

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6328928号
(P6328928)

(45) 発行日 平成30年5月23日(2018.5.23)

(24) 登録日 平成30年4月27日(2018.4.27)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01)
C 12 N 15/02	(2006.01)
A 61 K 39/395	(2006.01)
A 61 P 35/00	(2006.01)
A 61 P 43/00	(2006.01)
C 12 N	15/00
C 12 N	15/00
A 61 K	39/395
A 61 P	35/00
A 61 P	43/00

請求項の数 53 (全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-272028 (P2013-272028)	(73) 特許権者	504429002 アムジエン・フレモント・インコーポレイ テッド アメリカ合衆国、カリフォルニア・913 20-1799、サウザンド・オークス、 ワン・アムジエン・センター・ドライブ
(22) 出願日	平成25年12月27日(2013.12.27)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(62) 分割の表示	特願2010-262796 (P2010-262796) の分割 原出願日 平成16年6月25日(2004.6.25)	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(65) 公開番号	特開2014-113150 (P2014-113150A)	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(43) 公開日	平成26年6月26日(2014.6.26)		
審査請求日	平成26年1月27日(2014.1.27)		
審判番号	不服2016-5756 (P2016-5756/J1)		
審判請求日	平成28年3月31日(2016.3.31)		
(31) 優先権主張番号	60/483,145		
(32) 優先日	平成15年6月27日(2003.6.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/525,570		
(32) 優先日	平成15年11月26日(2003.11.26)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】上皮成長因子受容体の欠失型変異体を認識する抗体、およびそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドを含む単離したヒトモノクローナル抗体であつて、

前記重鎖ポリペプチドは、配列番号2および配列番号142からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%同一である可変領域を含み、

前記軽鎖ポリペプチドは、配列番号19および配列番号144からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%同一である可変領域を含み、

EEKKGNVYVVT(配列番号94)を含むペプチドに特異的に結合し、

更に、前記重鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号121、配列番号123および配列番号125の3つ全てを含み、前記軽鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号101、配列番号116および配列番号118の3つ全てを含むか、または

前記重鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号108、配列番号110および配列番号112の3つ全てを含み、前記軽鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号101、配列番号103および配列番号105の3つ全てを含む、

抗体。

【請求項 2】

前記重鎖ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも95%同一である可変領域を含み、前記軽鎖ポリペプチドが、配列番号19のアミノ酸配列に少なくとも95%同一である可変領域を含み、

10

20

更に、前記重鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号108、配列番号110および配列番号112の3つ全てを含み、前記軽鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号101、配列番号103および配列番号105の3つ全てを含む、

請求項1に記載の単離したヒトモノクローナル抗体。

【請求項3】

前記重鎖ポリペプチドが、配列番号142のアミノ酸配列に少なくとも95%同一である可変領域を含み、前記軽鎖ポリペプチドが、配列番号144のアミノ酸配列に少なくとも95%同一である可変領域を含み、

更に、前記重鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号121、配列番号123および配列番号125の3つ全てを含み、前記軽鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号101、配列番号116および配列番号118の3つ全てを含む、

請求項1に記載の単離したヒトモノクローナル抗体。

【請求項4】

重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドを含む単離したヒトモノクローナル抗体であって、

前記重鎖ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖ポリペプチドが、配列番号144のアミノ酸配列を含むか、または、前記重鎖ポリペプチドが、配列番号142のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖ポリペプチドが、配列番号19のアミノ酸配列を含み、

EEKKGNVYVT（配列番号94）を含むペプチドに特異的に結合する、

抗体。

10

【請求項5】

重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドを含み、EGFRvIIIに結合する、単離したヒトモノクローナル抗体であって、

前記重鎖ポリペプチドが、配列番号138のアミノ酸配列に少なくとも90%同一である可変領域を含み、

前記軽鎖ポリペプチドが、配列番号140のアミノ酸配列に少なくとも90%同一である可変領域を含み、

更に、前記重鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号121、配列番号123および配列番号125の3つ全てを含み、前記軽鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号101、配列番号116および配列番号118の3つ全てを含むか、または

20

前記重鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号108、配列番号110および配列番号112の3つ全てを含み、前記軽鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号101、配列番号103および配列番号105の3つ全てを含む、

抗体。

30

【請求項6】

a)配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド、および、配列番号19のアミノ酸配列に少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド；または

b)配列番号142のアミノ酸配列に少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖ポリペプチド、および、配列番号144のアミノ酸配列に少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖ポリペプチド

40

を含み、

更に、前記重鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号121、配列番号123および配列番号125の3つ全てを含み、前記軽鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号101、配列番号116および配列番号118の3つ全てを含むか、または

前記重鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号108、配列番号110および配列番号112の3つ全てを含み、前記軽鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号101、配列番号103および配列番号105の3つ全てを含む、

EGFRvIIIに結合するモノクローナル抗体。

【請求項7】

50

配列番号56に特異的に結合する、請求項1、3、5および6のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項8】

前記重鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号121、配列番号123および配列番号125の3つ全てを含み、前記軽鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号101、配列番号116および配列番号118の3つ全てを含む、請求項1、5、6および7のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項9】

前記重鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号108、配列番号110および配列番号112の3つ全てを含み、前記軽鎖ポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：配列番号101、配列番号103および配列番号105の3つ全てを含む、請求項1、5および6のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項10】

抗体に結合した標識を更に含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項11】

前記標識が、³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I、ローダミン、ランタニド、リン、FITC、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群から選択される、請求項10に記載の抗体。

【請求項12】

前記標識が、放射標識、蛍光標識、酵素標識、化学発光標識およびビオチニル基からなる群から選択される、請求項10に記載の抗体。

【請求項13】

(a)請求項1から9のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体および標識；または

(b)請求項10から12のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体

を含むキット。

【請求項14】

前記標識が抗体に共有結合的に結合している、請求項13に記載のキット。

【請求項15】

(a)を含み、前記標識が、放射標識、蛍光標識、酵素標識、化学発光標識およびビオチニル基からなる群から選択される、請求項13に記載のキット。

【請求項16】

(a)を含み、前記標識が、³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I、ローダミン、ランタニド、リン、FITC、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群から選択される、請求項13に記載のキット。

【請求項17】

前記抗体が、EGFRへの結合を超えてEGFRvIIIへの結合に関して選択的である、請求項13に記載のキット。

【請求項18】

前記モノクローナル抗体に結合する二次抗体を更に含み、前記二次抗体が標識に結合している、請求項13に記載のキット。

【請求項19】

前記二次抗体が、抗-免疫グロブリンである、請求項18に記載のキット。

【請求項20】

前記標識が、モノクローナル抗体に結合している、請求項13に記載のキット。

【請求項21】

前記抗体が請求項7に記載の抗体であり、ヒト抗体ではない、請求項13に記載のキット。

【請求項22】

10

20

30

40

50

前記抗体がマウスの定常領域を含む、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 3】

前記抗体がラットの定常領域を含む、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 4】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体を產生するハイブリドーマ細胞。

【請求項 2 5】

チャイニーズハムスター卵巣細胞である、請求項 2 4 に記載の細胞。

【請求項 2 6】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体をコードする遺伝子を含む形質転換細胞。

【請求項 2 7】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の少なくとも1つの抗体；および存在する場合に、前記抗体のEGFRvIIIとの結合を示すための手段を含む、哺乳類組織または細胞中のEGFRvIIIの検出のためのアッセイキット。

【請求項 2 8】

前記抗体が標識されている、請求項 2 7 に記載のアッセイキット。

【請求項 2 9】

前記抗体が、非標識の第一の抗体であり、前記結合を示すための手段が、抗-免疫グロブリンである標識された第二の抗体を含む、請求項 2 7 に記載のアッセイキット。

【請求項 3 0】

前記抗体が、蛍光色素、酵素、放射性核種および放射線不透過性物質からなる群から選択されるマーカーで標識されている、請求項 2 7 に記載のアッセイキット。

【請求項 3 1】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体を接触させる工程；および前記抗体に結合した標識の存在または非存在を検出する工程を含む、EGFRvIIIを発現する細胞を検出する方法。

【請求項 3 2】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体を発現する細胞を提供する工程を含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体を調製する方法。

【請求項 3 3】

前記抗体の提供が、前記抗体を產生するハイブリドーマ細胞を提供することによって実施される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記ハイブリドーマ細胞が、前記抗体をコードする核酸配列を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

配列番号19中の軽鎖CDR1である軽鎖CDR1；
配列番号19中の軽鎖CDR2である軽鎖CDR2；および
配列番号19中の軽鎖CDR3である軽鎖CDR3；
を含む軽鎖可変領域：ならびに
配列番号2中の重鎖CDR1である重鎖CDR1；
配列番号2中の重鎖CDR2である重鎖CDR2；および
配列番号2中の重鎖CDR3である重鎖CDR3
を含む重鎖可変領域

を含み、抗原結合性断片、单鎖抗体または二重特異的抗体である、EGFRvIIIに対する結合特異性を有する抗体。

【請求項 3 6】

Fc鎖活性受容体に結合する、請求項 3 5 に記載の抗体。

【請求項 3 7】

CD3に結合する、請求項 3 6 に記載の抗体。

【請求項 3 8】

10

20

30

40

50

EGFRvIIIに結合する人工抗体であって、
 配列番号19中の軽鎖CDR1である軽鎖CDR1；
 配列番号19中の軽鎖CDR2である軽鎖CDR2；
 配列番号19中の軽鎖CDR3である軽鎖CDR3；
 配列番号2中の重鎖CDR1である重鎖CDR1；
 配列番号2中の重鎖CDR2である重鎖CDR2；および
 配列番号2中の重鎖CDR3である重鎖CDR3
 を含み、

二重特異的である、
 抗体。

10

【請求項39】

単鎖を含む、請求項38に記載の人工抗体。

【請求項40】

前記単鎖が、EGFRvIIIおよび他の分子に特異的である、請求項39に記載の人工抗体。

【請求項41】

前記他の分子が、CD3を含む、請求項40に記載の人工抗体。

【請求項42】

配列番号19中の軽鎖CDR1である軽鎖CDR1；
 配列番号19中の軽鎖CDR2である軽鎖CDR2；および
 配列番号19中の軽鎖CDR3である軽鎖CDR3；
 を含む、第一の軽鎖可変領域；
 配列番号2中の重鎖CDR1である重鎖CDR1；
 配列番号2中の重鎖CDR2である重鎖CDR2；および
 配列番号2中の重鎖CDR3である重鎖CDR3；
 を含む第一の重鎖可変領域；
 CD3に結合する第二の軽鎖可変領域；ならびに
 CD3に結合する第二の重鎖可変領域
 を含む、EGFRvIIIおよびCD3に結合する二重特異的抗体断片。

20

【請求項43】

単鎖コンストラクトを含む、請求項42に記載の二重特異的抗体断片。

30

【請求項44】

配列番号19中の軽鎖CDR1である軽鎖CDR1；
 配列番号19中の軽鎖CDR2である軽鎖CDR2；
 配列番号19中の軽鎖CDR3である軽鎖CDR3；
 配列番号2中の重鎖CDR1である重鎖CDR1；
 配列番号2中の重鎖CDR2である重鎖CDR2；および
 配列番号2中の重鎖CDR3である重鎖CDR3
 を含む、EGFRvIIIおよびCD3に結合する二重特異的抗体断片。

【請求項45】

EGFRvIIIに対する特異性を付与する第一の重鎖および軽鎖の対；および
 CD3に対する特異性を付与する第二の重鎖および軽鎖の対
 を含む、BiTE (Bi-specific T-cell engager) であって、
 前記第一の重鎖および軽鎖の対が、
 配列番号19中の軽鎖CDR1である軽鎖CDR1；
 配列番号19中の軽鎖CDR2である軽鎖CDR2；
 配列番号19中の軽鎖CDR3である軽鎖CDR3；
 配列番号2中の重鎖CDR1である重鎖CDR1；
 配列番号2中の重鎖CDR2である重鎖CDR2；および
 配列番号2中の重鎖CDR3である重鎖CDR3
 を含む、

40

50

BiTE。

【請求項 4 6】

配列番号19中の軽鎖CDR1である軽鎖CDR1；
配列番号19中の軽鎖CDR2である軽鎖CDR2；
配列番号19中の軽鎖CDR3である軽鎖CDR3；
配列番号2中の重鎖CDR1である重鎖CDR1；
配列番号2中の重鎖CDR2である重鎖CDR2；および
配列番号2中の重鎖CDR3である重鎖CDR3
を含む、EGFRvIIIに対する特異性を有するBiTE (Bi-specific T-cell engager)。

【請求項 4 7】

効果的な量のBiTE (Bi-specific T-cell engager) を含む、配列番号56のアミノ酸配列
を含むEGFRvIIIの発現と関連する細胞増殖を阻害するための組成物であって、

前記BiTEが、

配列番号19中の軽鎖CDR1である軽鎖CDR1；
配列番号19中の軽鎖CDR2である軽鎖CDR2；
配列番号19中の軽鎖CDR3である軽鎖CDR3；
配列番号2中の重鎖CDR1である重鎖CDR1；
配列番号2中の重鎖CDR2である重鎖CDR2；および
配列番号2中の重鎖CDR3である重鎖CDR3
を含み、

前記BiTEが、EGFRvIIIのLEEKKGNYVTDHC (配列番号56) に結合する、組成物。

【請求項 4 8】

in vivoで使用されるものである、請求項 4 7 に記載の組成物。

【請求項 4 9】

哺乳動物に使用されるものである、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 0】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 4 9 に記載の組成物。

【請求項 5 1】

前記哺乳動物が、上皮細胞増殖を伴う癌に罹患している、請求項 5 0 に記載の組成物。

【請求項 5 2】

前記癌が、肺癌、大腸癌、胃癌、腎臓癌、前立腺癌、乳癌、膠芽細胞腫または卵巣癌を
含む、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

前記癌が、膠芽細胞腫である、請求項 5 2 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2004年4月15日に出願された米国仮出願第60/562,453号、2003年11月26日に
出願された米国仮出願第60/525570号、および2003年6月27日に出願された米国仮出願第60
/483,145号に対する優先権を主張する。

【0 0 0 2】

本発明の実施形態は新規な抗体、特に上皮成長因子受容体の欠失型変異体、および特に
タイプIIIの欠失型変異体、EGFRvIIIを認識する抗体に関する。本発明の実施形態は、上
皮成長因子受容体の欠失型変異体、および特にEGFRvIII認識するヒトモノクローナル抗体
にも関する。本発明の実施形態は、このような抗体の変異体にも関する。このような抗体
、およびそれらの免疫複合体の診断用および治療用配合物も提供する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

ヒトおよび動物の癌のより良い診断および治療を助長するための腫瘍特異的分子は、前
世紀から探し求められてきている。ウイルス誘導型の癌およびウイルスゲノムによって特

10

20

30

40

50

定される関連分子構造に基づくデータ以外は、大部分のタイプのヒトの癌において、分子構造データに基づく腫瘍特異的物質の確かな証拠を与えるのは困難となっている。新規な分子構造に基づく腫瘍特異的分子の例は非常に少数しか存在していない。悪性のヒトグリオーム、および上皮成長因子受容体分子の増幅または変化と潜在的に関係がある他の腫瘍、例えば胸部の癌腫および他のヒト癌腫などの場合、独特の配列を有する構造上改変された分子の明確な実例は存在していない。

【0004】

上皮成長因子受容体(EGFR)は、原癌遺伝子c-erbBの170キロダルトンの膜糖タンパク質産物である。EGFR遺伝子の配列は知られている(Ullrichら、(1984).Human Epidermal Growth Factor Receptor cDNA Sequence and Aberrant Expression of the Amplified Gene in A431 Epidermoid Carcinoma Cells.Nature 309:418~425)。EGFR遺伝子は、トリ赤芽球症ウイルスにおいて本来同定されたerbB癌遺伝子の相同体である(Downwardら、(1984).Close Similarity of Epidermal Growth Factor Receptor and v-erbB Oncogene Protein Sequence.Nature 307:521~527、Ullrichら、(1984))。遺伝子増幅によるこの癌遺伝子の活性化は、様々なヒト腫瘍(Haleyら、(1987A).The Epidermal Growth Factor Receptor Gene in:Oncogenes、Genes、and Growth Factors Edited by:Guroff、G.12th Edition.Chapter2.pp.40~76.Wiley、ニューヨーク)、および特にグリア起源の腫瘍において観察されてきている(Libermannら、(1985).Amplification、Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin.Nature 313:144~147;Wongら、(1987).Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Malignant Gliomas is Invariably Associated with Gene Amplification.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:6899~6903;Yamazakiら、(1988).Amplification of the Structurally and Functionally Altered Epidermal Growth Factor Receptor Gene(c-erbB) in Human Brain Tumors.Molecular and Cellular Biology 8:1816~1820;Maldenら、(1988).Selective Amplification of the Cytoplasmic Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Glioblastoma Multiforme.Cancer Research 4:2711~2714)。

【0005】

EGF-rは、多くの型のヒト固形腫瘍において過剰発現されることが実証されてきている。Mendelsohn Cancer Cells 7:359(1989)、Mendelsohn Cancer Biology 1:339~344(1990)、Modjtahedi and Dean Int'l J.Oncology 4:277~296(1994)。例えばEGFRの過剰発現は、いくつかの肺、胸部、結腸、胃、脳、膀胱、頭部および首、卵巣、腎臓および前立腺癌腫において観察されてきている.Modjtahedi and Dean Int'l J.Oncology 4:277~296(1994)。上皮成長因子(EGF)と形質転換成長因子-₁(TGF-₁)の両方がEGF-rと結合して、細胞増殖および腫瘍増殖をもたらすことが実証されている。

【0006】

v-erbB癌遺伝子と正常なEGFR遺伝子の間の1つの重要な違いは、ウイルスの癌遺伝子は正常な受容体のアミノ末端切断型であり、それらは大部分の細胞質外ドメインを欠いているが、膜貫通およびチロシンキナーゼドメインは保持していることである(Fungら、(1984).Activation of the Cellular Oncogene c-erbB by LTR Insertion:Molecular Basis for Induction of Erythroblastosis by Avian Leukosis Virus.Cell 33:357~368;Yamamotoら、(1983).A New Avian Erythroblastosis Virus、AEV-H Carries erbB Gene Responsible for the Induction of Both Erythroblastosis and Sarcoma.Cell 34:225~232、Nilssenら、(1985).c-erbB Activation in ALV-Induced Erythroblastosis:Novel RNA Processing and Promoter Insertion Results in Expression of an Amino-Truncated EGF Receptor.Cell 41:719~726;Gammettら、(1986).Differences in Sequences Encoding the Carboxy-Terminal Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Correlate with Differences in the Disease Potential of Viral erbB Genes.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:6053~6057)。これによって、上皮成長因子(EGF)とは結合することができないが、依然として他の物質をリン酸化することができるタンパク質が生成し(Gilmoreら、(1985).Prote

10

20

30

40

50

in Phosphorylation at Tyrosine is Induced by the v-erbB Gene Product in Vivo and In Vitro. *Cell* 40:609~618; Krisら、(1985). Antibodies Against a Synthetic Peptide as a Probe for the Kinase Activity of the Avian EGF Receptor and v-erbB Protein. *Cell* 40:619~625)、キナーゼドメインは制御されておらず構成的に活性を有するので、v-erbBタンパク質は発癌性であるという推測がもたらされている(Downwardら、1984)。

【 0 0 0 7 】

様々な遺伝的改変、例えば遺伝子のカルボキシ末端のアミノ酸置換および欠失がウイルスのerbB癌遺伝子において生じる可能性がある。しかしながら入手可能な証拠は、アミノ末端切断が発癌現象には重要であると論じている。アミノ末端切断は、プロモーター挿入またはレトロウイルス形質導入によって生じるものも含めて、あらゆるv-erbB癌遺伝子の特徴である(Nilsenら、(1985). c-erbB Activation in ALV-Induced Erythroblastosis: Novel RNA Processing and Promoter Insertion Results in Expression of an Amino-Truncated EGF Receptor. *Cell* 41:719~726; Gammettら、(1986). Differences in Sequences Encoding the Carboxy-Terminal Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Correlate with Differences in the Disease Potential of Viral erbB Genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:6053~6057)。

【 0 0 0 8 】

対照的に、カルボキシ末端欠失はレトロウイルス形質導入によって生じる腫瘍のみと関係があるらしく、宿主範囲および腫瘍型特異性を決定するようである(Gammettら、1986; Rainesら、(1985). c-erbB Activation in Avian Leukosis Virus-Induced Erythroblastosis: Clustered Integration Sites and the Arrangement of Provirus in the c-erbB Alleles. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82:2287~2291)。アミノ末端切断トリc-erbB遺伝子またはウイルス癌遺伝子-ヒトEGF受容体キメラを用いたトランスフェクション実験は、この欠失は単独で形質転換タンパク質を作製するのに十分であることを実証する(Pelleyら、(1988). Proviral-Activated c-erbB is Leukemogenic but not Sarcomagenic: Characterization of a Replication-Competent Retrovirus Containing the Activated c-erbB. *Journal of Virology* 62:1840~1844; Wellsら、(1988). Genetic Determinants of Neoplastic Transformation by the Retroviral Oncogene v-erbB. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:7597~7601)。

【 0 0 0 9 】

EGFR遺伝子の増幅は悪性のヒトグリオームの40%で起こり(Libermannら、(1985). Amplification, Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin. *Nature* 313:144~147; Wongら、(1987). Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Malignant Gliomas is Invariably Associated with Gene Amplification. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:6899~6903)、受容体遺伝子の再編成は、遺伝子増幅を有する腫瘍の多くで明らかである。構造的改変は、遺伝子のアミノ末端半分に優先的に影響を与えるようであるが(Yamazakiら、(1985). Amplification, Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin. *Nature* 313:144~147; Maldenら、(1988). Selective Amplification of the Cytoplasmic Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Research* 48:2711~2714)、再編成の性質は、いかなる腫瘍においても当時は正確には特徴付けられていなかった。

【 0 0 1 0 】

サイズが異なるEGFR遺伝子および増幅は、いくつかのヒトの癌において報告されてきている(Humphreyら、(1988). Amplification and Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Human Glioma Xenografts. *Cancer Research* 48:2231~2238; Bignerら、(1988). J. *Neuropathol. Exp. Neurol.* 47:191~205; Wongら、(1987). Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Malignant Gliomas is Invar

10

20

30

40

50

iably Associated with Gene Amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6899 ~ 6903; および Humphrey ら、 Amplification and expression of the epidermal growth factor receptor gene in human glioma xenografts. Cancer Res. 48(8):2231 ~ 8(1988)。しかしながら、細胞中の改変型EGFR分子に関する分子基盤の決定因子は未だ求まっていない。

【0011】

1989年、Drs. Bigner および Vogelstein の作業によって、タイプIII変異体として知られるようになったEGF受容体変異体(デルタ-EGFr または EGFr_{vIII}とも呼ばれる)の配列が解明された。この作業は、米国特許第6,455,498号、米国特許第6,127,126号、米国特許第5,981,725号、米国特許第5,814,317号、米国特許第5,710,010号、米国特許第5,401,828号、および米国特許第5,212,290号中に記載されている。

10

【0012】

EGFR変異体は、EGFR遺伝子増幅を伴う遺伝子再編成によって生じる。知られているEGFrの8つの主な変異体が存在する:(i)EGFr_IはEGFRの大部分の細胞外ドメインを欠いており、(ii)EGFr_{II}はEGFRの細胞外ドメインの83aaのインフレーム欠失からなり、(iii)EGFr_{III}はEGFRの細胞外ドメインの267aaのインフレーム欠失からなり、(iv)EGFr_{IV}はEGFRの細胞質ドメインの欠失を含み、(v)EGFr_VはEGFRの細胞質ドメインの欠失を含み、(vi)EGFR.TDM/2~7はEGFRの細胞外ドメインのエクソン2~7の重複を含み、(vii)EGFR.TDM/18~25はEGFRのチロシンキナーゼドメインのエクソン18~26の重複を含み、かつ(viii)EGFR.TDM/18~26は、EGFRのチロシンキナーゼドメインのエクソン18~26の重複を含む(Kuanら、EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy. Endocr Relat Cancer 8(2):83 ~ 96(2001))。さらに、エクソン11と14の接合部に新規なヒスチジン残基を導入した第2の欠失を有する、第2のさらに珍しいEGFr_{III}変異体(EGFr_{III}/ 12~13)が存在する(Kuanら、EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy. Endocr Relat Cancer 8(2):83 ~ 96(2001))。

20

【0013】

EGFr_{III}は、ヒトの癌中の上皮成長因子(EGF)受容体の最も一般的に存在する変異体である(Kuanら、EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy. Endocr Relat Cancer 8(2):83 ~ 96(2001))。遺伝子増幅の過程中、267アミノ酸欠失が細胞外ドメイン中で起こり、腫瘍特異的モノクローナル抗体が認識することができる新規な接合部を作製する。EGF受容体のこの変異体は、リガンドと無関係な形式で、構成的シグナルによって腫瘍の進行をもたらす。EGFr_{III}が任意の正常な組織において発現することは知られていない(Wikstrand、CJ. ら、Monoclonal antibodies against EGFr_{III} are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas. Cancer Research 55(14):3140 ~ 3148(1995); Olapade-Olaopa、EO. ら、Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br J Cancer. 82(1):186 ~ 94(2000))。しかしながらEGFr_{III}は、腫瘍細胞中で顕著な発現を示す、例えば27~76%の乳癌バイオプシーがEGFr_{III}を発現し(Wikstrand、CJ. ら、Monoclonal antibodies against EGFr_{III} are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas. Cancer Research 55(14):3140 ~ 3148(1995); Ge H. ら、Evidence of high incidence of EGFr_{III} expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis. Int J Cancer. 98(3):357 ~ 61(2002))、50~70%のグリオームがEGFr_{III}を発現し(Wikstrand、CJ. ら、Monoclonal antibodies against EGFr_{III} are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas. Cancer Research 55(14):3140 ~ 3148(1995); Moscatello、G. ら、Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. Cancer Res. 55(23):5536 ~ 9(1995))、16%のNSCL癌がEGFr_{III}を発現し(Garcia de Palazzo、IE ら、Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. Cancer Res. 53(14):3217 ~ 20(1993))、75%の卵巣癌がEGFr_{III}を発現し(Moscatello、G. ら、Frequent expression of a mutant epidermal growth

30

40

50

h factor receptor in multiple human tumors.Cancer Res.55(23):5536~9(1995)、および68%の前立腺癌がEGFRvIIIを発現する(Olapade-Olaopa、E0.ら、Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer.Br J Cancer.82(1):186~94(2000))。

【0014】

グリシン置換を有する267アミノ酸の欠失によって、抗体が標的とすることができます。独特な接合部が生成する。さらにいくつかの腫瘍におけるEGFRvIIIの発現、および正常組織中で発現しないことを鑑みると、EGFRvIIIは腫瘍治療における薬剤標的の理想的な標的である可能性がある。特にEGFRvIIIは、腫瘍の免疫複合体療法(例えば、抗腫瘍薬または毒素と結合した抗体)の理想的な候補であると思われる。EGFRvIIIを過剰発現させる他の癌の治療法は、変異体受容体を特異的に標的化する腫瘍特異的リボザイムであって、正常なEGFRを切断しないリボザイムの使用を含んでいた。このリボザイムは、無胸腺ヌードマウスにおいて乳癌の増殖を有意に阻害することが分かった(Luoら、Int.J.Cancer.104(6):716~21(2003))。

完全なEGFRvIIIタンパク質用の一般的抗体は記載されている。国際特許出願No.WO01/62931、およびKuanら、EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy.Endocr Relat Cancer.8(2):83~96(2001)、Kuanら、EGFRvIII as a promising target for antibody-based brain tumor therapy.Brain Tumor Pathol.17(2):71~78(2000)、Kuanら、Increased binding affinity enhances targeting of glioma xenografts by EGFRvIII-specific scFv.International Journal of Cancer.88(6):962~969(2000)、Landryら、Antibody recognition of a conformational epitope in a peptide antigen;Fv-peptide complex of an antibody fragment specific for the mutant EGF receptor、EGFRvIII.Journal of Molecular Biology.308(5):883~893(2001)、Reistら、Astatine-211 labeling of internalizing anti-EGFRvIII monoclonal antibody using N-succinimidyl 5-[211At]astato-3-pyridinecarboxylate.Nuclear Medicine and Biology.26(4):405~411(1999)、Reistら、In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody:comparison with its murine parent.Nuclear Medicine and Biology.24(7):639~647(1997)、Wikstrandら、Generation of anti-idiotypic reagents in the EGFRvIII tumor-associated antigen system.Cancer Immunology, Immunotherapy.50(12):639~652(2002)、Wikstrandら、Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas.Cancer Research.55(14):3140~3148(1995)、Wikstrandら、The class III variant of the epidermal growth factor receptor(EGFRvIII):characterization and utilization as an immunotherapeutic target.J.Neurovirol.4(2):148~158(1998)、Jungbluthら、A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor.Proc Natl Acad Sci U S A.100(2):639~44(2003)、Mamotら、Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR)-targeted Immunoliposomes Mediate Specific and Efficient Drug Delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing Tumor Cells.Cancer Research 63:3154~3161(2003))を参照のこと。しかしながら、これら前述の抗体のそれぞれは、可変および/または定常領域のいずれか中にマウスの配列を有するか、あるいはこれらを含む。このようなマウス由来のタンパク質の存在はこれらの抗体の迅速な除去をもたらす可能性があるか、あるいは患者中で抗体に対する免疫応答の発生をもたらす可能性がある。さらに、このような抗体は比較的低い親和性、親和性成熟後でも約 2.2×10^{-8} ~ 1.5×10^{-9} である(Kuanら、EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy.Endocr Relat Cancer.8(2):83~96(2001))。

マウスまたはラット由来の抗体の使用を避けるために、研究者達はヒト抗体の機能をげっ歯類に導入して、げっ歯類が完全ヒト抗体を生成することができるようしている。例えば、Mendezら、Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice.Nat Genet.15(2):146~56(1997)を参照のこと。野生型EGFRを認識する優れた抗体の生成に関して、この手法が使用されている。例

10

20

30

40

50

えば、Yang X-Dら、Development of ABX-EGF、a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody、for cancer therapy.Crit Rev Oncol Hematol 38(1):17~23(2001);Yang X-Dら、Eradication of Established Tumors by a Fully Human Monoclonal Antibody to the Epidermal Growth Factor Receptor without Concomitant Chemotherapy.Cancer Research 59(6):1236~1243(1999);および米国特許第6,235,883号を参照のこと。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】米国仮出願第60/562,453号

【特許文献2】米国仮出願第60/525570号

【特許文献3】米国仮出願第60/483,145号

【特許文献4】米国特許第6,455,498号

【特許文献5】米国特許第6,127,126号

【特許文献6】米国特許第5,981,725号

【特許文献7】米国特許第5,814,317号

【特許文献8】米国特許第5,710,010号

【特許文献9】米国特許第5,401,828号

【特許文献10】米国特許第5,212,290号

【特許文献11】国際特許出願No.WO01/62931

【特許文献12】米国特許第6,235,883号

【特許文献13】米国特許第5,627,052号

【特許文献14】米国特許第5,151,510号

【特許文献15】国際特許出願No.WO03/48731

【特許文献16】米国特許第5,958,708号

【特許文献17】米国特許第5,372,783号

【特許文献18】米国特許出願第08/759,620号

【特許文献19】米国特許出願第07/466,008号

【特許文献20】米国特許出願第07/610,515号

【特許文献21】米国特許出願第07/919,297号

【特許文献22】米国特許出願第07/922,649号

【特許文献23】米国特許出願第08/031,801号

【特許文献24】米国特許出願第08/112,848号

【特許文献25】米国特許出願第08/234,145号

【特許文献26】米国特許出願第08/376,279号

【特許文献27】米国特許出願第08/430,938号

【特許文献28】米国特許出願第08/464,584号

【特許文献29】米国特許出願第08/464,582号

【特許文献30】米国特許出願第08/463,191号

【特許文献31】米国特許出願第08/462,837号

【特許文献32】米国特許出願第08/486,853号

【特許文献33】米国特許出願第08/486,857号

【特許文献34】米国特許出願第08/486,859号

【特許文献35】米国特許出願第08/462,513号

【特許文献36】米国特許出願第08/724,752号

【特許文献37】米国特許第6,162,963号

【特許文献38】米国特許第6,150,584号

【特許文献39】米国特許第6,114,598号

【特許文献40】米国特許第6,075,181号

【特許文献41】米国特許第5,939,598号

【特許文献42】日本国特許3068180B2

10

20

30

40

50

【特許文献 4 3】日本国特許3068506B2	
【特許文献 4 4】日本国特許3068507B2	
【特許文献 4 5】欧州特許No.、EP0463151B1	
【特許文献 4 6】国際特許出願No.、W094/02602	
【特許文献 4 7】国際特許出願No.、W096/34096	
【特許文献 4 8】W098/24893	
【特許文献 4 9】W000/76310	
【特許文献 5 0】W003/47336	
【特許文献 5 1】米国特許第5,545,807号	10
【特許文献 5 2】米国特許第5,545,806号	
【特許文献 5 3】米国特許第5,625,825号	
【特許文献 5 4】米国特許第5,625,126号	
【特許文献 5 5】米国特許第5,633,425号	
【特許文献 5 6】米国特許第5,661,016号	
【特許文献 5 7】米国特許第5,770,429号	
【特許文献 5 8】米国特許第5,789,650号	
【特許文献 5 9】米国特許第5,814,318号	
【特許文献 6 0】米国特許第5,877,397号	
【特許文献 6 1】米国特許第5,874,299号	
【特許文献 6 2】米国特許第6,255,458号	20
【特許文献 6 3】米国特許第5,591,669号	
【特許文献 6 4】米国特許第6,023,010号	
【特許文献 6 5】米国特許第5,612,205号	
【特許文献 6 6】米国特許第5,721,367号	
【特許文献 6 7】米国特許第5,789,215号	
【特許文献 6 8】米国特許第5,643,763号	
【特許文献 6 9】GenPharm国際米国特許出願第07/574,748号	
【特許文献 7 0】米国特許出願第07/575,962号	
【特許文献 7 1】米国特許出願第07/810,279号	
【特許文献 7 2】米国特許出願第07/853,408号	30
【特許文献 7 3】米国特許出願第07/904,068号	
【特許文献 7 4】米国特許出願第07/990,860号	
【特許文献 7 5】米国特許出願第08/053,131号	
【特許文献 7 6】米国特許出願第08/096,762号	
【特許文献 7 7】米国特許出願第08/155,301号	
【特許文献 7 8】米国特許出願第08/161,739号	
【特許文献 7 9】米国特許出願第08/165,699号	
【特許文献 8 0】米国特許出願第08/209,741号	
【特許文献 8 1】欧州特許No.0546073B1	
【特許文献 8 2】国際特許出願Nos.W092/03918	40
【特許文献 8 3】W092/22645	
【特許文献 8 4】W092/22647	
【特許文献 8 5】W092/22670	
【特許文献 8 6】W093/12227	
【特許文献 8 7】W094/00569	
【特許文献 8 8】W094/25585	
【特許文献 8 9】W096/14436	
【特許文献 9 0】W097/13852	
【特許文献 9 1】W098/24884	
【特許文献 9 2】米国特許第5,981,175号	50

【特許文献 9 3】	欧洲特許出願Nos.773288	
【特許文献 9 4】	欧洲特許出願Nos.843961	
【特許文献 9 5】	米国特許第5,476,996号	
【特許文献 9 6】	米国特許第5,698,767号	
【特許文献 9 7】	米国特許第5,958,765号	
【特許文献 9 8】	米国特許第4,816,397号	
【特許文献 9 9】	米国特許第5,916,771号	
【特許文献 1 0 0】	米国特許第6,207,418号	
【特許文献 1 0 1】	米国特許第5,194,594号	10
【特許文献 1 0 2】	米国特許第4,681,581号	
【特許文献 1 0 3】	米国特許第4,735,210号	
【特許文献 1 0 4】	米国特許第5,101,827号	
【特許文献 1 0 5】	米国特許第5,102,990号 (RE35,500)	
【特許文献 1 0 6】	米国特許第5,648,471号	
【特許文献 1 0 7】	米国特許第5,697,902号	
【特許文献 1 0 8】	米国特許第3,896,111号	
【特許文献 1 0 9】	米国特許第4,151,042号	
【特許文献 1 1 0】	米国特許第4,248,870号	
【特許文献 1 1 1】	米国特許第4,265,814号	
【特許文献 1 1 2】	米国特許第4,308,268号	20
【特許文献 1 1 3】	米国特許第4,308,269号	
【特許文献 1 1 4】	米国特許第4,309,428号	
【特許文献 1 1 5】	米国特許第4,317,821号	
【特許文献 1 1 6】	米国特許第4,322,348号	
【特許文献 1 1 7】	米国特許第4,331,598号	
【特許文献 1 1 8】	米国特許第4,137,230号	
【特許文献 1 1 9】	米国特許第4,260,608号	
【特許文献 1 2 0】	米国特許第5,208,020号	
【特許文献 1 2 1】	米国特許第6,441,163号	
【特許文献 1 2 2】	米国特許第4,816,444号	30
【特許文献 1 2 3】	米国特許第4,978,744号	
【特許文献 1 2 4】	米国特許第4,414,205号	
【特許文献 1 2 5】	米国特許第5,076,973号	
【特許文献 1 2 6】	米国特許第4,486,414号	
【特許文献 1 2 7】	米国特許第4,986,988号	
【特許文献 1 2 8】	米国特許第5,138,036号	
【特許文献 1 2 9】	米国特許第4,879,278号	
【特許文献 1 3 0】	米国特許第3,773,919号	
【特許文献 1 3 1】	EP58,481	
【特許文献 1 3 2】	EP52,322	40
【特許文献 1 3 3】	EP36,676	
【特許文献 1 3 4】	EP88,046	
【特許文献 1 3 5】	EP143,949	
【特許文献 1 3 6】	EP142,641	
【特許文献 1 3 7】	日本国特許出願83-118008	
【特許文献 1 3 8】	米国特許4,485,045号	
【特許文献 1 3 9】	米国特許4,544,545号	
【特許文献 1 4 0】	EP102,324	
【特許文献 1 4 1】	W099/53049	
【特許文献 1 4 2】	米国特許第4,399,216号	50

- 【特許文献 1 4 3】米国特許第4,912,040号
 【特許文献 1 4 4】米国特許第4,740,461号
 【特許文献 1 4 5】米国特許第4,959,455号
 【特許文献 1 4 6】国際出願特許No.WO99/45031
 【特許文献 1 4 7】米国特許第6235883号
 【特許文献 1 4 8】国際出願特許No.WO03/48730
 【特許文献 1 4 9】EP133,988
 【特許文献 1 5 0】米国特許No.DE3,218,121
 【非特許文献】
 【0 0 1 6】 10
- 【非特許文献 1】Ulrichら、(1984).Human Epidermal Growth Factor Receptor cDNA Sequence and Aberrant Expression of the Amplified Gene in A431 Epidermoid Carcinoma Cells.Nature 309:418 ~ 425
- 【非特許文献 2】Downwardら、(1984).Close Similarity of Epidermal Growth Factor Receptor and v-erbB Oncogene Protein Sequence.Nature 307:521 ~ 527
- 【非特許文献 3】Haleyら、(1987A).The Epidermal Growth Factor Receptor Gene in:Onogenes, Genes, and Growth Factors Edited by:Guroff, G.12th Edition.Chapter2.pp. 40 ~ 76.Wiley、ニューヨーク
- 【非特許文献 4】Libermannら、(1985).Amplification, Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin.Nature 313:144 ~ 147 20
- 【非特許文献 5】Wongら、(1987).Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Malignant Gliomas is Invariably Associated with Gene Amplification.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:6899 ~ 6903
- 【非特許文献 6】Yamazakiら、(1988).Amplification of the Structurally and Functionally Altered Epidermal Growth Factor Receptor Gene(c-erbB) in Human Brain Tumors.Molecular and Cellular Biology 8:1816 ~ 1820
- 【非特許文献 7】Maldenら、(1988).Selective Amplification of the Cytoplasmic Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Glioblastoma Multiforme.Cancer Research 4:2711 ~ 2714 30
- 【非特許文献 8】Mendelsohn Cancer Cells 7:359(1989)
- 【非特許文献 9】Mendelsohn Cancer Biology 1:339 ~ 344(1990)
- 【非特許文献 1 0】Modjtahedi and Dean Int'l J.Oncology 4:277 ~ 296(1994)
- 【非特許文献 1 1】Fungら、(1984).Activation of the Cellular Oncogene c-erbB byLTR Insertion:Molecular Basis for Induction of Erythroblastosis by Avian Leukosis Virus.Cell 33:357 ~ 368
- 【非特許文献 1 2】Yamamotoら、(1983).A New Avian Erythroblastosis Virus, AEV-H Carries erbB Gene Responsible for the Induction of Both Erythroblastosis and Sarcoma.Cell 34:225 ~ 232
- 【非特許文献 1 3】Nilsenら、(1985).c-erbB Activation in ALV-Induced Erythroblastosis:Novel RNA Processing and Promoter Insertion Results in Expression of an Amino-Truncated EGF Receptor.Cell 41:719 ~ 726 40
- 【非特許文献 1 4】Gammieら、(1986).Differences in Sequences Encoding the Carboxy-Terminal Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Correlate with Differences in the Disease Potential of Viral erbB Genes.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:6053 ~ 6057
- 【非特許文献 1 5】Gilmoreら、(1985).Protein Phosphorylation at Tyrosine is Induced by the v-erbB Gene Product in Vivo and In Vitro.Cell 40:609 ~ 618
- 【非特許文献 1 6】Krisら、(1985).Antibodies Against a Synthetic Peptide as a Probe for the Kinase Activity of the Avian EGF Receptor and v-erbB Protein.Cell 40:6 50

19 ~ 625

【非特許文献 17】Nilsenら、(1985).c-erbB Activation in ALV-Induced Erythroblastosis:Novel RNA Processing and Promoter Insertion Results in Expression of an Ami no-Truncated EGF Receptor.Cell 41:719 ~ 726

【非特許文献 18】Gammieら、1986;Rainesら、(1985).c-erbB Activation in Avian Leukosis Virus-Induced Erythroblastosis:Clustered Integration Sites and the Arrangement of Provirus in the c-erbB Alleles.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:2287 ~ 2291

【非特許文献 19】Pelleyら、(1988).Proviral-Activated c-erbB is Leukemogenic but not Sarcomagenic:Characterization of a Replication-Competent Retrovirus Containing the Activated c-erbB.Journal of Virology 62:1840 ~ 1844

10

【非特許文献 20】Wellsら、(1988).Genetic Determinants of Neoplastic Transformation by the Retroviral Oncogene v-erbB.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:7597 ~ 7601

【非特許文献 21】Humphreyら、(1988).Amplification and Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Human Glioma Xenografts.Cancer Research 48:2231 ~ 2238

【非特許文献 22】Bignerら、(1988)J.Neuropathol.Exp.Neurol.、47:191 ~ 205;Wongら、(1987).Increased Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Malignant Gliomas is Invariably Associated with Gene Amplification.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:6899 ~ 6903

【非特許文献 23】Yamazakiら、(1985).Amplification, Enhanced Expression and Possible Rearrangement of EGF Receptor Gene in Primary Human Brain Tumours of Glial Origin.Nature 313:144 ~ 147

20

【非特許文献 24】Maldenら、(1988).Selective Amplification of the Cytoplasmic Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Glioblastoma Multiforme.Cancer Research 48:2711 ~ 2714

【非特許文献 25】Humphreyら、Amplification and expression of the epidermal growth factor receptor gene in human glioma xenografts.Cancer Res.48(8):2231 ~ 8(1988)

【非特許文献 26】Kuanら、EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy.Endocr Relat Cancer.8(2):83 ~ 96(2001)

30

【非特許文献 27】Wikstrand、CJ.ら、Monoclonal antibodies against EGFRVIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas.Cancer Research 55(14):3140 ~ 3148(1995)

【非特許文献 28】Olapade-Olaopa、EO.ら、Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer.Br J Cancer.82(1):186 ~ 94(2000)

【非特許文献 29】Ge H.ら、Evidence of high incidence of EGFRVIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis.Int J Cancer.98(3):357 ~ 61(2002)

【非特許文献 30】Moscatello、G.ら、Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors.Cancer Res.55(23):5536 ~ 9(1995)

40

【非特許文献 31】Garcia de Palazzo、IEら、Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas.Cancer Res.53(14):3217 ~ 20(1993)

【非特許文献 32】Luoら、Int.J.Cancer.104(6):716 ~ 21(2003)

【非特許文献 33】Kuanら、EGFRVIII as a promising target for antibody-based brain tumor therapy.Brain Tumor Pathol.17(2):71 ~ 78(2000)

【非特許文献 34】Kuanら、Increased binding affinity enhances targeting of glioma xenografts by EGFRVIII-specific scFv.International Journal of Cancer.88(6):962 ~ 969(2000)

50

【非特許文献 3 5】 Landryら、Antibody recognition of a conformational epitope in a peptide antigen;Fv-peptide complex of an antibody fragment specific for the mutant EGF receptor、EGFRvIII.Journal of Molecular Biology.308(5):883～893(2001)

【非特許文献 3 6】 Reistら、Astatine-211 labeling of internalizing anti-EGFRvIII monoclonal antibody using N-succinimidyl 5-[211At]astato-3-pyridinecarboxylate.Nuclear Medicine and Biology.26(4):405～411(1999)、

【非特許文献 3 7】 Reistら、In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody:comparison with its murine parent.Nuclear Medicine and Biology.24(7):639～647(1997)

【非特許文献 3 8】 Wikstrandら、Generation of anti-idiotypic reagents in the EGFRvIII tumor-associated antigen system.Cancer Immunology、Immunotherapy.50(12):639～652(2002) 10

【非特許文献 3 9】 Wikstrandら、Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas malignant gliomas.Cancer Research.55(14):3140～3148(1995)

【非特許文献 4 0】 Wikstrandら、The class III variant of the epidermal growth factor receptor(EGFRvIII):characterization and utilization as an immunotherapeutic target.J.Neurovirol.4(2):148～158(1998)

【非特許文献 4 1】 Jungbluthら、A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor.Proc Natl Acad Sci U S A.100(2):639～44(2003) 20

【非特許文献 4 2】 Mamotら、Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR)-targeted Immunoliposomes Mediate Specific and Efficient Drug Delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing Tumor Cells.Cancer Research 63:3154～3161(2003)、

【非特許文献 4 3】 Mendezら、Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice.Nat Genet.15(2):146～56(1997)

【非特許文献 4 4】 Yang X-Dら、Development of ABX-EGF、a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody、for cancer therapy.Crit Rev Oncol Hematol 38(1):17～23(2001) 30

【非特許文献 4 5】 Yang X-Dら、Eradication of Established Tumors by a Fully Human Monoclonal Antibody to the Epidermal Growth Factor Receptor without Concomitant Chemotherapy.Cancer Research 59(6):1236～1243(1999)

【非特許文献 4 6】 Babcockら、A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single、isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities.Proc Natl Acad Sci U S A.93(15):7843～8(1996)

【非特許文献 4 7】 Sambrookら、Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1989)

【非特許文献 4 8】 LaPlancheら、Nucl.Acids Res.14:9081(1986)

【非特許文献 4 9】 Stecら、J.Am.Chem.Soc.106:6077(1984) 40

【非特許文献 5 0】 Steinら、Nucl.Acids Res.16:3209(1988)

【非特許文献 5 1】 Zonら、Anti-Cancer Drug Design 6:539(1991)

【非特許文献 5 2】 Zonら、Oligonucleotides and Analogues.A Practical Approach、pp.87～108(F.Eckstein、Ed.、Oxford University Press、Oxford England(1991))

【非特許文献 5 3】 Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543(1990)

【非特許文献 5 4】 Dayhoff、M.O.、in Atlas of Protein Sequence and Structure、101～110ページ(第5巻、National Biomedical Research Foundation(1972))およびこの巻の1～10ページの追録2

【非特許文献 5 5】 SmithおよびWatermanのAdv.Appl. Math.2:482(1981)

【非特許文献 5 6】 NeedlemanおよびWunsch J.Mol.Biol.48:443(1970) 50

- 【非特許文献 5 7】 PearsonおよびLipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444(1988)
- 【非特許文献 5 8】 Immunology-A Synthesis(第2版、E.S.Golub and D.R.Gren、Eds.、Sinauer Associates、Sunderland、Mass.(1991))
- 【非特許文献 5 9】 Bowieら、Science 253:164(1991)
- 【非特許文献 6 0】 Proteins、Structures and Molecular Principles(Creighton、Ed.、W.H.Freeman and Company、ニューヨーク(1984))
- 【非特許文献 6 1】 Introduction to Protein Structure(C.Branden and J.Tooze、eds.、Garland Publishing、ニューヨーク、ニューヨーク(1991))
- 【非特許文献 6 2】 Thorntonら、Nature 354:105(1991)
- 【非特許文献 6 3】 Fauchere、J. Adv. Drug Res. 15:29(1986) 10
- 【非特許文献 6 4】 Veber and Freidinger TINS p.392(1985)
- 【非特許文献 6 5】 Evansら、J. Med. Chem. 30:1229(1987)
- 【非特許文献 6 6】 Rizo and Giersch Ann. Rev. Biochem. 61:387(1992)
- 【非特許文献 6 7】 The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(Parker、S.、Ed.、McGraw-Hill、サンフランシスコ(1985))
- 【非特許文献 6 8】 「Selected Lymphocyte Antibody Method」(Babcockら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93:7843 ~ 7848(1996))
- 【非特許文献 6 9】 Fundamental Immunology Ch.7(Paul、W.、ed.、第2版.Raven Press、ニューヨーク(1989))
- 【非特許文献 7 0】 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health、Bethesda、Md.(1987および1991)) 20
- 【非特許文献 7 1】 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901 ~ 917(1987)
- 【非特許文献 7 2】 Chothiaら、Nature 342:878 ~ 883(1989)
- 【非特許文献 7 3】 Songsivilai & Laczmann Clin. Exp. Immunol. 79:315 ~ 321(1990)
- 【非特許文献 7 4】 Kostelnikら、J. Immunol. 148:1547 ~ 1553(1992)
- 【非特許文献 7 5】 Brooks、B.R.、Brucolieri、R.E.、Olafson、B.D.、States、D.J.、Swaminathan、S.およびKarplus、M.、1983、J. Comp. Chem. 4:187
- 【非特許文献 7 6】 Greenら、Nature Genetics 7:13 ~ 21(1994)
- 【非特許文献 7 7】 Mendezら、Nature Genetics 15:146 ~ 156(1997)
- 【非特許文献 7 8】 GreenおよびJakobovits J. Exp. Med. 188:483 ~ 495(1998) 30
- 【非特許文献 7 9】 Fangerら、Inmunol Methods 4:72 ~ 81(1994)
- 【非特許文献 8 0】 Trauneckerら、Int. J. Cancer (Suppl) 7:51 ~ 52(1992)
- 【非特許文献 8 1】 Deoら、18:127(1997)
- 【非特許文献 8 2】 Valeriusら、Blood 90:4485 ~ 4492(1997)
- 【非特許文献 8 3】 Vitetta Immunol Today 14:252(1993)
- 【非特許文献 8 4】 Junghansら、in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655 ~ 686(第2版、Chafner and Longo、eds.、Lippincott Raven(1996))
- 【非特許文献 8 5】 Selaら、Immunoconjugates 189 ~ 216(C. Vogel、ed. 1987)
- 【非特許文献 8 6】 Ghoseら、Targeted Drugs 1 ~ 22(E. Goldberg、ed. 1983)
- 【非特許文献 8 7】 Dienerら、Antibody Mediated Delivery Systems 1 ~ 23(J. Rodwell、ed. 1988) 40
- 【非特許文献 8 8】 Pieterszら、Antibody Mediated Delivery Systems 25 ~ 53(J. Rodwell、1988)
- 【非特許文献 8 9】 Bumolら、Antibody Mediated Delivery Systems 55 ~ 79(J. Rodwell、1988)
- 【非特許文献 9 0】 Garnettら、Cancer Res. 46:2407 ~ 2412(1986)
- 【非特許文献 9 1】 Ohkawaら、Cancer Immunol. Immunother. 23:81 ~ 86(1986)
- 【非特許文献 9 2】 Endoら、Cancer Res. 47:1076 ~ 1080(1980))
- 【非特許文献 9 3】 Hurwitzら、Appl. Biochem. 2:25 ~ 35(1980)
- 【非特許文献 9 4】 Manabiら、Biochem. Pharmacol. 34:289 ~ 291(1985) 50

- 【非特許文献 9 5】Dillmanら、Cancer Res.46:4886 ~ 4891(1986)
- 【非特許文献 9 6】Shovalら、Proc.Natl.Acad.Sci. 85:8276 ~ 8280(1988)
- 【非特許文献 9 7】Tsukadaら、J.Natl.Canc.Inst.73:721 ~ 729(1984)
- 【非特許文献 9 8】Katoら、J.Med.Chem.27:1602 ~ 1607(1984)
- 【非特許文献 9 9】Tsukadaら、Br.J.Cancer52:111 ~ 116(1985)
- 【非特許文献 1 0 0】Biochem.Biophys.Res.Commun.102:1048 ~ 1054(1981)
- 【非特許文献 1 0 1】J.Natl.Canc.Inst.80:1154 ~ 1159(1988)
- 【非特許文献 1 0 2】Cancer Res.48:6097 ~ 6102(1988)
- 【非特許文献 1 0 3】Prot.Natl.Acad.Sci.79:626 ~ 629(1982)
- 【非特許文献 1 0 4】Lambertら、I.Biol.Chem.260:12035 ~ 12041(1985) 10
- 【非特許文献 1 0 5】Lambertら、Immunotoxins 175 ~ 209(A.Frankel、ed.1988)
- 【非特許文献 1 0 6】Ghetieら、Cancer Res.48:2610 ~ 2617(1988)
- 【非特許文献 1 0 7】J.Biol.Chem.260:10905 ~ 10908(1985)
- 【非特許文献 1 0 8】Menendezら、Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer、サンディエゴ、アブストラクト81(1989)
- 【非特許文献 1 0 9】Hinmanら、53 Cancer Res.3336 ~ 3342(1993)
- 【非特許文献 1 1 0】Kupchanら、J.Med.Chem.21:31 ~ 37(1978)
- 【非特許文献 1 1 1】Higashideら、Nature 270:721 ~ 722(1977)
- 【非特許文献 1 1 2】Kawaiら、Chem.Pharm.Bull.32:3441 ~ 3451(1984)
- 【非特許文献 1 1 3】Chem.Pharm.Bull.12:3441(1984) 20
- 【非特許文献 1 1 4】Sieberら、43Comparative Leukemia Research 1975、Bibl.Haemat. 495 ~ 500(1976)
- 【非特許文献 1 1 5】Remillardら、Science 189:1002 ~ 1005(1975)
- 【非特許文献 1 1 6】Wolpert-DeFillippsら、Biochem.Pharmacol.24:1735 ~ 1738(1975))
- 【非特許文献 1 1 7】Kupchan、Ped.Proc.33:2288 ~ 2295(1974)
- 【非特許文献 1 1 8】Carlssonら、Biochem.J.173:723 ~ 737(1978)
- 【非特許文献 1 1 9】Pettitら、Antineoplastic agents 337.Synthesis of dolastatin 10 structural modifications.Anticancer Drug Des.10(7):529 ~ 44(1995) 30
- 【非特許文献 1 2 0】Woykeら、In vitro activities and postantifungal effects of the potent dolastatin 10 structural modification auristatin PHE. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.45:3580 ~ 3584(2001)、
- 【非特許文献 1 2 1】Pettitら、Specific activities of dolastatin10 and peptide derivatives against Cryptococcus neoformans.Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42:2961 ~ 2965(1998)、WoykeThree-dimensional visualization of microtubules during the Cryptococcus neoformans cell cycle and the effects of auristatin PHE on microtubule integrity and nuclear localization.Submitted、Antimicrobial Agents and Chemotherapy
- 【非特許文献 1 2 2】Doroninaら、Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy.Nature Biotechnology.(2003) 40
- 【非特許文献 1 2 3】Franciscoら、cAC10-vcMMAE、an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity.Blood.(2003)5月8日[Epub ahead of print].Epub2003年4月24日
- 【非特許文献 1 2 4】Kingら、Monoclonal antibody conjugates of doxorubicin prepared with branched peptide linkers:inhibition of aggregation by methoxytriethylene glycol chains.J Med Chem.45(19):4336 ~ 43(2002)
- 【非特許文献 1 2 5】Dubowchikら、Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs.2.Modes of anticancer drugs paclitaxel(Taxol)、mitomycin C and doxorubicin.Bioorg Med Chem Lett.8(23):3347 ~ 52(1998)
- 【非特許文献 1 2 6】newmedinc「ドット」コムのウェブサイト 50

【非特許文献 127】Mayer、A.M.S. *Marine Pharmacology in 1998:Antitumor and Cytotoxic Compounds*. *The Pharmacologist*. 41(4):159 ~ 164(1999)

【非特許文献 128】Remington's *Pharmaceutical Sciences*(第18版、Mack Publishing Company、Easton、PA、1990)

【非特許文献 129】Langerら、*J.Biomed Mater.Res.*、(1981)15:167 ~ 277およびLanger、*Chem.Tech.*、(1982)12:98 ~ 105

【非特許文献 130】Sidmanら、*Biopolymers*、(1983)22:547 ~ 556

【非特許文献 131】Epsteinら、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*、(1985)82:3688 ~ 3692

【非特許文献 132】Hwangら、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*、(1980)77:4030 ~ 4034

【非特許文献 133】Baldrick P. 「*Pharmaceutical excipient development:the need for preclinical guidance.*」 *Regal.Toxicol.Pharmacol.* 32(2):210 ~ 8(2000) 10

【非特許文献 134】Wang W. 「*Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals.*」 *Int.J.Pharm.* 203(1 ~ 2):1 ~ 60(2000)

【非特許文献 135】Charman WN 「*Lipids, lipophilic drugs, and Oral drug delivery-some emerging concepts.*」 *J Pharm Sci.* 89(8):967 ~ 78(2000)

【非特許文献 136】Powellら、「*Compendium of excipients for parenteral formulations*」 *PDA J Phram Sci Technol.* 52:238 ~ 311(1998)

【非特許文献 137】Wikstrandら、*J Neurovirol.* 4(2):148 ~ 58(1998)

【非特許文献 138】Yangら、*Crit Rev Oncol Hematol.*、38(1):17 ~ 23(2001)

【非特許文献 139】Kearneyら、*J. Immunol.* 123:1548 ~ 1550(1979) 20

【非特許文献 140】Babcockら、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*、93:7843 ~ 7848(1996)

【非特許文献 141】Batraら、「*Epidermal growth factor ligand-independent,unregulated,cell transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene*」 *Cell Growth Differ.* 6(10):1251 ~ 9(1995)

【非特許文献 142】Johnsら、*Int.J.Cancer.* 98:398、2002

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0017】

一実施形態では本発明は、EGFRvIIIおよび配列L E E K K G N Y V V T D H C(配列番号56)を含むペプチドと特異的に結合する単離したヒトモノクローナル抗体を含む。一実施形態では、治療剤を抗体に結合させることができる。一実施形態では、毒素を使用する。他の実施形態では本発明は、L E E K K G N Y V V T D H Cを含む配列(配列番号56)内に含まれるエピトープと特異的に結合する単離したヒトモノクローナル抗体を含み、SPOTアレイ中のアラニンスキャニングによって決定される結合に必要とされる残基はEEK、KKNYV、LEK、EKNYおよびEEKGNからなる群から選択される。 30

【0018】

他の実施形態は、VH3-33遺伝子によってコードされている重鎖可変領域のアミノ酸配列を含む、単離したヒトモノクローナル抗体を含む。この重鎖可変領域のアミノ酸配列は、JH4b遺伝子によってコードされているアミノ酸配列、またはD6-13およびD3-9からなる群から選択されるD遺伝子によってコードされているアミノ酸配列を含むことができる。 40

【0019】

他の実施形態は、A23(VK2)遺伝子によってコードされている軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む、単離したヒトモノクローナル抗体を含む。この軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、JK1遺伝子によってコードされているアミノ酸配列を含むことができる。

【0020】

他の実施形態は、EGFRvIIIと結合し、(配列番号138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16、および17)で同定される抗体13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342および333の重鎖アミノ酸配列からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列を含む、単離した抗体またはその断片を含む。抗体はモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体であってよい。抗体または断片は、薬剤として許容可能な担体または 50

希釈剤と結合させることができ、治療剤と結合させることができる。治療剤は毒素であつてよい。治療剤はDM-1、AEFP、AURISTATIN E、またはZAPなどの毒素であつてよい。治療剤はリンカーによって抗体と結合させることができる。毒素は二次抗体によって抗体と結合させることができる。他の実施形態は、抗体を生成するハイブリドーマ細胞系、および抗体をコードする遺伝子を含む形質転換細胞を含む。細胞は例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞であつてよい。

【0021】

他の実施形態は、EGFRvIIIの発現と関連する細胞の増殖を阻害する方法であつて、有効量の抗体またはその断片でEGFRvIIIを発現する細胞を処置することを含む方法を含む。一実施形態では、抗体は抗体13.1.2の重鎖アミノ酸配列(配列番号138)、抗体131の重鎖アミノ酸配列(配列番号2)、抗体170の重鎖アミノ酸配列(配列番号4)、抗体150の重鎖アミノ酸配列(配列番号5)、抗体095の重鎖アミノ酸配列(配列番号7)、抗体250の重鎖アミノ酸配列(配列番号9)、抗体139の重鎖アミノ酸配列(配列番号10)、抗体211の重鎖アミノ酸配列(配列番号12)、抗体124の重鎖アミノ酸配列(配列番号13)、抗体318の重鎖アミノ酸配列(配列番号15)、抗体342の重鎖アミノ酸配列(配列番号16)、および抗体333の重鎖アミノ酸配列(配列番号17)からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列を含む。この方法はin vivoで行うことができ、肺、結腸、胃、腎臓、前立腺、胸部、膠芽細胞または卵巣癌などの、上皮細胞増殖を伴う癌に罹患しているヒトなどの哺乳動物で行うことができる。

【0022】

他の実施形態は、標的細胞を殺傷する方法を含む。この方法は、標的細胞を毒素と結合した抗体と接触させることによって行う。この抗体はペプチドLEEKGNY(配列番号133)と結合する。一実施形態では、抗体はペプチドに対して $1.3 \times 10^{-9} M$ を超える結合親和性を有する。一実施形態では、毒素はAEFP、DM-1、およびZAPから選択される。一実施形態では、抗体毒素化合物は、ペプチドを含まない細胞に対してよりも標的細胞に対して10倍を超えて毒性がある。一実施形態では、抗体は抗体13.1.2の重鎖アミノ酸配列(配列番号138)、抗体131の重鎖アミノ酸配列(配列番号2)、抗体170の重鎖アミノ酸配列(配列番号4)、抗体150の重鎖アミノ酸配列(配列番号5)、抗体095の重鎖アミノ酸配列(配列番号7)、抗体250の重鎖アミノ酸配列(配列番号9)、抗体139の重鎖アミノ酸配列(配列番号10)、抗体211の重鎖アミノ酸配列(配列番号12)、抗体124の重鎖アミノ酸配列(配列番号13)、抗体318の重鎖アミノ酸配列(配列番号15)、抗体342の重鎖アミノ酸配列(配列番号16)、および抗体333の重鎖アミノ酸配列(配列番号17)からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列を含む。他の実施形態は、抗体はペプチドリンカーによって、あるいは二次抗体によって毒素と結合させる。

【0023】

本発明の他の実施形態は、EGFRvIIIと結合する単離した抗体であつて、以下の相補性決定領域(CDR)：

(a)配列番号138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16、および17で同定される抗体13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342および333のCDR1領域のアミノ酸配列からなる群から選択される配列からなるCDR1、

(b)配列番号138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16、および17で同定される抗体13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342および333のCDR2領域のアミノ酸配列からなる群から選択される配列からなるCDR2、および

(c)配列番号138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16、および17で同定される抗体13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342および333のCDR3領域のアミノ酸配列からなる群から選択される配列からなるCDR3、

を含む重鎖アミノ酸配列を含む単離した抗体を含む。一実施形態では、抗体はモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体である。一実施形態では、抗体は薬剤として許容可能な担体、希釈剤、および/または治療剤と結合させる。一実施形態では、治療剤は毒素である。一実施形態では、毒素はDM-1またはAuristatin Eである。

【0024】

10

20

30

40

50

EGFRvIIIと結合し、配列番号140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31および32で同定される抗体13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、342、および333の軽鎖アミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列を含む、単離した抗体またはその断片も含まれる。抗体はモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体であってよい。抗体は薬剤として許容可能な担体または希釈剤と結合させることができ、あるいは毒素、例えばDM1またはAURISTATIN Eなどの治療剤と結合させることができる。一実施形態では、配列番号140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31および32で同定される抗体13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、342、および333の軽鎖アミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列を含む、抗体を生成するハイブリドーマ細胞系または形質転換細胞が企図される。

10

【0025】

他の実施形態は、このような抗体を生成するハイブリドーマ細胞系、および抗体をコードする遺伝子を含むチャイニーズハムスター卵巣細胞などの形質転換細胞を含む。

【0026】

さらに他の実施形態は、EGFRvIIIの発現と関連する細胞の増殖を阻害する方法であって、有効量の前記した抗体または断片でEGFRvIIIを発現する細胞を処置することを含む方法を含む。この方法はin vivoで行うことができ、肺、結腸、胃、腎臓、前立腺、胸部、膠芽細胞または卵巣癌などの、上皮細胞増殖を伴う癌に罹患しているヒトなどの哺乳動物で行うことができる。

【0027】

さらに他の実施形態は、EGFRvIIIと結合する単離した抗体であって、以下の相補性決定領域(CDR)：

(a)配列番号140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31および32で同定される抗体13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、342、および333のCDR1領域のアミノ酸配列からなる群から選択される配列からなるCDR1、

(b)配列番号140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31および32で同定される抗体13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、342、および333のCDR1領域のアミノ酸配列からなる群から選択される配列からなるCDR2、および

(c)配列番号140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31および32で同定される抗体13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、342、および333のCDR1領域のアミノ酸配列からなる群から選択される配列からなるCDR3、
を含む軽鎖アミノ酸配列を含む単離した抗体を含む。

20

【0028】

前段落で記載した抗体は、以下の相補性決定領域(CDR)：

(a)配列番号138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16、および17で同定される抗体13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342および333のCDR1領域のアミノ酸配列からなる群から選択される配列からなるCDR1、

(b)配列番号138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16、および17で同定される抗体13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342および333のCDR2領域のアミノ酸配列からなる群から選択される配列からなるCDR2、および

(c)配列番号138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16、および17で同定される抗体13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342および333のCDR3領域のアミノ酸配列からなる群から選択される配列からなるCDR3、
を含む重鎖アミノ酸配列をさらに含むことができる。

30

【0029】

他の実施形態は、EGFRvIIIの発現と関係した細胞の増殖を阻害する方法であって、有効量の前記した抗体または断片でEGFRvIIIを発現する細胞を処置することを含む方法を含む。この方法はin vivoで行うことができ、肺癌腫、乳癌腫、頭部および首部分の癌、前立腺癌腫または膠芽細胞腫などの、上皮細胞増殖を伴う癌に罹患しているヒトなどの哺乳動物で行うことができる。

40

50

【0030】

他の実施形態は、配列番号138、2、4、5、7、9、10、12、13、15、16、および17で同定される抗体13.1.2、131、170、150、095、250、139、211、124、318、342および333の重鎖アミノ酸配列からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列またはその断片をコードするスクレオチド配列を含む単離したポリスクリオチド分子、または配列番号140、19、20、21、29、23、25、26、28、33、31および32で同定される抗体13.1.2、131、170、150、123、095、139、250、211、318、342、および333の軽鎖アミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列またはその断片をコードするスクレオチド配列を含む単離したポリスクリオチド分子を含む。

【0031】

他の実施形態は、容器、その中に含まれる組成物（前記載した抗体を含む）、およびその組成物を使用してEGFRvIIIの発現によって特徴付けられる癌を治療することができるこことを示すパッケージ挿入物または標識を含む製造品を含む。このような癌には、肺癌腫、乳癌腫、頭部および首部分の癌、前立腺癌腫または膠芽細胞腫がある。肺、結腸、胃、腎臓、前立腺または卵巣癌をスクリーニングするために哺乳動物組織または細胞中のEGFRvIIIを検出するためのアッセイキットであって、EGFRvIIIが上皮癌によって発現する抗原であり、抗原タンパク質と結合する抗体、および存在する場合抗体と抗原の反応を示すための手段を含むキットも含まれる。抗体は標識モノクローナル抗体であってよく、あるいは抗体は非標識の一次抗体であってよく、反応を示すための手段は抗免疫グロブリンである標識した二次抗体を含む。抗原と結合する抗体は、蛍光色素、酵素、放射性核種および放射線不透過性物質からなる群から選択されるマーカーを用いて標識することができる。抗原と結合する抗体は、過剰発現wtEGFRとも結合することができる。このキットは患者の選択用に臨床上使用することができる。

【0032】

他の実施形態は、新規なGly残基を含むEGFRvIIIのエピトープを特異的に認識する抗体を含む。

【0033】

他の実施形態は、EGFRvIIIのタンパク質変異体を含む。変異体はpFLAG挿入体を有する可能性があり、配列番号56中のアミノ酸からなる可能性があり、*in silico*で存在することができる。

【0034】

他の実施形態は、認識配列EEKKGNVVT(配列番号57)と結合する抗体またはその変異体を含む。

【0035】

他の実施形態は、EGFRvIIIと特異的に結合する抗体変異体を含む。この抗体変異体は、配列番号57を含むペプチドとさらに結合することができる。抗体変異体は、ペプチド中の残基EKNYまたはEEKGNと相互作用する残基を有することができる。一実施形態では抗体変異体は、それが野生型EGFRタンパク質と結合するより10倍強くペプチド配列と結合する。一実施形態では抗体は、EGFRvIIIおよび配列番号56のペプチドと特異的に結合する。一実施形態では、単離した抗体または変異体は、深いキャビティ（空洞, cavity）を含む相補性決定領域を有し、このキャビティは重鎖のCDR2およびCDR3、軽鎖のCDR3、および軽鎖のCDR1由来の小さな部分によって作製される。一実施形態では、単離した抗体または変異体は、結合に関与するキャビティの5 Å以内に残基31、37、95～101、143～147、159、162～166、169～171、211～219、221、および223を有する。一実施形態では、単離した抗体または変異体は、狭い溝を含む相補性決定領域を有し、この溝は重鎖CDR2およびCDR3、および軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3によって作製される。一実施形態では、単離した抗体または変異体は、結合に関与する溝の5 Å以内に残基31、33、35～39、51、54～56、58～61、94～101、144～148、160、163～166、172、および211～221を有する。一実施形態では、単離した抗体または変異体は、結合に関与する溝の5 Å以内に残基31～33、35、37、55、96～101、148、163、165、170、172、178、217、および218を有する。一実施形態では、单

10

20

30

40

50

離した抗体または変異体は、ペプチドEEKKGN(配列番号127)のエピトープが抗体のパラトープと結合すると、少なくとも1つの結合がE2とY172、K3とH31、K4とH31、N6とD33、N6とY37、およびN6とK55からなる群から選択される2残基間で形成されるように形成されたパラトープを有する。一実施形態では、単離した抗体または変異体は、ペプチドEEKKGNY(配列番号131)のエピトープが抗体のパラトープと結合すると、少なくとも1つの結合がK4とQ95、K4とQ95、N6とQ98、G5とH31、Y7とH31、Y7とW165からなる群から選択される2残基間で形成されるように形成されたパラトープを有する。一実施形態では抗体は、*in silico*で決定される構造または*in silico*で決定される構造との相互作用を有する。

【0036】

他の実施形態は、特定の結合性でEGFRvIIIと結合する変異体を選択するための方法を提供し、この方法はパラトープを作製するために分子構造を使用すること、エピトープを作製するために分子構造を使用すること、2つの間の相互作用エネルギーを計算すること、およびそのエネルギーレベルをmAb変異体のエピトープおよび第2のパラトープのエネルギーレベルと比較すること、およびエネルギーレベルの違いに基づいて変異体を選択することを含む。この方法は、パラトープの第2の変異体とエピトープの間の相互作用エネルギーを使用して第3の相互作用エネルギーを測定すること、およびその第3の相互作用エネルギーと第2の相互作用エネルギーを比較してどの変異体を選択するかを決定することを、さらに含むことができる。一実施形態では、変異体を作製し結合に関して試験する。

10

【0037】

他の実施形態は、特定の結合性でEGFRvIIIと結合する変異体を選択するための方法を提供し、この方法はパラトープと相互作用するエピトープの残基を調べること、重要な残基を選択して認識配列を作製すること、この配列を使用してEGFRvIII変異体を作製すること、およびEGFRvIII変異体を使用してmAb変異体を選択することを含む

20

【0038】

他の実施形態は、EGFRvIIIに対する抗体変異体を作製するための方法を提供し、前記方法はパラトープと相互作用するエピトープの残基を分析すること、さらに重要なエピトープの残基を選択して認識配列を作製すること、この認識配列を使用してEGFRvIII変異体を作製すること、およびEGFRvIII変異体を使用して抗体変異体を選択することを含む。一実施形態では、抗体の選択は*in silico*で行う。一実施形態では、EGFRvIII変異体を使用することによる抗体の選択は、EGFRvIII変異体に対する抗体を産生することによって行う。

30

【0039】

単離した抗体変異体がEGFRvIIIおよび配列番号57のペプチドと結合する実施形態では、抗体は以下のTyr172Arg、Leu99Glu、Arg101Glu、Leu217G1u、Leu99Asn、Leu99His、L99T、Arg101Aspの点変異、またはこれらのいくつかの組合せをさらに含むことができる。一実施形態では、抗体はモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。

【0040】

一実施形態では、抗体またはその変異体は配列EEKKGNYVVT(配列番号57)と結合し、抗体または変異体はナノモル未満の結合能力を有する。

40

【0041】

他の実施形態では、抗体はEGFRvIIIと結合し、抗体はエピトープと結合するパラトープを有し、そのエピトープは、E、K、NおよびYを含むパラトープと相互作用する一組の残基を有する。一実施形態では、抗体は抗体131である。

【0042】

他の実施形態では、抗体はEGFRvIIIと結合し、抗体はエピトープと結合するパラトープを有し、そのエピトープは、E、E、K、G、およびNを含むパラトープと相互作用する一組の残基を有する。一実施形態では、エピトープの一次構造はEEKKGNY(配列番号131)である。一実施形態では、抗体は13.1.2である。

【0043】

他の実施形態では、抗体はEGFRvIIIと結合し、 $1.3 \times 10^{-9} \text{M}$ 未満、 $1.0 \times 10^{-9} \text{M}$ 未満、または

50

500pM未満のK_Dを有する。一実施形態では抗体は、野生型EGFRペプチドと比較して配列番号56に特異的である。一実施形態では、野生型EGFRペプチド(配列番号134)との抗体の非特異的結合は、EGFRvIII(配列番号135)と抗体の特異的結合の10%未満である。一実施形態では、抗体は131、139、および13.1.2.からなる群から選択される。一実施形態では、抗体をインターナリゼーションさせる。一実施形態では、インターナリゼーションは抗体の少なくとも約70%、または少なくとも約80%に関して生じる。

一実施形態では、変異体ヒトモノクローナル抗体は、野生型EGFRタンパク質またはその変異体(配列番号134)と比較してEGFRvIIIタンパク質に実質的に特有であるエピトープと優先的に結合する。一実施形態では変異体は、正規のクラス1に対応する重鎖の相補性決定領域(CDR1)を含む。一実施形態では変異体は、正規のクラス3に対応する重鎖の相補性決定領域(CDR2)を含む。一実施形態では変異体は、正規のクラス4に対応する軽鎖の相補性決定領域(CDR1)を含む。一実施形態では変異体は、正規のクラス1に対応する軽鎖の相補性決定領域(CDR2)を含む。一実施形態では変異体は、正規のクラス1に対応する軽鎖の相補性決定領域(CDR3)を含む。一実施形態では変異体は、正規のクラス1に対応する第1の重鎖の相補性決定領域(CDR1)、正規のクラス3に対応する第2の重鎖の相補性決定領域(CDR2)、正規のクラス4に対応する第1の軽鎖の相補性決定領域(CDR1)、正規のクラス1に対応する第2の軽鎖の相補性決定領域(CDR2)、および正規のクラス1に対応する第3の軽鎖の相補性決定領域(CDR3)を含み、これらの相補性決定領域は、EGFRタンパク質と比較してEGFRvIIIタンパク質に実質的に特有であるエピトープとの、変異体の結合が可能であるように形成されている。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】野生型EGFRとEGFRvIIIとのアラインメントの図である。267個のアミノ酸の欠失およびGの置換を示す。

【図2】EGFRvIII PEP3 14-merペプチドの設計図である。図2Aでは、EGFRvIII のN末端アミノ酸配列LEKK(配列番号58)(1~5)はEGFRのN末端配列と同一であり、この後ろに特有のグリシン残基が認められ、さらにEGFRの273から280残基と同一なアミノ酸が続く。図2BはEGFRvIII(6-272)で欠失しているEGFRのアミノ酸を示す。

【図3A】発明抗体の配列の図である。各抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のヌクレオチド配列とアミノ酸配列を示す。したがって、記載の抗体のそれぞれにつき4つの配列を示す。

【図3B】図3Aと同じ。

【図3C】図3Aと同じ。

【図3D】図3Aと同じ。

【図3E】図3Aと同じ。

【図3F】図3Aと同じ。

【図3G】図3Aと同じ。

【図3H】図3Aと同じ。

【図3I】図3Aと同じ。

【図3J】図3Aと同じ。

【図3K】図3Aと同じ。

【図3L】図3Aと同じ。

【図4】13.1.2抗体の重鎖領域と特定の生殖細胞系重鎖領域とを比較した表である。「-」はハイブリドーマ重鎖領域のアミノ酸残基が生殖細胞系の同じ部位のアミノ酸残基と同じであることを表す。生殖細胞系からの逸脱は適切なアミノ酸残基で示す。

【図5】13.1.2抗体の軽鎖領域と特定の生殖細胞系軽鎖領域とを比較した表である。「-」はハイブリドーマ軽鎖領域のアミノ酸残基が生殖細胞系の同じ部位のアミノ酸残基と同じであることを表す。生殖細胞系からの逸脱は適切なアミノ酸残基で示す。

【図6】種々のハイブリドーマ由来抗体重鎖領域と特定の生殖細胞系重鎖領域とを比較した表である。「-」はハイブリドーマ重鎖領域のアミノ酸残基が生殖細胞系の同じ部位の

10

20

30

40

50

アミノ酸残基と同一であることを表す。生殖細胞系からの逸脱は適切なアミノ酸残基で示す。

【図7】種々のハイブリドーマ由来抗体軽鎖領域と特定の生殖細胞系軽鎖領域とを比較した表である。「-」はハイブリドーマ軽鎖領域のアミノ酸残基が生殖細胞系の同じ部位のアミノ酸残基と同一であることを表す。生殖細胞系からの逸脱は適切なアミノ酸残基で示す。

【図8】組み替えEGFRvIII mAbとEGFRvIIIを発現する細胞(NR6細胞)との結合を表す図である。ひし形は95、三角形は133、正方形は139、「x」は150、アステリクスは170、円は21、直線は230、長方形は250を示す。

【図9 A】H80に対するヒト抗EGFR抗体(ABX-EGF)のFACS染色解析の図である。

10

【図9 B】H80に対する抗体131のFACS染色解析の図である。

【図9 C】H80に対する抗体139のFACS染色解析の図である。

【図9 D】H80に対する抗体13.1.2のFACS染色解析の図である。

【図9 E】H1477に対するABX-EGFのFACS染色解析の図である。

【図9 F】H1477に対する抗体131のFACS染色解析の図である。

【図9 G】H1477に対する抗体139のFACS染色解析の図である。

【図9 H】H1477に対する抗体13.1.2のFACS染色解析の図である。

【図9 I】A549に対するABX-EGFのFACS染色解析の図である。

【図9 J】A549に対する抗体131のFACS染色解析の図である。

【図9 K】A549に対する抗体139のFACS染色解析の図である。

20

【図9 L】A549に対する抗体13.1.2のFACS染色解析の図である。

【図9 M】膠芽腫細胞に対するEGFRvIII mAbの結合を示すグラフである。黒い三角形はH1477に対する抗体131の結合を示す。黒い正方形はH1477に対する抗体13.1.2の結合を示す。白い三角形はH80に対する抗体131の結合を示す。白い正方形はH80に対する抗体13.1.2の結合を示す。

【図9 N】ヒト類表皮癌細胞系A431に対するEGFRvIII mAbの結合を示すグラフである。黒い正方形は抗体13.1.2を示す。黒い三角形は抗体131を示す。

【図9 O】マウス線維芽細胞系NR6に対する抗体13.1.2の結合を示すグラフである。正方形はNR6を示す。三角形は野生型EDFRを有するNR6を示す。円はEGFRvIIIを発現するNR6を示す。

30

【図9 P】マウス線維芽細胞系に対する抗体131の結合を示すグラフである。正方形はNR6を示す。三角形は野生型EDFRを発現するNR6を示す。円はEGFRvIIIを発現するNR6を示す。

【図10 A】EGFRを発現する細胞(A431)に結合するヒト抗EGFR抗体(ABX-EGF)のFACS染色解析の図である。

【図10 B】EGFRを発現する細胞(A431)に結合する抗体131のFACS染色解析の図である。

【図10 C】EGFRを発現する細胞(A431)に結合する抗体139のFACS染色解析の図である。

。

【図11】抗体131の構造モデルの分子表面を示す図である。6カ所のCDRに異なる陰影で濃淡をつけてそれぞれの境界を示した。結合キャビティは中心付近に位置する。

40

【図12】抗体13.1.2分子表面の構造モデルの図である。6カ所のCDR領域には濃淡をつけて番号をふった。垂直中心線にほぼ沿って長い溝が位置する。

【図13 A】13.1.2抗体とペプチドBEKKGN(配列番号127)との複合体の予測結合モデル図である。CDR領域に陰影をつけて境界を示した。

【図13 B】13.1.2抗体とペプチドBEKKGN(配列番号127)との複合体の結合モデルにおける水素結合を示す図である。CDRのループおよび残基の陰影は図12に準ずる。ペプチド残基には、図上方のN末端側からC末端方向へ1から6まで番号をふった。6カ所の水素結合は点線で示した。水素結合を形成する6組のアミノ酸は、E2...Y172、K3...H31、K4...H31、N6...D33、N6...Y37、N6...K55である。

【図14】選択された結合モデルの1つにおけるエピトープ-抗体結合エネルギーとKdの対

50

数との相関を示すグラフである。

【図15】ペプチド-13.1.2抗体複合体の精妙な結合モデルを示す図である。ペプチドが空間を埋めるような形になっている。

【図16】精妙な結合モデルの水素結合を示す図である。

【図17】抗体-抗原結合エネルギーと相対親和性の対数とが線形関係にあることを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0045】

前に論じたようにEGFRvIIIは、EGFrの細胞外ドメイン中の267のアミノ酸を欠き、接合部において1つのアミノ酸グリシンが置換された、EGFRの欠失変異体である。これらの特徴は、図1中の野生型EGFRとEGFRvIIIの間の配列アラインメントに示す。欠失体の接合部におけるアミノ酸グリシンの置換体を鑑みると、野生型EGFR中には存在せずEGFRvIII中に存在する新規なエピトープに対する抗体を作製することは理論上可能になる。したがって、図2に示すPEP3と呼ぶ、免疫およびスクリーニング用のペプチドを設計した(Kuanら、EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer*. 8(2):83~96(2001))。このような14量体ペプチドは、EGFRvIIIと野生型EGFRに共通な5n-末端アミノ酸、独特のグリシン接合部位、および野生型EGFR(残基273~280に対応)とEGFRvIII(残基7~14に対応)の間の保存配列中に含まれる8個のアミノ酸残基を有する。さらに、EGFRvIIIをコードする遺伝子でトランスフェクトした膠芽細胞および細胞(B300.19細胞)も、免疫およびスクリーニング用に使用した(本明細書では時折B300.19/EGFRvIII形質転換体と呼ぶ)。

10

【0046】

EGFRvIIIに対するヒト抗体を作製するために、トランスジェニックXenoMouse(登録商標)マウスを、膠芽細胞/EGFRvIII、B300.19/EGFRvIII細胞と、野生型EGFRと比較してEGFRvIIIにおいて表される新規な細胞外ドメイン中の接合領域を対象とするペプチド(PEP3)の組合せを用いて免疫した。免疫したマウス由来のB細胞を単離し、これらを使用してハイブリドーマを生成し、次にEGFRvIIIとの結合に関してスクリーニングしたか、あるいはXenoMax(登録商標)/SLAM(登録商標)技術を使用してEGFRvIIIとの結合に関するスクリーニングにおいて直接使用した(Babcockら、A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(15):7843~8(1996)、および米国特許第5,627,052号)。EGFRvIIIと結合すると同定した抗体は一連のアッセイにおいてスクリーニングして、EGFRvIIIの特異的認識を確認した。この方法によって、EGFRvIIIと結合しEGFRvIIIに特異的であったヒトモノクローナル抗体の群を作製し、単離し、特徴付けした。後のエピトープマッピングによって、独特ではあるが重複した特異性を実証した。すべての抗体を、細胞に細胞毒性薬剤を送達する目的で、細胞によってインターナリゼーションされるそれらの能力に関してin vitroでさらに評価した。効率の良い薬剤送達を示した抗体は細胞毒性薬剤と直接結合させ、in vitroおよびin vivoでEGFRvIIIを発現する腫瘍細胞を殺傷するそれらの能力に関して調べた。これらの試験は、腫瘍が特異的な遺伝的病巣を有する患者の癌を治療するための、次世代の抗体薬剤結合体に関する基盤を与える。

20

30

【0047】

前に記載した方法によって、完全ヒト抗EGFRvIII抗体の群を作製した。ハイブリドーマ手法を使用して、PEP3との結合に関するELISAにおいて陽性であった、抗体13.1、13.2、13.3、および13.4を含めたいくつかの抗体(野生型EGFRとの限られた交差反応性しか示さなかつた)を作製した。これらの中で、抗体13.1(および特に、そのサブクローン13.1.2)を、さらなる研究および開発用に選択した。XenoMax手法を使用して、pep3オリゴヌクレオチドとの結合に関して非常に特異的であるが、野生型EGFRと限られた交差反応性しか有さなかつた、抗体131、139、250、および095を含めた一群の抗体を作製した。これらの中では、131抗体が非常に興味深い性質を有する。それぞれの抗体に関する配列は、図4~7中に示す(配列番号1~33および141~144)。様々な抗体の配列と結合能力の比較を行い、

40

50

それらの結果は図4～10中に示す。図9A～9L、および図10A～10Dにおいて見ることができるように、抗体131、139、および13.1.2はいずれも、ABX-EGFと比較してEGFRvIII発現細胞(H1477)に関する優れた選択性を示した。その結果のいくつかは図9M～9P中においてグラフの形で示し、このことは、少なくとも2つの抗体13.1.2および131が、単なるEGFRvIII細胞と比較してEGFRvIII発現細胞に関して優れた特異性を示したことを示す。最後に、予想した構造モデルに基づいて、抗体の変異体を作製して改変された結合性を有する抗体を得た。

【 0 0 4 8 】

さらに本発明の抗体は、同一または類似のエピトープと結合する他の抗体をスクリーニングするのに非常に有用である。形成される抗原-抗体複合体の性質に関して同一または改善された効果を有すると予想される他の抗体を解明するための交差競合試験において、本発明の抗体を使用することができる。

10

【 0 0 4 9 】

EGFRvIIIに関して非常に高い親和性を有していた131抗体と13.1.2のそれぞれは、細胞によって十分にインターナリゼーションし、毒素と結合すると細胞殺傷の際に非常に有効であるようであった。興味深いことに、両方の抗体は、XenoMouseマウスの異なる免疫において、異なる技術を使用して作製したにもかかわらず、非常に類似した生殖細胞系遺伝子に由来していた。しかしながら、エピトープマッピング作業に基づくと、それぞれの抗体はEGFRvIII分子上のわずかに異なるエピトープと結合し、EGFRvIII上に結合に不可欠なわずかに異なる残基を有するようである。これらの結果は、生殖細胞系遺伝子の使用はEGFRvIIIを標的とする抗体治療物質を作製するために重要であり、これらの構造的発見に基づき抗体および他の治療物質のさらなる設計を可能にする方法で、わずかな変化によって抗体の結合および影響を変えることができることを示す。

20

【 0 0 5 0 】

13.1.2および131抗体と同じエピトープと結合するか、あるいは13.1.2および131抗体と結合に関して競合する抗体が非常に望ましい。以下でさらに詳細に論じるように、SPOTアレイでのアラニンスキャニングによって、いくつかの抗体の結合に関して重要な残基が解明されてきている。したがって、重要な結合残基を共有する抗体も非常に望ましい。

【 0 0 5 1 】

(定義)

30

他に定義しない限り、本明細書で使用する科学および技術用語は、当業者によって一般的に理解されている意味を有するものとする。さらに、文脈によって他に必要とされない限り、単数形の語は複数形を含み、複数形の語は単数形を含むものとする。一般に、本明細書に記載する細胞および組織培養、分子生物学、ならびにタンパク質およびオリゴまたはポリヌクレオチド化学およびハイブリダイゼーションの技術に関して使用する名称は、当分野においてよく知られており一般的に使用されている名称である。組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養および形質転換(例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション)用の、標準的な技法を使用する。酵素反応および精製技法は、製造者の仕様書に従い、あるいは当分野で一般的に行われているように、あるいは本明細書に記載するのと同様に行う。前述の技術および手順は、当分野でよく知られている従来の方法に従い、本明細書中に引用し論じる様々な一般的およびさらに詳細な参考文献中に記載されたのと同様に一般的に行う。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1989)を参照のこと。本明細書に記載する、分析化学、合成有機化学、ならびに医療および薬剤化学の実験手順および技法に関して使用する名称は、当分野においてよく知られており一般的に使用されている名称である。化学合成、化学分析、薬剤調製、配合、および送達、ならびに患者の治療用の、標準的な技法を使用する。

40

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用する、用語「単離ポリヌクレオチド」は、ゲノム、cDNA、または合成起源、あるいはこれらのいくつかの組合せのポリヌクレオチドを意味するものとし、その起

50

源によって、「単離ポリヌクレオチド」は、(1)「単離ポリヌクレオチド」が自然に見られるポリヌクレオチドの全体または一部分とは結合していない、(2)自然では連結していないポリヌクレオチドと動作可能に連結している、あるいは(3)大きな配列の一部分として自然には存在しない。

【0053】

本明細書で言及する用語「単離タンパク質」は、cDNA、組換えRNA、または合成起源、あるいはこれらのいくつかの組合せのタンパク質を意味するものとし、その起源、または派生源によって、「単離タンパク質」は、(1)自然に見られるタンパク質とは結合していない、(2)同じ源由来の他のタンパク質を含まない、例えばマウスのタンパク質を含まない、(3)異種由来の細胞によって発現される、あるいは(4)自然には存在しない。 10

【0054】

用語「ポリペプチド」は、本来のタンパク質、断片、またはポリペプチド配列の類似体を指すための一般用語として本明細書では使用する。それ故、本来のタンパク質、断片、および類似体は、ポリペプチド属の種である。本発明の好ましいポリペプチドは、ヒト重鎖免疫グロブリン分子およびヒトkappa軽鎖免疫グロブリン分子、ならびに重鎖免疫グロブリン分子と軽鎖免疫グロブリン分子、例えばkappa軽鎖免疫グロブリン分子またはlambd a軽鎖免疫グロブリン分子などを含む組合せ、およびこの逆によって形成される抗体分子、ならびにこれらの断片および類似体を含む。

【0055】

本明細書で使用し物体に適用する、用語「自然に存在する」は、物体を自然中で見つけることができる事実を指す。例えば、自然から単離することができ、研究室または他の場所において人間によって故意に改变されていない、(ウイルスを含めた)生物中に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、自然に存在する。 20

【0056】

本明細書で使用する用語「動作可能に連結した」は、それらをその意図する形式で機能させることができある関係にあるように記載される要素の位置を指す。コード配列と「動作可能に連結した」制御配列は、コード配列の発現がその制御配列と適合性がある条件下で得られるような方式で連結している。

【0057】

本明細書で使用する用語「制御配列」は、それらが連結するコード配列の発現およびプロセシングに影響を与えるのに必要な、ポリヌクレオチド配列を指す。このような制御配列の性質は宿主生物に応じて異なる;原核生物では、このような制御配列には一般にプロモーター、リボソーム結合部位、および転写停止配列があり;真核生物では、一般にこのような制御配列には、プロモーターおよび転写停止配列がある。用語「制御配列」は、その存在が発現およびプロセシングに必要なあらゆる要素を少なくとも含み、その存在が有利である他の要素、例えばリーダー配列および融合パートナー配列も含むことができるものとする。 30

【0058】

本明細書で言及する用語「ポリヌクレオチド」は、少なくとも10塩基長のポリマー形のヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドのいずれか、あるいは改变形のいずれかの型のヌクレオチドを意味する。この語は、一本鎖および二本鎖形のDNAを含む。 40

【0059】

本明細書で言及する用語「オリゴヌクレオチド」は、自然に存在するヌクレオチド、ならびに自然に存在する、および自然に存在しないオリゴヌクレオチド結合によって1つに連結した改变型ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、200塩基以下の長さを一般に含むポリヌクレオチドのサブセットである。好ましくはオリゴヌクレオチドは10~60塩基長であり、最も好ましくは12、13、14、15、16、17、18、19、または20~40塩基長である。通常オリゴヌクレオチドは、例えばプローブ用の一本鎖であるが、オリゴヌクレオチドは、例えば遺伝子変異体の構築において使用するための二本鎖であってよい。本発明の 50

オリゴヌクレオチドは、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドであってよい。

【0060】

本明細書で言及する用語「自然に存在するヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。本明細書で言及する用語「改変ヌクレオチド」は、改変または置換された糖基などを有するヌクレオチドを含む。本明細書で言及する用語「オリゴヌクレオチド結合」は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデード、ホスホロアミデートなどのオリゴヌクレオチド結合体を含む。例えばLaPlancheら、Nucl. Acids Res.14:9081(1986);Stecら、J.Am.Chem.Soc.106:6077(1984);Steinら、Nucl.Acids Res.16:3209(1988);Zonら、Anti-Cancer Drug Design 6:539(1991);Zonら、Oligonucleotides and Analogues.A Practical Approach, pp.87~108(F.Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England(1991));Stecら、米国特許第5,151,510号;Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543(1990)を参照のこと。望むならば、オリゴヌクレオチドは検出用の標識を含むことができる。

【0061】

本明細書で使用する用語「変異体」は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと異なるが、タンパク質の活性が不利益に変更されていないように異なるポリペプチド、ポリヌクレオチド、分子である。エピトープの変異体が存在する可能性がある。抗体の変異体が存在する可能性がある。好ましい実施形態では、エピトープと結合するタンパク質変異体の能力は不利益に変更されていない。一実施形態ではタンパク質変異体は、野生型mAbの能力の10~500%で結合することができる。例えばタンパク質変異体は、野生型mAbの能力の10%、50%、110%、500%で、あるいは500%を超えて結合することができる。一実施形態では、10~500%の結合能力の範囲が含まれる。結合能力はエピトープと変異体の k_a 、 k_d 、または K_D だけには限られないがこれらを含めた、多くの形式で表すことができる。1つの好ましい実施形態では、エピトープは本明細書に記載するエピトープである。

【0062】

一実施形態では、変異体抗体は、5個以下のアミノ酸の置換、欠失または添加によって野生型配列と異なる可能性がある。開示するポリペプチド配列の1つを改変し、例えば本明細書に記載する代表的手順を使用して、その改変ポリペプチドの結合性を評価することによって、このような変異体は一般に同定することができる。他の実施形態では、ポリペプチド変異体は同定したポリペプチドと好ましくは少なくとも約70%の同一性、より好ましくは少なくとも約90%、および最も好ましくは少なくとも約95%の同一性を示す。変異体は保存型置換および/または改変のみが異なることが好ましい。変異体タンパク質は、本明細書に記載するタンパク質構造と構造上類似しているタンパク質、および本明細書に記載するタンパク質構造と機能的に同等であるタンパク質を含む。他の実施形態では、本明細書に記載するタンパク質とそれが機能的に同等である場合、変異体のパラトープが本明細書に記載するパラトープと類似している限り、そのタンパク質は変異体である。一実施形態では、図11に記載するパラトープと類似した形状を有する任意の物質が変異体である。一実施形態では、図12に記載するパラトープと類似した形状を有する任意の物質が変異体である。一実施形態では、図13Aおよび13Bに記載する相互作用表面と類似した形状を有する任意の物質が変異体である。

【0063】

一実施形態では、核酸配列がストリンジェントな条件下において野生型配列と選択的にハイブリダイズすることができる場合、抗体は変異体である。一実施形態では、適切な適度にストリンジェントな条件は、5×SSC、0.5%SDS、1.0mMのEDTA(pH8.0)の溶液中での予備洗浄;50~65、5×SSC、一晩のハイブリダーゼーション、あるいは種間相同性の場合、45での0.5×SSCを用いたハイブリダーゼーション、次に0.1%SDSを含む2×、0.5×および0.2×SSCのそれぞれを用いた20分間65での二回の洗浄を含む。このようなハイブリダイズDNA配列のも、コード縮重のためにハイブリダイズDNA配列によってコードされる抗体ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と同様に、本発明の範囲内にある。本明

10

20

30

40

50

細書で言及する用語「選択的にハイブリダイズする」は、検出可能かつ特異的に結合することを意味する。本発明のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、およびそれらの断片は、非特異的核酸との検出可能な結合の感知可能な量を最少にするハイブリダーゼーションおよび洗浄条件下において、核酸鎖と選択的にハイブリダイズする。高ストリンジエンシー条件を使用して、当分野で知られており本明細書で論じるのと同様の、選択的ハイブリダーゼーション条件を得ることができる。一般に、本発明のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、および断片と対象とする核酸配列の間の核酸配列相同性は、少なくとも80%、およびより典型的かつ好ましくは少なくとも85%、90%、95%、99%、および100%の高い相同性であろう。それらの配列の間に部分的または完全な同一性が存在する場合、2つのアミノ酸配列は相同的である。例えば85%の相同性は、最大にマッチさせて2つの配列をアライメントさせた場合に、85%のアミノ酸が同一であることを意味する。(マッチさせた2つの配列のいずれかの)ギャップがマッチングを最大にする際に与えられ;5以下のギャップ長が好ましく、2以下がより好ましい。あるいは好ましくは、2つのタンパク質配列(または少なくとも30アミノ酸長のそれらに由来するポリペプチド配列)は、変異データマトリクスおよび6以上のギャップペナルティーを用いるプログラムALIGNを使用して、それが(標準偏差単位で)5を超えるアライメントスコアを有する場合、この語を本明細書で使用するように相同的である。Dayhoff、M.O.、in *Atlas of Protein Sequence and Structure*、101～110ページ(第5巻、National Biomedical Research Foundation(1972))およびこの巻の1～10ページの追録2を参照のこと。2つの配列またはその一部分は、ALIGNプログラムを使用して最適にアライメントをとるとき、それらのアミノ酸が50%以上同一である場合、より好ましくは相同的である。用語「～に対応する」を本明細書で使用して、ポリヌクレオチド配列が参照ポリヌクレオチド配列の全体または一部分と相同的である(すなわち、進化上厳密に関連はないが同一である)こと、あるいはポリヌクレオチド配列が参照ポリヌクレオチド配列と同一であることを意味する。対照的に、用語「～と相補的である」を本明細書で使用して、相補配列が参照ポリヌクレオチド配列の全体または一部分と相同的であることを意味する。例示のため、ヌクレオチド配列「TATAC」は参照配列「TATAC」に対応し、参照配列「GTATA」と相補的である。

【0064】

以下の用語を使用して、2つ以上のポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の配列関係を記載する:「参照配列」、「比較ウインドウ」、「配列同一性」、「配列同一性の割合」、および「実質的同一性」。「参照配列」は、配列比較用の基盤として使用する定義済み配列であり、参照配列は、大きな配列のサブセット、例えば配列表中に与えられる完全長cDNAまたは遺伝子配列のセグメントとして存在してよく、あるいは完全なcDNAまたは遺伝子配列を含むことができる。一般に参照配列は、少なくとも18ヌクレオチドまたは6アミノ酸長であり、頻繁には少なくとも24ヌクレオチドまたは8アミノ酸長であり、しばしば少なくとも48ヌクレオチドまたは16アミノ酸長である。2つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、(1)2つの分子間で類似している配列(すなわち、完全なポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の一部分)をそれぞれ含むことができ、(2)2つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列間で異なる配列をさらに含むことができるので、2つ(またはそれを超える)分子間の配列の比較は、「比較ウインドウ」で2分子の配列を比較して、局所領域の配列類似性を確認および比較することによって典型的には行う。本明細書で使用する「比較ウインドウ」は、少なくとも18の隣接ヌクレオチド位置または6アミノ酸の概念上のセグメントを指し、ポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、少なくとも18の隣接ヌクレオチドまたは6アミノ酸配列の参照配列と比較することができ、比較ウインドウ中のポリヌクレオチド配列の一部分は、2配列の最適アライメント用の(付加または欠失を含まない)参照配列と比較して、20パーセント以下の付加、欠失、置換など(すなわちギャップ)を含むことができる。比較ウインドウを一直線に並べるための配列の最適アライメントは、SmithおよびWatermanのAdv. Appl. Math. 2:482(1981)の局所相同性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch J. Mol. Biol. 48:443(1970)の相同性アライメントアルゴリズムによって、PearsonおよびLipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444(1988)

の類似性検索法によってこれらのアルゴリズムをコンピュータで実行することによって(GAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA in the Wisconsin Geneticsソフトウェアパッケージリリース7.0、(Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison、Wis.)、Geneworks、またはMacVectorソフトウェアパッケージ)、あるいは調査によって行うことができ、様々な方法によって生じる最適アラインメント(すなわち、比較ウインドウで最も高い相同意性の割合をもたらす)を選択する。

【0065】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列が、比較ウインドウで同一であることを意味する(すなわち、ヌクレオチド毎または残基毎のベースで)。用語「配列同一性の割合」は、比較ウインドウで2つの最適にアラインメントをとる配列を比較すること、同一の核酸塩基(例えばA、T、C、G、UまたはI)あるいは残基が両方の配列に存在する位置の数を測定しマッチする位置の数を得ること、マッチする位置の数を比較ウインドウ中の位置の全体数(すなわちウインドウサイズ)で割ること、およびその結果に100を掛けて配列同一性の割合を得ることによって計算する。本明細書で使用する用語「実質的同一性」は、ポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の性質を示し、ポリヌクレオチドまたはアミノ酸は、少なくとも18ヌクレオチド(6アミノ酸)位置の比較ウインドウ、頻繁に少なくとも24~48ヌクレオチド(8~16アミノ酸)位置のウインドウで参照配列と比較して、少なくとも85パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90~95パーセントの配列同一性、さらに通常では少なくとも99パーセントの配列同一性を有する配列を含み、配列同一性の割合は、比較ウインドウで参照配列の合計20パーセント以下の欠失または付加を含むことができる配列と、参照配列を比較することによって計算する。参照配列は、大きな配列のサブセットであってよい。野生型タンパク質または核酸と実質的同一性を有するアミノ酸または核酸は、その野生型タンパク質または核酸の変異体の例である。

【0066】

本明細書で使用するように、20個の従来のアミノ酸およびそれらの略称は従来の使用に従う。Immunology-A Synthesis(第2版、E.S.Golub and D.R.Gren、Eds.、Sinauer Associates、Sunderland、Mass.(1991))を参照のこと。20個の従来のアミノ酸の立体異性体(例えば、D-アミノ酸)、非天然アミノ酸、例えば-、-二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸など、乳酸、および他の非従来的アミノ酸も、本発明のポリペプチドの適切な要素である可能性がある。非従来的アミノ酸の例には4-ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタミン酸、-N,N,N-トリメチルリシン、-N-アセチルリシン、0-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、-N-メチルアルギニン、ならびに他の類似のアミノ酸およびイミノ酸(例えば4-ヒドロキシプロリン)がある。本明細書で使用するポリペプチド表記では、標準的な使用および慣習に従い、左手方向がアミノ末端方向であり、右手方向がカルボキシ末端方向である。

【0067】

同様に、他に示さない限り、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左手端が5'端であり、二本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向を5'方向と呼ぶ。5'から3'への新生RNA転写物の付加の方向を転写方向と呼び、RNAと同じ配列を有しRNA転写物の5'から5'端であるDNA鎖上の配列領域は「上流配列」と呼び、RNAと同じ配列を有しRNA転写物の3'から3'端であるDNA鎖上の配列領域は「下流配列」と呼ぶ。

【0068】

ポリペプチドに適用する用語「実質的同一性」は、2つのペプチド配列は、デフォルトギャップ加重値を使用するプログラムGAPまたはBESTFITなどによって、最適にアラインメントをとると、少なくとも80パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも95パーセントの配列同一性、および最も好ましくは少なくとも99パーセントの配列同一性を共有することを意味する。同一ではない残基の位置は、保存アミノ酸置換によって異なることが好ましい。保存アミノ酸置換は、類似の側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族ヒドロキシル側

10

20

30

40

50

鎖を有するアミノ酸の群はセリンおよびスレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群はアスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群はフェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群はリシン、アルギニン、およびヒスチジンであり；ならびにイオウ含有側鎖を有するアミノ酸の群はシステインおよびメチオニンである。好ましい保存アミノ酸置換群はバリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸、およびアスパラギン-グルタミンである。実質的同一性を有するポリペプチドは変異体であってよい。

【0069】

変異体タンパク質は、わずかな変化を有するタンパク質も含む。本明細書で論じるように、抗体または免疫グロブリン分子のアミノ酸配列のわずかな変化は、本発明によって含まれるものとして企図される、ただし、アミノ酸配列の変化は少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、および最も好ましくは99%を保つものとする。特に、保存アミノ酸置換が企図される。

10

【0070】

保存置換は、それらの側鎖に関係があるアミノ酸のファミリー内で起こる置換である。遺伝的にコードされているアミノ酸は一般に以下のファミリーに分けられる：(1)酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸、(2)塩基性=リシン、アルギニン、ヒスチジン、(3)非極性=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、トリプトファンおよび(4)非電荷極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。より好ましいファミリーは：セリンおよびスレオニンは脂肪族ヒドロキシファミリーであり；アスパラギンおよびグルタミンはアミド含有ファミリーであり；アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンは脂肪族ファミリーであり；かつフェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは芳香族ファミリーである。例えば、ロイシンとイソロイシンまたはバリン、アスパラギン酸とグルタミン酸、スレオニンとセリンの単離置換、またはあるアミノ酸と構造上関連があるアミノ酸の同様の置換は、特にその置換がフレームワーク内のアミノ酸と関係がない場合は、生成する分子の結合または性質に対して重大な影響はない予想することができる。アミノ酸の変化が機能性ペプチドをもたらすかどうかは、ポリペプチド誘導体の特異的活性をアッセイすることによって容易に決定することができる。アッセイは本明細書に詳細に記載する。抗体または免疫グロブリン分子の断片または類似体は、当業者によって容易に調製することができる。断片または類似体の好ましいアミノおよびカルボキシ末端は、機能性ドメインの境界近辺に存在する。構造性および機能性ドメインは、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列データと、公のまたは専有の配列データベースを比較することによって同定することができる。コンピュータによる比較法を使用して、既知の構造および/または機能の他のタンパク質中に存在する、配列モチーフまたは予想されるタンパク質立体配座ドメインを同定することができる。既知の三次元構造へと折りたたまれているタンパク質配列を同定するための方法が知られている。Bowieら、Science 253:164(1991)。したがって前述の例は、当業者は配列モチーフおよび構造の立体配座を認識することができ、これらを使用して本明細書に記載する抗体の構造性および機能性ドメインを定義することができることを実証する。

20

30

40

【0071】

好ましいアミノ酸置換は、(1)タンパク質分解に対する感受性を低下させる、(2)酸化に対する感受性を低下させる、(3)タンパク質複合体形成に関する結合親和性を変える、(4)結合親和性を変える、および(4)このような類似体の他の物理化学的または機能的性質を与えるかまたは変える置換である。類似体は天然のペプチド配列以外の様々なムテイン配列を含むことができる。例えば、1つまたは多数のアミノ酸置換(好ましくは保存アミノ酸置換)は、天然の配列に(好ましくは、分子間接触部分を形成するドメインの外側のポリペプチド部分に)作製することができる。保存アミノ酸置換は、親配列の構造特性を実質的に変えないはずである(例えば置換アミノ酸は、親配列中に存在するヘリックスを破壊す

50

る、あるいは親配列を特徴付ける他のタイプの二次構造を乱す傾向はないはずである)。当分野で認められているポリペプチドの二次構造および三次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles(Creighton、Ed.、W.H.Freeman and Company、ニューヨーク(1984));Introduction to Protein Structure(C.Branden and J.Tooze、eds.、Garland Publishing、ニューヨーク、ニューヨーク(1991));およびThorntonら、Nature 354:105(1991)中に記載されている。

【0072】

本明細書で使用する用語「ポリペプチド断片」は、アミノ末端および/またはカルボキシ末端欠失を有するが、残りのアミノ酸配列は、例えば完全長cDNA配列から推定される天然の配列中の対応する位置と同一であるポリペプチドを指す。断片は典型的には少なくとも5、6、8または10アミノ酸長、好ましくは少なくとも14アミノ酸長、より好ましくは少なくとも20アミノ酸長、通常は少なくとも50アミノ酸長、およびさらにより好ましくは少なくとも70アミノ酸長である。本明細書で使用する用語「類似体」は、推定アミノ酸配列の一部分と実質的同一性を有する少なくとも25アミノ酸のセグメントを含むポリペプチドを指す。類似体は典型的には、少なくとも20アミノ酸長、好ましくは少なくとも50アミノ酸長以上であり、しばしば完全長の天然のポリペプチドと同じ長さであってよい。断片および類似体は変異体の形である。

【0073】

ペプチド類似体は、鑄型ペプチドの性質と類似の性質を有する非ペプチド薬剤として、製薬産業において一般的に使用されている。これらのタイプの非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣体」または「模倣ペプチド」と呼ばれる。Fauchere、J.Adv.Drug Res.15:29(1986);Veber and Freidinger TINS p.392(1985);およびEvansら、J.Med.Chem.30:1229(1987)。このような化合物は、コンピュータによる分子モデリングによって開発されることが多い。治療上有用なペプチドと構造的に類似しているペプチド模倣体を使用して、同等の治療または予防効果を生み出すことができる。一般に模倣ペプチドは、ヒト抗体などの、典型的ポリペプチド(すなわち、生化学的性質または薬理学的活性を有するポリペプチド)と構造的に類似しているが、当分野でよく知られている方法によって、-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂-CH₂-、-CH=CH- (シスおよびトランス)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-、および-CH₂SO-からなる群から選択される結合によって場合によっては置換されている1つまたは複数のペプチド結合を有する。同じタイプのD-アミノ酸(例えば、L-リシンの代わりにD-リシン)による、コンセンサス配列の1つまたは複数のアミノ酸の系統的置換を使用して、より安定性のあるペプチドを作製することができる。さらに、コンセンサス配列または実質的に同一なコンセンサス配列変異体を含む制約型ペプチドを、例えばペプチドを環化する分子間ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を加えることによって、当分野で既知の方法によって作製することができる(Rizo and Giersch Ann.Rev.Biochem.61:387(1992))。ペプチド模倣体および模倣ペプチドは、いずれも変異体の形である。

【0074】

「抗体」または「抗体ペプチド」は、完全抗体、または、完全抗体と特異的に競合する結合断片を指す。組換えDNA技法によって、あるいは完全抗体の酵素または化学的切断によって、結合断片を生成させる。結合断片にはFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、および単鎖抗体がある。「二重特異性」または「二機能性」抗体以外の抗体は、その結合部位のそれぞれが同一であると理解される。過剰な抗体が抗受容体と結合する受容体の量を、(in vitro 競合結合アッセイで測定して)少なくとも約20%、40%、60%または80%、およびさらに通常は約85%より多く減少させると、抗体は受容体と抗受容体の接着を実質的に阻害する。

【0075】

用語「エピトープ」は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体と特異的に結合することができ、あるいは他の場合は分子と相互作用することができる任意のタンパク質抗原決定基を含む。エピトープ抗原決定基は一般に、アミノ酸または炭水化物または糖側鎖などの分子の化学的活性がある表面の基からなり、特異的な三次元構造特性、および特異的な電荷特性を一般に有する。エピトープは「直鎖状」または「立体配座状」であってよい。直鎖

10

20

30

40

50

状エピトープでは、タンパク質と相互作用分子(抗体など)の間のすべての相互作用点が、そのタンパク質の一次アミノ酸配列に沿って直線状に存在する。立体配座状エピトープでは、相互作用点は互いに離れたタンパク質のアミノ酸残基中に存在する。解離定数が 1 μ M、好ましくは 100nM、およびさらに好ましくは 10nM、および一層さらに好ましくは 1nMであるとき、抗体は抗原と特異的に結合すると言える。ひとたび抗原上の所望のエピトープを決定した後、例えば本発明において記載する技法を使用して、そのエピトープに対する抗体を作製することができる。あるいは、発見プロセス中に、抗体の作製および特徴付けによって、望ましいエピトープに関する情報を解明することができる。この情報から、同じエピトープとの結合に関して抗体を競合的にスクリーニングすることができる。これを達成するための手法は、交差競合試験を行って互いに競合的に結合する抗体、例えば抗原との結合に関して競合する抗体を発見することである。それらの交差競合に基づいて抗体を「ピンニング」するためのハイスループット法は、国際特許出願No.WO03/48731中に記載されている。当業者によって理解されるように、実際、抗体が特異的に結合することができる任意のものがエピトープであると思われる。エピトープは、抗体が結合する残基を含むことができる。一実施形態では、エピトープはEGFRvIIIエピトープである。より好ましい実施形態では、エピトープは本明細書の実施例4に記載するエピトープである。一実施形態では、エピトープは実施例14に記載するエピトープである。一実施形態では、エピトープは配列LEEKKGNYVVT(配列番号59)を含む。一実施形態では、エピトープは配列EEKKGNVVT(配列番号57)を含む。一実施形態では、エピトープは配列EKNY(配列番号60)を含む。一実施形態では、エピトープは配列EEKGN(配列番号61)を含む。実際これらを1つのペプチド上にこの順で構築する必要はなく、これらはパラトープと相互作用するエピトープを形成する残基であることを、当業者は理解するであろう。当業者によって理解されるように、分子の形状を作製する残基または側鎖によって占められる空間は、エピトープが何であるかを決定するのに役立つ。同様に、エピトープ、ファンデルワールス相互作用、側鎖の移動度などと関係がある任意の官能基はいずれも、エピトープが実際何であるかを決定することができる。したがって、エピトープはエネルギー相互作用も含むことができる。

【0076】

用語「パラトープ」は、エピトープとの結合を決定する結合領域の一般的構造を記載することを意味する。この構造は、結合領域がエピトープと結合するかしないか、あるいはその形式に影響を与える。パラトープは、抗体またはその断片と抗原を結合させることを担う抗体の抗原部位を指すことができる。パラトープは抗体のイディオトープ、およびエピトープとの結合する領域である相補性決定領域(CDR)も指す。一実施形態では、パラトープは図11中のL1 10、L2 30、L3 50、H1 20、H2 40、およびH3 60である抗体の領域である。一実施形態では、パラトープはL1、L2、L3、H1、H2、およびH3に関する実施例16中のCDR配列を含む抗体の領域である。一実施形態では、パラトープは図12中のL1 110、L2 130、L3 150、H1 120、H2 140、およびH3 160である抗体の領域である。一実施形態では、パラトープはL1、L2、L3、H1、H2、およびH3に関する実施例18中のCDR配列を含む抗体の領域である。一実施形態では、パラトープは実施例18に列挙する配列を含む。一実施形態では、図13Aおよび図13B中に示すように、パラトープはエピトープと相互作用する残基を含む。中実の黒い構造はペプチド構造である。一実施形態では、パラトープは13.1.2mAbの残基Tyr172Argを含む。一実施形態では、13.1.2mAbのパラトープはTyr172Arg、Arg101Glu、Leu99Asn、Leu99His、Arg101Asp、Leu217Glu、Leu99Thr、Leu217Asn、Arg101Gln、およびAsn35Glyからなる群から選択される少なくとも1つの残基を含む。当業者によって理解されるように、任意の抗体またはその変異体のパラトープは、本出願によって述べる方法で決定することができる。それらが結合エネルギーの10%に貢献すると予想される場合、残基は「重要である」と考えられる。一実施形態では、それらが結合エネルギーの2%に貢献すると予想される場合、残基は「重要である」と考えられる。一実施形態では、それらが結合エネルギーの50%に貢献すると予想される場合、残基は「重要である」と考えられる。一実施形態では、それらがエピトープの表面、またはパラトープの表面と相互作用

10

20

30

40

50

すると予

想される場合、残基は「重要である」と考えられる。一実施形態では、残基を変えることによって結合の損失をもたらす場合、残基は「重要である」と考えられる。

【0077】

用語「特異的に」または「優先的に」結合する、または同様のフレーズは、抗体がそのエピトープに独占的に結合することを示すこと意味するわけではない。そうではなく、抗体またはその変異体が、抗体が曝される少なくとも1つの他の物質と抗体が結合するより高い程度で、そのエピトープと結合することができるることを意味する。一実施形態では、特異的に結合する抗体は、それがEGFRタンパク質と結合するより、高い親和性(より強い、あるいは低い K_D)でEGFRvIIIタンパク質と結合するであろう。例えば、特異的に結合する抗体は、少なくとも1、1~2、2~5、5~10、10~20、20~30、30~50、50~70、70~90、90~120、120~150、150~200、200~300、300~500、500~1000パーセント以上までの最小増大率でより強く結合するであろう。10

【0078】

アミノ酸の略語、数、アミノ酸、例えばLeu217Glnは、第1のアミノ酸から第2のアミノ酸の番号付けしたアミノ酸における変異を表す。したがってTyr172Argは、野生型タンパク質は位置172にチロシンを有するが、変異体は位置172にアルギニンを有することを意味すると思われる。

【0079】

用語「物質」を本明細書で使用して、化学化合物、化学化合物の混合物、生物マクロ分子、または生物物質から作製した抽出物を表す。20

【0080】

「哺乳動物」は、本明細書で使用すると、哺乳動物であると考えられる任意の動物を指す。哺乳動物はヒトであることが好ましい。

【0081】

酵素、パパインによる抗体の消化によって、「Fab」断片としても知られる2つの同一の抗原結合断片、および、抗原結合活性は有さないが結晶化する能力は有する「Fc」断片が生成する。酵素、ペプシンによる抗体の消化によって、抗体分子の2つのアームが結合した状態であり2つの抗原結合部位を含む $F(ab')_2$ 断片が生成する。 $F(ab')_2$ 断片は、抗原を架橋させる能力を有する。30

【0082】

「Fv」は本明細書で使用する場合、抗原認識部位と抗原結合部位の両方を保持する抗体の最小断片を指す。これらの断片は、抗体の変異体と考えることもできる。

【0083】

「Fab」は本明細書で使用する場合、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖のCH1ドメインを含む抗体の断片を指す。

【0084】

用語「mAb」は、モノクローナル抗体を指す。

【0085】

抗体配列を作製したXenoMax法の記載は以下のように示す：「AB」は抗体を指し、「EGFRvIII」は抗体の結合特異性を指し、「X」はXenoMouseマウス由来であることを指し、「G1」はIgG1アイソタイプを指し、あるいは「G2」はIgG2アイソタイプを指し、最後の三桁は抗体が由來した単細胞ナンバーを指し、例えば：AB-EGFRvIII-XG1-095は、IgG1アイソタイプおよび細胞ナンバー95のXenoMouseマウス由来のEGFRvIIIとの、結合特異性を有する抗体であると思われる。40

【0086】

用語「SC」は単細胞を指し、個々のXenoMax法由来の抗体は、本明細書の抗体が由來した単細胞ナンバーを指すSCおよび三桁、または単に三桁として呼ぶことができる。

【0087】

ハイブリドーマ由来抗体配列の記載は以下のように示す：「AB」は抗体を指し、「EGFRv

50

「III」は抗体の結合特異性を指し、「X」はXenoMouseマウス由来であることを指し、「G1」はIgG1アイソタイプを指し、あるいは「G2」はIgG2アイソタイプを指し、「K」はkappaを指し、「L」はlambdaを指す。最後の三桁は抗体が由來したクローンナンバーを指し、例えば:AB-EGFRvIII-XG1K-13.1.2である。

【0088】

本明細書で使用する「標識」または「標識された」は、検出可能な成分、例えば放射標識、蛍光標識、酵素標識、化学発光標識、またはビオチニル基をポリペプチドに加えることを指す。放射性同位体または放射性核種は³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹Iを含むことができ、蛍光標識はローダミン、ランタニド、リンまたはFITCを含むことができ、酵素標識はホースラディッシュペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼを含むことができる。

10

【0089】

本明細書で使用する用語「薬剤物質または薬剤」は、患者に適切に投与すると望ましい治療効果を誘導することができる、化学化合物または組成物を指す。本明細書の他の化学用語は、The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(Parker, S., Ed., McGraw-Hill、サンフランシスコ(1985))によって例示されたのと同様に、当分野の従来の使用に従つて使用する。

【0090】

本明細書で使用する「実質的に純粋である」は、ある物体種が存在する主要な種である(すなわち、モル単位で、組成物中の任意の他の個々の種よりそれが多量に存在する)、および好ましくは実質的に精製された分画は、その物体種が(モル単位で)存在する全マクロ分子種の少なくとも約50パーセントを構成する組成物であることを意味する。一般に、実質的に純粋である組成物は、組成物中に存在する全マクロ分子種の約80パーセントより多く、より好ましくは約85%、90%、95%、99%、および99.9%より多くを含むであろう。組成物が一種のマクロ分子種から本質的になる、ほぼ均質な状態(従来の検出法によって混入物質種を組成物中に検出することができない)まで、物体種を精製することが最も好ましい。

20

【0091】

用語「患者」は、ヒトおよび家畜被験体を含む。

【0092】

30

用語「SLAM(登録商標)技術」は、「Selected Lymphocyte Antibody Method」(Babcockら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、93:7843～7848(1996)、およびSchrader、米国特許第5,627,052号)を指す。

【0093】

用語「XenoMax(商標)」は、(以下に記載するように)XenoMouse(登録商標)マウスを用いるSLAM技術を使用することを指す。

【0094】

(抗体構造)

基本的な抗体の構造単位は、テトラマーを含むことが知られている。それぞれのテトラマーは、それぞれの対が1つの「軽」鎖(約25kDa)および1つの「重」鎖(約50～70kDa)を有する、ポリペプチド鎖の2つの同一な対から構成される。それぞれの鎖のアミノ末端部分は、抗原認識を主に担う約100～110以上のアミノ酸の可変領域を含む。それぞれの鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主に担う定常領域を定義する。ヒト軽鎖はkappaおよびlambda軽鎖としてクラスされる。重鎖はmu、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンとしてクラスされ、それぞれIgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして抗体のアイソタイプを定義する。軽鎖および重鎖内では、可変領域と定常領域は約12以上のアミノ酸の「J」領域によって接合しており、重鎖は約10以上のアミノ酸の「D」領域も含む。Fundamental Immunology Ch.7(Paul, W., ed.、第2版.Raven Press、ニューヨーク(1989))を概略的に参照のこと。それぞれの軽鎖/重鎖対の可変領域が、抗体結合部位を形成する。

40

。

50

【0095】

したがって、完全抗体は2つの結合部位を有する。二機能性または二重特異的抗体を除けば、2つの結合部位は同じである。

【0096】

鎖はいずれも、相補性決定領域すなわちCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって接合された、同じ一般構造の比較的保存されたフレームワーク領域(FR)を示す。それぞれの対の2つの鎖由来のCDRはフレームワーク領域近くに一直線に並び、特定のエピトープとの結合を可能にする。N末端からC末端に、軽鎖および重鎖はドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。それぞれのドメインへのアミノ酸のアサイメントは、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1987および1991))、またはChothia & Lesk J.Mol.Biol.196:901～917(1987);Chothiaら、Nature 342:878～883(1989)の定義に従う。

【0097】

二重特異的または二機能性抗体は、2つの異なる重鎖/軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。二重特異的抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結を含めた、様々な方法によって生成することができる。例えば、Songsivilai & Lacbmann Clin.Exp.Immunol.79:315～321(1990)、Kostelnýら、J.Immunol.148:1547～1553(1992)を参照のこと。二重特異的抗体の生成は、従来の抗体の生成と比較して比較的困難なプロセスである可能性があり、二重特異的抗体の収率および純度は一般に低い。二重特異的抗体は、1つの結合部位を有する断片(例えばFab、Fab'、およびFv)の形では存在しない。

【0098】

抗体の一般的な構造態様以外に、パラトープとエピトープの間のさらに特異的な相互作用を、構造的手法によって調べることができる。一実施形態では、CDRの構造はパラトープを形成し、それによって抗体はエピトープと結合することができる。このようなパラトープの構造はいくつかの方法によって決定することができる。NMRまたはX線結晶学などの、伝統的な構造解析手法を使用することができる。これらの手法はパラトープ単独の構造を、あるいはそれがエピトープと結合している構造を調べることができる。あるいは、分子モデルをin silicoで作製することができる。Accelrys(サンディエゴ、CA)からのInsightIIモデリングパッケージなどの市販のパッケージ品による相同性モデリングを介して、構造体を作製することができる。簡潔には、調べる抗体の配列を使用して、タンパク質データバンクなどの、既知の構造のタンパク質のデータベースで検索することができる。既知の構造を有する相同タンパク質を同定した後、これらの相同タンパク質はモデル鑄型として使用する。考えられる鑄型のそれぞれを一直線に並べ、これによって鑄型間の配列アラインメントに基づく構造を生成することができる。未知の構造を有する抗体の配列をこれらの鑄型と次いで一直線に並べて、未知の構造を有する抗体に関する分子モデルを作製することができる。当業者によって理解されるように、このような構造体をin silicoで作製するための多くの代替法が存在し、それらはいずれも使用することができる。例えば、QUANTA(Polygen Corp.、Waltham、Mass.)およびCHARM(Brooks、B.R.、Bruccoleri、R.E.、Olafson、B.D.、States、D.J.、Swaminathan、S.およびKarplus、M.、1983、J.Comp.Chem. 4:187)を使用する、Hardmanらに発行された米国特許第5,958,708号中に記載された方法と類似の方法を使用することができる。

【0099】

考えられるパラトープがエピトープと結合するかどうか、およびどの程度十分に結合するかを測定する際に重要なのはパラトープの形状だけではなく、エピトープとパラトープの間の相互作用自体も、変異体抗体の設計における重要な情報源である。当業者によって理解されるように、この相互作用を試験することができる様々な方法が存在する。1つの方法は、おそらく前に記載したのと同様に作製した構造モデルを使用すること、次いでドッキング単位を有し特にパラトープとそのエピトープの間の立体配座および方向空間に関するMonte Carlo検索を行うことができる、InsightII(Accelrys、サンディエゴ、CA)など

10

20

30

40

50

のプログラムを使用することである。その結果は、どこでどのようにエピトープがパラトープと相互作用するかを推測できることである。一実施形態では、関連相互作用の測定を助けるのに、エピトープの断片、または変異体のみを使用する。一実施形態では、パラトープとエピトープの間の相互作用のモデル化において、完全なエピトープを使用する。当業者によって理解されるように、これら2つの異なる手法は異なる利点および欠点を有する。例えば、エピトープの断片のみを使用することによって、長い時間をかけずに、それぞれの側鎖の考えられる変化をより詳細に調べることができる。他方で、エピトープの断片のみ、あるいは完全タンパク質の代わりに単にエピトープを使用することによって、エピトープ断片の特性がエピトープ全体の特性と同じである可能性はなく、したがっておそらくコンピュータモデリング中に誤解する危険が増大すると考えられる。一実施形態では、両方の手法を限られた程度で使用して、結果をクロスチェックする。好ましい実施形態では、エピトープの変異体を使用する場合、エピトープの変異体がそのエピトープの最も重要な残基を含むように、それを最適化する。最も重要な残基の同一性は、例えば本明細書の実施例4および14中に記載したのと同様に、任意の方法で決定することができる。10

【0100】

これらの作製した構造体を使用することによって、どの残基がパラトープとエピトープの間の相互作用で最も重要であるかを決定することができる。したがって一実施形態では、どの残基を変更して抗体の結合特性を変えるかを容易に選択することができる。例えば、ドッキングモデルを用いれば、パラトープ中のいくつかの残基の側鎖はエピトープの結合を立体的に妨げる可能性があるので、これらの残基を小さな側鎖を有する残基に変えることは利点があることを明らかにできる。これは多くの方法で決定することができる。例えば、単に2つのモデルを見て、官能基および近接性に基づいて相互作用を推測することができる。あるいは、前に記載したのと同様にエピトープとパラトープの繰り返しの対合を行って、より好ましいエネルギー相互作用を得ることができる。様々な抗体の変異体に関するこれらの相互作用を測定して、抗体をエピトープと結合させることができると他の方法を決定することもできる。様々なモデルを組み合わせて、抗体の構造をどのようにして変えて、望ましい特定の性質を有する抗体を得るべきかを決定することもできる。20

【0101】

前で決定したモデルは、様々な技法によって試験することができる。例えば、前に論じたプログラムを用いて相互作用エネルギーを測定して、どの変異体をさらに調べるかを決定することができる。さらに、クローンおよびファンデルワールス相互作用を使用して、エピトープと変異体パラトープの相互作用エネルギーを測定する。さらに、部位特異的変異誘発を使用して、抗体構造の予想される変化が実際に望ましい結合性の変化をもたらすかどうかを調べる。あるいは、エピトープに変化を施して、そのモデルが正確であるかを確認することができ、あるいはパラトープとエピトープの間に存在する可能性がある一般的な結合性を決定することができる。30

【0102】

構造をモデリングするための前述の方法を使用して、タンパク質構造のどのような変化が抗体の個々の望ましい特性をもたらすかを決定することができる。これらの方法を使用して、タンパク質構造のどのような変化が望ましい特性をもたらさないかを決定することができる。40

【0103】

当業者によって理解されるように、これらのモデルは本発明の実施形態の抗体およびその変異体を作製するのに必要な指針を与える一方で、*in silico*モデルの通常の試験を、おそらく*in vitro*試験によって行うことが依然として望ましい場合がある。さらに、当業者に明らかであるように、任意の変更は抗体の活性に対して他の副作用があることもある。例えば、大きな結合をもたらすと予想される任意の変更が大きな結合を誘導することがあるが、抗体の活性を低下させるあるいは変える可能性がある他の構造変化を、引き起こす場合もある。これが当てはまるかどうかの決定は当分野では通常のことであり、多くの方法で行うことができる。例えば、実施例21中と同様のELISA試験によって、活性を試50

験することができる。あるいは、表面プラズモン共鳴装置を使用することによって、サンプルを試験することができる。

【0104】

(抗体の結合、および優勢結合の変異体抗体)

一実施形態では、抗体のエピトープに対する結合能力を増大させるために、前に記載したモデルを使用する。抗体はエピトープとさらに容易に結合することができ、したがって高い結合定数(k_a)を有する。あるいは、抗体はエピトープからゆっくりと解離することができ、したがって低い解離定数(k_d)を有し、あるいはエピトープ-パラトープ相互作用の K_D は値が小さい可能性があり、したがってエピトープとパラトープの間の結合度が高くなる可能性がある。

10

【0105】

いくつかの実施形態では、正反対の特性と結び付くように変異体抗体を設計する。すなわち、抗体は強く結合しない、または、おそらくは素早く結合しない。

【0106】

他の実施形態では、変異体抗体は野生型抗体とそれらの K_D は異なるが、それらの変異体抗体は特定のエピトープにはより特異的である。これは設計した抗体のパラトープが、他のエピトープと結合する可能性が低いことを意味する可能性がある。抗体は、既に改変されている他の特性を有する可能性がある。例えば、変異体は抗体の非特異的結合に影響を受けない可能性があり、あるいは抗体が高濃度で存在するときでも、溶液中に溶けた状態である可能性がある。このような変異体は、論じる抗体に存在する可能性がある。例えば、以下で調べた高濃度のいくつかの変異体抗体、例えば13.1.2mAbは、Biacore実験において、ゆっくり結合する要素を生成したが、いくつかの変異体、例えばL217N-2.1は同じ濃度でもこのゆっくり結合する要素を示さなかった。

20

【0107】

前に決定したモデルによって予想した変異体は作製することができ、次いでこれらを試験して、それらが実際望ましい特性と結び付くかどうかを決定することができる。エピトープとのより大きな合計相互作用エネルギーを有する変異体を、他の試験用に選択することができる。相互作用エネルギーはいくつかの方法で測定することができ、その1つは前に記載している。

【0108】

30

これらの変異体は、いくつかの方法で試験することができる。代表的なオプションには、KinExA(例えば、1994年12月13日にLackieに発行された米国特許第5,372,783号)(Sapidyne Instruments Inc.、ID、Boise)、表面プラズモン共鳴(SPR)(例えば、BIACORE(商標)Biacore、Inc.、Piscataway、NJ.)、ストップドフロー蛍光法、共鳴反射法、および蛍光分極法があるが、これらだけには限られない。これらのオプションの多くはデータを記録することができるだけでなく、データを様々な理論曲線に適合させ、それによって k_a 、 k_d 、および K_D 、ならびに他の性質を決定するための、容易な手段を与えることができる。これらの曲線と生じるデータの適合は、いくらかの変化に関する可能性なしでは行えないことを記すことは重要である。このため、関連する結合、解離、および平衡定数は、これらの曲線に適合させて求めるだけでなく、互いの直接の比較によっても求め、そして、当業者の知識に照らして求めることもできる。

40

【0109】

(ヒト抗体および抗体のヒト化)

ヒト抗体は、マウスまたはラット可変領域および/または定常領域を有する抗体に関するいくつかの問題点を回避する。このようなマウスまたはラット由来タンパク質の存在は抗体の迅速な除去をもたらす可能性があり、あるいは患者による抗体に対する免疫応答の生成をもたらす可能性がある。マウスまたはラット由来抗体の使用を避けるために、げっ歯類が完全ヒト抗体を生成するように、げっ歯類にヒト抗体の機能を導入することによって、完全ヒト抗体を作製することができる。

【0110】

50

YAC中のメガベースの大きさのヒト遺伝子座をクローニングおよび再構築し、それらをマウス生殖細胞系中に導入する能力は、巨大または大まかにマッピングされた遺伝子座の機能要素を解明するための、ならびに、ヒト疾患の有用なモデルを作製するための強力な手法を与える。さらに、マウス遺伝子座とそのヒトの相当する遺伝子座を置換するためのこのような技術の使用は、発生中のヒト遺伝子産物の発現および調節、他のシステムとの情報伝達、および疾患の誘導および進行におけるそれらの関与についての有用な知見を与えると思われる。

【0111】

のような戦略の重要で実際的な適用例は、マウス体液性免疫系の「ヒト化」である。ヒト免疫グロブリン(Ig)遺伝子座を、内在性Ig遺伝子が不活性状態であるマウスに導入することによって、プログラム化された発現および抗体の構築、ならびにB細胞発生におけるそれらの役割の根底にある機構を研究するための機会が与えられる。さらに、このような戦略は、完全ヒトモノクローナル抗体(mAbs)-ヒト疾患における抗体療法の見込みを実現するための重要なマイルストーン-を生成するための理想的な供給源を与えると思われる。完全ヒト抗体は、マウスまたはマウス由来mAbに固有な免疫およびアレルギー応答を最小にし、したがって投与する抗体の有効性および安全性を高めると予想される。完全ヒト抗体の使用は、繰り返しの抗体投与を必要とする炎症、自己免疫疾患、および癌などの慢性および再発性ヒト疾患の治療において、実質的な利点を与えると予想することができる。

【0112】

この目的のための1つの手法は、このようなマウスはマウス抗体が不在である大きなヒト抗体のレパートリーを生成することを見越して、ヒトIg遺伝子座の大きな断片を用い、マウス抗体生成に欠陥があるマウス系統を処理することであった。大きなヒトIg断片は、遺伝子の多様性、および抗体生成および発現の正確な調節を保つと思われる。抗体多様化および選択に関するマウスの機構、およびヒトタンパク質に対する免疫寛容性の欠如を利用することによって、これらのマウス系統において再生されたヒト抗体のレパートリーは、ヒト抗原を含めた当該の任意の抗原に対する高親和性抗体を生成するはずである。ハイブリドーマ技術を使用して、望ましい特異性を有する抗原特異的ヒトmAbを、容易に生成し選択することができると思われる。この一般的な戦略は、1994年に公開されたのと同様の、我々の第1のXenoMouseマウス系統の作製に関して実証された(Greenら、Nature Genetics 7:13 ~ 21(1994)を参照のこと)。XenoMouse系統は、それぞれヒト重鎖遺伝子座およびkappa軽鎖遺伝子座の245kbおよび190kbの大きな生殖細胞系配列断片(主要な可変および定常領域配列を含んでいた)を含む酵母人工染色体(YAC)を用いて処理した。すなわち、ヒトIg含有YACは、抗体の再編成および発現に関してマウス系と適合性があり、不活性マウスIg遺伝子を置換することができたことが分かった。B細胞発生を誘導し、完全ヒト抗体の成体様ヒトレパートリーを生成し、抗原特異的なヒトmAbを作製するそれらの能力によって、このことが実証された。これらの結果は、多数のV遺伝子を含むヒトIg遺伝子座の大部分、他の調節要素、およびヒトIg定常領域を導入することによって、感染および免疫処置に対するヒト体液性応答に特徴がある完全レパートリーを、実質的に再現することができることも示唆した。Greenらの研究は近年、それぞれヒト重鎖遺伝子座およびkappa軽鎖遺伝子座のメガベースの大きさの、生殖細胞系配列YAC断片を導入することによって、この導入をヒト抗体レパートリーの約80%より多くまで拡大した。Mendezら、Nature Genetics 15:146 ~ 156(1997)、および1996年12月3日に出願された米国特許出願第08/759,620号を参照のこと。

【0113】

XenoMouseマウスの生成は、1990年1月12日に出願された米国特許出願第07/466,008号、1990年11月8日に出願された米国特許出願第07/610,515号、1992年7月24日に出願された米国特許出願第07/919,297号、1992年7月30日に出願された米国特許出願第07/922,649号、1993年3月15日に出願された米国特許出願第08/031,801号、1993年8月27日に出願された米国特許出願第08/112,848号、1994年4月28日に出願された米国特許出願第08/234,145号、1

10

20

30

40

50

995年1月20日に出願された米国特許出願第08/376,279号、1995年4月27日に出願された米国特許出願第08/430,938号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/464,584号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/464,582号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/463,191号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/462,837号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/486,853号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/486,857号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/486,859号、1995年6月5日に出願された米国特許出願第08/462,513号、1996年10月2日に出願された米国特許出願第08/724,752号、および1996年12月3日に出願された米国特許出願第08/759,620号、ならびに米国特許第6,162,963号、米国特許第6,150,584号、米国特許第6,114,598号、米国特許第6,075,181号、および米国特許第5,939,598号、ならびに日本国特許3068180B2、日本国特許3068506B2、および日本国特許3068507B2中でさらに論じられ示されている。Mendezら、Nature Genetics 15:146~156(1997)、ならびにGreenおよびJakobovits J.Exp.Med.188:483~495(1998)も参照のこと。1996年6月12日に付与公開された欧州特許No.、EP0463151B1、1994年2月3日に公開された国際特許出願No.、W094/02602、1996年10月31日に公開された国際特許出願No.、W096/34096、1998年6月11日に公開されたW098/24893、2000年12月21日に公開されたW000/76310、W003/47336も参照のこと。
10

【0114】

他の手法では、GenPharm International、Inc.を含めた他者が、「ミニ遺伝子座」手法を使用してきている。ミニ遺伝子座手法では、Ig遺伝子座由来の(個々の遺伝子の)片を封入することによって、外来性のIg遺伝子座が模倣されている。したがって、1つまたは複数のV_H遺伝子、1つまたは複数のD_H遺伝子、1つまたは複数のJ_H遺伝子、μ定常領域、および第2の定常領域(好ましくはガンマ定常領域)が、動物中に挿入するための構築体中に形成される。この手法はSuraniらへの米国特許第5,545,807号、ならびにそれぞれLonbergおよびKayへの米国特許第5,545,806号、米国特許第5,625,825号、米国特許第5,625,126号、米国特許第5,633,425号、米国特許第5,661,016号、米国特許第5,770,429号、米国特許第5,789,650号、米国特許第5,814,318号、米国特許第5,877,397号、米国特許第5,874,299号、および米国特許第6,255,458号、ならびにKrimpenfortおよびBernsへの米国特許第5,591,669号および米国特許第6,023,010号、Bernsらへの米国特許第5,612,205号、米国特許第5,721,367号、および米国特許第5,789,215号、ならびにChoiおよびDunnへの米国特許第5,643,763号、および1990年8月29日に出願されたGenPharm国際米国特許出願第07/574,748号、1990年8月31日に出願された米国特許出願第07/575,962号、1991年12月17日に出願された米国特許出願第07/810,279号、1992年3月18日に出願された米国特許出願第07/853,408号、1992年6月23日に出願された米国特許出願第07/904,068号、1992年12月16日に出願された米国特許出願第07/990,860号、1993年4月26日に出願された米国特許出願第08/053,131号、1993年7月22日に出願された米国特許出願第08/096,762号、1993年11月18日に出願された米国特許出願第08/155,301号、1993年12月3日に出願された米国特許出願第08/161,739号、1993年12月10日に出願された米国特許出願第08/165,699号、1994年3月9日に出願された米国特許出願第08/209,741号中に記載されている。欧州特許No.0546073B1、国際特許出願Nos.W092/03918、W092/22645、W092/22647、W092/22670、W093/12227、W094/00569、W094/25585、W096/14436、W097/13852、およびW098/24884ならびに米国特許第5,981,175号も参照のこと。さらにTaylorら1992、Chenら1993、Tuailionら1993、Choiら1993、Lonbergら(1994)、Taylorら(1994)、およびTuailionら(1995)、Fishwildら(1996)を参照のこと。
30

【0115】

Kirinも、ミクロ細胞融合によって染色体の大きな片、または完全な染色体が導入されているマウスからの、ヒト抗体の作製を実証している。欧州特許出願Nos.773288および欧州特許出願Nos.843961を参照のこと。Xenerex Biosciencesは、可能性のあるヒト抗体の作製に関する技術を開発している。この技術では、ヒトリンパ細胞、例えばBおよび/またはT細胞を用いてSCIDマウスを再編制する。次いで抗原を用いてマウスを免疫し、抗原に対する免疫応答を生成することができる。米国特許第5,476,996号、米国特許第5,698,767
40

号、および米国特許第5,958,765号を参照のこと。

【0116】

ヒト抗マウス抗体(HAMA)応答は、キメラあるいはヒト化抗体の調製へと産業を導いている。キメラ抗体はヒト定常領域およびマウスの可変領域を有するが、いくつかのヒト抗キメラ抗体(HACA)応答が、特に抗体の慢性的な使用または高用量の使用において観察されるであろうと予想される。したがって、HAMAまたはHACA応答の懸念および/または影響を低下させるために、EGFRvIIIに対する完全ヒト抗体を供給することが望ましいと思われる。

【0117】

(抗体療法)

本明細書で論じるように、EGFRvIII抗体の機能は、その作用形式の少なくとも一部分に重要であるようである。機能によって、例えばEGFRvIIIに関して作用するEGFRvIII抗体の活性が意味される。したがっていくつかの点で、EGFRvIIIに対する治療候補としての抗体の作製に関して、抗体は補体を固定し細胞毒性リンパ球を補い、したがってCDCおよびADCに関与することができる望ましい可能性がある。以下の:マウスIgM、マウスIgG2a、マウスIgG2b、マウスIgG3、ヒトIgM、ヒトIgG1、ヒトIgG3、およびヒトIgAを非制限的に含めた、同じであることが可能であるいくつかのアイソタイプの抗体が存在する。さらに、EGFRvIIIに対する治療候補としての抗体の作製に関して、抗体はナチュラルキラー(NK)細胞などのエフェクター細胞上のFc受容体と関与することによって、抗体依存性細胞毒性作用(ADCC)を活性化することができることが望ましい可能性がある。以下の:マウスIgG2a、マウスIgG2b、マウスIgG3、ヒトIgG1、およびヒトIgG3を非制限的に含めた、ADCCが可能であるいくつかのアイソタイプの抗体が存在する。作製する抗体は最初にこのようなアイソタイプを有している必要はないが、作製する抗体は任意のアイソタイプを有し、その後で、当分野でよく知られている従来の技法を使用して、抗体のアイソタイプを変えることができることは理解されよう。このような技法には、特に直接的な組換え技法の使用(例えば米国特許第4,816,397号を参照のこと)、および細胞-細胞融合技法(例えば米国特許第5,916,771号および米国特許第6,207,418号)がある。

【0118】

細胞-細胞融合技法では、任意の望ましいアイソタイプを有する重鎖を有するミエローマまたは他の細胞系を調製し、軽鎖を有する他のミエローマまたは他の細胞系を調製する。このような細胞は後に融合させることができ、完全抗体を発現する細胞系を単離することができる。

【0119】

例えば、本明細書で論じるいくつかの抗EGFRvIII抗体は、ヒト抗EGFRvII IgG1抗体である。このような抗体がEGFRvIII分子との望ましい結合性を有する場合、それは容易にアイソタイプを変えて、(抗体の特異性およびその親和性のいくらかを定義する)同じ可変領域を有しながらヒトIgM、ヒトIgG3、またはヒトIgGAを作製することができると思われる。IgG1を含めたこのような分子は、補体を固定しCDCに関与することができると思われ、IgG1またはIgG3定常領域を含む場合、このような分子は細胞毒性リンパ球を補うことによって、抗体依存性細胞毒性作用(ADCC)に関与することもできると思われる。

【0120】

したがって、抗体として、前に論じたのと同様の望ましい「構造」特性を満たす候補を作製し、それらは一般にアイソタイプを変えることによって、少なくともいくつかの望ましい「機能」特性を備えることができる。

【0121】

(他の療法の設計および作製)

EGFRvIIIに関して本明細書で生成および特徴付けする抗体の活性に基づいて、抗体成分以外の他の療法のモダリティの設計を容易にする。このようなモダリティには非制限的に、最新の抗体療法剤、例えば二重特異的抗体、免疫毒素、および放射標識療法剤など、ペプチド療法剤、遺伝子療法剤、特に細胞内発現抗体、アンチセンス療法剤、および小分子の作製がある。

10

20

30

40

50

【0122】

最新の抗体療法剤の作製に関しては、補体固定および細胞毒性リンパ球の補充が望ましい特性である場合、例えば二重特異的抗体、免疫毒素、または放射標識を使用することによって細胞殺傷性を高めることができる。

【0123】

例えば、二重特異的抗体に関しては、(i)1つがEGFRvIIIに対する特異性を有し、もう1つが一緒に結合する第2の分子に対する特異性を有する2つの抗体、(ii)EGFRvIIIに対して特異的な一本の鎖、および第2の分子に対して特異的な第2の鎖を有する1つの抗体、または(iii)EGFRvIIIおよび他の分子に対する特異性を有する単鎖抗体を含む、二重特異的抗体を作製することができる。このような二重特異的抗体は、よく知られている技法を使用して作製することができ、例えば(i)および(ii)に関しては、例えば、Fangerら、Inununo I Methods 4:72~81(1994)、ならびにWrightおよびHarris上記を参照し、および(iii)に関しては、例えば、Trauneckerら、Int.J.Cancer(Suppl)7:51~52(1992)を参照のこと。それぞれの場合、CD16またはCD64(例えば、Deoら、18:127(1997)を参照のこと)CD3(MicrometのBiTE技術)またはCD89(例えば、Valeriusら、Blood90:4485~4492(1997)を参照のこと)を非制限的に含むFc鎖活性受容体に、第2の特異性を施すことができる。前述の事項に従い調製した二重特異的抗体は、EGFRvIIIを発現する細胞、特に本発明のEGFRvIII抗体が有効である細胞を殺傷する可能性があると思われる。

10

【0124】

免疫毒素に関しては、当分野でよく知られている技法を使用して、抗体を改変して免疫毒素として作用させることができる。例えば、Vitetta Immunol Today 14:252(1993)を参照のこと。米国特許第5,194,594号も参照のこと。放射標識抗体の調製に関しては、このような改変型抗体は、当分野でよく知られている技法を使用して容易に調製することができる。例えば、Junghansら、in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655~686(第2版、Chafner and Longo、eds.、Lippincott Raven(1996))を参照のこと。米国特許第4,681,581号、米国特許第4,735,210号、米国特許第5,101,827号、米国特許第5,102,990号(RE35,500)、米国特許第5,648,471号、および米国特許第5,697,902号も参照のこと。それぞれの免疫毒素および放射標識分子は、EGFRvIIIを発現する細胞、特に本発明のEGFRvIII抗体が有効である細胞を殺傷する可能性があると思われる。

20

【0125】

抗体はエピトープとさらに迅速に結合し、エピトープからさらにゆっくりと解離するよう設計することができ、したがって抗体自体が設計された治療剤である可能性がある。抗体の改変された特性は、例えば患者への治療剤の投与において使用することができる。

30

【0126】

(治療用免疫複合体)

理解されるように、薬剤、毒素、または他の分子と結合した抗体(免疫複合体または免疫毒素)は、抗体などの特異的結合分子によって特異的に結合することができる分子を発現する細胞を、標的殺傷する際に非常に有用である。前に論じたように、EGFRvIIIが任意の正常組織において発現されることは知られていない。さらにEGFRvIIIは、多数のヒト腫瘍において顕著な発現を示す。したがってEGFRvIIIは、免疫毒素を用いた標的として非常に魅力的な分子である。

40

【0127】

モノクローナル抗体-薬剤複合体を用いて行った腫瘍細胞の特異的標的化に関して、多くの報告がなされている(Selaら、Immunoconjugates 189~216(C.Vogel、ed.1987)中;Ghoseら、Targeted Drugs 1~22(E.Goldberg、ed.1983)中;Dienerら、Antibody Mediated Delivery Systems 1~23(J.Rodwell、ed.1988)中;Pieterszら、Antibody Mediated Delivery Systems 25~53(J.Rodwell、1988)中;Bumolら、Antibody Mediated Delivery Systems 55~79(J.Rodwell、1988)中)。メトトレキセート、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ビングラスチン、メルファラン、マイトマイシンC、およびクロラムブシルなどの細胞毒性薬剤を、様々なマウスモノクローナル抗体と結合させている。いくつか

50

の場合、血清アルブミン(Garnettら、Cancer Res.46:2407～2412(1986);Ohkawaら、Cancer Immunol. Immunother.23:81～86(1986);Endoら、Cancer Res.47:1076～1080(1980))、デキストラン(Hurwitzら、Appl.Biochem.2:25～35(1980);Manabiら、Biochem.Pharmacol.34:289～291(1985);Dillmanら、Cancer Res.46:4886～4891(1986);Shovalら、Proc.Natl.Acad.Sci. 85:8276～8280(1988))、またはポリグルタミン酸(Tsukadaら、J.Natl.Canc.Inst.73:721～729(1984);Katoら、J.Med.Chem.27:1602～1607(1984);Tsukadaら、Br.J.Cancer 52:111～116(1985))などの仲介担体分子によって、薬剤分子を抗体分子と結合させた。

【0128】

このような免疫複合体を調製するために広範囲のリンカー技術が使用されており、切斷性リンカーと非切斷性リンカーの両方が研究されている。多くの場合、薬剤分子が標的部位において非改変形で複合体から放出され得る場合、しかしながら、薬剤の完全な細胞毒性能力のみを観察することができると思われる。10

【0129】

抗体-薬剤複合体を調製するために使用されている切斷性リンカーの1つは、シス-アコニット酸に基づく酸の影響を受けやすいリンカーであって、このリンカーは、受容体仲介のエンドサイトーシス中に遭遇するエンドソームおよびリソソームなどの異なる細胞内区画の酸性環境を利用する。ShenおよびRyserは、ダウノルビシンとマクロ分子担体の複合体を調製するためにこの方法を導入した(Biochem.Biophys.Res.Commun.102:1048～1054(1981))。YangおよびReisfeldは同じ技術を使用して、ダウノルビシンと抗メラノーマ抗体を結合させた(J.Natl.Canc.Inst.80:1154～1159(1988))。近年Dillmanらも、同じ方法で酸の影響を受けやすい結合を使用して、ダウノルビシンと抗T細胞抗体の複合体を調製した(Cancer Res.48:6097～6102(1988))。20

【0130】

Trouetらによって探求された他の手法は、ペプチドのスペーサーアームによってダウノルビシンと抗体を結合させることを含んでいた(Prot.Natl.Acad.Sci.79:626～629(1982))。リソソームペプチダーゼの作用によって、このような複合体から遊離薬剤が放出され得るという前提の下で、このことが行われた。

【0131】

しかしながら *in vitro* 細胞毒性試験によって、抗体-薬剤複合体が遊離非結合薬剤と同じ細胞毒性能力を得たことは稀であったことが明らかとなっている。これによって、薬剤分子が抗体から放出される機構は非常に効率が悪いことが示唆された。免疫毒素の分野では、モノクローナル抗体と触媒によって活性化するタンパク質毒素の間のジスルフィド架橋によって形成された複合体は、他の結合を含む複合体より細胞毒性が強いことが示された。Lambertら、J.Biol.Chem.260:12035～12041(1985);Lambertら、Immunotoxins 175～209(A.Frankel、ed.1988)中;Ghetieら、Cancer Res.48:2610～2617(1988)を参照のこと。30
このことは、抗体分子と毒素の間のジスルフィド結合の効率の良い切断に貢献する、グルタチオンの高い細胞内濃度に原因があった。これにもかかわらず、薬剤とマクロ分子の間の複合体を調製するためのジスルフィド架橋を使用する数個の報告例しか存在しない。Shenらは、メトトレキセートのメルカプトエチルアミド誘導体への転換、次にジスルフィド結合を介したポリ-D-リシンとの結合を記載した(J.Biol.Chem.260:10905～10908(1985))。40
さらに、ある報告は、三硫化物含有毒性薬剤カリケアマイシンと抗体の複合体の調製を記載した(Menendezら、Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer、サンディエゴ、アブストラクト81(1989))。他の報告は、三硫化物含有毒性薬剤カリケアマイシンと抗体の複合体の調製を記載した(Hinmanら、53 Cancer Res.3336～3342(1993))。

【0132】

ジスルフィド結合抗体-薬剤複合体がほとんど利用されない1つの理由は、ジスルフィド架橋を介して薬剤と抗体を結合させることができる硫黄原子含有部分を有する細胞毒性薬剤が入手困難であることである。さらに、既存の薬剤の化学的修飾は、それらの細胞毒性能力の低下をもたらす。50

【0133】

既存の抗体-薬剤複合体に関する他の重大な欠点は、限られた数の標的抗原およびメトトレキセート、ダウノルビシンおよびビンクリスチンのような抗癌剤の比較的穏やかな細胞毒性のために、それらが十分な濃度の薬剤を標的部位に送達することができないことがある。有意な細胞毒性を得るために、抗体との直接的な多数の薬剤分子の結合、またはポリマー担体分子による結合が必要となる。しかしながら、このような非常に改変された抗体は、標的抗原との不十分な結合および血流からの迅速な *in vivo* での消失を示すことが多い。

【0134】

メイタンシノイドは、非常に細胞毒性の強い薬剤である。メイタンシンは、東アフリカの低木 *Maytenus serrata* から Kupchan らによって最初に単離され、メトトレキセート、ダウノルビシン、およびビンクリスチンのような従来の癌用化学療法剤より 100 ~ 1000 倍細胞毒性が強いことが示された(米国特許第3,896,111号)。その後、数種の微生物もメイタンシノールおよびメイタンシノールの C-3 エステルなどのメイタンシノイドを生成することが発見された(米国特許第4,151,042号)。メイタンシノールの合成 C-3 エステルおよびメイタンシノールの類似体も報告されてきている(Kupchan ら、 *J. Med. Chem.* 21:31 ~ 37(1978); Higashide ら、 *Nature* 270:721 ~ 722(1977); Kawai ら、 *Chem. Pharm. Bull.* 32:3441 ~ 3451(1984))。そこから C-3 エステルが調製されたメイタンシノールの類似体の例には、芳香環(例えば脱クロロ)、または C-9、C-14(例えばヒドロキシル化メチル基)、C-15、C-18、C-20 および C-4,5 が修飾されたメイタンシノールがある。

10

20

【0135】

自然に存在する C-3 エステルおよび合成 C-3 エステルは、2 つのグループに分けることができる:

(a) 単純なカルボン酸を有する C-3 エステル(米国特許第4,248,870号、米国特許第4,265,814号、米国特許第4,308,268号、米国特許第4,308,269号、米国特許第4,309,428号、米国特許第4,317,821号、米国特許第4,322,348号および米国特許第4,331,598号)、および

(b) N-メチル-L-アラニンの誘導体を有する C-3 エステル(米国特許第4,137,230号、米国特許第4,260,608号、米国特許第5,208,020号、および *Chem. Pharm. Bull.* 12:3441(1984))

30

【0136】

グループ(b)のエステルは、グループ(a)のエステルより一層細胞毒性が強いことが分かった。

【0137】

メイタンシンは有糸分裂阻害剤である。メイタンシンを用いた *in vivo* での L1210 細胞の処理は、有糸分裂中に 67% の細胞の蓄積をもたらすことが報告されてきている。未処理対照細胞は、3.2% から 5.8% の間の範囲の有糸分裂指数を示すことが報告された(Sieber ら、 *43 Comparative Leukemia Research* 1975, *Bibl. Haemat.* 495 ~ 500(1976))。ウニ卵およびハマグリ卵を用いた実験によって、微小管タンパク質、チューブリンの重合を阻害することにより微小管の形成に干渉することによって、メイタンシンは有糸分裂を阻害することが示唆されてきている(Remillard ら、 *Science* 189:1002 ~ 1005(1975))。

40

【0138】

In vitro では、P388、L1210、および LY5178 マウス白血病細胞懸濁液は、 $10^{-3} \sim 10^{-1} \mu\text{g}/\text{ml}$ の用量でメイタンシンによって阻害され、P388 系は最も感度が高いことが分かっている。メイタンシンは、ヒト上咽頭癌細胞の *in vitro* 増殖の活性阻害剤であることも示されており、ヒト急性リンパ芽球性白血病系 CEM は、 $10^{-7} \text{mg}/\text{ml}$ ほど低い濃度によって阻害されると報告された(Wolpert-DeFillipps ら、 *Biochem. Pharmacol.* 24:1735 ~ 1738(1975))。

【0139】

In vivo において、メイタンシンは活性があることも示されてきている。P388 リンパ性白血病系での腫瘍増殖は 50 ~ 100 倍の用量範囲で阻害されることが示され、これは高い治

50

療指数を示唆し;さらに有意な阻害活性が、L1210マウス白血病系、ヒトルイス肺癌系、およびヒトB-16黒色癌系に関して実証されると思われる(Kupchan、Ped.Proc.33:2288 ~ 2295 (1974))。

【0140】

メイタンシノイドと細胞結合剤(抗体など)を結合させる現在の方法は、2つの反応工程を含む。細胞契合剤、例えば抗体は、N-スクシンイミジルピリジルジチオプロピオネート(SPDP)などの架橋試薬を用いて最初に改変し、ジチオピリジル基を抗体中に導入する(Car Issonら、Biochem.J.173:723 ~ 737(1978);米国特許第5,208,020号)。第2の工程では、DM1(以前はN²'-脱アセチル-N²'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシンと呼ばれていた)などのチオール基を有する反応性メイタンシノイドを、開始試薬として改変型抗体に加えて、改変型抗体におけるチオピリジル基の置換、およびジスルフィド結合細胞毒性メイタンシノイド/抗体複合体の生成をもたらす(米国特許第5,208,020号)。メイタンシノイドを結合させるための1工程の方法は、米国特許第6,441,163号中に記載されている。メイタンシノイド系の免疫毒素技術は、Immunogen Corporation(Cambridge、MA)から入手可能である。

【0141】

他の重要な毒素技術は、オーリスタチン毒素に基づく。オーリスタチンは、強力な細胞増殖阻害物質としてインド洋のアメフラシDolabellaから得られたドラスタチン10に由来する。米国特許第4,816,444号および米国特許第4,978,744号を参照のこと。他のドラスタチンに関しては、米国特許第4,414,205号(ドラスタチン-1、2、および3)、米国特許第5,076,973号(ドラスタチン-3)、米国特許第4,486,414号(ドラスタチン-AおよびB)、米国特許第4,986,988号(ドラスタチン-13)、米国特許第5,138,036号(ドラスタチン-14)、および米国特許第4,879,278号(ドラスタチン-15)も参照のこと。アリゾナ大学においてDr.Pettitおよび同僚によって単離および合成された、様々なオーリスタチン誘導体が試験されており、細胞に対して非常に毒性が強いことが示されている。Pettitら、Antineoplastic agents 337. Synthesis of dolastatin 10 structural modifications. Anticancer Drug Des. 10(7):529 ~ 44(1995)、Woykeら、In vitro activities and postantifungal effects of the potent dolastatin 10 structural modification auristatin PHE. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45:3580 ~ 3584(2001)、Pettitら、Specific activities of dolastatin10 and peptide derivatives against Cryptococcus neoformans. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42:2961 ~ 2965(1998)、Woyke Three-dimensional visualization of microtubules during the Cryptococcus neoformans cell cycle and the effects of auristatin PHE on microtubule integrity and nuclear localization. Submitted、Antimicrobial Agents and Chemotherapyを参照のこと。

【0142】

近年、抗体上のペイロードとして送達すると非常に有効であると思われる、他のオーリスタチン誘導体が開発されている。例えばモノメチルオーリスタチンE(MMAE)は、腫瘍特異的抗体と結合するとき、腫瘍細胞用の強力な毒素として示されてきている。Doroninaら、Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nature Biotechnology. (2003)(オンラインで入手可能)、Franciscoら、cAC10-vcMMAE、an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective anti tumor activity. Blood. (2003)5月8日 [Epub ahead of print]. Epub 2003年4月24日(オンラインで入手可能)。オーリスタチン分子の毒性以外に、ペプチド結合複合体はバッファーおよび血漿における他の結合技術より安定性があり、したがって正常組織に対してより特異的であり毒性が低いことが研究によって示されてきている。Doroninaら、Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. Nature Biotechnology. (2003)(オンラインで入手可能)、Franciscoら、cAC10-vcMMAE、an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. Blood. (2003)5月8日 [Epub ahead of print]. Epub 2003年4月24日(オンラインで入手可能)。このようなリンカーは、分岐状ペプチド設計体に基づくものであり、例えばmAb-バリン

10

20

30

40

50

-シトルリン-MMAEおよびmAb-フェニルアラニン-リシン-MMAE複合体を含む。Doroninaら、Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy.Nature Biotechnology.(2003)(オンラインで入手可能)、Franciscoら、cAC10-vcMMAE、an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity.Blood.(2003)5月8日[Epub ahead of print].Epub2003年4月24日(オンラインで入手可能)。このような設計および結合技法は、例えばKingら、Monoclonal antibody conjugates of doxorubicin prepared with branched peptide linkers:inhibition of aggregation by methoxytriethyleneglycol chains.J Med Chem.45(19):4336 ~ 43(2002)およびDubowchikら、Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs.2.Models of anticancer drugs paclitaxel(Taxol)、mitomycin C and doxorubicin.Bioorg Med Chem Lett.8(23):3347 ~ 52(1998)によって記載されている。前述の事項に基づくオーリスタチンE系免疫毒素技術は、Seattle Genetics Corporation(Seattle、WA)から入手可能である。

【0143】

免疫複合体を作製するための毒素としての可能性を有すると思われる、天然源-抽出物、および半合成および合成類似体から得られる、多数の新規な微小管に影響を与える化合物が存在する(newmedinc「ドット」コムのウェブサイトを参照のこと)。このような分子、およびこれらを使用する薬剤製品の例には、以下の:コルチシン-部位結合剤(クラシン)、コンプレタスタチン(AVE806、コンプレタスタチンA-4プロドラッグ(CA4P)、Oxi-4503)、クリプトフィシン(LY355703)、ジスコデルモリド、ドラスタチンおよび類似体(オーリスタチンPHE、ドラスタチン10、ILX-651、シンプロスタチン1、T2T-1027)、エポチロン(BMS-247550、BMS-310705、EP0906、KOS-862、ZK-EPO)、エレウセロビン、FR182877、ハリコンドリンB(E7389)、ハルイミド(NPI-2352およびNPI-2358)、ヘミアステリン(HTI-286)、ラウリマリド、メイタンシノイド('DMI')(ビバツツマブメルタンシン、カンツツマブメルタンシン、huN901-DM1/BB-10901TAP、MLN591DM1、My9-6-DM1、トラツツマブ-DM1)、P-C-SPES、ペルオルシドA、レスベラトール、S-アリルメルカプトシステイン(SAMC)、スponジスタチン、ビチレブアミド、分子モーター-キネシン(SB-715992)、設計型コルチシン-部位結合剤(A-289099、A-293620/A-318315、ABT-7511E7010、D-24851/D-64131、ZD6126)、他の新規な紡錘体毒素(2-メトキシエストラジオール(2-ME2)、ベズイミダゾールカルバメート(ANG600系、メベンダゾール)、CP248/CP461、HMN-214、R440、SDX-103、T67/T607)がある。さらに、他の海洋由来の毒素は、Mayer、A.M.S.Marine Pharmacology in 1998:Antitumor and Cytotoxic Compounds.The Pharmacologist.41(4):159 ~ 164(1999)中に総説されている。

【0144】

(治療投与および配合物)

静脈内、皮下または筋肉内注射などの他の非経口投与経路によって、長時間の作用は、それほど頻繁ではなくより好都合な投与スケジュールを可能にするであろう。

【0145】

in vivo投与用に使用するとき、本明細書に記載する抗体配合物は滅菌済みでなければならない。これは例えば、凍結乾燥および再溶解の前または後に、滅菌済み濾過膜を介した濾過によって容易に行われる。抗体は通常凍結乾燥した形で、あるいは溶液中に保存される。一般に治療用抗体組成物は、皮下注射針によって貫通可能なストッパーなどの配合物の格納を可能にするアダプターを有する、滅菌済みアクセスポートを有する容器、例えば静脈内注射溶液用バッグまたはバイアル中に置かれる。

【0146】

抗体投与の経路は、既知の方法、例えば静脈内、腹膜内、大脳内、筋肉内、眼球内、動脈内、クモ膜下、吸入または病巣内経路による注射または注入、あるいは以下に記す徐放系に従う。抗体は注入によって連続的に、あるいは大量注射によって投与することが好ましい。

【0147】

治療上使用する抗体の有効量は、例えば治療目的、投与の経路、および患者の状態に依

10

20

30

40

50

存するであろう。したがって、セラピストは、必要に応じて最適な治療効果を得るために、用量を滴定し、投与の経路を変えることが好ましい。典型的には、望ましい効果を得る用量に達するまで臨床医は抗体を投与するであろう。この治療の進行は従来のアッセイによって、あるいは本明細書に記載するアッセイによって容易にモニターされる。

【0148】

本明細書に記載する抗体は、薬剤として許容可能な担体と混合して調製することができる。治療組成物は静脈内に、あるいは鼻または肺を介して、好ましくは液状または粉末状エアロゾル(凍結乾燥済み)として投与することができる。組成物は望むならば非経口的あるいは皮下に投与することもできる。全身に投与するとき、治療組成物は滅菌済みであり、発熱物質を含まず、pH、等浸透圧、および安定度に関して妥当な事項を有する非経口的に許容可能な溶液中に存在しなければならない。これらの条件は当業者には知られている。簡潔には、望ましい純度を有する化合物と生理的に許容可能な担体、賦形剤、または安定剤を混合することによって、保存または投与用の化合物の用量配合物を調製する。このような物質は、使用する用量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、これらはTRIS HCl、リン酸、クエン酸、酢酸、および他の有機酸塩などのバッファー;アスコルビン酸などの抗酸化剤;ポリアルギニンなどの低分子量(約10残基未満)ペプチド、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ポリマー;グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、またはアルギニンなどのアミノ酸;单糖、二糖、およびセルロースまたはその誘導体、グルコース、マンオース、またはデキストリンを含めた他の炭水化物;EDTAなどのキレート剤;マンニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール;ナトリウムなどの対イオン、および/またはTWEEN、PLURONICSまたはポリエチレングリコールなどの非イオン性界面活性剤を含む。

10

【0149】

注射用の滅菌済み組成物は、Remington's Pharmaceutical Sciences(第18版、Mack Publishing Company、Easton、PA、1990)中に記載されたのと同様の従来の薬剤慣習に従って配合することができる。例えば水、またはゴマ、ピーナッツ、または綿実油のような自然に存在する植物油、あるいはオレイン酸エチルのような合成脂質賦形剤などの賦形剤に、活性化合物を溶かすことまたは懸濁させることができ。容認されている薬剤慣習に従って、バッファー、防腐剤、抗酸化剤などを取り込ませることができる。

20

【0150】

30

徐放性製剤の適切な例には、ポリペプチドを含む固形疎水性ポリマーの半透性物質があり、その物質は成形品、フィルムまたはマイクロカプセルの形である。徐放性物質の例には、Langerら、J.Biomed Mater.Res.、(1981)15:167～277およびLanger、Chem.Tech.、(1982)12:98～105によって記載されたのと同様のポリエステル、ヒドロゲル(例えばポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号、EP58,481)、L-グルタミン酸とガンマエチル-L-グルタミン酸のコポリマー(Sidmanら、Biopolymers、(1983)22:547～556)、非分解性エチレン-酢酸ビニル(Langerら上記)、LUPRON Depot(商標)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー(乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸リュープロリドから構成される注射用ミクロスフェア)、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸(EP133,988)がある。

40

【0151】

エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日間を超えて分子を放出することができるが、いくつかのヒドロゲルは短時間の間タンパク質を放出する。被包するとタンパク質は長時間身体中に留まり、37℃における湿気への露出の結果としてタンパク質は変性または凝集し、生物学的活性の消失および免疫原性の起こり得る変化をもたらす可能性がある。関係する機構に応じて、タンパク質を安定化させるための合理的な戦略を考案することができる。例えば、凝集機構がジスルフィド交換による分子間S-S結合形成であることが発見されている場合、スルフヒドリル残基を改変すること、酸性溶液から凍結乾燥させること、含水量を調節すること、適切な添加剤を使用すること、および特異的なポリマーマトリクス組成物を開発することによって、安定化を得ることができる

50

。

【0152】

徐放性組成物は、懸濁液中に結晶を維持することができる適切な配合物に懸濁させた、抗体の結晶の調製物も含む。これらの調製物は、皮下または腹腔内に注射すると徐放効果を生み出すことができる。他の組成物は、リポソームに包まれた抗体も含む。このような抗体を含むリポソームは、それ自体が知られている方法によって調製される：米国特許No. DE3,218,121; Epsteinら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、(1985)82:3688～3692; Hwangら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、(1980)77:4030～4034; EP52,322 EP36,676; EP88,046; EP143,949; EP142,641; 日本国特許出願83-118008; 米国特許4,485,045号および米国特許4,544,545号；ならびにEP102,324。

10

【0153】

所与の患者用の抗体配合物の用量は、疾患の重度および型、体重、性別、食事、投与の時間および経路、他の治療、および他の関連する臨床的要因を含めた薬剤の作用を変えることが知られている様々な要因を考慮に入れて、担当医によって決定されるであろう。治療上有効な用量は、*in vitro*または*in vivo*法によって決定することができる。

【0154】

治療上使用する抗体の有効量は、例えば治療目的、投与の経路、および患者の状態に依存するであろう。したがって、用量を滴定し必要に応じて投与の経路を変えて最適な治療効果を得ることが、セラピストにとって好ましい。典型的な1日当たりの用量は、前述の要因に応じて約0.001mg/kgから100mg/kg以上までの範囲であると思われる。典型的には、望ましい効果を得る用量に達するまで臨床医は抗体を投与するであろう。この治療の進行は従来のアッセイによって、あるいは本明細書に記載するアッセイによって容易に調べられる。

20

【0155】

本明細書の組成物および方法の治療物体の投与は、適切な担体、賦形剤、および改善された移動性、送達性、寛容性などを与えるために配合物中に取り込ませる他の物質とともに施されることは理解されよう。すべての製薬化学者に公式に知られているRemington's Pharmaceutical Sciences(第18版、Mack Publishing Company、Easton、PA、1990)、特にその中のBlock、Lawrenceによる第87章中に、多数の適切な配合物を見つけることができる。これらの配合物には例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油、脂質、脂質(カチオンまたはアニオン)含有賦形剤(Lipofectin(商標)など)、DNA複合体、無水吸収性ペースト、水中油および油中水型エマルジョン、エマルジョンカーボワックス(様々な分子量のポリエチレングリコール)、半固体状ゲル、およびカーボワックスを含む半固体状混合物がある。前述の混合物はいずれも、本発明の治療および療法において適切である可能性がある、ただし配合物中の活性成分は配合によって不活性化されず、配合物は投与の経路と生理的に適合性および寛容性があるものとする。製薬化学者によく知られている配合物、賦形剤および担体に関する他の情報に関しては、Baldrick P.「Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance.」Regal.Toxicol.Pharmacol.32(2):210～8(2000)、Wang W.「Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals.」Int.J.Pharm.203(1～2):1～60(2000)、Charman WN「Lipids, lipophilic drugs, and Oral drug delivery-some emerging concepts.」J Pharm Sci.89(8):967～78(2000)、Powellら、「Compendium of excipients for parenteral formulations」PDA J Pharm Sci Technol.52:238～311(1998)、およびその中の引用も参照のこと。

30

【0156】

(抗体の調製)

本明細書に記載する抗体は、以下に記載したのと同様のXenoMouse(登録商標)技術を使用することによって調製した。したがってこのようなマウスは、ヒト免疫グロブリン分子および抗体を生成することができ、マウス免疫グロブリン分子および抗体の生成に欠陥がある。これを達成するために使用される技術は、本明細書に開示する特許、出願、および参照文献中に開示されている。しかしながら詳細には、それに由来するマウスおよび抗体

40

50

のトランスジェニック生成の一実施形態が、1996年12月3日に出願された米国特許出願第08/759,620号、および1998年6月11日に公開された国際特許出願W098/24893、ならびに2000年12月21日に公開されたW000/76310中に開示されている。これらは、参照として本願明細書に組み込まれる。Mendezら、Nature Genetics 15:146～156(1997)も参照のこと。

【0157】

このような技術を使用することによって、様々な抗原に対する完全ヒトモノクローナル抗体を生成することができる。一実施形態では、XenoMouse(登録商標)系マウスを対象抗原(例えばEGFRvIII)で免疫し、リンパ細胞(B細胞など)を抗体を発現したマウスから回収し、このような細胞を骨髄型細胞系と融合させ不死ハイブリドーマ細胞系を調製して、このようなハイブリドーマ細胞系をスクリーニングおよび選択して、対象抗原に特異的な抗体を生成するハイブリドーマ細胞系を同定する。本明細書で与えるのは、EGFRvIIIに特異的な抗体を生成する多数のハイブリドーマ細胞系を生成するための方法である。さらに本明細書で与えるのは、このような抗体の重鎖および軽鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を含めた、このような細胞系によって生成される抗体の特徴である。

【0158】

あるいは、ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを作製する代わりに、免疫処済みXenoMouse(登録商標)系マウスから単離した回収細胞によって生成された抗体を、初回抗原、好ましくはEGFRvIIIタンパク質に対する反応性に関してさらにスクリーニングする。このようなスクリーニングは、EGFRvIIIタンパク質を用いるELISA、完全長EGFRvIIIを安定的に発現するNR6M細胞とのin vitro結合、およびNR6M細胞中での抗体によるEGFRvIII受容体のインターナリゼーションを含む。対象抗体を分泌するB細胞を、EGFRvIII特異的溶血plaquesアッセイを使用して次いで単離する(Babcockら、Proc Natl Acad Sci U S A、93:7843～7848(1996))。溶解の標的細胞は、好ましくはEGFRvIII抗原でコーティングされたヒツジ赤血球細胞(SRBC)である。当該の免疫グロブリンおよび補体を分泌するB細胞培養物の存在下では、plaquesの形成は、標的細胞が特異的なEGFRvIIIを介して溶解したことを示す。plaquesの中心に存在する抗原に特異的なプラズマ細胞を単離することができ、抗体の特異性をコードする遺伝情報をプラズマ細胞から単離する。逆転写酵素PCRを使用して、分泌される抗体の可変領域をコードするDNAをクローニングすることができる。次いでこのようなクローニングDNAを、適切な発現ベクター、好ましくはpcDNAなどのベクターカセット、より好ましくは免疫グロブリン重鎖および軽鎖の定常ドメインを含むこのようなpcDNAベクター中にさらに挿入することができる。作製したベクターは次いで宿主細胞、好ましくはCHO細胞にトランスフェクトすることができ、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、あるいは望ましい配列をコードする遺伝子を増幅するのに適したように改変した従来の栄養培地で培養することができる。本明細書において我々は、EGFRvIIIに特異的な抗体を生成する多数のプラズマ細胞の単離を記載する。さらに、抗EGFRvIII抗体の特異性をコードする遺伝物質を単離し、適切な発現ベクター中に導入し、次いでそれを宿主細胞にトランスフェクトする。

【0159】

XenoMouseマウス由来のB細胞は、抗体ディスプレーライブラリーを作製することができる遺伝物質の供給源として使用することもできる。このようなライブラリーは、バクテリオファージ、酵母菌中に、あるいは当分野の通常の技術を使用してリボソームディスプレーによってin vitroで作製することができる。過剰免疫したXenoMouseマウスは、高親和性で、抗原反応性がある抗体をそこから単離することができる豊富な供給源である可能性がある。したがって、EGFRvIIIを過剰免疫したXenoMouseマウスを使用して、EGFRvIIIに対する高親和性抗体を単離することができる抗体ディスプレーライブラリーを作製することができる。このようなライブラリーはpep3オリゴペプチドに対してスクリーニングすることができると思われ、EGFRvIIIを発現する細胞に対する抗体スクリーニングを結果として誘導して、本来提示される抗原に関する特異性を確認することができると思われる。次いで完全IgG抗体を、組換えDNA技術を使用して発現させることができる。例えばW099/53049を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0160】

一般に、前述の細胞系によって生成された抗体は、完全なヒトIgG1またはIgG2重鎖およびヒトkappa軽鎖を有していた。一実施形態では、抗体は高い親和性を有しており、固相および溶液相によって測定すると、典型的には約 10^{-9} ~ 約 10^{-13} MのKdを有していた。他の実施形態では、抗体は約 10^{-6} ~ 約 10^{-8} Mの低い親和性を有していた。

【0161】

当業者によって理解されるように、本発明の実施形態の抗体は、ハイブリドーマ細胞系以外の細胞系において発現させることができる。特定の抗体をコードする配列は、適切な哺乳動物宿主細胞の形質転換用に使用することができる。形質転換は、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の既知の方法、例えばウイルス中(あるいはウイルスベクター中への)ポリヌクレオチドのパッケージ化、およびウイルス(またはベクター)を用いた宿主細胞の形質導入、または米国特許第4,399,216号、米国特許第4,912,040号、米国特許第4,740,461号、および米国特許第4,959,455号によって例示されたのと同様の、当分野で知られているトランスフェクション手順によるものであってよい。使用する形質転換手順は、形質転換する宿主に依存する。異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための方法は当分野でよく知られており、デキストラント介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿法、ポリブレン介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム中へのポリヌクレオチドの被包、および核へのDNAの直接的なマイクロインジェクションを含む。

【0162】

発現用の宿主として利用可能な哺乳動物細胞系は当分野でよく知られており、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)、ヒト原発性肝癌細胞(例えばHepG2)、およびいくつかの他の細胞系だけには限られないがこれらを含めた、American Type Culture Collection(ATCC)から入手可能なもの多くの不死細胞系を含む。特に好ましい細胞系は、どの細胞系が高い発現レベルを有し、構成的EGFRvIII結合性を有する抗体を生成することによって選択する。

【実施例】

【0163】

行われた実験および得られた結果を含む以下の実施例は、専ら図示する目的で提供され、本発明を制限するものとして解釈されるべきものではない。

【0164】

EGFRvIII特異的抗体を生成するための戦略には、当初から、複数の抗原(ペプチド、様々な可溶性タンパク質、抗原発現細胞)と組み合わせたXenoMouseマウスにおける免疫感作に続いて、ハイブリドーマを產生するための融合かもしくはXenoMax(商標)/SLAM(商標)技術によるB細胞の単離を用いた抗体產生細胞の単離が必要であった。抗体產生細胞に対し、ELISAによる特異性に対する一次スクリーニング、そしてFMATおよび/またはFACSによる細胞表面結合性に対する二次スクリーニングを施した。次いで、薬物送達にとって有用と考えられる抗体を同定するのにインターナリゼーションアッセイを実施した。抗体の親和性を測定した。エピトープマッピングに対する特定の抗体を選択した。さらに、癌治療におけるかかる抗体の有効性を分析するためのin vitroおよびin vivo試験用に特定の抗体を選択した。

【0165】

(実施例1：抗原調製)

(A. EGFRvIII PEP3-KLH抗原の調製)

実施例2と関連して、14-merヒトEGFRvIII PEP3(LEEKKGNYVVTDHC(配列番号56))ペプチドをR&D Systemsによってカスタム合成した。次いで、PEP3ペプチドを以下のようにキーホールリンペットヘモシニアン(KLH)と結合させた。EGFRvIII PEP3(200mcg)(R&D)を蒸留水を用いて最終容量が165mcIになるまで50mcgのキーホールリンペットヘモシニアン(KLH; Pierce、イリノイ州ロックフォード)と混合させた。250mcIの複合体用緩衝液(0.1M MES、0.9M NaCl、pH4.7)を添加し、10mg/mlのストック溶液である1-エチル-3-[3-ジメチルアミノ

10

20

30

40

50

プロピル]カルボジイミド塩酸(EDC、Pierce、イリノイ州ロックフォード)25mciの添加によってEGFRvIII PEP3およびKLHを架橋した。この複合体を室温で2時間インキュベートし、PBS pH7.4を用いて1kDaフィルタ(遠心フィルタ;Millipore、マサチューセッツ州ベッドフォード)を介して反応していないEDCを遠心分離によって除去した。

【0166】

実施例3と関連して、14-merヒトEGFRvIII PEP3(LEEKKGNVVTDHC(配列番号56))ペプチドをカスタム合成した。次いで、PEP3ペプチドを以下のようにKLHと結合させた。ヒトEGFRvIII PEP3(200mcg)を蒸留水を用いて最終容量が165mciになるまで50mcgのキーホールリンペットヘモシニアン(KLH;Pierce、イリノイ州ロックフォード)と混合させた。250mciの複合体用緩衝液(0.1M MES、0.9M NaCl、pH4.7)を添加し、10mg/mlのストック溶液である1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸(EDC、Pierce、イリノイ州ロックフォード)25mciの添加によってEGFRvIII PEP3およびKLHを架橋した。複合体を室温で2時間インキュベートし、PBS pH7.4を用いて1kDaフィルタ(遠心フィルタ;Millipore、マサチューセッツ州ベッドフォード)を介して反応していないEDCを遠心分離によって除去した。

10

【0167】

(B.B300.19/EGFRvIIIトランスフェクタント)

B300.19/EGFRvIIIトランスフェクタントを調製するために、野生型EGFRをA431細胞から予めクローニングし、EGFR遺伝子を、6~273残基をコードするコドンが欠失し、欠失の接合部で生成されるグリシン残基をコードするコドンを有するEGFRvIIIをコードするように改変した。欠失GTT(バリン)およびCGT(アルギニン)を囲むコドンの範囲内で欠失が起こり、欠失後に生成されるコドンはGGT(グリシン)である(Wikstrandら、J Neurovirol.4(2):148~58(1998))。

20

【0168】

1. 野生型EGFRコンストラクトのクローニング

Micro-fast RNAキット(Invitrogen、オンタリオ州バークリントン)を用いてPolyA+mRNAをA431(ATCC)細胞から抽出した。ランダムpdN6プライマーおよびM-MuLV逆転写酵素(NEB、New England Biolabs、マサチューセッツ州ビバリー)を用いてpolyA+mRNAから全cDNAを合成した。Pfu DNAポリメラーゼを用いて、プライマー:センス5'-GGATCTCGAGCCAGACCGGAACGACAGGCCACCTC-3';(配列番号62)とアンチセンス5'-CGGATCTCGAGCCGGAGCCCAGCACTTGTCTT-3'(配列番号63)を用いてA431 cDNAから2.3kbのPCR産物を増幅した。

30

【0169】

PCR産物をXholで消化し、ゲルを精製し、Xholで直線化したプラスミドpWBFNP内にライゲーションし(国際特許出願No.WO99/45031)、プラスミドWt-EGFR/pWBFNPを生成した。

【0170】

2. EGFRvIIIコンストラクトの生成

プライマー対のC13659/C29538およびC29539/C14288(BioSource International)を用いて、プラスミドWt-EGFR/pWBFNP鑄型から増幅されたPCR産物をライゲーションし、EGFR細胞外ドメインのアミノ酸6から273までをコードする配列内で欠失を導入し、発現ベクターpWBDHFR2内にサブクローニングした(国際特許出願No.WO99/45031)。用いたC29538およびC29539は、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(NEB、New England Biolabs、マサチューセッツ州ビバリー):

40

C13659:5'-CGGATGAATTCCCAGACCGGACGACAGGCCACCTC-3'(センス)(配列番号64);

C29538:5'-CTTTCTTTCTCCAGAGCC-3'(アンチセンス)(配列番号65);

C29539:5'-GTAATTATGTGGTGACAGATC-3'(センス)(配列番号66);

C14288:5'-CGGATCTCGAGCTCAAGAGAGCTTGGTTGGGAGCT-3'(アンチセンス)(配列番号67)

によってリン酸化した。

【0171】

プライマー対C13659/C29538を用いて、Pfuポリメラーゼ(NEB、New England Biolabs、マサチューセッツ州ビバリー)を使用して増幅したWt-EGFR/pWBFNP鑄型から、5'末端を欠

50

失した232bp断片を生成した。PCR産物をEcoRI(NEB、New England Biolabs、マサチューセッツ州ビバリー)を用いて消化し、ゲルを精製した。プライマー対C29539/C14288を用いて、Pfuポリメラーゼによって増幅したWt-EGFR/pWBFNP鑄型から、3'末端を欠失した1273bp断片を生成した。PCR産物をXhol(NEB、New England Biolabs、マサチューセッツ州ビバリー)によって消化し、ゲルを精製した。T4 DNAリガーゼ(NEB、New England Biolabs、マサチューセッツ州ビバリー)を用いてEcoR1/Xholで消化されたpWBDHFR2内に断片をライゲーションし、コンストラクトEGFRvIII/pWBDHFRを生成した。

【0172】

EGFRの細胞内ドメインを以下のようにして生成したコンストラクト内に導入した。1566bpのDraIII/Xhol断片をプラスミドWt-EGFR/pWBFNPから単離し、DraIII/Xholで消化されたEGFRvIII/pWBDHFR内にライゲーションし、EGFRvIII-FL/pWBDHFRを生成した。

10

【0173】

3. EGFRvIII-FL/pWBDHFR用いたB300.19細胞のトランスフェクション

700 μlのDMEM/HI培地内でトランスフェクションごとにB300.19細胞(8×10^6)を用いた。EGFRvIII-FL/pWBDHFR20 μgおよびCMV-PuroプラスミドDNA2 μgを添加した。Bio-Rad Gene Pulserを用いて300ボルト/960 μFで細胞をエレクトロポレートした。エレクトロポレートした後、細胞を氷上で10分間冷却し、その後、10mlの非選択培地(DMEM/HIグルコース、10%FBS、50 μM BME、L-グルタミン2mM、100単位のペニシリン-G/ml、100単位のMCGストレプトマイシン/ml)を添加した。細胞を7.5%CO₂、37 °Cで48時間インキュベートした。

20

【0174】

インキュベートした後、細胞を96ウェルプレート内の 2×10^4 、 0.4×10^4 および 0.08×10^4 細胞/ウェルで選択培地(DMEM/HIグルコース、10%FBS、2mM L-グルタミン、50 μM BME、100単位のペニシリン-G/ml、100単位のMCGストレプトマイシン/ml、2ug/mlのピューロマイシン)に分離し、14日間選択培地内で選択し、安定なクローンを生成した。純粋な耐性クローンをE752mAb(Yangら、Crit Rev Oncol Hematol.、38(1):17~23(2001)に記載の抗EGFR抗体)およびヤギ抗ヒトIgG PEで染色し、次いでFACS Vantage(Becton Dickinson)を用いて分析した。

【0175】

(C. EGFRvIII-RbFc発現コンストラクトの構築物)

EGFRvIIIウサギFc融合タンパク質を生成するために、本発明者はまずウサギFcをコードするDNAを含有するベクターを構築した。これをEGFRvIIIをコードするDNAにライゲーションした。このアプローチを以下により詳細に述べる。

30

【0176】

1. RbFc/pcDNA3.1 Hygroの構築物

プライマー1322/867(下記)を用いて、ウサギIgGのHinge-CH2-CH3ドメインをコードする721bp断片を増幅した。

#1322(センス):5'-GGTGGCGGTACCTGGACAAGACCGTTGCG-3'(配列番号68)

#867(アンチセンス):5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGAGCGGGA-3'(配列番号69)

【0177】

KpnIおよびNotIを用い、生成したPCR産物を消化し、ゲルを精製し、KpnI/NotIで消化したpcDNA3.1(+)/Hygro(Invitrogen、オンタリオ州バーリントン)内にライゲーションし、プラスミドRbFc/pcDNA3.1 Hygroを生成した。

40

【0178】

2. EGFRvIII-RbFc/pCEP4の構築物

プライマー1290/1293(下記)を用いることで、PfuポリメラーゼによってEGFRvIII-FL/pWBDHFRプラスミド鑄型から1165bp産物を増幅した。

#1290(センス):5'-CTACTAGCTAGCCACCATGCGACCCCTCCGGGA-3'(配列番号70)

#1293(アンチセンス):5'-CGGGGTACCCGGCGATGGACGGGATC-3'(配列番号71)

【0179】

PCR産物をNheIおよびKpnIで消化し、ゲルを精製し、NheI/KpnIで消化されたRbFc/pcDNA

50

3.1 Hygro内でライゲーションし、プラスミドEGFRvIII-RbFc/pcDNA3.1 Hygroを生成した。

【0180】

EGFRvIII-RbFc/pcDNA3.1 Hygroから2170bpのSnaBI/XhoI断片を単離し、SnaBI/XhoIで消化したpCEP4(Invitrogen、オンタリオ州バーントン)内でサブクローニングし、プラスミドEGFRvIII-RbFc/pCEP4を生成した。

【0181】

3.293F EGFRvIII-RbFcの安定な細胞系の生成

以下のように、リン酸カルシウムのトランスフェクションによってプラスミドEGFRvIII-RbFc/pCEP4を293F細胞(Gibco、ニューヨーク州グランドアイランド)内に導入した。トランスフェクションの1日前に、 1×10^6 個の293F細胞をゼラチンでコーティングされた100mmの組織培養ペトリ皿上に播種し、5%CO₂、37℃でインキュベートした。トランスフェクションの2~3時間前に、細胞を新鮮な非選択培地(DMEM/F12、10%FBS、L-グルタミン2mM、ペニシリンG 100U/ml、MCGストレプトマイシン100U/ml)10mlに与えた。トランスフェクション試薬をマイクロチューブ内で以下のように調製した。DNA(EGFRvIII-RbFc/pCEP4)10μgを62μlの2Mリン酸カルシウムおよび脱イオン水と混合し、最終容量が500μlとなるようにした。別のチューブピペットで500μlの2XHBSを取り出し、トランスフェクション試薬を移すのに用いた。

【0182】

チューブピペットにおける溶液を一滴ずつ細胞に添加する一方で、トランスフェクションするまで5%CO₂インキュベーター内に細胞を残存させることによって適切なpHを維持した。トランスフェクションの15~20時間後、PBSを用いて細胞を洗浄し、10mlの新鮮な293F非選択培地に与えた。トランスフェクションの48~72時間後に発現細胞をトリプシンを用いて採取し、細胞を293F選択培地(DMEM/F12、10%FBS、L-グルタミン2mM、ペニシリンG100U/ml、MCGストレプトマイシン100U/ml、ハイグロマイシン250ug/ml)中の96ウェルプレート内に 0.08×10^4 細胞/ウェルで14日間置いた。

【0183】

捕捉抗体として1μg/mlの抗EGFR抗体E763(米国特許第6235883号)を用い、かつ1:100希釈でヤギ抗ウサギIgGHRPO(CaITag)で検出して、ELISAによってハイグロマイシン耐性クローンをスクリーニングした。

【0184】

(実施例2：ハイブリドーマ生成による抗EGFRvIII抗体の產生)

0日目に-1定常領域を有する抗体を產生する8匹のXenoMouseマウス(XenoMouse GIマウス)を免疫し、このプロトコルにしたがい、11、21、32、44、および54日目に追加免疫を行い、58日目に融合を実施した。すべての注射について、尻尾の根元における皮下投与に加え、腹腔内投与を介してすべての免疫を行った。0日目に完全フロイントアジュバント(CFA)(Sigma、ミズーリ州セントルイス)と1:1v/vで混合されたバイロジエンを含まないDPBSに懸濁された 1.5×10^7 個のB300.19/EGFRvIIIトランスフェクト細胞(実施例1A)を用いて免疫を行った。11、21、および32日目に、不完全フロイントアジュバント(IF)(Sigma、ミズーリ州セントルイス)と1:1v/vで混合された、DPBS中の 1.5×10^7 個のB300.19/EGFRvIIIトランスフェクト細胞を用いて追加免疫を行った。44日目にIFと1:1v/vで混合されたDPBS内のPEP3(EGFRvIIIペプチド)-KLH複合体5μg(実施例1)を用いて追加免疫を行い、54日目にアジュバントを含まない、DPBS内のPEP3(EGFRvIIIペプチド)-KLH複合体5μgを用いて最後の追加免疫を行った。

【0185】

58日目に、マウスを安樂死させ、次いで鼠径および腰リンパ節を回収した。組織グラインダーを用いたリンパ節の機械的破壊によってリンパ球を放出し、次いでCD90の負の選択によってT細胞を減少させた。洗浄した濃縮B細胞と、ATCC、cat.#CRL1580(Kearneyら、J. Immunol. 123:1548~1550(1979))から購入した非分泌性骨髄腫のP3X63Ag8.653細胞とを1:1の比率で混合させることによって融合を実施した。細胞混合物を800gで遠心分離によって

静かにペレット状にした。上清を完全に取り出した後、細胞をプロナーゼ溶液(CalBiochem、cat.#53702;PBS内で0.5mg/ml)2~4mLを用いて2分間処理した。次いで、FBS3~5mLを添加して酵素活性を中断させ、そして電気細胞融合溶液であるECFS(0.3Mスクロース、Sigma、Cat#S7903、0.1mMの酢酸マグネシウム、Sigma、Cat#M2545、0.1mMの酢酸カルシウム、Sigma、Cat#C4705(ミズーリ州セントルイス))を用いて懸濁液を全容量40mLに調節した。

【0186】

遠心分離後に上清を取り出し、ECFS40mLを用いた再懸濁によって細胞を洗浄した。この洗浄工程を繰り返し、再度細胞をECFSで 2×10^6 個の細胞/mlの濃度になるまで再懸濁した。融合ジェネレーターであるECM2001型、Genetronic、Inc.、カリフォルニア州サンディエゴを用いて電気細胞融合を実施した。用いた融合チャンバーの大きさは2.0mLで、機器上の条件として、アライメント条件:電圧50V、時間50秒、膜破壊:電圧3000V、時間30μs、融合後の保持時間3秒を用いた。融合後、HATを含有するDMEM(JRH Biosciences)、15%FCS(Hyclone)で細胞を再懸濁し、37℃および10%CO₂で培養するために、L-グルタミン、ペングルタミン、OPI(オキサロ酢酸、ピルビン酸塩、ウシインスリン)(すべてがSigma、ミズーリ州セントルイス由来)およびIL-6(Boehringer Mannheim)を補った。

【0187】

細胞を、平底の96ウェルの組織培養プレートに1ウェル当たり 4×10^4 個の細胞数でプレーティングした。HT(ヒポキサンチンおよびチミジン)を追加した培地に移す2週間前に、培養物をHAT(ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジン)を追加した培地内で維持した。ハイブリドーマをHAT培地内の生存によって選択し、抗原反応性についてELISAを用いて上清をスクリーニングした。ELISAにおいては、抗原でコーティングされたプレート(EGFRvIIIペプチド-OVAでコーティングされたプレート、および、カウンタースクリーニングとして野生型EGFRペプチド-OVAでコーティングされたプレート)上で上清をインキュベートすることや、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)で標識されたマウス抗ヒトIgGを用いてEGFRvIII特異的結合を検出することを必要とする(表2.1参照)。

【0188】

【表1】

表 2.1

プレートウェル	ハイブリドーマ	1回目のOD		2回目のOD	
		融合プレート	muEGFr	EGFr	
13.2 D10	13.1	4.034	2.653	0.051	
13.3 C12	13.2	3.829	2.443	0.049	
13.3 F11	13.3	3.874	1.081	0.049	
13.6 B11	13.4	3.322	1.311	0.052	
<hr/>					
クローニング	プレート	OD#1	OD#2		
<hr/>					
13.1.1	0.5c/w D2	2.614	2.586	0.042	
13.1.2	0.5c/w F5	2.248	1.272	0.041	

【0189】

観察されるように、少なくとも4種類の抗原特異的なハイブリドーマ、すなわち13.1、1

10

20

30

40

50

3.2、13.3、および13.4を検出した。ELISAアッセイによるEGFRvIII特異性において陽性であったこれらのハイブリドーマは、EGFRvIIIを発現するトランスフェクト300.19細胞およびトランスフェクトされていない親細胞300.19を用いたFACSによって確認した。

【0190】

限界希釈播種を用い、選択された抗原陽性ウェルのクローニングを実施した。単一のコロニーの増殖に対してプレートを視覚的に検査し、次いで上記のような抗原特異的なELISAおよびFACSによる確認によって單一コロニーウェル由来の上清をスクリーニングした。高度な反応性を有するクローンをアッセイし、Luminex機器を用いた多重ELISAによってヒトの鎖および鎖の純度を検証した。ELISAおよびFACSアッセイにおけるEGFRvIIIの特異性に基づき、さらなるスクリーニングおよび分析における最も有望な候補としてクローン13.1.2を選択した。13.1.2抗体の重鎖および軽鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸の配列を図3Lならびに重鎖および軽鎖の核酸に対する配列番号137および139、重鎖および軽鎖のアミノ酸配列に対する138および140に示す。さらに、13.1.2の重鎖および軽鎖の配列とそれらの由来である生殖細胞系配列との比較について図4および図5に示す。

10

【0191】

(実施例3:XenoMax技術の利用による抗体産生)

(XenoMouse動物の免疫感作)

-1定常領域(XenoMouseG1マウス)を有する抗体を産生するXenoMouseマウス、-2定常領域(XenoMouseXMG2マウス)を有する抗体を産生するXenoMouseマウス、および-4定常領域(XenoMouseG4マウス)を有する抗体を産生するXenoMouseマウスに連続して免疫することにより、ヒトEGFRvIIIに対するヒトモノクローナル抗体を作製した。

20

【0192】

XenoMax技術を介してmAbを生成するために、XenoMouseG1およびXMG2マウスの集団について、EGFRvIII PEP3(実施例1A)およびEGFRvIII発現300.19細胞(実施例1B)で、細菌により発現したEGFRvIIIタンパク質の細胞外ドメイン(EGFRvIII-ECD)(Dr.Bigner、デューク大学)およびEGFRvIII発現300.19細胞で、またはEGFRvIII-ウサギFc融合タンパク質(EGFRvIII-RbFc)(実施例1C)およびEGFRvIII発現300.19細胞で、またはEGFRvIII-RbFcのみで、皮下注射および腹膜内(BIP)によって足蹠(FP)を介して、または、尻尾の根元を介して免疫した。

30

【0193】

足蹠での免疫感作において、最初の免疫は、 $10X 10^6$ 個のEGFRvIII発現300.19細胞が存在する場合または存在しない場合で、またマウス1匹当たり1:1v/vのTitermax gold(Sigma、オンタリオ州オークビル)と混合した10 μ gのEGFRvIII PEP3もしくはEGFRvIII-ECDもしくはEGFRvIII-RbFcが存在する場合または存在しない場合で行った。続いて最初の免疫において用いた半分の量の免疫原で追加免疫した。下記の表3.1において示されるように、マウス1匹当たり一晩吸着させたミョウバン(Sigma、オンタリオ州オークビル)と混合した免疫原を用いて、最初の4回の追加免疫を行った。これに続いて、表3.1に示すように、Titermax goldを用いたそれぞれの免疫原の1回の注射、ミョウバンを用いた1回の注射、次いでPBSを用いた免疫原によって最後の追加免疫を行った。特に、0、3、7、10、14、17、21および24日目に動物に免疫した。19日目に動物を出血させ、血清を採血し、採血の選択についての力値を測定した。28日目に動物を採血した。

40

【0194】

【表2】

表3.1
足蹠での免疫感作のスケジュール

グループ#		1	2	3	4	5	6	7	8
動物#		5	5	5	5	5	5	5	5
マウス系統		XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3
追加免疫#	アジュバント	免疫原		免疫原		免疫原		免疫原	
1回目	Titermax gold	EGFRvIII-300.19 細胞+PEP3-KLH		EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII-RbFc		EGFRvIII-RbFc	
2回目	ミョウバン	EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-RbFc	
3回目	ミョウバン	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc	
4回目	ミョウバン	EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-RbFc	
5回目	ミョウバン	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc	
6回目	Titermax gold	EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-RbFc	
7回目	ミョウバン	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc	
8回目	PBS	EGFRvIII-300.19 細胞+PEP3-KLH		EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII-RbFc		EGFRvIII-RbFc	
採血									

10

20

30

【0195】

足蹠での免疫において説明したそれぞれの免疫原による最初のBIPにおける免疫を、マウス1匹当たり1:1v/vで混合した完全フロイントアジュバント(CFA、Sigma、オンタリオ州オークビル)で行った。続いてまず、マウス1匹当たり1:1v/vで不完全フロイントアジュバント(IFA、Sigma、オンタリオ州オークビル)と混合したそれぞれの免疫原で追加免疫してから、PBSを用いた免疫源によって最後の追加免疫を行った。以下の表3.2に示すように、0、14、28、42、56、および75日目(最後の追加免疫)に動物に免疫した。63日目に動物を出血させ、血清を採血し、採血の選択のために力価を測定した。78日目に動物を採血した。

【0196】

40

【表3】

表3.2
BIPにおける免疫感作のスケジュール

グループ		9	10	11	12	13	14	15	16
動物#		5	5	5	5	5	5	5	5
マウス系統		XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3	XMG2	XM3C-3
追加免疫#	アジュバント	免疫原		免疫原		免疫原		免疫原	
1回目	CFA	EGFRvIII-300.19 細胞+PEP3-KLH		EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII-RbFc		EGFRvIII-RbFc	
2回目	IFA	EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-RbFc	
3回目	IFA	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc	
4回目	IFA	EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-300.19 細胞		EGFRvIII-RbFc	
5回目	IFA	PEP3-KLH		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-RbFc	
6回目	PBS	EGFRvIII-300.19 細胞+PEP3-KLH		EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII-ECD		EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII-RbFc		EGFRvIII-RbFc	
採血									

【0197】

(力価測定による採血のための動物の選択)

ELISAによって抗hEGFRvIII抗体力価を測定した。EGFRvIII-RbFc(2.5 μg/ml)、対照RbFc(2 μg/ml)、EGFRvIIIペプチド-OVA(2 μg/ml)(実施例1)、対照OVA(4 μg/ml)のいずれかをCostar Labcoat Universal Binding Polystyrene 96ウェルプレート(Corning、マサチューセッツ州アクトン)上に4で一晩コーティングした。結合されていない抗原を含有する溶液を取り出し、プレートをUV光(365nm)で4分間(4000マイクロジュール)処理した。プレートをdH₂Oで5回洗浄した。EGFRvIIIで免疫したXenoMouse(登録商標)動物すなわちnaive XenoMouse(登録商標)動物由来の血清の力価を、2サンプルずつ1:100希釈からはじめて、1:2希釈の2%ミルク/PBS中で測定した。最後のウェルはブランクとした。dH₂Oでプレートを5回洗浄した。ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP、Pierce、イリノイ州ロックフォード)を結合した抗体を室温で1時間、最終濃度1 μg/mLで添加した。プレートをdH₂Oで5回洗浄した。TMB発色基質(メリーランド州ガイザースベルグ)を添加して、30分間プレートを発色させ、1Mリン酸の添加によってELISAを中断した。個々のXenoMouse(登録商標)動物の特定の力価を450nmにおける吸光度から測定し、表3.3および表3.4に示す。力価は、血清の希釈度の逆数を示すことから、その数が大きくなるとhEGFRvIIIに対する液性免疫応答が亢進することを意味する。

【0198】

皮下注射および腹腔内によって尻尾の根元を介して免疫したマウスについて、EGFRvIII-RbFc(2.0 μg/ml)または対照RbFc(2.5 μg/ml)でプレートをコーティングした以外は上記とどうように力価を測定した。

【0199】

10

20

30

40

【表4】

表3.3

グループ#	免疫感作 (部位および 免疫原)	マウス 系統 および 性別	マウス ID	EGFRvIII -RbFc@ 2.5μg/ml	対照 RbFc@ 2.0μg/ml	2.0μg/mlで コーティング されたEGFR vIIIペプチド- OVA	4.0μg/mlで コーティング されたOVA
1	FP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII PEP3-KLH (免疫感作計画 参照)	XMG2	0748-1	330		13549	<100
			0748-2	237		7635	<100
			0748-3	109		9824	<100
			0748-4	714		8014	<100
			0748-5	165		9421	<100
			naive	<100		n/a	n/a
2	FP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII PEP3-KLH (免疫感作計画 参照)	XM3C-3	0741-1	388		347	<100
			0741-2	327		240	<100
			0741-3	385		330	<100
			0741-4	589		227	<100
			0741-5	273		626	<100
			naive	<100		n/a	n/a
3	FP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII- ECD(免疫感作 計画参照)	XMG2	0749-1	552		<100	<100
			0749-2	477		<100	<100
			0749-3	100		<100	<100
			0749-4	100		<100	<100
			0749-5	1631		<100	<100
			naive	100		n/a	n/a
4	FP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII- ECD(免疫感作 計画参照)	XM3C-3	0742-1	372		<100	<100
			0742-2	745		<100	<100
			0742-3	484		<100	<100
			0742-4	530		<100	<100
			0742-5	270		<100	<100
			naive	100		n/a	n/a
5	FP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII- RbFc(免疫感作 計画参照)	XMG2	0750-1	5399	175	<100	<100
			0750-2	3072	151	<100	<100
			0750-3	>6400	358	<100	<100
			0750-4	5845	196	<100	<100
			0750-5	5770	196	<100	<100
			naive	100	100	n/a	n/a
6	FP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII- RbFc(免疫感作 計画参照)	XM3C-3	0743-1	1220	<100	<100	<100
			0743-2	1183	<100	<100	<100
			0743-3	645	<100	<100	<100
			0743-4	759	<100	<100	<100
			0743-5	1260	<100	<100	<100
			naive	100	<100	n/a	n/a
7	FP EGFRvIII-RbFc (免疫感作計画 参照)	XMG2	0745-1	1897	<100	<100	<100
			0745-2	>6400	323	<100	<100
			0745-3	1225	<100	<100	<100
			0745-4	4047	<100	<100	<100
			0745-5	852	<100	<100	<100
			naive	100	<100	n/a	n/a
8	FP EGFRvIII-RbFc (免疫感作計画 参照)	XM3C-3	0744-1	362	<100	<100	<100
			0744-2	807	<100	<100	<100
			0744-3	479	<100	<100	<100
			0744-4	631	<100	<100	<100
			0744-5	1112	<100	<100	<100
			naive	100	<100	n/a	n/a

【0200】

血清学に基づき、XenoMax採血サンプルについて、表3.3から、グループ5に由来するすべてのXenoMouse動物およびグループ6に由来するXenoMouse動物0743-5を選択した。

【0201】

【表5】

表3.4

グループ#	免疫感作(部位および免疫原)	マウス系統および性別	マウスID	EGFRvIII-RbFc@2.5ug/ml.	対照RbFc@2.0ug/ml	2.0μg/mlでコーティングされたEGFRvIIIペプチド-OVA	4.0μg/mlでコーティングされたOVA
9	BIP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII- PEP3-KLH (免疫感作計画 参照)	XMG2	O695-1	2921		>128000	472
			O695-2	2219		30504	379
			O695-3	4609		>128000	608
			O695-4	>6400		>128000	368
			O695-5	1580		19757	269
			naive	<100		n/a	242
10	BIP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII- PEP3-KLH (免疫感作計画 参照)	XM3C-3	O700-1	<100			
			O700-2	<100			
			O700-3	>6400			
			O700-4	5342			
			O700-5	>6400			
			naive	<100			
11	BIP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII- ECD(免疫感作 計画参照)	XMG2	O696-1	<100		561	240
			O696-2	<100		788	326
			O696-3	<100		604	266
			O696-4	143		444	263
			O696-5	<100		303	254
			naive	<100			242
12	BIP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII- ECD(免疫感作 計画参照)	XM3C-3	O702-1	358			
			O702-2	469			
			O702-3	401			
			O702-4	>6400			
			O702-5	>6400			
			naive	<100			
13	BIP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII- RbFc(免疫感作 計画参照)	XMG2	O694-1	>6400	>6400	250	243
			O694-2	>6400	>6400	296	309
			O694-3	>6400	>6400	736	605
			O694-4	>6400	>6400	739	1111
			O694-5	3710	>6400	517	465
			naive	<100	>6400		242
14	BIP EGFRvIII-300.19 細胞+EGFRvIII- RbFc(免疫感作 計画参照)	XM3C-3	O703-1	2740	>6400		
			O703-2	408	>6400		
			O703-3	1406	>6400		
			O703-4	1017	>6400		
			O703-5	403	>6400		
			naive	<100	>6400		
15	BIP EGFRvIII-RbFc (免疫感作計画 参照)	XMG2	O697-1	>6400	>6400	340	348
			O697-2	>6400	>6400	642	1793
			O697-3	6242	>6400	319	246
			O697-4	1766	>6400	133	<100
			O697-5	>6400	>6400	685	448
			naive	<100	>6400	243	242
16	BIP EGFRvIII-RbFc (免疫感作計画 参照)	XM3C-3	O701-1	592	>6400		
			O701-2	1118	>6400		
			O701-3	>6400	>6400		
			O701-4	<100	<100		
			O701-5	n/a	n/a		
			naive	<100	>6400		

【0202】

表3.4における血清学データに基づき、採血サンプルについて、XenoMouse動物(0695-1、0695-3および0695-4)を選択した。

【0203】

(B細胞の選択)

10

20

30

40

50

先に考察した動物由来のB細胞を採取し、培養した。EGFRvIIIペプチド特異的抗体を分泌するB細胞をBabcockら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、93:7843~7848(1996)に記載のように単離した。ELISAを用いて、一次EGFRvIIIペプチド-OVA特異的ウェルを同定した。500個、150個、もしくは50個の細胞/ウェルでの245枚の96ウェルプレートでXenoMouse動物由来の約500万個のB細胞を培養し、EGFRvIIIペプチド-OVA上でスクリーニングし、抗原特異的なウェルを同定した。約515個のウェルは、バックグラウンドを大幅に超えるODを示した。代表的な試料を表3.5に示す。

【0204】

【表6】

表3.5

10

	プレート の合計数	陽性カットオフOD:															
		0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5
Cansera 500 細胞/ ウェル	12	1152	634	81	56	49	45	38	32	29	26	25	18	11	4	1	0
Sigma 500 細胞/ ウェル	13	1248	773	195	139	117	99	80	73	58	53	49	21	9	5	1	0
Sigma 150 細胞/ ウェル	20	1920	1304	478	178	91	67	55	47	45	36	33	19	9	5	2	0
合計	45	4320	2711	754	373	257	211	173	152	132	115	107	58	29	14	4	0

【0205】

OD>0.5であるEGFRvIIIペプチド-OVA-ELISA陽性ウェル244個を、EGFRvIIIペプチド-OVAおよびOVAに対して再度スクリーニングし、それらがEGFRvIIIペプチドに特異的であることを確認した。これらの結果の代表例を表3.6に示す。

30

【0206】

【表7】

表3.6

プレート	ウェル	1'EGFRvIIIペプチド-OVA OD	2'EGFRvIIIペプチド-OVA OD	OVA OD
121	G	1	0.7534	1.4065
121	A	7	1.3472	2.1491
121	D	8	0.6743	0.4179
121	E	8	2.0415	2.6965
121	H	10	0.8611	0.4288
121	C	12	2.1455	2.6443
122	H	1	1.8890	2.5987
122	H	5	0.5943	0.8321
122	F	8	0.6834	0.7715

40

【0207】

(限界抗原アッセイおよび分析)

限界抗原分析は、他のすべての抗原特異的抗体に対してB細胞培養上清中に存在する抗原特異的抗体を親和性でランクづけする方法である。コーティング抗原が極めて少ないので存在下で、最も高い親和性を有する抗体のみが、平衡状態で任意の検出可能なレベルで結合できる(例えば、国際特許出願No.WO03/48730)。

50

【0208】

EGFRvIIIペプチド-OVAを7.5ng/ml、1.5ng/mlおよび0.03ng/mlの3つの濃度で96ウェルEisaプレート上で4で一晩コーティングした。0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS中の1%ミルク50μlをプレートに添加する前に、各プレートをdH₂Oで5時間洗浄し、それからB細胞の上清4μlを各ウェルに添加した。室温でシェーカーで18時間経過した後、再度プレートをdH₂Oで5時間洗浄した。各ウェルに1μg/mlのヤギ抗ヒト(Fc)-HRP50μlを添加した。室温で1時間後、再度プレートをdH₂Oで5時間洗浄し、TMB基質50μlを各ウェルに添加した。1Mリン酸50μLの各ウェルへの添加によって反応を中断させ、プレートを波長450nmで読み取った。結果を表3.7に示す。

【0209】

【表8】

表3.7

培養 プレート	ウェル	限界Ag						高濃度抗原 (1.0μg/ml)	
		0.03ng/ml		1.5ng/ml		7.5ng/ml			
		OD	ランク	OD	ランク	OD	ランク		
133	B	2	0.7670	1	1.189	54	1.871	95	2.050
124	G	12	0.7400	2	1.895	1	3.101	1	3.463
145	C	1	0.715	3	1.552	7	2.671	10	3.194
129	G	10	0.6720	4	1.367	22	2.692	8	2.977
186	B	6	0.657	5	1.842	2	2.859	3	3.411
143	F	12	0.653	6	1.677	3	2.741	6	3.156
136	E	3	0.6340	7	1.468	15	2.683	9	3.280
137	C	11	0.595	8	1.582	5	2.94	2	3.444
139	A	11	0.582	9	1.374	19	2.282	47	2.255
174	F	1	0.573	10	1.577	6	2.775	4	2.364

10

20

30

【0210】

限界抗原分析から生成された結果を高濃度の抗原アッセイにおいて得られたOD全体と比較した。限界抗原アッセイにおいて得られたODに対する高濃度の抗原アッセイにおいて得られたODの比率をとることにより、親和性の相対的ランクづけを行った。より高い比率を有する抗体は最も高い親和性を有することになる。表3.7は、(最も低い抗原プレーティング濃度0.03ng/mlにおける)限界抗原アッセイのODに対する高濃度の抗原アッセイのODに基づいてランクづけされたB細胞の培養上清試料を示す。

【0211】

(FMATによるネイティブ細胞の結合アッセイ)

EGFRvIIIペプチド-OVA-Eisaにおける陽性のウェルの上清について、NR6細胞(NR6M細胞)上に安定的に発現したネイティブ形態のEGFRvIIIに対する結合能を分析した(Batraら、Epidermal growth factor ligand-independent,unregulated,cell transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene.Cell Growth Differ.6(10):1251~9(1995)参照)。NR6M細胞を1ウェル当たり8000個の細胞で播種し、96ウェルFMATプレートで一晩インキュベートした。次いでウェル内に15μlを残して培地を取り出した。B細胞の培養上清15μlを添加し、15μlの抗ヒトIgG Fc Cy5を最終濃度1μg/mlでウェルに添加した。次いで、それを4で2時間インキュベートの状態にした。細胞をPBS150μlで洗浄し、そしてFMATで読み取る前に固定した。結果を全蛍光強度として示した(表3.8)。ヒト抗EGFRvIII mAb13.1.2を最終濃度1μg/mlで開始するポジティブ対照として用い、ネガティブ対照は同濃度のPK16.3.1とした。試験試料244個中134個はNR6M細胞に結合し、その

40

50

うち62個は8000を超える総蛍光量を有していた。これらの結合した134個のうち6個は偽陽性であった。

【0212】

Wt受容体への結合に起因する結合を除去するために、同種のネイティブ結合アッセイをNR6Wt細胞(EGF受容体を発現するNR6細胞)(Batraら、Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. Cell Growth Differ. 6(10):1251~9(1995)参照)において実施した(表3.8)。ABX-EGFをポジティブ対照として用い、同濃度のPK16.3.1をネガティブ対照抗体として用いた。134のNR6M結合サンプルのうち3つは、NR6 Wt細胞に強く結合していた。ElisaにおいてEGFRvIIIペプチドに結合した244個のうちの190個のウェルは、細胞上のネイティブ形態にも結合した。表3.8に例を挙げる。

【0213】

【表9】

表3.8

プレート			1' VIII-pep-OVA OD	2' VIII-pep-OVA OD	OVA OD	FMAT NR6M細胞 に対する ネイティブ 結合	FMAT NR6Wt細胞 に対する ネイティブ 結合
174	F	1	2.4945	3.0308	0.1900	138373	1668
187	A	4	1.5337	1.2085	0.1920	128626	202459.8
132	D	8	0.8555	1.2070	0.1649	109379	0
142	C	11	2.2889	2.8194	0.2239	94944	0
129	A	7	2.1501	2.8208	0.1515	84024	0
127	E	1	2.6923	3.1986	0.1219	82031	0
124	G	12	3.2929	3.5634	0.1455	73080	0
141	C	6	0.7512	1.2567	0.1547	60816	814.5
173	C	1	2.5728	2.5714	0.2134	58702	2523.4
128	G	9	0.6293	0.7483	0.1520	49631	0
129	H	6	2.9370	3.0952	0.2582	0	0
183	E	11	2.3450	2.7717	0.1050	0	0

【0214】

表3.8では、ウェル187A4由来の上清をWt結合サンプルとして同定し、141C6はNR6 M細胞の結合に対して偽陽性であった。ウェル129H6および183E11は、何らのネイティブ結合性も有しない強いペプチド結合サンプルであった。

【0215】

(インターナリゼーションアッセイ)

上位60のネイティブ結合性B細胞培養上清を、受容体に対するインターナリゼーション能力についてさらにアッセイした。NR6 M細胞を8000個の細胞/ウェルで96ウェルFMATプレート内に播種し、一晩インキュベートした。培地を取り出し、全容量30 μl培地でB細胞の培養上清10~15 μlを2サンプル添加した。次いで、二次抗体(最終濃度1.5 μg/mlでSS Alexa647抗ヒトIgG Fab)15 μlを添加し、混合物を氷上で1時間インキュベートした。培地の効果を調べるために、不適切なB細胞の培養上清を用いた。ヒト抗EGFRvIII mAb13.2.1を、1 μg/ml(最終濃度)で開始するポジティブ対照として用い、ネガティブ対照は同濃度のPK16.3.1(ヒト抗KLH IgG2抗体)とした。インキュベーション後、細胞を冷却PBSで洗浄し、50 μlの培地をすべてのウェルに添加し、2サンプルの一方を37℃で30分間インキュベート

10

20

30

40

50

し、他方を氷上で維持した。インキュベーション後、培地を取り出し、冷却した50mMグルタチオン100μlを37℃でインキュベートしたセットに添加し、冷却した培地100μlを他方のセットに添加し、次いで両方のセットを氷上に1時間放置した。次いで細胞を冷却PBS100μlで洗浄し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、FMATで読み取った。グルタチオン存在下での全蛍光/グルタチオン非存在下での全蛍光X100で計算して、結果を%インターナリゼーションとして示した。代表的なデータを表3.9に挙げる。

【0216】

【表10】

表3.9

10

ウェル番号	グルタチオン非存在 FL1x総数	グルタチオン存在 FL1x総数	%インターナリゼーション (グルタチオン存在/ グルタチオン非存在) ×100
124 C9	1877	1394	74.3%
124 G12	26465	9959	37.6%
125 H1	14608	3686	25.2%
125 D10	2342	1236	52.8%
127 E1	15059	1318	8.7%
127 B9	12444	7109	57.1%
127 E11	6623	0	0.0%
128 G9	10071	1851	18.4%
129 A7	27648	8708	31.5%
130 B4	4558	4354	95.5%
131 H5	9258	2656	28.7%
132 D8	35820	13293	37.1%
133 F9	9773	3621	37.0%
136 F10	2392	0	0.0%
137 G6	5104	1021	20.0%
137 G10	3451	0	0.0%

20

30

40

【0217】

このアッセイを行うのに多数の特定試薬を必要とした。これらの試薬を以下のように調製した。

【0218】

1. ヒツジ赤血球(SRBC)のビオチン化。

SRBCを25%ストックとしてRPMI培地内に保存した。SRBC1.0mlを未使用のエッペンドルフチューブに小分けすることによってSRBCの濃縮細胞ペレット250μlを得た。微量遠心機を用いた8000rpm(6800rcf)パルス回転によってSRBCをペレット状にし、上清を回収し、ペレットをpH8.6のPBS1.0mlに再懸濁し、そして遠心分離を繰り返した。洗浄サイクルを2回繰り返し、次いでSRBCペレットを15mlのファルコンチューブに移し、pH8.6のPBSによって5mlにした。分離した50mlのファルコンチューブ、スルホ-NHSビオチン2.5mgをpH8.6のPBS45mlに添加した。ビオチンが完全に溶解してから、SRBC5mlを添加し、チューブをRTで1時間回転した。SRBCを3000rpmで5分間遠心分離し、上清を回収した。ビオチン化したSRBCをエッペンドルフチューブに移し、pH7.4のPBS以外では上記のように3回洗浄し、次いで15mlのファルコンチューブ内で免疫細胞用培地(RPMI1640)によって5mlになるようにした(5%-B-

50

SRBCストック)。ストックを必要になるまで4℃で保存した。

【0219】

2.B-SRBCのストレプトアビジン(SA)コーティング。

5%B-SRBCストック1mlを未使用のエッペンドルフチューブ内に移した。上記のようにB-SRBC細胞を3回洗浄し、pH7.4のPBS1.0mlに再懸濁することで最終濃度5%(v/v)を得た。10mg/mlのストレプトアビジン(CalBiochem、カリフォルニア州サンディエゴ)ストック溶液10μlを添加し、チューブをRTで20分間混合し回転した。洗浄工程を繰り返し、SA-SRBCをpH7.4のPBS1ml(5%(v/v))に再懸濁した。

【0220】

3.SA-SRBCのEGFRvIIIによるコーティング。

SA-SRBCを10μg/mlのビオチン化したEGFRvIIIペプチド-OVAでコーティングし、20分間RTで混合し回転させた。上記のようにSRBCをpH7.4のPBS1.0mlで2回洗浄した。EGFRvIIIでコーティングしたSRBCをRPMI(+10%FCS)で再懸濁し、最終濃度を5%(v/v)にした。

【0221】

4.免疫蛍光(IF)によるEGFRvIIIペプチド-SRBCの判定。

5%SA-SRBC10μlおよび5%EGFRvIIIペプチドでコーティングされたSRBC10μlを、PBS40μlを含有する別の未使用の1.5mlのエッペンドルフチューブにそれぞれ添加した。対照ヒト抗EGFRvIII抗体を45μg/mlでSRBCの各試料に添加した。チューブをRTで25分間回転し、次いで細胞をPBS100μlで3回洗浄した。細胞をPBS50μlに再懸濁し、Alexa488(Molecular Probes、オレゴン州ユージン)に結合したヤギ抗ヒトIgG Fc抗体40mcg/mLとともにインキュベートした。RTで25分間チューブを回転し、次いでPBS100μlで洗浄し、細胞をPBS10μlに再懸濁した。染色細胞10μlをクリーンなガラス顕微鏡スライド上にスポットし、ガラスカバースリップで覆って蛍光下で観察し、そして0~4の任意のスケールでスコアリングした。

【0222】

5.形質細胞の調製。

様々なアッセイによって対象の免疫グロブリンを分泌するB細胞クローニングを含有するものとして予め同定された単一のミクロ培養ウェルの中身を回収した。100~1000μlのピペットマンを用いて、37℃のRPMI(10%FCS)を添加することによってウェルの含量を回復させた。ピペッティングによって細胞を再懸濁し、次いで未使用の1.5mlのエッペンドルフチューブ(最終容量約500~700μl)に移した。微量遠心機で2500rpm(660rcf)、室温で1分間細胞を遠心分離し、次いでチューブを180度回転させ、再度2500rpmで1分間回転させた。凍結培地を回収し、免疫細胞をRPMI(10%FCS)100μl中に再懸濁し、次いで遠心分離した。RPMI(10%FCS)でのこの洗浄を繰り返し、細胞をRPMI(10%FCS)60μl中に再懸濁し、使用準備ができるまで氷上で保存した。

【0223】

6.形質細胞の顕微操作。

予めシリコーンエッジでスライドガラス(2×3インチ)を調製し、RTで一晩、保存可能な状態にした。使用前に、スライドを約5μlのSigmaCoat(Sigma、オンタリオ州オークビル)で処理し、ガラス表面上を均一にふき取り、乾燥させ、次いで完全にふき取った。細胞の試料60μlに、EGFRvIIIペプチドでコーティングした各SRBC(5%v/vストック)を60μlずつ、RPMI(10%FCS)で調製した4×モルモット補体(Sigma、オンタリオ州オークビル)ストック、および4×濃縮血清ストック(10%FCSを含むRPMI中で1:150)を添加した。混合物を調製したスライド上にスポットし(10~15μl)、これらスポットを希釀されていないパラフィンオイルで覆った。スライドを37℃で最低45分間インキュベートした。EGFRvIIIに特異的な形質細胞をブラークにより同定し、顕微操作によってピックアップした(表3.10参照)。

【0224】

10

20

30

40

【表11】

表3.10

ウェルID			単一細胞番号	選定された 単一細胞の総数
124	G	12	EGFRvIII-SCX-105-116(LL)	12
129	A	7	EGFRvIII-SCX-117-128(DM)	12
174	F	1	EGFRvIII-SCX-129-137(DM)	9
182	A	5	EGFRvIII-SCX-138-149(LL);162-169(OP)	20
125	D	10	EGFRvIII-SCX-170-181(DM);194-201(LL)	20
127	B	9	EGFRvIII-SCX-182-193(LL);202-209(OP)	20
190	D	7	EGFRvIII-SCX-210-229(LL)	20
130	B	4	EGFRvIII-SCX-230-249(LL)	20
138	D	2	EGFRvIII-SCX-250-269(LL)	20
145	C	1	EGFRvIII-SCX-80-92(DM)	13
172	B	12	EGFRvIII-SCX-93-104(LL)	12
187	A	4	EGFRvIII-SCX-270-281(LL)	12
173	C	1	EGFRvIII-SCX-282-293(BC)	12
127	E	1	EGFRvIII-SCX-294-305(LL)	12
142	C	11	EGFRvIII-SCX-306-317(LL)	12
141	A	10	EGFRvIII-SCX-318-329(BC)	12
132	D	8	EGFRvIII-SCX-330-341(LL)	12
124	D	4	EGFRvIII-SCX-342-349(BC)	8

【0225】

(組み換え抗EGFRvIII抗体の単一細胞PCR、クローニング、発現、精製および特性決定)

可変領域をコードする遺伝子を、単一の顕微操作された形質細胞においてRT-PCRによって解析した。mRNAを抽出し、逆転写酵素PCRを実施することでcDNAを生成した。ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、可変重鎖および軽鎖をコードするcDNAを特異的に増幅させた。ヒト可変重鎖領域をIgG1発現ベクター中にクローニングした。pcDNA3.1+/Hygro(Invitrogen、オンタリオ州バーリントン)の複数のクローニング部位内にヒトIgG1の定常ドメインをクローニングすることにより、このベクターを生成した。ヒト可変軽鎖領域をIgK発現ベクター中にクローニングした。ヒトIgKの定常ドメインをpcDNA3.1+/Neo(Invitrogen、オンタリオ州バーリントン)の複数のクローニング部位内にクローニングすることにより、これらのベクターを生成した。次いで、重鎖および軽鎖発現ベクターを70%コンフルエンスのヒト胎児腎臓293細胞の60mmディッシュ内に同時リポフェクションし、トランスフェクトされた細胞が24~72時間において元の形質細胞と同一の特異性を有する組み換え抗体を分泌できた。上清(3mL)をHEK293細胞から回収し、ヒトIgGを特異的に検出するサンドイッチELISAを用いてインタクト(intact)抗体の分泌を求めた(表3.11)。ELISAを用いて組み換え抗体のEGFRvIIIに対する結合を介して特異性を評価した(表3.11)。

【0226】

10

20

30

40

【表12】

表3.11

mAb ID	細胞#	力値	
		全抗体	抗原結合性
129A7	SC- EGFRvIII-XG1-123/124	>1:64	>1:64
138D2	SC- EGFRvIII-XG1-250	>1:64	>1:64
174F1	SC- EGFRvIII-XG1-131	>1:64	>1:64
182A5	SC- EGFRvIII-XG1-139	>1:64	>1:64
190D7	SC- EGFRvIII-XG1-211	>1:64	>1:64
125D10	SC- EGFRvIII-XG2-170	>1:64	>1:64
182D5	SC- EGFRvIII-XG2-150	>1:64	>1:64
141A10	SC- EGFRvIII-XG1-318	1:64	1:64
132D8	SC- EGFRvIII-XG1-333	>1:64	>1:64
124D4	SC- EGFRvIII-XG1-342	>1:64	>1:64

【0227】

分泌ELISA試験を以下のように実施した。Ab分泌のために、2 μg/mLのヤギ抗ヒトIgGH+Lを、そして、抗原結合性のために、EGFRvIII-Rab Ig Fc融合タンパク質1.5 μg/mlをCosta r Labcoat Universal Bindingポリスチレン96ウェルプレート上にコーティングし、4で一晩保持した。プレートをdH₂Oで5時間洗浄した。希釈されていないミニリポフェクション(minilipofection)上清由来の7個のウェルについて1:2で組み換え抗体の力値を求めた。プレートをdH₂Oで5回洗浄した。分泌プレートについては、ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的-HRP結合抗体を、RTで最終濃度1 μg/mLで1時間添加し、結合プレートについては、室温で1時間、1 μg/mlのRb抗Hu Fcで検出した。プレートをdH₂Oで5回洗浄した。30分間TMBの添加とともにプレートを発色させ、1Mリン酸の添加によってELISAを中断した。各ELISAプレートを分析し、450nmで各ウェルの吸光度を判定した。

【0228】

(シーケンシングおよび配列分析)

クローニングされた重鎖および軽鎖のcDNAを両方向でシーケンシングし、分析することで抗体の生殖細胞系配列の派生を決定し、生殖細胞系配列からの変化を同定した。上記配列を図3A～3Kおよび(配列番号34～55)に示す。重鎖および軽鎖の各配列とこれらの由来である生殖細胞系配列の比較について図4～7に示す。さらに、図4および図5において、ハイブリドーマ由来の13.1.2抗体の配列をその生殖細胞系配列と比較する。

【0229】

本明細書における考察から認識されるように、131抗体および13.1.2抗体は、EGFRvIIIに対して極めて高い親和性を有し、細胞によって十分にインターナリゼーションされ、毒素と結合させた場合、細胞殺滅に極めて有効であると考えられる。興味深いことに、各抗体は、XenoMouseマウスの異なる免疫感作において生成され、そして、それぞれは異なる技術を利用したが、極めて類似する生殖細胞系遺伝子に由来する。しかしながら、エピトープマッピングの結果(本明細書において記載)に基づくと、各抗体は、EGFRvIII分子上のわずかに異なるエピトープに結合し、結合に不可欠であるEGFRvIII上のわずかに異なる残基を有すると考えられる。これらの結果は、生殖細胞系遺伝子の利用がEGFRvIIIを標的化する抗体治療の実現にとって重要で、これらの構造的知見に基づいた抗体および他の治療法のさらなる設計を可能にする方法において、小規模の変化によって抗体の結合および効果が改変できることを示唆する。

【0230】

10

20

30

40

50

(細胞上に発現したネイティブEGFRvIIIに対する抗EGFRvIII mAbの結合)

この実施例では、抗EGFRvIII抗体のNR6M細胞への結合を測定した。特に、XenoMaxに由来するIgG1組み換え抗体の定量されていない上清のNR6MおよびNR6Wt細胞に対する結合能についてアッセイした。細胞を10000/ウェルで播種し、FMAT96ウェルプレート内で37℃で一晩インキュベートした。培地を取り出し、ミニリポ(mini lipo)上清(力価低下)40μlを添加し、細胞を氷上で1時間インキュベートした。ヒト13.1.2のEGFRvIII抗体およびABXEG F(E7.6.3、米国特許第6235883号)抗体をポジティブ対照として添加した。PK16.3.1抗体をネガティブ対象として用いた。細胞を冷PBSで洗浄し、二次抗体を1μg/ml、40μl/ウェルで添加し(SSA Alexa抗ヒトIgGFc)、氷上で1時間インキュベートした。次いで、細胞を冷却PBSで洗浄し、固定し、FMATによって読み取った。カウンタスクリーニングによるNR6Wt細胞に対する結合への特異性について、すべての抗体を試験した。

10

【0231】

(組み換え抗EGFRvIII抗体の精製)

より大規模な產生において、重鎖および軽鎖の発現ベクター(2.5μgの各鎖/ディッシュ)をHEK293細胞で70%コンフルエントであった10枚の100mmのディッシュ内にリポフェクトした。トランスフェクトした細胞を37℃で4日間インキュベートし、上清(6mL)を回収し、6mLの新鮮な培地と交換した。7日目に、上清を取り出し、最初の回収物とともにプールした(10枚のプレートから全部で120mL)。プロテイン-A セファロース(Amersham Biosciences、ニュージャージー州ピスカタウェイ)アフィニティクロマトグラフィー(1mL)を用いて各抗体を上清から精製した。pH2.5の0.1Mグリシン500mcLを用いてプロテイン-Aカラムから抗体を溶出した。溶出液をpH7.4のPBSで透析し、フィルタで無菌化した。非還元SDS-PAGEによって抗体を分析することで純度および収量を評価した。さらに、OD250におけるUV分析によって濃度を測定した。

20

【0232】

(組み換え抗EGFRvIII mAbによるEGFRvIII受容体のインターナリゼーション)

XenoMax由来のIgG1組み換え抗体を発現させ、先に説明したように精製し、定量した。さらに、抗体をNR6M細胞のEGFRvIII受容体に対するそのインターナリゼーション能についてアッセイした。250,000個のNR6M細胞0.25μg/mlを一次抗体(SC95、SC131、SC133、SC139、SC150、SC170、SC211、SC230、SC250および対照としてヒト13.1.2)とともに3回、96ウェルV底プレート内で氷上で7分間インキュベートした。PBS中の冷却10%FCSで細胞を洗浄し、3μg/mlで二次抗体(SSA Alexa抗ヒトIgGFab)Fabを添加し、氷上で7分間インキュベートした。細胞をPBS中の冷却10%FCSで1回洗浄し、次いで冷培地で再懸濁した。次いで、3サンプルのうちの2セットを37℃でインキュベートし、残存する1セットを4℃で1時間インキュベートした。その後で4℃でインキュベートされた細胞および37℃でインキュベートされた1セットの細胞をグルタチオンによって氷上で1時間処理した(前記の通り)。次いで、PBS中の冷却1%FCS100μlで細胞を洗浄して再懸濁し、FACSによって分析した。%インターナリゼーションをFACS分析から得られた幾何学的平均値から計算した[(グルタチオン存在下の37℃での平均値-グルタチオン存在下の4℃での平均値)/(グルタチオン非存在下の37℃での平均値-グルタチオン存在下の4℃での平均値)]。NAとは、FACS分析を実施したものの、データを表3.12に示さなかったことを意味する。

30

【0233】

40

【表13】

表3.12

mAb	FACS幾何平均			%インターナリゼーション
	グルタチオン 非存在下 37°C	グルタチオン 存在下 37°C	グルタチオン 存在下 4°C	
13.1.2	22.12	19.19	5.38	82.5%
sc95	22.56	17.75	5.13	72.4%
sc131	NA	NA	NA	72%
sc133	23.39	18.63	6.24	72.2%
sc139	22.64	19.23	4.88	80.8%
sc150	20.29	7.78	4.66	20.0%
sc170	19.97	7.75	4.67	20.1%
sc211	20.76	8.23	4.78	21.6%
sc230	20.68	7.97	5.02	18.8%
sc250	24.13	8.07	4.84	16.7%

10

20

【0234】

13.1.2は、EGFRvIIIエピトープを対象とするハイブリドーマ生成(実施例2)を介して生成され、この実験においてポジティブ対照として用いられた抗体であった。表3.12におけるこれらの結果は、2種類の抗体のサブセット即ち効率的にインターナリゼーションされたもの(70~80%)およびインターナリゼーションされなかったもの(22%以下)の存在を明らかにする。

【0235】

(実施例4:ヒト抗EGFRvIII抗体のエピトープマッピング)

本発明の特定の抗体が結合するエピトープを決定するために、特異的なEGFRvIIIペプチド配列由来の合成ペプチドを用い、6つのヒトモノクローナル抗体および3つのマウスモノクローナル抗体(mabs)のEGFRvIIIに対するエピトープをマッピングした。マッピングした抗体は、ヒトハイブリドーマ由来の抗EGFRvIII13.1.2抗体、ヒトXenoMax由来の抗EGFRvIII131、139、250、095、および211抗体、ならびにマウス抗EGFRvIII H10、Y10、およびB9抗体(Dr.D.Bigner、デューク大学を由来)であった。

30

【0236】

用いたアプローチは、ヒト抗EGFrVIII抗体のこれらのペプチドエピトープとの分子相互作用を試験するためのカスタムしたSPOTペプチドアレイ(Sigma Genosys)であった。SPOT技術は、抗体エピトープの系統的分析に適するフォーマットにおけるペプチドの固相合成に基づく。カスタムアレイオリゴペプチドの合成は、Sigma-Genosysから購入可能である。EGFrVIII変異体のアミノ酸配列由来のオーバーラッピングオリゴペプチドのペプチドアレイをSigma-Genosysから注文した。

40

【0237】

ポリプロピレンメンブレンシート上のスポットとして、連続する12-merペプチドを合成した。ペプチドアレイは、EGFrVIII配列の残基1~20に及び、これらはwtEGFrの細胞外ドメインにおけるアミノ酸6~273の欠失および接合部におけるグリシン(G)残基の生成を意味していた。各々の連続するペプチドについて、前のペプチドから1残基ずらして、アレイオリゴペプチドのネストされたオーバーラッピングライブラリーを生成した。9種類のペプチドが結合したメンブレンを9種類の異なる抗EGFrVIII抗体(1 μg/ml)と反応させた。メンブレン結合ペプチドに対するmAbの結合を、HRP結合二次抗体を用いた増幅化学発光(ECL)を利用して酵素結合免疫吸着アッセイによって評価した。利用したアレイを表4.1に示

50

す。

【0238】

【表14】

表4.1
スポットアレイ配列:

1.ALEEKKGNYVVT(配列番号72)
2.LEEKKGNYVVT(配列番号59)
3.EEKKGNYVVT(配列番号73)
4.EKKGNVYVVT(配列番号74)
5.KKGNYVVT(配列番号75)
6.KGNVYVVT(配列番号76)
7.GNYVVT(配列番号77)
8.NYVVT(配列番号78)
9.YVVT(配列番号79)

10

【0239】

さらに、コンビナトリアルアラニンスキャンによって機能的エピトープをマッピングした。この処理において、コンビナトリアルアラニンスキャン方法を用いることで、抗EGFR vIII mAbとの相互作用に必要なEGFrVIIIペプチドのアミノ酸を同定した。これを達成するため、アラニンスキャン用にSPOTアレイの2番目のセットを指定した。12個の残基のそれぞれにアラニン置換を含む1群の変異体ペプチドを上記のようにスキャンした。変異しなかった配列であるスポット#1は、抗体結合におけるポジティブ対照である。利用したアレイを表4.2に示す。

【0240】

20

【表15】

表4.2
アラニン走査アレイ:

1.LEEKKGNYVVTD(配列番号--59)	10
2.AEEKKGNYVVTD(配列番号80)	
3.LAEKKGNVVT(配列番号81)	
4.LEAKKGNYVVTD(配列番号82)	
5.LEEAKGNYVVTD(配列番号83)	
6.LEEKAGNYVVTD(配列番号84)	
7.LEEKKANYVVTD(配列番号85)	
8.LEEKKGAYVVTD(配列番号86)	
9.LEEKKGNAVVTD(配列番号87)	
10.LEEKKGNYAVTD(配列番号88)	
11.LEEKKGNYVATD(配列番号89)	20
12.LEEKKGNYVVAD(配列番号90)	
13.LEEKKGNYVVTA(配列番号91)	

【0241】

ヒトEGFrVIIIに対する9種類全部のmAbのエピトープをマッピングし、SPOTの手順によって同定した。9種類全部の抗体をペプチドと反応させた。3種類のマウス抗体および6種類のXenoMouseマウス由来のヒト抗体を用いて得られる結果を表4.3に示す。ハイライトされた残基は、本発明者がアラニンに変異させ、試験抗体による結合が無くなった残基である。したがって、これらは抗体への結合に関連する残基である。

30

【0242】

【表16】

表4.3

EGFR	A	T	C	V	K	K	C	P	R	N	Y	V	V	T	D	H	G	S	C	V	R	A	SEQ ID NO: 92	
EGFrVIII				L	E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T	D	H	G	S	C	V	R	A	(SEQ ID NO: 93)	
13.1.2				E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T										(SEQ ID NO: 94)	
131				E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T										(SEQ ID NO: 94)	
139				L	E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T	D								(SEQ ID NO: 95)	
250				L	E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T	D								(SEQ ID NO: 95)	
095											Y	V	V	T	D	H								(SEQ ID NO: 96)
211											Y	V	V	T	D									(SEQ ID NO: 97)
H10											Y	V	V	T	D									(SEQ ID NO: 97)
Y10						E	E	K	K	G	N	Y	V	V	T									(SEQ ID NO: 98)
B9										G	N	Y	V	V	T									(SEQ ID NO: 99)

【0243】

表4.3に示された網掛けしたアミノ酸は、抗体認識に対するエピトープに最も関連がある残基である。オーバーラッピング配列のペプチドを用いて10種類全部のmAbのエピトー

50

プの最小の長さを正確にマッピングし、エピトープ中の各残基をアラニンで置換することによって、変異エピトープに結合するmAbに対する耐性を判定した。

【0244】

表4.4に、抗体に関する更なる特性をまとめた。特に、非還元か還元のいずれかの条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動のウェスタンプロットプレートで抗体サブセットの腫瘍細胞系の溶解物に対する結合性に対して試験した。精製された組み換えタンパク質も含める。非還元と還元の両方の条件下での抗体結合は、エピトープが直鎖状であることを示唆する。試料：

EGFRvIII-ウサギFc融合タンパク質

H1477-EGFRvIII発現コンストラクトでトランスフェクトしたH80ヒト腫瘍細胞系

10

(これらの細胞は、EGFRとEGFRvIIIの両方を発現する。)

EGFR-精製野生型EGFRタンパク質

A431-野生型EGFRのみを発現するヒト腫瘍細胞系

A549-野生型EGFRのみを発現するヒト腫瘍細胞系

H80-野生型EGFRのみを発現するヒト腫瘍細胞系

EGFR Biacore-特異性の高感度試験として、精製EGFRに対する結合性についてBiacoreでmAbを試験した。

【0245】

【表17】

表4.4

20

mAb	EGFRvIII ウェス タン (ネイティブ)	rEGFRvIII ウェス タン (還元)	EGFRvIII FACS	H1477 ウェス タン (ネイティブ)	H1477 ウェス タン (還元)	pep3 KinExA	EGFR ウェス タン (ネイティブ)	EGFR ウェス タン (還元)
13.1.2	+	+	+	+	+	25pM	-	-
131	+	+	+	+	+	0.05pM	-	-
139	?	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
095	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
211	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
250	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND

【0246】

30

【表18】

MAb	EGFR Blacore	A431 FACS	A431 ウェス タン (ネイティブ)	A431 ウェス タン (還元)	A549 FACS	A549 ウェス タン (ネイティブ)	A549 ウェス タン (還元)	H80 FACS	H80 ウェス タン (ネイティブ)	H80 ウェス タン (還元)
13.1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
131	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-
139	N.D.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
095	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
211	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
250	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

【0247】

これらの結果は、これらmAbの大半が本質的に同一の結合特異性を示し、7種類のmAbがEGFRvIII変異体に特異的に結合することが示された一方、2種類のmAbsが、A431細胞の溶解物を用いた精製タンパク質ウェスタンプロットにおいて野生型EGFr(マウスH10およびヒト211)と交差反応したことを示した。しかしながら、ウェスタンプロットにおいて、抗体211が、ネイティブのEGFRvIIIと還元され精製されたEGFRvIIIの両方に結合する一方、非還元タンパク質にややより強く結合することに着目すべきである。A431細胞の溶解物に対する試験では、抗体211が、非還元試料の野生型EGFRのサイズのバンドに強く結合するが、還元試料中には何のシグナルも認められない。このことは、抗体211の結合が野生型EGFR中に存在する立体構造エピトープに起因し、EGFRvIII変異体とは異なる挙動を示したことを示唆する。5種類のmAbのエピトープがEGFRvIII変異体に特異的なグリシン残基に及ぶ残基2~12の範囲内にある一方、(H10および211を含む)4種類のmAbのエピトープがEGFRvIIIおよび野生型EGFrに共通の残基7~16に及ぶ。FACSにおいて抗体131はA431およびA549の細胞に結合する。これらの細胞は、EGFR発現に対して陽性である一方でEGFRvIIIの発現に対して明らかに陰性である。抗体131は、ウェスタンにおいて、非還元もしくは非還元精製EGFRまたはA431およびA549細胞の還元もしくは非還元溶解物に結合しないが、これは抗体131が一部のヒト腫瘍細胞系の細胞表面上に発現されたEGFRの変異体に結合している可能性があることを示唆する。この変異体は変性の影響を受けやすいと考えられる。

【0248】

(実施例5: in vitroにおける抗EGFRvIII抗体の特異性の特性決定)

精製抗体の特異性は、野生型もしくは変異体EGFRをトランスフェクトしたNR6細胞においてFACS解析を実施することによって確認した。細胞を5 µg/mlずつの各抗体とともに氷上で1時間インキュベートし、FAC緩衝液で洗浄し、続いてPE結合ヤギ抗ヒトIgGとともにインキュベートした。

【0249】

(実施例6: 増幅されたEGFRとの交差反応)

変異体EGF受容体を認識する抗体は、遺伝子増幅が発生している細胞上の野生型EGF受容体のサブセットと交差反応することが示されている(Johnsら、Int.J.Cancer.98:398、2002)。同定されたヒトEGFRvIII抗体が類似の特性を有するか否か判定するために、培養中の種々の細胞における同抗体の野生型EGF受容体に対する認識能について試験した。抗体を指定された細胞系とともに4℃でインキュベートした。FACS緩衝液で洗浄後、フィコエリスリン(phycoerythrin)結合二次抗体を添加し、インキュベーションを継続した。分析対象のすべての細胞系が野生型EGFRを発現した。野生型EGFRの1つのサブセットは、抗体XG1

～131によって、A431とSF-539細胞上では認識されたが、A498もしくはSKRC-52細胞上では認識されなかった。EGFRvIIIに対する別種の抗体である13.1.2は、この野生型EGFRのサブセットを認識しなかった。併せて考慮すると、これらのデータは、変異体EGFRvIIIを認識する抗体のサブセットのみが細胞表面上の野生型EGFRを認識できることを示唆する。変異体EGFRvIIIを認識する特定の抗体における野生型EGF受容体の小集団に対する認識能は、EGFRの総密度に依存しないが、腫瘍細胞に固有の新規な立体構造エピトープを意味する可能性が高い。EGFRvIIIを認識する抗体における野生型受容体の小集団と交差反応する能力は、変異体受容体の接合部内の特異的なエピトープおよびこの特徴的なエピトープに対する抗体の親和性の両方によって決定できる(本明細書におけるエピトープマッピングの結果および親和性を決定する切片を参照)。

10

【0250】

(実施例7: *in vitro*における抗EGFRvIII抗体の特異性の特性決定:抗体の細胞系に対する結合)

1群の細胞系に関してFACS解析を実施することによって精製抗体の特異性を確認した。ヒト膠芽細胞腫系であるH80およびEGFRvIIIを高レベルに発現するH1477(H80-EGFRvIII)、ヒト類表皮癌系であるA431、およびヒト肺癌細胞系であるA549を細胞系として用いた。ATCC(米国メリーランド州ロックビル)から得たA431およびA549以外のすべての細胞系は、Dr.Bignerから得た。細胞を10 µg/mlずつの各抗体とともに氷上で30分間インキュベートし、FACS緩衝液で洗浄し、続いてJackson ImmunoResearch(米国ペンシルベニア州ウェストグローブ)製PE結合ヤギ抗ヒトIgGとともにインキュベートした。図9A～9Lおよび10A～10Dでは、暗色のヒストグラムは不適切なIgGで染色された細胞を示し、縁取られたすなわち白色のヒストグラムは適切な抗体の染色について示す。抗EGFRvIII抗体13.1.2、131および139は、トランスフェクトした細胞系のEGFRvIIIタンパク質に結合する。結果の一部をまとめたグラフを図9M～9Pに示す。

20

【0251】

変異体EGF受容体を認識する抗体は、遺伝子増幅が生じている細胞上の野生型EGF受容体のサブセットと交差反応することが示されている(Johnsら、Int.J.Cancer.98:398、2002)。この実施例では、XG1-131およびXG1-139によって染色されたA431およびA549。図10Bおよび図10Cは、131および139が、単にH80系、A431系およびA549系内の集団のサブセットを認識する代わりに、野生型EGFRと特定の交差反応を行うことを示す。しかしながら、この交差反応はこれらの細胞系におけるABX-EGF(E7.6.3)染色のわずか10%のレベルで行われるにすぎない。これらの結果は、図9A～9Pおよび図10A～10Dに提示される。

30

【0252】

細胞表面抗原を認識する抗体は、薬物または毒素を細胞内に特異的に輸送する送達賦形剤として使用できる。抗体が抗原のインターナリゼーションを刺激する場合には、おそらくは薬物または毒素が抗体から切断された後で薬物または毒素が細胞の死を引き起こす可能性がある。上記の機構を利用することで、動物および患者における腫瘍細胞を特異的に殺傷することができる。薬物を細胞に送達できる抗体を選択する1つの方法は、二次細胞毒性アッセイである。これらのアッセイでは、一次抗体は細胞表面に結合し、薬物または毒素と結合した二次抗体を添加する。一次抗体が抗原のインターナリゼーションを刺激する場合、二次抗体もともにインターナリゼーションされ、薬物または毒素の切断時には細胞死を招くであろう。

40

【0253】

(実施例8: 二次細胞毒性アッセイ)

この実施例により、どのようにして抗体が、二次抗体を介して結合した毒物を、標的エピトープを発現する細胞(標的細胞)に向かわせるのに使用することができるかを求める。毒物を結合した抗体を、標的ペプチドを発現する細胞に投与する。これらの細胞の死は、抗体毒物の組合せが有効であることを示す。

【0254】

要求される特異的な致死量は、特定の使用に左右されて変化する可能性がある。1つの

50

実施形態では、癌の可能性がある細胞の任意の低下で十分である。例えば、標的細胞では、0～1、1～5、5～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～95、95～99、100%のいずれかの低下で十分であろう。別の実施形態では、標的細胞数において所望される低下は、抗体の組合せに関する非特異的致死性の機能である。例えば、抗体によって非特異的な標的化および致死性が極めて低下している場合、標的細胞数が10%低下するだけで抗体/毒素の組合せは十分となりうる。例えば、抗体/毒素の組合せによっては10%未満の標的でない集団が死に至る。さらに、その特定量は特定の需要や状況に左右されるだろう。特に有用であるのは、標的細胞に対して高度に選択性があり、標的細胞または同細胞に関連するタンパク質に十分に結合する抗体である。1つの実施形態では、標的はEGFRvIIIタンパク質またはそれらの断片である。1つの実施形態では、EGFRvIIIタンパク質もしくはそれらの断片に特異的な、インターナリゼーションされる際に効率的なヒトのまたはヒト化した抗体は、EGFRvIIIタンパク質もしくは断片と密接に関連し、有効な毒素に関連するが、このことはこれらの実施例から教示される。

10

【0255】

(実施例9：二次細胞毒性clonogenic assay)

二次細胞毒性アッセイに加え、EGFRvIII特異的抗体をclonogenic assayに用いることができる。前記したように、毒物が結合した抗体を細胞に投与する。増殖の減少は、抗体毒物の組合せが効果的であることを示す。

【0256】

(実施例10：細胞毒性アッセイにおける抗EGFRvIII抗体(13.1.2)の直接結合物)

20

間接的結合物に関する前記実施例に加え、毒物が直接結合した抗体を用いてこれらの試験を行うことができる。直接毒物に結合した抗体は、実施例8の抗体毒物結合物と同様の方法で使用する。

【0257】

(実施例11：in vivoにおける抗EGFRvIII抗体の特性決定)

抗体毒物結合物を、in vivoでも使用することができる。抗体毒物結合物を、標的細胞を有し標的ペプチドを発現する試験組織に投与する。標的組織内での標的細胞数の減少は、毒物結合抗体がin vivoセッティングにおいて機能する能力を有することを示す。

【0258】

(実施例12：癌患者/ヒト腫瘍におけるEGFRvIIIの発現)

30

EGFRvIIIに特異的に結合することで知られる2つのマウスモノクローナル抗体(B9、IgG1およびY10、IgG2(Dr.Bigner、デューク大学))の組合せを用いて種々の癌患者由来の凍結組織切片を染色することにより、ヒト腫瘍におけるEGFRvIIIの発現を測定した。同切片をアイソタイプが同じである対照抗体で染色した。すべての患者の試料から得られた染色結果をまとめたものを表12.1に示す。

【0259】

【表19】

表12.1
患者サンプルから得られた染色結果のまとめ

腫瘍タイプ	試料の大きさ(N)	EGFRvIII>+	EGFRvIII>++
膠芽細胞腫	8	100%	100%
乳癌	100	31%	24%
NSCL癌	51	47%	39%
頭頸部癌	21	42%	38%
前立腺癌	22	4.5%	4.5%

EGFRvIII>+はEGFRvIIIを発現するすべての腫瘍を含む。

EGFRvIII>++は少なくとも10%以上のEGFRvIIIを発現する同腫瘍のみを含む。

【0260】

主に細胞膜および/または細胞質上に発現を認めた。かなり多数の乳癌(31%)、NSCL(47%)、および頭頸部(42%)癌の染色標本はEGFRvIIIに対して陽性を示した。ある例によると、質の高いIHC染色を得るのに、2種類の抗体の使用は、1種類の抗体の使用よりも優れていける可能性がある。凍結組織標本は固定化組織よりも優れていた。

【0261】

当業者によって認識されているように、治療中の腫瘍がEGFRvIIIを発現することを確かめるために、治療用抗体を用いて患者を試験することは有利であろう。

【0262】

(実施例13: in vivoにおける抗EGFRvIII抗体の特性決定)

実施例11の方法を用いることで、肺癌および神経膠腫が治療されることになる。これは動物モデルの作製によって幅広く検討されることになる。膠芽細胞腫および肺癌に対する動物モデルを以下のように作製する。wt-EGFRを発現する肺癌細胞を、EGFRvIIIでトランスフェクトする。同細胞をnu/nuマウスの肺の中に注射し、腫瘍が上記に匹敵するステージに進行させる。次いで、抗EGFRvIII結合物を必要に応じて1から10日ごとに上記のように静脈内に注射する。次いで、それら癌細胞の大きさおよび予防または持続的成長の抑制をモニターすることで、これらの抗EGFRvIII抗体および抗体・毒素の組合せの有効性を判定することになる。当業者によって認識されるように、これは本明細書において開示される抗体のいずれかに対して実施可能である。

【0263】

(実施例14: 置換アッセイによるエピトープの機能的特性決定)

EGFRvIIIエピトープ内部における結合にとって不可欠なこれらのアミノ酸残基の正体をさらに決定するために、エピトープペプチド内のアミノ酸の置換解析を実施した。実施例4に由来する配列、すなわちLEEKKGNVYVTD(配列番号59)から開始した。この実施例では、マッピングされたエピトープの各アミノ酸を20種類の全L-アミノ酸によって1回につき1個置換することにより、あらゆる単一部位の置換が可能な類似体を合成し、スクリーニングすることでペプチド結合のフォーマットに関する詳細な情報を提供した。mAb131および13.1.2についての個別の置換パターンを同定した。これら置換から得られた結果について表14.1にまとめる。

【0264】

【表20】

表14.1

mAbs	認識配列
131	E E K K G N Y V V T (配列番号57)
13.1.2	E E K K G N Y V V T (配列番号57)

【0265】

10

mAb13.1.2における5つの残基は結合にとって重要(太字)であるが、4つの残基のみがmAb 131の結合にとって不可欠であると思われる。残りの残基を結合上の損失をあまり伴うことなく様々なアミノ酸で置換した。131および13.1.2エピトープは配列および長さで一致するものの、それぞれにおける結合パターンは異なるように思われる。mAb131の結合は残基EKNY(配列番号60)に大きく依存する。一方、前記データにより、残基EEKGN(配列番号61)がmAb13.1.2の結合に関与することが明らかになった。

【0266】

(実施例15:mAbs鎖シャッフリング)

mAbの131および13.1.2の重鎖および軽鎖をシャッフリングし、293T細胞内に一過的にトランスフェクトした。72時間後、上清を収集し、ELISAによって分泌およびEGFrVIII抗原に対する結合についてアッセイした。

20

【0267】

結果として、13.1.2の鎖を有する131の重鎖の発現から得られた抗体とその逆は十分に発現することが示されたが、おそらくはEGFrVIII抗原に対するこれら2種類のmAbの異なる結合パターンに起因して結合活性が75%低下するであろう(データは示さない)。これにより、mAbの131および13.1.2という2種類のパラトープ間の差異が求まり、さらに2種類のmAb間において選択されたエピトープの構造的特徴が異なることを示唆している。

【0268】

(実施例16:131の分子モデリングおよびそのパラトープ)

30

本実施例は、これら実施形態のタンパク質において三次元構造がいかにして生成できるかを実証する。Accelrys(カリフォルニア州サンディエゴ)製InsightIIモデリングパッケージを用い、抗体131の可変領域の三次元構造モデルを相同モデリングアプローチを通じて生成させた。同モデルを以下の表16.1に記載される可変領域配列から構築した。残基の番号付与を軽鎖アミノ酸から開始し、重鎖アミノ酸へと継続した。

【0269】

【表21】

表16.1

軽鎖可変領域

DTVMTQTPLSSHVTLGQPASISC	(配列番号100)	
RSSQSLVHSDGNTYLS(CDR1)	(配列番号101)	
WLQQRPGPPRLLIY	(配列番号102)	10
RISRRFS(CDR2)	(配列番号103)	
GVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYC	(配列番号104)	
MQSTHVPRT(CDR3)	(配列番号105)	
FGQTKVEIK	(配列番号106)	

重鎖可変領域

QVQLVESGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFR	(配列番号107)	20
NYGMH(CDR1)	(配列番号108)	
WVRQAPGKGLEWVA	(配列番号109)	
VIWYDGSDKYYADSVRG(CDR2)	(配列番号110)	
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(配列番号111)	
DGYDILTGNGNPRDFDY(CDR3)	(配列番号112)	
WGQGTLTVVSS	(配列番号113)	30

【0270】

抗体131の配列を用いてProtein Data Bankを探索することで、相同抗体およびそれらの構造を同定した。相同抗体の配列の131抗体に対する類似性に基づき、数種類の構造が選択された。Protein Data Bank由来の試料のモデリング用に選択した構造は、Protein Data Bankで同定されている1HEZ、2H1P、1AQK、1DQL、1MF2および1FLRを有していた。次いで、これらの鑄型構造を重ねあわせによってアライメントさせ、用いることで複数の鑄型の中で構造に基づく配列アライメントを生成した。次いで、抗体131の可変領域の配列を鑄型配列に対してアライメントさせた。構造および配列のアライメントを用いることで、131抗体の可変領域における分子モデルを生成した。軽鎖CDR1の配列は、RSSQSLVHSDGNTYLS(配列番号101)であった。軽鎖CDR2の配列は、RISRRFS(配列番号103)であった。軽鎖CDR3の配列はMQSTHVPRT(配列番号105)であった。重鎖CDR1の配列はNYGMH(配列番号108)であった。重鎖CDR2の配列はVIWYDGSDKYYADSVRG(配列番号110)であった。重鎖CDR3の配列はDGYDILTGNGNPRDFDY(配列番号112)であった。

【0271】

抗体131に対して相互作用する表面を構造モデルから算出し、図11に示した。様々なCDRをL1(軽鎖CDR1)10、H1(重鎖CDR1)20、L2 30、H2 40、L3 50およびH3 60のように同定する。予測された抗体131と相互作用する表面に関する顕著な特徴は深いキャビティである。このキャビティを、軽鎖CDR1によって与えられる小部分とともに、主に重鎖のCDR2、CDR3

および軽鎖のCDR3によって囲まれている。キャビティはおそらくは結合ポケットである。結合キャビティの5オングストローム以内に、残基31、37、95～101、143～147、159、162～166、169～171、211～219、221および223が存在する。これらの残基は、パラトープを含み、EGFRvIIIエピトープの結合に密接に関与する可能性が高い。さらに、これらの残基は一般に結合部位に対する重要な構造上の特徴を提示する可能性が高い。

【0272】

(実施例17：抗体131のモデルを確立する部位特異的変異導入)

本実施例では、結合に重要である残基を示唆するモデルを試験する1つの方法を示す。また、本実施例からいくつかの変異抗体がもたらされる。131クローンの変異抗体は、単一残基の変異をmAb 131の重鎖や軽鎖に導入することで作成される。これらの変異体を分析して、点変異によって変化した側鎖が抗原への結合に及ぼす影響を明らかにした。

10

【0273】

mAb 131の重鎖および軽鎖を変化させた。重鎖では、部位特異的変異導入法によって216番目のLをRに変えた。軽鎖では、99番目のVをFに変更した。野生型の配列と比較すると、両変異は変異抗原の発現と分泌に影響を与えていた。いずれの変異でも、変異mAbはEGFRvIII抗原に結合しなくなった。L216およびV99をそれぞれRとFに置換すると活性が低下するので、L216およびV99はEGFRvIII抗原との重大な接触をおそらく有することが証明された。もちろん、これらの置換が抗体全体の構造を崩壊させるという選択肢は常に存在する。

【0274】

(実施例18：13.1.2の分子モデリングとパラトープ)

20

Accelrys(カリフォルニア州サンディエゴ)が販売するInsightIIモデリングパッケージと同じモデリング法によって、抗体13.1.2の可変領域の3次元構造モデルを作成した。このモデルは、下記の表18.1に示す可変領域配列から、既知のX線結晶構造をテンプレートに形成された。

【0275】

【表22】

表18.1

軽鎖可変領域(1~113)

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC	(配列番号114)	
RSSQSLVHSDGNTYLS(CDR1)	(配列番号101)	
WLHQRPQPPRLLIY	(配列番号115)	10
KISNRFS(CDR2)	(配列番号116)	
GVPDRFSGSGAGTAFTLKISRVEAEDVGVYYC	(配列番号117)	
MQATQLPRT(CDR3)	(配列番号118)	
FGQGTKVEIKR	(配列番号119)	

重鎖可変領域(114~234)

QVQLVESGGVVQPGRSRLSCAASGFTFS	(配列番号120)	
SYGMH(CDR1)	(配列番号121)	20
WVRQAPGKGLEWVA	(配列番号122)	
VIWYDGSNKYYVDSVKG(CDR2)	(配列番号123)	
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(配列番号124)	
DGWQQLAPFDY(CDR3)	(配列番号125)	
WGQGTLVTVSSA	(配列番号126)	

【0276】

軽鎖CDR1の配列はRSSQSLVHSDGNTYLS(配列番号101)であった。軽鎖CDR2の配列はKISNSRF S(配列番号116)であった。軽鎖CDR3の配列はMQATQLPRT(配列番号118)であった。重鎖CDR1 の配列はSYGMH(配列番号121)であった。重鎖CDR2の配列はVIWYDGSNKYYVDSVKG(配列番号12 3)であった。重鎖CDR3の配列はDGWQQLAPFDY(配列番号125)であった。

【0277】

抗体13.1.2の配列を用いてProtein Data Bankを検索し、ホモログ抗体を明らかにした。抗体13.1.2の配列との類似性に基づいて、Protein Data BankのIDが1HEZ、2H1P、8FAB 、および1AQKの構造をモデリングテンプレートとして選択した。テンプレートの構造を重ね合わせるように一直線に並べて、構造に基づく配列アラインメントをテンプレート間で作成した。抗体13.1.2の可変領域配列をテンプレートの配列と並べた。構造および配列アラインメントを用いて抗体13.1.2の可変領域の分子モデルを作成した。

【0278】

このモデルの相互作用面を算出した結果を図12に示す。13.1.2モデルの大きな特色として、CDR領域表面の長細い溝が挙げられる。この溝の境界は、重鎖のCDR2 140とCDR3 160 、軽鎖のCDR1 110、CDR2 130、およびCDR3 150によって形成されている。この溝の一端は軽鎖CDR3 150の残部と接し、他端は重鎖と軽鎖の接点付近で重鎖CDR3 160の広い領域に開放している。この溝はおそらく抗原に対する結合窩であると考えられる。結合溝の5オングストローム以内に31、33、35~39、51、54~56、58~61、94~101、144~148、160、16 3~166、172、および211~221番目の残基がある。これらの残基はEGFRvIIIエピトープが結合するパラトープを構成している可能性が高い。また、これらの残基は結合部位一般に重要な構造的特色となっていると考えられる。

【0279】

(実施例19：ペプチドと抗体の結合モデル)

実施例14のエピトープマッピング研究から、エピトープがmAb 13.2.1のパラトープに結合するために必要なアミノ酸は6残基からなるペプチドEEKKGN(配列番号127)の中に存在することが明らかにされた。したがって、この6残基ペプチドを13.1.2構造モデルのCDR領域と組み合わせて結合モデルを作成した。まず、ペプチドEEKKGN(配列番号127)のモデルを作成した。これは前記の方法と同様に行われたが、今回はProtein Data Bankで同定された1181のX線結晶構造をテンプレートとして使用した。次に、このペプチド構造を長い溝の中にマニュアル操作で置いて、初期複合体を形成した。InsightIIの結合モジュールを用いて立体配座空間および配向空間をモンテカルロ法で自動的に検索した。ファイ角、ブシー角、およびカイ角に完全な回転自由度を与えることによってペプチドの立体配座に柔軟性を持たせた。結合の過程において、結合溝から5オングストローム以内にある残基は可動性を有したが、それ以外の抗体の残基は固定された。モンテカルロ検索によって発見された信頼性の高い配置にsimulated annealingおよびエネルギー最小化を行い、最終複合構造モデルを得た。得られた各結合モデルで、InsightIIパッケージのDiscover_3モジュールを用いて抗体とペプチドとの相互作用エネルギーを算出した。全結合モデルの相互作用エネルギーを評価し、全体的な抗体-ペプチドの相互作用がもっとも強いモデルを検討した。これらの相互作用エネルギーを図13Aおよび図13示す。

【0280】

図13Bに示すように、この結合モデルにはペプチドEEKKGN(配列番号127)と抗体13.1.2との間に6カ所の水素結合が存在する。ペプチド残基にはN末端からC末端の方向に1から6までの番号がふられている。6カ所の水素結合を緑色の点線で示す。水素結合を形成する6組のアミノ酸は、E2...Y172、K3...H31、K4...H31、N6...D33、N6...Y37、N6...K55である。この結合モデルでは、伸びた鎖構造の溝にペプチドが結合している。ペプチド内の残基は溶媒と抗体表面に交互に面している。結合溝に面し抗体との接触が著明な残基はE2、K4、N6である。これは、この3残基がペプチドの結合に重要である可能性を示しており、エピトープマッピングの結果と一致する。6個のペプチド残基のそれぞれと13.1.2のパラトープとの間の相互作用エネルギーをDiscover_3モジュールで算出し、その結果を表19.1に示す。表19.1は6個のペプチド残基のそれぞれと13.1.2のパラトープとの相互作用エネルギーを示す。エネルギーの単位はすべてkcal/molとする。

【0281】

相互作用エネルギーの高い残基はエネルギーの高い順にN6、K4、E2であり、抗体-抗原反応においてこれらの残基が抗原側で重要な役割を担っていることが裏付けられ、これも実験データと一致していた。これらのデータは、結合モデルを支持する強固な証拠である。本実施形態では、パラトープは結合したペプチドから5オングストローム以内にある残基と定義される。定義のようなパラトープを構成する20残基は、31～33、35、37、55、96～101、148、163、165、170、172、178、および217～218番目の残基である。残基ベースで各抗体残基が抗体-抗原反応にどの程度貢献しているかを評価するために、パラトープ残基とペプチドEEKKGN(配列番号127)との相互作用エネルギーを前記20残基のそれぞれについて算出した。その結果を表19.2に列挙する。表19.2は、20個のパラトープ残基のそれぞれとペプチドEEKKGN(配列番号127)との相互作用エネルギーを示す。エネルギーの単位はすべてkcal/molとする。ペプチドとの相互作用エネルギーが高かった残基はLys55とHis31であり、それにTyr172、Ala96、Asp33、Tyr37、Leu99、Thr97、Gln98、Lys178、Asn170が続いた。

【0282】

10

20

30

40

【表23】

表19.1

ペプチド残基	クーロン	VdW	計
E1	-2.013	-3.738	-5.751
E2	-10.661	-0.617	-11.278
K3	-9.816	-0.493	-10.309
K4	-11.123	-0.968	-12.091
G5	-1.241	-1.468	-2.709
N6	-16.504	-0.181	-16.685

10

【0283】

【表24】

表19.2

13.1.2残基	クーロン	VdW	計
His31	-12.835	3.033	-9.801
Ser32	2.857	-1.062	1.794
Asp33	-4.181	-0.698	-4.879
Asn35	0.253	-1.009	-0.756
Tyr37	-2.058	-2.463	-4.521
Lys55	-14.363	1.568	-12.794
Ala96	-6.077	0.896	-5.182
Thr97	-2.739	-1.431	-4.171
Gln98	-2.542	-1.548	-4.09
Leu99	-1.507	-2.779	-4.286
Pro100	0.439	-0.379	0.061
Arg101	3.992	-0.549	3.443
His148	0.101	-0.083	0.018
Val163	-0.104	-0.237	-0.342
Trp165	1.358	-1.122	0.236
Asn170	-2.102	-0.487	-2.589
Tyr172	-8.7	0.896	-7.804
Lys178	-3.614	-0.03	-3.644
Leu217	0.761	-1.426	-0.664
Ala218	-0.071	-0.281	-0.352

20

30

40

【0284】

(実施例20：抗体の親和性を改善する合理的デザイン)

本実施例では、部位特異的変異導入法によって抗体の親和性を改善する合理的デザインの基礎として結合モデルがどのように利用できるかを示す。13.1.2パラトープの各残基を *in silico* で他の19種のアミノ酸のそれぞれに変化させた。結果として、19×20、すなわち計380種の仮想変異体が形成された。残基の置換後に50段階からなるエネルギー最小化

50

を行って変異を起こし、側鎖の変化によって局所立体配座の変化を誘発した。ペプチド全体とパラトープ全体との相互作用エネルギーを各変異体で算出した。全体の相互作用エネルギーが野生型の13.1.2よりも高い変異体は、ペプチドEEKKGN(配列番号127)に対してより強い親和性を秘め、EGFRvIII蛋白質全体に対しても強い親和性を有する可能性があると考えられた。これらの変異体の大半は野生型の13.1.2よりもクーロン相互作用が強かったが、ファンデルワールス(VdW)相互作用は野生型抗体よりも弱い変異体もあった。野生型抗体13.1.2のVdW相互作用エネルギーは-9.689kcal/molであることを考慮して、VdW相互作用エネルギーが-8.5kcal/molよりも低い変異体は除外した。相互作用エネルギーの総和が野生型13.1.2よりも高い残りの変異体を表20.1に列挙する。比較用に、野生型のデータを最下段に記載する。エネルギーの単位はすべてkcal/molとする。

10

【 0 2 8 5 】

【表25A】

表20.1

変異体	クーロン	VdW	計
Tyr172Arg	-93.004	-8.702	-101.706
Leu99Glu	-79.897	-8.506	-88.403
Arg101Glu	-77.984	-8.833	-86.817
Leu217Glu	-75.124	-8.998	-84.123
Leu99Asn	-73.337	-9.894	-83.231
Leu99His	-73.631	-9.008	-82.639
Ara101Asp	-71.983	-9.877	-81.861
Leu217Gln	-70.263	-9.795	-80.058
Leu99Thr	-69.882	-10.153	-80.035
Gln98Glu	-70.651	-9.257	-79.908
Leu217Asn	-70.989	-8.769	-79.758
Arg101Gln	-69.432	-10.164	-79.596
Leu217Asp	-69.934	-9.643	-79.578
Asn35Gly	-69.016	-10.191	-79.207
Tyr172His	-69.312	-9.509	-78.820
Val163Asn	-68.841	-9.944	-78.784
Tyr172Asn	-68.896	-9.871	-78.767
Ala218Lys	-70.024	-8.570	-78.594
Asn35Arg	-68.989	-9.604	-78.593
Trp165Lys	-69.578	-8.766	-78.344
Trp165Arg	-68.814	-9.216	-78.030
Leu99Tyr	-67.052	-10.464	-77.517
Tyr172Thr	-68.146	-9.225	-77.371
Ala96Thr	-67.534	-9.623	-77.158
Ala96Ser	-67.222	-9.822	-77.045
Pro100Trp	-67.399	-9.496	-76.894
Leu217Ser	-66.676	-10.133	-76.810
Ser32Ile	-66.700	-10.077	-76.777
Tyr172Ser	-67.588	-9.146	-76.734
His31Glu	-67.070	-9.461	-76.531
Leu217Tyr	-65.605	-10.726	-76.331
Val163His	-67.236	-9.064	-76.300
His148Ser	-66.780	-9.495	-76.274
His148Val	-66.634	-9.629	-76.263
His148Ala	-66.770	-9.473	-76.243
His148Gly	-66.762	-9.456	-76.217
His148Thr	-66.700	-9.508	-76.209
Leu99Ser	-66.126	-10.006	-76.132
Pro100Asp	-66.153	-9.787	-75.940
Trp165Glu	-66.665	-9.267	-75.932
His148Asn	-66.010	-9.889	-75.899
Pro100Gln	-65.873	-9.871	-75.745
Leu217Thr	-66.045	-9.672	-75.717
Ser32Val	-65.845	-9.854	-75.699
Ser32Pro	-65.807	-9.813	-75.620
Pro100Gly	-65.841	-9.774	-75.615
Pro100Ala	-65.889	-9.712	-75.601
Ser32Ala	-65.497	-10.089	-75.586
Ser32Thr	-65.723	-9.861	-75.584

10

20

30

40

【0286】

【表25B】

変異体	クーロン	VdW	計
Ala218Thr	-66.054	-9.505	-75.560
Pro100Ser	-65.831	-9.699	-75.530
Val163Gly	-65.993	-9.536	-75.529
Gln98Thr	-66.162	-9.277	-75.438
Pro100Met	-65.811	-9.602	-75.412
Ser32Met	-66.252	-9.153	-75.406
Ser32Gly	-65.509	-9.891	-75.399
Pro100Asn	-65.729	-9.655	-75.384
Tyr37Phe	-66.253	-9.020	-75.272
Val163Ala	-65.713	-9.543	-75.255
Leu217Ile	-65.479	-9.759	-75.238
野生型13.1.2	-65.517	-9.689	-75.205

10

【0287】

表20.1に記載した変異体は、抗体の親和性を改良する際に操作対象となり得る候補である。一覧表の上位14番目までの候補については、各残基が抗原側および抗体側に及ぼす影響についてさらに分析が行われ、提案された修飾の影響が検討されている。in vivoの部位特異的変異導入法の対象として、Tyr172Arg、Arg101Glu、Leu99Asn、Leu99His、Arg101Asp、Leu217Gln、Leu99Thr、Leu217Asn、Arg101Gln、およびAsn35Glyの10変異体が選択された。この結果は実施例21で述べる。

20

【0288】

(実施例21：13.1.2のモデルを確立する部位特異的変異導入法)

本実施例では、結合に重要な残基を示唆する前記モデルを検証する1つの方法を示す。また、本実施例によっていくつかの変異抗体がもたらされる。13.1.2の変異抗体は、13.1.2 mAbの重鎖や軽鎖に单一残基の変異を導入することで作成される。これらの変異体を分析して、種々の側鎖が抗原との結合に及ぼす影響を明らかにした。部位特異的変異導入法によって誘発された一連の変異を表21.1にまとめる。

30

【0289】

【表26】

表21.1

	鎖	変異
1	軽鎖(CDR3)	Arg101Asp
2	軽鎖(CDR3)	Arg101Gln
3	軽鎖(CDR3)	Arg101Glu
4	軽鎖(CDR1)	Asn35Gly
5	重鎖(CDR3)	Leu217Asn
6	重鎖(CDR3)	Leu217Gln
7	軽鎖(CDR3)	Leu99Asn
8	軽鎖(CDR3)	Leu99His
9	軽鎖(CDR3)	Leu99Thr
10	重鎖(CDR2)	Tyr172Arg

40

【0290】

表21.1に挙げた10の変異を13.1.2 mAbの重鎖または軽鎖にそれぞれ導入した。次に、変

50

異の生じたそれぞれの鎖を補完的な野生型の鎖とともに293細胞に導入した。ヒトIgG抗体の発現と分泌、およびEGFRvIII抗原への結合について上清を検討した。ELISAによる測定結果を表21.2にまとめる。

【0291】

【表27】

表21.2

	変異	結合エネルギー	発現	結合
1	Arg101Asp	-81.861	あり	なし
2	Arg101Gln	-79.596	あり	なし
3	Arg101Glu	-86.817	あり	なし
4	Asn35Gly	-79.207	あり	あり
5	Leu217Asn	-79.758	あり	あり
6	Leu217Gln	-80.058	あり	あり
7	Leu99Asn	-83.231	あり	あり
8	Leu99His	-82.639	あり	あり
9	Leu99Thr	-80.035	あり	あり
10	Tyr172Arg	-101.706	あり	あり
11	野生型	-75.205	あり	あり

【0292】

(実施例22: EGFRvIII/pFLAG変異体のコンストラクトの調製)

本実施例では、EGFRvIII変異体の作成法を示す。EGFRvIIIの細胞外領域をコードする1092塩基対の断片を、9712と9713のプライマー対(Qiagen、カリフォルニア州バレンシア)

プライマー#9712:5'-ataaaagcttcggagaaaagaaaggtaatta-3'(センス)(配列番号128)

プライマー#9713:5'-TTATTGGTACCTCAGGCGATGGACGGGATCTTA-3'(アンチセンス)(配列番号129)

を用いて、Pfu DNAポリメラーゼ酵素(Stratagene、カリフォルニア州ラホイア)で増幅したプラスミドテンプレートEGFRvIII-rbIgG/pCEP4(前記のとおり)から作成した。プライマー#9712をHindIII部位に、プライマー#9713をKpnI部位に導入した。PCR産物をカラム(Qiagenカラム精製キット、カリフォルニア州バレンシア)にかけて精製し、HindIIIおよびKpnI(NEB、New England Biolabs、マサチューセッツ州ベリーリ)で消化し、ゲル精製(Qiagenゲル精製キット、カリフォルニア州バレンシア)した。T4 DNAリガーゼ(NEB、New England Biolabs、マサチューセッツ州ベリーリ)で断片とpFLAG-CMV-1(Sigma、ミズーリ州セントルイス)のライゲーションを行い、HindIIIおよびKpnI(NEB、New England Biolabs、マサチューセッツ州ベリーリ)で直鎖化した。得られたベクターをEGFRvIII/pFLAG-CMV-1#1と名付けた。

【0293】

(実施例23: EGFRvIII/pFLAG組み換え蛋白質の調製)

本実施例では、EGFRvIII蛋白質変異体の作成法を示す。まず、500 μgのEGFRvIII/pFLAG-CMV-1#1プラスミドDNAを25mlのOpti-MEMI(Invitrogen、オンタリオ州バーリントン)に再懸濁し、25mlのOpti-MEMIに再懸濁した500 μlの293fectin(Invitrogen、オンタリオ州バーリントン)と合わせた。混合物を室温で20分間反応させてから、2%のFBSと50 μg/mlのG418(Invitrogen、オンタリオ州バーリントン)を含む1Lの293FreeStyle培地(Invitrogen、オンタリオ州バーリントン)に調製した293T細胞(1 × 10⁹)と混ぜ合わせた。細胞を、8%CO₂下37 °Cで7日間、125rpmで震盪しながら培養した。

10

20

30

40

50

【0294】

EGFRvIII-FLAG融合蛋白質の精製は、抗FLAG M2アフィニティークロマトグラフィーキット(Sigma、ミズーリ州セントルイス)を用いて、製造者のプロトコルに従って行った。

【0295】

単量体の融合蛋白質は次のように作成した。まず、最終濃度が10mMになるように精製蛋白質(1508 μg)にDTTを加えて、55℃で30分間還元した。次に、IAA(ヨード酢酸)(Sigma、ミズーリ州セントルイス)を加えて22mMとしてから遮光して室温で15分間反応させ、これを7k MWCO透析カセット(Pierce、イリノイ州ロックフォード)に充填して4ℓのPBSで透析した。

【0296】

(実施例24～30：変異抗体の結合試験)

10

以下の実施例には、Biacore実験(表面プラズモン共鳴)およびKinExA実験が含まれる。これらの実施例では、前記実施例で產生された種々の抗体およびその変異体が期待どおりの結合特性を有することを明らかにするための試験法について示す。対象となった変異体はすべて13.1.2を背景に有するものであった。

【0297】

(装置)

表面プラズモン共鳴実験はすべてBiacore 2000光学バイオセンサー(Biacore, Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイ)を使用して行った。結合平衡除外法はすべてKinExA 3000(Sapidyne Instruments, Inc.、アイダホ州ボイシ)を使用して行った。

20

【0298】

(試薬)

Pep-3のNH₂-LEEKKGNYVVTDHG-OH(分子量1590Da)(配列番号130)の合成は外注にして、Anatech, Inc.(カリフォルニア州サンノゼ)から購入した。mAbはすべて社内で調製した。分子量39,907の抗原EGFRvIIIflag(遊離SH基を介した凝集を阻害するためにヨード酢酸と反応させた)も社内で調製した。ウシ血清アルブミン(BSA)フラクションV(#BP1605-100)はFisher Scientific(ペンシルバニア州ピッツバーグ)から購入した。その他の一般的な試薬はすべてSigma-Aldrich, Inc.(ミズーリ州セントルイス)から購入した。

【0299】

Biacore分析用およびKinExA分析用の抗原とmAbの試料はすべて、真空で脱気し100 μg/mlのBSAを加えたHBS-P緩衝液(0.01M HEPES、0.15M NaCl、0.005%サーファクタントP-20、Biacore Inc.、スウェーデンウプサラ)で調製した。Biacoreアミンカップリング試薬、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)、N-ヒドロキシサクシンイミド(NHS)、およびエタノールアミンはBiacore Inc.から購入した。pep-3/mAb 131の実験でBiacoreセンサー表面を再生するには、26mMのNaOHを12秒間パルス投与した。他のmAbはすべて20分以内に解離してベースライン値に戻った。研究グレードのCM5バイオセンサーチップはBiacore, Inc.から購入した。

30

【0300】

KinExA検出抗体にはFcに特異的なCy5標識ヤギ抗ヒトIgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.、ペンシルバニア州ウェストグローブ、#109-175-008)を用い、この0.5mg/mlストック(1×PBS、pH7.4)をHEPES緩衝液(0.01M HEPES、0.15M NaCl、pH7.2)で1000倍に希釈した。KinExA実験には固相粒子としてNHS活性化Sephadex 4 Fast Flowビーズ(Pharmacia Biotech AB、スウェーデンウプサラ、#17-0906-01)を使用した。マイクロ遠心チューブに分注したセファロースビーズストック1.5mLを遠心して、沈降したビーズを冷やした脱イオン水で少なくとも6回洗浄してからセファロースビーズと抗原を反応させた。ビーズを炭酸ナトリウム緩衝液(0.05M、pH9.3)で1回洗浄してから、炭酸ナトリウム緩衝液中の抗原(約40 μg)をセファロースビーズに加えた。セファロースと抗原の入ったチューブを4℃で1晩震盪した。震盪後に遠心してセファロースを沈降させ、pH8.3の1Mトリス緩衝液で2回洗浄した。BSA 2%を含む1Mトリス緩衝液中、抗原で被覆したビーズを室温で1時間震盪した。

40

50

【0301】

(Biacore測定)

標準EDC/NHSおよび炭水化物カップリングを用いて、mAbを共有結合でCM5 センサーチップに固定化した。質量の移動と密集を最低限に抑えるために、最大抗原結合反応(R_{max})が50~100RUを超えないような濃度でmAbを固定化した。対照として使用する各チップの対照フローセルでは、活性化や阻害をmAbなしで行った。

【0302】

Biacoreキネティクス実験はすべて23 で行った。各実験では、2倍希釈法を用いて(1.0 10 μM のpep-3から始まる)6~8種の濃度の抗原を調製した。抗原試料を3回、バイオセンサーの表面に100 μL /分で無作為に添加した。緩衝プランク液を実験中に間欠的に数回注入して二重参照とした。各濃度のpep-3 溶液とプランク液を90秒間添加した。解離の様子を13~180分間追跡した。251nMのpep-3とプランク液を交互に3回ずつ追加で添加して解離相を3~4時間追跡し、mAb 131に結合するpep-3の解離データを得た。

【0303】

BiacoreセンサーグラムはすべてScrubberソフトウェア(バージョン1.1f、BioLogic Software、オーストラリア)を用いて処理した。センサーグラムをまずy軸上でゼロ化してから、添加開始時にx軸に整列させた。バルク屈折率の変化は、対照フローセルの反応を減じることで除去した。添加したプランク液全体の反応の平均値をアナライトおよびプランク液の全センサーグラムから減じて、測定フローセルと対照フローセルとの間の体系的アーチファクトを除去した。CLAMP バイオセンサーデータ解析ソフトウェア(バージョン3.4 20 0、BioLogic Software、オーストラリア)を用いて、処理したデーター式から k_a および k_d を求めた。全フローセルからのデータはマストラנסポート期間を含む1:1生体分子結合モデルと全体的に適合した。いくつかのmAbでは、1:1相互作用モデルではセンサーグラムをうまく説明できないことが明らかな場合に、一連のpep-3溶液で第1濃度または第2濃度に相当する溶液を除外してキネティクス曲線のあてはめを行った。 K_D は k_d/k_a から算出した。

【0304】

(KinExA平衡測定)

KinExA実験はすべて室温で行った(約23)。すべての平衡実験において、抗原を連続的に希釈してmAb結合部位濃度が一定の溶液を作成した。最初の10の滴定点までは2倍希釈を行い、11番目と12番目の連続する希釈は10倍希釈とした。すべての実験で、試料の流速は0.25mL/分、標識抗体の流速は0.5mL/分とした。次に、抗原/抗体試料が平衡に達するようにした。これには約48~72時間を要した。pep-3/mAb 131 KinExA実験では、 K_D 制御滴定におけるpep-3の開始濃度は352nM、定数[mAb結合部位]=219pMとした。mAb制御滴定では、開始時[pep-3]は251nM、[mAb結合部位]は11nMとした。pep-3/mAb 131を用いた K_D 制御実験では、各試料1.25mLをフローセルから採取した。250 μL の試料を抗体制御実験で分析した。すべての平衡実験で、試料ごとに2、3回反復して測定を行った。KinExAソフトウェア(バージョン2.4、Sapidyne Instruments)を用いたところ、平衡滴定データは二重曲線分析において1:1結合モデルに適合した。

【0305】

EGFRvIIIfpflag/mAb 131複合体を、KinExAを用いて K_D 制御下でのみ検討した。開始時の[EGFRvIIIfpflag]は198nM、[mAb結合部位]は150pMとした。試料1mLをフローセルから採取した。すべての試料を2回測定した。KinExAソフトウェア(バージョン2.4、Sapidyne Instruments)を用いたところ、平衡滴定データは二重曲線分析において1:1結合モデルに適合した。この結果および予測平衡定数については、後記の実施例28を参照のこと。

【0306】

EGFRvIIIfpflag/mAb 13.1.2複合体のKinExA滴定では、EGFRvIIIの開始濃度は5.26 μM (mAb制御)または230.1nM(K_D 制御)、[mAb結合部位]は9.59nM(mAb制御)または498pM(K_D 制御)とした。 K_D 制御実験中に、各試料1.30mLをフローセルから採取した。抗体制御実験では250 μL の試料を分析した。すべての平衡実験で、試料ごとに2、3回反復して測定を行った。K 50

inExAソフトウェア(バージョン2.4、Sapidyne Instruments)を用いたところ、平衡滴定データは二重曲線分析において1:1結合モデルに適合した。

【0307】

(実施例24：抗体の結合定数のin vitroでの決定)

野生型mAb 131の結合キネティクスを、Biacoreの表面プラズモン共鳴(SPR)装置を用いて観察した。 K_D は380pMと著明な低値であり、これはきわめて緩徐な k_d と急速な k_a に起因していた。曲線のあてはめに基づく他のキネティクスパラメーターの推定値は、 $k_a=2.246 \times 10^6$ 、 $k_d=8.502 \times 10^{-4}$ であった。

【0308】

ある実施形態では、キネティクスの向上した改良型抗体あるいは変異抗体が教示された。キネティクスの向上とは、抗体がエピトープに結合する際のキネティクスの要素の1つが、同じエピトープに既知の抗体が結合する際の要素よりも優れていることを意味する。例えば、(結合能力として) 1.3×10^{-9} よりも大きい K_D でpep-3に結合する抗体は改良型抗体である。それ故に、 K_D が500nM未満、500～300nM、300～100nM、100～1nM、1.3nM、1.3nM～1000pM、1000pM～900pM、900～500pM、500～400pM、400～300pM、300～100pM、100～50pM、50～1pM、あるいはそれ未満の抗体が考えられた。

【0309】

(実施例25：抗体の結合定数のin vitroでの決定)

実施例24と同様に、Pep-3(EGFRvIIIエピトープ)に対するmAb 13.1.2の結合キネティクスを検討した。推定 K_D は67nMであったが、実験ごとに若干の違いがみられた。曲線をあてはめて他のキネティクスパラメーターの推定値を導き出したところ、 $k_a=2.835 \times 10^5$ 、 $k_d=0.01922$ であった。

【0310】

(実施例26：抗体の結合定数のin vitroでの決定)

実施例24と同様に、Pep-3(EGFRvIIIエピトープ)に対するmAb 095の結合キネティクスを検討した。推定 K_D は66nMであった。曲線をあてはめてキネティクスパラメーターの推定値を導き出したところ、 $k_a=1.491 \times 10^5$ 、 $k_d=9.927 \times 10^{-3}$ であった。

【0311】

(実施例27：抗体の結合定数のin vitroでの決定)

実施例24と同様に、Pep-3(EGFRvIIIエピトープ)に対するmAb 139の結合キネティクスを検討した。推定 K_D は290nMであった。曲線をあてはめてキネティクスパラメーターの推定値を導き出したところ、 $k_a=10328$ 、 $k_d=2.981 \times 10^{-3}$ であった。

【0312】

(実施例28：抗体の結合定数のin vitroでの決定)

抗体の結合特性をさらに完全に分析するために、KinExA実験を実施してmAb 131の結合特性を明らかにした。二重曲線分析から導き出した K_D は 1.74×10^{-10} であった。KinExA実験では、mAb 131に対するEGFRvIIIflagの K_D は 6.266×10^{-11} であった。

【0313】

(実施例29：変異抗体の結合定数のin vitroでの決定)

13.1.2抗体の結合特性をさらに完全に分析するために、KinExA実験を実施してmAb 13.1.2の結合特性を明らかにした。二重曲線分析から導き出した K_D は 7.538×10^{-10} であった。また、本実施例の抗原はEGFRvIIIflagの変異体であり、ヨード酢酸(IAA)と相互作用を起こした。

【0314】

(実施例30：Biacoreの結果とKinExAの結果との比較)

前記の実施例およびKinExA試験の結果を下記の表30.1に示す。表30.1の括弧内の数字は95%信頼区間である。「ND」は未測定を意味し、「*」はpep-3ではなく(ヨード酢酸と反応した)EGFRvIIIflagとの結合であることを表す。

【0315】

速度定数が立証するように、mAb 131の結合定数が最大、解離定数が最小であったこと

10

20

30

40

50

から、mAb 131の K_D がもっとも小さかった。

【0316】

【表28】

表30.1

MAb	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$K_d(s^{-1})$	$K_D(nM)$	$KinExAK_D(nM)$
131	2.25×10^6	8.50×10^{-4}	0.380	0.174(EGFRvIIIpflagとの場合は0.0627)
13.1.2	$2.10(0.58) \times 10^5$	0.016(0.003)	75(14)	0.75((IAAと相互作用した)EGFRvIIIpflagとの場合)
096	1.49×10^5	9.90×10^{-3}	66	ND
139	1.03×10^4	2.98×10^{-3}	290	ND

【0317】

(実施例31: L99T-5.3変異抗体の結合定数のin vitroでの決定)

Pep-3(EGFRvIIIエピトープ)に対するmAb L99T-5.3の結合キネティクスを検討した。最初の段階として、標準EDC/NHSカップリング反応を用いて、5,600共鳴単位(RU)から8,000RUのmAb L99T-5.3をCM5センサーチップの2つのフローセル(Fc)に固定化し、5,600共鳴単位(RU)から8,000RUのmAb 13.1.2を1つのFcに固定化した。この表面密度によって生じたpep-3との結合シグナルは100RU未満であった。合わせて2つのCM5センサーチップを用いて両方のmAbを固定化した。これと過去に収集したデータとを合わせると、それぞれの抗体に対して計5回の独立した実験が行われ、95%信頼区間が算出された。すべての試験でBiacore 2000光学バイオセンサーを使用した。

【0318】

次に、mAbを固定化したバイオセンサーの表面にpep-3を流した。pep-3の開始濃度は1.25 μM とし、続いて2倍希釈を連続8回行って得られた希釈液を3回測定で無作為に添加した。一連の添加の過程を通じて、ブランク液を6標本ごとに添加して二重参照とした。

【0319】

最後に、バイオセンサーのデータをScrubberで処理し、マストランスポート期間を含む1:1相互作用モデルによるClampを利用してデータを曲線にあてはめた。1.25 μM の高濃度液の添加は、データが1:1相互作用モデルに適合しないことが明らかであったので、動態曲線にあてはめる際に除外した。この逸脱は、pep-3が高濃度の場合に生じる非特異的相互作用が原因であった可能性がもっとも高い。すべてのキネティクスデータは1:1相互作用モデルに十分に適合した。

【0320】

推定 K_D は54~70nMと様々であった。他のキネティクスパラメーターにも実験ごとに若干のばらつきがみられたが、この推定値は $K_a=2.238 \times 10^5$ 、 $K_d=0.01217$ であった。

【0321】

(実施例32~38)

実施例32~38では、Biacore装置を用いて変異mAbの結合キネティクスについてさらに検討した。これらの実施例の第1段階として、5,600共鳴単位(RU)から8,000RUの対象mAbをCM5センサーチップのフローセル(Fc)1つに標準EDC/NHSカップリング反応を用いてそれぞれ固定化した。この表面密度によって生じたpep-3との結合シグナルは100RU未満であった。各フローセルに特有のmAbを固定化して、計3つのCM5センサーチップですべての変異mAbを固定化した。3つのセンサーチップのうち2つでは、1つのフローセルにmAb 13.1.2が含まれていた。すべての試験でBiacore 2000光学バイオセンサーを使用した。

【0322】

次に、mAbを固定化したバイオセンサーの表面にpep-3を流した。pep-3の開始濃度は4.9 μM とし、続いて2倍希釈を連続8~11回行って得られた希釈液を2回測定または3回測定で

10

20

30

40

50

無作為に添加した。一連の添加の過程を通じて、プランク液を6標本ごとに添加して二重参照とした。

【0323】

最後に、バイオセンサーのデータをScrubberで処理し、マストラ NSPポート期間を含む1:1相互作用モデルによるClampを利用してデータを曲線にあてはめた。高濃度液(4.98~1.25 μM)の添加は、mAbおよびその親和性によってはデータが1:1相互作用モデルに適合しないことが明らかであったので、動態曲線にあてはめる際に一部除外した。この逸脱は、Pep-3が高濃度の場合に生じる非特異的相互作用が原因であった可能性がもっとも高い。すべてのキネティクスデータは1:1相互作用モデルに適合した。

【0324】

10

(実施例32: L217Q-10.1変異抗体の結合定数のin vitroでの決定)

mAb L217Q-10.1のPep-3(EGFRvIIIエピトープ)に対する結合キネティクスを検討した。推定 K_D は92nMであった。曲線をあてはめて導き出した他のキネティクスパラメーターの推定値は、 $k_a=2.04 \times 10^5$ 、 $k_d=0.01885$ であった。

【0325】

(実施例33: L217N-2.1変異抗体の結合定数のin vitroでの決定)

実施例32と同様に、mAb L217N-2.1のPep-3(EGFRvIIIエピトープ)に対する結合キネティクスを検討した。推定 K_D は185nMであった。曲線をあてはめて導き出した他のキネティクスパラメーターの推定値は、 $k_a=2.198 \times 10^5$ 、 $k_d=0.04069$ であった。

【0326】

20

(実施例34: N35G-3.1変異抗体の結合定数のin vitroでの決定)

実施例32と同様に、mAb N35G-3.1のPep-3(EGFRvIIIエピトープ)に対する結合キネティクスを検討した。推定 K_D は204nMであった。曲線をあてはめて導き出した他のキネティクスパラメーターの推定値は、 $k_a=1.497 \times 10^5$ 、 $k_d=0.03057$ であった。

【0327】

(実施例35: 変異抗体の結合定数のin vitroでの決定)

実施例32と同様に、mAb L99H-9.2のPep-3(EGFRvIIIエピトープ)に対する結合キネティクスを検討した。推定 K_D は395nMであった。曲線をあてはめて導き出した他のキネティクスパラメーターの推定値は、 $k_a=83390$ 、 $k_d=0.03293$ であった。

【0328】

30

(実施例36: 変異抗体の結合定数のin vitroでの決定)

実施例32と同様に、mAb Y172R-1.2のPep-3(EGFRvIIIエピトープ)に対する結合キネティクスを検討した。推定 K_D は927nMであった。曲線をあてはめて導き出した他のキネティクスパラメーターの推定値は、 $k_a=82237$ 、 $k_d=0.07622$ であった。

【0329】

(実施例37: L217N-2.1変異抗体の結合定数のin vitroでの決定)

実施例32と同様に、mAb L99N-4.1のPep-3(EGFRvIIIエピトープ)に対する結合キネティクスを検討した。推定 K_D は1.4 μMであった。キネティクスが速すぎて適合しなかったので、 K_D の測定には定常状態(平衡)結合モデルを使用してmAb L99N-4.1を適合させた。

【0330】

40

(実施例38: 13.1.2と設計された変異体との比較)

表38.1に示すように、結合特性の向上したmAbが開発された。95%信頼区間を括弧内に記す。L99T-5.3では k_a が増加して k_d が減少しており、したがって全体の K_D は小さくなった。13.1.2およびL99T-5.3に対するPep-3の結合については、平衡解離定数および複合体形成速度定数の統計学的有意差(95%信頼区間で比較)は存在してもごく小さいが、L99T-5.3に対するPep-3の結合の方がわずかに親和性の高くなるような自然なバイアスが存在すると見受けられる。また、同じバイオセンサーチップを用いた場合は、L99T-5.3の方が13.1.2よりも常に高い親和性を示すと考えられた。

【0331】

【表29】

表38.1

MAb	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(nM)$
13.1.2	$2.10(0.58)\times 10^5$	0.016(0.003)	75(14)
L99T-5.3	$2.16(0.12)\times 10^5$	0.013(0.001)	60(10)
L217Q-10.1	2.04×10^5	0.019	92
L217N-2.1	2.20×10^5	0.040	185
N35G-3.1	1.50×10^5	0.030	204
L99H-9.2	8.34×10^4	0.033	395
Y172R-1.2	8.22×10^4	0.076	927
L99N-4.1	ND	ND	1,400*

【0332】

(付加的な結合モデルならびにモデル選択法と結合親和性推定法)

他の実施形態では、ちょうど6アミノ酸長のペプチドだけではなく多様な長さのペプチドに前記実施例を使用でき、これは不可欠な結合残基がペプチドに含まれている限り実施可能である。例えば、6アミノ酸のペプチドEEKKGN(配列番号127)の代わりに7アミノ酸のペプチドEEKKGNY(配列番号131)を使用することができる。エピトープとしてどのような大きさのペプチドも使用できる。他の実施形態では、LEEKKGNYVVTDHC(配列番号56)、LEEKKGNYVVTD(配列番号59)、LEEKKGNYVVT(配列番号132)、およびEEKKGNYVVT(配列番号57)の中からペプチドを選択した。ここで開示された短い断片から全長のペプチドやその変異体まで、あらゆる大きさのペプチドが使用可能である。

【0333】

当業者が認めるように、アミノ酸が付加されると、ペプチドが抗体に結合する様式に変化が生じることがある。付加されたアミノ酸は、ペプチドと抗体との間にもう1つの付加的な結合を形成させるだけでなく、ペプチドが抗体に結合する際にペプチドや抗体の構造を変化させることもある。したがって、ある実施形態では、EEKKGN(配列番号127)やEEKKGNY(配列番号131)など様々な長さのエピトープペプチドで結合の特性や最適化について調べることができる。ペプチドの長い断片を用いれば、ペプチドと抗体との相互作用をペプチドのより長い部分について正確に描出できる。そればかりでなく、結合力の変化および結合に関与する残基を調べることによって、長いペプチドに関するさらなる情報をデータから推定することができる。

【0334】

また、おそらくは長いペプチド断片の検証を補完して、種々の結合モデルにフィルタリング処理を追加で実施することによって、より正確な結合モデルを選択することができる。フィルタリング処理を追加することによって、莫大な数の結合モデルをフィルターにかけて入手可能な実験データと一致するモデルを見出すことができる。

【0335】

ある実施形態では、フィルターは、高解像度エピトープマッピングデータや実験によって特徴が明らかにされた個々の残基の結合プロファイルなどに基づいており、これはペプチド中の各アミノ酸に関して算出された結合エネルギープロファイルと相關する可能性がある。例えば、7アミノ酸からなるペプチドの結合エネルギープロファイルを、似たような結合エネルギープロファイルを示す結合モデルを選択する際に利用することができる。結合エネルギープロファイルは、ペプチド中の特定のアミノ酸に割り当てられた結合エネルギーであり、そのモデルに含まれる各アミノ酸の結合エネルギーという観点からペプチドのプロファイルを作成するためのものである。例を挙げると、ある結合モデルにおいて、

10

20

30

40

50

アミノ酸AおよびBからなるペプチドでAの結合エネルギーが-5、Bの結合エネルギーが-20とすると、そのプロファイルは(-5に)A1および(-20に)B2となる。このプロファイルは他の結合モデルをフィルターにかけて選択するために使用できる。例えば、この結合エネルギー-プロファイルをフィルターまたは「テンプレート」として使用すると、Aに相当する部分が相対的に小さい値でBに相当する部分が相対的に大きい値(負の数として小さい、または絶対値が大きい)のペプチドが候補モデルに含まれるとその結合モデルが選択されることになる。別の実施形態では、Bの部分の値はAの部分の値よりも4倍大きい値であるといった制限をテンプレートにさらに加える必要が生じる。

【0336】

結合エネルギー-プロファイルのテンプレートは、他の結合モデル中のペプチドのプロファイルと様々な方法で比較することができる。結合エネルギー-プロファイルのテンプレートが期待される結合エネルギー-プロファイルと類似している場合は、フィルターによってさらなる調査に用いる好ましい結合モデルを選択することができる。結合エネルギー-プロファイルのテンプレートが期待された結合エネルギー-プロファイルと異なる場合には、フィルターを利用して好ましくない結合モデルを除外することができる。ある実施形態では、フィルタリングの過程には好ましい結合エネルギーとそうでないものの両方のテンプレートが含まれ、フィルターは結合モデルの選択と除外のいずれにも使用される。当業者が認めるように、多数の異なる結合エネルギー-プロファイルが存在する可能性があり、したがって状況に応じて使用できる結合エネルギー-プロファイルのテンプレートも多様である。

10

【0337】

ある実施形態では、結合エネルギー-プロファイルのテンプレートを、ペプチド中の特定部位の結合エネルギーが相対的に大きいテンプレートと定義することが可能である。好ましい実施形態では、結合エネルギー-プロファイルのテンプレートおよびテンプレートによって選択された結合エネルギー-プロファイルは、ペプチドEKKGNY(配列番号131)の2、4、6番目の位置で相対的に大きい結合エネルギーを示す。別の実施形態では、結合エネルギー-プロファイルのテンプレートはペプチドEKKGNY(配列番号131)の3番目の位置で相対的に小さい結合エネルギーを示す。この議論では、E1、E2、K3、K4、G5、N6、Y7のように位置が割り振られている。

【0338】

ある実施形態では、フィルタリングの過程でまずK3とK4の結合エネルギーが比較される。K3と比較してK4の結合エネルギーが相対的に大きい結合モデルを選択し、K3と比較してK4の結合エネルギーが相対的に小さい結合モデルは除外する。したがって、「相対的に大きい」という言葉はK3と比較してK4の方が大きい結合エネルギーを有する(負の数として小さい、または絶対値が大きい)ことを意味している。次に、結合モデルを結合エネルギー-プロファイルのテンプレートを用いて再度結合モデルのフィルタリングを行うが、今度は2、4、6番目の位置の結合エネルギーが相対的に大きい結合モデルを選択し、それ以外のモデルは除外する。したがって、「相対的に大きい」という言葉はペプチド中の最小結合エネルギーと比較して2、4、6番目の位置の結合エネルギーの方が大きい(負の数として小さい、または絶対値が大きい)ことを意味している。よって、この実施形態では、結合エネルギー-プロファイルのテンプレートは、E1はいかなる値でも可、E2は最小値よりも大きい値、K3はK4よりも小さい値、K4は最小値よりも大きい値、G5はいかなる値でも可、N6は最小値よりも大きい値、Y7はいかなる値でも可、というようにまとめられる。E2、K4、N6のいずれかよりも小さい値が少なくとも1つある限り(またはK3がE2、K4、N6のいずれかよりも小さい限り)、E1、G5、Y7はいかなる値も取り得る。別の実施形態では、「相対的に大きい」値をモデリングや実験で明らかにされた標準値に合わせることもある。ある実施形態では、結合モデルが最初のフィルターを通過することの方が2番目のフィルタリングの段階を通過することよりも重要である。当業者が認めるように、これら2つの処理は順番に行う必要はなく、同時にあっても構わない。

20

【0339】

30

40

50

また、結果のフィルタリングに使用するこれらのプロファイルのテンプレートは、ペプチドや抗体、結合の状態によって変化する。今回の開示、特に実施例14に関する開示によって、当業者は適切な結合エネルギープロファイルのテンプレートを決定することができる。例えば、表14.1に示すように、131抗体および13.1.2抗体にはペプチド結合に重要となるであろう残基がいくつか認められる。131 mAbでは、検証した特定のペプチドに関してE2、K4、N6、およびY7の位置が重要であった。13.1.2 mAbでは、検証した特定のペプチドに関してはE2、K4、G5、およびN6の位置が重要であった。これらの重要残基は、結合エネルギープロファイルのテンプレートを作成する際に関与し得る残基である。後記の議論からも明らかなように、実施例39の結合エネルギープロファイルのテンプレートは実施例14の分析で示唆されるものとは異なると考えられる。実施例39はあまり厳密ではないテンプレートで、多くのモデルがスクリーニングの段階を通過できるようになっている。スクリーニングの段階を通過できるモデル数を減らしたいと望むならば、E1およびG5に関する必要条件をさらに追加することができる。10

【0340】

次の実施例では、長いペプチドの使用が前記の結果をどのように変化させ、その変化が何を意味するのかについて示す。また、前記のフィルターの1つを使用して特定の結合モデルを選択した様子を示す。

【0341】

(実施例39: 7アミノ酸からなるペプチドのエピトープ-抗体結合モデル)

本実施例は、13.1.2構造モデルのCDR領域に複合させた7残基ペプチドに対する1組の結合モデルの作成について示す。また、本実施例では1つの結合モデルを他の結合モデルの中から選別する方法を示す。20

【0342】

まず、7残基ペプチドEEKKGNY(配列番号131)の構造モデルを広がった立体配座で構築し、InsightIIモデリングパッケージのDiscover_3モジュールでエネルギーの最小化を行った。次に、マニュアル操作でペプチド構造を結合部位に置いて初期複合体を形成した。InsightII結合モジュールの緩和エネルギー拘束を用いて、移動空間および回転空間のモンテカルロ検索を自動的に実施した。結合の過程において、結合溝から5オングストローム以内に位置する残基は可動性を有したが、他の抗体残基は固定されていた。ペプチドを開始部位から5オングストローム以内に拘束した。モンテカルロ検索によって発見された信頼性の高い配置にsimulated annealingおよびエネルギー最小化を行って、最終的な複合構造モデルを得た。計63個の結合モデルが得られた。30

【0343】

それぞれの結合モデルで、抗体とペプチド中の各残基との相互作用エネルギーをDiscover_3で算出した。各残基がエピトープ-抗体結合にどの程度関与しているかを示すプロファイルを調査して、高分解能エピトープマッピングデータ、すなわち「結合エネルギープロファイルのテンプレート」に一致する結合モデルを選択した。63の結合モデルのうち19がこの調査を通過した。個々の残基の一般的な結合エネルギープロファイルを表39.1に示す。実施例14のエピトープマッピングデータと一致して、K4の結合エネルギーが傑出しており、N6とE2の結合エネルギーも大きかった。この結合エネルギープロファイルのテンプレートでは、K4がK3よりも大きいという事実が特に強調されている。また、この結合エネルギープロファイルでは、E2、K4、およびN6が相対的に大きい値であるという必要条件も重視されている。換言すれば、E2、K4、およびN6の結合エネルギーがペプチド中の最小結合エネルギー(負の数として最大、あるいは絶対値が最小)ではなかった。40

【0344】

【表30】

表39.1.

抗体13.1.2に対する7残基ペプチドの各残基の結合エネルギープロファイルは実施例14のエピトープマッピングデータと一致する。

E1	E2	K3	K4	G5	N6	Y7	計
-10.97	-19.34	-13.46	-24.26	-10.1	-18.19	-15.15	-111.45

10

【0345】

結合エネルギープロファイルに基づくフィルタリングを通過した19のモデルで、親和性データが存在する7つの変異体(実施例36のTyr172Arg、実施例33のLeu217Asn、実施例32のLeu217Gln、実施例34のAsn35Gly、実施例37のLeu99Asn、実施例35のLeu99His、実施例31のLeu99Thr)のそれぞれに対してエピトープ-抗体結合エネルギー特性のシミュレーションを実施した。この複合体の静電相互作用の程度を概算しなければならないことから、一連の計算では多数の異なる誘電定数を使用した。側鎖の変化が誘発する局所構造の変化を説明するために、残基置換後に30~100段階のエネルギー最小化を行って変異を生じさせた。それぞれの結合モデルで、各変異の選択されたパラメーターについて、7残基ペプチドと抗体全体との相互作用エネルギーを算出した。8つの結合エネルギーを1まとまりとする各組(変異型7つと野生型)に対して、それぞれの結合データ式の直線あてはめを行って、 K_d の対数と比較した。直線あてはめの相関係数をそれぞれ算出した。もっとも強い相関が得られた1つのモデルは表39.1に示すデータを有し、誘電定数は 1^*r で、50段階のエネルギー最小化が行われた。このモデルのエピトープ-抗体結合エネルギーを表39.2に示す。すべてのデータの相関係数は0.80であった。実施例37にあるように、Leu99Asnの K_D は高い精度で測定されていないことから、Leu99Asnのデータを除外した直線あてはめが別途行われた。図14に示すように、0.91という優れた相関係数が得られた。したがって、正確な結合モデルはこの選択モデルによって十分に表されている。空間を占めるペプチドを示したモデルが図15であり、水素結合は図16に示す。L3 150は図16の下方、H3 160は上方に位置する。H2 140はペプチド結合領域の右側にある。ペプチド自体は結合部位に位置し、E1がページ上方に淡色で示され、下方に向かって順にK3、K4、G5、N6、Y7と陰影が濃くなっていく。水素結合に関与する抗体残基を図16に示す。この実施例から生まれたモデルでは、K4...Q95、K4...Q95、N6...Q98、G5...H31、Y7...H31、およびY7...W165の7つの水素結合が示される。

20

【0346】

30

【表31】

表39.2
エピトープ-抗体結合エネルギー特性のシミュレーション、Kdの対数との比較

変異体	クーロン	vdw	計	Ln(Kd)	
172Arg	-19.103	-27.962	-47.065	-13.891	
217Asn	-19.003	-28.715	-47.718	-15.503	
-217Gln	-18.977	-28.73	-47.707	-16.201	
35Gly	-19.095	-28.431	-47.526	-15.405	10
99Asn	-18.719	-28.778	-47.497	(-13.479)	
99His	-18.837	-28.719	-47.556	-14.744	
99Thr	-19.155	-28.704	-47.859	-16.475	
野生型	-18.981	-28.728	-47.708	-16.269	

【0347】

実施例39で選択された図21のモデルにみられるように、結合モデルからいくつかの予期せぬ結果が明示された。1つの興味深い結果として、E2、K4、N6といった残基がペプチド全体としてみると結合に重要な残基である一方で、これらのアミノ酸のすべてが抗体との水素結合形成に関与するようには作られていないことが挙げられる。K4はQ95との2つの水素結合形成に関与しているとみられ、これは結合エネルギー-プロファイルやプロファイルテンプレートにおけるK4的重要性と矛盾がない。モデルでは、N6もQ98と結合するとされている。しかし、この特定のモデルでは、E2はモデル内で水素結合を形成するようにはみえない。これに一致する興味深い傾向として、結合エネルギー-プロファイルのテンプレート内の各重要残基(E2、K4、N6など)の大半は埋もれて、抗体結合溝と接近している。したがって、この結合モデルの選択は、これらの残基は抗体と密接に相互作用しているという理由から重要であるという事実を説明し得るものである。また、E1がW214との水素結合形成に関与することも可能である。

【0348】

実施例39は、前記の方法では結合エネルギーとK_Dとの間に強い相関が生じることも示している。これは、この方法で作成されたモデルが、抗体-ペプチド複合体のK_Dの最適化あるいは少なくとも予測を可能にすることを示唆している

【0349】

実施例39と実施例19との比較からわかるように、2つのモデルの両方で重要な残基や、7アミノ酸結合モデルにのみ認められる残基があり、一方で7アミノ酸結合モデルでは重要な残基がある。例えば、7ペプチドのエピトープは、K4...Q95、K4...Q95、N6...Q98、G5...H31、Y7...H31、Y7...W165の間に水素結合を形成すると考えられる。これに対して、6ペプチドのエピトープは、E2...Y172、K3...H31、K4...H31、N6...D33、N6...Y37、N6...K55の間に水素結合を形成すると考えられる。これらのデータが示すように、6アミノ酸ペプチドモデルと7アミノ酸ペプチドモデルの両方でH31の重要性が強調されており、両モデルでH31がペプチドと2つの水素結合を形成している。2組のデータ間にその他の傾向が存在する可能性もあるが、結合作用の多くは6アミノ酸モデルから7アミノ酸モデルに変化しているようである。しかし、これらのモデルではエピトープの大きさによる多様性が検出され、したがって、今回の開示の観点からして、短いものから長いものへとエピトープペプチドを大きくすることが問題であってはならないことを実施例は示している。種々の結合モデルで一貫して重要性を明示するアミノ酸の存在は、短いペプチドモデルが長いペプチド相互作用を代表できるような種々の相互作用の重要性に対するバイアスを生む。

【0350】

20

30

40

50

当業者が認めるように、前記の議論あるいは実施例のうち6アミノ酸ペプチドEEKKGN(配列番号127)に関するものは、7アミノ酸ペプチドEEKKGNY(配列番号131)またはそれよりも長いペプチドにもあてはめることができる。例えば、実施例39の情報を用いて実施例20を再現し、部位特異的変異導入法によって親和性の向上した抗体を合理的に計画することができる。さらに、部位特異的変異導入法によって抗体の親和性を改良する合理的計画を試みた後に、実施例39の結果を用いて実施例21を再現し、実施例20で得られた新規抗体を検証することもできる。

【0351】

ある実施形態では、実施例39の結果が抗体とペプチドとの相互作用部分の再定義に使用される。例を挙げると、EEKKGNY(配列番号131)に対するパラトープは、例えば95番目の残基のようにペプチドと相互作用することが予測される抗体残基を含むものと定義することができる。あるいは、実施例19にあるように、パラトープは結合したペプチドの5オングストローム以内に存在する全残基と定義することもできる。

10

【0352】

(種々の蛋白質におけるin silicoでの親和性成熟)

多数の異なる研究で、in vitroでの抗体の親和性成熟が成功している。一般的には、分子生物学的手法で無作為化変異体ライブラリーを作成する必要があり、そして、優れた結合能を有するクローナーを増幅するために、選択/スクリーニング法を開発する必要がある。次に、選択された変異体を精製して親和性を測定しなければならない。この過程では、長く面倒な一連の実験が要求される。以下の実施例は、抗体-抗原複合体構造のみを利用してin silicoでの選択によって親和性成熟の正確な予測が可能であることを示す。

20

【0353】

(実施例40：抗体-抗原結合エネルギー特性シミュレーションによるin silicoでの親和性成熟)

本実施例では、in silicoの抗体-抗原結合エネルギー特性シミュレーションが親和性成熟に使用できることを示す。特に、本実施例では、Fab-12(rhuMab VEGFとして知られるIg G型)のVEGF(血管内皮成長因子)に対する結合キネティクスが前記のin silicoの過程を通じて予測できることを示す。

【0354】

使用したVEGF-Fab複合体の結晶構造は、PDBデータベース内にみつかり、アクセス番号は1BJ1、分解能は2.4オングストロームであった。一連の抗VEGF Fab変異体に関する既発表の実験親和性データを用いて概念を検証した。VEGF-Fab構造の3次元配位を使用して、H97Y、S100aT、T28D、28D31H、28D31H97Y100aT、N31H、Y53W、71I73K、71V73Vの各変異体にin silicoで変異を起こした。親和性データは、Chen, Yらの論文(J Mol Biol., 293(4):865-81(1999年))から得た。実施例39で述べたように、種々のVEGF-Fab変異体間でエネルギー特性シミュレーションを実施した。結果を表40.1に列挙する。本実施例の結果は、結合エネルギーと親和性順位との有意な相関関係がこの過程を通じて得られたことを示している。結合エネルギーと相対親和性の対数との直線あてはめを図23に示す。-0.91という相関係数は、in silicoのシミュレーションが相互作用の詳細を原子レベルで正確に表現していることを示している。

30

【0355】

40

【表32】

表40.1
親和性データと比較した抗体-抗原結合エネルギーのシミュレーション

カバット番号	配列番号	相対親和性	Ln(相対親和性)	結合エネルギー	
H97Y	101Y	14	2.639	-59.065	
S100aT	105T	1.9	0.642	-57.465	
T28D	28D	1.4	0.336	-57.647	
28D31H	28D31H	3.1	1.131	-57.699	10
28D31H97Y100aT	28D31H101Y105T	20	2.996	-59.518	
N31H	31H	3.6	1.281	-57.724	
Y53W	54W	1.3	0.262	-57.504	
71I73K	72I74K	0.9	-0.105	-57.158	
71V73V	72V74V	0.3	-1.204	-57.314	
野生型	野生型	1	0.000	-57.404	

【0356】

前記実施例から明らかなように、シミュレーションに基づいて推定を行い、*in vitro*実験を用いずに親和性の高い変異体を同定することができる。また、この研究方法が異なる抗体やペプチドにも有用なことは明らかである。分解能の高い抗体-抗原複合体構造のみを使用し、この方法論を広く適用すると*in silico*で親和性を成熟させることができる。ある実施形態では、この*in silico*の親和性成熟を使用することによって膨大な時間と資源が節約できる。

【0357】

(実施例41：抗体の標準クラスの決定)

Chothiaらは、各免疫グロブリン鎖の超可変領域の「標準クラス」という点から抗体構造を記述している(*J. Mol. Biol.* 1987年8月20日;196(4):901~17)。種々の免疫グロブリンのFabおよびVL断端の原子構造を分析して、抗原結合部位のアミノ酸配列と3次元構造との関連を明らかにした。Chothiaらは、パッキング、水素結合、または独特的の立体配座、

立体配座、あるいは立体配座をとる能力を介して超可変領域の主鎖立体配座に主として責任を負う残基はあまりないことを発見した。これらの残基は、超可変領域内や保存されたシートの枠組みの中に生じることが知られている。構造が明らかにされていない免疫グロブリンの配列を検討することによって、Chothiaらは、多くの免疫グロブリンの超過変領域は構造が既知の抗体のそれと大きさが類似していることを示した。さらに、観察された立体配座に責任を負う部位に相同的な残基が含まれることも示している。

【0358】

Chothiaらの発見から、これらの超可変領域は既知の構造の超可変領域と類似した立体配座を有することが示唆される。超過変領域のうち5カ所に関しては、立体配座の繰り返しは比較的少数の個別的な構造クラスに限定して認められると考えられる。超過変領域に一般的に生じるこれらの主鎖立体配座は、「標準構造」と名づけられている。Chothiaら(*Nature*. 1989年12月21~28日;342(6252):877~83)や他のグループ(Martin他.*J. Mol. Biol.* 1996年11月15日;263(5):800~15)がさらに行なった研究では、抗体の6カ所の超過変領域のうち少なくとも5カ所に主鎖立体配座の小さな繰り返しが存在することが確認されている。

【0359】

前記抗体の一部を分析して、各抗体の相補性決定領域(CDR)の標準クラスを明らかにした。周知のとおり、標準クラスは、抗体軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3に加えて、抗体重鎖のCDR1およびCDR2にのみ割り振られている。後記の表(41.1)に分析結果をまとめる。標準クラスデータは*HCDR1-HCDR2-LCDR1-LCDR2-LCDR3の形で表されており、ここで「HCDR」

は重鎖、「LCDR」は軽鎖を示している。したがって、例えば1-3-2-1-5という標準クラスは、HCDR1が標準クラス1、HCDR2が標準クラス3、LCDR1が標準クラス2、LCDR2が標準クラス1、LCDR3が標準クラス5に相当する抗体を示す。

【0360】

【表33】

表41.1

mAb	H1-H2-L1-L2-L3	
139	1-3-2-1-1	10
250	1-3-2-1-1	
123	1-3-4-1-1	
131	1-3-4-1-1	
13_1_2	1-3-4-1-1	
211	1-3-4-1-1	
318	1-3-4-1-1	
333	1-3-4-1-1	
342	1-3-4-1-1	
95	3-1-4-1-1	20
150	3-Y-4-1-1	
170	3-Y-4-1-1	

【0361】

必要な長さを備え、標準クラスに定められる重要残基に合致していれば、(H3を除く)各CDRは標準構造に割り振られる。例えば、前記Chothiaらの論文中に、各抗体で定義されたアミノ酸を確認することができる。

【0362】

(均等物)

30

上記の記述および実施例は、本発明の特定の好ましい実施形態を詳述したものであり、発明者が意図した最良の方法が説明されている。しかし、前記が文中で詳細に記述されているように見受けられたとしても、本発明の実施方法は多様であり、本発明は添付の請求項およびその均等物に従って解釈されなければならない。

〔 四 1 〕

【 図 2 】

FIGURE 1

FIGURE 2

A
1 2 3 4 5 273 275 277 279
L-E-H-K-K-G-N-Y-Y-V-T-D-H-C
278 280
(SEQ ID NO. 54

6
VCGTSNKUQLQLOTPEDHPLSLQRQFMNNECVVNLNLTIVTIVRNVYDLSPLFETIQFV
AGVULJALANTVBRPDLNQDQIIGRSMYNLSVNLQDNTGKLELPHENLQ
ELIILHQAIVPFSNNPFLCNVSEIWEIDVSSDFLSNQMDPQFHNLGSQKQCDPSCPGN
SCWNGAGHGENCQULFKLICAQCGSCGRKGKSPCCTGQCAAGCTGCPRESDCLVCRK
FREBEATCQDTCPPMLNLYPTTYQMVQVNPMEKGKYSFGATCVCCKPR
272
(SEQ ID NO. 136

(SEQ ID NO. 136

〔 図 3 A 〕

〔 図 3 B 〕

XenoMax 由来ヒト抗 EGFRvIII 抗体のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列

095.

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5'-CAAGGTCAGCTGAGGACTGGCCGACCGAGCTGGCTGAAGCCCTACAGACCCCTG
CCCTGCTGCTGACCTGCTCTGAGGCTCAGACAGTGGTGTACTTGGAGG
GGATCCGGCAGACCAAGGAGGAGGCTGGAGTGGATTTGGTTCTATCTAAGA
CTTACGAGCTACATAGACCCCTGAGCAAGCTGAGCTGGTACCTATAGCTGACAC
TCTAAGAACCTGAGCTTCTCCGAGCTGAGCTGGCTGTGTTGGCCGACCGCCCTG
TATTAAGCTTCTCCGGAGCTGAGCTGGCTGTGTTGGCCGACCGCCCTG
GGACCTCTGGGGCAGGAGCTGGCTGTGTTGGCCGACCGCCCTG (SEQ ID NO:35)

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

QVQLQESGPFLVKPSQTLSTLCTVSGGSISGGGGYWSWIRQHPGKGLEWIGFIYRGNTY
YNPSLKSRTVITISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARDGYCRTGCYGGWFDPWGQ
GTLVTVSP (SEQ ID NO:7)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列

5' GATGGATGAGTACCCAGAACCTCTCCATCTCCACCTGGACCCCTGGACAGCGCCGC
CTCATCTCTCCAGGGCTACTGAAACGGCTACATACGATGTTGGAAACATCTATT
GAGTGTGGCTTCAGGGAGGGCAGGGCCGGCTTCAGAACGCTTAACTTATTAAGATTTC
TAATGGCTTCTGGCAGGGAGGGCAGGGCCGGCTTCAGAACGCTTAACTTATTAAGATTTC
CAGACTGAAGATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTGGGGGGTTTAACTTACCTGG
AAGGGCAACAAATTCTCATCCATCTGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAA3' (SEQ
ID NO: 34)

軽鎖可変領域のアミノ酸配列:

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLIHTDGNIYLSLWQQRPGQPPRLLIYKISNRSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQGTQFPITFGQGTRLEIK (SEQ ID
NO:23)

FIG. 3A

FIG. 3B

123k/124e

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' CAGGTGCGAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCGCTGGTCCAGCCTGGGAGGTCTCCGAA
 GACTCTCTGCGACGGCCGGGCAATTCACCTCTGAGCTACTGAGCACTGAGTCCTGGTC
 CCGAGCGCTCAGGGACAGGGCTGGATGCTGGTGGCGATGTTATGCTATATGCTGGAGA
 AAGAGAACATCTGCGACAGCTCTGGTGGAGGGCCGATTCACCACTCTGAGACAGATTC
 CGAACAGATCTGTTGCAATGACAGACCTGGAGCTGGAGACAGCGCTGTAT
 ATTACCTGCTGGAGGAAAGTATTGTGAGCTACCTGCTAACCTGCTATAAGTACTACT
 ACGGCTGGAGCTCTGGGGCAAGGGACCGACGGTCACTGGCTCCCTCA3' (SEQ ID
 NO:37)

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

QVQLVESGGGVQPGRLSRLSCAASGFTLSSYGMHNRQAPGKGLEWAVMSYDGS
KEDYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSEGVCSSRSCYKYYYYG
MDVWGGTGTVTVVSS (SEQ ID NO:13)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5 'ATATTTGTTGATCTGCTTCACCTCCCTGGCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCC
 TCTCTCTCGAGCTCTAGTCAGAGCTCTCTGATAGATAAGGAACTACATTG
 GATTTGGATCTGCGAGAACGGCCAGCTCTTCCACAGCTCTGATATTGGTTCT
 ATATGGGGCTCTGGGGCTCTGAGCAGGTTCTAGTGAGCTGGAGCTGGGGACAGATT
 ACAGCTACATCAGCATGGGGCTGGGGCTGAGGTTCTGGGGATATTACTGATCGCA
 GGGCTTCAACAACTCTTCGACCTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAA3'
 (SEQ ID: NO. 36)

軽鎖可変領域のアミノ酸配列:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA
SGVPDRFSGSGSTDFTLNISRVEAEDVGHYCMQALQTPTFGQGKVEIK (SEQ ID
NO:29)

【図3C】

131

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' CAGGTGCAAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCGCTGGGCAAGCTGGGGAGGCTCCCTGA
GACTCTCTGCGACGCTCTGGATTACCTTCAAGAAACTATGGCACTGGGTC
GCCAGGCTCAGGCAAGGGCTGGAGCTGGGAGTATATGGTATGAGGAAGT
GATAAATCTATGCAACTCCGCTGAGGGGCCGATTICACCATCTCCAGAGAACATT
AAGAACACGCTGTATCTGAAATGAAACGGCTGAGAGCGAGAACCGCTGTGA
TTACATGCGAGAGATGCTACGATTTTGACTGTAATCTAGGGACTTTGACTA
CTGGGGCAAGGAAACCTGTCACCGCTCCCA' (SEQ ID NO:39)

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

QVQLVESGGVVVQSGRSLSRLSCAASQFTFRNRYGMWVRQAPGKLEWVAIVYDGS
DKYADSVGRFTISDRNSKNTLYLQMQNSLRAEDTAVYYCARDYDILTNPDRFVW
GQGTIVTVSS (SEQ ID NO:2)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' GACTCTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCACATGTAACCCCTGGACAGCCGC
CTCCATCTCTGCAAGCTGATCAAAGCCTGTCACAGTATGAAACACCTACT
GAGTTGGCCTCTCAGCAGGCAACCTCCAAAGACTCTCAATTTATAGGATTTC
TAGCCGGTTCTCTGGGCTCAGCAGGCTGAGTCAGTGGCAGTGGGGCAGAGATT
TCACACTGGAAATCAGCAGGCTGAGGGATGTCGGGGTTTATTACTGCAAG
CAACTACACAGCTTCTGGACGAGGCAAGGGACCAAGGGAGATCAA3' (SEQ ID NO:38)

軽鎖可変領域のアミノ酸配列:

DTVMITQTPPLSSHTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGOPPRLLIYRISRFS
GVDRFSGSGACTDFLIEISRVEAEDVYVYCMOSTHVERTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:19)

FIG. 3C

【図3D】

139

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' GAGGTGCAAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCTGCGACGCTCTGGATTACCTTACGAGCTATGGCATAGACTGGGTC
GCCAGGCTCAGGAAAGGGCTGGAGCTGGGCTCTGGGCTATTAGTGGTACTGGTGT
AGTACAAACTACGCAAGCTGGGCTGGGCTGAGCTGGGCTGTCACCATCTCCAGAGAACATT
CAAGAACACACTGTATCTGCAAAATGAAACGCTGAGACCCGGAGACACGGGGCTCT
ATTACTGTGCTGGGAGGCAAGCTGGGAGTGGCTGGAGACTGGGGACCGGGACCC
CTGGGGCAAGGAAACCTGTCACCGCTCCCA' (SEQ ID NO:41)

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

EVQVLESGGLVQPGSLSRLSCAASGFTFSYAMWSWVQRQAPGKLEWVAISGGGST
NYADSVGRFTISDRNSKNTLYLQMQNSLRAEDTAVYYCAGSSGWSEIWGGTIVTV
S (SEQ ID NO:10)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' GACATCCAGATGACCCAGCTCCATCCTCCCTGTCGATCTGAGGAGACAGAGT
CACCATCTCTGCGACGCTAGTCAGGGCATTAAGAAATAATTAGCCTGGTATCAGCA
GAACACAGGAAAGGCTCTAACGGCTGATCTGCTTACGCTCCAAATTGCAAGGT
GGGTCCTCATCAAGGTTACGGGCTGAGTCGGGACAGAAATTACTCTCATAGTCA
GCAGGCTCAGGCTGAGGTTGCAAGATTTGCGACTTATTACTGCTCACAGCATCACAGTAC
CGCTCAGTTCGGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA3' (SEQ ID NO:40)

軽鎖可変領域のアミノ酸配列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIRNNILAWYQOKPGKAPKRILYIASNLQSGVPS
RFTGSGGTEFTLIVSSLQPEDFATYCLQHHSYPLTSGGGTKEIK (SEQ ID NO:25)

FIG. 3D

【図3E】

150

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' CAGGTACACGCTGAGCAGTCAGGTCAGGACTGGTGAAGCCCTGGACAGACCTCT
CACTCACCTGTCGCAACTCTCCGGGCAAGTGTCTCTAGCTACAGTCTCTGGGACT
GGATCAGGCACTTCCCCTACGAGGAGGCTTGAAGTGGCTGGAGAGGGCATATCACAGG
TCAGGTTGTTACAGGATATCGAGTATCGAGTAAAGCTGAAATAACATCACCC
AGACACATTCAGAAACGAGTCTCTCCCTGAGCTGAACCTGTGACTCTCCGAGGACAC
GGCTGTGTTACTCTGCAAGAGGCACTGGCTTGAACACTGGGGCCAGGGAAACCT
GGTCAACCGCTCTCTCA3' (SEQ ID NO:43)

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

QVQLQSGPGLVKRPSQTLSLTCATGDSVSSYSSAWNNIIRQSPSRGLEWLGRAYHRSR
WYEAVSVKSRLTIDPDTSKNQFSLQLNSVTPEADTAVYYCARGSRFWDQGTIVTVSS
(SEQ ID NO:5)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' GATATTGATGACCCAGACTCCACTCTCCACCTGTCAACCTTGGACAGCCGGC
CTCCATCTCTGAGGCTAGTCAGTCAAACGCTGTAACACAGGAAGAAATACCTACT
GAGTTGGCTTACAGCAGGCGCAAGGCGAGCTCAAGACTCTTAATTATAAGATTTC
TAACCGGTTCTCTGGGGTCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGGGAGGGACAGATT
TCACACTGAAATTAAGGGTGAAGCTGAGGATGTGCGGGATTATTCTCAGTGC
ATACTACACAAATTCTCTGGACGCTTCCGGCAAGGGACCAAGGGTGGAAATCAA3' (SEQ ID NO:42)

軽鎖可変領域のアミノ酸配列:

DIVMTQTPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGOPPRLLIYKISNRFS
GVDRFSGSGACTDFLKIISRVEAEDVYFCMHTTQFPWTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:21)

FIG. 3E

【図3F】

170

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' CAGGTACACGCTGAGCAGTCAGGTCAGGACTGGTGAAGCCCTGGACAGACCTCT
CACTCACCTGTCGCAACTCTCCGGGCAAGTGTCTCTAGCTACAGTCTCTGGGACT
GGATCAGGCACTTCCCCTACGAGGAGGCTTGAAGTGGCTGGGAAGGGCATACTACAGG
TCAGAATGTTATATAGTATGTAGTACCTGTCGAAATAGTCGAAATACACCA
GACACATTCAGAAACGAGTTCTCCCTGCACTGTAACCTCTGACTCCGGAGGACACG
GCTGTGTTACTCTGTCAGTGAAGAGGCACTGGCTTGAACACTGTCAGTGGGGAGGG
GTCACCGCTCTCTCA3' (SEQ ID NO:45)

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

QVQLQSGPGLVKFQSTLTLTCATGDSVSSNNAWNWIRQSPARGLEWLGRRTYRSK
WINDIVVSVKSRLTIDPDTSKNQFSLQLNSVTPEADTAVYYCVRATAFDYWGQGTIVTV
SS (SEQ ID NO:4)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' GCTATTGTTGACGGCCAGACTCACTCTCCCTACCTCTACCCCTGGACAGCCGGC
CTCCATCTCTGAGGCTAGTCAGTCAAACGCTGTCAGACGGATGGAAACACTACTT
GAGTTGGCTTACAGCAGGCGAGGGCAAGGCAAGACTCTTACCTTAAATTATAAGATTTC
TAACCGGTTCTCTGGGGTCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGGGAGGGAGGAGATT
TCACACTGAAATTAAGGGTGAAGCTGAGGATGTGCGGGATTATTCTCAGTGC
ATACTACACAAATTCTCTGGACGCTTCCGGCAAGGGACCAAGGGTGGAAATCAA3' (SEQ ID NO:44)

軽鎖可変領域のアミノ酸配列:

AIVLQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGOPPRLLIYKISNRFS
GVDRFSGSGACTDFLKIISRVEAEDVYFCMHTTQFPWTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:20)

FIG. 3F

【図3G】

211

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' CAGGTGAGCTGGGGAGGGCTGGTCCACCCCTGGAGGCTCCGAA
GACTCTCTGTAGCTGATCCACTCTGGATTACCCCTAGTACGATGGCATGGCAGTGGTCC
GGCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGACTGACATCATATGAGAAGT
AAAAAAAGACTATGAGACTCCCGAAGGGCGATTACCATCTCCAGAGAACATT
CAGAGACACCGCTGATCTGCAAAATGACAGGCTGAGAGTGAGGACACGGCTGTT
ATTACTGTGAGCGAAGGATATGTAGTAGCTGATCTAAAGTACTACTATT
ACGGTATGAGCTCTGGGCCAAGGGACCAAGGGTCAACCGTCTTCATCA3' (SEQ ID NO:47)

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

QVQLVESGGVVQPGRSRLSLSCVASGFTLSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVTSYDGSK
KDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCSEGYCDSSSCYKYYYYG
MDWVGQGTTVSS (SEQ ID NO:12)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGGCGGC
CTCCATCTCTGTAGCTGATCCACTCTGGATTACCCCTAGTACGATGGCATGGCAGTGGTCC
GGATGGTATCTGCAAGGGCTGGAGTGGGCTGCAAGTGCATCATATGAGAAGT
TAATGGGCTCTGGGCTCTGGACAGGCTGAGTGGCAGTGGATCAGGACACAGATT
TACATGAAATCTGGCAGAGTGGAGGATGTGGGTTTATTACTGATCATGCA
GGCTCTACAAACTCTGGGAGCTGGGACAGTCCGGCAAGGGACCAAGGGTAAATCAA3' (SEQ ID NO:46)

軽鎖可変領域のアミノ酸配列:

DIVMTQSPSLPLVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQRPQSPOLLIYLGSNRA
SGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:28)

FIG. 3G

【図3H】

250

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' GAGGGGAGCTGGGGAGGGCTGGGTACACGCTGGGGAGGCTCCGTC
GACTCTCTGTGAGCTCTGGATTACCCCTAGTACGATGGCATGGCAGTGGTCC
GGCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGCTGGGCTCAGCTGGGCTCTGGGCT
AGCACAAATTAGCAGACTCCGTCAGGCTGGGAGCTGGATCAGGACACAAATT
CAGAGACACCGCTGATCTGCAAAATGACAGGCTGAGAGTGAGGACACGGCTGTT
ATTACTGTGAGCGAAGGATATGTAGTAGCTGATCTAAAGTACTACTATT
ACGGTATGAGCTCTGGGCCAAGGGACCAAGGGTCAACCGTCTTCATCA3' (SEQ ID NO:49)

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

EQQLLESGGGWVQPGESLRLSCVASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGG
NTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQVNLSRAEDTAVYYCAGSSGSEWYQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:9)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' GACATCCAGATGACCCAGCTGGTCCACCTCCCTGTCAGCTGTAGGAGACAGCGT
CACCACATCTGGGGGACAGCTGGGAGCTTAAAGAAAATTAGGCTGGTATCAGC
AGAAACAGGGAACGGCCCTAAAGGGCTGATCTGTCAGCTTACAAAGT
GGGGTCCACATCAAGGGTTCAGGGCTGGGAGCTGGGAGAAATTCACTTCAACATC
CCGAGGCTCTGGGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGGGAGCTGG
CCGCTCACTTTGGGGGAGGACAGGGTGGGAGCTAGA3' (SEQ ID NO:48)

軽鎖可変領域のアミノ酸配列:

DIQMTQSPSSLSASVGDSVTITCRTSQGIRKNLWYQQKPGKAPKRILYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGCTEFITLTSRILQPEDFATYCLQHHSYPLTFGGGTRVEIR (SEQ ID NO:26)

FIG. 3H

【図3I】

318

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' CAGGTGAGCTGGGGAGGGCTGGTCCACCCCTGGAGGAGCTCCGAA
GACTCTCTGTAGCTGATCCACTCTGGATTACCCCTAGTACGATGGCATGGCAGTGGTCC
GGCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGCTGCAAGTGCATCATATGAGAAGT
AAAAAAAGACTATCAGACTCCGTAAGGGCGGATTACCATCTCCAGAGAACATT
CAAGAACACCGCTTATCTGCAAAATGACAGGCTGAGAGTGAGGACACGGCTGTT
ATTACTGTGAGCGAAGGATATGTAGTAGCTGATCTAAAGTACTACTATT
ACGGTATGAGCTCTGGGCCAAGGGACCAAGGGTCAACCGTCTTCATCA3' (SEQ ID NO:51)

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

QVOLVESGGVVQPGRSRLSLSCVASGFTLSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVTSYDGSK
KDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCSEGYCDSSSCYKYYYYG
MDWVGQGTTVSS (SEQ ID NO:15)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGGAGCCGC
CTCCATCTCTGGCAGGCTAGTCAAGGACCTCTTATAGAAATGAAACAACTATT
GGATGGTATCTGCAAGGGCAGGGCTGCAAGGCTGGGCTGCAAGTGCATCATATGAGAAGT
TAATGGGCTCTGGGCTCTGGACAGGCTGAGGCTGGGCTGCAAGTGCATCATATGAGAAGT
TACACTGAAATCTAGCAGAGGCTGGAGGAGTGGGGTTTATTACTGATCATGC
AGGCTCTACAAACTCTGGGAGCTGGGACAGGCTGGCAAGGGACCAAGGGTAAATCAA3' (SEQ ID NO:50)

軽鎖可変領域のアミノ酸配列:

DIVMTQSPSLPLVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQRPQSPOLLIYLGSNRA
SGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:33)

FIG. 3I

【図3J】

333

重鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' CAGGTGAGCTGGGGAGGGCTGGTCCACCCCTGGAGGAGCTCCGAA
GACTCTCTGTGAGCTCTGGATTACCCCTAGTACGATGGCATGGCAGTGGTCC
GGCAGGCTCTAGGCAAGGGCTGGAGTGGGCTGGAGCTGACATCATATGAGAAGT
AAAAAAAGACTATCAGACTCTGGTAAGGGCGGATTACCATCTCCAGAGAACATT
CAAGAACACCGCTTATCTGCAAAATGACAGGCTGAGGCTGAGGACACGGCTGTT
ATTACTGTGAGCGAAGGATATGTAGTAGCTGATCTAAAGTACTACTACT
ACGGTATGAGCTCTGGGCCAAGGGACCAAGGGTCAACCGTCTTCATCA3' (SEQ ID NO:53)

重鎖可変領域のアミノ酸配列:

QVOLVESGGVVQPGRSRLSLSCVASGFTLSSYGMHWVRQALGKLEWVAVTSYDGSK
KDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCSEGYCDSSTSCYKYYYYG
MDWVGQGTTVSS (SEQ ID NO:15)

軽鎖可変領域のヌクレオチド配列:

5' GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGAGGAGCCGC
CTCCACATCTCTGGCAGGCTAGTCAAGGCTCTTATAGAAATGAAACAACTATT
GGATGGTATCTGCAAGGGCAGGGCTGGAGTGGGCTGGAGCTGACATCATATGAGAAGT
TAATGGGCTCTGGGCTCTGGACAGGCTGGAGGCTGGGCTGGAGCTGAGTCAAGGACACAGATT
TACACTGAAATCTAGCAGAGGCTGGAGGAGTGGGGTTTATTACTGATCATGC
AGGCTCTACAAACTCTGGGAGCTGGGACAGGCTGGCAAGGGACCAAGGGTAAATCAA3' (SEQ ID NO:52)

軽鎖可変領域のアミノ酸配列:

DIVMTQSPSLPLVTPGEPASISCRSSQSLLYRNGNNYLDWYLQRPQSPOLLIYLGSNRA
SGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:32)

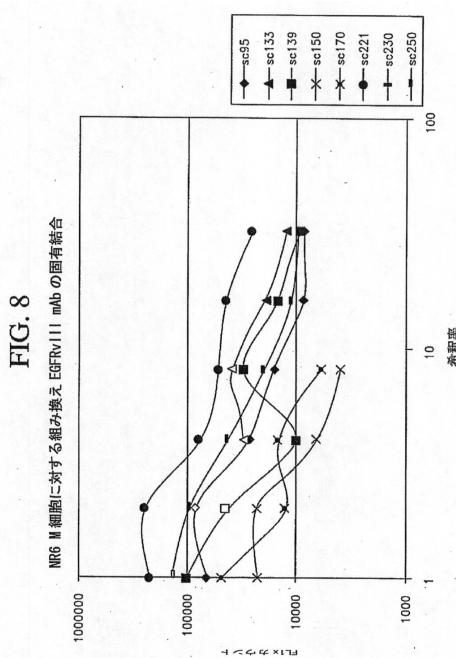
FIG. 3J

【 図 6 】

【 図 7 】

P ₂ -JL		V kappa/J	FRI	CDR1	FR2	CDR3	FR4	CDR1	FR2	CDR3	FR4
11461	131	Germinal	DIMONOGAMMATEPPEKAC	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
115210	170	A23 (Vκ2) /Jκ1	A-T	—	—	—	—	—	—	—	—
115226	105	Germinal	DIMONOGAMMATEPPEKAC	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112812	195	A23 (Vκ2) /Jκ1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
112825	133	Germinal	DIMONOGAMMATEPPEKAC	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112826	205	A30 (Vκ1) /Jκ4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
112907	211	Germinal	DIMONOGAMMATEPPEKAC	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112947	123	A3 (Vκ2) /Jκ1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
112948	342	Germinal	DIMONOGAMMATEPPEKAC	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112950	153	A3 (Vκ2) /Jκ1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
112951	150	Germinal	DIMONOGAMMATEPPEKAC	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
P ₂ -JL		μ-HEM	CDR2	FRI	CDR3	FR4	CDR1	FR2	CDR3	FR4	CDR1
112810	191	STABBS	GYDPMKSSGSSGSDPDTLTKLTKLTKLTKL	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112510	170	—	—	—	—	—	S	W	Y	W	Y
112520	150	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
112521	95	STABBS	GYDPMKSSGSSGSDPDTLTKLTKLTKLTKL	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112522	119	STABBS	GYDPMKSSGSSGSDPDTLTKLTKLTKLTKL	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112602	230	STABBS	GYDPMKSSGSSGSDPDTLTKLTKLTKLTKL	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112607	211	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
112613	143	STABBS	GYDPMKSSGSSGSDPDTLTKLTKLTKLTKL	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112644	342	STABBS	GYDPMKSSGSSGSDPDTLTKLTKLTKLTKL	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112649	342	STABBS	GYDPMKSSGSSGSDPDTLTKLTKLTKLTKL	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112650	333	STABBS	GYDPMKSSGSSGSDPDTLTKLTKLTKLTKL	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W
112651	318	STABBS	GYDPMKSSGSSGSDPDTLTKLTKLTKLTKL	RSRSRSRSRSRSRSRSRS	WQGQGPQFLL	Y	W	Y	W	Y	W

(8)



【図 9 A】

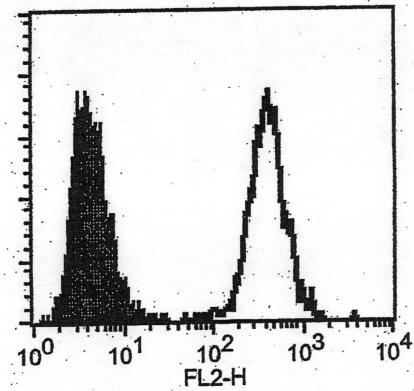
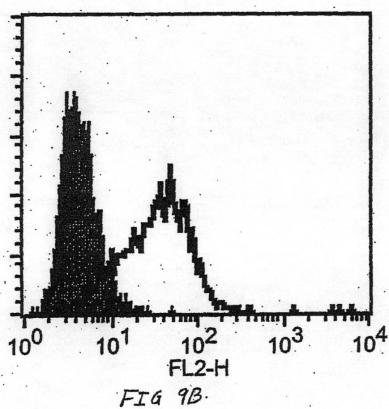
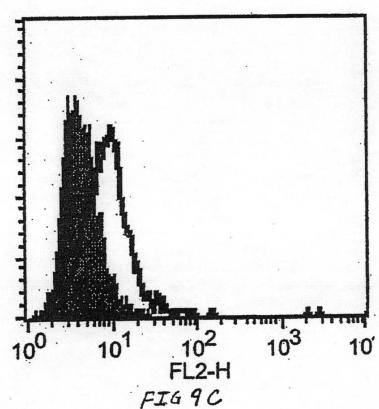


FIG 9A

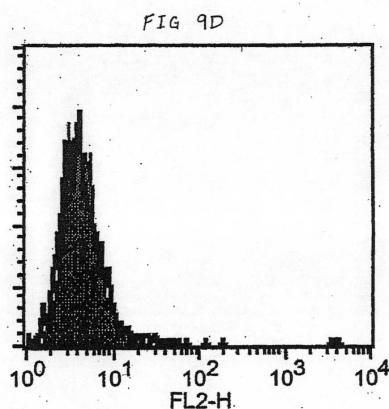
【図 9 B】



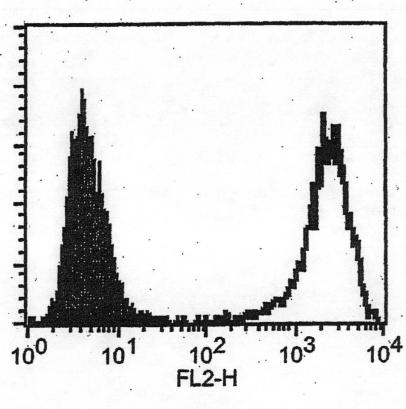
【図 9 C】



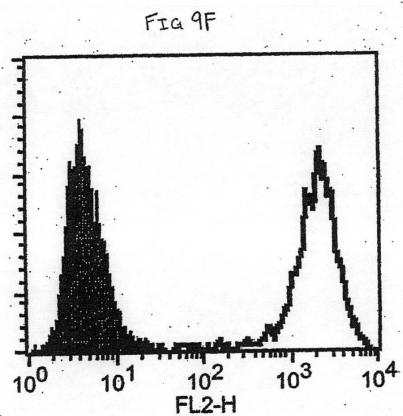
【図 9 D】



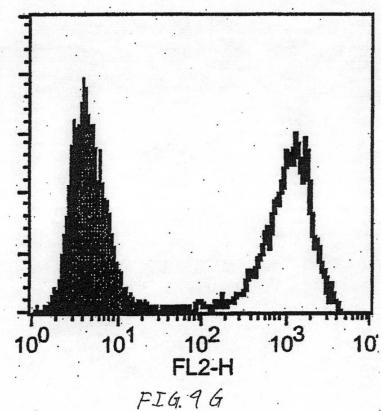
【図 9 E】



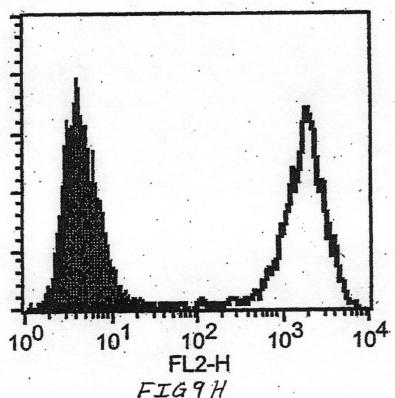
【図 9 F】



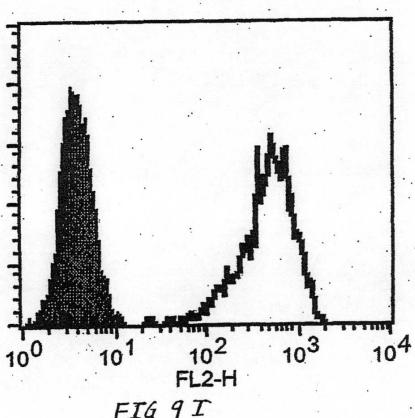
【図 9 G】



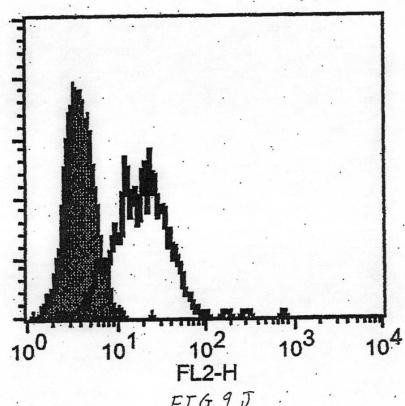
【図 9 H】



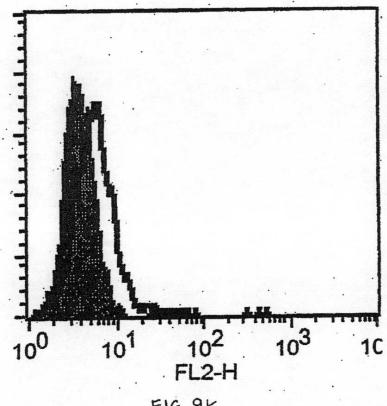
【図 9 I】



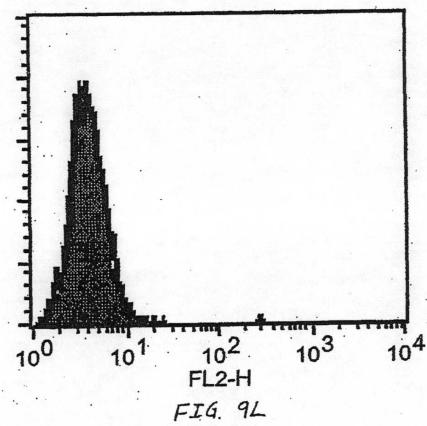
【図 9 J】



【図 9 K】

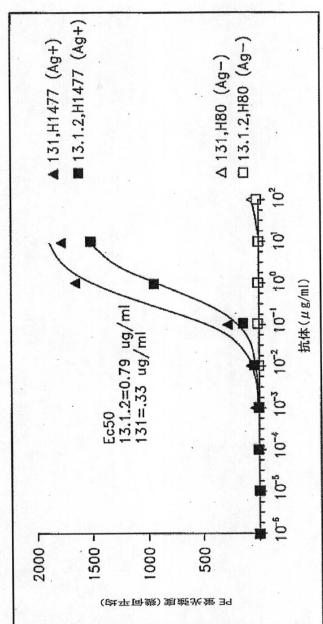


【図 9 L】



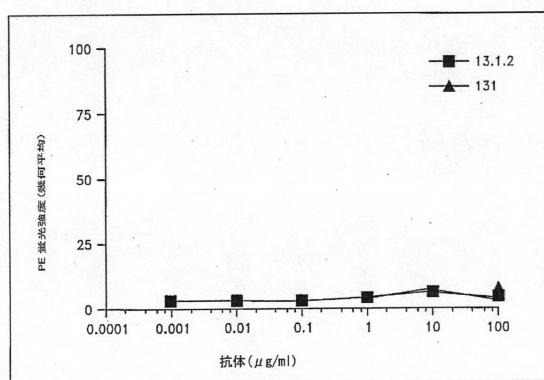
【図 9 M】

FIG. 9M



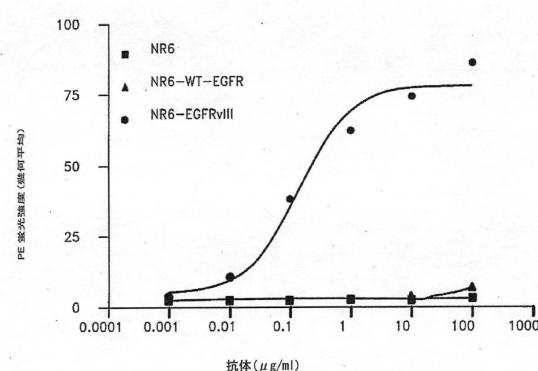
【図 9 N】

FIG. 9N



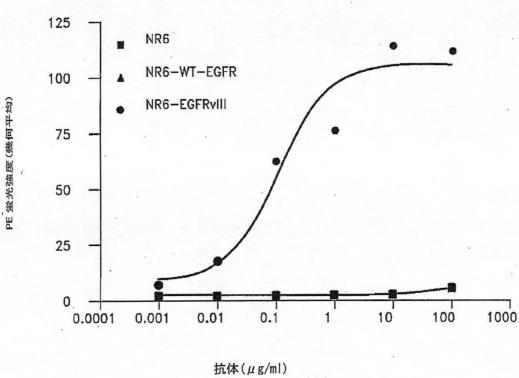
【図 9 O】

FIG. 9O



【図 9 P】

FIG. 9P



【図 10 A】

ABX-EGF

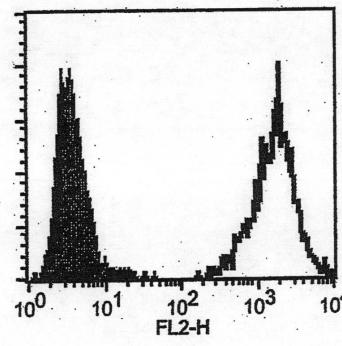


FIG. 10A

【図 10 B】

XG1-131

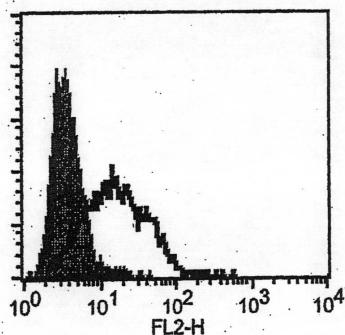


FIG. 10 B

【図 10 C】

XG1-139

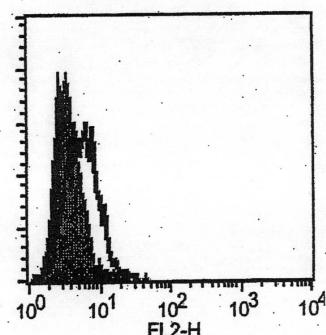


FIG. 10 C

【図 10 D】

dEGFR13.1.2

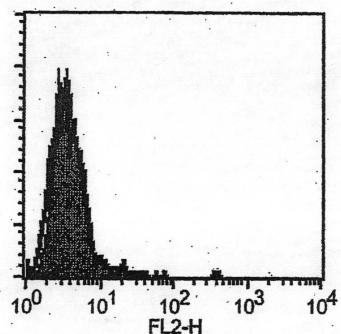


FIG. 10 D

【図 12】

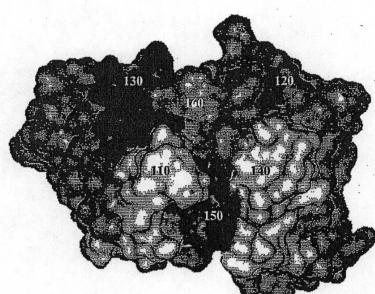


FIG. 12

【図 13 A】

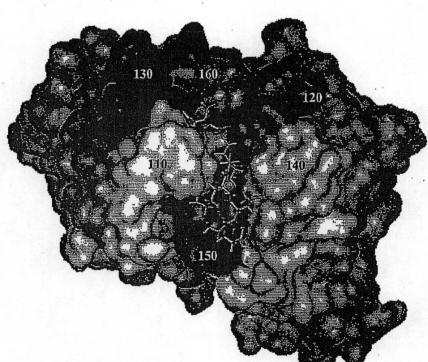


FIG. 13 A

【図 11】

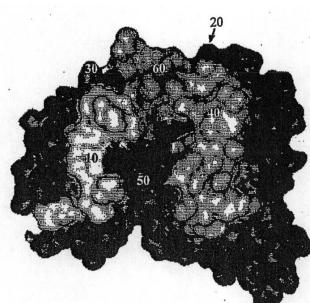
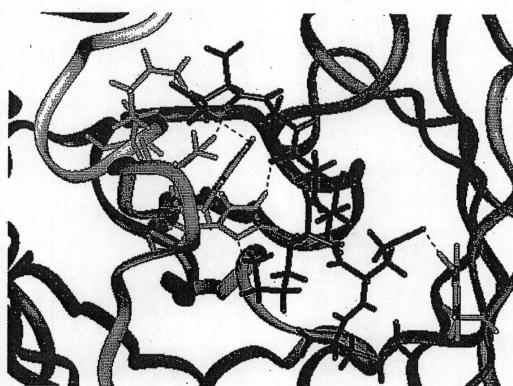


FIG. 11

【図13B】



【 図 1 4 】

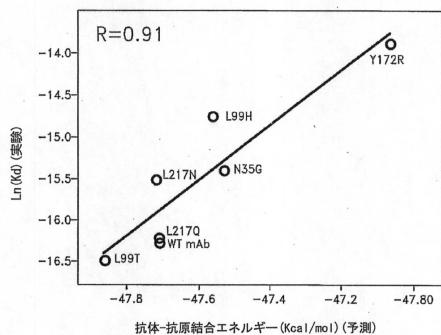


FIG. 14

【 15 】

FIG. 13B

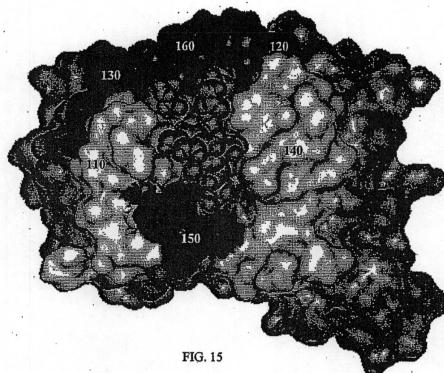
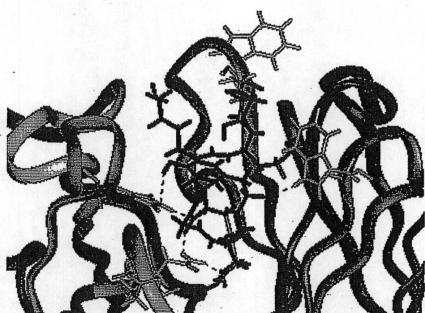


FIG. 15

【 16 】



【 17 】

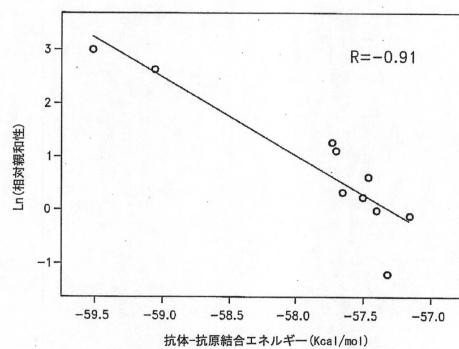


FIG. 16

FIG. 17

【配列表】

0006328928000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K	16/28	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	16/46	C 0 7 K	16/46
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/08	C 1 2 P	21/08
G 0 1 N	33/50	G 0 1 N	33/50
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	33/53
G 0 1 N	33/532	G 0 1 N	33/532
G 0 1 N	33/574	G 0 1 N	33/574
G 0 1 N	33/577	G 0 1 N	33/577

(31)優先権主張番号 60/562,453

(32)優先日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 リチャード・ウィーバー

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94116・サン・フランシスコ・パチェコ・ストリート・2
537

(72)発明者 シャオ・フェン

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94587・ユニオン・シティ・レッド・シーダー・レーン・
135

(72)発明者 オリット・フォード

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94404・フォスター・シティ・ケイマン・レーン・712

(72)発明者 ラリー・グリーン

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94114・サン・フランシスコ・ヒル・ストリート・464

(72)発明者 ジーン・グダス

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94560・ニューオーク・クリスタル・スプリングス・ドラ
イブ・36178

(72)発明者 ブルース・キート

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94010・ヒルズボロー・レイクビュー・ドライブ・118
0

(72)発明者 イング・リウ

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94040・マウンテン・ビュー・フィリス・アヴェニュー・
1105

(72)発明者 パラーニ・ラサナスワミ

カナダ・ブリティッシュ・コロンビア・V6P・4V7・バンクーバー・フレンチ・ストリート・
7878

(72)発明者 ロバート・ラヤ

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94536・フレモント・グリーンウッド・ドライブ・336
7

(72)発明者 シャオ・ドン・ヤング

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94306・パロ・アルト・ブライアント・ストリート・28
33

(72)発明者 ジョセ・コルヴァラン

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94404・フォスター・シティ・ウィリアムズ・ストリート
・125

(72)発明者 イアン・フォルツ

カナダ・ブリティッシュ・コロンビア・V5A・4B9・バーナビー・ナイツウッド・プレイス・

2108

(72)発明者 シャオ - チ・ジア

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94403・サン・マテオ・ムレイ・コート・22

(72)発明者 ジャスパル・カン

カナダ・ブリティッシュ・コロンビア・V4N・5H6・サリー・ワンハンドレッドナインス・ア
ヴェニュー・16727

(72)発明者 チャドウィック・ティー・キング

カナダ・ブリティッシュ・コロンビア・V4N・5H6・バンクーバー・ニコラ・ストリート・1
501-535

(72)発明者 スコット・エル・クラカンプ

アメリカ合衆国・カリフォルニア・94538・フレモント・ショパン・テラス・1160・#3
01

(72)発明者 キャオジュアン・ジェーン・スウ

アメリカ合衆国・カリフォルニア・95135・サン・ホセ・フィラン・ウェイ・4073

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 山本 晋也

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第98/50433(WO, A1)

特許第5583560 (JP, B2)

特許第4800210 (JP, B2)

Cancer Res., 1995年 7月15日, Vol. 55, No. 14, pp. 31
40-3148Brain Tumor Pathol., 2000年, Vol. 17, No. 2, pp. 7
1-78Crit. Rev. Oncol. Hematol., 2001年 4月, Vol. 38,
No. 1, pp. 17-23

Int. J. Cancer, 1993年, vol. 55, pp. 931-937

British Journal of Cancer, 1995年, vol. 71, pp. 9
28-933

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

C07K16/00-16/46

PubMed

专利名称(译)	识别表皮生长因子受体缺失突变体的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP6328928B2	公开(公告)日	2018-05-23
申请号	JP2013272028	申请日	2013-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	每次上午二烯帧蒙特Incorporated的莱特		
申请(专利权)人(译)	每次Amujien弗里蒙特股份有限公司莱特		
当前申请(专利权)人(译)	每次Amujien弗里蒙特股份有限公司莱特		
[标]发明人	リチャード・ウィーバー シャオ・フェン オリット・フォード ラリー・グリーン ジーン・グダス ブルース・キート イングリウ パラーニ・ラサナスワミ ロバート・ラヤ シャオ・ドン・ヤング ジョセ・コルヴァラン イアン・フォルツ シャオ・チ・ジア ジャス・パル・カン チャド・ウィック・ティー・キング スコット・エル・クラカンプ キャオ・ジュアン・ジエーン・スウ		
发明人	リチャード・ウィーバー シャオ・フェン オリット・フォード ラリー・グリーン ジーン・グダス ブルース・キート イングリウ パラーニ・ラサナスワミ ロバート・ラヤ シャオ・ドン・ヤング ジョセ・コルヴァラン イアン・フォルツ シャオ・チ・ジア ジャス・パル・カン チャド・ウィック・ティー・キング スコット・エル・クラカンプ キャオ・ジュアン・ジエーン・スウ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/02 A61K39/395 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/28 C07K16/46 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/532 G01N33/574 G01N33/577 A61K47/48 C07K16/22 C07K17/00 C12N C12N5/06		
CPC分类号	A61K47/6803 A61K47/6849 A61K47/6897 A61K2039/505 A61P1/00 A61P11/00 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P35/00 A61P43/00 B82Y5/00 C07K16/2863 C07K2317/34 C07K2317/92 Y10S435/81 C07K16/28 G01N33/532 G01N33/574 C07K16/30 C07K2317/21 C07K2317/77		

FI分类号

C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C A61K39/395.T A61P35/00 A61P43/00.111 C07K16/28 C07K16/46
 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/532.A G01N33/574.A G01N33/577.B
 C07K14/715 C07K14/82 C07K16/30 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/06.100 C12N15/10.200.
 Z C12N15/12 C12N15/13 C12N5/00.102 C12N5/20

F-TERM分类号

2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045
 /CB02 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA01
 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA36 4B024/BA54 4B024/CA02 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024
 /EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA01 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/BJ12
 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA05 4B064
 /DA14 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/AC15 4B065/BA01 4B065/BA08
 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/DD63 4C085
 /EE01 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA42 4H045/DA76
 4H045/EA29 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74

代理人(译)

村山彥
 安倍晋三龙彥

优先权

60/483145 2003-06-27 US
 60/525570 2003-11-26 US
 60/562453 2004-04-15 US

其他公开文献

JP2014113150A5
 JP2014113150A

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

本发明涉及新型抗体，特别是针对表皮生长因子受体缺失突变体的抗体，特别是涉及III型缺失突变体EGFRvIII的抗体。本发明还涉及针对表皮生长因子受体缺失突变体特别是EGFRvIII的人单克隆抗体。还提供了此类抗体的诊断和治疗制剂及其免疫缀合物。

(19)日本国特許庁(JP)	(12)特許公報(B2)	(11)特許番号 特許第6328928号 (P6328928)
(45)発行日 平成30年5月23日(2018.5.23)	(24)登録日 平成30年4月27日(2018.4.27)	
(51)Int.Cl.	F I	
C12N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C12N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A61P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A61P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
		請求項の数 53 (全 113 頁) 最終頁に続く
(21)出願番号 特願2013-272028 (P2013-272028)	(73)特許権者 504429002	
(22)出願日 平成25年12月27日(2013.12.27)		アムジェン・フレメント・インコーポレイ
(62)分割の表示 特願2010-262795 (P2010-262795)		テッド
		アメリカ合衆国、カリ福ルニア・913
		20-1799、サウザンド・オークス、
		ワン・アムジェン・センター・ドライブ
(51)出願番号 特願2014-113150 (P2014-113150A)	(74)代理人 100108450	
(65)公開番号 特開2014-113150 (P2014-113150A)		弁理士 村山 眞彦
(43)公開日 平成26年6月25日(2014.6.25)		100110364
(65)公開番号 特開2014-113150 (P2014-113150A)		弁理士 実広 信哉
(43)公開日 平成26年6月26日(2014.6.26)		100133400
(65)公開番号 特開2014-113150 (P2014-113150A)		弁理士 阿部 遼彦
(43)審査請求日 平成26年1月27日(2014.1.27)		
(65)審査請求日 不願2016-5756 (P2016-5756/J1)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号 60/483,145		
(32)優先日 平成28年3月31日(2016.3.31)		
(33)優先権主張国 米国(US)		
(31)優先権主張番号 60/525,570		
(32)優先日 平成15年6月27日(2003.6.27)		
(33)優先権主張国 米国(US)		
(31)優先権主張番号 60/525,570		
(32)優先日 平成15年11月26日(2003.11.26)		
(33)優先権主張国 米国(US)		

(54)【発明の名称】上皮成長因子受容体の欠失型変異体を認識する抗体、およびそれらの使用