

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6632984号  
(P6632984)

(45) 発行日 令和2年1月22日(2020.1.22)

(24) 登録日 令和1年12月20日 (2019.12.20)

(51) Int.Cl.		F I			
<b>C07K</b>	<b>16/28</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C07K</b>	<b>16/28</b>	Z N A
<b>C12N</b>	<b>15/13</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C12N</b>	<b>15/13</b>	
<b>C12P</b>	<b>21/08</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C12P</b>	<b>21/08</b>	
<b>A61K</b>	<b>45/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61K</b>	<b>45/00</b>	
<b>A61P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A61P</b>	<b>35/00</b>	

請求項の数 24 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-553491 (P2016-553491)
(86) (22) 出願日	平成27年3月10日 (2015. 3. 10)
(65) 公表番号	特表2017-510559 (P2017-510559A)
(43) 公表日	平成29年4月13日 (2017. 4. 13)
(86) 國際出願番号	PCT/US2015/019722
(87) 國際公開番号	W02015/138460
(87) 國際公開日	平成27年9月17日 (2015. 9. 17)
審査請求日	平成30年3月9日 (2018. 3. 9)
(31) 優先権主張番号	61/950, 963
(32) 優先日	平成26年3月11日 (2014. 3. 11)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)

(73) 特許権者 597160510  
リジェネロン・ファーマシューティカルズ  
・インコーポレイテッド  
REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.  
アメリカ合衆国 10591-6707 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソーミル・リバー・ロード 777 番  
(74) 代理人 100078282  
弁理士 山本 秀策  
(74) 代理人 100113413  
弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗EGFRvIII抗体およびその使用

### (57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト E G F R V I I I に特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合性断片であって、重鎖可変領域（H C V R）および軽鎖可変領域（L C V R）を含み、前記 H C V R が、配列番号 3 4 のアミノ酸配列に含有される 3 個の相補性決定領域（C D R）、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含み、前記 L C V R が、配列番号 4 2 のアミノ酸配列に含有される 3 個の C D R、L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項2】

H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 が、それぞれ配列番号 3 6、3 8 および 4 0 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。 10

【請求項3】

L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 が、それぞれ配列番号 44、46 および 48 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

#### 【請求項4】

配列番号 3 6 / 3 8 / 4 0 / 4 4 / 4 6 / 4 8 の H C D R 1 / H C D R 2 / H C D R 3 / L C D R 1 / L C D R 2 / L C D R 3 のアミノ酸配列の組み合わせを含む、請求項 1に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 5】

前記 H C V R が、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の抗体またはそ

の抗原結合性断片。

【請求項 6】

前記 L C V R が、配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 7】

配列番号 3 4 / 4 2 の H C V R / L C V R 配列ペアを含む、請求項 4 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の抗体またはその抗原結合性断片と同じ E G F R v I I I 上のエピトープに結合する、抗体またはその抗原結合性断片。 10

【請求項 9】

E G F R v I I I への結合に関して請求項 7 に記載の抗体またはその抗原結合性断片と競合する、抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 10】

細胞毒にコンジュゲートされている、請求項 1 または請求項 4 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 11】

前記細胞毒が、生体毒素、化学療法剤および放射性同位体からなる群より選択される、請求項 1 0 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。 20

【請求項 12】

前記細胞毒が、マイタンシノイド、オーリスタチン、トメイマイシン、デュオカルマイシン、<sup>2 2 5</sup> A c、<sup>2 2 7</sup> T h およびこれらのいずれかの誘導体からなる群より選択される、請求項 1 0 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 13】

請求項 1 または請求項 4 に記載の抗体またはその抗原結合性断片と、薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物。

【請求項 14】

化学療法剤、抗炎症剤および鎮痛薬からなる群より選択される 1 種または複数の追加的な治療剤をさらに含む、請求項 1 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

E G F R v I I I を発現するがんまたは腫瘍を処置するための、請求項 1 3 に記載の薬学的組成物。 30

【請求項 16】

前記がんまたは前記腫瘍が、神経膠芽腫、乳管または乳管内乳癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺がんおよび頭頸部の扁平上皮細胞癌からなる群より選択される、請求項 1 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

患者におけるがんを処置するため、腫瘍成長を低下させるため、および / または腫瘍退縮を引き起こすための請求項 1 3 に記載の薬学的組成物であって、抗体またはその抗原結合性断片および細胞毒を含む第 1 の抗体 - 薬物コンジュゲート (A D C) を含み、前記第 1 の A D C の前記抗体または前記抗原結合性断片が、E G F R v I I I に特異的に結合するが、配列番号 1 4 8 の接合部ペプチドにも配列番号 1 6 5 のペプチドにも結合しない、薬学的組成物。 40

【請求項 18】

抗体またはその抗原結合性断片および細胞毒を含む第 2 の A D C をさらに含み、前記第 2 の A D C の前記抗体または前記抗原結合性断片が、E G F R v I I I に特異的に結合し、かつ配列番号 1 4 8 の接合部ペプチドおよび / または配列番号 1 6 5 のペプチドにも結合する、請求項 1 7 に記載の薬学的組成物。

【請求項 19】

前記第 1 の A D C の前記抗体または前記その抗原結合性断片が、配列番号 3 6 、 3 8 、 50

40、44、46および48を含む重鎖相補性決定領域および軽鎖相補性決定領域を含む、請求項17に記載の薬学的組成物。

**【請求項20】**

前記第1のADCの前記抗体または前記その抗原結合性断片が、配列番号34を含む重鎖可変領域と、配列番号42を含む軽鎖可変領域とを含む、請求項19に記載の薬学的組成物。

**【請求項21】**

前記細胞毒がマイタンシノイドである、請求項17に記載の薬学的組成物。

**【請求項22】**

前記細胞毒が、1-(2クロロエチル)-1,2-ジメタンスルホニルヒドラジド、1,8-ジヒドロキシ-ビシクロ[7.3.1]トリデカ-4,9-ジエン-2,6-ジイン-13-オン、1-デヒドロテストステロン、5-フルオロウラシル、6-メルカブトプリン、6-チオグアニン、9-アミノカンプトシン、アクチノマイシンD、アマニチン、アミノブテリン、アンゲイジン、アントラサイクリン、アントラマイシン(AMC)、オーリスタチン、ブレオマイシン、ブスルファン、酪酸、カリチアマイシン、カンプトシン、カルミノマイシン、カルムスチン、セマドチン、시스プラチン、コルヒチン、コンプレタスタチン、シクロホスファミド、シタラビン、サイトカラシンB、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ダカルバジン、ジアセトキシベンチルドキソルビシン、ジプロモマンニトール、ジヒドロキシアントラシンジオン、ジソラゾール、ドラスタチン、ドキソルビシン、デュオカルマイシン、エキノマイシン、エリュテロビン、エメチン、エポチロン、エスペラミシン、エストラムスチン、エチジウムプロマイド、エトボシド、フルオロウラシル、ゲルダナマイシン、グラミシジンD、グルココルチコイド、イリノテカン、レプトマイシン、ロイロシン、リドカイン、ロムスチン(CCNU)、マイタンシノイド、メクロレタミン、メルファラン、メルカブトプリン、メトブテリン、メトレキセート、ミスラマイシン、マイトイマイシン、ミトキサントロン、N8-アセチルスペルミジン、ボドフィロトキシン、プロカイン、プロプラノロール、ブテリジン、ピューロマイシン、ピロロベンゾジアゼピン(PDB)、リゾキシン、ストレプトゾトシン、タリソマイシン、タキソール、テニポシド、テトラカイン、チオテバ、クロラムブシル、トメイマイシン、トポテカン、ツブリシン、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビンおよびその誘導体からなる群から選択される、請求項10に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

10

20

30

**【請求項23】**

前記細胞毒がマイタンシノイドである、請求項10に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

**【請求項24】**

前記細胞毒がDM1である、請求項10に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

本発明は、ヒト上皮増殖因子受容体(EGFR)の欠失変異体、特に、クラスIIII欠失変異体、EGFRvIIIに特異的に結合するヒト抗体およびヒト抗体の抗原結合性断片、ならびにこれらの抗体を使用する治療および診断方法に関する。

40

**【背景技術】**

**【0002】**

上皮増殖因子(EGF)受容体すなわちEGFRの過剰発現および/または遺伝子增幅は、乳房、卵巣、膀胱、脳における腫瘍および様々な扁平上皮癌を含む複数のヒト腫瘍において報告された(Wong, A. J.ら、1987年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84巻：6899～6903頁；Harrisら、1992年、Natl. Cancer Inst. Monogr.、11巻：181～187頁)。しかし、多くの正常組織もこの受容体を発現し、新生物標的と共に標的化され得

50

るため、抗新生物治療方法としてのEGFRの標的化には問題があった。一方、EGFR遺伝子増幅を有する多くの神経膠芽腫が、遺伝子再編成を頻繁に含有することが報告された(Ekstrand, A.J.ら、1992年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻：4309～4313頁；Wong A.J.ら、1992年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻：2965～2969頁)。一研究において、44種の神経膠芽腫のうち17種が、EGFRコード配列に1個または複数の変更を有することが見いだされ、これらの症例の全てが、増幅されたEGFRを含有した一方、遺伝子増幅がない22症例はいずれも、いかなる腫瘍特異的配列異常も示さなかった(Frederick, L.ら、2000年、Cancer Res. 60巻：1383～1387頁)。同研究は、個々の腫瘍において複数の種類のEGFR変異を検出することができたことも示した。

EGFRのクラスII改変体(EGFRvIII)は、神経膠芽腫において最も頻繁に見出されるEGFR改変体である(Bignerら、1990年、Cancer Res. 50巻：8017～8022頁；Humphreyら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87巻：4207～4211頁；Yamazakiら、1990年、Jap. J. Cancer Res. 81巻：773～779頁；Ekstrandら、1992年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89巻：4309～4313頁；Wikstrandら、1995年、Cancer Res. 55巻：3140～3148頁；およびFrederickら、2000年、Cancer Res. 60巻：1383～1387頁)。EGFRvIIIは、EGFR遺伝子のエクソン2～7の欠失によって特徴付けられ、これは、コード領域の801塩基対のインフレーム欠失、すなわち、6～273アミノ酸残基の欠失(成熟EGFRの残基番号に基づく)、ならびに融合接合部における新たなグリシンの生成をもたらす(Humphreyら、1988年、Cancer Res. 48巻：2231～2238頁；Yamazakiら、1990年、上記参照)。EGFRvIIIは、リガンド非依存性の、弱いが構成的活性型のキナーゼ活性と、増強された腫瘍形成能を有することが示された(Nishikawaら、1994年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91巻：7727～7731頁；およびBatraら、1995年、Cell Growth and Differentiation 6巻：1251～1259頁)。神経膠腫に加えて、EGFRvIIIは、乳管(ductal)および乳管内乳癌(Wikstrandら、1995年、Cancer Res. 55巻：3140～3148頁)、非小細胞肺癌(Garcia de Palazzoら、1993年、Cancer Res. 53巻：3217～3220頁)、卵巣癌(Moscateilloら、1995年、Cancer Res. 55巻：5536～5539頁)、前立腺がん(Olapade-Olaopaら、2000年、British J. Cancer 82巻：186～194頁)ならびに頭頸部の扁平上皮細胞癌(Tinnoferら、2011年、Clin. Cancer Res. 17巻(15号)：5197～5204頁)において検出されている。対照的に、上述および他の研究は、正常組織が、EGFRvIIIを発現しないことを報告する(Garcia de Palazzoら、1993年、上記参照；Wikstrandら、1995年、上記参照；およびWikstrandら、1998年、J. Neuro Virol. 4巻：148～158頁)。EGFRvIIIの高度に腫瘍特異的な性質は、EGFRvIIIを、この分子を発現するがんおよび腫瘍の処置に特に有用な標的とする。

ヒトEGFRの核酸およびアミノ酸配列を、それぞれ配列番号145および146に示し、EGFRvIIIのアミノ酸配列を、配列番号147に示す。EGFRvIIIに対する抗体は、例えば、US5, 212, 290、US7, 736, 644、US7, 589, 180およびUS7, 767, 792に記載されている。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0003】

10

20

30

40

50

【特許文献 1】米国特許第 5 , 2 1 2 , 2 9 0 号明細書

【特許文献 2】米国特許第 7 , 7 3 6 , 6 4 4 号明細書

【非特許文献】

【0 0 0 4】

【非特許文献 1】Wong , A . J . ら、 Proc . Natl . Acad . Sci . U S A ( 1 9 8 7 年 ) 8 4 卷 : 6 8 9 9 ~ 6 9 0 3 頁

【非特許文献 2】Harris ら、 Natl . Cancer Inst . Monogr . ( 1 9 9 2 年 ) 1 1 卷 : 1 8 1 ~ 1 8 7 頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0 0 0 5】

本発明は、 E G F R v I I I に結合する抗体およびその抗原結合性断片を提供する。本発明の抗体は、 E G F R v I I I を発現する腫瘍細胞の標的化にとりわけ有用である。本発明の抗 E G F R v I I I 抗体およびその抗原結合ポーションは、非修飾型で単独で使用しても、抗体 - 薬物コンジュゲートまたは二重特異的抗体の一部として含まれていてよい。

【0 0 0 6】

本発明の抗体は、全長(例えば、 I g G 1 または I g G 4 抗体)であっても、あるいは抗原結合ポーション(例えば、 F a b 、 F ( a b ' )<sub>2</sub> または s c F v 断片)のみを含んでいてもよく、機能性に影響を及ぼすよう、例えば、残存エフェクター機能を排除するよう修飾されていてよい( Reddy ら、( 2 0 0 0 年 ) 、 J . Immunol . 1 6 4 卷 : 1 9 2 5 ~ 1 9 3 3 頁)。

20

【0 0 0 7】

本発明の例示的な抗 E G F R v I I I 抗体は、本明細書における表 1 および 2 に列挙されている。表 1 は、例示的な抗 E G F R v I I I 抗体の重鎖可変領域( H C V R )、軽鎖可変領域( L C V R )、重鎖相補性決定領域( H C D R 1 、 H C D R 2 および H C D R 3 )および軽鎖相補性決定領域( L C D R 1 、 L C D R 2 および L C D R 3 )のアミノ酸配列識別子を表記する。表 2 は、例示的な抗 E G F R v I I I 抗体の H C V R 、 L C V R 、 H C D R 1 、 H C D R 2 、 H C D R 3 、 L C D R 1 、 L C D R 2 および L C D R 3 の核酸配列識別子を表記する。

30

【0 0 0 8】

本発明は、表 1 に列挙されている H C V R アミノ酸配列またはそれに対し少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % 配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む H C V R を含む、 E G F R v I I I に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【0 0 0 9】

本発明は、表 1 に列挙されている L C V R アミノ酸配列またはそれに対し少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 8 % もしくは少なくとも 9 9 % 配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む L C V R を含む、 E G F R v I I I に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

40

【0 0 1 0】

本発明は、表 1 に列挙されている L C V R アミノ酸配列のいずれかとペアを組んだ表 1 に列挙されている H C V R アミノ酸配列のいずれかを含む H C V R および L C V R アミノ酸配列ペア( H C V R / L C V R )を含む、 E G F R v I I I に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も提供する。ある特定の実施形態によると、本発明は、表 1 に列挙されている例示的な抗 E G F R v I I I 抗体のいずれかの内に含有される H C V R / L C V R アミノ酸配列ペアを含む、抗体またはその抗原結合性断片を提供する。ある特定の実施形態では、 H C V R / L C V R アミノ酸配列ペアは、 2 / 2 0 、 1 8 / 2 6 、 3 4 / 4 2 、 5 0 / 5 8 、 6 6 / 7 4 、 8 2 / 9 0 、 9 8 / 1 0 6 、 1 1 4 / 1 2 2 および 1 3 0 / 1 3 8 からなる群より選択される。

50

## 【0011】

本発明は、表1に列挙されているHCDR1アミノ酸配列または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1(HCDR1)を含む、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も提供する。

## 【0012】

本発明は、表1に列挙されているHCDR2アミノ酸配列または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2(HCDR2)を含む、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も提供する。10

## 【0013】

本発明は、表1に列挙されているHCDR3アミノ酸配列または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3(HCDR3)を含む、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も提供する。

## 【0014】

本発明は、表1に列挙されているLCDR1アミノ酸配列または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1(LCDR1)を含む、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も提供する。20

## 【0015】

本発明は、表1に列挙されているLCDR2アミノ酸配列または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2(LCDR2)を含む、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も提供する。30

## 【0016】

本発明は、表1に列挙されているLCDR3アミノ酸配列または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3(LCDR3)を含む、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も提供する。

## 【0017】

本発明は、表1に列挙されているLCDR3アミノ酸配列のいずれかとペアを組んだ表1に列挙されているHCDR3アミノ酸配列のいずれかを含むHCDR3およびLCDR3アミノ酸配列ペア(HCDR3/LCDR3)を含む、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も提供する。ある特定の実施形態によると、本発明は、表1に列挙されている例示的な抗EGFRvIII抗体のいずれかの内に含有されるHCDR3/LCDR3アミノ酸配列ペアを含む抗体またはその抗原結合性断片を提供する。40

## 【0018】

本発明は、表1に列挙されている例示的な抗EGFRvIII抗体のいずれかの内に含有される6個のCDR(すなわち、HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)のセットを含む、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も提供する。ある特定の実施形態では、HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3アミノ酸配列セットは、4-6-850

- 1 2 - 1 4 - 1 6 ; 2 0 - 2 2 - 2 4 - 2 8 - 3 0 - 3 2 ; 3 6 - 3 8 - 4 0 - 4 4 -  
4 6 - 4 8 ; 5 2 - 5 4 - 5 6 - 6 0 - 6 2 - 6 4 ; 6 8 - 7 0 - 7 2 - 7 6 - 7 8 - 8  
0 ; 8 4 - 8 6 - 8 8 - 9 2 - 9 4 - 9 6 ; 1 0 0 - 1 0 2 - 1 0 4 - 1 0 8 - 1 1 0 -  
1 1 2 ; 1 1 6 - 1 1 8 - 1 2 0 - 1 2 4 - 1 2 6 - 1 2 8 ; および 1 3 2 - 1 3 4 - 1  
3 6 - 1 4 0 - 1 4 2 - 1 4 4 からなる群より選択される。

#### 【0019】

関連する実施形態では、本発明は、表1に列挙されている例示的な抗EGFRvIII抗体のいずれかによって定義されるHCVR/LCVRアミノ酸配列ペア内に含有される6個のCDR（すなわち、HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3）のセットを含む、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片を提供する。例えば、本発明は、18/26；66/74；274/282；290/298；および370/378からなる群より選択されるHCVR/LCVRアミノ酸配列ペア内に含有されるHCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3アミノ酸配列セットを含む、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む。HCVRおよびLCVRアミノ酸配列内のCDRを同定するための方法および技法は、本技術分野において周知のものであり、本明細書に開示されている規定のHCVRおよび/またはLCVRアミノ酸配列内のCDRの同定に使用することができる。CDRの境界の同定に使用することのできる例示的な慣例として、例えば、Kabat定義、Chothia定義およびAbM定義が挙げられる。一般用語において、Kabat定義は、配列可変性に基づき、Chothia定義は、構造的ループ領域の位置に基づき、AbM定義は、KabatとChothiaアプローチの折衷である。例えば、Kabat、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991年)；Al-Lazikaniら、J. Mol. Biol. 273巻：927～948頁(1997年)；およびMartinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86巻：9268～9272頁(1989年)を参照されたい。抗体内のCDR配列を同定するために、公開データベースを利用することもできる。  
10  
20

#### 【0020】

本発明は、抗EGFRvIII抗体またはそのポーションをコードする核酸分子も提供する。例えば、本発明は、表1に列挙されているHCVRアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供する；ある特定の実施形態では、核酸分子は、表2に列挙されているHCVR核酸配列またはそれに対し少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。  
30

#### 【0021】

本発明は、表1に列挙されているLCVRアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供する；ある特定の実施形態では、核酸分子は、表2に列挙されているLCVR核酸配列またはそれに対し少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。  
40

#### 【0022】

本発明は、表1に列挙されているHCDR1アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供する；ある特定の実施形態では、核酸分子は、表2に列挙されているHCDR1核酸配列またはそれに対し少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

#### 【0023】

本発明は、表1に列挙されているHCDR2アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供する；ある特定の実施形態では、核酸分子は、表2に列挙されているHCDR  
50

2 核酸配列またはそれに対し少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% 配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

**【0024】**

本発明は、表 1 に列挙されている H C D R 3 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供する；ある特定の実施形態では、核酸分子は、表 2 に列挙されている H C D R 3 核酸配列またはそれに対し少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% 配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

**【0025】**

本発明は、表 1 に列挙されている L C D R 1 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供する；ある特定の実施形態では、核酸分子は、表 2 に列挙されている L C D R 1 核酸配列またはそれに対し少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% 配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

**【0026】**

本発明は、表 1 に列挙されている L C D R 2 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供する；ある特定の実施形態では、核酸分子は、表 2 に列挙されている L C D R 2 核酸配列またはそれに対し少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% 配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

**【0027】**

本発明は、表 1 に列挙されている L C D R 3 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供する；ある特定の実施形態では、核酸分子は、表 2 に列挙されている L C D R 3 核酸配列またはそれに対し少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% 配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列を含む。

**【0028】**

本発明は、H C V R をコードする核酸分子であって、前記 H C V R が、3 個の C D R のセット（すなわち、H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3）を含み、前記 H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 アミノ酸配列セットが、表 1 に列挙されている例示的な抗 E G F R v I I I 抗体のいずれかによって定義される核酸分子も提供する。

**【0029】**

本発明は、L C V R をコードする核酸分子であって、前記 L C V R が、3 個の C D R のセット（すなわち、L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3）を含み、前記 L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3 アミノ酸配列セットが、表 1 に列挙されている例示的な抗 E G F R v I I I 抗体のいずれかによって定義される核酸分子も提供する。

**【0030】**

本発明は、H C V R および L C V R の両方をコードする核酸分子であって、前記 H C V R が、表 1 に列挙されている H C V R アミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含み、前記 L C V R が、表 1 に列挙されている L C V R アミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含む核酸分子も提供する。ある特定の実施形態では、核酸分子は、表 2 に列挙されている H C V R 核酸配列またはそれに対し少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% 配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列と、表 2 に列挙されている L C V R 核酸配列またはそれに対し少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% 配列同一性を有するその実質的に同様の配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列とを含む。本発明の本態様に係るある特定の実施形態では、核酸分子は、H C V R および L C V R をコードし、前記 H C V R および L C V R は両者共に、表 1 に列挙されている同じ抗 E G F R v I I I 抗体に由来する。

10

20

30

40

50

## 【0031】

本発明は、抗EGFRvIII抗体の重または軽鎖可変領域を含むポリペプチドを発現することができる組換え発現ベクターも提供する。例えば、本発明は、上述の核酸分子、すなわち、表1に表記されているHCVR、LCVRおよび/またはCDR配列のいずれかをコードする核酸分子のいずれかを含む組換え発現ベクターを含む。係るベクターが導入された宿主細胞と共に、前記抗体または抗体断片の產生を可能にする条件下で前記宿主細胞を培養し、このようにして產生された前記抗体および抗体断片を回収することにより前記抗体またはそのポーションを产生する方法も、本発明の範囲内に含まれる。

## 【0032】

本発明は、修飾されたグリコシル化パターンを有する抗EGFRvIII抗体を含む。  
一部の実施形態では、望ましくないグリコシル化部位を除去するための修飾、あるいは例えば、抗体依存性細胞性細胞傷害（ADC）機能を増加させるために、オリゴ糖鎖に存在するフコース部分を欠く抗体が有用となることもある（Shieldら（2002年）JBC 277巻：26733頁を参照）。他の適用では、補体依存性細胞傷害（CDC）を修飾するために、ガラクトシル化の修飾を行うことができる。

10

## 【0033】

別の態様では、本発明は、EGFRvIIIに特異的に結合する組換えヒト抗体またはその断片と、薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。関連する態様では、本発明は、抗EGFRvIII抗体および第2の治療剤の組み合わせである組成物を特色とする。一実施形態では、第2の治療剤は、抗EGFRvIII抗体と有利に組み合わされるいずれかの薬剤である。本発明は、細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされた抗EGFRvIII抗体を含む抗体-薬物コンジュゲート（ADC）も提供する。本発明の抗EGFRvIII抗体に関与する例示的な併用療法、同時製剤およびADCは、本明細書の他の箇所に開示されている。

20

## 【0034】

さらに別の態様では、本発明は、本発明の抗EGFRvIII抗体または抗体の抗原結合ポーションを使用して、腫瘍細胞を殺傷するためまたは腫瘍細胞成長を阻害もしくは減衰させるための治療方法を提供する。本発明の本態様に係る治療方法は、本発明の抗体または抗体の抗原結合性断片を含む治療有効量の薬学的組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップを含む。処置される障害は、EGFRvIIIを標的化することによりおよび/またはEGFRvIIIによるリガンド媒介性細胞シグナリングを阻害することにより向上、改善、阻害または予防されるいずれかの疾患または状態である。

30

## 【0035】

他の実施形態は、次の詳細な説明の総説から明らかになるであろう。他の実施形態は、次の詳細な説明の総説から明らかになるであろう。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

ヒトEGFRvIIIに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合性断片であって、

(i)配列番号148の接合部ペプチドにも、

40

(ii)配列番号165のペプチドにも

結合しない、抗体またはその抗原結合性断片。

(項目2)

表面プラズモン共鳴アッセイによって測定される、約50nMもしくはそれに満たない、約20nMもしくはそれに満たない、約10nMもしくはそれに満たない、約5.0nMもしくはそれに満たない、約1.0nMもしくはそれに満たない、または約0.5nMもしくはそれに満たない、ヒトEGFRvIII二量体に対する平衡解離定数（K<sub>D</sub>）を示す、項目1に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目3)

表面プラズモン共鳴アッセイによって測定される、EGFRvIII二量体に対するK

50

$K_D$ よりも少なくとも約4倍、少なくとも約10倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約500倍、少なくとも約1000倍、少なくとも約2000倍または少なくとも約3000倍高い、ヒトEGFR二量体に対する $K_D$ を示す、項目2に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目4)

表面プラスモン共鳴アッセイによって検出可能なレベルではEGFR二量体に結合しない、項目3に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目5)

前記抗体またはその断片が、重鎖可変領域(HCVR)および軽鎖可変領域(LCVR)を含み、前記HCVRが、配列番号34のアミノ酸配列に含有される3個の相補性決定領域(CDR)、HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含み、前記LCVRが、配列番号42のアミノ酸配列に含有される3個のCDR、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含む、項目1に記載の抗体または抗原結合性断片。

10

(項目6)

HCDR1、HCDR2およびHCDR3が、それぞれ配列番号36、38および40のアミノ酸配列を含む、項目5に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目7)

LCDR1、LCDR2およびLCDR3が、それぞれ配列番号44、46および48のアミノ酸配列を含む、項目5または6に記載の抗体または抗原結合性断片。

20

ヒトEGFRvIIIに特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合性断片であって、配列番号4/6/8/12/14/16、20/22/24/28/30/32、36/38/40/44/46/48、52/54/56/60/62/64、68/70/72/76/78/80、84/86/88/92/94/96、100/102/104/108/110/112、116/118/120/124/126/128および132/134/136/140/142/144からなる群より選択されるHCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3の組み合わせである、抗体またはその抗原結合性断片。

(項目9)

前記HCVRが、配列番号2、18、34、50、66、82、98、114および130からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目8に記載の抗体または抗原結合性断片。

30

(項目10)

前記LCVRが、配列番号10、26、42、58、74、90、106、122および138からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目8に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目11)

配列番号2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122および130/138からなる群より選択されるHCVR/LCVR配列ペアを含む、項目8に記載の抗体または抗原結合性断片。

40

(項目12)

配列番号34/42のHCVR/LCVR配列ペアを含む、項目8に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目13)

項目12に記載の抗体または抗原結合性断片と同じEGFRvIII上のエピトープに結合する、抗体またはその抗原結合性断片。

(項目14)

EGFRvIIIへの結合に関して項目12に記載の抗体または抗原結合性断片と競合する、抗体またはその抗原結合性断片。

(項目15)

50

細胞毒にコンジュゲートされている、項目 1 に記載の抗体または抗原結合性断片。

( 項目 1 6 )

前記細胞毒が、生体毒素、化学療法剤および放射性同位体からなる群より選択される、項目 15 に記載の抗体または抗原結合性断片。

(項目17)

前記細胞毒が、マイタンシノイド、オーリスタチン、トメイマイシン、デュオカルマイシン、<sup>2 2 5</sup>A c、<sup>2 2 7</sup>T hおよびこれらのいずれかの誘導体からなる群より選択される、項目 15 に記載の抗体または抗原結合性断片。

( 項目 18 )

項目 1 に記載の抗体または抗原結合性断片と、薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物。

( 項目 19 )

化学療法剤、抗炎症剤および鎮痛薬からなる群より選択される1種または複数の追加的な治療剤をさらに含む、項目18に記載の薬学的組成物。

( 項目 20 )

E G F R v I I I を発現するがんまたは腫瘍を処置するための方法であって、それを必要とする被験体に、治療有効量の項目 18 に記載の薬学的組成物を投与するステップを含む、方法。

(項目21)

前記がんまたは前記腫瘍が、神経膠芽腫、乳管または乳管内乳癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺がんおよび頭頸部の扁平上皮細胞癌からなる群より選択される、項目20に記載の方法。

(項目22)

患者におけるがんを処置するため、腫瘍成長を低下させるため、および／または腫瘍退縮を引き起こすための方法であって、それを必要とする患者に、抗体またはその抗原結合性断片および細胞毒を含む第1の抗体 - 薬物コンジュゲート(ADC)を投与するステップを含み、前記第1のADCの前記抗体または前記抗原結合性断片が、EGFRvIIIに特異的に結合するが、配列番号148の接合部ペプチドにも配列番号165のペプチドにも結合しない、方法。

( 項目 2 3 )

前記患者に、抗体またはその抗原結合性断片および細胞毒を含む第2のADCを投与するステップをさらに含み、前記第2のADCの前記抗体または前記抗原結合性断片が、EGFRvIIIに特異的に結合し、かつ配列番号148の接合部ペプチドおよび/または配列番号165のペプチドにも結合する、項目22に記載の方法。

( 項目 2 4 )

前記第1のA.D.Cの前記抗体または前記抗原結合性断片が、配列番号36、38、40、44、46および48を含む重鎖相補性決定領域および軽鎖相補性決定領域を含む、項目22に記載の方法。

( 項目 25 )

前記第1のADCの前記抗体または前記抗原結合性断片が、配列番号34を含む重鎖可変領域と、配列番号42を含む軽鎖可変領域とを含む、項目24に記載の方法。

## 【図面の簡単な説明】

〔 0 0 3 6 〕

【図1a】図1は、還元(上パネル)および非還元(下パネル)条件下で、抗EGFRvIIIA抗体[すなわち、図1aにおけるH1H1863N2(Fuc-)ならびに対照IおよびII;ならびに図1bにおけるH1H1911、H1H1912およびH1H1915]または抗His抗体を使用した、EGFRおよびEGFRvIIIAのウエスタンプロットの結果を示す。レーン1および6:10 μlのBENCHMARK(商標)標準(INVITROGEN(商標))；レーン2および7:400 ngのhEGFR-mmh(配列番号154)；レーン3および8:400 ngのhEGFRvIIIA-mmh(配

列番号 152) ; ならびにレーン 4、5、9 および 10 : スペース。対照 I : 米国特許第 7,736,644 号に開示されているヒト抗 EGFRvIII 接合部ペプチド抗体 (IgG1) ; および対照 II : 米国特許第 7,589,180 号に開示されているキメラ抗 EGFRvIII / EGFR 抗体。

【図 1 b】図 1 は、還元 (上パネル) および非還元 (下パネル) 条件下で、抗 EGFRvIII 抗体 [すなわち、図 1 a における H1H1863N2 (Fuc-) ならびに対照 I および II ; ならびに図 1 b における H1H1911、H1H1912 および H1H1915] または抗 HIs 抗体を使用した、EGFR および EGFRvIII のウエスタンプロットの結果を示す。レーン 1 および 6 : 10 μl の BENCHMARK (商標) 標準 (INVITROGEN (商標)) ; レーン 2 および 7 : 400 ng の hEGFR-mmh (配列番号 154) ; レーン 3 および 8 : 400 ng の hEGFRvIII-mmh (配列番号 152) ; ならびにレーン 4、5、9 および 10 : スペース。対照 I : 米国特許第 7,736,644 号に開示されているヒト抗 EGFRvIII 接合部ペプチド抗体 (IgG1) ; および対照 II : 米国特許第 7,589,180 号に開示されているキメラ抗 EGFRvIII / EGFR 抗体。

#### 【0037】

【図 2】図 2 は、H1H1863N2 (Fuc-) の結合特徴を示す。それ C 末端においてリinker を介してビオチンにタグ付けされた、EGFRvIII 接合部ペプチドまたは EGFR の残基 311 ~ 326 のペプチド (「EGFR 311 ~ 326 ペプチド」) を、FORTEBIO (登録商標) OCTET (登録商標) RED 機器におけるストレプトアビシンコーティングされた OCTET (登録商標) チップに捕捉し、H1H1863N2 (Fuc-) または対照 I ~ III と反応させた。対照 I および II : 上に同じ ; ならびに対照 III : 米国特許出願公開第 2010/0056762 号に開示されているヒト化抗 EGFRvIII 抗体 (hIgG1)。(白抜き) : C 末端ビオチン標識 EGFRvIII 接合部ペプチド (配列番号 149) ; および (黒塗り) : C 末端ビオチン標識 EGFR 311 ~ 326 ペプチド (配列番号 151)。

#### 【0038】

【図 3】図 3 は、EGFRvIII を発現する HEK293 細胞 (HEK293 / EGFRvIII) による抗 EGFRvIII mAb の内部移行を示す。細胞表面に結合した抗 EGFRvIII 抗体および対照抗体を、色素コンジュゲートされた二次抗体 (Fab) によって検出した ; 画像を 40×で取得し、内部移行した小胞を定量化した。対照 I および II : 上に同じ ; ならびに対照 IV : 米国特許第 7,060,808 号に開示されているキメラ抗 EGFR 抗体。(白抜き) : 37 における内部移行 ; および (黒塗り) : 4 における内部移行。

#### 【0039】

【図 4 a】図 4 は、重症複合免疫不全 (SCID) マウスにおいて異種移植された B16F10.9 腫瘍または EGFRvIII を発現する B16F10.9 腫瘍 (B16F10.9 / EGFRvIII) による、抗 EGFRvIII 抗体 H1H1863N2 (Fuc-) の結合および内部移行を示す。細胞表面に結合した (図 4 a) または細胞表面に結合しつつ内部移行した (図 4 b) 抗 EGFRvIII 抗体またはアイソタイプ対照抗体を、フローサイトメトリーを使用して、アロフィコシアニンコンジュゲートされた抗ヒト Fc (hFc - APC) 抗体によって検出した。抗体注射後 10 分目 (白抜き)、4 時間目 (斜線) および 24 時間目 (黒塗り) の平均蛍光強度 (MIF) を示す。

【図 4 b】図 4 は、重症複合免疫不全 (SCID) マウスにおいて異種移植された B16F10.9 腫瘍または EGFRvIII を発現する B16F10.9 腫瘍 (B16F10.9 / EGFRvIII) による、抗 EGFRvIII 抗体 H1H1863N2 (Fuc-) の結合および内部移行を示す。細胞表面に結合した (図 4 a) または細胞表面に結合しつつ内部移行した (図 4 b) 抗 EGFRvIII 抗体またはアイソタイプ対照抗体を、フローサイトメトリーを使用して、アロフィコシアニンコンジュゲートされた抗ヒト Fc (hFc - APC) 抗体によって検出した。抗体注射後 10 分目 (白抜き)、4 時間目 (斜線) および 24 時間目 (黒塗り) の平均蛍光強度 (MIF) を示す。

10

20

30

40

50

斜線) および 24 時間目(黒塗り)の平均蛍光強度(MIF)を示す。

#### 【0040】

【図5a - b】図5は、野生型マウス(黒丸)またはヒトEGFRを発現するマウス(黒四角)における、抗EGFRvIII抗体H1H863N2(Fuc+) (図5d)ならびに対照抗体(上述の通り)、すなわち、対照I(図5b)、対照III(図5c)および対照IV(図5a)の薬物動態解析の結果を示す。

【図5c - d】図5は、野生型マウス(黒丸)またはヒトEGFRを発現するマウス(黒四角)における、抗EGFRvIII抗体H1H863N2(Fuc+) (図5d)ならびに対照抗体(上述の通り)、すなわち、対照I(図5b)、対照III(図5c)および対照IV(図5a)の薬物動態解析の結果を示す。 10

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0041】

本発明について記載する前に、記載されている特定の方法および実験条件は変動し得るため、本発明が、係る方法および条件に限定されないことを理解されたい。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることから、本明細書において使用されている用語法が、単に特定の実施形態を説明するためのものであり、限定を企図しないことも理解されたい。

#### 【0042】

他に断りがなければ、本明細書において使用されているあらゆる技術および科学用語は、本発明が属する分野における当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書において、用語「約」は、特定の列挙されている数値に関連して使用されている場合、値が、列挙されている値から1%以下で変動し得ることを意味する。例えば、本明細書において、表現「約100」は、99および101ならびにその間のあらゆる値(例えば、99.1、99.2、99.3、99.4等)を含む。 20

#### 【0043】

本発明の実施または検査において、本明細書に記載されている方法および材料と類似または同等のいかなる方法および材料を使用してもよいが、好ましい方法および材料を次に説明する。本明細書に言及されているあらゆる特許、出願および非特許刊行物は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0044】

##### 定義

用語「EGFRvIII」は、本明細書において、他に特に指示されていなければ、正常に発現されるEGFRに共通した特徴とは対照的に、EGFRvIIIに特異的ないずれかの特徴を示す、配列番号147に示すアミノ酸配列を有するヒトEGFRクラスII改变体またはその生物学的に活性な断片を指す。EGFRvIIIは、成熟EGFRのアミノ酸残基6から273を欠き(すなわち、シグナルペプチド、すなわち、残基1~24なしの配列番号146)、アミノ酸残基5~274の間の6位に新たなグリシン残基を含有する。

#### 【0045】

本明細書におけるタンパク質、ポリペプチドおよびタンパク質断片のあらゆる参照は、非ヒト種に由来すると明確に指定されない限り、それぞれのタンパク質、ポリペプチドまたはタンパク質断片のヒトバージョンを指すよう企図されている。よって、表現「EGFRvIII」は、例えば「マウスEGFRvIII」、「サルEGFRvIII」等のように非ヒト種に由来すると指定されない限り、ヒトEGFRvIIIを意味する。 40

#### 【0046】

本明細書において、表現「細胞表面に発現されたEGFRvIII」は、EGFRvIIIタンパク質の少なくとも一ポーションが、細胞膜の細胞外側に露出され、抗体の抗原結合ポーションに到達できるように、in vitroまたはin vivoで細胞の表面に発現される、1種もしくは複数のEGFRvIIIタンパク質(複数可)またはその細胞外ドメインを意味する。「細胞表面に発現されたEGFRvIII」は、EGFRv 50

I I I タンパク質を正常に発現する細胞の表面に発現された E G F R v I I I タンパク質を含む、またはこれからなることができる。あるいは、「細胞表面に発現された E G F R v I I I 」は、その表面にヒト E G F R v I I I を正常には発現しないが、その表面に E G F R v I I I を発現するように入為的に操作された、細胞の表面に発現された E G F R v I I I タンパク質を含む、またはこれからなることができる。

#### 【 0 0 4 7 】

本明細書において、表現「抗 E G F R v I I I 抗体」は、単一特異性を有する一価抗体、ならびに E G F R v I I I に結合する第 1 のアームおよび第 2 の（標的）抗原に結合する第 2 のアームを含む二重特異的抗体の両方を含み、前記抗 E G F R v I I I アームは、本明細書における表 1 に表記されている H C V R / L C V R または C D R 配列のいずれかを含む。表現「抗 E G F R v I I I 抗体」は、薬物または毒素（すなわち、細胞傷害性薬剤）にコンジュゲートされた抗 E G F R v I I I 抗体またはその抗原結合ポーションを含む抗体 - 薬物コンジュゲート（A D C）も含む。表現「抗 E G F R v I I I 抗体」は、放射性核種にコンジュゲートされた抗 E G F R v I I I 抗体またはその抗原結合ポーションを含む抗体 - 放射性核種コンジュゲート（A R C）も含む。

#### 【 0 0 4 8 】

用語「抗体」は、本明細書において、特定の抗原（例えば、E G F R v I I I ）に特異的に結合するまたはこれと相互作用する、少なくとも 1 個の相補性決定領域（C D R ）を含むいずれかの抗原結合分子または分子複合体を意味する。用語「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互接続された 2 本の重（H）鎖および 2 本の軽（L）鎖である 4 本のポリペプチド鎖を含む免疫グロブリン分子、ならびにその多量体（例えば、I g M ）を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書において、H C V R または V<sub>H</sub> と省略）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3 個のドメイン、C<sub>H</sub> 1、C<sub>H</sub> 2 および C<sub>H</sub> 3 を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書において、L C V R または V<sub>L</sub> と省略）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1 個のドメイン（C<sub>L</sub> 1）を含む。V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> 領域は、フレームワーク領域（F R ）と命名されたより保存された領域が散在する、相補性決定領域（C D R ）と命名された超可変性の領域にさらに細分することができる。各 V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> は、アミノ末端からカルボキシ末端へと、次の順序：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4 に配置された、3 個の C D R および 4 個の F R で構成されている。本発明の異なる実施形態では、抗 E G F R v I I I 抗体（またはその抗原結合ポーション）の F R は、ヒト生殖系列配列と同一であっても、あるいは天然にまたは人為的に修飾されていてもよい。アミノ酸コンセンサス配列は、2 種またはそれを超える C D R の対比（s i d e - b y - s i d e ）解析に基づき定義することができる。

#### 【 0 0 4 9 】

用語「抗体」は、本明細書において、完全抗体分子の抗原結合性断片も含む。用語、抗体の「抗原結合ポーション」、抗体の「抗原結合性断片」その他は、本明細書において、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、いずれかの天然に存在する、酵素により得ることができる、合成のまたは遺伝子改変されたポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。抗体の抗原結合性断片は、例えば、タンパク質分解による消化または抗体可変ドメインおよび任意選択で抗体定常ドメインをコードする D N A の操作および発現を含む組換え遺伝子操作技法等、いずれかの適した標準技法を使用して、完全抗体分子から得られ得る。係る D N A は、公知であるおよび / または例えば、商業的供給源、D N A ライブラリー（例えば、ファージ抗体ライブラリーを含む）から容易に入手することができる、または合成することができる。D N A を配列決定し、化学的にまたは分子生物学的技法を使用することにより操作して、例えば、適した構成へと 1 種または複数の可変および / または定常ドメインを配置する、あるいはコドンを導入する、システイン残基を作出する、アミノ酸を修飾、付加または欠失させること等ができる。

#### 【 0 0 5 0 】

抗原結合性断片の非限定例として、( i ) F a b 断片；( i i ) F ( a b' ) 2 断片；( i i i ) F d 断片；( i v ) F v 断片；( v ) 单鎖 F v ( s c F v ) 分子；( v i ) d

10

20

30

40

50

A b 断片；および(v i i)抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位(例えば、CDR3ペプチド等、単離された相補性決定領域(CDR))または制約されたFR3-CDR3-FR4ペプチドが挙げられる。ドメイン特異的抗体、單一ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ(例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディ等)、小モジュラー免疫医薬(small modular immunopharmaceutical)(SMIP)およびサメ可変IgNARドメイン等、他の操作された分子も、本明細書における表現「抗原結合性断片」の内に包含される。

#### 【0051】

抗体の抗原結合性断片は、典型的に、少なくとも1個の可変ドメインを含むであろう。可変ドメインは、いかなるサイズまたはアミノ酸組成のものであってもよく、一般に、1個または複数のフレームワーク配列に隣接するまたはこれとインフレームの少なくとも1個のCDRを含むであろう。 $V_L$ ドメインと会合する $V_H$ ドメインを有する抗原結合性断片において、 $V_H$ および $V_L$ ドメインは、いずれか適した配置において互いに対して位置することができる。例えば、可変領域は、二量体となり、 $V_H - V_H$ 、 $V_H - V_L$ または $V_L - V_L$ 二量体を含有することができる。あるいは、抗体の抗原結合性断片は、单量体 $V_H$ または $V_L$ ドメインを含有することができる。

#### 【0052】

ある特定の実施形態では、抗体の抗原結合性断片は、少なくとも1個の定常ドメインに共有結合により連結された少なくとも1個の可変ドメインを含有することができる。本発明の抗体の抗原結合性断片内に見出すことができる可変および定常ドメインの非限定的な例示的構成として、以下が挙げられる：(i) $V_H - C_H 1$ ；(ii) $V_H - C_H 2$ ；(iii) $V_H - C_H 3$ ；(iv) $V_H - C_H 1 - C_H 2$ ；(v) $V_H - C_H 1 - C_H 2 - C_H 3$ ；(vi) $V_H - C_H 2 - C_H 3$ ；(vii) $V_H - C_L$ ；(viii) $V_L - C_H 1$ ；(ix) $V_L - C_H 2$ ；(x) $V_L - C_H 3$ ；(xi) $V_L - C_H 1 - C_H 2$ ；(xii) $V_L - C_H 1 - C_H 2 - C_H 3$ ；(xiii) $V_L - C_H 2 - C_H 3$ ；および(xiv) $V_L - C_L$ 。上に列挙する例示的構成のいずれかを含む、可変および定常ドメインのいずれかの構成において、可変および定常ドメインは、互いに直接的に連結されても、完全または部分的ヒンジまたはリンカー領域により連結されていてもよい。ヒンジ領域は、少なくとも2個(例えば、5、10、15、20、40、60個以上)のアミノ酸からなることができ、これにより、单一ポリペプチド分子における隣接する可変および/または定常ドメインの間に可撓性または半可撓性連結がもたらされる。さらに、本発明の抗体の抗原結合性断片は、互いにおよび/または1個または複数の单量体 $V_H$ または $V_L$ ドメインと非共有結合的に会合した(例えば、ジスルフィド結合(複数可)により)、上に列挙する可変および定常ドメイン構成のうちいずれかのホモ二量体またはヘテロ二量体(または他の多量体)を含むことができる。

#### 【0053】

完全抗体分子と同様に、抗原結合性断片は、单一特異的または多特異的(例えば、二重特異的)となり得る。抗体の多特異的抗原結合性断片は、典型的に、少なくとも2個の異なる可変ドメインを含み、各可変ドメインは、別々の抗原にまたは同じ抗原上の異なるエピトープに特異的に結合することができるであろう。本明細書に開示されている例示的な二重特異的抗体フォーマットを含むいすれかの多特異的抗体フォーマットは、本技術分野で利用できる慣用的な技法を使用して、本発明の抗体の抗原結合性断片の文脈における使用に適合させることができる。

#### 【0054】

本発明の抗体は、補体依存性細胞傷害(CDC)または抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を介して機能することができる。「補体依存性細胞傷害」(CDC)は、補体の存在下における、本発明の抗体による抗原発現細胞の溶解を指す。「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」(ADCC)は、Fc受容体(FcR)を発現する非特異的細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球およびマクロファージ)が、標的

10

20

30

40

50

細胞における結合された抗体を認識し、これにより標的細胞の溶解をもたらす細胞媒介性反応を指す。CDCおよびADCCは、本技術分野で周知かつ利用できるアッセイを使用して測定することができる（例えば、米国特許第5,500,362号および同第5,821,337号ならびにClaynesら（1998年）Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95巻：652～656頁を参照）。抗体の定常領域は、補体を固定し、細胞依存性細胞傷害を媒介する抗体の能力において重要である。よって、抗体のアイソタイプは、抗体が細胞傷害を媒介するのに望ましいか否かに基づいて選択することができる。

#### 【0055】

本発明のある特定の実施形態では、本発明の抗EGFRvIII抗体は、ヒト抗体である。用語「ヒト抗体」は、本明細書において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する抗体を含むように企図されている。本発明のヒト抗体は、例えば、CDR、特にCDR3において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列にコードされないアミノ酸残基を含むことができる（例えば、in vitroにおけるランダムもしくは部位特異的変異誘発またはin vivoにおける体細胞変異によって導入された変異）。しかし、用語「ヒト抗体」は、本明細書において、マウス等、別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含むようには企図されていない。

#### 【0056】

本発明の抗体は、一部の実施形態では、組換えヒト抗体となり得る。用語「組換えヒト抗体」は、本明細書において、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現された抗体（さらに後述する）、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体（さらに後述する）、ヒト免疫グロブリン遺伝子のトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体（例えば、Taylorら（1992年）Nucleic Acids Res. 20巻：6287～6295頁を参照）、または他のDNA配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングに関する他のいづれかの手段によって調製、発現、作出もしくは単離された抗体等、組換え手段によつて調製、発現、作出または単離されたあらゆるヒト抗体を含むよう企図されている。係る組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する。しかし、ある特定の実施形態では、係る組換えヒト抗体は、in vitro変異誘発（または、ヒトIg配列のトランスジェニックである動物が使用される場合は、in vivo体細胞変異誘発）に付され、これにより、組換え抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列に由来し、これに関係するが、in vivoにおけるヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然には存在しなくてよい配列となる。

#### 【0057】

ヒト抗体は、ヒンジ不均一性に関連する2種の形態で存在することができる。一形態において、免疫グロブリン分子は、二量体が鎖間重鎖ジスルフィド結合によって結び付けられた、およそ150～160kDaの安定的4鎖構築物を含む。第2の形態において、二量体は、鎖間ジスルフィド結合により連結されず、約75～80kDaの分子が、共有結合によりカップリングされた軽および重鎖で構成されて形成される（半抗体（half antibody））。これらの形態は、親和性精製後であっても、分離が極めて困難であった。

#### 【0058】

様々なインタクトIgGアイソタイプにおける第2の形態の出現頻度は、抗体のヒンジ領域アイソタイプに関連する構造の差によるが、これに限定されない。ヒトIgG4ヒンジのヒンジ領域における单一のアミノ酸置換は、ヒトIgG1ヒンジを使用して典型的に観察されるレベルまで、第2の形態の出現を有意に低下させることができる（Angalら（1993年）Molecular Immunology 30巻：105頁）。本発明は、ヒンジ、C<sub>H</sub>2またはC<sub>H</sub>3領域に1個または複数の変異を有する抗体を包含し

10

20

30

40

50

、これは、例えば、所望の抗体形態の収量を向上するための產生において望ましくなり得る。

#### 【0059】

本発明の抗体は、単離された抗体となり得る。「単離された抗体」は、本明細書において、その天然の環境の少なくとも1種の構成成分から同定および分離および／または回収された抗体を意味する。例えば、生物の少なくとも1個の構成成分からまたは抗体が天然に存在するもしくは天然に産生される組織もしくは細胞から分離または取り出された抗体は、本発明の目的のための「単離された抗体」である。単離された抗体は、組換え細胞内のin situにおける抗体も含む。単離された抗体は、少なくとも1種の精製または単離ステップに付された抗体である。ある特定の実施形態によると、単離された抗体は、他の細胞材料および／または化学物質を実質的に含まなくてよい。10

#### 【0060】

本明細書に開示される抗EGFRvIII抗体は、この抗体が得られた相当する生殖系列配列と比較して、重および軽鎖可変ドメインのフレームワークおよび／またはCDR領域に1個または複数のアミノ酸置換、挿入および／または欠失を含むことができる。係る変異は、本明細書に開示されているアミノ酸配列を、例えば、公開抗体配列データベースから入手できる生殖系列配列と比較することによって容易に確認することができる。本発明は、本明細書に開示されているアミノ酸配列のいずれかに由来する抗体およびその抗原結合性断片を含み、1個または複数のフレームワークおよび／またはCDR領域内の1個または複数のアミノ酸は、抗体が由来する生殖系列配列の相当する残基（複数可）へと、または別のヒト生殖系列配列の相当する残基（複数可）へと、または相当する生殖系列残基（複数可）の保存的アミノ酸置換へと変異されている（係る配列変化は、本明細書において、「生殖系列変異」とまとめて称される）。当業者であれば、本明細書に開示されている重および軽鎖可変領域配列から始めて、1個または複数の個々の生殖系列変異またはその組み合わせを含む多数の抗体および抗原結合性断片を容易に产生することができる。ある特定の実施形態では、V<sub>H</sub>および／またはV<sub>L</sub>ドメイン内のフレームワークおよび／またはCDR残基の全てが、抗体が由来する本来の生殖系列配列に見出される残基へと逆変異されている。他の実施形態では、ある特定の残基のみが、例えば、FR1の最初の8アミノ酸の内もしくはFR4の最後の8アミノ酸の内に見出される変異された残基のみまたはCDR1、CDR2もしくはCDR3の内に見出される変異された残基のみが、本来の生殖系列配列へと逆変異されている。さらに、本発明の抗体は、フレームワークおよび／またはCDR領域内の2個以上の生殖系列変異のいかなる組み合わせを含有することもできる、例えば、ある特定の個々の残基は、特定の生殖系列配列の相当する残基へと変異されるが、本来の生殖系列配列とは異なるある特定の他の残基は、維持される、あるいは異なる生殖系列配列の相当する残基へと変異される。1個または複数の生殖系列変異を含有する抗体および抗原結合性断片を得たら、結合特異性の向上、結合親和性の増加、アンタゴニストまたはアゴニスト性の生物学的特性の向上または増強（場合による）、免疫原性の低下等、1種または複数の所望の特性に関して容易に検査することができる。このような一般的な様式で得られる抗体および抗原結合性断片は、本発明の範囲内に包含される。203040

#### 【0061】

本発明はまた、1個または複数の保存的置換を有する、本明細書に開示されているHCVR、LCVRおよび／またはCDRアミノ酸配列のいずれかの改変体を含む抗EGFRvIII抗体を含む。例えば、本発明は、本明細書の表1に示されているHCVR、LCVRおよび／またはCDRアミノ酸配列のいずれかと比べて、例えば、10個以下、8個以下、6個以下、4個以下等の保存的アミノ酸置換を有するHCVR、LCVRおよび／またはCDRアミノ酸配列を有する抗EGFRvIII抗体を含む。

#### 【0062】

用語「エピトープ」は、本明細書において、パラトープとして公知の抗体分子の可変領域における特異的な抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原は、2個以上のエピトープを有し得る。よって、異なる抗体は、抗原における異なる区域に結合することができ、異なる生物学的効果を有することができる。エピトープは、コンフォメーション性または直鎖状のいずれであってもよい。コンフォメーション性エピトープは、直鎖状ポリペプチド鎖の異なるセグメント由来の空間的に並置されたアミノ酸によって產生される。直鎖状エピトープは、ポリペプチド鎖における隣接するアミノ酸残基によって產生されるエピトープである。ある特定の状況において、エピトープは、抗原における糖類、ホスホリル基またはスルホニル基の部分を含むことができる。

## 【0063】

10

用語「実質的同一性」または「実質的に同一」は、核酸またはその断片について言及する場合、後述する F A S T A 、 B L A S T または G a p 等、配列同一性のいずれか周知のアルゴリズムによって測定され、適切なヌクレオチド挿入または欠失を用いて別の核酸（またはその相補ストランド）と最適に整列されたときに、ヌクレオチド塩基の少なくとも約 95 % 、より好ましくは少なくとも約 96 % 、 97 % 、 98 % または 99 % においてヌクレオチド配列同一性が存在することを示す。参照核酸分子に対し実質的同一性を有する核酸分子は、ある特定の事例において、参照核酸分子にコードされるポリペプチドと同じまたは実質的に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができる。

## 【0064】

20

ポリペプチドに適用する場合、用語「実質的類似性」または「実質的に類似の」は、2種のペプチド配列が、デフォルトギャップ重量を使用してプログラム G A P または B E S T F I T 等により最適に整列されたときに、少なくとも 95 % 配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも 98 % または 99 % 配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一ではない残基ポジションは、保存的アミノ酸置換により異なる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する側鎖（R 基）を有する別のアミノ酸残基により置換される置換である。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変化させないであろう。2種以上のアミノ酸配列が、保存的置換により互いに異なる場合、パーセント配列同一性または類似性の程度は、置換の保存的性質を補正するために上向きに調整することができる。この調整を行うための手段は、当業者に周知のものである。例えば、参考として本明細書に援用される Pearson (1994年) Methods Mol. Biol. 24巻：307～331頁を参照のこと。類似の化学的特性を有する側鎖を有するアミノ酸の群の例として、（1）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン；（2）脂肪族 - ヒドロキシル側鎖：セリンおよびスレオニン；（3）アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン；（4）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン；（5）塩基性側鎖：リジン、アルギニンおよびヒスチジン；（6）酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに（7）硫黄含有側鎖がシステインおよびメチオニンであることが挙げられる。好ましい保存的アミノ酸置換群は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタミン酸 - アスパラギン酸およびアスパラギン - グルタミンである。あるいは、保存的置き換えは、参考として本明細書に援用される Gonnet ら、(1992年) Science 256巻：1443～1445頁に開示されている PAM250 対数尤度マトリックスにおいて正の値を有するいずれかの変化である。「中程度に保存的」置き換えは、PAM250 対数尤度マトリックスにおいて負ではない値を有するいずれかの変化である。

## 【0065】

40

配列同一性とも称されるポリペプチドの配列類似性は、典型的には、配列解析ソフトウェアを使用して測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む様々な置換、欠失および他の修飾に割り当てられた類似性の尺度を使用して類似の配列を一致させる。例えば、G C G ソフトウェアは、デフォルトパラメータにより使用して、異

50

なる生物種由来の相同ポリペプチド等、密接に関係したポリペプチドの間、あるいは野生型タンパク質とその変異タンパク質との間の配列相同性または配列同一性を決定することができるGapおよびBestfit等のプログラムを含有する。例えば、GCGバージョン6.1を参照されたい。ポリペプチド配列は、デフォルトまたは推奨されるパラメータを用いてFASTAを使用して比較することもできる。GCGバージョン6.1におけるプログラムFASTA(例えば、FASTA2およびFASTA3)は、アライメントならびに問い合わせおよび検索配列間の最良の重複の領域のパーセント配列同一性を提供する(Pearson(2000年)上記参照)。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する際の別の好ましいアルゴリズムは、デフォルトパラメータを使用したコンピュータプログラムBLAST、特にBLASTPまたはTBLASTNである。例えば、それぞれ参考として本明細書に援用されるAltschulら、(1990年)J. Mol. Biol. 215巻:403~410頁およびAltschulら、(1997年)Nucleic Acids Res. 25巻:3389~402頁を参照のこと。

#### 【0066】

##### pH依存性結合

本発明は、pH依存性結合特徴を有する抗EGFRvIII抗体を含む。例えば、本発明の抗EGFRvIII抗体は、中性pHと比較して、酸性pHにおけるEGFRvIIIへの結合低下を示すことができる。あるいは、本発明の抗EGFRvIII抗体は、中性pHと比較して、酸性pHにおけるEGFRvIIIへの結合増強を示すことができる。表現「酸性pH」は、約6.2未満の、例えば、約6.0、5.95、5.9、5.85、5.8、5.75、5.7、5.65、5.6、5.55、5.5、5.45、5.4、5.35、5.3、5.25、5.2、5.15、5.1、5.05、5.0またはそれに満たないpH値を含む。本明細書において、表現「中性pH」は、約7.0~約7.4のpHを意味する。表現「中性pH」は、約7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35および7.4のpH値を含む。

#### 【0067】

ある特定の事例において、「中性pHと比較して、酸性pHにおけるEGFRvIIIへの結合低下」は、中性pHにおけるEGFRvIIIへの抗体結合の $K_D$ 値に対する、酸性pHにおけるEGFRvIIIへの抗体結合の $K_D$ 値の比の観点から表現される(または逆もまた同じ)。例えば、抗体またはその抗原結合性断片が、約3.0またはそれより大きい酸性/中性 $K_D$ 比を示す場合、抗体またはその抗原結合性断片は、本発明の目的のため、「中性pHと比較して、酸性pHにおけるEGFRvIIIへの結合低下」を示すと考慮することができる。ある特定の例示的な実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性断片の酸性/中性 $K_D$ 比は、約3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、20.0、25.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、100.0またはそれより大きくなることができる。

#### 【0068】

pH依存性結合特徴を有する抗体は、例えば、中性pHと比較して、酸性pHにおける特定の抗原への結合低下(または増強)に関して抗体の集団をスクリーニングすることにより得ることができる。その上、アミノ酸レベルにおける抗原結合ドメインの修飾は、pH依存性特徴を有する抗体を生じることができる。例えば、抗原結合ドメイン(例えば、CDR内の)の1個または複数のアミノ酸をヒスチジン残基に置換することにより、中性pHと比べて酸性pHにおいて抗原結合が低下した抗体を得ることができる。

#### 【0069】

##### Fc改変体を含む抗EGFRvIII抗体

本発明のある特定の実施形態によると、例えば、中性pHと比較して酸性pHにおいて、FcRn受容体への抗体結合を増強または減弱化する1個または複数の変異を含むFc

ドメインを含む、抗 E G F R v I I I 抗体が提供される。例えば、本発明は、F c ドメインの C<sub>H</sub> 2 または C<sub>H</sub> 3 領域に変異を含む抗 E G F R v I I I 抗体を含み、前記変異（複数可）は、酸性環境（例えば、pH が約 5.5 ~ 約 6.0 に及ぶエンドソーム）における F c R n に対する F c ドメインの親和性を増加させる。係る変異は、動物に投与される際に、抗体の血清半減期の増加をもたらすことができる。係る F c 修飾の非限定例として、例えば、250（例えば、E または Q）；250 および 428（例えば、L または F）；252（例えば、L / Y / F / W または T）、254（例えば、S または T）および 256（例えば、S / R / Q / E / D または T）位における修飾；または 428 および / もしくは 433（例えば、H / L / R / S / P / Q または K）および / もしくは 434（例えば、A、W、H、F または Y [ N 434 A、N 434 W、N 434 H、N 434 F または N 434 Y ] ）位における修飾；または 250 および / もしくは 428 位における修飾；または 307 もしくは 308（例えば、308 F、V 308 F）および 434 位における修飾が挙げられる。一実施形態では、修飾は、428 L（例えば、M 428 L）および 434 S（例えば、N 434 S）修飾；428 L、259 I（例えば、V 259 I）および 308 F（例えば、V 308 F）修飾；433 K（例えば、H 433 K）および 434（例えば、434 Y）修飾；252、254 および 256（例えば、252 Y、254 T および 256 E）修飾；250 Q および 428 L 修飾（例えば、T 250 Q および M 428 L）；ならびに 307 および / または 308 修飾（例えば、308 F または 308 P）を含む。さらに別の実施形態では、修飾は、265 A（例えば、D 265 A）および / または 297 A（例えば、N 297 A）修飾を含む。

## 【0070】

例えば、本発明は、250 Q および 248 L（例えば、T 250 Q および M 248 L）；252 Y、254 T および 256 E（例えば、M 252 Y、S 254 T および T 256 E）；428 L および 434 S（例えば、M 428 L および N 434 S）；257 I および 311 I（例えば、P 257 I および Q 311 I）；257 I および 434 H（例えば、P 257 I および N 434 H）；376 V および 434 H（例えば、D 376 V および N 434 H）；307 A、380 A および 434 A（例えば、T 307 A、E 380 A および N 434 A）；ならびに 433 K および 434 F（例えば、H 433 K および N 434 F）からなる群より選択される変異の 1 種または複数のペアまたは群を含む F c ドメインを含む抗 E G F R v I I I 抗体を含む。前述の F c ドメイン変異および本明細書に開示されている抗体可変ドメイン内の他の変異のあらゆる可能な組み合わせは、本発明の範囲内であるとみなされる。

## 【0071】

本発明は、キメラ重鎖定常（C<sub>H</sub>）領域を含む抗 E G F R v I I I 抗体も含み、前記キメラ C<sub>H</sub> 領域は、2種以上の免疫グロブリンアイソタイプの C<sub>H</sub> 領域に由来するセグメントを含む。例えば、本発明の抗体は、ヒト Ig G 1、ヒト Ig G 2 またはヒト Ig G 4 分子に由来する C<sub>H</sub> 3 ドメインの一部または全部と組み合せた、ヒト Ig G 1、ヒト Ig G 2 またはヒト Ig G 4 分子に由来する C<sub>H</sub> 2 ドメインの一部または全部を含むキメラ C<sub>H</sub> 領域を含むことができる。ある特定の実施形態によると、本発明の抗体は、キメラヒンジ領域を有するキメラ C<sub>H</sub> 領域を含む。例えば、キメラヒンジは、ヒト Ig G 1、ヒト Ig G 2 またはヒト Ig G 4 ヒンジ領域に由来する「下ヒンジ」配列（EU 番号付けに従った 228 ~ 236 位のアミノ酸残基）と組み合せた、ヒト Ig G 1、ヒト Ig G 2 またはヒト Ig G 4 ヒンジ領域に由来する「上ヒンジ」アミノ酸配列（EU 番号付けに従った 216 ~ 227 位のアミノ酸残基）を含むことができる。ある特定の実施形態によると、キメラヒンジ領域は、ヒト Ig G 1 またはヒト Ig G 4 上ヒンジに由来するアミノ酸残基と、ヒト Ig G 2 下ヒンジに由来するアミノ酸残基とを含む。本明細書に記載されているキメラ C<sub>H</sub> 領域を含む抗体は、ある特定の実施形態では、抗体の治療または薬物動態特性に有害に影響することなく、修飾された F c エフェクター機能を示すことができる（例えば、その開示全体が参照により本明細書に組み入れられる、2013年2月1日に出願された米国特許仮出願第 61 / 759,578 号を参照）。

10

20

30

40

50

## 【0072】

## 抗体 - 薬物コンジュゲート (ADC)

本発明は、細胞傷害性薬剤、化学療法薬または放射性同位体等、治療部分にコンジュゲートされた抗EGFRvIII抗体またはその抗原結合性断片を含む抗体 - 薬物コンジュゲート (ADC) を提供する。

## 【0073】

細胞傷害性薬剤は、細胞の成長、生存率または繁殖に有害な任意の薬剤を含む。本発明の本態様に従って抗EGFRvIII抗体にコンジュゲートすることができる適した細胞傷害性薬剤および化学療法剤の例として、例えば、1-(2クロロエチル)-1,2-ジメタンスルホニルヒドラジド、1,8-ジヒドロキシ-ビシクロ[7.3.1]トリデカ-4,9-ジエン-2,6-ジイン-13-オン、1-デヒドロテストステロン、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、9-アミノカンプトテシン、アクチノマイシンD、アマニチン、アミノブテリン、アンガイジン (*anguidine*)、アントラサイクリン、アントラマイシン (AMC)、オーリスタチン、ブレオマイシン、ブルファン、酪酸、カリチアマイシン、カンプトテシン、カルミノマイシン (*carminomycin*)、カルムスチン、セマドチン、시스プラチン、コルヒチン (*coldhicine*)、コンブレタスタチン、シクロホスファミド、シタラビン、サイトカラシンB、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ダカルバジン (*decarbazine*)、ジアセトキシベンチルドキソルビシン、ジプロモマンニトール、ジヒドロキシアントラシンジオン、ジソラゾール (*disorazole*)、ドラスタチン、ドキソルビシン、デュオカルマイシン、エキノマイシン、エリュテロビン、エメチン、エポチロン、エスペラミシン、エストラムスチン、エチジウムプロマイド、エトポシド、フルオロウラシル、ゲルダナマイシン、グラミシジンD、グルココルチコイド、イリノテカン、レプトマイシン、ロイロシン (*leurosine*)、リドカイン、ロムスチン (CCNU)、マイタシノイド、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン (*mercaptopurine*)、メトブテリン、メトレキセート、ミスラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、N8-アセチルスペルミジン、ポドフィロトキシン、プロカイン、プロプラノロール、ブテリジン、ピューロマイシン、ピロロベンゾジアゼピン (PDB)、リゾキシン、ストレプトゾトシン、タリソマイシン (*tallysomycin*)、タキソール、テニポシド (*tenoposide*)、テトラカイン、チオテパ (*thioepa*)、クロラムブシリ、トメイマイシン (*tomayomycin*)、トボテカン、ツブリシン (*tubulysin*)、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビンおよび前述のいずれかの誘導体が挙げられる。ある特定の実施形態によると、抗EGFRvIII抗体にコンジュゲートされる細胞傷害性薬剤は、DM1もしくはDM4等のマイタシノイド、トメイマイシン誘導体またはドラスタチン誘導体である。本技術分野で公知の他の細胞傷害性薬剤は、本発明の範囲内であるとみなされ、例えば、リシン、C. difficile毒素、シュードモナス外毒素、リシン、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、ブリオジン (*bryodin*)、サポリン、ヨウシュヤマゴボウ毒素 (すなわち、ファイトラッカトキシン (*phytolaccatoxin*) およびファイトラッキゲニン (*phytolaccigenin*)) 等のタンパク質毒素、およびSapraら、Pharmacol. & Therapeutics, 2013年、138巻: 452~469頁に表記されているもの等のその他を含む。

## 【0074】

本発明は、1種または複数の放射性核種にコンジュゲートされた抗EGFRvIII抗体を含む抗体 - 放射性核種コンジュゲート (ARC) も含む。本発明の本態様の文脈において使用することができる例示的な放射性核種として、例えば、<sup>225</sup>Ac、<sup>212</sup>Bi、<sup>213</sup>Bi、<sup>131</sup>I、<sup>186</sup>Re、<sup>227</sup>Th、<sup>222</sup>Rn、<sup>223</sup>Ra、<sup>224</sup>Raおよび<sup>90</sup>Yが挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0075】

本発明のある特定の実施形態では、リンカー分子を介して細胞傷害性薬剤 (例えば、上

10

20

30

40

50

に開示されている細胞傷害性薬剤のいずれか)にコンジュゲートされた抗EGFRvIII抗体を含むADCが提供される。本技術分野で公知のいかなるリンカー分子またはリンカー技術を使用して、本発明のADCを作出または構築してもよい。ある特定の実施形態では、リンカーは、切断可能リンカーである。他の実施形態によると、リンカーは、切断不能リンカーである。本発明の文脈において使用することができる例示的なリンカーは、例えば、MC(6-マレイミドカプロイル)、MP(マレイミドプロパノイル)、val-cit(バリン-シトルリン)、val-alanine(バリン-アラニン)、プロテアーゼ切断可能リンカーにおけるジペプチド部位、alanine-phenylalanine(アラニン-フェニルアラニン)、プロテアーゼ切断可能リンカーにおけるジペプチド部位、PAB(p-アミノベンジルオキシカルボニル)、SPP(N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート)、SMCC(N-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)、SIB( N-スクシンイミジル(4-ヨード-アセチル)アミノベンゾエート)ならびにこれらの変体および組み合わせを含む、またはこれらからなるリンカーを含む。本発明の文脈において使用することができるリンカーの追加的な例は、例えば、それらの内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、U.S.7,754,681およびDucry, Bioconjugate Chem., 2010年、21巻：5～13頁ならびにこれらに引用されている参考文献に開示されている。

#### 【0076】

本発明は、リンカーが、抗体または抗原結合分子内の特定のアミノ酸における付着により抗EGFRvIII抗体または抗原結合分子を薬物または細胞毒に接続するADCを含む。本発明の本態様の文脈において使用することができる例示的なアミノ酸付着は、例えば、リジン(例えば、U.S.5,208,020; U.S.2010/0129314; Hollanderら、Bioconjugate Chem.、2008年、19巻：358～361頁；WO2005/089808；U.S.5,714,586；U.S.2013/0101546；およびU.S.2012/0585592を参照)、システイン(例えば、U.S.2007/0258987；WO2013/055993；WO2013/055990；WO2013/053873；WO2013/053872；WO2011/130598；U.S.2013/0101546；およびU.S.7,750,116を参照)、セレンオシスティン(例えば、WO2008/122039；およびHoferら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、2008年、105巻：12451～12456頁を参照)、ホルミルグリシン(例えば、Carricoら、Nat. Chem. Biol.、2007年、3巻：321～322頁；Agarwallaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、2013年、110巻：46～51頁およびRabukaら、Nat. Protocols、2012年、10巻：1052～1067頁を参照)、非天然アミノ酸(例えば、WO2013/068874およびWO2012/166559を参照)および酸性アミノ酸(例えば、WO2012/05982を参照)を含む。リンカーは、炭水化物(例えば、U.S.2008/0305497およびRyanら、Food & Agriculture Immunol.、2001年、13巻：127～130頁を参照)およびジスルフィドリンカー(例えば、WO2013/085925、WO2010/010324、WO2011/018611およびShaunakら、Nat. Chem. Biol.、2006年、2巻：312～313頁を参照)への付着により、抗原結合タンパク質にコンジュゲートすることもできる。

#### 【0077】

ペプチド、ポリペプチドまたは他の高分子に化学部分をコンジュゲートするための本技術分野で公知のいかなる方法を本発明の文脈において使用して、本明細書に記載されている抗EGFRvIII ADCを作製してもよい。リンカーを介した抗体-薬物コンジュゲーションのための例示的な方法は、本明細書における実施例12に表記されている。この例示的な方法に関する変種は、当業者であれば認めることができ、本発明の範囲内であるとみなされる。

10

20

30

40

50

## 【0078】

ある特定の実施形態によると、本発明は、本明細書に記載されている抗EGFRvIII抗体（例えば、H1H1863N2と命名された抗体）が、これによりその開示全体が参照により本明細書に組み入れられるWO2014/145090に表記されているリンカーライド物質（例えば、本明細書において「M0026」とも称される、化合物「7」）にコンジュゲートされたADCを提供する（本明細書における実施例12も参照）。

## 【0079】

## エピトープマッピングおよび関連技術

本発明の抗体が結合するエピトープは、EGFRvIIITンパク質の3個またはそれを超える（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個またはそれを超える）アミノ酸の単一の近接配列からなることができる。あるいは、エピトープは、EGFRvIIIの複数の非近接アミノ酸（またはアミノ酸配列）からなることができる。一部の実施形態では、エピトープは、EGFRvIIITのリガンド結合ドメインにまたはその付近に位置する。他の実施形態では、エピトープは、EGFRvIIITのリガンド結合ドメインの外側に、例えば、係るエピトープに結合される場合、抗体が、EGFRvIIITへのリガンド結合に干渉しないEGFRvIIIの表面における位置に位置する。

## 【0080】

本発明は、ある特定の実施形態によると、EGFRvIIITに特異的に結合する（かつEGFRに結合しない）抗EGFRvIIIT抗体を含み、前記抗体は、EGFRvIIIT接合部ペプチド（例えば、配列番号148）を認識する。係る抗体は、本明細書において、「接合部ペプチド結合剤」、「EGFRvIIITペプチド結合抗体」その他と称することができる。本発明は、他の実施形態によると、EGFRvIIITに特異的に結合する（かつEGFRに結合しない）抗EGFRvIIIT抗体を含み、前記抗体は、EGFRvIIIT接合部ペプチドを認識しない（例えば、配列番号148の接合部ペプチドを認識しない、および/または配列番号165のペプチドを認識しない）。係る抗体は、本明細書において、「コンフォメーション性結合剤」、「EGFRvIIITコンフォメーション性エピトープ結合剤」その他と称することができる。

## 【0081】

当業者に公知の様々な技法を使用して、抗体が、ポリペプチドまたはタンパク質内の「1個または複数のアミノ酸と相互作用」するか決定することができる。例示的な技法は、例えば、Antibodies、HarlowおよびLane(Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harb.、NY)に記載されているもの等の慣用的なクロスプロッキングアッセイ、アラニン走査変異解析、ペプチドプロット解析(Reineke、2004年、Methods Mol Biol 248巻：443～463頁)およびペプチド切断解析を含む。加えて、抗原のエピトープ切除、エピトープ抽出および化学修飾等の方法を用いることができる(Tomer、2000年、Protein Science 9巻：487～496頁)。抗体が相互作用するポリペプチド内のアミノ酸を同定するために使用することのできる別の方法は、質量分析により検出される水素/重水素交換である。一般用語において、水素/重水素交換方法は、目的のタンパク質を重水素標識するステップと、続いて抗体を重水素標識タンパク質に結合させるステップを含む。次に、タンパク質/抗体複合体を水に移して、抗体によって保護された残基（重水素標識されたままになる）を除く全残基において水素-重水素交換を行わせる。抗体の解離後に、標的タンパク質を、プロテアーゼ切断および質量分析による解析に付し、これにより、抗体が相互作用する特異的なアミノ酸に相当する重水素標識残基を明らかにする。例えば、Ehring(1999年)Analytical Biochemistry 267巻(2号)：252～259頁；EngenおよびSmith(2001年)Anal. Chem. 73巻：256A～265A頁を参照されたい。

## 【0082】

10

20

30

40

50

本発明は、本明細書に記載されている特異的な例示的な抗体（例えば、本明細書における表1に表記されているアミノ酸配列のいずれかを含む抗体）のいずれかと同じエピトープに結合する抗EGFRvIII抗体をさらに含む。同様に、本発明は、EGFRvIIIへの結合に関して、本明細書に記載されている特異的な例示的な抗体（例えば、本明細書における表1に表記されているアミノ酸配列のいずれかを含む抗体）のいずれかと競合する抗EGFRvIII抗体も含む。

#### 【0083】

本技術分野で公知かつ本明細書で例証されている慣用的な方法を使用することにより、抗体が、参照抗EGFRvIII抗体と同じエピトープに結合するか、またはこれと結合に関して競合するか容易に決定することができる。例えば、被験抗体が、本発明の参照抗EGFRvIII抗体と同じエピトープに結合するか決定するために、参照抗体を、EGFRvIIIタンパク質に結合させる。次に、EGFRvIII分子に結合する被験抗体の能力を評価する。被験抗体が、参照抗EGFRvIII抗体との飽和結合後にEGFRvIIIに結合することができる場合、被験抗体が、参照抗EGFRvIII抗体とは異なるエピトープに結合すると結論付けることができる。他方では、被験抗体が、参照抗EGFRvIII抗体との飽和結合後にEGFRvIII分子に結合できない場合、被験抗体は、本発明の参照抗EGFRvIII抗体によって結合されるエピトープと同じエピトープに結合し得る。続いて、追加の慣用的な実験法（例えば、ペプチド変異および結合解析）を実行して、観察された被験抗体の結合の欠如が、実際に、参照抗体と同じエピトープへの結合によるものであるか、あるいは立体的遮断（または別の現象）が、観察される結合の欠如の原因であるかを確認することができる。この種の実験は、ELISA、RIA、Biacore、フローサイトメトリーまたは本技術分野で利用できる他のいずれかの定量的もしくは定性的抗体結合アッセイを使用して行うことができる。本発明のある特定の実施形態に従って、例えば、1、5、10、20または100倍過剰な一方の抗体が、競合的結合アッセイ（例えば、Jung hansら、Cancer Res. 1990年：50巻：1495～1502頁を参照）において測定される通り、他方の結合を少なくとも50%、ただし好ましくは75%、90%さらには99%阻害する場合、2種の抗体は、同じ（または重複する）エピトープに結合する。あるいは、一方の抗体の結合を低下または排除する抗原における基本的にあらゆるアミノ酸変異が、他方の結合を低下または排除する場合、2種の抗体は、同じエピトープに結合すると考慮される。一方の抗体の結合を低下または排除するアミノ酸変異のサブセットのみが、他方の結合を低下または排除する場合、2種の抗体は、「重複するエピトープ」を有すると考慮される。

#### 【0084】

抗体が、参照抗EGFRvIII抗体と結合に関して競合（または結合に関して交差競合）するか否か決定するために、2種の配向性において上に記載されている結合手法を行う：第1の配向性において、参照抗体を、飽和条件下でEGFRvIIIタンパク質に結合させ、続いてEGFRvIII分子への被験抗体の結合を評価する。第2の配向性において、被験抗体を、飽和条件下でEGFRvIII分子に結合させ、続いてEGFRvIII分子への参照抗体の結合を評価する。両方の配向性において、第1の（飽和）抗体のみが、EGFRvIII分子に結合することができる場合、被験抗体および参照抗体が、EGFRvIIIへの結合に関して競合すると結論付けられる。当業者によって認められる通り、参照抗体と結合に関して競合する抗体は、参照抗体と同じエピトープに必ずしも結合しないが、重複するまたは隣接するエピトープに結合することにより、参照抗体の結合を立体的に遮断することができる。

#### 【0085】

##### ヒト抗体の調製

本発明の抗EGFRvIII抗体は、完全ヒト抗体となり得る。完全ヒトモノクローナル抗体を含むモノクローナル抗体を生成するための方法は、本技術分野で公知である。いずれかの係る公知の方法を本発明の文脈において使用して、ヒトEGFRvIIIに特異的に結合するヒト抗体を作製することができる。

10

20

30

40

50

## 【0086】

例えば V E L O C I M M U N E (商標) 技術、または完全ヒトモノクローナル抗体を生成するための他のいずれかの同様の公知の方法を使用して、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する、 E G F R v I I I に対する高親和性キメラ抗体が、最初に単離される。後述する実験セクションにおける通り、抗体は、親和性、リガンド遮断活性、選択性、エピトープ等を含む望ましい特徴に関して特徴付けされ、選択される。必要に応じて、マウス定常領域を、所望のヒト定常領域、例えば、野生型または修飾型 I g G 1 または I g G 4 と置き換えて、完全ヒト抗 E G F R v I I I 抗体を生成する。選択される定常領域は、特定の用途に応じて変動し得るが、高親和性抗原結合および標的特異性特徴は、可変領域に属する。ある特定の事例において、完全ヒト抗 E G F R v I I I 抗体は、抗原陽性 B 細胞から直接的に単離される。

10

## 【0087】

## 生物学的同等物

本発明の抗 E G F R v I I I 抗体および抗体断片は、記載されている抗体のアミノ酸配列から変動するがヒト E G F R v I I I に結合する能力を保持するアミノ酸配列を有するタンパク質を包含する。係る改変体抗体および抗体断片は、親配列と比較してアミノ酸の 1 個または複数の付加、欠失または置換を含むが、記載されている抗体の生物学的活性と基本的に同等な生物学的活性を示す。同様に、本発明の抗 E G F R v I I I 抗体をコードする D N A 配列は、開示されている配列と比較してヌクレオチドの 1 個または複数の付加、欠失または置換を含むが、本発明の抗 E G F R v I I I 抗体または抗体断片と基本的に生物学的に同等である抗 E G F R v I I I 抗体または抗体断片をコードする配列を包含する。係る改変体アミノ酸および D N A 配列の例は、上記で検討されている。

20

## 【0088】

2 種の抗原結合タンパク質または抗体が、例えば、同じモル濃度の用量にて類似の実験条件下、単一用量 (d o e s) または複数用量のいずれかで投与された際に、その吸収の速度および程度有意差を示さない薬学的同等物または薬学的代替物である場合、両者は生物学的に同等であるとみなされる。いくつかの抗体が、その吸収の程度において同等であるが、その吸収速度においては同等ではない場合において、これら抗体は、同等物または薬学的代替物であるとみなされ、そして係る吸収速度における差が意図的であり、標識において反映され、例えば慢性使用における有効な体内薬物濃度の到達に必須ではなく、試験される特定の薬物製品にとって医学的に無意味であるとみなされるため、これらが生物学的に同等であると依然としてみなされ得る。

30

## 【0089】

一実施形態では、2 種の抗原結合タンパク質は、その安全性、純度および効力において臨床的に有意義な差がない場合、生物学的に同等である。

## 【0090】

一実施形態では、参照産物および生物学的産物の間で切り替えない継続的療法と比較して、免疫原性の臨床的に有意な変化または有効性の減弱化を含む有害効果のリスクにおいて増大が予想されずに、患者に対して、参照産物および生物学的産物の間でこのような切り替えを 1 回または複数回行うことができる場合、2 種の抗原結合タンパク質は、生物学的に同等である。

40

## 【0091】

一実施形態では、2 種の抗原結合タンパク質が両者共に、使用条件 ( 単数または複数 ) に対し共通の作用機序 ( 単数または複数 ) によって、係る機序が公知の程度まで作用する場合、2 種の抗原結合タンパク質は、生物学的に同等である。

## 【0092】

生物学的同等性は、in vivo および in vitro 方法によって示すことができる。生物学的同等性の測定は、例えば、(a) 時間の関数として血液、血漿、血清または他の生体液における抗体またはその代謝物の濃度を測定する、ヒトまたは他の哺乳動物における in vivo 検査；(b) ヒト in vivo バイオアベイラビリティデータ

50

と相關され、これを合理的に予測する *in vitro* 検査；(c) 時間の関数として抗体（またはその標的）の適切な急性薬理学的效果を測定する、ヒトまたは他の哺乳動物における *in vivo* 検査；および(d) 抗体の安全性、有効性またはバイオアベイラビリティまたは生物学的同等性を確立する十分に制御された臨床治験における検査を含む。

#### 【0093】

本発明の抗 E G F R v I I I 抗体の生物学的に同等な改変体は、例えば、残基もしくは配列の様々な置換を行うことによりまたは生物学的活性に必要とされない末端もしくは内部残基もしくは配列を欠失させることにより、構築することができる。例えば、生物学的活性に必須ではないシステイン残基を欠失または他のアミノ酸と置き換えて、復元における不要なまたは不正確な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止することができる。他の文脈において、生物学的に同等な抗体は、抗体のグリコシル化特徴を修飾するアミノ酸変化、例えば、グリコシル化を排除または除去する変異を含む抗 E G F R v I I I 抗体改変体を含むことができる。

#### 【0094】

##### 種選択性および種交差反応性

本発明は、ある特定の実施形態によると、ヒト E G F R v I I I に結合するが、他の種由来の E G F R v I I I には結合しない抗 E G F R v I I I 抗体を提供する。本発明は、ヒト E G F R v I I I および 1 種または複数の非ヒト種に由来する E G F R v I I I に結合する抗 E G F R v I I I 抗体も含む。例えば、本発明の抗 E G F R v I I I 抗体は、ヒト E G F R v I I I に結合することができ、場合により、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、カニクイザル (*cynomolgous*)、マーモセット、アカゲザルまたはチンパンジーの E G F R v I I I のうち 1 種または複数に結合しても結合しなくてもよい。本発明のある特定の例示的な実施形態によると、ヒト E G F R v I I I およびカニクイザル（例えば、*Macaca fascicularis*）E G F R v I I I に特異的に結合する抗 E G F R v I I I 抗体が提供される。本発明の他の抗 E G F R v I I I 抗体は、ヒト E G F R v I I I に結合するが、カニクイザル E G F R v I I I には結合しない、またはごく弱く結合する。

#### 【0095】

##### 多特異的抗体

本発明の抗体は、単一特異的または多特異的（例えば、二重特異的）となり得る。多特異的抗体は、1 種の標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的となり得る、あるいは 2 種以上の標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含有し得る。例えば、Tuttlar、1991 年、J. Immunol. 147 卷：60～69 頁；Kufferら、2004 年、Trends Biotechnol. 22 卷：238～244 頁を参照されたい。本発明の抗 E G F R v I I I 抗体は、別の機能分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質に連結するまたはこれと同時発現させることができる。例えば、抗体またはその断片は、別の抗体または抗体断片等、1 種または複数の他の分子実体へと機能的に連結して（例えば、化学的カップリング、遺伝的融合、非共有結合的会合または他の方法により）、第 2 の結合特異性を有する二重特異的または多特異的抗体を产生することができる。

#### 【0096】

本発明は、免疫グロブリンの一方のアームがヒト E G F R v I I I に結合し、免疫グロブリンの他方のアームが第 2 の抗原に特異的な二重特異的抗体を含む。E G F R v I I I 結合アームは、本明細書における表 1 に表記されている H C V R / L C V R または C D R アミノ酸配列のいずれかを含むことができる。ある特定の実施形態では、E G F R v I I I 結合アームは、ヒト E G F R v I I I に結合し、E G F R v I I I へのリガンド結合を遮断する。他の実施形態では、E G F R v I I I 結合アームは、ヒト E G F R v I I I に結合するが、E G F R v I I I へのリガンド結合を遮断しない。

#### 【0097】

10

20

30

40

50

本発明の文脈において使用することのできる例示的な二重特異的抗体フォーマットは、第1の免疫グロブリン(Ig)C<sub>H</sub><sub>3</sub>ドメインおよび第2のIgC<sub>H</sub><sub>3</sub>ドメインの使用であって、第1および第2のIgC<sub>H</sub><sub>3</sub>ドメインが、互いに少なくとも1個のアミノ酸が異なり、少なくとも1個のアミノ酸の差異が、アミノ酸の差異を欠く二重特異的抗体と比較してプロテインAへの二重特異的抗体の結合を低下させる使用を含む。一実施形態では、第1のIgC<sub>H</sub><sub>3</sub>ドメインは、プロテインAに結合し、第2のIgC<sub>H</sub><sub>3</sub>ドメインは、H95R修飾(IMGTエクソンナンバリングによる；EUナンバリングによるH435R)等、プロテインA結合を低下または消失させる変異を含有する。第2のC<sub>H</sub><sub>3</sub>は、Y96F修飾(IMGTによる；EUによるY436F)をさらに含むことができる。第2のC<sub>H</sub><sub>3</sub>内に見出すことのできるさらなる修飾は、IgG1抗体の場合、D16E、L18M、N44S、K52N、V57MおよびV82I(IMGTによる；EUによるD356E、L358M、N384S、K392N、V397MおよびV422I)；IgG2抗体の場合、N44S、K52NおよびV82I(IMGT；EUによるN384S、K392NおよびV422I)；ならびにIgG4抗体の場合、Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79QおよびV82I(IMGTによる；EUによるQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419QおよびV422I)を含む。上に記載されている二重特異的抗体フォーマットにおける変種は、本発明の範囲内であるとみなされる。  
10

## 【0098】

本発明の文脈において使用することのできる他の例示的な二重特異的フォーマットとして、例えば、scFvに基づくまたはダイアボディ二重特異的フォーマット、IgG-scFv融合体、二重可変ドメイン(DVD)-Ig、クアドローマ、ノブントゥーホール(knobs-into-holes)、共通軽鎖(例えば、ノブントゥーホールを有する共通軽鎖等)、CrossMab、CrossFab、(SEED)ボディ、ロイシンジッパー、デュオボディ(Duobody)、IgG1/IgG2、二重作用Fab(DAF)-IgGおよびMab<sup>2</sup>二重特異的フォーマットが挙げられるがこれらに限定されない(例えば、前述のフォーマットの総説に関して、Kleinら、2012年、mAbs 4巻：6号、1～11頁およびこれに引用されている参考文献を参照)。二重特異的抗体は、ペプチド/核酸コンジュゲーションを使用して構築することもでき、例えば、直交性の化学反応性を有する非天然アミノ酸を使用して、部位特異的抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを生成すると、これは、特定された組成、結合価および幾何学を有する多量体の複合体へと自己集合する(例えば、Kazaneら、J. Am. Chem. Soc. [Publ: 2012年12月4日]を参照)。  
20  
30

## 【0099】

## 治療製剤および投与

本発明は、本発明の抗EGFRVIII抗体またはその抗原結合性断片を含む薬学的組成物を提供する。本発明の薬学的組成物は、適した担体、賦形剤および移動、送達、耐性その他の向上をもたらす他の薬剤と共に製剤化される。多数の適切な製剤は、あらゆる薬剤師に公知の処方集に見出すことができる：Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Easton, PA。これらの製剤は、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油、脂質、脂質(カチオン性またはアニオン性)含有小胞(LIPOFECTIN(商標)、Life Technologies、Carlsbad、CA等)、DNAコンジュゲート、無水吸収ペースト、水中油型および油中水型エマルジョン、エマルジョンカーボワックス(様々な分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲルならびにカーボワックスを含有する半固体混合物を含む。Powellら、「Compendium of excipients for parenteral formulation」PDA(1998年)J Pharm Sci Technol 52巻：238～311頁も参照されたい。  
40

## 【0100】

患者に投与される抗体の用量は、患者の年齢およびサイズ、標的疾患、状態、投与経路その他に応じて変動し得る。好まれる用量は、典型的には、体重または体表面積に従って計算される。成体患者において、通常、約0.01～約20mg/kg体重、より好ましくは、約0.02～約7、約0.03～約5または約0.05～約3mg/kg体重の単一用量で、本発明の抗体を静脈内投与することが有利となり得る。状態の重症度に応じて、処置の頻度および持続時間を調整することができる。抗EGFRvIII抗体を投与するための有効投薬量およびスケジュールは、経験的に決定することができる；例えば、患者の進行を定期的評価によってモニターすることができ、これに従って用量を調整することができる。さらに、投薬量を種間で一定の基準で決めることは、本技術分野で周知の方法を使用して行うことができる（例えば、Mordentilら、1991年、Pharmaceut. Res. 8巻：1351頁）。

#### 【0101】

様々な送達系が公知であり、本発明の薬学的組成物の投与に使用することができ、例えば、リポソーム中のカプセル化、マイクロパーティクル、マイクロカプセル、変異体ウイルスを発現することのできる組換え細胞、受容体媒介性エンドサイトーシスが挙げられる（例えば、Wuら、1987年、J. Biol. Chem. 262巻：4429～4432頁を参照）。導入の方法として、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外および経口経路が挙げられるがこれらに限定されない。組成物は、いずれかの簡便な経路により、例えば、注入またはボーラス注射により、上皮または粘膜皮膚内層（例えば、口腔粘膜、直腸および腸管粘膜等）を通した吸収により投与することができ、他の生物学的に活性な薬剤と共に投与することができる。投与は、全身性であっても局所性であってもよい。

#### 【0102】

本発明の薬学的組成物は、標準的な針およびシリンジにより皮下にまたは静脈内に送達することができる。加えて、皮下送達に関して、ペン型送達装置（pen delivery device）は、本発明の薬学的組成物の送達において容易に適用される。係るペン型送達装置は、再使用可能または使い捨てとなり得る。再使用可能なペン型送達装置は、一般に、薬学的組成物を含有する交換可能なカートリッジを利用する。カートリッジ内の薬学的組成物が全て投与され、カートリッジが空となったら、空のカートリッジを容易に廃棄し、薬学的組成物を含有する新しいカートリッジと交換することができる。続いて、ペン型送達装置を再使用することができる。使い捨てペン型送達装置において、交換可能なカートリッジは存在しない。寧ろ、使い捨てペン型送達装置は、装置内のリザーバーに保たれた薬学的組成物を予め充填した状態で届けられる。リザーバーから薬学的組成物が空になったら、装置全体が廃棄される。

#### 【0103】

多数の再使用可能なペン型および自動注入送達装置が、本発明の薬学的組成物の皮下送達において適用される。例として、ほんの数例ではあるが、AUTOPEN（商標）（Owen Mumford, Inc.、英国ウッドストック）、DISETRONIC（商標）ペン（Disetronic Medical Systems、スイス、ブルグドルフ）、HUMALOG MIX 75/25（商標）ペン、HUMALOG（商標）ペン、HUMALIN 70/30（商標）ペン（Eli Lilly and Co.、インディアナ州インディアナポリス）、NOVOPEN（商標）I、IIおよびIII（Novo Nordisk、デンマーク、コペンハーゲン）、NOVOPEN JUNIOR（商標）（Novo Nordisk、デンマーク、コペンハーゲン）、BD（商標）ペン（Becton Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレイクス）、OPTIPEN（商標）、OPTIPEN PRO（商標）、OPTIPEN STARLET（商標）およびOPTICLIK（商標）（sanofi-aventis、ドイツ、フランクフルト）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の薬学的組成物の皮下送達において適用される使い捨てペン型送達装置の例として、ほんの数例ではあるが、SOLOSTAR（商標）ペン（sanofi-aventis）、FLEXPE

N(商標)(Novo Nordisk)およびKWIK PEN(商標)(Eli Lilly)、SURECLICK(商標)自動注入装置(Amgen、Thousand Oaks、CA)、PENLET(商標)(Haselmeier、Stuttgart、Germany)、EPIPEN(Dey、L.P.)およびHUMIRA(商標)ペン(Abbott Labs、Abbott Park IL)が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0104】

ある特定の状況において、薬学的組成物は、放出制御系において送達することができる。一実施形態では、ポンプを使用することができる(Langer、上記参照；Sefton、1987年、CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14巻：201頁を参照)。別の実施形態では、ポリマー材料を使用することができる；Medical Applications of Controlled Release、LangerおよびWise(編)、1974年、CRC Pres.、Boca Raton、Floridaを参照されたい。さらに別の実施形態では、放出制御系は、組成物の標的に近接して置くことができ、このため、全身性用量の一部分のみを必要とする(例えば、Goodson、1984年、Medical Applications of Controlled Release、上記参照中、2巻、115～138頁を参照)。他の放出制御系は、Langer、1990年、Science 249巻：1527～1533頁による総説で検討されている。

#### 【0105】

注射用調製物は、静脈内、皮下、皮内および筋肉内注射、点滴注入等のための剤形を含むことができる。これらの注射用調製物は、公に知られた方法によって調製することができる。例えば、注射用調製物は、例えば、注射のために従来から使用されてきた無菌水性媒体または油性媒体において、上に記載されている抗体またはその塩を溶解、懸濁または乳化することにより調製することができる。注射用の水性媒体として、例えば、アルコール(例えば、エタノール)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤[例えば、ポリソルベート80、水素化ヒマシ油のHCO-50(ポリオキシエチレン(50mol)付加物)]等、適切な可溶化剤と組み合わせて使用することのできる、生理食塩水、グルコースを含有する等張性溶液および他の補助的薬剤等が存在する。油性媒体として、例えば、安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等、可溶化剤と組み合わせて使用することができる、ゴマ油、ダイズ油等が用いられている。このように調製された注射液は、好ましくは、適切なアンプル内に充填される。

#### 【0106】

有利には、上に記載されている経口または非経口的使用のための薬学的組成物は、活性成分の用量を適合させるのに適した単位用量の剤形へと調製される。単位用量の係る剤形として、例えば、錠剤、丸剤、カプセル、注射(アンプル)、坐剤等が挙げられる。含有されている先述の抗体の量は一般に、単位用量の剤形当たり約5～約500mgである；特に注射形態において、先述の抗体は、約5～約100mgで、他の剤形では約10～約250mgで含有されることが好ましい。

#### 【0107】

##### 抗体の治療的使用

本発明は、それを必要とする被験体に、抗EGFRvIII抗体または抗EGFRvII抗体を含む抗体-薬物コンジュゲート(例えば、本明細書における表1に表記されているHCVR/LCVRまたはCDR配列のいずれかを含む抗EGFRvIII抗体またはADC)を含む治療組成物を投与するステップを含む方法を含む。治療組成物は、本明細書に開示されている抗EGFRvIII抗体、その抗原結合性断片またはADCのいずれかと、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含むことができる。

#### 【0108】

本発明の抗体およびADCは、EGFRvIII発現または活性に関連するまたはこれ

10

20

30

40

50

に媒介される、あるいは E G F R v I I I および E G F R リガンドの間の相互作用を遮断すること、または E G F R v I I I 活性および / またはシグナリングを他の仕方で阻害すること、および / または受容体内部移行を促進すること、および / または細胞表面受容体数を減少させることによって処置できるいざれかの疾患または障害の処置、予防および / または改善にとりわけ有用である。例えば、本発明の抗体および A D C は、E G F R v I I I を発現する、および / またはリガンド媒介性シグナリングに応答する腫瘍の処置に有用である。本発明の抗体および抗原結合性断片を使用して、脳および髄膜、口腔咽頭部、肺および気管支樹、胃腸管、雄性および雌性生殖器管、筋肉、骨、皮膚および付属器、結合組織、脾臓、免疫系、造血性細胞および骨髄、肝臓および尿路ならびに眼等の特殊な感覚器官に生じる原発性および / または転移性腫瘍を処置することもできる。ある特定の実施形態では、本発明の抗体および A D C を使用して、次のがんのうち 1 種または複数を処置する：腎細胞癌、膀胱癌、頭頸部がん、前立腺がん、悪性神経膠腫、骨肉腫、結腸直腸がん、胃がん（例えば、M E T 増幅による胃がん）、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、滑膜肉腫、甲状腺がん、乳がんまたはメラノーマ。

#### 【 0 1 0 9 】

本明細書に記載されている処置方法の文脈において、抗 E G F R v I I I 抗体は、単独療法として（すなわち、唯一の治療剤として）、または 1 種もしくは複数の追加的な治療剤と組み合わせて（その例は、本明細書の他の箇所に記載されている）投与することができる。

#### 【 0 1 1 0 】

具体的な実施形態によると、本発明は、患者におけるがんを処置するため、腫瘍成長を低下させるため、および / または腫瘍退縮を引き起こすための方法を提供する。本発明の本態様に係る方法は、単独で、または第 2 の抗 E G F R v I I I 抗体もしくは A D C と組み合わせて第 1 の抗体 - 薬物コンジュゲート（A D C）を患者に投与するステップを含む。第 1 の A D C は、典型的には、抗体または抗体の抗原結合性断片と細胞毒とを含み、前記第 1 の A D C の前記抗体または抗原結合性断片は、E G F R v I I I に特異的に結合するが、配列番号 1 4 8 の接合部 E G F R v I I I ペプチドにも配列番号 1 6 5 のペプチドにも結合しない（すなわち、前記第 1 の A D C は、コンフォメーション性 E G F R v I I I 結合抗体を含む）。第 2 の抗体または A D C が投与される実施形態では、第 2 の抗体または A D C は、典型的には、抗体または抗体の抗原結合性断片と細胞毒とを含み、前記第 2 の抗体または抗原結合性断片は、E G F R v I I I に特異的に結合し、配列番号 1 4 8 の接合部 E G F R v I I I ペプチドおよび / または配列番号 1 6 5 のペプチドにも結合する（すなわち、前記第 2 の抗体または A D C は、E G F R v I I I 接合部ペプチド結合抗体を含む）。本発明の本態様の文脈において 2 種の別々の抗 E G F R v I I I A D C が使用される場合、両方の A D C は、ある特定の実施形態では、同じ細胞傷害性薬剤または同じクラスの細胞傷害性薬剤を含むことができる。2 種の別々の抗 E G F R v I I I A D C が使用される他の実施形態では、各 A D C は、異なる細胞傷害性薬剤および / または異なるクラスの細胞傷害性薬剤を含むことができる。本発明の本態様の非限定的な例示的な実施形態は、本明細書の実施例 1 4 に表記されている。ある特定の実施形態によると、第 1 の A D C の抗体または抗原結合性断片（すなわち、コンフォメーション性 E G F R v I I I 結合抗体）は、配列番号 3 6 、 3 8 、 4 0 、 4 4 、 4 6 および 4 8 を含む重および軽鎖相補性決定領域、または配列番号 3 4 を含む重鎖可変領域ならびに配列番号 4 2 を含む軽鎖可変領域を含む。

#### 【 0 1 1 1 】

##### 併用療法および製剤

本発明は、1 種または複数の追加的な治療的活性な構成成分と組み合わせた本明細書に記載されている抗 E G F R v I I I 抗体のいざれかを含む組成物および治療製剤、ならびにそれを必要とする被験体に係る組み合わせを投与するステップを含む処置方法を含む。

#### 【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

50

本発明の抗EGFRvIII抗体は、PRLRアンタゴニスト（例えば、抗PRLR抗体またはPRLRの小分子阻害剤）、EGFRアンタゴニスト（例えば、抗EGFR抗体[例えば、セツキシマブまたはパニツムマブ]またはEGFRの小分子阻害剤[例えば、ゲフィチニブまたはエルロチニブ]）、Her2/ErbB2、ErbB3またはErbB4等、別のEGFRファミリーメンバーのアンタゴニスト（例えば、抗ErbB2[例えば、トラスツズマブまたはT-DM1{KADCYLA(登録商標)}]、抗ErbB3もしくは抗ErbB4抗体、またはErbB2、ErbB3もしくはErbB4活性の小分子阻害剤）、cMETアンタゴニスト（agonist）（例えば、抗cMET抗体）、IGF1Rアンタゴニスト（例えば、抗IGF1R抗体）、Braf阻害剤（例えば、ベムラフェニブ、ソラフェニブ、GDC-0879、PLX-4720）、PDGFR-阻害剤（例えば、抗PDGFR-抗体）、PDGFR-阻害剤（例えば、抗PDGFR-抗体または例えば、イマチニブメシレートもしくはスニチニブマレート等の小分子キナーゼ阻害剤）、PDGFリガンド阻害剤（例えば、抗PDGF-A、-B、-Cまたは-D抗体、アブタマー、siRNA等）、VEGFアンタゴニスト（例えば、アフリベルセプト等、VEGFトラップ、例えば、US7,087,411を参照（本明細書において、「VEGF阻害性融合タンパク質」とも称される）、抗VEGF抗体（例えば、ベバシズマブ）、VEGF受容体の小分子キナーゼ阻害剤（例えば、スニチニブ、ソラフェニブまたはパゾパニブ））、DLL4アンタゴニスト（例えば、REGN421等、US2009/0142354に開示されている抗DLL4抗体）、Ang2アンタゴニスト（例えば、H1H685P等、US2011/0027286に開示されている抗Ang2抗体）、FOLH1アンタゴニスト（例えば、抗FOLH1抗体）、STEAP1またはSTEAP2アンタゴニスト（例えば、抗STEAP1抗体または抗STEAP2抗体）、TMPRSS2アンタゴニスト（例えば、抗TMPRSS2抗体）、MSLNアンタゴニスト（例えば、抗MSLN抗体）、CA9アンタゴニスト（例えば、抗CA9抗体）、ウロプラキンアンタゴニスト（例えば、抗ウロプラキン[例えば、抗UPK3A]抗体）、MUC16アンタゴニスト（例えば、抗MUC16抗体）、Tn抗原アンタゴニスト（例えば、抗Tn抗体）、CLEC12Aアンタゴニスト（例えば、抗CLEC12A抗体）、TNFRSF17アンタゴニスト（例えば、抗TNFRSF17抗体）、LGR5アンタゴニスト（例えば、抗LGR5抗体）、一価CD20アンタゴニスト（例えば、リツキシマブ等、一価抗CD20抗体）、PD-1抗体、PD-L1抗体、CD3抗体、CTLA-4抗体等からなる群より選択される1種または複数の追加的な治療的に活性な構成成分（複数可）と同時製剤化することができるおよび/またはこれらと組み合わせて投与することができる。本発明の二重特異的抗原結合分子と組み合わせて有益に投与することができる他の薬剤は、例えば、タモキシafen、アロマターーゼ阻害剤、ならびに小分子サイトカイン阻害剤およびIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18等のサイトカインまたはこれらそれぞれの受容体に結合する抗体を含むサイトカイン阻害剤を含む。

### 【0113】

本発明は、1種または複数の化学療法剤と組み合わせた、本明細書に記載されている抗EGFRvIII抗体のいずれかを含む組成物および治療製剤を含む。化学療法剤の例として、チオテバおよびシクロホスファミド（cyclophosphamide）（cytoxin（商標））等、アルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファンおよびビポスルファン（piposulfan）等、スルホン酸アルキル；ベンゾドパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドパ（meturedopa）およびウレドパ（uredopa）等、アジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド（triethylenethiophosphate）およびトリメチロールメラミン（trimethylololamine）を含むエチレンイミンおよびメチラメラミン（methylameline）；クロラムブシリ、クロルナファジン（chloraphazine）、コロ

ホスファミド (cholophosphamide) 、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンビキン (novembichin) 、フェネステリン (phenesterine) 、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスター等、ナイトロジエンマスター等；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン等、ニトロソウレア (nitrosurea) ；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン (marcelomycin) 、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin) 、ピューロマイシン、クエラマイシン (queelamycin) 、ロドルビシン (rodorubicin) 、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン等、抗生物質；メトレキセートおよび 5 - フルオロウラシル (5 - FU) 等、代謝拮抗薬；デノブテリン、メトレキセート、ブテロブテリン、トリメトレキセート等、葉酸アナログ；フルダラビン、6 - メルカブトブリソニン、チアミブリソニン (thiamiprime) 、チオグアニン等、ブリニアログ；アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフルール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン等、ピリミジンアナログ；カルステロン (calusteron) 、ドロモスタノロンプロピオネット、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン等、アンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン等、抗副腎薬 (anti-adrenal) ；フロリン酸等、葉酸補充薬；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド (aldophosphamide glycoside) ；アミノレブリソニン酸；アムサクリン；ベストラブシル (bestrabucil) ；ビスマントレン (bisantrene) ；エダトレキセート (edatraxate) ；デフォファミン (defofamine) ；デメコルチソニド；ジアジコン；エルフォルニチン (elfornithine) ；エリプチニウムアセテート (elliptinium acetate) ；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット (phenamet) ；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK (商標) ；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ビポブロマン；ガシトシン (gacytosine) ；アラビノシド (「Ara - C」) ；シクロホスファミド；チオテバ；タキサン、例えば、パクリタキセル (Taxol (商標) 、Bristol-Myers Squibb Oncology、Princeton、N.J.) およびドセタキセル (Taxotere (商標) ；Avantis Anthony、France) ；クロラムブシル；ゲムシタビン；6 - チオグアニン；メルカブトブリソニン；メトレキセート；シスプラチニンおよびカルボプラチニン等、白金アナログ；ビンブラスチン；白金；エトポシド (VP-16) ；イホスファミド；マイトマイシン C；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノブテリン；ゼローダ；イバンドロネット；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤 RFS-2000；ジフルオロメチルオルニチニン (DMFO) ；レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタビン；ならびに上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられる。この定義には、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害剤 4(5)-イミダゾール、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン (trioxifene) 、ケオキシフェン (keoxifene) 、LY 117018、オナプリストン (onapristone) およびトレミフェン (フェアストン) を含む抗エストロゲン剤；ならびにフルタミド、ニルタ

10

20

30

40

50

ミド、ビカルタミド、リュープロリドおよびゴセレリン等、抗アンドロゲン剤；ならびに上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体等、腫瘍におけるホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤も含まれる。

#### 【0114】

本発明の抗EGFRvIII抗体は、抗ウイルス薬、抗生物質、鎮痛薬、コルチコステロイド、ステロイド、酸素、抗酸化剤、COX阻害剤、心保護薬（cardioprotectant）、金属キレート剤、IFN-ガンマおよび/またはNSAIDと組み合わせて投与および/または同時製剤化することもできる。

#### 【0115】

追加的な治療的に活性な構成成分（複数可）、例えば、上に列挙されている薬剤またはその誘導体のいずれかは、本発明の抗EGFRvIII抗体の投与の直前に、それと同時に、またはその後に投与することができる；（本開示の目的のため、係る投与レジメンは、追加的な治療的に活性な構成成分「と組み合わせた」抗EGFRvIII抗体の投与とみなされる）。本発明は、本発明の抗EGFRvIII抗体が、本明細書の他の箇所に記載されている追加的な治療的に活性な構成成分（複数可）のうち1種または複数と同時に製剤化された薬学的組成物を含む。10

#### 【0116】

##### 投与レジメン

本発明のある特定の実施形態によると、抗EGFRvIII抗体（または抗EGFRvI antibodyおよび本明細書に言及されている追加的な治療的に活性な薬剤のいずれかの組み合わせを含む薬学的組成物）の複数用量は、規定の時間経過にわたって被験体に投与することができる。本発明の本態様に係る方法は、本発明の抗EGFRvIII抗体の複数用量を被験体に逐次的に投与するステップを含む。本明細書において、「逐次的に投与する」は、抗EGFRvIII抗体の各用量が、異なる時点で、例えば、所定の間隔（例えば、数時間、数日間、数週間または数ヶ月間）によって隔てられた異なる日に被験体に投与されることを意味する。本発明は、抗EGFRvIII抗体の単一の初回用量、続いて抗EGFRvIII抗体の1または複数の二次用量と、任意選択で、続いて抗EGFRvIII抗体の1または複数の三次用量を患者に逐次的に投与するステップを含む方法を含む。20

#### 【0117】

用語「初回用量」、「二次用量」および「三次用量」は、本発明の抗EGFRvIII抗体の投与の時系列を指す。よって、「初回用量」は、処置レジメンの最初に投与される用量であり（「ベースライン用量」とも称される）；「二次用量」は、初回用量の後に投与される用量であり；「三次用量」は、二次用量の後に投与される用量である。初回、二次および三次用量は全て、同じ量の抗EGFRvIII抗体を含有することができるが、一般に、投与頻度の観点から互いに異なっていてもよい。しかし、ある特定の実施形態では、初回、二次および/または三次用量に含有されている抗EGFRvIII抗体の量は、処置過程において互いに変動する（例えば、適宜、上方または下方に調整される）。ある特定の実施形態では、処置レジメンの最初に「負荷用量」として2以上の（例えば、2、3、4または5）用量が投与され、続いてより少ない頻度で投与されるその後の用量（例えば、「維持用量」）が投与される。3040

#### 【0118】

本発明の例示的な特定の実施形態では、各二次および/または三次用量は、直前の用量から1~26（例えば、1、1<sub>1</sub>/2、2、2<sub>1</sub>/2、3、3<sub>1</sub>/2、4、4<sub>1</sub>/2、5、5<sub>1</sub>/2、6、6<sub>1</sub>/2、7、7<sub>1</sub>/2、8、8<sub>1</sub>/2、9、9<sub>1</sub>/2、10、10<sub>1</sub>/2、11、11<sub>1</sub>/2、12、12<sub>1</sub>/2、13、13<sub>1</sub>/2、14、14<sub>1</sub>/2、15、15<sub>1</sub>/2、16、16<sub>1</sub>/2、17、17<sub>1</sub>/2、18、18<sub>1</sub>/2、19、19<sub>1</sub>/2、20、20<sub>1</sub>/2、21、21<sub>1</sub>/2、22、22<sub>1</sub>/2、23、23<sub>1</sub>/2、24、24<sub>1</sub>/2、25、25<sub>1</sub>/2、26、26<sub>1</sub>/2またはそれより長い）週間後に投与される。語句「直前の用量」は、本明細書において、一連の複数の投与において、介50

在する用量が存在しない順番において丁度次の用量の投与の前に患者に投与される抗 E G F R v I I I 抗体の用量を意味する。

#### 【 0 1 1 9 】

本発明の本態様に係る方法は、抗 E G F R v I I I 抗体のいずれかの数の二次および／または三次用量を患者に投与するステップを含むことができる。例えば、ある特定の実施形態では、単一の二次用量のみが、患者に投与される。他の実施形態では、2もしくはそれより多い（例えば、2、3、4、5、6、7、8もしくはそれより多い）二次用量が、患者に投与される。同様に、ある特定の実施形態では、単一の三次用量のみが、患者に投与される。他の実施形態では、2以上の（例えば、2、3、4、5、6、7、8もしくはそれより多い）三次用量が、患者に投与される。投与レジメンは、特定の被験体の生涯にわたり無期限に、または係る処置がもはや治療上の必要がなくなるもしくは有利でなくなるまで行うことができる。10

#### 【 0 1 2 0 】

複数の二次用量を含む実施形態では、各二次用量は、他の二次用量と同じ頻度で投与することができる。例えば、各二次用量は、直前の用量の1～2週間または1～2か月後に患者に投与することができる。同じく、複数の三次用量を含む実施形態では、各三次用量は、他の三次用量と同じ頻度で投与することができる。例えば、各三次用量は、直前の用量の2～12週間後に患者に投与することができる。本発明の特定の実施形態では、二次および／または三次用量が患者に投与される頻度は、処置レジメンの過程にわたって変動し得る。投与の頻度は、医師によって、臨床検査後に個々の患者の必要に応じて処置過程の間に調整することもできる。20

#### 【 0 1 2 1 】

本発明は、2～6負荷用量が第1の頻度で（例えば、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、1ヶ月間に1回、2ヶ月間に1回等）患者に投与され、続いて2またはそれを超える維持用量がより低い頻度で患者に投与される投与レジメンを含む。例えば、本発明の本態様によると、負荷用量が、1ヶ月間に1回の頻度で投与される場合、維持用量は、6週間に1回、2ヶ月間に1回、3ヶ月間に1回等で患者に投与することができる。

#### 【 0 1 2 2 】

##### 抗体の診断的使用

本発明の抗 E G F R v I I I 抗体を使用して、例えば、診断目的で、試料における E G F R v I I I または E G F R v I I I 発現細胞を検出および／または測定することもできる。例えば、抗 E G F R v I I I 抗体またはその断片を使用して、E G F R v I I I の異常発現（例えば、過剰発現、過小発現、発現の欠如等）によって特徴付けられる状態または疾患を診断することができる。E G F R v I I I の例示的な診断アッセイは、例えば、患者から得られた試料を本発明の抗 E G F R v I I I 抗体と接触させるステップを含むことができ、抗 E G F R v I I I 抗体は、検出可能な標識またはレポーター分子で標識されている。あるいは、未標識の抗 E G F R v I I I 抗体は、それ自体が検出可能に標識されている二次抗体と組み合わせて診断適用において使用することができる。検出可能な標識またはレポーター分子は、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>Sもしくは<sup>125</sup>I等、放射性同位元素；フルオレセインイソチオシアネートもしくはローダミン等、蛍光もしくは化学発光部分；またはアルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼもしくはルシフェラーゼ等、酵素となり得る。試料における E G F R v I I I の検出または測定に使用することのできる特異的な例示的アッセイとして、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）および蛍光標識細胞分取（FACS）が挙げられる。3040

#### 【 0 1 2 3 】

本発明に係る E G F R v I I I 診断アッセイにおいて使用することのできる試料は、正常または病的状態における、検出可能な量の E G F R v I I I タンパク質またはその断片を含有する、患者から得ることができるいずれかの組織または流体試料を含む。一般に、健康な患者（例えば、異常な E G F R v I I I のレベルまたは活性に関連する疾患または

状態に罹患していない患者)から得られる特定の試料におけるEGFRvIIIのレベルを測定して、EGFRvIIIのベースラインまたは標準レベルを最初に確立するであろう。続いて、EGFRvIIIのこのベースラインレベルは、EGFRvIII関連疾患または状態を有すると疑われる個体から得られる試料において測定されたEGFRvIIIのレベルに対して比較することができる。

#### 【実施例】

##### 【0124】

次の実施例は、本発明の方法および組成物を作製および使用する方法の完全な開示および説明を当業者に提供できるように示されており、本発明者らが自身の発明として考慮する範囲の限定を企図しない。使用された数に対する正確度を確保するための努力をしたが、一部の実験誤差および偏差が考慮されるべきである。他に断りがなければ、分子量は、平均分子量であり、温度はセ氏温度であり、圧力は大気圧またはその近辺である。

10

##### 【0125】

###### (実施例1) 抗EGFRvIII抗体の生成

VELCIMMUNE(登録商標)マウス(すなわち、ヒト免疫グロブリン重およびカッパー軽鎖可変領域をコードするDNAを含む操作されたマウス)を、EGFRvIIIの細胞外ドメインを含む免疫原で免疫化することにより、抗EGFRvIII抗体を得た。第1のセットの抗体は、H1H2194P、H1H2195P、H2M1863N2、H2M1911N、H2M1912N、H2M1915N、H2M1917N、H2M1918NおよびH3M1913Nと命名された抗体を含む(表1および2に示す通り)。

20

##### 【0126】

EGFRvIII特異的イムノアッセイにより抗体免疫応答をモニターした。所望の免疫応答が達成されたら、脾細胞を収集し、マウス骨髄腫細胞と融合してその生存能を保ち、ハイブリドーマ細胞株を形成した。ハイブリドーマ細胞株をスクリーニングおよび選択して、EGFRvIII特異的抗体を産生する細胞株を同定した。この技法を使用して、数種類の抗EGFRvIIIキメラ抗体(すなわち、ヒト可変ドメインおよびマウス定常ドメインを保有する抗体)を得た。加えて、US2007/0280945A1に記載されている通り、数種類の完全ヒト抗EGFRvIII抗体を、骨髄腫細胞へ融合することなく抗原陽性B細胞から直接的に単離した。

30

##### 【0127】

別々に、特に参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第2010/0304436A1号において「8088」と記載されているCHO宿主細胞株において、フコシル化が低下したH1H1863N2[「H1H1863N2(Fuc-)」]も調製した。簡潔に説明すると、H1H1863N2の軽鎖および重鎖配列を発現ベクターにクローニングした。軽および重鎖プラスミドならびにCreをコードする遺伝子を含有するpR4004ベクターにより、2百万個の8088細胞をトランسفェクトした。400μg/mlハイグロマイシンによる選択を生き延びたトランسفェクト細胞を、無血清コース不含培地における懸濁下の成長に適応させた。トランسفェクト細胞から、蛍光タンパク質EGFPを発現したが、DsRedもECFPも発現しなかった細胞をフローサイトメトリーにより単離した。選別された細胞を、4×10<sup>5</sup>細胞/mlでシェーカーフラスコに播種し、3日後に培養培地を収集し、その中にある抗体タンパク質[すなわち、H1H1863N2(Fuc-)]をプロテインAクロマトグラフィーにより精製した。得られたH1H1863N2(Fuc-)の質量分析による解析は、本来の抗体であるH1H1863N2(Fuc+)と比べてコアフコースが除去されていることを確認した。本明細書における名称「H1H1863N2」とおよび「H1H1863N2(Fuc+)」は両者共に、フコシル化修飾なしの本来の抗体を示す。

40

##### 【0128】

本実施例の方法に従って生成された例示的な抗EGFRvIII抗体の特定の生物学的特性を、下に記す実施例において詳細に説明する。

50

## 【0129】

(実施例2) 重および軽鎖可変領域アミノ酸および核酸配列

表1は、本発明の選択された抗E G F R v I I I 抗体の重および軽鎖可変領域ならびにCDRのアミノ酸配列識別子を表記する。対応する核酸配列識別子を表2に表記する。

## 【表1】

表1:アミノ酸配列識別子

抗体名称	配列番号:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2194P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H2195P	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M1863N2	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M1911N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M1912N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M1915N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M1917N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M1918N	114	116	118	120	122	124	126	128
H3M1913N	130	132	134	136	138	140	142	144

10

## 【表2】

表2:核酸配列識別子

抗体名称	配列番号:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2194P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H2195P	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M1863N2	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M1911N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M1912N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M1915N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M1917N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M1918N	113	115	117	119	121	123	125	127
H3M1913N	129	131	133	135	137	139	141	143

20

## 【0130】

抗体は典型的には、本明細書において、次の命名法に従って参照される：表1および2に示す通り、Fc接頭語（例えば、「H1H」、「H2M」、「H3M」等）と、続く数的識別子（例えば、「2194」、「2195」、「1863」等）と、続く「P」または「N」接尾語。よって、この命名法に従って、抗体は、本明細書において、例えば、「H1H2194N」、「H2M1911N」、「H3M1913N」等と称することができる。

本明細書に使用されている抗体名称におけるH1H、H2MおよびH3M接頭語は、抗体の特定のFc領域アイソタイプを示す。例えば、「H1H」抗体は、ヒトIgG1Fcを有し、「H2M」抗体は、マウスIgG2Fcを有し、「H3M」抗体は、マウスIgG3Fcを有する（全ての可変領域は、抗体名称における最初の「H」によって表示される通り、完全にヒトのものである）。当業者であれば認められる通り、特定のFcアイソタイプを有する抗体は、異なるFcアイソタイプを有する抗体に変換することができるが（例えば、マウスIgG1Fcを有する抗体は、ヒトIgG4を有する抗体に変換することができる等）、いずれにせよ、可変ドメイン（CDRを含む）（これは表

40

40  
Fcを有する）、マウスIgG2Fcを有する（全ての可変領域は、抗体名称における最初の「H」によって表示される通り、完全にヒトのものである）。当業者であれば認められる通り、特定のFcアイソタイプを有する抗体は、異なるFcアイソタイプを有する抗体に変換することができるが（例えば、マウスIgG1Fcを有する抗体は、ヒトIgG4を有する抗体に変換することができる等）、いずれにせよ、可変ドメイン（CDRを含む）（これは表

50

1 および 2 に示す数的識別子によって示される) は、同じままであり、結合特性は、Fc ドメインの性質にかかわらず、同一または実質的に同様であると予想される。

### 【0131】

以下の実施例において使用される対照構築物

比較目的のために対照構築物を次の実験に含めた: 対照 I : 米国特許第 7,736,644 号に開示されている「13.1.2」抗体のそれぞれ配列番号 142 および 144 に相当するアミノ酸配列を有する重および軽鎖可変ドメインを有するヒト抗 EGFRvIII 抗体 (IgG1); 対照 II : 米国特許第 7,589,180 号に開示されている「ch806」抗体のそれぞれ配列番号 11 および 12 に相当するアミノ酸配列を有する重および軽鎖可変ドメインを有するキメラ抗 EGFRvIII 抗体 (hIgG1); 対照 III : 米国特許出願公開第 2010/0056762 号に開示されている「hu806」抗体のそれぞれ配列番号 42 および 47 に相当するアミノ酸配列を有する重および軽鎖可変ドメインを有するヒト化抗 EGFRvIII 抗体 (hIgG1); 対照 IV : 米国特許第 7,736,644B2 号の「131」抗体のそれぞれ配列番号 2 および 19 に相当するアミノ酸配列を有する重および軽鎖可変ドメインを有するヒト抗 EGFRvIII 抗体 (IgG1)。「13.1.2」抗体は、EGFRvIII の接合部ペプチド (配列番号 148) に特異的であることが公知であり; 「ch806」および「hu806」抗体は、増幅または過剰発現される EGFR (配列番号 146) の残基 311~326 (配列番号 165)、または EGFRvIII の残基 44~59 (配列番号 147) に結合することが公知である。  
10

### 【0132】

(実施例 3) EGFRvIII 結合親和性の決定

37 における表面プラズモン共鳴により、ヒトモノクローナル抗 EGFRvIII 抗体の結合親和性および動態学的定数を決定した。T100 BIACORE (商標) 機器において測定を行った。ヒト IgG1 Fc として発現された抗体 (すなわち、「H1H」名称) を抗ヒト Fc センサー表面 (mAb 捕捉フォーマット) に捕捉し、可溶性单量体 [EGFR-mmh (配列番号 154) および EGFRvIII-mmh (配列番号 152)] または二量体 [EGFR-mFc (配列番号 155) および EGFRvIII-mFc (配列番号 153)] タンパク質を表面にわたって注入した。受容体捕捉フォーマットにおいて、EGFRvIII-mFc または EGFR-mFc のいずれかが BIACORE (商標) チップ上に捕捉され、それぞれの抗体が流れた。Scrubber 2.0 カーブフィッティングソフトウェアを使用して 1:1 結合モデルへとデータを加工および適合させることにより、動態学的会合 ( $k_a$ ) および解離 ( $k_d$ ) 速度定数を決定した。次の通り、動態学的速度定数から結合解離平衡定数 ( $K_D$ ) および解離半減期 ( $t_{1/2}$ ) を計算した:  $K_D (M) = k_d / k_a$ ; および  $t_{1/2} (\text{分}) = \ln 2 / (60 * k_d)$ 。  
20

### 【0133】

結果を表 3 および 4 に示す。NB = 検査した条件下で結合なし; NT = 検査せず。  
30

【表3】

表3(ヒトFc抗体の結合動態)

37°Cにおける結合/MAb捕捉フォーマット					
Ab	検体	$k_a$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M)	T <sup>1/2</sup>
H1H1863N2 (Fuc+)	EGFRvIII-mmh	1.97E+04	8.95E-03	4.54E-07	1.3
	EGFR-mmh	NT	NT	NT	NT
	EGFRvIII-mFc	7.28E+04	8.07E-04	1.11E-08	14
	EGFR-mFc	NT	NT	NT	NT
H1H1863N2 (Fuc-)	EGFRvIII-mmh	3.02E+04	1.02E-02	3.39E-07	1.1
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1.12E+05	6.42E-04	5.73E-09	18
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1911N	EGFRvIII-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1912N	EGFRvIII-mmh	1.83E+04	1.64E-02	8.99E-07	0.7
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2.04E+04	9.71E-04	4.77E-08	12
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1913N	EGFRvIII-mmh	1.63E+02	1.14E-03	7.03E-06	10
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1.40E+04	3.16E-04	2.26E-08	37
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H1915N	EGFRvIII-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	NB	NB	NB	NB
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
H1H2194P	EGFRvIII-mmh	8.10E+04	1.37E-03	1.70E-08	8
	EGFR-mmh	7.60E+04	9.60E-04	1.26E-08	12
	EGFRvIII-mFc	9.54E+04	2.22E-04	2.33E-09	52
	EGFR-mFc	8.10E+04	1.99E-04	2.43E-09	58
H1H2195P	EGFRvIII-mmh	6.48E+04	6.94E-04	1.07E-08	17
	EGFR-mmh	5.66E+04	5.23E-04	9.20E-09	22
	EGFRvIII-mFc	1.02E+05	1.13E-04	1.10E-09	103
	EGFR-mFc	9.20E+04	1.89E-04	2.05E-09	61
対照I	EGFRvIII-mmh	1.29E+05	1.53E-01	1.19E-06	0.1
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	7.15E+04	7.36E-03	1.03E-07	1.6
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
対照II	EGFRvIII-mmh	4.90E+04	7.33E-03	1.50E-07	2
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2.02E+05	4.08E-04	2.02E-09	28
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
対照III	EGFRvIII-mmh	8.57E+04	5.16E-03	6.02E-08	2.2
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	2.52E+05	2.98E-04	1.18E-09	39
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
対照V	EGFRvIII-mmh	1.94E+05	1.59E-02	8.20E-08	1
	EGFR-mmh	NB	NB	NB	NB
	EGFRvIII-mFc	1.91E+05	3.71E-04	1.95E-09	31
	EGFR-mFc	NT	NT	NT	NT

10

20

30

40

【表4】

表4(ヒトFc抗体の結合動態)

37°Cにおける結合/受容体捕捉フォーマット					
Ab	捕捉された受容体	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (M)	T <sub>1/2</sub>
H1H1863N2 (Fuc+)	EGFRvIII-mFc	9.00E+05	2.06E-04	2.30E-10	56
	EGFR-mFc	2.11E+05	1.82E-01	8.65E-07	0.1
H1H1863N2 (Fuc-)	EGFRvIII-mFc	1.01E+06	2.15E-04	2.10E-10	54
	EGFR-mFc	1.99E+05	4.67E-01	2.34E-06	0.02
H1H1911N	EGFRvIII-mFc	3.29E+04	6.43E-04	1.95E-08	18
	EGFR-mFc	7.77E+03	1.74E-03	2.24E-07	7
H1H1912N	EGFRvIII-mFc	9.90E+04	5.37E-04	5.40E-09	22
	EGFR-mFc	3.99E+04	9.14E-04	2.29E-08	13
H1H1913N	EGFRvIII-mFc	6.30E+04	1.00E-06	1.58E-11	11550
	EGFR-mFc	5.93E+03	1.00E-06	1.69E-10	11550
H1H1915N	EGFRvIII-mFc	1.00E+05	3.28E-04	3.20E-09	35
	EGFR-mFc	4.35E+04	8.01E-03	1.84E-07	1.4
H1H2193N	EGFRvIII-mFc	2.17E+05	5.85E-05	2.68E-10	197
	EGFR-mFc	2.04E+05	9.15E-05	4.47E-10	126
H1H2194N	EGFRvIII-mFc	1.88E+05	7.38E-05	3.94E-10	157
	EGFR-mFc	1.87E+05	7.07E-05	3.80E-10	163
H1H2195N	EGFRvIII-mFc	2.37E+05	2.53E-05	1.06E-10	456
	EGFR-mFc	2.25E+05	5.20E-05	2.31E-10	222
対照I	EGFRvIII-mFc	4.46E+05	4.04E-03	9.06E-09	2.9
	EGFR-mFc	NB	NB	NB	NB
対照II	EGFRvIII-mFc	1.25E+06	7.31E-05	5.90E-11	158
	EGFR-mFc	4.44E+05	1.46E-04	3.29E-10	79
対照III	EGFRvIII-mFc	1.49E+06	1.00E-06	6.70E-13	11550
	EGFR-mFc	2.86E+05	6.17E-05	2.15E-10	187

## 【0134】

表3および4に示す通り、数種類の抗体が、EGFRvIIIに対する選択性を示し、mAb捕捉フォーマットにおいて野生型EGFRに結合しなかった。受容体捕捉フォーマットにおいて(表4)、H1H863N2、H1H1915Nおよび対照Iは、最大の選択性を示した。

## 【0135】

(実施例(Experiment)4)ELISAによって決定される抗体特異性

抗hEGFRvIII mAbをさらに特徴付けるために、その結合特異性をELISAによって試験した。次のうち1種でプレートをコーティングした：EGFR-mmh(配列番号154)；EGFRvIII-mmh(配列番号152)；および接合部ペプチド(J-ペプチド)(配列番号148)。リンカーを介してC末端(配列番号149)またはN末端(配列番号150)のいずれかでビオチンに連結された接合部ペプチドのため、プレートをアビシンで予めコーティングした。また、そのN末端にビオチンありまたはなしの無関係ペプチド(対照ペプチド)をコーティングした。コーティングされたプレートに抗EGFRvIII抗体とアイソタイプ対照抗体を加え、1時間25でインキュベートした。次にプレートを洗浄し、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)をコンジュゲートされた抗ヒトFc抗体により、結合した抗EGFRvIII mAbを検出した。テトラ-メチル-ベンジジン(TMB)基質溶液によりプレートを発色させて、比色反応を生じ、VICTOR(X5プレートリーダーにおいて450nmの吸光度を読み取る前に硫酸で中和した。データ解析は、PRISM(商標)ソフトウェア内のシグモイド曲線用応答モデルを使用した。最大応答の発生に要求される抗体濃度の50%として定

10

20

30

40

50

義される、計算された EC<sub>50</sub> 値を、結合効力の指標として使用した。結果を表 5 に示す。  
N T : 検査せず。対照 I ~ III : 上述の通り。

## 【表 5】

表5

抗体	EC50 (nM)						
	EGFR-mm h (25°C)	EGFRvIII -mmh (2 5°C)	J-ペプチ ド	C末端ビ オチンJ- ペプチド	N末端ビ オチンJ- ペプチド	対照ペ プチド	N末端ビ オチン 対照ペ プチド
H1H1863N2 (Fuc-)	>10	0.0766	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1863N2 (Fuc+)	>10	0.113	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1911N	9.06	0.0748	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1912N	0.0405	0.0118	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1913N	2.55	2.14	>10	>10	>10	>10	>10
H1H1915N	>10	0.167	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2193P	0.0040	0.0035	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2194P	0.0037	0.0032	>10	>10	>10	>10	>10
H1H2195P	0.0052	0.0049	>10	>10	>10	>10	>10
対照I	>10	0.0094	0.118	0.0153	0.0106	>10	>10
対照II	0.0095	0.0057	>10	>10	>10	>10	>10
対照III	0.0079	0.0048	NT	NT	NT	NT	NT
アイソタイプ対照	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

## 【0136】

抗体 H1H1863N2、H1H1915 および対照 I は、EGFRvIII に対する強い結合を示したが、野生型 EGFR に対する結合は示さなかった (> 10 nM)。対照 I (接合部ペプチドで免疫化したマウスに由来する「13.1.2」抗体の重および軽鎖配列に相当する配列を有する(米国特許第 7,736,644 号)) を除く抗体のいずれも、接合部ペプチドに対する結合を示さなかった。

## 【0137】

(実施例 5) 抗 EGFRvIII 抗体を使用した EGFR および EGFRvIII のウエスタンプロット

還元および非還元条件下の両方におけるウエスタンプロットにより、抗体のうち 1 種である H1H1863N2 をその結合特徴に関して検査した。EGFR-mmh (配列番号 154) または EGFRvIII-mmh (配列番号 152) を Tris-グリシン SDS-PAGE ゲルにロードし、泳動し、続いてニトロセルロースに移した。ブロッキング後に、メンプランを半分にカットし、抗 EGFRvIII 抗体または抗 His 抗体のいずれかでプローブした。対照 I および II は、上述の通りである。

## 【0138】

図 1a に示す通り、H1H1862N2 (Fuc-) は、還元または非還元 EGFRvIII-mmh または EGFR-mmh に結合しないことから、EGFRvIII に対するコンフォメーション性エピトープを有する。対照的に、対照 II は、還元および非還元条件下で野生型および変形体 III EGFR の両方に結合する一方、接合部ペプチド結合剤である対照 I は、EGFRvIII に特異的である。H1H1863N2 とは対照的に、対照 I および II は両者共に、直鎖状結合エピトープを有する。図 1b は、ウエスタンプロットにおいて混合型の挙動を示す他の EGFRvIII 抗体を示す。

## 【0139】

(実施例 6) EGFR / EGFRvIII ペプチド結合および抗体競合アッセイペプチド結合および抗体競合アッセイを使用して、H1H1863N2 (Fuc-) を

10

20

30

40

50

その結合特徴に関して検査した。ペプチド結合実験のため、FORTEBIO（登録商標）OCTET（登録商標）RED機器におけるストレプトアビジンコーティングされたOCTET（登録商標）チップを使用して、そのC末端においてリンカーを介してビオチンをタグ付けしたEGFRvIII接合部ペプチド（配列番号148）[すなわち、LEEKKGNYVVTDHGGGGSK（配列番号149）-ビオチン]またはそのC末端においてリンカーを介してビオチンをタグ付けしたEGFRの残基311～326からなるペプチド（「EGFR 311～326ペプチド」；配列番号165）[すなわち、CGADSYEMEEDGVRKCGGGGSK（配列番号151）-ビオチン]をほぼ0.4nMの濃さ（thickness）まで捕捉した。ペプチド捕捉後に、コーティングされたチップを抗体の1μM溶液に置き、結合応答を記録した（図2を参照）。対照I～IIは、上述と同じものである。

## 【0140】

予測される通り、対照Iは、C末端ビオチンを有する接合部ペプチドに結合し、対照IIおよびIIIは、C末端ビオチンを有するEGFR 311～326ペプチドに結合した。H1H1863N2(Fuc-)は、該ペプチドのどちらにも結合できなかった。

## 【0141】

抗体交差競合のため、ほぼ200共鳴単位（RU）のhEGFRvIII-mmh（配列番号152）を、高密度の抗ペンタ-ヒスチジンポリクローナル抗体（cat. #34660、QUIAGEN）でコーティングしたBIACORE（商標）表面に捕捉した。同時注入方法論を使用して、500nMの第1のmAbの5分間注入により、捕捉されたhEGFRvIII-mmhを飽和させ、その後直ちに、500nMの第1のmAbを補充した第2のmAb（500nM）のさらなる5分間注入を行った。第2のmAbの、RUとして表現される有意な結合は、これが、結合に関して第1のmAbと競合しないものと解釈した。対照実験のため、アイソタイプマッチしたmAbを、第1のmAbまたは第2のmAbのいずれかとして使用した。結果を表6に示す。

## 【表6】

表6

BIACORE(商標)表面 (第1の抗体)	第2の抗体結合(RU)			
	H1H1863N2(Fuc-)結合応答	対照I結合応答	対照II結合応答	対照III結合応答
EGFRvIII単独	270	234	247	247
EGFRvIII-H1H1863N2(Fuc-)複合体	5	253	191	208
EGFRvIII-対照I複合体	291	5	258	272
EGFRvIII-対照II複合体	225	252	6	25
EGFRvIII-対照III複合体	223	254	13	7

## 【0142】

H1H1863N2(Fuc-)は、hEGFRvIII-mmh捕捉表面への結合に関して対照抗体I～IIIのいずれとも競合しなかった。予想される通り、両者共にEGFRの残基311～326に結合することが公知の対照IIおよびIIIは、EGFRvIII-mmh捕捉表面への結合に関して互いに競合した。

## 【0143】

（実施例7）抗EGFRvIII抗体の細胞結合選択性

抗EGFRvIII mAbの特異性を決定するために、HEK293、EGFRvIIIを発現するHEK293細胞（HEK293/EGFRvIII）およびA431細

10

20

30

40

50

胞に対するその結合を蛍光標識細胞分取（FACS）により解析した。HEK293/E G F R v I I I 細胞は、L I P O F E C T A M I N E（商標）2000トランスフェクション試薬（I N V I T R O G E N（商標））を使用して、全長h E G F R v I I I（配列番号147）を構成的に発現するネオマイシン抵抗性DNAベクターによりHEK293細胞をトランスフェクトすることにより調製した。トランスフェクション後2日目に、およそ2週間のG418選択下に細胞を置いた。E G F R v I I Iを陽性発現する集団を蛍光標識細胞分取（FACS）により単離した。細胞当たりほぼ $3 \times 10^6$ コピーのE G F R v I I Iを発現するHEK293細胞を実験に使用した。簡潔に説明すると、10 μg/m1の抗E G F R v I I I抗体を細胞と共に30分間室温でインキュベートし、洗浄し、二次抗体、すなわち、ヒトIgGに対するフィコエリトリン（P E）標識ヤギF(ab')<sub>2</sub>（cat #109-116-170、Jackson ImmunoResearch Laboratories）と共にインキュベートし、続いてFACS解析前に最終洗浄した。実験の別のセットにおいて、抗E G F R v I I I抗体は、そのリジン残基を介して蛍光色素A L E X A F L U O R（登録商標）488色素（I N V I T R O G E N（商標））に直接的にコンジュゲートし、これにより、二次抗体を使用するステップを排除した。直接的に標識した抗E G F R v I I I抗体を使用したHEK293細胞およびHEK293/E G F R v I I I細胞の結果を表7に示し、二次P E標識抗Fc（ヒトまたはマウス）を使用した結果を表8に示す。直接的に標識した抗E G F R v I I I抗体を使用したA431細胞の結果を表9に示し、二次P E標識抗Fc（ヒトまたはマウス）を使用した結果を表10に示す。対照I、II、III、IVおよびVについては上述されている。MFI：平均蛍光強度。

【表7】

表7

抗体	親HEK293 MFI	HEK 293/EGFRvIII MFI	比 (EGFRvIII MFI/親MFI)
未染色	3548	4005	1.1
H1H1863N2 (Fuc -)	3776	361000	95.6
H1H1863N2 (Fuc +)	3805	360000	94.6
H1H1911N	3593	55064	15.3
H1H1912N	3727	122000	32.7
H1H1913N	4801	239000	49.8
H1H1915N	3461	73413	21.2
対照I	3559	258000	72.5
対照II	3582	313000	87.4
対照IV	24954	439000	17.6

【表8】

表8

抗体	親HEK293 MFI	HEK 293/EGFRvIII MFI	比 (EGFRvIII MFI/親MFI)
未染色	819	920	1.1
PE 抗ヒト IgG	1027	1106	1.1
H1H1863N2 (Fuc -)	1671	301000	180.1
H1H1911N	1812	107000	59.1
H1H2194P	981	18583	18.9
H1H2195P	1176	13517	11.5
対照 I	1480	272000	183.8
対照 II	1015	313000	308.4
対照 IV	23325	354000	15.2
対照 V	11732	997062	85.0

10

【表9】

表9

抗体	A431 MFI	バックグラウンドを 上回る倍数
未染色	6708	1.0
H1H1863N2 (Fuc -)	26036	3.9
H1H1911N	15984	2.4
H1H1912N	14343	2.1
H1H1915N	8440	1.2
対照 I	9652	1.4
対照 II	15716	2.3
対照 III	71514	10.7
対照 IV	962000	143.4

20

【表10】

表10

抗体	A431 MFI	バックグラウンドを 上回る倍数
未染色	1314	0.9
PE 抗ヒト IgG	1428	1.0
H1H1863N2 (Fuc -)	3385	2.4
H1H1911N	3140	2.2
H1H2194P	2291	1.6
H1H2195P	2227	1.6
対照 I	1448	1.0
対照 II	5576	3.9
対照 IV	395000	276.6
対照 V	4240	3.0

40

## 【0144】

数種類の抗EGFRvIII抗体は、直接的に標識された抗EGFRvIII抗体（表7）または二次PE標識抗ヒトIgG（表8）のいずれかを使用して検出した場合、親HEK293細胞を上回るHEK293/EGFRvIII細胞株に対する別個の結合優先性を示した。大部分の抗体は、A431細胞と共にインキュベートした場合（30分間4

50

で)、対照ⅠⅡおよびⅣ抗体を除いて、最小結合から結合なしを呈した(表9および10)。

#### 【0145】

(実施例8) HEK293/EGFRvIII細胞による抗EGFRvIII mAbの内部移行

抗EGFRvIII mAb(10ug/ml)を、HEK293/EGFRVIII(実施例7を参照、上記参照)細胞と共に2時間氷上でインキュベートし、続いて2回PBS洗浄した。次に、細胞を二次DYLI GHT(商標)488コンジュゲート抗ヒトIgG Fab断片(Jackson ImmunoResearch Laboratories)と共に氷上の30分間インキュベーションに付し、続いて2回の追加的なPBS洗浄を行った。抗体を内部移行バッファー(PBS+FBS)において1時間37で内部移行させた、または4で維持した。細胞を4%ホルムアルデヒドにおいて固定し、核をDRAQ5(登録商標)DNA色素(Cell Signaling Technology, Inc.)で染色した。IMAGEXPRESS(商標)ハイコンテンツシステム(Molecular Devices)において40×で画像を取得し、Columbusソフトウェア(Perkin Elmer)を使用して、内部移行した小胞を定量化した。結果を表11および図3に示す。

#### 【表11】

表11

Ab	4°Cにおける小胞の蛍光強度		37°Cにおける小胞の蛍光強度	
	平均	± SD	平均	± SD
H1H1863N2(Fuc-)	29896	8333	617184	46823
H1H1911N	29834	11879	280439	61121
H1H1912N	4912	1774	370201	12205
対照I	21981	4613	263506	28067
対照II	20339	5644	615239	144397
対照IV	92311	19386	1078196	106073

20

#### 【0146】

確固とした内部移行は、H1H1863N2、対照ⅠⅠおよび対照Ⅳに37で生じた。内部移行は、H1H1911N、H1H1912Nおよび対照Iにも観察された。

30

#### 【0147】

(実施例9) U87/EGFRvIII腫瘍異種移植片への抗EGFRvIII抗体の結合

H1H1863N2の特異性をさらに決定するために、EGFRvIIIを発現するヒト神経膠芽腫細胞株U87を、実施例7においてHEK293/EGFRvIII細胞に関して記載されている通りに調製した。細胞当たりほぼ $1.5 \times 10^5$ コピーのEGFRvIIIを発現するU87細胞(U87/EGFRvIII)を実験に使用した。U87/EGFRvIII細胞( $3 \times 10^6$ 細胞)を重症複合免疫不全(SCID)マウスに異種移植し、 $200 \sim 300 \text{ mm}^3$ のメジアンサイズが得られるまで腫瘍を成長させた。次に、マウスに、尾静脈経由でH1H1863N2(Fuc-)またはアイソタイプ対照を注射した。抗体の注射後10分、4時間および24時間目にマウスを屠殺し、腫瘍を除去し、PBSに置いた。腫瘍を直ちに解離させ、アロフィコシアニン(APC)コンジュゲートした抗ヒトFc(hFc-AAPC)抗体で染色した。染色した細胞を、2%ウシ胎仔血清および0.1%アジ化ナトリウムを含有する流れるPBSで3回洗浄した。10分目および4時間目の時点における腫瘍を一晩固定し、続いてフローサイトメーターにより測定した。24時間目の時点で収集した腫瘍は、固定せずに測定した。全試料をACCURI C6 FLOW CYTOMETER(登録商標)(Accuri Cytometers, Inc.)において収集し、平均蛍光強度(MFI)を決定した。結果を表12に示す。MFI値は、2~3つの生物学的複製物の平均±平均の標準誤差(S

40

50

E M ) である。

【表12】

表12

注射後時間	MFI±SEM (U87/EGFRvIII)	
	アイソタイプ対照	H1H1863N2(Fuc-)
10分間	708 ± 4	2259 ± 115
4時間	741 ± 34	10620 ± 2881
24時間	664 ± 34	27923 ± 3297

10

【0148】

アイソタイプ対照と比較して、H1H1863N2 (Fuc-) 抗体は、時間依存的様式で効率的に U87 / EGFRvIII 腫瘍細胞に結合した。

【0149】

(実施例10) B16F10.9 / EGFRvIII 腫瘍異種移植片への抗EGFRvIII 抗体の結合

SCIDマウスに、5万個のマウスマラノーマ細胞 B16F10.9 または EGFRvIII を過剰発現する B16F10.9 (B16F10.9 / EGFRvIII) を植え込んだ。B16F10.9 / EGFRvIII 細胞は、実施例7において HEK293 / EGFRvIII 細胞に関して記載されている通りに調製した。細胞当たりほぼ  $1.5 \times 10^5$  コピーの EGFRvIII を発現する B16F10.9 細胞を本実験に使用する。200 ~ 300 mm<sup>3</sup> のメジアンサイズが得られるまで、腫瘍をおよそ14日間成長させた。次に、マウスに、尾静脈経由で H1H1863N2 (Fuc-) またはアイソタイプ対照を注射した。抗体の注射後10分、4時間および24時間目に、マウスを屠殺し、腫瘍を除去し、PBSに置いた。腫瘍を直ちに解離させ、アロフィコシアニンコンジュゲートした抗ヒトFc(hFc-APC)抗体で染色した。染色した細胞を、流れるPBS(1×PBS、2%ウシ胎仔血清、0.1%アジ化ナトリウム)で3回洗浄し、標準方法を使用して固定および透過処理(permeabilize)した。フローサイトメトリーを使用して、細胞表面に結合した H1H1863N2 (Fuc-) を検出し、FlowJsoftウェア(Tree Star, Inc.)を使用して解析を行った。結果を表13および図4aに示す。細胞表面に結合および細胞内部に結合した抗体の両方を検出するために、細胞を、固定および透過処理ステップ後に同じ抗ヒトFc(hFc-APC)抗体を使用して2回目染色した。これにより、細胞内部抗体を検出することができた。結果を表14および図4bに示す。全試料を ACCURI (登録商標) C6 FLOW CYTOMETRY (登録商標)において収集し、平均蛍光強度(MFI)を決定した。未染色対照のMFIの減算後に試料毎のMFIを報告した。MFI値は、2つの生物学的複製物(N=2)の平均 ± 平均の標準誤差(SEM)である。\*この時点に対し N = 1。

20

30

【表13】

表13

注射後時間	MFI±SEM(B16F10.9/EGFRvIII)-表面染色			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	アイソタイプ対照	H1H1863N2(Fuc-)	アイソタイプ対照	H1H1863N2(Fuc-)
10分間	74 ± 67	56 ± 2	128 ± 49	2003 ± 216
4時間	80 ± 15	195 ± 52	54 ± 21	4224 ± 610
24時間	79 ± 21	155 ± 42	72*	5692 ± 595

40

\*

\*

【表14】

表14

注射後時間	MFI±SEM(B16F10.9/EGFRvIII)-表面&内部染色			
	B16F10.9		B16F10.9/EGFRvIII	
	アイソタイプ対照	H1H1863N2(Fuc-)	アイソタイプ対照	H1H1863N2(Fuc-)
10分間	132 ± 92	117 ± 18	155 ± 44	2627 ± 192
4時間	165 ± 22	422 ± 106	120 ± 22	7785 ± 782
24時間	135 ± 11	281 ± 51	132*	9578 ± 852

10

## 【0150】

H1H1863N2(Fuc-)は、時間依存的様式でEGFRvIIIを発現するB16F10.9細胞の表面に効率的に結合した一方、アイソタイプ対照の結合は最小であった。細胞表面のみへのその結合と比較した、H1H1863N2(Fuc-)の総結合(すなわち、細胞表面結合プラス内部結合)の増加は、細胞表面に結合した抗体が、B16F10.9細胞により有效地に内部移行したことを示した。

## 【0151】

## (実施例11)マウスにおける抗EGFRvIII抗体の薬物動態

抗EGFRvIII抗体のin vivo選択性を決定するために、マウスEGFRを天然に発現する野生型マウス(「WTマウス」)およびヒトEGFRを発現するヒト化EGFRマウス(「hEGFRマウス」)を使用した薬物動態試験を行った。マウスは、C57BL/6(75%)および129SV(25%)を含有するバックグラウンドを有する交雑系統に由来した。コホートは、それぞれWTまたはhEGFRマウスのいずれか5匹を含有した。全ての抗体は、0.2mg/kgの用量で皮下投与した。投与後0時間、6時間、1日、2日、3日、4日、7日、10日、14日、21日および30日目に血液(Bleed)を収集した。サンドイッチELISAによりヒト抗体の血清レベルを決定した。簡潔に説明すると、1μg/ml濃度のヤギポリクローナル抗ヒトIgG(Fc特異的)抗体(Jackson Immuno Research)を96ウェルプレートにコーティングし、一晩4℃でインキュベートした。BSAでプレートをブロッキングした後に、6用量系列希釈における血清試料および12用量系列希釈におけるそれぞれの抗体の参考標準をプレートに加え、1時間室温でインキュベートした。洗浄して、結合していない抗体を除去した後に、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)にコンジュゲートした同じヤギポリクローナル抗ヒトIgG(Fc特異的)抗体(Jackson Immuno Research)を使用して、捕捉されたヒト抗体を検出し、メーカーの推奨するところに従って標準比色テトラメチルベンジジン(TMB)基質により発色させた。450nmにおける吸光度をプレートリーダーに記録し、試料プレートにおいて作成された参考検量線を使用して、血清試料におけるhIgGの濃度を計算した。標準方法を使用してマウス抗ヒト抗体(MAHA)を測定したところ、全般に低かった。

20

## 【0152】

図5a～図5dは、4種の被験抗体の抗体濃度vs.時間プロットを示す。対照IV(「Mab C225」)は、ヒトEGFRに結合するが、そのマウスホモログには結合しないことが公知である。予想される通り、この抗体は、hEGFRマウスにおける速いクリアランスおよびWTマウスにおける遅いクリアランス(すなわち、標的媒介性クリアランスなし)を呈した(図5a)。対照I(「Mab 13.1.2」)は、ヒトEGFRにもマウスEGFRにも存在しないEGFRvIII接合部ペプチド「LEEKKGNYVVTDH」に結合することが公知である。この抗体は、in vivoでヒトEGFRにもマウスEGFRにも結合しない。予想される通り、この抗体は、両方の種類のマウスにおいて同一の遅い薬物動態クリアランス速度を呈し(図5b)、標的媒介性クリアランスは観察されなかった。対照II抗体(「Mab hu806」)は、WTマウスと比べてhEGFRマウスにおけるクリアランス増加を示した(図5c)。この知見は、Bi

40

50

a core (実施例3、表4を参照)およびF A C S (実施例7、表9)によって決定される、in vitroでh E G F Rに結合するその能力と合致した。図5dは、H1H1863N2 (Fuc+)のクリアランスを示す。この抗体は、対照Iと同様に、両方の種類のマウスにおいて同一の遅いクリアランス速度を呈した。よって、H1H1863N2は、in vivoでヒトE G F RにもマウスE G F Rにも結合しない。

#### 【0153】

(実施例12)抗E G F R v I I I 抗体 - 薬物コンジュゲートは、in vivo E G F R v I I I 陽性乳がん同種移植モデルにおける腫瘍成長を阻害する

本実施例において、例示的な抗E G F R v I I I 抗体H1H1863N2の2種の異なる抗体 - 薬物コンジュゲートを、in vivoで腫瘍成長を阻害するその能力について検査した。切断不能MCCリンカー(例えば、U S 5 , 2 0 8 , 0 2 0 および米国特許出願公開第2 0 1 0 / 0 1 2 9 3 1 4 号を参照)を介してマイタンシノイド毒素DM1へとH1H1863N2をコンジュゲートして、「H1H1863N2 - M C C - D M 1」を产生することにより、第1のADCを产生した。「M0026」(その開示全体が参照により本明細書に組み入れられる、W O 2 0 1 4 / 1 4 5 0 9 0 における「化合物7」としても公知)と称される新規切断可能リンカーに付着させたDM1の修飾バージョンへとH1H1863N2をコンジュゲートして、「H1H1863N2 - M0026」を生じることにより、第2のADCを产生した。MMT/E G F R v I I I 細胞に対するin vitroにおける細胞傷害性を検査した際に、H1H1863N2 - M C C - D M 1は、12nMのIC<sub>50</sub>を示した一方、H1H1863N2 - 7は、薬物当量に基づく0.8nMのIC<sub>50</sub>を示した。  
10 20

#### 【0154】

D M 1 および M 0 0 2 6 にコンジュゲートされた抗E G F R v I I I 抗体のin vivo有効性を比較するために、E G F R v I I I 陽性乳がん同種移植片を有する免疫無防備状態のマウスにおいて試験を行った。

#### 【0155】

簡潔に説明すると、雌C B 1 7 S C I D マウス(Taconic, Hudson, NY)の左側腹部への0.5 × 10<sup>6</sup>個のMMT/E G F R v I I I 細胞の皮下植え込みにより、腫瘍同種移植片を確立した。腫瘍が140mm<sup>3</sup>の平均体積に達したら(ほぼ8日目)、マウスを7匹の群にランダム化し、MCC - DM1またはM0026リンカー - 薬物フォーマットのいずれかを使用した抗E G F R v I I I ADCを投薬した。MCC - DM1またはM0026リンカー - 薬物フォーマットのいずれかを使用した非結合ADCを含む対照試薬と、P B S ビヒクルも評価した。1および5mg/kgのADCを1週間にわたり3回投薬し、その後、ビヒクル単独を投与した群においておよそ2000mm<sup>3</sup>の平均腫瘍サイズが達成されるまでモニターした。この時点で、後述の通りに腫瘍成長阻害を計算した。  
30

#### 【0156】

ビヒクル処置群と比べた平均腫瘍サイズを次の通りに計算した：ビヒクル群の平均サイズが1000mm<sup>3</sup>に達するまで、カリパスで1週間に2回腫瘍を測定した；式(長さ×幅<sup>2</sup>) / 2を使用して、腫瘍サイズを計算した。次式に従って、腫瘍成長阻害を計算した：(1 - ((T<sub>final</sub> - T<sub>initial</sub>) / (C<sub>final</sub> - C<sub>initial</sub>))) \* 100(式中、T(処置群)およびC(対照群)は、ビヒクル群が1000mm<sup>3</sup>に達した日の平均腫瘍量を表す)。結果は表15に概要を述べる。  
40

## 【表15】

表15

処置群	8日目の最終腫瘍サイズ mm <sup>3</sup> (平均±SD)	平均腫瘍成長阻害(%)
PBSビヒクル	2253 ± 217	0
対照-MCC-DM1 1mg/kg	2827 ± 278	-27
対照-MCC-DM1 5mg/kg	2402 ± 256	-7
対照-M0026 1mg/kg	2729 ± 470	-22
対照-M0026 5mg/kg	2787 ± 503	-25
H1H1863N2-MCC-DM1 1mg/kg	931 ± 292	62
H1H1863N2-MCC-DM1 5mg/kg	471 ± 227	84
H1H1863N2-M0026 1mg/kg	679 ± 265	74
H1H1863N2-M0026 5mg/kg	96 ± 34	102

10

## 【0157】

表15に要約されるように、5mg/kg H1H1863N2-M0026を投薬したマウスにおいて最大の腫瘍阻害が観察され、初期腫瘍の退縮が観察された。5mg/kg H1H1863N2-M0026による処置に起因する102%の腫瘍成長阻害は、5mg/kg H1H1862N2-MCC-DM1による腫瘍処置後に観察されるもの(83%)と比べて有意に大きかった。H1H1863N2-mccc-DM1と比較した、H1H1863N2-M0026によって誘導される腫瘍成長阻害の優位性は、1mg/kg用量で同様に維持された。MCC-DM1またはM0026を使用した対照ADCで処置した群において、抗腫瘍効果は観察されなかった。

20

## 【0158】

本実施例は、したがって、本発明の抗EGFRvIII抗体が、抗体-薬物コンジュゲートの形態で投与されると、腫瘍成長の阻害において高度に強力であることを示す。本実施例は、その上、特に、新規リンカー/薬物分子M0026にコンジュゲートされた本発明の抗EGFRvIII抗体(例えば、H1H1863N2)の文脈において、腫瘍退縮を実際に促進する本発明のADCの役割を支持する。

30

## 【0159】

本発明は、本明細書に記載されている具体的な実施形態による範囲内に限定されるべきではない。実際に、本発明の様々な修正が、本明細書に記載されているものに加えて、前述の記載および添付の図面から、当業者には明らかになるであろう。係る修正は、添付の特許請求の範囲内に収まることを企図する。

## 【0160】

(実施例13)抗EGFRvIII-DM1抗体は、EGFRvIII発現細胞に対する特異性を示し、強力な細胞殺傷活性を実証する

40

本実施例において、細胞生存率を低下させる、マイタンシン毒素DM1にコンジュゲートされた抗ヒトEGFRvIII抗体の能力を、in vitro細胞ベースアッセイを使用して決定した。

## 【0161】

全長ヒトEGFRvIII(配列番号147)または野生型ヒトEGFR(配列番号146)を、HEK293(293/hEGFRvIII、293/hEGFRwt)、U251(U251/hEGFRvIII)およびMMT060562(MMT/hEGFRvIII)細胞株に安定的に導入した。全細胞は、リポフェクタミン2000に基づく方法論により生成し、G418の存在下で完全成長培地において培養した。

## 【0162】

50

E G F R w t または E G F R v I I I の細胞表面発現を F A C S 解析により測定した。簡潔に説明すると、 $1 \times 10^6$  個の細胞を、 $10 \mu g / ml$  の抗 E G F R v I I I 抗体 H 1 H 1 8 6 3 N 2、抗 E G F R w t 対照 m A b (対照 I V ) またはアイソタイプ対照と共に 30 分間氷上で、抗体希釈バッファーにおいてインキュベートした。抗体希釈バッファーによる 2 回の洗浄後に、細胞を  $10 \mu g / ml$  の P E コンジュゲート抗ヒト二次抗体と共に 30 分間氷上でインキュベートした。2 回の追加的な洗浄後に、試料を Accur i C 6 (BD) または Hypercyt (IntelliCyt) サイトメーターにおいて流し、FlowJo ソフトウェアを使用してデータを解析した。結果は、表 16 に概要を述べる。n. d. = 決定されず。

【表 16】

10

表16:EGFRwtおよびEGFRvIII操作細胞株における細胞表面発現

細胞株	FACS 結合(アイソタイプ対照を上回る MFI の倍数)				
	未染色	H1H1863N2 (抗 EGFRvIII)	対照 IV (抗 EGFRwt)	二次単独	アイソタ イプ対照
HEK293	1X	1X	49x	1X	1X
HEK293/hEGFRwt	1X	n.d.	332x	1X	1X
HEK293/hEGFRvIII	1X	264X	n.d.	1X	1X
U251	1X	1X	n.d.	1X	1X
U251/hEGFRvIII	1X	13X	n.d.	1X	1X
MMT/	1X	1X	n.d.	1X	1X
MMT/hEGFRvIII	1X	280X	n.d.	1X	1X

## 【0163】

これらの結果は、E G F R v I I I 表面発現が、HEK293 / hEGFRvI I I および MMT / hEGFRvI I I 細胞株において匹敵した一方、U251 / EGFRvI I I 発現レベルが、HEK293 / hEGFRvI I I および MMT / hEGFRvI I I 細胞系のおよそ 20 分の 1 であったことを示す。H1H1863N2 による E G F R v I I I 結合は、親細胞株において検出できなかった。対照的に、抗 E G F R w t 対照抗体 (対照 I V ) は、アイソタイプ対照を 49 倍上回って HEK293 親細胞に結合した。HEK293 細胞への E G F R w t 発現ベクターの安定的取り込みは、バックグラウンドを 332 倍上回るまで発現を増加させ、HEK293 / hEGFRvI I I および MMT / hEGFRvI I I 細胞における E G F R v I I I 発現に匹敵した。

30

## 【0164】

E G F R v I I I への抗 E G F R v I I I 抗体 H 1 H 1 8 6 3 N 2 の選択的結合を、HEK293 親、HEK293 / hEGFRw t 、HEK293 / hEGFRvI I I および A 4 3 1 細胞株を使用した F A C S により評価した。結果を表 17 に示す。

40

## 【表17】

表17:EGFRvIII発現細胞株に対する抗EGFRvIII抗体の結合特異性

mAb	FACS 結合(アイソタイプ対照を上回る MFI の倍数)			
	HEK293	HEK293/ EGFRwt	HEK293/ EGFRvIII	A431
対照IV(抗EGFRwt)	83	251	855	621
H1H1863N2(抗EGFRvIII)	1	3	662	13
アイソタイプ対照	1	1	1	1
二次Ab単独	1	1	1	1
未染色細胞	1	1	1	1

## 【0165】

表17に示す通り、H1H1863N2および抗EGFRwt対照抗体(対照IV)の両方が、アイソタイプ対照と比べて、HEK293/EGFRvIII細胞への強い結合(バックグラウンドの>650倍)を示した。対照的に、H1H1863N2は、wt-EGFR HEK293細胞株(バックグラウンドを3倍上回る)および内在性発現EGFR細胞株A431(対照を13倍上回る)に弱く結合した。抗EGFR-wt対照抗体は、wt-EGFR発現細胞に強く結合し、野生型EGFRを上回るEGFRvIIIに対するH1H1863N2の選択性を確認した。

## 【0166】

次に、細胞生存率を低下させる、マイタンシン毒素DM1にコンジュゲートされた抗ヒトEGFRvIII抗体の能力を、in vitro細胞ベースアッセイを使用して決定した。細胞をPDLコーティングした96ウェルプレートに、ウェル当たり250~2000細胞となるよう完全成長培地において播種し、一晩増殖させた。細胞生存率曲線のため、ADCまたは遊離薬物(DM1-SMe)を、500nM~5pMに及ぶ最終濃度で細胞に加え、3日間インキュベートした。細胞をCCK8(Dojindo)と共に最後の1~3時間インキュベートし、450nmにおける吸光度(OD<sub>450</sub>)をFlexstation3(Molecular Devices)において決定した。ジギトニン(40nM)処理細胞由来のバックグラウンドOD450レベルを、全ウェルから減算し、未処理対照のパーセンテージとして生存率を表現する。10ポイント応答曲線にわたる4パラメータロジスティック方程式からIC<sub>50</sub>値を決定した(GraphPad Prism)。結果を表18Aおよび18Bに示す。IC<sub>50</sub>値は、nM単位であり、特定の薬物/抗体比(DAR)に対し正規化される。

10

20

30

## 【表18】

表18A:抗EGFRvIII-DM1抗体-薬物コンジュゲートの細胞殺傷効力

細胞株	HEK293		HEK293/ hEGFRvIII		HEK293/ hEGFRwt		U251	
	IC <sub>50</sub> (nM)	%殺傷						
ADC								
H1H1863N2-MCC-DM1	>100	90	1	97	>100	91	48	77
抗 EGFRwt-MCC-DM1	76	94	0.2	97	~1.0	94	ND	ND
DM1-SMe	0.31	97	0.6	99	0.57	95	1.8	81
アイソタイプ対照-MCC-DM1	>100	92	>100	96	>100	91	40	77

表18B:抗EGFRvIII-DM1抗体-薬物コンジュゲートの細胞殺傷効力

細胞株	U251/ hEGFRvIII		MMT		MMT/ hEGFRvIII	
	IC <sub>50</sub> (nM)	%殺傷	IC <sub>50</sub> (nM)	%殺傷	IC <sub>50</sub> (nM)	%殺傷
ADC						
H1H1863N2-MCC-DM1	4	78	>150	40	3	100
抗 EGFRwt-MCC-DM1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DM1-SMe	1.2	83	0.6	96	0.7	100
アイソタイプ対照-MCC-DM1	35	76	>150	66	NK	72

## 【0167】

表18Aおよび18Bに示す通り、H1H1863N2-MCC-DM1は、1.0～4.0 nMに及ぶIC<sub>50</sub>で、HEK293/hEGFRvIII、U251/hEGFRvIIIおよびMMT/hEGFRvIII細胞株の生存率を低下させた。対照的に、DM1にコンジュゲートされたアイソタイプ対照は、100 nMを超えるIC<sub>50</sub>で、293/EGFRvIIIおよびMMT/hEGFRvIII細胞の、そして35 nMのIC<sub>50</sub>で、U251/hEGFRvIII細胞の生存率を低下させた。H1H1863N2-MCC-DM1は、野生型EGFRを発現するHEK293細胞(293/hEGFRwt)にも対照親細胞株にも影響がなく、EGFRvIII発現細胞に対する特異性を示唆した。

## 【0168】

よって、本実施例は、EGFRvIII抗体H1H1863N2が、EGFRvIII発現細胞株に対する特異性を有することを実証し、DM1毒素にコンジュゲートされた場合に、特異的細胞殺傷能力を実証する。

## 【0169】

(実施例14) EGFRvIIIコンフォメーション性結合抗体-薬物コンジュゲートが、EGFRvIII接合部ペプチド結合抗体-薬物コンジュゲートと組み合わせて投薬されると、向上した細胞殺傷効力が達成される

本実施例において、2種の異なる型の抗EGFRvIII抗体-薬物コンジュゲートを同時投与することにより、細胞殺傷を増強する能力を決定した。本実施例のため、検査した組み合わせは、2種の異なる抗EGFRvIII抗体からなった：(1) EGFRvIII

10

20

30

40

50

I I 接合部ペプチド A D C を認識しない抗 E G F R v I I I 特異的抗体（本明細書において、「コンフォメーション性結合剤」と称される）；および（2）E G F R v I I I 接合部ペプチドを認識する抗 E G F R v I I I 特異的抗体（本明細書において、「ペプチド結合剤」と称される）。実施例 6において実証される通り、抗 E G F R v I I I 抗体 H 1 H 1863 N 2 は、E G F R v I I I 接合部ペプチドにもヒト E G F R の残基 311～326 にも結合せず、したがって、「コンフォメーション性結合剤」であると考慮される。

#### 【0170】

##### i n v i t r o における交差競合

先ず、E G F R v I I I 接合部ペプチドに結合する抗体と交差競合する H 1 H 1863 N 2 の能力を、結合競合アッセイにより決定した。本実施例において使用した接合部ペプチド結合性抗 E G F R v I I I 抗体は、対照 V であった。10

#### 【0171】

Octet HTXバイオセンサー（ForteBio Corp.、A Division of Pall Life Sciences）におけるリアルタイム無標識バイオレイヤー干渉法（BLI）アッセイを使用して、交差競合を決定した。0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.05% v/v 界面活性剤 P 20、1.0 mg / mL BSA で構成されたバッファー（Octet HBST バッファー）において 25 で、1000 rpm のスピードでプレートを振盪しつつ実験全体を行った。2種の抗体が、組換えヒト E G F R v I I I (h E G F R v I I I . mmh；配列番号 152) における結合に関して交差競合したか否かを評価するために、およそ 0.35 nm の h E G F R v I I I . mmh を、抗ペンタ-His コーティングされた Octet バイオセンサー上に捕捉した。次に、抗原捕捉したバイオセンサーを、第 1 の抗 E G F R v I I I モノクローナル抗体（以降 mAb - 1 と称される）の 50 μg / mL 溶液を含有するウェルにおける 5 分間の浸漬により、mAb - 1 で飽和させた。次に、バイオセンサーをその後、第 2 の抗 E G F R v I I I モノクローナル抗体（以降 mAb - 2 と称される）の 50 μg / mL 溶液を含有するウェルに 3 分間浸した。各実験ステップ間に、全バイオセンサーを Octet HBST バッファーにおいて洗浄した。実験の経過において、リアルタイム結合応答をモニターし、全ステップの終わりに結合応答を記録した。mAb - 1 と予め複合体形成した h E G F R v I I I への mAb - 2 結合の応答を比較し、異なる抗 E G F R v I I I モノクローナル抗体の競合的 / 非競合的挙動を決定した。20

#### 【0172】

この実験的交差競合フォーマットを使用して、H 1 H 1863 N 2 は、検査した E G F R v I I I 接合部ペプチド結合剤と交差競合を示さず、E G F R v I I I への結合に関して対照 I I または対照 I V と交差競合しなかった。この交差競合アッセイの結果は、したがって、H 1 H 1863 N 2 が、E G F R v I I I 接合部ペプチド結合剤ならびに対照 I I および I V とは別個の結合エピトープを有することを示す。30

#### 【0173】

##### 個々の抗 E G F R v I I I 抗体 - 薬物コンジュゲートの細胞殺傷活性

次に、組み合わせて投与した場合の、細胞生存率を低下させる H 1 H 1863 N 2 - M C C - D M 1 および抗 E G F R v I I I ペプチド結合性 A D C の能力を評価した。S M C C - D M 1 にコンジュゲートした場合の、細胞殺傷を誘導する対照 V の能力（すなわち、対照 V - M C C - D M 1）を、実施例 13 に記載されている i n v i t r o 細胞ベースアッセイを使用して決定した。結果は、表 19 に概要を述べる。40

## 【表19】

表19:抗EGFRvIII-DM1抗体-薬物コンジュゲートの細胞殺傷効力

細胞株	HEK293		HEK293/ hEGFRvIII(高)		MMT		MMT/ hEGFRvIII(高)	
	IC50	%殺傷	IC50	%殺傷	IC50	%殺傷	IC50	%殺傷
ADC								
DM1-Sme (遊離 DM1)	0.19	98	0.25	99	0.15	100	0.18	99
アイソタイプ 対照-MCC- DM1	200	91	150	92	110	68	250	72
H1H1863N2- MCC-DM1	80	97	0.37	99	200	95	3.25	97
対照V-MCC- DM1	90	95	0.25	100	200	89	0.35	97

## 【0174】

表19に要約されるように、抗EGFRvIII-ADCは、0.25nM～3.25nMに及ぶIC<sub>50</sub>値で、様々なEGFRvIII過剰発現細胞株の細胞生存率を低下させた。

## 【0175】

抗EGFRvIII抗体-薬物コンジュゲートの対になった組み合わせの細胞殺傷活性次に、1:1比で、抗EGFRvIIIペプチド結合性ADCとペアを組んだH1H1863N2-MCC-DM1の細胞殺傷効力を、EGFRvIII過剰発現細胞株において検査した。結果を表20に示す。

## 【表20】

表20:抗EGFRvIII-DM1 ADCの対になった組み合わせの細胞殺傷効力

細胞株:		HEK293		HEK293/ hEGFRvIII		MMT		MMT/ hEGFRvIII	
ADC 1	ADC 2	IC <sub>50</sub> (nM)	%殺傷						
H1H1863N2- MCC-DM1	なし	250	87	1.52	95	250	59	11.1	98
対照V-MCC- DM1	なし	100	85	0.14	98	100	67	0.7	95
H1H1863N2- MCC-DM1	対照V- MCC- DM1	100	91	0.19	99	200	98	0.58	100
DM1-Sme (遊離 DM1)	なし	0.21	96	0.28	97	0.19	100	0.19	100
アイソタイプ 対照-MCC- DM1	なし	200	93	95	93	150	32	100	36

## 【0176】

表20に要約されるように、H1H1863N2-MCC-DM1(コンフォメーション性エピトープ結合剤)および対照V-MCC-DM1(接合部ペプチド結合剤)の組み合わせは、単一ADC処置と少なくとも等しい、またはある特定の事例においてはそれと比較して増強された、細胞殺傷効力をもたらした。2種の抗体の間の干渉の欠如は、別個の作用機序を有する異なる細胞毒または異なるクラスの細胞毒を有する2種の非競合抗体

10

20

30

40

50

の有効使用を示唆する。

【0177】

要約すると、本実施例は、H1H1863N2が、対照EGFRvIIIペプチド結合抗体と交差競合しないことを実証する。この独特的エピトープは、細胞殺傷効力を向上するための、それとEGFRvIIIペプチド結合性ADCとの組み合わせを可能にする。このようなEGFRvIII ADCの新規組み合わせは、より優れた治療有効性を可能にし得る。

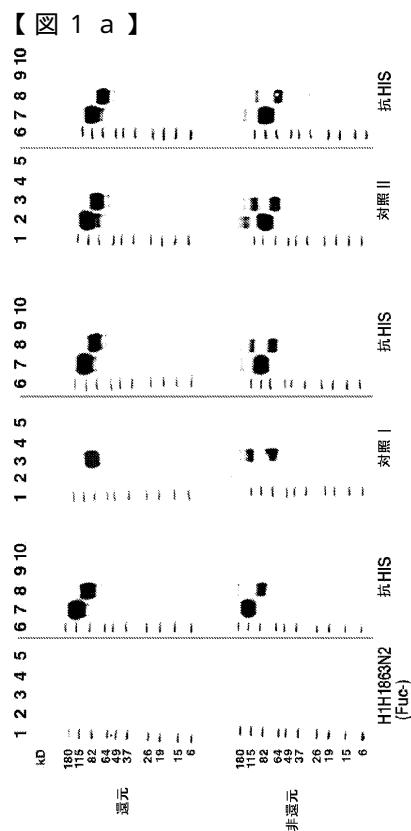


Fig.1A

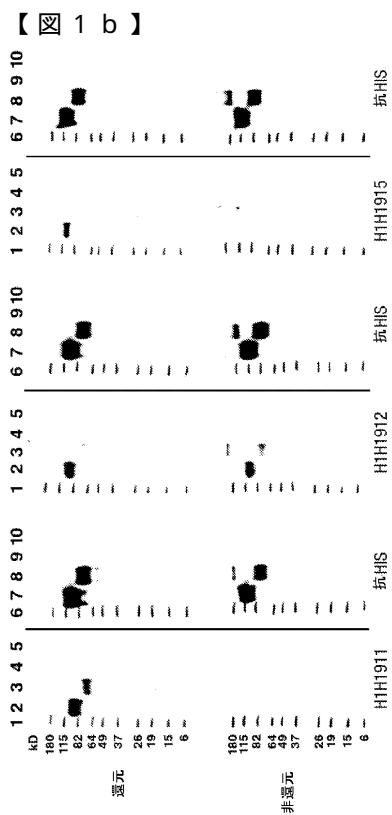


Fig.1B

【図2】

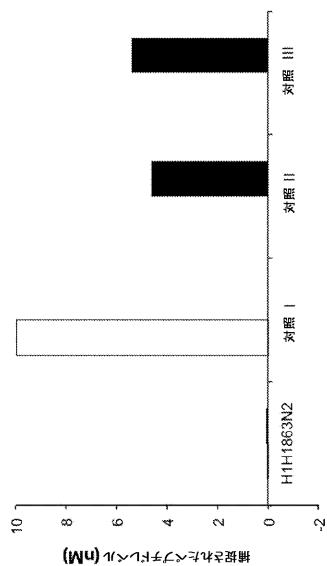


Fig. 2

【図3】

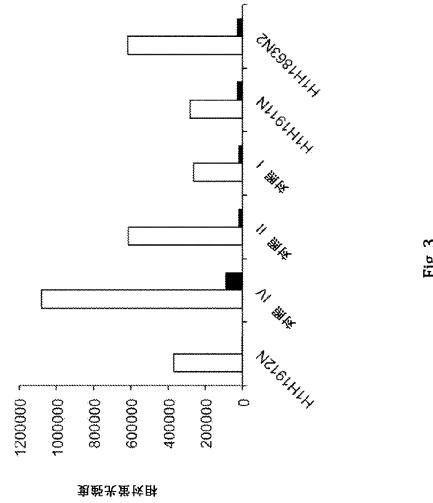


Fig. 3

【図4 a】

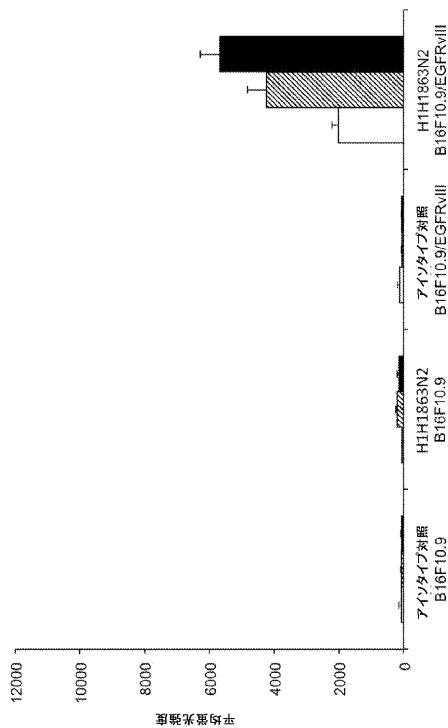


Fig. 4A

【図4 b】

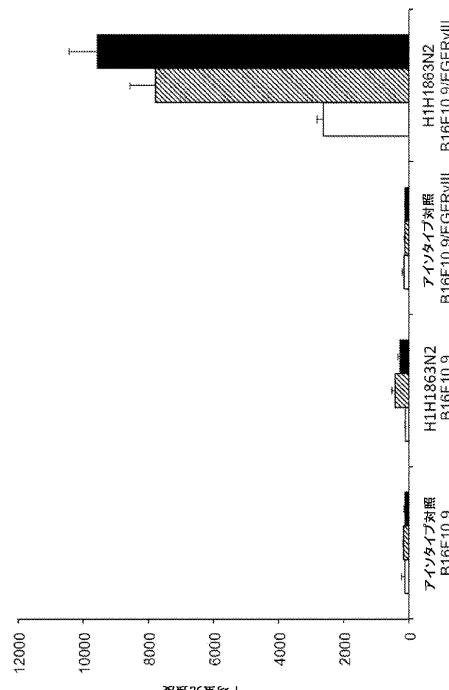


Fig. 4B

【図 5 a - b】

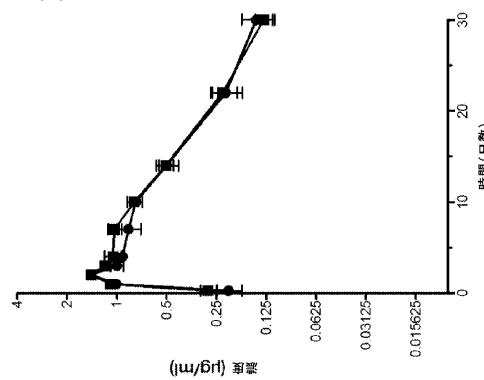


Fig. 5B

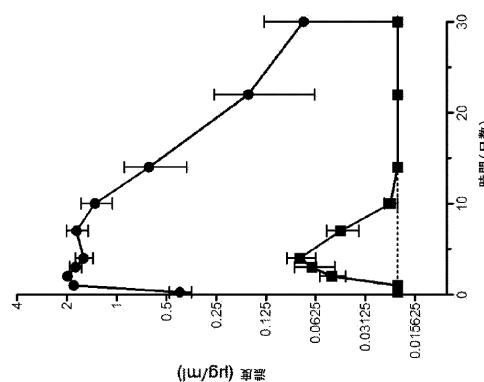


Fig. 5A

【図 5 c - d】

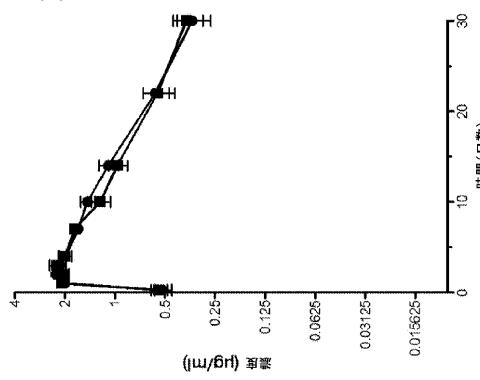


Fig. 5D

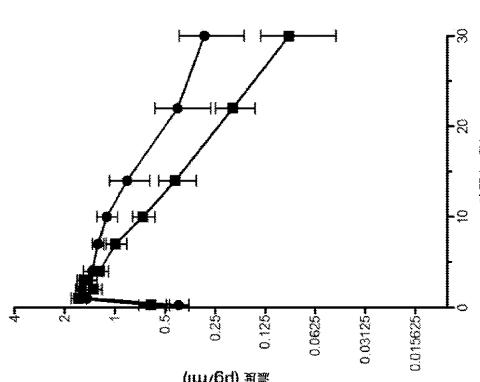


Fig. 5C

## 【配列表】

0006632984000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/537 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/537	
A 6 1 K 31/551 (2006.01)	A 6 1 K 38/00	
	A 6 1 K 31/551	

(72)発明者 カーシュナー, ジェシカ アール.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバーロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 マクドナルド, ダグラス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバーロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 サーストン, ギャビン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバーロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 マーティン, ジョエル エイチ.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバーロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 デルフィーノ, フランク

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバーロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ニトリ, トーマス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバーロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ケリー, マーカス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバーロード 777, リジェネロン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド 気付

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 國際公開第2005/010151(WO, A1)

米国特許出願公開第2009/0269343(US, A1)

國際公開第2010/096434(WO, A1)

Cancer Research, 2012, Vol.72, No.12, pp.2924-2930

Int. J. Cancer, 2003, Vol.105, pp.273-280

J. Biol. Chem., 2011, Vol.286, No.7, pp.5913-5920

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 07 K 1/00 - 19/00

A 61 K 31/33 - 33/44

A 61 K 38/00 - 38/58

A 61 K 39/00 - 39/44

C 12 N 15/00 - 15/90

Capplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

UniProt/GenSeq