

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-545452

(P2013-545452A)

(43) 公表日 平成25年12月26日(2013.12.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-536881 (P2013-536881)  
 (86) (22) 出願日 平成23年10月28日 (2011.10.28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年5月7日 (2013.5.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/058385  
 (87) 国際公開番号 W02012/058592  
 (87) 国際公開日 平成24年5月3日 (2012.5.3)  
 (31) 優先権主張番号 61/408,500  
 (32) 優先日 平成22年10月29日 (2010.10.29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/436,012  
 (32) 優先日 平成23年1月25日 (2011.1.25)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512186793  
 イミュノジェン, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02  
 451, ウォルサム, ウィンター ス  
 トリート 830  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔  
 (74) 代理人 230113332  
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非拮抗性EGFR結合分子およびその免疫複合体

(57) 【要約】

EGFRに結合する抗体および免疫複合体を含むが、これらに限定されない、新規の抗癌剤が提供される。腫瘍の成長を抑制する方法などの、前記薬剤、抗体または免疫複合体を使用する方法がさらに提供される。本発明は全般的に、EGFRに結合する抗体、その抗原結合断片、ポリペプチド、および免疫複合体に関連する。特に、EGFRシグナル伝達を阻害することはないが、免疫複合体としてEGFR過剰発現性腫瘍細胞に対して高い細胞傷害性を有する抗EGFR抗体およびその断片に関連する。本発明はまた、悪性腫瘍などの疾患を診断および治療するために、そのようなEGFR結合分子を使用する方法に関連する。

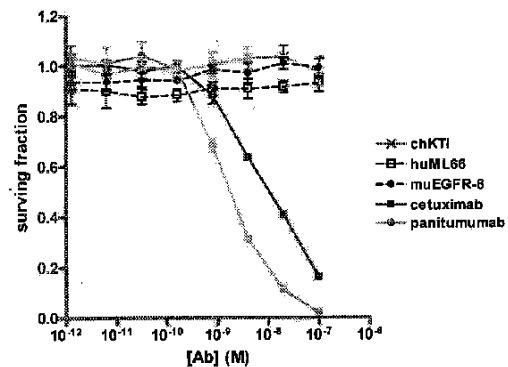


FIGURE 8

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒトEGFRに特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片であって、(a) 10 µg/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b) 100 nM以下でMDA-MB468細胞株でのトランスフォーミング増殖因子(TGF)のEGFRへの結合を阻害しない、(c) 100 nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d) 100 nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、ならびに(e) 100 nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、という特徴からなる群より選択される少なくとも1つの特徴を有する前記抗体。

10

**【請求項 2】**

前記抗体または抗原結合断片が、(a) 10 µg/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b) 100 nM以下でMDA-MB468細胞株でのTGFのEGFRへの結合を阻害しない、(c) 100 nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d) 100 nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、ならびに(e) 100 nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、という特徴からなる群より選択される少なくとも2つの特徴を有する、請求項1に記載の抗体または抗原結合断片。

20

**【請求項 3】**

前記抗体または抗原結合断片が、(a) 10 µg/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b) 100 nM以下でMDA-MB468細胞株でのTGFのEGFRへの結合を阻害しない、(c) 100 nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d) 100 nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、ならびに(e) 100 nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、という特徴からなる群より選択される少なくとも3つの特徴を有する、請求項2に記載の抗体または抗原結合断片。

30

**【請求項 4】**

前記抗体または抗原結合断片が、(a) 10 µg/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b) 100 nM以下でMDA-MB468細胞株でのTGFのEGFRへの結合を阻害しない、(c) 100 nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d) 100 nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、ならびに(e) 100 nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、という特徴からなる群より選択される少なくとも4つの特徴を有する、請求項3に記載の抗体または抗原結合断片。

40

**【請求項 5】**

前記抗体または抗原結合断片が、(a) 10 µg/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b) 100 nM以下でMDA-MB468細胞株でのTGFのEGFRへの結合を阻害しない、(c) 100 nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞

50

胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d)100nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、ならびに(e)100nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、という特徴からなる群より選択される少なくとも5つの特徴を有する、請求項4に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項6】

ヒトEGFRに特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片であって、(a)10μg/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b)100nM以下でMDA-MB468細胞株でのTGFのEGFRへの結合を阻害しない、(c)100nM以下ではケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制する、(d)100nM以下ではEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制する、ならびに(e)100nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害する、前記抗体。

10

【請求項7】

ヒトEGFRに特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片であって、(a)10μg/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b)100nM以下でMDA-MB468細胞株でのTGFのEGFRへの結合を阻害しない、(c)100nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d)100nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、(e)100nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、ならびに(f)MDA-MB468細胞株で外来性EGFが存在しないときにEGFRのリン酸化を誘導することがない、前記抗体。

20

【請求項8】

ヒトEGFRに特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片であって、(a)10μg/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b)100nM以下でMDA-MB468細胞株でのTGFのEGFRへの結合を阻害しない、(c)100nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d)100nM以下ではEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制する、(e)100nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、ならびに(f)MDA-MB468細胞株で外来性EGFが存在しないときにEGFRのリン酸化を誘導する、前記抗体。

30

【請求項9】

(a)配列番号17~20からなる群より選択される基準VH配列に対して少なくとも90%同一であるVH配列;および(b)配列番号21~24からなる群より選択される基準VL配列に対して少なくとも90%同一であるVL配列を含む、請求項1~8のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

40

【請求項10】

前記VH配列およびVL配列が前記基準VH配列およびVL配列に少なくとも95%同一である、請求項9に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項11】

前記VH配列およびVL配列が前記基準VH配列およびVL配列に対して少なくとも99%同一である、請求項10に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項12】

50

( a ) 配列番号 17 ~ 20 からなる群より選択される V H 配列 ; および ( b ) 配列番号 21 ~ 24 からなる群より選択される V L 配列を含む、請求項 11 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 13】

配列番号 17 および配列番号 21 を含む、請求項 12 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 14】

配列番号 18 および配列番号 22 を含む、請求項 12 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 15】

配列番号 19 および配列番号 23 を含む、請求項 12 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 16】

配列番号 20 および配列番号 24 を含む、請求項 12 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 17】

( a ) 配列番号 17 の V H ポリペプチドおよび配列番号 21 の V L ポリペプチドを含む抗体 ;

( b ) 配列番号 18 の V H ポリペプチドおよび配列番号 22 の V L ポリペプチドを含む抗体 ;

( c ) 配列番号 19 の V H ポリペプチドおよび配列番号 23 の V L ポリペプチドを含む抗体 ; ならびに

( d ) ( d ) 配列番号 20 の V H ポリペプチドおよび配列番号 24 の V L ポリペプチドを含む抗体

からなる群より選択される抗体と同一のヒト E G F R エピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 18】

( a ) 配列番号 17 の V H ポリペプチドおよび配列番号 21 の V L ポリペプチドを含む抗体 ;

( b ) 配列番号 18 の V H ポリペプチドおよび配列番号 22 の V L ポリペプチドを含む抗体 ;

( c ) 配列番号 19 の V H ポリペプチドおよび配列番号 23 の V L ポリペプチドを含む抗体 ; ならびに

( d ) 配列番号 20 の V H ポリペプチドおよび配列番号 24 の V L ポリペプチドを含む抗体

からなる群より選択される基準抗体である前記基準抗体のヒト E G F R に対する結合を競合的に阻害する抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 19】

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

( a ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一である C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域 ; ならびに

( b ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 11、配列番号 12 および配列番号 13 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 20】

( a ) それぞれ、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 の基準重鎖 C D R 1 配列、

10

20

30

40

50

C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一である C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびに

( b ) それぞれ、配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 1 3 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、請求項 1 9 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 1】

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

( a ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 1、配列番号 4 および配列番号 3 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、

10

ならびに ( b ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 1 3 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 2】

( a ) それぞれ、配列番号 1、配列番号 4 および配列番号 3 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、

20

ならびに ( b ) それぞれ、配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 1 3 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、請求項 2 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 3】

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

( a ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、配列番号 1、配列番号 5 および配列番号 3 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、

30

ならびに ( b ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 1 3 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 4】

( a ) それぞれ、配列番号 1、配列番号 5 および配列番号 3 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、

ならびに ( b ) それぞれ、配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 1 3 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

40

を含む、請求項 2 3 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 2 5】

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

( a ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、

ならびに ( b ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号

50

号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 6】

( a ) それぞれ、配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

( b ) それぞれ、配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、請求項 2 5 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 2 7】

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

( a ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 6、配列番号 9 および配列番号 8 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

( b ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 8】

( a ) それぞれ、配列番号 6、配列番号 9 および配列番号 8 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

( b ) それぞれ、配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、請求項 2 7 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 2 9】

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

( a ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 6、配列番号 1 0 および配列番号 8 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

( b ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3 0】

( a ) それぞれ、配列番号 6、配列番号 1 0 および配列番号 8 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

( b ) それぞれ、配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、請求項 2 9 に記載の抗体または抗原結合断片。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 1】

前記抗体またはその抗原結合断片がネズミ科、非ヒト、ヒト化、キメラ、再現化 (re surfaced) またはヒトのものである、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 3 2】

全長型抗体である、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 3 3】

抗原結合断片である、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

## 【請求項 3 4】

前記抗体またはその抗原結合断片が Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、単鎖 Fv または scFv、ジスルフィド結合 Fv、V-NAR ドメイン、IgNar、細胞内抗体、IgG CH<sub>2</sub>、ミニボディ (minibody)、F(ab')<sub>3</sub>、テトラボディ (tetra body)、トリアボディ (trια body)、二重特異性抗体、単ドメイン抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb<sub>2</sub>、(scFv)<sub>2</sub> または scFv-Fc を含む、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 3 5】

請求項 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の VH 配列および VL 配列を含むポリペプチド。

## 【請求項 3 6】

前記抗体またはその抗原結合断片が実質的に類似の結合親和性でヒトとマカクの両方の EGFR に結合する、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはポリペプチド。

20

## 【請求項 3 7】

約 1.0 ~ 約 10 nM の K<sub>d</sub> でヒトとマカクの EGFR に結合する、請求項 3 6 に記載の抗体またはポリペプチド。

## 【請求項 3 8】

約 1.0 nM またはそれより良好な K<sub>d</sub> でヒトとマカクの EGFR に結合する、請求項 3 7 に記載の抗体またはポリペプチド。

## 【請求項 3 9】

フローサイトメトリー、Biacore または放射免疫アッセイにより前記結合親和性が測定される、請求項 3 6 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはポリペプチド。

30

## 【請求項 4 0】

請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片、またはポリペプチドを産生する、単離された細胞。

## 【請求項 4 1】

請求項 1 ~ 3 9、7 3 および 7 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片、またはポリペプチドを作製する方法であって、(a) 請求項 4 0 に記載の細胞を培養すること；および (b) 前記培養細胞から前記抗体、その抗原結合断片、またはポリペプチドを単離することを含む、前記方法。

## 【請求項 4 2】

前記細胞が真核細胞である、請求項 4 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 4 3】

式 (A) - (L) - (C) を有する免疫複合体であって、式中、(A) は請求項 1 ~ 3 9、7 3、および 7 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片、またはポリペプチドであり；

(L) はリンカーであり；そして

(C) は細胞傷害性薬剤であり；そして、

式中、前記リンカー (L) が (A) を (C) に連結する前記免疫複合体。

## 【請求項 4 4】

前記リンカーが切断可能リンカー、非切断可能リンカー、親水性リンカー、およびジカ

50

ルボン酸ベースのリンカーからなる群より選択される、請求項 4 3 に記載の免疫複合体。

【請求項 4 5】

前記リンカーが非切断可能リンカーである、請求項 4 4 に記載の免疫複合体。

【請求項 4 6】

前記リンカーが、N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルジチオ ) ペタノアート ( S P P ) ; N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルジチオ ) ブタノエート ( S P D B ) または N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルジチオ ) - 2 - スルホブタノエート ( スルホ - S P D B ) ; N - スクシンイミジル 4 - ( マレイミドメチル ) シクロヘキサンカルボキシレート ( S M C C ) ; N - スルホスクシンイミジル 4 - ( マレイミドメチル ) シクロヘキサンカルボキシレート ( スルホ S M C C ) ; N - スクシンイミジル - 4 - ( ヨードアセチル ) - アミノベンゾエート ( S I A B ) ; および N - スクシンイミジル - [ ( N - マレイミドプロピオンアミド ) - テトラエチレングリコール ] エステル ( N H S - P E G 4 - マレイミド ) からなる群より選択される、請求項 4 5 に記載の免疫複合体。

10

【請求項 4 7】

前記リンカーが N - スクシンイミジル - [ ( N - マレイミドプロピオンアミド ) - テトラエチレングリコール ] エステル ( N H S - P E G 4 - マレイミド ) である、請求項 4 6 に記載の免疫複合体。

【請求項 4 8】

前記細胞傷害性薬剤がマイタンシノイド、マイタンシノイド類似体、ドキシソルピシン、修飾型ドキシソルピシン、ベンゾジアゼピン、タキソイド、CC - 1065、CC - 1065 類似体、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリケアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アリストアチン ( a r i s t a t i n ) 、トマイマイシン誘導体、およびレプトマイシン誘導体または前記薬剤の前駆薬からなる群より選択される、請求項 4 3 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

20

【請求項 4 9】

前記細胞傷害性薬剤がマイタンシノイドである、請求項 4 8 に記載の免疫複合体。

【請求項 5 0】

前記細胞傷害性薬剤が N ( 2 ' ) - デアセチル - N ( 2 ' ) - ( 3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル ) - マイタンシン ( D M 1 ) または N ( 2 ' ) - デアセチル - N 2 - ( 4 - メルカプト - 4 - メチル - 1 - オキソペンチル ) - マイタンシン ( D M 4 ) である、請求項 4 9 に記載の免疫複合体。

30

【請求項 5 1】

請求項 1 ~ 3 9 、 7 3 および 7 4 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、もしくはポリペプチド、または請求項 4 3 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体、および薬剤的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

【請求項 5 2】

第 2 の抗癌剤をさらに含む、請求項 5 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 3】

標識されている、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、もしくはポリペプチド、または請求項 4 3 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体を含む診断用試薬。

40

【請求項 5 4】

前記標識が、放射性標識、フルオロフォア、クロモフォア、造影剤および金属イオンからなる群より選択される、請求項 5 3 に記載の診断用試薬。

【請求項 5 5】

請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、もしくはポリペプチド、または請求項 4 3 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体を含むキット。

【請求項 5 6】

E G F R を発現する細胞の増殖を抑制する方法であって、請求項 4 3 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体または請求項 5 1 もしくは 5 2 に記載の医薬組成物と前記細胞を

50



接触させることを含む前記方法。

【請求項 57】

前記細胞が腫瘍細胞である、請求項 56 に記載の方法。

【請求項 58】

新生物を有する患者を治療する方法であって、前記患者に治療上有効量の請求項 43 ~ 50 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体または請求項 51 もしくは 52 に記載の医薬組成物を投与することを含む前記方法。

【請求項 59】

前記新生物が腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、副腎、副甲状腺、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺、眼、頭部および頸部、中枢神経系、末梢神経系、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部および泌尿生殖器系の新生物からなる群より選択される、請求項 58 に記載の方法。

10

【請求項 60】

前記対象に第 2 の抗癌剤を投与することをさらに含む、請求項 58 または 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記の第 2 の抗癌剤が化学療法剤である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

患者における細胞増殖障害を治療する方法であって、前記患者に治療上有効量の請求項 43 ~ 50 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体または請求項 51 もしくは 52 に記載の医薬組成物を投与することを含む前記方法。

20

【請求項 63】

前記細胞増殖障害が、副腎皮質過形成（クッシング病）、先天性副腎過形成、子宮内膜増殖症、良性前立腺肥大症、乳房過形成、内膜過形成、局所性上皮過形成（ヘック病）、皮脂腺過形成、代償性肝臓過形成、および新生物以外の他の任意の細胞増殖障害からなる群より選択される、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

配列番号 17 ~ 28 からなる群より選択される配列に対して少なくとも 90% 同一であるポリペプチドをコードする配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 65】

前記配列が、配列番号 17 ~ 28 からなる群より選択される配列に対して少なくとも 95% 同一である、請求項 64 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項 66】

前記配列が、配列番号 17 ~ 28 からなる群より選択される配列に対して少なくとも 99% 同一である、請求項 65 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 67】

配列番号 29 ~ 40 に対して少なくとも 90% 同一である配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 68】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 29 ~ 40 に対して少なくとも 95% 同一である配列を含む、請求項 67 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

40

【請求項 69】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 29 ~ 40 に対して少なくとも 99% 同一である配列を含む、請求項 68 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 70】

配列番号 17 ~ 40 からなる群より選択される配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 71】

請求項 64 ~ 70 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 72】

50

請求項 7 1 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 7 3】

2010年10月21日にATCCに寄託され、そして、ATCC受託番号PTA-11424を有する前記プラスミドDNAによりコードされる抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7 4】

2010年10月21日にATCCに寄託され、そして、ATCC受託番号PTA-11423を有する前記ハイブリドーマにより産生される抗体またはその抗原結合断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野

本発明は全般的に、EGFRに結合する抗体、その抗原結合断片、ポリペプチド、および免疫複合体に関連する。特に、EGFRシグナル伝達を阻害することはないが、免疫複合体としてEGFR過剰発現性腫瘍細胞に対して高い細胞傷害性を有する抗EGFR抗体およびその断片に関連する。本発明はまた、悪性腫瘍などの疾患を診断および治療するために、そのようなEGFR結合分子を使用する方法に関連する。

【背景技術】

【0002】

本発明の背景

上皮成長因子受容体(EGFRまたはErbB1またはHER1)は、HER2(ErbB2)、HER3(ErbB3)およびHER4(ErbB4)を含む、受容体型チロシンキナーゼ(RTK)のヒト上皮成長因子受容体(HER)ファミリーのメンバーである。これらのRTKは、リガンド結合性細胞外ドメイン(ECD)、1回膜貫通ドメイン、ならびに触媒性キナーゼドメインおよびC末端テールを含む細胞内ドメインからなる相同性構造を共通して有する。受容体の二量体化と細胞内領域のトランスリン酸化を誘導する細胞外リガンドの結合によって、HERキナーゼシグナル伝達を開始される。これらの事象は、細胞の増殖と生存にとって重要な下流シグナル伝達経路の活性化に至る最初のシグナルを生成する。

【0003】

EGFRは、頭部頸部腫瘍、大腸直腸腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、腎臓腫瘍、膵臓腫瘍、皮膚腫瘍および他の固形腫瘍などの上皮細胞起源の多くの種類の悪性腫瘍で過剰発現している。EGFR介在性シグナル伝達経路は腫瘍の成長と転移の進行において重要な役割を果たし、EGFRを腫瘍治療の好適な標的とする(非特許文献1、非特許文献2)。現時点では、2つの小分子型チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)(エルロチニブ(タルセバ)およびゲフィチニブ(イレッサ))および2つの裸モノクローナル抗体(セツキシマブ(エルピタックス)およびパニツムマブ(ベクチビックス))を含む4つのEGFR標的化薬剤が、大腸直腸癌、膵臓癌、頭部頸部癌および非小細胞性肺癌の治療に承認されている。これらの抗EGFR薬剤はEGFRの活性化と下流シグナル伝達を強固に阻害する。TKIはEGFRの細胞内キナーゼドメインへの結合についてATPと競合し(非特許文献3)、一方、前記の2つのモノクローナル抗体は前記受容体への結合についてEGFRリガンドと競合する(非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6)。

【0004】

抗EGFR療法は完璧ではない。EGFRシグナル伝達の阻害はある種の腫瘍で有効なだけである。例えば、抗EGFR抗体の有効性は、KRAS、BRAF、PIK3CAおよびPTENの変異を有する大腸直腸癌患者では顕著に低下する(非特許文献7、非特許文献8)。さらに、小分子型EGFR阻害剤の活性は、活性化EGFR変異を有するNSCLC患者に限定される(非特許文献9、非特許文献10、非特許文献11)。また、EGFR療法により皮膚傷害になる。皮膚の基底上皮細胞におけるEGFR発現は表皮の正常な発生と生理に重要な役割を果たし、そして、EGFRシグナル伝達の阻害が、ざ瘡

10

20

30

40

50

様の皮膚発疹、皮膚乾燥、掻痒症、爪周囲炎、頭髮異常、粘膜炎およびまつ毛または顔の毛の成長の上昇を含む様々な皮膚傷害を引き起こす（非特許文献12に概説される）。生命を危うくすることは滅多にないが、皮膚傷害は、患者の生活の質を低下させる身体的および精神社会的不快感の原因となる。さらに、患者の約10%では、皮膚傷害が非常に重篤であるため、EGFR阻害剤の臨床成果を損なう治療の中断または中止が必要になる。

したがって、正常な組織に無害であるが、EGFR過剰発現性悪性腫瘍の治療になお非常に有効である改良型抗EGFR療法の必要性が存在する。この特定の必要性を処理するため、本発明は、EGFRシグナル伝達を阻害することはないが、免疫複合体としてEGFR発現性腫瘍細胞に対して高い細胞傷害性を有するユニークなEGFR抗体に焦点を合わせる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Baselga, *Oncologist*, 7:2-8 (2002)

【非特許文献2】Yarden and Sliwkowski, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:127-137 (2001)

【非特許文献3】Baselga and Arteaga, *J Clin Oncol*, 23:2445-2459 (2005)

【非特許文献4】Gill et al., *J Biol Chem*, 259:7755-7760 (1984)

【非特許文献5】Goldstein et al., *Clin Cancer Res*, 1:1311-1318 (1995)

【非特許文献6】Prewett et al., *Clin Cancer Res*, 4:2957-2966 (1998)

【非特許文献7】De Roock et al., *Lancet Oncol*, 11:753-762 (2010)

【非特許文献8】Bardelli and Sienna, *J Clin Oncol*, 28:1254-1261 (2010)

【非特許文献9】Linardou et al., *Nat Rev Clin Oncol*, 6:352-366 (2009)

【非特許文献10】Paz-Ares et al., *J Cell Mol Med*, 14:51-69 (2009)

【非特許文献11】Mok et al., *Discov Med*, 8:227-231 (2009)

【非特許文献12】Li and Perez-Soler, *Targ Oncol* 4:107-119 (2009)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の簡単な概要

本発明は全般的に、EGFRに結合する抗体、その抗原結合断片、ポリペプチド、および免疫複合体に関連する。特に、EGFRシグナル伝達を阻害することはないが、免疫複合体としてEGFR過剰発現性腫瘍細胞に対して高い細胞傷害性を有する抗EGFR抗体およびその断片に関連する。本発明はまた、悪性腫瘍などの疾患を診断および治療するために、そのようなEGFR結合分子を使用する方法に関連する。

【0007】

したがって、1つの実施形態において、本発明はヒトEGFRに特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片を対象とし、前記抗体は、(a)10 $\mu$ g/ml以下でMDA-MB468細胞株とヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性

10

20

30

40

50

E G F Rリン酸化を阻害しない、( b ) 1 0 0 n M以下でM D A - M B 4 6 8細胞株でのトランスフォーミング増殖因子 ( T G F )のE G F Rへの結合を阻害しない、( c ) 1 0 0 n M以下でケラチノサイトとM C F - 1 0 A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を2 0 %より多く抑制しない、( d ) 1 0 0 n M以下でE G F R発現性N C I - H 2 9 2腫瘍細胞およびN C I - H 3 2 2 M腫瘍細胞の基底増殖の2 0 %より多く増殖を抑制しない、ならびに( e ) 1 0 0 n M以下でA 4 3 1細胞株におけるセツキシマブおよび5 2 8抗体の結合を3 0 %より多く阻害しないという特徴からなる群より選択される少なくとも1つの特徴を有する。

【 0 0 0 8 】

別の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、( a ) 1 0 μ g / m l以下でM D A - M B 4 6 8細胞株とヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子( E G F )誘導性E G F Rリン酸化を阻害しない、( b ) 1 0 0 n M以下でM D A - M B 4 6 8細胞株でのT G F のE G F Rへの結合を阻害しない、( c ) 1 0 0 n M以下でケラチノサイトとM C F - 1 0 A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を2 0 %より多く抑制しない、( d ) 1 0 0 n M以下でE G F R発現性N C I - H 2 9 2腫瘍細胞およびN C I - H 3 2 2 M腫瘍細胞の基底増殖の2 0 %より多く増殖を抑制しない、ならびに( e ) 1 0 0 n M以下でA 4 3 1細胞株におけるセツキシマブおよび5 2 8抗体の結合を3 0 %より多く阻害しないという特徴からなる群より選択される少なくとも2つの特徴を有する。

10

【 0 0 0 9 】

別の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、( a ) 1 0 μ g / m l以下でM D A - M B 4 6 8細胞株とヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子( E G F )誘導性E G F Rリン酸化を阻害しない、( b ) 1 0 0 n M以下でM D A - M B 4 6 8細胞株でのT G F のE G F Rへの結合を阻害しない、( c ) 1 0 0 n M以下でケラチノサイトとM C F - 1 0 A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を2 0 %より多く抑制しない、( d ) 1 0 0 n M以下でE G F R発現性N C I - H 2 9 2腫瘍細胞およびN C I - H 3 2 2 M腫瘍細胞の基底増殖の2 0 %より多く増殖を抑制しない、ならびに( e ) 1 0 0 n M以下でA 4 3 1細胞株におけるセツキシマブおよび5 2 8抗体の結合を3 0 %より多く阻害しないという特徴からなる群より選択される少なくとも3つの特徴を有する。

20

【 0 0 1 0 】

別の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、( a ) 1 0 μ g / m l以下でM D A - M B 4 6 8細胞株とヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子( E G F )誘導性E G F Rリン酸化を阻害しない、( b ) 1 0 0 n M以下でM D A - M B 4 6 8細胞株でのT G F のE G F Rへの結合を阻害しない、( c ) 1 0 0 n M以下でケラチノサイトとM C F - 1 0 A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を2 0 %より多く抑制しない、( d ) 1 0 0 n M以下でE G F R発現性N C I - H 2 9 2腫瘍細胞およびN C I - H 3 2 2 M腫瘍細胞の基底増殖の2 0 %より多く増殖を抑制しない、ならびに( e ) 1 0 0 n M以下でA 4 3 1細胞株におけるセツキシマブおよび5 2 8抗体の結合を3 0 %より多く阻害しないという特徴からなる群より選択される少なくとも4つの特徴を有する。

30

【 0 0 1 1 】

別の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、( a ) 1 0 μ g / m l以下でM D A - M B 4 6 8細胞株とヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子( E G F )誘導性E G F Rリン酸化を阻害しない、( b ) 1 0 0 n M以下でM D A - M B 4 6 8細胞株でのT G F のE G F Rへの結合を阻害しない、( c ) 1 0 0 n M以下でケラチノサイトとM C F - 1 0 A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を2 0 %より多く抑制しない、( d ) 1 0 0 n M以下でE G F R発現性N C I - H 2 9 2腫瘍細胞およびN C I - H 3 2 2 M腫瘍細胞の基底増殖の2 0 %より多く増殖を抑制しない、ならびに( e ) 1 0 0 n M以下でA 4 3 1細胞株におけるセツキシマブおよび5 2 8抗体の結合を3 0 %より多く阻害しないという特徴からなる群より選択される少なくとも5つの特徴を有する。

40

【 0 0 1 2 】

別の実施形態において、本発明はヒトE G F Rに特異的に結合する非拮抗性抗体または

50

その抗原結合断片を対象とし、前記抗体は、(a) 10  $\mu$ g/ml以下でMDA-MB 468細胞株とヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b) 100 nM以下でMDA-MB 468細胞株でのTGFのEGFRへの結合を阻害しない、(c) 100 nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制しない、(d) 100 nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制しない、ならびに(e) 100 nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害しない。

**【0013】**

別の実施形態において、本発明はヒトEGFRに特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片を対象とし、前記抗体は、(a) 10  $\mu$ g/ml以下でMDA-MB 468細胞株とヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b) 100 nM以下でMDA-MB 468細胞株でのTGFのEGFRへの結合を阻害しない、(c) 100 nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制しない、(d) 100 nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制しない、ならびに(e) 100 nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害しない、ならびに(f) MDA-MB 468細胞株で外来性EGFが存在しないときにEGFRのリン酸化を誘導することはしない。

**【0014】**

別の実施形態において、本発明はヒトEGFRに特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片を対象とし、前記抗体は、(a) 10  $\mu$ g/ml以下でMDA-MB 468細胞株とヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b) 100 nM以下でMDA-MB 468細胞株でのTGFのEGFRへの結合を阻害しない、(c) 100 nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制しない、(d) 100 nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制しない、ならびに(e) 100 nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害しない、ならびに(f) MDA-MB 468細胞株で外来性EGFが存在しないときにEGFRのリン酸化を誘導する。

**【0015】**

別の実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は、(a) 配列番号17~20からなる群より選択される基準VH配列に対して少なくとも90%同一であるVH配列、および(b) 配列番号21~24からなる群より選択される基準VL配列に対して少なくとも90%同一であるVL配列を含む。さらなる実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は、基準VH配列およびVL配列に対して少なくとも95%同一なVH配列およびVL配列を含む。別の実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は、基準VH配列およびVL配列に対して少なくとも99%同一なVH配列およびVL配列を含む。さらに別の実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は、(a) 配列番号17~20からなる群より選択されるVH配列、および(b) 配列番号21~24からなる群より選択されるVL配列を含む。

**【0016】**

1つの実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は配列番号17および配列番号21を含む。別の実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は配列番号18および配列番号22を含む。別の実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は配列番号19および配列番号23を含む。別の実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は配列番号20および配列番号24を含む。

**【0017】**

10

20

30

40

50

1つの実施形態において、本発明は、同一のヒトEGFRエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、(a)配列番号17のVHポリペプチドおよび配列番号21のVLポリペプチドを含む抗体、(b)配列番号18のVHポリペプチドおよび配列番号22のVLポリペプチドを含む抗体、(c)配列番号19のVHポリペプチドおよび配列番号23のVLポリペプチドを含む抗体、ならびに(d)配列番号20のVHポリペプチドおよび配列番号24のVLポリペプチドを含む抗体からなる群より選択される抗体を提供する。

【0018】

1つの実施形態において、本発明は、ヒトEGFRへの基準抗体の結合を競合的に阻害する抗体またはその抗原結合断片を提供し、前記基準抗体は、(a)配列番号17のVHポリペプチドおよび配列番号21のVLポリペプチドを含む抗体、(b)配列番号18のVHポリペプチドおよび配列番号22のVLポリペプチドを含む抗体、(c)配列番号19のVHポリペプチドおよび配列番号23のVLポリペプチドを含む抗体、ならびに(d)配列番号20のVHポリペプチドおよび配列番号24のVLポリペプチドを含む抗体からなる群より選択される。

10

【0019】

1つの実施形態において、本発明は、ヒトEGFRに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を提供し、前記抗体またはその抗原結合断片は、(a)1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号1、配列番号2および配列番号3の基準重鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一であるCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに(b)1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号11、配列番号12および配列番号13の基準軽鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一であるCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。別の実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は、(a)それぞれ、配列番号1、配列番号2および配列番号3の基準重鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一であるCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに(b)それぞれ、配列番号11、配列番号12および配列番号13の基準軽鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリンa軽鎖可変領域を含む。

20

30

【0020】

1つの実施形態において、本発明は、ヒトEGFRに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を提供し、前記抗体またはその抗原結合断片は、(a)1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号1、配列番号4および配列番号3の基準重鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに(b)1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号11、配列番号12および配列番号13の基準軽鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。別の実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は、(a)それぞれ、配列番号1、配列番号4および配列番号3の基準重鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに(b)それぞれ、配列番号11、配列番号12および配列番号13の基準軽鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

40

【0021】

1つの実施形態において、本発明は、ヒトEGFRに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を提供し、前記抗体またはその抗原結合断片は、(a)1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号1、配列番号5および配列番号3の基準重鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、C

50

D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに ( b ) 1 つ、2 つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号11、配列番号12および配列番号13の基準軽鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。別の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、( a ) それぞれ、配列番号1、配列番号5および配列番号3の基準重鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに ( b ) それぞれ、配列番号11、配列番号12および配列番号13の基準軽鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

10

**【0022】**

1つの実施形態において、本発明は、ヒトE G F Rに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を提供し、前記抗体またはその抗原結合断片は、( a ) 1 つ、2 つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号6、配列番号7および配列番号8の基準重鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに ( b ) 1 つ、2 つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号14、配列番号15および配列番号16の基準軽鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。別の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、( a ) それぞれ、配列番号6、配列番号7および配列番号8の基準重鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに ( b ) それぞれ、配列番号14、配列番号15および配列番号16の基準軽鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

20

**【0023】**

1つの実施形態において、本発明は、ヒトE G F Rに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を提供し、前記抗体またはその抗原結合断片は、( a ) 1 つ、2 つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号6、配列番号9および配列番号8の基準重鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに ( b ) 1 つ、2 つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号14、配列番号15および配列番号16の基準軽鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。別の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、( a ) それぞれ、配列番号6、配列番号9および配列番号8の基準重鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに ( b ) それぞれ、配列番号14、配列番号15および配列番号16の基準軽鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

30

40

**【0024】**

1つの実施形態において、本発明は、ヒトE G F Rに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を提供し、前記抗体またはその抗原結合断片は、( a ) 1 つ、2 つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号6、配列番号10および配列番号8の基準重鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに ( b ) 1 つ、2 つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号14、配列番号15および配列番号16の基準軽鎖C D R 1 配列、C D R 2 配列およびC D R 3 配列に同一なC D R 1、C D R 2 およびC D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。別の実施形態において、( a ) それぞれ、配列番号6、配列番号10および配列番号8の基準重

50

鎖 C D R 1 配列、 C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、 C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに ( b ) それぞれ、配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 1 配列、 C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、 C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、請求項 2 7 に記載の抗体または抗原結合断片。

【 0 0 2 5 】

1 つの実施形態において、本発明の抗体または抗原結合断片は、ネズミ科、非ヒト、ヒト化、キメラ、再現化 ( r e s u r f a c e d )、またはヒト抗体または抗原結合断片である。別の実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は全長型抗体である。別の実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は抗原結合断片である。別の実施形態において、前記抗体またはその抗原結合断片は F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F d、単鎖 F v または s c F v、ジスルフィド結合 F v、V - N A R ドメイン、I g N a r、細胞内抗体、I g G C H 2、ミニボディ ( m i n i b o d y )、F ( a b' )<sub>3</sub>、テトラボディ ( t e t r a b o d y )、トリアボディ ( t r i a b o d y )、二重特異性抗体、単ドメイン抗体、D V D - I g、F c a b、m A b 2、( s c F v )<sub>2</sub>、または s c F v - F c を含む。

10

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、本明細書において記載される V H 配列および V L 配列を含むポリペプチドを提供する。

【 0 0 2 7 】

1 つの実施形態において、本発明は、実質的に類似の結合親和性でヒト E G F R とマカク E G F R の両方に結合する抗体またはポリペプチドを提供する。1 つの実施形態において、前記抗体またはポリペプチドは約 1 . 0 ~ 約 1 0 n M の K d でヒト E G F R とマカク E G F R に結合する。別の実施形態において、前記抗体またはポリペプチドは約 1 . 0 n M またはそれより良い K d でヒト E G F R とマカク E G F R に結合する。別の実施形態において、フローサイトメトリー、B i a c o r e または放射免疫アッセイによって結合親和性が測定される。

20

【 0 0 2 8 】

1 つの実施形態において、本発明は、本明細書において記載される抗体またはその抗原結合断片またはポリペプチドを産生する単離された細胞を提供する。

30

【 0 0 2 9 】

1 つの実施形態において、本発明は、本明細書において記載される抗体またはその抗原結合断片またはポリペプチドを作製する方法を提供し、方法は、( a ) 前記抗体、その抗原結合断片またはポリペプチドを発現する細胞を培養すること、および ( b ) 前記抗体、その抗原結合断片またはポリペプチドを前記培養細胞から単離することを含む。1 つの実施形態において、前記細胞は真核細胞である。

【 0 0 3 0 】

1 つの実施形態において、本発明は、式 ( A ) - ( L ) - ( C ) を有する免疫複合体を提供し、( A ) は本明細書において記載される抗体またはその抗原結合断片またはポリペプチドであり、( L ) はリンカーであり、および、( C ) は細胞傷害性薬剤であり、ならびに、前記リンカー ( L ) が ( A ) を ( C ) に連結する。別の実施形態において、前記リンカーは、切断可能リンカー、非切断可能リンカー、親水性リンカーおよびジカルボン酸ベースリンカーからなる群より選択される。別の実施形態において、前記リンカーは非切断可能リンカーである。別の実施形態において、前記リンカーは、N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルジチオ ) ペンタノエート ( S P P )、N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルジチオ ) ブタノエート ( S P D B ) または N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルジチオ ) - 2 - スルホブタノエート ( スルホ - S P D B )、N - スクシンイミジル 4 - ( マレイミドメチル ) シクロヘキサンカルボキシレート ( S M C C )、N - スルホスクシンイミジル 4 - ( マレイミドメチル ) シクロヘキサンカルボキシレート ( スルホ S M C C )、N - スクシンイミジル - 4 - ( ヨードアセチル ) - アミノベンゾエート ( S I A

40

50



B)、およびN-スクシンイミジル-[(N-マレイミドプロピオンアミド)-テトラエチレングリコール]エステル(NHS-PEG4-マレイミド)からなる群より選択される。さらなる実施形態において、前記リンカーはN-スクシンイミジル-[(N-マレイミドプロピオンアミド)-テトラエチレングリコール]エステル(NHS-PEG4-マレイミド)である。

【0031】

別の実施形態において、前記免疫複合体は、マイタンシノイド、マイタンシノイド類似体、ドキシソルピシン、修飾型ドキシソルピシン、ベンゾジアゼピン、タキソイド、CC-1065、CC-1065類似体、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリケアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アリストアチン(aristatin)、トマイマイシン誘導体、およびレプトマイシン誘導体からなる群より選択される細胞傷害性薬剤、または前記薬剤の前駆薬を含む。別の実施形態において、前記細胞傷害性薬剤はマイタンシノイドである。さらなる実施形態において、前記細胞傷害性薬剤はN(2')-デアセチル-N(2')-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-マイタンシン(DM1)またはN(2')-デアセチル-N2-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-マイタンシン(DM4)である。

10

【0032】

1つの実施形態において、本発明は、抗体もしくはその抗原結合断片または本明細書において記載されるポリペプチドまたは本明細書において記載される免疫複合体、および薬剤的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。別の実施形態において、前記医薬組成物は、第2の抗癌剤を含む。

20

【0033】

1つの実施形態において、本発明は、標識された本発明の抗体もしくはその抗原結合断片、ポリペプチドまたは免疫複合体を含む診断用試薬を提供する。1つの実施形態において、前記標識は、放射性標識、フルオロフォア、クロモフォア、造影剤および金属イオンからなる群より選択される。

【0034】

1つの実施形態において、本発明は、本明細書において記載される抗体もしくはその抗原結合断片、ポリペプチドまたは免疫複合体を含むキットを提供する。

【0035】

1つの実施形態において、本発明は、免疫複合体または本明細書において記載される医薬組成物と細胞を接触させることを含む、EGFR発現細胞の成長を抑制する方法を提供する。別の実施形態において、前記細胞は腫瘍細胞である。

30

【0036】

1つの実施形態において、本発明は、新生物を有する患者を治療する方法であって、治療上有効量の本明細書において記載される免疫複合体または医薬組成物を前記患者に投与することを含む方法を提供する。別の実施形態において、前記新生物は、腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、副腎、副甲状腺、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺、眼、頭部および頸部、中枢神経系、末梢神経系、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部および泌尿生殖器系の新生物からなる群より選択される。別の実施形態において、前記方法は、前記対象に第2の抗癌剤を投与することを含む。さらなる実施形態において、その第2の抗癌剤は化学療法剤である。

40

【0037】

1つの実施形態において、本発明は、患者の細胞増殖障害を治療する方法であって、治療上有効量の本明細書において記載される免疫複合体または医薬組成物を前記患者に投与することを含む方法を提供する。別の実施形態において、前記細胞増殖障害は、新生物の他に、副腎皮質過形成(クッシング病)、先天性副腎過形成、子宮内膜増殖症、良性前立腺肥大症、乳房過形成、内膜過形成、局所性上皮過形成(ヘック病)、皮脂腺過形成、代償性肝臓過形成、および他の任意の細胞増殖障害からなる群より選択される。

【0038】

50

1つの実施形態において、本発明は、配列番号17～28からなる群より選択される配列に少なくとも90%同一であるポリペプチドをコードする配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施形態において、前記配列は、配列番号17～28からなる群より選択される配列に少なくとも95%同一な配列である。さらなる実施形態において、前記配列は、配列番号17～28からなる群より選択される配列に少なくとも99%同一である。

【0039】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号29～40に少なくとも90%同一である配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、配列番号29～40に少なくとも95%同一な配列を含む。さらなる実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、配列番号29～40に少なくとも99%同一な配列を含む。さらに別の実施形態において、本発明は、配列番号17～40からなる群より選択される配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施形態において、本発明は、本明細書において記載されるポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。別の実施形態において、本発明は、本明細書において記載されるベクターを含む宿主細胞を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】表記の抗EGFR抗体のヒトEGFR(huEGFR)とサルEGFR(maEGFR)抗原への結合親和性を説明する表を示す。

【図2】ML66 VL(A)およびVH(B)の再現(resurfacing)におけるフレームワーク表面残基の特定の変化を描写する表を示す。

【図3】ML66 VL(A)およびVH(B)の再現化(resurfaced)配列とネズミ科対応物のアラインメントを示す。

【図4】ML-66(黒四角形)とhuML-66(白四角形)のMDA-MB468細胞への結合を描写する線グラフを示す。

【図5】MDA-MB468細胞(A)およびヒト初代ケラチノサイト(B)でのリガンド誘導性EGFRリン酸化における表記の抗EGFR抗体の効果を描写するウエスタンブロットデータを示す。

【図6】外来性EGFRリガンドが存在しないときの、MDA-MB468細胞でのEGFRリン酸化への表記の抗EGFR抗体の効果を描写するウエスタンブロットデータを示す。

【図7】muEGFR-8(菱形)とhuML66(白四角)が存在するときの、ビオチン化TGF(A)とEGF(B)リガンドの腫瘍細胞への結合を描写する線グラフを示す。

【図8】図8は、ヒト初代ケラチノサイトの増殖の抑制におけるmuEGFR-8(菱形)とhuML66(白四角)の能力を描写する線グラフを示す。

【図9】表記の濃度のEGF(A)またはTGF(B)により刺激されたMCF10A細胞増殖の抑制におけるmuEGFR-8(菱形)とhuML66(白丸)の能力を描写する線グラフを示す。

【図10】NCI-H292(A)細胞株とNCI-H322M(B)細胞株の基底細胞増殖の抑制におけるmuEGFR-8(菱形)とhuML66(白丸)の能力を描写する線グラフを示す。

【図11】表記の濃度のmuEGFR-8(菱形)とhuML66(白四角)が存在するときの、ビオチン化528抗体(A)とセツキシマブ(B)のMDA-MB468細胞への結合を描写する線グラフを示す。

【図12】表記の濃度のhuML66とchKTI抗体が存在するときの、NK細胞媒介性の特異的殺滅%を描写する線グラフを示す。

【図13】図13は、huML66裸抗体(A)とmuEGFR-8裸抗体(B)およびそれらの対応するDMx複合体の結合曲線を示す。

10

20

30

40

50

【図14】NCI-H226細胞株(A)、NCI-H292細胞株(B)およびNCI-H322M細胞株(C)におけるML66-SMCC-DM1複合体およびML66-SPDB-DM4複合体の細胞傷害活性を描写する線グラフを示す。

【図15】過剰なML66ブロッキング抗体が存在するとき、または、ML66ブロッキング抗体が存在しないときの、KB細胞株におけるML66-SMCC-DM1の細胞傷害活性を描写する線グラフを示す。

【図16】NCI-H226細胞株(A)、NCI-H292細胞株(B)およびNCI-H322M細胞株(C)におけるmuEGFR-8-SMCC-DM1複合体の細胞傷害活性を描写する線グラフを示す。

【図17】表記のマイタンシノイド複合体で処置されたマウスにおけるKB腫瘍異種移植片の増殖を描写する線グラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本発明の詳細な説明

本発明は、非アンタゴニスト特性を有する、新しいクラスのEGFR結合分子を提供する。また、抗EGFR抗体の免疫複合体は、インビボ腫瘍モデルを用いて示されるように、思いのほかよくEGFR発現細胞を殺滅する。

【0042】

I. 定義

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語と言い回しを以下に定義する。

【0043】

本明細書において使用される場合、「上皮成長因子受容体」または「EGFR」は成熟型チロシンキナーゼ細胞表面受容体を指す。「可溶性EGFR」または「sEGFR」という用語は、EGFRの細胞外リガンド結合性ドメインを含むEGFRの一部を指す。より具体的には、sEGFRは成熟型EGFRのアミノ酸1~619を含む(Ullrich et al., Human Epidermal Growth Factor cDNA Sequence and Aberrant Expression of the Amplified Gene in A-431 Epidermoid Carcinoma Cells, Nature, Vol. 309, 418-25 (1986))。

【0044】

「EGFR媒介性癌」という言い回しは、正常な、対応する上皮組織でのレベルよりも高いレベルにまでEGFRが異常に活性化されている上皮腫瘍を特徴とする癌を指す。これらの比較的高いレベルのEGFRの活性が多く種類の癌で腫瘍の成長を促進する。そのような癌には非小細胞性肺癌、乳癌、大腸直腸癌、頭部および頸部癌および前立腺癌が含まれるが、これらに限定されない。EGFRの異常な活性化は前記受容体の過剰発現、遺伝子増幅、活性化変異、受容体リガンドの過剰発現、および/またはEGFR活性の調節因子の喪失により生じ得る。

【0045】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を通じて、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、または前述のものの組合せなどの標的を認識し、そして、特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味する。本明細書において使用される場合、「抗体」という用語は、抗体が所望の生物活性を示す限り、完全型ポリクローナル抗体、完全型モノクローナル抗体、抗体断片(Fab断片、Fab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、およびFv断片など)、単鎖Fv(scFv)変異体、少なくとも2つの完全型抗体から形成された二重特異性抗体などの多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原決定部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む他の任意の改変型免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、それらの、それぞれ、 、 、 およびμと称される重鎖定常ドメインの識別に基づき、主要な5つのクラスの免疫グロブリン、すなわち、IgA、IgD、

10

20

30

40

50

I g E、I g GおよびI g M、またはそれらのサブクラス(アイソタイプ)(例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1およびI g A 2)のいずれかの抗体であり得る。異なるクラスの免疫グロブリンは異なる、そして、周知のサブユニット構造と三次元構造を持つ。抗体は裸抗体、または、毒素、放射性同位体などの他の分子との複合体であり得る。

【0046】

「ブロッキング」抗体または「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原、例えば、E G F Rの生物活性を阻害する、または、低下させる抗体である。いくつかの実施形態において、ブロッキング抗体またはアンタゴニスト抗体は抗原の生物活性を実質的に、または完全に阻害する。生物活性は10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%低下させられることが可能であり、または100%低下させられることさえ可能である。

10

【0047】

抗体に関して、「E G F Rの活性化を阻害する能力」という言い回しは、本明細書において使用される場合、そのE G F Rへの結合がヒトE G F Rの活性化とその受容体が活性化して生じるヒトE G F Rの生物活性を阻害することになる抗体に当てはまると意図される。細胞増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、受容体結合アッセイ、受容体リン酸化アッセイ、またはマウス腫瘍モデルのいずれかをを用いて決定されるような(実施例を参照のこと)、E G F R生物活性の1つ以上の指標を測定することにより、E G F Rの活性化を阻害する抗体の能力をアッセイすることができる。

20

【0048】

「抗E G F R抗体」または「E G F R結合抗体」という用語は、抗体が診断薬および/または治療薬としてE G F Rを標的とすることに有用である程に、十分な親和性でE G F Rに結合可能である抗体を指す。いくつかの抗E G F R抗体が当技術分野において公知である。例えば、セツキシマブ(A b 2 2 5)および5 2 8 A bは、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4, 9 4 3, 5 3 3号に記載される。

【0049】

抗E G F R抗体の無関連の非E G F Rタンパク質への結合の程度は、例えば、放射免疫アッセイ(R I A)により測定して、前記抗体のE G F Rへの結合の約10%未満であり得る。ある実施形態において、E G F R結合抗体は1  $\mu$  M以下、100 n M以下、10 n M以下、1 n M以下、または0.1 n M以下の解離定数(K d)を有する。

30

【0050】

「抗体断片」という用語は、完全型抗体の一部を指し、そして、完全型抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例にはF a b断片、F a b '断片、F ( a b ' ) 2断片およびF v断片、線状抗体、単鎖抗体、および抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【0051】

「モノクローナル抗体」は、単一抗原性決定基、またはエピトープとの非常に特異的な認識および結合に関わる均一な抗体集団を指す。これは、典型的には様々な抗原性決定基に対する様々な抗体を含むポリクローナル抗体と対照的である。「モノクローナル抗体」という用語は完全型モノクローナル抗体と全長型モノクローナル抗体の両方、ならびに抗体断片(F a b、F a b '、F ( a b ' ) 2、F vなど)、単鎖(s c F v)変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む他の任意の改変型免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、および形質導入動物を含むが、これらに限定されない様々な方法で作製されたそのような抗体を指す。

40

【0052】

「ヒト化抗体」という用語は、特定の免疫グロブリン鎖、キメラ免疫グロブリン、または最小非ヒト(例えば、ネズミ科)配列を含むその断片である非ヒト(例えば、ネズミ科)抗体の形態を指す。典型的には、ヒト化抗体は、相補性決定領域(C D R)の残基が、

50

所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター）のCDRの残基により置換されるヒト免疫グロブリンである（Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536）。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）の残基は、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種由来の抗体の対応する残基により置換される。Fvフレームワーク領域内および/または置換された非ヒト残基内のどちらかで、さらなる残基の置換により前記ヒト化抗体をさらに改変して、抗体特異性、親和性、および/または能力を改良し、そして、最適化することができる。概して、前記ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDR領域の全て、または実質的に全てを含む、少なくとも1つの、そして典型的には、2つ、または3つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、一方、FR領域の全て、または実質的に全てはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた免疫グロブリン定常領域またはドメイン（Fc）、典型的には、ヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部を含み得る。ヒト化抗体を作製するために使用される方法の例は米国特許第5,225,539号に記載される。

10

**【0053】**

抗体の「可変領域」は、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を単体で、または組合せて指す。重鎖と軽鎖の可変領域はそれぞれ、超可変領域としても知られる3つの相補性決定領域（CDR）により連結された4つのフレームワーク領域（FR）からなる。各鎖のCDRはFRにより近位にまとめられ、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRの決定には、少なくとも2つの技術、すなわち、（1）異種間配列可変性に基づくアプローチ（すなわち、Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); および（2）抗原抗体複合体の結晶学的研究に基づくアプローチ（Al-lazikani et al. (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948）がある。さらに、CDRの決定技術において、これらの2つのアプローチの組合せが時には使用される。

20

30

**【0054】**

可変ドメイン内の残基（軽鎖のおよそ残基1~107および重鎖のおよそ残基1~113）に言及する際にKabat番号付システムが一般に使用される（例えば、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。

**【0055】**

Kabatでの、アミノ酸位置番号付は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)において、抗体の編集について、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに使用される番号付システムを指す。この番号付システムを用いて、可変ドメインのFRもしくはCDRの短縮化、またはFRもしくはCDRへの挿入に応じて、実際の線状アミノ酸配列がより少ない、または付加的なアミノ酸を含むことができる。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後ろに単一アミノ酸挿入物（Kabatによる残基52a）、および重鎖FR残基82の後ろに挿入残基（例えば、Kabatによる残基82a、82b、および82cなど）を含むことができる。所与の抗体について、前記抗体の配列とKabat番号付により番号付けられた「標準」配列の相同性領域の整列により、残基の

40

50

Kabat 番号付を決定することができる。Chothia は、代わりに、構造的ループの位置に言及する (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。Kabat 番号付法を用いて番号付けするとき、Chothia CDR-H1 ループの末端は、ループ長に応じて H32 と H34 の間で変動する (これは、Kabat 番号付法が H35A と H35B に挿入を配し、35A と 35B のどちらも存在しない場合、ループを 32 で終わり、35A のみが存在する場合、ループは 33 で終わり、35A と 35B の両方が存在する場合、ループは 34 で終わるためである)。AbM 超可変領域は Kabat CDR と Chothia 構造的ループの間の妥協点を表し、Oxford Molecular の AbM 抗体モデリングソフトウェアによって使用される。

10

【表 1】

ループ	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24~L34	L24~L34	L24~L34
L2	L50~L56	L50~L56	L50~L56
L3	L89~L97	L89~L97	L89~L97
H1	H31~H35B	H26~H35B	H26~H32...34
			(Kabat 番号付)
H1	H31~H35	H26~H35	H26~H32
			(Chothia 番号付)
H2	H50~H65	H50~H58	H52~H56
H3	H95~H102	H95~H102	H95~H102

20

## 【0056】

「ヒト抗体」という用語は、ヒトにより産生された抗体、または、当技術分野において公知の技術を用いて作製される、ヒトにより産生された抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。ヒト抗体のこの定義には完全型もしくは全長型抗体、その断片、ならびに / または、例えば、ネズミ科軽鎖ポリペプチドおよびヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体などの少なくとも 1 つのヒト重鎖および / もしくは軽鎖ポリペプチドを含む抗体が含まれる。

30

## 【0057】

「キメラ抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が 2 つ以上の種に由来する抗体を指す。典型的には、軽鎖と重鎖の両方の可変領域が、所望の特異性、親和性および能力を有する哺乳類 (例えば、マウス、ラット、ウサギなど) の 1 種に由来する抗体の可変領域に対応し、一方、定常領域が、その種での免疫反応の誘発を避けるために、別の種 (通常、ヒト) に由来する抗体の配列に相同である。

## 【0058】

「エピトープ」または「抗原性決定基」という用語は本明細書において互換的に使用され、そして、特定の抗体による認識と特異的な結合が可能である抗原の部分の部分を指す。抗原がポリペプチドであるとき、エピトープは連続的アミノ酸およびタンパク質の三次折り畳みにより並置される非連続的アミノ酸の両方から形成され得る。連続的アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、タンパク質変性の際、保持されるが、三次折り畳みにより形成されるエピトープは、典型的には、タンパク質変性の際、失われる。典型的には、エピトープは、特有の空間的構造を有する少なくとも 3 アミノ酸、およびより一般には少なくとも 5 アミノ酸、または 8 ~ 10 アミノ酸を含む。

40

## 【0059】

「結合親和性」は、分子 (例えば、抗体) の単一の結合部位とその結合相手 (例えば、

50

抗原)の間の非共有結合性相互作用の強さの総計を一般的に指す。別途、示されない限り、本明細書において使用される場合、「結合親和性」は、結合ペアのメンバー(例えば、抗体と抗原)の間の1:1相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Xのその相手Yへの親和性は、一般的に解離定数(K<sub>d</sub>)により表され得る。本明細書において記載される方法を含む、当技術分野において公知の一般的な方法により親和性を測定することができる。低親和性抗体は一般に、ゆっくりと抗原に結合し、容易に解離する傾向があるが、高親和性抗体は一般に、速やかに抗原に結合し、より長く結合し続ける傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当技術分野において公知であり、本発明の目的のためにそれらのいずれも使用可能である。具体的で例示的な実施形態が以下に説明される。

#### 【0060】

結合親和性に言及するために本明細書において使用されるとき、「あるいはそれより良好な(or better)」は、分子とその結合相手の間のより強固な結合を指す。本明細書において使用されるとき、「あるいはそれより良好な(or better)」は、より小さいK<sub>d</sub>数値により表される、より強固な結合を指す。例えば、「0.6 nMまたはそれより良好な(or better)」抗原への親和性を有する抗体の抗原への親和性は< 0.6 nM、すなわち、0.59 nM、0.58 nM、0.57 nMなど、または0.6 nM未満の任意の値である。

#### 【0061】

「特異的に結合する」という表現により、抗体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合し、そして、その結合が抗原結合ドメインとエピトープの間のいくらかの相補性を必要とすることが一般に意味される。この定義によれば、抗体が無作為で無関連のエピトープに結合するよりも容易に、抗体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合するとき、その抗体はそのエピトープに「特異的に結合する」と言われる。ある抗体があるエピトープに結合するその相対的親和性の意味を修飾するために、「特異性」という用語が本明細書において使用される。例えば、抗体「A」は抗体「B」よりも所与のエピトープに高い特異性を持つとみなされることが可能である、または、抗体「A」は、関連のエピトープ「D」に対するよりも高い特異性でエピトープ「C」に結合すると言われることが可能である。

#### 【0062】

「優先的に結合する」という表現により、抗体が、関連の、同様の、相同の、または類似のエピトープに結合するよりも容易にエピトープに特異的に結合することが意味される。したがって、所与のエピトープに「優先的に結合する」抗体は、たとえ、そのような抗体が関連のエピトープと交差反応することができても、前記の関連のエピトープよりもそのエピトープに結合しやすいであろう。

#### 【0063】

基準抗体の所与のエピトープへの結合を、いくらか阻害する程度にまで、そのエピトープに抗体が優先的に結合する場合、その抗体は、前記エピトープへの基準抗体の結合を「競合的に阻害する」と言われる。競合的阻害は、当技術分野において公知の任意の方法、例えば、競合ELISAアッセイにより決定され得る。抗体が、所与のエピトープへの基準抗体の結合を少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%競合的に阻害すると言われることが可能である。

#### 【0064】

「実質的に同様の」または「実質的に同じ」という言い回しは、本明細書において使用される場合、当業者が、2つの値の間の差異を、前記値(例えば、K<sub>d</sub>値)により判断される生物学的特性に関して、生物学的および/または統計的にほとんど無い、または、全く無いとみなすほど、その2つの数値の間の類似性の程度が十分に高いことを示す(一般に、一方は本発明の抗体に関連し、他方は基準/対照抗体に関連する)。前記の2つの値の間の差異は、基準/対照抗体の値の関数として、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、または約10%未満であり得る。2つの「実質的に同様の結合親和性」の間の差異は一般的に、基準/対照抗体の値の関数として、約10%未満である。

10

20

30

40

50

## 【0065】

「単離された」ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物は、自然では見出されない形状のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物である。単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物には、それらが自然で見いだされる形状ではもはやない程度にまで精製されたものが含まれる。いくつかの実施形態において、単離された抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物は実質的に純粋である。

## 【0066】

本明細書において使用される場合、「実質的に純粋な」は、少なくとも50%純粋（すなわち、混入汚染物質が無い）、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも98%純粋、または少なくとも99%純粋である物質に当てはまる。

10

## 【0067】

「免疫複合体」または「複合体」という用語は、本明細書において使用される場合、細胞結合薬剤（すなわち、抗EGFR抗体、またはその断片）に結合した化合物またはその誘導体を指し、そして、一般式：C-L-Aにより定義され、式中、C=細胞毒素、L=リンカー、およびA=細胞結合薬剤または抗EGFR抗体または抗体断片である。免疫複合体はまた順序が逆の一般式：A-L-Cによっても定義され得る。

## 【0068】

「リンカー」は、化合物、通常は、マイタンシノイドなどの薬品を抗EGFR抗体またはその断片などの細胞結合薬剤に安定な共有結合により連結することができる任意の化学部分である。前記の化合物または抗体が活性を有するままでいる条件で、リンカーは、酸誘導性切断、光誘導性切断、ペプチダーゼ誘導性切断、エステラーゼ誘導性切断およびジスルフィド結合切断を受けやすい、または、それらに対し実質的に耐性を有する可能性がある。適切なリンカーは当技術分野においてよく知られており、例えば、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチダーゼ不安定性基およびエステラーゼ不安定性基が含まれる。リンカーにはまた、荷電リンカー、および、本明細書において記載され、および、当技術分野において公知であるようなその親水性型が含まれる。

20

## 【0069】

「癌」および「癌性」という用語は、未制御の細胞増殖を特徴とする細胞集団を有する哺乳類動物での生理的状态を指す、または説明する。癌の例には癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫および白血病が含まれるが、これらに限定されない。「腫瘍」および「新生物」は過剰な細胞成長または増殖の結果生じる、前癌性傷害を含む良性（非癌性）か悪性（癌性）のどちらかの1つ以上の細胞を指す。治療され得る、および/または、予防され得る「癌」または「腫瘍原性」疾患の例には、腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、副甲状腺、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭部および頸部、神経系（中枢および末梢の）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部、および泌尿生殖器系の新生物が含まれる。

30

## 【0070】

「癌細胞」、「腫瘍細胞」という用語および文法上の相当語は、腫瘍細胞集団の大部分を含む非腫瘍原性細胞と腫瘍原性幹細胞（癌幹細胞）の両方を含む、腫瘍または前癌性傷害に由来する細胞集団の全体を指す。本明細書において使用される場合、再生し、そして、腫瘍細胞に分化する能力に欠く腫瘍細胞のみに言及し、癌幹細胞から区別するときは、「腫瘍細胞」という用語は「非腫瘍原性」という用語により修飾される。

40

## 【0071】

「対象」という用語は、特定の治療の受容者であり得る、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類などを含むが、これらに限定されない任意の動物（例えば、哺乳類動物）を指す。典型的には、「対象」および「患者」という用語は、ヒト対象に関して、本明細書において互換的に使用される。

## 【0072】

1つ以上のさらなる治療薬「との併用」投与には同時（共同）投与および任意の順番の

50



連続投与が含まれる。

【0073】

「医薬製剤」という用語は、有効成分の生物活性が有効であることを可能にするような形態であり、そして、その製剤が投与されるであろう対象にとって受け入れがたいほど毒性が有る追加的な成分は含まない調剤薬を指す。前記製剤は無菌であり得る。

【0074】

本明細書において開示されるような抗体の「有効量」は、具体的に記述されている目的を実行するために十分な量である。「有効量」は、記述されている目的に関連して、経験的に、およびルーチンの決定され得る。

【0075】

「治療上有効量」という用語は、対象または哺乳類動物での疾患または傷害を「治療する」ために有効な抗体または他の薬品の量を指す。癌の場合では、治療上有効量の薬品は、癌細胞の数を減らし、腫瘍サイズを減らし、周辺の器官への癌細胞の浸潤を抑制し（すなわち、ある程度遅らせる、または停止させる）、腫瘍転移を抑制し（すなわち、ある程度遅らせる、または停止させる）；腫瘍の成長をある程度抑制し；および/または癌に伴う症状の1つ以上をある程度除去することができる。本明細書における「治療（treating）」の定義を参照のこと。前記薬品が増殖を防止することができる、および/または、存在している癌細胞を殺滅することができるという点で、それは細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性であり得る。「予防上有効量」は、所望の予防的結果を達成するのに必要な投薬量と必要な期間の有効な量を指す。必然的ではないが、典型的には、疾患前、または疾患の初期の段階で予防的用量が対象に用いられるので、予防上有効量は治療上有効量より少ない。

【0076】

「標識」という語は、本明細書において使用されるとき、「標識化」抗体を作製するように直接的または間接的に抗体と複合体化される検出可能な化合物または組成物を指す。標識はそれ自体が検出可能（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）であり得るか、酵素標識の場合では、検出可能である基質化合物または組成物の化学的変化を触媒することができる。

【0077】

「化学療法剤」は、作用機序に関係なく、癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤には、例えば、リツキシマブおよびシクロホスファミドなどのCD20のアンタゴニスト、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、プレジニゾン（predinisonone）、フルダラビン、エトポシド、メトトレキサート、レナリドミド、クロラムブチル、ベンタムスチンならびに/またはそのような化学療法剤の改変版が含まれる。

【0078】

「治療（treating）」または「治療（treatment）」または「治療（to treat）」または「緩和（alleviating）」または「緩和（to alleviate）」などの用語は、1）診断された病状または障害を治癒する、遅滞させる、その症状を減少させる、および/または、その進行を停止させる治療手段と2）目的の病状または障害の発生を防止する、および/または、遅延させる予防的または防止的手段の両方を指す。したがって、治療を必要とする人には、既に障害を有する人、障害を持ちやすい人、および障害が防止される予定である人が含まれる。ある実施形態において、患者が次のうちの1つ以上を示す場合、その対象は本発明の方法に従って癌の「治療」が成功している：癌細胞の数の減少または癌細胞の完全な不在；腫瘍サイズの減少；例えば、癌の軟組織および骨への進展を含む、周辺の器官への癌細胞の浸潤の阻害またはその不在；腫瘍転移の阻害またはその不在；腫瘍の成長の阻害またはその不在；特定の癌に伴う1つ以上の症状の除去；疾病率と死亡率の低下；生活の質の改善；腫瘍原性の低下、腫瘍の腫瘍原性頻度または腫瘍原性能；腫瘍での癌幹細胞の数または発生頻度の低下；腫瘍原性細胞の非腫瘍原性状態への分化；またはそれら効果の組合せ。

【0079】

10

20

30

40

50

「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、本明細書において互換的に使用されるように、任意の長さのヌクレオチドの重合体を指し、そして、それにはDNAおよびRNAが含まれる。ヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾型ヌクレオチドもしくは塩基、および/もしくはそれらの類似体、またはDNAポリメラーゼもしくはRNAポリメラーゼによって重合体に組み込まれ得る任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドはメチル化ヌクレオチドおよびそれらの類似体などの、修飾型ヌクレオチドを含み得る。修飾が存在する場合は、重合体の構築の前、または後にヌクレオチドへの修飾が加えられ得る。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断され得る。ポリヌクレオチドは重合の後に、例えば、標識成分との複合体化によりさらに修飾され得る。他の種類の修飾には、例えば、「キャップ (cap)」、天然ヌクレオチドの1つ以上の類似体との置換、例えば、非荷電結合 (例えば、メチルホスホネート、ホスフォトリエステル、ホスフォアミデート、カバメート (cabamate) など) および荷電結合 (例えば、ホスフォロチオエート、ホスフォロジチオエートなど) による修飾などのヌクレオチド間修飾、例えば、タンパク質 (例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ply-L-リシンなど) のような、ペンダント部分を含有する修飾、インターカレート剤 (例えば、アクリジン、ソラーレンなど) を有する修飾、キレート剤 (例えば、金属キレート剤、放射性金属キレート剤、ホウ素キレート剤、酸化金属キレート剤など) を含有する修飾、アルキル化剤を含有する修飾、修飾型結合を有する修飾 (例えば、芳香族核酸など)、ならびにポリヌクレオチドの非修飾型が含まれる。さらに、糖に通常存在するヒドロキシル基のいずれかが、例えば、ホスホネート基、ホスフェート基により置換され得、標準的な保護基により保護されることができ、または、さらなるヌクレオチドへのさらなる結合を準備するために活性化されることができ、または、固形支持体と複合体化されることができる。5'末端および3'末端のOHはリン酸化可能であり、または、1個から20個の炭素原子のアミンまたは有機キャッピング基部分で置換できる。他のヒドロキシルはまた標準的な保護基に対して誘導化され得る。ポリヌクレオチドは、例えば、2'-O-メチル-リボース、2'-O-アシル-リボース、2'-フルオロ-リボースまたは2'-アジド-リボース、炭素環糖類似体、 $\alpha$ -アノマー糖、アラビノース、キシロースまたはリキソースなどのエピマー糖、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプトロース、非環式類似体、およびメチルリボシドなどの無塩基ヌクレオシド類似体を含む、一般的に当技術分野において公知であるリボース糖またはデオキシリボース糖の類似型を含むことができる。1つ以上のホスフォジエステル結合が代替りの結合基によって置換され得る。これらの代替りの結合基には、ホスフェートがP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、 $P(O)NR_2$ (「アミデート」)、 $P(O)R$ 、 $P(O)OR'$ 、COまたは $CH_2$ (「ホルムアセタール」)によって置換され、各々RまたはR'が独立してHまたは、所望によりエーテル(-O-)結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルまたはアラルジルを含有する置換型もしくは非置換型アルキル(1~20C)である実施形態が含まれるが、これに限定されない。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。前述の説明は、RNAおよびDNAを含む、本明細書において言及される全てのポリヌクレオチドに当てはまる。

10

20

30

40

#### 【0080】

「ベクター」という用語は、宿主細胞において目的の1つ以上の遺伝子または配列を送達でき、そして、所望により発現できるコンストラクトを意味する。ベクターの例には、ウイルス性ベクター、裸DNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、カチオン性濃縮剤と会合したDNAまたはRNA発現ベクター、リボソーム中にカプセル化されたDNAまたはRNA発現ベクター、およびプロデューサー細胞などのある真核生物細胞が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0081】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸の重合体を指すために本明細書において互換的に使用される。その重合体は線状または分岐状であることができ、修飾型アミノ酸を含むことができ、そして非アミノ酸が割

50

り込むことができる。その用語はまた、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分との複合体化などの他の任意の操作または修飾など、天然に、または介入により修飾されたアミノ酸重合体を包含することができる。例えば、アミノ酸の1つ以上の類似体（例えば、非天然アミノ酸などを含む）、ならびに当技術分野において公知の他の修飾を含むポリペプチドもまた定義に含まれる。本発明のポリペプチドは抗体に基づいているので、ある実施形態において、前記ポリペプチドは単鎖または随伴鎖として存在し得ると理解される。

#### 【0082】

2つ以上の核酸またはポリペプチドに関しての「同一な」または「同一性」パーセントという用語は、前記配列の同一性の一部としてどのような保存的アミノ酸置換をも考慮することなく、一致が最大となるように比較および（必要に応じて、ギャップを挿入して）整列したとき、同一な、または特定のパーセンテージの同一であるヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有する2つ以上の配列またはサブ配列を指す。配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを用いて、または目視検査により同一性パーセントを測定することができる。アミノ酸またはヌクレオチド配列のアラインメントを得るために使用され得る様々なアルゴリズムおよびソフトウェアが当技術分野において公知である。配列アラインメントアルゴリズムの1つのそのような非限定的な例は、Karlin et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:2264-2268に記載され、Karlin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:5873-5877において改変され、そしてNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラムに組み込まれた(Altschul et al., 1991, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402)アルゴリズムである。ある実施形態において、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されるようにGapped BLASTを使用することができる。BLAST-2、WU-BLAST-2(Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology, 266:460-480)、ALIGN、ALIGN-2(Genentech社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニア州)またはMegalign(DNASTAR社)は、配列を整列させるために使用され得る、他の公に利用可能であるソフトウェアである。ある実施形態において、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントはGCGソフトウェアのGAPプログラムを用いて(例えば、NWSgapdna.CMPマトリックスおよび40、50、60、70、または90のギャップウェイトおよび1、2、3、4、5、または6のレンジスウェイトを用いて)決定される。ある別の実施形態において、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを決定するために、NeedlemanおよびWunschのアルゴリズム(J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970))を組み込んだGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムを使用することができる(例えば、Blossum62マトリックスかPAM250マトリックスのどちらか、および16、14、12、10、8、6、または4のギャップウェイト、および1、2、3、4、5のレンジスウェイトを用いる)。あるいは、ある実施形態において、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間の同一性パーセントは、MyersおよびMillerのアルゴリズム(CABIOS, 4:11-17 (1989))を用いて決定される。例えば、ALIGNプログラム(バージョン2.0)を用いて、および残基表付きPAM120、12のギャップレンジペナルティおよび4のギャップペナルティを用いて、同一性パーセントを決定することができる。特定のアラインメントソフトウェアによる最大のアラインメントを得るための適切なパラメータは当業者により決定され得る。ある実施形態において、アラインメントソフトウェアの初期設定パラメータが使用される。ある実施形態において、第1アミノ酸配列の第2配列アミノ酸に対する同一性パーセンテージ「X」は $100 \times (Y/Z)$ として計算され、式中、Yは、(目視検査または特定の配列アラインメントプログラムにより整列された)第1配列と第2配列のアラインメントにおいて同一性マッチとしてスコアされた

アミノ酸残基の数であり、そしてZは第2配列中の残基の総数である。第1配列の長さが第2配列よりも長い場合、第2配列に対する第1配列の同一性パーセントは、第1配列に対する第2配列の同一性パーセントよりも長いであろう。

#### 【0083】

非限定的な例としては、任意の特定のポリヌクレオチドが基準配列に対してある配列同一性パーセンテージを有しているかどうか（例えば、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一であるか、および、いくつかの実施形態では、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか）、ある実施形態では、Bestfitプログラム（Wisconsin配列解析パッケージ、Unix（登録商標）用第8版、Genetics Computer Group, University Research Park, 575 サイエンス・ドライブ、マジソン、ウィスコンシン州53711）を用いて決定することができる。Bestfitは、2つの配列間の最も良い相同性区間を見つけ出すためにSmithおよびWatermanの局所的相同性アルゴリズム（Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489）を使用する。特定の配列が本発明に従う基準配列に対して、例えば、95%同一であるか決定するためにBestfitまたは他の任意の配列整列プログラムを使用するとき、同一性のパーセンテージが基準ヌクレオチド配列の全長にわたって計算され、そして、基準配列の総ヌクレオチド数の5%までの相同性のギャップが許容されるように、パラメータが設定される。

10

#### 【0084】

いくつかの実施形態において、本発明の2つの核酸またはポリペプチドが実質的に同一であり、これは、配列比較アルゴリズムを用いて、または目視検査により測定されるように、一致が最大となるように比較および整列すると、それらが少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、および、いくつかの実施形態では、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の同一性を有していることを意味する。少なくとも約10残基、約20残基、約40~60残基の長さの、またはその間の任意の介在値の配列領域にわたって同一性が存在することが可能であり、そして、60~80残基よりも長い領域、例えば、少なくとも約90~100残基にわたって同一性が存在することが可能であり、そして、いくつかの実施形態では、例えば、ヌクレオチド配列のコーディング領域などの比較されている配列の全長にわたってその配列が実質的に同一である。

20

30

#### 【0085】

「保存的アミノ酸置換」は、1つのアミノ酸残基が類似の側鎖を有する別のアミノ酸残基で置換されるアミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーが当技術分野において定義されており、それらは塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。例えば、チロシンのフェニルアラニンへの置換は保存的置換である。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドおよび抗体の配列における保存的置換は、そのアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは抗体の抗原、すなわち、前記ポリペプチドまたは抗体が結合するEGFRへの結合を抑制しない。抗原結合を排除しないヌクレオチドおよびアミノ酸の保存的置換を同定する方法は当技術分野において周知である（例えば、Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993)、Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10): 879-884 (1999)、および Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997)を参照のこと）。

40

50

## 【0086】

本開示および特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、別途、文脈から明確に指示されない限り、複数形を含む。

## 【0087】

「含む (comprising)」という言葉を用いて実施形態が本明細書において記載される場合、その他の点では、「からなる (consisting of)」および/または「から基本的になる (consisting essentially of)」という用語で記載される類似の実施形態もまた提供されると理解される。

## 【0088】

「Aおよび/またはB」などの句で使用されるような「および/または」という用語は、本明細書において、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」、ならびに「B」のどれも含むとされる。同様に、「A、B、および/またはC」などの句で使用されるような「および/または」という用語は、次の実施形態：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A（のみ）；B（のみ）；ならびにC（のみ）のそれぞれを包含するとされる。

## 【0089】

## II. EGF R 結合薬剤

腫瘍は、多くの場合、様々なリガンドリガンドに結合し、そして、無制限の腫瘍の成長を促進する成長因子受容体を過剰発現する。そのような成長因子受容体の1つの例は上皮成長因子受容体 (EGFR) タンパク質ファミリーの受容体である。

## 【0090】

上皮成長因子受容体 (EGFR) タンパク質ファミリーのメンバーによるシグナル伝達は、リガンドの結合により引き起こされるホモ二量体またはヘテロ二量体の形成に依存する。この受容体ファミリーは4つの膜結合型タンパク質、すなわちEGFR、HER2/neu、HER3およびHER4からなる。これらのタンパク質の過剰発現は、乳房、大腸、卵巣、子宮内膜、胃、膵臓、前立腺および唾液腺の癌を含むが、これらに限定されない、多くの種類の癌の予後不良と相関づけられている。多数のグループが、腫瘍の成長を抑制するために、EGFRタンパク質ファミリーの個々のメンバー（例えば、HER2/neuまたはEGFR）を標的とする戦略を開発してきているが、その治療のうち、これらの形態の癌を最終的に治癒させると証明されているものは無い。

## 【0091】

本発明に従って、EGFRに特異的に結合する新規の薬剤（例えば、抗体）が提供される。これらの新規の薬剤はEGFR非拮抗性である。しかしながら、（例えば、免疫複合体として）エフェクターに結合するとき、前記免疫複合体が作用して、標的細胞の成長および/または増殖を抑制することができるように、そのエフェクターは殺活性をレスキューする。

## 【0092】

したがって、本発明は、EGFRに特異的に結合する薬剤を提供する。これらの薬剤は本明細書において「EGFR結合薬剤」と称される。記載されるEGFR結合薬剤は、非拮抗性抗体であるという点で先行技術のEGFR結合薬剤と異なり、そして、それらはわずかに作動性であり得る。

## 【0093】

ある実施形態において、前記EGFR結合薬剤は抗体、免疫複合体またはポリペプチドである。いくつかの実施形態において、EGFR結合薬剤はヒト化抗体である。

## 【0094】

ある実施形態において、前記EGFR結合薬剤は次の作用のうちの1つ以上を有する：腫瘍細胞の増殖を抑制する、腫瘍中の癌幹細胞の出現頻度を低下させることにより腫瘍の腫瘍原性を低減させる、腫瘍の成長を抑制する、生存率を増加させる、腫瘍細胞の細胞死を引き起こす、腫瘍原性細胞を非腫瘍原性状態に分化させる、または腫瘍細胞転移を防止する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態において、前記 E G F R 結合薬剤は腫瘍体積を低下させることができる。E G F R 結合薬剤の腫瘍体積を低下させる能力は、例えば、対照被検者の腫瘍体積の中央値で除算された治療対象の腫瘍体積の中央値である、% T / C 値を測定することにより評価される。いくつかの実施形態において、E G F R 結合薬剤を用いる治療の結果、% T / C 値が約 5 5 % 未満、約 5 0 % 未満、約 4 5 % 未満、約 4 0 % 未満、約 3 5 % 未満、約 3 0 % 未満、約 2 5 % 未満、約 2 0 % 未満、約 1 5 % 未満、約 1 0 % 未満または約 5 % 未満になる。

## 【 0 0 9 6 】

ある実施形態において、ヒト E G F R に特異的に結合する免疫複合体または他の薬剤が細胞傷害性薬剤による細胞死を引き起こす。例えば、ある実施形態において、ヒト E G F R 抗体に対する抗体が、E G F R を発現する腫瘍細胞においてタンパク質の内部移行により活性化されるマイタンシノイドと複合体化される。ある別の実施形態において、前記薬剤または抗体は複合体化されていない。

10

## 【 0 0 9 7 】

ある実施形態において、E G F R 結合薬剤は腫瘍の成長を抑制することができる。ある実施形態において、E G F R 結合薬剤はインビボで（例えば、異種移植片マウスモデルおよび/または癌を有するヒトで）腫瘍の成長を抑制することができる。

## 【 0 0 9 8 】

E G F R 結合薬剤は E G F R 抗体 M L 6 6 および E G F R - 8 ならびにその断片、異型体および誘導体を含む。E G F R 結合薬剤はまた、抗体 M L 6 6 および E G F R - 8 と同じ E G F R エピトープに特異的に結合する E G F R 結合薬剤を含む。E G F R 結合薬剤はまた、抗体 M L 6 6 および E G F R - 8 を競合的に阻害する E G F R 結合薬剤を含む。M L 6 6 の重鎖配列および軽鎖配列をコードするプラスミドは 2 0 1 0 年 1 0 月 2 1 日に米国培養細胞系統保存機関 ( A T C C ) に寄託され、そして、P T A - 1 1 4 2 4 の受託番号を与えられた。E G F R - 8 をコードするハイブリドーマは 2 0 1 0 年 1 0 月 2 1 日に A T C C に寄託され、そして、P T A - 1 1 4 2 3 の受託番号を与えられた。

20

## 【 0 0 9 9 】

E G F R 結合薬剤はまた、M L 6 6 および E G F R - 8 の重鎖 C D R 配列および軽鎖 C D R 配列を含む E G F R 結合薬剤を含む。M L 6 6 および E G F R - 8 の C D R 配列は、ネズミ科抗体とヒト化抗体の両方だが、下記の表 1 および 2 に記載される。

30

## 【表 2】

表 1：可変重鎖 CDR アミノ酸配列

抗体	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
ML66	ASNSVS (配列番号 1)	VIWNHGGTD (配列番号 2)	KGGIYFDY (配列番号 3)
ML66 Kabat HC CDR2 (ラット)		VIWNHGGTDYNSVIKS (配列番号 4)	
ML66 Kabat HC CDR2 (ヒト化)		VIWNHGGTDYNPSIKS (配列番号 5)	
EGFR-8	KDTYIH (配列番号 6)	RIDPTNGNKK (配列番号 7)	EDGYRYDDWYFDV (配列番号 8)
EGFR-8 Kabat HC CDR2 (マウス)		RIDPTNGNKKYDPKFQG (配列番号 9)	
EGFR-8 Kabat HC CDR2 (ヒト化)		RIDPTNGNKKYDQKFQG (配列番号 10)	

10

20

## 【表 3】

表 2：可変軽鎖 CDR アミノ酸配列

抗体	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
ML66	RASESVSTLMH (配列番号 11)	LASHRES (配列番号 12)	QQRNDPWT (配列番号 13)
EGFR-8	SASSVSYMH (配列番号 14)	ATSKLAS (配列番号 15)	QQWSSNPLT (配列番号 16)

30

## 【0100】

EGFR 結合分子は、CDR 当たり、4 つまでの (すなわち、0、1、2、3、または 4 つの) 保存的アミノ酸置換を有する ML66 または EGFR-8 の CDR を含む、EGFR に特異的に結合する抗体、または抗原結合断片であり得る。

## 【0101】

ポリペプチドは、本明細書において記載される個々の可変軽鎖または可変重鎖のうちの 1 つを含み得る。抗体およびポリペプチドはまた可変軽鎖と可変重鎖の両方を含み得る。ネズミ科およびヒト化 ML66 および EGFR-8 抗体の可変軽鎖配列および可変重鎖配列が下記の表 3 および 4 に提供される。

40

## 【表 4】

表 3 : 可変重鎖アミノ酸配列

抗体	VH アミノ酸配列
ラット ML66 V <sub>H</sub>	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGLSLASNSVSWIRQPPGKGLEWMGVIWNH GGTDYNSVIKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAMYFCVRKGGIYFDYWGQ GVMVTVSS (配列番号 17)
huML66 V <sub>H</sub>	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGLSLASNSVSWIRQPPGKGLEWMGVIWNH GGTDYNPSIKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLTAADTAMYFCVRKGGIYFDYWGQ GVLVTVSS (配列番号 18)
muEGFR-8 V <sub>H</sub>	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTTSGFNKDTYIHWVKKRPEQGLEWIGRIDPTN GNNKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTREDGYRYDDWYF DVWGAGTTVTVSS (配列番号 19)
huEGFR-8 V <sub>H</sub>	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCTTSGFTIKDTYIHWVKKRPGQGLEWIGRIDPTN GNNKYDQKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTREDGYRYDDWY FDVWGQGLTVTVSS (配列番号 20)

10

20

## 【表 5】

表 4 : 可変軽鎖アミノ酸配列

抗体	VL アミノ酸配列
ラット ML66 V <sub>L</sub>	DTVLTQSPALAVSPGERVTISCRASESVSTLMHWYQQKSGQQPKLLIYLAS HRESGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPMEADDTATYYCQQSRNDPWTFGGGT NLELKR (配列番号 21)
huML66 V <sub>L</sub>	DTVLTQSPSLAVSPGERATISCRASESVSTLMHWYQQKPGQQPKLLIYLAS HRESGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPMEAEDTATYYCQQSRNDPWTFGQGTK LELKR (配列番号 22)
muEGFR-8 V <sub>L</sub>	QIVLTQSPASMSASPGKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYATS KLAGVVPARFSGSGSGTSSYSLTSSMEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGAGTK LELKR (配列番号 23)
huEGFR-8 V <sub>L</sub>	DIVLTQSPAFMSASPGKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKPDQSPKRWIYAT SKLAGVPSRFSGSGSGTDYSLTSSMEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGQGT KLELKR (配列番号 24)

30

40

## 【0102】

(a) 配列番号 17 ~ 20 に対して少なくとも約 90% の配列同一性を有するポリペプチド、および / または (b) 配列番号 21 ~ 24 に対して少なくとも約 90% の配列同一

50



性を有するポリペプチドを含むポリペプチドもまた提供される。ある実施形態において、前記ポリペプチドは、配列番号 17 ~ 24 に対して少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。したがって、ある実施形態において、前記ポリペプチドは (a) 配列番号 17 ~ 20 に対して少なくとも約 95% の配列同一性を有するポリペプチド、および/または (b) 配列番号 21 ~ 24 に対して少なくとも約 95% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。ある実施形態において、前記ポリペプチドは (a) 配列番号 17 ~ 20 のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび/または (b) 配列番号 21 ~ 24 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。ある実施形態において、前記ポリペプチドは、EGFR に特異的に結合する抗体および/またはポリペプチドである。ある実施形態において、前記ポリペプチドは、EGFR に特異的に結合するネズミ科、キメラ、またはヒト化抗体である。ある実施形態において、配列番号 17 ~ 24 に対してあるパーセンテージの配列同一性を有する前記ポリペプチドは、保存的アミノ酸置換のみによって、配列番号 17 ~ 24 と異なる。

## 【表 6】

表 5 : 重鎖および軽鎖全長アミノ酸配列

抗体	全長型重鎖/軽鎖アミノ酸配列	
huML66HC	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGLSLASNSVSWIRQPPGKGLEWMGVI WNHGGTDYNPSIKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLTAADTAMYFCVRKGGIY FDYWGQGVLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 25)	10
huML66LC	DTVLTQSPSLAVSPGERATISCRASESVSTLMHWYQQKPGQPKLLIYLAS HRESGVPARFSGSGSDTDFLTIDPMEAEDTATYYCQQRNDPWFQGGTK LELKRITVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC (配列番号 26)	20
huEGFR-8 HC	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCTTSQFTIKDTYIHVWVKRPGQGLEWIGRI DPTNGNPKYDQKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTREDG YRYDDWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番 号 27)	30
huEGFR-8 LC	DIVLTQSPAIFMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKPDQSPKRWIYAT SKLASGVPSPRFSGSGSDYSLTISSEMEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGQGT KLELKRITVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV VTKSFNRGEC (配列番号 28)	40

## 【0103】

(a) 配列番号 25 および 27 に対して少なくとも約 90% の配列同一性を有するポリペプチド、および/または (b) 配列番号 26 および 28 に対して少なくとも約 90% の配列同一性を有するポリペプチドを含むポリペプチドもまた提供される。ある実施形態において、前記ポリペプチドは、配列番号 25 ~ 28 に対して少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の

配列同一性を有するポリペプチドを含む。したがって、ある実施形態において、前記ポリペプチドは (a) 配列番号 25 および 27 に対して少なくとも約 95% の配列同一性を有するポリペプチド、および / または (b) 配列番号 26 および 28 に対して少なくとも約 95% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。ある実施形態において、前記ポリペプチドは (a) 配列番号 25 および 27 のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび / または (b) 配列番号 26 および 28 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。ある実施形態において、前記ポリペプチドは、EGFR に特異的に結合する抗体および / またはポリペプチドである。ある実施形態において、前記ポリペプチドは、EGFR に特異的に結合するヒト化抗体である。ある実施形態において、配列番号 25 ~ 28 に対してあるパーセンテージの配列同一性を有する前記ポリペプチドは、保存的アミノ酸置換のみにより、配列番号 25 ~ 28 と異なる。

10

## 【0104】

Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495 により説明されるものなどの、ハイブリドーマ方法を用いてモノクローナル抗体を調製することができる。免疫抗原に特異的に結合する抗体のリンパ球による産生を誘発するために、前記ハイブリドーマ方法を用いて、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物が上記のように免疫される。リンパ球はまたインビトロで免疫され得る。免疫後、リンパ球を単離し、そして、例えば、ポリエチレングリコールを用いて適切な骨髄腫細胞株と融合して、次に未融合のリンパ球と骨髄腫細胞から選別することができるハイブリドーマ細胞を形成する。免疫沈澱、イムノプロットングにより、またはインビトロ結合アッセイ (例えば、放射免疫アッセイ (RIA) ; 酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) ) により判定されるような、選択された抗原に対して特異的な指向性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、その後、標準的な方法 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) を用いるインビトロ培養で、または動物の腹水腫瘍としてインビボで増殖ができる。その後、前記モノクローナル抗体は培養液または腹水から、ポリクローナル抗体について上述したように精製され得る。

20

## 【0105】

あるいは、モノクローナル抗体はまた、米国特許第 4, 816, 567 号に記載されるように、組換え DNA 法を用いて作製され得る。モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、前記抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを用いる RT-PCR などにより成熟型 B 細胞またはハイブリドーマ細胞から単離され、そして、それらの配列は従来手法を用いて決定される。その後、重鎖および軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドは適切な発現ベクターにクローン化され、本来、免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞または骨髄腫細胞などの宿主細胞に形質移入されると、その宿主細胞によってモノクローナル抗体が作製される。また、所望の種の組換えモノクローナル抗体またはその断片を、記載されるように、所望の種の CDR を発現するファージディスプレイライブラリーから単離することができる (McCafferty et al., 1990, Nature, 348: 552 - 554, Clackson et al., 1991, Nature, 352: 624 - 628, および Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222: 581 - 597)。

30

40

## 【0106】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、別の抗体を作製するために組換え DNA 技術を用いて、多種多様な方法でさらに改変され得る。いくつかの実施形態において、例えば、マウスモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の定常ドメインが、1) キメラ抗体を作製するために、例えば、ヒト抗体のそれらの領域の代わりに置換されることができ、または、2) 融合抗体を作製するために非免疫グロブリンポリペプチドの代わりに置換されることができ、いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体の所望の抗

50

体断片を作成するために、前記定常領域が短縮または除去される。モノクローナル抗体の特異性、親和性などを最適化するために、可変領域の部位特異的突然変異形成または高密度突然変異形成が用いられ得る。

【0107】

いくつかの実施形態において、ヒトEGFRに対するモノクローナル抗体はヒト化抗体である。ある実施形態において、そのような抗体は、ヒト対象に投与されるとき、抗原性とHAM A（ヒト抗マウス抗体）反応を低減させるために治療的に使用される。当技術分野において公知の様々な技術を用いてヒト化抗体が作製され得る。ある別の実施形態において、EGFRに対する抗体はヒト抗体である。

【0108】

当技術分野において公知の様々な技術を用いてヒト抗体が直接調製され得る。インビトロで免疫されて、または標的抗原に対して指向性を有する抗体を産生する免疫された個体から単離された、不死化ヒトBリンパ球が作製され得る（例えば、Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985)、Boemer et al., 1991, *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95、および米国特許第5,750,373を参照のこと）。また、例えば、Vaughan et al., 1996, *Nat. Biotech.*, 14:309-314、Sheets et al., 1998, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 95:6157-6162、Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381、およびMarks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581)に記載されるように、ヒト抗体を発現するファージライブラリーからヒト抗体を選択することができる。抗体ファージライブラリーの作製と使用についての技術はまた、米国特許第5,969,108号、第6,172,197号、第5,885,793号、第6,521,404号、第6,544,731号、第6,555,313号、第6,582,915号、第6,593,081号、第6,300,064号、第6,653,068号、第6,706,484号、および第7,264,963号、およびRothe et al., 2007, *J. Mol. Bio.*, doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018（それらの各々の全体が参照により組み込まれる）に記載される。親和性成熟戦略と鎖シャッフリング(chain shuffling)戦略(Marks et al., 1992, *Bio/Technology* 10:779-783、その全体が参照により組み込まれる)が当技術分野において公知であり、そして、高親和性ヒト抗体を作製するために用いられ得る。

【0109】

ヒト化抗体はまた、免疫されると、内在性免疫グロブリンの産生が無い状態で、全レパートリーのヒト抗体を産生することができる、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含有する形質導入マウスで作製され得る。このアプローチは米国特許第5,545,807号、第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、および第5,661,016号に記載される。

【0110】

この発明はまた、EGFRを特異的に認識する二重特異性抗体を包含する。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープを特異的に認識し、そして結合することができる抗体である。その異なるエピトープは同じ分子（例えば、同じEGFR）内にあるか、例えば、両方の前記抗体がEGFR、ならびに、例えば、1) T細胞受容体（例えば、CD3）もしくはFc受容体（例えば、CD64、CD32、もしくはCD16）などの白血球上のエフェクター分子、または2) 以下に詳細が説明されるような細胞傷害性薬剤を特異的に認識し、そして結合することができるように、異なる分子内にあるかのどちらかであり得る。

【0111】

10

20

30

40

50

例示的な二重特異性抗体は2つの異なるエピトープに結合することができ、そのうちの少なくとも1つは本発明のポリペプチドに由来する。あるいは、特定の抗原を発現する細胞に細胞防御機構を集中するように、免疫グロブリン分子の抗 抗原アームは、T細胞受容体分子（例えば、CD2、CD3、CD28、もしくはB7）、またはIgGのFc受容体などの白血球上のトリッガー分子に結合するアームと組み合わせられ得る。二重特異性抗体はまた、特定の抗原を発現する細胞に細胞傷害性薬剤を向けるために使用され得る。これらの抗体は抗原結合アーム、および細胞傷害性薬剤またはEOTUBE、DPTA、DOTAもしくはTETAなどの放射性核種キレート剤に結合するアームを有する。二重特異性抗体を作製する技術は当技術分野において一般的である（Millstein et al., 1983, Nature 305:537-539、Brennan et al., 1985, Science 229:81、Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol. 121:120、Trauneker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659、Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225、Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553、Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152:5368、および米国特許第5,731,168）。二価よりも多い価数を有する抗体もまた考慮される。例えば、三重特異的抗体が調製され得る（Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)）。したがって、ある実施形態において、EGFRに対する抗体は多重特異性である。

#### 【0112】

ある実施形態において、例えば、腫瘍透過性を増すために、抗体断片が提供される。抗体断片の作製について、様々な技術が知られている。伝統的に、これらの断片は完全型抗体のタンパク質分解性消化に由来する（例えば、Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117、Brennan et al., 1985, Science, 229:81）。ある実施形態において、抗体断片は組換え技術により作製される。Fab抗体断片、Fv抗体断片およびscFv抗体断片は全て大腸菌または他の宿主細胞で発現され、そして分泌されることができ、したがって、大量のこれらの断片の産生が可能になる。そのような抗体断片はまた先に考察した抗体ファージライブラリーから単離され得る。前記抗体断片は、例えば、米国特許第5,641,870号に記載されるように、線状抗体であり、そして、単一特異性または二重特異性であり得る。抗体断片作製の他の技術は当業者に明らかである。

#### 【0113】

本発明によれば、EGFRに特異的な単鎖抗体の作製のために技術を適合させることができる（米国特許第4,946,778号を参照のこと）。さらに、EGFRへの所望の特異性を有するモノクローナルFab断片、またはその誘導体、断片、類似体もしくは相同体の敏速で有効な同定を可能にするFab発現ライブラリー（Huse, et al., Science 246:1275-1281 (1989)）の構築のために方法を適合させることができる。（a）抗体分子のペプシン消化により作製されたF(ab')<sub>2</sub>断片；（b）F(ab')<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を還元することにより作製されたFab断片、（c）パインと還元剤を用いる抗体分子の処理により作製されたFab断片、および（d）Fv断片を含むが、これらに限定されない抗体断片が当技術分野における技術により作製され得る。

#### 【0114】

特に抗体断片の場合、その血清中半減期を増加させるために抗体を修飾することがさらに望ましい場合がある。例えば、抗体断片内の適切な領域の突然変異によりサルベージ受容体結合エピトープを抗体断片に組み込むことによって、または、その後、抗体断片とどちらかの末端もしくは内部で融合されるペプチドタグに前記エピトープを（例えば、DN

A 合成またはペプチド合成により) 組み込むことによって、これが達成され得る。

【0115】

ヘテロ複合体化抗体もまた本発明の範囲内にある。ヘテロ複合体化抗体は2つの共有結合により結合された抗体からなる。そのような抗体は、例えば、免疫細胞を望まない細胞にターゲティングすると主張されている(米国特許第4,676,980号)。架橋剤を当然必要とする方法を含む、合成タンパク質化学において公知の方法を用いて、インビトロで前記抗体を調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を用いて、またはチオエーテル結合形成により免疫毒素を構築することができる。この目的に適切な試薬の例にはイミノチオレート(iminothiolate)およびメチル-4-メルカプトブチリミデート(methyl-4-mercaptobutyrimide)が含まれる。

10

【0116】

本発明の目的のため、修飾型抗体は、ヒトEGFRのポリペプチドと前記抗体の結合のために備えられている任意の種類の可変領域を含み得るということが理解されるべきである。この点で、前記可変領域は、誘導されて液性反応を開始することができ、そして、所望の腫瘍関連抗原に対する免疫グロブリンを作製することができる任意の種類の哺乳類動物を含むことができ、またはそれに由来することができる。したがって、修飾型抗体の可変領域は、例えば、ヒト、ネズミ科、非ヒト霊長類(例えば、カニクイザル、マカクなど)またはオオカミの起源であり得る。いくつかの実施形態において、修飾型免疫グロブリンの可変領域と定常領域の両方がヒトのである。他の実施形態において、適合性が有る抗体の可変領域(通常、非ヒトソースに由来する)は、その分子の結合特性を改善し、または、その分子の免疫原性を低下させるために、操作または特異的に適合させることができる。この点で、本発明において有用な可変領域はヒト化され得、または、そうでなければ、導入されたアミノ酸配列を含むことにより改変され得る。

20

【0117】

ある実施形態において、1つ以上のCDRの少なくとも部分的置換により、そして、必要に応じて、部分的フレームワーク領域置換と配列変更により重鎖および軽鎖の両方の可変ドメインを改変する。前記CDRは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラスまたはそれどころか同じサブクラスの抗体に由来し得るが、前記CDRは異なるクラスの抗体、および、ことによると異なる種の抗体に由来することが考えられる。1つの可変ドメインの抗原結合能力を別のものに振替えるために、CDRの全てをドナー可変領域のCDR全部で置き換えることが常に必要なわけではない。むしろ、いくつかの場合では、前記抗原結合部位の活性を維持するために必要な残基を振替えることが必要なだけである。米国特許第5,585,089号、第5,693,761号および第5,693,762号に示される説明を考慮すると、ルーチン的な実験を行うか試行錯誤による実験を行うかのどちらかにより免疫原性が低減した機能性抗体を得ることは優に当業者の能力の範囲内である。

30

【0118】

可変領域の改変にも関わらず、本発明の修飾型抗体は、天然または未改変の定常領域を含む、およそ同じ免疫原性を有する抗体と比較すると、上昇した腫瘍局在性または減少した血清中半減期などの所望の生化学的特質をもたらすように、定常領域ドメインのうちの1つ以上の少なくとも一部が欠失されているか、またはそうでなければ改変されている抗体(例えば、全長型抗体またはその免疫反応性断片)を含むと当業者は理解する。いくつかの実施形態において、修飾型抗体の定常領域はヒト定常領域を含む。本発明に適合する定常領域の修飾は1つ以上のドメイン内の1つ以上のアミノ酸の付加、欠失または置換を含む。すなわち、本明細書において開示される修飾型抗体は3つの重鎖定常ドメイン(CH1、CH2またはCH3)の1つ以上および/または軽鎖定常ドメイン(CL)に改変または修飾を含み得る。いくつかの実施形態において、1つ以上のドメインが部分的または完全に欠失されている修飾型定常領域が考慮される。いくつかの実施形態において、前記修飾型抗体は、CH2ドメイン全体が取り除かれているドメイン欠失コンストラクトま

40

50

たは異型体（ C H 2 コンストラクト ）を含む。いくつかの実施形態において、前記の取り除かれた定常領域ドメインは短アミノ酸スペーサー（例えば、10残基）で置換され、典型的には存在しない定常領域によってもたらされるいくつかの分子的柔軟性を提供する。

#### 【0119】

それらの形状の他に、前記定常領域がいくつかのエフェクター機能を媒介することが当該技術分野において公知である。例えば、補体のC1成分の抗体への結合が補体系を活性化させる。補体の活性化は細胞病原体のオプソニン化と溶解に重要である。補体の活性化はまた炎症反応を刺激し、そして、自己免疫過敏にも関係する可能性がある。また、抗体はFc領域を介して細胞に結合し、抗体Fc領域上のFc受容体部位が細胞上のFc受容体（FcR）に結合する。IgG（ $\gamma$ 受容体）、IgE（ $\epsilon$ 受容体）、IgA（ $\alpha$ 受容体）およびIgM（ $\mu$ 受容体）を含む、異なるクラスの抗体に特異的である多数のFc受容体が存在する。細胞表面上での抗体のFc受容体への結合が抗体被覆粒子の貪食および破壊、免疫複合体の除去、抗体被覆標的細胞のキラー細胞による溶解（抗体依存性T細胞介在性細胞傷害、またはADCCと呼ばれる）、炎症メディエーターの放出、胎盤通過および免疫グロブリン生産の制御を含む多数の重要で多様な生物学的反応を引き起こす。

10

#### 【0120】

ある実施形態において、前記EGFR結合抗体は改変されたエフェクター機能を提供し、それは次にその投与される抗体の生物学的プロファイルに影響を与える。例えば、定常領域ドメインの（点突然変異または他の手段による）欠失または不活化が、その循環する修飾型抗体のFc受容体結合を低減させ、それによって腫瘍局在性を上昇させることができる。他の場合では、本発明と矛盾しない定常領域の修飾が補体の結合を適度なものにし、したがって、複合体化細胞毒素の血清中半減期と非特異的結合を減少させることがあり得る。定常領域のさらに他の修飾を用いて、抗原特異性または抗体の柔軟性の上昇により向上した局在性を可能にするジスルフィド結合またはオリゴサッカリド部分を除去することができる。同様に、優に当業者の理解の範囲内である、周知の生化学的または分子工学的技術を用いて、本発明に従う定常領域の修飾を容易に行うことができる。

20

#### 【0121】

ある実施形態において、抗体であるEGFR結合薬剤が1つ以上のエフェクター機能を持たない。例えば、いくつかの実施形態において、前記抗体は抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）活性および/または補体依存性細胞傷害（CDC）活性を持たない。ある実施形態において、前記抗体はFc受容体および/または補体因子に結合しない。ある実施形態において、前記抗体はエフェクター機能を持たない。

30

#### 【0122】

ある実施形態において、前記修飾型抗体は操作されてCH3ドメインを各修飾型抗体のヒンジ領域に直接融合することができると留意される。他のコンストラクトでは、ヒンジ領域と改変型CH2ドメインおよび/またはCH3ドメインの間にペプチドスペーサーを提供することが好ましい可能性がある。例えば、CH2ドメインが欠失されていて、そして、（修飾型にせよ非修飾型にせよ）残りのCH3ドメインが5~20アミノ酸のスペーサーを用いてヒンジ領域に連結している、適合性が有るコンストラクトを発現することができるであろう。例えば、定常ドメインの調節性要素が遊離状態でアクセス可能なままでいること、または、ヒンジ領域が柔軟なままでいることを確実にするために、そのようなスペーサーを付加することができる。しかしながら、いくつかの場合では、アミノ酸スペーサーが免疫原性であり、そして、そのコンストラクトに対して望まない免疫反応を誘発することになる可能性があることが留意されるべきである。したがって、ある実施形態において、前記コンストラクトに付加される任意のスペーサーは、前記修飾型抗体の所望の生化学的特質を維持するように、相対的に非免疫原性であるか、またはそれどころか完全に除去される。

40

#### 【0123】

定常領域ドメイン全体の欠失の他に、部分的欠失、または少数もしくはそれどころか単

50

一のアミノ酸の置換により本発明の抗体が提供され得ることが理解される。例えば、C H 2ドメインの選択された領域での単一のアミノ酸の突然変異が、実質的にFc結合を低下させ、それによって腫瘍局在性を上昇させるのに充分である可能性がある。同様に、調節されるべきエフェクター機能（例えば、補体CLQ結合）を制御する1つ以上の定常領域ドメインの部分を単に欠失することが望ましい場合がある。定常領域のそのような部分的欠失が、対象の定常領域ドメインに関連する他の望ましい機能をそのままにしておきながら、前記抗体の選択された特質（血清中半減期）を改善し得る。さらに、先に示唆したように、結果生じるコンストラクトのプロファイルを向上させる1つ以上のアミノ酸の突然変異または置換により、開示された抗体の定常領域を修飾することができる。この点で、前記修飾型抗体の立体構造および免疫原性を実質的に維持したまま、保存された結合部位（例えば、Fc結合）によって提供される活性を乱すことが可能であり得る。ある実施形態は、エフェクター機能の減少または上昇などの望ましい特性を向上させるため、または、より多くの細胞毒素もしくは炭水化物の接着に備えるために定常領域への1つ以上のアミノ酸の付加を含むことが可能である。そのような実施形態において、選択された定常領域ドメインに由来する特異的配列を挿入または複製することが望ましい可能性がある。

10

20

30

40

50

#### 【0124】

本発明は、本明細書において示されるキメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体、またはそれらの抗体断片に実質的に相同な異型体および同等物をさらに包含する。これらは、例えば、保存的置換突然変異、すなわち、1つ以上のアミノ酸の類似のアミノ酸による置換を含むことができる。例えば、保存的置換は、例えば、1つの酸性アミノ酸の別の酸性アミノ酸による、1つの塩基性アミノ酸の別の塩基性アミノ酸による、または1つの中性アミノ酸の別のアミノ酸による置換などの、同じ一般的クラス内でのあるアミノ酸の別のアミノ酸による置換を指す。保存的アミノ酸置換により意図されることは当技術分野において周知である。

#### 【0125】

本発明のポリペプチドはヒトEGFRに対する抗体またはその断片を含む組換えポリペプチド、天然ポリペプチド、または合成ポリペプチドであり得る。本発明のいくつかのアミノ酸配列は、そのタンパク質の構造または機能の著しい効果もなく、変更され得ることが当技術分野において認識される。したがって、本発明は、実質的な活性を示す、またはEGFRタンパク質に対する抗体もしくはその断片の領域を含む様々なポリペプチドをさらに含む。そのような変異体は欠失、挿入、逆位、反復および型置換を含む

#### 【0126】

前記のポリペプチド および 類似体は さらに 修飾されて、通常はそのタンパク質の一部ではない付加的な化学部分を含有することができる。それらの誘導体化部分はそのタンパク質の溶解度、生物学的半減期または吸収を改善することができる。前記部分は前記タンパク質などの任意の望ましい副作用を低減または除去することができる。REMI NGTON ' S PHARMA CEUTICAL SCIENCES , 20th e d . , Mack Publishing Co . , Easton , PA ( 2000 ) にそれらの部分についての概要を見出すことができる。

#### 【0127】

当技術分野において公知の任意の適切な方法により、本明細書において記載される単離されたポリペプチドを産生することができる。そのような方法は直接タンパク質合成法から単離されたポリペプチド配列をコードするDNA配列を構築し、そして、適切な形質転換された宿主でそれらの配列を発現させることまでにわたる。いくつかの実施形態において、目的の野生型タンパク質をコードするDNA配列を単離または合成することにより、組換え技術を用いてDNA配列を構築することができる。所望により、部位特異的突然変異形成により前記配列に突然変異を起こさせて、その機能上の類似体を提供することができる。例えば、Zoeller et al . , Proc . Nat ' l . Acad . Sci . USA 81 : 5662 - 5066 ( 1984 ) および米国特許第4 , 588 , 585号を参照のこと。



## 【 0 1 2 8 】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチド合成機を用いる化学合成により、目的のポリペプチドをコードするDNA配列を構築することができるであろう。そのようなオリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、そして、目的の組換えポリペプチドが産生される宿主細胞において好まれるコドンを選択して設計されることが可能である。目的の単離されたポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド配列を合成するために標準的な方法を適用することができる。例えば、折り返し翻訳された遺伝子を構築するために完全アミノ酸配列が使用され得る。また、特定の単離されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNAオリゴマーを合成することができる。例えば、所望のポリペプチドの一部をコードするいくつかの小オリゴヌクレオチドを合成そして結合させることができる。個々のオリゴヌクレオチドは典型的には相補的会合のための5'または3'オーバーハングを含む。

10

## 【 0 1 2 9 】

一旦、(合成、部位特異的突然変異形成または別の方法により)組み立てられると、目的の特定の単離されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は発現ベクターに挿入され、そして、所望の宿主での前記タンパク質の発現に適切な発現制御配列に機能するように結合させられる。ヌクレオチドシーケンシング、制限酵素マップ作製、および適切な宿主での生物学的に活性が有るポリペプチドの発現により、適切な組み立てを確認することができる。当技術分野においてよく知られるように、宿主での形質移入遺伝子の高発現レベルを得るためには、その選択された発現宿主で機能する転写発現制御配列および翻訳発現制御配列に機能するように前記遺伝子が結合されねばならない。

20

## 【 0 1 3 0 】

ある実施形態において、ヒトEGFRに対する抗体またはその断片をコードするDNAを増幅し、そして、それを発現させるために組換え発現ベクターを用いる。組換え発現ベクターは、哺乳類遺伝子、微生物遺伝子、ウイルス遺伝子または昆虫遺伝子に由来する適切な転写調節エレメントまたは翻訳調節エレメントに機能するように結合した、抗EGFR抗体またはその断片のポリペプチド鎖をコードする合成DNA断片、またはcDNA由来のDNA断片を有する複製可能なDNAコンストラクトである。転写ユニットは一般的に、以下に詳細が記載されるように、(1)遺伝因子、または遺伝子発現での調節性の役割を有するエレメント、例えば、転写プロモーターまたはエンハンサー、(2)mRNAに転写され、そしてタンパク質に翻訳される構造配列またはコード配列、および(3)適切な転写および翻訳開始および終結配列、からなる集合体を含む。そのような調節性要素は転写を制御するためのオペレーター配列を含むことができる。通常、複製起点によって付与される宿主中で複製する能力、および、形質転換体の認識を容易にするための選択遺伝子が追加的に組み込まれ得る。DNA領域が機能的に互いに関連するとき、それらを機能するように結合する。例えば、シグナルペプチド(分泌リーダー)のDNAがポリペプチドの分泌に関与する前駆体として発現する場合、それを前記ポリペプチドのDNAに機能するように結合する。プロモーターがコード配列の転写を制御する場合、それを前記配列に機能するように結合する。または、リボソーム結合部位が翻訳を可能にするように配置される場合、それをコード配列に機能するように結合する。酵母発現系での使用向けの構造エレメントは、翻訳されたタンパク質の宿主細胞による細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。あるいは、リーダー配列または輸送配列無しで組換えタンパク質が発現する場合、それはN末端メチオニン残基を含むことができる。この残基はその後、最終製品を提供するために、発現された組換えタンパク質から所望により切断され得る。

30

40

## 【 0 1 3 1 】

発現制御配列および発現ベクターの選択は宿主の選択に依存する。多種多様な発現宿主/ベクターの組合せを用いることができる。真核生物宿主に有用な発現ベクターには、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルスおよびサイトメガロウイルスに由来する発現制御配列を含むベクターが含まれる。細菌性宿主に有用な発現ベクターには、pCR1、pBR322、pMB9およびそれらの派生物を含む、大腸菌由来のプラ

50

スミドなどの公知の細菌性プラスミド、M13などのより広い宿主範囲のプラスミドおよび繊維状一本鎖DNAファージが含まれる。

【0132】

E G F R 結合ポリペプチドまたは抗体（または抗原として使用するためのE G F Rタンパク質）の発現に適切な宿主細胞には、適切なプロモーターの制御下にある、原核生物、酵母、昆虫または高等真核細胞が含まれる。原核生物にはグラム陰性生物またはグラム陽性生物、例えば、大腸菌または桿菌が含まれる。高等真核細胞には、以下に記載されるような哺乳類起源の樹立細胞株が含まれる。無細胞翻訳系もまた使用することができるであろう。細菌宿主、真菌宿主、酵母宿主、および哺乳類細胞宿主と用いるための適切なクロニングベクターおよび発現ベクターはPouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985)によって記載され、その適切な開示が参照により本明細書に組み込まれる。抗体の産生を含むタンパク質産生の方法に関する追加情報は、例えば、米国特許公開第2008/0187954号、米国特許第6,413,746号、および第6,660,501号、および国際特許公開第WO04009823号に見出すことができ、それらの各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0133】

組換えタンパク質を発現するために、様々な哺乳類細胞培養系または昆虫細胞培養系もまた、好都合にも、使用される。そのようなタンパク質は一般に、正しく折り畳まれ、適切に修飾され、そして完全に機能的であるので、哺乳類細胞での組換えタンパク質の発現が行われ得る。適切な哺乳類宿主細胞系列の例には、Gluzman (Cell 23:175, 1981)により記載されるサル腎臓細胞のCOS-7系列、ならびに、例えば、L細胞、C127細胞株、3T3細胞株、チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、HeLa細胞株およびBHK細胞株を含む、適切なベクターの発現が可能である他の細胞株が含まれる。哺乳類発現ベクターは、複製起点、発現される遺伝子に結合した適切なプロモーターおよびエンハンサー、および他の5'または3'隣接非転写配列などの非転写エレメント、ならびに必須リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位およびアクセプター部位、ならびに転写終結配列などの5'または3'非翻訳配列を含むことができる。昆虫細胞での異種性タンパク質の産生用のバキュロウイルス系はLuckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988)によって考察されている。

20

30

【0134】

任意の適切な方法に従って、形質転換宿主により産生されたタンパク質を精製することができる。そのような標準的な方法はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィー、親和性カラムクロマトグラフィーおよびサイズ排除カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、示差的溶解度、またはタンパク質精製の他の任意の標準的な技術による方法を含む。ヘキサヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの親和性タグを前記タンパク質に結合することにより、適切な親和性カラムに通過させることによる簡便な精製を可能にすることができる。単離されたタンパク質はまた、タンパク質分解、核磁気共鳴およびX線結晶解析のような技術を用いて物理的に特性解析され得る。

40

【0135】

例えば、培地に組換えタンパク質を分泌する系に由来する上清はまず、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いて濃縮される。濃縮ステップの次に、前記濃縮物を適切な精製マトリックスに供することができる。あるいは、イオン交換樹脂、例えば、ペンダントジエチルアミノエチル(DEAE)基を有するマトリックスまたは基材を用いることができる。前記マトリックスはアクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、またはタンパク質精製に一般的に用いられる他の種類であり得る。あるいは、陽イオン交換ステップを用いることができる。適切な陽イオン交換体には、スルホプロピル基またはカ

50

ルボキシメチル基を含む様々な不溶性マトリックスが含まれる。最後に、EGFR結合薬剤をさらに精製するために、疎水性RP-HPLC媒体、例えば、ペンダントメチル基または他の脂肪族基を有するシリカゲルを用いる1回以上の逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)工程を用いることができる。均一な組換えタンパク質を提供するために、前述の精製ステップのいくつか、または全てを様々な組み合わせで用いることもできる。

#### 【0136】

例えば、細胞ペレットからの最初の抽出、それに続く1回以上の濃縮、塩析、水性イオン交換クロマトグラフィーステップまたはサイズ排除クロマトグラフィーステップによって、細菌培養物で産生された組換えタンパク質を単離することができる。最終精製ステップに高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いることができる。組換えタンパク質の発現に用いられる微生物細胞は、周期的凍結融解、超音波破碎、機械的破碎または細胞溶解剤を含む、任意の簡便な方法により破碎され得る。

10

#### 【0137】

抗体および他のタンパク質の当技術分野において公知の精製方法にはまた、例えば、米国特許公開第2008/0312425号、第2008/0177048号、および第2009/0187005号に記載されるものが含まれ、それらの各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0138】

ある実施形態において、EGFR結合薬剤は、抗体ではないポリペプチドである。タンパク質標的に高親和性で結合する非抗体ポリペプチドを特定し、そして、産生する様々な方法が当技術分野において公知である。例えば、各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる、Skerra, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304 (2007)、Hosse et al., Protein Science, 15:14-27 (2006)、Gill et al., Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658 (2006)、Nygren, FEBS J., 275:2668-76 (2008)、およびSkerra, FEBS J., 275:2677-83 (2008)を参照のこと。ある実施形態において、EGFR結合ポリペプチドを同定/産生するためにファージディスプレイ技術が用いられている。ある実施形態において、前記ポリペプチドは、プロテインA、リボカリン、フィブロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサスリピートドメイン、およびチオレドキシンからなる群より選択される種類のタンパク質スキャフォールドを含む。

20

30

#### 【0139】

いくつかの実施形態において、前記薬剤は非タンパク質分子である。ある実施形態において、前記薬剤は小分子である。コンビナトリアル化合物ライブラリーおよび非タンパク質EGFR結合薬剤の同定に有用な技術は当業者に公知である。例えば、各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる、Kennedy et al., J. Comb. Chem., 10:345-354 (2008)、Dolle et al., J. Comb. Chem., 9:855-902 (2007)、およびBhattacharyya, Curr. Med. Chem., 8:1383-404 (2001)を参照のこと。あるさらなる実施形態において、前記薬剤は炭水化物、グリコサミノグリカン、糖タンパク質、またはプロテオグリカンである。

40

#### 【0140】

ある実施形態において、前記薬剤は核酸アプタマーである。アプタマーは、別の分子に結合するそれらの能力に基づいて(例えば、無作為に突然変異形成されたプールから)選択されたポリヌクレオチド分子である。いくつかの実施形態において、前記アプタマーはDNAポリヌクレオチドを含む。ある別の実施形態において、前記アプタマーはRNAポリヌクレオチドを含む。ある実施形態において、前記アプタマーは1つ以上の修飾型核酸残基を含む。核酸アプタマーを作製し、タンパク質への結合についてスクリーニングする

50

方法は当技術分野においてよく知られている。例えば、各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,270,163号、米国特許第5,683,867号、米国特許第5,763,595号、米国特許第6,344,321号、米国特許第7,368,236号、米国特許第5,582,981号、米国特許第5,756,291号、米国特許第5,840,867号、米国特許第7,312,325号、米国特許第7,329,742号、国際特許公開第WO02/077262号、国際特許公開第WO03/070984号、米国特許出願公開第2005/0239134号、米国特許出願公開第2005/0124565号、および米国特許出願公開第2008/0227735号を参照のこと。

#### 【0141】

##### III. 免疫複合体

本発明はまた、薬品または前駆薬に結合または複合体化した抗EGFR抗体、抗体断片および本明細書において開示されるようなそれらの同等物を含む複合体（本明細書において免疫複合体とも称される）を対象とする。適切な薬品または前駆薬は当技術分野において公知である。前記薬品または前駆薬は細胞傷害性薬剤であり得る。本発明の細胞傷害性複合体で使用される細胞傷害性薬剤は、細胞を殺滅することとなる、または細胞死を誘導する、またはいくつかの方法で細胞の生存能を減少させる任意の化合物であることができ、そして、例えば、マイタンシノイド類およびマイタンシノイド類似体を含む。他の適切な細胞傷害性薬剤は、例えば、ベンゾジアゼピン類、タキソイド類、CC-1065およびCC-1065類似体、デュオカルマイシン類およびデュオカルマイシン類似体、エンジン類、例えば、カリケアマイシン類、ドラスタチンおよびオーリスタチン類を含むドラスタチン類似体、トマイマイシン誘導体、レプトマイシン誘導体、メトトレキサート、シスプラチン、カルボプラチン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブチルならびにモルホリノドキシソルビシンである。

#### 【0142】

薬品または前駆薬を前記抗体または機能上の同等物に連結するために結合基を用いることによりそのような複合体を調製することができる。適切な結合基は当技術分野においてよく知られており、そして、例えば、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチダーゼ不安定性基およびエステラーゼ不安定性基を含む。

#### 【0143】

前記薬品または前駆薬は、例えば、ジスルフィド結合を介して前記抗EGFR抗体またはその断片に結合され得る。リンカー分子または架橋剤は、前記抗EGFR抗体またはその断片と反応することができる反応性化学基を含む。前記細胞結合薬剤との反応の反応性化学基はN-スクシンイミジルエステルおよびN-スルホスクシンイミジルエステルであり得る。さらに、リンカー分子は反応性化学基を含み、それは、ジスルフィド結合を形成する薬品と反応することができるジチオピリジル基であり得る。リンカー分子には、例えば、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)（例えば、Carlsson et al., Biochem. J., 173: 723-737 (1978)を参照のこと）、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート(SPDB)（例えば、米国特許第4,563,304号を参照のこと）、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)2-スルホブタノエート(スルホ-SPDB)（米国特許公開第20090274713号を参照のこと）、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート(SPP)（例えば、CAS登録番号341498-08-6を参照のこと）、2-イミノチオラン、またはアセチルコハク酸無水物が含まれる。例えば、架橋試薬を用いて前記抗体または細胞結合薬剤を修飾することができる、その後、こうして得られた遊離チオール基または保護化チオール基を含む前記抗体または細胞結合薬剤をジスルフィド含有マイタンシノイドまたはチオール含有マイタンシノイドと反応させて複合体を作製する。HPLC、サイズ排除、吸着、イオン交換および親和性キャプチャーを含むが、これらに限定されないクロマトグラフィー、透

10

20

30

40

50

析またはタンジェント流濾過によって前記複合体を精製することができる。

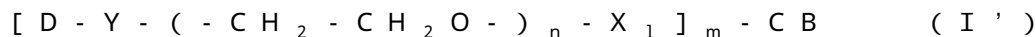
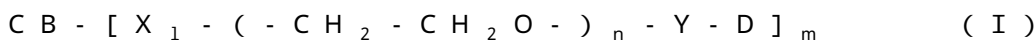
【0144】

本発明の別の態様において、前記免疫複合体の力価、溶解性または有効性の増強において、ジスルフィド結合およびポリエチレングリコールスペーサーを介して細胞傷害性薬品に前記抗EGFR抗体を結合する。そのような切断可能親水性リンカーは国際公開第WO 2009/0134976号に記載される。このリンカー設計の追加的な利点は前記抗体薬品複合体の所望の高いモノマー比率と極めて少ない凝集である。この態様において、2~8という狭い範囲の薬品負荷を有し、ポリエチレングリコールスペーサー（ $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 、 $n=1-14$ ）を担持するジスルフィド基（ $-\text{S}-\text{S}-$ ）を介して連結した細胞結合薬剤と薬品の複合体が具体的に考慮され、そして、癌細胞に対して比較的高い生物学的活性を示し、そして、最小タンパク質凝集と共に高複合体収率および高モノマー比率といった所望の生化学的特性を有する複合体が説明される。

10

【0145】

この態様において、式(I)の抗EGFR抗体薬品複合体または式(I')の複合体が具体的に考慮され：



式中、

【0146】

CBは抗EGFR抗体または断片を表し；

20

【0147】

Dは薬品を表し；

【0148】

Xはチオエーテル結合、アミド結合、カルバメート結合、またはエーテル結合を介して前記細胞結合薬剤に結合した脂肪族単位、芳香族単位または複素環式単位を表し；

【0149】

Yはジスルフィド結合を介して前記薬品に結合した脂肪族単位、芳香族単位または複素環式単位を表し；

【0150】

lは0または1であり；

30

【0151】

mは2から8までの整数であり；および

【0152】

nは1から24までの整数である。

【0153】

いくつかの実施形態において、mは2から6までの整数である。

【0154】

いくつかの実施形態において、mは3から5までの整数である。

【0155】

いくつかの実施形態において、nは2から8までの整数である。あるいは、例えば、米国特許第6,441,163号および第7,368,565号において開示されるように、細胞結合薬剤と反応するのに適切な反応性エステルを導入するために、前記薬品は最初に修飾され得る。活性化リンカー部分を含有するこれらの薬品と細胞結合薬剤の反応は細胞結合薬剤薬品複合体作製の別の方法を提供する。例えば、米国特許第6,716,821号に示されるように、PEG結合基を用いて抗EGFR抗体または断片にマイタンシノイド類を結合することもできる。これらのPEG非切断可能結合基は水および非水性溶剤の両方で可溶性であり、そして、細胞結合薬剤に1つ以上の細胞傷害性薬剤を結合するために使用され得る。例示的なPEG結合基は、一方の末端の官能性スルフィドリル基またはジスルフィド基および他方の末端の活性型エステルを介して、両端で細胞傷害性薬剤および細胞結合薬剤と反応するヘテロ二官能性PEGリンカーを含む。PEG結合基を用いる

40

50

細胞傷害性複合体の合成の一般的な例として、参照により本明細書に完全に組み込まれている米国特許第6,716,821号を再び参照する。合成は、反応性PEG部分を担持する1つ以上の細胞傷害性薬剤の細胞結合薬剤との反応で始まり、前記細胞結合薬剤のアミノ酸残基により各反応性PEG部分の末端活性型エステルが置換されることになり、PEG結合基を介して細胞結合薬剤に共有結合で結合した1つ以上の細胞傷害性薬剤を含む細胞傷害性複合体が生じる。あるいは、前記二官能性PEG架橋剤を用いて前記細胞結合を修飾して(ピリジルジスルフィドなどの)反応性ジスルフィド部分を導入することができ、その後、チオール含有マイタンシノイドを用いてそれを処理して複合体をもたらすことができる。別の方法では、前記二官能性PEG架橋剤を用いて前記細胞結合を修飾してチオール部分を導入することができ、その後、(ピリジルジスルフィドなどの)反応性ジスルフィド含有マイタンシノイドを用いてそれを処理して複合体をもたらすことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0156】

非切断可能連結を有する抗体-マイタンシノイド複合体もまた調製され得る。そのような架橋剤は当技術分野において記述されており(米国特許公開第20050169933号を参照のこと)、そして、N-スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサカルボキシレート(SMCC)を含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態において、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、スルホ-SMCC、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、スルホ-MBSまたはスクシンイミジル-ヨードアセテートなどの架橋試薬を用いて、文献に記載されるように、前記抗体を修飾して1~10の反応基を導入する(Yoshitake et al, Eur. J. Biochem., 101:395-399 (1979)、Hashida et al, J. Applied Biochem., 56-63 (1984)、および Liu et al, Biochem., 18:690-697 (1979))。その後、前記修飾型抗体を前記チオール含有マイタンシノイド誘導体と反応させて複合体を作製する。Sephadex G25カラムによるゲル濾過によって、または透析もしくはタンジェント流濾過によって前記複合体を精製することができる。前記チオール含有マイタンシノイドを用いて前記修飾型抗体を処理し(1~2モル当量/マレイミド基)、そして、Sephadex G-25カラムによるゲル濾過、セラミックハイドロキシアパタイトカラムでのクロマトグラフィー、透析またはタンジェント流濾過またはそれらの方法の組合せにより抗体-マイタンシノイド複合体を精製する。典型的には、平均して、抗体あたり1~10マイタンシノイドが連結される。1つの方法は、マレイミド基を導入するためにスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)を用いて抗体を修飾して、次に、チオール含有マイタンシノイドを用いて前記修飾型抗体を反応させてチオエーテル結合複合体をもたらすことである。ここでも、抗体分子あたり1~10の薬品分子を用いて複合体が生じる。同様にして、抗体、抗体断片、および他のタンパク質のマイタンシノイド複合体を作製する。

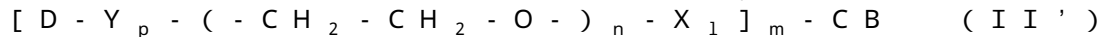
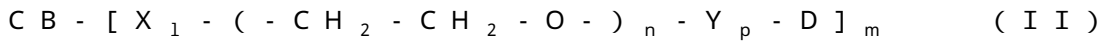
#### 【0157】

本発明の別の態様において、EGFR抗体は、PEGスペーサーの中間性により非切断可能結合を介して前記薬品に結合させられる。薬品と前記抗EGFR抗体または断片の間のリンカーを形成する親水性PEG鎖を含む適切な架橋試薬もまた当技術分野においてよく知られており、または、市販されている(例えば、オハイオ州、パウエルのQuantabio Biodesignより)。当業者に知られている標準的な合成化学技術を用いて市販のPEGそれ自体から適切なPEG含有架橋剤を合成することもできる。米国特許公開第20090274713号および国際公開第WO2009/0134976号に詳細が記載される方法により、二官能性PEG含有架橋剤と前記薬品を反応させて次の式、 $Z-X_1-(CH_2-CH_2-O)_n-Y_p-D$ 、の化合物をもたらすことができ、それは次に前記細胞結合薬剤と反応して複合体をもたらすことができる。あるいは、前記二官能性PEG架橋剤を用いて前記細胞結合を修飾して(マレイミドまたはハロアセトアミド

などの)チオール反応性基を導入することができ、その後、チオール含有マイタンシノイドを用いてそれを処理して複合体をもたらすことができる。別の方法では、前記二官能性PEG架橋剤を用いて前記細胞結合を修飾してチオール部分を導入することができ、その後、(マレイミドまたはハロアセトアミドを担持するマイタンシノイドなどの)チオール反応性マイタンシノイドを用いてそれを処理して複合体をもたらすことができる。

【0158】

したがって、本発明の別の態様は、式(II)または式(II')の抗EGFR抗体薬品複合体であり：



式中、CBは抗EGFR抗体または断片を表し；

【0159】

Dは薬品を表し；

【0160】

Xはチオエーテル結合、アミド結合、カルバメート結合、またはエーテル結合を介して前記細胞結合薬剤に結合した脂肪族単位、芳香族単位または複素環式単位を表し；

【0161】

Yはチオエーテル結合、アミド結合、カルバメート結合、エーテル結合、アミン結合、炭素間結合およびヒドラゾン結合からなる群より選択される共有結合を介して前記薬品に結合した脂肪族単位、芳香族単位または複素環式単位を表し；

【0162】

lは0または1であり；

【0163】

pは0または1であり；

【0164】

mは2から15までの整数であり；および

【0165】

nは1から2000までの整数である。

【0166】

いくつかの実施形態において、mは2から8までの整数であり；および

【0167】

いくつかの実施形態において、nは1から24までの整数である。

【0168】

いくつかの実施形態において、mは2から6までの整数である。

【0169】

いくつかの実施形態において、mは3から5までの整数である。

【0170】

いくつかの実施形態において、nは2から8までの整数である。適切なPEG含有リンカーの例には、前記抗EGFR抗体またはその断片との反応のためにN-スクシンイミジルエステルまたはN-スルホスクシンイミジルエステル部分を、ならびに前記化合物との反応のためにマレイミドベースまたはハロアセチルベースの部分を有するリンカーが含まれる。本明細書において記載される方法によって、当技術分野において公知の任意の架橋剤にPEGスペーサーを組み込むことができる。

【0171】

本明細書において開示されるリンカーの多くが米国特許公開第2005016993号および第20090274713号、および国際公開第WO2009/0134976号に詳しく記載され、それらの内容が完全に参照により本明細書に組み込まれる。

【0172】

本発明は、約2~約8薬品分子(「薬品負荷」)、例えば、マイタンシノイドを抗EGFR抗体またはその断片に結合し、前記複合体の抗腫瘍効果が、同じ細胞結合薬剤に結合

10

20

30

40

50

した薬品の数がより少ない、または、より多い薬品負荷と比較してずっと有効である態様を含む。「薬品負荷」は、本明細書において使用される場合、細胞結合薬剤（例えば、抗EGFR抗体またはその断片）に結合され得る薬品分子（例えば、マイタンシノイド）の数を指す。1つの態様において、細胞結合薬剤に結合され得る薬品分子の数は平均して約2から約8までであり得る（例えば、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1）。N<sup>2</sup>' -デアセチル-N<sup>2</sup>' - (3-メルカプト-1-オキソプロピル) -マイタンシン(DM1)およびN<sup>2</sup>' -デアセチル-N<sup>2</sup>' - (4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)マイタンシン(DM4)を使用することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0173】

二官能性架橋試薬を前記抗EGFR抗体またはその断片と反応させることにより前記抗EGFR抗体またはその断片を修飾し、それによりリンカー分子の前記抗EGFR抗体またはその断片への共有結合をもたらすことができる。本明細書において使用される場合、「二官能性架橋試薬」は、本明細書において記載される薬品などの薬品に細胞結合薬剤を共有結合する任意の化学部分である。別の方法では、前記薬品によって、結合部分の一部が提供される。この点で、前記薬品へ前記細胞結合薬を結合させるために使用されるより大きいリンカー分子の一部である結合部分を前記薬品は含む。例えば、マイタンシノイドDM1を形成するために、遊離スルフヒドリル基(SH)を有するようにマイタンシンのC-3位の側鎖であるヒドロキシル基を修飾する。このマイタンシンのチオール化形態は修飾型細胞結合薬剤と反応して複合体を形成することができる。したがって、最後のリンカーは2つの構成要素から組み立てられ、そのうちの1つは前記架橋試薬によって提供され、一方、他方はDM1の側鎖によって提供される。

#### 【0174】

血清アルブミンなどの中継的担体分子により前記薬品分子を前記抗体分子に結合することもできる。

#### 【0175】

本明細書において使用される場合、「細胞結合薬剤に結合した」または「抗EGFR抗体または断片に結合した」という表現は、細胞結合薬剤である抗EGFR抗体または断片に適切な結合基、またはその前駆体を介して結合した少なくとも1つの薬品誘導体を含む複合体分子を指す。1つの結合基はSMCCである。

#### 【0176】

ある実施形態において、本発明において有用な細胞傷害性薬剤はマイタンシノイド類およびマイタンシノイド類似体である。適切なマイタンシノイド類の例にはマイタンシノールのエステルおよびマイタンシノール類似体が含まれる。マイタンシノールおよびマイタンシノール類似体のように、微小管形成を阻害し、そして、哺乳類細胞にとって高い毒性がある任意の薬品が含まれる。

#### 【0177】

適切なマイタンシノールエステルの例には、修飾型芳香族環を有するもの、および他の位置に修飾を有するものが含まれる。そのような適切なマイタンシノイドは、米国特許第4,424,219号、第4,256,746号、第4,294,757号、第4,307,016号、第4,313,946号、第4,315,929号、第4,331,598号、第4,361,650号、第4,362,663号、第4,364,866号、第4,450,254号、第4,322,348号、第4,371,533号、第5,208,020号、第5,416,064号、第5,475,092号、第5,585,499号、第5,846,545号、第6,333,410号、第7,276,497号、お

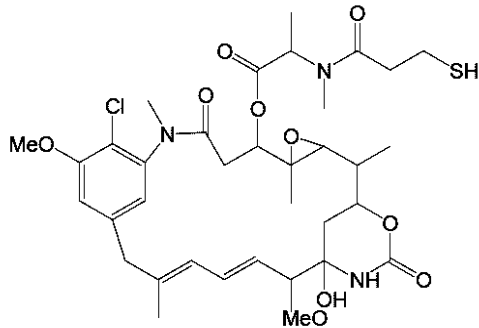


よび第 7, 473, 796 号に開示される。

【0178】

ある実施形態において、本発明の免疫複合体は、正式には  $N^{2'}$  -デアセチル -  $N^{2'}$  - (3-メルカプト - 1-オキソプロピル) - マイタンシンという名称の前記チオール含有マイタンシノイド (DM1) を細胞傷害性薬剤として活用する。DM1 は次の構造式 (III) で表される。

【化1】



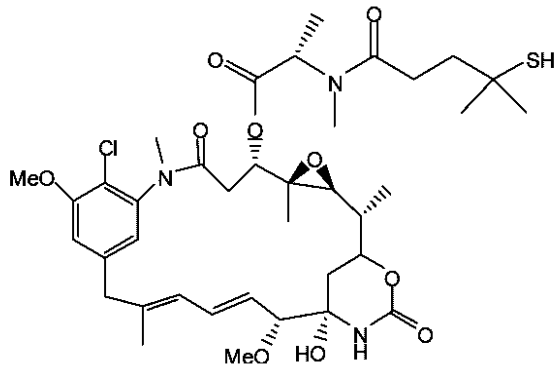
10

式 (III)

【0179】

別の実施形態において、本発明の複合体はチオール含有マイタンシノイドである  $N^{2'}$  -デアセチル -  $N^{2'}$  - (4-メチル - 4-メルカプト - 1-オキソペンチル) - マイタンシン (例えば、DM4) を細胞傷害性薬剤として活用する。DM4 は次の構造式 (IV) で表される。

【化2】



30

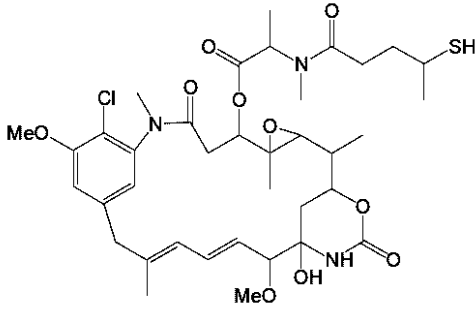
式 (IV)

【0180】

立体障害型チオール結合を含有する側鎖を含む別のマイタンシノイドは  $N^{2'}$  -デアセチル -  $N^{2'}$  - (4-メルカプト - 1-オキソペンチル) - マイタンシン (DM3 という名称) であり、次の構造式 (V) で表される。

40

## 【化 3】



式 (V)

10

## 【0181】

本発明の複合体において、米国特許第5,208,020号および第7,276,497号に教示されるマイタンシノイド類の各々を用いることもできる。この点で、第5,208,020号および第7,276,697号の開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0182】

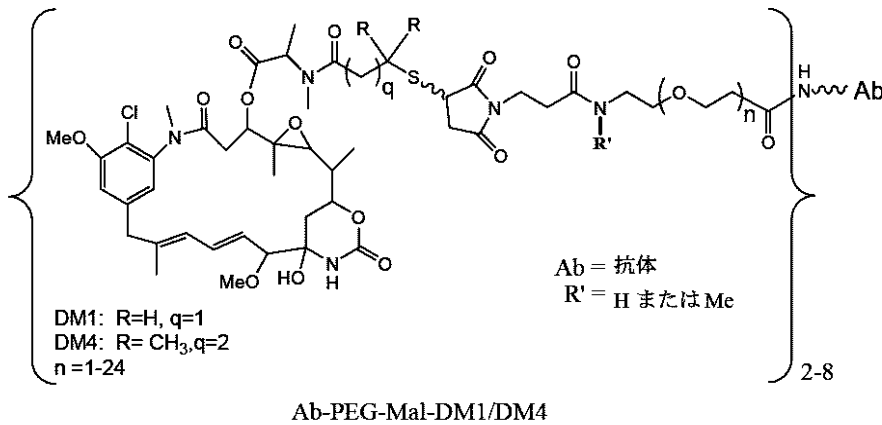
マイタンシノイドの多くの位置が、結合部分を化学的に連結するための位置として働きうる。例えば、ヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されるC-14位、ヒドロキシで修飾されるC-15位およびヒドロキシ基を有するC-20位が全て有用であると予想される。いくつかの実施形態において、C-3位は、結合部分を化学的に結合するための位置として働き、そして、いくつかの特定の実施形態において、マイタンシノールのC-3位は、結合部分を化学的に結合するための位置として働く。

20

## 【0183】

いくつかの複合体の構造の表示が以下に示される。

## 【化 4】

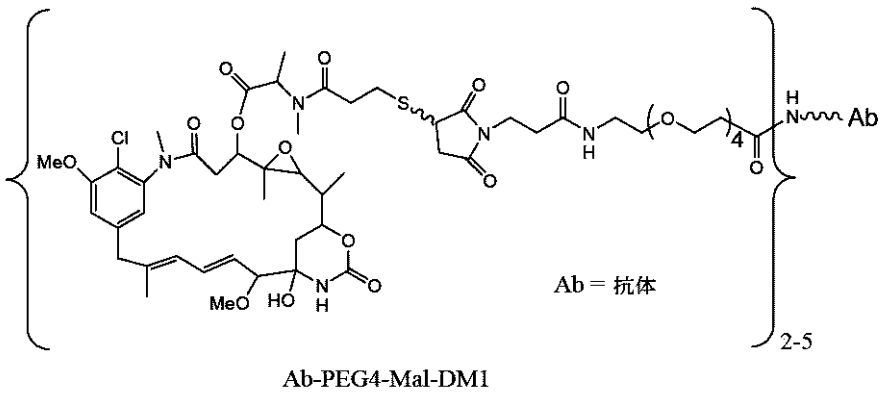


30

式 (VI)

40

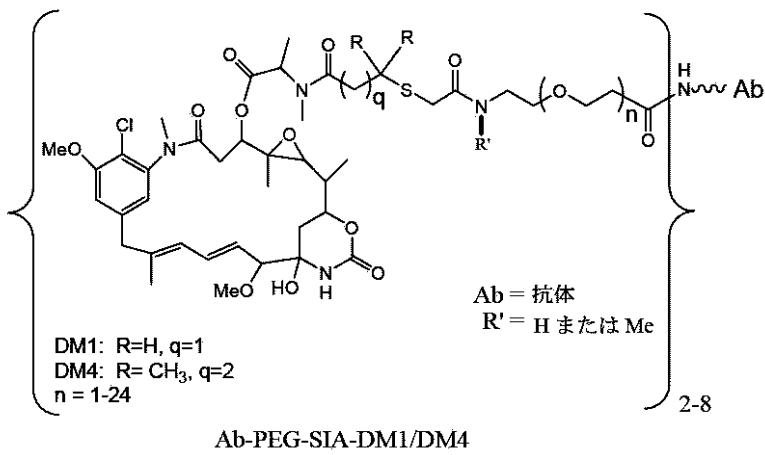
【化5】



10

式(VII)

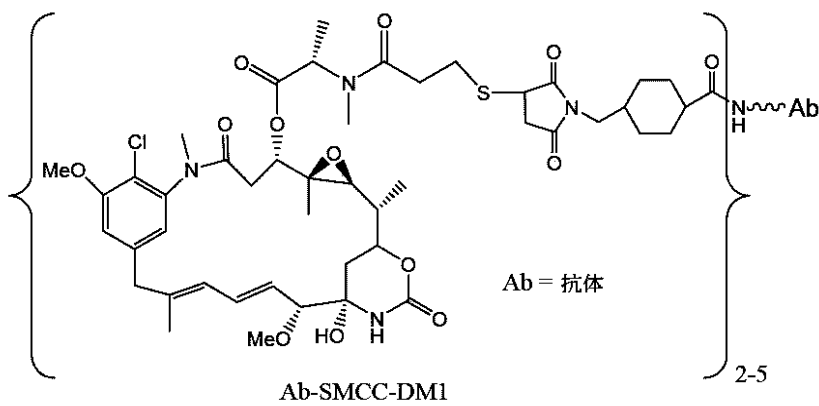
【化6】



20

式(VIII)

【化7】

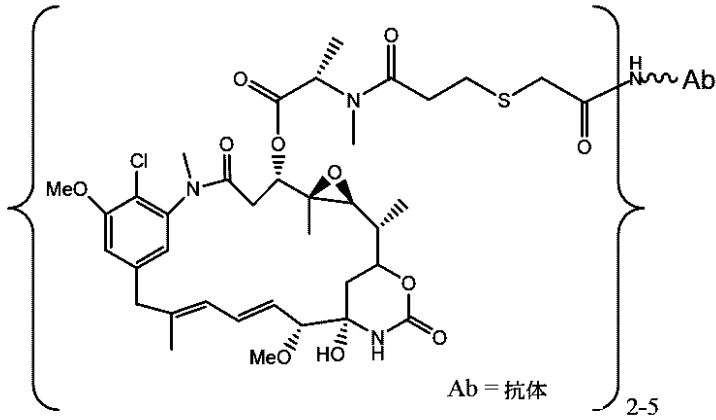


30

40

式(IX)

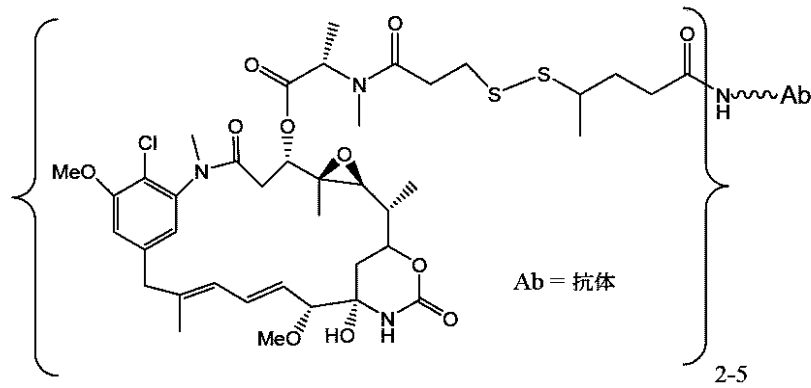
【化 8】



Ab-SIA-DM1

式 (X)

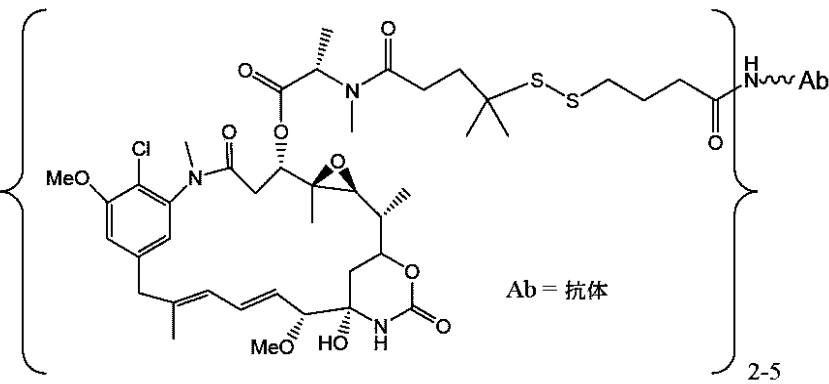
【化 9】



Ab-SPP-DM1

式 (X I)

【化 1 0】



Ab-SPDB-DM4

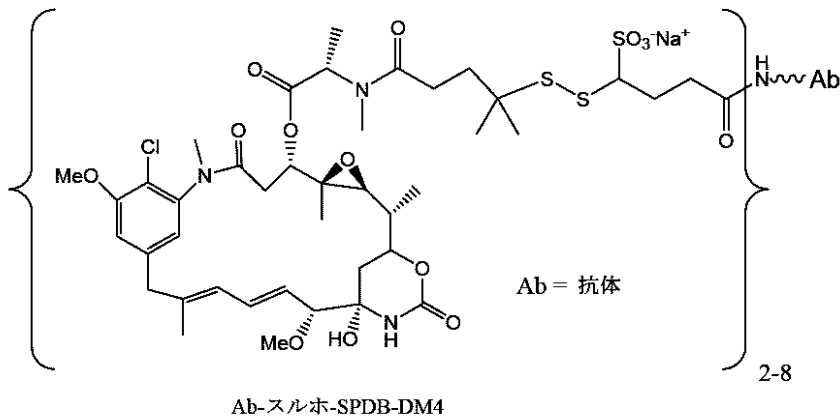
10

20

30

40

## 【化 1 1】



10

## 式 (X I I I)

## 【 0 1 8 4】

そのような抗体 - マイタンシノイド複合体の作製についてのいくつかの説明が米国特許第 6, 333, 410 号、第 6, 441, 163 号、第 6, 716, 821 号、および第 7, 368, 565 号において提供され、その各々の全体が本明細書に組み込まれる。

## 【 0 1 8 5】

一般に、反応性基を担持するジスルフィド部分を有する過剰なモル濃度のマイタンシノイド類ともに水性緩衝液中の抗体の溶液をインキュベートすることができる。過剰な（エタノールアミン、タウリンなどのような）アミンの添加により反応混合物をクエンチすることができる。その後、ゲル濾過によりマイタンシノイド - 抗体複合体を精製することができる。

20

## 【 0 1 8 6】

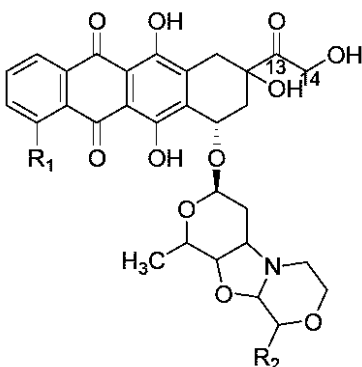
抗体分子あたりの結合したマイタンシノイド分子の数は、252 nm および 280 nm での吸光度の比率を分光測定的に測定することにより決定され得る。マイタンシノイド分子 / 抗体の平均数は、例えば、1 ~ 10 または 2 ~ 5 であり得る。

## 【 0 1 8 7】

抗 E G F R 免疫複合体を調製するためにアントラサイクリン化合物、ならびにその誘導体、中間体、および修飾型を使用することもできる。例えば、抗 E G F R 複合体中にドキソルピシン、ドキソルピシン誘導体、ドキソルピシン中間体、および修飾型ドキソルピシンを使用することができる。例示的な化合物は国際公開第 W O 2 0 1 0 / 0 0 9 1 2 4 号に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような化合物には、例えば、次の式の化合物が含まれる。

30

## 【化 1 2】



40

## 【 0 1 8 8】

式中、 $R_1$  は水素原子、ヒドロキシ基またはメトキシ基であり、そして、 $R_2$  は  $C_1 - C_5$  アルコキシ基、または薬剂的に許容可能なその塩である。

50

## 【0189】

マイタンシノイドまたは他の薬品と抗体の複合体を、様々な望ましくない細胞株の増殖を抑制するそれらの能力についてインビトロで評価することができる。例えば、これらの化合物の細胞毒性の評価のためにNCI-H226、NCI-H292およびNCI-H322Mなどの細胞株を簡便に用いることができる。前記化合物に4～5日間、評価される細胞を曝露ことができ、細胞の生存率が公知の方法による直接的アッセイで測定される。その後、そのアッセイの結果からIC<sub>50</sub>値を計算することができる。

## 【0190】

本明細書において記載されるいくつかの実施形態に従って、細胞に前記免疫複合体を取り込ませることができる。EGFR発現細胞が前記免疫複合体を取り込む、または内部化する、それによって、前記免疫複合体が治療効果を及ぼす。いくつかの特定の実施形態において、前記免疫複合体は、切断可能リンカーによって細胞傷害性薬剤に連結された抗体、抗体断片、またはポリペプチドを含み、そして、前記免疫複合体がEGFR発現細胞によって内部化されると、前記細胞傷害性薬剤が前記抗体、抗体断片、またはポリペプチドから分離される。

10

## 【0191】

いくつかの実施形態において、前記免疫複合体は腫瘍体積を低減させることができる。例えば、いくつかの実施形態において、免疫複合体を用いる治療により、%T/C値が約50%未満、約45%未満、約40%未満、約35%未満、約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%、または未満または約5%未満になる。

20

## 【0192】

本発明の別の態様において、薬品の代わりにsiRNA分子を本発明の抗体に結合することができる。オリゴヌクレオチドの修飾に一般的に使用される方法により（例えば、米国特許公開第20050107325号および第20070213292号を参照のこと）、本発明の抗体にsiRNAを結合することができる。したがって、その3'-ホスホロミダイト形態または5'-ホスホロミダイト形態のsiRNAを、ヒドロキシル官能性を担持する架橋剤の一端と反応させて、siRNAと前記架橋剤の間にエステル結合をもたらすことができる。同様に、末端アミノ基を担持する架橋剤との前記siRNAホスホラミダイトの反応により、アミンによる前記siRNAへの前記架橋剤の結合をもたらされる。あるいは、標準的な化学的方法により前記siRNAを誘導体化してチオール基を導入することができる。修飾されてジスルフィド部分またはマレイミド部分が導入された抗体とこのチオール含有siRNAを反応させて切断可能複合体または非切断可能複合体を作製することができる。この方法により、1～20の間のsiRNA分子を抗体に結合することができる。

30

## 【0193】

## III. ポリヌクレオチド

ある実施形態において、本発明は、EGFRに特異的に結合するポリペプチドまたはそのようなポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを包含する。例えば、本発明は、ヒトEGFRに対する抗体をコードする、またはそのような抗体の断片をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドはRNAの形状またはDNAの形状であり得る。DNAにはcDNA、ゲノムDNAおよび合成DNAが含まれ；そして、それは二本鎖または一本鎖である可能性があり、一本鎖である場合、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であり得る。

40

## 【0194】

ある実施形態において、前記ポリヌクレオチドは単離されたものである。ある実施形態において、前記ポリヌクレオチドは実質的に純粋である。

## 【0195】

本発明は、配列番号1～28からなる群より選択される配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。

## 【0196】

50

本発明は、下記の表 7 ~ 9 に示されるものから選択される配列を含むポリヌクレオチドをさらに提供する。

【表 7】

表 7 : 可変重鎖ポリヌクレオチド配列

抗体	VH ポリヌクレオチド配列	
ラット ML66 V <sub>H</sub>	caagtgcactaaaggagtcaggacctggctgtgtacagccatcacagacctgtctctcacctgcactgtctctgggt atcattagccagcaatagtgtaagctggattcggcagcctccaggaagggtctggagtgatgggagtaatatggaat catggaggcacagattataattcagttatcaaatcccgaactgagcatcagcagggacacctgaagagccaagtttctt aaagatgaacagctcgcagactgaagacacagccatgtacttctgtgtcagaagggtgggatctactttgattactggg gtcaaggagtcattggtcacagtctcctca (配列番号 29)	10
muEGFR-8 V <sub>H</sub>	gaggttcagctgcagcagctcggggcagagctgtgaagccagggcctcagcaagttgtcctgcacaactctggct tcaacattaaagacacctatatacactgggtgaagaagaggcctgaacagggcctggagtgattggaaggattgatc ctacgaatggaaataataatgacccgaagttccagggaaggccactataacagcagacacatctccaacacag cctacctgcagctcagcagcctgacatctgaggacactgccgtctattactgtactagagaagatgggtataggtagac gactgggtactcgtgtctggggcagggaccaggtcaccgtctcctca (配列番号 30)	20
huML66 V <sub>H</sub>	aagcttgccaccatgggttggcttgcattatcctttctgggtgcaacagccacagggctcacagtcaagtgcagctg caggaatccggccccggactggtaagcccagcgagacctctctctgacatgcacagtcagcgggctgagctggct agtaacagcgtcagttggatcagcagcctcctgggaaggggctggagtgatgggagtaactggaaccacgggg gtaccgactacaatcattatataagaccgctgagtatctcacgggacaccagcaaatcgaagtgttctgaagatg aatagcctgactgcagccgatacagccatgtacttctgtgtccggaagggtggcattacttcgactattggggtcaggg tgtctctgggtactgtctctcagccagcaccgaaggccc (配列番号 31)	30
huEGFR-8 V <sub>H</sub>	aagcttgccaccatgggttggctatgcatcatctgttttgggtgcaactgccactgggtccattcgaagtacagctgt acagtcaggtgctgaagtcgtaagcccgggcccagtgcaagctgtcctgtactacatctggattacaataaaagaca cctacattcactgggtgaagaagagggcccggcaggggctggagtgattggccgattgatcccacaatggcaac aataaatatgaccagaaattccaaggcaagccaccatcactgcagatacctcaagtaacactgcttacctgcagttgtct tctctgacatccgaggatacagccgtgtactactgcactagagaggatggatacagatatgacgactgggtactcgtatg gtggggccaggggacctgtgactgtttctcgcctccacaaggccc (配列番号 32)	30

## 【表 8】

表 8：可変軽鎖ポリヌクレオチド配列

抗体	VL ポリヌクレオチド配列	
ラット ML66 V <sub>L</sub>	gacactgtactgaccagctctcctgctfttggctgtgtctccaggagagagggtaccatctcctgtagggccagtgagag tgtcagtaacttatgcaactggtaccaacagaaatcaggacagcaacccaaactcctcatctatctagcatcacaccgag aatctggggctcctgccagggtcagtgccagtggtctgggacagacttcacccaccattgatcctatggaggctgat gacactgcaacctattactgtcagcagagtcggaatgatccgtggacgttcggtggaggcaccacacctggaattgaaac gg (配列番号 3 3)	10
muEGFR-8 V <sub>L</sub>	caaattgtctcaccagctctccagcaagcatgtctgcttctccaggggagaaggtcacatgacctgcagtgccagctc aagtgttaagttacatgcaactggtaccagcagaagtcaggcacctccccaaaagatggatctatgccacatccaaactg gcttctggagtcctgtctcgtcagtgccagtggtctgggacctctactctctcacaatcagcagcatggaggctga agatgctgccattactgtccagcagtgaggtagtaatccactcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaa cgg (配列番号 3 4)	
huML66 V <sub>L</sub>	gaattgccaccatgggatggctcctgtataatcctgtttctggtcgcaaccgcaaccggcgtgcaactccgacctgtgct gacacagtcaccaagcctggctgtttcacctggtgaaagactaccatcagttgctgggctagcgaagcgtgcaact ctgatgcaactggtaccagcagaagcctggccaacagcccaactgctgatatactggcatcacatcgtgagtcggga gtacctgtaggttctctgggagcggcagcggcaccgactttaccctgacaatcaccatggaggccgaagataca gctacttactactgccaacagctctagaaacgatccatggactttggacaagggaccaaattggagcttaagcgtacg (配列番号 3 5)	20
huEGFR-8 V <sub>L</sub>	gaattgccaccatgggatggctcctgtatcattctgttctggtagccacagctaccggcgtgcaactccgacatcgtgctg acacaatcccctgctttatgtcagcttctccaggagagaaagtaccatgacctgctctgcctctagctctgtgctcaca tgcaactggtatcagcagaagccagaccagagtcctaagagatggatctacgctaccagtaaacctggcttctggcgtgcc atctcggtttccaggaagcggcagcgggaccgactactcattgacaatatcctctatggaggccgaagcgtgcaaca tactactgtcagcagtgaggctcaaatccactcacattcggacaggtacaaaactggagctgaagcgtacg (配 列番号 3 6)	30





【表 9 - 2】

<p>huEGFR-8 HC</p>	<p>aagcttgccaccatgggctggctatgcatcatctgttttggggcaactgccactgggtgccatttcaagtacagcttgt  acagtcagggtctgaagtcgcaagccccggggccagtgcaagctgtcctgtactacatctggattacaataaagaca  cctacattcactgggtgaagaagaggccccgggcaggggctggagtggtggcggattgatcccacaatggcaac  aataaatatgaccagaaatccaaggcaagccaccatcactgcagatacctcaagtaacactgcttacctgcagttgtct  tctctgacatccgaggatacagccgtgtactactgcactagagaggatggatacagatatgacgactggfacttcatgt  gtggggccaggggaccctggctactgtttccctccgctcccaaaaggcccatcagtttcccttggctccaagttctaa  atccacaagcgggtggaacagctgcactgggatgacctgtaaaagattattccctgagcctgtgacagtgagctggaata  gcgagcattgacttcaggtgtgcacactttcccgctgtgtgacgtcctccgctgtactactgtccagtgtcgtaac  cgtccctctagcagcttgggaacccagacctacatctgtaacgtcaaccataaacatccaacacaaaggtggaataag  aaggtgaaccaaagagctgtgataagacacatacatgccctcctgtctgcaccagagctcctcggaggtccatctgt  gttctgttcccccaaaccaaggacactttatgatctctgtactccagaggtcacctgtgtgtgtgcacgtgagc  catgaagatcccaggttaaattcaactggtacgtggatggagtcgaggttcacaatgccaagaccaagcccaggag  gagcaatataattctacatatcggtagtgagcgttctgaccgtgctccaccaagattggctcaatggaaaagagtaca  gtgcaaggtgtccaacaaggcttcccgctcccatfgagaaaactatcctcaaaaggccagccacggggaac  cccaggtatatactgccccatctagagacgagctgaccaagaaccaggtgagctcactgtctgtgcaaggggtt  taccttctgacattgctgtagagtgaggagctaacggacagccagaaaacaactacaagacaactccccagtgctgg  acagcgacgggagcttctctactccaagttgactgtagacaagtctagatggcagcaaggaaactgttctcctgct  cagtaatgcatgaggctctgcacaatcactataccagaaatcactgtcccttagcccagggtgactcgag (配列  番号 39)</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>huEGFR-8 LC</p>	<p>gaattcggccaccatggggtggctctgtatcattctgttctgtagccacagctaccggcgtgcactccgacatcgtgctg  acacaatcccctgctttatgtcagcttctccaggagagaaagtaccatgacctgctctgcctctagctctgtgctctaca  tgactggatcagcagaagccagaccagagctcctaagagatggatctacgctaccagtaaacggcttctggcgtgcc  atctcggtttfcaggaagcggcagcgggaccgactactcattgacaatctctatggaggccgaagacgctgcaaca  tactactgtcagcagtgagctcaaatccactcacattcggacaggtacaaaactggagctgaagcgtacgggtggctg  caccatctgtcttcatctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataactct  atcccagagaggccaagtagcagtggaaggtggataacgacctcaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagag  caggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaa  gtctacgctgcaagtcacccatcagggcctgagctcggcctcacaagagcttcaacaggggagagtgtag  (配列番号 40)</p>	<p>30</p> <p>40</p>

【 0 1 9 7 】

配列番号 29 ~ 40 に対して少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% の配列同一性を有するポリヌクレオチドもまた提供される。したがって、ある実施形態において、前記ポリペプチドは、(a) 配列番号 29 ~ 32、37 または 39 に対して少なくとも約 95% の配列同一性を有するポリペプチド、および / または (b) 配列番号 33 ~ 36、38 または 40 に対して少なくとも約 95% の配列同一性を有するポリペプチドを含む。ある実施形態において、前記ポリペプチドは、(a) 配列番号 29 ~ 32、37 または 39 のアミノ酸配列を有するポリペプチド；および / または (b) 配列番号 33 ~ 36、38 または 40 のアミノ

酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0198】

ある実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、例えば、発現と宿主細胞からのポリペプチドの分泌を補助するポリヌクレオチド（例えば、前記細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌性配列として機能するリーダー配列）に同じリーディングフレームで融合した成熟型ポリペプチドのコード配列を含む。リーダー配列を有するポリペプチドはプレタンパク質であり、そして、宿主細胞によりそのリーダー配列を切断されてそのポリペプチドの成熟型を形成することができる。前記ポリヌクレオチドはまたは、成熟型タンパク質と付加的な5'アミノ酸残基であるプロタンパク質をコードすることができる。プロ配列を有する成熟型タンパク質はプロタンパク質であり、そして、前記タンパク質の非活性型である。一旦、プロ配列が分離されると、活性型成熟型タンパク質が後に残る。

10

【0199】

ある実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、例えば、そのコードポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列に同じリーディングフレームで融合した成熟型ポリペプチドのコード配列を含む。例えば、前記マーカー配列は、細菌性宿主の場合では、そのマーカーに融合した成熟型ポリペプチドの精製に備えた、pQE-9ベクターによって供給されるヘキサヒスチジンタグであり得、または、前記マーカー配列は、哺乳類宿主（例えば、COS-7細胞）が使用されるとき、インフルエンザヘماغルチニンタンパク質に由来するヘماغルチニン（HA）タグである可能性がある。

20

【0200】

本発明はさらに、例えば、断片、類似体および誘導体をコードする、本明細書において先に説明したポリヌクレオチドの異型体に関連する。

【0201】

前記ポリヌクレオチド異型体はコード領域、非コード領域、または両方での変異を含むことができる。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド異型体は、サイレントな置換、付加、または欠失をもたらすが、そのコードポリペプチドの特質または活性を変えない変異を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子コードの縮重に起因するサイレント置換によってヌクレオチド異型体を作製する。様々な理由のため、例えば、特定の宿主用にコドンの発現を最適化するためにポリヌクレオチド異型体を作製することができる（ヒトmRNAでのコドンを大腸菌などの細菌性宿主によって好まれるコドンに変える）。

30

【0202】

本明細書において記載されるポリヌクレオチドを含むベクターと細胞もまた提供される。

【0203】

IV. 使用方法および医薬組成物

本発明のEGFR結合薬剤（抗体、免疫複合体およびポリペプチドを含む）は、癌の治療などの治療法を含むが、これらに限定されない様々な用途において有用である。ある実施形態において、前記薬剤は腫瘍の成長の抑制、分化の誘導、腫瘍体積の低減、および/または腫瘍の腫瘍原性の低減に有用である。前記使用法はインビトロ方法、エクスピボ方法またはインピボ方法であり得る。ある実施形態において、前記EGFR結合薬剤または抗体または免疫複合体、またはポリペプチドは、それが結合するヒトEGFRについて拮抗性ではない。

40

【0204】

1つの態様において、本発明の抗EGFR抗体および免疫複合体は生物試料中のEGFRの存在の検出に有用である。「検出(detecting)」という用語は、本明細書において使用される場合、定量的または定性的検出を包含する。ある実施形態において、生物試料は細胞または組織を含む。

【0205】

50

1つの態様において、本発明は生物試料中のEGFRの存在の検出方法を提供する。ある実施形態において、前記方法は、抗EGFR抗体のEGFRへの結合を許容する条件下で抗EGFR抗体を生物試料に接触させること、および、前記抗EGFR抗体とEGFRの間で複合体が形成されるか検出することを含む。

【0206】

1つの態様において、本発明は、EGFRの発現上昇を伴う障害の検出方法を提供する。ある実施形態において、前記方法は、試験細胞を抗EGFR抗体と接触させること；前記抗EGFR抗体のEGFRへの結合を検出することにより、試験細胞によるEGFRの発現レベルを（定量的または定性的のどちらかで）決定すること；および試験細胞によるEGFRの発現レベルを対照細胞（例えば、試験細胞と同じ組織に起源を有する正常細胞、またはそのような正常細胞に匹敵するレベルのEGFRを発現する細胞）によるEGFRの発現レベルと比較することを含み、対照細胞と比較して高いレベルのEGFRの試験細胞による発現がEGFRの発現上昇に関係する障害の存在を示す。ある実施形態において、前記試験細胞は、EGFRの発現上昇に関係する障害を有する疑いがある個体から得られる。ある実施形態において、前記障害は、癌または腫瘍などの細胞増殖障害である。

10

【0207】

ある実施形態において、上記の方法などの診断または検出の方法は、細胞の表面上に発現されたEGFR、またはEGFRをその表面に発現する細胞から得られた膜調製物中のEGFRへの抗EGFR抗体の結合を検出することを含む。ある実施形態において、前記方法は、前記方法は、抗EGFR抗体のEGFRへの結合を許容する条件下で抗EGFR抗体を細胞に接触させること、および、前記抗EGFR抗体と前記細胞の表面上のEGFRの間で複合体が形成されるか検出することを含む。細胞の表面上に発現されたEGFRへの抗EGFR抗体の結合を検出するための例示的な測定法は「FACS」測定法である。

20

【0208】

EGFRへの抗EGFR抗体の結合を検出するために、ある他の方法を用いることができる。そのような方法には、ウエスタンブロット、放射免疫アッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈澱アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイおよび免疫組織化学（IHC）などの当技術分野において周知の抗原結合アッセイが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0209】

ある実施形態において、抗EGFR抗体は標識される。標識には、直接的に検出される標識または部分（蛍光標識、クロモフォア標識、電子密度標識、化学発光標識および放射性標識など）、ならびに、例えば、酵素反応または分子的相互作用により間接的に検出される酵素またはリガンドなどの部分が含まれるが、これらに限定されない。

【0210】

ある実施形態において、抗EGFR抗体は不溶性マトリックスに固定化される。固定化は、溶液中で遊離状態のままの任意のEGFRから前記抗EGFR抗体を分離することを必要とする。これは、従来、非水溶性マトリックスもしくは表面（Bennich et al., 米国特許第3,720,760号）への吸着、または（例えば、グルタルアルデヒド架橋を用いる）共有結合によるように、アッセイ処置の前に前記抗EGFR抗体を不溶化するか、抗EGFR抗体とEGFR間の複合体形成の後に前記抗EGFR抗体を、例えば、免疫沈澱により不溶化するかのどちらかによって達成される。

40

【0211】

抗EGFR抗体の代わりに、またはそれに加えて本発明の免疫複合体を用いて、診断または検出についての上記の実施形態のいずれかを行うことができる。

【0212】

ある実施形態において、前記EGFR結合薬剤またはアンタゴニスト（例えば、抗EGFR抗体）を用いて治療される疾患は癌である。ある実施形態において、前記癌は、前記EGFR結合薬剤（例えば、抗体）が結合するEGFR発現細胞を特徴とする。

50

## 【0213】

さらなる態様において、本発明は、膀胱、脳、頭部および頸部、膵臓、肺、乳房、卵巣、大腸、前立腺、皮膚および腎臓の癌を含む、EGFRを発現する、とりわけ、EGFRを異常に発現する（例えば、過剰発現する）細胞増殖障害を治療する改良された方法であって、治療上有効量の本発明の抗EGFR結合薬剤を、それを必要とするヒト対象に投与することを含む方法を対象とする。別の実施形態において、前記抗体はヒト化抗体である。別の好ましい実施形態において、前記ヒト化抗体は、結合活性を保持するために必要な位置（例えば、SDR）を除き、任意の位置に置換を含む修飾型CDRを含む。本発明の抗EGFR結合薬剤により治療される細胞増殖障害の例には、腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、副甲状腺、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭部および頸部、神経系（中枢および末梢の）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部および泌尿生殖器系に位置する新生物が含まれるが、これらに限定されない。

10

## 【0214】

同様に、他の細胞増殖障害も本発明の抗EGFR結合薬剤によって治療され得る。そのような細胞増殖障害の例には、副腎皮質過形成（クッシング病）、先天性副腎過形成、子宮内膜増殖症、良性前立腺肥大症、乳房過形成、内膜過形成、局所性上皮過形成（ヘック病）、皮脂腺過形成、代償性肝臓過形成および先に記載した器官系に位置する、新生物を除く、他の任意の細胞増殖障害が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0215】

本発明は、本明細書において記載される抗体または他の薬剤を用いて腫瘍の成長を抑制する方法をさらに提供する。ある実施形態において、腫瘍の成長を抑制する方法は、EGFR結合薬剤（例えば、抗体）と細胞をインビトロで接触させることを含む。例えば、EGFRを発現する不死化細胞株または癌細胞株が、腫瘍の成長を抑制するための前記抗体または他の薬剤を添加した培地で培養される。いくつかの実施形態において、腫瘍細胞が、例えば、生検組織、胸水または血液試料などの患者試料から単離され、そして、腫瘍の成長を抑制するためのEGFR結合薬剤を添加した培地で培養される。

20

## 【0216】

いくつかの実施形態において、腫瘍の成長を抑制する方法は、前記EGFR結合薬剤（例えば、抗体）と腫瘍または腫瘍細胞をインビボで接触させることを含む。ある実施形態において、EGFR結合薬剤と腫瘍または腫瘍細胞を接触させることは動物モデルにおいて行われる。例えば、腫瘍の成長を抑制するために、易感染性マウス（例えば、NOD/SCIDマウス）で成長させた、1つ以上のEGFRを発現する異種移植片にEGFR結合薬剤を投与することができる。いくつかの実施形態において、癌幹細胞が、例えば、生検組織、胸水または血液試料などの患者試料から単離され、そして、易感染性マウスに注入され、その後、腫瘍細胞増殖を抑制するために、EGFR結合薬剤が投与される。いくつかの実施形態において、腫瘍の成長を防ぐために前記EGFR結合薬剤が腫瘍原性細胞の前記動物への導入と同時、またはすぐ後に投与される。いくつかの実施形態において、腫瘍原性細胞が特定のサイズに成長した後に前記EGFR結合薬剤が治療薬として投与される。

30

## 【0217】

ある実施形態において、腫瘍の成長を抑制する方法は、治療上有効量のEGFR結合薬剤を対象に投与することを含む。ある実施形態において、前記対象はヒトである。ある実施形態において、前記対象は腫瘍を有する、または腫瘍を除去されている。

40

## 【0218】

ある実施形態において、前記腫瘍は、前記EGFR結合薬剤または抗体が結合するEGFRを発現する。

## 【0219】

さらに、本発明は、対象における腫瘍の腫瘍原性を低減させる方法であって、治療上有効量のEGFR結合薬剤をその対象に投与することを含む方法を提供する。ある実施形態において、前記腫瘍は癌幹細胞を含む。ある実施形態において、前記腫瘍中における癌幹

50

細胞の出現頻度は前記薬剤の投与により低下する。

【0220】

本発明は、腫瘍原性細胞を非腫瘍原性細胞に分化させる方法であって、前記腫瘍原性細胞をEGFR結合薬剤と接触させることを含む方法（例えば、腫瘍原性細胞を含む腫瘍を有する、またはそのような腫瘍を除去された対象にEGFR結合薬剤を投与することによる）をさらに提供する。

【0221】

腫瘍細胞を含むが、これに限定されない細胞の分化を誘導するための、本明細書において記載されるEGFR結合薬剤、ポリペプチドまたは抗体の使用法もまた提供される。例えば、有効量の本明細書において記載されるEGFR結合薬剤（例えば、抗EGFR抗体）と細胞を接触させることを含む、細胞の分化を誘導する方法が考えられている。治療上有効量のEGFR結合薬剤、ポリペプチド、または抗体を対象に投与することを含む、前記対象の腫瘍中の細胞の分化を誘導する方法もまた提供される。ある実施形態において、前記腫瘍は膵臓腫瘍である。ある他の実施形態において、前記腫瘍は大腸腫瘍である。いくつかの実施形態において、前記治療方法は治療上有効量のEGFR結合薬剤、ポリペプチド、または抗体を前記対象に投与することを含む。

10

【0222】

本発明は、本明細書において記載されるEGFR結合薬剤の1つ以上を含む医薬組成物をさらに提供する。ある実施形態において、前記医薬組成物は薬剤的に許容可能な媒体をさらに含む。これらの医薬組成物はヒト患者での腫瘍の成長の抑制と癌の治療に使用される。

20

【0223】

ある実施形態において、本発明の精製抗体または薬剤を薬剤的に許容可能な媒体（例えば、担体、添加剤）と組み合わせることにより、貯蔵および使用のために製剤を調製する（Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000）。適切な薬剤的に許容可能な媒体には、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの非毒性緩衝液；塩化ナトリウムなどの塩；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノールアルコール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール；メチルパラベンまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペントノール；およびm-クレゾール）；低分子量ポリペプチド（例えば、約10アミノ酸残基未満）；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性高分子；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、グルコース、マンノースまたはデキストリン類などの炭水化物；EDTAなどのキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成性対イオン；金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；ならびにTWEENまたはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0224】

局所的治療または全身的治療のどちらかのために、多くの方法で本発明の医薬組成物を投与することができる。投与は経皮パッチ、軟膏、外用水薬、クリーム剤、ゲル剤、滴剤、坐剤、スプレー剤、液剤および粉剤などの局所投与（例えば、膣直腸内投与を含む粘膜への投与）；肺性投与（例えば、噴霧器によるものを含む、粉剤またはエアロゾル剤の吸入または吹送による投与）；気管支内投与、鼻腔内投与、表皮性投与および経皮投与）；経口投与；または静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内の注射もしくは点滴を含む非経口投与；または頭蓋内（例えば、髄腔内または脳室内）投与であり得る。

【0225】

50

本発明の抗体または免疫複合体は、抗癌特性を有する第2の化合物と、医用配合剤で、または併用療法としての投与計画で組み合わせられ得る。前記の医用配合剤または投与計画の第2の化合物は、互いに不利に影響しあうことが無いように、前記組合せのADCに対して相補的な活性を持つことができる。前記EGFR結合剤と第2の抗癌剤を含む医薬組成物もまた提供される。

#### 【0226】

疾患の治療について、本発明の抗体または薬剤の適切な投薬量は、全て治療を行う医師の自由裁量で、治療される疾患の種類、前記疾患の重症度と経過、前記疾患の反応性、前記抗体または薬剤が治療目的または予防目的で投与されるのかということ、それ以前の治療法、患者の病歴などに依存する。前記抗体または薬剤は一回で、または数日から数か月続く一連の治療にわたって、または治療がもたらされるまで、または病状の軽減（例えば、腫瘍サイズの減少）が達成されるまで投与され得る。最適な投与スケジュールは、患者の体内での薬品蓄積の測定値から計算することができ、そして、個々の抗体または薬剤の相対的な力価に応じて変化する。投与を行う医師は最適な投薬量、投薬方法および反復速度を容易に決定することができる。ある実施形態において、投薬量は、体重kgあたり0.01μgから100mgまでであり、そして、毎日、毎週、毎月または毎年1回以上投与され得る。ある実施形態において、前記抗体または他のEGFR結合剤は二週間毎に1回または三週間毎に1回投与される。ある実施形態において、前記抗体または他のEGFR結合剤の投薬量は体重kgあたり約0.1mgから約20mgまでである。治療を行う医師は、体液または組織中の前記薬品の測定された滞留時間および濃度に基づき、投与の反復速度を推定することができる。

10

20

#### 【0227】

併用療法は「相乗作用」をもたらすことができ、そして、「相乗的」とであると判明し得る、すなわち、有効成分が一緒に使用されると、達成される効果が、別々に前記化合物を使用することにより生じる効果の合計よりも大きいと判明し得る。前記有効成分が、(1)配合単位剤形に共製剤され、そして、同時に投与または送達されるとき；(2)別々の製剤として交互に、もしくは並行して送達されるとき；または(3)ある他の投与計画により送達されるとき、相乗効果が達成され得る。交互療法(alternation therapy)で送達されるとき、前記化合物が、例えば、別々の注射筒での異なる注射により、順次、投与または送達されるとき、相乗効果が達成され得る。一般的に、交互療法(alternation therapy)の間に、有効投薬量の各有効成分が順次、すなわち、連続的に投与され、一方、併用療法では、有効投薬量の2つ以上の有効成分が一緒に投与される。

30

#### 【0228】

##### VI. EGFR結合剤を含むキット

本発明は、本明細書において記載される抗体、免疫複合体または他の薬剤を含み、そして、本明細書において記載される方法を実行するために使用することができるキットを提供する。ある実施形態において、キットは、1つ以上の容器にEGFRに対する少なくとも1つの精製抗体を含む。いくつかの実施形態において、前記キットは、対照、アッセイを実行するための説明書、および結果の分析と発表のための任意の必要なソフトウェアの全てを含む、検出アッセイの実行に必要および/または十分な構成要素の全てを含む。開示された本発明の抗体、免疫複合体または他の薬剤を、当技術分野においてよく知られている確立されたキットフォーマットの1つに容易に組み込むことができることを当業者は容易に認識する。

40

#### 【0229】

EGFR結合剤（例えば、EGFR結合抗体）、ならびに第2の抗癌剤を含むキットがさらに提供される。ある実施形態において、前記の第2の抗癌剤は化学療法剤（例えば、リツキシマブ）である。

#### 【実施例】

#### 【0230】

50

本明細書において記載される実施例および実施形態は例示のみを目的とし、そして、それらを踏まえて様々な改変または変更が当業者に示唆され、且つ、それらが本願の精神と範囲の中に含まれるべきであると理解される。

#### 【0231】

(実施例1)

ラットML66 EGFR抗体の作製と選択

ラットEGFR抗体を作製するために、Titermaxアジュバント(Sigma Aldrich、セントルイス、ミズーリ州)中のMDA-MB468乳房癌細胞株(ATCC)膜調製物を用いてメスのSprague Dawley系ラット(Charles River Laboratory、ウィルミントン、マサチューセッツ州)に皮下注射を行った。最初の免疫から3週間後にPBS中の同じ抗原で免疫を一度繰り返した。細胞融合の3日前にもう1用量の抗原を腹腔内注射した。標準的な動物実験プロトコルに従って前記ラットの脾臓を回収し、2枚の滅菌凍結顕微鏡用スライドガラスの間で磨りつぶして単一の細胞懸濁液を得た。ACK溶解緩衝液を用いる赤血球の溶解の後、次に前記脾臓細胞をマウス骨髄腫P3X63Ag8.653細胞(P3細胞)(J. F. Kearney et al. 1979, J Immunol, 123: 1548-1550)と1:3(P3細胞:脾臓細胞)の割合で混合し、そして、ポリエチレングリコール1500(Roche)を用いて前記細胞を融合した。ハイブリドーマを選択するために、ヒポキサンチン アミノプテリン チミジン(HAT)(Sigma Aldrich)を含有するRPMI-1640培地に融合細胞を再懸濁し、そして、200 $\mu$ l/ウェルの割合でそれを平底96ウェルプレートに蒔いた。その後、ハイブリドーマクローンが抗体スクリーニングに利用できるようになるまで、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内37で前記プレートをインキュベートした。

10

20

#### 【0232】

ヒトEGFR発現ラットYB2/0安定細胞と野生型YB2/0細胞(ATCC)を使用するホールセル(whole cell)ELISAを用いてハイブリドーマ培養上清をスクリーニングした。EGFR発現YB2/0細胞株と反応するだけであり、親細胞株とは反応しないハイブリドーマクローンが限界希釈によりサブクロニングされた。安定的なサブクロンが培養され、そして、市販のアイソタイピング薬剤(Roche)を用いて前記抗体をアイソタイピングした。総計で12種のEGFR特異的ラットモノクローナル抗体が得られ、そして、他の実施例で説明されるそのユニークな特質のためにML66クローンが選ばれた。

30

#### 【0233】

ネズミ科EGFR-8抗体の作製と選択

ネズミ科抗EGFR抗体を作製するために、メスのBalb/cマウス(Charles River Laboratory、ウィルミントン、マサチューセッツ州)にCA922(Japanese Collection of Research Bioresources(JCRB)、新宿、日本)およびHSC4(JCRB、新宿、日本)などの頭部および頸部扁平上皮癌細胞株を、2週間ごとに5回、マウスあたり5 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞の用量で皮下注射した。ハイブリドーマ作製のために殺処理される3日前に、免疫されたマウスはもう1用量の抗原の腹腔内注射を受けた。標準的な動物実験プロトコルに従って前記マウスの脾臓を回収し、2枚の滅菌凍結顕微鏡用スライドガラスの間で磨りつぶして単一のRPMI-1640培地中の細胞懸濁液を得た。ACK溶解緩衝液を用いて赤血球を溶解した後、次に前記脾臓細胞をマウス骨髄腫P3細胞と1:3(P3細胞:脾臓細胞)の割合で混合した。脾臓細胞とP3細胞の混合物は洗浄され、そして、融合媒体(0.3Mマンニトール/D-ソルビトール、0.1mM CaCl<sub>2</sub>、0.5mM MgCl<sub>2</sub>および1mg/ml BSA)中のプロネースを用いて室温で3分間処理された。FBS(ウシ胎児血清、Invitrogen)の添加により反応を停止させ、その後、細胞を洗浄し、2mlの冷融合メディアに再懸濁し、そして、BTX ECM 2001電気融合マシン(Harvard Apparatus)を用いて融合した。ヒポキサン

40

50



チン アミノプテリン チミジン (HAT) (Sigma Aldrich) を含有する RPMI - 1640 選択培地に融合細胞を穏やかに加え、37 で20分間インキュベートし、その後、200  $\mu$ l / ウェルの割合でそれを平底96ウェルプレートに蒔いた。その後、ハイブリドーマクローンが抗体スクリーニングに利用できるようになるまで、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内37 で前記プレートをインキュベートした。J. Langone and H. Vunakis (Eds., *Methods in Enzymology, Vol. 121, "Immunochemical Techniques, Part I"*; Academic Press, Florida) および E. Harlow and D. Lane ("*Antibodies: A Laboratory Manual*"; 1988; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY) に記載されるものを含む、免疫とハイブリドーマ作製の他の技術もまた使用可能である。

10

## 【0234】

EGF (R&D Systems) で処理されていないか処理されている免疫細胞を使用するフローサイトメトリ結合アッセイを用いてハイブリドーマのスクリーニングを行った。EGF とのインキュベーションが細胞表面上の EGF R レベルを下方制御するので、EGF R 特異的ハイブリドーマ上清は未処理の細胞と反応するのみであり、EGF 処理化細胞とは反応しないであろう。まず、無血清培地で一晚、スクリーニングの標的の細胞が培養され、そして、2つの部分に分けられた。その細胞の一方の部分が未処理で残され、他方の部分が37、3時間EGFで処理された。EGF 処理細胞が Cell Trace (商標) 遠赤色 DDAO - SE (Invitrogen) で標識され、1:1の比率で未処理の細胞と混合され、そして、ハイブリドーマ上清と2時間氷上でインキュベートされた。その後、細胞を洗浄し、FITC - 標識抗マウス IgG (Jackson ImmunoResearch) とインキュベートし、洗浄し、ホルマリン固定し、そして、FACScalibur (BD Bioscience) を用いて解析した。EGF R 特異的ハイブリドーマを増やし、そして、可溶性組換えヒトEGF R細胞外ドメイン (RELIA Tech) を抗原として用いるELISAにより上清を再スクリーニングした。ヒトEGF R 発現 A431 表皮癌細胞株 (ATCC) とサルEGF R 発現 Vero 細胞株 (アフリカミドリザル腎臓上皮細胞株) (ATCC) を使用するフローサイトメトリ結合アッセイを用いて陽性のハイブリドーマを再スクリーニングした。簡単に述べると、前記ハイブリドーマ上清をA431細胞およびDDAO - 標識Vero細胞と氷上で1時間インキュベートした。前記細胞を2回洗浄し、そして、PE複合体化ヤギ抗マウスIgG抗体 (Jackson ImmunoResearch) と氷上で1時間インキュベートした。その後、前記細胞をFACS緩衝液で洗浄し、ホルマリン固定し、そして、FACScaliburフローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて解析した。

20

30

## 【0235】

EGF R 過剰発現 HCC 827 細胞 (ATCC) の基底増殖を抑制する能力について、ヒト抗原およびサル抗原の両方に反応する陽性ハイブリドーマクローンを試験した。簡単に述べると、100  $\mu$ l の10% FBS 含有完全培地中、96ウェルプレートに2000細胞 / ウェルの割合で、対数増殖するHCC 827細胞をプレーティングした。100  $\mu$ l のハイブリドーマ上清を前記細胞に添加し、そして、加湿5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で混合物を37 で5日間インキュベートした。比色分析性 WST - 8 アッセイ (Dojindo Molecular Technologies、ロックビル、メリーランド州) を用いて細胞増殖のレベルを決定した。WST - 8 は生細胞中のデヒドロゲナーゼにより還元されて、組織培地中で可溶性であるオレンジ色のホルマザン産物となり、そして、生成したホルマザンの量は生細胞の数に正比例する。WST - 8 の最終体積の10%が各ウェルに添加され、そして、さらに2~4時間、プレートを37 でインキュベートした。その後、Spectra Max M2 プレートリーダー (Molecular Devices、サニーベール、カリフォルニア州) で450 nm の吸光度 (A450)

40

50

を測定することによりプレート进行分析した。培地とWST-8のみを有するウェルのバックグラウンドA450吸光度を全ての値から減算した。未処理の細胞を用いるウェルの平均値で各処理試料の値を除算することにより生存率を計算した(生存率=(A450処理試料-A450バックグラウンド)/(A450未処理試料-A450バックグラウンド))。生存率が、細胞が無いウェルでの値を示し、そして、1が、どのようなEGFR抗体も含まない血清含有培地での細胞増殖のレベルを示すように、前記の結果が正規化された。HCC827細胞増殖を抑制する能力の欠如のため、EGFR-8ハイブリドーマを選択した。限界希釈によりそれらをサブクロニングした。フローサイトメトリーによって親細胞と同じEGFRに対する反応性を示す1つのサブクローンがその後の解析のために選択された。安定なサブクローンが培養され、そして、市販のアイソタイピング試薬(Roche)を用いて前記抗体をアイソタイピングした。

10

## 【0236】

## 抗体の精製

例えば、プロテインAまたはプロテインGクロマトグラフィー(HiTrapプロテインAまたはプロテインG HP、1mL、Amersham Biosciences)などの標準的な方法を用いてハイブリドーマサブクローン上清から抗体を精製した。簡単に述べると、1/10体積の1Mトリス/塩酸緩衝液、pH8.0の添加によりクロマトグラフィー用に上清を調製した。pHを調製した上清を0.22µmの濾過膜を通して濾過し、そして、結合緩衝液(PBS、pH7.3)で平衡化したカラムに負荷した。280nmでの吸光が無い、安定したベースラインが得られるまで、結合緩衝液で前記カラムを洗浄した。0.15M NaClを含有する0.1M酢酸緩衝液、pH2.8で、0.5mL/分の流速を用いて抗体を溶出した。約0.25mLの画分を採取し、そして、1/10体積の1Mトリス/塩酸、pH8.0の添加によりそれらを中和した。ピーク画分を1xPBSに対して2回、一晚透析し、そして、0.2µmの濾過膜を通して濾過することにより無菌化した。A280での吸光度により精製抗体を定量した。

20

## 【0237】

ネズミ科抗体について、第四級アンモニウム(Q)クロマトグラフィーでのイオン交換クロマトグラフィー(IEC)を用いて、プロテインA精製された画分をさらに精製した。簡単に述べると、プロテインA精製の試料を結合緩衝液(10mMトリス、10mM塩化ナトリウム、pH8.0)に緩衝液交換し、そして、0.22µmのフィルターを通して濾過した。その後、120cm/時間の流速で結合緩衝液を用いて平衡化したQファーストフロー樹脂(GE Lifesciences)に調製された試料を負荷した。前記試料中の全てのMAbを結合するように、十分な容積を持つカラムが選択された。その後、280nmでの吸光が無い、安定したベースラインが得られるまで、前記カラムを結合緩衝液で洗浄した。20カラム体積(CV)での10mMから500mMまでの塩化ナトリウムの濃度勾配を開始することにより抗体を溶出した。280nm(A280)での吸光度の測定値に基づきピーク画分を採取した。Agilent HPLC1100システム(Agilent、サンタクララ、カリフォルニア州)を用い、SWXLガードカラム、6.0x40mm(Tosoh Bioscience、モンゴメリービル、ペンシルバニア州)を用いるTSKゲルG3000SWXL、7.8x300mmでのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により単量体のパーセンテージを評価した。単量体の含量が95%よりも多い画分をプールし、TFEシステムを用いてPBS(pH7.4)に緩衝液交換し、そして、0.2µmの濾過膜を通して濾過することにより無菌化した。精製された抗体のIgG濃度を、1.47の吸光係数を用いてA280により決定した。優れた選択性を有する抗体を精製するためにセラミックハイドロキシアパタイト(CHO)などの代替の方法もまた使用された。IECクロマトグラフィーについて説明されたものと同様のプロトコルを用いて、40µmの粒子サイズを有するタイプII CHO樹脂(Bio-Rad Laboratories)を使用した。CHO用の結合緩衝液は20mMリン酸ナトリウム、pH7.0に対応し、そして、20CVにわたる20~160mMのリン酸ナトリウムの濃度勾配を用いて抗体を溶出した。

30

40

50

## 【0238】

(実施例2)

ヒトとサルのエグフR抗原への結合親和性

ヒト抗原およびサル抗原への前記EGFR抗体の結合親和性を決定するために、フローサイトメトリー結合アッセイにおいて、MDA-MB468(ATCC)およびA431細胞(ATCC)などのEGFR発現ヒト腫瘍細胞株ならびにVer0(ATCC)という名称のアフリカミドリザル腎臓細胞株を使用した。簡単に述べると、様々な濃度のEGFR抗体と4で1時間インキュベートした。前記細胞を洗浄し、そして、PE複合体二次抗体(Jackson ImmunoResearch)と前記細胞を4で1時間インキュベートした。その後、前記細胞を洗浄し、ホルマリン固定し、そして、FACS array(BD Bioscience)で解析した。これらの抗体の結合親和性を決定するために、セミログプロットで抗体濃度に対して幾何平均蛍光強度をプロットした。非線形回帰により用量反応曲線を生成し、そして、GraphPad Prismバージョン4(GraphPad software)を用いて、各抗体の見かけの解離定数(Kd)に対応する前記曲線のEC50値が計算された。EGFR-8抗体、ML66抗体、セツキシマブおよびパニツムマブはヒト腫瘍細胞株とVer0細胞の両方に対して強い特異的な結合を示した。図1に示されている表はヒトとサルのEGFRに対する各抗体のKdを記載している。

10

## 【0239】

(実施例3)

ML66抗体のVL領域とVH領域のクローニングおよびシーケンシング

製造業者のプロトコルに従ってRNeasyキット(QIAGEN)を用いて、 $5 \times 10^6$ 細胞のML66ハイブリドーマから全細胞性RNAを調製した。その後、SuperScript II cDNA合成キット(Invitrogen)を用いて、全RNAからcDNAを合成した。

20

## 【0240】

ハイブリドーマ細胞に由来するcDNAでの初回のデジェネレート(degenerate)PCR反応の方法は、Wang et al. ((2000) J Immunol Methods. 233:167-77)およびCoet al. ((1992) J Immunol. 148:1149-54)に記載される方法に基づいた。次のデジェネレート(degenerate)プライマー、すなわち、EcoMH1:CTTCCGGAAATTC SARGTNMA GCTGSAGSAGTC(配列番号41)、EcoMH2:CTTCCGGAAATTC SARGTNMA GCTGSAGSAGTCWGG(配列番号42)およびBamIGG1:GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC(配列番号43)を用いるPCRによりVH配列を増幅した。次のデジェネレート(degenerate)プライマー、すなわち、SacIMK:GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA(配列番号44)およびHindKL:TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC(配列番号45)を用いるPCRによりVL配列を増幅した。(混合塩基は次のように定義する:N=G+A+T+C、S=G+C、Y=C+T、M=A+C、R=A+G、W=A+T)。その後、PCR反応混合物を1%低融点アガロースゲルに流し、300~400bpのバンドを切り出し、Zymo DNAミニカラムを用いて精製し、そして、シーケンシングのためにAgencourt Biosciencesに送付した。両方向からの可変領域cDNAを生成するために、それぞれの5'PCRプライマーおよび3'PCRプライマーをシーケンシングプライマーとして使用した。DNAシーケンシングの結果からVH領域およびVL領域のアミノ酸配列を予測した。

30

40

## 【0241】

VL cDNA配列およびVH cDNA配列をクローン化するために使用したデジェネレート(degenerate)プライマーが5'末端配列を変更するので、完全な配

50

列を確かめるために追加のシーケンシングの試みが必要とされた。抗体配列が引き出される、ラット生殖系列配列についてのNCBI IgBlastサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) を検索するために、予備検討段階のcDNA配列が用いられた。その後、新しいPCR反応によりPCRプライマーによって変更されていない、完全な可変領域cDNA配列が生じるように、ラット抗体の生殖系列関連リーダー配列にアニーリングするようにPCRプライマーが設計された。あるいは、5'末端配列を得るために、Coet al., ((1992) J Immunol. 148:1149-54) に記載されるようなRACE法もまた使用された。上述したように、PCR反応、バンド精製およびシーケンシングを行った。

#### 【0242】

配列の確定のための質量決定

全長型抗体cDNA配列を得るために、可変領域のcDNA配列情報を生殖系列の定常領域配列と組み合わせた。その後、重鎖および軽鎖の分子量を計算し、そして、ラットML66抗体のLC/MS分析により得られた分子量と比較した。分子量の測定値はML66の軽鎖および重鎖の両方のcDNA配列と一致する。

#### 【0243】

ML66抗体のヒト化

例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるRoguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3): 969-973 (1994) およびRoguska et al., Protein Eng. 9(10): 895-904 (1996) などにおいて以前に説明された再現化(resurfacing)方法に従って、ML66抗体をヒト化した。一般に、再現化(resurfacing)は軽鎖および重鎖の両方における可変領域フレームワーク表面残基の特定ならびにヒト同等物との置換を伴う。再現化(resurfaced)抗体ではげっ歯類のCDRは保存されている。ML66の例示的なCDRは表10に示されているように限定される。再現化(resurfacing)のために用いられるAbM重鎖CDR2の限定に加えて、前記の表はラット版とヒト版のML66についての例示的なKabat限定重鎖CDR2を提供する。下線を引いた配列は、再現化(resurfacing)ではCDRと考えられなかったKabat重鎖CDR2の部分を示す。

#### 【表10】

軽鎖

CDR1: RASESVSTLMH

CDR2: LASHRES

CDR3: QQSRNDPWT

重鎖

CDR1: ASNSVS

CDR2: VIWNHGGTD

CDR3: KGGIYFDY

Kabat ML66 HC CDR2

ラット HC CDR2: VIWNHGGTDYNSVIKS

ヒト化 HC CDR2: VIWNHGGTDYNPSIKS

#### 【0244】

30%以上の相対的アクセス可能性を有する任意の位置として表面残基位置を定義した (Pedersen J.T. et al., J. Mol. Biol. 199

10

20

30

40

50

4 ; 235 : 959 - 973 )。その後、最も相同性が高いヒト表面配列を特定するために、計算された表面残基をヒト生殖系列表面配列と整列させた。軽鎖可変ドメインの置換表面として用いたヒト生殖系列配列は I G K V 7 - 3 \* 0 1 であり、そして、重鎖可変ドメインの置換表面として用いたヒト生殖系列配列は I G H V 4 - 3 9 \* 0 2 であった。具体的なフレームワーク表面残基の変更が図 1 に示されている。軽鎖では総計で 6 つの表面残基、および重鎖では総計で 9 つの表面残基がヒトの相対物で置換された。図 2 は、軽鎖および重鎖の両方の M L 6 6 可変ドメインの再現化 ( r e s u r f a c e d ) 配列のラットの対応物とのアラインメントを示す。

#### 【 0 2 4 5 】

ヒト化 M L 6 6 ( h u M L 6 6 ) 抗体の組換え発現

h u M L 6 6 の可変領域配列がコドン最適化を受け、そして、Blue Heron Biotechnology により合成された。単鎖哺乳類発現プラスミド中の各定常配列とのインフレームでのクローニングのために前記配列の両脇に制限酵素部位を配置する。p A b K Z e o プラスミド中の E c o R I 部位および B s i W I 部位に軽鎖可変領域をクローニングする。p A b G 1 N e o プラスミド中の H i n d I I I 部位および A p a 1 部位に重鎖可変領域をクローニングする。一過性または安定的哺乳類細胞形質移入のどちらかにより組換え抗体を発現するために、これらのプラスミドを使用することができる。H E K 2 9 3 T 細胞で組換え抗体を発現するために、改変型 P E I 法 ( D u r o c h e r , Y . e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s . 3 0 : E 9 ( 2 0 0 2 ) ) を用いて一過性形質移入を行った。上述したような標準的な方法を用いるプロ

10

20

#### 【 0 2 4 6 】

( 実施例 4 )

ヒト化抗体の結合親和性

M D A - M B 4 6 8 細胞を用いるフローサイトメトリーアッセイで、h u M L 6 6 抗体の結合親和性をネズミ科の対応物と比較した。実施例 2 に記載されるように前記結合アッセイを行い、そして、非線形回帰により生成した用量反応曲線が図 4 に示された。Graph Pad Prismバージョン 4 ( Graph Pad software、サンディエゴ、カリフォルニア州 ) を用いて計算した K d によって、ヒト化が M L 6 6 抗体の結合親和性に影響しなかったことが示されている。抗 K T I ( K u n i t z 型トリプシン阻害剤 ) 抗体 ( A T C C より得たハイブリドーマから産生される ) を陰性対照として使用した。

30

#### 【 0 2 4 7 】

( 実施例 5 )

E G F R リガンド誘導性 E G F R 活性化の阻害

E G F R リガンドの結合は E G F R リン酸化とそれに続く下流シグナル伝達経路の活性化を誘導する。リガンド誘導性 E G F R 活性化における抗 E G F R 抗体の効果を調査するために、M D A - M B 4 6 8 腫瘍細胞株およびヒト初代成人性ケラチノサイトを用いるウエスタンブロット分析を実行した。簡単に述べると、6 ウェルプレートに  $1 \times 10^6$  細胞 / ウェルの割合で細胞を蒔き、通常培地中で培養した。細胞を洗浄し、そして、0 . 1 % B S A を含有する無血清 / E G F 培地中で 3 7 ° C で 2 時間細胞を飢餓状態に置いた。1 0 μ g / m l の抗体を前記細胞に添加し、そして、混合物を 3 7 ° C で 3 時間インキュベートした。前記混合物に 5 0 n g / m l の E G F ( R & D S y s t e m s ) を添加し、そして、3 7 ° C で 1 5 分間インキュベートした。その後、細胞を氷冷した P B S で洗浄し、そして、プロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤を含有する R I P A 緩衝液中で溶解した。S D S - P A G E でタンパク質ライセートを分離し、そして、ニトロセルロース膜に転写した。前記の膜を 5 % B S A でブロックし、そして、抗リン酸化チロシン抗体 ( クローン 4 G 1 0 、 M i l l i p o r e ) と 4 ° C で一晩インキュベートした。前記の膜を洗浄し、H R P 複合体化抗マウス抗体 ( J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h )

40

50

と室温で1時間インキュベートし、そして、再度洗浄した。ECL（増強型化学発光）システム（GE Health care）を用いてシグナルを検出した。各レーンに等量のタンパク質が負荷されたことを確実にするために、前記の膜がプローブ除去処理され、そして、抗 チューブリン抗体（Sigma Aldrich）を用いる再検出に処された。

【0248】

図5に示されるように、EGF刺激により、MDA-MB468細胞およびヒト初代ケラチノサイトの両方での強いEGFRリン酸化がもたらされた。セツキシマブおよびパニツムマブを用いる細胞の処理がEGF誘導性EGFRリン酸化を強く阻害する一方、huML66抗体とmuEGFR-8抗体はEGFRの活性化に影響を持たなかった。陰性対照として抗KTI抗体を使用した。

10

【0249】

（実施例6）

EGFR抗体の作動性活性

EGFRリガンドが存在しないときのEGFRシグナル伝達に対する本発明のEGFR抗体の効果を調査するために、実施例5に記載されるように、無血清培地でMDA-MB468腫瘍細胞を飢餓状態に置いた。その後、前記細胞を10μg/mlのEGFR抗体と37で3時間インキュベートした。陽性対照として、未処理の細胞を50ng/mlのEGFと37で15分間インキュベートした。実施例5に記載されるように、タンパク質ライセートを調製し、そして、ウエスタンブロットを用いて分析した。図6に代表的な結果が示されている。EGF処理により、MDA-MB468細胞における強いEGFRリン酸化が明らかに誘導された。同様に、EGFRリン酸化のレベルはEGFによるものよりも低かったが、muEGFR-8抗体もまたEGFRのリン酸化を誘導した。対照的に、パニツムマブ、セツキシマブおよびhuML66抗体は、前記リガンドが存在しないとき、EGFRシグナル伝達に影響しなかった。実施例5および6に記載される結果によって、EGFR-8抗体は作動性である一方、ML-66抗体はEGFRシグナル伝達に影響しないことが示される。

20

【0250】

（実施例7）

リガンド結合の競合

EGFRシグナル伝達阻害の1つのメカニズムはリガンド結合の阻止である。EGFR抗体がEGFRへのリガンドの結合を阻害するか検討するために、抗EGFR抗体の存在下でのビオチン化EGFRリガンドのMDA-MB468細胞への結合をフローサイトメトリーにより測定した。製造業者の指示に従い、EZ-リンクマイクロスフホ-NHS-LC-ビオチン化キット（Pierce、ロックランド、イリノイ州）を用いてTGF（R&D system）のビオチン化が行われた。ビオチン化EGFはInvitrogenから購入した。競合アッセイの前に、ビオチン化リガンドの結合曲線を構築した。様々な濃度の抗EGFR抗体をEC50濃度（EGFとTGFについて、それぞれ、1.8nMおよび10nM）のビオチン化リガンドと予備混合し、そして、その混合物を前記細胞と氷上で30分間インキュベートした。その後、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、そして、ストレプトアビジン-APC複合体（Jackson Immunoresearch）と氷上で15分間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、そしてFlowJoプログラム（Tree Star）を用いてFACS Calibur（BD Bioscience）で分析した。セミログプロットで抗体濃度に対して幾何平均蛍光強度をプロットした。図7に示されるように、セツキシマブおよびパニツムマブの両方がリガンドの結合を強く阻害したが、一方、陰性対照抗体、すなわち、抗KTI抗体はどのような効果も持たなかった。興味深いことに、huML66抗体はTGFの結合を増強するように見えたが（図7A）、一方、それはEGFの結合には最小の効果を持ち（図7B）、そして、muEGFR-8抗体はTGFとEGFの両方の結合を増強するように見えた。

30

40

50

## 【0251】

## (実施例8)

## ヒト初代ケラチノサイトと正常上皮細胞株の増殖阻害アッセイ

皮膚、胃腸管および他の器官のヒト正常基底上皮細胞は生理的にEGFRを発現する。これらの組織におけるEGFRシグナル伝達は上皮細胞の増殖に重要である。セツキシマブおよびパニツムマブならびにエルロチニブおよびゲフィチニブなどの小チロシンキナーゼ阻害剤によるEGFR機能の破壊が著しい皮膚傷害性を引き起こす。皮膚および他の上皮細胞における潜在的な傷害性を模倣するために、ヒト初代ケラチノサイト(Invitrogen)と非腫瘍原性乳房上皮細胞株であるMCF10A(ATCC)を用いる増殖アッセイが構築された。このアッセイでは、製造業者により示唆されるEGFRリガンド含有培地中にウェルあたり1,500~2,000細胞の割合で細胞をプレーティングし、そして、抗EGFR抗体と37で5日間インキュベートした。ケラチノサイトアッセイ(図8)では、様々な濃度の抗体と共に0.2ng/mlのEGFで細胞が培養された。一方、MCF10A細胞アッセイ(図9)では、様々な濃度のEGFRリガンドおよび一定の濃度(10µg/ml)の抗体と細胞がインキュベートされた。比色分析性WST-8アッセイ(Dojindo Molecular Technologies、ロックビル、メリーランド州)を用いて細胞増殖のレベルを決定した。WST-8は生細胞中のデヒドロゲナーゼにより還元されて、組織培地中で可溶性であるオレンジ色のホルマザン産物となり、そして、生成したホルマザン産物の量は生細胞の数に正比例する。WST-8の最終体積の10%が各ウェルに添加され、そして、さらに2~4時間、加湿5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内でプレートを37でインキュベートした。その後、Spectra Max M2プレートリーダー(Molecular Devices、サニーベール、カリフォルニア州)で450nmの吸光度(A450)を測定することによりプレートを分析した。培地とWST-8のみを有するウェルのバックグラウンドA450吸光度を全ての値から減算した。未処理の細胞を用いるウェルの平均値で各処理試料の値を除算することにより生存率を計算した(生存率=(A450処理試料-A450バックグラウンド)/(A450未処理試料-A450バックグラウンド))。0が、EGFが存在しないときの細胞増殖レベルを示し、そして、1が、どのようなEGFR抗体処理も無く、EGFが存在するときの細胞増殖のレベルを示すように、前記の結果が正規化された。

10

20

30

## 【0252】

前記増殖アッセイが行われる前に、前記抗EGFR抗体のヒト初代ケラチノサイトならびにMCF10A細胞への結合が確認された。ケラチノサイト増殖アッセイの代表的な結果が図8に示されている。傷害性プロファイルから予測されるように、セツキシマブおよびパニツムマブは用量依存的にケラチノサイト増殖を強く抑制したが、一方、huML66抗体とmuEGFR-8抗体は、陰性対照であるキメラKTI抗体と同様に、ケラチノサイトに対してほとんど、または、全く効果を持たなかった。同様に、図9に示されるように、セツキシマブおよびパニツムマブはMCF10A細胞増殖を強く抑制したが、一方、huML66抗体とmuEGFR-8抗体は正常上皮細胞の増殖にほとんど、または、全く効果を持たなかった。これらのデータは、ML66抗体およびEGFR-8抗体は、正常な上皮細胞に対して、セツキシマブおよびパニツムマブよりも傷害性が少ないことを示唆する。

40

## 【0253】

## (実施例9)

## NCI-H292細胞株およびNCI-H322M細胞株の基底増殖の阻害

腫瘍細胞の基底レベルの増殖の阻害における抗EGFR抗体の能力を判定するために、EGFR発現NCI-H292(ATCC)肺腫瘍細胞株およびNCI-H322M(NCI)肺腫瘍細胞株を用いる増殖アッセイを構築した。10%FBS含有通常増殖培地にウェルあたり2,000細胞の割合で細胞をプレーティングし、そして、様々な濃度の抗EGFR抗体の存在下で37、5日間培養した。実施例8に記載されるように、比色分析性WST-8アッセイを用いて細胞増殖のレベルを判定した。生存率1が、抗EGFR

50

抗体が無い通常増殖培地での細胞増殖を表し、そして、0が、どのような細胞も無いウェルを表すように、ODの結果が正規化された。

【0254】

図10AおよびBは、それぞれ、NCI-H292細胞およびNCI-H322M細胞を用いる増殖アッセイの結果を示す。セツキシマブ処理およびパニツムマブ処理が用量依存的に両方の細胞株の増殖を抑制した。対照的に、huML66抗体およびmuEGFR-8抗体は腫瘍細胞増殖に影響しなかった。

【0255】

(実施例10)

抗EGFR抗体結合の競合

抗EGFR抗体の結合エピトープを識別するために、フローサイトメトリーを用いて抗体結合競合アッセイを行った。この実験では、様々な濃度の「競合」抗体の存在下でのビオチン化528抗体(ATCCより得た528ハイブリドーマから産生される)およびセツキシマブのMDA-MB468細胞への結合が測定された。528抗体とセツキシマブがまず実施例8に記載されるように標識された。様々な濃度のパニツムマブ、セツキシマブ、528、muEGFR-8、huML66およびKTI抗体と0.2nMビオチン化528抗体またはセツキシマブを予備混合した。前記抗体混合物を標的のA431細胞と氷上で2時間インキュベートした。前記細胞を洗浄し、そして、ストレプトアビジン-アレクサ488複合体と氷上で1時間インキュベートした。洗浄後、前記細胞を固定し、そして、FACS caliberで分析した。セミログプロットで抗体濃度に対して幾何平均蛍光強度をプロットし、そして、100%が、競合抗体が存在しないときのビオチン化基準抗体の最大の結合を表し、そして、0%が、ビオチン化抗体が存在しないときのバックグランド染色を表すように、正規化された。図11AおよびBは、それぞれ、競合抗体が存在するときのビオチン化528抗体およびセツキシマブの代表的な結合結果を示す。528、セツキシマブおよびパニツムマブは互いに競合するが、一方、huML66抗体およびmuEGFR-8抗体はセツキシマブと528抗体の両方と競合しないことを図11のデータは示し、本発明の抗体がセツキシマブおよび528抗体のエピトープとは異なるエピトープに結合することを示唆する。

【0256】

(実施例11)

huEGFR抗体のADCC活性

新規に単離したヒトナチュラルキラー(NK)細胞をエフェクター細胞として使用して腫瘍細胞株の抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)を測定するために乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)放出アッセイを用いた(Shields RL, J Biol Chem. 2001 276(9):6591-604)。NK細胞単離キットII(番号130-091-152; Miltenyi Biotec、オーバーン、カリフォルニア州)のための改変されたプロトコルを用いて、正常なドナーからのヒト末梢血液(Research Blood Components, Inc.、ブライトン、マサチューセッツ州)からNK細胞をまず単離した。末梢血液を1xPBSで2倍に希釈した。50mLのコニカルチューブ中の25mLのフィコール・パック(Ficoll Paque)に25mLの希釈血液を注意深く重層し、そして、400g、室温で45分間遠心分離した。末梢血単核球細胞(PBMC)を境界面から採取し、新しい50mLのコニカルチューブに移し、そして、1xPBSで1回洗浄した。PBMCを計数し、そして、MACS緩衝液(1xPBS、0.5%BSA、2mMEDTA)を用いて $2.5 \times 10^7$ 細胞/100 $\mu$ Lの濃度に再懸濁し、その後、前記細胞懸濁液に1/4x体積のNK細胞ビオチン-抗体カクテルを添加した。前記NK細胞ビオチン-抗体カクテルは、NK細胞を除くリンパ球に結合するビオチン化抗体を含み、その結果、NK細胞のネガティブ選択がもたらされる。前記混合物を4で10分間インキュベートし、その後、3/5x体積のMACS緩衝液および前記ビオチン化抗体に結合するであろう2/5x体積のNK細胞マイクロビーズカクテルが添加された。前記細胞抗体混合物を4でさらに15分間イン

10

20

30

40

50



キュベートした。次に、50 mLのMACS緩衝液を用いて細胞を1回洗浄し、そして、3 mLのMACS緩衝液に再懸濁した。自動MACS分離機(Miltenyi Biotec)を用いてNK細胞を陰性画分として分離した。その結果のNK細胞を30 mLの完全RPMI培地(5%ウシ胎児血清、1%ペニシリン ストレプトマイシン、1 mM HEPES、1 mMピルビン酸ナトリウム、1% 100x MEM非必須アミノ酸溶液を追加したRPMI-1640)に一晩プレATINGした。その後のアッセイと全ての希釈はRHP培地(20 mM HEPES、pH 7.4、0.1% BSAおよび1% ペニシリン ストレプトマイシンを追加したRPMI-1640培地)で行った。

#### 【0257】

丸底96ウェルプレートにウェルあたり50 μLのRHP培地中の様々な濃度の抗体を二つ組で分取した。標的細胞(この実験ではA431細胞株)をRHP培地に $10^6$ 細胞/mLの割合で再懸濁し、そして、希釈抗体を含有する各ウェルに100 μL/ウェルの割合でそれを添加した。標的細胞と希釈抗体を含む前記プレートを室温で30分間インキュベートした。その後、50 μL/ウェルの割合で標的細胞を含むウェルにNK細胞を添加した。典型的な比率は1:3~4(標的細胞:NK細胞)であった。各実験に次の対照を設定した:NK細胞のみ、標的細胞のみ(突発性LDH放出)、標的細胞とNK細胞(抗体非依存性LDH放出)、標的細胞と10%トライトンX-100(最大LDH放出)。細胞を溶解させるために前記混合物を37°Cで4時間インキュベートした。プレートを1200 rpmで10分間遠心分離し、そして、100 μLの上清を注意深く新しい平底96ウェルプレートに移した。細胞毒性検出キット(Roche 1644793)のLDH反応混合物(100 μL/ウェル)を各ウェルに添加し、そして、室温で5~30分間インキュベートした。試料の光学密度(OD)を490 nmで測定した(OD<sub>490</sub>)。次の式を用いて各試料のパーセント特異的溶解を決定した:パーセント特異的溶解 =  $100 \times (\text{試料の値} - \text{突発的放出}) / (\text{最大放出} - \text{突発的放出})$ 。

#### 【0258】

図12は、chKTI抗体のものと比較したhuML66抗体の代表的なADCC活性を示す。huML66抗体は用量依存的に標的細胞のNK細胞媒介性殺滅を誘導し、最大特異的殺滅は50%超に達した。対照的に、標的細胞に結合しないchKTI抗体はADCCを媒介することができなかった。

#### 【0259】

(実施例12)

huML66-SMCC-DM1の調製

(スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC、Pierce Biotechnology, Inc)リンカーをジメチルアセトアミド(DMA)に溶解した。50 mMリン酸カリウム、50 mM NaCl、2 mM EDTA、pH 6.5中の5 mg/mLの前記抗体を10倍モル過剰のSMCCと共にインキュベートすることにより、SMCCを用いてhuEGFR抗体を修飾して前記抗体にマレイミドを導入した。外界温度で約100分後、同じリン酸カリウム緩衝液で平衡化したSEPHADEX(商標)G25カラムを用いて前記反応混合物を精製した。抗体含有画分をプールし、そして、その後のステップに使用した。

#### 【0260】

前記マレイミドリンカーに対して1.7倍モル過剰のDM1の10 mM溶液とSMCC修飾型抗体を反応させた。前記反応を外界温度下で約18時間攪拌した。pH 6.5の1xPBSで平衡化したSEPHADEX(商標)G25ゲル濾過カラムを通して前記複合体化反応混合物を濾過した。その後、10 mMヒスチジン、250 mMグリシン、1% ショ糖を含むpH 5.5の緩衝液にhuEGFR抗体-SMCC-DM1複合体を透析した。以前に報告されている抗体とDM1の吸光係数(Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 8618-8623 (1996))を用い、抗体分子あたりの結合したDM1分子の数を決定した。25%アセトニトリル、100 mM酢酸アンモニウム緩衝液、pH 7.0で平衡化したHiSepカ

10

20

30

40

50

ラムに20～50 μgの複合体を注入し、そして、アセトニトリル中に溶出することにより複合体化反応後に存在する遊離マイタンシノイドのパーセンテージを決定した。252 nmの波長に設定した吸光度検出器を用いて（濃度勾配で溶出され、そして、公知の標準物との溶出時間の比較により同定された）総遊離マイタンシノイド種のピーク面積を測定し、そして、（カラム通過画分中の複合体ピークに溶出される）結合型マイタンシノイドに関連したピーク面積と比較して総遊離マイタンシノイド種のパーセンテージを計算した。huEGFR抗体あたり3.5～4 DM1分子を有する複合体が得られ、未複合体化マイタンシノイドとして1%未満が存在した。

#### 【0261】

huML66-SPDB-DM4の調製

例示的なN-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート(SPDB)リンカーをエタノールに溶解した。50 mM NaCl、2 mM EDTA、および3%エタノールを含む50 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.5)中で8 mg/mLのhuEGFR抗体を5.5～5倍モル過剰のSPDBリンカーと室温で約2時間インキュベートした。SPDB修飾型抗体をPBS、pH 6.5で2倍に希釈し、そして、ジメチルアセトアミド(DMA)中のDM4の濃溶液(15～30 mM)の添加により1.5倍モル過剰のマイタンシノイドDM4を用いて修飾した。室温での一晩のインキュベーションの後、10 mMヒスチジン、250 mMグリシン、1%ショ糖、pH 5.5で平衡化したSEPHADEX(商標)G25Fでのクロマトグラフィーにより複合体化抗体を精製した。以前に報告されている抗体とマイタンシノイドの吸光係数(Widdison *Wet al. J Med Chem, 49:4392-4408 (2006)*)を用い、抗体分子あたりの結合したDM4分子の数を決定した。上述のように、総遊離マイタンシノイド種のパーセンテージを決定した。huEGFR抗体あたり3.5～4 DM4分子を有する複合体が得られ、未複合体化マイタンシノイドとして1%未満が存在した。

#### 【0262】

(実施例13)

マイタンシノイド 複合体の結合親和性

実施例2に記載されるように、MDA-MB468細胞またはA431細胞を使用してhuML66抗体マイタンシノイド複合体およびmuEGFR-8抗体マイタンシノイド複合体の結合親和性が裸抗体の結合親和性と比較された。huML66抗体と複合体の結合曲線(図13A)から計算されたKdは裸huML66抗体について1.12 nMであり、huML66-SMCC-DM1複合体について2.33 nMであり、そしてhuML66-SPDB-DM4複合体について2.93 nMであった。muEGFR-8抗体と複合体の結合曲線(図13B)から計算されたKdは裸muEGFR-8抗体について1.43 nMであり、そして、muEGFR-8-SMCC-DM1複合体について4.54 nMであった。このデータは、DM複合体化によってhuML66およびmuEGFR-8抗体のhuEGFRへの結合親和性が顕著に変更されないことを示す。

#### 【0263】

(実施例14)

インビトロ細胞傷害性アッセイ

インビトロ細胞傷害性アッセイを用いてEGFR抗体マイタンシノイド複合体の腫瘍細胞増殖を抑制する能力を測定した。簡単に述べると、10%FBSを含有する完全RPMI培地100 μL中にウェルあたり1,500～3,000細胞の割合で標的細胞をプレートングした。5倍の希釈系列を用いて完全RPMI培地に複合体を希釈し、そして、ウェルあたり100 μLを添加した。典型的には、最終濃度は $3 \times 10^{-8}$  Mから $8 \times 10^{-14}$  Mまでの範囲であった。加湿5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で細胞を37 °Cで5日間インキュベートした。比色分析性WST-8アッセイにより残っている細胞の生存性を決定し、そして、450 nmの吸光度(A450)がマルチウェルプレートリーダーで測定された。未処理の対照の平均値で各処理試料の値を除算することにより生存率を算出

10

20

30

40

50

した。各処理について、セミログプロットで抗体 複合体濃度に対して生存率の値をプロットした。

【0264】

図14では、huML66-SMCC-DM1複合体およびhuML66-SPDB-DM4複合体のインビトロ細胞傷害性がchKTI-SMCC-DM1複合体およびchKTI-SPDB-DM4複合体などの非特異的マイタンシノイド複合体の活性と比較された。典型的な細胞傷害性アッセイの結果がNCI-H226細胞(ATCC)、NCI-H292細胞(ATCC)およびNCI-H322M細胞(NCI)について、それぞれ、図13A、BおよびCに示されている。huML66Ab複合体は、3nMから0.1nMまでの範囲のEC50で3種のEGFR発現性腫瘍細胞株において強く特異的な細胞傷害性を示した。

10

【0265】

図15では、キメラML66-SMCC-DM1(chML66-SMCC-DM1)の特異的傷害性がKB細胞株で試験された。この実験では、過剰な裸chML66抗体(1μM)と共に、またはそれ無しで標的細胞がchML66複合体とインキュベートされた。裸chML66抗体はML66複合体の結合を阻止し、したがって、前記複合体の特異的細胞傷害性を阻害した。ML66-SMCC-DM1のEC50は、裸ML66抗体によるブロッキングが有る場合と無い場合で、それぞれ、30nMおよび3nMである。したがって、ML66複合体について1ログの特異性ウィンドウが存在する。

20

【0266】

図16では、muEGFR-8-SMCC-DM1のインビトロ細胞傷害性が非特異的chKTI-SMCC-DM1複合体の活性と比較された。典型的な細胞傷害性アッセイの結果がNCI-H226細胞(ATCC)、NCI-H292細胞(ATCC)およびNCI-H322M細胞(NCI)について、それぞれ、図16A、BおよびCに示されている。muEGFR-8-SMCC-DM1複合体は、NCI-H226、NCI-H292およびNCI-H322Mにおいて、それぞれ、0.68nM、0.43nMおよび3.07nMのEC50で3種のEGFR発現性腫瘍細胞株において強く特異的な細胞傷害性を示した。対照的に、chKTI-SMCC-DM1はほとんど効果を持たず、そして、裸muEGFR-8抗体は3種の細胞株全てでどのような傷害性も示さなかった。DMx複合体化が本発明の非拮抗性EGFR抗体を高い細胞傷害性を有するものにする

30

【0267】

(実施例15)

KB腫瘍モデルにおけるchML66抗体マイタンシノイド複合体のインビボ有効性試験

SCIDマウスの皮下に移植されたEGFR発現KB細胞を用いて、確立された腫瘍異種移植片モデルにおいてchML66-抗体-マイタンシノイド複合体の活性を試験した。腫瘍が約115mm<sup>3</sup>の平均腫瘍体積に達したとき、腫瘍体積によって動物が無作為抽出されて処理群に分けられ、そして、20もしくは10mg/kgのchML66-SMCC-DM1複合体または5もしくは2.5mg/kgのchML66-SPDB-DM4複合体で1回注射された。図17において、各処理群の平均腫瘍体積が腫瘍細胞の接種後の時間に対してプロットされている。chML66-DM複合体を用いる処理が腫瘍の成長を著しく遅らせていることが明らかである。特に、5mg/kgの用量でのchML66-SPDB-DM4の処理により6匹のマウスうち3匹で腫瘍が無くなり、そして、6匹のマウス全てが完全奏効を経験した(明確な腫瘍が検出されなかった)。より少ない用量のchML66-SPDB-DM4でもまた、6匹のマウスのうち4匹での完全奏効という結果になった。chML66-SMCC-DM1で処理されたマウスのどれも完全奏効を経験しなかった。しかしながら、複合体処理は腫瘍の成長を著しく抑制した。腫瘍の成長阻害のパーセント(%T/C)は、対照群の腫瘍体積が既定のサイズに達したときの対照群の腫瘍体積の中央値で除算した各処理群の腫瘍体積の中央値に対応する。42%

40

50

より下の% T / C 値での処理は活性が有るとみなされるが、一方、12%より下の% T / C 値での処理は非常に活性が有るとみなされる。10 mg / kg の chML66 - SMCC - DM1、20 mg / kg の chML66 - SMCC - DM1、2.5 mg / kg の chML66 - SPDB - DM4 および 5 mg / kg の chML66 - SPDB - DM4 について、細胞接種後20日での% T / C 値は、それぞれ、23%、6%、0% または 0% に対応する。KB腫瘍異種移植片においてchML66マイタンシノイド複合体は高い活性を有することをこの結果は示している。

【0268】

前述の、具体的な実施形態の説明は本発明の一般的な性質を十分に明らかにしているの  
 で、当技術分野の技術内の知識を応用することにより、過度の実験を行うことなく、本発  
 明の全般的な構想から逸脱することなく、容易にそのような具体的な実施形態を改変する  
 ことができ、および/または、容易にそのような具体的な実施形態を様々な用途に適合さ  
 せることができる。したがって、そのような適合と改変は、本明細書において提示される  
 教示と指導に基づき、開示された実施形態の等価物の意味と範囲の内にあるものとされる  
 。本明細書の語法または表現法が、本教示と指導を踏まえて当業者によって理解されるよ  
 うに、本明細書における表現法または語法は説明を目的とし、限定を目的とするものでは  
 ないと理解されるものとする。

10

【0269】

本発明の広がり範囲は、上述の例示的な実施形態のいずれによっても限定されること  
 がなく、以下の請求項とそれらの同等物に従って定義されるのみであるとされる。

20

【図1】

抗体クローン番号	huEGFR Kd	maEGFR Kd
muEGFR-8	$6.27 \times 10^{-10}$	$4.70 \times 10^{-10}$
huML66	$1.00 \times 10^{-09}$	$2.00 \times 10^{-09}$
セツキシマブ	$5.66 \times 10^{-10}$	$5.50 \times 10^{-11}$
パニツムマブ	$5.72 \times 10^{-10}$	$1.20 \times 10^{-10}$

【 図 2 】

## ML66のヒト化

A

ML66-V <sub>L</sub>		
Kabat 位置	ラット 残基	ヒト 残基
1	D	D
3	V	V
5	T	T
7	S	S
10	A	<u>S</u>
11	L	L
16	G	G
18	R	R
19	V	<u>A</u>
40	<b>S</b>	<u>P</u>
41	G	G
42	Q	Q
45	K	K
57	G	G
60	A	A
67	S	S
70	D	D
80	A	A
81	D	<u>E</u>
100	G	<u>Q</u>
103	N	<u>K</u>
105	E	E
107	K	K
108	R	R

B

ML66-V <sub>H</sub>		
Kabat 位置	ラット 残基	ヒト 残基
1	Q	Q
3	Q	Q
5	<b>K</b>	<u>Q</u>
11	L	L
13	<b>Q</b>	<u>K</u>
15	S	S
16	<b>Q</b>	<u>E</u>
41	P	P
42	G	G
43	K	K
61	<b>S</b>	<u>P</u>
62	V	<u>S</u>
64	K	K
65	S	S
74	S	S
75	K	K
83	Q	<u>I</u>
84	T	<u>A</u>
85	E	<u>A</u>
105	Q	Q
108	M	<u>L</u>
112	S	S

図 2

【 図 3 】

## ヒト化アライメント

**A**

	1		68
ratH.66 VL	DTVLTQSPRLAVSPGERVTISCRASESVSLMHWYQQKSGQPRLIYLASHRESGVPAR		
huH.66 VL	-----S-----R-----P-----		
	61		107
ratH.66 VL	FSGSGSGTDFTLTIDPMEADDTATYYCQSSRHPFWTFGGGTNLELKR		
huH.66 VL	-----E-----Q--K-----		

**B**

	1		69
ratH.66 VH	QVQLKESGPELVQPSTLSLTCTVSGLSLASNSVSWIRQPPKGLYWGIVINRHGCTDYN		
huH.66 VH	---Q---K--E-----		
	61		116
ratH.66 VH	SVIKSRLSISRDTSKSQVFLKRNLSLQIEDTAMYPVCRKGGIYFDYWGQGVMTVSS		
huH.66 VH	PS-----TRA-----L-----		

図 3

【 图 4 】

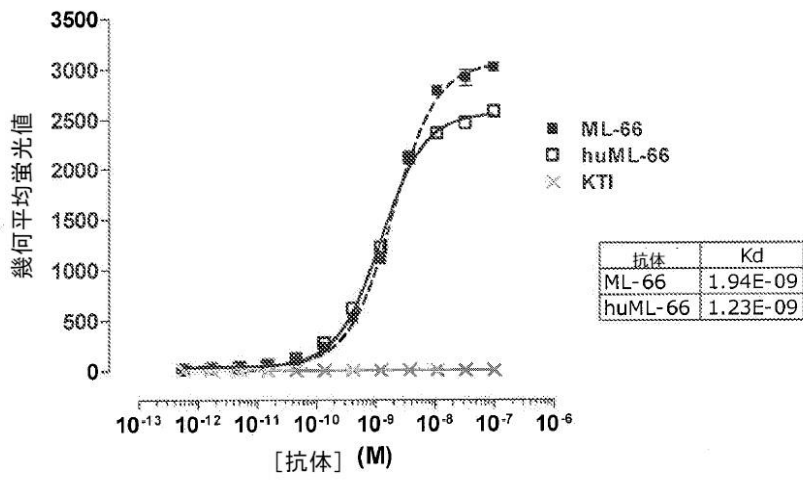
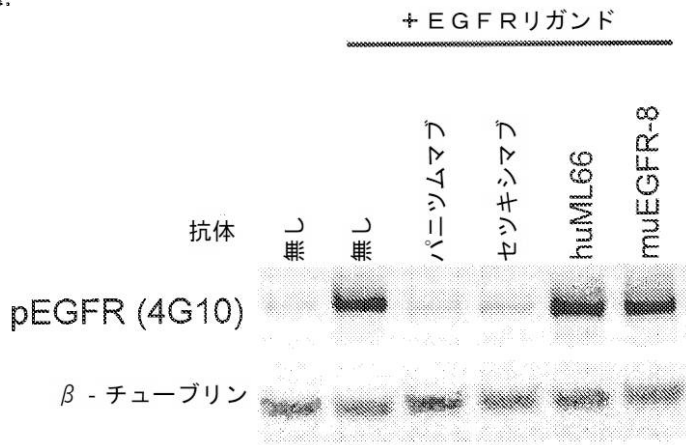


图 4

【 図 5 】

A.



B.

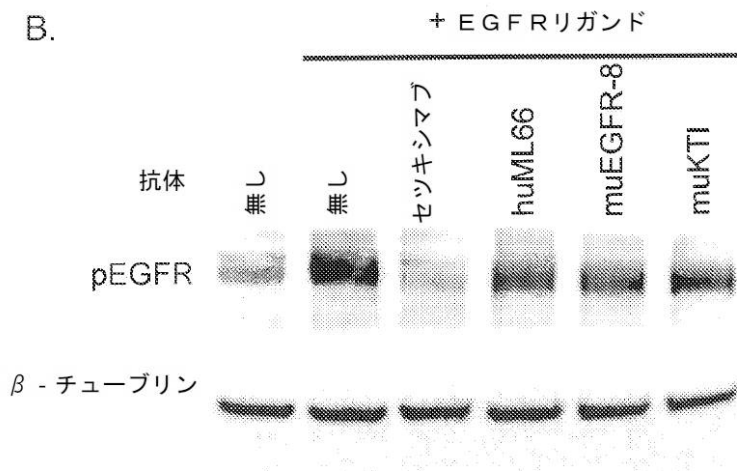


図 5



【 図 6 】

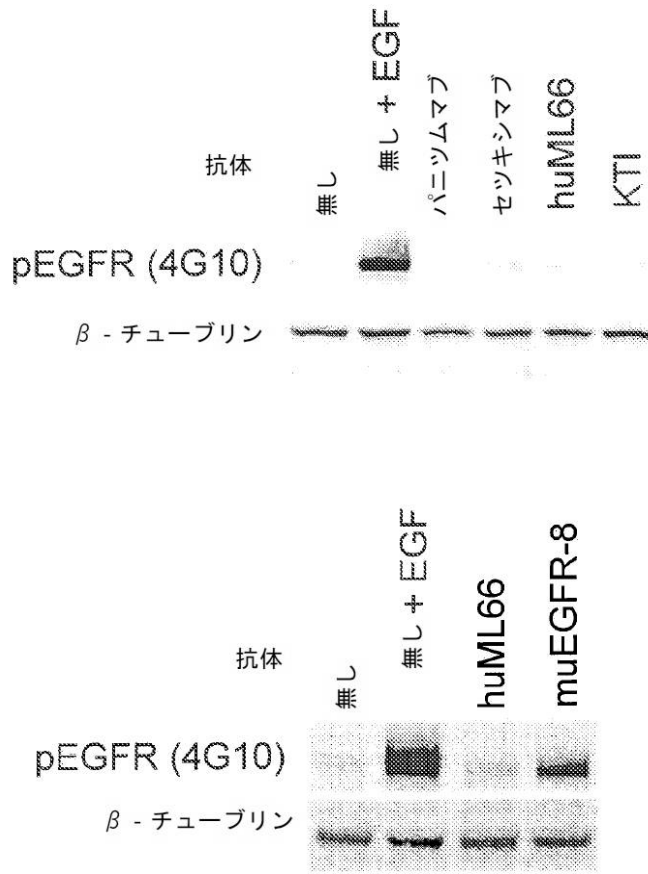
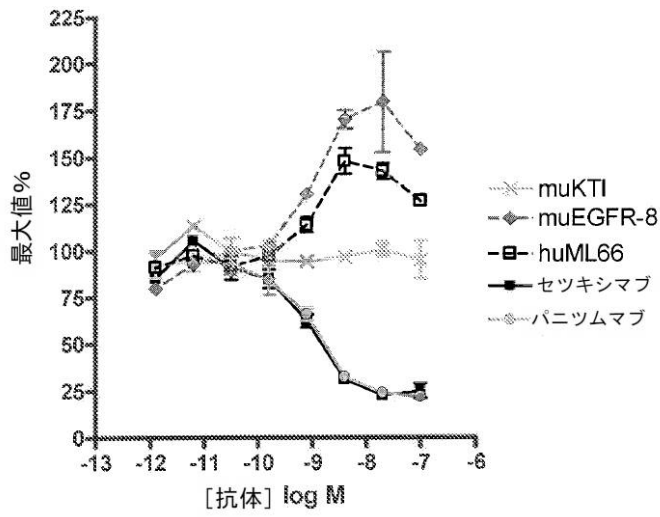


図 6

【 図 7 】

A



B

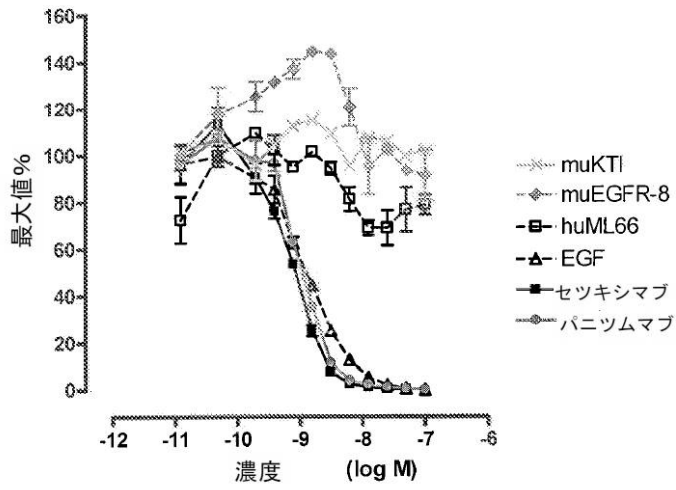


図 7

【 図 8 】

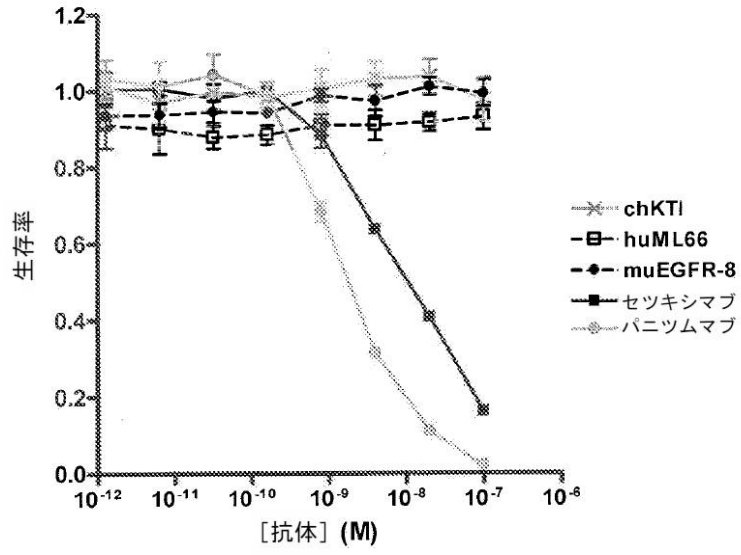


図 8

【 図 9 】

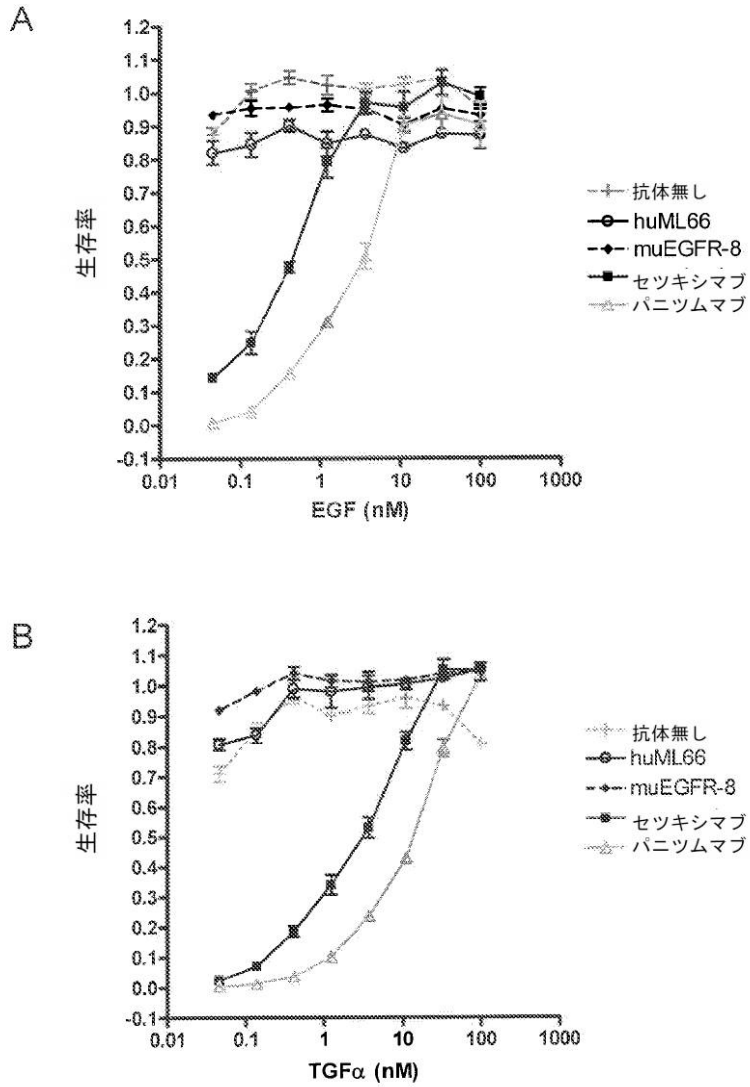


図 9

【 図 1 0 】

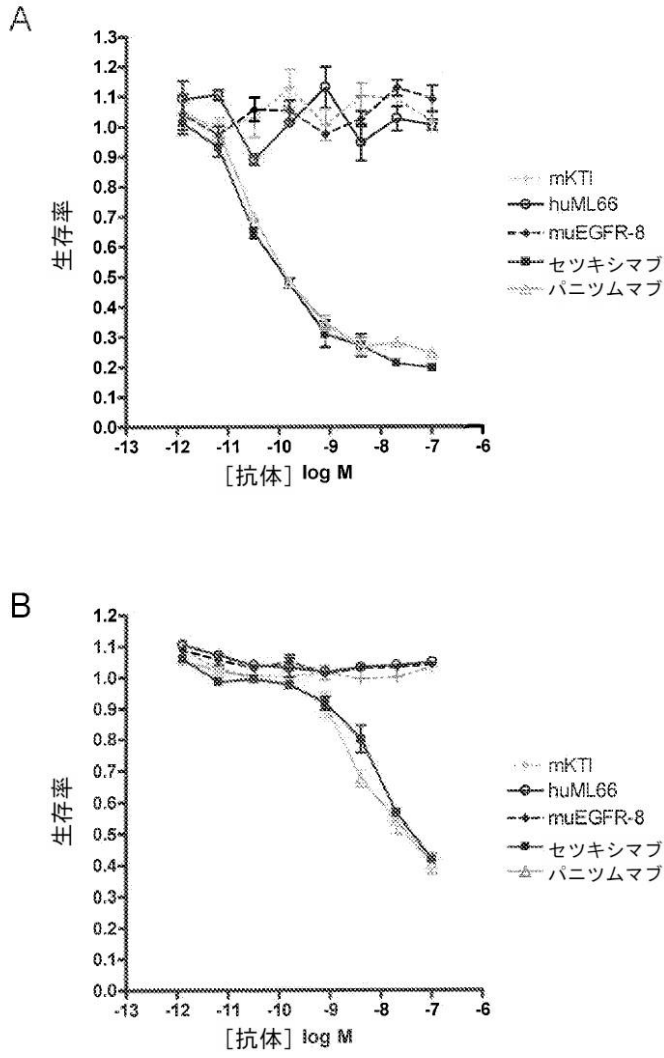


図 1 0

【 図 1 1 】

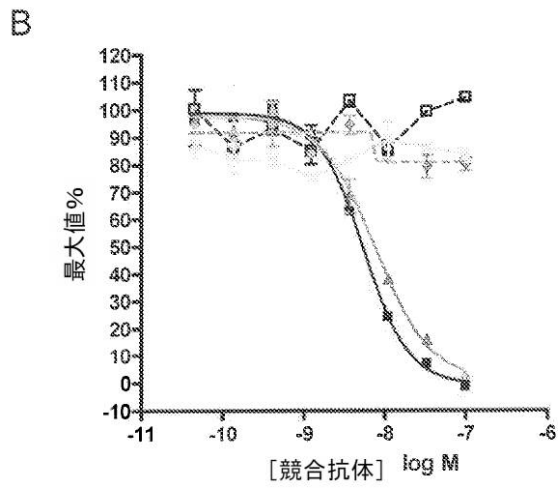
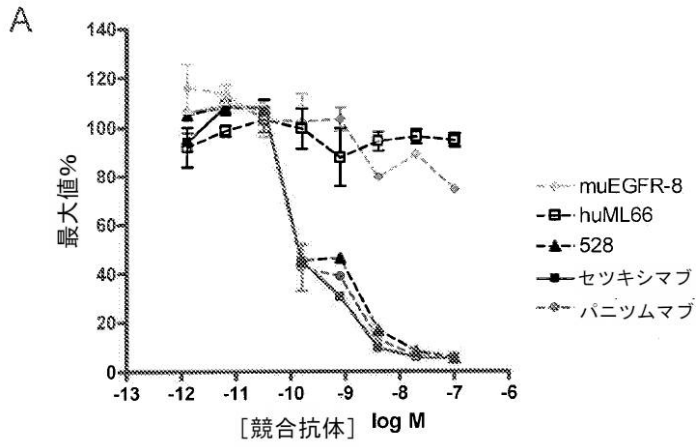


図 1 1

【 図 1 2 】

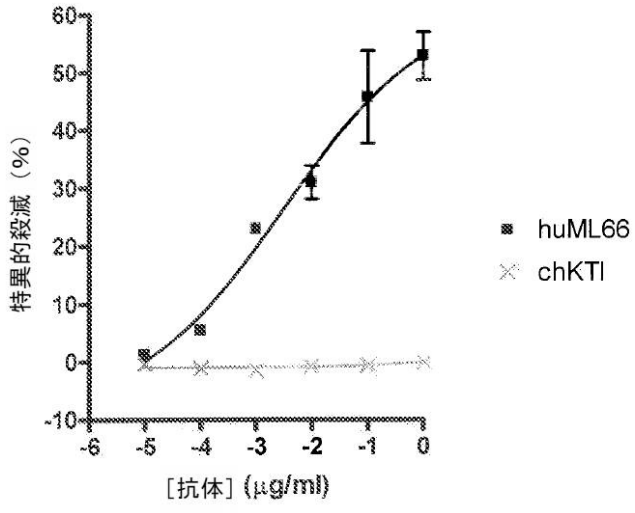
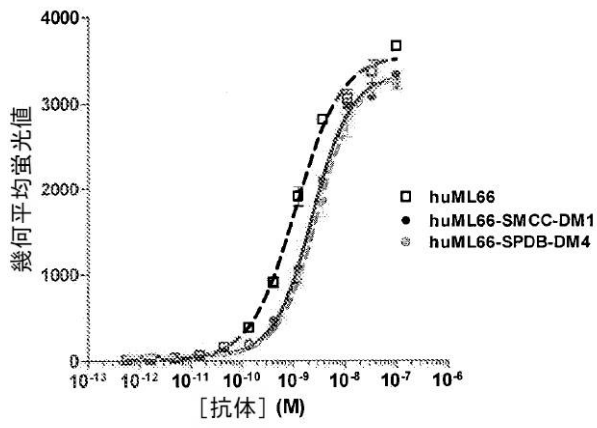


図 1 2

【 图 1 3 】

A



B

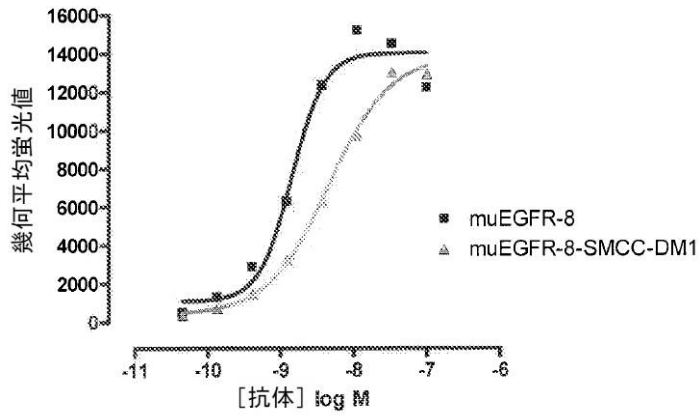


图 1 3



【 図 1 4 】

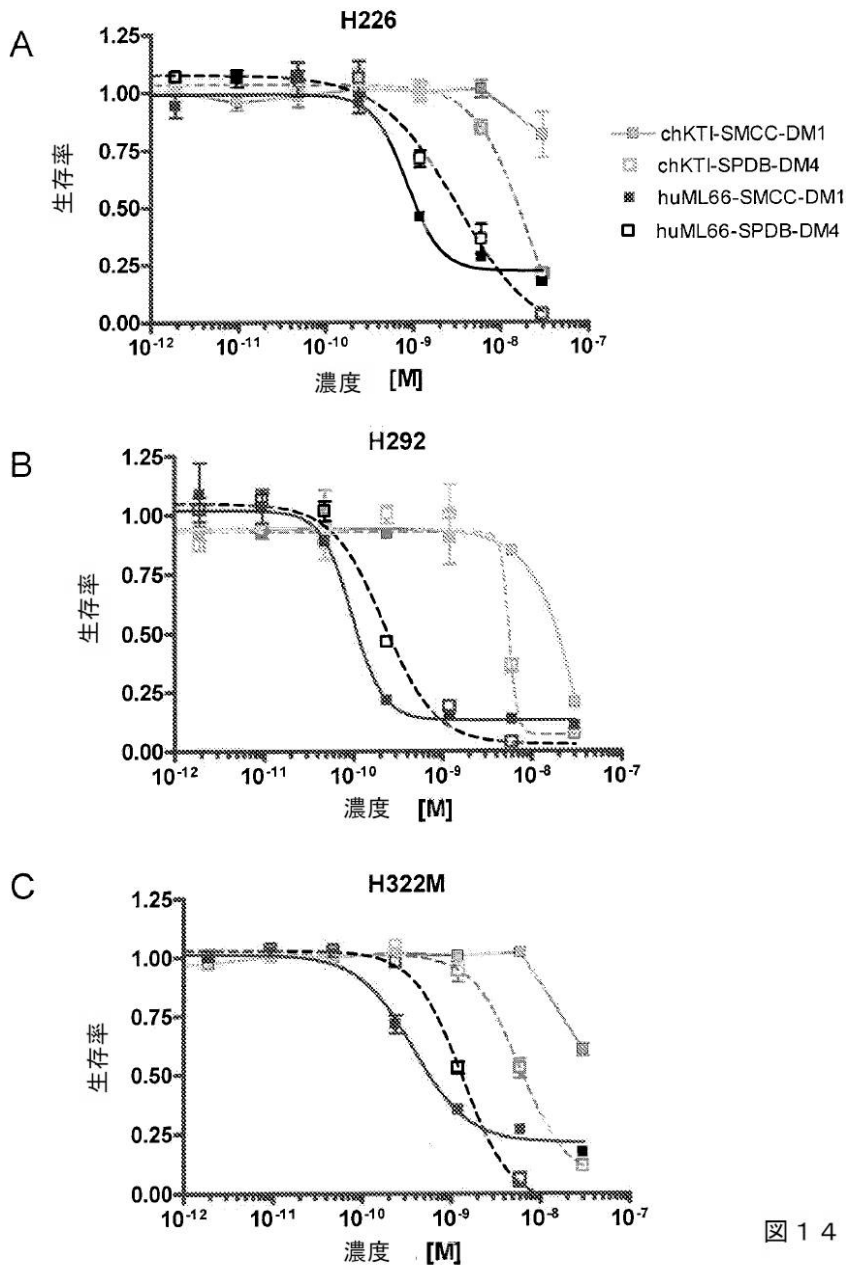


図 1 4

【 図 1 5 】

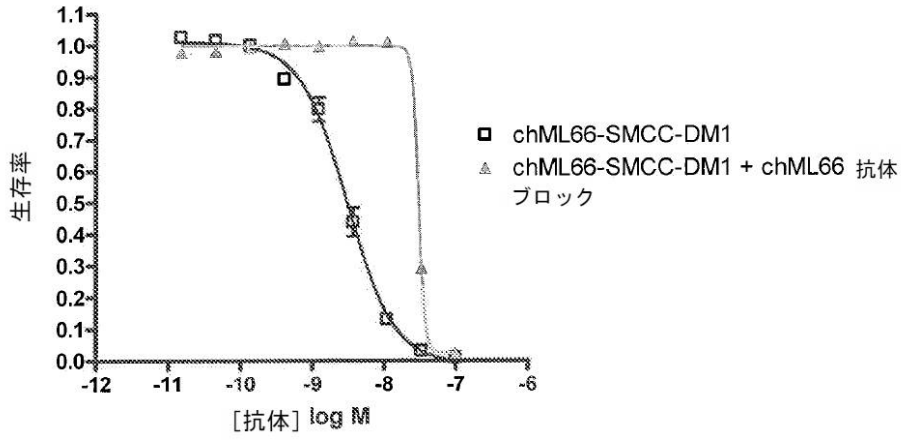


図 1 5

【 图 1 6 】

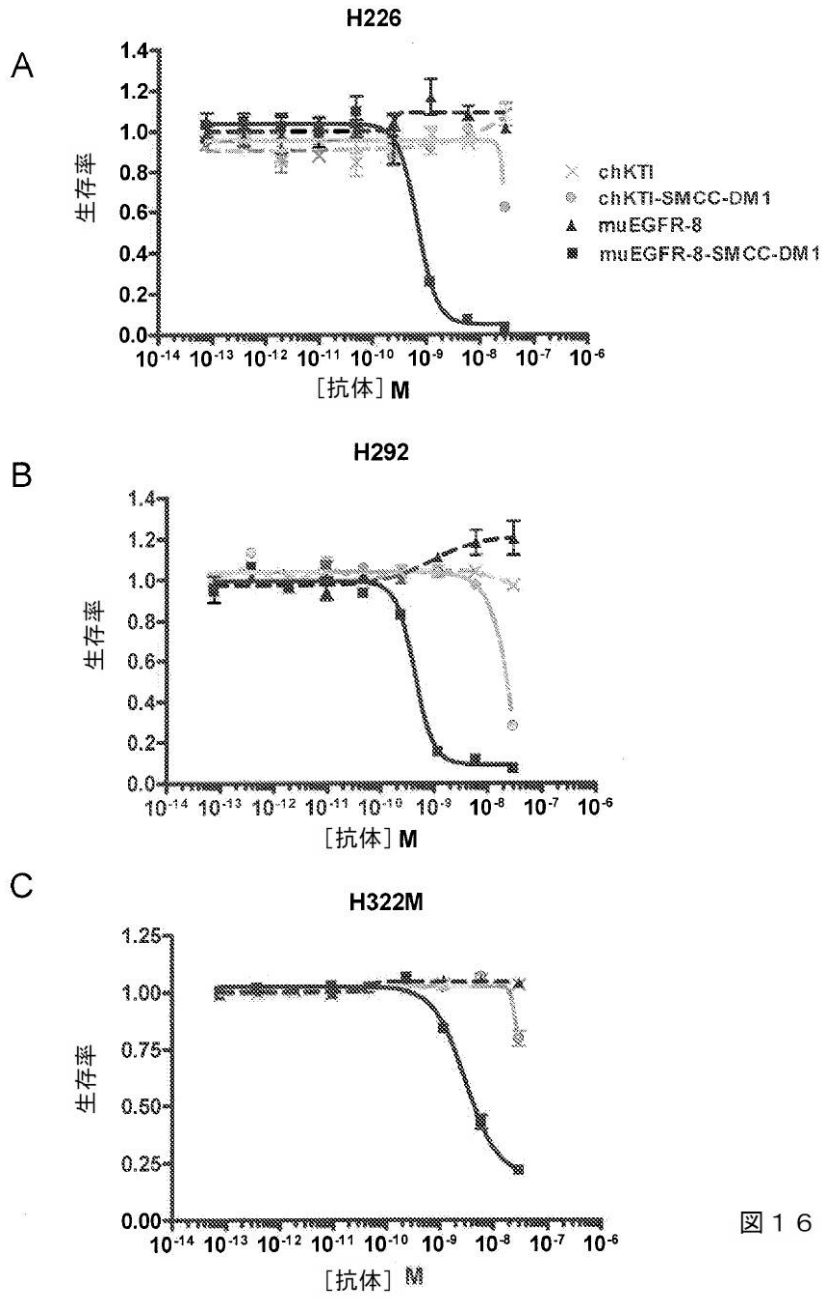


图 1 6

【 図 1 7 】

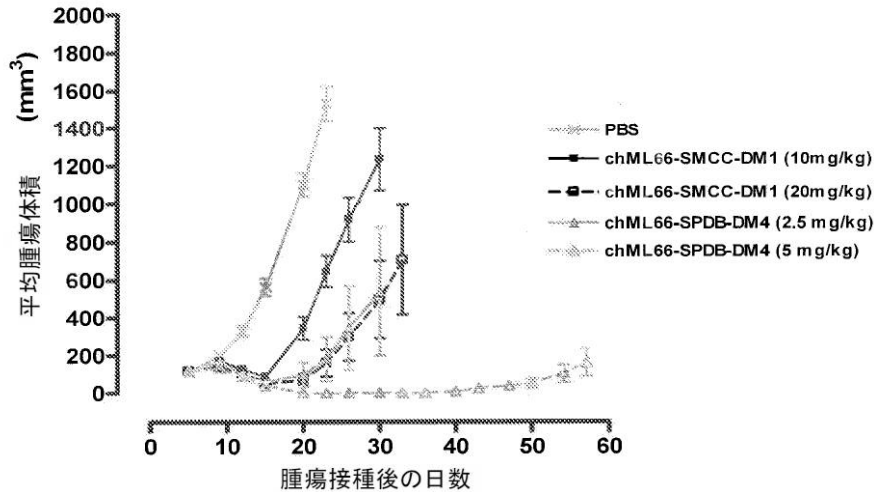


図 1 7

## 【 配列表 】

2013545452000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成25年10月31日(2013.10.31)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

## 【 請求項 1 】

ヒトEGFRに特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片であって、(a)  $10 \mu\text{g/ml}$ 以下でMDA-MB468細胞株またはヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b)  $100 \text{ nM}$ 以下でMDA-MB468細胞株でのトランスフォーミング増殖因子(TGF)のEGFRへの結合を阻害しない、(c)  $100 \text{ nM}$ 以下でケラチノサイトまたはMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d)  $100 \text{ nM}$ 以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞またはNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、ならびに(e)  $100 \text{ nM}$ 以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、という特徴からなる群より選択される少なくとも1つの特徴を有する前記抗体。

## 【 請求項 2 】

MDA-MB468細胞株で外来性EGFが存在しないときにEGFRのリン酸化を誘導することがない、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

## 【 請求項 3 】

MDA-MB468細胞株で外来性EGFが存在しないときにEGFRのリン酸化を誘

導する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

(a) 配列番号 17 ~ 20 からなる群より選択される基準 V H 配列に対して少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一である V H 配列；および (b) 配列番号 21 ~ 24 からなる群より選択される基準 V L 配列に対して少なくとも 90% 同一、少なくとも 95% 同一、少なくとも 99% 同一、または 100% 同一である V L 配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

配列番号 17 および配列番号 21 を含む、請求項 4 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

配列番号 18 および配列番号 22 を含む、請求項 4 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

配列番号 19 および配列番号 23 を含む、請求項 4 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

配列番号 20 および配列番号 24 を含む、請求項 4 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

(a) 配列番号 1 の基準重鎖 C D R 1 配列、配列番号 2、4、もしくは 5 の基準重鎖 C D R 2 配列、および配列番号 3 の基準重鎖 C D R 3 配列と比較して、それぞれ同一であるか、または 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの保存的アミノ酸置換をそれぞれ含む、C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびに

(b) 配列番号 1 1 の基準軽鎖 C D R 1 配列、配列番号 1 2 の基準軽鎖 C D R 2 配列、および配列番号 1 3 の基準軽鎖 C D R 3 配列と比較して、それぞれ同一であるか、または 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの保存的アミノ酸置換をそれぞれ含む、C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 10】

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

(a) 配列番号 6 の基準重鎖 C D R 1 配列、配列番号 7、9、もしくは 10 の基準重鎖 C D R 2 配列、および配列番号 8 の基準重鎖 C D R 3 配列と比較して、それぞれ同一であるか、または 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの保存的アミノ酸置換をそれぞれ含む、C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

(b) 配列番号 1 4 の基準軽鎖 C D R 1 配列、配列番号 1 5 の基準軽鎖 C D R 2 配列、および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 3 配列と比較して、それぞれ同一であるか、または 1 つ、2 つ、もしくは 3 つの保存的アミノ酸置換をそれぞれ含む、C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 11】

前記抗体またはその抗原結合断片がネズミ科、非ヒト、ヒト化、キメラ、再現化 ( r e s u r f a c e d ) またはヒトのものである、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 12】

全長型抗体である、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 13】

抗原結合断片である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 4】

前記抗体またはその抗原結合断片が Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、単鎖 Fv または scFv、ジスルフィド結合 Fv、V-NAR ドメイン、IgNar、細胞内抗体、IgG CH<sub>2</sub>、ミニボディ (minibody)、F(ab')<sub>3</sub>、テトラボディ (tetrabody)、トリアボディ (triabody)、二重特異性抗体、単ドメイン抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb<sub>2</sub>、(scFv)<sub>2</sub> または scFv-Fc を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 5】

前記抗体またはその抗原結合断片が実質的に類似の結合親和性でヒトとマカクの両方の EGF R に結合する、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 6】

約 1.0 ~ 約 10 nM の K<sub>d</sub> でヒトとマカクの EGF R に結合する、請求項 1 5 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 7】

約 1.0 nM またはそれより良好な K<sub>d</sub> でヒトとマカクの EGF R に結合する、請求項 1 5 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 8】

フローサイトメトリー、Biacore または放射免疫アッセイにより前記結合親和性が測定される、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 9】

(a) 配列番号 1 7 ~ 2 0 からなる群より選択される基準 V H 配列に対して少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも約 9 5 % 同一、少なくとも約 9 9 % 同一、または 1 0 0 % 同一である V H 配列；および (b) 配列番号 2 1 ~ 2 4 からなる群より選択される基準 V L 配列に対して少なくとも 9 0 % 同一、少なくとも約 9 5 % 同一、少なくとも約 9 9 % 同一、または 1 0 0 % 同一である V L 配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片、または請求項 1 9 に記載のポリペプチドを産生する、単離された細胞。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片、または請求項 1 9 に記載のポリペプチドを作製する方法であって、(a) 請求項 2 0 に記載の細胞を培養すること；および (b) 前記培養細胞から前記抗体、その抗原結合断片、またはポリペプチドを単離することを含む、前記方法。

【請求項 2 2】

前記細胞が真核細胞である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

式 (A) - (L) - (C) を有する免疫複合体であって、式中、(A) は請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片、または請求項 1 9 に記載のポリペプチドであり；(L) はリンカーであり；そして、(C) は細胞傷害性薬剤であり；そして、式中、前記リンカー (L) が (A) を (C) に連結する前記免疫複合体。

【請求項 2 4】

前記リンカーが切断可能リンカー、非切断可能リンカー、親水性リンカー、およびジカルボン酸ベースのリンカーからなる群より選択される、請求項 2 3 に記載の免疫複合体。

【請求項 2 5】

前記リンカーが、N-スクシンイミジル 4 - (2-ピリジルジチオ)ペンタノアート (

S P P ) ; N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルジチオ ) ブタノエート ( S P D B )  
 または N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルジチオ ) - 2 - スルホブタノエート ( スルホ - S P D B ) ; N - スクシンイミジル 4 - ( マレイミドメチル ) シクロヘキサンカルボキシレート ( S M C C ) ; N - スルホスクシンイミジル 4 - ( マレイミドメチル ) シクロヘキサンカルボキシレート ( スルホ S M C C ) ; N - スクシンイミジル - 4 - ( ヨードアセチル ) - アミノベンゾエート ( S I A B ) ; および N - スクシンイミジル - [ ( N - マレイミドプロピオンアミド ) - テトラエチレングリコール ] エステル ( N H S - P E G 4 - マレイミド ) からなる群より選択される、請求項 2 4 に記載の免疫複合体。

【請求項 2 6】

前記リンカーが N - スクシンイミジル 4 - ( マレイミドメチル ) シクロヘキサンカルボキシレート ( S M C C ) または N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルジチオ ) ブタノエート ( S P D B ) である、請求項 2 5 に記載の免疫複合体。

【請求項 2 7】

前記細胞傷害性薬剤がマイタンシノイド、マイタンシノイド類似体、ドキシソルピシン、修飾型ドキシソルピシン、ベンゾジアゼピン、タキソイド、C C - 1 0 6 5、C C - 1 0 6 5 類似体、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリケアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アリストアチン ( a r i s t a t i n )、トマイマイシン誘導体、およびレプトマイシン誘導体または前記薬剤の前駆薬からなる群より選択される、請求項 2 3 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

【請求項 2 8】

前記細胞傷害性薬剤がマイタンシノイドである、請求項 2 7 に記載の免疫複合体。

【請求項 2 9】

前記細胞傷害性薬剤が N ( 2 ' ) - デアセチル - N ( 2 ' ) - ( 3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル ) - マイタンシン ( D M 1 ) または N ( 2 ' ) - デアセチル - N 2 - ( 4 - メルカプト - 4 - メチル - 1 - オキソペンチル ) - マイタンシン ( D M 4 ) である、請求項 2 8 に記載の免疫複合体。

【請求項 3 0】

( A ) は、配列番号 1 8 の重鎖可変領域および配列番号 2 2 の軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合断片であり；

( L ) は N - スクシンイミジル 4 - ( マレイミドメチル ) シクロヘキサンカルボキシレート ( S M C C ) リンカーであり；そして

( C ) は 細胞傷害性薬剤 N ( 2 ' ) - デアセチル - N ( 2 ' ) - ( 3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル ) - マイタンシン ( D M 1 ) である、  
 請求項 2 3 に記載の免疫複合体。

【請求項 3 1】

( A ) は、配列番号 1 8 の重鎖可変領域および配列番号 2 2 の軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合断片であり；

( L ) は N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルジチオ ) ブタノエート ( S P D B ) リンカーであり；そして

( C ) は 細胞傷害性薬剤 N ( 2 ' ) - デアセチル - N 2 - ( 4 - メルカプト - 4 - メチル - 1 - オキソペンチル ) - マイタンシン ( D M 4 ) である、  
 請求項 2 3 に記載の免疫複合体。

【請求項 3 2】

( A ) は、配列番号 2 0 の重鎖可変領域および配列番号 2 4 の軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合断片であり；

( L ) は N - スクシンイミジル 4 - ( マレイミドメチル ) シクロヘキサンカルボキシレート ( S M C C ) リンカーであり；そして

( C ) は 細胞傷害性薬剤 N ( 2 ' ) - デアセチル - N ( 2 ' ) - ( 3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル ) - マイタンシン ( D M 1 ) である、  
 請求項 2 3 に記載の免疫複合体。

## 【請求項 3 3】

(A) は、配列番号 2 0 の重鎖可変領域および配列番号 2 4 の軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合断片であり：

(L) は N - スクシンイミジル 4 - ( 2 - ピリジルジチオ ) ブタノエート ( S P D B ) リンカーであり；そして

(C) は 細胞傷害性薬剤 N ( 2 ' ) - デアセチル - N 2 - ( 4 - メルカプト - 4 - メチル - 1 - オキソペンチル ) - マイタンシン ( D M 4 ) である、

請求項 2 3 に記載の免疫複合体。

## 【請求項 3 4】

請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、もしくは請求項 1 9 に記載のポリペプチド、または請求項 2 3 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体、および薬剤的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

## 【請求項 3 5】

第 2 の抗癌剤をさらに含む、請求項 3 4 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3 6】

標識されている、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、もしくは請求項 1 9 に記載のポリペプチド、または請求項 2 3 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体を含む診断用試薬。

## 【請求項 3 7】

前記標識が、放射性標識、フルオロフォア、クロモフォア、造影剤および金属イオンからなる群より選択される、請求項 3 6 に記載の診断用試薬。

## 【請求項 3 8】

請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、もしくは請求項 1 9 に記載のポリペプチド、または請求項 2 3 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体を含むキット。

## 【請求項 3 9】

E G F R を発現する細胞の増殖を抑制するための、請求項 2 3 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体を含む組成物、または E G F R を発現する細胞の増殖を抑制するための、請求項 3 4 もしくは 3 5 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4 0】

前記細胞が腫瘍細胞である、請求項 3 9 に記載の組成物または医薬組成物。

## 【請求項 4 1】

新生物を有する患者を治療するための、治療上有効量の請求項 2 3 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体を含む組成物、または新生物を有する患者を治療するための、請求項 3 4 もしくは 3 5 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4 2】

前記新生物が腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、副腎、副甲状腺、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺、眼、頭部および頸部、中枢神経系、末梢神経系、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部および泌尿生殖器系の新生物からなる群より選択される、請求項 4 1 に記載の組成物または医薬組成物。

## 【請求項 4 3】

前記新生物が、膀胱癌、脳腫瘍、膵臓癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、および腎臓癌からなる群から選択される癌である、請求項 4 1 に記載の組成物または医薬組成物。

## 【請求項 4 4】

第 2 の抗癌剤をさらに含む、請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の組成物または医薬組成物。

## 【請求項 4 5】

前記の第 2 の抗癌剤が化学療法剤である、請求項 4 4 に記載の組成物または医薬組成物。

## 【請求項 4 6】



患者における細胞増殖障害を治療するための、治療上有効量の請求項23～33のいずれか1項に記載の免疫複合体を含む組成物、または患者における細胞増殖障害を治療するための、請求項34もしくは35に記載の医薬組成物。

【請求項47】

前記細胞増殖障害が、副腎皮質過形成（クッシング病）、先天性副腎過形成、子宮内膜増殖症、良性前立腺肥大症、乳房過形成、内膜過形成、局所性上皮過形成（ヘック病）、皮脂腺過形成、代償性肝臓過形成、および新生物以外の他の任意の細胞増殖障害からなる群より選択される、請求項46に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項48】

配列番号17～40からなる群より選択される配列に対して少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも99%同一、または100%同一であるポリペプチドをコードする配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項49】

請求項48に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項50】

請求項49に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項51】

2010年10月21日にATCCに寄託され、そして、ATCC受託番号PTA-11424を有する前記プラスミドDNAによりコードされる抗体またはその抗原結合断片。

【請求項52】

2010年10月21日にATCCに寄託され、そして、ATCC受託番号PTA-11423を有する前記ハイブリドーマにより産生される抗体またはその抗原結合断片。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

1つの実施形態において、本発明は、配列番号29～40に少なくとも90%同一である配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、配列番号29～40に少なくとも95%同一な配列を含む。さらなる実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、配列番号29～40に少なくとも99%同一な配列を含む。さらに別の実施形態において、本発明は、配列番号17～40からなる群より選択される配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施形態において、本発明は、本明細書において記載されるポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。別の実施形態において、本発明は、本明細書において記載されるベクターを含む宿主細胞を提供する。

特定の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

ヒトEGFRに特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片であって、(a)  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b)  $100 \text{ nM}$ 以下でMDA-MB468細胞株でのトランスフォーミング増殖因子(TGF)のEGFRへの結合を阻害しない、(c)  $100 \text{ nM}$ 以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d)  $100 \text{ nM}$ 以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、ならびに(e)  $100 \text{ nM}$ 以下でA431細

胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、という特徴からなる群より選択される少なくとも1つの特徴を有する前記抗体。

(項目2)

前記抗体または抗原結合断片が、(a)10 $\mu$ g/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b)100nM以下でMDA-MB468細胞株でのTGF $\beta$ のEGFRへの結合を阻害しない、(c)100nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d)100nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、ならびに(e)100nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、という特徴からなる群より選択される少なくとも2つの特徴を有する、項目1に記載の抗体または抗原結合断片。

(項目3)

前記抗体または抗原結合断片が、(a)10 $\mu$ g/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b)100nM以下でMDA-MB468細胞株でのTGF $\beta$ のEGFRへの結合を阻害しない、(c)100nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d)100nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、ならびに(e)100nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、という特徴からなる群より選択される少なくとも3つの特徴を有する、項目2に記載の抗体または抗原結合断片。

(項目4)

前記抗体または抗原結合断片が、(a)10 $\mu$ g/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b)100nM以下でMDA-MB468細胞株でのTGF $\beta$ のEGFRへの結合を阻害しない、(c)100nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d)100nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、ならびに(e)100nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、という特徴からなる群より選択される少なくとも4つの特徴を有する、項目3に記載の抗体または抗原結合断片。

(項目5)

前記抗体または抗原結合断片が、(a)10 $\mu$ g/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b)100nM以下でMDA-MB468細胞株でのTGF $\beta$ のEGFRへの結合を阻害しない、(c)100nM以下でケラチノサイトとMCF-10A上皮細胞のリガンド誘導性増殖を20%より多く抑制することがない、(d)100nM以下でEGFR発現性NCI-H292腫瘍細胞およびNCI-H322M腫瘍細胞の基底増殖の20%より多く増殖を抑制することがない、ならびに(e)100nM以下でA431細胞株におけるセツキシマブおよび528抗体の結合を30%より多く阻害することがない、という特徴からなる群より選択される少なくとも5つの特徴を有する、項目4に記載の抗体または抗原結合断片。

(項目6)

ヒトEGFRに特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片であって、(a)10 $\mu$ g/ml以下でMDA-MB468細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子(EGF)誘導性EGFRリン酸化を阻害しない、(b)100nM以下でM

MDA - MB 468 細胞株での TGF の EGFR への結合を阻害しない、(c) 100 nM 以下ではケラチノサイトと MCF - 10A 上皮細胞のリガンド誘導性増殖を 20% より多く抑制する、(d) 100 nM 以下では EGFR 発現性 NCI - H292 腫瘍細胞および NCI - H322M 腫瘍細胞の基底増殖の 20% より多く増殖を抑制する、ならびに (e) 100 nM 以下で A431 細胞株におけるセツキシマブおよび 528 抗体の結合を 30% より多く阻害する、前記抗体。

(項目 7)

ヒト EGFR に特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片であって、(a) 10 µg/ml 以下で MDA - MB 468 細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子 (EGF) 誘導性 EGFR リン酸化を阻害しない、(b) 100 nM 以下で MDA - MB 468 細胞株での TGF の EGFR への結合を阻害しない、(c) 100 nM 以下でケラチノサイトと MCF - 10A 上皮細胞のリガンド誘導性増殖を 20% より多く抑制することがない、(d) 100 nM 以下で EGFR 発現性 NCI - H292 腫瘍細胞および NCI - H322M 腫瘍細胞の基底増殖の 20% より多く増殖を抑制することがない、(e) 100 nM 以下で A431 細胞株におけるセツキシマブおよび 528 抗体の結合を 30% より多く阻害することがない、ならびに (f) MDA - MB 468 細胞株で外来性 EGF が存在しないときに EGFR のリン酸化を誘導することがない、前記抗体。

(項目 8)

ヒト EGFR に特異的に結合する非拮抗性抗体またはその抗原結合断片であって、(a) 10 µg/ml 以下で MDA - MB 468 細胞株およびヒト初代ケラチノサイトでの上皮成長因子 (EGF) 誘導性 EGFR リン酸化を阻害しない、(b) 100 nM 以下で MDA - MB 468 細胞株での TGF の EGFR への結合を阻害しない、(c) 100 nM 以下でケラチノサイトと MCF - 10A 上皮細胞のリガンド誘導性増殖を 20% より多く抑制することがない、(d) 100 nM 以下では EGFR 発現性 NCI - H292 腫瘍細胞および NCI - H322M 腫瘍細胞の基底増殖の 20% より多く増殖を抑制する、(e) 100 nM 以下で A431 細胞株におけるセツキシマブおよび 528 抗体の結合を 30% より多く阻害することがない、ならびに (f) MDA - MB 468 細胞株で外来性 EGF が存在しないときに EGFR のリン酸化を誘導する、前記抗体。

(項目 9)

(a) 配列番号 17 ~ 20 からなる群より選択される基準 VH 配列に対して少なくとも 90% 同一である VH 配列；および (b) 配列番号 21 ~ 24 からなる群より選択される基準 VL 配列に対して少なくとも 90% 同一である VL 配列を含む、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 10)

前記 VH 配列および VL 配列が前記基準 VH 配列および VL 配列に少なくとも 95% 同一である、項目 9 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 11)

前記 VH 配列および VL 配列が前記基準 VH 配列および VL 配列に対して少なくとも 99% 同一である、項目 10 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 12)

(a) 配列番号 17 ~ 20 からなる群より選択される VH 配列；および (b) 配列番号 21 ~ 24 からなる群より選択される VL 配列を含む、項目 11 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 13)

配列番号 17 および配列番号 21 を含む、項目 12 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 14)

配列番号 18 および配列番号 22 を含む、項目 12 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 15)

配列番号 19 および配列番号 23 を含む、項目 12 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 16)

配列番号 20 および配列番号 24 を含む、項目 12 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 17)

(a) 配列番号 17 の V H ポリペプチドおよび配列番号 21 の V L ポリペプチドを含む抗体；

(b) 配列番号 18 の V H ポリペプチドおよび配列番号 22 の V L ポリペプチドを含む抗体；

(c) 配列番号 19 の V H ポリペプチドおよび配列番号 23 の V L ポリペプチドを含む抗体；ならびに

(d) (d) 配列番号 20 の V H ポリペプチドおよび配列番号 24 の V L ポリペプチドを含む抗体

からなる群より選択される抗体と同一のヒト E G F R エピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片。

(項目 18)

(a) 配列番号 17 の V H ポリペプチドおよび配列番号 21 の V L ポリペプチドを含む抗体；

(b) 配列番号 18 の V H ポリペプチドおよび配列番号 22 の V L ポリペプチドを含む抗体；

(c) 配列番号 19 の V H ポリペプチドおよび配列番号 23 の V L ポリペプチドを含む抗体；ならびに

(d) 配列番号 20 の V H ポリペプチドおよび配列番号 24 の V L ポリペプチドを含む抗体

からなる群より選択される基準抗体である前記基準抗体のヒト E G F R に対する結合を競合的に阻害する抗体またはその抗原結合断片。

(項目 19)

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

(a) 1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一である C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびに

(b) 1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 11、配列番号 12 および配列番号 13 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

(項目 20)

(a) それぞれ、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一である C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域；ならびに

(b) それぞれ、配列番号 11、配列番号 12 および配列番号 13 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、項目 19 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 21)

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

(a) 1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 1、配列番号 4 および配列番号 3 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R

3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

(b) 1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号11、配列番号12および配列番号13の基準軽鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

(項目22)

(a) それぞれ、配列番号1、配列番号4および配列番号3の基準重鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

(b) それぞれ、配列番号11、配列番号12および配列番号13の基準軽鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、項目21に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目23)

ヒトEGFRに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

(a) 1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、配列番号1、配列番号5および配列番号3の基準重鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

(b) 1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号11、配列番号12および配列番号13の基準軽鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

(項目24)

(a) それぞれ、配列番号1、配列番号5および配列番号3の基準重鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

(b) それぞれ、配列番号11、配列番号12および配列番号13の基準軽鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、項目23に記載の抗体または抗原結合断片。

(項目25)

ヒトEGFRに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

(a) 1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号6、配列番号7および配列番号8の基準重鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

(b) 1つ、2つ、または3つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号14、配列番号15および配列番号16の基準軽鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

(項目26)

(a) それぞれ、配列番号6、配列番号7および配列番号8の基準重鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

(b) それぞれ、配列番号14、配列番号15および配列番号16の基準軽鎖CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列に同一なCDR1、CDR2およびCDR3を含

む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、項目 2 5 に記載の抗体または抗原結合断片。

(項目 2 7)

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

( a ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 6、配列番号 9 および配列番号 8 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

( b ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

(項目 2 8)

( a ) それぞれ、配列番号 6、配列番号 9 および配列番号 8 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

( b ) それぞれ、配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、項目 2 7 に記載の抗体または抗原結合断片。

(項目 2 9)

ヒト E G F R に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

( a ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 6、配列番号 1 0 および配列番号 8 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

( b ) 1 つ、2 つ、または 3 つの保存的アミノ酸置換を例外として、それぞれ、配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、前記抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 0)

( a ) それぞれ、配列番号 6、配列番号 1 0 および配列番号 8 の基準重鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、ならびに

( b ) それぞれ、配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の基準軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列および C D R 3 配列に同一な C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域

を含む、項目 2 9 に記載の抗体または抗原結合断片。

(項目 3 1)

前記抗体またはその抗原結合断片がネズミ科、非ヒト、ヒト化、キメラ、再現化 ( r e s u r f a c e d ) またはヒトのものである、項目 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 2)

全長型抗体である、項目 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 3)

抗原結合断片である、項目 1 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目34)

前記抗体またはその抗原結合断片がFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、単鎖FvまたはscFv、ジスルフィド結合Fv、V-NARDメイン、IgNar、細胞内抗体、IgG<sub>CH2</sub>、ミニボディ(minibody)、F(ab')<sub>3</sub>、テトラボディ(tetrabody)、トリアボディ(triabody)、二重特異性抗体、単ドメイン抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb<sub>2</sub>、(scFv)<sub>2</sub>またはscFv-Fcを含む、項目1~33のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目35)

項目1~34のいずれか1項に記載のVH配列およびVL配列を含むポリペプチド。

(項目36)

前記抗体またはその抗原結合断片が実質的に類似の結合親和性でヒトとマカクの両方のEGFRに結合する、項目1~35のいずれか1項に記載の抗体またはポリペプチド。

(項目37)

約1.0~約10nMのKdでヒトとマカクのEGFRに結合する、項目36に記載の抗体またはポリペプチド。

(項目38)

約1.0nMまたはそれより良好なKdでヒトとマカクのEGFRに結合する、項目37に記載の抗体またはポリペプチド。

(項目39)

フローサイトメトリー、Biacoreまたは放射免疫アッセイにより前記結合親和性が測定される、項目36~38のいずれか1項に記載の抗体またはポリペプチド。

(項目40)

項目1~39のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合断片、またはポリペプチドを産生する、単離された細胞。

(項目41)

項目1~39、73および74のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合断片、またはポリペプチドを作製する方法であって、(a)項目40に記載の細胞を培養すること；および(b)前記培養細胞から前記抗体、その抗原結合断片、またはポリペプチドを単離することを含む、前記方法。

(項目42)

前記細胞が真核細胞である、項目41に記載の方法。

(項目43)

式(A)-(L)-(C)を有する免疫複合体であって、式中、  
(A)は項目1~39、73、および74のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合断片、またはポリペプチドであり；  
(L)はリンカーであり；そして  
(C)は細胞傷害性薬剤であり；そして、  
式中、前記リンカー(L)が(A)を(C)に連結する前記免疫複合体。

(項目44)

前記リンカーが切断可能リンカー、非切断可能リンカー、親水性リンカー、およびジカルボン酸ベースのリンカーからなる群より選択される、項目43に記載の免疫複合体。

(項目45)

前記リンカーが非切断可能リンカーである、項目44に記載の免疫複合体。

(項目46)

前記リンカーが、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート(SPP)；N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ブタノエート(SPDB)またはN-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホブタノエート(スルホ-SPDB)；N-スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(SMCC)；N-スルホスクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシレート(スルホSMCC)；N-スクシンイミジル-4-(ヨード

アセチル) - アミノベンゾエート (S I A B) ; および N - スクシンイミジル - [ ( N - マレイミドプロピオンアミド) - テトラエチレングリコール ] エステル ( N H S - P E G 4 - マレイミド) からなる群より選択される、項目 4 5 に記載の免疫複合体。

( 項目 4 7 )

前記リンカーが N - スクシンイミジル - [ ( N - マレイミドプロピオンアミド) - テトラエチレングリコール ] エステル ( N H S - P E G 4 - マレイミド) である、項目 4 6 に記載の免疫複合体。

( 項目 4 8 )

前記細胞傷害性薬剤がマイタンシノイド、マイタンシノイド類似体、ドキシソルピシン、修飾型ドキシソルピシン、ベンゾジアゼピン、タキソイド、C C - 1 0 6 5、C C - 1 0 6 5 類似体、デュオカルマイシン、デュオカルマイシン類似体、カリケアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アリストアチン ( a r i s t a t i n )、トマイマイシン誘導体、およびレプトマイシン誘導体または前記薬剤の前駆薬からなる群より選択される、項目 4 3 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

( 項目 4 9 )

前記細胞傷害性薬剤がマイタンシノイドである、項目 4 8 に記載の免疫複合体。

( 項目 5 0 )

前記細胞傷害性薬剤が N ( 2 ' ) - デアセチル - N ( 2 ' ) - ( 3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル) - マイタンシン ( D M 1 ) または N ( 2 ' ) - デアセチル - N 2 - ( 4 - メルカプト - 4 - メチル - 1 - オキソペンチル) - マイタンシン ( D M 4 ) である、項目 4 9 に記載の免疫複合体。

( 項目 5 1 )

項目 1 ~ 3 9、7 3 および 7 4 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、もしくはポリペプチド、または項目 4 3 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体、および薬剤的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

( 項目 5 2 )

第 2 の抗癌剤をさらに含む、項目 5 1 に記載の医薬組成物。

( 項目 5 3 )

標識されている、項目 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、もしくはポリペプチド、または項目 4 3 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体を含む診断用試薬。

( 項目 5 4 )

前記標識が、放射性標識、フルオロフォア、クロモフォア、造影剤および金属イオンからなる群より選択される、項目 5 3 に記載の診断用試薬。

( 項目 5 5 )

項目 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、もしくはポリペプチド、または項目 4 3 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体を含むキット。

( 項目 5 6 )

E G F R を発現する細胞の増殖を抑制する方法であって、項目 4 3 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体または項目 5 1 もしくは 5 2 に記載の医薬組成物と前記細胞を接触させることを含む前記方法。

( 項目 5 7 )

前記細胞が腫瘍細胞である、項目 5 6 に記載の方法。

( 項目 5 8 )

新生物を有する患者を治療する方法であって、前記患者に治療上有効量の項目 4 3 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体または項目 5 1 もしくは 5 2 に記載の医薬組成物を投与することを含む前記方法。

( 項目 5 9 )

前記新生物が腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、副腎、副甲状腺、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺、眼、頭部および頸部、中枢神経系、末梢神経系、リンパ系



骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部および泌尿生殖器系の新生物からなる群より選択される、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記対象に第 2 の抗癌剤を投与することをさらに含む、項目 5 8 または 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記の第 2 の抗癌剤が化学療法剤である、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

患者における細胞増殖障害を治療する方法であって、前記患者に治療上有効量の項目 4 3 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体または項目 5 1 もしくは 5 2 に記載の医薬組成物を投与することを含む前記方法。

(項目 6 3)

前記細胞増殖障害が、副腎皮質過形成（クッシング病）、先天性副腎過形成、子宮内膜増殖症、良性前立腺肥大症、乳房過形成、内膜過形成、局所性上皮過形成（ヘック病）、皮脂腺過形成、代償性肝臓過形成、および新生物以外の他の任意の細胞増殖障害からなる群より選択される、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 4)

配列番号 1 7 ~ 2 8 からなる群より選択される配列に対して少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドをコードする配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 6 5)

前記配列が、配列番号 1 7 ~ 2 8 からなる群より選択される配列に対して少なくとも 9 5 % 同一である、項目 6 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 6 6)

前記配列が、配列番号 1 7 ~ 2 8 からなる群より選択される配列に対して少なくとも 9 9 % 同一である、項目 6 5 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 6 7)

配列番号 2 9 ~ 4 0 に対して少なくとも 9 0 % 同一である配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 6 8)

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 2 9 ~ 4 0 に対して少なくとも 9 5 % 同一である配列を含む、項目 6 7 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 6 9)

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 2 9 ~ 4 0 に対して少なくとも 9 9 % 同一である配列を含む、項目 6 8 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 7 0)

配列番号 1 7 ~ 4 0 からなる群より選択される配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

(項目 7 1)

項目 6 4 ~ 7 0 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

(項目 7 2)

項目 7 1 に記載のベクターを含む宿主細胞。

(項目 7 3)

2 0 1 0 年 1 0 月 2 1 日に A T C C に寄託され、そして、A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 2 4 を有する前記プラスミド D N A によりコードされる抗体またはその抗原結合断片。

(項目 7 4)

2 0 1 0 年 1 0 月 2 1 日に A T C C に寄託され、そして、A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 2 3 を有する前記ハイブリドーマにより産生される抗体またはその抗原結合断片。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/58385
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07K 16/00;A61K 39/395; A61K 39/00;C12N 15/00;C12N 5/16;C12N 5/02 (2012.01) USPC - 530/387.1, 530/388.1, 530/391.1; 424/130.1, 424/141.1; 424/178.1; 435/320.1; 435/326; 435/375 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C07K 16/00;A61K 39/395; A61K 39/00;C12N 15/00;C12N 5/16;C12N 5/02 (2012.01) USPC - 530/387.1, 530/388.1, 530/391.1; 424/130.1, 424/141.1; 424/178.1; 435/320.1; 435/326; 435/375 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - C07K 16/00;A61K 39/395; A61K 39/00;C12N 15/00;C12N 5/16;C12N 5/02 (2012.01) - see keyword below USPC - 530/387.1, 530/388.1, 530/391.1; 424/130.1, 424/141.1; 424/178.1; 435/320.1; 435/326; 435/375 - see keyword below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Medline, Google: EGFR, ErbB, ErbB1, Her1, antibody, binding, phosphorylation, MDA-MB468, human primary keratinocyte, Cetuximab, IMC-C225, Nimotuzumab, ICR9, Matuzumab, Panitumumab, Zalutumumab, 528, 425, EGF-R, activation, agonist, monoclonal, light chain, heavy chain, CDR, EGF, TGF, 100nM, MCF-10A, NCI-H292, NCI-H32		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YANG et al. Eradication of Established Tumors by a Fully Human Monoclonal Antibody to the Epidermal Growth Factor Receptor without Concomitant Chemotherapy. Cancer Res. 1999, Vol. 59(6), p. 1236-43. pg 1237, col 1, para 2; and pg 1238, col 1, top para and para 1-4, and Fig 1(a)	1 ----- 9-14/(1)
A	WO 2010/055950 A1 (MATSUMURA et al.) 20 May 2010 (20.05.2010), Fig 9, 35-4 G2a sequence (SEQ ID NO: 12 (238): amino acid residues 25-140	9-14/(1)
A	WO 2008/098145 A1 (CLARK et al.) 14 August 2008 (14.08.2008), para [0031], [0190], and Fig 19, scFvIg-OVA sequence: amino acid residues: 20-125	9-14/(1)
A	US 2010/0008929 A1 (VAN DE WINKEL et al.) 14 January 2010 (14.01.2010), Abstract, para [0024], [0100], [0316], and Fig 15A-B	19-20
A	US 2004/0031072 A1 (LA ROSA et al.) 12 February 2004 (12.02.2004), para [0004], [0006], and SEQ ID NO: 175132: amino acid residues 28-33	19-20
A	EP 1,033,406 A1 (SAKAGUCHI et al.) 06 September 2000 (06.09.2000), para [0013], [0018], [0078], [0079], and SEQ ID NO: 2: amino acid residues 24-34	19-20
A	UniProt_B4NGM2, GK21222, Last modified: 23 September 2008, [online]. [Retrieved on 2012.05.21]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/B4NGM2> Protein names, and Sequence: amino acid residues 121-127	19-20
A	US 2009/0175881 A1 (PRESTA et al.) 09 July 2009 (09.07.2009), para [0009], and SEQ ID NO: 15: amino acid residues 1-9	19-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 23 May 2012 (23.05.2012)		Date of mailing of the international search report <b>21 JUN 2012</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/58385

## Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 11/58385

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

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

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.: 31-63  
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:  
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: claims 1-16, and 19-30, drawn to an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to human EGFR, wherein said antibody has at least one characteristic selected from the group consisting of: (a) to (e), as indicated in claim 1; or wherein the antibody or antigen binding fragment thereof comprises: (a) an immunoglobulin heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3; and (b) an immunoglobulin light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3. The first named invention (claims 1, 9-13, 19-20) is limited to wherein said antibody has at least one characteristic that is (a) does not inhibit epidermal growth factor (EGF)-induced EGFR phosphorylation in a MDA-MB468 cell line and human primary keratinocytes at 10 ug/ml or lower, and wherein VH sequence is at least 90% identical to SEQ ID NOs: 17, which comprises SEQ ID NOs: 1-3; and wherein VL sequence is at least 90% identical to SEQ ID NO: 21, which comprises SEQ ID NOs: 11-13. \*\*\*\*\*Continued in the 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.:  
1, 9-14/(1), 19-20, limited to characteristic (a), and wherein antibody comprising sequences of SEQ ID NOs: 1-3 and 11-13; or least 90% identical to SEQ ID NOs: 17 and 21, or SEQ ID NOs: 18 and 22.
- 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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/58385

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007/0141048 A1 (OLEKSIEWICZ et al.) 21 June 2007 (21.06.2007), para [0565], and SEQ ID NO: 264: amino acid residues 107-114	19-20
A	US 2010/0190247 A1 (LAZAR et al.) 29 July 2010 (29.07.2010), para [0028], Fig 3a; SEQ ID NO: 118; and Table 5a, L3.56	19-20
A	US 2004/0259942 A1 (SHAW et al.) 23 December 2004 (23.12.2004), para [0055], [0064], and [0091]	1, 9-14/(1)
A	US 2009/0022677 A1 (FISHER et al.) 22 January 2009 (22.01.2009), para [0006], [0007], and [0022]	1, 9-14/(1)
A	MODJTAHEDI et al. Anti-EGFR monoclonal antibodies which act as EGF, TGF alpha, HB-EGF and BTC antagonists block the binding of eplregulin to EGFR-expressing tumours. Int J Cancer. 1998, Vol. 75(2), p. 310-6. Abstract; pg 310, col 2, last para; and pg 312, Fig 1: ICR9	1, 9-14/(1), 19-20
A	JOST et al. Matrix-independent Survival of Human Keratinocytes through an EGF Receptor/MAPK-Kinase-dependent Pathway. Mol Biol Cell. 2001, vol. 12(5), p. 1519-27. Abstract; and pg 1520, col 1, last para	1, 9-14/(1), 19-20
A	US 2009/0258442 A1 (POLAKIEWICZ et al.) 15 October 2009 (15.10.2009), para [0124]	1, 9-14/(1), 19-20
A	KIM et al. E-cadherin promotes EGFR-mediated cell differentiation and MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005, Vol. 289(6), L1049-60. Abstract	1, 9-14/(1), 19-20
A	FRIESS et al. Combination Treatment with Erlotinib and Pertuzumab against Human Tumor Xenografts Is Superior to Monotherapy. Clin Cancer Res. 2005, Vol. 11(14), p. 5300-9. pg 5306, col 2, lower para	1, 9-14/(1), 19-20
A	LAMMERTS van BUEREN et al. The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008, Vol. 105(16), p. 6109-14. Abstract; and pg 6110, col 1, middle para and col 2, top para	1, 9-14/(1), 19-20
A	KAMAT et al. Enhanced EGFR inhibition and distinct epitope recognition by EGFR antagonistic mAbs C225 and 425. Cancer Biol Ther. 2008, Vol. 7(5), p. 726-33. pg 726, para 1	1, 9-14/(1), 19-20
T	US 2011/0287036 A1 (MATSUMURA et al.) 24 November 2011 (24.11.2011), para [0126], [0129], [0167], Fig 9 - '35-4 G2a'; and SEQ ID NO: 12	9-14/(1)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 11/58385

Continuation of:  
Box No III (unity of invention is lacking)

(Continuation of Group I+) Applicant is invited to elect an additional characteristic from (b) to (e) for claims 2-5, or claim 6, 7, or 8, with an additional set of SEQ ID NOs that represent a VH comprising CDRs 1-3 and a VL comprising CDRs1-3, or a set of CDRs in a single antibody represented by SEQ ID NOs with (a) defined amino acid(s) for conservative substitution(s) at defined position(s) at the respective SEQ ID NO(s), to be searched by paying additional fee for each election. The exact number of additional claims that will be searched will depend upon the election.

Group II+, claims 17-18, drawn to an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to the same human EGFR epitope of a reference antibody, or competitively inhibits binding of a reference antibody to human EGFR, as indicated in claims 17 and 18. The first named invention is limited to wherein the reference antibody comprising the VH polypeptide of SEQ ID NO: 17 and the VL polypeptide of SEQ IDNO:21. Applicant is invited to elect an additional reference antibody with selected SEQ ID NO pair to be searched by paying additional fee for each election, as each-pair of SEQ ID NOs represents an antibody that is different from all others (Specification: pg 25, pg 25, Table 3-4). [Note: The antibody will be searched is not the reference antibody, but the antibody that binds to the same epitope or competitively inhibits binding of the reference antibody to human EGFR]

Group III+, claims 64-72, drawn to an isolated polynucleotide comprising a sequence that encodes a polypeptide. The first named invention is limited to a sequence that encodes a polypeptide at least 90% identical to SEQ ID NO: 17 or the polynucleotide comprises a sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO: 29. Applicant is invited to elect an additional pair of SEQ ID NOs comprising a polynucleotide and its encoding polypeptide to be searched by paying additional fee for each election.

Group IV, claims 73-74, drawn to an antibody or antigen binding fragment thereof encoded by the plasmid DNA having A TCC deposit no. PT A-11424 or PT A-11423.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I-III do not include the inventive concept of an antibody or antigen binding fragment thereof encoded by the plasmid DNA having A TCC deposit no. PT A-11424 or PT A-11423, as required by Group IV.

Groups I-II do not include the inventive concept of an isolated polynucleotide, as required by Groups III.

Group I+ does not include the inventive concept of an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to the same human EGFR epitope of a reference antibody, as required by Group II+.

Among Group I+, each characteristic is determined by a different function and using a different type of cells, which is structurally and functionally different from other type of cells; and different antibodies represented by a different set of SEQ ID NOs are structurally and functionally different from each other (See Specification: pg 24-25, Table 1-4).

Among Group II+, each reference antibody comprising sequences having a pair of SEQ ID NOs that is different from all other antibodies (Specification: pg 25, pg 25, Table 3-4). Therefore, it is expected that different reference antibodies bind to different epitopes unless specified in the specification, so as the antibody that inhibits the binding of the reference antibody to EGFR.

Among Group III+, each polynucleotide is structurally different from others and encoding a different polypeptide.

The inventions of claims 1-5 and 7 of Groups I+ share the technical feature of a non-antagonistic antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to human EGFR, wherein said antibody has at least one characteristic selected from the group consisting of: (a) does not inhibit epidermal growth factor (EGF)-induced EGFR phosphorylation at 10 ug/ml or lower, (b) does not inhibit binding of transforming growth factor alpha (TGFa) to EGFR in a MDA-MB468 cell line at 100 nM or lower, (c) does not inhibit more than 20% of ligand-induced proliferation of cells at 100 nM or lower, (d) does not inhibit more than 20% of basal proliferation of EGFR expressing tumor cells at 100 nM or lower, and (e) does not inhibit more than 30% binding of cetuximab and 528 antibody at 100 nM or lower.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, an article entitled 'Eradication of Established Tumors by a Fully Human Monoclonal Antibody to the Epidermal Growth Factor Receptor without Concomitant Chemotherapy' by Yang et al. (hereinafter 'Yang': Cancer Res. 1999, Vol. 59(6), p. 1236-43) discloses a non-antagonistic antibody that specifically binds to human EGFR, wherein said antibody has at least one characteristic selected from the group consisting of: (b) does not inhibit binding of transforming growth factor alpha (TGFa) to EGFR in a MDA-MB468 cell line at 100 nM or lower (pg 1237, col 1, para 2 - 'Human MAb Production and Purification..... EGF-specific'; pg 1238, col 1, top para - 'that secrete human IgG2k Mabs specific to... human EGF'; pg 1238, col 1, para 1 - 'purified antibodies were evaluated for their ability to block the binding of EGF and TGF-a to human tumor cell lines ... MDAMB-468... levels of EGFR...E7.5.2 and E7.8.2 did not have any effect on EGF binding', wherein 'E7.5.2 and E7.8.2' are 'non-antagonistic antibodies' as they do 'not inhibit the binding of EGF and TGF-a to EGFR' at concentration 100nM and lower, based on the definition in the Specification; pg 1238, col 1, para 2 - 'blocking EGF/TGF-a binding'; Fig 1(a) - E7.5.2 and E7.8.2; Specification: para [0062] - 'an "antagonist" antibody is one which inhibits or reduces biological activity of the antigen it binds, such as EGFR').

\*\*\*\*\*Continued in the next extra sheet\*\*\*\*\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/58385

## Continuation of:

The previous extra sheet - Box No III (unity of invention is lacking)

(Continuation of the discussion for claims 1-5 and 7 of Groups I+) Although Yang does not specifically teaches (a) and (c), it would be obvious to one of ordinary skill in the art at the time the invention was made to expect that the non-antagonistic antibodies E7.5.2 and E7.8.2 taught by Yang would meet the limitations of (a) and (c), because Yang further teaches EGFR phosphorylation is induced by EGF binding (pg 1238, col 1, para 4 - 'the first events after EGF binding to its receptor is the induction of EGFR tyrosine kinase activity, which results in the autophosphorylation of the receptor') and EGF binding to EGFR also induce the cell proliferation (pg 1238, col 1, para 3 - 'effects on EGF-triggered cellular responses such as... cell proliferation'). Therefore, antibodies that do not inhibit EGF binding to EGFR at the concentrations of 100 nM and lower will not inhibit EGF induced responses including (a) does not inhibit epidermal growth factor (EGF)-induced EGFR phosphorylation in a MDA-MB468 cell line and human primary keratinocytes at 10 ug/ml or lower, and (c) does not inhibit more than 20% of ligand-induced proliferation of keratinocytes and MCF-10A epithelial cells at 100 nM or lower. Furthermore, the limitations 'at 100nM or lower' are directed to any antibody concentration that is 100 nM or <100 nM, which include any concentration of 0.1 nM, 0.001 nM,... or 0.000001 nM, etc. Under an extremely low antibody concentration, even an antagonistic antibody to EGFR will not have any effect on inhibiting EGFR activation. Since all characteristics of (a)-(e) are directed to 'not inhibit' or 'not inhibit more than' of a selected function associated with EGFR activation, which is equivalently directing to 'no efficacy' of an antibody. In a concentration that open to an extremely low concentration, it is anticipated that any non-antagonistic antibody that specifically binds to human EGFR can meet all characteristics (a)-(e).

Furthermore, an article entitled 'Anti-EGFR monoclonal antibodies which act as EGF, TGF alpha, HB-EGF and BTC antagonists block the binding of epiregulin to EGFR-expressing tumours' by Modjtahedi et al. (Int J Cancer. 1998, Vol. 75(2), p. 310-6) discloses a non-antagonistic antibody that specifically binds to human EGFR, wherein said antibody activates the binding of TGFa and EGF to EGFR in a MDA-MB468 cell line at 100 nM and lower (Abstract - 'using a panel of anti-EGFR receptor (EGFR) monoclonal antibodies (MAbs) ... We found that MAbs ICR9, which enhances the binding of EGF, TGFa,... to the EGFR'; pg 310, col 2, last para - 'Human ... breast ... MDA-MB468'; pg 312, Fig 1: ICR9). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The inventions of the claims 1-8 of Groups I+ further share the technical feature of using human primary keratinocytes, MCF-10A epithelial cells, NCI-H292, NCI-H322M, and A431 cell line for detecting EGFR associated function. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, Yang further discloses using A431 cell line for detecting EGFR associated function (pg 1238, col 1, para 1 - 'purified antibodies were evaluated for their ability to block the binding of EGF and TGF-a to human tumor cell lines ... A431...levels of EGF'); an article entitled 'Matrix-independent Survival of Human Keratinocytes through an EGF Receptor/MAPK-Kinase-dependent Pathway' by JOST et al. (Mol Biol Cell. 2001, vol. 12(5), p. 1519-27) discloses using human primary keratinocytes for detecting EGFR associated function (Abstract - 'We demonstrate that EGFR activation... for survival of primary ... human keratinocytes'; pg 1520, col 1, last para); US 2009/0258442 A1 to POLAKIEWICZ et al. discloses using MCF-10A epithelial cells for detecting EGFR associated function (para [0124] - 'Carcinoma-related signal transduction protein phosphorylation ... from human carcinoma cell lines and patient cell lines ... 3T3-EGFRwt, 3T3-EGFR(L858R),...MCF-10A'); an article entitled 'E-cadherin promotes EGFR-mediated cell differentiation and MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells' by KIM et al. (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005, Vol. 289(6), L1049-60) discloses using NCI-H292 cells for detecting EGFR associated function (Abstract - 'epidermal growth factor receptor (EGFR) activation causes mucin expression ... in human NCI-H292 airway epithelial cells'); and an article entitled 'Combination Treatment with Erlotinib and Pertuzumab against Human Tumor Xenografts Is Superior to Monotherapy' by FRIESS et al. (Clin Cancer Res. 2005, Vol. 11(14), p. 5300-9) discloses using human NCI-H322M cell line for detecting EGFR associated function (pg 5306, col 2, lower para - 'express similar levels of HER1/EGFR receptors ... human NSCLC xenografts ... NCI-H322M'). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The inventions of the claims 1-8 of Groups I+ further share the technical feature of (not) competing binding of cetuximab and 528 antibody. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, an article entitled 'The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility' by LAMMERTS van BUEREN et al. (hereinafter 'Lammerts'; Proc Natl Acad Sci U S A. 2008, Vol. 105(16), p. 6109-14) discloses an antibody zalutumumab that does not competing binding of cetuximab and 528 (pg 6110, col 2, top para - 'mAb 528 ... blocked cetuximab but not zalutumumab binding to EGFR - suggesting overlapping but nonidentical epitopes', indicating mAb 528 and cetuximab share the same epitope but not zalutumumab; pg 6110, col 1, middle para; Abstract - 'Zalutumumab, a therapeutic inhibitory EGFR antibody directed against domain III'). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The inventions of the claims of 19-30 of Groups I+ further share the technical features of an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to human EGFR, wherein the antibody or antigen binding fragment thereof comprises: (a) an immunoglobulin heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3; and (b) an immunoglobulin light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, US 2010/0008929 A1 to van de WINKEL et al. (hereinafter 'Winkel') discloses an antibody that specifically binds to human EGFR (Abstract - 'Isolated human monoclonal antibodies which specifically bind to human EGFR'), wherein the antibody comprises: (a) an immunoglobulin heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3; and (b) an immunoglobulin light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 (para [0100] - 'an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen ...EGFR... the term "antigen-binding portion" of an antibody include ... a monovalent fragment consisting of the VL, VH, ... domains'; para [0024] - 'an isolated human monoclonal antibody which binds to human EGFR, ... wherein the antibody comprises (i) the 6 CDR regions shown in FIG. 15 (SEQ ID NOs:5, 6, 7, 8, 9, and 10); Fig 15A-B). Furthermore, EP 1033406 A1 to SAKAGUCHI et al. discloses an anti-CD40 antibody (para [0013]), wherein the antibody comprising a region at CDR1 region of VL between amino acid residues 24-34, that is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 11 (Sequence List: pg 15, SEQ ID NO: 2). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

\*\*\*\*\*Continued in the next extra sheet\*\*\*\*\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/58385

Continuation of:

The previous extra sheet - Box No III (unity of invention is lacking)

Furthermore, the inventions of Groups II+ further share the technical feature of an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to the same human EGFR epitope of an antibody, as indicated in claims 17 and 18. Since the antibodies having sequence selected from SEQ ID NOs: 17-24 are defined by binding to epitope(s) distinct from those of cetuximab and 528 (Specification: para [0271] - 'the huML66 and muEGFR-8 antibodies do not compete with both cetuximab and 528 antibodies, suggesting the antibodies of the invention bind to epitope(s) distinct from those of cetuximab and 528 antibodies'; pg 25, Table 3 and 4), this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, Lammerts discloses an antibody zalutumumab that does not compete with binding to cetuximab and 528 (pg 6110, col 2, top para - 'mAb 528 ... blocked cetuximab but not zalutumumab binding to EGFR', indicating mAb 528 and cetuximab share the same epitope but not zalutumumab). Furthermore, Winkler also discloses antibodies that do not bind to the epitope bound by cetuximab and 528 (para [0316] - 'antibodies that are ...non competitive with 225 or 528', wherein '225' is the antibody from which cetuximab is derived from; please see Kamat et al: pg 726, col 2, para 1 - 'A chimeric version of 225 (C225;Cetuximab;Erbixux)'). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Finally, the inventions of Groups III+ further share the technical feature of an isolated polynucleotide comprising a sequence that encodes a polypeptide. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, WO 2008/098145 A1 to CLARK et al. discloses an isolated polynucleotide comprising a sequence that encodes a polypeptide (para [0190] - 'isolated cDNA from the 33D1 and the P4G2 hybridomas for use in preparing 33D1 and DCAL-2 scFvs'), comprising a sequence that encodes a polypeptide that is at least 90% identical to the sequence of SEQ ID NO: 21 (Fig 19 - 'nucleotide and predicted amino acid sequence of P4G2 scFvlg-OVA fusion', wherein the polypeptide sequence comprising a region between amino acid residues 20-125, that is 93.3% identical to the claimed SEQ ID NO: 21). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+-IV therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note re item 4: Claims 31-63 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 6
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 A	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02 A	
A 6 1 K 31/5395 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 K 31/5395	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

- (72) 発明者 セティアディ, ジュリアント  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 2, ウォルサム, クロックタワー ドライブ  
 1 3 2, ユニット 4 1 1 0
- (72) 発明者 シン, ラジーバ  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 0 1, フレーミングハム, レーンウッド アベニ  
 ュー 4 0
- (72) 発明者 パーク, ピーター ユー.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 3, サマービル, ウェブスター アベニュー  
 2 5 ナンバー 3 0 1
- (72) 発明者 ルイ, リニユン  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 9 3, ウェストン, アローヘッド ロード 1 1
- (72) 発明者 チッテンデン, トーマス  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 6, サドベリー, ウォーカー ファーム ロー  
 ド 2 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA01 GA11 HA17  
 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 CA25 CA44  
 4C084 AA19 MA02 NA05 ZB262  
 4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 AA26 BB41 BB43 CC23 EE01 EE03  
 HH01 HH03  
 4C086 AA01 AA02 CB25 MA02 MA04 NA05 ZB26  
 4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA28 FA74