

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4298498号
(P4298498)

(45) 発行日 平成21年7月22日 (2009. 7. 22)

(24) 登録日 平成21年4月24日 (2009. 4. 24)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)
A 6 1 P 37/04 (2006. 01)
C O 7 K 16/28 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/04
C O 7 K 16/28

請求項の数 57 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-503174 (P2003-503174)
(86) (22) 出願日 平成14年6月13日 (2002. 6. 13)
(65) 公表番号 特表2005-501529 (P2005-501529A)
(43) 公表日 平成17年1月20日 (2005. 1. 20)
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/018748
(87) 国際公開番号 W02002/100348
(87) 国際公開日 平成14年12月19日 (2002. 12. 19)
審査請求日 平成17年5月27日 (2005. 5. 27)
(31) 優先権主張番号 60/298, 172
(32) 優先日 平成13年6月13日 (2001. 6. 13)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 503458261
ゲンマブ エー／エス
G E N M A B A / S
デンマーク ケー コペンハーゲン ディ
ーケー ー 1 2 5 3 トルドボガーデ 3 3
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74) 代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 上皮成長因子受容体 (E G F R) に対するヒトモノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトEGFRに結合する単離されたヒトモノクローナル抗体であって、

(1) ヒト重鎖フレームワーク領域、配列番号: 2 の31番目から35番目のアミノ酸残基からなるヒト重鎖CDR1領域、配列番号: 2 の50番目から66番目のアミノ酸残基からなるヒト重鎖CDR2領域、及び、配列番号: 2 の99番目から114番目のアミノ酸残基からなるヒト重鎖CDR3領域、並びに

(2) ヒト軽鎖フレームワーク領域、配列番号: 4 の24番目から34番目のアミノ酸残基からなるヒト軽鎖CDR1領域、配列番号: 4 の50番目から56番目のアミノ酸残基からなるヒト軽鎖CDR2領域、及び、配列番号: 4 の89番目から97番目のアミノ酸残基からなるヒト軽鎖CDR3領域

を含む、抗体。

【請求項 2】

抗体がIgG1、IgA、IgE、IgM、IgG4、及びIgD抗体から成る群より選択される、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体がIgG1抗体である、請求項1に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗体がEGFRリガンドのヒトEGFRへの結合を阻害する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 5】

10

20

前記EGFRリガンドがEGF又はTGF- α である、請求項1に記載の抗体。

【請求項6】

前記抗体が、少なくとも約 10^8M^{-1} の平衡結合定数(K_A)でヒトEGFRに結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項7】

前記抗体が、少なくとも約 10^9M^{-1} の平衡結合定数(K_A)でヒトEGFRに結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項8】

前記抗体が、EGFRリガンドのヒトEGFRへの結合を少なくとも約50%、遮断する、請求項1に記載の抗体。

10

【請求項9】

IgG1重鎖由来の可変領域と、カッパ軽鎖由来の可変領域とを含む、請求項3に記載の抗体。

【請求項10】

それぞれSEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:3に記載されたヌクレオチド配列をそれらの可変領域に含む、ヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖核酸にコードされた請求項1に記載の抗体。

【請求項11】

それぞれSEQ ID NO:2及びSEQ ID NO:4に示すアミノ酸配列、及び、アミノ酸残基が同じ側鎖ファミリーからのアミノ酸残基により置換されているアミノ酸配列改変を含む重鎖及びヒトカッパ軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の抗体。

20

【請求項12】

それぞれSEQ ID NO:2及びSEQ ID NO:4に示すアミノ酸配列を含む重鎖及びヒトカッパ軽鎖可変領域を有する、請求項1に記載の抗体。

【請求項13】

少なくとも約 10^8M^{-1} の親和結合定数(K_A)でEGFRに結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項14】

EGFRに結合して、EGFRのEGFもしくはTGF- α 誘導性自己リン酸化を阻害する、請求項1に記載の抗体。

【請求項15】

EGFR発現細胞に結合して成長を阻害する、請求項1に記載の抗体。

30

【請求項16】

前記細胞が、膀胱細胞、乳房細胞、結腸細胞、腎臓細胞、卵巣細胞、前立腺細胞、腎細胞、扁平細胞、及び非小肺細胞から成る群より選択される腫瘍細胞である、請求項15に記載の抗体。

【請求項17】

前記細胞が滑膜線維芽細胞及びケラチノサイトから成る群より選択される、請求項15に記載の抗体。

【請求項18】

EGFR発現細胞に結合して、ヒトエフェクタ細胞の存在下で前記細胞の溶解(ADCC)を誘導する請求項1に記載の抗体。

40

【請求項19】

EGFR発現細胞に結合はするが、前記細胞の補体媒介性溶解は誘導しない、請求項1に記載の抗体。

【請求項20】

前記抗体がFabフラグメント又は一本鎖抗体である、請求項1に記載の抗体。

【請求項21】

ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する非ヒトトランスジェニック動物から得たB細胞を不死化細胞に融合させて含むハイブリドーマにより産生される、請求項1に記載の抗体。

【請求項22】

50

ヒト重鎖及びヒト軽鎖をコードする核酸を含むトランスフェクターマにより産生される、請求項1に記載の抗体。

【請求項23】

ヒト重鎖及びヒト軽鎖をコードする核酸を含むトランスフェクターマであって、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合部分を検出可能な量、産生する、トランスフェクターマ。

【請求項24】

それぞれSEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:3に記載されたヌクレオチド配列をそれらの可変領域に含む、ヒト重鎖及びヒト軽鎖をコードする核酸を含む、請求項23に記載のトランスフェクターマ。

【請求項25】

請求項1に記載の抗体を発現する非ヒトトランスジェニック動物であって、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項26】

請求項1に記載の抗体と、ヒト抗原提示細胞（APC）に対する結合特異性部分とを含む二重特異的分子。

【請求項27】

請求項1に記載の抗体と、ヒトFc受容体に対する結合特異性部分とを含む二重特異的分子。

【請求項28】

前記Fc受容体がヒトFcγRI又はヒトFcα受容体である、請求項27に記載の二重特異的分子。

【請求項29】

Fc受容体に、前記受容体の免疫グロブリン結合部位とは異なる部位で結合する、請求項27に記載の二重特異的分子。

【請求項30】

請求項1に記載の抗体と、薬学的に許容可能な担体とを含む組成物。

【請求項31】

ヒトEGFRに結合する2種以上のヒトモノクローナル抗体の組合せを含む組成物であって、前記抗体がIgG1、IgA、IgE、IgM、IgG4及びIgD抗体からなる群より選択され、前記各抗体がEGFRの異なるエピトープに結合し、そして前記抗体の一つが請求項1に記載の抗体である、組成物。

【請求項32】

請求項1に記載の抗体及び化学療法薬を含む組成物。

【請求項33】

請求項1に記載の抗体を細胞毒に連結して含むイムノトキシン。

【請求項34】

EGFR発現細胞の成長が阻害されるように、該細胞を、有効量の請求項1に記載の抗体に接触させるステップを含む、EGFR発現細胞の成長を阻害する方法であって、但し前記抗体がEGFRリガンドのヒトEGFRへの結合を阻害する、方法。

【請求項35】

前記細胞が、膀胱細胞、乳房細胞、結腸細胞、腎臓細胞、卵巣細胞、前立腺細胞、腎細胞、扁平細胞、非小肺細胞、滑膜線維芽細胞、およびケラチノサイトから成る群より選択される、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

EGFR発現細胞の細胞溶解を誘導する方法であって、EGFR発現細胞の細胞溶解が起きるように、エフェクタ細胞の存在下で、請求項3に記載の抗体にEGFR発現細胞を接触させるステップを含む、方法。

【請求項37】

前記細胞が、膀胱細胞、乳房細胞、結腸細胞、腎臓細胞、卵巣細胞、前立腺細胞、腎細胞、扁平細胞、非小肺細胞、滑膜線維芽細胞、およびケラチノサイトから成る群より選択さ

10

20

30

40

50

れる、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

EGFRの発現が媒介する疾患を治療又は予防するための医薬組成物であって、請求項1に記載の抗体を、EGFR媒介疾患を治療又は予防するのに有効な量で含む組成物。

【請求項39】

前記疾患が癌である、請求項38に記載の組成物。

【請求項40】

前記疾患が自己免疫疾患である、請求項38に記載の組成物。

【請求項41】

前記ヒト抗体が、Fc受容体に対する結合特異性部分に結合されている、請求項38に記載の組成物。

10

【請求項42】

前記ヒト抗体が細胞毒に結合されている、請求項38に記載の組成物。

【請求項43】

他の治療薬と同時投与される、請求項38に記載の組成物。

【請求項44】

前記治療薬がドキソルビシン（アドリアマイシン）、シスプラチンブレオマイシンスルフェート、カルムスチン、クロラムブシル、及びシクロホスファミドヒドロキシウレア、から成る群より選択される、請求項43に記載の組成物。

20

【請求項45】

前記癌が膀胱癌、乳癌、結腸癌、腎臓癌、卵巣癌、前立腺癌、腎癌、並びに頭部及び頸部の癌からなる群より選択される、請求項39に記載の組成物。

【請求項46】

前記疾患が上皮の過増殖を含む、請求項40に記載の組成物。

【請求項47】

前記疾患が炎症性関節炎である、請求項38に記載の組成物。

【請求項48】

請求項1に記載の抗体を用いて、EGFRの発現が媒介する疾患を治療又は予防するための医薬組成物を製造する方法。

【請求項49】

前記疾患が癌である、請求項48に記載の方法。

30

【請求項50】

前記疾患が自己免疫疾患である、請求項48に記載の方法。

【請求項51】

前記ヒト抗体が、Fc受容体に対する結合特異性部分に結合されている、請求項48に記載の方法。

【請求項52】

前記ヒト抗体が細胞毒に結合されている、請求項48に記載の方法。

【請求項53】

前記癌が膀胱癌、乳癌、結腸癌、腎臓癌、卵巣癌、前立腺癌、腎癌、並びに頭部及び頸部の癌からなる群より選択される、請求項49に記載の方法。

40

【請求項54】

前記疾患が上皮の過増殖を含む、請求項50に記載の方法。

【請求項55】

前記疾患が炎症性関節炎である、請求項48に記載の方法。

【請求項56】

試料中のEGFR抗原又はEGFR発現細胞の存在を検出する方法であって、

前記試料を、請求項1に記載の抗体に、前記抗体又はその部分とEGFRとの間で複合体形成が可能な条件下で、接触させるステップと、

複合体の形成を検出するステップと

50

を含む、方法。

【請求項57】

それぞれSEQ ID NO:2及びSEQ ID NO:4に示すアミノ酸配列を含む重鎖及び軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクタ。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本出願は、その全文をこの引用をもってここに援用することとする2001年6月13日出願の米国仮出願60/298,172号に基づく優先権を主張するものである。

【発明の背景】

10

【0002】

EGF受容体(EGFR)は170 kDaのタイプ1膜貫通分子である。頭部及び頸部、乳房、結腸、前立腺、肺、並びに卵巣の癌を含め、数多くのヒト腫瘍でその発現が上方調節されていることが見出されている。その過剰発現の程度が臨床上の予後不良と相関付けられている(Baselga, et al. (1994) Pharmac. Therapeut. 64:127-154; Modjtahedi, et al. (1994) Int. J. Oncology 4:277-296)。さらに、その発現には、しばしば、EGFR発現腫瘍細胞によるEGFR-リガンド、とりわけTGF- α 及びEGFの産生が伴うが、このことは、自己分泌ループがこれらの細胞の悪化に関与していることを示唆している(Baselga, et al. (1994) Pharmac. Therapeut. 64:127-154; Modjtahedi, et al. (1994) Int. J. Oncology. 4:277-296)。従ってこのようなEGFRリガンドとEGFRとの間の相互作用を遮断すると、腫瘍の成長及び生存を阻害することができる (Baselga, et al. (1994) Pharmac. Therapeut. 64:127-154)。

20

【0003】

EGFRのリガンド結合ドメインを狙うモノクローナル抗体(MAb)は、EGF及びTGF- α との相互作用、と同時に結果的に細胞内シグナル伝達経路を遮断することができる。このようなin vitroでの遮断に成功し、マウス異種移植モデルで腫瘍成長を左右するそれらの能力について評価の下されたマウスモノクローナル抗体がいくつか、作製されてきた (Masui, et al. (1986) Cancer Res. 46: 5592-5598; Masui, et al. (1984) Cancer Res. 44: 1002-1007; Goldstein, et al. (1995) Clin. Cancer Res. 1: 1311-1318)。無胸腺マウスで、ヒト腫瘍細胞の一日後に投与した場合、抗EGFR MAbの大半は腫瘍形成を防ぐ上で効果的であった (Baselga, et al. (1994) Pharmac. Therapeut. 64:127-154)。しかしながら、樹立ヒト腫瘍異種移植片を持つマウスに注射したところ、これらのマウスMAbs (例えば MAbs 225s 及び528) は、部分的な腫瘍退縮を起こしたに過ぎなかった。腫瘍を完全に根絶させるには化学療法薬の同時投与が必要であった (Baselga, et al. (1994) Pharmac. Therapeut. 64:127-154; Fan, et al. (1993) Cancer Res. 53: 4322-4328; Baselga, et al. (1993) J. Natl. Cancer Inst. 85: 1327-1333)。

30

【0004】

従って、今日までに得られた結果で、EGFRは免疫治療法のターゲットとして明確に確立されたが、マウス抗体では、理想的な治療薬とは成らないこともこれらの結果は示している。さらに、マウス抗体を用いた治療法は一般に重篤な免疫反応を患者に起こす。マウス抗体の免疫原性を避けるためには、治療薬は理想的には完全にヒトであるべきである。この目的への第一歩として、マウス抗体可変領域をヒト定常領域に連結したキメラ型の225 MAb (C225) が開発された。C225はin vivoにおいて樹立異種移植腫瘍片の治療において優れた抗腫瘍活性を示したが、これは高用量にしたときにのみ、達成されたものである (Goldstein, et al. (1995) Clin. Cancer Res. 1:1311-1318)。現在では、C225は多種の充実腫瘍の治療について臨床治験で評価を受けつつある (Baselga, J. (2000) J. Clin. Oncol. 18: 54S-59S; Baselga, J. (2000) Ann. Oncol. 11 Suppl 3: 187-190, 2000)。

40

【0005】

従って、EGFRの過剰発現に関連する疾患を治療及び／又は予防する上で、低用量で投与したときに効果的であると共に、患者の免疫反応を惹起しないような優れた治療用抗EGFR

50

抗体が求められている。上述したように、モノクローナル抗体(MAb)は疾患に対する数多くの診断法及び治療法で際だった役割を果たし、完全ヒト抗体の開発を可能とする最新技術が現れたことで、より魅力的な薬剤となった。抗体及び抗体誘導体は、現在開発中の生物薬の25パーセントを占め、これらの多くが癌治療薬として開発中である。抗体では免疫系で有効に作用する能力を持つ標的特異性が組み合わされている。これらの性質や、それらの長い生物学的半減期を組み合わせるという観点から、研究者は抗体の治療薬としての可能性に注目するようになった。その高まりとして、最近、米国食品医薬品庁(FDA)は癌治療用のいくつかの抗体を認可した。

【0006】

発明の概要

本発明は、EGFRの発現に関する疾患、特にEGFRを発現する腫瘍及び自己免疫疾患を治療及び予防するための優れた抗体治療薬を提供するものである。本抗体は、完全にヒト型（ここでは「HuMAbTM」と言及される）であり、従って患者における免疫原性が低い点で優れている。さらに本抗体は、他の抗EGFR抗体について以前に報告されたものより低投薬量で治療上効果的（例えばEGFR発現細胞の成長及び／又は機能を防ぐ上で）である。加えて、いくつかの実施態様では、本抗体は、補体を活性化せず（例えば標的細胞の補体媒介性溶解を誘導しないなど）、従って治療中の有害な副作用が小さいという更なる長所を有する。

【0007】

従って、ある実施態様では、本発明は、ヒト上皮成長因子受容体（EGFR）に特異的に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体や、このような抗体の一つ又は組合せを含有する組成物を提供するものである。本ヒト抗体は、例えばEGF及びTGF- α などのEGFRリガンドのEGFRに対する結合を阻害（例えば遮断）する。例えば、EGFRリガンドのEGFRへの結合は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100% 阻害することができ、好ましくはEGFRが媒介する細胞シグナル伝達を防ぐことができる。

【0008】

本発明の好適なヒト抗体は、ヒトエフェクタ細胞（例えば多核白血球、単球、マクロファージ及び樹状細胞など）の存在下でEGFR発現細胞（in vitro又はin vivo）の成長を阻害する、及び／又は、致死（例えば溶解又はファゴサイトーシス）を媒介するが、EGFR発現細胞の補体媒介性溶解は活性化しない。従って、本発明のヒトモノクローナル抗体は、in vivo及びin vitroで診断薬又は治療薬として用いることができる。

【0009】

ここに例示した実施態様の一つでは、本発明のヒト抗体は、IgG1重鎖及びカッパ軽鎖を有するIgG1（IgG1kなど）抗体である。しかしながら、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、及びIgEを含む他の抗体アイソタイプも本発明の包含するところである。本抗体は完全抗体であっても、又は、Fab、F(ab')₂、Fv及びFvフラグメントを含む、抗体の抗原結合フラグメントであってもよい。

【0010】

ある特定の実施態様では、本ヒト抗体は、それらの可変領域に、それぞれSEQ ID NO:1及びSEQ ID NO:3に記載されたヌクレオチド配列及びそれらの保存的配列改変を含むヒトIgG重鎖及びヒトカッパ軽鎖核酸にコードされている。別の実施態様では、本ヒト抗体は、それぞれSEQ ID NO:2及びSEQ ID NO:4に示すアミノ酸配列及びそれらの保存的配列改変を含むIgG重鎖及びカッパ軽鎖可変領域を含む。

【0011】

別の特定の実施態様では、本ヒト抗体は、抗体2F8に相当するか、又は、抗体2F8と同じエпитープに結合する（例えば競合するなど）又は同じ機能的結合特性を有する抗体に相当する。

【0012】

本発明のヒト抗体は、例えば本抗体の重鎖及び軽鎖をコードする核酸を含有するトランスフェクターマ（例えば不死化CHO細胞又はリンパ球性細胞から成るトランスフェクター

10

20

30

40

50

マ)などの宿主細胞で組換えにより産生させても、又は、本抗体を発現するハイブリドーマ（例えば本抗体をコードするヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物から得たB細胞を不死化細胞に融合させて含む）から直接得てもよい。ある特定の実施態様では、本抗体は、ここで2F8と言及されるハイブリドーマに産生させるか、又は、それらの可変領域に、それぞれSEQ ID NO:1 及びSEQ ID NO:3に記載されたヌクレオチド配列及びそれらの保存的配列改変を含むヒト重鎖及びヒト軽鎖核酸を含有する宿主細胞（例えばCHO細胞）トランスフェクトーマに産生させる。

【0013】

別の実施態様では、本発明のヒト抗EGFR抗体を、以下の特徴：

- a) EGFRに対する特異性；
 - b) 少なくとも約 10^7 、好ましくは約 10^8M^{-1} 、 10^9M^{-1} 、そしてより好ましくは約 10^{10}M^{-1} 乃至 10^{11}M^{-1} 又はそれ以上の平衡結合定数 (K_A) でのEGFRに対する結合親和性；
 - c) 約 10^{-3}s^{-1} 、好ましくは約 10^{-4}s^{-1} 、より好ましくは 10^{-5}s^{-1} 、そして最も好ましくは 10^{-6}s^{-1} のEGFRからの解離定数 (K_D) ；
 - d) EGFR発現細胞をオプソニン化する能力；又は
 - e) ヒトエフェクタ細胞の存在下で、約 $10\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で（例えばin vitroで）EGFR発現細胞（例えば腫瘍細胞）の成長を阻害する、及び／又は、ファゴサイトーシス及び致死を媒介する能力
- のうちの一つ又はそれ以上で特徴付けることができる。

【0014】

本発明のヒト抗体のターゲットとする（オプソニン化する）ことができるEGFR発現腫瘍細胞の例には、限定はしないが、膀胱、乳房、結腸、腎臓、卵巣、前立腺、腎細胞、扁平細胞、肺（非小細胞）、又は頭部及び頸部の腫瘍細胞がある。他のEGFR発現細胞には、例えばそれぞれ関節炎及び乾癬の治療の標的細胞として用いることができる滑膜線維芽細胞及びケラチノサイトがある。

【0015】

別の実施態様では、本発明のヒト抗体は少なくとも約 10^8M^{-1} 、より好ましくは少なくとも約 10^9M^{-1} 又は 10^{10}M^{-1} の親和定数でEGFR抗原に結合し、in vitroにおいて約 $1\times 10^{-7}\text{M}$ 以下の IC_{50} で、又は、約 $10\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で、EGFR発現細胞の成長を阻害する、及び／又は、多核白血球（PMN）、単球及びマクロファージなどのヒトエフェクタ細胞によるファゴサイトーシス及び致死を媒介することができる。

【0016】

さらに別の実施態様では、本発明のヒト抗体は、EGFR媒介性細胞シグナル伝達を阻害するものである。例えば本抗体は、EGFRリガンド（例えばEGF又はTGF- α ）が誘導するEGFRの自己リン酸化を阻害することができる。さらに本抗体は、自己分泌EGF又はTGF- α 誘導性細胞活性化を、又はヒト多核白血球の存在下でEGFR発現細胞の溶解（ADCC）を誘導することにより、阻害することができる。EGFR発現細胞には、なかでも、膀胱細胞、乳房細胞、結腸細胞、腎臓細胞、卵巣細胞、前立腺細胞、腎細胞、扁平細胞、非小肺細胞、滑膜線維芽細胞、及びケラチノサイト、がある。

【0017】

別の局面では、本発明は、本発明の抗体又は抗原結合部分をコードする核酸分子を提供するものである。本発明の抗体をコードする核酸を含有する組換え発現ベクタ、及びこのようなベクタをトランスフェクトした宿主細胞も、本発明の包含するところであり、例えば前記ハイブリドーマにより産生された抗体2F8の重鎖及び軽鎖の可変及び定常領域をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクタなど、このような宿主細胞を培養することにより本発明の抗体を作製する方法も同様である。

【0018】

さらに別の局面では、本発明は、本発明のヒト抗EGFR抗体を発現する、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物を由来とする単離されたB細胞を提供す

10

20

30

40

50

るものである。好ましくは、前記の単離されたB細胞が、EGFR抗原の精製もしくは濃縮製剤、及び／又は、EGFR発現細胞、で免疫したトランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物から得られるとよい。好ましくは、当該の非ヒトトランスジェニック動物、例えばトランスジェニックマウスが、本発明の抗体の全部又は一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するとよい。次に単離されたB細胞を不死化させて、ヒト抗EGFR抗体の供給源（例えばハイブリドーマ）とする。

【0019】

従って、本発明は、EGFRに特異的に結合する本発明のヒトモノクローナル抗体を産生できるハイブリドーマも提供する。ある実施態様では、本ハイブリドーマは、本発明の抗体の全部又は一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物から得たB細胞を、不死化細胞に融合させたものを含む。本発明の具体的なハイブリドーマには2F8がある。

10

【0020】

さらに別の局面では、本発明は、EGFRに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を発現する、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物（ここでは「HuMab」とも言及される）を提供する。ある具体的な実施態様では、本非ヒトトランスジェニック動物は本発明の抗体の全部又は一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスである。本非ヒトトランスジェニック動物は、EGFR抗原の精製もしくは濃縮製剤、及び／又は、EGFR発現細胞、により免疫することができる。好ましくは、トランスジェニックマウスなどの本非ヒトトランスジェニック動物は、V-D-J組換え及びアイソタイプ・スイッチングを起こすことにより、EGFRに対する複数のアイソタイプ（例えばIgG、IgA及び／又はIgM）のヒトモノクローナル抗体を産生できるとよい。アイソタイプ・スイッチングは、例えば古典的なアイソタイプ・スイッチングで起きるものでも、又は非古典的なアイソタイプ・スイッチングで起きるものでもよい。

20

【0021】

別の局面では、本発明は、EGFRと特異的に反応するヒトモノクローナル抗体を作成する方法を提供するものである。ある実施態様では、本方法は、本発明の抗体の全部及び／又は一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物を、EGFR抗原の精製もしくは濃縮製剤、及び／又は、EGFR発現細胞、により免疫するステップを含む。次に前記動物のB細胞（例えば脾B細胞）を得、骨髓腫細胞に融合して、EGFRに対するヒトモノクローナル抗体を分泌する不死のハイブリドーマ細胞を形成する。

30

【0022】

さらに別の局面では、本発明のヒト抗EGFR抗体を、例えば別のペプチド又はタンパク質（例えばFab'フラグメント）などの別の機能分子で誘導体化する、前記機能分子に連結する、又は前記機能分子と同時発現させる。例えば、本発明の抗体又は抗原結合部分を、例えば別の抗体（例えば二重特異的又は多重特異的抗体を作製するため）、細胞毒、細胞リガンド又は抗原など、一つ以上の他の分子に機能的に連結（例えば化学結合、遺伝子融合、非共有結合的結合又は他の方法などにより）することができる。従って、本発明は、いずれもEGFR発現細胞に結合したり、他の分子を前記細胞にターゲティングしたり、又は、EGFRや他の分子又は細胞に結合するような、多種の抗体結合体、二重及び多重特異的分子、及び融合タンパク質を包含する。

40

【0023】

ある特定の実施態様では、本発明は、EGFRに対する少なくとも一つの第一結合特異性部分（例えばヒト抗EGFR抗体又はそのフラグメントもしくはミメティック）と、例えばヒトFcγRI又はヒトFcα受容体などのFc受容体か、又は、抗原提示細胞（APC）上にある別の抗原、に対する第二結合特異性部分とを備える二重特異的又は多重特異的分子を包含するものである。典型的には、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、少なくとも一種の

50

抗体又はそのフラグメント（例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、又は一本鎖Fv）、好ましくはヒト抗体又はその一部分、又は「キメラ」もしくは「ヒト化」抗体又はその一部分を含む（例えば非ヒト抗体（例えばマウス）由来の変換領域又は少なくとも相補性決定領域（CDR）を有し、残りの部分はヒト由来であるなど）。

【0024】

従って、本発明は、ヒトEGFRと、Fc受容体、例えばヒトIgG受容体、例えばFc-ガンマ受容体（FcγR）、例えばFcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、及びFcγRIII（CD16）など、のFc受容体との両方に結合する二重特異的及び多重特異的分子を包含する。ヒトIgA受容体（例えばFcαRI）などの他のFc受容体も標的とすることができる。当該のFc受容体は好ましくは、例えば単球、マクロファージ又は活性化多核白血球など、エフェクタ細胞の表面上に位置するとよい。ある好適な実施態様では、本二重特異的及び多重特異的分子は、当該Fc受容体のうちで免疫グロブリンFc（例えばIgG又はIgA）結合部位とは異なる部位で、この受容体に結合する。従って、本二重特異的及び多重特異的分子の結合は、生理的レベルの免疫グロブリンでは遮断されない。

10

【0025】

別の局面では、本発明は、本発明のヒト抗EGFR抗体を、例えば細胞障害性の薬物、酵素活性毒素、もしくはそのフラグメント、放射性同位体、又は低分子抗癌剤などの治療部分に連結して含む結合体を提供するものである。

【0026】

代替的には、本発明のヒト抗体を、このような治療的及び細胞傷害性薬剤と一緒に、しかしそれらに連結はせず、同時投与することもできる。それらはこのような薬剤と同時に（例えば単一の組成物としたり、又は別々に）同時投与することも、又は、このような薬剤の投与の前又は後に投与することもできる。このような薬剤には、例えばドキソルビシン（アドリマイシン）、シスプラチンブレオマイシンスルフェート、カルムスチン、クロラムブシル、及びシクロホスファミドヒドロキシウレアなどの化学療法薬を含めることができる。本発明のヒト抗体を、放射線治療と併用して投与することもできる。

20

【0027】

別の局面では、本発明は、薬学的に許容可能な担体と、EGFRに特異的に結合する少なくとも一種の本発明のヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分とを含む組成物、例えば薬品及び診断用組成物／キットなど、を提供するものである。ある実施態様では、本組成物は、好ましくはそれぞれが別々のエピトープに結合する複数のヒト抗体又はその抗原結合部分の組合せを含む。例えば、エフェクタ細胞の存在下で標的細胞の高度に効果的な致死を媒介するヒトモノクローナル抗体を含む医薬組成物を、EGFR発現細胞の成長を阻害する別のヒトモノクローナル抗体と組み合わせることができる。従ってこの組合せは、最大の治療上の利益をもたらすよう調整された多重療法を提供することとなる。本発明の少なくとも一種のヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分と、本発明の少なくとも一種の二重特異的又は多重特異的分子との組合せを含む、医薬組成物などの組成物も、本発明の範囲内にある。

30

【0028】

さらに別の局面では、本発明は、上述した本発明のヒト抗体及び関連する組成物を用いて、EGFR発現細胞の増殖及び／又は成長を阻害する、及び／又は、EGFR発現細胞の致死を誘導する、方法を提供する。ある実施態様では、本方法は、EGFR発現細胞を、ヒトエフェクタ細胞の存在下で、一種又は組合せの本発明のヒトモノクローナル抗体にin vitro又はin vivoで接触させるステップを含む。本方法は、例えばin vitro又はex vivo（例えばEGFR発現細胞とエフェクタ細胞とを含む培養物など）など、培養物中で用いることができる。例えば、EGFR発現細胞及びエフェクタ細胞を含有する試料を、in vitroで培養し、本発明の抗体又はその抗原結合部分（あるいは本発明の二重特異的もしくは多重特異的分子）と組み合わせることができる。代替的には、本方法は、例えばin vivo（例えば治療もしくは予防）プロトコルの一部としてなど、対象内で行うこともできる。

40

【0029】

50

EGFRの発現（例えば過剰発現）に関連する疾患のin vivo治療及び予防で使用するには、本発明のヒト抗体を患者（例えばヒトの対象）に治療上有効量（例えばEGFR発現細胞の成長の阻害、ファゴサイトーシス及び／又は致死に至るような投薬量）、例えば注射や、抗体ベースの臨床用製品に関して当業で公知の他の投与経路など、何らかの適した投与経路を用いて、投与する。

【0030】

本発明のヒト抗体を用いて治療及び／又は予防できる典型的なEGFR関連疾患には、限定はしないが、自己免疫疾患及び癌がある。例えば、治療及び／又は予防可能な癌には、膀胱、乳房、結腸、腎臓、卵巣、前立腺、腎細胞、扁平細胞、肺（非小細胞）、頭部及び頸部の癌がある。治療可能な自己免疫疾患には、例えば乾癬及び炎症性関節炎、例えばリウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス随伴関節炎、及び乾癬性関節炎、がある。

10

【0031】

ある実施態様では、当該の患者を、化学療法薬、放射線、又は、Fc α 受容体又はFc γ 受容体などのFc受容体の発現又は活性を、高める又は阻害するなど修飾する薬剤、例えばサイトカインなど、で付加的に治療する。治療中の投与に向く典型的なサイトカインには、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー-刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン- γ （IFN- γ ）、及び腫瘍壊死因子（TNF）、がある。典型的な治療薬には、とりわけ、抗新生物薬、例えばドキソルビシン（アドリマイシン）、シスプラチンブレオマイシンスルフェート、カルムスチン、クロラムブシル、及びシクロホスファミドヒドロキシウレアなど、がある。

20

【0032】

EGFRを高率では発現しないような癌細胞に対して、本発明のヒト抗EGFR抗体の治療効果を増すには、本抗体を、例えば腫瘍細胞上のEGFRの発現を上方調節し、より均質にするリンホカイン製剤など、EGFRの発現を上方調節又はもたらす薬剤と一緒に同時投与することができる。投与に適したリンホカイン製剤には、インターフェロン-ガンマ、腫瘍壊死因子、及びこれらの組合せ、がある。これらを静脈内投与することもできる。リンホカインの適した投薬量は、典型的には、10,000乃至1,000,000単位／患者の範囲である。

【0033】

さらに別の局面では、本発明は、EGFR関連疾患を診断するためなど、試料中のEGFR抗原の存在をin vitro又はin vivoで検出する方法を提供するものである。ある実施態様では、これは、テストしようとする試料を、選択に応じてコントロール試料も並行して、本発明のヒトモノクローナル抗体（又はその抗原結合部分）に、本抗体及びEGFR間の複合体が形成可能な条件下で接触させることで達成される。次に複合体形成を（例えばELISAを用いて）検出する。テスト試料と並行してコントロール試料を用いる場合、両方の試料で複合体を検出し、これら試料間で複合体形成の統計上有意な違いがあれば、テスト試料中にEGFR抗原が存在することの指標となる。

30

【0034】

本発明の他の特徴及び長所は、以下の詳細な説明及び請求の範囲から明白となるであろう。

【0035】

40

発明の詳細な説明

本発明は、上皮成長因子受容体抗原（ここでは「EGFR」と言及される）の発現、特に過剰発現、を特徴とする疾患を治療及び診断するための新規な抗体ベースの治療法を提供するものである。本発明の治療法は、EGFR上に存在するエピトープに結合する単離されたヒトIgGモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を利用する。本発明に包含される他の単離されたヒトモノクローナル抗体には、IgA、IgG1-4、IgE、IgM、及びIgD抗体、がある。ある実施態様では、本ヒト抗体は、V-D-J組換え及びアイソタイプ・スイッチングを起こすことにより、EGFRに対する複数のアイソタイプのヒトモノクローナル抗体（例えばIgG、IgA、及び／又はIgE）を産生できる、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物で産生される。従って、本発明の数々の局面には、抗体、抗体フラグメン

50

ト、及びその医薬組成物だけでなく、モノクローナル抗体を産生する非ヒトトランスジェニック動物、B細胞、ホスト細胞トランスフェクターマ、及びハイブリドーマも含まれる。本発明の抗体を用いて、EGFR又は関連する交差反応性の成長因子受容体を発現する細胞を検出する方法や、又は、EGFR発現細胞の成長、分化及び／又は遊走性をin vitro又はin vivoで阻害する方法も、本発明の包含するところである。

【0036】

本発明がより容易に理解できるよう、いくつかの用語をまず定義する。更なる定義は、本詳細な説明欄全体に記載されている。

【0037】

用語「上皮成長因子受容体」、「EGFR」、及び「EGFR抗原」はここでは交換可能に用いられており、ヒトEGFRのパリアント、アイソフォーム及び種相同体を包含する。ある好適な実施態様では、本発明の抗体がEGFR抗原に結合すると、EGFRリガンドのEGFRへの結合が阻害又は遮断されることで、EGFR発現細胞（例えば腫瘍細胞）の成長が阻害される。用語「EGFRリガンド」は、EGF、TGF- α 、ヘパリン結合EGF（HB-EGF）、アンフィレギュリン（AR）、及びエピレギュリン（EPI）を含む、EGFRに対する全ての（例えば生理的な）リガンドを包含する。別の好適な実施態様では、本発明の抗体がEGFR抗原に結合すると、エフェクタ細胞によるEGFR発現細胞のファゴサイトーシス及び／又は致死が媒介される。

【0038】

ここで用いる用語「成長を阻害する」（例えば細胞を言及する）とは、抗EGFR抗体に接触した細胞の成長の、抗EGFR抗体に接触していない同じ細胞の成長に比較したときのあらゆる測定可能な減少、例えば細胞成長の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、又は100%の阻害など、を包含することを意図している。

【0039】

ここで用いる用語「結合を阻害する」及び「結合を遮断する」（例えばEGFRリガンドのEGFRへの結合の阻害／遮断を言う）は交換可能に用いられており、部分的及び完全な阻害／遮断の両方を包含する。好ましくはEGFRリガンドのEGFRへの阻害／遮断により、EGFRリガンドがEGFRに阻害又は遮断なしで結合したときに起きる正常なレベル又は種類の細胞シグナル伝達が低下又は変化するとよい。さらに阻害及び遮断は、抗EGFR抗体に接触していないリガンドに比較した場合の、抗EGFR抗体に接触したときのEGFRに対するEGFRリガンドの結合親和性のあらゆる測定可能な低下、例えば、EGFRリガンドのEGFRに対する少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、又は100%の遮断など、を包含することを意図している。

【0040】

用語「抗体」には、ここで言及する場合、抗体全体や、そのあらゆる抗原結合フラグメント（即ち「抗原結合部分」）又は一本鎖が含まれる。「抗体」とは、少なくとも2本の重（H）鎖及び2本の軽（L）鎖をジスルフィド結合で相互に接続して含む糖タンパク質、又はその抗原結合部分、を言う。各重鎖は、重鎖可変領域（ここではVHと省略される）と重鎖定常領域とから成る。重鎖定常領域はCH1、CH2及びCH3という3つのドメインから成る。各軽鎖は軽鎖可変領域（ここではVLと省略される）及び軽鎖定常領域から成る。軽鎖定常領域は一つのドメインCLから成る。VH及びVL領域はさらに、より保存されたフレームワーク領域（FR）と呼ばれる領域間に介在する相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域に小さく分割することができる。各VH及びVLは、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端まで並んだ3つのCDR及び4つのFRから成る。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の多種の細胞（例えばエフェクタ細胞）を含め宿主組織又は因子や、古典的な補体系の第一コンポーネント（C1q）に対する免疫グロブリンの結合を媒介していると考えられる。

【0041】

抗体の「抗原結合部分」（又は簡単に「抗体部分」）という用語は、ここで用いる場合、抗原（例えばEGFR）への特異的結合能を維持した、抗体のうちの一つ以上のフラグメン

10

20

30

40

50

トを言う。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体のうちの数フラグメントに行わせることができることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合フラグメントの例には、(i) VL、VH、CL及びCH1ドメインから成る一価のフラグメントであるFabフラグメント；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFabフラグメントから成る二価のフラグメントであるF(ab')₂フラグメント；(iii) VH及びCH1ドメインから成るFdフラグメント；(iv) 抗体の一本の腕のVL及びVHドメインから成るFvフラグメント；(v) VHドメインから成るdAbフラグメント(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)；及び(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)、がある。さらに、Fvフラグメントの2つのドメインVL及びVHは別々の遺伝子にコードされているが、これらは、VL及びVH領域が対を成して一価の分子を形成するような一個のタンパク質鎖に作製できるようにする合成リンカーにより、組換え法を用いて連結することができる(一本鎖Fv(scFv)として知られる；例えば Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい)。このような一本鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されるものと、意図されている。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来技術を用いて得られ、それらのフラグメントを、インタクト抗体と同じ態様で実用性についてスクリーニングされている。

10

【0042】

用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合できるタンパク質決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸又は糖側鎖などの化学的に活性な表面分子群から成り、通常は特異的な三次元構造上の特徴や、特異的な電荷上の特徴を有する。コンホメーション的及び非コンホメーション的エピトープは、変性溶媒の存在下では前者への結合は失われるが、後者への結合は失われないことで区別される。

20

【0043】

用語「二重特異的分子」は、2つの異なる結合特異性部分を有する、例えばタンパク質、ペプチド、又はタンパク質もしくはペプチド複合体など、あらゆる作用物質を包含することを意図している。例えば前記分子は、(a) 細胞表面抗原及び(b) エフェクタ細胞の表面上のFc受容体に結合又は相互作用してもよい。用語「多重特異的分子」又は「ヘテロ特異的分子」は、3つ以上の異なる結合特異性部分を有する、例えばタンパク質、ペプチド、又はタンパク質もしくはペプチド複合体など、あらゆる作用物質を包含することを意図している。例えば前記分子は、(a) 細胞表面抗原、(b) エフェクタ細胞の表面上のFc受容体、及び(c) 少なくとも一つの他の成分、に結合又は相互作用してもよい。従って本発明は、限定はしないが、EGFRなどの細胞表面抗原や、エフェクタ細胞上のFc受容体などの他の標的に向けられた二重特異的、三重特異的、四重特異的、及び他の多重特異的分子を包含する。

30

【0044】

用語「二重特異抗体」はジアボディも含む。ジアボディはVH及びVLドメインが一個のポリペプチド鎖上に発現しているが、この同じ鎖上の2つのドメインの間で対を成すには短すぎるリンカを用いることで、これらドメインを別の鎖の相補ドメインと対を成させて、2つの抗原結合部位を生じるようにした二価の二重特異的な抗体である(例えばHolliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123)。

40

【0045】

ここで用いる用語「ヘテロ抗体」とは、少なくともそのうちの2種以上が異なる特異性部分を有するような、相互に連結された2種以上の抗体、抗体結合フラグメント(例えばFab)、それらの誘導体、又は抗原結合領域を言う。これらの異なる特異性部分には、エフェクタ細胞上のFc受容体に対する結合特異性と、腫瘍細胞などの標的細胞上の抗原又はエピトープに対する結合特異性部分が含まれる。ここで用いる用語「ヒト抗体」には、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を由来とする可変領域及び定常領域を有する抗体が含まれるものと、意図されている。本発明のヒト抗体には、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配

50

列にはコードされていないアミノ酸残基（例えばin vitroでのランダムもしくは部位指定変異誘発法や、又はin vivoでの体細胞変異などにより導入された変異など）が含まれていてもよい。しかしながら、ここで用いる用語「ヒト抗体」に、マウスなどの別のほ乳類種の生殖細胞系由来のCDR配列がヒトフレームワーク配列内に移植された抗体が含まれるとは、意図していない。

【0046】

ここで用いる用語「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」とは、単一の分子組成から成る抗体分子の製剤を言う。モノクローナル抗体組成物は単一の結合特異性及び親和性を特定のエピトープに対して示す。従って、用語「ヒトモノクローナル抗体」とは、単一の結合特異性を示すと共に、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を由来とする可変領域及定常領域を有するような抗体を言う。ある実施態様では、本ヒトモノクローナル抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物から得たB細胞を、不死化細胞に融合させて含むハイブリドーマにより産生される。

【0047】

ここで用いる用語「組換えヒト抗体」には、例えば（a）ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックな動物（例えばマウス）から単離された、又はそこから調製されたハイブリドーマから単離された抗体（さらに下のセクションIで解説する）、（b）例えばトランスフェクトーマからなど、当該抗体を発現するよう形質転換させた宿主細胞から単離された抗体、（c）組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体、及び（d）ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングに関係する何らかの他の手段により調製、発現、作製又は単離された抗体、など、組換え手段により調製、発現、作製又は単離されたあらゆるヒト抗体が含まれると、意図されている。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を由来とする可変及び定常領域を有する。しかしながら、いくつかの実施態様では、このような組換えヒト抗体にin vitroで変異誘発を行う（又は、ヒトIg配列についてトランスジェニックな動物を用いる場合はin vivoで体細胞変異誘発を行う）ことができ、こうして当該の組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系VH及びVL配列を由来とするか、又は関係しながらも、in vivoのヒト抗体生殖細胞系レパートリー中には天然で存在しないであろう配列となる。

【0048】

ここで用いる場合「異種抗体」は、このような抗体を産生する非ヒトトランスジェニック生物との関係から定義される。この用語は、当該の非ヒトトランスジェニック動物を構成しない生物に見られるものに相当するアミノ酸配列又はコードする核酸配列を有し、一般的には当該の非ヒトトランスジェニック動物の種以外の種を由来とする抗体を言う。

【0049】

ここで用いる「ヘテロハイブリッド抗体」とは、異なる生物由来の軽鎖及び重鎖を有する抗体を言う。例えば、ヒト重鎖をマウス軽鎖に結合させて有する抗体がヘテロハイブリッド抗体である。ヘテロハイブリッド抗体の例には、上に解説したキメラ抗体及びヒト化抗体がある。

【0050】

ここで用いる「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を言うものと、意図されている（例えばEGFRに特異的に結合する単離された抗体は、EGFR以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかしながら、ヒトEGFRのエピトープ、アイソフォーム又はバリエーションに特異的に結合する単離された抗体であれば、例えば他の種由来など（例えばEGFRの種相同志）、他の関連する抗原に対して交差反応性を有していてもよい。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質及び／又は化学物質を実質的に含まないであろう。本発明のある実施態様では、異なる特異性を有する「単離された」モノクローナル抗体の組合せを、良く定義された組成で組み合わせる。

【0051】

ここで用いる「特異的結合」とは、所定の抗原への抗体の結合を言う。典型的には、抗体は少なくとも約 $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ の親和性で結合し、所定の抗原に対しては、前記所定の抗原又は関係の近い抗原以外の非特異的な抗原（例えばBSA、カゼイン）に対するその結合親和性よりも少なくとも2倍高い親和性で結合する。文言「抗原を認識する抗体」及び「抗原に特異的な抗体」はここでは用語「抗原に特異的に結合する抗体」と交換可能に用いられている。

【0052】

ここで用いる用語、あるIgG抗体に対する「高親和性」とは、少なくとも約 10^7M^{-1} 、好ましくは少なくとも約 10^8M^{-1} 、より好ましくは少なくとも約 10^9M^{-1} 、そしてさらにより好ましくは少なくとも約 10^{10}M^{-1} 、 10^{11}M^{-1} 、 10^{12}M^{-1} 又はそれより高い、例えば最高で 10^{13}M^{-1} 又はそれより高いものなど、の結合親和性を言う。しかしながら、「高親和性」結合は他の抗体アイソタイプでは様々であろう。例えばIgMアイソタイプにとっての「高親和性」結合とは、少なくとも約 $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ の結合親和性を言う。

10

【0053】

ここで用いる用語「 K_A 」とは、特定の抗体－抗原相互作用の結合定数を言うものと、意図されている。

【0054】

ここで用いる用語「 K_D 」とは、特定の抗体－抗原相互作用の解離定数を言うものと、意図されている。

【0055】

20

ここで用いる「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子にコードされた抗体クラス（例えばIgM又はIgG1）を言う。

【0056】

ここで用いる「アイソタイプ・スイッチング」とは、抗体のクラス、即ちアイソタイプ、が、あるIgクラスから他のIgクラスのうちの一つに変化する現象を言う。

【0057】

ここで用いる「スイッチングのないアイソタイプ」とは、アイソタイプ・スイッチングが起きないときに産生される重鎖のアイソタイプ・クラスを言い、スイッチングのないアイソタイプをコードするCH遺伝子は、典型的には、機能上の再編成の起きるVDJ遺伝子のすぐ下流の一番目にあるCH遺伝子である。アイソタイプ・スイッチングは、古典的もしくは非古典的なアイソタイプ・スイッチングに分類されてきた。古典的なアイソタイプ・スイッチングは、導入遺伝子中の少なくとも一つのスイッチ配列が関与する組換えにより起きるものである。非古典的なアイソタイプ・スイッチングは、例えばヒト σ_μ とヒト Σ_μ との間の相同組換え（ δ 関連欠失）などで起きることがある。その他の非古典的なスイッチング機序、なかでも例えば導入遺伝子間及び／又は染色体間の組換えなどがあると、アイソタイプ・スイッチングが起きることがある。

30

【0058】

ここで用いる用語「スイッチ配列」とは、スイッチ組換えを担うDNA配列を言う。「スイッチ・ドナー」配列は典型的に μ スイッチ領域であり、スイッチ組換えの際に欠失するコンストラクト領域の5'側（即ち上流）にある。「スイッチ・アクセプター」領域は、欠失するコンストラクト領域と、置換定常領域（例えば γ 、 ϵ 、等）との間にあるであろう。組換えが必ず起きるといった特定の部位はないため、最終的な遺伝子配列は、コンストラクトからは予測できないことが多いであろう。

40

【0059】

ここで用いる「糖付加パターン」は、タンパク質、より具体的には免疫グロブリンタンパク質、に共有結合する糖単位のパターンであると定義しておく。ある異種抗体の糖付加パターンが、導入遺伝子のCH遺伝子の由来となった種よりも当該の非ヒトトランスジェニック動物の種の糖付加パターンの方により似ていると当業者が認識するのであれば、この異種抗体の糖付加パターンを、前記非ヒトトランスジェニック動物の種の産生する抗体に天然で起きる糖付加パターンに実質的に似ていると特徴付けることができる。

50

【0060】

ある物質に対してここで用いられる用語「天然で発生する」とは、物質が自然界に見られる事実を言う。例えば、(ウィルスを含む)生物中に存在するポリペプチド又はポリヌクレオチド配列であって、天然にある源から単離でき、実験室で人間により意図的な改変を加えられていないポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は天然で発生したものである。

【0061】

ここで用いる用語「再編成される」とは、Vセグメントが、D-J又はJセグメントのすぐ隣に位置することで、それぞれ完全VH又はVLドメインを実質的にコードするコンホメーションとなるような重鎖又は軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の立体配置を言う。再編成の起きた免疫グロブリン遺伝子座は、生殖細胞DNAに比較することで特定でき、再編成の起きた遺伝子座は少なくとも一つの組換えられた7量体/9量体相同配列を有するであろう。

【0062】

Vセグメントに関してここで用いる用語「再編成のない」又は「生殖細胞の立体配置」とは、Vセグメントが組換えられておらず、D又はJセグメントのすぐ隣にあるような立体配置を言う。

【0063】

ここで用いる用語「核酸分子」には、DNA分子及びRNA分子が包含されるものと、意図されている。核酸分子は一本鎖でも、又は二本鎖でもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0064】

EGFRに結合する抗体又は抗体部分(例えばVH、VL、CDR3など)をコードする核酸分子に関してここで用いる用語「単離された核酸分子」とは、当該抗体又は抗体部分をコードするヌクレオチド配列が、EGFR以外の抗原に結合する抗体又は抗体部分をコードする、天然ではヒトゲノムDNA中で当該核酸をフランクしているであろう他のヌクレオチド配列を含まないことを言うものと、意図されている。ある実施態様では、本ヒト抗EGFR抗体、又はその部分は、2F8のヌクレオチド又はアミノ酸配列や、それぞれSEQ ID NO: 1 及び 3並びに 2及び4に示す重鎖(VH)及び軽鎖(VL)可変領域を含む。

【0065】

ここに開示及び請求するように、SEQ ID NO: 1-4に示す配列は、「保存的配列改変」、即ち、当該ヌクレオチド配列にコードされた、又は、当該アミノ酸配列を含有する、抗体の結合特性に有意に影響しない又は変化させないようなヌクレオチド及びアミノ酸配列改変を包含する。このような保存的配列改変には、ヌクレオチド及びアミノ酸の置換、付加及び欠失、がある。また、例えば部位指定変異誘発法及びPCR媒介変異誘発法など、当業で公知の標準的な技術によっても、SEQ ID NO: 1-4に改変を導入することができる。保存的アミノ酸置換には、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置換されるものが含まれる。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当業で定義されている。これらのファミリーには、塩基性の側鎖を持つアミノ酸(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性の側鎖を持つアミノ酸(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、無電荷の極性側鎖を持つアミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性の側鎖を持つアミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ分枝側鎖を持つアミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖を持つアミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)、がある。このように、ヒト抗EGFR抗体の中で予測される重要でないアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基に置換することが好ましい。

【0066】

あるいは、別の実施態様では、例えば飽和変異誘発法などにより、抗EGFR抗体コーディング配列の全部又は一部にわたって変異を無作為に導入することができ、その結果改変された抗EGFR抗体を結合活性についてスクリーニングすることができる。

【0067】

従って、ここで開示する（重鎖及び軽鎖可変領域）ヌクレオチド配列にコードされた抗体、及び／又は、ここに開示する（即ちSEQ ID NO: 1-4）（重鎖及び軽鎖可変領域）アミノ酸配列を含有する抗体には、保存的に改変された、類似の配列にコードされた、又は、類似の配列を含有する実質的に類似の抗体が含まれる。このような実質的に類似の抗体を、ここにSEQ ID No:1-4として開示された部分的（即ち重鎖及び軽鎖可変領域）配列に基づいてどのように作製できるかを、以下にさらに論じる。

【0068】

核酸の場合、用語「実質的な相同性」は、最適にアライメントして比較した場合の2つの核酸又はそのうちの指示した配列が、適当なヌクレオチド挿入又は欠失がありながらも、ヌクレオチドの少なくとも約80%、通常はヌクレオチドの少なくとも約90%乃至95%、そしてより好ましくは少なくとも約98%乃至99.5%、同一であることを指すものである。代替的には、数セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下で当該鎖の相補配列にハイブリダイズするときに、実質的な相同性が存在することとする。

10

【0069】

二つの配列間のパーセント同一性は、これら二つの配列を最適にアライメントするのに導入せねばならないギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮に入れたときの、これら配列に共通の同一位置の数の関数である（即ち、%相同性＝同一位置の数／位置の総数×100）。二つの配列間の配列の比較及びパーセント同一性の決定は、以下の非限定的な例に解説するように、数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。

20

【0070】

二つのヌクレオチド間のパーセント同一性は、GCGソフトウェア・パッケージ (<http://www.gcg.com>で入手できる) のGAPプログラムを用い、NWSgapdna.CMP マトリクスを用いて、ギャップ・ウェイトを40、50、60、70、又は80にし、そしてレンジス・ウェイトを1、2、3、4、5、又は6にして決定することができる。二つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間のパーセント同一性はまた、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれた E. マイヤース及びW. ミラーのアルゴリズム (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) を用い、PAM120 ウェイト残基表を用いて、ギャップ・レンジス・ペナルティを12、そしてギャップ・ペナルティを4にして、決定することもできる。さらに、二つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェア・パッケージ (<http://www.gcg.com>で入手できる) のGAPプログラムに組み込まれたニードルマン及びワンシュ (J. Mol. Biol. (48):44-453 (1970)) のアルゴリズムを用い、Blossum 62 マトリクス又はPAM250マトリクスのいずれかを用いて、ギャップ・ウェイトを16、14、12、10、8、6、又は4にし、レンジス・ウェイトを1、2、3、4、5、又は6にして、決定することができる。

30

【0071】

さらに本発明の核酸及びタンパク質の配列を「クエリー配列」として利用して、公開データベースの検索を行って、例えば関連する配列を同定することなどができる。このような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLAST 及びXBLASTプログラム（バージョン2.0）を利用すれば行える。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラムを用い、スコア= 100、ワード長= 12 にして行くと、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラムを用い、スコア= 50、ワード長= 3にして行くと、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較を目的としてギャップのあるアライメントを行うには、Gapped BLAST をAltschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402が解説するとおりに利用できる。BLAST及びギャップドBLASTプログラムを利用する場合、各プログラムの（例えばXBLAST 及びNBLAST）のデフォルト・パラメータを利用できる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> を参照されたい。

40

【0072】

当該核酸は全細胞中にあっても、細胞ライセート中にあっても、又は部分的に精製されたもしくは実質的に純粋な形で存在してもよい。核酸は、アルカリ／SDS処理、CsClバン

50

ディング、カラム・クロマトグラフィ、アガロースゲル電気泳動法、及び当業で公知の他の技術を含む標準的な技術により、例えば他の細胞内核酸又はタンパク質など、他の細胞成分又は他の混入物質を取り除いて精製されている場合に、「単離されている」又は「実質的に純粋である」ことになる。F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照されたい。

【0073】

cDNA、ゲノム又は混合物由来である本発明の核酸組成物は、しばしば天然配列（改変された制限部位等を除き）のままであり、遺伝子配列を提供する標準的技術に従って変異させてもよい。コーディング配列の場合、これらの変異は、必要に応じアミノ酸配列を左右するものでもよい。具体的には、ここで解説した天然V、D、J、定常、スイッチ及び他のこのような配列に実質的に相同又は由来とするDNA配列が考えられる（「由来する」が、ある配列が別の配列と同一か、もしくは別の配列から改変されていることを指す場合）。

10

【0074】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に置かれたときに「作動的に連結された」ことになる。例えば、あるプロモータ又はエンハンサが、あるコーディング配列の転写を左右するのであれば、その配列に作動的に連結されていることになる。転写制御配列に関する場合、作動的に連結されたとは、連結しようとするDNA配列が連続していることを意味し、また2つのタンパク質コーディング領域を接合するために必要な場合には、連続し、かつ読み取り枠内にあることを意味する。スイッチ配列の場合には、作動的に連結された、とは、当該配列がスイッチ組換えを起こし得ることを指す。

20

【0075】

ここで用いる用語「ベクタ」とは、連結された先の別の核酸を輸送できる核酸分子を言うものと、意図されている。ベクタの一種が、付加的なDNAセグメントを連結できる環状の二本鎖DNAループを言う「プラスミド」である。ベクタのもう一つの種類がウィルスベクタであり、この場合、付加的なDNAセグメントは、ウィルスゲノム内に連結させることができる。いくつかのベクタは導入された先の宿主細胞内で自律的複製が可能である（例えば細菌由来の複製開始点を有する細菌ベクタや、エピソームほ乳類ベクタなど）。他のベクタ（例えば非エピソームほ乳類ベクタなど）は、宿主細胞に導入されるや、宿主細胞のゲノムに組み込まれるため、宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、いくつかのベクタは、作動的に連結された先の遺伝子の発現を命令することができる。このようなベクタをここでは「組換え発現ベクタ」（又は単に「発現ベクタ」）と呼ぶ。一般的に、組換えDNA技術で実用性のある発現ベクタは、しばしばプラスミドの形である。本明細書では、プラスミドが最も普通に用いられている形のベクタであるため、「プラスミド」及び「ベクタ」を交換可能に用いている場合がある。しかしながら、本発明には、例えばウィルスベクタ（例えば複製欠陥レトロウィルス、アデノウィルス及びアデノ随伴ウィルス）など、同等の機能を果たす他の形のこのような発現ベクタも包含されることが、意図されている。

30

【0076】

ここで用いる用語「組換え宿主細胞（又は単に「宿主細胞」）とは、組換え発現ベクタが導入された細胞を言うものと、意図されている。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の後代も言うものと意図されていることは、理解されねばならない。突然変異又は環境による影響が原因で、特定の改変が継代に起きる場合があるため、このような後代は実際には親細胞と同一でないかも知れないが、それでも尚、ここで用いる用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。組換え宿主細胞には、例えば、CHO細胞及びリンパ球がある。

40

【0077】

本発明の多様な局面を以下の小項でさらに詳述する。

【0078】

I. EGFRに対するヒト抗体の作製

50

本発明のモノクローナル抗体 (MAB) は、従来のモノクローナル抗体法、例えばKohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術など、を含む多様な技術により作製できる。体細胞ハイブリダイゼーション法が基本的には好適であるが、モノクローナル抗体を作製する他の技術、例えばBリンパ球のウィルス又は腫瘍形成性形質転換など、も利用できる。

【0079】

ハイブリドーマを調製するための好適な動物系はマウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ作製は大変よく確立された手法である。融合用の免疫化脾細胞の免疫プロトコル及び単離のための技術は当業で公知である。融合相手 (例えばマウス骨髄腫細胞) 及び融合法も公知である。

【0080】

ある好適な実施態様では、EGFRを狙ったヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を持つトランスジェニックマウスを用いて作製できる。これらのトランスジェニックマウスはここでは「HuMAB」マウスと呼ばれ、再編成していないヒト重鎖 (μ 及び γ) 及び κ 軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子最小遺伝子座を、内因性の μ 及び κ 鎖遺伝子座を不活性化する標的設定された変異と一緒に含有する (Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859)。従って、このマウスの示すマウスIgM又は κ の発現は低く、免疫処置に応答して、導入されたヒト重鎖及び軽鎖導入遺伝子がクラス・スイッチング及び体細胞変異を起こすことにより高親和ヒトIgG κ モノクローナルが生じる (Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* で 113:49-101レビューされた 上記のLonberg, N. et al. (1994) ; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, 及びHarding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546)。HuMABマウスの作製は、下の項 I I 及びTaylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920 ; Lonberg et al., (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851に詳細に解説されており、これらすべての内容全体を引用をもってここに援用することとする。さらに、すべてLonberg 及びKay、並びにジェンファーム・インターナショナル社に付与された米国特許第5,545,806号 ; 第5,569,825号 ; 第5,625,126号 ; 第5,633,425号 ; 第5,789,650号 ; 第5,877,397号 ; 第5,661,016号 ; 第5,814,318号 ; 第5,874,299号 ; 及び第5,770,429号 ; Surani et al. のto 米国特許第5,545,807号 ; 1998年6月11日に公開された国際公報W0 98/24884 ; 1994年11月10日に公開されたW0 94/25585 ; 1993年6月24日に公開された W0 93/1227 ; 1992年12月23日に公開されたW0 92/22645 ; 1992年3月19日に公開されたW0 92/03918を参照されたく、これらのすべての開示全体を、引用をもってここに援用することとする。代替的には、実施例2で解説するHC012トランスジェニックマウスを用いてヒト抗EGFR抗体を作製することができる。

【0081】

ヒト抗体免疫

EGFRに対する完全ヒトモノクローナル抗体を作製するためには、HuMABマウスをLonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 及び W0 98/24884に解説されたようにEGFR抗原の精製もしくは濃縮製剤及び／又はEGFR発現細胞で免疫することができる。好ましくは、当該マウスは1回目の輸注時に6乃至16週齢であるとよい。例えば、EGFR抗原 (例えばEGFRを発現するLNCaP細胞から精製されたもの) の精製もしくは濃縮製剤 (5乃至20 μ g) を用いて、HuM

10

20

30

40

50

Abマウスを腹腔内により免疫することができる。EGFR抗原の精製もしくは濃縮製剤を用いた免疫処置でも抗体が生じない場合、腫瘍細胞株など、EGFR発現細胞でマウスを免疫して、免疫応答を促進することもできる。

【0082】

多様な抗原を用いて蓄積した経験では、HuMAbトランスジェニックマウスは、まず抗原を完全フロイントアジュバントに入れて腹腔内（IP）免疫し、その後不完全フロイントアジュバントに抗原を入れて1週置きに（最高で合計6回）腹腔内免疫処置したときに最も良く応答することが示された。免疫応答は、眼窩後方の採血で得た血漿試料で、免疫プロトコルの経過にわたって観察することができる。血漿はELISA（以下に解説するように）でスクリーニングすることができ、十分な抗体価の抗EGFRヒト免疫グロブリンを持つマウスを融合に用いることができる。マウスは、と殺及び脾臓の摘出から3日前に抗原を静注して追加免疫することができる。各抗原について2乃至3回の融合を行う必要があるだろうと予測される。例えばHC07及びHC012株の合計12匹のHuMAbマウスを免疫できる。

10

【0083】

EGFRに対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

標準的なプロトコルに基づき、マウス脾細胞を単離し、PEGでマウス骨髓腫細胞株に融合させることができる。こうして出来たハイブリドーマを次に、抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングする。例えば免疫されたマウス由来の脾臓リンパ球の単個細胞懸濁液を、50%PEGで、P3X63-Ag8.653非分泌性マウス骨髓腫細胞（ATCC, CRL 1580）の数の6分の1に融合させる。細胞を平底の微量定量プレートに約 2×10^5 になるようにプレートし、20%ウシクロン血清、18%「653」調整培地、5%オリゲン（IGEN社）、4 mM L-グルタミン、1 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、5mM HEPES、0.055 mM 2-メルカプトエタノール、50 単位/ml ペニシリン、50 mg/ml ストレプトマイシン、50 mg/ml ゲンタマイシン及び1×HAT（シグマ社；HATは融合から24時間後に加える）を含有する選択培地で2週間インキュベートする。2週間後、HATをHTに取り替えた培地で細胞を培養する。次に個々のウェルをELISAによりヒト抗EGFRモノクローナルIgM及びIgG抗体についてスクリーニングする。広汎なハイブリドーマ成長が起きたら培地を通常10乃至14日後に観察する。抗体を産生しているハイブリドーマを再度プレートし、再度スクリーニングし、ヒトIgG、抗EGFRモノクローナル抗体についてまだ尚陽性であれば、限界希釈により少なくとも2回、サブクロニングすることができる。次に安定なサブクロンをin vitroで培養して、少量の抗体を組織培養培地中に生じさせ、特徴付けに向ける。

20

30

【0084】

EGFRに対するヒトモノクローナル抗体を産生するトランスフェクターマの作製

本発明のヒト抗体は、当業で公知のように、組換えDNA技術及び遺伝子トランスフェクション法の組合せなどを用いて、ホスト細胞トランスフェクターマで作製することもできる（Morrison, S. (1985) Science 229:1202）。

【0085】

例えばある実施態様では、ヒト抗体遺伝子などの目的の遺伝子を、真核細胞プラスミドなどの発現ベクター内に連結することができる。次にこのプラスミドを細菌細胞（例えばE. coli）などのホスト細胞に導入し、この細胞を成長させることができる。組み込まれたDNAを持つプラスミドを含有するホスト細胞を選抜し、リゾチームで処理して細胞壁を取り除くことができる。その結果得られるスフェロプラストを骨髓腫細胞などの不死化細胞に融合させることができる（「トランスフェクション」と言及する）。融合後、安定な細胞（トランスフェクタント）を特定及び選抜することができる。これらの細胞は、その後腹水又は組織培地中で成長させることで増殖させ、組換えヒト抗体の作製に用いることができるトランスフェクターマである。

40

【0086】

インタクト抗体を発現させるための部分的抗体配列の利用

抗体は、6つの重鎖及び軽鎖相補性決定領域（CDR）に位置するアミノ酸残基を主に通じて標的抗原と相互作用する。そのため、CDR内のアミノ酸配列は、CDRの外にある配列よ

50

りも、個々の抗体間の違いが大きい。CDR配列は大半の抗体-抗原相互作用を担っているため、特定の天然発生型の抗体を由来とするCDR配列を、異なる性質を持つ異なる抗体由来のフレームワーク配列に移植した状態で含有するような発現ベクタを構築すると、特定の天然発生型抗体の性質を模倣する組換え抗体を発現させることができる（例えばRiechmann, L. et al., 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986, Nature 321:522-525; and Queen, C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033を参照されたい）。このようなフレームワーク配列は生殖細胞抗体遺伝子配列を含む公開DNAデータベースから得ることができる。これらの生殖細胞配列は成熟型の抗体遺伝子配列とは異なるが、それはなぜなら、それらには、B細胞成熟の過程でV(D)J接合により形成される、完全に集合した可変遺伝子が含まれていないからである。生殖細胞遺伝子配列はまた、可変領域全体にわたって、高親和二次レパートリー抗体の配列とも、個々のレベルで均一に異なる。例えば、体細胞変異は、フレームワーク領域のアミノ末端部分では比較的頻度が低い。例えば、体細胞変異は、フレームワーク領域1のアミノ末端部分及びフレームワーク領域4のカルボキシ末端部分では比較的頻度が低い。さらに、数多くの体細胞変異は、抗体の結合特性に大きく影響するものではない。そのために、もとの抗体のものと同様な結合特性を有するインタクト組換え抗体を作り直すために、特定の抗体のDNA配列全体を得る必要はない（あらゆる目的で、引用をもってここに援用することとする1999年3月12日出願のPCT/US99/05535を参照されたい）。典型的には、CDR領域にわたる部分的重鎖及び軽鎖配列があれば、この目的にとって充分である。この部分的配列を用いて、どの生殖細胞可変遺伝子及びジョイニング遺伝子セグメントが、組換え後の抗体可変遺伝子に寄与したかを決定する。次にこの生殖細胞配列を用いて、可変領域の欠けている部分を充填する。重鎖及び軽鎖リーダ配列はタンパク質成熟の過程で切断され、最終的な抗体の特性には寄与しない。そのため、発現コンストラクトのためには対応する生殖細胞リーダ配列を用いる必要がある。欠けている配列を追加するためには、クローンされたcDNA配列を、ライゲーション又はPCR増幅法により、合成オリゴヌクレオチドに組み合わせることができる。代替的には、可変領域全体を一組の短い、重複のあるオリゴヌクレオチドとして合成し、PCR増幅法で組み合わせ、完全に人工的な可変領域クローンを作製することもできる。このプロセスは、特定の制限部位を削除又は含有させたり、あるいは特定のコドンに至適化するなどのいくつかの利点を有する。

【0087】

ハイブリドーマからの重鎖及び軽鎖転写産物のヌクレオチド配列を用いて、重複組の合成オリゴヌクレオチドをデザインし、天然配列と同一のアミノ酸コーディング能を持つ合成V配列を作製する。この合成重鎖及びカッパ鎖配列は3つの方法で天然配列と異なってもよい：一続きの反復ヌクレオチド塩基に中断を加えてオリゴヌクレオチド合成及びPCR増幅がし易いようにする；最適な翻訳開始部位をコザックの規則に従い導入する(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266L19867019870)；そしてHindIII部位をこの翻訳開始部位の上流に設計する。

【0088】

重鎖及び軽鎖可変領域の両方について、最適化されたコーディング鎖配列及び対応する非コーディング鎖配列を、この対応する非コーディングオリゴヌクレオチドのほぼ中間点で30乃至50ヌクレオチドに分割する。従って各鎖毎に、オリゴヌクレオチドを、150乃至400個のヌクレオチドのセグメントにわたる重複する二本鎖の組に組み立てることができる。次にこのプールをテンプレートとして用いて、150乃至400個のヌクレオチドから成るPCR増幅産物を作製する。典型的には、一個の可変領域オリゴヌクレオチドの組を2つのプールに分割し、これらのプールを別々に増幅して2つの重複するPCR産物を作製することになるであろう。次にこれらの重複する産物をPCR増幅で組み合わせ、完全な可変領域を形成する。また、重鎖又は軽鎖定常領域（カッパ軽鎖のBbsI部位、又はγ重鎖のAgeI部位を含む）の重複するフラグメントをPCR増幅に含めることが、発現ベクタコンストラクト内に容易にクローンできるフラグメントを作製するには望ましいであろう。

【0089】

次に、再構築された重鎖及び軽鎖可変領域を、クローンされたプロモータ配列、翻訳開始配列、定常領域配列、3'側非翻訳配列、ポリアデニレーション配列、及び転写終了配列に組み合わせて、発現ベクタコンストラクトを形成する。重鎖及び軽鎖発現コンストラクトを単一のベクタ内で組み合わせることも、同時トランスフェクトすることも、順にトランスフェクトすることも、あるいは宿主細胞内に別々にトランスフェクトしてからこの宿主細胞を融合して、両方の鎖を発現する宿主細胞を形成することもできる。

【0090】

ヒトIgGκのための発現ベクタの構築に用いるプラスミドを以下に解説する。当該プラスミドは、PCR増幅後のV重鎖及びVカッパ軽鎖cDNA配列を用いると完全重鎖及び軽鎖最小遺伝子を再構築できるように構築された。これらのプラスミドは、完全にヒトの、もしくはキメラの、IgG₁κ又はIgG₄κ抗体を発現させるために用いることができる。同様なプラスミドは、他の重鎖アイソタイプを発現させたり、又は、ラムダ軽鎖を含む抗体を発現させるためにも、構築することができる。

10

【0091】

このように、本発明の別の局面では、本発明のヒト抗EGFR抗体、例えば2F8、の構造上の特徴を用いて、EGFRに結合するなどの本発明の抗体の少なくとも一つの機能的特性を維持した、構造上関連するヒト抗EGFR抗体を作製する。より具体的には、2F8の一つ以上のCDR領域を、既知のヒトフレームワーク領域及びCDRに組換えにより組み合わせることで、更なる、組換え操作された、本発明のヒト抗EGFR抗体を作製することができる。

20

【0092】

従って、別の実施態様では、本発明は：

(1) ヒト重鎖フレームワーク領域及びヒト重鎖CDRであって、前記ヒト重鎖CDRのうちの少なくとも一つが、図15に示された(又はSEQ ID NO: 2のアミノ酸残基に相当する)CDRのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、ヒト重鎖フレームワーク領域及びヒト重鎖CDRと；(2) ヒト軽鎖フレームワーク領域及びヒト軽鎖CDRであって、前記ヒト軽鎖CDRのうちの少なくとも一つが、図15に示された(又はSEQ ID NO: 4のアミノ酸残基に相当する)CDRのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含み、前記抗体がEGFRへの結合能を維持している、ヒト軽鎖フレームワーク領域及びヒト軽鎖CDRと、を含む抗体を調製するステップ

30

を含む、抗EGFR抗体を調製する方法を提供するものである。

【0093】

当該抗体のEGFRへの結合能は、実施例に記載したものなど、標準的な結合検定法(例えばELISA)を用いて判定することができる。抗体の重鎖及び軽鎖CDR3ドメインは特に重要な役割を、抗原に対する抗体の結合特異性／親和性において果たすことが当業で公知であるため、上述のように調製された本発明の組換え抗体は、好ましくは、2F8の重鎖及び軽鎖CDR3を含むとよい。本抗体にさらに2F8のCDR2を含めることもできる。本抗体にはさらに2F8のCDR1を含めることもできる。従って、さらに本発明は、(1) ヒト重鎖フレームワーク領域、ヒト重鎖CDR1領域、ヒト重鎖CDR2領域、及びヒト重鎖CDR3領域であって、前記ヒト重鎖CDR3領域が図15に示す2F8のCDR3(又はSEQ ID NO: 2のアミノ酸残基に相当する)である、ヒト重鎖フレームワーク領域、ヒト重鎖CDR1領域、ヒト重鎖CDR2領域、及びヒト重鎖CDR3領域と、(2) ヒト軽鎖フレームワーク領域、ヒト軽鎖CDR1領域、ヒト軽鎖CDR2領域、及びヒト軽鎖CDR3領域であって、前記ヒト軽鎖CDR3領域が図15に示す2F8のCDR3(又はSEQ ID NO: 4のアミノ酸残基に相当する)であり、前記抗体がEGFRに結合する、ヒト軽鎖フレームワーク領域、ヒト軽鎖CDR1領域、ヒト軽鎖CDR2領域、及びヒト軽鎖CDR3領域と、を含む抗EGFR抗体を提供するものである。さらに本抗体に、2F8の重鎖CDR2及び／又は軽鎖CDR2を含めてもよい。さらに本抗体に、2F8の重鎖CDR1及び／又は軽鎖CDR1を含めてもよい。

40

【0094】

好ましくは上述の操作された抗体のCDR1、2、及び／又は3が、ここに開示した2F8のそ

50

れと全く同じアミノ酸配列を含むとよい。しかしながら、当業者であれば、抗体のEGFRへの結合能が事実上保持されれば、2F8通りのCDR配列から何らかの逸脱（例えば保存的置換）があってもよいことは理解されよう。従って、別の実施態様では、操作後の抗体は、2F8の一つ以上のCDRに対し、例えば90%、95%、98% 又は99.5% 同一な一つ以上のCDRから成ってもよい。EGFRへ単に結合することだけでなく、上述したものなどの操作された抗体は、本発明の抗体の他の機能上の特徴：例えば：

（１）EGFR発現生存細胞への結合；

（２）EGFRへの高親和結合；

（３）EGFRの固有のエピトープへの結合（それにより、補完的な活性を持つモノクローナル抗体を組み合わせる用いた場合に、同じエピトープへの結合をめぐる競合が起きる可能性をなくす）；

（４）EGFR発現細胞のオプソニン化；及び／又は

（５）ヒトエフェクター細胞の存在下でのEGFR発現細胞の成長阻害、ファゴサイトーシス及び／又は致死の媒介；

など、の保持について選抜してもよい。

【0095】

EGFRへのヒトモノクローナル抗体の結合の特徴付け

本発明のヒトモノクローナルEGFR抗体の結合を特徴付けるには、免疫したマウスの血清をELISAなどで検査することができる。簡単に説明すると、微量定量プレート（20を、PBSに入れた0.25 µg/mlの精製EGFRで被覆した後、5%ウシ血清アルブミンPBS溶液で遮断する。EGFR免疫マウスから採った血漿の希釈液を各ウェルに加え、37℃で1乃至2時間、インキュベートする。このプレートをPBS/Tweenで洗浄した後、アルカリホスファターゼに結合させたヤギ抗ヒトIgG Fc特異ポリクローナル試薬と一緒に37℃で1時間、インキュベートする。洗浄後、プレートをpNPP基質（1mg/ml）で展開させ、405乃至650のODで分析する。好ましくは、最も高い抗体価を生じるマウスを融合に用いるとよい。

【0096】

上述のELISA検定は、EGFR免疫原との陽性反応性を示すハイブリドーマを探すスクリーニングにも用いることができる。EGFRに強力に結合するハイブリドーマをサブクローンし、さらに特徴付ける。親細胞との反応性を維持した（ELISAにより）各ハイブリドーマから採った一つのクローンを選択し、5乃至10バイアルの細胞銀行を作製して-140℃で保存し、抗体精製に向ける。

【0097】

ヒト抗EGFR抗体を精製するには、選抜されたハイブリドーマを、モノクローナル抗体精製用の2リットル入りスピナー・フラスコで成長させることができる。上清を濾過し、濃縮してからプロテインA-セファロース（ニュージャージー州ピスカタウェイ、ファルマシア社）によるアフィニティ・クロマトグラフィにかけることができる。溶出したIgGをゲル電気泳動法及び高速液体クロマトグラフィでチェックして純度を確認することができる。緩衝液をPBSに交換し、1.43の吸光係数を用いたOD₂₈₀により、濃度を判定できる。このモノクローナル抗体を分取し、-80℃で保存できる。

【0098】

選抜されたヒト抗EGFRモノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかを調べるためには、各抗体を市販の試薬（イリノイ州ロックフォード、ピアース社）を用いてビオチン化することができる。未標識のモノクローナル抗体及びビオチン化モノクローナル抗体を用いた競合実験は、EGFRで被覆したELISAプレートを上述したように用いて行うことができる。ビオチン化MAbの結合は、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ・プローブで検出できる。

【0099】

精製された抗体のアイソタイプを調べるには、アイソタイプELISAを行うことができる。微量定量プレートのウェルを10 µg/mlの抗ヒトIgで一晩かけて4℃で被覆できる。5% BSAで遮断した後、プレートを10 µg/mlのモノクローナル抗体又は精製済みのアイソタイ

10

20

30

40

50

ブ・コントロールに、周囲温度で2時間、反応させる。次にこのウェルをヒトIgG1又はヒトIgM-特異アルカリホスファターゼ結合プローブに反応させることができる。プレートを展開させ、上述したように分析する。

【0100】

EGFR発現生存細胞へのモノクローナル抗体の結合を実証するためには、フローサイトメトリを利用できる。簡単に説明すると、EGFR発現細胞株（標準的な成長条件下で成長させたもの）を、0.1% Tween 80及び20%マウス血清を含有する多様な濃度のモノクローナル抗体PBS溶液に混合し、37℃で1時間、インキュベートする。洗浄後、細胞を、フルオレセインで標識された抗ヒトIgG抗体に、一次抗体染色と同じ条件下で反応させる。これら試料は、FACSscan装置により、単個細胞に当たる光及び側光散乱特性を用いて分析することができる。蛍光顕微鏡法を用いた代替的な検定法を（フローサイトメトリ検定法に加えて又は代わりに）用いてもよい。細胞は上述した通りに染色し、蛍光顕微鏡法で調べることができる。この方法では、個々の細胞の観察が可能であるが、抗原の密度によっては感受性が劣るかも知れない。

10

【0101】

さらに抗EGFRヒトIgGは、EGFR抗原との反応性についてウェスタン・ブロット法でもテストすることができる。簡単に説明すると、EGFR発現細胞からの細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にかけることができる。電気泳動後、単離した抗原をニトロセルロース・メンブレンに写し取り、20%マウス血清で遮断し、テスト対象のモノクローナル抗体でプローブする。ヒトIgGの結合は、抗ヒトIgGアルカリホスファターゼを用いて検出し、BCIP/NBT基質錠剤で展開させることができる（ミズーリ州セントルイス、シグマ・ケミカルズ社）。

20

【0102】

EGFRに対するヒトモノクローナル抗体のファゴサイトーシス及び細胞致死活性

ヒトモノクローナル抗EGFR抗体は、EGFRへの特異的結合に加え、EGFR発現細胞のファゴサイトーシス及び致死を媒介する能力についても、テストすることができる。モノクローナル抗体活性のin vitroでの検査は、in vivoモデルでのテストの前の最初のスクリーニングとなるであろう。簡単に説明すると、健康なドナーからの多核白血球(PMN)又は他のエフェクタ細胞をフィッコール・ハイパック密度遠心分離法で精製した後、混入赤血球を溶解させることができる。洗浄したPMNを、10%熱不活化ウシ胎児血清を添加したRPMI中に懸濁させ、⁵¹Crで標識したEGFR発現細胞と、様々なエフェクタ細胞対腫瘍細胞の比（エフェクタ細胞：腫瘍細胞）で混合することができる。次に、精製済みのヒト抗EGFR IgGを様々な濃度で加えることができる。無関係のヒトIgGを陰性コントロールとして用いることができる。検定は、37℃で0-120分間かけて行うことができる。⁵¹Crの培養上清への放出を測定することで、試料を細胞溶解について検定できる。さらに抗EGFRモノクローナルを相互に組み合わせてテストして、複数のモノクローナル抗体で細胞溶解が高められるかを調べることもできる。

30

【0103】

さらに、EGFRに結合するヒトモノクローナル抗体をin vivoモデル（例えばマウス）でテストして、腫瘍細胞など、EGFR発現細胞のファゴサイトーシス及び致死の媒介能を調べることができる。これらの抗体は、排他的であることを意図しない以下の基準などに基づいて選抜することができる：

40

1) EGFR発現生存細胞への結合；

2) EGFRへの結合の高親和性；

3) EGFR上の固有のエピトープへの結合（それにより、補完的な活性を持つモノクローナル抗体を組み合わせて用いた場合に、同じエピトープへの結合をめぐった競合が起きる可能性をなくす）；

(4) EGFR発現細胞のオプソニン化；及び／又は

(5) ヒトエフェクター細胞の存在下でのEGFR発現細胞の成長阻害、ファゴサイトーシス及び／又は致死の媒介。

50

【0104】

本発明の好適なヒトモノクローナル抗体は、これらの基準の一つ以上、そして好ましくは全てを満たすものである。ある具体的な実施態様では、本ヒトモノクローナル抗体を、2種以上の抗EGFRモノクローナル抗体又はそのフラグメントを含む医薬組成物など、組み合わせる。例えば、所望の治療又は診断効果を上げるために、異なる、しかし補完的な活性を有するヒト抗EGFRモノクローナル抗体を組み合わせることで単一の治療法にすることができる。これの一例は、エフェクタ細胞の存在下での標的細胞の効果の高い致死を媒介する抗EGFRヒトモノクローナル抗体を、EGFR発現細胞の成長を阻害する別のヒト抗EGFRモノクローナル抗体と組み合わせる含有する組成物であろう。

【0105】

I I. ヒトモノクローナル抗EGFR抗体を産生する非ヒトトランスジェニック動物の作製

さらに別の局面では、本発明は、EGFRに、好ましくは高親和性で、特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を発現できるトランスジェニックマウスなどの非ヒトトランスジェニック動物を提供するものである。ある好適な実施態様では、トランスジェニックマウス（HuMAbマウス）などの本非ヒトトランスジェニック動物は、ヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する。ある実施態様では、トランスジェニックマウスなどの本非ヒトトランスジェニック動物は、EGFR抗原の精製もしくは濃縮製剤、及び／又は、EGFR発現細胞で免疫されている。好ましくは、トランスジェニックマウスなどの本非ヒトトランスジェニック動物は、V-D-J組換え及びアイソタイプ・スイッチングを起こすことにより、EGFRに対して複数のアイソタイプのヒトモノクローナル抗体（例えばIgG、IgA 及び／又は IgE）を産生できる。アイソタイプ・スイッチングは、例えば古典的又は非古典的なアイソタイプ・スイッチングなどで起きるものでもよい。

【0106】

外来の抗原刺激に対して異種抗体レパートリーで応答する非ヒトトランスジェニック動物をデザインするには、トランスジェニック動物内に含まれた異種免疫グロブリン導入遺伝子がB細胞発生の経路全体にわたって正確に機能する必要がある。ある好適な実施態様では、異種重鎖導入遺伝子の正確な機能にアイソタイプ・スイッチングが含まれる。従って、本発明の導入遺伝子は、アイソタイプ・スイッチングと、以下：（１）高レベルかつ細胞種特異的な発現、（２）機能遺伝子の再編成、（３）アレル排除の活性化及びアレル排除への応答、（４）充分な一次レパートリーの発現、（５）シグナル伝達、（６）体細胞の超変異、及び（７）免疫応答中の導入遺伝子抗体遺伝子座の優性、のうちの一つ以上とが生じるように、構築される。

【0107】

前述の基準の全てを満たす必要はない。例えば、トランスジェニック動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座を機能的に破壊した実施態様では、この導入遺伝子はアレル排除を活性化する必要はない。さらに、導入遺伝子が機能的に再編成された重鎖及び／又は軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含む実施態様では、機能遺伝子の再編成という二番目の基準は、導入遺伝子が既に再編成されている限りにおいて、不要である。分子免疫学の背景については、引用をもってここに援用することとする Fundamental Immunology, 2nd edition (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N.Y.を参照されたい。

【0108】

いくつかの実施態様では、本発明のヒトモノクローナル抗体を作製するために用いる非ヒトトランスジェニック動物は、再編成された、再編成のない、又は再編成された及び再編成のないものの組合せの異種免疫グロブリン重鎖及び軽鎖導入遺伝子を、このトランスジェニック動物の生殖細胞に含有する。重鎖導入遺伝子のそれぞれは少なくとも一つのC_H遺伝子を含む。加えて、この重鎖導入遺伝子が、このトランスジェニック動物のB細胞中で、複数のC_H遺伝子をコードする異種導入遺伝子のアイソタイプ・スイッチングを支援できる機能的アイソタイプ・スイッチ配列を含有してもよい。このようなスイッチ配列は、導入遺伝子C_H遺伝子の源として働く種由来の生殖細胞免疫グロブリン遺伝子座に天然で存在するものであってもよく、あるいはこのようなスイッチ配列は、導入遺伝子コンストラ

クトを受け取る側の種（トランスジェニック動物）にあるものを由来としてもよい。例えば、トランスジェニックマウスを作製するために用いるヒト導入遺伝子コンストラクトは、マウス重鎖遺伝子座に天然で存在するものと類似のスイッチ配列が導入されている場合には、より高頻度でアイソタイプ・スイッチング事象を起こすと思われる。これはおそらく、マウススイッチ・リコンビナーゼ酵素系で機能するにはこのようなマウススイッチ配列は最適であるが、ヒトスイッチ配列はそうでないからであろう。スイッチ配列は従来のクローニング法で単離及びクローンしてもよく、又は、免疫グロブリンスイッチ領域配列に関して公開された配列情報に基づいてデザインされた重複合成オリゴヌクレオチドから *de novo* 合成してもよい（引用をもってここに援用する Mills et al., Nucl. Acids Res. 15:7305-7316 (1991); Sideras et al., Intl. Immunol. 1:631-642 (1989))。 10

【0109】

前述のトランスジェニック動物のそれぞれの場合、機能的に再編成された異種重鎖及び軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子が、このトランスジェニック動物のB細胞の大部分で見られる（少なくとも10パーセント）。

【0110】

本発明のトランスジェニック動物を作製するために用いる導入遺伝子は、少なくとも一つの可変遺伝子セグメント、一つの多様性遺伝子セグメント、一つのジョイニング遺伝子セグメント、及び少なくとも一つの定常領域遺伝子セグメント、をコードするDNAを含む重鎖導入遺伝子を含む。免疫グロブリン軽鎖導入遺伝子は、少なくとも一つの可変遺伝子セグメント、一つのジョイニング遺伝子セグメント、及び少なくとも一つの定常領域遺伝子セグメント、をコードするDNAを含む。前記軽鎖及び重鎖遺伝子セグメントをコードする遺伝子セグメントは、当該の非ヒトトランスジェニック動物を構成しない種を由来とする免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAを由来とするか、又は、このようなDNAに相当するため、この非ヒトトランスジェニック動物にとって異種である。本発明の一局面では、これら個々の遺伝子セグメントが再編成されないように、即ち、機能的免疫グロブリン軽鎖又は重鎖をコードするよう、再編成されないように、導入遺伝子を構築する。このような再編成のない導入遺伝子は、V、D、及びJ遺伝子セグメントの組換え（機能的再編成）を支援し、好ましくは、EGFR抗原に暴露したときに、非ヒトトランスジェニック動物内でD領域遺伝子セグメントの全部又は一部が再編成後の免疫グロブリン重鎖へ取り込まれることを支援するとよい。 20 30

【0111】

代替的な実施態様では、当該導入遺伝子は再編成のない「最小遺伝子座」を含むものである。このような導入遺伝子は典型的に、C、D、及びJセグメントの大部分や、V遺伝子セグメントのサブセットを含む。このような導入遺伝子コンストラクトにおいては、多様な調節配列、例えばプロモータ、エンハンサ、クラス・スイッチ領域、RNAプロセッシングの際のスプライスドナー及びスプライスアクセプタ配列、組換えシグナル等、は、当該の異種DNA由来の対応する配列を含む。このような調節配列は、この導入遺伝子に、本発明で用いられる非ヒト動物と同じ種から、又は、関連する種から、導入してよい。例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを導入遺伝子内でげっ歯類免疫グロブリンエンハンサ配列に組み合わせて、トランスジェニックマウスでの利用に向けてもよい。代替的には、哺乳動物のゲノムに天然で存在することが公知の機能的DNA配列にとって同種でないような合成調節配列を、導入遺伝子に組み込んでもよい。合成調節配列は、例えばスプライスアクセプタ部位又はプロモータ／エンハンサ・モチーフの許容可能な配列を明示したものなど、コンセンサスの規則に従ってデザインされる。例えば、最小遺伝子座は、天然で発生する生殖細胞Ig遺伝子座に比較して、必須でないDNA部分（例えば介在配列；イントロン又はその一部分）に、少なくとも一つの間（即ち当該部分の末端ではない）の欠失を有するゲノム免疫グロブリン遺伝子座部分を含む。 40

【0112】

本発明のある好適な実施態様では、EGFRに対するヒト抗体を作製するために用いるトランスジェニック動物は、WO98/24884の実施例5、6、8、又は14に解説された軽鎖導入遺伝 50

子を1コピー含有する動物と、W098/24884の実施例10で解説された J_H を欠失させた動物と交配したその仔で育種したW098/24884の実施例12で解説された導入遺伝子（例えばpHC1又はpHC2）のコピーを少なくとも1つ、典型的には2乃至10、そして時には25乃至50又はより以上、含有する。前記公報の内容を引用をもってここに援用することを明示しておく。動物は、これら3種の形質のそれぞれについてホモ接合型となるよう、交配する。このような動物は以下の遺伝子型：（W098/24884の実施例12に解説された）ヒト重鎖の再編成のない最小遺伝子座の一個のコピー（染色体の1ハプロイド当たり）、（W098/24884の実施例14に解説された）再編成されたヒト K 軽鎖コンストラクトの一個のコピー（染色体の1ハプロイド当たり）、及び（W098/24884の実施例10に解説された）機能的 J_H セグメントの全てを除去する各内因性マウス重鎖遺伝子座での欠失、を有する。このよ

10

【0113】

このような動物から単離されたB細胞は、ヒト重鎖及び軽鎖について単一特異的であるが、それはこれらが各遺伝子のコピーを1つしか含有しないからである。さらに、これらはヒト又はマウス重鎖についても単一特異的となるであろうが、それは、内因性マウス重鎖遺伝子コピーの両方が、W098/24884の実施例9及び12に解説するように導入された J_H 領域全般の欠失のために、機能を失っているからである。さらに、B細胞の大部分が、ヒト

20

【0114】

この好適な実施態様のトランスジェニックマウスは、大きなレパートリー、理想的には天然マウスのそれと実質的に同様なレパートリーで、免疫グロブリン産生を示すであろう。このように、例えば内因性Ig遺伝子が不活化されている実施態様では、総免疫グロブリンレベルは、血清の約0.1 から10 mg/ml、好ましくは0.5 から5 mg/mlの範囲、理想的には少なくとも約1.0 mg/mlであろう。IgMからIgGへのスイッチを行うことのできる導入遺

30

【0115】

前記レパートリーは、理想的には、非トランスジェニックマウスが示すものに、通常は少なくとも約10%、好ましくは25乃至50%又はそれ以上、近いとよいであろう。概して、少なくとも約1000種の異なる免疫グロブリン（理想的にはIgG）、好ましくは 10^4 乃至 10^6 又はそれ以上の種類が、主にマウスゲノムに導入された様々なV、J及びD領域の数に応じて産生されるとよいであろう。これらの免疫グロブリンは、典型的には、例えばブドウ球

40

【0116】

いくつかの実施態様では、所定の抗原種に対する抗体応答で現れるV遺伝子の選択幅を制限するために、予め決められたレパートリーを持つマウスを作製することが好ましいであろう。予め決められたレパートリーを有する重鎖導入遺伝子は、ヒトにおいて所定の抗原種に対する抗体応答で優先的に用いられるヒトVH遺伝子などを含んでもよい。代替的には、いくつかのVH遺伝子は、多様な理由（例えば所定の抗原に対して親和性の高いV領域

50

をコードする可能性が低い；体細胞変異及び親和性尖鋭化を起こす傾向が小さい；又は、特定のヒトに対して免疫原性である、など）のために規定のレパトリーから除外してもよい。このように、多様な重鎖又は軽鎖遺伝子セグメントを含有する導入遺伝子が再編成される前に、このような遺伝子セグメントを、当該トランスジェニック動物以外の生物種由来であるとして、例えばハイブリダイゼーション又はDNA配列決定法などにより、容易に特定できよう。

【0117】

本発明のトランスジェニックマウスは、前述したようにEGFR抗原の精製もしくは濃縮製剤、及び／又は、EGFR発現細胞で免疫することができる。このマウスが産生するB細胞は、導入遺伝子内スイッチ組換え（cisスイッチング）を通じてクラス・スイッチングを起こして、EGFRと反応性の免疫グロブリンを発現するであろう。この免疫グロブリンはヒト配列抗体でもよく、その重鎖及び軽鎖ポリペプチドは、ヒト導入遺伝子配列にコードされていてもよいが、前記ヒト導入遺伝子配列は、体細胞変異及びV領域組換えジョイント由来の配列や、生殖細胞にコードされた配列を含んでもよい。これらのヒト配列免疫グロブリンは、ヒトV_L又はV_H遺伝子セグメント及びヒトJ_L又はJ_Lセグメントにコードされたポリペプチド配列と実質的に同等であると言うことができ、ただし他の非生殖細胞配列も、体細胞変異及び示差的なV-J及びV-D-J組換えジョイントの結果として存在してもよい。このようなヒト配列抗体に関しては、各鎖の可変領域は、典型的に、ヒト生殖細胞V、J遺伝子セグメントに、そして重鎖の場合D、遺伝子セグメントに、少なくとも80パーセント、コードされている。しばしば可変領域の少なくとも85パーセントが、導入遺伝子上に存在するヒト生殖細胞配列にコードされている。可変領域配列のうちのしばしば90又は95パーセント又はそれ以上が、導入遺伝子上に存在するヒト生殖細胞配列にコードされている。しかしながら、体細胞変異並びにVJ及びVDJジョイニングでは非生殖細胞配列が導入されるために、当該ヒト配列抗体はしばしば、ヒト導入遺伝子に見られるようなヒトV、D又はJ遺伝子セグメントにはコードされていない何らかの可変領域配列を（そして頻度は劣るが定常領域配列を）、このマウスの生殖細胞中に有するであろう。典型的には、このような非生殖細胞配列（又は個々のヌクレオチド位置）は、CDR中か、又はCDR近傍、あるいは体細胞変異が集中的に起きることが知られている領域に集まるであろう。

【0118】

所定の抗原に結合するヒト配列抗体は、ヒト配列γ鎖（例えばγ1、γ2a、γ2B、又はγ3）及びヒト配列軽鎖（例えばκ）を含むヒト抗体が生じるようなアイソタイプ・スイッチングにより生じさせることができる。このようなアイソタイプ・スイッチングの起きたヒト配列抗体は、親和性成熟及び抗原によるB細胞の選択の結果として、特に二次（又は後続）抗原刺激の結果として、一箇所以上の体細胞変異を、典型的には可変領域、そしてしばしばCDRの内部か、又はCDRから約10残基以内に、しばしば含有する。これらの高親和性ヒト配列抗体は、少なくとも $1 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 、典型的には少なくとも $5 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 、しばしば $1 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ を越える結合親和性、そして時には $5 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 乃至 $1 \times 10^{11} \text{M}^{-1}$ 又はそれ以上の結合親和性を有しているだろう。

【0119】

本発明の別の局面は、高親和性（例えば $2 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ を越える）でEGFRに結合するヒトモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマを作製するために使用できる、このようなマウス由来のB細胞に関するものである。このように、本発明の別の実施態様では、これらのハイブリドーマを用いて、EGFRへの結合に関する親和定数（ K_A ）が少なくとも $2 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ の免疫グロブリンを含む組成物を作製し、このとき前記の免疫グロブリンは：

（1）ヒトV_L遺伝子セグメント及びヒトJ_Lセグメントにコードされたポリペプチド配列に実質的に同一なポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域、及び（2）ヒトC_L遺伝子セグメントにコードされたポリペプチド配列に実質的に同一なポリペプチド配列を有する軽鎖定常領域、から成るヒト配列軽鎖と；

（1）ヒトV_H遺伝子セグメント、選択的にD領域、及びヒトJ_Hセグメントにコードされたポリペプチド配列に実質的に同一なポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び（2

）ヒトC_H遺伝子セグメントにコードされたポリペプチド配列に実質的に同一なポリペプチド配列を有する定常領域、から成るヒト配列重鎖とを含む。

【0120】

EGFRに対する高親和ヒトモノクローナル抗体の開発は、組み込まれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスで、ヒト可変領域遺伝子セグメントのレパートリーを拡大する方法により容易になるが、当該方法は、前記組み込まれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子には存在しないV領域遺伝子セグメントを含むV遺伝子導入遺伝子を前記ゲノムに導入するステップを含む。しばしば前記V領域導入遺伝子は、ヒトゲノムに天然で存在するような、又は、組換え法と一緒に別にスプライスされるような、ヒトV_H又はV_L (V_K) 遺伝子セグメント・アレイの一部分を含む酵母人工染色体であり、この酵母人工染色体の含有するV遺伝子セグメントは順序が狂っていても、又は省略されていてもよい。しばしば少なくとも5つ以上の機能的V遺伝子セグメントがYAC上に含有されている。このバリエーションでは、前記Vレパートリー拡大法で生じるトランスジェニックマウスを作製することが可能であり、このとき当該マウスは、V領域導入遺伝子上に存在するV領域遺伝子セグメントにコードされた可変領域配列と、ヒトIg導入遺伝子にコードされたC領域とを含む免疫グロブリン鎖を発現する。Vレパートリー拡大法により、少なくとも5個の異なるV遺伝子を有するトランスジェニックマウスを作製でき、また少なくとも約24個又はそれ以上のV遺伝子を含有するマウスも作製できる。いくつかのV遺伝子セグメントは非機能的であってもよい（例えば偽遺伝子等）。これらのセグメントを維持してもよいが、あるいは、必要に応じて当業者に可能な組換え法により選択的に欠失させてもよい。

【0121】

マウス生殖細胞を操作して、J及びC遺伝子セグメントを含有するヒトIg導入遺伝子には実質的に存在しない拡大されたVセグメント・レパートリーを有する機能的YACを含有させたら、拡大されたVセグメント・レパートリーを有する機能的YACを、異なるヒトIg導入遺伝子を有するマウス生殖細胞に交雑するバックグラウンドを含め、他の遺伝的バックグラウンドにこの形質を伝播及び交雑することができる。拡大されたVセグメント・レパートリーを有する複数の機能的YACを、1つのヒトIg導入遺伝子（又は複数のヒトIg導入遺伝子）と一緒に働かせるために生殖細胞に交雑してよい。ここではYAC導入遺伝子と言及するが、ゲノムに組み込んだときのこのような導入遺伝子は、酵母で自律的複製を行うのに必要な配列など、酵母配列を実質的に欠いていてもよい。このような配列は、選択的に、酵母での複製がもはや必要でなくなってから（即ちマウスES細胞又はマウス前接合子への導入前に）遺伝子操作（例えば制限消化及びパルスフィールドゲル電気泳動法又は他の適した方法など）により取り除いてもよい。ヒト配列免疫グロブリン発現の形質を伝播させる方法には、ヒトIg導入遺伝子を有し、そして選択的には、拡大されたVセグメント・レパートリーを有する機能的YACもさらに有するようなトランスジェニックマウスを育種する方法がある。V_H及びV_L遺伝子セグメントの両方がYAC上に存在してもよい。当該トランスジェニックマウスは、ヒトIg導入遺伝子、及び／又は、他のヒトリンパ球たんぱくをコードする導入遺伝子を含め、他のヒト導入遺伝子を持つバックグラウンドを含む、実施者が希望するいかなるバックグラウンドに交雑してもよい。さらに本発明は、拡大されたV領域レパートリーYAC導入遺伝子を有するトランスジェニックマウスが産生する高親和ヒト配列免疫グロブリンを提供する。前の記載では本発明のトランスジェニック動物の好適な実施態様を解説したが、以下、4つのカテゴリーに分類された他の実施態様も考察されている：

I. 再編成のない重鎖及び再編成される軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物；

II. 再編成のない重鎖及び再編成される軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物；

III. 再編成される重鎖及び再編成のない軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有する

トランスジェニック動物；及び

I V. 再編成される重鎖及び再編成される軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物。

【0122】

これらのカテゴリーのトランスジェニック動物のうち、好適な優先度は以下、 $II > I > III > IV$ （この場合の内因性の軽鎖遺伝子（又は少なくともK遺伝子）は、相同組換え（又は他の方法）によりノックアウトされている）、及び $I > II > III > IV$ （この場合の内因性軽鎖遺伝子はノックアウトされておらず、アレル排除により劣性とならなければならない）の通りである。

【0123】

III. EGFRに結合する二重特異的／多重特異的分子

本発明のさらに別の実施態様では、EGFRに対するヒトモノクローナル抗体、又はその抗原結合部分を誘導体化するか、又は、例えば別のペプチド又はタンパク質（例えばFab'フラグメント）などの別の機能分子に連結して、複数の結合部位又は標的エピトープに結合する二重特異的又は多重特異的分子を作製することができる。例えば、本発明の抗体又は抗原結合部分は、例えば別の抗体、抗体フラグメント、ペプチド又は結合ミメティックなど、1つ以上の他の結合分子に（例えば化学結合、遺伝子融合、非共有結合的結合又は他の方法により）機能的に連結することができる。

【0124】

従って、本発明は、EGFRに対する少なくとも1つの第一結合特異性部分と、第二標的エピトープに対する第二結合特異性部分とを含む二重特異的及び多重特異的分子を包含するものである。本発明のある具体的な実施態様では、前記第二標的エピトープは、例えばヒトFcγRI (CD64) 又はヒトFcα受容体 (CD89) などのFc受容体である。従って、本発明は、FcγR、FcαR又はFcεRを発現するエフェクタ細胞（例えば単球、マクロファージ又は多核白血球 (PMN) など）と、EGFRを発現する標的細胞の両方に結合できる二重特異的及び多重特異的分子を包含する。これらの二重特異的及び多重特異的分子はEGFR発現細胞をエフェクタ細胞に狙わせて、本発明のヒトモノクローナル抗体と同様、Fc受容体が媒介するエフェクタ細胞の活性、例えばEGFR発現細胞のファゴサイトーシス、抗体依存的細胞媒介細胞傷害性 (ADCC)、サイトカイン放出、又はスーパーオキシド・アニオンの産生など、を惹起する。

【0125】

さらに本発明の二重特異的及び多重特異的分子には、抗Fc結合特異性部分及び抗EGFR結合特異性部分に加え、第三結合特異性部分を含めることができる。ある実施態様では、前記第三結合特異性部分は、細胞傷害活性に関与する表面タンパク質に結合して標的細胞への免疫応答を増す分子など、抗エンハンスメント因子 (EF) 部分である。前記の「抗エンハンスメント因子部分」は、抗原又は受容体などの特定の分子に結合して、Fc受容体又は標的細胞抗原の結合決定基の作用を高めるような抗体、機能的抗体フラグメント又はリガンドであってよい。前記「抗エンハンスメント因子部分」は、Fc受容体又は標的細胞抗原に結合することができる。代替的には、前記抗エンハンスメント因子部分は、第一及び第二結合特異性部分が結合する実体とは異なる実体に結合することができる。例えば、前記抗エンハンスメント因子部分は、細胞傷害性T細胞に（例えばCD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1を介して、又は、標的細胞への免疫応答が高まる結果となる他の免疫細胞を介して）結合することができる。

【0126】

ある実施態様では、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、又は一本鎖Fvなどを含め、少なくとも一種の抗体又はその抗体フラグメントを結合特異性部分として含む。この抗体はまた、軽鎖もしくは重鎖二量体であっても、あるいは、その内容を引用をもって援用することと明示しておく1990年8月7日発行のLadner et al. の米国特許第4,946,778号に解説されているように、Fv又は一本鎖コンストラクトなど、その何らかの最小フラグメントであってもよい。

【0127】

ある実施態様では、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、エフェクタ細胞の表面上に存在するFc γ R又はFc α Rに対する結合特異性部分と、EGFRなどの標的細胞抗原に対する第二結合特異性部分とを含む。

【0128】

ある実施態様では、Fc受容体に対する結合特異性を、その結合がヒト免疫グロブリンG (IgG) の遮断を受けないヒトモノクローナル抗体によって提供する。ここで用いる用語「IgG受容体」とは、1番染色体上にある8つの γ 鎖遺伝子のいずれをも言う。これらの遺伝子は、3つのFc γ 受容体クラス：Fc γ RI (CD64)、Fc γ R II (CD32)、及びFc γ R III (CD16) に分類される合計12種の膜貫通又は可溶性の受容体アイソフォームをコードしている。ある好適な実施態様では、前記Fc γ 受容体はヒト高親和Fc γ RIである。このヒトFc γ RIは72kDaの分子であり、単量体IgGに対して高い親和性 (10^8 乃至 10^9M^{-1}) を示す。

10

【0129】

これらの好適なモノクローナル抗体の作製及び特徴付けは、その教示全体を引用をもってここに援用することとするFanger et al. のPCT 出願WO 88/00052 及び米国特許第4,954,617号に解説されている。これらの抗体は Fc γ RI、Fc γ R II 又はFc γ R III のエピトープに、当該受容体のFc γ 結合部位とは異なる部位で結合するため、これらの結合は、生理的レベルのIgGでは実質的に遮断を受けない。本発明で有用な特異的抗Fc γ RI 抗体はMab 22、Mab 32、Mab 44、Mab 62 及びMab 197である。Mab 32を産生するハイブリドーマはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションからATCC受託番号HB9469で入手できる。抗Fc γ RI Mab 22、Mab 22のF(ab')₂フラグメントは、メダレックス社（ニュージャージー州アナナデル）から入手できる。他の実施態様では、抗Fc γ 受容体抗体は、ヒト化型のモノクローナル抗体22(H22)である。H22抗体の作製及び特徴付けはGraziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 及び PCT/US93/10384に解説されている。H22抗体産生細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに1992年11月4日に指定番号HA022CL1で寄託され、受託番号CRL 11177を受けている。

20

【0130】

さらに別の好適な実施態様では、Fc受容体に対する結合特異性部分を、その結合が好ましくはヒト免疫グロブリンA (IgA) の遮断を受けない、Fc-アルファ受容体 (Fc α RI (CD 89)) などのヒトIgA受容体に結合する抗体に提供させる。用語「IgA受容体」には、19番染色体上にある一個の α 遺伝子 (Fc α RI) の遺伝子産物が包含されるものと、意図されている。この遺伝子は、55乃至110kDaの選択的にスプライシングされる膜貫通型アイソフォームをいくつかコードしていることが知られている。Fc α RI (CD89) は、単球/マクロファージ、好酸性及び好中性顆粒球上で構成的に発現するが、非エフェクタ細胞集団上では発現しない。Fc α RIはIgA1及びIgA2の両方に対して中間の親和性 ($\geq 5 \times 10^7\text{M}^{-1}$) を有するが、この親和性は、G-CSF 又はGM-CSFなどのサイトカインに暴露すると上昇する (Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440)。Fc α RIに、IgAリガンド結合ドメイン以外で結合する、A3、A59、A62及びA77と同定された4種類のFc α RI特異的モノクローナル抗体が解説されている。(Monteiro, R.C. et al., 1992, J. Immunol. 148:1764)。

30

40

【0131】

Fc α RI及びFc γ RIは、(1) 単球、PMN、マクロファージ及び樹状細胞などの免疫エフェクタ細胞上に主に発現する；(2) 高レベル（例えば1個の細胞当たり5,000乃至100,000）で発現する；(3) 細胞傷害活性 (ADCC、ファゴサイトーシス) の媒介物質である；(4) 自己抗原を含め、それらが狙う抗原の抗原提示促進を媒介する、点で、本発明での使用に好適なトリガー受容体である。

【0132】

他の実施態様では、本発明の二重特異的及び多重特異的分子はさらに、EGFRなどの標的細胞抗原に、結合するなど認識する結合特異性部分を含む。ある好適な実施態様では、前記結合特異性部分を、本発明のヒトモノクローナル抗体に提供させる。

50

【0133】

ここで用いる「エフェクタ細胞特異抗体」とは、エフェクタ細胞のFc受容体に結合する抗体又は機能的抗体フラグメントを言う。本発明で用いるのに好適な抗体は、エフェクタ細胞のFc受容体に、内因性免疫グロブリンが結合しない部位で結合するものである。

【0134】

ここで用いる用語「エフェクタ細胞」とは、免疫応答の認識及び活性化段階でなく、免疫応答のエフェクタ段階に関与する免疫細胞を言う。免疫細胞の例には、骨髓又はリンパ系由来の細胞、例えばリンパ球（例えば、細胞溶解性T細胞（CTL）を含むB細胞及びT細胞）、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、好中球、多核白血球、顆粒球、マスト細胞、及び好塩基球、がある。いくつかのエフェクタ細胞は特異的Fc受容体を発現し、特異的免疫機能を果たす。好適な実施態様では、エフェクタ細胞は、ADCCを誘導できる好中球など、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性（ADCC）を誘導することができる。例えば、FcRを発現する単球、マクロファージは、標的細胞の特異的致死及び他の免疫系構成成分への抗原提示か、又は、抗原提示細胞への結合に関与している。他の実施態様では、エフェクタ細胞は、標的抗原、標的細胞、又は微生物を貪食することができる。エフェクタ細胞上の特定のFcRの発現は、サイトカインなどの体液性因子により調節することができる。例えば、Fc γ RIの発現がインターフェロンガンマ（IFN- γ ）により上方調節されることが判明している。この発現亢進により、Fc γ RI担持細胞の標的に対する細胞傷害活性が増す。エフェクタ細胞は、標的抗原又は標的細胞を貪食又は溶解することができる。

【0135】

「標的細胞」は、本発明の組成物（例えばヒトモノクローナル抗体、二重特異的もしくは多重特異的分子）の標的とすることができる、対象（例えばヒト又は動物）内の何らかの望ましくない細胞を意味することとする。好適な実施態様では、本標的細胞は、EGFRを発現又は過剰発現している細胞である。EGFRを発現する細胞には、典型的に、腫瘍細胞、例えば膀胱、乳房、結腸、腎臓、卵巣、前立腺、腎細胞、扁平細胞、肺（非小細胞）、並びに頭部及び頸部の腫瘍細胞、がある。他のEGFR発現細胞には、それぞれ関節炎及び乾癬の治療において標的として利用できる滑膜線維芽細胞及びケラチノサイトがある。

【0136】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本発明の二重特異的もしくは多重特異的分子に利用できる他の抗体は、マウス、キメラ及びヒト化モノクローナル抗体である。

【0137】

キメラマウスーヒトモノクローナル抗体（即ちキメラ抗体）は、当業で公知の組換えDNA技術により作製できる。例えば、マウス（又は他の種の）モノクローナル抗体分子のFc定常領域をコードする遺伝子を制限酵素で消化して、このマウスFcをコードする領域を取り除き、ヒトFc定常領域をコードする遺伝子の同等の部分に置換する（Robinson et al., 国際特許公報 PCT/US86/02269; Akira, et al., ヨーロッパ特許出願 184,187; Taniguchi, M., ヨーロッパ特許出願 171,496; Morrison et al., ヨーロッパ特許出願 173,494; Neuberger et al., 国際出願 WO 86/01533; Cabilly et al. 米国特許第4,816,567号; Cabilly et al., ヨーロッパ特許出願125,023; Better et al. (1988 Science 240:1041-1043); Liu et al. (1987) PNAS 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) PNAS 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; 及びShaw et al., 1988, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559を参照されたい）。

【0138】

さらに本キメラ抗体は、抗原結合に直接は関与していないFv可変領域の配列を、ヒトFv可変領域由来の同等の配列に置換することによって、ヒト化することができる。ヒト化キメラ抗体の概略的レビューはMorrison, S. L., 1985, Science 229:1202-1207 及びOi et al., 1986, BioTechniques 4:214に提供されている。これらの方法は、重鎖又は軽鎖の少なくとも一方から、免疫グロブリンFv可変領域の全部又は一部をコードする核酸配列を

単離、操作、及び発現させるステップを含む。このような核酸の源は当業者に公知であり、例えば、抗GPII_bIII_a抗体産生ハイブリドーマである7E3から得てもよい。こうして、キメラ抗体又はそのフラグメントをコードする組換えDNAに適した発現ベクタ内にクローンできる。適したヒト化抗体は、代替的には、CDR 置換法米国特許第5,225,539号；Jones et al. 1986 Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. 1988 Science 239:1534; 及びBeidler et al. 1988 J. Immunol. 141:4053-4060によっても作製できる。

【0139】

特定のヒト抗体のCDRの全部を、非ヒトCDRの少なくとも一部分に置換してもよいが、又は、CDRのうちのごく一部を、非ヒトCDRに置換してもよい。ヒト化抗体をFc受容体に結合させるのに必要な数のCDRを置換するだけでよい。

10

【0140】

抗体は、ヒト抗体のCDRの少なくとも一部分を非ヒト抗体由来のCDRと置換できれば、いかなる方法によっても、ヒト化することができる。Winterは、本発明のヒト化抗体の調製に使用してもよい方法を解説している（その内容を引用をもってここに援用することを明示しておく、1987年3月26日提出の英国特許出願GB 2188638A）。ヒトCDRは、国際出願WO 94/10332 の標題 Humanized Antibodies to Fc Receptors for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytesに解説された通りにオリゴヌクレオチド部位指定変異誘発法を用いて非ヒトCDRに置換してもよい。

【0141】

さらに、特定のアミノ酸を置換、欠失又は追加してあるキメラ抗体及びヒト化抗体も、本発明の範囲内にある。特に、好適なヒト化抗体は、例えば抗原への結合を向上させるためなど、フレームワーク領域にアミノ酸置換を有するものである。例えばマウスCDRを有するヒト化抗体においては、ヒトフレームワーク領域に位置するアミノ酸を、マウス抗体の相当する位置にあるアミノ酸と置換することができる。このような置換は、場合によっては抗原に対するヒト化抗体の結合を高めることが知られている。アミノ酸を追加、欠失、又は置換してある抗体をここでは改変された抗体又は変更された抗体と呼ぶ。

20

【0142】

改変された抗体という用語には、さらに、抗体の数部分を欠失、追加、又は置換するなどにより改変されたモノクローナル抗体、キメラ抗体、及びヒト化抗体などの抗体が包含されるものと、意図されている。例えば抗体は、定常領域を欠失させ、それを抗体の血清半減期などの半減期、安定性又は親和性を増すはずの定常領域に置換することにより、改変することができる。いかなる改変も、当該の二重特異的及び多重特異的分子が、FcγRに対して特異的な抗原結合領域を少なくとも1つ有し、少なくとも1つのエフェクタ機能を惹起するのであれば、本発明の範囲内にある。

30

【0143】

本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、化学的技術、（例えばD. M. Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807）、「ポリドーマ」技術（Readingの米国特許第4,474,893号を参照されたい）、又は組換えDNA技術を用いて作製できる。

【0144】

具体的には、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、当業で公知であり、ここに紹介された実施例で解説する方法を用いて、例えば抗FcR及び抗EGFR結合特異性部分など、構成部分の結合特異性部分を結合させることにより、調製できる。例えば本二重特異的及び多重特異的分子の各結合特異性部分を別々に作製しておき、後で相互に結合することができる。これら結合特異性部分がタンパク質又はペプチドである場合、多種の結合又は架橋剤を共有結合に用いることができる。架橋剤の例には、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、及びスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホ-SMCC）（例えばKarpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参

40

50

照されたい)がある。他の方法にはPaulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132); Brennan et al. (Science (1985) 229:81-83)、及びGlennie et al. (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375)が解説したものがあある。好適な結合剤は 両者ともピアース・ケミカル社 (イリノイ州ロックフォード) から入手できるSATA 及びスルホ-SMCCである。

【0145】

結合特異性部分が抗体 (例えば二種のヒト化抗体) である場合、これらは2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介して結合させることができる。ある特に好適な実施態様では、前記ヒンジ領域を修飾して、奇数のスルフヒドリル残基、好ましくは1つ、を結合前に含有させる。

【0146】

代替的には、両方の結合特異性部分を同じベクタにコードさせ、同じ宿主細胞内で発現及び集合させることができる。この方法は、当該二重特異的及び多重特異的分子がMAB×MAB、MAB×Fab、Fab×F(ab')₂又はリガンド×Fab融合タンパク質である場合に特に有用である。例えば二重特異的分子など、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、例えば一本鎖二重特異抗体、1つの一本鎖抗体及び結合決定基を含む一本鎖二重特異的分子、又は2つの結合決定基を含む一本鎖二重特異的分子など、一本鎖分子であってもよい。さらに二重特異的及び多重特異的分子は一本鎖分子であってもよく、あるいは少なくとも2つの一本鎖分子を含んで成るものでもよい。二重及び多重特異的分子を調製する方法は、例えば米国特許第5,260,203号; 米国特許第5,455,030号; 米国特許第4,881,175号; 米国特許第5,132,405号; 米国特許第5,091,513号; 米国特許第5,476,786号; 米国特許第5,013,653号; 米国特許第5,258,498号; 及び米国特許第5,482,858号に解説されている。

【0147】

二重特異的及び多重特異的分子の、それらの特異的標的への結合は、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、FACS分析、バイオアッセイ (例えば成長阻害)、又はウェスタン・ブロット検定法などにより、確認することができる。これらの検定法はそれぞれ、大まかに言って、目的のタンパク質-抗体複合体の存在を、この複合体に特異的な標識済みの試薬 (例えば抗体) により検出するものである。例えばFcR-抗体複合体は、この抗体-FcR複合体を認識して特異的に結合する、例えば酵素に結合させた抗体又は抗体フラグメントなどを用いて、検出することができる。代替的には、当該の複合体を、多種の他の免疫検定法のいずれかを用いて検出することもできる。例えば抗体を放射

性標識し、ラジオイムノアッセイ (RIA)で用いることができる (例えば引用をもってここに援用するWeintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照されたい)。放射性同位元素は、 γ カウンター又はシンチレーション・カウンター、あるいはオートラジオグラフィの使用などの手段により、検出できる。

【0148】

I V. 抗体結合体/イムノトキシン

別の局面では、本発明は、細胞毒、薬物又は放射性同位元素などの治療部分に結合させたヒト抗EGFRモノクローナル抗体又はそのフラグメントを特徴とする。細胞毒に結合させた場合、これらの抗体結合体は「イムノトキシン」と呼ばれる。細胞毒又は細胞傷害性薬剤には、細胞にとって有害 (例えば致死させる) なあらゆる物質が含まれる。例にはタキソール、シトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、ミトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイ

ン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びプロマイシン並びにこれらの類似体又は同族体、がある。治療的薬剤には、限定はしないが、抗代謝産物 (例えばメトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤 (例えばメクロレタミン、チオテパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU) 及びロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド、ブスルフ

ァン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ミトマイシンC、及びcis-ジクロロジアミンプラチナム(II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン (例えばダウノルビシン (以前のダウノマイシン)、及びドキソルビシン)、抗生物質 (例えばダクチノマイシン (以前のアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン (AMC))、及び抗有糸分裂剤 (例えばビンクリスチン及びビンブラスチン)、がある。本発明の抗体を、放射性ヨウ素などの放射性同位元素に結合させて、癌などのEGFR関連疾患を治療するための細胞傷害性放射性医薬品を作製することもできる。

【0149】

本発明の抗体結合体を用いて所定の生物学的応答を修飾することができるが、当該の薬物成分を、古典的な化学療法薬に限定されるものと、捉えられてはならない。例えば当該の薬物成分は、所望の生物活性を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質には、例えばアブリン、リシンA、シュードモナス・エキソトキシン、又はジフテリア毒素などの酵素活性のある毒素又はその活性フラグメント；腫瘍壊死因子又はインターフェロン- γ などのタンパク質；又は、例えばリンホカイン、インターロイキン-1 (「IL-1」)、インターロイキン-2 (「IL-2」)、インターロイキン-6 (「IL-6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「GM-CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G-CSF」)、又は他の成長因子などの生物学的応答修飾物質、が含まれよう。

【0150】

このような治療的部分を抗体に結合させる技術は公知であり、例えばMonoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)のArnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy"; Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)のHellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery"; Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985) のThorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review"; Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)、の"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy"及びThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)を参照されたい。

【0151】

V. 医薬組成物

別の局面では、本発明は、薬学的に許容可能な担体と一緒に調合された、本発明のヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分を1つ又は組み合わせで含有する、医薬組成物などの組成物を提供するものである。ある好適な実施態様では、本組成物は、複数 (例えば二種以上) の単離された本発明のヒト抗体又はその抗原結合部分の組合せを含有する。好ましくは、本組成物の抗体又はその抗原結合部分の各々が、EGFRの異なる、予め選択されたエピトープに結合するとよい。

【0152】

ある実施態様では、補完的な活性を有するヒト抗EGFRモノクローナル抗体を、二種以上のヒト抗EGFRモノクローナル抗体を含む、医薬組成物などの組成物などとして、組み合わせて用いる。例えば、エフェクタ細胞の存在下で標的細胞の効果の高い致死を媒介するヒトモノクローナル抗体を、EGFR発現細胞の成長を阻害する別のヒトモノクローナル抗体と組み合わせることができる。

【0153】

別の実施態様では、本組成物は、(例えばFc受容体に対する少なくとも1つの結合特異性部分と、EGFRに対する少なくとも1つの結合特異性部分とを含有する) 本発明の二重特異的もしくは多重特異的分子を1つ又は組み合わせて含んで成る。

【0154】

さらに本発明の医薬組成物を併用療法で投与することもでき、即ち他の薬剤と組み合わ

10

20

30

40

50

せることができる。例えば、当該の併用療法に、少なくとも1つの抗腫瘍薬又は他の従来の治療と一緒に、本発明の組成物を含めることができる。

【0155】

ここで用いる「薬学的に許容可能な担体」には、生理学的に適合性あるあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤等が含まれる。好ましくは、当該の担体が静脈内、筋肉内、皮下、腸管外、脊髄もしくは上皮投与（例えば注射又は輸注により）に適しているとよい。投与経路によっては、活性化合物、即ち抗体、二重特異的及び多重特異的分子を、当該化合物を不活化しかねない酸及び他の天然条件の作用から当該化合物を保護する物質で被覆してもよい。

【0156】

「薬学的に許容可能な塩」とは、親化合物の所望の生物活性を保持しつつも、望ましくない毒性作用を与えないような塩を言う（例えばBerge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照されたい）。このような塩の例には、酸添加塩及び塩基添加塩がある。酸添加塩には、非毒性の無機酸、例えば塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リン等から誘導されたものや、非毒性の有機酸、例えば脂肪族モノカルボン酸及びジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族の酸、脂肪族及び芳香族のスルホン酸等から誘導されたものがある。塩基添加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属から誘導されたものや、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカイン等の非毒性の有機アミンから誘導されたものがある。

【0157】

本発明の組成物は、当業で公知の多種の方法で投与することができる。当業者であれば理解されるように、投与の経路及び／又は形態は、所望の結果に応じて様々であろう。当該活性化合物は、インプラント、経皮パッチ、及びマイクロ封入送達系を含む制御放出製剤など、急速な放出から当該化合物を保護する担体と一緒に調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸など、生分解性で生体適合性あるポリマを用いることができる。このような製剤の調製法が数多く、特許付与されており、当業者に広く公知である。例えばSustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0158】

特定の投与経路で本発明の化合物を投与するには、当該化合物の失活を防ぐ物質でそれを被覆するか、又は当該化合物と同時投与することが必要な場合がある。例えば本化合物を、適したリポソームなどの担体又は希釈剤に入れて対象に投与してもよい。薬学的に許容可能な希釈剤には生理食塩水及び水性の緩衝液がある。リポソームには水中油中水CGFエマルジョンや、従来のリポソームがある(Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27)。

【0159】

薬学的に許容可能な担体には無菌の水溶液又は分散液並びに、無菌の注射液又は分散液の即時調製用の無菌粉末がある。このような媒質及び薬剤の、薬学的に活性な物質のための使用は当業で公知である。従来の媒質又は薬剤が当該活性化合物にとって不適合でない限り、本発明の医薬組成物中のその使用が意図されている。補助的な活性化合物も、本組成物中に組み込むことができる。

【0160】

治療用の組成物は典型的に無菌でなければならず、また製造及び保管条件下で安定でなければならない。本組成物は、高い薬物濃度に適した溶液、マイクロ乳液、リポソーム、又は他の秩序ある構造として調合することができる。当該の担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、及びこれらの適した混合物などを含有する溶媒又は分散媒であってよい。

適した流動性は、例えばレシチンなどのコーティングを用いたり、分散液の場合には必要な粒子の大きさを維持したり、そして界面活性剤を使用するなどにより、維持できる。多くの場合、例えば糖類、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、又は塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に含めることが好ましいであろう。注射用組成物の吸収を長引かせるには、モノステアリン酸塩及びゼラチンなど、吸収を遅らせる薬剤を組成物中に含めることにより、可能である。

【0161】

無菌の注射用溶液は、必要量の活性化合物を適した溶媒に、必要に応じて上に列挙した成分の1つ又は組み合わせと一緒に加えた後、滅菌マイクロ濾過を行うことにより、調製できる。分散液は一般的には、塩基性の分散媒と、上に列挙したものの中で必要な他の成分とを含有する無菌の賦形剤に当該活性化合物を加えることで、調製されている。無菌の注射用溶液の調製用の無菌粉末の場合、好適な調製法は真空乾燥及び凍結乾燥（凍結乾燥）であり、その結果、活性成分及び付加的な所望の成分の粉末が、予め殺菌濾過されたその溶液から生じる。

【0162】

投薬計画は、最適な所望の応答（例えば治療的応答）が得られるように調節される。例えば単一の巨丸剤を投与してもよく、複数の分割された用量を一定期間にわたって投与しても、又は、治療状況の緊急度を指標として用量を比率的に増減させてもよい。投与の容易さ及び投薬量の均一性のためには、非経口用組成物を単位剤形で調合することが特に有利である。ここで用いる単位剤形とは、治療しようとする対象にとって単位型の投薬量として調整された物理的に別個の単位を言う。各単位は、必要な薬品用担体との関連から所望の治療効果を生ずるよう計算された所定量の活性化合物を含有する。本発明の単位剤形の詳細は、（a）活性化合物の固有の特徴、及び、達成しようとする特定の治療効果、及び（b）このような活性化合物を、個体の感受性の治療に向けて配合する技術に内在する限界、によって決定され、またこれらに直接依存する。

【0163】

薬学的に許容可能な抗酸化剤の例には：（1）水溶性の抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等；（2）油性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、アルファートコフェロール、等；及び（3）金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸等がある。

【0164】

治療用組成物の場合、本発明の調合物には、経口、鼻孔、局所（口腔内及び舌下を含む）、直腸、膣及び／又は非経口投与に適したものが含まれる。当該調合物は適宜、単位剤形で提供してもよく、製薬業で公知の何らかの方法で調製してもよい。一個分の剤形を作製するために担体物質と組み合わせることのできる活性成分の量は、治療しようとする対象、及び特定の投与形態に応じて様々であろう。一個分の剤形を作製するために担体物質と組み合わせることのできる活性成分の量は、一般に、治療効果を生む組成物量となるであろう。概して、100パーセントのうちで、この量は約0.01パーセント乃至約99パーセントの活性成分、好ましくは約0.1パーセント乃至約70パーセント、最も好ましくは約1パーセント乃至約30パーセントの範囲であろう。

【0165】

経膣投与に適した本発明の調合物には、さらに、当業で適していることが公知の担体を含有するペッサリ、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム又はスプレー調合物がある。本発明の組成物の局所もしくは経皮投与用の剤形には、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ及び吸入剤、がある。当該の活性化合物は、薬学的に許容可能な担体や、必要に応じて何らかの保存剤、緩衝剤、又は推進剤と無菌条件下で混合してよい。

【0166】

ここで用いる文言「非経口投与」及び「非経口的に投与する」とは、通常は注射による、腸管内及び局所投与以外の投与形態を意味し、その中には、限定はしないが、静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、上皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、硬膜外及び胸骨内注射及び輸注、がある。

【0167】

本発明の医薬組成物中に用いてもよい適した水性及び非水性の担体の例には、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、及びこれらの適した混合物、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステル、がある。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティング材料を用いたり、分散液の場合には必要な粒子の大きさを維持したり、そして界面活性剤を使用するなどにより、維持できる。

10

【0168】

これらの組成物には、保存剤、湿潤剤、乳濁剤及び分散剤などのアジュバントを含有させてもよい。微生物の存在を防ぐには、上述の滅菌法と、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等の多種の抗菌剤及び抗カビ剤の含有の両方を行うと、確実になる。例えば糖類、塩化ナトリウム等の等張剤を組成物に含めることも好ましい場合がある。加えて、注射用の薬形の吸収を長引かせるには、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなど、吸収を遅らせる薬剤を含めることにより、可能である。

【0169】

本発明の化合物を製薬としてヒト及び動物に投与する場合、これらを単独で与えることもできるが、又は、例えば0.01%乃至99.5%（より好ましくは0.1%乃至90%）の活性化合物を薬学的に許容可能な担体と組み合わせて含有する医薬組成物としても、与えることができる。

20

【0170】

選択した投与経路に関係なく、適した水和型で用いてもよい本発明の化合物、及び／又は、本発明の医薬組成物は、当業者に公知の常法により、薬学的に許容可能な剤形に調合される。

【0171】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、特定の患者、組成物、及び投与形態にとって、患者に毒性となることなく所望の治療応答を得るために有効量の活性成分が得られるよう、変更してもよい。選択される投薬量レベルは、用いる本発明の特定の組成物又は、そのエステル、塩又はアミドの活性、投与経路、投与期間、用いる特定の化合物の排出速度、治療期間、用いる特定の組成物と併用する他の薬物、化合物及び／又は物質、治療する患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康及び以前の医療歴等、医業で公知の因子を含め、多種の薬物動態学的因子に依拠することとなろう。

30

【0172】

当業において通常の技術を有する医師又は獣医であれば、本医薬組成物の必要な有効量を容易に決定及び処方することができる。例えば、この医師又は獣医は、当該医薬組成物中に用いる本発明の化合物の用量を、所望の治療効果を得るのに必要なそれより少ないレベルで開始し、この投薬量を所望の効果が得られるまで次第に増加させていってもよい。一般的には、本発明の組成物の適した一日当たりの用量は、治療効果を生むために有効な最も少ない用量である化合物量であろう。このような有効量は一般に、上で解説した因子に依拠するであろう。投与は、静脈内、筋肉内、腹腔内、又は皮下によることが好ましく、好ましくは標的部位の近位に投与するとよい。必要に応じ、治療用組成物の有効な一日分の用量を、2回、3回、4回、5回、6回又はそれ以上の小分けした用量に分けて別々に、全日にわたって適当な間隔を置きながら、選択的には単位剤形で投与するとよい。本発明の化合物を単独で投与することも可能であるが、本化合物を医薬調合物（組成物）として投与することが好ましい。

40

【0173】

治療用組成物は当業で公知の医療器具を用いて投与できる。例えばある好適な実施態様

50

では、本発明の治療用組成物を、例えば米国特許第5,399,163号；第5,383,851号；第5,312,335号；第5,064,413号；第4,941,880号；第4,790,824号；又は第4,596,556号に開示された器具などの無針皮下注射器具で投与することができる。本発明で有用な公知のインプラント及びモジュールの例には、制御された速度で薬品を分配するインプラント可能なマイクロ輸注ポンプを開示する米国特許第4,487,603号；薬品を皮膚を透過させて投与する治療器具を開示する米国特許第4,486,194号；精確な輸注速度で医薬を送達する医療用輸注ポンプを開示する米国特許第4,447,233号；継続的な薬物送達のための可変流量式のインプラント可能な輸注装置を開示する米国特許第4,447,224号；多チャンバ・コンパートメントを有する浸透圧薬物送達系を開示する米国特許第4,439,196号；及び浸透圧薬物送達系を開示する米国特許第4,475,196号、がある。これらの特許を引用をもってここに援用することとする。数多くの他のこのようなインプラント、送達系、及びモジュールが当業者に公知である。

10

【0174】

いくつかの実施態様では、本発明のヒトモノクローナル抗体を、*in vivo*で確実に適正に分布するように調合することができる。例えば血液脳関門（BBB）は数多くの親水性化合物を排除する。本発明の治療用化合物がBBBを確実に透過するようにする（望ましい場合）には、これらを例えばリポソーム中に調合することができる。リポソームの製造方法については、例えば米国特許第4,522,811号；第5,374,548号；及び第5,399,331号を参照されたい。前記リポソームは、特定の細胞又は臓器に選択的に輸送されて目的の薬物送達を高めるような1つ以上の成分を含んでいてもよい（例えばV.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685）。標的決定成分の例には、葉酸又はビオチン（例えばLow et al. の米国特許第5,416,016号を参照されたい）；マンノシド（Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）；抗体（P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140；M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）；そのような種が本発明の調合物や、本発明の分子の構成成分を成していてもよいサーファクタントプロテインA受容体（Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134）；p120（Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090）；があり、さらにK. Keinanen；M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123；J.J. Killian；I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273を参照されたい。本発明の一実施態様では、本発明の治療用化合物をリポソーム中に調合する。より好適な実施態様では、当該リポソームが標的決定成分を含む。最も好適な実施態様では、当該リポソーム中の治療用化合物を、腫瘍又は感染に近位の部位への大量注射により送達する。当該組成物は、注射筒での注入が容易な程度に流動性でなくてはならない。それは、製造及び保管条件下で安定でなくてはならず、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から守られていなくてはならない。

20

30

【0175】

「治療上有効量」とは、好ましくは、腫瘍の成長を、未処置の対象に比較して少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、そしてさらにより好ましくは少なくとも約80%、阻害するものである。化合物の癌阻害能は、ヒト腫瘍での効験を予測する動物モデル系で評価できる。代替的には、ある組成物のこのような性質は、当該化合物の阻害能を調べることで評価でき、このような*in vitro*での阻害を、当業者に公知の検定法で評価できる。治療上有効量の治療用化合物であれば、対象において腫瘍の大きさを減じたり、又は症状を軽減することができる。当業者であれば、このような量を、対象の体格、対象の症状の重篤度、及び選択された特定の組成物又は投与経路などの因子に基づいて決定できよう。

40

【0176】

本組成物は、無菌、かつ、本組成物を注射筒で送達可能な程度に流動性でなくてはならない。当該の担体は、水に加え、等張の緩衝生理食塩水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、及びこれらの適した混合物であってよい。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングを用いたり、分散液の場合には必要な粒子サイズを維持したり、そして界面活性剤を利用

50

するなどにより、維持できる。多くの場合、糖類、マンニトール又はソルビトールなどの多価アルコール、及び塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に含めることが好ましい。注射可能な組成物の長期吸収は、モノステアリン酸アルミニウム又はゼラチンなど、吸収を遅らせる物質を組成物中に含めると、可能である。

【0177】

活性化化合物を上述のように適切に保護すれば、当該化合物を、例えば不活性の希釈剤又は同化可能な食用担体と一緒に経口投与してもよい。

【0178】

VI. 発明の用途及び方法

本発明の組成物（例えばEGFRに対するヒトモノクローナル抗体及びその誘導体／結合体）は、in vitro 及びin vivo で診断上及び治療上の実用性を有する。例えばこれらの分子を、多種の疾患を治療、予防又は診断するために、in vitro 又はex vivoなどの培養中の細胞や、又は、in vivoでなど対象中の細胞に投与することができる。ここで用いる用語「対象」には、ヒト及び非ヒト動物が包含されるものと、意図されている。好適なヒト動物には、EGFRの発現、典型的には異常な発現（例えば過剰発現）を特徴とする疾患を有するヒトの患者が含まれる。例えば本発明の方法及び組成物は、膀胱、乳房、結腸、腎臓、卵巣、前立腺、腎細胞、扁平細胞、肺（非小細胞）、並びに頭部及び頸部の腫瘍細胞などを含め、EGFRを発現する腫瘍細胞の存在を特徴とする疾患など、腫瘍形成性疾患を持つ対象を治療するために、用いることができる。本発明の方法及び組成物はまた、例えば自己免疫疾患、癌、乾癬、又は炎症性関節炎、例えばリウマチ性関節炎、全身性紅斑性狼瘡随伴関節炎、又は乾癬性関節炎などの他の疾患を治療するためにも、用いることができる。本発明の用語「非ヒト動物」には、例えばほ乳動物及び非哺乳動物、例えばヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、は虫類等、あらゆる脊椎動物が含まれる。

【0179】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）は、まず、治療又は診断上の用途に関連する結合活性について、in vitroでテストすることができる。例えば本発明の組成物を、以下の実施例で解説するELISA及びフロー・サイトメトリ検定法でテストできる。さらに、EGFR発現細胞の細胞溶解を含め、少なくとも一種のエフェクタ媒介性エフェクタ細胞活性を惹起する上でのこれらの分子の活性を検定することもできる。エフェクタ細胞媒介性ファゴサイトーシスを検定するためのプロトコルを、以下の実施例で解説する。

【0180】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）は、EGFR関連疾患の治療及び診断において更なる実用性を有する。例えば本ヒトモノクローナル抗体、多重特異的もしくは二重特異的分子を用いて、以下の生物学的活性：EGFR発現細胞をオプソニン化する；ヒトエフェクタ細胞の存在下でEGFR発現細胞のファゴサイトーシス又は細胞溶解を媒介する；EGFR発現細胞において、EGF又はTGF- α 誘導性自己リン酸化を阻害する；EGFR発現細胞の自己分泌EGF又はTGF- α 誘導性活性化を阻害する；又は、EGFR発現細胞の成長を、低投薬量などで、阻害する、のうちの1つ以上をin vivo又はin vitroで惹起することができる。

【0181】

別の実施態様では、本発明のヒトモノクローナル抗体は、細胞の補体媒介性溶解を誘導することができないため、座瘡など、補体活性化性の炎症を惹起する副作用が少ない。座瘡の主な原因は皮脂を生ずる濾胞内の角質化パターンの変化である。ケラチノサイトはEGFRを発現するため、皮膚内でのEGFRシグナル伝達プロセスに干渉すると、濾胞内でケラチノサイトの成長及び分化が変化して、座瘡が形成されることがある。直接的な免疫蛍光実験で、初期の非炎症性及び炎症性座瘡病変では、古典的及び代替的な補体経路の活性化が起きていることが示されている。

【0182】

ある具体的な実施態様では、本ヒト抗体及びその誘導体をin vivoで用いて、多種のEGFR関連疾患を治療、予防又は診断する。EGFR関連疾患の例には、多種の癌、例えば膀胱、乳房、結腸、腎臓、卵巣、前立腺、腎細胞、扁平細胞、肺（非小細胞）、並びに頭部及び頸部の癌など、がある。他のEGFR関連疾患には、とりわけ、自己免疫疾患、乾癬及び炎症性関節炎、がある。

【0183】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）を投与する方法は当業で公知である。用いる分子の適した投薬量は、対象の年齢及び体重や、用いる特定の薬物に左右されるであろう。本分子は、Goldenberg, D.M. et al. (1981) Cancer Res. 41: 4354-4360、及びEP 0365 997に解説されているように、¹³¹I、⁹⁰Y、¹⁰⁵Rh等の放射性核種に結合させることができる。また本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）を抗感染薬に結合させることもできる。

10

【0184】

別の実施態様では、本ヒトEGFR抗体又はその抗原結合フラグメントと、化学療法薬などの治療薬と同時投与したり、又は、放射線などの抗癌療法など、他の公知の治療法と同時投与することができる。このような治療薬には、とりわけ、抗新生物薬、例えば患者にとって毒性又は亜毒性であるようなレベルのときにのみ効果的なドキソルビシン（アドリマイシン）、シスプラチンブレオマイシンスルフェート、カルムスチン、クロラムブシル、及びシクロホスファミドヒドロキシウレア、がある。シスプラチンは4週毎に1回、100mg/m²の用量を静脈内投与し、アドリマイシンは21日毎に1回、60-75mg/m²の用量を静脈内投与する。本発明のヒト抗EGFR抗体又はその抗原結合フラグメントの化学療法薬との同時投与により、ヒト腫瘍細胞に対して細胞傷害性作用を生じる異なる機序で働く2つの抗原薬が提供される。このような同時投与により、薬物耐性の発生という問題や、腫瘍細胞の抗原性に変化が生じて当該抗体に非反応性になることを原因とした問題を解決することができる。

20

【0185】

例えば本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）に結合させたエフェクタ細胞など、標的特異的エフェクタ細胞も、治療薬として用いることができる。標的を設定するエフェクタ細胞はヒト白血球、例えばマクロファージ、好中球又は単球であってよい。他の細胞には、好酸球、ナチュラルキラー細胞及び他のIgG-もしくはIgA受容体担持細胞、がある。必要に応じ、エフェクタ細胞を、治療しようとする対象から得ることができる。標的特異的エフェクタ細胞は、生理学的に許容可能な溶液に溶かした細胞懸濁液として、投与することができる。投与する細胞数は、10⁸乃至10⁹の桁でよいが、治療の目的に応じて様々であろう。一般的には、前記の量は、EGFRを発現する腫瘍細胞などの標的細胞に局在させたり、そしてファゴサイトーシスなどの細胞致死を引き起こすのに十分なものであろう。投与経路も様々でよい。

30

【0186】

標的特異的エフェクタ細胞を用いた治療は、標的細胞の除去のための他の技術と連携して行うことができる。例えば、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）、及び／又は、これらの組成物を結合させたエフェクタ細胞を用いた抗腫瘍療法を、化学療法と連携して用いることができる。さらに、併用免疫療法を用いて、2つの異なる細胞傷害性エフェクタ集団を腫瘍細胞拒絶に方向付けてもよい。例えば抗Fc-ガンマRI又は抗CD3に結合させた抗EGFR抗体を、IgG-もしくはIgA-受容体特異的結合剤と連携して用いてもよい。

40

【0187】

本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、例えば細胞表面上の受容体にキャップをして消去するなどにより、エフェクタ細胞上のFcγR又はFcαRレベルを修飾するためにも用いることができる。さらに抗Fc受容体の混合物をこの目的に使用することもできる。

【0188】

例えばIgG1、-2、又は-3もしくはIgM由来の部分など、補体に結合する補体結合部位を

50

有する本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）は、補体の存在下でも用いることができる。ある実施態様では、標的細胞を含む細胞集団をex vivoで本発明の結合剤及び適したエフェクタ細胞で処理した後に、補体又は補体を含む血清を添加することで補うことができる。本発明の結合剤で被覆してある標的細胞のファゴサイトーシスは、補体たんばくの結合により亢進できる。別の実施態様では、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）で被覆した標的細胞を、補体により溶解させることもできる。さらに別の実施態様では、本発明の組成物は補体を活性化しない。

【0189】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）を補体と一緒に投与することもできる。従って、ヒト抗体、多重特異的もしくは二重特異的分子及び血清又は補体を含む組成物が、本発明の範囲内にある。これらの組成物は、補体が当該ヒト抗体、多重特異的もしくは二重特異的分子の近くに位置するという点で有利である。代替的には、本発明のヒト抗体、多重特異的もしくは二重特異的分子と、補体又は血清を、別々に投与することもできる。

【0190】

さらに、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）及び使用上の指示を含むキットも、本発明の範囲内にある。前記キットには、さらに、少なくとも1つの更なる試薬、例えば補体か、又は、1種以上の更なる本発明のヒト抗体（例えば第一ヒト抗体とは異なる、EGFR抗原のエピトープに結合する補完的活性を有するヒト抗体など）を含めることができる。

【0191】

他の実施態様では、例えば対象をサイトカインで処置するなどにより、Fc γ 又はFc α 受容体の発現又は活性を、高める又は阻害するなど修飾する薬剤で、対象を付加的に処置することができる。当該の多重特異的分子による処置中に投与するのに好適なサイトカインには、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン- γ （IFN- γ ）、及び腫瘍壊死因子（TNF）、がある。

【0192】

別の実施態様では、対象をリンホカイン製剤で付加的に処置することができる。リンホカイン製剤を用いると、EGFRを高度には発現しない癌細胞にそうするよう、誘導することができる。リンホカイン製剤は、腫瘍細胞間でのEGFRの発現をより均質にすることができるため、治療をより効果的にすることができる。投与に適したリンホカイン製剤には、インターフェロン-ガンマ、腫瘍壊死因子、及びこれらの組み合わせ、がある。これらは静脈内投与することができる。リンホカインの適した投薬量は10,000乃至1,000,000単位／患者である。

【0193】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）は、Fc γ R又はEGFRを発現する細胞を、このような細胞を標識するためなど、標的に設定するために用いることができる。このような使用の場合、結合剤は、検出の可能な分子に結合させることができる。従って、本発明は、Fc γ R又はEGFRなど、Fc受容体が発現する細胞をex vivo又はin vitroで位置確認するための方法を提供する。この検出可能な標識は、例えば放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、又は酵素コファクターなどであってよい。

【0194】

ある実施態様では、本発明は、試料中でEGFR抗原の存在を検出する、又は、EGFR抗原の量を測定する方法を提供するものである。本方法は、前記試料及びコントロール試料を、EGFRに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその抗原結合部分に、前記抗体又はその一部分とEGFRとの間の複合体形成が可能な条件下で接触させるステップを含む。その後複合体の形成を検出するが、このとき当該試料をコントロール試料に比較したときに複合体形成に違いがあれば、当該試料中のEGFR抗原の存在の指標となる。

【0195】

さらに別の実施態様では、本発明は、in vivo又はin vitroでFc発現細胞の存在を検出する、又は、その量を定量する方法を提供するものである。本方法は、(i) 検出可能なマーカに結合させた本発明の組成物（例えば多重もしくは二重特異的分子）又はそのフラグメントを対象に投与するステップと、(ii) 前記検出可能なマーカを検出する手段に前記対象を暴露して、Fc発現細胞を含有する区域を特定するステップと、を含む。

【0196】

さらに本発明を、以下の実施例により描出するが、以下の実施例をさらに限定的なものと捉えてはならない。本出願全体を通じて引用された全図面及び全参考文献、特許及び公開済み特許出願の内容を、引用をもってここに援用することを明示しておく。

【0197】

実施例

材料及び方法

抗原： トランスジェニックマウスを、A431ヒト類上皮癌細胞株（CRL-1555、ロット203945、ヴァージニア州マナサス、ATCC）及びシグマ・ケミカル社（製品E 3641 ロット109H4108 及び 20K4079）から入手した可溶性上皮成長因子受容体（EGFR）で免疫した。可溶性EGFRは使用時まで-20℃乃至-80℃で保存されていた。

【0198】

媒質の調合物： (A) 10% FBS、ペニシリン-ストレプトマイシン（シグマ社P-7539）、及び2-メルカプトエタノール（ギブコ社、BRL 21985-023）を含有する高グルコースDMEM（メディアテック・セルグロ社#10013）を用いてA431細胞及び骨髓腫細胞を培養した。オリジン-ハイブリドーマ・クローニング・ファクター（アイジェン社 21001）、OPI サプリメント（シグマ社 0-5003）、HAT 又はHT（シグマ社 H 0262, H 0137）を含む付加的な媒質補助剤を、このハイブリドーマ成長培地に加えた。(B) 無血清培地はDMEM、抗生物質及び2-メルカプトエタノールのみを含有していた。

【0199】

免疫用の細胞： 免疫用の細胞をDMEM（上を参照）中で、T-75細胞培養フラスコ上でコンフルエントになるまで成長させ、フラスコ1本当たりトリプシンEDTA（セルグロ社、カタログ番号25-053-C1）溶液5-10mlで回収した。フラスコから回収した細胞を50mlの完全培地中に再懸濁させた後、3回遠心分離（1000G）して洗浄し、50mlの無菌PBSに再懸濁させた。0.5mlの無菌PBSに懸濁させた 1×10^7 個の細胞をマウスに注射した。

【0200】

EGFR： 可溶性のEGFRをRibiアジュバント（シグマ社、M6536）の無菌PBS溶液に、濃度25 µg EGFR/100 µlになるように混合した。最後の尾静脈による免疫処置は、可溶性EGFRのPBS溶液で行った。

【0201】

トランスジェニックマウス： マウスをフィルタ・ケージの中に入れ、融合日の体調を良好と評価した。選択されたハイブリドーマを生じたマウスは雄の6-8週齢の(CMD) ++；(HCo7)11952+；(JKD) ++；(KCo5)9272+ 遺伝子型（表1を参照されたい）だった。

【0202】

10

20

30

【表 1】

表 1

遺伝子型データ						
マウス	性別	出生日	遺伝子型			
20241	雄	9/21/99	CMD++	(HCo7) 11952 +	(JKD) ++	(KCo5) 9272
20242	雄	9/21/99	CMD++	(HCo7) 11952 +	(JKD) ++	(KCo5) 9272
20243	雄	9/21/99	CMD++	(HCo7) 11952 +	(JKD) ++	(KCo5) 9272

10

【0203】

* 個々の導入遺伝子の名称を括弧内に示し、その後、ランダムに組み込まれた導入遺伝子の株番号を示す。記号++及び+は、ホモ接合型又はヘミ接合型を示すが、ランダムに組み込まれたヒトIg導入遺伝子については、ヘテロ接合型とホモ接合型とを区別できないPCRベースの検定法でマウスを慣例的にスクリーニングしているため、+の名称が、実際にはこれらの因子についてホモ接合型であるマウスにも与えられている可能性がある。

【0204】

抗体：以下の抗EGFR MAbをin vitro及びin vivoで用いた。：2F8（「Humax-EGFR」とも言及する）、ヒトIgG1 抗EGFR抗体（オランダ、ユトレヒト、ジェンマブ社）；m225を産生するハイブリドーマ、マウスIgG2a 抗EGFR抗体は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（メリーランド州ロックビル、ATCC、HB-8508）から得た；無関係のIgG1抗体として用いた無関係のヒトIgGアイソタイプコントロール（ジェンマブ社）；及び間接的免疫蛍光法のための二次抗体として用いたヤギ抗マウスIgG（H+L）のフルオレセイン-イソチオシアネート（FITC）結合F(ab')₂フラグメント（カリフォルニア州サンフランシスコ、プロトス）、FITC結合F(ab')₂ウサギ-α-ヒトIgG（デンマーク、クロストラップ、ダコ社）。

20

【0205】

2F8ハイブリドーマを、10% ウシ胎児血清(FBS)（ユタ州ローガン、ハイクローン社）及び100 U/ml ペニシリン及び100 U/ml ストレプトマイシン（両者ともギブコBRL社）（pen/strep）を加えたDMEM（スコットランド、ペーズリー、ライフ・テクノロジーズ、ギブコBRL社）中で培養した。このm225ハイブリドーマを、15% FBS（ハイクローン社）及びpen/strep（両者ともギブコBRL社）を加えたRPMI1640（ギブコBRL社）中で培養した。細胞株はすべて、5%二酸化炭素を含有する加湿した雰囲気内で37℃で保存した。Humax 抗体をプロテインAアフィニティ・クロマトグラフィーを用いて精製した後、HR200カラム（ニュージャージー州、ファルマシア社）でサイズ排除した。マウス抗体はプロテインGクロマトグラフィーを用いて精製した後、HR200カラムでサイズ排除した。すべての抗体の純度はドデシル硫酸-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)で調べたところ95%を越えた。F(ab')₂フラグメントをペプシン又はβ-メルカプトエタノール処理で作製した後、プロテインA/G精製した。単離されたF(ab')₂フラグメントはSDS-PAGEで調べたところ95%を越える純度だった。

30

40

【0206】

細胞株：EGFRを高度に過剰発現する類上皮癌であるA431をATCC（メリーランド州ロックビル、CRL-155）から入手した。この細胞を10% 熱不活化FBS（ハイクローン社）、50 µg/ml ストレプトマイシン、50 IU/ml ペニシリン、及び4 mM L-グルタミン（すべてギブコBRL社）を加えたRPMI 1640培地（ギブコBRL社）で培養した。細胞が成長して付着性になったときに、これらをトリプシン-EDTA のPBS（スコットランド、ペーズリー、ライフ・テクノロジーズ社）溶液で剥がした。腫瘍モデルでは、前記細胞は常に対数期で用いられている。細胞を安定なEGFR発現及びマイコプラズマ混入についてテストしてから、各実験を行う。

【0207】

50

融合法： 安楽死させたばかりのマウスから脾臓を無菌的に採集し、ペトリ皿に入れた20-30mlの低温の無血清培地（SFM）内に配置した。付着組織を取り除き、脾臓をSFMで2回、すすいだ。組織グラインダに入れたSFM中で均質化することで、脾細胞を丁寧に採集した。

【0208】

細胞を1000gで10分間、遠心分離し、脾細胞ペレットを5mlの氷温の0.17 M NH_4Cl に2乃至5分間、懸濁させることで、この細胞ペレット中の赤血球を溶解させた。次に細胞混合液を20 mlのSFMで希釈し、1000gで10分間、遠心分離した。骨髓腫細胞を50 mlの遠心分離試験管中に採集した。次に、脾細胞及び骨髓腫細胞を3回、1000gで遠心分離して洗浄し、30-40 ml のSFMに再懸濁させた。

10

【0209】

細胞計数後、脾細胞及び骨髓腫細胞を1:1 乃至4:1の脾細胞／骨髓腫細胞比で混合した。この脾細胞／骨髓腫細胞混合液を遠心分離してペレットにし、上清を吸引で取り除いた。1-2 mlのPEG溶液（シグマ社、#P-7181）をこの細胞ペレットに45秒間かけて滴下により加え、その溶液を75秒間、静かに混合して融合を行わせた。2mlのSFMを滴下で1分間加えてこのPEG溶液をゆっくりと希釈した。これを、別の2mlのSFMで繰り返した後、溶液を1分間、放置した。

【0210】

次に溶液を更なる30mlのSFMで90秒間かけてゆっくりと希釈した。細胞を1000gで10分間、遠心分離し、30mlのHAT培地に再懸濁させた。この融合混合液を、3%オリジン・ハイブリドーマ・クロニング・ファクターを含有するHAT添加培地で200-300mlまで希釈し、96ウェル・プレートに200 μl ／ウェルを越えるまで分散させた（～10-15プレート／脾臓）。ハイブリドーマ・プレートを3乃至7日後にハイブリドーマについて調べた。7日目に、プレートの各ウェル中の培地の半分を3%のオリジンを添加した新鮮なHT培地に取り替えた。その後3乃至4日毎にHT培地をプレートに供給した。

20

【0211】

ELISA用試薬：

1. リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、Ca及びMgのないD-PBS、ハイクローンD-PBS#SH30013.03、又はシグマP 3813。
2. PBS-T（洗浄緩衝液）、0.05% Tween 20を含有するPBS、シグマP-1379。
3. PBS-T プラス1% BSA（シグマA 9647）。これは遮断緩衝液及び試料緩衝液として役立つ。
4. ELISA プレート、Nunc イムノ-プレート F96 Maxisorp 442404。
5. 抗ヒトIgG γ 鎖特異抗体、ジャクソン・イムノRリサーチ#109-006-098。
6. アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒト γ 鎖特異IgG、ジャクソン・イムノ・リサーチ#109-056-098。代替物は、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト κ 、シグマA 3813を用いること。
7. アイソタイプ特異的ELISAに用いるためのアルカリホスファターゼ標識抗ヒトIgG1、又はIgG3、サザン・バイオテクノロジー#9050-04&9210-04。
8. p ニトロフェニル(pNPP)、シグマN2765、又はシグマ・ファスト・タブレット・キット N-2770。
9. pNPP 基質及び緩衝液－2つの選択肢：
 - A. ジエタノールアミン緩衝液：97 ml のジエタノールアミン、シグマD-2286と0.1g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及び800 ml Di 水を混合する。pH を9.8に調節し、最終体積を1.0 L にDi 水で調節する。pNPPの20 mg 錠、シグマ N-2765を1錠、20 mlのジエタノールアミン緩衝液当たり加える。
 - B. シグマ・ファスト pNPP タブレット・セット、シグマN-2770： 緩衝剤タブレット1錠及び pNPPタブレット1錠を20 ml の H_2O に溶解させる。
10. 405nmのフィルタを付けたELISAプレート・リーダー。
11. 上皮成長因子受容体(EGFR)、シグマE 3641、ビオチン標識EGF (EGF-B)、モラキュ

30

40

50

ラー・プローブ E-3477。

12. ビオチン標識抗EGFR MAb又はヒト抗体。

13. 陰性コントロール用の非特異的ヒト抗体、又は精製ヒトIgG1 κ 、シグマ I-I3889。

14. 自動ELISA プレート洗浄機：Titertek MAP C。

【0212】

抗ヒトIgG、 κ ELISA： ハイブリドーマ・プレートをヒトIgG κ 産生MAbについてスクリーニングするために、ELISAプレートを1 μ g/mlの抗ヒトIgG γ 鎖特異抗体、ジャクソン・イムノリサーチ#109-006-098で一晩以上かけて4 $^{\circ}$ Cで被覆した。プレートをプレート洗浄機で洗浄し、100 μ l/ウェル PBS-Tと1% BSAを加えた。プレートを少なくとも15分間インキュベートし、10-50 μ lの細胞培養上清をELISAプレート・ウェルに加えた。このとき各プレートの2、3のウェルはIgGを陽性コントロールとして含有し、細胞培養培地を陰性コントロールとして含有した。プレートを1乃至2時間、室温でインキュベートし、洗浄し、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト κ 抗体（シグマA-3813）をPBS-Tに1:5000に溶かしたものと1% BSAの混合液を加えた。プレートを室温で1時間インキュベートし、プレート洗浄機で4回、洗浄し、pNPP基質を加えた。プレートを10-60分間インキュベートし、吸光度を405 nmでELISAプレート・リーダーで読み取った。

10

【0213】

抗EGFRヒト抗体の特異性をテストするELISA法—EGFRで被覆したELISAプレートへの抗体の直接的結合： 抗EGFR抗体がEGFRに特異的に結合することを立証するために、Nunc Maxi sorp プレートを、PBSに0.4 μ g/mlになるように溶かした100 μ l/ウェルのEGFRで、4 $^{\circ}$ Cで一晩かけて、又は、室温で2時間かけて被覆した。プレートをPBS-Tで3回、洗浄し、100 μ l/ウェルのPBS-Tプラス1% BSAを加えて、プラスチック表面上の非特異的部位を遮断し、少なくとも15分間インキュベートしてから試料を添加した。テストしようとする試料の希釈液をPBS-T プラス1% BSAに入れて添加した。上清を最小で1:3になるようにPBS-T 1% BSAで希釈してからELISAプレートに添加した。試料及び標準を100 μ lウェルになるように添加し、1時間、室温でインキュベートしてから、プレートをPBS-Tで3回、洗浄した。アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒト γ 特異抗体を1:3000乃至1:5000の希釈度で含有する100 μ l/ウェルのPBS-T 1% BSAを加えた。代替的には、アルカリホスファターゼ標識抗ヒト κ を用いることもできる。プレートを1時間、室温でインキュベートし、4回洗浄し、pNPP基質を加えた。吸光度を405 nmで読み取った。

20

30

【0214】

抗EGFRヒト抗体の特異性をテストするELISA法—ELISA EGF/EGFR 遮断検定法： 抗EGFR抗体がEGFRに結合する上に、ビオチン標識した上皮成長因子の上皮成長因子受容体（EGFR）への結合を遮断することを立証するために、Nunc Maxisorp プレートを、PBSに0.4 μ g/mlになるように溶かした100 μ l/ウェルのEGFRで、4 $^{\circ}$ Cで一晩、又は、室温で2時間かけて、被覆した。プレートをPBS-Tで3回、洗浄し、100 μ l/ウェルのPBS-Tプラス1% BSAを加えて、プラスチック表面上の非特異的部位を遮断し、少なくとも15分間インキュベートしてから試料を添加した。テストしようとする試料の希釈液をPBS-T プラス1% BSAに入れて添加した。上清を最小で1:3になるようにPBS-T 1% BSAで希釈してからELISAプレートに添加した。試料及び標準を100 μ lウェルになるように添加し、30分間、室温でインキュベートしてから、20 μ l/ウェルのビオチン標識EGFを0.5 μ g/mlになるように加え、プレートを1時間インキュベートした（これは既にプレート上にある試料溶液に加える）。代替的には、試料を1時間インキュベートし、洗浄し、100 μ l/ウェルのEGF—ビオチンを0.1 μ g/mlになるように加え、1時間インキュベートすることもできる。プレートを3回洗浄し、ストレプトアビジン・アルカリホスファターゼを1:2000の希釈度で含有する100 μ l/ウェルのPBS-T 1% BSAを加え、1時間インキュベートした。プレートを4回洗浄し、pNPP基質を加え、吸光度を405 nmで読み取った。

40

【0215】

抗EGFRヒト抗体のエピトープ特異性を判定するための競合的ELISA—市販のマウスMAbs 225、528、AB5、及び29.1との競合： この検定は、どのMAbが抗体225、528、AB5及び29.1

50

に最も似ているかを判定するために行われた。Mabs 225、528、及びAB5 はEGF のその受容体への結合を遮断してEGFRのin-vivo 内因性チロシンキナーゼ活性を阻害する。Mab 29.1 は非遮断性Mabであり、EGFRの糖質残基に結合する。プレートを少なくとも2時間室温で、又は一晩4℃で、0.4 µg/ml のEGFRのPBS溶液で被覆し、洗浄し、100 µl /ウェルのPBS-T 1% BSAで遮断した。この遮断溶液を払い飛ばし、100 µl /ウェルのPBS-T-1% BSA をプレートの左側のカラム1-6に加え、他方、未標識のマウスMabを1 µg/ml (100 µl /ウェル)、プレートの右側のカラム7-12に加えた。プレートを室温で1時間インキュベートし、25 µlの細胞培養上清を、各上清が一方のウェルではPBS-T-1% BSAと一緒に、そして一方のウェルではマウスMabと一緒に添加されるように、プレートの各半分の同等の位置に加えた。プレートを1時間インキュベートし、洗浄し、アルカリホスファターゼ標識された抗ヒトIgG Fc抗体を加えた。プレートを1時間、インキュベートした。プレートを洗浄し、基質を加えた。吸光度を405 nmで読み取った。Mabの競合率を以下の式：(競合なしの上清のOD - Mab競合有りの上清のOD) / 競合なしの上清のOD) × 100、で判定した。

【0216】

抗EGFRヒト抗体のエピトープ特異性を判定するための競合的ELISA—ビオチン標識ヒト抗体を用いた競合的ELISA： 抗EGFRヒト抗体の特異性を判定するためにも、競合的ELISA検定法を行った。プレートを少なくとも2時間室温で、又は一晩4℃で、0.4 µg/ml のEGFRのPBS溶液で被覆した。プレートを洗浄し、100 µl /ウェルのPBS-T 1% BSAで遮断した。50 µlの(10-30 µg/ml) の未標識のヒト抗体又はマウスMabをプレート・カラムの一番上のウェルに加え、50 µlを順に各カラムの下方に移動させて混合して、各抗体の3倍の希釈液を作製した。混合後、50 µlを一番下のウェルから廃棄した。プレートを1時間インキュベートし、20 µl /ウェルのビオチン化抗EGFRヒト抗体又は未標識のマウス抗ヒトEGFR抗体をプレート全体に加えて、競合する抗体の最終濃度をほぼ0.1-0.2 µg/mlとした。プレートを室温で1時間インキュベートし、洗浄し、100 µl /ウェルのストレプトアビジンアルカリホスファターゼ (PBS-T-BSA中1:2000)又はアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG を加えた。プレートを1時間インキュベートし、洗浄し、基質を加えた。吸光度を405 nmで読み取った。

【0217】

抗EGFRヒト抗体の特異性をテストするFACS法—EGF/EGFR遮断： この検定は、抗EGFR抗体が細胞表面上のEGFRに結合すること、そしてそうすることで、ビオチン標識上皮成長因子(EGF-B) の上皮成長因子受容体 (EGFR) への結合を遮断すること、を立証するために用いた。このFACSベースの方法では、約 10^6 EGFR分子/細胞を発現するヒト上皮癌細胞株A431を用いる。

【0218】

EGFR FACS検定法のための材料：

- 1つ以上のT-175 フラスコに入ったコンフルエントA431 細胞 (ATCC CRL 1555)。A431細胞をDMEM プラス10 % FCS中で培養する。
- トリプシン-EDTA溶液、シグマ T-3924。
- ビオチン標識EGF。約5 µg/mlのストック溶液を調製し、10 µl / ウェルを用いる。
- 丸底96 ウェルプレート。
- PBS、無菌。
- PBS プラス1% BSA プラス0.02 % アジ化ナトリウム(FACS緩衝液)。
- PE-標識ストレプトアビジン、シグマS 3402。1:20 にFACS 緩衝液で希釈する。
- PE-標識又はFITC標識抗ヒトIgG、FCγ特異的、ファーマーミンジェン34164X、34165X。
- 96ウェルプレート用のスイング籠及びアダプタ (ベックマン社)で低速遠心分離。
- FACS。
- BD FACS 試験管。

【0219】

方法： A431細胞をトリプシンEDTA処理で採集した。組織培養フラスコの培地を取り除き、フラスコを10-20 mlの無菌 PBS又はHBSSで素早くすすいだ。5-10 mlのトリプシンEDTA

を加え、フラスコをインキュベータに数分間、戻した。細胞がプラスチック表面から離脱し始めたときに10 mlピペットを用いてプラスチック表面から細胞を静かに吸い取り、多すぎない細胞クランプ数の単個細胞懸濁液を作製した。細胞を20-30 mlの細胞培養培地（FBSを加えたもの）を入れた50 ml入り試験管に移し、1000gで10分間、遠心分離し、細胞を低温のFACS緩衝液中で遠心分離及び再懸濁させることで、2回、洗浄した。細胞溶液をナイロン製メッシュで濾過して細胞クランプを取り除いた（BD FACS試験管の上部をこのために装備する）。細胞を計数し、1乃至 5×10^6 個の細胞/mlになるように体積を調節した。細胞を丸底96ウェルプレートに約200,000細胞/ウェルになるように分散させ、約1分間、1000gで遠心分離した後、液体分を払い飛ばした（細胞をウェルの底に残さねばならない）。プレートを氷の上に置くか、又は、4℃に維持した。別の96ウェルプレートで、10 µg/mlから始まって4.5ng/mlまで3倍ずつ減少する抗体希釈液を調製して、抗体試料のFACS緩衝液希釈液を調製した。各抗体希釈液、アイソタイプ・コントロール、及び緩衝液コントロールのうちの100 µlを前記丸底プレートに加えた。抗体試料及びコントロールを細胞と混合し、30分間、氷上でインキュベートした。10 µlのビオチン標識EGFを抗体細胞溶液に加え、さらに30分間、インキュベートした。細胞をFACS緩衝液中で遠心分離及び再懸濁させることにより、3回洗浄した。50 µlウェルのストレプトアビジンPEを加え、混合し、30分間、氷上でインキュベートした。この細胞を3回、洗浄し、50 µlのFACS緩衝液中に再懸濁させた。各ウェルの内容物を、300乃至400 µlのFACS緩衝液を容れた試験管に移した。各試料中5000-10000個の細胞を、FL-2チャンネルでFACSにより分析した。MCF対抗体濃度を表にした。

10

20

【0220】

ヒト又は動物由来材料： A431ヒト類上皮癌細胞株（ヴァージニア州マナサス、ATCC、CRL-1555, ロット 203945）。トリプシンEDTA（セルグロー社 カタログ番号25-053-C1）。P3 X63 ag8.653 骨髄腫細胞株：ATCC CRL 1580、ロットF-15183 オリジン・ハイブリドーマ・クロニング・ファクター（アイジェン社21001）、OPI サプリメント（シグマ社 0-5003）ユタ州ローガン、ハイクローン社のウシ胎児血清（SH30071 ロット番号ALE10321、及びAGH6843）。オリゲン・フリーズ培地（アイジェン社、#210002）

【0221】

ELISA： ヒト抗体のEGFRへの結合を判定するために、96ウェル微量定量プレート（ドイツ、フリッケンハウゼン、グライナー社）上で1 µg/mlのPBS中濃度で一晩かけて被覆したEGFR（ミズーリ州セントルイス、シグマ社）でELISAを用いた。プレートを、100 µl/ウェルの濃度のELISA緩衝液（PBS/.05%Tween 20 及び1% ニワトリ血清（ギブコ BRL社））で遮断後、ELISA緩衝液で希釈したモノクローナル抗体を加え、1時間、37℃でインキュベートした。次にこのプレートを3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG Fc特異（ペンシルバニア州ウェスト・グレース、ジャクソン社）と一緒に1時間、37℃でインキュベートした。この検定液をABTS（ドイツ、マンハイム、ロシュ・ダイアグノスティックス社）で30分間、展開させた。吸光度をマイクロプレート・リーダー（カナダ、ウィヌースキ、バイオテック社）で415 nmで測定した。遮断実験に関しては、プレートを50 µlの遮断剤のELISA緩衝液溶液と一緒に10分間、予めインキュベートしてから、50 µlの完全ヒト抗体を加えた。マウス血清中のヒトIgGを判定するために、ELISAプレートをウサギ抗ヒトカップ、軽鎖（ダコ社）で、96ウェル微量定量プレート（グライナー社）に容れたPBS中で、一晩かけて被覆した。このプレートをELISA緩衝液（PBS/.05%Tween20 及び1% ニワトリ血清）100 µl/ウェル、で遮断した後、ELISA緩衝液で希釈したマウス血清を加え、1時間、37℃でインキュベートした。次にこのプレートを3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識ウサギ F(ab')₂フラグメント抗ヒトIgG（ダコ社）と一緒に1時間、37℃でインキュベートした。この検定液をABTS（ロシュ社）で30分間、展開させた。吸光度をマイクロプレート・リーダー（バイオテック社）で415nmで測定した。

30

40

【0222】

フローサイトメトリ： EGFR過剰発現腫瘍細胞をMAbと一緒に30分間、4℃でインキュベートした。細胞を、1%ウシ胎児血清アルブミン（ロシュ社）及び0.01%のアジドを添加し

50

たリン酸緩衝生理食塩水で3回、洗浄した。対比染色を、ヤギ抗マウス抗体のFITC結合F(ab')₂フラグメント、又は、ウサギ抗ヒトIgG抗体のFITC結合F(ab')₂フラグメントを用いて行った。阻害実験に関しては、細胞をEGF 又はTGF- α と一緒に10分間、4℃で予めインキュベートした。試料はすべて、FACScanフローサイトメータ（カリフォルニア州サンホセ、ベクトン・ディッキンソン社）で分析した。

【0223】

リン酸化実験： 24ウェル・プレート（デンマーク、カムストラップ、NUNC社）に容れたA431細胞のサブコンフルエント株を一晚、低血清条件（0.5%）で処理した。異なる抗体希釈液をこのウェルに加え、37℃及び5%二酸化炭素で30分間、インキュベートした。細胞を5ng/mlのEGF（ニュージャージー州ロッキーヒル、プレポテック社）を加えて、又は、加えずに、37℃及び5%二酸化炭素で5分間、刺激した。細胞抽出物をTomic et al. (Tomic et al, 1995)が解説したように、1ウェル当たり100 μ lの溶解緩衝液を用いて調製した。50 μ lのA431細胞抽出物を、SDSナトリウム-PAGEと、抗ホスホチロシン抗体（ケンタッキー州、トランスダクション・ラボラトリーズ社、PY20）、ヤギ抗マウスIgG-HRP抗体（トランスダクション・ラボラトリーズ社）を用いた免疫ブロット法と、ECL検出法とで分析した。TGF- α （ニュージャージー州ロッキーヒル、プレポテック社）による刺激の場合、24ウェル・プレート（NUNC社）に容れたA431細胞のサブコンフルエント培養物を一晚、低血清培地（0.5%）で処理した。抗体を10又は0 μ g/mlの固定した用量、加え、上述のようにインキュベートした。細胞を次第に量を多くしたTGF- α で刺激した。細胞を上述のように処理した。

【0224】

In vitro 細胞成長阻害： 完全ヒト抗体の細胞成長阻害上の特徴を、非放射性阻害検定法で評価した。簡単に説明すると、100 μ lの2 $\times 10^4$ /ml A431細胞を平底組織培養プレートに加え、細胞培養インキュベータ内に配置した。2時間後に100 μ lの抗体希釈液を加え、細胞培養インキュベータ内に戻した。細胞を6乃至7日間、インキュベートし、上清をデカントし、100 μ lの0.25%グルタルアルデヒドのPBS溶液を各ウェルに加えた。室温で45分間、インキュベートした後、ウェルをデミ水で2回、洗浄した。50 μ lの1%クリスタルバイオレットのデミ水溶液を加え、室温で15分間、インキュベートした。プレートをデミ水で2回、洗浄した後、プレートをプレート・シェーカ上に30分間、置いている間に100%メタノールで展開させた。吸光度をマイクロプレート・リーダーで550nmフィルタを650nm基準フィルタと共に用いて測定した。阻害は三対にして測定する。抗体を加えなかったウェルの平均吸光度で、特定の抗体濃度の三対の平均吸光度を除算した後に100倍することで、相対的な細胞増殖率を判定した。

【0225】

エフェクタ細胞の単離： 末梢白血球をRepp, et al. (1991) Blood 78: 885-889に解説されたものを少し改良した方法で単離した。簡単に説明すると、ヘパリン-抗凝固血を層にしてフィッコール勾配にした。遠心分離後、エフェクタ細胞を中間相から採集し、残った赤血球を低張溶解で取り除いた。サイトスピン・プレパラートを用いて、単離された細胞の純度を評価すると95%より高かった。トリパン・ブルー圧排法で判定した細胞の生存率は95%を越えた。

【0226】

ADCC検定法： 完全ヒト抗体の腫瘍細胞溶解能を⁵¹クロム放出検定法で評価した (Valerius, et al. (1993) Blood, 82: 931-939)。単離されたヒト白血球をエフェクタ源として用いた。簡単に説明すると、腫瘍標的を100 μ Ci⁵¹Crと一緒に2時間、インキュベートした。培養基で3回洗浄した後、5 $\times 10^3$ 個の標的細胞を、50 μ lの単離エフェクタ細胞及び感作MAbを様々な濃度で培養基で希釈して含有する丸底組織培養プレートに加えた。最終体積は200 μ lであり、エフェクター対標的細胞の比（E:T）は80:1であった。この検定液を一晚、37℃でインキュベートし、遠心分離で停止させた。三対にした上清中でクロム放出を測定した。細胞傷害率を以下の式を用いて計算した：

10

20

30

40

50

$$\% \text{特異的溶解} = \frac{\text{実験cpm} - \text{自発的cpm}}{\text{最大cpm} - \text{自発的cpm}} \times 100$$

但し、最大⁵¹Cr放出は、ZAP-オグロビン^(R) (10% 最終濃度)を標的細胞に加えることで判定し、基礎放出値は、感作抗体及びエフェクタ細胞の非存在下で測定した。抗体が媒介する、非細胞性の細胞傷害性 (エフェクタ細胞なし) がごく低レベル、これらの検定条件下で観察された (<5% 特異的溶解)。

【0227】

SPR技術を用いた親和性の測定： 抗EGFR抗体の結合親和性をBIAcore 300 (スウェーデン、ウプスラ、バイアコア社)を用いて判定した。シグマ社から購入したA431細胞から精製したEGFRをCM5チップ上にメーカーの指示通りに固定した。測定は、抗体F(ab')フラグメントを様々な濃度にして行った。結合及び解離定数をBIAエバリュエーション・ソフトウェア (バージョン3.1)を用いて判定した。

10

【0228】

マウス及び腫瘍モデル： ノードBalb/cマウス(NuNu)をハーラン社 (オランダ、ホルスト)から購入した。解説する実験はすべて、8乃至12週齢のメスのマウスで行った。マウスはセントラル・ラボラトリ・アニマル・ファシリティ (オランダ、ユトレヒト) のトランスジェニックマウス・ファシリティで飼われ、実験はユトレヒト大学動物倫理委員会の承認を受けた。実験への参加時、マウスは1週間に3回、活動レベル、皮膚の異常、下痢及び全体の外見を含め、毒性及び不全の徴候についてチェックを受けた。よく樹立された皮下 (s.c.)腫瘍モデルを用いた。簡単に説明すると、高EGFR発現A431細胞をマウスの右側に、 3×10^6 個の細胞の用量で接種した。この腫瘍は成長して均一になり、ノギスで容易に測定できる。腫瘍の体積は長さ×幅×高さ (mm³で)で報告されている。当該のモノクローナル抗体を、実験プロトコルに従って腹腔内 (i.p.)注射した。腫瘍細胞をin vivo通過後にフローサイトメトリ及び免疫組織化学法によって安定なEGFR発現についてテストした。薬物動態を調べるために、腫瘍のある、又は、ないマウスに2F8抗体をi.p.注射した。この注射の前及び後の6週間、週毎の血液試料を尾の静脈から採血した。試料をヒトIgG ELISAで分析した。

20

【0229】

統計学的分析： グループのデータを、平均±平均の標準偏差 (SEM)で報告する。グループ間の違いを、対にしていけない (又は適宜対の) スチューデントt検定で分析した。有意水準を示す。有意水準は $p < 0.05$ レベルのときに認められた。

30

【0230】

実施例1 「HuMAB」とも呼ばれる抗EGFRヒト抗体の産生に関するCmu標的化マウスの作製CMDターゲティング・ベクタの構築

プラスミドpICEmuは、mu遺伝子に延びる、Balb/Cゲノム・ラムダ・ファージディスプレイから得られたマウスIg重鎖遺伝子座のEcoRI/XhoI断片を含有する (Marcu et al. Cell 22: 187, 1980)。このゲノム断片をプラスミドpICEMI9HのXhoI/EcoRI部位にサブクローンした (Marsh et al; Gene 32, 481-485, 1984)。pICEmuに含まれたこれら重鎖配列は、muイントロン・エンハンサのちょうど3'側に位置するEcoRI部位の下流から、mu遺伝子の最後の膜貫通エキソンのほぼ1kb下流に位置するXhoI部位まで延びる。しかし、このmuスイッチ反復領域の大半は、E. coliを通過させて欠失させてある。ターゲティング・ベクタは以下の通りに構築された。1.3 kbのHindIII/SmaI断片をpICEmuから切り取り、HindIII/SmaIで消化したpBluescript (カリフォルニア州ラホーヤ、ストラタジーン社)内にサブクローンした。このpICEmu断片は、Cmu1のほぼ1 kb 5'側に位置するHindIII部位からCmu1内にあるSmaI部位まで延びる。その結果得られたプラスミドをSmaI/SpeIで消化し、pICEmu由来の、Cmu1の3'側のSmaI部位から最後のCmuエキソンのちょうど下流に位置するXbaI部位まで延びる約4 kbのSmaI/XbaI断片を挿入した。その結果得られたプラスミドpTAR1をSmaI部位で直線化し、neo発現カセットを挿入した。このカセットは、マウスホスホグリセレートキナーゼ (pgk) プロモータ (XbaI/TaqI断片Adra et al. (1987) Gene 60: 6

40

50

5-74) の転写制御下にあると共に、pgkポリアデニレーション部位(PvuII/HindIII 断片; Boer et al. (1990) Biochemical Genetics 28: 299-308) を含有するneo遺伝子から成る。このカセットは、プラスミドpKJ1 (Tybulewicz et al. (1991) Cell 65: 1153-1163 に解説がある)から得たが、このプラスミドから前記neoカセットをEcoRI/HindIII断片として切り出し、EcoRI/HindIIIで消化したpGEM-7Zf (+) 内にサブクローンして、pGEM-7 (KJ1)を作製した。このneoカセットを、pGEM-7 (KJ1)からEcoRI/SalI消化により切り出し、平滑末端にしてから、プラスミドpTAR1のSmaI部位にゲノムCmu配列とは反対の方向でサブクローンした。その結果得られたプラスミドをNot Iで直線化し、単純疱疹ウィルスチミジンキナーゼ(tk)カセットを挿入して、Mansour et al. (1988) Nature 336: 348-352 が解説した通りに、相同組換え体を持つESクローンを濃縮できるようにした。このカセットは、Tybulewicz et al. (1991) Cell 65: 1153-1163が解説したように、マウスpgkプロモータ及びポリアデニレーション部位を両端に持つtk遺伝子のコーディング配列から成る。その結果得られたCMDターゲティング・ベクタは、前記重鎖遺伝子座に合計でほぼ5.3 kb の相同性を含有し、neo発現カセットが一番目のCmuエキソンの非反復SmaI部位に挿入された変異mu遺伝子を生ずるよう、デザインされている。このターゲティング・ベクタを、ES細胞内に電気穿孔注入する前に、プラスミド配列内で切断するPvuIで直線化した。

【0231】

標的設定されたES細胞の作製及び分析

AB-1 ES 細胞 (McMahon, A. P. and Bradley, A., (1990) Cell 62: 1073-1085) を有糸分裂不活性期のSNL76/7 細胞支持細胞層 (同書) 上で、基本的には解説 (Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 71-112のRobertson, E. J. (1987))された通りに成長させた。直線化させたCMDターゲティング・ベクタを、電気穿孔法でAB-1細胞に、Hasty et al. (Hasty, P. R. et al. (1991) Nature 350: 243-246)で解説された方法により注入した。注入後の細胞を100 mm 皿に、 $1-2 \times 10^6$ 細胞/皿の密度になるようにプレートした。24時間後、G418 (200マイクログラム/mlの活性成分)及び FIAU (5×10^{-7} M)を培地に加え、薬物耐性クローンを8乃至9日間、展開させた。クローンを摘みだし、トリプシン処理し、2つの部分に分割し、さらに展開させた。その後各クローン由来の細胞の半分を凍結させ、残りの半分を、ベクタと標的配列との間の相同組換えについて分析した。

【0232】

DNA解析をサザン・ブロット・ハイブリダイゼーションで行った。DNAはLaird et al. (Laird, P. W. et al., (1991) Nucleic Acids Res. 19 : 4293)が解説した通りに前記クローンから単離した。単離されたゲノムDNAをSpeIで消化し、muイントロン・エンハンサとmuスイッチ領域との間の配列にハイブリダイズするプローブAである915 bp のSacI 断片でプローブした。プローブAは、野生型遺伝子座の9.9 kbのSpeI断片と、CMDターゲティング・ベクタと相同組換えを起こしたmu遺伝子座の判断材料となる7.6kbのバンドとを検出する(neo発現カセットはSpeI部位を含有する)。サザン・ブロット解析でスクリーニングした1132 個のG418及びFIAU 耐性クローンのうち、3個が、mu遺伝子座での相同組換えを示す7.6 kb のSpeI バンドを示した。これら3個のクローンを酵素BglI、BstXI、及びEcoRI でさらに消化して、当該ベクタがmu遺伝子に相同的に組み込まれたことを確認した。プローブAとハイブリダイズした場合、BglI、BstXI、又はEcoRI で消化した野生型DNAのサザン・ブロットでは、それぞれ15.7、7.3、及び12.5 kbの断片が生ずるが、標的にしたmuアレルの存在は、それぞれ7.7、6.6、及び14.3 kbの断片で示される。SpeI消化により検出された3個の陽性クローンはすべて、neoカセットがCmuIエキソンへ挿入されたことの判断材料となる、予想通りのBglI、BstXI、及びEcoRI制限断片を示した。

【0233】

変異mu遺伝子を持つマウスの作製

264番、272番及び408番と指定した3つの標的設定されたESクローンを解凍し、C57BL/6 J胚盤胞にBradley (Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 113-151のBradley, A. (1987))の

解説通りに注入した。注入された胚盤胞を偽妊娠メスの子宮に移して、注入されたES細胞及びホストの胚盤胞を由来とする細胞の混合物であるキメラマウスを作製した。このキメラへのES細胞の寄与度は、黒色のC57BL/6Jバックグラウンド上に見える、ES細胞系由来の野鼠色の皮の量により視覚的に判断できる。クローン272及び408では、ごく低いパーセンテージでキメラが生じた（即ち、野鼠色の着色率が低い）が、クローン264では、高率でオスのキメラが生じた。これらのキメラをC57BL/6Jメスと交配し、ES細胞ゲノムの生殖細胞伝播を示す野鼠色の仔を作った。尾の生検で得たDNAをBglI消化し、サザン・ブロット分析して、標的設定されたmu遺伝子のスクリーニングを行った（ES細胞DNAの分析について上述した通り）。野鼠色の仔のほぼ50%が、野生型のバンド15.7kbに加え、ハイブリダイズした7.7kbのBglIバンドを示し、標的設定されたmu遺伝子の生殖細胞伝播が実証された。

【0234】

mu遺伝子の機能不活性化に関するトランスジェニックマウスの分析

neoカセットをCmu1に挿入したことでIg重鎖遺伝子が不活性化したかどうかを調べるために、クローン264キメラを、JH遺伝子セグメントを欠失させて重鎖発現を不活性化させるJHD変異がホモ接合型となったマウスと交配した(Chen et al, (1993) Immunol. 5: 647-656)。4匹の野鼠色の仔を得た。血清を1月齢のこれら動物から得、ELISAで検定してマウスIgMの存在を調べた。4匹の仔のうち2匹がIgMを完全に欠いていた（表2を参照されたい）。4匹の動物を、尾の生検で得たDNAをBglI消化し、プローブA（図1を参照されたい）にハイブリダイズさせ、さらにStuI消化し、475bpのEcoRI/StuI断片（同書）にハイブリダイズさせる、といったサザン・ブロット分析で遺伝子型決定したところ、血清IgMを発現できない当該動物は、重鎖遺伝子座の一方のアレルがJHD変異を持ち、他方のアレルがCmu1変異を持つものであることが実証された。JHD変異がヘテロ接合型となったマウスは野生型のレベルの血清Igを示す。これらのデータは、Cmu1変異はmu遺伝子の発現を不活性化することを実証するものである。

【0235】

【表2】

表 2

マウス	血清IgM (マイクログラム/ml)	IgH 鎖遺伝子型
42	<0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	<0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 x BL6 F1	153	+/+
JHD	<0.002	JHD/JHD

【0236】

表2は、CMD及びJHD 変異の両方を持つマウス（CMD/JHD）、JHD変異についてヘテロ接合型のマウス（+/JHD）、野生型（129Sv × C57BL/6J）F1 マウス（+/+）、及び、JHD変異がホモ接合型のB細胞欠損マウス（JHD/JHD）について、ELISAで検出された血清IgMレベルを示す。

【0237】

実施例2 抗EGFRヒト抗体の作製用のHC012トランスジェニックマウスの作製

HC012ヒト重鎖導入遺伝子

80 kb のpHC2 のインサート(Taylor et al., 1994, Int. Immunol., 6: 579-591)及び25 kbのpVx6のインサートを同時注入することで、HC012導入遺伝子を作製した。プラスミドpVx6 を以下に解説するように構築した。

【0238】

生殖細胞ヒトVH1-18 (DP-14)遺伝子を、ほぼ2.5 kb の5' 側フランキンク及び5 kb の3'側フランキンクゲノム配列と一緒に含む、8.5 kb のHindIII/SalI DNA 断片をプラスミド・ベクタpSP72 (ウィスコンシン州マジソン、プロメガ社) 内にサブクローンして、プラスミドp343.7.16を作製した。生殖細胞ヒトVH5-51 (DP-73)遺伝子を、ほぼ5 kbの5' 側フランキンク及び1 kb の3' 側フランキンクゲノム配列と一緒に含む、7 kbのBamHI/Hind III DNA断片を、pBR322ベースのプラスミド・クローニング・ベクタpGP1f (Taylor et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295)内にクローンして、プラスミドp251fを作製した。pGP1f、pGP1k (SEQ ID NO:13)を由来とする新しいクローニング・ベクタを、EcoRV/BamHIで消化し、生殖細胞ヒトVH3-23 (DP47)遺伝子をほぼ4 kbの5' 側フランキンク及び5 kb の3' 側フランキンクゲノム配列と一緒に含む、10 kbのEcoRV/BamHI DNA 断片に連結した。その結果得られたプラスミドp112.2RR.7をBamHI/SalI で消化し、p251fの7 kbの精製済みBamHI/SalI インサートに連結した。その結果得られたプラスミドpVx4をXhoIで消化し、p343.7.16の8.5 kbの XhoI/SalI インサートに連結した。VH1-18遺伝子を他の2つのV遺伝子と同じ方向で持つクローンを得た。このクローンをpVx6と命名した後、NotIで消化し、精製されたその26 kbのインサートを、pHC2の精製済み80kbのNotIインサートと一緒に、1:1のモル比で、Hogan et al. (B. Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 2nd edition, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY)が解説したように半日齢(C57BL/6J x DBA/2J)F2 胚の前核に同時注入した。これらの注入を受けた胚から発生したマウスから、V×6及びHC2の両方を由来とする配列を含むトランスジェニックマウスの3つの個別の株を確立した。これらの株を(HC012)14881、(HC012)15083、及び(HC012)15087と命名する。次にこれらの3つの株のそれぞれを、実施例1で解説したCMD変異、JKD 変異 (Chen et al. 1993, EMBO J. 12: 811-820)、及び(KCo5)9272 導入遺伝子(Fishwild et al. 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851)を含むマウスに交配した。その結果得られるマウスは、ヒト免疫グロブリン重鎖及びカッパ軽鎖導入遺伝子を、内因性マウス重鎖及びカッパ軽鎖遺伝子座の破壊についてホモ接合型であることをバックグラウンドとして発現する。

【0239】

実施例3 EGFRに対するヒトモノクローナル抗体の作製

2つの異なる株のマウスを用いてEGFR反応性ヒトモノクローナル抗体を作製した。株((CMD)++; (JKD)++; (HCo7)11952+/++; (KCo5)9272+/++) (ここで「HCo7マウス」と言及する、及び株 ((CMD)++; (JKD)++; (HCo12)15087+/++; (KCo5)9272+/++) (ここで「HCo12マウス」と言及する)。これらの株のそれぞれは、内因性重鎖 (CMD) 及びカッパ軽鎖 (JKD) 遺伝子座の破壊についてホモ接合型である。両方の株とも、ヒトカッパ軽鎖導入遺伝子(HCo7)を含むが、個々の動物は、#11952の挿入についてはヘミ接合型又はホモ接合型である。2種の株は、用いたヒト重鎖導入遺伝子の点で異なる。マウスはHCo7又はHCo12導入遺伝子のいずれかについてヘミ接合型又はホモ接合型だった。CMD変異は実施例1で上述されている。(HCo12) 15087 マウスの作製は実施例2で解説されている。JKD 変異 (Chen et al. 1993, EMBO J. 12: 811-820) 及び(KCo5)9272 (Fishwild et al. 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851) 及び(HCo7)11952 マウスは、米国特許第5,770,429号及び第5,545,806号 (Lonberg & Kay, 6/23/98)に解説されている。

【0240】

用いた免疫スケジュールを下の表3に挙げる。マウスをA431細胞で2回、次に可溶性抗原のRibitアジュバント溶液で、免疫した。EGFR特異的血清抗体価を3回目の免疫後にELISAで判定した。3回の異なる免疫を最終追加刺激として行なった後、融合を行った。これらには、2回又は3回の順番の静脈内 (iv) 追加刺激を尾の静脈を通じた10 µgの抗原の5

10

20

30

40

50

0 μ l PBS溶液注射で行うこと、又は、2回の順番の腹腔内 (i.p.) 追加刺激を25 μ gの可溶性EGFRのRibiアジュバント溶液注射で行うこと、が含まれた (表3を参照されたい)。融合に用いた3匹のマウスは、HCo7及びHCo12遺伝子型の両方を含むマウスの、より大きなコホートの一部だった。

【0241】

【表3】

免疫スケジュール：表3

免疫スケジュール								
			ELISA	EGFR	ELISA		EGFR	
	A431 細胞	A431 細胞	抗体価	RIBi溶液 腹腔内	抗体価	融合	RIBi溶液 腹腔内	融合
マウス	1日目	20日目	30日目	33日目	43日目	46日目	50日目	53日目
20241	2X10 ⁶	1X10 ⁷	0	25 μ g	4050		25 μ g	Ribi 2x25 μ g***
20242	2X10 ⁶	1X10 ⁷	0	25 μ g	4050		25 μ g	2 iv x10 ⁶ μ g*
20243	2X10 ⁶	1X10 ⁷	450	25 μ g	12150	3 iv x10 ⁶ μ g*		
* -4, -3及び-2日目にEGFRのPBS(10 μ g)溶液を静脈内								
** -4, 及び-3日目にEGFRのPBS(10 μ g)溶液を静脈内								
*** -4, 及び-3日目にEGFRのRibi(10 μ g)溶液を腹腔内								

【0242】

最初の2回の注射に用いた免疫戦略である2-10 $\times$ 10⁶個の生存 A431細胞の腹腔内注射では、生じた抗EGFR抗体価は低かった (表2を参照されたい)。しかしながら、これらのマウスに3回目の免疫処置を25 μ g/マウスの可溶性EGFRのRibiアジュバント溶液で行ったところ、血清抗体価は30倍を越えて上昇した。これらの結果は、細胞表面上に大量のEGFRを発現する細胞は一次免疫応答を惹起するために大変効果的であり、この免疫応答は、その後、精製抗原のアジュバント溶液を一用量与えただけでも大きく亢進したことを明確に実証している。

【0243】

マウス20243の融合前の最終追加刺激は、10 μ gの可溶性EGFRのPBS溶液を-4、-3、及び-2日目に尾の静脈を通じた静脈内追加刺激として行った。可溶性EGFR中のTriton X-100により、マウスの尾に炎症が起きた。従って、炎症の可能性を減らすために、マウス20242に、-4日目及び-3日目に可溶性EGFRで2回のみ、静脈内追加刺激を与え、マウス20241には、-4日目及び-3日目に25 μ gのEGFRのRibiアジュバント溶液で2回、腹腔内免疫した。これら3回の融合の結果、46個のヒト γ 、 κ -抗原陽性ハイブリドーマ (表4を参照されたい) が生じた。アジュバントで腹腔内追加刺激を受けたマウス20241

のみが、35種の抗原特異的ヒトガンマカッパ抗体を生じた。

【0244】

【表4】

表 4

マウス	$\gamma/\kappa+$	$\gamma/\kappa+$	$\gamma1\kappa+$	$\gamma3\kappa+$
		EGFR+	EGFR+	EGFR+
20243	120	14	13	1
20242	35	2	2	0
20241	*	30	28	2

10

【0245】

実施例4 ハイブリドーマの調製

P3 X63 ag8.653 骨髓腫細胞株 (ATCC CRL 1580、ロットF-15183)を融合に用いた。最初のATCCバイアルを解凍し、培養で展開させた。凍結バイアルの種ストックをこの展開物から調製した。細胞の新鮮なバイアルを融合から1乃至2週前に解凍した。

20

【0246】

10% FBS、ペニシリン・ストレプトマイシン (シグマ社、P-7539)、及び 5.5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール (ギブコBRL、21985-023)を含有する高グルコースDMEM (セルグロ社メディアテック、#10013)を用いて、A431細胞及び骨髓腫細胞を培養した。3% オリジン・ハイブリドーマ・クローニング・ファクター (アイジェン社、21001)、OPI補助剤 (シグマ社、0-5003)、 1.1×10^{-3} オキサロ酢酸、 4.5×10^{-4} M のピルビン酸ナトリウム、及び 24国際単位/L ウシインシュリン、HAT (シグマ社、H 0262) 1.0×10^{-4} M ヒポキサンチン、 4.0×10^{-7} M アミノプテリン、 1.6×10^{-5} M チミジン、又はHT (シグマ社、H0137) 1.0×10^{-4} M ヒポキサンチン、 1.6×10^{-5} M チミジン を含有したハイブリドーマ成長培地に更なる培地補助剤を加えた。

30

【0247】

特徴付けされたウシ胎児血清 (SH30071 ロット#AJE10321 及びAGH6843) をユタ州ローガン、ハイクローン社から得た。無血清培地はDMEM、抗生物質及び2-メルカプトエタノールのみを含んだ。

【0248】

3匹のマウスすべての脾臓は大きさは正常であり、 2×10^7 乃至 1×10^8 個の脾細胞が得られた。脾細胞を融合した。

【0249】

ヒトIgG κ 抗体に関する最初のELISAスクリーニングを、融合後7乃至10日後に行った。ヒトIgG、 κ 陽性ウェルを、可溶性EGFRで被覆したELISAプレート上でスクリーニングした。抗原陽性ハイブリドーマを24ウェル・プレートに移し、最終的には組織培養フラスコに移した。EGFR特異的ハイブリドーマを限界希釈によりサブクローニングして、モノクローナル性を確認した。抗原陽性ハイブリドーマを、細胞をDMEM 10% FBSプラス10% DMSO (シグマ社、D2650) 又はオリゲン・フリーズ培地 (アイジェン社、#210002) 中で凍結させることにより、発生上の過程のいくつかの段階で保存した。細胞を -80°C 、又はLN₂中で保存した。

40

【0250】

次に、最初のEGFR特異的ハイブリドーマを、それらのエピトープ特異性と、EGFのEGFR受容体への結合遮断能について、評価した。マウスモノクローナル抗EGFR抗体225 及び52

50

8は、以前、EGFRに結合すること、EGFのEGFRへの結合を遮断すること、そして動物及びヒトでの実験で抗癌免疫治療作用物質であることが示されている。従って、免疫治療特性を持つヒト抗体を同定するために、これらの抗体を、競合的ELISAフォーマットで非遮断性抗体に加えて用いた。

【0251】

実施例5 結合親和性

ハイブリドーマ2F8の結合親和性をBIAcore 3000（スウェーデン、アプスラ、バイアコア社）を用いて判定した。シグマ社から購入したA431細胞から精製したEGFRをCM5 チップ上に、メーカーの指示通りに固定した。抗体2F8は $5.47 (\pm 0.52) \times 10^8 \text{M}^{-1}$ の平衡結合定数 (K_A) を有した。

【0252】

実施例6 競合的ELISA検定法

抗原陽性ハイブリドーマが24ウェル・プレート内で確立してすぐ、競合的ELISA検定法を最初の定性検定法として用いた。大まかには、強力な競合（80-100%）があることは、抗体が、競合する抗体と同じエピトープ又は、競合する抗体と近いところの抗原領域に結合することを示唆する。50%より低い競合率は、抗体及びその競合物質が、抗原のうちで近くない領域に結合することを示唆する。最初の検定は、その多くが1ウェル当たり100個を越えるハイブリドーマを含有した未クロンのハイブリドーマの上清を用いて行った。それ以降の検定は、最初のウェルのサブクローンをを用いて行った。図1及び2は、（図1及び2のデータは、MAb 225との競合程度に基づいて並べられている）粗細胞培養上清を用いた場合ですら、225及び528抗体と類似又は同一のエピトープに結合する抗体を特定できることを示す。またこの実験では、マウス20241由来又はマウス20242及び20243由来の抗体の競合的結合パターンの分布が異なることが明らかになった。例えば、#20241マウス由来の最初の7種の抗体（図1）は、MAb 225 及び528の両方と強く競合する。20241由来の残りの抗体は 225 及び528 抗体と中程度又は弱く、競合した。20242及び20243マウス由来の5種の抗体（1H6、2F8、1A8、5C5、及び8E1）は、強い競合を抗体225に対して示し、MAb 528由来のものには全く示さないか、又は弱い競合を示した（図2）。マウス20242及び20243由来の抗体2F6、8A12、5F12、6B3、及び6D9はMAb 225 及び528の両方と競合したが、その競合は225抗体との方がより強かった。これらのマウス由来の他の抗体は、市販のMAbとは競合しないか、又は弱く競合した。

【0253】

これら最初の競合的ELISAの結果を、サブクローンした細胞の生じた精製済み抗体で確認した。図3及び4は、抗体5F12及び6B3はMAb 225 及び 528の両方と強く競合することを示すが、互いに相互的な競合をも実証するものである。このデータは、これらの抗体が同じエピトープか、あるいは225もしくは528結合部位に近いEGFR分子領域に結合することを示す。抗体2F8はMAb 225と中程度に競合するが、抗体528とは大きくは競合しない（図3及び4）。しかしながら、抗体2F8、6B3及び5F12は強い交差競合性を示す。このデータは、抗体2F8が225及び528抗体とは別のエピトープに結合すること、そしてHuMAb6B3及び5F12が結合するエピトープと隣り合った又は重複するEGFR受容体領域に結合すること、を示している。抗体2A2及び6E9はいずれのMAbとも競合せず、225及び528MAbの結合部位とは関係のないEGFRエピトープに結合する（図3及び4）。

【0254】

実施例7 EGF/EGFR遮断検定

さらに抗原陽性サブクローンをEGF/EGFR遮断検定法で評価した。これらの検定法には、MAb 225 及び／又は 528と強力に競合する抗体や、225又は528に対し弱競合性又は非競合性の抗体のサブクローンが含まれた。いくつかの抗体を培地で展開させ、プロテインAクロマトグラフィで精製した。図5及び6は、ELISAでは225抗体の中程度乃至強力な競合物質である抗体2F8、5F12、及び6B3が、EGFのEGFRへの結合の強力な遮断剤であることを示す。これは、ヒトA431類上皮腫瘍細胞によるELISAフォーマット又はFACSで行った検定でも明白である。両方の検定で、これらヒト抗体はMAb 225と同程度又はより良好であった

。抗体2F8、5F12、6B3、及び6E9はまた、A431細胞の表面に対しても同様な結合特性を有する（図7）。

【0255】

in vitro EGF/EGFR 遮断及びELISA 競合実験では、2F8、5F12、及び6B3抗体は、免疫治療作用物質であることが示されている他の抗EGFRマウス及びヒト抗体と同様な特性を有することが実証された(Sato, et al. (1983) Mol. Biol. Med. 511-529; Gill, et al. (1984) J. of Biol. Chem. 259(12):7755-7760)。2F8抗体は、様々な評価にわたって、6B3及び5F12抗体と同様又はより良好であった。

【0256】

実施例8 EGF受容体に対するヒトモノクローナル抗体を用いた、EGF受容体へのEGF/TGF- α の結合の阻害

A431細胞に対し、フローサイトメトリ、ELISA、及び、リガンド誘導性自己リン酸化の阻害を用いて阻害実験を行った。マウスMAb 225 又は 525を陽性コントロールとして用いた。無関係のヒトIgG アイソタイプ・コントロールをアイソタイプ・コントロールとして用いた。一種類のヒト抗体2F8を更なる実験のすべてに選択した。この抗体をここでは「Humax-EGFRTM」とも言及する。図8は、2F8の濃度依存的なEGF遮断能を示す。2F8 及びm225は同じ程度に遮断するが、EGFの遮断能の方が小さい。

【0257】

図9は、2F8の遮断能を、EGF及びTGF- α のA431細胞（卵巣類上皮腫を由来とし、 1×10^6 を越えるEGFR分子をその細胞表面上に発現する細胞）への結合をそれが効率的に阻害する点でさらに示す。2F8のA431細胞への結合の阻害は、フローサイトメトリ分析を用いて判定した。細胞は、5（白抜き棒）又は50 $\mu\text{g/ml}$ （黒く塗りつぶした棒）のリガンドのいずれかと一緒に予めインキュベートしてから、2F8を加えた。リガンドなし（PBS群）の場合の抗体の結合を100%とした。これらの結果は、2F8が、EGFR上で当該リガンドと近い部位又は同じ部位で結合することを示す。

【0258】

実施例9 EGF受容体に対するヒトモノクローナル抗体を用いた腫瘍細胞活性化の阻害

2F8の腫瘍細胞活性化阻害能を評価するために、EGF惹起性細胞応答、例えば内因性チロシンキナーゼ活性の活性化及び随伴性の細胞増殖など、に2F8 が及ぼす影響を調べた。EGF又はTGF- α がEGFRに結合した後に起きる最初の事象の1つは、受容体の自己リン酸化の誘導である。EGFをA431細胞と一緒にインキュベートすると、EGFRのチロシンリン酸化が起きる(M_r 170,000)（図10A）。2F8は受容体キナーゼ活性自体は活性化しなかったが、この抗体はEGF惹起性EGFRチロシンリン酸化を用量依存的態様で遮断し、完全な遮断は濃度が16.6 nM（抗体：EGF モル比、20:1、図10A）のときに起きた。細胞を抗体で処理すると、TGF- α は、チロシンリン酸化は2F8により濃度66 nM（抗体：TGF- α モル比、7,3:1、図10B）のときに完全に遮断されたことを示した。

【0259】

EGF/TGF- α が受容体に結合すると細胞活性化が起きるが、これは細胞増殖に反映される。従って2F8が腫瘍細胞(A431、MDA-MD-468 及び HN5 細胞)の成長に及ぼす阻害作用 を評価した。当該の実験は外因性EGFの非存在下で行った。マウス抗体を比較として用いた。Humax-EGFR はA431細胞の成長を濃度依存的態様で阻害し、最大の阻害値は50%であり、マウス抗体225で得られたそれと同様のレベルであった（図14）。コントロール抗体は細胞増殖に何ら影響を及ぼさなかった（図14）。さらに成長の阻害は2種の他の細胞株でも同様なレベル（HN5及びMDA-MB468、パネルB及びC）で得られた。外因性EGFは培養株に全く添加されなかったため、これらの結果は、2F8の自己分泌刺激遮断能、ひいては自己分泌EGF/TGF- α 誘導性腫瘍細胞活性化の阻害能を示すものである。

【0260】

実施例10 EGF受容体に対するヒトモノクローナル抗体はADCCを誘導する

ADCCは腫瘍細胞を抗体が認識したときに惹起される強力な免疫エフェクター機序である。2F8の存在下におけるヒトPMN細胞のA431細胞致死能を評価するために、A431細胞に ^{51}Cr

10

20

30

40

50

を取り込ませた後、抗体及びエフェクタ細胞（PMN）と一緒に一晚、インキュベートした。インキュベート後、クロム放出を測定した。図 1 4 に示すように、2F8 はヒト PMN を用いて A431 細胞に対する ADCC を誘導することができる。2F8 は A431 標的細胞の 45% に PMN 誘導性溶解を媒介することができ、この率は、Mab 425 で観察されるものより高い（図 1 4）。

【0 2 6 1】

重要なことに、2F8 は免疫エフェクター細胞を動員し、ADCC を誘導することはできるが、腫瘍細胞の補体媒介性溶解を誘導することはできない。

【0 2 6 2】

実施例 1 1 EGF 受容体に対するヒトモノクローナル抗体は腫瘍形成を妨げる

HuMab 2F8 が腫瘍形成を妨げる能力を無胸腺マウスモデルで示すために、6（6）匹のマウスのグループに、0（0）日目に 200 μ l の PBS に入れた 3×10^6 個の腫瘍細胞を脇腹に皮下注射した。その後、マウスに 1 日目（75 μ g/200 μ l）、3 日目（25 μ g/200 μ l）、及び 5 日目（25 μ g/200 μ l）（矢印）に、腹腔内 HuMab 2F8（塗りつぶした四角）又はコントロールとしてヒト IgG1- κ MAb（白抜き丸）のいずれかと一緒に注射した（図 1 4）。データを平均腫瘍体積 + SEM として提示し、同様な結果を示した 3 つの個別の実験の代表とする。

【0 2 6 3】

HuMab 2F8 による樹立 A431 腫瘍異種移植片の根絶を m225 に比較して図 1 4 に示す。マウスの脇腹に 200 μ l の PBS に入れた 3×10^6 個の腫瘍細胞をゼロ（0）日目に皮下注射した。10 日目にマウスを無作為に処置グループに振り分け、12 日目（75 μ g/200 μ l）、14 日目（25 μ g/200 μ l）、及び 16 日目（25 μ g/200 μ l）（矢印）に、HuMab 2F8（塗りつぶした四角、2F8 短期）又はマウス抗 EGFR MAb m225（塗りつぶした三角、m225 短期）で、処置した。さらに、12 日目に 75 μ g/200 μ l の HuMab 2F8 又は m225 を投与した後、14、16、19、22、26、29、33、36、及び 40 日目に 25 μ g/200 μ l の HuMab 2F8 又は m225 を投与した（白抜き四角、2F8 長期；白抜き三角、m225 長期）グループも含めた。データは平均腫瘍体積 + SEM で表し、同様な結果を示した 3 つの個別の実験を表す。黒い矢印は短期処置の処置日を示し、白抜き矢印は長期処置の処置日を示す。

【0 2 6 4】

同等物

当業者であれば、ごく慣例的な実験を用いるのみで、ここに解説した本発明の具体的な実施例の同等物を数多く認識され、又は確認できることであろう。このような同等物は以下の請求の範囲の包含するところと意図されている。

【0 2 6 5】

引用による援用

ここに引用された全ての特許、係属中の特許出願及び他の公開文献を、引用をもってその全文をここに援用することとする。

【図面の簡単な説明】

【0 2 6 6】

【図 1】図 1 は、マウス 20241 由来のハイブリドーマ上清、対、マウスモノクローナル抗 EGFR MAb 225、528、及び AB5 の競合的 ELISA を示すグラフである。

【図 2】図 2 は、マウス 20242 及び 20243 由来のヒト抗体上清、対、マウスモノクローナル抗 EGFR MAb 225、528、及び AB5 の競合的 ELISA を示すグラフである。

【図 3】図 3 は、精製済みヒト抗体、対、マウスモノクローナル抗 EGFR MAb 225 及び 528 の競合的 ELISA を示すグラフである。

【図 4】図 4 A、4 B、4 C、及び 4 D は、HuMab (A) 6B3、(B) 5F12、(C) 2F8、及び (D) 2A2 を用いた競合的 ELISA を示すグラフである。

【図 5】図 5 A 及び 5 B は、抗 EGFR HuMab 及びマウス MAb (ELISA フォーマット) による、EGF-ビオチンの EGFR への結合の阻害を示すグラフである。

【図 6】図 6 は、抗 EGFR HuMab 及びマウス MAb による EGF ビオチンの、A431 細胞上の EGFR への結合の阻害を示すグラフである。

【図 7】図 7 は、A431細胞における抗EGFR HuMAb の抗体価を示すグラフである。

【図 8】図 8 は、精製済み及び天然EGFRに対するEGFの結合を阻害する上での2F8の能力を示すグラフである。2F8 (ダイヤ)、マウス225 (四角)、EGF (三角) 又はヒトIgG1 カップ・アイソタイプ・コントロール (黒丸)の作用を、固定されたEGFRに対するEGF-ビオチンの結合で測定している。図 8 に示すように、2F8は、225 (30 nMのIC50) よりも有意に低い17nMのIC50でEGF-ビオチンの結合を阻害することができる。

【図 9】図 9 は、A431細胞に対するEGF及びTGF- α の結合を阻害する上での2F8の能力を示す棒グラフである。A431細胞は、卵巣類上皮腫由来であり、 1×10^6 を越えるEGFR分子をそれらの細胞表面上に発現する。2F8によるA431細胞への結合阻害能を、フローサイトメータ分析を用いて判定した。細胞を5 (白抜き棒) 又は50 $\mu\text{g/ml}$ (塗りつぶした棒) のいずれかのリガンドと一緒に予めインキュベートしてから2F8を加えた。リガンドなしの場合 (PBS群) の抗体の結合を 100%と指定した。図示のように、EGF及び TGF- α のA431細胞への結合は2F8により効率的に遮断される。これらの結果は、2F8がEGFR上の、リガンドに近い、又は、同じ部位に結合することを示している。

【図 10】図 10 A 及び 10 B は、モノクローナル抗EGFRがA431細胞の自己リン酸化に及ぼす作用を示す。血清を枯渇させたサブコンフルエントA431細胞を方法の項で示したように様々な抗体(10 $\mu\text{g/ml}$)で処理し、EGF (A) 又はTGF- α (B)で刺激し、抽出した。EGFRのリン酸化は、SDS-PAGE及び抗ホスホチロシン抗体を用いた免疫ブロット法で分析した。

【図 11】図 11 A、11 B、及び 11 C は、抗EGFRヒト抗体によるEGFR発現腫瘍細胞株の成長阻害を示すグラフである。EGFR発現腫瘍細胞株A431 (A)、HN5 (B) 及びMDA-MB-468 (C)を、多様な濃度のHuMAb 2F8 (四角)、5C5 (三角)、6E9 (十字)、2A2 (ダイヤ) 抗体陰性コントロール抗CTLA4 (白抜き丸)、抗体陽性コントロール225 (塗りつぶした丸) 又は培地のみ (コントロール) と一緒に7 (7) 日間、インキュベートした。その後、細胞成長を、固定細胞のクリスタル・バイオレット染色を用いて評価した。成長阻害率を、培地のみのコントロールに存在するタンパク質量に比較したときの、7 (7) 日間のインキュベーション後に残ったタンパク質量として計算した。データは三連の測定値を表し、様々な日に行った3つの実験の代表である。

【図 12】図 12 は、ヒトPMN媒介性抗体依存的細胞傷害性を示すグラフである。PMNは解説した通りに単離された。 ^{51}Cr で標識したA431細胞を96ウェル平底プレートにプレートした。PMNはエフェクター：標的比が100:1になるように加え、抗体は様々な濃度で加えた。一晩のインキュベート後、 ^{51}Cr 放出を測定した。

【図 13】図 13 は、無胸腺マウスモデルにおけるHuMAb 2F8による腫瘍形成の防止を示すグラフである。6 (6) 匹のマウスのグループに、 3×10^6 個の腫瘍細胞を200 μl のPBSに入れてゼロ日目 (0) に脇腹に皮下注射した。その後、マウスに1日目 (75 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$)、3日目 (25 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$)、及び5日目 (25 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$) (矢印) に、腹腔内HuMAb 2F8 (塗りつぶした四角) 又はコントロールとしてヒトIgG1- κ MAb (白抜き丸) のいずれかと一緒に腹腔内注射した。データを平均腫瘍体積+SEMとして提示し、同様な結果を示した3つの個別の実験の代表とした。

【図 14】図 14 は、HuMAb 2F8による樹立A431腫瘍異種移植片の根絶を、マウス抗EGFR MAb (m225) に比較して示すグラフである。マウスの脇腹に200 μl のPBSに入れた 3×10^6 個の腫瘍細胞をゼロ (0) 日目に皮下注射した。10日目にマウスを無作為に処置グループに振り分け、12日目 (75 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$)、14日目 (25 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$)、及び16日目 (25 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$) (矢印) に、HuMAb 2F8 (塗りつぶした四角、2F8短期) 又はマウス抗EGFR MAb 225 (塗りつぶした三角、m225短期) で、処置した。さらに、12日目に75 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ のHuMAb 2F8 又は m225を投与した後、14、16、19、22、26、29、33、36、及び40日目に25 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ の HuMAb 2F8 又は m225 を投与した (白抜き四角、2F8長期；白抜き三角、m225長期)グループも含めた。データは平均腫瘍体積+SEMで表し、同様な結果を示した3つの個別の実験の代表とした。黒い矢印は短期処置の処置日を示し、白抜き矢印は長期処置の処置日を示す。

【図 15】図 15 A 及び 15 B は、2F8の V_H -及び V_L -領域の配列を、CDR領域を指定して示

10

20

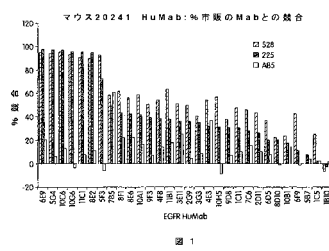
30

40

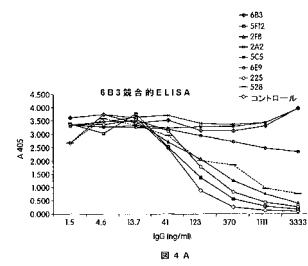
50

す。

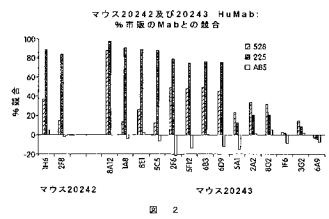
【図 1】



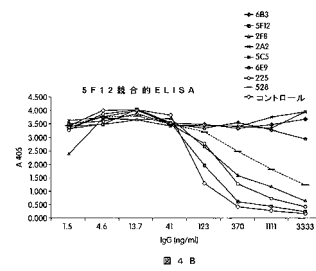
【図 4 A】



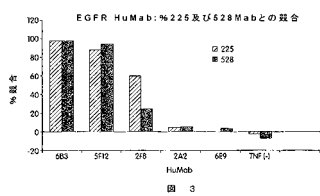
【図 2】



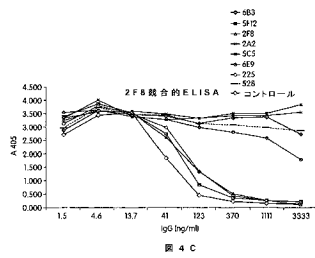
【図 4 B】



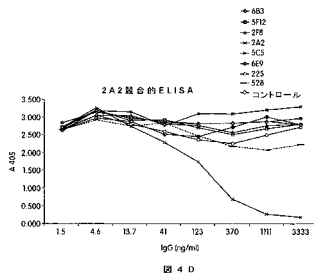
【図 3】



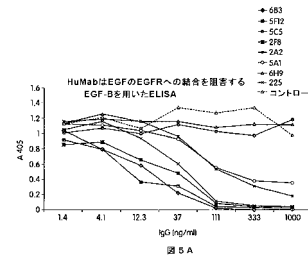
【図 4 C】



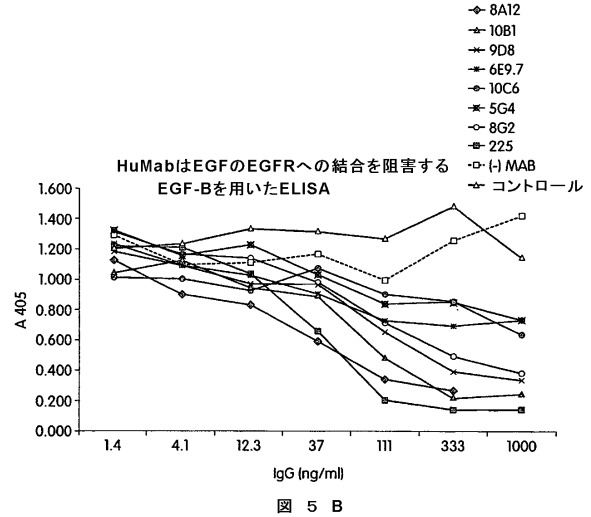
【図 4 D】



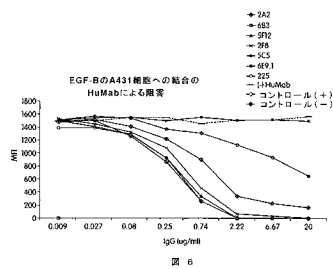
【図 5 A】



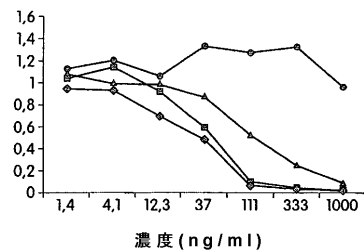
【図 5 B】



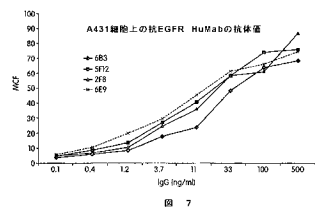
【図 6】



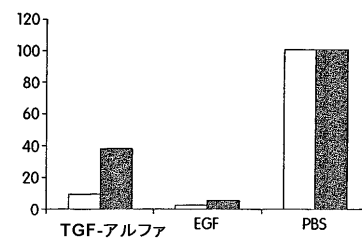
【図 8】



【図 7】



【図 9】



【図 10】

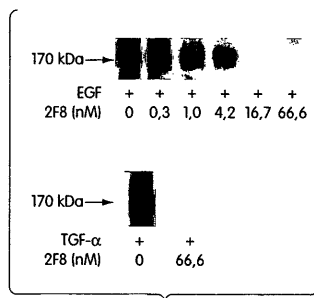
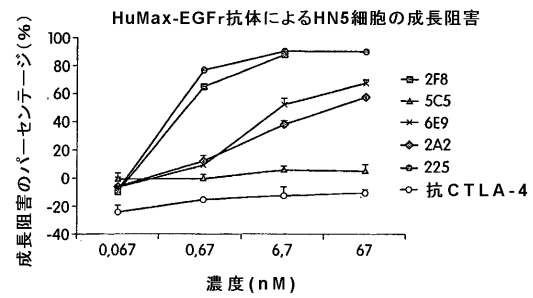


図 10

【図 11 B】



【図 11 C】

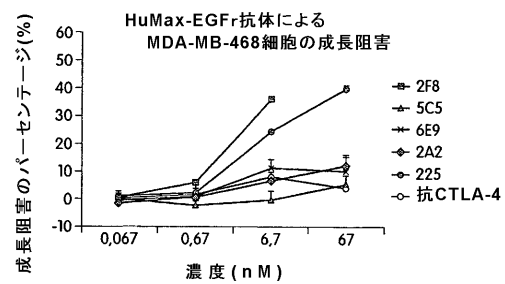


図 11 C

【図 11 A】

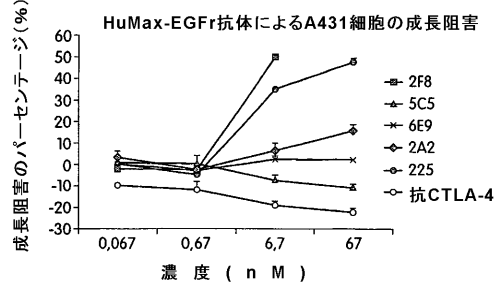


図 11 A

【図 12】

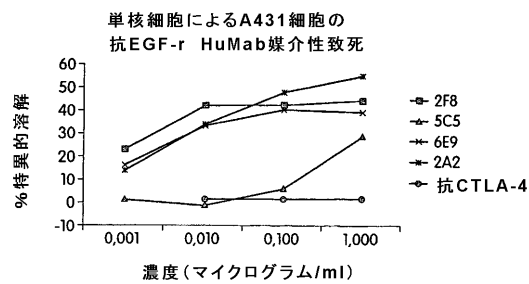


図 12

【図 14】

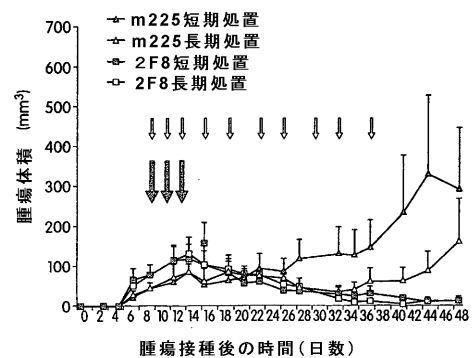


図 14

【図 13】

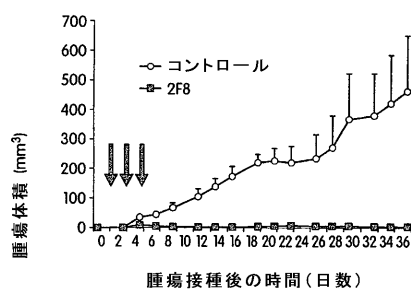


図 13

【図 15 A】

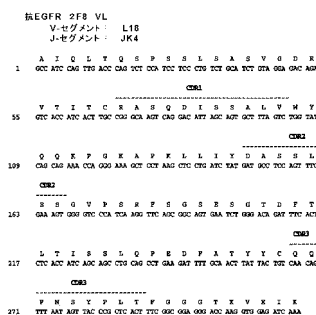


図 15 A

【図15B】

REGFR 2F8 VH
V-セグメント: VH3-33
D-セグメント: D3-10
J-セグメント: JK4b

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
GAG GTG CAG CTG GTG GAG TGT GGG GGA GGC GTG GTC CAG GTT GGG AGG TGT CTG

CSB1

55 R L S C A A S G F T F S Y Y G M H H
AGA CTG TGT TGT GCA GAG TCT GGA TTC ACU TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAG TGG

CSB2

109 V R Q A P G K G L E W V A V I H D S
GTG GAG CAG GTT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG GAT GAT

CSB3

163 Q S T E Y T G S S V K G R F T I S S
GGA AGT TAT AAA TAC TAT GGA GAC TTC GTG AAG GGC CAA TTC AGC ATC TGC AGA

CSB4

217 D N S K N T L Y L Q M H S L R A E D
GAC AAT TTC AAG AAG ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GGC GAG GAC

CSB5

271 T A V Y V C A R D G I T M V R Q V R
ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GAT ATG AAT ATG GTT GAG GGA GTT ATG

CSB6

325 E D V F P D V W G O G T L V T V S S
AAG GAC TAC TTT GAC TAC TGG GGT GAG GGA ACG CTG GTG ACG GTG TTC TCA

図15B

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 B
C 1 2 N 15/02 (2006.01) C 1 2 N 15/00 C
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08
- (74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
- (72)発明者 ファン デ ウィンケル, ヤン
 オランダ ザイスト セーカー 3707 フェルレングデ スロットラーン 80
- (72)発明者 ファン ダイク, マルクス, アー.
 オランダ ビルトホーフェン エンエルー 3722 ゼットハー ハイラーン 16
- (72)発明者 ヒェリッツェン, アルナウト, エフ.
 オランダ ベンニク エンエルー 3981 テイベー フンデルコーペルスフック 31
- (72)発明者 ハーク, エドワード
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94087 サニーベール エドモンズ コート 1004

審査官 富永 みどり

- (56)参考文献 特開平02-291295 (JP, A)
 国際公開第01/025492 (WO, A1)
 国際公開第01/009187 (WO, A1)
 Cancer Res., 1999年, Vol.59, No.6, p.1236-1243
 J.Immunol.Methods, 2001年, Vol.248, No.1/2, p.17-30

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq
 SwissProt/PIR/GeneSeq
 PubMed
 JSTPlus(JDreamII)
 BIOSIS/WPI(DIALOG)