

(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2012-518039

(P2012-518039A)

(43) 公表日 平成24年8月9日 (2012. 8. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 245 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-551178 (P2011-551178)	(71) 出願人	511200812
(86) (22) 出願日	平成22年2月17日 (2010. 2. 17)		ルードヴィッヒ インスティテュート フ
(85) 翻訳文提出日	平成23年10月14日 (2011. 10. 14)		ォー キャンサー リサーチ・リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/024407		スイス国、ツエー・ハー 8001・チュ
(87) 国際公開番号	W02010/096434		ーリツヒ、シユターデルホーフアーシュト
(87) 国際公開日	平成22年8月26日 (2010. 8. 26)		ラーセ・22
(31) 優先権主張番号	12/388, 504	(74) 代理人	110001173
(32) 優先日	平成21年2月18日 (2009. 2. 18)		特許業務法人川口国際特許事務所
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	オールド、ロイド・ジエイ
			アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・100
			24、ニュー・ヨーク、ウエスト・エンド
			・アベニュー・600、アパートメント・
			6・デイー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的結合タンパク質およびこれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、増幅された上皮成長因子受容体 (E G F R) におよび該 E G F R の d e 2 - 7 E G F R トランケーションに結合する特異的結合メンバー、特に抗体およびこれらの断片に関する。詳細には、前記特異的結合メンバー、特に抗体およびこれらの断片によって認識されるエピトープは、異常な翻訳後修飾に基づいて強化されるまたははっきりわかる。これらの特異的結合メンバーは、癌の診断および治療に有用である。本発明の結合メンバーは、治療の際に化学療法薬もしくは抗癌剤とおよび / または他の抗体もしくはこれらの断片と併用することもできる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

E G F R 遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、E G F R 遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンの E G F R 受容体 d e 2 - 7 を発現する腫瘍における E G F R に結合することができる単離された抗体であって、配列番号：13 のアミノ酸配列から成る d e 2 - 7 接合点ペプチドに結合しないものであり；ヒト野生型 E G F R の残基 287 - 302 の配列（配列番号：14）内のエピトープに結合するものであり；ならびに配列番号：2 に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列を含まず、および配列番号：4 に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列を含まないものである抗体。

10

【請求項 2】

重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が配列番号：42 に示すアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が配列番号：47 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 3】

重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が配列番号：129 に示すアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が配列番号：134 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 4】

重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が配列番号：22 に示すアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が配列番号：27 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離された抗体。

20

【請求項 5】

重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が配列番号：32 に示すアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が配列番号：37 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 6】

重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：44、45 および 46 に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 7】

重鎖および軽鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、配列番号：49、50 および 51 に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体。

30

【請求項 8】

重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：130、131 および 132 に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 9】

重鎖および軽鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、配列番号：135、136 および 137 に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 10】

重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：23、24 および 25 に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体。

40

【請求項 11】

重鎖および軽鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、配列番号：28、29 および 30 に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 12】

重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：33、34 および 35 に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含む、

50

請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 1 3】

重鎖および軽鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、配列番号：38、39および40に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 1 4】

抗体 F (a b ') 2、s c F v 断片、ダイアボディー、トリアボディーまたはテトラボディーの形態である、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 1 5】

検出可能または機能性標識をさらに含む、請求項 1 に記載の単離された抗体。

10

【請求項 1 6】

前記検出可能または機能性標識が、共有結合で付けられる薬物である、請求項 1 5 に記載の単離された抗体。

【請求項 1 7】

前記標識が、放射標識である、請求項 1 5 に記載の単離された抗体。

【請求項 1 8】

P E G 化されている、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 1 9】

請求項 1 に記載の単離された抗体をコードする配列を含む単離された核酸。

【請求項 2 0】

請求項 1 に記載の単離された抗体を調製する方法であって、該抗体の発現を引き起こす条件下で核酸を発現させること、および該抗体を回収することを含むものである方法。

20

【請求項 2 1】

ヒト患者における腫瘍の治療方法であって、請求項 1 に記載の単離された抗体の有効量を該患者に投与することを含むものである方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 の単離された抗体を含む、E G F R が異常発現されるまたは E G F R がトランケートされたタンパク質形態で発現される腫瘍の診断のためのキット。

【請求項 2 3】

試薬および / または使用のための説示をさらに含む、請求項 2 2 に記載の、E G F R が異常発現されるまたは E G F R がトランケートされたタンパク質形態で発現される主要の診断のためのキット。

30

【請求項 2 4】

請求項 1 に記載の単離された抗体を含む医薬組成物。

【請求項 2 5】

医薬的に許容されるビヒクル、担体または希釈剤をさらに含む、請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

化学療法薬、抗 E G F R 抗体、放射免疫療法薬およびこれらの組み合わせから成る群より選択される抗癌剤をさらに含む、請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 2 7】

前記化学療法薬が、チロシンキナーゼ阻害剤、リン酸化カスケード阻害剤、翻訳後調節物質、細胞成長または分裂阻害剤（例えば、抗有糸分裂剤）、シグナル伝達阻害剤およびこれらの組み合わせから成る群より選択される、請求項 2 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が、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成る群より選択される、請求項 2 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 9】

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

50

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成る群より選択される、請求項 2 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 0】

請求項 2 4 に記載の医薬組成物の治療有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における癌を予防および / または治療する方法。

【請求項 3 1】

請求項 2 4 に記載の医薬組成物の治療有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物において異常発現 E G F R を生産する脳内在性の癌の治療のための方法。

【請求項 3 2】

請求項 3 0 に記載の哺乳動物における異常発現 E G F R を生産する脳内在性の癌を治療するための方法であって、該脳内在性の癌が、膠芽腫、髄芽腫、髄膜腫、新生物性星状細胞種および新生物性動静脈奇形から成る群より選択されるものである方法。

10

【請求項 3 3】

請求項 1 の単離された抗体をコードする組換え D N A 分子で形質転換された単細胞宿主。

【請求項 3 4】

E . コリ (E . c o l i)、シュードモナス (P s e u d o m o n a s)、バチルス (B a c i l l u s)、ストレプトマイセス (S t r e p t o m y c e s)、酵母、C H O、Y B / 2 0、N S O、S P 2 / 0、R 1 . 1、B - W、L - M、C O S 1、C O S 7、B S C 1、B S C 4 0 および B M T 1 0 細胞、植物細胞、昆虫細胞ならびにヒト細胞 (組織培養でのもの) から成る群より選択される、請求項 1 の単離された抗体をコードする組換え D N A 分子で形質転換された単細胞宿主。

20

【請求項 3 5】

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を有する E G F R の存在を検出するための方法であって、前記 E G F R が、(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を有する E G F R の存在が疑われる哺乳動物からの生体サンプルと請求項 1 の単離された抗体とを、該 E G F R の該単離された抗体への結合を可能ならしめる条件下で接触させること ; および (b) 前記サンプルからの前記 E G F R と前記単離された抗体との間で結合が発生したかどうかを検出することによって測定され、結合の検出が、前記サンプル中の前記 E G F R の存在または活性を示すものである方法。

30

【請求項 3 6】

哺乳動物における癌を検出するための方法であって、請求項 3 5 の方法に従って E G F R の存在または検出することを含み、E G F R の存在の検出が、該哺乳動物における腫瘍または癌の存在を示すものである方法。

【請求項 3 7】

E G F R 遺伝子の増幅を有する腫瘍 (該腫瘍の細胞は、E G F R 遺伝子の多数のコピーを含有する。) におけるおよびトランケートされたバージョンの E G F R 受容体 d e 2 - 7 を発現する腫瘍における E G F R に結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、前記重鎖が配列番号 : 4 2 に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有する、および前記軽鎖が配列番号 : 4 7 に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有するものである抗体。

40

【請求項 3 8】

請求項 3 7 に記載の単離された抗体であって、前記抗体の前記重鎖が、配列番号 : 4 2 に示すアミノ酸配列を含み、および前記抗体の前記軽鎖が配列番号 : 4 7 に示すアミノ酸配列を含む、抗体。

【請求項 3 9】

E G F R 遺伝子の増幅を有する腫瘍 (該腫瘍の細胞は、E G F R 遺伝子の多数のコピーを含有する。) におけるおよびトランケートされたバージョンの E G F R 受容体 d e 2 - 7 を発現する腫瘍における E G F R に結合することができる単離された抗体であって、重

50

鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：44、45および46に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含み、ならびに該軽鎖の可変領域が、配列番号：49、50および51に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメインを含むものである抗体。

【請求項40】

EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が配列番号：129に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が、配列番号：134に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有するものである抗体。

10

【請求項41】

請求項40に記載の単離された抗体であって、前記抗体の前記重鎖が、配列番号：129に示すアミノ酸配列を含み、および前記抗体の前記軽鎖が、配列番号：134に示すアミノ酸配列を含む、抗体。

【請求項42】

EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：130、131および132に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含み、ならびに該軽鎖の可変領域が、配列番号：135、136および138に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメインを含むものである抗体。

20

【請求項43】

EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が、配列番号：22に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が、配列番号：27に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有するものである抗体。

30

【請求項44】

請求項43に記載の単離された抗体であって、前記抗体の前記重鎖が、配列番号：22に示すアミノ酸配列を含み、および前記抗体の前記軽鎖が、配列番号：27に示すアミノ酸配列を含む、抗体。

【請求項45】

EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：23、24および25に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含み、ならびに該軽鎖の可変領域が、配列番号：28、29および30に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメインを含むものである抗体。

40

【請求項46】

EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が、配列番号：32に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が、配列番号：37に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有するものである抗体。

50

【請求項 47】

請求項 46 に記載の単離された抗体であって、前記抗体の前記重鎖が、配列番号：32 に示すアミノ酸配列を含み、および前記抗体の前記軽鎖が、配列番号：37 に示すアミノ酸配列を含む、抗体。

【請求項 48】

E G F R 遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、E G F R 遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンの E G F R 受容体 d e 2 - 7 を発現する腫瘍における E G F R に結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：33、34 および 35 に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含み、なら

10

【請求項 49】

E G F R 遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、E G F R 遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンの E G F R 受容体 d e 2 - 7 を発現する腫瘍における E G F R に結合することができる単離された抗体であって、

配列番号：13 のアミノ酸配列から成る d e 2 - 7 接合点ペプチドに結合しないものであり；

ヒト野生型 E G F R の残基 287 - 302 の配列（配列番号：14）内のエピトープに結合するものであり；

20

軽鎖および重鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、

式 I に示すアミノ酸配列：

H S S Q D I X_{a a 1} S N I G (I)

（式中、X_{a a 1} は、非荷電極性 R 基を有するアミノ酸残基である。）

に対応するアミノ酸配列を有する第一のポリペプチド結合ドメイン領域、

式 I I に示すアミノ酸配列：

H G T N L X_{a a 2} D (I I)

（式中、X_{a a 2} は、荷電極性 R 基を有するアミノ酸残基である。）

に対応するアミノ酸配列を有する第二のポリペプチド結合ドメイン領域、および

式 I I I に示すアミノ酸配列：

V Q Y X_{a a 3} Q F P W T (I I I)

（式中、X_{a a 3} は、A、G、および A または G が保存的に置換されているアミノ酸残基から成る群より選択される。）

30

に対応するアミノ酸配列を有する第三のポリペプチド結合ドメイン領域を含み、ならびに該重鎖の可変領域が、

式 V I に示すアミノ酸配列：

S D X_{a a 4} A W N (I V)

（式中、X_{a a 4} は、F、Y、および F または Y が保存的に置換されているアミノ酸残基から成る群より選択される。）

に対応するアミノ酸配列を有する第一のポリペプチド結合ドメイン領域、

40

式 V、式 V I または式 V I I に示すアミノ酸配列：

Y I S Y S G N T R Y X_{a a 5} P S L K S (V)

（式中、X_{a a 5} は、非荷電極性 R 基を有するアミノ酸残基である。）

Y I S Y S X_{a a 6} N T R Y N P S L K S (V I)

（式中、X_{a a 6} は、G、A、および G または A が保存的に置換されているアミノ酸残基から成る群より選択される。）

Y I S Y S G N T R Y N P S L X_{a a 7} S (V I I)

（式中、X_{a a 7} は、塩基性アミノ酸残基である。）

に対応するアミノ酸配列を有する第二のポリペプチド結合領域、および

式 V I I I に示すアミノ酸配列：

50

X_{a a 8} T A G R G F P Y

(V I I I)

(式中、X_{a a 8} は、V、A、および V または A が保存的に置換されているアミノ酸残基から成る群より選択される。)

に対応するアミノ酸配列を有する第三のポリペプチド結合ドメイン領域を含むものであり；

ならびに配列番号：2 に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列を含まず、および配列番号：4 に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列を含まないものである抗体。

【請求項 5 0】

X_{a a 1} が、N であり；X_{a a 2} が、D であり；X_{a a 3} が、A であり；X_{a a 4} が、F であり；X_{a a 5} が、非荷電極性 R 基を有するアミノ酸残基であり；X_{a a 6} が、G であり；X_{a a 7} が、K であり；および X_{a a 8} が、V である、請求項 4 9 に記載の単離された抗体。

10

【請求項 5 1】

X_{a a 5} が、N または Q である、請求項 5 0 に記載の単離された抗体。

【請求項 5 2】

X_{a a 1} が、N または S である、請求項 4 9 に記載の抗体。

【請求項 5 3】

X_{a a 2} が、D または E である、請求項 4 9 に記載の抗体。

【請求項 5 4】

X_{a a 3} が、A または G である、請求項 4 9 に記載の抗体。

20

【請求項 5 5】

X_{a a 4} が、F または Y である、請求項 4 9 に記載の抗体。

【請求項 5 6】

X_{a a 5} が、N または Q である、請求項 4 9 に記載の抗体。

【請求項 5 7】

X_{a a 6} が、G または A であり、および X_{a a 7} が、独立して K または R である、請求項 4 9 に記載の抗体。

【請求項 5 8】

X_{a a 8} が、V または A である、請求項 4 9 に記載の抗体。

【請求項 5 9】

抗体 F (a b ')₂、s c F v 断片、ダイアボディー、トリアボディーまたはテトラボディーの形態である、請求項 4 9 に記載の単離された抗体。

30

【請求項 6 0】

検出可能または機能性標識をさらに含む、請求項 4 9 に記載の単離された抗体。

【請求項 6 1】

前記検出可能または機能性標識が、共有結合で付けられる薬物である、請求項 6 0 に記載の単離された抗体。

【請求項 6 2】

前記標識が、放射標識である、請求項 6 0 に記載の単離された抗体。

【請求項 6 3】

P E G 化されている、請求項 4 9 に記載の単離された抗体。

40

【請求項 6 4】

請求項 4 9 の単離された抗体をコードする配列を含む単離された核酸。

【請求項 6 5】

請求項 4 9 に記載の単離された抗体を調製する方法であって、該抗体の発現を引き起こす条件下で核酸を発現させること、および該抗体を回収することを含むものである方法。

【請求項 6 6】

ヒト患者における腫瘍の治療方法であって、請求項 4 9 に記載の単離された抗体の有効量を該患者に投与することを含むものである方法。

【請求項 6 7】

50

請求項 49 の単離された抗体を含む、EGFR が異常発現されるまたは EGFR がトランケートされたタンパク質形態で発現される腫瘍の診断のためのキット。

【請求項 68】

試薬および / または使用のための説明書をさらに含む、請求項 67 に記載の、EGFR が異常発現されるまたは EGFR がトランケートされたタンパク質形態で発現される腫瘍の診断のためのキット。

【請求項 69】

請求項 49 に記載の単離された抗体を含む医薬組成物。

【請求項 70】

医薬的に許容されるビヒクル、担体または希釈剤をさらに含む、請求項 69 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 71】

化学療法薬、抗 EGFR 抗体、放射免疫療法薬およびこれらの組み合わせから成る群より選択される抗癌剤をさらに含む、請求項 69 に記載の医薬組成物。

【請求項 72】

前記化学療法薬が、チロシンキナーゼ阻害剤、リン酸化カスケード阻害剤、翻訳後調節物質、細胞成長または分裂阻害剤（例えば、抗有糸分裂剤）、シグナル伝達阻害剤およびこれらの組み合わせから成る群より選択される、請求項 71 に記載の医薬組成物。

【請求項 73】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が、AG1478、ZD1839、STI571、OSI-774、SU-6668 およびこれらの組み合わせから成る群より選択される、請求項 72 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 74】

前記抗 EGFR 抗体が、抗 EGFR 抗体 528、225、SC-03、DR8.3、L8A4、Y10、ICR62、ABX-EGF およびこれらの組み合わせから成る群より選択される、請求項 71 に記載の医薬組成物。

【請求項 75】

請求項 69 に記載の医薬組成物の治療有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における癌を予防および / または治療する方法。

【請求項 76】

請求項 69 に記載の医薬組成物の治療有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物における異常発現 EGFR を生産する脳内在性の癌の治療のための方法。

30

【請求項 77】

請求項 76 に記載の哺乳動物における異常発現 EGFR を生産する脳内在性の癌を治療するための方法であって、該脳内在性の癌が、膠芽腫、髄芽腫、髄膜腫、新生物性星状細胞種および新生物性動静脈奇形から成る群より選択されるものである方法。

【請求項 78】

請求項 49 の単離された抗体をコードする組換え DNA 分子で形質転換された単細胞宿主。

【請求項 79】

E. コリ (E. coli)、シュドモナス (Pseudomonas)、バチルス (Bacillus)、ストレプトマイセス (Streptomyces)、酵母、CHO、YB/20、NSO、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS7、BSC1、BSC40 および BMT10 細胞、植物細胞、昆虫細胞ならびにヒト細胞（組織培養でのもの）から成る群より選択される、請求項 49 の単離された抗体をコードする組換え DNA 分子で形質転換された単細胞宿主。

40

【請求項 80】

増幅された EGFR、de2-7EGFR、または高マンノースグリコシル化を有する EGFR の存在を検出するための方法であって、前記 EGFR が、(a) 増幅された EGFR、de2-7EGFR、または高マンノースグリコシル化を有する EGFR の存在が

50

疑われる哺乳動物からの生体サンプルと請求項 49 に記載の単離された抗体とを、該 E G F R の該単離された抗体への結合を可能ならしめる条件下で接触させること；および (b) 前記サンプルからの前記 E G F R と前記単離された抗体との間で結合が発生したかどうかを検出することによって測定され、結合の検出が、前記サンプル中の前記 E G F R の存在または活性を示すものである方法。

【請求項 81】

哺乳動物における癌を検出するための方法であって、請求項 80 の方法に従って E G F R の存在または検出することを含み、E G F R の存在または検出が、該哺乳動物における腫瘍または癌の存在を示すものである方法。

【請求項 82】

E G F R 遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、E G F R 遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンの E G F R 受容体 d e 2 - 7 を発現する腫瘍における E G F R に結合することができる単離された抗体であって、配列番号：13 のアミノ酸配列から成る d e 2 - 7 接合点ペプチドに結合しないものであり；ヒト野生型 E G F R の残基 273 - 501 の配列内のエピトープに結合するものであり；軽鎖および重鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、アミノ酸配列 H S S Q D I N S N I G （配列番号：18）を有する第一のポリペプチド結合ドメイン領域、アミノ酸配列 H G T N L D D （配列番号：19）を有する第二のポリペプチド結合ドメイン領域、およびアミノ酸配列 V Q Y A Q F P W T （配列番号：20）を有する第三のポリペプチド結合ドメイン領域を含み、および該重鎖の可変領域が、アミノ酸配列 S D F A W N （配列番号：15）を有する第一のポリペプチド結合ドメイン領域、式 I X に示すアミノ酸配列：

Y I S Y S G N T R Y X _{a a g} P S L K S （I X）

（式中、X _{a a g} は、非荷電極性 R 基を有するアミノ酸残基である。）、

に対応するアミノ酸配列を有する第二のポリペプチド結合領域、およびアミノ酸配列 V T A G R G F P Y （配列番号：17）を有する第三のポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体。

【請求項 83】

ヒト野生型 E G F R の残基 287 - 302 の配列（配列番号：14）内のエピトープに結合する、請求項 82 に記載の単離された抗体。

【請求項 84】

X _{a a g} が、N または Q である、請求項 82 に記載の単離された抗体。

【請求項 85】

前記結合ドメイン領域が、ヒト抗体フレームワークによって保持される、請求項 82 に記載の単離された抗体。

【請求項 86】

前記ヒト抗体フレームワークが、ヒト I g G 1 抗体フレームワークである、請求項 85 に記載の単離された抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願データ

本国際 P C T 特許出願は、2009 年 2 月 18 日に提出された米国特許出願番号 12 / 388, 504 の優先権を主張するものであり、該米国特許出願の開示は、この全体が参照により本明細書に組み込まれる。本国際 P C T 出願は、2002 年 5 月 13 日に提出された米国特許出願番号 10 / 145, 598 （2009 年 9 月 15 日に公開された米国特許番号 7, 589, 180）；2001 年 5 月 11 日に提出された米国仮特許出願番号 60 / 290, 410；2001 年 9 月 28 日に提出された米国仮特許出願番号 60 / 326, 019；2001 年 12 月 21 日に提出された米国仮特許出願番号 60 / 342, 258；2002 年 5 月 13 日に提出された国際 P C T 特許出願番号 P C T / U S 02 / 15185 （2002 年 11 月 21 日に W O 02 / 092771 として公開された）；2

10

20

30

40

50

008年8月14日に出願された国際PCT特許出願番号PCT/US2008/009771(2009年2月19日にWO 2009/023265として公開された);および2007年8月14日に出願された米国仮特許出願番号60/964,715のそれぞれの開示もまたこの全体を参照により組み込む。

【0002】

発明の分野

本発明は、増幅された上皮成長因子受容体(EGFR)に結合する特異的結合メンバー、特に抗体およびこれらの断片に関し、ならびに細胞外ドメインから267個のアミノ酸を欠如しているトランケートされたEGFR受容体(de2-7EGFR)を生じさせる結果となるEGFRのエキソン2から7のインフレーム欠失に関する。詳細には、前記特異的結合メンバー、特に抗体およびこれらの断片によって認識されるエピトープは、異常な翻訳後修飾に基づいて強化されるまたははっきりわかる。これらの特異的結合メンバーは、癌の診断および治療に有用である。本発明の結合メンバーは、治療の際に化学療法薬もしくは抗癌剤とおよび/または他の抗体もしくはこれらの断片と併用することもできる。

10

【背景技術】

【0003】

関連技術の背景

化学療法手段による増殖性疾患、特に癌、の治療は、人体および動物体内のターゲット増殖性細胞と他の正常細胞の相違の利用に依存することが多い。例えば、多くの化学薬品は、急速に複製するDNAにより取り込まれてDNA複製方法および細胞分裂方法を中断させるように設計される。もう1つのアプローチは、発達したヒト組織において通常は発現されない腫瘍細胞または他の異常細胞の表面の抗原、例えば腫瘍抗原または胚抗原を同定することである。このような抗原を、この抗原を遮断または中和できる抗体などの結合タンパク質でターゲティングすることができる。加えて、抗体およびこれらの断片をはじめとする結合タンパク質は、毒剤、または腫瘍部位でこの毒剤を直接または間接的に活性化することができる他の物質を送達することができる。

20

【0004】

EGFRは、多くのタイプの上皮性腫瘍において過発現されるので、腫瘍をターゲットにした抗体療法の魅力的なターゲットである(Voldborg et al. (1997). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Ann Oncol. 8, 1197-206; den Eynde, B. and Scott, A. M. Tumor Antigens. In: P. J. Delves and I. M. Roitt (eds.), Encyclopedia of Immunology, Second Edition, pp. 2424-31. London: Academic Press (1998)). さらに、EGFRの発現は、胃、結腸、膀胱、乳房、前立腺、子宮内膜、腎臓および脳(例えば、神経膠腫)をはじめとする多数の腫瘍タイプにおいて不良な予後に関係づけられている。その結果として、多数のEGFR抗体が文献に報告されており、幾つかは臨床評価を受けている(Baselga et al. (2000) Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin. J. Clin. Oncol. 18, 904; Faillot et al. (1996): A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. Neurosurgery. 39, 478-83; Seymour, L. (1999) Novel anti-cancer agents in development: exciting

30

40

50

prospects and new challenges. Cancer Treat. Rev. 25, 301 - 12)).

【0005】

頭頸部癌、扁平上皮細胞肺癌、脳神経膠腫および悪性星状細胞腫を有する患者においてEGFR mAbを使用する研究からの結果は、期待の持てるものであった。大部分のEGFR抗体の抗腫瘍活性は、リガンド結合を遮断するこれらの能力によって強化される (Sturgis et al. (1994) 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; Goldstein et al. (1995) Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. Clin. Cancer Res. 1, 1311 - 8)。このような抗体は、細胞増殖機能および抗体依存性免疫機能 (例えば、補体活性化) 両方の調節によりこれらの効力を媒介することができる。しかし、これらの抗体の使用は、肝臓および皮膚などの高い内因性EGFRレベルを有する器官での取り込みにより制限されることがある (Baselga et al., 2000; Faillot et al., 1996)。

【0006】

EGFR遺伝子の増幅 (即ち、EGFR遺伝子の多数のコピー) を有する腫瘍の有意な割合が、de2-7EGFR、ΔEGFR、またはΔ2-7 (本明細書ではこれらの用語を交換可能に用いている。) として公知の該受容体のトランケートされたバージョン (Wikstrand et al. (1998) The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFR): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. J. Neurovirol. 4, 148 - 158) も共発現する (Olapade-Olaopa et al. (2000) Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br. J. Cancer. 82, 186 - 94)。de2-7EGFRにおいて見られる再配列は、エキソン2-7にわたる801のヌクレオチドを欠くインフレーム成熟mRNAを生じさせる結果となる (Wong et al. (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 2965 - 9; Yamazaki et al. (1990) 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; Yamazaki et al. (1988) Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. Mol. Cell Biol. 8, 1816 - 20; Sugawa et al. (1990) 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)。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のアミノ酸の欠失および融合接合点の新規グリシン残基を有する(Sugawa et al., 1990)。グリシン残基の挿入と共に、この欠失が、この欠失界面に特有の接合点ペプチドを生じさせる(Sugawa et al., 1990)。

【0007】

de2 - 7 EGFRは、神経膠腫、乳房、肺、卵巣および前立腺をはじめとする多数の腫瘍タイプにおいて報告されている(Wikstrand et al. (1997) Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. Cancer Res. 57, 4130 - 40; Olapade-Olaopa et al. (2000) Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br. J. Cancer. 82, 186 - 94; Wikstrand, et al. (1995) Monoclonal antibodies against EGFRvIII in are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. Cancer Res. 55, 3140 - 8; Garcia de Palazzo et al. (1993) Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. Cancer Res. 53, 3217 - 20)。このランケートされた受容体はリガンドに結合しないが、低い構成的活性を有し、ならびにヌードマウスにおいて腫瘍異種移植片として成長した神経膠腫細胞に有意な成長利点をもたらす(Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 7727 - 31)、ならびにNIH3T3細胞(Batra et al. (1995) Epidermal growth factor ligand independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. Cell Growth Differ. 6, 1251 - 9)およびMCF - 7細胞を形質転換することもできる。神経膠腫細胞においてde2 - 7 EGFRにより用いられる細胞メカニズムは、完全には明らかにされていないが、アポトーシスの減少(Nagane et al. (1996) 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)および増殖の小規模な増進(Nagane et al., 1996)を含むことが報告されている。

【0008】

このランケートされた受容体の発現は、腫瘍細胞に限定されるので、これは、抗体療法の高特異的ターゲットになる。従って、多数の研究室が、de2 - 7 EGFRのこの特有のペプチドに対して特異的なポリクローナル(Humphrey et al. (1990) Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. Proc. Natl. Acad. Sc

i . U . S . A . 87 , 4207 - 11) とモノクローナル (Wikstrand et al . (1995) Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas ; Okamoto et al . (1996) Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor . Br . J . Cancer . 73 , 1366 - 72 ; Hills et al . (1995) Specific targeting of a mutant , activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody . Int . J . Cancer . 63 , 537 - 43) 抗体両方の産生を報告している。この特有の de2 - 7 ペプチドでの免疫後に単離された一連のマウス mAb は、すべて、前記トランケートされた受容体に対して選択性および特異性を示し、ならびにヌードマウスにおいて成長した de2 - 7 EGFR 陽性異種移植片をターゲットにした (Wikstrand et al . (1995) ; Reist et al . (1997) 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 ; Reist et al . (1995) 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) 。

【0009】

しかし、de2 - 7 EGFR 抗体の1つの潜在的欠点は、EGFR 遺伝子の増幅を示す腫瘍の一部のみが、de2 - 7 EGFR も発現する点である (Ekstrand et al . (1992) 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) 。 de2 - 7 EGFR を含有する腫瘍の正確な百分率は、異なる技術 (即ち、PCR 対免疫組織化学) および様々な抗体の使用がこの存在の頻度についての広範な報告値を生じさせたため、完全には確立されていない。公表されているデータは、神経膠腫のおおよそ25 - 30 % が de2 - 7 EGFR を発現し、この発現が退形成性星状細胞腫において最も低くおよび多形性膠芽腫において最も高いことを示している (Wong et al . (1992) ; Wikstrand et al . (1998) The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFR) : characterization and utilization as an immunotherapeutic target . J . Neurovirol . 4 , 148 - 58 ; Moscatello et al . (1995) Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors . Cancer Res . 55 , 5536 - 9) 。 de2 - 7 EGFR 発現性神経膠腫の中での陽性細胞の割合は、37 - 86 % にわたると報告されている (Wikstrand et al . (

1997))。乳癌腫の27%および肺癌の17%は、de2-7 EGFRについて陽性であることが判明した(Wikstrand et al.(1997); Wikstrand et al.(1995); Wikstrand et al.(1998); Hills et al., 1995)。従って、de2-7 EGFR特異的抗体は、EGFR陽性腫瘍のある割合にのみ有用であると予想されるであろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Voldborg et al.(1997). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Ann Oncol. 8, 1197-206 10

【非特許文献2】den Eynde, B. and Scott, A.M. Tumor Antigens. In: P.J. Delves and I.M. Roitt (eds.), Encyclopedia of Immunology, Second Edition, pp. 2424-31. London: Academic Press (1998)

【非特許文献3】Baselga et al.(2000) Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin. J. Clin. Oncol. 18, 904 20

【非特許文献4】Faillot et al.(1996): A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. Neurosurgery. 39, 478-83

【非特許文献5】Seymour, L.(1999) Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges. Cancer Treat. Rev. 25, 301-12 30

【非特許文献6】Sturgis et al.(1994) 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

【非特許文献7】Goldstein et al.(1995) Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. Clin. Cancer Res. 1, 1311-8 40

【非特許文献8】Wikstrand et al.(1998) The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFR): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. J. Neurovirol. 4, 148-158

【非特許文献9】Olapade-Olaopa et al.(2000) Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br. J. Cancer. 82, 186-94 50

【非特許文献10】Wong et al. (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 2965 - 9

【非特許文献11】Yamazaki et al. (1990) 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

10

【非特許文献12】Yamazaki et al. (1988) Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. Mol. Cell Biol. 8, 1816 - 20

【非特許文献13】Sugawa et al. (1990) 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

20

【非特許文献14】Wikstrand et al. (1997) Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. Cancer Res. 57, 4130 - 40

【非特許文献15】Olapade-Olaopa et al. (2000) Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br. J. Cancer. 82, 186 - 94

【非特許文献16】Wikstrand, et al. (1995) Monoclonal antibodies against EGFRvIII in are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. Cancer Res. 55, 3140 - 8

30

【非特許文献17】Garcia de Palazzo et al. (1993) Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. Cancer Res. 53, 3217 - 20

【非特許文献18】Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 7727 - 31

40

【非特許文献19】Batra et al. (1995) Epidermal growth factor ligand independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. Cell Growth Differ. 6, 1251 - 9

【非特許文献20】Nagane et al. (1996) A common mutant epidermal growth factor receptor con

50

fers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. Cancer Res. 56, 5079 - 86

【非特許文献21】Humphrey et al. (1990) 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

10

【非特許文献22】Wikstrand et al. (1995) Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas

【非特許文献23】Okamoto et al. (1996) Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. Br. J. Cancer. 73, 1366 - 72

【非特許文献24】Hills et al. (1995) Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. Int. J. Cancer. 63, 537 - 43

20

【非特許文献25】Reist et al. (1997) 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

【非特許文献26】Reist et al. (1995) 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

30

【非特許文献27】Ekstrand et al. (1992) 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

40

【非特許文献28】Moscatello et al. (1995) Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. Cancer Res. 55, 5536 - 9

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

このように、EGFR抗体の活性の現存の証拠は期待のもてるものであるが、上記を反映する適用可能性および効力の範囲に対する制限が依然として認められる。従って、広範

50

な腫瘍に関して効力を明示する抗体および同様の薬剤の開発が望ましいであろうし、この目標を達成することに本発明は関する。

【 0 0 1 2 】

本明細書における参考文献の引用は、これらが本発明に対する先行技術であることの承認とみなしてはならない。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 3 】

発明の要旨

本発明は、野生型 E G F R からの一切のアミノ酸配列改変または置換を明示しない、ならびに腫瘍形成性、高増殖性または異常細胞において見つけれられるが正常または野生型細胞では一般に検出することができない、単離された特異的結合メンバー、特に抗体またはこれらの断片を提供する（本明細書において用いる場合の用語「野生型細胞」は、内因性 E G F R 発現するが d e 2 - 7 E G F R を発現しない細胞を考慮しており、およびこの用語は、特に E G F R 遺伝子を過発現する細胞を除外する；用語「野生型」は、異常または腫瘍形成性細胞にではなく正常細胞に存在する遺伝子型もしくは表現型または他の特性を指す。）。さらなる態様において、本発明は、腫瘍形成性、高増殖性または異常細胞において見つけれられるが正常または野生型細胞では一般に検出することができない E G F R エピトープであって、異常な翻訳後修飾または異常な発現に基づいて強化されるまたははっきりわかるものであるエピトープを認識する特異的結合メンバー、特に抗体またはこれらの断片を提供する。本明細書に提供する特定の非限定的例示において、翻訳後修飾が完全でないまたは野生型細胞における E G F R の正常な発現で見られるほどに十分でない E G F R エピトープは、強化されるまたははっきりわかる。1つの態様において、E G F R エピトープは、初期のもしくは単純な炭水化物修飾または早期グリコシル化、特に高マンノース修飾に基づいて強化されるまたははっきりわかり、および複雑な炭水化物修飾が存在する場合には低減されるまたははっきりわからない。

【 0 0 1 4 】

抗体であることがあり、またはこれらの断片、例えば、これらの免疫原性断片であることがある、特異的結合メンバーは、異常発現の不在下および正常 E G F R 翻訳後修飾の存在下では、正常または野生型 E G F R エピトープを含有する正常または野生型細胞に実質的に結合せず、該細胞を認識しない。

【 0 0 1 5 】

より詳細には、本発明の特異的結合メンバーは、E G F R を過発現する（例えば、E G F R 遺伝子が増幅される。）または d e 2 - 7 E G F R を、特に、異常な翻訳後修飾の存在下で、発現する細胞中に存在する E G F R エピトープであって正常条件下、特に、正常な翻訳後修飾の存在下で、E G F R を発現する細胞では一般に検出することができない E G F R エピトープを認識する、抗体またはこれらの断片である場合がある。

【 0 0 1 6 】

本発明者らは、異常に発現された E G F R を特異的に認識する、本明細書において m A b 8 0 6、c h 8 0 6、h u 8 0 6、m A b 1 7 5、m A b 1 2 4、および m A b 1 1 3 3 と呼ぶ抗体により例示する、新規モノクローナル抗体を開示した。詳細には、本発明の抗体は、腫瘍形成性、高増殖性または異常細胞において見つけれられるが正常または野生型細胞では一般に検出することができない E G F R エピトープであって異常な翻訳後修飾に基づいて強化されるまたははっきりわかるエピトープを認識する。本発明の新規抗体は、増幅された野生型 E G F R および d e 2 - 7 E G F R も認識するが、この d e 2 - 7 E G F R 突然変異の特有の接合点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、増幅された E G F R および（本明細書において d e 2 - 7 突然変異により例示される）突然変異体 E G F R をはじめとする、異常発現 E G F R を、特に異常翻訳後修飾に基づいて、特異的に認識する。加えて、これらの抗体は、正常な量の E G F R を発現する神経膠腫細胞系の細胞表面で発現されたときの E G F R を認識しないが、E L I S A プレーットの表面に固定された E G F R（s E G F R）の細胞外ドメインに結合する。このことは

、高次構造エピトープ (conformational epitope) の認識を示す。これらの抗体は、EGFR遺伝子の増幅を有するがde2-7 EGFRを発現しないA431細胞の表面に結合する。重要なこととして、これらの抗体は、殆どの他の正常組織におけるより高いレベルの内因性野生型 (wt) EGFRを発現するがEGFRを異常に発現または増幅しない、肝臓および皮膚などの正常組織には有意に結合しなかった。

【0017】

本発明の抗体は、EGFR増幅および/またはEGFR突然変異、特にde2-7 EGFRをはじめとする異常EGFR発現が存在する腫瘍または細胞を染色するまたは別様に認識することにより、EGFR腫瘍または腫瘍形成性細胞の性質を特異的に類別することができる。さらに、本発明の抗体は、増幅されたEGFRを含有する腫瘍に対しておよびde2-7 EGFR陽性異種移植片に対して有意なインビボ抗腫瘍活性を明示する。

10

【0018】

de2-7 EGFRおよび増幅されたEGFRに結合するが正常、野生型EGFRには結合しないこれらの抗体の特有の特異性は、以前から知られているEGFR抗体で見られることがある正常組織取り込みに関連した問題を伴わずに、多数の腫瘍タイプ、例えば、頭頸部、乳房または前立腺腫瘍および神経膠腫を同定する、特性づけするおよびターゲットにする診断および治療用途をもたらす。

【0019】

従って、本発明は、接合点ペプチドとは異なるエピトープにおいてde2-7 EGFRに結合するがEGFR遺伝子の増幅不在で正常細胞におけるEGFRに実質的に結合しない、抗体などの特異的結合タンパク質を提供する。増幅は、この細胞がEGFRの多数のコピーを含むことを含むものとする。

20

【0020】

好ましくは、本発明の抗体によって認識されるエピトープは、成熟正常または野生型EGFR配列の残基273-501を含む領域内に位置し、および好ましくは、成熟正常または野生型EGFR配列の残基287-302 (配列番号: 14) を含む。従って、EGFR配列の残基273-501および/または287-302 (配列番号: 14) を含む領域内に位置するエピトープでde2-7 EGFRに結合する、抗体などの特異的結合タンパク質も提供する。前記エピトープは、当業者に公知の任意の従来エピトープマッピング技術によって決定することができる。または、残基273-501および/もしくは287-302 (配列番号: 14) をコードするDNA配列を消化し、結果として生ずる断片を適する宿主において発現させることができるであろう。抗体結合は、上で述べたように決定することができるであろう。

30

【0021】

好ましい態様において、前記抗体は、本発明者らが同定し、特性づけした抗体の特性、特に、増幅されたEGFRおよびde2-7 EGFRにおいて見つけられるような異常発現EGFRを認識する特性を有するものである。

【0022】

もう1つの態様において、本発明は、本発明の抗体と競合できる抗体であって、本発明の抗体のVHおよびVL鎖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りde2-7 EGFRへの結合から遮断される条件下で本発明の抗体と競合できる抗体を提供する。特に、抗イディオタイプ抗体が考えられ、本明細書において例示する。抗イディオタイプ抗体LMH-11、LMH-12およびLMH-13を本明細書において提供する。

40

【0023】

抗体のこのターゲット抗原への結合は、この重および軽鎖の相補性決定領域 (CDR) により媒介され、CDR3の役割が特に重要である。従って、本発明の抗体の重または軽鎖、好ましくは両方、のCDR3領域に基づく特異的結合メンバーは、インビボ療法のための有用な特異的結合メンバーであるであろう。

【0024】

50

従って、同定された本発明の抗体のCDR、特にCDR3領域に基づく抗体などの特異的結合タンパク質は、これらのde2-7EGFRステータスに関係なく、増幅されたEGFRを有する腫瘍のターゲティングに有用であろう。本発明の抗体は、正常、野生型受容体に有意には結合しないので、正常細胞での有意な取り込み、現在開発されているEGFR抗体の制限がないであろう。

【0025】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、配列番号：13のアミノ酸配列から成るde2-7接合点ペプチドに結合しないものである；ヒト野生型EGFRの残基287-302の配列（配列番号：14）内のエピトープに結合するものである；ならびに配列番号：2に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列を含まず、および配列番号：4に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列を含まないものである抗体を提供する。

10

【0026】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が配列番号：42に示すアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が配列番号：47に示すアミノ酸配列を有するものである抗体を提供する。

【0027】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が配列番号：129に示すアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が配列番号：134に示すアミノ酸配列を有するものである抗体を提供する。

20

【0028】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が配列番号：22に示すアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が配列番号：27に示すアミノ酸配列を有するものである抗体を提供する。

【0029】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が配列番号：32に示すアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が配列番号：37に示すアミノ酸配列を有するものである抗体を提供する。

30

【0030】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：44、45および45に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

【0031】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、配列番号：49、50および51に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

【0032】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：130、131および132に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

40

【0033】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、配列番号：135、136および137に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

【0034】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：23、24および25に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

50

【 0 0 3 5 】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、配列番号：28、29および30に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

【 0 0 3 6 】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：33、34および35に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

【 0 0 3 7 】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、配列番号：38、39および40に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

10

【 0 0 3 8 】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、抗体F(a b')₂、s c F v断片、ダイアボディー、トリアボディーまたはテトラボディーの形態である抗体を提供する。

【 0 0 3 9 】

もう1つの態様において、検出可能または機能性標識をさらに含む単離された抗体を提供する。

【 0 0 4 0 】

もう1つの態様において、前記検出可能または機能性標識は、共有結合で付けられる薬物である。

20

【 0 0 4 1 】

もう1つの態様において、前記標識は、放射標識である。

【 0 0 4 2 】

もう1つの態様において、単離された抗体であって、PEG化されている抗体を提供する。

【 0 0 4 3 】

もう1つの態様において、本明細書中で詳述する単離された抗体をコードする配列を含む単離された核酸を提供する。

30

【 0 0 4 4 】

もう1つの態様において、単離された抗体を調製する方法を提供し、この方法は、該抗体の発現を引き起こす条件下で、上で詳述したおよび本明細書中で詳述するとおりの核酸を発現させること、および該抗体を回収することを含む。

【 0 0 4 5 】

もう1つの態様において、ヒト患者における腫瘍の治療方法を提供し、この方法は、本明細書中で詳述する単離された抗体の有効量を該患者に投与することを含む。

【 0 0 4 6 】

もう1つの態様において、本明細書中で詳述する単離された抗体を含む、EGFRが異常発現されるまたはEGFRがトランケートされたタンパク質形態で発現される腫瘍の診断のためのキットを提供する。

40

【 0 0 4 7 】

もう1つの態様において、前記キットは、試薬および/または使用のための説示をさらに含む。

【 0 0 4 8 】

もう1つの態様において、本明細書中で詳述するとおりの単離された抗体を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 4 9 】

もう1つの態様において、前記医薬組成物は、医薬的に許容されるビヒクル、担体または希釈剤をさらに含む。

50

【 0 0 5 0 】

もう1つの態様において、前記医薬組成物は、化学療法薬、抗EGFR抗体、放射免疫療法薬およびこれらの組み合わせから成る群より選択される抗癌剤をさらに含む。

【 0 0 5 1 】

もう1つの態様において、前記化学療法薬は、チロシンキナーゼ阻害剤、リン酸化カスケード阻害剤、翻訳後調節物質、細胞成長または分裂阻害剤（例えば、抗有糸分裂剤）、シグナル伝達阻害剤およびこれらの組み合わせから成る群より選択される。

【 0 0 5 2 】

もう1つの態様において、前記チロシンキナーゼ阻害剤は、AG1478、ZD1839、STI571、OSI-774、SU-6668およびこれらの組み合わせから成る群より選択される。

10

【 0 0 5 3 】

もう1つの態様において、前記抗EGFR抗体は、抗EGFR抗体528、225、SC-03、DR8.3、L8A4、Y10、ICR62、ABX-EGFおよびこれらの組み合わせから成る群より選択される。

【 0 0 5 4 】

もう1つの態様において、哺乳動物における癌を予防および/または治療する方法を提供し、この方法は、本明細書中で詳述するとおりの医薬組成物の治療有効量を哺乳動物に投与することを含む。

【 0 0 5 5 】

もう1つの態様では、哺乳動物において異常発現EGFRを生産する脳内在性の癌を治療するための方法を提供し、この方法は、本明細書中で詳述するとおりの医薬組成物の治療有効量を哺乳動物に投与することを含む。

20

【 0 0 5 6 】

もう1つの態様において、前記脳内在性の癌は、膠芽腫、髄芽腫、髄膜腫、新生物性星状細胞腫および新生物性動静脈奇形から成る群より選択される。

【 0 0 5 7 】

もう1つの態様において、本明細書中で詳述する単離された抗体をコードする組換えDNA分子で形質転換された単細胞宿主を提供する。

【 0 0 5 8 】

もう1つの態様において、前記単細胞宿主は、E.コリ(E. coli)、シュードモナス(Pseudomonas)、バチルス(Bacillus)、ストレプトマイセス(Streptomyces)、酵母、CHO、YB/20、NSO、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS 1、COS 7、BSC1、BSC40およびBMT10細胞、植物細胞、昆虫細胞ならびにヒト細胞（組織培養でのもの）から成る群より選択される。

30

【 0 0 5 9 】

もう1つの態様において、増幅されたEGFR、de2-7EGFR、または高マンノースグリコシル化を有するEGFRの存在を検出するための方法を提供し、この方法では、(a)増幅されたEGFR、de2-7EGFR、または高マンノースグリコシル化を有するEGFRの存在が疑われる哺乳動物からの生体サンプルと請求項1に記載の単離された抗体とを、該EGFRの該単離された抗体への結合を可能ならしめる条件下で接触させること；および(b)前記サンプルからの前記EGFRと前記単離された抗体との間で結合が発生したかどうかを検出することによってEGFRを測定し、結合の検出が、前記サンプル中の前記EGFRの存在または活性を示す。

40

【 0 0 6 0 】

増幅されたEGFR、de2-7EGFR、または高マンノースグリコシル化を有するEGFRの存在を検出する方法のもう1つの態様において、前記EGFRの存在の検出は、該哺乳動物における腫瘍または癌の存在を示す。

【 0 0 6 1 】

50

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、前記重鎖が配列番号：42に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有する、および前記軽鎖が配列番号：47に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有するものである抗体を提供する。

【0062】

もう1つの態様において、前記抗体の重鎖は、配列番号：42に示すアミノ酸配列を含み、およびこの場合、前記抗体の軽鎖は、配列番号：47に示すアミノ酸配列を含む。

10

【0063】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：44、45および46に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含み、ならびに該軽鎖の可変領域が、配列番号：49、50および51に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

【0064】

20

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が配列番号：129に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が、配列番号：134に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有するものである抗体を提供する。

【0065】

もう1つの態様において、前記抗体の重鎖は、配列番号：129に示すアミノ酸配列を含み、およびこの場合、前記抗体の軽鎖は、配列番号：134に示すアミノ酸配列を含む。

30

【0066】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：130、131および132に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含み、ならびに該軽鎖の可変領域が、配列番号：135、136および137に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

40

【0067】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が、配列番号：22に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が、配列番号：27に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有するものである抗体を提供する。

【0068】

もう1つの態様において、前記抗体の重鎖は、配列番号：22に示すアミノ酸配列を含

50

み、およびこの場合、前記抗体の軽鎖は、配列番号：27に示すアミノ酸配列を含む。

【0069】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：23、24および25に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含み、ならびに該軽鎖の可変領域が、配列番号：28、29および30に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

10

【0070】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が、配列番号：32に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が、配列番号：37に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有するものである抗体を提供する。

【0071】

もう1つの態様において、前記抗体の重鎖は、配列番号：32に示すアミノ酸配列を含み、およびこの場合、前記抗体の軽鎖は、配列番号：37に示すアミノ酸配列を含む。

20

【0072】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：33、34および35に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含み、ならびに該軽鎖の可変領域が、配列番号：38、39および40に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

30

【0073】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、

配列番号：13のアミノ酸配列から成るde2-7EGFR接合点ペプチドに結合しないものである；

ヒト野生型EGFRの残基287-302の配列内のエピトープに結合するものである；

軽鎖および重鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、

40

式Iに示すアミノ酸配列：

HSSQDI Xaa₁SNIG (I)

（式中、Xaa₁は、非荷電極性R基を有するアミノ酸残基である。）（配列番号：151）

に対応するアミノ酸配列を有する第一のポリペプチド結合ドメイン領域と、

式IIに示すアミノ酸配列：

HGTNL Xaa₂D (II)

（式中、Xaa₂は、荷電極性R基を有するアミノ酸残基である。）（配列番号：152）

に対応するアミノ酸配列を有する第二のポリペプチド結合ドメイン領域と、

50

式 I I I に示すアミノ酸配列：

V Q Y X a a ₃ Q F P W T (I I I)

(式中、X a a ₃ は、A、G、および A または G が保存的に置換されているアミノ酸残基から成る群より選択される。) (配列番号： 1 5 3)

に対応するアミノ酸配列を有する第三のポリペプチド結合ドメイン領域とを含み、ならびに該重鎖の可変領域が、

式 V I に示すアミノ酸配列：

S D X a a ₄ A W N (I V)

(式中、X a a ₄ は、F、Y、および F または Y が保存的に置換されているアミノ酸残基から成る群より選択される。) (配列番号： 1 5 4)

に対応するアミノ酸配列を有する第一のポリペプチド結合ドメイン領域と、

式 V、式 V I または式 V I I に示すアミノ酸配列：

Y I S Y S G N T R Y X a a ₅ P S L K S (V)

(式中、X a a ₅ は、非荷電極性 R 基を有するアミノ酸残基である。) (配列番号： 1 5 5)、

Y I S Y S X a a ₆ N T R Y N P S L K S (V I)

(式中、X a a ₆ は、G、A、および G または A が保存的に置換されているアミノ酸残基から成る群より選択される。) (配列番号： 1 5 6)

Y I S Y S G N T R Y N P S L X a a ₇ S (V I I)

(式中、X a a ₇ は、塩基性アミノ酸残基である。) (配列番号： 1 5 7)

に対応するアミノ酸配列を有する第二のポリペプチド結合領域と、

式 V I I I に示すアミノ酸配列：

X a a ₈ T A G R G F P Y (V I I I)

(式中、X a a ₈ は、V、A、および V または A が保存的に置換されているアミノ酸残基から成る群より選択される。) (配列番号： 1 5 8)

に対応するアミノ酸配列を有する第三のポリペプチド結合ドメイン領域と

を含むものである；ならびに

配列番号： 2 に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列を含まず、および配列番号： 4 に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列を含まないものである抗体を提供する。

【 0 0 7 4 】

もう一つの態様において、X a a ₁ は、N であり；X a a ₂ は、D であり；X a a ₃ は、A であり；X a a ₄ は、F であり；X a a ₅ は、非荷電極性 R 基を有するアミノ酸残基であり；X a a ₆ は、G であり；X a a ₇ は、K であり；および X a a ₈ は、V である。

【 0 0 7 5 】

もう一つの態様において、X a a ₅ は、N または Q である。

【 0 0 7 6 】

もう一つの態様において、X a a ₁ は、N または S である。

【 0 0 7 7 】

もう一つの態様において、X a a ₂ は、D または E である。

【 0 0 7 8 】

もう一つの態様において、X a a ₃ は、A または G である。

【 0 0 7 9 】

もう一つの態様において、X a a ₄ は、F または Y である。

【 0 0 8 0 】

もう一つの態様において、X a a ₅ は、N または Q である。

【 0 0 8 1 】

もう一つの態様において、X a a ₆ は、G または A であり、および X a a ₇ は、独立して K または R である。

【 0 0 8 2 】

10

20

30

40

50

もう1つの態様において、 X_{aa8} は、VまたはAである。

【0083】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、配列番号：13のアミノ酸配列から成るde2-7接合点ペプチドに結合しないものである；ヒト野生型EGFRの残基273-501の配列内のエピトープに結合するものである；軽鎖および重鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、アミノ酸配列HSSQDINSNIG（配列番号：18）を有する第一のポリペプチド結合ドメイン領域と、アミノ酸配列HGTNLDD（配列番号：19）を有する第二のポリペプチド結合ドメイン領域と、アミノ酸配列VQYAQFPWT（配列番号：20）を有する第三のポリペプチド結合ドメイン領域とを含み、

該重鎖の可変領域が、アミノ酸配列SDFAWN（配列番号：15）を有する第一のポリペプチド結合ドメイン領域と、式IXに示すアミノ酸配列：

YISYSGNTRYX $_{aa9}$ PSLKS（IX）

（式中、 X_{aa9} は、非荷電極性R基を有するアミノ酸残基である。）、

に対応するアミノ酸配列を有する第二のポリペプチド結合ドメイン領域と、アミノ酸配列VTAGRGFPY（配列番号：17）を有する第三のポリペプチド結合ドメイン領域とを含むものである抗体を提供する。

【0084】

もう1つの態様において、前記抗体は、ヒト野生型EGFRの残基287-302の配列（配列番号：14）内のエピトープに結合する。

【0085】

もう1つの態様において、 X_{aa9} は、NまたはQである。

【0086】

もう1つの態様において、前記結合ドメイン領域は、ヒト抗体フレームワークによって保持される。

【0087】

もう1つの態様において、前記ヒト抗体フレームワークは、ヒトIgG1抗体フレームワークである。

【0088】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖が、配列番号：2に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有し、および該軽鎖が、配列番号：4に示すアミノ酸配列に実質的に相同性であるアミノ酸配列を有するものである抗体を提供する。

【0089】

もう1つの態様において、前記抗体の重鎖は、配列番号：2に示すアミノ酸配列を含み、およびこの場合、前記抗体の軽鎖は、配列番号：4に示すアミノ酸配列を含む。

【0090】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、重鎖および軽鎖を含み、該重鎖の可変領域が、配列番号：15、16および17に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含む、ならびに該軽鎖の可変領域が、配列番号：18、19および20に示すアミノ酸配列に高相同性のアミノ酸配列を有するポリペプチド結合ドメイン領域を含むものである抗体を提供する。

【0091】

他の目的および利点は、以下の例証となる図面、および添付の請求項を参照して行われる、後続の「詳細な記述」の精査から当業者に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】図1は、神経膠腫細胞系のフローサイトメトリ分析の結果を提示するものである。U87MG（薄灰色ヒストグラム）およびU87MG・Δ2-7（濃灰色ヒストグラム）細胞を、示されているとおり、無関係なIgG2b抗体（白（open）ヒストグラム）、DH8.3（de2-7 EGFRに特異的）、mAb806または528（野生型とde2-7 EGFRの両方を結合する。）いずれかで染色した。

【図2-1】図2A-Dは、mAb806、mAbDH8.3およびmAb528のELISAの結果を提示するものである。（A）sEGFRコートELISAプレートへの漸増濃度のmAb806（▲）DH8.3（●）または528（■）の結合。（B）溶液中の漸増濃度の可溶性EGFR（sEGFR）によるsEGFRコートELISAプレートへのmAb806およびmAb528の結合の阻害。（C）de2-7接合点ペプチドへの漸増濃度のDH8.3の結合により、mAb806およびmAb528についての固定化野生型sEGFRへの結合曲線（D）が説明される。

【図2-2】図2Eおよび2Fは、C末端ビオチン化ペプチドを使用する、および本発明のモノクローナル抗体を他の公知抗体（これらの中で、de2-7 EGFR突然変異体の接合点ペプチドを認識するL8A4抗体）および対照と一緒に含む、BIACore結合研究の結果をグラフで提示するものである。

【図3】図3は、mAb806およびDH8.3抗体の内在化を描写するものである。U87MG・Δ2-7細胞をmAb806（▲）またはDH8.3（●）と共に4で前保温し、37に移し、FACSによって内在化を判定した。データは、3回（DH8.3）または4回（mAb806）の独立した実験の各時点での平均内在化±SEを表す。

【図4】図4Aおよび4Bは、U87MGおよびU87MG・Δ2-7異種移植片を有するヌードマウスにおける放射標識（a） 125 I-mAb806および（b） 131 I-DH8.3の生体内分布（%ID/g腫瘍組織）を図示するものである。各点は、1時間（n=4）を除く5匹のマウスの平均±SEを表す。

【図5】図5Aおよび5Bは、U87MG・Δ2-7異種移植片を有するヌードマウスにおける（a）腫瘍：血液または（b）腫瘍：肝臓比として表示した放射標識 125 I-mAb806（白棒）および 131 I-DH8.3（黒棒）抗体の生体内分布を図示するものである。各棒は、1時間（n=4）を除く5匹のマウスの平均±SEを表す。

【図6】図6A-Cは、EGFR遺伝子の増幅を有する細胞系のフローサイトメトリ分析を図示するものである。A431細胞をmAb806、DH8.3または528のいずれかで染色し（黒ヒストグラム）、無関係なIgG2b抗体（白ヒストグラム）と比較した。

【図7】図7Aおよび7Bは、U87MG・Δ2-7およびA431異種移植片を有するヌードマウスにおける放射標識（a） 125 I-mAb806および（b） 131 I-528の生体内分布（%ID/g腫瘍組織）を図示するものである。

【図8】図8A-Dは、（A、C）U87MG・Δ2-7および（B、D）A431異種移植片を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：肝臓比として表示した放射標識 125 I-mAb806（白棒）および 131 I-528（黒棒）ならびに抗体の生体内分布を図示するものである。

【図9】図9Aおよび9Bは、予防的モデルにおける（A）U87MGおよび（B）U87MG・Δ2-7異種移植片成長率に対するmAb806の抗腫瘍効果を図示するものである。週齢4-6週BALB/cヌードマウス、（n=5）、の両側腹部に、第0日に、 3×10^6 U87MGまたはU87MG・Δ2-7細胞をs.c.注射した。腫瘍細胞接種の1日前に開始して1mgのmAb806（●）；0.1mgのmAb806（▲）；またはピヒクル（○）のいずれかをマウスにi.p.注射した。矢印により示すように2週間、週3回、注射を施した。平均腫瘍容積±S.E.としてデータを表示する。

【図10】図10A、10Bおよび10Cは、確率モデルにおける(A)U87MG、(B)U87MG・Δ2-7および(C)U87MG・wtEGFR異種移植片に対するmAb806の抗腫瘍効果を図示するものである。週齢4-6週BALB/cヌードマウス、(n=5)、の両側腹部に、 3×10^6 U87MG、U87MG・Δ2-7またはU87MG・wtEGFR細胞をs.c.注射した。腫瘍が $65-80 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍容積に達したときに開始して1mg用量のmAb806(●)；0.1mg用量のmAb806(▲)；またはビヒクル(○)のいずれかをマウスにi.p.注射した。矢印により示すように2週間、週3回、注射を施した。平均腫瘍容積±S.E.としてデータを表示する。

【図11】図11Aおよび11Bは、(A)予防的モデルおよび(B)確率モデルにおけるA431異種移植片に対するmAb806の抗腫瘍効果を図示するものである。週齢4-6週BALB/cヌードマウス、(n=5)、の両側腹部に、 3×10^6 A431細胞をs.c.注射した。予防的モデルの場合は腫瘍細胞接種の1日前に開始して、または腫瘍が 200 mm^3 の平均腫瘍容積に達したときに開始して、1mg用量のmAb806(●)；またはビヒクル(○)のいずれかをマウスにi.p.注射した。矢印により示すように2週間、週3回、注射を施した。平均腫瘍容積±S.E.としてデータを表示する。

【図12】図12は、予防的モデルにおけるA431異種移植片に対するAG1478での治療と組み合わせたmAb806での治療の抗腫瘍効果を図示するものである。平均腫瘍容積±S.E.としてデータを表示する。

【図13】図13は、漸増濃度(0.5 μMおよび5 μM)のAG1478の存在下でのA431細胞へのmAb806の結合を描写するものである。

【図14】図14Aおよび14Bは、806VH鎖遺伝子の(A)核酸配列および(B)このアミノ酸翻訳(それぞれ、配列番号：1および配列番号：2)を図示するものである。

【図15】図15Aおよび15Bは、806VL鎖遺伝子の(A)核酸配列および(B)このアミノ酸翻訳(それぞれ、配列番号：3および配列番号：4)を図示するものである。

【図16】図16は、Kabattに従って番号付けしたVH鎖配列(配列番号：2)を示すものであり、CDR(配列番号：15、16および17)に下線を引く。VH鎖配列(配列番号：2)の鍵残基は、24、37、48、67および78である。

【図17】図17は、Kabattに従って番号付けしたVL鎖配列(配列番号：4)を示すものであり、CDR(配列番号：18、19および20)に下線を引く。VL鎖配列(配列番号：4)の鍵残基は、36、46、57および71である。

【図18】図18A-18Dは、併用抗体療法、特にmAb806および528抗体、の治療効果を判定するために計画したインビボ研究の結果を示すものである。マウスにU87MG・Δ2-7(AおよびB)、U87MG・DK(C)、またはA431(D)細胞の接種を施した。

【図19】図19A-Dは、電子顕微鏡検査による内在化の分析を示すものである。U87MG・Δ2-7細胞を4で、mAb806またはDH8.3と共に、続いて金コンジュゲート型抗マウスIgGと共に前保温し、37に移し、電子顕微鏡検査によって様々な時点で内在化を検査した。(A)5分後の被覆小窩(矢印)へのDH8.3抗体の局在化；(B)2分後のマクロピノサイトーシス(矢印)によるmAb806の内在化；(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mAb806の局在化。すべての画像についての原倍率は、30,000倍である。

【図20】図20は、 1.25×10^5 I-mAb806の注射の8時間後に採集したU87MG・Δ2-7異種移植切片のオートラジオグラフィーを示すものである。

【図21】図21は、EGFR遺伝子の増幅を有する細胞系のフローサイトメトリー分析を示すものである。HM5およびMDA-468細胞を、無関係なIgG2b抗体(破線

10

20

30

40

50

での白ヒストグラム)、mAb 806 (黒ヒストグラム)または528 (閉線での白ヒストグラム)で染色した。DH8.3抗体は、両方の細胞系に対して完全に陰性であった(データを示さない。)。

【図22】図22は、細胞系からのEGFRの免疫沈降を示すものである。mAb 806、sc-03抗体またはIgG2bアイソタイプ対照で³⁵S標識U87MG、Δ2-7またはA431細胞からEGFRを免疫沈降させた。側面の矢印は、de2-7およびwtEGFRの位置を示す。3回の独立した実験において同一のバンドニングパターンが得られた。

【図23】図23は、¹²⁵I-mAb 806の注射の24時間後に採集したA431異種移植切片のオートラジオグラフィーを示すものであり、生組織への局在領域を指摘する(矢印)。

【図24-1】図24Aおよび24Bは、全身mAb 806治療を施した頭蓋内U87MG、ΔEGFR(A)およびLN-Z308、ΔEGFR(B)異種移植片を有するヌードマウスの生存延長を示すものである。U87MG、EGFR細胞(1×10^5)またはLN-Z308、ΔEGFR細胞(5×10^5)をヌードマウスの脳に内植し、内植後第0日から第14日まで、これらの動物を、mAb 806、PBS、またはアイソタイプIgGのいずれかで治療した。図24Eは、腫瘍内mAb 806治療を施した頭蓋内U87MG、ΔEGFR異種移植片を有するヌードマウスの生存延長を示すものである。説明したようにU87MG、ΔEGFRを内植した。第1日に開始して1日おきに5回、5μLの体積で10mgのmAb 806またはアイソタイプIgG対照を腫瘍注射部位に注射した。

【図24-2】図24Cおよび24Dは、mAb 806治療による頭蓋内腫瘍の成長阻害を示すものである。mAb 806またはアイソタイプIgG対照のいずれかで治療したヌードマウス(1群あたり5匹)を、U87MG、EGFR(C)については第9日に、およびLN-Z308、ΔEGFR(D)については第15日に安楽死させ、これらの脳を回収し、固定し、切開した。対照の腫瘍容積を100%と考えることによってデータを計算した。値は、平均±SDである。***、 $P < 0.001$; 対照対mAb 806。矢じり、腫瘍組織。

【図25】図25A、25Bおよび25Cは、mAb 806が、U87MG、wtEGFR脳腫瘍を有するマウスの生存を延長するが、U87MG、DKまたはU87MG脳腫瘍を有するマウスの生存を延長しないことを示すものである。U87MG(A)、U87MG、DK(B)、またはU87MG、wtEGFR(C)細胞(5×10^5)をヌードマウスの脳に内植し、内植後第0日から第14日までmAb 806で治療し、その後、治療中止後、観察した。

【図26】図26Aは、U87MG細胞系でのmAb 806の反応性のFACS分析を示すものである。U87MG、U87MG、ΔEGFR、U87MG、DK、およびU87MG、wtEGFR細胞を、抗EGFR mAb 528、EGFR.1および抗ΔEGFR抗体、mAb 806で染色した。モノクローナルEGFR.1抗体は、wtEGFRを排他的に認識し、ならびにモノクローナル528抗体は、wtEGFRおよびΔEGFR両方と反応した。mAb 806は、U87MG、ΔEGFRおよびU87MG、DKと強く反応し、U87MG、wtEGFRとは弱く反応した。横座標上のバー、一次抗体不在下での細胞の最大染色。結果は、3回の異なる実験で再現された。図26Bは、EGFR形態のmAb 806免疫沈降を示すものである。突然変異体およびwtEGFRを、(レーン1)U87MG、(レーン2)U87Δ、EGFR、(レーン3)U87MG、DK、および(レーン4)U87MG、wtEGFR細胞から、抗EGFR抗体、528、EGFR.1、または抗ΔEGFR抗体、mAb 806で免疫単離し(immunoprecipitated)、その後、抗pan EGFR抗体、C13でのウェスタンブロッティングによって検出した。

【図27】図27Aおよび27Bは、mAb 806での全身治療が、ΔEDFRのリン酸化、およびU87MG、ΔEGFR脳腫瘍におけるBcl-XL発現を減少させることを

10

20

30

40

50

示すものである。U 8 7 M G . Δ E G F R 腫瘍を m A b 8 0 6 治療の第 9 日に切除し、直ちに液体窒素で凍結させ、腫瘍溶解産物調製まで - 8 0 で保管した。(A) Δ E G F R の発現および自己リン酸化度のウエスタンブロット分析。3 0 μ g の腫瘍溶解産物を S D S - ポリアクリルアミドゲルにさらし、ニトロセルロース膜に転写し、抗ホスホチロシン m A b でプローブし、その後、ストリッピングし、抗 E G F R 抗体、C 1 3 で再プローブした。(B) (A) の場合と同じ腫瘍溶解産物を使用することによる B c 1 - X L のウエスタンブロッティング。抗ヒト B c 1 - X ポリクローナル抗体で膜をプローブした。レーン 1 および 2、アイソタイプ対照で治療した U 8 7 M G . Δ E G F R 脳腫瘍；レーン 3 および 4、m A b 8 0 6 で治療した U 8 7 M G . Δ E G F R 脳腫瘍。

【図 2 8】図 2 8 は、m A b 8 0 6 治療が、U 8 7 M G . Δ E G F R 腫瘍において、成長および脈管形成の減少、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もたらすことを示すものである。腫瘍切片を K i - 6 7 について染色した。各群 4 匹のマウスからの頭蓋内腫瘍における 4 つのランダムに選択した高倍率視野 (4 0 0 倍) から K i - 6 7 陽性であった全細胞の百分率によって、細胞増殖指数を評定した。データは、平均 ± S E である。アポトーシス細胞を T U N E L アッセイによって検出した。各群 4 匹のマウスからの頭蓋内腫瘍における 4 つのランダムに選択した高倍率視野 (4 0 0 倍) からの T U N E L 陽性細胞：全細胞数の比によって、アポトーシス指数を評定した。データは、平均 ± S E である。腫瘍切片を抗 C D 3 1 抗体で免疫染色した。各群 4 匹のマウスからの頭蓋内腫瘍における 4 つのランダムに選択した視野 (2 0 0 倍) からのコンピュータ画像解析によって、M V A を分析した。m A b 8 0 6 治療 U 8 7 M G . Δ E G F R 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 F 4 / 8 0 抗体で染色した。

【図 2 9】図 2 9 は、親 U 8 7 M G 神経膠腫細胞系およびトランスフェクトされた U 8 7 M G 神経膠腫細胞系のフローサイトメトリー分析を示すものである。示されているとおり、無関係な I g G 2 b 抗体 (白ヒストグラム) または 5 2 8 抗体または m A b 8 0 6 (黒ヒストグラム) のいずれかで細胞を染色した。

【図 3 0】図 3 0 は、細胞系からの E G F R の免疫沈降を示すものである。E G F R を、^{3 5} S 標識 U 8 7 M G . w t E G F R、U 8 7 M G . Δ 2 - 7、および A 4 3 1 細胞から、m A b 8 0 6 (8 0 6)、s c - 0 3 抗体 (c - t e r m)、または I g G 2 b アイソタイプ対照 (c o n) で免疫沈降させた。矢印、d e 2 - 7 および w t E G F R の位置。

【図 3 1】図 3 1 は、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 および U 8 7 M G . w t E G F R 異種移植片の代表 H & E 染色パラフィン切片を示すものである。上の図 1 0 において説明したように治療したマウスから U 8 7 M G . Δ 2 - 7 (腫瘍接種の 2 4 日後に採集) および U 8 7 M G . w t E G F R (腫瘍接種の 4 2 日後に採集) 異種移植片を切除し、H & E で染色した。ビヒクル治療 U 8 7 M G . Δ 2 - 7 (腫瘍接種の 1 8 日後に採集) および U 8 7 M G . w t E G F R (腫瘍接種の 3 7 日後に採集) 異種移植片は、壊死を殆ど示さなかった (左パネル) が、m A b 8 0 6 で治療した U 8 7 M G . Δ 2 - 7 と U 8 7 M G . w t E G F R の両方において広範な壊死 (矢印) が観察された (右パネル)。

【図 3 2】図 3 2 は、U 8 7 M G、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 および U 8 7 M G . w t E G F R 異種移植片から採取した凍結切片における E G F R 発現の免疫組織化学的分析を示すものである。上の図 3 1 において説明した時点で切片を採集した。異種移植切片を 5 2 8 抗体 (左パネル) および m A b 8 0 6 (右パネル) で免疫染色した。w t E G F R、増幅された E G F R、または d e 2 - 7 E G F R のいずれに対する免疫反応性減少も、m A b 8 0 6 で治療した異種移植片では観察されなかった。インビトロデータと一致して、親 U 8 7 M G 異種移植片は、5 2 8 抗体について陽性であったが、m A b 8 0 6 染色については陰性であった。

【図 3 3】図 3 3 は、産生されるバイシストロン性発現構築物の略図を示すものである。キメラ抗体鎖の転写を伸長因子 - 1 プロモーターによって開始させ、強力な人工終結配列によって終結させる。軽鎖のコーディング領域と N e o R のコーディング領域の間、および重鎖のコーディング領域と d h f r 遺伝子のコーディング領域の間に、I R E S 配列を導入した。

10

20

30

40

50

【図 3 4】図 3 4 A および 3 4 B は、U 8 7 M G - d e 2 - 7 異種移植腫瘍を有する B A L B / c ヌードマウスにおいて (A) ^{1 2 5} I または (B) ^{1 1 1} I n のいずれかで放射標識した c h 8 0 6 の生体内分布分析を行ったことを示すものである。5 μ g の放射標識抗体をマウスに注射し、8、28、48 または 74 時間、いずれかの時点で、1 時点につき 4 匹のマウスの群で犠牲にした。器官を採集し、計量し、ガンマカウンターで放射能を測定した。

【図 3 5】図 3 5 A および 3 5 B は、(A) % I D グラム腫瘍組織および (B) 腫瘍対血液比を描写するものである。インジウム - 1 1 1 抗体は、およそ 3 0 % の I D / グラム組織および 4 . 0 の腫瘍対血液比を示す。

【図 3 6】図 3 6 は、確率腫瘍モデルにおけるキメラ抗体 c h 8 0 6 の治療効力を描写するものである。週齢 4 - 6 週の雌ヌードマウスの両側腹部に、1 0 0 μ L の P B S 中の 3×10^6 U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞を s . c . 接種した。m A b 8 0 6 を陽性対照として含めた。腫瘍が 5 0 m m ³ の平均容積に達したとき治療を開始し、この治療は、示されている日での合計 5 回の注射についての i . p . で施した 1 m g の c h 8 0 6 または m A b 8 0 6 から成った。データを各治療群について平均腫瘍容積 $\pm$ S . E . として提示する。

【図 3 7】図 3 7 は、抗 E G F R キメラ I g G I 抗体 c h 8 0 6 および対照 c G 2 5 0 についてのターゲット (A) U 8 7 M G . d e 2 - 7 および (B) A 4 3 1 細胞に対する C D C 活性を示すものである。三重反復判定の細胞傷害性平均 (バール ; $\pm$ S D) パーセントを提示する。

【図 3 8】図 3 8 は、c h 8 0 6 およびアイソタイプ対照 c G 2 5 0 (0 - 1 0 μ g / m L) によって媒介される 5 0 : 1 のエフェクター : ターゲット細胞比でのターゲット (A) U 8 7 M G . d e 2 - 7 および (B) A 4 3 1 細胞に対する A D C C を示すものである。三重反復判定の細胞傷害性平均 (バール ; $\pm$ S D) パーセントとして結果を提示する。

【図 3 9】図 3 9 は、ターゲット U 8 7 M G . d e 2 - 7 細胞に対する 1 μ g / m L の親 m A b 8 0 6 および c h 8 0 6 によって媒介される A D C C をある範囲のエフェクター : ターゲット比に関して示すものである。三重反復判定の平均 (バール ; $\pm$ S D) を提示する。

【図 4 0】図 4 0 は、c h 8 0 6 を結合するが h u I g G を結合しない抗体を生産する 2 5 のハイブリドーマを最初に選択したことを示すものである。その後、高親和性結合を有するこれらの抗 c h 8 0 6 ハイブリドーマのうちの 4 つ (クローン 3 E 3、5 B 8、9 D 6 および 4 D 8) を制限希釈により単個細胞からのクローン増殖について追跡し、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 と呼んだ。加えて、h u I g G に特異的な m A b を生産する 2 つのハイブリドーマもクローニングし、さらに特性づけした : クローン 2 C 1 0 (L M H - 1 5) および 2 B 8 (L M H - 1 6) 。

【図 4 1】図 4 1 A、4 1 B および 4 1 C は、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 で c h 8 0 6 または m A b 8 0 6 抗原結合活性を中和する能力について E L I S A により三重反復で検査した。平均 ($\pm$ S D) 結果は、s E G F R でコーティングしたプレートへの c h 8 0 6 およびマウス m A b 8 0 6 両方の結合の溶解状態での遮断で抗イディオタイプ m A b L M H - 1 1、- 1 2、- 1 3 および - 1 4 のアンタゴニスト活性を明示した (L M H - 1 4 を示さない。) 。

【図 4 2 - 1】図 4 2 A、4 2 B は、1 0 μ g / m L の精製 (A) L M H - 1 1、(B) L M H - 1 2 および (C) L M H - 1 3 でコーティングしたマクロタイタープレートを示すものである。これら 3 種の精製クローンを、血清または 1 % F C S / 培地中の c h 8 0 6 または m A b 8 0 6 を捕捉するこれらの能力について比較した。その後、結合した c h 8 0 6 または m A b 8 0 6 を検出する。二次コンジュゲートアビジン - H R P および A B T S 基質のための対照に加えて、血清および 1 % F C S / 培地中のアイソタイプ対照抗体 h u 3 S 1 9 3 および m 3 S 1 9 3 を含めた。検出のためにビオチン化 L M H - 1 2 (1

10

20

30

40

50

0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を使用して三重反復試験サンプルの平均 ($\pm \text{SD}$) として結果を提示する。これらの結果は、捕捉および検出のために使用した LMH - 12 が、血清中の ch806 (3 ng/mL) に対する最高の感受性と無視できる程度のバックグラウンド結合を有したことを示している。

【図 42 - 2】図 42C は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の精製 (A) LMH - 11、(B) LMH - 12 および (C) LMH - 13 でコーティングしたマイクロタイタープレートを示すものである。これら 3 種の精製クローンを、血清または 1% FCS / 培地中の ch806 または mAb806 を捕捉するこれらの能力について比較した。その後、結合した ch806 または mAb806 を検出する。二次コンジュゲートアビジン - HRP および ABTS 基質のための対照に加えて、血清および 1% FCS / 培地中のアイソタイプ対照抗体 hu3S193 および m3S193 を含めた。検出のためにビオチン化 LMH - 12 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を使用して三重反復試験サンプルの平均 ($\pm \text{SD}$) として結果を提示する。これらの結果は、捕捉および検出のために使用した LMH - 12 が、血清中の ch806 (3 ng/mL) に対する最高の感受性と無視できる程度のバックグラウンド結合を有したことを示している。

【図 43】図 43 は、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 をそれぞれ捕捉および検出のために使用する、最適な薬物動力学 ELISA 条件の妥当性検証を示すものである。3 回の独立した ELISA を四重反復で行って、3 人の健常ドナーからのドナー血清中の ch806 (●) または 1% BSA / 培地中の ch806 (■) を、血清中のアイソタイプ対照 hu3S193 (▲) または 1% BSA / 培地中のアイソタイプ対照 hu3S193 (▼) と共に測定した。二次コンジュゲートアビジン - HRP についての対照 () および ABTS 基質についての対照 (六角形) 単独も各 ELISA に含めた。平均 ($\pm \text{SD}$) 結果は、3 ng/mL の検出限界で血清中の ch806 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 1.6 ng/mL) の測定について非常に再現性のある結合曲線を明示する ($n = 12$; 1 - 100 ng/mL 、変動係数 $< 25\%$; 100 ng/mL - 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、変動係数 $< 15\%$)。試験した 3 つの血清のいずれに関してもはっきりわかるバックグラウンド結合はなく、および無視できる程度の結合がアイソタイプ対照 hu3S193 に関して観察された。

【図 44】図 44 は、mAb806 でプロットした、CHO 細胞において発現された組換え sEGFR の免疫プロットを描写するものである。組換え sEGFR を PNGase F で処理して、N 結合型グリコシル化 (脱グリコシル化したもの) または未処理のもの (未処理のもの) を除去し、タンパク質を SDS - PAGE につけ、膜に転写し、mAb806 で免疫プロットした。

【図 45】図 45 は、異なる抗体 (SC - 03、806 および 528 抗体) での ^{35}S 標識細胞系 (U87MG, $\Delta 2 - 7$ 、U87MG - wtEGFR、および A431) からの EGFR の免疫沈降を描写するものである。

【図 46】図 46 は、 ^{35}S メチオニン / システインでのパルス標識後、異なる時点 (時間 0 から 240 分) での異なる細胞 (A431 および U87MG, $\Delta 2 - 7$) からの EGFR の免疫沈降を描写するものである。抗体 528 および 806 を免疫沈降に使用する。

【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 消化の不在下 (-) でのおよび Endo H 消化後 (+) の様々な抗体 (SC - 03、806 および 528) での様々な細胞系 (U87MG, $\Delta 2 - 7$ 、U87MG - wtEGFR、および A431) からの EGFR の免疫沈降を描写するものである。

【図 48】図 48 は、A431 および U87MG, $\Delta 2 - 7$ 細胞系の細胞表面ヨウ素化後の 806 抗体での、および Endo H 消化を伴うまたは伴わない、免疫沈降を描写するものであり、この図により、A431 細胞の細胞表面に mAb806 によって結合された EGFR が Endo H 感受性形態であることが確証される。

【図 49 - 1】図 49 - 1 は、pREN ch806 LC Neo Vector (配列番号: 7) を示すものである。

【図 49 - 2】図 49 - 2 は、pREN ch806 LC Neo Vector (配

10

20

30

40

50

列番号：7)を示すものである。

【図49-3】図49-3は、pREN ch806 LC Neo Vector (配列番号：7)を示すものである。

【図49-4】図49-4は、pREN ch806 LC Neo Vector (配列番号：7)を示すものである。

【図49-5】図49-5は、pREN ch806 LC Neo Vector (配列番号：7)を示すものである。

【図49-6】図49-6は、pREN ch806 LC Neo Vector (配列番号：7)を示すものである。

【図50-1】図50-1は、pREN ch806 HC DHFR Vector (配列番号：8)を示すものである。 10

【図50-2】図50-2は、pREN ch806 HC DHFR Vector (配列番号：8)を示すものである。

【図50-3】図50-3は、pREN ch806 HC DHFR Vector (配列番号：8)を示すものである。

【図50-4】図50-4は、pREN ch806 HC DHFR Vector (配列番号：8)を示すものである。

【図50-5】図50-5は、pREN ch806 HC DHFR Vector (配列番号：8)を示すものである。

【図50-6】図50-6は、pREN ch806 HC DHFR Vector (配列番号：8)を示すものである。 20

【図50-7】図50-7は、pREN ch806 HC DHFR Vector (配列番号：8)を示すものである。

【図51-1】図51A-Bは、mAb124 VHおよびVL鎖核酸配列(それぞれ、配列番号：21および26)およびアミノ酸配列(それぞれ、配列番号：22および27)を示すものである。

【図51-2】図51C-Dは、mAb124 VHおよびVL鎖核酸配列(それぞれ、配列番号：21および26)およびアミノ酸配列(それぞれ、配列番号：22および27)を示すものである。

【図52-1】図52A-Bは、mAb1133 VHおよびVL鎖核酸配列(それぞれ、配列番号：31および36)およびアミノ酸配列(それぞれ、配列番号：32および37)を示すものである。 30

【図52-2】図52C-Dは、mAb1133 VHおよびVL鎖核酸配列(それぞれ、配列番号：31および36)およびアミノ酸配列(それぞれ、配列番号：32および37)を示すものである。

【図53】図53は、hu806H(VH+CH)発現カートリッジを含有するpEE12.4とhu806L(VL+CL)発現カートリッジを含有するpEE6.4とを含む複合2遺伝子LonzaプラスミドのDNAプラスミド図を示すものである。

【図54-1】図54-1は、図53に記載した複合LonzaプラスミドのDNA配列(配列番号：41；補体 配列番号：162)を示すものである。この配列は、hu806抗体に関連したすべての翻訳(配列番号：42-51および163-166)も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである：(灰色)：シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列；(ラベンダー)：hu806 VH鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域；(ピンク)：hu806 CH鎖、コドン最適化された重鎖定常領域；(緑色)：hu806 VL鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域；および(黄色)：hu806 CL鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。 40

【図54-2】図54-2は、図53に記載した複合LonzaプラスミドのDNA配列 50

(配列番号：41；補体 配列番号：162)を示すものである。この配列は、hu806抗体に関連したすべての翻訳(配列番号：42-51および163-166)も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである：(灰色)：シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列；(ラベンダー)：hu806 VH鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域；(ピンク)：hu806 CH鎖、コドン最適化された重鎖定常領域；(緑色)：hu806 VL鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域；および(黄色)：hu806 CL鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

10

【図54-3】図54-3は、図53に記載した複合LonzaプラスミドのDNA配列(配列番号：41；補体 配列番号：162)を示すものである。この配列は、hu806抗体に関連したすべての翻訳(配列番号：42-51および163-166)も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである：(灰色)：シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列；(ラベンダー)：hu806 VH鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域；(ピンク)：hu806 CH鎖、コドン最適化された重鎖定常領域；(緑色)：hu806 VL鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域；および(黄色)：hu806 CL鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

20

【図54-4】図54-4は、図53に記載した複合LonzaプラスミドのDNA配列(配列番号：41；補体 配列番号：162)を示すものである。この配列は、hu806抗体に関連したすべての翻訳(配列番号：42-51および163-166)も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである：(灰色)：シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列；(ラベンダー)：hu806 VH鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域；(ピンク)：hu806 CH鎖、コドン最適化された重鎖定常領域；(緑色)：hu806 VL鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域；および(黄色)：hu806 CL鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

30

【図54-5】図54-5は、図53に記載した複合LonzaプラスミドのDNA配列(配列番号：41；補体 配列番号：162)を示すものである。この配列は、hu806抗体に関連したすべての翻訳(配列番号：42-51および163-166)も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである：(灰色)：シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列；(ラベンダー)：hu806 VH鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域；(ピンク)：hu806 CH鎖、コドン最適化された重鎖定常領域；(緑色)：hu806 VL鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域；および(黄色)：hu806 CL鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

40

【図54-6】図54-6は、図53に記載した複合LonzaプラスミドのDNA配列(配列番号：41；補体 配列番号：162)を示すものである。この配列は、hu806抗体に関連したすべての翻訳(配列番号：42-51および163-166)も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである：(灰色)：シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列；(ラベンダー

50

) : h u 8 0 6 V H 鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域 ; (ピンク) : h u 8 0 6 C H 鎖、コドン最適化された重鎖定常領域 ; (緑色) : h u 8 0 6 V L 鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域 ; および (黄色) : h u 8 0 6 C L 鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図 5 4 - 7】図 5 4 - 7 は、図 5 3 に記載した複合 L o n z a プラスミドの D N A 配列 (配列番号 : 4 1 ; 補体 配列番号 : 1 6 2) を示すものである。この配列は、h u 8 0 6 抗体に関連したすべての翻訳 (配列番号 : 4 2 - 5 1 および 1 6 3 - 1 6 6) も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた ; 影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである : (灰色) : シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列 ; (ラベンダー) : h u 8 0 6 V H 鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域 ; (ピンク) : h u 8 0 6 C H 鎖、コドン最適化された重鎖定常領域 ; (緑色) : h u 8 0 6 V L 鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域 ; および (黄色) : h u 8 0 6 C L 鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図 5 4 - 8】図 5 4 - 7 は、図 5 3 に記載した複合 L o n z a プラスミドの D N A 配列 (配列番号 : 4 1 ; 補体 配列番号 : 1 6 2) を示すものである。この配列は、h u 8 0 6 抗体に関連したすべての翻訳 (配列番号 : 4 2 - 5 1 および 1 6 3 - 1 6 6) も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた ; 影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである : (灰色) : シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列 ; (ラベンダー) : h u 8 0 6 V H 鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域 ; (ピンク) : h u 8 0 6 C H 鎖、コドン最適化された重鎖定常領域 ; (緑色) : h u 8 0 6 V L 鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域 ; および (黄色) : h u 8 0 6 C L 鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図 5 4 - 9】図 5 4 は、図 5 3 に記載した複合 L o n z a プラスミドの D N A 配列 (配列番号 : 4 1 ; 補体 配列番号 : 1 6 2) を示すものである。この配列は、h u 8 0 6 抗体に関連したすべての翻訳 (配列番号 : 4 2 - 5 1 および 1 6 3 - 1 6 6) も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた ; 影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである : (灰色) : シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列 ; (ラベンダー) : h u 8 0 6 V H 鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域 ; (ピンク) : h u 8 0 6 C H 鎖、コドン最適化された重鎖定常領域 ; (緑色) : h u 8 0 6 V L 鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域 ; および (黄色) : h u 8 0 6 C L 鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図 5 5】図 5 5 A および 5 5 B は、h u 8 0 6 翻訳アミノ酸配列 (配列番号 : 1 6 4 および 1 6 6 の V H および V L 鎖ならびに配列番号 : 1 6 3 および 1 6 5 のこれらそれぞれのシグナルペプチド ; 配列番号 : 4 3 および 4 8 の C H および C L 鎖) を示す、ならびに V H および V L 鎖 (それぞれ、配列番号 : 1 6 4 および 1 6 5) についての K a b a t 番号を与えるものであり、C D R (配列番号 : 4 4 - 4 6 および 4 9 - 5 1) に下線を引く。

【図 5 6 - 1】図 5 6 A および 5 6 B は、ベニアリング設計における最初の段階、表面露出についての m A b 8 0 6 配列 (配列番号 : 1 6 7 の V H 鎖および配列番号 : 1 2 の V L 鎖) 内のアミノ酸残基の等級づけを示すものである。等級を各残基の上にアスタリスク (*) の数で与え、最大露出残基は 3 つのアスタリスクを有する。これらの図は、最初のオリゴヌクレオチド (V H 鎖 : 図 5 6 C ならびに配列番号 : 5 2 および 1 6 9 - 1 7 7 ; V L 鎖 : 図 5 7 C ならびに配列番号 : 6 2、6 6、6 8 および 1 8 1 - 1 8 7) がどのようにオーバーラップして、第一のベニアリングされた産物 (配列番号 : 1 6 8 の V H 鎖およ

10

20

30

40

50

び配列番号：180のVL鎖)を形成するかを示す設計図を含む。

【図56-2】図56Cは、ベニアリング設計における最初の段階、表面露出についてのmAb806配列(配列番号：167のVH鎖および配列番号：12のVL鎖)内のアミノ酸残基の等級づけを示すものである。等級を各残基の上にアスタリスク(*)の数で与え、最大露出残基は3つのアスタリスクを有する。これらの図は、最初のオリゴヌクレオチド(VH鎖：図56Cならびに配列番号：52および169-177；VL鎖：図57Cならびに配列番号：62、66、68および181-187)がどのようにオーバーラップして、第一のベニアリングされた産物(配列番号：168のVH鎖および配列番号：180のVL鎖)を形成するかを示す設計図を含む。

【図57-1】図57Aおよび57Bは、ベニアリング設計における最初の段階、表面露出についてのmAb806配列(配列番号：167のVH鎖および配列番号：12のVL鎖)内のアミノ酸残基の等級づけを示すものである。等級を各残基の上にアスタリスク(*)の数で与え、最大露出残基は3つのアスタリスクを有する。これらの図は、最初のオリゴヌクレオチド(VH鎖：図56Cならびに配列番号：52および169-177；VL鎖：図57Cならびに配列番号：62、66、68および181-187)がどのようにオーバーラップして、第一のベニアリングされた産物(配列番号：168のVH鎖および配列番号：180のVL鎖)を形成するかを示す設計図を含む。

【図57-2】図57Cは、ベニアリング設計における最初の段階、表面露出についてのmAb806配列(配列番号：167のVH鎖および配列番号：12のVL鎖)内のアミノ酸残基の等級づけを示すものである。等級を各残基の上にアスタリスク(*)の数で与え、最大露出残基は3つのアスタリスクを有する。これらの図は、最初のオリゴヌクレオチド(VH鎖：図56Cならびに配列番号：52および169-177；VL鎖：図57Cならびに配列番号：62、66、68および181-187)がどのようにオーバーラップして、第一のベニアリングされた産物(配列番号：168のVH鎖および配列番号：180のVL鎖)を形成するかを示す設計図を含む。

【図58-1】図58-1は、コドン最適化huIgG1重鎖DNA配列(配列番号：80；補体配列番号：178)およびアミノ酸翻訳(配列番号：43)のマップを示すものである。

【図58-2】図58-2は、コドン最適化huIgG1重鎖DNA配列(配列番号：80；補体配列番号：178)およびアミノ酸翻訳(配列番号：43)のマップを示すものである。

【図59】図59は、hu806VH+CHアミノ酸配列(8C65AAG hu806VH+CH；配列番号：81)とmAb806VH鎖(配列番号：167)についての原参照ファイルを比較するタンパク質アラインメントを示すものである。強調表示領域は、VH鎖内の保存アミノ酸配列を示す。CDRに下線を引く。アスタリスクは、初期ベニアリング方法において計画し、実行した変更を表す。番号がついている部位は、後の修飾への参照である。

【図60】図60は、mAb806VL鎖(配列番号：179)についての原参照ファイルへのhu806VL+CLアミノ酸配列(8C65AAG hu806シグナル+VL+CL；配列番号：83)についての対応するアラインメントを示すものである。これは、修飾番号7でなされる変更を図示するために含めた追加のファイル(r2vk1 hu806シグナル+VL+CL；配列番号：82)、前駆体構築物を含有する。

【図61】図61は、hu806シグナル+VLおよびCL配列(8C65AAG hu806VL+CL；配列番号：190および188)と対応するch806配列(pREN ch806LC Nco；LICR；配列番号：189)のヌクレオチドおよびアミノ酸アラインメントを示すものである。図62において説明するように、これを修飾し、アノテートする。

【図62】図62は、hu806シグナル+VH配列(8C65AAG hu806VH鎖；配列番号：192)と対応するmAb806配列[コドン変更(cc)およびベニアリング(ven)前のmAb806VH鎖；配列番号：191]のヌクレオチドアラ

10

20

30

40

50

インメントを示すものである。図 5 9 および 6 0 のアミノ酸変更の後のヌクレオチド変更を図示し、ならびにアミノ酸の無変更につながった保存的核酸変更も示す。より容易に検分できるように、h u 8 0 6 におけるシグナルおよび V H 鎖間のイントロンを除去した。シグナル配列および C D R に下線を引く。対応するアミノ酸配列 (配列番号: 4 2) を前記アラインメントに重ね合わせた。

【図 6 3】図 6 3 は、B i a c o r e によって判定したときの、一過性トランスフェクタント 2 9 3 細胞から得た精製 h u 8 0 6 抗体の組換え E G F R - E C D への結合を示すものである。精製対照ヒト I g G 1 抗体では E G F R - E C D への結合は観察されなかった。

【図 6 4 - 1】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 2】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 3】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 4】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 5】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 6】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 7】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 8】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 9】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 1 0】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 1 1】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 1 2】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 1 3】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 1 4】I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号: 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを

10

20

30

40

50

示すものである。

【図 6 4 - 1 5】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 1 6】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 1 7】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図64-18】IgG1 hu806をコードするプラスミド8C65AAGの配列（配列番号：41）およびアノテーションのGenBank形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 1 9】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 2 0】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 2 1】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 2 2】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 2 3】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 2 4】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 2 5】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 2 6】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 2 7】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 2 8】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 2 9】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 6 4 - 3 0】 I g G 1 h u 8 0 6 をコードするプラスミド 8 C 6 5 A A G の配列 (配列番号 : 4 1) およびアノテーションの G e n B a n k 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図 64-31】 IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列 (

10

20

30

40

50

配列番号：41) およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図65】図65は、mAb806 (配列番号：15-18、20および193) および mAb175 (配列番号：130-132、135および194-195) からの CDR についてのアミノ酸配列のアラインメントを示すものである。2抗体間の配列の相違を太字にする。

【図66】図66Aおよび66Bは、mAb175での細胞系および正常ヒト肝臓の免疫組織化学的染色を示すものである。(A) A431細胞(wtEGFRを過発現する。)、U87MG、Δ2-7細胞(Δ2-7EGFRを発現する。)およびU87MG細胞(wtEGFRを中程度レベルで発現する。)を含有するブロックから調製した切片を、ピオチン化mAb175を使用して染色した。(B) mAb175 (左パネル)、アイソタイプ対照 (中央パネル) および二次抗体対照 (右パネル) での正常ヒト肝臓の染色(400倍)。特異的洞様毛細血管または肝細胞染色は観察されなかった。

【図67】図67A、67Bおよび67Cは、酵母に提示されたEGFRの断片とmAb806およびmAb175の反応性を示すものである。(A) 酵母提示EGFR断片のmAb175およびmAb806標識の平均蛍光シグナルを描写する代表フローサイトメトリーヒストグラム。酵母ディスプレイでは、細胞のある割合は、これらの表面でタンパク質を発現せず、その結果、2つのヒストグラムピークが得られる。すべての断片が線状C末端c-mycタグを含有するので、9E10抗体を陽性対照として使用する。(B) 様々なEGFR断片に結合する抗体の概要。(C) 酵母ペレットを30分間、800℃に加熱することによって、EGFR断片を変性させた。すべての事例で、c-mycタグは、9E10抗myc抗体により依然として認識された。このことは、熱処理が酵母表面提示タンパク質を損なわせないことを明示している。高次構造感受性EGFR抗体mAb225を使用して変性を確認した。

【図68】図68A、68B、68Cおよび68Dは、脳および前立腺癌異種移植片に対するmAb175の抗腫瘍効果を示すものである。(A) U87MG、Δ2-7異種移植片を有するマウス(n=5)に、PBS、1mgのmAb175またはmAb806(陽性対照)と共に、2週間、週3回、出発腫瘍容積が100mm³であったときには第6、8、10、13、15および17日に、i.p.注射した。データを平均腫瘍容積±SEとして表示する。(B) 2つの無関係な抗体(青色、塗りつぶし、および緑色、中空)、全EGFRのためのmAb528(ピンク色、塗りつぶし)、mAb806(薄青色、中空)およびmAb175(オレンジ色、中空)で細胞を染色し、その後、FACSによって分析した。(C) DU145細胞を溶解し、mAb528、mAb806、mAb175または2つの独立した無関係な抗体でのIPに付し、その後、EGFRについて免疫プロットした。(D) DU145異種移植片を有するマウス(n=5)に、PBS、1mgのmAb175またはmAb806を1日1回、出発腫瘍容積が85mm³であったときには第18-22、25-29および39-43日に、i.p.注射した。データを平均腫瘍容積±SEとして表示する。

【図69】図69A、69B、69C、69D、69Eおよび69Fは、Fab断片に結合したEGFRペプチド287-302の結晶構造を示すものである。(A) 軽鎖、赤色；重鎖、青色；結合ペプチド、黄色；およびEGFRからの重ねたEGFR₂₈₇₋₃₀₂、紫色での、Fab806のコンピュータプリントアウト画像。(B) 軽鎖、黄色；重鎖、緑色；結合ペプチド、ライラック色；およびEGFR(DI-3)からのEGFR₂₈₇₋₃₀₂、紫色での、Fab175のコンピュータプリントアウト画像。(C) FAB175に結合したペプチドへの該受容体内のEGFR₂₈₇₋₃₀₂の類似性を示す、(B)の詳細。ペプチド骨格をCαトレースとして、および相互作用している側鎖をスティックとして示す。主鎖に関して、O原子を赤色に彩色する；N、青色；S、オレンジ色；およびC。(D) 空間的オーバーラップを示す、Fab175：ペプチド複合体とEGFRの重ね合わせ。EGFR187-286の表面を青緑色に彩色して、(C)の場合のように彩色。(E) 不透明青色で示すEGFR187-286および透明な軽鎖表

10

20

30

40

50

面（オレンジ色）および重鎖表面（緑色）での、（D）に対する直交図。（F）抗原結合部位を調べる175 Fab複合体の詳細な立体図。（C）の場合のように彩色し、水素結合を黒色の点々で示す。複合体を形成して隠れている水分子を赤色の球として示す。

【図70】図70A、70B、70Cおよび70Dは、EGFRに結合するmAb806に対する271-283シス테인結合の影響を示すものである。（A）wtEGFR、EGFR-C271A、EGFR-C283AまたはC271A/C283A突然変異体でトランスフェクトした細胞をmAb528で（塗りつぶしピンク色ヒストグラム）、mAb806で（青色線）、または二次抗体のみで（紫色）染色し、その後、FACSによって分析した。クラスを合わせた無関係な抗体を使用して、ゲインを設定した。（B）EGFR-C271AまたはC271/283A EGFRを発現するBaF3細胞を、説明したようなMTTアッセイにおいてEGFへのこれらの応答について検査した。データ点のBoltzmannフィットを用いて、EC₅₀を導出した。三重反復測定の前平均およびsdとしてデータを表す。（C）野生型またはEGFR-C271A/C283Aを発現するBaF3細胞をIL-3および血清飢餓させ、その後、EGFまたはビヒクル対照に暴露した。全細胞溶解産物をSDS-PAGEによって分離し、抗ホスホチロシン抗体（上方パネル）または抗EGFR抗体（下方パネル）で免疫プロットした。（D）野生型（左パネル）またはC271A/C283A（右パネル）EGFRを発現するBaF3細胞を、抗体不在下（中白記号）、mAb528（灰色丸）またはmAb806（黒色三角）の存在下（両方とも10μg/mL）、漸増濃度のEGFで刺激した。三重反復測定の前平均およびsdとしてデータを表す。

【図71】図71A、71Bおよび71Cは、（A）声帯の転移性扁平上皮細胞癌腫を有する患者における¹¹¹In-ch806の生体内分布の全身ガンマカメラ画像[右頸部（矢印）における腫瘍への定量的な高い取り込み量を示している。血液プール活性、および肝臓における遊離¹¹¹Inの小さな異化も見られる]。（B）この患者の頸部の単一光子コンピュータ断層撮影（Single Photon Computed Tomography）（SPECT）画像[生存腫瘍（矢印）での¹¹¹Inの取り込みと、壊死を示す中心部取り込み減少を示している]。（C）対応する頸部CTスキャン[大きな右頸部腫瘍量（矢印）と中心性壊死を明示している]を示すものである。

【図72】図72Aおよび72Bは、テザリングされていないEGFR1-621の構造の立体モデルを示すものである。受容体骨格を青色で、およブリガンドTGF-αを赤色で描く。mAb806/175エピトープを青緑色で、およビジスルフィド結合を黄色で描写する。エピトープを受容体に結び付けるジスルフィド結合の原子を空間充填形式で示す。テザリングされた高次構造からのEGFR-ECD CR2ドメインをテザリングされていないEGFR単量体の構造にこのリガンドの存在下でドッキングさせることによって、このモデルを構築した。

【図73】図73は、EGFRの断片とmAb806の反応性を示すものである。可溶性1-501 EGFR断片またはCH/EGFR断片融合タンパク質（GH-274-501、GH-282-501、GH-290-501およびGH-298-501）を発現するベクターでトランスフェクトした293T細胞からの溶解産物をSDS-PAGEによって分割し、膜に転写し、mAb806（左パネル）または抗myc抗体9B11（右パネル）で免疫プロットした。

【図74】図74Aおよび74Bは、mAb175 VH鎖核酸配列（配列番号：128）およびアミノ酸配列（単数または複数）（配列番号：129）をそれぞれ示すものである。

【図75】図75Aおよび75Bは、mAb175 VL鎖核酸配列（配列番号：133）およびアミノ酸配列（単数または複数）（配列番号：134）をそれぞれ示すものである。

【図76-1】図76Aおよび76Bは、小規模（100mL）振盪フラスコ培養でのGS-CHO（14D8、15B2および40A10）およびGS-NS0（36）hu806トランスフェクタントの（A）体積産物濃度および（B）生細胞濃度[806抗イデ

10

20

30

40

50

イオタイプをコーティング抗体としておよび c h 8 0 6 C l i n i c a l L o t : J 0 6 0 2 4 を標準物質として使用して E L I S A により産物の濃度を推定した。]; (C) 1 5 L 攪拌タンク型バイオリアクターにおける G S - C H O 4 0 A 1 0 トランスフェクタント細胞成長および体積生産量 [生細胞密度 ($\times 10^5$ 細胞 / m L)、細胞生存度 (■) および生産量 (▲ m g / L)] を示すものである。

【図 7 6 - 2】図 7 6 C は、小規模 (1 0 0 m L) 振盪フラスコ培養での G S - C H O (1 4 D 8、1 5 B 2 および 4 0 A 1 0) および G S - N S 0 (3 6) h u 8 0 6 トランスフェクタントの (A) 体積産物濃度および (B) 生細胞濃度 [8 0 6 抗イディオタイプをコーティング抗体としておよび c h 8 0 6 C l i n i c a l L o t : J 0 6 0 2 4 を標準物質として使用して E L I S A により産物の濃度を推定した。]; (C) 1 5 L 攪拌タンク型バイオリアクターにおける G S - C H O 4 0 A 1 0 トランスフェクタント細胞成長および体積生産量 [生細胞密度 ($\times 10^5$ 細胞 / m L)、細胞生存度 (■) および生産量 (▲ m g / L)] を示すものである。

10

【図 7 7 - 1】図 7 7 A、7 7 B および 7 7 C は、小規模培養により生産したプロテイン A 精製 h u 8 0 6 抗体構築物ならびに対照 c h 8 0 6 および m A b 8 0 6 のサイズ排除クロマトグラフィー (B i o s e p S E C - S 3 0 0 0) 分析を示すものである。各図の上方パネルに A 2 1 4 n m でのクロマトグラムをおよび下方パネルに A 2 8 0 n m でのクロマトグラムを提示する。

【図 7 7 - 2】図 7 7 D および 7 7 E は、小規模培養により生産したプロテイン A 精製 h u 8 0 6 抗体構築物ならびに対照 c h 8 0 6 および m A b 8 0 6 のサイズ排除クロマトグラフィー (B i o s e p S E C - S 3 0 0 0) 分析を示すものである。各図の上方パネルに A 2 1 4 n m でのクロマトグラムをおよび下方パネルに A 2 8 0 n m でのクロマトグラムを提示する。

20

【図 7 8】図 7 8 は、大規模生産およびプロテイン A 精製後のプロテイン A 精製 h u 8 0 6 抗体構築物 4 0 A 1 0 のサイズ排除クロマトグラフィー (B i o s e p S E C - S 3 0 0 0) 分析を示すものである。1 . 2 % の凝集物が存在する 9 8 . 8 % の純度を示す、2 1 4 n m でのクロマトグラムを提示する。

【図 7 9】図 7 9 は、N o v e x , U S A からのプレキャスト 4 - 2 0 % T r i s / グリシゲルを標準 S D S - P A G E 条件下で使用して、精製トランスフェクタント h u 8 0 6 標品 (5 μ g) G S - C H O (1 4 D 8、1 5 B 2 および 4 0 A 1 0) および G S - N S 0 (3 6) h u 8 0 6 を還元条件下で分析したことを示すものである。クマシーブルー染色剤によって検出したタンパク質。

30

【図 8 0】図 8 0 は、プレキャスト 4 - 2 0 % T r i s / グリシゲルを標準 S D S - P A G E 条件下で使用して、精製トランスフェクタント h u 8 0 6 標品 (5 μ g) G S - C H O (1 4 D 8、1 5 B 2 および 4 0 A 1 0) および G S - N S 0 (3 6) を非還元条件下で分析したことを示すものである。クマシーブルー染色剤によって検出したタンパク質。

【図 8 1】図 8 1 は、プレキャスト 4 - 2 0 % T r i s / グリシゲルを標準 S D S - P A G E 条件下で使用して、精製トランスフェクタント h u 8 0 6 G S - C H O 4 0 A 1 0 (5 μ g) を大規模生産後に分析したことを示すものである。クマシーブルー染色剤によって検出したタンパク質。

40

【図 8 2】図 8 2 は、1 5 L 生産後の精製トランスフェクタント h u 8 0 6 G S - C H O 4 0 A 1 0 (5 μ g) の等電点電気泳動ゲル分析を示すものである。クマシーブルー染色によって検出したタンパク質。レーン 1、p I マーカー; レーン 2、h u 8 0 6 (3 つのアイソフォーム、p I 8 . 6 6 から 8 . 8 2); レーン 3、p I マーカー。

【図 8 3】図 8 3 は、A 4 3 1 細胞への結合を示すものである: プロテイン A 精製 h u 8 0 6 抗体標品 (2 0 μ g / m L) およびアイソタイプ対照 h u A 3 3 (2 0 μ g / m L) のフローサイトメトリー分析。対照は、二次抗体単独 (緑色) および c h 8 0 6 (赤色) を含む。H u 8 0 6 構築物を小規模培養によって生産した。

【図 8 4】図 8 4 は、A 4 3 1 細胞への結合を示すものである: 示すとおり、細胞表面

50

の野生型 E G F R の ~ 1 0 % を結合する精製 m A b 8 0 6 、 c h 8 0 6 および h u 8 0 6 4 0 A 1 0 抗体標品 (2 0 μ g / m L) 、 5 2 8 (野生型 E G F R と d e 2 - 7 E G F R の両方を結合する。) および無関係な対照抗体 (2 0 μ g / m L) のフローサイトメトリー分析。

【図 8 5】図 8 5 は、U 8 7 M G . d e 2 - 7 神経膠腫細胞への結合を示すものである。精製 m A b 8 0 6 、 c h 8 0 6 および h u 8 0 6 4 0 A 1 0 抗体標品 (2 0 μ g / m L) ならびに 5 2 8 抗 E G F R および無関係な対照抗体 (2 0 μ g / m L) のフローサイトメトリー分析。

【図 8 6】図 8 6 は、(A) U 8 7 M G . d e 2 - 7 神経膠腫細胞および (B) A 4 3 1 癌腫細胞への 125 I 放射標識 8 0 6 抗体構築物の特異的結合を示すものである。

【図 8 7】図 8 7 は、スキャッチャード解析を示すものである：U 8 7 M G . d e 2 - 7 細胞への 125 I 放射標識 (A) c h 8 0 6 および (B) h u 8 0 6 抗体構築物の結合。

【図 8 8】図 8 8 は、スキャッチャード解析を示すものである：A 4 3 1 細胞への 125 I 放射標識 (A) c h 8 0 6 および (B) h u 8 0 6 抗体構築物の結合。

【図 8 9】図 8 9 は、2 8 7 - 3 0 2 E G F R 8 0 6 ペプチドエピトープへの該固定化ペプチド上を通過する 5 0 n M 、 1 0 0 n M 、 1 5 0 n M 、 2 0 0 n M 、 2 5 0 n M および 3 0 0 n M の漸増濃度の (A) h u 8 0 6 および (B) c h 8 0 6 による結合についての B I A c o r e 分析を示すものである。

【図 9 0】図 9 0 は、(A) エフェクター対ターゲット細胞比範囲 (E : T = 0 . 7 8 : 1 から 1 0 0 : 1) にわたって 1 μ g / m L の各抗体で；(B) ターゲット A 4 3 1 に対して各抗体の濃度範囲 (3 . 1 5 n g / m L - 1 0 μ g / m L) にわたって E : T = 5 0 : 1 で判定した、ターゲット A 4 3 1 細胞に対する c h 8 0 6 媒介および h u 8 0 6 媒介抗体依存性細胞傷害性を示すものである。

【図 9 1】図 9 1 は、B A L B / c ヌードマウスにおける確率した A 4 3 1 異種移植片の治療を示すものである。5 匹のマウスの群に 6 $\times$ 1 m g の用量での 2 週間にわたる抗体療法を示すとおり (矢印) に施した。研究終了までの平均 $\pm$ S E M 腫瘍容積を提示する。

【図 9 2】図 9 2 は、B A L B / c ヌードマウスにおける確率した U 8 7 M g . d e 2 - 7 異種移植片の治療を示すものである。5 匹のマウスの群に 6 $\times$ 1 m g の用量での 2 週間にわたる抗体療法を示すとおり (矢印) に施した。研究終了までの平均 $\pm$ S E M 腫瘍容積を提示する。

【図 9 3】図 9 3 は、m A b 8 0 6 ペプチド (A) N 、 (B) H N および (C) H A についてのランダムコイル化学シフト値からの偏差を示すものである。p H 6 . 8 の 5 % 2 H $_2$ O 、 7 0 m M N a C l および 5 0 m M N a P O $_4$ を含有する H $_2$ O 溶液中でペプチドを調製した。逐次的割当てに用いたすべてのスペクトルは、B r u k e r A v a n c e 5 0 0 おいて 2 9 8 K で獲得した。

【図 9 4】図 9 4 A 、 9 4 B 、 9 4 C 、 9 4 D 、 9 4 E および 9 4 F は、 111 I n - c h 8 0 6 の注入後第 5 日における A) 腹側、および B) 背側の患者 7 の前進ガンマカメラ像を示すものである。肺 (矢印) における転移病変での 111 I n - c h 8 0 6 の高い取り込み量がはっきりわかる。C) および D) は、C T スキャンで転移病変を示すものである。E) 胸部の 3 D S P E C T 画像、および F) 転移病変 (矢印) での 111 I n - c h 8 0 6 の特異的取り込みを示す S P E C T と C T の位置合わせした (c o - r e g i s t e r e d) 断層画像。

【図 9 5】図 9 5 A 、 9 5 B 、 9 5 C 、 9 5 D 、 9 5 E および 9 5 F は、 111 I n - c h 8 0 6 の注入後、A) 第 0 日、B) 第 3 日および C) 第 7 日に得た患者 8 の頭頸部の平面画像を示すものである。最初の血液プール活性が第 0 日に見られ、右前頭葉における退形成性星状細胞腫での 111 I n - c h 8 0 6 の取り込みが第 3 日 (矢印) にははっきりわかり、第 7 日まで増加する。 111 I n - c h 8 0 6 の特異的取り込みは、D) 脳 (矢印) の S P E C T 画像において確認され、E) 18 F - F D G P E T 、および F) M R I では腫瘍部位 (矢印) ではっきりわかる。

【図 9 6】図 9 6 A 、 9 6 B 、 9 6 C および 9 6 D は、患者 4 と比較して患者 3 において

10

20

30

40

50

、選別腫瘍サンプルにおける 806 抗原発現の差にもかかわらず、腫瘍での ^{111}In -ch806 の同様の取り込みがはっきりわかることを示すものである。A) はっきりわかる心血液プール活性 (B) を伴う、患者 4 に関する SPECT 断層画像における肺転移 (矢印) の ^{111}In -ch806 局在。B) 対応する CT スキャン。保存腫瘍は、806 発現について陽性率 < 10% を有することが明らかになった。C) はっきりわかる心血液プール活性 (B) を伴う、患者 3 に関する肺転移 (矢印) の ^{111}In -ch806 局在。D) 対応する CT スキャン。保存腫瘍は、806 発現について 50 - 75% の陽性率を有することが明らかになった。

【図 97】図 97 は、ELISA によって測定した ch806 タンパク質についてのプールされた集団の薬物動態を示すものである。注入後の時間 (時) に対する実測および予測 ch806 (% ID / L)。

【図 98】図 98 A および 98 B は、 5 mg/m^2 (■)、 10 mg/m^2 (□)、 20 mg/m^2 (△)、および 40 mg/m^2 (◇) 用量レベルでの ^{111}In -ch806 の A) 正規化された全身クリアランスおよび B) 肝クリアランスについての個々の患者の結果を示すものである。各パネルに示したデータセットについての線形回帰 [A) $r^2 = 0.9595$; B) $r^2 = 0.9415$]。

【発明を実施するための形態】

【0093】

詳細な記述

本発明に従って、当該技術分野における技能の範囲内の従来の分子生物学、微生物学および組換え DNA 技術を利用することができる。このような技術は、文献において十分説明されている。例えば、Sambrook et al., 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(1989); 「Current Protocols in Molecular Biology」Volumes I - E [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) を参照のこと。

【0094】

本明細書において用いる場合、以下の用語は、限定ではないが、与える定義を有すると考える。

【0095】

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ペアのメンバーを記述するものである。特異的結合ペアのメンバーは、天然に由来する場合があります、または完全にもしくは部分的に合成生産されることがある。前記分子ペアの一方のメンバーは、この分子ペアの他方のメンバーの特定の空間および極性機構に特異的に結合する、従って相補的である、この表面上のエリア、またはキャビティーを有する。従って、前記ペアのメンバーは、互いに特異的に結合する特性を有する。特異的結合ペアのタイプの例は、抗原 - 抗体、ビオチン - アビジン、ホルモン - ホルモン受容体、受容体 - リガンド、酵素 - 基質である。本出願は、抗原 - 抗体タイプの反応に関する。

【0096】

この様々な文法形式での用語「異常な発現」は、非過発現状態とは対照的に、いずれの1回においてもより多くのタンパク質が存在するまたは検出され得るような、発現もしくは翻訳増進、タンパク質の促進因子もしくは調節因子の修飾、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向上をはじめとする任意の手段によって引き起こされる、組織におけるタンパク質の任意の発現上昇もしくは改変または過発現、例えばタンパク質の量の増加を意味するおおよび含むものであり得る。異常な発現は、配列改変、欠失もしくは挿入に起因する突然変異タンパク質もしくは変異体の場合のような改変されたタンパク質、改変されたフォールディングが発現されるシナリオまたは改変を含めて、細胞におけるタンパク質発現または翻訳後修飾機構が、タンパク質の発現増進またはレベルもしくは量増加に起因して酷使されるかでなければ破壊される任意のシナリオまたは改変を含み、考えている。

10

【0097】

用語「異常な発現」が、異常（通常、増加された）量／レベルのタンパク質が存在する状態を、この異常量またはレベルの動因に関係なく、包含するために本明細書において特に選択されたことを理解することは重要である。例えば、異常量のタンパク質は、遺伝子増幅不在でのタンパク質の過発現の結果として生ずることがあり、これは、例えば、癌を有する被験者の頭頸部から採取した多くの細胞／組織サンプルにおける場合であるが、他のサンプルは、遺伝子増幅に帰する異常タンパク質レベルを呈示する。

【0098】

この後者に関連して、本発明を例証するために本明細書に提示する本発明者らの研究の幾つかは、サンプルの分析を含み、該サンプルのうちの幾つかは、E F G Rの増幅に起因して異常タンパク質レベルを呈示する。従って、このことが、増幅について言及する実験所見の本明細書での発表の、ならびにE F G Rの異常レベルを記述する場合の用語「増幅／増幅された」おおよびこれらに類するものの使用の説明となる。しかし、これは、本発明の結合メンバーに頼ることによるような臨床的介入が考えられる環境または状況を規定する前記タンパク質の異常量またはレベルの観察であり、このため、本明細書では、用語「異常な発現」が、E F G Rレベルの対応する異常性を生じさせる原因となる環境をより広く捕えるものであると考える。

20

【0099】

従って、これらの様々な文法形式での用語「過発現」おおよび「増幅」は、異なる技術的意味を有すると解されるが、これらは、本発明に関連して異常E F G Rタンパク質レベルが存在する状態を表す限り、互いに等価であるとみなされる。従って、用語「異常な発現」は、ここでの目的のためにこの範囲内に用語「過発現」おおよび「増幅」を包含すると考えられるように選択されたものであり、そのため、本明細書において用いる場合、すべての用語を互いに等価とみなすことができる。

30

【0100】

用語「抗体」は、天然のものであろうと、または部分的にもしくは完全に合成生産されたものであろうと、免疫グロブリンを記述する。この用語は、抗体結合ドメインであるまたは抗体結合ドメインに相同性である結合ドメインを有する任意のポリペプチドまたはタンパク質も包含する。C D Rグラフト化抗体もこの用語により考えられる。

40

【0101】

抗体を多数の方法で修飾できるが、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結合メンバーまたは基質を包含すると解釈すべきである。従って、この用語は、天然のものであろうと、完全にまたは部分的に合成のものであろうと、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、抗体断片、抗体の誘導体、機能的等価物おおよびホモログを包含する。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を含むキメラ分子、または等価物を含む。キメラ抗体のクローニングおおよび発現は、E P - A - 0 1 2 0 6 9 4 おおよび E P - A - 0 1 2 5 0 2 3 ならびに米国特許番号 4 , 8 1 6 , 3 9 7 おおよび米国特許番号 4 , 8 1 6 , 5 6 7 に記載されている。

【0102】

50

全抗体の断片が、結合抗原の機能を果たす場合があることは証明されている。結合断片の例は、(i) VL、VH、CLおよびCH1ドメインから成るFab断片；(ii) VHおよびCH1ドメインから成るFd断片；(iii) 単一抗体のVLおよびVHドメインから成るFv断片；(iv) VHドメインから成るdAb断片(Ward, E. S. et al. (1989) Nature 341, 544-546)；(v) 単離されたCDR領域；(vi) F(ab')₂断片、2つの連結されたFab断片を含む二価断片；(vii) 抗原結合部位を形成するように2つのドメインを会合させることができるペプチドリンカーによってVHドメインとVLドメインが連結されている、一本鎖Fv分子(scFv)(Bird et al. (1988) Science 242, 423-426; Huston et al. (1988) PNAS USA 85, 5879-5883)；(viii) 多価抗体断片(scFv二量体、三量体および/または四量体(Power and Hudson (2000) J. Immunol. Methods 242, 193-204)；(ix) 二重特異性一本鎖Fv二量体(PCT/US92/09965)および(x)「ダイアボディー」、遺伝子融合によって構築された多価または多重特異性断片(WO94/13804; P. Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448)である。

【0103】

「抗体結合部位(antibody combining site)」は、抗原に特異的に結合する軽鎖または重および軽鎖可変領域および超可変領域で構成された抗体分子の構造部分である。

【0104】

本明細書において用いる場合のこの様々な文法形式での「抗体分子」というフレーズは、インタクトな免疫グロブリン分子と免疫グロブリン分子の免疫活性部分の両方を考えている。

【0105】

例示的抗体分子は、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、およびパラトープを含有する免疫グロブリン分子の部分であり、前記部分としては、当該技術分野においてFab、Fab'、F(ab')₂およびF(v)として公知の部分が挙げられ、これらの部分は、本明細書に記載する治療方法での使用に好ましい。

【0106】

抗体は、二重特異性であることもあり、この場合、この抗体の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、および他の結合ドメインは、例えばエフェクター機能またはこれらに類するものを補充するために、異なる特異性を有する。本発明の二重特異性抗体は、この抗体の1つの結合ドメインが、本発明の特異的結合メンバー[この断片を含む]であり、および他の結合ドメインが、異なる抗体またはこの断片[異なる抗EGFR抗体、例えば、抗体528(米国特許番号4,943,533)、キメラおよびヒト化225抗体(米国特許番号4,943,533およびWO/9640210)、抗de2-7抗体、例えばDH8.3(Hills, D. et al (1995) Int. J. Cancer 63(4), 537-543)、抗体L8A4およびY10(Reist, C. J. 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、またはWikstrandらの抗体(Wikstrand C. et al (1995) Cancer Res. 55(14):3140-3148)のものを含む]、二重特異性抗体を含む。他の結合ドメインは、神経または神経膠細胞特異的抗体の場合のような、特定の細胞タイプを認識するまたはターゲットにする抗体である

場合がある。本発明の二重特異的抗体の場合、本発明の抗体の1つの結合ドメインを、例えば、免疫調節成分（例えば、インターロイキン（単数または複数））、成長調節成分またはサイトカイン（例えば、腫瘍壊死因子（TNF））、および特に、この全体が本明細書に組み込まれる、2002年2月13日に出願された米国特許出願番号60/355,838において論証されているTNF二重特異性の種類）または毒素（例えばリシン）または抗有糸分裂もしくはアポトーシス剤もしくは因子のような、特定の細胞受容体を認識するおよび/または特定の様式で細胞を調節させる、他の結合ドメインまたは分子と、結合させることができる。

【0107】

抗体分子のFabおよびF(ab')₂部分は、周知である方法による実質的にインタクトな抗体分子に対する、それぞれ、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調製することができる。例えば、Theofilopoulosらの米国特許番号4,342,566を参照のこと。Fab'抗体分子部分も周知であり、これらをF(ab')₂部分から生産し、その後、メルカプトエタノールなどで2つの重鎖部分を連結しているジスルフィド結合を還元する、およびその後、得られたタンパク質メルカプタンをヨードアセトアミドなどの試薬でアルキル化する。インタクトな抗体分子を含有する抗体が、本明細書では好ましい。

【0108】

この様々な文法形式での「モノクローナル抗体」というフレーズは、特定の抗原と免疫反応することができる抗体結合部位の種類を1種類しか有さない抗体を指す。従って、モノクローナル抗体は、これが免疫反応するいずれの抗原に対しても単一の結合親和性しか概して提示しない。モノクローナル抗体は、それぞれが異なる抗原に対して免疫特異的な複数の抗体結合部位を有する抗体分子、例えば、二重特異性（キメラ）モノクローナル抗体も含むことがある。

【0109】

用語「抗原結合ドメイン」は、抗原の一部またはすべてに特異的に結合するおよび抗原の一部またはすべてに相補的であるエリアを含む抗体の一部を記述するものである。抗原が大きい場合、抗体は、抗原の特定の部分にしか結合できず、この部分をエピトープと呼ぶ。抗原結合ドメインは、1つ以上の抗体可変ドメインによって与えられることがある。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。

【0110】

「翻訳後修飾」は、翻訳が完了した後、およぼリボソームからまたは未完成ポリペプチド上に同時翻訳的に放出された後にタンパク質が経験する、共有結合修飾をはじめとする、修飾（単数または複数）の任意の1つまたは組み合わせを包含し得る。翻訳後修飾としては、リン酸化、ミリスチル化、ユビキチン化、グリコシル化、補酵素付着、メチル化およびアセチル化が挙げられるが、これらに限定されない。翻訳後修飾は、タンパク質の活性、この細胞内もしくは細胞外目的地、この安定性もしくは半減期、および/またはリガンド、受容体もしくは他のタンパク質によるこの認識を調節するまたはこれらに影響を及ぼす場合がある。翻訳後修飾は、細胞小器官において発生する場合があり、核もしくは細胞質において発生する場合があり、または細胞外で発生する場合がある。

【0111】

用語「特異的」は、特異的結合ペアの一方のメンバーが、この特異的結合パートナー（単数または複数）以外の分子への有意な結合を一切示さないであろう状況を指すために用いることができる。この用語は、例えば、抗原結合ドメインが、多数の抗原により保持されている特定のエピトープに特異的である場合にも適用され、この場合、前記抗原結合ドメインを保持する特異的結合メンバーは、このエピトープを保持する様々な抗原に結合することができるであろう。

【0112】

用語「含む（comprise）」は、一般に含む（include）の意味で用いて

10

20

30

40

50

おり、即ち、１つ以上の特徴または成分の存在を許容する。

【０１１３】

用語「から本質的に成る」は、大きな産物に共有結合で付いていない被定義残基数の産物、特にペプチド配列を指す。しかし、上で言及した本発明のペプチドの場合、該ペプチドのNまたはC末端への小さな修飾、例えば、保護基またはこれらに類するものを付加させるための末端の化学修飾、例えばC末端のアミド化が考えられることは、当業者には理解されるであろう。

【０１１４】

用語「単離された」は、本発明に従って、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になるであろう状態を指す。メンバーおよび核酸には、これらが、これらの自然な環境において、またはこれらを調製する環境（例えば、細胞培養）において（このような調製がインビトロもしくはインビボで実施される組換えDNA技術によるとき）見つけられる、他のポリペプチドまたは核酸などの、これらが自然に随伴する材料がない、または実質的にないであろう。メンバーおよび核酸は、希釈剤またはアジュバントと調合されることがあり、それでもなお実際には、単離されていることがある - 例えば、通常、前記メンバーは、イムノアッセイにおいて用いるためのマイクロタイタープレートにコーティングするために使用される場合にはゼラチンもしくは他の担体と混合されるであろう、または診断もしくは療法において使用されるときには医薬的に許容される担体もしくは希釈剤と混合されるであろう。特異的結合メンバーは、自然にもしくは異種真核細胞の系によりグリコシル化されることがあり、または（例えば、真核細胞における発現によって生産される場合）グリコシル化されないことがある。

【０１１５】

また、本明細書において用いる場合、用語「グリコシル化」および「グリコシル化された」は、オリゴ糖の付加による、糖タンパク質と呼ばれるタンパク質の翻訳後修飾を含むおよび包含する。特に、N結合型オリゴ糖およびO結合型オリゴ糖をはじめとする、オリゴ糖は、糖タンパク質におけるグリコシル化部位で付加される。N結合型オリゴ糖は、特にAsn残基が配列N-X-S/T（Xは、ProまたはAspであり得ない。）で存在する場合、Asn残基に付加され、および糖タンパク質において見つけられる最も一般的なものである。N結合型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（一般に、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成るが小胞体（ER）において最初に形成される。その後、この高マンノース型糖タンパク質は、ERからゴルジに輸送され、そこでさらにこのオリゴ糖のプロセッシングおよび修飾が発生する。O結合型オリゴ糖は、SerまたはThr残基のヒドロキシル基に付加される。O結合型オリゴ糖の場合、N-アセチルグルコサミンが、ERにおいてアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼによりSerまたはThr残基に最初に移送される。その後、このタンパク質は、ゴルジに移動し、そこでさらなる修飾および連鎖伸長が発生する。O結合型修飾は、SerまたはThr部位でのOGlcNAc単糖類単独の単純付加で発生する場合があります、この修飾は、別の条件下では、グリコシル化でなくリン酸化である場合もある。

【０１１６】

本明細書において用いる場合、「pg」は、ピコグラムを意味し、「ng」は、ナノグラムを意味し、「ug」または「μg」は、マイクログラムを意味し、「mg」は、ミリグラムを意味し、「uL」または「μL」は、マイクロリットルを意味し、「mL」は、ミリリットルを意味し、「L」は、リットルを意味する。

【０１１７】

用語「806抗体」、「mAb806」、「ch806」、および具体的に列挙していない任意の変異体は、本明細書では交換可能に用いることがあり、ならびに本出願および請求項を通して用いる場合、単数または多数のタンパク質を含むタンパク質性材料を指し、ならびに本明細書に記載するならびに配列番号：2および配列番号：4に提示するアミノ酸配列データ、ならびに配列番号：7および8に組み込まれているならびに配列番号：

7 および 8 の一部を構成するキメラ抗体 c h 8 0 6、ならびに本明細書および請求項に示す活性のプロフィールを有するタンパク質にわたる。従って、実質的に等価のまたは改変された活性を提示するタンパク質は、同様に考えられる。これらの修飾は、例えば部位特異的突然変異誘発により得られる修飾のような計画的なものであることがあり、またはこの複合体の生産体である宿主における突然変異によって得られるものもしくはこの指名サブユニットのような偶発的なものであることがある。また、用語「8 0 6 抗体」、「m A b 8 0 6」および「c h 8 0 6」は、本明細書に具体的に列挙するタンパク質ならびに実質的に相同な類似体および対立遺伝子変種を、これらの範囲内に含むことを、意図したものである。

【0 1 1 8】

用語「ヒト化 8 0 6 抗体」、[h u 8 0 6]、および「ベニアリングされた 8 0 6 抗体」、ならびに具体的に列挙しない任意の変異体は、本明細書で交換可能に用いることがあり、ならびに本出願および請求項を通して用いる場合、単数または多数のタンパク質を含むタンパク質性材料を指し、ならびに本明細書に記載するならびに配列番号：4 2 および配列番号：4 7 に提示するアミノ酸配列データ、ならびに本明細書および請求項に示す活性のプロフィールを有するタンパク質にわたる。従って、実質的に等価のまたは改変された活性を提示するタンパク質は、同様に考えられる。これらの修飾は、例えば部位特異的突然変異誘発により得られる修飾のような計画的なものであることがあり、またはこの複合体の生産体である宿主における突然変異によって得られるものもしくはこの指名サブユニットのような偶発的なものであることがある。また、用語「ヒト化 8 0 6 抗体」、[h u 8 0 6]、および「ベニアリングされた 8 0 6 抗体」は、本明細書に具体的に列挙するタンパク質ならびに実質的に相同性の類似体および対立遺伝子変種を、これらの範囲内に含むことを、意図したものである。

【0 1 1 9】

用語「1 7 5 抗体」および「m A b 1 7 5」、ならびに具体的に列挙しない任意の変異体は、本明細書で交換可能に用いることがあり、ならびに本出願および請求項を通して用いる場合、単数または多数のタンパク質を含むタンパク質性材料を指し、ならびに本明細書に記載するならびに配列番号：1 2 9 および配列番号：1 3 4 に提示するアミノ酸配列データ、ならびに本明細書および請求項に示す活性のプロフィールを有するタンパク質にわたる。従って、実質的に等価のまたは改変された活性を提示するタンパク質は、同様に考えられる。これらの修飾は、例えば部位特異的突然変異誘発により得られる修飾のような計画的なものであることがあり、またはこの複合体の生産体である宿主における突然変異によって得られるものもしくはこの指名サブユニットのような偶発的なものであることがある。また、用語「1 7 5 抗体」および「m A b 1 7 5」は、本明細書に具体的に列挙するタンパク質ならびに実質的に相同性の類似体および対立遺伝子変種を、これらの範囲内に含むことを、意図したものである。

【0 1 2 0】

用語「1 2 4 抗体」および「m A b 1 2 4」、ならびに具体的に列挙しない任意の変異体は、本明細書で交換可能に用いることがあり、ならびに本出願および請求項を通して用いる場合、単数または多数のタンパク質を含むタンパク質性材料を指し、ならびに本明細書に記載するならびに配列番号：2 2 および配列番号：2 7 に提示するアミノ酸配列データ、ならびに本明細書および請求項に示す活性のプロフィールを有するタンパク質にわたる。従って、実質的に等価のまたは改変された活性を提示するタンパク質は、同様に考えられる。これらの修飾は、例えば部位特異的突然変異誘発により得られる修飾のような計画的なものであることがあり、またはこの複合体の生産体である宿主における突然変異によって得られるものもしくはこの指名サブユニットのような偶発的なものであることがある。また、用語「1 2 4 抗体」および「m A b 1 2 4」は、本明細書に具体的に列挙するタンパク質ならびに実質的に相同性の類似体および対立遺伝子変種を、これらの範囲内に含むことを、意図したものである。

【0 1 2 1】

用語「1133抗体」および「mAb1133」、ならびに具体的に列挙しない任意の変異体は、本明細書で交換可能に用いることがあり、ならびに本出願および請求項を通して用いる場合、単数または多数のタンパク質を含むタンパク質性材料を指し、ならびに本明細書に記載するならびに配列番号：32および配列番号：37に提示するアミノ酸配列データ、ならびに本明細書および請求項に示す活性のプロフィールを有するタンパク質にわたる。従って、実質的に等価のまたは改変された活性を提示するタンパク質は、同様に考えられる。これらの修飾は、例えば部位特異的突然変異誘発により得られる修飾のような計画的なものであることがあり、またはこの複合体の生産体である宿主における突然変異によって得られるものもしくはこの指名サブユニットのような偶発的なものであることがある。また、用語「11133抗体」および「mAb11133」は、本明細書に具体的に列挙するタンパク質ならびに実質的に相同性の類似体および対立遺伝子変種を、これらの範囲内に含むことを、意図したものである。

10

【0122】

本明細書に記載するアミノ酸残基は、「L」異性体型であることが好ましい。しかし、免疫グロブリン結合の望ましい機能特性がこのポリペプチドにより保持される限り、「D」異性体型の残基で任意のL-アミノ酸残基を置換することができる。NH₂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指す。COOHは、ポリペプチドのカルボキシ末端に存在する遊離カルボキシ基を指す。標準的なポリペプチド命名法、J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969)に準拠して、アミノ酸残基についての略語を以下の対応表に示す：

20

【0123】

【表1】

対応表

1文字	記号	3文字	アミノ酸
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	リシン
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

30

40

すべてのアミノ酸残基配列が、本明細書では、この左右の向きがアミノ末端からカルボキシ末端への従来の方向である式によって表われてい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点または終点のダッシュが、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。本明細書において代わる代わる現れることがある3文字および1文字表記を相関させるために上の表を提示する。

【0124】

50

「レプリコン」は、インピボでDNA複製の独立単位として機能する、即ち、この独自制御下で複製できる、任意の遺伝要素（例えば、プラスミド、染色体、ウイルス）である。

【0125】

「ベクター」は、別のDNAセグメントを取り付けて、この取り付けられたセグメントの複製を引き起こすことができるレプリコン、例えばプラスミド、ファージまたはコスミド、である。

【0126】

「DNA分子」は、この一本鎖形態または二本鎖ヘリックスのいずれかでの、重合形態のデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミジン、またはシトシン）を指す。この用語は、該分子の一次および二次構造のみを指し、これをいずれの特定の三次形態にも限定しない。従って、この用語は、なかんずく、線状DNA分子（例えば、制限断片）、ウイルス、プラスミドおよび染色体において見つけられる二本鎖DNAを含む。特定の二本鎖DNA分子の構造を論じる際、非転写DNA鎖（即ち、mRNAに相同性の配列を有する鎖）に沿って5'から3'方向でもっぱら配列を与える通常の慣習に従って本明細書に配列を記載することがある。

10

【0127】

「複製起点」は、DNA合成に関与するDNA配列を指す。

【0128】

DNA「コーディング配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれたとき、インピボでポリペプチドに転写および翻訳される二本鎖DNA配列である。コーディング配列の境界は、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められる。コーディング配列としては、原核配列、真核mRNAからのcDNA、真核（例えば、哺乳動物）DNAからのゲノムDNA配列、およびさらに合成DNA配列が挙げられるが、これらに限定されない。ポリアデニル化シグナルおよび転写終結配列は、通常、コーディング配列に対して3'に位置するであろう。

20

【0129】

転写および翻訳制御配列は、宿主細胞におけるコーディング配列の発現に備える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、およびこれらに類するもの、である。

30

【0130】

「プロモーター配列」は、細胞内でRNAポリメラーゼに結合することができるおよび下流（3'方向）コーディング配列の転写を開始させることができるDNA調節領域である。本発明を定義する目的で、プロモーター配列は、バックグラウンドより上の検出可能なレベルで転写を開始させるために必要な最低数の塩基または要素を含むように、転写開始部位によってこの3'末端で結合され、上流（5'方向）にわたる。プロモーター配列内には、転写開始部位（従来、ヌクレアーゼS1でのマッピングによって定義される。）およびRNAポリメラーゼの結合に責任を負うタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）があるであろう。真核プロモーターは、常にではないが、多くの場合、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含有する。原核プロモーターは、-10および-35コンセンサス配列に加えて、Shinc Dalgarno配列を含有する。

40

【0131】

「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。コーディング配列は、RNAポリメラーゼが該コーディング配列をmRNAに転写し、その後、これが、該コーディング配列によってコードされたタンパク質に翻訳されるとき、細胞内の転写および翻訳制御配列の「制御下」にある。

【0132】

「シグナル配列をコーディング配列の前に含めることができる。この配列は、ポリペプチドを細胞表面に向けるようにまたはポリペプチドを培地に分泌するように宿主細胞に通信するシグナルペプチド、ポリペプチドに対してN末端をコードし、このシグナルペプチ

50

ドは、該宿主細胞により、このタンパク質がこの細胞を離れる前に、クリッピングされる。原核生物および真核生物由来の様々なタンパク質に関連してシグナル配列を見つけることができる。

【0133】

本発明のプロープに言及する際に本明細書において用いる場合の用語「オリゴヌクレオチド」は、2つ以上、好ましくは3つ以上、のリボヌクレオチド、で構成された分子と定義する。この正確なサイズは、多くの要因に依存し、該要因もまた、このオリゴヌクレオチドの最終的な機能および用途に依存するであろう。

【0134】

本明細書において用いる場合の用語「プライマー」は、核酸鎖に相補的であるプライマー伸長産物の合成を誘導する条件下に、即ち、ヌクレオチドおよび誘導剤、例えばDNAポリメラーゼ、の存在下、ならびに適する温度およびpHに置かれたとき、合成の開始点として作用することができる、精製制限消化において自然に発生するものであろうと、合成生産されたものであろうと、オリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、一本鎖であることがあり、または二本鎖であることがあり、および誘導剤の存在下で所望の伸長産物の合成を始動するために十分な長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマー源、およびこの方法の使用をはじめとする多くの要因に依存するであろう。例えば、診断用途については、ターゲット配列の複雑さに依存して、オリゴヌクレオチドプライマーは、概して15 - 25以上のヌクレオチドを含有するが、より少ないヌクレオチドを含有することもある。

【0135】

本明細書におけるプライマーは、特定のターゲットDNA配列の異なる鎖に「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、これらそれぞれの鎖とハイブリダイズするために十分に相補的でなければならないことを意味する。従って、プライマー配列がテンプレートの正確な配列を反映する必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチド断片をプライマーの5'端に付けることができ、このプライマー配列の残部は、前記鎖に相補的である。または、非相補的塩基またはより長い配列をプライマーに散在させることができるが、但し、このプライマー配列が、前記鎖の配列とハイブリダイズし、こ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ために十分な、前記鎖の配列との相補性を有することを条件とする。

【0136】

本明細書において用いる場合、用語「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」は、細菌酵素であって、これらのそれぞれが二本鎖DNAを特定のヌクレオチド配列でまたは付近で切断するものを指す。

【0137】

細胞は、外因性または異種DNAにより、このようなDNAが該細胞内に導入されているとき、「形質転換」されている。前記形質転換DNAは、前記細胞のゲノムを構成する染色体DNAに組み込まれている（共有結合で連結されている。）ことがあり、または組み込まれていないことがある。例えば、原核細胞、酵母および哺乳動物細胞では、形質転換DNAは、プラスミドなどのエピソード要素上に維持されることがある。真核細胞に関して、安定に形質転換された細胞は、形質転換DNAが染色体に組み込まれて、染色体複製によって娘細胞により受け継がれるものである。この安定性は、形質転換DNAを含有する娘細胞の集団から成る細胞系またはクローンを確率する真核細胞の能力によって実証される。「クローン」は、有糸分裂により単個細胞または共通祖先から誘導された細胞の集団である。「細胞系」は、何世代にもわたってインビトロで安定な成長ができる初代細胞のクローンである。

【0138】

2つのDNA配列は、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%、および最も好ましくは少なくとも約90または95%）が、これらの核酸配列の被定義長にわたってマッチしているとき、「実質的に相同性」である。実質的に相同性であ

る配列は、配列データバンクにおいて入手できる標準的なソフトウェアを使用して配列を比較することにより、または例えばこの特定のシステムについて定義されたとおりの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で、同定することができる。適切なハイブリダイゼーション条件を定義することは、当該技術分野の技能の範囲内である。例えば、Maniatis et al., 上記文献; DNA Cloning, Vols. I & II, 上記文献; Nucleic Acid Hybridization, 上記文献を参照のこと。

【0139】

本開示配列を有する抗体をコードするが、このような配列に縮重した、本発明の特異的結合メンバー（抗体）をコードするDNA配列も本発明の範囲内であることは、理解されるはずである。「に縮重した」とは、異なる3文字コドンを用いて、特定のアミノ酸を明記することを意味する。それぞれの特定のアミノ酸をコードするために以下のコドンを交換可能に用いることができることは、当該技術分野において周知である。

【0140】

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 (He 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 GUA の GUC 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	
リシン (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	
終結コドン	UAA (オーカー) または UAG (アンバー) または UGA (オーバー)	

上に明記したコドンがRNA配列についてのものであることは、理解されるはずである。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。

【0141】

例えば、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更されるように、本発明の抗体の開示配列を突然変異させることができる。このような突然変異は、一般に、最も少ないヌクレオチド変更を可能にすることにより行うことができる。この種の置換突然変異を非保存的手法で（即ち、特定のサイズまたは特性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に、このコドンを変更することにより）または保存的手法で（即ち、特定のサイズまたは特性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に、このコドンを変更することにより）行って、結果として得られるタンパク質中のアミノ酸を変更することができる。このような保存的変更は

、結果として得られるタンパク質の構造および機能の変化を一般には殆どもたらさない。非保存的変更は、結果として得られるタンパク質の構造、活性または機能を改変する可能性がより高い。本発明は、結果として得られるタンパク質の活性または結合特性を有意に改変しない保存的変更を含有する配列を含むものとするべきである。

【0142】

以下は、アミノ酸の様々な分類の一例である：

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、トリプトファン、メチオニン

非荷電極性 R 基を有するアミノ酸

10

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

荷電極性 R 基を有するアミノ酸 (pH 6.0 で負電荷を有する。)

アスパラギン酸、グルタミン酸

塩基性アミノ酸 (pH 6.0 で正電荷を有する。)

リシン、アルギニン、ヒスチジン (pH 6.0 で)

【0143】

もう1つの分類は、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

【0144】

もう1つの分類は、分子量 (即ち、R 基のサイズ) によるものであり得る：

20

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

30

アスパラギン酸 133

グルタミン 146

リシン 146

グルタミン酸 147

メチオニン 149

ヒスチジン (pH 6.0 で) 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

40

【0145】

特に好ましい置換は、

- 正電荷を維持できるように、Arg の代わりに Lys およびこの逆；
- 負電荷を維持できるように、Asp の代わりに Glu およびこの逆；
- 遊離-OH を維持できるように、Thr の代わりに Ser；ならびに
- 遊離NH₂ を維持できるように Asn の代わりに Gln

である。

【0146】

特に好ましい特性を有するアミノ酸を代用するためにアミノ酸置換を導入することもある。例えば、Cys を、別の Cys とのジスルフィド架橋の潜在的部位に導入すること

50

ができる。Hisを、特に「触媒性の」部位として導入することができる（即ち、Hisは、酸または塩基として作用することができ、ならびに生化学的触媒の中で最も一般的なアミノ酸である。）。誘導する、この特に平面的な構造のため、Proを導入することができる。（タンパク質構造内で3回転）。

【0147】

2つのアミノ酸配列は、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%、および最も好ましくは少なくとも90または95%）が同一である、または保存的置換を表すとき、「実質的に相同性」である。

【0148】

DNA構築物の「非相同性」領域は、より大きなDNA分子内の、自然にはこのより大きな分子に付随して見つけれられない、DNAの同定可能なセグメントである。従って、非相同性領域が哺乳動物遺伝子をコードするとき、この遺伝子は、この供給源生物のゲノム内ではこの哺乳動物ゲノムDNAに隣接していないDNAに、通常、隣接しているであろう。相同性コーディング配列のもう1つの例は、コーディング配列これ自体が、自然には見つけれられない構築物（例えば、ゲノムコーディング配列がイントロンを含有するcDNA、または天然遺伝子とは異なるコドンをもつ合成配列）である。対立遺伝子変異または自然発生突然変異事象は、本明細書において定義する場合のDNAの非相同性領域を生じさせない。

【0149】

「医薬的に許容される」というフレーズは、生理的に許容可能であり、ヒトに投与したときアレルギーまたは類似した有害反応、例えば急性胃蠕動、めまいおよびこれらに類するものを一般に生じさせない、分子エンティティーおよび組成物を指す。

【0150】

「治療有効量」というフレーズは、ターゲット細胞集団、癌細胞群もしくは腫瘍の成長もしくは進行もしくは有糸分裂活性、または病態の他の特徴の臨床的に有意な変化を予防するために、および好ましくは少なくとも約30パーセント、好ましくは少なくとも50パーセント、好ましくは少なくとも70パーセント、好ましくは少なくとも80パーセント、好ましくは少なくとも90%減少させるために十分な量を意味するために本明細書では用いる。例えば、EGFR活性化度、またはEGFR陽性細胞の、特に、抗体または結合メンバー活性もしくは陽性細胞の、活性もしくは量を減少させることができる。

【0151】

DNA配列は、発現制御配列に、該発現制御配列が該DNA配列の転写および翻訳を制御および調節するとき、「作動するように連結されている」。用語「作動するように連結される」は、発現制御配列の制御下でのDNA配列の発現およびDNA配列によってコードされた所望の産物の生産を可能にするために、発現されるDNA配列の前に適切な開始シグナル（例えば、ATG）を有することおよび正しいリーディングフレームを維持することを含む。組換えDNA分子に挿入することを望む遺伝子が、適切な開始シグナルを含有しない場合、このような開始シグナルをこの遺伝子の前に挿入することができる。

【0152】

用語「標準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と洗浄の両方について5×SSCおよび65℃に実質的に相当する塩および温度条件を指す。しかし、このような「標準ハイブリダイゼーション条件」が、バッファー中のナトリウムおよびマグネシウムの濃度、ヌクレオチド配列長および濃度、ミスマッチ率、ホルムアミドのパーセントおよびこれらに類するものをはじめとする、個々の条件に依存することは、当業者には理解されるであろう。ハイブリダイズする二配列が、RNA-RNAであるのか、DNA-DNAであるのか、またはRNA-DNAであるのかも、「標準ハイブリダイゼーション条件」の決定において重要である。このような標準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が一般に予測または確定T_mより10-20℃下であり、所望される場合にはより高いストリンジェンシーの洗浄を伴う周知の原則に従って、当業者によ

10

20

30

40

50

って容易に決定される。

【0153】

本発明は、腫瘍形成性、高増殖性または異常細胞において見つけれられるEGFRエピトープであって、前記細胞において異常な翻訳後修飾に基づいて強化されまたははっきりわかり、正常または野生型細胞では検出できないエピトープを認識する、新規特異的結合メンバー、特に抗体またはこの断片（免疫原性断片を含む。）を提供する。特別な、しかし非限定的な、実施形態において、前記結合メンバー、例えば抗体は、単純な炭水化物修飾または早期グリコシル化に基づいて強化されまたははっきりわかり、複雑な炭水化物修飾またはグリコシル化の存在下では低減されるまたははっきりわからない、EGFRエピトープを認識する。前記特異的結合メンバー、例えば抗体またはこの断片は、過発現の不在下および正常なEGFR翻訳後修飾の存在下では正常または野生型EGFRエピトープを含有する正常または野生型細胞に結合しない、または該細胞を認識しない。

10

【0154】

本発明は、腫瘍形成性、高増殖性または異常細胞において顕示されるEGFRエピトープであって、前記細胞において強化され、露呈され、またははっきりわかり、正常または野生型細胞では検出できないエピトープ、特にEGFRペプチド（₂₈₇CGADSYEM EEDGV RKC₃₀₂（配列番号：14））を認識する、新規抗体806、175、124、1133、ch806およびhu806ならびにこれらの断片（免疫原性断片を含む。）を提供する。特別な、しかし非限定的な、実施形態において、前記抗体は、単純な炭水化物修飾または早期グリコシル化に基づいて強化されまたははっきりわかり、複雑な炭水化物修飾またはグリコシル化の存在下では低減されるまたははっきりわからない、EGFRエピトープを認識する。前記抗体またはこの断片は、過発現、増幅、または腫瘍形成性事象の不在下では、正常または野生型EGFRエピトープを含有する正常または野生型細胞に結合しない、または該細胞を認識しない。

20

【0155】

本発明の特別な態様において、および上で述べたように、本発明者らは、増幅された野生型EGFRおよびde2-7 EGFRを特異的に認識し、しかもなお、de2-7 EGFR突然変異の特有の接合点ペプチドとは異なるエピトープに結合する、新規モノクローナル抗体806、175、124、1133、ch806およびhu806を発見した。加えて、mAb806、mAb175、mAb124、mAb1133、およびhu806は、神経膠腫細胞の細胞表面で発現される正常、野生型EGFRを認識しないが、ELISAプレートの表面に固定されたEGFRの細胞外ドメインに結合し、このことは、ポリペプチド態様を有する高次構造エピトープを示す。

30

【0156】

重要なことに、mAb806、mAb175、mAb124、mAb1133、ch806およびhu806は、殆どの他の正常組織においてより高いレベルの内因性wtEGFRを発現するが、EGFRが過発現または増幅されない、肝臓および皮膚などの、正常組織に有意に結合しない。従って、mAb806、mAb175、mAb124、mAb1133、およびhu806は、de2-7 EGFRおよび増幅されたEGFRを認識するが、正常な、野生型EGFR、またはde2-7 EGFRに特有である特有の接合点ペプチドを認識しない、新規の有用な特異性を明示する。好ましい態様において、本発明のmAb806、mAb175、mAb124、mAb1133、およびhu806は、図14Bおよび15B；74Bおよび75B；51Bおよび51D；52Bおよび52D；ならびに55Aおよび55Bにそれぞれ図示するVHおよびVL鎖CDRドメインアミノ酸配列（それぞれ、配列番号：2および4、129および134、22および27、32および37、ならびに42および47；配列番号：163および164のhu806 VH鎖シグナルペプチドおよびVH鎖配列をそれぞれ含む配列番号：42；ならびに配列番号：165および166のhu806 VL鎖シグナルペプチドおよびVL鎖配列をそれぞれ含む配列番号：47）を含む。

40

【0157】

50

もう1つの態様において、本発明は、175抗体のVHおよびVL鎖配列（それぞれ、配列番号：129および134）を有する抗体の少なくとも10%が、de2-7 EGF Rへの結合から、ELISAアッセイにおいてこのような抗体との競合により遮断される条件下で、175抗体と競合することができる抗体を提供する。上に示したように、抗イディオタイプ抗体がここでは考えられる。

【0158】

本発明は、増幅されたEGFRを発現するまたはde2-7 EGF Rを発現する細胞中に存在し、正常なまたは野生型EGFRを発現する細胞において、特に正常な翻訳後修飾の存在下で、検出できない、EGFRエピトープを認識する、特異的結合メンバー、特に抗体またはこれらの断片に関する。

10

【0159】

本発明の抗体の追加の非限定的観察または特徴は、早期グリコシル化または単純炭水化物修飾に特有である、高マンノース基の存在下でのこれらのエピトープのこれらの認識であることを、さらに述べ、本明細書において実証する。例えば、改変されたまたは異常なグリコシル化は、抗体エピトープの存在および/もしくは認識を助長する、または抗体エピトープの一部を含む。

【0160】

グリコシル化は、オリゴ糖の付加による、糖タンパク質と呼ばれるタンパク質の翻訳後修飾を含む、および包含する。特にN結合型オリゴ糖およびO結合型オリゴ糖をはじめとする、オリゴ糖は、糖タンパク質におけるグリコシル化部位に付加される。N結合型オリゴ糖は、特にAsn残基が配列N-X-S/T（この場合のXは、ProおよびAspではあり得ない。）で存在する場合、Asn残基に付加され、および糖タンパク質において見つけられる最も一般的なものである。N結合型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（一般に、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成るが小胞体（ER）において最初に形成される。その後、この高マンノース型糖タンパク質は、ERからゴルジに輸送され、そこでさらにこのオリゴ糖のプロセッシングおよび修飾が、通常、発生する。O結合型オリゴ糖は、SerまたはThr残基のヒドロキシル基に付加される。O結合型オリゴ糖の場合、Nアセチルグルコサミンが、ERにおいてアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼによりSerまたはThr残基に最初に移送される。その後、このタンパク質は、ゴルジに移動し、そこでさらなる修飾および連鎖伸長が発生する。

20

30

【0161】

本発明の特別な態様において、および上で述べたように、本発明者らは、増幅された野生型EGFRおよびde2-7 EGF Rを特異的に認識するがこのde2-7 EGF R突然変異の特有の接合点ペプチドとは異なるエピトープに結合する、mAb806（およびこのキメラch806）、mAb175、mAb124、mAb1133およびhu806と呼ぶ抗体により本明細書において例示する、新規モノクローナル抗体を発見した。本発明の抗体は、増幅されたEGFRおよび（本明細書においてde2-7突然変異により例示する）突然変異体EGFRを含めて、過発現されたEGFRを、特に、異常な翻訳後修飾に基づいて、特異的に認識する。加えて、これらの抗体は、神経膠腫細胞の細胞表面で発現される正常、野生型EGFRを認識しないが、ELISAプレートの表面に固定されたEGFRの細胞外ドメインに結合し、このことは、ポリペプチド態様を有する高次構造エピトープを示す。重要なことに、これらの抗体は、殆どの他の正常組織におけるより高いレベルの内因性wtEGFRを発現するが、EGFRを過発現および増幅しない肝臓および皮膚などの正常組織に有意に結合しない。従って、これらの抗体は、de2-7 EGF Rおよび増幅されたEGFRを認識するが、正常、野生型EGFR、またはde2-7 EGF Rの特徴である特有の接合点ペプチドを認識しない、新規の有用な特異性を明示する。

40

【0162】

好ましい態様において、前記抗体は、本発明者らが同定および特性づけした抗体の特徴

50

、特に、増幅された E G F R および d e 2 - 7 E G F R を認識する特徴を有するものである。特に好ましい態様において、前記抗体は、m A b 8 0 6、m A b 1 7 5、m A b 1 2 4、m A b 1 1 3 3、および h u 8 0 6、またはこれらの活性断片である。さらなる好ましい態様において、本発明の抗体は、図 1 6 および 1 7 ; 7 4 B および 7 5 B ; 5 1 B および 5 1 D ; 5 2 B および 5 2 D ; ならびに 5 5 A および 5 5 B にそれぞれ図示する、V H および V L 鎖アミノ酸配列を含む。

【 0 1 6 3 】

好ましくは、前記特異的結合メンバーまたは抗体のエピトープは、成熟正常または野生型 E G F R 配列の残基 2 7 3 - 5 0 1 を含む領域内に位置し、および好ましくは、前記エピトープは、成熟正常または野生型 E G F R 配列の残基 2 8 7 - 3 0 2 (配列番号 : 1 4) を含む。従って、E G F R 配列の残基 2 7 3 - 5 0 1 を含む、および E G F R 配列の残基 2 8 7 - 3 0 2 (配列番号 : 1 4) を含む領域内に位置するエピトープで d e 2 - 7 E G F R に結合する特異的結合タンパク質、例えば抗体も提供する。前記エピトープは、当業者に公知の任意の従来のエピトープマッピング技術によって決定することができる。または、残基 2 7 3 - 5 0 1 および 2 8 7 - 3 0 2 (配列番号 : 1 4) をコードする D N A 配列を消化し、得られた断片を適する宿主において発現させることができよう。上で述べたように抗体結合を決定することができる。

10

【 0 1 6 4 】

特に、前記メンバーは、成熟正常または野生型 E G F R の残基 2 7 3 - 5 0 1 を含む、およびより具体的には残基 2 8 7 - 3 0 2 (配列番号 : 1 4) を含む、エピトープに結合するであろう。しかし、同じまたは実質的に同様の反応性パターンを示す他の抗体も本発明の態様を構成する。このことは、配列番号 : 2 および 4 ; 1 2 9 および 1 3 4 ; 2 2 および 2 7 ; 3 2 および 3 7 ; ならびに 4 2 および 4 7 にそれぞれ示す V H および V L 鎖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判定することができる。概して、この比較は、細胞の核標本から作製した二重反復プロットに結合メンバーを結び付けて、結合パターンを直接比較する、ウエスタンブロットを用いて行われるであろう。

20

【 0 1 6 5 】

もう 1 つの態様において、本発明は、m A b 8 0 6 と、このような抗体の 1 つについての V H および V L 鎖配列を有する抗体の少なくとも 1 0 % が、E L I S A アッセイにおいてこのような抗体との競合により d e 2 - 7 E G F R への結合から遮断される条件下で、競合することができる抗体を提供する。上で述べたように、抗イディオタイプ抗体が考えられ、これらを本明細書において例証する。

30

【 0 1 6 6 】

もう 1 つの態様において、本発明は、m A b 1 7 5、m A b 1 2 4、および / または m A b 1 1 3 3 と、このような抗体の 1 つについての V H および V L 鎖配列を有する抗体の少なくとも 1 0 % が、E L I S A アッセイにおいてこのような抗体との競合により d e 2 - 7 E G F R への結合から遮断される条件下で、競合することができる抗体を提供する。上で述べたように、抗イディオタイプ抗体が考えられ、これらを本明細書において例証する。

40

【 0 1 6 7 】

もう 1 つの態様において、本発明は、m A b 8 0 6、m A b 1 7 5、m A b 1 2 4、m A b 1 1 3 3 および / または h u 8 0 6 と、このような抗体の 1 つについての V H および V L 鎖配列を有する抗体の少なくとも 1 0 % が、E L I S A アッセイにおいてこのような抗体との競合により d e 2 - 7 E G F R への結合から遮断される条件下で、競合することができる抗体を提供する。上で述べたように、抗イディオタイプ抗体が考えられ、これらを本明細書において例証する。

【 0 1 6 8 】

成熟野生型 E G F R の残基 2 7 3 - 5 0 1 を含むおよびさらに具体的には残基 2 8 7 - 3 0 2 (配列番号 : 1 4) を含むエピトープから本質的に成る単離されたポリペプチドが、本発明のもう 1 つの態様を構成する。本発明のペプチドは、診断アッセイまたはキット

50

において、および抗腫瘍または抗癌ワクチンを含めて、治療的にまたは予防的に、特に有用である。従って、本発明のペプチド組成物は、医薬組成物および免疫原性組成物を含む。

【0169】

診断および治療用途

本発明の特異的結合メンバー、特に抗体またはこれらの断片、の特有の特性であって、それにより該結合メンバー（単数または複数）が、腫瘍形成性、高増殖性または異常細胞において見つけれられるおよび正常または野生型細胞では検出できないEGFRエピトープを認識する、ならびに該エピトープが、異常な翻訳後修飾に基づいて強化されるまたははっきりわかる、ならびに前記メンバー（単数または複数）が、de2-7 EGFRおよび増幅されたEGFRに結合するがwtEGFRに結合しないという特性は、以前から知られているEGFR抗体で見られることがある正常組織取り込みに関連した問題を伴わない、多数の腫瘍形成性細胞タイプおよび腫瘍タイプ、例えば頭頸部、乳房、肺、膀胱または前立腺腫瘍および神経膠腫を同定する、特性づけする、ターゲットにするおよび治療する、減少させるまたは排除する、診断および治療用途をもたらす。従って、（例えば、突然変異体または変異体EGFRの増幅または発現により）EGFRを過発現する細胞、特に、異常な翻訳後修飾を明示するものを、本発明の結合メンバー（単数または複数）、特に抗体（単数もしくは複数）もしくはこの（これらの）断片を利用して、認識する、単離する、特性づけする、ターゲットにする、および治療するまたは排除することができる。

10

20

【0170】

本発明のさらなる態様において、mAb806、mAb175、mAb124、mAb1133および/またはhu806の投与を含む、腫瘍、癌性状態、前癌性状態、および高増殖性細胞成長に関連したまたは高増殖性細胞成長の結果として生ずる任意の状態を治療する方法を提供する。

【0171】

従って、本発明の抗体は、EGFR過発現、特に増幅、および/またはEGFR突然変異、特にde2-7EGFRが存在する腫瘍または細胞を染色するまたは別様に認識することにより、EGFR腫瘍または腫瘍形成性細胞の性質を特異的に類別することができる。さらに、mAb806（およびキメラ抗体ch806）、mAb175、mAb124、mAb1133およびhu806によって例示されるような、本発明の抗体は、増幅されたEGFRを含有する腫瘍に対しておよびde2-7 EGFR陽性異種移植片に対して有意なインビボ抗腫瘍活性を明示する。

30

【0172】

上で略述したように、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されたときのEGFRの腫瘍関連形態（de2-7 EGFRおよび増幅されたEGFR）を認識し、正常、野生型受容体を認識しないことを発見した。抗体認識は、EGFR遺伝子の過発現を呈示する細胞において発現されるEGFRの異常な翻訳後修飾（例えば、特有のグリコシル化、アセチル化またはリン酸化変異体）に依存すると考えられる。

40

【0173】

下で説明するように、本発明の抗体を治療法の研究において使用し、これらは、過発現している（例えば、増幅された）ヒト腫瘍のEGFR異種移植片およびヒトde2-7 EGFR発現性異種移植片の増殖を阻害することならびにこのような腫瘍内で有意な壊死を誘導することが明らかになった。

【0174】

さらに、本発明の抗体は、予防的モデルにおいて頭蓋内腫瘍の成長を阻害する。このモデルは、de2-7 EGFRを発現する神経膠腫細胞をヌードマウスに注射すること、および次に、抗体を同日にまたは1から3日以内に、場合により反復投与で、頭蓋内注射することを含む。抗体の用量は、適切には約10 μgである。抗体を注射したマウスを対照と比較し、治療したマウスの生存率が有意に増加されたことが判明した。

50

【 0 1 7 5 】

従って、本発明のさらなる態様において、本発明の特異的結合メンバーの投与を含む、腫瘍、癌性状態、前癌性状態、および高増殖性細胞成長に関連したまたは高増殖性細胞成長の結果として生ずる任意の状態を治療する方法を提供する。

【 0 1 7 6 】

本発明の抗体は、ヒトまたは動物被験者における腫瘍、特に上皮性腫瘍、の診断および治療方法において使用されるように設計されている。これらの腫瘍は、神経膠腫、乳房、肺、前立腺、頭部または頸部腫瘍をはじめとする（しかし、これらに限定されない）任意のタイプの一次または二次充実性腫瘍であり得る。

【 0 1 7 7 】

10

結合メンバーおよび抗体産生

ハイブリドーマによってモノクローナル抗体を作るための一般的な方法論は周知である。融合以外の技術、例えば、発癌性DNAでのBリンパ球の直接形質転換、またはE p s t e i n - B a r r ウイルスでのトランスフェクションによって、不死、抗体生産細胞系を作ることにもできる。例えば、M . S c h r e i e r e t a l . , 「Hybridoma Techniques」(1980); Hammering et al. , 「Monoclonal Antibodies And T cell Hybridomas」(1981); Kennett et al. , 「Monoclonal Antibodies」(1980)を参照のこと; 米国特許番号4,341,761; 米国特許番号4,399,121; 米国特許番号4,427,783; 米国特許番号4,444,887; 米国特許番号4,451,570; 米国特許番号4,466,917; 米国特許番号4,472,500; 米国特許番号4,491,632; および米国特許番号4,493,890も参照のこと。

20

【 0 1 7 8 】

E F G Rに対して生産されたモノクローナル抗体のパネルを、様々な特性、即ちアイソタイプ、エピトープ、親和性などについてスクリーニングすることができる。E F G Rまたはこのサブユニットの活性を模倣するモノクローナル抗体は、特に興味深い。このようなモノクローナル抗体は、特異的結合メンバー活性アッセイで容易に同定することができる。天然または組換え特異的結合メンバーの免疫親和性精製が可能であるときには、高親和性抗体も有用である。

30

【 0 1 7 9 】

ポリクローナル抗E F G R抗体を生産するための方法は、当該技術分野において周知である。N e s t o rらの米国特許番号4,493,795参照。有用な抗体分子のF a bおよび/またはF (a b ') 2部分を概して含有するモノクローナル抗体を、Antibodies - A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds. , Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988) (これは、参照により本明細書に組み込まれる。)に記載されているハイブリドーマ技術を用いて調製することができる。簡単に言うと、モノクローナル抗体組成物が生産されるハイブリドーマを形成するために、適切なE G F Rでの高免疫処置を施した哺乳動物の脾臓から得たリンパ球と黒色腫または他の自己不滅化細胞系を融合させる。

40

【 0 1 8 0 】

典型的には、ポリエチレングリコール(P E G)6000を使用して脾細胞を黒色腫細胞と融合させる。融合したハイブリッドを、H A Tに対するこれらの感度により選択する。本発明の実施に有用なモノクローナル抗体を生産するハブリドーマを、本発明の抗体または結合メンバーと免疫反応するこれらの能力、およびターゲット細胞における指定腫瘍形成または高増殖活性を阻害するこれらの能力によって同定する。

【 0 1 8 1 】

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抗体ハイブリドーマ培養を開始させることにより、本発明の実施に有用なモノ

50

クローナル抗体を生産することができる。ハイブリドーマが抗体分子を培地に分泌するために十分な条件下でおよび期間にわたって培養物を維持する。その後、抗体含有培地を回収する。その後、周知の技術により抗体分子をさらに単離することができる。

【0182】

これらの組成物の調製に有用な培地は、当該技術分野において周知でもあり、市販されてもおり、ならびに合成培地、近交系マウスおよびこれらに類するものを含む。例示的合成培地は、4.5 g m / L グルコース、20 mm グルタミン、および20%ウシ胎仔血清を補足した、ダルベッコ最小必須培地(DMEM; Dulbecco et al., Virol. 8:396(1959))である。例示的近交系マウス株は、Balb/cである。

10

【0183】

モノクローナル抗EGFR抗体を生産するための方法も当該技術分野において周知である。Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953(1983)を参照のこと。典型的に、抗EGFRモノクローナル抗体を生産するための、以前に記載されている手順では、EGFRまたはペプチド類似体を単独で使用するか、免疫原としての免疫原性担体にコンジュゲートさせる。腫瘍形成、異常または高増殖性細胞中に存在するEGFRと免疫反応する抗体を生産する能力についてこれらのハイブリドーマをスクリーニングする。他の抗EGFR抗体としては、Genmab/Medar exからのHuMAX-EGFr抗体、108抗体(ATCC HB9764)および米国特許番号6,217,866、ならびにSchering AGからの抗体14E1(米国特許番号5,942,602)が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0184】

組換え結合メンバー、キメラ、二重特異性および断片

一般に、それぞれ配列番号:2および4;129および134;22および27;32および37;ならびに42および47のCDR1領域として実質的に示すようなアミノ酸配列を含むCDR1領域は、腫瘍抗原への該CDR1領域の結合を可能にする構造内に保持されるであろう。例えば配列番号:4のCDR1領域の場合、このCDR1領域は、好ましくは、配列番号:4のVL鎖領域によって(および他の列挙した配列についても同様に)保持される。

30

【0185】

一般に、それぞれ配列番号:2および4;129および134;22および27;32および37;ならびに42および47のCDR2領域として実質的に示すようなアミノ酸配列を含むCDR2領域は、腫瘍抗原への該CDR2領域の結合を可能にする構造内に保持されるであろう。例えば配列番号:4のCDR2領域の場合、このCDR2領域は、好ましくは、配列番号:4のVL鎖領域によって(および他の列挙した配列についても同様に)保持される。

【0186】

一般に、それぞれ配列番号:2および4;129および134;22および27;32および37;ならびに42および47のCDR3領域として実質的に示すようなアミノ酸配列を含むCDR3領域は、腫瘍抗原への該CDR3領域の結合を可能にする構造内に保持されるであろう。例えば配列番号:4のCDR3領域の場合、このCDR3領域は、好ましくは、配列番号:4のVL鎖領域によって(および他の列挙した配列についても同様に)保持される。

40

【0187】

「実質的に示すような」とは、本発明のこのCDR領域、例えばCDR3領域が、それぞれ配列番号:2および4;129および134;22および27;32および37;ならびに42および47の指定領域と同一または高相同性であることを意味する。「高相同性の」とは、CDRの1つ以上においてほんの少数の置換、好ましくは1から8、好ましくは1から5、好ましくは1から4、または1から3または1もしくは2の置換

50

がなされていることがあることが考えられる。このような用語は、結果として生ずる抗体が、mAb 806、mAb 175、mAb 124、mAb 1133およびhu 806によって示されるような、本明細書において論ずる抗体クラスの特有の特性を示す限り、CDRに対するランケーションを含むとも考えられる。

【0188】

本発明のCDR、特にCDR3を保持するための構造は、一般に、該CDR領域が、再配列免疫グロブリン遺伝子によってコードされた自然に存在するVHおよびVL鎖抗体可変ドメインのCDR領域に対応する位置にある抗体重もしくは軽鎖配列またはこれらの実質的な部分の構造であろう。免疫グロブリン可変ドメインの構造および位置は、Kabatt, E. A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Edition, US Department of Health and Human Services, 1987、および今ではインターネットで入手できるこの最新版(<http://immu番号bm.e.nwu.edu>)への参照により決定することができる。さらに、当業者には公知であるように、CDR決定を様々な方法で行うことができる。例えば、Kabatt、Chothiaおよび併用ドメイン決定分析を用いることができる。これに関しては、例えば、<http://www.bioinf.org.uk/abs/#cdrid>を参照のこと。

10

【0189】

好ましくは、本発明の抗体におけるVH鎖CDR残基として実質的に示すようなアミノ酸配列は、ヒト重鎖可変ドメインまたはこの実質的な部分におけるものであり、ならびに本発明の抗体におけるVL鎖CDR残基として実質的に示すアミノ酸配列は、ヒト軽鎖可変ドメインまたはこの実質的な部分におけるものである。

20

【0190】

前記可変ドメインは、任意の生殖細胞系もしくは再配列ヒト可変ドメインに由来することがあり、または公知のヒト可変ドメインのコンセンサス配列に基づく合成可変ドメインであることがある。例えば上記段落で定義したような本発明のCDR3由来の配列を、組換えDNA技術を用いて、CDR3領域を欠く可変ドメインのレパートリーに導入することができる。

【0191】

例えば、Marksら(Bio/Technology, 1992, 10: 779-783)には、可変ドメインエリアの5'端に向けられたまたは可変ドメインエリアの5'端に隣接したコンセンサスプライマーを、ヒトVH遺伝子の第三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共に用いて、CDR3を欠くVH可変ドメインのレパートリーを生じさせる、抗体可変ドメインのレパートリーを生産する方法が記載されている。Marksらは、このレパートリーを特定の抗体のCDR3と組み合わせる方法をさらに記載している。類似の技術を用いて、本発明のCDR3由来配列を、CDR3を欠くVHまたはVLドメインのレパートリーとシャフリングすることができ、シャフリングされた完全VHまたはVLドメインを同源VLまたはVHドメインと組み合わせ、本発明の特異的結合メンバーを生じさせることができる。その後、WO 92/01047のファージディスプレイなどの適する宿主系においてこのレパートリーを提示させて、適する特異的結合メンバーを選択することができる。レパートリーは、 10^4 以上の個々のメンバーからの、例えば 10^6 から 10^8 または 10^{10} のメンバーからの、いずれかから成り得る。

30

40

【0192】

類似のシャフリングまたはコンビナトリアル技術もStemmer(Nature, 1994, 370: 389-391)によって開示されており、彼は、p-ラクタマーゼ遺伝子に関しての技術を記載しているが、このアプローチを抗体の産生に用いることができると述べている。

【0193】

さらなる選択肢は、例えばmAb 806 VHまたはVL遺伝子のランダム突然変異誘

50

発を用いて全可変ドメイン内で突然変異を発生させて、本発明のCDR3由来配列を有する新規VHまたはVL領域を生じさせることである。このような技術は、Gramら(1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580)によって記載されており、彼は、エラープローンPCRを用いた。

【0194】

用いることができるもう1つの方法は、VHまたはVL遺伝子のCDR領域に対する突然変異誘発を誘導することである。このような技術は、Barbassら(1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813)およびSchierら(1996, J. Mol. Biol. 263:551-567)によって開示されている。

10

【0195】

上に記載したすべての技術は、これら自体、公知であり、本質的に、本発明の一部を構成しない。当業者は、当該技術分野において常例的な方法論を用いて本発明の特異的結合メンバーを生じさせるためにこのような技術を用いることができるであろう。

【0196】

免疫グロブリン可変ドメインの実質的な部分は、少なくとも3つのCDRをこれらの介在フレームワーク領域と共に含むであろう。好ましくは、前記部分は、第一および第四のフレームワーク領域のいずれかまたは両方の少なくとも約50%も含むであろう。前記50%は、第一フレームワーク領域のC末端50%および第四フレームワーク領域のN末端50%である。可変ドメインの実質的な部分のN末端またはC末端における追加の残基は、自然に存在する可変ドメイン領域に通常は随伴されないものであることがある。例えば、組換えDNA技術によってなされる本発明の特異的結合メンバーの構築は、クローニングまたは他の操作工程を助長するために導入されるリンカーによりコードされたNまたはC末端残基の導入を生じさせる結果となることがある。他の操作工程としては、免疫グロブリン重鎖を含むさらなるタンパク質配列、他の可変ドメイン(例えば、ダイアボディーの生産において)、またはさらに詳細に下で論じるようなタンパク質標識に本発明の可変ドメインを接合するためのリンカーの導入が挙げられる。

20

【0197】

本発明の好ましい態様において、それぞれ配列番号:2および4;129および134;22および27;32および37;ならびに42および47に実質的に示す配列に基づく結合ドメインのペアを含む特異的結合メンバーは好ましいが、これらの配列に基づく単一結合ドメインが本発明のさらなる態様を構成する。VH鎖における実質的に示した配列に基づく結合ドメインの場合、このような結合ドメインは、免疫グロブリンVHドメインが特異的様式でターゲット抗原に結合できることは公知であるので、腫瘍抗原のターゲティング剤として使用することができる。

30

【0198】

一本鎖特異的結合ドメインのいずれかの場合、これらのドメインは、本明細書に開示するmAb806、ch806、mAb175、mAb124、mAb1133およびhu806抗体と同様に良好なまたは等しいインビボ特性を有する2ドメイン特異的結合メンバーを形成することができる相補ドメインについてスクリーニングするために使用することができる。

40

【0199】

この使用は、米国特許番号5,969,108に開示されてい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用いるファージディスプレイスクリーニング法によって果たすことができ、これらの方法では、HまたはL鎖クローンのいずれかを含有する個々のコロニーを用いて、他方の鎖(LまたはH)をコードするクローンの完全ライブラリーを感染させ、結果として得られる二本鎖特異的結合メンバーを、この参考文献に記載されているものなどのファージディスプレイ技術に従って選択する。この技術は、Marksら、同書にも開示されている。

【0200】

50

本発明の特異的結合メンバーは、抗体定常領域またはこれらの一部をさらに含むことがある。例えば、V L鎖配列に基づく特異的結合メンバーを、ヒトC kまたはC λ鎖、好ましくはC λ鎖を含む抗体軽鎖定常ドメインにこれらのC末端で取り付けることができる。同様に、V H鎖配列に基づく特異的結合メンバーを、任意の抗体アイソタイプ、例えばI g G、I g A、I g E、I g DおよびI g Mならびに該アイソタイプのサブクラスのいずれか（特にI g G 1、I g G 2 bおよびI g G 4が好ましい。）に由来する免疫グロブリン重鎖のすべてまたは一部にこれらのC末端で取り付けることができる。

【0201】

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もたらし、癌療法、自己免疫疾患、移植片拒絶反応、抗ウイルス予防における認可された製薬試薬としておよび抗血栓薬として抗体を使用する機会を作った（Glennie and Johnson, 2000）。キメラmAb（マウスV領域、ヒトC領域）におよびmAb相補性決定領域（CDR）のみがマウス由来のものであるヒト化試薬にマウスmAbを変換する分子工学の適用は、mAb療法の臨床的成功にとって極めて重要なものであった。この分子工学で作られたmAbは、著しい低減した免疫原性または免疫原性欠如、増加された血清半減期を有し、このmAbのヒトFc部分は、補体の免疫エフェクターおよび細胞毒細胞を動員する可能性を増す（Clark 2000）。臨床投与されたmAbの生体内分布、薬物動態および該mAbに対する免疫応答の任意の誘導の調査は、製剤タンパク質と内因性タンパク質を区別するための分析の開発を必要とする。

10

20

【0202】

前記抗体またはこれらの任意の断片を、任意の細胞毒、細菌または他のもの、例えばシュードモナス（*pseudomonas*）内毒素、リシンもしくはジフテリア毒素にコンジュゲートさせるまたは組換え融合させることもできる。使用する毒素の部分は、全毒素である場合もあり、またはこの毒素の任意の特別なドメインである場合もある。このような抗体-毒素分子は、異なる種類の癌のターゲッティングおよび治療法にうまく用いられている。例えば、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を参照のこと。

30

【0203】

二重および三重特異性多量体を異なるscFv分子の会合によって形成することができ、ならびに腫瘍へのT細胞補充（免疫療法）、ウイルスリターゲッティング（遺伝子療法）のための架橋試薬として、および赤血球凝集剤として（免疫診断）設計されている。例えば、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を参照のこと。

40

【0204】

ヒト免疫グロブリン重および軽鎖の大部分を有するトランスジェニックマウスに免疫処置を施すことによって、完全ヒト抗体を調製することができる。これらのマウスは、当該技術分野において周知であり、このようなマウスの例は、Xenomouse（商標）（Abgenix, Inc.）（米国特許番号6,075,181および米国特許番号6,150,584）、HuMAb-Mouse（商標）（Medarex, Inc./GenPharm）（米国特許番号5,545,806および米国特許番号5,569,825）、TransChromo Mouse（Kirin）およびKM Mouse（Medarex/Kirin）である。

50

【0205】

次に、例えば、標準的なハイブリドーマ技術により、またはファージディスプレイにより、抗体を調製することができる。このとき、これらの抗体は、完全ヒトアミノ酸配列のみを含有するであろう。

【0206】

ヒトライブラリーからのファージディスプレイを用いて、完全ヒト抗体を産生することもできる。ファージディスプレイは、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; ならびにまた、米国特許番号5,885,793および米国特許番号5,969,108)におけるような、当業者に周知の方法を用いて行うことができる。

10

【0207】

治療用抗体および使用

本発明の特異的結合メンバーの、特に腫瘍：血液比およびクリアランス率に関する、インビボ特性は、mAb 806に少なくとも匹敵するであろう。このような特異的結合メンバーをヒトまたは動物被験者に投与すると、 $> 1:1$ のピーク腫瘍対血液比を示すであろう。好ましくは、このような比で、前記特異的結合メンバーは、 $1:1$ より大きい、好ましくは $2:1$ より大きい、さらに好ましくは $5:1$ より大きい腫瘍対器官比も有するであろう。好ましくは、このような比で、前記特異的結合メンバーは、腫瘍部位から離れている器官において、 $< 1:1$ の器官対血液比も有するであろう。これらの比は、投与した特異的結合メンバーの異化および分泌器官を除外する。従って、scFvおよびFabの場合（添付の実施例に示すように）、結合メンバーは、腎臓によって分泌され、他の器官より多くここに存在する。全IgGの場合、クリアランスは、少なくとも一部は肝臓によるであろう。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後、10時間と200時間の間で達成される。さらに詳細には、この比は、無胸腺ヌードマウスの一方の側腹部に皮下形成された約0.2 - 1.0gの腫瘍異種移植片において測定することができる。

20

【0208】

本発明の抗体を検出可能なまたは機能性標識で標識することができる。検出可能な標識としては、放射標識、例えば同位体 ^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 および ^{186}Re が挙げられるがこれらに限定されず、これらを、抗体イメージング技術分野において公知の従来の化学を用いて、本発明の抗体に取り付けることができる。標識としては、蛍光標識、およびMRI・CTイメージング技術分野において従来用いられている標識も挙げられる。さらに、標識としては、特定の同源検出可能部分、例えば標識されたアビジンへの結合により検出することができる化学的部分、例えばビオチンが挙げられる。

30

【0209】

機能性標識は、腫瘍組織の破壊を生じさせるために腫瘍部位をターゲットにするように設計される物質を含む。このような機能性標識としては、腫瘍部位でプロドラッグから活性薬物に変換することができる細胞傷害性薬物、例えば5-フルオロウラシルまたはリシン、および酵素、例えば細菌カルボキシペプチターゼまたはニトロレダクターゼが挙げられる。

40

【0210】

また、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を含む抗体、ならびに前記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生産または活性を調節する薬物は、一定の診断用途を有することができ、例えば、癌、前癌病変、高増殖性細胞成長に関連したもしくは起因する状態、またはこれらに類するものなどの状態を検出および/

50

または測定する目的で利用することができる。例えば、前記特異的結合メンバー、抗体またはこれらのサブユニットは、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の公知の技術により、様々な培養基においてこ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の両方を生産するために使用することができる。同様に、本発明の特異的結合メンバーの活性（単数または複数）を模倣するまたは該活性に拮抗する小分子を発見または合成することができ、これらを診断および/または治療プロトコルにおいて使用することができる。

【0211】

放射標識された特異的結合メンバー、特に抗体およびこれらの断片は、インビトロ診断技術においておよびインビボ放射線イメージング技術において、および放射免疫療法において有用である。インビボイメージングの場合、本発明の特異的結合メンバーを、放射性同位体（単数または複数）ではなく、磁気共鳴画像向上剤をはじめとする（しかし、これに限定されない）イメージング剤にコンジュゲートさせることがあり、この場合、例えば、キレート形成基（*chelating group*）によってより多数の常磁性イオンを抗体分子に負荷する。キレート形成基の例としては、EDTA、ポリフィリン、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、ランタニウム、ホルミウムおよびエルビウムが挙げられる。本発明のさらなる態様において、放射標識された特異的結合メンバー、特に抗体およびこれらの断片、特に放射免疫コンジュゲートは、放射免疫療法において、特に、癌療法のための放射標識抗体として、有用である。なお、さらなる態様において、放射標識された特異的結合メンバー、特に抗体およびこれらの断片は、放射免疫ガイド外科手術技術において有用であり、この場合、これらは、癌細胞、前癌性細胞、腫瘍細胞および高増殖性細胞の存在および/または位置を、このような細胞を除去するための外科手術前、中または後に、特定するおよび示すことができる。

【0212】

本発明の特異的結合メンバー、特に抗体およびこれらの断片を他の分子または薬剤にコンジュゲートさせるまたは取り付ける、本発明の免疫複合体または抗体融合タンパク質としては、さらに、化学的アブレーション剤、毒素、免疫調節物質、サイトカイン、細胞傷害性薬剤、化学療法剤または薬にコンジュゲートさせた結合メンバーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0213】

放射免疫療法（RAIT）は、診療所に参入しており、様々な抗体免疫複合体を使用して効力を実証している。¹³¹I 標識ヒト化抗胎児癌抗原（抗CEA）抗体hMN-14は、結腸直腸癌において評価されており（Behr TM et al（2002）Cancer 94（4 Suppl）：1373-81）、⁹⁰Y 標識を有する同抗体は、髄様甲状腺癌腫において評定されている（Stein R et al（2002）Cancer 94（1）：51-61）。モノクローナル抗体を使用する放射免疫療法も非ホジキンリンパ腫および脾臓癌について評定され、報告されている（Goldenber 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）。特定の抗体を用いる放射免疫療法の方法も米国特許番号6,306,393および米国特許番号6,331,175に記載されている。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、放射免疫ガイド外科手術（RIGS）も診療所に参入しており、効力および有用性を実証している（Kim JC et al（2002）Jut.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）。

【0214】

本発明の抗体は、治療の必要がある患者に、任意の適する経路により、通常は血流もしくはＣＳＦへの注射によって投与することができ、または腫瘍部位に直接投与することができる。正確な用量は、抗体が診断用であるのかまたは治療用であるのか、腫瘍のサイズおよび位置、抗体の正確な性質（全抗体であるのか、断片であるのか、ダイアボディーであるのかなど）、ならびに抗体に取り付ける検出可能なまたは機能性標識をはじめとする、多数の要因に依存するであろう。放射性核種（radio nu c l i a）を療法に使用する場合、適する最大１回量は、約４５ｍＣｉ／ｍ²であり、最大約２５０ｍＣｉ／ｍ²までである。好ましい投薬量は、１５から４０ｍＣｉの範囲であり、さらに好ましい投薬範囲は２０から３０ｍＣｉ、または１０から３０ｍＣｉである。このような療法は、骨髓または幹細胞置換を必要とすることがある。腫瘍イメージングまたは腫瘍治療のいずれかのための典型的な抗体用量は、Ｆ（a b '）２形態での抗体０．５から４０ｍｇの範囲、好ましくは１から４ｍｇであろう。裸の抗体を、好ましくは、１回あたりタンパク質２０から１０００ｍｇ、または１回あたりタンパク質２０から５００ｍｇ、または１回あたりタンパク質２０から１００ｍｇの用量で投与する。この用量は、成人患者の単回治療のための用量であり、比例して小児および乳児に合せることができ、ならびに分子量に比例して他の抗体形態に合わせることもできる。毎日、週２回、週または月間隔で、医師の指示で治療を繰り返すことができる。

10

【０２１５】

これらの調合物は、第二の結合タンパク質、例えば上で説明したＥＧＰＲ結合タンパク質を含むことがある。特に好ましい形態でのこの第二の結合タンパク質は、上で論じた、

20

【０２１６】

医薬組成物および治療用組成物

本発明の特異的結合メンバーは、該特異的結合メンバーに加えて少なくとも１つの成分を含むことがある医薬組成物の形態で通常は投与されるであろう。

【０２１７】

従って、本発明の医薬組成物、および本発明に従って使用するための医薬組成物は、活性成分に加えて、医薬的に許容される賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤、または当業者に周知の他の材料を含むことがある。このような材料は、非毒性であるべきであり、および活性成分の効力に干渉すべきでない。担体または他の材料の正確な性質は、経口的であるこ

30

【０２１８】

経口投与のための医薬組成物は、錠剤、カプセル、粉末または液体形態であり得る。錠剤は、固体担体、例えばゼラチン、またはアジュバントを含むことがある。液体医薬組成物は、一般に、液体担体、例えば水、石油、動物もしくは植物油、鉱油または合成油を含む。生理食塩溶液、デキストロースもしくは他の糖類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もしくはポリエチレングリコールを含むことがある。

【０２１９】

静脈内注射または苦痛部位への注射のための活性成分は、発熱物質不含であり、適するｐＨ、等張性および安定性を有する、非経口的に許容される水溶液の形態であろう。関連当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンガー液、乳酸加リンガー液などの等張性ビヒクルを使用して、適する溶液を調製することが十分できる。必要に応じて、保存薬、安定剤、緩衝剤、抗酸化物質および／または他の添加剤を含むことがある。

40

【０２２０】

前記組成物を単独で、または他の治療、療法薬または薬剤と併用で、治療すべき状態に依存して同時にまたは逐次的に、投与することができる。加えて、本発明は、本明細書に記載する結合メンバー、特に抗体またはこの断片と他の薬剤または療法、例えば抗癌剤もしくは療法薬、ホルモン、抗ＥＧＦＲ剤もしくは抗体または免疫調節成分とを含む組成物

50

を考慮しており、含む。さらに一般的には、これらの抗癌剤は、チロシンキナーゼ阻害剤もしくはリン酸化カスケード阻害剤、翻訳後調節物質、細胞成長もしくは分裂阻害剤（例えば、抗有糸分裂剤）、またはシグナル伝達阻害剤であり得る。他の治療または療法としては、疼痛寛解薬、例えば非ステロイド系抗炎症薬（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）またはオピエート、例えばモルフィン、または制吐薬の適する用量の投与を挙げることができる。前記組成物をチロシンキナーゼ阻害剤（AG1478およびZD1839、STI571、OSI-774、SU-6668を含むが、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、ニトロソウレア、プロカルバジン、ビンクリスチン、ヒドロキシウレア、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薬と併用で（逐次的に（即ち、前もしくは後に）または同時に）投与することができる。例えば、これらの薬剤は、抗EGFR特異的薬剤、またはチロシンキナーゼ阻害剤、例えばAG1478、ZD1839、STI571、OSI-774、もしくはSU-6668である場合があり、またはより一般的な抗癌剤および抗新生物剤、例えばドキソルビシン、シスプラチン、テモゾロミド、ニトロソウレア、プロカルバジン、ビンクリスチン、ヒドロキシウレア、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、もしくはロムスチンである場合がある。加えて、前記組成物を、免疫応答をおよび癌細胞または腫瘍の減少または排除を刺激するホルモン、例えばデキサメタゾン、免疫調節成分、例えばインターロイキン、腫瘍壊死因子（TNF）または他の成長因子またはサイトカインと共に投与することができる。

10

20

【0221】

免疫調節成分、例えばTNFを、本発明の抗体によって認識されるEGFRエピトープを認識するばかりでなくTNF受容体に結合する二重特異性抗体の形態の本発明のメンバーと併用することがある。前記組成物は、抗EGFR抗体528、225、SC-03、DR8.3、L8A4、Y10、ICR62およびABX-EGFをはじめとする（しかし、これらに限定されない）他の抗EGFR抗体と共に投与されることもあり、または該他の抗EGFR抗体との合剤を含むこともある。

【0222】

以前に、ドキソルビシンおよびシスプラチンなどの薬剤と抗EGFR抗体の併用は、強化された抗腫瘍活性を生じさせた（Fan et al, 1993; Baselga et al, 1993）。ドキソルビシンとmAb 528の併用は、確率したA431異種移植片の完全根絶を生じさせる結果となったが、いずれかの方のみの薬剤での治療は、一時的なインビボ成長阻害しか生じさせなかった（Baselga et al, 1993）。同様に、シスプラチンとmAb 528または225のいずれかとの併用も十分に確率したA431異種移植片の根絶のもたらし、いずれかの薬剤での治療を用いたときにはこれが観察されなかった（Fan et al, 1993）。

30

【0223】

従来の放射線療法

加えて、本発明は、前記結合メンバーと従来の放射線療法の併用のための治療用組成物を考慮しており、含む。EGF受容体をターゲットにする抗体での治療は、従来の放射線療法の効果を向上させることができることが指摘されている（Milas et al., Clin. Cancer Res. 2000 Feb; 6(2): 701, Huang et al., Clin. Cancer Res. 2000 Jun; 6(6): 2166）。

40

【0224】

本明細書において実証するように、本発明の結合メンバー、特に、抗体またはこの断片、特に、mAb 806、ch 806、mAb 175、mAb 124、mAb 1133もしくはhu 806またはこれらの断片と、抗癌療法薬、特に抗EGFR療法薬（他の抗EGFR抗体を含む。）との併用は、異種移植腫瘍に対する有効な療法、および特に外科手術

50

を実証する。実施例において、例えば、AG1478およびmAb806の併用は、いずれかの薬剤単独での治療と比較してA431異種移植腫瘍容積の低減を有意に増進させる結果となることを実証する。AG1478(4-(3-クロロアニリノ)-6,7-ジメトキシキナゾリン)は、EGF受容体キナーゼの強力な選択的阻害剤であり、米国特許番号5,457,105に詳細に記載されており、この特許はこの全体が参照により本明細書に組み込まれる(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も参照のこと)。本明細書実施例は、本発明の抗体と他の抗EGFR抗体との、特に528抗EGFR抗体との、治療相乗作用をさらに実証する。

10

【0225】

本発明は、本発明の治療法の実施に有用な治療用組成物をさらに考えている。本治療組成物は、医薬的に許容される賦形剤(担体)と、活性成分としての本明細書に記載するとおりの特異的結合メンバー、このポリペプチド類似体またはこれらの断片の1つ以上とを混合物で含む。好ましい実施形態において、前記組成物は、ターゲット細胞と本結合メンバー/抗体の特異的結合を調節することができる抗原を含む。

【0226】

活性成分としてポリペプチド、類似体または活性断片を含有する治療用組成物の調製は、当該技術分野において十分に理解されている。典型的に、このような組成物は、注射剤として、溶液または懸濁液のいずれかとして、調製される。しかし、注射前の液体への溶解または懸濁に適する固体形態も調製することができる。調製品を乳化させることもできる。活性治療成分は、医薬的に許容される、および活性薬剤と相溶性である、賦形剤と混合されることが多い。適する賦形剤は、例えば、水、食塩液、デキストロース、グリセロール、エタノール、またはこれらに類するもの、およびこれらの組み合わせである。加えて、所望される場合には、前記組成物は、活性成分の有効性を向上させる少量の補助物質、例えば湿潤または乳化剤、pH緩衝剤を含有することがある。

20

【0227】

ポリペプチド、類似体または活性断片を、中和された医薬的に許容される塩の形態としての治療用組成物に調合することができる。医薬的に許容される塩としては、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で形成されたもの)ならびに例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸およびこれらに類するもののような有機酸とで形成されるものが挙げられる。遊離カルボキシル基から形成される塩を、例えば水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウムまたは第二鉄などの無機塩基、ならびに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、プロカインおよびこれらに類するもののような有機塩基から誘導することもできる。

30

【0228】

治療用ポリペプチド含有、類似体含有または活性断片含有組成物は、従来、静脈内投与、例えば、単位用量の注射により投与される。本発明の治療組成物に関して用いるときの用語「単位用量」は、ヒトのための単一投薬量として適する物理的に別個の単位であって、それぞれが、必要希釈剤、即ち担体、またはビヒクルと共同で所望の治療効果を生じさせるように計算された所定量の活性材料を含有するものである単位を指す。

40

【0229】

前記組成物を、投薬用製剤と適合性の手法で、および治療有効量で投与する。投与する量は、治療を受ける被験者、前記活性成分を利用するこの被験者の免疫系の能力、および所望されるEGFR結合能力の程度に依存する。投与のために必要とされる活性成分の正確な量は、担当医の判断に依存し、各個体に固有である。しかし、適する投薬量は、1日につき個体の体重1キログラムあたり活性成分約0.1から20、好ましくは約0.5から約10、およびさらに好ましくは1から数ミリグラムにわたるおよび投与経路に依存するであろう。初回投与およびブースター接種に適するレジメも様々であるが、典型的な例

50

は、初回投与、続いて、後続注射または他の投与による 1 時間以上の間隔での反復投与である。または、血液中 10 ナノモルから 10 マイクロモルの濃度を維持するために十分な持続点滴静注が考えられる。

【0230】

経口投与のための医薬組成物は、タブレット、カプセル、粉末または液体形態である場合がある。錠剤は、固体担体、例えばゼラチン、またはアジュバントを含むことがある。液体医薬組成物は、一般に、液体担体、例えば水、石油、動物もしくは植物油、鉱油または合成油を含む。生理食塩溶液、デキストロースもしくは他の糖類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もしくはポリエチレングリコールを含むことがある。

10

【0231】

静脈内注射または苦痛部位への注射のための活性成分は、発熱物質不含であり、適する pH、等張性および安定性を有する、非経口的に許容される水溶液の形態であろう。関連当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンガー液、乳酸加リンガー液などの等張性ビヒクルを使用して、適する溶液を調製することが十分できる。必要に応じて、保存薬、安定剤、緩衝剤、抗酸化物質および/または他の添加剤を含むことがある。

【0232】

診断アッセイ

本発明は、本発明の特異的結合メンバーによって認識されるこれらの能力を参照することにより、異常発現される EGF R などの刺激の存在を検出するための方法を含む、様々な診断利用にも関する。前に述べたように、EGF R は、様々な公知技術によりこれ自体に対する抗体を生産するために用いることができ、その後、このような抗体を単離し、例えば、疑わしいターゲット細胞における特定の EGF R 活性の存在についての試験において利用することができよう。

20

【0233】

本発明の特異的結合メンバー、特に抗体およびこれらの断片、の診断利用は、当業者には周知および通例であって本明細書に基づくものである、インビトロおよびインビボ利用を含む。EGF R ステータスの、特に EGF R の異常な発現に関する、インビトロ評価および評価のための診断アッセイおよびキットは、癌、前癌状態、高増殖性細胞成長に関連した状態を有することがわかっているもしくは疑われるものまたは腫瘍サンプルからのものをはじめとする、患者サンプルを診断、評価およびモニターするために利用することができる。EGF R ステータスの評価および評価は、薬物の臨床試験についての、または異なる薬剤または結合メンバーに対して、特定の化学療法薬または本発明の特異的結合メンバー、特に抗体（これらの合剤を含む。）の投与についての、患者の適正の判定にも有用である。このタイプの診断モニタリングおよび評価は、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）、この場合のアッセイは、Herceptin を使用する抗体療法について患者を評価するためにも用いられる。インビボ利用としては、腫瘍のイメージングまたは個体の癌ステータスを評価（放射線イメージングを含む。）が挙げられる。

30

【0234】

前に提案したように、本発明の診断方法は、EGF R / タンパク質に対するアンタゴニスト、例えば、抗 EGF R 抗体、好ましくはアフィニティー精製されたポリクローナル抗体、およびさらに好ましくは mAb、の有効量を含むアッセイによる細胞サンプルまたは培地の検査を含む。加えて、ここで用いる抗 EGF R 抗体分子は、Fab、Fab'、F(ab')₂ もしくは F(v) 部分または全抗体分子の形態であることが好ましい。前に論じたように、この方法の恩恵を受けることができる患者としては、癌、前癌性病変、ウイルス感染症、高増殖性細胞成長を含むもしくは高増殖性細胞成長に起因する病態または他の同様の病的障害に罹患している患者が挙げられる。EGF R を単離するおよび抗 EGF R 抗体を誘導するための方法ならびにターゲット細胞の検査を支援する抗 EGF R 抗体の能力を判定するおよび最適化するための方法は、すべて、当該技術分野において周知で

40

50

ある。

【0235】

好ましくは、本発明の診断方法において用いられる抗EFG R抗体は、アフィニティー精製されたポリクローナル抗体である。さらに好ましくは、前記抗体は、モノクローナル抗体(mAb)である。加えて、ここで用いる抗EFG R抗体分子は、全抗体分子のFab、Fab'、F(ab')₂もしくはF(v)部分の形態である場合がある。

【0236】

上で詳細に説明したように、周知のハイブリドーマ技術をはじめとする標準的な方法によってEFG Rに対する抗体(単数または複数)を生産および単離することができる。便宜上、EFG Rに対する抗体(単数または複数)を本明細書ではAb₁と呼び、別の種において産生された抗体(単数または複数)をAb₂と呼ぶ。

10

【0237】

細胞内のEFG Rの存在は、このような判定に適用できる通常のインビトロまたはインビボ免疫学的手順によって突き止めることができる。多数の有用な手順が公知である。特に有用である3つのこのような手順は、検出可能な標識で標識したEFG R、検出可能な標識で標識した抗体Ab、または検出可能な標識で標識した抗体Ab₂を用いる。これらの手順は、次の方程式(式中、アスタリスクは、この粒子が標識されていることを示し、および「R」は、EFG Rを表す。)によって要約することができる：

$$A. \quad R^* + Ab_1 = R^* Ab_1,$$

$$B. \quad R + Ab^* = R Ab_1^*$$

$$C. \quad R + Ab_1 + Ab_2^* = R Ab_1 Ab_2^*$$

20

【0238】

前記手順およびこれらの利用は、すべて、当業者によく知られており、従って、本発明の範囲内で用いることができる。「競合」手順、手順Aは、米国特許番号3,654,090および米国特許番号3,850,752に記載されている。手順C、「サンドイッチ」手順は、米国特許番号RE31,006および米国特許番号4,016,043に記載されている。さらに他の手順、例えば「二重抗体」または「DASP」手順が公知である。

【0239】

上の各事例において、EFG Rは、1つ以上の抗体または結合パートナーと複合体を形成し、この複合体の1つのメンバーが、検出可能な標識によって標識される。複合体形成されたことおよび所望される場合にはこれらの量を、標識の検出に適用できる公知の方法によって判定することができる。

30

【0240】

上述のことから、Ab₂の特徴的特性は、これがAb₁と反応することであることがわかるであろう。この特性は、哺乳動物種において産生されたAb₁を、別の種において抗体Ab₂を産生させるために抗原として使用したためである。例えば、ウサギ抗体を抗原として使用してヤギにおいてAb₂を産生させることができる。従って、Ab₂は、ヤギにおいて産生された抗ウサギ抗体であるであろう。本明細書および請求項のために、Ab₁は、一次または抗EFG R抗体を指すであろう、およびAb₂は、二次または抗Ab₁抗体を指すであろう。

40

【0241】

これらの研究のために最も一般的に用いられる標識は、放射性元素、酵素、紫外線に暴露されたときに蛍光を発する化学物質、およびその他である。

【0242】

多数の蛍光材料が公知であり、これらを標識として用いることができる。これらとしては、例えば、フルオレセイン、ローダミン、オーラミン、Texas Red、AMCAブルーおよびLucifer Yellowが挙げられる。特別な検出材料は、ヤギにおいて調製され、イソチオシアナートによりフルオレセインにコンジュゲートされた、抗ウサギ抗体である。

50

【0243】

E G F Rまたはこの結合パートナー（単数または複数）、例えば本特異的結合メンバーを放射性元素でまたは酵素で標識することもできる。この放射性標識を、現在利用できる計数手順のいずれかによって検出することができる。好ましい同位体を、 ^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 および ^{186}Re から選択することができる。

【0244】

酵素標識は、同じく有用であり、および現在利用されている比色、分光測光、蛍光分光測光、電流測定またはガス定量技術のいずれかによって検出することができる。架橋分子、例えばカルボジイミド、ジイソシアナート、グルタルアルデヒドおよびこれらに類するものとの反応により、選択された粒子に酵素をコンジュゲートさせることができる。これらの手順に使用することができる多くの酵素が公知であり、これらを利用することができる。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。米国特許番号3,654,090；米国特許番号3,850,752；および米国特許番号4,016,043を、例として、代替標識材料および方法のこれらの開示について参照する。

【0245】

本発明に従って有利に利用することができる特定なアッセイ系は、受容体アッセイとして公知である。受容体アッセイでは、前記特異的結合メンバーなどのアッセイすべき材料を適切に標識し、その後、一定の細胞試験コロニーに、標識された材料と未標識の材料の両方の量を接種し、その後、結合研究を行って、標識された材料が細胞受容体に結合する程度を判定する。このようにして、材料間の親和性の差を突き止めることができる。

【0246】

従って、前記特異的結合メンバーの精製量を、例えば、これに対する抗体または他の阻害剤で標識すること、またはこれに対する抗体または他の阻害剤と化合させることができ、その後、結合研究を行うこととなる。次に、標識されたおよび未標識未化合の特異的結合メンバーの様々な量を含有する溶液を調製し、その後、細胞サンプルに接種し、その後、温置する。次に、結果として生ずる細胞単層を洗浄し、可溶化し、その後、<5%の標準誤差を生じさせるために十分な時間長にわたってガンマカウンターで計数する。次に、これらのデータをスキッチャード解析に付し、その後、材料活性に関する観察および結論を引き出す。上記は、例示的なものであるが、アッセイした材料の細胞結合能力が識別特性として役立つことができる場合、受容体アッセイを行うことができ、利用することができる手法を示す。

【0247】

本発明に従って有用なおよび考えられるアッセイは、「シス/トランス」アッセイとして公知である。簡単に言うと、このアッセイは、2つの遺伝子構築物を利用し、一般に、これらの一方は、適切な細胞系にトランスフェクトされたとき関心のある特定の受容体を継続的に発現するプラスミドであり、およびこれらのもう一方は、受容体/リガンド複合体の制御下でルシフェラーゼなどの受容体を発現するプラスミドである。従って、例えば、化合物を特定の受容体に対するリガンドとして評価することが望まれる場合、前記プラスミドの一方は、選択された細胞系においてこの受容体の発現を生じさせる結果となる構築物であるであろうし、およびもう一方のプラスミドは、この特定の受容体に対する応答要素が挿入され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であろう。試験している化合物が、前記受容体のアゴニストである場合、このリガンドは、この受容体と複合体化し、結果として生じる複合体が、前記応答要素と結合し、ルシフェラーゼ遺伝子の転写を開始させるであろう。その後、この結果として生ずる化学発光を測光法で測定し、用量応答曲線を得、公知リガンドのものと比較する。上述のプロトコルは、米国特許番号4,981,784およびPCT国際公開番号WO 88/03168に記載されて

10

20

30

40

50

おり、このために当業者に参照される。

【0248】

本発明のさらなる実施形態では、疑いのあるターゲット細胞におけるEGFRの異常な発現（増幅されたEGFRおよび/またはEGFR突然変異を含むが、これらに限定されない。）の存在または不在を判定するために、医療専門家による使用に適する市販試験キットを作製することができる。上で論じた試験技術に従って、このようなキットの1つのクラスは、標識されたEGFRまたはこの結合パートナー、例えばこれに対して特異的な抗体、および説明書を少なくとも含有するが、勿論、選択される方法、例えば、「競合的」、「サンドイッチ」、「DASP」およびこれらに類するものに依存するであろう。前記キットは、末梢的試薬、例えば緩衝剤、安定剤なども含有することがある。

10

【0249】

従って、EGFRの異常な発現または翻訳後修飾についての存在または細胞の能力を実証するための試験キットであって、

(a) 本特異的結合メンバーまたはこれに対する特異的結合パートナーを検出可能な標識に直接または間接的に取り付けることによって得られる少なくとも1つの標識された免疫化学反応性成分の所定量；

(b) 他の試薬；および

(c) 該キットの使用説明書

を含む試験キットを作製することができる。

【0250】

20

より具体的には、前記診断試験キットは、

(a) 一般には固相に結合して免疫吸着剤を形成する、または代案では、適するタグ、もしくは多数のこのような末端生成物など（もしくはこれらの結合パートナー）、それぞれのうちの1つに結合する、上で説明したとおりの特異的結合メンバー（または結合パートナー）の既知量；

(b) 必要な場合には、他の試薬；および

(c) 概試験キットの使用説明書

を含む。

【0251】

30

さらなる変形形態では、所定のプロトコル（例えば、「競合的」、「サンドイッチ」、「二重抗体」、など）に従って動作する、ならびに

(a) 検出可能な標識に前記特異的結合メンバーをカップリングさせることによって得た、標識された成分と；

(b) 1つ以上の追加の免疫化学試薬 [これらのうちの少なくとも1つの試薬は、リガンドまたは固定されたりガンドであり、このリガンドは、

(i) 標識された成分(a)と結合することができるリガンド；

(ii) 標識された成分(a)の結合パートナーと結合することができるリガンド；

(iii) 判定すべき成分（単数または複数）の少なくとも1つと結合することができるリガンド；および

(iv) 判定すべき成分（単数または複数）の少なくとも1つの結合パートナーの少なくとも1つと結合することができるリガンド

40

から成る群より選択される。]と；

(c) EGFR、前記特異的結合メンバー、およびこれに対する特異的結合パートナーの間の免疫化学反応の1つ以上の成分の検出および/または決定のためのプロトコルを実施するための説明書と

を含む、試験キットを作製し、上で述べた目的のために使用することができる。

【0252】

上記に従って、EGFRの活性、EGFRの異常な発現もしくは翻訳後修飾、および/または前記特異的結合メンバーの活性または結合を調節させるために有効な可能性のある薬物をスクリーニングするためのアッセイ系を作製することができる。前記受容体または

50

結合メンバーを試験系に導入し、見込みのある薬物も、この結果として得られる細胞培養物に導入し、その後、この培養物を検査して、該見込みのある薬物単独の添加、または既知薬剤（単数もしくは複数）の添加量の作用、いずれかに起因する、これらの細胞のS期活性の一切の変化を観察する。

【0253】

核酸

本発明は、本発明の特異的結合メンバーをコードする単離された核酸をさらに提供する。核酸は、DNAおよびRNAを含む。好ましい態様において、本発明は、本発明の抗体のVHおよびVL鎖のCDR残基として示すようなポリペプチドをはじめとする、上で定義したとおりの本発明のポリペプチドをコードする核酸を提供する。

10

【0254】

本発明は、上述のとおり少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む、プラスミド、ベクター、転写産物または発現カセットの形態の構築物も提供する。

【0255】

本発明は、上述のとおり1つ以上の構築物を含む組換え宿主細胞も提供する。提供する任意の特異的結合メンバーをコードする核酸これ自体が本発明の態様を構成し、前記特異的結合メンバーの生産方法であって、これをコードする核酸から発現させることを含むものである方法も本発明の態様を構成する。前記核酸を含有する組換え宿主細胞を適切な条件下で培養することにより、発現を適便に果たすことができる。発現による生産後、任意の適する技術を用いて特異的結合メンバーを単離および/または精製することができ、その後、適宜、使用することができる。

20

【0256】

本発明による特異的結合メンバーおよびコードする核酸分子およびベクターであって、例えばこれらの天然の環境から、単離および/または精製されたもの、実質的に純粋なもしくは均質な形態でのもの、または核酸の場合には、必要な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点がないまたは実質的にないものを提供することができる。本発明による核酸は、DNAまたはRNAを含むことがあり、および完全にまたは部分的に合成のものであることがある。

【0257】

様々な異なる宿主細胞のクローニングおよび発現のための系が周知である。適する宿主細胞としては、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技術分野において利用できる哺乳動物細胞系としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、NSOMウス黒色腫細胞および多くの他のものが挙げられる。一般的で好ましい細菌宿主は、E. コリ(E. coli)である。

30

【0258】

E. コリ(E. coli)などの原核細胞における抗体および抗体断片の発現は、当該技術分野において十分に確立されている。総説については、例えば、Pluckthun, A. Bio/Technology 9:545-551(1991)を参照のこと。培養での真核細胞における発現も、特異的結合メンバーの生産の選択肢として、当業者は利用することができる。最近の総説については、例えば、Raff, M. E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4:573-576; Trill J. J. et al. (1995) Curr. Opinion Biotech 6:553-560を参照のこと。

40

【0259】

プロモーター配列、ターミネーター配列、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を適宜含む、適切な調節配列を含有する、適するベクターを選択または構築することができる。ベクターは、適宜、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る場合がある。さらなる詳細については、例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd e

50

dition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと。例えば、核酸構築物の調製、突然変異誘発、シーケンシング、細胞へのDNAの導入および遺伝子発現における核酸の操作、ならびにタンパク質の分析についての、多くの公知の技術およびプロトコルが、Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992に詳細に記載されている。SambrookらおよびAusubelらの前記開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0260】

従って、本発明のさらなる態様は、本明細書に開示する核酸を含有する宿主細胞を提供する。なお、さらなる態様は、このような核酸を宿主細胞に導入することを含む方法を提供する。この導入は、任意の利用可能な技術を利用することができる。真核細胞について、適する技術としては、レトロウイルスまたは他のウイルス、例えばワクシニアもしくは、昆虫細胞については、バキュロウイルスを使用する、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、電気泳動法、リボソーム媒介トランスフェクションおよび形質導入を挙げることができる。細菌細胞について、適する技術としては、バクテリオファージを使用する、塩化カルシウム形質転換、電気泳動法およびトランスフェクションを挙げることができる。

10

【0261】

この導入の後、例えば、この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り、核酸からからの発現を生じさせることまたは可能にすることができる。

20

【0262】

1つの実施形態では、本発明の核酸を宿主細胞のゲノム（例えば、染色体）に組み込む。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含めることにより、組み込みを促進することができる。

【0263】

本発明は、上で述べた構築物を発現系において使用して、上述のとおり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ことを含む方法も提供する。

【0264】

上で述べたように、本発明は、配列番号：2および4；129および134；22および27；32および37；ならびに/または42および47に示すアミノ酸配列を有する特異的結合メンバー、特に抗体またはこの断片をコードする組換えDNA分子もしくはクローン化遺伝子、またはこれらの変性変異体にも関し、好ましくは、前記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遺伝子は、ヌクレオチド配列を有し、またはこのような配列の1つをコードするDNA配列に相補的である。

30

【0265】

本発明のもう1つの特徴は、本明細書に開示するDNA配列の発現であろう。当該技術分野において周知であるように、DNA配列は、これらを、適切な発現ベクター内の発現制御配列に作動するように連結させること、およびこの発現ベクターを用いて適切な単細胞宿主を形質転換させることによって、発現させることができる。

40

【0266】

発現制御配列への本発明のDNA配列のこのような作動するような連結は、勿論、既に該DNA配列の一部ではない場合、該DNA配列の上流の正しいリーディングフレーム内に開始コドン、ATGの提供を含む。

【0267】

野生品種の宿主/発現ベクターの組み合わせを本発明のDNA配列の発現に利用することができる。例えば、有用な発現ベクターは、染色体、非染色体および合成DNA配列のセグメントから成ることがある。適するベクターとしては、SV40および公知の細菌プラスミドの誘導体、例えば、E. コリ (E. coli) プラスミド col E1、pCR

50

1、pBR322、pMB9およびこれらの誘導体、RP4などのプラスミド；ファージDNA、例えば、ファージXの非常に多数の誘導体、例えばNM989、および他のファージDNA、例えばM13および糸状一本鎖ファージDNA；酵母プラスミド、例えば、2uプラスミドまたはこの誘導体；真核細胞において有用なベクター、例えば、昆虫または哺乳動物細胞において有用なベクター；プラスミドとファージDNAの組み合わせから誘導されたベクター、例えば、ファージDNAまたは他の発現制御配列を利用するために修飾されたプラスミド；ならびにこれらに類するものが挙げられる。

【0268】

様々な発現制御配列 - これに作動するように連結されたDNA配列の発現を制御する配列 - のいずれかをこれらのベクターにおいて使用して、本発明のDNA配列を発現させることができる。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また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-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の糖分解酵素のためのプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター（例えば、Pho5）、酵母接合因子のプロモーター、および原核もしくは真核細胞またはこれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが公知である他の配列、ならびにこれらの様々な組み合わせが挙げられる。

10

【0269】

様々な単細胞宿主細胞も、本発明のDNA配列の発現に有用である。これらの宿主としては、周知の真核および原核宿主、例えばE.コリ（E.coli）、シュードモナス（Pseudomonas）、バシラス（Bacillus）、ストレプトマイセス（Streptomyces）、真菌、例えば酵母、および動物細胞、例えばCHO、YB/20、NSO、SP2/0、R1.1、B-WおよびL-M細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞（例えば、COS 1、COS 7、BSC1、BSC40、およびBMT10）、昆虫細胞（例えば、Sf9）、ならびにヒト細胞および植物細胞（組織培養でのもの）を挙げることができる。

20

【0270】

すべてのベクター、発現制御配列および宿主が、本発明のDNA配列を発現するために同等に良好に機能するとは限らないであろうことは、理解されるであろう。同じ発現系を用いてすべての宿主が同等に良好に機能するとも限らないであろう。しかし、当業者は、本発明の範囲を逸脱することなく所望の発現を果たすために過度な実験を伴わずに適切なベクター、発現制御配列、および宿主を選択することができるであろう。例えば、ベクターを選択する際、宿主を考慮しなければならない。ベクターはこれの中で機能しなければならないからである。ベクターのコピー数、このコピー数を制御する能力、およびこのベクターによってコードされた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、考慮されるであろう。

30

【0271】

発現制御配列を選択する際、通常、様々な要因が考慮されるであろう。これらとしては、例えば、系の相対強度、この制御能力、および発現される特定のDNA配列または遺伝子との、特に、可能性のある二次構造に関しての、この適合性が挙げられる。適する単細胞宿主は、例えば、選択したベクターとこれらの適合性、これらの選択特性、タンパク質を正しくフォールディングするこれらの能力、およびこれらの発酵要件、ならびに発現されるDNA配列によってコードされた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を考慮することによって選択されるであろう。

40

【0272】

これらおよび他の要因を考慮して、当業者は、発酵を用いてまたは大規模動物培養で本発明のDNA配列を発現させることとなる様々なベクター／発現制御配列／宿主の組み合わせを構築することができるであろう。

【0273】

50

本発明の範囲内で誘導されるタンパク質複合体 / サブユニットのヌクレオチド配列から特異的結合メンバー類似体を調製できることをさらに意図している。断片などの類似体は、例えば、特異的結合メンバー材料のペプシン消化によって生産することができる。ムテインなどの他の類似体は、特異的結合メンバーコーディング配列の標準的な部位特異的突然変異誘発によって生産することができる。プロモーターとして機能しようと、阻害剤として機能しようと、小分子などの「特異的結合メンバー活性」を呈示する類似体を、公知のインビボおよび / またはインビトロアッセイによって同定することができる。

【0274】

上で述べたように、特異的結合メンバーをコードするDNA配列を、クローニングするのではなく、合成的に調製することができる。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有するDNA配列を設計することができる。一般に、この配列を発現に用いることとなる場合、所期の宿主のために好ましいコドンを選択することとなる。標準的な方法によって調製したオリゴヌクレオチドをオーバーラップさせることから完全配列を組み立てて、完全コーディング配列に組み立てる。例えば、Edge, Nature, 292: 756 (1981); Nambair et al, Science, 223: 1299 (1984); Jay et al., J. Biol. Chem., 259: 6311 (1984) 参照のこと。

10

【0275】

合成DNA配列は、特異的結合メンバー類似体または「ムテイン」を発現するであろう遺伝子の適便な構築を可能にする。または、天然特異的結合メンバー遺伝子またはcDNAの部位特異的突然変異誘発によってムテインをコードするDNAを作製することができる、および従来のポリペプチド合成を用いてムテインを直接作製することができる。

20

【0276】

タンパク質への非天然アミノ酸の部位特異的組み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 (April 1989) に記載されている。この方法を使用して非天然アミノ酸との類似体を作成することができる。

【0277】

本発明は、翻訳レベルでEGFRの発現に干渉するために使用することができ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わたる。このアプローチは、アンチセンス核酸およびリボザイムを利用して、特定のmRNAの翻訳を、このmRNAをアンチセンス核酸でマスクすることまたはリボザイムで開裂させることのいずれかによって阻止する。

30

【0278】

アンチセンス核酸は、特定のmRNA分子の少なくとも一部に相補的であるDNAまたはRNA分子である(Weintraub, 1990; Marcus-Sekura, 1988を参照のこと)。細胞内で、これらは、このmRNAにハイブリダイズして、二本鎖分子を形成する。細胞は、この二本鎖形の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に干渉しない。AUG開始コドンにハイブリダイズする約15ヌクレオチドおよび分子のオリゴマーは、特に有効である。これらは、合成が容易であり、および生産細胞に導入すると、より大きな分子より提起する問題が少ない可能性が高いからである。インビトロで多くの遺伝子の発現を阻害するためにアンチセンス法が用いられている(Marcus-Sekura, 1988; Hambor et al., 1988)。

40

【0279】

リボザイムは、DNA制限エンドヌクレアーゼに多少類似した様式で他の一本鎖RNA分子を特異的に開裂させる能力を有するRNA分子である。リボザイムは、一定のmRNAがこれら特有のイントロンを切除する能力を有するという観察から発見された。これらのRNAのヌクレオチド配列を修飾することにより、研究者らは、RNA分子内の特定の

50

ヌクレオチド配列を認識し、これを切断する分子を遺伝子工学で作製することができた (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 だけが不活性化される。

【0280】

研究者は、リボザイムの2つのタイプ、テトラヒメナ (Tetrahymena) タイプと「ハンマーヘッド」タイプを同定した (Hasselhoff and Gerlach, 1988)。テトラヒメナタイプのリボザイムは、4塩基配列を認識し、この一方で「ハンマーヘッド」タイプは、11から18塩基配列を認識する。認識配列が長いほど、ターゲット mRNA 種において排他的に発生する可能性が高い。従って、特異的 mRNA 配列を不活性化するにはハンマーヘッドタイプのリボザイムのほうがテトラヒメナタイプのリボザイムより好ましく、18塩基認識配列のほうが、より短い認識配列より好ましい。

10

【0281】

このように、本明細書に記載する DNA 配列を使用して、EGFR およびこれらのリガンドについての mRNA に対するアンチセンス分子、および該 mRNA を切断するリボザイムを調製することができる。

【0282】

本発明を例示するものとして提供する以下の非限定的実施例を参照することにより、本発明をよりよく理解できる。本発明の好ましい実施形態をより十分に例証するために以下の実施例を提示するが、これらを、いかなる点においても、本発明の広い範囲を限定するものとみなしてはならない。

20

【実施例1】

【0283】

抗体の産生および単離
細胞系

免疫及び特異性分析のために、天然のものである、または正常、野生型もしくは「wt EGFR」遺伝子でまたは $\Delta 2-7$ 欠失突然変異を有する Δ EGFR 遺伝子でトランスフェクトされたものである、幾つかの細胞系を使用した：マウス線維芽細胞系 NR6、NR6 Δ EGFR (Δ EGFR でトランスフェクトされたもの) および NR6 wt EGFR (wt EGFR でトランスフェクトされたもの)、ヒト膠芽腫細胞系 U87MG (低レベルの内因性 wt EGFR を発現しているもの)、U87MG wt EGFR (wt EGFR でトランスフェクトされたもの)、U87MG Δ EGFR (Δ EGFR でトランスフェクトされたもの)、ならびにヒト扁平上皮細胞癌腫細胞系 A431 (高レベルの wt EGFR を発現する。)。

30

【0284】

免疫および特異性分析のために、天然のものである、または正常、野生型もしくは「wt EGFR」遺伝子でまたは de207 もしくは $\Delta 2-7$ 欠失突然変異を有する Δ EGFR 遺伝子でトランスフェクトされたものである、幾つかの細胞系を使用した：マウス線維芽細胞系 NR6、NR6 Δ EGFR (Δ EGFR でトランスフェクトされたもの) および NR6 wt EGFR (wt EGFR でトランスフェクトされたもの)、ヒト膠芽腫細胞系 U87MG (低レベルの内因性 wt EGFR を発現しているもの)、U87MG wt EGFR または「U87MG . wt EGFR」(wt EGFR でトランスフェクトされたもの)、U87MG Δ EGFR または「U87MG . $\Delta 2-7$ 」(Δ EGFR でトランスフェクトされたもの)、ならびにヒト扁平上皮細胞癌腫細胞系 A431 (高レベルの wt EGFR を発現する。)。NR6、NR6 Δ EGFR、および NR6 wt EGFR 細胞系は、以前に記載されている (Batra et al. (1995) Epidermal Growth Factor Ligand-independent, Unregulated, Cell-Transforming Potential of a Naturally Occurring Human Mutant EGFRvIII Gene. Cell Growth Differ. 6(10):1251-1259)。N

40

50

R 6 細胞系には正常内因性EGFRがない (Batra et al., 1995)。U 8 7 M G 細胞系およびトランスフェクションは、以前に記載されている (Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 7727 - 7731)。

【0285】

低レベルのwtEGFRを内因的に発現するU 8 7 M G 星状細胞腫細胞系 (Ponten, J. and Macintyre, E. H. (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glioma. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 74, 465 - 86) を、de 2 - 7 EGFRを含有するレトロウイルスで感染させて、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞系を生産した (Nishikawa et al., 1994)。トランスフェクトされた細胞系U 8 7 M G . wtEGFRを、Nagane et al. (1996) Cancer Res. 56, 5079 - 5086に記載されているように生産した。U 8 7 M G 細胞は、およそ 1×10^5 のEGFRを発現するに対して、U 8 7 M G . wtEGFR細胞は、およそ 1×10^6 のEGFRを発現し、従って、遺伝子増幅で見られる状況によく似ている。いずれの公知EGFR関連分子も発現しないマウスプロB細胞系BaF / 3もde 2 - 7 EGFRでトランスフェクトし、結果としてBaF / 3 . Δ 2 - 7 細胞系を得た (Luwor et al. (2004) The tumor-specific de 2 - 7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR, Oncogene 23: 6095 - 6104)。ヒト扁平上皮癌腫A 4 3 1細胞をATCC (メリーランド州ロックヴィル) から入手した。類表皮癌腫細胞系A 4 3 1は、以前に記載されている (Sato et al. (1987) Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors. Methods Enzymol. 146, 63 - 81)。

【0286】

10% FCS (CSL, オーストラリア、メルボルン) ; 2 mM グルタミン (Sigma Chemical Co.、ミズーリ州セントルイス)、およびペニシリン/ストレプトマイシン (Life Technologies, Inc.、ニューヨーク州グランドアイランド) を補足したGlutaMAX (商標) (Life Technologies, Inc.、オーストラリア、メルボルンおよびニューヨーク州グランドアイランド) を伴うDMEM / F - 12において、すべての細胞系を培養した。加えて、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 およびU 8 7 M G . wtEGFR細胞系を、400 mg / mLのゲネチシン (Life Technologies, Inc.、オーストラリア、ヴィクトリア州メルボルン) 中で維持した。細胞系を5% CO₂の未変性雰囲気において37℃で成長させた。

【0287】

試薬

de 2 - 7 EGFRユニーク接合点ペプチドは、アミノ配列: L E E K K G N Y V V T D H (配列番号: 13) を有する。de 2 - 7 EGFRからビオチン化された特有の接合点ペプチド (ビオチン - L E E K K G N Y V V T D H (配列番号: 5) およびL E E K K G N Y V V T D H - ビオチン (配列番号: 6)) を標準的なFmocケミストリーによって合成し、逆相HPLCおよび質量スペクトル分析 (Auspep、オーストラリア、メルボルン) によって純度 (> 96%) を判定した。

【0288】

研究において使用した抗体

他の試薬での本発明者らの調査結果と比較するために、本発明者らの研究に追加のmAbを含めた。これらの試薬は、wtEGFRに対するmAb528 (Sato et al. (1983) Mol. Biol. Med. 1 (5), 511-529)、およびΔ2-7 EGFR欠失突然変異の接合点配列にわたる合成ペプチドに対して産生されたDH8.3であった。de2-7 EGFRに対して特異的である前記DH8.3抗体 (IgG1) は、以前に記載されており (Hilles et al. (1995) Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. Int. J. Cancer. 63, 537-43, 1995)、およびde2-7 EGFRにおいて見つけられる特有の接合点ペプチドでのマウスの免疫処置 (Hills et al., 1995) 後に該抗体を得た。

10

【0289】

de2-7 EGFRと野生型EGFRの両方を認識する528抗体は、以前に記載されており (Masui et al. (1984) Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. Cancer Res. 44, 1002-7)、および米国微生物系統保存機関 (the American Type Culture Collection) (メリーランド州ロックヴィル) から入手したハイブリドーマ (ATCC HB-8509) を使用してBiological Product Research Facility, Ludwig Institute for Cancer Research (オーストラリア、メルボルン) において該抗体を生産した。ポリクローナル抗体SC-03は、EGFRのカルボキシ末端ペプチドに対して産生されたアフィニティー精製ウサギポリクローナル抗体である (Santa Cruz Biotechnology Inc.)。

20

【0290】

抗体産生

マウス線維芽細胞系NR6_{ΔEGFR}を免疫原として使用した。BALB/cマウスに2から3週間隔でアジュバント中の $5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ 個の細胞での免疫処置を5回、皮下的に施すことにより、マウスハイブリドーマを産生させた。完全フロイントアジュバントを初回注射に使用した。その後、不完全フロイントアジュバント (Difco (商標)、カンザス州ローレンスのVoigt Global Distribution) を使用した。免疫処置を施したマウスからの脾細胞をマウス骨髓腫細胞系SP2/0 (Shulman et al. (1978) Nature 276: 269-270) と融合させた。新たに産生されたクローンの上清を、血球吸着アッセイにおいて、NR6、NR6_{wtEGFR} およびNR6_{ΔEGFR} との反応性についてスクリーニングし、ヒト膠芽腫細胞系U87MG、U87MG_{wtEGFR} およびU87MG_{ΔEGFR} を用いて血球吸着アッセイにより分析した。その後、選択されたハイブリドーマ上清をウエスタンブロットティングによって試験し、免疫組織化学によってさらに分析した。予想した反応性を示した、新たに産生されたmAbを精製した。

30

40

【0291】

5つのハイブリドーマを確率し、ロゼット赤血球凝集アッセイにおけるNR6_{ΔEGFR}での高い力価 (1:2500) ならびにNR6およびNR6_{wtEGFR}細胞の低いバックグラウンドに基づくさらなる特性づけのために3つのクローン、124 (IgG2a)、806 (IgG2b) および1133 (IgG2a) を先ず選択した。第四のクローン、その後、175 (IgG2a) をさらに特性づけした。これは、別途、下の実施例23において論ずる。その後の赤血球凝集分析において、これらの抗体は、天然ヒト膠芽腫細胞系U87MGおよびU87MG_{wtEGFR}との反応性を示さなかった (未希釈上清10%) が、U87MG_{ΔEGFR}との強反応性であり; A431との反応性は、あまり見られなかった。対照的に、FACS分析では、806は天然U87MGと非反応性で

50

あり、U87MG Δ EGFRを強く染色し、より低い程度にU87MG_{wt}EGFRを染色した。このことは、 Δ EGFRとwtEGFRの両方への806の結合を示している（下記参照）。

【0292】

次に、ウエスタンブロットアッセイにおいて、mAb124、mAb806およびmAb1133をwtEGFRおよび Δ EGFRとの反応性について分析した。洗剤溶解産物をNR6 Δ EGFR、U87MG Δ EGFRからならびにA431から抽出した。3つのmAbすべてが、wtEGFRタンパク質（170kDa）と Δ EGFRタンパク質（140kDa）の両方を染色する細胞溶解産物に類似した反応性パターンを示した。基準試薬として、wtEGFRと反応性であることが公知である（Waterfield et al. (1982) J. Cell Biochem. 20(2), 149-161）mAbR.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公知であるmAb528の代わりに使用した。mAbR.I.は、野生型および Δ EGFRとの反応性を示した。3つの新たに酸性されたクローンすべてが、 Δ EGFRとの反応性およびwtEGFRとのあまり強くない反応性を示した。U87MG Δ EGFRおよびNR6 Δ EGFRの溶解産物においてDH8.3のみが陽性であった。

10

20

【0293】

異種移植片腫瘍U87MG、U87MG Δ EGFRおよびA431に関するクローン124、806および1133ならびにmAb528およびmAbDH8.3の免疫組織化学分析を表1に示す。すべてのmAbが、異種移植片U87MG Δ EGFRの強い染色を示した。mAb528だけは、天然U87MG異種移植片において弱い反応性を示した。A431異種移植片では、mAb528は、強い均質な反応性を示した。mAb124、mAb806およびmAb1133は、A431の扁平上皮細胞癌腫の主として基底部に位置する細胞との反応性を見せ、上部細胞層および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陰性であった。

【0294】

【表2】

表1

抗体528、DH8.3ならびに124、806および1133の免疫組織化学分析

抗体	異種移植片 Δ U87MG Δ EGFR	異種移植片 A431	異種移植片 Δ U87MG(天然)
mAb528	陽性	陽性	陽性(局限的染色)
mAb124	陽性	陽性(主に基底細胞)	-
mAb806	陽性	陽性(主に基底細胞)	-
mAb1133	陽性	陽性(主に基底細胞)	-
DH8.3	陽性	-	-

30

40

内因性マウス抗体の検出のため微量間質染色

【0295】

シーケンシング

mAb806、mAb124およびmAb1133の可変重鎖（VH）および可変軽鎖（VL）をシーケンシングし、これらの相補性決定領域（CDR）を下記のとおり同定した：

mAb806

mAb806 VH鎖：核酸配列（配列番号：1）、およびシグナルペプチドを伴うアミノ酸配列（配列番号：2）を図14Aおよび14Bにそれぞれ示す（図14Bではシグナ

50

ルペプチドに下線を引く)。図16では下線を引くことにより相補性決定領域CDR1、CDR2およびCDR3(それぞれ、配列番号:15、16および17)を指摘する。このシグナルペプチドなしでのmAb806 VH鎖アミノ酸配列(配列番号:11)を図16に示す。

【0296】

mAb806 VL鎖:核酸配列(配列番号:3)、およびシグナルペプチドを伴うアミノ酸配列(配列番号:4)を図15Aおよび15Bにそれぞれ示す(図15Bではシグナルペプチドに下線を引く)。図17では下線を引くことにより相補性決定領域CDR1、CDR2およびCDR3(それぞれ、配列番号:18、19および20)を指摘する。このシグナルペプチドなしでのmAb806 VL鎖アミノ酸配列(配列番号:12)を図17に示す。

10

【0297】

mAb124

mAb124 VH鎖:核酸(配列番号:21)アミノ酸(配列番号:22)配列を図51Aおよび51Bにそれぞれ示す。下線を引くことにより相補性決定領域CDR1、CDR2およびCDR3(それぞれ、配列番号:23、24および25)を指摘する。

【0298】

mAb124 VL鎖:核酸(配列番号:26)アミノ酸(配列番号:27)配列を図51Cおよび51Dにそれぞれ示す。下線を引くことにより相補性決定領域CDR1、CDR2およびCDR3(それぞれ、配列番号:28、29および30)を指摘する。

20

【0299】

mAb1133

mAb1133 VH鎖:核酸(配列番号:31)アミノ酸(配列番号:32)配列を図52Aおよび52Bにそれぞれ示す。下線を引くことにより相補性決定領域CDR1、CDR2およびCDR3(それぞれ、配列番号:33、34および35)を指摘する。

【0300】

mAb1133 VL鎖:核酸(配列番号:36)アミノ酸(配列番号:37)配列を図52Cおよび52Dにそれぞれ示す。下線を引くことにより相補性決定領域CDR1、CDR2およびCDR3(それぞれ、配列番号:38、39および40)を指摘する。

30

【実施例2】

【0301】

FACSによる細胞系への抗体の結合

本明細書および以下の実施例に示すように、さらなる特性づけのためにmAb806を先ず選択した。下の実施例26において論じるように、mAb124およびmAb1133もさらなる特性づけのために選択し、ここで論ずるmAb806の特有の特性に対応する特性を有することが判明した。

【0302】

mAb806の特異性を判定するために、U87MG、U87MG-Δ2-7およびU87MG-wtEGFR細胞へのこの結合を、flow活性化細胞選別(FACS)によって分析した。簡単に言うと、以前に記載されている(Nishikawa et al., 1994)ように、細胞を適切な抗体(10μg/mL)で標識し、その後、フルオレセインコンジュゲート型ヤギ抗マウスIgG(1:100希釈; Calbiochem、米国、カリフォルニア州サンディエゴ; Becton-Dickinson Pharmingen、米国、カリフォルニア州サンディエゴ)によって標識した。Coulter Epics Elite ESPを用いて最低5,000事象を観察することによってFACSデータを得、Windows(登録商標)用EXPO(バージョン2)を使用して分析した。無関係なIgG2bをmAb806のためのアイソタイプ対照として含め、de2-7とwtEGFRの両方を認識するので528抗体を含めた。

40

【0303】

528抗体のみが親U87細胞系を染色することができた(図1)。このことは、これ

50

らの細胞が wt EGF R を発現することを実証した以前の報告 (Nishikawa et al., 1994) と一致している。mAb 806 および DH 8.3 は、対照抗体に類似した結合レベルを有した。このことは、これらが野生型受容体に結合できないことを明示している (図 1)。U87MG.Δ2-7 および U87MG. wt EGF R 細胞へのアイソタイプ対照抗体の結合は、U87MG 細胞について観察されたものと類似していた。

【0304】

mAb 806 は、U87MG.Δ2-7 および U87MG. wt EGF R 細胞を染色した。このことは、mAb 806 が de2-7 EGF R および増幅された EGF R を特異的に認識することを示している (図 1)。DH 8.3 抗体は、U87MG.Δ2-7 細胞を染色した。このことにより、DH 8.3 抗体が de2-7 EGF R を特異的に認識することが確認される (図 1)。予想どおり、528 抗体は、U87MG.Δ2-7 および U87MG. wt EGF R 細胞系を両方とも染色した (図 1)。予想どおり、528 抗体は、親細胞より高い強度で U87MG.Δ2-7 を染色した。これが、これらの細胞で共発現される de2-7 および野生型受容体両方に結合するからである (図 1)。ターゲット細胞へのヒト赤血球 (O 型) でコーティングされたプロテイン A の出現により表面結合 IgG を検出するプロテイン A 混合血球吸着を用いて、類似した結果を得た。モノクローナル抗体 806 は、U87MG.Δ2-7 と反応性であったが、野生型 EGF R を発現する U87MG との有意な反応性を示さなかった (未希釈上清 10% 未満)。重要なことに、mAb 806 は、BaF/3.Δ2-7 細胞系にも結合した。このことは、wt EGF R の共発現が mAb 806 反応性の必要条件でないことを明示している (図 1)。

【実施例 3】

【0305】

アッセイにおける抗体の結合

mAb 806 および DH 8.3 抗体の特異性をさらに特性づけするために、これらの結合を ELISA によって検査した。2つのタイプの ELISA を用いて抗体の特異性を判定した。第一のアッセイでは、プレートを sEGFR (0.1 M 炭酸バッファー pH 9.2 中、10 μg/mL) で 2 時間コーティングし、その後、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 EGF R の組換え細胞外ドメイン (アミノ酸 1-621) であり、これを以前に記載されたとおりに生産した (Domagala 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, 11-29)。リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中 2% HSA 中の漸増濃度で抗体をウェルに三重反復で添加した。基質として ABTS (Sigma、オーストラリア、シドニー) と 405 nm で測定した吸光度とを使用して、ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート型ヒツジ抗マウス IgG (Silenus、オーストラリア、メルボルン) により、結合抗体を検出した。

【0306】

mAb 806 抗体と 528 抗体の両方が、固定化野生型 sEGFR に対して用量依存性の飽和結合曲線を提示した (図 2A)。de2-7 EGF R において見つけれられる特有の接合点ペプチドは sEGFR に含有されないもので、mAb 806 は、野生型 EGF R 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。528 抗体の結合は、mAb 806 抗体について観察されたものより低かった。おそらく、これが高次構造決定基を認識するからである。予想どおり、DH 8.3 抗体は、10 μg/mL までの濃度でさえ、野生型 sEGFR に結合しなかった (図 2A)。溶解状態の sEGFR は、固定化 sEGFR への 528 抗体の結合を用量依存様式で阻害したが、mAb 806 への結合を阻害することができなかった (図 2B)。このことは、mAb 806 が、ELISA プレートに固定化されると野生型 EGF R にしか結合できないこと、高次構造変化を誘導し得る方法を示唆している。BIAcore を用いて、mAb 806 は固定化 sEGFR に結合する

が、固定化 m A b 8 0 6 は溶解状態の s E G F R に結合できないという同様の結果が観察された (図 2 C)。

【 0 3 0 7 】

1 0 分間 9 5 °C での加熱による変性後、溶解状態の s E G F R は、固定化 s E G F R への m A b 8 0 6 の結合を阻害できなかった (図 2 C)。このことにより、m A b 8 0 6 は一定の条件下で野生型 E G F R に結合できることが確認される。興味深いことに、変性された s E G F R は、5 2 8 抗体の結合を阻害できなかった (図 2 C)。このことは、この抗体が高次構造エピトープを認識することを明示している。D H 8 . 3 抗体は、特有の d e 2 - 7 E G F R ペプチドへの用量依存的な可飽和結合を示した (図 2 D)。m A b 8 0 6 抗体と 5 2 8 抗体の両方が、D H 8 . 3 の飽和結合を達成するために用いられるものより高い濃度でさえ、前記ペプチドに結合しなかった。このことは、m A b 8 0 6 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、さらに示している。

10

【 0 3 0 8 】

第二のアッセイにおいて、ビオチン化 d e 2 - 7 特異的ペプチド (ビオチン L E E K K G N Y V V T D H (配列番号 : 5)) は、ストレプタビジンでプレコートされた E L I S A プレート (P i e r c e 、イリノイ州ロックフォード) に結合しなかった。第一のアッセイの場合のように抗体を結合させ、検出した。m A b 8 0 6 抗体と 5 2 8 抗体の両方が、D H 8 . 3 の飽和結合を達成するために用いたものより高い濃度でさえ、前記ペプチドに結合しなかった。このことは、m A b 8 0 6 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、さらに示している。

20

【 0 3 0 9 】

m A b 8 0 6 が、前記接合点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、追加の実験を行った。C 末端ビオチン化 d e 2 - 7 ペプチド (L E E K K G N Y V V T D H - ビオチン (配列番号 : 6)) を、m A b 8 0 6 およびこの d e 2 - 7 ペプチドに対して産生させた m A b L 8 A 4 (R e i s t e t a l . (1 9 9 5) C a n c e r R e s . 5 5 (1 9) , 4 3 7 5 - 4 3 8 2 ; F o u l o n e t a l . (2 0 0 0) C a n c e r R e s . 6 0 (1 6) , 4 4 5 3 - 4 4 6 0) と共に、研究において用いた。

【 0 3 1 0 】

ペプチド研究において用いた試薬

30

接合点ペプチド : L E E K K G N Y V V T D H - O H (B i o s o u r c e 、カリフォルニア州カマリロ) ;

ペプチド C : L E E K K G N Y V V T D H (K - B i o t) - O H (B i o s o u r c e 、カリフォルニア州カマリロ) ;

s E G F R : 野生型 E G F R の C H O 細胞由来組換え可溶性細胞外ドメイン (アミノ酸 1 - 6 2 1) (L I C R M e l b o u r n e) ;

m A b 8 0 6 : マウスモノクローナル抗体、I g G _{2 b} (L I C R N Y B) ;

m A b L 8 A 4 : マウスモノクローナル抗体、I g G ₁ (D u k e U n i v e r s i t y) ;

I g G ₁ アイソタイプ対照 m A b ;

40

I g G _{2 b} アイソタイプ対照 m A b 。

【 0 3 1 1 】

ペプチド C をストレプタビジン・マイクロセンサー・チップに 3 5 0 R U (+ / - 3 0 R U) の表面密度で固定化した。m A b の系列希釈物をこのペプチドとの反応について試験した。非ビオチン化ペプチドを使用する遮断実験を行って、特異性を評価した。

【 0 3 1 2 】

m A b L 8 A 4 は、低い抗体濃度 (6 . 2 5 M) でさえ、ペプチド C との強い反応性を示した (図 2 E)。m A b 8 0 6 は、1 0 0 n M (試験した最高濃度) の抗体濃度までペプチド C との検出可能な特異的反応性を示さなかった (図 2 E および 2 F)。m A b L 8 A 4 がペプチド C と反応することは予想された。このペプチドを m A b L 8 A 4 の産生

50

の際に免疫原として使用したからである。接合点ペプチド（非ビオチン化、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）の添加は、mAb L8A4とペプチドCの反応性を完全に遮断する。このことにより、接合点ペプチドエピトープに対するこの抗体の特異性が確証される。

【0313】

BIAcore実験の第二のセットでは、sEGFRをCMマイクロセンサーチップ上に、 $\sim 4000 \text{RU}$ の表面密度で固定化した。mAbの系列希釈物をsEGFRとの反応性について試験した。

【0314】

mAb 806は、変性されたsEGFRと強反応性であったが、mAb L8A4は、変性されたsEGFRと反応しなかった。変性されたsEGFRとmAb 806の反応性は、抗体濃度の減少に伴って減少する。mAb L8A4がsEGFRと反応しないことは予想された。接合点ペプチドを免疫原として使用してmAb L8A4を産生させたからであり、sEGFRは接合点ペプチドを含有しないからである。

10

【0315】

ドットプロット免疫染色実験も行った。ペプチドの系列希釈物をPVDfまたはニトロセルロース膜上に $0.5 \mu\text{L}$ でスポットティングした。PBS中の2%BSAで膜をブロックし、その後、806、L8A4、DH8.3および対照抗体でプローブした。抗体L8A4およびDH8.3は、膜上のペプチドに結合した（データを示さない。）。mAb 806は、L8A4が結合を明確に示した濃度で、ペプチドに結合しなかった（データを示さない。）。対照抗体もペプチド結合について陰性であった。

20

【0316】

mAb 806は、免疫プロットिंगに従って細胞溶解産物中のwtEGFRに結合した（結果を示さない。）。このことは、de2-7EGFRと反応するがwtEGFRと反応しないDH8.3抗体で得られた結果とは異なる。従って、mAb 806は、変性後にwtEGFRを認識することができるが、この受容体がこの天然状態で細胞表面にあるときには認識することができない。

【実施例4】

【0317】

スキャッチャード解析

各抗体の相対親和性を判定するために、免疫反応についての補正後、U87MG、 $\Delta 2-7$ 細胞を使用するスキャッチャード解析を行った。抗体をChloramine T法により ^{125}I （Amrad、オーストラリア、メルボルン）で標識し、Lindmoアッセイ（Lindmo et al. (1984) Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J. Immunol. Methods. 72, 77-89）により免疫反応性を判定した。

30

【0318】

1% HSA / PBS中で、 $1 - 2 \times 10^6$ の生U87MG、 $\Delta 2-7$ またはA431細胞を用いて、90分間、4で穏やかに回転させながらすべての結合アッセイを行った。 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ の設定濃度の ^{125}I 標識抗体を、漸増濃度の適切な未標識抗体の存在下で使用した。 $10,000$ 倍過剰の未標識抗体の存在下で非特異的結合を判定した。 ^{125}I 放射標識mAb 806およびDH8.3 H抗体両方が、親U87MG細胞に結合しなかった。温置が完了した後、細胞を洗浄し、COBRA IIガンマカウンター（Packard Instrument Company、米国、コネチカット州メリデン）を使用して結合 ^{125}I 標識抗体について計数した。

40

【0319】

mAb 806およびDH8.3抗体両方が、ヨウ素化されたとき高い免疫反応性を保持し、典型的に、mAb 806については90%より大きく、およびDH8.3抗体につい

50

ては45 - 50 %であった。mAb806は、 $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ のde2-7 EGFR受容体に対する親和性を有したのに対し、DH8.3の親和性は、 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ で数10倍低かった。ヨウ素化された抗体もU87MG親細胞に結合しなかった。mAb806は、1細胞につき平均で 2.4×10^5 の結合部位を認識し、DH8.3抗体は、平均で 5.2×10^5 部位に結合した。このように、抗体間に受容体数の良好な一致があるばかりでなく、以前の報告(Reist et al. (1997) 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)では同じ細胞系に対して異なるde2-7 EGFR特異的抗体により測定して1細胞につき 2.5×10^5 のde2-7受容体を示した。

【実施例5】

【0320】

U87MG.Δ2-7細胞による抗体の内在化

ターゲット細胞への結合後の抗体内在化率は、この腫瘍ターゲティング特性と治療選択肢の両方に影響を及ぼす。それ故、本発明者らは、U87MG.Δ2-7細胞への結合後のmAb806およびDH8.3抗体の内在化をFACSによって検査した。U87MG.Δ2-7細胞をmAb806抗体またはDH8.3抗体($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)のいずれかと共に1時間、DMEM中、4℃で温置した。洗浄後、37℃に予熱したDMEMに細胞を移し、37℃での温置後の様々な時点でアリコートを取った。氷冷した洗浄バッファー(1% HSA / PBS)でアリコートを直ちに洗浄することにより、内在化を停止させた。この時間経過の完了時、上で説明したようにFACSにより細胞を染色した。式：内在化した抗体 = (時間_xでの平均蛍光 - バックグラウンド蛍光) / (時間₀での平均蛍光 - バックグラウンド蛍光) × 100を用いて様々な時点での表面抗体染色をゼロ時と比較することにより、内在化百分率を算出した。この方法を、以前に記載されているような(Huang et al. (1997) 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)内在化を測定するためにヨウ素化抗体(mAb806)を使用する1つのアッセイにおいて検証した。異なる時点での内在化率の差を、スチューデントt検定を用いて比較した。この研究を通して、ウィルコキソン分析により分析したインビボ生存アッセイを除き、データをスチューデントt検定により有意性について分析した。

【0321】

両方の抗体は、mAb806については10分およびDH8.3については30分で定常状態レベルに達する、比較的急速な内在化を示した(図3)。DH8.3の内在化のほうが、率(mAb806についての36.8%と比較して10分の時点で内在化されたDH8.3 80.5%、 $p < 0.001$)の点でも、60分の時点で内在化された総量(93.5%対30.4%、 $p < 0.001$)の点でも、有意に高かった。mAb806は、行った4つすべてのアッセイにおいて20分と比較して30および60分で有意に低い内在化レベルを示した(図3)。このことは、ヨウ素化mAb806に基づく内在化アッセイを用いても確認された(データを示さない。)。

【実施例6】

【0322】

抗体内在化の電子顕微鏡分析

抗体間の内在化率に関する上で述べた差にかんがみて、電子顕微鏡を用いて抗体細胞内

輸送の詳細な分析を行った。

【0323】

U87MG、Δ2-7細胞を、ゼラチンコートチャンバースライド(Nunc、イリノイ州ネーパerville)で集密度80%に成長させ、その後、氷冷DMEMで洗浄した。その後、細胞をmAb806またはDH8.3抗体と共にDMEM中で45分間、4℃で温置した。洗浄後、細胞をさらに30分間、金コンジュゲート型(20nm粒子)抗マウスIgG(BBInternational、英国、カーディフ)と共に4℃で温置した。さらなる洗浄後、予熱したDMEM/10%PCSSを細胞に添加し、これを37℃で、1-60分の様々な時間、温置した。氷冷培地により抗体の内在化を停止させ、PBS/0.1%BSA中の2.5%グルタルアルデヒドで細胞を固定し、その後、2.5%四酸化オスミウムで後固定した。アセトンの段階的系列による脱水後、サンプルをEpon/Araldite樹脂に包埋し、Reichert Ultracut-Sマイクロトーム(Leica)で超薄切片として切断し、ニッケルグリッドで回収した。これらの切片を酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色した後、Philips CM12透過型電子顕微鏡を用いて80kVで視検した。カイ二乗検定を用いて、被覆小窩内に含有された金粒の統計解析を行った。

10

【0324】

DH8.3抗体は、主に被覆小窩により内在化された一方で、mAb806は、マクロピノサイトーシスによって内在化されるように見えた(図19)。実際、mAb806と共に温置した細胞において形成された32の被覆小窩の詳細な分析は、これらのいずれも抗体を含有しないことを示した。対照的に、DH8.3と共に温置した細胞からのすべての被覆小窩の約20%は、抗体について陽性であり、多数の金粒を含有するものがあった。被覆小窩内に含有される金粒の総数の統計解析により、この差は非常に有意である($p < 0.01$)であることが判明した。20-30分後、両方の抗体を形態学的にリボソームに似ている構造で見ることができた(図19C)。これらの構造内の細胞破壊片の存在もこれらのリボソーム性と一致していた。

20

【実施例7】

【0325】

腫瘍保有ヌードマウスにおける抗体の生体内分布

U87MG異種移植片を一方の体側におよびU87MG、Δ2-7異種移植片を他方の体側に有するヌードマウスにおいて、mAb806およびDH8.3抗体の生体内分布を比較した。DH8.3抗体が4-24時間の間に腫瘍ターゲティングのピークレベルを示すことが以前の報告(Hills et al. (1995) Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. Int. J. Cancer. 63, 537-43)により実証されているので、この研究に比較的短期間を選んだ。

30

【0326】

ヌードBALB/cマウスにおいて 3×10^6 U87MG、U87MG、Δ2-7またはA431細胞のs.c.注射により腫瘍異種移植片を確率した。様々な時点で免疫組織化学により測定して、U87MG、Δ2-7異種移植片におけるde2-7 EGFR発現は、生体分布期間全体を通して安定したままであった(データを示さない。)。A431細胞は、免疫組織化学により判定して、腫瘍異種移植片として成長したときこれらのmAb806反応性を保持していた。U87MGまたはA431細胞を一方の体側に注射し、この7-10日後にU87MG、Δ2-7細胞を他方の体側に注射した。de2-7

40

EGFR発現性異種移植片のほうが、成長速度が速いからである。上で説明したように抗体を放射標識して免疫反応性について評定し、腫瘍が100-200mgの重量になったら眼窩後方経路によりマウスに注射した。各マウスが2つの異なる抗体(1抗体につき2μg)を受けた: 2μCiの 125 I-標識mAb806および2μCiの 131 I-標識DH8.3または528。指示されていない限り、5匹の群を注射後の様々な時点で

50

犠牲にし、心穿刺により血液を得た。腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓および肺を切開により得た。すべての組織を計量し、デュアル・チャネル・カウンティングWindowを用いて¹²⁵Iおよび¹³¹I活性についてアッセイした。データを、それぞれの抗体について、注射用量標準との比較により決定した%ID/g腫瘍として表すか、腫瘍対血液/肝臓比(即ち、%ID/g血液もしくは肝臓で割った%ID/g腫瘍)に変換した。群間の差をスチューデントt検定によって分析した。放射標識mAb806の注射後、一部の腫瘍をホルマリンで固定し、パラフィンに包埋し、5, μm切片に切断し、その後、X線フィルム(AGFA、ベルギー、モルツェル)に感光させて、オートラジオグラフィーにより抗体局在を判定した。

【0327】

%ID/g腫瘍の点から見ると、mAb806は、U87MG、Δ2-7異種移植片において8時間で18.6%ID/g腫瘍のこのピークレベルに達し(図4)、血液を除く他のいずれの組織より相当高度であった。DH8.3も8時間でピーク腫瘍レベルを示したが、このレベルは、mAb806と比較して統計的に($p < 0.001$)低い8.8%ID/g腫瘍であった(図4B)。両方の抗体のレベルは、24および48時間でゆっくりと低下した。¹²⁵I標識mAb806を単独で注射した8時間後に収集したU87MG、Δ2-7異種移植片組織切片のオートラジオグラフィーは、生存腫瘍への抗体の局在を明らかに示している(図20)。いずれの抗体もU87MG親異種移植片の特異的ターゲッティングを示さなかった(図4Aおよび4B)。腫瘍対血液/肝臓比に関して、mAb806は、24時間の時点で血液(1.3の比)および肝臓(6.1の比)の両方に対する最高比率を示した(図5Aおよび5B)。DH8.3抗体は、この最高比を血液に関しては8時間で(0.38の比)および肝臓に関しては24時間で(1.5の比)示した(図5Aおよび5B)。これらの用法が、mAb806について得られた値より相当低い。

【0328】

上で説明したように、腫瘍におけるmAb806のレベルは、8時間でピークに達した。このピークは、多くの腫瘍ターゲッティング抗体と比較して相対的に早い。これは、同様の容量の抗体を使用して注射後4-24時間の時点ですべてがピークを示すde2-7EGFR特異的抗体を使用する他の研究(Hills et al., 1995; Reist et al., 1997; Reist et al. (1996) Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. Cancer Res. 56, 4970-7)と完全に一致している。実際には、以前の報告とは異なり、抗体ターゲッティングが急速にピークに達するであろうという仮定のもとに、8時間時点を含めた。mAb806で見られた%ID/g腫瘍は、標準的なヨウ素化技術を用いて他のde2-7EGFR特異的抗体について報告されたもの(Hills et al., 1995; Huang et al., 1997; Reist et al. (1995) 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)に類似していた。

【0329】

この早期ピークの理由は、おそらく二通りある。第一に、トランスフェクトされたU87MG細胞を含む、de2-7EGFRを発現する腫瘍は、腫瘍異種移植片として極めて急速に成長する。従って、これらの生体内分布研究において使用した比較的短い期間の間でさえ、腫瘍サイズは、成長の緩慢な腫瘍と比較して%ID/g腫瘍が低減されるような程度まで増加する(4日間で質量の5-10倍増加)。第二に、mAb806の内在化は、DH8.3と比較すると相対的に緩慢であったが、多くの他の腫瘍抗体/抗原系に対

10

20

30

40

50

しては依然として急速であった。内在化された抗体は、細胞から排出される分解産物での急速なタンパク質分解を受ける (Press et al. (1990) *Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores*. *Cancer Res.* 50, 1243-50)。内在化、分解および排出のこの方法が、細胞内に保持されたヨウ素化抗体の量を減少させる。この結果、内在化する抗体は、これらの内在化しない対応品より低いターゲティングレベルを示す。本明細書において報告する電子顕微鏡データは、内在化された mAb 806 がリソソームに急速に輸送される、そこで急速な分解がおそらく発生することを明示している。この観察は、細胞からのヨウ素の迅速な排除と一致する。

10

【0330】

de 2-7 EGFR において見つけれられる特有の接合点ペプチドに対する以前に記載されている L8A4 モノクローナル抗体は、mAb 806 に類似した様式で動作する (Reist et al. (1997) *In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent*. *Nucl. Med. Biol.* 24, 639-47)。de 2-7 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、類似した内在化率 (mAb 806 についての 1 時間で 30% と比較して 1 時間で 35%) を有し、de 2-7 EGFR でトランスフェクトされた 3T3 線維芽細胞を使用すると匹敵するインビボターゲティング (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) を示した (Reist et al. (1997) *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)。

20

【0331】

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は、5-ヨード-3-ピリジンカルボン酸 N-スクシミジル (Reist et al., 1997) で標識したとき、増進された。この標識された接合団は、リソソーム pH で正電荷を有し、それ故、細胞保持を増進した (Reist et al. (1996) *Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate*. *Cancer Res.* 56, 4970-7)。増進された保持は、放射線免疫療法のために抗体を考慮するとき有用である可能性を秘めており、この方法は、ヨウ素化 mAb 806 またはこの断片の保持を向上させるために用いることができよう。

30

40

【実施例 8】

【0332】

増幅された EGFR を含有する細胞への mAb 806 の結合

増幅された受容体遺伝子を含む細胞において発現された EGFR を mAb 806 が認識できるかどうかを検査するために、A431 細胞へのこの結合を分析した。以前に説明したように、A431 細胞は、ヒト扁平上皮癌腫細胞であり、高レベルの wt EGFR を発現する。A431 細胞への mAb 806 の低い非常に再現性のある結合が、FACS 分析によって観察された (図 6)。DH8.3 抗体は、A431 細胞を結合しなかった。このことは、mAb 806 の結合が低レベルの de 2-7 EGFR 発現の結果ではなかったことを示している (図 6)。予想どおり、抗 EGFR 528 抗体は、A431 細胞

50

胞の強い染色を示した(図6)。この結果にかんがみて、A431細胞へのmAb806の結合をスキャッチャード解析によって特性づけした。ヨウ素化mAb806の結合は、比較的低かったが、スキャッチャードのための一貫したデータを得ることができた。3つのこのような実験の平均により、1細胞につき 2.5×10^5 受容体で、 $9.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ の親和性についての値を得た。従って、この受容体に対する親和性は、de2-7

EGFRに対する親和性より数10倍低かった。さらに、mAb806は、A431細胞の表面において見つけられるEGFRの小部分しか認識しないようである。528抗体は、1細胞につきおよそ 2×10^6 の受容体を判断した。このことは、非常に多数の他の研究(Santon et al. (1986) Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice. Cancer Res. 46, 4701-5)と一致している。

【0333】

これらの結果がA431細胞系に単に限定されないことを保証するために、mAb806反応性を、EGFR遺伝子の増幅を示す2つの他の細胞系において検査した。HN5頭頸部細胞系(Kwok TT and Sutherland RM (1991) Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. Br. J. Cancer. 64, 251-4)とMDA-468乳癌細胞系(Films et al. (1985) 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. 128, 898-905)の両方は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する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、両方の細胞系の強い染色を提示した(図21)。A431細胞系と同様に、mAb806は、528抗体で観察されたものより低レベルでだが、両方の細胞系を明確に染色した(図21)。従って、mAb806結合は、単にA431限定されず、EGFR遺伝子の増幅を含有する細胞について一般的に観察されることであるようである。

【0334】

mAb806による野生型sEGFRの認識は、エピトープを露出させるためにこの受容体の何らかの変性を明確に必要とする。必要とされる変性の程度は、ほんのわずかである。プラスチック表面への野生型sEGFRの吸着でさえELISAアッセイにおいてmAb806の頑丈な結合を誘導するからである。mAb806は、A431細胞の表面のEGFRのおおよそ10%しか結合しないので、受容体のこのサブセットは、de2-7EGFRトランシェーションによって誘導されるものに類似した改変高次構造を有するであろうと推測したくなる。実際、A431細胞における遺伝子増幅によって媒介されるEGFRの極めて高い発現は、一部の受容体を不正確にプロセッシングする原因となり、これが改変高次構造につながる。興味深いことに、mAb806でのA431細胞溶解産物の半定量的免疫プロットイングは、これが、SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングに従ってA431EGF受容体の大部分を認識し得ることを示した。この結果は、mAb806が、改変高次構造を有するA431細胞の表面の受容体のサブセットに結合するという主張のさらなる裏付けとなる。A431細胞におけるこれらの観察は、mAb806が、EGFR遺伝子の増幅を有する神経膠腫を結合することを実証する免疫組織化学データと一致する。mAb806結合は、親U87MG細胞に対して完全に陰性であるので、増幅されたEGFRを含有する細胞にこの現象を限定することができると見えてくるであろうが、U87MG細胞の表面の「変性された」受容体のレベルが検出レベルより下である場合がある。しかし、ヨウ素化されたmAb806は、 1×10^7 以下の細胞を

含有する U 8 7 M G 細胞ペレットに結合しなかったので、この可能性は低いと思われる。

【実施例 9】

【0335】

m A b 8 0 6 による A 4 3 1 細胞のインビボターゲットティング

第二の生体内分布研究を m A b 8 0 6 で行って、これが A 4 3 1 腫瘍異種移植片をターゲットにすることができるかどうかを判定した。この研究は、すべてのマウスに陽性対照として含めた m A b 8 0 6 による U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片のターゲットティングに関してより多くの情報を得るために、より長い時間経過にわたって行った。加えて、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陽性対照として含めた。以前の研究により、ヌードマウスにおいて成長させた A 4 3 1 細胞へのこの抗体の低いが有意なター

10

ゲットングが実証されていたからである (M a s u i e t a l . (1 9 8 4) G r o w t h i n h i b i t i o n o f h u m a n t u m o r c e l l s i n a t h y m i c m i c e b y a n t i - e p i d e r m a l g r o w t h f a c t o r r e c e p t o r m o n o c l o n a l a n t i b o d i e s . C a n c e r R e s . 4 4 , 1 0 0 2 - 7) 。

【0336】

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はほぼ同一のターゲットティング特性を提示した (図 4 A と比較した図 7 A) 。 % I D / g 腫瘍の点から見て、U 8 7 M G . Δ 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、ゆっくりと低下したが、正常組織において検出されるレベルより高いレベルを常に維持した。A 4 3 1 異種移植片への取り込みは、比較的低かったが、最初の 2 4 時間の間に、肝臓、脾臓、腎臓および肺などの正常組織では観察されない % I D / g 腫瘍の小さな増加があった (図 7 A) 。 5 2 8 抗体の取り込みは、一部は、この抗体の血液からのより早いクリアランスのため、% I D / g 腫瘍で表したとき、両方の異種移植片において非常に低かった (図 7 B) 。 ^{1 2 5} I 放射標 m A b 8 0 6 を単独で注射した 2 4 時間後に採集した A 4 3 1 異種移植片組織切片のオートラジオグラフィーは、腫瘍の辺縁付近の生存腫瘍への抗体の局在化をはっきりと示すが、中心壊死領域への抗体の局在を示さない (図 2 3) 。腫瘍対血液比の点から見ると、m A b 8 0 6 は、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片については 7 2 時間でおおよび A 4 3 1 異種移植片については 1 0 0 時間でピークに達した (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 腫瘍に関しては 1 . 0 を決して超えなかったが、これは、全時間経過を通して増加し (図 8 B) 、検査したすべての他の組織より高かった (データを示さない。) 。このことは、低いターゲットティングレベルを示している。

20

30

【0337】

5 2 8 抗体についての腫瘍対血液比は、m A b 8 0 6 に類似したプロフィールを示したが、A 4 3 1 異種移植片でのより高いレベルに注目された (図 8 A 、 B) 。 m A b 8 0 6 は、7 2 時間の時点で U 8 7 M G . Δ 2 - 7 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、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はっきりと明示している (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ものに類似していた (データを示さない。) 。 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 時間の時点で 2 . 0 であった。このこともまた、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 8 D) 。

40

【実施例 10】

【0338】

治療法研究

m A b 8 0 6 の効果を疾患の 2 つの異種移植片モデル - 予防的モデルと確率腫瘍モデル - において評価した。

【0339】

異種移植片モデル

50

以前の報告 (Nishikawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91 (16), 7727 - 7731) と一致して、de 2 - 7 EGFR でトランスフェクトされた U87MG 細胞は、親細胞および wt EGFR でトランスフェクトされた U87MG 細胞より急速に成長した。従って、同じマウスにおいて両方の細胞タイプを成長させることはできなかった。

【0340】

100 mL の PBS 中の腫瘍細胞 (3×10^6) を週齢 4 - 6 週の雌ヌードマウス (Animal Research Center、オーストラリア、ウエスタンオーストラリア州) の両側腹部に皮下接種した。mAb 806 の治療効力を予防的モデルと確率腫瘍モデルの両方において調査した。予防的モデルでは、それぞれが 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て、1 または 0.1 mg の mAb 806 または ビヒクル (PBS) のいずれかで腹腔内治療した。治療を 2 週間、週 3 回、合計 6 回にわたって続けた。確率モデルでは、腫瘍が $65 \pm 6.42 \text{ mm}^3$ (U87MG, $\Delta 2 - 7$)、 $84 \pm 9.07 \text{ mm}^3$ (U87MG)、 $73 \pm 7.5 \text{ mm}^3$ (U87MG, wt EGFR) または $201 \pm 19.09 \text{ mm}^3$ (A431 腫瘍) の平均容積に達したときに治療を開始した。式 (長さ $\times$ 幅²) / 2 (式中、長さは、最長軸であり、幅は、長さに対して直角での測定であった) を用いて、 mm^3 で腫瘍容積を決定した (Clark et al. (2000) Therapeutic efficacy of anti-Lewis (y) humanized 3 S 193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with Taxol chemotherapy. Clin. Cancer Res. 6, 3621 - 3628)。各治療群について平均腫瘍容積 $\pm$ S.E. としてデータを表した。スチューデント t 検定を用いて所与の時点で統計解析を行った。異種移植片が 1.5 cm^3 の近似容積に達したとき、動物を安楽死させ、組織検査のために腫瘍を切除した。この研究プロジェクトは、the Animal Ethic Committee of Austin and Repatriation Medical Centre により承認された。

【0341】

腫瘍異種移植片の組織検査

異種移植片を切除し、二等分した。一方の半分を 10% ホルマリン / PBS で固定した後、パラフィンに包埋した。その後、4 マイクロメートル切片を切断し、常例的組織検査のためにヘマトキシリンおよびエオシン (H&E) で染色した。他の半部分を Tissue Tek (登録商標) OCT 化合物 (Sakura Finetek、カリフォルニア州トランス) に包埋し、液体窒素で凍結させ、 -80°C で保管した。薄い (5 マイクロメートル) クリオスタット用切片を切断し、10 分間、氷冷アセトンで固定し、その後、さらに 10 分間、空気乾燥させた。切片を 10 分間、タンパク質ブロッキング試薬 (Lipshaw Immunon、米国、ピッツバーク) でブロッキングし、その後、ビオチン化一次抗体 (1 mg / mL) と共に 30 分間、室温 (RT) で温置した。ECL タンパク質ビオチン化モジュール (Amersham、オーストラリア、ボウルクハム・ヒルズ (Baulkham Hills)) をこの製造業者の説示どおりに使用して、すべての抗体をビオチン化した。PBS ですすいだ後、切片をストレプタビジン・ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体と共にさらに 30 分間温置した (Silenus、オーストラリア、メルボルン)。最終 PBS 洗浄後、これらの切片を 30 分間、過酸化水素の存在下、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール (3-amino-9-ethylcarbazole) (AEC) 基質 (0.1 M 酢酸、0.1 M 酢酸ナトリウム、0.02 M AEC (Sigma Chemical Co.、ミズーリ州セントルイス)) に暴露した。切片を水ですすぎ、5 分間、ヘマトキシリンで対比染色し、マウントした。

【0342】

予防的モデルにおける mAb 806 の効力

mAb 806 を予防的異種移植片モデルにおいて U87MG および U87MG, $\Delta 2 -$

7に対する効力について検査した。腫瘍接種の前日に抗体またはビヒクルを i . p . 投与し、2週間、週3回与えた。m A b 8 0 6 は、注射1回につき1 m g の用量で、w t E G F R を発現する親 U 8 7 M G 異種移植片の成長に対して効果がなかった（図9 A）。対照的に、m A b 8 0 6 は、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片を用量依存的様式で有意に阻害した（図9 B）。対照動物を犠牲にした第20日の時点で、平均腫瘍容積は、対照群については $1637 \pm 178.98 \text{ mm}^3$ であり、注射1回につき0.1 m g の群については統計的により小さい $526 \pm 94.74 \text{ mm}^3$ であり（ $p < 0.0001$ ）、1 m g 注射群については $197 \pm 42.06 \text{ mm}^3$ であった（ $p < 0.0001$ ）。治療群を第24日の時点で犠牲にし、この時点での平均腫瘍容積は、0.1 m g 治療群については $1287 \pm 243.03 \text{ mm}^3$ 、および1 m g 群については $492 \pm 100.8 \text{ mm}^3$ であった。

10

【0343】

確率異種移植片モデルにおける m A b 8 0 6 の効力

予防的異種移植片モデルにおける m A b 8 0 6 の効力にかんがみて、次に、確率腫瘍異種移植片の成長を阻害するこの能力を検査した。抗体治療は、腫瘍が、U 8 7 M G . Δ 2 0 7 異種移植片については $65 \pm 6.42 \text{ mm}^3$ および親 U 8 7 M G 異種移植片については $84 \pm 9.07 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍容積に達したときにこれを開始したことを除き、予防的モデルにおいて説明したとおりであった。もう一度繰り返して、m A b 8 0 6 は、注射1回につき1 m g の容量で親 U 8 7 M G 異種移植片の成長に効果がなかった（図10 A）。対照的に、m A b 8 0 6 は、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片の成長を用量依存様式で有意に阻害した（図10 B）。第17日の時点で、対照動物を犠牲にする前日、平均腫瘍容積は、対照群については $935 \pm 215.04 \text{ mm}^3$ であり、注射1回につき0.1 m g の群については $386 \pm 57.51 \text{ mm}^3$ であり（ $p < 0.01$ ）、1 m g 注射群については $217 \pm 58.17 \text{ mm}^3$ であった（ $p < 0.002$ ）。

20

【0344】

m A b 8 0 6 で観察される成長阻害が、d e 2 - 7 E G F R を発現する細胞に限定されるのかどうかを検査するために、U 8 7 M G . w t E G F R 腫瘍異種移植片に対するこの効力を確率モデルにおいて検査した。これらの細胞は、d e 2 - 7 E G F R 発現のない E G F R 遺伝子の増幅を有する腫瘍についてのモデルとして役立つ。腫瘍が $73 \pm 7.5 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍容積に達したとき、m A b 8 0 6 治療が開始した。m A b 8 0 6 は、ビヒクルで治療した対照腫瘍と比較したとき、確率 U 8 7 M G . w t E G F R 異種移植片の成長を有意に阻害した（図10 C）。対照動物を犠牲にした当日、この平均腫瘍容積は、対照群については $960 \pm 268.9 \text{ mm}^3$ であり、1 m g 注射で治療した群については $468 \pm 78.38 \text{ mm}^3$ であった（ $p < 0.04$ ）。

30

【0345】

確率腫瘍の組織学的および免疫組織化学的分析

m A b 8 0 6 治療および対照 U 8 7 M G . Δ 2 - 7 および U 8 7 M G . w t E G F R 異種移植片（それぞれ、第24および42日に採集したもの）間の可能性のある組織学的相違を評価するために、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を H & E で染色した。m A b 8 0 6 で治療した U 8 7 M G . Δ 2 - 7（治療終了の3日後に採集したもの）および U 8 7 M G . w t E G F R 異種移植片（治療終了の9日後に採集したもの）両方からの切片において壊死エリアが見られた。この結果が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、対照で治療した異種移植片からの切片の分析は、m A b 8 0 6 治療で見られたのと同じ壊死エリアを示さなかった。m A b 8 0 6 または対照治療 U 8 7 M G 異種移植片からの切片を H & E で染色もし、これらは二群間での細胞生存度に差がないことを示した。このことは、m A b 8 0 6 結合が、腫瘍異種移植片内の低減された細胞生存度 / 壊死を誘導するという仮説のさらなる裏付けとなる。

40

【0346】

U 8 7 M G、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 および U 8 7 M G . w t E G F R 異種移植片切片の免疫組織化学的分析を行って、m A b 8 0 6 治療後の d e 2 - 7 および w t E G F R 発現

50

レベルを判定した。上のように第24および42日の時点で切片を採集し、528および806抗体で免疫染色した。予想どおり、528抗体は、すべての異種移植片切片を染色し、治療した腫瘍と対照腫瘍の間に強度の明らかな低下はなかった。U87MG切片の染色は、mAb806では検出不能であったが、U87MG、 $\Delta 2-7$ およびU87MG、wtEGFR異種移植片切片の陽性染色が観察された。対照および治療U87MG、 $\Delta 2-7$ およびU87MG、wtEGFR異種移植片の間にmAb806染色密度の差はなかった。このことは、抗体治療がde2-7またはwtEGFR発現を減少しないことを示唆している。

【0347】

mAb806でのA431異種移植片の治療

mAb806の抗腫瘍効果がU87MG細胞に限定されないことを実証するために、A431異種移植片を有するマウスにこの抗体を投与した。これらの細胞は、増幅されたEGFR遺伝子を含むし、1細胞につきおおそ 2×10^6 の受容体を発現する。上で説明したように、mAb806は、これらのEGFRの約10%を結合し、A431異種移植片をターゲットにする。mAb806は、前に説明した予防的異種移植片モデルにおいて検査したとき、A431異種移植片の成長を有意に阻害した(図11A)。対照動物を犠牲にした第13日の時点で、平均腫瘍容積は、対照群では $135 \pm 147.54 \text{ mm}^3$ であり、および1mg注射治療群については $260 \pm 60.33 \text{ mm}^3$ であった($p < 0.0001$)。

【0348】

別の実験では、0.1mgのmAb用量も予防的モデルにおいてA431異種移植片の成長を有意に阻害した。

【0349】

予防的A431異種移植片モデルの効力にかんがみて、確率腫瘍異種移植片の成長を阻害するこの能力を検査した。抗体治療は、腫瘍が $201 \pm 19.09 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍容積に達するまでこれを開始しなかったことを除き、予防的モデルにおいて説明したとおりであった。mAb806は、確率腫瘍異種移植片の成長を有意に阻害した(図11B)。対照動物を犠牲にした第13日の時点で、平均腫瘍容積は、対照群については $1142 \pm 120.06 \text{ mm}^3$ であり、および1mg注射群については $451 \pm 65.58 \text{ mm}^3$ であった($p < 0.0001$)。

【0350】

要約すると、ここで説明したmAb806での治療法研究により、U87MG、 $\Delta 2-7$ 異種移植片成長の用量依存性阻害が明らかに実証された。対照的に、親U87MG異種移植片の阻害は、これらがインビボでwtEGFRを発現し続けるという事実にもかかわらず、観察されなかった。mAb806は、異種移植片容積を有意に減少させたばかりでなく、腫瘍内に有意な壊死も誘導した。これは、神経膠腫異種移植片を発現するヒトde2-7EGFRに対するこのような抗体のインビボでの治療的使用の成功を証明する最初の報告である。

【0351】

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、神経膠腫のおおよそ50%において観察される(Voldberg et al., 1997)。受容体遺伝子増幅によって媒介されるその後のEGFR過発現は、細胞内シグナリングおよび細胞成長を増加させることにより、成長有利性をもたらすことができることが提案された(Filmus et al., 1987)。U87MG細胞系をwtEGFRでトランスフェクトして、EGFR遺伝子増幅の方法を模倣する神経膠腫細胞を生産した。mAb806での確率U87MG、wtEGFR異種移植片の治療は、結果として有意な成長阻害を生じさせた。従って、mAb806は、EGFR遺伝子の増幅を有する細胞に対してもインビボ抗腫瘍活性を媒介する。興味深いことに、U87MG、wtEGFR異種移植片のmAb806阻害は、U87MG、 $\Delta 2-7$ 腫瘍で観察されるものより効果が低いようである。このことは、mAb806が、増幅されたEGFRに対してより低い親和性を有

10

20

30

40

50

し、細胞表面で発現された受容体の小率にしか結合しないという事実をおそらく反映している。しかし、U87MG.wtEGFR異種移植片容積に対する小さな効果にもかかわらず、mAb806治療は、これらの異種移植片内に大きな壊死エリアを生じさせた。

【0352】

mAb806がU87MG由来細胞系の阻害のみを媒介するという可能性を除くために、本発明者らは、A431異種移植片に対するこの効力を試験した。この扁平上皮細胞癌腫由来細胞系は、インビトロでもインビボでも保持される有意なEGFR遺伝子増幅を有する。mAb806でのA431異種移植片の治療は、予防的モデルにおいても確率モデルにおいても有意な成長阻害を生じさせた。このことは、mAb806の抗腫瘍効果が、トランスフェクトされたU87MG細胞系に限定されないことを示している。

10

【実施例11】

【0353】

mAb806およびAG1478でのA431異種移植片の併用療法治療

AG1478と併用でのmAb806の抗腫瘍効果を、A431異種移植片を有する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に対するEGFRキナーゼの強力で選択的な阻害剤であり、血小板由来成長因子受容体キナーゼである(Calbiochem, Cat. 番号658552)。3つの対照を含めた；ビヒクルのみ、ビヒクル+mAb806のみ、およびビヒクル+AG1478のみでの治療。結果を図12に示す。0.1mgのmAb806を、異種移植の1日前ならびに異種移植後1、3、6、8および10日の時点で投与した。400μgのAG1478を、異種移植後0、2、4、7、9および11日の時点で投与した。

20

【0354】

AG1478とmAb806は、両方とも、単独で投与したとき、腫瘍容積の有意な減少を生じさせた。しかし、併用すると、腫瘍容積の減少が大きく増進された。

【0355】

加えて、A431細胞のEGFRへのmAb806の結合をAG1478の不在および存在下で評価した。細胞を無血清培地中に一晚置き、その後、AG1478で10分間、37℃で治療し、PBSで2回洗浄し、その後、1%Tritonで溶解し、溶解産物を遠心分離により10分間、12,000gで調製した。その後、Schooler and Wiley, Analytical Biochemistry 277, 135-142(2000)により記載されたアッセイの改良版でのELISAにより、溶解産物を806反応性について評定した。プレートをPBS/EDTA中の10μg/mLのmAb806で一晩、室温でコーティングし、その後、2回洗浄した。その後、プレートを10%血清アルブミン/PBSで2時間、37℃でブロックし、2回洗浄した。1:20の細胞溶解産物を10%血清アルブミン/PBSに1時間、37℃で添加し、その後、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90分、室温で反応させ、このプレートを4回洗浄し、10%血清アルブミン/PBS中の抗ウサギ-HRP(Silenusからの場合は1:2000)を90分間、室温で添加し、4回洗浄し、ABTSを基質として使用して発色させた。mAb806結合は、漸増量のAG1478の存在下で有意に増加されることが判明した(図13)。

30

40

【実施例12】

【0356】

EGFRステータスについて事前にタイプ分けしたヒト膠芽腫における免疫反応性

膠芽腫におけるEGFR発現、増幅および突然変異の高い発生率を考慮して、詳細な免疫組織化学研究を行って、異種移植片以外の腫瘍における806の特異性を評定した。16膠芽腫のパネルを免疫組織化学によって分析した。16膠芽腫のこのパネルを、増幅された野生型EGFRおよびde2-7EGFR発現の存在についてRT-PCRにより事前にタイプ分けした。これらの腫瘍のうち6つは、wtEGFR転写産物のみを発現し

50

、10は、wtEGFR遺伝子増幅を有し、これらのうち5つは、野生型EGFR転写産物のみを示し、5つは、野生型EGFRおよびde2-7遺伝子転写産物両方を示した。

【0357】

組織学スライドに適用し、10分間、冷アセトン中で固定した新鮮な凍結組織の5mm切片を使用して、免疫組織化学分析を行った。結合した一次抗体を、ビオチン化ウマ抗マウス抗体、その後のアビジン-ビオチン-複合反応で検出した。ジアミノベンジジン・四塩酸塩(DAB)を色原体として使用した。組織における免疫組織化学反応の程度を光学顕微鏡検査によって予測し、次のように25%増分で免疫反応性細胞数に従って等級づけした：

局所的 = 5%未満

+ = 5 - 25%

++ = 25 - 50%

+++ = 50 - 75%

++++ = > 75%

10

【0358】

528細胞は、すべての腫瘍において強い反応性を示したが、DH8.3免疫染色は、de2-7EGFRを発現する腫瘍に限定された(表2)。FACSおよびロゼット形成アッセイでの前の観察と一致して、mAb806は、非増幅EGFR遺伝子からのwtEGFR転写産物を発現する膠芽腫と反応しなかった(表2)。mAb806のこの反応性パターンは、異種移植片研究において観察されたものに類似しており、重ねて、この抗体がde2-7および増幅されたEGFRを認識するが、細胞表面で発現されたときのwtEGFRを認識しないことを示唆している。

20

【0359】

【表3】

表2

野生型EGFRおよび突然変異de2-7EGFRの存在についてならびにそれらの増幅ステータスについて予めタイプ分けされた膠芽腫に対するmAb528、DH8.3および806の免疫反応性

増幅	de2-7EGFR 発現	528	DH8.3	806
	なし	++++	-	-
	なし	++++	-	-*
	なし	++++	-	-
	なし	++	-	-
	なし	+++	-	-
	なし	++++	-	-
あり	なし	++++	-	++++
あり	なし	++++	-	+
あり	なし	++++	-	+++
あり	なし	++++	-	++++
あり	なし	++++	-	+-++++
あり	あり	++++	++++	++++
あり	あり	++++	++++	++++
あり	あり	++++	++++	++++
あり	あり	++++	++	++

30

40

* 局所的染色

【実施例13】

【0360】

正常組織におけるEGFR免疫反応性

50

d e 2 - 7 E G F R が正常組織において発現されるかどうかを判定するために、m A b 8 0 6 および D H 8 . 3 での免疫組織化学研究を 2 5 組織のパネルで行った。試験したいずれの組織においても、m A b 8 0 6 との強い免疫反応性も、D H 8 . 3 との強い免疫反応性もなかった。このことは、d e 2 - 7 E G F R が正常組織に不在であることを示唆している（表 3）。表皮の基底細胞層および上皮の粘膜扁平細胞に限定された m A b 8 0 6 での多少の可変染色が扁桃に存在した。胎盤では、栄養膜上皮の偶発的免疫染色が観察された。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、いずれの有意な m A b 8 0 6 反応性を示すこともできなかった。肝臓サンプルでは反応性は全く観察されず、皮膚サンプルにおけるおよび扁桃粘膜の扁平上皮における基底ケラチノサイトにおいて弱い、一貫性のない局所的反応性のみが偶発的に（研究したすべてのサンプルの 1 0 % 以下において）検出された。このことにより、この抗体が細胞表面で発現される w t E G F R をいずれの有意な程度にも結合しないことが、さらに実証される（表 3）。すべて補組織が、5 2 8 抗体で見られる普遍的染色により証明されるように、w t E G F R について陽性であった（表 3）。

【 0 3 6 1 】

【表 4】

表 3
正常組織に対する 582、DH8.3 および 806 の反応性

組織	528	DH8.3	806
食道	陽性	—	—
胃	陽性	—	—
十二指腸	陽性	—	—
小腸/十二指腸	陽性	—	—
結腸	陽性	—	—
肝臓	陽性	—	—
唾液腺(耳下腺)	陽性	—	—
腎臓	陽性	—	—
膀胱	陽性	—	—
前立腺	陽性	—	—
精巣	陽性	—	—
子宮(子宮外/内 膜)	陽性	— *	—
卵管	陽性	—	—
卵巢	陽性	—	—
乳房	陽性	— *	—
胎盤	陽性	—	—
末梢神経	陽性	—	—
骨格筋	陽性	—	—
甲状腺	陽性	—	—
リンパ節	陽性	—	—
脾臓	陽性	—	—
扁桃	陽性	—	—扁平上皮の基底 層の偶発的な弱 い反応性
心臓	陽性	—	—
肺	陽性	—	—
皮膚	陽性	—	—扁平上皮の基底 層の偶発的な弱 い反応性

10

20

30

40

50

* 様々な組織において多少の間質染色

【実施例 14】

【0362】

様々な腫瘍における E G F R 免疫反応性

12 の異なる悪性病変のパネルを使用して、他の腫瘍タイプにおける d e 2 - 7 E G F R の程度を検査した。528 抗体は、黒色腫および精上皮腫を除く分析した多くの腫瘍において、多くの場合、均質な染色を示した。存在する場合、D H 8 . 3 免疫反応性は、偶発的病巣腫瘍細胞に限定された。このことは、この検出システムを用いると、脳外の腫瘍における d e 2 - 7 E G F R 発現は、あったとしてもわずかである（表 4）。血管における局所的染色、および一部の腫瘍における D H 8 . 3 抗体での結合組織の様々な拡散染色もあった（表 4）。この染色は、使用する抗体濃度に強く依存し、および非特異的バックグラウンド反応性と考えられた。m A b 8 0 6 は、頭頸部腫瘍の 64% および肺癌腫の 50% において陽性染色を示した（表 4）。症例の 30% が陽性であった泌尿器腫瘍を除く他の場所では m A b 8 0 6 反応性が殆どなかった。

【0363】

頭頸部および肺癌は、D H 8 . 3 抗体について陰性であったので、これらの腫瘍においてこの m A b で見られた反応性を E G F R 遺伝子増幅と関連づけることができる。

【0364】

【表 5】

表 4

腫瘍パネルに対するモノクローナル抗体 528、DH8.3 および 806

腫瘍	528	DH8.3	806
悪性黒色腫転移	0/10	0/10	0/10
膀胱	10/10 (7x++++, 2x++++, 1x+)	0/10*	3/10* (2x++++, 1x++)
乳腺	6/10 (3x++++, 3x++)	1/10 (1x+)	1/10 (foc)
頭頸部癌	11/11 (1x+++–10x++++)	0/11*	7/11 (3x++++, 3x+++, 1x+)
肺	12/12 (10x++++–1x+++)	0/12*	6/12 (3x++++ 3x+++)
平滑筋肉腫	5/5 (4x++++, 1x+)	0/5	0/5
脂肪肉腫	5/5 (2x + 3x +++)	0/5	0/5*
滑膜肉腫	4/5* (4x +++++)	0/5	0/5*
MFH 悪性線維性組織球腫	4/5*	0/5*	0/5*
結腸癌腫	10/10 (9x++++, 1x+)	0/10*	0/10
精上皮腫	1/10*	1/10*	0/10
卵巣(漿液性-乳頭状)	4/5 (3x++++, 1x+)	0/5*	0/5

* 局所的染色

【実施例 15】

【0365】

E G F R ステータスについて未選択のヒト膠芽腫における免疫反応性

m A b 8 0 6 の特有の特異性を確認するおよび反応性を評価するために、4 6 膠芽腫の、これらの E G F R ステータスについて事前に選択していない、パネルにおいて、これを 5 2 8 および D H 8 . 3 抗体と比較した。5 2 8 抗体は、2 つ (番号 2 7 および 2 9) を除くすべてのサンプルにおいて強くおよび均一に陽性であった (4 4 / 4 6、9 5 . 7 %)。これら 2 つの症例は、m A b 8 0 6 および m A b D H 8 . 3 についても陰性であった。m A b 8 0 6 は、2 7 / 4 6 (5 8 . 7 %) 症例において陽性であり、これらのうちの 2 2 症例は、この腫瘍の 5 0 % より多くで均質な免疫反応性を呈示した。D H 8 . 3 抗体は、1 5 / 4 6 (3 2 . 6 %) 膠芽腫において陽性であり、これらのうちの 9 症例は、均質な免疫反応性を示した。これらの未選択腫瘍の免疫化学染色を表 5 に作表する。

10

【 0 3 6 6 】

1 症例 (番号 3 5) を除くあらゆる症例において、m A b 8 0 6 と D H 8 . 3 間に一致があった。E G F R 増幅の存在についての分子分析を 4 4 症例において行った (表 5)。これらのうち 3 0 症例は、コタイプであり、前に確率された m A b 8 0 6 免疫反応性パターンを有した：例えば、1 6 の m A b 8 0 6 陰性症例は、E G F R 増幅を示さず、および 1 4 の E G F R 増幅症例も、m A b 8 0 6 免疫陽性であった。しかし、8 0 6 免疫反応性を示す 1 3 の症例は、E G F R 増幅について陰性であり、その一方で 1 つの E G F R 増幅症例は、m A b 8 0 6 陰性であった。これらの増幅陰性および 8 0 6 陽性症例の突然変異ステータスのさらなる分析を下で説明する。この分析により、E G F R 増幅について陰性であると共に 8 0 6 により認識される 1 3 症例の大部分についての説明が得られる。

20

【 0 3 6 7 】

その後、R T - P C R により欠失突然変異の分子分析を 4 1 / 4 6 症例に対して行った (表 5)。これらのうちの 3 4 症例は、コタイプであり、欠失突然変異について特異的な D H 8 . 3 を有した：1 2 症例は、R T - P C R と免疫組織化学の両方において陽性であり、2 2 症例は、陰性 / 陰性であった。3 症例 (番号 2、番号 3 4、および番号 4 0) は、欠失突然変異について D H 8 . 3 陽性 / R T - P C R 陰性であり、3 症例 (番号 1 2、番号 1 8、および番号 3 9) は、D H 8 . 3 陰性 / R T - P C R 陽性であった。本発明者らの前の特異性分析に基づいて予想されたとおり、1 症例 (番号 3 5) を除いてすべての D H 8 . 3 陽性組織において m A b 8 0 6 免疫反応性が見られた。

【 0 3 6 8 】

症例番号 3 も、d e 2 - 7 突然変異の配列を含む突然変異 (表 5 において A 2 と呼ぶ) を示したが、この突然変異は、8 0 1 の塩基が欠如した古典的 d e 2 - 7 欠失ではないようであった (データは示さない。)。この症例は、D H 8 . 3 反応性について陰性であったが、8 0 6 との反応性を示した。このことは、8 0 6 が、追加の、ことによると特有の E G F R 突然変異を認識できることを示している。

30

【 0 3 6 9 】

【表 6】

表 5

mAb528、806 および DH8.3 での 46 の未選択膠芽腫の免疫組織化学分析

番号	528	806	DH8.3	EGFR Amp. *	5' MUT
1	++++	++++	++	A	5' MUT
2	++++	++++	++++	N	WT
3	++++	++++ (検出)	陰性	N	A2
4	++++	++++	陰性	N	WT
5	++++	++++	++++	N	5' MUT
6	++++	++++	陰性	<u>A</u>	WT
7	++++	++++	++++	N	5' MUT
8	++++	++++	++++	<u>A</u>	5' MUT
9	++++	++++	陰性	<u>A</u>	WT
10	++++	陰性	陰性	N	WT
11	++	++	++	<u>A</u>	5' MUT
12	++++	++	陰性	<u>A</u>	5' MUT
13	++++	++++	陰性	N	WT
14	++	陰性	陰性	Nd	nd
15	++	++	陰性	N	WT
16	+	陰性	陰性	N	nd
17	++++	陰性	陰性	N	WT
18	++++	++++	陰性	A	5' MUT
19	++++	++++	陰性	N	WT
20	++++	陰性	陰性	N	WT
21	++++	++++	陰性	N	WT
22	+++	陰性	陰性	N	WT
23	++++	++++	++	N	5' MUT
24	++++	++++	陰性	A	WT
25	++++	陰性	陰性	N	WT
26	++++	++++	+++	<u>A</u>	5' MUT
27	陰性	陰性	陰性	N	WT
28	+++	陰性	陰性	N	WT
29	陰性	陰性	陰性	N	WT
30	++++	++++	陰性	N	WT
31	++++ 部分検出	陰性	陰性	N	nd
32	++	+++	++	N	5' MUT
33	+++	++++	++++	A	5' MUT
34	++++	+++	++++	N	WT
35	++++	陰性	++++	<u>A</u>	5' MUT
36	+++	++	+++	<u>A</u>	5' MUT
37	++++	+	+	<u>A</u>	5' MUT
38	++++	陰性	陰性	N	WT
39	++	陰性	陰性	N	5' MUT

10

20

30

40

40	++++	++++	+	A	WT
41	++	陰性	陰性	N	WT
42	++++	++++	陰性	A	WT
43	++++	陰性	陰性	nd	nd
44	++++	陰性	陰性	N	WT
45	++++	陰性	陰性	N	WT
46	++++	陰性	陰性	N	nd

* N = 増幅されていない、A - 増幅

* WT = 野生型、5' 突然変異

nd = 行っていない

10

【0370】

806抗体反応性は、19/27においてまたは前記症例の70%を超えて、増幅されたまたはde2-7突然変異体EGFRコタイプであった。これら8症例のうちの2症例がDH8.3反応性でもあったことは注目に値する。

【実施例16】

【0371】

頭蓋内神経膠腫腫瘍の全身治療および分析

抗ΔEGFRモノクローナル抗体、mAb806、の効力を試験するために、本発明者らは、頭蓋内ΔEGFR過発現性神経膠腫異種移植片を有するヌードマウスを、mAb806、このアイソタイプ対照IgGまたはPBSの注射で治療した。

20

【0372】

ヒト膠芽腫の一次外植片は、培養において増幅、再配列受容体の発現を急速に喪失するので、このような発現を呈示する現存膠芽腫細胞系はない。ヒト腫瘍において見られるものに匹敵する発現レベルを維持させるために、U87MG、LN-Z308、およびA1207（ニューヨーク州ニューヨーク、Amount Sinai Medical CenterのDr. S. Aaronsonからの寄贈品）細胞をΔEGFR、キナーゼ欠失ΔEGFR（DK）、または野生型EGFR（wtEGFR）ウイルスに感染させた。以前に記載されているように（Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 7727-7731）、これらのウイルスは、G418に対する耐性も付与した。

30

【0373】

類似したレベルの様々な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おおよそ対応する；ヒト膠芽腫は、トランケートされた受容体の10から50遺伝子コピーの増幅レベルを概して有する。）を、前に記載されているように（Nishikawa et al., 1994）FACSにより選択し、それぞれ、U87MG.ΔEGFR、U87MG.DK、U87MG.wtEGFR、LN-Z308.ΔEGFR、LN-Z308.DK、LN-Z308.wtEGFR、A1207.ΔEGFR、A1207.DK、およびA1207.wtEGFRと呼んだ。それぞれを、G418を含有する培地（U87MG細胞系、400μg/mL；LN-Z308およびA1207細胞系、800μg/mL）中で維持した。

40

【0374】

5μLのPBS中のU87MG.ΔEGFR細胞（ 1×10^5 ）または 5×10^5 LN-Z308.ΔEGFR、A1207.ΔEGFR、U87MG、U87MG.DK、およびU87MG.wtEGFR細胞を、前に記載されているように（Mishima et al. (2000) A peptide derived from the non-receptor binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblast

50

oma growth and angiogenesis in vivo in combination with cisplatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 8484-8489) ノドマウスの脳の右線条体に内植した。内植後第0から14日まで、一日おきに100 μ Lの容量で1 μ gのmAbをi.p.注射することにより、mAb 806、またはIgG 2bアイソタイプ対照、での全身療法を果たした。脳内U87MG、 Δ EGFR腫瘍の直接療法については、5 μ Lの容量で10 μ gのmAb 806、またはIgG 2bアイソタイプ対照を、第1日に開始して5日間、1日おきに、腫瘍注射部位に注射した。

【0375】

PBSまたはアイソタイプ対照IgGで治療した動物は、13日の生存期間中央値を有し、これに対してmAb 806で治療したマウスは、21日までの生存期間中央値の61.5%増加を有した($p < 0.001$; 図24A)。

10

【0376】

腫瘍確率後、内植の3日後のマウスの治療も、対照群のもの(データを示さない。)と比較して、mAb 806治療動物の生存期間中央値を(13日から19日; $p < 0.01$)46.1%延長した。

【0377】

mAb 806のこれらの抗腫瘍効果がU87MG、 Δ EGFR異種移植片を越えて延長するかどうかを判定するために、LN-Z380、 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、類似した治療を施した。LN-Z308、 Δ EGFR異種移植片を有するmAb 806治療マウスの生存期間中央値は、対照についての19日から58日に延長された($P < 0.001$; 図24B)。驚くべきことに、8匹のmAb 806治療動物のうちの4匹は、60日を超えて生存した(図24B)。A1207、 Δ EGFR異種移植片を有する動物の生存期間中央値も対照についての24日から29日に延長された($P < 0.01$; データを示さない。)

20

【0378】

mAb 806治療は、 Δ EGFR過発現性脳腫瘍成長を阻害する

U87MG、 Δ EGFRおよびLN-Z308、 Δ EGFR異種移植片を有するマウスを第9日および第15日にそれぞれ安楽死させた。腫瘍切片を組織病理分析し、腫瘍容積を決定した。動物生存について観察された結果と一致して、mAb 806治療は、対照群のものと比較して異種移植片、U87MG、 Δ EGFRの容積を約90%($P < 0.001$; 図24C)およびLN-Z308、 Δ EGFRを95%より大きく($P < 0.001$; 図24D)減少させた。A1207、 Δ EGFR腫瘍を有する動物について同様の結果を得た(65%容積減少、 $P < 0.01$; データを示さない。)

30

【0379】

mAb 806での腫瘍内治療は、U87MG、 Δ EGFR脳腫瘍を有するマウスの生存期間を延長する

U87MG、 Δ EGFR異種移植片の治療のためのmAb 806の直接腫瘍内注射の効力も判定した。腫瘍内植の翌日、mAb 806またはアイソタイプ対照IgGの腫瘍内注射を動物に施した。対照動物は、15日間生存し、これに対してmAb 806治療マウスは、18日間、生きたままであった($P < 0.01$; 図24E)。mAb 806での腫瘍内治療は、多少効果的であったが、多回頭蓋内注射の困難および注射リスク増加を必然的に伴った。従って、本発明者らは、さらなる研究のために全身治療に焦点を当てた。

40

【0380】

mAb 806治療は、U87MG、wtEGFRを有するマウスの生存期間を延長するが、U87MGおよびU87MG、DK頭蓋内異種移植片を有するマウスの生存期間を延長しない

mAb 806による成長阻害が、 Δ EGFRを発現するマウスについて選択的であるかどうかを判定するために、本発明者らは、U87MG、U87MG、DK(キナーゼ欠失 Δ EGFR)およびU87MG、wtEGFR脳異種移植片を有する動物を治療した。m

50

A b 8 0 6 治療は、低レベルの内因性野生型 E G F R (w t E G F R) を発現する U 8 7 M G 腫瘍 (H u a n g e t a l . (1 9 9 7) T h e e n h a n c e d t u m o r i g e n i c a c t i v i t y o f a m u t a n t e p i d e r m a l g r o w t h f a c t o r r e c e p t o r c o m m o n i n h u m a n c a n c e r s i s m e d i a t e d b y t h r e s h o l d l e v e l s o f c o n s t i t u t i v e t y r o s i n e p h o s p h o r y l a t i o n a n d u n a t t e n u a t e d s i g n a l i n g . J . B i o l . C h e m . , 2 7 2 , 2 9 2 7 - 2 9 3 5) を内植したマウス、および低レベルの内因性 w t E G F R に加えてキナーゼ欠失 Δ E G F R を過発現する U 8 7 M G . D K 異種移植片を有する動物の生存期間を延長しなかった (図 2 5) 。 m A b 8 0 6 治療は、w t E G F R を過発現する U 8 7 M G . w t E G F R 腫瘍を有するマウスの生存期間をわずかに延長した (P < 0 . 0 5 、対照群についての 2 6 日に対して生存期間中央値 2 3 日) (図 2 5 C) 。

10

【 0 3 8 1 】

m A b 8 0 6 反応性はインビボ抗腫瘍効力と相関する

様々なレベルまたは異なるタイプの E G F R を発現する腫瘍に対する m A b 8 0 6 の異なる効果を理解するために、本発明者らは、F A C S により様々な腫瘍細胞との m A b 8 0 6 の反応性を判定した。染色された細胞を、C e l l Q u e s t ソフトウェア (B e c t o - D i c k i n s o n P h a r m i n g e n) を使用して F A C S C a l i b u r で分析した。第一の抗体については、次に m A b を使用した：m A b 8 0 6 、抗 E G F R m A b クローン 5 2 8 、およびクローン E G F R . 1 。マウス I g G 2 a または I g G 2 b をアイソタイプ対照として使用した。

20

【 0 3 8 2 】

以前の報告 (N i s h i k a w a e t a l . (1 9 9 4) A m u t a n t e p i d e r m a l g r o w t h f a c t o r r e c e p t o r c o m m o n i n h u m a n g l i o m a c o n f e r s e n h a n c e d t u m o r i g e n i c i t y . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . , 9 1 , 7 7 2 7 - 7 7 3 1) と一致して、抗 E G F R m A b 5 2 8 は、 Δ E G F R と w t E G F R の両方を認識し、U 8 7 M G 細胞と比較して強い染色を U 8 7 M G . Δ E G F R 細胞について明示した (図 2 5 A 、 5 2 8) 。

30

【 0 3 8 3 】

対照的に、抗体 E G F R . 1 は、w t E G F R と反応したが、 Δ E G F R と反応しなかった (N i s h i k a w a e t a l . , 1 9 9 4) 。 U 8 7 M G . Δ E G F R 細胞は、U 8 7 M G 細胞と同様に弱反応性であったからである (図 2 6 A 、パネル E G F R . 1) 。

【 0 3 8 4 】

この E G F R . 1 抗体は、U 8 7 M G 細胞とより強力に U 8 7 M G . w t E G F R と反応した。U 8 7 M G . w t E G F R 細胞は、w t E G F R を過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 細胞と強く反応し、U 8 7 M G 細胞とはしなかったが、U 8 7 M G . w t E G F R と弱く反応した。このことは、m A b 8 0 6 が、 Δ E G F R に対して選択的であり、過発現 w t E G F R への弱い交差活性を有することを示していた (図 2 6 A 、パネル m A b 8 0 6) 。

40

【 0 3 8 5 】

U 8 7 M G . w t E G F R とのこの反応性レベルは、および抗体治療により媒介される生存期間延長に量的にも質的にも類似していた (図 2 5 C) 。

【 0 3 8 6 】

本発明者らは、免疫沈降により m A b 8 0 6 特異性をさらに判定した。様々な細胞系における E G F R を抗体 m A b 8 0 6 、抗 E G F R m A b クローン 5 2 8 (O n c o g e n e R e s e a r c h P r o d u c t s 、マサチューセッツ州ボストン) またはクローン E G F R . 1 (O n c o g e n e R e s e a r c h P r o d u c t s) で免疫沈

50

降させた。

【0387】

簡単に言うと、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 P₃i、1 mM フッ化フェニルメチル (phenylmethylsulfonyl fluoride)、2 mM Na₃VO₄、5 μg/mL ロイペプチンおよび5 μg/mL アプロチニンを含有する溶解バッファーで細胞を溶解した。抗体を細胞溶解産物と共に4℃で1時間温置した後、プロテインAおよびGセファロースを添加した。免疫沈降物を溶解バッファーで2回、HNTGバッファー[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、電気泳動に付し、ニトロセルロース膜に転写した。

10

【0388】

電気泳動により分離されたタンパク質のプロットを、免疫プロットでの野生型EGFRとΔEGFR両方の検出に使用される(Huang et al., 1997)抗EGFR抗体、C13(カリフォルニア州サンディエゴ、University of CaliforniaのDr. G. N. Gillにより提供されたもの)、でプローブし、ECL化学発光検出システム(Amercham Pharmacia Biotech.)を使用してタンパク質を可視化した。Bcl-Xに対する抗体(ウサギポリクローナル抗体; Transduction Laboratories、ケンタッキー州レキシントン)およびホスホチロシン(4G10、Upstate Biotechnology、ニューヨーク州レークブラッド)を、以前に記載されているように(Nagane et al., (1998) 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. U.S.A. 95, 5724-5729)ウエスタンブロット分析のために使用した。

20

【0389】

FACS分析と一致して、抗体528は、wtEGFRおよび突然変異受容体を認識し(図26B-パネルIP: 528)、これに対して抗体EGFR.1は、wtEGFRと反応したが突然変異種とは反応しなかった(図26B、パネルIP: EGFR.1)。さらに、U87MG.ΔEGFRおよびU87MG.DK細胞内の突然変異受容体のレベルは、U87MG.wtEGFR細胞内のwtEGFRのものに匹敵した(図26B、パネルIP: 528)。

30

【0390】

しかし、抗体mAb806は、U87MG.ΔEGFRおよびU87MG.DK細胞から沈降した突然変異受容体のより多くの量と比較してU87MG.wtEGFR細胞溶解産物から少量のwtEGFRしか沈降させることができず、U87MG細胞からは検出不能な量しか沈降させることができなかった(図26B、パネルIP: mAb806)。まとめると、これらのデータは、mAb806が、細胞表面で過発現されたときのwtEGFRの小部分の中にも存在するΔEGFR内のエピトープを認識することを示唆している(下のmAb806エピトープについてのさらなる考察および言及を参照のこと)。

40

【0391】

mAb806治療は、ΔEGFR自己リン酸化を減少させ、U87MG.ΔEGFR脳腫瘍におけるBcl-X_L発現を減少する

mAb806による成長阻害の基礎をなすメカニズムを次に調査した。ΔEGFRの構成的に活性なキナーゼ活性およびカルボキシ末端自己リン酸化は、この生物学的機能にとって欠くことのできないものである(Nishikawa et al., (1994) A mutant epidermal growth factor receptor

50

common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 7727 - 7731; Huang et al., 1997; Nagane et al. (1996) 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; Nagane et al. (2001) Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. Cancer Lett. 162 (Suppl. 1), S17 - S21) ので、 Δ EGFR リン酸化ステータスを治療および対照動物からの腫瘍において判定した。図 27A に示すように、mAb806 治療は、 Δ EGFR 自己リン酸化を劇的に低下させたが、受容体レベルは、mAb806 治療異種移植片においてわずかにしか減少されなかった。本発明者らは、受容体自己リン酸化が、 Δ EGFR 過発現性腫瘍のアポトーシスの低下に重要な役割を果たす抗アポトーシス遺伝子、Bcl - X_L、のアップレギュレートを引き起こすことを以前に明らかにした (Nagane et al., 1996; Nagane et al., 2001)。従って、Bcl - X_L 発現に対する mAb806 治療の効果を次に判定した。mAb806 治療動物からの Δ EGFR 腫瘍は、低減された Bcl - X_L レベルを実際には示さなかった。

【0392】

mAb806 治療は、U87MG、 Δ EGFR 腫瘍において成長および血管新生を減少させ、アポトーシスを増加させる

mAb806 治療によって生ずるインビボ抑制および受容体シグナリングに対するこの生化学的効果に照らして、本発明者らは、対照または治療マウスからの腫瘍の増殖率を判定した。mAb806 治療腫瘍の Ki67 染色によって測定した増殖指数は、対照腫瘍のものより有意に低かった ($P < 0.001$; 図 28)。

【0393】

簡単に言うと、これらを、塩化亜鉛を含有する溶液中で固定し、パラフィン包埋し、切断し、モノクローナルラット抗マウス CD31 抗体 (Becton - Dickinson Pharmingen; 1:200) を使用して免疫染色した。ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織を用いて Ki - 67 免疫組織化学により腫瘍細胞増殖の評定を行った。脱パラフィンおよび再水和の後、これらの組織切片をメタノール中の 3% 過酸化水素と共に温置して、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。これらの切片を 30 分間、ヤギ血清でブロックし、一晚、この一次抗体と共に 4℃ で温置した。その後、これらの切片を PBS で洗浄し、ビオチン化二次抗体と共に 30 分間温置した。PBS での数回の洗浄後、ストレプタビジン・ホースラディッシュペルオキシダーゼと共に色原体としてジアミノベンジジンおよび対比染色剤としてヘマトキシリンを使用して、産物を可視化した。増殖の測度として、Ki - 67 標識指数を、高倍率 (3400) 視野で標識された核：全核の比として決定した。

【0394】

系統的無作為サンプリングにより各症例においておおよそ 2000 の核を計数した。マクローファージおよび NK 細胞染色のために、緩衝 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定された凍結切片を、ビオチン化 mAb F4/80 (Serotec、ノースカロライナ州ローリー) およびポリクローナルウサギ抗アシアロ GM1 抗体 (Dako Chemicals、バージニア州リッチモンド) をそれぞれ使用して免疫染色した。コンピュータ分析を用いて血管新生を血管面積として定量した。このために、抗 CD31 を使用して切片を免疫染色し、対比染色を用いずにコンピュータ画像解析システムを使用して分析した。以前に記載されているように (Mishima et al., 2000) CCD カラーカ

メラを使用して3200倍率で切片のデジタル画像を取り込むことにより、MVAを判定した。その後、Image Pro Plusバージョン4.0ソフトウェア(Media Cybernetics、メリーランド州シルバースプリング)を使用して画像を解析し、各切片における染色の総量を測定することによりMVAを決定した。各スライドにつき4視野を評価した。この値を各視野における総面積の百分率として表した。各実験において少なくとも2人の観察者(K. M.、H. J. S. H.)が結果を確認した。

【0395】

加えて、腫瘍組織内のアポトーシス細胞を、以前に説明されている(Mishima et al., 2000)ようなTUNEL法を使用することにより検出した。TUNEL陽性細胞を400倍で計数した。各視野におけるアポトーシス細胞数：全細胞数の比としてアポトーシス指数を算出した。TUNEL染色によるアポトーシス指数の分析により、対照腫瘍と比較してmAb806治療腫瘍においてアポトーシス細胞数の有意な増加が実証された($P < 0.001$; 図28)。

10

【0396】

治療および対照検体からの腫瘍のCD31についての免疫染色により、腫瘍血管新生の程度も分析した。腫瘍血管新生を定量するために、コンピュータ画像解析を用いて微小血管面積(MVA)を測定した。mAb806治療腫瘍は、対照腫瘍が示すより30%少ないMVAを示した($P < 0.001$; 図28)。

【0397】

受容体と抗体の間の相互作用が炎症反応を惹起し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、F4/80、およびNK細胞マーカー、アシアロGM1について腫瘍切片を染色した。腫瘍マトリックスによりマクロファージを同定し、これらは、特に、mAb806治療U87MG、ΔEGFR腫瘍辺縁周辺に蓄積していた(図28)。本発明者らは、腫瘍に浸潤したおよび腫瘍周囲のNK細胞を殆ど観察せず、mAb806治療腫瘍とアイソタイプ対照腫瘍の間に有意差を観察しなかった(データを示さない)。

20

【実施例17】

【0398】

mAb806およびmAb528での併用免疫療法

ここに示す実験は、本発明に従って抗体の効力を判定するために計画したインビボ作業を説明するものである。

30

【0399】

雌ヌードマウス、週齢4-6週を実験動物として使用した。マウスの各側腹部に 3×10^6 の腫瘍細胞の皮下接種を施した。

【0400】

これらの動物に、U87MG.D2-7、U87MG.DK、またはA431細胞(これらはすべて上で説明したものである。)のいずれかを施した。療法は、腫瘍が十分なサイズに成長したときに開始した。

【0401】

その後、マウスに(i)リン酸緩衝食塩水、(ii)mAb806(0.5mg/注射)、(iii)mAb528(0.5mg/注射)、または(iv)両方のmAbの組み合わせのうちの1つの注射を施した。「(iv)」に関しては、異なるマウス群に各mAbの0.5mg/注射、または各mAbの0.25mg/注射のいずれかを施した。

40

【0402】

検査したマウスの第一群は、U87MG.D2-7注射を受けたマウスであった。治療プロトコルは、接種の9日後に開始し、2週間、週3回、継続した(即ち、動物に細胞を注射した9、11、13、16、18および20日後に接種した)。治療プロトコルの開始時点での平均腫瘍サイズは、 115 mm^3 であった。各群は、50匹のマウスを含み、それぞれが2種類の腫瘍を有した。

【0403】

50

抗体の組み合わせ（それぞれの 0.5 mg / 注射）を受けたマウスの群の中で、3 つに完全退縮があった。他の群のいずれにおいても退縮はなかった。図 18 A は、これらの結果を図示するものである。

【0404】

マウスの第二群において、注射材料は、この併用療法が、注射 1 回につき各抗体 0.25 mg を含んだことを除き、同じであった。細胞を接種した 10、12、14、17、19 および 21 日後に注射を施した。この両方の開始時の平均腫瘍サイズは、114 mm³ であった。結果を図 18 B に示す。

【0405】

マウスの第三群には U87MG・DK を施した。治療注射は、細胞を接種した 18 日後に開始し、第 20、22、25、27 および 29 日に継続した。この治療の開始時の平均腫瘍サイズは、107 mm³ であった。図 18 C は、これらの結果をまとめたものである。この治療注射は、第一群の場合と同じであった。

【0406】

最後に、A431 細胞を接種したマウスの第四群に、接種後 8、10、12 および 14 日の時点で群 I および I I I の場合のように注射を施した。開始時の平均腫瘍サイズは、71 mm³ であった。結果を図 18 D に示す。

【0407】

これらの結果は、併用抗体療法が、腫瘍低減に相乗効果を示すことを示した。図 18 A 参照。類似した効果が、図 18 B のとおり、より低い用量で見られた。このことは、この効果が単に用量レベルによるものでないことを示している。

【0408】

前記併用療法は、U87MG・DK の成長を阻害しなかった（図 18 C）。このことは、抗体免疫機能が、図 18 A および 18 B において見られる減少についての原因でなかったことを示している。

【0409】

図 18 D に示すように、前記併用療法は、A431 腫瘍に対しても相乗的効力を示し、4 用量が 60 % 完全応答率をもたらした。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ものとは機能的に異なることを示唆している。

【実施例 18】

【0410】

腫瘍異種移植片成長の mAb 806 阻害

本明細書において論じ、本実施例においてさらに実証し、論じるように、mAb 806 は、de2-7 EGFR または増幅された EGFR のいずれかを発現するが野生型 EGFR を発現しない腫瘍異種移植片の成長を阻害することが、図らずも判明した。

【0411】

実施例 1 において説明したとおりに細胞系および抗体を調製した。mAb 806 の特異性を判定するために、U87MG、U87MG・D2-7、および U87MG・wt EGFR 細胞へのこの結合を FACS によって分析した。簡単に言うと、528、806 および DH8.3 抗体を使用して、培養した親およびトランスフェクトされた U87MG 細胞系を野生型および de2-7 EGFR について分析した。細胞（1.3 × 10⁶）を、1 % HSA を含有する PBS 中の 5 μg / mL の適切な抗体またはアイソタイプ適合陰性対照と共に 30 分間 4℃ で温置した。PBS / 1 % HSA での 3 回の洗浄後、細胞をさらに 30 分、4℃ で、FTTC 結合ヤギ抗マウス抗体（1:100 希釈；Calbiochem、カリフォルニア州サンディエゴ）と共に温置した。3 回のその後の洗浄の後、細胞を Epics Elite ESP（Beckman Coulter、フロリダ州ハイアレア）で最低 20,000 事象の観察により分析し、Windows（登録商標）用 EXPO（バージョン 2）を使用して解析した。無関係な IgG2b（ヒト抗原 A33 に対する mAb 100-310）を mAb 806 についてのアイソタイプ対照として含め、528 抗体

10

20

30

40

50

を、これが de 2 - 7 と wt E G F R の両方を認識するので、含めた。

【 0 4 1 2 】

5 2 8 抗体のみが親 U 8 7 M G 細胞系を染色できた (図 2 9)。このことは、これらの細胞が wt E G F R を発現することを実証した以前の報告 (N i s h i k a w a e t a l . (1 9 9 4) A m u t a n t e p i d e r m a l g r o w t h f a c t o r r e c e p t o r c o m m o n i n h u m a n g l i o m a c o n f e r s e n h a n c e d t u m o r i g e n i c i t y . P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 1 , 7 7 2 7 - 7 7 3 1) と一致している。m A b 8 0 6 は、対照抗体に類似した結合レベルを有した。このことは、これが wt E G F R を結合できないことを明確に実証している (図 2 9)。U 8 7 M G . D 2 - 7 および U 8 7 M G . w t E G F R 細胞系へのアイソタイプ対照抗体の結合は、U 8 7 M G 細胞について観察されたものに類似していた。m A b 8 0 6 は、U 8 7 M G . D 2 - 7 および U 8 7 M G . w t E G F R 細胞を染色した。このことは、m A b 8 0 6 が de 2 - 7 E G F R および過発現された E G F R サブセットを特異的に認識することを示している (図 2 9)。予想どおり、5 2 8 抗体は、U 8 7 M G . D 2 - 7 および U 8 7 M G . w t E G F R 細胞系両方を染色した (図 2 9)。U 8 7 M G . w t E G F R 細胞に対する 5 2 8 抗体染色の強度は、m A b 8 0 6 よりはるかに高かった。このことは、m A b 8 0 6 が、過発現された E G F R の一部分しか認識しないことを示唆している。U 8 7 M G . w t E G F R 細胞で観察された m A b 8 0 6 反応性は、A 4 3 1 細胞、wt E G F R . 3 を過発現するもう 1 つの細胞系に類似している。

10

20

【 0 4 1 3 】

U 8 7 M G . D 2 - 7 および A 4 3 1 細胞系を使用してスキャッチャード解析を行って、各細胞系での m A b 8 0 6 についての相対親和性および結合部位を判定した。実施例 4 において述べたように、m A b 8 0 6 は、de 2 - 7 E G F R 受容体に対して $1 \cdot 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の親和性を有し、平均 (3 回の独立した実験) $2 \cdot 4 \times 10^5$ の結合部位 / 細胞を認識する。対照的に、実施例 8 で述べたように、A 4 3 1 細胞における wt E G F R に対する m A b 8 0 6 の親和性は、たった $9 \cdot 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であった。興味深いことに、m A b 8 0 6 は、A 4 3 1 細胞表面の $2 \cdot 3 \times 10^5$ の結合部位を認識し、この数値は、これらの細胞において見つけれられる E G F R の報告数より数十倍低い。本発明者らの A 4 3 1 細胞の表面の E G F R の数を確認するために、本発明者らは、 ^{125}I 標識 5 2 8 抗体を使用してスキャッチャード解析を行った。予想どおり、この抗体は、A 4 3 1 細胞の表面のおおよそ 2×10^6 部位に結合した。従って、m A b 8 0 6 は、A 4 3 1 の表面の E G F R 受容体の一部にしか結合しないようである。重要なことに、 ^{125}I 標識 m A b 8 0 6 は、細胞数を 1×10^7 に増加させたときでさえ、親 U 8 7 M G 細胞に全く結合しなかった。

30

【 0 4 1 4 】

m A b 8 0 6、s c - 0 3 (E G F R の C O O H 末端ドメインに対して特異的な市販ポリクローナル抗体) および I g G 2 b アイソタイプ対照を使用する ^{35}S 標識後の免疫沈降により、様々な細胞系において m A b 8 0 6 反応性をさらに特性づけした。簡単に言うと、5 % 透析 F C S を捕捉したメチオニン / システインを伴わない D M E M 中の 1 0 0 m C i / m L の T r a n ^{35}S 標識 (I C N B i o m e d i c a l s、カリフォルニア州アーヴィン) で細胞を 1 6 時間、標識した。P B S で洗浄後、細胞を 1 時間、4 で溶解バッファー (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 塩化 4 - (2 - アミノエチル) ベンゼンスルホニル (A E B S F)、1 5 0 n M アプロチニン、1 μ M E - 6 4 プロテアーゼ阻害剤、0 . 5 m M E D T A、および 1 μ M ロイペプチン、p H 7 . 4) に入れておいた。1 0 分間、1 2 , 0 0 0 g での遠心分離により溶解産物を清澄化し、その後、5 μ g の適切な抗体と共に 3 0 分間、4 で温置した後、プロテイン A - セファロースを添加した。溶解バッファーで免疫沈降物を 3 回洗浄し、S D S サンプルバッファーと混合し、4 - 2 0 % T r i s / グリシンゲルを使用するゲル電気泳動により分離し、その後、乾燥させ、X 線フィルムに感光

40

50

した。

【0415】

s c - 03 抗体は、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞から3バンドを免疫沈降させた；これらの細胞において観察される2つのd e 2 - 7 E G F R バンドに対応する二重線、およびw t E G F R に対応する、より高分子量のバンド（図22および30）。対照的に、m A b 8 0 6 は、2つのd e 2 - 7 E G F R バンドを免疫沈降させたが、w t E G F R は、完全に不在であった。U 8 7 M G . w t E G F R およびA 4 3 1 細胞において見られたパターンは、本質的に同一であった。s c - 03 抗体は、A 4 3 1 細胞からw t E G F R に対応する単一バンドを免疫沈降させた（図22および30）。m A b 8 0 6 m、U 8 7 M G . w t E G F R およびA 4 3 1 細胞両方からw t E G F R に対応する単一バンドを免疫沈降させた（図22および30）。F A C S およびスキャッチャードデータと一致して、m A b 8 0 6 により免疫沈降されたE G F R の量は、細胞表面に存在する全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 - 03 が類似した量のd e 2 - 7 E G F R を免疫沈降させることを考慮すると、これらの結果は、m A b 8 0 6 が、E G F R の一部分しか、該受容体を過発現する抗体において認識しないという見解を裏付けとなる。m A b 8 0 6 抗体と528抗体の比較は、同一の反応性パターンを示した（データを示さない）。無関係なI g G 2 b（m A b 8 0 6 についてのアイソタイプ対照）は、いずれの細胞系からもE G F R を免疫沈降させなかった（図22および30）。同一条件を用いて、m A b 8 0 6 は、親U 8 7 M G 細胞からE G F R を免疫沈降させなかった（データを示さない）。

10

20

【0416】

m A b 8 0 6 を、予防的異種移植片モデルにおいて、U 8 7 M G およびU 8 7 M G . Δ 2 - 7 腫瘍に対する効力についても検査した。腫瘍接種前日に抗体またはビヒクルをi . p . 投与し、2週間、週3回これを施した。1 m g / 注射の用量で、m A b 8 0 6 は、w t E G F R を発現する親U 8 7 M G 異種移植片の成長に対して効果がなかった（図9A）。対照的に、m A b 8 0 6 は、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片の成長を用量依存様式で有意に阻害した（図9B）。対照動物を犠牲にした腫瘍接種20日後、平均腫瘍容積は、対照群については $1600 \pm 180 \text{ mm}^3$ であり、0 . 1 m g / 注射群については有意に小さい $500 \pm 95 \text{ mm}^3$ であり（ $P < 0.0001$ ）、および1 m g / 注射群については $200 \pm 42 \text{ mm}^3$ であった（ $p < 0.0001$ ）。第24日の時点で治療群を犠牲にし、この時点でのこの平均腫瘍容積は、0 . 1 m g 治療群については $1300 \pm 240 \text{ mm}^3$ であり、および1 m g 群については $500 \pm 100 \text{ mm}^3$ であった（ $P < 0.005$ ）。

30

40

【0417】

予防的異種移植片モデルにおけるm A b 8 0 6 の効力にかんがみて、確率腫瘍異種移植片の成長を阻害するこの能力を検査した。抗体治療は、腫瘍が、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片については 65 mm^3 の平均腫瘍容積に達したとき（内植の10日後）および親U 8 7 M G 異種移植片については 84 mm^3 の平均腫瘍容積に達したとき（内植の19日後）に開始したことを除き、予防的モデルに関して説明したとおりであった（実施例10参照）。もう一度、m A b 8 0 6 は、1 m g / 注射の用量でさえ、親U 8 7 M G 異種移植片の成長に対して効果がなかった（図10A）。対照的に、m A b 8 0 6 は、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片の成長を用量依存様式で有意に阻害した（図10B）。対照動物を犠牲にした前日、第17日の時点で、平均腫瘍容積は、対照群については $900 \pm 200 \text{ mm}^3$ であり、0 . 1 m g / 注射群については $400 \pm 60 \text{ mm}^3$ であり（ $P < 0.01$ ）、および1 m g / 注射群については $220 \pm 60 \text{ mm}^3$ であった（ $P < 0.002$ ）。I g G 2 b アイソタイプ対照でのU 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片の治療は、腫瘍成長に対して効果がなかった（データを示さない）。

【0418】

m A b 8 0 6 で観察された成長阻害が、d e 2 - 7 E G F R を発現される細胞に限定されるのかどうかを検査するために、確率モデルにおいてU 8 7 M G . w t E G F R 異種

50

移植片に対するこの効力も検査した。これらの細胞は、de 2 - 7 E G F R 発現を伴わない E G F R 遺伝子の増幅を有する腫瘍のモデルとして役立つ。m A b 8 0 6 治療は、腫瘍が 73 mm^3 の平均腫瘍容積に達したとき（内植の 22 日後）に開始した。m A b 8 0 6 は、ビヒクルで治療した対照腫瘍と比較したとき、確率 $U87MG, wtEGFR$ 異種移植片の成長を有意に阻害した（図 10C）。対照動物を犠牲にした翌日、平均腫瘍容積は、対照群については $1000 \pm 300 \text{ mm}^3$ であり、および 1 mg / 注射で治療した群については $500 \pm 80 \text{ mm}^3$ であった（ $P < 0.04$ ）。

【0419】

m A b 8 0 6 治療および対照 $U87MG, \Delta 2 - 7$ および $U87MG, wtEGFR$ 異種移植片間の可能性のある組織学的相違を評価するために、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を H & E で染色した（図 31）。m A b 8 0 6 治療 $U87MG, \Delta 2 - 7$ （m A b 8 0 6 治療異種移植片を腫瘍接種の 24 日後に採集し、18 日の時点のビヒクル治療異種移植片を採集した。）および $U87MG, wtEGFR$ 異種移植片（m A b 8 0 6 異種移植片を腫瘍接種の 42 日後に採集し、37 日の時点でビヒクル治療異種移植片を採集した；図 31）からの切片において壊死エリアが見られた。この結果が多数の腫瘍異種移植片（各細胞系について $n = 4$ ）において一貫して観察された。しかし、ビヒクルで治療した $U87MG, \Delta 2 - 7$ および $U87MG, wtEGFR$ 異種移植片からの切片は、m A b 8 0 6 治療後に見られたのと同じ壊死エリアを示さなかった（図 31）。同一時点で除去したビヒクルおよび m A b 8 0 6 治療異種移植片も、腫瘍壊死の点でのこれらの相違を示した（データを示さない。）。従って、観察された壊死の増加の原因は、m A b 8 0 6 治療異種移植片に用いた、より長い成長期間ではなかった。さらに、m A b 8 0 6 治療 $U87MG$ 異種移植片からの切片を H & E で染色もし、一切壊死エリアを示さなかった。このことは、m A b 8 0 6 結合が、細胞生存度低下を誘導し、結果として腫瘍異種移植片内の壊死増加が生ずるという仮説のさらなる裏付けとなる。

【0420】

$U87MG, \Delta 2 - 7$ および $U87MG, wtEGFR$ 異種移植片切片の免疫組織化学的分析を行って、m A b 8 0 6 治療後の de 2 - 7 および $wtEGFR$ 発現レベルを判定した（図 32）。予想どおり、528 抗体は、すべての異種移植片切片を染色し、治療腫瘍と対照腫瘍の間で強度の明らかな低下はなかった（図 32）。 $U87MG$ 切片の染色は、m A b 8 0 6 では検出不能であったが、 $U87MG, \Delta 2 - 7$ および $U87MG, wtEGFR$ 異種移植片切片の陽性染色が観察された（図 32）。対照および治療 $U87MG, \Delta 2 - 7$ および $U87MG, wtEGFR$ 異種移植片間に m A b 8 0 6 染色密度の差はなかった。このことは、抗体治療が、m A b 8 0 6 活性を欠くクローン変異体の選択につながらないことを示唆している。

【0421】

m A b 8 0 6 の抗腫瘍効果が $U87MG$ 細胞に限定されないことを実証するために、A 431 異種移植片を有するマウスに該抗体を投与した。これらの細胞は、増幅された E G F R 遺伝子を含むし、およそ 2×10^6 受容体 / 細胞を発現する。本発明者らは、m A b 8 0 6 がこれらの E G F R の $\sim 10\%$ を結合し、A 431 異種移植片をターゲットにすることを以前に明らかにした（Garcia et al. (1993) Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell along carcinomas. Cancer Res. 53, 3217 - 3220）。m A b 8 0 6 は、前に説明した予防的異種移植片モデルにおいて検査したとき、A 431 異種移植片の成長を有意に阻害した（図 11A）。対照動物を犠牲にした第 13 日の時点で、平均腫瘍容積は、ビヒクル治療群では $1400 \pm 150 \text{ mm}^3$ であり、および 1 mg / 注射治療群については $260 \pm 60 \text{ mm}^3$ であった（ $P < 0.0001$ ）。別の実験において、 0.1 mg の m A b の用量も、予防的モデルにおいて A 431 異種移植片の成長を有意に（ $P < 0.05$ ）阻害した（データを示さない。）（実施例 10 参照）。

【0422】

予防的 A 4 3 1 異種移植片モデルにおける m A b 8 0 6 の効力にかんがみて、確率腫瘍異種移植片の成長を阻害するこの能力を検査した。抗体治療は、腫瘍が $200 \pm 20 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍容積に達するまでこれを開始しなかったことを除き、予防的モデルにおいて説明したとおりであった。m A b 8 0 6 は、確率 A 4 3 1 異種移植片の成長を有意に阻害した (図 1 1 B)。対照動物を犠牲にした日である第 1 3 日の時点で、平均腫瘍容積は、対照群については $1100 \pm 100 \text{ mm}^3$ であり、および 1 m g / 注射群については $450 \pm 70 \text{ mm}^3$ であった ($P < 0.0001$)。

【実施例 19】

【0423】

キメラ 8 0 6 抗体の構築、発現および分析

キメラ抗体は、例えばマウス、ラットまたは他の種の重および軽鎖可変領域をヒト重および軽鎖可変領域に連結させた分子の 1 つのクラスであり、キメラ抗体は、組換え生産される。キメラ抗体の 1 つの利点は、これらが異種抗原作用、非ヒト抗体 (例えば、マウス、ラットまたは他の種) の特有の免疫原性を減少させることができる点である。加えて、組換えにより作製されるキメラ抗体は、特に、高レベル発現ベクターを利用するとき、多くの場合、大量に生産することができる。

【0424】

高レベル生産のために、最も広く用いられている哺乳動物発現系は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (dehydrofolate reductase) 欠失 (「dhfr -」) チャイニーズハムスター卵巣細胞により提示される遺伝子増幅手順を利用するものである。この系は、当業者に周知である。この系は、ジヒドロ葉酸塩 (dehydrofolate) のテトラヒドロ葉酸塩への転化を触媒する、DHFR 酵素をコードする、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (dehydrofolate reductase) 「dhfr」遺伝子に基づく。高い生産量を達成するために、所望のタンパク質をコードする遺伝子と共に機能性 DHFR 遺伝子を含む発現ベクターで dhfr - CHO 細胞をトランスフェクトする。この場合の所望のタンパク質は、組換え抗体重鎖および / または軽鎖である。

【0425】

競合的 DHFR 阻害剤メトトレキサート (MTX) の量を増加させるために、組換え細胞は、dhfr 遺伝子の増幅により耐性を生じさせる。標準的な場合、利用される増幅ユニットは、dhfr 遺伝子のサイズよりはるかに大きく、結果として、抗体重鎖が共増幅される。

【0426】

抗体鎖などのタンパク質の大規模生産が所望されるとき、発現レベルと利用される細胞の安定性の両方が重要である。長期培養において、組換え CHO 細胞集団は、これらが単一の親クローンに由来するものであったとしても、増幅中にこれらの特異的抗体生産に関して均質性を喪失する。

【0427】

バイシストロン性発現ベクターを、キメラ抗体の組換え発現において使用するためにブリペイドした。これらのバイシストロン性発現ベクターは、「内部リボソーム侵入部位」即ち「IRES」を利用する。キメラ抗 E G F R の生産のためのこれらの構築物では、免疫グロブリン鎖および選択可能マーカー c D N A が I R E S により連結されている。I R E S は、細胞のトランス作用性因子を利用して m R N A 内の内部開始コドンに小さなりボソームサブユニットを補充する、シス作用性要素である。I R E S は、真核細胞内のポリシストロン性転写ユニットからの 2 つ以上のタンパク質のタンパク質の発現を助長する。選択可能マーカー遺伝子が翻訳されるバイシストロン性発現ベクターのキャップ依存様式での、および I R E S 内の関心のある遺伝子の I R E S 依存様式での使用は、様々な実験的方法に応用されている。I R E S 要素は、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産、組換えタンパク質生産、遺伝子療法、遺伝子捕捉、および遺伝子ターゲティングへの組み込みに成功している。

【0428】

キメラ抗体 806 (ch806) 構築の概要

標準的な分子生物学技術を用い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 鎖をクローニングすることにより、キメラ 806 抗体を産生させた。その後、V H および V L 抗体を p R E N 哺乳動物発現ベクターにクローニングし（この構築物を配列番号：7 および配列番号：8 に示す。）、増幅および発現のために C H O (D H F R - / - v c) 細胞にトランスフェクトした。簡単に言うと、トリプシン処理後、標準条件下での電気泳動を用いて、 4×10^6 の C H O 細胞を、L C および H C 発現ベクターそれぞれ 10 μ g でコトランスフェクトした。室温で 10 分静置後、細胞を 15 mL の培地（10% ウシ胎仔血清、ヒポキサンチン/チミジンサプリメントと添加剤）に添加し、 1.5×10^6 の細胞培養ペトリ皿に移した。その後、これらのプレートを正常条件下で 2 日間、インキュベーター内に置いた。

10

【0429】

この時点で、ゲンタマイシン、5 nM メトトレキサートの添加、透析したウシ胎仔血清でのウシ胎仔血清の置換、およびヒポキサンチン/チミジンの除去により、培地からの L C と H C の両方で首尾よくトランスフェクトされたクローンについての選択を開始させた。トランスフェクション後第 17 日に、キメラ 806 抗体の発現のために選択下成長している個々のクローンを採取しスクリーニングした。E L I S A をスクリーニングに利用し、この E L I S A は、変性可溶性 E G F 受容体（変性 E G F R が 806 結合を可能ならしめることは公知である。）で E L I S A プレートが被覆することから成った。このアッセイは、個々のクローンによる生産レベルのスクリーニングを考慮にいれており、スクリーニングされた抗体の機能性も考慮にいれている。すべてのクローンが機能性 ch806 を生産することが明らかになり、最良の生産体を取って、増幅に発展させた。生産される ch806 のレベルを増幅するために、最高生産性クローンをより高いメトトレキサート濃度（100 nM 対 5 nM）のもとでの再選択に付した。前述の手順を用いてこの作業に着手した。

20

【0430】

その後、100 mM M T X で成長しているクローンを、生産レベルの測定、血清の離脱、細胞バンクの測定のために、オーストラリア、メルボルンの Ludwig Institute の Biological Production Facility に渡した。この細胞系は、ローラーボトル内で ~ 10 mg / リットルを安定して生産することが明らかになった。

30

【0431】

p R E N ch806 L C neo ベクターの核酸配列を配列番号：7 に提供する。
p R E N ch806 H C D H F R ベクターの核酸配列を配列番号：8 に提供する。

【0432】

図 33 は、I R E S を利用するベクター p R E N - H C および p R E N - L C を描写するものである。p R E N パイシストロン性ベクター系は、2002 年 2 月 13 日に出願された同時係属米国特許出願番号 60 / 355, 838 に記載および開示されており、この出願は、この全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0433】

キメラ 806 が、マウス親抗体のものと同一の結合特異性を呈示することを実証するために、ch806 を F A C S 分析によって評定した。野生型細胞（U87MG 親細胞）E G F 受容体を過発現する細胞（A431 細胞および U87MG . wt E G F R 細胞）および U87 . Δ 2 - 7 細胞を使用して分析を行った（データを示さない。）。E G F R を過発現する細胞および d e 2 - 7 E G F R を発現する細胞を使用して、m A b 806 および ch806 の類似した結合特異性を得た。野生型細胞において結合は観察されなかった。スキャッチャード解析により、U87MG d e 2 - 7 細胞を使用して 6.4×10^9 M⁻¹ の放射標識 ch806 についての結合親和性が明らかになった（データは示さない。）。

40

【0434】

50

U87MG-de2-7異種移植腫瘍を有するBALB/cヌードマウスにおいてch806抗体の生体内分布分析を行った。結果を図34に示す。マウスに5 μ gの放射標識抗体を注射し、8、24、48および74時間の時点で、1時点につき4匹の群で犠牲にした。器官を回収し、計量し、ガンマカウンターで放射能を測定した。¹²⁵I標識ch806は、74時間にわたって高い腫瘍取り込み量および累積腫瘍保持量を有する¹¹¹In標識ch806と比較して、腫瘍に対するターゲティング低減を呈示する。74時間の時点で、¹¹¹In標識抗体は、およそ30%のID/グラム組織および4.0の腫瘍対血液比を呈示する(図35)。¹¹¹In標識ch806は、肝臓、脾臓および腎臓において多少の非特異的保持量を示す。このことは、この同位体の使用に共通しており、時間と共に減少し、これにより、この結合がch806に非特異的であり、¹¹¹In結合に起因することが裏付けられる。

10

【0435】

キメラ抗体ch806を確率腫瘍モデルにおいて治療効力について評価した。100 μ LのPBS中の 3×10^6 U87MG- Δ 2-7を、週齢4-6週の雌ヌードマウス(Animar Research Center、オーストラリア、ウエスタンオーストラリア州)の両側腹部にs.c.接種した。mAb806を陽性対照として含めた。結果を図36に描写する。腫瘍が50mm³の平均容積に達したときに治療を開始した。治療は、指示された日に合計5回の注射についてのi.p.で施した1mgのch806またはmAb806から成った。式(長さ $\times$ 幅²)/2(式中、長さは、最長軸であり、幅は、長さに対して直角での測定値であった。)を用いて、mm³で腫瘍容積を決定した。各治療群について平均腫瘍容積 $\pm$ S.E.としてデータを表した。ch806およびmAb806は、U87MG- Δ 2-7異種移植片に対してほぼ同一の抗腫瘍活性を呈示した。

20

【0436】

ch806免疫エフェクター機能の分析

材料および方法

抗体および細胞系

マウス抗de2-7 EGFRモノクローナルmAb806、キメラ抗体ch806(IgG₁)、および対照アイソタイプ適合キメラ抗G250モノクローナル抗体cG250は、オーストラリア、メルボルンのLudwig Institute for Cancer Research、Biological Production Facilityによって調製された。補体依存性細胞傷害性(CDC)および抗体依存性細胞傷害性(ADCC)アッセイは、両方とも、U87MG-de2-7およびA431細胞をターゲット細胞として利用するものであった。前に記載したU87MG-de2-7細胞系は、de2-7 EGFRを含有するレトロウイルスに感染させたヒト星状細胞腫細胞系である(Nishikawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7727-31)。ヒト扁平上皮癌腫A431細胞は、米国微生物系統保存機関(the American Type Culture Collection)(バージニア州マナッサス)から購入した。すべての細胞系を、10%熱不活性化FCS(CSL、オーストラリア、メルボルン)と100単位/mLペニシリンと100 μ g/mLストレプトマイシンとを捕捉したGlutamax(Life Technologies、オーストラリア、メルボルン)を伴うDMEM/F-12において培養した。レトロウイルスでトランスフェクトされたU87MG-de2-7細胞についての選択を維持するために、400 μ g/mLのG418を培地を含めた。

30

40

【0437】

ヒト末梢血単核細胞(PBMC)エフェクター細胞の調製

健康ボランティアドナー血からPBMCを単離した。Ficoll-Hypaque(ICN Biomedical Inc.、米国オハイオ州)での密度勾配遠心分離により、ヘパリン加全血を分画した。PBMC画分を回収し、5%熱不活性化FCSを含有する、100U/mLのペニシリンと100 μ g/mLのストレプトマイシンとを捕捉し、2mMのL-グルタミンを捕捉したRPMI+1640で3回洗浄した。

50

【0438】

ターゲット細胞の調製

以前に公表された方法 (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) の変形により、CDCおよびADCCアッセイを行った。簡単に言うと、 5×10^6 のターゲットU87MG.de2-7およびA431細胞を、 1×10^6 細胞あたり $50 \mu\text{Ci}$ ^{51}Cr (Geneworks、オーストラリア、アデレード) で標識し、2時間、37

で温置した。その後、細胞をPBS (0.05 M、pH 7.4) で3回洗浄し、培養基で4回洗浄した。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、デンマーク、ロスキレ) の各ウェルに添加した。

10

【0439】

CDCアッセイ

$50 \mu\text{L}$ の標識ターゲット細胞に、 $50 \mu\text{L}$ のch806またはアイソタイプ対照抗体cG250を、濃度範囲0.00315 - $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ にわたって三重反復で添加し、氷の上で5分、温置した。次に、 $50 \mu\text{L}$ の新たに調製した健常ドナー補体 (血清) を添加して血清の1:3最終希釈物を生じさせた。これらのマイクロタイタープレートを4時間、37 で温置した。遠心分離後、上清に放出された ^{51}Cr を計数した (Cobra II自動ガンマカウンター、Canberra Packard、オーストラリア、メルボルン)。特異的溶解百分率を実験 ^{51}Cr 放出、全放出 ($50 \mu\text{L}$ ターゲット細胞 + $100 \mu\text{L}$ 10% Tween 20) および自然放出 ($50 \mu\text{L}$ ターゲット細胞 + $100 \mu\text{L}$ 培地)、から算出した。

20

【0440】

ADCCアッセイ

健常ドナーPBMCによりもたらされたch806媒介ADCCを、2つの4時間 ^{51}Cr 放出アッセイによって測定した。第一のアッセイでは、標識されたターゲット細胞を、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、デンマーク、ロスキレ) に50:1のエフェクター/ターゲット (E:T) 細胞比でプレーティングした。ADCC活性測定のために、0.00315 - $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ (最終濃度) の試験および対照抗体を各ウェルに三重反復で添加した。第二のADCCアッセイでは、ch806のADCC活性を、 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ の一定の試験抗体濃度で、あるエフェクター:ターゲット細胞比範囲にわたって、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 で4時間温置し、その後、 $50 \mu\text{L}$ の上清を各ウェルから回収し、放出された ^{51}Cr をガンマカウンティング (Cobra II自動ガンマカウンター、Canberra Packard、オーストラリア、メルボルン)。これらのアッセイに対照を含めて、自然放出 (培地のみ) および全放出 (10% Tween 20 / PBS) について補正した。適切な対照と同じサブクラスの抗体を並行して実行した。

30

40

【0441】

細胞溶解 (細胞傷害性) 百分率を下記式に従って算出した:

$$\text{細胞傷害性百分率} = \frac{\text{サンプルカウント} - \text{自然放出}}{\text{全放出} - \text{自然放出}} \times 100$$

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

【0442】

結果

CDC分析の結果を図37に提示する。アイソタイプ対照cG250で観察されたものに匹敵するCDCを有するch806 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 以下の存在下で、最小DCD活性が観察された。

50

【0443】

50 : 1 の E : T 比でのターゲット U 8 7 M G . d e 2 - 7 および A 4 3 1 細胞に対する c h 8 0 6 媒介 A D C C を図 3 8 に提示する。有効な c h 8 0 6 特異的細胞傷害性をターゲット U 8 7 M G . d e 2 - 7 細胞に対して呈示したが、A 4 3 1 細胞に対して最小 A D C C が c h 8 0 6 により媒介された。達成される細胞傷害性レベルは、2 つの細胞集団上の c h 8 0 6 結合部位の数を反映する。ターゲット 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、 $\sim 1 \times 10^6$ の d e 2 - 7 E G F R を発現するが、A 4 3 1 細胞上で発現される 1×10^6 の野生型 E G F R 分子のサブセットだけが c h 8 0 6 によって認識される（上の実施例参照）。

【0444】

さらなる A D C C 分析を行って、ターゲット U 8 7 M G . d e 2 - 7 細胞に対する $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ の c h 8 0 6 により媒介される A D C C と、 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ の親マウス m A b 8 0 6 によって果たされるものとを比較した。結果を図 3 9 に提示する。m A b 8 0 6 のキメラ化は、親マウス m A b によって達成される A D C C の著しい向上を果たし、30 % より大きい細胞傷害性が E : T 比 25 : 1 および 50 : 1 で果たされた。

【0445】

親マウス m A b 8 0 6 免疫エフェクター機能の欠如は、キメラ化により著しく向上された。c h 8 0 6 は、良好な A D C C、しかし最小の C D C 活性を媒介する。

【実施例 20】

【0446】

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産生

m A b 8 0 6 または c h 8 0 6 の臨床評価を補助するために、抗体の血清薬物動態をモニターするためのおよびマウス - ヒトキメラ抗体に対する任意の免疫応答を定量するための検査室的アッセイが必要とされる。マウスモノクローナル抗イディオタイプ抗体（抗 i d）を産生させ、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対照としての使用について特性づけした。これらの抗イディオタイプ抗体は、患者において自然な抗 E G F R 抗体応答を生じさせる、治療または予防用ワクチンとしても有用であり得る。

【0447】

抗イディオタイプ抗体を産生させるための方法は、当該技術分野において周知である（Chatterjee et al, 2001; Uemura et al, 1994; Steffens et al, 1997; Safa and Foon, 2001; Brown and Ling, 1988）。

【0448】

簡単に言うと、マウスモノクローナル抗イディオタイプ抗体（抗 i d）を次のように産生させた。c h 8 0 6 での免疫処置を施したマウスからの脾細胞を S P 2 / 0 - A G 1 4 形質細胞腫細胞と融合させ、抗体産生性ハイブリドーマを、c h 8 0 6 への特異的結合および抗原に対する競合的結合について E L I S A により選択した（図 40）。25 のハイブリドーマを最初に選択し、L M H - 11、- 12、- 13 および - 14 と呼ぶ 4 つは、c h 8 0 6、m A b 8 0 6 への特異的結合を明示する抗体であって c h 8 0 6 または m A b 8 0 6 抗原結合活性を中和することができるものである抗体を分泌した（図 41）。c h 8 0 6 / m A b 8 0 6 イディオタイプまたは C D R 領域の認識は、精製ポリクローナルヒト I g G との交差反応性の欠如により実証された。

【0449】

血清サンプル中の c h 8 0 6 の判定を補助するための容易に入手できる組換え抗原 d e 2 - 7 E G F R の不在下、臨床サンプル中の c h 8 0 6 を測定するための高感度で特異的な E L I S A の開発に、806 可変領域に同時に結合する新規抗イディオタイプ c h 8 0 6 抗体の能力を活用した（図 42）。捕捉のために L M H - 12 および検出のためにビオチン化 L M H - 12 を使用すると、検証済 E L I S A は、血清中の c h 8 0 6（ $2 \mu\text{g} / \text{mL} - 1.6 \text{ ng} / \text{mL}$ ）の測定についての非常に再現性のある結合曲線を $3 \text{ ng} / \text{mL}$

10

20

30

40

50

Lの検出限界で明示した。(n = 12 ; 1 - 100 ng / mL、変動係数 < 25 % ; 100 ng / mL - 5 µg / mL、変動係数 < 15 %)。試験した3つのドナー血清に関してははっきりわかるバックグラウンド結合はなく、無視できる程度の結合がアイソタイプ対照 hu3S193 に関して観察された。ハイブリドーマは、高レベルの抗体 LMH - 12 を生産するので、ch806の測定および臨床サンプル中の任意の免疫応答の定量をできるようにより大規模な生産を計画する (Brown and Ling, 1988)。

【0450】

結果

マウス免疫処置および免疫処置前および後血清サンプルのハイブリドーマクローン選択免疫反応性は、高力価のマウス抗 ch806 および抗 hu Ig G mAb の発生を示した。ch806 に結合するが hu Ig G にはしない抗体を生産する25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一部についての結合特性を図42Aおよび42Bに示す。その後、高親和性結合を有するこれらの抗 ch806 ハイブリドーマのうちの4つ(クローン3E3、SB8、9D6、および4D8)を制限希釈により単個細胞からのクローン増殖について追跡し、これらをそれぞれ Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hybridoma (LMH) - 11、- 12、- 13、および - 14 と呼んだ(図42)。

10

【0451】

選択された抗イディオタイプ抗体の結合および遮断活性

2つのch806抗体に同時に結合する抗ch806抗体の能力は、血清ch806レベルを判定するためのELISAにおける試薬としてのこれらの使用に望ましい特徴である。クローン性ハイブリドーマ、LMH - 11、- 12、- 13、および - 14 は、同時結合を明示した(データを示さない)。

20

【0452】

クローン増殖後、ハイブリドーマ培養上清を、sEGFR621でch806またはmAb806抗原結合活性を中和する能力について、ELISAによって検査した。結果は、sEGFRをコーティングしたプレートへのch806およびマウスmAb806結合両方を溶解状態で遮断する、抗イディオタイプmAb LMH - 11、- 12、- 13、および - 14 のアンタゴニスト活性を明示した(LMH - 11、- 12、- 13については図41)。

30

【0453】

ローラーボトル内での大規模培養後、確率されたクローン性ハイブリドーマ、LMH - 11、- 12、- 13、および - 14、の結合特異性をELISAによって検証した。マウスモノクローナル抗体アイソタイプングキットにより、LMH - 11 から - 14 までの抗体をアイソタイプ Ig G 1 k として同定した。

【0454】

臨床血清サンプル中のch806 薬物動態ELISAアッセイ開発

血清サンプル中のch806の判定を補助するために、806可変領域を同時に結合する抗イディオタイプch806抗体の能力を、臨床サンプル中のch806についての高感度で特異的なELISAアッセイの開発に活用した。捕捉のための3つの精製クローンLMH - 11、- 12、および - 13 (図49Bおよび49C)を、それぞれ、血清中の結合ch806を捕捉して検出するこれらの能力について比較した。結果は、捕捉のためにLMH - 12 (10 µg / mL) および検出のためにビオチン化LMH - 12の使用が、血清(3 ng / mL)中のch806に対する最高の感受性と無視できる程度のバックグラウンド結合を生じさせることを示した。

40

【0455】

1 µg / mLの抗イディオタイプLMH - 12 および1 µg / mLのビオチン化LMH - 12 を捕捉および検出にそれぞれ使用する最適な薬物動態ELISA条件を確立して、この方法の検証を行った。3つの独立したELISAを四重反復で行って、3人の健常ドナーからのドナー血清または1%BSA/培地中でch806をアイソタイプ対照hu3

50

S 1 9 3 と共に測定した。検証結果を図 4 3 に提示する。該結果は、血清中の c h 8 0 6 (2 μ g / m L - 1 . 6 n g / m L) の測定についての非常に再現性のある結合曲線を 3 n g / m L の検出限界で明示した。(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 %) 。試験した 3 つの血清に関してははっきりわかるバックグラウンド結合はなく、無視できる程度の結合がアイソタイプ対照 h u 3 S 1 9 3 に関して観察された。

【実施例 2 1】

【0 4 5 6】

炭水化物構造および抗体認識の評定

m A b 8 0 6 抗体による E G F R (増幅された E G F R と d e 2 - 7 E G F R の両方) の結合および認識における炭水化物構造の役割をさらに評定するための実験を企てた。

【0 4 5 7】

炭水化物構造が、m A b 8 0 6 エピトープに直接関係するかどうかを判定するために、C H O 細胞において発現された組換え s E G F R を P N G a s e F で処理して、N 結合型グリコシル化を除去した。処理後、このタンパク質を S D S - P A G E で泳動させ、膜に転写し、m A b 8 0 6 で免疫プロットした(図 4 4)。予想どおり、脱グリコシル化 s E G F R は、S D S - P A G E で、より速く泳動した。このことは、これらの炭水化物がうまく移動したことを示している。m A b 8 0 6 抗体は、脱グリコシル化材料を明らかに結合していた。このことは、抗体エピトープが事実上ペプチドであり、単なるグリコシル化エピトープでないことを明示している。

【0 4 5 8】

^{3 5} S で代謝標識された細胞系から調製した溶解産物を、E G F R に対する異なる抗体で免疫沈降させた(図 4 5)。予想どおり、5 2 8 抗体は、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞から 3 つのバンド、野生型(w t) E G F R に対応する上方のバンドと d e 2 - 7 E G F R に対応する 2 つの下方のバンドを免疫沈降させた。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、異なるグリコシル化を表すと思われる(C h u e t a l . (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 バンドしか免疫沈降させず、過度な露出の後でさえ野生型受容体は完全に不在であった(データを示さない。) 。興味深いことに、m A b 8 0 6 は、5 2 8 抗体と比較したとき、下方 d e 2 - 7 E G F R バンドとの相対反応性増加を示したが、上方バンドとの反応性減少を示した。S C - 0 3 抗体、E G F R の C 末端ドメインに対する市販ウサギポリクローナル抗体は、5 2 8 抗体で見られるような 3 つの E G F R バンドを免疫沈降させたが、この抗体によって免疫沈降された受容体の総量は、かなり少なかった。m A b 8 0 6 についての対照として無関係な I g G 2 b 抗体を使用したとき、バンドは観察されなかった(実施例 1 8 参照)。

【0 4 5 9】

5 2 8 抗体は、U 8 7 M G . w t E G F R 細胞からこの野生型受容体に対応する単一のバンドを免疫沈降させた(図 4 5)。m A b 8 0 6 も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 E G F R バンドは、5 2 8 反応性受容体より明らかに速く泳動した。S C - 0 3 抗体は、U 8 7 M G . w t E G F R 細胞から両方の E G F R 反応性バンドを免疫沈降させた。このことにより、m A b 8 0 6 および 5 2 8 がこれらの細胞からの全細胞溶解産物における異なる形態の E G F R を認識することがさらに確証される。

【0 4 6 0】

U 8 7 M G . w t E G F R 細胞で観察されたように、5 2 8 抗体は、A 4 3 1 細胞から単一 E G F R バンドを免疫沈降させた(図 4 5)。5 2 8 反応性 E G F R バンドは、これらの低い百分率のゲル(6 %) で非常に幅広であり、おそらく、受容体グリコシル化の多様性を反映している。単一 E G F R バンドが m A b 8 0 6 での免疫沈降後にも見られた。この E G F R バンドは、5 2 8 の全般的に広幅の反応性バンドよりかなり速くは泳動しなかったが、再現可能な様式で広幅 5 2 8 バンドの立ち上がりに位置した。U 8 7 M G . Δ

2 - 7 細胞溶解産物とは異なり、A 4 3 1 溶解産物から m A b 8 0 6 により免疫沈降された E G F R の総量は、5 2 8 抗体でよりかなり少なく、m A b 8 0 6 がこれらの細胞表面の E G F R の一部しか認識しないことを示す本発明者らのスキャッチャードデータと一致した結果であった（実施例 4 参照）。S C - 0 3 での免疫沈降は、結果として、5 1 8 抗体についてのような単一広幅 E G F R バンドを生じさせた。類似した結果を N H 5 細胞で得た（データを示さない。）。考え合わせると、このデータは、m A b 8 0 6 が、E G F R のより早く泳動する種（この受容体の示差グリコシル化形態を表すことがある。）と優先的に反応することを示している。

【0 4 6 1】

受容体プロセッシングのどの時期に m A b 8 0 6 活性が現れるかを判定するために、パルス / チェイス実験を行った。A 4 3 1 および U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞を 5 分間、³ ⁵ S メチオニン / システインでパルスし、その後、様々な時間、3 7 °C で温置した後、m A b 8 0 6 または 5 2 8 で免疫沈降させた（図 4 6）。5 2 8 抗体での A 4 3 1 細胞における免疫沈降パターンは、E G F R に特異的な高次構造依存性抗体に特有のものであった。少量の受容体が 0 分の時点で（即ち、5 分パルス後に）免疫沈降され、標識 E G F R 量は各時点で増していった。時間に伴う受容体の分子量も併存した。対照的に、m A b 8 0 6 反応性 E G F R 材料は、0 分では高レベルで存在し、2 0 分でピークに達し、その後、さらに進んだ各時点では低下した。従って、m A b 8 0 6 は、プロセッシングの早期に見つけられる E G F R の形態を優先的に認識するようである。

【0 4 6 2】

パルス標識 U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞において観察される抗体反応性は、より複雑であった。0 分における 5 2 8 抗体での免疫沈降により、少量の下方 d e 2 - 7 E G F R バンドが標識されることが明らかになった（図 4 6）。この少量の 5 2 8 反応性 d e 2 - 7 E G F R 下方バンドは、時間に伴って増加し、6 0 分でピークに達し、2 および 4 時間でゆっくりと下降した。標識上方 d e 2 - 7 E G F R バンドの有意な量は 6 0 分まで検出されず、その後、このレベルは、この時間経過の終わりまで増加し続けた。このことは、上方 d e 2 - 7 E G F R がこの受容体のより成熟した形態であることを明確に示している。この時間経過研究中の m A b 8 0 6 反応性も様々であったが、m A b 8 0 6 は、下方 d e 2 7 E G F R バンドを優先的に沈降させた。実際、標識の 4 時間後まで、有意なレベルの m A b 8 0 6 上方バンドはなかった。

【0 4 6 3】

上の実験は、m A b 8 0 6 が、より未成熟な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している。この可能性を、³ ⁵ S メチオニン / システインで一晩標識した異なる細胞系からの E G F R を免疫沈降させること、その後、その結果として生じた沈降物をエンドグリコシダーゼ H（E n d o H）消化に付すことによって試験した。この酵素は、タンパク質から高マンノースタイプの炭水化物（即ち、未成熟グリコシル化）を優先的に除去する一方で、複合炭水化物（即ち、成熟グリコシル化）をインタクトで残す。5 2 8、m A b 8 0 6 および S C - 0 3 での標識 U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞溶解産物に関する免疫沈降および消化は、類似した結果をもたらした（図 4 7）。

【0 4 6 4】

予測したとおり、下方 d e 2 - 7 E G F R バンドは、E n d o H 消化に対して十分感受性であり、E n d o H 消化後、S D S - P A G E でより早く泳動した。このことは、このバンドが高マンノース形態の d e 2 - 7 E G F R を表すことを明示している。上方 d e 2 - 7 E G F R バンドは、E n d o H 消化に対して本質的に耐性であり、E n d o H 消化後に泳動の非常にわずかな違いしか示さなかった。このことは、この炭水化物構造の大部分が複合タイプのものであることを示している。酵素消化後の上方バンドの分子量の少しだが再現性のある減少は、上方 d e 2 - 7 E G F R バンドに関する炭水化物が主として複合タイプのものでありながら、多少の高マンノース構造を有することを示唆している。興味深いことに、これらの細胞は、5 2 8 免疫沈降後にはっきりと見える少量

10

20

30

40

50

の内因性 w t E G F R も発現する。E n d o H 消化後に野生型受容体の分子量の少しだが注目に値する減少もあった。このことは、これが高マンノース構造も含有することを示している。

【 0 4 6 5 】

E n d o H 消化に対する免疫沈降 w t E G F R の感度は、U 8 7 M G . w t E G F R 細胞と A 4 3 1 細胞の両方で類似していた (図 4 7) 。 5 2 8 抗体により沈降された材料の大半は、E n d o H 酵素に対して耐性であったが、この材料の少量は、高マンノース形態のものであった。もう一度、E n d o H 消化後に w t E G F R の分子量の小さな増加があった。このことは、これが多少の高マンノース構造を含有することを示唆している。S C - 0 3 抗体を使用したときの結果は、5 2 8 抗体と類似していた。対照的に、m A b 8 0 6 により沈降された E G F R の大部分は、U 8 7 M G . w t E G F R 細胞と A 4 3 1 細胞の両方において E n d o H に対して感受性であった。このことにより、m A b 8 0 6 が高マンノース形態の E G F R を優先的に認識することが確認される。類似した結果が、N H - 5 細胞で得られ、この場合、m A b 8 0 6 によって沈降された材料の大部分が E n d o H 消化に対して感受性であったが、m A b 5 2 8 および S C - 0 3 により沈降された材料は、E n d o H 消化に対して耐性であった (データを示さない。) 。

10

【 0 4 6 6 】

A 4 3 1 細胞系の細胞表面ヨウ素化を ^{125}I で行い、その後、8 0 6 抗体で免疫沈降させた。表面ヨウ素化についてのプロトコルは、次のとおりであった：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、本明細書において上で説明したとおりである。標識のために、1 0 % F C S を伴う培地中で細胞を成長させ、E D T A で剥離させ、P B S で 2 回洗浄し、その後、4 0 0 μ L の P B S に再浮遊させた (おおよそ $2 - 3 \times 10^6$ 細胞) 。この浮遊液に、1 5 μ L の ^{125}I (1 0 0 m C i / m L ストック) 、1 0 0 μ L ウシラクトペルオキシダーゼ (1 m g / m L) ストック、1 0 μ L H_2O_2 (0 . 1 % ストック) を添加し、この溶液を 5 分間温置した。その後、さらなる 1 0 μ L H_2O_2 を添加し、さらに 3 分間、温置を継続した。その後、細胞を再び 3 回、P B S で洗浄し、1 % T r i t o n に溶解した。ラクトペルオキシダーゼでの A 4 3 1 細胞系の細胞表面ヨウ素化、その後の 8 0 6 抗体での免疫沈降は、上で説明した全細胞溶解産物のものに類似して、A 4 3 1 細胞の細胞表面に結合した 8 0 6 によって認識される E G F R の主形態は、E n d o H 消化に感受性であった (図 4 8) 。このことにより、A 4 3 1 細胞の細胞表面の 8 0 6 により結合された E G F R の形態は、E n d o H 感受性形態であり、従って、高マンノースタイプであることが確認される。

20

30

【 実施例 2 2 】

【 0 4 6 7 】

ヒト化 (ベニアリングされた) 抗体 8 0 6

A . h u 8 0 6 構築

ヒト化 8 0 6 抗体 (h u 8 0 6) のための発現ベクターを構築した。単一 G S プロモーター由来遺伝子発現カセット内の完全長 h u 8 0 6 についての両方の遺伝子を含有する、8 C 6 5 A A G (1 1 8 9 1 b p ; 配列番号 : 4 1) と呼ぶ、ベクターを設計した (図 5 3 および 5 4) 。

40

【 0 4 6 8 】

重鎖可変 (V H) および定常 (C H) 領域 (それぞれ、配列番号 : 4 2 および 4 3) を図 5 5 A に示し、V H 領域 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 (それぞれ、配列番号 : 4 4、4 5 および 4 6) を、下線を引くことにより指摘する。

【 0 4 6 9 】

軽鎖可変 (V L) および定常 (C L) 領域 (それぞれ、配列番号 : 4 7 および 4 8) を図 5 5 B に示し、V L 領域 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 (それぞれ、配列番号 : 4 9、5 0 および 5 1) を、下線を引くことにより指摘する。

【 0 4 7 0 】

ヒト化抗体構築物を得るために、ベニアリング (v) 技術 (D a u g h e r t y e t

50

al. (1991) Polymerase chain reaction facilitates the cloning, CDR-grafting, and rapid expression of a murine monoclonal antibody directed against the CD 18 component of leukocyte integrins. *Nucleic Acids Res.* 19 (9), 2471-6; Daugherty の米国特許番号 6,797,492; Padlan, E. A. (1991) A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol. Immunol.* 28 (4-5), 489-98; Padlan らの European 特許番号 519596) を用いた。リガンド結合特性を保ちながら 806 抗体可変ドメインの免疫原性を最少にするために、ヒト抗体にいて通常見つけられるものとは異なるフレームワーク領域内の表面露出残基の置換を企てた。この企てを実現するために、マウスモノクローナル抗体 (mAb) 806 の VL および VH 鎖を、遺伝子合成およびオーバーラッピング PCR プライマー技術によって作り直した。CL (カッパ) 鎖を同じ方法で組み立てた。インタクトな結合部位の保存を実証するために、ELISA により 806 抗原エピトープを含む合成ペプチドへのおよび表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析によって測定して組換え EGF 受容体 (EGFR) 細胞外ドメイン (ECD) への良好な結合を明示する scFv 形式でも vVL および vVH を発現させた。

10

20

【0471】

コドン最適化カッパ-LC および新たに設計したコドン - およびスプライス - 部位最適化ヒト IgG1 重鎖定常領域を使用して v806L および v806VH を完全長ヒト IgG1 コンテキストに作り変えて、NS0 および CHO 細胞系において安定した遺伝子発現を実現した。この発現系は、LONZA Biologics によって提供されているような pEE12.4 および pEE6.4 重および軽鎖発現ベクターを使用する LONZA GS 発現系に基づく。

【0472】

8C65AAG ベクターの一過性発現によって得た hu806 抗体産物 (図55) は、SPR により組換え EGFR-ECD と反応性であり、ELISA により剛性 EGFR 806 ペプチドエピトープと反応性であった。この 8C65AAG ベクターを、安定な GS-NS0 hu806 の産生のために LICR Affiliate Christopher Renner (University of Zurich) に、および GS-CHO hu806 細胞系の酸性のために LICR、Melbourne Centre に移した。

30

【0473】

hu806 抗体遺伝子の構築、増幅およびクローニングのための戦略
ベニアリングおよびコドン最適化

抗体ベニアリングは、HAMMA (ヒト抗マウス抗体) 応答への拮抗を目的としたヒト化戦略である。マウス mAb は、単回投与時でさえ、患者の免疫系により「異種」抗原とみなされ、免疫反応が誘導されて、これらの患者におけるこの試薬のさらなる使用を妨げる。mAb 806 ベニアリング方法の第一段階において、mAb 806 における VL および VH 鎖のアミノ酸配列を分析し、この mAb 806 タンパク質配列内の各アミノ酸残基を表面露出について等級づけした (図56 および図57)。抗体分子の外側に存在するアミノ酸だけを可能な修飾について考慮した。これらは、抗体認識にさらされる唯一のものであったからである。BLAST を用いて、mAb 806 タンパク質配列を 3 つのヒト抗体配列 (VH36germ、CAD26810、および AAA37941) と比較した。mAb 806 表面残基が、ヒト抗体配列のコンセンサスとマッチしなかったたびに、この残基を同定して、コンセンサス配列に変えた。最初に、ch806 の VL 内の 12 のアミノ酸および VH 鎖内の 14 のアミノ酸をベニアリングに付した (図56 および図57)。

40

50

【 0 4 7 4 】

コドン最適化は、抗体の、またはこれらの抗体を発現させるために使用した系のコドンバイアスに基づく他のタンパク質の、非相同発現を改善する手段である。h u 8 0 6 の作成における目的の1つは、コドン最適化を利用してこの抗体についての発現レベルを改善することであった。この発現系は、L O N Z A B i o l o g i c s によって提供されているようなp E E 1 2 . 4 およびp E E 6 . 4 H C およびL C 発現ベクターを使用するL O N Z A G S 発現系ならびに生産細胞としてのN S 0 および / またはC H O 細胞に基づく。従って、N S 0 / C H O 発現系においてこのコドンが有利であるかどうかについて考慮して、所与のアミノ酸のためのどのコドンを使用するかを決定した。

【 0 4 7 5 】

10

P C R による 8 0 6 D N A 配列の構築および増幅

h u 8 0 6 抗体の可変重 (V H) および可変軽 (V L) 領域の、ベニアリングされコドン最適化されたバージョンの配列を、次の方法で合成した：各領域 (V H または V L) について、8 - 1 0 オリゴヌクレオチドを、オーバーラッピングセンスおよびアンチセンスプライマーとして設計した。これらのオリゴは、シグナル配列、コーディング配列、イントロンを含めて、全 h u 8 0 6 V H または V L 配列を包含するように、ならびに 5 ' 末端に H i n d I I I 部位および 3 ' 末端に 3 ' B a m H I 部位を含むように、互いにオーバーラップするであろう。これらのオリゴヌクレオチドマップを図 5 6 B および 5 7 B に提示し、プライマーの詳細を下に提供する。

【 0 4 7 6 】

20

簡単に言うと、h u 8 0 6 V H または V L を P C R により次のように組み立てた：最初に、v 8 0 6 h c - または v 8 0 6 l c - オリゴ 1、2、3、4、オリゴ 5、6、およびオリゴ 7、8、9、10 を 3 つの独立した反応で結合させた。2 5 μ L の 2 × H o t S t a r T a q M a s t e r M i x (Q i a g e n) および 4 8 μ L の 無ヌクレアーゼ水を含む 5 0 μ L の P C R 反応に、各隣接オリゴのアリコート (5 0 p m o l)、および各内部オリゴ 5 p m o l を加えた。サーモ・サイクル・プログラムは、次のとおりであった：9 5 ° C ; 1 5 ' '、[9 4 ° C ; 3 0 ' '、5 8 ° C ; 3 0 ' '、7 2 ° C ; 3 0 ' '] × 2 0 サイクル、7 2 ° C ; 1 0 ' '、4 ' '。これらの 3 反応の生成物を、ゲル電気泳動による分離後、切除した。その後、塩カラム (Q i a g e n - Q i a s p i n M i n i p r e p s) を使用してこれらを精製し、併せた。これらの生成物を、プライマー 1 および 1 0 を使用する P C R によってさらに精製した。この第二の反応の生成物は、発現プラスミドへの挿入を可能にする、H i n d I I I および B a m H I についての制限酵素部位を含んだ。

30

【 0 4 7 7 】

【表 7】

hu806V領域をPCR合成するために使用されたオリゴヌクレオチド

		配列番号:	
v806 VH:			
v806hc -1:	GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGACCTGGCGCATTC	52	
v806hc -2:	CCCTTCCTCCTCACTGGGATTTGGCAGCCCCTTACCTGTGGCGGCTGCT ACCAGAAAGAGAATGCGCCAGGTCCAATCC	53	
v806hc -3:	CCCAGTGAGGAGGAAGGGATCGAAGGTCACCATCGAAGCCAGTCAAG GGGGCTTCCATCCACTCCTGTGTCTTCTCTAC	54	
v806hc -4:	GACTCGGCTTGACAAGCCCAGGTCCACTCTCTTGGAGCTGCACCTGGCT GTGGACACCTGTAGAGAAGACACAGGAGTGG	55	10
v806hc -5:	GGGCTTGTCAAGCCGAGTCAAACCTTTGTCCCTAACATGTACTGTGTCCG GATACTCTATCTCATCAGATTTTTCGTGGAATTGG	56	
v806hc -6:	CCCAGAGTATGATATGTAGCCCATCCATTCTAAACCTTTCCTGGTGGC TGCCTTATCCAATTCCACGCAAAATCTGATG	57	
v806hc -7:	GGGCTACATATCATACTCTGGGAACACCAGATATCAACCCTCTCTGAA AAGCCGGATCACAATCACTAGGGACACGTCG	58	
v806hc -8:	GCAGTAATATGTTGCTGTGTCTGGGGCTGTAACGGAGTTCAGCTGCAG GAAGAACTGGCTCTTCGACGTGTCCCTAGTGATTG	59	
v806hc -9:	CCAGACACAGCAACATATTACTGCGTAACCGCTGGCAGAGGCTTCCCC TATTGGGGACAGGGCACCCCTAGTGACAGTGAGC	60	20
v806hc -10:	CACGGATCCATCTTACCGCTGCTCACTGTCACTAGGGTG	61	
v806 VL:			
v806lc -1:	GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTG	62	
v806lc 2:	CTGGGATTTGGCAGCCCCTTACCTGTTGCGGCTGCTACAAGAAACAGTA TTCTCCAAGTCCAATCCATGGTGGCGGCAAG	63	
v806lc 3:	GGGGCTGCCAAATCCCAGTGAGGAGGAAGGGATCGAAGGTGACCATC GAAGCCAGTCAAGGGGGCTTCCATCCACTCC	64	30
v806lc 4:	CATGCTGGATGGACTCTGAGTCATCTGAATATCACTGTGAACACCTGTA GAGAAGACACAGGAGTGGATGGAAGCCC	65	
v806lc 5:	CTCAGAGTCCATCCAGCATGTCACTCTCCGTGGGAGATAGGGTGACGA TAACCTGTCAATTCAAGCCAAGACATCAACTCC	66	
v806lc 6:	GTTCCGTGATAGATTAGTCCTTTGAAGGACTTACCAGGCTTCTGTTGGA GCCATCCAATATTGGAGTTGATGTCTTGGCTTG	67	
v806lc 7:	CAAAGGACTAATCTATCACGGAACAACTTGGACGACGGCGTGCCATC GAGATTTTCAGGGTCTGGCAGCGGGACCGACTATAC	68	
v806lc 8:	GTGCTGGACGCAGTAGTATGTGGCAAAGTCTTCTGGCTCTAAGCTAGA GATGGTCACTGTATAGTCGGTCCCCGCTG	69	
v806lc -9:	CATACTACTGCGTCCAGCACGCTCAGTTCCCCTGGACATTTCGGCGGCGG CACAAAACCTGGAAATCAAACGTGAGTAGGG	70	40
v806lc 10:	CTCGGATCCCTACTCACGTTTGATTTC	71	

【0478】

h i 8 0 6 C L :

定常カップ軽鎖 (CL) のコドン最適化バージョンを、可変領域について用いたものと同じ手法で調製した。しかし、最初のPCR段階は、オリゴVK1con-1、2、3、4；および5、6、7、8を使用する2つだけの予備生成物の作成を含んだ。加えて、この生成物についての隣接制限部位は、プラスミド挿入前、BamHIおよびNotIであ

った。

【 0 4 7 9 】

【 表 8 】

hu806CL領域をPCR合成するために使用されたオリゴヌクレオチド

		配列番号：	
VK1cons-1:	GACGGATCCTTCTAAACTCTGAGGGGGTTCGGATGACG	72	
VK1cons-2:	GGAGCTGCGACGGTTCCTGAGGAAAGAAGCAAACAGGATGGTGTTTAA GTAACAATGGCCACGTCATCCGACCCCCTC	73	10
VK1cons-3:	GGAACCGTCGCAGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCATCCGACGAGC AACTGAAGTCAGGCACAGCCTCCGTGGTG	74	
VK1cons-4:	GTGCGTTGTCCACTTTCCACTGGACTTTGGCCTCTCTTGGGTAAAAGTT ATTAAGGAGGCACACCACGGAGGCTGTGC	75	
VK1cons-5:	GTGGAAGTGGACAACGCACTACAGAGCGGGAAGTCTCAGGAAAGCG TGACAGAGCAGGACTCAAAGATTCAACATACAGCC	76	
VK1cons-6:	CTTCACAGGCATATACCTTGTGCTTTTCATAATCAGCTTTTGACAGTGTC AGGGTAGAAGATAGGCTGTATGTTGAATCTTTTGAGTC	77	
VK1cons-7:	GCACAAGGTATATGCCTGTGAAGTAACTCATCAGGGACTCAGCAGCCC TGTCATAAAAGTTTAAATAGAG	78	
VK1cons-8:	CCTGCGGCCGCTTATCAGCATTCGCCTCTATTAAGTCTTTGGTGAGAG GG	79	20

【 0 4 8 0 】

h u 8 0 6 C H :

I g G 1 定常重鎖 (C H) 遺伝子 (配列番号 : 8 0) の合成ヒト化バージョンをドイツ、レーゲンスブルクの Gene Art から購入した。この遺伝子を CHO / NS 0 細胞における発現のためにコドン最適化した。この遺伝子配列、制限部位などの詳細を図 5 8 に示す。

【 0 4 8 1 】

発現プラスミドの構築

一過性トランスフェクションおよび予備試験のために、上で説明した手法で調製した h u 8 0 6 V H および V L 配列を、総称定常領域を含有する発現ベクターにライゲートした。これらのベクターは、L I C R A f f i l i a t e C h r i s o p h R e n n e r (U n i v e r s i t y o f Z u r i c h 、スイス)により提供されたものであり、(総称 C H を含有する) p E A K 8 H C 、および(総称 C L を含有する) 3 3 - x m - l c として知られていた。C I P の存在下で G a m H I および H i n d I I I を使用してベクターを消化し、その後、h u 8 0 6 V H および V L を対応するベクターにライゲートした。結果として得られたプラスミドを使用して、T o p 1 0 ケミカルコンピtent E . コリ (E . c o l i) (I n v i t o r g e n) をこの製造業者の指示に従って形質転換した。形質転換された E . コリ (E . C o l i) を L B + アンピシリンプレートにプレートイングし、制限消化および P C R によって耐性クローンをスクリーニングした。一般に、この手法で検出された 8 の陽性クローンを単離し、さらに増幅した。これらのコロニーから精製した D N A を自動 D N A シークエンシングによって分析した。

【 0 4 8 2 】

B a m H I および N o t I を使用する制限酵素 - 消化およびライゲーションにより、これらの構築物に定常領域のコドン最適化バージョンを付加させた。これらの形質転換体を、上で述べたように選択し、シークエンシングし、分析した。完全長抗体鎖を L o n z a G S 系にライゲートする前に、1つの事例では、B a m H I を使用する消化、D N A ポリメラーゼを使用するフィルイン、および平滑末端ライゲーションにより、可変領域配列と定常領域配列の間の B a m H I 部位を破壊した。

【0483】

その後、h u 8 0 6 (V H + C H) または h u 8 0 6 (V L + C L) を含有する制限断片を N o t I で消化し、続いて H i n d I I I で消化した。これらの消化を、N o t I 部位に平滑末端を作るように計画し、例えば、順次、以下の手法で行った：先ず、プラスミドを N o t I で消化した。完全消化（シングルカット）プラスミドを、1 % アガロースゲルを使用する電気泳動によって分離した。その後、この生成物を切除し、塩カラムで生成し、DNA ポリメラーゼを使用してフィルインした。この反応の生成物を塩カラム精製し、その後、H i n d I I I で消化した。その後、この生成物（h u 8 0 6 (V H + C H) については ~ 1 . 3 K b、および h u 8 0 6 (V L + C L) については ~ 0 . 8 K b）をゲル電気泳動によって分離し、切除し、精製した。

10

【0484】

ベクター p E E 1 2 . 4 および p E E 6 . 4 (L o n z a B i o l o g i c s p l c、英国、スラウ) を H i n d I I I および P m l I でそれぞれ消化した。h u 8 0 6 (V H + C H) を p E E 1 2 . 4 にライゲートして p E E 1 2 . 4 - h u 8 0 6 H を作成し、h u 8 0 6 (V L + C L) を p E E 6 . 4 に例ゲートして p E E 6 . 4 - h u 8 0 6 L を作成した。

【0485】

スクリーニング後、h u 8 0 6 重鎖配列と h u 8 0 6 軽鎖配列の両方を含有する、複合 2 遺伝子 L o n z a プラスミドを作成した。簡単に言うと、p E E 1 2 . 4 - h u 8 0 6 H および p E E 6 . 4 - h u 8 0 6 L ベクターを N o t I および S a l I 制限酵素で消化した。結果として得られた断片であって、C S 転写ユニットおよび h C M V - M I E プロモーター、続いて h u 8 0 6 重または軽鎖発現カセットを含有する断片を単離し、互いにライゲートした。結果として得られた「複合」L o n z a プラスミド（8 C 6 5 A A G と呼ぶ）を、H E K 2 9 3 系における単一プラスミド過性トランスフェクションのために、ならびに N S 0 および C H O 系における安定したトランスフェクションのために使用した。プラスミドマップを図 5 3 に示す。

20

【0486】

構築物に対する修飾

ベニアリングされた h u 8 0 6 H c および h u 8 0 6 L c のアミノ酸配列を検証した完全配列を m A b 8 0 6 と比較して図 5 9 および図 6 0 にそれぞれ示す。付録の中の h u 8 0 6 配列に隣接して、最初のベニアリング変更を示すアスタリスク（*）があり、数（1 - 8）は、本明細書において説明する番号付修飾 1 番および 8 番を指す。

30

【0487】

図 6 0 に関して、参照ファイル（m A b 8 0 6 L C）は、位置 9 1 に正しいチロシン（Y）ではなくヒスチジン（H）を間違っして示している；修飾番号 1 の主題。位置 9 1 の h u 8 0 6 に対して行った必要修飾を説明するために、原、未訂正ファイル配列を図 6 0 に示す。

【0488】

最初の構築およびシークエンシング段階後に多数の修飾を h u 8 0 6 c D N A 配列に対して行った。これらの修飾を行った理由としては、配列修飾目的での 4 つの制限酵素部位の導入、P C R 中に導入された配列内の 2 つのアミノ酸エラーの補正、最初の m A b 8 0 6 ドキュメンテーションから生ずる 1 つのアミノ酸エラーの補正、および変異体の追加のベニアリングを果たすための 4 つの追加のアミノ酸変更のエンジニアリングが挙げられた。以下の 8 段階の修飾を行った：

40

1 . h u 8 0 6 V L : C D R 3 H 9 1 Y

原ヌクレオチドが作られたドキュメントは、m A b 8 0 6 V L 配列の C D R 3 内の位置 9 1 に C A C（ヒスチジン、H）があると誤って示していた。部位特異的突然変異誘発を用いて、T A C（チロシン、Y；特許 W O 0 2 / 0 9 2 7 7 1）の正しい配列を生成した。アミノ酸配列内のこの位置での必然的変更は、C V Q H A Q F（配列番号：8 4）から C V Q Y A Q F（配列番号：8 5）であった。採集 D N A および翻訳タンパク質配列

50

を *ch806* と比較して図 6 1 に示す。

【0489】

hu806 VL 領域のヒスチジンからチロシンへの修飾のためのセンスプライマー (P D V 1 ; 40 量体)

5' - C C A C A T A C T A C T G C G T C C A G T A C G C T C A G T T C C C C T G G A C - 3' (配列番号 : 86)

hu806 VL 領域のヒスチジンからチロシンへの修飾のためのアンチセンスプライマー (P D V 2 ; 20 量体)

5' - C T G G A C G C A G T A G T A T G T G G - 3' (配列番号 : 87)

【0490】

2. *hu806* 重鎖 : 制限部位 *Dra* I I I および *Fse* I の付加

hu806 VH および VL 領域周辺のイントロンに制限酵素部位を付加した。これらの制限部位 (*pREN* ベクター系に特有、*LICR*) を、発現カセットに対して修飾を行う方法を容易にするように設計した。最初のシグナル領域を含まない *hu806* VH 配列を *Dra* I I I に対する単一消化により除去または挿入することができた。加えて、*Fse* I を *Not* I (*pREN* 系) または *Eco* R I (*Lonza System*) と同時に使用して、原配列から *Bam* H I の機能を果たす定常領域を切り取ることができた。

【0491】

2 段階 PCR 方法を用いてこれらの修飾を果たす。その後、産物を *Hind* I I I および *Bgl* I I I で消化した。その後、これらを、*Hind* I I I および *Bam* H I で消化されたコドン最適化定常領域を含有する *pREN* ベクターにライゲートした。この再ライゲーション方法は、*Bam* H I 部位を破壊した。

【0492】

第一の *Dra* I I I 部位の上流の可変領域のためのセンスプライマー (806 重鎖 *Dra* I I I Up ; 26 量体)

5' - G A G A A G C T T G C C G C C A C C A T G G A T T G - 3' (配列番号 : 88)

Dra I I I 部位 I を組み込むアンチセンスプライマー (806 重鎖 *Dra* I I I Down ; 28 量体)

5' - C A C T G G G T G A C T G G C T T C G A T G G T G A C C - 3' (配列番号 : 89)

2 *Dra* I I I 部位間の HC 可変領域のためのセンスプライマー (806 重鎖 *Dra* I I I - *Fse* I Up ; 49 量体)

5' - G G T C A C C A T C G A A G C C A G T C A C C C A G T G A A G G G G G C T T C C A T C C A C T C C - 3' (配列番号 : 90)

Dra I I I 部位および *Fse* I 部位を組み込みアンチセンスプライマー (806 重鎖 *Dra* I I I - *Fse* I Down ; 44 量体)

5' - C C A A G A T C T G G C C G G C C A C G G T G T G C C A T C T T A C C G C T G C T C A C - 3' (配列番号 : 91)

【0493】

3. *hu806* 軽鎖 : 制限部位 *Rsr* I I I および *Pac* I の付加

hu806 軽鎖について、付加した制限部位は、重鎖における *Dra* I I I と同じ機能を有する *Rsr* I I I、および *Fse* I の機能に匹敵する *Pac* I であった。

【0494】

第一の *Rsr* I I I 部位の上流の可変領域のためのセンスプライマー (806 軽鎖 *Rsr* I I I Up ; 22 量体)

5' - G A G A A G C T T G C C G C C A C C A T G G - 3' (配列番号 : 92)

Rsr I I I 部位 I を組み込むアンチセンスプライマー (806 軽鎖 *Rsr* I I I Down ; 25 量体)

5' - C G G T C C G C C C C C T T G A C T G G C T T C G - 3' (配列番号 : 93)

10

20

30

40

50

)

2 R s r I I 部位間の L C 可変領域のためのセンスプライマー (8 0 6 軽鎖 R s r I I - P a c I U p ; 4 5 量体)

5 ' - C G A A G C C A G T C A A G G G G G C G G A C C G C T T C C A T C C A C T C C T G T G T C - 3 ' (配列番号 : 9 4)

R s r I I 部位 I I および P a c I 部位を組み込むアンチセンスプライマー (8 0 6 軽鎖 R s r I I - P a c I D o w n ; 5 0 量体)

5 ' - C C A A G A T C T T T A A T T A A C G G A C C G C T A C T C A C G T T T G A T T T C C A G T T T T G - 3 ' (配列番号 : 9 5)

【 0 4 9 5 】

10

4 . h u 8 0 6 V H : P 8 5 A のリベニアリング

親 m A b 8 0 6 についての V H アミノ酸 8 1 - 8 7 におけるタンパク質配列は、S V T I E D T (配列番号 : 9 6) である。ベニアリング方法の一部として、S V T A P D T (配列番号 : 9 7 ; 図 5 6) を読み出すために、位置 8 4 および 8 5 のイソロイシンおよびグルタミン酸をアラニン - プロリンに変更した。さらなる分析により、アラニンは、この場合、プロリンより良好な選択肢であるであろうと判断した。下に挙げるプライマーを使用して、部位特異的突然変異誘発を用いてこの第二の変更を生じさせた (S V T A A D T 、配列番号 : 9 8) 。最終 D N A および翻訳タンパク質配列を図 6 2 に提示する。

【 0 4 9 6 】

20

センスプライマー (R x 3 ; 4 9 量体)

5 ' - C T G C A G C T G A A C T C C G T T A C A G C C G C A G A C A C A G C A A C A T A T T A C T G C G - 3 ' (配列番号 : 9 9)

アンチセンスプライマー (F x 4 ; 4 9 量体)

5 ' - C G C A G T A A T A T G T T G C T G T G T C T G C G G C T G T A A C G G A G T T C A G C T G C A G - 3 ' (配列番号 : 1 0 0)

【 0 4 9 7 】

5 . h u 8 0 6 V H : 追加のベニアリング

h u 8 0 6 重鎖可変領域配列は、最初のベニアリング後に 3 つのさらなる突然変異を受けた : T 7 0 S 、 S 7 6 N および Q 8 1 K 。位置 7 6 でのセリンからアスパラギンへの変更は、m A b 8 0 6 分子の原配列に戻る補正を意味した。フレームワーク内での追加の変更を含めた。これらは、マウス抗体において見つけれないがヒト抗体において見つけれられる残基を象徴するからである。従って、タンパク質配列 T R D T S K S Q F F L Q (配列番号 : 1 0 1) を S R D T S K N Q F F L K (配列番号 : 1 0 2) にベニアリングした。最終 D N A および翻訳タンパク質配列を m A b 8 0 6 と比較して図 6 2 に提示する。

30

【 0 4 9 8 】

H C 可変領域 5 ' P C R 断片のためのセンスプライマー (h u 8 0 6 H C f x 2 - 5 p - U ; 4 9 量体)

5 ' - G G T C A C C A T C G A A G C C A G T C A C C C A G T G A A G G G G G C T T C C A T C C A C T C C - 3 ' (配列番号 : 1 0 3)

5 ' P C R 断片のためのアンチセンスプライマー (このプライマーは、第一の 2 つの変更を組み込む。) (h u 8 0 6 H C f x 2 - 5 p - D ; 4 5 量体)

40

5 ' - G A T T C T T C G A C G T G T C C C T T G A G A T T G T G A T C C G G C T T T T C A G A G - 3 ' (配列番号 : 1 0 4)

3 ' P C R 断片のためのセンスプライマー (このプライマーは、すべての変更を組み込む。) (h u 8 0 6 H C f x 2 - 3 p - U ; 5 5 量体)

5 ' - C A A G G G A C A C G T C G A A G A A T C A G T T C T T C C T G A A A C T G A A C T C C G T T A C A G C C G C - 3 ' (配列番号 : 1 0 5)

H C 可変領域 3 ' P C R 断片のためのアンチセンスプライマー (h u 8 0 6 H C f x 2 - 3 p - D ; 4 4 量体)

5 ' - C C A A G A T C T G G C C G G C C A C G G T G T G C C A T C T T A C C G

50

CTGCTCAC - 3' (配列番号: 106)

【0499】

6. hu806 VL: E79Qベニアリング

これは、行った唯一の構築後VLベニアリング修飾であった。位置79で部位特異的突然変異誘発を用いて、配列SSLEPE (配列番号: 107)をSSLQPE (配列番号: 108)に補正した。最終DNAおよび翻訳タンパク質配列をch806と比較して図61に提示する。

【0500】

LC可変領域5' PCR断片のためのセンスプライマー (hu806LC - 5p - U; 45量体)

5' - CGAAGCCAGTCAAGGGGGCGGACCGCTTCCATCCACTCCTGTGTC - 3' (配列番号: 109)

5' PCR断片のためのアンチセンスプライマー (このプライマーは、意図した突然変異を組み込む。) (hu806LC - 5p - D; 34量体)

5' - CTCTGGTTGTAAAGCTAGAGATGGTTCAGTGTATAG - 3' (配列番号: 110)

LC可変領域3' PCR断片のためのセンスプライマー (このプライマーは、意図した突然変異を組み込む。) (hu806LC - 3p - U; 45量体)

5' - CCATCTCTAGCTTTACAAACCAAGAGGACTTTGCCACATACTACTGCG - 3' (配列番号: 111)

LC可変領域3' PCR断片のためのアンチセンスプライマー (hu806LC - 3p - D; 50量体)

5' - CCAAGATCTTTAATTAAACGGACCGCTACTCACGTTTGATTTTCCAGTTTTTG - 3' (配列番号: 112)

【0501】

7. hu806軽鎖: カッパ定常領域スプライス - 接合点修飾

この突然変異は、カッパ定常領域のコドン最適化バージョンのスプライシングにおけるエラーを補正するために必要であった。この変更の前に、VYACEVTH (配列番号: 113)で始まりこの分子の末端まで続くアミノ酸鎖部分を最終抗体に含めた (図60)。

【0502】

LC定常カッパ5' PCR断片のためのセンスプライマー (F1; 21量体)

5' - GGC GGC ACA A A A C T G G A A A T C - 3' (配列番号: 114)

LC定常カッパ5' PCR断片のためのアンチセンスプライマー (このプライマーは、補正を組み込む。) F2; 59量体)

5' - GATGAGTTACTTTCACAGGCATATACTTTGTGCTTTTTCATAATCAGCTTTTGA CAGTGT C - 3' (配列番号: 115)

LC定常カッパ3' PCR断片のためのセンスプライマー (このプライマーは、補正を組み込む。) (F3; 26量体)

5' - AGTATATG C C T G T G A A G T A A C T C A T C - 3' (配列番号: 116)

LC定常カッパ3' PCR断片のためのアンチセンスプライマー (F4; 17量体)

5' - GCCACGATGCGTCCGGC - 3' (配列番号: 117)

【0503】

8. hu806 VH: N60Q

構築の初期段階で抗体806に対して行ったベニアリング変更に加えて、VH CDR2における位置60のアスパラギンをこの時点でグルタミンに変更した。N - グリコシル化は、スキーム: NXS/T (この場合のXは、任意のアミノ酸である。)に従う。位置60からのアミノ酸配列は、このスキームに従うNPSであった。しかし、(本発明者らの例におけるような)プロリン、またはシステインが、N - グリコシル化のためにX位置

10

20

30

40

50

に見つけられる場合がしばしばある。一致性のないグリコシル化が抗体の反応性の変動につながることは、重要なことである。従って、アスパラギンを除去し、この最も近縁のアミノ酸、グルタミンで置換して、この部位がグリコシル化される一切の可能性を除いた（図59および図62）。

【0504】

ベニアリングされた hu806 抗体 8C65AAG 構築物の結合

ベニアリングされた hu806 抗体 8C65AAG 構築物の結合

初期抗原結合検証のために少量の hu806 の調製を可能にすべく、最終プラスミド 8C65AAG での 293FT 細胞の一過性トランスフェクションを行った。数回の小規模反復一過性トランスフェクションからの培養上清をプールし、濃縮し、プロテイン A クロマトグラフィー段階を用いて hu806 抗体を回収した。定量的 huIgG1 ELISA によって測定しておおよそ 1 - 2 μ g の hu806 抗体を得、この抗体を組換え EGF R - ECD への結合について Biacore によって分析した（図63）。細胞培養基からウシ免疫グロブリンが hu806 と共精製しおよびこれが全 IgG の主画分に相当し、その結果、hu806 結合の定量的評価が制限された。

10

【0505】

シークエンシングプライマー

RenVecUPSTREAM：センスプライマー（このプライマーは、ピーク8および33xmベクターにおける可変領域の上流でシークエンシングを開始する。）

5' - GCACCTTGATGTAAATTCCTCTTG - 3'（配列番号：118）

20

【0506】

RenVecDownstrmHC：アンチセンスプライマー（このプライマーは、ピーク8重鎖プラスミド上の可変領域の下流でシークエンシングを開始する。非コドン最適化HC定常領域内でアニールする。）

5' - GAAGTAGTCCCTTGACCAAG - 3'（配列番号：119）

【0507】

RenVecDownstrmLC：アンチセンスプライマー（このプライマーは、33-xm-1c軽鎖プラスミド上の可変領域の顆粒でシークエンシングを開始する。非コドン最適化LC定常領域内でアニールする。）

5' - GAAGATGAAAGACAGATGGTGCAAG - 3'（配列番号：120）

30

【0508】

UpstrmLonza：センスプライマー（このプライマーは、LonzaベクターpEE12.4およびpEE6.4における可変領域の上流でシークエンシングを開始する。）

5' - CGGTGGAGGGCAGTGTAGTC - 3'（配列番号：121）

【0509】

Dnstrm6-4：アンチセンスプライマー（このプライマーは、LonzaベクターpEE6.4における定常領域の顆粒でシークエンシングを開始する。）

5' - GTGATGCTATTGCTTTATTG - 3'（配列番号：122）

40

【0510】

Dnstrm12-4：アンチセンスプライマー（このプライマーは、LonzaベクターpEE12.4における定常領域の顆粒でシークエンシングを開始する。）

5' - CATACCTACCAAGTTCTGCGCC - 3'（配列番号：123）

【0511】

Cod-OptLCconstE：コドン最適化軽鎖v-カッパ定常領域の内部の、センスプライマー

5' - CCATCCTGTTTGCTTCTTTCC - 3'（配列番号：124）

【0512】

Cod-OptLCconstF：コドン最適化軽鎖v-カッパ定常領域（vk）の内部の、アンチセンスプライマー。

50

5' - G A C A G G G C T G C T G A G T C - 3' (配列番号: 125)

【0513】

806HCspec: 806HC可変領域のベニアリングされたバージョンの内部のおよび該バージョンに特有の、センスプライマー。

5' - G T G C A G C T C C A A G A G A G T G G A C - 3' (配列番号: 126)

【0514】

806LCspec: 806LC可変領域のベニアリングされたバージョンの内部のおよび該バージョンに特有の、センスプライマー。

5' - C A G A G T C C A T C C A G C A T G T C - 3' (配列番号: 127)

【0515】

IgG1 hu806をコードするプラスミド8C65AAGの配列およびアノテーションについてのGenBank形式のテキストドキュメントを図64に示す。

【0516】

Vector NTI (Invitrogen)を使用して図53を作成した。

【0517】

Vector NTI AlignXを使用して図59-62を作成した。

【0518】

考察

806抗EGF受容体抗体のベニアリングは、哺乳動物CHOまたはNS0細胞における発現について示したようなコドン最適化に伴う、VHにおける14のアミノ酸の突然変異(図59および図62)およびVL鎖に対する12の変更(図60および図61)を含む。8C65AAGと呼ぶ最終2遺伝子ベクターの配列を検証し、コーディング配列および翻訳をチェックした。一過性発現hu806産物を用いてBiacore分析により組換えEGFR細胞外ドメインへの結合を確認した。

【0519】

高レベルのインタクトhu806抗体を生産する安定した単一クローンをLONZAにより推奨されているような無グルタミン培地で選択した。安定したクローンを血清から徐々に離脱させて、無血清培養物を得た。

【0520】

B.hu806のインピトロおよびインピボ特性づけ

より生産性の高い安定したGS-CHO hu806トランスフェクタント14D8、15B2および40A10ならびにGS-NS0 hu806トランスフェクタント36を発展させ、小規模培養により予備的hu806産物の精製および特性づけが可能になるようにさせた。結果は、類似した物理化学的特性を示した。従って、大規模(15L)攪拌タンク培養を最高生産性トランスフェクタント(GS-CHO hu806 40A10)について企て、精製産物をU87MG.de2-7およびA431異種移植片モデルでのさらなるインピトロ特性づけおよびインピボ療法研究に付した。

【0521】

方法論および結果

生産および下流プロセッシング:

小規模

100mLの細胞培養容積を有するE500振盪フラスコを用いて、振盪フラスコ実験を行った。図76は、培養中の4つのトランスフェクタントについての細胞製造度および抗体生産性チャートを提示するものである。806抗イディオタイプ抗体LMH-12(Liu et al. (2003) Generation of anti-idiotypic antibodies for outlin clinical immunotherapy laboratory analyses. Hybrid Hybrid omics. 22(4), 219-28)をコーティング抗体として使用し、ch806 Clinical Lot: J06024を標準物質として使用して、ELISAにより産物濃度を推定した。回収時の材料を遠心分離し、上清を0.2µmフィルターで濾過

10

20

30

40

50

し、その後、これらの抗体をプロテインAクロマトグラフィーによってアフィニティー精製した。

【0522】

大規模

hu806候補クローン40A10を発現するCHO-K1SVトランスフェクタント細胞系を、CD-CHO (Invitrogen) / 25 μ M L-メチオニンスルホキシミン (MSX; Sigma) / GSサプリメント (Sigma) を基礎培地として使用して16日間、グルコースをショット供給しながら16L攪拌タンク内で培養した。図76Cは、15L攪拌タンク型バイオリアクターにおける細胞成長および体積生産量を表すものである。最終収量は、ELISAにより58 mg / Lで14.7 Lであった。

10

【0523】

回収時の材料を遠心分離し、上清を0.2 μ mフィルターで濾過し、その後、Pall Centrimate濃縮機において2 $\times$ 30 K膜を使用して2 Lに濃縮した。その後、アリコート (4 $\times$ 500 mL) を250 mLのプロテインAカラムに負荷し、200 mMのNaClを含有する50 mMのクエン酸塩 (pH 4.5) で溶出させた。その後、4回の実行からの溶出抗体をプールし、濃縮し、PBS (pH 7.4) に透析した。

【0524】

前記小および大規模培養からのhu806産物をOD A280 nmにより定量した。rプロテインAから回収した抗体サンプルを、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) (小規模、図77; 大規模、図78)、還元および非還元条件下での4-20% Tris-グリシンSDS-PAGE (図79-81) によって評定し、Amersham Multiphor II Electrophoresisシステムを用いてAmpholine PAGプレート (pH 3.5-9.5) で、この製造業者の説示に従って等電点電気泳動を行った (図82)。

20

【0525】

プロテインAアフィニティー精製hu806抗体は、対称タンパク質ピーク、およびch806臨床参照材料と同一のSEC溶出プロファイルを示した。SDS-PAGEゲルプロファイルは、免疫グロブリンと一致した。IEFパターンは、タンパク質配列の8.4の算出pIと一致する8.66から8.82にわたるpIを有する3つのアイソフォームを示した。

30

【0526】

結合分析

FACS分析

OD A280 nmにより各サンプルについて決定した抗体濃度の推定値を腺癌細胞系A431細胞 (EGFR遺伝子増幅を有する。) でのFACS分析に用いた。本発明者らは、mAb806が、wtEGFR特異的mAb528と比較してA431腫瘍細胞上で発現される $\sim 2 \times 10^6$ のwtEGFRのおおよそ10%を結合することを以前に観察している (Johns et al. (2002) 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. Int. J. Cancer. 98 (3), 398-408)。細胞を4つのhu806サンプル、無関係なIgG2b抗体、または陽性対照ch806のうちのいずれか1つで染色し、それぞれを20 μ g / mLの濃度で評定した。二次抗体のみについての対照も含めた [ヤギ抗hu-IgG (Fc特異的) FITCコンジュゲート型]。複合FACS結合曲線を図83に提示する。この曲線は、すべての構築物について等価の染色の証拠となる。

40

【0527】

大規模培養により生産されたhu806 40A10サンプルの細胞結合特性を、FA

50

CSにより、A431細胞ならびに変異体EGFRvIII受容体を発現するU87MG・de2-7神経膠腫細胞(Johns et al., 2002)の結合についても評定した。二重反復分析の代表的結果を図84および85にそれぞれ提示する。対照は、示されているように、無関係なIgG2b抗体(影つきヒストグラム)、ch806または528(野生型EGFRとde2-7 EGFRの両方を結合する。)を含んだ。

【0528】

ch806およびhu806抗体は、A431およびU87MG・de2-8細胞系の類似した染色を明示した。このことは、mAb806が、de2-7 EGFRおよび過発現EGFRサブセットを認識するという本発明者らの以前の観察(Luwor et al. (2001) 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. 61(14), 5355-61)を裏付ける。予想どおり、528抗体は、U87MG・de2-7細胞系とA431細胞系の両方を染色した(図84および85)。

【0529】

細胞結合分析

U87MG・de2-7細胞系および増幅されたEGFR遺伝子を発現するA431類表皮癌腫細胞系を使用して、細胞吸着アッセイ(Lindmo et al. (1984) Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J. Immunol. Methods. 72(1), 77-89)により、放射免疫コンジュゲートの抗原結合能力を評定した。

【0530】

過剰な抗原の存在下での抗原発現性細胞への結合により、hu806およびch806放射性コンジュゲートの免疫反応性画分を決定した。¹²⁵I-hu806および¹²⁵I-ch806のU87MG・de2-7細胞結合についての結果を、細胞濃度範囲20×10⁶から0.03×10⁶細胞/サンプルにわたって図86Aに提示する。¹²⁵I-hu806および¹²⁵I-ch806のA431結合についての結果を、細胞濃度範囲200×10⁶から0.39×10⁶細胞/サンプルにわたって図86Bに提示する。

【0531】

スキッチャード解析を用いて、会合定数(K_a)を算出した(Lindmo et al., 1984)。低レベル(20ng)の標識抗体単独での結合を、過剰な未標識抗体の存在下での結合と比較した。以前に記載されているように(Clarke et al. (2000) In vivo biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice. Cancer Res. 60(17), 4804-11)、遊離、反応性抗体の量の計算の際に免疫反応性画分を考慮に入れ、特異的結合(nM; 全抗体×%結合抗体)を特異的結合/反応性なし(図87および88)に対して図示した。この線の負の傾きから会合定数を決定した。

【0532】

U87MG・de2-7細胞におけるEGFRvIIIに結合する¹²⁵I-hu806についての結合親和性を1.18×10⁹M⁻¹であると判定した。¹²⁵I-ch806についてのK_aは、1.06×10⁹M⁻¹であった。これらの観察は、1.1×10⁹M⁻¹の親マウスmAb806のものに非常に匹敵する、それぞれ1.36×10⁹M⁻¹および1.90×10⁹M⁻¹の¹¹¹In-および¹²⁵I-ch806につい

10

20

30

40

50

ての K_a 値の報告されている結果 (Panousis et al. (2005) Engineering and characterization of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR. Br. J. Cancer. 92 (6), 1069-77) と一致していた。

【0533】

A431細胞に関するスキャッチャード解析により、これらの細胞上のEGFRの小集団への両方の806構築物による結合の高い親和性が実証された。¹²⁵I-ch806についての K_a は、 $0.61 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった；¹²⁵I-hu806については、 $K_a = 0.28 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 。

10

【0534】

バイオセンサー分析

カルボキシメチルデキストランでコーティングされたセンサーチップ (CM5) を使用して、BIAcore 2000 バイオセンサーで、バイオセンサー分析を行った。標準的アミンカップリング化学を用いて、チップを806エピトープペプチド (EGFRアミノ酸287-302；配列番号：14；2005年2月17日に出願された米国特許出願番号11/060,646；2004年2月20日に出願された米国仮特許出願番号60/546,602；および2004年7月1日に出願された米国仮特許出願番号60/584,623参照 (これらのそれぞれの開示はこの全体が参照により本明細書に組み込まれる。)) でチャンネル3に関して誘導体化した。系安定性判定に用いた対照抗原でチャンネル2を誘導体化した。エタノールアミンでチャンネル1を誘導体化し、屈折率の影響の補正のためのブランク対照チャンネルとして使用した。hu806のサンプルをHBSバッファー (10 mM HEPES、pH 7.4；150 mM NaCl；3.4 mM ジNa-EDTA；0.005% Tween-20) で希釈し、50 nM、100 nM、150 nM、200 nM、250 nM および 300 nM を含有するアリコート (120 μL) を 30 μL /分の流量でセンサーチップ表面に注入した。注入段階の後、600秒間、チップ表面にHBSバッファーを流すことによって、解離をモニターした。結合抗体を溶出し、20 μL の 10 mM 水酸化ナトリウム溶液の注入によりサンプル間でチップ表面を再生した。陽性対照、ch806を含めた。BIAevaluationソフトウェアの平衡結合モデルを用いて、結合パラメータを決定した。図89は、生成したセンサーグラムを提示するものである。

20

30

【0535】

チャンネル3においてhu806と陽性対照、ch806、の両方で用量依存性結合が観察された。対照チャンネル2への適切なモノクローナル抗体の用量依存性結合により、系の適正を確認した。hu806 (またはch806) と対照抗体の間で交差反応性は観察されなかった。本発明者らの分析は、見掛けの K_D ($1/K_a$) がhu806については37 nM および ch806 については94 nM であると判定した。

【0536】

抗体依存性細胞傷害性分析

精製hu806抗体40A10調製品とターゲットA431腺癌細胞および新たに単離した健常ドナー末梢血単核エフェクター細胞を使用してADCC分析を行った。簡単に言うと、1) エフェクター対ターゲット細胞比 ($E:T = 0.78:1$ から $100:1$) の範囲にわたって各抗体 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を用いて、および2) 各抗体の濃度範囲 (3.15 ng/mL - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) にわたって $E:T = 50:1$ で、すべての分析を三重反復で行った。抗体アイソタイプ、自然および全細胞傷害性についての対照を三重反復で含め、特異的細胞傷害性についての計算は、以前に記載されたとおり (Panousis et al., 2005) であった。結果を図90に提示する。

40

【0537】

hu806は、キメラch806 IgG1より優れたADCC活性を一貫して明示した

50

。示した代表実験において、 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ のhu806は、ch806の5%細胞傷害性とは対照的に30%細胞傷害性のADCCを果たした。

【0538】

インビボ806療法研究

BALB/cヌードマウスにおいて確率A431腺癌またはU87MG-de2-7神経膠腫異種移植片を使用して、hu806の治療効力を調査した。異種移植片を確率させるために、 $100 \mu\text{L}$ のPBS中の 1×10^6 A431腺癌細胞または 1×10^6 U87MG-de2-7神経膠腫細胞をマウスの右および左鼠径部乳線に皮下注射した。式 $[(\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2]$ (式中、長さは、最長軸であり、幅は、長さに対して直角での測定値であった。)を用いて、腫瘍容積(TV)を算出した。最初の実験では、確率A431またはU87MG-de2-7異種移植片を有する5匹のBALB/cヌードマウスの群($n = 10$ 腫瘍/群)にIP注射による 1mg hu806もしくは 1mg ch806抗体またはPBSビヒクル対照治療を施した。A431については第6、8、11、13、15および18日に、およびU87MG-de2-7細胞系については第4、6、8、11、13および15日にそれぞれ療法を施した。腫瘍負荷量の倫理的考慮による実験停止までの平均 $\pm$ SEM腫瘍容積を、A431異種移植片について第25日まで図91に、およびU87MG-de2-7異種移植片について第31日まで図92に提示する。

10

【0539】

hu806でのインビボ療法評価は、PBSビヒクル対照と比較してA431異種移植片成長の顕著な低減を証明した。hu806について観察されたA431異種移植片成長曲線は、ch806治療群に非常に匹敵した。確率U87MG-de2-7異種移植片に関しては、PBS対照群を第20日に安楽死させた。hu806療法は、第20日まではPBS対照と比較して腫瘍容積の有意な低減($P < 0.001$)、および第20日後はch806群に類似した継続腫瘍成長低減を明示した。

20

【0540】

考察

プロテインAアフィニティー精製hu806抗体は、ch806臨床参照材料と同一のSE溶出プロフィール、および免疫グロブリンと一致したSDS-PAGEゲルプロフィールを呈示した。IEFパターンは、8.4の期待pIと一致した。

【0541】

スキャッチャード細胞結合およびバイオセンサーエピトープ結合分析により、hu806抗体は、ch806抗体に非常に匹敵する結合曲線を明示した。EGFRvIIIおよび過発現野生型EGFRに対するhu806およびch806の結合親和性は、類似しており、低ナノモル範囲であった。FACS分析による細胞結合は、これらの観察を裏付けた。

30

【0542】

さらに、hu806は、ターゲット抗原陽性A431細胞に対してch806構築物より著しく改善されたADCCを明示した。

【0543】

hu806でのインビボ療法評価は、ch806治療群に非常に匹敵する、A431異種移植片成長の顕著な低減を示した。確率U87MG-de2-7異種移植片に関して、hu806療法は、第20日まではPBS対照と比較して腫瘍成長の有意な低減、および第20日後はch806群に類似した継続腫瘍成長を明示した。

40

【実施例23】

【0544】

モノクローナル抗体175

実施例1において論じたように、クローン175(IgG2a)をさらなる特性づけに選択した。

【0545】

a. 材料および方法

50

細胞系

$\Delta 2-7$ EGFRでトランスフェクトされたU87MG、 $\Delta 2-7$ (Huang et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 2927-2935) およびA431細胞系 (Ulrich et al. (1984) Nature. 309, 418-425) は、以前に記載されている。ホルモン依存性前立腺細胞腫DU145 (Mickey et al. (1977) Cancer Res. 37, 4049-4058) をATCC (atcc.org) から得た。

【0546】

すべての細胞系を、10% FCS (CSL、メルボルン) と2mMグルタミン (Sigma Chemical Co、セントルイス) とペニシリン/ストربتマイシン (Life Technologies、グランドアイランド) とを含有するDMEM (Life Technologies、ニューヨーク、グランドアイランド) 中で維持した。加えて、U87MG、 $\Delta 2-7$ 細胞を400mg/mLのGeneticin (Life Technologies、グランドアイランド) 中で維持した。BaF/3 (Palacios et al. (1984) Nature. 309, 126-131) および異なるEGF受容体を発現するBaF/3細胞系 (Walker et al. (2004) J. Biol. Chem. 279, 22387-22398) を、10%ウシ胎仔血清 (GIBCO BRL) とIL-3源としての10% WEHI-3B調整培地 (Ymer et al. (1985) Nature. 317, 255-258) とを捕捉したRPMI 1640 (GIBCO BRL) 中で常例的に維持した。すべての細胞系を37℃で、空気/CO₂ (95% - 5%) 雰囲気中で成長させた。

【0547】

抗体およびペプチド

mAb806およびmAb175をLudwig Institute for Cancer Research (LICR) New York Branchで産生させ、Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research、Melbourne) において生産および精製した。マウス線維芽細胞系NR6 Δ EGFRを免疫原として使用した。BALB/cマウスに2から3週間間隔で5回、アジュバント中の 5×10^5 - 2×10^6 細胞で皮下的に免疫処置を施すことにより、マウスハイブリドマを産生させた。完全フロイントアジュバントを初回注射に使用した。その後は不完全フロイントアジュバント (Difco) を使用した。免疫処置を施したマウスからの脾臓細胞をマウス骨髓腫細胞系SP2/0と融合させた。新たに産生されたクローンの上清を、血球吸着アッセイにおいて細胞系NR6、NR6 wtEGFR およびNR6 Δ EGFR との反応性についてスクリーニングし、ヒト線維芽細胞系U87MG、U87MG wtEGFR、およびU87MG Δ EGFRでの血球吸着アッセイにより分析した。

【0548】

活性化パピンを伴うPBSを1:20の比で用いて、2から3時間、37℃で、インタクトmAb (50mg) を消化し、ヨードアセトアミドでパピンを不活性化した。その後、20mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) 中のプロテインAセファロース (Amersham) のカラムに消化物を通し、Mono-Sカラム (Amersham) のカチオン交換利用によりこのフロースルーをさらに精製した。その後、10,000 MWCO遠心濃縮機 (Millipore) を使用してタンパク質を濃縮した。Fab-ペプチド複合体については、モル過剰の凍結乾燥ペプチドをFabに調節添加し、2時間、4℃で温置した後、結晶化試験を始めた。

【0549】

哺乳動物細胞において発現されたEGFR断片を使用するmAb175のマッピング

これらの断片でのトランスフェクションの前日に、ヒト293T胎児由来腎臓線維芽細胞を、2mLの培地が入っている6ウェル組織培養プレートに、1ウェルにつき 8×10^5 で接種した。製造業者の説示に従ってLipofectamine 2000 (Inv

trogen)と複合させたプラスミドDNA 3 - 4 μ gで細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの24から48時間後、細胞培養物を吸引し、細胞単層を250 μ lの溶解バッファー(1% Triton X-100、10%グリセロール、150 mM NaCl、50 mM HEPES pH7.4、1 mM EGTAおよび完全プロテアーゼ阻害剤ミックス(Roche))に溶解した。1.5% β -メルカプトエタノールを含有するSDSサンプルバッファーと細胞溶解産物のアリコート(10 - 15 μ L)を混合し、5分間、100°Cでの加熱により変性させ、10% NuPAGE Bis-Tris ポリアクリルアミドゲル(Invitrogen)で電気泳動させた。その後、サンプルをニトロセルロース膜に電気転写し、これをTBSTバッファー(10 mM Tris-HCl、pH8.0、100 mM NaClおよび0.1% Tween-20)中ですすぎ、2.5%スキムミルクを含有するTBST中で30分間、室温でブロックした。膜を一晩、4°Cで、ブロッキングバッファー中の0.5 μ g/mLのmAb175と共に温置した。並列膜を一晩、mAb9B11(1:5000、Cell Signaling Technology、マサチューセッツ州ダンヴァーズ)でプローブしてc-mycエピトープを検出した。膜をTBST中で洗浄し、1:5000希釈でホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート型ウサギ抗マウスIgG(Biorad)を含有するブロッキングバッファー中で2時間、室温で温置した。その後、プロットをTBST中で洗浄し、Western Pico Chemiluminescent Substrate(Pierce、イリノイ州ロックフォード)との温置後、オートラジオグラフィフィルムを使用して現像した。

10

20

【0550】

哺乳動物細胞および酵母において発現されたEGFR断片を使用するmAb175のマッピング

残基274、282、290および298で開始し、すべてアミノ酸501で終わる、ならびに成長ホルモンに融合させたものである、一連のオーバーラッピングc-mycタグ付きEGFR外部ドメイン断片は、以前に記載されている(Johns et al., (2004) J. Biol. Chem. 279, 30375 - 30384)。酵母細胞表面でのEGFRタンパク質の発現を、以前に説明されている(Johns et al., (2004) とおりに行った。

30

【0551】

簡単に言うと、振盪ブラットフォーム上の酵母窒素塩基とカゼイン加水分解産物とデキストロースとリン酸バッファーpH7.4とを含有する最小培地中、30°Cで、5 - 6のOD₆₀₀に達するまでおおよそ1日間、形質転換コロニーを成長させた。その後、タンパク質提示のために、ガラクトースを含有する最小培地に移すことにより酵母細胞を誘導し、24時間、30°Cで振盪しながら温置した。その後、分析まで細胞を4°Cで保管した。c-mycモノクローナル抗体9E10を含有する未加工腹水をCovance(カリフォルニア州リッチモンド)から入手した。1 $\times$ 10⁶酵母細胞を氷冷FACSバッファー(1 mg/mL BSAを含有するPBS)で洗浄し、抗c-myc腹水(1:50希釈)またはヒトEGFRモノクローナル抗体(10 μ g/mL)のいずれかと共に50 μ Lの最終容積で1時間、4°Cで温置した。その後、細胞を氷冷FACSバッファーで洗浄し、光から保護してフィコエリトリン標識抗マウスIgG(1:25希釈)と共に50 μ Lの最終容積で1時間、4°Cで温置した。酵母細胞を氷冷FACSバッファーで洗浄した後、Coulter Epics XLフローサイトメーター(Beckman-Coulter)で蛍光データを得、WinMDIサイトメトリソフトウェア(J. Trotter, Scripps University)で分析した。線形対高次構造エピトープの判定のために、酵母細胞を80°Cで30分間加熱し、その後、冷却し、20分後に抗体で標識した。表7に列挙する一連のEGFR突然変異体は、以前に記載されている(Johns et al., (2004))。

40

【0552】

表面プラズモン共鳴(BIACore)

50

B I A c o r e 3 0 0 0 をすべての実験に用いた。アミン、チオールまたは P m s カップリングを 5 μ L / 分の流量で用いて、C M 5 センサーチップに、推定 m A b 8 0 6 エピトープを含有するペプチドを固定した (W a d e e t a l . (2 0 0 6) A n a l . B i o c h e m . 3 4 8 , 3 1 5 - 3 1 7) 。 m A b 8 0 6 および m A b 1 7 5 を 2 5 で、5 μ L / 分の流量でセンサー表面を通過させた。実行間に 1 0 m M H C l を 1 0 μ L / 分の流量で注入することにより表面を再生させた。

【 0 5 5 3 】

免疫沈降およびウエスタンブロッティング

細胞を 2 0 分間、溶解バッファー (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 m M フッ化 4 - (2 - (アミノエチル) 、 1 5 0 n M アプロチニン、1 m M E - 6 4 プロテアーゼ阻害剤、0 . 5 m M E D T A 、および 1 m M ロイペプチン、p H 7 . 4) で溶解し、3 0 分間の 1 4 , 0 0 0 x g の遠心分離により清澄化し、適切な抗体で 6 0 分間、5 μ g / m L の最終濃度で免疫沈降させ、一晚、セファロース - A ビーズで捕捉した。その後、サンプルを 2 X N u P A G E S D S S a m p l e B u f f e r (I n v i t r o g e n) で溶出し、N u P A G E ゲル (3 - 8 % または 4 - 1 2 % のいずれか) で分割し、I m m o b i l i o n - P 転写膜 (M i l l i p o r e) に電気転写させ、その後、適切な抗体でプローブした後、化学発光ラジオグラフィーによって検出した。

10

【 0 5 5 4 】

免疫組織化学

凍結切片を、5 μ g / m L m A b 1 7 5 または無関係なアイソタイプ対照で 6 0 分間、室温で染色した。D a k o E n v i s i o n + H R P 検出システムを製造業者の説示に従って使用して、結合抗体を検出した。最後に切片を水ですすぎ、ヘマトキシリンで対比染色し、マウントした。

20

【 0 5 5 5 】

異種移植片モデル

1 0 0 μ L の P B S 中の U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞 (3×10^6) を、週齢 4 - 6 週の雌 B a l b / c ノードマウス (A n i m a l R e s e a r c h C e n t r e 、オーストラリア、パース) の両側腹部に s . c . 接種した。すべての研究は、以前に報告されている (P e r e r a e t a l . (2 0 0 5) C l i n . C a n c e r R e s . 1 1 , 6 3 9 0 - 6 3 9 9) ように確率腫瘍モデルを使用して行った。適切な図の説明文に示されている平均容積に腫瘍が達したら、治療を開始した。式 (長さ $\times$ 幅²) / 2 (式中、長さは、最長軸であり、幅は、垂直測定値であった) を用いて、mm³ で腫瘍容積を決定した。各治療群について平均腫瘍容積 $\pm$ S . E . としてデータを表す。すべてのデータを有意性について片側スチューデント t 検定により分析し、p < 0 . 0 5 を統計的に有意とみなした。この研究プロジェクトは、the A n i m a l E t h i c s C o m m i t t e e o f t h e A u s t i n H o s p i t a l により承認された。

30

【 0 5 5 6 】

E G F R 突然変異体構築物を発現する安定した細胞系の産生および特性づけ

部位特異的突然変異誘発キット (S t r a t a g e n e 、カリフォルニア州ラホーヤ) を使用して、w t E G F R の突然変異を生じさせた。各突然変異誘発についてのテンプレートは、ヒト E G F R c D N A (アクセッション番号 x 0 0 5 8 8) (U l l r i c h e t a l . (1 9 8 4) N a t u r e . 3 0 9 , 4 1 8 - 4 2 5) であった。各構築物の自動ヌクレオチドシーケンシングを行って、E G F R 突然変異の完全性を確認した。野生型および突然変異体 (C 1 7 3 A / C 2 8 1 A) E G F R を電気泳動により B a F / 3 細胞にトランスフェクトした。

40

【 0 5 5 7 】

突然変異体 E G F R を発現する安定した細胞系を、ネオマイシン含有培地における選択によって得た。最終選択後、m R N A を各細胞系から単離し、逆転写し、P C R によって E G F R 配列を増幅させた。発現された E G F R におけるすべての突然変異を、P C R 産

50

物のシーケンシングによって確認した。PBS、5% FCS、5 mM EDTA、中10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗EGFR抗体mAb528 (Masui et al. (1984) Cancer Res. 44, 10024007; Gill et al. (1984) J. Biol. Chem. 259, 7755-7760)を使用し、続いてAlexa 488標識抗マウスIg (1:400の最終希釈)を使用して、FACSstar (Becton and Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレーク)でのFACS分析により、EGFR発現レベルを判定した。クラスを合わせた無関係な一次抗体と共に細胞を温置することにより、バックグラウンド蛍光を決定した。すべての細胞を、RPMI、10% FCS、WEHI 3B調整培地および1.5 mg/mL G418中で常例的に継代させた。

10

【0558】

突然変異体EGFRのEGF依存性活性化

wtEGFRまたはC271A/C283A-EGFRを発現する細胞を洗浄し、血清およびIL-3を伴わない培地中で3時間温置した。遠心分離により細胞を回収し、EGF (100 ng/mL)を含有する培地または同等の容積のPBSに再浮遊させた。15分後、細胞を回収し、ペレット化し、p-メルカプトエタノールを含有するSDS/PAGEサンプルバッファーに直接溶解した。NuPAGE 4-12%勾配ゲルでサンプルを分離し、Immobilon PVD F膜に転写し、抗ホスホチロシン (4G10、Upstate Biotechnologies)または抗EGFR抗体 (LICRで生産したmAb806)でプローブした。化学発光を用いて反応性バンドを検出した。

20

【0559】

細胞増殖に対するEGFおよび抗体の効果

対数期の成長中の細胞を回収し、PBSで2回洗浄して残留IL-3を除去した。細胞をRPMI 1640 + 10% FCSに再浮遊させ、担体のみと共に、または漸増濃度のEGFと共に、96ウェルプレートに10⁵細胞/ウェルで接種した。適切な場合には、固定濃度 (2 $\mu\text{g}/\text{ウェル}$)のmAb528またはmAb806も培養物に添加した。MTTアッセイ (van de Loosdrecht et al. (1994) J. Immunol Methods. 174, 311-320)を用いて増殖を判定した。

【0560】

高次構造特異的抗体との反応性

細胞を遠心分離により回収し、対照または試験抗体で染色し (すべて、FACSバッファーで洗浄した氷上で40分間、FACSバッファー中10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で)、その後、Alexa 488標識抗マウスIg (1:400の最終希釈、氷上で20分)で染色した。氷冷FACSバッファーで細胞を2回洗浄し、遠心分離で回収し、FACSscanで分析した; Cell Quest (Becton and Dickinson)内の統計ツールを使用して各サンプルについてのピーク蛍光チャネルおよび蛍光中央値を決定した。バックグラウンド (陰性対照) 蛍光をすべての測定値から演繹した。ピーク形状および蛍光強度を最も代表するものとして蛍光中央値を選択し、mAb806結合のmAb528結合に対する比を導出するために用いた。

30

【0561】

Fab 175およびFab806、Fab-ペプチド複合体の結晶構造決定ならびに溶解状態の806ペプチドエピトープのNMR構造

分子置換、ならびにFab806について $R = 0.225 / R_{\text{free}} = 0.289$ およびFab806:ペプチドについて $R = 0.226 / R_{\text{free}} = 0.279$; Fab806について $R = 0.210 / R_{\text{free}} = 0.305$ およびFab806:ペプチドについて $R = 0.203 / R_{\text{free}} = 0.257$ で修飾する精密化により、構造を決定した。

40

【0562】

10 mg/mL Fabと0.1 M酢酸ナトリウムバッファーpH 4.6、6-8% PEG 6000および15-20%イソプロパノールが入っているレザバーとを使用する

50

懸滴蒸気拡散により、天然 806 Fab の結晶を成長させた。データ収集のために、0.1 M 酢酸ナトリウムバッファー pH 4.6、10% PEG 6000、15 - 20% イソプロパノールおよび 10% グリセロールを含有する凍結防止溶液に結晶を移した。その後、血症をナイロンループに取り付け、液体窒素に直接入れて瞬間冷凍した。

【0563】

10 mg / mL Fab - ペプチド複合体と 0.2 M 酢酸アンモニウム 16 - 18% PEG 5,000 モノメチルエーテルが入っているレザバーとを使用する懸滴蒸気拡散により、806 Fab - ペプチド複合体の結晶を成長させて、シーディング技術により結晶品質を向上させた。データ収集のために、25% グリセロールを補足したレザバーから成る凍結防止溶液に移した。その後、結晶をナイロンループに取り付け、液体窒素に直接入れて瞬間冷凍した。

10

【0564】

175 Fab - ペプチド複合体の結晶を、先ず、Topaz 結晶化システム (Fluidigm、サンフランシスコ) を使用する自由界面拡散によって成長させた。微結晶を、類似の条件 0.1 M ビス - トリスプロパンバッファー、0.2 M 酢酸アンモニウムおよび 18% PEG 10,000 で 7 mg / mL Fab を使用する懸滴蒸気拡散によって成長させた。その後、0.15 M 塩酸ナトリウムおよび 15% PEG 1500 へのストリークシーディングによって微結晶を改善して、小板形結晶を生じさせた。データ収集のために、25% グリセロールを補足したレザバーから成る凍結防止溶液に移した。その後、結晶をナイロンループに取り付け、液体窒素に直接入れて瞬間冷凍した。

20

【0565】

AXCO 光学素子を装着した Rigaku micromax - 007 発生装置の R - AXIS IV 検出器を使用して研究所内で 806 Fab および 175 Fab 複合体結晶に関する回折データを収集し、その後、CrystalClear を使用してこれらのデータを処理した。ビームライン X29、Brookhaven National Laboratory で ADSC quantum 315 CCD 検出器を用いて 806 Fab - ペプチド複合体データを収集し、これらのデータを HKL2000 (Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Academic Press (New York)) で処理した (データ収集統計を表 9 に示す。)。Fab 構造 2E8 の座標を用いてプログラム MOLREP (Vagin, A. and Teplyaev, A. (1997) J. Appl. Cryst. 30, 1022 - 1025) を用いる分子置換により天然 806 Fab を解明し、構造の精密化を REFMAC5 (Murshudov et al. (1997) Acta crystallographica 53, 240 - 255) および Coot の分子ビルディング (Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Acta crystallographica 60, 2126 - 2132) で行った。

30

【0566】

806 Fab 構造の座標を用いてプログラム MOLREP を用いる分子置換により 806 - ペプチド構造と 175 Fab - ペプチド構造の両方を解明し、精密化およびリビルディングを、再び、REFMAC5、ならびに COOT および O で行った。最終構造の検証を PROCHECK (Laskowski et al. (1993) J. Appl. Cryst. 26, 283 - 291) および WHATCHECK (Hoof et al. (1996) Nature 381, 272) で行った。

40

【0567】

NMR 研究

NMR 研究のために、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を補足したナイトハルト (Neidhardt) 最小培地 (Neidhardt et al. (1974) Journal of bacteriology 119, 736 - 747) 中で E. コリ (E. coli) を成長

50

させたことを除いてFairlieらによって以前に記載された方法(Fairlie et al. (2002) Protein expression and purification 26, 171-178)を用いてSHP2のSH2ドメインへの融合体として¹⁵N標識ペプチドを組換え生産した。CNBrを使用して前記ペプチドを融合パートナーから開裂させ、逆相HPLCにより精製し、この素性をMALDI-TOF質量分析およびN末端シーケンシングによって確認した。前記ペプチドこれ自体内ではなく、806抗体結合配列内のメチオニン残基をロイシンに突然変異させて、融合パートナーからの開裂を可能にした。

【0568】

NMR研究に使用したサンプルは、5% ²H₂Oと70mM NaClと50mM Na₂PO₄とを含有するpH6.8のH₂O溶液中で調製した。冷凍プローブを使用してBruker Avance500分光計において298Kですべてのスペクトルを獲得した。m806Fabの不在下でのペプチドの逐次的割当てを、標準的2D TOCSYおよびNOESYならびに¹⁵N編集TOCSYおよびNOESYスペクトルを用いて確立した。ペプチドとfAb806との相互作用を、fAb806の不在および存在下での該ペプチドの¹⁵N HSQCをモニターすることによって検査した。fAb806の存在下での前記ペプチドの¹⁵N HSQCスペクトルのスペクトル摂動は、該ペプチドが、存在溶液条件下でfAb806に結合できたことを明確に示す。複合形態の前記ペプチドの詳細な高次構造は、決定しなかった。mAb806についてのランダムコイル化学シフト値からの偏差を図93に示す。

【0569】

患者におけるchAb806の生体内分布

インビトロでのmAb806の腫瘍特異性を実証するために、キメラバージョン(ch806)が設計され、cGMP条件生産された(Panousis et al. (2005) Br. J. Cancer. 92, 1069-1077)。806陽性腫瘍を有する患者におけるch806の安全性、生体内分布および免疫応答を評価するための第I相ファースト・イン・マン治験が行われ、安全性、生体内分布および薬物動態の結果が以前に報告されている(Scott et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 4071-4076)。患者における正常組織(即ち肝臓)と比較して腫瘍におけるch806の特異性を定義するために、5-7mCi(²⁰⁰-280MBq) ¹¹¹In-ch806の注射後1週間にわたって得た全身ガンマカメラ画像から¹¹¹In-ch806の%注射用量(ID)を算出することにより、腫瘍および肝臓におけるch806の定量取り込みを行った。個々の患者それぞれにおける関心のある器官に基づいて、肝臓および腫瘍線量計算を行った。累積活性の計算を可能にする、バックグラウンドおよび減弱について補正した、¹¹¹In-ch806注入画像データセット。注射後1週間にわたって腫瘍および肝臓における¹¹¹In-ch806の濃度を導出するために線量計算を行った。

【0570】

b. シーケンシング

mAb175の可変重(VH)および可変軽(VL)鎖をシーケンシングし、これらの層布袋決定領域を次のように同定した：

mAb175 VH鎖：核酸(配列番号：128)およびアミノ酸(配列番号：129)配列を図74Aおよび74Bにそれぞれ示す。図74Bでは下線を引くことにより相補性決定領域CDR1、CDR2およびCDR3(それぞれ、配列番号：130、131および132)を指摘する。

【0571】

mAb175 VL鎖：核酸(配列番号：133)およびアミノ酸(配列番号：134)配列を図75Aおよび75Bにそれぞれ示す。図75Bでは下線を引くことにより相補性決定領域CDR1、CDR2およびCDR3(それぞれ、配列番号：135、136および137)を指摘する。

【0572】

細胞系がクローン性でなく、従って、この細胞系から多数の配列が得られたので、mAb 175 についての配列データは、配列構造と結晶構造の両方に基づく。上で述べた mAb 175 の配列を結晶構造により確認した。この配列は、標準配列データのみに基づく以前の配列とは V L 鎖 C D R 1 および C D R 2 のそれぞれにおいて 1 個だけアミノ酸が異なる。最終配列および結晶構造データに基づき、mAb 175 の別のアイソタイプ（異常な Ig G 2 a アイソタイプ）も得られた。

【0573】

mAb 175 特異性

予備的結合研究は、mAb 175 が、EGFR に対して mAb 806 と類似した特異性を呈示することを示唆した。mAb 806（Ig G 2 b）および mAb 175（Ig G 2 a）の C D R 領域におけるアミノ酸配列はほぼ同一であり、それぞれにおけるアミノ酸の差異はたった 1 個である（図 65；下の実施例 26 参照）。すべてのこれらの差異は、側鎖の電荷およびサイズを保存する。明らかに、これらの抗体は、独立して産生した。

【0574】

c. 実験

mAb 175 の特異性を分析するために 1 セットの免疫組織化学実験を行った。mAb 175 は、EGFR を過発現する A 431 異種移植片の切片（図 66 A）および Δ 2 - 7 EGFR を発現する U 87 MG、Δ 2 - 7 神経膠腫異種移植片の切片（図 66 A）を染色した。対照的に、mAb 175 は、U 87 MG 異種移植片切片を染色しなかった。U 87 MG 細胞系は、中程度レベルの野生型 EGFR しか発現せず（図 66 A）、検出可能な EGFR オートクラインループを有さない。最も重要なことに、mAb 175 は、正常肝臓切片に結合しない（図 66 B）。従って、mAb 175 は、mAb 806 と同じ特異性を有するように見える、即ち、これは過発現されたおよびトランケートされたヒト EGFR を検出するが、中程度レベルで発現される wt EGFR を検出しない。

【0575】

mAb 175 エピトープの同定

mAb 175 は、アミノ酸 6 - 273 を検出する Δ 2 - 7 EGFR、および EGFR₁₋₅₀₁ も結合するので、mAb 175 エピトープは、残基 274 - 501 内に含まれていなければならない。mAb 806 のエピトープを決定するとき、本発明者らは、すべてアミノ酸 501 で終わる、ヒト GH のカルボキシ末端に融合した一連の c - myc タグ付き EGFR 断片を発現させた（Chao et al. (2004) J. Mol. Biol. 342, 539 - 550; Johns et al. (2004) J. Biol. Chem. 279, 30375 - 30384）。

【0576】

ウエスタンブロットでは mAb 175 も 274 - 501 EGFR 断片と 282 - 501 EGFR 断片の両方と反応したが、アミノ酸 290 および 298 で回避する断片を検出しなかった（図 73）。すべての GH - EGFR 融合タンパク質の存在を、c - myc 抗体、9E10 を使用して確認した（図 73）。従って、mAb 175 エピトープの重要な決定基は、アミノ酸 290 付近に位置する。最後に、mAb 806 エピトープを欠失している（Δ 287 - 302）274 - 501 EGFR 断片は、mAb 175 結合についても陰性であった（図 73）。このことは、この領域が mAb 175 結合の大部分を同様に決定したことを示唆している。

【0577】

第二のアプローチを用いて、mAb 175 エピトープをさらに特性づけした。EGFR の細胞外ドメインを包含する断片を酵母の表面で発現させ、フローサイトメトリーを使用して間接的免疫蛍光により mAb 175 結合について試験した。mAb 175 は、Δ 2 - 7 EGFR の細胞外ドメインに対応する酵母断片 273 - 621 を認識したが、断片 1 - 176、1 - 294、294 - 543、および 475 - 621 を認識しなかった（図 67 A および図 67 B）。従って、mAb 175 エピトープの少なくとも一部は、EGFR

10

20

30

40

50

断片を使用する免疫プロットティングデータと一致して、アミノ酸 274 - 294 間の領域内に含まれていなければならない。mAb 175 は、273 - 621 の変性断片に結合する (図 67C) ので、このエピトープは、事実上、線形でなければならない (図 73)。mAb 806 および mAb 175 が EGFR の類似した領域および高次構造を認識することは、明白である。

【0578】

表面プラズモン共鳴 (BIAcore) を用いて、EGFR ペプチド (287 CGADSYEM EEDGV RKC₃₀₂; 配列番号: 138) への mAb 175 の結合を調査した。アミン、チオール - ジスルフィド交換または Pms - Ser カップリング化学を用いて、EGFR₂₈₇₋₃₀₂ をバイオセンサー表面に固定した。後述の方法は、排他的に N 末端システインによりペプチドを固定する (Wade et al. (2006) Anal. Biochem. 348, 315 - 317)。

【0579】

mAb 175 は、すべての配向で EGFR₂₈₇₋₃₀₂ を結合した (表 6)。EGFR₂₈₇₋₃₀₂ に対する mAb 175 の親和性は、Pms - セリンカップリングについての 35 nM からアミンカップリングについての 154 nM にわたった。すべての場合、EGFR₂₈₇₋₃₀₂ に対する mAb 175 の結合親和性は、mAb 806 について得られたものより低かった (表 6)。本発明者らは、EGFR の 2 つの異なる細胞外断片への mAb 175 の親和性も判定した。mAb 175 は、1 - 501 断片に、ペプチドを用いて得たものに類似した親和性で、結合した (16 nM 対 35 nM) (表 6)。予想どおり、テザリングされた高次構造を形成し得る 1 - 621 完全長細胞外ドメインに対する mAb 175 の親和性は、はるかに低かった (188 nM)。mAb 806 および mAb 175 は、EGFR₂₈₇₋₃₀₂ に対して類似した親和性を有するが、mAb 175 は、EGFR の細胞外ドメインに対して、より高い親和性を示すようである (表 6)。明らかに、mAb 175 エピトープは、EGFR₂₈₇₋₃₀₂ 内に含まれており、および mAb 806 と同様、EGFR の細胞外ドメインへの結合親和性は、高次構造に依存する。

【0580】

【表 9】

表 6

EGFR エピトープに対する mAb806 および mAb175 についての抗体親和性の BIAcore 判定

EGFR 断片	mAb175 についての K _D (nM)	mAb806 についての K _D (nM)
287-302 (Pms-Ser カップリング)	35	16
287-302 (チオールカップリング)	143	84
287-302 (アミンカップリング)	154	85
1-501 (テザー形成不能)	16	34
1-621 (テザー形成可能)	188	389

【0581】

酵母の表面で発現される、273 - 621 EGFR 断片の突然変異体のパネル (Chao et al. (2004) J. Mol. Biol. 342, 539 - 550; Johns et al. (2004) J. Biol. Chem. 279, 30375 - 30384) を用いて、mAb 175 エピトープの構造を特性づけした。mAb 175 および mAb 806 は、突然変異体へのほぼ同一の反応性パターンを呈示した (表 7)。287 - 302 ジスルフィド結合のみの破壊は、エピトープ反応性に対して中等度の効果しかなかった。抗体が、C287 でのすべての突然変異体に、および C302 でのすべてではないが多少の突然変異体に結合したからである (表 7)。mAb 175 結合にとって重量なアミノ酸としては、E293、G298、V299、R300 および C302 が挙げられ

る（表 7）。mAb175 は、突然変異 V299 および D297 に対する感度のほうが適度に高いようであったが、これらの部位での幾つかの突然変異への結合低減も示した（表 7）。重ねて、mAb175 エピトープは、mAb806 によって認識されるエピトープと本質的に同じように見える。

【 0 5 8 2 】

【 表 1 0 】

表 7

酵母上の EGFR エピトープ 287-302 変異表示および mAb806 と mAb175 に対する結合スコア

EGFR 変異	mAb806 結合	mAb175 結合
C287A	+	+
C287G	+	+
C287R	+	+
C287S	+	+
C287W	+	+
C287Y	+	+
G288A	++	++
A289K	++	++
D290A	++	++
S291A	++	++
Y292A	++	++
E293A	+	+
E293D	+	+
E293G	+	+
E293K	-	-
M294A	++	++
E295A	++	++
E296A	++	++
D297A	++	+ 接触
D297Y	+	+
G298A	+	+
G298D	-	-
G298S	-	-
V299A	++	+ 接触
V299D	-	-
V299K	++	+ 接触
R300A	++	++
R300C	+	+
R300P	-	-
K301A	++	++
K301E	+	+
C302A	-	-
C302F	+	+
C302G	-	-
C302R	+	+
C302S	-	-
C302Y	+	+

10

20

30

40

50

【0583】

Δ2-7EGFRまたはEGFRオートクラインループによる刺激を受けた腫瘍異種移植片に対するmAb175の効力

U87MG、Δ2-7神経膠腫異種移植片に対するmAb806およびmAb175のインビボ抗腫瘍活性を検査した。異種移植片を6日間、確率させた後、抗体療法(2週間、週3回、指示された日に)を開始した。この時点で、平均腫瘍容積は、 100 mm^3 であった(図68A)。mAb175治療は、ビヒクルまたはmAb806での治療と比較して全腫瘍成長を低減させる結果となり、対照動物を倫理的理由で犠牲にした、接種後19日の時点で非常に有意であった($P < 0.0001$ 対対照および $P < 0.002$ 対mAb806)。この時点での平均腫瘍容積は、ビヒクル、mAb806およびmAb175治療群についてそれぞれ1530、300および 100 mm^3 であった(図68A)。このことにより、Δ2-7EGFRを発現する異種移植片に対するmAb175活性の抗腫瘍活性が確認される。

10

【0584】

U87MG細胞が、1細胞につきおよそ 1×10^5 EGFRを発現したとしても、mAb806は、いずれの表面EGFRも認識することができず、および驚くべきことに、U87MGインビボ成長を阻害しない。さらに、これらの細胞は、いずれのEGFRリガンドも共発現しない。EGFREピトープが、一過性発現されるかどうか、ならびに従って、EGFRオートクラインループを有する細胞においてmAb806およびmAb175によって認識され得るかどうかに関する研究を行った。前立腺細胞系DU145は、U87MG細胞において観察されるのに類似したレベルでwtEGFRを発現するが、U87MG細胞とは異なり、DU145細胞は、TGF- α 遺伝子の増幅を含み、従って、EGFR/TGF- α オートクラインループを示す。mAb175および806は、両方とも、FACS分析により判定するとDU145細胞に結合し(図58B)、ならびに両方とも、これらの細胞から抽出されるEGFRの小率を免疫沈降させることができる(図68C)。療法の技術が、mAb175結合のより多い結合を示したが、L2ドメインに結合するmAb528と比較したとき、mAb175およびmAb806は、これらの細胞の表面のEGFRのサブセットしか結合しない(図68Bおよび68C)。第二の前立腺細胞系(LnCap); (データを示さない。)および結腸系(LIM1215)[これらの両方も、EGFRオートクラインループを有する(Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1992) Mol Cell Biol. 3, 1235-1243; Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1991) Mol Cell Biol. 11, 4005-4014)]に関しても、類似した観察が見られた。明らかに、mAb806およびmAb175は、オートクライン刺激ループの存在下では細胞上のEGFRの小率しか認識できない。

20

30

【0585】

mAb175およびmAb806は、U87MG細胞よりDU145細胞において発現されたEGFRのほうに有効に結合するので、ヌードマウスにおいて成長させたDU145異種移植片におけるこれらの抗体の抗腫瘍活性を分析するための研究を行った。異種移植片を18日間確率させた後、療法(3週間、週3回、指示された日に)を開始した。この時点での平均腫瘍容積は、 90 mm^3 であった(図68D)。mAb175とmAb806の両方が、DU145異種移植片の成長を阻害した。対照群を第67日に犠牲にし、この群は、mAb806およびmAb175群についてのそれぞれ605および 815 mm^3 (それぞれ、 $p < 0.007$ および 0.02)と比較して、 1145 mm^3 の平均腫瘍容積を有した(図68D)。

40

【0586】

mAb806およびmAb175のFab断片と接触しているEGFR₂₈₇₋₃₀₂の3D構造

mAb806およびmAb175が、すべてではないが多少高次構造のEGFRをどのようにして認識できるのかについての分子的詳細を理解するために、両方の抗体について

50

の F a b 断片の結晶構造を、酸化された E G F R₂₈₇₋₃₀₂ エピトープ（それぞれ、解像度 2.0 および 1.59 Å）との複合体でおよび単独（それぞれ、解像度 2.3 および 2.8 Å）で判定した。両方の場合、遊離 F a b 構造と複合体化 F a b 構造は、本質的に同じであり、これらの抗体のペプチドおよび C D R ループの高次構造は、輪郭がはっきりしていた（図 69）。エピトープは、β-リボン構造をとり、このリボンの一端は、F a b のほうを向いており、V 299 は、抗原結合部位の中央に埋もれている（図 69 C-E）。エピトープの両端が溶媒に露出されており。このことは、はるかに長いポリペプチドへのこれらの抗体の結合に矛盾しない。

【0587】

エピトープと接触している 20 の抗体残基のうち、3 つは、m A b 806 と m A b 175 とで 2 つしか置換を有さない（図 65）。m A b 175 接触残基は、軽鎖 S 30、S 31、N 32、Y 49、H 50、Y 91、F 94、W 96 および重鎖 D 32、Y 33、A 34、Y 51、S 53、Y 54、S 55、N 57、R 59、A 99、G 100、R 101 であり；m A b 806 接触残基は、同じであるが、軽鎖について N 30 および重鎖について F 33 の配列の違いがある。E G F R₂₈₇₋₃₀₂ は、ペプチド残基 293-302 間の密接により F a b に結合し、該接触の大部分は、残基 297 と 302 と間でのものある。E G F R₂₈₇₋₃₀₂ の主鎖原子と F a b の間の水素結合だけは、残基 300 と 302 についてのものである（図 69 F）。エピトープ配列の認識は、残基 E 293（F a b の H 50 および R 101 への）、D 297（Y 51 および N 57 への）、R 300（D 32 への）および K 301（水分子による Y 51 および W 96 への）への側鎖水素結合によって起こる。疎水性接触は、G 298、V 299 および C 302 でなされる。

【0588】

293 と 302 の間のエピトープ骨格の高次構造は、F a b 806 および F a b 175 結晶において本質的に同一であった（これらの残基にこける C α 原子について、rms 偏差 = 0.4 Å）。ジスルフィド結合により拘束されるが、ペプチドの N 末端（287-292）は、いずれの抗体構造において有意に接触せず、この領域の高次構造は異なる。しかし、F a b 806 複合体におけるこのセグメントは、どちらかと言えば不規則に見える。より興味深いことに、抗体と接触している E G F R₂₈₇₋₃₀₂ エピトープの高次構造は、テザリングされたまたはテザリングされていない E G F R 構造の骨格内で観察される E G F R₂₈₇₋₃₀₂ 高次構造に相当密接に関連している（Li et al., 2005; Garrett et al., 2002）。F a b 175 複合体からの E G F R₂₈₇₋₃₀₂ について、C α 位置における rms 偏差は、それぞれ、0.66 および 0.75 Å である（図 69）。

【0589】

m A b 806 および m A b 175 による E G F R の認識をさらなるに洞察するために、¹⁵N 標識酸化ペプチド E G F R₂₈₇₋₃₀₂ の高次構造を、溶解、遊離状態で、および 806 F a b の存在下で NMR により研究した（「材料および方法」参照）。遊離ペプチドについては、共鳴を割当て、ランダムコイルについてのものと比較した。本質的に、遊離ペプチドは、天然 E G F R において見られるようなベータリボンではなく、ランダムコイル構造をとる（Garrett et al., (2002 Cell 20; 110, 763-773)）。

【0590】

F a b を添加すると、共鳴シフトが観察された。しかし、F a b の添加および複合体の結晶化成功に基づく有意な線幅拡大から生ずる弱いシグナルのため、F a b 806 - エピトープ複合体の溶解構造をさらに追跡しなかった。しかし明らかに、ペプチドが m A b 806（または m A b 175）の F a b 断片に結合すると、F a b は、天然受容体におけるこのペプチドに匹敵するペプチドの高次構造を選択または誘導するようである。

【0591】

m A b 806 および m A b 175 が E G F R の一部の高次構造しか認識しない理由を研究するために、m A b 175 の F a b 断片を、E G F R₂₈₇₋₃₀₂ をスーパーインボ

10

20

30

40

50

ーズすることにより、EGFRの細胞外ドメイン（テザリングされたまたはテザリングされていないモノマー）にドッキングさせた。Δ2-7様断片については、受容体との有意な立体衝突はなかった。テザリングされていない形態では、Fabの接近可能表面が、より多く埋もれていた（テザリングされた形態での550²と比較して920²）。従って、この抗原を、酵母発現突然変異体によって示されたように（Chao et al. (2004) J. Mol. Biol. 342, 539-550）、抗体の非CDR領域とさらに接触させることができる。逆に言えば、全EGFR外部ドメインをFabにドッキングさせると、エピトープの前（残基187-286）のおよびFabの中央にわたるCR1ドメインの一部との実質的な空間的オーバーラップがある（図69Dおよび69E）。従って、CR1ドメインは、テザリングされた高次構造またはテザリングされていない高次構造において本質的に同じ構造を有するので、mAb806およびmAb175は、いずれの形態のEGFRにも結合できないであろう。明らかに、wEGFRのいずれかの既知高次構造でのCR1ドメインに関するエピトープの配向と、エピトープ結合を可能にする配向は、異なるに相違ない。CR1ドメインの検査は、EGFR₂₈₇₋₃₀₂の前のジスルフィド結合（271-283）が、エピトープへの接近の障害となるポリペプチドを拘束することを示し；このジスルフィドの分解は、これが抗体への直接結合に関与していなかったとしても、CR1ドメインを部分的にアンフォールディングさせるので、mAb175またはmAb806がエピトープに接近できると予想されよう。

【0592】

EGFR₂₇₁₋₂₈₃ジスルフィド結合の破壊は、mAb806結合を増加させるタンパク質中のジスルフィド結合は、構造剛性をもたらすが、一部の細胞表面受容体、特に、サイトカインおよび成長因子についてのものでは、ジスルフィド結合の一過的破壊およびジスルフィド結合変化が受容体の機能を支配する場合がある（Hogg, P. J. (2003) Trends in biochemical sciences 28, 210-214）。これは、mAb806およびmAb175がこれらの結合部位に接近できる1つのメカニズムであったので、位置271および283のいずれかまたは両方のシステイン残基をアラニン残基に突然変異させること（C271A/C283A）により、エピトープへの接近容易性増大を試みた。完全長C271A-、C283A-またはC271A/C283A-EGFRを発現することができるベクターをIL-3依存性Ba/F3細胞系にトランスフェクトした。C271A-およびC271A/C283A-EGFR突然変異体をwtEGFRと同等のレベルで発現する、安定したBa/F3クローンを選択した（図70A）。高レベルの突然変異C283A-EGFRを発現するBa/F3細胞は、観察されなかった。前に説明したように、wtEGFRは、mAb806とあまり反応しないが、突然変異受容体は、mAb528、mAb806および抗FLAG抗体と、同等に強力に反応した。このことは、この受容体が、細胞表面で発現され、正しくフォールディングされること、およびこのような場合、mAb806がエピトープに完全に接近できることを示唆している。mAb806が、C271A/C283A突然変異体をwtEGFRより効率的に認識することを確認するために、mAb806結合のmAb528の結合に対する比を決定した。野生型EBFRとC271A/C283A-EGFRの両方にN末端FLAGタグを付けたので、M2抗体に対するmAb806およびmAb528結合の比も決定した。前に報告したように、mAb806は、Ba/F3細胞の表面で発現された全wtEGFRの小率しか認識しなかった（mAb806/528結合比は、0.08である。）（表8）。対照的に、mAb806は、この細胞表面で発現されたC271A/C283A突然変異体EGFRの事実上すべてを認識した（1.01のmAb806/528結合比）（図70Aおよび表8）。

【0593】

10

20

30

40

【表 1 1】

表 8

野生型または C271A/C283A EGFR を発現する細胞との mAb806 反応性

細胞系	抗体結合の比		
	mAb 528/M2	mAb 806/M2	mAb 806/mAb 528
wtEGFR-FLAG	1.37	0.11	0.08
wt-EGFR	—	—	0.07
C271/283*	1.08±0.10	1.09±0.38	1.01±0.13

* 4 つの独立したクローンについての平均

10

【0 5 9 4】

2 つのシステインの突然変異は、E G F R 結合および受容体機能を損なわせなかった。C 2 7 1 A / C 2 8 3 A E G F R 突然変異体を発現する B a F 3 細胞は、E G F の存在下で増殖する (図 7 0 B)。C 2 7 1 A / C 2 8 3 A 突然変異を発現する細胞における E G F についての用量応答曲線の左シフトが再現性よく観察された。このことは、リガンドに対してのより高い親和性、または突然変異受容体についての向上されたシグナリング可能性を示唆している。ウエスタンブロット分析により、C 2 7 1 A / C 2 8 3 A 突然変異体が w t E G F R に類似したレベルで発現されることが、および E G F R 刺激に応答してチロシンリン酸化されることが確認された (図 7 0 C)。他の細胞系での以前の研究と一致して、m A b 8 0 6 は、w t E G F R を発現する G a / F a 細胞のインビトロ E G F 誘導増殖に対して効果がないが、リガンド遮断性 m A b 5 2 8 は、これらの細胞の E G F 誘導増殖を完全に阻害する (図 7 0 D、左パネル)。対照的に、m A b 8 0 6 は、C 2 7 1 A / C 2 8 3 A 突然変異体を発現する B a F 細胞における E G F 誘導増殖を完全に除去した (図 7 0 D、右パネル)。2 7 1 - 2 8 3 システインループが破壊されると、m A b 8 0 6 は、より有効に結合するばかりでなく、一旦結合すると、m A b 8 0 6 は、リガンド誘導増殖を防止する。

20

【0 5 9 5】

【表 1 2】

表 9

データ収集および精密化の統計値

データ収集

	806(天然)	806(ヘプテッド)	175(天然)	175(ヘプテッド)
空間群 単位格子寸法(A)	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a	140.37	35.92	36.37	83.17
b	74.62	83.16	94.80	69.26
c	83.87	72.21β=92.43	108.90	71.47
供給源	研究所内	BNL X29	研究所内	研究所内
波長(A)	1.542	1.1	1.542	1.542
解像度範囲(A)	29.7-2.2 (2.27-2.20)	50-2.0 (2.07-2.0)	50-2.8 (2.87-2.8)	14.18-1.59 (1.65-1.59)
R _{int} (%)	6.4(26.7)	6.6(28.2)		8.6(30.0)
I/σI	12.2(3.2)	22(3.15)		10.2(2.2)
完全性(%)	98.3(91.3)	96.6(79.2)	98.4(90.5)	78.8(11.8) 98.1 at 1.89 Å
全反射	156497	98374		205401
特有の反射	44905	27692	9171	43879

精密化

解像度範囲(A)	20-2.3	72.17-2.00	50-2.6	14.18-1.6
反射	37397	26284	9171	41611
R _{結晶}	0.225	0.226	0.210	0.203
R _{遊離}	0.289	0.279	0.305	0.257
タンパク質原子	6580	3294	3276	3390
溶媒分子	208	199	46	247
r. m. s. d 結合長(A)	0.022	0.007	0.015	0.014
r. m. s. d 結合長(°)	1.70	1.12	1.77	1.48
平均 B 因子(A ²)	40.3	33.6	37.5	20.7
全異方性 B 因子(A ²)B11	-1.52	2.42	0.20	1.13

【0596】

考察

E G F R₂₈₇₋₃₀₂ エピトープに関する構造研究は、m A b 8 0 6 と m A b 1 7 5 の両方が、w t E G F R 構造内の同じ 3 D 構造モチーフを認識したことを明らかにし、この骨格高次構造が、Δ 2 - 7 E G F R にも存在し、露出していることを示している。しかし、批判的には、これらの構造内のエピトープの配向は、関連アミノ酸への抗体接近を妨げるであろう。このことは、m A b 8 0 6 が、生理レベルで細胞表面において発現された w t E G F R を結合しないという実験観察と一致している。

【0597】

E G F R_{C 2 7 1 A / C 2 8 3 A} 突然変異体での結果は、C R 1 ドメインが、m A b 8 0 6 および m A b 1 7 5 をこの突然変異受容体に化学量論的に結合させることに利用でき

10

20

30

40

50

ようになり得ることを示している。この突然変異受容体は、E G F 刺激に対して十分な感受性があるので、依然として天然高次構造をとる場合があるが、w t E G F Rとは異なり、m A b 8 0 6 によって完全に阻害される。この壊れたジスルフィド結合を有するE G F Rのミスフォールディングされた形態が、癌細胞の表面に存在し得る場合、このデータは、これが、細胞シグナリングを開始させることができるであろうことおよびm A b 8 0 6 またはm A b 1 7 5 のいずれかによって阻害されるはずであることを明確に示す。

【0598】

データのもう1つの説明は、リガンド活性化中、受容体の再配列がエピトープの付近での局所的アンフォールディングを誘導することがあり、この結果、この受容体に、結合を可能にする高次構造をとらせるということである。結晶構造の場合、エピトープは、E G F R外部ドメインの物理的中心付近に位置し、フォールディングされたC R 1ドメインとE G F R外部ドメインの四次構造の両方によってエピトープへの接近が阻まれる。テザリングされたおよびテザリングされていない高次構造の場合、C R 1ドメインの完全性は、L 1 : リガンド : L 2ドメイン(テザリングされていない場合)またはL 2 : C R 2ドメイン(テザリングされている場合)のいずれかとの追加の相互作用によって安定化される。しかし、エピトープ領域は、外部ドメインにおいて見つけられる最高熱パラメータの幾つかを有する : m A b 8 0 6 / 1 7 5 エピトープは、構造不安定性である。受容体活性化中に、受容体が、テザリングされた高次構造とテザリングされていない高次構造の間での転位を受けると、m A b 8 0 6 およびm A b 1 7 5 は、エピトープに接近できる。従って、分子レベルでは、これらのメカニズムは、正常細胞へのm A b 8 0 6 およびm A b 1 7 5 の無視できる程度の結合、ならびに過発現されたおよび/または活性化されたE G F Rを有する腫瘍細胞への実質的に高い結合レベルの一因となり得る。

【実施例24】

【0599】

モノクローナル抗体124および1133

上の実施例1において論じたように、m A b 1 2 4 およびm A b 1 1 3 3 をm A b 8 0 6 と同時に産生させ、これらが、本明細書において論ずるm A b 8 0 6 の特有の特性に類似した特性、特に、過発現された野生型E G F Rに対する特異性を呈示することが判明した。

【0600】

最初のスクリーニングは、ニューヨークで行われた(Jungbluth et al . (2003) A Monoclonal Antibody Recognizing Human Cancers with Amplification/Over-Expression of the Human Epidermal Growth Factor Receptor PNAS . 100 , 639 - 644)。E L I S A 競合評定およびB i a c o r e 分析を行って、m A b 1 2 4 および/またはm A b 1 1 3 3 が、m A b 8 0 6 と同一のエピトープまたは代替E G F R 決定基を認識するかどうかを判定した。

【0601】

F A C S 分析

U 8 7 M G . Δ 2 - 7、A 4 3 1 およびH N 5 細胞への抗体結合をF A C S によって評定した。すべての抗体が、d e 2 - 7 E G F R への強い結合および過発現された野生型E G F R への少ない結合を有するm A b 8 0 6 のものと類似した特異性を呈示した。

【0602】

競合E L I S A

一連の競合E L I S A を行って、1 2 4 および1 1 3 3 抗体がm A b 8 0 6 エピトープと競合するかどうかを判定した。簡単に言うと、E G F R (s E G F R) の変性可溶性ドメインをE L I S A プレートにコーティングした。その後、未標識1 2 4、または1 1 3 3 抗体を漸増濃度でこのプレートの全域に添加した。洗浄後、ビオチン化m A b 8 0 6 を各ウェルに添加して、これが依然としてs E G F R を結合できるかどうかを判定した。結

合している m A b 8 0 6 の検出は、ストレプタビジンコンジュゲート型 H R P を使用して果たした。抗体が、m A b 8 0 6 と同じ（または重複する）エピトープに結合する場合には、m A b 8 0 6 結合は期待されない。

【 0 6 0 3 】

結果を表 1 0 にまとめる。濃度依存性阻害性結合効果が、m A b 1 2 4 および m A b 1 1 3 3 について観察された：m A b 8 0 6 結合は、未標識抗体濃度が減少するにつれて増加した。このことは、1 2 4 および 1 1 3 3 抗体が、m A b 8 0 6 と同一のエピトープまたは極めて近接しているものを認識することを示唆している。

【 0 6 0 4 】

【表 1 3 】

10

表 10

sEGFR に対する mAb124 および mAb1133 競合 ELISA 結合の要約

未標識プロッキング抗体	ビオチン標識 806 の結合 806
124	なし
1133	なし
806(阻害剤についての対照)	なし
無関係な IgG2b	++++

【 0 6 0 5 】

F A C S 分析：細胞結合競合

20

U 8 7 M G . Δ 2 - 7 を未標識抗体 1 2 4 、 1 1 3 3 と共に前保温した。陽性対照 8 0 6 およびアイソタイプ対照をアッセイに含めた。細胞を洗浄し、その後、A l e x a 4 4 8 コンジュゲート型 m A b 8 0 6 で染色し、F A C S により 8 0 6 結合レベルを判定した。

【 0 6 0 6 】

結果を表 1 1 にまとめる。1 2 4 および 1 1 3 3 抗体は、細胞表面への m A b 8 0 6 の結合を遮断した。このことは、m A b 8 0 6 または極めて近接しているものの認識を示す。

【 0 6 0 7 】

【表 1 4 】

30

表 11

FACS 分析:U87MG. Δ2-7 細胞結合競合

未標識プロッキング抗体	Alexa488 標識 806 の阻害
124	+++
1133	+++
806	++++
IgG2b 対照	なし

【 0 6 0 8 】

B I A c o r e 分析：m A b 8 0 6 ペプチドエピトープへの結合

40

m A b 8 0 6 エピトープを含有する E G F R アミノ酸配列 ₂₈₇ C G A D S Y E M E E D G V R K C ₃₀₂ (配列番号：14) をペプチドとして合成し、バイオセンサーチップ上に固定した。このエピトープへの抗体 1 2 4 、 1 1 3 3 および 8 0 6 (2 0 0 n M) の結合を測定した。得られた最大結合共鳴ユニット (R U) を表 1 2 にまとめる。1 2 4 、 1 1 3 3 は、8 0 6 ペプチドエピトープの認識を確認する、ペプチドへの明確な結合を示した。

【 0 6 0 9 】

【表 15】

表 12

BIAcore 分析:mAb806 ペプチドへの最大結合

抗体	mAb806 ペプチドへの結合 (RU)
806	1100
124	1000
1133	800

【0610】

10

考察

本実施例において証明されるように、mAb124 および mAb1133 は、mAb806 によって認識される EGFR ペプチドに結合し、ならびに EGFR の細胞外ドメインおよび de2-7 EGFR を発現する細胞への mAb806 の結合を遮断する。従って。これら3つの抗体は、EGFR 上の同じ決定基を認識する。

【実施例 25】

【0611】

ch806 の臨床試験

様々な腫瘍タイプを有する患者における腫瘍ターゲッティング / 生体内分布 / 薬物動態分析において ch806 のインビボ特異性を検査するための臨床試験を計画した。

20

【0612】

1. 材料および方法

試験計画

このファースト・イン・マン試験は、非盲検、用量漸増第 I 相試験であった。主目的は、806 抗原を発現する進行腫瘍を有する患者における ch806 の単回注入の安全性を評価することであった。第二の試験目的は、¹¹¹In-CH806 の生体内分布、薬物動態および腫瘍取り込み量を判定すること；ch806 に対する患者の免疫応答を判定すること；ならびに ch806 の臨床活性の初期の証拠を評定することであった。腫瘍上に発現された EGFR に対する ch806 のインビボ特異性を最適に評定するために、単回投与をこの試験に選択した。このプロトコルは、試験開始前に the Human Research and Ethics Committee of the Austin Hospital による承認を受けた。この試験は、the Australian Therapeutic Goods Administration Clinical Trial Exemption (CTX) スキームのもとで行った。すべての患者から書面でのインフォームドコンセントを得た。

30

【0613】

適格性基準は、以下を含んだ：保管腫瘍サンプルの化学発光 in-situ ハイブリダイゼーション (chromogenic in-situ hybridisation) または免疫組織化学に基づき 806 抗原発現について陽性の進行または転移性腫瘍 (保管腫瘍サンプルの免疫組織化学評定が、806 発現について陽性のいずれかの細胞を示した場合、腫瘍を 806 陽性と定義した、下記参照)；組織学的にまたは細胞学的に証明された悪性；少なくとも1つの病変が 2 cm である、CT スキャンで測定可能な疾患；少なくとも3ヶ月の期待生存期間；カルノフスキー・パフォーマンス・スケール (KPS) 70；妥当な血液学的、肝臓および腎臓機能；年齢 > 18 歳；ならびにインフォームド

40

コンセント提出可能。除外基準は、以下を含んだ：活性中枢神経系転移 (妥当な治療を受けており安定している場合を除く)；試験登録前4週間以内の化学療法、免疫療法、生物学的療法、または放射合線療法；以前の抗体暴露 [ヒト抗キメラ抗体 (HACA) の形跡がない場合を除く]；以前の癌療法の作用から完全に回復していないこと；全身性コルチコステロイドまたは免疫抑制剤の併用；管理されていない乾癬または他の重篤疾患；妊娠または授乳期；医学的に許容された避妊手段を使用していない妊娠している可能性のある女

50

性。

【0614】

生理食塩液 / 5 % ヒト血清アルブミン中の、インジウム - ^{111}In (^{111}In - 200 - 28 MBq ; 5 - 7 mCi) で追跡標識した ch806 の、60 分にわたる静脈内注入による単回注入を患者に施した。計画用量漸増は、患者が 4 用量レベル : 5、10、20 および 40 mg / m²、のうちの 1 つに登録することを意味した。腫瘍上に発現された EGFR に対する ch806 の特異性を評価できるように、ならびにいずれかの正常組織コンパートメントが ch806 結合したかどうか (および薬物動態または生体内分布への影響) をインビボで判定するために、これらの用量を選択した。生体内分布、薬物動態、および免疫応答をすべての患者において評価した。

10

【0615】

生体内分布および腫瘍取り込み量の評価のために全身ガンマ・カメラ・イメージングを、 ^{111}In - ch806 注入後第 0 日、第 1 日、第 2 または 3 日、第 4 または 5 日、および第 6 または 7 日に行った。薬物動態のための血液サンプルをこれらの時点、ならびに加えて第 14 日 (± 2 日) および第 21 日 (± 2 日) に採取した。HACA レベルの評価のための血液サンプルは、ベースラインで、および第 30 日まで週 1 回、採取した。各試験訪問時に毒性評価を行った。身体検査ならびに常例的血液学および生化学検査を、試験終了 (第 30 日) まで週 1 回行った。第 30 日に再び病期分類を行った。

【0616】

用量漸増基準

20

各用量レベルの第一の患者を 4 週間、観察した後、任意の追加の患者が登録した。ch806 の注入の 4 週間以内に最初に 2 人の患者のいずれにおいても用量制限毒性 (DLT) が観察されなかった場合には、4 人の患者を次に高い投薬力価で参加させることとなった。2 人の患者の任意のコホート内の一方の患者が、初回投与から 4 週間以内に DLT を経験した場合、追加の 4 人の患者 (最大 6 人) をこの投薬レベルで参加させた。任意の用量レベルでの 6 人のうち 1 人より多くが、グレード 3 以上の毒性を経験しなかった場合、その後の患者を次の用量レベルで参加させた。

【0617】

NCI 有害事象共通用語基準 (Common Terminology Criteria for adverse Events : CTCAE v3.0) によって定義されているとおり、グレード 3 非血液毒性、またはグレード 4 血液毒性として DLT を定義した。最大耐用量 (MTD) は、6 人のうち 2 人以上の患者が DLT を経験した場合のものより低い ch806 用量と定義した。

30

【0618】

Ch806 の放射標識

臨床グレード ch806 を、オーストラリア、メルボルンの the Biological Production Facility of the Ludwig Institute for Cancer Research において生産した。以前に記載されている方法 (Scott et al. (2000) Cancer Res 60, 3254 - 3261 ; Scott et al. (2001) J. Clin. Oncol. 19 (19), 3976 - 3987) に従って二官能性金属イオンキレート CHX - A ' - DTPA により ^{111}In (MDS Nordion、カナダ、カナダ) で抗体 ch806 を標識した。

40

【0619】

ガンマ・カメラ・イメージング

^{111}In - ch806 生体内分布の全身画像を、 ^{111}In - ch806 の注入後第 0 日に、および注入後第 7 日までの少なくとも 3 回のさらなる機会に、すべての患者に関して得た。既知腫瘍を有する身体領域の単一光子放射コンピュータ断層撮影 (SPECT) 画像も、この期間中に少なくとも 1 回得た。すべてのガンマカメラ画像を二検出器ガンマカメラ (Picker International、オハイオ州クリーヴランド) で

50

獲得した。

【0620】

薬物動態

薬物動態分析用の血液を¹¹¹In - ch806 注入前第0日に採取し；その後、¹¹¹In - ch806 後5分、60分、2時間および4時間の時点、第1日、第2または3日、第3または5日、および第6または7日に採取した。ch806 タンパク質の薬物動態のためのさらなる血液を第14日（±2日）および第21日（±2日）および第30日（±2日）にも得た。

【0621】

血清サンプルを二つ組で当分し、適切な¹¹¹In 標準物質と一緒に、ガンマ・シンチレーション・カウンタ（Packard Instruments、オーストラリア、メルボルン）で計数した。血清の結果を%注射用量毎リットル（%ID/L）で表示する。各注入後の患者血清ch806 タンパク質レベルの測定は、ヒト血清中のch806 タンパク質の免疫化学測定についての検証済プロトコル⁴⁰を用いて行った。血清サンプル中のch806 についての定量限界は、70 ng/mLであった。すべてのサンプルを三重反復でアッセイし、および少なくとも1:2倍に希釈した。ch806 の測定血清レベルをμg/mLとして表示する。

10

【0622】

曲線適合プログラム（WinNonlin Pro Node 5.0.1、Pharsight Co、カリフォルニア州マウンテンビュー）を使用して、注入後の血清¹¹¹In - ch806 測定値、およびELISAで決定した患者血清ch806 タンパク質レベルを用いて薬物動態計算を行った。次のパラメータについての推定値を決定した：T_{1/2α}およびT_{1/2β}（体内動態の分布相および消失相の半減期）；V₁、中心コンパートメントの容積；C_{max}（最大血清濃度）；AUC（無限時間に外挿した血清濃度曲線下面積）；およびCL（全血清クリアランス）。

20

【0623】

¹¹¹In - ch806 の全血クリアランスならびに腫瘍および臓器線量計測

それぞれの個々の患者の¹¹¹In - ch806 注入画像データセットにおいて関心のある領域に基づき全血および正常器官（肝臓、肺、腎臓および脾臓）線量計算を行い、これによって累積活性を計算すること、およびOLINDAを使用する最終線量計測結果について分析することができた（Stabin et al. (2005) J. Nucl. Med. 46 (6), 1023 - 1027）。バックグラウンドおよび減弱について補正した¹¹¹In - ch806 画像データセットを用いて、各時点で、関心のある領域を適する腫瘍についても定義し、線量計算を行って、腫瘍/gmで¹¹¹In - ch806 の濃度を導出した（Scott et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11 (13), 4810 - 4817）。この値を、注入したmg ch806 タンパク質量に基づいて、μg ch806 / gm 腫瘍に変換した。

30

【0624】

HACA分析

HACA評価のための血液サンプルをch806 注入前に採取し、その後、ch806 注入後30日まで週1回採取した。前に記載されているように（Scott et al. , 2005 ; Liu et al. (2003) Hybrid Hybridomic 22 (4), 219 - 28 ; Ritter et al. (2001) Cancer Res. 61 (18), 685 - 6859）、サンプルをELISAにより、およびBIAcore 2000計器を使用する表面プラズモン共鳴技術により、分析した。

40

【0625】

免疫組織化学的方法

治験中の各患者からのホルマリン固定パラフィン包埋組織を次のように免疫染色した：簡単に言うと、パラフィン包埋組織の4 μm切片をSuperFrost（登録商標）Plusスライド（Menzel - Glaser、ドイツ）にマウントし、脱パラフィンし

50

、再水和した後、Target Retrieval Solution、pH 6.0 (10分; Dako、デンマーク、グロストルプ) 中でのマイクロウェーブにより抗原賦活化した。その後、切片を3% H₂O₂で10分間処理して内因性ペルオキシダーゼを除去し、室温で60分間、m806抗体(4 µg/mL)と共にまたはアイソタイプを合わせた適切な濃度の陰性抗体(IgG2b; Chemicon、カリフォルニア州テメキュラ)と共に温置した。PowerVision Kit (Immunovision Technologies、カリフォルニア州プリズベン)を使用して抗体結合を検出した。免疫染色の視覚化を可能にするために、切片を色原体3-アミノ-9-エチルカルバゾール(0.4%、Sigma Chemicals Co.、米国ミズーリ州)と共に10分間温置し、Mayerのヘマトキシリンで対比染色した。この免疫染色手順についての陰性対照は、一次抗体の除外により調製した。結果を陽性腫瘍細胞染色の百分率として表示した。

10

【0626】

化学発光 in situ ハイブリダイゼーション法

治験中の各患者からのホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織を切断し、Super Frost (登録商標) Plus スライドにマウントし、脱パラフィンし、再水和した後、Spot Light (登録商標) Tissue Pre-treatment Kit (Zymed Laboratories Inc.、カリフォルニア州サウスサンフランシスコ)で前処理した。その後、切片にSpot Light (登録商標) EGFR DNA プローブをかぶせ、10分間、95℃で変性させ、一晚、37℃で温置した。ハイブリダイゼーション後、スライドを0.5×SSCで洗浄した。Spot Light (登録商標) CISH (商標) Polymer Detection Kitを使用してプローブの検出を行った。シグナルのクラスタまたは癌細胞の>25%において5の個別シグナルを示した切片は、m806反応性と相関するEGFR遺伝子の増幅を有すると考えた。

20

【0627】

2. 結果

患者

8人の患者[女性1人および男性7人; 平均年齢61歳(範囲44-75歳)]が治験を完了した(表16)。原発腫瘍部位、以前の治療歴、および試験登録時の疾患部位も表16に示す。8人すべての患者が、保存腫瘍において806抗原陽性を有した(表16)。

30

【0628】

すべての患者が組み入れ基準を満たしており、患者8(原発性脳腫瘍を有した者)を除くすべてが試験登録時に転移性疾患を有した。ターゲット病変として分類した腫瘍部位は、以下を含んだ: 肺(5人の患者)、脳(1人の患者)、リンパ節(1人の患者)、声門上(1人の患者)。転移性疾患の他の部位(非ターゲット領域)は、副腎腫瘍、骨およびリンパ節を含んだ(表16)。カルノフスキー・パフォーマンクス・ステータス中央値は90であった(範囲80-100)。

【0629】

【表 16】

表16 患者の特徴

患者 番号	用量レ ベル (mg/m ²)	年齢 (歳)	性別	KPS (%)	原発 腫瘍 部位	陽性 細胞 の IHC (%)	以前 の療 法	試験 登録 時の 疾患 部位	ch806 に対 する 腫瘍 応答
1	5	71	M	10	NSCLC	50-75	RT	肺、 副腎	PD
8	5	44	M	90	退形 成性 星状 細胞 種	>75*	外科 手術、 RT、CT	脳	SD
2	10	49	F	80	SCC 肛門	<10	化学 療法、 RT	LN、 肺、 骨	SD
3	10	75	M	90	NSCLC	50-75	外科 手術、 RT	肺	SD
4	20	52	M	100	結腸	<10†	外科 手術、 CT	肺、 LN	PD
5	20	65	M	80	中皮 腫	>75	RT、CT	肺	SD
6	40	59	M	80	SCC 声帯	>75	外科 手術、 RT、CT	軟組 織	SD
7	40	71	M	90	SCC 皮膚	50-75	外科 手術、 CT	肺、 LN	PD

略語：F=女性；M=男性；NSCLC=非小細胞肺癌腫；SCC=扁平上皮細胞癌腫；RT=放射線療法；CT=化学療法；LN=リンパ節；PD=進行性疾患；SD=安定病態 *de2-7 EGFR発現について陽性 †EGFR遺伝子増幅について陽性

【0630】

有害事象およびHACA

ch806に関連した有害事象を表17および18に列挙する。注入関連有害事象は、観察されなかった。DLTはなく、従って、MTDに達しなかった。治験担当医の意見ではことによるとch806に起因し得る原則毒性(principle toxicities)は、一過性そう痒症、軽度悪心、疲労/嗜眠、ならびに血清ALPおよびGGTレベルに対して起こり得る影響であった。患者5においてCTCグレード2のGGTの上昇が観察されたが、この上昇は、ベースライングレード1上昇のバックグラウンドに基づくものであり、事実上、一過性であった。3つの重篤有害事象(SAE)が報告されたが、ch806に起因しなかった。総合的に言えば、ch806は、すべての用量レベルで安全および十分認容性であり、一般に予測可能で管理できる軽症の毒性が観察された。さらなる用量漸増は、この治験に利用できるcGMP ch806の限られた量のため、行わなかった。

【0631】

ch806に対する陽性免疫応答(ELISA方法論とBIACore方法論の両方の一致を有する。)が、8人の患者のうち1人だけに観察された(患者1)。

【 0 6 3 2 】

【表 1 7】

表17 ch806に関連した有害事象の発生

有害事象	用量レベル(mg/m ²)*				各事象のイベントの総数
	5	10	20	40	
めまい	0	0	0	1	1
疲労	0	0	1	0	1
嗜眠	0	0	0	1	1
食欲抑制	0	0	0	1	1
悪心	0	1	0	1	2
そう痒症	1	0	0	0	1
ALP 上昇	0	0	1	0	1
GGT 上昇	0	0	1	0	1
合計	1	1	3	4	9

*数は、各用量レベルでの任意の事象のイベントの数を表す

【 0 6 3 3 】

【表 1 8】

表18 治験薬関連有害事象の分布

用量レベル (mg/m ²)	最大 CTCグレード毒性*			
	1=軽度	2=中等度	3=重度	4=生命を危うくする
5	1	0	0	0
10	1	0	0	0
20	2	1	0	0
40	4	0	0	0
総合	8	1	0	0

*患者の数

【 0 6 3 4 】

ch 8 0 6 の放射標識

この治験中に投与した ¹¹¹In - ch 8 0 6 の注入は、合計 8 回であった。¹¹¹In - ch 8 0 6 の平均 (± S D) 放射化学的純度および免疫反応性をそれぞれ 99 . 3 ± 0 . 1 % および 77 . 4 ± 7 . 0 % であると測定した。

【 0 6 3 5 】

ch 8 0 6 の生体内分布

すべての用量レベルでの患者における ¹¹¹In - ch 8 0 6 生体内分布の初期パターンは、時間とともに徐々に除去される、血液プール活性と一致していた。注入後 1 週間にわたって、肝臓および脾臓における ¹¹¹In - ch 8 0 6 の取り込み量は、細網内皮系による ¹¹¹In - キレート代謝産物の正常クリアランスと一致していた。肺 (患者 1、3、4、5 および 7)、腹部 (患者 1 および 2)、および頸部右側の正門上領域 (患者 6) に位置するターゲット病変を含めて、すべての用量レベルですべての患者のターゲット病変 (2 cm) に関して ¹¹¹In - ch 8 0 6 の特異的局在が観察された (図 9 4)。脳腫瘍 (患者 8) における ¹¹¹In - ch 8 0 6 の高い取り込み量も実証された (図 9 5)。重要なことに、腫瘍における ¹¹¹In - ch 8 0 6 の取り込み量は、806 抗原発現レベルに依存しなかった。例えば、患者 4 は、保存腫瘍における 806 反応性についての IHC による < 10 % にもかかわらず、両肺ターゲット領域による高い取り込み量を明示した (図 9 6)。患者 4 におけるターゲット病変のこの ¹¹¹In - ch 8 0 6 取り込み度は、腫瘍細胞の 50 - 75 % が保存サンプル免疫組織化学に基づき 806 抗原染色について陽性であった、患者 3 において見られたものに匹敵した (図 9 6)。

【0636】

薬物動態

¹¹¹In-ch806の単回注入についての個々の患者の薬物動態パラメータ $T_{1/2\alpha}$ および $R_{1/2\beta}$ 、 V_1 、 C_{max} 、 AUC および CL を表19に示す。 $Kruskal-Wallis$ 順位和検定をアルファおよび β 半減期、 V_1 およびクリアランスに適用した。用量レベル間の有意差は観察されなかった($P > 0.05$)。

【0637】

プールされた集団ELISAデータにフィッティングした薬物動態曲線を図97に示す。平均 $\pm$ SD薬物動態パラメータは、 $T_{1/2\alpha}$ 29.16 ± 21.12 時間、 $T_{1/2\beta}$ 172.40 ± 90.85 時間、 V_1 2984.59 ± 91.91 mL、および CL 19.44 ± 4.05 mL/時間であった。測定ピークおよびトラフch806血清濃度(C_{max} および C_{min})データを各患者について表20に提示する。予想どおり、各用量レベルに関して C_{max} および C_{min} について比例関係が観察された。ch806 ELISA薬物動態データについて決定した平均 $\pm$ SD値は、¹¹¹In-ch806薬物動態データについて得た値とよく一致していた(表19)。

【0638】

【表19】

表19 各用量レベルにおけるおよび全用量レベルにわたる

¹¹¹In-CHX-A'-DTPA-ch806についての平均 $\pm$ SD薬物動態パラメータ推定値

用量レベル (mg/m ²)	$T_{1/2\alpha}$ (時)		$T_{1/2\beta}$ (時)		V_1 (mL)		CL (mL/時)		AUC (時*mg/mL)	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
5	10.91	3.4	183.9	110.2	2963.06	493.23	21.97	16.59	541.17	371.75
10	11.75	4.4	124.5	9.25	3060.29	721.70	28.58	8.60	566.79	26.39
20	9.34	8.3	125.3	73.66	2902.06	1064.77	30.98	21.65	1438.12	957.18
40	8.95	3.2	133.9	10.79	4742.42	169.10	37.99	6.47	2269.04	381.68
すべて	10.24	1.32	141.90	28.30	3416.96	886.04	29.88	6.61		

【0639】

【表20】

表20 ELISA分析によって決定した C_{max} および C_{min} 血清ch806レベル

患者番号	用量レベル (MG/M ²)	C_{max}^* (μ G/ML)	C_{min}^* (μ G/ML)
1	5	1.38 ± 0.02	$0.10 \pm 0.05^\dagger$
8	5	1.52 ± 0.17	0.96 ± 0.08
2	10	5.92 ± 0.11	1.50 ± 0.01
3	10	6.27 ± 0.45	1.83 ± 0.20
4	20	12.25 ± 0.66	4.05 ± 0.05
5	20	11.22 ± 0.77	1.58 ± 0.04
6	40	27.76 ± 2.10	6.90 ± 0.38
7	40	32.32 ± 0.84	6.80 ± 0.13

* C_{max} =注入60分後; C_{min} =第7日 †第8日血清レベル

【0640】

¹¹¹In-ch806の線量計測

全身クリアランスは、 948.6 ± 378.6 時間の生物学的 $T_{1/2}$ (平均 $\pm$ SD)で、すべての用量レベルにわたってすべての患者において類似していた。比較的短い物理

的半減期のため、生物学的反撃の計算は、有効半減期の小さな変化に極めて敏感であった。用量レベル間に全身クリアランスの統計的有意差はなかった [K r u s k a l - W a l l i s 順位和検定: P 値 = 0 . 5 4] (図 9 8)。

【 0 6 4 1 】

正常器官 (肝臓、肺、腎臓および脾臓) からの $^{111}\text{In} - \text{ch}806$ のクリアランスは、用量レベル間での差を示さず、平均有効 $T_{1/2}$ をそれぞれ 78 . 3、48 . 6、69 . 7 および 66 . 2 時間であると算出した。これらの正常器官間にクリアランスの統計的有意差はなかった。特に、肝臓クリアランスは用量間での差を示さなかった (図 9 8)。このことは、肝臓には $\text{ch}806$ についての飽和性抗原コンパートメントがないことを示している。

10

【 0 6 4 2 】

腫瘍線量分析を 6 人の患者について完了した。患者 1 および 2 は、心臓血プールに近いターゲット病変を有し、または幾つかの画像獲得中に動き、これらが正確な分析を妨げた。 $^{111}\text{In} - \text{ch}806$ の測定ピーク取り込みは、注入後 5 - 7 日に発生し、 $5.2 - 13.7 \times 10^{-3} \% \text{ 注入用量} / \text{gm}$ 腫瘍組織にわたった。

【 0 6 4 3 】

臨床活動の評価

この 1 ヶ月試験の完了時、5 人の患者は、安定病態を、3 人の患者は進行性疾患を有することが判明した (表 1 6)。興味深いことに、1 人の患者 (患者 7、 $40 \text{ mg} / \text{m}^2$ 用量レベル) は、置換期間中に (細針穿刺吸引で転移性 SCC であると証明された) 触知可能な耳リンパ節の一過性修飾の臨床徴候を有した。このことは、 $\text{ch}806$ の潜在的生物活性を示唆している。しかし、この患者は、試験完了時に RECIST により進行性疾患が確認された。

20

【 0 6 4 4 】

追加データ

8 人の患者 [女性 1 人および男性 7 人 ; 61 歳の平均年齢 (範囲 44 - 75 歳)] が、報告 (S c o t t e t a l . (2 0 0 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 1 0 4 , 4 0 7 1 - 4 0 7 6) どおり、この第一相試験を完了した。すべての患者が組み入れ基準を満たしており、患者 8 (原発性脳腫瘍を有した者) を除くすべてが試験登録時に転移性疾患を有した。腫瘍による Ab 取込がすべての患者において見られ、 $^{111}\text{In} - \text{ch}806$ 、 $\text{mAb}806$ のキメラ化バージョンは、腫瘍における迅速で高レベルの取り込みを明示した (図 7 1)。正常器官 (肝臓、肺、腎臓および脾臓) からの $^{111}\text{In} - \text{ch}806$ のクリアランスは、用量間での差を示さなかった (S c o t t e t a l . , 2 0 0 7)。特に、肝臓クリアランスは用量間での差を示さなかった。このことは、肝臓には $\text{ch}806$ についての飽和性抗原コンパートメントがないことを示している。全肝臓取り込みは、注入直後、 $14.45 \pm 2.43 \% \text{ ID}$ の最大値であり、72 時間までに $8.45 \pm 1.63 \% \text{ ID}$ に、および注入後一週間までに $3.18 \pm 0.87 \% \text{ ID}$ に下降した。このことは、注入後 3 日にわたって肝臓において (40 mg 用量について) $30 \% \text{ ID}$ より上に達することを示した、 wtEGFR (例えば、225) への抗体の取り込み (D i v g i e t a l . (1 9 9 1) J . N a t l . C a n c e r I n s t . 8 3 , 9 7 - 1 0 4) と著しく対照的である。 $^{111}\text{In} - \text{ch}806$ の測定ピーク腫瘍は、注入後 5 - 7 日に発生した。患者 1 および 3 における定量的腫瘍取り込み量計算は、心臓血プールへのターゲット病変の近接および患者の動きのため、正確に行うことができなかった。腫瘍におけるピーク $\text{ch}806$ 取込は、 5.21 から $13.73 \times 10^{-3} \% \text{ ID} / \text{gm}$ 腫瘍組織であった。腫瘍における実際の $\text{ch}806$ 濃度の計算は、(平均 $\pm \text{SD}$) $0.85 \pm 0.85 \mu \text{g} / \text{gm}$ ($5 \text{ mg} / \text{m}^2$)、 $0.92 \pm 0.92 \mu \text{g} / \text{gm}$ ($10 \text{ mg} / \text{m}^2$)、 $3.80 \pm 1.10 \mu \text{g} / \text{gm}$ ($20 \text{ mg} / \text{m}^2$)、および $7.05 \pm 1.40 \mu \text{g} / \text{gm}$ ($40 \text{ mg} / \text{m}^2$) のピーク値を示した。

30

40

【 0 6 4 5 】

考察

50

本実施例において示すような、本試験は、過発現形態、突然変異体形態またはリガンド活性化形態のEGFR上の露出されたエピトープのみに対するキメラ抗体の生体内分布および腫瘍ターゲティングの最初に報告される証明に相当する。ch806は、すべての患者において腫瘍部位の卓越したターゲティングを示し、正常組織取り込みの形跡を示さず、および有意な毒性を示さなかった。ch806のこれらのインビトロおよびインビボ特性が、EGFRをターゲットにする他のすべての抗体とこれを区別する。

【0646】

40 mg / m²以下の用量で、ch806は、十分認容性であり、DLTは観察されず、MTDに達しなかった。ch806にことによると起因する原則毒性は、一過性そう痒症、軽度悪心、疲労／嗜眠、ならびに血清ALPおよびGGTレベルに対して起こり得る影響であった。これらの患者の悪性病変の進行性は、彼らの疾患がこれらの有害事象への寄与因子である場合もあったことを意味した。ことによると試験薬に関連していた有害事象は、すべて軽度であり、多くが自己限定的であり、およびいずれの動的治療も必要とされなかった。重要なことに、最高用量レベルでさえ、いずれの患者においても皮膚発赤および胃腸管障害が観察されなかった。この単回投与試験におけるch806の卓越した認容性が、反復投与試験での次の試験段階を正当化した。

10

【0647】

すべての患者におけるch806の生体内分布は、血液プール活性の漸進的クリアランスを示し、¹¹¹In-ch806の確定的な正常組織取り込みを示さなかった。すべての患者において、ch806の卓越した腫瘍取り込みも、肺、リンパ節および副腎転移を含めて、ならびに中皮腫および神経膠腫において、顕性であった。この取り込みは、wtEGFRに対する他の抗体による腫瘍への取り込みを可視化するために必要な用量の十分の一から二十分の一である5 mg / m²（試験した最低用量）³³を含めてすべての用量レベルで観察された。wtEGFRに対する抗体と比較したch806の取り込みのこの差は、抗原シンクとしてのwtEGFR作用によるこれらの実質的正常組織（肝臓および皮膚）取り込みに起因し得る³³。加えて、保存腫瘍サンプルの免疫組織化学により評定して806の発現が低い患者においてでさえ、¹¹¹In-ch806の局在は高度であった（図96）。神経膠腫における¹¹¹In-ch806の取り込みは、特に印象的であり（図97）、ならびに全身注入後、または局所領域的注入後でさえ、脳腫瘍の抗体ターゲティングに関するいずれの発表データに匹敵しなかった。このデータは、広範な腫瘍により発現されるEGFRに対するch806の特有の選択性の裏付けとなり、ならびにヒトにおけるこの抗体の正常組織取り込み欠如を確認する。

20

30

【0648】

薬物動態分析により、ch806が、一週間より長い消失相半減期を有する、および¹¹¹In-ch806の用量依存性を有さないことが明らかになった。AUC、C_{max}およびC_{min}についての比例関係も観察され、10 mg / m²より上の用量レベルで約1 μg / mLより上のトラフ血清濃度が達成された。V₁、C₁、T₁ / 2_αおよびT₁ / 2_β値は、用量レベル間で一致しており、典型的なIgG1ヒト抗体（Scott et al., 2005; Steffens et al. (1997) J. Clin. Oncol. 15, 1529 - 1537; Scott et al. (2001) J. Clin. Oncol. 19 (19), 3976 - 3987）と合っていた。ch806のクリアランスが、ELISA ch806計算値を¹¹¹In-ch806測定値と比較したとき、低いことも判定した。この差は、試験した少ない患者数によって説明できるが、ch806 ELISAについてのより長いサンプルリング時点は、この値を真のch806クリアランスをより象徴するものとして支持する。ch806についての薬物動態値は、今日まで報告されている他のキメラ抗体に匹敵し（Steffens et al., 1997; Scott et al., 2001）、ch806の週1回投与計画を支持する。

40

【0649】

定量的線量計測および薬物動態結果は、この置換において評定した用量レベルについて

50

ch806の飽和性正常組織コンパートメントがないことを示す。重要なことに、薬物動態ならびに全血および肝臓器官クリアランスの用量依存性欠如は、wtEGFRに対する抗体について報告されているすべての研究(Baselga J. and Artega C. L. (2005) J. Clin. Oncol. 23, 2445 - 2449; Divgi et al. J. Natl. Cancer Inst. 83(2), 97 - 104; Baselga J (2001) Eur. J. Cancer 37 Suppl. 4, S16 - 22; Gibson et al. (2006) Clin. Colorectal Cancer 6(1), 29 - 31; Rowinsky et al. (2004) J. Clin. Oncol. 22, 3003 - 3015; Tan et al. (2006) Clin. Cancer Res. 12(21), 6517 - 6522)と著しく対照的であり、ヒトにおけるch806の腫瘍特異性および正常組織結合欠如を支持する。これらの観察は、腫瘍において選択的にEGFRをターゲットにし、他のEGFR抗体およびキナーゼ阻害剤の通常の毒性(特に皮膚)(Lacouture AE (2006) Nature Rev. Cancer 6, 803 - 812; Adams G. P. and Weiner L. M. (2005) Nat. Biotechnol. 23(9), 1147 - 1157)を回避する、およびより大きな治療効果をことによると達成する、ch806(またはヒト化形態)についての可能性の説得力のある証拠となる。さらに、ペイロールデリバリー(腫瘍細胞におけるmAb806の急速な内在化のため)の、ならびに複合毒性を最小にする可能性が高い他の生物製剤、例えばEGFR抗体およびチロシンキナーゼ阻害剤との併用治療の可能性が本試験からのデータによって強く裏付けられる。本試験は、腫瘍に特異的であるEGFR上のエピトープをターゲットにすることができることの明確な証拠を提供するものであり、癌療法へのこのユニークなアプローチのさらなる臨床開発が進行中である。

10

20

【実施例26】**【0650】**

配列比較

mAb806、mAb175、mAb124、mAb1133、およびhu806のそれぞれについてのVH鎖およびVL鎖CDRをここで示し、比較する。

【0651】

【表 2 1】

表13

マウス抗体アイソタイプ¹ およびCDR配列比較(Kabat)¹

A. 可変軽鎖

	CDR1	CDR2	CDR3
806 (IgG2b)	HSSQDINSNIG (配列 番号 NO: 18)	HGTNLDD (配列番号 NO: 19)	VOYAQFPWT (配列番 号 NO: 20)
124 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (配列 番号 NO: 28)	HGTNLDD (配列番号 NO: 29)	VOYGQFPWT (配列番 号 NO: 30)
175 (IgG2a)	HSSQDISSNIG (配列 番号 NO: 135)	HGTNLED (配列番号 NO: 136)	VOYGQFPWT (配列番 号 NO: 137)
1133 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (配列 番号 NO: 38)	HGTNLDD (配列番号 NO: 39)	VOYGQFPWT (配列番 号 NO: 40)

10

B. 可変重鎖

	CDR1	CDR2	CDR3
806 (IgG2b)	SDFAWN (配列番号 NO: 15)	YISYSGNTRYNPSLKS (配列番号 NO: 16)	VTAGRGFPY (配列番 号 NO : 17)
124 (IgG2a)	SDYAWN (配列番号 NO: 23)	YISYSANTRYNPSLKS (配列番号 NO: 24)	ATAGRGFPY (配列 番号 NO : 25)
175 (IgG2a)	SDYAWN (配列番号 NO: 130)	YISYSANTRYNPSLKS (配列番号 NO: 131)	ATAGRGFPY (配列 番号 NO : 132)
1133 (IgG2a)	SDYAWN (配列番号 NO: 33)	YISYSANTRYNPSLKS (配列番号 NO: 34)	ATAGRGFPY (配列 番号 NO : 35)

20

¹mAb806 CDR 配列との相違に下線を引く

【0652】

それぞれの抗体アイソタイプについて上に与えたCDRは、Kabat分析に基づく。当業者には明らかであるように、CDRを他の分析、例えば、Kabat定義とChothia定義の複合に基づいて定義することもできる。例えば、複合KabatおよびChothia分析を上アイソタイプに適用すると、それぞれのアイソタイプについてのV_L鎖 CDRおよびV_H鎖の配列は、表14に示すとおりである。

30

【0653】

【表 2 2】

表14

マウス抗体アイソタイプ およびCDR配列比較(複合KabatおよびChothia)¹

A. 可変軽鎖

	CDR1	CDR2	CDR3
806 (IgG2b)	HSSQDINSNIG(配列番号 NO: 18) ²	HGTNLDD(配列番号 NO: 139) ²	VQYAQFPWT(配列番号 NO:20) ²
124 (IgG2a)	HSSQDINSNIG(配列番号 NO: 28)	HGTNLDD(配列番号 NO: 140)	VOYGQFPWT(配列番号 NO:30)
175 (IgG2a)	HSSQDISSNIG(配列番号 NO: 135)	HGTNLDD(配列番号 NO: 141)	VOYGQFPWT(配列番号 NO:137)
1133 (IgG2a)	HSSQDINSNIG(配列番号 NO: 38)	HGTNLDD(配列番号 NO: 142)	VQYGQFPWT(配列番号 NO:40)

10

B. 可変重鎖

	CDR1	CDR2	CDR3
175 (IgG2a)	GYSITSDFAWN(配列番号 NO: 143) ³	GYISYSGNTRYNP S LKS(配列番号 NO : 144) ³	VTAGRGFPY(配列番号 NO :17)
1133 (IgG2a)	GYSITSDYAWN(配列番号 NO : 145)	GYISYSANTRYNP S LKS(配列番号 NO : 146)	ATAGRGFPY(配列番号 NO :25)
806 (IgG2b)	GYSITSDYAWN(配列番号 NO : 147)	GYISYSANTRYNP S LKS(配列番号 NO : 148)	ATAGRGFPY(配列番号 NO :132)
175 (IgG2a)	GYSITSDYAWN(配列番号 NO : 149)	GYISYSANTRYNP S LKS(配列番号 NO : 150)	ATAGRGFPY(配列番号 NO :35)

20

¹mAb806 CDR配列との相違に下線を引く²米国特許同時係属出願第10/145, 598号(米国特許第7, 589, 180号)の図17参照³米国特許同時係属出願第 10/145, 598 号(米国特許第 7, 589, 180 号)の図 16 参照

【0 6 5 4】

【表 2 3】

30

表15 mAb806 および hu806 CDR 配列比較(Kabat)¹

A. 可変軽鎖

	CDR1	CDR2	CDR3
mAb 806	HSSQDINSNIG(配列番号 NO : 18)	HGTNLDD(配列番号 NO : 19)	VQYAQFPWT(配列番号 NO : 20)
hu 806	HSSQDINSNIG(配列番号 NO : 49)	HGTNLDD(配列番号 NO : 50)	VQYAQFPWT(配列番号 NO : 51)

B. 可変重鎖

	CDR1	CDR2	CDR3
mAb 806	SDFAWN(配列番号 NO : 15)	YISYSGNTRYNP S LKS(配列番号 NO : 16)	VTAGRGFPY(配列番号 NO : 17)
hu 806	SDFAWN(配列番号 NO : 44)	YISYSGNTRON P SLKS(配列番号 NO : 45)	VTAGRGFPY(配列番号 NO : 46)

40

【0 6 5 5】

上に示したように、mAb 806、mAb 175、mAb 124 および mAb 1133 アイソタイプの CDR 配列は、エピトープ認識のために相同的タンパク質フォールディング

50

グを生じさせることが予想される高保存的アミノ酸変更を除き、同一である。上の実施例において提供した結合および他のデータに累加して、このデータは、これらのアイソタイプおよび h u 8 0 6 が、m A b 8 0 6 について上で論じたのと同じ特有の特性（過発現、突然変異またはリガンド活性化形態の E G F R の場合にのみ結合に利用できる E G F R 上のエピトープへの結合）を呈示する、ならびに異なる可変領域配列の、特に、様々な C D R 配列の、抗体が同じ特性および結合能力を有することを実証する、近縁ファミリーメンバー変異体であることを示す。

【 0 6 5 6 】

【表 2 4】

参考文献

Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Bellot, F., Schlessinger, J., and Sela, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86,3778-3781.

Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Pirak, M. E., Bellot, F., Schlessinger, J., and Sela, M. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1605-1611.

Arteaga, C. I. and Baselga, J. (2004) *Cancer Cell*. 5, 525-531.

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.

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 a." *Cancer Res.*, 52 : 3335-3339, 1992.

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.

Baselga, J. (2006) *Science*. 312, 1175-1178.

Baselga, J. and Arteaga, C. L. (2005) *J. Clin. Oncol.* 23,2445-2459.

Baselga, J. Clinical trials of Herceptin (R) (trastuzumab). *Eur. J. Cancer*, 37 : 1824,2001.

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

10

20

30

against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts.” *Cancer Res.*, 58: 2825-2831, 1998.

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.

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. 10

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-pl85HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer.” *J. Clin. Oncol.*, 14 : 737-744, 1996.

Batra SK, Castellino-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. 20

Bernier, J. (2006) *Expert. Rev Anticancer Ther.* 6, 1539-1552.

Bhattacharya-Chatterjee, M., S. K. Chatterjee, et al. (2001). "The anti-idiotypic vaccines for immunotherapy." *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3(1) : 63-9. *Biol. Cell.* 13,4029-4044.

Bouyain, S., Longo, P. A., Li, S., Ferguson, K. M., and Leahy, D. J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 15024-15029.

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 I trial.” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22 : 225-230, 1992. 30

Brown, G. and N. Ling (1988). *Murine Monoclonal Antibodies. Antibodies, Volume 1. A Practical Approach.* D. Catty. Oxford, England, IRL Press: 81-104.

Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. x., Ward, C. W., and Yokoyama, S. (2003) *Mol. Cell.* 12,541-552.

Chao, G., Cochran, I. R., and Wittrup, K. D. (2004) *J. Mol. Biol.* 342,539-550. 40

Cho, H. S. and Leahy, D. J. (2002) *Science* 297, 1330-1333.

Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. x., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., DelUley, D. W., Jr., and Leahy, D. J. (2003) *Nature* 421, 756-760.

Clarke, K., et al., ”*In vivo* biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice.” *Cancer Res*, 2000. 60(17): p. 4804-11.

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 3S 193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with Taxol chemotherapy." *Clin. Cancer Res.*, 6 : 3621-3628, 2000.

Clayton, A. H., Walker, F., Orchard, S. G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 30392-30399.

Daugherty BL, DeMartino JA, Law MF, Kawka DW, Singer II, Mark GE. "Polymerase chain reaction facilitates the cloning, CDR-grafting, and rapid expression of a murine monoclonal antibody directed against the CD18 component of leukocyte integrins." *Nucleic Acids Res.* 1991 19(9):2471-6.

10

de Larco, J. E. and Todaro, G. J. (1978) *J. Cell. Physiol.* 94, 335-342.

de Larco, J. E., Reynolds, R., Carlberg, K., Engle, C., and Todaro, G. J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255,3685-3690.

den Eynde, B. and Scott, A. M. Tumor Antigens. In : P. J. Delves and I. M. Roitt (eds.), *Encyclopedia of Immunology*, Second Edition, pp. 2424 31. London: Academic Press, 1998.

20

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

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 11-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma." *J. Natl. Cancer Inst.*, 83 : 97-104,1991.

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.

30

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.

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.

40

Ekstrand, A. J., James, C. D., Cavenee, W. K., Seliger, B., Pettersson, R. F., and Collins, V. P. (1991) *Cancer Res.* 51,2164-2172.

Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) *Acta crystallographica* 60, 2126-2132.

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.

Fairlie, W. D., Uboldi, A. D., De Souza, D. P., Hemmings, G. I., Nicola, N. A., and Baca, M. (2002) *Protein expression and purification* 26, 171-178.

Fan, Z., and Mendelsohn, J. "Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies." *Curr. Opin. Oncol.*, 10 : 67-73, 1998.

Fan, Z., Baselga, J., Masui, H., and Mendelsohn, J. "Antitumor effect of antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts." *Cancer Res.*, 53 : 4637-4642, 1993.

10

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.

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

20

Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003) *Mol. Cell* 11, 507-517.

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/deEGFR) expressed in cancer cells." *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 5375-83.

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.

30

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.

Gadella, T. W. J. and Jovin, T. M. (1995) *Journal of Cell Biology* 129,1543-1558.

Gan H.K., Walker F., Burgess A.W., Rigopoulos A., Scott A.M. and Johns T.G. "The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitor AG1478 Increases the Formation of Inactive Untethered EGFR Dimers: Implications For Combination Therapy With Monoclonal Antibody 806." *J. Biol. Chem.* (2007);282(5):2840-50.

40

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 along carcinomas." *Cancer Res.*, 53: 3217-3220, 1993.

Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2002) *Cell*, 110, 763-773.

Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2003) *Mol. Cell*. 11, 495-505.

Gill, G. N., Kawamoto, T., Cochet, C., Le, A., Sato, J. D., Masui, H., McLeod, C., and Mendelsohn, J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 7755-7760.

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.

10

Grandis, J. R., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., and Twardy, D. J. "Levels of TGF- α and BOFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival." *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 32CE, 1998.

Green, M. C., Murray, J. L., and Hortobagyi, G. N. "Monoclonal antibody therapy for solid tumors." *Cancer Treat. Rev.*, 26 : 269-286, 2000.

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.

20

Halaisch, M. E., Schmidt, U., Botefur, I. C., Holland, J. P., 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.

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

30

Harari, D., and Yarden, Y. "Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer." *Oncogene*, 19 : 6102-6114, 2000.

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.

Hogg, P. J. (2003) *Trends in biochemical sciences* 28, 210-214.

Holbro, T. and Hynes, N. E. (2004) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:195-217., 195-217.

Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996) *Nature* 381, 272.

40

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.

Humphrey, P. A., Wong, A. I., 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" (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4207-4211.

Johns TG, Perera RM, Vernes SC, Vitali AA, Cao DX, Cavenee WK, Scott AM and Furnari FB. "The efficacy of EGFR-specific antibodies against glioma xenografts is influenced by receptor levels, activation status and heterodimerization." *Clin. Cancer Res.* (2007);13(6): 1911-1925.

Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, H-J. Su Huang, Cavenee WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, Gullick WJ, Old LJ, Burgess AW, Scott AM. "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." *Int. J. Cancer* (2002) 98: 398-408

10

Johns, T.G., Adams, T.E., Cochran, J.R., Hall, N.E., Hoyne, P.A., Olsen, M.J., Kim, Y.S., Rothacker, J., Nice, E.C., Walker, F., Ritter, G., Jungbluth, A.A., Old, L.J., Ward, C.W., Burgess, A.W., Wittrup, K.D., and Scott, A.M. "Identification of the Epitope for the EGFR-Specific Monoclonal Antibody 806 Reveals that it Preferentially Recognizes an Untethered Form of the Receptor." *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 30375-30384

20

Johns, T.G., et al., "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." *Int. J. Cancer*, 2002. 98(3): p. 398-408.

Johns, T.G., Luwor, R.B., Murone, C., Walker, F., Weinstock, J., Vitali, A.A., Perera, R.M., Old, L.J., Nice, E.C., Burgess, A.W. and Scott, A.M. "Anti-tumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor AG1478." *PNAS* (2003) 100: 15871-15876

Johns, T.G., Mellman I., Cartwright G.A., Ritter G., Old L.J., Burgess A. W. and Scott A.M. "The anti-tumor monoclonal antibody 806 recognizes a high-mannose form of the EGF receptor that reaches the cell surface when cells over-express the receptor." *FASEB J.* (2005) 19(7):780-2.

30

Jorissen, R. N., Walker, F. W., Pouliot, N., Garrett, T. P. J., Ward, C. W., and Burgess, A. W. "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling." *Exp. Cell Res.* 284,31-53.2003.

Jungbluth, A.A., Stockert, E., Huang, H-J.S., Collins, VP, Coplan, K., Iversen, K., Kolb, D., Johns T.G., Scott A..M., Gullick W.J., Ritter, G., Cohen L., Cavane W.K., Old, L.J. A "Monoclonal Antibody Recognizing Human Cancers with Amplification/Over- Expression of the Human Epidermal Growth Factor Receptor." *PNAS* (2003) 100: 639- 644.

40

Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R., and Pronin, I. "Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 163 cases." *J. Clin. Pathol.*, 52,-574-580, 1999.

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.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.

Lee F.T., Mountain A.J., O'Keefe G.J., Sagona J., Rigopoulos A., Smyth F.E., Govindan S.V., Goldenberg D.M., Old L.J. and Scott A.M. "ImmunoPET detection of xenografts expressing de2-7 EGFR using Iodine-124 labelled ch806 via residualising ligand IMPR4." *J. Nucl. Med.* (2006) 47 (5) suppl 1: 429P.

Li D., Ji H., Zaghlul S., McNamara K., Liang M.C., Shimamura T., Kubo S., Takahashi M., Chiriac L.R., Padera R.F., Scott A.M., Jungbluth, A.A., Cavenee W.K., Old L.J., Demetri G.D., Wong KK. "Therapeutic anti-EGFR antibody 806 generates responses in murine de novo EGFR mutant-dependent lung carcinomas." *J. Clin. Invest.* (2007); 117(2): 346-352. 10

Lindmo, T., 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(1): p. 77-89.

Liu, Z., Panousis, C., Smyth, F.E., Murphy, R., Wirth, V., Cartwright, G., Johns, T.G., and Scott, A.M. "Generation of Anti-Idiotypic Antibodies for Application in Clinical Immunotherapy Laboratory Analyses." *Hybridoma and Hybridomics*, (2003) 22 (4): 219- 228. 20

Luwor RB, Johns TG, Murone C, H-J. Su Huang, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM. "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 Research* (2001) 61: 5355-5361.

Luwor, R.B., Zhu, H-J., Walker, F., Vitali A.A., Perera, R.M., Burgess, A.W., Scott, A.M. and Johns, T.G. "The Tumor Specific de2-7 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) confers Increased survival in BaF/3 Cells Via a PI-3 Kinase Dependent Mechanism." *Oncogene* (2004) 23: 6095-6104

MacDonald, A., Chisholm, G. D., and Habib, F. K. (1990) *Br. J Cancer.* 62,579-584. 30

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.

Mellinghoff, I. K., Cloughesy, T. F., and Mischel, P. S. (2007) *Clin. Cancer Res.* 13,378-381.

Mendelsohn, J. "Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.*" 3:2703-2707,1997.

Mickey, D. D., Stone, K. R., Wunderli, H., Mickey, G. H., Vollmer, R. T., and Paulson, D. F. (1977) *Cancer Res.* 37,4049-4058. 40

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

Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, Ji X, Suvarna P, Volland JR, Old LJ, H-J. Su Huang, Cavenee WK. "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.” *Cancer Research* (2001) 61: 5349–5354.

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.

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. 10

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.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta crystallographica* 53, 240-255.

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. 20

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.

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.

Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., and Smith, D. F. (1974) *Journal of bacteriology* 119, 736-747. 30

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.

Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, I. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002) *Cell* 110, 775-787.

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. 40

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.

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

Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) "Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode." *Academic Press* (New York).

Padlan EA. "A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties." *Mol. Immunol.* 1991 28(4-5):489-98.

Padlan et al., EP 519596, Merck/NIH

Palacios, R, Henson, G., Steinmetz, M., and McKeam, J. P. (1984) *Nature.* 309, 126-131.

Panousis, C., Rayzman, V.M., Johns, T.G., Renner C., Liu Z., Cartwright, G., Lee F-T., Wang, D., Gan, H., Cao, D., Kypridis, A., Smyth, F.E., Brechbiel, M.W., Burgess, A.W., Old, L.J. and Scott, A.M. "Engineering and characterization of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR." *Br. J. Cancer* (2005) 92:1069-1077.

10

PCT Patent WO02092771, 2002.

Perera R.M., Narita Y., Furnari, F.B., Luwor, R.B., Burgess, A.W., Old, L.J., Cavenee, W.K., Scott, A.M. and Johns, T.G. "A novel EGFR antibody that displays synergistic anti-tumor activity when combined with conventional EGFR therapeutics." *Clinical Cancer Research* (2005) 11: 6390-6399.

20

Perera R.M., Zoncu R., Johns T.G., Pypaert M., Lee F.T., Mellman I., Old L.J., Toomre D.K., and Scott A.M. "Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor receptor antibody." *Neoplasia.* (2007); 9(12):1099-110

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

Pietras, R. J., Pegam, M. D-, Finn, R-S., Maneval, D. A., and Slmon, 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.

Ponten J, Macintyre EH. "Long term culture of normal and neoplastic human glia." *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1968 ; 74: 465-86.

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.

40

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.

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.

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.

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 : 63947, 1997.

10

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.

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.

20

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.

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.

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.

30

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.

Schlessinger, J. (2002) *Cell* 20; 110,669-672.

Scott A.M., Gill S. S., Lee F., Liu Z., Skrinos E., Murone C., Saunder T., Chappell B., Papenfuss A., Old L.J. “A Phase I single dose escalation trial of ch806 in patients with advanced tumors expressing the 806 antigen.” *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol. 24, No. 18S (June 20 Supplement), (2006): 13028.

40

Scott A.M., Lee FT., Tebbutt N., Herbertson R., Gill S.S., Liu Z., Skrinos E., Murone C., Saunder T.H., Chappell B., Papenfuss A.T., Poon A.M.T., Hopkins W., Smyth F.E., MacGregor D., Cher L.M., Jungbluth A.A., Ritter, G., Brechbiel M.W., Murphy R., Burgess AW, Hoffman E.W., Johns T.J., Old L.J. “A Phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2007) 104 (10): 4071-6. Epub 2007 February 28.

Scott, A. M., and Welt, S. Antibody-based immunological therapy. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 717-722, 1997.

Seymour L. "Novel anti-cancer agents in development : exciting prospects and new challenges." *Cancer Treat. Rev.* 1999; 25: 301-12.

Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1991) *Mol. Cell Bio.* 11,4005-4014.

Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1992) *Mol. Biol. Cell* 3, 1235-1243.

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.

10

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.

Sok, J. c., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. 1., Freilino, M. 1., Graner, M. W., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., Gooding, W. E., Furnari, F. B., and Grandis, J. R. (2006) *Clin. Cancer Res.* 12,5064-5073.

20

Stamos, J., Sliwkowski, M. X., and Eigenbrot, C. (2002) *J. Biol.. Chem.* 277,46265-46272.

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.

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.

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

30

Teramoto, T., Onda, M., Tokunaga, A., and Asano, G. "Inhibitory effect of antiepidermal growth factor receptor antibody on a human gastric cancer." *Cancer* (Phila.), 77 : 1639-1645, 1996.

Todaro, G. J., Delarco, J. E., and Cohen, S. (1976) *Nature* 264, 26-31.

Trail, P. A., and Bianchi, A. B. "Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer." *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 584-588, 1999.

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.

40

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., and. (1984) *Nature.* 309,418-425.

Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) *J. Appl. Cryst.* 30, 1022-1025.

van de Loosdrecht, A. A., Beelen, R. H., Ossenkoppele, G. J., Broekhoven, M. G., and Langenhuijsen, M. M. (1994) *J. Immunol. Methods*. 174,311-320.

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.

Wade, J. D., Hojo, K., Kawasaki, K., Johns, T. G., Catimel, B., Rothacker, J., and Nice, E. C. (2006) *Anal. Biochem.* 348, 315-317.

Waksal, H. W. "Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer." *Cancer Metastasis Rev.*, 18 : 427-436, 1999.

10

Walker, F., Orchard, S. G., Jorissen, R. N., Hall, N. E., Zhang, H. H., Hoyne, P. A., Adams, T. E., Johns, T. G., Ward, C., Garrett, T. P., Zhu, H. I., Nerrie, M., Scott, A. M., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2004) *J. Biol. Chem.* 79, 22387-22398.

Weiner, L. M. "An overview of monoclonal antibody therapy of cancer." *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12) : 41-50,1999.

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.

20

Whitson K.B., Red M.L., Whitson S.R., McCoy A., Vitali A.A., Walker F., Johns T.G., Beth A.H. and Staros J.A. "Functional Effects of Selective Glycosylation at Asn-579 of the Epidermal Growth Factor Receptor." *Biochemistry* (2005) 44: 14920-14931

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.

30

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.

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.

Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bier, 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.

40

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.

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.

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.

Yarden, Y. and Schlessinger, J. (1987) *Biochemistry.* 26, 1443-1451.

10

Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127-137.

Yen, L., Benlimame, N., Nie, Z. R., Xiao, D., Wang, T., Al Moustafa, A. E., Esumi, H., Milanini, J., Hynes, N. E., Pages, G., and Alaoui-Jamali, M. A. (2002) *Mol. Biol. Cell.* 13(11):4029-44.

Ymer, S., Tucker, W. Q., Sanderson, C. 1., Hapel, A. J., Campbell, H. D., and Young, 1. G. (1985) *Nature.* 19-25;317,255-258.

Zhang, x., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., and Kuriyan, J. (2006) *Cell.* 125, 1137-1149.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, & Yokoyama S (2003) *Mol. Cell.* 12:541-552.

20

Ferguson KM (2008) *Annu. Rev. Biophys.* 37, 353-373.

Mendelsohn J & Baselga J (2006) *Semin. Oncol.* 33, 369-385.

Herbst RS, Kim ES, & Harari PM (2001) *Expert Opin. Biol. Ther.* 1, 719-732.

Lynch DH & Yang XD (2002) *Semin. Oncol.* 29, 47-50.

Baselga J & Artcaga CL (2005) *J. Clin. Oncol.* 23, 2445-2459.

30

Burgess AW (2008) *Growth Factors* 26, 263-274.

Milano G, Spano JP, & Leyland-Jones B (2008) *Br. J. Cancer* 99, 1-5.

Solomon BM & Jatoi A (2008) *Curr. Oncol. Rep.* 10, 304-308.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavennee WK, & Huang HJ (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 7727-7731.

Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, & Bigner DD (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4207-4211.

40

Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, Huang HJ, Cavennee WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, et al. (2002) *Int. J. Cancer.* 98, 398-408.

Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TJ, Scott AM, Gullick WJ, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 639-644.

Scott AM, Lee FT, Tebbutt N, Herbertson R, Gill SS, Liu Z, Skrinos E, Murone C, Saunderson TH, Chappell B, et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 4071-4076.

Johns TG, Luwor RB, Murone C, Walker F, Weinstock J, Vitali AA, Perera RM, Jungbluth AA, Stockert E, Old LJ, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15871-15876.

Perera RM, Narita Y, Furnari FB, Gan HK, Murone C, Ahlqvist M, Luwor RB, Burgess AW, Stockert E, Jungbluth AA, et al. (2005) *Clin. Cancer. Res.* 11, 6390-6399.

Johns TG, Adams TE, Cochran JR, Hall NE, Hoyne PA, Olsen MJ, Kim YS, Rothacker J, Nice EC, Walker F, et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 30375-30384.

10

Walker F, Orchard SG, Jorissen RN, Hall NE, Zhang HH, Hoyne PA, Adams TE, Johns TG, Ward C, Garrett TP, et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 22387-22398.

Sivasubramanian A, Chao G, Pressler HM, Wittrup KD, & Gray JJ (2006) *Structure* 14, 401-414.

Luwor RB, Johns TG, Murone C, Huang HJ, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, & Scott AM (2001) *Cancer Res.* 61, 5355-5361.

Ching KZ, Ramsey E, Pettigrew N, D'Cunha R, Jason M, & Dodd JG (1993) *Mol. Cell Biochem.* 126, 151-158.

20

Sizeland AM & Burgess AW (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 4005-4014.

Chao G, Cochran JR, & Wittrup KD (2004) *J. Mol Biol.* 342, 539-550.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, et al. (2002) *Cell* 110, 763-773.

Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, & Ferguson KM (2005) *Cancer Cell.* 7, 301-311.

30

Hogg PJ (2003) *Trends Biochem. Sci.* 28, 210-214.

Li S, Kussie P, & Ferguson KM (2008) *Structure* 16, 216-227.

Schmiedel J, Blaukat A, Li S, Knochel T, & Ferguson KM (2008) *Cancer Cell* 13, 365-373.

Sandler AB (2006) *Oncology (Williston Park)* 20, 35-40.

Sampson JH, Crotty LE, Lee S, Archer GE, Ashley DM, Wikstrand CJ, Hale LP, Small C, Dranoff G, Friedman AH, et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7503-7508.

40

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, & Schlessinger J (1984) *Nature.* 309, 418-425.

Walker F, Hibbs ML, Zhang HH, Gonez LJ, & Burgess AW (1998) *Growth Factors* 16, 53-67.

Wade JD, Hojo K, Kawasaki K, Johns TG, Catimel B, Rothacker J, & Nice EC (2006) *Anal. Biochem.* 348, 315-317.

Vagin AA & Isupov MN (2001) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57, 1451-1456.

Murshudov GN, Vagin AA, & Dodson EJ (1997) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 53, 240-255.

Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, & Lemmon MA (2003) *Mol. Cell* 11, 507-517.

Rettig WJ, Old LJ (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:481-511.

Van den Eynde BJ, Scott AM (1998) in *Encyclopedia of Immunology*, eds Roitt DPJ, Roitt IM (Academic Press: London), pp 2424-2431.

10

Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, et al. (1997) *Blood* 90(6):2188-2195.

Baselga J, Arteaga CL (2005) *J. Clin. Oncol.* 23:2445-2449.

Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS (1997) *Ann. Oncol.* 8(12): 1197-1206.

Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, et al. (1996) *J. Clin. Oncol.* 14:737-744.

20

Welt S, Divgi CR, Real FX, Yeh SD, Garin-Chesa P, Finstad CL, Sakamoto J, Cohen A, Sigurdson ER, Kemeny N, et al. (1990) *J. Clin. Oncol.* 8(11):1894-906.

Scott AM, Lee FT, Jones R, Hopkins W, MacGregor D, Cebon J, Hannah A, U P, Rigopolous A, Sturrock S, et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11(13):4810-4817.

Steffens MG, Boerman OC, Oosterwijk-Wakka JC, Oosterhof GO, Witjes JA, Koenders EB, Oyen WJ, Buijs WC, Debruyne FM, Corstens FH, et al. (1997) *J. Clin. Oncol.* 15:1529-1537.

30

Scott AM, Geleick D, Rubira M, Clarke K, Nice EC, Smyth FE, Stockert E, Richards EC, Carr FJ, Harris WJ, et al. (2000) *Cancer Res* 60:3254-3261.

Scott AM, Lee F-T, Hopkins W, Cebon JS, Wheatley JM, Liu Z, Smyth FE, Murone C, Sturrock S, MacGregor D, et al. (2001) *J. Clin. Oncol.* 19(19):3976-3987.

Welt S, Divgi CR, Scott AM, Garin-Chesa P, Finn RD, Graham M, Carswell EA, Cohen A, Larson SM, Old LJ (1994) *J. Clin. Oncol.* 12:1193-1203.

Scott AM, Wiseman G, Welt S, Adjei A, Lee FT, Hopkins W, Divgi CR, Hanson LH, Mitchell P, Gansen DN, et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1639-47.

40

Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 87(21):8602-8606.

Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(19):6899-6903.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(16):7727-7731.

Hills D, Rowlinson-Busza D, Gullick WJ (1995) *Int. J. Cancer* 63(4):537-543.

Sridhar SS, Seymour L, Shepherd FA (2003) *Lancet Oncol.* 4(7):397-406.

Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J (1995) *Clin. Cancer Res.* 1(11):1311-1318.

10

Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, Bigner DD (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(11):4207-4211.

Baselga J, Pfister D, Cooper MR, Cohen R, Burtneess B, Bos M, D'Andrea G, Seidman A, Norton L, Gunnett K, et al. (2000) *J. Clin. Oncol.* 18(4):904-914.

Graeven U, Kremer B, Sudhoff T, Kiling B, Rojo F, Weber D, Tillner J, Unal C, Schmiegel W (2006) *Br. J. Cancer* 94(9):1293-1299.

Ramos TC, Figueredo J, Catala M, Gonzales S, Selva JC, Cruz TM, Toldeo C, Silva S, Pestano Y, Ramos M, et al. (2006) *Cancer Biol. Ther.* 5(4):375-379.

20

Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, Huang HJ, Cavenee WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, et al. (2002) *Int. J. Cancer* 98(3):398-408.

Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TG, Scott AM, Gullick WJ, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(2): 639-644.

Johns TG, Adams TE, Wittrup KD, Hall NE, Hoyne PA, Cochran JR, Olsen MJ, Kim YS, Rothacker J, Nice EC, et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279(29):30375-30384.

Johns TG, Mellman I, Cartwright GA, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM (2005) *FASEB J.* 19(7):780-782.

30

Luwor RB, Johns TG, Murone C, Huang HJ, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM (2001) *Cancer Res.* 61(14): p. 5355-5361.

Johns TG, Luwor RB, Murone C, Walker F, Weinstock J, Vitali AA, Perera RM, Jungbluth AA, Stockert E, Old LJ, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(26):15871-15876.

Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, Ji XD, Suvarna P, Volland JR, Old LJ, et al. (2001) *Cancer Res.* 61(14):5349-5354.

Perera RM, Narita Y, Furnari FB, Tavernasi ML, Luwor RB, Burgess AW, Stockert E, Jungbluth AA, Old LJ, Cavenee WK, et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11(17):6390-6399.

40

Panousis C, Rayzman VM, Johns TG, Renner C, Liu Z, Cartwright G, Lee F-T, Wang D, Kypridis A, Smyth FE, et al. (2005) *Br. J. Cancer.* 92(6):1069-1077.

Divgi CR, Welt S, Kris M, Real FX, Yeh SD, Gralla R, Merchant B, Schweighart S, Unger M, Larson SM, et al. (1991) *J. Natl. Cancer Inst.* 83(2):97-104.

Baselga J (2001) *Eur. J. Cancer* 37 Suppl 4:S16-22.

Gibson TB, Ranganathan A, Grothey A (2006) *Clin. Colorectal Cancer* 6(1):29-31.

Rowinsky EK, Schwartz GH, Gollob JA, Thompson JA, Vogelzang NJ, Figlin R, Bukowski R, Haas N, Lockbaum P, Li YP, et al. (2004) *J. Clin. Oncol.* 22:3003-3015.

Tan AR, Moore DF, Hidalgo M, Doroshow JH, Polpin EA, Goodin S, Mauro D, Rubin EH (2006) *Clin. Cancer Res.* 12(21): 6517-6522.

Lacouture AE (2006) *Nature Rev. Cancer.* 6:803-812.

10

Adams GP, Weiner LM (2005) *Nat. Biotechnol.* 23(9): 1147-1157.

Liu Z, Panousis C, Smyth FE, Murphy R, Wirth V, Cartwright G, Johns TG, Scott AM (2003) *Hybrid Hybridomics* 22(4):219-28.

Stabin MG, Sparks RB, Crowe E (2005) *J. Nucl. Med.* 46(6):1023-1027.

Ritter G, Cohen LS, Williams C Jr, Richards EC, Old LJ, Welt S (2001) *Cancer Res.* 61(18):685-6859.

20

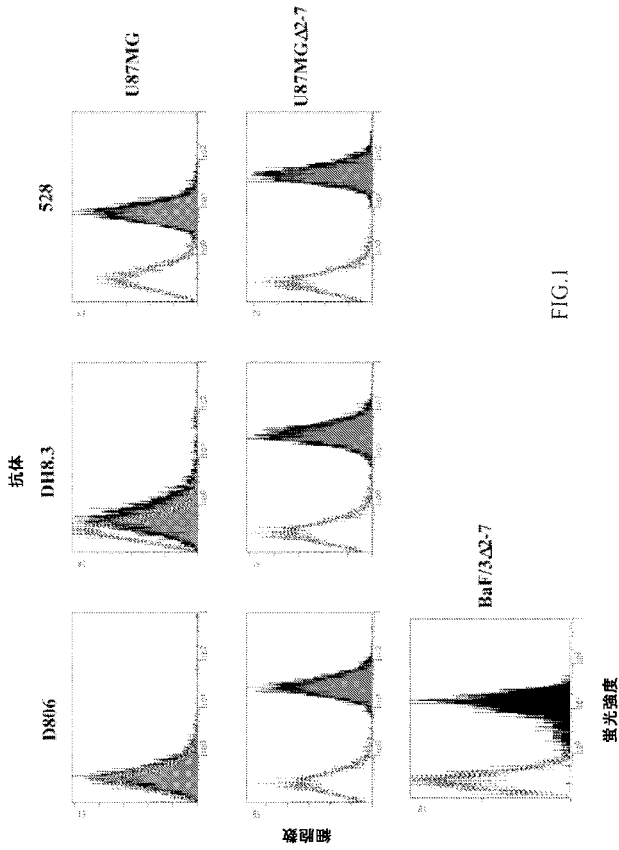
【 0 6 5 7 】

本発明の精神または本質的な特徴を逸脱することなく、本発明を他の形態で具現するまたは他の方法で実施することができる。従って、本開示は、すべての態様において、説明的なもののみならず、限定的なもののみならず、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって示すものであり、この趣旨および同等の範囲に入るすべての変更は、本発明の範囲に包含されると解釈する。

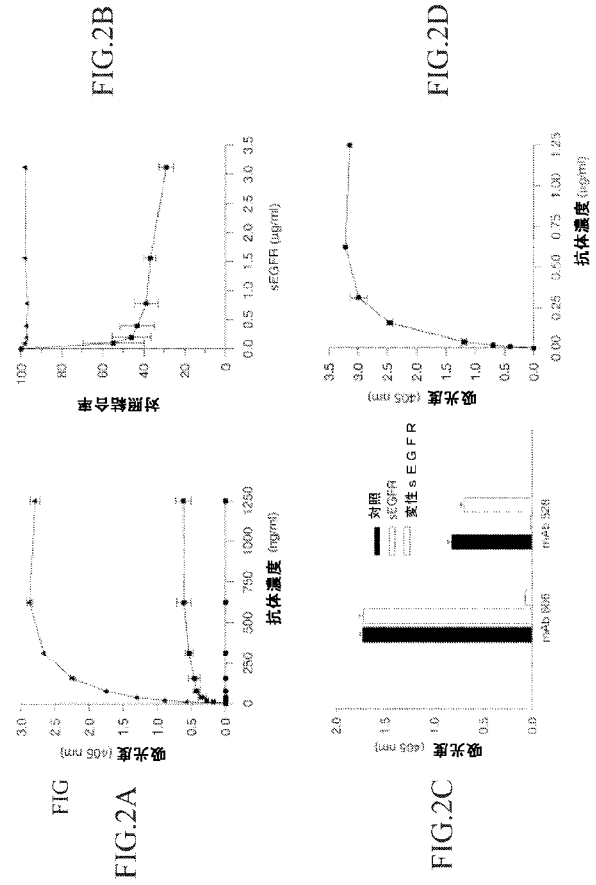
【 0 6 5 8 】

様々な参考文献を本明細書のいたるところで引用しており、上の参考文献リストに提供している。該参考文献のそれぞれは、この全体が参照により本明細書に組み込まれる。

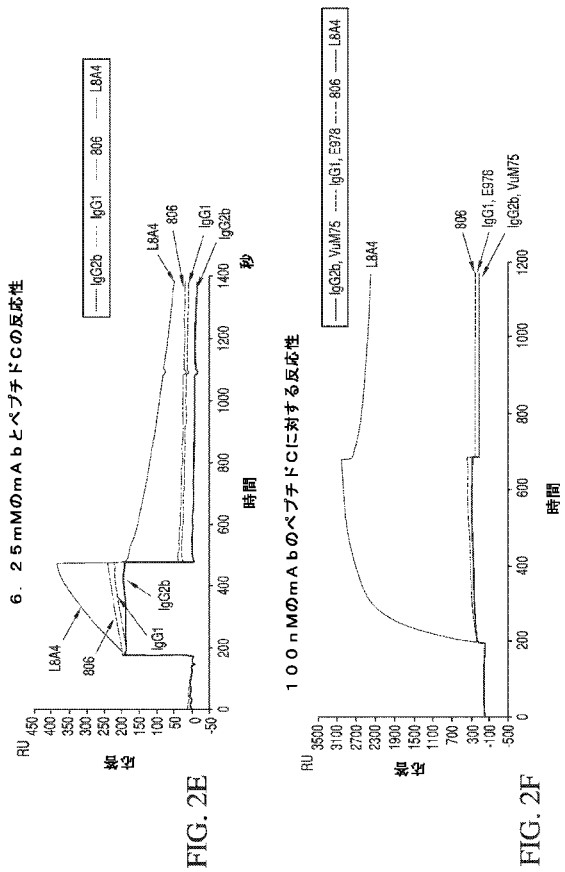
【図 1】



【図 2 - 1】



【図 2 - 2】



【図 3】

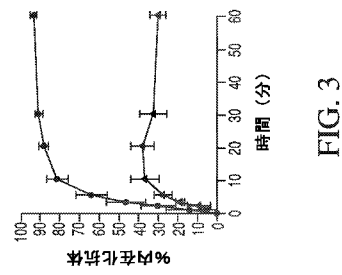
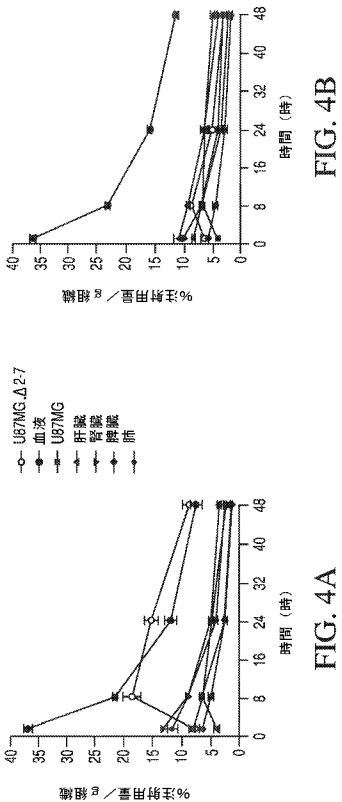
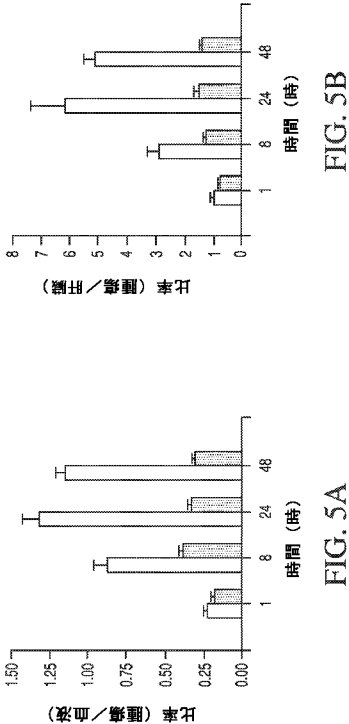


FIG. 3

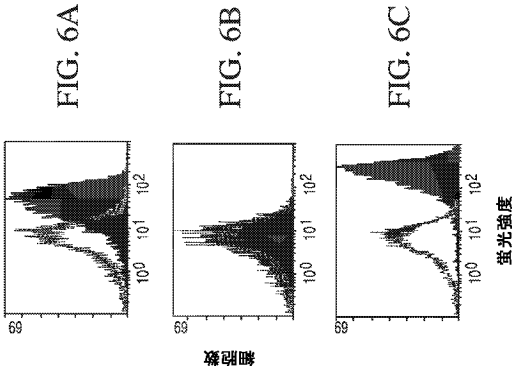
【 図 4 】



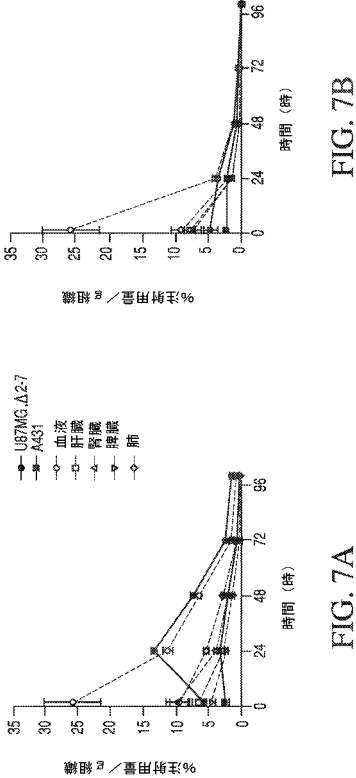
【 図 5 】



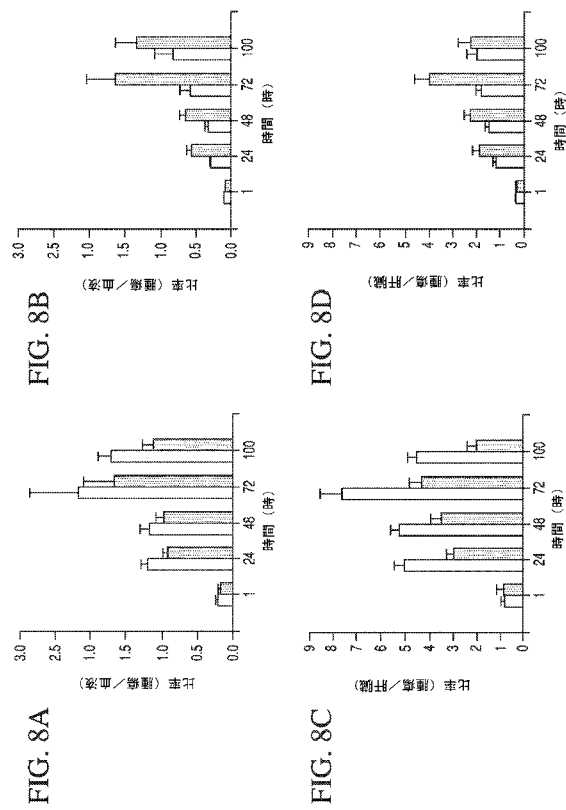
【 図 6 】



【 図 7 】



【図 8】



【図 9】

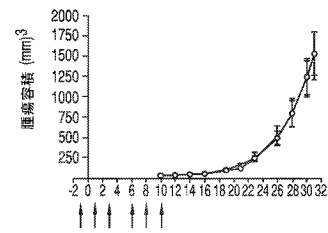


FIG. 9A

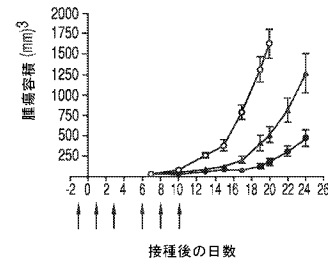


FIG. 9B

【図 10】

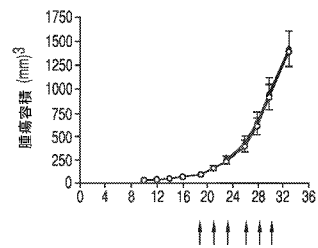


FIG. 10A

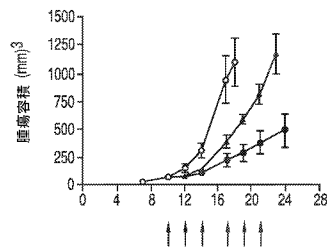


FIG. 10B

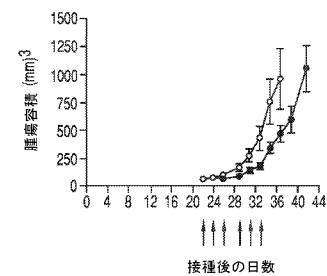


FIG. 10C

【図 11】

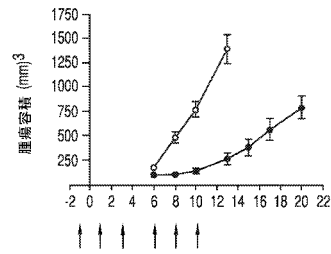


FIG. 11A

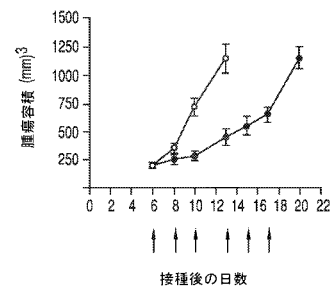
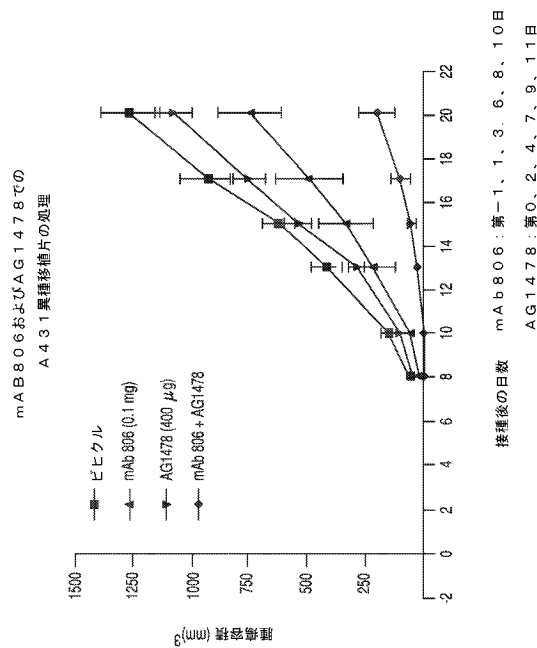
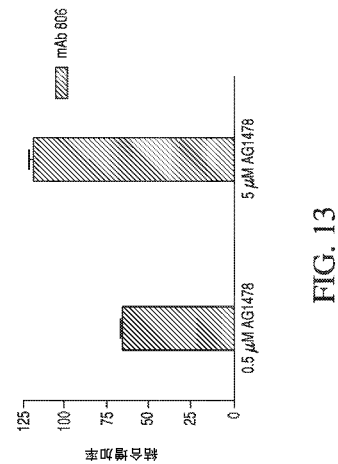


FIG. 11B

【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】

mAb 806 V H 鎖 (シグナルペプチドを含む。) : 核酸およびアミノ酸配列

核酸

ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGGGCTGTTACAGCCTTCTGGTGCTGCTGATG
TGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTGTCCTCA
CTGCACTGTCAGTGGCTACTCAATCACCAGTGATTTGGCTGGAAGTGAATCCGGC
AGTTTCCAGGAAACAGCTGGAGTGGATGGGCTACATAAGTTATAGTGGTAACACT
AGGTCACACCAATCTCAAAAGTCGAATCTCTATCCTCGAGACATCAACGAAC
CAATTCCTCTGCAAGTGAATCTGTGACTATTGAGGACACAGCCACATATTACTGT
GTAACGGCGGGACGCGGGTTTCTTATTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGCTCT
GCA (配列番号: 1)

FIG.14A

アミノ酸

MRVLLILLWLEAFPGVLSVDVQLQESGPSLVKPSQSLSTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFP
シグナルペプチド
GNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRISTRDTSKNQFFLQLNSVTIEDATYYCVTAGRG
FPYWGQGLVTVSA (配列番号: 2)

FIG.14B

【図 1 5】

mAb 806 V L 鎖 (シグナルペプチドを含む。) : 核酸およびアミノ酸配列

核酸配列

ATGGTGTCACAGCTCAGTTCCTTGCACTTCTGTTGCTTTGGTTTCCAGGTGCAAGAT
GTGACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGCTGTATCTCTGGGAGACACAG
TCAGCATCACTTGCCATTCAAGTCAGGACATTAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGC
AGAGACCAGGAAATCATTTAAGGGCTGATCTATCATGGAACCAACTTGGACGAT
GAAGTTCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATCTCTCACCATC
AGCAGCTGGAATCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAGTATGCTCAGTTT
CCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAACTG (配列番号: 3)

FIG.15A

アミノ酸配列

MVSTAQFLAELLWFPGARCDILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQRRP
シグナルペプチド
GKSFKGLIYHGTNLDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQYAQFPWTFGG
GTKLEIKR (配列番号: 4)

FIG.15B

【図 16】

mAb806 H-L鎖 (シグナルペプチドなし) : アミノ酸配列

DAVQLQESGPSLYKPSQSLSTLTVTGYSITSDIAVNWIRQPGNKLEWAGYISYSGNTRYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLOLN
CDR2
SVHEDIATYYCVLAGRGEPYWGQGLTVSA (配列番号: 11)
CDR3

FIG.16

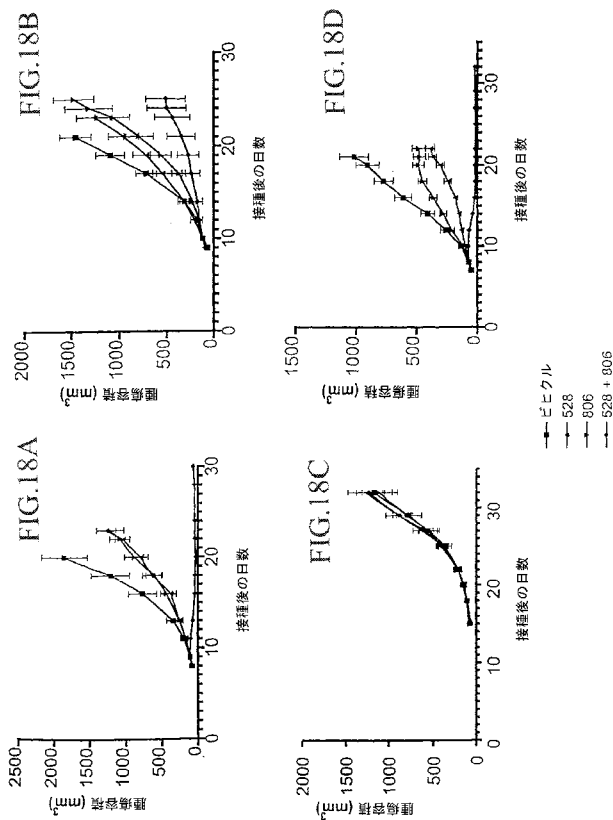
【図 17】

mAb806 V-L鎖 (シグナルペプチドなし) : アミノ酸配列

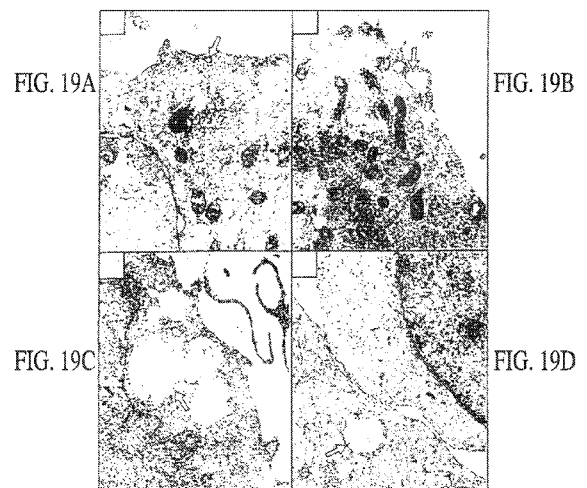
DILMTQSPSSMSVSLGDTYSITCISSQDINNIQWLQQRPCKSKGLIYHGILNLDDEVPSRSGSGCADYSLTISLSEDFAD
CDR1
YYCVQYAOEPATITGGGKLEIKR (配列番号: 12)
CDR3

FIG.17

【図 18】



【図 19】



【図 20】

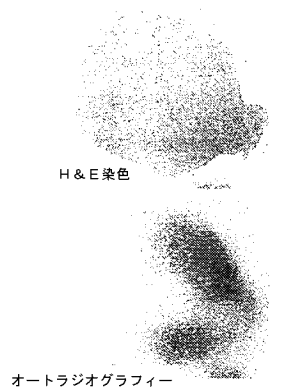


FIG. 20

【図 21】

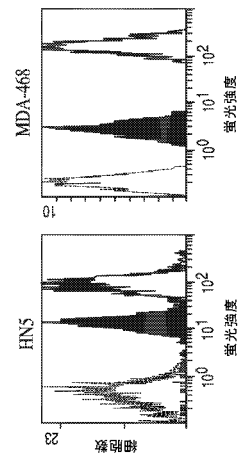


FIG. 21

【図 22】

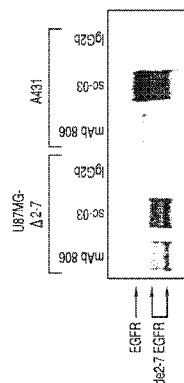


FIG. 22

【図 23】

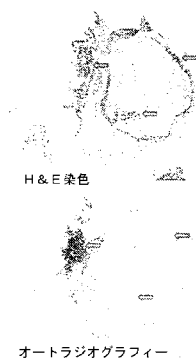


FIG. 23

【図 24 - 1】

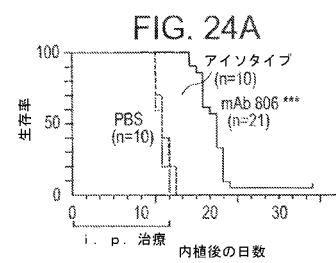


FIG. 24A

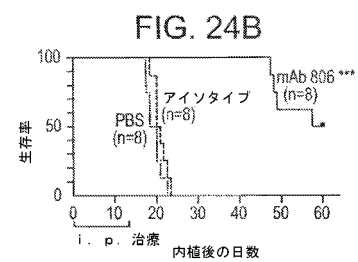


FIG. 24B

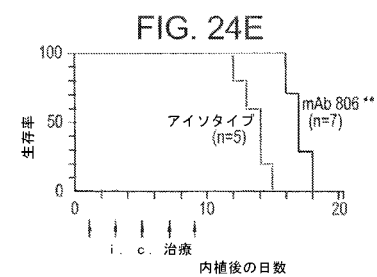
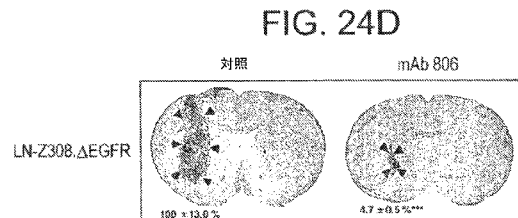
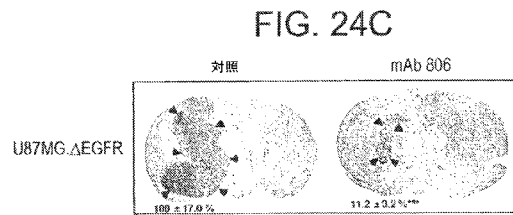


FIG. 24E

【図 24 - 2】



【図 25】

FIG. 25A

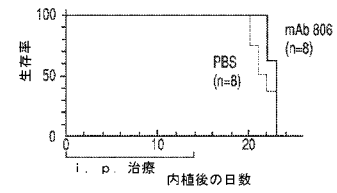


FIG. 25B

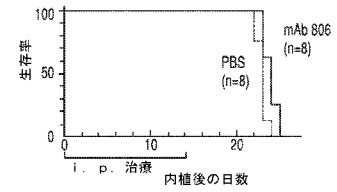
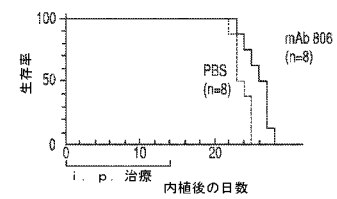


FIG. 25C



【図 26】

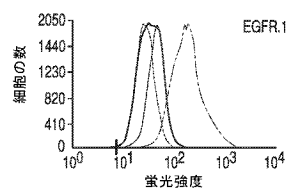
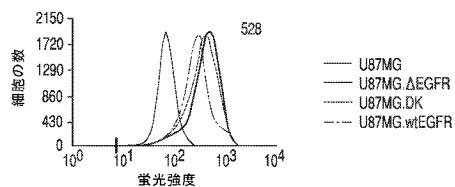


FIG. 26A

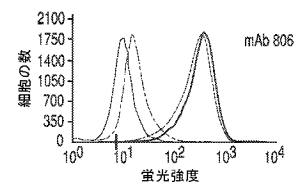


FIG. 26B

【図 27】

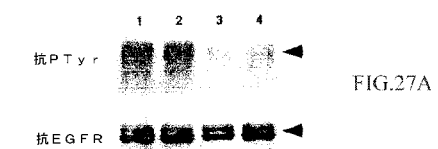


FIG. 27A

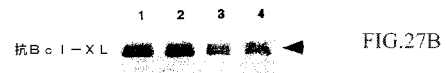


FIG. 27B

【図 28】

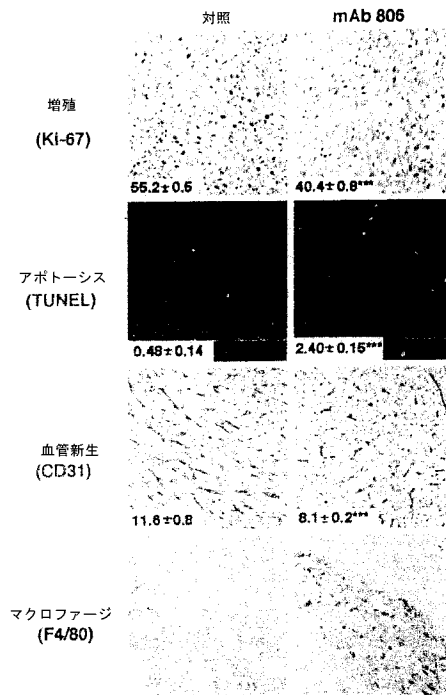


FIG.28

【図 29】

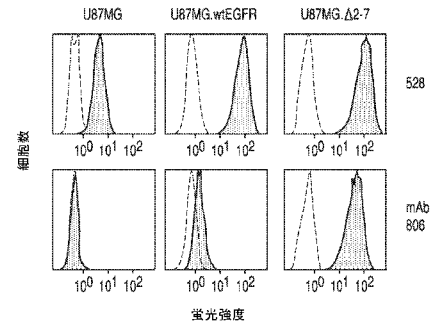


FIG. 29

【図 30】

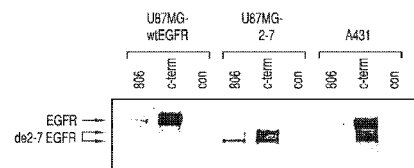


FIG. 30

【図 31】

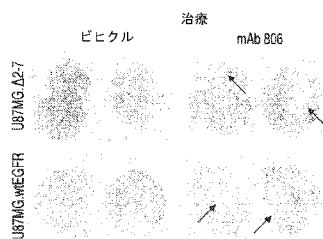


FIG. 31

【図 33】

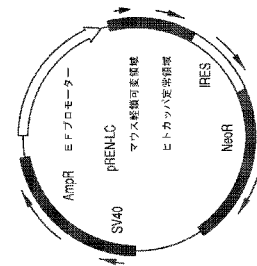


FIG. 33

【図 32】

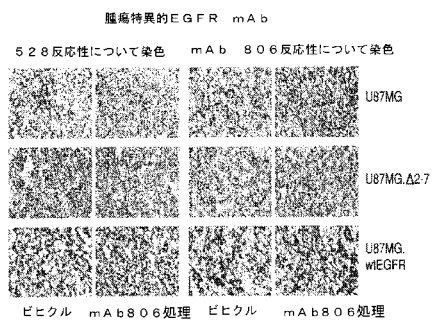


FIG. 32

【図 3 4】

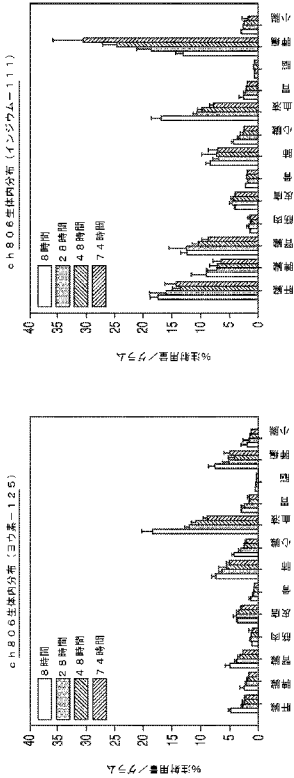


FIG. 34B

FIG. 34A

【図 3 6】

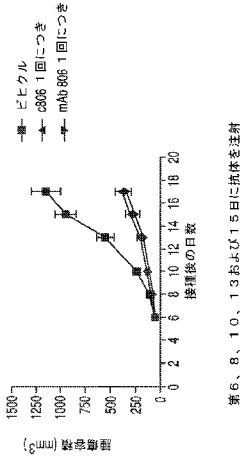


FIG. 36

【図 3 5】

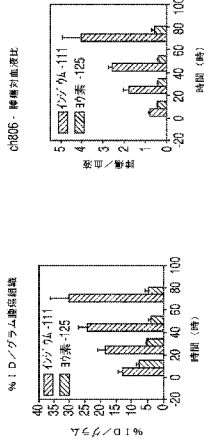


FIG. 35A

FIG. 35B

【図 3 7】

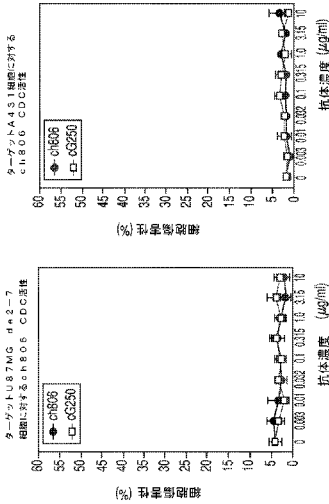


FIG. 37

【図 38】

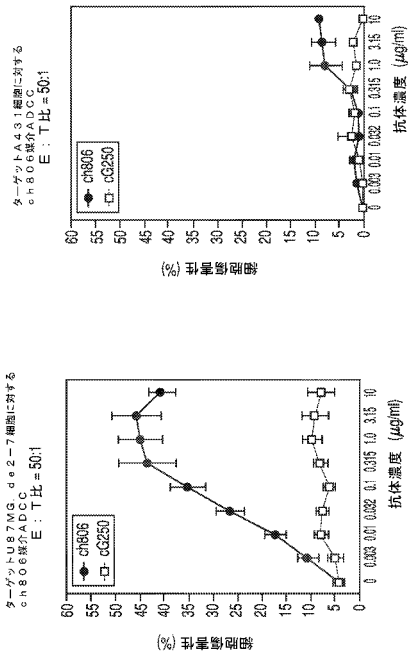


FIG. 38

【図 39】

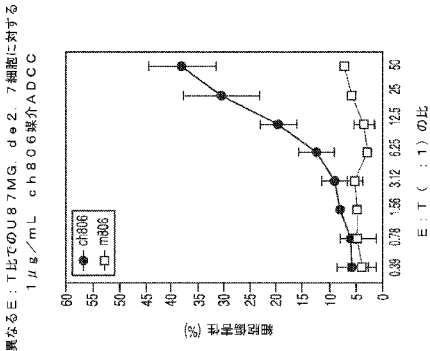


FIG. 39

【図 40】

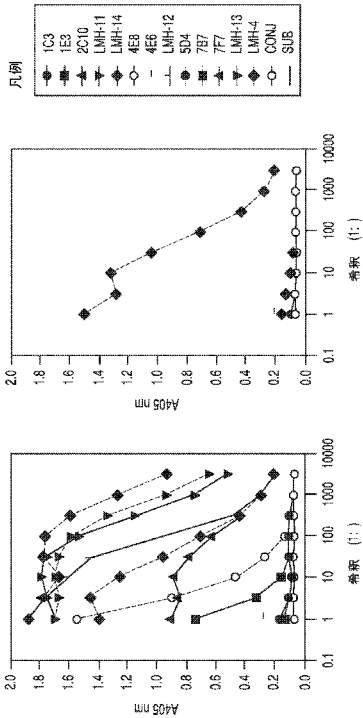


FIG. 40

【図 41】

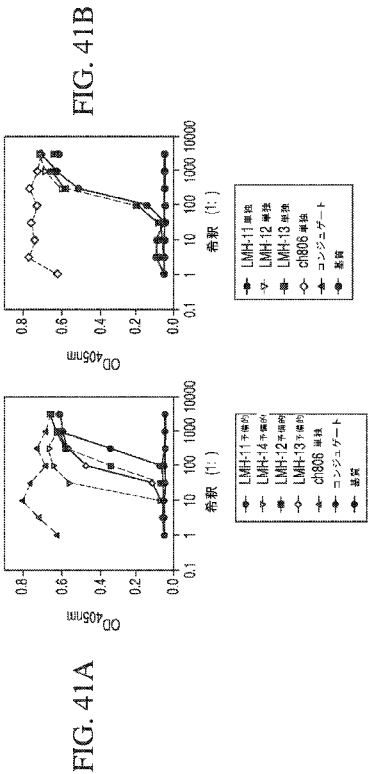
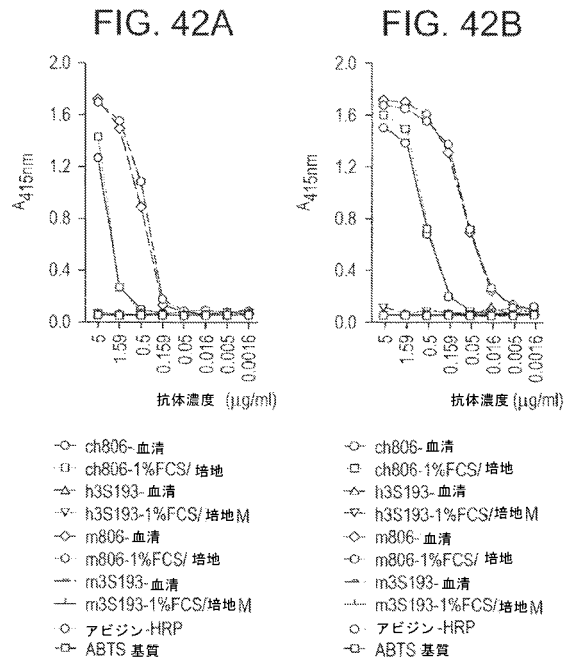


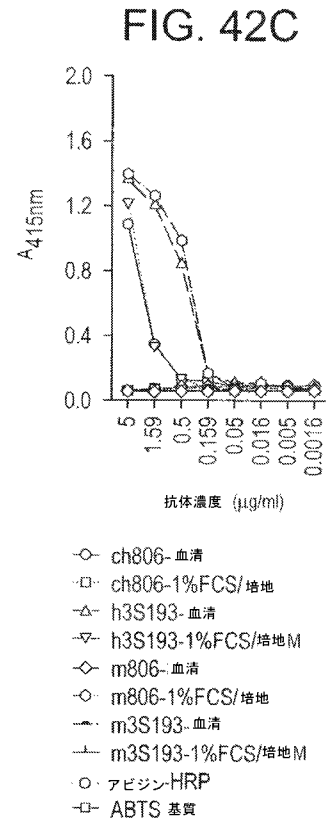
FIG. 41C



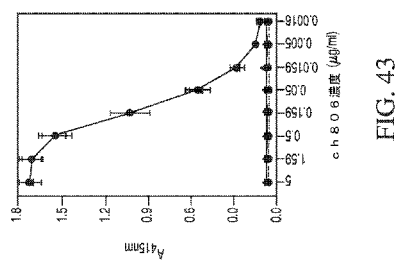
【図 4 2 - 1】



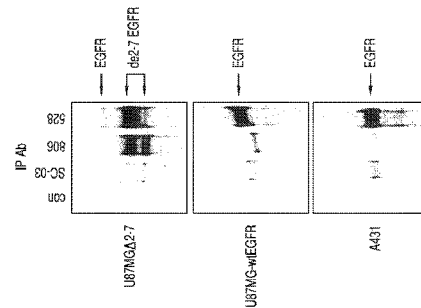
【図 4 2 - 2】



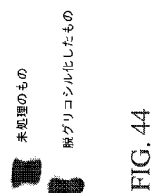
【図 4 3】



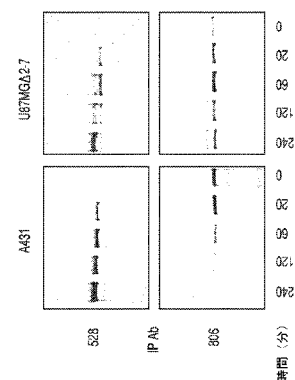
【図 4 5】



【図 4 4】



【図 4 6】



【図 47】

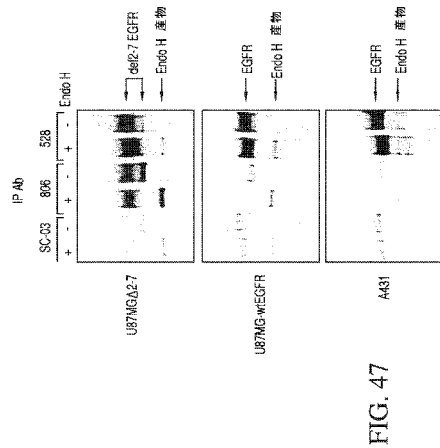


FIG. 47

【図 48】

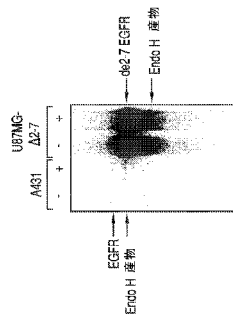


FIG. 48

【図 49 - 2】

1051 AGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACGGGCGCCGTCCAGGCACC
 1101 TCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTTAGSTGGGGGAG
 1151 GGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGTGGAGACTGAAGT
 1201 TAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTGT
 1251 AGTTTGGATCTTGGTTTATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTCAAAGTTTT
 1301 TTTCTTCCATTTCAGGTGTACGGCTCTCGGGAAGCTTTAGTTTAAACGCC
 1351 GCCACCATGGTGTCCACAGCTCAGTTCTTGCATTCITGTGCTTTGGTTT
 M V S T A Q F L A P L L L W F
 1401 CCAGGTGCAAGATGTGACATCCTGATGACCCATCTCCATCTCCATGTCT
 P G A R C D I L M T Q S P S S M S
 1451 GTATCTCTGGGAGACACAGTCAGCATCACTTGCATTCAAGTCAGGACATT
 V S L G D I V S I T C H S S Q D I
 1501 AACAGTAATATAGGGTGGTTCGACAGAGACCAAGGAAATCATTTAAGGC
 N S H I G W L Q Q R P G R S F K G
 1551 CTGATCTATCATGGAACCAACTTGGACGATGAAGTTCCATCAAGGTTCACT
 L I Y H G I N L D D E V P S R E S
 1601 GGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATCT
 G S G S G A D Y S L T I S S L E S
 1651 GAAGATTTTCGAGACTATTACTGTGTACAGCATGCTCAGTTCCGTTGACG
 E D F A D Y Y C V Q R A Q F P W T
 1701 TTCGGTGGAGGCCCAAGCTGGAATCAAACGGGTGAGTGGATCCATCTGGG
 F G G G T K L E I K R
 1751 ATAAGCATGCTGTGTTCTGTCTCCTTACATGCTCTGTGATTATGCGCAA
 1801 CAACACACCCAAAGGGCAGAACTTGTACTTAAACACCATCTCTGTTCTCTT
 1851 TCCTCAGGAAGCTGTGGCTGCACCA
 T V A A P
 1876 TCTGTCTTCACTCTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC
 S V F I F P P S D E Q L K S G T A
 1926 CTCTGTTGTGGCTGTGTAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTAC

FIG.49 続き

【図 49 - 1】

配列番号: 7 pREN ch806 LC Neo ベクター

1 Xho I
 CTCGAGAGCGGGCAGTGCAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC
 51 ATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGCTCGTATGTTGTGT
 101 GGAGATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAAATTCGTGAGGCTCCGGT
 EcoRI EFla プロモーター
 151 GCGGTCAGTGGGCGAGGCGCACATGCCCCAGTCCCCGAGAACTGGG
 201 GGGAGGGGCTCGCAATTGAACCGGTGCTAGAGAAAGTGGCGCGGGTAA
 251 ACTGGGAAATGTATGTCGTGACTGCTGCTCCGCTTTTCCCGAGGGTGGG
 301 GGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTGCCTGAAACGTTCTTTTCGCAA
 351 CGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGTAAGTGGCGTGTGTGTTCCCGCGGGC
 401 CTGGCTCTTTACGGTTATGGCCCTTGGCTGCTTGAATTACTTCCACG
 451 CCGCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCGAGCTTCGGGTGGAAGTG
 501 GGTGGGAGAGTTTCAGGCTTGGGCTTAAGSAGCCCTTCGCTCGTGCT
 551 TGAGTTGAGGCTGCTGCTGGGCGCTGGGGCGCCGCTGCGAATCTGGTG
 601 GCACCTTCGCGCTGTCTGCTGCTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAAAA
 651 ATTTTGTATGACCTGCTGCGAGCTTTTCTGCAAGATAGTCTGTGTA
 701 AATCGCGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGTTTTCGGCGCGCGG
 751 CGGCGAGCGGGGCGGCTGCTGCCAGCGACATGTTCCGCGAGCGGGGCC
 801 TCGAGCGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCGCG
 851 CCGTCTCTGCTGCTGCTGCTGCGCGCGCGCTGATTCGCGCGCGCTGGG
 901 GGCAGGCTCGCGCGCTCGGCAACAGTTGCTGAGCGGAAGATGGCGCG
 951 TTCCCGGCTGCTGCGAGGAGCTCAAAATGAGGAGCGCGCGCTCGGGA
 1001 GAGCGGCGGGGTGAGTCAACACACAAAGGAAAGGGCTTTCCGCTCTC

FIG.49

【図 49 - 3】

S V V C L L N N F Y P R E A K V Q

1976 AGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGT
 W K V D N A L Q S G N S Q E S V
 2026 ACAGAGCAGGACAGCAAGCAGCAGCTACAGCCTCAGCAGCAGCTGAC
 T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
 2076 GCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTCGCAAGTCA
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T
 2126 CCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
 H Q G L S S P V T K S F N R G E
 Nhe/Xba
 2176 TGTGAGCTAGAACTAACTAACTAAGCTAGCAACGGTTCCCTCTAGCG
 C *
 2226 GATCAATTCCGCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCGAAGCGGCTTGGAA
 2276 TAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCACCATATGTCCGTC
 2326 TTTTGGCAATGTGAGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTGACGAGCA
 2376 TTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGTCTGTTGAAT
 2426 GTCGTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACACGTC
 2476 TGTAGCGACCTTTTGCAGGCGAGCGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCC
 2526 TCTGCGCCAAAGCCACGTGTATAAGATACCTGCAAGGCGGCACAA
 2576 CCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAATGGCT
 2626 CTCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCGAGAGGTACCC
 2676 ATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCTCGGTGCACATGCTTTACGTGTGT
 2751 TAGTCAGGTTAAAAACGTCTAGCCCCCGAACCCGCGGACGTGCTT
 2801 TTCCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGTTGAACAGATGGATTGCAAG
 2851 CAGGTTCTCCGCGGCTTGGGTGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCA
 2901 CAACAGACATCGGCTGCTGATGCGCGGCTGTCCGCTGTGAGCGCA
 2951 GGGCGCGCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGCTGCCCTGAATG

FIG.49 続き

【図 49 - 4】

3001 AACTGCAGGACGAGGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTT
 3051 CCTTGGCGAGCTGTGCTCCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCT
 3101 GCTATTGGGCGAAGTGCCGCGGCGAGGATCTCTGTGATCTCACCCTTGCTC
 3151 CTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACG
 3201 CTTGATCCGGCTACCTGCCATTGCAACCAAGCGAAACATCGCATCGA
 3251 GCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCGGCTCTTGTGATCAGGATGATCTGG
 3301 ACGAAGAGCATCAGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTGTCGCCAGGCTCAAG
 3351 GCGCGCATGCGCGAGCGGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCGCTG
 3401 CTTGCCGAATATCATGTGGAAATGCGCGCTTTTCTGGATTTCAGACT
 3451 GTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACC
 3501 CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGT
 3551 GCTTTACGGTATGCGCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCTTCTATCGCC
 3601 TTCTTGACGAATTCTTCTGAGTCGATCGACCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
 3651 CCGCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCCTGAATGGCGAATGG
 3701 GACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGTACGCG
 3751 CAGCGTGACCGCTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCGCT
 3801 TCTTCCCTTCTCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTCCCGCTCAAGCTCTA
 3851 AATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGA
 3901 CCCCAGAACTTGATTAGGGTGTGTTACGCTAGTGGGCCATCGCCCT
 3951 GATAGACGGTTTTTTCGCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTG
 4001 GACTCTGTGTCGAACCTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTTA
 4051 TAAGGGATTTTGGCGATTTCGGCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTA
 4101 ACAAAATTTAAGCGGAATTTTAACAAAATTAACGCTTACAATTTAGGT
 4151 GGCACCTTTTCGGGGAAATGTGCGGGAAACCCCTATATTTGTTATTTTC

FIG.49 続き

【図 49 - 6】

5351 CAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCTAC
 5401 CAACCTCTTTTCCGAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAT
 5451 ACTGTCTTCTAGTGTAGCGGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT
 5501 AGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTATCCAGTGGCTGCTG
 5551 CCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGAATCAAGACGATAGTTA
 5601 CCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCC
 5651 CAGCTTGGACCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC
 5701 TATGAGAAAGCGCCAGCTTCCGGAAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCG
 5751 GTAAGCGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGACGAGGAGCTTCCAGGGGG
 5801 AAACGCTGTGATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTGGCCACCTCTGACTTG
 5851 AGCGTCGATTTTGTGATGCTGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAAC
 5901 GCCAGCAACCGGCTTTTACGGTTCTGGGCTTTTGTGCGCTTTTGGC
 5951 TCACATGTTCTTCTCGCTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTA
 6001 CCGCTTTGAGTGAAGTGATACCGCTCGCGCAGCGGAACGACCGAGCGC
 6051 AGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGCGCCCAATACGCAACCGCC
 6101 TCTCCCGCGCGTTGGCGAATCATTATGCAAGTATCAGAGGCCCTTT
 6151 CGTCTTCAC

FIG.49 続き

【図 49 - 5】

4201 TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAAT
 4251 GCTTCAATAATATTGAAAAAGAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGCTG
 4301 TCGCCCTTATTCCTTTTTCGCGCATTTTCCTTACTGTTTTGTCTCAC
 4351 CCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACG
 4401 AGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT
 4451 TTCGCCCCGAAGACGTTTCCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA
 4501 TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGCGCAAGAGCAACTCGGTG
 4551 CCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAG
 4601 AAAAGCATATTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATATGAGTGTCTCC
 4651 ATAACCATGAGTGATAAAGTCTGCGGCCAATCTTACTTCTGACAACGATCGG
 4701 AGGACCGAAGGAGCTAAGCGCTTTTTCGCAACATGGGGGATCATGTAA
 4751 CTCGCTTGATCGTTGGGAACCGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC
 4801 GAGCGTGACACCAAGATGCGCTGTAGCAATGGCAACAGCTTGGCGAACT
 4851 ATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCGCGCAACATTAATAGACT
 4901 GGATGGAGCGGATAAAGTTGCGAGGACCACTTCTGCGCTCGGCTTCCG
 4951 GCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCGCGTGAGCGTGGGTCTCG
 5001 CGGTATCATGCGCACTGGGGCCAGATGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
 5051 TTATCTACACGAGCGGGAGTCAAGCAACTATGATGAACGAAATAGACAG
 5101 ATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTTGGTAAGTGTGAGACCA
 5151 AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCAATTTTAAATTTA
 5201 AAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCT
 5251 TAACGTGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA
 5301 AGGATGTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCACTGAATCTGCTGCTTGCAAA

FIG.49 続き

【図 50 - 1】

配列番号: 8 pREN 806 HC DHPR ベクター

Xho I
 CTGAGAGCGGCGAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGTCACTC

2 ATTAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTCCGGCTCGTATGTTGT
 EcoRI BflI プロモーター
 02 GGAGATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAAATCTGAGGCTCCGCT
 52 GCGGCTCAGTGGCGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGAGAAAGTTGGG
 02 GGGAGGGGTGGCAATTGAACCGGTGCTAGAGAGGTGGCGGGGTAA
 52 ACTGGGAAAGTATGCTGTACTGGCTCCGCTTTTCCCGAGGGTGGG
 02 GGAGAACCGTATATAAGTGAGTAGTGCGCGTGAACGTTCTTTTCGCAA
 52 CGGCTTGGCGCCAGAACACAGGTAAAGTCCGTGTGCTTCCCGCGGC
 02 CTGGCTCTTTACGGGTTATGGCCCTGCGCTGCTTGAATTAATTCACG
 52 CCCCTGGCTGCACTACGTGATTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTG
 02 GGTGGGAGAGTTGAGGCTTGGCTTAAGAGGCCCTTCGCTCGTGTCT
 52 TGAGTTGAGGCTTGGCTTGGCGCTGGGCGCGCCGCTGCAATCTGCTG
 02 GCACCTTGGCGCTGTCTGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCAATTTAA
 52 ATTTTGTAGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGCTTTGTA
 02 AATCGGGCCAGATCTGCACACTGATTTTCGGTTTTTGGGGCGCGGG
 52 CGCGACCGGGCCCGTGGCTCCAGCGCACATGTCGGCGAGGCGGGCC
 02 TGCAGCGCGGCCACCGAGAAATCGAGCGGGGTAGTCTCAAGCTGGCGCG
 52 CTTGCTCTGCTGCTGCTGCTGCGCGCGCGTGTATCGCCCGCGCTGGG
 02 GGCAGGCTGGCCCGGTGGCAACAGTTGCGTGAGCGGAAGATGGCGCG
 52 TTCCCGGCTGCTGCGGGAGCTCAAAATGGAGGAGCGCGCTGGGA
 002 GAGCGGGGGGTGAGTCACCAACAAAGAAAGGGCTTTTCGCTCTC

FIG.50

【図 50 - 2】

1052 AGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGTCCAGGCACC
 1102 TCGATTAGTTCCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTGGGGGAG
 1152 GGGTTTATGCGATGAGGTTTCCCCCACTGAGTGGTGGAGACTGAAGT
 1202 TAGGCGAGCTTGGCACTTGAATTTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGG
 1251 AGTTTGGATCTTGGTTCAATTTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTCAAAGTTT
 1302 TTTCTTCCATTTCAAGGTGACGGCTCTCGGSAAGCTTTAGTTTAAACGCC
 1352 GCCACCATGAGAGTGTGATTTCTTTTGGGCTGTTTACAGCCTTTCTGGT
 1401 GTCCCTTCTGATGTGACAGCTTCAGGAGTCGGGACCTACCTGTTGAAACCT
 1451 TCTCAGACTCTGTCCTCACCTGACACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGT
 1501 GATTTTGCCTGGAAGTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAGAGCTGGAGTGG
 1551 ATGGGCTACATAAGTTATAGTGTGAACACTAGTGTACAAACCAATCTCTCAA
 1601 AGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAAGAACCAATTTCTCTGCAG
 1651 TTGAATTTCTGACTATTGAGGACACGCCACATATTACTGTGTAAACGGCG
 1701 GGACGCGGGTTTCTTATTTGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
 1751 CAGTGAGTGGATCTCTGCGCTGGGCGGCGGCTCTGTC
 1801 CCACACCGCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCTCCACCAAGGCG
 1851 CCATCGGTCTTCCCTTGGCACCCTCTTCCAAAGACACCTCTGGGGGAC
 1901 AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGG
 1951 TGTCGTGGAAGTCAAGCGCCTGACAGCGGGTGCACACCTTCCCGGCT
 2001 GTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGGC
 2051 CTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACSTGAATCACAAGC
 2101 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAA
 2151 ACTCACACATGCCACCGTGGCCAGCAGCTGAACCTCTGGGGGACCGTCT
 2201 AGTCTTCTCTTCCCGCCAAACCCAGGACACCTCATGATCTCCGGGA
 2251 CCCCTGAGTCAATGCGTGGTGGGACCTGAGCCACGAGAACCTGAG
 2301 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAACGCCAAGAC
 2351 AAAGCCGCGGAGGAGCAGTACACAGCAGCTACCGGCTGGTCAAGCTCC
 2401 TCACCGTCTGTCACCGAGTCTGGTGAATGGCAAGGAGTCAAGTGAAG
 2451 GTCTCCAAACAAAGCCTCCGAGCGCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGC
 2501 CAAAGGCGAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGG
 2551 AGGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTGACCTGCGCTGGTCAAGGCTTC
 2601 TATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGCAATGGGCGAGCGGAGAA
 2651 CAACTACAAGACCAAGCTCCCGTGGAGTCCGACGGCTCTTCTTCC

FIG.50 続き

【図 50 - 4】

N Y K T T P P V L D S D G S F F L
 2701 TCTACAGCAAGCTCACCGTGACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
 2751 TTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGACAACTACACGAGAA
 2801 GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGCTAGAACTAACTAAGCTAGC
 2851 AACGGTTTCCCTCTAGCGGATCAATTCGCCCCCCCCCTAACGTTAC
 2901 TGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTAT
 2951 TTTCCACCATATTGCCGCTTTTGGCAATGTGAGGCGCCGGAACCTGGC
 3001 CCTGTCTTCTTGACGAGCATCTCAGGGGCTTTCCCTCTCGCCAAAGG
 3051 AATGCAAGCTCTGTTGAATGTGCTGAAGGAGCAGTTCTCTGGAAGCTT
 3101 CTTGAAGACAAACACGCTGTGAGCAACCTTTGCAGGACCGGAACCCC
 3151 CCACCTGGCGCAGGTCCTCTGCGGCCAAAGCCACGTGTATAAGATAC
 3201 ACCTGCAAGAGCGGCAACACCCAGTCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTG
 3251 TGGAAAGAGTCAATGGCTCTCTCAAGCGTATTCAACAAGGGCTGAAG
 3301 GATGCCCAAGGATCCCCATTTGATGGGATCTGATCTGGGCGCTCGGTG
 3351 CACATGCTTTACGTGTGTTTGTGCGAGGTAAAAAAGCTTAGGCCCCCC
 3401 GAACACCGGGACGTGGTTTCTCTTGAATAACAGATAATACCATGGTT
 3451 CGACCATGGAAGTGCATCTGCGCGTGTCCCAAAATATGGGATTTGGCAA
 3501 GAACGAGACCTACCTTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCC
 3551 AAAGAATGACCAACCTCTCAGTGGAGGTAAACAGAACTCTGCTGATT
 3601 ATGGGTAGGAAACCTGGTTCTCATTCTCAGAGAACTGACCTTTAAA
 3651 GGACAGAAATTAATGTTGATATAGTTCTCAGTASAGAACTCAAGAACCC
 3701 ACCACGAGGAGCTCATTTTCTTCCCAAAAGTTTGGATGATGCTTTAAGAC
 3751 TTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTC

FIG.50 続き

【図 50 - 3】

1901 AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGG
 A A L G C L V K D Y F P E P V T V
 1951 TGTCGTGGAAGTCAAGCGCCTGACAGCGGGTGCACACCTTCCCGGCT
 s w n s g a l t s g v h t f p a
 2001 GTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGGC
 v l q s s g l y s l s s v y s v p
 2051 CTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACSTGAATCACAAGC
 S S S L G T Q T Y I C N V N H K P
 2101 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAA
 S N T K V D K K V E P K S C D K
 2151 ACTCACACATGCCACCGTGGCCAGCAGCTGAACCTCTGGGGGACCGTCT
 T H T C F P C P A P E L L G G P S
 2201 AGTCTTCTCTTCCCGCCAAACCCAGGACACCTCATGATCTCCGGGA
 V F L F P P K P K D T L M I S R T
 2251 CCCCTGAGTCAATGCGTGGTGGGACCTGAGCCACGAGAACCTGAG
 P E V T C V V V D V S H E D P E
 2301 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAACGCCAAGAC
 V K F N W Y V D G V E V H N A K T
 2351 AAAGCCGCGGAGGAGCAGTACACAGCAGCTACCGGCTGGTCAAGCTCC
 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L
 2401 TCACCGTCTGTCACCGAGTCTGGTGAATGGCAAGGAGTCAAGTGAAG
 T V L H Q D W L N S K E Y K C K
 2451 GTCTCCAAACAAAGCCTCCGAGCGCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGC
 V S N K A L P A P I E K T I S K A
 2501 CAAAGGCGAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGG
 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E
 2551 AGGAGATGACCAAGAACAGGTCAAGCTGACCTGCGCTGGTCAAGGCTTC
 E M T K N Q V S L T C L V K F
 2601 TATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGCAATGGGCGAGCGGAGAA
 Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
 2651 CAACTACAAGACCAAGCTCCCGTGGAGTCCGACGGCTCTTCTTCC

FIG.50 続き

【図 50 - 5】

3801 GGAGGCGAGTCTCTTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACAGGCCACCTCAG
 3851 ACTCTTTGTGACAAGGATCATGACGGAATTTGAAGTGAACGCTTTTCC
 3901 CAGAAATGATTGGGGAATATAAACTTCTCCAGAAATACCCAGGCGTC
 3951 CTCTCTGAGTCCAGGAGGAAAAAGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTA
 4001 CGAGAAGAAAGATTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTTCCCTCC
 4051 TAAAGCTATGCAATTTTATAAGACCATGGGACTTTTGTCTGATCGAC
 4101 CTGGCGTAATAGCGAAGAGCGCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGC
 4151 GCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCG
 4201 CGGGGTGTGGTGTACCGCGAGCGTGACCGCTACACTTCCAGCGCCCT
 4251 AGCGCCCGCTCTTCTGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCG
 4301 GCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTT
 4351 AGTGTCTTACGCGACCTCGACCCCAAAAACTTGAATAGGGTGTGTTTC
 4401 ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCTTTGACGTTGGA
 4451 GTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTCCAACTGGAACAACTCA
 4501 ACCCTATCTCGGTCTATTATAAGGATTTTGGCGATTTTGGCCTATTGG
 4551 TTAATAAATGAGCTGATTTAAACAAATTTAAACGGAATTTAAACAAATA
 4601 TTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACC
 4651 CCTATATTGTTTATTTTCTAAATACATTAATATGATCCGCTCATG
 4701 AGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATAT
 4751 GAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCTTATTCCTTTTGTGCGCATTTT
 4801 GCCTTACTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCT
 4851 GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAATCGGATCTCAACAG
 4901 CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCGGAAGACGTTTCCAATGATGA

FIG.50 続き

【図 50 - 6】

4951 GCACCTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTATTGACGCC
5001 GGGCAAGAGCAACTCGGTCGCGGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
5051 TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATATTACGGATGGCATGACAGTAA
5101 GAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAAGCTGCGGCCAAC
5151 TTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGAGCTAACCGCTTTTGTGCA
5201 CAACATGGGGATCATGTAAGTCCCTTTGATCGTTGGGAACCGAGCTGA
5251 ATGAAGCCATACCAAAACGAGAGCGTGACACCCAGATGCCTGTAGCAATG
5301 GCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGGAAGTACTTACTCTAGCTTC
5351 CCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGGATAAAGTTGACAGGACCAC
5401 TTCTGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA
5451 GCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGG
5501 TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTA
5551 TGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAG
5601 CATTTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATT
5651 AAAACTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATA
5701 ATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
5751 GACCCCGTAGAAAAGATCAAGGATGTTCTTGAGATCCTTTTTCGTGCA
5801 CGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAACCCGCTACAGCGGTGGTTTG
5851 TTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCA
5901 GCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGCTCTTAGTGAGCCGTAGTTAGGC
5951 CACCACCTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAAT
6001 CCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGT
6051 TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACG

FIG.50 続き

【図 50 - 7】

6101 GGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
6151 GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCGAAGGGA
6201 GAAAGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGC
6251 ACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCTCGG
6301 GTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGCATTTTGTGATGCTCGTCAGGGG
6351 GCGGAGCCTATGGAAAAACCGCAGCAACCGCGCTTTTACGGTTCCTG
6401 GCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCAGATGTTCTTCTCGGTTATCCCTGGA
6451 TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCC
6501 GCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
6551 CGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCGGATTCATTAATG
6601 CAGGTATCACGAGGCCCTTTGCTCTTCAC

FIG.50 続き

【図 51 - 1】

mAb124 V H 鎖: 核酸およびアミノ配列

A. 核酸配列
GATGTGAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGCTCCCTACCTGCACTGTCAGTGGCT
ACTCAATCACCGAGTACTGCTGGAACCTGATCGCGGAGTTTCCAGGAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAA
GTTACAGTGTAACTAGGTACACCAATCTCAAAAGTCAATCTCTATCTGAGACACATCCCAAGAACCAAT
CTTCTGCACTGAACTTCTGTGACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAACGCGGACCGCGGTTTCTTAC
TGGGGCCAGGAGCTCTGGTCACTGCTCTGCA (配列番号: 21)

B. アミノ酸配列
DVQLQESGSLVKPSQSLICTVTGYSDYAWNWIROPKNLEWMGYISANTRYNPISKRSITRDTSKNQFFLQL
CDR2
NSVTIEDTAYYCATAAGRFYWGQGLTVVSA (配列番号: 22)
CDR3

FIG.51

【図 51 - 2】

mAb124 V L 鎖: 核酸およびアミノ配列

C. 核酸配列
GACATCTGATGACCAATCTCCATCTCTATCTCTGGAGACACAGTCAGTATCAGTTCGCTTCAGTCA
GGACATTACAGTAATAGGTTGTCAGCAAGAACAGGGAATCATTTAAGGCGTGTATCATGGAACCAA
CTTGACAGTGGATTCATCAAGGTCAGTGGAGTGGATCTGGAGCGGATTTCTTCCACCATCAGCAGCTGAA
TCTGAAGATTTTGTAGACTATTACTGTGTACAGTATGGTCACTTCCGTGGACCTTCGGTGGAGGACCAAGCTGAAA
TCAAACGG (配列番号: 26)

D. アミノ酸配列
DILMTQSPSSMSISLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQKPGKFKGLYHGINLDDGVPSRFGSGGADYSLTISSEDFVD
CDR1
YYCYOYGOFPWTFGGTKLEIKR (配列番号: 27)
CDR3

FIG.51 続き

【 図 5 4 - 2 】

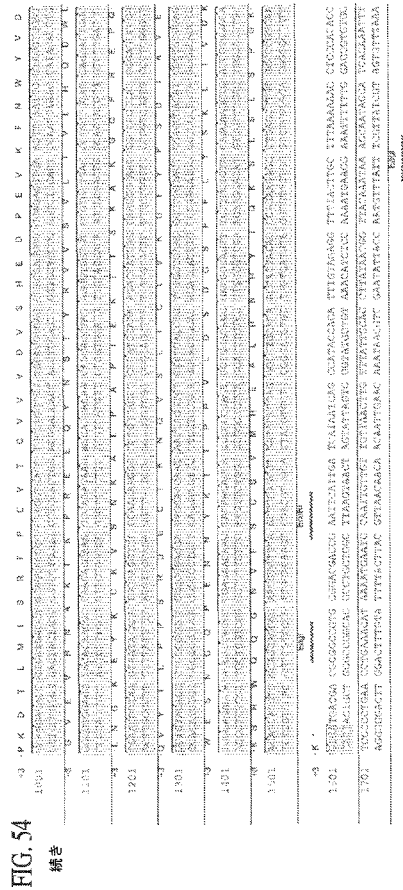


FIG. 54

【 図 5 4 - 4 】

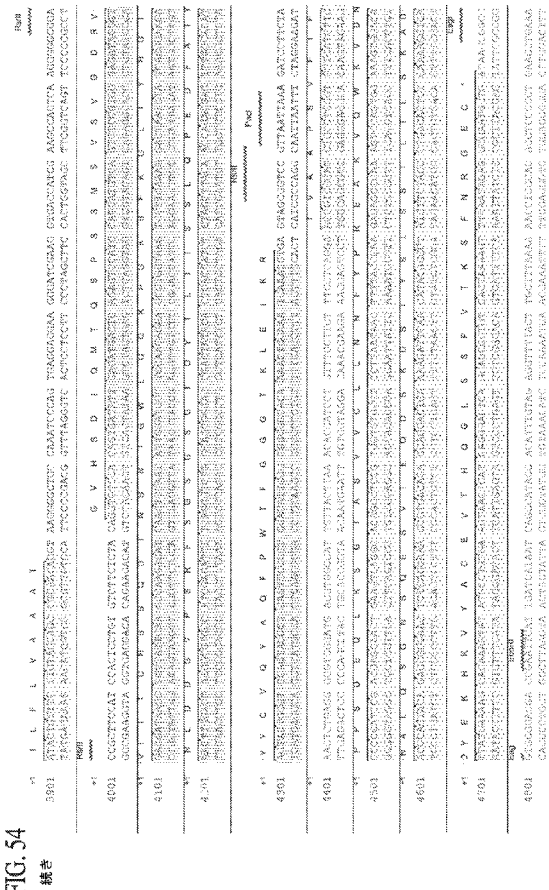


FIG. 54

【 図 5 4 - 3 】

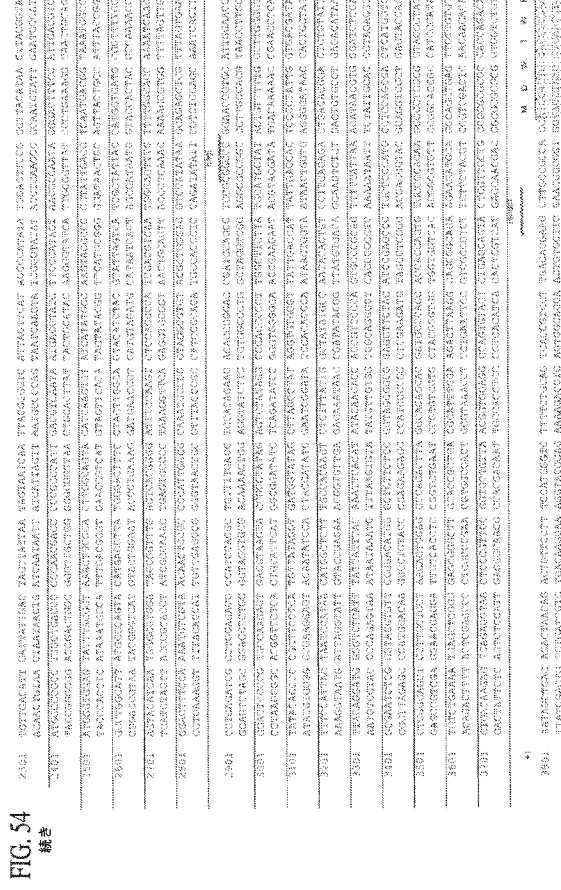


FIG. 54

【 図 5 4 - 5 】

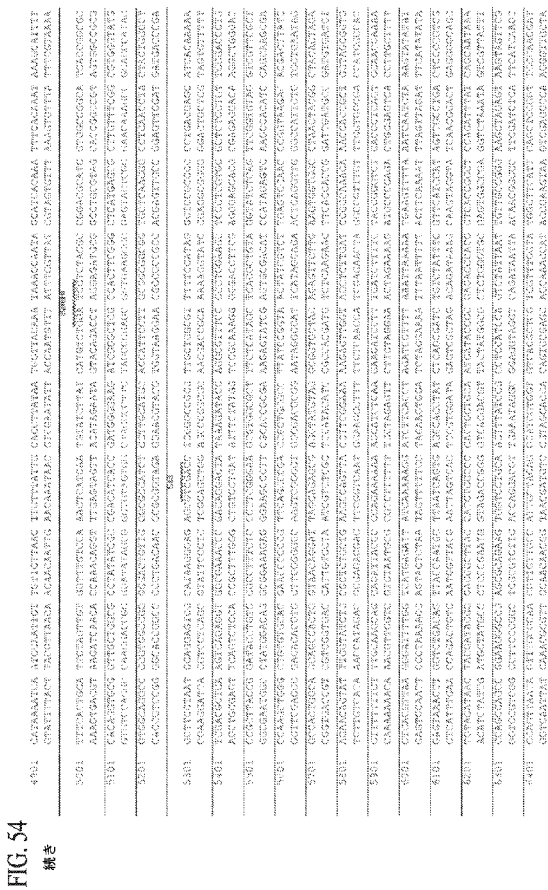


FIG. 54

【図 6 4 - 5】

```

COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 1048 End: 1194" 1)
COMMENT      #62-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 1111 End: 1194" 1)
COMMENT      "Heavy Chain Variable CDR3 region"
#63-(CGroupPar (CParagraph 21 (1 21 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #64-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 1336 (3 #128 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #65-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 1305 End: 1498" 1)
COMMENT      #66-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "SV40 (pro SV40 cell)" 1)
COMMENT      "Region: (SV40 (pro SV40 cell))"
COMMENT      "Misc. Region (1 total)"
#67-(CGroupPar (CParagraph 23 (1 23 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #68-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 4325 (3 #128 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #69-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 4315 End: 4325" 1)
COMMENT      #70-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Lysine-Chain variable CDR3 region"
COMMENT      1) "Heavy"
#71-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 4716 (3 #128 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #72-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 4716 End: 4746" 1)
COMMENT      #73-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Lysine-Chain variable CDR3 region"
COMMENT      1) "Heavy"
COMMENT      "Lysine-Chain variable CDR3 region"
COMMENT      "Lysine-Chain variable CDR3 region"
#74-(CGroupPar (CParagraph 25 (1 25 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #75-(CLinePar

```

FIG.64 続き

【図 6 4 - 6】

```

COMMENT      (CParagraph 1644 (3 #128 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #76-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 1644 End: 1674" 1)
COMMENT      "SV40 poly A"
#77-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 1827 (3 #256 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #78-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 1827 End: 1857" 1)
COMMENT      #79-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "SV40 poly A" 1) "SV40 poly
COMMENT      A" 1)
COMMENT      "Poly A region (2 total)"
#80-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 30 (1 30 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #81-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 1684 (3 #256 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #82-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 1684 End: 1714" 1)
COMMENT      #83-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Protein (ICMV-M2) (Item No.1)"
COMMENT      1)
COMMENT      "Protein (ICMV-M2) (Item No.1)"
#84-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 9784 (3 #256 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #85-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 9784 End: 10226" 1)
COMMENT      #86-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "SV40 poly A" 1)
COMMENT      "Protein (ICMV-M2) (Item No.1)"
COMMENT      "Protein (ICMV-M2) (Item No.1)"
#87-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 44 (1 44 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #88-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 128 (3 #128 0) 1 2 2 0 194)

```

FIG.64 続き

【図 6 4 - 7】

```

COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #89-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 128 End: 342" 1)
COMMENT      "Heavy Chain 806 V-Region Insert"
#90-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 3993 (3 #256 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #91-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 3998 End: 4376" 1)
COMMENT      "Light-Chain 806 V-Region Insert"
COMMENT      "V-Region (2 total)"
#92-(CGroupPar (CParagraph 52 (1 52 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #93-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 2903 (3 #256 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #94-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 2903 End: 3023" 1)
COMMENT      #95-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "S'UT"
COMMENT      1) "S'UT 1"
#96-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 3051 (3 #256 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #97-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 3051 End: 3067" 1)
COMMENT      #98-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "S'UT"
COMMENT      1) "S'UT 2"
#99-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 10927 (3 #256 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #100-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 10927 End: 11047" 1)
COMMENT      #101-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "S'UT"
COMMENT      1) "S'UT 3"
#102-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 13 (0 0) 1 1 1 0 178)

```

FIG.64 続き

【図 6 4 - 8】

```

COMMENT      (CParagraph 11875 (3 #198 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #103-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
COMMENT      180)
COMMENT      "Start: 11875 End: 11931" 1)
COMMENT      #104-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
COMMENT      180)
COMMENT      "S'UT 1" "S'UT 2"
COMMENT      "S'UT 3"
#105-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 93 (1 93 0) 1 1 1 0
COMMENT      178)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #106-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 6121 (3 #138 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #107-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
COMMENT      180)
COMMENT      "Start: 6121 End: 6981"
COMMENT      (Comp.commentary)
COMMENT      1)
COMMENT      #108-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
COMMENT      180)
COMMENT      "bcl2-lacZ reporter" 1)
COMMENT      "RNA (bcl2-lacZ reporter Amp(R))"
COMMENT      "RNA - Misc. (1 total)"
#109-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 54 (1 54 0) 1 1 1 0
COMMENT      178)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #110-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 7707 (3 #148 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #111-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
COMMENT      180)
COMMENT      "Start: 7707 End: 8806" 1)
COMMENT      #112-(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
COMMENT      180)
COMMENT      "GS cDNA" 1) "mRNA (GS
COMMENT      cDNA)" 1)
COMMENT      "RNA (1 total)" "Reporter Map"
#113-(CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 13 (0 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjecList
COMMENT      #114-(CGroupPar

```

FIG.64 続き

【 図 6 4 - 1 3 】

【 図 6 4 - 1 3 】

```

COMMENT 0)
COMMENT #166-(CMVideoStyle "ONE" 1 (LOGPEN 0 0 16364) 8 0 0 0 1
      (LOGSCALE 0 0 1 34.14256 2.56256 0.607853))
COMMENT #167-(CMVideoStyle "TWO" 1 (LOGPEN 0 0 12768) 8 0 0 0 0)
COMMENT #168-(CMVideoStyle "THREE" 1 (LOGPEN 0 0 1641450) 8 0 0 0 0)
COMMENT #169-(CMVideoStyle "FOUR" 1 (LOGPEN 0 0 1611680) 1 0 0 0 0)
COMMENT #170-(CMVideoStyle "Error: Decoder" 1 (LOGPEN 0 0 128) 8 0 0 0 0)
COMMENT #171-(CMVideoStyle "Exit1" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 0 0 0)
COMMENT #172-(CMVideoStyle "Exit2" 1 (LOGPEN 0 0 0) 8 0 0 0 0)
COMMENT #173-(CMVideoStyle "Exit3" 0 0 0 0)
COMMENT #174-(CMVideoStyle "Screen Label" 1 (LOGPEN 0 0 1 0 1
      (LOGSCALE 0 0 0 450 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
      1 3 "BT BT" 0)
COMMENT #175-(CMVideoStyle "Position" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 0 0 0)
COMMENT #176-(CMVideoStyle "Arrows" 0 0 1
      (LOGSCALE 0 0 0 450 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
      0 0 0)
COMMENT #177-(CMVideoStyle "Position Label" 1 (LOGPEN 0 0 8386608) 1 0
      (LOGSCALE 0 0 0 450 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.63
      8386608 1 1
COMMENT "9" 0)
COMMENT #178-(CMVideoStyle "Range" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
      (LOGSCALE 0 0 16777216 0 0 0 0) 1 1
COMMENT #179-(CMVideoStyle "Range Label" 1 (LOGPEN 0 0 8386608) 1 0 1
      (LOGSCALE 0 0 0 450 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.63
      8386608 1 1
COMMENT "9K" 0)
COMMENT #180-(CMVideoStyle "ONE Label" 1 (LOGPEN 0 0 49216) 1 0 1
      (LOGSCALE 0 0 0 450 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
      0.511111 1 63333 "BT" 0)
COMMENT #181-(CMVideoStyle "CDS Label" 1 (LOGPEN 0 0 4227264) 1 0 1
      (LOGSCALE 0 0 0 450 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.305556
      239 1 1
COMMENT "9K" 0)
COMMENT #182-(CMVideoStyle "Space" 1 (LOGPEN 0 0 0) 3 1
      (LOGSCALE 0 0 16777216 0 1
      (LOGSCALE 0 0 0 450 0 0 0 9 48 2 0 "Arial") 0.3 0 0 1
      (LOGSCALE 8 1 0 8 1.8 0)
      #183-(CMVideoStyle "CDS" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1 (LOGSCALE 8 39423
      3) 0 0
      1 (LOGSCALE 3 0 0.3 1.8 0)
COMMENT #184-(CMVideoStyle "Label" 1 (LOGPEN 0 0 4227264) 1 0 1
      (LOGSCALE 0 0 0 450 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.914444
      8386608
COMMENT 1 1 "BK" 0)
COMMENT #185-(CMVideoStyle "Label" 3 1 (LOGPEN 0 0 8421376) 0 0 1
      (LOGSCALE 0 0 0 450 280 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.937333
      241
      2 "BK (450)" 0)
COMMENT #186-(CMVideoStyle "Label" 1 1 (LOGPEN 0 0 8437524) 1 0 1
      (LOGSCALE 0 0 0 450 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.722222
      1 0

```

FIG.64 続き

【 図 6 4 - 1 5 】

【 図 6 4 - 1 5 】

```

COMMENT                                #191--(C)GaussHogee
COMMENT                                (WLogset 2 (7 2 0) 1 2 0 0 Nil -108 160)
COMMENT                                (C00)acLL191
COMMENT                                #198--(C)GaussHogee
COMMENT                                (WLogsetLL190)
COMMENT                                (WLogset 0 (3 #10# 0) 1 2 0 0 #190#
COMMENT                                100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1 (LOG333333 0 100#000
COMMENT                                0) 1
COMMENT                                0.4061 5.9819 1 0.052322) 0.8 1.
COMMENT                                #195--(C)Gauss
COMMENT                                (WLogset 0 (0 0) 1 2 0 0 #14#
COMMENT                                37/49700 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFON 32 12 0 0 700 0 0 0 3 2 1
COMMENT                                34
COMMENT                                "Arial" 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                "Gospat" 0 0 0 0 "ser" 1 0 0 -10.065
COMMENT                                8.39323 6.2820 6.84619 #196#
COMMENT                                #100--(C)GaussHogee
COMMENT                                (WLogsetLL190)
COMMENT                                (WLogset 0 (3 #29# 0) 1 2 0 0 #190#
COMMENT                                393235
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOG333333 0 100#000 0) 1 3.74091
COMMENT                                3.95/74 1
COMMENT                                0.042322) 0.8 1.6 0
COMMENT                                #201--(C)Gauss
COMMENT                                (WLogset 0 (0 0) 1 2 0 0 #14#
COMMENT                                28336148 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFON 32 12 0 0 700 0 0 0 3 2 1
COMMENT                                34
COMMENT                                "Arial" 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                "Gospat" 0 0 0 0 "ser" 1 0 0 -11.1684
COMMENT                                24.76 14.482 0.84619
COMMENT                                1 0 0 -11.1684 24.76 14.482 0.84619
COMMENT                                #201#)
COMMENT                                (C00)acLL191
COMMENT                                #202--(C)GaussHogee
COMMENT                                (WLogset 19 (7 13 0) 1 2 0 0 Nil 18088376
COMMENT                                100)
COMMENT                                (C00)acLL191
COMMENT                                #193--(C)Gauss
COMMENT                                (WLogset 0 (3 #16# 0) 1 2 0 0 #16#
COMMENT                                100)
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 0 0 16:11880) 0.833333
COMMENT                                1.12422 1.9/37)
COMMENT                                #193--(C)Gauss
COMMENT                                (WLogset 0 (0 0) 1 2 0 0 #14#
COMMENT                                160887.2 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFON 32 12 0 0 700 0 0 0 3 2 1
COMMENT                                34
COMMENT                                "Arial" 2.53336 0.666667 0

```

FIG.64 続き

```

COMMENT
COMMENT
COMMENT      #281=-(CGroupWage
      (CWage: 2 (1 2) 1 2 0 0 Nil -10# 160)
COMMENT      (CObjec.L1:
COMMENT      #198=-(CGroupWage
      (CWage: 0
      (CObjec.L1: 0 (3 #10# 0) 1 2 0 0 #198#
COMMENT      160)
      (LOGPER 0 0 0) 1 (LOG32USE 0 100#006
COMMENT      0) 1
      (LOGFORT 32 12 0 0 0 0 0 0 3 2 1
COMMENT      0)
      #199=-(CLabel
      (CLabel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #14#
COMMENT      (LOGPER 0 0 0) 1
      (LOGFORT 32 12 0 0 0 0 0 0 3 2 1
COMMENT      34
      "AriaL:" 2.53336 0.666657 0
COMMENT      "Group: RC C-Box" "RM" 1 0 0 #26.04#
COMMENT      #199=-(CGroupWage
      (CWage: 0
      (CObjec.L1:
COMMENT      (CLabel: 0 (3 #29# 0) 1 2 0 0 #198#
COMMENT      160) (LOGPER 0 0 0) 1
      (LOG32USE 0 100#006# 0) 1 3.7409#
COMMENT      39323#
      #201=-(CLabel
      (CLabel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #14#
COMMENT      (LOGPER 0 0 0) 1
      (LOGFORT 32 12 0 0 0 0 0 0 3 2 1
COMMENT      34
      "AriaL:" 2.53336 0.666657 0
COMMENT      "Group:OpilLama Rappa C-Box"
      1 0 0 -11.1684 24.716 14.4872 5.84615
COMMENT      #200#)
COMMENT      (CObjec.L1:
COMMENT      #202=-(CGroupWage
      (CWage: 13 (1 13) 1 2 0 0 Nil 1808376
COMMENT      160)
COMMENT      (CObjec.L1:
COMMENT      #193=-(CLabel
      (CLabel: 0 (3 #16# 0) 1 2 0 0 #16#
COMMENT      100) (LOGPER 0 0 0) 1 (LOG32USE 0 100#006# 0) 1 8.3333#
COMMENT      1.2422 1.5737)
COMMENT      #203=-(CLabel
      (CLabel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #14#
COMMENT      (LOGPER 0 0 0) 1
      (LOGFORT 32 12 0 0 0 0 0 0 3 2 1
COMMENT      34
      "AriaL:" 2.53336 0.666657 0

```

【図 64 - 17】

```

COMMENT 0.88800 12.1092 10.9013 0.896104
#210=(COB)ccList;
COMMENT (COB)ccList;
COMMENT #212=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 25 (7 23 0) 1 2 0 0 N11 27958036
100)
COMMENT (COB)ccList;
COMMENT #213=(CS)ccp;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #212# 0
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0 0 4)
0.893306
COMMENT 3.9873 0.7 21
COMMENT #214=(CL)cc;
COMMENT (CW)ccgt 0 (0 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0 "BOLD"
COMMENT 0 -5.40773 20.9109 1.64103 0.846104
#215=(CG)ccp;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #226 0) 1 2 0 0 #212# 0
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0 0 4)
0.893306
COMMENT 3.78870 0.7 21
COMMENT #216=(CL)cc;
COMMENT (CW)ccgt 0 (0 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT "Logon-Consol. 800 2.1-3" "BK" 1 0 0 -
26.0426 1.64103 0.846104 #216#)
#217=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 25 (7 23 0) 1 2 0 0 N11 #36 100)
COMMENT (COB)ccList;
COMMENT #218=(CL)cc;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
0.893306
COMMENT 3.78870 0.7 21
COMMENT #219=(CL)cc;
COMMENT (CW)ccgt 0 (0 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0 "BOLD"
COMMENT "Logon-Consol. 800 2.1-3" "BK" 1 0 0 -
26.0426 1.64103 0.846104 #216#)

```

FIG.64 続き

【図 64 - 18】

```

COMMENT "BK" 1 0 0 -12.2962 9.97981 3.79487
#218#)
COMMENT #220=(CL)cc;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
3.78870
COMMENT #221=(CL)cc;
COMMENT (CW)ccgt 0 (0 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0 "BOLD"
COMMENT "Logon-Consol. 800 2.1-3" "BK" 1 0 0 -
12.2962 9.97981 3.79487
#222#)
COMMENT #222=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 30 (7 30 0) 1 2 0 0 N11 18088376
100)
COMMENT (COB)ccList;
COMMENT #223=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 1 (LOGB3USE 0
0.893306
COMMENT #224=(CL)cc;
COMMENT (CW)ccgt 0 (0 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT "Promoter (CGV-MIS)" "BK" 1 0 0 -
3.78870 7.29041 0.846104 #223#)
#225=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 1 (LOGB3USE 0
1.64221 3.21919 1.662322) 0.8 1.8
#226=(CL)cc;
COMMENT (CW)ccgt 0 (0 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34

```

FIG.64 続き

【図 64 - 19】

```

COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT "Promoter (CGV-MIS) (Logon-Consol. 800) "BK"
-14.8456 12.1092 11.1093 0.846104
#227#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 15 (7 15 0) 1 2 0 0 N11 -100)
COMMENT (COB)ccList;
COMMENT #228=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT "Logon-Consol. 800 2.1-3" "BK" 1 0 0 -
14.8456 12.1092 11.1093 0.846104
#229#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT "Logon-Consol. 800 2.1-3" "BK" 1 0 0 -
14.8456 12.1092 11.1093 0.846104
#230#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT "Logon-Consol. 800 2.1-3" "BK" 1 0 0 -
14.8456 12.1092 11.1093 0.846104
#231#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT "Logon-Consol. 800 2.1-3" "BK" 1 0 0 -
14.8456 12.1092 11.1093 0.846104
#232#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT "Logon-Consol. 800 2.1-3" "BK" 1 0 0 -
14.8456 12.1092 11.1093 0.846104
#233#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT "Logon-Consol. 800 2.1-3" "BK" 1 0 0 -
14.8456 12.1092 11.1093 0.846104

```

FIG.64 続き

【図 64 - 20】

```

COMMENT #234=(CL)cc;
COMMENT (CW)ccgt 0 (0 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0 "BOLD"
0 0 13.5882 1.50809 2.61538 0.846104
#235#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0 "BOLD"
0 0 13.5882 1.50809 2.61538 0.846104
#236#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0 "BOLD"
0 0 13.5882 1.50809 2.61538 0.846104
#237#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0 "BOLD"
0 0 13.5882 1.50809 2.61538 0.846104
#238#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0 "BOLD"
0 0 13.5882 1.50809 2.61538 0.846104
#239#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0 "BOLD"
0 0 13.5882 1.50809 2.61538 0.846104
#240#=(CG)ccWdggt;
COMMENT (CW)ccgt 0 (3 #216 0) 1 2 0 0 #216#
100)
COMMENT (LOGPEN 0 0 0) 8 (LOGB3USE 0
1.8
COMMENT (LOGFONT 32 12 0 0 /00 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT "Arial") 2.53336 0.666667 0 "BOLD"
0 0 13.5882 1.50809 2.61538 0.846104

```

FIG.64 続き

【図 6 4 - 2 1】

```

COMMENT
#219- (CObLocList)
#211- (CGroupWidgel
(CWidgel: 53 (7 53 0) 1 2 0 0 NLL 18088360
100)
(CObLocList)
#212- (CWinArrow
(CWidgel: 0 (3 #13# 0) 1 2 0 0 #132# 0
100)
(LONGPK 0 0 6723840) 1
(LONGPK32 0 100/9334 3) 1 2.59031
0.082322) 0.8 1.8 1)
#213- (CLabel
(CWidgel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #14#
100)
(LONGPK 0 0 0) 1
(LONGPK32 32 12 0 0 700 0 0 0 3 2 1
"Arial") 2.53336 0.666667 0
"RTA (Data=Access) At (R)" "OK" 1 0
6.9424 3.25641 0.692308 0.692308
(CObLocList)
#214- (CGroupWidgel
(CWidgel: 34 (7 34 0) 1 2 0 0 NLL 26863420
100)
(CObLocList)
#215- (CWinArrow
(CWidgel: 0 (3 #14# 0) 1 2 0 0 #132# 0
100)
(LONGPK 0 0 6723840) 1
(LONGPK32 0 100/9334 3) 1 2.59031
0.082322) 0.8 1.8 0)
#216- (CLabel
(CWidgel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #14#
100)
(LONGPK 0 0 0) 1
(LONGPK32 32 12 0 0 700 0 0 0 3 2 1
"Arial") 2.53336 0.666667 0 "RTA (G
Data)"
"OK" 1 0 0 6.93373 3.25641 0.692308
#217- (CGroupWidgel
(CWidgel: 11 (6 0) 1 2 0 0 NLL 1088
100)
(CObLocList)
#218- (CGroupWidgel
(CWidgel: 1 (10 #0# 0) 1 2 0 0 NLL 1227 100)
(CObLocList)

```

FIG.64 続き

【図 6 4 - 2 2】

```

COMMENT
#219- (CObLocList)
(CWidgel: 1 (1 #0# 1) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 10053171) 8 1 3.6048 1.9
0.082322 1)
#220- (CLabel
(CWidgel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 103) 1
(LONGPK32 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
"Georgia") 2.53336 0.555556 128
"\\.\ Back (4367)" "OK (88)" 5 0 0
28.576 4.07692 0.692308 #219#)
(CObLocList)
#221- (CGroupWidgel
(CWidgel: 2 (10 #1# 0) 1 2 0 0 NLL 674 100)
(CObLocList)
#222- (CObLocList)
(CWidgel: 1 (1 #0# 1) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 10053171) 8 1 3.6048 1.9
0.082322 1)
#223- (CLabel
(CWidgel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 103) 1
(LONGPK32 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
"Georgia") 2.53336 0.555556 128
"\\.\ Back (4367)" "OK (88)" 5 0 0
9.57581 3.42026 0.692308 #222#)
(CObLocList)
#224- (CGroupWidgel
(CWidgel: 2 (10 #3# 0) 1 2 0 0 NLL 320 100)
(CObLocList)
#225- (CObLocList)
(CWidgel: 1 (1 #3# 1) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 10053171) 8 1 3.6048 1.9
0.082322 1)
#226- (CLabel
(CWidgel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 103) 1
(LONGPK32 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
"Georgia") 2.53336 0.555556 128
"\\.\ Back (4367)" "OK (88)" 5 0 0
7.0424 2.64103 0.692308 #225#)
(CObLocList)
#227- (CGroupWidgel
(CWidgel: 2 (10 #3# 0) 1 2 0 0 NLL 1366 100)
(CObLocList)

```

FIG.64 続き

【図 6 4 - 2 3】

```

COMMENT
#228- (CObLocList)
(CWidgel: 1 (1 #3# 1) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 10053171) 8 1 3.6048 1.9
0.082322 1)
#229- (CLabel
(CWidgel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 103) 1
(LONGPK32 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
"Georgia") 2.53336 0.555556 128
"\\.\ Back (4367)" "OK (88)" 5 0 0
7.0424 2.64103 0.692308 #228#)
(CObLocList)
#230- (CGroupWidgel
(CWidgel: 2 (10 #3# 0) 1 2 0 0 NLL 739 100)
(CObLocList)
#231- (CObLocList)
(CWidgel: 1 (1 #3# 1) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 10053171) 8 1 3.6048 1.9
0.082322 1)
#232- (CLabel
(CWidgel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 103) 1
(LONGPK32 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
"Georgia") 2.53336 0.555556 128
"\\.\ Back (4367)" "OK (88)" 5 0 0
10.8424 3.17943 0.692308 #231#)
(CObLocList)
#233- (CGroupWidgel
(CWidgel: 1 (10 #7# 0) 1 2 0 0 NLL 2780/292
100)
(CObLocList)
#234- (CObLocList)
(CWidgel: 1 (1 #7# 1) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 10053171) 8 1 3.6048 1.9
0.082322 1)
#235- (CLabel
(CWidgel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 103) 1
(LONGPK32 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
"Georgia") 2.53336 0.555556 128
"\\.\ Back (4367)" "OK (88)" 5 0 0
28.5993 3.33333 0.692308 #234#)
(CObLocList)
#236- (CGroupWidgel

```

FIG.64 続き

【図 6 4 - 2 4】

```

COMMENT
(CWidgel: 1 (10 #9# 0) 1 2 0 0 NLL 18088360
100)
(CObLocList)
#237- (CObLocList)
(CWidgel: 1 (1 #9# 1) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 10053171) 8 1 3.6048 1.9
0.082322 1)
#238- (CLabel
(CWidgel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 103) 1
(LONGPK32 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
"Georgia") 2.53336 0.555556 128
"\\.\ Back (4367)" "OK (88)" 5 0 0
28.5993 3.33333 0.692308 #237#)
(CObLocList)
#239- (CGroupWidgel
(CWidgel: 2 (10 #2# 0) 1 2 0 0 NLL 181 100)
(CObLocList)
#240- (CObLocList)
(CWidgel: 1 (1 #2# 1) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 10053171) 8 1 3.6048 1.9
0.082322 1)
#241- (CLabel
(CWidgel: 0 (0 0) 1 2 0 0 #13# 0
100)
(LONGPK 0 0 103) 1
(LONGPK32 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
"Georgia") 2.53336 0.555556 128
"\\.\ Back (4367)" "OK (88)" 5 0 0
28.5993 3.33333 0.692308 #240#)
(CObLocList)
#242- (CGroupWidgel
(CWidgel: 2 (10 #4# 0) 1 2 0 0 NLL 674 100)
(CObLocList)

```

FIG.64 続き

【 図 6 4 - 2 5 】

[illegible]

FIG.64 続き

[illegible]

FIG.64 続き

【 図 6 4 - 2 7 】

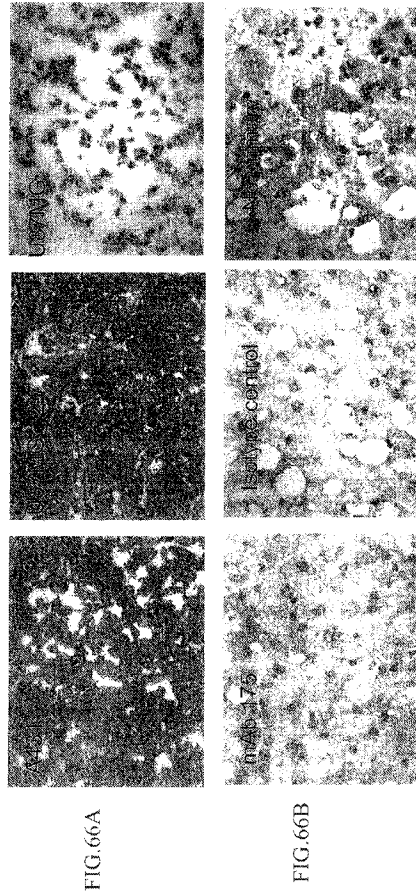
[illegible]

FIG.64 続き

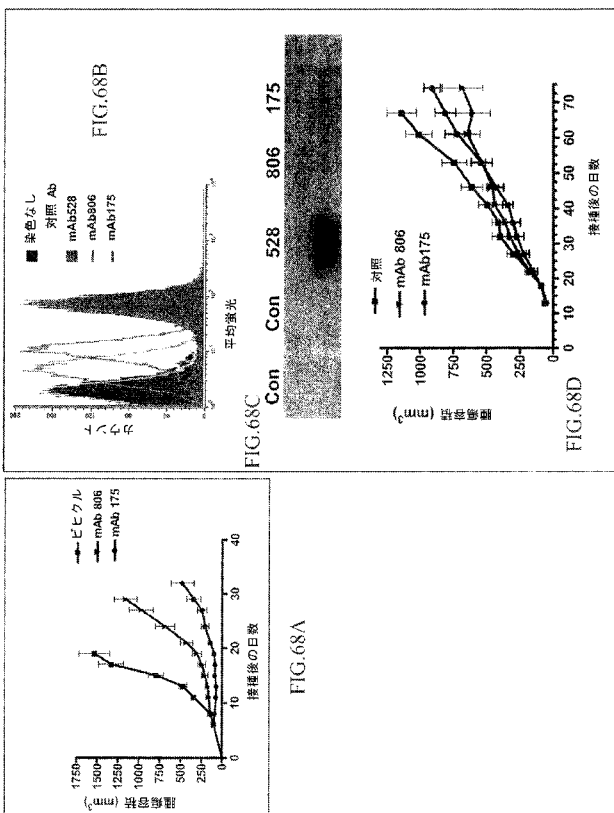
[illegible]

FIG.64 続き

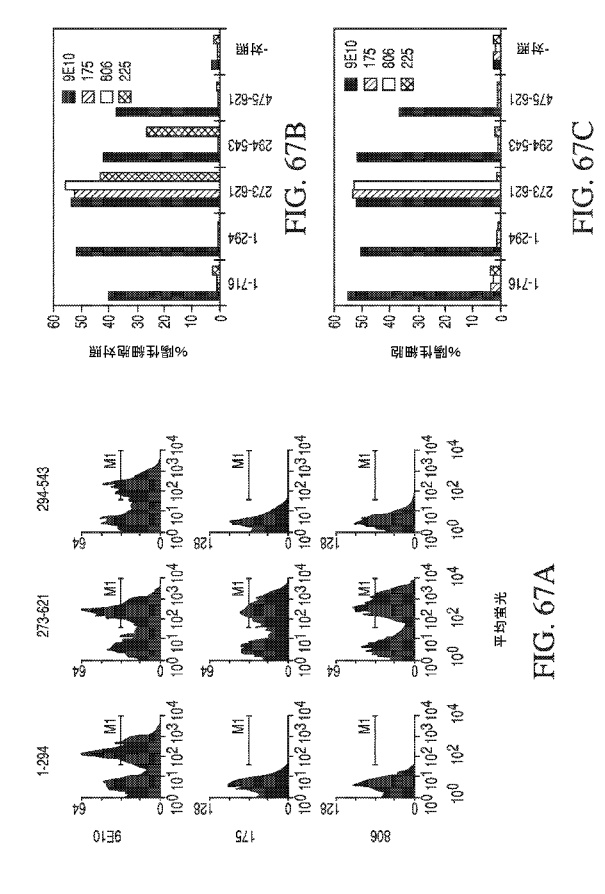
【図 6 6】



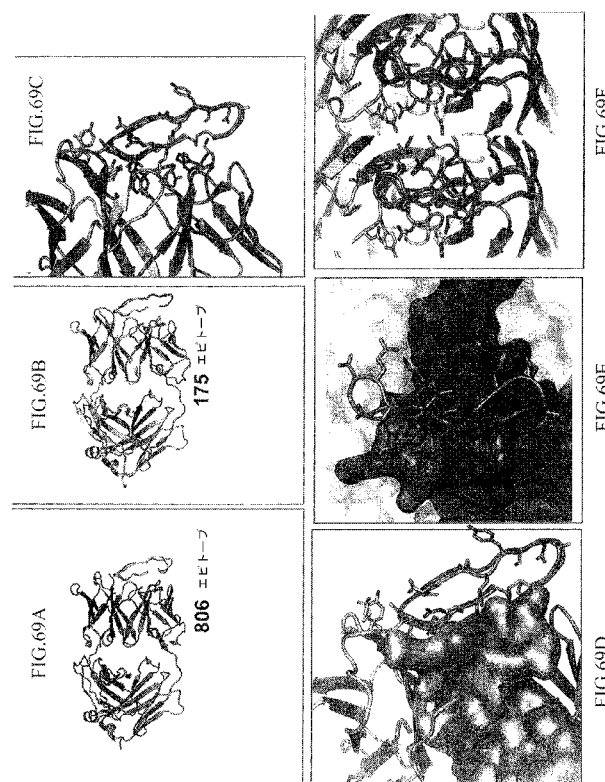
【図 6 8】



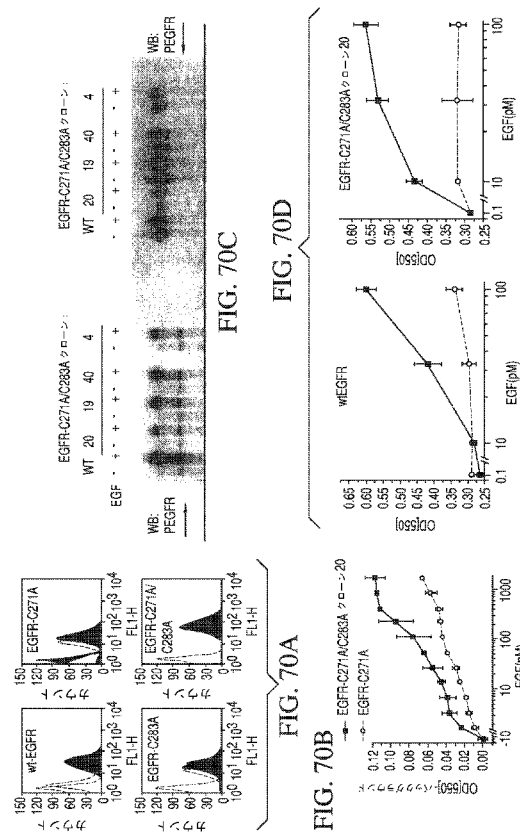
【図 6 7】



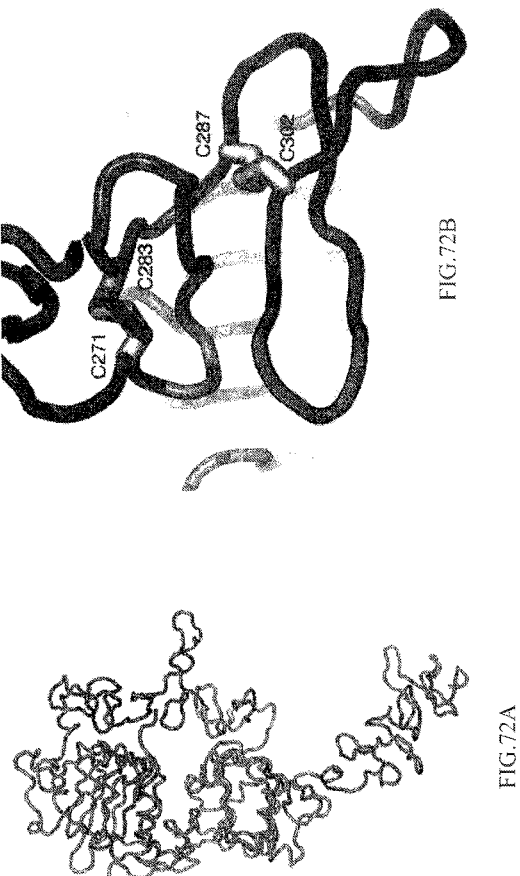
【図 6 9】



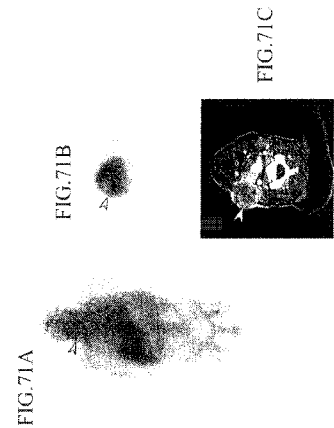
【 図 7 0 】



【 図 7 2 】



【 図 7 1 】



【 図 7 3 】

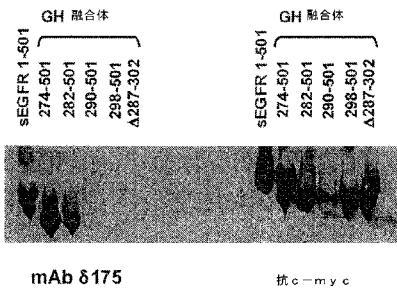
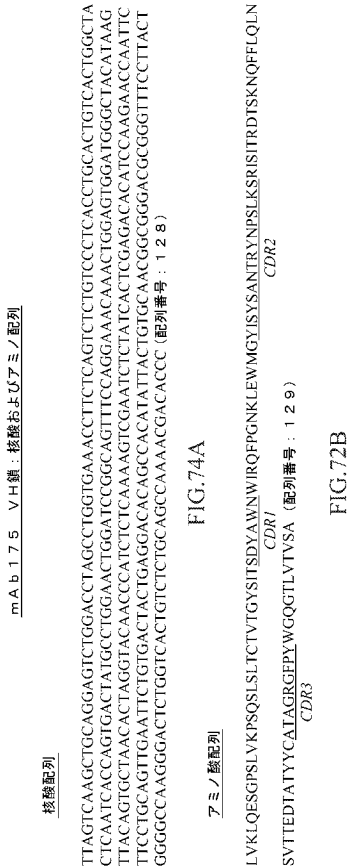
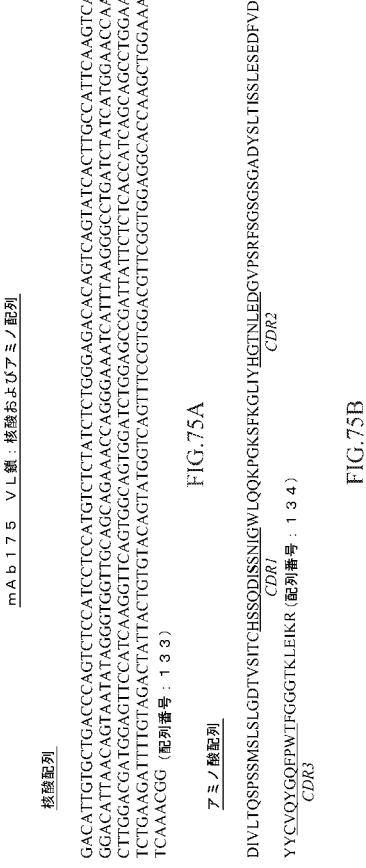


FIG.73

【 図 7 4 】

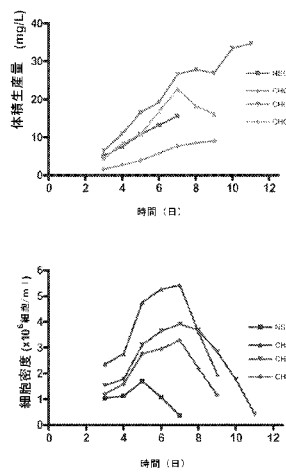


【 図 7 5 】

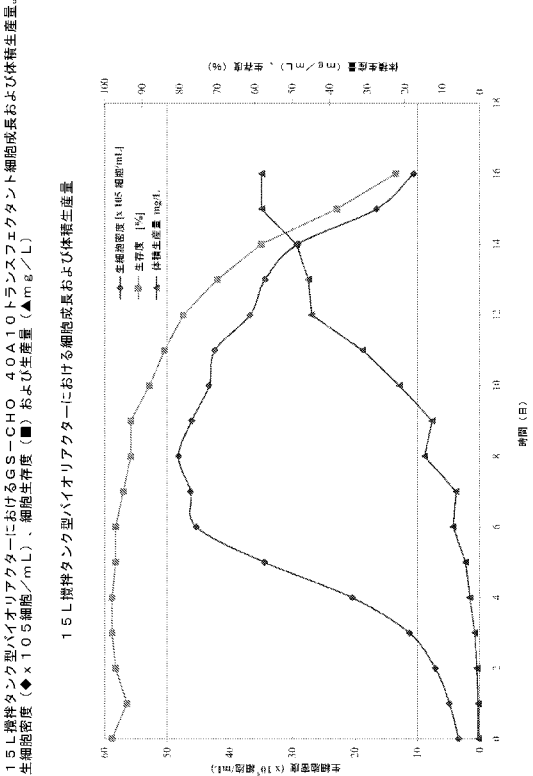


【 図 7 6 - 1 】

小規模（100mL）振盪フラスコ培養でのGS-CHO（14DB、15B2および40A10）およびGS-CHO（15B2）の細胞増殖速度および生産性。606抗イデオタイプ3（15B2）の抗体の生産性（mg/L）を比較する。606抗イデオタイプ3（15B2）の抗体の生産性（mg/L）を比較する。606抗イデオタイプ3（15B2）の抗体の生産性（mg/L）を比較する。



【 図 7 6 - 2 】



【図 77 - 1】

小規模培養により生産したプロテインA精製 hu806 抗体構築物ならびに対照 ch806 および mAb806 のサイズ排除クロマトグラフィー (Biossep SEC-S3000) 分析。各図の上方パネルに 214nm でのクロマトグラムを、および下方パネルに 280nm でのクロマトグラムを提示する。

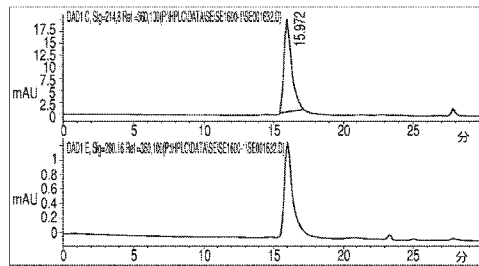


FIG. 77A

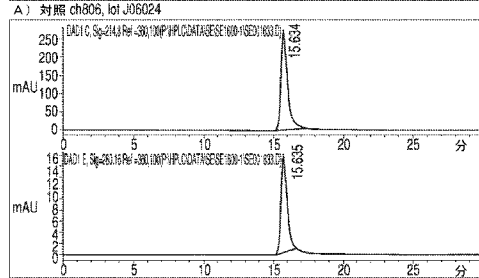


FIG. 77B

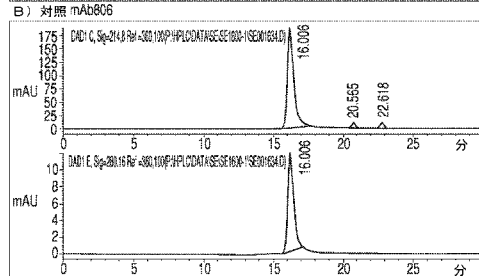
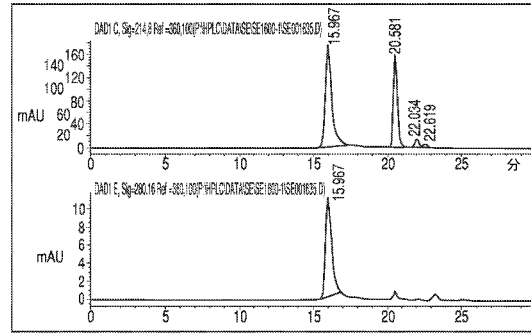


FIG. 77C

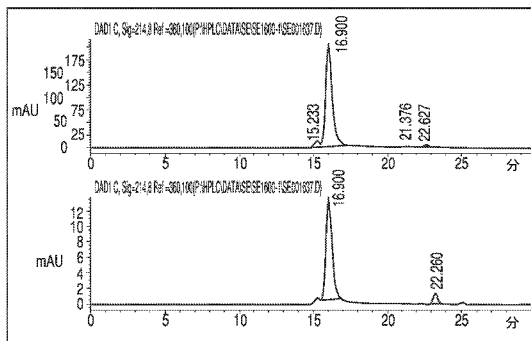
C) 精製 GS-CHO hu806 14D トランスフェクタント産物

【図 77 - 2】



D) : 精製 GS-CHO hu806 15B2 トランスフェクタント産物

FIG. 77D



E) : 精製 GS-NSO hu806 36 トランスフェクタント産物

FIG. 77E

【図 78】

図 3 大規模生産およびプロテインA精製後のプロテインA精製 hu806 抗体構築物 40A10 のサイズ排除クロマトグラフィー (Biossep SEC-S3000) 分析。1、2% の凝集物が存在する 98.8% の純度を示す。214nm でのクロマトグラムを提示する。

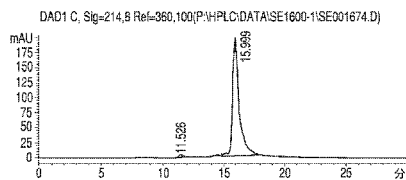


FIG. 78

【図 79】

Novex, USA からのプレキャスト 4-20% Tris/Glycine シンゲルを標準的な SDS-PAGE 条件下で使用して、精製トランスフェクタント hu806 標品 (5 μg) GS-CHO (14D8、15B2 および 40A10) および GS-NSO (36) hu806 を還元条件下で分析した。

クマシーブルー染色剤によって検出したタンパク質。

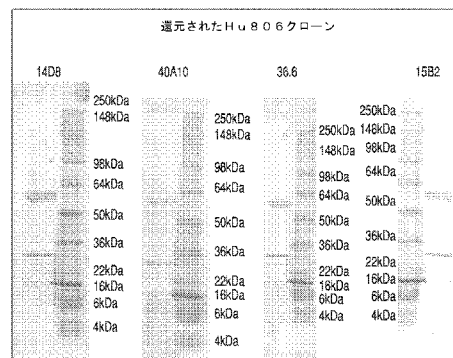


FIG. 79

【図 80】

プレキャスト4-20%Tris/グリシンゲルを標準的なSDS-PAGE条件下で使用して、精製トランスフェクタントhu806標品(5 μ g)GS CHO(14D8、15B2および40A10)およびGS-NSO(36)を非還元条件下で分析した。クマシーブルー染色剤によって検出したタンパク質。

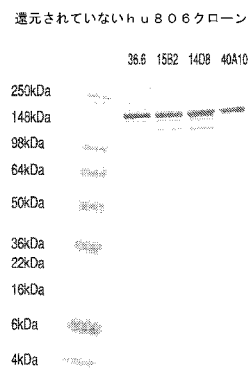


FIG. 80

【図 81】

プレキャスト4-20%Tris/グリシンゲルを標準的なSDS-PAGE条件下で使用して、精製トランスフェクタントhu806 GS CHO 40A10(5 μ g)を大規模生産後に分析した。クマシーブルー染色剤によって検出したタンパク質。



FIG.81

【図 82】

15L生産後の精製トランスフェクタントhu806 GS CHO 40A10(5 μ g)の等電点電気泳動ゲル分析。クマシーブルー染色によって検出したタンパク質。レーン1、pIマーカー；レーン2、hu806(3つのアイソフォーム、pI 8.66から8.22)；レーン3、pIマーカー。

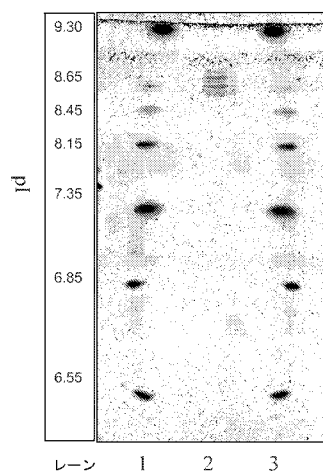


FIG.82

【図 83】

A431細胞への結合：プロテインA精製hu806抗体標品(20 μ g/mL)およびアインタイプ対照huA33(20 μ g/mL)のフローサイトメトリー分析。対照は、二次抗体単独(緑色)およびch806(赤色)を含む。Hu806構築物を小規模培養によって生産した。

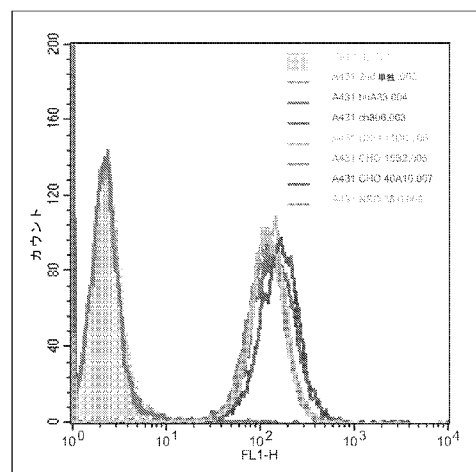
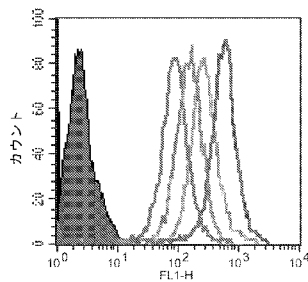


FIG.83

【図 84】

A431細胞への結合：示すとおり、細胞表面の野生型EGFRの～10%を結合する精製mAb806、ch806およびhu806、40A10抗体標品（20 μ g/mL）、528（野生型EGFRとde2-7 EGFRの両方を結合する。）および無関係な抗体（20 μ g/mL）のフローサイトメトリー分析。

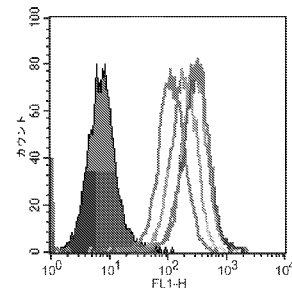


キー	名称	パラメータ	ゲート
■	A431 2B.003	FL1-H	ゲートなし
---	A431 mAb806	FL1-H	ゲートなし
---	A431 ch806.006	FL1-H	ゲートなし
---	A431 hu806.006	FL1-H	ゲートなし
---	A431 Hu806.007	FL1-H	ゲートなし

FIG.84

【図 85】

U87MG、de207神経膠腫細胞への結合。精製mAb806、ch806およびhu806、40A10抗体標品（20 μ g/mL）ならびに528抗EGFRおよび無関係な対照抗体（20 μ g/mL）のフローサイトメトリー分析。



キー	名称	パラメータ	ゲート
■	U87MG d2-7 2B.009	FL1-H	ゲートなし
---	U87MG d2-7 mAb806.012	FL1-H	ゲートなし
---	U87MG d2-7 mAb806.012	FL1-H	ゲートなし
---	U87MG d2-7 ch806.013	FL1-H	ゲートなし
---	U87MG d2-7 hu806.014	FL1-H	ゲートなし

FIG.85

【図 86】

A) U87MG、de2-7神経膠腫細胞およびB) A431癌細胞への125I放射標識806抗体標品の特異的結合

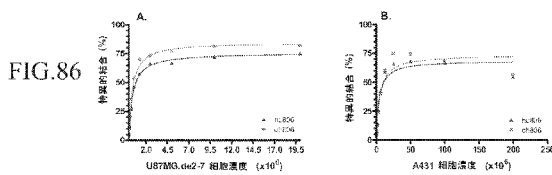


FIG.86

図12. スキャッチャード解析：U87MG、de2-7細胞への125I放射標識A) ch806およびB) hu806抗体標品結合

【図 87】

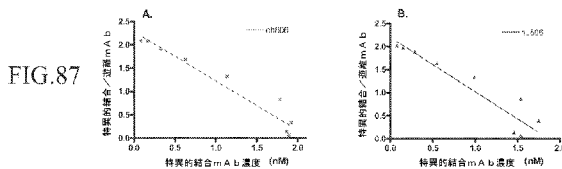


FIG.87

図13. スキャッチャード解析：A431細胞への125I放射標識A) ch806およびB) hu806抗体標品結合

【図 88】

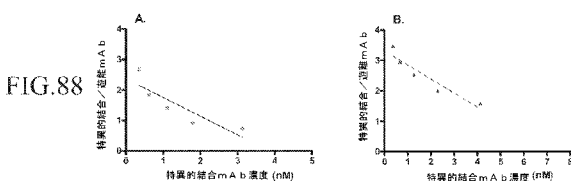


FIG.88

【図 89】

287-302 EGFR 806ペプチドエピトープへの抗原化ペプチド上を通過する50nM、100nM、150nM、200nM、250nMおよび300nMの濃度でのA) hu806およびB) ch806による結合についてのBIAcore分析

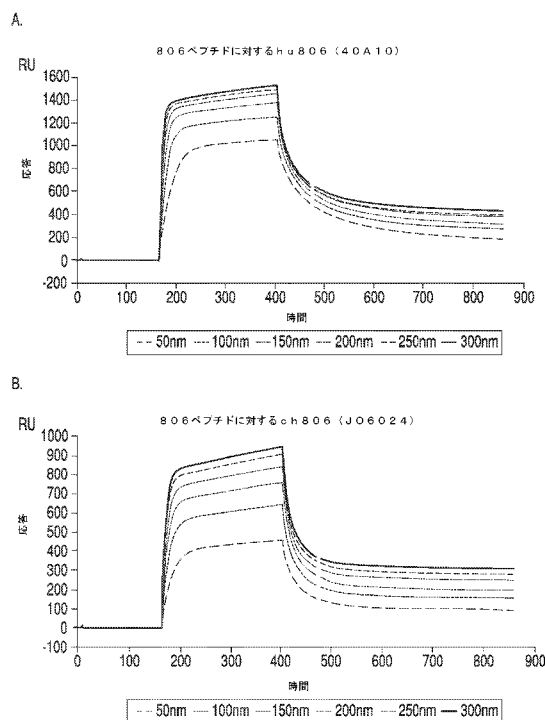


FIG. 89

【図 90】

A) エフェクター対ターゲット細胞比範囲 (E : T = 0.78 : 1 から 100 : 1) にわたって $1 \mu\text{g/mL}$ の各抗体で; B) ターゲット抗体 A431 に対して各抗体の濃度範囲 (3.15 ng/mL - $10 \mu\text{g/mL}$) にわたって E : T = 50 : 1 で判定した、ターゲット A431 に対する ch806 媒介および hu806 媒介抗体依存性細胞傷害性

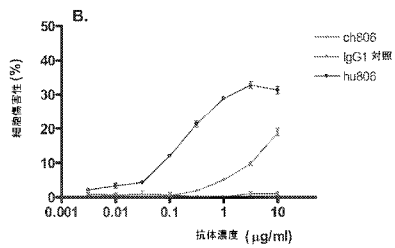
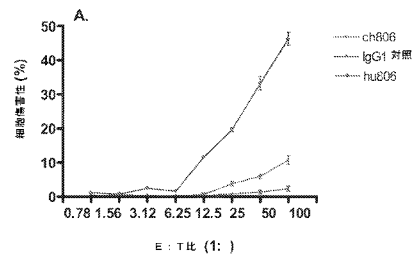


FIG.90

【図 91】

B1A/B ノーマドマウスにおける確立 A431 腫瘍移植の治療。5 匹のマウスの群に $5 \times 1 \text{ mg}$ の期間での 2 週間わたる抗体投与を示すところ (矢印) に照した。研究終了までの平均 $\pm$ SEM 腫瘍容積を示す。

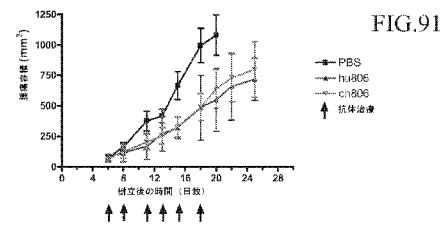


図 17. B1A/B ノーマドマウスにおける確立 U87MG, hu207 腫瘍移植の治療。5 匹のマウスの群に $5 \times 1 \text{ mg}$ の期間での 2 週間わたる抗体投与を示すところ (矢印) に照した。研究終了までの平均 $\pm$ SEM 腫瘍容積を示す。

【図 92】

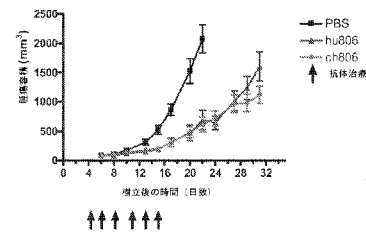


FIG.92

【図 93】

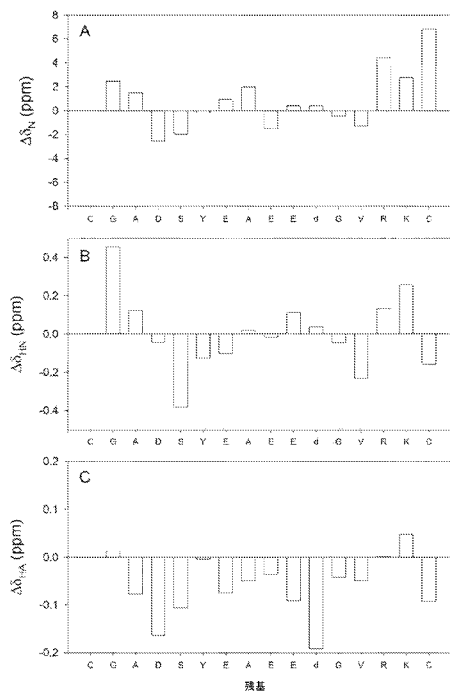
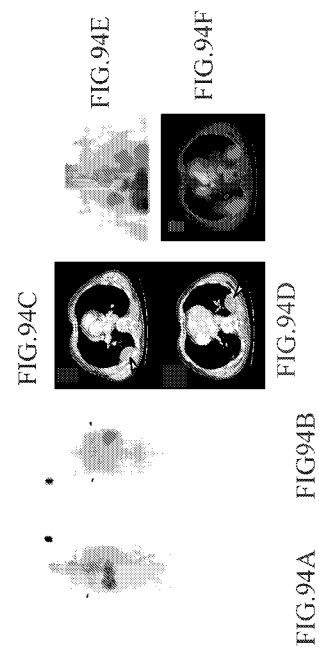
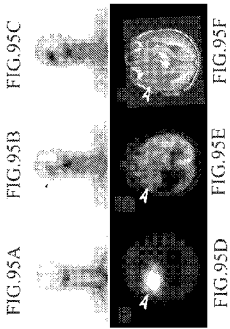


FIG.93

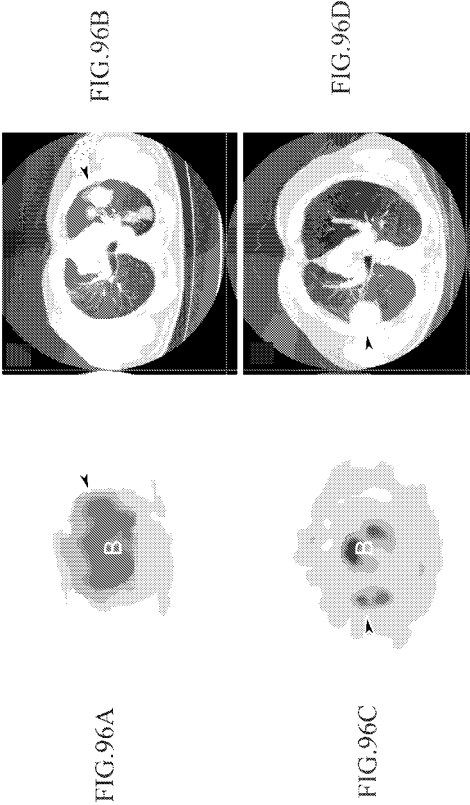
【図 94】



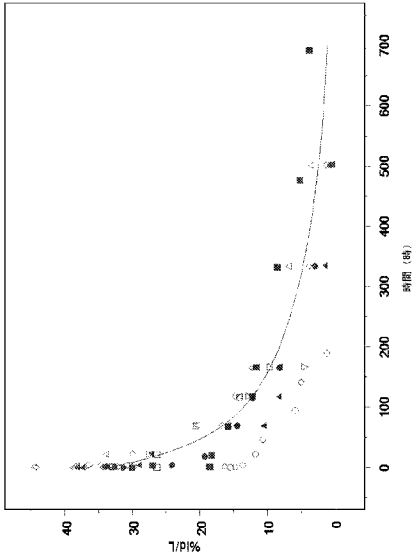
【 図 9 5 】



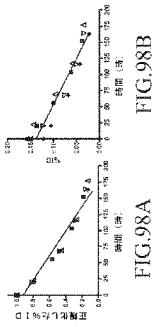
【 図 9 6 】



【 図 9 7 】



【 図 9 8 】



【配列表】

2012518039000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成23年11月17日(2011.11.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2012518039000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成23年11月18日(2011.11.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

もう1つの態様において、EGFR遺伝子の増幅を有する腫瘍（該腫瘍の細胞は、EGFR遺伝子の多数のコピーを含有する。）におけるおよびトランケートされたバージョンのEGFR受容体de2-7を発現する腫瘍におけるEGFRに結合することができる単離された抗体であって、配列番号：13のアミノ酸配列から成るde2-7接合点ペプチドに結合しないものである；ヒト野生型EGFRの残基273-501の配列内のエピトープに結合するものである；軽鎖および重鎖を含み、該軽鎖の可変領域が、アミノ酸配列HSSQDINSNIG（配列番号：18）を有する第一のポリペプチド結合ドメイン領域と、アミノ酸配列HGTNLDD（配列番号：19）を有する第二のポリペプチド結合ドメイン領域と、アミノ酸配列VQYAQFPWT（配列番号：20）を有する第三のポリペプチド結合ドメイン領域とを含み、

該重鎖の可変領域が、アミノ酸配列SDFAWN（配列番号：15）を有する第一のポリペプチド結合ドメイン領域と、式IXに示すアミノ酸配列：

$$YISYSGNTRYX_{aa9}PSLKS \quad (IX)$$

（式中、 X_{aa9} は、非荷電極性R基を有するアミノ酸残基（配列番号159）である。）

に対応するアミノ酸配列を有する第二のポリペプチド結合ドメイン領域と、アミノ酸配列VTAGRGFPY（配列番号：17）を有する第三のポリペプチド結合ドメイン領域とを含むものである抗体を提供する。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0092

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0092】

【図1】図1は、神経膠腫細胞系のフローサイトメトリー分析の結果を提示するものである。U87MG（薄灰色ヒストグラム）およびU87MG、Δ2-7（濃灰色ヒストグラム）細胞を、示されているとおり、無関係なIgG2b抗体（白（open）ヒストグラム）、DH8.3（de2-7 EGFRに特異的）、mAb806または528（野生型とde2-7 EGFRの両方を結合する。）いずれかで染色した。

【図2-1】図2A-Dは、mAb806、mAbDH8.3およびmAb528のELISAの結果を提示するものである。（A）sEGFRコートELISAプレートへの漸

増濃度の mAb 806 (▲) DH8.3 (●) または 528 (■) の結合。(B) 溶液中の漸増濃度の可溶性 EGFR (sEGFR) による sEGFR コート ELISA プレートへの mAb 806 および mAb 528 の結合の阻害。(C) de2-7 接合点ペプチドへの漸増濃度の DH8.3 の結合により、mAb 806 および mAb 528 についての固定化野生型 sEGFR への結合曲線 (D) が説明される。

【図2-2】図2Eおよび2Fは、C末端ビオチン化ペプチドを使用する、および本発明のモノクローナル抗体を他の公知抗体(これらの中で、de2-7 EGFR 突然変異体の接合点ペプチドを認識する L8A4 抗体)および対照と一緒に含む、BIACore 結合研究の結果をグラフで提示するものである。

【図3】図3は、mAb 806 および DH8.3 抗体の内在化を描写するものである。U87MG、Δ2-7 細胞を mAb 806 (▲) または DH8.3 (●) と共に 4 で前保温し、37 に移し、FACS によって内在化を判定した。データは、3回(DH8.3)または4回(mAb 806)の独立した実験の各時点での平均内在化 ± SE を表す。

【図4】図4Aおよび4Bは、U87MG および U87MG、Δ2-7 異種移植片を有するヌードマウスにおける放射標識 (a) ^{125}I -mAb 806 および (b) ^{131}I -DH8.3 の生体内分布 (%ID/g 腫瘍組織) を図示するものである。各点は、1時間 (n = 4) を除く 5 匹のマウスの平均 ± SE を表す。

【図5】図5Aおよび5Bは、U87MG、Δ2-7 異種移植片を有するヌードマウスにおける (a) 腫瘍: 血液または (b) 腫瘍: 肝臓比として表示した放射標識 ^{125}I -mAb 806 (白棒) および ^{131}I -DH8.3 (黒棒) 抗体の生体内分布を図示するものである。各棒は、1時間 (n = 4) を除く 5 匹のマウスの平均 ± SE を表す。

【図6】図6A-Cは、EGFR 遺伝子の増幅を有する細胞系のフローサイトメトリー分析を図示するものである。A431 細胞を mAb 806、DH8.3 または 528 のいずれかで染色し (黒ヒストグラム)、無関係な IgG2b 抗体 (白ヒストグラム) と比較した。

【図7】図7Aおよび7Bは、U87MG、Δ2-7 および A431 異種移植片を有するヌードマウスにおける放射標識 (a) ^{125}I -mAb 806 および (b) ^{131}I -528 の生体内分布 (%ID/g 腫瘍組織) を図示するものである。

【図8】図8A-Dは、(A、C) U87MG、Δ2-7 および (B、D) A431 異種移植片を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: 肝臓比として表示した放射標識 ^{125}I -mAb 806 (白棒) および ^{131}I -528 (黒棒) ならびに抗体の生体内分布を図示するものである。

【図9】図9Aおよび9Bは、予防的モデルにおける (A) U87MG および (B) U87MG、Δ2-7 異種移植片成長率に対する mAb 806 の抗腫瘍効果を図示するものである。週齢 4 - 6 週 BALB/c ヌードマウス、(n = 5)、の両側腹部に、第0日に、 3×10^6 U87MG または U87MG、Δ2-7 細胞を s.c. 注射した。腫瘍細胞接種の1日前に開始して 1 mg の mAb 806 (●); 0.1 mg の mAb 806 (▲); または ビヒクル (○) のいずれかをマウスに i.p. 注射した。矢印により示すように 2 週間、週 3 回、注射を施した。平均腫瘍容積 ± S.E. としてデータを表示する。

【図10】図10A、10B および 10C は、確率モデルにおける (A) U87MG、(B) U87MG、Δ2-7 および (C) U87MG、wtEGFR 異種移植片に対する mAb 806 の抗腫瘍効果を図示するものである。週齢 4 - 6 週 BALB/c ヌードマウス、(n = 5)、の両側腹部に、 3×10^6 U87MG、U87MG、Δ2-7 または U87MG、wtEGFR 細胞を s.c. 注射した。腫瘍が $65 - 80 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍容積に達したときに開始して 1 mg 用量の mAb 806 (●); 0.1 mg 用量の mAb 806 (▲); または ビヒクル (○) のいずれかをマウスに i.p. 注射した。矢印により示すように 2 週間、週 3 回、注射を施した。平均腫瘍容積 ± S.E. としてデータを表示する。

【図11】図11Aおよび11Bは、(A) 予防的モデルおよび (B) 確率モデルにおける A431 異種移植片に対する mAb 806 の抗腫瘍効果を図示するものである。週齢 4

- 6週BALB/cヌードマウス、($n = 5$)、の両側腹部に、 3×10^6 A431細胞をs.c.注射した。予防的モデルの場合は腫瘍細胞接種の1日前に開始して、または腫瘍が 200 mm^3 の平均腫瘍容積に達したときに開始して、1mg用量のmAb806(●)；またはビヒクル(○)のいずれかをマウスにi.p.注射した。矢印により示すように2週間、週3回、注射を施した。平均腫瘍容積 $\pm$ S.E.としてデータを表示する。

【図12】図12は、予防的モデルにおけるA431異種移植片に対するAG1478での治療と組み合わせたmAb806での治療の抗腫瘍効果を図示するものである。平均腫瘍容積 $\pm$ S.E.としてデータを表示する。

【図13】図13は、漸増濃度($0.5\text{ }\mu\text{M}$ および $5\text{ }\mu\text{M}$)のAG1478の存在下でのA431細胞へのmAb806の結合を描写するものである。

【図14】図14Aおよび14Bは、806VH鎖遺伝子の(A)核酸配列および(B)このアミノ酸翻訳(それぞれ、配列番号：1および配列番号：2)を図示するものである。

【図15】図15Aおよび15Bは、806VL鎖遺伝子の(A)核酸配列および(B)このアミノ酸翻訳(それぞれ、配列番号：3および配列番号：4)を図示するものである。

【図16】図16は、Kabattに従って番号付けしたVH鎖配列(配列番号：2)を示すものであり、CDR(配列番号：15、16および17)に下線を引く。VH鎖配列(配列番号：2)の鍵残基は、24、37、48、67および78である。

【図17】図17は、Kabattに従って番号付けしたVL鎖配列(配列番号：4)を示すものであり、CDR(配列番号：18、19および20)に下線を引く。VL鎖配列(配列番号：4)の鍵残基は、36、46、57および71である。

【図18】図18A-18Dは、併用抗体療法、特にmAb806および528抗体、の治療効果を判定するために計画したインビボ研究の結果を示すものである。マウスにU87MG.D2-7(AおよびB)、U87MG.DK(C)、またはA431(D)細胞の接種を施した。

【図19】図19A-Dは、電子顕微鏡検査による内在化の分析を示すものである。U87MG. Δ 2-7細胞を4で、mAb806またはDH8.3と共に、続いて金コンジュゲート型抗マウスIgGと共に前保温し、37に移し、電子顕微鏡検査によって様々な時点で内在化を検査した。(A)5分後の被覆小窩(矢印)へのDH8.3抗体の局在化；(B)2分後のマクロピノサイトーシス(矢印)によるmAb806の内在化；(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mAb806の局在化。すべての画像についての原倍率は、30,000倍である。

【図20】図20は、 ^{125}I -mAb806の注射の8時間後に採集したU87MG. Δ 2-7異種移植切片のオートラジオグラフィーを示すものである。

【図21】図21は、EGFR遺伝子の増幅を有する細胞系のフローサイトメトリー分析を示すものである。HM5およびMDA-468細胞を、無関係なIgG2b抗体(破線での白ヒストグラム)、mAb806(黒ヒストグラム)または528(閉線での白ヒストグラム)で染色した。DH8.3抗体は、両方の細胞系に対して完全に陰性であった(データを示さない。)

【図22】図22は、細胞系からのEGFRの免疫沈降を示すものである。mAb806、sc-03抗体またはIgG2bアイソタイプ対照で ^{35}S 標識U87MG. Δ 2-7またはA431細胞からEGFRを免疫沈降させた。側面の矢印は、de2-7およびwtEGFRの位置を示す。3回の独立した実験において同一のバンドニングパターンが得られた。

【図23】図23は、 ^{125}I -mAb806の注射の24時間後に採集したA431異種移植切片のオートラジオグラフィーを示すものであり、生組織への局在領域を指摘する(矢印)。

【図 24 - 1】図 24 A および 24 B は、全身 mAb 806 治療を施した頭蓋内 U87MG、ΔEGFR (A) および LN-Z308、ΔEGFR (B) 異種移植片を有するヌードマウスの生存延長を示すものである。U87MG、EGFR 細胞 (1×10^5) または LN-Z308、ΔEGFR 細胞 (5×10^5) をヌードマウスの脳に内植し、内植後第 0 日から第 14 日まで、これらの動物を、mAb 806、PBS、またはアイソタイプ IgG のいずれかで治療した。図 24 E は、腫瘍内 mAb 806 治療を施した頭蓋内 U87MG、ΔEGFR 異種移植片を有するヌードマウスの生存延長を示すものである。説明したように U87MG、ΔEGFR を内植した。第 1 日に開始して 1 日おきに 5 回、 $5 \mu\text{L}$ の体積で 10 mg の mAb 806 またはアイソタイプ IgG 対照を腫瘍注射部位に注射した。

【図 24 - 2】図 24 C および 24 D は、mAb 806 治療による頭蓋内腫瘍の成長阻害を示すものである。mAb 806 またはアイソタイプ IgG 対照のいずれかで治療したヌードマウス (1 群あたり 5 匹) を、U87MG、EGFR (C) については第 9 日に、および LN-Z308、ΔEGFR (D) については第 15 日に安楽死させ、これらの脳を回収し、固定し、切開した。対照の腫瘍容積を 100% と考えることによってデータを計算した。値は、平均 $\pm$ SD である。***、 $P < 0.001$; 対照対 mAb 806。矢じり、腫瘍組織。

【図 25】図 25 A、25 B および 25 C は、mAb 806 が、U87MG、wtEGFR 脳腫瘍を有するマウスの生存を延長するが、U87MG、DK または U87MG 脳腫瘍を有するマウスの生存を延長しないことを示すものである。U87MG (A)、U87MG、DK (B)、または U87MG、wtEGFR (C) 細胞 (5×10^5) をヌードマウスの脳に内植し、内植後第 0 日から第 14 日まで mAb 806 で治療し、その後、治療中止後、観察した。

【図 26】図 26 A は、U87MG 細胞系での mAb 806 の反応性の FACS 分析を示すものである。U87MG、U87MG、ΔEGFR、U87MG、DK、および U87MG、wtEGFR 細胞を、抗 EGFR mAb 528、EGFR、1 および抗 ΔEGFR 抗体、mAb 806 で染色した。モノクローナル EGFR、1 抗体は、wtEGFR を排他的に認識し、ならびにモノクローナル 528 抗体は、wtEGFR および ΔEGFR 両方と反応した。mAb 806 は、U87MG、ΔEGFR および U87MG、DK と強く反応し、U87MG、wtEGFR とは弱く反応した。横座標上のバー、一次抗体不在下での細胞の最大染色。結果は、3 回の異なる実験で再現された。図 26 B は、EGFR 形態の mAb 806 免疫沈降を示すものである。突然変異体および wtEGFR を、(レーン 1) U87MG、(レーン 2) U87Δ、EGFR、(レーン 3) U87MG、DK、および (レーン 4) U87MG、wtEGFR 細胞から、抗 EGFR 抗体、528、EGFR、1、または抗 ΔEGFR 抗体、mAb 806 で免疫単離 (immunoprecipitated)、その後、抗 pan EGFR 抗体、C13 でのウェスタンブロッティングによって検出した。

【図 27】図 27 A および 27 B は、mAb 806 での全身治療が、ΔEDFR のリン酸化、および U87MG、ΔEGFR 脳腫瘍における Bcl-XL 発現を減少させることを示すものである。U87MG、ΔEGFR 腫瘍を mAb 806 治療の第 9 日に切除し、直ちに液体窒素で凍結させ、腫瘍溶解産物調製まで -80°C で保管した。(A) ΔEGFR の発現および自己リン酸化度のウェスタンブロット分析。 $30 \mu\text{g}$ の腫瘍溶解産物を SDS-ポリアクリルアミドゲルにさらし、ニトロセルロース膜に転写し、抗ホスホチロシン mAb でプローブし、その後、ストリッピングし、抗 EGFR 抗体、C13 で再プローブした。(B) (A) の場合と同じ腫瘍溶解産物を使用することによる Bcl-XL のウェスタンブロッティング。抗ヒト Bcl-X ポリクローナル抗体で膜をプローブした。レーン 1 および 2、アイソタイプ対照で治療した U87MG、ΔEGFR 脳腫瘍; レーン 3 および 4、mAb 806 で治療した U87MG、ΔEGFR 脳腫瘍。

【図 28】図 28 は、mAb 806 治療が、U87MG、ΔEGFR 腫瘍において、成長および脈管形成の減少、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もたら

すことを示すものである。腫瘍切片を K i - 6 7 について染色した。各群 4 匹のマウスからの頭蓋内腫瘍における 4 つのランダムに選択した高倍率視野 (4 0 0 倍) から K i - 6 7 陽性であった全細胞の百分率によって、細胞増殖指数を評定した。データは、平均 $\pm$ S E である。アポトーシス細胞を T U N E L アッセイによって検出した。各群 4 匹のマウスからの頭蓋内腫瘍における 4 つのランダムに選択した高倍率視野 (4 0 0 倍) からの T U N E L 陽性細胞 : 全細胞数の比によって、アポトーシス指数を評定した。データは、平均 $\pm$ S E である。腫瘍切片を抗 C D 3 1 抗体で免疫染色した。各群 4 匹のマウスからの頭蓋内腫瘍における 4 つのランダムに選択した視野 (2 0 0 倍) からのコンピュータ画像解析によって、M V A を分析した。m A b 8 0 6 治療 U 8 7 M G . Δ E G F R 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 F 4 / 8 0 抗体で染色した。

【図 2 9】図 2 9 は、親 U 8 7 M G 神経膠腫細胞系およびトランスフェクトされた U 8 7 M G 神経膠腫細胞系のフローサイトメトリー分析を示すものである。示されているとおり、無関係な I g G 2 b 抗体 (白ヒストグラム) または 5 2 8 抗体または m A b 8 0 6 (黒ヒストグラム) のいずれかで細胞を染色した。

【図 3 0】図 3 0 は、細胞系からの E G F R の免疫沈降を示すものである。E G F R を、³⁵S 標識 U 8 7 M G . w t E G F R、U 8 7 M G . Δ 2 - 7、および A 4 3 1 細胞から、m A b 8 0 6 (8 0 6)、s c - 0 3 抗体 (c - t e r m)、または I g G 2 b アイソタイプ対照 (c o n) で免疫沈降させた。矢印、d e 2 - 7 および w t E G F R の位置。

【図 3 1】図 3 1 は、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 および U 8 7 M G . w t E G F R 異種移植片の代表 H & E 染色パラフィン切片を示すものである。上の図 1 0 において説明したように治療したマウスから U 8 7 M G . Δ 2 - 7 (腫瘍接種の 2 4 日後に採集) および U 8 7 M G . w t E G F R (腫瘍接種の 4 2 日後に採集) 異種移植片を切除し、H & E で染色した。ビヒクル治療 U 8 7 M G . Δ 2 - 7 (腫瘍接種の 1 8 日後に採集) および U 8 7 M G . w t E G F R (腫瘍接種の 3 7 日後に採集) 異種移植片は、壊死を殆ど示さなかった (左パネル) が、m A b 8 0 6 で治療した U 8 7 M G . Δ 2 - 7 と U 8 7 M G . w t E G F R の両方において広範な壊死 (矢印) が観察された (右パネル)。

【図 3 2】図 3 2 は、U 8 7 M G、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 および U 8 7 M G . w t E G F R 異種移植片から採取した凍結切片における E G F R 発現の免疫組織化学的分析を示すものである。上の図 3 1 において説明した時点で切片を採集した。異種移植切片を 5 2 8 抗体 (左パネル) および m A b 8 0 6 (右パネル) で免疫染色した。w t E G F R、増幅された E G F R、または d e 2 - 7 E G F R のいずれに対する免疫反応性減少も、m A b 8 0 6 で治療した異種移植片では観察されなかった。インビトロデータと一致して、親 U 8 7 M G 異種移植片は、5 2 8 抗体について陽性であったが、m A b 8 0 6 染色については陰性であった。

【図 3 3】図 3 3 は、産生されるバイシストロン性発現構築物の略図を示すものである。キメラ抗体鎖の転写を伸長因子 - 1 プロモーターによって開始させ、強力な人工終結配列によって終結させる。軽鎖のコーディング領域と N e o R のコーディング領域の間、および重鎖のコーディング領域と d h f r 遺伝子のコーディング領域の間に、I R E S 配列を導入した。

【図 3 4】図 3 4 A および 3 4 B は、U 8 7 M G - d e 2 - 7 異種移植腫瘍を有する B A L B / c ヌードマウスにおいて (A) ¹²⁵I または (B) ¹¹¹In のいずれかで放射標識した c h 8 0 6 の生体内分布分析を行ったことを示すものである。5 μ g の放射標識抗体をマウスに注射し、8、28、48 または 74 時間、いずれかの時点で、1 時点につき 4 匹のマウスの群で犠牲にした。器官を採集し、計量し、ガンマカウンターで放射能を測定した。

【図 3 5】図 3 5 A および 3 5 B は、(A) % I D グラム腫瘍組織および (B) 腫瘍対血液比を描写するものである。インジウム - 1 1 1 抗体は、おおそ 3 0 % の I D / グラム組織および 4 . 0 の腫瘍対血液比を示す。

【図 3 6】図 3 6 は、確率腫瘍モデルにおけるキメラ抗体 c h 8 0 6 の治療効力を描写するものである。週齢 4 - 6 週の雌ヌードマウスの両側腹部に、1 0 0 μ L の P B S 中の 3

$\times 10^6$ U87MG、 $\Delta 2-7$ 細胞をs.c.接種した。mAb806を陽性対照として含めた。腫瘍が 50 mm^3 の平均容積に達したとき治療を開始し、この治療は、示されている日での合計5回の注射についてのi.p.で施した 1 mg のch806またはmAb806から成った。データを各治療群について平均腫瘍容積 $\pm\text{S.E.}$ として提示する。

【図37】図37は、抗EGFRキメラIgG1抗体ch806および対照cG250についてのターゲット(A)U87MG、 $\Delta 2-7$ および(B)A431細胞に対するCDC活性を示すものである。三重反復判定の細胞傷害性平均(バー; $\pm\text{S.D.}$)パーセントを提示する。

【図38】図38は、ch806およびアイソタイプ対照cG250($0-10\text{ }\mu\text{g/mL}$)によって媒介される50:1のエフェクター:ターゲット細胞比でのターゲット(A)U87MG、 $\Delta 2-7$ および(B)A431細胞に対するADCCを示すものである。三重反復判定の細胞傷害性平均(バー; $\pm\text{S.D.}$)パーセントとして結果を提示する。

【図39】図39は、ターゲットU87MG、 $\Delta 2-7$ 細胞に対する $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ の親mAb806およびch806によって媒介されるADCCをある範囲のエフェクター:ターゲット比に関して示すものである。三重反復判定の平均(バー; $\pm\text{S.D.}$)を提示する。

【図40】図40は、ch806を結合するがhuIgGを結合しない抗体を生産する25のハイブリドーマを最初に選択したことを示すものである。その後、高親和性結合を有するこれらの抗ch806ハイブリドーマのうちの4つ(クローン3E3、5B8、9D6および4D8)を制限希釈により単個細胞からのクローン増殖について追跡し、それぞれ、Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hybridoma(LMH)-11、-12、-13および-14と呼んだ。加えて、huIgGに特異的なmAbを生産する2つのハイブリドーマもクローニングし、さらに特性づけした:クローン2C10(LMH-15)および2B8(LMH-16)。

【図41】図41A、41Bおよび41Cは、クローン増殖後、ハイブリドーマ培養上清を、sEGFR621でch806またはmAb806抗原結合活性を中和する能力についてELISAにより三重反復で検査した。平均($\pm\text{S.D.}$)結果は、sEGFRでコーティングしたプレートへのch806およびマウスmAb806両方の結合の溶解状態での遮断で抗イディオタイプmAb LMH-11、-12、-13および-14のアンタゴニスト活性を明示した(LMH-14を示さない)。

【図42-1】図42A、42Bは、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ の精製(A)LMH-11、(B)LMH-12および(C)LMH-13でコーティングしたマクロタイタープレートを示すものである。これら3種の精製クローンを、血清または1%FCS/培地中のch806またはmAb806を捕捉するこれらの能力について比較した。その後、結合したch806またはmAb806を検出する。二次コンジュゲートアビジン-HRPおよびABTS基質のための対照に加えて、血清および1%FCS/培地中のアイソタイプ対照抗体hu3S193およびm3S193を含めた。検出のためにビオチン化LMH-12($10\text{ }\mu\text{g/mL}$)を使用して三重反復試験サンプルの平均($\pm\text{S.D.}$)として結果を提示する。これらの結果は、捕捉および検出のために使用したLMH-12が、血清中のch806(3 ng/mL)に対する最高の感受性と無視できる程度のバックグラウンド結合を有したことを示している。

【図42-2】42Cは、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ の精製(A)LMH-11、(B)LMH-12および(C)LMH-13でコーティングしたマクロタイタープレートを示すものである。これら3種の精製クローンを、血清または1%FCS/培地中のch806またはmAb806を捕捉するこれらの能力について比較した。その後、結合したch806またはmAb806を検出する。二次コンジュゲートアビジン-HRPおよびABTS基質のための対照に加えて、血清および1%FCS/培地中のアイソタイプ対照抗体hu3S193およびm3S193を含めた。検出のためにビオチン化LMH-12($10\text{ }\mu\text{g/mL}$)

L)を使用して三重反復試験サンプルの平均(±SD)として結果を提示する。これらの結果は、捕捉および検出のために使用したLMH-12が、血清中のch806(3 ng/mL)に対する最高の感受性と無視できる程度のバックグラウンド結合を有したことを示している。

【図43】図43は、1 μg/mLの抗イディオタイプLMH-12および1 μg/mLのビオチン化LMH-12をそれぞれ捕捉および検出のために使用する、最適な薬物動学的ELISA条件の妥当性検証を示すものである。3回の独立したELISAを四重反復で行って、3人の健常ドナーからのドナー血清中のch806(●)または1%BSA/培地中のch806(■)を、血清中のアイソタイプ対照hu3S193(▲)または1%BSA/培地中のアイソタイプ対照hu3S193(▼)と共に測定した。二次コンジュゲートアビジン-HRPについての対照()およびABTS基質についての対照(六角形)単独も各ELISAに含めた。平均(±SD)結果は、3 ng/mLの検出限界で血清中のch806(2 μg/mL - 1.6 ng/mL)の測定について非常に再現性のある結合曲線を明示する(n=12; 1-100 ng/mL、変動係数<25%; 100 ng/mL - 5 μg/mL、変動係数<15%)。試験した3つの血清のいずれに関してもはっきりわかるバックグラウンド結合はなく、および無視できる程度の結合がアイソタイプ対照hu3S193に関して観察された。

【図44】図44は、mAb806でプロットした、CHO細胞において発現された組換えsEGFRの免疫プロットを描写するものである。組換えsEGFRをPNGaseFで処理して、N結合型グリコシル化(脱グリコシル化したもの)または未処理のもの(未処理のもの)を除去し、タンパク質をSDS-PAGEにかけ、膜に転写し、mAb806で免疫プロットした。

【図45】図45は、異なる抗体(SC-03、806および528抗体)での³⁵S標識細胞系(U87MG、Δ2-7、U87MG-wtEGFR、およびA431)からのEGFRの免疫沈降を描写するものである。

【図46】図46は、³⁵Sメチオニン/システインでのパルス標識後、異なる時点(時間0から240分)での異なる細胞(A431およびU87MG、Δ2-7)からのEGFRの免疫沈降を描写するものである。抗体528および806を免疫沈降に使用する。

【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消化の不在下(-)でのおよびEndo H消化後(+)の様々な抗体(SC-03、806および528)での様々な細胞系(U87MG、Δ2-7、U87MG-wtEGFR、およびA431)からのEGFRの免疫沈降を描写するものである。

【図48】図48は、A431およびU87MG、Δ2-7細胞系の細胞表面ヨウ素化後の806抗体での、およびEndo H消化を伴うまたは伴わない、免疫沈降を描写するものであり、この図により、A431細胞の細胞表面にmAb806によって結合されたEGFRがEndo H感受性形態であることが確証される。

【図49-1】図49-1は、pREN ch806 LC Neo Vector(配列番号:7)を示すものである。

【図49-2】図49-2は、pREN ch806 LC Neo Vector(配列番号:7)を示すものである。

【図49-3】図49-3は、pREN ch806 LC Neo Vector(配列番号:7)を示すものである。

【図49-4】図49-4は、pREN ch806 LC Neo Vector(配列番号:7)を示すものである。

【図49-5】図49-5は、pREN ch806 LC Neo Vector(配列番号:7)を示すものである。

【図49-6】図49-6は、pREN ch806 LC Neo Vector(配列番号:7)を示すものである。

【図50-1】図50-1は、pREN ch806 HC DHFR Vector(配列番号:8)を示すものである。

【図 5 0 - 2】図 5 0 - 2 は、p R E N c h 8 0 6 H C D H F R V e c t o r (配列番号：8) を示すものである。

【図 5 0 - 3】図 5 0 - 3 は、p R E N c h 8 0 6 H C D H F R V e c t o r (配列番号：8) を示すものである。

【図 5 0 - 4】図 5 0 - 4 は、p R E N c h 8 0 6 H C D H F R V e c t o r (配列番号：8) を示すものである。

【図 5 0 - 5】図 5 0 - 5 は、p R E N c h 8 0 6 H C D H F R V e c t o r (配列番号：8) を示すものである。

【図 5 0 - 6】図 5 0 - 6 は、p R E N c h 8 0 6 H C D H F R V e c t o r (配列番号：8) を示すものである。

【図 5 0 - 7】図 5 0 - 7 は、p R E N c h 8 0 6 H C D H F R V e c t o r (配列番号：8) を示すものである。

【図 5 1 - 1】図 5 1 A - B は、m A b 1 2 4 V H および V L 鎖核酸配列 (それぞれ、配列番号：2 1 および 2 6) およびアミノ酸配列 (それぞれ、配列番号：2 2 および 2 7) を示すものである。

【図 5 1 - 2】図 5 1 C - D は、m A b 1 2 4 V H および V L 鎖核酸配列 (それぞれ、配列番号：2 1 および 2 6) およびアミノ酸配列 (それぞれ、配列番号：2 2 および 2 7) を示すものである。

【図 5 2 - 1】図 5 2 A - B は、m A b 1 1 3 3 V H および V L 鎖核酸配列 (それぞれ、配列番号：3 1 および 3 6) およびアミノ酸配列 (それぞれ、配列番号：3 2 および 3 7) を示すものである。

【図 5 2 - 2】図 5 2 C - D は、m A b 1 1 3 3 V H および V L 鎖核酸配列 (それぞれ、配列番号：3 1 および 3 6) およびアミノ酸配列 (それぞれ、配列番号：3 2 および 3 7) を示すものである。

【図 5 3】図 5 3 は、h u 8 0 6 H (V H + C H) 発現カートリッジを含有する p E E 1 2 . 4 と h u 8 0 6 L (V L + C L) 発現カートリッジを含有する p E E 6 . 4 とを含む複合 2 遺伝子 L o n z a プラスミドの DNA プラスミド図を示すものである。

【図 5 4 - 1】図 5 4 - 1 は、図 5 3 に記載した複合 L o n z a プラスミドの DNA 配列 (配列番号：4 1 ; 補体 配列番号：1 6 2) を示すものである。この配列は、h u 8 0 6 抗体に関連したすべての翻訳 (配列番号：4 2 - 5 1 および 1 6 3 - 1 6 6) も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである： (灰色) : シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列； (ラベンダー) : h u 8 0 6 V H 鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域； (ピンク) : h u 8 0 6 C H 鎖、コドン最適化された重鎖定常領域； (緑色) : h u 8 0 6 V L 鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域；および (黄色) : h u 8 0 6 C L 鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図 5 4 - 2】図 5 4 - 2 は、図 5 3 に記載した複合 L o n z a プラスミドの DNA 配列 (配列番号：4 1 ; 補体 配列番号：1 6 2) を示すものである。この配列は、h u 8 0 6 抗体に関連したすべての翻訳 (配列番号：4 2 - 5 1 および 1 6 3 - 1 6 6) も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである： (灰色) : シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列； (ラベンダー) : h u 8 0 6 V H 鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域； (ピンク) : h u 8 0 6 C H 鎖、コドン最適化された重鎖定常領域； (緑色) : h u 8 0 6 V L 鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域；および (黄色) : h u 8 0 6 C L 鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図 5 4 - 3】図 5 4 - 3 は、図 5 3 に記載した複合 L o n z a プラスミドの DNA 配列

(配列番号：41；補体 配列番号：162)を示すものである。この配列は、hu806抗体に関連したすべての翻訳(配列番号：42-51および163-166)も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである：(灰色)：シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列；(ラベンダー)：hu806 VH鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域；(ピンク)：hu806 CH鎖、コドン最適化された重鎖定常領域；(緑色)：hu806 VL鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域；および(黄色)：hu806 CL鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図54-4】図54-4は、図53に記載した複合LonzaプラスミドのDNA配列(配列番号：41；補体 配列番号：162)を示すものである。この配列は、hu806抗体に関連したすべての翻訳(配列番号：42-51および163-166)も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである：(灰色)：シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列；(ラベンダー)：hu806 VH鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域；(ピンク)：hu806 CH鎖、コドン最適化された重鎖定常領域；(緑色)：hu806 VL鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域；および(黄色)：hu806 CL鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図54-5】図54-5は、図53に記載した複合LonzaプラスミドのDNA配列(配列番号：41；補体 配列番号：162)を示すものである。この配列は、hu806抗体に関連したすべての翻訳(配列番号：42-51および163-166)も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである：(灰色)：シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列；(ラベンダー)：hu806 VH鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域；(ピンク)：hu806 CH鎖、コドン最適化された重鎖定常領域；(緑色)：hu806 VL鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域；および(黄色)：hu806 CL鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図54-6】図54-6は、図53に記載した複合LonzaプラスミドのDNA配列(配列番号：41；補体 配列番号：162)を示すものである。この配列は、hu806抗体に関連したすべての翻訳(配列番号：42-51および163-166)も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである：(灰色)：シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列；(ラベンダー)：hu806 VH鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域；(ピンク)：hu806 CH鎖、コドン最適化された重鎖定常領域；(緑色)：hu806 VL鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域；および(黄色)：hu806 CL鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図54-7】図54-7は、図53に記載した複合LonzaプラスミドのDNA配列(配列番号：41；補体 配列番号：162)を示すものである。この配列は、hu806抗体に関連したすべての翻訳(配列番号：42-51および163-166)も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた；影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである：(灰色)：シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列；(ラベンダー)

) : h u 8 0 6 V H 鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域 ; (ピンク) : h u 8 0 6 C H 鎖、コドン最適化された重鎖定常領域 ; (緑色) : h u 8 0 6 V L 鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域 ; および (黄色) : h u 8 0 6 C L 鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図 5 4 - 8】図 5 4 - 7 は、図 5 3 に記載した複合 L o n z a プラスミドの D N A 配列 (配列番号 : 4 1 ; 補体 配列番号 : 1 6 2) を示すものである。この配列は、h u 8 0 6 抗体に関連したすべての翻訳 (配列番号 : 4 2 - 5 1 および 1 6 3 - 1 6 6) も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた ; 影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである : (灰色) : シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列 ; (ラベンダー) : h u 8 0 6 V H 鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域 ; (ピンク) : h u 8 0 6 C H 鎖、コドン最適化された重鎖定常領域 ; (緑色) : h u 8 0 6 V L 鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域 ; および (黄色) : h u 8 0 6 C L 鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図 5 4 - 9】図 5 4 は、図 5 3 に記載した複合 L o n z a プラスミドの D N A 配列 (配列番号 : 4 1 ; 補体 配列番号 : 1 6 2) を示すものである。この配列は、h u 8 0 6 抗体に関連したすべての翻訳 (配列番号 : 4 2 - 5 1 および 1 6 3 - 1 6 6) も示す。このプラスミドを配列検証し、コーディング配列および翻訳を確認した。関心のある領域を識別するために配列の区画に影をつけた ; 影のついた領域は、実際のスプライス接合部に対応する。カラーコードは、次のとおりである : (灰色) : シグナル領域、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方で見つけられる最初のコーディング配列 ; (ラベンダー) : h u 8 0 6 V H 鎖、ベニアリングされた重鎖可変領域 ; (ピンク) : h u 8 0 6 C H 鎖、コドン最適化された重鎖定常領域 ; (緑色) : h u 8 0 6 V L 鎖、ベニアリングされた軽鎖可変領域 ; および (黄色) : h u 8 0 6 C L 鎖、コドン最適化軽鎖定常領域。

【図 5 5】図 5 5 A および 5 5 B は、h u 8 0 6 翻訳アミノ酸配列 (配列番号 : 1 6 4 および 1 6 6 の V H および V L 鎖ならびに配列番号 : 1 6 3 および 1 6 5 のこれらそれぞれのシグナルペプチド ; 配列番号 : 4 3 および 4 8 の C H および C L 鎖) を示す、ならびに V H および V L 鎖 (それぞれ、配列番号 : 1 6 4 および 1 6 5) についての K a b a t 番号を与えるものであり、C D R (配列番号 : 4 4 - 4 6 および 4 9 - 5 1) に下線を引く。

【図 5 6 - 1】図 5 6 A および 5 6 B は、ベニアリング設計における最初の段階、表面露出についての m A b 8 0 6 配列 (配列番号 : 1 6 7 の V H 鎖および配列番号 : 1 2 の V L 鎖) 内のアミノ酸残基の等級づけを示すものである。等級を各残基の上にアスタリスク (*) の数で与え、最大露出残基は 3 つのアスタリスクを有する。これらの図は、最初のオリゴヌクレオチド (V H 鎖 : 図 5 6 C ならびに配列番号 : 5 2 および 1 6 9 - 1 7 7 ; V L 鎖 : 図 5 7 C ならびに配列番号 : 6 2、6 6、6 8 および 1 8 1 - 1 8 7) がどのようにオーバーラップして、第一のベニアリングされた産物 (配列番号 : 1 6 8 の V H 鎖および配列番号 : 1 8 0 の V L 鎖) を形成するかを示す設計図を含む。

【図 5 6 - 2】図 5 6 C は、ベニアリング設計における最初の段階、表面露出についての m A b 8 0 6 配列 (配列番号 : 1 6 7 の V H 鎖および配列番号 : 1 2 の V L 鎖) 内のアミノ酸残基の等級づけを示すものである。等級を各残基の上にアスタリスク (*) の数で与え、最大露出残基は 3 つのアスタリスクを有する。これらの図は、最初のオリゴヌクレオチド (V H 鎖 : 図 5 6 C ならびに配列番号 : 5 2 および 1 6 9 - 1 7 7 ; V L 鎖 : 図 5 7 C ならびに配列番号 : 6 2、6 6、6 8 および 1 8 1 - 1 8 7) がどのようにオーバーラップして、第一のベニアリングされた産物 (配列番号 : 1 6 8 の V H 鎖および配列番号 : 1 8 0 の V L 鎖) を形成するかを示す設計図を含む。

【図 5 7 - 1】図 5 7 A および 5 7 B は、ベニアリング設計における最初の段階、表面露出についての m A b 8 0 6 配列 (配列番号 : 1 6 7 の V H 鎖および配列番号 : 1 2 の V L

鎖)内のアミノ酸残基の等級づけを示すものである。等級を各残基の上にアスタリスク(*)の数で与え、最大露出残基は3つのアスタリスクを有する。これらの図は、最初のオリゴヌクレオチド(VH鎖:図56Cならびに配列番号:52および169-177;VL鎖:図57Cならびに配列番号:62、66、68および181-187)がどのようにオーバーラップして、第一のベニアリングされた産物(配列番号:168のVH鎖および配列番号:180のVL鎖)を形成するかを示す設計図を含む。

【図57-2】図57Cは、ベニアリング設計における最初の段階、表面露出についてのmAb806配列(配列番号:167のVH鎖および配列番号:12のVL鎖)内のアミノ酸残基の等級づけを示すものである。等級を各残基の上にアスタリスク(*)の数で与え、最大露出残基は3つのアスタリスクを有する。これらの図は、最初のオリゴヌクレオチド(VH鎖:図56Cならびに配列番号:52および169-177;VL鎖:図57Cならびに配列番号:62、66、68および181-187)がどのようにオーバーラップして、第一のベニアリングされた産物(配列番号:168のVH鎖および配列番号:180のVL鎖)を形成するかを示す設計図を含む。

【図58-1】図58-1は、コドン最適化huIgG1重鎖DNA配列(配列番号:80;補体配列番号:178)およびアミノ酸翻訳(配列番号:43)のマップを示すものである。

【図58-2】図58-2は、コドン最適化huIgG1重鎖DNA配列(配列番号:80;補体配列番号:178)およびアミノ酸翻訳(配列番号:43)のマップを示すものである。

【図59】図59は、hu806 VH+CHアミノ酸配列(8C65AAG hu806 VH+CH;配列番号:81)とmAb806 VH鎖(配列番号:167)についての原参照ファイルを比較するタンパク質アラインメントを示すものである。強調表示領域は、VH鎖内の保存アミノ酸配列を示す。CDRに下線を引く。アスタリスクは、初期ベニアリング方法において計画し、実行した変更を表す。番号がついている部位は、後の修飾への参照である。

【図60】図60は、mAb806 VL鎖(配列番号:179)についての原参照ファイルへのhu806 VL+CLアミノ酸配列(8C65AAG hu806シグナル+VL+CL;配列番号:83)についての対応するアラインメントを示すものである。これは、修飾番号7でなされる変更を図示するために含めた追加のファイル(r2vk1 hu806シグナル+VL+CL;配列番号:82)、前駆体構築物を含有する。

【図61】図61は、hu806シグナル+VLおよびCL配列(8C65AAG hu806 VL+CL;配列番号:190および188)と対応するch806配列(pREN ch806 LC Nco;LICR;配列番号:189)のヌクレオチドおよびアミノ酸アラインメントを示すものである。図62において説明するように、これを修飾し、アノテートする。

【図62】図62は、hu806シグナル+VH配列(8C65AAG hu806 VH鎖;配列番号:192)と対応するmAb806配列[コドン変更(cc)およびベニアリング(ven)前のmAb806 VH鎖;配列番号:191]のヌクレオチドアラインメントを示すものである。図59および60のアミノ酸変更の後のヌクレオチド変更を図示し、ならびにアミノ酸の無変更につながった保存的核酸変更も示す。より容易に検分できるように、hu806におけるシグナルおよびVH鎖間のイントロンを除去した。シグナル配列およびCDRに下線を引く。対応するアミノ酸配列(配列番号:42)を前記アラインメントに重ね合わせた。

【図63】図63は、Biacoreによって判定したときの、一過性トランスフェクタント293細胞から得た精製hu806抗体の組換えEGFR-ECDへの結合を示すものである。精製対照ヒトIgG1抗体ではEGFR-ECDへの結合は観察されなかった。

【図64-1】IgG1 hu806をコードするプラスミド8C65AAGの配列(配列番号:41)およびアノテーションのGenBank形式のテキストドキュメントを示

【図64-18】 IgG1 hu806をコードするプラスミド8C65AAGの配列（

配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－１９】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－２０】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－２１】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－２２】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－２３】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－２４】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－２５】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－２６】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－２７】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－２８】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－２９】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－３０】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６４－３１】IgG1 hu806 をコードするプラスミド 8C65AAG の配列（配列番号：４１）およびアノテーションの GenBank 形式のテキストドキュメントを示すものである。

【図６５】図６５は、mAb806（配列番号：１５－１８、２０および１９３）および mAb175（配列番号：１３０－１３２、１３５および１９４－１９５）からの CDR についてのアミノ酸配列のアラインメントを示すものである。２抗体間の配列の相違を太字にする。

【図６６】図６６Ａおよび６６Ｂは、mAb175 での細胞系および正常ヒト肝臓の免疫組織化学的染色を示すものである。（Ａ）A431細胞（wtEGFRを過発現する。）、U87MG、Δ2-7細胞（Δ2-7EGFRを発現する。）およびU87MG細胞（wtEGFRを中程度レベルで発現する。）を含有するブロックから調製した切片を、ビオチン化mAb175を使用して染色した。（Ｂ）mAb175（左パネル）、アイソタ

イブ対照（中央パネル）および二次抗体対照（右パネル）での正常ヒト肝臓の染色（400倍）。特異的洞様毛細血管または肝細胞染色は観察されなかった。

【図67】図67A、67Bおよび67Cは、酵母に提示されたEGFRの断片とmAb 806およびmAb 175の反応性を示すものである。（A）酵母提示EGFR断片のmAb 175およびmAb 806標識の平均蛍光シグナルを描写する代表フローサイトメトリートヒストグラム。酵母ディスプレイでは、細胞のある割合は、これらの表面でタンパク質を発現せず、その結果、2つのヒストグラムピークが得られる。すべての断片が線状C末端c-mycタグを含有するので、9E10抗体を陽性対照として使用する。（B）様々なEGFR断片に結合する抗体の概要。（C）酵母ペレットを30分間、800℃に加熱することによって、EGFR断片を変性させた。すべての事例で、c-mycタグは、9E10抗myc抗体により依然として認識された。このことは、熱処理が酵母表面提示タンパク質を損なわせないことを明示している。高次構造感受性EGFR抗体mAb 225を使用して変性を確認した。

【図68】図68A、68B、68Cおよび68Dは、脳および前立腺癌異種移植片に対するmAb 175の抗腫瘍効果を示すものである。（A）U87MG、Δ2-7異種移植片を有するマウス（n=5）に、PBS、1mgのmAb 175またはmAb 806（陽性対照）と共に、2週間、週3回、出発腫瘍容積が100mm³であったときには第6、8、10、13、15および17日に、i.p.注射した。データを平均腫瘍容積±SEとして表示する。（B）2つの無関係な抗体（青色、塗りつぶし、および緑色、中空）、全EGFRのためのmAb 528（ピンク色、塗りつぶし）、mAb 806（薄青色、中空）およびmAb 175（オレンジ色、中空）で細胞を染色し、その後、FACSによって分析した。（C）DU145細胞を溶解し、mAb 528、mAb 806、mAb 175または2つの独立した無関係な抗体でのIPに付し、その後、EGFRについて免疫ブロットした。（D）DU145異種移植片を有するマウス（n=5）に、PBS、1mgのmAb 175またはmAb 806を1日1回、出発腫瘍容積が85mm³であったときには第18-22、25-29および39-43日に、i.p.注射した。データを平均腫瘍容積±SEとして表示する。

【図69】図69A、69B、69C、69D、69Eおよび69Fは、Fab断片に結合したEGFRペプチド287-302の結晶構造を示すものである。（A）軽鎖、赤色；重鎖、青色；結合ペプチド、黄色；およびEGFRからの重ねたEGFR₂₈₇₋₃₀₂、紫色での、Fab 806のコンピュータプリントアウト画像。（B）軽鎖、黄色；重鎖、緑色；結合ペプチド、ライラック色；およびEGFR（DI-3）からのEGFR₂₈₇₋₃₀₂、紫色での、Fab 175のコンピュータプリントアウト画像。（C）FAB 175に結合したペプチドへの該受容体内のEGFR₂₈₇₋₃₀₂の類似性を示す、（B）の詳細。ペプチド骨格をCαトレースとして、および相互作用している側鎖をスティックとして示す。主鎖に関して、O原子を赤色に彩色する；N、青色；S、オレンジ色；およびC。（D）空間的オーバーラップを示す、Fab 175：ペプチド複合体とEGFRの重ね合わせ。EGFR 187-286の表面を青緑色に彩色して、（C）の場合のように彩色。（E）不透明青色で示すEGFR 187-286および透明な軽鎖表面（オレンジ色）および重鎖表面（緑色）での、（D）に対する直交図。（F）抗原結合部位を調べる175 Fab複合体の詳細な立体図。（C）の場合のように彩色し、水素結合を黒色の点々で示す。複合体を形成して隠れている水分子を赤色の球として示す。

【図70】図70A、70B、70Cおよび70Dは、EGFRに結合するmAb 806に対する271-283システイン結合の影響を示すものである。（A）wt EGFR、EGFR-C271A、EGFR-C283AまたはC271A/C283A突然変異体でトランスフェクトした細胞をmAb 528で（塗りつぶしピンク色ヒストグラム）、mAb 806で（青色線）、または二次抗体のみで（紫色）染色し、その後、FACSによって分析した。クラスを合わせた無関係な抗体を使用して、ゲインを設定した。（B）EGFR-C271AまたはC271/283A EGFRを発現するBAF3細胞を、説明したようなMTTアッセイにおいてEGFへのこれらの応答について検査した。データ

点の B o l z m a n フィットを用いて、 EC_{50} を導出した。三重反復測定の前平均および sd としてデータを表す。(C) 野生型または E G F R - C 2 7 1 A / C 2 8 3 A を発現する B a F 3 細胞を I L - 3 および血清飢餓させ、その後、E G F またはビヒクル対照に暴露した。全細胞溶解産物を S D S - P A G E によって分離し、抗ホスホチロシン抗体 (上方パネル) または抗 E G F R 抗体 (下方パネル) で免疫プロットした。(D) 野生型 (左パネル) または C 2 7 1 A / C 2 8 3 A (右パネル) E G F R を発現する B a F 3 細胞を、抗体不在下 (中白記号)、m A b 5 2 8 (灰色丸) または m A b 8 0 6 (黒色三角) の存在下 (両方とも $10 \mu g / mL$)、漸増濃度の E G F で刺激した。三重反復測定の平均および sd としてデータを表す。

【図 7 1】図 7 1 A、7 1 B および 7 1 C は、(A) 声帯の転移性扁平上皮細胞癌腫を有する患者における ^{111}In - c h 8 0 6 の生体内分布の全身ガンマカメラ画像 [右頸部 (矢印) における腫瘍への定量的な高い取り込み量を示している。血液プール活性、および肝臓における遊離 ^{111}In の小さな異化も見られる]。(B) この患者の頸部の単一光子コンピュータ断層撮影 (S i n g l e P h o t o n C o m p u t e d T o m o g r a p h y) (S P E C T) 画像 [生存腫瘍 (矢印) での ^{111}In の取り込みと、壊死を示す中心部取り込み減少を示している]。(C) 対応する頸部 C T スキャン [大きな右頸部腫瘍量 (矢印) と中心性壊死を明示している] を示すものである。

【図 7 2】図 7 2 A および 7 2 B は、テザリングされていない E G F R 1 - 6 2 1 の構造の立体モデルを示すものである。受容体骨格を青色で、およぼリガンド T G F - α を赤色で描く。m A b 8 0 6 / 1 7 5 エピトープを青緑色で、およぼジスルフィド結合を黄色で描写する。エピトープを受容体に結び付けるジスルフィド結合の原子を空間充填形式で示す。テザリングされた高次構造からの E G F R - E C D C R 2 ドメインをテザリングされていない E G F R 単量体の構造にこのリガンドの存在下でドッキングさせることによって、このモデルを構築した。

【図 7 3】図 7 3 は、E G F R の断片と m A b 8 0 6 の反応性を示すものである。可溶性 1 - 5 0 1 E G F R 断片または C H / E G F R 断片融合タンパク質 (G H - 2 7 4 - 5 0 1、G H - 2 8 2 - 5 0 1、G H - 2 9 0 - 5 0 1 および G H - 2 9 8 - 5 0 1) を発現するベクターでトランスフェクトした 2 9 3 T 細胞からの溶解産物を S D S - P A G E によって分割し、膜に転写し、m A b 8 0 6 (左パネル) または抗 m y c 抗体 9 B 1 1 (右パネル) で免疫プロットした。

【図 7 4】図 7 4 A および 7 4 B は、m A b 1 7 5 V H 鎖核酸配列 (配列番号: 1 2 8) およびアミノ酸配列 (単数または複数) (配列番号: 1 2 9) をそれぞれ示すものである。

【図 7 5】図 7 5 A および 7 5 B は、m A b 1 7 5 V L 鎖核酸配列 (配列番号: 1 3 3) およびアミノ酸配列 (単数または複数) (配列番号: 1 3 4) をそれぞれ示すものである。

【図 7 6 - 1】図 7 6 A および 7 6 B は、小規模 ($100 mL$) 振盪フラスコ培養での G S - C H O (1 4 D 8、1 5 B 2 および 4 0 A 1 0) および G S - N S 0 (3 6) h u 8 0 6 トランスフェクタントの (A) 体積産物濃度および (B) 生細胞濃度 [8 0 6 抗イデオタイプをコーティング抗体としておよび c h 8 0 6 C l i n i c a l L o t : J 0 6 0 2 4 を標準物質として使用して E L I S A により産物の濃度を推定した。] ; (C) 1 5 L 攪拌タンク型バイオリアクターにおける G S - C H O 4 0 A 1 0 トランスフェクタント細胞成長および体積生産量 [生細胞密度 ($\times 10^5$ 細胞 / mL)、細胞生存度 (■) および生産量 (▲ mg / L)] を示すものである。

【図 7 6 - 2】7 6 C は、小規模 ($100 mL$) 振盪フラスコ培養での G S - C H O (1 4 D 8、1 5 B 2 および 4 0 A 1 0) および G S - N S 0 (3 6) h u 8 0 6 トランスフェクタントの (A) 体積産物濃度および (B) 生細胞濃度 [8 0 6 抗イデオタイプをコーティング抗体としておよび c h 8 0 6 C l i n i c a l L o t : J 0 6 0 2 4 を標準物質として使用して E L I S A により産物の濃度を推定した。] ; (C) 1 5 L 攪拌タンク型バイオリアクターにおける G S - C H O 4 0 A 1 0 トランスフェクタント細胞成

長および体積生産量〔生細胞密度 ($\times 10^5$ 細胞/mL)、細胞生存度 (■) および生産量 (Δ mg/L)〕を示すものである。

【図 77 - 1】図 77 A、77 B および 77 C は、小規模培養により生産したプロテイン A 精製 hu 806 抗体構築物ならびに対照 ch 806 および mAb 806 のサイズ排除クロマトグラフィー (Biosep SEC - S3000) 分析を示すものである。各図の上方パネルに A 214 nm でのクロマトグラムをおよび下方パネルに A 280 nm でのクロマトグラムを提示する。

【図 77 - 2】77 D および 77 E は、小規模培養により生産したプロテイン A 精製 hu 806 抗体構築物ならびに対照 ch 806 および mAb 806 のサイズ排除クロマトグラフィー (Biosep SEC - S3000) 分析を示すものである。各図の上方パネルに A 214 nm でのクロマトグラムをおよび下方パネルに A 280 nm でのクロマトグラムを提示する。

【図 78】図 78 は、大規模生産およびプロテイン A 精製後のプロテイン A 精製 hu 806 抗体構築物 40 A 10 のサイズ排除クロマトグラフィー (Biosep SEC - S3000) 分析を示すものである。1.2% の凝集物が存在する 98.8% の純度を示す、214 nm でのクロマトグラムを提示する。

【図 79】図 79 は、Novex, USA からのプレキャスト 4 - 20% Tris / グリシンゲルを標準 SDS - PAGE 条件下で使用して、精製トランスフェクタント hu 806 標品 (5 μ g) GS CHO (14 D8、15 B2 および 40 A 10) および GS - NS0 (36) hu 806 を還元条件下で分析したことを示すものである。クマシーブルー染色剤によって検出したタンパク質。

【図 80】図 80 は、プレキャスト 4 - 20% Tris / グリシンゲルを標準 SDS - PAGE 条件下で使用して、精製トランスフェクタント hu 806 標品 (5 μ g) GS CHO (14 D8、15 B2 および 40 A 10) および GS - NS0 (36) を非還元条件下で分析したことを示すものである。クマシーブルー染色剤によって検出したタンパク質。

【図 81】図 81 は、プレキャスト 4 - 20% Tris / グリシンゲルを標準 SDS - PAGE 条件下で使用して、精製トランスフェクタント hu 806 GS CHO 40 A 10 (5 μ g) を大規模生産後に分析したことを示すものである。クマシーブルー染色剤によって検出したタンパク質。

【図 82】図 82 は、15 L 生産後の精製トランスフェクタント hu 806 GS CHO 40 A 10 (5 μ g) の等電点電気泳動ゲル分析を示すものである。クマシーブルー染色によって検出したタンパク質。レーン 1、pI マーカー；レーン 2、hu 806 (3 つのアイソフォーム、pI 8.66 から 8.82)；レーン 3、pI マーカー。

【図 83】図 83 は、A 431 細胞への結合を示すものである：プロテイン A 精製 hu 806 抗体標品 (20 μ g/mL) およびアイソタイプ対照 hu A 33 (20 μ g/mL) のフローサイトメトリー分析。対照は、二次抗体単独 (緑色) および ch 806 (赤色) を含む。Hu 806 構築物を小規模培養によって生産した。

【図 84】図 84 は、A 431 細胞への結合を示すものである：示すとおりの、細胞表面の野生型 EGFR の ~ 10% を結合する精製 mAb 806、ch 806 および hu 806 40 A 10 抗体標品 (20 μ g/mL)、528 (野生型 EGFR と de 2 - 7 EGFR の両方を結合する。) および無関係な対照抗体 (20 μ g/mL) のフローサイトメトリー分析。

【図 85】図 85 は、U 87 MG . de 2 - 7 神経膠腫細胞への結合を示すものである。精製 mAb 806、ch 806 および hu 806 40 A 10 抗体標品 (20 μ g/mL) ならびに 528 抗 EGFR および無関係な対照抗体 (20 μ g/mL) のフローサイトメトリー分析。

【図 86】図 86 は、(A) U 87 MG . de 2 - 7 神経膠腫細胞および (B) A 431 癌腫細胞への 125 I 放射標識 806 抗体構築物の特異的結合を示すものである。

【図 87】図 87 は、スキャッチャード解析を示すものである：U 87 MG . de 2 - 7

細胞への¹²⁵I放射標識(A)ch806および(B)hu806抗体構築物の結合。

【図88】図88は、スキャッチャード解析を示すものである：A431細胞への¹²⁵I放射標識(A)ch806および(B)hu806抗体構築物の結合。

【図89】図89Aおよび図89Bは、287-302 EGF R 806ペプチドエピトープへの該固定化ペプチド上を通過する50nM、100nM、150nM、200nM、250nMおよび300nMの漸増濃度の(A)hu806および(B)ch806による結合についてのBIAcore分析を示すものである。

【図90】図90Aおよび図90Bは、(A)エフェクター対ターゲット細胞比範囲(E:T=0.78:1から100:1)にわたって1μg/mLの各抗体で；(B)ターゲットA431に対して各抗体の濃度範囲(3.15ng/mL-10μg/mL)にわたってE:T=50:1で判定した、ターゲットA431細胞に対するch806媒介およびhu806媒介抗体依存性細胞傷害性を示すものである。

【図91】図91は、BALB/cヌードマウスにおける確率したA431異種移植片の治療を示すものである。5匹のマウスの群に6×1mgの用量での2週間にわたる抗体療法を示すとおり(矢印)に施した。研究終了までの平均±SEM腫瘍容積を提示する。

【図92】図92は、BALB/cヌードマウスにおける確率したU87Mg.de2-7異種移植片の治療を示すものである。5匹のマウスの群に6×1mgの用量での2週間にわたる抗体療法を示すとおり(矢印)に施した。研究終了までの平均±SEM腫瘍容積を提示する。

【図93】図93は、mAb806ペプチド(A)N、(B)HNおよび(C)HAについてのランダムコイル化学シフト値からの偏差を示すものである。pH6.8の5%₂H₂O、70mM NaClおよび50mM NaPO₄を含有するH₂O溶液中でペプチドを調製した。逐次的割当てに用いたすべてのスペクトルは、Bruker Avance 500において298Kで獲得した。

【図94】図94A、94B、94C、94D、94Eおよび94Fは、¹¹¹In-ch806の注入後第5日におけるA)腹側、およびB)背側の患者7の前進ガンマカメラ像を示すものである。肺(矢印)における転移病変での¹¹¹In-ch806の高い取り込み量がはっきりわかる。C)およびD)は、CTスキャンで転移病変を示すものである。E)胸部の3D SPECT画像、およびF)転移病変(矢印)での¹¹¹In-ch806の特異的取り込みを示すSPECTとCTの位置合わせした(co-registered)断層画像。

【図95】図95A、95B、95C、95D、95Eおよび95Fは、¹¹¹In-ch806の注入後、A)第0日、B)第3日およびC)第7日に得た患者8の頭頸部の平面画像を示すものである。最初の血液プール活性が第0日に見られ、右前頭葉における退形成性星状細胞腫での¹¹¹In-ch806の取り込みが第3日(矢印)にははっきりわかり、第7日まで増加する。¹¹¹In-ch806の特異的取り込みは、D)脳(矢印)のSPECT画像において確認され、E)¹⁸F-FDG PET、およびF)MRIでは腫瘍部位(矢印)ではっきりわかる。

【図96】図96A、96B、96Cおよび96Dは、患者4と比較して患者3において、選別腫瘍サンプルにおける806抗原発現の差にもかかわらず、腫瘍での¹¹¹In-ch806の同様の取り込みがはっきりわかることを示すものである。A)はっきりわかる心血液プール活性(B)を伴う、患者4に関するSPECT断層画像における肺転移(矢印)の¹¹¹In-ch806局在。B)対応するCTスキャン。保存腫瘍は、806発現について陽性率<10%を有することが明らかになった。C)はっきりわかる心血液プール活性(B)を伴う、患者3に関する肺転移(矢印)の¹¹¹In-ch806局在。D)対応するCTスキャン。保存腫瘍は、806発現について50-75%の陽性率を有することが明らかになった。

【図97】図97は、ELISAによって測定したch806タンパク質についてのプールされた集団の薬物動態を示すものである。注入後の時間(時)に対する実測および予測ch806(%ID/L)。

【図 9 8】図 9 8 A および 9 8 B は、 $5 \text{ mg} / \text{m}^2$ (■)、 $10 \text{ mg} / \text{m}^2$ (□)、 $20 \text{ mg} / \text{m}^2$ (△)、および $40 \text{ mg} / \text{m}^2$ (◇) 用量レベルでの ^{111}In -c h 8 0 6 の A) 正規化された全身クリアランスおよび B) 肝クリアランスについての個々の患者の結果を示すものである。各パネルに示したデータセットについての線形回帰 [A) $r^2 = 0.9595$; B) $r^2 = 0.9415$]。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0361

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0361】

【表 4】

表 3

正常組織に対する 528、DH8.3 および 806 の反応性

組織	528	DH8.3	806
食道	陽性	－	－
胃	陽性	－	－
十二指腸	陽性	－	－
小腸/十二指腸	陽性	－	－
結腸	陽性	－	－
肝臓	陽性	－	－
唾液腺(耳下腺)	陽性	－	－
腎臓	陽性	－	－
膀胱	陽性	－	－
前立腺	陽性	－	－
精巣	陽性	－	－
子宮(子宮外/内膜)	陽性	－*	－
卵管	陽性	－	－
卵巢	陽性	－	－
乳房	陽性	－*	－
胎盤	陽性	－	－
末梢神経	陽性	－	－
骨格筋	陽性	－	－
甲状腺	陽性	－	－
リンパ節	陽性	－	－
脾臓	陽性	－	－
扁桃	陽性	－	－扁平上皮の基底層の偶発的な弱い反応性
心臓	陽性	－	－
肺	陽性	－	－
皮膚	陽性	－	－扁平上皮の基底層の偶発的な弱い反応性

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0595

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0595】

【表12】

表9

データ収集および精密化の統計値

データ収集

	806(天然)	806(ヘフット)	175(天然)	175(ヘフット)
空間群 単位格子寸 法(A)	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
A	140.37	35.92	36.37	83.17
B	74.62	83.16	94.80	69.26
C	83.87	72.21β=92.43	108.90	71.47
供給源	研究所内	BNL X29	研究所内	研究所内
波長(A)	1.542	1.1	1.542	1.542
解像度範囲 (A)	29.7-2.2 (2.27-2.20)	50-2.0 (2.07-2.0)	50-2.8 (2.87-2.8)	14.18-1.59 (1.65-1.59)
R _{int} (%)	6.4(26.7)	6.6(28.2)		8.6(30.0)
I/σI	12.2(3.2)	22(3.15)		10.2(2.2)
完全性(%)	98.3(91.3)	96.6(79.2)	98.4(90.5)	78.8(11.8) 98.1 at 1.89 A
全反射	156497	98374		205401
特有の反射	44905	27692	9171	43879

精密化

解像度範囲 (A)	20-2.3	72.17-2.00	50-2.6	14.18-1.6
反射	37397	26284	9171	41611
R _{結晶}	0.225	0.226	0.210	0.203
R _{遊離}	0.289	0.279	0.305	0.257
タンパク質原子	6580	3294	3276	3390
溶媒分子	208	199	46	247
r.m.s.d 結合 長(A)	0.022	0.007	0.015	0.014
r.m.s.d 結合 長(°)	1.70	1.12	1.77	1.48
平均 B 因子 (Å ²)	40.3	33.6	37.5	20.7
全異方性 B 因 子(Å ²)B11	-1.52	2.42	0.20	1.13

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0627

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0627】

2. 結果

患者

8人の患者〔女性1人および男性7人；平均年齢61歳（範囲44 - 75歳）〕が治験

を完了した（表 1 3）。原発腫瘍部位、以前の治療歴、および試験登録時の疾患部位も表 1 3 に示す。8 人すべての患者が、保存腫瘍において 8 0 6 抗原陽性を有した（表 1 3）。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 6 2 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 6 2 8】

すべての患者が組み入れ基準を満たしており、患者 8（原発性脳腫瘍を有した者）を除くすべてが試験登録時に転移性疾患を有した。ターゲット病変として分類した腫瘍部位は、以下を含んだ：肺（5 人の患者）、脳（1 人の患者）、リンパ節（1 人の患者）、声門上（1 人の患者）。転移性疾患の他の部位（非ターゲット領域）は、副腎腫瘍、骨およびリンパ節を含んだ（表 1 3）。カルノフスキー・パフォーマンス・ステータス中央値は 9 0 であった（範囲 8 0 - 1 0 0）。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 6 2 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 6 2 9】

【表 16】

表13 患者の特徴

患者 番号	用量レ ベル (mg/m ²)	年齢 (歳)	性別	KPS (%)	原発 腫瘍 部位	陽性 細胞 の IHC (%)	以前 の療 法	試験 登録 時の 疾患 部位	ch806 に対 する 腫瘍 応答
1	5	71	M	10	NSCLC	50-75	RT	肺、 副腎	PD
8	5	44	M	90	退形 成性 星状 細胞 種	>75*	外科 手術、 RT、CT	脳	SD
2	10	49	F	80	SCC 肛門	<10	化学 療法、 RT	LN、 肺、 骨	SD
3	10	75	M	90	NSCLC	50-75	外科 手術、 RT	肺	SD
4	20	52	M	100	結腸	<10†	外科 手術、 CT	肺、 LN	PD
5	20	65	M	80	中皮 腫	>75	RT、CT	肺	SD
6	40	59	M	80	SCC 声帯	>75	外科 手術、 RT、CT	軟組 織	SD
7	40	71	M	90	SCC 皮膚	50-75	外科 手術、 CT	肺、 LN	PD

略語：F=女性；M=男性；NSCLC=非小細胞肺癌腫；SCC=扁平上皮細胞癌腫；RT=放射線療法；CT=化学療法；LN=リンパ節；PD=進行性疾患；SD=安定病態 *de2-7 EGFR発現について陽性 †EGFR遺伝子増幅について陽性

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0630

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0630】

有害事象およびHACA

ch806に関連した有害事象を表14および18に列挙する。注入関連有害事象は、観察されなかった。DLTはなく、従って、MTDに達しなかった。治験担当医の意見ではことによるとch806に起因し得る原則毒性(principle toxicities)は、一過性そう痒症、軽度悪心、疲労/嗜眠、ならびに血清ALPおよびGGTレベルに対して起こり得る影響であった。患者5においてCTCグレード2のGGTの上昇が観察されたが、この上昇は、ベースライングレード1上昇のバックグラウンドに基づくものであり、事実上、一過性であった。3つの重篤有害事象(SAE)が報告されたが、ch806に起因しなかった。総合的に言えば、ch806は、すべての用量レベルで安全および十分認容性であり、一般に予測可能で管理できる軽症の毒性が観察された。さ

らなる用量漸増は、この治験に利用できる c G M P c h 8 0 6 の限られた量のため、行わなかった。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 6 3 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 6 3 2】

【表 1 7】

表14 ch806に関連した有害事象の発生

有害事象	用量レベル(mg/m ²)*				各事象のイベントの総数
	5	10	20	40	
めまい	0	0	0	1	1
疲労	0	0	1	0	1
嗜眠	0	0	0	1	1
食欲抑制	0	0	0	1	1
悪心	0	1	0	1	2
そう痒症	1	0	0	0	1
ALP 上昇	0	0	1	0	1
GGT 上昇	0	0	1	0	1
合計	1	1	3	4	9

*数は、各用量レベルでの任意の事象のイベントの数を表す

【手続補正 1 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 6 3 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 6 3 3】

【表 1 8】

表15 治験薬関連有害事象の分布

用量レベル (mg/m ²)	最大 CTC グレード 毒性*			
	1=軽度	2=中等度	3=重度	4=生命を危うくする
5	1	0	0	0
10	1	0	0	0
20	2	1	0	0
40	4	0	0	0
総合	8	1	0	0

*患者の数

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 6 3 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 6 3 6】

薬物動態

1 1 1 I n - c h 8 0 6 の単回注入についての個々の患者の薬物動態パラメータ T 1 / 2 α および R 1 / 2 β 、 V 1 、 C m a x 、 A U C および C L を表 1 6 に示す。 K r u s k

a l - W a l l i s 順位和検定をアルファおよび β 半減期、V 1 およびクリアランスに適用した。用量レベル間の有意差は観察されなかった ($P > 0.05$)。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 6 3 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 6 3 7】

プールされた集団 E L I S A データにフィッティングした薬物動態曲線を図 9 7 に示す。平均 $\pm$ S D 薬物動態パラメータは、 $T_{1/2\alpha} = 29.16 \pm 21.12$ 時間、 $T_{1/2\beta} = 172.40 \pm 90.85$ 時間、 $V_1 = 2984.59 \pm 91.91$ mL、および $CL = 19.44 \pm 4.05$ mL / 時間であった。測定ピークおよびトラフ c h 8 0 6 血清濃度 (C_{max} および C_{min}) データを各患者について表 1 7 に提示する。予想どおり、各用量レベルに関して C_{max} および C_{min} について比例関係が観察された。c h 8 0 6 E L I S A 薬物動態データについて決定した平均 $\pm$ S D 値は、 $^{111}In - ch 8 0 6$ 薬物動態データについて得た値とよく一致していた (表 1 6)。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 6 3 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 6 3 8】

【表 1 9】

表 16 各用量レベルにおけるおよび全用量レベルにわたる

$^{111}In-CHX-A''-DTPA-ch806$ についての平均 $\pm$ S D 薬物動態パラメータ推定値

用量レベル (mg/m ²)	$T_{1/2\alpha}$ (時)		$T_{1/2\beta}$ (時)		V_1 (mL)		CL (mL/時)		AUC (時*mg/mL)	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
5	10.91	3.4	183.9	110.2	2963.06	493.23	21.97	16.59	541.17	371.75
10	11.75	4.4	124.5	9.25	3060.29	721.70	28.58	8.60	566.79	26.39
20	9.34	8.3	125.3	73.66	2902.06	1064.77	30.98	21.65	1438.12	957.18
40	8.95	3.2	133.9	10.79	4742.42	169.10	37.99	6.47	2269.04	381.68
すべて	10.24	1.32	141.90	28.30	3416.96	886.04	29.88	6.61		

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 6 3 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 6 3 9】

【表 2 0】

表17 ELISA分析によって決定したCmaxおよびCmin血清ch806レベル

患者番号	用量レベル (MG/M ²)	C _{max} [*] (μG/ML)	C _{min} [*] (μG/ML)
1	5	1.38±0.02	0.10±0.05†
8	5	1.52±0.17	0.96±0.08
2	10	5.92±0.11	1.50±0.01
3	10	6.27±0.45	1.83±0.20
4	20	12.25±0.66	4.05±0.05
5	20	11.22±0.77	1.58±0.04
6	40	27.76±2.10	6.90±0.38
7	40	32.32±0.84	6.80±0.13

*C_{max}=注入60分後;C_{min}=第7日 †第8日血清レベル

【手続補正 1 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 6 4 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 6 4 3】

臨床活動の評価

この1ヶ月試験の完了時、5人の患者は、安定病態を、3人の患者は進行性疾患を有することが判明した(表13)。興味深いことに、1人の患者(患者7、40mg/m²用量レベル)は、置換期間中に(細針穿刺吸引で転移性SCCであると証明された)触知可能な耳リンパ節の一過性増大の臨床徴候を有した。このことは、ch806の潜在的生物活性を示唆している。しかし、この患者は、試験完了時にRECISTにより進行性疾患が確認された。

【手続補正 1 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2012518039000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/024407

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/28	G01N33/50	G01N33/574 A61P35/00 A61K39/395
ADD.		
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) C07K A61K G01N A61P		
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 practical, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Chao: "Characterizing and engineering antibodies against the epidermal growth factor receptor", February 2008 (2008-02), pages 53-54, 78, XP002578350, Retrieved from the Internet: URL:http://hdl.handle.net/1721.1/42076 [retrieved on 2010-04-15] page 53 - page 54 page 78	1
X,P	WO 2009/023265 A1 (LUDWIG INST CANCER RES [US]; JOHNS TERRANCE GRANT [AU]; SCOTT ANDREW M) 19 February 2009 (2009-02-19) * abstract page 5, paragraph 0012 page 60 - page 61; table 2	1, 14-36, 49, 52-81
-/--		
☒ 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 "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" 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 "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 "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. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 November 2010		Date of mailing of the international search report 14/12/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Malamoussi, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/024407

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PANOUSIS C ET AL: "Engineering and characterisation of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR.", BRITISH JOURNAL OF CANCER 28 MAR 2005 LNKD- PUBMED:15770208, vol. 92, no. 6, 28 March 2005 (2005-03-28), pages 1069-1077, XP002578351, ISSN: 0007-0920 * abstract figures 2B, 2C page 1072, right-hand column, paragraph 2	2,6,7, 14-39, 49-86
A	JOHNS T G ET AL: "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", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, JOHN WILEY & SONS, INC, UNITED STATES, SWITZERLAND, GERMANY LNKD- DOI:10.1002/IJC.10189, vol. 98, no. 3, 20 March 2002 (2002-03-20), pages 398-408, XP002343752, ISSN: 0020-7136 page 398, right-hand column, paragraph 3	2,19-24, 30-34, 38,49-86
A	PRESTA ET AL: "Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL LNKD- DOI:10.1016/J.ADDR.2006.01.026, vol. 58, no. 5-6, 7 August 2006 (2006-08-07), pages 640-656, XP024892146, ISSN: 0169-409X [retrieved on 2006-08-07] page 641, right-hand column, paragraph 1 page 642, left-hand column, paragraph 2 page 644, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 2	2,19-24, 30-34, 38,49-86
A	PRESTA ET AL: "Molecular engineering and design of therapeutic antibodies", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB LNKD- DOI:10.1016/J.COI.2008.06.012, vol. 20, no. 4, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 460-470, XP023612046, ISSN: 0952-7915 [retrieved on 2008-08-06] page 464, right-hand column, paragraph 4	2,19-24, 30-34, 38,49-86
	----- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/024407

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIU XIAO-YUN ET AL: "Engineering therapeutic monoclonal antibodies.", IMMUNOLOGICAL REVIEWS APR 2008 LNKD-PUBMED:18363992, vol. 222, April 2008 (2008-04), pages 9-27, XP002578352, ISSN: 1600-065X page 12; table 2 * abstract	2,19-24, 30-34, 38,49-86
A	SCOTT ANDREW M ET AL: "A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 6 MAR 2007 LNKD-PUBMED:17360479, vol. 104, no. 10, 6 March 2007 (2007-03-06), pages 4071-4076, XP002578353, ISSN: 0027-8424 * abstract; figures 1,2	2,19-24, 30-34, 38,49-86

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/024407**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims 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. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

2, 6, 7, 37-39(completely); 1, 14-36, 49-86(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2010 /024407

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2, 6, 7, 37-39(completely); 1, 14-36, 49-86(partially)

provides an antibody defined by SEQ ID No: 42 and 47, or comprising SEQ ID No: 44-46 and 49-51 (hu806), which is capable of binding EGFR on tumors overexpressing EGFR gene or expressing the de2-7EGFR mutant receptor, wherein said antibody does not bind to the de2-7 EGFR junctional peptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13, and binds to an epitope within the sequence of residues 287-302 (SEQ ID NO:14) of human wild-type EGFR and does not comprise a heavy and light chain variable region sequence having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2 and 4, respectively, and the use of said antibody in the treatment or diagnosis of a tumor/cancer.

2. claims: 3, 8, 9, 40-42(completely); 1, 14-36, 49, 59-81(partially)

provides an antibody defined by SEQ ID No: 129 and 134, or comprising SEQ ID No: 130-132 and 135-137 (mAb175), having the properties as described above, and the use of said Ab in the treatment or diagnosis of tumor/cancer.

3. claims: 4, 10, 11, 43-45(completely); 1, 14-36, 49, 59-81(partially)

provides an antibody defined by SEQ ID No: 22 and 27, or comprising SEQ ID No: 23-25 and 28-30 (mAb124), having the properties as described above, and the use of said Ab in the treatment or diagnosis of tumor/cancer.

4. claims: 5, 12, 13, 46-48(completely); 1, 14-36, 49, 59-81(partially)

provides an antibody defined by SEQ ID No: 32 and 37, or comprising SEQ ID No: 33-35 and 38-40 (mAb1133), having the properties as described above, and the use of said Ab in the treatment or diagnosis of tumor/cancer.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/024407

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 2009023265 A1	19-02-2009	AU 2008287335 A1	19-02-2009
		CN 101896503 A	24-11-2010
		EP 2188311 A1	26-05-2010

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1			
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		T		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00				
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		D		
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574		Z		
G 0 1 N	33/531	(2006.01)	G 0 1 N	33/531		A		
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15				

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 ジョーンズ, テランス・グラント
オーストラリア国、クレイトン・3 1 6 8、ライト・ストリート・2 7 - 3 1、モナツシユ・イン
ステイテユート・オブ・メデイカル・リサーチ
- (72) 発明者 パヌーシス, コン
オーストラリア国、ビクトリア、メルボルン、マクロード・3 0 8 5、アースキン・ロード・7 7
- (72) 発明者 スコット, アンドリユー・マーク
オーストラリア国、ビクトリア・3 1 0 1、キュー、コタム・ロード・3 6 7
- (72) 発明者 ルナー, クリストフ
ドイツ国、ハンブルク / ザール・6 6 4 2 4、リングシユトラセ・8
- (72) 発明者 リッター, ゲルト
アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・1 0 0 2 1、ニュー・ヨーク、イースト・シツクスステイサード
・ストリート・4 3 0、アパートメント・1 0・エイ
- (72) 発明者 ユングブルス, アヒム
アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・1 0 0 2 1、ニュー・ヨーク、イースト・シツクスステイサード
・ストリート・4 5 0、アパートメント・9・デイー
- (72) 発明者 ストツケルト, エリザベス
オーストリア国、1 0 1 0・ウィーン、プランケンガツセ・1 / 8
- (72) 発明者 コリンズ, ピーター
イギリス国、シー・ピー・2・アイ・エイチ・エル、ケンブリッジ、パントン・ストリート・6 7
- (72) 発明者 カベニー, ウェブスター・ケイ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 0 1 4、デルマー、ビスタ・デ・ラ・テイエラ・4 6 5 7
- (72) 発明者 ホワン, フェイ - ジェン・ス
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 2 0 6 7、ランチヨ・サンタ・フェ、ピー・オー・ボツクス
・2 4 7
- (72) 発明者 バージス, アントニー・ウィルクス
オーストラリア国、ビクトリア・3 1 2 4、キャンバーウエル、レンジ・ストリート・3 2
- (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・3 1 8 2、セント・キルダ、オデツサ・ストリート、9
- (72) 発明者 マーレイ, アンヌ
アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・1 0 0 2 1、ニュー・ヨーク、ヨーク・アベニュー・1 2 7 5
- (72) 発明者 マーク, ジョージ
アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・1 0 0 2 1、ニュー・ヨーク、ヨーク・アベニュー・1 2 7 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA45 CA01 GA11 HA01
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90Y AB01 AC14 BA01 CA25 CA44 CA46
4C085 AA14 EE01
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA28 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2012518039A5	公开(公告)日	2014-12-04
申请号	JP2011551178	申请日	2010-02-17
[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Rimitetsudo		
[标]发明人	オールドロイドジエイ ジョーンズテランズグラント パヌーシスコン スコットアンドリユーマーク ルナークリストフ リッターゲルト ユングブルスアヒム ストツケルトエリザベス コリンズピーター カベニーウエブスターケイ ホワンフエイジエンス バージスアントニーウィルクス ナイスエドワードコリンズ マーレイアンヌ マークジョージ		
发明人	オールド,ロイド・ジエイ ジョーンズ,テランズ・グラント パヌーシス,コン スコット,アンドリユー・マーク ルナー,クリストフ リッター,ゲルト ユングブルス,アヒム ストツケルト,エリザベス コリンズ,ピーター カベニー,ウエブスター・ケイ ホワン,フエイ・ジエンス バージス,アントニー・ウィルクス ナイス,エドワード・コリンズ マーレイ,アンヌ マーク,ジョージ		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/09 C12P21/08 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/531 C12N1/15		
CPC分类号	A61K31/495 A61K39/39541 A61K51/103 A61K51/1045 A61K51/1078 A61K2039/505 A61P35/00 A61P43/00 A61K47/6871 C07K16/2863 C07K16/30 C07K16/4258 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/734 C07K2317/77 A61K2300/00 A61K39/395 A61K47/68 C07K2317/54 C07K2317/622 G01N33/574 A61K47/6849 A61K39/39558 C07K16/40 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/52 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/92		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C12P21/08 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395.T A61P35/00 G01N33/53.D G01N33/574.Z G01N33/531.A C12N1/15		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA25		

4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA74

优先权 12/388504 2009-02-18 US

其他公开文献 JP5859314B2
JP2012518039A

摘要(译)

本发明涉及特异性结合成员，特别是抗体及其片段，其结合扩增的表皮生长因子受体 (EGFR) 和EGFR的de2-7EGFR截短。特别地，特异性结合成员识别的表位，特别是抗体及其片段，在异常的翻译后修饰后增强或明显。这些特异性结合成员可用于癌症的诊断和治疗。本发明的结合成员还可以与化学治疗剂或抗癌剂和/或其他抗体或其片段组合用于治疗。