

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2008年4月24日 (24.04.2008)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2008/047723 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 39/395 (2006.01)	C12N 15/00 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)	C12Q 1/68 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)	G01N 33/15 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)	G01N 33/50 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)	

区駒場四丁目2番16号 Tokyo (JP). 国立大学法人  
東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP];  
〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo  
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/069988

(22) 国際出願日: 2007年10月12日 (12.10.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2006-278819  
2006年10月12日 (12.10.2006) JP

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 油谷 浩幸 (ABU-  
RATANI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒1800003 東京都武蔵野  
市吉祥寺南町3-30-16 Tokyo (JP). 伊藤 浩孝  
(ITO, Hirotaka) [JP/JP]; 〒1530041 東京都目黒区駒場  
四丁目2番16号 株式会社未来創薬研究所内 Tokyo  
(JP). 吉田 賢二 (YOSHIDA, Kenji) [JP/JP]; 〒1530041  
東京都目黒区駒場四丁目2番16号 株式会社未来  
創薬研究所内 Tokyo (JP).

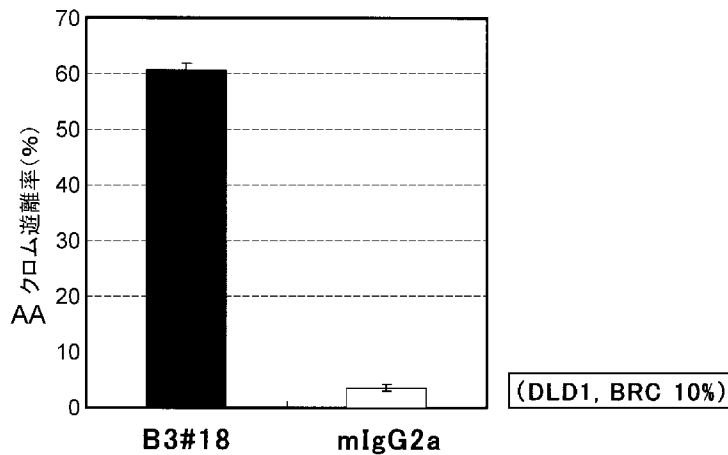
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式  
会社未来創薬研究所 (FORERUNNER PHARMA RE-  
SEARCH CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1530041 東京都目黒

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒  
3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビ  
ル6階 Ibaraki (JP).

[ 続葉有 ]

(54) Title: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CANCER USING ANTI-EREG ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗EREG抗体を用いる癌の診断および治療



AA CHROMIUM RELEASE RATE (%)

(57) Abstract: Disclosed is a method for diagnosis of cancer, which is characterized by detecting an epiregulin (EREG) protein. It is found that the expression of an EREG is enhanced at a vary high frequency in a gene level or a protein level in gastrointestinal cancer, pulmonary adenocarcinoma, pancreatic cancer, gastric cancer or renal cancer. In the diagnosis or treatment of cancer, an antibody recognizing the EREG protein is used. Also disclosed are a pharmaceutical composition, a cell proliferation inhibitor and an anti-cancer agent, each comprising an antibody capable of binding to an EREG as an active ingredient. Further disclosed is a method for inducing cytopathy in an EREG-expressing cell or inhibiting the proliferation of an EREG-expressing cell, by contacting the EREG-expressing cell with an antibody capable of binding to an EREG.

(57) 要約: epiregulin (EREG)タンパク質を検出することを特徴とする癌の診断方法が開示される。大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、あるいは腎癌において、非常に高頻度でEREGが遺伝子レベ

[ 続葉有 ]



WO 2008/047723 A1



- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

---

ルおよびタンパク質レベルで発現亢進していることが見いだされた。本発明の癌の診断あるいは治療には、REGタンパク質を認識する抗体が用いられる。また、REGに結合する抗体を有効成分として含有する医薬組成物、細胞増殖抑制剤および抗癌剤が開示される。さらに、REG発現細胞とREGに結合する抗体とを接触させることにより、REG発現細胞に細胞障害を引き起こす方法およびREG発現細胞の増殖を抑制する方法が開示される

## 明 細 書

## 抗EGF抗体を用いる癌の診断および治療

## 技術分野

[0001] 本発明は、癌の診断および治療方法、ならびに細胞増殖抑制剤および抗癌剤に関する。

## 背景技術

[0002] 豊田らが精製した上皮細胞成長因子(epidermal growth factor、以下、EGFと記載する。)ファミリーのメンバーは、epiregulin(EGF)と命名された。EGFは、HeLa細胞の形態変化を誘導する癌増殖阻害因子として機能することが知られている(非特許文献1)。豊田らによって精製されたマウス由来のEGF(成熟タンパク質)のアミノ酸配列は46アミノ酸残基からなり、EGFファミリーの他のメンバーと24から50%程度の配列の同一性を示す。またマウスEGFは、ヒト上皮癌細胞株A431細胞上のEGF受容体に対して低親和性を示した。豊田らによるヒトEGF遺伝子のクローニングと発現解析において、他のEGFファミリーメンバーがヒト組織においてユビキタスに発現するのに対してEGFの発現はマクロファージ、胎盤、各種の癌細胞において検出可能であることが示された(非特許文献2)。また、可溶性のEGFが幾つかの癌細胞に対して増殖抑制効果を有していることが示された(WO94/29340)。

[0003] 高橋らは、Erk(MPK3)及びp38(MAPK14)のラットの分化型動脈血管平滑筋細胞(vascular smooth muscle cell、以下、VSMCと記載する)における活性化が、細胞の脱分化を誘導することを示した。更に、VSMCが分泌するEGFが、オートクライン及び/又はパラクライン分化因子として働くことを実証した。また、VSMCの分化因子として作用する可能性がある不飽和リゾホスファチジン酸及びPDGFBホモダイマーは、Erk-及びp38 Mapk-依存型の態様でEGFのmRNA発現を急速にアップレギュレートした。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcriptase polymerase chain reaction; 以下、RT-PCRと記載する)解析および組織免疫化学(immunohistochemical, immunohistochemistry; 以下、IHCと記載する)解析は、EGFのアテローム性動脈硬化症血管やバルーン損傷ラット動脈中の限局発現を明らかにした。これらの結果から、高橋

らは、*EREG*がアテローム性動脈硬化のような血管再構築の進行に関与していると推察している(非特許文献3)。

[0004] Minnらは*in vivo*選択、トランスクリプトーム解析、機能解析及び臨床研究に基づき、乳癌の肺転移に関連する幾つかの遺伝子群を同定し、その内のひとつの分子が*EREG*であることを明らかにした(非特許文献4)。

更に白澤らは*EREG*がケラチノサイトのみならず組織中マクロファージにも発現すること、及び*EREG*欠損マウスが慢性皮膚炎の症状をきたすことを明らかにした。本マウスの解析における諸検討を通じて、*EREG*が外部環境とのバリアにおいて、ケラチノサイトおよびマクロファージによる免疫及び炎症関連応答で重要な役割を果たしていることが示されていた(非特許文献5)。

[0005] 前記のように、皮膚炎、癌の転移、アテローム性動脈硬化症と*EREG*との関連性は示されていた。しかし*EREG*に結合し中和活性や細胞障害活性を有する抗体が、*EREG*を発現する癌細胞に与える影響についてはこれまで具体的な記載はなされていなかった。

非特許文献1: *J. Biol. Chem.* 270: 7495-7500, 1995

非特許文献2: *Biochem. J.* 326: 69-75, 1997

非特許文献3: *Circulation* 108: 2524-2529, 2003

非特許文献4: *Nature* 436: 518-524, 2005

非特許文献5: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 13921-13926, 2004

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、抗*EREG*抗体とその用途を提供することを課題とする。より詳細には、抗*EREG*抗体を用いて癌を診断および治療する新規方法、抗*EREG*抗体を含む新規な細胞増殖抑制剤および抗癌剤、ならびに新規な抗*EREG*抗体を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは*EREG*が大腸癌などの癌細胞で高発現していることを見出した。さらに、抗*EREG*抗体の補体依存性細胞障害 (complement-dependent cytotoxicity; CD

C)活性、更に抗体依存性細胞障害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ; ADCC)活性を測定したところ、抗EREG抗体はEREG発現細胞に対してCDC活性およびADCC活性を有することを見出した。また、抗EREG抗体が、癌細胞株に対し中和作用による増殖抑制効果があることを明らかにした。更には以上の知見により、本発明者らは、抗EREG抗体が、原発性の、あるいは転移性の各種の癌の診断、予防および治療に有効であることを見出して、本発明を完成させた。より具体的には、本発明者らは、EREGが、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌をはじめとする、EREGが発現亢進している癌の、治療あるいは診断するためのツールとして有用であることを見出して本発明を完成した。

[0008] 本発明は、EREGタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。本発明はまた、EREGタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤を提供する。本発明はまた、EREGタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する抗癌剤を提供する。好ましくは、EREGタンパク質に結合する抗体は細胞障害活性を有する抗体である。更に好ましくは、当該抗体は更に中和活性を有する抗体である。本発明の好ましい態様において、治療の対象とできる癌は、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌である。本発明に基づく抗EREG抗体を含む抗癌剤は、これらのEREGが発現亢進した癌であって、原発性、あるいは転移性の癌の治療に有用である。本発明における特に好ましい治療の対象は、原発性大腸癌、転移性大腸癌、膵癌である。

[0009] あるいは本発明は、EREGタンパク質に結合する抗体と、薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、EREGが発現亢進している癌の治療および予防のいずれか、または両方に有用である。すなわち本発明は、EREGタンパク質に結合する抗体の、癌の治療および予防の、いずれか、または両方のための医薬組成物の製造における使用に関する。

[0010] 別の態様においては、本発明は、EREG発現細胞とEREGタンパク質に結合する抗体とを接触させることによりEREGタンパク質を発現する細胞に細胞障害を引き起こす方法を提供する。本発明はまた、EREGタンパク質を発現する細胞とEREGタンパク質に結合する抗体とを接触させることによりEREGタンパク質を発現する細胞の増殖を

抑制する方法を提供する。好ましくは、EGFRタンパク質に結合する抗体は細胞障害活性を有する抗体である。また好ましくは、EGFRタンパク質を発現する細胞は癌細胞である。

[0011] 更に別の態様においては、本発明は、EGFRタンパク質に結合し、かつ、EGFRタンパク質を発現する細胞に対して細胞障害活性を有する抗体を提供する。好ましくは、該細胞障害活性はADCC活性である。好ましくは、該細胞障害活性はCDC活性である。本発明はまた、細胞障害性物質を結合した抗体を提供する。本発明において、抗体に結合される細胞障害性物質としては、化学療法剤、放射性同位元素、および毒性ペプチドを示すことができる。本発明における抗体は、好ましくは抗体自身が細胞障害活性を有する抗体であることができる。

[0012] 本発明は更に、EGFRタンパク質に結合し、かつ、EGFRタンパク質を発現する細胞に対して細胞障害活性を有し、かつ中和活性を有する抗体を提供する。

別の態様においては、本発明は、癌診断マーカーとしてのEGFRタンパク質の使用を提供する。

[0013] 更に別の態様においては、本発明は、EGFRタンパク質に結合する抗体を用いてEGFRタンパク質を検出することを特徴とする癌の診断方法を提供する。本発明の方法においては、好ましくは、EGFRタンパク質の細胞外領域が検出される。また好ましくは、本発明の方法はEGFRタンパク質を認識する抗体を用いて行われる。好ましくは、本発明の方法においては、血液中、血清中、または血漿中のEGFRタンパク質、あるいは細胞から分離したEGFRタンパク質が検出される。

[0014] 別の態様においては、本発明は、以下の工程：

(a) 被検者から試料を採取する工程；

(b) 採取された試料に含まれるEGFRタンパク質を、EGFRタンパク質に結合する抗体を用いて検出する工程

を含む癌の診断方法を提供する。本発明において上記試料は被検者から採取できるものであればいかなるものでも使用することができる。一の態様においては被検者から採取した血液試料が使用される。本発明における好ましい血液試料は血清である。また別の態様では被検者から外科的に、あるいは生検（バイオプシー）により採取

された試料も使用される。該診断方法に係る癌は、対象とする癌細胞がEGFRタンパク質を発現する癌であればいずれの癌でもよい。本発明における好ましい癌は、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、および腎癌である。本発明に基づいて、これらの癌の原発性病巣、および転移性病巣のいずれをも診断することができる。特に好ましい癌は原発性大腸癌、転移性大腸癌、および膵癌である。

本発明において、被験者から試料を採取する工程は被験者から採取された試料を提供する工程とすることもできる。

[0015] さらに別の態様においては、本発明は、(1)放射性同位元素で標識されたEGFRタンパク質に結合する抗体を被験者に投与する工程、および(2)前記放射性同位元素の集積を検出する工程を含む癌の診断方法を提供する。ある態様において、放射性同位元素は、陽電子放出核種である。本発明における好ましい陽電子放出核種は、たとえば $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{45}\text{Ti}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{66}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、および $^{124}\text{I}$ からなる群から選択することができる。

[0016] また別の態様においては、本発明は、EGFRタンパク質をコードする遺伝子の発現を検出することを特徴とする癌の診断方法を提供する。

さらに別の態様においては、本発明は、本発明の診断方法に用いるための診断薬やキットを提供する。

[0017] 加えて本発明は、癌の治療剤の候補化合物をスクリーニングするための方法を提供する。本発明においては、たとえば、EGFRの発現レベルを指標として、癌の治療剤の候補化合物を選択することができる。あるいは、EGFRの細胞増殖刺激作用に対する中和作用を指標として、癌の治療剤の候補化合物を選択することもできる。

すなわち、本発明は、以下の発明を提供するものである。

- [1]EGFRタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する医薬組成物、
- [2]EGFRタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤、
- [3]EGFRタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する抗癌剤、
- [4]EGFRタンパク質に結合する抗体が細胞増殖阻害活性を有する抗体である、[3]に記載の抗癌剤、
- [5]EGFRタンパク質に結合する抗体が、以下(1)から(57)のいずれかに記載の抗

体である、[3]または[4]に記載の抗癌剤；

(1) CDR1として配列番号:2に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:4に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:6に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(2) (1)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:8に記載のアミノ酸配列の117から452位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(3) (1)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(4) CDR1として配列番号:12に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:14に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:16に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(5) (4)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:18に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(6) (4)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(7) (1)に記載のH鎖、および(4)に記載のL鎖を含む抗体、

(8) (2)に記載のH鎖、および(5)に記載のL鎖を含む抗体、

(9) (3)に記載のH鎖、および(6)に記載のL鎖を含む抗体、

(10) CDR1として配列番号:49に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:51に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:53に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(11) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:149に記載のアミノ酸配列の118から441位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(12) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(13) CDR1として配列番号:55に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:57に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:59に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、



- (14) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:151に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (15) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (16) (10)に記載のH鎖、および(13)に記載のL鎖を含む抗体、
- (17) (11)に記載のH鎖、および(14)に記載のL鎖を含む抗体、
- (18) (12)に記載のH鎖、および(15)に記載のL鎖を含む抗体、
- (19) CDR1として配列番号:61に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:63に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:65に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (20) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:153に記載のアミノ酸配列の116から439位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (21) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (22) CDR1として配列番号:67に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:69に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:71に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (23) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:155に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (24) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (25) (19)に記載のH鎖、および(22)に記載のL鎖を含む抗体、
- (26) (20)に記載のH鎖、および(23)に記載のL鎖を含む抗体、
- (27) (21)に記載のH鎖、および(24)に記載のL鎖を含む抗体、
- (28) CDR1として配列番号:73に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:75に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:77に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (29) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:157に記載のアミノ酸配列の

- 119から442位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (30) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (31) CDR1として配列番号:79に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:81に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:83に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (32) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:159に記載のアミノ酸配列の109から215位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (33) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (34) (28)に記載のH鎖、および(31)に記載のL鎖を含む抗体、
- (35) (29)に記載のH鎖、および(32)に記載のL鎖を含む抗体、
- (36) (30)に記載のH鎖、および(33)に記載のL鎖を含む抗体、
- (37) CDR1として配列番号:85に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:87に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:89に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (38) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:161に記載のアミノ酸配列の117から440位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (39) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (40) CDR1として配列番号:91に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:93に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:95に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (41) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:163に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (42) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (43) (37)に記載のH鎖、および(40)に記載のL鎖を含む抗体、

- (44) (38)に記載のH鎖、および(41)に記載のL鎖を含む抗体、
- (45) (39)に記載のH鎖、および(42)に記載のL鎖を含む抗体、
- (46) CDR1として配列番号:97に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:99に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:101に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (47) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:165に記載のアミノ酸配列の113から436位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (48) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (49) CDR1として配列番号:103に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:105に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:107に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (50) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:167に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (51) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (52) (46)に記載のH鎖、および(49)に記載のL鎖を含む抗体、
- (53) (47)に記載のH鎖、および(50)に記載のL鎖を含む抗体、
- (54) (48)に記載のH鎖、および(51)に記載のL鎖を含む抗体、
- (55) (1)から(54)のいずれかに記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、(1)から(54)のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、
- (56) (1)から(55)のいずれかに記載の抗体が結合するEREGタンパク質のエピトープと同じエピトープに結合する抗体、
- (57) (1)から(56)のいずれかに記載の抗体の低分子化抗体。
- [6]EREGタンパク質に結合する抗体が、配列番号:21に記載のアミノ酸配列において、29番目のAlaから69番目のSer、又は63番目のValから108番目のLeuを認識することを特徴とする、[3]から[5]のいずれかに記載の抗癌剤、

- [7]癌が、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、および腎癌からなる群から選択されるいずれかの癌である、[3]から[6]のいずれかに記載の抗癌剤、
- [8]癌が、原発性の癌である[7]に記載の抗癌剤、
- [9]癌が、転移性の癌である[7]に記載の抗癌剤、
- [10] EREGタンパク質に結合し、かつEREGタンパク質を発現する細胞に対して細胞増殖阻害活性を有する抗体、
- [11]細胞増殖阻害活性が細胞障害活性である[10]に記載の抗体、
- [12]細胞障害活性がADCC活性である[11]に記載の抗体、
- [13]細胞障害活性がCDC活性である[11]に記載の抗体、
- [14]更に付加的にEREGタンパク質に対する中和活性を有することを特徴とする[10]から[13]のいずれかに記載の抗体、
- [15]細胞増殖阻害活性が中和活性である[10]に記載の抗体、
- [16][10]に記載の抗体から作成される低分子化抗体、
- [17]化学療法剤、または、毒性ペプチドを結合した[10]から[16]のいずれかに記載の抗体、
- [18] EREGタンパク質に結合する抗体であって、化学療法剤、毒性ペプチド、および放射性同位元素からなる群から選択されたいずれかの細胞障害性物質が結合された抗体、
- [19]以下(1)から(57)のいずれかに記載の抗体である、[10]から[18]のいずれかに記載の抗体；
- (1) CDR1として配列番号:2に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:4に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:6に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (2) (1)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:8に記載のアミノ酸配列の117から452位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (3) (1)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (4) CDR1として配列番号:12に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:14に記載

載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:16に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(5) (4)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:18に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(6) (4)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(7) (1)に記載のH鎖、および(4)に記載のL鎖を含む抗体、

(8) (2)に記載のH鎖、および(5)に記載のL鎖を含む抗体、

(9) (3)に記載のH鎖、および(6)に記載のL鎖を含む抗体、

(10) CDR1として配列番号:49に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:51に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:53に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(11) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:149に記載のアミノ酸配列の118から441位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(12) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(13) CDR1として配列番号:55に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:57に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:59に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(14) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:151に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(15) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(16) (10)に記載のH鎖、および(13)に記載のL鎖を含む抗体、

(17) (11)に記載のH鎖、および(14)に記載のL鎖を含む抗体、

(18) (12)に記載のH鎖、および(15)に記載のL鎖を含む抗体、

(19) CDR1として配列番号:61に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:63に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:65に記載のアミノ酸配列を有す

るH鎖を含む抗体、

(20) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:153に記載のアミノ酸配列の116から439位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(21) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(22) CDR1として配列番号:67に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:69に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:71に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(23) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:155に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(24) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(25) (19)に記載のH鎖、および(22)に記載のL鎖を含む抗体、

(26) (20)に記載のH鎖、および(23)に記載のL鎖を含む抗体、

(27) (21)に記載のH鎖、および(24)に記載のL鎖を含む抗体、

(28) CDR1として配列番号:73に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:75に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:77に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(29) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:157に記載のアミノ酸配列の119から442位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(30) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(31) CDR1として配列番号:79に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:81に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:83に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(32) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:159に記載のアミノ酸配列の109から215位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(33) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の1

- 07から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (34) (28)に記載のH鎖、および(31)に記載のL鎖を含む抗体、
- (35) (29)に記載のH鎖、および(32)に記載のL鎖を含む抗体、
- (36) (30)に記載のH鎖、および(33)に記載のL鎖を含む抗体、
- (37) CDR1として配列番号:85に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:87に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:89に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (38) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:161に記載のアミノ酸配列の117から440位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (39) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (40) CDR1として配列番号:91に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:93に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:95に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (41) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:163に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (42) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の07から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (43) (37)に記載のH鎖、および(40)に記載のL鎖を含む抗体、
- (44) (38)に記載のH鎖、および(41)に記載のL鎖を含む抗体、
- (45) (39)に記載のH鎖、および(42)に記載のL鎖を含む抗体、
- (46) CDR1として配列番号:97に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:99に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:101に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (47) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:165に記載のアミノ酸配列の113から436位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (48) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(49) CDR1として配列番号:103に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:105に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:107に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(50) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:167に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(51) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(52) (46)に記載のH鎖、および(49)に記載のL鎖を含む抗体、

(53) (47)に記載のH鎖、および(50)に記載のL鎖を含む抗体、

(54) (48)に記載のH鎖、および(51)に記載のL鎖を含む抗体、

(55) (1)から(54)のいずれかに記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、(1)から(54)のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(56) (1)から(55)のいずれかに記載の抗体が結合するEREGタンパク質のエピトープと同じエピトープに結合する抗体、

(57) (1)から(56)のいずれかに記載の抗体の低分子化抗体。

[20]配列番号:21に記載のアミノ酸配列において、29番目のAlaから69番目のSer、又は63番目のValから108番目のLeuを認識することを特徴とする、[10]から[20]のいずれかに記載の抗体、

[21]癌診断マーカーとしてのEREGタンパク質およびEREGのmRNAのいずれか、または両方の使用、

[22]EREGタンパク質に結合する抗体をEREGタンパク質に結合させる工程を含む癌の診断方法、

[23]以下の工程:

(a) 被検者から試料を採取する工程;

(b) 採取された試料に含まれるEREGタンパク質を、EREGタンパク質に結合する抗体を用いて検出する工程

を含む癌の診断方法、



[24](1)放射性同位元素で標識されたEREGタンパク質に結合する抗体を被検者に投与する工程、および(2)前記放射性同位元素の集積を検出する工程を含む癌の診断方法、

[25]放射性同位元素が、陽電子放出核種である[22]に記載の診断方法、

[26]陽電子放出核種が $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{45}\text{Ti}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{66}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、および $^{124}\text{I}$ からなる群から選択されるいずれかの核種である[25]に記載の診断方法、

[27]EREGタンパク質をコードする遺伝子の発現を検出することを特徴とする癌の診断方法、

[28]癌が、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、および腎癌からなる群から選択されるいずれかの癌である[22]から[27]のいずれかに記載の診断方法、

[29]癌が、原発性の癌である[28]に記載の診断方法、

[30]癌が、転移性の癌である[28]に記載の診断方法、

[31]EREGタンパク質に結合する抗体を含む、癌の診断方法に用いるための診断薬、

[32]EREGタンパク質に結合する抗体と、EREGタンパク質を含む生体試料を含む、癌の診断方法に用いるためのキット、

[33]次の工程を含む、癌の治療剤の候補化合物のスクリーニング方法；

(1)EREG発現細胞に被験化合物を接触させる工程、

(2)EREG発現細胞におけるEREGの発現レベルを測定する工程、および

(3)対照と比較して、EREGの発現レベルを低下させる化合物を癌の治療剤の候補化合物として選択する工程、

[34]EREGの発現レベルが、培養上清中に分泌されるEREG蛋白質のレベルによって評価される[33]に記載の方法、および

[35]次の工程を含む、癌の治療剤の候補化合物のスクリーニング方法；

(1)EREG依存的に増殖する細胞を、EREGと被験化合物の存在下で培養する工程、

(2)細胞増殖レベルを測定する工程、および

(3)対照と比較して細胞増殖を抑制した被験化合物を癌の治療剤の候補化合物として選択する工程。

## 発明の効果

[0018] 種々の癌組織、あるいは癌細胞株の遺伝子発現解析に基づいて、EGFR遺伝子の癌細胞における顕著な発現亢進が確認された。一方、正常細胞におけるEGFRの発現レベルは非常に低かった。したがって、EGFRは、癌を特異的に検出するためのマーカーとして有用である。

本発明において、抗EGFR抗体の、EGFR発現細胞に対する細胞障害作用が確認された。EGFRの発現レベルは、正常細胞で非常に低い一方、癌細胞では亢進している。このことは、抗EGFR抗体の投与によって、たとえば生体内において、癌細胞特異的な細胞障害作用が得られることを裏付けている。

更に、本発明において、EGFR依存性の細胞増殖が、抗EGFR抗体によって中和されることが確認された。したがって、抗EGFR抗体は、好ましい態様において、細胞障害作用に加えて、EGFRの細胞増殖作用の中和を通じて、癌細胞の増殖抑制をもたらす。

## 図面の簡単な説明

[0019] [図1]正常組織および癌組織におけるEGFR mRNAの転写量を示す図である。縦軸はプローブID:205767\_at HG-U133Aの信号強度(Gene chip U133Aの全遺伝子の発現スコアの平均を100とする相対値)を示す。

[図2]癌細胞株におけるEGFR mRNAの転写量を示す図である。縦軸はプローブID:205767\_at HG-U133Aの信号強度(Gene chip U133Aの全遺伝子の発現スコアの平均を100とする相対値)を示す。

[図3]フローサイトメトリーを用いて抗EGFRモノクローナル抗体のEGFR<sup>+</sup>細胞に対する結合活性を示した試験結果を表した図である。縦軸は細胞数(蛍光計数値)を、横軸は蛍光強度値を示す。

[図4]フローサイトメトリーを用いて抗EGFRモノクローナル抗体の大腸癌細胞株DLD1に対する結合活性を示した試験結果を表した図である。縦軸は細胞数(蛍光計数値)を、横軸は蛍光強度値を示す。

[図5]大腸癌細胞株DLD1に対する抗EGFRモノクローナル抗体のCDC活性を示した図である。縦軸はクロム遊離率(%),横軸には抗体の種類を示した。

[図6]大腸癌細胞株DLD1に対する抗EREGモノクローナル抗体のADCC活性を示した図である。縦軸はクロム遊離率(%),横軸には抗体の種類を示した。

[図7]ヒトEREGに対するEGFR\_BAF細胞の増殖依存性を示す図である。縦軸は450nmにおける吸光度(参照波長655nm)を、横軸はEREGの濃度(ng/mL)を示す。

[図8]ヒトEREGに対する膵臓癌細胞株AsPC1の増殖依存性を示す図である。縦軸は450nmにおける吸光度(参照波長655nm)を、横軸はEREGの濃度(ng/mL)を示す。

[図9]ヒトEREGに対する大腸癌細胞株DLD1の増殖依存性を示す図である。縦軸は450nmにおける吸光度(参照波長655nm)を、横軸はEREGの濃度(ng/mL)を示す。

[図10]EGFR\_BAF細胞を用いて、ヒトEREGに対する抗EREGモノクローナル抗体の中和活性を示した図である。縦軸は細胞増殖率(各抗体濃度における吸光度/コントロールの吸光度×100%)を、横軸は抗体濃度( $\mu$ g/mL)を示す。

[図11]膵臓癌細胞株AsPC1を用いて、ヒトEREGに対する抗EREGモノクローナル抗体の中和活性を示した図である。縦軸は細胞増殖率(各抗体濃度における吸光度/コントロールの吸光度×100%)を、横軸は抗体濃度( $\mu$ g/mL)を示す。

[図12]可変領域配列を同定し、再構成したキメラ化抗体がEREGに対し結合する様子を示す図である。

[図13]癌細胞株に対するキメラ化抗体のADCC誘導活性を示す図である。

[図14]キメラ抗体のEREGに対する種交叉性解析結果を示す図である。

[図15]組換え可溶性EREGとEGFのEGFR受容体活性化能を比較した結果を示す図である。

[図16]EREG強制発現細胞共培養によりEGF受容体活性化が起こること、抗EREG抗体によりこの活性化が抑制されることを示す図である。

[図17]EREG強制発現細胞共培養によりEGF受容体活性化が起こること、抗EREG抗体によりこの活性化が抑制されることを示す図である。

[図18]DLD-1細胞共培養によりEGFR受容体活性化が起こり、この活性化は抗EREG抗体添加で抑制されることを示す図である。

[図19]抗EREG抗体を用いたサンドイッチELISA法による可溶性EREG蛋白質の検出の様子を示す図である。

[図20]抗REGマウスモノクローナル抗体EP27による免疫染色結果を示す図である。  
[図21-1]マウス抗REG抗体とヒトキメラ抗REG抗体を用いた抗原蛋白質に対するサンドイッチELISAの結果を示す図である。  
[図21-2]図21-1の続きを示す図である。  
[図21-3]図21-2の続きを示す図である。  
[図22]サンドイッチELISAのデータを元に抗体の結合反応性パターンをクラスタリング解析した結果を示す図である。

[0020] [発明の実施の形態]

REGは、膜結合型上皮細胞成長因子蛋白質である。そのアミノ酸配列およびこれをコードする遺伝子配列は、それぞれGenBank登録番号NP\_001423 (配列番号:22) 及びNM\_001432 (配列番号:21)に開示されている。本発明において、REGタンパク質とは、全長タンパク質およびその断片の両方を含むことを意味する。断片とは、REGタンパク質の任意の領域を含むポリペプチドであり、天然のREGタンパク質の機能を有していなくてもよい。断片の例として、REGタンパク質の細胞外領域を含む断片が挙げられる。REGタンパク質の細胞外領域は配列番号:22のアミノ酸配列において29-122番目が相当する。又、膜貫通領域は配列番号:22のアミノ酸配列において123-140番目が相当する。

本発明においては、臨床検体および癌細胞株の解析から、原発性大腸癌、転移性大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌組織において、非常に高頻度でREGが遺伝子レベルで発現していることが示された。また、癌細胞株においては更に蛋白質レベルでも高発現していることが示された。すなわち、REGタンパク質は癌の診断マーカーとして有用である。

[0021] REG遺伝子発現の検出

本発明による癌の診断方法は、REG遺伝子発現を検出する工程を含む。本発明の方法の1つの態様においては、REGタンパク質の発現を検出する。

本発明において検出とは、定量的または定性的な検出を含む。例えば、定性的な検出としては、次のような測定を挙げることができる。

単にREGタンパク質が存在するか否かの測定

EREGタンパク質が一定の量以上存在するか否かの測定

EREGタンパク質の量を他の試料(例えば、コントロール試料など)と比較する測定など

一方、定量的な検出とは、EREGタンパク質の濃度の測定、EREGタンパク質の量の測定などを挙げることができる。

[0022] 本発明における被検試料は、EREGタンパク質が含まれる可能性のある試料であれば特に制限されない。具体的には、哺乳類などの生物の体から採取された試料が好ましい。さらに好ましい試料は、ヒトから採取された試料である。被検試料の具体的な例としては、例えば、血液、間質液、血漿、血管外液、脳脊髄液、滑液、胸膜液、血清、リンパ液、唾液、尿などが例示できる。好ましい試料は、血液試料である。血液試料とは、血清、血漿、および全血を含む。これら血液試料の中では、血清が好ましい。その他、生物の体から採取された組織若しくは細胞が固定化された標本又は細胞の培養液などの被検試料から得られる試料も本発明の被検試料に含まれる。

[0023] 本発明によって診断される癌は、特に制限されることはなく如何なる癌でもよい。具体的には、大腸癌、転移性大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、あるいは腎癌などを挙げることができる。本発明においては、これらの癌の原発病巣、および転移病巣のいずれをも診断することができる。本発明において特に好ましい癌は、原発性大腸癌、転移性大腸癌、および膵癌である。

[0024] 本発明においては、被検試料中にEREGタンパク質が検出された場合に、癌が検出される。具体的には、陰性コントロールまたは健常者と比較して被検試料中に検出されるEREGタンパク質の量が多い場合に、被検者が癌である、または将来癌を罹患する可能性が高いことが示される。すなわち本発明は、次の工程を含む癌の検出方法に関する。

(1)被検者から採取された生体試料中のEREG発現レベルを検出する工程、および

(2)(1)で検出されたEREGの発現レベルが、対照と比較して高い場合に被検者が癌を有することが示される工程

[0025] 本発明において、対照とは、陰性コントロールや健常者の生体試料が含まれる。陰性コントロールは、健常者の生体試料を採取し、必要に応じて混合することによって

得ることができる。対照のEREGの発現レベルは、被検者の生体試料におけるEREGの発現レベルとともに検出することができる。あるいは、予め、多数の健常者の生体試料におけるEREGの発現レベルを検出し、健常者における標準的な発現レベルを統計学的に決定することができる。具体的には、たとえば、平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差(S.D.)、あるいは平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差(S.D.)を標準値として用いることもできる。統計学的に、平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差(S.D.)は80%の、また平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差(S.D.)は90%の健常者の値を含む。

[0026] あるいは、対照におけるEREGの発現レベルを、ROC曲線を利用して設定することができる。ROC曲線(receiver operating characteristic curve; 受信者操作特性曲線)は、縦軸に検出感度を、横軸に擬陽性率(すなわち"1-特異度")を示すグラフである。本発明においては、生体試料中のEREGの発現レベルを判定するための基準値を連続的に変化させたときの、感度と擬陽性率の変化をプロットすることによって、ROC曲線を得ることができる。

[0027] なおROC曲線を得るための「基準値」は、統計学的な解析のために一時的に利用される数値である。ROC曲線を得るための「基準値」は、一般的には、選択しうる全ての基準値をカバーできる範囲内で、連続的に変化させられる。たとえば、解析される集団のEREGの測定値の最小値と最大値の間で、基準値を変化させることができる。

得られたROC曲線に基づいて、所望の検出感度、並びに精度を期待できる標準値を選択することができる。ROC曲線などによって統計学的に設定された標準値は、カットオフ値(cut-off value)とも呼ばれる。カットオフ値に基づく癌の検出方法は、前記工程(2)において、(1)で検出されたEREGの発現レベルが、カットオフ値と比較される。そして、カットオフ値よりも(1)で検出されたEREGの発現レベルが高いときに、被検者の癌が検出される。

[0028] 本発明において、EREGの発現レベルは、任意の方法によって決定することができる。具体的には、EREGのmRNAの量、EREGタンパク質の量、そしてEREGタンパク質の背生物学的な活性を評価することによって、EREGの発現レベルを知ることができる。EREGのmRNAやタンパク質の量は、本明細書に記載したような方法によって決定することができる。あるいはEREGの生物学的な活性として、EREG依存的に細胞増殖

が誘導される細胞を使って、細胞増殖誘導活性を評価することもできる。

[0029] 本発明においては、EGFRタンパク質を発現する任意の動物種を被検者とすることができる。たとえば、サル、ウシ、ヒツジ、マウス、イヌ、ネコ、ハムスター等ヒト以外の多くの哺乳類がEGFRタンパク質を発現していることが知られている。したがってこれらの動物は、本発明における被検者に含まれる。特に好適な被検者はヒトである。なおヒト以外の動物を被検者とするときは、当該動物種のEGFRタンパク質が検出されることは言うまでもない。

[0030] 本発明の診断方法の好ましい態様としては、上記の癌に罹患した患者から取得した組織若しくは細胞を固定化した切片上でEGFRタンパク質を検出する工程を含む癌の診断方法を挙げることができる。更に本発明の別の態様では細胞から遊離し、血中に存在するEGFRタンパク質を検出する工程を含む診断方法を挙げることができる。特に好ましくは、本発明は、血中に存在するEGFRタンパク質の細胞外領域を含む断片を検出する工程を含む癌の診断方法である。

[0031] 被検試料に含まれるEGFRタンパク質の検出方法は特に限定されない。抗EGFR抗体を用いた免疫学的方法により検出することが好ましい。免疫学的方法としては、たとえば次のような手法を利用することができる。

ラジオイムノアッセイ(RIA)、  
エンザイムイムノアッセイ(EIA)、  
蛍光イムノアッセイ(FIA)、  
発光イムノアッセイ(LIA)、  
免疫沈降法(IP)、  
免疫比濁法(TIA)、  
ウエスタンブロット(WB)、  
免疫組織化学(IHC)法、  
免疫拡散法(SRID)

[0032] これらの手法の中で、エンザイムイムノアッセイは好ましい免疫学的アッセイ法の一つである。より具体的には、酵素結合免疫吸着定量法(enzyme-linked immunosorbent assay:ELISA)を好ましいエンザイムイムノアッセイとして示すことができる。ELISA

の一態様としては、例えば、sandwich ELISA(サンドウィッチELISA)が挙げられる。ELISAなどの上述した免疫学的方法は当業者に公知の方法である。

[0033] 抗EREG抗体を用いた一般的な検出方法としては、例えば、以下の方法を挙げることができる。まず抗EREG抗体を支持体に固定した後に、タンパク質の支持体に対する非特異的な結合を防ぐため、支持体がブロッキングされる。例えば仔牛血清アルブミン(BSA)、ゼラチン、アルブミンなどがブロッキングに用いられる。抗体を支持体に結合するための種々の方法が公知である。たとえば、ポリスチレン樹脂などの合成樹脂は、抗体を物理的に吸着する。あるいは官能基を導入した支持体に、抗体を化学的に結合することもできる。抗体を化学的に結合するために、二官能性リンカーを利用することもできる。

[0034] 次に、支持体に被検試料を加えインキュベーションされる。このとき、支持体に結合した抗EREG抗体が被検試料中のEREGタンパク質と結合する。次いで、抗EREG抗体を介して支持体に結合されたEREGが検出される。支持体に結合されたEREGの検出に先立ち、支持体を洗浄することもできる。支持体に結合したEREGは、たとえばEREGを認識する第二の抗体で検出することができる。第二の抗体は、標識物質によって標識することができる。あるいは第二抗体を認識する第三の抗体(二次抗体)によって、第二の抗体を間接的に標識することもできる。こうして支持体上の抗EREG抗体に結合したEREGタンパク質を定性的に又は定量的に検出することにより被検試料中のEREGタンパク質が検出することができる。更に以下において幾つかの具体例が説明される。

[0035] 本発明において抗EREG抗体を固定するために用いられる支持体には、次のような素材を利用することができる。

不溶性の多糖類:アガロース、セルロースなど、

合成樹脂:シリコン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、ナイロン樹脂、ポリカーボネイト樹脂など

ガラスなどの不溶性の支持体

これらの支持体は、ビーズやプレートなどの形状で用いられる。ビーズの場合、これらが充填されたカラムなどが使用できる。プレートの場合、マルチウェルプレート(96



穴マルチウェルプレート等)やバイオセンサーチップなどが使用できる。抗EREG抗体と支持体との結合においては、化学結合や物理的な吸着などの通常用いられる方法により抗EREG抗体が支持体に結合できる。これらの支持体はすべて市販のものが好適に使用できる。

[0036] 抗EREG抗体とEREGタンパク質との結合は、通常、緩衝液中で行われる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、炭酸塩緩衝液などが使用される。また、インキュベーションの条件としては、すでによく用いられている条件、例えば、4°Cから室温の間の温度にて1時間から24時間までの時間でインキュベーションが好適に実施できる。インキュベーションの後の洗浄は、EREGタンパク質と抗EREG抗体の結合を妨げないものであれば何でもよく、例えば、Tween20等の界面活性剤を含む緩衝液などが好適に使用できる。

[0037] 本発明のEREGタンパク質検出方法においては、そのEREGタンパク質含有量を検出する被検試料の他に、対照試料が適切に調製できる。対照試料としては、EREGタンパク質を含まない陰性対照試料やEREGタンパク質を含む陽性対照試料などが挙げられる。この場合、EREGタンパク質を含まない陰性対照試料で得られた結果と、EREGタンパク質を含む陽性対照試料で得られた結果とを比較することにより、被検試料中のEREGタンパク質の存在又は非存在の確認ができる。また、濃度を段階的に変化させた一連の対照試料を調製し、各対照試料に対する検出結果を数値として得た後に、EREGタンパク質の濃度値と対応する測定値に基づいて標準曲線を得ることができる。被検試料に含まれるEREGタンパク質の測定結果と標準曲線から、被検試料に含まれるEREGタンパク質を定量的に検出することができる。

[0038] 抗EREG抗体を介して支持体に結合したEREGタンパク質の検出の好ましい態様として、標識物質で標識された抗EREG抗体を用いる方法が挙げられる。例えば、支持体に固定された抗EREG抗体に被検試料を接触させ、必要に応じて洗浄後に、EREGタンパク質を特異的に認識する標識抗体を結合させることによって該EREGタンパク質が検出される。

抗EREG抗体は通常知られている方法により標識することができる。標識物質としては、蛍光色素、酵素、補酵素、化学発光物質、放射性物質などの当業者に公知の標

識物質を用いることができる。具体的には、次のような標識物質が抗体の標識に利用されている。

[0039] ラジオアイソトープ： $^{32}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{131}\text{I}$ など

蛍光色素：フルオレセイン、ローダミン、ダンシルクロリド、ウンベリフェロンなど

酵素：ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、ホースラディッシュスーパーオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼなど

結合親和性物質：ビオチンなど

[0040] 標識物質としてビオチンを用いる場合には、アルカリホスファターゼなどの酵素を結合させたアビジンによってビオチン標識抗体を検出することができる。標識物質と抗EGFR抗体との結合のためには、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法、過ヨウ素酸法、などの公知の方法が使用できる。

[0041] 標識物質の検出方法も公知である。例えば、放射性物質により標識された抗EGFR抗体を検出する場合には、放射活性を液体シンチレーションカウンターによって検出することができる。酵素により標識された抗EGFR抗体は、該標識抗EGFR抗体に基質を加えた後に、基質の酵素的変化により検出することができる。発色反応や発光反応を触媒する酵素と、基質の組み合わせが公知である。たとえばパーオキシダーゼの検出用基質の具体的な例としては、2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ジアンモニウム塩 (ABTS)、1,2-フェニレンジアミン (オルソ-フェニレンジアミン)、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB)などを挙げることができる。これらの発色基質を用いた場合には、吸光光度計によって反応を追跡することができる。基質が蛍光発光物質の場合には基質の酵素的変化を蛍光光度計を用いて検出できる。

[0042] 本発明のEGFRタンパク質の検出方法の特に好ましい態様として、ビオチンで標識された抗EGFR抗体およびアビジンを用いる方法を挙げることができる。具体的には、ビオチン標識抗EGFR抗体を酵素が結合されたアビジンあるいはストレプトアビジンによって検出することができる。アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素が結合されたアビジンやストレプトアビジンが公知である。

本発明のEREGタンパク質を検出する方法の他の態様として、EREGタンパク質を特異的に認識する一次抗体を一種類以上、および該一次抗体を特異的に認識する二次抗体を一種類以上用いる方法を挙げることができる。

[0043] 二次抗体を利用するときには、支持体に結合した抗体(固相化抗体)とは別の動物種に由来する抗EREG抗体が液相抗体として用いられる。固相化抗体に捕捉されたEREGタンパク質に液相抗体が結合する。更に液相抗体に二次抗体が結合する。二次抗体は液相抗体に結合し、固相化抗体には結合できない。したがって、支持体に残る二次抗体の量は、EREGタンパク質を介して支持体に結合している液相抗体の量に依存する。上記操作の結果、結合した二次抗体を定性的に又は定量的に検出することにより、被検試料中のEREGタンパク質を検出することができる。この場合、二次抗体が標識物質により好適に標識できる。

[0044] 本発明のEREGタンパク質の検出方法の他の態様としては、凝集反応を利用した検出方法を挙げることができる。該方法においては、抗EREG抗体を吸着した担体を用いてEREGタンパク質が検出できる。抗体を吸着する担体としては、不溶性で、非特異的な反応を起こさず、かつ安定である限り、いかなる担体を使用してもよい。例えば、ラテックス粒子、ベントナイト、コロジオン、カオリン、固定羊赤血球等を使用することができる。ラテックス粒子は均一性や安定性に優れる好ましい担体である。ラテックス粒子としては、例えば、ポリスチレンラテックス粒子、スチレン-ブタジエン共重合体ラテックス粒子、ポリビニルトルエンラテックス粒子等を使用することができる。あるいはカルボキシル基などの官能基が導入されたラテックス粒子も公知である。たとえばポリスチレンラテックス粒子は好ましいラテックス粒子である。

疎水性表面を有するラテックス粒子は、抗体と混合することによって、抗体を物理的に吸着する。あるいはラテックス粒子が官能基を有するときは、抗体を化学的に結合することもできる。抗体を結合した粒子を試料と混合させ、一定時間攪拌させる。試料中にEREGタンパク質が高濃度で含まれるほど粒子の凝集度が大きくなるので、該凝集度を肉眼で見積もることによりEREGタンパク質が検出できる。また、凝集による濁度や散乱光の増加を分光光度計等により測定することによってもEREGタンパク質が検出できる。

- [0045] 本発明のEREGタンパク質の検出方法の他の態様としては、例えば、表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを用いた方法を挙げることができる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することによって、タンパク質とタンパク質間の相互作用を表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに該タンパク質を標識することなく観察できる。例えば、BIAcore(ビアコア社製)等のバイオセンサーを用いることによりEREGタンパク質と抗EREG抗体の結合が検出できる。具体的には、抗EREG抗体を固定化したセンサーチップに、被検試料を接触させ、抗EREG抗体に結合するEREGタンパク質が共鳴シグナルの変化として検出できる。
- [0046] EREGは、癌細胞において特異的に発現が増強している膜タンパク質である。したがって、抗EREG抗体によって、癌細胞、あるいは癌組織を検出することができる。たとえば抗EREG抗体を使った免疫組織学的な解析によって、生体から採取された細胞や組織に含まれる癌細胞が検出される。あるいは生体内の癌組織を抗EREG抗体によって検出することもできる。すなわち本発明は、(1)放射性同位元素で標識されたEREGタンパク質に結合する抗体を被検者に投与する工程と、(2)前記放射性同位元素の集積を検出する工程を含む癌の検出方法に関する。生体内に投与した抗体を追跡するために、抗体は、検出可能に標識することができる。たとえば蛍光物質や発光物質、あるいは放射性同位元素で標識された抗体の生体における挙動を追跡することができる。蛍光物質や発光物質で標識された抗体は、内視鏡や腹腔鏡を利用して観察することができる。放射性同位元素は、その放射活性を追跡することによって、抗体の局在を画像化することができる。本発明において、生体内における抗EREG抗体の局在は、癌細胞の存在を表している。
- [0047] 生体内の癌を検出するために抗体を標識する放射性同位元素として、陽電子放出核種を利用することができる。たとえば $^{18}\text{F}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{66}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、および $^{124}\text{I}$ のような陽電子放出核種で抗体を標識することができる。これらの陽電子放出核種による抗EREG抗体の標識には、公知の方法(Acta Oncol. 32, 825-830, 1993)を利用することができる。
- [0048] 陽電子放出核種で標識された抗EREG抗体がヒトや動物に投与された後に、PET(ポジトロン断層撮影装置)により、その放射性核種が放射する放射線が体外から計測

され、コンピュータトモグラフィの手法で画像に変換される。PETは、薬物の体内挙動などに関するデータを非侵襲的に得るための装置である。PETによって、放射強度をシグナル強度として定量的に画像化することができる。上記のようにPETを使用することによって、患者から試料を採取することなく特定の癌で高発現する抗原分子が検出できる。抗EREG抗体は、上記の核種の他に<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>18</sup>F、<sup>45</sup>Ti等の陽電子放出核種を用いた短寿命核種によって放射標識することもできる。

[0049] 医療用サイクロトロンによる上記核種を用いた短寿命核種の生産、短寿命放射標識化合物の製造技術等に関する研究開発が進められている。これらの技術により抗EREG抗体が種々の放射性同位元素によって標識することができる。患者に投与された抗EREG抗体は、各部位の病理組織に対する抗EREG抗体の特異性に従って原発巣及び転移巣に集積する。抗EREG抗体が陽電子放出核種で標識されていれば、その放射活性を検出することにより該原発巣および転移巣の存在が放射活性の局在によって検出される。該診断用途に用いる場合には25-4000 keVのガンマ粒子又は陽電子放射量の活性値が適切に使用できる。また、適切な核種を選択して、さらに大量に投与すれば治療効果も期待できる。放射線による抗癌作用を得るためには、70-700 keVのガンマ粒子または陽電子放射量値を与える核種を使用できる。

[0050] 本発明の方法の別の態様においては、EREGのmRNAの発現を検出する。本発明において検出とは、定量的または定性的な検出を含む。例えば、定性的な検出として、次のような測定操作を挙げることができる。  
単にEREGのmRNAが存在するか否かの測定、  
EREGのmRNAが一定の量以上存在するか否かの測定、  
EREGのmRNAの量を他の試料(例えば、コントロール試料など)と比較する測定など  
一方、定量的な検出とは、EREGのmRNAの濃度の測定、EREGのmRNAの量の測定などを挙げることができる。

[0051] 本発明における被検試料としては、EREGのmRNAが含まれる可能性のある任意の試料を利用することができる。哺乳類などの生物の体から採取された試料が好ましく、さらに好ましくはヒトから採取された試料である。被検試料の具体的な例としては、例えば、血液、間質液、血漿、血管外液、脳脊髄液、滑液、胸膜液、血清、リンパ液

、唾液、尿などが例示できる。好ましい試料は血液試料である。血液試料には、血清、血漿、あるいは全血が含まれる。又、生物の体から採取された組織若しくは細胞が固定化された標本又は細胞の培養液などの、被検試料から得られる試料も本発明の被検試料に含まれる。

[0052] 診断される癌は、特に制限されない。具体的には、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、あるいは腎癌などを挙げることができる。本発明においては、これらの癌の原発病巣、および転移病巣のいずれをも診断することができる。特に好ましいものは原発性大腸癌、転移性大腸癌、および膵癌である。

[0053] 本発明においてはEREGタンパク質を発現する任意の動物種を被検者とすることができる。たとえば、サル、ウシ、ヒツジ、マウス、イヌ、ネコ、ハムスター等ヒト以外の多くの哺乳類がEREGを発現していることが知られている。特に好適な被検者はヒトである。なおヒト以外の動物種を被検者とするときには、当該動物種のEREGのmRNAが検出される。

[0054] 以下に検出方法の具体的な態様を記載する。まず、被検者から試料を調製する。次いで、該試料に含まれるEREGのmRNAを検出する。本発明においては、mRNAから合成したcDNAの検出することもできる。本発明においては、被検試料中にEREGのmRNAやEREGをコードするcDNAが検出された場合、被検者の癌が検出される。たとえば、陰性コントロールまたは健常者と比較して被検試料中に検出されるEREGのmRNAやEREGをコードするcDNAの量が多い場合に、被検者が癌である、または将来癌を罹患する可能性が高いことが示される。

mRNAを検出する方法は、公知である。具体的には、例えばノーザンブロッティング法、RT-PCR法、DNAアレイ法等を本発明に利用することができる。

上記した本発明の検出方法は、種々の自動検査装置を用いて自動化することもできる。自動化することによって、一度に大量の試料を検査することができる。

本発明は、被検試料中のEREGタンパク質を検出するための試薬を含む癌の診断のための診断薬またはキットの提供をも目的とする。本発明の診断薬は、少なくとも抗EREG抗体を含む。本発明の診断薬またはキットがELISA法等のEIA法に基づく場合は、抗体を固相化する担体を含むことができる。あるいはあらかじめ担体に結合さ

せた抗体を供給することもできる。本発明の診断薬またはキットがラテックス等の担体を用いた凝集法に基づく場合は抗体が吸着した担体を含むことができる。

[0055] 本発明の癌の診断用試薬と、EREGの検出に用いられるその他の要素を組み合わせることによって、癌の診断のためのキットとすることができる。すなわち本発明は、EREGに結合する抗体と、EREGを含む生体試料からなる対照試料を含む癌の診断のためのキットに関する。本発明のキットには、更に付加的に、EREGのイムノアッセイのための試薬を含むことができる。たとえばELISA用の試薬として、酵素標識を検出するための発色基質や、固相を洗浄するための洗浄液を組み合わせることができる。その他、測定操作を説明するための指示書をキットに添付することもできる。

[0056] また、本発明は、被検試料中のEREGのmRNA、またはEREGをコードするcDNAを検出するための試薬を含む癌の診断のための診断薬またはキットを提供する。本発明の診断薬は少なくともEREGをコードするDNA(配列番号:21;NM\_001423に記載の塩基配列からなるDNA)またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含む。

ここで「相補鎖」とは、A:T(ただしRNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

[0057] このようなオリゴヌクレオチドは、EREGをコードするDNAの検出や増幅に用いるプローブやプライマー、該DNAの発現を検出するためのプローブやプライマーとして使用することができる。プローブは、DNAアレイの基板の形態で使用することができる。

該オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、その長さは、通常15bp~100bpである。好ましいプライマーの長さは17bp~30bpである。プライマーは、EREGをコードするDNAまたはその相補鎖の少なくとも一部を増幅しうる任意のプライマーを利用することができる。また、プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的とし、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

[0058] また、*EREG*をコードするDNAまたはその相補鎖の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズする任意のオリゴヌクレオチドをプローブとして利用することができる。*mRNA*を検出するためのプローブの塩基配列は、*EREG*のセンス鎖に相補的な塩基配列から選択される。該プローブは、通常少なくとも15bp以上の鎖長を有する。

本発明において、オリゴヌクレオチドは、適宜標識してプローブとすることができる。オリゴヌクレオチドを標識する方法は公知である。たとえば、 $^{32}\text{P}$ で標識したATPを基質として、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてオリゴヌクレオチドの5'端をリン酸化することにより標識することができる。あるいは、DNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして標識された基質塩基を取り込ませる方法(ランダムプライム法等)を例示することができる。ランダムプライム法には、クレノウ酵素等がDNAポリメラーゼとして利用される。また塩基は、 $^{32}\text{P}$ 等のラジオアイソトープ、蛍光色素、ビオチン、あるいはジゴキシン等によって標識することができる。

[0059] 本発明におけるオリゴヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得される二本鎖DNA断片として作製することもできる。

上記の診断薬やキットにおいては、有効成分であるオリゴヌクレオチドや抗体以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤(BSAやゼラチンなど)、保存剤、ブロッキング溶液、反応溶液、反応停止液、試料を処理するための試薬等が必要に応じて混合されていてもよい。

#### [0060] 抗*EREG*抗体の作製

本発明で用いられる抗*EREG*抗体は*EREG*タンパク質に特異的に結合すればよく、その由来、種類および形状は問われない。具体的には、非ヒト動物の抗体(例えば、マウス抗体、ラット抗体、ラクダ抗体)、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体などの公知の抗体が使用できる。本発明においては、モノクローナル、あるいはポリクローナルな抗体として利用することができる。好ましい抗体は、モノクローナル抗体である。

本発明で使用される抗*EREG*抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として取得できる。本発明で使用される抗*EREG*抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体



は、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主により産生されるもの等を含む。

[0061] モノクローナル抗体産生ハイブリドーマが、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。まず、REGタンパク質を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫する。免疫動物から得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させてハイブリドーマを得る。更にこのハイブリドーマから、通常のスクリーニング法により、目的とする抗体を産生する細胞をスクリーニングすることによって抗REG抗体を産生するハイブリドーマが選択できる。

[0062] 具体的には、モノクローナル抗体の作製は例えば以下に示すように行われる。まず、REG遺伝子を発現することによって、抗体取得の感作抗原として使用されるREGタンパク質が取得できる。REG遺伝子の塩基配列は、GenBank登録番号NM\_001432(配列番号:21)などに開示されている。すなわち、REGをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクターに挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒトREGタンパク質が公知の方法で精製できる。また、精製した天然のREGタンパク質もまた同様に使用できる。また、本発明で用いられるように、REGタンパク質の所望の部分ポリペプチドを異なるポリペプチドと融合した融合タンパク質を免疫原として利用することもできる。免疫原とする融合タンパク質を製造するために、例えば、抗体のFc断片やペプチドタグなどを利用することができる。融合タンパク質を発現するベクターは、所望の二種類又はそれ以上のポリペプチド断片をコードする遺伝子をインフレームで融合させ、当該融合遺伝子を前記のように発現ベクターに挿入することにより作製することができる。融合タンパク質の作製方法はMolecular Cloning 2nd ed. (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9, 47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989)に記載されている。

[0063] このようにして精製されたREGタンパク質を、哺乳動物に対する免疫に使用する感作抗原として使用できる。REGの部分ペプチドもまた感作抗原として使用できる。たとえば、次のようなペプチドを感作抗原とすることができる。

ヒトREGのアミノ酸配列より化学合成によって取得されたペプチド

REG遺伝子の一部を発現ベクターに組込んで発現させることによっても取得された

## ペプチド

EREGタンパク質をタンパク質分解酵素により分解することによって取得されたペプチド

部分ペプチドとして用いるEREGの領域および大きさは限定されない。好ましい領域はEREGの細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列(配列番号:22のアミノ酸配列において29-122番目)から選択することができる。感作抗原とするペプチドを構成するアミノの数は、少なくとも3以上、たとえば、5以上、あるいは6以上であることが好ましい。より具体的には、8~50、好ましくは10~30残基のペプチドを感作抗原とすることができる。

[0064] 該感作抗原で免疫される哺乳動物は、特に限定されない。モノクローナル抗体を細胞融合法によって得るためには、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して免疫動物を選択するのが好ましい。一般的には、げっ歯類の動物が免疫動物として好ましい。具体的には、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギを免疫動物とすることができる。その他、サル等を免疫動物とすることもできる。

[0065] 公知の方法にしたがって上記の動物が感作抗原により免疫できる。例えば、一般的方法として、感作抗原を腹腔内または皮下に注射することにより哺乳動物を免疫することができる。具体的には、該感作抗原が哺乳動物に4から21日毎に数回投与される。感作抗原は、PBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適当な希釈倍率で希釈して免疫に使用される。更に、感作抗原をアジュバントとともに投与することができる。例えばフロイント完全アジュバントと混合し、乳化して、感作抗原とすることができる。また、感作抗原の免疫時には適当な担体を使用できる。特に分子量の小さい部分ペプチドが感作抗原として用いられる場合には、該感作抗原ペプチドをアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合させて免疫することが望ましい。

[0066] このように哺乳動物が免疫され、血清中における所望の抗体量の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に付される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用できる。

前記免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。ミ

エローマ細胞は、スクリーニングのための適当な選択マーカーを備えていることが好ましい。選択マーカーとは、特定の培養条件の下で生存できる(あるいはできない)形質を指す。選択マーカーには、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損(以下HGPRT欠損と省略する)、あるいはチミジンキナーゼ欠損(以下TK欠損と省略する)などが公知である。HGPRTやTKの欠損を有する細胞は、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン感受性(以下HAT感受性と省略する)を有する。HAT感受性の細胞はHAT選択培地中でDNA合成を行うことができず死滅するが、正常な細胞と融合すると正常細胞のサルベージ回路を利用してDNAの合成を継続することができるためHAT選択培地中でも増殖するようになる。

[0067] HGPRT欠損やTK欠損の細胞は、それぞれ6チオグアニン、8アザグアニン(以下8AGと省略する)、あるいは5'ブROMODEオキシウリジンを含む培地で選択することができる。正常な細胞はこれらのピリミジンアナログをDNA中に取り込んでしまうので死滅するが、これらの酵素を欠損した細胞は、これらのピリミジンアナログを取り込めないので選択培地の中で生存することができる。この他G418耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって2-デオキシストレプトタミン系抗生物質(ゲンタマイシン類似体)に対する耐性を与える。細胞融合に好適は種々のミエローマ細胞が公知である。例えば、以下のようなミエローマ細胞を、本発明におけるモノクローナル抗体の製造に利用することができる。

[0068] P3(P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)  
P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)  
NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)  
MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)  
SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)  
FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)  
S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、  
R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133)等

[0069] 基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて、前記免疫細胞とミエ

ローマ細胞との細胞融合が行われる。

より具体的には、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の栄養培養液中で、前記細胞融合が実施できる。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール(PEG)、センダイウイルス(HVJ)等を使用することができる。更に融合効率を高めるために所望によりジメチルスルホキシド等の補助剤を加えることもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定できる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1から10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液を利用することができる。さらに、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を培養液に添加することができる。

[0070] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37°C程度に加温したPEG溶液を混合することによって目的とする融合細胞(ハイブリドーマ)が形成される。細胞融合法においては、例えば平均分子量1000から6000程度のPEGを、通常30から60%(w/v)の濃度で添加することができる。続いて、上記に挙げた適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等が除去される。

[0071] このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択することができる。例えばHGPRTやTKの欠損を有する細胞は、HAT培養液(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液)で培養することにより選択できる。すなわち、HAT感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT培養液中で、正常細胞との細胞融合に成功した細胞が選択的に増殖させることができる。目的とするハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間、上記HAT培養液を用いた培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、目的とするハイブリドーマを選択することができる。ついで、通常の限界希釈法を実施することによって、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングが実施できる。あるいは、EREGを認識する抗体を国際公開WO03/104453に記載された方法によって作成することもできる。

- [0072] 目的とする抗体のスクリーニングおよび単一クローニングが、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施できる。例えば、ポリスチレン等でできたビーズや市販の96ウェルのマイクロタイタープレート等の担体に抗原を結合させ、ハイブリドーマの培養上清と反応させる。次いで担体を洗浄した後に酵素で標識した二次抗体等を反応させる。もしも培養上清中に感作抗原と反応する目的とする抗体が含まれる場合、二次抗体はこの抗体を介して担体に結合する。最終的に担体に結合する二次抗体を検出することによって、目的とする抗体が培養上清中に存在しているかどうか決定できる。抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法等によりクローニングすることが可能となる。この際、抗原としては免疫に用いたものを始め、実施的に同質なEREGタンパク質が好適に使用できる。たとえばEREGの細胞外ドメイン、あるいは当該領域を構成する部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを、抗原として利用することができる。
- [0073] また、ヒト以外の動物に抗原を免疫することによって上記ハイブリドーマを得る方法以外に、ヒトリンパ球を抗原感作して目的とする抗体を得ることもできる。具体的には、まずin vitroにおいてヒトリンパ球をEREGタンパク質で感作する。次いで免疫感作されたリンパ球を適当な融合パートナーと融合させる。融合パートナーには、たとえばヒト由来であって永久分裂能を有するミエローマ細胞を利用することができる(特公平1-59878号公報参照)。この方法によって得られる抗EREG抗体は、EREGタンパク質への結合活性を有するヒト抗体である。
- [0074] さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に対して抗原となるEREGタンパク質を投与することによって、抗EREGヒト抗体を得ることもできる。免疫動物の抗体産生細胞は、適当な融合パートナーとの細胞融合やエプスタインバーウイルスの感染などの処理によって不死化させることができる。このようにして得られた不死化細胞からEREGタンパク質に対するヒト抗体を単離することによってもできる(国際公開WO 94/25585、WO93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602参照)。更に不死化された細胞をクローニングすることにより、目的の反応特異性を有する抗体を産生する細胞をクローニングすることもできる。トランスジェニック動物を免疫動物とするときには、当該動物の免疫システムは、ヒトEREGを異物と認識する。した

がって、ヒトEREGに対するヒト抗体を容易に得ることができる。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは通常の培養液中で継代培養することができる。また、該ハイブリドーマを液体窒素中で長期にわたって保存することもできる。

- [0075] 当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清から目的とするモノクローナル抗体を得ることができる。あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水としてモノクローナル抗体を得ることもできる。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適している。

本発明においては、抗体産生細胞からクローニングされた抗体遺伝子によってコードされる抗体を利用することもできる。クローニングした抗体遺伝子は、適当なベクターに組み込んで宿主に導入することによって抗体として発現させることができる。抗体遺伝子の単離と、ベクターへの導入、そして宿主細胞の形質転換のための方法は既に確立されている(例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur.J. Biochem. (1990) 192, 767-775参照)。

- [0076] たとえば、抗EREG抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、抗EREG抗体の可変領域(V領域)をコードするcDNAを得ることができる。そのためには、通常、まずハイブリドーマから全RNAが抽出される。細胞からmRNAを抽出するための方法として、たとえば次のような方法を利用することができる。

グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)

AGPC法(Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)

- [0077] 抽出されたmRNAは、mRNA Purification Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス製)等を使用して精製することができる。あるいは、QuickPrep mRNA Purification Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス製)などのように、細胞から直接全mRNAを抽出するためのキットも市販されている。このようなキットを用いて、ハイブリドーマから全mRNAを得ることもできる。得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域をコードするcDNAを合成することができる。cDNAは、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製)等によって合成することができる。また、cDNAの合成および増幅のために、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製)およびPCRを

用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988)85, 89 98-9002、Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989)17, 2919-2932)を利用することができる。更にこうしたcDNAの合成の過程においてcDNAの両末端に後述する適切な制限酵素サイトが導入できる。

[0078] 得られたPCR産物から目的とするcDNA断片が精製され、次いでベクターDNAと連結される。このように組換えベクターが作製され、大腸菌等に導入されコロニーが選択された後に、該コロニーを形成した大腸菌から所望の組換えベクターが調製できる。そして、該組換えベクターが目的とするcDNAの塩基配列を有しているか否かについて、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認できる。

[0079] 可変領域をコードする遺伝子を得るために、可変領域遺伝子増幅用のプライマーを使ったPCR法を利用することもできる。まず抽出されたmRNAを鋳型としてcDNAを合成し、cDNAライブラリーを得る。cDNAライブラリーの合成には市販のキットを用いるのが便利である。実際には、少数の細胞のみから得られるmRNAは極めて微量なので、それを直接精製すると収率が低い。したがって通常は、抗体遺伝子を含まないことが明らかなキャリアRNAを添加した後に精製される。あるいは一定量のRNAを抽出できる場合には、抗体産生細胞のRNAのみでも効率よく抽出することができる。たとえば10以上、あるいは30以上、好ましくは50以上の抗体産生細胞からのRNA抽出には、キャリアRNAの添加は必要でない場合がある。

[0080] 得られたcDNAライブラリーを鋳型として、PCR法によって抗体遺伝子が増幅される。抗体遺伝子をPCR法によって増幅するためのプライマーが公知である。たとえば、論文(J. Mol. Biol. (1991) 222, 581-597)などの開示に基づいて、ヒト抗体遺伝子増幅用のプライマーをデザインすることができる。これらのプライマーは、イムノグロブリンのサブクラスごとに異なる塩基配列となる。したがって、サブクラスが不明のcDNAライブラリーを鋳型とするときには、あらゆる可能性を考慮してPCR法を行う。

[0081] 具体的には、たとえばヒトIgGをコードする遺伝子の取得を目的とするときには、重鎖として $\gamma$  1～ $\gamma$  5、軽鎖として $\kappa$  鎖と $\lambda$  鎖をコードする遺伝子の増幅が可能なプライマーを利用することができる。IgGの可変領域遺伝子を増幅するためには、一般に3'

側のプライマーにはヒンジ領域に相当する部分にアニールするプライマーが利用される。一方5'側のプライマーには、各サブクラスに応じたプライマーを用いることができる。

[0082] 重鎖と軽鎖の各サブクラスの遺伝子増幅用プライマーによるPCR産物は、それぞれ独立したライブラリーとする。こうして合成されたライブラリーを利用して、重鎖と軽鎖の組み合わせからなるイムノグロブリンを再構成することができる。再構成されたイムノグロブリンの、*ERE*Gに対する結合活性を指標として、目的とする抗体をスクリーニングすることができる。

[0083] たとえば*ERE*Gに対する抗体の取得を目的とするとき、抗体の*ERE*Gへの結合は、特異的であることがさらに好ましい。*ERE*Gに結合する抗体は、たとえば次のようにしてスクリーニングすることができる。

(1)ハイブリドーマから得られたcDNAによってコードされるV領域を含む抗体を*ERE*Gに接触させる工程、

(2)*ERE*Gと抗体との結合を検出する工程、および

(3)*ERE*Gに結合する抗体を選択する工程

抗体と*ERE*Gとの結合を検出する方法は公知である。具体的には、担体に固定した*ERE*Gに対して被験抗体を反応させ、次に抗体を認識する標識抗体を反応させる。洗浄後に担体上の標識抗体が検出されたときには、当該被験抗体の*ERE*Gへの結合を証明できる。標識には、ペルオキシダーゼや $\beta$ -ガラクトシダーゼ等の酵素活性蛋白質、あるいはFITC等の蛍光物質を利用することができる。抗体の結合活性を評価するために*ERE*Gを発現する細胞の固定標本を利用することもできる。

[0084] 結合活性を指標とする抗体のスクリーニング方法として、ファージベクターを利用したパニング法を用いることもできる。上記のように抗体遺伝子を重鎖と軽鎖のサブクラスのライブラリーとして取得した場合には、ファージベクターを利用したスクリーニング方法が有利である。重鎖と軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、適当なリンカー配列で連結することによってシングルチェーンFv(scFv)とすることができる。scFvをコードする遺伝子をファージベクターに挿入すれば、scFvを表面に発現するファージを得ることができる。このファージを目的とする抗原と接触させて、抗原に結合したファージ



を回収すれば、目的の結合活性を有するscFvをコードするDNAを回収することができる。この操作を必要に応じて繰り返すことにより、目的とする結合活性を有するscFvを濃縮することができる。

[0085] 本発明において抗体をコードするポリヌクレオチドは、抗体の全長をコードしていてもよいし、あるいは抗体の一部をコードしていてもよい。抗体の一部とは、抗体分子の任意の部分と言う。以下、抗体の一部を示す用語として、抗体断片を用いる場合がある。本発明における好ましい抗体断片は、抗体の相補鎖決定領域(complementarity determination region;CDR)を含む。更に好ましくは、本発明の抗体断片は、可変領域を構成する3つのCDRの全てを含む。

[0086] 目的とする抗EREG抗体のV領域をコードするcDNAが得られた後に、該cDNAの両末端に挿入した制限酵素サイトを認識する制限酵素によって該cDNAが消化される。好ましい制限酵素は、抗体遺伝子を構成する塩基配列に出現する可能性が低い塩基配列を認識して消化する。更に1コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素が好ましい。上記のように消化された抗EREG抗体のV領域をコードするcDNAを適当な発現ベクターに挿入することによって、抗体発現ベクターを得ることができる。このとき、抗体定常領域(C領域)をコードする遺伝子と、前記V領域をコードする遺伝子とをインフレームで融合させることによって、キメラ抗体を得ることができる。ここで、キメラ抗体とは、定常領域と可変領域の由来が異なることを言う。したがって、マウスーヒトなどの異種キメラ抗体に加え、ヒトーヒト同種キメラ抗体も、本発明におけるキメラ抗体に含まれる。予め定常領域を有する発現ベクターに、前記V領域遺伝子を挿入して、キメラ抗体発現ベクターを構築することもできる。

[0087] 具体的には、たとえば、所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAを保持した発現ベクターの5'側に、前記V領域遺伝子を消化する制限酵素の制限酵素認識配列を配置しておくことができる。両者を同じ組み合わせの制限酵素で消化し、インフレームで融合させることによって、キメラ抗体発現ベクターが構築される。

本発明で使用される抗EREG抗体を製造するために、抗体遺伝子を発現制御領域による制御の下で発現するように発現ベクターに組み込むことができる。抗体を発現

するための発現制御領域とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。次いで、この発現ベクターで適当な宿主細胞を形質転換することによって、抗EREG抗体をコードするDNAを発現する組換え細胞を得ることができる。

[0088] 抗体遺伝子の発現にあたり、抗体重鎖(H鎖)および軽鎖(L鎖)をコードするDNAは、それぞれ別の発現ベクターに組み込むことができる。H鎖とL鎖が組み込まれたベクターを、同じ宿主細胞に同時に形質転換(co-transfect)することによって、H鎖とL鎖を備えた抗体分子を発現させることができる。あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい(国際公開WO 94/11523参照)。

[0089] 抗体遺伝子を一旦単離し、適当な宿主に導入して抗体を作製するための宿主と発現ベクターの多くの組み合わせが公知である。これらの発現系は、いずれも本発明に応用することができる。真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞、あるいは真菌細胞が使用できる。具体的には、本発明に利用することができる動物細胞としては、次のような細胞を例示することができる。

(1)哺乳類細胞、:CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、Hela、Veroなど

(2)両生類細胞:アフリカツメガエル卵母細胞など

(3)昆虫細胞:sf9、sf21、Tn5など

[0090] あるいは植物細胞としては、ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)などのニコチアナ(Nicotiana)属由来の細胞による抗体遺伝子の発現系が公知である。植物細胞の形質転換には、カルス培養した細胞を利用することができる。

更に真菌細胞としては、次のような細胞を利用することができる。

酵母:サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)などのサッカロミセス(Saccharomyces)属、メタノール資化酵母(Pichia pastoris)などのPichia属

糸状菌:アスペルギルス・ニガー(Aspergillus niger)などのアスペルギルス(Aspergillus)属、

あるいは原核細胞を利用した抗体遺伝子の発現系も公知である。たとえば、細菌細胞を用いる場合、大腸菌(E. coli)、枯草菌などの細菌細胞を本発明に利用すること

ができる。

これらの細胞中に、目的とする抗体遺伝子を含む発現ベクターを形質転換により導入する。形質転換された細胞をin vitroで培養することにより、該形質転換細胞の培養物から所望の抗体を取得できる。

[0091] また、組換え型抗体の産生には、上記宿主細胞に加えて、トランスジェニック動物を利用することもできる。すなわち目的とする抗体をコードする遺伝子を導入された動物から、当該抗体を得ることができる。例えば、抗体遺伝子は、乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子の内部にインフレームで挿入することによって融合遺伝子として構築できる。乳汁中に分泌されるタンパク質として、たとえば、ヤギ $\beta$ カゼインなどを利用することができる。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片はヤギの胚へ注入され、該注入胚が雌のヤギへ導入される。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ(またはその子孫)が産生する乳汁からは、所望の抗体を乳汁タンパク質との融合タンパク質として取得できる。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、ホルモンがトランスジェニックヤギに適宜使用できる(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

[0092] 本発明の組み換え抗体のC領域として、動物抗体由来のC領域を使用できる。例えばマウス抗体のH鎖C領域としては、 $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 2a$ 、 $C\gamma 2b$ 、 $C\gamma 3$ 、 $C\mu$ 、 $C\delta$ 、 $C\alpha 1$ 、 $C\alpha 2$ 、 $C\epsilon$ が、L鎖C領域としては $C\kappa$ 、 $C\lambda$ が使用できる。また、マウス抗体以外の動物抗体としてラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ラクダ、サル等の動物抗体が使用できる。これらの配列は公知である。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、C領域を修飾することができる。

[0093] 本発明において、抗体がヒトに投与される場合、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体とすることができる。遺伝子組換え型抗体とは、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト化(Humanized)抗体などを含む。これらの改変抗体は、公知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体とは、互いに由来の異なる可変領域と定常領域を連結した抗体を言う。例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域と、ヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域か

らなる抗体は、マウスーヒトー異種キメラ抗体である。マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結させ、これを発現ベクターに組み込むことによって、キメラ抗体をを発現する組換えベクターが作製できる。該ベクターにより形質転換された組換え細胞を培養し、組み込まれたDNAを発現させることによって、培養中に生産される該キメラ抗体を取得できる。キメラ抗体およびヒト化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用される。

例えばH鎖においては、C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3、C $\gamma$ 4、C $\mu$ 、C $\delta$ 、C $\alpha$ 1、C $\alpha$ 2、およびC $\epsilon$ をC領域として利用することができる。またL鎖においてはC $\kappa$ 、およびC $\lambda$ をC領域として使用できる。これらのC領域のアミノ酸配列、ならびにそれをコードする塩基配列は公知である。また、抗体そのもの、あるいは抗体の産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾することができる。

[0094] 一般にキメラ抗体は、ヒト以外の動物由来抗体のV領域とヒト抗体由来のC領域とから構成される。これに対してヒト化抗体は、ヒト以外の動物由来抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域(FR; framework region)およびヒト抗体由来のC領域とから構成される。ヒト化抗体はヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

たとえば本発明に基づいて作成された抗REGモノクローナル抗体B3#18の可変領域と、ヒト定常領域を構成するアミノ酸配列と連結することによって得られるマウスーヒトキメラ抗体は、本発明におけるモノクローナル抗体として好ましい。すなわち本発明は、次のアミノ酸配列を含むH鎖とL鎖とを含む、マウスーヒトキメラモノクローナル抗体を提供する。

H鎖:配列番号:10に記載のアミノ酸配列中1~446位のアミノ酸配列(シグナル配列:  
:-19~-1を除いた配列)

L鎖:配列番号:20に記載のアミノ酸配列中1~213位のアミノ酸配列(シグナル配列:  
:-20~-1を除いた配列)

さらに、本発明のキメラ抗体の好ましい他の例として、以下の抗体を挙げることができる。

配列番号:129に記載のアミノ酸配列においてシグナル配列(-19~-1)を除いた配列を有するH鎖、および配列番号:131に記載のアミノ酸配列においてシグナル配列(-19~-1)を除いた配列を有するL鎖を含む抗体。

配列番号:133に記載のアミノ酸配列においてシグナル配列(-19~-1)を除いた配列を有するH鎖、および配列番号:135に記載のアミノ酸配列においてシグナル配列(-19~-1)を除いた配列を有するL鎖を含む抗体。

配列番号:137に記載のアミノ酸配列においてシグナル配列(-19~-1)を除いた配列を有するH鎖、および配列番号:139に記載のアミノ酸配列においてシグナル配列(-19~-1)を除いた配列を有するL鎖を含む抗体。

配列番号:141に記載のアミノ酸配列においてシグナル配列(-19~-1)を除いた配列を有するH鎖、および配列番号:143に記載のアミノ酸配列においてシグナル配列(-19~-1)を除いた配列を有するL鎖を含む抗体。

配列番号:145に記載のアミノ酸配列においてシグナル配列(-19~-1)を除いた配列を有するH鎖、および配列番号:147に記載のアミノ酸配列においてシグナル配列(-19~-1)を除いた配列を有するL鎖を含む抗体。

[0095] 抗体の可変領域は、通常、4つのフレーム(FR)にはさまれた3つの相補性決定領域(complementarity-determining region ; CDR)で構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む。一方FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い相同性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるとされている。

[0096] ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、たとえばマウス抗体のCDRをヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るための一般的な遺伝子組換え手法も知られている。

具体的には、マウスの抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、たとえばOverlap Extension PCRが公知である。Overlap Extension PCRにおいては、ヒト抗体のFRを合成するためのプライマーに、移植すべきマウス抗体のCDRをコードする塩基配列が付加される。プライマーは4つのFRのそれぞれについて用意される。一

般に、マウスCDRのヒトFRへの移植においては、マウスのFRと相同性の高いヒトFRを選択するのが、CDRの機能の維持において遊離であるとされている。すなわち、一般に、移植すべきマウスCDRに隣接しているFRのアミノ酸配列と相同性の高いアミノ酸配列からなるヒトFRを利用するのが好ましい。

[0097] また連結される塩基配列は、互いにインフレームで接続されるようにデザインされる。それぞれのプライマーによってヒトFRが個別に合成される。その結果、各FRにマウスCDRをコードするDNAが付加された産物が得られる。各産物のマウスCDRをコードする塩基配列は、互いにオーバーラップするようにデザインされている。続いて、ヒト抗体遺伝子を鋳型として合成された産物のオーバーラップしたCDR部分を互いにアニールさせて相補鎖合成反応が行われる。この反応によって、ヒトFRがマウスCDRの配列を介して連結される。

[0098] 最終的に3つのCDRと4つのFRが連結されたV領域遺伝子は、その5'末端と3'末端にアニールし適当な制限酵素認識配列を付加されたプライマーによってその全長が増幅される。上記のように得られたDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト型抗体発現用ベクターが作成できる。該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、該組換え細胞を培養し、該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、該ヒト化抗体が該培養細胞の培養物中に産生される(欧州特許公開EP 239400、国際公開WO 96/02576参照)。

[0099] 上記のように作製されたヒト化抗体の抗原への結合活性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト抗体のFRが好適に選択できる。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもできる。たとえば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。具体的には、FRにアニーリングするプライマーに部分的な塩基配列の変異を導入することができる。このようなプライマーによって合成されたFRには、塩基配列の変異が導入される。アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への結合活性を上記の方法で測定し評価することによって所望の性質

を有する変異FR配列が選択できる(Sato, K.et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856)

。

- [0100] また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞で感作する。次いで、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞融合させることによって、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体が取得できる(特公平1-59878参照)。融合パートナーであるヒトミエローマ細胞には、例えばU266などを利用することができる。
- [0101] また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することにより所望のヒト抗体が取得できる(国際公開WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体のV領域を一本鎖抗体(scFv)としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体のV領域をコードするDNA配列が決定できる。抗原に結合するscFvのDNA配列を決定した後、当該V領域配列を所望のヒト抗体C領域の配列とインフレームで融合させた後に適当な発現ベクターに挿入することによって発現ベクターが作製できる。該発現ベクターを上記に挙げたような好適な発現細胞中に導入し、該ヒト抗体をコードする遺伝子を発現させることにより該ヒト抗体が取得できる。これらの方法は既に公知である(国際公開WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388)。
- [0102] 本発明で使用される抗体には、EREGタンパク質に結合する限り、IgGに代表される二価抗体だけでなく、一価抗体、若しくはIgMに代表される多価抗体も含まれる。本発明の多価抗体には、全て同じ抗原結合部位を有する多価抗体、または、一部もしくは全て異なる抗原結合部位を有する多価抗体が含まれる。本発明で使用される抗体は、抗体の全長分子に限られず、EREGタンパク質に結合する限り、低分子化抗体またはその修飾物であってもよい。
- [0103] 低分子化抗体は、全長抗体(whole antibody、例えばwhole IgG等)の一部分が欠損

している抗体断片を含む。EREG抗原への結合能を有する限り、抗体分子の部分的な欠損は許容される。本発明における抗体断片は、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)のいずれか、または両方を含んでいることが好ましい。VHまたはVLのアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び／又は挿入を含むことができる。さらにEREG抗原への結合能を有する限り、VHおよびVLのいずれか、または両方の一部を欠損させることもできる。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fvなどを挙げることができる。また、低分子化抗体の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv(single chain Fv)、Diabody、sc(Fv)<sub>2</sub>(single chain (Fv)<sub>2</sub>)などを挙げることができる。これら抗体の多量体(例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、ポリマー)も、本発明の低分子化抗体に含まれる。

[0104] 抗体の断片は、抗体を酵素で処理して抗体断片を生成させることによって得ることができる。抗体断片を生成する酵素として、例えばパパイン、ペプシン、あるいはプラスミンなどが公知である。あるいは、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させることができる(例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照)。

[0105] 消化酵素は、抗体断片の特定の位置を切断し、次のような特定の構造の抗体断片を与える。このような酵素的に得られた抗体断片に対して、遺伝子工学的手法を利用すると、抗体の任意の部分を欠失させることができる。

パパイン消化:F(ab)<sub>2</sub>またはFab

ペプシン消化:F(ab')<sub>2</sub>またはFab'

プラスミン消化:Fab

[0106] したがって、本発明における低分子化抗体は、EREGに対する結合親和性を有する限り、任意の領域を欠失した抗体断片であることができる。更に、特に、本発明による



癌などの細胞増殖性疾患の治療においては、抗体は、そのエフェクター活性を維持していることが望ましい。すなわち、本発明における好ましい低分子化抗体は、EGFRに対する結合親和とエフェクター機能の両方を有する。抗体のエフェクター機能には、ADCC活性およびCDC活性が含まれる。本発明における治療用の抗体は、特に好ましくは、ADCC活性およびCDC活性のいずれか、または両方をエフェクター機能として備える。

[0107] Diabodyは、遺伝子融合により構築された二価(bivalent)の抗体断片を指す(Holliger P et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 6444-6448 (1993)、EP404,097号、WO93/111 61号等)。Diabodyは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーである。通常、ダイマーを構成するポリペプチド鎖は、各々、同じ鎖中でVL及びVHがリンカーにより結合されている。Diabodyにおけるリンカーは、一般に、VLとVHが互いに結合できない位に短い。具体的には、リンカーを構成するアミノ酸残基は、例えば、5残基程度である。そのため、同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、単鎖可変領域フラグメントを形成できず、別の単鎖可変領域フラグメントと二量体を形成する。その結果、Diabodyは2つの抗原結合部位を有することとなる。

[0108] scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。scFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結される(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1988, 85, 5879-5883.)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの抗体由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーには、特に制限はない。例えば3から25残基程度からなる任意の一本鎖ペプチドをリンカーとして用いることができる。具体的には、たとえば後述のペプチドリンカー等を用いることができる。

[0109] V領域は、たとえば上記のようなPCR法によって連結することができる。PCR法によるV領域の連結のために、まず次のDNAのうち、全部あるいは所望の部分アミノ酸配列をコードするDNAが鋳型として利用される。

前記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA配列、および

前記抗体のL鎖またはL鎖V領域をコードするDNA配列

[0110] 増幅すべきDNAの両端の配列に対応する配列を有するプライマーの一对を用いたPCR法によってH鎖とL鎖のV領域をコードするDNAがそれぞれ増幅される。次いで、ペプチドリンカー部分をコードするDNAを用意する。ペプチドリンカーをコードするDNAもPCRを利用して合成することができる。このとき利用するプライマーの5'側に、別に合成された各V領域の増幅産物と連結できる塩基配列を付加しておく。次いで、[H鎖V領域DNA]－[ペプチドリンカーDNA]－[L鎖V領域DNA]の各DNAと、アセンブリーPCR用のプライマーを利用してPCR反応を行う。

[0111] アセンブリーPCR用のプライマーは、[H鎖V領域DNA]の5'側にアニールするプライマーと、[L鎖V領域DNA]の3'側にアニールするプライマーとの組み合わせからなる。すなわちアセンブリーPCR用プライマーとは、合成すべきscFvの全長配列をコードするDNAを増幅することができるプライマーセットである。一方[ペプチドリンカーDNA]には各V領域DNAと連結できる塩基配列が付加されている。その結果、これらのDNAが連結され、さらにアセンブリーPCR用のプライマーによって、最終的にscFvの全長が増幅産物として生成される。一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された組換え細胞が常法に従って取得できる。また、その結果得られる組換え細胞を培養して該scFvをコードするDNAを発現させることにより、該scFvが取得できる。

sc(Fv)<sub>2</sub>は、2つのVH及び2つのVLをリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である(Hudson et al, J Immunol. Methods 1999;231:177-189)。sc(Fv)<sub>2</sub>は、例えば、scFvをリンカーで結ぶことによって作製できる。

[0112] また2つのVH及び2つのVLが、一本鎖ポリペプチドのN末端側を基点としてVH、VL、VH、VL([VH]リンカー[VL]リンカー[VH]リンカー[VL])の順に並んでいることを特徴とする抗体が好ましい。

2つのVHと2つのVLの順序は特に上記配置に限定されず、どのような順序で並べられていてもよい。例えば以下のような配置も挙げることができる。

[VL]リンカー[VH]リンカー[VH]リンカー[VL]

[VH]リンカー[VL]リンカー[VL]リンカー[VH]

[VH]リンカー[VH]リンカー[VL]リンカー[VL]

[VL]リンカー[VH]リンカー[VH]リンカー[VH]

[VL]リンカー[VH]リンカー[VH]リンカー[VH]

[0113] 抗体の可変領域を結合するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、または合成化合物リンカー(例えば、Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996参照)に開示されるリンカー等を用いることができる。本発明においてはペプチドリンカーが好ましい。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することができる。通常、ペプチドリンカーを構成するアミノ酸残基は、1から100アミノ酸、好ましくは3から50アミノ酸、更に好ましくは5から30アミノ酸、特に好ましくは12から18アミノ酸(例えば、15アミノ酸)である。

[0114] ペプチドリンカーを構成するアミノ酸配列は、scFvの結合作用を阻害しない限り、任意の配列とすることができる。例えば、ペプチドリンカーの場合次のようなアミノ酸配列を利用することができる。

Ser

Gly・Ser

Gly・Gly・Ser

Ser・Gly・Gly

Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:23)

Ser・Gly・Gly・Gly(配列番号:24)

Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:25)

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:26)

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:27)

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:28)

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:29)

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:30)

(Gly・Gly・Gly・Gly・Ser(配列番号:31))<sub>n</sub>

(Ser・Gly・Gly・Gly・Gly(配列番号:32))<sub>n</sub>

[<sub>n</sub>は1以上の整数である]

ペプチドリンカーのアミノ酸配列は、目的に応じて当業者が適宜選択することができる

る。たとえば前記ペプチドリンカーの長さを決定するnは、通常1～5、好ましくは1～3、より好ましくは1または2である。

[0115] よって本発明において特に好ましいsc(Fv)<sub>2</sub>の態様としては、例えば、以下のsc(Fv)<sub>2</sub>を挙げることができる。

[VH]ペプチドリンカー(15アミノ酸)[VL]ペプチドリンカー(15アミノ酸)[VH]ペプチドリンカー(15アミノ酸)[VL]

あるいは、合成化学物リンカー(化学架橋剤)を利用してV領域を連結することもできる。ペプチド化合物などの架橋に通常用いられている架橋剤を本発明に利用することができる。例えば次のような化学架橋剤が公知である。これらの架橋剤は市販されている。

N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、

ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、

ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS3)、

ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(DSP)、

ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)(DTSSP)、

エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、

エチレングリコールビス(スルホスクシンイミジルスクシネート)(スルホ-EGS)、

ジスクシンイミジル酒石酸塩(DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩(スルホ-DST)、

ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、および

ビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOCOES)など

[0116] 4つの抗体可変領域を結合する場合には、通常、3つのリンカーが必要となる。複数のリンカーは、同じでもよいし、異なるリンカーを用いることもできる。本発明において好ましい低分子化抗体はDiabody又はsc(Fv)<sub>2</sub>である。このような低分子化抗体を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し、抗体断片を生成させるか、又はこれら抗体断片をコードするDNAを構築し、これを発現ベクターに導入し

た後、適当な宿主細胞で発現させればよい(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

[0117] 本発明の抗体としては、EREKを認識する任意の抗体を利用することができる。たとえば以下(1)から(57)に記載の抗体が好ましい抗体として例示できる。これらの抗体は、例えば、全長抗体、低分子化抗体、動物抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、あるいはヒト抗体であってよい。

(1) CDR1として配列番号:2に記載のアミノ酸配列(B3#18抗体のH鎖CDR1の配列)、CDR2として配列番号:4に記載のアミノ酸配列(B3#18抗体のH鎖CDR2の配列)、およびCDR3として配列番号:6に記載のアミノ酸配列(B3#18抗体のH鎖CDR3の配列)を有するH鎖を含む抗体、

(2) (1)に記載のH鎖であって、CH(H鎖定常領域)として配列番号:8に記載のアミノ酸配列の117から452位のアミノ酸配列(B3#18抗体のCHの配列)を有するH鎖を含む抗体、

(3) (1)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列(DF151マウス-ヒトキメラ抗体のCHの配列)を有するH鎖を含む抗体、

(4) CDR1として配列番号:12に記載のアミノ酸配列(B3#18抗体のL鎖CDR1の配列)、CDR2として配列番号:14に記載のアミノ酸配列(B3#18抗体のL鎖CDR2の配列)、およびCDR3として配列番号:16に記載のアミノ酸配列(B3#18抗体のL鎖CDR3の配列)を有するL鎖を含む抗体、

(5) (4)に記載のL鎖であって、CL(L鎖定常領域)として配列番号:18に記載のアミノ酸配列の107から213(B3#18抗体のCLの配列)を有するL鎖を含む抗体、

(6) (4)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列(B3#18マウス-ヒトキメラ抗体のCLの配列)を有するL鎖を

含む抗体、

(7) (1)に記載のH鎖、および(4)に記載のL鎖を含む抗体、

(8) (2)に記載のH鎖、および(5)に記載のL鎖を含む抗体、

(9) (3)に記載のH鎖、および(6)に記載のL鎖を含む抗体、

(10) CDR1として配列番号:49に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:51に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:53に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(11) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:149に記載のアミノ酸配列の118から441位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(12) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(13) CDR1として配列番号:55に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:57に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:59に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(14) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:151に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(15) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(16) (10)に記載のH鎖、および(13)に記載のL鎖を含む抗体、

(17) (11)に記載のH鎖、および(14)に記載のL鎖を含む抗体、

(18) (12)に記載のH鎖、および(15)に記載のL鎖を含む抗体、

(19) CDR1として配列番号:61に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:63に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:65に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(20) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:153に記載のアミノ酸配列の116から439位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(21) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

- (22) CDR1として配列番号:67に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:69に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:71に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (23) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:155に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (24) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (25) (19)に記載のH鎖、および(22)に記載のL鎖を含む抗体、
- (26) (20)に記載のH鎖、および(23)に記載のL鎖を含む抗体、
- (27) (21)に記載のH鎖、および(24)に記載のL鎖を含む抗体、
- (28) CDR1として配列番号:73に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:75に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:77に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (29) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:157に記載のアミノ酸配列の119から442位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (30) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (31) CDR1として配列番号:79に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:81に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:83に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (32) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:159に記載のアミノ酸配列の109から215位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (33) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (34) (28)に記載のH鎖、および(31)に記載のL鎖を含む抗体、
- (35) (29)に記載のH鎖、および(32)に記載のL鎖を含む抗体、
- (36) (30)に記載のH鎖、および(33)に記載のL鎖を含む抗体、
- (37) CDR1として配列番号:85に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:87に

記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:89に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(38) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:161に記載のアミノ酸配列の117から440位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(39) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(40) CDR1として配列番号:91に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:93に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:95に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(41) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:163に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(42) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(43) (37)に記載のH鎖、および(40)に記載のL鎖を含む抗体、

(44) (38)に記載のH鎖、および(41)に記載のL鎖を含む抗体、

(45) (39)に記載のH鎖、および(42)に記載のL鎖を含む抗体、

(46) CDR1として配列番号:97に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:99に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:101に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(47) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:165に記載のアミノ酸配列の113から436位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(48) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(49) CDR1として配列番号:103に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:105に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:107に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(50) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:167に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、



- (51) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (52) (46)に記載のH鎖、および(49)に記載のL鎖を含む抗体、
- (53) (47)に記載のH鎖、および(50)に記載のL鎖を含む抗体、
- (54) (48)に記載のH鎖、および(51)に記載のL鎖を含む抗体、
- (55) (1)から(54)のいずれかに記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、(1)から(54)のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、
- (56) (1)から(55)のいずれかに記載の抗体が結合するEREGタンパク質のエピトープと同じエピトープに結合する抗体、
- (57) (1)から(56)のいずれかに記載の抗体の低分子化抗体。

[0118] 上記(1)に記載の下記のCDRを有するH鎖におけるVHとしては、配列番号:44に記載のアミノ酸配列(B3#18抗体のVHの配列)を有するVHが例示できる。

CDR1:配列番号:2に記載のアミノ酸配列(B3#18(EP27)抗体のH鎖CDR1の配列)、  
CDR2:配列番号:4に記載のアミノ酸配列(B3#18(EP27)抗体のH鎖CDR2の配列)、  
および

CDR3:配列番号:6に記載のアミノ酸配列(B3#18(EP27)抗体のH鎖CDR3の配列)

[0119] また、上記(4)に記載の下記のCDRを有するL鎖におけるVLとしては、配列番号:46に記載のアミノ酸配列(B3#18抗体のVLの配列)を有するVLが例示できる。

CDR1:配列番号:12に記載のアミノ酸配列(B3#18(EP27)抗体のL鎖CDR1の配列)

、

CDR2:配列番号:14に記載のアミノ酸配列(B3#18(EP27)抗体のL鎖CDR2の配列)

、および

CDR3:配列番号:16に記載のアミノ酸配列(B3#18(EP27)抗体のL鎖CDR3の配列)

[0120] 上記(10)に記載の下記のCDRを有するH鎖におけるVHとしては、配列番号:109に記載のアミノ酸配列(C7(EP03)のVHの配列)を有するVHが例示できる。

CDR1:配列番号:49に記載のアミノ酸配列(C7(EP03)抗体のH鎖CDR1の配列)、

CDR2:配列番号:51に記載のアミノ酸配列(C7(EP03)抗体のH鎖CDR2の配列)、お

よび

CDR3:配列番号:53に記載のアミノ酸配列(C7(EP03)抗体のH鎖CDR3の配列)

[0121] また、上記(13)に記載の下記のCDRを有するL鎖におけるVLとしては、配列番号:111に記載のアミノ酸配列(C7(EP03)抗体のVLの配列)を有するVLが例示できる。

CDR1:配列番号:55に記載のアミノ酸配列(C7(EP03)抗体のL鎖CDR1の配列)、

CDR2:配列番号:57に記載のアミノ酸配列(C7(EP03)抗体のL鎖CDR2の配列)、および

CDR3:配列番号:59に記載のアミノ酸配列(C7(EP03)抗体のL鎖CDR3の配列)

[0122] 上記(19)に記載の下記のCDRを有するH鎖におけるVHとしては、配列番号:113に記載のアミノ酸配列(#15(EP08)のVHの配列)を有するVHが例示できる。

CDR1:配列番号:61に記載のアミノ酸配列(#15(EP08)抗体のH鎖CDR1の配列)、

CDR2:配列番号:63に記載のアミノ酸配列(#15(EP08)抗体のH鎖CDR2の配列)、および

CDR3:配列番号:65に記載のアミノ酸配列(#15(EP08)抗体のH鎖CDR3の配列)

[0123] また、上記(22)に記載の下記のCDRを有するL鎖におけるVLとしては、配列番号:115に記載のアミノ酸配列(#15(EP08)抗体のVLの配列)を有するVLが例示できる。

CDR1:配列番号:67に記載のアミノ酸配列(#15(EP08)抗体のL鎖CDR1の配列)、

CDR2:配列番号:69に記載のアミノ酸配列(#15(EP08)抗体のL鎖CDR2の配列)、および

CDR3:配列番号:71に記載のアミノ酸配列(#15(EP08)抗体のL鎖CDR3の配列)

[0124] 上記(28)に記載の下記のCDRを有するH鎖におけるVHとしては、配列番号:117に記載のアミノ酸配列(B2#30(EP20)のVHの配列)を有するVHが例示できる。

CDR1:配列番号:73に記載のアミノ酸配列(B2#30(EP20)抗体のH鎖CDR1の配列)

、

CDR2:配列番号:75に記載のアミノ酸配列(B2#30(EP20)抗体のH鎖CDR2の配列)

、および

CDR3:配列番号:77に記載のアミノ酸配列(B2#30(EP20)抗体のH鎖CDR3の配列)

[0125] また、上記(31)に記載の下記のCDRを有するL鎖におけるVLとしては、配列番号:

119に記載のアミノ酸配列(B2#30(EP20)抗体のVLの配列)を有するVLが例示できる。

。

CDR1:配列番号:79に記載のアミノ酸配列(B2#30(EP20)抗体のL鎖CDR1の配列)

、

CDR2:配列番号:81に記載のアミノ酸配列(B2#30(EP20)抗体のL鎖CDR2の配列)

、および

CDR3:配列番号:83に記載のアミノ酸配列(B2#30(EP20)抗体のL鎖CDR3の配列)

[0126] 上記(37)に記載の下記のCDRを有するH鎖におけるVHとしては、配列番号:121に記載のアミノ酸配列(B3#8(EP24)のVHの配列)を有するVHが例示できる。

CDR1:配列番号:85に記載のアミノ酸配列(B3#8(EP24)抗体のH鎖CDR1の配列)、

CDR2:配列番号:87に記載のアミノ酸配列(B3#8(EP24)抗体のH鎖CDR2の配列)、

および

CDR3:配列番号:89に記載のアミノ酸配列(B3#8(EP24)抗体のH鎖CDR3の配列)

[0127] また、上記(40)に記載の下記のCDRを有するL鎖におけるVLとしては、配列番号:123に記載のアミノ酸配列(B3#8(EP24)抗体のVLの配列)を有するVLが例示できる。

。

CDR1:配列番号:91に記載のアミノ酸配列(B3#8(EP24)抗体のL鎖CDR1の配列)、

CDR2:配列番号:93に記載のアミノ酸配列(B3#8(EP24)抗体のL鎖CDR2の配列)、

および

CDR3:配列番号:95に記載のアミノ酸配列(B3#8(EP24)抗体のL鎖CDR3の配列)

[0128] 上記(46)に記載の下記のCDRを有するH鎖におけるVHとしては、配列番号:125に記載のアミノ酸配列(B3#41(EP29)のVHの配列)を有するVHが例示できる。

CDR1:配列番号:97に記載のアミノ酸配列(B3#41(EP29)抗体のH鎖CDR1の配列)

、

CDR2:配列番号:99に記載のアミノ酸配列(B3#41(EP29)抗体のH鎖CDR2の配列)

、および

CDR3:配列番号:101に記載のアミノ酸配列(B3#41(EP29)抗体のH鎖CDR3の配列)

)

- [0129] また、上記(49)に記載の下記のCDRを有するL鎖におけるVLとしては、配列番号:127に記載のアミノ酸配列(B3#41(EP29)抗体のVLの配列)を有するVLが例示できる。
- 。 CDR1:配列番号:103に記載のアミノ酸配列(B3#41(EP29)抗体のL鎖CDR1の配列)、
- CDR2:配列番号:105に記載のアミノ酸配列(B3#41(EP29)抗体のL鎖CDR2の配列)、および
- CDR3:配列番号:107に記載のアミノ酸配列(B3#41(EP29)抗体のL鎖CDR3の配列)
- [0130] また、上記(1)から(57)に記載の抗体には、一価抗体だけでなく、二価以上の多価抗体も含まれる。本発明の多価抗体には、全て同じ抗原結合部位を有する多価抗体、または、一部もしくは全て異なる抗原結合部位を有する多価抗体が含まれる。
- [0131] 上記(55)に記載の抗体の好ましい態様は、CDRに改変が生じていない抗体である。一例として、上記(55)に記載の抗体のうち、「(1)に記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、(1)に記載の抗体と同等の活性を有する抗体」の好ましい態様は、「(1)に記載の抗体と同等の活性を有し、(1)に記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、CDR1として配列番号:2に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:4に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:6に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体」である。上記(55)に記載の抗体のうち、その他の抗体の好ましい態様も同様に表現することができる。
- [0132] ポリペプチドに変異を導入する方法は、あるポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための、当業者によく知られた方法の一つである。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法(Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Methods Enzymol. 100, 468-500, Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ(1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367, Kunkel,TA(1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492, Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766)などを用いて、本発明の抗体

に適宜変異を導入することにより、該抗体と機能的に同等な抗体を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、本発明の抗体のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、該抗体と機能的に同等な抗体もまた本発明の抗体に含まれる。

このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、さらに好ましくは10アミノ酸以内(例えば、5アミノ酸以内)である。

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質に基づいて、次のような分類が確立している。

疎水性アミノ酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、

親水性アミノ酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、

脂肪族側鎖を有するアミノ酸(G、A、V、L、I、P)、

水酸基含有側鎖を有するアミノ酸(S、T、Y)、

硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸(C、M)、

カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸(D、N、E、Q)、

塩基含有側鎖を有するアミノ酸(R、K、H)、

芳香族含有側鎖を有するアミノ酸(H、F、Y、W)

(括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す)

- [0133] あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている(Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. and Smith, M., Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。すなわち、一般に、あるポリペプチドを構成するアミノ酸配列中、各群に分類されたアミノ酸は、相互に置換したときに、当該ポリペプチドの活性が維持される可能性が高いとされている。本発明において、上記アミノ酸群の群内のアミノ酸間の置換を保存的置換と言

う。

[0134] また本発明は、本願発明で開示された抗EREG抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体もまた提供する。すなわち本発明は、上述の(1)～(57)のいずれかの抗体が認識するエピトープと同一のエピトープを認識する抗体と、その用途に関する。このような抗体は、例えば、以下の方法により得ることができる。

被験抗体が、ある抗体とエピトープを共有することは、両者の同じエピトープに対する競合によって確認することができる。抗体間の競合は、交叉ブロッキングアッセイなどによって検出される。例えば競合ELISAアッセイは、好ましい交叉ブロッキングアッセイである。

[0135] 具体的には、交叉ブロッキングアッセイにおいては、マイクロタイタープレートのウェル上にコートしたEREGタンパク質を、候補の競合抗体の存在下、または非存在下でプレインキュベートした後に、本発明の抗EREG抗体が添加される。ウェル中のEREGタンパク質に結合した本発明の抗EREG抗体の量は、同じエピトープへの結合に対して競合する候補競合抗体(被験抗体)の結合能に間接的に相関している。すなわち同一エピトープに対する被験抗体の親和性が大きくなればなる程、本発明の抗EREG抗体のEREGタンパク質をコートしたウェルへの結合活性は低下する。あるいは逆に、同一エピトープに対する被験抗体の親和性が大きくなればなる程、被験抗体のEREGタンパク質をコートしたウェルへの結合活性は増加する。

[0136] ウェルに結合した抗体量は、予め抗体を標識しておくことによって、容易に測定することができる。たとえば、ビオチン標識された抗体は、アビジンペルオキシダーゼコンジュゲートと適切な基質を使用することにより測定できる。ペルオキシダーゼなどの酵素標識を利用した交叉ブロッキングアッセイを、特に競合ELISAアッセイと言う。抗体は、検出あるいは測定が可能な他の標識物質で標識することができる。具体的には、放射標識あるいは蛍光標識などが公知である。

更に被験抗体が本発明の抗EREG抗体と異なる種に由来する定常領域を有する場合には、ウェルに結合したいずれかの抗体を、いずれかの定常領域を認識する標識抗体によって測定することもできる。あるいは同種由来の抗体であっても、クラスが相違する場合には、各クラスを識別する抗体によって、ウェルに結合した抗体を測定す

ることができる。

[0137] 候補の競合抗体非存在下で実施されるコントロール試験において得られる結合活性と比較して、候補抗体が、少なくとも20%、好ましくは少なくとも20-50%、さらに好ましくは少なくとも50%、抗EREG抗体の結合をブロックできるならば、該候補競合抗体は本発明の抗EREG抗体と実質的に同じエピトープに結合するか、又は同じエピトープへの結合に対して競合する抗体である。抗EREG抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体としては、例えば、上記(57)に記載の抗体が挙げられるが、これに限定されるものではない。

また、上記(1)から(57)に記載の抗体には、上述の通り、一価抗体だけでなく、多価抗体も含まれる。本発明の多価抗体には、全て同じ抗原結合部位を有する多価抗体、または、一部もしくは全て異なる抗原結合部位を有する多価抗体が含まれる。

[0138] 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。又、抗体に化学療法剤、毒性ペプチド或いは放射性化学物質などを結合することも可能である。このような抗体修飾物(以下、抗体コンジュゲートと称する。)は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。尚、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。また後に述べるように、EREGタンパク質のみならず、化学療法剤、毒性ペプチド或いは放射性化学物質などを認識するように遺伝子組換え技術を用いて設計した二重特異性抗体(bispecific antibody)のような分子型として取得することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体も包含される。

[0139] 抗EREG抗体に結合させて細胞障害活性を機能させる化学療法剤としては、たとえば次のような化学療法剤が例示できる。

azaribine、anastrozole、azacytidine、bleomycin、bortezomib、bryostatins-1、busulfan、camptothecin、10-hydroxycamptothecin、carmustine、celebrex、chlorambucil、cisplatin、irinotecan、carboplatin、cladribine、cyclophosphamide、cytarabine、dacarbazine、docetaxel、dactinomycin、daunomycin glucuronide、daunorubicin、dexamethasone、diethylstilbestrol、doxorubicin、doxorubicin glucuronide、epirubicin、ethinyl estradiol、estramustine、etoposide、etoposide glucuronide、floxuridine、fludarabine、flutamide、f

luorouracil, fluoxymesterone, gemcitabine, hydroxyprogesterone caproate, hydroxyurea, idarubicin, ifosfamide, leucovorin, lomustine, mechlorethamine, medroxyprogesterone acetate, megestrol acetate, melphalan, mercaptopurine, methotrexate, mitoxantrone, mithramycin, mitomycin, mitotane, phenylbutyrate, prednisone, procarbazine, paclitaxel, pentostatin, semustine streptozocin, tamoxifen, taxanes, taxol, testosterone propionate, thalidomide, thioguanine, thiotepa, teniposide, topotecan, uracil mustard, vinblastine, vinorelbine, vincristine

- [0140] 本発明において、好ましい化学療法剤は、低分子の化学療法剤である。低分子の化学療法剤は、抗体への結合の後も、抗体の機能に干渉する可能性が低い。本発明において、低分子の化学療法剤は、通常100～2000、好ましくは200～1000の分子量を有する。ここに例示した化学療法剤は、いずれも低分子の化学療法剤である。これらの本発明における化学療法剤は、生体内で活性な化学療法剤に変換されるプロドラッグを含む。プロドラッグの活性化は酵素的な変換であっても、非酵素的な変換であっても良い。
- [0141] また、ricin, abrin, ribonuclease, onconase, DNase I, Staphylococcal enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin, Pseudomonas endotoxin, L-asparaginase, PEG L-Asparaginaseなどの毒性ペプチドで抗体を修飾することもできる。また別の態様では、一または二以上の低分子化学療法剤と毒性ペプチドをそれぞれ組み合わせて抗体の修飾に使用できる。抗EREG抗体と上記の低分子化学療法剤との結合は共有結合または非共有結合が利用できる。これら化学療法剤を結合した抗体の作製方法は公知である。
- [0142] 更に、タンパク質性の薬剤や毒素は、遺伝子工学的な手法によって抗体と結合することができる。具体的には、たとえば上記毒性ペプチドをコードするDNAと抗EREG抗体をコードするDNAをインフレームで融合させて発現ベクター中に組み込んだ組換えベクターが構築できる。該ベクターを適切な宿主細胞に導入することにより得られる形質転換細胞を培養し、組み込んだDNAを発現させて、毒性ペプチドを結合した抗EREG抗体を融合タンパク質として得ることができる。抗体との融合タンパク質を得る場合、一般に、抗体のC末端側にタンパク質性の薬剤や毒素を配置される。抗



体と、タンパク質性の薬剤や毒素の間には、ペプチドリンカーを介在させることもできる。

[0143] さらに、本発明で使用される抗体は二重特異性抗体 (bispecific antibody) であってもよい。二重特異性抗体とは、異なるエピトープを認識する可変領域を同一の抗体分子内に有する抗体を言う。本発明において、二重特異性抗体は EREG 分子上の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有することができる。このような二重特異性抗体は、1 分子の EREG に対して 2 分子の抗体分子が結合できる。その結果、より強力な細胞障害作用を期待できる。

[0144] あるいは、一方の抗原結合部位が EREG を認識し、他方の抗原結合部位が細胞障害性物質を認識する二重特異性抗体とすることもできる。細胞障害性物質には、具体的には、化学療法剤、毒性ペプチド或いは放射性化学物質等が含まれる。このような二重特異性抗体は、EREG を発現している細胞に結合する一方で、細胞障害性物質を捕捉する。その結果、細胞障害性物質を EREG 発現細胞に直接作用させることができる。すなわち細胞障害性物質を認識する二重特異性抗体によって、腫瘍細胞を特異的に障害し、腫瘍細胞の増殖を抑制することができる。

[0145] また本発明においては、EREG 以外の抗原を認識する二重特異性抗体を組み合わせることもできる。たとえば、EREG と同様に標的とする癌細胞の細胞表面に特異的に発現する抗原であって、EREG とは異なる抗原を認識するような二重特異性抗体を組み合わせることができる。

二重特異性抗体を製造するための方法は公知である。たとえば、認識抗原が異なる 2 種類の抗体を結合させて、二重特異性抗体を作製することができる。結合させる抗体は、それぞれが H 鎖と L 鎖を有する 1/2 分子であっても良いし、H 鎖のみからなる 1/4 分子であっても良い。あるいは、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて、二重特異性抗体産生融合細胞を作製することもできる。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体が作製できる。

[0146] 前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その 3' 側下流にポリ A シグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例え

ばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げる  
ことができる。

また、その他に、ウイルスプロモーター／エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーシ  
ョンファクター1 $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ )などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等  
を、抗体発現のために使用することができる。プロモーター／エンハンサーを利用す  
ることができるウイルスとして、具体的には、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデ  
ノウイルス、シミアンウイルス40 (SV40) 等を示すことができる。

[0147] SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法 (Nature (19  
79) 277, 108) を利用することができる。また、HEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーは  
Mizushimaらの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に目的とする遺  
伝子発現に利用することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列  
および発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子が発現できる。プロ  
モーターとしては、例えばlacZプロモーター、araBプロモーターを挙げること  
ができる。lacZプロモーターを使用する場合はWardらの方法 (Nature (1989) 341, 544-546 ; F  
ASEBJ. (1992) 6, 2422-2427) を利用することができる。あるいはaraBプロモーターはB  
etterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) により、目的とする遺伝子の発現に利  
用することができる。

[0148] 抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合  
、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよ  
い。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、尿素のグアニジン塩酸塩  
の様なタンパク質変性剤を使用することによって所望の結合活性を有するように、抗  
体の構造が組み直される (refolded)。

[0149] 発現ベクターに挿入される複製起源としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウ  
ウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。さらに、  
宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクター中に、選択マーカー挿入  
することができる。具体的には、次のような選択マーカーを利用することができる。

アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、  
チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、  
大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、  
ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等

[0150] 本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞または原核細胞系が使用できる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられる。原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞を用いて発現される。哺乳類細胞としては、例えばCHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、Hela細胞などを利用することができる。

[0151] 次に、形質転換された宿主細胞をin vitroまたはin vivoで培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

前記のように発現、産生された抗体は、通常のタンパク質の精製で使用されている公知の方法を単独で使用することによって又は適宜組み合わせることによって精製できる。例えば、プロテインAカラムなどのアフィニティーカラム、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) の測定には公知の手段を使用することができる。例えば、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光免疫法などを用いることができる。

本発明で使用される抗体は糖鎖が改変された抗体であってもよい。抗体の糖鎖を改変することにより抗体の細胞障害活性を増強できることが知られている。糖鎖が改変された抗体としては、例えば、次のような抗体が公知である。

グリコシル化が修飾された抗体 (WO99/54342など)、

糖鎖に付加するフコースが欠損した抗体(WO00/61739、WO02/31140など)、  
バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体(WO02/79255など)など

[0152] 本発明で使用される抗体は、好ましくは細胞障害活性を有する抗体である。

本発明における細胞障害活性としては、例えば抗体依存性細胞介在性細胞障害(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity:ADCC)活性、補体依存性細胞障害(complement-dependent cytotoxicity:CDC)活性などを挙げることができる。本発明において、CDC活性とは補体系による細胞障害活性を意味する。一方ADCC活性とは標的細胞の細胞表面抗原に特異的抗体が付着した際、そのFc部分にFc $\gamma$ 受容体保有細胞(免疫細胞等)がFc $\gamma$ 受容体を介して結合し、標的細胞に障害を与える活性を意味する。

抗EREG抗体がADCC活性を有するか否か、又はCDC活性を有するか否かは公知の方法により測定することができる(例えば、Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc.,(1993)等)。

[0153] 具体的には、まず、エフェクター細胞、補体溶液、標的細胞の調製が実施される。

(1)エフェクター細胞の調製

CBA/Nマウスなどから脾臓を摘出し、RPMI1640培地(Invitrogen社製)中で脾臓細胞が分離される。10%ウシ胎児血清(FBS、HyClone社製)を含む同培地で洗浄後、細胞濃度を $5 \times 10^6$ /mlに調製することによって、エフェクター細胞が調製できる。

(2)補体溶液の調製

Baby Rabbit Complement(CEDARLANE社製)を10% FBS含有培地(Invitrogen社製)にて10倍希釈し、補体溶液が調製できる。

(3)標的細胞の調製

EREGタンパク質を発現する細胞を0.2 mCiの $^{51}\text{Cr}$ -クロム酸ナトリウム(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)とともに、10% FBS含有DMEM培地中で37°Cにて1時間培養することにより該標的細胞を放射性標識できる。EREGタンパク質を発現する細胞としては、EREGタンパク質をコードする遺伝子で形質転換された細胞、原発性大腸癌、転移性大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌細胞、大腸癌細胞、食道癌細胞、胃癌

細胞、腫瘍細胞等を利用することができる。放射性標識後、細胞を10% FBS含有RPMI1640培地にて3回洗浄し、細胞濃度を $2 \times 10^5$ /mlに調製することによって、該標的細胞が調製できる。

- [0154] ADCC活性、又はCDC活性は下記に述べる方法により測定できる。ADCC活性の測定の場合は、96ウェルU底プレート(Becton Dickinson社製)に、標的細胞と、抗EREG抗体を50  $\mu$ lずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、エフェクター細胞100  $\mu$ lを加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。抗体の終濃度は0または10  $\mu$ g/mlとする。培養後、100  $\mu$ lの上清を回収し、ガンマカウンター(COBRA II AUTO-GAMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company社製)で放射活性を測定する。細胞障害活性(%)は得られた値を使用して $(A-C) / (B-C) \times 100$ の計算式に基づいて計算できる。Aは各試料における放射活性(cpm)、Bは1% NP-40(nacal tesque社製)を加えた試料における放射活性(cpm)、Cは標的細胞のみを含む試料の放射活性(cpm)を示す。
- [0155] 一方、CDC活性の測定の場合は、96ウェル平底プレート(Becton Dickinson社製)に、標的細胞と、抗EREG抗体を50  $\mu$ lずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、補体溶液100  $\mu$ lを加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。抗体の終濃度は0または3  $\mu$ g/mlとする。培養後、100  $\mu$ lの上清を回収し、ガンマカウンターで放射活性を測定する。細胞障害活性はADCC活性の測定と同様にして計算できる。
- [0156] 一方、抗体コンジュゲートによる細胞障害活性の測定の場合は、96ウェル平底プレート(Becton Dickinson社製)に、標的細胞と、抗EREG抗体コンジュゲートを50  $\mu$ lずつ加え、氷上にて15分間反応させる。炭酸ガスインキュベーター内で1から4時間培養する。抗体の終濃度は0または3  $\mu$ g/mlとする。培養後、100  $\mu$ lの上清を回収し、ガンマカウンターで放射活性を測定する。細胞障害活性はADCC活性の測定と同様にして計算できる。
- [0157] 本発明の細胞障害活性を有する抗体は、さらに好ましくは中和活性を有する抗体である。一般的に、中和活性とは、ウイルスや毒素など、細胞に対して生物学的活性を有するリガンドの当該生物学的活性を阻害する活性を言う。即ち、中和活性を有す

る物質とは、当該リガンド又は当該リガンドが結合する受容体に結合し、当該リガンドと受容体の結合を阻害する物質を指す。中和活性によりリガンドとの結合を阻止された受容体は、当該受容体を通じた生物学的活性を発揮することができなくなる。このような中和活性を有する抗体は一般に中和抗体と呼ばれる。当該中和活性は、対象とするリガンドの存在下において、当該生物学的活性をその中和活性を評価する被検物質の存在又は非存在下条件間で比較することにより測定することができる。

[0158] 本発明に係るEREGの主要な受容体として考えられているEGFレセプターの場合、リガンドの結合により二量体を形成し、細胞内に存在する自らのドメインであるチロシンキナーゼを活性化する。活性化されたチロシンキナーゼは自己リン酸化によりリン酸化チロシンを含むペプチドを形成し、それらに様々なシグナル伝達のアクセサリー分子を会合させる。それらは主にPLC $\gamma$  (ホスホリパーゼC $\gamma$ )、Shc、Grb2などである。これらのアクセサリー分子のうち、前二者は更にEGFレセプターのチロシンキナーゼによりリン酸化を受ける。EGFレセプターからのシグナル伝達における主要な経路はShc、Grb2、Sos、Ras、Raf/MAPKキナーゼ/MAPキナーゼの順にリン酸化が伝達される経路である。更に副経路であるPLC $\gamma$  からPKCへの経路が存在すると考えられている。

こうした細胞内のシグナルカスケードは細胞種毎に異なるため、目的とする標的細胞毎に適宜標的分子を設定することができ、上記の因子に限定されるものではない。生体内シグナルの活性化の測定キットは市販のものを適宜使用することができる(例えば、プロテインキナーゼC活性測定システム(GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社)等)。

[0159] また、生体内シグナルカスケードの下流に存在する標的遺伝子に対する転写誘導作用を指標として、生体内シグナルの活性化を検出することもできる。転写活性の変化は、レポーターアッセイの原理によって検出することができる。具体的には、標的遺伝子の転写因子又はプロモーター領域の下流にGFP(Green Fluorescence Protein)やルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を配し、そのレポーター活性を測定することにより、転写活性の変化をレポーター活性として測定することができる。

[0160] 更に、EGFレセプターは通常は細胞増殖を促進する方向に働くため、標的とする細

胞の増殖活性を測定することによって、生体内シグナル伝達の活性化を評価することができる。本発明においては後者の細胞増殖活性を評価することによって本発明の中和抗体の中和活性を評価するが、本方法に限定されるものではなく、選択した標的細胞毎に前記に挙げた方法を好適に採用し評価することができる。

[0161] 即ち、例えば以下のような細胞増殖活性を測定することにより、抗EREG抗体の中和活性を評価又は測定することができる。例えば、培地中に添加した $[^3\text{H}]$ ラベルしたチミジンの生細胞による取り込みをDNA複製能力の指標として測定する方法が用いられる。

より簡便な方法としてトリパンブルー等の色素を細胞外に排除する能力を顕微鏡下で計測する色素排除法や、MTT法が用いられる。後者は、生細胞がテトラゾリウム塩であるMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)を青色のホルマザン産物へ転換する能力を有することを利用して。より具体的には、被検細胞の培養液に被験抗体を添加して一定時間を経過した後に、MTT溶液を培養液に加えて一定時間静置することによりMTTを細胞に取り込ませる。その結果、黄色の化合物であるMTTが細胞内のミトコンドリア内のコハク酸脱水素酵素により青色の化合物に変換される。この青色生成物を溶解し呈色させた後にその吸光度を測定することにより生細胞数の指標とするものである。

MTT以外に、MTS、XTT、WST-1、WST-8等の試薬も市販されており(nacalai tesqueなど)好適に使用することができる。更に、細胞のATPや細胞培養物のインピーダンスを指標として細胞増殖活性を評価する方法も公知である。活性の測定に際しては、対照抗体として抗EREG抗体と同一のアイソタイプを有する抗体で当該中和活性を有しない結合抗体を、抗EREG抗体と同様に使用して、抗EREG抗体が対照抗体よりも強い中和活性を示すことにより活性を判定することができる。

[0162] 抗EREG抗体が増殖を抑制する細胞は、EREGタンパク質が発現している細胞であれば特に限定されない。好ましいEREG発現細胞は、たとえば癌細胞である。具体的には、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌に由来する細胞は、本発明におけるEREG発現細胞として好適である。本発明によれば、これらの癌の、原発病巣、および転移病巣のいずれに対しても有効な細胞増殖の抑制効果を得ることができる。さらに好ま

しい癌細胞は、原発性大腸癌、転移性大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌である。従って、抗EREG抗体は、細胞増殖に起因する疾患、例えば、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌などの治療、予防を目的として使用できる。これらの癌は、原発巣、転移巣にかかわらず、治療あるいは予防の対象とすることができる。より好ましくは原発性大腸癌、転移性大腸癌、膵癌の治療および／または予防を目的として抗EREG抗体を用いることができる。更に、これらの癌の中で、EREG依存性に増殖する癌は、本発明における治療および／または予防の対象として好ましい。

[0163] また本発明は、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、または該ポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチドを提供する。また、本発明は、これらポリヌクレオチドを含むベクター、該ベクターを含む形質転換体(形質転換細胞を含む)を提供する。

本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコードする限り、特に限定されず、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体である。本発明のポリヌクレオチドは、天然以外の塩基を含んでよい。

[0164] 本発明のポリヌクレオチドは、抗体を遺伝子工学的な手法により発現させる際に使用することができる。また本発明の抗体と同等な機能を有する抗体をスクリーニングする際に、プローブとして用いることもできる。即ち本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、またはその一部をプローブとして用い、ハイブリダイゼーション、遺伝子増幅技術(例えばPCR)等の技術により、該ポリヌクレオチドとストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするDNAを得ることができる。このようなDNAも本発明のポリヌクレオチドに含まれる。ハイブリダイゼーション技術(Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989)は当業者によく知られた技術である。

[0165] ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジентな条件が挙げられる。低ストリンジентな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42°C、0.1×SSC、0.1%SDSの条件であり、好ましくは50°C、0.1×SSC、0.1%SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジент



な条件が挙げられる。高ストリンジेंटな条件とは、例えば65°C、5×SSC及び0.1% SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するポリヌクレオチドが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0166] これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により得られるポリヌクレオチドがコードする、本発明の抗体と機能的に同等な抗体は、通常、これら抗体とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明の抗体には、本発明の抗体と機能的に同等であり、かつ該抗体のアミノ酸配列と高い相同性を有する抗体も含まれる。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも50%以上の同一性、好ましくは75%以上の同一性、さらに好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。ポリペプチドの相同性を決定するには、文献(Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730)に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

[0167] 医薬組成物

別の観点においては、本発明は、EGFRタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。又、本発明はEGFRタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤、特に抗癌剤に関する。本発明の細胞増殖抑制剤および抗癌剤は、癌を罹患している対象または罹患している可能性がある対象に投与されることが好ましい。

本発明において、EGFRタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤は、EGFRタンパク質に結合する抗体を対象に投与する工程を含む細胞増殖を抑制する方法、または、細胞増殖抑制剤の製造におけるEGFRタンパク質に結合する抗体の使用と表現することもできる。

[0168] また、本発明において、EGFRタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する抗癌剤は、EGFRタンパク質に結合する抗体を対象に投与する工程を含む癌を予防または治療する方法、または、抗癌剤の製造におけるEGFRタンパク質に結合する

抗体の使用と表現することもできる。

本発明において、「*EREG*に結合する抗体を有効成分として含有する」とは、抗*EREG*抗体を主要な活性成分として含むという意味であり、抗*EREG*抗体の含有率を制限するものではない。

本発明の医薬組成物(例えば、細胞増殖抑制剤、抗癌剤。以下同様。)に含有される抗体は*EREG*タンパク質と結合する限り特に制限はなく、本明細書中に記載された抗体が例示できる。

[0169] 本発明の医薬組成物は、経口、非経口投与のいずれかによって患者に投与することができる。好ましくは非経口投与である。係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによって本発明の医薬組成物が全身または局部的に投与できる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1 kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000mg/bodyの範囲で投与量が選択できる。しかしながら、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

[0170] 本発明の医薬組成物は、常法に従って製剤化することができ(例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A)、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着色料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられる。更にこれらに制限されず、その他常用の担体が適宜使用できる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を担体として挙げることもできる。

[0171] また、本発明は、*EREG*発現細胞と*EREG*タンパク質に結合する抗体とを接触させる

ことによりEREG発現細胞に障害を引き起こす方法又は細胞の増殖を抑制する方法を提供する。

すなわち本発明は、次の態様を含む。

—EREGタンパク質を発現する細胞とEREGタンパク質に結合する抗体とを接触させる工程を含む該EREG発現細胞に細胞障害を引き起こす方法。

—EREGタンパク質を発現する細胞とEREGタンパク質に結合する抗体とを接触させる工程を含む該EREG発現細胞の増殖を抑制する方法。

—EREGタンパク質に結合する抗体が細胞障害活性を有する抗体である、前記方法。

—EREGタンパク質に結合する抗体が中和活性を有する抗体である、前記方法。 —EREGタンパク質に結合する抗体が、以下(1)から(57)のいずれかに記載の抗体である、前記方法；

(1) CDR1として配列番号:2に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:4に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:6に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(2) (1)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:8に記載のアミノ酸配列の117から452位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(3) (1)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(4) CDR1として配列番号:12に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:14に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:16に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(5) (4)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:18に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(6) (4)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(7) (1)に記載のH鎖、および(4)に記載のL鎖を含む抗体、

(8) (2)に記載のH鎖、および(5)に記載のL鎖を含む抗体、

- (9) (3)に記載のH鎖、および(6)に記載のL鎖を含む抗体、
- (10) CDR1として配列番号:49に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:51に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:53に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (11) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:149に記載のアミノ酸配列の118から441位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (12) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (13) CDR1として配列番号:55に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:57に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:59に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (14) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:151に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (15) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (16) (10)に記載のH鎖、および(13)に記載のL鎖を含む抗体、
- (17) (11)に記載のH鎖、および(14)に記載のL鎖を含む抗体、
- (18) (12)に記載のH鎖、および(15)に記載のL鎖を含む抗体、
- (19) CDR1として配列番号:61に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:63に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:65に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (20) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:153に記載のアミノ酸配列の116から439位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (21) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (22) CDR1として配列番号:67に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:69に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:71に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

- (23) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:155に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (24) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (25) (19)に記載のH鎖、および(22)に記載のL鎖を含む抗体、
- (26) (20)に記載のH鎖、および(23)に記載のL鎖を含む抗体、
- (27) (21)に記載のH鎖、および(24)に記載のL鎖を含む抗体、
- (28) CDR1として配列番号:73に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:75に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:77に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (29) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:157に記載のアミノ酸配列の119から442位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (30) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (31) CDR1として配列番号:79に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:81に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:83に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (32) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:159に記載のアミノ酸配列の109から215位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (33) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (34) (28)に記載のH鎖、および(31)に記載のL鎖を含む抗体、
- (35) (29)に記載のH鎖、および(32)に記載のL鎖を含む抗体、
- (36) (30)に記載のH鎖、および(33)に記載のL鎖を含む抗体、
- (37) CDR1として配列番号:85に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:87に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:89に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (38) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:161に記載のアミノ酸配列の

- 117から440位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (39) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (40) CDR1として配列番号:91に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:93に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:95に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (41) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:163に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (42) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (43) (37)に記載のH鎖、および(40)に記載のL鎖を含む抗体、
- (44) (38)に記載のH鎖、および(41)に記載のL鎖を含む抗体、
- (45) (39)に記載のH鎖、および(42)に記載のL鎖を含む抗体、
- (46) CDR1として配列番号:97に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:99に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:101に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (47) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:165に記載のアミノ酸配列の113から436位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (48) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (49) CDR1として配列番号:103に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:105に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:107に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (50) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:167に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (51) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (52) (46)に記載のH鎖、および(49)に記載のL鎖を含む抗体、

(53) (47)に記載のH鎖、および(50)に記載のL鎖を含む抗体、  
(54) (48)に記載のH鎖、および(51)に記載のL鎖を含む抗体、  
(55) (1)から(54)のいずれかに記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、(1)から(54)のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、  
(56) (1)から(55)のいずれかに記載の抗体が結合するEREGタンパク質のエピトープと同じエピトープに結合する抗体、  
(57) (1)から(56)のいずれかに記載の抗体の低分子化抗体。  
—EREGタンパク質を発現する細胞が癌細胞である、前記方法。

[0172] 上述の通り、上記(1)から(57)に記載の抗体には、一価抗体だけでなく、二価以上の多価抗体も含まれる。本発明の多価抗体には、全て同じ抗原結合部位を有する多価抗体、または、一部もしくは全て異なる抗原結合部位を有する多価抗体が含まれる。

[0173] EREGタンパク質に結合する抗体は、本発明の細胞増殖抑制剤に含有されるEREGタンパク質に結合する抗体として上述したとおりである。抗EREG抗体が結合する細胞はEREGが発現している細胞であれば特に限定されない。本発明における好ましいEREG発現細胞は癌細胞である。より好ましくは、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、および腎癌細胞である。本発明の方法は、これらの癌の、原発巣および転移層のいずれに対しても適用することができる。さらに好ましい癌細胞は、原発性大腸癌、転移性大腸癌、および膵癌である。

[0174] 本発明において「接触」は、例えば、試験管内で培養しているEREG発現細胞の培養液に抗体を添加することにより行われる。この場合において、添加される抗体の形状としては、溶液又は凍結乾燥等により得られる固体等の形状が適宜使用できる。水溶液として添加される場合にあつては純粋に抗体のみを含有する水溶液であつてもよいし、例えば上記記載の界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液であつてもよい。添加する濃度は特に限定されないが、培養液中の最終濃度として、好ましくは1 pg/mlから1 g/mlの範囲であり、より好ましくは1 ng/mlから

1 mg/mlであり、更に好ましくは1  $\mu$ g/mlから1 mg/mlが好適に使用されうる。

[0175] また本発明において「接触」は更に、別の態様では、EREG発現細胞を体内に移植した非ヒト動物や内在的にEREGを発現する癌細胞を有する動物に投与することによっても行われる。投与方法は経口、非経口投与のいずれかによって実施できる。特に好ましくは非経口投与による投与方法であり、係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによって本発明の医薬組成物細胞増殖阻害剤および抗癌剤が全身または局部的に投与できる。また、被験動物の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。水溶液として投与される場合にあつては純粋に抗体のみを含有する水溶液であつてもよいし、例えば上記記載の界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液であつてもよい。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1 kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000mg/bodyの範囲で投与量が選択できる。しかしながら、本発明の抗体投与量はこれらの投与量に制限されるものではない。

[0176] 抗EREG抗体の接触によってEREG発現細胞に引き起こされた細胞障害を評価又は測定する方法として、以下の方法が好適に使用される。試験管内において該細胞障害活性を評価又は測定する方法としては、上記に記載の抗体依存性細胞介在性細胞障害(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity:ADCC)活性、補体依存性細胞障害(complement-dependent cytotoxicity:CDC)活性などの測定法を挙げることができる。抗EREG抗体がADCC活性を有するか否か、又はCDC活性を有するか否かは公知の方法により測定することができる(例えば、Current protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc.,(1993)等)。活性の測定に際しては、対照抗体として抗EREG抗体と同一のアイソタイプを有する抗体で該細胞障害活性を有しない結合抗体を、抗EREG抗体と同様に使用して、抗EREG抗体が対照抗体よりも強い細胞傷害活性を示すことにより活性を判定することができる。



[0177] 抗体のアイソタイプは、その抗体のアミノ酸配列のH鎖定常領域の配列で規定される。生体内においては、抗体産生B細胞の成熟化の際に起こる染色体上の遺伝子組み換えにより生じるクラススイッチによって抗体のアイソタイプが最終的に決定される。アイソタイプの相違が抗体の生理的・病的機能の相違に反映される。具体的には、例えば、細胞障害活性の強度は抗原の発現量と共に、抗体のアイソタイプによっても影響されることが知られている。従って、上記記載の細胞障害活性の測定に際しては、対照として用いられる抗体は被験抗体と同一のアイソタイプを用いることが好ましい。

[0178] また、生体内で細胞障害活性を評価、あるいは測定するために、例えばEREG発現癌細胞を非ヒト被検動物の皮内又は皮下に移植後、当日又は翌日から毎日又は数日間隔で被験抗体を静脈又は腹腔内に投与される。腫瘍の大きさを経日的に測定することにより細胞障害活性と規定することができる。試験管内での評価と同様に同一のアイソタイプを有する対照抗体を投与し、抗EREG抗体投与群における腫瘍の大きさが対照抗体投与群における腫瘍の大きさよりも有意に小さいことにより細胞傷害活性を判定することができる。非ヒト被検動物としてマウスを用いる場合には、胸腺を遺伝的に欠損してそのTリンパ球の機能を欠失したヌード(nu/nu)マウスを好適に用いることができる。当該マウスを使用することにより、投与された抗体による細胞障害活性の評価・測定に当たって被検動物中のTリンパ球の関与を除くことができる。

抗EREG抗体の接触によるEREG発現細胞の増殖に対する抑制効果を評価又は測定する方法としては、前記の中和活性測定法と同様の方法を好適に用いることができる。

また、生体内で細胞増殖抑制活性を評価又は測定する方法として、上記記載の生体内において細胞障害活性を評価又は測定する方法と同じ方法を好適に用いることができる。

[0179] スクリーニング方法

本発明者らによって、細胞が分泌したEREGが、EREG依存的に増殖する細胞の細胞増殖を誘導していることが明らかにされた。またEREGが癌細胞において特異的に発現が亢進していることも確認された。したがって、EREG発現細胞におけるEREGの

発現レベルを抑制することによって、癌の治療を実現できる。すなわち、本発明によって、癌細胞のEREGの発現レベルを抑制する化合物が、癌の治療剤の候補化合物として有用であることが示された。これらの知見に基づいて、本発明は、次の工程を含む、癌の治療剤の候補化合物のスクリーニング方法を提供する。

- (1)EREG発現細胞に被験化合物を接触させる工程、
- (2)EREG発現細胞におけるEREGの発現レベルを測定する工程、および
- (3)対照と比較して、EREGの発現レベルを低下させる化合物を癌の治療剤の候補化合物として選択する工程。

[0180] 本発明において、EREG発現細胞としては、たとえばEREGを発現している癌細胞を用いることができる。具体的には、たとえば図2においてEREGの発現亢進を示した癌細胞株は、いずれも本発明のスクリーニング方法に利用することができる。具体的には、本発明のスクリーニング方法に利用しうる細胞として、次のような癌細胞株を示すことができる。以下に例示した細胞株は、いずれもセルバンクから入手することができる。これらの細胞株の培養条件は既に確立されている。具体的には、たとえば表2に示したような条件で培養することができる。

食道癌細胞株:TE2

胃癌細胞株 :GT3

:MKN45

:2M

:2MD3

大腸癌細胞株:CACO2

:DLD1

:hCT116

:LOVO

肝癌細胞株 :Alexander

膵癌細胞株 :Capan1

:Paca2

:PK-1

腎癌細胞株 :Caki1  
                  :Caki2  
肺癌細胞株 :A549  
                  :H157  
                  :H1648  
                  :H2009  
                  :H23  
                  :H2347  
                  :H522

[0181] これらの細胞株を被験化合物の存在下で培養し、当該細胞株におけるEREGの発現レベルが測定される。EREGの発現レベルは、細胞内のmRNAの量や、細胞内、細胞表面、あるいは細胞外に分泌されるEREG蛋白質の量を測定することによって評価することができる。EREGのmRNAや蛋白質の測定方法としては、本明細書に記載した任意の方法を利用することができる。本発明者らによって、分泌されたEREGの、EREG依存的に増殖する細胞の細胞増殖誘導作用が確認されている。したがって、細胞外に分泌されるEREGの量を指標とする抗癌剤候補化合物のスクリーニング方法は、本発明の好ましい態様である。

[0182] 本発明においては、対照と比較して、EREGの発現レベルが低い被験化合物が、目的とする候補化合物として選択される。本発明における対照としては、たとえば被験化合物の不存在下で培養された同じ細胞株を用いることができる。あるいは、EREGの発現レベルに与える影響が予め明らかな化合物の存在下で培養した細胞株を対照とすることもできる。このような対象を用いることによって、ある化合物よりもより作用の大きい化合物を選択することもできる。

[0183] 本発明においては、被験化合物のEREGに対する中和作用を指標として、癌の治療薬をスクリーニングすることもできる。すなわち本発明は、次の工程を含む、癌の治療剤の候補化合物のスクリーニング方法に関する。

- (1)EREG依存的に増殖する細胞を、EREGと被験化合物の存在下で培養する工程、
- (2)細胞増殖レベルを測定する工程、および

(3)対照と比較して細胞増殖を抑制した被験化合物を癌の治療剤の候補化合物として選択する工程。

- [0184] 本発明において、EGF依存的に増殖する細胞とは、EGFに対して用量依存性の細胞増殖を示す細胞を言う。たとえば後に述べる実施例において、膀胱癌細胞株AsPC1は、EGFによる用量依存的な細胞増殖を示す。あるいは、本発明者らの知見によれば、EGFレセプター-G-CSFレセプターのキメラレセプターを発現させることによって、EGF依存性を付与できることが明らかにされた。具体的には、EGFレセプターの細胞外ドメインと、G-CSFレセプターの細胞内ドメインからなるキメラ受容体をコードするDNAで形質転換されたマウスの細胞は、ヒトEGFに対して、用量依存的な細胞増殖を示すようになる。したがって、このようにしてEGFR依存性が人為的に誘導された細胞も、本発明のスクリーニング方法に利用することができる。
- [0185] EGFと被験化合物の存在下で培養されたEGF依存的に増殖する細胞は、次いで、その増殖レベルが測定される。細胞増殖は任意の方法で測定することができる。たとえば実施例に示すような、市販の生存細胞の計数用試薬を利用して、生存細胞数を比較することができる。あるいは、より大規模なスクリーニングを効率的に行うためのシステムも市販されている。たとえば、マルチウエルプレートを利用し、各ウエルの生存細胞数を評価することができるシステムが実用化されている。生存細胞数の比較の結果、対照と比較して、細胞数の増加を抑制した被験化合物を、癌の治療薬の候補化合物として選択することができる。
- [0186] 本発明のスクリーニング方法において、対照として、たとえば被験化合物の不存在下で培養された同じ細胞株を用いることができる。あるいは、EGFの分泌形式による細胞増殖誘導作用に与える影響が予め明らかな化合物の存在下で培養した細胞株を対照とすることもできる。このような対象を用いることによって、ある化合物よりもより作用の大きい化合物を選択することもできる。
- [0187] 本発明のスクリーニング方法によって選択された候補化合物は、EGFの作用の抑制を作用機序とする抗癌剤の治療薬の候補化合物として有用である。本発明において、EGFに対する抗体によって、癌の治療効果が確認されている。したがって、本発明のスクリーニングによって選択される化合物にも、抗体と同様の作用が期待でき

る。本発明のスクリーニング方法によって選択された候補化合物は、更に、必要に応じて、他の癌細胞株、あるいは初代培養細胞に対する作用、更に正常細胞に対する毒性などの影響が評価される。これらの評価を通じて、癌の治療薬として有用な化合物を選択することができる。一連の、癌の治療薬としての評価方法は、既に確立されている。

[0188] 本発明のスクリーニング方法においては、天然の、あるいは人為的に合成されたあらゆる化合物を被験化合物として利用することができる。たとえば、蛋白質ライブラリーや抗体ライブラリーは、本発明における被験化合物のライブラリーとして好ましい。あるいは、蛋白質や抗体を提示したファージライブラリーを被験化合物とすることもできる。更に、コンビナトリアルライブラリーなどの、人為的に合成された化合物のライブラリーを被験化合物として用いることもできる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 実施例

[0189] 以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

### 実施例1. 各癌種におけるヒトEREGの遺伝子発現解析

#### 1-1. Gene chip を用いたヒトEREG遺伝子発現解析

大腸癌や膵癌といった癌組織で特異的に発現亢進する遺伝子を探索するため、GeneChip U133A (アフィメトリクス社製) を用いて、正常組織、癌組織及び癌細胞株の網羅的遺伝子発現解析が実施された。

はじめに、表1および表2に示す正常組織、癌組織及び癌細胞株からISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いて常法により全RNAが調製された。そしてそれらの全RNAを各10  $\mu$ gずつ用いて、GeneChip U-133A (アフィメトリクス社製) を用いた転写解析に供することにより遺伝子発現解析を行った。当該方法はExpression Analysis Technical Manual (アフィメトリクス社製) に準じて実施された。全遺伝子の発現スコアの平均値を100とし、癌組織あるいは癌細胞において発現が亢進する遺伝子の探索が行われた。

[0190] その結果、ヒトEREG mRNA(プローブID: 205767\_at HG-U133A)が、調査した正常組織においては顕著な発現が認められず、原発性大腸癌、転移性大腸癌、肺腺癌、膵癌組織、ならびに、大腸癌細胞株(CACO2、DLD1、HCT116、LOVO)、胃癌細胞株(2M、2MD3)、肝癌細胞株(Alexander)、膵癌細胞株(Capan1、Paca2)、腎癌細胞株(Caki1、Caki2)、ならびに原発性大腸癌、転移性大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌細胞株(H157、H1648、H2009、H23、H2347)において、発現亢進していることが明らかとなった(図1および図2)。

以上より、ヒトEREG遺伝子(プローブID:205767\_at HG-U133A)は正常組織で発現量が非常に低いのに対し、原発性大腸癌、転移性大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌、大腸癌、膵癌、胃癌及び腎癌と広範な癌種で発現亢進していることが明らかとなった。

[0191] [表1]

EREG遺伝子発現解析に用いた組織

組織	入手先
全脳	Clontech 64020-1
肺	臨床検体 1例
気管	Clontech 64091-1
心臓	Ambion7966
腎臓	Ambion 7976
肝臓	clinical sample (Surgery)
膵臓	Ambion 7954
胃	clinical sample (Surgery)
小腸	Ambion 7984
大腸	Ambion 7986
骨髄	Clontech64106-1
末梢血単核球細胞	臨床検体 1例
精巣	Clontech64027-1
前立腺	Ambion 7988
卵巣	Ambion 7974
皮膚	Stratagene 735031
肺腺癌1	臨床検体 1例
肺腺癌2	臨床検体 1例
肺腺癌3	臨床検体 1例
肺腺癌4	臨床検体 1例
肺腺癌5	臨床検体 1例
原発性大腸癌1	臨床検体 1例
原発性大腸癌2	臨床検体 1例
原発性大腸癌3	臨床検体 1例
原発性大腸癌4	臨床検体 1例
転移性大腸癌1	臨床検体 1例
転移性大腸癌2	臨床検体 1例
転移性大腸癌3	臨床検体 1例
転移性大腸癌4	臨床検体 1例
転移性大腸癌5	臨床検体 1例
転移性大腸癌6	臨床検体 1例
転移性大腸癌7	臨床検体 1例
膵癌1	臨床検体 1例
膵癌2	臨床検体 1例
膵癌3	臨床検体 1例
膵癌4	臨床検体 1例

[0192] [表2]

EREG遺伝子発現解析に使用した細胞株と培養条件

癌種	細胞株	培地	血清(%)
脳腫瘍	U251	DMEM	10
乳癌	MCF7	RPMI1640	10
食道癌	TE2	RPMI1640	10
胃癌	AGS	RPMI1640	10
	GT3	DMEM	10
	KatoIII	RPMI1640:DMEM=1:1	10
	MKN45	RPMI1640	10
	MKN74	RPMI1640	10
	2M	DMEM	10
	2MD3	DMEM	10
大腸癌	CACO2	DMEM	20
	DLD1	RPMI1640	10
	hCT116	McCoy5A	10
	LOVO	HamF12:DMEM=1:1	10
	SW480	RPMI1640	10
肝癌	Alexander	DMEM	10
	HepG2	DMEM	10
	HLE	DMEM	10
	HuH6	DMEM	10
	HuH7	DMEM	10
膵癌	Capan1	DMEM	20
	KLM1	RPMI1640	10
	Panc1	RPMI1640	10
	Paca2	RPMI1640	10
	PK-1	RPMI1640	10
腎癌	Caki1	RPMI1640	10
	Caki2	RPMI1640	10
肺癌	A549	DMEM	10
	Lu130	RPMI1640	10
	H1359	RPMI1640	10
	H157	RPMI1640	10
	H1648	HamF12:DMEM=1:1	10
	H2009	HamF12:DMEM=1:1	10
	H23	RPMI1640	10
	H2347	RPMI1640	10
	H522	RPMI1640	10
子宮頸癌	Hela	DMEM	10

[0193] 実施例2. 抗EREGモノクローナル抗体の作製

2-1. 全長ヒトEREG発現細胞の樹立

その配列が配列番号:21で示される全長ヒトEREG cDNA(NM\_001432)は定法より単離され、その遺伝子断片が哺乳細胞発現用ベクター(pMCN)にクローニングされ、hEREG/pMCNと命名された。pMCNは、mouse CMVプロモータ(ACCESSION No. U68299)下で外来遺伝子を発現誘導させることが可能であり、かつ、ネオマイシン耐性遺伝子が挿入されたベクターである。hEREG/pMCNがCHO細胞DG44株(Invitrogen社)へエレクトロポレーションにより導入され、500 μg/mL Geneticin での選抜により



、全長ヒトEREG定常発現CHO細胞が樹立されEREG\_DGと命名された。

[0194] 2-2. 可溶性ヒトEREG/マウスIgG2a Fc融合蛋白(sEREG-mFc)の作製

次に、抗EREG抗体作製のための免疫抗原として可溶性ヒトEREG/マウスIgG2a Fc融合蛋白質(以下、sEREG-mFc)が作製された。

発現ベクターpMCNにDHFR遺伝子を組み込んだpMCDNベクターに、ヒトEREG細胞外領域(7-122アミノ酸)とマウスIgG2a定常領域をヒンジ部位のCp0I認識配列で連結した、sEREG-mFcが構築され、sEREG-mFc/ pMCDNと命名された。配列番号:33で表される配列はsEREG-mFc遺伝子の塩基配列を、配列番号:34で表される配列はsEREG-mFcのアミノ酸配列を示す。sEREG-mFc / pMCDNはCHO細胞DG44株(Invitrogen社)へエレクトロポレーションにより導入され、500  $\mu$ g/mL Geneticinでの選抜により、sEREG-mFc発現CHO細胞が樹立された。

次に培養上清よりsEREG-mFcの精製が実施された。培養上清がHi Trap ProteinG HP(Amersham社 CAT#17-0404-01)カラムにアプライされ、結合バッファー(20mM リン酸ナトリウム(pH7.0))にて洗浄後、溶出バッファー(0.1M グリシン-HCl(pH2.7))で目的とするsEREG-mFcが溶出された。溶出液は中和バッファー(1M Tris-HCl(pH9.0))を加えたチューブに回収し直ちに中和された。次に溶出されたsEREG-mFcは Superdex 200 HR 10/30(Amersham社)によるゲルろ過に供され、その溶液がPBSに置換された。精製蛋白の定量はDC protein assay (BIO-RAD社)を用いて実施され、添付のウシIgGをスタンダードとしてその含有タンパク質量が換算された。

[0195] 2-3. 抗EREGモノクローナル抗体の作製

Balb/cおよびMRL/MpJ-Tnfrsf6<lpr>/Crljマウス(日本チャールス・リバー)が免疫動物として用いられた。5~8週齢より免疫が開始され、初回免疫にはsEREG-mFcが100  $\mu$ g/headとなるように調製され、フロイント完全アジュバント(FCA、ベクトンディッキンソン社)を用いてエマルジョン化したものが皮下に投与された。2週間後に50  $\mu$ g/headとなるように調製されたsEREG-mFcがフロイント不完全アジュバント(FIA、ベクトンディッキンソン社)でエマルジョン化され、皮下に投与された。以降1週間間隔で追加免疫が2~3回行われ、最終免疫として50  $\mu$ g/headとなるようにsEREG-mFcがPBSにより希釈され、尾静脈内に投与された。

[0196] 最終免疫の4日後、脾臓細胞が摘出され、マウスミエローマ細胞P3-X63Ag8U1 (P3 U1、ATCCより購入)と2:1になるように混合された後、PEG1500(ロシュ・ダイアグノスティック社)を徐々に加える事により細胞融合が行われた。慎重にRPMI1640培地(GIBCO BRL社)を加え、PEG1500が希釈された後に、遠心操作によりPEG1500が除去された。その後、10%FBS、1 x HAT media supplement (SIGMA社)、0.5 x BM-Conditioned H1 Hybridoma cloning supplement (ロシュ・ダイアグノスティック社)を含むRPMI1640 (以降、HAT培地)で懸濁され 200  $\mu$  L /wellとなるように96穴培養プレートに播種された。スクリーニングはヒトフローサイトメーターを用いたEREG<sub>DG</sub>に対する結合活性を評価することにより実施された。その結果、陽性の結合活性を示したクローンが限界希釈法によりモノクローン化された。

更にHelios Gene Gunシステム(バイオラッド)を用いたDNA免疫法により、マウスを免疫してモノクローナル抗体を取得した。金-DNA(ヒトEREG全長発現ベクター)粒子のカートリッジチューブへのコーティングは、Helios Gene Gun操作マニュアルにしたがった。1.0  $\mu$  m金粒子50mgを測り取り、0.1mlの0.05Mスペルミジン溶液で懸濁して混合し、1mg/mlの0.1mlのプラスミド溶液を加えてvortexした。さらに、1M CaCl<sub>2</sub>を0.1ml加え、10分間放置し、軽く遠心後、上清を取り除き、エタノールで懸濁、遠心した。エタノール脱水の操作を3回繰り返したのち、最終的に6mlの0.05mg/ml polyvinylpyrrolidone・エタノール溶液に懸濁した。この溶液をコート用チューブに吸い上げ、チューブをコート、乾燥させ、チューブカッターで0.5インチの長さに切断した。

4~5週令に達したマウスMRL/MpJ-Tnfrsf6<sup>lpr</sup>/Crljに、1~3回/週の間隔でDNA免疫(~200psiヘリウム圧)を行い、この間、断続的に血清中の抗EREG抗体価のモニターを行った。血清抗体価上昇が確認された個体に対し、EREG強制発現細胞株(5x E6 cells/head)を尾静脈内もしくは腹腔内に投与した。2~3日飼育後、脾臓を摘出し、抗体産生細胞を含む単核細胞を単離した。sEREG-mFc免疫の場合と同様の方法にて細胞融合およびクローン化をおこなった。

[0197] 血清を加えたHAT培地で培養したハイブリドーマの培養上清から抗体を精製した。培地に加えた血清は、FBS(Ultra low IgG)(GIBCO BRL社)である。実施例2-2で示された、sEREG<sub>mFc</sub>の精製方法と同様の方法により、Hi Trap ProteinG HPを使って、

培養上清から抗体を精製した。Hi Trap ProteinG HPの溶出画分は、PD-10カラム(Amersham社)を用いてPBSに置換された後、4°Cで保管された。精製抗体の定量はDC protein assay (BIO-RAD社)を用いて実施され、添付のウシIgGをスタンダードとしてその含有タンパク質量が換算された。

その結果、表3に示したクローンB2#30 (IgG1, Kappa)、B3#18 (IgG2b, Kappa)、そしてB3#41 (IgG1, Kappa)等が成功裏に単離された。

[0198] [表3]

単離した抗EREGマウスモノクローナル抗体の抗体サブタイプ、認識エピトープ部位、及び種交叉性

抗体ID	抗体名	抗体サブタイプ	エピトープ	マウス交叉性	サル交叉性
EP02	C1	IgG2a/κ	ereg	+++	NA
EP03	C7	IgG1/κ	ereg	+++	+++
EP04	#6	IgG2b/κ	ereg	+	NA
EP05	#9	IgG1/κ	ereg	++	NA
EP06	#11	IgG1/κ	ereg	+	NA
EP07	#13	IgG1/κ	ereg	-	NA
EP08	#15	IgG1/κ	ereg	-	+++
EP09	#19	IgG1/κ	ereg	+	NA
EP10	#20	IgG2b/κ	ereg	++	NA
EP11	#24	IgG1/κ	ereg	+	NA
EP12	#26	IgG1/κ	ereg	-	NA
EP14	#31	IgG1/κ	ereg	++	NA
EP15	#32	IgG2b/κ	(ereg)	-	NA
EP16	#33	IgG1/κ	ereg	++	NA
EP17	#34	IgG1/κ	ereg	-	NA
EP18	#35	IgG2b/κ	ereg	-	NA
EP19	B2#15	IgG1/κ	ereg	++	NA
EP20	B2#30	IgG1/κ	ereg	+++	+++
EP22	B3#2	IgG1/κ	ereg	-	NA
EP23	B3#7	IgG1/κ	ereg	-	NA
EP24	B3#8	IgG1/κ	ereg	+++	+++
EP25	B3#10	IgG1/κ	Nterm	+++	NA
EP26	B3#13	IgG1/κ	ereg	-	NA
EP27	B3#18	IgG2b/κ	ereg	++	+++
EP29	B3#41	IgG1/κ	(ereg)	+++	+++
EP30	B3#44	IgG1/κ,λ	ereg	-	NA
EP31	B3#52	IgG1/κ	ereg	+++	NA
EP32	B3#61	IgG1/κ	Nterm	+++	NA
EP33	B3#62	IgG1/κ	ereg	+++	NA

\* 注 (ereg): 結合するが反応性弱い  
NA: 未解析

[0199] 2-4. フローサイトメリーによる結合活性の評価

前記に記載の方法により取得された抗体を用いて、EREG\_DGに対する結合がフローサイトメリーにより評価された。FACS Buffer (1% FBS/PBS)に $1 \times 10^5$  cells/mLの密度で懸濁されたEREG\_DGに対して適切な濃度に希釈した抗EREG抗体が添加され、氷上にて60分間反応させた。細胞はFACS Bufferにて1回洗浄された後に、FITC標識抗マウスIgG抗体が添加され、氷上にて30分間反応させた。反応後、遠心により上

清が除かれた後に、細胞はFACS Buffer 150  $\mu$  Lに懸濁され、フローサイトメトリーによる解析に供された。

[0200] フローサイトメーターはFACS Calibur(ベクトンディッキンソン社)が用いられた。前方散乱光(forward scatter)及び側方散乱光(side scatter)のヒストグラムを用いて生細胞集団に対してゲートが設定された。REG\_DGに加えて、ヒト大腸癌細胞株DLD1に対する結合活性の評価が併せて実施された。ヒト大腸癌細胞株DLD1は、図2に示す結果から、REG\_DG細胞と同様にヒトREG遺伝子の発現亢進が確認されている。

図3に示すように、ハイブリドーマが産生する抗REGモノクローナル抗体(B2#30、B3#18、そしてB3#41)はREG\_DGに強く結合し、親株であるDG44細胞には結合しなかった。これらの試験結果から、これらのモノクローナル抗体が細胞膜上に提示されたREGに特異的に結合する事が判明した。

[0201] また、前記の本発明の抗REGモノクローナル抗体が、ヒトREG遺伝子を発現亢進するDLD1に対しても、REG\_DGと同様に特異的に結合することが確認された(図4)。

ヒトREG遺伝子が発現亢進することは、これまで膀胱癌(Thogersen, Vら、Cancer Res. 61:6227-6233, 2001)、膵臓癌(Zhu, Z.,ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 273:1019-1024, 2000)、前立腺癌(Torrington, N.,ら、Anticancer Res. 20:91-95, 2000)、大腸癌(Baba, I.,ら、Cancer Res. 60:6886-6889, 2000)等で報告されているが、ヒトREG遺伝子の発現亢進とヒトREGタンパク質の発現亢進とが相関することは、本発明において初めて示された。

[0202] 実施例3. 抗REGモノクローナル抗体のcomplement-dependent cytotoxicity (CDC) 活性およびantibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)活性の測定

#### 3-1. 抗REGモノクローナル抗体のCDC活性の測定

標的細胞としてはヒト大腸癌細胞株DLD1が用いられた。DLD1の培養には10% FBSを含むRPMI1640培地(GIBCO BRL社)が用いられた。DLD1細胞 $5 \times 10^5$ 個が遠心分離(1000 rpm、5分間、4°C)により回収され、細胞ペレットが約200  $\mu$  Lの培地および3.7 MBqのChromium-51 (Code No. CJS4, Amersham Pharmacia Biotech)に懸濁され、5%炭酸ガスインキュベーター中で37°Cにて1時間培養された。前記細胞が培地で3回

洗浄された後に、培地にて細胞密度が $1 \times 10^4$ /mLに調製され、96ウェル平底プレートに100  $\mu$ Lずつ添加された。

[0203] 次に、抗EREGモノクローナル抗体(B3#18\_IgG2b)およびコントロールマウスIgG2a抗体(Cat. No. 553453、BD Biosciences Pharmingen)が培地にて希釈された後に、各ウェルに50  $\mu$ Lずつ添加された。抗体は終濃度10  $\mu$ g/mLに調製された。続いて、幼令ウサギ補体(Cat. No. CL3441、Cederlane)が培地にて5倍希釈後、当該プレートの各ウェルに50  $\mu$ Lずつ添加され、当該プレートは5%炭酸ガスインキュベーター中で37°Cにて1.5時間静置した。静置後当該プレートが遠心分離(1000 rpm、5分間、4°C)され、各ウェルより上清が100  $\mu$ Lずつ回収され、ガンマカウンター(1480 WIZARD 3"、Wallac)にて回収された上清の放射活性が測定された。下式に基づいて特異的クロム遊離率が求められた。

$$\text{特異的クロム遊離率(\%)} = (A-C) \times 100 / (B-C)$$

式中、A:各ウェルにおける放射活性(cpm)、

B:100  $\mu$ Lの細胞に対して、2% NP-40溶液(Nonidet P-40、Code No.252-23、ナカライテスク株式会社)を100  $\mu$ L添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、そして

C:100  $\mu$ Lの細胞に対して、培地を100  $\mu$ L添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値を示す。測定はduplicateにて実施され、各ウェルから由来する上清の特異的クロム遊離率の平均値及び標準偏差が算出された。

[0204] その結果、図5に示すように、試験に用いられた抗EREGモノクローナル抗体にCDC活性が確認された。一方対照として用いたマウスIgG2a抗体は同濃度でCDC活性を示さなかった。

[0205] 3-2. 抗EREGモノクローナル抗体のADCC活性の測定

ADCC活性の測定にはCDCの場合と同様にヒト大腸癌細胞株DLD1を用いて実施された。すなわち、細胞が96ウェル平底プレートにて培養し Chromium-51と反応させた後、10% FBSを含むRPMI1640培地(Invitrogen社)にて洗浄され、100  $\mu$ Lの培地が添加された。次に、抗EREGモノクローナル抗体(B2#30、B3#18及びB3#41)を培地にて希釈した後に当該プレートの各ウェルに50  $\mu$ Lずつ添加された。抗体は終濃度1  $\mu$

g/mLで添加された。続いて、エフェクター細胞溶液( $1 \times 10^7$ 個/mL)が各ウェルに50  $\mu$ Lずつ添加され、当該プレートが5%炭酸ガスインキュベーター中で37°Cにて4時間静置され、特異的クロム遊離率が決定された。Balb/cマウス(日本チャールス・リバー株式会社)の脾臓細胞を50 ng/mLリコンビナントヒトinterleukin-2 (Cat. No. 200-02, Peprotech)を含む培地で5日間培養したもの、もしくは同マウスの骨髄細胞を50 ng/mLリコンビナントヒトinterleukin-2、および10 ng/mLリコンビナントマウスGM-CSF (Cat. No. 315-03, Peprotech)を含む培地で6日間培養したものが、エフェクター細胞として使用された。

その結果、試験に用いられた全ての抗EGFRモノクローナル抗体がDLD1に対してA DCCを誘導することが明らかとなった(図6)。

[0206] 実施例4. ヒトEGFRによる細胞増殖刺激に対する抗EGFRモノクローナル抗体の中和活性の測定

4-1. EGFR-mG-CSFキメラレセプターを発現するBa/F3細胞株(EGFR\_BAF)の樹立  
常法により、その配列が配列番号:35(GeneBank Acc.No. NM\_005228)で示されるヒトEGFRレセプター(以下、「EGFR」と記載する。)が単離された後に、ヒトEGFRレセプターとmG-CSFRとを融合させたキメラレセプターを発現できるベクターが作製された。即ち、ヒトEGFRの細胞外領域(Met7-Ser645)とマウスG-CSFR(NM\_007782)の細胞内領域のキメラ受容体(hEGFR/mG-CSFR)を発現するベクター(pCV\_hEGFR/mG-CSFR)が作製された。当該キメラ受容体であるhEGFR/mG-CSFRの塩基配列を配列番号:39に、そのアミノ酸配列を配列番号:40に示す。

[0207] Pvu Iで切断することにより直鎖化したキメラ受容体(hEGFR/mG-CSFR)発現ベクター(pCV\_hEGFR/mG-CSFR)15  $\mu$ gが、0.33 kV, 950  $\mu$ FDの条件下でBa/F3細胞にエレクトロポレーション(Gene Pulser ; BioRad)により導入された。遺伝子が導入された細胞は10% FBS(GIBCO社)、200  $\mu$ g/mL Geneticin、及び、組み換え体ヒトEGFR(R&Dシステムズ社、Cat:1195-EP/CF、200ng/mL)を含有するRPMI1640培地で選抜され、EGFR\_BAF株の単離が行われた。

[0208] 4-2. EGFR\_BAFのEGFR依存性の評価

4-1.に記載の方法により単離されたEGFR\_BAFのヒトEGFRの濃度に依存した細胞

増殖を測定する試験が実施された。培養時のヒトEGFRを除去するため細胞が洗浄され、再びRPMI1640+10% FBS培地に懸濁された後に、 $2 \times 10^4$  細胞/100  $\mu$  L/wellの密度にて96穴プレートに播種された。ヒトEGFR (R&Dシステムズ社)は、培地を用いて各濃度(7.8~250 ng/ml)に希釈し調製後に細胞に添加され、その後、細胞が37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で3日間培養が行われた。培養後、指示書に従い、Cell Count Reagent SF (ナカライテスク社)の測定試薬を加えて2時間発色を行い、反応液の吸光度(450/655 nm)がBenchmark Plus (Bio-Rad社)を用いて測定された。

また、同様に、ヒト膀胱癌細胞株AsPC1及びヒト大腸癌細胞株DLD1のヒトEGFRに対する依存性増殖が前記と同様に測定された。培地としてCHO-S-SFMII (GIBCO社)が使用された。

[0209] その結果、EGFR\_BAF (図7) 及びAsPC1 (図8)はヒトEGFRの濃度に依存して増殖することが明らかとなった。しかしながら、DLD1はヒトEGFRの依存性を有しないことが明らかとなった(図9)。

[0210] 4-3. 抗EGFRモノクローナル抗体のヒトEGFR依存的な細胞増殖に対する中和活性の測定

樹立したEGFR\_BAFを用いて、ヒトEGFRに対する依存性増殖に対する抗EGFRモノクローナル抗体の中和活性の測定が実施された。ヒトEGFR (終濃度125 ng/mL)を含むRPMI1640+10% FBS培地にEGFR\_BAFが懸濁され、1ウエル当たり $2 \times 10^4$ 細胞の密度にて96穴プレートに播種された。抗EGFRモノクローナル抗体が各濃度(0.008~25  $\mu$  g/ml)にて培地により希釈された後に細胞に添加され、その後、細胞は37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で3日培養された。培養後、測定キットCell Count Reagent SF (ナカライテスク社)の測定試薬を加えて2時間発色を行い、反応液の450nmにおける吸光度を655 nmを参照波長としてBenchmark Plus (Bio-Rad社)により測定した。

[0211] 抗体濃度0  $\mu$  g/mLの数値を対照値として、細胞増殖率(各抗体濃度におけるOD値/コントロールのOD値x100(%))を算出した。阻害活性の正の対照として、公知の抗ヒトEGFRヤギポリクローナル抗体 (R&Dシステムズ社、Cat:AF1195)が使用された。この抗体は製品の添付文書中に、繊維芽細胞株Balb/3T3のヒトEGFRに対して依存した



増殖に対する中和活性が示されている。しかしながら、癌細胞株に対する増殖抑制効果に関する情報は添付文書に記載されていない。

また、標的細胞としてAsPC1を用いた抗EREGモノクローナル抗体の中和活性も前記と同じ方法によって実施され、抗体濃度は25, 2.5, 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3条件で測定された。

それぞれの結果を図10と図11に示す。

[0212] EGFR\_BAF及びAsPC1を用いたいずれの系においてもB2#30及びB3#18は、中和活性を示し、B3#41の中和活性は非常に弱いことが明らかとなった。また、B2#30やB3#18との比較において、公知の抗hEREGヤギポリクローナル抗体の中和活性が非常に弱いことが明らかとなった。

以上により、B2#30及びB3#18は、EREG依存的な中和活性を有し、膵癌細胞株AsPC1の増殖を抑制することが明らかとなった。

今回単離した抗EREGモノクローナル抗体(B2#30及びB3#18)は、ADCC活性あるいはCDC活性による殺細胞効果と、ヒトEREG依存的な細胞増殖抑制効果(中和活性)を併せ持ち、ヒトEREG遺伝子が発現亢進している癌細胞に対する新規メカニズムの抗体医薬品であることが、本研究にて証明された。

[0213] 実施例5. 抗EREGモノクローナル抗体の可変領域遺伝子配列の決定

EREG依存的な中和活性を保持し、かつ、DLD1細胞株に対しADCC活性、及びCDC活性を示したB3#18(EP27)を産生するハイブリドーマより、抗体可変領域遺伝子の配列を決定した。当該抗体可変領域遺伝子は、抗EREG抗体B3#18産生ハイブリドーマより抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅された。Total RNAは、RNeasy Plant Mini Kits(QIAGEN社)を用いて $1 \times 10^7$ 細胞のハイブリドーマより抽出された。

[0214]  $1 \mu\text{g}$ のTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社)によりRACEライブラリーを構築した。マウスIgG2b定常領域配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG2b (配列番号:41)またはマウス $\kappa$ 鎖定常領域塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドkappa (配列番号:42)を用い、5'末端側遺伝子

断片が増幅された。逆転写反応は42°Cで1時間30分間の条件下にて実施された。PCR溶液(50  $\mu$  L中)の組成を以下に示す。

5  $\mu$  Lの10× Advantage 2 PCR Buffer、  
5  $\mu$  Lの10× Universal Primer A Mix、  
0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、  
1  $\mu$  Lの Advantage 2 Polymerase Mix (以上、CLONTECH社製)、  
2.5  $\mu$  Lの逆転写反応産物、および  
10pmoleの合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG2bまたはkappa  
更にPCR及び反応条件は次のとおりである。

94°Cの初期温度にて30秒間／94°Cにて5秒間／72°Cにて3分間のサイクルを5回、  
94°Cにて5秒間／70°Cにて10秒間／72°Cにて3分間のサイクルを5回、さらに  
94°Cにて5秒間／68°Cにて10秒間／72°Cにて3分間のサイクルを25回

最後に反応産物は72°Cで7分間加熱された。各PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて、アガロースゲルから精製された後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製)へクローニングされ、その塩基配列が決定された。B3#18のH鎖可変領域の塩基配列を配列番号:43、アミノ酸配列を配列番号:44、L鎖可変領域の塩基配列を配列番号:45、そしてアミノ酸配列を配列番号:46に示す。

C7(EP03)、#15(EP08)、B2#30(EP20)、B3#8(EP24)、B3#41(EP29)に関して同様な方法にて可変領域配列の決定を行った。重鎖可変領域の増幅には、マウスIgG1定常領域配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG1 (配列番号:47、5'-ccatggagttagtttgggcagcagatcc-3')を用いた。決定された可変領域塩基配列を配列番号:108(EP03、重鎖)、110(EP03、軽鎖)、112(EP08、重鎖)、114(EP08、軽鎖)、116(EP20、重鎖)、118(EP20、軽鎖)、120(EP24、重鎖)、122(EP24、軽鎖)、124(EP29、重鎖)、126(EP29、軽鎖)に示した。また、可変領域翻訳配列を配列番号:109(EP03、重鎖)、111(EP03、軽鎖)、113(EP08、重鎖)、115(EP08、軽鎖)、117(EP20、重鎖)、119(EP20、軽鎖)、121(EP24、重鎖)、123(EP24、軽鎖)、125(EP29、重鎖)、127(EP29、軽鎖)に示した。それぞれ抗体の可変領域配列表番号、CDR1、CDR2、CDR3アミノ酸配列を表4にまとめた。

[0215] [表4]抗EREGモノクローナル抗体のCDR配列、配列番号との対応関係

	CDR1	CDR2	CDR3	可変領域塩基配列番号	可変領域翻訳配列番号
EP03	重鎖	NYWMN (配列番号:49)	RIHPDSETHYNQKFKN(配列番号:51) LYYTMDY(配列番号:53)	(配列番号:108)	(配列番号:109)
	軽鎖	KASQDINKNIA (配列番号:55) YTSTLQP (配列番号:57)	LQYDNLPLYT (配列番号:59)	(配列番号:110)	(配列番号:111)
EP08	重鎖	SYWMH (配列番号:61)	EINPYNGGTNYNEKFKS (配列番号:63) WKLGTY (配列番号:65)	(配列番号:112)	(配列番号:113)
	軽鎖	RASQEISGYLS (配列番号:67) AASTLDS (配列番号:69)	LQYASYPRT (配列番号:71)	(配列番号:114)	(配列番号:115)
EP20	重鎖	VYSLH (配列番号:73)	VISTYYGDAIYNQKFKG (配列番号:75) EGNGLPDY(配列番号:77)	(配列番号:116)	(配列番号:117)
	軽鎖	TASSVSSSYLH (配列番号:79) STSNLAS (配列番号:81)	HQYHRSPLT (配列番号:83)	(配列番号:118)	(配列番号:119)
EP24	重鎖	SYGVH (配列番号:85)	VIVRDGTTNYSALKS (配列番号:87) NWNGIMDY(配列番号:89)	(配列番号:120)	(配列番号:121)
	軽鎖	RASQDISYLN (配列番号:91) YTSRLHS (配列番号:93)	QQGHTVPWT (配列番号:95)	(配列番号:122)	(配列番号:123)
EP27	重鎖	DTYIQ (配列番号:2)	RIDPLNGNTKYVPKFG (配列番号:4) SGTLDF (配列番号:6)	(配列番号:43)	(配列番号:44)
	軽鎖	KASQDIHKYIA (配列番号:12) YTSTLQP (配列番号:14)	LQYDNLRT (配列番号:16)	(配列番号:45)	(配列番号:46)
EP29	重鎖	SYWMH (配列番号:97)	AIYPGNSDSYNQKFKG (配列番号:99) VMAY (配列番号:101)	(配列番号:124)	(配列番号:125)
	軽鎖	RASQDIGNSLN (配列番号:103) ATSNLDS (配列番号:105)	LQYASSPWT (配列番号:107)	(配列番号:126)	(配列番号:127)

## [0216] 実施例6. 組換えキメラ抗体のEREGに対する結合活性の確認

単離された抗体可変領域配列とヒトIgG1/IgK定常領域配列を持つ組換えキメラ抗体がEREGに対して結合性を保持することを以下の方法で確認した。それぞれの重鎖可変領域配列をPCR増幅し、ヒトキメラ抗体発現ベクター重鎖クローニングサイトに組み込んだ。つづいて軽鎖可変領域配列をPCR増幅し、上述の重鎖を組み込んだヒトキメラ抗体発現ベクターの軽鎖クローニングサイトに組み込んだ。構築した細胞発現ベクターにおいて重鎖、軽鎖ともに抗体遺伝子はマウスCMVプロモータ下で転写されるように設計されている。各ヒトキメラ抗体の塩基配列およびその翻訳配列の配列番号の対応を表5にまとめた。

[表5]

各ヒトキメラ抗体の配列番号

		塩基配列配列番号	アミノ酸配列番号
キメラ化EP03	重鎖	配列番号:128	配列番号:129
	軽鎖	配列番号:130	配列番号:131
キメラ化EP08	重鎖	配列番号:132	配列番号:133
	軽鎖	配列番号:134	配列番号:135
キメラ化EP20	重鎖	配列番号:136	配列番号:137
	軽鎖	配列番号:138	配列番号:139
キメラ化EP24	重鎖	配列番号:140	配列番号:141
	軽鎖	配列番号:142	配列番号:143
キメラ化EP27	重鎖	配列番号:9	配列番号:10
	軽鎖	配列番号:19	配列番号:20
キメラ化EP29	重鎖	配列番号:144	配列番号:145
	軽鎖	配列番号:146	配列番号:147

[0217] ヒトキメラ抗体発現ベクターを用いて、エレクトポレーション法にてDG44細胞を形質転換した。ヒトキメラ抗体発現ベクター上に存在する選択マーカーにより獲得されるジェネティシン耐性を指標に、組換え細胞クローン選択を行った。クローン化された組換え細胞培養上清中の抗体量を、抗ヒト抗体を用いたサンドイッチELISA法で検出し、組換え抗体発現細胞を選抜した。選抜した組換え細胞の培養上清よりHiTrap Protein Aカラム(Amersham Bioscience)を用いて添付マニュアルに従い、ヒトキメラ抗体の精製を行った。

[0218] sEREG-mFcをnuncイムノプレートにコートし、BSAを含む溶液でブロッキング後に、精製キメラ抗体の結合反応性を解析した。キメラ抗体を添加して一時間インキュベー

ション後、プレート洗浄、アルカリフォスファターゼ標識した抗ヒトIgG抗体(BIOSOURCE, AHI0305)を添加、反応させた。洗浄を行ったあと、検出試薬Sigma104を加えることによりキメラ抗体結合量を測定した。図12に示したように、キメラ抗体はEREGに対して容量依存的な結合を示した。以上の結果から、単離された抗体可変領域配列は正に抗EREG抗体に由来するものであることが確認された。

[0219] 実施例7. キメラ化抗EREG抗体のin vitro ADCC活性

キメラ化抗体のヒトPBMCを用いたin vitro ADCC活性を図13に示した。1000単位/mLのヘパリン溶液(ノボ・ヘパリン注5千単位, ノボ・ノルディスク社)をあらかじめ200  $\mu$  L注入した注射器を用い、健常人より末梢血50 mLを採取した。この末梢血をPBS(-)で2倍希釈した後、4等分し、15 mLのFicoll-Paque PLUS(GEヘルスケア社)をあらかじめ注入して遠心操作を行なったLeucosepinリンパ球分離管(Cat. No. 227290, Greiner bio-one社)に加えた。これを遠心分離(2150 rpm, 10分間, 室温)した後、単核球画分層を分取した。10%FBSを含むDulbecco's Modified Eagle's Medium(SIGMA社製)(以下10%FBS/D-MEM)で1回細胞を洗浄した後、10%FBS/D-MEMで細胞密度を $5 \times 10^6$  /mLに調整し、ヒトPBMC溶液とした。

実施例3と同様の方法にて、DLD-1およびMIA-PaCa2細胞をChromium-51ラベルした。標的細胞に各濃度に調製した抗体溶液を添加し、室温にて15分間反応させた後に、ヒトPBMC溶液( $5 \times 10^5$ 細胞/ウェル)を加え、5%炭酸ガスインキュベーター中約4時間培養し、培養後の上清中の放射活性をガンマカウンターで測定、実施例3に記載した方法でクロム遊離率を算出した。すべてのキメラ化抗体でADCC誘導が認められ、キメラ化抗体EP20, EP27, EP08が特に強い活性を持っていた。各々の抗体のADCC誘導の強さに関して、膵臓癌細胞株MIA-PaCa2と大腸癌細胞株DLD-1で同様な傾向を示した。

[0220] 実施例8. 抗EREG抗体の種交叉性およびエピトープ解析

単離した抗体のマウスEREGおよびサルEREGに対する交叉反応性を解析した。全長マウスEREG cDNA(NM\_007950)およびサルEREG cDNA(XM\_001102069)はcDNAライブラリを鋳型にPCR増幅し、クローニングした。単離された配列を、それぞれ、配列番号168および169に示した。実施例2に示した方法で、可溶型マウスEREG/マウ

スIgG2a Fc融合蛋白質 (以下マウスEREG-mFc)および可溶性サルEREG/マウスIgG 2a Fc融合蛋白質 (以下サルEREG-mFc)が調製された。マウスEREG-mFcおよびサルEREG-mFcの配列を、それぞれ、配列番号170および171に示した。ヒトEREG-mFc、マウスEREG-mFc、サルEREG-mFcそれぞれをnuncイムノプレートにコートし、BSAを含む溶液でブロッキングした。その後、精製キメラ抗体の結合反応性を解析した。キメラ抗体を添加して一時間インキュベーション後、プレート洗浄、アルカリフォスファターゼ標識した抗ヒトIgG抗体 (BIOSOURCE, AHI0305)を添加、反応させた。洗浄を行ったあと、検出試薬Sigma104を加えることによりキメラ抗体結合量を測定した (図14)。同一抗体濃度における各種EREGへの結合を、横軸[ヒトEREG-mFc] 対 縦軸[マウスEREG-mFc]、横軸[ヒトEREG-mFc] 対 縦軸[サルEREG-mFc]とプロットすることで、同一抗体濃度におけるEREGに対する抗体の結合飽和度の相違を展開表示した。横軸に沿うプロットは、ヒトEREGに対する結合選択性を示し、EP08はヒトEREGに結合するが、マウスEREGには結合しないことを表す。放物線状のプロットを示したEP27は、マウス分子に対しても結合するが、結合飽和に到達するにはより高濃度の抗体が必要であること、つまりヒトEREGに比べマウスEREGに対する結合アフィニティは弱いことを示す。対角線状のプロットを与える抗体は異なる種のEREGに対してヒトと同等のアフィニティを示すことを表している。ハイブリドーマ産生マウス抗体を用いて同様の解析を行った結果を (表3)にまとめた。反応しない(-)、非常に弱い反応性(+)、ヒトに比べやや弱い(++)、ヒト分子同等の反応性(+++)の4段階で表示した。

- [0221] 抗体のエピトープ部位解析を行う目的で、ヒトEREG細胞外ドメイン部分断片への結合反応性を解析した。配列番号:21のヒトEREGの<sup>29</sup>Alaから<sup>69</sup>SerまでのN末端部分配列をGST融合蛋白質として発現、精製した。得られた組換え蛋白質の配列を配列番号:172に示した。成熟型EGFドメイン構造をもつ可溶性ヒトEREG断片 (配列番号:21の<sup>63</sup>Valから<sup>108</sup>Leuに相当)はR&D Systems (cat.no. 1195-EP/CF)より購入した。EREG配列断片をイムノプレートに固層化し、抗体の結合反応性をELISA法で調べ、その結果を表3にまとめた。ほとんどがEGFドメイン構造を含む可溶性EREG断片 (表3でeregと表示)に結合した。EP25、EP32はN末端部分配列 (Nterm)に結合した。単離したすべての抗体がどちらかのペプチド断片に結合し、109残基以降の配列を認識する抗

体は存在しなかった。

[0222] 実施例9. EREG発現細胞によるEGF受容体シグナルの活性化

可溶性REGは、低親和性EGFファミリーリガンドとして報告されている(参考文献:S helly et al. (1998) J Biol Chem 273, 10496-505; Jones et al. (1999) FEBS Lett 447, 227-31)。EGFR\_BaFを用いた作用比較から、REGはEGFに比べてEGF受容体に対して100倍以下の低い活性(親和性)しか示さないことが確認された(図15)。生理的条件下でREGは血中に多量に存在する因子ではない。また癌化に伴い、遺伝子レベルでの発現上昇が起こるとの報告はあるものの、癌患者で血中高濃度のREG蛋白質を検出したという報告はない。可溶性としてではなく、むしろ細胞膜上に発現した膜型のREGが近傍に存在するEGF受容体を刺激する局所的な活性化機構が存在するのではないかとの仮説のもと、以下の検証を行った。まず、REG強制発現細胞とEGFR\_BaFを共培養することで、可溶性REGなしで、EGFR\_BaFの増殖が促進されるかを確認した。REG発現細胞REG\_DG、陰性対照となるDG44細胞を $5 \times 10^3$ /ウェルで96ウェルプレートにまき込み、FCS存在下で終夜培養した。翌日 $1 \times 10^4$ のEGFR\_BaF、陰性対照となるBa/F3細胞を添加し3日間を続けた。図16に示したようにREGを発現しないDG44細胞と共培養してもEGFR\_BaFの増殖は全く刺激されない一方で、REG強制発現細胞REG\_DGとの共培養で顕著なEGFR\_BaF増殖促進が観察された。REG\_DGによる増殖促進は、抗REG抗体EP20( $10 \mu\text{g/ml}$ )の添加により抑制された。EGFR\_BaF細胞増殖をWST-8試薬添加により定量化した(図17)。Ba/F3細胞をREG\_DG細胞と共培養しても増殖刺激はおこらないこと、REG\_DGとEGFR\_BaFの共培養によって促進された細胞増殖は抗REG抗体添加によりほぼ完全に抑制できることが示された。

[0223] 大腸癌細胞株DLD-1ではREG以外にも、amphiregulin (EGFリガンドファミリーメンバー)の遺伝子レベルでの過剰発現が起きていることが、GeneChip解析により確認されている。EGF受容体シグナルにおいて、受容体を活性化するリガンドファミリー分子の重複性が存在し、ひとつのリガンドを阻害することは、受容体シグナル活性化阻害と論理的等価ではない。DLD-1とEGFR\_BaFを共培養した場合、Ba/F3との比較で、EGFR\_BaFに顕著な増殖刺激が入ること、この増殖刺激は抗REG中和抗体EP20,

EP27の添加で抑制されることが示された(図18)。

[0224] EREG\_DG、DLD-1細胞培養上清中の可溶性EREG量をサンドイッチELISA法で定量した。マウスEP30をイムノプレートにコーティング、ブロッキング後、濃度標準品である可溶性組換えヒトEREG(R&D Systems)および、被験サンプルである3日間培養後の細胞培養上清を添加した。インキュベーション後、キメラ化EP20抗体とアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体でEREGを検出した。標準品を用いた可溶性EREG検出結果を図19に示した。培養上清中のEREG量は、EREG\_DG(A405/655検出値0.157)、DLD-1(A405/655検出値0.184)ともに検出限界(1ng/ml)以下であった。以上の結果はEREGによるEGF受容体シグナルの活性化は近接した細胞間でおこること、膜型EREGが活性化に関与している可能性が非常に高いことを示す。

EREGによるEGF受容体活性化が細胞間相互作用を通じて効率よく起こることを示す結果は、本発明が最初の発見であり、これを抗体で抑制できることもまた最初の発見である。

[0225] 実施例10. 免疫組織染色による大腸癌組織でのEREG検出

癌組織におけるEREG蛋白質発現、癌細胞膜上への局在を免疫組織染色で確認した。免疫組織染色は臨床癌組織より作製されたTissue Arrayを用いて行い、組織標本の作製は以下のように行った。術後摘出された組織を4%パラホルムアルデヒドで一夜固定後、0.01Mリン酸緩衝液で2時間洗浄し、AMeX法(参考文献:Sato et al. (1986) Am J Pathol 125, 431-5)によりパラフィン包埋した。このブロックから、直径1.5mmの癌組織を切り出し、約2.5 x 3.0 cmの新しいブロックに移植し、異なる組織を配列し、Tissue Arrayとした。Tissue Arrayを薄切して脱パラフィンした後、Ventana HX Discovery System (Ventana Medical Systems, Inc)を用いて免疫組織染色を行った。50  $\mu$ g/mlの抗EREGマウスモノクローナル抗体(EP27)を薄切した組織に添加して反応させた。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgG抗体を加え、その後DABで発色反応を行った。その結果、大腸癌原発部においてEREG蛋白質の発現、細胞膜へ局在性が認められた(図20)。一方、非癌部組織において同染色条件でEREG蛋白質は全く検出されてなかった。癌組織における蛋白質レベルでの発現検出、膜への局在性の確認は、本発明において初めて示された。



[0226] 実施例11. サンドイッチELISAによる抗EREGモノクローナル抗体のエピトープ認識分類

実施例8で多くの抗体の認識エピトープがEREGの成熟型EGFドメイン内にあることを明らかにした。さらに詳細に、同一抗原分子に対して結合競合を起こさない、エピトープの異なる抗体の組み合わせをサンドイッチELISA法で解析した。マウス抗EREG抗体を1  $\mu$  g/mlに希釈しnuncイムノプレートへと固層化した。ブロッキングを行った後、50  $\mu$  g/mlの成熟型EGFドメイン構造の可溶性ヒトEREG断片(配列番号:21の<sup>63</sup>Valから<sup>108</sup>Leu)もしくは100  $\mu$  g/mlヒトEREG-mFc(配列番号:34)を100  $\mu$  l/ウェル添加し、マウス抗体に抗原分子を捕捉させた。洗浄後、抗EREGキメラ抗体を添加(抗体濃度:1, 0.33, 0.11, 0.037  $\mu$  g/ml)し、キメラ抗体の捕捉抗原分子への結合反応性をアルカリホスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体およびSigma104発色で検出した。得られたデータ(図21-1~図21-3)を統計解析ソフトウェアR(URL <http://www.R-project.org>)を用いてクラスタリング解析し、デンドログラムを図22に示した。図22で横軸の分岐点までの距離が遠いほどサンドイッチELISA系での反応パターンが違うこと、抗原認識様式が異なることを示す。EP20は、EP27等多くの抗体とサンドイッチ可能であり、特徴的なエピトープを有することがわかる。図22のEP29からEP25までのクラスターに属する抗体は、別抗体との同時結合をほとんど許容せず、これら抗体により抗原分子が深く捕捉されている様子が推測される。

#### 産業上の利用可能性

[0227] 本願発明に係るEREGタンパク質に特異的な抗体は、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、あるいは腎癌などの診断薬として使用することができる。本発明による診断薬は、原発性、あるいは転移性の癌の診断に有用である。具体的には、患者から採取された生体試料中に含まれるEREGタンパク質、あるいはEREGをコードするmRNAを検出することにより、癌を検出することができる。あるいは、生体内におけるEREG発現細胞の局在を検出することによって、生体内において原発性大腸癌、転移性大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、あるいは腎癌の存在を検出することができる。

また、本願発明に係る細胞障害活性を有する抗EREG抗体は、EREGタンパク質を発現する癌の治療あるいは予防に有用である。具体的には、本発明に基づいて、大

腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌などの各種の癌細胞の細胞障害剤あるいは細胞増殖抑制剤が提供される。本発明による癌細胞の細胞障害剤あるいは細胞増殖抑制剤は、原発性、および転移性のいずれの癌に対しても適用することができる。

[0228] 更に、本願発明に係る細胞障害活性を有する抗EGFR抗体は、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌などの各種の癌に対する治療薬として使用することができる。本発明において、抗EGFR抗体は、原発性、および転移性のいずれの癌に対する治療薬としても有用である。

加えて、本願発明に係る抗体をコードする遺伝子及び当該遺伝子により形質転換された組換え細胞は上記記載の効果、あるいはより好適な効果を奏する組換え抗体を作製するために使用することができる。

更に、本発明の知見に基づいて、癌の治療薬として有用な候補化合物をスクリーニングすることができる。本発明によって、癌のEGFR依存性の増殖が明らかにされた。したがって、本発明のスクリーニング方法によって選択された化合物は、癌のEGFR依存的な増殖を抑制する化合物といえる。本発明によって選択された化合物は、安全性や癌に対する特異性の評価を通じて、抗癌剤としての有用性を明らかにするための候補化合物として有用である。

## 請求の範囲

- [1] EREGタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する医薬組成物。
- [2] EREGタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤。
- [3] EREGタンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する抗癌剤。
- [4] EREGタンパク質に結合する抗体が細胞増殖阻害活性を有する抗体である、請求項3に記載の抗癌剤。
- [5] EREGタンパク質に結合する抗体が、以下(1)から(57)のいずれかに記載の抗体である、請求項3または請求項4に記載の抗癌剤；
- (1) CDR1として配列番号:2に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:4に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:6に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (2) (1)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:8に記載のアミノ酸配列の117から452位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (3) (1)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (4) CDR1として配列番号:12に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:14に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:16に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (5) (4)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:18に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (6) (4)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (7) (1)に記載のH鎖、および(4)に記載のL鎖を含む抗体、
- (8) (2)に記載のH鎖、および(5)に記載のL鎖を含む抗体、
- (9) (3)に記載のH鎖、および(6)に記載のL鎖を含む抗体、
- (10) CDR1として配列番号:49に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:51に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:53に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

- (11) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:149に記載のアミノ酸配列の118から441位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (12) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (13) CDR1として配列番号:55に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:57に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:59に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (14) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:151に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (15) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (16) (10)に記載のH鎖、および(13)に記載のL鎖を含む抗体、
- (17) (11)に記載のH鎖、および(14)に記載のL鎖を含む抗体、
- (18) (12)に記載のH鎖、および(15)に記載のL鎖を含む抗体、
- (19) CDR1として配列番号:61に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:63に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:65に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (20) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:153に記載のアミノ酸配列の116から439位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (21) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (22) CDR1として配列番号:67に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:69に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:71に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (23) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:155に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (24) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

- (25) (19)に記載のH鎖、および(22)に記載のL鎖を含む抗体、
- (26) (20)に記載のH鎖、および(23)に記載のL鎖を含む抗体、
- (27) (21)に記載のH鎖、および(24)に記載のL鎖を含む抗体、
- (28) CDR1として配列番号:73に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:75に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:77に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (29) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:157に記載のアミノ酸配列の119から442位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (30) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (31) CDR1として配列番号:79に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:81に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:83に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (32) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:159に記載のアミノ酸配列の109から215位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (33) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (34) (28)に記載のH鎖、および(31)に記載のL鎖を含む抗体、
- (35) (29)に記載のH鎖、および(32)に記載のL鎖を含む抗体、
- (36) (30)に記載のH鎖、および(33)に記載のL鎖を含む抗体、
- (37) CDR1として配列番号:85に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:87に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:89に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (38) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:161に記載のアミノ酸配列の117から440位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (39) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (40) CDR1として配列番号:91に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:93に

記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:95に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(41) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:163に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(42) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(43) (37)に記載のH鎖、および(40)に記載のL鎖を含む抗体、

(44) (38)に記載のH鎖、および(41)に記載のL鎖を含む抗体、

(45) (39)に記載のH鎖、および(42)に記載のL鎖を含む抗体、

(46) CDR1として配列番号:97に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:99に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:101に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(47) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:165に記載のアミノ酸配列の113から436位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(48) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(49) CDR1として配列番号:103に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:105に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:107に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(50) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:167に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(51) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(52) (46)に記載のH鎖、および(49)に記載のL鎖を含む抗体、

(53) (47)に記載のH鎖、および(50)に記載のL鎖を含む抗体、

(54) (48)に記載のH鎖、および(51)に記載のL鎖を含む抗体、

(55) (1)から(54)のいずれかに記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、(1)から(54)のいずれか

- に記載の抗体と同等の活性を有する抗体、
- (56) (1)から(55)のいずれかに記載の抗体が結合するEREGタンパク質のエピトープと同じエピトープに結合する抗体、
- (57) (1)から(56)のいずれかに記載の抗体の低分子化抗体。
- [6] EREGタンパク質に結合する抗体が、配列番号: 21に記載のアミノ酸配列において、29番目のAlaから69番目のSer、又は63番目のValから108番目のLeuを認識することを特徴とする、請求項3から請求項5のいずれかに記載の抗癌剤。
- [7] 癌が、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、および腎癌からなる群から選択されるいずれかの癌である、請求項3から請求項6のいずれかに記載の抗癌剤。
- [8] 癌が、原発性の癌である請求項7に記載の抗癌剤。
- [9] 癌が、転移性の癌である請求項7に記載の抗癌剤。
- [10] EREGタンパク質に結合し、かつEREGタンパク質を発現する細胞に対して細胞増殖阻害活性を有する抗体。
- [11] 細胞増殖阻害活性が細胞障害活性である請求項10に記載の抗体。
- [12] 細胞障害活性がADCC活性である請求項11に記載の抗体。
- [13] 細胞障害活性がCDC活性である請求項11に記載の抗体。
- [14] 更に付加的にEREGタンパク質に対する中和活性を有することを特徴とする請求項10から請求項13のいずれかに記載の抗体。
- [15] 細胞増殖阻害活性が中和活性である請求項10に記載の抗体。
- [16] 請求項10に記載の抗体から作成される低分子化抗体。
- [17] 化学療法剤、または、毒性ペプチドを結合した請求項10から請求項16のいずれかに記載の抗体。
- [18] EREGタンパク質に結合する抗体であって、化学療法剤、毒性ペプチド、および放射性同位元素からなる群から選択されたいずれかの細胞障害性物質が結合された抗体。
- [19] 以下(1)から(57)のいずれかに記載の抗体である、請求項10から請求項18のいずれかに記載の抗体；
- (1) CDR1として配列番号: 2に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号: 4に記載

のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:6に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(2) (1)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:8に記載のアミノ酸配列の117から452位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(3) (1)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(4) CDR1として配列番号:12に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:14に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:16に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(5) (4)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:18に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(6) (4)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(7) (1)に記載のH鎖、および(4)に記載のL鎖を含む抗体、

(8) (2)に記載のH鎖、および(5)に記載のL鎖を含む抗体、

(9) (3)に記載のH鎖、および(6)に記載のL鎖を含む抗体、

(10) CDR1として配列番号:49に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:51に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:53に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(11) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:149に記載のアミノ酸配列の118から441位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(12) (10)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(13) CDR1として配列番号:55に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:57に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:59に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(14) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:151に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、



- (15) (13)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (16) (10)に記載のH鎖、および(13)に記載のL鎖を含む抗体、
- (17) (11)に記載のH鎖、および(14)に記載のL鎖を含む抗体、
- (18) (12)に記載のH鎖、および(15)に記載のL鎖を含む抗体、
- (19) CDR1として配列番号:61に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:63に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:65に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (20) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:153に記載のアミノ酸配列の116から439位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (21) (19)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (22) CDR1として配列番号:67に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:69に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:71に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (23) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:155に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (24) (22)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、
- (25) (19)に記載のH鎖、および(22)に記載のL鎖を含む抗体、
- (26) (20)に記載のH鎖、および(23)に記載のL鎖を含む抗体、
- (27) (21)に記載のH鎖、および(24)に記載のL鎖を含む抗体、
- (28) CDR1として配列番号:73に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:75に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:77に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (29) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:157に記載のアミノ酸配列の119から442位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、
- (30) (28)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の1

17から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(31) CDR1として配列番号:79に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:81に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:83に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(32) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:159に記載のアミノ酸配列の109から215位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(33) (31)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(34) (28)に記載のH鎖、および(31)に記載のL鎖を含む抗体、

(35) (29)に記載のH鎖、および(32)に記載のL鎖を含む抗体、

(36) (30)に記載のH鎖、および(33)に記載のL鎖を含む抗体、

(37) CDR1として配列番号:85に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:87に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:89に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(38) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:161に記載のアミノ酸配列の117から440位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(39) (37)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(40) CDR1として配列番号:91に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:93に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:95に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(41) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:163に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(42) (40)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(43) (37)に記載のH鎖、および(40)に記載のL鎖を含む抗体、

(44) (38)に記載のH鎖、および(41)に記載のL鎖を含む抗体、

(45) (39)に記載のH鎖、および(42)に記載のL鎖を含む抗体、

(46) CDR1として配列番号:97に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:99に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:101に記載のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(47) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:165に記載のアミノ酸配列の113から436位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(48) (46)に記載のH鎖であって、CHとして配列番号:10に記載のアミノ酸配列の117から446位のアミノ酸配列を有するH鎖を含む抗体、

(49) CDR1として配列番号:103に記載のアミノ酸配列、CDR2として配列番号:105に記載のアミノ酸配列、およびCDR3として配列番号:107に記載のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(50) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:167に記載のアミノ酸配列の108から214位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(51) (49)に記載のL鎖であって、CLとして配列番号:20に記載のアミノ酸配列の107から213位のアミノ酸配列を有するL鎖を含む抗体、

(52) (46)に記載のH鎖、および(49)に記載のL鎖を含む抗体、

(53) (47)に記載のH鎖、および(50)に記載のL鎖を含む抗体、

(54) (48)に記載のH鎖、および(51)に記載のL鎖を含む抗体、

(55) (1)から(54)のいずれかに記載の抗体において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入された抗体であって、(1)から(54)のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体、

(56) (1)から(55)のいずれかに記載の抗体が結合するEREGタンパク質のエピトープと同じエピトープに結合する抗体、

(57) (1)から(56)のいずれかに記載の抗体の低分子化抗体。

[20] 配列番号:21に記載のアミノ酸配列において、29番目のAlaから69番目のSer、又は63番目のValから108番目のLeuを認識することを特徴とする、請求項10から請求項20のいずれかに記載の抗体。

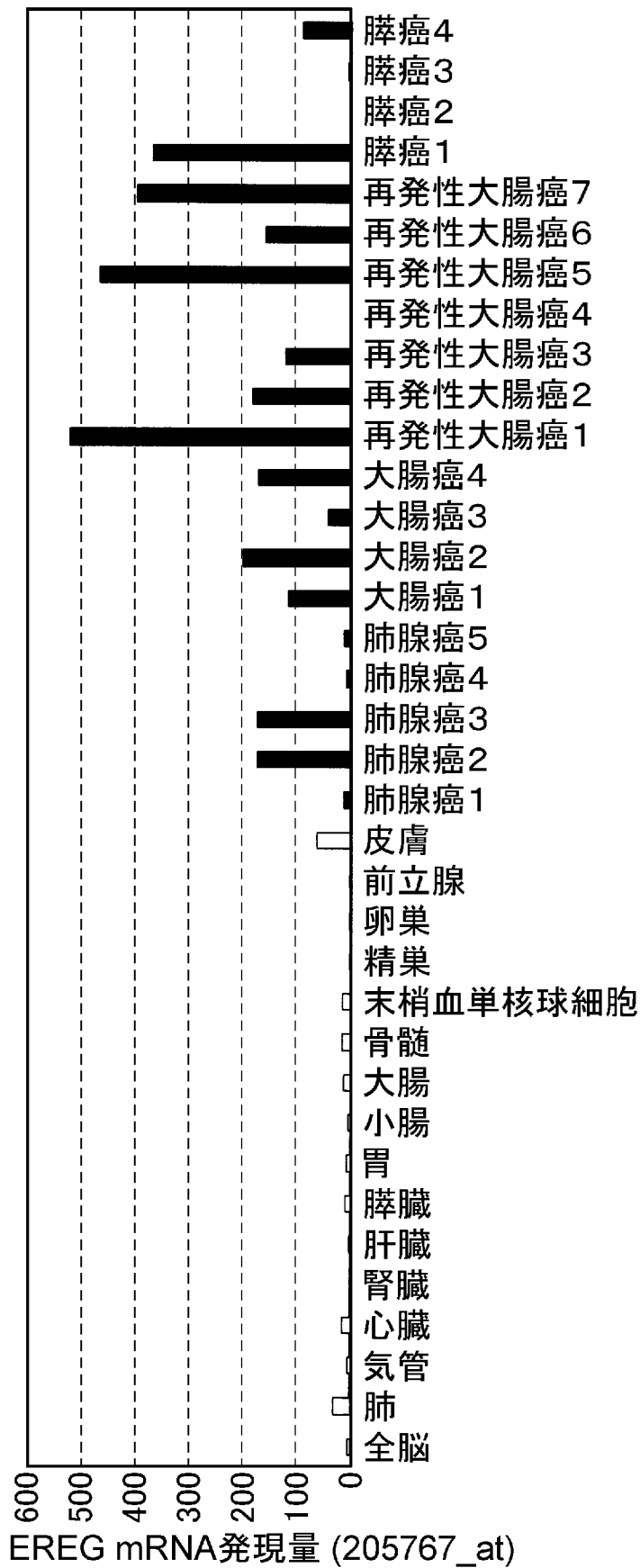
[21] 癌診断マーカーとしてのEREGタンパク質およびEREGのmRNAのいずれか、または両方の使用。

- [22] EREGタンパク質に結合する抗体をEREGタンパク質に結合させる工程を含む癌の診断方法。
- [23] 以下の工程：  
(a) 被検者から試料を採取する工程；  
(b) 採取された試料に含まれるEREGタンパク質を、EREGタンパク質に結合する抗体を用いて検出する工程  
を含む癌の診断方法。
- [24] (1)放射性同位元素で標識されたEREGタンパク質に結合する抗体を被検者に投与する工程、および(2)前記放射性同位元素の集積を検出する工程を含む癌の診断方法。
- [25] 放射性同位元素が、陽電子放出核種である請求項22に記載の診断方法。
- [26] 陽電子放出核種が $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{45}\text{Ti}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{66}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、および $^{124}\text{I}$ からなる群から選択されるいずれかの核種である請求項25に記載の診断方法。
- [27] EREGタンパク質をコードする遺伝子の発現を検出することを特徴とする癌の診断方法。
- [28] 癌が、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、および腎癌からなる群から選択されるいずれかの癌である請求項22から請求項27のいずれかに記載の診断方法。
- [29] 癌が、原発性の癌である請求項28に記載の診断方法。
- [30] 癌が、転移性の癌である請求項28に記載の診断方法。
- [31] EREGタンパク質に結合する抗体を含む、癌の診断方法に用いるための診断薬。
- [32] EREGタンパク質に結合する抗体と、EREGタンパク質を含む生体試料を含む、癌の診断方法に用いるためのキット。
- [33] 次の工程を含む、癌の治療剤の候補化合物のスクリーニング方法；  
(1)EREG発現細胞に被験化合物を接触させる工程、  
(2)EREG発現細胞におけるEREGの発現レベルを測定する工程、および  
(3)対照と比較して、EREGの発現レベルを低下させる化合物を癌の治療剤の候補化合物として選択する工程。
- [34] EREGの発現レベルが、培養上清中に分泌されるEREG蛋白質のレベルによって評

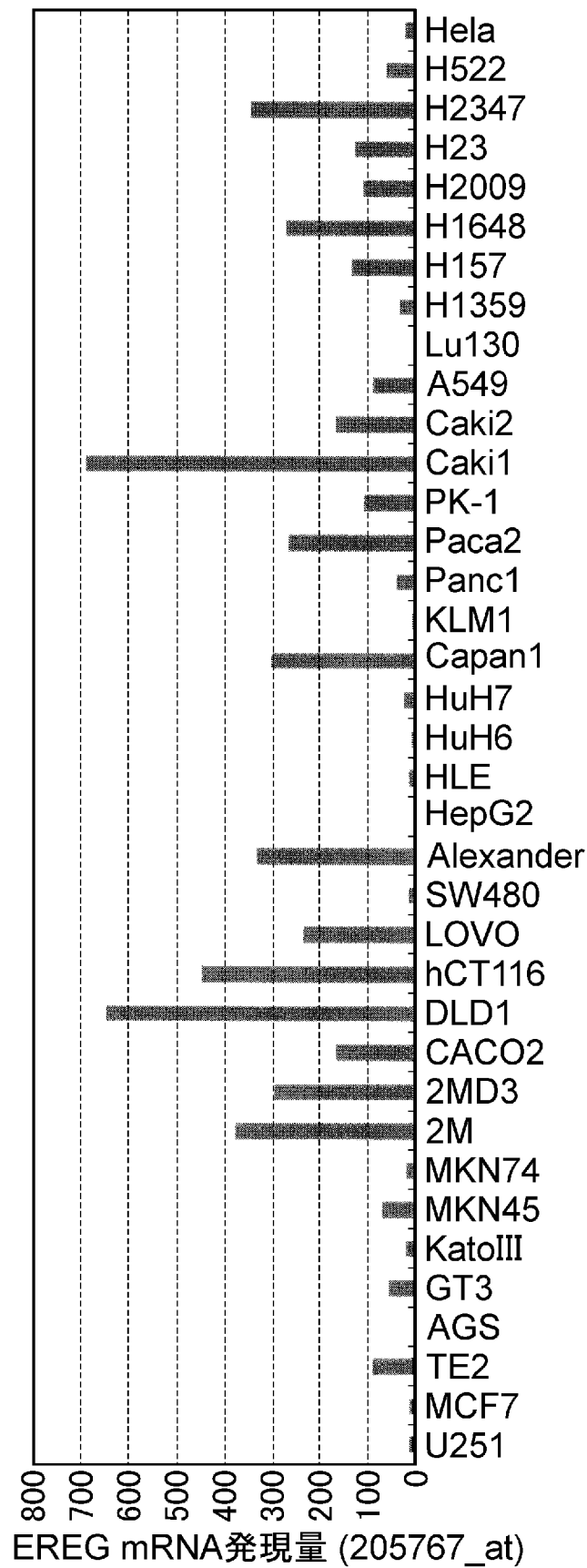
価される請求項33に記載の方法。

- [35] 次の工程を含む、癌の治療剤の候補化合物のスクリーニング方法；
- (1) EREG依存的に増殖する細胞を、EREGと被験化合物の存在下で培養する工程、
  - (2) 細胞増殖レベルを測定する工程、および
  - (3) 対照と比較して細胞増殖を抑制した被験化合物を癌の治療剤の候補化合物として選択する工程。

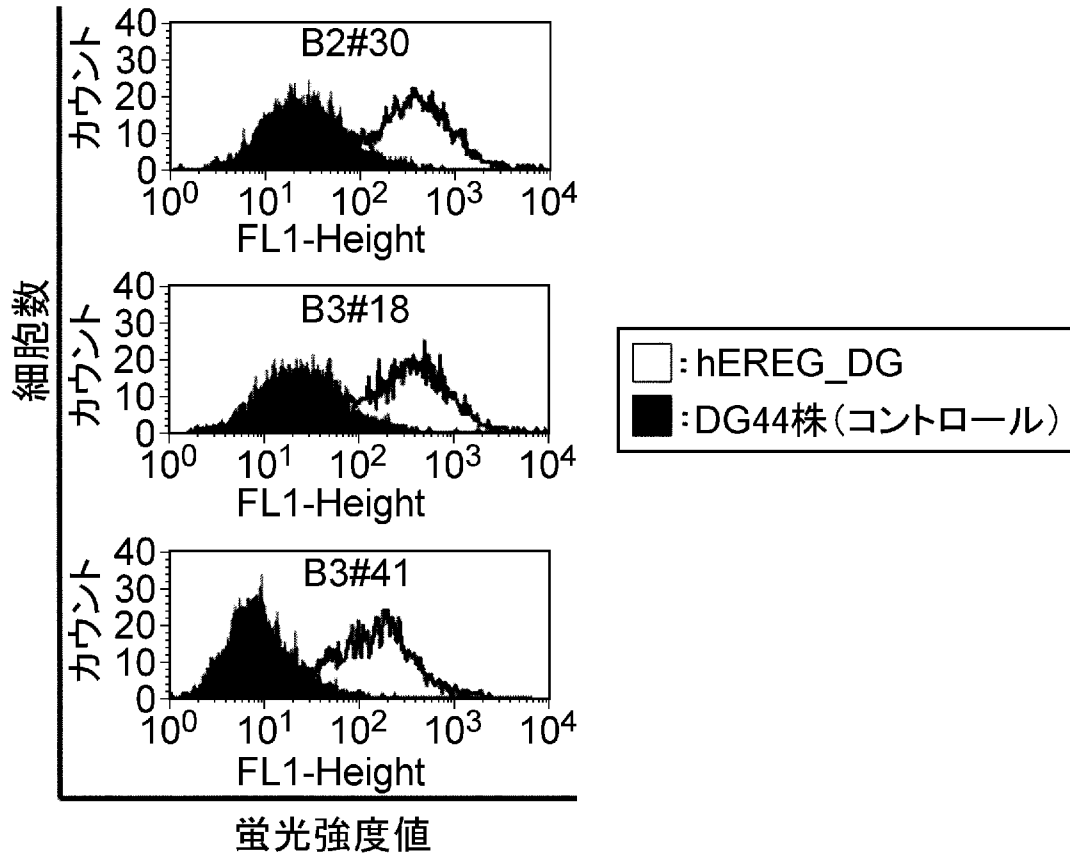
[図1]



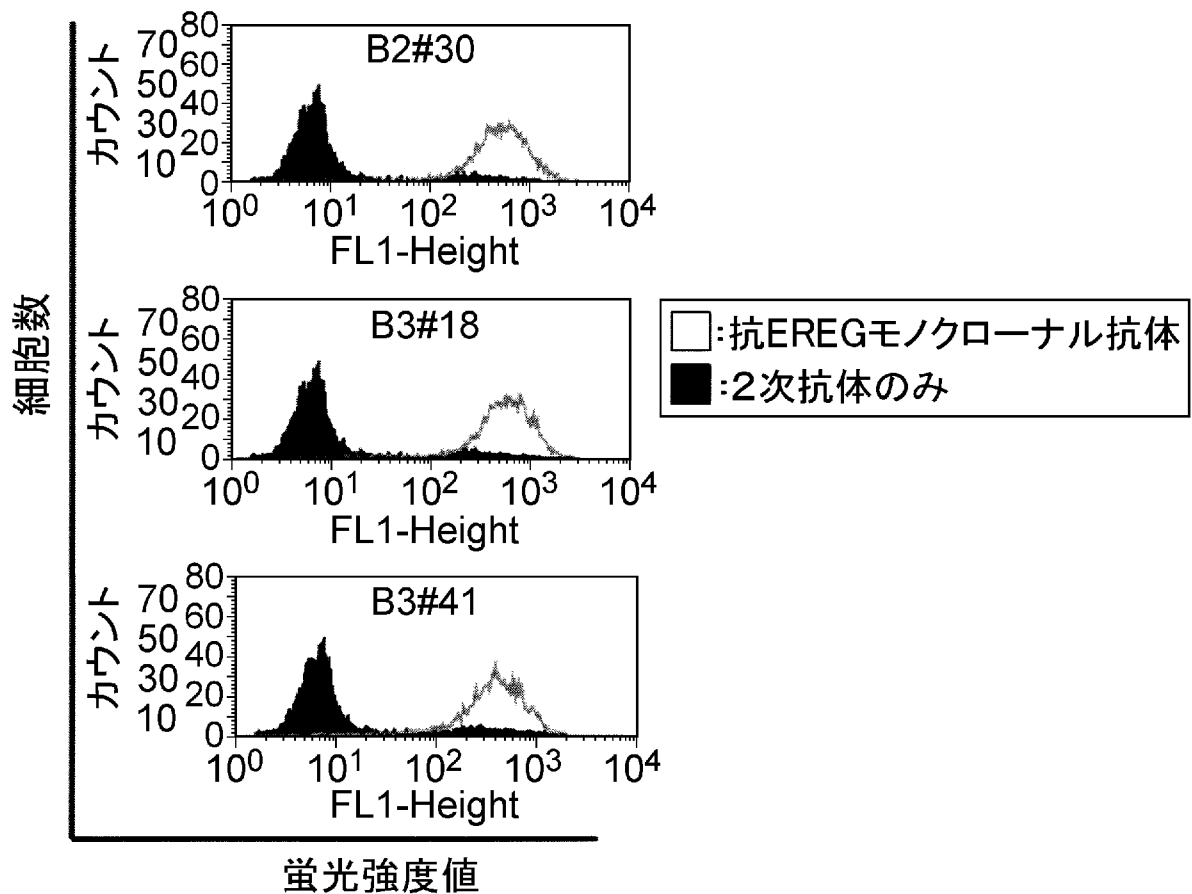
[図2]



[図3]

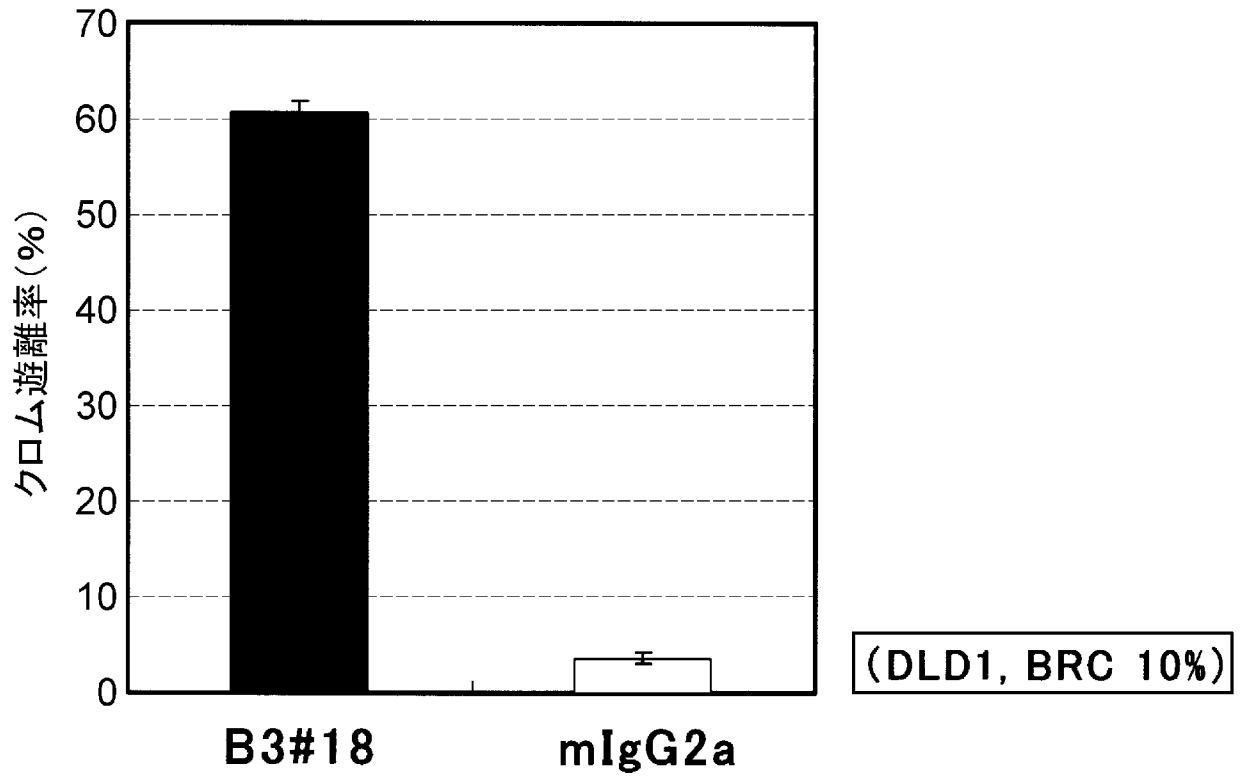


[図4]

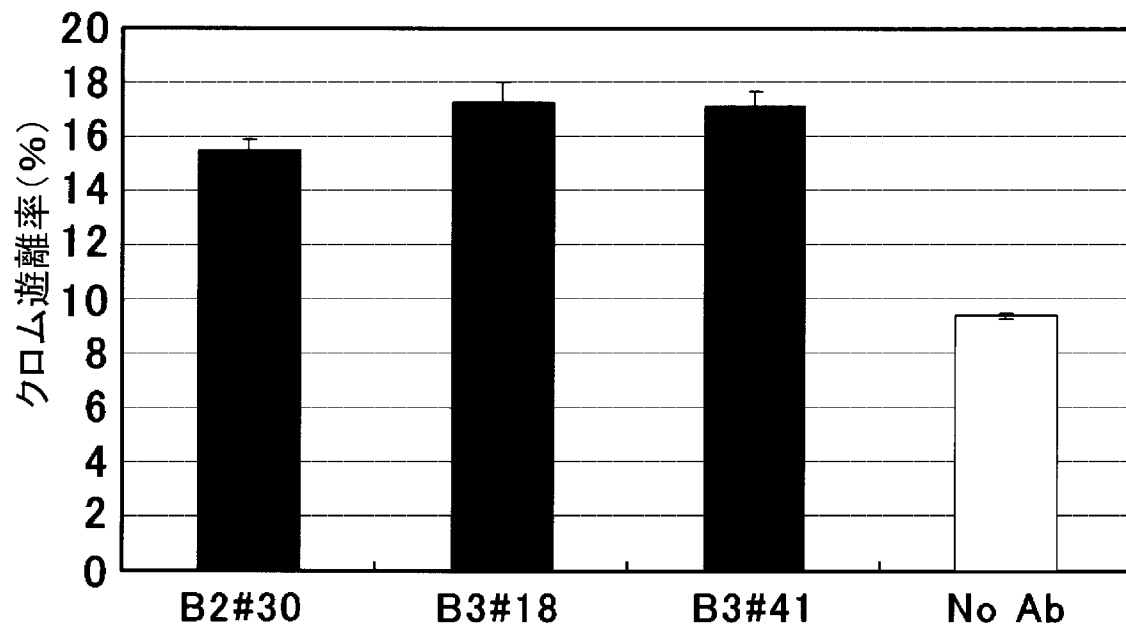




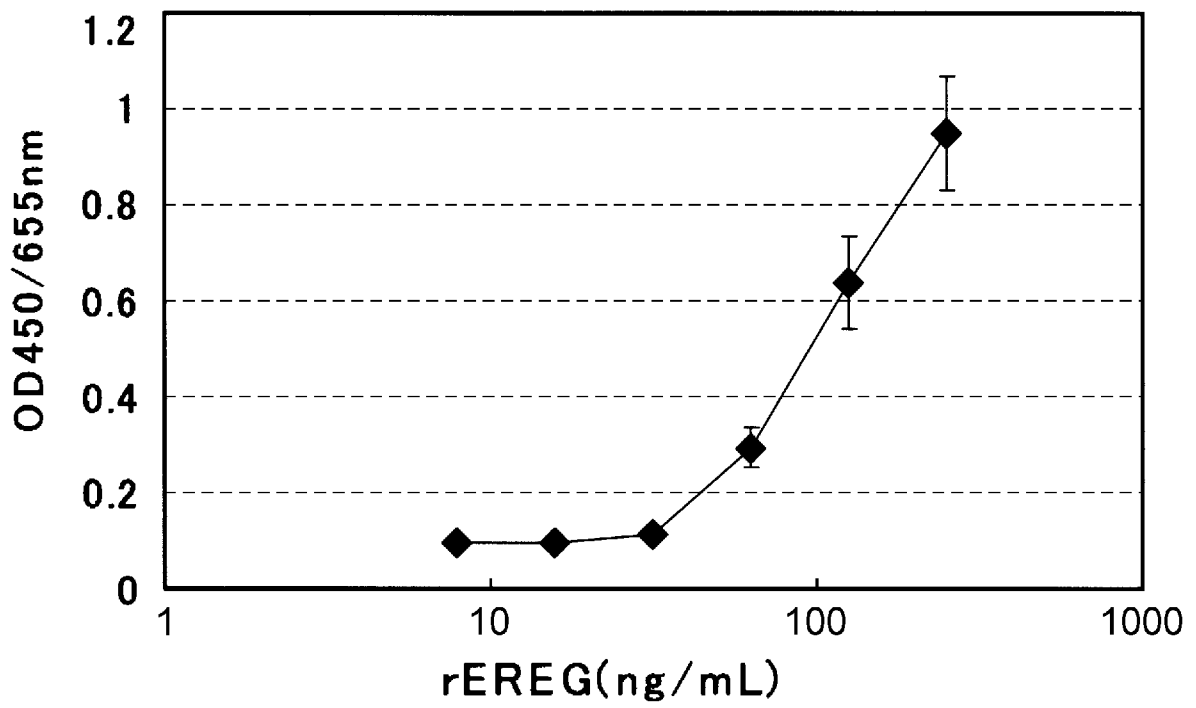
[図5]



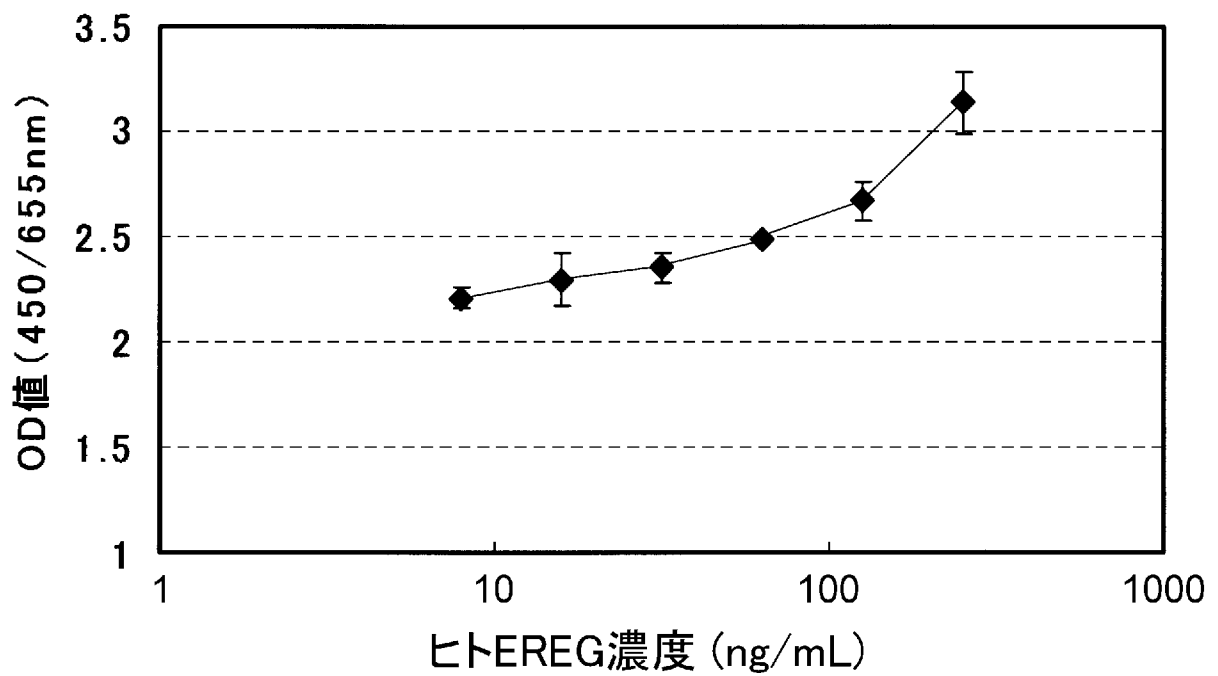
[図6]



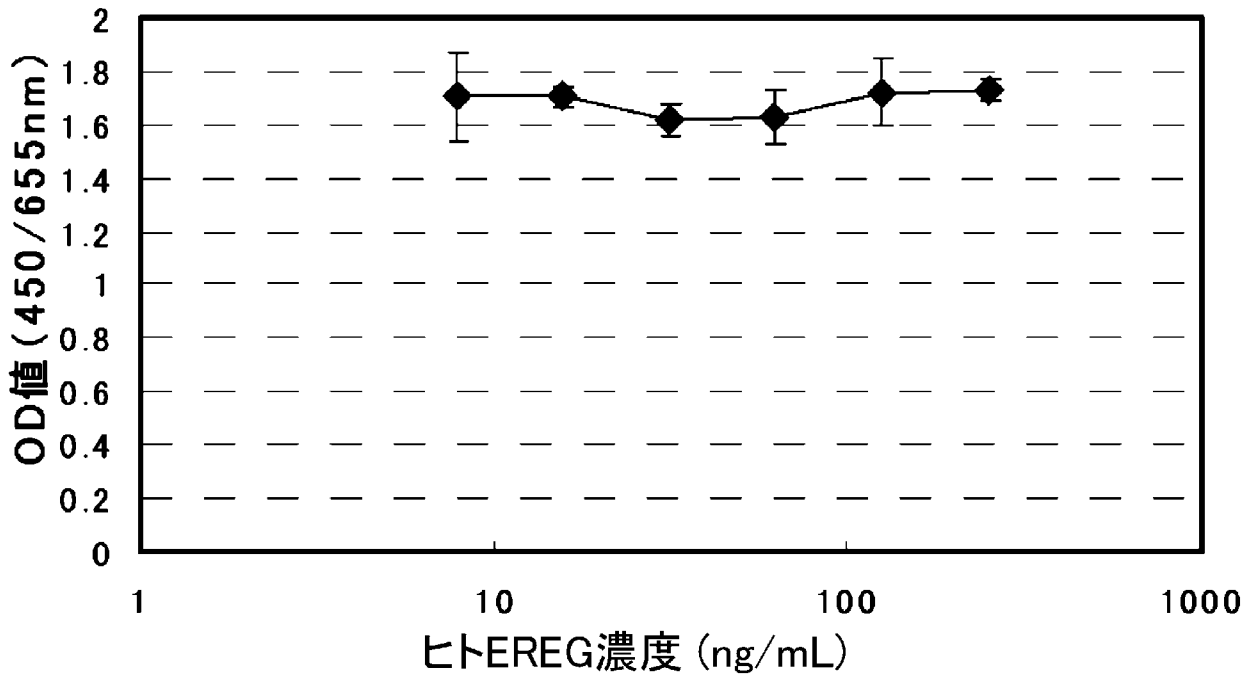
[図7]



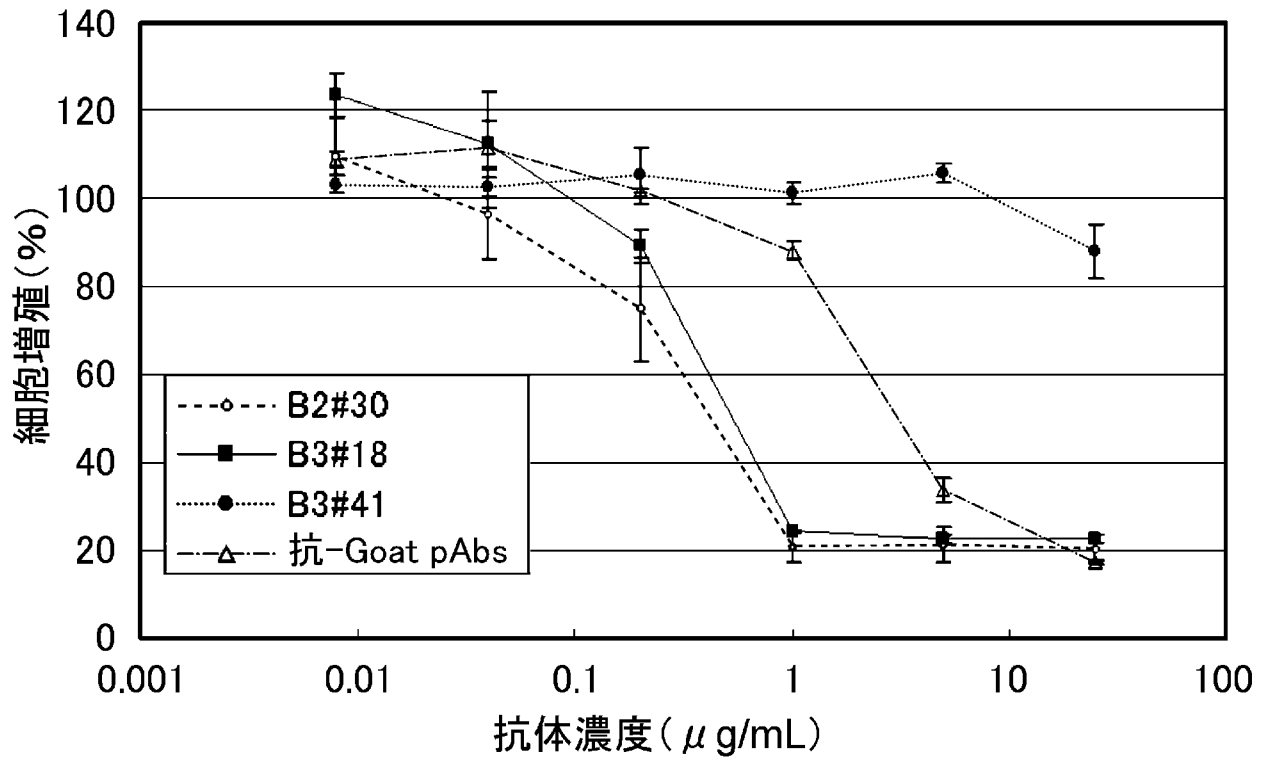
[図8]



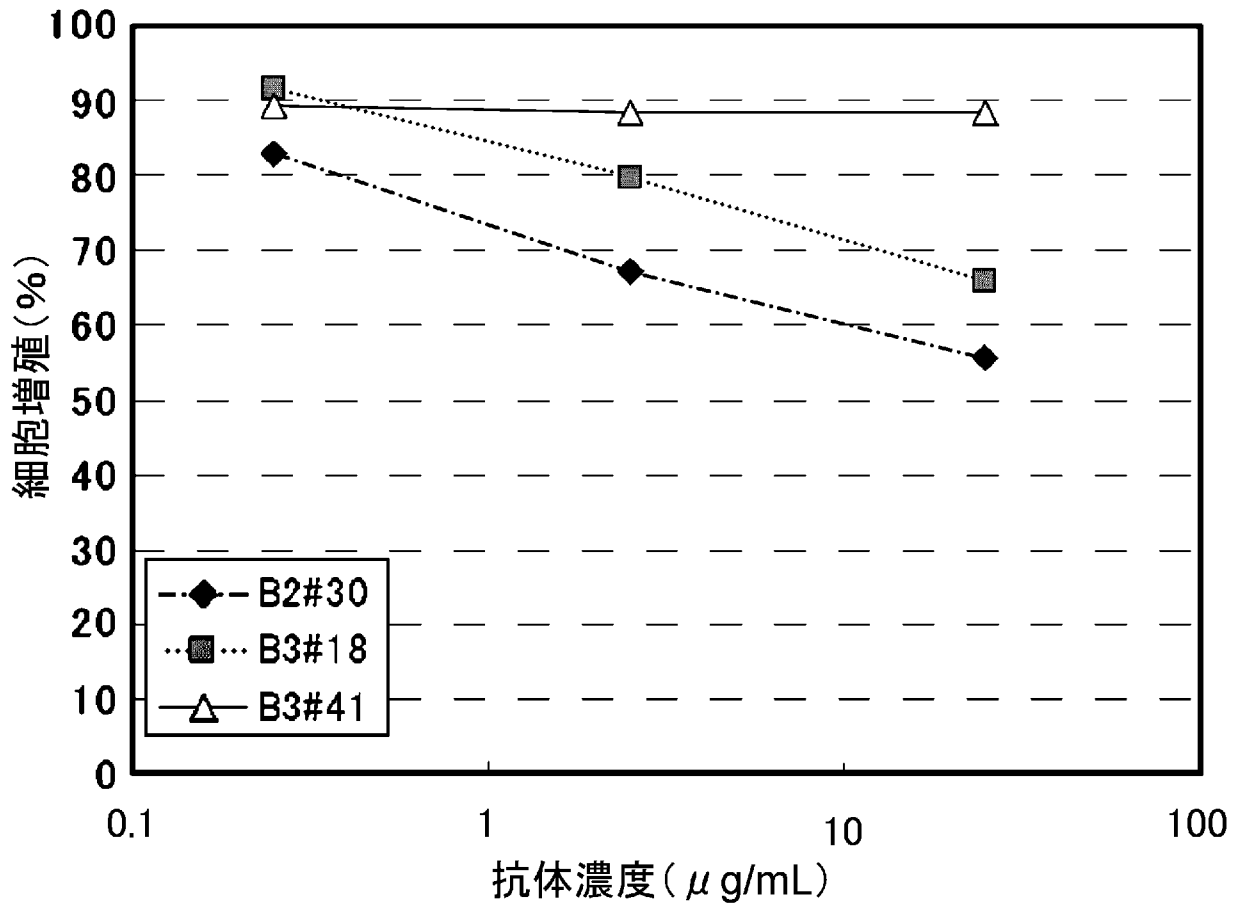
[図9]



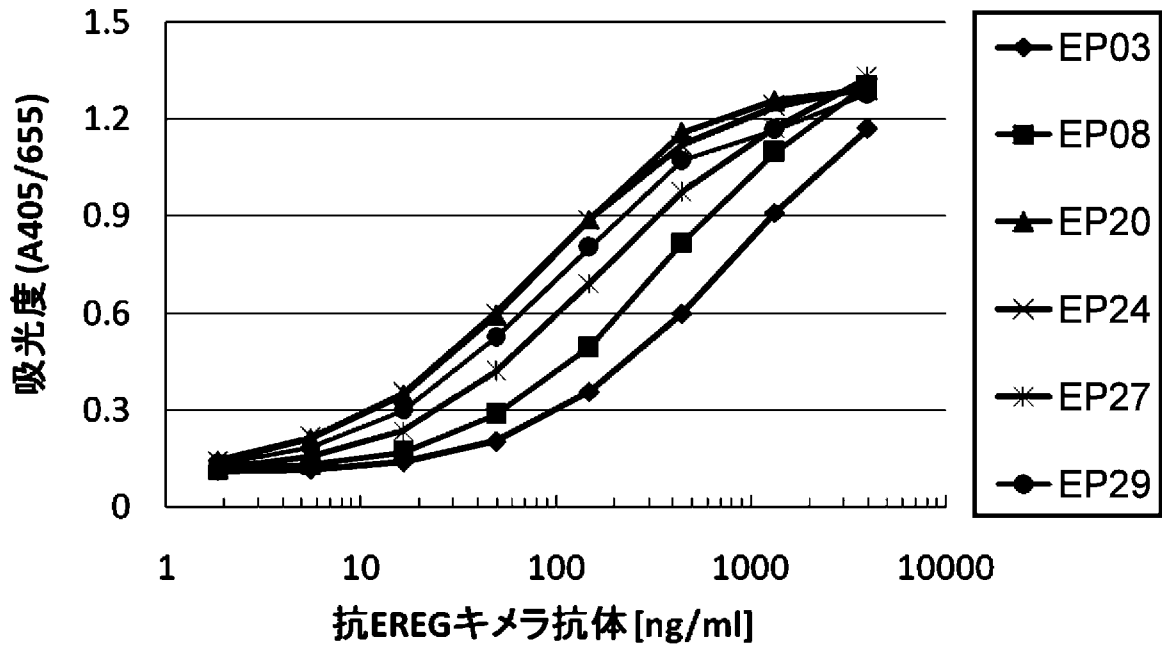
[図10]



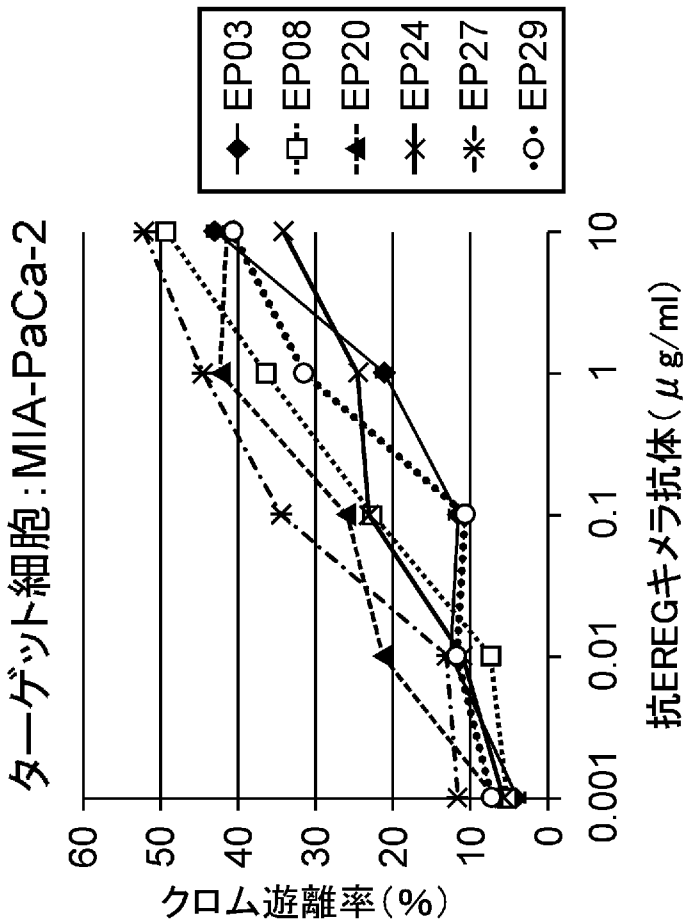
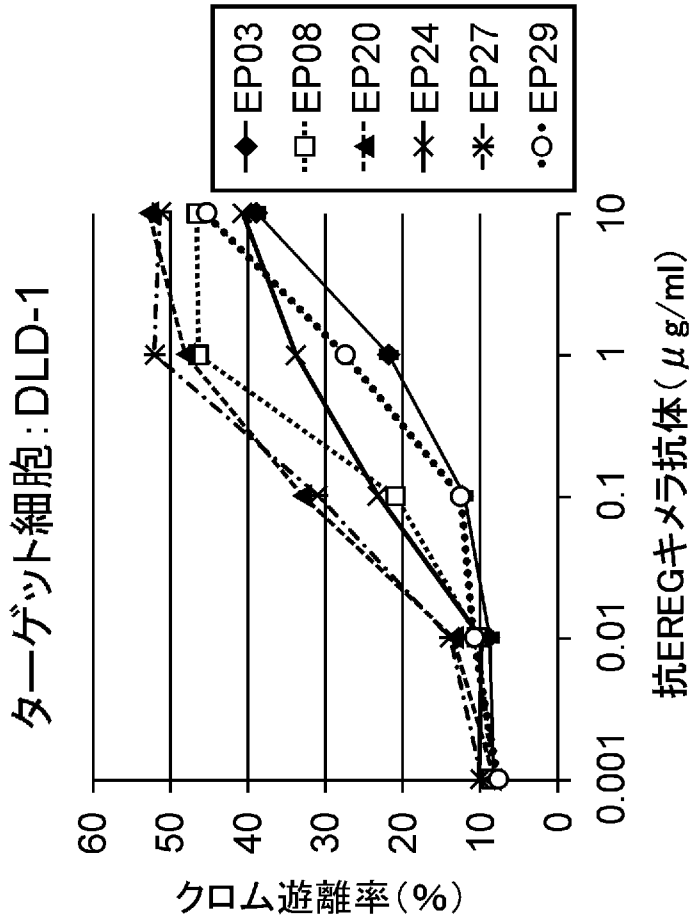
[図11]



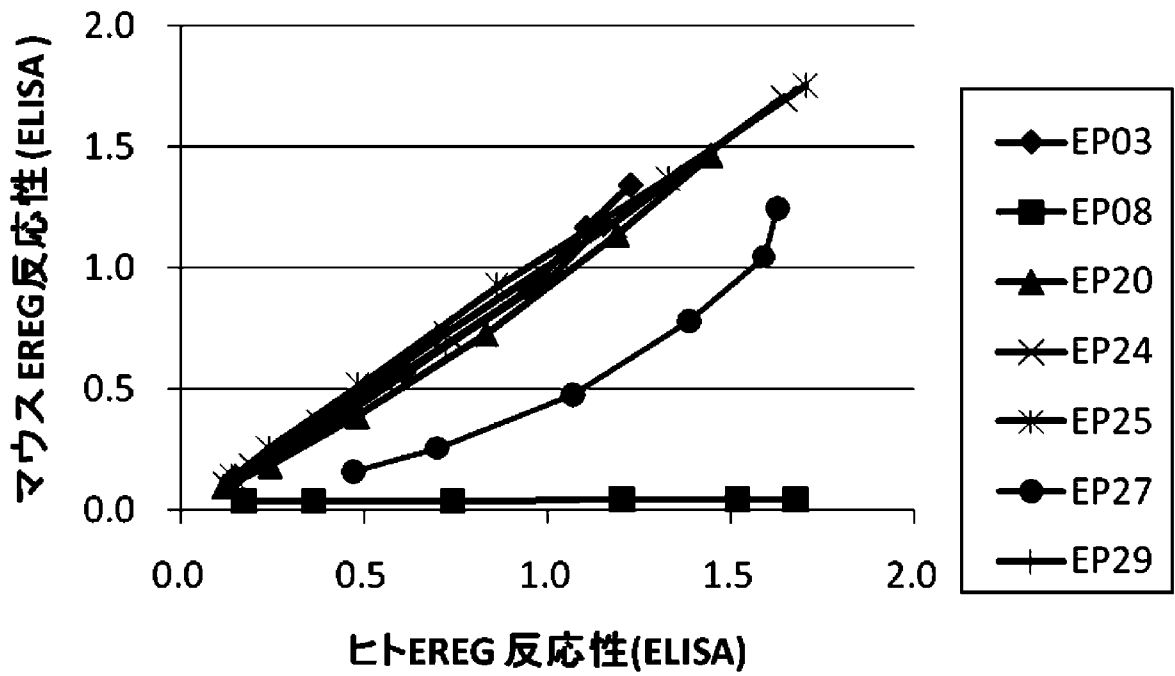
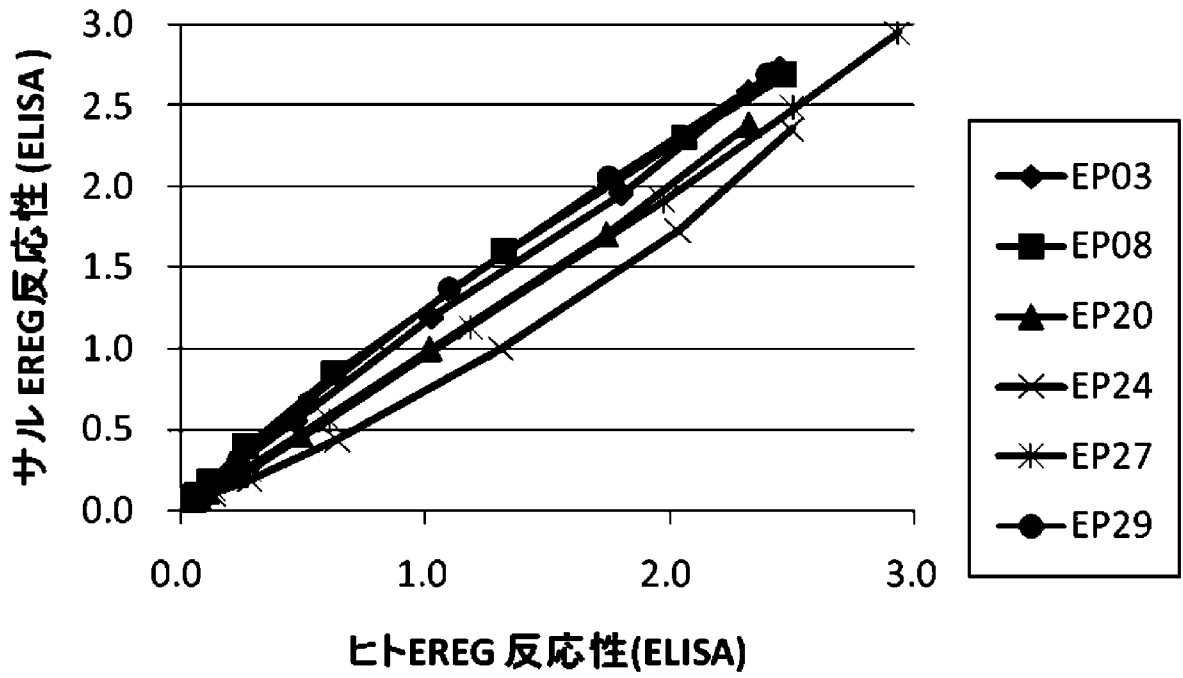
[図12]



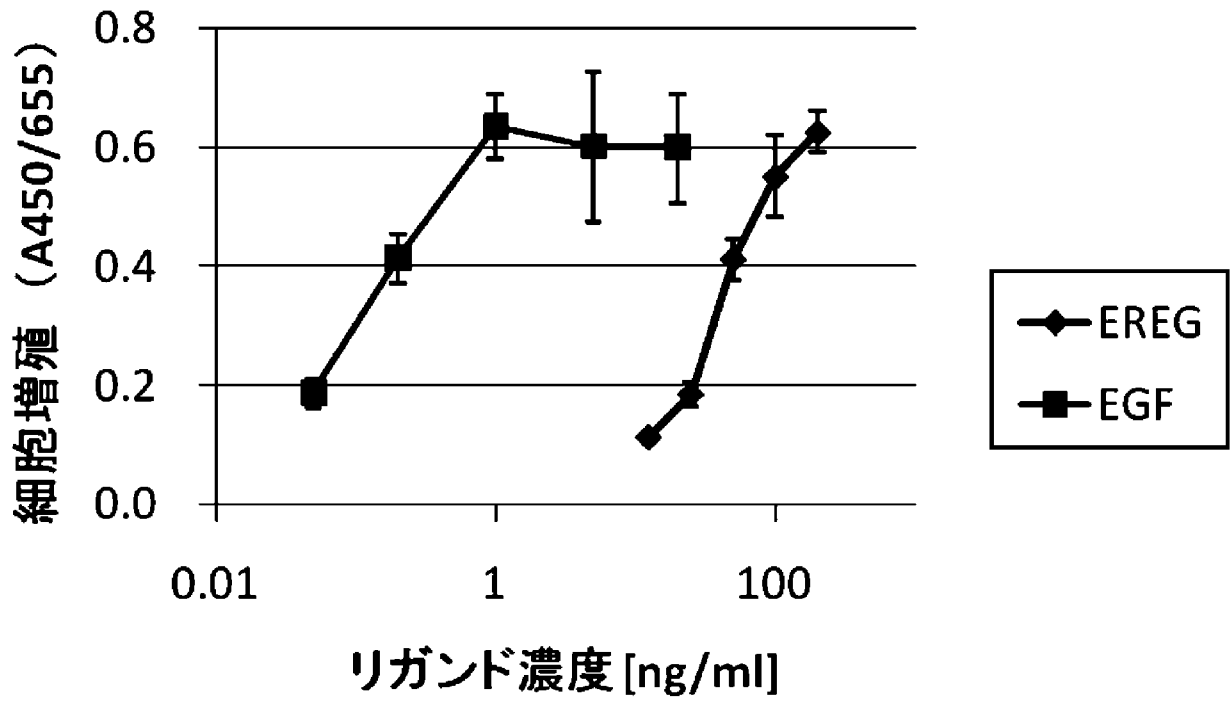
[図13]



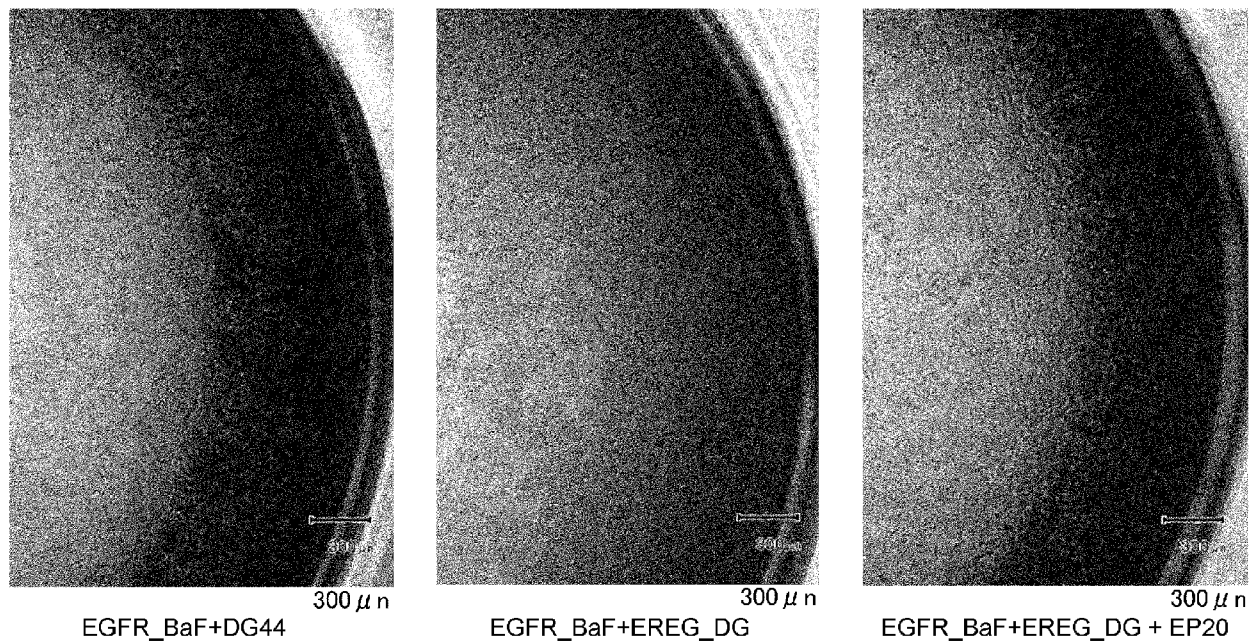
[図14]



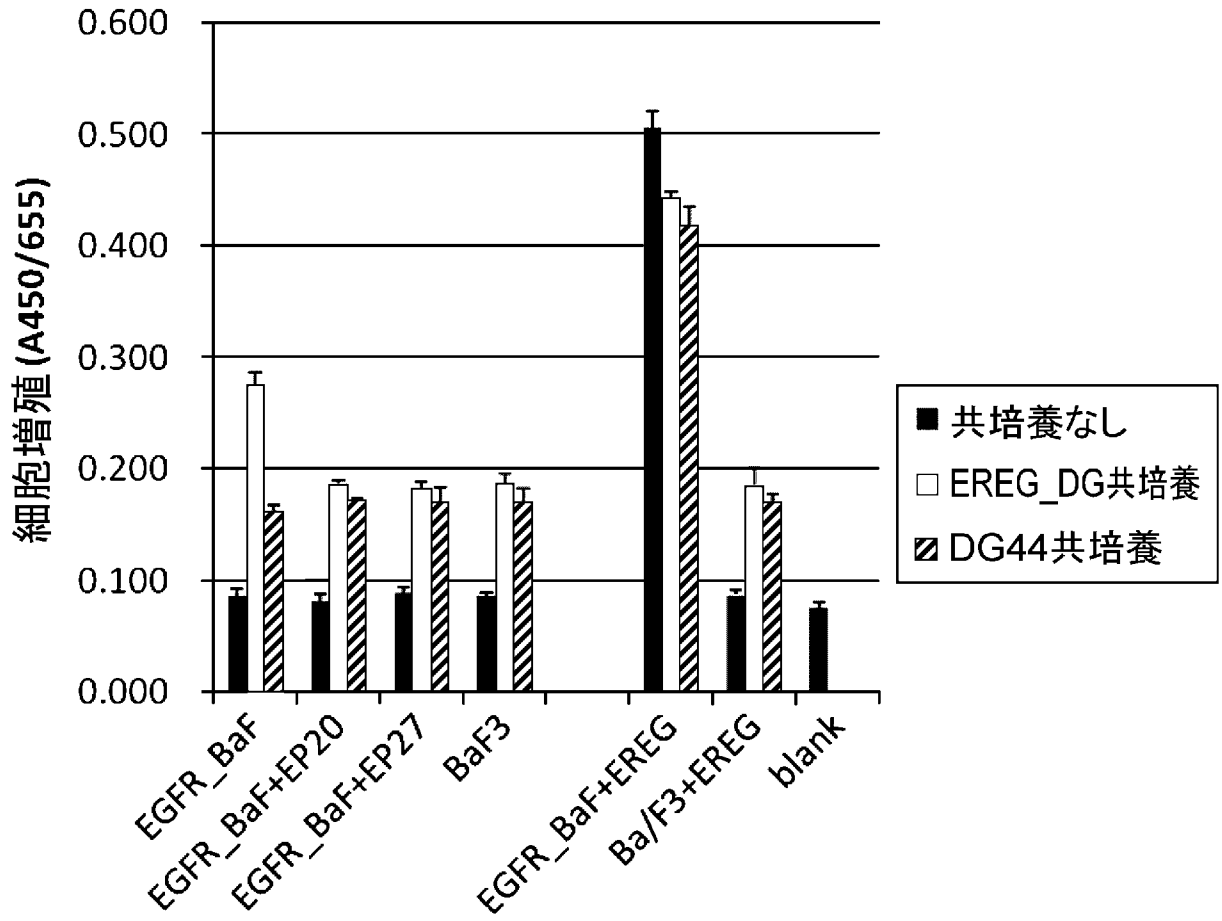
[図15]



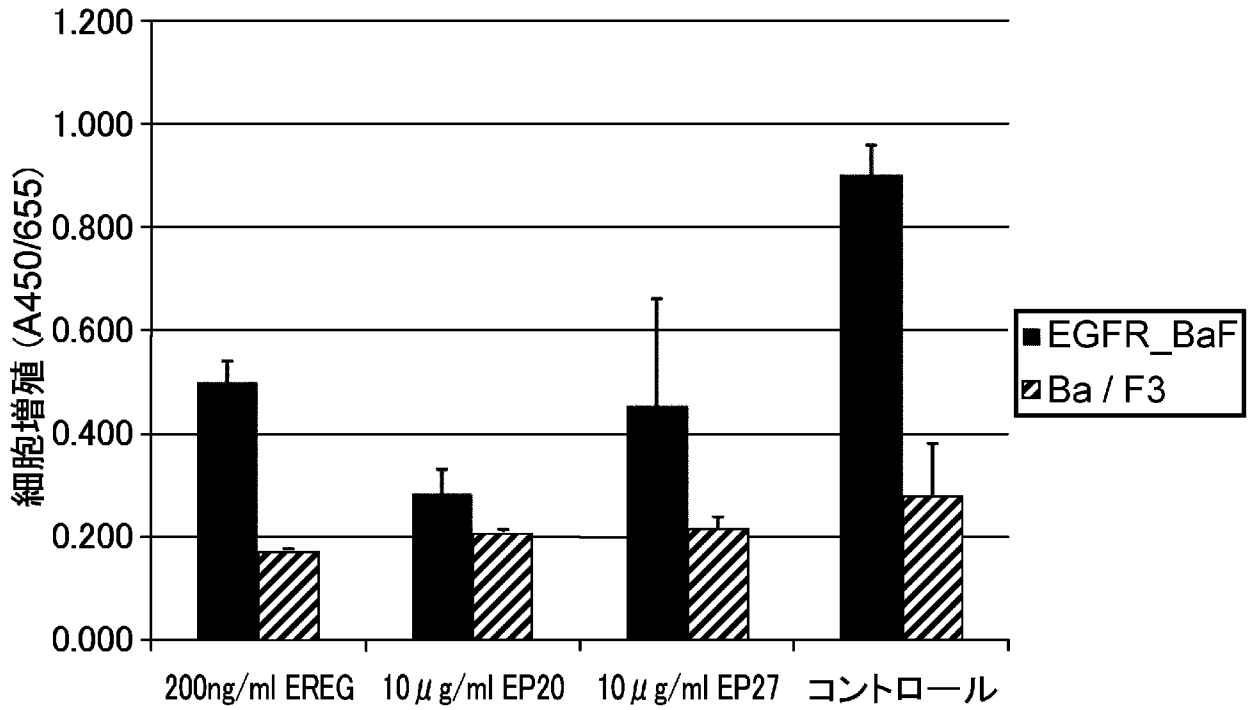
[図16]



[図17]

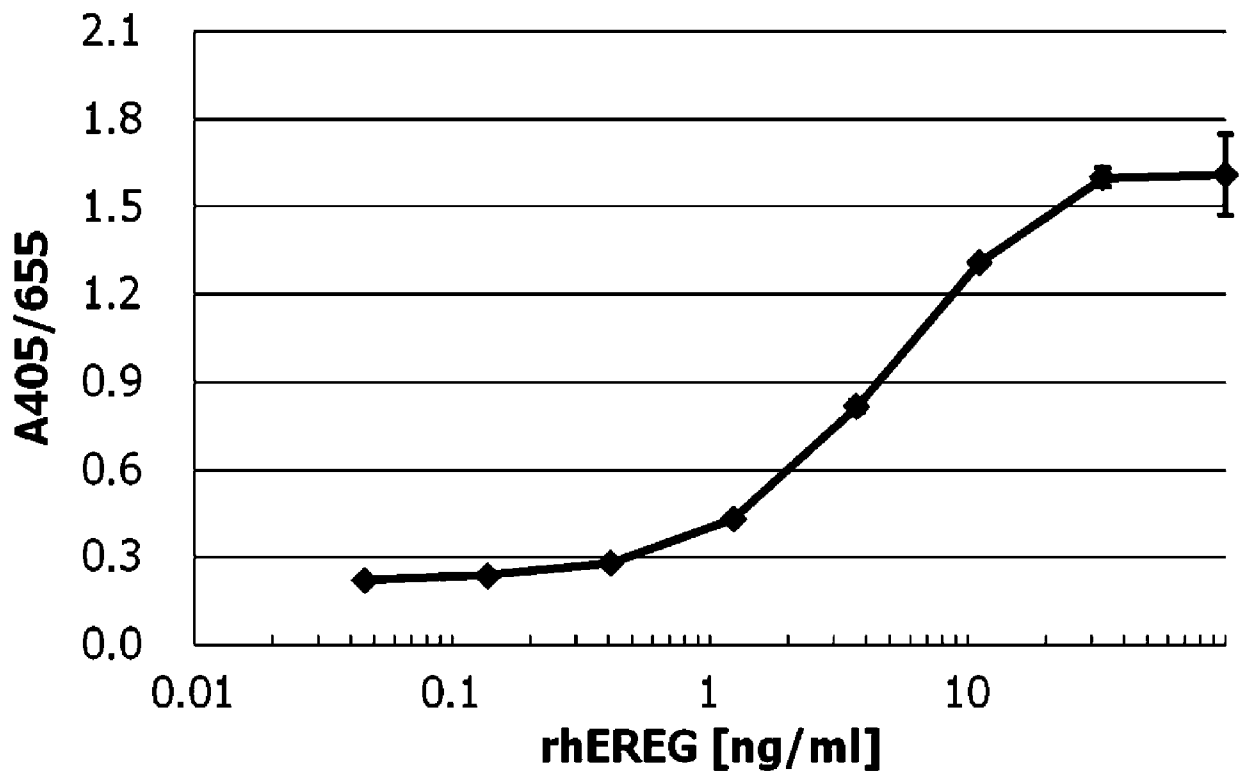


[図18]





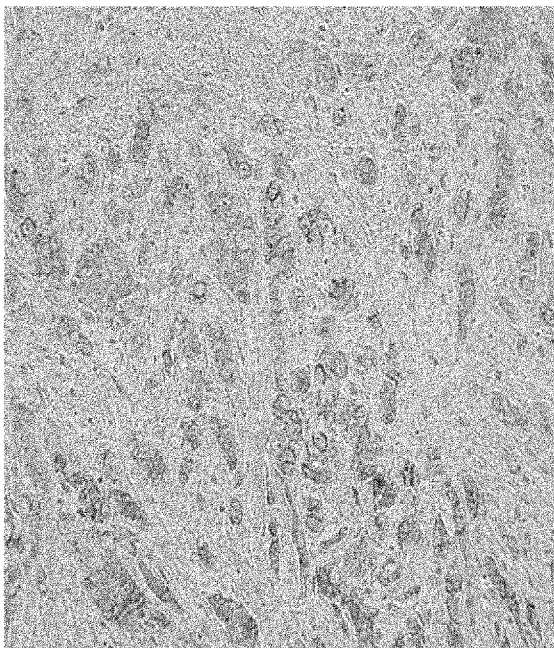
[図19]



[図20]

大腸癌(原発)

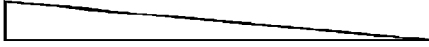
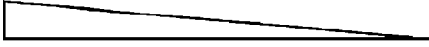
非癌部



[図21-1]

検出抗E R E Gキメラ抗体

マウス抗E R E G抗体により捕捉された抗原タンパク質  
 EREG(63-108)  
 EREG 細胞外ドメイン-Fc

	EPO3				EPO8			
EP26	-0.001	0.001	-0.001	-0.002	0.002	0.001	0.001	-0.004
EP30	0.002	0.004	0.001	-0.002	-0.007	0.001	-0.006	-0.006
EP29	0.010	0.007	-0.001	-0.002	0.001	0.006	0.005	0.000
EP33	0.012	0.011	0.005	0.005	0.009	0.010	0.010	0.004
EP18	0.007	0.010	0.007	0.008	0.007	0.004	0.002	0.000
EP31	-0.007	0.005	0.003	-0.001	0.005	0.010	0.007	0.001
EP04	0.022	0.018	0.008	0.006	0.019	0.012	0.007	0.001
EP09	0.009	0.012	0.005	0.003	0.013	0.012	0.008	0.001
EP22	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	-0.003
EP32	0.004	0.006	0.002	0.001	0.003	0.005	0.003	0.001
EP19	-0.006	-0.001	-0.009	-0.008	0.014	0.014	0.007	-0.001
EP24	-0.006	0.004	0.000	0.002	0.002	0.003	0.005	0.003
EP06	0.012	0.015	0.007	0.006	0.012	0.014	0.010	0.005
EP10	0.019	0.018	0.004	0.002	0.017	0.008	0.008	0.001
EP14	0.007	0.009	0.009	0.007	0.008	0.009	0.011	0.007
EP25	-0.001	0.003	-0.001	0.000	0.004	0.004	0.004	0.003
EP15	0.164	0.085	0.035	0.020	0.016	0.008	0.007	0.003
EP08	0.014	0.019	0.010	0.007	0.012	0.015	0.013	0.003
EP13	0.017	0.015	0.007	0.008	0.010	0.011	0.008	0.003
EP27	0.011	0.009	0.002	0.001	0.007	0.006	0.008	0.002
EP28	-0.003	0.026	-0.004	-0.007	0.031	-0.001	-0.001	-0.003
EP23	0.005	0.011	0.008	0.009	0.008	0.010	0.006	0.003
EP05	0.009	0.007	-0.001	-0.005	0.006	0.002	-0.002	-0.006
EP11	0.010	0.009	0.000	0.003	0.001	0.004	0.006	0.001
EP16	0.007	0.008	0.005	0.003	0.002	0.008	0.011	0.005
EP02	0.070	0.068	0.056	0.051	0.089	0.066	0.050	0.029
EP03	-0.005	-0.004	-0.014	-0.017	-0.001	-0.011	0.070	0.034
EP20	1.585	1.502	1.088	0.722	1.375	1.110	0.900	0.536
EP12	0.568	0.388	0.189	0.088	-0.012	-0.015	-0.019	-0.023
EP07	0.493	0.294	0.132	0.054	0.015	0.013	0.011	0.002
EP17	0.574	0.395	0.207	0.101	0.002	0.001	-0.004	-0.007
								
EP26	0.007	0.007	0.007	0.008	0.005	0.005	0.004	0.005
EP30	0.012	0.005	0.001	-0.003	0.005	-0.005	-0.002	-0.006
EP29	0.002	0.004	0.004	0.010	0.038	0.035	0.029	0.011
EP33	0.004	0.007	0.006	0.007	0.053	0.048	0.045	0.025
EP18	0.005	0.009	0.008	0.006	0.001	0.002	0.002	0.001
EP31	-0.002	-0.003	0.000	-0.002	0.005	0.009	0.011	0.005
EP04	0.006	0.008	0.007	0.009	0.001	-0.003	-0.001	-0.001
EP09	0.006	0.007	0.007	0.004	0.005	0.003	0.003	0.001
EP22	0.003	0.000	0.004	0.004	0.000	-0.003	0.000	0.000
EP32	0.000	0.000	0.004	0.002	0.000	0.001	0.003	-0.001
EP19	0.010	0.016	0.017	0.018	0.015	0.017	0.017	0.013
EP24	0.014	0.007	0.009	0.003	0.001	-0.001	0.002	-0.003
EP06	0.014	0.013	0.012	0.007	0.012	0.011	0.008	0.004
EP10	0.031	0.033	0.014	0.014	0.004	-0.001	-0.003	0.001
EP14	0.025	0.024	0.020	0.008	0.010	0.007	0.009	0.004
EP25	0.061	0.021	0.022	0.008	0.016	0.010	0.007	0.000
EP15	0.613	0.596	0.498	0.329	0.006	0.007	0.009	0.010
EP08	0.460	0.415	0.300	0.142	0.010	0.013	0.013	0.007
EP13	0.377	0.364	0.288	0.167	0.006	0.002	0.003	0.002
EP27	0.004	0.004	0.007	0.002	0.006	0.001	0.000	-0.002
EP28	-0.003	-0.010	0.002	-0.002	0.002	0.004	0.005	-0.005
EP23	0.003	0.005	0.006	0.005	0.003	0.003	0.006	0.004
EP05	0.088	0.069	0.046	0.022	-0.001	0.002	-0.001	-0.004
EP11	0.080	0.075	0.057	0.033	0.001	-0.001	-0.001	0.000
EP16	0.086	0.064	0.039	0.023	0.008	0.005	-0.002	0.001
EP02	0.017	0.020	0.015	0.016	0.015	0.006	0.001	-0.005
EP03	-0.011	-0.014	-0.012	-0.012	0.196	0.134	0.097	0.001
EP20	0.919	0.849	0.647	0.391	0.268	0.223	0.163	0.087
EP12	0.839	0.833	0.681	0.418	-0.011	-0.013	-0.013	-0.015
EP07	0.992	0.949	0.718	0.422	0.012	0.016	0.011	0.009
EP17	1.012	1.009	0.873	0.556	0.005	0.008	0.014	0.027

[図21-2]

検出抗E R E Gキメラ抗体

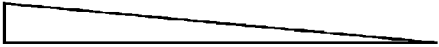
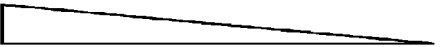
マウス抗E R E G抗体により捕捉された抗原タンパク質  
ERE G(63-108)  
ERE G 細胞外ドメイン-Fc

	EP20				EP24			
EP26	0.743	0.841	0.719	0.563	0.736	0.623	0.419	0.290
EP30	0.564	0.610	0.642	0.496	0.764	0.660	0.588	0.424
EP29	-0.008	-0.003	0.002	-0.004	0.209	0.067	0.018	-0.001
EP33	0.000	0.003	0.001	0.002	0.210	0.073	0.022	0.003
EP18	0.001	-0.001	-0.002	-0.005	0.196	0.061	0.021	0.001
EP31	0.001	0.004	0.001	-0.003	0.197	0.063	0.022	0.009
EP04	0.023	0.009	0.004	0.000	0.374	0.124	0.031	0.001
EP09	0.004	0.006	0.001	-0.002	0.295	0.106	0.030	0.009
EP22	0.000	0.000	0.001	-0.002	0.270	0.105	0.054	0.032
EP32	-0.002	0.005	0.000	-0.002	0.242	0.088	0.029	0.007
EP19	-0.008	-0.004	-0.006	-0.009	0.240	0.066	0.007	0.000
EP24	-0.003	0.002	0.003	0.000	0.231	0.077	0.025	0.006
EP06	0.044	0.068	0.073	0.087	0.351	0.160	0.063	0.021
EP10	0.029	0.020	0.017	0.013	0.326	0.134	0.056	0.020
EP14	0.010	0.012	0.014	0.009	0.239	0.086	0.037	0.012
EP25	0.000	0.006	0.002	0.000	0.266	0.092	0.035	0.011
EP15	0.005	0.000	0.001	-0.004	0.259	0.085	0.022	0.000
EP08	0.096	0.115	0.105	0.079	0.269	0.101	0.032	0.004
EP13	0.087	0.111	0.173	0.166	0.232	0.084	0.091	0.036
EP27	0.385	0.474	0.391	0.311	0.506	0.332	0.197	0.075
EP28	0.351	0.433	0.470	0.371	0.482	0.325	0.220	0.114
EP23	0.047	0.072	0.056	0.040	0.782	0.575	0.463	0.300
EP05	0.156	0.169	0.163	0.147	0.443	0.193	0.090	0.035
EP11	0.109	0.118	0.087	0.067	0.302	0.125	0.047	0.014
EP16	0.024	0.033	0.039	0.037	0.267	0.117	0.056	0.024
EP02	0.338	0.357	0.329	0.238	0.378	0.164	0.066	0.018
EP03	0.082	0.128	0.138	0.116	0.291	0.081	0.019	-0.014
EP20	-0.033	-0.026	0.036	-0.030	0.206	0.039	0.004	0.010
EP12	-0.021	-0.022	0.036	-0.024	0.219	0.050	0.018	0.004
EP07	0.006	0.003	0.008	0.029	0.274	0.080	0.017	0.024
EP17	-0.008	-0.006	-0.011	-0.013	0.220	0.062	0.016	-0.013
EP26	0.575	0.567	0.440	0.312	0.602	0.510	0.386	0.248
EP30	0.605	0.559	0.513	0.329	0.680	0.605	0.546	0.363
EP29	-0.002	-0.005	-0.001	-0.001	0.190	0.074	0.028	0.013
EP33	0.000	-0.003	-0.003	0.000	0.174	0.070	0.016	0.011
EP18	-0.005	-0.005	-0.004	-0.002	0.179	0.057	0.013	0.003
EP31	0.003	-0.003	-0.003	0.000	0.173	0.058	0.023	0.018
EP04	0.003	-0.004	-0.003	-0.005	0.269	0.094	0.033	0.005
EP09	0.009	0.005	0.004	0.000	0.253	0.093	0.035	0.007
EP22	-0.002	-0.002	-0.001	-0.001	0.201	0.072	0.025	0.010
EP32	-0.002	-0.002	-0.002	0.000	0.222	0.079	0.026	0.012
EP19	0.016	0.015	0.016	0.012	0.318	0.139	0.060	0.028
EP24	-0.002	-0.003	-0.001	-0.002	0.214	0.073	0.026	0.011
EP06	0.072	0.047	0.019	0.006	0.344	0.147	0.053	0.015
EP10	0.126	0.085	0.034	0.015	0.363	0.172	0.076	0.028
EP14	0.056	0.035	0.021	0.007	0.232	0.093	0.043	0.013
EP25	0.086	0.048	0.031	0.009	0.289	0.143	0.092	0.044
EP15	0.000	0.001	0.005	0.010	0.259	0.098	0.038	0.019
EP08	0.335	0.253	0.144	0.058	0.276	0.112	0.044	0.012
EP13	0.274	0.214	0.141	0.064	0.287	0.098	0.036	0.015
EP27	0.336	0.255	0.207	0.145	0.403	0.247	0.131	0.055
EP28	0.345	0.355	0.251	0.156	0.406	0.290	0.156	0.075
EP23	0.002	0.003	0.005	0.004	0.330	0.224	0.184	0.122
EP05	0.259	0.182	0.103	0.034	0.418	0.231	0.120	0.036
EP11	0.161	0.150	0.079	0.036	0.277	0.138	0.048	-0.003
EP16	0.199	0.138	0.082	0.040	0.335	0.172	0.085	0.037
EP02	0.095	0.035	0.009	0.005	0.253	0.088	0.028	0.002
EP03	0.239	0.175	0.127	0.022	0.242	0.111	0.064	-0.005
EP20	0.053	0.034	0.000	0.006	0.315	0.172	0.056	0.030
EP12	-0.016	0.049	-0.015	-0.016	0.255	0.079	0.016	-0.002
EP07	0.029	0.090	0.003	0.004	0.309	0.151	0.037	0.015
EP17	-0.002	0.001	0.004	0.012	0.262	0.107	0.040	0.023

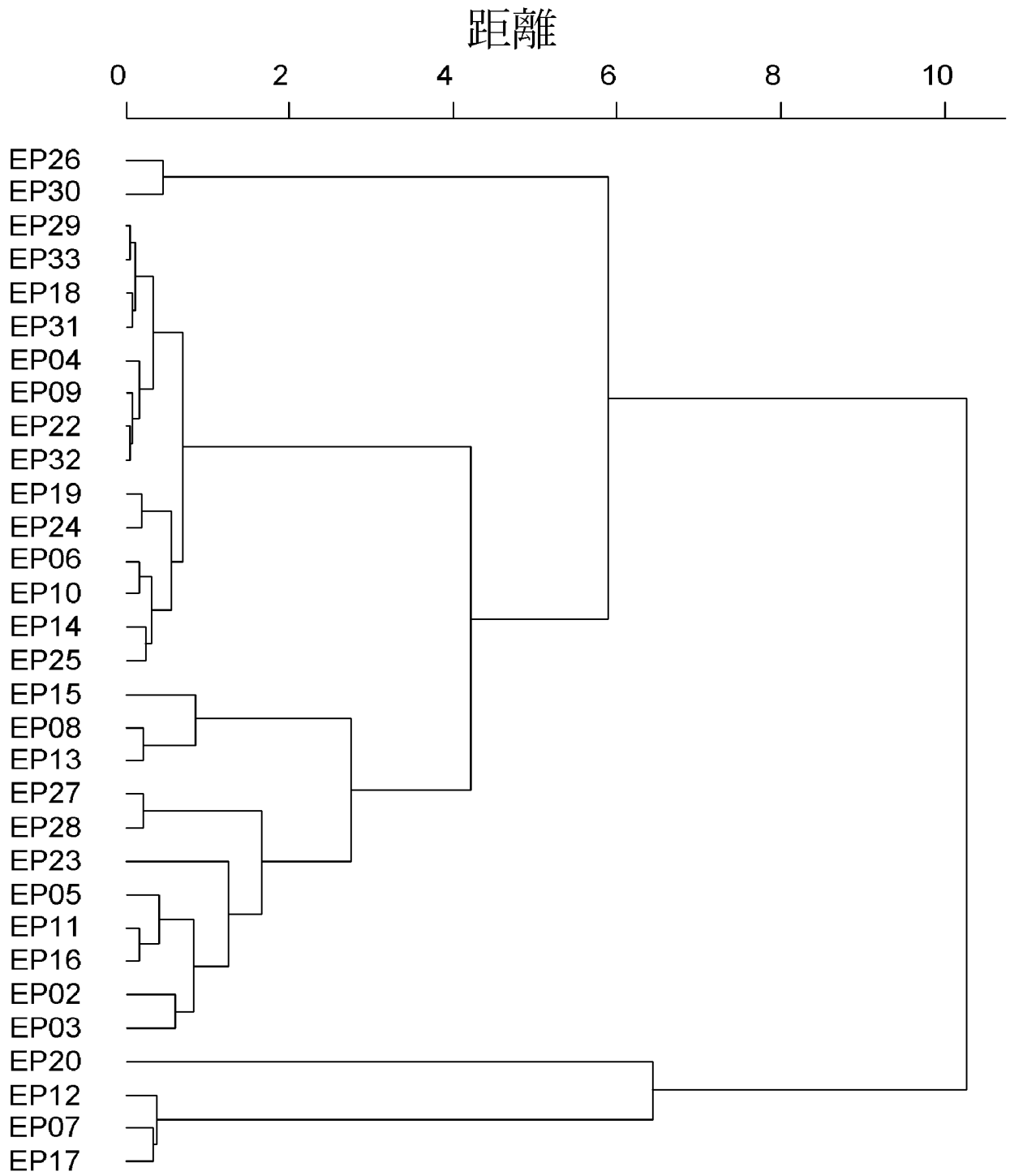
[図21-3]

検出抗E R E Gキメラ抗体

マウス抗E R E G抗体により捕捉された抗原タンパク質  
 EREG(63-108)  
 EREG 細胞外ドメイン-Fc

	EP27				EP29			
EP26	-0.002	-0.001	-0.005	-0.007	0.001	0.006	-0.001	-0.008
EP30	-0.002	-0.004	-0.010	-0.013	0.013	0.010	-0.005	-0.012
EP29	-0.005	0.001	-0.003	-0.011	-0.010	-0.001	-0.005	-0.013
EP33	0.000	0.001	0.001	-0.003	-0.003	0.003	-0.001	-0.008
EP18	-0.002	-0.005	-0.003	-0.008	-0.001	-0.008	-0.003	-0.010
EP31	0.000	0.011	0.013	0.001	-0.004	0.000	0.008	0.003
EP04	0.005	-0.006	-0.015	-0.016	0.005	-0.001	-0.012	-0.016
EP09	-0.005	0.001	-0.001	-0.002	-0.010	0.001	-0.005	-0.005
EP22	0.006	0.005	0.004	0.001	-0.001	-0.002	0.000	-0.005
EP32	-0.006	-0.002	0.002	-0.003	-0.002	-0.003	-0.001	-0.004
EP19	0.104	0.117	0.090	0.034	-0.007	0.001	0.001	-0.004
EP24	0.105	0.193	0.187	0.086	-0.007	-0.004	0.002	-0.005
EP06	-0.004	0.005	-0.002	-0.005	-0.004	0.005	-0.002	-0.009
EP10	0.007	0.004	-0.002	-0.007	0.004	-0.001	0.004	-0.008
EP14	-0.006	-0.006	-0.006	-0.004	-0.008	-0.005	-0.007	0.127
EP25	-0.003	0.016	0.009	0.006	-0.004	0.003	0.007	0.008
EP15	-0.004	-0.002	-0.012	-0.011	0.012	0.006	-0.010	-0.014
EP08	-0.006	-0.005	-0.010	-0.010	-0.006	-0.004	-0.007	-0.011
EP13	-0.008	-0.009	0.018	0.014	-0.010	-0.009	0.031	0.036
EP27	-0.004	-0.005	0.000	0.000	-0.004	0.003	0.002	-0.002
EP28	-0.004	-0.005	0.018	-0.007	-0.004	0.001	0.002	-0.009
EP23	-0.003	-0.001	-0.003	-0.005	0.015	0.015	0.009	-0.006
EP05	0.002	0.001	-0.005	-0.006	0.003	0.002	-0.007	-0.009
EP11	-0.011	-0.009	-0.008	-0.010	-0.005	-0.009	-0.011	-0.004
EP16	-0.004	-0.001	-0.002	0.000	-0.007	-0.002	-0.002	0.001
EP02	0.056	0.011	0.004	-0.012	0.064	0.014	-0.002	-0.021
EP03	-0.016	0.036	-0.020	-0.033	-0.020	0.036	-0.022	-0.037
EP20	1.770	1.400	1.078	0.630	-0.020	-0.029	-0.037	0.004
EP12	-0.019	-0.025	-0.004	-0.010	0.095	0.049	0.064	0.003
EP07	-0.004	-0.012	-0.013	0.007	0.078	0.034	0.014	0.073
EP17	-0.013	-0.016	-0.016	-0.025	0.061	0.026	0.002	-0.022
								
EP26	0.005	0.003	0.002	0.003	0.537	0.501	0.404	0.287
EP30	0.038	0.023	0.016	0.009	0.486	0.513	0.462	0.261
EP29	0.021	0.028	0.032	0.014	-0.006	-0.005	-0.002	-0.006
EP33	0.042	0.043	0.033	0.022	-0.007	-0.006	-0.006	-0.003
EP18	-0.009	-0.010	-0.010	-0.006	-0.012	-0.008	-0.009	-0.006
EP31	0.033	0.020	0.027	0.009	0.006	-0.004	-0.003	0.003
EP04	-0.015	-0.014	-0.010	-0.012	-0.020	-0.012	-0.008	-0.008
EP09	-0.005	-0.005	0.000	-0.007	-0.007	-0.006	-0.001	-0.008
EP22	-0.006	-0.004	-0.004	-0.001	-0.002	-0.002	-0.003	0.001
EP32	-0.002	-0.005	-0.003	-0.002	-0.006	-0.005	-0.002	-0.002
EP19	0.049	0.034	0.031	0.018	0.008	0.011	0.013	0.012
EP24	0.031	0.072	0.033	0.018	-0.008	-0.007	-0.008	-0.012
EP06	-0.002	-0.002	-0.002	-0.004	0.042	0.027	0.014	0.006
EP10	-0.007	-0.005	-0.003	-0.011	0.093	0.071	0.043	0.016
EP14	-0.006	-0.003	-0.002	-0.004	0.058	0.027	0.016	0.005
EP25	0.111	0.079	0.070	0.037	0.074	0.041	0.020	-0.003
EP15	-0.009	-0.009	-0.005	0.008	0.539	0.514	0.473	0.319
EP08	-0.005	-0.008	0.000	-0.007	0.429	0.396	0.362	0.175
EP13	0.038	-0.008	-0.008	-0.002	0.415	0.348	0.313	0.189
EP27	0.184	0.135	0.110	0.056	0.189	0.170	0.122	0.037
EP28	0.194	0.219	0.162	0.061	0.183	0.215	0.187	0.060
EP23	-0.007	-0.008	-0.006	-0.002	0.234	0.208	0.071	0.112
EP05	-0.001	-0.005	0.004	-0.008	0.263	0.209	0.164	0.056
EP11	-0.003	-0.006	-0.008	-0.009	0.165	0.142	0.100	0.046
EP16	0.003	0.000	0.002	0.001	0.199	0.161	0.109	0.046
EP02	-0.019	-0.026	-0.022	-0.021	-0.029	-0.042	-0.021	-0.019
EP03	-0.024	-0.016	0.013	-0.026	-0.022	0.009	0.015	-0.030
EP20	0.914	0.939	0.847	0.568	0.012	0.037	0.001	0.004
EP12	-0.007	-0.026	-0.016	-0.019	0.773	0.701	0.658	0.433
EP07	0.034	0.008	-0.002	-0.002	0.820	0.801	0.721	0.462
EP17	-0.015	-0.013	0.002	0.006	0.771	0.785	0.730	0.533

[図22]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/069988

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K39/395(2006.01)i, A61K51/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K16/22(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K39/395, A61K51/00, A61P35/00, A61P43/00, C07K16/22, C12N15/00, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CAplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP 2005-519023 A (Centro De Inmunologia Molecular), 30 June, 2005 (30.06.05), Claims; Par. Nos. [0001] to [0005] & WO 2002/045747 A1 & AU 200221521 A & US 2002/160014 A1 & EP 1350521 A1 & KR 2003064416 A & BR 200116010 A & ZA 200304415 A & NZ 526284 A & CN 1592636 A & MX 2003005030 A1 & US 2006/188497 A1 & AU 2002221521 B2	1-4, 7-10 6, 11-18, 20, 33-35 5, 19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 November, 2007 (08.11.07)		Date of mailing of the international search report 20 November, 2007 (20.11.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/069988

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2003-503366 A (Genentech, Inc.), 28 January, 2003 (28.01.03), Full text & WO 2001/000245 A2 & AU 200057632 A & NO 200106329 A & EP 1189641 A2 & BR 200012198 A & GB 2368796 A & DE 10084743 T & HU 200201695 A2 & CN 1370082 A & CZ 200104596 A3 & MX 2001013458 A1 & GB 2368796 B & NZ 516830 A & US 6949245 B1 & US 2005/238640 A1 & NZ 531426 A & RU 2270029 C2 & US 2006/034842 A1 & US 2006/073143 A1 & AU 784045 B2 & US 2006/193854 A1 & US 2006/216285 A1 & MX 240461 B	1-4, 6-18, 20, 33-35 5, 19
Y	Nobuo HANAI, "Kotai no Kaihen to Transgenic Mouse", Biotherapy, 17(5), pages 415 to 421 (2003), full text	16-18, 20
Y	Ryutaro ASANO et al., "Gairon: Kotai Ryoho no Shinpo -Rinsho Oyo eno Kitai", Igaku no Ayumi, 211(7), pages 723 to 727 (2004), full text	16, 20
X Y	WO 2004/081047 A1 (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 23 September, 2004 (23.09.04), Full text & EP 1607404 A1 & AU 2004220156 A1 & NO 200504351 A & MX 2005009751 A1 & KR 2005108389 A & CN 1761682 A & US 2006/252105 A1 & IN 200502615 P4	31, 32 33-35
Y	WO 2005/076979 A2 (WYETH), 25 August, 2005 (25.08.05), Claims & US 2006/014686 A1 & AU 2005213464 A1 & EP 1747284 A2	33-35
A	BABA, I., et al., Involvement of Deregulated Epiregulin Expression in Tumorigenesis in Vivo through Activated Ki-Ras Signaling Pathway in Human Colon Cancer Cells, Cancer Res., 60, pp.6886-6889 (2000)	1-20, 31-35
A	TOYODA, H., et al., Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family, Biochem. J., 326, pp.69-75 (1997)	1-20, 31-35
A	ZHU, Z., et al., Epiregulin Is Up-Regulated in Pancreatic Cancer and Stimulates Pancreatic Cancer Cell Growth, Biochem. Biophys. Res. Commun., 273, pp.1019-1024 (2000)	1-20, 31-35

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/069988

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	Noriaki SUNANAGA et al., "Haigan ni okeru Epiregulin Idenshi no Hatsugen ni tsuite no Kento", Dai 47 Kai The Japanese Respiratory Society Gakujutsu Koenkai Program, page 167 (2007)	1-20, 31-35
L	WO 94/29340 A1 (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 December, 1994 (22.12.94), & AU 9468562 A & EP 703242 A1 & AU 685124 B & US 5783417 A & KR 313736 B (in this cited document, it is described that an epiregulin (EREG) protein as a subject to which a neutralization antibody is bound exhibits the effect of cell proliferation inhibition same as the invention of the present application)	1-9



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2007/069988

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 21-30

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 21 to 30 are relevant to diagnostic methods to be practiced on the human body (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  
the

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

It appears that claims 1-20 and 31-35 of the present application include the following groups of inventions A to D.

A. A pharmaceutical composition comprising an antibody capable of binding to an EREG protein as an active ingredient. (claims 1-9)

B. An antibody capable of binding to an EREG protein and having an activity of inhibiting the proliferation of a cell expressing the EREG protein. (claims 10-20)

C. A diagnostic agent for use in the diagnosis of cancer, comprising an antibody capable of binding to an EREG protein (claims 31 and 32)

D. A method for screening for a candidate compound for a cancer therapeutic agent. (claims 33-35)

There is found no common technical matter among the groups A to D, and a common technical matter among the groups A to C is an antibody capable of binding to an EREG protein.

However, since an antibody capable of binding to an EREG protein is already known (see, for example, WO 2004/081047 A1), the antibody cannot be regarded as a special technical feature.

Consequently, it is considered that the present application includes the following three inventions which do not comply with the requirement of unity of invention.

1. A and B (claims 1-20)
2. C (claims 31 and 32)
3. D (claims 33-35)

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K39/395(2006.01)i, A61K51/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K16/22(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i</p>					
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K39/395, A61K51/00, A61P35/00, A61P43/00, C07K16/22, C12N15/00, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50</p>					
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年                  日本国公開実用新案公報 1971-2007年                  日本国実用新案登録公報 1996-2007年                  日本国登録実用新案公報 1994-2007年</p>					
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2), 医学・薬学予稿集全文データベース</p>					
<p>C. 関連すると認められる文献</p>					
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号			
X	JP 2005-519023 A (セントロ ド インムノロジヤ モレキュラー)	1-4, 7-10			
Y	2005.06.30, 請求の範囲, 【0001】～【0005】				
	& WO 2002/045747 A1 & AU 200221521 A & US 2002/160014 A1	6, 11-18,			
	& EP 1350521 A1 & KR 2003064416 A & BR 200116010 A	20, 33-35			
	& ZA 200304415 A & NZ 526284 A & CN 1592636 A				
A	& MX 2003005030 A1 & US 2006/188497 A1 & AU 2002221521 B2	5, 19			
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>					
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>			
<p>国際調査を完了した日</p> <p>08.11.2007</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>20.11.2007</p>			
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>荒木 英 則</p>	<table border="1"> <tr> <td>4C</td> <td>9736</td> </tr> </table>	4C	9736
4C	9736				
		<p>電話番号 03-3581-1101 内線</p>	<p>3452</p>		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2003-503366 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2003.01.28, 全文	1-4, 6-18, 20, 33-35
A	& WO 2001/000245 A2 & AU 200057632 A & NO 200106329 A & EP 1189641 A2 & BR 200012198 A & GB 2368796 A & DE 10084743 T & HU 200201695 A2 & CN 1370082 A & CZ 200104596 A3 & MX 2001013458 A1 & GB 2368796 B & NZ 516830 A & US 6949245 B1 & US 2005/238640 A1 & NZ 531426 A & RU 2270029 C2 & US 2006/034842 A1 & US 2006/073143 A1 & AU 784045 B2 & US 2006/193854 A1 & US 2006/216285 A1 & MX 240461 B	5, 19
Y	花井 陳雄, 抗体の改変とトランスジェニックマウス, Biotherapy, 17(5), pp.415-421 (2003), 全文	16-18, 20
Y	浅野 竜太郎ら, 概論: 抗体療法の進歩-臨床応用への期待, 医学の あゆみ, 211(7), pp.723-727 (2004), 全文	16, 20
X	WO 2004/081047 A1 (大正製薬株式会社) 2004.09.23, 全文	31, 32
Y	& EP 1607404 A1 & AU 2004220156 A1 & NO 200504351 A & MX 2005009751 A1 & KR 2005108389 A & CN 1761682 A & US 2006/252105 A1 & IN 200502615 P4	33-35
Y	WO 2005/076979 A2 (WYETH) 2005.08.25, 請求の範囲 & US 2006/014686 A1 & AU 2005213464 A1 & EP 1747284 A2	33-35
A	BABA, I., et al., Involvement of Deregulated Epiregulin Expression in Tumorigenesis in Vivo through Activated Ki-Ras Signaling Pathway in Human Colon Cancer Cells, Cancer Res., 60, pp.6886-6889 (2000)	1-20, 31-35
A	TOYODA, H., et al., Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family, Biochem. J., 326, pp.69-75 (1997)	1-20, 31-35
A	ZHU, Z., et al., Epiregulin Is Up-Regulated in Pancreatic Cancer and Stimulates Pancreatic Cancer Cell Growth, Biochem. Biophys. Res. Commun., 273, pp.1019-1024 (2000)	1-20, 31-35

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	砂長 則明ら, 肺癌における Epiregulin 遺伝子の発現についての検討, 第 47 回日本呼吸器学会学術講演会プログラム, p. 167 (2007)	1-20, 31-35
L	WO 94/29340 A1 (大正製薬株式会社) 1994. 12. 22, & AU 9468562 A & EP 703242 A1 & AU 685124 B & US 5783417 A & KR 313736 B (本願において中和抗体の結合対象とされる EREG タンパク質が、本願発明と同様の細胞増殖抑制作用を示すことが記載されている。)	1-9



## ○第Ⅲ欄の続き

本願の請求の範囲 1 から 20 及び 31 から 35 には、それぞれ以下の A から D に掲げる発明が記載されているものと認められる。

- A. EREG タンパク質に結合する抗体を有効成分として含有する医薬組成物  
(請求の範囲 1 から 9)
- B. EREG タンパク質に結合し、かつ EREG タンパク質を発現する細胞に対して細胞増殖阻害活性を有する抗体 (請求の範囲 10 から 20)
- C. EREG タンパク質に結合する抗体を含む、癌の診断方法に用いるための診断薬  
(請求の範囲 31 及び 32)
- D. 癌の治療剤の候補化合物のスクリーニング方法 (請求の範囲 33 から 35)

ここで、A から D に共通する技術的事項の存在が認められないところであり、A から C に共通する技術的事項として、EREG タンパク質に結合する抗体があるものと認められる。

しかしながら、EREG タンパク質に結合する抗体は公知のものであるから (例えば、WO 2004/081047 A1 を参照されたい)、この点をもって特別な技術的特徴ということとはできない。

したがって、本願は相互に発明の単一性を有さない、以下の 3 発明からなるものと認められる。

1. A 及び B (請求の範囲 1 から 20)
2. C (請求の範囲 31 及び 32)
3. D (請求の範囲 33 から 35)