

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5719298号

(P5719298)

(45) 発行日 平成27年5月13日 (2015. 5. 13)

(24) 登録日 平成27年3月27日 (2015. 3. 27)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 Z N A T
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 24 (全 111 頁)

(21) 出願番号	特願2011-524186 (P2011-524186)	(73) 特許権者	505257682
(86) (22) 出願日	平成21年8月27日 (2009. 8. 27)		シムフォゲン・アクティーゼルスカブ
(65) 公表番号	特表2012-500814 (P2012-500814A)		S Y M P H O G E N A / S
(43) 公表日	平成24年1月12日 (2012. 1. 12)		デンマーク、デーコーー 2 7 5 0 バレラッ
(86) 国際出願番号	PCT/DK2009/050217		プ、ペデルストルブヴァイ 9 3 番
(87) 国際公開番号	W02010/022736	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成22年3月4日 (2010. 3. 4)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成24年8月22日 (2012. 8. 22)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	PA200801202		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成20年8月29日 (2008. 8. 29)	(74) 代理人	100122301
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 富田 憲史
(31) 優先権主張番号	61/136, 391	(74) 代理人	100144923
(32) 優先日	平成20年9月2日 (2008. 9. 2)		弁理士 中川 将之
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100157956
			弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え抗上皮増殖因子受容体抗体組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗ヒト E G F R 抗体を用いる先行処置レジメンを受けたことがある対象におけるがんの処置において使用するための抗体組成物であって、第 1 の抗ヒト E G F R 抗体分子および第 1 の分子とは別個の第 2 の抗ヒト E G F R 抗体分子を含み、

a) 第 1 の抗ヒト E G F R 抗体分子が、

i) 軽鎖が配列番号 7 2 のアミノ酸 3 ~ 2 1 6 を含み、かつ重鎖が配列番号 4 0 のアミノ酸 3 ~ 1 2 4 および配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む、抗体；

i i) 軽鎖が配列番号 7 2 のアミノ酸 3 ~ 1 0 9 を含み、かつ重鎖が配列番号 4 0 のアミノ酸 3 ~ 1 2 4 を含む、抗体；および

i i i) 軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 がそれぞれ、配列番号 7 2 の残基 2 9 ~ 3 4、5 2 ~ 5 5、および 9 2 ~ 9 6 を含み、かつ重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 がそれぞれ、配列番号 4 0 の残基 2 8 ~ 3 5、5 3 ~ 6 0、および 9 9 ~ 1 1 4 を含む、抗体からなる群より選択され；かつ

b) 第 2 の抗ヒト E G F R 抗体分子が、

i) 軽鎖が配列番号 7 3 のアミノ酸 3 ~ 2 2 1 を含み、かつ重鎖が配列番号 4 1 のアミノ酸 3 ~ 1 2 0 および配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む、抗体；

i i) 軽鎖が配列番号 7 3 のアミノ酸 3 ~ 1 1 4 を含み、かつ重鎖が配列番号 4 1 のアミノ酸 3 ~ 1 2 0 を含む、抗体；および

i i i) 軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 がそれぞれ、配列番号 7 3 の残基 2

10

20

9～39、57～59、および96～104を含み、かつ重鎖CDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ、配列番号41の残基28～35、53～60、および99～110を含む、抗体からなる群より選択される、抗体組成物。

【請求項2】

抗ヒトEGFR抗体を用いる先行処置レジメンを受けたことがある対象におけるがんの処置において使用するための抗体組成物であって、第1の抗ヒトEGFR抗体分子および第1の分子とは別個の第2の抗ヒトEGFR抗体分子を含み、

a) 第1の抗ヒトEGFR抗体分子の軽鎖および重鎖CDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ、配列番号72の残基29～34、52～55、および92～96、ならびに配列番号40の残基28～35、53～60、および99～114を含み：かつ

b) 第2の抗ヒトEGFR抗体分子の軽鎖および重鎖CDR1、CDR2およびCDR3がそれぞれ、配列番号73の残基29～39、57～59、および96～104、ならびに配列番号41の残基28～35、53～60、および99～110を含む、

抗体組成物。

【請求項3】

抗ヒトEGFR抗体を用いる先行処置レジメンを受けたことがある対象におけるがんの処置において使用するための抗体組成物であって、第1の抗ヒトEGFR抗体分子および第1の分子とは別個の第2の抗ヒトEGFR抗体分子を含み、

a) 第1の抗ヒトEGFR抗体分子が、配列番号72のアミノ酸3～216を含む軽鎖、ならびに配列番号40のアミノ酸3～124および配列番号91のアミノ酸配列を含む重鎖を有し：かつ

b) 第2の抗ヒトEGFR抗体分子が、配列番号73のアミノ酸3～221を含む軽鎖、ならびに配列番号41のアミノ酸3～120および配列番号91のアミノ酸配列を含む重鎖を有する、

抗体組成物。

【請求項4】

該先行処置レジメンが、セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ、ICR62、mAb806、マツズマブ、およびこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体からなる群より選択される抗ヒトEGFR抗体を使用した、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項5】

該先行処置レジメンが第一選択治療であった、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

該先行処置レジメンが第二選択治療であった、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項7】

第一選択治療が、

- a) 化学療法；
- b) 少なくとも一つのチロシンキナーゼ阻害剤；
- c) 少なくとも一つの血管新生阻害剤；
- d) 少なくとも一つのホルモン；
- e) 少なくとも一つの分化誘導剤；または
- f) a) - e) の任意の組み合わせによる処置レジメンを含んでいた、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

該対象のがんが、先行処置レジメンの施行中に進行していた、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

該対象のがんが、該先行処置レジメンの施行後に進行していた、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 0】

該がんが該先行処置レジメンに対して抵抗性または部分抵抗性であった、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 1】

セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ、I C R 6 2、m A b 8 0 6、マツズマブ、およびこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体からなる群より選択される少なくとも一つの他の抗 E G F R 抗体による処置に対して抵抗性または部分抵抗性であるがんの処置において使用するための抗体組成物であって、第 1 の抗ヒト E G F R 抗体分子および第 1 の分子とは別個の第 2 の抗ヒト E G F R 抗体分子を含み、

a) 第 1 の抗ヒト E G F R 抗体分子が、

i) 軽鎖が配列番号 7 2 のアミノ酸 3 ~ 2 1 6 を含み、かつ重鎖が配列番号 4 0 のアミノ酸 3 ~ 1 2 4 および配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む、抗体；

i i) 軽鎖が配列番号 7 2 のアミノ酸 3 ~ 1 0 9 を含み、かつ重鎖が配列番号 4 0 のアミノ酸 3 ~ 1 2 4 を含む、抗体；および

i i i) 軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 がそれぞれ、配列番号 7 2 の残基 2 9 ~ 3 4、5 2 ~ 5 5、および 9 2 ~ 9 6 を含み、かつ重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 がそれぞれ、配列番号 4 0 の残基 2 8 ~ 3 5、5 3 ~ 6 0、および 9 9 ~ 1 1 4 を含む、抗体からなる群より選択され；かつ

b) 第 2 の抗ヒト E G F R 抗体分子が、

i) 軽鎖が配列番号 7 3 のアミノ酸 3 ~ 2 2 1 を含み、かつ重鎖が配列番号 4 1 のアミノ酸 3 ~ 1 2 0 および配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む、抗体；

i i) 軽鎖が配列番号 7 3 のアミノ酸 3 ~ 1 1 4 を含み、かつ重鎖が配列番号 4 1 のアミノ酸 3 ~ 1 2 0 を含む、抗体；および

i i i) 軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 がそれぞれ、配列番号 7 3 の残基 2 9 ~ 3 9、5 7 ~ 5 9、および 9 6 ~ 1 0 4 を含み、かつ重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 がそれぞれ、配列番号 4 1 の残基 2 8 ~ 3 5、5 3 ~ 6 0、および 9 9 ~ 1 1 0 を含む、抗体からなる群より選択される、

抗体組成物。

【請求項 1 2】

少なくとも一つの他の抗 E G F R 抗体が第一選択治療において使用される、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

a) 化学療法；

b) 少なくとも一つのチロシンキナーゼ阻害剤；

c) 少なくとも一つの血管新生阻害剤；

d) 少なくとも一つのホルモン；

e) 少なくとも一つの分化誘導剤；または

f) a) - e) の任意の組み合わせによる処置レジメン後の第二選択治療において使用される、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

第三選択治療において使用される、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

完全なまたは部分的な抵抗性が、該対象から単離されたがん細胞の試料をアッセイすることによって決定されたものである、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

該がんが、頭頸部がん、大腸がん、乳がん、腎がん、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、神経膠腫、膵がん、膀胱がん、非小細胞肺癌 (N S C L C)、胃がん、子宮頸がん、肝細

胞がん、胃食道がん、直腸結腸がん、直腸がん、類上皮癌、腎細胞癌（ＲＣＣ）、頭頸部の扁平上皮細胞癌（ＳＣＣＨＮ）、食道がん、多形性神経膠芽腫、扁平上皮細胞癌、腎臓がん、肉腫およびメラノーマからなる群より選択される、請求項１～１５のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１７】

該抗体組成物が、外科手術後および／または放射線療法後のアジュバント療法において使用される、請求項１～１６のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１８】

- a) 化学療法；
- b) 少なくとも一つのチロシンキナーゼ阻害剤；
- c) 少なくとも一つの血管新生阻害剤；
- d) 少なくとも一つのホルモン；
- e) 少なくとも一つの分化誘導剤；または
- f) a) - e) の任意の組み合わせ

と一緒に併用療法に使用される、請求項１～１７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１９】

血管新生阻害剤がベバシズマブである、請求項７、１３、および１８のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２０】

該組成物の第１および第２の抗ヒトＥＧＦＲ抗体分子がヒトＥＧＦＲへの互いの結合を阻害しない、請求項１～１９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２１】

該組成物の抗体分子の少なくとも一つが、ヒトＥＧＦＲに関して他の抗体の最大結合能を増加させる能力を持つ、請求項１～２０のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２２】

第１および第２の抗体分子の他にはさらなる抗体分子を含有しない、請求項１～２１のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２３】

第２の抗体分子に対する第１の抗体分子の比率が１：１である、請求項１～２２のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２４】

該組成物の第１および第２の抗ＥＧＦＲ抗体分子がアイソタイプＩｇＧ₁またはＩｇＧ₂である、請求項１～２３のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

[発明の分野]

本発明はヒトがん療法において使用するための組換え抗体の分野に関する。

【背景技術】

【０００２】

[発明の背景]

上皮増殖因子受容体（EGFR）は、腫瘍の進行にとって極めて重要なプロセスである細胞増殖ならびにアポトーシス、血管新生および転移拡散に、重要な役割を果たす（Salomonら，Crit. Rev. Oncology/Haematology, 19:183-232 (1995)；Wuら，J. Clin. Invest., 95:1897-1905 (1995)；Karnesら，Gastroenterology, 114:930-939 (1998)；Woodburnら，Pharmacol. Therap. 82: 241-250 (1999)；Priceら，Eur. J. Cancer, 32A:1977-1982 (1996)）。実際、EGFRが媒介する細胞成長は、非小細胞肺癌、前立腺がん、乳がん、胃がん、および頭頸部腫瘍を含むさまざまな固形腫瘍において増加することが、研究によって示されている（Salomon DSら，Critical Reviews in Oncology/Haematology, 19:183-232 (1995)）。さらにまた、がん細胞表面でのEGFRの過剰な活性化は、現在では、がん患

10

20

30

40

50

者における進行疾患、転移表現型の発生および予後不良と関連することが知られている (Salomon DSら, Critical Reviews in Oncology/Haematology 19:183-232 (1995))。

【 0 0 0 3 】

さらにまた、EGFR発現は、しばしば、EGFR発現腫瘍細胞によるEGFRリガンド (特にTGFおよびEGF) の産生を伴うことから、オートクリンループがこれらの細胞の進行に関与することが示唆される (Baselgaら (1994) Pharmac. Therapeut. 64:127-154 ; Modjtahediら (1994) Int. J. Oncology. 4:277-296)。したがって、そのようなEGFRリガンドとEGFRの間の相互作用をブロックすれば、腫瘍の成長および生存を阻害することができる (Baselgaら (1994) Pharmac. Therapeut. 64:127-154)。

【 0 0 0 4 】

EGFRは分子量約170kDaの膜結合型糖タンパク質である。EGFRは、グリコシル化された外側のリガンド結合ドメイン (621残基) と細胞質ドメイン (542残基) とが短い23アミノ酸の膜貫通リンカーで連結されたものからなる。EGFRの細胞外部分は、25個のジスルフィド結合と12個のN結合型糖鎖付加部位を持ち、一般に、4つのサブドメインからなるとみなされている。EGFRのX線結晶構造から、この受容体は、EGFに結合することができない自己阻害型の繫留型 (tethered) コンフォメーション (Fergusonら, Mol Cell, 2003, vol 11:507-517) と、EGFリガンド結合および受容体二量体化を媒介しうる活性コンフォメーション (Garretら, Cell 2002, vol 110:763-773 ; Ogisoら, Cell, 2002, vol 110:775-787) の両方をとることが示唆されている。特にドメインIおよびドメインIIIは、高アフィニティリガンド結合部位の形成に相加的寄与 (additive contribution) をなすことが示唆されている。ドメインIIおよびIVは、システインリッチなラミニン様領域であり、これはタンパク質フォールディングを安定化し、予想EGFR二量体化境界面を含有する。

【 0 0 0 5 】

EGFRは、細胞表面では、いくつかの異なるコンフォメーションで存在することが知られており、繫留型または固定型 (locked) コンフォメーションの頻度が最も高い。繫留型コンフォメーションは二量体化することができないので、不活性である。治療用抗体Erbixは、ドメインIIIに結合し、受容体为非繫留型状態になるのを立体的に阻止することによって、繫留型コンフォメーションを安定化することが知られている。しかし、一部の受容体はそれでもなお、非繫留型コンフォメーションをとって、リガンドに結合し、二量体化する能力を持ちうる。モノクローナル抗体 (mAb) は、典型的には、一つのコンフォメーションに対する結合にしか有効でないので、他のコンフォメーションを示すがん細胞またはさまざまなコンフォメーションを示すがん細胞を効果的にターゲットとすることができない。

【 0 0 0 6 】

EGFRのリガンド結合ドメインに対するモノクローナル抗体 (mAb) は、EGFRリガンドとの相互作用をブロックすることができ、同時に、その結果として起こる細胞内シグナリング経路をブロックすることができる。

【 0 0 0 7 】

Erbix (商標) (セツキシマブ (cetuximab)) は、ヒトEGFRの細胞外ドメインに特異的に結合する組換えヒト/マウスキメラモノクローナル抗体である。Erbixは、ヒトIgG1重鎖および軽鎖定常領域を持つマウス抗EGFR抗体のFv領域から構成され、約152kDaの分子量を持つ。Erbixは哺乳動物細胞培養 (マウス骨髄腫) で生産される。Erbixは、転移性直腸結腸がんを持ち、その腫瘍がEGFRを発現する患者の処置に関して、承認されている。さらにまた、Erbixは、外科手術によって除去することができない頭頸部の扁平上皮細胞がんを持つ患者を処置するために放射線療法と組み合わせて、または標準的な白金ベースの治療法が失敗に終わった頭頸部の扁平上皮細胞がんの第二選択処置として、使用される。

【 0 0 0 8 】

Vectibix (商標) (パニツムマブ (panitumumab)) は、ヒトEGFRに特異的に結合する組換えヒトIgG2 モノクローナル抗体である。Vectibixは約147kDaの分子量を持つ。パニツ

10

20

30

40

50

ムマブは、遺伝子操作された哺乳動物細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）で生産される。Vectibixは、転移性直腸結腸がんを持ち、その腫瘍がEGFRを発現する患者であって、フルオロピリミジン、オキサリプラチン、およびイリノテカンを含む化学療法レジメンの施行中または施行後も疾患の進行を伴う患者の処置に関して、承認されている。

【 0 0 0 9 】

ImcloneがErbixという商標で販売しているセツキシマブは、US4,943,533およびWO 96/40210に記載されている。AbgenixがVectibixという商標で販売しているパニツムマブは、US6,235,883に記載されている。ザルツムマブ（Zalutuzumab）（Humax-EGFR）は、現在臨床開発中のもう一つの抗EGFR抗体である。この抗体はGenmabによって開発されたものであり、WO 02/100348およびWO 2004/056847に記載されている。セツキシマブ、パニツムマブ、およびザルツムマブ（zalutumumab）は、EGFR上の同じエピトープに結合する。

10

【 0 0 1 0 】

US5,891,996およびUS6,506,883に記載されているニモツズマブ（nimotuzumab）（TheraCIM hr3）は、欧州と米国を除いて、世界中のいくつかの国で、がんの処置に関して承認されている。

【 0 0 1 1 】

臨床開発中であるか臨床開発中であった他のモノクローナル抗EGFR抗体には、以下に挙げるものがある：

- ・The Institute of Cancer Researchによって開発されたICR62。この抗体はWO 95/20045に記載されている。

20

- ・突然変異型のEGFR（EGFR vIII）に対するモノクローナル抗体であるmAb806。この抗体はLudwig Institute of Cancer Researchによって開発され、WO 02/092771に記載されている。

- ・Merck-Seronoによって開発されたマツズマブ（matuzumab）（EMD72000）は、WO 02/66058に記載されている。マウス前駆体mAb425はWO 92/15683に記載されている。

【 0 0 1 2 】

モノクローナル抗体への長期間にわたる曝露は抵抗性腫瘍の選択を引き起こしうることが、当技術分野では知られている。そのような状況は、モノクローナル抗体による長期間の処置を受けた患者で生じ得る。同じエピトープに結合する2つのモノクローナル抗体Erbix（Imclone製）とVectibix（Abgenix製）は幅広く使用されているので、臨床家がこれらの抗体に対して抵抗性を持つ腫瘍を経験する可能性は高い。他にもモノクローナル抗体が臨床試験中であり、それらも数年のうちに市場に参入する可能性がある。ErbixおよびVectibixと同じエピトープに結合するHumax-Egfr（Genmab製のザルツムマブ）もその一つである。これら3つのモノクローナル抗体のいずれか一つに抵抗性である腫瘍は他の2つにも抵抗性であると推定することができる。

30

【 0 0 1 3 】

同様に、現在臨床試験中である他のモノクローナル抗EGFR抗体、すなわちニモツズマブ（YM Biosciences、キューバ）、マツズマブ（Merck KGaA）、mAb806（Ludwig Institute）およびICR62（Institute of Cancer Research）のいずれかに抵抗性である腫瘍の臨床例も存在しう。

40

【 0 0 1 4 】

これらのモノクローナル抗体のいずれかに対して完全にまたは部分的に抵抗性である腫瘍は、患者から単離された試料を使ってアッセイすることができるので、その腫瘍が抵抗性であるか否かは先験的（a priori）に知ることができる。

【 0 0 1 5 】

モノクローナル抗体療法に対する抵抗性（または不応性腫瘍）の他に、EGFR発現がんの処置におけるもう一つの問題は、外科手術、放射線療法、および/または化学療法剤、チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）および/またはモノクローナル抗体による内科的処置の後に起こる腫瘍の再発または進行である。再発または進行は抵抗性または少なくとも部分的な抵抗性の結果でありうるので、再発性腫瘍または進行性腫瘍は異なる医薬で処置されるべ

50

きであると推定されている。したがって、先の抗EGFR抗体処置に対して不応性であるがん、または前記先の抗EGFR抗体処置後に進行するがんの、第二選択または第三選択処置が必要とされている。

【発明の概要】

【0016】

〔発明の概要〕

本発明者らは、Erbix (セツキシマブ (Cetuximab)) に対して抵抗性であるがん細胞株を、本発明の抗体組成物により、インビトロで効果的に処置することができるのに対して、該抵抗性細胞株をVectibix (パニツムマブ) に曝露しても、Erbixによる処置と同様に効果がないことを発見した。ザルツムマブもこの細胞株に対しては効果がないだろうと予想される。これらの結果から、本発明の抗体組成物は、Erbix、Vectibixおよびザルツムマブ抵抗性腫瘍に対して有効であるという結論が導かれた。したがって、本発明の抗体組成物は、これらの製品のいずれかに応答しない患者を処置するために使用することができる。また、本発明の抗体組成物は、これらのモノクローナル抗体のいずれかにに対して最初から抵抗性である腫瘍を処置するためにも使用することができる。Erbixなどのモノクローナル抗体に対する抵抗性は、実施例21に記載する方法を使って、インビトロでアッセイすることができる。例えば、あるがん細胞株が10 µg/mLのErbixを含有する培地中で増殖する場合、それは、Erbixに対して部分抵抗性であるとみなされる。パニツムマブおよびザルツムマブに対する抵抗性も同じ方法でアッセイすることができる。

【0017】

これらの知見に基づいて、本発明者らは、現在開発途上にある他の抗EGFR抗体、例えば限定するわけではないが、セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ、ICR62、mAb806、マツズマブ、およびこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体のいずれかにに対して抵抗性または部分抵抗性であるがんの処置に、本発明の抗体組成物を使用することも考えている。

【0018】

これらの結果は、侵襲性がん細胞株をマウスに移植したインビボ試験 (実施例23) によって確認されている。Erbixによる最初の処置に続いて、部分レスポnder (partial responder) を選択し、Erbixによる長期処置か、本発明の抗体組成物による処置に付した。後者が腫瘍サイズの迅速な減少をもたらしたのに対し、継続的Erbix処置では腫瘍サイズが維持された。この前臨床効力は、Erbixと本発明の抗体1024および992の間に、結合の部分的オーバーラップがある場合でも達成された。例えば、Erbixから1024/992療法に移行した直後は、腫瘍内にErbixが残存していて、Erbixと本発明の組成物の2つの抗体の間で結合の競合が起こり、それが本発明の組成物の効力を低下させる可能性があるだろう。しかしこれは、1024/992処置の効力に有意な影響を及ぼさない。

【0019】

インビボ試験でも、本発明の抗体の組合せによってErbix抵抗性細胞を効率よく処置できることが確認された (実施例25)。したがって、Erbixに対して獲得された抵抗性機序は、本発明の抗体組成物の効力に影響を及ぼさない。

【0020】

結論として、本発明の抗体組成物は、Erbixなどのモノクローナル抗EGFR抗体に対して抵抗性または部分抵抗性であるがんを処置するために使用することができ、また、以前の処置レジメンにおいてErbixなどのモノクローナル抗EGFR抗体による処置を受けたことがある対象におけるがんを処置するために使用することができる。

【0021】

Erbix、Vectibixおよびザルツムマブの結合は同一であることから、これら3つのmAbについては、類似する結果が達成されると予想される。これらの知見に基づいて、本発明者らは、別のモノクローナル抗EGFR抗体、例えば限定するわけではないが、セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ、ICR62、mAb806、マツズマブ、およびこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体による処置を以前に受けたこ

とがあるがんの処置に、本発明の抗体組成物を使用することも考えている。そのような処置の効力は、実施例23に記載する試験と類似する前臨床試験で確かめることができる。

【0022】

さらにまた、本発明者らは、本発明の抗体組成物による処置後の再発性腫瘍成長を、本発明の抗体組成物を使ってうまく排除できることを確認した。これは実施例22に記載する前臨床試験で実証されている。再発性腫瘍は、最初に移植された腫瘍と同じくらい効率よく排除され、これらの腫瘍が本発明の抗体組成物による処置に対して抵抗性ではないことを明確に示した。

【0023】

したがって、第1の態様において、本発明は、抗ヒトEGFR抗体を含む先行処置レジメンを受けたことがある対象におけるがんを処置する方法において使用するための抗体組成物であって、少なくとも2つの別個の(distinct)抗ヒトEGFR抗体分子を含み、

a. 第1の別個の抗EGFR抗体分子が、抗体992、抗体992のVL配列(配列番号72のアミノ酸3~109)およびVH配列(配列番号40のアミノ酸3~124)を含む抗体、抗体992のCDR3(配列番号116および111)を持つ抗体、抗体992と同じエピトープに結合する抗体、およびヒトEGFRへの抗体992の結合を阻害する能力を持つ抗体からなる群より選択され;かつ

b. 第2の別個の抗EGFR抗体分子が、抗体1024、抗体1024のVL配列(配列番号73のアミノ酸3~114)およびVH配列(配列番号41のアミノ酸3~120)を含む抗体、抗体1024のCDR3(配列番号120および114)を持つ抗体、抗体1024と同じエピトープに結合する抗体、およびヒトEGFRへの抗体1024の結合を阻害する能力を持つ抗体からなる群より選択される、抗体組成物に関する。

【0024】

ある実施形態では、前記先行処置レジメンが、前記抗体組成物と同じ抗体組成物を含んでいたレジメンである。

【0025】

もう一つの実施形態では、前記先行処置レジメンが、セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ、ICR62、mAb806、マツズマブ、およびこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体からなる群より選択される抗ヒトEGFR抗体を含んでいたレジメンである。好ましくは、前記抗ヒトEGFR抗体が、セツキシマブ、パニツムマブ、およびザルツムマブ、ならびにこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体からなる群より選択される。より好ましくは、前記抗ヒトEGFR抗体が、セツキシマブおよびパニツムマブ、ならびにこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体からなる群より選択される。より好ましくは、前記抗ヒトEGFR抗体が、セツキシマブまたはセツキシマブと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体である。

【0026】

がんは、頭頸部がん、大腸がん、乳がん、腎がん(renal cancer)、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、神経膠腫、脾がん、膀胱がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、胃がん、子宮頸がん、肝細胞がん、胃食道(gastrophageal)がん、直腸結腸がん、直腸がん、類上皮癌、RCC、頭頸部の扁平上皮細胞癌(SCCHN)、食道がん、多形性神経膠芽腫、扁平上皮細胞癌、および腎臓がん(kidney cancer)、メラノーマ、本明細書に記載する癌および肉腫からなる群より選択することができる。

【0027】

抗体処置は、外科手術後および/または放射線療法後のアジュバント療法であることができる。

【0028】

処置は、化学療法および/または少なくとも一つのチロシンキナーゼ阻害剤および/または少なくとも一つの血管新生阻害剤および/または少なくとも一つのホルモンおよび/または少なくとも一つの分化誘導剤による処置を含む併用療法であることができる。

【0029】

先行処置レジメンは、第一選択治療、第二選択治療、または第三選択治療であることが

できる。

【0030】

第一選択治療は、さらに、化学療法および/または少なくとも一つのチロシンキナーゼ阻害剤および/または少なくとも一つの血管新生阻害剤および/または少なくとも一つのホルモンおよび/または少なくとも一つの分化誘導剤による処置レジメンを含むことができる。

【0031】

化学療法は、好ましくは、アドリアマイシン、シスプラチン、タキソール、ドキシソルビン、トポテカン、フルオロピリミジン、オキサリプラチン、およびイリノテカンからなる群より選択される化学療法化合物の投与を含む。

10

【0032】

本発明のいくつかの実施形態では、対象が、先行処置レジメンの施行中または施行後に進行した対象である。別の実施形態では、対象が、前記先行処置レジメン後に進行した対象である。

【0033】

がんは、先行処置レジメンに対して抵抗性または部分抵抗性であることができる。

【0034】

さらなる一態様において、本発明は、セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ、ICR62、mAb806、マツズマブ、およびこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体からなる群より選択される少なくとも一つの他の抗EGFR抗体による処置に対して抵抗性または部分抵抗性であるがんを処置する方法において使用するための抗体組成物であって、少なくとも2つの別個の抗ヒトEGFR抗体分子を含み、

20

a. 第1の別個の抗EGFR抗体分子が、抗体992、抗体992のVL配列（配列番号72のアミノ酸3～109）およびVH配列（配列番号40のアミノ酸3～124）を含む抗体、抗体992のCDR3（配列番号116および111）を持つ抗体、抗体992と同じエピトープに結合する抗体、およびヒトEGFRへの抗体992の結合を阻害する能力を持つ抗体からなる群より選択され；かつ

b. 第2の別個の抗EGFR抗体分子が、抗体1024、抗体1024のVL配列（配列番号73のアミノ酸3～114）およびVH配列（配列番号41のアミノ酸3～120）を含む抗体、抗体1024のCDR3（配列番号120および114）を持つ抗体、抗体1024と同じエピトープに結合する抗体、およびヒトEGFRへの抗体1024の結合を阻害する能力を持つ抗体からなる群より選択される、

30

抗体組成物に関する。

【0035】

この態様では、本組成物を第一選択治療に使用することができる。

【0036】

この態様の別の実施形態では、本組成物が、化学療法および/または少なくとも一つのチロシンキナーゼ阻害剤および/または少なくとも一つの血管新生阻害剤および/または少なくとも一つのホルモンおよび/または少なくとも一つの分化誘導剤を含む処置レジメン後の第二選択治療に使用される。本組成物は第三選択治療に使用することもできる。

【0037】

40

本組成物は、化学療法および/または少なくとも一つのチロシンキナーゼ阻害剤および/または少なくとも一つの血管新生阻害剤および/または少なくとも一つのホルモンおよび/または少なくとも一つの分化誘導剤と共に併用療法に使用することができる。

【0038】

いくつかの実施形態では、本組成物が、外科手術および/または放射線療法後にアジュバント療法として使用される。

【0039】

完全抵抗性または部分抵抗性は、好ましくは、前記対象から単離されたがん細胞の試料をアッセイすることによって決定される。このアッセイは、前記対象から得たがん細胞へのセツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ、ICR62、mAb806、マツズ

50

マブ、およびこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体の結合を測定することを含みうる。結合の欠如は、その抗体に対する抵抗性を示す。あるいは、部分抵抗性または完全抵抗性を、実施例21のアッセイに類似する増殖アッセイで決定することもできる。

【0040】

本発明のさらなる関連態様において、本発明は、

- ・EGFRシグナリングを減少させる方法、
- ・EGFRを発現する細胞を殺す方法、
- ・EGFRを発現する細胞においてアポトーシスを誘導する方法、
- ・EGFRを発現する細胞の増殖を阻害する方法、
- ・インビボで腫瘍細胞の分化を誘導する方法、および
- ・EGFRのインターナリゼーションを誘導するための方法、

であって、EGFR発現細胞の組成物に抗体組成物を投与することを含み、前記細胞は、以前に、セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ、ICR62、マツズマブ、Mab806、およびこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体からなる群より選択される抗EGFR抗体に供されたことがあり、前記抗体組成物が本願に記載するとおりである方法に関する。

【0041】

さらなる態様において、本発明は、

- ・EGFRシグナリングを減少させる方法、
- ・EGFRを発現する細胞を殺す方法、
- ・EGFRを発現する細胞においてアポトーシスを誘導する方法、
- ・EGFRを発現する細胞の増殖を阻害する方法、
- ・インビボで腫瘍細胞の分化を誘導する方法、および
- ・EGFRのインターナリゼーションを誘導するための方法、

であって、EGFR発現細胞の組成物に抗体組成物を投与することを含み、前記細胞が、セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ、ICR62、マツズマブ、Mab806、およびこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体からなる群より選択される抗EGFR抗体に対して抵抗性または部分抵抗性であり、前記抗体組成物が本願に記載するとおりである方法に関する。

【0042】

本発明のこれらの態様に関して、本発明の抗体組成物は、本明細書に記載する組成物のいずれであってもよい。好ましくは、本発明の抗体組成物は、「好ましい抗体組成物」という見出しを付けた項に記載するとおり、すなわち本明細書に記載の抗体1024および992に基づく抗体組成物である。

【0043】

定義

用語「抗体」は、血清の機能的コンポーネントを表し、多くの場合、分子（抗体または免疫グロブリン）のコレクション（collection）を指すか、または1分子（抗体分子または免疫グロブリン分子）を指す。抗体分子は、特異的抗原決定基（抗原または抗原エピトープ）と結合または反応する能力を持ち、それが、結果として、免疫エフェクター機序の誘導につながりうる。個々の抗体分子は、通常、単一特異性であるとみなされ、抗体分子の組成物はモノクローナル（すなわち同一抗体分子からなる）またはポリクローナル（すなわち、同じ抗原上の、あるいは別個の異なる抗原上の、同じまたは異なるエピトープと反応する2つ以上の異なる抗体分子からなる）であることができる。各抗体分子は、それがその対応する抗原に特異的に結合することを可能にするユニークな構造を持ち、全ての天然抗体分子は、2つの同一軽鎖および2つの同一重鎖という同じ全体的基本構造を持つ。抗体は免疫グロブリンとも総称されている。本明細書において使用する抗体（単数または複数）という用語は、キメラ抗体および単鎖抗体、ならびに抗体の結合性フラグメント、例えばFab、FvフラグメントまたはscFvフラグメント、ならびに多量体型、例えばIgA分子

10

20

30

40

50

二量体または五価IgMも包含するものとする。抗体は、ヒト、マウス、キメラ、ヒト化、または再構成 (reshaped) 抗体であることができる。

【 0 0 4 4 】

「コグネイト (cognate) V_H および V_L コードペア (coding pair)」という用語は、同じ抗体産生細胞内に含まれるかまたは同じ抗体産生細胞に由来する V_H コード配列と V_L コード配列の元々のペアを表す。したがって、コグネイト V_H および V_L ペアは、その細胞が由来するドナー中に元々存在する V_H および V_L ペアリングを表す。「 V_H および V_L コードペアから発現される抗体」という用語は、抗体または抗体フラグメントが、その V_H および V_L コード配列を含有するベクター、プラスミドなどから産生されることを示す。コグネイト V_H および V_L コードペアが完全な抗体として発現されるか、その安定なフラグメントとして発現される場合、それらは、それらが由来する細胞から元々発現される抗体が持つ結合アフィニティーおよび結合特異性を保持している。コグネイトペアのライブラリーはコグネイトペアのレパートリーまたはコレクションとも呼ばれ、個別に保存するか、またはプールすることができる。

10

【 0 0 4 5 】

「CDR」 - 相補性決定領域 - という用語は、Lefrancら (2003) 「IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains」Dev. Comp Immunol 27, 55-77に定義されているとおりである。

【 0 0 4 6 】

「組換えポリクローナルタンパク質の別個のメンバー」という用語は、異なっているが相同なタンパク質分子を含むタンパク質組成物 (ここで、各タンパク質分子は、その組成物の他の分子と相同であるが、ポリクローナルタンパク質の個々のメンバー間でのアミノ酸配列の相違を特徴とする1つまたはそれ以上の可変ポリペプチド配列ストレッチも含有する) の1つのタンパク質分子を意味する。

20

【 0 0 4 7 】

「ヘッド-トゥ-ヘッド (head-to-head) プロモーター」という用語は、それらのプロモーターによって駆動される2つの遺伝子フラグメントの転写が互いに反対向きに起こるように近接して配置されているプロモーターペアを指す。ヘッド-トゥ-ヘッドプロモーターは、それら2つのプロモーター間に無関係な核酸からなるスタッファー (stuffer) を持つような構成をとることもできる。そのようなスタッファーフラグメントは、500を超えるヌクレオチドを容易に含有することができる。ヘッド-トゥ-ヘッドプロモーターは、二方向性 (bi-directional) プロモーターと呼ぶこともできる。

30

【 0 0 4 8 】

「免疫グロブリン」という用語は、一般に、血中または血清中に見いだされる抗体の混合物の総称として使用されるが、他の供給源に由来する抗体の混合物を指すために使用することもできる。

【 0 0 4 9 】

「免疫グロブリン分子」という用語は、例えば免疫グロブリンの一部、または任意のポリクローナルもしくはモノクローナル抗体組成物の一部である、個々の抗体分子を意味する。

40

【 0 0 5 0 】

「目的の変異 (variant) 核酸分子のライブラリー」という用語は、全体として「目的の組換えポリクローナルタンパク質」をコードする核酸分子のコレクションを表すために用いられる。トランスフェクションに使用する場合、目的の変異核酸分子のライブラリーは、発現ベクターのライブラリーに含まれる。そのようなライブラリーは、典型的には、少なくとも2、3、5、10、20、50、1000、 10^4 、 10^5 または 10^6 個の別個のメンバーを持つ。

【 0 0 5 1 】

「マス移動 (mass transfer)」という用語は、あるベクター集団からもう一つのベクター集団への、目的の核酸配列の移動、および目的とする個々のDNAの単離という手段にたよることなく、各DNAについて同時にそれを行うことを表すために用いられる。そのよ

50

うなベクター集団は、例えば目的の可変領域、プロモーター、リーダーまたは増強要素（enhancing element）を含有するライブラリーであることができる。次に、これらの配列を、前もって単離することなく、例えばファージベクターから哺乳動物細胞発現ベクターに移動させることができる。とりわけ抗体配列の場合は、この技法により、ライブラリーを例えば選択ベクター（例：ファージディスプレイベクター）から哺乳動物細胞発現ベクターに移動させる際に、多様な V_H および V_L 間の連関（the linkage between V_H and V_L diversity）が失われないことが保証される。これにより、 V_H と V_L の元のペアリング（pairing）が保持される。

【0052】

本明細書において使用する「作動可能に連結された（operably linked）」という用語は、あるセグメントがもう一つのセグメントに連結されて、他方のセグメントと機能的な関係に置かれている場合を指す。例えば、シグナル配列をコードするDNAは、あるポリペプチドをコードするDNAに対して、それが小胞体へのそのポリペプチドの移動に関与するリーダーとして発現されるのであれば、作動可能に連結されている。また、プロモーターまたはエンハンサーは、あるコード配列に対して、それがその配列の転写を刺激するのであれば、作動可能に連結されている。

【0053】

「ポリクローナル抗体」という用語は、同じ抗原上または異なる抗原上のいくつかの異なる特異的抗原決定基と結合または反応する能力を持つ異なる抗体分子の組成物を表す。通常、ポリクローナル抗体の多様性は、ポリクローナル抗体のいわゆる可変領域にあると考えられている。しかし、本発明においては、ポリクローナル性は、例えば、ヒトアイソタイプIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2、またはマウスアイソタイプIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、およびIgAなど、2つ以上の抗体アイソタイプを含有する抗体混合物の場合のように、いわゆる定常領域中に存在する個々の抗体分子間の相違を表すと理解することもできる。本発明の場合は、そのようなポリクローナル抗体も「抗体組成物」と呼ぶことができる。

【0054】

「エピトープ」という用語は、一般に、より大きな分子の一部分またはより大きな分子の一部（例えば抗原または抗原性部位）であって、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトにおいて、抗原活性または免疫原活性を持つものを表すために使用される。免疫原活性を持つエピトープは、より大きな分子のうち、動物における抗体応答を惹起する部分である。抗原活性を持つエピトープは、より大きな分子のうち、当技術分野において周知である任意の方法（例えば本明細書に記載するイムノアッセイ）で決定される、抗体が免疫特異的に結合する部分である。抗原エピトープは必ずしも免疫原性である必要はない。抗原は抗体または抗体フラグメントが免疫特異的に結合する物質、例えば毒素、ウイルス、細菌、タンパク質またはDNAなどである。抗原または抗原性部位は、それが著しく小さい場合を除けば、2つ以上のエピトープを持つことが多く、多くの場合、免疫応答を刺激する能力を持つ。エピトープは、線状エピトープである場合も、コンフォメーションル（conformational）エピトープである場合もある。線状エピトープは、抗体によって認識されるタンパク質分子上の約6～10個の隣接アミノ酸からなる。これに対し、コンフォメーションルエピトープは、連続的には配置されていないアミノ酸からなる。この場合、抗体は3次元構造だけを認識する。タンパク質分子が3次元構造に折りたたまれると、エピトープを形成するアミノ酸が隣接して、抗体はその配列を認識することが可能になる。変性タンパク質では、線状エピトープだけが認識されうる。コンフォメーションルエピトープは、当然のことながら、折りたたまれたタンパク質の外側になければならない。コンフォメーションルエピトープを認識する抗体は、温和な非変性的手法下でしか結合することができない。同じ抗原上の異なるエピトープに結合する抗体は、エピトープの位置に依存して、それらが結合する抗原の活性に対してさまざまな効果を持ちうる。抗原の活性部位にあるエピトープに結合する抗体がその抗原の機能を完全にブロックしうるのに対して、異なるエピトープに結合する別の抗体は、抗原の活性に全く影響しないか、わずかに影

10

20

30

40

50

響しないこともありうる。しかしそれでも、そのような抗体は、補体を活性化することによって、その抗原の排除をもたらす場合があり、同じ抗原上の異なるエピトープに結合する1つ以上の抗体と組み合わせた場合には、相乗効果をもたらさう。本発明において、エピトープは、好ましくは、EGFRの細胞外ドメインの一部である。本発明の抗原は、好ましくは、抗体または抗体フラグメントが免疫特異的に結合する、細胞外ドメインEGFRタンパク質、ポリペプチドまたはそのフラグメントである。EGFR関連抗原は、抗体または抗体フラグメントが免疫特異的に結合する、EGFRポリペプチドの細胞外ドメインまたはそのフラグメントの類似体または誘導体であることもできる。

【0055】

同じ抗原への結合に関して互いに競合する能力を持つ抗体は、同じエピトープまたはオーバーラップエピトープに結合しうるか、互いに近接している結合部位を持ちうるので、競合は主として立体障害によって引き起こされる。抗体間の競合を決定するための方法は実施例で説明する。

【0056】

本明細書において使用する「ポリクローナルタンパク質」または「ポリクローナル性」という用語は、異なっているが相同なタンパク質分子（好ましくは免疫グロブリンスーパーファミリーから選択されるもの）を含むタンパク質組成物を指す。したがって各タンパク質分子は、その組成物の他の分子と相同であるが、ポリクローナルタンパク質の個々のメンバー間でのアミノ酸配列の相違を特徴とする1つまたはそれ以上の可変ポリペプチド配列ストレッチも含有する。そのようなポリクローナルタンパク質の既知の例には、抗体または免疫グロブリン分子、T細胞受容体およびB細胞受容体が含まれる。ポリクローナルタンパク質は、共通する特徴（例えば所望のターゲット抗原に対するポリクローナル抗体の場合であれば、所望のターゲットに対する共通の結合活性など）によって規定されたタンパク質分子の所定のサブセットからなりうる。

【0057】

「タンパク質」または「ポリペプチド」とは、長さまたは翻訳後修飾とは無関係に、任意のアミノ酸鎖を意味する。タンパク質は、単量体として存在するか、2つまたはそれ以上の集合したポリペプチド鎖、タンパク質のフラグメント、ポリペプチド、オリゴペプチド、またはペプチドを含む多量体として存在することができる。

【0058】

「RFLP」という用語は「制限断片長多型」を指し、これは、制限酵素による切断後に核酸分子フラグメントの泳動ゲルパターンの分析が行われる方法である。

【0059】

「スクランブリング (scrambling)」という用語は、例えば免疫グロブリンスーパーファミリーの2つの異なるポリペプチド鎖で構成されるポリクローナルタンパク質の2つまたはそれ以上の別個のメンバーが、1個の細胞から発現される状況を表す。この状況は、当該1個の細胞が1対より多くの遺伝子セグメントのペアをそのゲノム中に組み込んでいて、遺伝子セグメントの各ペアがポリクローナルタンパク質の別個のメンバーをコードしている場合に生じうる。そのような状況においては、それら遺伝子セグメントから発現されるポリペプチド鎖の意図せぬ組合せが生じうる。これらの意図せぬポリペプチド鎖の組合せは、何の治療効果も持たないだろう。

【0060】

「 V_H - V_L 鎖スクランブリング」という用語は、上に定義したスクランブリングの一例である。この例では、 V_H をコードする遺伝子セグメントと V_L をコードする遺伝子セグメントとが、遺伝子セグメントのペアを構成する。スクランブリングは、 V_H および V_L ポリペプチドの意図せぬ組合せが、2つの異なる V_H および V_L コード遺伝子セグメントペアが同じ細胞中に組み込まれている一つの細胞から産生される場合に起こる。そのようなスクランブル (scrambled) 抗体分子は、元の特異性を保持していない可能性が高いので、何の治療効果も持たないだろう。

【0061】

「トランスフェクション」という用語は、本明細書では、外来DNAを細胞中に導入することを広く表す用語として使用される。この用語は、外来DNAを細胞中に導入するための他の機能的に等価な方法、例えば形質転換、感染、形質導入、またはドナー細胞とアクセプター細胞の融合なども包含するものとする。

【0062】

「可変ポリペプチド配列」および「可変領域」という用語は、可換的に使用される。

【0063】

「別個のエピトープ」という用語は、2つの異なる抗体が別個のエピトープに結合する場合に、抗原結合に関する競合が100%未満であること、好ましくは抗原結合に関する競合が50%未満であること、より好ましくは抗原結合に関する競合が基本的に存在しないことを意味する。抗体ペアの「別個のエピトープ」に関する分析は、典型的には、EGFRを発現する細胞と個別に蛍光標識された抗体でのFACS分析を使って、または実施例で説明するようにフローセル表面に捕捉またはコンジュゲートされたEGFR抗原を用いる表面プラズモン共鳴を使って、飽和抗体条件下での結合実験によって決定される。

10

【0064】

「EGF結合を阻害する」能力を持つという用語が、ある抗体分子に適用される場合、それは、その抗体分子が、EGFRへのEGF結合に関して、10nM未満、好ましくは8nM未満、より好ましくは7nM未満、より好ましくは5nM未満、より好ましくは4nM未満、より好ましくは3nM未満、より好ましくは2nM未満、より好ましくは2nM未満、より好ましくは1nM未満のIC50値を示すことを意味する。

20

【0065】

「上皮増殖因子受容体」「EGFR」および「EGFR抗原」という用語は、本明細書では可換的に使用され、ヒトEGFRの変異体、アイソフォームおよび種ホモログを包含する。好ましい実施形態では、EGFR抗原への本発明の抗体の結合が、EGFRへのEGFRリガンドの結合を阻害またはブロックすることによって、EGFRを発現する細胞（例えば腫瘍細胞）の成長を阻害する。「EGFRリガンド」という用語は、例えば限定するわけではないが、EGF、TGF- α 、ヘパリン結合性EGF（HB-EGF）、アンフィレギュリン（AR）、ヘレグリン、ベータセルリン、およびエプレギュリン（EPI）など、EGFRの（例えば生理学的）リガンドを全て包含する。もう一つの好ましい実施形態では、EGFR抗原への本発明の抗体の結合が、エフェクター細胞の食作用および/またはEGFRを発現する細胞の殺滅を媒介する。

30

【0066】

EGFRドメイン構造：成熟EGFR（SwissProtアクセッション番号P00533）の細胞外部分は621個のアミノ酸と4つの受容体ドメインからなり、ドメインIは残基1～165を、ドメインIIは残基166～312を、ドメインIIIは残基313～481を、そしてドメインIVは482～621を包含する（Cochranら 2004 J Immunol. Methods 287, 147-158）。ドメインIおよびIIIはリガンドに対する高アフィニティー結合部位の形成に寄与することが示唆されている。ドメインIIおよびIVは、タンパク質フォールディングを安定化するシステインリッチなラミニン様領域であり、予想EGFR二量体化境界面を含有する。

【0067】

本明細書において使用される（例えば細胞に関して）「成長を阻害する」という用語は、抗EGFR抗体と接触していない同じ細胞の成長と比較して、抗EGFR抗体と接触させた時の、細胞の増殖（細胞数の増加）または代謝の測定可能な任意の減少、例えば細胞培養物の成長の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、または100%の阻害を包含するものとする。

40

【0068】

本明細書において（例えばEGFRへのEGFRリガンドの結合の阻害/ブロックングに関して）「結合を阻害する」および「結合をブロックする」という用語は可換的に使用され、部分的な阻害/ブロックングと完全な阻害/ブロックングの両方を包含する。EGFRに対するEGFRリガンドの阻害/ブロックングは、好ましくは、阻害またはブロックングを伴わずにEGFRリガンドがEGFRに結合した場合に起こる細胞シグナリングの正常なレベルまたはタイプ

50

を減少または変化させる。また、阻害およびブロッキングは、抗EGFR抗体と接触していないリガンドと比較して、抗EGFR抗体と接触している場合の、EGFRに対するEGFRリガンドの結合アフィニティーの任意の測定可能な減少、例えばEGFRに対するEGFRリガンドの少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、または100%のブロッキングも包含するものとする。

【0069】

「組換え抗体」という用語は、当該細胞には本来関連のない抗体のコード配列を含む発現ベクターでトランスフェクトされた細胞または細胞株から発現される抗体分子またはいくつかの分子を表すために使用される。

【0070】

がん - がん（医学用語：悪性新生物）は、一群の細胞が制御されない成長（正常範囲を超えた分裂）、浸潤（隣接組織への侵入および隣接組織の破壊）、そして時には転移（リンパまたは血液を介した体内の他の位置への拡散）を示す疾患群である。がんのこれら3つの悪性形質により、がんは、自己限定性であって浸潤したり転移したりしない良性腫瘍と区別される。大半のがんは腫瘍を形成するが、白血病のように腫瘍を形成しないものもある。がんは新生物成長および過剰増殖性障害と呼ばれる場合もある。

【0071】

アジュバント療法：一次処置の後に治癒の可能性を増加させるために施行される処置。アジュバント療法には、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、または生物学的療法が含まれる。

【0072】

化学療法：小分子薬物による処置。

【0073】

放射線療法：放射線による処置。

【0074】

第一選択治療：ある疾患または状態のための最初の処置。がん患者の場合、第一選択治療は外科手術、化学療法、放射線療法、抗体療法、またはこれらの治療法の組合せであることができる。一次治療または一次処置とも呼ばれる。

【0075】

第二選択治療：最初の処置（第一選択治療）が効かない場合または効かなくなった場合に施行される処置。

【0076】

第三選択治療：第二選択治療が効かない場合または効かなくなった場合に施行される処置。

【0077】

TKI - チロシン阻害剤の阻害剤（inhibitors of tyrosine inhibitors）。

【0078】

進行：医学において、がんなどの疾患が悪化するか体内で拡散する時の、その疾患の経過。

【0079】

抵抗性がん：処置に応答しないがん。がんは処置の最初から抵抗性である場合もあるし、処置中に抵抗性になる場合もある。不応性がんとも呼ばれる。これとは対照的に、効果的な処置は、腫瘍の根絶を引き起こす。

【0080】

部分抵抗性がん：部分抵抗性がんは処置に応答するが、処置は腫瘍の根絶を引き起こさない。部分抵抗性がんの場合、腫瘍成長は部分的にまたは完全に阻害されうるが、腫瘍は退縮しないか、ごくわずかしかなる退縮しない。

【0081】

セツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ、ニモツズマブ、ICR62、mAb425、マツズマブ、およびこれらのいずれかと同じエピトープに結合する能力を持つ抗体からなる群よ

10

20

30

40

50

り選択される抗EGFR抗体に対する抵抗性または部分抵抗性は、これらの抗体の一つ以上を投与された患者において観察されるか、または、例えばEGFRの発現とモノクローナル抗体の非結合または低結合とを決定することなどによるインビトロアッセイで、もしくは実施例21に記載するような増殖アッセイで、測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1】脾細胞の選別（詳細については実施例1を参照のこと）。以下のゲートを設けた（図示）：・ゲート1：生細胞（FSC/ヨウ化プロピジウムプロット）（左下パネル）。・ゲート2：形質細胞はCD43陽性/CD138陽性としてゲーティングした（右下パネル）。・ゲート3：ダブルット識別（doublet discrimination）（右上パネル）。 10

【図2】マウス-mSymplex（商標）PCR。単一の細胞から得られる重鎖および軽鎖抗体遺伝子の増幅およびコグネイト連結（cognate linkage）を行うためのマルチプレックスオーバーラップ伸長RT-PCR。詳細については実施例1を参照のこと。

【図3】マウスレパートリークローニング。単一形質細胞から得られるVH/VL遺伝子ペアをコードするmSymplex（商標）PCR産物のプールを、SOE（splicing by overlap extension）法により、ヒト 定常軽鎖をコードする遺伝子にスプライスした。完全なヒト-マウスキメラ抗体をコードする遺伝子のプールを発現ベクターに挿入した後、二方向性プロモーターカセット（2×CMV）を挿入した。

【図4】哺乳類全長抗体発現ベクター00-VP-002の概略図。AmpおよびAmp pro、アンピシリン耐性遺伝子およびそのプロモーター；pUC起点、pUCの複製開始点；CMV、軽鎖および重鎖の発現を駆動する哺乳類プロモーター；IGHVリーダー、ゲノムヒト重鎖リーダー；Hスタッファー、重鎖可変領域コード配列と交換されるインサート；IGHG1、ゲノム免疫グロブリンアイソタイプG1重鎖定常領域をコードする配列（配列は付表（Appendix）2に示す）；ウサギB-グロビンA、ウサギ -グロビンポリA配列；IGKVリーダー、マウス リーダー；Lスタッファー、軽鎖コード配列と交換されるインサート；SV40term、シミアンウイルス40ターミネーター配列；FRT、Flp認識ターゲット部位；Neo、ネオマイシン耐性遺伝子；SV40ポリA、シミアンウイルス40ポリAシグナル配列。 20

【図5】450～620nmにおける吸光度差のクラスター分析。上清は、クローン番号後の数字（1～4）で示されるように、反応性によってクラスター化される。暗灰色が代謝的に活性な細胞の数の減少を示すのに対して、明灰色は代謝的に活性な細胞の数の増加を示す。黒色は代謝的に活性な細胞の数に対する効果がない上清を示す。 30

【図6】競合ELISAで決定された、特定のEGFRドメインに対する表掲のリファレンス抗体による、抗EGFR抗体の阻害の度合。A）阻害を算出。B）阻害を次のようにスコアリング：25～49%：中くらいの競合（+）；50～74%：強い競合（++）；75～100%：極めて強い競合（+++）。有意な阻害（50～100%）を示す枠を灰色に網掛けしてある。このアッセイの再現性を例証するためにErbixとVectibixを2つずつ示す（4回の独立した実験）。Ab2（225）はErbixをもたすマウス前駆体である。

【図7】試料mAbを、EGFRの細胞外ドメインへの結合に関して、4つの異なるリファレンス抗体と競合させるという、Biacore 3000 SPR機器で行った1回のエピトープマッピングサイクルの図解。 40

【図8】SPR技術を用いる競合分析によって決定された、特定のEGFRドメインに対する表掲のリファレンス抗体による、抗EGFR抗体の阻害の度合。A）阻害を算出。B）阻害を次のようにスコアリング：25～49%：中くらいの競合（+）；50～74%：強い競合（++）；75～100%：極めて強い競合（+++）。有意な阻害（50～100%）を示すセルを灰色に網掛けしてある。*印を付けたクローン1229は、Biacoreアッセイでは結合しなかった。

【図9】抗EGFR抗体ペアのSPR競合分析による、抗EGFR抗体レパートリー内のエピトープクラスターの決定。抗体を、推定されるEGFRドメイン認識に従ってグループ分けした。抗体の組合せがオーバーラップエピトープ（overlapping epitope）に結合して50%を上回る阻害をもたらすことがわかったセルを、灰色に網掛けしてある。決定を行わなかったセルを黒く色づけしてある。A）阻害を算出。B）阻害を次のようにスコアリング：25～49% 50

: 中くらいの競合 (+); 50~74%: 強い競合 (++); 75~100%: 極めて強い競合 (+++)。

【図10】Biacore分析によって決定された、EGFRの細胞外ドメインに対するリファレンス抗体およびEGFR抗体のエピトープマップ。A) EGFR細胞外ドメイン (ECD) のドメインIまたはドメインI/IIに対する抗体のエピトープマップ。B) EGFR ECDのドメインIIIに対する抗体のエピトープマップ。

【図11】EGFR上の非オーバーラップエピトープに対する抗体のオリゴクローナル混合物の同時結合の研究。A) ドメインIII、ドメインIに対する抗体または特異性が不明な抗体の逐次的付加。異なるmAb混合物または単一mAbに対して試験した単一試料mAbの阻害値を網掛けした枠内に示す。阻害を算出するために使用したRu max値も示す。B) EGFR上の非オーバーラップエピトープに対する6つの別個の試料mAbと、試験した6つの抗体を含有する抗体混合物との競合分析。試験した試料抗体を含まない抗体混合物を陽性対照とした。異なるmAb混合物に対して試験した単一試料mAbの阻害値を網掛けした枠に示す。阻害を算出するために使用したRu max値も示す。C) 抗体による結合のブロッキングおよび場合によっては強化を示す、Bにおける分析で得られた対応するセンサーグラム (sensogram)。D) ドメインI、I/IIに対する追加の抗体および特異性が不明な追加の抗体を、上記6つのmAb抗体混合物に対して試験したもの。

【図12】全長EGFRに対する抗体滴定とストレプトアビジンHRP試薬を使ったビオチン化EGFリガンド結合の検出による、抗体を介したEGFリガンド遮断の決定。Erbix、VectibixおよびSynagis IgG (パリビズマブ (palivizumab)) をそれぞれ陽性対照および陰性対照として使用した。試験した抗体による、認識される抗体エピトープの遮断後に、0.1 µg/ml ビオチン化EGFリガンドと、検出用の二次ストレプトアビジン-HRPコンジュゲートとを添加することにより、EGFリガンド競合の度合を可視化した。

【図13】表示の抗体による前処理が、NH5細胞におけるEGF (50ng/ml) 誘導性EGFRリン酸化に及ぼす効果。グラフで指定した抗体 (10 µg/ml) を細胞と共に30分間インキュベートしてから、EGFを7.5分間加えた。*印を付けたデータセットは、対照 (-)ctrl) データセットとは有意に異なった ($p < 0.05$)。A. 1208は、EGFRリン酸化に関して、有意な保護効果を持っていた。B. 1277および1320はEGF誘導性リン酸化を有意に防御する。エラーバーは3回の独立した実験の標準偏差を表す。

【図14】HN5細胞におけるリン酸化EGFR (pEGFR) およびEGFRのインセル・ウェスタン (in cell western) 分析。「混合物」は、最終濃度を10 µg/mlにした992、1030および1042抗体の等モル混合物を表し、他の抗体はそれぞれ10 µg/mlの濃度で使用した。EGFRリン酸化を刺激するために、固定前に50 µg/mlのEGFを7.5分間添加しておいた。エラーバーは6つの独立したデータポイント (ctrl-) または3つの独立したデータポイント (992、1030、1042、混合物またはErbix) の標準偏差を表す。992、1030、混合物およびErbixは、リン酸化に関して、有意な ($* = p < 0.05$) 保護効果を持っていた。

【図15】抗体のインキュベーションがEGFRのインターナリゼーションに及ぼす効果。初期染色と比較して細胞表面から除去された受容体のパーセントとしてデータを示す。エラーバーはSEMに相当する。

【図16】無処理対照と比較した代謝的に活性な細胞のパーセントによって測定した、さまざまな濃度の抗体992、1030および1042ならびにその混合物の存在下でのA431-NS細胞の成長曲線。1001は、陰性対照として使用した、類似のアイソタイプを持つ非機能的抗体である。

【図17】450nmにおける吸光度によって測定した、10 µg/mlの抗体992、1030、1042およびその混合物ならびにさまざまな濃度のEGFRリガンドEGFの存在下でのA431-NS細胞の成長曲線。1001は、陰性対照として使用した、類似のアイソタイプを持つ非機能的抗体である。

【図18】さまざまな濃度の抗体992および992とドメインI、IIまたはIII中に存在する非オーバーラップエピトープを持つ抗体との混合物の存在下でのA431-NS細胞の成長曲線。1001は、陰性対照として使用した、類似のアイソタイプを持つ非機能的抗体である。

10

20

30

40

50

【図 1 9】A431NS細胞におけるアポトーシス。EGFR-混合物 (EGFR-mix)、個々のモノクローナル抗体、ErbixおよびVectibixを10倍希釈系列で試験した。Roche製ELISAキットを使って、アポトーシス細胞のヒストン-DNA複合体を測定した。

【図 2 0】ヌードBalb/C Nu/Nuマウス10匹の4群に 1×10^6 個のA431NS細胞を接種した。腫瘍が約100mm³になった時に処置を開始した。矢印で示すように実験中に5回、1mg/mlの抗体を各群に注射した。腫瘍直径をデジタルキャリパーで測定した。結果を平均腫瘍体積 (\pm SEM) として示す。

【図 2 1】図20に示す実験において個々のマウスが死亡した場合は、腫瘍を摘出して重量を測定した。平均値 \pm SEMを示す。星印は $P < 0.05$ での有意性を示す。

【図 2 2】10 μ g/mlの抗体1001、Erbix、Vectibixおよび非オーバーラップエピトープを持つ3つの抗体の混合物992 + 1030 + 1042の存在下でのA431-NSスフェロイドの成長。1001は、陰性対照として使用した、類似のアイソタイプを持つ非機能的抗体である。

【図 2 3】カニクイザル皮膚表皮に由来するcDNAからクローニングされたカニクイザルEGFRの細胞外ドメインのDNA配列 (配列番号100) およびタンパク質配列 (配列番号101)。

【図 2 4】カニクイザルEGFR ECDの得られたタンパク質配列 (配列番号101) と、GENBANKアクセッション番号X00588から得たヒトEGFR ECD (配列番号108) のアラインメント。コンセンサス配列 (配列番号109) も示されている。

【図 2 5】ヒトもしくはカニクイザルEGFR ECDのどちらか一方またはその両方に結合する交差反応性抗体と種特異的抗体のELISAアッセイ識別の例。

【図 2 6】異種移植マウスの4つの実験群のそれぞれから得た代表的腫瘍切片の顕微鏡写真。倍率200倍において、矢印は、インピボでのA431細胞の最終分化の増殖巣を示す。3つの抗EGFRクローンの混合物 (992 + 1030 + 1042) で処置した腫瘍の方が、増殖巣が著しく大きく、数も多いことに注目されたい (上側の2つのパネル)。

【図 2 7】A) 10 μ g/mlの対照抗体 (リツキシマブ (rituximab)、抗CD-20) または992と1024との抗EGFR抗体混合物を添加した24時間後に、倍率40倍で撮影したHN5スフェロイドの画像。B) 細胞に覆われている面積を、ソフトウェアImage Jを使って定量化したもの ($* p < 0.01$)。

【図 2 8】4つの処置群におけるインボルクリンレベルを無処置対照群のパーセントとして示すグラフ ($* \#$ それぞれErbix群、Vectibix群および陰性対照群と比較して、 $p < 0.005$)。

【図 2 9】A) 10 μ g/mlのAlexa-488標識Erbixまたは992 + 1024と共に2時間インキュベートしたHN5細胞およびA431NS細胞を、倍率60倍で撮影した画像。B) 10 μ g/mlのAlexa-488標識Erbixまたは992 + 1024と共に2時間インキュベートしたA431NS細胞を、小さなピンホールを使って倍率60倍で撮影した画像。

【図 3 0】A) 10 μ g/mlのAlexa-488標識Erbixまたは992 + 1024と共に表示の時間インキュベートしたHN5細胞を、倍率60倍で撮影した画像。

【図 3 1】ELISAで、A431-NS細胞および精製全長EGFRに対して、逐次的抗体滴定を行うことによる、Fab992、1024および1030抗原提示特異性の決定。結合したFab抗体を、二次ヤギ抗ヒトFab特異的HRPコンジュゲートで可視化した。A) A431細胞から得た精製全長EGFRに対して試験したFab抗体。B) A431-NS細胞の表面上に発現されたEGFRに対して試験したFab抗体。

【図 3 2】ELISAで、パラホルムアルデヒド固定A431-NS細胞に対して、逐次的抗体滴定を行うことによる、抗体992、1024、1030、ErbixおよびVectibixのIgGおよびFabフラグメントの機能的アフィニティー (functional affinity) の決定。結合したFabおよびIgG抗体を、二次ヤギ抗ヒトFab特異的HRPコンジュゲートで可視化した。抗RSVプロテインF抗体Synagisを陰性対照抗体として使用したところ、使用したELISAアッセイでは何の結合も示さなかった。A) A431-NS細胞へのIgG抗体の機能的結合。B) A431-NS細胞へのFab抗体の機能的結合。

【図 3 3】非オーバーラップエピトープに結合するFabフラグメントで事前に受容体を飽和させた時のA431-NS細胞上のEGFRへのIgG結合の強化の決定。A431-NS細胞上の認識され

10

20

30

40

50

るEGFRエピトープを表示のFabフラグメントで30分間飽和させた後、指定したIgG抗体で逐次的に滴定し、Fab添加有りまたは無しで結合したIgGを、二次マウス抗ヒトFc HRPコンジュゲートで可視化した。A) 表示のFabフラグメントによる事前前駆体飽和有りまたは無しでの、A431-NS細胞へのIgG 992の結合特徴。B) 表示のFabフラグメントによる事前前駆体飽和有りまたは無しでの、A431-NS細胞へのIgG 1024の結合特徴。C) 表示のFabフラグメントによる事前前駆体飽和有りまたは無しでの、A431-NS細胞へのIgG 1030の結合特徴。

【図34】カニクイザル全長EGFR cDNA (図34A; 配列番号102) とコードされているタンパク質 (図34B; 配列番号103)。

【図35】1 µg/mlの表示の抗体/組合せを使ってA431NSで得られたアポトーシス。Roche製ELISAキットを使ってヒストン-DNA複合体を検出した。アポトーシスのレベルを陽性対照 (最大アポトーシス) と関連づけた。

10

【図36】Balb/C nu/nuマウスに 1×10^6 個のA431NS細胞を注射した。腫瘍が平均で約100mm³に達した時に処置を開始した。マウスには抗体を17回注射した。8日目に最初の処置を開始し、最後の処置は34日目に行った。抗体/組成物を0.5mg/回または0.17mg/回の量で注射した。腫瘍体積の平均値 ± SEMを示す。

【図37】A431NSの増殖の阻害。X軸は本発明の3抗体の異なる代表的組合せを表す。Y軸は代謝活性を無処理対照 (対照) のパーセントとして表す。エラーバーは ± SEMを表す。さらなる詳細については実施例6を参照されたい。

【図38】A431NSヒト腫瘍異種移植片においてErbixと比較した2つの異なる用量の992 + 1024混合物の成長阻害効果。BALB/c nu/nuマウスに 10^6 個のA431NS細胞を接種した。腫瘍が100mm³の平均サイズに達した時 (8日目) に、マウスを9匹の群にランダムに割り当て、処置を開始した。表示の抗体を、0.5mg/回または1mg/回の量で、週に2回、合計9回、注射した。グラフ上の明灰色の領域は処置期間を示す。点線の開始点は、所与の群において、最初のマウスを過大な腫瘍サイズゆえに安楽死させた時点を示している。2mg/週の992 + 1024と2mg/週のErbixおよび1mg/週の992 + 1024と2mg/週のErbixの間の統計的有意差は60日目に算出した (この時点では、992 + 1024 2mg/週群を除く全ての群が終了していた)。60日目より前に除外された動物の腫瘍サイズは持ち越したので、このグラフは、所与の群内の全てのマウスの累積腫瘍体積を示す。平均値 ± SEMを示す。

20

【図39】992 + 1024抗体混合物、Erbixまたは対照抗体で処置したマウスの生存率のカプラン-マイヤー (Kaplan-Meyer) プロット (図38に示す実験と同じ実験)。結果を処置マウスの生存パーセントとして表す。992 + 1024およびErbixを比較したところ、高用量群 (2mg/週、 $P = 0.0008$) のマウスと低用量群 (1mg/週、 $P = 0.0004$) のマウスの生存率に、有意差が認められた。また、低用量の992 + 1024は、高用量のErbixと比較して、有意に良かった ($P = 0.0087$)。統計的差異はログランク (マンテル-コックス) 検定を使って算出した。

30

【図40】FACS分析による全長ヒトおよびカニクイザルEGFRトランスフェクトCHO細胞に対するIgG992、1024および1320の交差反応性の分析。結合した抗体をPE標識ヤギF(ab')₂抗ヒトIgG FCで検出した。EGFRを発現する均一細胞 (SCC/FCS特性) に対してゲーティングを行った。結合を1nM濃度における%最大抗体結合として表す。

【図41】992 (A) および1024 (B) の重鎖および軽鎖のマウス (chi) およびヒト化 (hu) 候補可変領域の可変領域アミノ酸配列のClustalw2アライメント。IMGTによって規定されたCDR領域に下線を引く; ギャップは (-) で表され、同一アミノ酸は (*) で表され、保存的突然変異は (:) と表され、半保存的突然変異は (.) と表されている。太字のアミノ酸は、完全ヒトフレームワーク変異体が低下した結合アフィニティーを示す場合に、最初に同定されたマウス残基への復帰突然変異が行われるであろうアミノ酸位置を示す。配列番号は次のとおりである: ヒト化992VH (配列番号104)、ヒト化992VL (配列番号105)、ヒト化1024VH (配列番号106)、ヒト化1024VL (配列番号107)、Chimeric 992VH (配列番号40のアミノ酸3 ~ 124)、キメラ992VL (配列番号72のアミノ酸3 ~ 109)、キメラ1024VH (配列番号41のアミノ酸3 ~ 120)、キメラ1024VL (配列番号73のアミノ酸3 ~ 114)。

40

【図42】図42A: 992L1024の二重可変ドメインコード遺伝子の概略図。992L1024 IGHV (

50

751bp) は、5'AscI制限部位から表示されており、その後ろに992 IGHV、ASTKGPリンカー、1024 IGHVが続き、3'XhoI制限部位で終わっている。また、992L1024 IGKV (1071bp) は、5'NheI制限部位から表示されており、その後ろに992 IGKV、TVAAPリンカー、1024 IGKV、IGKCが続き、3'NotI制限部位で終わっている。 図42B: 1024L992の二重可変ドメインコード遺伝子の概略図。1024L992 IGHV (751bp) は、5'AscI制限部位から表示されており、その後ろに1024 IGHV、ASTKGPリンカー、992 IGHVが続き、3'XhoI制限部位で終わっている。また、1024L992 IGKV (1071bp) は、5'NheI制限部位から表示されており、その後ろに1024 IGKV、TVAAPリンカー、992 IGKV、IGKCが続き、3'NotI制限部位で終わっている。

【図43】さまざまな濃度の表示の抗体の存在下での、0.5%FBS中のHN5wt細胞(上)およびErbix抵抗性HN5細胞(下)の代謝活性。説明: 抗体992および1024は本願に定義するとおりである。Sym004は抗体992および1024を含む抗体組成物である。

【図44】抗体992+1024を含む1mgの抗体組成物を合計9回注射することによる初回処置(左側の灰色のボックス)後の個々のA431NS腫瘍の腫瘍成長曲線。全ての腫瘍が治療にตอบสนองしたが、処置後80日を過ぎると、3つの腫瘍が再び成長し始めた。抗体992+1024を含む抗体組成物でこれらの腫瘍を再処置すると、腫瘍の退縮が誘導された(右側の灰色のボックス)。

【図45】A431NS異種移植片腫瘍を持つBALB/c nu/nuマウスをErbixで前処置した後、腫瘍が約500mm³の平均腫瘍サイズになった時に、ランダム化して、Erbix処置を続けるか、抗体992+1024を含む抗体組成物(図の凡例ではSym004)による処置に切り換えた。抗体992+1024を含む抗体組成物による処置に切り替えた群では、Erbix処置を継続した群と比較して、腫瘍量の有意な減少が見られた。

【図46】さまざまな濃度の表示の抗体の存在下での、0.5%FBS中のErbix抵抗性HN5クローンの代謝活性。

【図47】50mg/kgのSym004またはErbixで処置したErbix抵抗性HN5クローン#7腫瘍異種移植片の成長。平均の標準誤差をグラフに示す。

【発明を実施するための形態】

【0083】

[発明の詳細な説明]

抗体混合物

本発明は、抗ヒトEGFR抗体を使用する先行処置レジメンに供された対象におけるがんまたは少なくとも一つの他の抗EGFR抗体による処置に対して抵抗性もしくは部分抵抗性であるがんを処置する方法において使用するための抗体組成物であって、少なくとも2つの別個の抗ヒトEGFR抗体分子を含む抗体組成物に関する。本発明では、前記少なくとも2つの別個の抗ヒトEGFR抗体が、非オーバーラップエピトープに結合する。抗体の非オーバーラップ性は、好ましくは、EGFR発現細胞を使ったFACS分析において、異なる方法で標識された抗体を使用して決定されるか、またはフローセル表面に捕捉またはコンジュゲートされたEGFR抗原を用いる表面プラズモン共鳴を使って決定される。実施例に記載するELISAに基づく方法も使用することができる。2つ以上の非オーバーラップEGFRエピトープに結合する組成物は、1つまたは2つのエピトープをターゲットとするモノクローナル抗体の組成物と比較して、EGFRコンフォメーションの相違に対する脆弱性が低く、突然変異に対する脆弱性も低いだろうから、より広範囲にわたるEGFR依存性がんタイプに対して使用することができる。さらにまた、2つ以上の非オーバーラップEGFRエピトープに結合する抗体組成物は、1つのエピトープしかターゲットとしない組成物と比較して、優れた効力を持ちうる。特に、本抗体組成物は、インビボでのがん細胞の最終分化に関して優れた効力を持ちうる。モノクローナル抗EGFR抗体療法の場合、一定の比率の患者はその抗体処置には効果的に応答しないだろう。一部の患者では、それが、抗体の迅速な排除によるか、抗体がその患者におけるその抗体に対する免疫応答を生じさせるからであるだろう。また、一部の患者では、応答の欠如は、彼らの特定のEGFR依存性がんが、モノクローナル抗体がそのエピトープに結合できないようなコンフォメーションで、EGFRを発現するからであるだろう

10

20

30

40

50

う。これは、糖鎖付加の相違によるか、ドメイン欠失によるか、突然変異および/またはSNPによるものでありうる。

【0084】

また、一部のがんでは、がん細胞のリガンド産生によって引き起こされるオートクリンEGFR刺激が重要であり、他の例では、がん細胞によって発現されるEGFRがリガンド刺激を必要としない。後者のがんタイプの場合、リガンド結合を阻害する能力を持つ抗体は有効でないだろう。

【0085】

抗体がEGFR上の少なくとも2つの別個のエピトープに結合する能力を持つ抗体組成物は、より広く応用可能であるだろう。なぜなら、抗体によって認識されるエピトープと比較して、両方のエピトープがどちらも変化している可能性は限られるからである。さらにまた、全ての抗体が患者によって排除される可能性も、はるかに小さくなる。優位性は、非オーバーラップエピトープを持つ2つのドメインIII抗体を使用することにより、がん細胞の最終分化の誘導に関して、最も明確に示された。このような効率のよい、がん細胞の抗体誘導性最終分化は、過去に報告されたことがなく、効率のよい抗体ベースのがん療法を設計する上で有意義な進歩である。その後の結果から、2つの抗体の特定の組合せで、類似する結果またはさらに優れた結果が得られることが示された。

【0086】

臨床効力が改善され、より広範囲のEGFR依存性がんタイプに対して、より広い有用性が得られるように、組成物中の抗体の数を増やすことができる。したがって本組成物は、3つの非オーバーラップエピトープに結合する能力を持つ抗体を含みうる。本組成物は、4つの非オーバーラップエピトープに結合する能力を持つ抗体を含みうる。本組成物は、5つの非オーバーラップエピトープに結合する能力を持つ抗体を含みうる。本組成物は、6つの非オーバーラップエピトープに結合する能力を持つ抗体を含みうる。本願の実施例では、EGFRには少なくとも6つの別個の抗体が一度に結合できることを示す（実施例3）。これは、抗体を注意深く選択することによって、6つより多くの、例えば7つまたは8つの非オーバーラップエピトープに結合する能力を持つ抗体を含む組成物を設計することが可能であること、またはそうすることがさらに有利であることを排除するものではない。

【0087】

オーバーラップエピトープを持つ抗体を含めることには利点がありうる。なぜなら、これは、そのエピトープが結合される可能性を増加させるからである。その理論的根拠の一つは、一部の患者および/または一部のがん細胞におけるエピトープは、コンフォメーション変化または突然変異もしくはSNPにより、変化している可能性があるということである。これは1つの抗体の結合には影響を及ぼしうるが、オーバーラップエピトープに結合するもう一つの抗体の結合には影響を及ぼさない可能性がある。さらにまた、抗体の一つが、患者によって排除される危険もある。なぜなら、それが抗原とみなされるからである。異なるエピトープではあるがオーバーラップしているエピトープに結合する2つの抗体を含めることにより、それら2つの抗体の一方が排除されることの重大さおよびエピトープに突然変異が生じることの重大さが軽減される。

【0088】

2つの非オーバーラップEGFRエピトープに結合する能力を持つ抗体の特別な組合せで、優れた結果が得られた。これらの好ましい「二抗体」組成物を、本発明の抗体組成物を設計する方法に関する指針と共に、以下に詳述する。抗体992、1030、および1042を含む三抗体組成物と比較して、類似する効力またはさらに改善された効力が、2つの抗体、すなわち992および1024しか含まない組成物を使った場合に得られることが判明した。抗体1024および1042は同じクラスターに属し、したがって実質上、同じ結合特異性を持つので、三抗体組成物について観察された結果は、最終分化に対する効果を含めて、組成物中の2つの結合特異性（992および1024/1042）だけに起因すると考えることができる。

【0089】

本組成物の抗体は、非ヒト可変鎖とヒト定常鎖とを持つキメラ抗体であることができる

。非ヒト可変鎖は、マウス、ラット、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、非ヒト霊長類または他の適切な動物に由来することができる。完全ヒト抗体を得るために、ヒト抗体遺伝子を持つトランスジェニック動物で、抗体を生成させることができる。抗体は、非ヒトCDR配列がヒトフレームワーク配列中に移植されている、いわゆるヒト化抗体であってもよい。

【0090】

好ましくは、ヒト定常鎖はIgG1またはIgG2アイソタイプである。より好ましくは、製造が容易になるように、組成物中の全ての抗体が同じアイソタイプを持つ。しかし、アイソタイプが異なる抗体を組成物に含めることは、有益でありうる。

【0091】

好ましくは、本発明の抗体組成物は、ヒトEGFR、突然変異型ヒトEGFR、ヒトEGFRの欠失変異体からなる群より選択されるEGFRに結合する能力を持つ抗体を含む。好ましくは、抗体は、臨床実験に先だって、適当な毒性試験で調べることができるように、ヒトEGFRと非ヒト霊長類EGFRのどちらにも結合する能力を持つ。好ましくは、非ヒト霊長類はカニクイザル (cynomolgous monkey) (Macaca fascicularis) である。

【0092】

2つ以上の別個のエピトープに結合する抗体を使ってEGFR依存性がんを処置するという上述の概念を裏付けるために、本発明者らは、EGFRに対する一連のキメラマウス/ヒト抗体を同定し、製造し、特徴づけた。これらのキメラ抗体を、Erbix (商標) およびVectibix (商標) によって例示される最新技術のモノクローナル抗体と、個別に、および混合物として、比較した。

【0093】

表1に、個々のキメラ抗体と、それらに関連する特徴の概要を示す。「抗体番号」は、本願の全体を通して使用される参照番号である。「特異性」は、実施例3で立証するように、その抗体が結合するEGFRドメインである。「デルタEGFR」は、実施例1に記載するEGFR突然変異体 (EGFRvIII) に結合するその抗体の能力である。「カニクイザルEGFR」はカニクイザルEGFRに結合するその抗体の能力である (実施例10)。「EGF阻害」は、EGF結合を阻害するその抗体の能力である (実施例4)。「増殖」は、がん細胞株A341およびHN-5の増殖を阻害するその抗体の能力である (実施例6)。

[表1] 本発明の抗体

10

20

【表 1】

抗体番号	特異性	デルタEGFR	カニクイザルEGFR	EGF阻害	増殖
992	ドメインIII	無/弱	有	有/弱	有
1030	ドメインIII	有	有	有	有
1024	ドメインIII	有	有		有
1042	ドメインIII	弱	有	(有)	有
1277	ドメインIII	有	有	有	HN5
1254	ドメインIII	有	有	有	HN5
1208	ドメインIII	有	有	有	有 HN5 +/-992
1320	ドメインIII	弱	無	有	有
1257	ドメインI/II	無	有	無	有
1261	ドメインI	無	有	無	有
1229	非ドメインI/II	有	無	無	有 (A431)
1284	ドメインI	無	有	有	有
1344	ドメインI/II	無	有	未検	HN5 +992
1260	ドメインI/II	無	有	有	A431
1308	ドメインI	無	有	未検	HN5 +992
1347	ドメインI	無	有	未検	HN5 +992
1428	ドメインI及びII	無	有	有	HN5 +992

10

20

【0094】

増殖、結合、受容体分解/不活化、および運動性アッセイにおいて、また動物モデルにおいて、キメラ抗体を単独で、または組み合わせて試験することによって生成したデータから、いくつかの結論を引き出すことができる。

【0095】

2つのがん細胞株HN-5およびA431で得られた結果（実施例6）は、異なるがん細胞株でも再現された（乳がん細胞株MDA-MB-468；前立腺がん細胞株DU145）。これらの実験から明白なことは、本発明が提供する抗体の組合せが極めて広い範囲のがん細胞株に対して効力を示すということであり、これは、ある範囲のEGFRコンフォメーションに対する本抗体組成物の効力を裏付けている。

30

【0096】

生理的濃度のリガンド（EGF）を成長培地に加える増殖アッセイでは、EGFを加えない場合よりも、抗体混合物の優位性が高いことも示された（実施例17）。文献によれば（Haya shiおよびSakamoto 1998 J Pharmacobiodyn 11;146-51）、血清は約1～1.8ng/mlまたは0.2～0.3nMのEGFを含有し、一方、胃液（gastic juice）は0.3ng/ml（約0.05nM）を含有すると報告されている（Pessonenら 1987 Life Sci. 40; 2489-94）。インビボ環境にはEGFおよび他のEGFRリガンドが存在する可能性が高いので、EGFRリガンドの存在下で有効であるという抗体混合物の能力は、本発明の抗体混合物の重要な特徴である。

40

【0097】

本発明のキメラマウス/ヒト抗体は、単独で使用するよりも組み合わせて使用する方が、より良い結果を与える。これは、単独で試験した場合にはがん細胞株（A431-NS）に対して中くらいの抗増殖効果しか示さない抗体が、いずれかの組合せで使用すると著しく優れた結果を示す、いくつかの実験（例えば実施例6参照）において例証される。これらの結果は、本発明のキメラ抗体の数多くの組合せで確認された。特に優れた結果が、抗体992と1024を含む組成物で得られた。

【0098】

例えば、いくつかの抗体を、A431-NSおよびHN-5を使った抗増殖アッセイで、抗体992、1208、1254、および1277のいずれかと一緒に試験した。

50

【 0 0 9 9 】

いくつかの抗体がさらなる抗体の結合を実際に刺激することにより、1つまたは数個の抗体による受容体飽和後は、ある特定の抗体が受容体に、より多量に結合するようになることが、受容体結合研究によって示された。ドメインIIIに対する抗体992の結合にとって、非オーバーラップエピトープに結合する1つ以上の抗体による事前の受容体飽和によって得られるこの相乗効果は、明らかに有益である。この協同的効果のもう一つの例は、未知のエピトープに対する抗体1396を、非オーバーラップエピトープに結合する抗体で飽和させたEGFRに対して試験した場合に見られる。

【 0 1 0 0 】

受容体結合研究では、EGFRの細胞外ドメインに少なくとも6つの抗体を同時に結合させることが可能であることも示された。これら6つの抗体は、3つのドメインIII抗体、1つのドメインI抗体、1つのドメインI/II抗体、および未知のエピトープに結合する1つの抗体を表す。興味深いことに、それら3つのドメインIII抗体の結合は、その後起こるさらなる抗体の結合を容易にするようである。これは、別個のエピトープに結合するいくつかの抗体を含む抗体組成物を提供するという概念を、明らかに裏付けている。

【 0 1 0 1 】

EGFRに対する抗体組成物の組成を設計する際は、非オーバーラップエピトープを持つ抗体を使用することが好ましい。というのも、それらは、より高い相乗効果を与えるからである。

【 0 1 0 2 】

EGFRのドメインIIIは、この受容体へのリガンド結合にとって重要である。さらにまた、ドメインIIIへの抗体結合は、受容体シグナリングをもたらさない繫留型単量体コンフォメーションのEGFRを安定化しうる。これらの理由から、抗体組成物は、ドメインIIIに対する特異性を持つ抗体を少なくとも2つは含有することが好ましい。好ましいドメインIII抗体には、抗体992、1024、1030、1208、1254、1277、および1320が含まれる。抗体組成物は、好ましくは、2つより多くのドメインIII抗体、例えば少なくとも3つのドメインIII抗体、例えば少なくとも4つのドメインIII抗体、例えば少なくとも5つのドメインIII抗体、例えば少なくとも6つのドメインIII抗体を含みうる。

【 0 1 0 3 】

もう一つの好ましい実施形態では、抗体組成物が、少なくとも一つのドメインI抗体を含む。好ましくは、前記少なくとも一つのドメインI抗体は、抗体1284、1308、1344、および1347からなる群より選択される。より好ましくは、前記少なくとも一つのドメインI抗体は、抗体1284および1347からなる群より選択される。

【 0 1 0 4 】

もう一つの好ましい実施形態では、抗体組成物が、少なくとも一つのドメインI/II抗体を含む。好ましくは、前記少なくとも一つのドメインI/II抗体は、抗体1257、1260、1261、1428、および1434からなる群より選択される。より好ましくは、少なくとも一つのドメインI/II抗体は、抗体1261および1260からなる群より選択される。

【 0 1 0 5 】

3つの抗体を含む好ましい混合物には次に挙げるものがある：抗体992 + 1320 + 1024；992 + 1024 + 1030；992 + 1255 + 1024；992 + 1024 + 1214；992 + 1024 + 1284；992 + 1024 + 1211；992 + 1024 + 1030。

【 0 1 0 6 】

4つの抗体を含む好ましい混合物には次に挙げるものがある：抗体992 + 1320 + 1024 + 1030；992 + 1024 + 1030 + 1284。

【 0 1 0 7 】

5つの抗体を含む好ましい混合物には次に挙げるものがある：992 + 1030 + 1024 + 1260 + 1347；992 + 1030 + 1024 + 1261 + 1347；992 + 1030 + 1024 + 1261 + 1284。

【 0 1 0 8 】

8つの抗体を含む好ましい混合物の一つとして、992 + 1030 + 1024 + 1277 + 1254 + 1320 +

10

20

30

40

50

1260 + 1261 + 1284 + 1347が挙げられる。

【0109】

さらにまた、非ヒト霊長類における毒性試験を行うことができるように、組成物中の全ての抗体が、ヒトEGFRに結合するだけでなく、少なくとも一つのさらなる霊長類EGFR、例えばチンパンジー、マカカ・ムラタ (Macaca mulatta)、アカゲザル (Rhesus monkey) および他のサル、または カニクイザルに由来するEGFRにも結合することが好ましい。カニクイザルは比較的小さな動物であり、毒性試験にはよく適している。したがって、さらなる霊長類EGFRは、好ましくはカニクイザルEGFRである。好ましくは、抗体は、ヒトおよび非ヒト霊長類EGFRにほぼ同じアフィニティーで結合する。

【0110】

本発明は、一つの組成物中に2、3、4、5、6、7、および8個の抗体を組み合わせた場合に、1つ以上の機能アッセイで優れた結果を示した。これらのデータは、組成物中の抗体の数の選択に関する指針を与えるものではあるが、決してそれらを限定的に解釈してはならない。実験データでは6つの抗体の同時結合しか示されていないが、本組成物は8個を上回る抗体を含みうる。組成物中に6つを上回る抗体を含める理由は、例えば抗体メンバーの排除速度の相違など、他にも存在しうる。

【0111】

本組成物の抗体のさらなる好ましい特徴はタンパク質の均質性であり、したがって抗体は容易に精製することができる。個々の抗体メンバーについては、特徴づけが容易になるように、1つの明確なピークを持つイオン交換クロマトグラフィープロファイルが好ましい。最終抗体組成物の特徴づけが容易になるように、明瞭なイオン交換クロマトグラフィープロファイルも好ましい。抗体を組み合わせる場合は、それらの抗体の全てを含む組成物を1回のランで特徴づけることができるように、イオン交換クロマトグラフィーを使ってそれらの抗体を識別できることも好ましい。

【0112】

抗体は、ヒト、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ラマ、ヒツジなど、任意の起源を持ちうる。抗体は実施例で説明するようにキメラ抗体であってもよく、または当技術分野で記載されている周知の方法を使ったそのヒト化型、超ヒト化 (super humanised) 型もしくは再構成型であってもよい。

【0113】

好ましい抗体組成物

本願の実施例で示すように、抗体992および1024に基づく抗EGFR組成物は、ユニークで明確な性質を持つ。抗体992の結合は、1024を含む他の抗体の結合によって強化される。市販の抗体とは対照的に、992と1024はどちらも、細胞上に提示されたコンフォメーションエピトープに優先的に結合する (実施例14および15)。992と1024のエピトープはどちらも、ErbixおよびVectibixのエピトープとオーバーラップするが、それらとは別個のエピトープである。個々の抗体が非オーバーラップエピトープに結合する他のいくつかの二抗体 (two-antibody) 組成物とは対照的に、抗体992および1024の結合特異性に基づく組成物は、受容体インターナリゼーションを迅速かつ効果的にトリガーする。動物モデルでは、抗体992および1024に基づく抗体組成物による処置後に、インボルクリン発現の増加およびケラチン真珠の出現を伴う最終分化に関わる新規な作用機序が観察される。このユニークな作用機序は、インビトロおよびインビボでより効果的かつ持続的な成長阻害をもたらす。このことは、処置の停止後に腫瘍が減少し続けるインビボ実施例に、最も明瞭に認められる。Erbixを投与した対照群では、処置の停止後すぐに、腫瘍が成長し始める。これは作用機序が異なることを明瞭に示している。

【0114】

この新規な作用機序は、1つの抗体組成物中の抗体992および1024が示す2つの結合特異性の組合せを使用することによって達成されと考えられる。この作用機序は、抗体992および1024とは競合しない第3の抗体を使用した場合 (例えば抗体992、1024、および1030の3つの組合せなど) にも見られる。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

これらの知見は、少なくとも2つの別個の抗ヒトEGFR抗体分子を含む抗体組成物であって、第1の別個の抗EGFR抗体分子が、抗体992、抗体992のVL配列（配列番号72のアミノ酸配列3～109）およびVH配列（配列番号40のアミノ酸3～124）を含む抗体、抗体992のCDR3（配列番号116および111）を持つ抗体、抗体992と同じエピトープに結合する抗体、およびヒトEGFRへの抗体992の結合を阻害する能力を持つ抗体からなる群より選択され；かつ、第2の別個の抗EGFR抗体分子が、抗体1024、抗体1024のVL配列（配列番号73のアミノ酸3～114）およびVH配列（配列番号41のアミノ酸3～120）を含む抗体、抗体1024のCDR3（配列番号120および114）を持つ抗体、抗体1024と同じエピトープに結合する抗体、およびヒトEGFRへの抗体1024の結合を阻害する能力を持つ抗体からなる群より選択される抗体組成物の設計へとつながった。

10

【 0 1 1 6 】

好ましくは、前記第1の別個の抗EGFR抗体分子は、抗体992、抗体992のVLおよびVH配列を含む抗体、抗体992のCDR3を持つ抗体、および抗体992と同じエピトープに結合する抗体からなる群より選択され；かつ、前記第2の別個の抗EGFR抗体分子は、抗体1024、抗体1024のVLおよびVH配列を含む抗体、抗体1024のCDR3を持つ抗体、および抗体1024と同じエピトープに結合する抗体からなる群より選択される。

【 0 1 1 7 】

本発明では、同じ結合特異性を持つ抗体を与えるような、抗体992および1024のCDR3配列における突然変異が考えられる。したがって、ある実施形態では、抗体992と同じ結合特異性を持つ抗体が、次の式を持つCDRH3：CTX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅W [式中、X₁～X₁₅は、次に挙げるアミノ酸の群から個別に選択される：

20

X₁ = RまたはK；

X₂ = N、D、EまたはQ；

X₃ = G、A、V、またはS；

X₄ = D、E、NまたはQ；

X₅ = Y、F、WまたはH；

X₆ = Y、F、WまたはH；

X₇ = V、I、LまたはA；

X₈ = S、T、GまたはA；

30

X₉ = S、T、GまたはA；

X₁₀ = G、A、V、またはS；

X₁₁ = D、E、NまたはQ；

X₁₂ = A、G、V、またはS；

X₁₃ = M、L、IまたはV

X₁₄ = DまたはE；かつ

X₁₅ = Y、またはF]

と、次の式によって表されるCDRL3：CX₁X₂X₃X₄X₅X₆PPTF [式中、X₁～X₆は、次に挙げるアミノ酸の群から個別に選択される：

40

X₁ = QまたはH；

X₂ = H、EまたはQ；

X₃ = Y、F、WまたはH；

X₄ = N、QまたはH；

X₅ = T、S、GまたはA；かつ

X₆ = V、I、LまたはA]

とを含む。

【 0 1 1 8 】

ある実施形態では、抗体1024と同じ結合特性を持つ抗体が、次の式を持つCDRH3：CVX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁W [式中、X₁～X₁₁は、次に挙げるアミノ酸の群から個別に選択される：

50

X_1 = RまたはK ;
 X_2 = Y、F、WまたはH ;
 X_3 = Y、F、WまたはH ;
 X_4 = G、A、V、またはS ;
 X_5 = Y、F、WまたはH ;
 X_6 = D、E、NまたはQ ;
 X_7 = EまたはD ;
 X_8 = A、G、V、またはS ;
 X_9 = M、L、IまたはV ;
 X_{10} = D、E、NまたはQ ; かつ
 X_{11} = Y、またはF]

10

と、次の式によって表されるCDRL3 : $CX_1X_2X_3X_4X_5X_6PX_7TF$ [式中、 $X_1 \sim X_7$ は、次に挙げるアミノ酸の群から個別に選択される :

X_1 = A、G、またはV ;
 X_2 = QまたはH ;
 X_3 = N、QまたはH ;
 X_4 = L、I、MまたはV ;
 X_5 = E、D、NまたはQ ;
 X_6 = L、I、MまたはV ; かつ
 X_7 = Y、F、WまたはH]

20

とを含む。

【 0 1 1 9 】

突然変異型CDR3を持つ抗体は標準的な技法を使って作成し、発現させ、本明細書に記載する方法を使って結合について調べることができる。

【 0 1 2 0 】

本発明のこの態様による抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化、再構成または超ヒト化抗体であることができる。これは当技術分野において知られている方法を使って行うことができる。例えば、抗体992および1024は、実施例18に記載する方法を使ってヒト化することができる。「超ヒト化」の方法はUS 6,881,557に記載されている。

【 0 1 2 1 】

30

より好ましくは、前記第1の別個の抗EGFR抗体分子が、抗体992、抗体992のVLおよびVH配列を含む抗体、ならびに抗体992のCDR3を持つ抗体からなる群より選択され ; かつ、前記第2の別個の抗EGFR抗体分子が、抗体1024、抗体1024のVLおよびVH配列を含む抗体、ならびに抗体1024のCDR3を持つ抗体からなる群より選択される。

【 0 1 2 2 】

より好ましくは、前記第1の別個の抗EGFR抗体分子が、抗体992、ならびに抗体992のVLおよびVH配列を含む抗体からなる群より選択され ; かつ、前記第2の別個の抗EGFR抗体分子が、抗体1024、ならびに抗体1024のVLおよびVH配列を含む抗体からなる群より選択される。

【 0 1 2 3 】

40

最も好ましくは、本組成物は、抗体992および1024を含む。

【 0 1 2 4 】

上述のように、第1および第2の抗EGFR抗体は、好ましくは、ヒトEGFRへの互いの結合を阻害しない。さらに好ましくは、少なくとも一方の抗体は、ヒトEGFRに関して他方の抗体の最大結合能を増加させる能力を持つ。抗体992および1024ではこの効果が観察される (実施例16)。

【 0 1 2 5 】

2つの抗体の間の比は正確に1 : 1の比である必要はない。したがって、組成物中の第2の抗体に対する第1の抗体の比率は、5 ~ 95%、例えば10 ~ 90%、好ましくは20 ~ 80%、より好ましくは30 ~ 70%、より好ましくは40 ~ 60%、例えば45 ~ 55、例えば約50%であること

50

ができる。

【 0 1 2 6 】

好ましくは、第1および第2の抗体はアイソタイプがIgG1またはIgG2である。

【 0 1 2 7 】

本発明者らが同定した抗体992と同じエピトープに結合する抗体の例は、クローン1209、1204、992、996、1033、および1220を含む抗体クラスターの抗体である。

【 0 1 2 8 】

本発明者らが同定した抗体1024と同じエピトープに結合する抗体の例は、クローン1031、1036、1042、984、1024、1210、1217、1221、および1218を含む抗体クラスターの抗体である。

10

【 0 1 2 9 】

CDR3は抗体の結合特異性を決定する。好ましい実施形態では、抗体992のCDR3を含む抗体が、抗体992のVHおよびVLのCDR1およびCDR2をさらに含む。同様に、抗体1024のCDR3を含む抗体は、好ましくは、抗体1024のVHおよびVLのCDR1およびCDR2をさらに含む。抗体のCDR配列は実施例17の表12に見いだすことができる。

【 0 1 3 0 】

別の態様では、抗体992と競合する抗体が、抗体1208、1254、および1277からなる群より選択される。また、抗体1024と競合する抗体は、抗体1042および1320からなる群より選択することができる。

【 0 1 3 1 】

20

ある実施形態では、組成物が、前記第1および第2の抗体の他には、さらなる抗体を含有せず、より好ましくはさらなる抗EGFR抗体を含有しない。

【 0 1 3 2 】

別の実施形態では、組成物がさらに第3の別個の抗EGFR抗体を含み、前記第3の別個の抗EGFR抗体分子は、抗体1030、抗体1030のVL配列（配列番号74のアミノ酸3～113）およびVH配列（配列番号42のアミノ酸3～120）を含む抗体、抗体1030のCDR3（配列番号112および119）を持つ抗体、抗体1030と同じエピトープに結合する抗体、およびヒトEGFRへの抗体1030の結合を阻害する能力を持つ抗体からなる群より選択される。前記第3の抗体は、好ましくは、ヒトEGFRへの前記第1および/または第2の抗体の結合の強化をもたらす。ある実施形態では、組成物が、前記第1、第2、および第3の抗体の他にはさらなる抗体を含有せず、より好ましくは、さらなる抗EGFR抗体を含有しない。

30

【 0 1 3 3 】

抗体1030と同じエピトープに結合する抗体は、クローン1195、1030、1034、1194、980、981、1246、および1223からなる抗体クラスターより選択することができる。

【 0 1 3 4 】

抗体1030のCDR3を含む抗体は抗体1030のVHおよびVLのCDR1およびCDR2をさらに含むことができる。

【 0 1 3 5 】

抗体は、投与のために1つの容器中に製剤化することができる。しかし、それらは、個別に製造し、精製し、特徴づけ、2つまたは3つの別々の容器に入れて、各容器に1つの抗体が入っているキット・オブ・パーツ（kit of parts）として提供することもできる。したがって、それらは同時に、連続的に、または個別に投与することができる。

40

【 0 1 3 6 】

さらなる態様では、抗体992および1024の2つの結合特異性が、1つの二重特異性結合分子（bi-specific binding molecule）中で組み合わされる。好ましくは、二重特異性結合分子は、抗体992および1024のCDRを含み、より好ましくは抗体992および1024のVHおよびVL配列を含む。二重特異性結合分子は、実施例19に記載するような二重可変ドメイン抗体であることができる。二重特異性結合分子は、文献に記載されているような二重特異性Fabフラグメント、二重特異性scFV、またはダイアボディの形態で設計することもできる。

【 0 1 3 7 】

50

抗体992および1024の結合特異性に基づく抗体組成物は、好ましくは、受容体インターナリゼーション、インピボでのA431NS腫瘍の退縮、インピボでのA431NS細胞における最終分化の誘導、およびインピボでの腫瘍インボルクリン発現のアップレギュレーションの1つまたはそれ以上をもたらす。

【0138】

本願は、抗体992および1024の組合せと同じまたは類似する効果を持つ抗体の例をいくつか提供する。これらの例には、同じ免疫化によって得られ、同じクラスターに属する抗体、および上記2つの抗体の一方と個別に競合する抗体が含まれる。同じまたは類似する効果を持つ抗体組成物は、抗体992および1024のVLおよびVH配列に基づいて設計することができ、これらの抗体のCDRに基づいて、特に上記2つの抗体のCDR3に基づいて設計することもできる。

10

【0139】

同じまたは類似する効果を持つさらなる抗体組成物は、基本的に実施例で説明するように免疫化とスクリーニングを行うことによって作製することができる。抗体992および1024と同じ結合特異性を持つ抗体は、本明細書に記載する2つの独立した競合アッセイで同定することができる。最後に、一方の抗体が他方の抗体の結合を強化する抗体組成物は、基本的に実施例16で述べるように結合実験を行うことによって同定することができる。抗体組成物は、受容体インターナリゼーションに及ぼす効果、インピトロおよびインピボ効力、結合アフィニティーなどに関して、実施例で述べるようにさらにスクリーニングすることができる。

20

【0140】

本発明の抗体組成物の使用

EGFR発現（例えば過剰発現）に関係する疾患のインピボでの処置および予防に使用するために、本発明の抗体は、患者（例えばヒト対象）に、治療有効投薬量（例えばEGFRを発現する腫瘍細胞の成長阻害、食作用、運動性の低減、最終分化、および/または殺滅をもたらす投薬量）で、任意の適切な投与経路を使って、例えば注射、および抗体ベースの臨床製品に関して当技術分野で知られている他の投与経路を使って、投与される。

【0141】

本発明の抗体を使って処置、改善、および/または予防することができる典型的なEGFR関連疾患には、自己免疫疾患およびがんが含まれるが、これらに限るわけではない。例えば、処置、改善、および/または予防することができるがんには、膀胱、乳房、子宮/子宮頸部、結腸、腎臓、卵巣、前立腺、腎細胞、脾臓、結腸、直腸、胃、扁平上皮細胞、肺（非小細胞）、食道、頭頸部、皮膚のがんが含まれる。処置することができる自己免疫疾患には、例えば乾癬が含まれる。

30

【0142】

さらにもう一つの実施形態では、本発明は、多形性神経膠芽腫を含む膠芽腫；小児星状細胞種を含む星状細胞腫；神経膠腫；神経芽細胞腫；消化管の神経内分泌腫瘍；気管支肺胞（bronchoalveolar）癌；濾胞樹状細胞肉腫；唾液腺癌；エナメル上皮腫；悪性末梢神経鞘（nerve sheath）腫瘍；内分泌性腺腫瘍；または精上皮腫、胎児性癌、卵黄嚢腫瘍、奇形腫および絨毛癌を含む精巣胚細胞性腫瘍の処置、改善、および/または予防のための方法に関する。

40

【0143】

可変重鎖および可変軽鎖コードペアの単離および選択

抗EGFR組換え抗体組成物を作製する方法には、可変重鎖（ V_H ）および可変軽鎖（ V_L ）をコードする配列を適当な供給源から単離し、それによって V_H および V_L コードペアのレパートリーを作製することが含まれる。一般に、 V_H および V_L コード配列を得るための適切な供給源は、ヒトEGFRポリペプチドもしくはペプチド、またはヒトEGFRを発現する細胞に由来するEGFRタンパク質、またはヒトEGFRを発現する細胞もしくはそのような細胞の画分で免疫化/ワクチン接種された非ヒト動物から得られる血液、脾臓または骨髓試料などのリンパ球含有細胞画分である。好ましくは、リンパ球含有画分は、非ヒト哺乳動物またはヒト

50

免疫グロブリン遺伝子を持つトランスジェニック動物から集められる。集められたリンパ球含有細胞画分をさらに濃縮して、特定のリンパ球集団、例えばBリンパ球系譜の細胞を得ることができる。好ましくは濃縮は、例えばB細胞、形質芽球および/または形質細胞の系譜特異的な細胞表面マーカータンパク質を利用して、磁気ビーズ細胞選別 (MACS) および/または蛍光活性化細胞選別 (FACS) を使って行われる。好ましくは、リンパ球含有細胞画分は、B細胞、形質芽球および/または形質細胞に関して濃縮または選別される。さらに好ましくは、CD43およびCD138の発現量が多い細胞を脾臓または血液から単離する。これらの細胞は、循環形質細胞、初期形質細胞、または形質芽球と呼ばれる場合もある。簡便のために、本発明ではこれらを形質細胞としか呼ばないが、他の用語も可換的に使用することができる。

10

【0144】

V_H および V_L コード配列の単離は、 V_H および V_L コード配列をベクター中でランダムに組み合わせる V_H および V_L コード配列ペアのコンビナトリアルライブラリーを作成するという古典的方法で行うことができる。しかし本発明では、EGFR免疫化時に体液性免疫応答で産生される抗体の多様性、アフィニティーおよび特異性を反映させることが好ましい。これには、ドナー中に元々存在する V_H および V_L ペアリングを維持することにより、各ペアがその配列の単離源となったドナーが産生する抗体中に元々存在している V_H および V_L ペアに対応する可変重鎖 (V_H) および可変軽鎖 (V_L) をコードしているような配列ペアのレパートリーを作成することが必要である。これは V_H および V_L コード配列のコグネイトペアとも呼ばれ、抗体はコグネイト抗体と呼ばれる。好ましくは、本発明の V_H および V_L コードペアは、

20

【0145】

V_H および V_L コード配列のコグネイトペアの作製にはいくつかの異なるアプローチがあるが、あるアプローチでは、リンパ球含有細胞画分から選別された単一細胞から V_H および V_L コード配列を増幅し、単離する。ドナーにおける V_H および V_L 配列ペアの多様性に似た V_H および V_L コード配列ペアのレパートリーを得るには、 V_H および V_L ペアのスクランプリング (ランダムな組合せ) を可能な限り伴わないハイスループットな方法、例えばWO 2005/042774 (この文献は引用により本明細書に組み込まれる) に記載されているような方法が好ましい。

30

【0146】

V_H および V_L コード配列は、別々に増幅して、第2段階でペアリングするか、増幅中にペアリングすることができる (Coronellaら 2000 Nucleic Acids Res. 28:E85 ; Babcookら 1996 PNAS 93:7843-7848およびWO 2005/042774)。第2のアプローチでは、 V_H および V_L コード配列の細胞内 (in-cell) 増幅およびペアリングを行う (Embletonら 1992 Nucleic Acids Res. 20:3831-3837 ; Chapalら 1997 BioTechniques 23:518-524)。第3のアプローチは、溶血プラークアッセイを V_H および V_L cDNAのクローニングと組み合わせた選択リンパ球抗体法 (selected lymphocyte antibody method) (SLAM) である (Babcookら 1996 PNAS 93:7843-7848)。マウスで使用するもう一つの方法は、標準的なハイブリドーマ (hybridoma) 技法と、それに続くスクリーニングおよびリード候補の選択を行った後、コードされている抗体をクローニングすることである。

40

【0147】

本発明の好ましい実施形態では、 V_H および V_L コードペアのレパートリーであって、メンバーペアが、EGFR免疫化によって生じる体液性免疫応答を担う遺伝子ペアを反映しているものが、以下の段階を含む方法に従って作製される：i) ヒトEGFRで免疫化した動物ドナーから得られたリンパ球含有細胞画分を用意する段階；ii) 場合により、前記細胞画分からB細胞または形質細胞を濃縮する段階；iii) 前記細胞画分の細胞を複数の容器に個別に分配することを含む、単離単一細胞の集団を得る段階；iv) 前記単離単一細胞から得たテンプレートを使って、マルチプレックスオーバーラップ伸長RT-PCR手法で、 V_H および V_L コードペアを増幅し、それらの連結を達成する段階、およびv) 場合により、連結された V_H

50

およびV_LコードペアのネステッドPCRを行う段階。好ましくは、単離されたコグネイトV_HおよびV_Lコードペアを、後述のスクリーニング手法に供する。

【0148】

V_HおよびV_L配列ペアが作製されたら、EGFR関連抗原に対する結合反応性を持つV_HおよびV_Lペアをコードする配列を同定するためのスクリーニング手法を実行する。好ましくは、EGFR関連抗原は、EGFRの細胞外部分、例えばドメインIII、II、I、および/またはIV、それらドメインのフラグメント、または完全な細胞外ドメインを含む。他の抗原には、突然変異体、例えばEGFRの欠失突然変異体、またはSNP、またはそのフラグメントが含まれる。V_HおよびV_L配列ペアがコンビナトリアルである場合は、ファージディスプレイ手法を応用することにより、EGFRに結合する抗体フラグメントをコードするV_HおよびV_Lペアを、スクリーニングに先だって濃縮することができる。

10

【0149】

EGFRで免疫化した時の体液性免疫応答で産生される抗体の多様性、アフィニティーおよび特異性を反映するために、本発明は、可能な限り最も広い多様性が得られるように、コグネイトペアのスクリーニング手法を開発した。スクリーニングのために、適切な宿主細胞中にトランスフェクトされた細菌または哺乳動物細胞スクリーニングベクターを使って、コグネイトV_HおよびV_Lコードペアのレパートリーを、抗体フラグメント（例えばscFvまたはFab）として、または全長抗体として、個別に発現させる。Fab/抗体のレパートリーは、例えば限定するわけではないが、EGFRに対する反応性、EGFRを発現するがん細胞株に対する抗増殖活性、およびEGFRへのリガンド（例えばEGF）結合を阻害する能力、アポトーシスの誘導、EGFRインターナリゼーションに関して、スクリーニングすることができる。

20

【0150】

並行して、Fab/抗体のレパートリーは、例えばヒトEGFRペプチドおよび場合によってはカニクイザルまたはチンパンジーまたはアカゲザルEGFRペプチドなどといった、選択された抗原に対して、スクリーニングすることができる。抗原ペプチドは、例えばヒトEGFR細胞外ドメイン、ヒト突然変異型EGFR細胞外ドメイン、およびカニクイザルEGFR細胞外ドメイン、またはそれらのフラグメントから選択することができる。ペプチドは、スクリーニング中のビーズまたはプレート上への固定化を容易にするために、ビオチン化することができる。これに代わる固定化手段も同様に使用することができる。抗原は、EGFRバイオロジーの知識、ならびにこれらの抗原に結合する能力を持つ抗体が潜在的にもたらしうると予想される中和および/または保護効果に基づいて選択される。このスクリーニング手法は、コンビナトリアルファージディスプレイライブラリーにも同様に適用することができる。

30

【0151】

スクリーニングに使用される組換えEGFRタンパク質は、細菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞、または他の適切な発現系で発現させることができる。正しいプロセッシング（糖鎖付加を含む）のためには、タンパク質を哺乳動物細胞で発現させる。EGFR-ECDタンパク質は、可溶性タンパク質（膜貫通領域および細胞内領域を持たないもの）として発現させるか、第3のタンパク質に融合して、可溶性を増加させることができる。EGFRタンパク質を融合タグ付きで発現させる場合、その融合パートナーは、スクリーニングに先だって切り離すことができる。上述の一次スクリーニングに加えて、選択した配列のなかに偽陽性をコードするものがないことを保証するために、二次スクリーニングを行うこともできる。

40

【0152】

一般に、本発明で行われるスクリーニングには、免疫学的アッセイが適している。そのようなアッセイは当技術分野では周知であり、例えばELISPOT、ELISA、FLISA、メンブレンアッセイ（例えばウェスタンブロット）、フィルター上のアレイ（arrays on filters）、FACSなどを構成する。アッセイは、V_HおよびV_Lペアをコードする配列から産生されるポリペプチドを利用して、事前の濃縮段階なしで行うことができる。V_HおよびV_Lコードペアのレパートリーがコグネイトペアである場合は、スクリーニング前の例えばファージデ

50

イスプレイなどによる濃縮は必要ない。しかし、コンビナトリアルライブラリーのスクリーニングでは、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、細菌表面ディスプレイ、酵母ディスプレイ、真核生物ウイルスディスプレイ、RNAディスプレイまたはコバレント (covalent) ディスプレイなどの濃縮方法と組み合わせて、またはそのような濃縮方法後に、イムノアッセイを行うことが好ましい (FitzGerald, K., 2000. Drug Discov. Today 5, 253-258に総説がある)。

【0153】

スクリーニングで選択された V_H および V_L ペアコード配列は、一般に、配列決定に供され、可変領域の多様性に関して分析される。特にCDR領域における多様性は興味深いが、 V_H および V_L ファミリー表現 (family representation) も興味深い。これらの分析に基づいて、1匹または複数匹の動物ドナーから単離されたEGFR結合抗体の総合的多様性を表現する V_H および V_L ペアをコードする配列が選択される。好ましくは、全てのCDR領域 (CDRH1、CDRH2、CDRH3ならびにCDRL1、CDRL2およびCDRL3配列) に相違を持つ配列が選択される。一つ以上の同一なまたは極めて類似するCDR領域を持つ配列であって、異なる V_H または V_L ファミリーに属するものが存在する場合は、それらも選択される。好ましくは、可変重鎖の少なくともCDR3領域 (CDRH3) が、選択される配列ペア間で異なる。潜在的に、 V_H および V_L 配列ペアの選択は、厳に (solemnly)、CDRH3領域の可変性に基づいて行うことができる。配列のプライミングおよび増幅中には、可変領域のフレームワーク領域に、特に第1フレームワーク領域に、突然変異が起こり得る。好ましくは、第1フレームワーク領域に起こるエラーは、その配列が生殖系列由来の配列と完全にまたは少なくとも98%は一致することを保証するために、例えば V_H および V_L 配列が完全にマウス配列になるように修正される。

【0154】

V_H および V_L ペアをコードする、選択された配列のコレクションの全体的多様性が、EGFR免疫化に対する体液性応答において遺伝子レベルで見られる多様性を、高度に表現していることが保証される場合は、選択された V_H および V_L コードペアのコレクションから発現される抗体の全体的特異性も、EGFR免疫化動物において産生される抗体の特異性に関して、それを表現していると予想される。選択された V_H および V_L コードペアのコレクションから発現される抗体の特異性が、ドナーによって産生された抗体の特異性を表現しているかどうかの指標は、選択された抗原に対するドナー血の抗体価を、選択された V_H および V_L コードペアのコレクションから発現された抗体の特異性と比較することによって得ることができる。また、選択された V_H および V_L コードペアのコレクションから発現された抗体の特異性を、さらに分析することもできる。特異性の度合は、対応する結合反応性を検出することができる異なる抗原の数と相関する。本発明のさらにもう一つの実施形態では、選択された V_H および V_L コードペアのコレクションから発現された個々の抗体の特異性が、エピトープマッピングによって分析される。

【0155】

エピトープマッピングは、いくつかの方法論で行うことができ、それらは必ずしも互いに排他的なわけではない。抗体のエピトープ特異性をマッピングする方法の一つは、ターゲット抗原の一次構造に由来するさまざまな長さのペプチドへの結合を評価することである。そのようなペプチドは線状でもコンフォメーション的でもよく、ELISA、FLISAおよび表面プラズモン共鳴 (SPR、Biacore、FACS) を含むいくつかのアッセイフォーマットで使うことができる。さらにまた、ペプチドは、利用可能な配列および構造データを使って、例えばターゲット抗原の細胞外領域または保存された領域を表現するように合理的に選択するか、抗原の選択された部分または全部を表現する一群のオーバーラップペプチドとして設計することができる (Meloan RH, Puijk WC, Schaaper WMM 「Epitope mapping by PEPSCAN」 Iwan Lefkovits編 「Immunology Methods Manual」 1997, Academic Press, p. 982-988)。ある抗体クローンと、1つまたはそれ以上のそのようなペプチドとの特異的反応性は、一般に、エピトープ特異性の指標になるだろう。しかしペプチドは、多くの場合、天然のまたは特異的なコンフォメーションを欠くことや、抗体とタンパク質抗原の間の

相互作用の埋没表面積 (buried surface area) が抗体とペプチドの間の場合と比較して一般に大きいことという両方の理由から、タンパク質抗原に対して産生された抗体によって認識されるエピトープの良い模倣物ではない。特異性の定義をタンパク質抗原上で直接行うことを可能にするエピトープマッピングの第2の方法は、既存の明確に定義された抗体を使った選択的エピトープマスキングによる方法である。ブロック後に抗原への第2のプロブ抗体 (probing antibody) の結合が減少すれば、それは一般に、共有エピトープまたはオーバーラップエピトープを示す。選択的マスキングによるエピトープマッピングは、例えば限定するわけではないがELISAやBiacoreなど、当技術分野ではよく知られているいくつかのイムノアッセイによって行うことができる (例えばDitzelら 1997. J. Mol. Biol. 267:684-695 ; Aldaz-Carrollら 2005 J. Virol. 79:6260-6271)。抗EGFR抗体のエピトープ特異性を決定するためのさらにもう一つの潜在的方法は、抗体の存在下でのエスケープ突然変異体 (escape mutant) の選択である。これは、例えばアラニンスキャンを使って行うことができる。そのようなエスケープ突然変異体から得られる目的の遺伝子を配列決定することにより、一般に、その抗体による認識にとって重要であって、それゆえにエピトープ (の一部) を構成しているアミノ酸が明らかになるだろう。

【0156】

選択された V_H および V_L コードペアからの抗EGFR抗体組成物の生産

本発明の抗体組成物は、1基または数基のバイオリアクターまたはその等価物において、ポリクローナル発現細胞株から生産することができる。このアプローチによれば、抗EGFR抗体を単一の調製物としてリアクターから精製することができ、抗EGFR抗体組成物を構成する個々のメンバーを途中で分離する必要はない。抗体組成物を2基以上のバイオリアクター中で生産する場合は、各バイオリアクターの個々の精製上清から得られる抗体をプールすることによって、精製抗EGFR抗体組成物を得ることができる。

【0157】

組換え抗体組成物を生産する一つの方法はWO 2004/061104およびWO 2006/007850 (これらの参考文献は引用により本明細書に組み込まれる) に記載されている。そこに記載されている方法は、個々の宿主細胞のゲノムへの抗体コード配列の部位特異的組込みに基づき、 V_H および V_L タンパク質鎖が生産中に元のペアリングで維持されることを保証する。さらにまた、部位特異的組込みは位置効果を最小限に抑えるので、ポリクローナル細胞株における個々の細胞の成長および発現特性は極めて類似すると予想される。一般に、本方法には、i) 1つ以上のリコンビナーゼ認識部位を持つ宿主細胞; ii) 宿主細胞のそれと適合する少なくとも一つのリコンビナーゼ認識部位を持つ発現ベクター; iii) 選択された V_H および V_L コードペアをスクリーニングベクターから発現ベクターに移動させることにより、全長抗体または抗体フラグメントがそのベクターから発現されるように、発現ベクターのコレクションを作製すること (スクリーニングベクターが発現ベクターと同一である場合、このような移動は必ずしも必要ないだろう); iv) 発現ベクターのコレクションと、宿主細胞のゲノム中のリコンビナーゼ認識部位をベクター中のそれと組み合わせる能力を持つリコンビナーゼをコードするベクターとによる、宿主細胞のトランスフェクション; v) トランスフェクトされた宿主細胞からのポリクローナル細胞株の取得/生成およびvi) ポリクローナル細胞株からの抗体組成物の発現および収集が含まれる。

【0158】

1つの組成物中に小数 (2~3またはそれ以上) の抗体を使用する場合、それらは、例えばWO 2004/085474に記載されているモノクローナル抗体の製造方法と類似する方法で、個別に発現させ、精製することができる。精製された抗体は、精製後に混合するか、あるいは別々のバイアルにパッケージして、投与の直前に混合するかまたは別々に投与することができる。

【0159】

好ましくは、哺乳動物細胞、例えばCHO細胞、COS細胞、BHK細胞、骨髓腫細胞 (例えばSp2/0またはNS0細胞)、NIH 3T3などの線維芽細胞、および不死化ヒト細胞、例えばHeLa細胞、HEK293細胞、またはPER.C6を使用する。しかし、非哺乳動物真核細胞または原核細胞

、例えば植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、真菌、大腸菌 (*E. coli*) など、使用することができる。適切な宿主細胞は、そのゲノム中に1つ以上の適切なリコンビナーゼ認識部位を含む。宿主細胞は、組込み体 (すなわち組込み部位に抗EGFR Ab発現ベクターまたは発現ベクターフラグメントのコピーが組み込まれている細胞) の選択が可能のように、組込み部位に作動可能に連結された選択方法も含有すべきである。ゲノム中の予め決定された位置にFRT部位を持つ細胞の作製は、例えばUS 5,677,177に記載されている。好ましくは、宿主細胞は、組込み体の高発現を可能にする部位 (いわゆるホットスポット) に位置する組込み部位を一つだけ持つ。

【0160】

適切な発現ベクターは、宿主細胞のリコンビナーゼ認識部位に適合する組換え認識部位を含む。好ましくは、リコンビナーゼ認識部位は宿主細胞の構築に使用した選択遺伝子とは異なる適切な選択遺伝子に連結される。選択遺伝子は当技術分野ではよく知られており、例えばグルタミンシンターゼ遺伝子 (GS)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子 (DHFR)、およびネオマイシンなどがあり、GSまたはDHFRは挿入された V_H および V_L 配列の遺伝子増幅に使用することができる。ベクターは、ベクターの完全な組込みの代わりに抗体コード配列のリコンビナーゼ媒介カセット交換 (recombinase-mediated cassette exchange) (RMCE) を行うことができるように、2つの異なるリコンビナーゼ認識部位を含有してもよい。RMCEは、Langerら 2002、SchlakeおよびBode 1994に記載されている。適切なリコンビナーゼ認識部位は当技術分野ではよく知られており、例えばFRT、loxおよびattP/attB部位などがある。好ましくは組込みベクターは、アイソタイプコードベクターであって、そこには、スクリーニングベクターから V_H および V_L コードペアを移動させる前に、定常領域 (好ましくはイントロンを含む) がベクター中に存在する (またはスクリーニングが全長抗体に対して行われるのであれば、定常領域がスクリーニングベクター中に既に存在する)。ベクター中に存在する定常領域は、重鎖定常領域全体 (CH_1 から CH_3 または CH_4 まで) であるか、抗体のFc部分をコードする定常領域 (CH_2 から CH_3 または CH_4 まで) であることができる。軽鎖 または 定常領域も移動前に存在しうる。定常領域が存在する場合、その数の選択は、使用するスクリーニングおよび移動系に依存する。重鎖定常領域は、アイソタイプIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgDおよびIgEから選択することができる。好ましいアイソタイプはIgG1、IgG2、および/またはIgG3である。さらに、抗EGFR抗体コード核酸の部位特異的組込みのための発現ベクターは、 V_H および V_L 鎖のそれぞれの高レベルな発現を指示する適切なプロモーターまたは等価な配列を含有する。図4に、発現ベクターを設計するための考えうる方法の一つを図解するが、他にも数多くの設計が可能である。

【0161】

選択された V_H および V_L コードペアの、スクリーニングベクターからの移動は、各発現ベクター分子が1つの V_H および V_L コードペアを含有するように、従来の制限酵素切断およびライゲーションによって、行うことができる。好ましくは、 V_H および V_L コードペアを、個別に移動させるが、所望であれば、それらを一まとめにして移動させることもできる。選択された V_H および V_L コードペアの全てを発現ベクターに移動させると、発現ベクターのコレクションまたはライブラリーが得られる。所望であれば、これに代わる移動方法も使用することができる。スクリーニングベクターが発現ベクターと同一である場合、発現ベクターのライブラリーは、スクリーニング中に選択された V_H および V_L 配列ペア (スクリーニング/発現ベクター中に置かれているもの) から構成される。

【0162】

核酸配列を宿主細胞中にトランスフェクトするための方法は当技術分野では知られている。部位特異的組込みを保証するために、宿主細胞には適切なリコンビナーゼも提供しなければならない。これは、好ましくは、リコンビナーゼをコードするプラスミドのコトランスフェクション (co-transfection) によって達成される。適切なリコンビナーゼは、例えば、対応するリコンビナーゼ認識部位を持つ宿主細胞/ベクター系と一緒に使用されるFlp、Creまたはファージ C31インテグラーゼである。宿主細胞をまとめてトランスフ

10

20

30

40

50

エクトし、すなわち発現ベクターのライブラリーを1回の反応で細胞株にトランスフェクトし、それによってポリクローナル細胞株を得ることができる。あるいは、発現ベクターのコレクションを宿主細胞に個別にトランスフェクトし、それによって個々の細胞株（各細胞株は特定の特異性を持つ抗体を産生する）のコレクションを生成させることもできる。次に、トランスフェクション後に生成する（個別またはポリクローナル）細胞株を、部位特異的組込み体について選択し、それらがトランスフェクション前に懸濁無血清培地での培養に既に適応していなかった場合は、懸濁無血清培地での培養に適応させる。トランスフェクションを個別に行った場合は、個々の細胞株をそれらの成長特性および抗体産生に関してさらに分析する。ポリクローナル細胞株の作製には、好ましくは、類似する増殖速度および抗体発現レベルを持つ細胞株を選択する。次に、個々の細胞株を所定の比で混合することにより、ポリクローナル細胞株を作製する。一般に、ポリクローナルマスター（master）細胞バンク（pMCB）、ポリクローナルリサーチ（research）細胞バンク（pRCB）および/またはポリクローナルワーキング（working）細胞バンク（pWCB）が、ポリクローナル細胞株から作り出される。ポリクローナル細胞株は、個々の細胞株を所定の比で混合することによって作製される。ポリクローナル細胞株をアンプルに分注することによって、ポリクローナルリサーチ細胞バンク（pRCB）またはマスター細胞バンク（pMCB）が作製され、そのリサーチまたはマスター細胞バンクの細胞を拡張（expand）することにより、そこからポリクローナルワーキング細胞バンク（pWCB）を作製することができる。リサーチ細胞バンクは主として概念実証試験用であり、リサーチ細胞バンクでは、ポリクローナル細胞株が、マスター細胞バンク中のポリクローナル細胞株ほど多くは個々のポリクローナル抗体を含まないかもしれない。通常、pMCBをさらに拡張して、生産用のpWCBを作り出す。pWCBを使い果たしたら、pMCBの新しいアンプルを拡張して、新しいpWCBを作り出す。

【0163】

本発明の一実施形態は、本発明の組換え抗EGFR抗体組成物を発現する能力を持つポリクローナル細胞株である。

【0164】

本発明のさらなる一実施形態は、個々の細胞がそれぞれ単一の V_H および V_L コードペアを発現する能力を持ち、ポリクローナル細胞株全体として V_H および V_L コードペアのコレクションを発現する能力を持ち、各 V_H および V_L ペアが抗EGFR抗体をコードしている、ポリクローナル細胞株である。好ましくは、 V_H および V_L コードペアのコレクションは、本発明の方法に従って作製されるコグネイトペアである。

【0165】

本発明の組換え抗体組成物は、pWCBのアンプル1本を、ポリクローナル細胞株が安定であり続けて、抗体の十分な発現を可能にするような適当な期間（この時間枠はおよそ15日～50日の間にある）、適当な培地で培養することによって製造することができる。流加培養法または灌流培養法などの培養方法を使用することができる。組換え抗体組成物は培養培地から得られ、従来の精製技法によって精製される。アフィニティークロマトグラフィーと、それに続くイオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用およびゲル濾過などの精製工程との組合せが、IgGの精製にはよく使用されてきた。精製後に、ポリクローナル抗体組成物における個々のメンバーの全ての存在を、例えばイオン交換クロマトグラフィーなどによって評価する。そのような抗体組成物の特徴づけはWO 2006/007853（引用により本明細書に組み込まれる）に詳述されている。

【0166】

組換え宿主中で抗体の混合物を発現させる代替的方法是WO 2004/009618に記載されている。この方法では、同じ軽鎖と会合した異なる重鎖を持つ抗体が、単一の細胞株から生産される。抗EGFR抗体組成物がコンビナトリアルライブラリーから生産される場合には、このアプローチを応用することができる。

【0167】

治療組成物

本発明のもう一つの態様は、本発明の抗EGFR抗体組成物、または抗EGFR組換えFabもしくは他の抗EGFR組換え抗体フラグメント組成物、または二重特異性結合分子を活性成分として含む医薬組成物である。好ましくは、そのような組成物の活性成分は、本発明に記載する抗EGFR組換え抗体組成物である。そのような組成物は、がんの改善および/または予防および/または処置を目的とする。好ましくは、医薬組成物は、ヒト、家畜、またはペットに投与される。

【0168】

医薬組成物はさらに医薬上許容される賦形剤を含みうる。

【0169】

抗EGFR抗体組成物またはその抗体のフラグメントは、医薬上許容される希釈剤、担体、または賦形剤に入れて、単位剤形 (unit dosage form) として投与することができる。従来の医薬実務を使って、がんを持つ患者に投与するための適切な製剤または組成物を得ることができる。好ましい実施形態では投与は治療的であり、すなわち、がん状態が診断された後に投与される。任意の適切な投与経路を使用することができ、例えば投与は、非経口、静脈内、動脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、坐剤、または経口投与であることができる。例えば医薬製剤は、溶液または懸濁液の形態をとりうる。経口投与の場合は、胃での分解から保護する必要がある。鼻腔内製剤の場合、抗体は、粉末、点鼻液、またはエアロゾルの形態で投与することができる。

【0170】

本発明の医薬組成物は、自体公知の方法で、例えば従来の溶解、凍結乾燥、混合、造粒、または糖剤化工程などによって、製造される。医薬組成物は、従来の医薬実務に従って製剤化することができる (例えばA.R. Gennaro編「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」(第20版) 2000、Lippincott Williams & Wilkins、ペンシルベニア州フィラデルフィアならびにJ.SwarbrickおよびJ.C.Boylan編「Encyclopedia of Pharmaceutical Technology」1988-1999、Marcel Dekker、ニューヨーク州ニューヨークを参照されたい)。

【0171】

好ましくは、活性成分の溶液または懸濁液、特に等張性水溶液または水性懸濁液を使って、本発明の医薬組成物を製造する。活性成分を単独で含むか、担体、例えばマンニトールと一緒に含む凍結乾燥組成物の場合は、上述の溶液または懸濁液を、可能であれば、使用前に調製してもよい。医薬組成物は滅菌することができ、かつ/または賦形剤、例えば保存剤、安定剤、湿潤および/または乳化剤、可溶化剤、浸透圧を調節するための塩類および/または緩衝剤などを含むことができ、自体公知の方法で、例えば従来の溶解または凍結乾燥工程などによって製造される。前記溶液または懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルピロリドンまたはゼラチンなどの増粘物質を含んでもよい。

【0172】

注射組成物は、通常の方法により、滅菌条件下で製造され、アンプルまたはバイアルへの組成物の導入および容器の封止にも、同じことが言える。

【0173】

医薬組成物は、約1%から約95%まで、好ましくは約20%から約90%までの活性成分を含む。本発明の医薬組成物は、例えば、単位用量形 (unit dose form)、例えばアンプル、バイアル、坐剤、錠剤、丸剤、またはカプセル剤などの形態をとることができる。製剤は、ある疾患または状態に関する治療を施すために、ヒト個体に治療有効量または予防有効量 (例えば病的状態を予防し、排除し、または軽減する量) で投与することができる。治療剤の好ましい投薬量は、がんの重症度、その患者の全体的健康状態、複合賦形剤の処方 (the formulation of the compound excipients)、およびその投与経路などの変量に依存するだろう。

【0174】

本発明の組成物の治療用途

10

20

30

40

50

本発明の医薬組成物は、哺乳動物における疾患の処置または改善に使用することができる。本医薬組成物を使って処置または予防することができる状態には、本発明の医薬組成物による治療的処置に好ましく供することができる患者のがんの予防および処置が含まれる。

【 0 1 7 5 】

本発明の一実施形態は、哺乳動物においてがんに関連する1つまたはそれ以上の症状を予防、処置または改善する方法であって、前記哺乳動物に本発明の抗EGFR組換え抗体組成物の有効量を投与することを含む方法である。

【 0 1 7 6 】

本発明のさらなる実施形態は、哺乳動物におけるがんに関連する1つまたはそれ以上の症状を処置、改善または予防するための組成物を製造するための本発明の抗EGFR組換え抗体組成物の使用である。

【 0 1 7 7 】

好ましくは、上記実施形態における哺乳動物は、ヒト、家畜またはペットである。

【 0 1 7 8 】

本発明の抗体は、一定の固形腫瘍の処置に適応を持つ。とりわけEGFR発現レベルを含むいくつかの因子に基づけば、次に挙げる腫瘍タイプが好ましい適応を表すようである：乳がん、卵巣がん、結腸がん、直腸がん、前立腺がん、膀胱がん、膵臓がん、頭頸部がん、および非小細胞肺癌。

【 0 1 7 9 】

がんのさらなる例には癌および肉腫が含まれる。癌には少なくとも次に挙げるものが含まれる：

上皮新生物、NOS、
 扁平上皮細胞新生物、
 扁平上皮細胞癌、NOS、
 基底細胞新生物、
 基底細胞癌、NOS、
 移行細胞乳頭腫および癌、
 腺腫および腺癌（腺）、
 腺腫、NOS、
 腺癌、NOS、
 形成性胃炎、
 インスリノーマ、NOS、
 グルカゴノーマ、NOS、
 ガストリノーマ、NOS、
 VIP産生腫瘍、
 胆管癌、
 肝細胞癌、NOS、
 腺様嚢胞癌、
 虫垂（appendix）のカルチノイド腫瘍、NOS、
 プロラクチノーマ、
 オンコサイトーマ、
 ヒュルトレ（Hurthle）細胞腺腫、
 腎細胞癌、
 グラウィッツ腫瘍、
 多発性内分泌腺腫、
 類内膜腺腫、NOS、
 皮膚付属器新生物、
 粘液性類表皮新生物、
 嚢胞性、粘液性および漿液性新生物、

10

20

30

40

50

嚢胞腺腫，NOS、
 腹膜偽性粘液腫、
 腺管，小葉および髄様新生物、
 腺房細胞新生物、
 複合上皮性新生物、
 ウォーシン（Warthin's）腫瘍、
 胸腺腫，NOS、
 分化性腺（specialized gonadal）新生物、
 性索間質腫瘍、
 莢膜腫瘍，NOS、
 顆粒膜細胞腫瘍，NOS、
 男性化細胞腫，NOS、
 セルトリ・ライディッヒ細胞腫瘍、
 パラガングリオーマおよびグロムス腫瘍、
 パラガングリオーマ，NOS、
 褐色細胞腫，NOS、
 グロムス腫瘍、
 母斑およびメラノーマ、
 メラノサイト性母斑、
 悪性メラノーマ，NOS、
 メラノーマ，NOS、
 結節性メラノーマ、
 異形成母斑、
 悪性黒子由来黒色腫、
 表在拡大型メラノーマ、
 末端黒子型メラノーマ，悪性。

10

20

【 0 1 8 0 】

肉腫の例には__が含まれる。肉腫には、それが発生した組織のタイプに基づいて、いくつかの異なる名前が付けられている。例えば骨肉腫は骨から発生し、軟骨肉腫は軟骨から発生し、平滑筋肉腫は平滑筋から発生する。平滑筋肉腫、軟骨肉腫および消化管間質腫瘍（GIST）などの軟部組織肉腫は、小児より成人においてよく見られる。

30

【 0 1 8 1 】

これらの適応症のそれぞれに関して、次に挙げる3つの臨床経路が、臨床的成果を上げる可能性をそれぞれ別個に持つと思われる。

【 0 1 8 2 】

補助療法：補助療法では、患者が、化学療法剤もしくは抗新生物剤および/または放射線療法と組み合わせられた本発明の抗体で処置されるだろう。上に列挙した一次ターゲットは、本発明の抗体を標準的な第一および第二選択治療または第三選択治療に加えることにより、プロトコールに基づいて処置されることになる。プロトコールの設計は、腫瘍質量の低下によって評価される有効性ならびに標準的な化学療法の通常用量を減らす能力を考慮して行われることになる。これらの投薬量の低下は、化学療法剤の用量関連毒性を低減することにより、追加の治療および/または長期間にわたる治療を可能にするだろう。先行技術の抗EGFR抗体は、化学療法剤または抗新生物剤であるアドリアマイシン（Erbix：進行前立腺癌）、シスプラチン（Exbitux：進行頭頸部癌および肺癌）、タキソール（Erbix：乳がん）、およびドキシソルピシン（Erbix）と組み合わせて、いくつかの補助臨床試験で利用されたことがあり、または現在利用されている。

40

【 0 1 8 3 】

本発明は、がん治療において同時、個別または連続投与するための組合せとして、本発明の抗体組成物とがん細胞の分化を誘導する能力を持つ少なくとも一つの化合物とを含む医薬品を提供する。本発明の抗体組成物を、がん細胞の最終分化を誘導することが知られ

50

ている薬剤と組み合わせることにより、その効果をさらに改善することができる。

【0184】

前記少なくとも一つの化合物は、レチノイン酸、トランスレチノイン酸、シスレチノイン酸、フェニルブチレート、神経成長因子、ジメチルスルホキシド、活性型ビタミンD(3)、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体、12-O-テトラデカノイルホルボール13-アセテート、ヘキサメチレン-ビス-アセトアミド、トランスフォーミング増殖因子、酪酸、サイクリックAMP、およびベスナリノンからなる群より選択することができる。好ましくは、前記化合物は、レチノイン酸、フェニルブチレート、オールトランスレチノイン酸、活性型ビタミンDからなる群より選択される。

【0185】

本発明の抗体組成物と少なくとも一つの化学療法化合物または抗新生物化合物とを含む医薬品は、がん治療において同時、別個または連続投与するための組合せとして使用することができる。化学療法化合物は、アドリマイシン、シスプラチン、タキソール、ドキシソルピシン、トポテカン、フルオロピリミジン、オキサリプラチン、およびイリノテカンからなる群より選択することができる。

【0186】

単独療法：腫瘍の単独療法において本発明の抗体を使用する場合は、化学療法剤または抗新生物剤を伴わずに、本抗体を患者に投与することができる。本発明の抗体を使用して得られた、本明細書に記載する前臨床試験の結果は、単独型治療としての肯定的な結果を示している。

【0187】

造影剤：放射性核種（例えばイットリウム（ ^{90}Y ））を本発明の抗体に結合させることにより、本発明の放射標識抗体は診断用造影剤として利用できると予想される。そのような役割においては、本発明の抗体が、EGFRを発現する細胞の固形腫瘍にも転移巣にも局在化するだろう。本発明の抗体の造影剤としての使用に関連して、本抗体は、固形腫瘍の外科的処置を補助して、術前スクリーニングとしても、どれくらいの腫瘍が残っているかおよび/または復活しているかを決定するための術後追跡手段としても、使用することができる。（ ^{111}In ）-Erbix抗体は、切除不能な扁平上皮細胞肺癌を持つ患者を対象とするフェーズIヒト臨床試験において、造影剤として使用されたことがある（Divgiら J. Natl. Cancer Inst. 83:97-104 (1991)）。患者は、標準的の前面および後面ガンマカメラ（standard anterior and posterior gamma camera）で追跡された。予備データにより、全ての一次病巣と大きな転移病巣は同定されるが、小さな転移病巣（1cm未満）は半分しか検出されないことが示された。

【0188】

チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）は、主としてキナゾリンから誘導される低分子量の合成分子であって、受容体の細胞内チロシンキナーゼドメインと相互作用し、細胞内Mg-ATP結合部位に関して競合することにより、リガンドが誘導する受容体リン酸化を阻害する。ゲフィチニブ（イレッサ、ZD1839）、エルロチニブ（Erlotinib）（タルセバ、OSI-774）、ラパチニブ（タイケルブ、GW572016）、カネルチニブ（CI-1033）、EKB-569およびPKI-166を含む臨床開発中のいくつかのTKIが、EGFRをターゲットにしている。TKIと抗EGFRとの併用処置は、EGFR依存性がん細胞に対して、インビボでもインビトロでも有益であることが示されている。本発明の抗体組成物とEGFRをターゲットとする少なくとも一つのTKIを含む医薬品は、がん治療において同時、別個または連続投与するための組合せとして使用することができる。さらなる小分子阻害剤には、ソラフェニブ（Sorafenib）（rafおよび複数のRTK）、スニチニブ（複数のRTK）、テムシロリムス（mTOR）、RAD001（mTOR）、およびAZD217（VEGFR2）などがある。

【0189】

他の実施形態では、本発明の抗体組成物が、他の抗体治療薬と組み合わせて使用される。それらの例には、例えばHER2に対する抗体（ハーセプチン）およびVEGFに対する抗体（アバスチン）が含まれる。さらなる他の実施形態では、本発明の抗体組成物が、免疫系の

10

20

30

40

50

細胞を刺激することが知られている薬剤と組合せて使用され、そのような併用処置は、本発明の抗体組成物の効力の、強化された免疫媒介的増強をもたらす。そのような免疫刺激剤の例には、例えば組換えインターロイキン（例：IL-21およびIL-2）が含まれる。

【0190】

投与量および投与経路

本発明の抗体の具体的な投薬についてはまだ決定されていないが、投薬に関して考慮すべき一定の事項は、既に承認されている類似の製品（ImClone C225（Erbix））との比較によって決定することができる。C225抗体は、典型的には、5～400mg/m²の範囲の用量で投与されており、低い方の用量は安全性試験との関連でのみ使用されている。したがって本発明者らは、本発明の抗体による患者への投薬はこの範囲内か、それより低用量の範囲、おそらく50～300mg/m²の範囲で行うことができ、それでもなお有効であることができるだろうと予想する。mg/m²という単位での投薬は、mg/kgという従来からの用量の尺度とは異なり、表面積に基づく尺度であり、幼児から成人まであらゆるサイズの患者が含まれるように考えられた便利な投薬尺度である。

【0191】

Erbix（セツキシマブ）に関して利用可能な処方情報には、400mg/m²の初回120分間IV注入と、その後、週1回の250mg/m²の60分間注入が含まれる。これらの投薬量は、単独処置および放射線療法との併用に関して推奨されている量である。Vectibix（パニツムマブ）の場合、推奨用量は、6mg/kgを60分かけて、14日ごとに投与するものである。

【0192】

GenmabのHuMaxEGFr抗体（ザルツムマブ）の予想臨床投薬量は、初期用量8mg/kgのHuMax-EGFrと、その後、疾患の進行が起こるまでは週1回の維持量の注入である。維持量は、患者が用量制限的発疹を発生させるまで、最大用量を16mg/kgのHuMax-EGFrとして、必要に応じて調節される（Genmabの製品説明書に記載の「Dosages for pivotal Phase III study（主要フェーズIII試験の投薬量）」）。

【0193】

本発明の抗体組成物の臨床的投薬は、現在、臨床現場で使用されているモノクローナル抗EGFR抗体（ErbixおよびVectibix）で観察されるような発疹の程度によって制限される可能性がある。カニクイザルにおける6週間の毒性試験で得られたデータでは、本発明の抗体組成物を、臨床現場で使用されているモノクローナル抗体の一つによる処置に使用されている用量と等価な用量で投与した場合に、発疹の徴候が見られなかった（実施例20）。したがって、本発明の抗体組成物は、静脈内に、週1回、250mg/m²の用量（これは、体表面積1.8m²、体重60kgのヒトでは、7.5mg/kgに相当する）で投与することができる。さらにまた、400mg/m²の初回負荷量（これは、体表面積1.8m²、体重60kgのヒトでは、12mg/kgに相当する）を投与してから、週1回の投薬を行うこともできる。

【0194】

本発明の抗体の送達には、3つの異なる送達アプローチが役立つと予想される。従来の静脈内送達は、大半の腫瘍にとって、おそらく標準的な送達技法になるだろう。しかし、腹腔内の腫瘍、例えば卵巣、胆管、その他の管などの腫瘍では、腫瘍部位での抗体用量を高くすると共に、抗体クリアランスを最小限に抑えるために、腹腔腔内投与が有利になりうる。同様に、一定の固形腫瘍は、局所灌流法に適した脈管構造を持つ。局所灌流法では、腫瘍部位での抗体用量を高くすることが可能になり、抗体の短期クリアランスも最小限に抑えられるだろう。

【0195】

任意のタンパク質または抗体の注入に基づく治療薬の場合、安全上の懸念は、主に、（i）サイトカイン放出症候群、すなわち低血圧、発熱、震え、悪寒、（ii）その物質に対する免疫原性応答の発生（すなわち、抗体治療に対する患者によるヒト抗体の発生、またはHAHAもしくはHACA応答）、および（iii）EGF受容体を発現する正常細胞（例えばEGFRを発現する肝細胞）に対する毒性に関するものである。標準的な試験および追跡を利用して、これらの安全上の懸念のそれぞれを監視することになる。特に、肝臓への損傷がある場

合は、それを評価するために、臨床試験中は頻繁に、肝機能を監視することになる。

【0196】

診断用途

本発明のもう一つの実施形態は、診断キットに向けられる。本発明のキットは、本発明に従って製造された抗EGFR抗体組成物を含み、そのタンパク質は検出可能なラベルで標識されていてもよいし、非ラベル検出 (non-label detection) 用に非標識であってもよい。本キットは、EGFRの過剰発現に関連するがんに冒されている個体を同定するために使用することができる。

【実施例】

【0197】

[実施例1]

抗EGFR抗体のクローニング

免疫化

雌BALB/c、A系、またはC57B16マウス (8~10週齢) を、異なる精製タンパク質やEGFR過剰発現細胞を注射することによる免疫化に使用した。

【0198】

一部の免疫化には、市販のEGFRタンパク質 (R&D systemsカタログ番号1095-ERまたはSigmaカタログ番号E3641) を使用した。他の免疫化には、融合タンパク質として製造された組換えヒトEGFRおよびEGFRvIIIであって、EGFRまたはEGFRvIIIのECDとヒト成長ホルモン (hGH) とからなり、実施例10bに記載のHisタグに加えてタバコ・エッチ・ウイルス (Tabacco Etch Virus: TEV) 切断部位を含むものを使用した。場合によっては、EGFRのECDを、TEVプロテアーゼ切断とそれに続くニッケルカラムでの精製によって単離した。

【0199】

細胞ベースの免疫化には、約 10^7 個/細胞の受容体を発現するヒト頭頸部がん細胞株HN5 (Easty DM, Easty GC, Carter RL, Monaghan P, Butler LJ. Br J Cancer. 1981 Jun;43 (6):772-85「Ten human carcinoma cell lines derived from squamous carcinomas of the head and neck」) を使用した。細胞を、10%FBS (ウシ胎児血清)、3mMグリセロール、5mMピルビン酸ナトリウムおよび1%ペニシリン・ストレプトマイシンを補足したDMEM培地で培養した。各免疫化の前に、細胞をPBSで洗浄し、TrypLEでトリプシン処理し、成長培地に再懸濁した。次に、その細胞懸濁液を、 $250 \times g$ で5分間遠心分離し、ほぐし、15mlの滅菌PBSに再懸濁することにより、PBS中で2回洗浄した。

【0200】

細胞または抗原をPBSに希釈してから、フロイントアジュバントと1:1に混合した。アジュバントは、免疫応答を強化し調整するために使用される。最初の免疫化には完全フロイントアジュバント (CFA) を使用し、それ以後の免疫化には不完全フロイントアジュバント (IFA) を使用した。IFAは鉱油から構成される水中油型エマルションであり、CFAは加熱殺菌乾燥マイコバクテリウム種が添加されたIFAである。どちらのアジュバントにもデポー効果がある。CFAは免疫応答の長期持続を引き起こし、免疫応答を増強するために最初の免疫化に使用され、IFAはそれ以後の免疫化に使用される。水を張ったガラスの表面に1滴を加えることによってエマルションを試験した。その液滴が1滴のままである場合、そのエマルションは安定であり、注射を行うことができる。安定なエマルションだけをマウスに投与した。

【0201】

スケジュール (表2参照) に応じて、各注入には、25~100 μg の抗原または 10^7 個の細胞を使用した。マウスには合計4回の注射を行った。全てのマウスに300 μl または200 μl のエマルションを注射した。スケジュールに応じて、注射は皮下 (s.c.)、腹腔内 (i.p.) または静脈内 (i.v.) に行った。

【0202】

終了時に、頸椎脱臼によってマウスを屠殺し、脾臓を取り出し、74 μm セルストレーナー (Corning#136350-3479) に移した。細胞をフィルターによって解離し、10%FBSを含む

10

20

30

40

50

冷RPMI1640に再懸濁し、300 × gで5分間遠心分離した。細胞ペレットを1%FBSを含むRPMI1640に再懸濁し、50 μmシリンジフィルター（BD#340603）を通して濾過し、遠心分離によって集めた。細胞ペレットを10% DMSOを含むFCSに再懸濁してから凍結保存し、冷凍細胞をFACS選別を行うまで-80 °Cで保存した。

【0203】

マウス形質細胞のFACS選別

凍結脾細胞が入っているバイアルを37 °Cで融解し、まだ氷が存在する状態で15mlチューブに移した。10mlの氷冷RPMI、10%FBS（ウシ胎児血清）を、チューブに、旋回させながら滴下した。10mlのFACS PBSで1回洗浄した後、5mlのFCS PBSを加えてから、50 μm Filconで細胞を濾過する。次に、細胞をペレット化し、2%FBSを含む1mlのPBS（最終体積）に再懸濁し、抗CD43-FITCおよび抗CD138-PEを使って、最終濃度が約5 μg/mlという指定の希釈度で染色した。細胞を4 °C、暗所で20分間インキュベートした。次に細胞を2mlのFACS緩衝液で2回洗浄した。最大15mlのFACS PBSを加えた。ヨウ化プロピジウム（PI）を1:100（100部のFACS PBS緩衝液に対して1部のPI）の割合で加えた後、PCR反応緩衝液（下記参照）が入っている96穴PCRプレート中に選別し、400 × gで2分間遠沈してから、プレートを-80 °Cで凍結した。図1に示すように、形質細胞を、CD43陽性/CD138陽性としてゲーティングした。

【0204】

コグネイトV_HおよびV_Lペアの連結

形質細胞としてゲーティングされた単一細胞でV_HおよびV_Lコード配列の連結を行うことにより、V_HおよびV_Lコード配列のコグネイトペアリングを容易にした。この手法では、1段階マルチプレックスオーバーラップ伸長RT-PCRと、それに続くネステッドPCRとに基づく、2段階PCR法を利用した。本実施例で使用したプライマー混合物は、軽鎖だけを増幅する。しかし、所望であれば、軽鎖を増幅する能力を持つプライマーをマルチプレックスプライマー混合物およびネステッドPCRプライマー混合物に加えることもできる。プライマーを加える場合は、陽性細胞が除外されないように選別手法を適合させるべきである。コグネイトV_HおよびV_L配列の連結に関する原理を図2に図解する。

【0205】

作製した96穴PCRプレートを融解し、選別された細胞をマルチプレックスオーバーラップ伸長RT-PCRのテンプレートとして使用した。単一細胞選別前に各ウェルに加えた選別緩衝液は、反応緩衝液（OneStep RT-PCR Buffer ; Qiagen）、RT-PCR用プライマー（表3参照）およびRNase阻害剤（RNasin、Promega）を含有していた。これに、OneStep RT-PCR酵素混合物（25倍希釈 ; Qiagen）とdNTP混合物（各200 μM）とを補足して、反応体積20 μl中で所与の最終濃度にした。プレートを55 °Cで30分間インキュベートして、各細胞のRNAを逆転写させた。RT後に、プレートを以下のPCRサイクルに供した：94 °Cで10分、35 ×（94 °Cで40秒、60 °Cで40秒、72 °Cで5分）、72 °Cで10分。

【0206】

PCR反応は、ハイスルーブットを容易にするために、96穴プレート24枚用のピール・シール・バスケット（Peel Seal Basket）を使って、H20BITサーマルサイクラー（ABgene）で行った。PCRプレートはサイクル処理後に-20 °Cで保存した。

【0207】

ネステッドPCR段階については、所与の最終濃度が得られるように、各ウェル（反応液量20 μl）に以下の混合物を含む96穴PCRプレートを調製した：1 × FastStart緩衝液（Roche）、dNTP混合物（各200 μM）、ネステッドプライマー混合物（表4参照）、Phusion DNAポリメラーゼ（0.08U ; Finnzymes）およびFastStart High Fidelity酵素ブレンド（0.8U ; Roche）。ネステッドPCRのテンプレートとして、マルチプレックスオーバーラップ伸長PCR反応液から、1 μlを移した。それらのネステッドPCRプレートを、以下の熱サイクル処理に供した：35 ×（95 °Cで30秒、60 °Cで30秒、72 °Cで90秒）、72 °Cで10分。

【0208】

ランダムに選択した反応物を1%アガロースゲルで分析することにより、約890塩基対（

bp) のオーバーラップ伸長フラグメントが存在することを確認した。

【0209】

それらのPCRフラグメントをさらに加工するまで、プレートで-20℃で保存した。

【0210】

ネステッドPCRで得た、連結された V_H および V_L コードペアのレパートリーを、異なるドナー由来のペアを混合せずにプールし、分取用1%アガロースゲル電気泳動で精製した。ヒト 定常軽鎖コード配列を、連結された V_H および V_L コードペアのプールされたPCR産物の V_L コード領域に、オーバーラップ伸長法でスプライスした(図3)。ヒト 定常軽鎖コード配列は、軽鎖を持つヒト抗体のコード配列を含有するプラスミドから、次に挙げる試薬類を含有する反応で増幅させた: 総体積50 μ l中、Phusion酵素(2U; Finnzymes)、1 \times Phusion緩衝液、dNTP混合物(各200 μ M)、hKcforw-v2プライマーおよび 3' プライマー(表5)、ならびにプラスミドテンプレートpLL138(10ng/ μ l)。反応は以下の熱サイクル処理に供した: 25 \times (95℃で30秒、55℃で30秒、72℃で45秒)、72℃で10分。その結果生じたPCRフラグメントを分取用1%アガロースゲル電気泳動で精製した。

【0211】

各レパートリーの精製プールPCRフラグメントを、次に挙げる試薬類を含有するオーバーラップ伸長PCR(総体積50 μ l)による以下のスプライシングにより、ヒト 定常部コード領域(付表2)の増幅精製PCRフラグメントにスプライスした: ヒト 定常部コード領域フラグメント(1.4ng/ μ l)、精製プールPCRフラグメント(1.4ng/ μ l)、Phusion DNAポリメラーゼ(0.5U; Finnzymes)およびFastStart High Fidelity酵素ブレンド(0.2U; Roche)、1 \times FastStart緩衝液(Roche)、dNTP混合物(各200 μ M)、mhKCreVプライマーおよびmJHセットプライマー(表5参照)。反応を以下の熱サイクル処理に供した: 95℃で2分、25 \times (95℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分)、72℃で10分。その結果生じたPCRフラグメント(約1070bp)を分取用1%アガロースゲル電気泳動で精製した。

【0212】

コグネイト V_H および V_L コードペアのスクリーニングベクターへの挿入

EGFRに対する結合特異性を持つ抗体を同定するために、得られた V_H および V_L コード配列を、全長抗体として発現させた。これには、 V_H および V_L コードペアのレパートリーを発現ベクターに挿入し、宿主細胞にトランスフェクトすることが含まれた。

【0213】

連結された V_H および V_L コードペアを含有する発現ベクターのレパートリーを作製するために、2段階のクローニング手法を使用した。統計的に、発現ベクターのレパートリーが、スクリーニングレパートリーの作製に使用したコグネイトペア V_H および V_L PCR産物の数の10倍に相当する数の組換えプラスミドを含有する場合、ユニークな遺伝子ペアの全てが表現される可能性は99%ある。そこで、400個のオーバーラップ伸長V遺伝子フラグメントが得られた場合には、スクリーニング用に、少なくとも4000クローンのレパートリーを作製した。

【0214】

簡単に述べると、連結された V_H および V_L コードペアのレパートリーの精製PCR産物がヒト 定常コード領域にスプライスされているものを、XhoIおよびNotI DNAエンドヌクレアーゼにより、PCR産物の末端に導入された認識部位で切断した。切断され精製されたフラグメントを、XhoI/NotIで消化した哺乳類IgG発現ベクター00-VP-002(図4)に、標準的なライゲーション手法でライゲートした。そのライゲーション混合物を大腸菌中にエレクトロポレーションし、適当な抗生物質を含有する2 \times YTプレートに加えて、37℃で終夜インキュベートした。プレートから回収された細胞から、標準的なDNA精製方法(Qiagen)を使って、増幅されたベクターのレパートリーを精製した。プロモーター-リーダーフラグメントの挿入に備えて、プラスミドを、AscIおよびNheIエンドヌクレアーゼで切断した。これらの酵素の制限部位は、 V_H および V_L コード遺伝子ペアの間に位置した。ベクターを精製した後、AscI-NheIで消化した二方向性哺乳類プロモーター-リーダーフラグメントを、標準的なライゲーション手法で、AscIおよびNheI制限部位に挿入した。ライゲートされた

ベクターを大腸菌中で増幅し、標準的な方法を使ってプラスミドを精製した。生成したスクリーニングベクターのレパートリーを、従来の手法で、大腸菌に形質転換した。得られたコロニーを384穴マスタープレートに集約し、貯蔵した。並べられたコロニーの数は、インプット (input) PCR産物の数を、少なくとも3倍は上回ったので、得られたユニークなV遺伝子ペアの全てが存在する可能性は95%になった。

【0215】

EGFR細胞外ドメインへの結合に関するスクリーニング

一般に、スクリーニングは2段階法として行った。抗体ライブラリーを、ELISAで、組換えEGFRタンパク質に対する反応性についてスクリーニングした後、細胞表面発現EGFRへの抗EGFR抗体結合を検出するために、NR6wtEGFR細胞株を使った細胞ベースのアプローチとして、FMAT (FLISA) を使用した。101および108/109ライブラリー (表2) については、EGFRの細胞外ドメインを表現する組換えEGFRを使ってELISAを行った。

10

【0216】

簡単に述べると、ELISAについては、Nunc maxisorbプレート (カタログ番号464718) を、PBS中に希釈した1µg/mlのタンパク質 (社内で製造したもの) により、4 で終夜コーティングした。50µlの2%ミルク-PBS-Tでのブロックに先だって、プレートをPBS + 0.05% Tween 20 (PBS-T) で1回洗浄した。プレートをPBS-Tで1回洗浄し、20µlの2%ミルク-PBS-Tと、FreeStyle CHO-Sトランスフェクタント (下記参照) から得た5µlの上清とを加え、室温で1時間半インキュベートした後、プレートを1ウェルにつき20µlのPBS-Tで1回洗浄した。ウェルに結合した抗体を検出するために、2%ミルク-PBS-Tで1:10000希釈した二次抗体 (HRP-ヤギ抗ヒトIgG、Jackson、カタログ番号109-035-097) を加え、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBS-Tで1回洗浄してから、25µlの基質 (Kem-en-tec Diagnostics、カタログ番号4390) を加え、それを5分間インキュベートした。インキュベーション後に25µlの1M硫酸を加えて、反応を停止させた。ELISAリーダーで450nmの特異的シグナルを検出した。

20

【0217】

抗EGFR抗体の、細胞ベースのFMAT検出のために、SKBR-3 (ATCC番号HTB-30) またはNR6wtEGFR (Welshら, 1991, J Cell Biol, 114, 3, 533-543) 細胞を、記載のとおり、成長培地で維持した。細胞を計数し、1:40,000に希釈したAlexa-647コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG (H-L) 抗体 (Molecular Probesカタログ番号A21445、ロット番号34686A) で、125,000細胞/mlに希釈した。その懸濁液のうち合計20µlを、384穴クリアボトムNuncプレートに移した。次に、10µlのトランスフェクション上清をウェルに加えた。6~10時間のインキュベーション後に、その反応から生じるFMATシグナルを測定した。

30

【0218】

スクリーニングで得られたデータは、全クローンのうち221個 (4.8%) がELISAで陽性であったことを示している。これらのクローンのうち93個 (2.0%) は、FMATでも陽性だった。クローンのうち全部で220個 (4.8%) がFMATにおいて陽性であり、そのうち127個 (220 - 93) は、細胞表面抗原に関してユニークに陽性だった。111ライブラリーも同様の方法でスクリーニングしたが、免疫化の手法は欠失突然変異型EGFR受容体EGFRvIIIに特異的な抗体が生成するように行ったので、ELISAスクリーニングには、野生型EGFRとEGFRvIIIの両方を検出するためのアッセイを含めた。ELISAでは7つのクローンがEGFRvIIIに特異的であると同定され、興味深いことにこれらのクローンは、FMATにおいて、wtEGFR発現細胞の染色に関して陰性だった。FMATおよびELISAでは13個のクローンが、wtEGFRについて陽性であるが、EGFRvIIIについては陽性でないと同定され、これらは、101および108/109ライブラリーと比較して、このライブラリーにユニークだった。全てのELISA陽性クローンを以降の分析のために選択した。

40

【0219】

配列解析およびクローン選択

ELISAでEGFR特異的と同定されたクローンを、元のマスタープレート (384穴フォーマット) から回収し、新しいプレートに集約した。DNAをクローンから単離し、V遺伝子のDNA

50

配列決定に付した。配列をアラインし、ユニークなクローンを全て選択した。得られた配列の多重アラインメントにより、各特定クローンのユニーク性が明らかになり、ユニークな抗体の同定が可能になった。220個のクローンを配列解析することにより、70個の、遺伝子的に別個な抗体配列クラスターが同定された。関連配列の各クラスターは、おそらく、共通する前駆体クローンの体細胞超変異によって派生したものだろう。全体に、各クラスターから1~2個のクローンを選択して、配列および特異性を検証した。選択された抗体可変配列の配列を付表1に示す。これらのヌクレオチド配列には両端の制限部位が含まれている。その結果、対応する翻訳されたアミノ酸配列（DNA配列の第3読み枠を使用）は、IMGTの定義によるVHおよびVL配列の一部を形成しない2つのアミノ酸を、N末端に含む（Le francら（2003）「IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains」Dev. Comp Immunol 27, 55-77）。表示のVL配列は全て、アミノ酸-TVAAP-で始まりC末端の-NRGEで終わる同じヒト 定常領域を含む。本発明に関して、特定の抗体に言及する場合、VL配列という用語からは、定常領域と2つのN末端アミノ酸（LA-）とが除外される。特定の抗体に言及する場合、VH配列という用語からは、2つのN末端アミノ酸（RA-）が除外される。

【0220】

配列および特異性の検証

抗体コードクローンを検証するために、DNAプラスミドを作製し、2ml規模でのFreeStyle CHO-S細胞（Invitrogen）のトランスフェクションを、発現のために行った。トランスフェクションの96時間後に上清を収集した。発現レベルを標準的抗IgG ELISAで推定し、特異性をEGFR特異的およびEGFRvIII特異的ELISAによって決定した。クローンの85%は正しい特異性および配列を持つことが示された。

【0221】

抗増殖効果に関するスクリーニング

細胞の損傷は、代謝細胞機能と増殖とを維持し、そのためのエネルギーを供給するという細胞の能力の喪失を、不可避免的にもたらす。代謝活性アッセイはこの前提に基づいている。通常、代謝活性アッセイでは、ミトコンドリア活性が測定される。細胞増殖試薬（Cell Proliferation Reagent）WST-1（Rocheカタログ番号11 644 807 001）は、生細胞の代謝活性を測定する調製済（ready-to-use）の基質である。そして、代謝活性は生細胞の数と相関すると仮定する。この実施例では、WST-1アッセイを使って、異なる抗EGFR抗体を含有する細胞培養上清で処理した後の、代謝的に活性な細胞の数を測定した。

【0222】

WST-1アッセイを行う前に、2mlの上清のうち、異なる体積（0、10、25、50および150 μl）を96穴プレートの適当なウェルに移した。

【0223】

次に、HN5細胞を1×PBSで洗浄し、3mlのトリプシン溶液を使ったトリプシン処理によって剥離した。次に、17mlの完全培地を加え、細胞を300×g（1200rcf）で5分間遠沈した。上清を取り除き、細胞をDMEM + 0.5% FBSに再懸濁した。細胞を計数し、その濃度を調節し、1500個の細胞を上清と共にウェルに加えて、各ウェルが全部で200 μlの培地を含有するようにした。プレートを、湿潤培養器中、37 °Cで、4日間インキュベートした。次に、1ウェルにつき20 μlのWST-1試薬を加え、プレートを37 °Cで1時間インキュベートした。次に、プレートをオービタルプレートシェーカーに移し、さらに1時間放置した。ELISAリーダーで450nmと620nm（参照波長）における吸光度を測定した。代謝的に活性な細胞（MAC）のレベルの相違を、次式のとおり、対照上清のパーセントとして算出した：

【数1】

$$\%MAC = \left(1 - \frac{(OD_{exp.} - OD_{media})}{(OD_{untreat.} - OD_{media})} \right) \times 100$$

【0224】

次に、これらの値を、フリーソフトウェアClusterおよびTreeViewを使って行った教師つき階層的クラスター分析（ELISAにおける反応性に基づくクラスター化）の根拠として使用した。

【0225】

抗体選択プロセスの初期段階で機能的抗体をスクリーニングできることが好ましい。83個の2mlトランスフェクションから得られた培養上清を、0.5%FBS中のHN5細胞を使って行われる増殖アッセイで、成長阻害機能をスクリーニングするために使用した。結果を、簡単な階層的クラスター分析によって視覚化した。クラスター分析（図5）でわかるように、いくつかの上清は、代謝的に活性なHN5細胞の数を濃度依存的に減少させる（暗灰色）ことがわかった（クラスター2）。また、いくつかの上清は、代謝的に活性なHN5細胞の数を濃度依存的に増加させた（明灰色）（クラスター1、3および4）。代謝的に活性なHN5細胞の数を減少させる上清が反応性2（黒い矢印）を持っているのに対し、代謝的に活性なHN5細胞の数を増加させる上清が反応性1（灰色の矢印）を持っていることは、興味深い知見だった。反応性2を持つ上清はwtEGFR ELISAとEGFRvIII ELISAの両方で陽性であり、反応性1を持つ上清はwtEGFRに対する反応性だけを持っていた。したがって、このような分析により、ELISAにおける抗体反応性と細胞アッセイにおける機能性とを関連づけることができる。

10

【0226】

クローン修復

マルチプレックスPCRアプローチを使用する場合は、プライマーの縮重および高度なホモロジーにより、V遺伝子ファミリー内およびV遺伝子ファミリー間で、ある程度のクロスプライミングが予想される。クロスプライミングは、免疫グロブリンフレームワーク中に自然には存在しないアミノ酸を導入して、例えば構造変化や免疫原性の増加などといったいくつかの潜在的結果を伴い、それらはいずれも治療活性の低下をもたらす。

20

【0227】

これらの欠陥を排除し、選択したクローンが自然の体液性免疫応答を反映することを保証するために、そのようなクロスプライミング突然変異を、クローン修復と呼ばれるプロセスで修正した。

【0228】

クローン修復手法の第1段階では、目的のクローンの起源となったV_H遺伝子に対応する配列を含有するプライマーセットを使ってV_H配列をPCR増幅することにより、クロスプライミングによって導入された突然変異を修正した。そのPCRフラグメントをXhoIおよびAscIで消化し、XhoI/AscIで消化した哺乳動物細胞発現ベクター（図4）に、従来のライゲーション手法でライゲートし直した。ライゲートされたベクターを大腸菌で増幅し、プラスミドを標準的方法で精製した。V_H配列を配列決定して修正を確かめ、軽鎖の挿入に備えて、そのベクターをNheI/NotIで消化した。

30

【0229】

第2段階では、目的のクローンの起源となったV_L遺伝子に対応する配列を含有するプライマーセットを使って全軽鎖をPCR増幅することにより、クロスプライミングによって導入された突然変異を修正した。そのPCRフラグメントをNheI/NotIで消化し、上で作製したV_H含有ベクターにライゲートした。そのライゲーション産物を大腸菌で増幅し、プラスミドを標準的な方法で精製した。次に、軽鎖を配列決定して修正を確かめた。

40

【0230】

選択したクローンの定常領域が、遺伝子の増幅時に導入された突然変異を含有する場合は、それを突然変異していない定常領域で置き換える。これは、修復されたV_L遺伝子（定常領域なしで増幅されたもの）が正しい配列を持つ定常領域（別のPCRで得たもの）に融合されるオーバーラップPCRで行われる。その配列全体を増幅し、上述のようにV_H含有ベクターにクローニングして、修復された軽鎖を配列決定して修正を確かめる。

【0231】

[表2] 抗EGFRクローニング用の出発材料を作製するために使用した免疫化スケジュー

50

ル

【表 2 - 1】

スケジュール、 マウス 群	系統	注射1	注射2	注射3	注射4	終了
101	Balb/c	1日目 25 μ g rhEGFR (R&D systems 1095-ER) CFA s.c.	35日目 25 μ g rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c	56日目 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c	70日目 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c	73日目
108	Balb/c	1日目 1 $\times 10^7$ HN5細胞 CFA i.p.	28日目 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	42日目 1 $\times 10^7$ HN5細胞 IFA i.p.	56日目 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	59日目
109	Balb/c	1日目 1 $\times 10^7$ HN5細胞 CFA i.p.	28日目 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	42日目 1 $\times 10^7$ HN5細胞 IFA i.p.	56日目 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) PBS i.v.	59日目

10

20

【表 2 - 2】

111	Balb/c	1日目 25 μ g rhEGFR* (Symphogen) CFA s.c.	28日目 25 μ g rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	42日目 25 μ g rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	56日目 25 μ g rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	59日目
118	Balb/c	1日目 1 $\times 10^7$ HN5細胞 CFA i.p.	29日目 100 μ g rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	44日目 1 $\times 10^7$ HN5細胞 IFA i.p.	58日目 25 μ g rhEGFR (Sigma E3641) IFA s.c.	61日目
119	C57B	1日目 1 $\times 10^7$ HN5細胞 CFA i.p.	29日目 100 μ g rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	44日目 1 $\times 10^7$ HN5細胞 IFA i.p.	58日目 25 μ g rhEGFR (Sigma E3641) IFA s.c.	61日目

30

40

【 0 2 3 2 】

[表 3] RT-PCRマルチプレックスオーバーラップ伸長プライマー混合物

【表 3】

プライマー名	濃度 (nM)	配列	配列番号
mHCre	0.2	GACSGATGGGCCCTTGGTGG	1
mKapp	0.2	GCTGTAGGTGCTGTCTTTGC	2
mVH			
mVH A	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTCCARCTGCARCAGYCTG	3
mVH B	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCGARGTGMAGCTKGTKGAGTC	4
mVH C	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTGCAGCTKMAGGAGTC	5
mVH 8	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCCAGGTTACTCTGAAAGAGTC	6
mVH 9	0.04	TATTCCCATGGCGCGCCCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTG	7
mVK			
mVK D	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAYATCCAGATGACHCARWCT	8
mVK E	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCRACATTGTGMTGACHCAGTC	9
mVK F	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCSAMATTGTKCTSACCCARTCTC	10
mVK 1-	0.04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGATRTTGTGATGACBCARRCT	11

10

20

W = A/T、R = A/G、S = G/C、Y = C/T、K = G/T、M = A/C、H = ACT、B = GCT ; 濃度 - 最終濃度

【 0 2 3 3 】

[表4] ネステッドプライマーセット

【表 4】

プライマー名	濃度 (nM)	配列	配列番号
mHCre	0.2	GGACAGGGMTCCAKAGTTCCADKT	16
hmJK			
hmJK1-	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATTTCAGCTTGGTG	17
hmJK2-	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTATTTCCAGCTTGGTC	18
hmJK4-	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTATTTCCAACTTTGTC	19
hmJK5-	0.2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTC	20

30

40

K = G/T、M = A/C、D = AGT ; 濃度 - 最終濃度

【 0 2 3 4 】

[表5] 定常部スライシングプライマーセット

50

【表 5】

プライマー	濃度 (nM)	配列	配列番号
ヒト κ 定常部増幅			
hKCforw-v2	0.2	GAACTGTGGCTGCACCATCTGTC	21
Kappa3'	0.2	ACCGCCTCCACCGGCGGCCGCTTATTAACACTCT CCCCTGTTG	22
SOE法 (splicing by overlap extension)			
mhKCrev	0.2	ACCGCCTCCACCGGCGGCCGCTTATTAACACTCT CCCCTGTTGAAGCTCTT	23
mJHセット			
mJH1	0.2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACCGTGGTCCC	12
mJH2	0.2	GGAGGCGCTCGAGACTGTGAGAGTGGTGCC	13
mJH3	0.2	GGAGGCGCTCGAGACAGTGACCAGAGTCCC	14
mJH4	0.2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTCC	15

10

【 0 2 3 5 】

[実施例2]

抗EGFR抗体の哺乳類生産

20

抗EGFR抗体の一過性発現にはFreeStyle MAX CHO発現系 (Invitrogen) を使用した。抗体を200~2000mlの体積で発現させた。

【 0 2 3 6 】

トランスフェクションの約24時間前に、CHO-S細胞を継代して、 0.5×10^6 細胞/mlの細胞濃度に到達させた。プラスミド (細胞培養培地1mlあたり1.25 μ g) を、OptiPro無血清培地中に希釈し、供給業者の推奨どおり、FreeStyle MAXトランスフェクション試薬の溶液と混合した。トランスフェクション試薬を細胞培養物に移し、6日後に上清を収集した。

【 0 2 3 7 】

プロテインA-Sepharoseカラム (MabSelect Sure、GE Health Care) を使用するアフィニティークロマトグラフィー工程を使ってIgG1分子を精製することにより、発現した抗体を培養上清から精製した。0.1Mグリシン、2.7を使って、抗体をカラムから溶出させた。280nmにおける吸光度測定によって決定した抗体含有画分をプールし、5mM酢酸ナトリウム、150mM NaCl、pH5に対して透析した。精製抗体試料を、LALアッセイにより、エンドトキシンの存在に関して試験した。

30

【 0 2 3 8 】

[実施例3]

エピトープ特異性の決定リファレンス抗体との競合ELISA

EGFRの既知のドメインに結合するリファレンス抗体 (J.R. Cochran et. al., JIM 2004 : 287; 147-158で公表されているもの) を利用し、抗EGFR抗体のヒトFc領域に特異的であってマウスIgG Fcに対する交差反応性を示さない二次試薬と共にインキュベートすることにより、抗EGFR抗体の結合エピトープ同士を識別することができる競合ELISAを開発した。このELISAは、Ditzelら、1995, The Journal of Immunology, Vol 154, Issue 2 893-906で公表された記載を適合させたものである。

40

【 0 2 3 9 】

全長EGFR受容体抗原をPBSで0.5 μ g/mlに希釈し、50 μ l/ELISAウェルを4で終夜コーティングすることにより、エピトープブロッキングELISA (epitope blocking ELISA) を行った。翌朝、ウェルをPBS-Tで2回洗浄し、PBS-T-1%BSAを使って室温で1時間ブロッキングした後、PBS-Tで2回洗浄した。次に、最大抗原結合の200倍を与えることが先の実験からわかっている希釈率で、25 μ lのマウスまたはラット・リファレンスマAbを、独立したELISA

50

ISAウェルに加えた。15分後に、25 μ lの抗EGFR抗体を、リファレンス抗体と共にブレインキュベートしたウェルまたは25 μ lのPBSを含有するウェルに、2 μ g/mlの濃度で加えた。これにより、混合後に、1 μ g/ml抗EGFR抗体の最終濃度と、最大抗原結合の100倍であるリファレンス抗体とが得られた。抗体を室温で45分間インキュベートした後、ウェルをPBS-Tで4回洗浄した。二次ヤギ抗ヒトIgG HRPコンジュゲートを1:3000に希釈し、50 μ lを各ウェルに加えてから、室温で30分間インキュベートした。最後にウェルをPBS-Tで4回洗浄し、50 μ l/ウェルのTMBを加えることによってプレートを発色させ、5～15～30分ごとに620nmで読み取った。阻害度を式： $\% \text{阻害} = (1 - (\text{OD競合} / \text{OD競合なし(PBS)})) \times 100$ から算出した。

【0240】

10

ELISA試薬：

- 1) コーティング緩衝液：1 \times PBS ; Gibcoカタログ番号：20012-019
- 2) 抗原：A431細胞から精製された野生型全長EGFR ; Sigma E3641
- 3) ELISAプレート：NUNC Maxisorp ; カタログ：442404
- 4) ブロッキング/希釈緩衝液：PBS-T中の1%BSA (PBS-T-1%BSA)
- 5) 洗浄緩衝液：1 \times PBS/0.05%Tween 20 (PBS-T)
- 6) 陽性対照：Erbix (Merck KGaA、ドイツ64271ダルムシュタット、カタログ番号：018964 ; セツキシマブ)、Vectibix (Amgen Inc、米国91320-1799カリフォルニア州サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、カタログ番号3241400 ; パニツムマブ)
- 7) リファレンス抗体：
 - ・ ICR10 (ラット)、Abcam、Ab231
 - ・ 199.12 (マウス)、Lab Vision Ab-11、MS-396-PABX
 - ・ EGFR.1 (マウス)、Lab Vision Ab-3、MS-311-PABX
 - ・ H11 (マウス)、Lab Vision Ab-5、MS-316-PABX
 - ・ B1D8 (マウス)、Lab Vision Ab-16、MS-666-PABX
 - ・ 111.6 (マウス)、Lab Vision Ab-10、MS-378-PABX
 - ・ 225 (マウス)、Lab Vision Ab-2、MS-269-PABX
 - ・ 528 (マウス)、Lab Vision Ab-1、MS-268-PABX
- 8) ヤギ抗ヒトIgG HRPコンジュゲート ; Serotec、Star 106P
- 9) TMB Plus ; KemEnTec、カタログ番号4390L
- 10) 1M H_2SO_4 。

20

30

【0241】

競合ELISAの結果を図6に示す。ELISA競合アッセイを使って、使用したリファレンス抗体 (EGFR細胞外ドメインに対して生じさせたもの) のドメイン特異性に従って、抗EGFR抗体上清をランク付けした。50～100%の阻害値は、オーバーラップエピトープまたは抗原上で近接しているエピトープに結合するそれら抗体ペア間の有意な競合のしるしであり、一方、50%未満の阻害値は、それら抗体ペアによって認識されるエピトープが近接しておらず、それが立体障害の減少をもたらしていることを示すと解釈した。抗EGFR抗体は、ドメインI、IIおよびIIIを含むEGFR ECD上のさまざまなエピトープに結合することがわかった。いくつかの抗体については、そのmAbがドメインIに対する抗体であるかドメインIIに対する抗体であるかを、この分析では識別することができなかった。そのような特異性はドメインI/IIと記した。さらにまた、いくつかの抗体は、ユニークなエピトープに結合するようだったが、使用した競合ELISAでは、そのエピトープをそれ以上推定することはできなかった (例えばクローン1229および1320、図6)。これらの抗体の一部は、対応するリファレンス抗体反応性がなかったドメインIVに対する抗体であることが考えられる。興味深いことに、ドメインIII抗体は、試験したマウスリファレンス抗体のうち、このドメインに対する抗体で得られた異なる競合パターンに基づいて、さらに4つのサブグループに分割することができた。グループIはmAb992だけからなり、これは、結合に関してリファレンス抗体Ab1およびAb2と競合することがわかった。グループIIはmAb1024および1042

40

50

からなり、これらはどちらも同じIg再配列に由来するものであり、したがってDNAレベルおよびアミノ酸レベルで極めて密接な配列ホモロジーを示した。これら2つの抗体は、結合に関して、Ab2とだけ競合することがわかった。グループIIIは、mAb1030、1208および1277からなり、これらは、結合に関して、リファレンス抗体Ab1、Ab5およびAb10と競合した。最後に、グループIVはmAb1254からなり、これは、結合に関して、使用したドメインII抗体リファレンス抗体Ab1、Ab2、Ab5およびAb10の全てと競合した。

【0242】

表面プラズモン共鳴技術を使った、別個のエピトープに関する、リファレンス抗体または同種抗体との競合分析

4つのフローセルを含むBiacore3000装置でSPR分析を行った。製造者の説明書に従って、フローセル1~4に対し、CM5 Biacoreチップに、10,000レゾナンスユニット (RU) のポリクローナル抗His抗体をコンジュゲートした。5 μ l/分の流速を使用し、15 μ lの6xHis EGFR ECDを20 μ l/mlの濃度で注入し、抗Hisポリクローナル抗体がコンジュゲートされている4つのフローセルの全てに、それを捕捉させた。参照ラン (reference run) では、抗原の注入後直ちに、競合を伴わない抗EGFR mAbの最大結合を、各フローセル中で樹立させた。簡単に述べると、5 μ lの抗体を40 μ g/mlの濃度で、EGFRが捕捉されている全てのフローセルに注入した後、低pH酸洗浄 (10mMグリシン-HCl pH2との接触時間10秒) で、抗体/抗原複合体のストリッピングを行った。各フローセルへの抗EGFR抗体の最大結合を決定した後、同じBiacoreサイクルで競合ラン (competition run) を行った。フローセルをまず最初にEGFR ECD抗原で飽和させた後、異なるリファレンス抗体または抗EGFR抗体を、別々のフローセルに、上に概説したものと同一抗原飽和条件を使って注入した。抗原またはブロッキング抗体の解離を最小限に抑えるために、この工程の直後に、EGFR抗原および競合抗体で飽和したフローセルに、抗EGFR抗体の2回目の注入を行った。次に、低pH酸洗浄 (10mMグリシン-HCl pH2との接触時間10秒) で、抗体/抗原複合体をストリップし、参照ランから始まる全サイクルを、新しい抗EGFR抗体で繰り返した。試験した抗EGFR抗体の阻害度は、各試料を注入する2秒前および2秒後に記録されるレポートポイント (report point) の導入により、競合前および競合後の個々の抗EGFR抗体のRu max値を比較することによって決定した。あるBiacoreサイクルの例を図7に示す。

【0243】

試薬類：

1. CM5チップ ; Biacore、カタログ番号BR-1000-14
2. NHS ; Biacore BR-1000-50
3. EDC ; Biacore BR-1000-50
4. 10mM酢酸緩衝液pH4.5 ; Biacore、カタログ番号BR-1003-50
5. テトラHis抗体 (BSAフリー) ; Qiagen、カタログ番号34670
6. エタノールアミン、1.0M pH8.5 ; Biacore BR-1000-50
7. 10x HBS-EPランニング緩衝液 : 0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% v/v Surfactant P20
8. 抗原 : 社内で製造された、6xHisを持つ組換えヒトEGFR細胞外ドメイン
9. 10mMグリシンHCl pH2.0
10. リファレンス抗体 :
 - ・ ICR10 (ラット)、Abcam、Ab231
 - ・ 199.12 (マウス)、Lab Vision Ab-11、MS-396-PABX
 - ・ EGFR.1 (マウス)、Lab Vision Ab-3、MS-311-PABX
 - ・ H11 (マウス)、Lab Vision Ab-5、MS-316-PABX
 - ・ B1D8 (マウス)、Lab Vision Ab-16、MS-666-PABX
 - ・ 111.6 (マウス)、Lab Vision Ab-10、MS-378-PABX
 - ・ 225 (マウス)、Lab Vision Ab-2、MS-269-PABX
 - ・ 528 (マウス)、Lab Vision Ab-1、MS-268-PABX

【0244】

競合ELISAで得られたエピトープ分析を確認すると共に、同種抗EGFR抗体ペア間の競合によるさらなるエピトープ分析を行うために、表面プラズモン共鳴によってリアルタイムで測定される抗体結合に基づく競合アッセイを確立した。リファレンス抗体のパネルに対して試験した抗EGFRクローンの、得られたエピトープマップを、下記図8に示す。50～100%の阻害値は、オーバーラップエピトープまたは抗原上で近接しているエピトープに結合する抗体ペア間の有意な競合のしるしであり、50%未満の阻害値は、それら抗体ペアによって認識されるエピトープが近接しておらず、それが立体障害の減少をもたらしていることを示すと解釈した。25%未満の阻害値は、有意でない阻害を表すと判断されたので、オーバーラップエピトープに関する分析には含めなかった。試験した抗体は、1320を除く全てが、使用したリファレンス抗体の1つ以上と競合することがわかった。これは、1320が、対応するリファレンス抗体反応性がなかった未知のエピトープに対する抗体であることを示している。完全ヒト抗体またはヒト化抗体であるVectibixおよびErbixを分析に含めたところ、それらはオーバーラップエピトープに結合することがわかった。競合ELISA分析と競合SPR分析の両方から得られたデータは、抗EGFR抗体の確立されたドメイン特異性に関して、一般によく相関した。しかし、これら2つのアッセイでは、個々のリファレンス抗体間の競合パターンに、わずかな相違が観察される場合もあった。これはおそらく、ELISA競合アッセイでは全長EGFR受容体抗原が使用されたのに対して、SPR競合アッセイでは組換え細胞外ドメインEGFRが使用されたという事実によるのだろう。

【0245】

抗EGFR抗体のエピトープマッピングを2つの異なる競合アッセイで確認した後、同種の抗EGFR抗体ペアの組合せの競合分析を精査して、どの抗体ペアが別個のエピトープを認識しているか、そしてオーバーラップエピトープを認識する抗体ペアをさらにエピトープクラスターに分割することができるかどうかを解析した。この分析の結果を図9に示す。この分析でも、50～100%の阻害値は、オーバーラップエピトープに結合する抗体ペア間の有意な競合のしるしであると解釈した。抗体を自分自身に対して試験した場合、つまり完全にオーバーラップしたエピトープを認識する抗体に対して試験した場合は、図9に示すように70%～100%の値が得られたので、この基準は妥当であると思われる。さらに、この知見により、この分析の時間枠内での抗原または抗体ペアの解離は、試験した抗体については、実験の結果に影響を持たないと思われることが示された。上記の項で決定された推定EGFR ECDドメイン特異性に従って抗体をグループ分けすることにより、もっぱらドメインIに結合する抗体、またはドメインIもしくはIIのどちらか(I/II)に結合する抗体は、主として、同じ特異性を持つ抗体メンバーと共にクラスターを形成し、ドメインIIIを認識する抗体メンバーとはクラスターを形成しないことがわかった。同様に、ドメインII抗体は、結合に関して、ドメインIIIを認識する抗体メンバーとだけ競合し、EGFRドメインIまたはI/IIを認識する抗体とは競合しないことがわかった。同じIg再配列から派生した2つのドメインIII抗体1024および1042はオーバーラップエピトープを認識することがわかったが、1024または1042のどちらか一方を992または1030のどちらか一方と比較したところ、重要なことに、有意な競合は起こらないことがわかった。したがって、抗体992、1030および1024/1042は、EGFR ECDのドメインIII上の3つの非オーバーラップエピトープを認識していると結論された。最後に、mAb1320は、結合に関して、mAb1024および1449（これらはどちらもドメインIIIに対する抗体である）と競合し、試験した他のドメインIII抗体とは競合しないことがわかった（1320と1042との競合は未検）。したがってmAb1320は、EGFRの細胞外ドメイン上のドメインIIIの周辺部に結合していると考えられた。エピトープ特異性の全体像は、EGFR ECDドメインI、I/IIまたはIIIに対する抗体のエピトープマップが図解されている図10に見ることができる。

【0246】

SPRで決定すると、992、1030および1024/1042を組み合わせて一対にしても、有意な抗体競合は起こらないことを見いだした後、受容体抗原にはいくつの抗体が同時に結合できるのかを調べるために、新しいBiacore実験を計画した。まず最初に、3つの抗体992、1024および1030によるドメインIIIの飽和が、ドメインIIIではない他のEGFR特異性を持つ抗

体の結合に対して、どんな影響を持つかを調べた。この分析の結果を図11Aに示す。単一の抗体を、単一の抗体と、または各Biacoreサイクル中に余分な抗体を1つずつ逐次的に加えることによって生成する最大3つの抗体からなる抗体混合物と組み合わせて試験することにより、単一抗体の阻害を確定した。認識されたエピトープの完全な遮断を保证するために、抗体は、それぞれ40 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で試験した。図11Aに示すように、3つのドメインIII抗体992、1024および1030は、結合の阻害を伴わずに、受容体に同時に結合することがわかった。抗体を添加するごとに増える、観察された負の阻害値から、添加される次の抗体の結合に関する相乗作用が、さらに示唆された。重要なことに、ドメインIIIを上記3つの抗体と共にインキュベートしても、ドメインI/II (mAb1261) もしくはドメインI (1347) 上の非オーバーラップエピトープに対する他の抗体、または未知の特異性を持つ他の抗体 (1361) は、上記3つのmAb混合物によるエピトープ遮断を受けることなく、結合しているようだった。さらに、試験したこれらの抗体は小さな負の阻害値を持つことから、それらは上記3つのmAb混合物による受容体飽和後の方がより良く結合していることが示された。したがって、この実験から、試験した6つの抗体はEGFRのECDに同時に結合できることが示唆された。観察されたこの現象をさらに検証するために、試験した全ての抗体 (1261、1347、992、1024、1030および1361) からなる抗体混合物を調製し、その混合物中の個々の試料抗体の阻害について調べた。陽性対照として役立つように、試験される試料抗体が含まれていない抗体混合物も試験した。図11B/Cに示すように、試験した6つの抗体はいずれも、全ての抗体を含む混合物と共にインキュベートしたEGF受容体への結合について調べると、80~116%阻害されることがわかった。しかし、個々の試料抗体をこの混合物から取り除くと、その試料抗体の有意な阻害は認められなかったことから、混合物中の抗体は、EGF受容体への結合に関して、自分自身によってのみブロックされることが示された。この実験は、少なくとも6つの、非オーバーラップエピトープを認識する抗体が、EGFRに同時に結合できることを、明確に例証している。最後の実験として、EGFRを上記6つの抗体混合物と共にインキュベートした場合に、ドメインI (1284) もしくはI/II (1257) に対する他の抗体、または特異性不明のクラスターに属する他の抗体 (1183、1255) が、そのEGFRに結合できるかどうかを調べた。図11Dに示すように、上記6抗体混合物とのインキュベーションを事前に行った場合、試験した抗体はいずれもEGFRに有意に結合することができなかった。これは、この抗体のコレクションが、結合している上記6つの抗体によって占有されずに残っている部位のいずれかに対する抗体を含んでいないからだろう。あるいは、試験したドメイン上の部位が、事実上全て、抗体によってブロックされていた可能性もある。

【0247】

[表6] EGFR細胞外ドメインに対する特異性が詳述されている市販の抗体

【表6 - 1】

クローン	種	ドメインI	ドメインII	ドメインIII
ICR10	ラット	×		
199.12/Ab11	マウス	×		
EGFR.1/Ab3	マウス		×	
H11/Ab5	マウス			×
111.6/Ab10	マウス			×
528/Ab-1	マウス			×
225/Ab-2	マウス			×

【0248】

[実施例4]

EGFR活性化阻害

抗体が媒介する、EGFR受容体へのEGFリガンド結合の遮断の、競合ELISAによる決定

試験した抗EGFR抗体がEGFR受容体に結合し、それと同時に、ビオチン化EGFリガンドの結合をブロックすることを確認するために、ELISAウェルを、濃度がPBS中、0.5 $\mu\text{g/ml}$ で

ある、80 μ l/ウェルの全長EGFRを使って、4 で終夜コーティングした。翌朝、ウェルをPBS-Tで2回洗浄し、150 μ lのPBS-T-1% BSAを使って室温で1時間ブロッキングした後、PBS-T中で2回洗浄した。次に、80 μ lの段階希釈した抗EGFR抗体および対照抗体をウェルに加え、室温で30分間インキュベートした。抗体インキュベーション後に、20 μ Lのビオチン化EGFリガンドを、0.5 μ g/mlの濃度で、抗EGFR抗体希釈液を含有する全てのウェルまたはPBS-T 1%BSAだけを含有するウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。次に、ウェルをPBS-Tで5回洗浄した後、ブロッキング緩衝液で1:1000に希釈した100 μ l/ウェルのストレプトアビジン-HRP二次試薬と共に、室温で30分間インキュベートした。最後に、ウェルをPBS-Tで5回洗浄し、100 μ L/ウェルのTMB基質を添加することによってプレートを発色させ、60分間インキュベートした。インキュベーション後に、100 μ l/ウェルの1M H_2SO_4 を添加することによって反応を停止し、プレートをOD450nmで読み取った。

10

【0249】

ELISA試薬：

- 1) コーティング緩衝液：1×PBS ; Gibcoカタログ:20012-019
- 2) 抗原：A431細胞から精製された野生型全長EGFR ; Sigma E2645
- 3) ELISAプレート：NUNC Maxisorp ; カタログ：442404
- 4) ブロッキング/希釈緩衝液：PBS-T中の1%BSA (PBS-T-1%BSA)
- 5) 洗浄緩衝液：1×PBS/0.05%Tween 20 (PBS-T)
- 6) 陽性対照：Erbix、Vectibix
- 7) 陰性対照：Synagis (Medimmune Inc、パリビズマブ、カタログ番号NDC60574-4111-1)
- 8) ビオチン化EGFリガンド ; Invitrogen、カタログE3477
- 9) ストレプトアビジン-HRP、超高感度 (ultra sensitive) : Sigma S2438
- 10) TMB Plus ; KemEnTec、カタログ番号4390L
- 11) 1M H_2SO_4

20

【0250】

ELISA競合アッセイを使って、ELISAウェルにコーティングされた全長EGFR受容体へのビオチン化EGFリガンドの結合を阻害する抗EGFR抗体の能力をランク付けした。図12に示すように、ErbixとVectibixはどちらもEGFリガンド結合を極めて強力にブロックするようだったが、EGFRに対する抗体でない陰性対照抗体Synagisは、EGFリガンド結合を阻害しなかった。図12Aに示すように、ドメインIIIに対する抗体であって非オーバーラップエピトープを認識する3つの抗体992、1030および1042を、単独で、または等モル混合物として、EGFリガンド結合を阻害するそれらの能力について試験した。試験した3つの抗体のうち、mAb1030だけが、ErbixおよびVectibixと比較して、中等度のEGFリガンド阻害活性を示した。mAb992、1030および1042の等モル混合物は、試験した単一抗体のみより効率よく、EGFリガンド結合を阻害するようだった。等モル混合物は、合計1 μ g/mlのIgG濃度では、mAb1030よりも約2倍効率よく、また、単独で試験したmAb992および1042よりも4倍効率よく、EGFリガンド結合を阻害することが明らかになり非オーバーラップエピトープを認識する3つのドメインIII抗体を混合することの相乗効果が示された。図12Bに示すように、抗EGFRクローン1208、1260、1277および1320も、このアッセイで試験した。これらの4つのクローンは、Erbix対照と比較して、クローン992、1030および1042で観察されたものよりも効率よく、EGFリガンド結合を用量依存的に阻害することができた。0.33 μ g/mlを上回る濃度において、抗EGFRクローン1208、1260、1277および1320は、同じ濃度で試験したErbixとちょうど同じくらい効率よくEGFリガンド結合を阻害するようだった。

30

40

【0251】

NH5細胞におけるEGF誘導性EGFRリン酸化を阻害する能力

抗EGFR抗体を、インセル・ウェスタン分析で、EGFRリン酸化に関する反応性について試験した。インセル・ウェスタン法では、同じ試料からEGFRとリン酸化EGFR (pEGFR)を検出することができ、その結果として、EGFRとpEGFRの発現比を、各抗体処理およびデータセットについて比較することが可能になる。10%FCSおよびペニシリン/ストレプトマイシン (pen/strep) を補足したDMEMで、ATCCによって提供された説明書に従って、HN5細胞を

50

培養した。飢餓の24時間前に、43,000個のHN5細胞をNunc製96穴プレート（カタログ番号167008）に播種した。抗体を添加する16時間前に、細胞をDMEM中で飢餓状態にした。抗体を、200 μ lのDMEM中、最終濃度が10 μ g/mlになるように加え、その混合物を少なくとも5回はピペットに出し入れすることによって混合した。抗体処理の30分後にEGFを50 μ g/mlの濃度で適当なウェルに加え、7.5分間放置した。インセル・ウェスタン、基本的には、インセル・ウェスタンキット（Odyssey、LI-COR Biosciences）の製造者によって提供された説明書に従って行った。

【0252】

EGF刺激後に、細胞を、3.7%ホルムアルデヒド（Sigma F-8775、ロット71K500、約1%のメタノールを含有）中で、20分間固定した。LI-CORブロッキング緩衝液（927-40000）でのブロッキングに先だって細胞膜の透過性を上げるために、PBS-Triton X-100（0.1%）で5分間の洗浄を5回行った。一次抗体を、提供された説明書に対応する濃度で加え、穏やかに振とうしながら室温で2.5時間インキュベートした（全EGFR、マウス、1:500希釈液、Biosource Internationalカタログ番号AHR5062、およびホスホEGFR Tyr1173、ウサギ、1:100希釈液、Biosource、カタログ番号44-794G）。

【0253】

一次抗体と共にインキュベートした後、細胞をPBS-T（0.1%Tween 20）中で5回、各5分間洗浄してから、二次抗体（ヤギ抗ウサギ、IRDye680、1:200希釈液、LI-CORカタログ番号926-32221、およびヤギ抗マウス、IRDye800CW、1:800希釈液、LI-CORカタログ番号926-32210）を加え、アルミホイルで覆ったプレートを穏やかに振とうしながら、室温で1時間インキュベートした。

【0254】

Tecan蛍光リーダーでの測定に先だって、プレートをPBS-T中で5回、各5分間洗浄した。どの洗浄でも、最後に、開口面を下にしてプレートを振ってその手を急に止めることで洗浄液を切り、次にそのプレートをペーパータオルに軽く打ちつけた。（ELISAプレートの処理と同じく、重要な事は、この処理中に細胞がプレート上に残っているという点、および細胞単層の完全性を乱すであろう吸引ではなくこの操作によって、洗浄液を除去することができるという点である）。最後の洗浄で残った残留洗浄液は、マルチチャンネルピペットを使って、ウェルの側面から穏やかな吸引によって除去した。蛍光シグナルを680nmチャンネル（励起675nmおよび蛍光705nm、バンド幅はどちらも10nm）および800nmチャンネル（励起762nmおよび蛍光798nm、バンド幅はどちらも10nm）について測定した。

【0255】

インセル・ウェスタン分析を用いることにより、3つの抗体（1208、1277および1320抗体）が、HN5細胞のpEGFR状態に有意に（ $p < 0.05$ ）影響を及ぼしていることが明白になる（図13）。

【0256】

抗EGFR抗体の抗EGFR混合物（992、1030および1042）およびそこに含まれる個々の抗体を、EGF誘導性EGFRリン酸化の阻害のインセル・ウェスタン分析における効果について調べた。図14に見られるように、992および1030ならびに抗EGFR抗体混合物は、EGF誘導性EGFRリン酸化を有意に阻害した（ $p < 0.05$ ）。

【0257】

[実施例5]

A431NS細胞におけるEGF受容体のインターナリゼーション

A431NS細胞（ATCC番号CRL-2592）を、80~90%コンフルエントのT175培養フラスコから、TrypLEを使ってトリプシン処理した。剥離した細胞をPBS中で洗浄し、血清を含まないID MEMに懸濁した。細胞を1~2mlのポーション（portion）に分割し、試験する抗体と共に氷上で30分間インキュベートした。抗体濃度は10 μ g/mlとした。細胞をDMEM中で3回洗浄し（250g、4分、4回）、1.8mlのDMEMに再懸濁した。各ポーションを、細胞懸濁液が300 μ lずつ入っている6本のFACSチューブに分割した。各ポーションのチューブのうち、3本は37℃の水槽に正確に40分間入れておき、残りの3本は直ちに氷上に置く。インキュベーション

ン後に、細胞を（250g、4分、4 ）で2回洗浄し、ペレットを、DMEM中のウサギ抗ヒトIgG Fc F(ab')₂-FITC 100 μlに再溶解する。細胞を4 で30分間インキュベートしてから、4 のDMEM中で3回洗浄し、FACSCaliburで分析する。

【0258】

結果を図15に示す。ErbixおよびVectibixとのインキュベーションは、約30%という等価なレベルの受容体インターナリゼーションを示し、初期表面染色の70%が残った。992のみとインキュベートすると、約45%の受容体ダウンレギュレーションが起こる。非オーバーラップエピトープを持つさらに2つの抗体を含有する抗体混合物と共にインキュベートすると、受容体ダウンレギュレーションの増加が起こる：992 + 1024、74%；992 + 1024 + 1030、83%。抗体をさらに追加しても、受容体インターナリゼーションのさらなる増加は起こらなかった。したがって、A431細胞におけるインターナリゼーションのレベルを最大にするには、少なくとも3つの抗体が要求されるようである。

【0259】

[実施例6]

増殖アッセイ

細胞の損傷は、代謝細胞機能と増殖とを維持し、そのためのエネルギーを供給するという細胞の能力の喪失を、不可避免的にもたらす。代謝活性アッセイはこの前提に基づいている。通常、代謝活性アッセイは、ミトコンドリア活性を測定する。細胞増殖試薬WST-1（Rocheカタログ番号11 644 807 001）は、生細胞の代謝活性を測定する調製済の基質である。そして、代謝活性は生細胞の数と相関すると仮定する。この実施例では、WST-1アッセイを使って、異なる濃度の異なる抗体で処理した後の、代謝的に活性な細胞の数を測定した。

【0260】

WST-1アッセイを行う前に、適当な抗体および抗体混合物を、0.5%のFBSおよび1%P/Sを補足したDMEMで、20 μg/mlの最終総抗体濃度に希釈して、最も高い抗体濃度を持つウェルの最終抗体濃度が10 μg/mlになるようにした。次に、これらの溶液のうち、150 μlを、96穴プレートの列（column）2のウェルに加え、3倍段階希釈を、各ウェルが100 μlの抗体溶液を含有することになるように、列9まで行った。列11には100 μlの培地を加えた。実験ウェルにおける培地蒸発の影響を低減するために、行（Row）1および8ならびに列1および12には200 μlの培地を加えた。

【0261】

次に、A431-NS細胞を1×PBSで洗浄し、3mlのトリプシン溶液を使ったトリプシン処理によって剥離する。次に、17mlの完全培地を加え、細胞を300×g（1200rcf）で5分間遠沈する。上清を取り除き、細胞をDMEM + 0.5%FBSに再懸濁する。細胞を計数し、その濃度を15,000細胞/mlに調節する。次に、100 μlの細胞懸濁液（1500細胞/ウェル）を、列2～11の実験ウェルに加える。プレートを、湿潤培養器中、37 で、4日間インキュベートする。次に、1ウェルにつき20 μlのWST-1試薬を加え、プレートを37 で1時間インキュベートする。次に、プレートをオービタルプレートシェーカーに移し、さらに1時間放置する。ELISAリーダーで450nmと620nm（参照波長）における吸光度を測定する。代謝的に活性な細胞（MAC）の量は、次式のとおり、無処理対照のパーセントとして算出される：

【数2】

$$\%MAC = \left(\frac{(OD_{exp.} - OD_{media})}{(OD_{untreat.} - OD_{media})} \right) \times 100$$

【0262】

EGF滴定試験のために、リガンドをDMEM + 0.5%FBSで20nM/mlの濃度に希釈して、最も高いEGF濃度を持つウェルの最終濃度が10nM/mlになるようにした。次に、この溶液のうち、150 μlを、96穴プレートの列2のウェルに加え、3倍段階希釈を、各ウェルが100 μlのEGF溶液を含有することになるように、列9まで行った。列11には100 μlの培地を加えた。実

験ウェルにおける培地蒸発の影響を低減するために、行 (Row) 1 および 8 ならびに列 1 および 12 には 200 μ l の培地を加えた。適当な抗体および抗体混合物を 0.5% の FBS および 1% P/S を補足した DMEM で、40 μ g/ml の最終総抗体濃度に希釈して、ウェル中の最終抗体濃度が 10 μ g/ml になるようにした。次に、これらの溶液のうち、50 μ l を、96 穴プレートの列 2 ~ 9 のウェルに加えた。

【 0 2 6 3 】

次に、A431-NS 細胞を 1 \times PBS で洗浄し、3ml のトリプシン溶液を使ったトリプシン処理によって剥離する。次に、17ml の完全培地を加え、細胞を 300 \times g (1200rcf) で 5 分間遠沈する。上清を取り除き、細胞を DMEM + 0.5% FBS に再懸濁する。細胞を計数し、その濃度を 40,000 細胞/ml に調節する。次に、50 μ l の細胞懸濁液 (2000 細胞/ウェル) を、列 2 ~ 11 の実験ウェルに加える。プレートを、湿潤培養器中、37 $^{\circ}$ C で、4 日間インキュベートする。次に、1 ウェルにつき 20 μ l の WST-1 試薬を加え、プレートを 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートする。次に、プレートをオービタルプレートシェーカーに移し、さらに 1 時間放置する。ELISA リーダーで 450nm と 620nm (参照波長) における吸光度を測定する。代謝的に活性な細胞 (MAC) の量は、620nm の参照波長における吸光度を差し引いた 450nm における吸光度によって示される。

10

【 0 2 6 4 】

代謝的に活性な細胞 (MAC) の量は、次式のとおり、無処理対照のパーセントとして算出される：

【 数 3 】

20

$$\%MAC = \left(\frac{(OD_{exp.} - OD_{media})}{(OD_{untreat.} - OD_{media})} \right) \times 100$$

【 0 2 6 5 】

結果

ドメイン III 内に非オーバーラップエピトープを持つ 3 つの抗 EGFR 抗体の混合物が、単独の抗体よりも優れていることを示すために、A431-NS 成長の阻害を調べる実験を行った。図 16A に見られるように、これらの抗体は単独では、A431-NS 成長の弱い阻害剤であるが、組み合わせると、431-NS 成長に対する相乗的阻害効果が得られる。992 と 1042 または 1030 との混合物も極めて強力であるが、3 つ全ての混合物は、全ての抗体濃度範囲にわたって、これらよりも優れている。

30

【 0 2 6 6 】

個々の抗体および抗体混合物が、さまざまな濃度の EGF で刺激された A431-NS 細胞の成長に及ぼす効果を調べた。その結果を図 17 に示す。図 17 に見られるように、0.1nM を上回る EGF 濃度は、抗体の非存在下では、細胞にとって毒性である。しかし、EGFR のドメイン III 内に非オーバーラップエピトープを持つ 3 つの抗体の混合物 (992、1030 および 1042) は、少なくとも 0.3nM までの EGF を試験した場合には、相乗的に作用して、EGF 存在下での A431-NS 細胞の成長を阻害することは明白であり、この混合物はどのモノクローナル抗体よりも優れている。

40

【 0 2 6 7 】

次に、本発明者らは、EGFR のドメイン III 内に非オーバーラップエピトープを持つ 2 つの抗体を、EGFR のドメイン I または II のどちらか一方にエピトープを持つ抗体と組み合わせることによっても、A431-NS 成長に対する相乗的阻害効果を得ることができることを実証する。図 18 に見られるように、抗体 992 および 1024 (これらはどちらも EGFR のドメイン III である) と、EGFR のドメイン I (1284) またはドメイン I/II (1434) と反応する抗体のどちらか一方との組合せは、EGFR のドメイン III 内に非オーバーラップエピトープを持つ 3 つの抗体 (992 + 1024 + 1030) と同じくらい強力である。さらにまた、これらの抗体混合物は、治療用抗 EGFR 抗体である Erbitux および Vectibix よりも強力に、A431-NS の成長を阻害する。

50

【0268】

他にも2つのがん細胞株DU145 (ATCC番号HTB-81) およびMDA-MB-468 (ATCC番号HTB-132) を使って、同様のアッセイを行った。これらの増殖アッセイで得られた結果を図16Bおよび16Cに示す。どちらの場合も、3つの抗体 (992、1030および1042) の混合物は、2つの抗体の混合物および単一の抗体よりも優れていた。DU145細胞では全ての濃度で、またMDA-MB-468では高濃度において、3つの抗体の混合物がVectibixより優れていた。

【0269】

上述の方法と同様の方法を使って、本発明者らは、3つの抗EGFR抗体の異なる組合せを試験した。

【0270】

結果

3つの抗体の異なる組合せの効果をA431NS細胞株で調べた。これらのうち、最も強力だった20の成長阻害活性を図37に示す。全ての組合せが、A431NS細胞の増殖を、無処理対照と比較して60%以上阻害した。もう一つの興味深い知見は、組合せ (992 + 1024 + 1254 および 992 + 1024 + 1320 および 992 + 1277 + 1320) を除いて、これらの組合せは、非オーバーラップエピトープを持つ抗体を含有するということである。これは、別個のエピトープに結合する3つの抗体の組合せをいくつか設計することが可能であることを示している。

【0271】

[実施例7]

アポトーシス

アポトーシスは細胞の死をもたらす生物学的機序である。この機序は、Erbixなどの抗EGFR抗体を使って、以前に報告されている (Baselga J. 「The EGFR as a target for a anticancer therapy - focus on cetuximab」 Eur J Cancer. 2001 Sep;37, Suppl 4:S16-22)。そこで、個々の抗EGFR抗体992、1042、および1030、ならびにその混合物 (992 + 1042 + 1030) がアポトーシスをどの程度誘導できるか調べた。

【0272】

1×10^4 個のA431NS細胞を、96穴培養プレートにおける3連測定で、 $0.01 \mu\text{g/ml} \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の範囲の濃度のEGFR混合物 (同じ割合の992、1030、1042)、992、1030、1042、ErbixまたはVectibixの存在下に、0.5%のFBSと抗生物質とを補足したDMEM中でインキュベートした。細胞と抗体を22時間インキュベートした。次に上清を収集し、RocheのELISAキット (カタログ番号11774425001) (スイス・バーゼル) で、ヒストン-DNA複合体の存在について測定した。

【0273】

A431NS細胞を使って、混合物の効果を、単独のモノクローナル抗体ならびにリファレンス抗体VectibixおよびErbixのそれぞれと比較した (結果は図19)。抗体は10倍希釈系列で試験した。 $1 \mu\text{g/ml}$ および $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で試験した場合、混合物は、個々のモノクローナル抗体ならびにVectibixよりも有意に ($P < 0.05$) 効率が良かった。混合物は、 $1 \mu\text{g/ml}$ で、Erbixと比較して統計的に有意に ($p < 0.05$)、アポトーシスを増加させた。

【0274】

[実施例7b]

実施例7に加えて、992 + 1024の混合物ならびに992 + 1024 + 1030の混合物を、実施例7で述べた方法と同じ方法により、アポトーシス活性について調べた (図35)。実際のアポトーシスレベルを、最大陽性対照に関連づけた。A431NS細胞を使用し、 $1 \mu\text{g/ml}$ で、2つの混合物の両方を、Erbixおよび個々のモノクローナル抗体992、1024および1030ならびに対照抗体と比較した。992 + 1024の混合物は、Erbixおよび個々のモノクローナル抗体よりも、有意に良かった (いずれも $P < 0.05$)。

【0275】

[実施例8]

インビボ効力

抗体992、1030および1042からなる抗EGFR混合物を、A431NS細胞を使ったヌードマウス

10

20

30

40

50

異種移植モデルで、インビボ効力について調べた。これは、抗EGFR抗体を含むモノクローナル抗がん抗体の力価 (potency) を調べるために広く使用されているモデルである。ヌードマウスは免疫機能が損なわれており、T細胞を欠く。それが、このマウスにおけるヒト細胞の成長を可能にする。

【 0 2 7 6 】

2群のヌードマウス (6~8週齢) に、 1×10^6 個のA431NS細胞を皮下注射した。平均腫瘍サイズが 100mm^3 に達した時に処置を開始した。マウスには、2~3日の間隔で、1mgの抗体を腹腔内に5回注射した。デジタルキャリパーを使って腫瘍サイズを2つの直径で測定し、式：腫瘍体積 (mm^3) = $L \times W^2 \times 0.5$ [式中、Lは最大直径であり、Wは最小直径である] を使って体積を算出した (Teicher BA「Tumor Models in Cancer Research」Humana Press、米国ニュージャージー州、2002、596頁)。実験の終わりまでに、腫瘍を切除し、重量を測定した。

【 0 2 7 7 】

Synagisを対照抗体として使用した。実験には、抗EGFR混合物 (抗体992、1030、および1024) の場合と同じスケジュールを使って、同じ量のErbixutおよびVectibixによる処置も含めた。

【 0 2 7 8 】

図20に見られるように、992、1030および1042の混合物は、A431NSの腫瘍成長を有意に阻害した ($P < 0.05$)。平均重量を図21に示す。その結果は、測定された腫瘍サイズと関連した。処置群と対照群の間には有意差がある。

【 0 2 7 9 】

[実施例8b]

インビボ効力

実施例8で説明したインビボ実験に加えて、992 + 1024および992 + 1024 + 1030の混合物を、上述のA431NS異種移植モデルで調べた (図36)。それぞれ9匹のヌードマウス (6~8週齢) からなる4つの群に、 1×10^6 個のA431NS細胞を皮下注射した。平均腫瘍サイズが 100mm^3 に達した時に、マウスに最初の抗体注射を施した。3つの群には、992 + 1024の混合物、992 + 1024 + 1030の混合物、Erbixutまたは対照抗体Synagisのいずれかを投与した。週に4回、0.5mgの注射を全部で17回、マウスに施した。最初の注射は8日目に行い、最後の注射は34日目に行った。腫瘍サイズを56日間測定した。抗体処置の終了後に、Erbixutを投与されたマウスの腫瘍がサイズの拡大を開始したのに対し、992 + 1024の混合物または992 + 1024 + 1030の混合物のどちらか一方を投与した2つの群のマウスでは、腫瘍のサイズが減少し続けた。992 + 1024群では91日目 (処置の終了から57日後) に、腫瘍サイズの拡大は観察されなかった。992 + 1024の組合せでは、平均腫瘍サイズが、56日目の時点で、Erbixutを投与したマウスでの平均腫瘍サイズより、有意に小さかった ($P < 0.01$)。

【 0 2 8 0 】

この実験におけるマウスの生存も監視した。マウスは、腫瘍が最大許容サイズに達した時に死亡したと記録した。次の表は、腫瘍細胞の接種から56日後の生存マウス数を示す。どちらの組合せでも、Erbixutと比較して、改善された生存が見られる。

【 表 6 - 2 】

群	992 + 1024	992 + 1024 + 1030	Erbixut	対照 Ab
マウスの初期数	9	9	9	9
56日目に残っているマウス	9	9	2	0

【 0 2 8 1 】

追加実験

実施例8に記載の異種移植片実験で得られる腫瘍溶解物に関する予備データは、992 + 1042 + 1030の組合せが、A431NSによるVEGF (これは血管新生の重要な媒介物質である) 産生

の強力なダウンレギュレーションを誘導することを示している。血管形成の増加は、多くの固形腫瘍に見られる現象であり、これは、栄養素の持続的供給などに関与することによって、生存条件に影響を及ぼす機序である。

【0282】

さらにまた、別の予備データは、実施例8で述べた異種移植片実験で得られる腫瘍溶解物には、ErbixおよびVectibixと比較して、増加したレベルの992 + 1042 + 1030の抗体組合せが観察されうること示している。

【0283】

[実施例8c]

強化されたインビボ腫瘍細胞分化

細胞の最終分化は、細胞タイプ特異的な遺伝子発現プログラムの活性化を含む複雑なプロセスであり、多段階のプロセスでその増殖能の不可逆的喪失をもたらす。悪性疾患では、がんがしばしば、増加した増殖速度を特徴とする脱分化状態にあり、がん細胞の最終分化を誘導する能力を持つ薬物は、悪性細胞を除去し、正常な細胞ホメオスタシスを再樹立することができるだろうと提案されている (Pierce GB, Speers WC 「Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation」 Cancer Res 48:1996-2004, 1988)。一定の実験条件下では、抗EGFRモノクローナル抗体が、免疫不全マウスにおいて異種移植片腫瘍として成長したヒト扁平上皮がん細胞の最終分化の速度を増加させることができると、以前に報告されている (Milas L, Mason K, Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J, Fan Z 「In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody」 Clin Cancer Res 6:701-8, 2000; Modjtahedi H, Eccles S, Sandle J, Box G, Titley J, Dean C 「Differentiation or immune destruction: two pathways for therapy of squamous cell carcinomas with antibodies to the epidermal growth factor receptor」 Cancer Res 54:1695-701, 1994)。

【0284】

本発明者らは、マウスで異種移植片として成長した抗EGFR処置A431NS細胞における最終分化の程度を、組織学的に調べた。組織学的試験には、実施例8で述べた実験における4つの実験群のそれぞれから得た、3つのランダムに選択されたマウス異種移植片腫瘍を含めた。

【0285】

組織を切離し、急速凍結し、クライオミクロトーム (Leitz、モデル1720) にTissue-Tekを使ってマウントし、5µm切片に切断し、Superfrost Plusスライド上にサンプリングした後、ヘマトキシリン/エオシン染色用に加工した。次に、2人の独立した観察者が全ての組織切片の顕微鏡検査を盲検的に行い、最終分化の程度の尺度として角化領域 (「ケラチン真珠」) をスコアリングした (Modjtahediら、1994)。得られた結果を表7に列挙する。3つの抗EGFR抗体の混合物で処置されたマウス (992 + 1024 + 1030、第1群) は、リファレンス抗体ErbixおよびVectibixで処置されたマウス (それぞれ第2群および第3群) と比較して、著しく大きく、しかも数の多い、最終分化したがん細胞の増殖巣を持っていた。抗体の代わりにPBSを投与した対照群 (第4群) では、最終分化は検出されなかった。

【0286】

デジタルカメラを装着した顕微鏡を使って代表的な顕微鏡像を取得した。図26参照。

【0287】

結論として、ドメインIII内に非オーバーラップエピトープを持つ3つの抗EGFR抗体 (クローン992、1030および1042) の組合せは、インビボの腫瘍細胞に対して、ErbixおよびVectibixモノクローナル抗体と比較すると予想外に強化された分化誘導効果を示した。最終分化に対する観察された効果から、本発明の抗体組成物は、例えばレチノイン酸、4-フェニルブチレートなどの他の分化誘導剤と共に、併用療法に使用することができるという結論が導かれる。

[表7]

10

20

30

40

50

【表 7】

群	腫瘍数	ケラチン真珠の数のスコアリング	コメント
1	16	++++	大きいケラチン真珠
1	17	+++	大きいケラチン真珠
1	54	++++	大きいケラチン真珠
2	14	++	小さいケラチン真珠
2	45	++	小さいケラチン真珠
2	49	++	小さいケラチン真珠
3	11	++	小さいケラチン真珠
3	34	++	小さいケラチン真珠
3	56	++	小さいケラチン真珠
4	43	—	
4	60	—	
4	31	—	

10

【 0 2 8 8 】

[実施例8d]

本発明の抗体組成物の持続的成長阻害効果

20

992 + 1024抗体混合物のインビボ効力を調べるために、実施例8および8bで述べた腫瘍異種移植片実験を繰り返した。簡単に述べると、BALB/c nu/nuマウスの脇腹に 10^6 個のA431NS細胞を皮下注射した。腫瘍異種移植片を平均サイズが 100mm^3 になるまで（7日目）成長させ、その時点でマウスを、各9匹からなる5つの群にランダムに割り当てて、抗体処置を開始した。これら5つの群には、高用量（2mg/週）または低用量（1mg/週）の992 + 1024混合物もしくはリファレンス抗体Erbix、または高用量（2mg/週）の対照抗体Synagisを与えた。全てのマウスに、週に2回、0.5または1mgの抗体を、7日目に開始して33日目に終わるまで、合計9回注射した。

【 0 2 8 9 】

高用量（2mg/週）の992 + 1024混合物は、Erbixと比較して、初期腫瘍成長を制御し長期腫瘍退縮を誘導する効率が非常に高かった（ $P = 0.0002$ 、図38）。2mg/週の992 + 1024混合物を投与された動物には試験期間中に終了したものがなく（実験開始後118日間、図38および39）、これは、60日目に9匹中1匹しか残っていなかった高用量Erbix 2mg/週群よりも、有意に良好な結果だった（ $P = 0.0008$ 、図39）。これは、長期生存に関する992 + 1024処置の持続的効果を示している。高用量の場合ほど効率は良くないが、低用量992 + 1024混合物（1mg/週）も腫瘍成長を制御することができ、腫瘍抑制（ $P = 0.0135$ 、図38）と生存率（ $P = 0.0087$ 、図39）の両面で、高用量2mg/週Erbixよりも有意に良好だった。これらの結果は、低い投薬量でさえ、992 + 1024の組合せの効力が、Erbixと比較して優れていることを実証している。これらの結果は、992 + 1024の組合せによって引き起こされる成長阻害が、承認されたモノクローナル抗体より持続的であることも実証している。

30

40

【 0 2 9 0 】

[実施例9]

スフェロイド成長

スフェロイド試験のために、丸底96穴プレートに、 $35\mu\text{l}$ の120mg/mlポリHEMA溶液を加え、フローフード（flow-hood）内に放置して終夜蒸発させる。ポリHEMAは細胞の付着を防止する。A431-NS細胞を上述のように処理し、計数し、その濃度を100,000細胞/mlに調節する。次に、 $50\mu\text{l}$ の細胞懸濁液（5,000細胞/ウェル）を、 $50\mu\text{l}$ の5%マトリゲル溶液と一緒に、列2～11の実験ウェルに加える。実験ウェルにおける培地蒸発の影響を低減するために、行1および8ならびに列1および12には $200\mu\text{l}$ の培地を加えた。プレートを $300\times g$ で5分間遠心分離し、湿潤培養器中、 37°C で終夜放置して形成させる。翌日、適当な抗体

50

および抗体混合物を、空の96穴プレートで、最終総抗体濃度が20 µg/mlになるように希釈した。これを、0.5%のFBSおよび1%P/Sを補足したDMEMで行って、最も高い抗体濃度を持つウェルにおける最終抗体濃度が10 µg/mlになるようにする。次に、これらの溶液のうち、150 µlを、96穴プレートの列2のウェルに加え、3倍段階希釈を、各ウェルが100 µlの抗体溶液を含有することになるように、列9まで行った。列11には100 µlの培地を加えた。次に、これらの溶液のうち、100 µlを、スフェロイドを含有するプレートに移し、7日間にわたってインキュベートしておく。次に、1ウェルにつき20 µlのWST-1試薬を加え、そのプレートを37 °Cで1時間インキュベートする。次に、プレートをオービタルプレートシェーカーに移し、さらに1時間放置する。ELISAリーダーで450nmと620nm（参照波長）における吸光度を測定する。代謝的に活性な細胞（MAC）の量は、次式のとおり、無処理対照のパーセントとして算出される：

【数 4】

$$\%MAC = \left(\frac{(OD_{exp.} - OD_{media})}{(OD_{untreat.} - OD_{media})} \right) \times 100$$

【 0 2 9 1 】

ドメインIII内に非オーバーラップエピトープを持つ3つの抗体の混合物（992 + 1030 + 1042）は、A431-NSスフェロイドの成長を効果的に阻害し、治療用モノクローナル抗EGFR抗体ErbbituxおよびVectibixよりも強力である（図22）。

【 0 2 9 2 】

[実施例10]

カニクイザルEGFR ECDへの結合

カニクイザルEGFR細胞外ドメインのクローニング

シグナルペプチドを除くカニクイザルEGFRの細胞外ドメインを、表皮から単離されたカニクイザルcDNAから、ネステッドPCRと、全長ヒトEGFRの公表された配列（GENBANK X00588、Ullrich, A.ら Nature 309(5967), 418-425 (1984)）から導き出された配列特異的プライマーとを使ってクローニングした。

【 0 2 9 3 】

PCR試薬：

正常皮膚表皮から単離されたカニクイザルcDNA：CytoMol Unimed、カタログ番号ccy34218、ロット番号A711054。

Phusion反応緩衝液（5×）：Finnzymes、カタログ番号F-518、ロット番号11。

Phusion酵素：Finnzymes、F-530S（2U/ µL）。

dNTP 25mM：Bioline、カタログ番号BIO-39029、ロット番号DM-103F。

シグナル配列の一部と膜貫通ドメインの一部とを含むカニクイザルEGFR ECDを増幅するためのプライマー：

5'ATGプライマー：5'-TCTTCGGAAGCAGCTATGC-3'（配列番号135）

3'Tm2プライマー：5'-TTCTCCACTGGCGTAAGAG-3'（配列番号136）

カニクイザルEGFR ECD Bp1～1863を増幅し、XbaI制限部位およびMluI制限部位を組み込むと共に、膜貫通ドメインの前に停止コドンを組み込む、ネステッドPCR用のプライマー：

5'EGFR XbaI：5'-ATCTGCATTCTAGACTGGAGGAAAGAAAGTTTGCCAAGGC-3'（配列番号137）

3'EGFR MluI：5'-TACTCGATGACGCGTTTAGGATGGGATCTTAGGCCCGTTCC-3'（配列番号138）

【 0 2 9 4 】

PCR条件：

30サイクル：融解98 °C/30秒、アニーリング55 °C/30秒、伸長72 °C/60秒。30サイクル後にPCR産物をさらに5分間伸長させる。

【 0 2 9 5 】

PCR反応は1 µlのテンプレートと2単位のPhusion酵素を使って、0.2mM dNTPおよび0.5 µMプライマーを含有する総体積50 µLの反応緩衝液中で行った。

【 0 2 9 6 】

約1800～1900Bpの見掛けの長さを持つ最終PCRバンドを得て、それを発現ベクターにクローニングした。クローニングされたカニクイザルEGFRの細胞外ドメインのDNA配列およびタンパク質配列を、図23に示し、ヒトEGFR ECDと整列させたカニクイザルEGFR ECDのタンパク質配列を図24に示す。ヒトEGFR ECDとカニクイザルEGFR ECDのDNA配列のアラインメントは97.6%の配列同一性を示し、一方、対応するタンパク質配列は98.6%の配列同一性を示した。

【 0 2 9 7 】

ELISAにおけるヒトEGFRとカニクイザルEGFRの細胞ドメイン間の抗体交差反応性の実証

試験した抗EGFR抗体がヒトとカニクイザルのEGFR ECDに同じように良く結合し、したがってカニクイザルにおける毒性試験が正当化されることを確かめるために、1 $\mu\text{g/ml}$ から始まる抗体の段階4倍希釈液を、組換えヒトおよびカニクイザルEGFR ECDタンパク質への結合に関して、ELISAで試験した。このアッセイにおいて同じ結合プロファイルを示す抗体は、良好な種EGFR交差反応性のしるしであると解釈した。ELISAウェルを、PBS中1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度を持つ50 μl /ウェルの全長EGFRを使って、4 で終夜コーティングした。翌朝、ウェルをPBS-Tで2回洗浄し、100 μl のPBS-T-1%BSAを使って室温で1時間ブロッキングした後、PBS-Tで2回洗浄した。次に、段階希釈した抗EGFR抗体および対照抗体を50 μl ずつウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。抗体インキュベーション後に、ウェルをPBS-Tで5回洗浄し、次に、ブロッキング緩衝液で1：3000に希釈した50 μl /ウェルのストレプトアビジン-HRP二次試薬と共に、室温で30分間インキュベートした。最後にウェルをPBS-Tで5回洗浄し、50 μl /ウェルのTMB基質を添加することによってプレートを発色させ、室温でインキュベートした。インキュベーション後に、100 μl /ウェルの1M H_2SO_4 を添加することによって反応を停止し、プレートをOD450nmで読み取った。

【 0 2 9 8 】

ELISA試薬：

1. ELISAプレート；NUNC Maxisorp；カタログ：442404
2. 抗原：ヒトrEGFR ECD；カニクイザルrEGFR ECD
3. コーティング緩衝液：1 \times PBS；Gibcoカタログ：20012-019
4. 洗浄緩衝液：1 \times PBS/0.05% Tween 20 (PBS-T)
5. ブロッキング/希釈緩衝液：PBS-T中、1%BSA
6. ヤギ抗ヒトIgG HRPコンジュゲート：Serotec、Star 106P
7. TMB Plus (KemEnTecカタログ番号4390L)
8. (1M H_2SO_4)。

【 0 2 9 9 】

図25に示すように、上記のELISAアッセイは、交差反応性のヒトおよびカニクイザル抗EGFR ECD 抗体 (図25A) と、マウス免疫化に使用したヒトEGFR ECDだけを認識する種特異的な抗体 (図25B) とを識別することができた。

【 0 3 0 0 】

[実施例11]

運動性の阻害

がん死の大半は、腫瘍細胞の播種と、それに続く遠隔部位における成長に由来する。隣接する正常組織の局所的浸潤は恒常性維持機能を損ない、腫瘍の外科的または放射線学的切除を妨げる。最近の研究では、誘導された運動性がこの拡散の促進において果たす中心的役割に光が当てられている。EGFRは細胞の運動性と拡散を助長することが知られており、したがって、EGFRが媒介する運動性の阻害は、EGFRをターゲットとする薬物の重要な機序である。

【 0 3 0 1 】

2つの抗体992および1024の混合物が頭頸部癌細胞株の運動性に及ぼす効果を調べた。10,000個の細胞からなるスフェロイドを実施例9で述べたように一晩で調製した。次にそのスフェロイドをNUNC T25細胞培養フラスコに移して、一晩、付着させた。次に、10 $\mu\text{g/ml}$

の抗体混合物992 + 1024または陰性対照抗体を加え、スフェロイドをさらに24時間インキュベートした。次に、倍率40倍で撮像し、細胞に覆われた面積をソフトウェアImage Jを使って測定した。

【0302】

結果：図27Aに見られるように、EGFR特異的抗体992および1024の添加は、腫瘍細胞によって覆われる面積の有意な減少をもたらす。図27Bでは運動性が定量化されているが、これは、陰性対照抗体と比較して運動性が約60%減少することを示している。この運動性の減少は著しく有意 ($p < 0.01$) である。

【0303】

このように、抗体992および1024の組合せは、EGFRが媒介する腫瘍細胞運動性を強力に阻害する。これは、抗EGFR抗体の組合せを播種性疾患の処置に使用できることを示している。

【0304】

[実施例12]

Sym004抗体組成物によるインボルクリンのアップレギュレーション

インボルクリンは初期扁平上皮細胞分化のマーカーであり、角化膜の形成に関与するタンパク質である。したがって、インボルクリンレベルは、分化した腫瘍細胞の数の尺度として使用することができる。無処置のA431NS異種移植片腫瘍またはErbix、Vectibixもしくは抗体992 + 1030 + 1042の混合物で処置されたA431NS異種移植片腫瘍から得られるタンパク質溶解物中のインボルクリンのレベルを、市販のインボルクリンELISAキット (Bio 20 medical Technologies) を使って見積もった。腫瘍溶解物は、QiagenのTissueLyzerを使って、1mlのRIPA緩衝液中で30 ~ 40mgの腫瘍組織をホモジナイズすることによって調製した。各清澄化溶解物中のタンパク質濃度は、PierceのBCAタンパク質アッセイキットを使って決定し、各試料から得られる0.4 μ gのタンパク質で、ELISAアッセイを使ってインボルクリンレベルを見積もった。

【0305】

結果：図27に見られるように、992 + 1030 + 1042処置群では、インボルクリンが、陰性対照群およびErbixまたはVectibix処置群と比較して有意に高いレベルで見いだされる。このように抗体992、1030および1042の組合せは、A431NS異種移植片腫瘍中のインボルクリンのレベルを増加させる。したがって、この組合せはおそらく、より高度のA431NS分 30 化を誘導するだろう。これは、正にこの処置群に見いだされる高いケラチン真珠数とよく相関する結果である (実施例8参照)。

【0306】

[実施例13]

Sym004抗体組成物によるEGFRのインターナリゼーション

いくつかの抗体は、その表面ターゲットのインターナリゼーションを誘導することによって機能する。EGFRはEGFなどのリガンドによって活性化されるとインターナリゼーションを起こすことが知られている。

【0307】

2つの抗体992および1024の混合物の、EGFRインターナリゼーションを誘導する能力を、 40 共焦点顕微鏡法を使って調べた。A431NS細胞とHN5細胞をLabTekの8穴チャンバースライドに播種し、0.5%FBSを含有するDMEM中で終夜インキュベートした。次に、細胞に、10 μ g/mlの、992 + 1024のAlexa-488標識抗体混合物または対照抗体Erbixを加えてから、さまざまな時間、インキュベートした。Biorad共焦点顕微鏡を使用し、大きいピンホールまたは小さいピンホールで、倍率60倍の画像を撮影した。

【0308】

結果：図29Aに示すように、Alexa-488標識EGFR特異的抗体992および1024を2時間添加すると、A431NS細胞株でもHN5細胞株でも、細胞内小胞中に抗体の蓄積が起こる。対照的にErbixは、主として、細胞表面に見いだされる。図29Bは、より薄い細胞区画の像を与える小さい方のピンホールを使ったA431NS細胞の像を示す。抗体992 + 1024が細胞の内部に 50

位置するのに対して、Erbixは主に細胞表面に見いだされることが、これらの像から明らかである。図30は992 + 1024が媒介するインターナリゼーションの時間枠を示しており、抗体添加の30分後には早くも、それらを細胞内小胞中に見いだすことができる。4時間後には抗体992 + 1024のほとんど全てが細胞の内部に見いだされ、表面染色は少ないか極めて弱い。対照的にErbixは細胞表面に留まっている。992 + 1024によって誘導されるインターナリゼーションが、それらの細胞におけるEGFRの持続的な分解と除去をもたらすことを示す証拠も得られている。

【 0 3 0 9 】

このように、抗体992および1024の組合せはEGFRインターナリゼーションを迅速かつ強力に誘導するが、ErbixはEGFRのインターナリゼーションを誘導しない。

10

【 0 3 1 0 】

[実施例14]

表面プラズモン共鳴による抗体アフィニティーの測定

組換え可溶性EGFR ECDに対するSym004 IgG抗体の一価アフィニティーの測定

可溶性抗原に対するIgG分子全体の一価アフィニティーの測定を可能にするCanziani, K lakampら, 2004, Anal. Biochem, 325:301-307に記載のアッセイを使って、本発明の全長IgG抗体の速度論的分析を、BIAcore 2000で行った。簡単に述べると、約10,000 Ruのポリクロナル抗ヒトIgG Fc抗体を、製造者の説明書に従ってCM5チップ表面にコンジュゲートした後、その抗Fcチップ表面に、25 µgの、個々の抗EGFR抗体またはSynagis陰性対照を捕捉させた。アッセイで使用される最も高い抗原濃度の結合が25Ruを超えないように、捕捉されるIgGの密度を各クローンについて最適化した。次に、ゲル排除クロマトグラフィーによって一価タンパク質しか含有しないことが前もって示されている250 µLの可溶性ヒトEGFR ECDを、HBS-EP緩衝液中の段階2倍希釈液として25 µL/分の流速で注入することにより、応答曲線を作成した。各サイクルの間に、捕捉された抗体/抗原複合体を10秒間の100mM H₃PO₄注入でストリッピングすることにより、チップ表面を再生した。速度論的分析は、陰性対照抗体Synagisを含有するフローセルの応答をまず最初に差し引き、次にHBS-EP緩衝液のみの注入によって生成した応答を差し引くことによって行った（「二重参照（double referencing）」）。会合速度定数（ka）および解離定数（kd）を、製造者が提供するBIA評価ソフトウェア4.1を使って、生成したセンサーグラム（sensogram）から包括的に（globally）に評価した。

20

30

【 0 3 1 1 】

試薬：

1. CM5チップ：Biacore、カタログ番号BR-1000-14
2. NHS：Biacore BR-1000-50
3. EDC：Biacore BR-1000-50
4. 10mM酢酸緩衝液 pH4.5：Biacore、カタログ番号BR-1003-50
5. ヤギ抗ヒトIgG Fc：Caltag、カタログ番号H10500
6. エタノールアミン、1.0M pH8.5：Biacore BR-1000-50
7. 10 × HBS-EPランニング緩衝液：0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20
8. 抗原：6 × Hisを持つヒトEGFR細胞外ドメイン
9. 100mM H₃PO₄

40

【 0 3 1 2 】

可溶性ヒトEGFR ECDに対する本発明の全長IgGの算出された一価アフィニティーを、下記の表8に示す。

【 0 3 1 3 】

[表8] 可溶性受容体に対する抗EGFR IgG抗体のアフィニティー測定値。抗体測定は、BIAcore 2000での表面プラズモン共鳴により、製造者が提供する評価ソフトウェアを使って行った。*992のアフィニティーはスキャッチャード分析によって決定した。NA. 該当なし

50

【表 8】

IgG	$k_{ON} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (1/s)$	$t_{1/2} (分)$	$K_D (nM)$
992*	NA	NA	0.2	170.0
1024	1.8E+05	4.9E-03	2.4	26.7
1030	1.3E+04	3.7E-04	31.1	29.2
1254	8.1E+04	1.0E-03	11.3	12.7
1260	3.7E+04	1.6E-04	74.1	4.2
1261	1.7E+05	3.2E-03	3.6	18.6
1277	1.3E+05	5.3E-05	217.6	0.4
1284	3.2E+04	1.5E-04	78.1	4.6
1320	1.2E+05	2.8E-03	4.1	24.2
1347	2.4E+04	5.0E-04	22.9	21.4

10

【0314】

試験したSym004抗体の大半は、それぞれ4.2nM、0.4nM、および4.6nMという高いアフィニティーを持っていた1260、1277、および1284を除いて、10～20nMの範囲のアフィニティーで、可溶性ヒトEGFR ECDを認識した。最後に、992は、試験した他の抗体よりもはるかに低いアフィニティーで可溶性EGFR ECDに結合することがわかった。そのため、この抗体の速度論的分析は、スキャッチャード分析によって決定する必要があったが、それにより、可溶性ヒトEGFR ECDに対するアフィニティーは170nMであることが明らかになった。

20

【0315】

固定化組換えEGFR ECDに対するSym004 Fab抗体のアフィニティーの測定

可溶性の形態で提示されたEGFR ECDと固定化された形態で提示されたEGFR ECDとの間に存在するかもしれない抗原提示の相違を調べるために、ヒトIgG Fcに融合されたヒトEGFR ECDからなるEGFR-Fcと呼ばれる固定化キメラEGFR受容体抗原 (R&D Systems、344-ER) での新しいアフィニティー測定を行った。この目的のために、一価アフィニティーの測定が可能になるように、IgG抗体992、1024および1030のFabフラグメントを作製した。

【0316】

Fabの作製：

PierceのFab調製キットを使用し、製造者の説明書に従って、パパイン消化により、992、1024および1030のFabフラグメントを作製した。簡単に述べると、製造者の説明書に従って、NAP-5カラム (Amersham Biosciences) により、20mMシス테인-HCl (pH7.0) を含有する新たに調製した消化緩衝液で、2mgの各IgG抗体をバッファー交換した。次に、350 μ lのパパインビーズのスラリーを、同じ消化緩衝液中で2回洗浄してから、そのビーズを遠沈し、上清を捨てた。1mlのバッファー交換済みIgG抗体をビーズに加え、1000rpmで振とうしながら37 終夜インキュベートすることにより、抗体を消化した。翌朝、HiTrapプロテインAカラム (GE Healthcare) での全長IgGの枯渇によって、未消化のIgGを粗Fabから分離した。生成したFabを、最後に、PBSに対して終夜透析し、還元条件下および非還元条件下のSDS-PAGEで分析した。非還元条件下で約50kDaのタンパク質バンドが、Fabの作製に成功したしるしであると解釈した。

30

40

【0317】

試薬：

1. ImmunoPure Fab調製キット ; Pierce ; カタログ番号44885
2. NAP5脱塩カラム ; Amersham、カタログ番号17-0853-02
3. PBS pH7.2 ; Gibco ; #20012-019
4. HiTrapプロテインA HP、1mlカラム ; GE Healthcare ; #17-0402-01
5. NuPAGE 4-12% Novexビス-トリスゲル ; Invitrogen ; #NP0322BOX
6. 分子マーカー ; Seebue Plus 2 ; Invitrogen ; #LC5925
7. 抗EGFR抗体 - 各2.0mg。

【0318】

50

質量輸送 (mass transport) の制限を避けるために極めて低い濃度でセンサー表面に固定化した組換え抗原を使って、Biacore 2000で、本発明のFab抗体の速度論的分析を行った。簡単に述べると、合計285Ruの組換えEGFR ECD-Fcキメラ (R&D Systems、カタログ番号344-ER) をCM5チップ表面に製造者の説明書に従ってコンジュゲートした。次に、本発明の抗体に由来するFabフラグメントを、固定化EGFRを持つチップ上で試験した場合に25を上回るRu max値をもたらさない最適化された濃度から出発する段階2倍希釈液で試験した。速度論的分析は、HBS-EP緩衝液のみの注入によって生成する応答をまず最初に差し引くことによって行った。会合速度定数 (k_a) および解離定数 (k_d) を、製造者が提供するBIA評価ソフトウェア4.1を使って、生成したセンサーグラムから包括的に評価した。

【0319】

10

固定化ヒトEGFR ECDに対する、試験された本発明のFabフラグメントの、算出されたアフィニティーを、下記の表9に示す。

【0320】

[表9] 固定化受容体に対する抗EGFR Fab抗体のアフィニティー測定値。抗体測定は、Biacore 2000での表面プラズモン共鳴により、製造者が提供する評価ソフトウェアを使って行った。*992のアフィニティーはスキッチャード分析によって決定した。NA、該当なし

【表9】

Fab	$k_{ON} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{OFF} (1/s)$	$t_{1/2} (分)$	$K_D (nM)$
Fab 992*	N.A.	N.A.	0.2	150.0
Fab 1024	1.9E+05	4.9E-03	2.3	25.6
Fab 1030	8.7E+04	2.0E-04	57.5	2.3

20

【0321】

上記表9に示すように、992および1024のFabフラグメントは、先の実施例で示されたアフィニティーと合致して、それぞれ150nMおよび26nMのアフィニティーを持つことがわかった。これは、これら2つの抗体の場合、可溶性EGFRに対する抗体認識と固定化EGFRに対する抗体認識には、わずかな相違しかないことを示している。しかし、抗体1030は、固定化抗原に対して、可溶性受容体との比較で10倍高い2.3nMのアフィニティーを示し、その結果、固定化抗原上に露出したエピトープを優先的に認識した。

30

【0322】

[実施例15]

A431-NS細胞上でのEGFR抗原提示の研究と機能的アフィニティーのランク付け

A431-NS細胞上の抗原提示と精製された全長EGFR受容体との比較

速度論的分析によって、抗体992は組換えEGFR ECDを150~170nMのアフィニティーで認識することが明らかになったので、この弱い相互作用は、mAb992が組換えEGFR ECD上またはA431細胞から精製された全長EGFR上に提示されるコンフォメーションではなく、A431-NS細胞上に発現されるEGFRのネイティブコンフォメーションを優先的に結合するという事実によるものであるかどうかを調べた。EGF受容体抗原提示の相違を調べるために、本発明の抗体の部分集団の並行ELISA結合試験を、試験されるA431-NS細胞および同じ細胞に由来する精製全長EGFRでのアビディティー効果 (avidity effect) を避けるために、Fabフラグメントを使って行った。

40

【0323】

Fabの作製：Fabフラグメントの作製は実施例14で説明したように行った。

【0324】

間接ELISA：間接ELISAのために、全長EGFR (Sigma E2645) を、炭酸緩衝液 (50 μ l/ウェル) 中、1 μ g/mlの濃度で、4で終夜コーティングした。翌朝、ウェルをPBS-T中で2回洗浄し、1%BSAを含有するPBS-Tで、室温で1時間ブロッキングした後、PBS-Tで2回洗浄した。次に、1%BSAを含有するDMEM中のFab抗体の段階希釈液50 μ lを、別々のELISAウェルに加え、室温で1時間インキュベートした後、ウェルをPBS-Tで4回洗浄した。次に、1%BS

50

Aを含有するDMEMで1:5000に希釈した二次ヤギ抗ヒト (Fab特異的) HRPコンジュゲート50 μ lを加え、氷上で30分間インキュベートした。最後にウェルをPBS-Tで4回洗浄し、50 μ l/ウェルのTMB基質を添加することによってプレートを発色させ、5~15~30分ごとに620nmで読み取った。基質と共にインキュベートした後、1M H_2SO_4 の添加によって反応を停止させ、吸光度を450nmで読み取った。

【0325】

試薬、間接ELISA:

- 1) コーティング緩衝液: 50mM炭酸緩衝液、pH9.8
- 2) 抗原: A431細胞から精製された野生型全長EGFR; Sigma E2645
- 3) ELISAプレート: NUNC Maxisorp; カタログ番号442404
- 4) 洗浄緩衝液: 1×PBS/0.05% Tween 20 (PBS-T)
- 5) ブロッキング/希釈緩衝液: PBS-T中の1%BSA (PBS-T-1%BSA)
- 6) 抗体希釈緩衝液: 1%BSAを含有するDMEM
- 7) ヤギ抗ヒト (Fab特異的) HRPコンジュゲート: Jackson、カタログ番号109-035-097
- 8) TMB Plus基質: KemEnTec、カタログ番号4390L
- 9) 1M H_2SO_4 。

10

【0326】

細胞ELISA: 最大半量OD (half maximal OD) (ED50) を与えるモル濃度と定義される相対結合アフィニティーを、A431-NS細胞での抗体滴定によって決定した。簡単に述べると、10,000個のA431-NS細胞を、0.5%FCSおよび1%P/Sを添加したDMEMが入っている96穴ELISAプレート中、37℃、5%CO₂で、一晩成長させた。翌朝、コンフルエントな細胞 (約20,000個/ウェル) をPBSで2回洗浄し、1%パラホルムアルデヒド溶液と共に室温で15分間インキュベートすることによって固定した後、PBSで4回洗浄した。次に、試験するEGFR抗体と陰性対照抗体Synagisを、1%BSAを含有するDMEMで段階希釈し、50 μ lの各希釈液をウェルに加え、室温で1時間インキュベートした後、ウェルをPBSで4回洗浄した。次に、1%BSAを含有するDMEMで1:5000に希釈した二次ヤギ抗ヒト (Fab特異的) HRPコンジュゲート50 μ lを加え、氷上で30分間インキュベートした。最後に、ウェルをPBSで4回洗浄し、50 μ l/ウェルのTMB Plus基質を加えることによってプレートを発色させ、5~15~30分ごとに620nmで読み取った。基質と共にインキュベートした後、1M H_2SO_4 の添加によって反応を停止させ、吸光度を450nmで読み取った。二次試薬のみでの平均バックグラウンド結合を差し引いた後、試験した各抗体に関して%最大結合をプロットすることで結合曲線の規格化を行うことにより、ED50値として表される機能的アフィニティーを算出した。

20

30

【0327】

試薬、細胞ELISA:

- 1) DMEM培地: Gibco、カタログ番号41966-029
- 2) FCS: Gibco、カタログ番号10099-141
- 3) ペニシリン・ストレプトマイシン (Pen strep) (P/S): Gibco、カタログ番号15140-122
- 4) ELISAプレート: Costar、カタログ番号3595
- 5) 洗浄緩衝液 (PBS): Gibcoカタログ番号20012-019
- 6) 抗体希釈緩衝液: 1%BSAを含有するDMEM
- 7) 細胞固定液: BD Biosciences、カタログ番号340181
- 8) ヤギ抗ヒト (Fab特異的) HRPコンジュゲート: Jackson、カタログ番号109-035-097
- 9) TMB Plus基質: KemEnTec、カタログ番号4390L
- 10) 1M H_2SO_4 。

40

【0328】

A431-NS細胞上に発現されたEGF受容体での抗原提示と、同じ細胞から精製された受容体での抗原提示の相違を、同じ二次抗体試薬およびインキュベーション時間を使用する並行ELISA結合試験で決定した。結果を図31に示す。この実験により、Fab抗体992および1024は、同じ濃度のFab1030の結合と比較して、ELISAウェルにコーティングされた精製全長EG

50

FRに、弱く結合することが明確に示された。しかし、992および1024のこの弱い結合活性は抗体をA431-NS細胞で試験すると回復し、この細胞に対しては、3つのFabがいずれも強い結合活性を示した。2つの異なるELISAを比較すると、Fab992および1024は、ELISAウェルにおいて、精製抗原上に提示されるコンフォメーションではなく、細胞表面上に発現されるネイティブEGFRコンフォメーションを好むことが、明確に示された。この結果から、組換え可溶性および固定化EGFR ECDで表面プラズモン共鳴を使って測定された992の見かけ上弱いアフィニティーが、試験した系における992抗体エピトープの好ましくない提示によるものであることも示唆された。

【 0 3 2 9 】

A431-NS細胞での機能的アフィニティーのランク付け

上述のように行われる細胞ELISAを使って、ED50値として表される最大半量OD値を算出することにより、992、1024、1030、VectibixおよびErbixのIgGおよびFabフラグメントの機能的アフィニティーをランク付けした。この分析の結果を図32に示し、算出されたED50値を下記表10に示す。

【 0 3 3 0 】

[表10] IgGのアビディティー効果またはFabの一価アフィニティーに基づくED50値として表された機能的アフィニティーのランク付け。ED50値はA431-NS細胞での段階抗体滴定によって決定した。SD：カーブフィッティングの標準偏差。

【 表 1 0 】

IgGアビディティー

Fabアフィニティー

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD	Fab	Log ED50	ED50 nM	SD
992	-0.56	0.3	0.04	992	1.00	9.9	0.11
1024	-0.49	0.3	0.05	1024	0.30	2.0	0.02
1030	0.17	1.5	0.02	1030	0.27	1.8	0.05
Vectibix	-0.15	0.7	0.04	Vectibix	0.08	1.2	0.04
Erbix	-0.23	0.6	0.04	Erbix	-0.07	0.8	0.06

【 0 3 3 1 】

この実験により、アビディティー効果を考慮すれば、IgG 992および1024はErbixとVectibixのどちらよりも高いアビディティーで、A431-NS細胞に結合しているらしく、一方、IgG 1030は試験したIgG抗体のなかで最も低いアフィニティーを持つことが、明確に示された。しかし、Fabフラグメントを使って細胞での一価アフィニティーを決定したところ、992は約10nMという最も低いアフィニティーを持っていた。それでもなお、この一価機能的アフィニティーは、BIAcoreでの試験と比較すると、少なくとも15分の1だった。

【 0 3 3 2 】

[実施例16]

抗体誘導性結合強化の研究

本発明の抗体ペアで行われたBIAcore競合実験により、992および1024の結合は、これらの抗体を両方向に互いに試験すると、それぞれ約55%および58%強化されることが明らかになった(図9A)。この現象をさらに調べるために、非オーバーラップエピトープに結合する抗体のFabフラグメントで事前に受容体を飽和させた時の、ある抗体クローンのIgG結合の効果を調べるための、固定されていない細胞を用いる細胞ELISAを設計した。

【 0 3 3 3 】

細胞ELISA：このELISAは、基本的には実施例15で説明したように行ったが、若干の変更を加えた。抗体の添加後にEGFRがコンフォメーション的に柔軟でありうるように、細胞は固定しないでおいた。簡単に述べると、10,000個のA431-NS細胞を、0.5%FCSおよび1%P/Sを添加したDMEMが入っている96穴ELISAプレート中、37℃、5%CO₂で、一晩成長させた。翌朝、コンフルエントな細胞(約20,000個/ウェル)をPBSで2回洗浄し、抗体誘導性結合強化を調べるためのウェルを、992、1024もしくは1030の40nM単一Fabフラグメント25 μl

と共にブレインキュベートするか、または結合飽和を与えることが先に示されている2つの組み合わせで各12.5 μ lの80nM単一Fabと共にブレインキュベートした。Fabフラグメントを加えずにIgG抗体の試験に使用するウェルには、1%BSAを含有するDMEM 25 μ lをウェルに加えた。Fabおよび培地添加に続いて、ELISAウェルを室温で30分間インキュベートした後、濃度360nMから始まる本発明のIgGまたはSynagis陰性対照の段階3倍希釈液25 μ lをウェルに加え、氷上で1時間インキュベートした。次に、ウェルをPBSで4回洗浄し、1%BSAを含有するDMEMで1:5000に希釈した二次モノクローナルマウス抗ヒト(Fc特異的)HRPコンジュゲート50 μ lを加え、氷上で30分間インキュベートした。最後にウェルをPBSで4回洗浄し、50 μ l/ウェルのTMB基質を添加することによってプレートを発色させ、5~15~30分ごとに620nmで読み取った。基質と共にインキュベートした後、1M H_2SO_4 の添加によって反応を停止させ、吸光度を450nmで読み取った。二次試薬のみでの平均バックグラウンド結合を差し引いた後、試験した各抗体に関して%最大結合をプロットすることで結合曲線の規格化を行うことにより、ED50値として表される機能的アフィニティを算出した。

10

【0334】

試薬、細胞ELISA:

- 1) DMEM培地: Gibco、カタログ番号41966-029
- 2) FCS: Gibco、カタログ番号10099-141
- 3) ペニシリン・ストレプトマイシン (Pen strep) (P/S)、Gibco、カタログ番号15140-122
- 4) ELISAプレート: Costar、カタログ番号3595
- 5) 洗浄緩衝液 (PBS): Gibcoカタログ番号20012-019
- 6) 抗体希釈緩衝液: 1%BSAを含有するDMEM
- 7) マウス抗ヒト (Fc特異的) HRPコンジュゲート: Ab-direct、カタログ番号MCA647P
- 8) TMB Plus基質: KemEnTec、カタログ番号4390L
- 9) 1M H_2SO_4 。

20

【0335】

抗体誘導性結合強化の研究を、同じ二次抗体試薬およびインキュベーション時間を使用する並行ELISA結合試験で行った。この試験の結果を図33に示し、算出されたED50値を下記表11に示す。

30

【0336】

[表11] 列挙したFabフラグメントによる事前の受容体飽和有りまたは無しでのIgGのアビディティ効果に基づくED50値として表された機能的アフィニティのランク付け。ED50値はA431-NS細胞での段階的抗体IgG滴定によって決定した。SD: カーブフィッティングの標準偏差。

【表 1 1】

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
IgG 992	-0.24	0.6	0.07
IgG 992 / Fab 1024	-0.31	0.5	0.02
IgG 992 / Fab 1030	-0.38	0.4	0.05
IgG 992 / Fab 1024 + 1030	-0.34	0.5	0.04

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
IgG 1024	-0.01	1.0	0.01
IgG 1024 / Fab 992	-0.05	0.9	0.04
IgG 1024 / Fab 992 + 1030	-0.08	0.8	0.02

IgG	Log ED50	ED50 nM	SD
IgG 1030	0.33	2.2	0.06
IgG 1030 / Fab 992	0.20	1.6	0.03
IgG 1030 / Fab 992 + 1024	0.34	2.2	0.06

10

【 0 3 3 7 】

図33および上記表11に示すように、IgG 992は、1024もしくは1030または1024および1030のFabフラグメントで受容体を事前に飽和させると、明らかな結合強化を示した。Fabフラグメントと共にインキュベートすると、ED50値が、IgG 992を単独で試験した場合の0.6 nMと比較して、それぞれ0.5、0.4および0.5nMに低下した。同様に、IgG 1024および1030も、細胞をまず最初にFab 992で飽和させた場合は、結合の増加を示し、IgGに先だってFab 992と1030の両方を細胞に加えた場合は、1024だけが結合の増加を示した。この結果から、同じターゲット受容体上の非オーバーラップエピトープに対して2つ以上の抗体を持つことの利益が、明確に例証された。

20

【 0 3 3 8 】

この実験では、実施例2と比較して、わずかに低い機能的アフィニティーが決定された。この結果は、おそらく、この実施例では異なる二次試薬を使用したという事実、および試験したIgGを、固定していない細胞と共に、インターナリゼーションを避けるために氷上でインキュベートしたという事実によるのだろう。

30

【 0 3 3 9 】

[実施例16B]

全長カニクイザルEGFRのクローニング

シグナルペプチドを含む全長カニクイザルEGFRを、表皮から単離されたカニクイザルcDNAから、ネステッドPCRと、公表されている全長ヒトEGFRの配列 (GENBANK X00588、Ulrich, A.ら Nature 309(5967), 418-425 (1984)) から導き出した配列特異的プライマーとを使って、クローニングした。

【 0 3 4 0 】

PCR試薬：

・正常皮膚表皮から単離されたカニクイザルcDNA：CytoMol Unimed、カタログ番号ccy342 18、ロット番号A711054

40

・FastStart反応緩衝液 (10 ×) : Roche、カタログ番号03 553 361 001

・FastStart酵素：Roche、Rocheカタログ番号03 553 361 001

・Phusion酵素：Finnzymes、F-530S (2U/ μ L)

・dNTP 25mM：Bioline、カタログ番号BIO-39029

・シグナル配列を含む全長カニクイザルEGFRを増幅するためのプライマー：

5'ATGプライマー：5'-TCCTCGGGAAGCAGCTATGC-3' (配列番号135)

3'STOPプライマー：5'-TCATGCTCCAATAAATTCAGT-3' (配列番号139)

【 0 3 4 1 】

PCR条件：

50

・ 95 /2分、40サイクル：95 /30秒、55 /30秒、72 /3分30秒、最後に72 で5分間のインキュベーション。

【 0 3 4 2 】

全長カニクイザルEGFRを増幅し、Not制限部位とXho制限部位とを組み込む、ネステッドPCR用のプライマー：

E579 Cyn Not5' : 5' -GGAGTCGGCGGCCGCGACCATGCGACCCTCCGGGACGG-3 (配列番号140)

E580 Cyn Xho5' : 5' -GCATGTGACTCGAGTCATGCTCCAATAAATTCCTGC-3 (配列番号141)

【 0 3 4 3 】

PCR条件：

95 /2分、次に30サイクル：95 /30秒融解、55 /30秒アニーリング、72 /3分伸長。30サイクル後にPCR産物をさらに10分間伸長させた。

【 0 3 4 4 】

PCR反応は0.5 μ lのテンプレートおよび0.1 μ lのPhusion酵素、0.4 μ lのFastStart酵素を使って、最終濃度が1 \times FastStart緩衝液、0.2mM dNTPおよび0.2 μ Mの各プライマーである総体積50 μ lの反応緩衝液中で行った。

【 0 3 4 5 】

見掛けの長さが約4000bpであるPCRフラグメントが得られ、それをTOPO TAクローニングキット (Invitrogen、パーツ番号4506-41) を使ってクローニングし、配列決定した。クローニングされたカニクイザルEGFRのDNA配列およびタンパク質配列を図34に示す。ヒトEGFRとカニクイザルEGFRのタンパク質配列のアラインメントは、99.2%の配列同一性を示した。

【 0 3 4 6 】

FACS分析による全長ヒトEGFRと全長カニクイザルEGFRとの抗体交差反応性の実証

全長ヒトEGFRと全長カニクイザルEGFRを、安定トランスフェクションにより、CHO細胞の表面に発現させ、細胞を、段階希釈したEGFR抗体のパネルへの結合について、FACS分析によって試験した。決定は、すべての抗体希釈系列において、固定された数の細胞の細胞表面上に発現されたEGFR抗原分子の数よりも少なくとも5倍は多くなるように抗体のモル過剰状態を維持することにより、 K_D 依存的条件で行った。この設定により、試験した全ての抗体濃度で、抗体結合のFACS分析を、完全な受容体飽和状態で行うことが可能になった。

【 0 3 4 7 】

簡単に述べると、BD FACSSarray Bioanalyzer Systemで定量的FACS分析を行って、ヒトまたはカニクイザル全長EGFRのどちらか一方をトランスフェクトしたCHO細胞の表面上に発現されたEGFR分子の数を決定した。細胞上のPE標識Erbibut IgGを滴定することによって分析を行い、PE密度がわかっているRainbowキャリブレーション用粒子で作成した標準曲線との比較によって、等価なPEの分子数を決定した。この定量分析により、EGFRトランスフェクトCHO細胞は、各細胞の表面上に約350,000分子をディスプレイすることが明らかになった。次に、5nMから始まる本発明の抗体の段階5倍希釈液を、各決定において表面にディスプレイされるEGFR抗原に対して抗体が少なくとも5倍モル過剰になるように体積を増加させながら、10,000個のEGFRトランスフェクトCHO細胞と共にインキュベートすることによって比較した。試験した全ての抗体濃度において完全な抗原飽和が促進されるように抗体をシェーカー上で細胞と共に14時間インキュベートすると同時に、FACS緩衝液には0.02% NaN_3 を添加し、受容体インターナリゼーションを防止するために温度を4 に保った。インキュベーション後に、細胞を、4 で5分間、1200RPMでペレット化し、200 μ lのFACS緩衝液に再懸濁した。次に、1 : 500に希釈した二次ヤギF(ab')₂ 抗ヒトIgG Fc PEで細胞を染色し、シェーカー上、4 で30分間インキュベートした。最後に、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、BD FACSSarray Bioanalyzer Systemで、均質な前方/側方散乱特性を示すEGFR発現CHO細胞にゲートをかけて分析した。

【 0 3 4 8 】

FACS試薬：

- ・Rainbowキャリブレーション用粒子：BD、カタログ番号559123
 - ・FACS緩衝液：1×PBS + 2%FCS + 0.02%NaN₃
 - ・ヤギF(ab')₂抗ヒトIgG Fc PE：Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-116-170
- 【 0 3 4 9 】

EGFR抗体IgG 992および1024の交差反応性の決定には上記のFACS結合アッセイを使用し、カニクイザルEGFRとは交差反応しない対照抗体IgG 1320と比較した。下記図40に示すように、上記のFACSアッセイは、ヒト全長EGFRとカニクイザル全長EGFRとの間で良好な交差反応性を示す抗体（図40A、IgG 992および図40B、IgG 1024）と、全長ヒトEGFRしか認識しない種特異的抗体（図40C、IgG 1320）とを、非常にうまく識別した。この分析から、IgG 992および1024はどちらも、安定トランスフェクトCHO細胞の表面に発現されたヒト全長EGFRとカニクイザル全長EGFRの両方に対して、優れた交差反応性を示すと結論づけられた。カニクイザルEGFRとヒトEGFRの間に見られる結合の相違は、その高度な配列類似性からみて意外であり、前臨床毒性試験に使用される動物において、正確なターゲット配列への結合に関して抗体を試験することの重要性を強調している。

10

【 0 3 5 0 】

[実施例17]

992、1024および1030に相同なクローン

免疫吸着アッセイ（immunosorbent assay）（ELISAおよび細胞ベースのアッセイ）に基づくEGFR結合性抗体クローンのスクリーニングにより、上記の実施例で説明したように、クローン992、1024、1030が同定された。992、1024、1030に相同なEGFR特異的クローンも同定された（表12）。

20

【 0 3 5 1 】

同じクラスターに属するクローンは、同じ結合特異性を持つと予想されるが、異なるアフィニティーで結合する可能性はある。したがって、それらのクローンの結合アフィニティーが違い過ぎないという条件の下では、本発明の抗体組成物において、クラスター内のクローンを互いに代用することができる。

【 0 3 5 2 】

[表12]

【表 12 - 1】

表 12	IGHV	IGHV遺伝子	IGHJ遺伝子	CDR3	配列番号	体細胞突然変異の数	体細胞突然変異
クラスター	クローン名						
992	1209	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVSSGDAMDYV	110	4	H46P, G61R, G76A, H90Q
	1204	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVSSGDAMDYV	111	5	H46P, G59D, G61R, G76A, H90Q
	992	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVSSGDAMDYV	111	4	H46P, G61R, G76A, H90Q
	996	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVSSGDAMDYV	111	4	H46P, G61R, G76A, H90Q
	1033	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVSSGDAMDYV	111	4	H46P, G61R, G76A, H90Q
	1220	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVSSGDAMDYV	111	4	H46P, G61R, G76A, H90Q
1030	1195	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYV	112	12	K14R, M39L, T55S, S58G, G59V, Y62T, T63Y, Y66-, Y67F, I78M, K84R, T86I
	1030	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYV	112	12	M39L, K48R, T55S, S58G, G59V, Y62T, T63Y, Y66-, Y67F, I78M, K84R, T86I
	1034	IGHV5S12*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYV	112	12	M39L, T55S, I56T, S58G, G59V, Y62T, T63Y, Y66-, Y67F, I78M, K84R, T86I
	1194	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYV	112	12	M39L, T55S, S58G, G59V, Y62T, T63Y, Y66-, Y67F, D69G, I78M, K84R, T86I
	980	IGHV5S12*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYV	112	11	M39L, T55S, S58G, G59V, Y62T, T63Y, Y66-, Y67F, I78M, K84R, T86I
	981	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYV	112	11	M39L, T55S, S58G, G59V, Y62T, T63Y, Y66-, Y67F, I78M, K84R, T86I
	1246	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYV	112	11	M39L, T55S, S58G, G59V, Y62T, T63Y, Y66-, Y67F, I78M, K84R, T86I
	1223	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAMDYV	112	12	M39L, M39L, T55S, S58G, G59V, Y62T, T63Y, Y66-, Y67F, I78M, K84R, T86I
1024	1031	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGDDAMDYV	113	6	Y33H, K43Q, N57H, S74N, S84P, P94L
	1036	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGDDAMDYV	113	6	Y33H, K43Q, N57H, S74N, S84P, P94L
	1042	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGDDAMDYV	113	6	Y33H, K43Q, N57H, S74N, S84P, P94L
	984	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CARYYGDDAMDYV	113	7	Y33H, K43Q, N57H, S74N, T79A, S84P, P94L
	1024	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGDEAMDYV	114	7	K14E, A17G, Y33H, N60S, T63N, L91F, P94L
	1210	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGDEAMDYV	115	7	K14E, A17G, Y33H, N60S, T63N, L91F, P94L
	1217	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGDEAMDYV	115	7	K14E, A17G, Y33H, N60S, T63N, L91F, P94L
	1221	IGHV1S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGDEAMDYV	115	7	K14E, A17G, Y33H, N60S, T63N, L91F, P94L

10

20

30

40

【表 1 2 - 2】

IGKV	IGKV	IGKV 遺伝子	IGKJ 遺伝子	CDR3	配列番号	体細胞突然変異の数	体細胞突然変異
表 12 (続き)	クラスター	クローン名					
992	1209	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	6	A25T, S30G, Y87F, S92N, L94V, I99V
	1204	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	6	A25T, S30G, Y87F, S92N, L94V, I99V
	992	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	6	A25T, S30G, Y87F, S92N, L94V, I99V
	996	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	116	7	T8A, A25T, S30G, Y87F, S92N, L94V, I99V
	1033	IGKV10-94*03	IGKJ2*01	CQYFTTSPPTF	117	8	A25T, I29V, S30G, Y87F, N93S, L94M, P96G, I99V
	1220	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTVPPTF	118	6	A25T, S30G, Y87F, S92N, L94V, I99V
1030	1195	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	K27Q, Y36F, Q44L
	1030	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F, Q44L
	1034	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F, Q44L
	1194	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F, Q44L
	980	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	Y36F, Q44L, Q48R
	981	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	Y36F, Q44L, H92Y
	1246	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F, Q44L
	1223	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F, Q44L
1024	1031	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1036	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	T85A
	1042	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	G84R
	984	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1024	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1210	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	T17A
	1217	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	
	1221	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	S32N
	1218	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0	

【 0 3 5 3 】

[実施例 18]

抗体922および1024のヒト化

全ての抗体はヒト抗体応答を誘発する潜在性を持っている。この応答は、適用される治療用抗体の「ヒトらしさ (humanness)」の度合と、ある程度相関する。免疫原性を予

10

20

30

40

50

測し、それによってヒト抗体応答を予測することはできないが、臨床使用には高度なヒトらしさを持つ抗体の方が好ましい傾向がある。本発明にいう抗体のヒトらしさは、ヒト化プロセスによって増加させることができる (Reichert JM 「Monoclonal antibodies in the clinic」 *Nature Biotechnol*, 2001;19:819-822 ; Reichert JM, Rosensweig CJ, Fade n LBおよびDewitz MC 「Monoclonal antibody successes in the clinic」 *Nature Biotechnol*, 2005;23:1073-1078)。

【 0 3 5 4 】

マウスmAbのヒト化は、原理上、一般にCDR移植と呼ばれる手法により、相補性決定領域 (CDR) を、近縁の配列を持つIGHVおよびIGKVドメインのヒトフレームワーク領域 (FR) に移植することによって達成される (Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MSおよび Winter G 「Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse」 *Nature*, 1986;321:522-525)。しかし、一部のフレームワークアミノ酸またはフレームワーク領域は抗原と極めて重要な接触をするか、抗原結合性CDRループのコンフォメーションを支持するので、超可変領域だけの単純なCDR移植ではアフィニティーの低下が起こりうる (Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RPおよびWaldmann TA 「A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor」 *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989;86:10029-10033 ; Al-Lazikani B, Lesk AMおよびChothia C 「Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins」 *J Mol Biol*, 1997;273:927-948)。したがって抗体ヒト化は、マウス由来可変領域からのCDRループを、相同性の高いヒトフレームワークに移植することを含むと同時に、抗原結合活性に影響を及ぼすことが立証されている重要な (key) マウスフレームワーク残基を残すことを含むべきである (Winter, G.およびW.J. Harris 「Humanized antibodies」 *Immunol. Today* 14.6 (1993) : 243-46)。抗体のアフィニティーと機能を保ったままヒト化を達成するために、いくつかの方法が開発され、応用されて成功を収めている (Almagro, J.C.およびJ. Fransson 「Humanization of antibodies」 *Front Biosci*. 13 (2008):1619-33)。ヒト化は、合理的方法、例えばCDR移植、リサーフェイシング (resurfacing)、超ヒト化 (superhumanization)、ヒトストリングコンテンツ最適化 (human string content optimization) などによって達成することができ、これらはいずれも数個のヒト化抗体候補の構築によるものである。候補のアミノ酸配列は、抗体構造の洞察および予測、ならびに抗原相互作用領域の全体構造を安定化することによる、直接的な、および間接的な、抗原結合への個々のアミノ酸の寄与に基づく。各抗体は予見し得ない個別の制約をいくつか持つので、通常は候補を精密化 (refine) する必要がある、一部のアミノ酸は元のマウス残基に復帰突然変異させる必要がある。これらの方法に共通しているのは、アフィニティーと機能を保つには、続けて数ラウンドの設計、試験および再設計が必要とされうることである。もう一つの選択肢はもっと経験的な方法であり、それらの方法では、大きなコンビナトリアルライブラリーが作製され、酵母ディスプレイもしくはファージディスプレイなどの方法または代替的スクリーニング方法での選択によって、所望の特徴を持つ抗体が変異体のプールから濃縮される。

【 0 3 5 5 】

本発明で述べる抗EGFR抗体は、ヒトV領域へのCDR移植によってヒト化することができる。好ましいシナリオでは、元のマウスV領域に対するホモロジーに基づいて、ヒトV領域が選択される。他の望ましい特徴、例えば低い免疫原性などを持つヒトV遺伝子領域も使用することができる。本実施例では、992および1024抗EGFRキメラ抗体のヒト化に使用される方法を説明する。図41Aに示すヒト化配列は、992 IGHVに由来するIMGTの定義によるCDR領域をIGHV1-46/IGHJ4に移植し、992 IGKVに由来するIMGTの定義によるCDR領域をIGKV1-27/IGKJ1-01に移植することによって作製された。図41Bに示すアミノ酸配列は、1024 IGHVに由来するIMGTの定義によるCDR領域をIGHV1-2*02/IGHJ6*02に移植し、1024 IGKVに由来するIMGTの定義によるCDR領域をIGKV2-28*01/IGKJ2*01に移植することによって作製された。指定されたヒト化抗体をコードする人工的遺伝子を合成し、哺乳動物細胞発現ベクタ

ーに挿入する。抗体を発現させ、精製し、実施例3で説明したように活性について試験する。初期試験後に、実施例14で説明したように、表面プラズモン共鳴によってヒト化抗体の結合速度を決定してもよい。同様に、細胞の表面に発現されたhEGFRへの結合を、実施例15で説明したように決定することもできる。

【0356】

ヒト化アミノ酸の結合活性が元の抗体で観察されるものより著しく低い場合は、アフィニティーを再生させるために、ベルニエ (Vernier) ゾーンに位置するまたはCDR領域の構造を支えると提唱されているヒト化フレームワーク残基から開始される逐次的な復帰突然変異スキームが使用されることになる (Foote, J.およびG. Winter「Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops」J Mol.Biol. 224 10
.2 (1992):487-99; Padlan, E.A.「Anatomy of the antibody molecule」Mol.Immunol 31
.3 (1994):169-217)。これらの残基は、IMGTナンバリングでは、992 IGHVの場合、アミノ酸番号13、45、および80であり、992 IGKVの場合、アミノ酸25であり、1024 IGHVの場合、アミノ酸13、45、80および82であり、1024 IGKLの場合、アミノ酸78である。これらの突然変異体は、標準的な分子生物学的方法を使用して、PCRによる部位特異的突然変異誘発法を使って構築することができる。構築された突然変異体は上述のように試験されるだろう。これらの候補セットは、抗原結合特性が保たれたヒト化抗体をもたらすだろうと予想される。しかし、追加の復帰突然変異、または部位特異的突然変異誘発法でCDR領域にアミノ酸置換を導入することによる親和性成熟も、排除することはできない。

【0357】

[実施例19]

二重可変ドメイン抗体

二重可変ドメイン (DVD) 抗体タンパク質は、992と1024のIGHVドメインを6アミノ酸リンカー (ASTKGP) で直列に融合し、992と1024のIGKVドメインを5アミノ酸リンカー (TVAAP) で融合することによって工学的に作製される [Wu C, Ying H, Grinnell C, Bryant S, Miller R, Clabbers A, Bose S, McCarthy D, Zhu RR, Santora L, vis-Taber R, Kunes Y, Fung E, Schwartz A, Sakorafas P, Gu J, Tarcsa E, Murtaza AおよびGhayur T「Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin」Nature Biotechnol, 2007;25:1290-1297]。二重IGHVおよびIGKVドメイン融合物の後ろにはそれぞれIGHCおよびIGKCドメインが続く。ある全長DVD抗体 (992L1024 30
) では、992 IGHVおよびIGKVがN末端にあり、その後ろにリンカーと、1024 IGHVおよびIGKVがそれぞれ続いている。もう一つの全長DVD抗体 (1024L992) では、1024 IGHVおよびIGKVがN末端にあり、その後ろにリンカーと、992 IGHVおよびIGKVがそれぞれ続いている。992抗体および1024抗体をコードするプラスミドDNAを、2段階PCRによってDVDコード遺伝子を構築するためのテンプレートとして使用する。まず最初に、IGHVおよびIGKVの2つの可変ドメインコード領域を、それらがオーバーラップ伸長領域をリンカーコード領域の位置に含むように、別々に増幅する (テンプレートとプライマーの組合せについては表13および表14を参照のこと)。C末端に近い方の可変ドメインをコードするIGKV遺伝子は、ヒト軽鎖定常ドメインコード遺伝子 (IGKC) がコード配列に含まれるように増幅される。二重可変ドメイン抗体のサブユニットのコード配列およびアミノ酸配列を付表3に示す。 40

【0358】

第1PCRは、各チューブ (反応液50 μ l) に以下の混合物を用意して、所与の最終濃度にする: 1 \times FastStart緩衝液 (Roche)、dNTP混合物 (各200 μ M)、プライマー (各10 pmol) (表14参照)、FastStart High Fidelity酵素ブレンド (2.2U; Roche) および100ngプラスミドテンプレート (表14参照)。PCRを以下の熱処理サイクルに供した: 95 $^{\circ}$ Cで2分、20 \times (95 $^{\circ}$ Cで30秒、55 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで1分)、72 $^{\circ}$ Cで10分。第1PCR反応から得られた正しいサイズを持つPCR産物 (表14参照) を、分取用アガロースゲル電気泳動によって精製し、2つの可変ドメインをオーバーラップ伸長PCRによってスプライスする第2段階に使用する。オーバーラップ伸長PCRによってDNAフラグメントをスプライシングする第2PCRは、各チューブ (反応液50 μ l) に以下の混合物を用意して、所与の最終濃度にする: 1 \times Fast 50

Start緩衝液（Roche）、dNTP混合物（各200 μM）、プライマー（各10pmol、表15参照）、FastStart High Fidelity酵素ブレンド（2.2U；Roche）およびテンプレート（100ng PCRフラグメント、表15参照）。PCRを上で述べた熱処理サイクルに供した。第2PCR段階から得られた産物を、分取用アガロースゲル電気泳動で精製し、二重IGHVについては制限酵素AclIおよびXhoIで処理し、二重IGKV（IGKCを含む）についてはNheIおよびNotIで処理する。それらのフラグメントを、標準的な制限酵素消化およびライゲーション手法により、哺乳類IgG発現ベクター00-VP-002（図4）に、続けてライゲートする。その結果得られた発現プラスミドベクターを大腸菌で増幅し、プラスミド調製物を標準的な方法で精製する。DVD抗体を発現させ、実施例2と同様に精製し、実施例3～13と同様に活性を特徴づけた。

【0359】

得られた抗体がターゲットhEGFrに対して低下した結合を示すか結合を示さない場合は、他のリンカーを試験することもできる。

【0360】

[表13] 992と1024からDVD抗体を構築するためのプライマー

【表13】

配列番号	プライマー名	配列
121	3'JH	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTTCCTTGAC
122	992_5'VH	CCAGCCGGGGCGCGCCGAGGTCCAACCTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTG
123	1024_5'VH	CCAGCCGGGGCGCGCCCAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTG
124	992_5'VK	catgggaatagctagccGACATTCAGATGACTCAGACTACATCCTCCCTG
125	1024_5'VK	catgggaatagctagccGACATCGTGATGACACAAGCTGCATTCTCCAATC
126	Kappa3'	ACCGCCTCCACCGGCGGCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTG
127	992H_O3'	CTGGGGGCCCTTGGTGCTGGCTGACGAGACGGTGACTGAGGTTC
128	1024H_O5'	GCCAGCACCAAGGGCCCCCAGGTCCAACCTGCAGCAGC
129	1024H_O3'	CGGGGCCCTTGGTGCTGGCTGACGAGACGGTGACTGAG
130	992H_O5'	GCCAGCACCAAGGGCCCCCAGGTCCAACCTGCAGCAAC
131	992K_O3'	GTCTGGTGACGCCACAGTTCGTTTGTATTCCAGCTTGGTG
132	1024K_O5'	CGAACTGTGGCTGCACCAGACATCGTGATGACACAAGC
133	1024K_O3'	GTCTGGTGACGCCACAGTTCGTTTTATTTCAGCTTGGTCC
134	992K_O5'	CGAACTGTGGCTGCACCAGACATTCAGATGACTCAGACTAC

【0361】

[表14] 992と1024からDVDコード遺伝子を構築するための第1PCR段階用のプライマーとテンプレートの組合せ

【表 1 4】

DVD	PCR用テンプレート	IGHV遺伝子増幅用プライマー		IGKV遺伝子増幅用プライマー	
		第1PCR段階	第1PCR産物 (サイズbp)	第1PCR段階	第1PCR産物 (サイズbp)
992L1024	992	992_5' VH 992H_03'	992H0 (406bp)	992_5' VK 992K_03'	992K0 (359bp)
	1024	1024H_05' 3' JH	H01024 (381bp)	1024K_05' Kappa3'	K01024* (702bp)
1024L992	992	992H_05' 3' JH	H0992 (393bp)	992K_05' Kappa3'	K0992 (687bp)
	1024	1024_5' VH 1024H_03'	1024H0 (392bp)	1024_5' VK 1024K_03'	1024K0* (374bp)

10

*増幅されるコード配列はIGKC遺伝子を含む。

【 0 3 6 2】

【表15】992と1024からDVDコード遺伝子を構築するための第2PCR段階 [SOE法 (splicing by overlap extension)] 用のプライマーとテンプレートの組合せ

20

【表 1 5 - 1】

	IGHV			IGKV		
DVD	テンプレート	プライマー	産物 (bp)	テンプレート	プライマー	産物 (bp)
992L1024	992HO HO1024	992_5'VH 3'JH	766	992KO KO1024	992_5'VK Kappa3'	1040
1024L992	HO992 1024HO	1024_5'VH 3'JH	766	KO992 1024KO	1024_5'VK Kappa3'	1040

30

【 0 3 6 3】

【実施例20】

カニクイザルを対象とする、Erbixと組み合わされた、6週間静脈内投与毒性試験

試験の目的：試験の目的は、6週間にわたるカニクイザルへの週1回の静脈内投与後に、試験物質992 + 1024の毒性を決定することだった。

【 0 3 6 4】

毒性は、ErbixやVectibixのようなEGFR阻害剤による臨床実務において用量制限因子になるので、臨床的に意味のある用量における992 + 1024の忍容性を評価することが、早い段階において重要であると思われた。これは、992 + 1024がEGFRをターゲットとする他の製品とは異なる機序で作用するらしいという事実によって強調される。これは、潜在的に、新たな有害作用、または他のEGFR阻害剤で見られる作用の悪化につながりうる。

40

【 0 3 6 5】

各群3匹の雌カニクイザルを、4/2.7および12/8mg/kgの992 + 1024ならびに12/8mg/kgのErbixという週間IV用量 (weekly IV dose) で、6週間処置した。4および12mg/kgという1つ目の用量は負荷量であり、2.7および8mg/kgは5回投与された維持量である。12/8mg/kgという用量は臨床実務で投与されるErbixのヒト臨床量と等価である。

【 0 3 6 6】

試験計画

50

【表 15 - 2】

群番号	群の説明	用量レベル (mg/kg/日)	投与体積 (mL/kg)	動物番号
				雌
1	対照	0	19/12#	1～3
2	992+1024 低	4.2/2.7#	19/12#	4～6
3	992+1024 高	12.6/8#	19/12#	7～9
4	Erbix	12.6/8#	19/12#	10～12

10

#1つ目の用量レベルは負荷量に関し、2つ目の用量レベルは8日目以降の投与に関する。

【0367】

試験中は以下のパラメータを追跡した：死亡、臨床徴候、体重、摂食量、血液検査、臨床化学検査、臓器重量、肉眼的所見。

【0368】

結果

死亡：試験の過程で予定外の死は起こらなかった。

臨床徴候：処置に関係する有害な臨床所見はなかった。

体重：992+1024またはErbixによる処置は体重に影響を及ぼさなかった。

摂食量：摂食量に対する明白な影響はなかった。

20

血液検査：992+1024またはErbixによる処置の作用を示唆するような血液学的パラメータへの影響はなかった。

【0369】

臨床化学検査：被験物質による処置の作用を示唆するような臨床化学パラメータの変化はなかった。

4週目に、1日あたり4.2/2.7mg/kgの992+1024を投与した1匹では、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼレベルとアラニンアミノトランスフェラーゼレベルが、処置前値と比較して増加していた。これらのレベルは6週目までには正常範囲に戻っていた。処置した他の動物に類似する作用は見られなかったので、肝臓酵素のこの増加の毒物学的意義は不明である。

30

【0370】

臓器重量：処置動物と対照動物の間で臓器重量に毒物学的に有意な差はなかった。

肉眼的所見：剖検時に、992+1024またはErbixの作用を示唆する一貫した所見はなかった。

【0371】

予備的結論：この予備データは、試験した用量において992+1024の忍容性は高く、処置に関係する有害作用は観察されなかったことを示している。

【0372】

[実施例21]

肺細胞がん株の成長阻害

40

肺がん細胞株はチロシンキナーゼドメインに突然変異を持つEGFRを発現することが知られている (Steinerら, Clin Cancer Res 13.5 (2007):1540-51)。実施例6で使用したものと同様の方法により、異なるEGFR突然変異を持つ肺がん細胞株HCC827およびH1975の成長を阻害する、2つの抗体992および1024の組合せの能力を調べた。

【0373】

結果

表16および表17に見られるとおり、992と1024の組合せは両方の細胞株の成長を阻害することができる。この組合せはモノクローナル抗体992および1024ならびにVectibixより優れている。

【0374】

50

【表16】HCC827細胞株に対する表示の抗体のIC50値および最大成長阻害

【表 1 6】

HCC827	IC50 (μ g/ml)	最大阻害
Erbix	0.013	80%
Vectibix	0.100	60%
992	0.050	80%
1024	0.034	40%
992 + 1024	0.031	80%

10

【 0 3 7 5 】

【表17】H1975細胞株に対する表示の抗体のIC50値および最大成長阻害

【表 1 7】

H1975	IC50 (μ g/ml)	最大阻害
Erbix	0.010	30%
Vectibix	0.141	30%
992	0.056	30%
1024	—	0%
992 + 1024	0.024	30%

20

【 0 3 7 6 】

【 実施例21 】

Erbix抵抗性細胞に対する効力

抗体992 + 1024を含む抗体組成物がErbix抵抗性細胞を阻害できるかどうかを調べるために、親HN5細胞を、Erbixに、そのレベルを増加させつつ継続的に曝露することにより、Erbix抵抗性HN5細胞を生成させた。Erbix抵抗性の細胞プールが生成したら、WST-1生存アッセイを使って、Erbix、Vectibixおよび抗体992 + 1024を含む抗体組成物の阻害効果を試験した。

【 0 3 7 7 】

30

方法

Erbix (セツキシマブ) 感受性ヒト頭頸部細胞株HN5を、Erbixに、その濃度を増加させつつ6ヶ月にわたって、長期間曝露することにより、Erbix抵抗性HN5細胞を生成させた。セツキシマブのIC50に相当する開始用量 (0.05 μ g/ml) から開始して、細胞が10 μ g/mlのErbixを含有する培地でうまく増殖するようになるまで、曝露量を次第に増加させた。細胞を10% FBSと適当な濃度のErbixを補足したDMEMで成長させ、週に2回継代した。

【 0 3 7 8 】

細胞増殖試薬WST-1は、生細胞の代謝活性を測定する調製済の基質であり、代謝活性は生細胞の数と相関すると仮定する。この実施例では、WST-1アッセイを使って、異なる濃度の異なる抗体で処理した後の、代謝的に活性な細胞の数を測定した。

40

【 0 3 7 9 】

WST-1アッセイを行う前に、適当な抗体および抗体混合物を、0.5%のFBSおよび1%P/Sを補足した適当な培地で、20 μ g/mlの最終総抗体濃度に希釈して、最も高い抗体濃度を持つウェルの最終抗体濃度が10 μ g/mlになるようにした。次に、これらの溶液のうち、150 μ lを、96穴プレートの列2のウェルに加え、3倍段階希釈を行って、各ウェルが100 μ lの抗体溶液を含有することになるように、それ以降、列9までのウェル列に加えた。列11には100 μ lの培地を加えた。実験ウェルにおける培地蒸発の影響を低減するために、行1および8ならびに列1および12には200 μ lの培地を加えた。

【 0 3 8 0 】

50

次に、HN5親細胞とHN5抵抗性細胞を1×PBSで洗浄し、3mlのトリプシン溶液を使ったトリプシン処理で剥離した。次に、17mlの完全培地を加え、細胞を300×g(1200rcf)で5分間遠沈した。上清を取り除き、細胞をDMEM+0.5%FBSに再懸濁した。細胞を計数し、その濃度を15000細胞/mlに調節した。次に、100μlの細胞懸濁液(1500細胞/ウェル)を、列2~11の実験ウェルに加えた。プレートを、湿潤培養器中、37℃で、4日間インキュベートした。次に、1ウェルにつき20μlのWST-1試薬を加え、プレートを37℃で1時間インキュベートした。次にプレートをオービタルプレートシェーカーに移して、1時間おいた。ELISAリーダーを使って450nmと620nm(参照波長)における吸光度を測定した。代謝的に活性な細胞(MAC)の量は、実施例6で使用した式と同じ式を使って、無処理対照のパーセントとして算出される。

10

【0381】

各混合物のIC50は、GraphPad Prismを使って、滴定曲線を式： $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC50} - X) \cdot \text{HillSlope}))}$ に当てはめることによって算出した。

【0382】

結果

滴定の結果をHN5親細胞とErbix抵抗性細胞の両方について図43に示す。Erbixの力価(potency)および効力(efficacy)がErbix抵抗性細胞では親細胞と比較して著しく減少していることが明白である。ErbixおよびVectibixの効力は約50%減少し、IC50は10倍以上増加した(表18)。対照的に、抗体992+1024を含む抗体組成物(Sym004)の力価は43%しか減少せず、IC50は2倍しか増加しなかった。これらの結果は、抗体992+1024を含む抗体組成物がErbixおよびVectibixよりも強力(potent)であり、Erbix抵抗性HN5細胞の成長を、より高い効力で阻害することを示している。

20

【0383】

[表18] 表示の抗体によるHN5wtおよびHN5 Erbix抵抗性細胞の阻害のIC50値および効力。ND：未検

【表18】

	IC50 (μg/ml)		効力(無処理に対する%)	
	HN5親	HN5 Erbix抵抗性	HN5親	HN5 Erbix抵抗性
Erbix	0.050	0.750	88.1%	34.4%
Vectibix	0.035	0.500	88.3%	32.3%
992	0.420	ND	85.5%	1.7%
1024	0.048	ND	84.8%	1.3%
992+1024 (Sym004)	0.053	0.110	88.2%	45.0%

30

【0384】

[実施例22]

抗体992+1024を含む抗体組成物を使ったインビボ再処置

40

6~8週齢のBALB/c nu/nu雌マウスの右脇腹に1×10⁶個のA431NS細胞を皮下注射した。腫瘍を週に1~3回、キャリパーで測定し、以下の式を使って腫瘍体積(V)を算出した： $V = (\text{幅})^2 \times (\text{長さ}) \times 0.5$ 。腫瘍が約100mm³の平均腫瘍体積に達した時に処置を開始し、マウスを、1mgの抗体992+1024の腹腔内注射により、週に2回、合計9回処置した。初回処置期間後、マウスを159日間にわたって追跡した。この期間中に腫瘍成長が検出された場合は、そのマウスを、1mgの抗体992+1024で、週に2回、試験の終了時まで再処置した。

【0385】

結果

全ての腫瘍が最初の4週間の治療に応答した(図44)。指數的腫瘍成長は停止し、腫瘍は0~約200mm³の腫瘍体積まで退縮した。その後、腫瘍体積は85日以上にわたって安定だ

50

ったが、その後、9つの腫瘍のうち3つが再び成長し始めた。第2ラウンドの治療を開始する前にさまざまなサイズを持っていたそれら3つの腫瘍を、残りの試験期間中、1mgの抗体992 + 1024で、週に2回処置した。3例全てにおいて、再処置は直ちに腫瘍退縮をもたらしたことから、腫瘍は抗体992 + 1024を含む抗体組成物による最初の4週間後に処置抵抗性になっていなかったことが示された。

【 0 3 8 6 】

[実施例23]

抗体992 + 1024を含む抗体組成物を使った部分Erbixレスポンダーのインビボ処置方法

6 ~ 8週齢のBALB/c nu/nu雌マウスの右脇腹に 1×10^6 個のA431NS細胞を皮下注射した。腫瘍を週に3回、キャリパーで測定し、以下の式を使って腫瘍体積 (V) を算出した: $V = (\text{幅})^2 \times (\text{長さ}) \times 0.5$ 。腫瘍が約 130mm^3 の平均腫瘍体積に達した時に、マウスを10匹と30匹の群に分割した。10匹の群は対照抗体で処置し、30匹の群は1mgのErbixで合計3回処置した。この時点で、Erbix処置群を、 500mm^3 の平均腫瘍サイズを持つ釣合いのとれた2つの群に、ランダムに割り当てた。それら2つの動物群は、1mgの抗体992 + 1024で週に2回処置するか、Erbix処置を継続するか、どちらか一方にした。6つの外れ値をこの試験から除外した。

【 0 3 8 7 】

結果

初回Erbix処置はA431NS腫瘍成長を部分的に阻害した (図45)。11日間のErbix処置後に、半数の動物が抗体992 + 1024を含む抗体組成物 (図の説明文ではSym004) による処置に移行した。抗体992 + 1024による処置に切り換えられたマウス群では、Erbix処置を続けた群と比較して、有意な腫瘍退縮が観察された。抗体992 + 1024を含む抗体組成物がErbixで前処置された大きい腫瘍に及ぼすこの明瞭な作用は、抗体992 + 1024を含む抗体組成物がこのA431NSモデルにおいてErbixより強力であること、そして抗体992 + 1024を含む抗体組成物がErbix部分レスポンダーにおける処置選択肢になりうることを示している。

【 0 3 8 8 】

[実施例24]

Erbix抵抗性細胞のインビボ処置

Sym004薬物候補がErbix抵抗性細胞を阻害できるかどうかをさらに調べるために、Erbix抵抗性HN5クローンをErbix抵抗性HN5細胞プールから生成させた。限界希釈法 (limited-dilution) によってクローンを生成させ、Erbix抵抗性クローンが生成したら、WST-1生存アッセイを使って、Erbix、VectibixおよびSym004の阻害効果を試験した。

【 0 3 8 9 】

方法

Erbix抵抗性HN5クローンは、Erbix抵抗性細胞プール (実施例21参照) から、限界希釈法によって生成させた。限界希釈法によるクローニングは、細胞の懸濁液を十分な培養培地で希釈すると、細胞の濃度が、正確に測定された体積の希釈懸濁液中に1個の細胞が含まれるような濃度になるだろうという仮定に基づいて、細胞を分離する手法である。この体積の希釈懸濁液を96穴プレートの別々のウェルに入れた場合、各ウェルには1細胞/ウェルが入るはずである。この細胞が生存可能な状態を保ち (1細胞/ウェルという細胞密度は明らかに低いので、通常はフィーダ細胞層および/または「条件」培地が必要である)、増殖するのであれば、単離された細胞クローンがそのウェル中に樹立されたことになる。10% FBSおよび適当な濃度のErbixを補足したDMEM中で細胞を成長させた。

【 0 3 9 0 】

細胞増殖試薬WST-1は、生細胞の代謝活性を測定する調製済の基質であり、代謝活性は生細胞の数と相関すると仮定する。この実施例では、WST-1アッセイを使って、異なる濃度の異なる抗体で処理した後の、代謝的に活性な細胞の数を測定した。

【 0 3 9 1 】

WST-1アッセイを行う前に、適当な抗体および抗体混合物を、0.5%のFBSおよび1%P/Sを補足した適当な培地で、20 µg/mlの最終総抗体濃度に希釈して、最も高い抗体濃度を持つウェルの最終抗体濃度が10 µg/mlになるようにした。次に、これらの溶液のうち、150 µlを、96穴プレートの列2のウェルに加え、3倍段階希釈を行って、各ウェルが100 µlの抗体溶液を含有することになるように、それ以降、列9までのウェル列に加えた。列11には100 µlの培地を加えた。実験ウェルにおける培地蒸発の影響を低減するために、行1および8ならびに列1および12には200 µlの培地を加えた。

【0392】

次に、HN5親細胞とHN5抵抗性細胞を1×PBSで洗浄し、3mlのトリプシン溶液を使ったトリプシン処理で剥離した。次に、17mlの完全培地を加え、細胞を300×g(1200rcf)で5分間遠沈した。上清を取り除き、細胞をDMEM+0.5%FBSに再懸濁した。細胞を計数し、その濃度を15000細胞/mlに調節した。次に、100 µlの細胞懸濁液(1500細胞/ウェル)を、列2~11の実験ウェルに加えた。プレートを、湿潤培養器中、37℃で、4日間インキュベートした。次に、1ウェルにつき20 µlのWST-1試薬を加え、プレートを37℃で1時間インキュベートした。次にプレートをオービタルプレートシェーカーに移して、1時間おいた。ELISAリーダーを使って450nmと620nm(参照波長)における吸光度を測定した。代謝的に活性な細胞(MAC)の量は、次式のとおりに、無処理対照のパーセントとして算出される：

$$\%MAC = \left(\frac{(OD_{exp.} - OD_{media})}{(OD_{untreat.} - OD_{media})} \right) \times 100$$

【0393】

各混合物のIC50は、GraphPad Prismを使って、滴定曲線を式： $Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{((\log IC_{50} - X) \cdot HillSlope)})$ に当てはめることによって算出した。

【0394】

結果

滴定の結果を4つの代表的クローンについて図46に示す。これらのクローンがErbixに対して異なるレベルの抵抗性を持つことは明白である。しかし、Sym004は、4つのどのクローンの成長の阻害についても、ErbixおよびVectibixより優れている。その優位性は、増加した効力(クローン#7、#11および#14)および/または力価(クローン#8、#11および#14)のどちらかの形で明白だった(表19)。

【0395】

[表19]表示の抗体による4つのErbix抵抗性HN5クローンの阻害のIC50値および効力。*最大阻害レベルが相違するので、IC50値を比較することができない。

【表19】

	力価IC ₅₀ (µg/ml)				
	HN5親	クローン#7	クローン#8	クローン#11	クローン#14
Erbix	0.050	0.016*	1.06	0.366*	0.314*
Vectibix	0.035	0.023*	2.70	0.311*	0.190*
Sym004	0.053	0.029*	0.33	0.267*	0.110*
	効力 (%最大阻害)				
	HN5親	クローン#7	クローン#8	クローン#11	クローン#14
Erbix	88.1%	60.9%	42.5%	35.7%	32.0%
Vectibix	88.3%	61.1%	51.3%	28.6%	33.7%
Sym004	88.2%	70.3%	57.5%	38.9%	43.5%

【0396】

[実施例25]

Erbixおよび抗体992+1024を含む抗体組成物を使ったErbix抵抗性HN5細胞のインビ

ボ処置

方法

6～8週齢の無胸腺ヌードマウスの右脇腹に 5×10^6 個のErbix抵抗性HN5クローン#7細胞を皮下注射した。腫瘍を週に2回、キャリパーで測定し、式： $(幅)^2 \times (長さ) \times 0.5$ に従って、腫瘍体積を mm^3 の単位で算出した。腫瘍が約 $650mm^3$ の平均サイズに達した時に、順次、処置を開始した。マウスを、50mg/kgのSym004またはErbixの腹腔内注射により、週に2回、3週間にわたって処置した。3週間の処置期間後にマウスを5週間にわたって追跡した。

【 0 3 9 7 】

結果

3週間のSym004治療後に、Sym004群ではどちらの腫瘍も完全に除去された（図47）。Erbix群では処置された3匹のマウスのうち2匹が、処置に対して部分的にしか応答しなかった。これは、Erbix処置に対して部分的に抵抗性/不応性である腫瘍を、Sym004で効率よく処置できることを示している。したがって、Erbixに対して獲得された抵抗性機序は、Sym004の効力には影響を及ぼさない。

【 0 3 9 8 】

付表1：抗体可変領域配列（以下、Seq. no. = 配列番号）

【表 20 - 1】

>992VH (Seq. no. 24)

cgcgccgaggtccaactgcagcaacctgggtctgagctggtagggcctggagcttcagtgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcactgggtgaagcagagggcctggacaaggcct
tgagtggattgggaatatcttctggttagtcgtactaactacgatgagaagttcaagagcaaggcc
acactgactgtagacacatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctg
cggctctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtagcggggatgctatggactactgggggtca
aggaacctcagtcaccgtctcg

>1024VH (Seq. no. 25)

cgcgcccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactggtagggcctgggggttcagtgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacaccttcaccagctactggatgcactgggtgaagcagagggcctggacaaggcct
tgagtggataggtgagattaatccttagcagcggctcgtataactacaatgagaagttcaagagtaaggcc
acactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactctg
cggctctattattgtgtaagatactatggttacgacgaagctatggactactgggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcg

10

>1030VH (Seq. no. 26)

cgcgccgaagtgcagctggtaggtctgggggaggccttagtgaagcctggaggggtccctgaaactctcct
gtgcagcctctggattcactttcagtagttatgcctgtcttgggttcgccagactccagagaggaggct
ggagtgggtcgcatccattagtggtgttggttagcaactactttccagacagtgtagaagggtccgtttcacc
atgtccagagataatgccaggaacatcctgtacctccaaatgagcagctctgagggtctgaggacacggcca
tgtattactgtgcaagaggttctgatggttacttctatgctatggactactgggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcg

>1042VH (Seq. no. 27)

cgcgcccaggtgcagcttcagcagcctggggctgaactggtagggcctgggggttcagtgaagctgtcct
gtaaggcttctggctacaccttcaccagccactggatgcactgggtgcagcagagggcctggacaaggcct
tgagtggattggagagattcatccttagcaacggctcgtactaactacaatgagaagttcaagaacaaggcc
acactgactgtagacaaatctccagcacagcctacatgcaactcagcagtttgacatctgaggactctg
cggctctattactgtgcaagatactatggttacgacgatgctatggactactgggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcg

20

>1208VH (Seq. no. 28)

cgcgccgaagtgcagctggtaggtctgggggaggccttagtgaagcctggaggggtccctgaaactctcct
gtgcagcctctggattcgctttcagtagctatgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcatacattggtagtggtgatgataatacccactatccagactctgtgaagggtccgattc
accatctccagacacaatgccaaaaacacctatacctgcaaatgagcagctctgaagtctgaggacacag
ccatgtattactgtgcaagacagaagtatggttaactacggggacactatggactactgggggtcaaggaac
ctcagtcaccgtctcg

30

>1229\ VH (Seq. no. 29)

cgcgcccaggttcagctgaaggagtcaggacctggcctggtagggcgccttcacagagcctgtccatcactt
gctctgtctctgggtttttcattaaccatctatgggtgtacactgggttcgccagcctccaggaagggtct
ggagtggctgggagttatgtgggctgggtggaaatacagattataattcggctctcatgtccagactgaac
atcagcaaggacaattccaagagccaagttttcttaaaagtgaacagctctacaaactgatgacacagcca
tgtactattgtaccagagatcccgatggttactacgtgggggtggttcttcgatgtctggggcgcgggggac
cacggtcaccgtctcg

>1254VH (Seq. no. 30)

cgcgccgaagtgcagctggtaggtctgggggaggccttagtgaagcctggaggggtccctgaaactctcct
gtgcagcctctggattcgcttacagtacctatgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcatacattagtagtggtgggtgatgccgcctactatcccgacactgtgaagggtccgattc
accatctccagagacaatgccaaaaacacctatacctgcaaatgagcagctctgaagtctgaggacacag
ccatgtattactgtgagaggtctcgctatggaaactacggggacgctatggactactgggggtcaaggaac
ctcagtcaccgtctcg

40

>1257VH (Seq. no. 31)

【表 20 - 2】

cgcgccgaggtccagctgcaacagctctggacctgagctgggtgaaacctggggcttcagtgaagataccct
gcaagacttctggatacactttcactgactacaacatggcctgggtgaagcagagccatggaaagagcct
tgagtggattggagatattattcctaacaatgggtggtgctatctacaaccagaaattcaagggaaggcc
actttgactgtagacaaatcctccagtagacgctccatggagctccgcagcctgacatctgaggactg
cagtctatttctgtgcaagaagaatatctactataggtacgacggggcaggtgctctggactactggg
tcaaggaaacctcagtcaccgtctcg

>1260VH (Seq. no. 32)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctgggtggcgccctcacagagcctgtccatcactt
gcactgtctctgggtttttcattaaccacctatggggtacactgggttcgccagcctccaggaaagggtct
ggagtggctgggagtaatatgggctgggtggaagcacaattataattcggctctcatgtccagactgagc
atcaagaaagacaactccaagagccaagttttcttaaaaaatgaacagctctgcaactgatgacacagcca
tgtactactgtgccagagcctatggttacaactttgactattggggccaaggcaccactctcacagtctc
g

10

>1261VH (Seq. no. 33)

cgcgccgaagtgcagctgggtggagtctgggggaggccttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcct
gtgcagctctctggattcactttcagtagctatgtcatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtgcgaaccattactagtgggtgtaggaacatctactatctagacagtgtgaaggggcgattc
actatctccagagacaatgccaaagacacctgtacctgcaaatgagcagctctgagggtctgaggacacgg
ccatgtattactgtgcaagacatgaggactataggtacgacggttactatgctatggactactgggggtca
aggaaacctcagtcaccgtctcg

>1277VH (Seq. no. 34)

cgcgccgaagtgcagctgggtggagtctgggggaggccttagtgaagcctggagagtccttgaaactctcct
gtgcagcctctctggattcgctttcagttactctgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtgcatacatgagtagtgctgggtgatgtcaccttctattcagacactgtgaagggccgattc
accatctccagagacaatgccaaagacacctgtatctgcaagtgagcagctctgaagtctgaggacacag
ccatatattactgtgtaagacaccgggacgtggctatggactactgggggtcaaggaaacctcagtcaccgt
ctcg

20

>1284VH (Seq. no. 35)

cgcgcccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactgggtgaagcctggggcttcagtgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacaccttcaccagcgactggatgcactggatgaaacagaggcctggacaaggcct
tgagtggattggagagattaatcctagtaacggctcgctctagctacaatgagaagttcaagagcaaggcc
aactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctg
cggctctattactgtgcaagaataggtggtatctacgtggagacttactggggccaagggactctggtcac
tgtctcg

30

>1308VH (Seq. no. 36)

cgcgccgaggtccagcttcagcagctctggagctgagctgggtgaggcctgggtccctcagtgaagatttccct
gcaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaactgggtgaggcagaggcctggacagggctct
tgagtggattggacagatttatcctggagatggtgataactaactacaatggaaagttcaagggttagagcc
aactgactgcaaaacaaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctg
cggctctatttctgtgcaagaagggtatcttccctctatgatgtttaccctactactttgactactgggg
ccaaggcaccactctcacagtctcg

>1320VH (Seq. no. 37)

cgcgcccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactgggtgaagcctggggcttcaatgaagctgtcct
gcaaggcttctggctacaccttcaccaactactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggcct
tgaatggattggagaaattaatcctagcaacggctcgtaactaattacaatgagaagttcaagagcaaggcc
aactgactgtagacaaatcgtccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctg
gggtctattactgtgcaaaaggggggaactactatgattacgactgggactactggggccaaggcaccac
tctcacagtctcg

40

>1344VH (Seq. no. 38)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctgggtggcgccctcacagagcctgtccatcactt
gcactgtctctgggtttttcattaaccatctatgggtgtacactgggttcgccagcctccaggaaagggtct
ggagtggctgggagtaatatgggctgggtggaacacaaattataattcggctctcatgtccagactgagc

【表 20 - 3】

atcagcaaagacaactccaagagtcaggtttttcttaaaaaatgaacagtcctgcaaactgatgacacagcca
tgtactttctgtgccagaggctatggctacaatttagactattggggccaaggcaccactctcacagtctc
g

>1347VH (Seq. no. 39)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctgggtggcgccctcacagagcctgtccatcacat
gcaccgtctcaggattctcattaaccggccatgggtgtaaactgggttcgccagcctccaggaaagggctc
ggagtggctgggaatgatatggggtgatggaagcacggactataattcaactctcaaatccagactgagt
atcagcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaaatgaacagtcctgcagactgatgacaccgcca
ggtactactgtgccagaggctacggctacctttactactttgactactggggccaaggcaccactctcac
agtctcg

10

>992VH (Seq. no. 40)

RAEVQLQQPGSELVVRPGASVKLSCKASGYTFSTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNIYPGSRST
NYDEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNQDYYVSSGDAMDYWGQGTSTVTS

>1024VH (Seq. no. 41)

RAQVQLQQPGAELVVRPGASVKLSCKASGYTFSTSHWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPSSGRN
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYGYDEAMDYWGQGTSTVTS

>1030VH (Seq. no. 42)

RAEVQLVESGGGLVVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYALSWVRQTPEKRLEWVASISGVGSTY
FPDSVKGRFTMSRDNARNILYLQMSSLRSEDATAMYYCARGSDGYFYAMDYWGQGTSTVTS

20

>1042VH (Seq. no. 43)

RAQVQLQQPGAELVVKPGASVKLSCKASGYTFSTSHWMHWVQRPGQGLEWIGEIHPSNGRT
NYNEKFKSKATLTVDKSPSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYGYDDAMDYWGQGTSTVTS

>1208VH (Seq. no. 44)

RAEVQLVESGGGLVVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYIGSGDDNT
HYPDSVKGRFTISRHNANTLYLQMSSLKSEDATAMYYCARQKYGNYGDTMDYWGQGTSTVTS

>1229VH (Seq. no. 45)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCSVSGFSLTIYGVHWVRQPPGKGLEWLGVMWAGGNTD
YNSALMSRLNISKDNSKSQVFLKVNLSLTDDTAMYYCTRDPDGYVGVWFFDVWGAGTTVT
VS

30

>1254VH (Seq. no. 46)

RAEVQLVESGGGLVVKPGGSLKLSCAASGFAYSTYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGDAA
YYPDTVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLKSEDATAMYYCARSRYGNYGDMYWGQGTSTVTS

>1257VH (Seq. no. 47)

RAEVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSGYTFSTYDYNMAWVKQSHGKSLEWIGDIIIPNNGGA
IYNQKFKGKATLTVDKSSSTASMELRSLTSEDATAVYFCARKNIYYRYDGAGALDYWGQGT
STVTS

>1260VH (Seq. no. 48)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTIYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
YNSALMSRLSIKKDNSKSQVFLKMNSLTDDTAMYYCARAYGYNFDYWGQGTTLTVS

40

>1261VH (Seq. no. 49)

RAEVQLVESGGGLVVKPGGSLKLSCAVSGFTFSSYVMSWVRQTPEKRLEWVATITSGGRNI
YYLDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSEDATAMYYCARHEDYRYDGYAMDYWGQGTST
VTS

>1277VH (Seq. no. 50)

【表 2 0 - 4】

RAEVQLVESGGGLVKPGESLKLSCAASGFAFSYSDMSWVRQTPEKRLEWVAYMSSAGDVT
FYSDTVKGRFTISRDNANTLYLQVSSLKSEDTAIYYCVRHRDVAMDYWGQGTSTVTVS

>1284VH (Seq. no. 51)

RAQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSDWMHWMKQRPQGLEWIGEINPSNGRS
SYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARIGGIYVETIYWGQGTTLTVS

>1308VH (Seq. no. 52)

RAEVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVRQRPQGLEWIGQIYPGDGDT
NYNGKFKGRATLTANKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRASSLYDVYPYFDYWGQGT
TLTVS

>1320VH (Seq. no. 53)

RAQVQLQQPGAELVKPGASMKLSCKASGYTFTNYWMHWKQRPQGLEWIGEINPSNGRT
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSGVYYCAKGGNYDYDWDYWGQGTTLTV
S

>1344VH (Seq. no. 54)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTIYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGNTN
YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYYCARGYGYNLDYWGQGTTLTVS

>1347VH (Seq. no. 55)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTGHGVNWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGSTD
YNSTLKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTARYYCARGYGYLYFDYWGQGTTLTVS

>992VL (Seq. no. 56)

ctagccgacattcagatgactcagactacatcctcctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatca
gttgccaggacaagtcaggacattggcaattatataaactgggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa
actcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcctcatcaaggttcagtgccagtggtctgga
acagattttctctcaccatttaacaacgtggagcgaagaggtgttgccacttacttttgcacactata
atacgggttcctccgacgttcgggtggagccaaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgcctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgctcacaagagc
ttcaacaggggagagtggt

>1024VL (Seq. no. 57)

ctagccgacatcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatct
cctgcaggtctagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttattgtattgggtatctgcagaagcc
aggccagtcctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgccctcaggagtcaccagacaggttcagt
agcagtggttcaggaaactgatttcacactgagaatcagcagagtgagggtgaggatgtgggtgtttatt
actgtgctcaaaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgt
ggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtg
tgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgcctccaatcgg
gtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgac
gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcg
cccgctcacaagagccttcaacaggggagagtggt

>1030VL (Seq. no. 58)

ctagccgacattgtgctgactcagtcctcctgcttccttagctgtatctctggggcagagggccaccattt
catgcagggccagcaaaagtgtcagtagatctggctatagttttatgcactgggtaccaactgaaaccagg
acagccacccaaactcctcatctatcttgcatccaacctagaatctggggctcctgcccaggttcagtggc
agtgggtctgggacagacttcacctcaacatccatcctgtggaagaggaggtgctgcaacctattact
gtcagcacagtagggagtttccgttaacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggc
tgccaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctg
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgcctccaatcgggta
actcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcc

10

20

30

40

【表 20 - 5】

gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1042VL (Seq. no. 59)

gatattgtgatgactcaggctgcattctccaatccagtcactcttggaaacatcagcttccatctcctgca
ggtctagtaagagttctctacatagtaatggcatcacttatttgtattggtatctgcagaagccaggcca
gtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgccctcaggagtcacagacaggttcagtagcagt
gggtcaagaactgatttcacactgagaatcagcagagtgagggtgaggatgtgggtgtttattactgtg
ctcaaaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgc
accatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctg
ctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccctccaatcgggtaact
cccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgag
caaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgctc
acaaagagcttcaacaggggagagtgt

10

>1208VL (Seq. no. 60)

ctagccgatgttgtgatgactcagactccactctccctgcctgtcagtccttggagatcaagcctccatct
cttgcagatctagtcagagccttgtacacagtaatggaaacacctatttacattggtacctgcagaagcc
aggccagtcctccaaaactcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggtcccagacaggttcagt
ggcagtggtcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtgagggtgaggatctgggagtttatt
tctgctctcaaagtacacatgttccacgttcggaggggggaccaagctggaaatcaaacgaactgtggc
tgcaacctctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

20

>1229VL (Seq. no. 61)

ctagccgacattgtgatgaccagtcctcacaaattcatgtccacatcagtgaggagacaggggtcagcatca
cctgcaaggccagtcaggatgtgactaatgcccgtagcctgggtatcaacaaaaaccaggacaatctcctaa
actactgatttactgggcatccatccgacacactggagtccttgatcgcttcacaggcagtagatctggg
acagattatactctcaccatcaacagtggtgcaggtgaagacctggccctttattattgtcagcaacatt
ataacactccgctcacgttcgggtgctgggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgcacctctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgctcacaaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1254VL (Seq. no. 62)

ctagccgatgttgtgatgacacagactccactctccctgcctgtcagtccttggagatcaagcctccatct
cttgcagatctagtcagagccttgtacacagtaatggtaaacctatttacattggtacctgcagaagcc
aggccagtcctccaaagctcctgctctacaaagtttccaaccgattttctggggtcccagacaggttcagt
ggcagtggtcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtgagggtgaggatctgggagtttatt
tctgctctcaaaatacacatgtgtacacgttcggaggggggacaaagttggaaataaaacgaactgtggc
tgcaacctctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

30

>1257VL (Seq. no. 63)

ctagcccaaatgtgtgtcacacagtcctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcaccatga
cctgcagtgccagctcaagtgtaagttacatttactgggtaccagcagaagccaggatcctccccagact
cctgatttatgacgcatccaacctggcctctggagtcctgttcgcttcagtggcagtggtctgggacc
tcttactctctcacaaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtgaggca
gttacccaatcacgttcgggtcggggacaaagttggaaataaaacgaactgtggctgcacctctgtctt
catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataactc
tatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccctccaatcgggtaactcccaggagagt
tcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagacta

40

【表 20 - 6】

cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttc
aacaggggagagtgt

>1260VL (Seq. no. 64)

ctagccgatataccagatgactcagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatca
gttgagtgcaagtcagggcattaccaattatTTAAactgggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa
actcctgatctattactcatcaagtttactcagggagtcccatcaaggttcagtgagcagtggtctggg
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcagtata
gtgagattccgtacacgttcggaggggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagagggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtgt

10

>1261VL (Seq. no. 65)

ctagcccaaattgtgctgaccagctctccagcaatcatgtctgcactctccaggggagaaggtcaccataa
cctgcagtgccagctcaagtgtaagttacatgcactgggtccagcagaagccagggcacttctcccaaact
ctggatttatagtacatccaacctggcttctggagtcctgtcgttcagtgagcagtggtctgggacc
tcttactctctcacaatcagccgaatggaggtgaagatgctgccacttattactgccagcaaaggagta
gttaccatacacgttcggaggggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggctgcaccatctgtctt
catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc
tatcccagagagggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagt
tcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagacta
cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttc
aacaggggagagtgt

20

>1277VL (Seq. no. 66)

ctagccgatgttgtgatgaccagactccactctccctgctgtcagtccttgagatcaagcctccatct
cttgagatctagtacagccttgtaacacagtaattggaacacctattacattggtaacctgcagaagcc
aggccagtcctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaacgattttctggggtccagacaggttcagt
ggcagtggtacagggacagatttcacactcaagatcagcagagtgaggctgaggtctgggagtttatt
tctgtctctcaaagtacacatgttccgacgttcgggtggaggaccaagctggaatcaaacgaactgtggc
tgaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgtgtaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaatcgggta
actcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaagagagcttcaacaggggagagtgt

30

>1284VL (Seq. no. 67)

ctagccgacattgtgctaacacagtcctcctgcttcccttagctgtatctctggggcagagggccaccatct
catgcagggccagccaaagtgtcagtcacatctacctatagttatatgcactgggtatcaacagaaatcagg
acagccacccaaactcctcatcaagtatgcataacctagagtcctggggtccctgccaggttcagtggc
agtgggtctgggacagacttcacctcaacatccatcctgtggaggaggagatactgcaacatattact
gtcagcacagttgggagattccgtggacgttcgggtggaggaccaagctggaatcaaacgaactgtggc
tgaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgtgtaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaatcgggta
actcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgct
gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
gtcacaagagagcttcaacaggggagagtgt

>1308VL (Seq. no. 68)

ctagccgacatccagatgacacaaactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatca
gttgagggcaagtcaggacattagcaattatTTAAactgggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa
agtctgatctactacacatcaagattactcagggagtcccatcaaggttcagtgagcagtggtctgga
acagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaaacagggta
atacgttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaataaaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagagggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggaga

40

【表 20 - 7】

gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgctgccaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagc
ttcaacaggggagagtgt

>1320VL (Seq. no. 69)

ctagccgacattcagatgacccagactacatccctcctgtctgcctctctgggagacagagtcacccatca
gttgacagtgaagtcaggacattagcaattatTTAAactggatcagcagaaaccagatggaactgttaa
actcctgatctatcacacatcaactttacactcaggagtcacccatcaaggttcagtggcagtggtctggg
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcaatata
gtaagcttccgtggagcgttcggtggaggcaccagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgtaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgctgccaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagc
ttcaacaggggagagtgt

10

>1344VL (Seq. no. 70)

ctagccgacattcagatgacacagactacttccctcctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatta
gttgacagtgaagtcagggcattagtaattatTTAAactggatcagcagaaaccagatggaactgttaa
actcctgatctattacacatcaagttacactcaggagtcacccatcaaggttcagtggcagtggtctggg
acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcagtata
gtaagcttccgtacacgttcggagggggaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgctgccaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagc
ttcaacaggggagagtgt

20

>1347VL (Seq. no. 71)

ctagccgaaaaatgtgctgactcagctctccagcaatcatgtctgcatctccaggggaaaaggtcacccatga
cctgcagggccagctcaagtgtaagttccagttacttgactggaccagcaaaagtcaggtgcctcccc
caaactctggatttatagcacatccaacttggtctctggagtcctgctcgcttcagtggcagtggtct
gggacctcttactctctcacagtcaacagtggtggagactgaagatgctgccacttattactgccaccagt
acagtggtttcccatcagcttcggctcggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggctgcaccatc
tgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaat
aacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccagg
agagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagc
agactacgagaaacacaaagtctacgctgccaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaag
agcttcaacaggggagagtgt

30

>992VL (Seq. no. 72)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV
PSRFSGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1024VL (Seq. no. 73)

LADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPYTFGGGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

>1030VL (Seq. no. 74)

LADIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSFMHWYQLKPGQPPKLLIYLASNL
ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPLTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【表 20 - 8】

>1042VL (Seq. no. 75)

DIIVMTQAAFSNPVTLGTASISCRSSKSLHNSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA
SGVDPDRFSSSGSRTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPYTFGGGKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1208VL (Seq. no. 76)

LADVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYST
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

>1229VL (Seq. no. 77)

LADIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTNAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASIRHTGV
PDRFTGSRSGTDYTLTINSVQAEDLALYYCQQHYNTPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1254VL (Seq. no. 78)

LADVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYST
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1257VL (Seq. no. 79)

LAQIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYIYWYQQKPGSSPRLIYDASNLASGVP
VRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPITFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

>1260VL (Seq. no. 80)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYSSSLHSGV
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSEIPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFP
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1261VL (Seq. no. 81)

LAQIVLTQSPAIMASAPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVP
ARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

>1277VL (Seq. no. 82)

LADVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYST
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1284VL (Seq. no. 83)

LADIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSTYSYMHWFQQKSGQPPKLLIKYASNL
ESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYCQHSWEIPWTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYST
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

>1308VL (Seq. no. 84)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKVLIIYTSRLHSGV
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFP
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【表 2 0 - 9】

>1320VL (Seq. no. 85)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSTLHSGV
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1344VL (Seq. no. 86)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGV
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

>1347VL (Seq. no. 87)

LAENVLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKLWIYSTSNLASG
VPAFSGSGSGTSYSLTVNSVETEDAATYYCHQYSGFPFTFGSGTKLELKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 3 9 9】

付表2：抗体定常領域配列

【表 2 1】

> ヒトIGKC領域 (Seq. no. 88)

ttcatcttccccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataact
 tctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcggttaactcccaggagag
 tgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagac
 tacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgctcacaagagct
 tcaacaggggagagtgttaataagcgccgcccgttgaggcggt

> ヒトIGKC領域 (Seq. no. 89)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

エクソン1 1..298

イントロン 299..689

エクソン2 690..734

イントロン 735..852

エクソン3 853..1182

イントロン 1183..1279

エクソン4 1280..1602

10

> ヒトIGHG1定常ドメインゲノム配列

(Seq. no. 90)

agtgcctccaccaaggcccatcggtcttccccctggcacccctcctccaagagcacctctggggggcacag
 cggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccct
 gaccagcggcgtgcacaccttccccggtgtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtg
 accgtgccctccagcagcttgggcacccagacctaactctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacca
 aggtggacaagagagtgtggtgagaggccagcacaggaggagggtgtctgctggaagccaggctcagcg
 ctctgctgagcagcatcccggtatgacagtcacagtcacaggcagcaaggcaggcccgctctgctctt
 caccggaggcctctgcccggcccaactcatgctcaggggagagggtcttctggctttttccccaggctctg
 ggcaggcacaggctaggtgcccttaacccaggccctgcacaaaaggggcagggtgctgggctcagacctg
 ccaagagccatattccggaggacccctgcccctgacctaaagcccaacccaaaggccaaactctccactccc
 tcagctcggaacaccttctctctctccagattccagtaactcccaatcttctctctgacagagcccaaatct
 tgtgacaaaactcacacatgcccacccgtgcccaggtaagccagcccaggcctcgccctccagctcaaggc
 gggacagggtgccttagagtagcctgcatccaggacaggcccccagcgggtgctgacagctccacctcca
 tctcttctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttctcttccccccaaaacccaaggacac
 cctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtc
 aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtaca
 acagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaa
 gtgcaaggctctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacatctccaaagccaaagggtgggacc
 cgtgggggtgcgaggggccacatggacagaggccggctcgcccccacctctgcccctgagagtgaacctgtg
 ccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacagggtgtacacctgcccccatcccgggaggaga
 tgaccaagaaccaggctcagcctgacctgctggtcaaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg
 ggagagcaatgggcagccggagagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctcctt
 tctctctatagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcaggggaaacgtcttctcatgctccgtga
 tgcagtaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtccccgggtaaatga

20

30

>IGHG1 (Seq. no. 91)

SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTF
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 LDDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 4 0 0 】

付表3：二重可変ドメイン抗体配列

40

【表 2 2 - 1】

>992L1024\IGHV (Seq. no. 92)

ggcgcgccgaggtccaactgcagcaacctgggtctgagctgggtgagcctggagcttcagtgaagctgtc
 ctgcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcactgggtgaagcagagggcctggacaaggc
 cttgagtggtattgggaataatttatcctggtagtctgtagtactaactacgatgagaagttcaagagcaagg
 ccacactgactgtagacacatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactc
 tgcgggtctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtagcggggatgctatggactactgggg
 caaggaacctcagtcacogtctcgtcagccagcaccaaggccccccaggtccaactgcagcagcctgggg
 ctgaactgggtggagcctgggggttcagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacaccttcaccagtca
 ctggatgcactgggtgaagcagagggcctggacaaggccttgagtggataggtgagattaatcctagcagc
 ggtcgtaataactacaatgagaagttcaagagtaaggccacactgactgtagacaaatcctccagcacag
 cctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactctgcgggtctattattgtgtaagatactatgggta
 cgacgaagctatggactactgggggtcaaggaacctcagtcacogtctcgag

10

>992L1024\IGKV (Seq. no. 93)

gctagccgacattcagatgactcagactacatcctccctgtctgctctctgggagacagagtcaccatc
 agttgcaggacaagtcaggacattggcaattattttaaactggatcagcagaaaccagatggaactgtta
 aactcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcctcatcaagggttcagtggcagtggggtctgg
 aacagatttttctctcaccattaacaacgtggagcaagaggatggtgccaacttacttttgccaacactat
 aatacgggttctccgagcttcggtggagggcaccagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccagaca
 tctgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatctcctgcaggtc
 tagtaagagtcctcctacatagtaatggcatcacttatttgtattgggtatctgcagaagccaggccagtct
 cctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgccctcaggagtcctcagacaggttcagtagcagtggtg
 caggaactgatttcacactgagaatcagcagagtgaggctgaggatgtgggtgtttattactgtgtctca
 aaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaaagctggaaataaaacgaactgtggctgcacca
 tctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgttgtgtgcctgtctga
 ataaacttctatcccagagaggccaaagtaacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccca
 ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaa
 gcagactacgagaaacacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcaggggcctgagctcgcccgctcaca
 agagcttcaacaggggagagtggttaataagcggccgc

20

>1024L992\IGHV (Seq. no. 94)

ggcgcgcccgaggtccaactgcagcagcctgggggtgaactgggtggagcctgggggttcagtgaagctgtc
 ctgcaaggcttctggctacaccttcaccagtcactggatgcactgggtgaagcagagggcctggacaaggc
 cttgagtggtataggtgagattaatcctagcagcggctcgtaataactacaatgagaagttcaagagtaagg
 ccacactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactc
 tgcgggtctattattgtgtaagatactatgggttacgacgaagctatggactactgggggtcaaggaacctca
 gtcacogtctcgtcagccagcaccaaggcccccgaggtccaactgcagcaacctgggtctgagctgggtga
 ggccctggagcttcagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcactg
 ggtgaagcagagggcctggacaaggccttgagtggttggaatatttatcctggtagtcgtagtactaac
 tacgatgagaagttcaagagcaaggccacactgactgtagacacatcctccagcacagcctacatgcagc
 tcagcagcctgacatctgaggactctgcgggtctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtag
 cggggatgctatggactactgggggtcaaggaacctcagtcacogtctcgag

30

>1024L992\IGKV (Seq. no. 95)

gctagccgacatcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatc
 tcttgcagggtctagtaagagtcctcctacatagtaatggcatcacttatttgtattgggtatctgcagaagc
 caggccagtcctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgccctcaggagtcctcagacaggttcag
 tagcagtggggtcaggaaactgatttcacactgagaatcagcagagtgagggtgaggtatgtgggtgtttat
 tactgtgtcctcaaaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactg
 tggctgcaccagacattcagatgactcagactacatcctcctgtctgcctctctgggagacagagtcac
 catcagttgcaggacaagtcaggacattggcaattattttaaactggatcagcagaaaccagatggaact
 gttaaactcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcctcatcaagggttcagtggcagtggtg
 ctggaacagatattttctctcaccattaacaacgtggagcaagaggatggtgccacttacttttgccaaca
 ctataatacgggttccctccgacgttcggtggagggcaccagctggaaatcaaacgaactgtggctgcacca
 tctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgttgtgtgcctgtctga
 ataaacttctatcccagagaggccaaagtaacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccca
 ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaa

40

【表 2 2 - 2】

gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgccaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcaciaa
agagcttcaacaggggagagtggttaataagcgccgc

>992L1024\IGHV (Seq. no. 96)

RAEVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNIYPGSRST
NYDEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYVSSGDAMDYWGQGTS
VTVSSASTKGPEVQLQQPGAELEVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPGQGLEWIG
EINPSSGRNNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYGYDEAMDYW
GQGTSVTVS

>992L1024\IGKV (Seq. no. 97)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV
PSRFGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPDIVMT
QAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPD
RFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNFPYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

>1024L992\IGHV (Seq. no. 98)

RAQVQLQQPGAELEVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPSSGRN
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYGYDEAMDYWGQGTSVTVS
SASTKGPEVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNIYP
GSRSTNYDEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYVSSGDAMDYW
GQGTSVTVS

20

>1024L992\IGKV (Seq. no. 99)

LADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPYTFGGGTKLEIKRTVAAP
DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS
RFGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNFPYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【図 1】

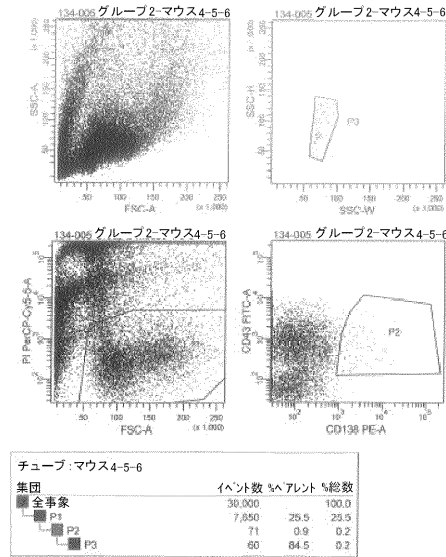


Fig. 1

【図 2】

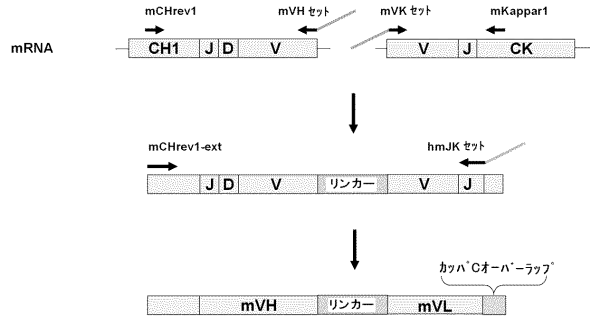


Fig. 2

【図 3】

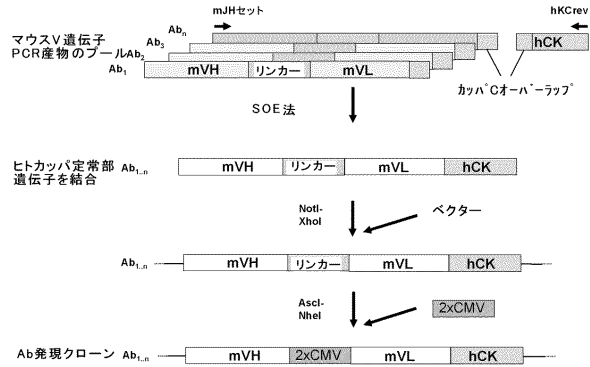


Fig. 3

【図 4】

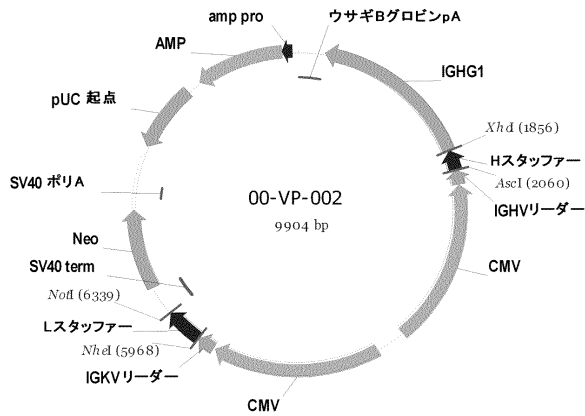


Fig. 4

【図 5】

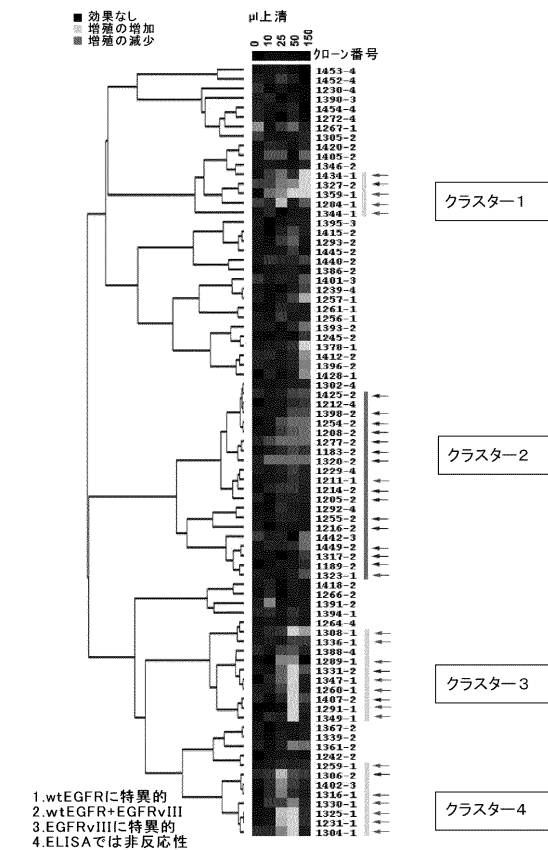


Fig. 5

【図 6】

	I		II	III			
クローン	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Ab-2
992	-20	-2	-21	-3	-14	78	77
1024	11	18	11	12	27	3	75
1030	12	-20	-35	82	92	91	-1
1042	-7	7	-29	-7	15	24	81
1208	-21	-3	-10	84	89	82	20
1229							
1257	78	92	77	25	33	6	37
1260	90	92	12	17	24	12	8
1261	57	88	30	6	13	3	6
1277	32	28	8	77	85	61	20
1284	68	52	9	31	30	12	26
1308	21	91	19	0	12	4	11
1320	2	8	0	6	7	9	-9
1344	82	82	40	28	36	19	14
1428	91	94	34	11	17	18	14
Erbibitux	-17	4	-4	21	-73	78	69
Erbibitux	-22	2	-5	22	-81	78	68
Vectibix	-30	-12	-24	6	57	60	42
Vectibix	-13	-1	-6	16	84	68	46

Fig. 6A

	I		II	III				エピソード 特性
クローン	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Ab-2	
992						+++	+++	ドメイン III
1024					+			ドメイン III
1030				+++	+++	+++		ドメイン III
1042							+++	ドメイン III
1208				+++	+++	+++		ドメイン III
1229								不明
1257	+++	+++	+++	+	+		+	ドメイン I
1260	+++	+++						ドメイン I
1261	++	+++	+					ドメイン I
1277	+	+		+++	+++	++		ドメイン III
1284	+++	++			+		+	ドメイン I
1308	++	+++						ドメイン I
1320								不明
1344	+++	+++	+	+	+			ドメイン I
1428	+++	+++	+					ドメイン I
Erbibitux						+++	++	ドメイン III
Erbibitux						+++	++	ドメイン III
Vectibix					++	++	+	ドメイン III
Vectibix					++	++	+	ドメイン III

Fig. 6B

【図 8】

	I		II	III				Erbibitux	Vectibix
クローン	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Ab-2		
992	-4	-3	7	1	-4	59	85	105	
1024	-3	-13	0	0	-5	6	104	102	
1030	54	-5	6	104	84	18	1	16	
1042	-6	-8	0	10	-4	14	107	103	
1208	5	4	5	66	32	37	18	29	
1229									
1257	22	100	85	-5	1	-1	0	-2	
1260	91	99	94	1	12	7	8	10	
1261	24	94	54	-3	-6	-4	-2	-5	
1277	5	3	10	95	62	81	59	86	
1284	66	-15	9	-13	-9	-9	-7	-13	
1308	15	85	11	-4	-3	-5	-6	-8	
1320	-3	-6	2	-3	-2	3	2	6	
1344	87	86	25	-5	0	-2	-4	-5	
1347	17	86	11	-1	-3	-3	-4	-6	
1428	77	88	42	0	1	0	2	0	
Erbibitux	-3	-3	0	29	0	101	94	104	
Vectibix	0	-4	5	0	0	88	79	102	

Fig. 8A

	I		II	III				エピソード 特性
クローン	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Ab-2	
992						+++	+++	ドメイン III
1024						+++	+++	ドメイン III
1030	+++			+++	+++	+++	+++	ドメイン III
1042				+++	+			ドメイン III
1208				+++	+			ドメイン III
1229								結合しない
1257	+++	+++	++					ドメイン I
1260	+++	+++	++					ドメイン I
1261	+++	+++	++	+++	++	++	+++	ドメイン I
1277				+++	++	++	+++	ドメイン III
1284	+++							ドメイン I
1308	+++	+++						ドメイン I
1320								不明
1344	+++	+++						ドメイン I
1347	+++	+++						ドメイン I
1428	+++	+++	+			+++	+++	ドメイン III
Erbibitux						+++	+++	ドメイン III
Vectibix						+++	+++	ドメイン III

Fig. 8B

【図 7】

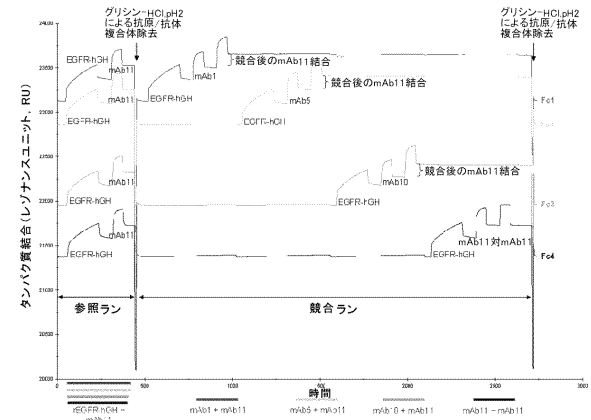


Fig. 7

【図 9】

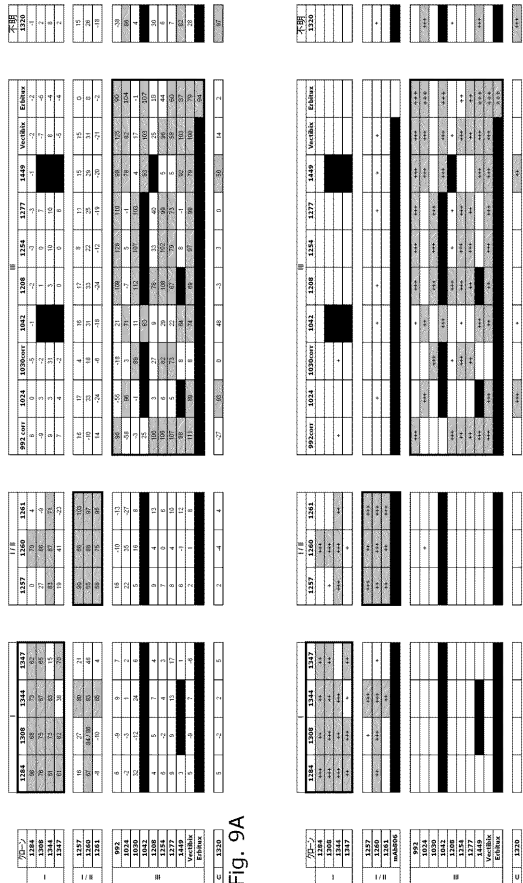


Fig. 9B

Fig. 9A

【図 10】

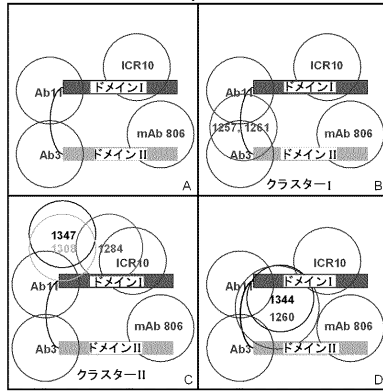


Fig. 10A

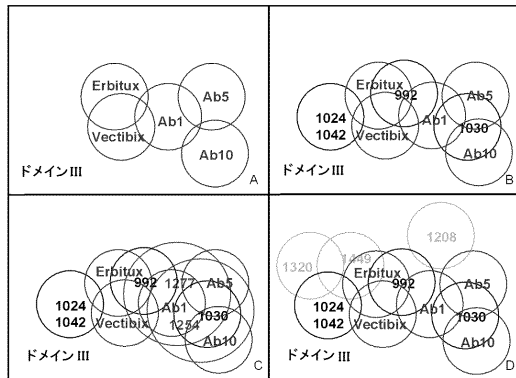


Fig. 10B

【図 11 - 1】

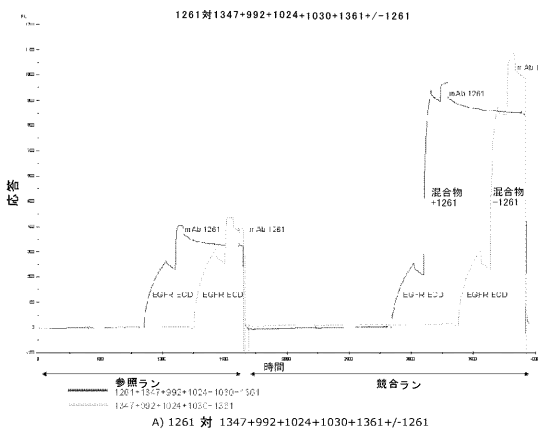
試料mAb	阻害 試料mAb 1030 対 992	Rumax 参照サイクル	Rumax 競合サイクル
ドメインIII	992	81	85 ^{AA}
ドメインIII	992 + 1030 対 1024	100	126 ^{AA}
ドメインI/II	992 + 1030 + 1024 対 1261	157	177 ^{AA}
ドメインI	992 + 1030 + 1024 対 1361	75	79 ^{AA}
ドメイン不明	992 + 1030 + 1024 対 1361	162	161 ^{AA}

Fig. 11A

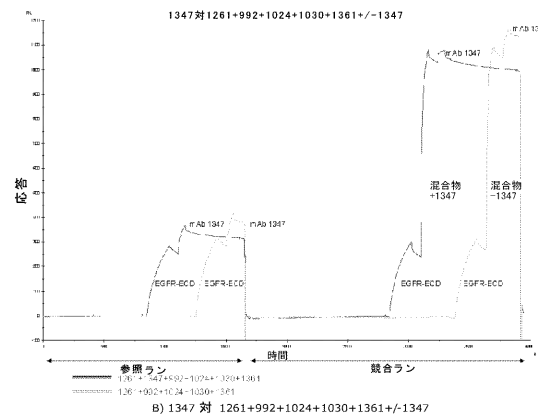
試料mAb	抗体混合物 (N=6)			試験した試料mAbを除く 抗体混合物 (N=6-1)		
	阻害 試料mAb	Rumax 参照 サイクル	Rumax 競合 サイクル	阻害 試料mAb	Rumax 参照 サイクル	Rumax 競合 サイクル
ドメインI/II	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 1261	135	7	1347+992+1024+1030+1361 対 1261	139	168 ^{AA}
ドメインI	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 1347	80	91	1261+992+1024+1030+1361 対 1347	107	92
ドメインIII	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 992	116	85	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 992	71	111 ^{AA}
ドメインIII	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 1024	113	110	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 1024	122	152 ^{AA}
ドメインIII	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 1030	87	87	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 1030	74	82 ^{AA}
ドメイン不明	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 1361	102	178	1261+1347+992+1024+1030 対 1361	159	152

Fig. 11B

【図 11 - 2】



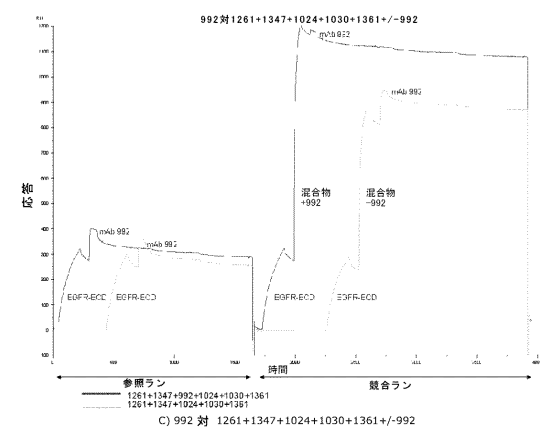
A) 1261 対 1347+992+1024+1030+1361+/-1261



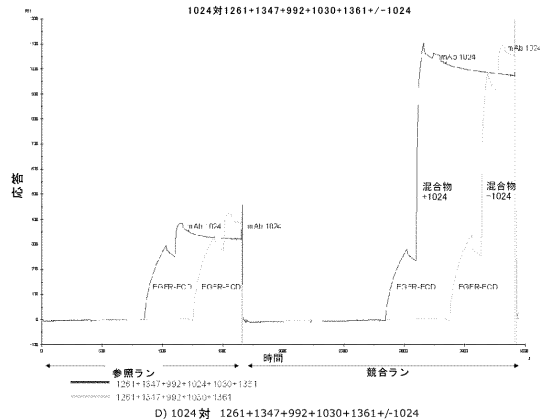
B) 1347 対 1261+992+1024+1030+1361+/-1347

Fig. 11C

【図 11 - 3】



C) 992 対 1261+1347+1024+1030+1361+/-992



D) 1024 対 1261+1347+992+1030+1361+/-1024

Fig. 11C (Cont.)

【図 11 - 4】

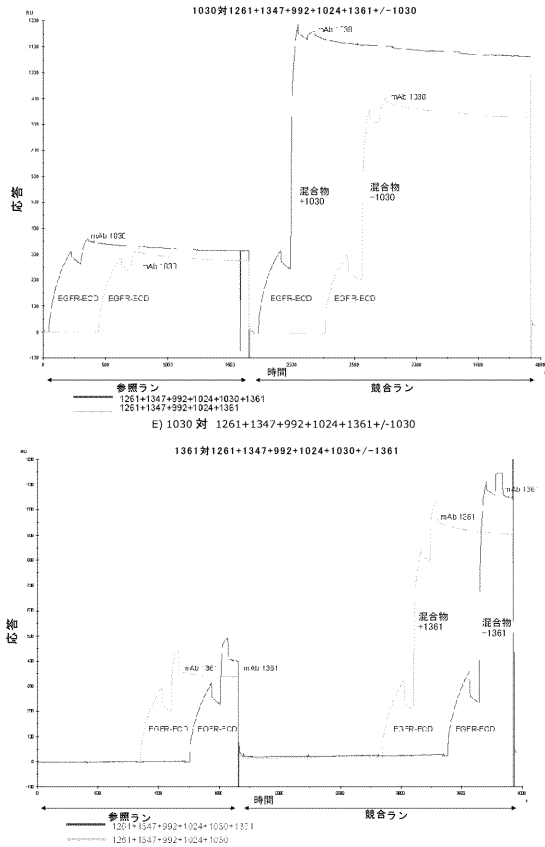


Fig. 11C (cont.)

【図 13】

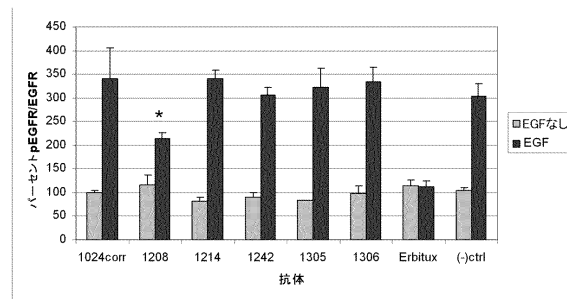


Fig. 13A

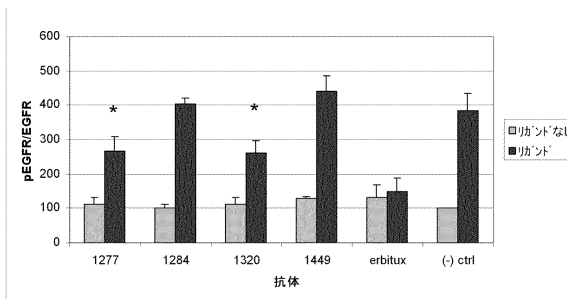


Fig. 13B

【図 11 - 5】

ドメイン I	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 1284	68	17
ドメイン II	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 1257	107	-7*
ドメイン 不明	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 1183	56	-7*
ドメイン 不明	1261+1347+992+1024+1030+1361 対 1255	79	-5*

Fig. 11D

【図 12 A】

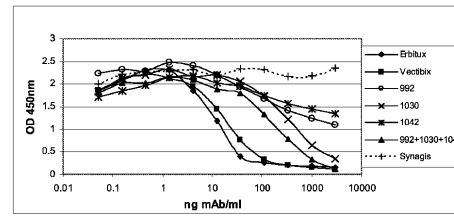


Fig. 12A

【図 12 B】

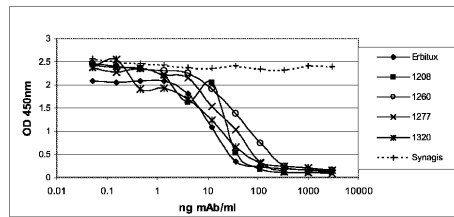


Fig. 12B

【図 14】

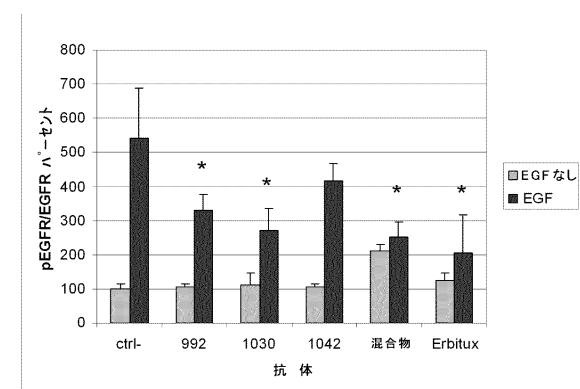


Fig. 14

【図 15】

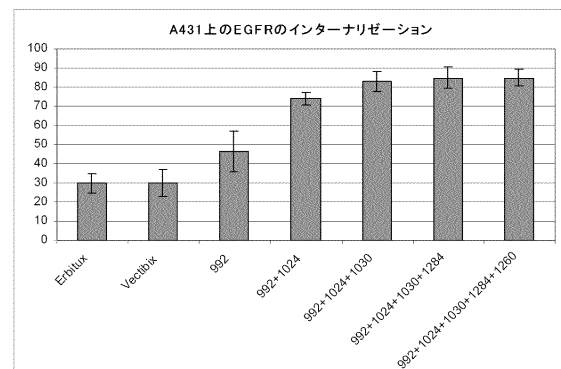
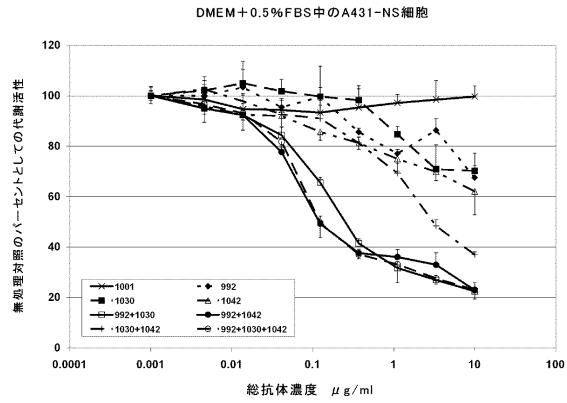
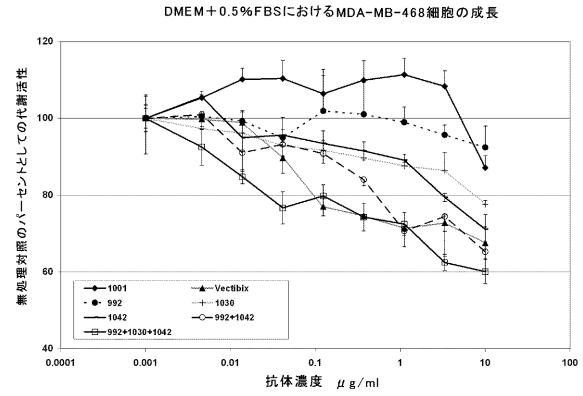


Fig. 15

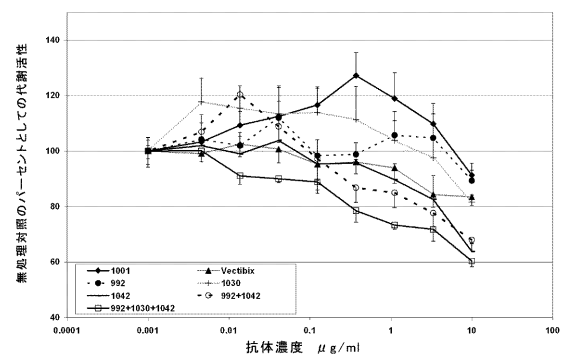
【図 16 - 1】



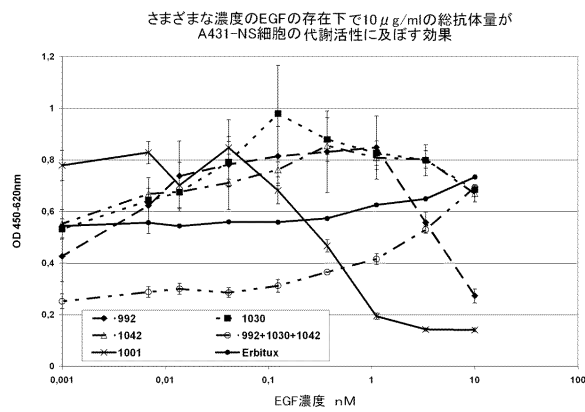
【図 16 - 2】



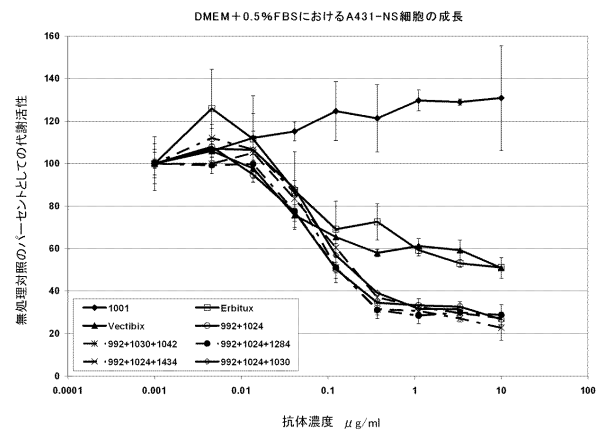
DMEM+0.5%FBSにおけるDU145細胞の成長



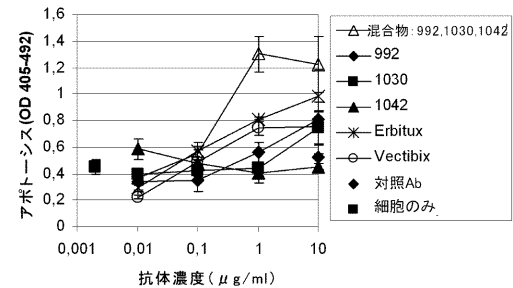
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【図 20】

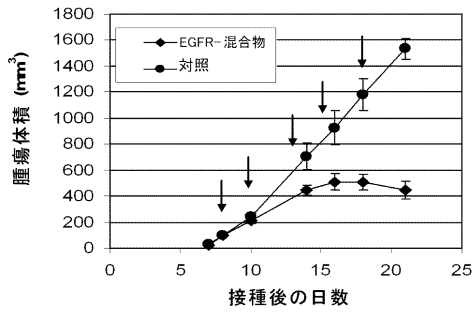


Fig. 20

【図 21】

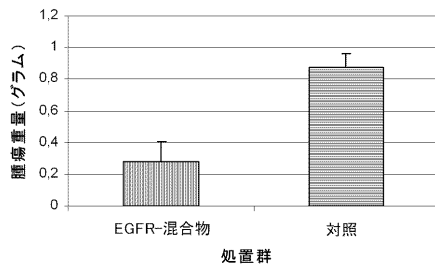


Fig. 21

【図 23 B】

LEERKVVQGTSTNKLTLQGTEDHFLSLQRMFNNECVVLGNLEITVQRYOLSTLTIQVAVYVLJALN
 TVRLFLNLQILIRKMNYSYALVNLNYDANKGLKSLPMNKQLLHGVNPNPALCNVESLQW
 RDIVSSEFLSNMSDFQNLHLSGQKCDPSCPNCSGAGBENCQKLTILICAQCSGRCKRKSFSUCCHN
 QCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDAPCKDTPPLMLYNPTTYQMDVNPGRYSFGATCVKRCPRNVVVDH
 GSVACGADSYEMEDGVKRCRCEGPRKVCNGIGLGEKPTLSINATINHFKNCTSIQDLNLLPV
 NPKDSPTHTPLDQGLDLKTYKLTISPLIQAMPENITLHAFENLEIRGRTKQGGFLAVVSLN
 ITSLGLSLKELISGQDVTISGNKILCVANTINWKKLFPTSSQRTKLIENRGENSKATQGVCHALCSPE
 CNGPEPRDVCQGNVSRGRBCVDKCNILLEGPREPVENSEICQHFELPQVNNITCTGRGPDNLCQAR
 YIDGPHCVKTCFAGVMGENTLVKRYADAGHVCHLCPNCTYCTGCPGLSGCARNGPKTIS

Fig. 23B

【図 22】

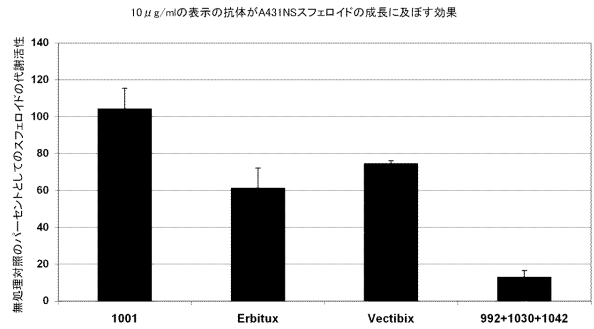


Fig. 22

【図 23 A】

ctggaggaaaagaaatttgcgaaggcagagtaacaaactcacgcagittgggcaactttgaagatcatt
 ttctgaagctccagagagatttcaataactgtgaagtggctttgggaacttgaatttaactacgtgca
 gaggaaattatgacttttcttcttaaagaactccagagagtggtgggttatgtctcatcgccctcaac
 acagttggagcgggatttctttggaaaactgcagatcatcagaggaaactgtactatgaaatttctatg
 ccttagcagttcttatcaactatgatgaaataaaacagagctgaaggagctgccaatgagaatactaca
 ggaactctctgacggcggtggtggttgcgaacaaactgccccttggtgacagctggagagatccagttg
 cgggacatagtcagcagcgagtttctcagcaacatgtcgatggacttccagaaacacttgggcagctgpc
 aaaaagtgtgatccaaagtgtcccaatgggagctgctgggtgcaaggagaggaactgccagaactgac
 caaaatcatctgtgccagcagctgctccggcgctgcccggcggaagtcccccagtgactgtgcacaaac
 cagttgtcccggggtgcaaggcgcccggaagacagctgactgtgtccggaacttccagagcgaag
 ccaagtgcgaaggaaactgcccccactatgctctacaacccaacacacacagatggatgtgaactc
 cgaggcgcaaatatacagcttgggtgcaactgctgaagaagtgtcccogtaattatgtgtgacagatcac
 ggctgtggtgtccagcctgcggggcgcaagctatgagatggagagagacggcgctccgaagttaaga
 agtgcgaagggtctgcgcaagttgttcaatggatagttatgtgtgaatttaagacaactctccat
 aatgtcaaaaattataaacacttcaaaaactgcaactccatgaagtggcgatctccatcctgcgggtg
 gcaatttaggggtgacttcttcaacaactccogctctgtgatccagagaactggatattctgaaaacog
 caaaggaaatcacagggtttttgtgatccagcttggcctgaaaacagagcggagactccatgtttga
 gaactcagaatcataagtggaagcaacagaacaggtcaggtttcttctggcgctgacgctgac
 ataacactccttggtatagctcctccaaggagataagcagtgagatgtgataatttcaggaacaaaa
 atttgcctatgcaatacaataaactggaaaactgtttgggaactccagtcagaaaacaaaattat
 aagcaacagaggtgaaaacagctgcaaggccacgggcaggtctgcacgtctgtgtcccccagggc
 tgtggggcgccggcccagggtggtgtctctgcgaagtgtcagcggggcgagaaagcgtggaca
 agtgcacaaactccggaaggcgccgaaggaggtttgtggaactctgagtgcaactgtgccacacaga
 atgctgcccaggtcatgaataactgcaacagagcggggaccagacaactgcatcaggtgtgccac
 tacatgcaagcggcccaatgctcaagactgcccagcagaggtcagtcagtcagggaacacacacactggtct
 ggaagtacgagagcggcgcaagtggtgcacactgpcatccaaactgcaactaggatgactggggc
 aggtcttgaggagctgtgaaaggacggggcctaagaatccatcc

Fig. 23A

【図 24 - 1】

(1) 1 10 20 30 47
 カニクイザルEGFR ECD (1) LEERKVVQGTSTNKLTLQGTEDHFLSLQRMFNNECVVLGNLEITVQ
 YVRLFLNLQILIRKMNYSYALVNLNYDANKGLKSLPMNKQLLHGVNPNPALCNVESLQW
 RDIVSSEFLSNMSDFQNLHLSGQKCDPSCPNCSGAGBENCQKLTILICAQCSGRCKRKSFSUCCHN
 QCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDAPCKDTPPLMLYNPTTYQMDVNPGRYSFGATCVKRCPRNVVVDH
 GSVACGADSYEMEDGVKRCRCEGPRKVCNGIGLGEKPTLSINATINHFKNCTSIQDLNLLPV
 NPKDSPTHTPLDQGLDLKTYKLTISPLIQAMPENITLHAFENLEIRGRTKQGGFLAVVSLN
 ITSLGLSLKELISGQDVTISGNKILCVANTINWKKLFPTSSQRTKLIENRGENSKATQGVCHALCSPE
 CNGPEPRDVCQGNVSRGRBCVDKCNILLEGPREPVENSEICQHFELPQVNNITCTGRGPDNLCQAR
 YIDGPHCVKTCFAGVMGENTLVKRYADAGHVCHLCPNCTYCTGCPGLSGCARNGPKTIS
 セクション 2
 (48) 48 60 70 80 94
 カニクイザルEGFR ECD (48) RNYDLSFLATIQEVASYVLALNIVVERIFLENLQIIRGNHYTNSYA
 LIEGFR ECD (48) RNYDLSFLATIQEVASYVLALNIVVERIFLENLQIIRGNHYTNSYA
 コンセンサス (48) RNYDLSFLATIQEVASYVLALNIVVERIFLENLQIIRGNHYTNSYA
 セクション 3
 (95) 95 100 110 120 130 141
 カニクイザルEGFR ECD (95) LAVLNTYDANKTGLKLELPMRNLQELILHGAVRFSNNPALCNVESLQWR
 LIEGFR ECD (95) LAVLNTYDANKTGLKLELPMRNLQELILHGAVRFSNNPALCNVESLQWR
 コンセンサス (95) LAVLNTYDANKTGLKLELPMRNLQELILHGAVRFSNNPALCNVESLQWR
 セクション 4
 (142) 142 150 160 170 188
 カニクイザルEGFR ECD (142) DIVSSEFLSNMSDFQNLHLSGQKCDPSCPNCSGAGBENCQKLTIL
 LIEGFR ECD (142) DIVSSEFLSNMSDFQNLHLSGQKCDPSCPNCSGAGBENCQKLTIL
 コンセンサス (142) DIVSSEFLSNMSDFQNLHLSGQKCDPSCPNCSGAGBENCQKLTIL
 セクション 5
 (189) 189 200 210 220 235
 カニクイザルEGFR ECD (189) IICAQCSGRCKRKSFSUCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEAT
 LIEGFR ECD (189) IICAQCSGRCKRKSFSUCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEAT
 コンセンサス (189) IICAQCSGRCKRKSFSUCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEAT
 セクション 6
 (236) 236 250 260 270 282
 カニクイザルEGFR ECD (236) CKDTCFFLMLYNPTTYQMDVNPGRYSFGATCVKRCPRNVVVDHGS
 LIEGFR ECD (236) CKDTCFFLMLYNPTTYQMDVNPGRYSFGATCVKRCPRNVVVDHGS
 コンセンサス (236) CKDTCFFLMLYNPTTYQMDVNPGRYSFGATCVKRCPRNVVVDHGS
 セクション 7
 (283) 283 290 300 310 329
 カニクイザルEGFR ECD (283) CVRACGADSYEMEDGVKRCRCEGPRKVCNGIGIGEFKDLISINA
 LIEGFR ECD (283) CVRACGADSYEMEDGVKRCRCEGPRKVCNGIGIGEFKDLISINA
 コンセンサス (283) CVRACGADSYEMEDGVKRCRCEGPRKVCNGIGIGEFKDLISINA
 セクション 8
 (330) 330 340 350 360 376
 カニクイザルEGFR ECD (330) TNIKHFNKCTSIQDLHLPLVAFRGDSFTHTPLDQGLDILKTYVE
 LIEGFR ECD (330) TNIKHFNKCTSIQDLHLPLVAFRGDSFTHTPLDQGLDILKTYVE
 コンセンサス (330) TNIKHFNKCTSIQDLHLPLVAFRGDSFTHTPLDQGLDILKTYVE
 セクション 9
 (377) 377 390 400 410 423
 カニクイザルEGFR ECD (377) ITGFLLIQAWPENTDLHAFENLEIRGRTKQGGFLAVVSLNITS
 LIEGFR ECD (377) ITGFLLIQAWPENTDLHAFENLEIRGRTKQGGFLAVVSLNITS
 コンセンサス (377) ITGFLLIQAWPENTDLHAFENLEIRGRTKQGGFLAVVSLNITS

Fig. 24

【図 24 - 2】

	(424)	424	430	440	450	460	470
カニクイザルEGFR ECD	(424)	LGLRSLKEISDGGVITISGNKNL	CYANTINWKKLF	GTSGKTIISNR			
ヒトEGFR ECD	(424)	LGLRSLKEISDGGVITISGNKNL	CYANTINWKKLF	GTSGKTIISNR			
コンセンサス	(424)	LGLRSLKEISDGGVITISGNKNL	CYANTINWKKLF	GTSGKTIISNR			
	(471)	471	480	490	500	510	517
カニクイザルEGFR ECD	(471)	GENSKRATGQVCHALCSPEGCWG	PEPKDCVSCNVSRGECVDR	CNI			
ヒトEGFR ECD	(471)	GENSKRATGQVCHALCSPEGCWG	PEPKDCVSCNVSRGECVDR	CNI			
コンセンサス	(471)	GENSKRATGQVCHALCSPEGCWG	PEPKDCVSCNVSRGECVDR	CNI			
	(518)	518	530	540	550	564	
カニクイザルEGFR ECD	(518)	LEGEPRDFEVENSECIQCHPECLPQ	VMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG				
ヒトEGFR ECD	(518)	LEGEPRDFEVENSECIQCHPECLPQ	VMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG				
コンセンサス	(518)	LEGEPRDFEVENSECIQCHPECLPQ	VMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG				
	(565)	565	570	580	590	600	611
カニクイザルEGFR ECD	(565)	PHCVKTCFAGVMGENTLVWKYADASHV	CHLCPNCTYGTGTFPLEG				
ヒトEGFR ECD	(565)	PHCVKTCFAGVMGENTLVWKYADASHV	CHLCPNCTYGTGTFPLEG				
コンセンサス	(565)	PHCVKTCFAGVMGENTLVWKYADASHV	CHLCPNCTYGTGTFPLEG				
	(612)	612	622				
カニクイザルEGFR ECD	(612)	CARNSEKIPS					
ヒトEGFR ECD	(612)	CPTNGEPLS					
コンセンサス	(612)	C	NGEPLS				

Fig. 24 (Cont.)

【図 25】

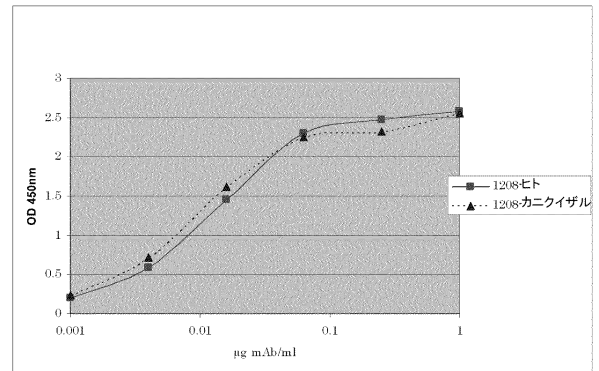


Fig. 25 A

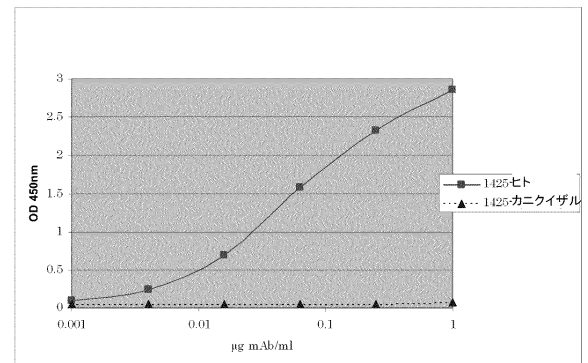


Fig. 25 B

【図 26】

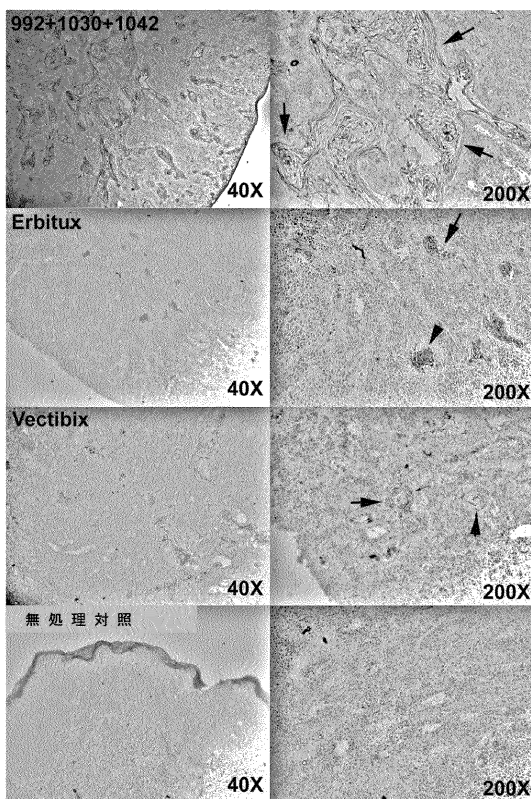


Fig. 26

【図 27】

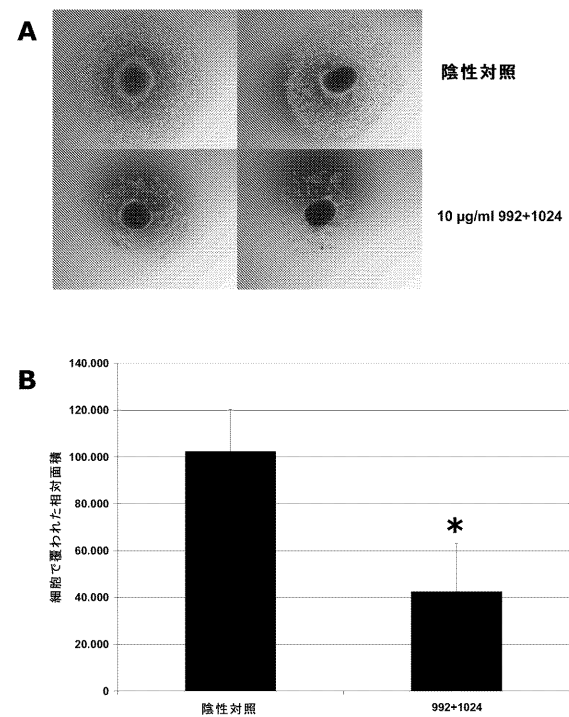


Fig. 27

【図 28】

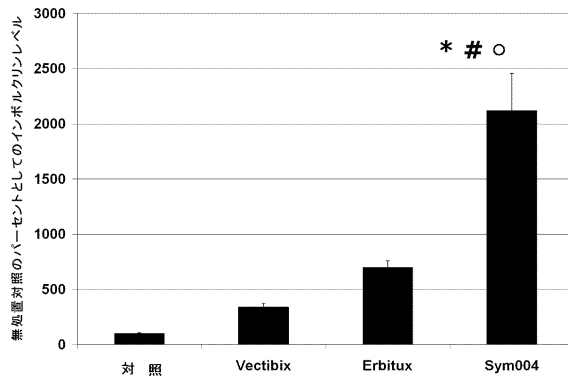


Fig. 28

【図 29】

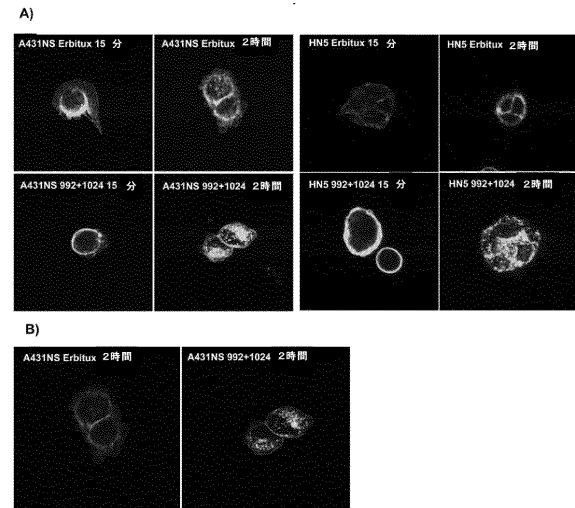


Fig. 29

【図 30】

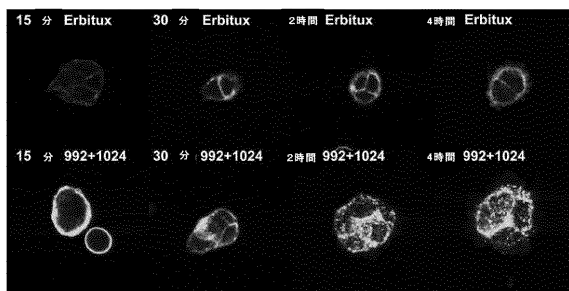


Fig. 30

【図 31 B】

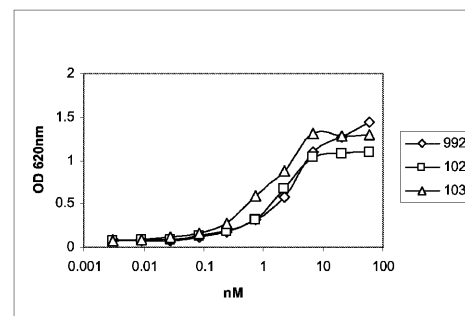


Fig. 31B

【図 31 A】

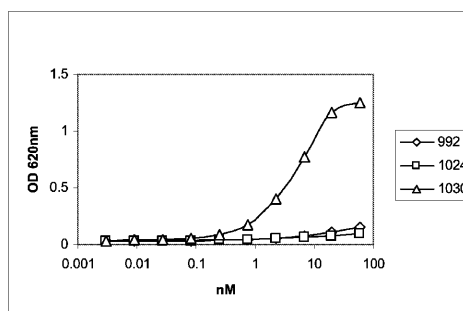


Fig. 31A

【図 32 A】

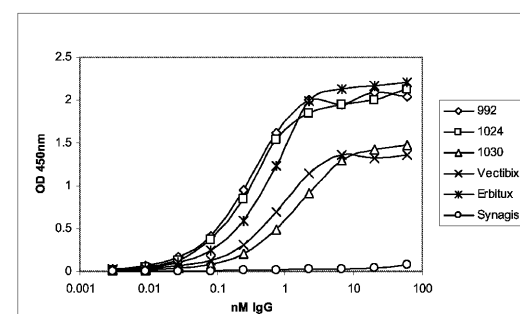


Fig. 32A

【図 4 3】

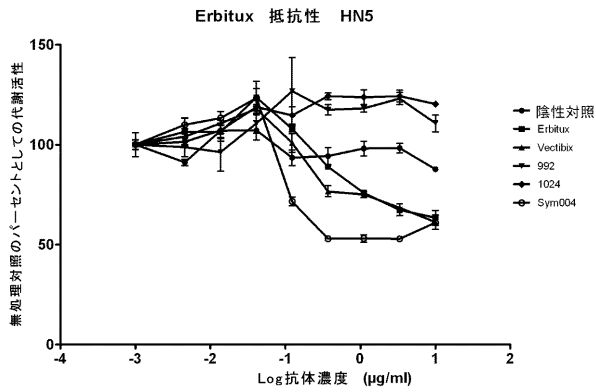
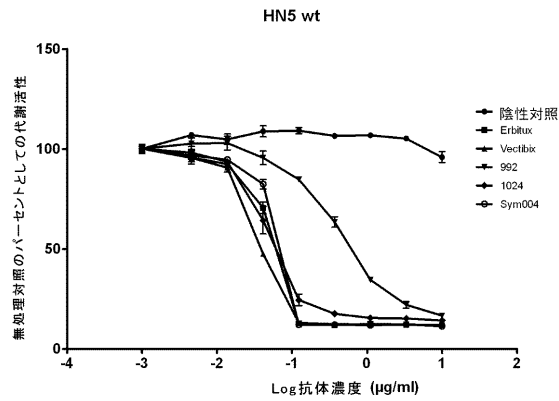


Fig. 43

【図 4 5】

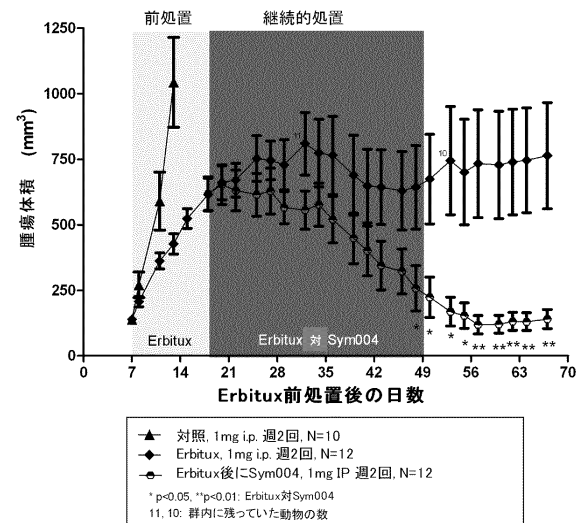


Fig. 45

【図 4 4】

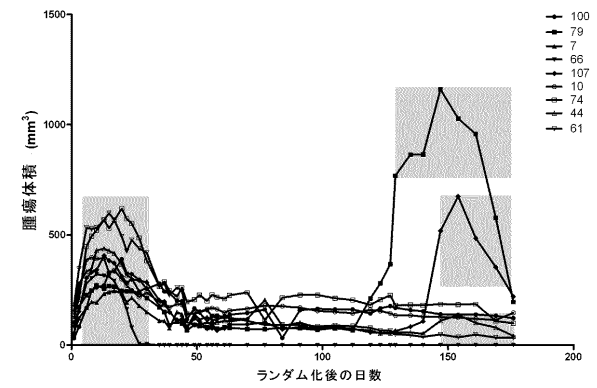


Fig. 44

【図 4 6】

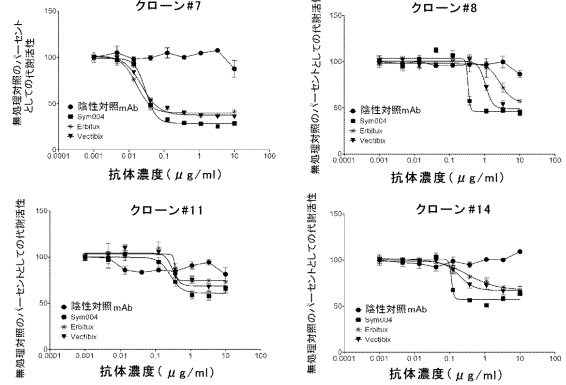


Fig. 46

【図 47】

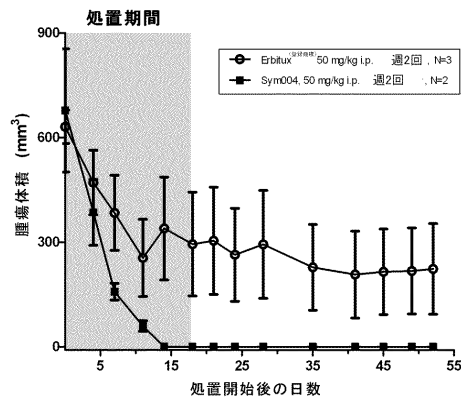


Fig. 47

【配列表】

0005719298000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ミッケル・ワンダー・ペダーセン

デンマーク、デーコー - 3 4 5 0 アレレス、フォルエルヴァイ 1 7 番

(72)発明者 ミカエル・クラーク

デンマーク、デーコー - 2 2 0 0 コペンハーゲン・エン、ラエセーギヤーゼ 1 アー番、5 チル・ヘイレ

(72)発明者 アダム・エス・ハイ

デンマーク、デーコー - 2 7 2 0 ヴァンレーゼ、ティビエルヴァイ 5 4 番

(72)発明者 ヘレ・ヤコブセン

デンマーク、デーコー - 2 8 3 0 ヴィルム、フルトヘウネト 6 6 番

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 3 5 0 1 2 (J P , A)

特表 2 0 0 6 - 5 0 5 5 4 6 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 P 3 5 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 2 8

C 1 2 N 1 5 / 0 9