(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6082673号
(P6082673)

(45)発行日　平成29年2月15日(2017.2.15)　(24)登録日　平成29年1月27日(2017.1.27)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	39/395	N

請求項の数 20　(全 137 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-172146(P2013-172146)
(22)出願日　平成25年8月22日(2013.8.22)
(62)分割の表示　特願2008-292842(P2008-292842)の分割
原出願日　平成14年5月13日(2002.5.13)
(65)公開番号　特開2014-36655(P2014-36655A)
(43)公開日　平成26年2月27日(2014.2.27)
審査請求日　平成25年9月5日(2013.9.5)
(31)優先権主張番号　60/290,410
(32)優先日　平成13年5月11日(2001.5.11)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/326,019
(32)優先日　平成13年9月28日(2001.9.28)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　500025570
ルードヴィッヒ　インスティテュート　フォー　キャンサー　リサーチ　リミテッド
アメリカ合衆国　ニューヨーク州１０１５８、ニューヨーク、サード　アベニュー　６０５
(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真
(74)代理人　100140523
弁理士　渡邊　千尋
(72)発明者　ロイド　ジェイ.　オールド
アメリカ合衆国　ニューヨーク　１００２４，　ニュー　ヨーク，　ウエスト　エンド　アベニュー　６００，　アパートメント　６ディー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】特異的結合タンパク質およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出されるＥＧＦＲエピトープを認識する単離された抗体であって、前記抗体は、

ヒトＩｇＧ１抗体のフレームワークと、

ヒトκ軽鎖定常領域と、

配列番号２のアミノ酸残基２６－３５Ａ、４９－６４及び９３－１０２（Ｋａｂａｔの番号付による）に示されるＣＤＲ配列を含む重鎖可変領域と、

配列番号４のアミノ酸残基２４－３４、５０－５６及び８９－９７（Ｋａｂａｔの番号付による）に示されるＣＤＲ配列を含む軽鎖可変領域と

を含み、

前記エピトープは、ＥＧＦＲの残基２７３－５０１を含む領域内に位置し、

前記抗体は、接合部ペプチドとは異なるエピトープにおけるｄｅ２－７ＥＧＦＲに結合することができ、

前記抗体は、異常な発現が存在しない正常細胞のＥＧＦＲには結合せず、

前記抗体は、哺乳動物の宿主細胞発現系において作成される、

単離された抗体。

【請求項２】

ヒトの野生型ＥＧＦＲの残基２８７－３０２の配列内のエピトープに結合する、請求項１に記載の単離された抗体。

【請求項３】
ヒト化された又はキメラである、請求項１又は２に記載の単離された抗体。
【請求項４】
前記単離された抗体は、キメラ抗体であり、重鎖及び軽鎖を含み、
前記重鎖は、配列番号２に示される重鎖可変領域を含み、
前記軽鎖は、配列番号４に示される軽鎖可変領域を含む、
請求項１に記載の単離された抗体。
【請求項５】
前記単離された抗体が免疫結合体であり、治療又は診断目的を有する１以上の他の分子又は薬剤と共有結合又は連結されている、請求項１～４のいずれか１項に記載の単離された抗体。
【請求項６】
前記他の分子又は薬剤が、他の抗体、抗体断片、毒物、リガンド、放射性同位体及び化学療法剤から選択される、請求項５に記載の単離された抗体。
【請求項７】
検出可能標識又は機能的標識を担持する、請求項１～４のいずれか１項に記載の単離された抗体。
【請求項８】
前記標識は共有結合した薬剤又は放射性標識である、請求項７に記載の単離された抗体。
【請求項９】
前記放射性標識が、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{36}Ｃｌ、^{51}Ｃｒ、^{57}Ｃｏ、^{58}ＣＯ、^{59}Ｆｅ、^{90}Ｙ、^{121}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{211}Ａｔ、^{198}Ａｕ、^{67}Ｃｕ、^{225}Ａｃ、^{213}Ｂｉ、^{99}Ｔｃ又は^{186}Ｒｅのうちの一つである、請求項８に記載の単離された抗体。
【請求項１０】
ペグ化されている、請求項１～４のいずれか１項に記載の単離された抗体。
【請求項１１】
ヒト又は動物の治療又は診断方法に使用するための、請求項１～１０のいずれか１項に記載の単離された抗体。
【請求項１２】
画像診断に使用する医薬の製造のための、請求項１～８のいずれか１項に記載の単離された抗体の使用。
【請求項１３】
哺乳動物のがんの治療又は予防のための医薬の製造のための、請求項１～８のいずれか１項に記載の単離された抗体の使用。
【請求項１４】
前記がんは脳内に位置するか又は脳に隣接して位置する、請求項１３に記載の単離された抗体の使用。
【請求項１５】
前記がんは、グリア芽細胞腫、髄芽細胞腫、髄膜腫、腫瘍性星状細胞腫及び腫瘍性動静脈先天異常から選択される脳内在性がんである、請求項１４に記載の単離された抗体の使用。
【請求項１６】
前記がんは、神経腫瘍である請求項１４に記載の単離された抗体の使用。
【請求項１７】
前記単離された抗体又はその活性フラグメントが全身投与される、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の単離された抗体の使用。
【請求項１８】
前記治療が放射免疫療法を含む、請求項１３～１７のいずれか１項に記載の単離された

抗体の使用。
【請求項１９】
前記単離された抗体又はその活性フラグメントが最初に投与され、その後、化学療法剤を含む組成物が投与される、請求項１３～１７のいずれか１項に記載の単離された抗体の使用。
【請求項２０】
請求項１～８のいずれか１項に記載の単離された抗体と、任意選択により、医薬上許容されるビヒクル、キャリア又は希釈剤とを含む、医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（発明の分野）
本発明は、増幅した上皮増殖因子レセプター（ＥＧＦＲ）およびそのＥＧＦＲのｄｅ２－７ＥＧＦＲ短縮型に結合する、特異的結合メンバー、特に、抗体およびそれらのフラグメントに関する。特に、その特異的結合メンバー、特に抗体およびそれらのフラグメントによって認識されるエピトープが、異常な翻訳後改変によって増強されているかまたは顕性である。これらの特異的結合メンバーは、癌の診断および処置において有用である。本発明の結合メンバーまたは、治療において、化学療法剤もしくは抗癌剤ならびに／または他の抗体もしくはそれらのフラグメントと併用して使用され得る。
【背景技術】
【０００２】
（発明の背景）
化学療法的手段による増殖性疾患、特に癌の処置は、しばしば、ヒトまたは動物の身体の中の、標的増殖細胞と他の正常細胞との間の差異を探索することに依存する。例えば、多くの化学薬剤は、迅速に複製するＤＮＡによって取り込まれ、その結果、ＤＮＡ複製および細胞分裂のプロセスが破壊されるように設計される。別のアプローチは、発達したヒト組織では正常に発現されない腫瘍細胞または、他の異常細胞の表面における抗原（例えば、腫瘍抗原または胚性抗原）を同定することである。このような抗原は、この抗原をブロックまたは中和し得る抗体のような結合タンパク質を用いて標的化され得る。さらに、これらの結合タンパク質（抗体およびそれらのフラグメントを含む）は、毒性因子または直接的もしくは間接的に毒性因子を腫瘍部位で活性化し得る他の物質を送達し得る。
【０００３】
ＥＧＦＲは、腫瘍標的化抗体療法について魅力的な標的である。なぜならば、ＥＧＦＲは、多くの型の上皮腫瘍において過剰発現されているからである（２７，２８）。さらに、ＥＧＦＲの発現は、胃、結腸、膀胱、胸部、前立腺、子宮内膜、腎臓および脳を含む多くの型の腫瘍（例えば、神経膠腫）の乏しい予後に関連する。結果的に、多くのＥＧＦＲ抗体が、文献に報告されており、いくつかでは、臨床的評価を行っている（１８，１９，２９）。頭頸部の癌、扁平上皮細胞肺癌、脳神経膠腫、および悪性星細胞腫を有する患者においてＥＧＦＲ　ｍＡｂを使用した研究からの結果は、助長的であった。殆どのＥＧＦＲ抗体の抗腫瘍活性は、それらのリガンド結合をブロックする能力によって増強されている（３０，３１）。このような抗体は、細胞増殖および抗体依存性免疫機能（例えば、補体活性化）の両方の調節を介してこれらの効力を媒介し得る。しかし、これらの抗体の使用は、ＥＧＦＲの高い内因性レベルを有する器官（例えば、肝臓および皮膚）における取り込みに制限され得る（１８，１９）。
【０００４】
ＥＧＦＲ遺伝子の増幅（すなわち、ＥＧＦＲ遺伝子の複数のコピー）を含む、有意な割合の腫瘍はまた、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲ、ΔＥＧＦＲ、またはΔ２－７（本明細書中で、交換可能に使用される用語）（２）として知られているそのレセプター（１３）の短縮型バージョンを同時に発現する。そのｄｅ２－７　ＥＧＦＲにおいて見出される再配置は、エキソン２～７に及ぶ８０１ヌクレオチドを欠失しているインフレームの成熟ｍＲＮＡを生

じさせる（６～９）。対応するＥＧＦＲタンパク質は、細胞外ドメインの残基６～２７３を含む２６７アミノ酸の欠失と融合連結部の新規グリシン残基とを有する（９）。この欠失は、グリシン残基の挿入と一緒に、欠失の境界点において独特の連結ペプチドを生み出す（９）。このｄｅ２－７　ＥＧＦＲ（２）は、神経膠腫、胸部、肺、卵巣、および前立腺を含む多くの型の腫瘍において報告されている（１－４）。この短縮型のレセプターはリガンドに結合しないが、このレセプターは、低い構成的活性を保持しており、そして、ヌードマウスにおいて腫瘍異種移植片として増殖した神経膠腫細胞に対して顕著な増殖利点を与え、そして、ＮＩＨ３Ｔ３細胞（１１）およびＭＣＦ－７細胞を形質転換し得る。神経膠腫細胞においてｄｅ２－７　ＥＧＦＲにより使用されるこれらの細胞機構は、完全には定義されていないが、アポトーシスの減少（１２）および増殖の僅かな増強（１２）を含むことが報告されている。

【０００５】

この短縮されたレポーターの発現が腫瘍細胞に限定されているので、この短縮されたレポーターは、抗体療法のための高度に固有の標的を示している。したがって、多くの研究機関は、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲの特異的なペプチドに対して特異的な、ポリクローナル抗体（１４）およびモノクローナル抗体（３，１５，１６）の両方の産生を報告している。一連のマウスｍＡｂ（これらは、独特のｄｅ２－７ペプチドで免疫した後に単離される）は、全て、短縮型レセプターに対して、選択性および特異性を示し、そして、ヌードマウスで増殖したｄｅ２－７　ＥＧＦＲ陽性異種移植片を標的化した（３，２５，３２）。

【０００６】

しかし、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲ抗体の１つの潜在的欠点は、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅を提示する腫瘍の僅かに一部分のみがｄｅ２－７ＥＧＦＲ（５）をもまた発現する（５）ということである。このｄｅ２－７　ＥＧＦＲを含む腫瘍の正確な割合は、完全には、確定されていない。なぜなら、様々な技術（すなわち、ＰＣＲ　対　免疫組織化学的方法）および種々の抗体の使用によって、その存在の頻度について報告される値に広い範囲が生じているからである。公開されたデータは、約２５～３０％の神経膠腫が、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲを発現し、その発現は、未分化の星状細胞腫において最も低く、そして、神経膠芽腫の多形態（ｍｕｌｔｉｆｏｒｍｅ）において最も高いことを示している（６，１３，１７）。ｄｅ２－７　ＥＧＦＲを発現している神経膠腫における陽性細胞の割合は、３７～８６％の範囲に及ぶと報告されている（１）。２７％の胸部癌腫および１７％の肺癌は、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲについて陽性であることが見出された（１，３，１３，１６）。したがって、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲ特異的抗体は、ＥＧＦＲ陽性腫瘍の一部のみにおいて有用であることが期待される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

したがって、ＥＧＦＲ抗体の活性に関する既存の証拠に助長されているものの、上記を反映した適用性および効力の範囲に関して観察される限界は依然として残る。したがって、広範な腫瘍への効力を実証する抗体および類似の因子を開発することが所望され、そして、これは本発明が指向する目的の達成に向かうものである。

【０００８】

本明細書中での参考文献の引用は、これらの参考文献が本発明の先行技術であるという承認として解釈されるべきではない。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

（発明の要旨）

広範な局面において、本発明は、野生型ＥＧＦＲから全くアミノ酸配列の変更も置換も示さず、そして、腫瘍形成性細胞、過増殖性細胞または異常細胞であることが見出され、そして、正常細胞においても野生型細胞（本明細書中で使用される「野生型細胞」との用語は、内因性ＥＧＦＲを発現するがｄｅ２－７　ＥＧＦＲは発現しない細胞を企図し、そし

てこの用語は、このＥＧＦＲ遺伝子を過剰発現する細胞を具体的に排除し；用語「野生型」とは、異常細胞または腫瘍形成性細胞ではなく正常細胞において存在する、遺伝子型もしくは表現型またはその他の特性をいう）においても検出可能ではないＥＧＦＲエピトープを認識する、単離された特異的な結合メンバー、特に、抗体またはそれらのフラグメントを提供する。さらなる局面において、本発明は、腫瘍形成性細胞、過増殖性細胞、または異常細胞において見出されるが、正常細胞においても野生型細胞においても検出されないＥＧＦＲエピトープを認識する、特異的結合メンバー、特に、抗体またはそれらのフラグメントを提供し、ここで、このエピトープは、異常な翻訳後改変または異常発現に際して増強されるかまたは顕性となる。本明細書中で提供される特定の非限定的な例示において、このＥＧＦＲエピトープは増強されるかまたは顕性となるが、ここで、翻訳後改変が野生型細胞におけるＥＧＦＲの正常発現にみられる程度まで完全ではなく十分でもない。１つの局面において、ＥＧＦＲエピトープは、最初のもしくは単純な炭水化物改変または初期のグリコシル化、特に、高次のマンノース改変に際して増強されるかまたは顕性となり、そして、複雑な炭水化物改変の存在下では減少されるかまたは顕性とならない。

【００１０】

この特異的結合メンバーは、抗体またはそれらのフラグメント（例えば、その免疫原性フラグメント）であり得、このメンバーは、異常発現の非存在下でありかつ正常なＥＧＦＲ翻訳後改変の存在下では正常なＥＧＦＲエピトープまたは野生型ＥＧＦＲエピトープを含む正常細胞または野生型細胞に結合しないかまたはそれらを認識しない。より具体的には、本発明の特異的結合メンバーは、抗体またはそれらのフラグメントであり得、特に、異常な翻訳後改変が存在下ではＥＧＦＲを過剰発現する（例えば、ＥＧＦＲが増幅されている）かまたはｄｅ２－７　ＥＧＦＲを発現してる細胞において存在し、そして、特に、正常な翻訳後改変が存在している場合には、通常の条件下でＥＧＦＲを発現する細胞において検出可能ではないＥＧＦＲエピトープを認識する。

【００１１】

本発明者らは、異常発現されるＥＧＦＲを特異的に認識する、新規のモノクローナル抗体（本明細書中において、ｍＡｂ　８０６として示される抗体によって例示される）を発見した。特に、本発明の抗体は、腫瘍形成性細胞、過増殖性細胞、または異常細胞において見いだされ、かつ正常細胞においても野生型細胞においても検出されないＥＧＦＲエピトープを認識し、ここで、そのエピトープは、異常な翻訳後改変に際して増強されるかまたは顕性となる。本発明の抗体はさらに、本明細書中に記載される、抗体ｍＡｂ　１２４および抗体ｍＡｂ１１３３によって例示される。本発明の新規の抗体はまた、増幅された野生型ＥＧＦＲおよびｄｅ２－７ＥＧＦＲを認識し、なおそのｄｅ２－７ＥＧＦＲ変異の独特の接合部（ｊｕｎｃｔｉｏｎａｌ）ペプチドとは異なるエピトープに結合する。本発明の抗体は、特に異常翻訳後改変に際して異常発現されるＥＧＦＲを特異的に認識し、その異常発現されるＥＧＦＲは増幅されたＥＧＦＲおよび変異ＥＧＦＲ（本明細書中で、ｄｅ２－７変異によって例示される）を含む。さらに、ｍＡｂ８０６は、正常量のＥＧＦＲを発現している神経膠腫細胞株の細胞表面において発現されている場合に、ＥＧＦＲを認識しないが、ｍＡｂ８０６は、ＥＬＩＳＡプレートの表面に固定されたＥＧＦＲの細胞外ドメイン（ｓＥＧＦＲ）に結合し、このことは、高次構造の（ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎａｌ）エピトープの認識を示している。ｍＡｂ８０６は、Ａ４３１細胞の表面に結合し、その細胞は、増幅されたＥＧＦＲ遺伝子を有しているが、ｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現しない。重要なことは、ｍＡｂ８０６は、殆どの他の組織よりも高いレベルの内因性の野生型（ｗｔ）ＥＧＦＲを発現するが、ＥＧＦＲを異常発現も増幅もしていない、肺および皮膚のような正常組織に有意に結合しない。

【００１２】

本発明の抗体は、染色によってかまたは異常なＥＧＦＲ発現（ＥＧＦＲ増幅および／またはＥＧＦＲ変異を含み、特にｄｅ２－７　ＥＧＦＲである）が存在する腫瘍または細胞を認識する他の手段によって、ＥＧＦＲ腫瘍または腫瘍形成性細胞の性質を特異的に分類し得る。さらに、本発明の抗体は、ｍＡｂ８０６によって例示され、増幅されたＥＧＦＲを

含む腫瘍およびｄｅ２－７　ＥＧＦＲ陽性異種移植片に対する顕著なインビボ抗腫瘍活性を実証する。

【００１３】

ｍＡｂ８０６がｄｅ２－７　ＥＧＦＲおよび増幅されたＥＧＦＲに結合するが正常な野生型ＥＧＦＲには結合しないとううｍＡｂ８０６の独特の特異性によって、これまで知られていたＥＧＦＲ抗体において見られ得た正常組織の取り込みに関連する問題なしに、多くの腫瘍型、例えば、頭頚部の腫瘍、胸部腫瘍または前立腺腫瘍および神経膠腫を同定し、特徴づけ、そして標的化するための診断的および治療的な使用が提供される。

【００１４】

従って、本発明は、接合部ペプチドとは異なるエピトープにおけるｄｅ２－７ＥＧＦＲに結合するが、そのＥＧＦＲ遺伝子の増幅の非存在下にて正常細胞中のＥＧＦＲには結合しない特異的結合タンパク質（例えば、抗体）を提供する。増幅とは、その細胞が複数のＥＧＦＲ遺伝子のコピーを含まないことを包含むことを意味する。

【００１５】

好ましくは、ｍＡｂ８０６によって認識されるエピトープは、成熟正常ＥＧＦＲ配列または成熟野生型ＥＧＦＲ配列の残基２７３～５０１を含む領域の中に位置づけられる。したがって、ＥＧＦＲ配列の残基２７３～５０１を含む領域に位置づけられるエピトープにおいてｄｅ２－７ＥＧＦＲに結合する、特異的結合タンパク質（例えば、抗体）がまた、提供される。このエピトープは、当業者に公知である任意の従来のエピトープマッピング技術によって決定され得る。あるいは、残基２７３～５０１をコードするＤＮＡ配列は消化され得、そしてその得られたフラグメントは適切な宿主において発現され得る。抗体結合は、上述のように決定され得る。

【００１６】

好ましい局面において、その抗体は、本発明者が同定しそして特徴付けた抗体（特に、増幅されたＥＧＦＲおよびｄｅ２－７ＥＧＦＲにおいて見出される、異常発現ＥＧＦＲを認識する抗体）の特徴を有する抗体である。特に好ましい局面において、この抗体は、ｍＡｂ８０６またはその活性フラグメントである。さらに好ましい局面において、本発明の抗体は、図１４（配列番号２）および図５（配列番号４）においてそれぞれ示されるような、ＶＨアミノ酸配列およびＶＬアミノ酸配列を含む。

【００１７】

別の局面において、本発明は、８０６抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列を有する少なくとも１０％の抗体が、ＥＬＩＳＡアッセイにおいてこのような抗体に競合することによって、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲに対する結合からブロックされる条件下で、８０６抗体と競合し得る抗体を提供する。特に、抗イディオタイプ抗体が、本明細書中で企図され、そして、例示される。抗イディオタイプ抗体である、ＬＭＨ－１１、ＬＭＨ－１２、およびＬＭＨ－１３が本明細書中で提供される。

【００１８】

成熟した正常な野生型ＥＧＦＲの残基２７３～５０１（成熟ｄｅ２－７　ＥＧＦＲの残基６～２３４）を含むエピトープから本質的になる単離されたポリペプチドは、本発明の別の局面を形成する。本発明のペプチドは、診断アッセイまたは診断キットにおいて、治療的または予防的に（腫瘍ワクチンまたは抗癌ワクチンを含む）において特に有用である。従って、本発明のペプチドの組成物としては、薬学的組成物および免疫学的組成物が挙げられる。

【００１９】

抗体の標的抗原への結合は、その重鎖および軽鎖の相補性決定領域（ＣＤＲ）を通して媒介され、ＣＤＲ３の役割は特に重要である。従って、その重鎖または軽鎖のＣＤＲ３領域、および好ましくは、ｍＡｂ８０６の軽鎖および重鎖の両方のＣＤＲ３領域に基づく特異的結合メンバーは、インビボ治療法のために有用な特異的結合メンバーである。ｍＡｂ８０６抗体のＣＤＲは、図１６および図１７において示されている。

【００２０】

従って、特異的結合タンパク質（例えば、同定されたｍＡｂ８０６抗体のＣＤＲ、特に、ＣＤＲ３領域に基づく抗体）は、それらのｄｅ２－７　ＥＧＦＲの状態にかかわらず、増幅したＥＧＦＲを有する腫瘍を標的化するのに有用である。ｍＡｂ８０６は、正常な野生型レセプターには有意には結合しないので、現在開発されているＥＧＦＲ抗体の制限である。正常組織における有意な取り込みは存在しない（１８，１９）。

【００２１】

添付の図面において、８０６ＶＨ遺伝子の核酸配列（配列番号１）およびその翻訳物（配列番号２）は図１４において示される。この８０６抗体のＶＬ遺伝子は図１５にて核酸配列（配列番号３）および推定アミノ酸配列（配列番号４）として示される。図１６および図１７において、ｍＡｂ８０６のＶＨポリペプチド配列およびＶＬポリペプチド配列が示され、そのＣＤＲを枠で囲む。

【００２２】

さらなる局面において、本発明は、抗原に結合し得る単離された特異的結合メンバーを提供し、ここで、この特異的結合メンバーは、配列番号２の残基９３～１０２として実質的に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む。本発明は、配列番号２の残基２６～３５Ａおよび４９～６４として実質的に示されるポリペプチド結合ドメインの１つまたは両方（好ましくは、両方）をさらに含む上記の単離された特異的結合メンバーをさらに提供する。このような実施形態の１つの例は、配列番号２において実質的に示される配列である。好ましい実施形態において結合ドメインはヒト抗体フレームワークによって保持される。

【００２３】

別の局面において、本発明は、腫瘍抗原に結合し得る単離された特異的結合メンバーを提供し、ここで、上記特異的結合メンバーは、そのアミノ酸配列番号４の中に実質的に見出されるＣＤＲを含む軽鎖と一緒に、すくなくとも配列番号２のＣＤＲ３配列を含む重鎖配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む。このような実施形態の１つの例は、配列番号４において実質的に見出される配列である。好ましい実施形態において、そのＣＤＲは、ヒト抗体フレームによって保持されている。

【００２４】

さらなる局面において、本発明は、上記で定義されたような、特異的結合メンバーをコードする配列を含む単離された核酸、ならびに本発明の特異的結合メンバーを調製する方法を提供し、この方法は、このような結合メンバーの発現を生じる条件下で、上記核酸を発現する工程、およびこの結合メンバーを回収する工程を包含する。

【００２５】

本発明のなおさらなる局面は、さらなる結合タンパク質を有するこのような結合タンパク質（例えば、ＥＧＦＲに結合する結合タンパク質であって、好ましくは、ＥＧＦＲへのリガンドの結合を阻害するタンパク質）の組成物である。このような組成物は、「ワンポット」カクテル、キットなどであり得、好ましくは投与の容易性のために処方され得る。

【００２６】

本発明に従う特異的結合メンバーは、ヒトまたは動物の身体の処置または診断の方法（例えば、ヒトの患者における腫瘍を処置する方法であって、この患者に有効量の本発明の特異的結合メンバーを投与する工程を包含する方法）において有用であり得る。

【００２７】

本発明はまた、本発明の抗体をコードする、組換えＤＮＡ分子もしくはクローン化された遺伝子またはそれらの縮重改変体に関し；好ましくは、本発明は、図１４（配列番号１）に示されるＤＮＡは配列を有するか、またはその配列に相補的である抗体ＶＨをコードする核酸分子、特に、組換えＤＮＡ分子またはクローン化された遺伝子に関する。別の実施形態において、本発明はまた、組換えＤＮＡ分子もしくはクローン化された遺伝子またはそれらの縮重改変体に関し、好ましくは、図１５（配列番号３）において示されるヌクレオチド配列を有しているかまたはそのＤＮＡ配列に相補的である抗体ＶＬをコードする、核酸分子、特に、組換えＤＮＡ分子またはクローン化された遺伝子に関する。

【００２８】
本発明はまた、本明細書で示される活性を有し、そして、上で示され、本明細書の図１４および図１５において示され、そして配列番号２および４から選択される、アミノ酸配列を提示する、ポリペプチドまたは抗体を含む。
【００２９】
本発明のさらなる実施形態において、本明細書に提供された組換えＤＮＡ分子またはクローン化された遺伝子の全長ＤＮＡ配列は、適切な宿主に導入され得る発現制御配列に作動可能に連結されて得る。従って、本発明は、本発明の抗体のＶＨおよび／またはＶＬあるいはそれらの部分、そしてより具体的には、上記で示され、配列番号１および配列番号３において示される、ＶＨおよび／またはＶＬをコートするＤＮＡ配列を含む、そのクローン化した遺伝子または組換えＤＮＡ分子で形質転換される単細胞宿主に及ぶ。
【００３０】
本発明は、本明細書において例示されるように、公知の組換え技術を含む、抗体およびその活性フラグメントの調製のためのいくつかの手段を必然的に企図し、従って、本発明は、その範囲において、このような合成抗体またはキメラ抗体の調製物に及ぶことが意図される。本明細書において開示される、ｃＤＮＡ配列およびアミノ酸配列の単離によって、このような組換え技術による本発明の抗体の再現が容易に行われ、従って、本発明は、組換えＤＮＡ技術による宿主系における発現のための、その開示されたＤＮＡ配列から調製される発現ベクターに及び、そしてそれにより得られる形質転換された宿主に及ぶ。
【００３１】
本発明は、抗体に結合し得、それによってこの抗体の活性の調節、阻害、増強を行い得る、薬物または他の実体（抗イディオタイプ抗体のような抗体を含む）を提供する。従って、ｍＡｂ８０６に対する抗イディオタイプ抗体が本明細書中で提供され、そして、例示される。このような抗イディオタイプ抗体は、抗体に特異的に結合する薬物（ｍＡｂ８０６またはそのエピトープ）、またはその活性を高める薬物の開発において有用である。
【００３２】
本発明の診断的用途は、腫瘍もしくは細胞サンプルを特徴付けるため、または腫瘍もしくは癌についてスクリーニングをするためのアッセイ（インビトロおよびインビボの診断アッセイを含む）における本発明の抗体の使用にまで及ぶ。
【００３３】
免疫アッセイにおいて、制御された量の抗体などが調製され得、酵素、特異的結合パートナーおよび／または放射性元素で標識され得、次いで、細胞サンプルに導入され得る。標識された物質またはその結合パートナーが、サンプル内の部位と反応する機会を有した後で、生じた質量を公知技術によって試験しえ得る。この公知技術は、結合した標識の性質に応じて変動し得る。
【００３４】
本発明の特異的結合メンバーは、検出可能な標識または機能的な標識を有し得る。特定の結合メンバーは、放射性標識（例えば、同位体^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{36}Ｃｌ、^{51}Ｃｒ、^{57}Ｃｏ、^{58}Ｃｏ、^{59}Ｆｅ、^{90}Ｙ、^{121}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{211}Ａｔ、^{198}Ａｕ、^{67}Ｃｕ、^{225}Ａｃ、^{213}Ｂｉ、^{99}Ｔｃ、および^{186}Ｒｅ）を有し得る。放射性標識が使用される場合、公知の現在利用可能な計数手順が、特定の結合メンバーを同定および定量するために使用され得る。例えば、標識が酵素である場合、検出は、当該分野で公知の任意の現在使用されている比色技術、分光測定技術、蛍光測定技術、電流測定技術、または気体測定技術により達成され得る。
【００３５】
放射性標識された特定の結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）は、インビトロでの診断技術およびインビボでの放射性画像化技術において有用である。本発明のさらなる局面において、放射性標識された特定の結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント（特に、放射性免疫結合体））は、放射性免疫治療において（特に、癌治療のた

めの放射性標識された抗体として）有用である。なおさらなる局面において、放射性標識された特定の結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）は、放射性免疫誘導性外科手順において有用である。この手順において、それらは、癌細胞、前癌細胞、腫瘍細胞、および過剰増殖細胞の存在および／または位置を、このような細胞を除去する外科手術の前、最中、または後に同定および示し得る。

【００３６】

本発明の免疫結合体または抗体融合タンパク質（ここで、本発明の特定の結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）は、他の分子または因子に結合体化または付着されている）としてはさらに、化学的除去剤、毒素、免疫モジュレーター、サイトカイン、細胞毒性剤、化学療法剤、または薬物に結合体化された結合メンバーが挙げられるがこれらに限定されない。

【００３７】

本発明は、例えば、増幅されたＥＧＦＲまたはｄｅ２－７ＥＧＦＲの存在の程度の定量的分析のための試験キットの形態で調製され得るアッセイ系を包含する。この系または試験キットは、本明細書中に記載される放射性技術および／または酵素技術のうちの１つ（抗体への標識の連結）により調製される標識成分、ならびに１つ以上のさらなる免疫化学薬剤を含み得、これらのうちの少なくとも１つは、決定される遊離もしくは固定化された成分またはそれらの結合パートナーである。

【００３８】

さらなる実施形態において、本発明は、結合メンバー、抗体、もしくはその活性フラグメントの活性、または同じ活性を有することが決定された薬剤または他の薬物に基づく特定の治療方法に関する。第１の治療方法は、癌（頭頸部癌、乳癌、前立腺癌、および神経膠腫が挙げられるがこれらに限定されない）の予防または処置に関する。

【００３９】

特に、本発明の結合メンバーおよび抗体、ならびに特定の実施形態においては、８０６抗体（その配列は、本明細書中で、配列番号２および４において示される）またはその活性フラグメント、およびそれらに由来するキメラ（二機能性）抗体または合成抗体が、薬学的組成物（治療が適切である（例えば、癌を処置するために）場合の投与のための、適切なビヒクル、キャリア、または希釈剤を含む）中で調製され得る。このような薬学的組成物はまた、ペグ化のような当該分野で公知の方法により、結合メンバー、抗体、またはフラグメントの半減期を調節する方法を含み得る。このような薬学的組成物はさらに、さらなる抗体または治療剤を含み得る。

【００４０】

従って、本発明の組成物は、処置される状態に依存して、単独または他の処置、治療、または薬剤と、同時にかまたは連続的に組み合わせて、投与され得る。さらに、本発明は、本明細書中に記載される結合メンバー（特に、抗体またはそのフラグメント）、および他の薬剤または治療（例えば、抗癌剤もしくは抗癌治療、抗ＥＧＦＲ剤もしくは抗体、または免疫モジュレーター）を含む組成物を企図し、それを包含する。より一般的に、これらの抗癌剤は、チロシンキナーゼインヒビターもしくはリン酸化カスケードインヒビター、翻訳後モジュレーター、細胞増殖インヒビターもしくは細胞分裂インヒビター（例えば、抗有糸分裂剤）、ＰＤＧＦＲインヒビター、またはシグナル伝達インヒビターであり得る。他の処置または治療としては、適切な用量の鎮痛薬（例えば、非ステロイド性抗炎症剤（例えば、アスピリン、パラセタモール、イブプロフェン、またはケトプロフェン）、あるいは鎮痛剤（例えば、モルヒネまたは抗催吐剤））の投与を包含し得る。従って、これらの薬剤は、抗ＥＧＦＲ特異的薬剤（例えば、ＡＧ１４７８）であり得るか、またはより一般的な抗癌剤および抗新生物剤であり得、非限定的な例として、ドキソルビシン、カルボプラチン、およびシスプラチンが挙げられる（がこれらに限定されない）。さらに、この組成物は、免疫モジュレーター（例えば、インターロイキン、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、もしくは他の増殖因子、サイトカイン、またはホルモン（例えば、デキサメタゾン））と共に投与され得、これらは、癌細胞または腫瘍の免疫応答、および減少または排除を刺

激する。この組成物はまた、他の抗ＥＧＦＲ抗体（抗ＥＧＦＲ抗体５２８；２２５；ＳＣ－０３；１０８（ＡＴＣＣ　ＨＢ９７６４）米国特許第６，２１７，８６６号；１４Ｅ１（米国特許第５，９４２，６０２号）；ＤＨ８．３；Ｌ８Ａ４；Ｙ１０；ＨｕＭＡＸ－ＥＧＦｒ（Ｇｅｎｍａｂ／Ｍｅｄａｒｅｘ）；ＩＣＲ６２；およびＡＢＸ－ＥＧＦ（Ａｂｇｅｎｉｘ）と共に投与され得るか、またはこれらとの組み合わせを含み得る。

【００４１】

本発明はまた、他の分子または薬剤に共有結合されているかそうでなければこれらに不随する結合メンバー（抗体およびそのフラグメントを含む）を含み得る。これらの他の分子または薬剤としては、別個の認識特性を有する分子（抗体または抗体フラグメントを含む）、毒素、リガンド、および化学治療剤が挙げられるがこれらに限定されない。

上記に加えて、本発明は、以下を提供する：

（項目１）

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、ＥＧＦＲエピトープを認識し、該ＥＧＦＲエピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ない、単離された特異的結合メンバー。

（項目２）

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、ＥＧＦＲエピトープを認識し、ここで該ＥＧＦＲエピトープは、正常なＥＧＦＲからの任意のアミノ酸配列変化またはアミノ酸配列置換を示さず、そして該ＥＧＦＲエピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ない、単離された特異的結合メンバー。

（項目３）

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、ＥＧＦＲエピトープを認識し、ここで該ＥＧＦＲエピトープは、正常なＥＧＦＲの任意のアミノ酸配列変化またはアミノ酸配列置換を示さず、そして該ＥＧＦＲエピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ず、ここで、該エピトープは、ＥＧＦＲの残基２７３～５０１を含む領域内に位置する、単離された特異的結合メンバー。

（項目４）

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、ＥＧＦＲエピトープを認識し、該ＥＧＦＲエピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ず、ここで、該エピトープは、異常な発現において増強されるかまたは明らかにされ、ここで、該特異的結合メンバーは、接合部ペプチドと区別されるエピトープでｄｅ２－７　ＥＧＦＲと結合し得、そして該特異的結合メンバーは、異常な発現の非存在下において正常細胞上でＥＧＦＲに結合せず、そしてここで、該エピトープは、ＥＧＦＲの残基２７３～５０１を含む領域内に位置する、単離された特異的結合メンバー。

（項目５）

項目１～４のいずれか１項以上に記載の単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーが、完全なヒトのメンバー、ヒト化されたメンバーまたはキメラ化されたメンバーである、単離された特異的結合メンバー。

（項目６）

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、ＥＧＦＲエピトープを認識し、該ＥＧＦＲエピトープは、正常なＥＧＦＲからの任意のアミノ酸配列変化またはアミノ酸配列置換を示さず、そして該ＥＧＦＲエピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ず、ここで、該結合メンバーは、配列番号２または配列番号４のいずれか１つまたは両方に実質的に記載されるとおりのポリペプチド配列を含む、単離された特異的結合メンバー。

（項目７）

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、ＥＧＦＲエピトープを認識し、該ＥＧＦＲエピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ず、ここで、該エピトープは、異常な発現において増強されるかまたは明らかにされ、ここで、該結合メンバーは、接合部ペプチドと区別されるエピトープでｄｅ２－７　ＥＧＦＲを結合し得、かつ正常な野生型遺伝子の増幅の非存在化において正常細胞上のＥＧＦＲに結合せず、そしてここで、該結合メンバーは、配列番号２または配列番号４のいずれか１つまたは両方に実質的に記載されるとおりのポリペプチド配列を含む、単離された特異的結合メンバー。

（項目８）

前記ポリペプチド配列が、配列番号２に記載される、項目６または７に記載の単離された特異的結合メンバー。

（項目９）

前記ポリペプチド配列が、配列番号４に記載される、項目６または７に記載の単離された特異的結合メンバー。

（項目１０）

前記結合メンバーが、配列番号２の、残基２６～３５Ａ、４９～６４または９３～１０２の任意の１つ以上に実質的に記載されるとおりのアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む、項目８に記載の特異的結合メンバー。

（項目１１）

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号２の、残基２６～３５Ａに記載されるとおりである、項目１０に記載の特異的結合メンバー。

（項目１２）

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号２の、残基４９～６４に記載されるとおりである、項目１０に記載の特異的結合メンバー。

（項目１３）

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号２の、残基９３～１０２に記載されるとおりである、項目１０に記載の特異的結合メンバー。

（項目１４）

前記抗体が、配列番号４の、残基２４～３４、５０～５６または８９～９７の任意の１つ以上に実質的に記載されるとおりのアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む、項目９に記載の特異的結合メンバー。

（項目１５）

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号４の、残基２４～３４に記載されるとおりである、項目１４に記載の特異的結合メンバー。

（項目１６）

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号４の、残基５０～５６に記載されるとおりである、項目１４に記載の特異的結合メンバー。

（項目１７）

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号４の、残基８９～９７に記載されるとおりである、項目１４に記載の特異的結合メンバー。

（項目１８）

前記単離された特異的結合メンバーが、抗体である、項目１～１７のいずれか１項に記載の単離された特異的結合メンバー。

（項目１９）

前記結合ドメインが、ヒト抗体フレームワークにを伴う、項目１～１７または１８のいずれか１項に記載の単離された特異的結合メンバーまたは抗体。

（項目２０）

前記ヒト抗体フレームワークが、ヒトＩｇＧ１抗体フレームワークである、項目１９に記載の単離された結合メンバーまたは抗体。

（項目２１）

配列番号２および配列番号４のいずれか１つに記載されるポリペプチド配列を含む、項目１８に記載の抗体。
（項目２２）
配列番号２に記載されるポリペプチド配列を含む、項目２１に記載の抗体。
（項目２３）
配列番号４に記載されるポリペプチド配列を含む、項目２１に記載の抗体。
（項目２４）
抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖフラグメント、二価抗体、三価抗体または四価抗体の形態である、項目１～２３のいずれか１項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。
（項目２５）
前記特異的結合メンバーまたは抗体が、検出可能標識または機能性標識を伴う、項目１～２４のいずれか１項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。
（項目２６）
前記標識が、共有結合により薬物に結合される、項目２５に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。
（項目２７）
前記標識が、放射性標識である、項目２５に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。
（項目２８）
前記結合パートナーまたは抗体が、ペグ化される、項目１～２４のいずれか１項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。
（項目２９）
項目１～２４のいずれか１項に規定されるとおりの特異的結合メンバーまたは抗体をコードする配列を含む、単離された核酸。
（項目３０）
項目１～２４のいずれか１項に規定されるとおりの特異的結合メンバーまたは抗体を調製する方法であって、該方法は、該結合メンバーまたは抗体の発現をもたらすような条件下で、項目２９に記載の核酸を発現する工程、および該結合メンバーまたは抗体を回収する工程、を包含する、方法。
（項目３１）
ヒトまたは動物の体を処置または診断する方法に使用するための、項目１～２８のいずれか１項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。
（項目３２）
腫瘍抗原に結合し得る特異的結合メンバーを調製する方法であって、該方法は以下の工程：
ａ）ＣＤＲ３コード領域を欠くＶＨドメインをコードする核酸の開始レパートリーを提供する工程；
ｂ）配列番号２の残基２６～３５Ａ、４９～６４または９３～１０２の任意の１つ以上に実質的に記載されるとおりのアミノ酸配列をコードするドナー核酸が、欠落したＣＤＲ３領域に挿入されるように、該レパートリーと、該ドナー核酸とを結合し、それによりＶＨドメインをコードする核酸の産物レパートリーを提供する工程；
ｃ）該産物レパートリーの核酸を発現する工程；
ｄ）試験動物において、＞１：１である腫瘍　対　血液の最大局在比および必要に応じて、＜１：１である非腫瘍保有器官　対　血液の局在比を持つ、特異的結合メンバーを選択する工程：および
ｅ）該結合メンバーまたは該結合メンバーをコードする核酸を回収する工程、
を包含する、方法。
（項目３３）
ヒト患者において腫瘍の処置をする方法であって、該方法は、該患者に、項目１～２８のいずれか１項に定義されるとおりの特異的結合メンバーまたは抗体の有効量を投与する工程を包含する、方法。

（項目３４）
腫瘍の診断のためのキットであって、該腫瘍においてＥＧＦＲは異常に発現されるかまたはＥＧＦＲは、短くされたタンパク質の形態で発現され、該キットは、項目１～２８のいずれか１項に記載される特異的結合メンバーまたは抗体を含み、必要に応じて、試薬および／または使用のための説明書を備える、キット。
（項目３５）
項目１～２８のいずれか１項に定義されるとおりの特異的結合メンバーまたは抗体、および必要に応じて、薬学的に受容可能なビヒクル、キャリアまたは希釈剤を含む、薬学的組成物。
（項目３６）
ヒト患者における腫瘍の処置のためのキットであって、該キットは、項目３５に記載の薬学的組成物の医薬投与形態、ならびに化学療法剤、抗ＥＧＦＲ抗体、放射免疫治療剤、およびこれらの組み合わせからなる群から選択されるさらなる抗癌剤を含む別の医薬投与形態を含む、キット。
（項目３７）
前記化学療法剤が、チロシンキナーゼインヒビター、リン酸化カスケードインヒビター、翻訳後モジュレーター、細胞増殖インヒビターまたは細胞分化インヒビター（例えば、抗有糸分裂因子）、シグナル変換インヒビター、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、項目３６に記載のキット。
（項目３８）
前記チロシンキナーゼインヒビターが、ＡＧ１４７８、ＺＤ１８３９、ＳＴＩ５７１、ＯＳＩ－７７４、ＳＵ－６６６８、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、項目３７に記載のキット。
（項目３９）
前記抗ＥＧＦＲ抗体が、抗ＥＧＦＲ抗体５２８、２２５、ＳＣ－０３、ＤＲ８．３、Ｌ８Ａ４、Ｙ１０、ＩＣＲ６２、ＡＢＸ－ＥＧＦ、およびこれらの組み合わせから選択される、項目３６に記載のキット。
（項目４０）
項目１～２４のいずれか１項に記載の特異的抗体メンバーもしくは抗体をコードするＤＮＡ配列またはその変性改変体、あるいはそのフラグメントを含む組換えＤＮＡ分子で形質転換された単細胞宿主であって、該フラグメントは以下：
（Ａ）図１３のＤＮＡ配列（配列番号１）；
（Ｂ）図１５のＤＮＡ配列（配列番号３）；
（Ｃ）図１３のＤＮＡ配列（配列番号１）および図１５のＤＮＡ配列（配列番号３）；
（Ｄ）配列番号８に記載されるとおりの定常ＩｇＧ１配列を有する図１３のＤＮＡ配列（配列番号１）および配列番号７に記載されるとおりの定常κ配列を有する図１５のＤＮＡ配列（配列番号３）；
（Ｅ）標準的なハイブリダイゼーション条件下で前出のＤＮＡ配列のうちのいずれかにハイブリダイズするＤＮＡ配列；および
（Ｆ）前出のＤＮＡ配列のうちのいずれかによってコードされるアミノ酸配列の発現をコードするＤＮＡ配列；
からなる群から選択され、ここで該ＤＮＡ配列は、発現制御配列に作動可能に連結される、単細胞宿主。
（項目４１）
前記単細胞宿主が、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ、酵母、ＣＨＯ細胞、ＹＢ／２０細胞、ＮＳＯ細胞、ＳＰ２／０細胞、Ｒ１．１細胞、Ｂ－Ｗ細胞、Ｌ－Ｍ細胞、ＣＯＳ１細胞、ＣＯＳ７細胞、ＢＳＣ１細胞、ＢＳＣ４０細胞、およびＢＭＴ１０細胞、植物細胞、昆虫細胞、および組織培養物中のヒト細胞からなる群から選択される、項目４０に記載の単細胞宿主。
（項目４２）

増幅されたＥＧＦＲ、ｄｅ２－７ＥＧＦＲまたは高マンノースグリコシル化ＥＧＦＲの存在を検出するための方法であって、該ＥＧＦＲは、以下の工程：
Ａ．増幅されたＥＧＦＲ、ｄｅ２－７ＥＧＦＲまたは高マンノースグリコシル化ＥＧＦＲがその中に存在すると思われる哺乳動物由来の生物学的サンプルと、該ＥＧＦＲに特異的に結合し得る抗体とを、該抗体への該ＥＧＦＲの結合が生じ得る条件下で接触させる工程；および
Ｂ．該サンプル由来の該ＥＧＦＲと、該抗体との間で、結合が生じたか否かを検出する工程；
によって測定され、ここで、該結合の検出は、該サンプル中の該ＥＧＦＲの存在または可性を示す、方法。

（項目４３）
哺乳動物中の癌を検出するための方法であって、該方法は、項目４２に記載の方法に従ってＥＧＦＲの存在または活性を検出する工程を包含し、ここで、該ＥＧＦＲの存在の検出は、該哺乳動物中の腫瘍または癌の存在を示す、方法。

（項目４４）
哺乳動物において癌を予防および／または処置する方法であって、該方法は、治療的に有効な量の項目３５に記載の薬学的組成物または項目３６～３９のいずれか１項に記載のキットを哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

（項目４５）
哺乳動物中で異常に発現されるＥＧＦＲを産生する脳内在性癌の処置のための方法であって、該方法は、治療的に有効な量の項目３５に記載の薬学的組成物または項目３６～３９のいずれか１項に記載のキットを哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

（項目４６）
前記脳内在性癌が、グリア芽細胞種、髄芽細胞腫、髄膜腫、腫瘍性星状細胞種および腫瘍性動静脈先天異常から選択される、項目４５に記載の方法。

（項目４７）
前記薬学的組成物または前記キットが、全身的に投与される、項目４５および４６に記載の方法。

（項目４８）
哺乳動物中の悪性神経腫瘍の処置のための方法であって、該方法は、治療的に有効な量の項目３５に記載の薬学的組成物または項目３６～３９のいずれか１項に記載のキットを哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

（項目４９）
配列番号２に記載されるとおりのポリペプチド配列を有する可変重鎖およびヒトＩｇＧ１定常領域を含む、抗体。

（項目５０）
配列番号４に記載されるとおりのポリペプチド配列を有する可変軽鎖およびヒトκ定常領域を含む、抗体。

（項目５１）
配列番号２に記載されるとおりのポリペプチド配列を有する可変重鎖を含む、抗体。

（項目５２）
配列番号４に記載されるようなポリペプチド配列を有する可変軽鎖を含む、抗体。

（項目５３）
配列番号２の、残基２６～３５Ａ、４９～６４または９３～１０２の任意の１つ以上に実質的に記載されるとおりのアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む、抗体。

（項目５４）
配列番号４の、残基２４～３４、５０～５６または８９～９７の任意の１つ以上に実質的に記載されるとおりのアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む、抗体。

（項目５５）
哺乳動物における癌の処置または予防のための、項目１～２８のいずれか１項に記載の特

異的結合メンバーまたは抗体の使用。
（項目５６）
哺乳動物における癌の処置または予防のための、項目３５に記載の薬学的組成物または項目３６～３９のいずれか１項に記載のキットの使用。
（項目５７）
哺乳動物における癌の処置または予防のための医薬の調製のための、項目１～２８および４９～５４のいずれか１項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体の使用。
（項目５８）
前記癌が、脳内に位置するかまたは脳に隣接して位置する、項目５５～５７のいずれか１項に記載の使用。
（項目５９）
哺乳動物における神経腫瘍の処置または予防のための医薬の調製のための、項目１～２８および４９～５４のいずれか１項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体の使用。
（項目６０）
前記放射性標識が、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{36}Ｃｌ、^{51}Ｃｒ、^{57}Ｃｏ、^{58}Ｃｏ、^{59}Ｆｅ、^{90}Ｙ、^{121}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{211}Ａｔ、^{198}Ａｕ、^{67}Ｃｕ、^{225}Ａｃ、^{213}Ｂｉ、^{99}Ｔｃまたは^{186}Ｒｅのうちのいずれか１つである、項目２５に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。
（項目６１）
項目１～２８のいずれか１項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体が結合する、単離された糖タンパク質、および癌ワクチンとして使用するための薬学的に受容可能なアジュバントの組成物。
（項目６２）
哺乳動物において癌を検出するための方法であって、該方法は、項目２５または２６のいずれかに記載の特異的結合メンバーまたは抗体を使用して、画像診断を行なう工程を包含する、方法。
（項目６３）
前記処置のための手順が、放射免疫療法を包含する、項目５５～５９のいずれか１項に記載の使用。
（項目６４）
項目２５、２６または６０に記載の特異的結合メンバーまたは抗体が最初に投与され、その後、化学療法剤を含む組成物が投与される、項目５５～５９のいずれか１項に記載の使用。
【図面の簡単な説明】
【００４２】
【図１】図１は、神経膠腫細胞株のフローサイトメトリー分析の結果を示す。Ｕ８７ＭＧ（薄灰色のヒストグラム）細胞およびＵ８７ＭＧ．Δ２－７（暗灰色のヒストグラム）細胞を、示されるような無関係のＩｇＧ２ｂ抗体（白抜きのヒストグラム）、ＤＪ８．３（ｄｅ２－７ＥＧＦＲに特異的）、ＭＡｂ８０６または５２８（野生型ＥＧＦＲおよびｄｅ２－７ＥＧＦＲの両方に結合する）のいずれかで染色した。
【図２－１】図２Ａ～Ｃは、ＭＡｂ８０６、ＤＨ８．３、または５２８抗体のＥＬＩＳＡの結果を示す。（Ａ）ｓＥＧＦＲをコートしたＥＬＩＳＡプレートに対するＭＡｂ８０６（黒三角）、ＤＨ８．３（黒丸）、または５２８（黒四角）抗体の増加した濃度の結合。（Ｂ）溶液中でのｓＥＧＦＲの濃度を増加させることによるｓＥＧＦＲをコートしたＥＬＩＳＡプレートに対するＭＡｂ８０６および５２８の結合の阻害。（Ｃ）ｄｅ２－７連結ペプチドに対するＤＨ８．３の増加した濃度の結合は、固定化された野生型ｓＥＧＦＲに対するｍＡｂ８０６および５２８抗体の結合曲線を示す。
【図２－２】図２Ｄおよび２Ｅは、Ｃ末端ビオチニル化ペプチドを用い、そして他の公知の抗体（とりわけ、ｄｅ２－７ＥＧＦＲ変異体の連結ペプチドを認識するＬ８Ａ４抗体）、およびコントロールと共に、本発明のモノクローナル抗体を含む、ＢＩＡｃｏｒｅ結合

研究の結果を図示する。
【図３】図３は、ＭＡｂ８０６およびＤＨ８．３抗体のインターナリゼーションを示す。Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を、ＭＡｂ８０６（黒三角）またはＤＨ８．３（黒丸）と共に４℃にてプレインキュベートし、３７℃に移し、そしてインターナリゼーションを、ＦＡＣＳにより決定した。データは、３つ（ＤＨ８．３）または４つ（ＭＡｂ８０６）の別々の実験の各時点での平均インターナリゼーション±ＳＥを示す。
【図４】図４Ａおよび４Ｂは、Ｕ８７ＭＧおよびＵ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片を保有するヌードマウスにおける放射標識された（ａ）^{125}Ｉ－ＭＡｂ８０６および（ｂ）^{131}Ｉ－ＤＨ８．３の生物分布（％ＩＤ／ｇ腫瘍）を示す。各点は、１時間を除く５匹のマウスの平均±ＳＥを示す（ｎ＝４）。
【図５】図５Ａおよび５Ｂは、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片を保有するヌードマウスにおける、（ａ）腫瘍：血液または（ｂ）腫瘍：肝臓の比として表される、放射標識された^{125}Ｉ－ＭＡｂ８０６（白抜きのバー）および^{131}Ｉ－ＤＨ８．３（黒塗りのバー）の生物分布を示す。各バーは、ｎ＝４の場合の１時間を除く、５匹の平均±ＳＥを示す。
【図６】図６は、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅を含む細胞株のフローサイトメトリー分析を示す。Ａ４３１細胞を、ＭＡｂ８０６、ＤＨ８．３、または５２８（黒のヒストグラム）のいずれかで染色し、そして無関係のＩｇＧ２ｂ抗体（白抜きのヒストグラム）と比較した。
【図７】図７Ａおよび７Ｂは、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７およびＡ４３１異種移植片を保有するヌードマウスにおける放射標識された（ａ）^{125}Ｉ－ＭＡｂ８０６および（ｂ）^{131}Ｉ－５２８の生物分布（％ＩＤ／ｇ腫瘍）を示す。
【図８】図８Ａ～Ｄは、（ａ、ｃ）Ｕ８７ＭＧΔ２－７および（ｂ、ｄ）Ａ４３１異種移植片を保有するヌードマウスにおける、（ａ、ｂ）腫瘍：血液または（ｃ、ｄ）腫瘍：肝臓の比として表される、放射標識された^{125}Ｉ－ＭＡｂ８０６（白抜きのバー）および^{131}Ｉ－５２８（黒塗りのバー）および抗体の生物分布を示す。
【図９】図９は、予防的モデルにおける、Ａ）Ｕ８７ＭＧおよびＢ）Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片の増殖率に対するｍＡｂ８０６の抗腫瘍効果を示す。３×１０^{6}個のＵ８７ＭＧまたはＵ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を、第０日に、４～６週齢のＢＡＬＢ／ｃヌードマウス（ｎ＝５）の両方側にｓ．ｃ．注入した。マウスに、１ｍｇのｍＡｂ８０６（黒丸）；０．１ｍｇのｍＡｂ８０６（黒三角）；またはビヒクル（白丸）のいずれかを、腫瘍細胞接種の１日前に開始してｉ．ｐ．注入した。注入を、矢印で示されるように、２週間にわたって１週間に３回与えた。データを、平均腫瘍体積±ＳＥとして示す。
【図１０】図１０は、確立されたモデルにおける、Ａ）Ｕ８７ＭＧ、Ｂ）Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７およびＣ）Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片に対するｍＡｂ８０６の抗腫瘍効果を示す。３×１０^{6}個のＵ８７ＭＧ、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７またはＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞を、４～６週齢のＢＡＬＢ／ｃヌードマウス（ｎ＝５）の両方側にｓ．ｃ．注入した。マウスに、１ｍｇ用量のｍＡｂ８０６（黒丸）；０．１ｍｇ用量のｍＡｂ８０６（黒三角）；またはビヒクル（白丸）のいずれかを、腫瘍が、平均腫瘍体積６５～８０ｍｍ^{3}に達した場合に開始して、ｉ．ｐ．注入した。注入を、矢印で示されるように、２週間にわたって１週間に３回与えた。データを、平均腫瘍体積±ＳＥとして示す。
【図１１】図１１は、Ａ）予防的モデルおよびＢ）確立されたモデルにおけるＡ４３１異種移植片に対するｍＡｂ８０６の抗腫瘍効果を示す。３×１０^{6}個のＡ４３１細胞を、４～６週齢のＢＡＬＢ／ｃヌードマウス（ｎ＝５）の両方側にｓ．ｃ．注入した。マウスに、１ｍｇ用量のｍＡｂ８０６（黒丸）；またはビヒクル（白丸）のいずれかを、予防的モデルにおいて、腫瘍細胞接種の１日前または腫瘍が、平均腫瘍体積２００ｍｍ^{3}に達した場合に開始して、ｉ．ｐ．注入した。注入を、矢印で示されるように、２週間にわたって１週間に３回与えた。データを、平均腫瘍体積±Ｓ．Ｅ．として示す。
【図１２】図１２は、予防的モデルにおけるＡ４３１異種移植片に対する、ＡＧ１４７８処置と組み合わせたｍＡｂ８０６処置の抗腫瘍効果を示す。データを、平均腫瘍体積±Ｓ．Ｅ．として示す。

【図１３】図１３は、増加した濃度のＡＧ１４７８（０．５ｕＭおよび５ｕＭ）の存在下における、Ａ４３１細胞に対する抗体８０６の結合を示す。
【図１４】図１４は、８０６ＶＨ遺伝子の核酸配列およびそのアミノ酸翻訳物（それぞれ、配列番号１および配列番号２）を示す。
【図１５】図１５は、８０６ＶＬ遺伝子の核酸配列およびそのアミノ酸翻訳物（それぞれ、配列番号３および配列番号４）を示す。
【図１６】図１６は、Ｋａｂａｔに従って番号付けられたＶＨ配列を示す（ＣＤＲを囲んでいる）。ＶＨの重要な残基は、２４、３７、４８、６７、および７８である。
【図１７】図１７は、Ｋａｂａｔに従って番号付けられたＶＬ配列を示す（ＣＤＲを囲んでいる）。ＶＬの重要な残基は、３６、４６、５７、および７１である。
【図１８】図１８Ａ～Ｄは、組み合わせ抗体治療（特に、ｍＡｂ８０６および５２８抗体）の治療効果を決定するために設計されたインビボ研究の結果を示す。マウスは、Ｕ８７ＭＧ．Ｄ２－７（ＡおよびＢ）、Ｕ８７ＭＧ．ＤＫ（Ｃ）、またはＡ４３１（Ｄ）細胞の接種を受けた。
【図１９】図１９Ａ～Ｄは、電子顕微鏡によるインターナリゼーションの分析を示す。Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を、ＭＡｂ８０６またはＤＨ８．３と共に、その後、金結合抗マウスＩｇＧと共に、４℃にてプレインキュベートし、３７℃に移し、そしてインターナリゼーションを、種々の時点で、電子顕微鏡により試験した。（Ａ）５分後の、コーティングされたピット（矢印）に対するＤＨ８．３抗体の局在化；（Ｂ）２分後の、巨視的飲作用（矢印）によるＭＡｂ８０６のインターナリゼーション；（Ｃ）２０分後の、リソソーム（矢印）へのＤＨ８．３の局在化；（Ｄ）３０分後の、リソソーム（矢印）へのＭＡｂ８０６の局在化。全ての画像の元の倍率は、×３０，０００である。
【図２０】図２０は、^{125}Ｉ－ＭＡｂ８０６の注入の８時間後に回収された、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片切片のオートラジオグラフィーを示す。
【図２１】図２１は、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅を含む細胞株のフローサイトメトリー分析を示す。ＨＮ５およびＭＤＡ－４６８細胞を、無関係のＩｇＧ２ｂ抗体（点線での白抜きのヒストグラム）、ＭＡｂ８０６（黒のヒストグラム）、または５２８（実線白抜きのヒストグラム）で染色した。ＤＨ８．３抗体は、両方の細胞株において完全に陰性であった（データは示していない）。
【図２２】図２２は、細胞株からのＥＧＦＲの免疫沈降を示す。ＥＧＦＲを、ＭＡｂ８０６、ｓｃ－０３抗体、またはＩｇＧ２ｂアイソタイプコントロールを用いて、^{35}Ｓ標識Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７またはＡ４３１細胞から免疫沈降させた。側面の矢印は、ｄｅ２－７およびｗｔＥＧＦＲの位置を示す。同一のバンドパターンを、３つの独立した実験において獲得した。
【図２３】図２３は、^{125}Ｉ－ＭＡｂ８０６の注入の２４時間後に回収されたＡ４３１異種移植片切片のオートラジオグラフィーを示す。生存組織に対する局在化の領域を示す（矢印）。
【図２４】図２４ＡおよびＢは、全身性ｍＡＢ８０６処置による、頭蓋内Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ（Ａ）およびＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ（Ｂ）異種移植片を保有するヌードマウスの延長された生存性を示す。Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞（1×10^{5}）またはＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ細胞（5×10^{5}）を、ヌードマウスの脳に移植し、そしてこの動物を、ｍＡｂ８０６、ＰＢＳ、またはアイソタイプＩｇＧのいずれかを用いて、移植後０日～第１４日まで処置した。ＣおよびＤは、ｍＡｂ８０６処置による頭蓋内腫瘍の増殖阻害を示す。ｍＡｂ８０６またはアイソタイプＩｇＧコントロールのいずれかで処置したヌードマウス（５匹／群）を、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ（Ｃ）については第９日に、そしてＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ（Ｄ）については第１５日に安楽死させ、そしてそれらの脳を回収し、固定し、そして切り出した。データを、コントロールの腫瘍体積を１００％と考えて算出した。値は、平均±ＳＤ、＊＊＊、Ｐ＜０．００１；コントロール対ｍＡｂ８０６である。矢頭、腫瘍組織。Ｅは、腫瘍内ｍＡｂ８０６処置による頭蓋内Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ異種移植片を保有するヌードマウスの延長された生存率を示す。Ｕ８７ＭＧ

．ΔＥＧＦＲ細胞を、上記のように移植した。５μｌの体積中の１０ｍｇのｍＡｂ８０６またはアイソタイプＩｇＧコントロールを、第１日で開始して１日おきに５回腫瘍注入部位に注入した。

【図２５】図２５は、ｍＡｂ８０６が、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ脳腫瘍を有するマウスの生存性を延長させたが、Ｕ８７ＭＧ．ＤＫ．またはＵ８７ＭＧ脳腫瘍を有するマウスの生存性は延長させなかったことを示す。Ｕ８７ＭＧ（Ａ）、Ｕ８７ＭＧ．ＤＫ（Ｂ）、またはＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ（Ｃ）細胞（5×10^{5}）を、ヌードマウス脳に移植し、そしてこの動物を、移植後０日から第１４日までｍＡｂ８０６で処置し、続いて、治療の中止後に観察した。

【図２６】図２６Ａは、Ｕ８７ＭＧ細胞株とのｍＡｂ８０６の反応性のＦＡＣＳ分析を示す。Ｕ８７ＭＧ、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ、Ｕ８７ＭＧ．ＤＫ、およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞を、抗ＥＧＦＲｍＡｂ５２８、ＥＧＦＲ．１、および抗ΔＥＧＦＲ抗体、ｍＡｂ８０６で染色した。モノクローナルＥＧＦＲ．１抗体は、ｗｔＥＧＦＲを排他的に認識し、そしてモノクローナル５２８抗体は、ｗｔＥＧＦＲおよびΔＥＧＦＲの両方と反応した。ｍＡｂ８０６は、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲおよびＵ８７ＭＧ．ＤＫと強力に反応し、そしてＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲと弱く反応した。横軸上のバーは、一次抗体の非存在下での細胞の最大染色を示す。結果を、３つの独立した実験において再現した。Ｂは、ＥＧＦＲ形態のｍＡｂ８０６免疫沈降を示す。変異体およびｗｔＥＧＦＲを、（レーン１）Ｕ８７ＭＧ、（レーン２）Ｕ８７ΔＥＧＦＲ、（レーン３）Ｕ８７ＭＧ．ＤＫ、および（レーン４）Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞から、抗ＥＧＦＲ抗体、５２８、またはＥＧＦＲ．１、あるいは抗ΔＥＧＦＲ抗体、ｍＡｂ８０６を用いて免疫単離し、次いで、抗汎用ＥＧＦＲ抗体Ｃ１３を用いてウェスタンブロットにより検出した。

【図２７】図２７は、ｍＡｂ８０６による全身処置が、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ脳腫瘍におけるΔＥＧＦＲのリン酸化およびＢｃｌ－X_L発現を減少させることを示す。Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ腫瘍を、ｍＡｂ８０６処置の９日目に切り出し、液体窒素中で直ちに凍結させ、そして腫瘍溶解物の調製前に－８０℃で保存した。Ａは、ΔＥＧＦＲの発現および自己リン酸化の程度のウェスタンブロット分析を示す。３０μｇの腫瘍溶解物を、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルに供し、ニトロセルロースメンブレンに移し、そして抗ホスホチロシンｍＡｂでプローブし、次いで、剥離しそして抗ＥＧＦＲ抗体Ｃ１３で再プローブした。Ｂは、Ａにおけるような同一の腫瘍溶解物を用いることによるＢｃｌ－X_Lのウェスタンブロットを示す。メンブレンに、抗ヒトＢｃｌ－Ｘポリクローナル抗体をプローブした。レーン１および２、アイソタイプコントロールで処置したＵ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ脳腫瘍；レーン３および４、ｍＡｂ８０６で処置したＵ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ脳腫瘍。

【図２８】図２８は、ＭＡｂ８０６処置が、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ腫瘍において、増殖および血管形成の減少ならびにアポトーシスおよびマクロファージ蓄積の増加を誘導することを示す。腫瘍切片を、Ｋｉ－６７について染色した。細胞増殖指数を、各グループの４匹のマウス由来の頭蓋内腫瘍における、４つの無作為に選択された高倍率場（×４００）からのＫｉ－６７ポジティブである総細胞のパーセンテージにより評価した。データは、平均±ＳＥである。アポトーシス細胞を、ＴＵＮＥＬアッセイにより検出した。アポトーシス指数を、ＴＵＮＥＬポジティブ細胞：各グループの４匹のマウス由来の頭蓋内腫瘍における、４つの無作為に選択された高倍率場（×４００）からの総細胞比により評価した。データは、平均±ＳＥである。腫瘍切片を、抗ＣＤ３１抗体で免疫染色した。ＭＶＡを、各グループの４匹のマウス由来の頭蓋内腫瘍からの４つの無作為に選択された場（×２００）からのコンピューター画像分析により分析した。ｍＡｂ８０６処置したＵ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ腫瘍におけるマクロファージの腫瘍周辺浸潤。腫瘍切片を、抗Ｆ４／８０抗体で染色した。

【図２９】図２９は、親およびトランスフェクトＵ８７ＭＧ神経膠腫細胞株のフローサイトメトリー分析を示す。細胞を、示されるように、無関係のＩｇＧ２ｂ抗体（白抜きのヒストグラム）または５２８抗体またはｍＡｂ８０６（黒塗りのヒストグラム）のいずれかで染色した。

【図３０】図３０は、細胞株からのＥＧＦＲの免疫沈降を示す。ＥＧＦＲを、^{35}Ｓ標識Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７、およびＡ４３１細胞から、ｍＡｂ８０６（８０６）、ｓｃ－０３抗体（ｃ末端）、またはＩｇＧ２ｂアイソタイプコントロール（ｃｏｎ）で免疫沈降させた。矢印は、ｄｅ２－７およびｗｔＥＧＦＲの位置を示す。

【図３１】図３１は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片の例示的なＨ＆Ｅ染色したパラフィン切片を示す。Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７（腫瘍接種の２４日後に収集した）およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ（腫瘍接種の４２日後に収集した）異種移植片を、上記図１０において記載されるように処置されたマウスから切り出し、そしてＨ＆Ｅで染色した。ビヒクル処置したＵ８７ＭＧ．Δ２－７（腫瘍接種の１８日後に収集した）およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ（腫瘍接種の３７日後に収集した）異種移植片は、非常に小さな領域の壊死を示したが（左パネル）、広範な壊死（矢印）を、ｍＡｂ８０６で処置したＵ８７ＭＧ．Δ２－７およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片の両方において観察した（右パネル）。

【図３２】図３２は、Ｕ８７ＭＧ、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７、およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片由来の凍結切片におけるＥＧＦＲ発現の免疫組織化学分析を示す。切片を、上記図３１に記載される時点で収集した。異種移植片切片を、５２８抗体（左パネル）およびｍＡｂ８０６（右パネル）で免疫染色した。ｗｔＥＧＦＲ、増幅ＥＧＦＲ，またはｄｅ２－７ＥＧＦＲのいずれに対する免疫反応性の減少も、ｍＡｂ８０６で処置した異種移植片において観察されなかった。インビトロでのデータと一致して、親Ｕ８７ＭＧ異種移植片は、５２８抗体に対してポジティブであったが、ｍＡｂ８０６染色に対してはネガティブであった。

【図３３】図３３は、作製された二シストロン性発現構築物の概略図を示す。キメラ抗体鎖の転写物は、伸長因子－１プロモーターで開始し、そして強力な人工終結配列で終了する。ＩＲＥＳ配列を、軽鎖のコード領域とＮｅｏＲのコード領域との間、および重鎖のコード領域とｄｈｆｒ遺伝子のコード領域との間に導入した。

【図３４】Ａ）^{125}ＩまたはＢ）^{111}Ｉｎのいずれかで放射性標識されたｃｈ８０６の生体分布分析を、Ｕ８７ＭＧ－ｄｅ２－７異種移植片腫瘍を有するＢＡＬＢ／ｃヌードマウスにおいて実施した。マウスに、５μｇの放射性標識抗体を注射し、各時点について４匹のマウスの群において、８時間、２８時間、４８時間または７４時間のいずれかにおいて屠殺した。器官を収集し、計量し、そしてγカウンターにて放射活性を測定した。

【図３５】図３５は、（Ａ）％ＩＤグラムの腫瘍組織および（Ｂ）血液に対する腫瘍の比率を示す。インジウム－１１１抗体は、約３０％ＩＤ／グラムの組織および４．０の血液に対する腫瘍の比率を示す。

【図３６】図３６は、確立された腫瘍モデルにおけるキメラ抗体ｃｈ８０６の治療的効力を示す。１００μｌのＰＢＳ中の3×10^{6}のＵ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を、４～６週齢メスヌードマウスの両脇腹に皮下接種した。ｍＡｂ８０６を、ポジティブコントロールとして含めた。腫瘍が５０mm^3の平均容積に達した時に処置を開始し、この処置は、示された日における合計５回の注射について、腹腔内に投与された１ｍｇのｃｈ８０６またはｍＡｂ８０６から構成された。データを、各処置群について平均腫瘍容積＋／－Ｓ．Ｅ．で表示した。

【図３７】抗ＥＧＦＲキメラＩｇＧ１抗体ｃｈ８０６およびコントロールｃＧ２５０についての、標的Ａ）Ｕ８７ＭＧ．ｄｅ２－７およびＢ）Ａ４３１細胞に対するＣＤＣ活性。三連の決定の平均（バー；±ＳＤ）％細胞傷害性が示される。

【図３８】ｃｈ８０６およびアイソタイプコントロールｃＧ２５０（０～１０μｇ／ｍｌ）によって媒介される、５０：１のエフェクター：標的細胞の比での標的Ａ）Ｕ８７ＭＧ．ｄｅ２－７およびＢ）Ａ４３１細胞に対するＡＤＣＣ。結果を、三連の決定の平均（バー；±ＳＤ）％細胞傷害性として示す。

【図３９】ある範囲のエフェクター：標的の比で、標的Ｕ８７ＭＧ．ｄｅ２－７細胞に対する、１μｇ／ｍｌの親ｍＡｂ　８０６およびｃｈ８０６によって媒介されるＡＤＣＣ。三連の決定の平均（バー；±ＳＤ）を示す。

【図４０】ｃｈ８０６に結合する抗体を産生するが、ｈｕＩｇＧに結合する抗体は産生しない２５個のハイブリドーマを、最初に選択した。高い親和性の結合を有するこれらの抗ｃｈ８０６ハイブリドーマのうち４個（クローン３Ｅ３、５Ｂ８、９Ｄ６および４Ｄ８）を、限界希釈によって単一の細胞からのクローン性増殖のために引き続き追跡し、そして、それぞれ、Ｌｕｄｗｉｇ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ （ＬＭＨ）－１１、ＬＭＨ－１２、ＬＭＨ－１３およびＬＭＨ－１４と称した。さらに、ｈｕＩｇＧに特異的なｍＡｂを産生する２つのハイブリドーマもまたクローニングし、さらに特徴付けた：クローン２Ｃ１０（ＬＭＨ－１５）および２Ｂ８（ＬＭＨ－１６）。

【図４１】クローン性増殖後に、ハイブリドーマ培養物上清を、ｓＥＧＦＲ６２１とｃｈ８０６またはｍＡｂ８０６との抗原結合特異性を中和する能力について、ＥＬＩＳＡによって三連で試験した。平均（±ＳＤ）結果は、ｃｈ８０６およびマウスｍＡｂ８０６の両方の溶液中にて、ｓＥＧＦＲでコーティングされたプレートへの結合をブロックする、抗イディオタイプｍＡｂ ＬＭＨ－１１、ＬＭＨ－１２、ＬＭＨ－１３およびＬＭＨ－１４のアンタゴニスト活性を実証した（ＬＭＨ－１４は示さず）。

【図４２】マイクロタイタープレートを、１０μｇ／ｍｌの精製したＡ）ＬＭＨ－１１、Ｂ）ＬＭＨ－１２およびＣ）ＬＭＨ－１３でコーティングした。３つの精製したクローンを、血清中または１％ＦＣＳ／培地中のｃｈ８０６またはｍＡｂ８０６を捕捉するその能力について比較し、次いで、結合したｃｈ８０６またはｍＡｂ８０６を検出した。血清中または１％ＦＣＳ／培地中のアイソタイプコントロール抗体ｈｕ３Ｓ１９３およびｍ３Ｓ１９３を、二次結合体アビジン－ＨＲＰおよびＡＢＴＳ基質についてのコントロールに加えて、含めた。結果は、検出のためにビオチン化ＬＭＨ－１２（１０μｇ／ｍｌ）を使用した三連のサンプルの平均（±ＳＤ）として示され、そして捕捉および検出のために使用したＬＭＨ－１２が、無視できるバックグラウンドの結合を伴って、血清中のｃｈ８０６（３ｎｇ／ｍｌ）について最も高い感受性を有したことを示す。

【図４３】捕捉および検出のために、それぞれ、１μｇ／ｍｌの抗イディオタイプＬＭＨ－１２および１μｇ／ｍｌのビオチン化ＬＭＨ－１２を使用する、最適な薬物動態ＥＬＩＳＡ条件の検証。３回の別個のＥＬＩＳＡを、血清中（上向き黒三角）または１％ＢＳＡ／培地（下向き黒三角）におけるアイソタイプコントロールｈｕ３Ｓ１９３と共に、３人の健康なドナー由来のドナー血清（黒丸）、または１％ＢＳＡ／培地（黒四角）におけるｃｈ８０６を測定するために、四連で実施した。二次結合体化アビジン－ＨＲＰ（菱形）についてのコントロールおよびＡＢＴＳ基質（六角形）単独もまた、各ＥＬＩＳＡと共に含めた。平均（±ＳＤ）結果は、３ｎｇ／ｍｌの検出限界で、血清においてｃｈ８０６（２μｇ／ｍｌ～１．６ｎｇ／ｍｌ）を測定するための、非常に再現性のある結合曲線を実証する（ｎ＝１２；１～１００ｎｇ／ｍｌ、変動係数＜２５％；１００ｎｇ／ｍｌ～５μｇ／ｍｌ、変動係数＜１５％）。バックグラウンドの結合は、試験した３つの血清のいずれにおいても明白ではなく、そして無視できる結合が、アイソタイプコントロールｈｕ３Ｓ１９３で観察された。

【図４４】図４４は、ｍＡｂ８０６でブロットされたＣＨＯ細胞において発現された組換えｓＥＧＦＲのイムノブロットを示す。組換えｓＥＧＦＲを、Ｎ連結グリコシル化を除去（脱グリコシル化）するためにＰＮＧａｓｅＦで処理したか、または処理しなかった（未処理）。このタンパク質を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで泳動し、そしてメンブレンに移し、そしてｍＡｂ８０６でイムノブロットした。

【図４５】図４５は、異なる抗体（ＳＣ－０３抗体、８０６抗体および５２８抗体）を用いた、^{35}Ｓ標識した細胞株（Ｕ８７ＭＧ Δ２－７、Ｕ８７ＭＧ－ｗｔＥＧＦＲおよびＡ４３１）からのＥＧＦＲの免疫沈降を示す。

【図４６】図４６は、^{35}Ｓメチオニン／システインでのパルス標識の後の異なる時点（時間０～２４０分）での、異なる細胞（Ａ４３１およびＵ８７ＭＧΔ２－７）からのＥＧＦＲの免疫沈降を示す。抗体５２８および８０６が、免疫沈降のために使用される。

【図４７】図４７は、高マンノース型炭水化物を除去するためのＥｎｄｏ Ｈ消化の非存

在下（－）およびＥｎｄｏ　Ｈ消化の後（＋）での、種々の抗体（ＳＣ－０３、８０６および５２８）を用いた種々の細胞株（Ｕ８７ＭＧΔ２－７、Ｕ８７ＭＧ－ｗｔＥＧＦＲおよびＡ４３１）からのＥＧＦＲの免疫沈降を示す。

【図４８】図４８は、Ａ４３１およびＵ８７ＭＧΔ２－７細胞株の細胞表面ヨウ素化、その後のＥｎｄｏ　Ｈ消化を伴うかまたは伴わない８０６抗体での免疫沈降を示し、ｍＡｂ８０６が結合した、Ａ４３１細胞の細胞表面上のＥＧＦＲが、Ｅｎｄｏ　Ｈ感受性形態であることを確認する。

【発明を実施するための形態】

【００４３】

（詳細な説明）

本発明に従って、当業者の範囲内にある従来の分子生物学、微生物学および組換えＤＮＡ技術が使用され得る。このような技術は、文献中に十分に記載されている。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ」（１９８９）；「Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ」Ｖｏｌｕｍｅｓ　Ｉ－ＩＩＩ［Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｒ．Ｍ．編（１９９４）］；「Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ」Ｖｏｌｕｍｅｓ　Ｉ－ＩＩＩ［Ｊ．Ｅ．Ｃｅｌｉｓ編（１９９４））］；「Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」Ｖｏｌｕｍｅｓ　Ｉ－ＩＩＩ［Ｃｏｌｉｇａｎ，Ｊ．Ｅ．編（１９９４）］；「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ編１９８４）；「Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ」［Ｂ．Ｄ．ＨａｍｅｓおよびＳ．Ｊ．Ｈｉｇｇｉｎｓ編（１９８５）］；「Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ａｎｄ　Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ」［Ｂ．Ｄ．ＨａｍｅｓおよびＳ．Ｊ．Ｈｉｇｇｉｎｓ編（１９８４）］；「Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅ」［Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ編（１９８６）］；「Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ　Ｃｅｌｌｓ　Ａｎｄ　Ｅｎｚｙｍｅｓ」［ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ、（１９８６）］；Ｂ．Ｐｅｒｂａｌ、「Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｇｕｉｄｅ　Ｔｏ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ」（１９８４）を参照のこと。

【００４４】

従って、本明細書中に現れる場合、以下の用語は、以下に示される意味を有するべきである。

【００４５】

（Ａ．専門用語）

用語「特異的結合メンバー」は、互いに結合特異性を有する分子対のメンバーを記述する。特異的結合対のメンバーは、天然由来であり得るか、または完全もしくは部分的に合成的に生成され得る。分子対の一方のメンバーは、分子対の他方のメンバーの特定の空間的構成および極性構成に特異的に結合し、従って、これらに相補的な、表面上のある領域または空洞を有する。従って、対のメンバーは、互いに対して特異的に結合する特性を有する。特異的結合対の型の例は、抗原－抗体、ビオチン－アビジン、ホルモン－ホルモンレセプター、レセプター－リガンド、酵素－基質である。この適用は、抗原－抗体型の反応に関する。

【００４６】

用語「異常発現」は、その種々の文法的形態で、組織中のタンパク質の上昇した発現または変更された発現または過剰発現のいずれか（例えば、増強された発現もしくは翻訳、タンパク質のプロモーターもしくはレギュレーターの調節、タンパク質についての遺伝子の増幅、または半減期もしくは安定性の増強を含む、任意の手段によって引き起こされるタンパク質量の増加。その結果、過剰発現されていない状態とは対照的に、より多くのタンパク質が存在するか、または任意の１つの時点において検出され得る）を、意味しかつ含み得る。異常な発現は、任意のシナリオまたは変更を含みかつ意図し、ここで、細胞中のタンパク質発現機構または翻訳後修飾機構は、タンパク質（ここでは、変更されたタンパク質は、例えば、変異したタンパク質、あるいは配列の変更、欠失もしくは挿入または変

化した折り畳みに起因した改変体が発現される場合を含む）の増強された発現または量もしくはレベルの増加に起因して、負荷をかけられるかさもなければ破壊される。

【００４７】

用語「異常発現」は、その異常な量またはレベルの有効な原因にかかわらず、タンパク質の異常な（通常増加した）量／レベルが存在する状態を包含するように、本明細書中で特に選択されていることを理解することが重要である。従って、タンパク質の異常な量は、遺伝子増幅（この場合、例えば、癌を有する被験体の頭部および頸部から採取した多くの細胞／組織サンプルにおいてであるが、他のサンプルは、遺伝子増幅に寄与し得る異常なタンパク質レベルを示す）の非存在下での、タンパク質の過剰発現から生じ得る。

【００４８】

後者に関して、本発明を説明するために本明細書中に示される本発明者らの研究のいくつかは、ＥＧＦＲの増幅から生じる異常なタンパク質レベルを示す特定のサンプルの分析を含む。従って、このことは、増幅に対して言及がなされる実験的知見の本明細書中での表示、およびＥＧＦＲの異常なレベルを記述する際の用語「増幅／増幅された」などの使用を説明する。しかし、これは、本発明の結合メンバーの助けを借りることによる臨床的調査が意図される環境または状況を規定する、タンパク質の異常な量またはレベルの観察であり、そしてこの理由のために、本明細書は、用語「異常発現」が、ＥＧＦＲレベルの対応する異常を生じる原因環境をより広く捉えるとみなす。

【００４９】

従って、用語「過剰発現」および「増幅」は、その種々の文法的形態において、別個の技術的意味を有することが理解されるが、これらは、本発明の文脈において、異常なＥＦＧＦタンパク質レベルが存在する状態を示す限り、互いに等価であるとみなされるべきである。結果として、用語「異常発現」は、本明細書中の目的のために、その範囲内に用語「過剰発現」および「増幅」を包含すると考えられるように選択されており、その結果、全ての用語が本明細書中で使用される場合に互いに等価とみなされ得る。

【００５０】

用語「抗体」は、天然または部分的もしくは全体的に合成により生成された免疫グロブリンを記述する。この用語はまた、結合ドメイン（これは、抗体結合ドメインであるか、または抗体結合ドメインに相同である）を有する任意のポリペプチドまたはタンパク質をカバーする。ＣＤＲ移植された抗体もまた、この用語によって意図される。

【００５１】

抗体は、多数の方法で改変され得るので、用語「抗体」は、必要な特異性を有する結合ドメインを有する任意の特定の結合メンバーまたは物質をカバーするように解釈されるべきである。従って、この用語は、抗体フラグメント、抗体の誘導体、機能的等価物およびホモログ（天然または全体的もしくは部分的に合成であるかにかかわらず、免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含む）をカバーする。従って、別のポリペプチドに融合した免疫グロブリン結合ドメインまたは等価物を含むキメラ分子が含まれる。キメラ抗体のクローニングおよび発現は、ＥＰ－Ａ－０１２０６９４およびＥＰ－Ａ－０１２５０２３ならびに米国特許第４，８１６，３９７号および同第４，８１６，５６７号に記載される。

【００５２】

抗体全体のフラグメントが、抗原に結合する機能を遂行し得ることが示されている。結合フラグメントの例は、以下である：（ｉ）ＶＬドメイン、ＶＨドメイン、ＣＬドメインおよびＣＨ１ドメインからなるＦａｂフラグメント；（ｉｉ）ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインからなるＦｄフラグメント；（ｉｉｉ）単鎖抗体のＶＬドメインおよびＶＨドメインからなるＦｖフラグメント；（ｉｖ）ＶＨドメインからなるｄＡｂフラグメント（Ｗａｒｄ，Ｅ．Ｓ．ら、Ｎａｔｕｒｅ　３４１，５４４－５４６（１９８９））；（ｖ）単離されたＣＤＲ領域；（ｖｉ）２つの連結されたＦａｂフラグメントを含む二価フラグメントである、Ｆ（ａｂ）’２フラグメント；（ｖｉｉ）単鎖Ｆｖ分子（ｓｃＦｖ）、ここで、ＶＨドメインおよびＶＬドメインは、２つのドメインを結合させて抗原結合部位を形成

するペプチドリンカーによって連結される（Ｂｉｒｄら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４２，４２３－４２６，１９８８；Ｈｕｓｔｏｎら、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ，８５，５８７９－５８８３，１９８８）；（ｖｉｉｉ）多価抗体フラグメント（ｓｃＦｖのダイマー、トリマーおよび／またはテトラマー（ＰｏｗｅｒおよびＨｕｄｓｏｎ，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　２４２：１９３－２０４　９（２０００））；（ｉｘ）二重特異的単鎖Ｆｖダイマー（ＰＣＴ／ＵＳ９２／０９９６５）；および（ｘ）遺伝子融合によって構築された多価または多重特異的フラグメントである「二価抗体（ｄｉａｂｏｄｙ）」（Ｗ０９４／１３８０４；Ｐ．Ｈｏｌｌｉｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０　６４４４－６４４８，（１９９３））。

【００５３】

「抗体結合部位」は、抗原に特異的に結合する、軽鎖または重鎖および軽鎖の可変領域および超可変領域から構成される抗体分子の構造的部分である。

【００５４】

句「抗体分子」は、その種々の文法的形態において、本明細書中で使用する場合、インタクトな免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の両方を意図する。

【００５５】

例示的な抗体分子は、インタクトな免疫グロブリン分子、実質的にインタクトな免疫グロブリン分子、およびパラトープ（ｐａｒａｔｏｐｅ）を含む免疫グロブリン分子の部分（Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）’$_2$およびＦ（ｖ）として当該分野で公知の部分を含み、これらの部分は、本明細書中に記載される治療方法における使用のために好ましい）である。

【００５６】

抗体はまた、二重特異的であり得、ここで、抗体の１つの結合ドメインは、本発明の特異的結合メンバーであり、そして他方の結合ドメインは、例えば、エフェクター機能などを補充するための異なる特異性を有する。本発明の二重特異的抗体としては、抗体の１つの結合ドメインが本発明の特異的結合メンバー（そのフラグメントを含む）であり、そして他方の結合ドメインが別個の抗体またはそのフラグメント（別個の抗ＥＧＦＲ抗体（例えば、抗体５２８（米国特許第４，９４３，５３３号）、キメラ２２５抗体およびヒト化２２５抗体（米国特許第４，９４３，５３３号およびＷＯ／９６４０２１０）、抗ｄｅ２－７抗体（例えば、ＤＨ８．３（Ｈｉｌｌｓ，Ｄ．ら、（１９９５）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　６３（４）：５３７－５４３））、抗体Ｌ８Ａ４および抗体Ｙ１０（Ｒｅｉｓｔ，ＣＪら、（１９９５）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５５（１９）：４３７５－４３８２；Ｆｏｕｌｏｎ　ＣＦら、（２０００）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．６０（１６）：４４５３－４４６０）、ＩＣＲ６２（Ｍｏｄｊｔａｈｅｄｉ　Ｈら、（１９９３）Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊａｎ－Ｊｕｎ；２２（１－３）：１２９－４６；Ｍｏｄｊｔａｈｅｄｉら、（２００２）Ｐ．Ａ．Ａ．Ｃ．Ｒ．５５（１４）：３１４０－３１４８）、またはＷｉｋｓｔｒａｎｄらの抗体（Ｗｉｋｓｔｒａｎｄ　Ｃ．ら（１９９５）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５５（１４）：３１４０－３１４８））のフラグメントを含む）であるものが挙げられる。他の結合ドメインは、特定の細胞型を認識または標的化する抗体（例えば、神経特異的抗体またはグリア細胞特異的抗体）であり得る。本発明の二重特異的抗体において、本発明の抗体の１つの結合ドメインは、特定の細胞レセプターを認識し、そして／または特定の様式で細胞を調節する他の結合ドメインまたは分子（例えば、免疫調節因子（例えば、インターロイキン）、増殖調節因子またはサイトカイン（例えば、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）および特に２００２年２月１３日出願のＵ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．６０／３５５，８３８号（これは、本明細書中でその全体が参考として援用される）において実証されたＴＮＦ二重特異的様式）または毒素（例えば、リシン）あるいは抗有糸分裂剤もしくは抗有糸分裂因子、またはアポトーシス剤もしくはアポトーシス因子）と組み合わされ得る。

【００５７】

抗体分子のＦａｂ部分およびＦ（ａｂ’）$_2$部分は、周知の方法によって、実質的にイン

タクトな抗体分子に対するパパインおよびペプシンのタンパク質分解反応によってそれぞれ調製され得る。例えば、Ｔｈｅｏｆｉｌｏｐｏｌｏｕｓらに対する米国特許第４，３４２，５６６号を参照のこと。Ｆａｂ’抗体分子部分もまた周知であり、そしてこれは、Ｆ（ａｂ’）$_2$部分から作成され、次いで例えばメルカプトエタノールによって２つの重鎖部分を連結するジスルフィド結合が還元され、次いで、ヨードアセトアミドのような試薬によって得られたタンパク質メルカプタンがアルキル化される。インタクトな抗体分子を含む抗体が、本明細書中で好ましい。

【００５８】

句「モノクローナル抗体」は、その種々の文法的形態において、特定の抗原と免疫反応し得る、抗体結合（ｃｏｍｂｉｎｉｎｇ）部位の１つの種のみを有する抗体をいう。従って、モノクローナル抗体は、代表的に、それが免疫反応する任意の抗原に対して、単一の結合親和性を示す。モノクローナル抗体はまた、複数の抗体結合部位（各々が、異なる抗原について免疫特異的である）を有する抗体分子（例えば、二重特異的（キメラ）モノクローナル抗体）を含み得る。

【００５９】

用語「抗原結合ドメイン」は、抗原の一部または全てに特異的に結合し、かつこれらに相補的な領域を含む抗体の一部を記述する。抗原が大きい場合、抗体は、抗原の特定の一部のみ（この部分は、エピトープと称される）に結合し得る。抗原結合ドメインは、１以上の抗体可変ドメインを含む。好ましくは、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）および抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。

【００６０】

「翻訳後修飾」は、共有結合的修飾を含む修飾のいずれか１つまたは組み合わせを包含し得、タンパク質は、翻訳完了後、およびリボソームから放出された後か、または同時翻訳的に初期ポリペプチド上で、この修飾を受ける。翻訳後修飾としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：リン酸化、ミリスチル化、ユビキチン化、グリコシル化、補酵素結合、メチル化およびアセチル化。翻訳後修飾は、タンパク質の活性、その細胞内もしくは細胞外の目的地点、その安定性もしくは半減期、および／またはリガンド、レセプターもしくは他のタンパク質による認識を調節し得るかまたは影響を与え得る。翻訳後修飾は、細胞オルガネラにおいて、核または細胞質において、あるいは細胞外で生じ得る。

【００６１】

用語「特異的」は、特異的結合対の１つのメンバーが、その特異的結合パートナー以外の分子に対する有意な結合を示さない状況をいうために使用され得る。この用語はまた、例えば、抗原結合ドメインが、多数の抗原によって保有される特定のエピトープに対して特異的である場合に適用可能であり、この場合、抗原結合ドメインを保有する特異的結合メンバーは、エピトープを保有する種々の抗原に結合し得る。

【００６２】

用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」は、一般に、含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）意味で使用され、すなわち、１以上の特徴または成分の存在を許容することをいう。

【００６３】

用語「から実質的になる」は、より大きい産物に共有結合していない、規定された残基数の産物（特にペプチド配列）をいう。しかし、本発明のペプチドが上記のことをいう場合、当業者は、ペプチドのＮ末端またはＣ末端への軽微な改変（例えば、保護基などを付加するための末端の化学的改変（例えば、Ｃ末端のアミド化））が意図され得ることを理解する。

【００６４】

用語「単離された」とは、本発明の特異的結合メンバーまたはこのような結合メンバーをコードする核酸が本発明に従って存在する状態をいう。メンバーおよび核酸は、これらが天然に会合する物質（例えば、他のポリペプチドまたは核酸）、これらがその天然の環境において見出される物質、またはこのような調製物がインビトロまたはインビボで実施される組換えＤＮＡ技術による場合には、これらが調製される環境（例えば、細胞培養物）

において見出される物質を含まないかまたは実質的に含まない。メンバーおよび核酸は、希釈剤またはアジュバントを用いて処方され得、そしてなお特定の目的のために単離され得る。例えば、これらメンバーは、通常、イムノアッセイにおける使用のためにマイクロタイタープレートをコーティングするために使用される場合、ゼラチンまたは他のキャリアと混合されるか、あるいは診断または処置において使用される場合、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤と混合される。特異的結合メンバーは、天然にかまたは異種真核生物細胞の系によってかのいずれかでグリコシル化されてもよいし、あるいは（例えば、原核生物細胞における発現によって産生される場合）グリコシル化されなくてもよい。

【００６５】

また、本明細書中で使用される場合、用語「グリコシル化」および「グリコシル化される（た）」は、オリゴ糖の添加によるタンパク質の翻訳後修飾（糖タンパク質と呼ばれる）を含みかつ包含する。オリゴ糖は、糖タンパク質（特に、Ｎ連結糖タンパク質およびＯ連結糖タンパク質が挙げられ得る）のグリコシル化部位にて添加される。Ｎ連結糖タンパク質は、Ａｓｎ残基に加えられる。詳細には、このＡｓｎ残基は、配列Ｎ－Ｘ－Ｓ／Ｔ中にあり、ここでＸは、ＰｒｏでもＡｓｐでもあり得ず、かつグリコシル化において見いだされる最も一般的な残基である。Ｎ連結糖タンパク質の生合成において、高マンノース型オリゴ糖（一般的には、ドリコール、Ｎ－アセチルグルコサミン、マンノースおよびグルコースから構成される）が、最初に小胞体（ＥＲ）において見出される。次いで、この高マンノース型糖タンパク質は、ＥＲからゴルジ（Ｇｏｌｇｉ）に輸送され、ここで、オリゴ糖のさらなるプロセシングおよび修飾が生じる。Ｏ連結オリゴ糖が、Ｓｅｒ残基またはＴｈｒ残基のヒドロキシル基に加えられる。Ｏ連結オリゴ糖において、ＥＲ中のＮ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼによって、Ｎ－アセチルグルコサミンが、Ｓｅｒ残基またはＴｈｒ残基に最初に移動される。次いで、タンパク質がゴルジに移動し、ここで、さらなる改変および鎖伸長が生じる。Ｏ連結改変は、Ｓｅｒ部位またはＴｈｒ部位（これらの部位はまた、異なる条件下にて、グリコシル化ではなくリン酸化され得る）にて、ＯＧ１ｃＮＡｃ単糖単独の単純な添加とともに生じ得る。

【００６６】

本明細書中で使用される場合、「ｐｇ」は、ピコグラムを意味し、「ｎｇ」は、ナノグラムを意味し、「ｕｇ」または「μｇ」は、マイクログラムを意味し、「ｍｇ」は、ミリグラムを意味し、「ｕｌ」または「μｌ」は、マイクロリットルを意味し、「ｍｌ」は、ミリリットルを意味し、そして「ｌ」は。リットルを意味する。

【００６７】

用語「８０６抗体」、「ｍＡｂ８０６」、「ｃｈ８０６」および具体的に列挙されていない任意の改変体は、本明細書中で相互交換可能に使用され得、本出願および特許請求の範囲全体を通して使用される場合、単一のタンパク質または複数のタンパク質を含むタンパク質性物質をいい、そして本明細書中に記載され、配列番号２および配列番号４で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、ならびに配列番号７および配列番号８に組み込まれて、これらの配列の一部を形成するキメラ抗体ｃｈ８０６にわたり、そしてその活性プロフィールが、本明細書中および特許請求の範囲に示される。従って、実質的に等価な活性または変化された活性を表示するタンパク質が、同様に企図される。これらの改変は、例えば、部位特異的変異誘発によって得られる改変のように意図的であってもよいし、その複合体または指定のサブユニットを産生する宿主の変異によって得られるように偶発的であってもよい。また、用語「８０６抗体」、「ｍＡｂ８０６」および「ｃｈ８０６」は、本明細書中で具体的に列挙されるその範囲内のタンパク質、ならびに全ての実質的に相同なアナログおよび対立遺伝子改変体を含むことが意図される。

【００６８】

本明細書中に記載されるアミノ酸残基は、「Ｌ」異性体形態であるのが好ましい。しかし、免疫グロブリン結合の所望の官能化特性がポリペプチドによって維持される限り、「Ｄ」異性体形態の残基が、任意のＬ－アミノ酸残基と置換され得る。NH_2は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基をいう。ＣＯＯＨは、ポリペプチドのカルボキシ

ル末端に存在する遊離カルボキシ基をいう。標準的なポリペプチドの命名法に賛同して（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ，２４３：３５５２－５９（１９６９））、アミノ酸残基についての略語が、以下の対応の表に示される：

【００６９】

【表１】

対応の表

記号		アミノ酸
１文字	３文字	
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	トレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リジン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
C	Cys	システイン

【００７０】

全てのアミノ酸残基配列は、左から右への方向が、従来のアミノ末端からカルボキシル末端への方向である構造式によって、本明細書中で表されることに留意すべきである。さらに、アミノ酸残基配列の始まりまたは終わりにおけるダッシュは、１つ以上のアミノ酸残基のさらなる配列に結合したペプチドを示すことに留意すべきである。上記表は、本明細書中で代替的に現され得る３文字表記および１文字表記の対応を示す。

【００７１】

「レプリコン」は、任意の遺伝学的エレメント（例えば、プラスミド、染色体、ウイルス）である、この遺伝学的エレメントは、インビボでのＤＮＡ複製（すなわち、それ自体の制御下で複製し得る）の自律的単位としての役目を果たす。

【００７２】

「ベクター」は、プラスミド、ファージまたはコスミドのようなレプリコンであり、結合したセグメントの複製を生じるように、別のＤＮＡセグメントがこれに結合され得る。

【００７３】

「ＤＮＡ分子」とは、そのいずれかの一本鎖形態におけるデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミン、またはシトシン）のポリマー形態、または二本鎖ヘリックスをいう。この用語は、分子の一次構造および二次構造のみをいい、任意の特定の三次形態

に対して限定しない。従って、この用語は、とりわけ、直鎖ＤＮＡ分子（例えば、制限フラグメント）、ウイルス、プラスミド、および染色体において見出される、二本鎖ＤＮＡを含む。特定の二本鎖ＤＮＡ分子の構造を議論する際に、配列は、ＤＮＡの非転写鎖（すなわち、ｍＲＮＡと相同な配列を有する鎖）に沿って５’方向から３’方向の配列のみを与える一般的な慣習に従って、本明細書中に記載され得る。

【００７４】

「複製起点」とは、ＤＮＡ合成に関係するＤＮＡ配列をいう。

【００７５】

ＤＮＡ「コード配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合、インビボにおいて転写されてポリペプチドに翻訳される、二本鎖ＤＮＡ配列である。コード配列の境界は、５’（アミノ）末端の開始コドンおよび３’（カルボキシル）末端の翻訳停止コドンによって、決定される。コード配列としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：原核生物配列、真核生物ｍＲＮＡ由来のｃＤＮＡ、真核生物（例えば、哺乳動物）ＤＮＡ由来のゲノムＤＮＡ配列、およびさらに合成ＤＮＡ配列。ポリアデニル化シグナル配列および転写末端配列は、通常、コード配列に対して３’側に位置される。

【００７６】

転写制御配列および翻訳制御配列は、宿主細胞中でコード配列の発現を与えるＤＮＡ調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターなど）である。

【００７７】

「プロモーター配列」は、細胞内のＲＮＡポリメラーゼに結合し得、かつコード領域の下流（３’方向）の転写を開始し得る、ＤＮＡ調節領域である。本発明を規定する目的で、このプロモーター配列は、その転写開始部位によって、その３’末端で結合され、上記バックグラウンドを検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含むように、上流（５’方向）に伸長する。プロモーター配列内で、転写開始部位（簡便には、ヌクレアーゼＳ１を用いたマッピングによって規定される）、およびＲＮＡポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）が見出される。真核生物プロモーターは、常にではなくしばしば、「ＴＡＴＡ」ボックスおよび「ＣＡＴ」ボックスを含む。原核生物プロモーターは、－１０および－３５のコンセンサス配列に加えて、Ｓｈｉｎｅ－Ｄａｌｇａｒｎｏ配列を含む。

【００７８】

「発現制御配列」は、別のＤＮＡ配列の転写および翻訳を制御および調節する、ＤＮＡ配列である。コード配列は、ＲＮＡポリメラーゼがこのコード配列をｍＲＮＡに転写する場合、細胞内の転写制御配列および翻訳制御配列の「制御下」であり、次いで、このコード配列は、このコード配列によってコードされるタンパク質に翻訳される。

【００７９】

「シグナル配列」は、コード配列の前に含まれ得る。この配列は、シグナルペプチド（ポリペプチドに対するＮ末端）をコードし、このシグナルペプチドは、宿主細胞と連絡して、ポリペプチドを細胞表面に指向させるかまたはポリペプチドを媒体に分泌させ、このシグナルペプチドは、タンパク質が細胞から放出される前に、宿主細胞によって切断される（ｃｌｉｐｐｅｄ　ｏｆｆ）。シグナル配列は、原核生物および真核生物に対してネイティブな種々のタンパク質に関連して見出され得る。

【００８０】

用語「オリゴヌクレオチド」とは、本明細書中で使用される場合、本発明のプローブをいい、２種以上のリボヌクレオチド、好ましくは、３種以上のリボヌクレオチドからなる分子として定義される。その正確なサイズは、同様に最終的な機能およびこのオリゴヌクレオチドの使用に依存した多くの因子に依存する。

【００８１】

用語「プライマー」とは、本明細書中で使用される場合、精製された制限消化物におけるように天然に生じるかまたは合成的に生成される、オリゴヌクレオチドをいい、これは、

プライマー伸長産物（これは、核酸鎖に相補的である）の合成が誘導される条件下（すなわち、ヌクレオチドおよび誘導因子（例えば、ＤＮＡポリメラーゼ）の存在下、ならびに適切な温度およびｐＨ）に置かれた場合、合成の開始点として作用し得る。プライマーは、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、誘導因子の存在下で所望のプライマー伸長産物の合成を初回刺激するのに十分に長くなければならない。プライマーの正確な長さは、多くの因子（温度、プライマーの供給源および方法の使用）に依存する。例えば、診断適用については、標的配列の複雑性に依存して、オリゴヌクレオチドプライマーは、代表的には、１５～２５ヌクレオチドまたはそれ以上のヌクレオチドを含むが、このオリゴヌクレオチドプライマーは、ほとんどヌクレオチドを含み得ない。

【００８２】

本明細書中のプライマーは、異なる鎖の特定の標的ＤＮＡ配列に「実質的に」相補的であるように選択される。これは、プライマーがそれらのそれぞれの鎖とハイブリダイズするのに十分相補的でなければならないことを意味する。従って、プライマー配列は、テンプレートの正確な配列を示す必要がない。例えば、非相補的ヌクレオチドフラグメントが、プライマーの５’末端に結合され得、このプライマー配列の残りは、その鎖に相補的である。あるいは、非相補的な塩基またはより長い配列が、プライマー中に分散され得、但し、そのプライマー配列は、その鎖の配列と十分な相補性を有し、この鎖とハイブリダイズし、それによって、伸長産物の合成のためのテンプレートを形成する。

【００８３】

本明細書中で使用される場合、用語「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」とは、細菌性酵素をいい、それらの各々は、二重鎖ＤＮＡを特定のヌクレオチド配列にて、または特定のヌクレオチド配列近位で、切断する。

【００８４】

細胞は、外来性ＤＮＡまたは非相同性ＤＮＡによって、このようなＤＮＡが細胞内に導入された際に「形質転換される」。この形質転換ＤＮＡは、細胞のゲノムを構成する染色体ＤＮＡに組み込まれても組み込まれなくてもよい（共有結合されても共有結合されなくてもよい）。例えば、原核生物、酵母、および哺乳動物細胞において、この形質転換ＤＮＡは、プラスミドのようなエピソームエレメントにより維持され得る。真核生物について、安定に形質転換される細胞は、形質転換ＤＮＡが染色体内に組み込まれ、その結果、染色体複製を介する娘細胞によって遺伝される細胞である。この安定性は、真核生物細胞が、形質転換ＤＮＡを含有する娘細胞の集団からなる細胞株またはクローンを樹立する能力によって証明される。「クローン」は、単細胞または有糸分裂による共通の祖先由来の細胞集団である。「細胞株」は、多くの世代について、インビボで安定に増殖し得る初代細胞のクローンである。

【００８５】

ヌクレオチドの少なくとも約７５％（好ましくは、少なくとも約８０％、そして最も好ましくは、少なくとも約９０％または９５％）がＤＮＡ配列の規定された長さと一致する場合、２つのＤＮＡ配列は、「実質的に相同」である。実質的に相同な配列は、配列データバンクで利用可能な標準的なソフトウェアを使用してか、または例えば、特定の系について規定されるようなストリンジェントな条件下でのサザンハイブリダイゼーション実験において、配列を比較することによって、同定され得る。規定される適切なハイブリダイゼーション条件は、当業者の範囲内である。例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓら、前出；ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ、第Ｉ巻および第ＩＩ巻、前出；Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ、前出。

【００８６】

本発明の特定の結合メンバー（抗体）をコードするＤＮＡ配列（これは、例えば、配列番号２または配列番号４と同じアミノ酸配列を有する抗体をコードするが；配列番号２または配列番号４に縮重される）もまた本発明の範囲内であることが、理解されるべきである。「～に縮重する」とは、異なる３文字コドンを使用して特定のアミノ酸を特定化することを意味する。以下のコドンを相互交換可能に使用して、各々の特定のアミノ酸をコード

し得ることは、当該分野で周知である：

【００８７】

【表２】

フェニルアラニン(PheまたはF)	UUUまたは UUC
ロイシン (Leuまたは L)	UUAまたはUUGまたはCUUまたは CUCまたは CUAまたはCUG
イソロイシン(Ileまたは I)	AUUまたは AUCまたはAUA
メチオニン (Metまたは M)	AUG
バリン (ValまたはV)	GUUまたはGUC またはGUA または GUG
セリン (SerまたはS)	UCUまたはUCCまたはUCA またはUCGまたはAGUまたはAGC
プロリン (Proまたは P)	CCUまたはCCCまたはCCAまたは CCG
トレオニン (ThrまたはT)	ACUまたは ACCまたはACA またはACG
アラニン (Alaまたは A)	GCUまたはGCG またはGCA またはGCG
チロシン (TyrまたはY)	UAU またはUAC
ヒスチジン (Hisまたは H)	CAU またはCAC
グルタミン (GlnまたはQ)	CAA またはCAG
アスパラギン (Asnまたは N)	AAU またはAAC
リジン (Lysまたは K)	AAA またはAAG
アスパラギン酸 (AspまたはD)	GAU またはGAC
グルタミン酸 (GluまたはE)	GAA またはGAG
システイン (Cysまたは C)	UGU または UGC
アルギニン (Argまたは R)	CGUまたはCGCまたはCGA またはCGGまたはAGAまたはAGG
グリシン (Glyまたは G)	GGUまたは GGCまたはGGA またはGGG
トリプトファン (Trpまたは W)	UGG
終止コドン	UAA(オーカー)またはUAG(アンバー)または UGA(オパール)

【００８８】

上で特定化されたコドンはＲＮＡ配列についてのコドンであることが、理解されるべきである。ＤＮＡについての対応するコドンは、Ｕの代わりにＴを有する。

【００８９】

変異は、配列番号２または配列番号４においてなされ得、この結果、特定のコドンが、異なるアミノ酸をコードするコドンに変化される。このような変異は、一般的に、最小のヌクレオチド変化を可能にすることによって、なされ得る。この種類の置換変異は、非保存的な様式でか（すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の分類に属するアミノ酸から別の分類に属するアミノ酸まで、コドンを変化させることによって）、または保存的な様式で（すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の分類に属するアミノ酸から同じ分類に属するアミノ酸まで、コドンを変化させることによって）、得られるタンパク質中のアミノ酸を変化させるようになされ得る。このような保存的変化は、一般に、得られるタンパク質の構造および機能の変化を引き起こさない。非保存的変化は、得られるタンパク質の構造、活性または機能をより変化させるようである。本発明は、得られるタンパク質の活性または結合特性を有意に変化させない保存的変化を含む配列を含むように考慮されるべきである。

【００９０】

以下は、アミノ酸の種々の分類の１つの例である：

（非極性Ｒ基を有するアミノ酸）

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、トリプトファン、メチオニン。

【００９１】
（非荷電の極性Ｒ基を有するアミノ酸）
グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン。
【００９２】
（荷電した極性Ｒ基を有するアミノ酸（ｐＨ６．０にて負に帯電している））
アスパラギン酸、グルタミン酸。
【００９３】
（塩基性アミノ酸（ｐＨ６．０にて正に帯電している））
リジン、アルギニン、ヒスチジン（ｐＨ６．０）。
【００９４】
別の分類は、フェニル基を有するアミノ酸であり得る：
フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン。
【００９５】
別の分類は、分子量（すなわち、Ｒ基のサイズ）に従い得る：
【００９６】
【表３】

グリシン	75
アラニン	89
セリン	105
プロリン	115
バリン	117
トレオニン	119
システイン	121
ロイシン	131
イソロイシン	131
アスパラギン	132
アスパラギン酸	133
グルタミン	146
リジン	146
グルタミン酸	147
メチオニン	149
ヒスチジン(ｐＨ6.0)	155
フェニルアラニン	165
アルギニン	174
チロシン	181
トリプトファン	204

【００９７】
以下の置換基が、特に好ましい：
－Ａｒｇに対するＬｙｓ（逆もまた同様）（その結果、正電荷が維持され得る）；
－Ａｓｐに対するＧｌｕ（逆もまた同様）（その結果、負電荷が維持され得る）；
－Ｔｈｒに対するＳｅｒ（その結果、遊離－ＯＨが維持され得る）；および、
－Ａｓｎに対するＧｌｎ（その結果、遊離NH_2が維持され得る）。
【００９８】
アミノ酸置換はまた、特定の好ましい性質を有するアミノ酸を置換するために導入され得る。たとえば、Ｃｙｓは、別のＣｙｓとジスルヒド結合するための潜在的部位を導入され得る。Ｈｉｓは、特定の「触媒」部位として導入され得る（すなわち、Ｈｉｓは、酸また

は塩基として作用し得、そして生化学的な触媒において最も一般的なアミノ酸である）。Ｐｒｏは、タンパク質構造のβ－ターンを誘導するその特定の平面構造に起因して、誘導され得る。

【００９９】

アミノ酸残基の少なくとも約７０％（好ましくは、少なくとも約８０％、そして最も好ましくは少なくとも９０％または９５％）が、同一であるか、または保存的置換を表す場合、２つのアミノ酸配列は、「実質的に相同」である。

【０１００】

ＤＮＡ構築物の「非相同的」領域は、天然の大きな分子に関連して見出されない大きなＤＮＡ分子内で、ＤＮＡのセグメントと同一視することができる。従って、非相同的領域が哺乳動物遺伝子をコードする場合、この遺伝子は、通常、供給源生物体のゲノムにおける哺乳動物のゲノムＤＮＡに隣接しないＤＮＡによって隣接される。非相同性コード配列の別の例は、コード配列自身が天然に見出されない構築物である（例えば、ｃＤＮＡ、ここで、ゲノムのコード配列は、イントロンまたはネイティブな遺伝子と異なるコドンを有する合成配列を含む）。対立遺伝子の変異または天然に生じる変異事象は、本明細書中に定義されるようなＤＮＡの非相同性領域を生じさせない。

【０１０１】

句「薬学的に受容可能」は、生理学的に耐用性があり、そしてヒトに投与される場合、代表的にアレルギーまたは同様の有害反応（例えば、胃の不調、めまい感など）を起こさない分子実体および組成物をいう。

【０１０２】

句「治療的有効量」は、本明細書中で使用され、予防するのに十分な量、および少なくとも約３０％、好ましくは少なくとも５０％、好ましくは少なくとも７０％、好ましくは少なくとも８０％、好ましくは少なくとも９０％まで、標的細胞の質量の増殖または進行あるいは有糸分裂、癌細胞または腫瘍のグループ、もしくは病理の他の特性において臨床的に有意な変化を好ましくは減少するのに十分な量を意味する。例えば、ＥＧＦＲ活性化もしくはＥＧＦＲ活性の程度、またはＥＧＦＲ陽性細胞（特に抗体または反応性細胞もしくは陽性細胞の結合メンバー）の量もしくは数は、減少され得る。

【０１０３】

ＤＮＡ配列は、発現制御配列が、ＤＮＡ配列の転写および翻訳を制御し、そして調節する場合、発現制御配列に「作動可能に連結される」。用語「作動可能に連結される」は、発現されるべきＤＮＡ配列の前の適切な開始シグナル（例えば、ＡＴＧ）を有すること、そして発現制御配列およびＤＮＡ配列によってコードされた所望の産物の生産の制御下で、ＤＮＡ配列の発現を可能にする正しいリーディングフレームを維持することを包含する。組換えＤＮＡ分子中に挿入されることが所望される遺伝子が、適切な開始シグナルを含んでいない場合、このような開始シグナルは、遺伝子の前部分に挿入され得る。

【０１０４】

用語「標準的ハイブリダイゼーション条件」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の両方について５×ＳＳＣおよび６５℃に実質的に等価な塩および温度条件およびをいう。しかし、当業者は、このような「標準的ハイブリダイゼーション条件」は、緩衝液中のナトリウムおよびマグネシウムの濃度、ヌクレオチド配列の長さおよび濃度（ミスマッチ％、ホルムアミド％など）を含む特定の条件に依存することを理解する。「標準的ハイブリダイゼーション条件」の決定において重要なことはまた、ハイブリダイズする２つの配列が、ＲＮＡ－ＲＮＡ、ＤＮＡ－ＤＮＡまたはＲＮＡ－ＤＮＡであるか否かである。このような標準的ハイブリダイゼーション条件は、周知の式に従って当業者によって容易に決定され、ここでハイブリダイゼーションは、代表的に、所望である場合、より高いストリンジェンシーの洗浄を用いて、予測されるかまたは測定されたT_mよりも１０～２０℃下である。

【０１０５】

（Ｂ．詳細な開示）

本発明は、腫瘍形成性細胞、過剰増殖性細胞または異常細胞において見出されるＥＧＦＲエピトープを認識する新規の特異的結合メンバー、特に、抗体またはそのフラグメント（免疫原性フラグメントを含む）を提供し、このエピトープは、異常な翻訳後改変の際に増大されるか、または顕性であり、正常細胞または野生型細胞において検出可能ではない。特定ではあるが、非限定の実施形態において、この結合メンバー（例えば、抗体）は、ＥＧＦＲエピトープを認識し、これは、単純な炭水化物改変または初期のグリコシル化の際に増大されるか、または顕性であり、そして複雑な炭水化物改変またはグルコシル化の存在において減少されるか、または顕性ではない。特異的結合メンバー（例えば、抗体またはそのフラグメント）は、過剰発現が存在しない場合および正常なＥＧＦＲ翻訳後改変が存在する場合において、正常ＥＧＦＲエピトープまたは野生型ＥＧＦＲエピトープを含む正常細胞または野生型細胞に結合も認識もしない。

【０１０６】

本発明は、ＥＧＦＲエピトープを認識する特異的結合メンバー、特に、抗体またはそのフラグメントに関し、このＥＧＦＲエピトープは、増幅したＥＧＦＲまたはｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現する細胞において存在し、正常ＥＧＦＲまたは野生型ＥＧＦＲを発現する細胞において（特に、正常な翻訳後改変の存在において）検出可能ではない。

【０１０７】

本発明の抗体のさらなる非限定的な観察または特徴は、初期のグリコシル化または単純な炭水化物改変の特徴である、高マンノース基の存在におけるそれらのエピトープの認識であることは、さらに記載され、そして本明細書中で実証される。従って、変更されたか、または異常なグリコシル化は、この抗体エピトープの存在および／または認識を容易にするか、あるいはこの抗体エピトープの一部を含む。

【０１０８】

グリコシル化には、オリゴ糖の付加によるタンパク質（糖タンパク質と称される）の翻訳後改変が挙げられ、そして包含する。オリゴ糖は、糖タンパク質（特に、Ｎ－連結オリゴ糖およびＯ－連結オリゴ糖を含む）のグリコシル化部位に付加される。Ｎ－連結オリゴ糖はＡｓｎ残基に付加され、特にＡｓｎ残基は、配列Ｎ－Ｘ－Ｓ／Ｔに存在し、ここで、ＸはＰｒｏでもＡｓｐでもあり得ず、そして糖タンパク質において最も共通に見出される。Ｎ－連結糖タンパク質の生合成において、高マンノース型オリゴ糖（一般的にドリコール、Ｎ－アセチルグリコサミン、マンノースおよびグルコース含む）は、最初に小胞体（ＥＲ）において形成される。次いで、高マンノース型糖タンパク質は、ＥＲからゴルジに移送され、ここで、オリゴ糖のさらなるプロセシングおよび改変が通常生じる。Ｏ－連結オリゴ糖は、Ｓｅｒ残基またはＴｈｒ残基のヒドロキシル基に添加される。Ｏ－連結オリゴ糖において、Ｎ－アセチルグリコサミンは、最初にＥＲにおいてＮ－アセチルグリコサミニルトランスフェラーゼによってＳｅｒ残基またはＴｈｒ残基に転移される。次いで、このタンパク質は、ゴルジまで移動し、ここでさらなる改変および鎖の伸長が生じる。

【０１０９】

本発明の特定の局面および上記のような場合において、本発明は、新規のモノクローナル抗体（ｍＡｂ　８０６およびそのキメラのｃｈ８０６と命名された抗体によって本明細書中で例示される）を発見し、これらは、増幅された野生型ＥＧＦＲおよびｄｅ２－７ＥＧＦＲを特異的に認識し、さらに、ｄｅ２－７ＥＧＦＲ変異の特有の接合部ペプチドとは明らかに異なるエピトープに結合する。本発明の抗体は、特に、異常な翻訳後改変の際に過剰発現したＥＧＦＲ（増幅したＥＧＦＲおよび変異体ＥＧＦＲ（ｄｅ２－７変異によって本明細書中で例示される）を含む）を特異的に認識する。さらに、ｍＡｂ８０６は、神経膠腫細胞の細胞表面において発現される正常な、野生型ＥＧＦＲを認識しないが、ＥＬＩＳＡプレートの表面上に固定されたＥＧＦＲの細胞外ドメインに結合する。このことは、ポリペプチドの局面を有する高次構造エピトープを示す。重要なことに、ｍＡｂ８０６は、多くの他の正常組織において発現されるレベルより高いレベルの内在性ｗｔＥＧＦＲを発現するが、ＥＧＦＲは過剰発現も増幅もされない肝臓および皮膚のような正常な組織には顕著に結合しない。従って、ｍＡｂ８０６は、新規であり、かつ有用な特異性（ｄｅ

２－７ＥＧＦＲおよび増幅されたＥＧＦＲを認識するが、正常な、野生型ＥＧＦＲも、ｄｅ２－７ＥＧＦＲの特徴である特有の接合部ペプチドも認識しない）を実証する。

【０１１０】

好ましい局面において、抗体は、本発明者が、増幅したＥＧＦＲおよびｄｅ２－７ＥＧＦＲを特に認識することを同定および特徴付けた特徴を有する抗体である。特に好ましい局面において、抗体は、ｍＡｂ　８０６であるか、またはその活性フラグメントである。さらに好ましい局面において、本発明の抗体は、ＶＨアミノ酸配列およびＶＬアミノ酸配列（それぞれ、図１４（配列番号２）および図１５（配列番号４）に示される）を含む。

【０１１１】

好ましくは、特異的結合メンバーまたは抗体のエピトープは、成熟した正常ＥＧＦＲ配列または野生型ＥＧＦＲ配列の残基２７３～５０１を含む領域内に局在される。従って、ＥＧＦＲ配列の残基２７３～５０１を含む領域内に局在するエピトープで、ｄｅ２－７ＥＧＦＲに結合する、特異的結合タンパク質（例えば、抗体）もまた、提供される。このエピトープは、当業者に公知の、任意の慣用的なエピトープマッピング技術によって決定され得る。あるいは、残基２７３～５０１をコードするＤＮＡ配列は消化され得、そして得られるフラグメントは適切な宿主において発現される。抗体結合は、上記のように決定され得る。

【０１１２】

特に、このメンバーは成熟した正常ＥＧＦＲまたは野生型ＥＧＦＲの前記２７３～５０１を含むエピトープに結合する。しかし、同様か、または実質的に類似する反応性パターンを示す他の抗体または、本発明の局面を形成する。これは、それぞれ、配列番号２および配列番号４に示されるＶＨドメインおよびＶＬドメインを含む抗体と、このようなメンバーを比較することによって決定され得る。比較は、代表的には、ウエスタンブロット（結合メンバーは、細胞の核調製物から調製された二重ブロットに結合される）を用いてなされ、その結果、結合パターンを直接比較し得る。

【０１１３】

別の局面において、本発明は、８０６抗体のＶＨ配列およびＶＬ配列を有する抗体の少なくとも１０％が、ＥＬＩＳＡアッセイにおいてこのような抗体との競合によってｄｅ２－７ＥＧＦＲへの結合をブロックする条件下で、８０６抗体と競合し得る抗体を提供する。上記のように、抗イディオタイプ抗体は、本明細書中で意図され、図解される。

【０１１４】

成熟した野生型ＥＧＦＲの残基２７３～５０１（成熟したｄｅ２－７ＥＧＦＲの残基６～２３４）を含むエピトープから本質的に構成される、単離されたポリペプチドは、本発明の別の局面を形成する。本発明のペプチドは、診断アッセイまたはキットにおいて特に有用であり、そして治療的または予防的（抗腫瘍ワクチンまたは抗癌ワクチン）に有用である。従って、本発明のペプチドの組成物は、薬学的組成物および免疫原性組成物を包含する。

【０１１５】

（診断用途および治療的用途）

本発明の特異的結合メンバー（特に、抗体またはそのフラグメント）に特有な特異性（それによって結合メンバーはＥＧＦＲエピトープ（腫瘍形成性細胞、過剰増殖性細胞または異常細胞において見出されるが、正常細胞または野生型細胞において検出可能ではない）を認識し、ここで、このエピトープは異常な翻訳後改変の際に増大されるか、または顕性であり、そしてこのメンバーはｄｅ２－７ＥＧＦＲおよび増幅したＥＧＦに結合するが、ｗｔＥＧＦＲには結合しない）は、多くの腫瘍形成性細胞型および腫瘍型（例えば、頭部および頸部、胸部、肺、膀胱または前立腺の腫瘍および神経膠腫）を同定、特徴づけ、標的化および処置、減少または排除するための診断用途および治療用途を、以前から公知であるＥＧＦＲ抗体に見られ得るような正常組織取込みに関連する問題を伴わずに、提供する。従って、ＥＧＦＲを（例えば、変異体ＥＧＦＲまたは改変体ＥＧＦＲの増幅または発現によって）過剰発現する細胞、特に、異常な翻訳後改変を示す細胞は、本発明の結合

メンバー（特に、抗体またはそのフラグメント）を利用して、認識、単離、特徴づけ、標的化および処置または排除され得る。

【０１１６】

従って、本発明の抗体は、ＥＧＦＲ過剰発現（特に増幅）および／またはＥＧＦＲ変異（特にｄｅ２－７ＥＧＦＲ）が存在する、腫瘍または細胞を染色あるいは認識することによって、ＥＧＦＲ腫瘍細胞または腫瘍形成性細胞の性質を特異的に分類し得る。さらに、本発明の抗体（ｍＡｂ８０６およびキメラ抗体ｃｈ８０６によって増幅されるような）は、増幅されたＥＧＦＲを含む腫瘍細胞およびｄｅ２－７ＥＧＦＲ陽性異種移植片に対する有意な抗腫瘍活性をインビボで実証する。

【０１１７】

上に概説するように、本発明者らは、本発明の特異的結合メンバーが、正常細胞において発現する場合、正常な、野生型レセプターではなく、ＥＧＦＲ（ｄｅ２－７ＥＧＦＲおよび増幅したＥＧＦＲ）の腫瘍関連形態を認識することを発見した。抗体の認識は、ＥＧＦＲ遺伝子の過剰発現を示す細胞において発現したＥＧＦＲの異常な翻訳後改変（例えば、特有のグリコシル化改変体、アセチル化改変体またはリン酸化改変体）に依存すると考えられる。

【０１１８】

下に記載するように、ｍＡｂ８０６およびｃｈ８０６は治療的研究において使用されている。ｍＡｂ８０６およびｃｈ８０６は、ＥＧＦＲを過剰発現した（例えば、増幅された）異種移植片およびヒトｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現するヒト腫瘍の異種移植片の増殖を阻害することおよびこのような腫瘍内の壊死を有意に誘導することが示される。

【０１１９】

さらに、本発明の抗体は、予防モデルにおいて頭蓋内腫瘍の増殖を阻害する。このモデルは、ヌードマウスへ、ｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現する神経膠腫細胞を注射すること、次いで、同日または１～３日以内のいずれかで、抗体を頭蓋内に注射すること（必要に応じて反復される用量で）を包含する。抗体の用量は、適切には約１０μｇである。抗体を注射したマウスは、コントロールと比較され、そして処置したマウスの生存が有意に増加することを見出した。

【０１２０】

従って、本発明のさらなる局面において、腫瘍、癌性状態、前癌性状態および任意の過剰増殖性細胞増殖に関連する状態または過剰増殖性細胞増殖から生じる状態の処置方法を提供し、この方法は、本発明の特異的結合メンバーの投与を包含する。

【０１２１】

本発明の抗体は、ヒト被験体および動物被験体における腫瘍（特に、上皮腫瘍）の診断方法および処置方法において使用されるように設計される。これらの腫瘍は、任意の型の一次固形腫瘍または二次固形腫瘍であり得、これらの腫瘍としては、神経膠腫、胸部、肺、前立腺、頭部または頸部の腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２２】

（結合メンバーおよび抗体生成）

ハイブリドーマによってモノクローナル抗体を作製するための一般的な方法論は周知である。不死化の抗体生成細胞株はまた、融合以外の技術（例えば、オンコジーンＤＮＡを用いるＢリンパ球の直接的な形質転換、またはエプスタイン－バーウイルスを用いるトランスフェクション）によっても作製され得る（例えば、Ｍ．Ｓｃｈｒｅｉｅｒら、「Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ」（１９８０）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇら「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｔ－ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ」（１９８１）；Ｋｅｎｎｅｔｔら、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」（１９８０）を参照のこと；米国特許第４，３４１，７６１号；同第４，３９９，１２１号；同第４，４２７，７８３号；同第４，４４４，８８７号；同第４，４５１，５７０号；同第４，４６６，９１７号；同第４，４７２，５００号；同第４，４９１，６３２号；同第４，４９３，８９０号もまた参照のこと）。

【０１２３】
ＥＧＦＲに対して産生されたモノクローナル抗体のパネルは、種々の特性；すなわち、アイソタイプ、エピトープ、親和性などについてスクリーニングされ得る。ＥＧＦＲまたはそのサブユニットの活性を模倣するモノクローナル抗体が特に興味深い。このようなモノクローナル抗体は、特異的結合活性アッセイにおいて容易に同定され得る。高親和性抗体はまた、ネイティブまたは組換えの特異的結合メンバーの免疫親和性精製が可能である場合、有用である。
【０１２４】
ポリクローナル抗ＥＧＦＲ抗体を生成するための方法は当該分野で周知である。Ｎｅｓｔｏｒらに対する米国特許第４，４９３，７９５号を参照のこと。モノクローナル抗体（代表的に、有用な抗体分子のＦａｂおよび／またはＦ（ａｂ’）$_2$部分を含む）は、以下に記載されるハイブリドーマ技術を用いて調製され得る：Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ編、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８８）、これは、参考として本明細書中で援用される。簡単に言うと、モノクローナル抗体組成物が生成されるハイブリドーマを形成するために、骨髄腫細胞株または他の自己永続性細胞株が、適切なＥＧＦＲで過剰に免疫された哺乳動物の脾臓から得られたリンパ球と融合される。
【０１２５】
脾細胞は代表的に、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）６０００を用いて骨髄腫細胞と融合される。融合されたハイブリットは、ＨＡＴに対するそれらの感受性によって選択される。本発明の実施において有用なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、本発明の抗体または結合メンバーと免疫応答する能力、および標的細胞における特定の腫瘍形成または過剰増殖活性を阻害する能力によって同定される。
【０１２６】
本発明の実施に有用なモノクローナル抗体は、適切な抗原特異性の抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養培地を含むモノクローナルハイブリドーマ培養を開始することによって産生され得る。この培養物は、ハイブリドーマが培地中に抗体分子を分泌するために十分な条件および時間で維持される。次いで、抗体含有培地が収集される。次いで、抗体分子は、周知の技術によってさらに単離され得る。
【０１２７】
これらの組成物の調製のために有用な培地は、当該分野で周知の培地および市販の培地の両方であり、合成培養培地、近交マウスなどを含む。例示的な合成培地は、４．５ｇｍ／ｌグルコース、２０ｍｍグルタミンおよび２０％胎仔血清を補充したダルベッコ最小必須培地（ＤＭＥＭ；Ｄｕｌｂｅｃｃｏら、Ｖｉｒｏｌ．８：３９６（１９５９））である。例示的な近交マウス系は、Ｂａｌｂ／ｃである。
【０１２８】
モノクローナル抗ＥＧＦＲ抗体を生成する方法はまた、当該分野で周知である。Ｎｉｍａｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８０：４９４９－４９５３（１９８３）を参照のこと。代表的に、ＥＧＦＲまたはペプチドアナログは、以前に記載された抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体を産生するための手順における免疫原として、単独または免疫原性キャリアに結合体化するかのいずれかで使用される。ハイブリドーマは、腫瘍形成性細胞、異常な細胞または過剰増殖性細胞に存在するＥＧＦＲと免疫応答する抗体を産生する能力についてスクリーニングされる。他の抗ＥＧＦＲ抗体としては、Ｇｅｎｍａｂ／ＭｅｄａｒｅｘからのＨｕＭＡＸ－ＥＧＦｒ抗体、１０８抗体（ＡＴＣＣ ＨＢ９７６４）（米国特許第６，２１７，８６６号）およびＳｃｈｅｒｉｎｇ ＡＧからの抗体１４Ｅ１（米国特許第５，９４２，６０２号）が挙げられるが、これらに限定されない。
【０１２９】
（組換え結合メンバー、キメラ、二重特異性およびフラグメント）
一般的に、ＣＤＲ３領域（配列番号２および配列番号４のＣＤＲ３領域として実質的に記

載されるアミノ酸配列を含む）が、腫瘍抗原へのＣＤＲ３の結合を可能にする構造に含まれる。配列番号４のＣＤＲ３の場合において、好ましくは、これは配列番号４のＶＬ領域によって含まれる。

【０１３０】

「実質的に記載される」とは、本発明のＣＤＲ３領域が、配列番号２および配列番号４の特異的領域に対する同一性および高い相同性のいずれかであることを意味する。「高い相同性」とは、いくつかの置換のみ、好ましくは１～８、好ましくは１～５、好ましくは１～４、または１～３もしくは１～２の置換がＣＤＲにおいて作製され得ることが意図される。

【０１３１】

本発明のＣＤＲ３を有する構造は、一般的に、抗体の重鎖配列または軽鎖配列あるいはその実質的な部分であり得、ここで、ＣＤＲ３は、再配置された免疫グロブリン遺伝子によってコードされる、天然に存在するＶＨおよびＶＬ抗体の可変ドメインのＣＤＲ３領域に対応する位置に局在される。免疫グロブリン可変ドメインの構造および位置は、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ．第４版．ＵＳ Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ．１９８７およびそれらの最新のもの、インターネット（ｈｔｔｐ：／／ｉｍｍｕｎｏ．ｂｍｅ．ｎｗｕ．ｅｄｕ）で現在利用可能なものを参照することによって決定され得る。

【０１３２】

好ましくは、配列番号２の残基９３～１０２に実質的に記載されるようなアミノ酸配列は、ヒト重鎖可変ドメインまたはその実質的な部分においてＣＤＲ３として保持され、そして配列番号４の残基２４～３４、５０～５６および８９～９７に実質的に記載されるようなアミノ酸配列は、それぞれ、ヒト軽鎖可変ドメインまたはその実質的な部分においてＣＤＲ１～３として保持される。

【０１３３】

可変ドメインは、任意の生殖細胞系列または再配置されたヒト可変ドメインから誘導され得るか、あるいは公知のヒト可変ドメインのコンセンサス配列に基づいて合成可変ドメインであり得る。本発明のＣＤＲ３由来配列（前述の段落に規定されるように）は、組換えＤＮＡ技術を使用して、ＣＤＲ３領域を欠く可変ドメインのレパートリーに導入され得る。

【０１３４】

例えば、Ｍａｒｋｓら（Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１９９２，１０：７７９－７８３）は、抗体の可変ドメインのレパートリーを産生する方法を記載し、ここで、可変ドメイン領域の５’末端に指向されるか、または近接されるコンセンサスプライマーは、ヒトＶＨ遺伝子の第３フレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーとの結合に使用され、ＣＤＲ３を欠くＶＨ可変ドメインのレパートリーを提供する。Ｍａｒｋｓらはさらに、このレパートリーがどのように特定の抗体のＣＤＲ３と結合し得るのかを記載する。類似の技術を使用して、本発明のＣＤＲ３由来配列は、ＣＤＲ３を欠くＶＨドメインまたはＶＬドメインのレパートリーと混ぜ合わせられ得、そして混合された完全ＶＨドメインまたはＶＬドメインは、本発明の特異的結合メンバーを提供するために、同系のＶＬドメインまたはＶＬドメインと結合され得る。次いで、レパートリーは、適切な宿主系（例えば、Ｗ０９２／０１０４７のファージディスプレイ系）において提示され得、その結果、適切な特異的結合メンバーが選択され得る。レパートリーは、10^4個以上（例えば、10^6～10^8または10^{10}メンバー）の任意の個々のメンバーからなり得る。

【０１３５】

類似の混合またはコンビナトリアル技術はまた、Ｓｔｅｍｍｅｒ（Ｎａｔｕｒｅ，１９９４，３７０：３８９－３９１）によって開示され、Ｓｔｅｍｍｅｒは、β－ラクタマーゼ遺伝子に関連する技術を記載するが、このアプローチが抗体の産生のために使用され得ることを観察する。

【０１３６】
さらなる代替物は、全体の可変ドメイン内で変異を生じるために、例えば、ｍＡｂ８０６のＶＨ遺伝子またはＶＬ遺伝子のランダム変異誘発を用いて、本発明のＣＤＲ３由来配列を含む、新規のＶＨ領域またはＶＬ領域を生成することである。このような技術は、Ｇｒａｍら（１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，８９：３５７６－３５８０）によって記載される（Ｇｒａｍは、エラー頻発型ＰＣＲを使用した）。
【０１３７】
使用され得る別の方法は、ＶＨ遺伝子またはＶＬ遺伝子のＣＤＲ領域に変異誘発を指向させることである。このような技術は、Ｂａｒｂａｓら（１９９４，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，９１：３８０９－３８１３）およびＳｃｈｉｅｒら（１９９６，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６３：５５１－５６７）によって開示される。
【０１３８】
上記の技術の全ては、それ自体、当該分野で公知であり、そしてそれら自体で本発明の一部を形成しない。当業者は、当該分野において慣用的な方法論を用いて、本発明の特異的結合メンバーを提供するために、このような技術を使用することが可能である。
【０１３９】
免疫グロブリン可変ドメインの実質的部分は、それらの介在性フレームワーク領域と共に、少なくとも３つのＣＤＲ領域を含む。好ましくは、この部分はまた、第１および第４フレームワーク領域の、または両方のいずれかの少なくとも約５０％、第１フレームワーク領域のＣ末端５０％および第４フレームワーク領域のＮ末端５０％を含む。可変ドメインの実質的部分のＮ末端またはＣ末端でのさらなる残基は、天然に存在する可変ドメイン領域と通常会合しない残基である。例えば、組換えＤＮＡ技術によって作成された本発明の特異的結合メンバーの構築は、導入されたリンカーによってコードされるＮ末端またはＣ末端の残基の導入を生じさせ得、クローニングまたは他の操作工程を容易にし得る。他の操作工程としては、免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン（例えば、二重抗体の産生における）またはより詳細に下に考察されるようなタンパク質標識を含むさらなるタンパク質配列に本発明の可変ドメインを結合するためのリンカーの導入が挙げられる。
【０１４０】
本発明の好ましい局面において、配列番号２および配列番号４に実質的に記載される配列に基づく１対の結合ドメインを含む特異的結合メンバーが好ましいが、これらの配列のいずれかに基づく単一結合ドメインは本発明のさらなる局面を形成する。配列番号２に実質的に記載される配列に基づく結合ドメインの場合において、このような結合ドメインは、腫瘍抗原に対する標的薬剤として使用され得る。なぜなら、免疫グロブリンＶＨドメインが特異的様式で標的抗原に結合し得ることが公知であるからである。
【０１４１】
単鎖抗体に特異的に結合するドメインのうちのいずれかの場合、これらのドメインは、２つのドメインに特異的に結合するメンバーを形成し得る相補的ドメインについてスクリーニングするために使用され得、このメンバーは、本明細書中に開示されるｍＡｂ８０６抗体と同程度に良好であるかまたは等しいインビボ特性を有する。
【０１４２】
このことは、米国特許第５，９６９，１０８号に開示されるような、いわゆる階層的二重コンビナトリアルアプローチを使用するファージディスプレイスクリーニング法によって、達成され得る。ここで、Ｈ鎖クローンまたはＬ鎖クローンのいずれかを含む個々のコロニーが、他方の鎖（ＬまたはＨ）をコードするクローンの完全なライブラリーを感染するために使用され、そして得られる２つの鎖に特異的な結合メンバーが、この参考文献に記載されるもののようなファージディスプレイ技術に従って選択される。この技術はまた、Ｍａｒｋｓら（同書）にも開示されている。
【０１４３】
本発明の特異的結合メンバーは、抗体定常領域またはその一部をさらに含み得る。例えば、配列番号４に基づく特異的結合メンバーは、そのＣ末端において、抗体の軽鎖定常ドメ

イン（ヒトＣκ鎖またはヒトＣλ鎖が挙げられ、好ましくはＣλ鎖）に付着し得る。同様に、配列番号２に基づく特異的結合メンバーは、そのＣ末端において、任意の抗体アイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＤおよびＩｇＭ）および任意のアイソタイプサブクラス（特に、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ｂ、およびＩｇＧ４であり、ＩｇＧ１が好ましい）由来の免疫グロブリン重鎖のすべてまたは一部に付着し得る。

【０１４４】

２５年前のモノクローナル抗体（ｍＡｂ）技術の出現は、有用な研究試薬の莫大なレパートリーを提供し、そして抗体を、癌治療、自己免疫障害、移植拒絶、抗ウイルス予防法における認可された薬学的試薬、および抗血栓剤として使用する機会を生じた（ＧｌｅｎｎｉｅおよびＪｏｈｎｓｏｎ　２０００）。マウスｍＡｂをキメラｍＡｂ（マウスＶ領域、ヒトＣ領域）に転換するための分子操作の適用、およびｍＡｂ相補性決定領域（ＣＤＲ）のみがマウスを起源とする場合のヒト化試薬は、ｍＡｂ治療の臨床的成功のために重要であった。操作されたｍＡｂは、免疫原性が顕著に減少しているかまたは有さず、血清半減期が増加しており、そしてｍＡｂのヒトＦｃ部分は、補体および細胞傷害性細胞の免疫効果を漸増させる可能性を増加させる（Ｃｌａｒｋ　２０００）。生体分布、薬物速度論および臨床的に投与されたｍＡｂに対する免疫応答の何らかの誘導についての調査は、薬学的タンパク質と内因性タンパク質とを区別するための分析の開発を必要とする。

【０１４５】

抗体、またはその任意のフラグメントはまた、任意の細胞毒素、細菌毒素または他の毒素（例えば、シュードモナス体外毒素、リシン、またはジフテリア毒素）に結合体化され得るか、または組換え的に融合され得る。使用される毒素の一部は、毒素全体、または毒素の任意の特定のドメインであり得る。このような抗体－毒素分子は、異なる種類の癌の標的化および治療のために、首尾よく使用されている。例えば、Ｐａｓｔａｎ，Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ．１９９７ Ｏｃｔ ２４；１３３３（２）：Ｃ１－６；Ｋｒｅｉｔｍａｎら，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ．２００１ Ｊｕｌ ２６；３４５（４）：２４１－７；Ｓｃｈｎｅｌｌら，Ｌｅｕｋｅｍｉａ．２０００ Ｊａｎ；１４（１）：１２９－３５；Ｇｈｅｔｉｅら，Ｍｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００１ Ｊｕｌ；１８（３）：２５１－６８を参照のこと。

【０１４６】

二重特異的多量体および三重特異的多量体は、異なるｓｃＦｖ分子の会合によって形成され得、そして腫瘍内へのＴ細胞漸増のための架橋剤（免疫療法）、ウイルス再標的化（遺伝子療法）および赤血球凝集試薬（免疫診断）として、設計されている。例えば、Ｔｏｄｏｒｏｖｓｋａら，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２００１ Ｆｅｂ １；２４８（１－２）：４７－６６；Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎら，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２０００；３２６：４６１－７９；ＭｃＣａｌｌら，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００１ Ｍａｙ １５；１６６（１０）：６１１２－７を参照のこと。

【０１４７】

完全ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の大部分を保有するトランスジェニックマウスを免疫することによって、調製され得る。これらのマウス（このようなマウスの例は、Ｘｅｎｏｍｏｕｓｅ™（Ａｂｇｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．）（米国特許第６，０７５，１８１号および同第６，１５０，５８４号）、ＨｕＭＡｂ－Ｍｏｕｓｅ™（Ｍｅｄａｒｅｘ，Ｉｎｃ．／ＧｅｎＰｈａｒｍ）（米国特許第５５４５８０６号および同第５５６９８２５号）、ＴｒａｎｓＣｈｒｏｍｏ Ｍｏｕｓｅ™（Ｋｉｒｉｎ）およびＫＭ Ｍｏｕｓｅ™（Ｍｅｄａｒｅｘ／Ｋｉｒｉｎ）である）は、当該分野において周知である。次いで、抗体は、例えば、標準的なハイブリドーマ技術またはファージディスプレイによって調製され得る。このようにして、これらの抗体は、完全ヒトアミノ酸配列のみを含む。

【０１４８】

完全ヒト抗体はまた、ヒトライブラリーからファージディスプレイを使用して作製され得る。ファージディスプレイは、当業者に周知の方法（例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍらお

よびＭａｒｋｓら（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ＨＲおよびＷｉｎｔｅｒ Ｇ.（１９９２）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ.２２７（２）：３８１－８；Ｍａｒｋｓ ＪＤら（１９９１）Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ.２２２（３）：５８１－９７；ならびにまた米国特許第５８８５７９３号および同第５９６９１０８号））を使用して実施され得る。

【０１４９】

（治療抗体および使用）

本発明の特異的結合メンバーのインビボ特性（特に、腫瘍：血液比およびクリアランス速度に関して）は、少なくともｍＡｂ８０６に匹敵する。ヒトまたは動物の被験体にこのような特異的結合メンバーを投与した後に、１：１より大きいピークの腫瘍対血液比を示す。好ましくは、このような比において、特異的結合メンバーはまた、１：１より大きい比、好ましくは２：１より大きい比、より好ましくは、５：１より大きい比の腫瘍対器官比を有する。好ましくは、このような比において、特異的結合メンバーはまた、腫瘍の部位から離れた器官において、１：１未満の器官対血液比を有する。これらの比は、投与された特異的結合メンバーの異化作用器官および分泌器官を除く。従って、ｓｃＦｖおよびＦａｂの場合（添付の実施例に示されるように）、結合メンバーは、腎臓によって分泌され、そして腎臓に、他の器官より多く存在する。ＩｇＧ全体の場合、クリアランスは、少なくとも部分的に、肝臓による。インタクトな抗体のピーク局在比は、通常、特異的結合メンバーの投与の１０時間後と２００時間後との間に達成される。より具体的には、この比は、無胸腺症ヌードマウスの一方の側腹部において皮下に形成される、約０．２～１．０ｇの腫瘍異種移植片において測定され得る。

【０１５０】

本発明の抗体は、検出可能な標識または機能的標識で標識され得る。検出可能な標識としては、同位体^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{36}Ｃｌ、^{51}Ｃｒ、^{57}Ｃｏ、^{58}Ｃｏ、^{59}Ｆｅ、^{90}Ｙ、^{121}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{211}Ａｔ、^{198}Ａｕ、^{67}Ｃｕ、^{225}Ａｃ、^{213}Ｂｉ、^{99}Ｔｃおよび^{186}Ｒｅのような放射性同位元素標識が挙げられるが、これらに限定されず、抗体画像化の分野において公知の従来の化学を使用して、本発明の抗体に付着され得る。標識としてはまた、蛍光標識およびＭＲＩ－ＣＴ画像のために当該分野において従来使用される標識が挙げられる。これらとしてはまた、ホースラディッシュペルオキシダーゼのような酵素標識が挙げられる。標識としてはさらに、ビオチンのような化学部分が挙げられ、これは、特定の同源物質を検出可能な部分（例えば、標識アビジン）に結合することによって、検出され得る。

【０１５１】

機能的標識としては、腫瘍の部位に標的化されて腫瘍組織の破壊を引き起こすように設計された物質が挙げられる。このような機能的標識としては、細胞傷害性薬物（例えば、５－フルオロウラシルまたはリシン）および酵素（例えば、細菌性カルボキシペルオキシダーゼまたはニトロレダクターゼ）が挙げられ、これらは、腫瘍の部位において、プロドラッグを活性薬物に転換し得る。

【０１５２】

また、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体との両方を含む抗体、ならびに特異的結合メンバー、抗体および／またはこれらのサブユニットの産生または活性を調節する薬物は、特定の診断適用を有し得、そして例えば、癌、癌前の病変、過剰増殖性の細胞の増殖に関連するかまたはその結果である状態などのような状態を検出および／または測定する目的で、利用され得る。例えば、特異的結合メンバー、抗体またはそのサブユニットを使用して、公知の技術（例えば、融合したマウス脾臓リンパ球および骨髄腫細胞を利用するハイブリドーマ技術など）によって、種々の細胞培地中で、それら自体に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体との両方を産生し得る。同様に、本発明の特異的結合メンバーの活性を模倣または拮抗する低分子が、発見または合成され得、そして診断および／または治療のプロトコルにおいて使用され得る。

【０１５３】

放射性同位体標識された特異的結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）は、

インビトロ診断技術ならびにインビボでの放射線画像化技術および放射免疫治療において有用である。インビボでの画像化の例において、本発明の特異的結合メンバーは、放射性同位体よりむしろ、画像化薬剤（磁気共鳴画像増強剤が挙げられるが、これに限定されない）に結合体化され得、ここで、例えば、抗体分子が、多数の常磁性イオンを、キレート基を介して負荷される。キレート基の例としては、ＥＤＴＡ、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、およびポリオキシムが挙げられる。常磁性イオンの例としては、ガドリニウム、鉄、マンガン、レニウム、ユーロピウム、ランタン、ホルミウム、およびテルビウム（ｆｅｒｂｉｕｍ）が挙げられる。本発明のさらなる局面において、放射性同位体標識された特異的結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント、特に、放射性免疫結合体）は、放射免疫治療において、特に、癌治療のための放射性同位体標識された抗体として、有用である。なおさらなる局面において、放射性同位体標識された特異的結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）は、放射免疫誘導手術技術において有用であり、ここで、これらのメンバーは、癌細胞、癌前細胞、腫瘍細胞、および過剰増殖細胞の存在および／または位置を、このような細胞を除去する手術の前、手術の間または手術の後に、同定および指示し得る。

【０１５４】

本発明の免疫結合体または抗体融合タンパク質（ここで、本発明の特異的結合メンバー、特に、抗体およびそのフラグメントは、他の分子または薬剤に結合体化または付着されている）としては、さらに、化学解離剤、毒素、免疫調節因子、サイトカイン、細胞傷害性因子、化学療法剤または薬物に結合体化された、結合メンバーが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１５５】

放射免疫治療（ＲＡＩＴ）は、種々の抗体免疫結合体を使用して、臨床的効力および実証効力を増強させた。^{131}Ｉで標識されたヒト化抗癌胎児抗原（抗ＣＥＡ）抗体ｈＭＮ－１４は、結腸直腸癌において評価され（Ｂｅｈｒ　ＴＭら（２００２）Ｃａｎｃｅｒ　９４（補遺４）：１３７３－８１）、そして^{90}Ｙ標識を有するこの抗体は、髄質の甲状腺癌腫において評価された（Ｓｔｅｉｎ　Ｒら（２００２）Ｃａｎｃｅｒ　９４（１）：５１－６１）。モノクローナル抗体を使用する放射免疫治療もまた、非ホジキンリンパ腫および膵臓癌について、評価および報告されている（Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ　ＤＭ（２００１）Ｃｒｉｔ　Ｒｅｖ　Ｏｎｃｏｌ　Ｈｅｍａｔｏｌ　３９（１－２）：１９５－２０１；Ｇｏｌｄ　ＤＶら（２００１）Ｃｒｉｔ　Ｒｅｖ　Ｏｎｃｏｌ　Ｈｅｍａｔｏｌ　３９（１－２）１４７－５４）。特定の抗体を用いる放射免疫治療の方法もまた、米国特許第６，３０６，３９３号および同第６，３３１，１７５号に記載されている。放射免疫誘導手術（ＲＩＧＳ）もまた、臨床実習に入り、そして効力および有用性が実証されている（抗ＣＥＡ抗体および腫瘍関連抗原に対する抗体の使用を含む）（Ｋｉｍ　ＪＣら（２００２）Ｉｎｔ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ　９７（４）：５４２－７；Ｓｃｈｎｅｅｂａｕｍ　Ｓら（２００１）Ｗｏｒｌｄ　Ｊ　Ｓｕｒｇ　２５（１２）：１４９５－８；Ａｖｉｔａｌ　Ｓら（２０００）Ｃａｎｃｅｒ　８９（８）：１６９２－８；ＭｃＩｎｔｏｓｈ　ＤＧら（１９９７）Ｃａｎｃｅｒ　Ｂｉｏｔｈｅｒ　Ｒａｄｉｏｐｈａｒｍ　１２（４）：２８７－９４）。

【０１５６】

本発明の抗体は、処置を必要とする患者に、任意の適切な経路で、通常は、血流もしくはＣＳＦへ、または腫瘍の部位への直接の注射によって、投与され得る。正確な用量は、多数の要因（その抗体が診断用であるか処置用であるか、腫瘍の大きさおよび位置、抗体の正確な性質（抗体全体であるか、フラグメントであるか、ダイアボディー（ｄｉａｂｏｄｙ）であるかなど）、ならびにその抗体に付着した検出可能標識または機能的標識の性質が挙げられる）に依存する。放射性核種が治療のために使用される場合、適切な最大の単回用量は、約４５ｍＣｉ／ｍ^{2}であり、最大で約２５０ｍＣｉ／ｍ^{2}である。好ましい投薬量は、１５～４０ｍＣｉの範囲であり、さらに好ましい投薬範囲は、２０～３０ｍＣｉ、または１０から３０ｍＣｉである。このような治療は、骨髄置換または幹細胞置換を

必要とし得る。腫瘍の画像化または腫瘍の処置のいずれかのための、代表的な抗体の用量は０．５～４０ｍｇ、好ましくは１～４ｍｇの、Ｆ（ａｂ’）２形態の抗体の範囲である。裸の抗体は、１用量あたり２０～１０００ｍｇのタンパク質、または１用量あたり２０～５００ｍｇのタンパク質または１用量あたり２０～１００ｍｇのタンパク質の用量で、好ましく投与される。これは、成人患者の１回の処置についての用量であり、これは、小児および幼児に対しては適切に調節され得、そしてまた、分子量に比例させて、他の抗体形式について調整され得る。処置は、毎日、１週間に２回、隔週または隔月で、医師の計らいで繰り返され得る。

【０１５７】

これらの処方物は、第二の結合タンパク質（例えば、前出で記載されたＥＧＦＲ結合タンパク質）を含み得る。特に好ましい形態において、この第二の結合タンパク質は、前出で議論された５２８または２２５のようなモノクローナル抗体である。

【０１５８】

（薬学製組成物および治療組成物）

本発明の特異的結合メンバーは、通常、薬学的組成物の形態で投与され、この組成物は、この特異的結合メンバーに加えて、少なくとも１つの成分を含有し得る。

【０１５９】

従って、本発明による薬学的組成物は、本発明による使用のために、活性成分に加えて、薬学的に受容可能な賦形剤、キャリア、緩衝剤、安定剤、または当業者に周知の他の材料を含有し得る。このような材料は、非毒性であるべきであり、そして活性成分の効力に影響を与えないべきである。キャリアまたは他の材料の正確な性質は、投与経路（これは、経口、または注射（例えば、静脈内）であり得る）に依存する。

【０１６０】

経口投与のための薬学的組成物は、錠剤、カプセル剤、散剤または液体形態であり得る。錠剤は、ゼラチンまたはアジュバントのような固体キャリアを含有し得る。液体の薬学的組成物は、一般に、水、石油、動物性油または植物性油、鉱油あるいは合成油のような、液体キャリアを含有する。生理食塩水、ブドウ糖または他の糖類の溶液、あるいはグリコール（例えば、エチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール）が、含有され得る。

【０１６１】

静脈内注射、または苦痛の部位での注射のためには、活性成分は、非経口的に受容可能な水溶液（これは、発熱物質を含まず、そして適切なｐＨ、等張性および安定性を有する）の形態である。当業者は、例えば、等張性ビヒクル（例えば、塩化ナトリウム注入剤、リンガー注入剤、乳酸加リンガー注入剤）を使用して、適切な溶液を調製することが十分に可能である。防腐剤、安定剤、緩衝剤、抗酸化剤、および／または他の添加剤が、必要に応じて含有され得る。

【０１６２】

組成物は、処置される状態に依存して、単独でかまたは他の処置、治療剤もしくは薬剤と組み合わせて、同時にかまたは連続してかのいずれかで、投与され得る。さらに、本発明は、本明細書中に記載される結合メンバー（特に、抗体またはそのフラグメント）、および他の薬剤または治療剤（例えば、抗癌剤もしくは治療剤、ホルモン、抗ＥＧＦＲ抗原もしくは抗体、または免疫調節因子）を含有する組成物を企図し、そして包含する。より一般的には、これらの抗癌剤は、チロシンキナーゼインヒビターまたはリン酸化カスケードインヒビター、翻訳後修飾因子、細胞増殖インヒビターまたは分裂インヒビター（例えば、抗有糸分裂薬）、あるいはシグナル伝達インヒビターであり得る。他の処置および治療としては、適切な用量の疼痛軽減薬物（例えば、非ステロイド系抗炎症薬物（例えば、アスピリン、パラセタモール、イブプロフェンもしくはケトプロフェン）またはモルヒネのようなアヘン剤）、あるいは制吐薬の投与が挙げられ得る。この組成物は、チロシンキナーゼインヒビター（ＡＧ１４７８およびＺＤ１８３９、ＳＴＩ５７１、ＯＳＩ－７７４、ＳＵ－６６６８が挙げられるが、これらに限定されない）、ドキソルビシン、テモゾロ

ミド、シスプラチン、カルボプラチン、ニトロソ尿素、プロカルバジン、ビンクリスチン、ヒドロキシ尿素、５－フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、エピポドフィロトキシン、カルムスチン、ロムスチン、および／または他の化学療法剤と組み合わせて（連続的に（すなわち、前もしくは後に）または同時にのいずれか）、投与され得る。従って、これらの薬剤は、抗ＥＦＧＲ特異的抗原、またはチロシンキナーゼインヒビター（例えば、ＡＧ１４７８、ＺＤ１８３９、ＳＴＩ５７１、ＯＳＩ－７７４、またはＳＵ－６６６８）であり得るか、あるいはより一般的な抗癌剤および抗腫瘍剤（例えば、ドキソルビシン、シスプラチン、テモゾロミド、ニトロソ尿素、プロカルバジン、ビンクリスチン、ヒドロキシ尿素、５－フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、エピポドフィロトキシン、カルムスチン、またはロムスチン）であり得る。さらに、この組成物は、デキサメタゾンのようなホルモン、インターロイキン、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）のような免疫調節因子、あるいは免疫応答および癌細胞もしくは腫瘍の減少または排除を刺激する他の増殖因子またはサイトカインと共に投与され得る。ＴＮＦのような免疫調節因子は、二重特異的抗体の形態で、本発明のメンバーと一緒に組み合わせられ、８０６ＥＧＦＲエピトープを認識し、そしてＴＮＦレセプターに結合し得る。この組成物はまた、他の抗ＥＧＦＲ抗体とともに投与され得るか、またはこの抗体との組み合わせを含有し得、この抗体としては、抗ＥＧＦＲ抗体５２８、２２５、ＳＣ－０３、ＤＲ８．３、Ｌ８Ａ４、Ｙ１０、ＩＣＲ６２およびＡＢＸ－ＥＧＦが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６３】

以前に、ドキソルビシンおよびシスプラチンのような薬剤の、抗ＥＧＦＲ抗体と組み合わせての使用は、増強された抗腫瘍活性を生じた（Ｆａｎら，１９９３；Ｂａｓｅｌｇａら，１９９３）。ドキソルビシンとｍＡｂ５２８との組合せは、樹立されたＡ４３１異種移植片の完全な根絶をもたらし、一方でいずれかの薬剤単独を用いる処置は、インビボでの増殖の阻害を一時的にのみ引き起こした（Ｂａｓｅｌｇａら、１９９３）。同様に、シスプラチンと、ｍＡｂ２８または２２５のいずれかとの組合せもまた、十分に樹立されたＡ４３１異種移植片の根絶をもたらし、これは、いずれかの薬剤を用いる処置が使用された場合には、観察されなかった（Ｆａｎら、１９９３）。

【０１６４】

（従来の放射線治療）

さらに、本発明は、従来の放射線治療と組み合わせた結合メンバーの使用のための、治療組成物を企図し、そして包含する。ＥＧＦレセプターを標的化する抗体を用いる処置は、従来の放射線治療の効果を増強し得ることが示されている（Ｍｉｌａｓら，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０００ Ｆｅｂ：６（２）：７０１ ８，Ｈｕａｎｇら，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０００ Ｊｕｎ：６（６）：２１６６ ７４）。

【０１６５】

本明細書中で実証されるように、本発明の結合メンバー（特に、抗体またはそのフラグメント、好ましくは、ｍＡｂ８０６、ｃｈ８０６またはそのフラグメント）と、抗癌治療剤（特に、抗ＥＧＦＲ治療剤であり、他の抗ＥＧＦＲ抗体を含む）との組合せは、異種移植された腫瘍に対する効果的な治療、および特に、相乗作用を示す。実施例において、ＡＧ１４７８とｍＡｂ８０６との組合せは、いずれかの薬剤単独での処置と比較して、有意に増強されたＡ４３１異種移植腫瘍体積の減少を生じることが実証される。ＡＧ１４７８（４－（３－クロロアニリノ）－６，７－ジメトキシキナゾリン）は、ＥＧＦレセプターキナーゼの強力かつ選択的なインヒビターであり、そして特に、米国特許第５，４５７，１０５号（その全体が本明細書中に参考として援用される）に記載されている（Ｌｉｕ，Ｗ．ら（１９９９）Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｓｃｉ．１１２：２４０９；Ｅｇｕｃｈｉ，Ｓ．ら（１９９８）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３：８８９０；Ｌｅｖｉｔｓｋｙ，Ａ．およびＧａｚｉｔ，Ａ．（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６７：１７８２もまた参照のこと）。本明細書の実施例は、８０６抗体の、他の抗ＥＧＦＲ抗体（特に、５２８抗ＥＧＦＲ抗体）との治療的相乗作用をさらに実証する。

【０１６６】
本発明は、本発明の治療方法を実施する際に有用な治療組成物をさらに企図する。本発明の治療組成物は、混合物中に、薬学的に受容可能な賦形剤（キャリア）、および活性成分として、本明細書中に記載されるような１種以上の特異的結合メンバー、そのポリペプチドアナログまたはそのフラグメントを含有する。好ましい実施形態において、この組成物は、本発明の結合メンバー／抗体の、標的細胞との特異的結合を調節し得る抗原を含有する。
【０１６７】
ポリペプチド、アナログまたは活性フラグメントを、活性成分として含有する治療組成物の調製は、当該分野において十分に理解されている。代表的に、このような組成物は、注射可能物（ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅ）（液体の溶液または懸濁液としてのいずれか）として調製される。しかし、注射の前に液体中の溶液または懸濁液に適切な固体形態もまた、調製され得る。この調製物はまた、乳化され得る。活性な治療剤成分は、しばしば、薬学的に受容可能でありかつその活性成分と適合性の賦形剤と混合される。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノールなど、およびこれらの組合せである。さらに、所望であれば、この組成物は、活性成分の有効性を増強する少量の補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝剤）を含有し得る。
【０１６８】
ポリペプチド、アナログまたは活性なフラグメントは、中和された、薬学的に受容可能な塩の形態で、治療組成物に処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、酸付加塩（ポリペプチドまたは抗体分子の遊離アミノ基と形成される）が挙げられ、そしてこれらは、無機酸（例えば、塩酸またはリン酸など）または有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など）と形成される。遊離カルボキシル基から形成される塩もまた、無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化鉄など）および有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなど）から誘導され得る。
【０１６９】
治療用のポリペプチド含有組成物、アナログ含有組成物または活性フラグメント含有組成物は、例えば、単位用量の注入によって静脈内に慣用的に投与される。本発明の治療用組成物に関して使用される場合、用語「単位用量」は、ヒトに対する単位投薬量として適切な物理的に別個の単位をいい、各単位は、必要とされる希釈剤（すなわち、キャリア、またはビヒクル）とともに、所望される治療効果を生じるように計算された、予め決められた量の活性物質を含む。
【０１７０】
この組成物は、投薬量処方物と適合可能な様式で、かつ治療有効量で投与される。投与される量は、処置される被験体（活性成分を利用するための被験体の免疫系の能力、および所望されるＥＦＧＲの結合能力の程度）に依存する。投与されるのに必要とされる活性成分の正確な量は、医者の判断に依存し、各個体に特有である。しかし、適切な投薬量は、１日に、個体の体重１ｋｇ当たり、約０．１ｍｇ～２０ｍｇ、好ましくは、約０．５ｍｇ～約１０ｍｇ、そしてより好ましくは、１ｍｇ～数ｍｇの活性成分の範囲であり得、そして投与の経路に依存し得る。初回の投与およびブースターショットのための適切なレジメンもまた変動し得るが、初回の投与後に、続く注射または他の投与により１時間以上の間隔を空けて投薬が繰り返されるのが典型的である。あるいは、血液中で１０ｎＭ～１０μＭの濃度を維持するのに十分な連続する静脈注入が、企図される。
【０１７１】
経口投与のための薬学的組成物は、錠剤形態、カプセル形態、粉末形態または液体形態であり得る。錠剤は、固体キャリア（例えば、ゼラチンまたはアジュバンド）を含み得る。液体の薬学的組成物は、一般に、液体キャリア（例えば、水、石油、動物油、植物油、鉱油、または合成油）を含む。生理食塩水溶液、デキストロース溶液もしくは他のサッカライド溶液、またはグリコール（例えば、エチレングリコール、プロピレングリコールまた

はポリエチレングリコール）が、含まれ得る。
【０１７２】
静脈内注射、または痛みのある部位での注射のために、活性成分が、発熱物質を含まず、かつ適切なｐＨ、等張性および安定性を有する、非経口的に受容可能な水溶液の形態である。当業者は、例えば、等張性ビヒクル（例えば、塩化ナトリウム注射液、リンガー液、乳酸加リンガー液）の使用に適切な溶液を十分に調製し得る。保存剤、安定剤、緩衝剤、抗酸化剤および／または他の添加剤が、必要な場合に、含まれ得る。
【０１７３】
（診断アッセイ）
本発明はまた、種々の診断適用（本発明の特定の結合メンバーによって認識されるそれらの能力を参照することにより、異常に発現したＥＧＦＲのような刺激物の存在を検出するための方法を含む）に関する。上記のように、このＥＧＦＲは、種々の公知の技術によって、抗体をそれ自体に産生するために使用され得、次いで、このような抗体は単離され、推定標的細胞中における特定のＥＧＦＲ活性の存在についての試験において利用され得る。
【０１７４】
本発明の特定の結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）の診断適用としては、当業者に周知かつ標準的であり、本明細書中の記載に基づく、インビボ適用およびインビトロ適用が挙げられる。（特に、ＥＧＦＲの異常な発現に関する）ＥＦＧＲ状態のインビトロ判定およびインビトロ評価のための、診断アッセイおよび診断キットは、癌、前癌状態、過剰増殖細胞の増殖に関連する状態を有していることが既知であるか、もしくはこれらの状態を有していると疑われるものを含む患者のサンプルまたは腫瘍サンプル由来のサンプルを判定、評価およびモニタリングするために利用され得る。ＥＧＦＲ判定の診断および評価はまた、薬物の臨床実験についての患者の適合性、または本発明の特定の化学療法剤もしくは特異的な結合メンバー（特に、抗体）（これらの組み合わせを含む）の投与についての患者の適合性を、異なる薬剤または結合メンバーに対して決定するのに有用である。このタイプの診断モニタリングおよび判定は、乳癌においてＨＥＲ２タンパク質に対する抗体を既に実際に利用しており（Ｈｅｒｃｅｐ　Ｔｅｓｔ，Ｄａｋｏ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、ここで、このアッセイをまた使用して、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎを利用する抗体療法のために患者を評価する。インビトロ適用としては、腫瘍の画像化または個体の癌の状態の評価（放射線画像化を含む）が挙げられる。
【０１７５】
上記で示唆したように、本発明の診断方法は、ＥＦＧＲ／タンパク質に対する有効量のアンタゴニスト（例えば、抗－ＥＦＧＲ抗体、好ましくは、親和性により精製されたポリクローナル抗体、そしてより好ましくは、ｍＡｂ）を含むアッセイ手段によって、細胞サンプルまたは培地を試験する工程を包含する。さらに、本明細書中で使用される抗－ＥＦＧＲ抗体分子が、Ｆａｂ部分、Ｆａｂ’部分、Ｆ（ａｂ’）$_2$部分、もしくはＦ（ｖ）部分、または抗体分子全体の形態であることが、好ましい。上記で議論されるように、この方法から利益を受け得る患者としては、癌、前癌病変、ウイルス感染、過剰増殖細胞の増殖もしくは他の同様の病理的障害に関連するかもしくはこれにより生じる病理、を患っている患者が挙げられる。ＥＦＧＲを単離して、抗ＥＦＧＲ抗体を誘導するための方法、ならびに標的細胞の試験を補助する抗ＥＦＧＲ抗体の能力を決定および最適化するための方法は、全て、当該分野で周知である。
【０１７６】
好ましくは、本発明の診断方法において使用される抗ＥＦＧＲ抗体は、親和性により精製されたポリクローナル抗体である。より好ましくは、この抗体は、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）である。さらに、本明細書中で使用される抗ＥＦＧＲ抗体分子は、Ｆａｂ部分、Ｆａｂ’部分、Ｆ（ａｂ’）$_2$部分、もしくはＦ（ｖ）部分、または抗体分子全体の形態であり得る。
【０１７７】

上記で詳細に議論されているように、ＥＧＦＲに対する抗体は、周知のハイブリドーマ技術を含む標準的な方法によって産生および単離され得る。便宜のために、ＥＧＦＲに対する抗体は、本明細書中で、Ab_1と呼ばれ、そして別の種において惹起される抗体をAb_2と呼ぶ。

【０１７８】

細胞中でのＥＧＦＲの存在は、このような決定に対して適切な、通常のインビトロ免疫学的手順またはインビボ免疫学的手順によって確認され得る。多数の有用な手順が、公知である。特に有用であるこのような３つの手順は、検出可能な標識で標識されたＥＧＦＲ、検出可能なレベルで標識された抗体Ab_1、または検出可能な標識で標識された抗体Ab_2のいずれかを利用する。この手順は、以下の式によって要約され得、ここでこのアスタリスクは、この粒子が標識されていることを示し、「Ｒ」は、ＥＧＦＲを表す：

Ａ．$R^{*}+Ab_1=R^{*}Ab_1$

Ｂ．$R+Ab^{*}=RAb_1^{*}$

Ｃ．$R+Ab_1+Ab_2^{*}=RAb_1Ab_2^{*}$。

【０１７９】

この手順およびそれらの適用は、当業者に全て熟知されており、従って、本発明の範囲内で利用され得る。この「競合」手順（手順Ａ）は、米国特許第３，６５４，０９０号および同第３，８５０，７５２号において記載されている。手順Ｃ（サンドイッチ手順）は、米国特許ＲＥ３１，００６号および同第４，０１６，０４３号に記載されている。「二重抗体」または「ＤＡＳＰ」手順のような、さらに別の手順が公知である。

【０１８０】

上記の各場合において、ＥＧＦＲは、１種以上の抗体または結合パートナーとの複合体を形成し、その複合体の１つのメンバーは、検出可能な標識で標識される。複合体が形成されるという事実、および所望の場合、その量が、標識の検出に適用可能な公知の方法によって決定され得る。

【０１８１】

Ab_2の特徴のある特性は、Ab_2がAb_1と反応することであるということが、上記から理解される。これは、ある哺乳動物種において惹起されるAb_1が、抗体Ab_2を惹起するために、抗原として別の種において使用されているからである。例えば、Ab_2は、ヤギにおいて、抗原としてウサギの抗体を使用して惹起され得る。従って、Ab_2は、ヤギにおいて惹起される抗ウサギ抗体である。この記載および特許請求の範囲の目的のために、Ab_1は、一次抗体または抗ＥＧＦＲ抗体をいい、そしてAb_2は、二次抗体または抗Ab_1抗体をいう。

【０１８２】

これらの研究のために最も一般的に使用される標識は、放射性元素、酵素、紫外線に曝露した場合に蛍光を発する化学物質などである。多数の蛍光物質が公知であり、そして標識として利用され得る。これらには、例えば、フルオレセイン、ローダミン、オーラミン、Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ、ＡＭＣＡブルーおよびＬｕｃｉｆｅｒイエローが挙げられる。特定の検出物質は、ヤギにおいて調製される抗ウサギ抗体であり、そしてイソチオシアネートを介してフルオレセインと結合体化される。

【０１８３】

ＥＧＦＲまたはその結合パートナー（例えば、本発明の特異的な結合メンバー）はまた、放射性元素または酵素により標識され得る。この放射性標識は、現在利用可能な計数手順のいずれかによって検出され得る。好ましい同位体は、^{3}H、^{14}C、^{32}P、^{35}S、^{36}Cl、^{51}Cr、^{57}Co、^{58}Co、^{59}Fe、^{90}Y、^{121}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I、^{111}In、^{211}At、^{198}Au、^{67}Cu、^{225}Ac、^{213}Bi、^{225}Ac、^{213}Bi、^{99}Tcおよび^{186}Reから選択され得る。

【０１８４】

酵素標識は、同様に有用であり、そして現在利用されている，比色技術、分光測光技術、蛍光分光測光技術、電流測定技術または気体定量技術によって検出され得る。この酵素は

、架橋分子（例えば、カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒドなど）との反応によって選択粒子に結合体化される。これらの手順において使用され得る多くの酵素は、公知であり、そして利用され得る。ペルオキシダーゼ、β－グルクロニダーゼ、β－Ｄ－グルコシダーゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ＋ペルオキシダーゼ、およびアルカリホスファターゼが、好ましい。米国特許第３，６５４，０９０号；同第３，８５０，７５２号；および同第４，０１６，０４３号には、代替の標識物質および標識方法の開示が、例示の目的で言及されている。

【０１８５】

本発明に従って有利に利用され得る特定のアッセイシステムは、レセプターアッセイとして公知である。レセプターアッセイにおいて、特異的な結合メンバーのようなアッセイされる物質が、適切に標識され、次いで、特定の細胞試験コロニーに、一定量の標識された物質および標識されていない物質の両方とともに播種し、この後、結合研究を、標識された物質が細胞レセプターに結合する程度を決定するために行う。この方法において、物質間の親和性の差を、確認し得る。

【０１８６】

従って、精製した量の特異的な結合メンバーを、放射標識し得、例えば、このメンバーに対する抗体または他のインヒビターと合わせ得、この後、結合研究を実施する。次いで、一定の量の、標識された未結合の特異的結合メンバーおよび標識されていない未結合の特異的結合メンバーを含む溶液を調製し、次いで、細胞サンプルを播種し、そしてその後、インキュベートする。次いで、得られた細胞の単層を洗浄し、溶解し、次いで十分な時間をかけてγ線計数器で計数し、５％未満の標準誤差を得た。次いで、これらのデータを、Ｓｃａｔｃｈａｒｄ分析に供し、その後、物質の活性に関する観察および結果が得られ得る。上記は、例示であるが、レセプターアッセイが実施され得、そして利用され得る様式を例示し、この場合、アッセイされる材料の細胞結合能は、区別可能な特性として役立ち得る。

【０１８７】

本発明に従って有用であり、そして企図されるアッセイは、「シス／トランス」アッセイとして公知である。簡単には、このアッセイは、２種類の遺伝子構造を利用する、その一方は、代表的に、適切な細胞株中にトランスフェクトされた場合に、目的の特定のレセプターを構成的に発現するプラスミドであり、そしてその２番目は、レセプター／リガンド複合体の制御下で、ルシフェラーゼのようなレポーターを発現するプラスミドである。従って、例えば、特定のレセプターに対するリガンドとして化合物を評価することが所望される場合、そのプラスミドの一方は、選択された細胞株中でレセプターの発現を生じる構築物であるが、この２番目のプラスミドは、特定のレセプターに対する応答エレメントが挿入されている、ルシフェラーゼ遺伝子に連結されたプロモーターを有する。試験において化合物が、レセプターに対するアゴニストである場合、このリガンドは、レセプターとの複合体を形成し、そして得られた複合体は、応答エレメントに結合し、そしてルシフェラーゼ遺伝子の転写を開始する。次いで、得られた化学発光を、測光法により測定し、そして用量応答曲線を得、そして公知のリガンドの用量応答曲線と比較する。上記のプロトコールは、米国特許第４，９８１，７８４号およびＰＣＴ国際公開番号ＷＯ８８／０３１６８号（当業者がその目的について参照する）において詳細に記載されている。

【０１８８】

本発明のさらなる実施形態において、医療専門家による使用に適した市販の試験キットが、ＥＧＦＲの異常な発現（推定される標的細胞中における、増幅されたＥＧＦＲおよび／またはＥＧＦＲの変異が挙げられるが、これらに限定されない）の存在または非存在を決定するために調製され得る。上記で議論した試験技術に従って、このようなキットの一つのクラスは、少なくとも標識されたＥＧＦＲまたはその結合パートナー（例えば、このＥＧＦＲに特異的な抗体）、および指示書を含み、当然、この指示書は、選択される方法（例えば、「競合」、「サンドイッチ」、「ＤＡＳＰ」など）に依存する。このキットはまた、周辺的な試薬（例えば、緩衝液、安定剤など）も含むみ得る。

【０１８９】
従って、試験キットは、ＥＧＦＲの存在、またはＥＧＦＲの異常な発現または翻訳後の改変に関する細胞の能力を実証するために調製され得、このキットは、以下：
（ａ）本発明の特異的な結合メンバーまたはそれに対する特異的な結合パートナーを、検出可能なラベルに直接的または間接的に結合させることによって得られる、予め決められた量の少なくとも１種の標識された免疫学的反応成分；
（ｂ）他の試薬；および
（ｃ）上記キットの使用のための指示書、
を含む。
【０１９０】
より具体的に、診断用試験キットは、以下：
（ａ）一般に固相に結合して、イムノソルベントを形成するか、あるいは最終産物などのような適切なタグ（または、それらの結合パートナー）に結合する、上記のような公知の量の特異的な結合メンバー（または結合パートナー）
（ｂ）必要な場合、他の試薬；および
（ｃ）上記試験キットの使用のための指示書、
を含む。
【０１９１】
さらなるバリエーションにおいて、この試験キットは、上述の目的のために調製および使用され得、これは、予め決められたプロトコール（例えば、「競合」、「サンドイッチ」、「二重抗体」など）に従って操作され、このキットは、以下：
（ａ）特異的な結合メンバーを検出可能なラベルにカップリングすることによって得られた、標識された成分；
（ｂ）少なくとも１種の試薬が、リガンドまたは固定リガンドである、１種以上のさらなる免疫化学的試薬；および
（ｃ）ＥＦＧＲとＥＦＧＲに対する特異的な結合メンバーとＥＦＧＲに対する特異的な結合パートナーとの間の免疫化学的反応の１つ以上の成分を検出および／または測定するためのプロトコールの実施のための指示書、
を含むキットであって、このリガンドは、以下：
（ｉ）標識された成分（ａ）と結合し得るリガンド；
（ｉｉ）標識された成分（ａ）の結合パートナーと結合し得るリガンド；
（ｉｉｉ）測定される、成分の少なくとも１種と結合し得るリガンド；および
（ｉｖ）測定される、少なくとも１種の成分の結合パートナーの少なくとも１種と結合し得るリガンド、
からなる群から選択される。
【０１９２】
上記に従って、ＥＦＧＲの活性、ＥＦＧＲの異常な発現もしくは翻訳後の改変、および／または特異的な結合メンバーの活性もしくは結合を調節するのに有効な、潜在的な薬物をスクリーニングするためのアッセイシステムが、調製され得る。このレセプターまたは結合メンバーは、試験システムに導入され得、そしてこの推定薬物がまた、得られた細胞培養物中に導入され得、そしてその後、この培養物を、推定薬物単独の添加か、または公知の薬剤の追加量の効果のいずれかに起因する、細胞のＳ期活性におけるいかなる変化も観察するために試験され得る。
【０１９３】
（核酸）
本発明は、本発明の特異的な結合メンバーをコードする、単離された核酸を提供する。核酸は、ＤＮＡおよびＲＮＡを含有する。好ましい局面において、本発明は、上に定義されるような本発明のポリペプチドをコードする核酸を提供し、これには、以下が挙げられる：配列番号２の残基９３～１０２または配列番号２の２６～３５Ａ、４９～６４および９３～１０２として記載されるようなポリペプチド、配列番号４の残基２４～３４、５０～

５６および８９～９７として記載されるようなポリペプチド、ならびに配列番号２および配列番号４のポリペプチド全体。

【０１９４】

本発明はまた、上記のような少なくとも１種のポリヌクレオチドを含む、プラスミド、ベクター、転写カセットまたは発現カセットの形態の構築物を提供する。

【０１９５】

本発明はまた、上記のような１種以上の構築物を含む、組換え宿主細胞を提供する。それ自体が提供される、任意の特異的な結合メンバーをコードする核酸は、特異的な結合メンバーの産生方法を同様に、本発明の局面を形成し、この方法は、コードする核酸からの発現を含む。発現は、適切な条件下で、核酸を含む組換え宿主細胞を培養することによって簡便に達成され得る。発現による産生後に、特異的結合メンバーは、任意の適切な技術を使用して単離および／または精製され得、次いで適切に使用され得る。

【０１９６】

本発明に従う、特異的結合メンバーならびにコードする核酸分子およびベクターを、例えば、それらの天然の環境から、実質的に純粋な形態もしくは均質な形態で単離および／または精製して提供し得、あるいは核酸の場合において、これらの特異的結合メンバーならびにコードする核酸分子およびベクターは、必要とされる機能を有するポリペプチドをコードする配列以外の核酸または遺伝子起源を、含まないか、または実質的に含まないものであり得る。本発明に従う核酸は、ＤＮＡまたはＲＮＡを含み得、そして全体的または部分的に合成され得る。

【０１９７】

種々の異なる宿主細胞において、ポリペプチドのクローニングおよび発現系は、周知である。適切な宿主細胞としては、細菌、哺乳動物細胞、酵母、およびバキュロウイルス系が挙げられる。異種ポリペプチドの発現のために当該分野で利用可能な哺乳動物の細胞株としては、チャイニーズハムスターの卵巣細胞、ＨｅＬａ細胞、乳児ハムスターの腎臓細胞、ＮＳＯマウス黒色腫細胞および他に多くが挙げられる。一般に、好ましい細菌の宿主は、Ｅ．ｃｏｌｉである。

【０１９８】

原核生物細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）における抗体および抗体フラグメントの発現は、当該分野で十分に確立されている。総説として、例えば、Ｐｌｕｅｃｋｔｈｕｍ，Ａ．Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９：５４５－５５１（１９９１）を参照のこと。培養物中での真核生物細胞の発現はまた、特異的結合メンバーの産生に関する選択肢として当業者に利用可能であり、最近の総説として、例えば、Ｒａｆｆ，Ｍ．Ｅ．（１９９３）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．４：５７３－５７６；Ｔｒｉｌｌ　Ｊ．Ｊ．ら（１９９５）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　６：５５３－５６０を参照のこと。

【０１９９】

適切な調節配列を含む適切なベクターが、選択または構築され得、この調節配列としては、適切な場合、プロモーター配列、末端配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子および他の配列が挙げられる。ベクターは、適切な場合、プラスミド、ウイルス（例えば、ファージまたはファージミド）であり得る。さらに詳細に、例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ：第２版、Ｓａｍｂｒｏｏｋら，１９８９，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓを参照のこと。核酸の操作（核酸構築物の調製、変異誘発、配列決定、ＤＮＡの細胞中への導入および遺伝子の発現、ならびにタンパク質の分析）のための多くの公知の技術およびプロトコールは、Ｓｈｏｒｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，第２版，Ａｕｓｕｂｅｌら編，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，１９９２に詳細に記載されている。ＳａｍｂｒｏｏｋらおよびＡｕｓｂｅｌらの開示は、本明細書中で参考として援用されている。

【０２００】

従って、本発明のさらなる局面は、本明細書中に開示されるような核酸を含む宿主細胞を提供する。なおさらなる局面は、このような核酸を宿主細胞に導入する工程を包含する方法を提供する。この導入は、任意の利用可能な技術を利用し得る。適切な技術としては、真核生物細胞に関して、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ－Ｄｅｘｔｒａｎ、エレクトロポレーション、リポソーム媒介トランスフェクション、およびレトロウイルスまたは他のウイルス（例えば、ワクシニアウイルス）が挙げられ得、あるいは昆虫細胞に関して、バキュロウイルスが挙げられ得る。細菌細胞に関して、適切な技術は、塩化カルシウム形質転換、エレクトロボレーション、およびバクテリオファージを使用するトランスフェクションが挙げられ得る。

【０２０１】

この導入の後に、例えば、遺伝子の発現のための条件下で宿主細胞を培養することによって、核酸から発現を引き起こすか、または核酸からの発現を可能にすることが続き得る。

【０２０２】

一つの実施形態において、本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム（例えば、染色体）中に組み込まれる。組込みは、標準的な技術に従って、ゲノムとの組換えを促進する配列を包含することによって促進され得る。

【０２０３】

本発明はまた、上記の特異的結合メンバーまたはポリペプチドを発現させるための発現系において上述の構築物を使用する工程を包含する方法を提供する。

【０２０４】

上述のように、本発明はまた、配列番号２および／または配列番号４に記載のアミノ酸配列を有する、特異的結合メンバー、特に抗体またはそのフラグメントをコードする、組換えＤＮＡ分子もしくはクローン化された遺伝子、またはその縮重改変体に関し；好ましくは、この結合メンバーまたは抗体をコードする核酸分子、特に組換えＤＮＡ分子またはクローン化された遺伝子は、配列番号１および／もしくは配列番号３に提供されるヌクレオチド配列を有するかまたは配列番号１および／もしくは配列番号３に提供されるＤＮＡ配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する。

【０２０５】

本発明の別の特徴は、本明細書中に開示されるＤＮＡ配列の発現である。当該分野で周知のように、ＤＮＡ配列は、適切な発現ベクター中の発現制御配列にそれらを作動可能に連結し、そしてその発現ベクターを使用して適切な単細胞宿主を形質転換することにより発現され得る。

【０２０６】

発現制御配列への、本発明のＤＮＡ配列のこのような作動可能な連結は、当然のことながら、既にそのＤＮＡ配列の一部でない場合は、そのＤＮＡ配列の上流の正しいリーディングフレームに開始コドンＡＴＧを準備することを含む。

【０２０７】

広範な種々の宿主／発現ベクターの組み合わせが、本発明のＤＮＡ配列を発現させる際に使用され得る。例えば、有用な発現ベクターは、染色体ＤＮＡ配列、非染色体ＤＮＡ配列および合成ＤＮＡ配列のセグメントから構成され得る。適切なベクターとしては、以下が挙げられる：ＳＶ４０の誘導体および公知の細菌プラスミド（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉプラスミドｃｏｌ　Ｅｌ、ｐＣＲｌ、ｐＢＲ３２２、ｐＭＢ９およびそれらの誘導体、ＲＰ４のようなプラスミド）；ファージＤＮＡ（例えば、ファージλの多数の誘導体（例えば、ＮＭ９８９）および他のファージＤＮＡ（例えば、Ｍ１３））ならびに線状一本鎖ファージＤＮＡ；２μプラスミドのような酵母プラスミドまたはその誘導体；真核生物細胞において有用なベクター（例えば、昆虫細胞または哺乳動物細胞において有用なベクター）；プラスミドおよびファージＤＮＡの組み合わせに由来するベクター（例えば、ファージＤＮＡまたは他の発現制御配列を使用するように改変されたプラスミド）；など。

【０２０８】

任意の広範な種々の発現制御配列（その配列に作動可能に連結されたＤＮＡ配列の発現を

制御する配列）は、本発明のＤＮＡ配列を発現させるためにこれらのベクターにおいて使用され得る。このような有用な発現制御配列としては、例えば、ＳＶ４０、ＣＭＶ、ワクシニア、ポリオーマまたはアデノウイルスの初期プロモーターもしくは後期プロモーター、ｌａｃ系、ｔｒｐ系、ＴＡＣ系、ＴＲＣ系、ＬＴＲ系、ファージλの主要オペレーター領域およびプロモーター領域、ｆｄコートタンパク質の制御領域、３－ホスホグリセレートキナーゼもしくは他の解糖酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼ（例えば、Ｐｈｏ５）のプロモーター、酵母接合因子のプロモーター、ならびに原核生物細胞もしくは真核生物細胞またはそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが公知の他の配列、およびこれらの組合せが挙げられる。

【０２０９】

広範な種々の単細胞宿主細胞はまた、本発明のＤＮＡ配列を発現する際に有用である。これらの宿主としては、以下が挙げられ得る：周知の真核生物宿主および原核生物宿主（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓの株）、真菌（例えば、酵母）、ならびに動物細胞（例えば、ＣＨＯ細胞、ＹＢ／２０細胞、ＮＳＯ細胞、ＳＰ２／０細胞、Ｒ１．１細胞、Ｂ－Ｗ細胞、およびＬ－Ｍ細胞）、アフリカミドリザル腎臓細胞（例えば、ＣＯＳ　１、ＣＯＳ　７、ＢＳＣ１、ＢＳＣ４０、およびＢＭＴ１０）、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９）、ならびに組織培養物中のヒト細胞および植物細胞。

【０２１０】

全てのベクター、発現制御配列および宿主が、本発明のＤＮＡ配列を発現するように等しく十分に機能するのではないことが理解される。また、全ての宿主が、同じ発現系で等しく十分に機能するわけでもない。しかし、当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、所望の発現を達成するために過度の実験をすることなく、適切なベクター、発現制御配列、および宿主を選択することができる。例えば、ベクターを選択する際に、ベクターが宿主において機能しなければならないので、その宿主を考慮しなければならない。ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、およびそのベクターによりコードされる任意の他のタンパク質（例えば、抗生物質マーカー）の発現もまた考慮される。

【０２１１】

発現制御配列を選択する際に、種々の因子が、通常考慮される。これらとしては、例えば、その系の相対的強度、その制御可能性、および、特に潜在的２次構造に関して、発現される特定のＤＮＡ配列または遺伝子との適合性が挙げられる。適切な単細胞宿主は、以下を考慮することにより選択される：例えば、選択されたベクターとのそれらの適合性、それらの分泌特徴、タンパク質を正確に折り畳むそれらの能力、およびそれらの発酵要件、ならびに発現されるＤＮＡ配列によりコードされる産物の宿主に対する毒性、および発現産物の精製の容易さ。

【０２１２】

これらおよび他の因子を考慮して、当業者は、発酵または大規模動物培養において本発明のＤＮＡ配列を発現する、種々のベクター／発現制御配列／宿主の組合せを構築し得る。

【０２１３】

特異的結合メンバーのアナログが、本発明の範囲内において、タンパク質複合体／由来するサブユニットのヌクレオチド配列から調製され得ることがさらに意図される。フラグメントのようなアナログは、例えば、特異的結合メンバー材料のペプシン消化により生成され得る。ムテインのような他のアナログは、特異的結合メンバーのコード配列の標準的な部位特異的変異誘発により生成され得る。プロモーターまたはインヒビターのどちらとして機能しても、低分子のような「特異的結合メンバー活性」を示すアナログは、公知のインビボアッセイおよび／またはインビトロアッセイにより同定され得る。

【０２１４】

上述のように、特異的結合メンバーをコードするＤＮＡ配列は、クローニングよりも合成により調製され得る。特異的結合メンバーアミノ酸配列についての適切なコドンを有するＤＮＡ配列が、設計され得る。一般的に、配列が発現に使用される場合、意図される宿主

について好ましいコドンを選択する。完全な配列は、標準的な方法により調製される重複しているオリゴヌクレオチドから組み立てられ、そして完全なコード配列へと組み立てられる。例えば、Ｅｄｇｅ，Ｎａｔｕｒｅ，２９２：７５６（１９８１）；Ｎａｍｂａｉｒら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２３：１２９９（１９８４）；Ｊａｙら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２５９：６３１１（１９８４）を参照のこと。

【０２１５】

合成ＤＮＡ配列は、特異的結合メンバーのアナログまたは「ムテイン」を発現する遺伝子の都合の良い構築を可能にする。あるいは、ムテインをコードするＤＮＡは、ネイティブ特異的結合メンバー遺伝子またはｃＤＮＡの部位特異的変異誘発により作製され得、そしてムテインは、従来のポリペプチド合成を使用して直接作製され得る。

【０２１６】

タンパク質への非天然アミノ酸の部位特異的組込みのための一般的な方法は、Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒ Ｊ．Ｎｏｒｅｎ，Ｓｐｅｎｃｅｒ Ｊ．Ａｎｔｈｏｎｙ－Ｃａｈｉｌｌ，Ｍｉｃｈａｅｌ Ｃ．Ｇｒｉｆｆｉｔｈ，Ｐｅｔｅｒ Ｇ．Ｓｃｈｕｌｔｚ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４４：１８２－１８８（１９８９年４月）に記載されている。この方法は、非天然アミノ酸を有するアナログを生成するために使用され得る。

【０２１７】

本発明は、翻訳レベルにおいてＥＧＦＲの発現を妨害するために使用され得る、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムの調製に及ぶ。このアプローチは、アンチセンス核酸を有する特異的ｍＲＮＡをマスクするかまたはそれをリボザイムで切断することのいずれかにより、そのｍＲＮＡの翻訳をブロックするために、アンチセンス核酸およびリボザイムを利用する。

【０２１８】

アンチセンス核酸は、特定のｍＲＮＡ分子の少なくとも一部に対して相補的であるＤＮＡ分子またはＲＮＡ分子である。（Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，１９９０；Ｍａｒｃｕｓ－Ｓｅｋｕｒａ，１９８８を参照のこと。）細胞において、アンチセンス核酸は、そのｍＲＮＡにハイブリダイズし、二本鎖分子を形成する。この細胞は、この二本鎖形態のｍＲＮＡを翻訳しない。従って、アンチセンス核酸は、ｍＲＮＡのタンパク質への発現を妨害する。約１５個のヌクレオチドのオリゴマーおよびＡＵＧ開始コドンにハイブリダイズする分子は、特に有効である。なぜなら、これらは、合成が容易であり、そしてこれらを産生細胞中に導入する場合に、より大きな分子よりも引き起こす問題が少ないようであるからである。アンチセンス法は、多くの遺伝子のインビトロでの発現を阻害するために使用されている（Ｍａｒｃｕｓ－Ｓｅｋｕｒａ，１９８８；Ｈａｍｂｏｒら，１９８８）。

【０２１９】

リボザイムは、ＤＮＡ制限エンドヌクレアーゼといくらか類似した様式で、他の一本鎖ＲＮＡ分子を特異的に切断する能力を有するＲＮＡ分子である。リボザイムは、特定のｍＲＮＡが、それ自身のイントロンを切除する能力を有するという知見から発見された。これらのＲＮＡのヌクレオチド配列を改変することにより、研究者らは、ＲＮＡ分子中の特定のヌクレオチド配列を認識して、かつそれを切断する分子を操作することができた（Ｃｅｃｈ，１９８８）。これらは配列特異的であるので、特定の配列を有するｍＲＮＡのみが、不活化される。

【０２２０】

研究者らは、２つの型のリボザイム、Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ型および「ハンマーヘッド」型を同定した。（ＨａｓｓｅｌｈｏｆｆおよびＧｅｒｌａｃｈ，１９８８）。Ｔｅｔｒａｈｙｍｅｎａ型リボザイムは、４塩基の配列を認識するが、一方「ハンマーヘッド」型は、１１～１８の塩基の配列を認識する。認識配列が長いほど、排他的に標的ｍＲＮＡ種において起こる可能性が高くなる。したがって、ハンマーヘッド型リボザイムは、特定のｍＲＮＡ種を不活化するためにＴｅｔｒａｈｙｍｅｎａ型リボザイムより望ましく、そして１８個の塩基の認識配列は、より短い認識配列よりも望ましい。

【０２２１】

従って、本明細書中に記載されるＤＮＡ配列を使用して、ＥＦＧＲおよびそのリガンドのｍＲＮＡに対するアンチセンス分子、およびこのｍＲＮＡを切断するリボザイムを調製し得る。

【０２２２】

本発明は、本発明の例示として提供される以下の非限定的な実施例を参照することによりよりよく理解され得る。以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態をより完全に例示するために示されるが、いかなる場合も本発明の広い範囲を限定するとは解釈するべきではない。

【実施例】

【０２２３】

（実施例１）

（抗体の単離）

材料

（細胞株）

免疫化および特異性分析のために、ネイティブか、あるいは正常、野生型または「ｗｔＥＧＦＲ」遺伝子もしくはΔ２－７欠失変異を有するΔＥＧＦＲ遺伝子でトランスフェクトされたいくつかの細胞株が使用された：マウス線維芽細胞株ＮＲ６、ＮＲ６$_{\Delta EGFR}$（ΔＥＧＦＲでトランスフェクトされた）およびＮＲ６$_{wtEGFR}$（ｗｔＥＧＦＲでトランスフェクトされた）、ヒト神経膠芽細胞腫細胞株Ｕ８７ＭＧ（低レベルの内因性ｗｔＥＧＦＲを発現する）、Ｕ８７ＭＧ$_{wtEGFR}$（ｗｔＥＧＦＲでトランスフェクトされた）、Ｕ８７ＭＧ$_{\Delta EGFR}$（ΔＥＧＦＲでトランスフェクトされた）、およびヒト扁平上皮癌細胞株Ａ４３１（高レベルのｗｔＥＧＦＲを発現する）［３８］である。細胞株およびトランスフェクションは、以前に記載された（Ｎｉｓｈｉｋａｗａ　Ｒ．，ら（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９１（１６）：７７２７－７７３１）。

【０２２４】

Ｕ８７ＭＧ星状細胞腫細胞株（２０）（内因的に低レベルのｗｔＥＧＦＲを発現する）を、ｄｅ２－７ＥＧＦＲを含有するレトロウイルスに感染させて、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞株を産生した（１０）。トランスフェクトされた細胞株Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲを、Ｎａｇａｎｅら１９９６（Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，５６：５０７９－５０８６）に記載されるように生成した。Ｕ８７ＭＧ細胞は、約1×10^{5}個のＥＧＦＲを発現するが、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞は、約1×10^{6}個のＥＧＦＲを発現し、従って遺伝子増幅で見られる状況を模倣する。

【０２２５】

ヒト扁平上皮癌Ａ４３１細胞を、ＡＴＣＣ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）から入手した。全ての細胞株を、１０％ＦＣＳ（ＣＳＬ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸ^{TM}（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を含むＤＭＥＭ／Ｆ－１２中で培養した。

【０２２６】

（試薬）

ｄｅ２－７　ＥＧＦＲからのビオチン化した特有の接合部（ｊｕｎｃｔｉｏｎａｌ）ペプチド（ビオチン－ＬＥＥＫＫＧＮＹＶＶＴＤＨ（配列番号５）およびＬＥＥＫＫＧＮＹＶＶＴＤＨ－ビオチン（配列番号６））を、標準的なＦｍｏｃ化学により合成し、純度（＞９６％）を、逆相ＨＰＬＣおよび質量スペクトル分析（Ａｕｓｐｅｐ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）により決定した。

【０２２７】

（研究で使用される抗体）

本発明者らの発見を他の試薬と比較するために、さらなるｍＡｂを、本発明者らの研究に含めた。これらの試薬は、ｗｔＥＧＦＲに対するｍＡｂ５２８（Ｓａｔｏ，Ｊ．Ｄ．ら（１９８３）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．１（５）：５１１－５２９）、およびΔ２－７ＥＧＦＲ欠失変異の接合部配列にわたる合成ペプチドに対して生成されたＤＨ８．３であ

る。このＤＨ８．３抗体（ＩｇＧ１）は、以前に記載されており（Ｈｉｌｌｓら，１９９５，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　６３（４）；５３７－５４３）、そしてｄｅ２－７　ＥＧＦＲにおいて見出される特有の接合部ペプチドを用いてマウスを免疫化した後に得られた（１６）。この５２８抗体（ｄｅ２－７および野生型ＥＧＦＲの両方を認識する）は、以前に記載されており（２１）、そしてＡＴＣＣ　ＨＢ－８５０９から得られるハイブリドーマを使用して、Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ（Ｌｕｄｗｉｇ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ）において生成された。ＳＣ－０３は、ＥＧＦＲのカルボキシ末端ペプチドに対して惹起され、アフィニティ精製されたウサギポリクローナル抗体である（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｃ．）。

【０２２８】

（モノクローナル抗体の作製）

マウス線維芽細胞株ＮＲ６$_{\Delta EGFR}$を免疫原として使用した。マウスハイブリドーマを、アジュバント中に５×１０^{5}～２×１０^{6}個の細胞で、皮下に２～３週間の間隔で５回ＢＡＬＢ／ｃマウスを免疫することにより作製した。完全フロイントアジュバントを、第１の注射に使用した。その後、不完全フロイントアジュバント（Ｄｉｆｃｏ）を使用した。免疫したマウス由来の脾臓細胞を、マウス骨髄腫細胞株ＳＰ２／０と融合させた。新しく作製したクローンの上清を、細胞株ＮＲ６、ＮＲ６$_{wtEGFR}$、およびＮＲ６$_{\Delta EGFR}$との反応性について血球吸着アッセイでスクリーニングし、次いでヒト神経膠芽細胞株Ｕ８７ＭＧ、Ｕ８７ＭＧ$_{wtEGFR}$、およびＵ８７ＭＧ$_{\Delta EGFR}$を用いる血球吸着アッセイにより分析した。選択されたハイブリドーマ上清を、続けてウエスタンブロットにより試験し、そして免疫組織化学によりさらに分析した。予測された反応性パターンを示す新しく生成されたｍＡｂを、精製した。

【０２２９】

５つのハイブリドーマを樹立し、そして、３つのクローン１２４（ＩｇＧ２ａ）、８０６（ＩｇＧ２ｂ）および１１３３（ＩｇＧ２ａ）を、血球凝集アッセイにおけるＮＲ６$_{\Delta EGFR}$の高い力価およびＮＲ６細胞およびＮＲ６$_{wtEGFR}$細胞における低いバックグランドに基づいて、さらなる特徴付けのために選択した。その後の血球凝集分析において、これらの抗体は、ネイティブヒト神経膠芽細胞腫細胞株Ｕ８７ＭＧおよびＵ８７ＭＧ$_{wtEGFR}$とに反応性を示さなかった（希釈していない上清で≦１０％）が、Ｕ８７ＭＧ$_{\Delta EGFR}$とは強い反応性であり；Ａ４３１とのより低い反応性が見られた。対照的に、ＦＡＣＳ分析において、８０６は、ネイティブＵ８７ＭＧと非反応性であり、そしてＵ８７ＭＧ$_{\Delta EGFR}$を強く染色し、そしてより低い程度でＵ８７ＭＧ$_{wtEGFR}$を染色し、このことは、ΔＥＧＦＲおよびｗｔＥＧＦＲの両方への８０６の結合を示す（以下を参照のこと）。

【０２３０】

ウエスタンブロットアッセイにおいて、次いで、ｍＡｂ１２４、ｍＡｂ８０６およびｍＡｂ１１３３を、ｗｔＥＧＦＲおよびΔＥＧＦＲとの反応性について分析した。界面活性剤溶解物を、ＮＲ６$_{\Delta EGFR}$、Ｕ８７ＭＧ$_{\Delta EGFR}$およびＡ４３１から抽出した。３つのｍＡｂ全てが、細胞溶解物との類似した反応性パターンを示し、ｗｔＥＧＦＲタンパク質（１７０ｋＤａ）およびΔＥＧＦＲタンパク質（１４０ｋＤａ）の両方を染色した。基準試薬として、ｗｔＥＧＦＲと反応性であることが既知（Ｗａｔｅｒｆｉｅｌｄ　Ｍ．Ｄ．　ら（１９８２）Ｊ．Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．２０（２）：１４９－１６１）のｍＡｂ　Ｒ．Ｉを、ウエスタンブロット分析において非反応性であることが既知のｍＡｂ　５２８の代わりに使用した。Ｍａｂ　Ｒ．Ｉは、ｗｔＥＧＦＲおよびΔＥＧＦＲとの反応性を示した。３つの新たに作製されたクローンの全てが、ΔＥＧＦＲとの反応性およびｗｔＥＧＦＲとのより少ない反応性を示した。ＤＨ８．３は、Ｕ８７ＭＧ$_{\Delta EGFR}$およびＮＲ６$_{\Delta EGPR}$の溶解物中で唯一ポジティブであった。

【０２３１】

異種移植片腫瘍Ｕ８７ＭＧ、Ｕ８７ＭＧ$_{\Delta EGFR}$、およびＡ４３１におけるクローン１

２４、８０６、および１１３３ならびにｍＡｂ　５２８およびｍＡｂ　ＤＨ８．３の免疫組織化学的分析を表１に示す。全てのｍＡｂは、異種移植片Ｕ８７ＭＧ$_{\Delta EGFR}$の強い染色を示した。ｍＡｂ　５２８のみが、ネイティブＵ８７ＭＧ異種移植片においける弱い反応性を示した。Ａ４３１異種移植片において、ｍＡｂ　５２８は、強い均一な反応性を示した。ＭＡｂ１２４、ＭＡｂ８０６、およびＭＡｂ１１３３は、Ａ４３１の扁平上皮細胞癌の最も底部に位置する細胞との反応性が明らかとなり、そして上部細胞層または角化成分とは反応しなかった。ＤＨ８．３は、Ａ４３１異種移植片においてネガティブであった。

【０２３２】

（表１）

（抗体５２８、ＤＨ８．３および１２４、８０６および１１３３の免疫組織化学的分析）

【０２３３】

【表４】

Mab	異種移植片 ΔU87MG$_{\Delta EGFR}$	異種移植片 A431	異種移植片 U87MG（ネイティブ）
528	ポジティブ	ポジティブ	ポジティブ（集中した染色）
mAb-124	ポジティブ	ポジティブ（主に基底細胞）	-
mAb-806	ポジティブ	ポジティブ（主に基底細胞）	-
mAb-1133	ポジティブ	ポジティブ（主に基底細胞）	-
DH8.3	ポジティブ	-	-

内因性マウス抗体の検出に起因する少量の間質染色

（実施例２）

（ＦＡＣＳによる細胞株への抗体の結合）

ｍＡｂ８０６の特異性を決定するために、Ｕ８７ＭＧ細胞、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞に対するその結合を、フロー活性化細胞ソーティング（ｆｌｏｗ　ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ｃｅｌｌ　ｓｏｒｔｉｎｇ）（ＦＡＣＳ）により分析した。簡潔には、細胞を関連抗体（１０μｇ／ｍｌ）次いでフルオレセイン結合ヤギ抗マウスＩｇＧ（１：１００希釈；Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ　Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＵＳＡ）で標識した。ＦＡＣＳデータを、最少で５，０００事象を観測することによりＣｏｕｌｔｅｒ　Ｅｐｉｃｓ　Ｅｌｉｔｅ　ＥＳＰで得、そしてＷｉｎｄｏｗｓ（登録商標）用ＥＸＰＯ（バージョン２）を使用して分析した。非関連ＩｇＧ２ｂは、ｍＡｂ　８０６についてのアイソタイプコントロールとして含まれ、そして５２８抗体は、ｄｅ２－７ＥＧＦＲおよびｗｔ　ＥＧＦＲの両方を認識するので含まれた。

【０２３４】

５２８抗体のみが、親ＵＳ７ＭＧ細胞株を染色し得た（図１）。このことは、これらの細胞がｗｔ　ＥＧＦＲを発現することを実証する以前の報告（Ｎｉｓｈｉｋａｗａら、１９９４）と一致している。ＭＡｂ　８０６およびＤＨ８．３は、コントロール抗体と同様の結合レベルを有しており、明らかにこれらがｗｔレセプターと結合できないことを実証している（図１）。Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞へのアイソタイプコントロール抗体の結合は、Ｕ８７ＭＧ細胞について観察された結合と同様であった。

【０２３５】

ＭＡｂ　８０６は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞を染色した。このことは、ｍＡｂ　８０６が、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲおよび増幅されたＥＧＦＲを特異的に認識することを示す（図１）。ＤＨ８．３抗体は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を染色した。このことは、ＤＨ８．３抗体が、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲを特異的に認識することを裏付けした（図１）。予測されるとおり、５２８抗体は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞株およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞株の両方を染色した（図１）。予測されると

おり、５２８抗体は、これらの細胞において同時発現されるｄｅ２－７レセプターおよび野生型細胞の両方に結合するので、親細胞より高い強度でＵ８７ＭＧ．Δ２－７を染色した（図１）。同様の結果を、ヒト赤血球（Ｏ型）でコーティングされたプロテインＡの標的細胞への出現により表面結合ＩｇＧを検出するプロテインＡ混合血球吸着を使用して得た。モノクローナル抗体８０６は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞と反応性であったが、Ｕ８７ＭＧ発現野生型ＥＧＦ－Ｒとは有意な反応性を示さなかった（希釈していない上清で１０％未満）。

【０２３６】

（実施例３）

（アッセイにおける抗体の結合）

ｍＡｂ　８０６およびＤＨ８．３抗体の特異性をさらに特徴付けるために、これらの結合を、ＥＬＩＳＡにより調べた。２つの型のＥＬＩＳＡを、これらの抗体の特異性を決定するために使用した。第１のアッセイにおいて、プレートをｓＥＧＦＲ（０．１Ｍ炭酸塩緩衝液（ｐＨ　９．２）中１０μｇ／ｍｌ）で２時間コーティングし、次いでＰＢＳ中の２％ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）でブロックした。ｓＥＧＦＲは、野生型ＥＧＦＲの組換え細胞外ドメイン（アミノ酸１～６２１）であり、そして以前に記載されるように生成した（２２）。抗体を、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）中２％ＨＳＡ中の増加する濃度において３連でウェルに加えた。結合した抗体を、基質としてＡＢＴＳ（Ｓｉｇｍａ，Ｓｙｄｎｅｙ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を使用して西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗マウスＩｇＧ（Ｓｉｌｅｎｕｓ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）により検出し、そして吸光度を４０５ｎｍで測定した。

【０２３７】

ｍＡｂ　８０６および５２８抗体の両方が、固定化された野生型ｓＥＧＦＲに対する用量依存性でかつ飽和した結合を示した（図２Ａ）。ｄｅ２－７　ＥＧＦＲ中に見出される特有の接合部ペプチドが、ｓＥＧＦＲ内に含まれていないので、ｍＡｂ　８０６は、野生型ＥＧＦＲ配列内に位置するエピトープに結合していなければならない。この５２８抗体の結合は、ｍＡｂ　８０６について観察された結合より低かった。予測されたとおり、ＤＨ８．３抗体は、１０μｇ／ｍｌまでの濃度でさえ野生型ｓＥＧＦＲに結合しなかった（図２Ａ）。溶液中のｓＥＧＦＲは、用量依存性様式で、固定化されたｓＥＧＦＲへの５２８抗体の結合を阻害したが、ｍＡｂ　８０６の結合を阻害することはできなかった（図２Ｂ）。このことは、ｍＡｂ　８０６が、一旦ＥＬＩＳＡプレートに固定化された（コンホメーション変化を誘導し得るプロセス）野生型ＥＧＦＲのみに結合し得ることを示唆する。同様の結果が、ＢＩＡｃｏｒｅを使用して観察され、これによりｍＡｂ　８０６は、固定化されたｓＥＧＦＲを結合したが、固定化されたｍＡｂ　８０６は、溶液中のｓＥＧＦＲを結合することができなかった（データ示さず）。ＤＨ８．３抗体は、特有のｄｅ２－７　ＥＧＦＲペプチドに対する用量依存性でかつ飽和可能な結合を示した（図２Ｃ）。

【０２３８】

第２のアッセイでは、ビオチン化されたｄｅ２－７特異的ペプチド（ビオチン－ＬＥＥＫＫＧＮＹＶＶＴＤＨ（配列番号５））を、ストレプトアビジン（Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、Ｉｌｌｉｎｏｉｓ）で予めコーティングされたＥＬＩＳＡプレートに結合させた。抗体を、第１のアッセイにおけるのと同じようにして、結合させ、そして検出した。ｍＡｂ　８０６も５２８抗体も、ＤＨ８．３の飽和結合を得るために使用された濃度よりも高い濃度においてさえ、ペプチドに結合しなかった。このことはさらに、ｍＡｂ　８０６が、このペプチド内のエピトープ決定基を認識しないことを示している。

【０２３９】

ｍＡｂ　８０６が、接合部ペプチドとは異なるエピトープを認識することをさらに実証するために、さらなる実験を行った。Ｃ末端をビオチン化したｄｅ２－７ペプチド（ＬＥＥＫＫＧＮＹＶＶＴＤＨ－ビオチン（配列番号６））を、ｄｅ２－７ペプチドに対して生成されたｍＡｂ　８０６およびｍＡｂ　Ｌ８Ａ４と共に、研究において使用した（Ｒｅｉｓｔ，ＣＪら（１９９５）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５５（１９）：４３７５－４３８２；Ｆ

ｏｕｌｏｎ ＣＦら（２０００）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６０（１６）：４４５３－４４６０）。

【０２４０】

（ペプチド研究において使用された試薬）

接合部ペプチド：ＬＥＥＫＫＧＮＹＶＶＴＤＨ－ＯＨ（Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ，Ｃａｍａｒｉｌｌｏ，ＣＡ）；

ペプチドＣ：ＬＥＥＫＫＧＮＹＶＶＴＤＨ（Ｋ－Ｂｉｏｔ）－ＯＨ（Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ，Ｃａｍａｒｉｌｌｏ，ＣＡ）；

ｓＥＧＦＲ：野生型ＥＧＦＲのＣＨＯ細胞由来組換え可溶性細胞外ドメイン（ａａ１－６２１）（ＬＩＣＲ Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ）；

ｍＡｂ ８０６：マウスモノクローナル抗体、IgG_{2b}（ＬＩＣＲ ＮＹＢ）；

ｍＡｂ Ｌ８Ａ４：マウスモノクローナル抗体、IgG_{1}（Ｄｕｋｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ）；

IgG_{1}アイソタイプコントロールｍＡｂ；

IgG_{2b}アイソタイプコントロールｍＡｂ。

【０２４１】

ペプチドＣを、３５０ＲＵ（＋／－３０ＲＵ）の表面密度で、ストレプトアビジンマイクロセンサーチップ上に固定した。ｍＡｂの段階希釈物を、ペプチドとの反応性について試験した。ビオチン化されていないペプチドを用いたブロッキング実験を行って、特異性を評価した。

【０２４２】

ｍＡｂ Ｌ８Ａ４は、低い抗体濃度（６．２５ｎＭ）においてでさえ、ペプチドＣと強い反応性を示した（図２Ｄ）。ｍＡｂ ８０６は、１００ｎＭの抗体濃度（試験された最高濃度）まで、ペプチドＣと検出可能な特異的反応性を示さなかった（図２Ｄおよび２Ｅ）。ｍＡｂ Ｌ８Ａ４は、ペプチドＣと反応することが予期された。なぜなら、このペプチドは、ｍＡｂ Ｌ８Ａ４の生成において免疫原として使用されたからである。接合部ペプチド（非ビオチン化、５０μｇ／ｍｌ）の添加により、ペプチドＣとｍＡｂ Ｌ８Ａ４の反応は完全にブロックされる。このことにより、接合部ペプチドのエピトープに対する抗体の特異性が確認される。

【０２４３】

第２セットのＢＩＡｃｏｒｅ実験では、ｓＥＧＦＲを、約４０００ＲＵの表面密度で、ＣＭマイクロセンサーチップ上に固定した。ｍＡｂの段階希釈物を、ｓＥＧＦＲとの反応性について試験した。

【０２４４】

ｍＡｂ ８０６は、変性したｓＥＧＦＲと強く反応性であったが、ｍＡｂ Ｌ８Ａ４は、変性したｓＥＧＦＲと反応しなかった。変性したｓＥＧＦＲとｍＡｂ ８０６の反応性は、抗体濃度が減少するにつれて減少する。ｍＡｂ Ｌ８Ａ４は、ｓＥＧＦＲとは反応しないことが予期された。なぜなら、ｍＡｂ Ｌ８Ａ４は、免疫原として接合部ペプチドを使用することにより生成されたものであり、そしてｓＥＧＦＲは接合部ペプチドを含まないからである。

【０２４５】

ドットブロット免疫染色実験もまた実施した。ペプチドの段階希釈物を、ＰＶＤＦメンブレンまたはニトロセルロースメンブレン上に０．５μｌでスポットした。メンブレンを、ＰＢＳ中の２％ＢＳＡでブロックし、次いで、８０６抗体、Ｌ８Ａ４抗体、ＤＨ８．３抗体およびコントロール抗体でプローブした。Ｌ８Ａ４抗体およびＤＨ８．３抗体は、メンブレン上でペプチドに結合した（データは示さず）。Ｌ８Ａ４が明らかに結合を示した濃度において、ｍＡｂ ８０６はペプチドを結合しなかった（データは示さず）。コントロール抗体もまた、ペプチド結合についてネガティブであった。

【０２４６】

ｍＡｂ ８０６は、イムノブロッティング後の細胞溶解産物中で、ｗｔＥＧＦＲに結合し

た（結果は示さず）。このことは、ｄｅ２－７ＥＧＦＲと反応したがｗｔＥＧＦＲとは反応しなかった、ＤＨ８．３抗体で得られた結果とは異なる。従って、ｍＡｂ　８０６は、レセプターが細胞表面上においてその天然の状態にある場合を除き、変性後のｗｔＥＧＦＲを認識し得る。

【０２４７】

（実施例４）

（スキャッチャード分析）

Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を使用するスキャッチャード分析を、免疫反応性についての補正後に実施して、各抗体の相対的親和性を決定した。抗体を、^{125}Ｉ（Ａｍｒａｄ、Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）で、クロラミンＴ方法により標識化し、そして免疫反応性を、Ｌｉｎｄｍｏアッセイ（２３）により決定した。すべての結合アッセイを、１～２×１０^{6}個の生存Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞またはＡ４３１細胞において、１％ＨＳＡ／ＰＢＳ中で９０分間にわたり４℃で穏やかに回転させながら実施した。１０ｎｇ／ｍｌの^{125}Ｉ標識化抗体の一定の濃度セットを、適切な未標識抗体の漸増濃度の存在下において使用した。非特異的結合は、１０，０００倍過剰の未標識抗体の存在下において決定された。インキュベーションの完了後、細胞を洗浄し、そしてＣＯＢＲＡ　ＩＩγ計数器（Ｐａｃｋａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｍｅｒｉｄｅｎ、ＵＳＡ）を用いて、結合した^{125}Ｉ標識化抗体について計数した。

【０２４８】

ｍＡｂ　８０６およびＤＨ８．３抗体は両方とも、ヨウ素化された場合に高い免疫反応性を保持しており、そして代表的には、ｍＡｂ　８０６については９０％より高く、そしてＤＨ８．３抗体については４５～５０％高かった。ｍＡｂ　８０６は、ｄｅ２－７ＥＧＦＲレセプターに対して、１．１×１０^{9}Ｍ$^{-1}$の親和性を有したが、ＤＨ８．３の親和性は、１．０×１０^{8}Ｍ$^{-1}$でおよそ１／１０倍近く低かった。^{125}Ｉで放射性標識されたｍＡｂ　８０６も、^{125}Ｉで放射性標識されたＤＨ８．３抗体も、親のＵ８７ＭＧ細胞には結合しなかった。ｍＡｂ　８０６は、１細胞あたり平均で２．４×１０^{5}個の結合部位を認識し、ＤＨ８．３抗体は、平均で５．２×１０^{5}個の部位に結合した。従って、この抗体間でレセプター数に良好な一致が見られるだけでなく、同じ細胞株で異なるｄｅ２－７ＥＧＦＲ特異的抗体により測定された場合に１細胞あたり２．５×１０^{5}個のｄｅ２－７レセプターを示した以前の報告（２５）とも良好な一致を示した。

【０２４９】

（実施例５）

（Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞による、抗体のインターナリゼーション）

標的細胞への結合後に抗体をインターナリゼーションする速度は、その腫瘍標的化特性および治療対象の両方に影響を及ぼす。従って、本発明者らは、ＦＡＣＳによって、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞への結合後のｍＡｂ　８０６およびＤＨ８．３抗体のインターナリゼーションを試験した。Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を、ＤＭＥＭ中で４℃にて１時間にわたり、ｍＡｂ　８０６またはＤＨ８．３抗体（１０μｇ／ｍｌ）のいずれかと共にインキュベートした。洗浄後、細胞を、３７℃に予め暖めておいたＤＭＥＭに移し、そして３７℃でのインキュベーション後の種々の時点で、アリコートを採取した。氷冷洗浄緩衝液（１％ＨＳＡ／ＰＢＳ）中でアリコートを迅速に洗浄することによって、インターナリゼーションを停止させた。時間経過の終了時に、細胞を、上記のようにＦＡＣＳによって染色した。インターナリゼーションのパーセンテージを、以下の式を使用して、０時間目に対して種々の時点での表面抗体染色を比較することにより算出した：インターナライズされた抗体のパーセント＝（ｘ時間目の平均蛍光　バックグラウンド蛍光）／（０時間目の平均蛍光－バックグラウンド蛍光）×１００。この方法は、以前（２４）に記載されたようなインターナリゼーションを測定するためのヨウ素化抗体（ｍＡｂ　８０６）を使用して、１アッセイで確認された。異なる時点でのインターナリゼーション速度の差異を、スチューデントｔ検定を使用して比較した。

【０２５０】

両方の抗体は、ｍＡｂ　８０６については１０分間で、そしてＤＨ８．３については３０分間で定常状態レベルに達する比較的急速なインターナリゼーションを示した（図３）。ＤＨ８．３のインターナリゼーションは、速度（ｍＡｂ　８０６についての３６．８％と比較して、１０分間でインターナライズされたＤＨ８．３は８０．５％、ｐ＜０．０１）および６０分間でインターナライズされた総量（３０．４％に対して９３．５％、ｐ＜０．００１）の両方に関して有意に高かった。ｍＡｂ　８０６は、実施された４回のアッセイすべてにおいて、２０分間目と比較して３０分間目および６０分間目には、わずかに低いレベルのインターナリゼーションを示した（図３）。この結果はまた、ヨウ素化されたｍＡｂ　８０６に基づくインターナリゼーションアッセイを使用して確認された。

【０２５１】

（実施例６）

（抗体のインターナリゼーションの電子顕微鏡検査分析）

抗体間でのインターナリゼーション速度における上記で着目された差異を考慮して、抗体の細胞内輸送に関する詳細な分析を、電子顕微鏡検査を使用して実施した。

【０２５２】

Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を、ゼラチンコーティングされたチャンバースライド（Ｎｕｎｃ、Ｎａｐｅｒｖｉｌｌｅ、ＩＬ）上で８０％コンフルエンスまで増殖させ、次いで、氷冷ＤＭＥＭで洗浄した。次いで、細胞を、ＤＭＥＭ中で４５分間にわたり４℃で、ｍＡｂ　８０６またはＤＨ８．３抗体と共にインキュベートした。洗浄後、細胞を、金結合体化（２０ｎｍ粒子）抗マウスＩｇＧ（ＢＢＩｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、Ｃａｒｄｉｆｆ、ＵＫ）と共に、４℃にてさらに３０分間インキュベートした。さらなる洗浄後、予め暖めておいたＤＭＥＭ／１０％ＦＣＳを細胞に添加し、これを、３７℃で１～６０分間の種々の時間にわたりインキュベートした。抗体のインターナリゼーションを、氷冷培地によって停止させ、そして、ＰＢＳ／０．１％ＨＳＡ中の２．５％グルタルアルデヒドを用いて細胞を固定し、次いで、２．５％四酸化オスミウム中で後固定（ｐｏｓｔ－ｆｉｘ）した。段階的な一連のアセトンを通して脱水した後、サンプルをＥｐｏｎ／Ａｒａｌｄｉｔｅ樹脂中に包埋し、Ｒｅｉｃｈｅｒｔ　Ｕｌｔｒａｃｕｔ－Ｓミクロトーム（Ｌｅｉｃａ）を用いて超薄切片として切り出し、そしてニッケルグリッド上に収集した。この切片を、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色し、その後、Ｐｈｉｌｉｐｓ　ＣＭ１２透過電子顕微鏡において８０ｋＶで観察した。コーティングされた孔内に含まれた金粒子の統計分析を、カイ２乗検定を用いて実施した。

【０２５３】

ＤＨ８．３抗体は、コーティングされた孔を介して優勢にインターナライズされたが、ｍＡｂ　８０６は、マクロピノサイトーシスによってインターナライズされるようであった（図１９）。実際、ｍＡｂ　８０６と共にインキュベートされた細胞において形成された３２個のコーティングされた孔の詳細な分析によって、これらがいずれも抗体を含まないことが明らかにされた。対照的に、ＤＨ８．３と共にインキュベートされた細胞由来のすべてのコーティングされた孔のうちの約２０％が、抗体についてポジティブであり、多数のものは複数の金粒子を含んだ。コーティングされた孔に含まれた金粒子の総数に関する統計分析によって、この差異が高度に有意（ｐ＜０．０１）であることが見出された。２０～３０分後、両方の抗体は、形態学的にリソソームに類似した構造体において観察され得る。これらの構造体内における細胞砕片の存在はまた、そのリソソームの性質と一致した。

【０２５４】

（実施例７）

（腫瘍保有ヌードマウスにおける抗体の生体内分布）

ｍＡｂ　８０６およびＤＨ８．３抗体の生体内分布を、一方の側にＵ８７ＭＧ異種移植片を含みかつ他方の側にＵ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片を含むヌードマウスにおいて比較した。比較的短い時間を、この研究のために選択した。なぜなら、以前の報告により、ＤＨ８．３抗体は、４～２４時間の間に腫瘍標的化のピークレベルを示すことが実証されて

いたからである（１６）。

【０２５５】

腫瘍異種移植片を、３×１０^{6}個のＵ８７ＭＧ細胞、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞またはＡ４３１細胞のｓ．ｃ．注射によって、ヌードＢＡＬＢ／ｃマウスにおいて確立した。Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片におけるｄｅ２－７ＥＧＦＲの発現は、生体内分布の全期間を通じて安定なままであった。また、Ａ４３１細胞は、免疫組織化学によって決定されるように腫瘍異種移植片として増殖される場合に、ｍＡｂ　８０６とのその反応性を保持していた（データは示さず）。Ｕ８７ＭＧ細胞またはＡ４３１細胞を一方の側で、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を他方の側に注射する７～１０日前に注射した。この理由は、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲを発現する異種移植片について観察されたより早い増殖速度の為である。抗体を放射性標識し、そして上記のようにして免疫反応性について評価し、そして腫瘍が１００～２００ｍｇ重量になった時点で、眼窩後方（ｒｅｔｒｏ－ｏｒｂｉｔａｌ）経路によりマウスに注射した。各マウスは、２種類の異なる抗体（１抗体あたり２μｇ）を受けた：２μＣｉの^{125}Ｉ標識化ｍＡｂ　８０６および２μＣｉの^{131}Ｉ標識化ＤＨ８．３または５２８。示されない限り、５匹のマウスの群を、感染後の種々の時点で屠殺し、そして心臓穿刺によって採血した。腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓および肺を、切開によって得た。すべての組織の重さを測り、そして二重チャネル計数Ｗｉｎｄｏｗを使用して、^{125}Ｉおよび^{131}Ｉ活性についてアッセイした。データは、注射された用量標準に対して比較することによって決定される％ＩＤ／ｇ腫瘍として各抗体について表されるか、または腫瘍　対　血液／肝臓比に変換された（すなわち、％ＩＤ／ｇ腫瘍を、％ＩＤ／ｇ血液または肝臓で除算した）。群間の差異を、スチューデントｔ検定によって分析した。

【０２５６】

％ＩＤ／ｇ腫瘍に関して、ｍＡｂ　８０６は、８時間で１８．６％ｍ／ｇの腫瘍のＵ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片においてそのピークレベルに達した（図４Ａ）。これは、血液を除くすべての他の組織よりもかなり高い。ＤＨ８．３もまた８時間でピーク腫瘍レベルを示したが、そのレベルは、ｍＡｂ　８０６と比較して、統計的により低い（ｐ＜０．００１）８．８％ｍ／ｇ腫瘍であった（図４Ｂ）。両方の抗体のレベルは、２４時間目および４８時間目には緩やかに低下した。いずれの抗体も、Ｕ８７ＭＧ親異種移植片の特異的標的化を示さなかった（図４Ａ、Ｂ）。腫瘍　対　血液／肝臓比に関して、ｍＡｂ　８０６は、血液（１．３の比）および肝臓（６．１の比）の両方について、２４時間目に最高の比を示した（図５Ａ、Ｂ）。ＤＨ８．３抗体は、血液中では８時間目に（０．３８の比）、そして肝臓では２４時間目に（１．５の比）、その最高比率を有した（図５Ａ、Ｂ）。これらは両方とも、ｍＡｂ　８０６について得られた値よりもかなり低かった。

【０２５７】

上記のように、腫瘍内におけるｍＡｂ　８０６のレベルは８時間目にピークに達した。このピークは、多くの腫瘍標的化抗体と比較して比較的早いが、これは、同様の用量の抗体を使用する場合に感染後４～２４時間目にすべてピークを示した、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲ特異的抗体を使用した他の研究と完全に一致する（１６、２５、３３）。実際、初期の報告とは異なり、８時間目の時点は、抗体標的化が迅速にピークに達するという仮定のもとに含まれていた。ｍＡｂ　８０６で観察された％ＩＤ／ｇ腫瘍は、標準的なヨウ素化技術を使用した場合に他のｄｅ２－７　ＥＧＦＲ特異的抗体について報告されていたものと類似していた（１６、２４、３２）。この早期ピークの理由はおそらく、２つの部分から構成される。第１には、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲを発現する腫瘍（トランスフェクトされたＵ８７ＭＧ細胞を含む）は、腫瘍異種移植片として極めて迅速に増殖する。従って、これらの生体内分布研究において使用された比較的短い期間の間でさえ、腫瘍のサイズは、％ＩＤ／ｇ腫瘍が、緩やかに増殖する腫瘍と比較して低減されるような程度（４日間にわたって質量において５～１０倍増加）まで増加する。第２に、ｍＡｂ　８０６のインターナリゼーションは、ＤＨ８．３と比較して比較的緩徐であったが；それはなお、多くの他の腫瘍抗体／抗原系と比較すると迅速である。インターナライズされた抗体は、迅速なタンパク質分解を受け、その分解産物が細胞から排泄される（３４）。このインターナリゼー

ション、分解および排泄のプロセスは、細胞内に保持されるヨウ素化抗体の量を減少させる。結果として、インターナライズされる抗体は、そのインターナライズされない対応物よりも低いレベルの標的化を示す。本明細書で報告された電子顕微鏡データは、インターナライズされたｍＡｂ　８０６が迅速にリソソームに輸送され、このリソソームにおいて迅速な分解がおそらく生じることを実証する。この観察は、細胞からのヨウ素の迅速な排泄と一致する。

【０２５８】

ｄｅ２－７　ＥＧＦＲにおいて見出された固有の接合部ペプチドに対する以前に記載されたＬ８Ａ４モノクローナル抗体は、ｍＡｂ　８０６と同様の様式（３５）で挙動する。ｄｅ２－７　ＥＧＦＲでトランスフェクトされたＵ８７ＭＧ細胞を使用すると、この抗体は、類似のインターナリゼーション速度を有し（ｍＡｂ　８０６についての１時間で３０％と比較して、１時間で３５％）、そしてｄｅ２－７　ＥＧＦＲでトランスフェクトされた３Ｔ３線維芽細胞を使用した場合に匹敵するインビボ標的化を示した（ｍＡｂ　８０６についての８時間で１８％ＩＤ／ｇ腫瘍と比較して、２４時間で２４％ＩＤ／ｇ腫瘍のピーク）（２５）。興味深いことに、腫瘍異種移植片におけるこの抗体のインビボ保持率は、Ｎ－スクシンイミジル５－ヨード－３－ピリジンカルボキシレートで標識された場合に増強された（２５）。この標識化された補欠分子族は、リソソームのｐＨでは正に荷電し、そのため、増強された細胞保持率を有する（３３）。保持率の増強は、放射性免疫治療用の抗体を考慮する場合に潜在的に有用であり、そしてこの方法を使用して、ヨウ素化されたｍＡｂ　８０６またはそのフラグメントの保持率を改善し得る。

【０２５９】

（実施例８）

（増幅されたＥＧＦＲを含有する細胞へのｍＡｂ　８０６の結合）

ｍＡｂ　８０６が、増幅されたレセプター遺伝子を含有する細胞において発現されるＥＧＦＲを認識し得るか否かを試験するために、Ａ４３１細胞に対するその結合を分析した。以前に記載されたように、Ａ４３１細胞は、ヒト扁平上皮癌細胞であり、そして高レベルのｗｔＥＧＦＲを発現する。Ａ４３１細胞に対するｍＡｂ　８０６の弱いが再現性は高い結合が、ＦＡＣＳ分析によって観察された（図６）。ＤＨ８．３抗体はＡ４３１細胞に結合しなかった。このことは、ｍＡｂ　８０６の結合が、ｄｅ２－７ＥＧＦＲの低レベル発現の結果ではなかったことを示す（図６）。予期されたように、抗ＥＧＦＲ５２８抗体は、Ａ４３１細胞の強い染色を示した（図６）。この結果を考慮して、Ａ４３１に対するｍＡｂ　８０６の結合を、スキャッチャード分析によって特徴付けた。ヨウ素化されたｍＡｂ　８０６の結合は比較的低かったが、スキャッチャードについて一貫したデータを得ることが可能であった。このような実験の平均は、１細胞あたり２．４×10^5レセプターで、９．５×$10^7$$M^{-1}$の親和性値を与えた。従って、このレセプターについての親和性は、ｄｅ２－７ＥＧＦＲについての親和性よりもおよそ１／１０倍近く低かった。さらに、ｍＡｂ　８０６は、Ａ４３１細胞表面上に見出されるＥＧＦＲの小さな部分のみを認識するようである。５２８抗体を使用して、本発明者らは、１細胞あたり約２×10^6個のレセプターを測定した。これは、多くの他の研究（２６）と一致する。

【０２６０】

ｍＡｂ　８０６による野生型ｓＥＧＦＲの認識は明らかに、エピトープを露出させるためのレセプターのいくらかの変性を必要とする。必要とされる変性の程度はごくわずかにすぎない。なぜなら、プラスチック表面上への野生型ｓＥＧＦＲの吸着でさえ、ＥＬＩＳＡアッセイにおいてｍＡｂ　８０６の頑強な結合を誘導したからである。ｍＡｂ　８０６のみが、Ａ４３１細胞表面上で約１０％のＥＧＦＲに結合したので、このレセプターのサブセットがｄｅ２－７ＥＧＦＲ短縮化によって誘導されるのと同様のコンフォメーション変化を有し得ると推測することは興味を引く。実際、Ａ４３１細胞において遺伝子増幅により媒介されるＥＧＦＲの極めて高い発現は、いくつかのレセプターを不適切にプロセシングさせ、これによりコンフォメーション変化を誘導し得る。興味深いことに、ｍＡｂ　８０６によるＡ４３１細胞溶解産物の半定量的イムノブロッティングによって、ｍＡｂ　８

０６が、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウェスタントランスファー後に、大半のＡ４３１　ＥＧＦレセプターを認識し得ることが示された。この結果はさらに、ｍＡｂ　８０６が、コンフォメーション変化を有する、Ａ４３１細胞表面上のレセプターサブセットに結合するという議論を支持する。Ａ４３１細胞におけるこれらの観察は、ｍＡｂ　８０６が、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅物を含有するグリオームに結合することを示した免疫組織化学データと一致する。ｍＡｂ　８０６の結合は、親のＵ８７ＭＧ細胞に対しては完全にネガティブであったので、この表現型は、増幅されたＥＧＦＲを含有する細胞に限定され得る（しかし、Ｕ８７ＭＧ細胞表面における「変性」レセプターのレベルは、検出レベル未満であり得る）ように思われた。しかし、ヨウ素化されたｍＡｂ　８０６は、1×10^{7}個までの細胞を含むＵ８７ＭＧ細胞ペレットに結合しなかったので、この可能性は低いように思われた。

【０２６１】

（実施例９）

（ｍＡｂ　８０６によるＡ４３１細胞のインビボ標的化）

第２の生体内分布研究を、ｍＡｂ　８０６を用いて実施することにより、ｍＡｂ　８０６がＡ４３１腫瘍異種移植片を標的化し得るか否かを決定した。この研究を、より長い期間にわたって行い、ｍＡｂ　８０６（これは、ポジティブコントロールとして、すべてのマウスに含まれた）によるＵ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片の標的化に関してより多くの情報を得た。さらに、抗ＥＧＦＲ５２８抗体を、Ａ４３１異種移植片についてのポジティブコントロールとして含ませた。なぜなら、以前の研究により、ヌードマウスにおいて増殖したＡ４３１細胞に対するこの抗体の弱いが有意な標的化が示されていたからである（２１）。

【０２６２】

最初の４８時間の間、ｍＡｂ　８０６は、最初の実験において観察されたものとほぼ同一の標的化特性を示した（図４Ａと比較した図７Ａ）。％ＩＤ／ｇ腫瘍に関して、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片におけるｍＡｂ　８０６のレベルは、２４時間後に緩やかに低下したが、常に、正常組織において検出されるよりも高いレベルを維持していた。Ａ４３１異種移植片における取り込みは比較的低かったが、最初の２４時間の間では、正常組織（例えば、肝臓、脾臓、腎臓および肺）では観察されない％ＩＤ／ｇ腫瘍の小さな増加が見られた（図７Ａ）。５２８抗体の取り込みは、％ＩＤ／ｇ腫瘍として表された場合に（図７Ｂ）、両方の異種移植片において非常に低かった。これは、血液からのこの抗体の迅速なクリアランスに一部起因する。腫瘍　対　血液比に関して、ｍＡｂ　８０６は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片については７２時間目およびＡ４３１異種移植片については１００時間目でピークとなった（図８Ａ、Ｂ）。ｍＡｂ　８０６についての腫瘍　対　血液比は、Ａ４３１腫瘍に対して決して１．０を上回ることはなかったが、この比は、時間経過全体を通して増加し（図８Ｂ）、そして低レベルの標的化を示す試験された他のすべての組織（データは示さず）よりも高かった。

【０２６３】

５２８抗体についての腫瘍　対　血液比は、ｍＡｂ　８０６と類似したプロフィールを示したが、より高いレベルが、Ａ４３１異種移植片において見られた（図８Ａ、Ｂ）。ｍＡｂ　８０６は、７２時間目に、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片において７．６のピーク腫瘍　対　肝臓比を有した。このことは明らかに、正常組織と比較してこれらの腫瘍における優先的な取り込みを示す（図８Ｃ）。ｍＡｂ　８０６についての他の腫瘍　対　器官比は、肝臓において観察された比と類似していた（データは示さず）。Ａ４３１異種移植片におけるｍＡｂ　８０６についてのピーク腫瘍　対　肝臓比は、１００時間目に２．０であった。これもまた、正常組織と比較して腫瘍におけるわずかに優先的な取り込みを示している（図８Ｄ）。

【０２６４】

（実施例１０）

（治療研究）

ｍＡｂ８０６の効果を、疾患の２つの異種移植片モデル（予防モデルおよび確立された腫瘍モデル）において評価した。

【０２６５】

（異種移植片モデル）

これまでの以前の報告（Ｎｉｓｈｉｋａｗａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９１（１６）；７７２７～７７３１）と一貫して、ｄｅ２－７ＥＧＦＲでトランスフェクトされたＵ８７ＭＧ細胞は、親細胞およびｗｔＥＧＦＲでトランスフェクトされたＵ８７ＭＧ細胞よりも迅速に増殖した。故に、同じマウスにおいて両方の細胞型が増殖することは不可能であった。

【０２６６】

１００ｍｌのＰＢＳ中の３×１０^{6}個の腫瘍細胞を、４～６週齢の雌のヌードマウス（Ａｎｉｍａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｒｅ，Ｗｅｓｔｅｒｎ Ａｕｓｔｒａｌｉａ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）の両方の側腹部に皮下投与した。ｍＡｂ ８０６の治療効果を、予防モデルおよび確立された腫瘍モデルの両方で研究した。予防モデルにおいて、それぞれ２つの異種移植片を有する５匹のマウスを、腫瘍細胞接種の前日に開始し、１ｍｇもしくは０．１ｍｇのｍＡｂ ８０６、またはビヒクル（ＰＢＳ）のいずれかを用いて心膜内処置した。この処置を、計６用量で、一週間あたり３回、２週間続けた。確立されたモデルにおいて、腫瘍が平均量の６５±６．４２ｍｍ^{3}（Ｕ８７ＭＧΔ２－７）、８４±９．０７ｍｍ^{3}（Ｕ８７ＭＧ）、７３±７．５ｍｍ^{3}（Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ）または２０１±１９．０９ｍｍ^{3}（Ａ４３１腫瘍）に到達した場合に、処置を開始した。腫瘍体積（ｍｍ^{3}）を、式（長さ×幅^{2}）／２を用いて決定し、ここで長さは最長軸であり、そして幅は、長さに直角で測定された（Ｓｃｏｔｔら、２０００）。データを各処置群についての平均腫瘍体積±Ｓ．Ｅ．として表した。統計学的分析を、スチューデントのｔ検定を用いて所定の時間で実行した。異種移植片が約１．５ｃｍ^{3}の体積に到達し、そして腫瘍が組織学的試験のために摘出された場合に、動物を安楽死させた。この研究プロジェクトを、Ａｎｉｍａｌ Ｅｔｈｉｃｓ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｆ ｔｈｅ Ａｕｓｔｉｎおよびリパトリエーション メディカル センターによって立証した。

【０２６７】

（腫瘍の異種移植片の組織学的試験）

異種移植片を摘出し、そして二等分した。その半分を、パラフィン中に包埋する前に１０％ホルマリン／ＰＢＳで固定した。次いで、４ミクロンの切片を切断し、そして通常の組織学的試験のためにヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）を用いて染色した。もう半分を、Ｔｉｓｓｕｅ Ｔｅｋ（登録商標）ＯＣＴ化合物（Ｓａｋｕｒａ Ｆｉｎｅｔｅｋ、Ｔｏｒｒａｎｃｅ，ＣＡ）に包埋し、そして液体窒素で凍結させて－８０℃で保存した。薄い（５ミクロン）のクリオスタット切片を、切断し、そして氷浴アセトンで１０分間固定化し、続いてさらに１０分間風乾させた。切片を、タンパク質ブロッキング剤（Ｌｉｐｓｈａｗ Ｉｍｍｕｎｏｎ，Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ Ｕ．Ｓ．Ａ）で１０分間ブロッキングし、次いでビオチン化１次抗体（１ｍｇ／ｍｌ）を用いて室温（ＲＴ）で３０分間インキュベートした。全ての抗体を、製造者の指示とおりに、ＥＣＬタンパク質ビオチン化モジュール（Ａｍｅｒｓｈａｍ，Ｂａｕｌｋｈａｍ Ｈｉｌｌｓ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を用いてビオチン化した。ＰＢＳでリンスした後、切片を、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体と共にさらに３０分間インキュベートした（Ｓｉｌｅｎｕｓ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）。ＰＢＳでの最終的な洗浄後、切片を過酸化水素の存在下で、３－アミノ－９－エチルカルボゾール（ＡＥＣ）基質（０．１Ｍ酢酸、０．１Ｍ酢酸ナトリウム、０．０２Ｍ ＡＥＣ（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｓｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ））に３０分間曝露した。切片を水でリンスし、そしてヘマトキシリンを用いて５分間対比染色し、そして標本にした。

【０２６８】

（予防モデルにおけるｍＡｂ８０６の効果）

ＭＡｂ８０６を、予防異種移植片モデルにおけるＵ８７ＭＧおよびＵ８７ＭＧΔ２－７腫

瘍に対する効果について試験した。抗体またはビヒクルを、腫瘍接種の前日に腹腔内投与し、そして１週間当たり３回、２週間投与した。ＭＡｂ８０６は、親Ｕ８７ＭＧ異種移植片の増殖に効果を有さず、これは、１回の注射あたり１ｍｇの容量でｗｔＥＧＦＲを発現した（図９Ａ）。対照的に、ｍＡｂ　８０６は、用量依存性の様式でＵ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片の増殖を有意に阻害した（図９Ｂ）。２０日目、コントロール動物を屠殺した場合に、平均腫瘍体積は、コントロール群について、１６３７±１７８．９８ｍｍ^{3}であり、０．１ｍｇの注射群（ｐ＜０．０００１）について５２６±９４．７４ｍｍ^{3}そして１ｍｇの注射群（ｐ＜０．０００１）について１９７±４２．０６ｍｍ^{3}より統計学的に小さかった。処置群を、２４日目に屠殺し、この時点で腫瘍体積は、０．１ｍｇの処置群について１２８７±２４３．０３ｍｍ^{3}および１ｍｇの処置群について４９２±１００．８ｍｍ^{3}であった。

【０２６９】

（確立された異種移植片モデルにおけるｍＡｂ８０６の効果）

予防異種移植片モデルにおけるｍＡｂ８０６の効果を与えて、次いで、確立された腫瘍異種移植片の増殖を阻害するその能力を試験した。抗体処置は、腫瘍が、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片について６５±６．４２ｍｍ^{3}および親のＵ８７ＭＧ異種移植片について８４±９．０７ｍｍ^{3}の平均腫瘍体積に到達した場合に開始することを除いて、予防モデルに記載されたとおりであった。前と同じように、ｍＡｂ　８０６は、注射あたり１ｍｇの用量で親のＵ８７ＭＧ異種移植片の増殖に影響しなかった（図１０Ａ）。対照的に、ｍＡｂ８０６は、用量依存性の様式においてＵ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片の増殖を有意に阻害した（図１０Ｂ）。１７日目、１日前にコントロール動物を屠殺し、平均腫瘍体積は、コントロール群について９３５±２１５．０４ｍｍ^3、０．１ｍｇの注射群（ｐ＜０．０１）について３８６±５７．５１ｍｍ^3、そして１ｍｇの注射群（ｐ＜０．００２）について２１７±５８．１７ｍｍ^{3}であった。

【０２７０】

ｍＡｂ８０６で観察される増殖阻害が、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲの細胞発現を制限するか否かを決定するために、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ腫瘍異種移植片に対するその効果を、確立されたモデルで試験した。これらの細胞は、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲ発現なしのＥＧＦＲ遺伝子の増幅を含む腫瘍のためのモデルとして働く。腫瘍が、７３±７．５ｍｍ^{3}の平均腫瘍体積に到達した場合に、ＭＡｂ８０６の処置を開始した。ビヒクルで処置したコントロール腫瘍と比較した場合、ＭＡｂ８０６は、確立されたＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片の増殖を有意に阻害した（図１０Ｃ）。コントロール動物を屠殺した日において、平均腫瘍体積は、コントロール群について９６０±２６８．９ｍｍ^3、そして１ｍｇ注射（ｐ＜０．０４）で処置した群について４６８±７８．３８ｍｍ^{3}であった。

【０２７１】

（確立された腫瘍の組織学的分析および免疫組織化学的分析）

ｍＡｂ　８０６処置したＵ８７ＭＧ．Δ２－７およびコントロールＵ８７ＭＧ．Δ２－７、ならびにＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片（それぞれ、２４日目と４２日目に収集した）の間の潜在的な組織学的差異を評価するために、ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した切片をＨ＆Ｅで染色した。ネクローシスの範囲は、ｍＡｂ　８０６で処置したＵ８７ＭＧ．Δ２－７（処置終了後３日目に収集した）、およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片（処置終了後９日目に収集した）の両方由来の切片において見られた。この結果は、多数の腫瘍異種移植片（ｎ＝４）において一貫して観察された。しかし、コントロールで処置した異種移植片由来の切片の分析は、ｍＡｂ８０６処置で見出されるネクローシスと同じ範囲を示さなかった。ｍＡｂ８０６またはＵ８７ＭＧ異種移植片処置したコントロール由来の切片をまたＨ＆Ｅで染色し、そして２つの群の間に何の細胞生存性における差異も無いことを明らかにし、さらに、ｍＡｂ８０６結合が、腫瘍の異種移植片内の細胞生存性／ネクローシスの減少を誘導するという仮説を支持した。

【０２７２】

Ｕ８７ＭＧ、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片切片の免

疫組織化学的分析を実行して、ｍＡｂ８０６処置後のｄｅ２－７およびｗｔＥＧＦＲ発現のレベルを決定した。切片を、上記のように２４日目と４２日目に収集し、そして５２８抗体または８０６抗体で免疫染色した。予想どおり、５２８抗体は、処置された腫瘍とコントロール腫瘍との間に明らかな強度の減少を伴なわずに全ての異種移植片切片が染色された。Ｕ８７ＭＧ切片の染色は、ｍＡｂ８０６では検出不可能であったが、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片切片の陽性染色を観察した。コントロールおよび処置されたＵ８７ＭＧ．Δ２－７、ならびにＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片の間にｍＡｂ８０６染色強度の差異はなく、抗体処置は、ｄｅ２－７またはｗｔＥＧＦＲ発現をダウンレギュレートしないことを示唆した。

【０２７３】

（ｍＡｂ８０６を用いたＡ４３１異種移植片の処置）

ｍＡｂ８０６の抗腫瘍効果がＵ８７ＭＧ細胞に制限されないことを実証するために、抗体を、Ａ４３１異種移植片と共にマウスに投与した。これらの細胞は、増幅されたＥＧＦＲ遺伝子を含み、そして細胞あたり約2×10^{6}個のレセプターを発現する。上記のように、ｍＡｂ８０６は、約１０％のこれらのＥＧＦＲおよび標的Ａ４３１異種移植片に結合する。以前に記載された予防異種移植片モデルにおいて試験される場合、ＭＡｂ　８０６は、Ａ４３１異種移植片の増殖を有意に阻害した（図１１Ａ）。１３日目、コントロール動物を屠殺した場合に、平均腫瘍体積は、コントロール群について１３８５±１４７．５４mm^{3}、および１ｍｇの注射処置群（ｐ＜０．０００１）について２６０±６０．３３mm^{3}であった。

【０２７４】

別の実験において、０．１ｍｇの用量のｍＡｂはまた、予防モデルにおけるＡ４３１異種移植片の増殖を有意に阻害した。

【０２７５】

予防Ａ４３１異種移植片モデルにおけるｍＡｂ８０６の効果を与え、確立された腫瘍異種移植片の増殖を阻害するその能力を試験した。抗体処置は、腫瘍が、２０１±１９．０９mm^{3}の平均腫瘍体積に到達するまで開始しないことを除いて、予防モデルに記載されるとおりであった。ｍＡｂ８０６は、確立された腫瘍異種移植片の増殖を優位に阻害した（図１１Ｂ）。１３日目、コントロール動物を屠殺した場合に、平均腫瘍体積は、コントロール群について１１４２±１２０．０６mm^{3}、および１ｍｇ注射群（ｐ＜０．０００１）について４５１±６５．５８mm^{3}であった。

【０２７６】

要約すれば、本明細書中に記載されるｍＡｂ８０６を用いた治療研究は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片増殖の用量依存性阻害を明らかに実証した。対照的に、親Ｕ８７ＭＧ異種移植片の阻害は、これらが、インビボでｗｔＥＧＦＲを発現し続ける事実に関わらず観察されなかった。ｍＡｂ８０６は、異種移植片の量を有意に減少するのみでなく、腫瘍内の有意なネクローシスを誘導した。これは、神経膠腫異種移植片を発現するヒトｄｅ２－７　ＥＧＦＲに対するインビボでの抗体の都合よい治療の使用を示す。

【０２７７】

ＥＧＦＲの遺伝子増幅は、多数の異なる腫瘍において報告されており、そして約５０％の神経膠腫において観察される（Ｖｏｌｄｂｅｒｇら、１９９７）。レセプター遺伝子増幅によって媒介される実質的なＥＧＦＲ過剰発現は、細胞内シグナルおよび細胞増殖によって増加される増殖の利点を与え得る（Ｆｉｌｍｕｓら、１９８７）。ＥＧＦＲ遺伝子増幅のプロセスを模倣する神経膠腫細胞を生成するために、Ｕ８７ＭＧ細胞を、ｗｔＥＧＦＲでトランスフェクトした。ｍＡｂ８０６での確立されたＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片の処置は、有意な増殖阻害を生じた。従って、ｍＡｂ８０６はまた、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅を含む細胞に対するインビボでの抗腫瘍活性を媒介する。興味深いことに、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片のｍＡｂ　８０６阻害は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７腫瘍で観察されるよりも少ない効果を示す。これは、ｍＡｂ　８０６が、増幅されたＥＧＦＲに対してより低い親和性を有し、そして細胞表面で発現される少い割合のレセプターのみに

結合するという事実を反映している。しかし、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片容量における少ない効果にも関わらず、ｍＡｂ　８０６処置が、これらの異種移植片内に大規模なネクローシスをつくるということに、注意すべきである。この可能性を指摘するために、ｍＡｂ　８０６は、本発明者らが、Ａ４３１異種移植片に対するその効果を試験したＵ８７ＭＧ由来細胞株の阻害のみを媒介する。これらの扁平上皮細胞癌由来の細胞株は、有意なＥＧＦＲ遺伝子増幅を含み、これらはインビトロおよびインビボの両方で保持される。ｍＡｂ８０６を用いたＡ４３１異種移植片の処置は、予防モデルおよび確立されたモデルの両方において、優位な増殖阻害を生じ、ｍＡｂ　８０６の抗腫瘍効果は、トランスフェクトされたＵ８７ＭＧ細胞株に制限されないことを示す。

【０２７８】

（実施例１１）

（Ａ４３１異種移植片とｍＡｂ８０６およびＡＧ１４７８との併用治療処置）

ＡＧ１４７８と組み合わせたｍＡｂ　８０６の抗腫瘍効果を、Ａ４３１異種移植片を伴なうマウスにおいて試験した。ＡＧ１４７８（４－（３－クロロアニリノ）－６，７－ジメトキシキナゾリン）は、ＨＥＲ２－ｎｅｕおよび血小板由来の増殖因子レセプターキナーゼに対する強力かつ選択的なＥＧＦＲキナーゼのインヒビターである（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、カタログ番号６５８５５２）。３つのコントロールが挙げられた：ビヒクルのみでの処置、ビヒクル＋ｍＡｂ８０６のみでの処置、そしてビヒクル＋ＡＧ１４７８のみでの処置。この結果は、図１２に例示される。０．１ｍｇのｍＡｂ８０６を、異種移植の１日前、および異種移植の１日後、３日後、６日後、８日後、および１０日後に投与した。４００μｇのＡＧ１４７８を、異種移植の０日後、２日後、４日後、７日後、９日後、および１１日後に投与した。

【０２７９】

単独で投与した場合、ＡＧ１４７８およびｍＡｂ８０６の両方が、有意な腫瘍体積の減少を生じた。しかし、組み合わせることによって、腫瘍体積の減少が、大幅に増大した。

【０２８０】

さらに、Ａ４３１細胞のＥＧＦＲへのｍＡｂ　８０６の結合を、ＡＧ１４７８の非存在下および存在下で評価した。細胞を、無血清培地に一晩置き、次いでＡＧ１４７８で、３７℃で１０分間処理し、ＰＢＳで２回洗浄し、次いで１％　Ｔｒｉｔｏｎに溶解させて、溶解物を調製した。この溶解物を、本明細書中の実施例２０に記載されるとおりに調製した。次いで、溶解物を、ＥＬＩＳＡ（ＳｃｈｏｏｌｅｒおよびＷｉｌｅｙ，Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２７７，１３５～１４２（２０００）によって記載されるアッセイの改変バージョン）によって８０６の反応性について評価した。プレートを、ＰＢＳ／ＥＤＴＡ中の１０μｇ／ｍｌのｍＡｂ　８０６で、室温で一晩コーティングし、次いで２回洗浄した。次いで、プレートを、１０％の血清アルブミン／ＰＢＳを用いて、３７℃で２時間ブロックし、そして２回洗浄した。１：２０の細胞溶解物を、１０％血清アルブミン／ＰＢＳに３７℃で１時間添加し、次いで４回洗浄した。１０％血清アルブミン／ＰＢＳ中の抗－ＥＧＦＲ（ＳＣ－０３（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｃ．））を、室温で９０分間反応させ、プレートを４回洗浄し、そして１０％血清アルブミン／ＰＢＳ中の抗ウサギ－ＨＲＰ（無症候由来の場合１：２０００）を室温で９０分間添加し、４回洗浄し、そしてＡＢＴＳを基質として用いて発色させた。ｍＡｂ８０６結合がＡＧ１４７８の量の増加の存在下で有意に増加することを見出した（図１３）。

【０２８１】

（実施例１２）

（ＥＧＦＲ状態について事前に分類されたヒト神経膠腫前駆型における免疫反応性）

ＥＧＦＲ発現の高い発生率を与えて、神経膠腫における増幅および変異の詳細な免疫組織化学的研究を、異種移植片以外の８０６個の腫瘍における特性を評価するために実行した。１６個の神経膠腫のパネルを、免疫組織化学によって分析した。１６個の神経膠腫のパネルを、増幅された野生型ＥＧＦＲおよびｄｅ２－７ＥＧＦＲ発現の存在についてＲＴ－

ＰＣＲによって事前に分類した。これらの腫瘍のうち６個のみが、ｗｔＥＧＦＲ転写を発現し、１０個は、ｗｔＥＧＦＲ遺伝子を増殖し、これらのうち５個は、野生型ＥＧＦＲ転写のみを示し、そして５個は、野生型ＥＧＦＲとｄｅ２－７遺伝子転写の両方を示した。免疫組織化学的分析を、組織学的スライドに塗布された新鮮な凍結組織の５ｍｍ切片を用いて実行し、そして冷アセトンで１０分間固定した。結合した１次抗体を、ビオチン化ホース抗マウス抗体に続くアビジン－ビオチン－複合体反応を用いて検出した。ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド（ＤＡＢ）を、色素原として使用した。組織における免疫組織化学的反応の程度を、光学顕微鏡によって見積もり、そして以下のような２５％の成分における免疫反応性細胞の数に従って、格付けした：

病巣＝５％未満

＋＝５～２５％

＋＋＝２５～５０％

＋＋＋＝５０～７５％

＋＋＋＋＝７５％より上。

【０２８２】

５２８抗体が、全ての腫瘍において強い反応性を示した一方で、ＤＨ８．３免疫染色を、ｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現する腫瘍に制限した（表２）。ＦＡＣＳおよびロゼッティングアッセイにおける事前の観察と一貫して、ｍＡｂ８０６は、非増幅ＥＧＦＲ遺伝子由来のｗｔＥＧＦＲ転写物を発現する神経膠腫とは反応しなかった（表２）。ｍＡｂ８０６に対する反応のパターンは、異種移植片研究において観察されたパターンと類似しており、そしてこの抗体が、細胞表面で発言される場合、ｄｅ２－７ＥＧＦＲおよび増幅されたＥＧＦＲを認識するが、ｗｔＥＧＦＲは認識しないことを再度示唆した。

【０２８３】

（表２）

（野生型ＥＧＦＲの存在について事前に分類された神経膠腫におけるＭＡｂ５２８、ＤＨ８．３および８０６の免疫反応性、ならびに変異ｄｅ２－７およびその増幅状態について）

【０２８４】

【表５】

増幅	de2-7 EGFR 発現	528	DH 8.3	806
	いいえ	++++	-	-
	いいえ	++++	-	-*
	いいえ	++++	-	-
	いいえ	++	-	-
	いいえ	+++	-	-
	いいえ	++++	-	-
はい	いいえ	++++	-	++++
はい	いいえ	++++	-	+
はい	いいえ	++++	-	+++
はい	いいえ	++++	-	++++
はい	いいえ	++++	-	+ - ++++
はい	はい	++++	++++	++++
はい	はい	++++	++++	++++
はい	はい	++++	++++	++++
はい	はい	++++	++++	++++
はい	はい	++++	++	++

＊病巣の染色

（実施例１３）

（正常組織におけるＥＧＦＲ免疫反応性）

ｄｅ２－７　ＥＧＦＲが、正常組織において発現されるか否かを決定するために、ｍＡｂ８０６およびＤＨ８．３についての免疫組織化学的研究を、２５個の組織において実行した。ｄｅ２－７　ＥＧＦＲが正常組織に存在しないことを示唆する任意の試験された組織において、ｍＡｂ８０６またはＤＨ８．３のいずれも強い免疫反応性を示さなかった（表３）。上皮の表皮および粘性平滑細胞の基底細胞層に制限されたｍＡｂ８０６を用いた扁桃におけるいくつかの生存可能な染色が存在する。胎盤において、栄養膜上皮の時折の免疫染色を、観察した。興味深いことに、高い内因性レベルのｗｔＥＧＦＲを発現する２つの組織（肝臓および皮膚）は、任意の有意なｍＡｂ８０６反応性を示し損なった。全ての肝臓サンプルで反応性は観察されず、そして弱い不安定な病巣の反応性のみを、皮膚サンプル中の基底のケラチノサイトおよび扁桃粘膜の平滑上皮細胞において時折（研究した全てのサンプルの１０％未満）検出し、さらにこの抗体が、細胞の表面上で発現されるｗｔＥＧＦＲに任意の有意な程度で結合しないことを実証した（表３）。全ての組織は、５２８抗体で見られる普遍的な染色によって確証されたとおりｗｔＥＧＦＲについて陽性であった（表３）。

【０２８５】

【表６】

表　3

正常組織での　582, DH8.3 および　806 のバイオアベイラビリティ

組織	528	DH8-3	806
食道	pos	-	-
胃	pos	-	-
十二指腸	pos	-	-
小腸/ 十二指腸	pos	-	-
結腸	pos	-	-
肝臓	pos	-	-
唾液腺　（耳下腺）	pos	-	-
腎臓	pos	-	-
膀胱	pos	-	-
前立腺	pos	-	-
精巣	pos	-	-
子宮 (cx/endom)	pos	-*	-
ファロピーオ氏管	pos	-	-
卵巣	pos	-	-
胸部	pos	-*	-
胎盤	pos	-	-
末梢神経	pos	-	-
骨格筋	pos	-	-
甲状腺	pos	-	-
リンパ節	pos	-	-
脾臓	pos	-	-
扁桃	pos	-	- occ. 扁平上皮細胞の基底層の弱い反応性
心臓	pos	-	-
肺	pos	-	-
皮膚	pos	-	- occ. 扁平上皮細胞の基底層の弱い反応性

＊種々の組織におけるいくつかの基質の染色

（実施例１４）

（種々の腫瘍におけるＥＧＦＲ免疫反応性）

他の腫瘍型におけるｄｅ２－７　ＥＧＦＲの程度を、１２個の異なる悪性疾患を用いて試験した。５２８抗体は、黒色腫およびセミノーマを除く分析された多くの腫瘍においてしばしば相同性染色を示した。存在する場合、ＤＨ８．３免疫反応性を、時折の病巣の腫瘍細胞に制限し、これらはこの検出系を用いて脳の外側の腫瘍におけるｄｅ２－７　ＥＧＦＲ発現はほとんどないことを示した（表４）。血管の病巣の染色、およびいくつかの腫瘍におけるＤＨ８．３抗体と結合性組織との可変性の拡散染色もまた、存在する（表４）。この染色は、使用された抗体結合性に強く依存しており、そして非特異的なバックグラウンド反応と考えられた。ｍＡｂ８０６は、６４％の頭部腫瘍および頸部腫瘍、ならびに５０％の配癌において陽性染色を示した（表４）。３０％の場合において陽性である尿の腫瘍を除く全ての部位でｍＡｂ８０６の反応性は、ほとんど存在しなかった。頭部癌および頸部癌および肺癌は、ＤＨ８．３抗体について陰性であるため、これらの腫瘍においてｍＡｂと共に見出される反応性は、ＥＧＦＲ遺伝子増幅と関連し得る。

【０２８６】

【表７】

表 4

腫瘍パネルにおける 528, DH8.3 および 806 のモノクローナル抗体

腫瘍	528	DH8.3	806
悪性黒色腫転移	0/10	0/10	0/10
膀胱 (tcc,sqcc, adeno)	10/10 (7x++++,2x+++,1x+)	0/10*	3/10* (2x++++,1x++)
乳腺	6/10 (3x++++,3x+++)	1/10 (1x+)	1/10 (foc)
頭部＋頸部癌 (sqcc)	11/11 1x+++ - 10x++++)	0/11*	7/11 (3x++++,3x+++,1x+)
肺 (sqcc, adeno, neuroend)	12/12 10x++++-1x+++)	0/12*	6/12 (3x++++ 3x+++)
平滑筋肉腫	5/5 (4x++++,1x+)	0/5	0/5
リポ肉腫	5/5 (2x＋3x+++)	0/5	0/5*
滑液肉腫	4/5* (4x ++++)	0/5	0/5*
Mth悪性線維組織球腫	4/5*	0/5*	0/5*
結腸癌	10/10 (9x++++, 1x+)	0/10*	0/10
セミノーマ	1/10*	1/10*	0/10
卵巣（漿液 -乳頭状 ）	4/5 (3x++++, 1x+)	0/5*	0/5

*病巣の染色

（実施例１５）

（ＥＧＦＲ状態に対して非選択のヒトグリア芽細胞腫における免疫反応性）

ｍＡｂ８０６の独特の特異性を確認し、そして反応性を評価するために、これを、５２８抗体およびＤＨ８．３抗体と、ＥＧＦＲ状態に対して予備選択されていない４６のグリア芽細胞腫のパネルにおいて比較した。この５２８抗体は、２つ（Ｎｏ．２７およびＮｏ．２９）を除く全てのサンプルにおいて強力にかつ同質にポジティブである（４４／４６、９５．７％）。これら２つの場合はまた、ｍＡｂ８０６およびｍＡｂ　ＤＨ８．３に対してもネガティブであった。ｍＡｂ８０６は、２７／４６（５８．７％）のケースにおいてポジティブであり、そのうちの２２ケースは、５０％より多くの腫瘍において同質の免疫反応性を示した。ＤＨ８．３抗体は、１５／４６（３２．６％）のグリア芽細胞腫においてポジティブであり、そのうちの９つは同質の免疫反応性を示した。これらの非選択の腫瘍の免疫組織化学染色を、表５に示す。

【０２８７】

１つの場合（Ｎｏ．３５）を除く全ての場合において、ｍＡｂ８０６とＤＨ８．３との間に一致性が存在した。

【０２８８】

ＥＧＦＲ増幅の存在についての分子的分析を、４４ケースにおいて行った（表５）。これらのうち、３０ケースは、以前に確立されたｍＡｂ８０６の免疫反応性の様式と同型を示した（ｃｏ－ｔｙｐｅ）：例えば、１６のｍＡｂ８０６ネガティブなケースは、ＥＧＦＲ増幅を全く示さず、そして１４のＥＧＦＲが増幅したケースもまた、ｍＡｂ８０６免疫ポジティブだった。しかし、８０６免疫反応性を示した１３のケースは、ＥＧＦＲ増幅についてはネガティブであり、一方で１つのＥＧＦＲが増幅したケースは、ｍＡｂ８０６ネガティブであった。これらの増幅ネガティブかつ８０６ポジティブの変異状態のさらなる分析は、以下に記載され、そしてＥＧＦＲ増幅についてネガティブであり、かつ８０６によって認識される、１３のケースの大部分についての説明を提供する。

【０２８９】

引き続いて、ＲＴ－ＰＣＲによって欠失変異の分子的分析を、４１／４６のケースに対し

て実施した（表５）。これらのうち、３４ケースは、欠失変異に特異的なＤＨ８．３と同型を示した：１２ケースは、ＲＴ－ＰＣＲおよび免疫組織化学の両方においてポジティブであり、そして２２ケースはネガティブ／ネガティブであった。３つのケース（＃２、＃３４、＃４０）は、欠失変異についてＤＨ８．３ポジティブ／ＲＴ－ＰＣＲネガティブであり、そして３つのケース（＃１２、＃１８、＃３９）は、ＤＨ８．３ネガティブ／ＲＴ－ＰＣＲポジティブであった。本発明者らの以前の特異性の分析に基づいて予想された通り、ｍＡｂ８０６の免疫反応性が、１つのケース（＃３５）を除く全てのＤＨ８．３ポジティブな組織において、観察された。

【０２９０】

ケース＃３もまた、変異を示した（表５においてＡ２と記される）、これは、ｄｅ２－７変異の配列を含むが、このことは、８０１塩基の消失している古典的なｄｅ２－７欠失であるようではなかった（データは示さず）。このケースは、ＤＨ８．３反応性についてネガティブであったが、８０６と反応性を示し、このことは、８０６がさらなる可能性のある独特のＥＧＦＲ変異を認識し得ることを示す。

【０２９１】

（表５）

（ｍＡｂ５２８、ｍＡｂ８０６およびｍＡｂ　ＤＨ８．３を用いた、４６の非選択のグリア芽細胞腫の免疫組織化学分析）

【０２９２】

【表８】

#	528	806	DH8.3	EGFR Amp.*	5' MUT
1	++++	++++	++	A	5' MUT
2	++++	++++	++++	N	WT
3	++++	++++ (det.)	ネガティブ	N	A2
4	++++	++++	ネガティブ	N	WT
5	++++	++++	++++	N	5' MUT
6	++++	++++	ネガティブ	A	WT
7	++++	++++	++++	N	5' MUT
8	++++	++++	++++	A	5' MUT
9	++++	++++	ネガティブ	A	WT
10	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
11	++	++	++	A	5' MUT
12	++++	++	ネガティブ	A	5' MUT
13	++++	++++	ネガティブ	N	WT
14	++	ネガティブ	ネガティブ	Nd	nd

15	++	++	ネガティブ	N	WT
16	+	ネガティブ	ネガティブ	N	nd
17	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
18	++++	++++	ネガティブ	A	5' MUT
19	++++	++++	ネガティブ	N	WT
20	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
21	++++	++++	ネガティブ	N	WT
22	+++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
23	++++	++++	++	N	5' MUT
24	++++	++++	ネガティブ	A	WT
25	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
26	++++	++++	+++	A	5' MUT
27	ネガティブ	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
28	+++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
29	ネガティブ	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
30	++++	++++	ネガティブ	N	WT
31	++++ par det	ネガティブ	ネガティブ	N	nd
32	++	+++	++	N	5' MUT
33	+++	++++	++++	A	5' MUT
34	++++	+++	++++	N	WT
35	++++	ネガティブ	++++	A	5' MUT
36	+++	++	+++	A	5' MUT
37	++++	+	+	A	5' MUT
38	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
39	++	ネガティブ	ネガティブ	N	5' MUT
40	++++	++++	+	A	WT
41	++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
42	++++	++++	ネガティブ	A	WT
43	++++	ネガティブ	ネガティブ	nd	nd
44	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
45	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
46	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	nd

＊Ｎ＝増幅していない、Ａ－増幅した
＋ＷＴ＝野生型、５’－ｍｕｔ
ｎｄ＝非実施
８０６抗体の反応性は、１９／２７のケースまたは７０％を越えるケースにおいて、増幅したＥＧＦＲまたはｄｅ２－７変異ＥＧＦＲと同型を示した。これらの８ケースのうちの２ケースはまた、ＤＨ８．３反応性であったことに注目するべきである。

【０２９３】

（実施例１６）

（頭蓋内神経膠腫腫瘍の組織的処置および分析）

抗ΔＥＧＦＲモノクローナル抗体ｍＡｂ８０６の効率を試験するために、本発明者らは、頭蓋内ΔＥＧＦＲ過剰発現グリーマ異種移植片を有するヌードマウスを、ｍＡｂ８０６、アイソタイブコントロールＩｇＧまたはＰＢＳの頭蓋内注入で処置した。

【０２９４】

ヒト神経膠腫細胞株Ｕ８７ＭＧ、ＬＮ－Ｚ３０８およびＡ１２０７（Ｄｒ．Ｓ．Ａａｒｏｎｓｏｎ，Ｍｏｕｎｔ Ｓｉｎａｉ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹより供与）を、ΔＥＧＦＲウイルス、キナーゼ欠損ΔＥＧＦＲ（ＤＫ）ウイルス、または野生型ＥＧＦＲ（ｗｔＥＧＦＲ）ウイルスで感染させた。同程度に高いレベルのＥＧＦＲを発現する集団を、蛍光活性化セルソーティングによって選択し、そしてそれぞれ、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ、Ｕ８７ＭＧ．ＤＫ、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ、ＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ、ＬＮ－Ｚ３０８．ＤＫ、ＬＮ－Ｚ３０８．ｗｔＥＧＦＲ、Ａ１２０７．ΔＥＧＦＲ、Ａ１２０７．ＤＫおよびＡ１２０７．ｗｔＥＧＦＲと称する。各々をＧ

４１８（Ｕ８７ＭＧ細胞株、４００μｇ／ｍｌ；ＬＮ－Ｚ３０８細胞株およびＡ１２０７細胞株、８００μｇ／ｍｌ）を含む培地中で維持した。

【０２９５】

Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞をヌードマウスに頭蓋内移植し、そして同日に処置を開始した。５μｌのＰＢＳ中の10^5個の細胞をヌードマウスの脳の右線条体中に移植した。ｍＡｂ８０６、またはＩｇＧ２ｂアイソタイプコントロールを用いる全身処置を、移植後０日～１４日に、１日おきに容量１００μｌ中ので１ｍｇのｍＡｂの腹腔内注入によって行った。頭蓋内Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ腫瘍の直接的な治療のために、１０μｇのｍＡｂ８０６、またはＩｇＧ２ｂアイソタイブコントロールを、容量５μｌで、第１日に開始して５日間、１日おきに、腫瘍注入部位に注入した。

【０２９６】

ＰＢＳまたはアイソタイブコントロールＩｇＧで処置した動物は、１３日の生存中央値を有し、一方ではｍＡｂ８０６で処置したマウスは、２１日までの生存中央値の６１．５％の増加を有した（Ｐ＜０．００１）。

【０２９７】

腫瘍確立後、移植後３日のマウスの処置はまた、コントロール群と比較して、ｍＡｂ８０６処置動物の生存中央値を４６．１％（１３日～１９日；ｐ＜０．０１）延長した。

【０２９８】

これらのｍＡｂ８０６の抗腫瘍効果がＵ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ異種移植片に対して延長するかどうかを決定するために、同様の処置を、ＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲおよびＡ１２０７．ΔＥＧＦＲの他の神経膠腫細胞異種移植片を有する動物に施行した。ＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ異種移植片を有するマウスのｍＡｂ８０６処置の生存中央値を、コントロールについての１９日から５８日に延長した（Ｐ＜０．００１）。注目すべきは、ｍＡｂ８０６処置動物の８匹のうち４匹が、６０日を越えて生存したことである。Ａ１２０７．ΔＥＧＦＲ異種移植片を有する動物の生存中央値をまた、コントロールについての２４日から２９日に延長した（Ｐ＜０．０１）。

【０２９９】

（ｍＡｂ８０６処置は、ΔＥＧＦＲ過剰発現脳腫瘍の増殖を阻害する）

Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ異種移植片およびＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ異種移植片を有するマウスを、それぞれ９日および１５日に安楽死させた。腫瘍切片を組織病理学的に分析して、そして腫瘍容量を決定した。動物の生存について観察された結果と一致して、ｍＡｂ８０６処置は、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲのおよそ９０％までの容量を有意に低減し（Ｐ＜０．００１）、そしてＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲは、コントロール群のものと比較して、９５％より多くの異種移植片を低減した（Ｐ＜０．００１）。同様の結果を、Ａ１２０７．ΔＥＧＦＲ腫瘍を有する動物について得た（６５％容量の低減、Ｐ＜０．０１）。

【０３００】

（ｍＡｂ８０６での腫瘍内処置は、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ脳腫瘍を有するマウスの生存を延長する）

Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ異種移植片の処置に対する、ｍＡｂ８０６の直接的腫瘍内注入の有効性もまた、決定した。移植後１日に、ｍＡｂ８０６またはアイソタイプコントロールＩｇＧの腫瘍内注入を動物に施した。コントロールの動物は、１５日間生存し、一方でｍＡｂ８０６処置したマウスは、１８日間生存し続けた（Ｐ＜０．０１）。ｍＡｂ８０６の腫瘍内処置はいくらか有効であるが、複数回の頭蓋内注入の困難さ、および感染のリスクの増大を伴う。従って、本発明者らは、さらなる研究のために全身処置に着目した。

【０３０１】

（ｍＡｂ８０６処置は、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ頭蓋内異種移植片を有するマウスの生存を僅かに延ばすが、Ｕ８７ＭＧ頭蓋内異種移植片を有するマウスもＵ８７ＭＧ．ＤＫ頭蓋内異種移植片を有するマウスも、生存を延ばさない）

ｍＡｂ８０６による増殖阻害がΔＥＧＦＲを発現する腫瘍に選択的であるかどうかを決定するために、本発明者らはＵ８７ＭＧ、Ｕ８７ＭＧ．ＤＫ（キナーゼ欠損ΔＥＧＦＲ）お

よびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲの脳異種移植片を有する動物を処置した。ｍＡｂ８０６処置は、低レベルの内在性の野生型ＥＧＦＲ（ｗｔＥＧＦＲ）を発現するＵ８７ＭＧ腫瘍を移植されたマウスの生存も、低レベルの内在性ｗｔＥＧＦＲに加えて、キナーゼ欠損ΔＥＧＦＲを過剰発現するＵ８７ＭＧ．ＤＫ異種移植片を有する動物の生存も、延ばさなかった。ｍＡｂ８０６処置は、ｗｔＥＧＦＲを過剰発現するＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ腫瘍を有するマウスの生存を僅かに延ばした（Ｐ＜０．０５、コントロール群に対して、生存中央値２３日　対　２６日）。

【０３０２】

（ｍＡｂ８０６の反応性は、インビボの抗腫瘍効果と相関がある）

異なるレベルのＥＧＦＲまたは異なる型のＥＧＦＲを発現する腫瘍に対する、ｍＡｂ８０６の異なる効果を理解するために、本発明者らは、ＦＡＣＳ分析によって種々の腫瘍細胞とのｍＡｂ８０６の反応性を決定した。以前の報告と一致して、抗ＥＧＦＲモノクローナル抗体５２８は、ΔＥＧＦＲおよびｗｔＥＧＦＲの両方を認識し、そしてＵ８７ＭＧ細胞と比較して、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞に対してより強い染色を実証した。対照的に、抗体ＥＧＦＲ．１は、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞がＵ８７ＭＧ細胞と同程度に弱い反応性であったので、ｗｔＥＧＦＲと反応したが、ΔＥＧＦＲとは反応しなかった。このＥＧＦＲ．１抗体は、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞がｗｔＥＧＦＲを過剰発現していたので、Ｕ８７ＭＧ細胞よりもより強力にＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲと反応した。ｍＡｂ８０６は、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞およびＵ８７ＭＧ．ＤＫ細胞と強力に反応し、そしてＵ８７ＭＧ細胞とは反応しないが、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲとは弱く反応した。このことは、ｍＡｂ８０６が、過剰発現したｗｔＥＧＦＲに対して弱い交差活性を有するΔＥＧＦＲに対して選択的であることを示す。Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲとの反応性のこのレベルは、抗体処置によって媒介される生存延長に対して、量的および質的に類似であった。

【０３０３】

本発明者らはさらに、免疫沈降によってｍＡｂ８０６の特異性を決定した。種々の細胞株におけるＥＧＦＲを、抗体５２８、ＥＧＦＲ．１およびｍＡｂ８０６を用いて免疫沈降した。次いで、電気泳動によって分離されたタンパク質をブロットを、抗ＥＧＦＲ抗体Ｃ１３（これは、ｗｔＥＧＦＲならびにΔＥＧＦＲおよびＤＫを認識する）を用いて探索した。ＦＡＣＳ分析と一致して、抗体５２８はｗｔＥＧＦＲおよび変異レセプターを認識し、一方で抗体ＥＧＦＲ．１は、ｗｔＥＧＦＲと反応したが、変異種とは反応しなかった。さらに、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞およびＵ８７ＭＧ．ＤＫ細胞における変異レセプターのレベルは、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞におけるｗｔＥＧＦＲのレベルに合致した。しかし、抗体ｍＡｂ８０６は、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞およびＵ８７ＭＧ．ＤＫ細胞から沈殿した大量の変異レセプターと比較して、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞溶解物からの少量のｗｔＥＧＦＲのみを沈殿可能であり、そしてＵ８７ＭＧ細胞からは検出可能な量は沈殿出来なかった。まとめると、これらのデータは、ｍＡｂ８０６が、細胞表面に過剰発現される場合にのみｗｔＥＧＦＲの小さな画分中にも存在する、ΔＥＧＦＲにおけるエピトープを認識することを示唆する。

【０３０４】

（ｍＡｂ８０６処置は、Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ脳腫瘍において、ΔＥＧＦＲの自己リン酸化を低減し、そしてＢｃｌ．$Ｘ_{Ｌ}$の発現を下方制御する）

本発明者らは、次に、ｍＡｂ８０６による増殖阻害の背景にある機構を調査した。構成的に活性なキナーゼ活性およびΔＥＧＦＲのカルボキシル末端の自己リン酸化は、生物学的機能に必須であるので、本発明者らは、処理された動物およびコントロール動物由来の腫瘍において、ΔＥＧＦＲリン酸化状態を決定した。レセプターのレベルは、ｍＡｂ８０６処置した異種移植片において僅かに減少するのみであったが、ｍＡｂ８０６処置は、ΔＥＧＦＲ自己リン酸化を劇的に低減することを見出した。本発明者らは以前に、レセプターの自己リン酸化が、ΔＥＧＦＲ過剰発現腫瘍のアポトーシスを低減することに重要な役割を有する抗アポトーシス遺伝子Ｂｃｌ－$Ｘ_{Ｌ}$を上方制御することを示した。従って、本発明者らは、次に、Ｂｃｌ－ＸＬの発現に対するｍＡｂ８０６の効果を決定した。ｍＡｂ

８０６処置動物からのΔＥＧＦＲ腫瘍は、実際に、Ｂｃｌ－X_Lの低下したレベルを示した。

【０３０５】

（Ｕ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ腫瘍において、ｍＡｂ８０６処置は、増殖および脈管新生を低下し、そしてアポトーシスを増大させる）

ｍＡｂ８０６処置によって生じるインビボ抑制およびレセプターシグナル伝達に対するその生化学的効果を考えて、本発明者らは、コントロールまたは処置したマウス由来の腫瘍の増殖速度を決定した。ｍＡｂ８０６処置した腫瘍のＫｉ－６７染色によって測定する増殖指標は、コントロール腫瘍の指標よりも有意に低かった（Ｐ＜０．００１）。更に、ＴＵＮＥＬ染色を介したアポトーシス指標の分析は、コントロール腫瘍と比較して、ｍＡｂ８０６処置した腫瘍におけるアポトーシス細胞の数の有意な増加を実証した（Ｐ＜０．００１）。腫瘍の血管新生の範囲をまた、ＣＤ３１に対する処置種およびコントロール種由来の腫瘍の免疫染色によって分析した。腫瘍の血管新生を定量するために、微小血管の領域（ＭＶＡ）を、コンピューター処理の画像解析を使用して測定した。ｍＡｂ８０６処置した腫瘍は、コントロール腫瘍よりも３０％未満のＭＶＡを示した（Ｐ＜０．００１）。レセプターと抗体との間の相互作用が炎症応答を導き得るかどうかを理解するために、本発明者らは、マクロファージマーカーのＦ４／８０、およびＮＫ細胞マーカーのアシアロＧＭ１について腫瘍切片を染色した。マクロファージは、腫瘍マトリクス全体で認識され、そして特にｍＡｂ８０６処置したＵ８７ＭＧ．ΔＥＧＦＲ腫瘍の周囲の辺りに蓄積した。本発明者らは、腫瘍中および腫瘍周辺に浸潤した、僅かなＮＫ細胞、およびｍＡｂ８０６処置とアイソタイプコントロール腫瘍との間に有意な差異のないことを観察した。

【０３０６】

（実施例１７）

（ｍＡｂ８０６およびｍＡｂ５２８を用いる併用治療）

この研究が理解戴けてますか？この実施例は、他の前記の実施例とはいくらか異なる形式である。

【０３０７】

本明細書中に記載される実験は、本発明に従う抗体の効果を決定するために設計された、インビボ研究を記載する。

【０３０８】

メスのヌードマウス（４～６週齢）を実験動物として使用した。マウスは、各々の腹側部において3×10^6個の腫瘍細胞の皮下（ｓｕｂｓｃｕｔａｎｅｏｕｓ）接種を受けた。この動物は、Ｕ８７ＭＧ．Ｄ２－７、Ｕ８７ＭＧ．ＤＫ、またはＡ４３１細胞のいずれか（こららの全ては前出に記載されている）を受けた。治療は、腫瘍が十分な大きさに成長した時に開始した。

【０３０９】

次いでマウスは、（ｉ）リン酸緩衝化生理食塩水、（ｉｉ）ｍＡｂ８０６（１回の注入当たり０．５ｍｇ）、（ｉｉｉ）ｍＡｂ５２８（１回の注入当たり０．５ｍｇ）または（ｉｖ）両方のｍＡｂの併用、のうちの１つの注入を受けた。「（ｉｖ）」に関して、異なる群のマウスが、各ｍＡｂの１回の注入当たり０．５ｍｇ、または各ｍＡｂの１回の注入当たり０．２５ｍｇを受けた。

【０３１０】

試験したマウスの第１群は、Ｕ８７ＭＧ．Ｄ２－７の注入を受けた群であった。この処置プロトコルは、接種後９日に開始し、そして１週当たり３回を２週間続けた（すなわち、これらの動物に、細胞の注入を受けた後、９日、１１日、１３日、１６日、１８日および２０日に接種した）。処置プロトコルの開始時に、平均腫瘍直径は１１５mm^3だった。各群は、５０匹のマウスを含み、各々は２つの腫瘍を有した。

【０３１１】

抗体（各々、１回の注入当たり０．５ｍｇ）の併用を受けたマウスの群内で、３つの完全な退行があった。他の全ての群においては退行は全くなかった。図１８Ａは、結果を図示

する。

【０３１２】

マウスの第２群においては、１回の注入当たり各抗体０．２５ｍｇを含む併用治療を除き、注入された物質は同一である。この注入を、細胞接種後１０日、１２日、１４日、１７日、１９日および２１日に、施した。治療の開始時点で、平均腫瘍サイズは１１４mm^3であった。結果を図１８Ｂに示す。

【０３１３】

マウスの第３群は、Ｕ８７ＭＧ．ＤＫの接種を受けた。治療剤の注入を、細胞の接種後１８日に開始し、そして２０日、２２日、２５日、２７日および２９日まで続けた。処置開始時の平均腫瘍サイズは、１０７mm^3だった。図１８Ｃは、結果の要約を示す。治療剤の注入は、第１群における注入と同一だった。

【０３１４】

最後に、マウスの第４群は、Ａ４３１細胞で接種されて、接種後８日、１０日、１２日および１４日に、群Ｉおよび群ＩＩＩにおける注入と同じ注入を受けた。開始時点で、平均腫瘍サイズは７１mm^3だった。結果を図１８Ｄに示す。

【０３１５】

これらの結果は、併用の抗体治療が腫瘍を低減させることにおいて相乗効果を示したことを示す。図１８Ａを参照のこと。同様の効果は、図１８Ｂにより、より低い用量で見られ、このことは、この効果が投薬レベルのみに起因するのではないことを示唆する。

【０３１６】

併用治療は、Ｕ８７ＭＧ．ＤＫの増殖を阻害しなかった（図１８Ｃ）。このことは、抗体の免疫機能が、図１８Ａおよび図１８Ｂにおいて見られる低下の原因ではないことを示した。

【０３１７】

図１８Ｄに示されるように、併用治療はまた、Ａ４３１腫瘍に対する相乗的な有効性を提示し、４用量が６０％の完全な応答比率を導いたことが、注目される。これらのデータは、ｍＡｂ８０６によって認識されるＥＧＦＲ分子が、５２８によって阻害されるＥＧＦＲ分子とは機能的に異なることを示唆する。

【０３１８】

（参考文献）

【０３１９】

【表９】

1. Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Friedman, A. H., and Bigner, D. D. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII, Cancer Res. *57:* 4130-40, 1997.
2. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer, Br J Cancer. *82:* 186-94, 2000.
3. Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., and et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas, Cancer Res. *55:* 3140-8, 1995.

4. Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas, Cancer Res. *53:* 3217-20, 1993.

5. Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., and Collins, V. P. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails, Proc Natl Acad Sci U S A. *89:* 4309-13, 1992.

6. Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas, Proc Natl Acad Sci U S A. *89:* 2965-9, 1992.

7. Yamazaki, H., Ohba, Y., Tamaoki, N., and Shibuya, M. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors, Jpn J Cancer Res. *81:* 773-9, 1990.

8. Yamazaki, H., Fukui, Y., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Kawamoto, T., Taniguchi, S., and Shibuya, M. Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors, Mol Cell Biol. *8:* 1816-20, 1988.

9. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas, Proc Natl Acad Sci U S A. *87:* 8602-6, 1990.

10. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity, Proc Natl Acad Sci U S A. *91:* 7727-31, 1994.

11. Batra, S. K., Castelino-Prabhu, S., Wikstrand, C. J., Zhu, X., Humphrey, P. A., Friedman, H. S., and Bigner, D. D. Epidermal growth factor ligand-

independent, unregulated, cell- transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene, Cell Growth Differ. *6:* 1251-9, 1995.

12. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis, Cancer Res. *56:* 5079-86, 1996.
13. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target, J Neurovirol. *4:* 148-58, 1998.
14. Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H., and Bigner, D. D. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma, Proc Natl Acad Sci U S A. *87:* 4207-11, 1990.
15. Okamoto, S., Yoshikawa, K., Obata, Y., Shibuya, M., Aoki, S., Yoshida, J., and Takahashi, T. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor, Br J Cancer. *73:* 1366-72, 1996.
16. Hills, D., Rowlinson-Busza, G., and Gullick, W. J. Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody, Int J Cancer. *63:* 537-43, 1995.
17. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors, Cancer Res. *55:* 5536-9, 1995.
18. Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., and Mendelsohn, J. Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin, J Clin Oncol. *18:* 904, 2000.

19. Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas, Neurosurgery. *39:* 478-83, 1996.

20. Ponten, J. and Macintyre, E. H. Long term culture of normal and neoplastic human glia, Acta Pathol Microbiol Scand. *74:* 465-86, 1968.

21. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti- epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies, Cancer Res. *44:* 1002-7, 1984.

22. Domagala, T., Konstantopoulos, N., Smyth, F., Jorissen, R. N., Fabri, L., Geleick, D., Lax, I., Schlessinger, J., Sawyer, W., Howlett, G. J., Burgess, A. W., and Nice, E. C. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between Epidermal Growth Factor (EGF) and the Extracellular Domain of the EGF receptor., Growth Factors. *18:* 11-29, 2000.

23. Lindmo, T., Boven, E., Cuttitta, F., Fedorko, J., and Bunn, P. A., Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess, J Immunol Methods. *72:* 77-89, 1984.

24. Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling, J Biol Chem. *272:* 2927-35, 1997.

25. Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N- succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate, Cancer Res. *57:* 1510-5, 1997.

26. Santon, J. B., Cronin, M. T., MacLeod, C. L., Mendelsohn, J., Masui, H., and Gill, G. N. Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice, Cancer Res. *46:* 4701-5, 1986.

27. Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials, Ann Oncol. *8:* 1197-206, 1997.

28. den Eynde, B. and Scott, A. M. Tumor Antigens. *In:* P. J. Delves and I. M. Roitt (eds.), Encyclopedia of Immunology, Second Edition edition, pp. 2424-31. London: Academic Press, 1998.

29. Seymour, L. Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges, Cancer Treat Rev. *25:* 301-12, 1999.

30. Sturgis, E. M., Sacks, P. G., Masui, H., Mendelsohn, J., and Schantz, S. P. Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer, Otolaryngol Head Neck Surg. *111:* 633-43, 1994.

31. Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P., and Mendelsohn, J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model, Clin Cancer Res. *1:* 1311-8, 1995.

32. Reist, C. J., Archer, G. E., Kurpad, S. N., Wikstrand, C. J., Vaidyanathan, G., Willingham, M. C., Moscatello, D. K., Wong, A. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts, Cancer Res. *55:* 4375-82, 1995.

33. Reist, C. J., Garg, P. K., Alston, K. L., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N- succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate, Cancer Res. *56:* 4970-7, 1996.

34. Press, O. W., DeSantes, K., Anderson, S. K., and Geissler, F. Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores, Cancer Res. *50:* 1243-50, 1990.

35. Reist, C. J., Batra, S. K., Pegram, C. N., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent, Nucl Med Biol. *24:* 639-47, 1997.

36. Mineo, C., Gill, G. N., and Anderson, R. G. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae, J Biol Chem. *274:* 30636-43, 1999.

37. Gunther, N., Betzel, C., and Weber, W. The secreted form of the epidermal growth factor receptor. Characterization and crystallization of the receptor-ligand complex, J Biol Chem. *265:* 22082-5, 1990.

（実施例１８）

（ＤＥ２－７上皮細胞増殖因子レセプター（ＥＧＦＲ）に対して特異的な新規のモノクローナル抗体は、ＥＧＲＦ遺伝子増幅を含有する細胞において発現されるＥＧＦＲもまた認識する）

以下の実験は、Ｊｏｈｎｓら（２００２）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，９８、および同

時継続中の出願番号第６０／３４２、２５８号（２００１年１２月２１日出願）（この両方の開示の全体が、本明細書において、適切な場合、本明細書中の図に相互参照される参考として援用される）において提示される。モノクローナル抗体ｍＡｂ８０６を研究して、そしてＥＧＦレセプターに関する結合特性に関係する追加データを得た。これは本明細書中の前の方に提示されるデータに追加して、そしてそれらの実証である。従って、以下の提示は特許出願および対応する刊行物において記載される、概要および物質を示す。

【０３２０】

モノクローナル抗体（ＭＡｂ８０６）は、潜在的に、腫瘍細胞の表面上に発現したＥＧＦＲを標的化することに関連する困難さを打開する。ＭＡｂ８０６は、ｄｅ２－７ＥＧＦＲでトランスフェクションされたＵ８７ＭＧ神経膠腫細胞（Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７）に高親和性（約１×１０^{9}Ｍ$^{-1}$）で結合したが、野生型ＥＧＦＲを発現する親細胞には結合しなかった。この観察と一致して、ＭＡｂ８０６は細胞外ドメインを含む野生型ＥＧＦＲの可溶性バージョンに結合し得ない。対照的に、この細胞外ドメインのＥＬＩＳＡプレートへの固定化は、ＭＡｂ８０６の飽和かつ用量応答性の結合を導き、このことはＭＡｂ８０６が特定の条件下で野生型ＥＧＦＲに結合し得ることを示唆する。ＭＡｂ８０６はまた、ＥＧＦＲ遺伝子増幅に起因して多量のＥＧＦＲを発現するＡ４３１細胞の表面に結合した。興味深いことに、ＭＡｂ８０６は、Ａ４３１細胞により発現される総ＥＧＦＲ分子の１０％のみを認識し、そして結合親和性はｄｅ２－７ＥＧＦＲについて決定された親和性よりも低かった。ＭＡｂ８０６は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片を特異的に標的化し、そしてＡ４３１異種移植片は、注入後８ｈに検出されるＵ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片におけるピークレベルで、ヌードマウスにおいて増殖した。親のＵ８７ＭＧ異種移植片の特異的な標的化は、観察されなかった。Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞への結合の後、ＭＡｂ８０６をマクロビノサイトーシス（ｍａｃｒｏｐｉｎｏｃｙｔｏｓｉｓ）により直ちに内部移行させて、続いてリポソームに輸送した（初期の標的化ピークに貢献する可能性のあるプロセスが、異種移植片において観察された）。従って、ＭＡｂ８０６を使用して、ＥＧＦＲ遺伝子増幅またはｄｅ２－７ＥＧＦＲを含む腫瘍細胞を標的化し得るが、これは細胞表面に発現されない場合、野生型ＥＧＦＲには結合しない。

【０３２１】

上記に論じられるように、ＭＡｂ８０６はｄｅ２－７ＥＧＦＲに特異的であるが、特有の接合部ペプチドからは明確に識別可能なエピトープに結合する。興味深いことに、ＭＡｂ８０６は神経膠腫細胞の細胞表面上に発現される野生型ＥＧＦＲを認識しなかったが、これはＥＬＩＳＡプレート表面に固定された野生型ＥＧＦＲの細胞外ドメインに実際に結合した。さらに、ＭＡｂ８０６は、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅を有するが、ｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現しない、Ａ４３１細胞の表面に結合した。従って、本発明者らの結果は、変異したレセプターを共発現する腫瘍が依然として好ましい標的化を示すが、ＭＡｂ８０６を使用して、腫瘍のｄｅ２－７ＥＧＦＲの状態に関係なく、増幅されたＥＧＦＲを有する腫瘍を特異的に標的化し得ることが、可能である。ＭＡｂ８０６は遺伝子増幅の非存在下において野生型レセプターに結合しないので、現在開発されているＥＧＦＲ抗体（[18、19]）に関係する潜在的な問題である、正常組織における取り込みは存在しない。

【０３２２】

（材料および方法）

（ＭＡｂおよび細胞株）

Ｕ８７ＭＧ星状細胞腫細胞株は、先に詳細に記載されている[20]。この細胞株を、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲを含むレトロウイルスで感染し、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞株を生成した。１０のヒト扁平上皮癌腫Ａ４３１細胞を、ＡＴＣＣ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ）から得た。これらの細胞株を、１０％ＦＣＳ（ＣＳＬ、Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）で補填したＧｌｕｔａＭＡＸ^{TM}（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）とともにＤＭＥＭ／Ｆ－１２中で培養した。任意の公知のＥＧＦＲ関連分子を発現しない、マウスｐｒｏ－Ｂ細胞株ＢａＦ／３を、上記のように、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲでトランスフェクトした。ＤＨ８．３抗体（ＩｇＧ１）は

先に記載されており、そしてｄｅ２－７　ＥＧＦＲ中で見出される特有の接合部ペプチドを用いたマウスの免疫化の後に得た[16]。ＭＡｂ　８０６（ＩｇＧ２ｂ）は、ｄｅ２－７ＥＧＦＲでトランスフェクトしたＮＲ６マウス線維芽細胞を用いたマウスの免疫化の後に産生された。それは、さらなる特徴付けのために選択され、血球凝集アッセイは、ＮＲ６．ΔＥＧＦＲ細胞に対しで高い力価を、しかしＮＲ６．ｗｔＥＧＦＲ細胞に対しては低バックグラウンドを示した。ｄｅ２－７および野生型ＥＧＦＲの両方を認識する５２８抗体は、先に記載され[21]、そしてＡＴＣＣから得たハイブリドーマを用い、Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ（Ｌｕｄｗｉｇ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ）において生産された。ＥＧＦＲのＣＯＯＨ末端ドメインに対して惹起されたポリクローナル抗体ｓｃ－０３は、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ、ＣＡ）から購入した。

【０３２３】

（その他の試薬）

野生型ＥＧＦＲの組換細胞外ドメイン（アミノ酸１－６２１）（ｓＥＧＦＲ）は、先に記載[22]のように生産された。ｄｅ２－７　ＥＧＦＲからのビオチン化された特有の接合部ペプチド（ビオチン－ＬＥＥＫＫＧＮＹＶＶＴＤＨ）は、標準的なＦｍｏｃ化学により合成し、そして純度（＞９６％）は、逆相ＨＰＬＣおよび質量スペクトル分析（Ａｕｓｐｅｐ、Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）により決定した。

【０３２４】

（ＦＡＣＳ分析）

細胞を、関係する抗体（１０μｇ／ｍｌ）、次にフルオレセイン結合体化ヤギ抗マウスＩｇＧ（１：１００希釈；Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）で標識した。ＦＡＣＳデータを、Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｅｐｉｃｓ　Ｅｌｉｔｅ　ＥＳＰ上で、最小５，０００事象を観察することにより得、そしてＷｉｎｄｏｗｓ（登録商標）用のＥＸＰＯ（ｖｅｒｓｉｏｎ　２）を用いて分析した。

【０３２５】

（ＥＬＩＳＡアッセイ）

２つのタイプのＥＬＩＳＡを用いて抗体の特異性を決定した。第１のアッセイでは、プレートをＳｅｇｆｒ（０．１Ｍ炭酸緩衝液ｐＨ９．２中で１０μｇ／ｍｌ）で２時間コートし、そして次にＰＢＳ中の２％ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）でブロックした。抗体を、リン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）中の２％ＨＳＡ中、漸増濃度で、ウェルに添加した（３連で）。結合した抗体は、基質としてＡＢＴＳ（Ｓｉｇｍａ、Ｓｙｄｎｅｙ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を用い、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ヒツジ抗マウスＩｇＧ（Ｓｉｌｅｎｕｓ、Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）により検出し、そして４０５ｎｍで吸光度を測定した。第２のアッセイでは、ビオチン化ｄｅ２－７特異的ペプチドを、ストレプトアビジン（Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋ－ｆｏｒｄ、Ｉｌｌｉｎｏｉｓ）でプレコートしたＥＬＩＳＡプレートに結合させた。抗体は、第１のアッセイにおけるように結合および検出した。

【０３２６】

（Ｓｃａｔｃｈａｒｄ分析）

抗体を、クロラミンＴ法により、^{125}Ｉ（Ａｍｒａｄ、Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）で標識し、そして免疫反応性をＬｉｎｄｍｏアッセイにより測定した[23]。すべての結合アッセイは、１％ＨＳＡ／ＰＢＳ中で、１～２×１０^{6}生存Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞またはＡ４３１細胞に対し、９０分間４℃で穏やかに回転して実施した。１０ｎｇ／ｍｌの^{125}Ｉ標識抗体の設定濃度を、漸増濃度の適切な非標識抗体の存在下で用いた。非特異的結合は、非標識抗体の１０，０００倍過剰の存在下で測定した。^{125}Ｉ－放射標識ＭＡｂ　８０６またはＤＨ８．３抗体のいずれも親Ｕ８７ＭＧ細胞に結合しなかった。インキュベーションが終了した後、細胞を洗浄し、そしてＣＯＢＲＡ　ＩＩγカウンター（Ｐａｃｋａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｍｅｒｉｄｅｎ

、ＣＴ）を用い、結合した^{125}Ｉ－標識抗体についてカウントした。Ｓｃａｔｃｈａｒｄ分析は、免疫反応性の補正の後に行った。

【０３２７】

（内在化アッセイ）

Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を、ＭＡｂ　８０６またはＤＨ８．３抗体のいずれか（１０μｇ／ｍｌ）と１時間ＤＭＥＭ中４℃でインキュベートした。洗浄後、細胞を３７℃に予め暖められたＤＭＥＭに移し、そして３７℃でのインキュベーションの後、種々の時点でアリコートを採取した。内在化（インターナリゼーション）を、氷冷洗浄緩衝液（１％ＨＳＡ／ＰＢＳ）中でアリコートを直ちに洗浄することにより停止した。時間経過の終了時、細胞を上記のようにＦＡＣＳによって染色した。内在化のパーセントは、以下の式を用いてゼロ時間に対する種々の時点における表面抗体染色を比較することにより算出した：内在化抗体のパーセント＝（時間$_x$における平均蛍光－バックグラウンド蛍光）／（時間０における平均蛍光－バックグラウンド蛍光）×１００。この方法は、先に記載のような^{24}内在化を測定するためのヨウ素化抗体（ＭＡｂ　８０６）を用い、１アッセイで有効にした。異なる時点での内在化率における差異は、Ｓｔｕｄｅｎｔのｔ検定を用いて比較した。

【０３２８】

（Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞の電子顕微鏡観察）

Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を、ゼラチンでコートしたチャンバースライド（Ｎｕｎｃ、Ｎａｐｅｒｖｉｌｌｅ、ＩＬ）上で８０％集密まで増殖させ、そして次に氷冷ＤＭＥＭで洗浄した。次いで、細胞をＭＡｂ　８０６またはＤＨ８．３抗体と、ＤＭＥＭ中４５分間４℃でインキュベートした。洗浄後、細胞を、金結合体化（２０ｎｍ粒子）抗マウスＩｇＧ（ＢＢＩｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、Ｃａｒｄｉｆｆ、ＵＫ）と４℃でさらに３０分間インキュベートした。さらなる洗浄の後、予め暖めたＤＭＥＭ／１０％ＦＣＳを細胞に添加し、これを、１～６０分の種々の時間の間３７℃でインキュベートした。抗体の内在化は、氷冷培地により停止させ、そして細胞を、ＰＢＳ／０．１％ＨＳＡ中２．５％グルタルアルデヒドで固定し、そして次に２．５％四酸化オスミウム中で後固定した。アセトンの段階付けた系列により脱水した後、サンプルをＥｐｏｎ／Ａｒａｌｄｉｔｅ樹脂中に包埋し、Ｒｅｉｃｈｅｒｔ　Ｕｌｔｒａｃｕｔ－Ｓミクロトーム（Ｌｅｉｃａ）を用いて超薄片として切断し、そしてニッケルグリッド上に集めた。これら切片を、Ｐｈｉｌｉｐｓ　ＣＭ１２透過電子顕微鏡上８０ｋＶで観察する前に、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で染色した。コートされたピット内に含まれる金粒子の統計分析は、χ^2検定を用いて実施した。

【０３２９】

（免疫沈降研究）

細胞を、１６時間、１００μＣｉ／ｍｌのＴｒａｎ^{35}Ｓ－Ｌａｂｅｌ（ＩＣＮ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ、ＣＡ）と、５％透析ＦＣＳで補填したメチオニン／システインなしのＤＭＥＭ中で標識した。ＰＢＳでの洗浄の後、細胞を、溶解緩衝液（１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、３０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５００μＭ　ＡＥＢＳＦ、１５０ｎＭアプロチニン、１μＭ　Ｅ－６４プロテアーゼインヒビター、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡおよび１μＭロイペプチン、ｐＨ７．４）中に４℃で１時間置いた。溶解物を、１２，０００ｇにおける１０分間の遠心分離により清澄化し、次いで、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅの添加の前に、４℃で３０分間、５μｇの適切な抗体とインキュベートした。免疫沈降物を、溶解緩衝液で３回洗浄し、ＳＤＳサンプル緩衝液と混合し、４～２０％Ｔｒｉｓ／グリシンゲルを用いるゲル電気泳動により分離し、次にそれを乾燥し、そしてＸ線フィルムに曝した。

【０３３０】

（腫瘍をもつヌードマウスにおける生体分布）

腫瘍異種移植片を、３×１０^{6}のＵ８７ＭＧ細胞、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞またはＡ４３１細胞の皮下注射によってヌードＢＡＬＢ／ｃマウス中に確立した。Ｕ８７ＭＧ．Δ

２－７異種移植片におけるｄｅ２－７ＥＧＦＲ発現は、種々の時点で免疫組織化学により測定したとき、生体分布の期間を通じて安定なままである（データは示さず）。Ａ４３１細胞はまた、腫瘍異種移植片として増殖するとき、免疫組織化学により決定されるように、それらのＭＡｂ８０６反応性を保持していた。Ｕ８７ＭＧ細胞またはＡ４３１細胞は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を１つの側に注射する７～１０日前に、他方の側に注射した。なぜなら、ｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現する異種移植片についてより速い増殖速度が観察されたからである。抗体を放射線標識し、そして上記のように免疫反応性を評価し、そして腫瘍が１００～２００ｍｇ重量であったとき、後眼窩（ｒｅｔｒｏ－ｏｒｂｉｔａｌ）経路によりマウス中に注射した。各マウスは、２つの異なる抗体（２μｇ／抗体）：２μＣｉの^{125}Ｉ－標識ＭＡｂ８０６および２μＣｉの^{131}Ｉ－標識ＤＨ８．３または５２８を受けた。示されなければ、５匹のマウスの群を、注射後の種々の時点で屠殺し、そして心臓穿刺により血液を得た。腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓および肺を解剖により得た。すべての組織を秤量し、そして２チャンネルの計数ウインドウを用いて^{125}Ｉ活性および^{131}Ｉ活性についてアッセイした。各抗体についてのデータは、注射用量標準に対する比較により決定されたグラム腫瘍あたりの注射用量のパーセント（％ＩＤ／ｇ腫瘍）で表されるか、または血液／肝臓に対する腫瘍の比（すなわち、％ＩＤ／ｇ腫瘍÷％ＩＤ／ｇ血液または肝臓）に変換された。群間の差異は、Ｓｔｕｄｅｎｔのｔ検定で分析した。放射標識ＭＡｂ８０６注射の後、いくつかの腫瘍をホルマリン中に固定し、パラフィン中に包埋し、５μｍ切片に切断し、そして次にＸ線フィルム（ＡＧＦＡ、Ｍｏｒｔｓｅｌ、Ｂｅｌｇｉｕｍ）に曝し、オートラジオグラフィーにより抗体局在化を決定した。

【０３３１】

（結果）

（細胞株への抗体の結合）

ＭＡｂ　８０６およびＤＨ８．３抗体の特異性を確認するために、Ｕ８７ＭＧ細胞およびＵ８７ＭＧ．Δ２－７細胞への結合をＦＡＣＳにより分析した。関連のないマウスＩｇＧ２ｂを、ＭＡｂ８０６のイソ型コントロールとして含め、そして５２８抗体を、これがｄｅ２－７および野生型ＥＧＦＲの両方を認識するので含めた。５２８抗体のみがＵ８７ＭＧ細胞株を染色し得たことは（図１）、これら細胞が野生型ＥＧＦＲを発現することを示す先の報告[10]と一致する。ＭＡｂ８０６およびＤＨ８．３抗体の両方が関連のない抗体と類似の結合レベルを有したことは、それらが野生型レセプターを結合し得ないことを明確に示す（図１）。イソ型コントロール抗体のＵ８７ＭＧ．Δ２－７細胞への結合は、Ｕ８７ＭＧ細胞について観察されたそれと同様であった。ＭＡｂ８０６およびＤＨ８．３抗体が、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を免疫染色したことは、これらの抗体がｄｅ２－７ＥＧＦＲを特異的に認識することを示す（図１）。５２８抗体は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７を、親細胞より高い強度で染色した（図１）。なぜなら、この抗体が、これら細胞で同時発現されるｄｅ２－７および野生型レセプターの両方を結合するからである。重要なことは、ＭＡｂ８０６がまた、ＢａＦ／３．Δ２－７細胞株を結合したことであり、野生型ＥＧＦＲの同時発現はＭＡｂ８０６反応性に必要ではないことを示す（図１に示される、しかしデータは本明細書中に示さず）。

【０３３２】

（ＥＬＩＳＡアッセイにおける抗体の結合）

ＭＡｂ８０６およびＤＨ８．３抗体の特異性をさらに特徴付けるために、それらの結合をＥＬＩＳＡにより調べた。ＭＡｂ８０６および５２８抗体の両方は、固定化された野生型ｓＥＧＦＲに対し、用量依存性かつ飽和する結合曲線を示した（図２Ａ）。ｄｅ２－７ＥＧＦＲ中で見出された上記特有の接合部ペプチドがｓＥＧＦＲ内に含まれていないとき、ＭＡｂ８０６は、野生型ＥＧＦＲ配列内に位置するエピトープに結合されているはずである。５２８抗体の結合は、ＭＡｂ８０６について観察された結合よりおそらく低かった。なぜなら、それは、構造的決定基を認識するからである。予期されるように、ＤＨ８．３抗体は、１０μｇ／ｍｌまでの濃度でさえ野生型ｓＥＧＦＲを一様に結合しなかった（図２Ａ）。溶液中のｓＥＧＦＲは、５２８抗体の固定化されたｓＥＧＦＲへの結合を用量

依存様式で阻害したけれども、それは、ＭＡｂ８０６の結合を阻害し得なかった（図２Ｂ）。これは、ＭＡｂ８０６が、一旦ＥＬＩＳＡプレート上に固定化された（立体構造変化を誘導し得るプロセス）野生型ＥＧＦＲのみを結合し得ることを示唆する。ＢＩＡコアを用いて同様の結果が観察され、それによって、ＭＡｂ８０６は固定化ｓＥＧＦＲを結合したが、固定化されたＭＡｂ８０６は、溶液中のｓＥＧＦＲを結合し得なかった（データは示さず）。９５℃における１０分間の加熱による変性の後、溶液中のｓＥＧＦＲは、ＭＡｂ８０６の固定化されたｓＥＧＦＲへの結合を阻害し得（図２Ｃに示すが本明細書中にデータは示さない）、ＭＡｂ８０６は、特定の条件下で、野生型ＥＧＦＲを結合し得ることを確認した。興味深いことに、この変性したｓＥＧＦＲが、５２８抗体の結合を阻害し得なかったことは（図２Ｃに示すが本明細書中にデータは示さない）、この抗体が立体構造エピトープを認識することを示す。ＤＨ８．３抗体は、特有のｄｅ２－７ＥＧＦＲペプチドに対し、用量依存性で、かつ飽和可能な結合を示した（図２Ｄ）。ＭＡｂ８０６または５２８抗体のいずれも、ＤＨ８．３の飽和結合を得るために用いた濃度より高い濃度でさえ、このペプチドに結合しなかったことは、ＭＡｂ８０６が、このペプチド内のエピトープ決定基を認識しないことをさらに示す。

【０３３３】

（抗体のＳｃａｔｃｈａｒｄ分析）

各抗体の相対的親和性を決定するために、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を用いてＳｃａｔｃｈａｒｄ分析を実施した。ＭＡｂ８０６およびＤＨ８．３抗体の両方は、ヨウ素化されたとき高い免疫反応性を保持し、そして代表的には、ＭＡｂ８０６については９０％より大きく、そしてＤＨ８．３抗体については４５～５０％であった。ＭＡｂ８０６は、ｄｅ２－７ＥＧＦＲレセプターに対して１．１×１０^{9}Ｍ$^{-1}$の親和性を有し、その一方、ＤＨ８．３の親和性は、１．０×１０^{8}Ｍ$^{-1}$で数１０倍、より低かった。いずれのヨウ素化抗体もＵ８７ＭＧ親細胞に結合しなかった。ＭＡｂ８０６は、平均して細胞あたり２．４×１０^{5}の結合部位を認識し、ＤＨ８．３抗体結合は平均して５．２×１０^{5}部位であった。従って、抗体間でレセプター数が良好に一致していたのみならず、同じ細胞株上の異なるｄｅ２－７ＥＧＦＲ特異的抗体により測定されたような、細胞あたり２．５×１０^{5}ｄｅ２－７レセプターを示す先の報告２５とも一致した。

【０３３４】

（Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞による抗体の内在化）

標的細胞への結合後の抗体内在化の割合は、その腫瘍標的化性質および治療オプションの両方に影響する。その結果、本発明者らは、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞への結合後のＭＡｂ８０６およびＤＨ８．３抗体の内在化をＦＡＣＳにより調べた。両方の抗体は比較的迅速な内在化を示し、ＭＡｂ８０６は１０分で、そしてＤＨ８．３は３０分で定常状態に到達した（図３）。ＤＨ８．３の内在化は、割合（１０分で、ＭＡｂ８０６の３６．８％と比較して内在化ＤＨ８．３の８０．５％、Ｐ＜０．０１）および６０分における内在化総量（９３．５％対３０．４％、ｐ＜０．００１）の点の両方で有意により高かった。ＭＡｂ８０６は、実施した４つのアッセイのすべてにおいて、２０分に比較して３０分および６０分におけるわずかにより低いレベルの内在化を示した（図３）。この結果はまた、ヨウ素化ＭＡｂ８０６に基づく内在化アッセイを用いて確認された（データは示さず）。

【０３３５】

（抗体内在化の電子顕微鏡分析）

抗体間の内在化割合におけるこの差異が得られたので、抗体細胞内輸送の詳細な分析を、電子顕微鏡を用いて実施した。ＤＨ８．３抗体は、コートされたピットを経由して優先的に内在化したが（図１９Ａ）、ＭＡｂ８０６は、マクロピノサイトーシスにより内在化するようであった（図１９Ｂ）。事実、ＭＡｂ８０６とインキュベートした細胞中で形成された３２のコートされたピットの詳細な分析は、それらのいずれも抗体を含まなかったことを示した。対照的に、ＤＨ８．３とインキュベートした細胞からのすべてのコートされたピットの約２０％は、複数の金粒子を含む数でもって抗体陽性であった。コートされたピット内に含まれた金粒子の総数の統計的分析は、この差異が高度に有意であったこと

を見出した（ｐ＜０．０１）。２０～３０分後、両方の抗体は、形態学的にリソソームに似ている構造中に観察することができた（図１９Ｃ）。これら構造内の細胞細片の存在はまた、それらのリソソーム性質と一致する。

【０３３６】

（腫瘍保持ヌードマウスにおける抗体の生体分布）

ＭＡｂ８０６およびＤＨ８．３抗体の生体分布を、１つの側にＵ８７ＭＧ異種移植片を、そして他方の側にＵ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片を含むヌードマウス中で比較した。比較的短時間の期間をこの研究のために選択した。なぜなら、先の報告[16]は、ＤＨ８．３抗体が４～２４時間の間で腫瘍標的化のピークレベルを示すことを証明していたからである。％ＩＤ／ｇ腫瘍について、ＭＡｂ８０６は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片において、８時間で１８．６％ＩＤ／ｇ腫瘍のそのピークレベルに到達し（図４Ａ）、血液を除く任意のその他の組織よりかなり高かった．ＤＨ８．３もまた、８時間でピーク腫瘍レベルを示したが、そのレベルは、ＭＡｂ８０６と比較して統計的により低い（ｐ＜０．００１）８．８％ＩＤ／ｇ腫瘍であった（図４Ｂ）。両方の抗体のレベルは、２４時間および４８時間でゆっくりと傾斜した。[125]Ｉで標識したＭＡｂ８０６単独での注射後８時間で集めたＵ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片組織切片のオートラジオグラフィーは、生存腫瘍への抗体の局在化を明らかに示す（図２０）。いずれの抗体もＵ８７ＭＧ親異種移植片の特異的標的化は示さなかった（図４Ａ、４Ｂ）。血液／肝臓に対する腫瘍の比に関し、ＭＡｂ８０６は、血液（１．３の比）および肝臓（６．１の比）の両方について、２４時間で最高の比を示した（図５Ａ、５Ｂ）。ＤＨ８．３抗体は、血液において８時間で最高の比（０．３８の比）そして肝臓において２４時間で最高の比（１．５の比）を有し（図５Ａ、５Ｂ）、その両方は、ＭＡｂ８０６について得られた値よりかなり低い。

【０３３７】

（増幅されたＥＧＦＲを含む細胞へのＭＡｂ８０６の結合）

ＭＡｂ８０６が、増幅されたレセプター遺伝子を含む細胞中で発現されたＥＧＦＲを認識し得るか否かを調べるために、Ａ４３１細胞に対するその結合を分析した。ＦＡＣＳ分析により、低いが、高度に再現性のあるＡ４３１細胞へのＭＡｂ８０６の結合が観察された（図６）。ＤＨ８．３抗体がＡ４３１細胞を結合しなかったことは、ＭＡｂ８０６の結合が低レベルｄｅ２－７ＥＧＦＲ発現の結果ではなかったことを示す（図６）。予期されるように、抗ＥＧＦＲ５２８抗体は、Ａ４３１細胞の強い染色を示した（図６）。３つのこのような実験の平均は、細胞あたり２．４×１０^{5}レセプターとの９．５×１０^{7}Ｍ$^{-1}$の親和性の値を与えた。従って、このレセプターに対する親和性は、ｄｅ２－７ＥＧＦＲに対する親和性より数１０倍低かった。さらに、ＭＡｂ８０６は、Ａ４３１細胞の表面上に見出されるＥＧＦＲの小部分のみを認識するようである。５２８抗体を用いて細胞あたり約２×１０^{6}のレセプターが測定され、これは、多くの他の研究[26]と一致する。これらの結果が単にＡ４３１細胞株に限定されなかったことを確実にするために、ＭＡｂ８０６反応性を、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅を示す２つの他の細胞株中で調べた。ＨＮ５頭頸部細胞株[27]およびＭＤＡ－４６８胸部癌細胞株[28]の両方は、ＥＧＦＲ遺伝子の複数コピーを含むことが報告されている。これらの報告と一致して、５２８抗体は、両方の細胞株の強い染色を示した（図２１）。Ａ４３１細胞株とのように、ＭＡｂ８０６は、両方の細胞株を明らかに染色したが、５２８抗体で観察されたより低いレベルであった（図２１）。従って、ＭＡｂ８０６結合は、単にＡ４３１細胞に限定されず、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅を含む細胞について一般的な観察であるようである。

【０３３８】

（免疫沈降）

ＭＡｂ８０６反応性を、^{35}Ｓ標識化細胞を用いる免疫沈降によりさらに特徴付けた。ｓｃ－０３抗体（ＥＧＦＲのｃ末端ドメインに特異的な市販のポリクローナル抗体）は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞からの３つのバンドを免疫沈降させた；２つのｄｅ２－７ＥＧＦＲバンドに対応するダブレットがこれらの細胞で観察され、そしてより大きい分子量バンドはｗｔＥＧＦＲに対応する（図２２）。対照的に、ＭＡｂ８０６は、２つのｄｅ２－

７ＥＧＦＲバンドを免疫沈降したが、ｗｔＥＧＦＲは全くなかった。このｓｃ－０３抗体は、Ａ４３１細胞からのｗｔＥＧＦＲに対応する１つのバンドを免疫沈降した（図２２）。ＭＡｂ８０６もまた、Ａ４３１細胞からのｗｔＥＧＦＲに対応する１つのバンドを免疫沈降した（図２２）が、ＦＡＣＳおよびＳｃａｔｃｈａｒｄデータと一致して、ＭＡｂ８０６により免疫沈降されたＥＧＦＲの量は、細胞表面上に存在する総ＥＧＦＲより実質的に少なかった。ＭＡｂ８０６およびｓｃ－０３は、同様の量のｄｅ２－７ＥＧＦＲを免疫沈降したので、この結果は、ＭＡｂ８０６抗体が、レセプターを過剰発現する細胞において、ＥＧＦＲの一部分のみを認識するという観念を支持している。関連のないＩｇＧ２ｂ（ＭＡｂ８０６のイソ型コントロール）は、いずれの細胞株からのＥＧＦＲも免疫沈降しなかった（図２２）。同一の条件を用いて、ＭＡｂ８０６は、親Ｕ８７ＭＧ細胞からのＥＧＦＲを免疫沈降しなかった（データは示さず）。

【０３３９】

（ＭＡｂ８０６によるＡ４３１細胞のインビボ標的化）

第２の生体分布研究は、ＭＡｂ８０６を用いて実施し、それがＡ４３１腫瘍異種移植片を標的にし得るか否かを決定した。この研究は、ＭＡｂ８０６によるＵ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片の標的化に関するより多くの情報を得るためにより長い時間経過に亘り実施し、これは、ポジティブコントロールとしてすべてのマウスに含められた。さらに、抗ＥＧＦＲ５２８抗体を、Ａ４３１異種移植片に対するポジティブコントロールとして含めた。なぜなら、先の研究[21]が、ヌードマウスで増殖したＡ４３１細胞への、低いが有意であるこの抗体の標的化を示していたからである。最初の４８時間の間、ＭＡｂ８０６は、初期実験で観察されたのとほぼ同じ標的化性質を示した（図４Ａと比較される図７Ａ）。％ＩＤ／ｇ腫瘍に関し、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片中のＭＡｂ８０６のレベルは、２４時間の後にゆっくりと傾いたが、正常組織中で検出されたレベルより常に高く維持された。Ａ４３１異種移植片中の取り込みは比較的低かったが、肝臓、脾臓、腎臓および肺のような正常組織中で観察されなかった、最初の２４時間の間の％ＩＤ／ｇ腫瘍のわずかな増加が存在した（図７Ａ）。％ＩＤ／ｇ腫瘍として表されたとき、５２８抗体の取り込みは、両方の異種移植片において低かった（図７Ｂ）。^{125}Ｉ標識ＭＡｂ８０６単独での注射の後２４時間で集められたＡ４３１異種移植片組織切片のオートラジオグラフィーは、腫瘍周縁の周囲あり、かつ壊死の中央領域にない生存腫瘍への抗体の局在化を明瞭に示す（図２３）。血液に対する腫瘍の比に関し、ＭＡｂ８０６は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片について７２時間、そしてＡ４３１異種移植片について１００時間でピークとなった（図８Ａ、８Ｂ）。ＭＡｂ８０６について、腫瘍：血液比は、Ａ４３１腫瘍に関して１．０を超えることは決してなかったが、時間経過の全体に亘って増加し（図８Ｂ）、そして調べた他のすべての組織より高かったこと（データは示さず）は、標的化のレベルが低いことを示す。５２８抗体についての血液に対する腫瘍の比は、Ａ４３１異種移植片でより高いレベルが注記されたが、ＭＡｂ８０６に類似のプロフィールを示した（図８Ａ、８Ｂ）。ＭＡｂ８０６が、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７異種移植片において、７２時間で７．６の肝臓に対する腫瘍の比のピークを有したことは、正常組織に比較したこれら腫瘍における優先的取り込みを明らかに示す（図８Ｃ）。ＭＡｂ８０６についての器官に対する他の腫瘍の比は、肝臓において観察された比と類似した（データは示さず）。Ａ４３１異種移植片におけるＭＡｂ８０６の肝臓に対する腫瘍の比のピークが、約１（１ｏｄ）時間において２．０であったことは、正常組織と比較して腫瘍のわずかに優先的な取り込みを再び示す（図８Ｄ）。

【０３４０】

（討論）

ｄｅ２－７ＥＧＦＲ中で見出された特有の接合部ペプチドに対して惹起された先に記載のＬ８Ａ４モノクローナル抗体は、ＭＡｂ８０６に類似の様式で挙動する[38]。ｄｅ２－７ＥＧＦＲでトランスフェクトされたＵ８７ＭＧ細胞を用い、この抗体は、類似の内在化率（ＭＡｂ８０６について１時間で３０％と比較して１時間で３５％）を有し、そしてｄｅ２－７ＥＧＦＲでトランスフェクトされた３Ｔ３線維芽細胞を用いるとき、匹敵するイ

ンビボ標的化を示した（ＭＡｂ８０６について８時間で１８％ＩＤ／ｇ腫瘍と比較して２４時間で２４％ＩＤ／ｇ腫瘍のピーク）[25]。

【０３４１】

おそらく、現存のＥＧＦＲ抗体と比較して最も重要なＭＡｂ　８０６の利点は、ＭＡｂ８０６が、細胞障害性因子に直接結合し得ることである。このアプローチは、現在のＥＧＦＲ特異的抗体を用いて可能ではない。なぜなら、これらの抗体は、肝臓を標的化し、そして細胞障害性結合が、ほとんど確実に、重篤な毒性を引き起こすからである。抗体への細胞障害性因子（例えば、薬物[41]または放射線同位体[42]）の結合は、効力を改善し、そしてこれらの因子の全身的毒性を減少させる可能性を有する。腫瘍の殺傷を媒介する結合抗体の能力は、それが内部移行される可能性に依存する。従って、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞におけるＭＡｂ　８０６を用いた場合に観察される迅速な内部移行は、ＭＡｂ　８０６がこのタイプのアプローチの理想的な候補であることを示唆する。

【０３４２】

ＭＡｂ　８０６は、特有の接合ペプチドと会合していないエピトープに対する第１のｄｅ２－７　ＥＧＦＲ特異的抗体であるという点において、新規である。これは、ＤＨ８．３（以前に記載されたｄｅ２－７　ＥＧＦＲ抗体）よりも優れた親和性および良好な腫瘍標的化特性を有する。しかし、重要な特性は、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅を示す腫瘍細胞の表面上で発現されるＥＧＦＲ分子のサブセットを認識する能力である。このことは、ＭＡｂ８０６が、独特の臨床的特性（ｄｅ２－７および増幅されたＥＧＦＲの両方を標的化するが、野生型レセプターは標的化しない能力）を有し得ることを示唆する。正確に実証される場合、この抗体は、肝臓のような器官を標的化せず、従って、ＥＧＦＲ（これは、細胞毒性因子の結合には使用され得ない）に対する現在の抗体よりも汎用性となる[18,19]。最終的に、ＭＡｂ　８０６は、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲにおいて見出される短縮により誘導されるコンフォメーション変化を分析するための有用な試薬であり得る。

【０３４３】

（参考文献）

【０３４４】

【表１０】

1. Wikstrand CJ, McLendon RE, Friedman AH, et al. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. Cancer Res 1997;57:4130–40.

2. Olapade-Olaopa EO, Moscatello DK, MacKay EH, et al. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br J Cancer 2000;82:186–94.

3. Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. Cancer Res 1995;55:3140–8.

4. Garcia de Palazzo IE, Adams GP, Sundareshan P, et al. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. Cancer Res 1993;53:3217–20.

5. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, et al. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- or C-terminal tails. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:4309–13.

6. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:2965–9.

7. Yamazaki H, Ohba Y, Tamaoki N, et al. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. Jpn J Cancer Res 1990;81:773–9.

8. Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, et al. Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. Mol Cell Biol 1988;8:1816–20.

9. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, et al. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified re-arranged genes in human glioblastomas. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:8602–6.

10. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:7727–31.

11. Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, et al. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. Cell Growth Differ 1995;6:1251–9.

12. Nagane M, Coufal F, Lin H, et al. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. Cancer Res 1996;56:5079 –86.
13. Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, et al. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. J Neurovirol 1998;4:148 –58.
14. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, et al. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:4207–11.
15. Okamoto S, Yoshikawa K, Obata Y, et al. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. Br J Cancer 1996;73:1366 –72.
16. Hills D, Rowlinson-Busza G, Gullick WJ. Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. Int J Cancer 1995; 63:537–43.
17. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. Cancer Res 1995; 55:5536 –9.
18. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. J Clin Oncol 2000;18:904 –14.
19. Faillot T, Magdelenat H, Mady E, et al. A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. Neurosurgery 1996;39:478 –83.
20. Ponten J, Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. Acta Pathol Microbiol Scand 1968;74:465–86.
21. Masui H, Kawamoto T, Sato JD, et al. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. Cancer Res 1984;44:1002–7.

22. Domagala T, Konstantopoulos N, Smyth F, et al. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF recep-tor. Growth Factors 2000;18:11–29.
23. Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, et al. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J Immunol Methods 1984;72:77–89.
24. Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. J Biol Chem 1997;272:2927–35.
25. Reist CJ, Archer GE, Wikstrand CJ, et al. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. Cancer Res 1997;57:1510 –5.
26. Santon JB, Cronin MT, MacLeod CL, et al. Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice. Cancer Res 1986;46:4701–5.
27. Kwok TT, Sutherland RM. Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low num-bers of EGF receptors. Br J Cancer 1991;64:251–4.
28. Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, et al. MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. Biochem Biophys Res Commun 1985;128:898 –905.
29. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Ann Oncol 1997;8:1197–206.
30. den Eynde B, Scott AM. Tumor antigens. In: Delves PJ, Roitt IM, eds. Encyclopedia of immunology. London: Academic Press, 1998. 2424–31.
31. Seymour L. Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges. Cancer Treat Rev 1999;25:301–12.

32. Sturgis EM, Sacks PG, Masui H, et al. Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer. Otolaryngol Head Neck Surg 1994;111:633–43.
33. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. Clin Cancer Res 1995;1:1311–8.
34. Fernandes H, Cohen S, Bishayee S. Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DEGFR) expressed in cancer cells. J Biol Chem 2001;276:5375–83.
35. Reist CJ, Garg PK, Alston KL, et al. Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecar-boxylate. Cancer Res 1996;56:4970 –7.
36. Reist CJ, Archer GE, Kurpad SN, et al. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine–cellobiose radio iodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. Cancer Res 1995;55:4375–82.
37. Press OW, DeSantes K, Anderson SK, et al. Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores. Cancer Res 1990;50:1243–50.
38. Reist CJ, Batra SK, Pegram CN, et al. *In vitro* and *in vivo* behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent. Nucl Med Biol 1997;24:639 –47.
39. Mineo C, Gill GN, Anderson RG. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. J Biol Chem 1999;274:30636 –43.
40. Luwor RB, Johns TG, Murone C, et al. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. Cancer Res 2001;61:5355–61.
41. Trail PA, Bianchi AB. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. Curr Opin Immunol 1999;11:584 –8.
42. DeNardo SJ, Kroger LA, DeNardo GL. A new era for radiolabeled antibodies in cancer? Curr Opin Immunol 1999;11:563–9.

（実施例１９）
（レセプターに対する新規なモノクローナル抗体である、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）８０６の全身投与による、変異上皮増殖因子レセプターを過剰発現する頭蓋内異種移植神経芽腫の増殖抑制）
この実施例は、ヌードマウスにおける頭蓋内異種移植神経芽腫の増殖に対するｍＡｂ　８０６の評価を示す。以下は、Ｍｉｓｈｉｍａら（２００１）　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，６１：　５３４９－５３５４に対応し、これに示されており、そしてこの刊行物全体は、適切な場合、本明細書中の図面を相互参照と共に本明細書中で参考として援用され、そしてこの一部をなす。Ｍｉｓｈｉｍａらのデータおよび知見は、以下に記載される。

【０３４５】
ｍＡｂ　８０６での全身処置は、腫瘍の容量を有意に減少し、そしてＵ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ神経芽腫、ＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ神経芽腫またはＡ１２０７神経芽腫（これらの各々は、高レベルのΔＥＧＦＲを発現する）の異種移植片を有するマウスの生存度を増加した。逆に、ｍＡｂ　８０６処置は、親Ｕ８７　ＭＧ腫瘍（これは低レベルの内在性野生型ＥＧＦＲを発現した）またはＵ８７　ＭＧ．ＤＫ腫瘍（これは、高レベルのキナーゼ欠失ΔＥＧＦＲを発現した）を有するマウスに対して効果的ではなかった。野生型ＥＧＦＲ過剰発現Ｕ８７　ＭＧ神経芽腫（Ｕ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ）を異種移植されたマウスの生存度のわずかな増加は、このような細胞との弱い交差反応性と一致するｍＡｂ８０６によって、達成された。マウスにおけるＵ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ腫瘍の、ｍＡｂ　８０６での処置は、腫瘍増殖および新脈管形成の両方の減少、ならびにアポトーシスの増加を引き起こした。機構的には、インビボのｍＡｂ　８０６処置は、構成的に活性なΔＥＧＦＲのリン酸化の減少を生じ、そしてアポトーシスプロテクターであるＢｃｌ－ＸＬの下方制御された発現を引き起こした。これらのデータは、ｍＡｂ　８０６処置が、ΔＥＧＦＲを発現する攻撃的な神経芽腫のための有用な生体治療剤であり得るという前臨床的証拠を提供する。

【０３４６】
本実施例は、新規のΔＥＧＦＲ特異的ｍＡｂであるｍＡｂ　８０６での全身処置が、構成的に活性なΔＥＧＦＲのリン酸化の減少を引き起こし、それにより、ヌードマウスにおいてこの変異レセプターを過剰発現する頭蓋内に移植された神経芽腫の増殖を抑制し、そしてそれらの生存を延長することを実証する。腫瘍増殖の阻害は、増殖および新脈管形成の減少、ならびに腫瘍細胞のアポトーシスの増加により媒介された。この抑制は、ΔＥＧＦＲによる活発なシグナル伝達に影響を与えた。なぜなら、キナーゼ欠失ΔＥＧＦＲ（ＤＫ）を過剰発現する細胞由来の頭蓋内異種移植片（これは、同様に、ｍＡｂ　８０６により十分に認識される）は、同じ治療の後に有意には抑制されなかったからである。

【０３４７】
（材料および方法）
（細胞株）ヒト神経膠芽腫の一次移植は、培養物中の増殖されて再配置されたレセプターの発現を迅速に損失するので、現存の神経膠芽腫細胞株はこのような発現を示さない。ヒト腫瘍において観察される発現レベルに匹敵する発現レベルの維持を強いるために、Ｕ８７　ＭＧ細胞、ＬＮ－Ｚ３０８細胞およびＡ１２０７細胞（Ｄｒ．Ｓ．Ａａｒｏｎｓｏｎ、Ｍｏｕｎｔ　Ｓｉｎａｉ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ＮＹから寄贈）を、ΔＥＧＦＲウイルス、キナーゼ欠失ΔＥＧＦＲ（ＤＫ）ウイルス、またはｗｔＥＧＦＲウイルス（これらはまた、以前に記載されたように（２１）、Ｇ４１８に対する耐性を与えた）で感染した。類似のレベルの種々のＥＧＦＲ対立遺伝子を発現する集団（これらの発現レベルは、２５遺伝子コピーの増幅レベルにほぼ対応し；ヒト神経膠芽腫は、代表的に、短縮型レセプターの１０～５０遺伝子コピーの増幅レベルを有する）を、以前に記載されたようにして（２１）、ＦＡＣＳによって選択し、そしてそれぞれ、Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ、Ｕ８７　ＭＧ．ＤＫ、Ｕ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ、ＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ、ＬＮ－Ｚ３０８．ＤＫ、ＬＮ－Ｚ３０８．ｗｔＥＧＦＲ、Ａ１２０７．ΔＥＧＦＲ、Ａ１２０７．ＤＫ、およびＡ１２０７．ｗｔＥＧＦＲと命名した。各々は、Ｇ４１８（Ｕ８７　ＭＧ細胞株、４００ｍｇ／ｍｌ；ＬＮ－Ｚ３０８細胞株およびＡ１２０７細胞株、８００ｍｇ／ｍｌ）を含む培地中で維持した。ΔＥＧＦＲ特異的ｍＡｂであるｍＡｂｓ．ｍＡｂ　８０６（ＩｇＧ２ｂ，ｋ）を、ΔＥＧＦＲを発現するＮＲ６マウス線維芽細胞でのマウスの免疫の後に、生成した。これを、いくつかのクローンから選択した。なぜなら、赤血球凝集アッセイにより、これが、ＮＲ６．ΔＥＧＦＲ細胞に対する高度な反応性、およびＮＲ６．ｗｔＥＧＦＲ細胞に対する低い反応性を有し、そしてＮＲ６．細胞に対しては反応性を有さなかったからである。

【０３４８】
（免疫沈降およびウエスタンブロット分析）細胞を、溶解緩衝液（５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ

（ｐＨ７．５）、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、１０％グリセロール、１％ Ｔｒｉｔｏｎ、Ｘ－１００、２ｍＭ ＥＤＴＡ、０．１％ ＳＤＳ、０．５％ デオキシコール酸ナトリウム、１０ｍＭ ナトリウムＰＰｉ、１ｍＭ フェニルメチルスルホニルフルオリド、２ｍＭ Na_3VO_4、５μｇ／ｍｌ ロイペプチン、および５μｇ／ｍｌアプロチニンを含む）を用いて溶解した。抗体を、細胞溶解物と共に、４℃で１時間インキュベートし、その後、プロテインＡセファロースおよびプロテインＧセファロースを添加した。免疫沈降物を、溶解緩衝液で２回、およびＨＮＴＧ緩衝液［５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、０．１％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００、および１０％ グリセロール］で１回洗浄し、電気泳動し、そしてニトロセルロース膜に移した。ブロットを、抗ＥＧＦＲ抗体であるＣ１３でプローブし、そしてタンパク質を、ＥＣＬ化学発光検出システム（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ．）を使用して可視化した。沈降のために使用したｍＡｂは、ｍＡｂ ８０６、抗ＥＧＦＲ ｍＡｂクローン５２８（Ｏｎｃｏｇｅｎｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）、またはクローンＥＧＦＲ．１（Ｏｎｃｏｇｅｎｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）であった。免疫ブロットにおける野生型およびΔＥＧＦＲの両方の検出のために使用したｍＡｂ、Ｃ１３は、Ｄｒ．Ｇ．Ｎ．Ｇｉｌｌ（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）から提供された。Ｂｃｌ－Ｘに対する抗体（ウサギポリクローナル抗体；Ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ）およびホスホチロシン（４Ｇ１０、Ｕｐｓｔａｔｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｌａｋｅ Ｐｌａｃｉｄ，ＮＹ）を、以前に記載されたようにして（２６）、ウエスタンブロット分析のために使用した。

【０３４９】

（フローサイトメトリー分析）細胞を、以前に記載されるようにして（２１）、関連の抗体で標識し、次いで、フルオレセイン結合ヤギ抗マウスＩｇＧ（１：１００希釈；Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）で標識した染色した。細胞を、Ｃｅｌｌ Ｑｕｅｓｔソフトウエア（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）を使用するＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒで分析した。一次抗体について、以下のｍＡｂを使用した：ｍＡｂ ８０６、抗ＥＧＦＲ ｍＡｂクローン５２８、およびクローンＥＧＦＲ．ｌ。マウスＩｇＧ２ａまたはＩｇＧ２ｂを、アイソタイプコントロールとして使用した。

【０３５０】

（腫瘍治療）ＰＢＳ５μｌ中の、Ｕ８７ ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞（1×10^5）または5×10^5のＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ、Ａ１２０７．ΔＥＧＦＲ、Ｕ８７ ＭＧ、Ｕ８７ ＭＧ．ＤＫおよびＵ８７ ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞を、以前に記載されたようにして（２７）、ヌードマウスの脳の右線条体に移植した。ｍＡｂ ８０６、またはＩｇＧ２ｂアイソタイプコントロールを用いる全身治療を、移植後０日目から１４日目まで一日おきに、１００μｌの容量で、１μｇのｍＡｂを腹腔内注射することによって、達成した。脳内Ｕ８７ ＭＧ．ΔＥＧＦＲ腫瘍の直接治療について、１０μｇのｍＡｂ ８０６、またはＩｇＧ２ｂアイソタイプコントロールを、５μｌの容量で、１日目から始めて５日間、一日おきに、腫瘍注入部位に注射した。

【０３５１】

（免疫組織化学）腫瘍における新脈管形成を評価するために、これらを、塩化亜鉛を含む溶液中に固定し、パラフィン包埋し、切片化し、そしてモノクローナルラット抗マウスＣＤ３１抗体（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ；１：２００）を用いて免疫染色した。腫瘍細胞増殖の評価を、Ｋｉ－６７免疫組織化学によって、ホルマリンで固定してパラフィン包埋した腫瘍組織について実施した。パラフィン除去（ｄｅｐａｒａｆｆｉｎｉｚａｔｉｏｎ）および再水和の後、この組織切片を、メタノール中３％の過酸化水素と共にインキュベートして、内在性ペルオキシダーゼをクエンチした。これらの切片を、ヤギ血清で３０分間ブロックし、そして一次抗体と共に、４℃で一晩インキュベートした。次いで、これらの切片を、ＰＢＳで洗浄し、そしてビオチン化した二

次抗体と共に３０分間インキュベートした。ＰＢＳで数回洗浄した後、生成物を、色素原としてのジアミノベンジジンおよび対比染色としてのヘマトキシリンを含むストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼを使用して可視化した。増殖の測定値として、Ｋｉ－６７標的指数を、強力な（３４００）場における標識した核：全核の比として決定した。約２０００個の核を、系統的ランダムサンプリングによって、各場合において計数した。マクロファージおよびＮＫ細胞の染色について、緩衝化した４％のパラホルムアルデヒド溶液で固定した凍結切片を、それぞれ、ビオチン化ｍＡｂ　Ｆ４／８０（Ｓｅｒｏｔｅｃ，Ｒａｌｅｉｇｈ，ＮＣ）およびポリクローナルウサギ抗アシアロ（ａｎｔｉａｓｉａｌｏ）ＧＭ１抗体（Ｄａｋｏ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＶＡ）を使用して、免疫染色した。新脈管形成を、コンピューター分析を使用して、血管面積として定量した。この目的のために、切片を、抗ＣＤ３１を使用して免疫染色し、そして対比染色を行わずに、コンピューター画像分析システムを使用して分析した。ＭＶＡを、以前に記載されるようにして（２７）、ＣＣＤカラーカメラを使用して、３２００倍の倍率でこれらの切片のデジタル画像を取り込むことによって、決定した。次いで、Ｉｍａｇｅ　Ｐｒｏ　Ｐｌｕｓバージョン４．０ソフトウエア（Ｍｅｄｉａ　Ｃｙｂｅｒｎｅｔｉｃｓ，Ｓｉｌｖｅｒ　Ｓｐｒｉｎｇ，ＭＤ）を使用して、画像を分析し、そしてＭＶＡを、各切片における全染色量を測定することによって、決定した。各スライドについて、４つの領域を評価した。この値を、各領域における全面積の割合として表した。結果を、少なくとも２人の観察者による各々の実験において、確認した（Ｋ．Ｍ．，Ｈ－Ｊ．Ｓ．Ｈ．）。

【０３５２】

（ＴＵＮＥＬアッセイ）腫瘍組織中のアポトーシス細胞を、以前に記載されるようにして（２７）、ＴＵＮＥＬ方法を使用することによって検出した。ＴＵＮＥＬ陽性細胞を、Ｘ４００で計数した。そのアポトーシス指数を、各領域中のアポトーシス細胞数：全細胞数の比として計算した。

【０３５３】

（統計的分析）このデータを、インビボ生存アッセイ以外は、スチューデントｔ検定によって、有意性について分析し、これを、ウィルコクソン分析によって分析した。

【０３５４】

（結果）

（ｍＡｂ　８０６の全身処置は、ΔＥＧＦＲ過剰発現脳内神経芽腫瘍を有するマウスの生存を延長する）

抗ΔＥＧＦＲ　ｍＡｂであるｍＡｂ　８０６の効力を試験するために、本発明者らは、脳内ΔＥＧＦＲ過剰発現神経芽腫異種移植片を有するヌードマウスを、ｍＡｂ　８０６、アイソタイプコントロールのＩｇＧ、またはＰＢＳの腹腔内注射を用いて処置した。Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞を、ヌードマウスに脳内移植し、そして「材料および方法」において記載されるようにして、同日に処置を始めた。

【０３５５】

ＰＢＳまたはアイソタイプコントロールのＩｇＧで処置された動物は、１３日の中央生存期間を有し、一方、ｍＡｂ　８０６で処置されたマウスは、２１日まで、中央生存期間の６１．５％の増加を有した（ｐ＜０．００１；図２４Ａ）。移植の３日後、腫瘍が確立された後のマウスの処置もまた、コントロール群の中央生存期間と比較して、４６．１％だけ（１３日から１９日目；Ｐ＜０．０１）ｍＡｂ　８０６処置動物の中央生存期間を延長した（データは示さず）。ｍＡｂ　８０６のこれらの抗腫瘍効果がＵ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ異種移植片を越えて延びるか否かを決定するために、本発明者らはまた、ＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲおよびＡ１２０７．ΔＥＧＦＲの他の神経芽腫細胞移植片を有する動物に対して同様の処置を行った。ＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ異種移植片を有するｍＡｂ　８０６で処置したマウスの中央生存期間は、コントロールについての１９日間から５８日間に延びた（Ｐ＜０．００１；図２４Ｂ）。驚くべきことに、ｍＡｂ　８０６で処置した８匹の動物のうち４匹が、６０日以上生存した（図２４Ｂ）。Ａ１２０７．ΔＥＧＦＲ異種移植片を有する動物の中央生存期間はまた、コントロールについての２４日間から２９

日間にのびた（Ｐ＜０．０１；データは示さず）。
【０３５６】
（ｍＡｂ　８０６処置は、ΔＥＧＦＲ過剰発現脳腫瘍増殖を阻害する）
Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ異種移植片およびＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ異種移植片を有するマウスを、それぞれ、９日目および１５日目に殺傷した。腫瘍部分を、組織病理学的に分析し、そして腫瘍容量を、「材料および方法」において記載されるようにして決定した。動物の生存期間について観察された結果と一致して、ｍＡｂ　８０６処置は、コントロール群の移植片の容量と比較して、Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ移植片の容量を９０％有意に減少し（Ｐ＜０．００１；図２４Ｃ）、ＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲ移植片の容量を９５％有意に減少した（Ｐ＜０．００１；図２４Ｄ）。類似の結果を、Ａ１２０７．ΔＥＧＦＲ腫瘍を有する動物について観察した（６５％の容量減少；Ｐ＜０．０１；データは示さず）。
【０３５７】
（ｍＡｂ　８０６での腫瘍内処置は、Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ脳腫瘍を有するマウスの生存期間を延長する）
本発明者らはまた、Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ異種移植片の処置のためのｍＡｂ　８０６の直接腫瘍内注射の効力を決定した。「材料および方法」において記載されるようにして、動物に、ｍＡｂ　８０６またはアイソタイプコントロールのＩｇＧの腫瘍内注射を、移植の１日後に実施した。コントロール動物は、１５日間生存し、一方、ｍＡｂ　８０６で処置したマウスは、１８日間生存し続けた（Ｐ＜０．０１；図２４Ｅ）。ｍＡｂ　８０６を用いる腫瘍内処置は、幾分か効果的であったが、これは複数回の頭蓋内注射および感染の危険性の増加という問題を伴った。従って、本発明者らは、さらなる研究のための全身処置に焦点をあてた。
【０３５８】
（ｍＡｂ　８０６処置は、Ｕ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲを有するマウスの生存期間をわずかに延長するが、Ｕ８７　ＭＧ脳内異種移植片またはＵ８７　ＭＧ．ＤＫ脳内異種移植片を有するマウスの生存期間は延長しない）
ｍＡｂ　８０６による増殖阻害が、ΔＥＧＦＲを発現する腫瘍に対して選択的であるか否かを決定するために、本発明者らは、Ｕ８７　ＭＧ脳異種移植片、Ｕ８７　ＭＧ．ＤＫ（キナーゼ欠失ΔＥＧＦＲ）脳異種移植片またはＵ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ脳異種移植片を有する動物を、処置した。ｍＡｂ　８０６処置は、Ｕ８７　ＭＧ腫瘍（これは低レベルの内在性ｗｔＥＧＦＲを発現する（２２））を移植したマウスの生存期間（図２５Ａ）も、Ｕ８７　ＭＧ．ＤＫ異種移植片（これは、低レベルの内因性ｗｔＥＧＦＲに加えて、キナーゼ欠失ΔＥＧＦＲを過剰発現する）を有する動物の生存期間（図２５Ｂ）も延長しなかった。ｍＡｂ　８０６処置は、Ｕ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ腫瘍（これは、ｗｔＥＧＦＲを過剰発現する）を有するマウスの生存期間をわずかに増加した（Ｐ＜０．０５；中央生存期間、２３日　対　２６日（コントロール群））（図２５Ｃ）。
【０３５９】
（ｍＡｂ　８０６の反応性はインビボ抗腫瘍効果と相関する）
種々のレベルのＥＧＦＲまたは異なるタイプのＥＧＦＲを発現する腫瘍に対するｍＡｂ８０６の差次的効果を理解するために、本発明者らは、ＦＡＣＳ分析によって、種々の腫瘍細胞とのｍＡｂ　８０６反応性を決定した。以前の報告（２１）と一致して、抗ＥＧＦＲ　ｍＡｂ　５２８は、ΔＥＧＦＲおよびｗｔＥＧＦＲの両方を認識し、そしてＵ８７　ＭＧ細胞と比較して、Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞のより強力な染色を示した（図２６Ａ、５２８）。逆に、抗体ＥＧＦＲ．１は、ΔＥＧＦＲと反応しなかったが、ｗｔＥＧＦＲと反応した（２１）。なぜなら、Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞は、Ｕ８７　ＭＧ細胞と同程度に弱い反応性であったからである（図２６Ａ、パネルＥＧＦＲ．１）。このＥＧＦＲ．１抗体は、Ｕ８７　ＭＧ細胞とよりも、Ｕ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲとより強く反応した。なぜなら、Ｕ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞は、ｗｔＥＧＦＲを過剰発現したからである（図２６Ａ、パネルＥＧＦＲ．１）。ｍＡｂ　８０６は、Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧ

ＦＲおよびＵ８７　ＭＧ．ＤＫ細胞と激しく反応し、Ｕ８７　ＭＧ細胞とは反応しなかったが、これはＵ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲと弱く反応し、このことは、ｍＡｂ　８０６が、過剰発現されたｗｔＥＧＦＲに対する弱い交差活性を有するΔＥＧＦＲについて選択的であることを示した（図２６Ａ、パネルｍＡｂ　８０６）。このレベルのＵ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲとの反応性は、抗体処置により媒介される生存期間の延長と定量的かつ定性的に類似していた（図２５Ｃ）。

【０３６０】

本発明者らは、免疫沈降によって、ｍＡｂ　８０６の特異性をさらに決定した。種々の細胞株におけるＥＧＦＲを、抗体５２８、ＥＧＦＲ．１およびｍＡｂ　８０６を用いて免疫沈降した。次いで、電気泳動で分離したタンパク質のブロットを、抗ＥＧＦＲ抗体、ｗｔＥＧＦＲを認識するＣ１３、ならびにΔＥＧＦＲおよびＤＫでプローブした（２２）。ＦＡＣＳ分析と一致して、抗体５２８は、ｗｔＥＧＦＲおよび変異レセプターを認識し（図２６Ｂ、パネルＩＰ：５２８）、一方、抗体ＥＧＦＲ．１は、ｗｔＥＧＦＲと反応したが、変異腫とは反応しなかった（図２６Ｂ、パネルＩＰ：ＥＧＦＲ．１）。さらに、Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞およびＵ８７　ＭＧ．ＤＫ細胞中の変異レセプターのレベルは、Ｕ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞中のｗｔＥＧＦＲのレベルに匹敵する（図２６Ｂ、パネルＩＰ：５２８）。

【０３６１】

しかし、抗体ｍＡｂ　８０６は、Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ細胞およびＵ８７　ＭＧ．ＤＫ細胞から沈殿されるより大量の変異レセプターおよびＵ８７　ＭＧ細胞から沈殿される検出不可能な量の変異レセプターと比較して、Ｕ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞溶解物由来の少量のｗｔＥＧＦＲのみを沈殿し得た（図２６Ｂ、パネルＩＰ：ｍＡｂ　８０６）。まとめて、これらのデータは、ｍＡｂ　８０６が、ΔＥＧＦＲ（これもまた、細胞表面上で過剰発現される場合にのみ、少量のｗｔＥＧＦＲ中に存在する）中のエピトープを認識することを示唆する。

【０３６２】

（ｍＡｂ　８０６処置は、ΔＥＧＦＲ自己リン酸化を減少し、そしてＵ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ脳腫瘍におけるＢｃｌ－ＸＬ発現を下方制御する）

ｍＡｂ　８０６による増殖阻害の基礎となる機構を、次に研究した。ΔＥＧＦＲの構成的に活性なキナーゼ活性およびΔＥＧＦＲのＣＯＯＨ末端の自己リン酸化は、生物学的機能に必須であるので（２１、２２、２８、２９）、ΔＥＧＦＲのリン酸化状態を、処置動物由来の腫瘍およびコントロール動物由来の腫瘍において決定した。図２７Ａに示されるように、ｍＡｂ　８０６処置は、ΔＥＧＦＲ自己リン酸化を劇的に減少させたが、レセプターレベルは、ｍＡｂ　８０６処置した異種移植片においてわずかしか減少しなかった。本発明者らは、レセプターの自己リン酸化は、抗アポトーシス遺伝子であるＢｃｌ－$Ｘ_{Ｌ}$（これはΔＥＧＦＲ過剰発現腫瘍のアポトーシスの減少において重要な役割を果たす）の上方制御を引き起こすことを以前に示している（２８、２９）。従って、Ｂｃｌ－$Ｘ_{Ｌ}$発現に対するｍＡｂ　８０６処置の効果を、次に決定した。ｍＡｂ　８０６で処置した動物由来のΔＥＧＦＲ腫瘍は、減少したレベルのＢｃｌ－ＸＬを確かに示した（図２７Ａ）。

【０３６３】

（ｍＡｂ　８０６処置は、Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ腫瘍における増殖および新脈管形成を減少し、そしてこの腫瘍のアポトーシスを増加する）

ｍＡｂ　８０６処置により引き起こされるインビボ抑制およびレセプターシグナル伝達に対するその生物学的効果の観点から、本発明者らは、コントロールマウス由来の腫瘍または処置マウス由来の腫瘍の増殖速度を決定した。ｍＡｂ　８０６処置腫瘍のＫｉ－６７染色により測定される増殖指数は、コントロール腫瘍の増殖指数よりも有意に低かった（Ｐ＜０．００１；図２８）。さらに、ＴＵＮＥＬ染色によるアポトーシス指数の分析により、コントロール腫瘍と比較した、ｍＡｂ　８０６処置した腫瘍におけるアポトーシス細胞の数の有意な増加が実証された（Ｐ＜０．００１；図２８）。腫瘍の血管形成の程度をまた、ＣＤ３１についての処置検体およびコントロール検体由来の腫瘍の免疫染色によっ

て分析した。腫瘍の血管形成を定量するために、ＭＶＡを、コンピューター化画像分析を使用して測定した。ｍＡｂ　８０６処置した腫瘍は、コントロール腫瘍よりも、ＭＶＡの３０％の減少を示した（Ｐ＜０．００１；図２８）。レセプターと抗体との間の相互作用が、炎症応答を引き起こし得るか否かを理解するために、本発明者らは、マクロファージマーカーのＦ４／８０、およびＮＫ細胞マーカーのアシアロＧＭ１について、腫瘍切片を染色した。マクロファージを、腫瘍マトリクス全体にわたって特定し、そしてこれは、ｍＡｂ　８０６処置したＵ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲ腫瘍の周辺部の周りに特に堆積していた（図２８）。本発明者らは、この腫瘍中およびこの周りに浸潤したわずかなＮＫ細胞を観察したが、ｍＡｂ　８０６処置した腫瘍およびアイソタイプコントロール腫瘍との間の有意な差違は観察されなかった（データは示さず）。

【０３６４】

（考察）

ΔＥＧＦＲは、神経膠腫の癌処置のために魅力的な、潜在的な治療標的であるようである。ΔＥＧＦＲが、悪い予後に関連する（２５）のに対して、ΔＥＧＦＲの遺伝的阻害または薬学的阻害は、インビトロおよびインビボの両方において、ΔＥＧＦＲ過剰発現細胞の増殖を効果的に抑制する（２９、３０）。この変異体ＥＧＦＲは細胞表面上で発現されるので、これは、抗体ベースの治療のための潜在的な標的を示し、ここで、本発明者らは、ヌードマウスにおける、異なる細胞のバックグラウンドのΔＥＧＦＲ過剰発現神経膠腫の頭蓋内異種移植片の処置について、新規の抗ΔＥＧＦＲ　ｍＡｂ、ｍＡｂ　８０６の効果を試験した。ｍＡｂ　８０６の全身投与は、腫瘍増殖を阻害し、動物の生存を延長した。ｍＡｂ　８０６の効果は、各細胞株に対して明白であり、腫瘍のｐ５３の状態に依存しなかった。なぜなら、Ｕ８７　ＭＧ．ΔＥＧＦＲおよびＡ１２０７．ΔＥＧＦＲは、野生型ｐ５３を発現するのに対して、ＬＮ－Ｚ３０８．ΔＥＧＦＲは、ｐ５３ヌルであった。

【０３６５】

ΔＥＧＦＲの腫瘍形成性の増大は、ＣＯＯＨ末端におけるその構成的に活性なキナーゼ活性およびチロシン自己リン酸化を介して媒介される（２２、２８、２９）。ｍＡｂ　８０６で処置した腫瘍におけるΔＥＧＦＲのリン酸化は、有意に減少し、増殖は減少し、そしてアポトーシスは増加した。このことは、ｍＡｂ　８０６の抗腫瘍効果が、少なくとも部分的に、レセプターの固有の機能の阻害に起因し得ることを示唆する。ΔＥＧＦＲシグナル伝達は、抗アポトーシス遺伝子（Ｂｃｌ－ＸＬ）のアップレギュレーションを引き起こし（２８）、そして、ｍＡｂ　８０６を用いた処置は、Ｂｃｌ－ＸＬ発現のダウンレギュレーションを生じた。このことは、ｍＡｂ　８０６の抗腫瘍効果が、ΔＥＧＦＲシグナル伝達の阻害を介して媒介されることをさらに示唆する。ｍＡｂ　８０６で処置した腫瘍におけるΔＥＧＦＲのレベルはまた、わずかに減少した（図２７Ａ）が、変異体レセプターの脱リン酸の程度と一致した程度またはこの生物学的効果の大きさを説明するために十分な程度までは減少しなかった。ｍＡｂ　８０６のこの抗腫瘍効果は、おそらく少なくとも部分的には、ΔＥＧＦＲの固有のシグナル伝達機能の阻害から生じる。この主張はまた、ＤＫ腫瘍に対する抗腫瘍効果の欠損によって指示され、このＤＫ腫瘍は、抗体へと結合するが、キナーゼ欠損性である。

【０３６６】

異なる抗ΔＥＧＦＲ抗体（ｍＡｂ　Ｙ１０）の腫瘍内注射は、マウスの脳におけるΔＥＧＦＲ発現Ｂ１６黒色腫の増殖を、Ｆｃ／Ｆｃレセプター依存性機構を介して阻害した（３１）。これに関連して、ｍＡｂ　Ｙ１０は、インビトロでマウスエフェクター細胞およびヒトエフェクター細胞の両方を用いて、抗体依存性マクロファージ細胞傷害性を媒介することを示した（１７）。この抗体依存性マクロファージ細胞傷害性は、本発明者らのｍＡｂ　８０６で処置した腫瘍において見出されたマクロファージ浸潤に関してほとんど効果を有さないが、ｍＡｂ　８０６の抗癌効果が、マクロファージ媒介性細胞傷害性によって達成され得るかどうかに関する疑問が生じる。本発明者らは、このことがありそうにもないことであると考えている。なぜなら、マクロファージ浸潤はまた、Ｕ８７　ＭＧ．ＤＫ（キナーゼ欠損性ΔＥＧＦＲ）腫瘍のｍＡｂ　８０６処置の際に生じ、この腫瘍におい

て、このｍＡｂ　８０６処置は、腫瘍増殖の調節において、効果がなかった。
【０３６７】
ｍＡｂ　８０６は、過剰発現されたｗｔＥＧＦＲを用いた弱い交差反応性を有するΔＥＧＦＲに対して選択的であるようである。インビトロでの特異性に一致して、ｍＡｂ　８０６処置は、ΔＥＧＦＲ過剰発現腫瘍において非常に有効であったのに対して、このｍＡｂ　８０６処置は、非常により低く頑強であるが、再現可能であり、ｗｔＥＧＦＲを過剰発現する腫瘍の増殖阻害を示した。しかし、ｍＡｂ　８０６とその標的分子との間の単純な相互作用は、腫瘍増殖を阻害するために不十分である。なぜなら、ｍＡｂ　８０６は、キナーゼ欠損性ΔＥＧＦＲ（ＤＲ）レセプターおよびΔＥＧＦＲへと等しく良好に結合し得るが、このｍＡｂ　８０６は、ＤＫ発現腫瘍増殖に影響を与える効果はない。ｍＡｂ　８０６に、細胞に通常存在する低レベルのｗｔＥＧＦＲと相互作用する能力がないことは、通常の組織と比較する場合、ΔＥＧＦＲを過剰発現した癌および、より少ない程度でｗｔＥＧＦＲを過剰発現した癌に対する大きな治療範囲を示唆する。
【０３６８】
ｍＡｂ　８０６処置は、頭蓋内異種移植片の抑制に効果的であったが、ΔＥＧＦＲ腫瘍が最終的に増殖し、永続的な回復は達成されないということは留意されるべきである。このことは、腫瘍の塊における不十分な抗体の分布から生じ得る。癌処置のために、他の治療モーダリティー（例えば、毒素、アイソトープまたは薬物）と組合わせたｍＡｂは、多くの場合において、抗体単独より効果的であることが示された（２，３，３２－３４）。ｗｔＥＧＦＲ抗体と化学療法薬物（例えば、ドキソルビシンおよびシスプラチン）との組合せはまた、抗腫瘍活性の強化を示した（３５，３６）。腫瘍増殖と脈管形成の発達とで標的化される組合せ処置は、いずれかの処置単独よりも効果的に阻害された神経膠芽腫を有する（２７）。このことは、化学療法薬物または脈管形成を調節する化合物とｍＡｂ　８０６の組合せが、ｍＡｂ　８０６単独よりさらに効率的である可能性を上昇する。
【０３６９】
（参考文献）
【０３７０】

【表１１】

1. Old, L. J. Immunotherapy for cancer. Sci. Am., *275:* 102–109, 1996.

2. Weiner, L. M. An overview of monoclonal antibody therapy of cancer. Semin. Oncol., *26* (Suppl. 12)*:* 41–50, 1999.

3. Green, M. C., Murray, J. L., and Hortobagyi, G. N. Monoclonal antibody therapy for solid tumors. Cancer Treat. Rev., *26:* 269–286, 2000.

4. Ashley, D. M., Batra, S. K., and Bigner, D. D. Monoclonal antibodies to growth factors and growth factor receptors: their diagnostic and therapeutic potential in brain tumors. J. Neurooncol., *35:* 259–273, 1997.

5. Fan, Z., and Mendelsohn, J. Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. Curr. Opin. Oncol., *10:* 67–73, 1998.

6. Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and Press, M. F. Studies of the *HER-2/neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science (Wash. DC), *244:* 707–712, 1989.

7. Harari, D., and Yarden, Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. Oncogene, *19:* 6102–6114, 2000.

8. Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M., and Fox, J. A. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). Semin. Oncol., *26* (Suppl. 12)*:* 60–70, 1999.

9. Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C, Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, I. C., and Norton, L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. J. Clin. Oncol., *14:* 737–744, 1996.

10. Baselga, J. Clinical trials of Herceptin(R) (trastuzumab). Eur. J. Cancer, *37:* 18–24, 2001.

11. Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit. Rev. Oncol. Hematol., *19:* 183–232, 1995.

12. Mendelsohn, J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. Clin. Cancer Res., *3:* 2703–2707, 1997.

13. Waksal, H. W. Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer.

Cancer Metastasis Rev., *18:* 427–436, 1999.

14. Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. Neurosurgery (Baltimore), *39:* 478–483, 1996.

15. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. J. Neurovirol., *4:* 148–158, 1998.

16. Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *89:* 2965–2969, 1992.

17. Wikstrand, C. J., Cokgor, I., Sampson, J. H., and Bigner, D. D. Monoclonal antibody therapy of human gliomas: current status and future approaches. Cancer Metastasis Rev., *18:* 451–464, 1999.

18. Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J, Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. Cancer Res., *53:* 3217–3220, 1993.

19. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. Cancer Res., *55:* 5536–5539, 1995.

20. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br. J. Cancer, *82:* 186–194, 2000.

21. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S, Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *91:* 7727–7731, 1994.

22. Huang, H-J. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D.,

Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. J. Biol. Chem., *272:* 2927–2935, 1997.

23. Mishima, K. Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. Expression of a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor mediates glioma cell invasion *in vivo*. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., *40:* 519, 1999.

24. Han, Y., Caday, C. G., Nanda, A., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. Tyrphostin AG1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. Cancer Res., *56:* 3859–3861, 1996.

25. Feldkamp, M. M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L., and Guha, A. Expression of activatedepidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. Neurosurgery (Baltimore), *45:* 1442–1453, 1999.

26. Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *95:* 5724–5729, 1998.

27. Mishima, K., Mazar, A. P., Gown, A., Skelly, M., Ji, X. D., Wang, X. D., Jones, T. R., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. A peptide derived from the non-receptor-binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis *in vivo* in combination with cisplatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *97:* 8484–8489, 2000.

28. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. Cancer Res., *56:* 5079–5086, 1996.

29. Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. Cancer Lett., *162* (Suppl. 1)*:* S17–S21, 2001.

30. Halatsch, M. E., Schmidt, U., Botefur, I. C., Holland, J. F., and Ohnuma, T. Marked inhibition of glioblastoma target cell tumorigenicity *in vitro* by retrovirus-mediated transfer of a hairpin ribozyme against deletion-mutant epidermal growth factor receptor messenger RNA. J. Neurosurg., *92:* 297–305, 2000.

31. Sampson, J. H, Crouy, L. E., Lee, S., Archer, G. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A. H., Friedman, H. S., and Bigner, D. D. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *97:* 7503–7508, 2000.

32. Trail, P. A, and Bianchi, A. B. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. Curr. Opin. Immunol., *11:* 584–588, 1999.

33. Pietras, R. J., Pegram, M. D., Finn, R. S., Maneval, D. A., and Slamon, D. J. Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. Oncogene, *17:* 2235–2249, 1998.

34. Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M., and Mendelsohn, J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. Cancer Res., *58:* 2825–2831, 1998.

35. Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., and Mendelsohn, J. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda), *85:* 1327–1333, 1993.

36. Fan, , Baselga, J., Masui, H., and Mendelsohn, J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus *cis*-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. Cancer Res., *53:* 4637–4642, 1993.

（実施例２０）

（モノクローナル抗体８０６は、ｄｅ２－７または増幅された上皮増殖因子レセプター（ＥＧＦＲ）のいずれかを発現する腫瘍異種移植片の増殖を阻害するが、野生型ＥＧＦＲを発現する腫瘍異種移植片の増殖は阻害しない）

以下の実施例は、Ｌｕｗｏｒら、（２００１）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，６１；５３５５－５３６１にもまた示される、本発明者らによる、知見を示す。この刊行物の開示は、適切である場合、本明細書中の図を引用しながら、その全体が本明細書中に援用され、そして、本明細書の一部をなす。

【０３７１】

モノクローナル抗体（ｍＡｂ）８０６は、Δ２－７上皮増殖因子レセプター（ｄｅ２－７ＥＧＦＲまたはＥＧＦＲｖＩＩＩ）に対して惹起され、ＥＧＦＲの短縮バージョンは、神経膠腫に共通に発現された。意外にも、ｍＡｂ　８０６はまた、ＥＧＦＲの増殖を示す細胞によって発現されるＥＧＦＲに結合するが、遺伝子増幅の非存在下で、野生型レセプターを発現する細胞または正常組織によって発現されるＥＧＦＲには結合しない。ｍＡｂ８０６の独特の特異性は、現在のＥＧＦＲ抗体を超える利点を提供し、これら抗体全ては、ヒトにおいて肝臓および皮膚への有意な結合を示す。従って、本発明者らは、ヌードマウスにおいて増殖したヒト腫瘍異種移植片に対する、ｍＡｂ　８０６の抗腫瘍活性を試験した。Ｕ８７　ＭＧ異種移植片（遺伝増幅の非存在下で約10^5のＥＧＦＲを内因的に発

現する神経膠腫細胞株）は、ｍＡｂ　８０６によって阻害されなかった。対照的に、ｍＡｂ　８０６は、予防的腫瘍モデルおよび確立された腫瘍モデルの両方を使用する用量依存的様式で、ｄｅ２－７ＥＧＦＲでトランスフェクトされたＵ８７　ＭＧ異種移植片の増殖を有意に阻害した。重要なことには、野生型ＥＧＦＲでトランスフェクトされたＵ８７ＭＧ細胞（これは、約10^6ＥＧＦＲ／細胞まで発現増加し、遺伝子増幅の状態を模倣する）はまた、ヌードマウス中で異種移植片として増殖する場合、ｍＡｂ　８０６によって阻害された。ｍＡｂ　８０６によって処置された異種移植片は全て、コントロール腫瘍において存在しなかった大きな壊死領域を示した。この異種移植片の生存能力の減少によって、レセプターのダウンレギュレーションまたはクローンの選択によって媒介されなかった。なぜなら、抗原発現のレベルは、コントロール群と処置された群との間で類似であったからである。ｍＡｂ　８０６の抗腫瘍効果は、Ｕ８７　ＭＧ細胞に限定されなかった。なぜなら、抗体は、新規かつ確立されたＡ４３１異種移植片（これは10^6ＥＧＦＲ／細胞を超えて発現する細胞株）の増殖を阻害したからであった。この研究は、ｍＡｂ　８０６が、有意な抗腫瘍活性を保持することを実証する。

【０３７２】

ｄｅ２－７ＥＧＦＲ特異的ｍＡｂ　８０６は、短縮型ｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現するＮＲ６マウス線維芽細胞でマウスを免疫した後に、産生された。ｍＡｂ　８０６は、ｄｅ２－７ＥＧＦＲでトランスフェクトされたＵ８７　ＭＧ神経膠腫細胞株に結合するが、ｄｅ２－７ＥＧＦＲでトランスフェクトされた親Ｕ８７　ＭＧ細胞株には結合しない。この親Ｕ８７　ＭＧ細胞株は、遺伝子増幅を有さずにｗｔＥＧＦＲを発現する（３）。類似する結果は、Ｕ８７　ＭＧ異種移植片を発現するｄｅ２－７ＥＧＦＲの特異的な標的化を示すｍＡｂ　８０６を用いて、インビボで観察されたが、親Ｕ８７　ＭＧ腫瘍では観察されなかった（３）。興味深いことに、ｍＡｂ　８０６は、増幅されたＥＧＦＲ遺伝子を含むＡ４３１細胞株の表面上のＥＧＦＲ部分集合（約１０％）を結合し得た。従って、ｄｅ２－７ＥＧＦＲ短縮化によって生成された独特のペプチド結合を認識する他の全てのｄｅ２－７ＥＧＦＲ特異的抗体とは違って、ｍＡｂ　８０６は、過剰発現されたｗｔＥＧＦＲでもまた見出されるエピトープに結合する。しかし、このエピトープが、好ましくはｄｅ２－７ＥＧＦＲにおいて露出され、レセプターの小さな部分が、ｗｔＥＧＦＲ遺伝子増幅を含む細胞において発現されることは明らかである。重要なことには、高レベルの内因性ｗｔＥＧＦＲを発現する正常組織（例えば、肝臓および皮膚）は、有意なｍＡｂ　８０６の結合を示さない。通常のレベルで発現される場合、ｄｅ２－７ＥＧＦＲおよび増幅されたｗｔＥＧＦＲの両方に結合するが、ネイティブなｗｔＥＧＦＲには結合しないｍＡｂ　８０６の独特の特徴に基づいて、本発明者らは、ヌードマウスで、異種移植片として増殖するいくつかの腫瘍細胞株に対するｍＡｂ　８０６の有効性を試験することを決定した。

【０３７３】

（材料および方法）

（細胞株およびモノクローナル抗体）

ヒト神経膠芽腫細胞株Ｕ８７　ＭＧ（これは、ｗｔＥＧＦＲを内因的に発現する）ならびにトランスフェクトされた細胞株Ｕ８７　ＭＧ．Δ２－７およびＵ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ（これらは、それぞれｄｅ２－７ＥＧＦＲおよび過剰発現されたｗｔＥＧＦＲを発現する）は、以前に記載されている（１６、２３）。類表皮腫癌細胞株Ａ４３１は、以前に記載されている（２４）。

【０３７４】

全ての細胞株を、１０％　ＦＣＳ（ＣＳＬ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ｖｉｃｔｏｒｉａ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）、２ｍＭグルタミン（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、およびペニシリン／ストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）を含むＤＭＥＭ（ＤＭＥＭ／Ｆ１２；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）中に維持した。さらに、Ｕ８７　ＭＧ．Δ２－７およびＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞株を、４００ｍｇ／ｍｌのジェネティシン（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉ

ｎｃ．，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ｖｉｃｔｏｒｉａ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）中に維持した。細胞株を、加湿された５％ＣＯ２雰囲気中３７℃で増殖させた。このｍＡｂ　８０６（ＩｇＧ２ｂ）を、ｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現するＮＲ６マウス線維芽細胞を用いたマウスの免疫後、産生した。ｍＡｂ　８０６を、ｄｅ２－７ＥＧＦＲを過剰発現する（１：２５００の力価）、ＮＲ６細胞への結合を示したロゼットアッセイの後、選択した。ｍＡｂ５２８（これは、ｄｅ２－７ＥＧＦＲおよびｗｔＥＧＦＲの両方を認識する）は、以前に記載されており（１０）、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）から得られたハイブリドーマを使用して、Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ（Ｌｕｄｗｉｇ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ｖｉｃｔｏｒｉａ，　Ａｕｓｔｒａｌｉａ）において産生した。ＤＨ８．３　ｍＡｂ（これは、ｄｅ２－７ＥＧＦＲに対して特異的である）は、Ｗｉｌｌｉａｍ　Ｇｕｌｌｉｃｋ教授（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｋｅｎｔ　ａｎｄ　Ｃａｎｔｅｒｂｕｒｙ，Ｋｅｎｔ，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ）によって親切に提供された（１９）。ＥＧＦＲのＯＯＨ－末端ドメインへと指向されるポリクローナル抗体（ｓｃ－０３）を、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏ－ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ，ＣＡ）から購入した。

【０３７５】

（レセプター発現のＦＡＣＳ分析）

培養された、親Ｕ８７　ＭＧ細胞株およびトランスフェクトされたＵ８７　ＭＧ細胞株を、ｗｔＥＧＦＲおよびｄｅ２－７ＥＧＦＲ発現について、５２８抗体、８０６抗体、およびＤＨ８．３抗体を使用して、分析した。細胞（１　３　１０　６）を、１％　ＨＳＡを含有するＰＢＳ中、５ｍｇ／ｍｌの、適切な抗体またはアイソタイプ適合性ネガティブコントロールと共に、４℃で３０分間インキュベートした。ＰＢＳ／１％　ＨＳＡでの３回の洗浄後、細胞を、ＦＩＴＣ結合ヤギ抗マウス抗体（１：１００希釈；Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）と共に、４℃でさらに３０分間インキュベートした。続いての３回の洗浄後、細胞を、Ｅｐｉｃｓ　Ｅｌｉｔｅ　ＥＳＰ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｈｉａｌｅａｈ，ＦＬ）上で、２０，０００事象の最小値を観察することによって分析し、Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）用のＥＸＰＯ（バージョン２）を使用して分析した。

【０３７６】

（スキャッチャード分析）

ｍＡｂ　８０６を、クロラミンＴ法によって、１２５Ｉ（Ａｍｒａｄ，Ｍｅｌ－ｂｏｕｒｎｅ，Ｖｉｃｔｏｒｉａ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）で標識した。全ての結合アッセイを、１％　ＨＳＡ／ＰＢＳ中で、$1\sim2\times10^{6}$の、生存するＵ８７　ＭＧ．Δ２－７またはＡ４３１細胞に対して、穏やかに回転しながら、４℃で９０分間実施した。、１０ｎｇ／ｍｌ　１２５Ｉ標識ｍＡｂ　８０６の設定濃度を、漸増濃度の非標識抗体の存在下で使用した。非特異的な結合を、１０，０００倍過剰の非標識化抗体の存在下で決定した。インキュベーションの後、細胞を、洗浄し、結合した１２５Ｉ標識化ｍＡｂ　８０６について、ＣＯＢＲＡ　ＩＩγカウンター（Ｐａｃｋａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｍｅｒｉｄｅｎ，ＣＴ）を使用して計数した。スキャッチャード分析を、免疫反応性について校正した後、実施した。

【０３７７】

（免疫沈降研究）

細胞を、５％の、透析されたＦＣＳを補充されたメチオニン／システインを含有しないＤＭＥＭ中、１００ｍＣｉ／ｍｌのＴｒａｎ　３５Ｓ－Ｌａｂｅｌ（ＩＣＮ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｒｖｉｎｅ，ＣＡ）を用いて１６時間標識した。ＰＢＳで洗浄した後、細胞を、溶解緩衝液（１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、３０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５００ｍＭ　４－（２－アミノエチル）ベンゼンスルホニルフロリド、１５０ｎＭアプロチニン、１ｍＭ　Ｅ－６４プロテアーゼインヒビター、０．５ｍＭ　ＥＤ

ＴＡ、および１ｍＭ　ロイペプチン，ｐＨ７．４）中に、４℃で１時間配置した。溶解物を、１２，０００３ｇで１０分間の遠心分離によって精製し、次いで、プロテインＡ－セファロースの添加の前に、５ｍｇの適切な抗体と共に、４℃で３０分間インキュベートした。免疫沈降物を、溶解緩衝液で３回洗浄し、ＳＤＳサンプル緩衝液と混合し、７．５％ゲルを使用したゲル電気泳動によって分離し、次いで、それを乾燥させ、Ｘ線フィルム中に露光した。

【０３７８】

（異種移植片モデル）

以前の報告と一致して（２３、２５）、ｄｅ２－７ＥＧＦＲでトランスフェクトされたＵ８７　ＭＧ細胞は、ｗｔＥＧＦＲでトランスフェクトした、親細胞およびＵ８７　ＭＧ細胞より、より迅速に成長した。１００ｍｌのＰＢＳ中の腫瘍細胞（$3x10^6$）を、４～６週齢の、雌性ヌードマウスの両脇腹へと、ｓ．ｃ．接種した（Ａｎｉｍａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ，Ｐｅｒｔｈ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）。ｍＡｂ　８０６の治療効果を、予防腫瘍モデルおよび確立された腫瘍モデルの両方において調査した。予防モデルにおいて、２つの異種移植片を有する５匹のマウスは、０．１ｍｇまたは１ｍｇのｍＡｂ　８０６またはビヒクル（ＰＢＳ）のいずれかでｉ．ｐ．処置した（これを、腫瘍細胞接種の前の日に開始した）。処置を、１週間当たり３回で２週間、計６用量について継続した。確立されたモデルについて、腫瘍は、６５ｍｍ３（Ｕ８７　ＭＧ．Δ２－７）、８４ｍｍ３（Ｕ８７　ＭＧ）、７３ｍｍ３（Ｕ８７　ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ）、または２０１ｍｍ３（Ａ４３１腫瘍）の平均体積に達した場合処置を開始した。腫瘍体積（ｍｍ３）は、式（長さ３幅２）／２を使用して決定し、ここで、長さは、最長軸であり、幅は、この長さに直角をなす測定値であった（２６）。データを、各処置群に対して平均腫瘍体積６ＳＥとして示した。この研究プロジェクトは、Ａｎｉｍａｌ　Ｅｔｈｉｃｓ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ａｕｓｔｉｎ　ａｎｄ　Ｒｅｐａｔｒｉａｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｃｅｎｔｒｅによって認可された。

【０３７９】

（腫瘍異種移植片の組織学的試験）

異種移植片を、示した時間に切除し、２等分した。半分を、パラフィン中に包埋する前に、１０％ホルマリン／ＰＢＳ中で固定した。次いで、４ｍｍの切片を、切り出し、慣用的な組織学的試験のためにＨ＆Ｅを用いて染色した。もう半分を、組織Ｔｅｋ　ＯＣＴ化合物（Ｓａｋｕｒａ　Ｆｉｎｅｔｅｋ，Ｔｏｒｒａｎｃｅ，ＣＡ）中に包埋し、液体窒素中で凍結させ、そして２８０℃で保存した。薄い（５－ｍｍ）凍結切片を、切り出し、１０分間氷冷アセトン中で固定し、その後、さらに１０分間空気乾燥させた。切片を、タンパク質ブロッキング試薬（Ｌｉｐｓｈａｗ　Ｉｍｍｕｎｏｎ，Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ，ＰＡ）中で１０分間ブロッキングし、次いで、ビオチン化一次抗体（１ｍｇ／ｍｌ）と共に、室温で３０分間インキュベートした。全ての抗体を、製造業者の指示書のとおり、ＥＣＬタンパク質ビオチン化モジュール（Ａｍｅｒｓｈａｍ，Ｂａｕｌｋｈａｍ　Ｈｉｌｌｓ，ＮＳＷ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を使用して、ビオチン化した。ＰＢＳでリンスした後、切片を、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体と共に、さらに３０分間インキュベートした（Ｓｉｌｅｎｕｓ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ｖｉｃｔｏｒｉａ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）。最終的なＰＢＳ洗浄の後、この切片を、過酸化水素存在下において、３－アミノ－９－エチルカルバゾール基質［０．１Ｍ酢酸、０．１Ｍ酢酸ナトリウム、０．０２Ｍ　３－アミノ－９－エチルカルバゾール（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）］に３０分間曝露した。切片を、水でリンスし、ヘマトキシリンで５分間対比染色し、そしてマウントした。

【０３８０】

（統計学的分析）

インビボ腫瘍測定値（ｍｍ３）を、平均６ＳＥとして示す。所定の時点での処値群間の差異を、スチューデントのｔ検定を使用して、統計的有意性について試験した。

【０３８１】

（結果）
（細胞株への抗体の結合）
ｍＡｂ　８０６の特異性を決定するために、このｍＡｂ　８０６の、Ｕ８７ＭＧ細胞、Ｕ８７ＭＧ．Ｄ２－７細胞、およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞への結合を、ＦＡＣＳによって分析した。無関係のＩｇＧ２ｂ（ヒト抗原Ａ３３に指向したｍＡｂ　１００－３１０）は、ｍＡｂ　８０６に対するアイソタイプコントロールとして含まれ、そして５２８抗体は、それがｄｅ２－７ＥＧＦＲおよびｗｔＥＧＦＲの両方を認識するので、含まれる。５２８抗体のみが、親Ｕ８７　ＭＧ細胞株を染色することが可能であり（図２９）、このことは、これらの細胞がｗｔＥＧＦＲを発現することを実証する以前の報告と一致した（１６）。ｍＡｂ　８０６が、コントロール抗体に類似する結合レベルを有し、このことは、明らかに、ｗｔＥＧＦＲを結合することができないことを実証する（図２９）。Ｕ８７ＭＧ．Ｄ２－７細胞株およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞株へのアイソタイプコントロール抗体の結合は、Ｕ８７ＭＧ細胞について観察される結合と類似した。ｍＡｂ　８０６は、Ｕ８７ＭＧ．Ｄ２－７細胞およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞を染色し、このことは、ｍＡｂ　８０６がｄｅ２－７ＥＧＦＲおよび過剰発現されたＥＧＦＲの部分集団を特異的に認識した（図２９）ことを示した。期待されるように、５２８抗体は、Ｕ８７ＭＧ．Ｄ２－７細胞株およびＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞株の両方を染色した（図２９）。Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞を染色する５２８抗体の強度は、ｍＡｂ　８０６抗体よりはるかに高く、このことは、ｍＡｂ　８０６のみが、過剰発現されたＥＧＦＲの一部を認識することを示唆した。Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞で観察されたｍＡｂ　８０６の反応性は、Ａ４３１細胞（ｗｔＥＧＦＲ．３を過剰発現する別の細胞株）で観察される反応性に類似する。

【０３８２】
スキャッチャード分析を、Ｕ８７ＭＧ．Ｄ２－７細胞およびＡ４３１細胞を使用して実施し、相対的親和性および各細胞株上のｍＡｂ　８０６に対する結合部位を決定した。ｍＡｂ　８０６は、１．１×$10^{9}$$M^{-1}$のｄｅ２－７ＥＧＦＲレセプターに対する親和性を有し、平均（３つの別個の実験）２．４×10^{5}結合部位／細胞を認識した。対照的に、Ａ４３１細胞上のｗｔＥＧＦＲに対するｍＡｂ　８０６の親和性は、ほんの９．５×$10^{7}$$M^{-1}$であった。興味深いことに、ｍＡｂ　８０６は、Ａ４３１細胞の表面上の２．３×10^{5}結合部位を認識し、この数は、これらの細胞に見出されるＥＧＦＲの報告された数より、約１０倍低い。本発明者らのＡ４３１細胞の表面上のＥＧＦＲの数を確認するために、本発明者らは、^{125}Ｉ－標識５２８抗体を使用して、スキャッチャード分析を実施した。期待されるように、この抗体は、Ａ４３１細胞の表面上の約２×10^{6}部位への結合した。従って、ｍＡｂ　８０６は、Ａ４３１細胞の表面上のＥＧＦＲレセプターの一部を結合するだけのようである。重要なことには、^{125}Ｉ－標識化ｍＡｂ　８０６は、細胞の数が、１×10^{7}まで増加した場合でさえも、全く親Ｕ８７　Ｍｇ細胞へと結合しなかった。

【０３８３】
（免疫沈降）
ｍＡｂ　８０６、ｓｃ－０３（ＥＧＦＲのＣＯＯＨ末端ドメインに対して特異的な市販のポリクローナル抗体）およびＩｇＧ２ｂアイソタイプコントロールを使用した３５Ｓ標識化の後、免疫沈降によって種々の細胞株における、ｍＡｂ　８０６の反応性をさらに特徴付けた。ｓｃ－０３抗体は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞から３つのバンドを免疫沈降し、２つのｄｅ２－７ＥＧＦＲのバンドに対応する二重のバンドがこれらの細胞において観察され、そして高分子量のバンドは、ｗｔＥＧＦＲに対応した（図３０）。対照的に、ｍＡｂ　８０６が、２つのｄｅ２－７ＥＧＦＲのバンドを免疫沈降したにも関わらず、ｗｔＥＧＦＲは、完全に存在しなかった（図３０）。Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞およびＡ４３１細胞において見られるパターンは、本質的に同一であった。ｓｃ－０３抗体は、両方の細胞株からｗｔＥＧＦＲに対応する単一のバンドを免疫沈降した（図３０）。このｍＡｂ　８０６はまた、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞およびＡ４３１細胞の両方からｗｔＥ

ＧＦＲに対応する単一のバンドを免疫沈降した（図３０）。ＦＡＣＳおよびスキャッチャードデータと一致して、ｍＡｂ　８０６によって免疫沈降されるＥＧＦＲの量は、細胞表面に存在する全ＥＧＦＲより実質的に少なかった。ｍＡｂ　８０６およびｓｃ－０３が、類似する量のｄｅ２－７ＥＧＦＲを免疫沈降したと仮定すれば、この結果は、ｍＡｂ　８０６抗体のみが、レセプターを過剰発現する細胞においてＥＧＦＲの一部を認識するという概念を支持する。ｍＡｂ　８０６抗体と５２８抗体との間の比較は、同一の反応性のパターンを示した（データは示さず）。無関係のＩｇＧ２ｂ（ｍＡｂ　８０６に対するアイソタイプコントロール）は、細胞株のいずれからもＥＧＦＲを免疫沈降しなかった（図３０）。同一の条件を使用して、ｍＡｂ　８０６は、親Ｕ８７　ＭＧ細胞からＥＧＦＲを免疫沈降した（データは示さず）。

【０３８４】

（予防モデルにおけるｍＡｂ　８０６の有効性）

ｍＡｂ　８０６を、予防移植片モデルにおけるＵ８７　ＭＧ腫瘍およびＵ８７　ＭＧ．Δ２－７腫瘍に対する有効性について試験した。抗体またはビヒクルを、腫瘍接種の１日前にｉ．ｐ．投与し、１週間あたり３回で２週間、与えた（「材料および方法」を参照のこと）。１ｍｇ／１回注射の用量で、ｍＡｂ　８０６は、ｗｔＥＧＦＲを発現する親Ｕ８７　ＭＧ異種移植片の増殖に対して効果を有さなかった（図９Ａ）。対照的に、ｍＡｂ　８０６は、Ｕ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片の増殖を、用量依存性様式で有意に阻害した（図９Ｂ）。腫瘍接種の２０日後に、コントロール動物を屠殺した場合、平均的な腫瘍体積は、コントロール群については１６００±１８０ｍｍ^{3}であり、０．１ｍｇ／１回注射群については５００±９５ｍｍ^3（Ｐ＜０．０００１）、および１ｍｇ／１回注射群についての２００±４２ｍｍ^3（Ｐ＜０．０００１）より有意に小さかった。処置群を、２４日目に屠殺し、屠殺した時点での平均の腫瘍体積は、０．１ｍｇ処置群については１３００±２４０ｍｍ３であり、１ｍｇ群については５００±１００ｍｍ^3（Ｐ＜０．００５）であった。

【０３８５】

（確立された異種移植片モデルにおけるｍＡｂ　８０６の有効性）

予防異種移植片モデルにおけるｍＡｂ　８０６の有効性が与えられた場合、確立された腫瘍異種移植片の増殖を阻害するｍＡｂ　８０６の能力を試験した。抗体処置を、腫瘍が、Ｕ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片について６５ｍｍ^{3}の平均腫瘍体積（移植１０日後）および親Ｕ８７　ＭＧ異種移植片について８４ｍｍ^{3}の平均腫瘍体積（移植１９日後）に到達した場合に、抗体処置が開始されることを除いて、予防モデルに記載されたとおりであった。もう一度、ｍＡｂ　８０６は、１ｍｇ／１回注射の用量でさえも、親Ｕ８７　ＭＧ異種移植片の増殖に対して効果を有さなかった（図１０Ａ）。対照的に、ｍＡｂ　８０６は、用量依存性様式でＵ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片の増殖を有意に阻害した（図１０Ｂ）。１７日目において、コントロール動物を屠殺する１日前で、平均腫瘍体積は、コントロール群については９００±２００ｍｍ^{3}であり、０．１ｍｇ／１回注射群については４００±６０ｍｍ^3（Ｐ＜０．０１）であり、そして１ｍｇ／１回注射群については２２０±６０ｍｍ^3（Ｐ＜０．００２）であった。ＩｇＧ２ｂアイソタイプコントロールを用いたＵ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片の処置は、腫瘍の増殖に効果を有さなかった（データは示さず）。

【０３８６】

ｍＡｂ　８０６を用いて観察される増殖阻害が、ｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現する細胞に限定されるかどうかを試験するために、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片に対するｍＡｂ　８０６の効果をまた、確立されたモデルにおいて試験した。これらの細胞を、ｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現しないＥＧＦＲ遺伝子の増幅を含む腫瘍についてのモデルとして扱った。ｍＡｂ　８０６処置を、腫瘍が、７３ｍｍ３の平均腫瘍体積に到達した（移植２２日後）場合に開始した。ｍＡｂ　８０６は、ビヒクルで処置されたコントロール腫瘍と比較された場合、確立されたＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ異種移植片の増殖を有意に阻害した（図１０Ｃ）。コントロール動物が屠殺された日において、平均腫瘍体積は、コントロール

群については１０００±３００ｍｍ^{3}であり、１ｍｇ／１回注射で処置した群については、５００±８０ｍｍ^3（Ｐ＜０．０４）であった。

【０３８７】

（樹立された腫瘍の組織学的分析および免疫組織化学的分析）　ｍＡｂ　８０６で処理したＵ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片およびｍＡｂ　８０６で処理したＵ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ異種移植片と、コントロールのＵ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片およびＵ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ異種移植片との間の可能な組織学的差異を評価するために、ホルマリン固定しパラフィン包埋した切片を、Ｈ＆Ｅで染色した（図３１）。壊死領域が、ｍＡｂ　８０６で処理したＵ８７　ＭＧ．Δ２－７由来の切片（ｍＡｂ　８０６で処理したＵ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片は、腫瘍接種の２４日後に収集し、ビヒクルで処理した異種移植片は、１８日目に収集した）およびＵ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ異種移植片由来の切片（ｍＡｂ　８０６異種移植片は、腫瘍接種の４２日後に収集し、ビヒクルで処理した異種移植片は、３７日目に収集した）において観察された（図３１）。この結果は、多数の腫瘍異種移植片（各細胞株についてｎ５　４）において一貫して観察された。しかし、ビヒクルで処理したＵ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片由来の切片およびビヒクルで処理したＵ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ異種移植片由来の切片（ｎ　５　５）は、ｍＡｂ　８０６処理後観察された同じ壊死領域を示さなかった（図３１）。ビヒクルで処理した異種移植片およびｍＡｂ　８０６で処理した異種移植片を、同じ時間で取り出した。そしてこれらはまた、腫瘍壊死においてこれらの差異を示した（データは示さず）。従って、観察される壊死の増加は、ｍＡｂ　８０６で処理された異種移植片について使用された、より長い増殖期間によって引き起こされたのではない。さらに、ｍＡｂ　８０６で処理したＵ８７　ＭＧ異種移植片由来の切片もまた、Ｈ＆Ｅで染色した。そしてこれらは、いかなる壊死領域も示さなかった（データは示さず）。このことはさらに、ｍＡｂ　８０６結合が、細胞生存度を減少させ、腫瘍異種移植片内で壊死の増加を生じるという仮説を支持する。

【０３８８】

Ｕ８７　ＭＧ異種移植片、Ｕ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片、およびＵ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ異種移植片の切片の免疫組織化学分析が、ｍＡｂ８０６処理後のｄｅ２－７発現レベルおよびｗｔ　ＥＧＦＲ発現レベルを測定するために実施した（図３２）。予期された通り、５２８抗体は、すべての異種移植片切片を染色した。処理した腫瘍とコントロール腫瘍との間で、強度の明らかな減少はなかった（図３２）。Ｕ８７　ＭＧ切片の染色は、ｍＡｂ　８０６を用いては検出不可能であったが、Ｕ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片切片およびＵ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ異種移植片切片のポジティブ染色が、観察された（図３２）。コントロールのＵ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片およびＵ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ異種移植片と、処理したＵ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片およびＵ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ異種移植片との間で、ｍＡｂ　８０６染色強度の差異は存在しなかった。このことは、抗体処理が、ｍＡｂ　８０６反応性を欠くクローン改変体の選択をもたらさないことを示唆する。

【０３８９】

（ｍＡｂ　８０６でのＡ４３１異種移植片の処理）　ｍＡｂ　８０６の抗腫瘍効果がＵ８７　ＭＧ細胞に限定されないことを示すために、この抗体を、Ａ４３１異種移植片を含むマウスに投与した。これらの細胞は、増幅されたＥＧＦＲ遺伝子を含み、そして約２×１０^{6}個のレセプター／細胞を発現する。本発明者らは、ｍＡｂ　８０６がこれらのＥＧＦＲのうちの約１０％に結合し、そしてＡ４３１異種移植片を標的とすることを以前に示した（３）。ｍＡｂ　８０６は、以前に記載された予防異種移植片モデルにて試験した場合に、Ａ４３１異種移植片の増殖を有意に阻害した（図１１Ａ）。１３日目に、コントロール動物を屠殺した場合、平均腫瘍体積は、ビヒクルで処理した群で１４００±１５０ｍｍ^{3}であり、１ｍｇ／注射処理群について２６０±６０ｍｍ^{3}であった（Ｐ＜０．０００１）。別個の実験において、用量０．１ｍｇのｍＡｂもまた、予防モデルにおいてＡ４３１異種移植片の増殖を有意に（Ｐ＜０．０５）を阻害した（データは示さず）。

【０３９０】
上記予防的Ａ４３１異種移植片モデルにおけるｍＡｂ　８０６の効力を考慮して、樹立された腫瘍異種移植片の増殖を阻害する能力を試験した。抗体処理は、上記の予防モデルにおいて記載した通りであったが、但し、腫瘍が平均腫瘍体積２００±２０ｍｍ^{3}に達するまで抗体処理を開始しなかった。ｍＡｂ　８０６は、樹立したＡ４３１異種移植片の増殖を有意に阻害した（図１１Ｂ）。１３日目（コントロール動物を屠殺した日である）に、平均腫瘍体積は、コントロール群について１１００±１００ｍｍ^{3}であり、１ｍｇ／注射群については４５０±７０ｍｍ^{3}であった（Ｐ＜０．０００１）。
【０３９１】
本発明者らは、ｍＡｂ　８０６が、ｗｔ　ＥＧＦＲを過剰発現する、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲトランスフェクトＵ８７　ＭＧ異種移植片とＡ４３１異種移植片との両方を標的とすることを以前に示した（３）。ｍＡｂ　８０６は、約１０^{5}個のＥＧＦＲを発現する（３）親Ｕ８７　ＭＧ細胞を標的としなかった（１６）。ＦＡＣＳ、免疫組織化学および免疫沈降により評価した場合、本発明者らは、ｍＡｂ　８０６がまた、＞１０^{6}個のＥＧＦＲ／細胞を発現するＵ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ細胞を特異的に結合可能であることをここに示す。従って、以前に観察されたＡ４３１細胞へのｍＡｂ　８０６の結合は、これらの細胞のいくらか通常ではない特性の結果ではなく、むしろｗｔ　ＥＧＦＲの過剰発現と関連するより一般的な現象であるようである。
【０３９２】
（ａ）本発明者らは、１×１０^{5}個のｗｔ　ＥＧＦＲ／細胞を発現する親Ｕ８７　ＭＧ細胞株へのｍＡｂ　８０６の結合（１６）を、ＦＡＣＳ、免疫沈降、免疫組織化学によっても、ヨウ素付加抗体を用いても、検出できなかった。実際、ヨウ素付加ｍＡｂ　８０６は、１×１０^{7}個の細胞を含むＵ８７　ＭＧ細胞ペレットに結合しなかった。これは、１×１０^{6}個のＡ４３１細胞を使用するスキャッチャードデータに基づくと、低レベル抗体結合を検出するはずの条件である（すなわち、両方の場合で、レセプターの総数が類似している）。
【０３９３】
（ｂ）スキャッチャード分析は、ｍＡｂ　８０６が、Ａ４３１細胞の表面上の総ＥＧＦＲのうちの１０％にのみ結合したことを明らかに示した。ｍＡｂ　８０６が、低親和性でこのｗｔ　ＥＧＦＲと単に結合する場合、そのｍＡｂ　８０６は、そのレセプターのうちのかなり高い割合と結合しているはずである。
【０３９４】
（ｃ）Ａ４３１およびＵ８７　ＭＧの比較免疫沈降。ｍＡｂ　８０６およびｓｃ－０３抗体を含むｗｔ　ＥＧＦＲ細胞株もまた、レセプターの部分集団のみが、ｍＡｂ　８０６により認識されるという仮説を支持した。まとめると、これらの結果は、ｍＡｂ　８０６が、ＥＧＦＲを過剰発現する細胞の表面上のＥＧＦＲ部分集団を認識するという知見を支持する。本発明者らは、ｍＡｂ８０６が、グリコシル化またはキナーゼ活性と関連する変化した生化学的特性を提示するかどうかを観察するために、ｍＡｂ　８０６によるＥＧＦＲ免疫沈降を現在分析中である。
【０３９５】
本明細書中に記載されるｍＡｂ　８０６を用いる異種移植片研究は、Ｕ８７　ＭＧ．Ｄ２－７異種移植片増殖の用量依存性阻害を示す。対照的に、親Ｕ８７　ＭＧ異種移植片がインビボでｗｔ　ＥＧＦＲを発現し続けるという事実にも関わらず、親Ｕ８７　ＭＧ異種移植片の阻害は、全く観察されなかった。ｍＡｂ　８０６は、異種移植片の体積を有意に減少しただけでなく、このｍＡｂ　８０６はまた、その腫瘍内で有意な壊死を誘導した。上記のように、他のｄｅ２－７ＥＧＦＲ特異的ｍＡｂが生成された（２０～２２）が、これは、ヒトｄｅ２－７　ＥＧＦＲ発現神経膠腫異種移植片に対してインビボでそのような抗体を首尾良く治療的に使用することを示す、最初の報告である。最近の報告は、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲ特異的Ｙ１０　ｍＡｂが、ヒトｄｅ２－７　ＥＧＦＲのマウスホモログでトランスフェクトされたマウスＢ１６黒色腫細胞に対して、インビボで抗腫瘍活性を有した

ことを示した（３３）。Ｙ１０は、補体もエフェクター細胞も存在しない場合に、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲを発現するＢ１６黒色腫細胞のインビトロ細胞溶解（＞９０％）を媒介した。そのインビトロでの観察とは対照的に、インビボでのＹ１０抗体の効力は、免疫応答性モデルにおいて異種移植片として増殖したＢ１６黒色腫細胞を使用した場合、Ｆｃ機能を介して完全に媒介された。従って、細胞が腫瘍異種移植片として増殖された場合、インビトロで観察される直接の効果は、複製されないようである。

【０３９６】

ＥＧＦＲの過剰発現が、多数の種々の腫瘍において報告されており、そしてこの過剰発現は、ほとんどの神経膠腫において観察される（４、１４）。レセプター遺伝子増幅により媒介されるその後のＥＧＦＲ過剰発現は、細胞内シグナル伝達および細胞増殖を増加することによって増殖を有利にし得ることが提唱されている（３４）。このＵ８７　ＭＧ細胞株を、ｗｔ　ＥＧＦＲでトランスフェクトして、ＥＧＦＲ遺伝子増幅プロセスを模倣する神経膠腫細胞を生成した。樹立されたＵ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ異種移植片をｍＡｂ　８０６で処理すると、有意な増殖阻害を生じた。従って、ｍＡｂ　８０６はまた、ＥＧＦＲを過剰発現する細胞に対するインビボでの抗腫瘍活性を媒介する。興味深いことに、Ｕ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ異種移植片のｍＡｂ　８０６による阻害は、Ｕ８７　ＭＧ．Δ２－７腫瘍を用いて観察されるよりも顕著ではない。このことは、ｍＡｂ　８０６が、過剰発現したｗｔ　ＥＧＦＲについてより低い親和性を有しており、そして細胞表面上に発現される低比率のレセプターにのみ結合するという事実を、おそらく反映する（３）。しかし、Ｕ８７　ＭＧ．ｗｔ　ＥＧＦＲ異種移植片の体積に対するこの小さな効果にも関わらず、ｍＡｂ　８０６処理が、これらの異種移植片内で大きな壊死領域を生成したことが、注意されるべきである。ｍＡｂ　８０６が、Ｕ８７　ＭＧ由来細胞株の阻害のみを媒介するという可能性を排除するために、本発明者らは、Ａ４３１異種移植片に対するｍＡｂ　８０６の効力を試験した。この扁平上皮細胞癌腫由来細胞株は、有意なＥＧＦＲ遺伝子増幅を含み、これは、インビトロおよびインビボの両方で保持される。ｍＡｂ　８０６でＡ４３１異種移植片を処理すると、予防モデルおよび樹立されたモデルの両方において、有意な増殖阻害を生じた。このことは、ｍＡｂ　８０６の抗腫瘍効果が、トランスフェクトされたＵ８７　ＭＧ細胞株に限定されないことを示す。

【０３９７】

抗体処理によるＡ４３１異種移植片増殖の完全な防止が、以前に報告されている。ｗｔ　ＥＧＦＲ　ｍＡｂである５２８、２２５、および４２５は、すべて、腫瘍接種日または腫瘍接種１日後のいずれかに投与した場合に、Ａ４３１異種移植片の形成を防止した（９、１０）。これらのｗｔ　ＥＧＦＲ抗体とｍＡｂ８０６との間のこの効力の差異の原因は、既知ではないが、細胞増殖阻害の機構に関連し得る。ｗｔ　ＥＧＦＲ抗体は、ＥＧＦＲへのリガンド結合をブロックすることによって機能するが、これは、おそらく、ｍＡｂ　８０６については事実ではない。なぜなら、ｗｔ　ＥＧＦＲ抗体は、Ａ４３１細胞の表面上のＥＧＦＲ小部分集団にのみ結合するからである。リガンド非依存性ｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現するＵ８７　ＭＧ細胞に対するｍＡｂ　８０６の有意な効力は、この抗体が、リガンドブロックを含まない機構によりその抗腫瘍活性を媒介するという知見を支持する。従って、本発明者らは、ｍＡｂ　８０６の抗腫瘍効果に寄与する非免疫学的機構および免疫学的機構を現在調査中である。非免疫学的機構は、レセプターレベルの微妙な変化、シグナル伝達のブロック、または不適切なシグナル伝達の誘導を包含し得る。

【０３９８】

以前、ｗｔ　ＥＧＦＲ抗体と組み合わせた薬剤（例えば、ドキソルビシンおよびシスプラチン）が、抗腫瘍活性の増強を生じた（３５、３６）。ドキソルビシンとｍＡｂ　５２８との組み合わせは、樹立したＡ４３１異種移植片の全体的な根絶を生じた一方、いずれかの薬剤単独での処理は、インビボでの一時的な増殖阻害しか生じなかった（３６）。同様に、シスプラチンと、ｍＡｂ　５２８または２２５のいずれかとの組み合わせもまた、十分に樹立されたＡ４３１異種移植片の根絶をもたらした。これは、いずれかの薬剤での処理が使用された場合は観察されなかった（３５）。従って、ｍＡｂ　８０６と化学療法剤

との組み合わせを含む将来の研究は、異種移植片モデルを使用して計画される。

【０３９９】

おそらく、現在のＥＧＦＲ抗体と比較したｍＡｂ　８０６の最も重要な利点であり得るのは、ｍＡｂ　８０６に細胞傷害性因子を直接結合することが可能であることである。このアプローチは、現在のＥＧＦＲ特異的抗体を用いて実現可能ではない。なぜなら、これらの抗体は、肝臓を標的とし、細胞傷害性結合体は、重篤な毒性をほとんど確実に誘導するからである。細胞傷害性薬剤（例えば、薬物（３７）または放射性同位体（３８））を抗体に結合体化することは、これらの薬剤の効力を改善しそして全体的毒性を減少する可能性を有する。この研究は、ｍＡｂ　８０６は、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲポジティブ異種移植片およびＥＧＦＲ過剰発現腫瘍に対する有意なインビボ抗腫瘍活性を有することを明らかに示す。ｍＡｂ　８０６の独特の特異性は、正常組織の取り込みと関連する限定を伴わない、多数の腫瘍型（特に、頭部および頸部の腫瘍および神経膠腫）を標的とする際の免疫治療能力を示唆する。

【０４００】

（参考文献）

【０４０１】

【表１２】

1. Scott, A. M., and Welt, S. Antibody-based immunological therapies. Curr. Opin. Immunol., *9:* 717–722, 1997.

2. Fan, Z., and Mendelsohn, J. Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. Curr. Opin. Oncol., *10:* 67–73, 1998.

3. Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. Cancer Res., *53:* 3217–3220, 1993.

4. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. J. Neurovirol., *4:* 148–158, 1998.

5. Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R., and Pronin, I. Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 168 cases. J. Clin. Pathol., *52:* 574–580, 1999.

6. Grandis, J. R., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., and Tweardy, D. J. Levels of TGF-a and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. J. Natl. Cancer Inst., *90:* 824–832, 1998.

7. Fan, Z., Masui, H., Altas, I., and Mendelsohn, J. Blockade of epidermal growth factor
receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. Cancer Res., *53:* 4322–4328, 1993.

8. Teramoto, T., Onda, M., Tokunaga, A., and Asano, G. Inhibitory effect of anti-epidermal
growth factor receptor antibody on a human gastric cancer. Cancer (Phila.), *77:* 1639–1645, 1996.
9. Rodeck, U., Herlyn, M., Herlyn, D., Molthoff, C., Atkinson, B., Varello, M., Steplewski, Z., and Koprowski, H. Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor: immunologically mediated and effector cell-independent effects. Cancer Res., *47:* 3692–3696, 1987.
10. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. Growth
inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. Cancer Res., *44:* 1002–1007, 1984.
11. Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson,
M., and Delattre, J. Y. A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. Neurosurgery, *39:* 478–483, 1996.
12. Divgi, C. R., Welt, S., Kris, M., Real, F. X., Yeh, S. D., Gralla, R., Merchant, B., Schweighart, S., Unger, M., Larson, S. M., *et al.* Phase I and imaging trial of indium 11-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. J. Natl. Cancer Inst., *83:* 97–104, 1991.
13. Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea,
G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., and Mendelsohn, J. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. J. Clin. Oncol., *18:* 904, 2000.
14. Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S. Epidermal
growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Ann. Oncol., *8:* 1197–1206, 1997.
15. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P. Identical splicing of

aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *87:* 8602–8606, 1990.

16. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *91:* 7727–7731, 1994.

17. Tang, C. K., Gong, X. Q., Moscatello, D. K., Wong, A. J., and Lippman, M. E. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. Cancer Res., *60:* 3081–3087, 2000.

18. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu,
D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br. J. Cancer, *82:* 186–194, 2000.

19. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. Cancer Res., *55:* 5536–5539, 1995.

20. Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., *et al.* Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. Cancer Res., *55:* 3140–3148, 1995.

21. Hills, D., Rowlinson-Busza, G., and Gullick, W. J. Specific targeting of a mutant, activated FGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. Int. J. Cancer, *63:* 537–543, 1995.

22. Okamoto, S., Yoshikawa, K., Obata, Y., Shibuya, M., Aoki, S., Yoshida, J., and Takahashi, T. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. Br. J. Cancer, *73:* 1366–1372, 1996.

23. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis.

Cancer Res., *56:* 5079–5086, 1996.

24. Sato, J. D., Le, A. D., and Kawamoto, T. Derivation and assay of biological effects
of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors. Methods Enzymol., *146:* 63–81, 1987.

25. Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang,
C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated
signaling. J. Biol. Chem., *272:* 2927–2935, 1997.

26. Clarke, K., Lee, F. T., Brechbiel, M. W., Smyth, F. E., Old, L. J., and Scott, A. M. Therapeutic efficacy of anti-Lewis(y) humanized 3S193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with Taxol chemotherapy. Clin. Cancer Res., *6:* 3621–3628, 2000.

27. Atlas, I., Mendelsohn, J., Baselga, J., Fair, W. R., Masui, H., and Kumar, R. Growth
regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor a. Cancer Res., *52:* 3335–3339, 1992.

28. Perez-Soler, R., Donato, N. J., Shin, D. M., Rosenblum, M. G., Zhang, H. Z., Tornos,
C., Brewer, H., Chan, J. C., Lee, J. S., Hong, W. K., *et al.* Tumor epidermal growth factor receptor studies in patients with non-small-cell lung cancer or head and neck cancer treated with monoclonal antibody RG 83852. J. Clin. Oncol., *12:* 730–739, 1994.

29. Wersall, P., Ohlsson, I., Biberfeld, P., Collins, V. P., von Krusenstjerna, S., Larsson,
S., Mellstedt, H., and Boethius, J. Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma. Cancer Immunol. Immunother., *44:* 157–164, 1997.

30. Brady, L. W., Miyamoto, C., Woo, D. V., Rackover, M., Emrich, J., Bender, H., Dadparvar, S., Steplewski, Z., Koprowski, H., Black, P., *et al.* Malignant astrocytomas
treated with iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a Phase II trial. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., *22:* 225–230, 1992.
31. Reist, C. J., Archer, G. E., Kurpad, S. N., Wikstrand, C. J., Vaidyanathan, G., Willingham, M. C., Moscatello, D. K., Wong, A. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. Cancer Res., *55:* 4375–4382, 1995.
32. Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate.
Cancer Res., *57:* 1510–1515, 1997.
33. Sampson, J. H., Crotty, L. E., Lee, S., Archer, G. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J.,
Hale, L. P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A. H., Friedman, H. S., and Bigner, D. D. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *97:* 7503–7508, 2000.
34. Filmus, J., Trent, J. M., Pollak, M. N., and Buick, R. N. Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its nonamplified variants.
Mol. Cell. Biol., *7:* 251–257, 1987.
35. Fan, Z., Baselga, J., Masui, H., and Mendelsohn, J. Antitumor effect of anti-epidermal
growth factor receptor monoclonal antibodies plus *cis*-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. Cancer Res., *53:* 4637–4642, 1993.
36. Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., Jr., and
Mendelsohn, J. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. J. Natl. Cancer Inst., *85:* 1327–1333, 1993.
37. Trail, P. A., and Bianchi, A. B. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment
of cancer. Curr. Opin. Immunol., *11:* 584–588, 1999.
38. DeNardo, S. J., Kroger, L. A., and DeNardo, G. L. A new era for radiolabeled antibodies in cancer? Curr. Opin. Immunol., *11:* 563–569, 1999.

（実施例２１）
（キメラ８０６抗体の構築、発現、および分析）

キメラ抗体は、例えば、マウス、ラット、または他の種の重鎖および軽鎖の可変領域が、ヒトの重鎖領域および軽鎖領域に結合されている、分子の分類である。キメラ抗体は、組換え生成される。キメラ抗体の１つの利点は、キメラ抗体が、異種抗原性効果（非ヒト抗体（例えば、マウス、ラット、または他の種）の固有の免疫原性）を減少し得ることである。さらに、組換えにより調製されたキメラ抗体は、しばしば、特に高レベル発現ベクターを使用した場合に、大量に生成され得る。

【０４０２】

高レベル生成のために、ほとんどの広範に使用される哺乳動物発現系は、デヒドロ葉酸還元酵素欠損（「ｄｈｆｒ－」）チャイニーズハムスター卵巣細胞により与えられる遺伝子増幅手順を使用する系である。この系は、当業者に周知である。この系は、ＤＨＦＲ酵素（デヒドロ葉酸からテトラヒドロ葉酸への変換を触媒する）をコードするデヒドロ葉酸還元酵素「ｄｈｆｒ」遺伝子に基づく。高生成を達成するために、ｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞を、機能的ＤＨＦＲ遺伝子を所望のタンパク質をコードする遺伝子とともに含む発現ベクターで、トランスフェクトする。この場合、所望のタンパク質は、組換え抗体の重鎖および／または軽鎖である。

【０４０３】

競合的ＤＨＦＲインヒビターであるメトトレキサート（ＭＴＸ）の量を増加することによって、その組換え細胞は、ｄｈｆｒ遺伝子を増幅することによって耐性を生じる。標準的な場合、使用される増幅単位は、ｄｈｆｒ遺伝子のサイズよりもかなり大きく、結果として、その抗体の重鎖が、同時に増幅される。

【０４０４】

そのタンパク質（例えば、抗体鎖）の大スケール生成が望まれる場合、使用される細胞の発現レベルおよび安定性の両方が、重要である。長期培養において、組換えＣＨＯ細胞集団は、その集団は単一の親クローンに由来するけれども、増幅の間にその特異的抗体生産性に関して均一性を失う。

【０４０５】

二シストロン性発現ベクターを、このキメラ抗体の組換え発現において使用するために調製した。これらの二シストロン性発現ベクターは、「内部リボソーム侵入部位」すなわち「ＩＲＥＳ」を使用する。キメラ抗ＥＧＦＲの生成のためのこれらの構築物において、免疫グロブリン鎖および選択マーカーのｃＤＮＡを、ＩＲＥＳを介して連結する。ＩＲＥＳは、細胞のトランス作用性因子の補助によって、そのｍＲＮＡ中の内部開始因子コドンに小リボソームサブユニットを動員する、シス作用性エレメントである。ＩＲＥＳは、真核生物細胞におけるポリシストロン性転写単位からの２つ以上のタンパク質の発現を容易にする。選択マーカー遺伝子がｃａｐ依存性様式で翻訳されそして目的の遺伝子がＩＲＥＳ依存性様式で発現される、二シストロン性発現ベクターの使用が、種々の実験的方法に適用されている。ＩＲＥＳエレメントは、細胞形質転換のためのベクター、トランスジェニック動物の生成のためのベクター、組換えタンパク質生成のためのベクター、遺伝子治療のためのベクター、遺伝子トラッピングのためのベクター、および遺伝子ターゲッティングのためのベクター中に、首尾良く組み込まれている。

【０４０６】

（キメラ抗体８０６（ｃｈ８０６）構築の要約）

このキメラ８０６抗体を、標準的な分子生物学的技術を使用して、親マウスハイブリドーマから８０６抗体のＶＨおよびＶＬをクローニングすることによって生成した。その後、このＶＨおよびＶＬを、ｐＲＥＮ哺乳動物発現ベクター中にクローニングした。このベクターの構成は、配列番号７および配列番号８に示される。そしてこのｐＲＥＮ哺乳動物発現ベクターを、増幅および発現のためにＣＨＯ（ＤＨＦＲ－／－ｖｅ）細胞中にトランスフェクトした。簡単に述べると、トリプシン処理した後、４×１０^{6}個のＣＨＯ細胞を、標準的な条件下でエレクトロポレーションを使用して、ＬＣ発現ベクターおよびＨＣ発現ベクター各々１０μｇで同時トランスフェクトした。室温で１０分間の休止期間の後、これらの細胞を、１５ｍｌの培地（１０％ウシ胎仔血清、添加物を含むヒポキサンチン／

チミジン補充物）に添加し、そして１５×１０ｃｍの細胞培養ペトリ皿に移した。その後、この皿を、通常の条件下でインキュベーター中に２日間配置した。この時点で、ゲンタマイシンの添加、５ｎＭメトトレキサートの添加、ウシ胎仔血清を透析した胎仔血清で置換すること、およびヒポキサンチン／チミジンの除去によって、その培地からＬＣおよびＨＣの両方で首尾良くトランスフェクトされたクローンについての選択が開始した。トランスフェクション後１７日目に、選択下で増殖する個々のクローンを選択し、そしてキメラ８０６抗体の発現についてスクリーニングした。ＥＬＩＳＡを、スクリーニングに使用した。ＥＬＩＳＡは、変性可溶性ＥＧＦレセプター（変性ＥＧＦＲは、８０６の結合を可能にすることが既知である）でＥＬＩＳＡプレートをコーティングすることからなった。このアッセイによって、個々のクローンによる生成レベルのスクリーニングが可能になり、そしてまた、スクリーニングされる抗体の機能性についてのスクリーニングが可能になる。すべてのクローンが、機能性ｃｈ８０６を生成していることが示された。最良の生成クローンを採取し、そして増幅のために増殖させた。生成されるｃｈ８０６のレベルを増幅するために、最高の生成クローンを、より高濃度のメトトレキサート（１００ｎＭ対５ｎＭ）下での再選択に供した。これは、上記の手順を使用して行った。

【０４０７】

その後、１００ｎＭ　ＭＴＸで増殖するクローンを、Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｐｒｏｃｔｉｏｎ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ，Ｌｕｄｗｉｇ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａに、生成レベルの測定、血清の分離、細胞バンク登録のために渡した。この細胞株は、回転ビンにおいて、約１０ｍｇ／リットルを安定して生成することが示された。

【０４０８】

ｐＲＥＮ　ｃｈ８０６　ＬＣ　ｎｅｏベクターの核酸配列が、配列番号７中に提供されている。ｐＲＥＮ　ｃｈ８０６　ＨＣ　ＤＨＦＲベクターの核酸配列が、配列番号８中に提供されている。

【０４０９】

図３３は、ＩＲＥＳを使用する、ベクターｐＲＥＮ－ＨＣおよびｐＲＥＮ－ＬＣを示す。ｐＲＥＮ二シストロン性ベクター系は、２００２年２月１３日出願の同時係属中の米国特許出願番号６０／３５５，８３８に記載され開示されている。この米国特許出願は、その全体が参考として本明細書中に援用される。

【０４１０】

ｃｈ８０６を、ＦＡＣＳ分析によって評価して、キメラ８０６が、マウス親抗体の結合特異性と同じ結合特異性を示すことを示した。分析は、野生型細胞（Ｕ８７　ＭＧ親細胞）、ＥＧＦレセプターを過剰発現する細胞（Ａ４３１細胞およびＵＡ８７　ｗｔ　ＥＧＦＲ細胞）、およびＵＡ８７Δ－７細胞を使用して実施した（データは示さず）。Ｍａｂ８０６とｃｈ８０６とで類似する結合特異性を、ＥＧＦＲを過剰発現する細胞と、ｄｅ２－７　ＥＧＦＲを発現する細胞を使用して得た。野生型細胞において、結合は観察されなかった。スキャッチャード分析によって、Ｕ８７　ＭＧｄｅ２－７細胞を使用して、放射性標識ｃｈ８０６についての結合親和性６．４×$10^{9}$$M^{-1}$が示された（データは示さず）。

【０４１１】

ｃｈ８０６抗体の生体分布分析を、Ｕ８７　ＭＧ－ｄｅ２－７異種移植片腫瘍を保有するＢＡＬＢ／ｃヌードマウスにおいて実施し、そしてその結果を、図３４に示す。マウスに、５μｇの放射性標識抗体を注射し、そしてそのマウスを、８時間、２４時間、４８時間、および７４時間の時点あたり４匹のグループとして屠殺した。器官を収集し、秤量し、そして放射能をγ計数管にて測定した。^{125}Ｉ標識ｃｈ８０６は、^{111}Ｉｎ標識ｃｈ８０６と比較して減少した腫瘍標的化を示した。^{111}Ｉｎ標識ｃｈ８０６は、高い腫瘍取り込みを有し、７４時間にわたって蓄積する腫瘍保持を有する。７４時間目に、^{111}Ｉｎ標識抗体は、約３０％のＩＤ／ｇ組織を示し、そして腫瘍：血液比４．０を示す（図３５）。^{111}Ｉｎ標識ｃｈ８０６は、肝臓、脾臓、および腎臓において、いくらかの

非特異的保持を示す。これは、この同位体の使用について共通しており、そして時間とともに減少する。このことは、この結合が、ｃｈ８０６に非特異的であり、^{111}Ｉｎ結合に起因することを支持する。

【０４１２】

キメラ抗体ｃｈ８０６を、樹立された腫瘍モデルにおいて治療効力について評価した。１００μｌのＰＢＳ中の3×10^{6}個のＵ８７　ＭＧ．Δ２－７細胞を、４～６週齢の雌ヌードマウス（Ａｎｉｍａｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｗｅａｔｅｒｎ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）の両方の側腹部に皮下接種した。このｍＡｂ８０６は、ポジティブコントロールとして含まれた。その結果を図３６に示す。腫瘍が平均体積５０mm^{3}に達したときに処置を開始した。処置は、示される日に合計５回注射するために腹腔内投与される１ｍｇのｃｈ８０６またはｍＡｂ８０６からなった。腫瘍体積（mm^{3}）を、式（長さ×$幅^{2}$）／２を使用して測定した。この式において、長さは、最長の軸であり、幅は、その長さに対して直角の測定値である。データは、各処置群についての平均腫瘍体積±標準誤差として表した。ｃｈ８０６およびｍＡｂ８０６は、Ｕ８７　ＭＧ．Δ２－７異種移植片に対してほぼ同じ抗腫瘍活性を示した。

【０４１３】

（ｃｈ８０６免疫エフェクターの機能の分析）

（材料および方法）

（抗体および細胞株）

マウス抗－ｄｅ２－７　ＥＧＦＲモノクローナルｍＡｂ８０６、キメラ抗体ｃｈ８０６（IgG_{1}）およびキメラ抗Ｇ２５０モノクローナル抗体ｃＧ２５０に一致したコントロールアイソタイプを、Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ，Ｌｕｄｗｉｇ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａにより調製した。補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）アッセイおよび抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）アッセイの両方は、標的細胞としてＵ８７ＭＧ．ｄｅ２－７およびＡ４３１細胞を利用した。以前に記載されたＵ８７ＭＧ．ｄｅ２－７細胞株は、ｄｅ２－７ＥＧＦＲを含むレトロウイルスに感染したヒト星状細胞腫細胞株である（Ｎｉｓｈｉｋａｗａ，Ｒ．ら（１９９４）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．９１：７７２７－３１）。ヒト扁平上皮癌Ａ４３１細胞を、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）から購入した。全ての細胞株を、Ｇｌｕｔａｍａｘ^{TM}（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を含み、１０％熱失活ＦＣＳ（ＣＳＬ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）、１００単位／ｍｌのペニシリンおよび１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンを補充した、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２中で培養した。レトロウイルスによりトランスフェクトしたＵ８７ＭＧ．ｄｅ２－７細胞についての選択を維持するために、４００μｇ／ｍｌのＧ４１８を培地に含ませた。

【０４１４】

（ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）エフェクター細胞の調製）

ＰＢＭＣを、健康なボランティアドナーの血液から単離した。ヘパリン処理した全血を、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（ＩＣＮ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　Ｉｎｃ．，Ｏｈｉｏ，ＵＳＡ）における密度遠心分離により分画した。ＰＢＭＣ画分を収集し、そして５％熱失活ＦＣＳを含む、１００Ｕ／ｍｌのペニシリンおよび１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン、２ｍＭ　Ｌ－グルタミンを補充した、ＲＰＭＩ$^{+}$１６４０で３回洗浄した。

【０４１５】

（標的細胞の調製）

ＣＤＣアッセイおよびＡＤＣＣアッセイを、以前に開示されている方法（Ｎｅｌｓｏｎ，Ｄ．Ｌ．ら（１９９１）：Ｊ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇｎａｎ，Ａ．Ｍ．Ｋｒｕｉｓｂｅｅｋ，Ｄ．Ｄ．Ｍａｒｇｕｌｉｅｓ，Ｅ．Ｍ．ＳｈｅｖａｃｈおよびＷ．Ｓｔｒｏｂｅｒ（編）、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，７．２７．１頁、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｇｒｅｅｎｅ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｗｉｌｅｙ　Ｉｎｔｅｒｓ

ｃｉｅｎｃｅ）の改変により行った。簡単には、５×１０^{6}個の標的Ｕ８７ＭＧ．ｄｅ２－７およびＡ４３１細胞を、１×１０^{6}個の細胞あたり５０μＣｉ^{51}Ｃｒ（Ｇｅｎｅｗｏｒｋｓ，Ａｄｅｌａｉｄｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）で標識し、そして３７℃にて２時間インキュベートした。次いで、細胞をＰＢＳ（０．０５Ｍ、ｐＨ７．４）で３回洗浄し、そして培養培地を用いて４回目の洗浄を行った。標識細胞のアリコート（１×１０^{4}細胞／５０μｌ）を、９６ウェルマイクロタイタープレート（ＮＵＮＣ，Ｒｏｓｋｉｌｄｅ，Ｄｅｎｍａｒｋ）の各ウェルに添加した。

【０４１６】

（ＣＤＣアッセイ）

５０μｌの標識した標的細胞に、５０μｌのｃｈ８０６またはアイソタイプコントロール抗体ｃＧ２５０を、０．００３１５～１０μｇ／ｍｌの濃度範囲にわたって三連で添加し、そして氷上で５分間インキュベートした。次いで、５μｌの新たに調製した健康なドナーの補体（血清）を添加して、１：３の最終希釈の血清を得た。マイクロタイタープレートを３７℃にて４時間インキュベートした。遠心分離の後、上清中の放出された^{51}Ｃｒを、計数した（Ｃｏｂｒａ　ＩＩ　ａｕｔｏｍａｔｅｄ　Ｇａｍｍａ　Ｃｏｕｎｔｅｒ，Ｃａｎｂｅｒｒａ　Ｐａｃｋａｒｄ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）。特異的溶解のパーセンテージを、実験的^{51}Ｃｒ放出、総放出（５０μｌの標的細胞＋１００μｌの１０％　Ｔｗｅｅｎ　２０）および自発的（５０μｌの標的細胞＋１００μｌの培地）放出から計算した。

【０４１７】

（ＡＤＣＣアッセイ）

健康なドナーＰＢＭＣによりもたらされるＣｈ８０６－媒介ＡＤＣＣを、２つの４時間の^{51}Ｃｒ放出アッセイにより測定した。第１のアッセイにおいて、標識した標的細胞を、エフェクター細胞と共に、９６ウェル「Ｕ」底マイクロプレート（ＮＵＮＣ，Ｒｏｓｋｉｌｄｅ，Ｄｅｎｍａｒｋ）中に、５０：１のエフェクター／標的（Ｅ：Ｔ）細胞比でプレートした。ＡＤＣＣ活性測定について、０．００３１５－１０μｇ／ｍｌ（最終濃度）の試験抗体およびコントロール抗体を、各ウェルに三連で添加した。第２のＡＤＣＣアッセイにおいて、ｃｈ８０６のＡＤＣＣ活性を、エフェクター：標的細胞の割合の範囲にわたって、一定の１μｇ／ｍｌの試験抗体濃度で、親マウスｍＡｂ８０６と比較した。両方のアッセイにおいて、マイクロタイタープレートを、３７℃にて４時間インキュベートし、次いで、５０μｌの上清を各ウェルから収集し、そして放出された^{51}Ｃｒを、γ線計数（Ｃｏｂｒａ　ＩＩ　ａｕｔｏｍａｔｅｄ　Ｇａｍｍａ　Ｃｏｕｎｔｅｒ，Ｃａｎｂｅｒｒａ　Ｐａｃｋａｒｄ，Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ，Ａｕｓｔｒａｌｉａ）により決定した。このアッセイに含まれるコントロールは、自発的な放出（培地単独）および総放出（１０％Ｔｗｅｅｎ２０／ＰＢＳ）について収集される。同じサブクラスの抗体を有する適切なコントロールを、並行して実行した。

【０４１８】

細胞溶解（細胞傷害性）パーセントを、以下の式に従って計算した：

細胞傷害性パーセント＝（サンプル計数－自発的放出）／（総放出－自発的放出）×１００

細胞傷害性パーセント（％）を、抗体の濃度（μｇ／ｍｌ）に対してプロットした。

【０４１９】

（結果）

ＣＤＣ分析の結果を、図３７に表す。最小のＣＤＣ活性を、１０μｇ／ｍｌまでのｃｈ８０６の存在下で観察し、これは、アイソタイプコントロールｃＧ２５０で観察されたＣＤＣに匹敵するＣＤＣを有する。

【０４２０】

５０：１のＥ：Ｔ比での、標的Ｕ８７ＭＧ．ｄｅ２－７細胞およびＡ４３１細胞に対するｃｈ８０６媒介ＡＤＣＣを、図３８に示す。有効なｃｈ８０６特異的細胞傷害性を、標的Ｕ８７ＭＧ．ｄｅ２－７細胞に対して示したが、最小のＡＤＣＣが、Ａ４３１細胞に対

するｃｈ８０６により媒介された。達成された細胞傷害性のレベルは、２つの細胞集団におけるｃｈ８０６結合部位の数を反映する。標的Ｕ８７ＭＧ．ｄｅ２－７細胞は、ｃｈ８０６により特異的に認識される約１×１０^{6}個のｄｅ２－７ＥＧＦＲを発現し、一方、Ａ４３１細胞で発現した１×１０^{6}個の野生型ＥＧＦＲ分子の1つのサブセットのみが、ｃｈ８０６により認識される（上記実施例を参照のこと）。

【０４２１】

さらなるＡＤＣＣ分析を、標的Ｕ８７ＭＧ．ｄｅ２－７細胞に対して１μｇ／ｍｌのｃｈ８０６により媒介されるＡＤＣＣを、１μｇ／ｍｌの親マウスｍＡｂ８０６によりもたらされるＡＤＣＣと比較するために行った。結果を図３９に示す。ｍＡｂ８０６のキメラ化は、２５：１および５０：１のＥ：Ｔ比でもたらされる３０％の細胞傷害性を超える、親マウスｍＡｂにより達成されるＡＤＣＣの著しい改変をもたらす。

【０４２２】

親マウスｍＡｂ８０６免疫エフェクター機能の欠如は、キメラ化において著しく改変された。ｃｈ８０６は、良好にＡＤＣＣを媒介するが、最小のＣＤＣ活性である。

【０４２３】

（実施例２２）

（キメラ抗体ｃｈ８０６に対する抗イディオタイプ抗体の作製）

ｍＡｂ８０６またはｃｈ８０６の臨床的評価を補助するために、実験室アッセイは、抗体の血清薬物動態学およびにマウス－ヒトキメラ抗体に応答する任意の免疫の量をモニターすることを必要とする。マウスモノクローナル抗イディオタイプ抗体（抗ｉｄ）を作製し、そして患者血清サンプル中のｃｈ８０６を測定するためのＥＬＩＳＡ試薬としての適合性について、およびヒト抗キメラ抗体免疫応答分析における陽性コントロールとしての使用のために特徴付けした。これらの抗イディオタイプ抗体はまた、患者において自然な抗ＥＧＦＲ抗体応答を生じさせる、治療用ワクチンまたは予防用ワクチンとして有用であり得る。

【０４２４】

抗イディオタイプ抗体を作製するための方法は、当該分野で周知である（Ｂｈａｔｔａｃｈａｒｙａ－Ｃｈａｔｔｅｒｊｅｅ，Ｃｈａｔｔｅｒｊｅｅら、２００１、Ｕｅｍｕｒａら、１９９４、Ｓｔｅｆｆｅｎｓ，Ｂｏｅｒｍａｎら、１９９７、ＳａｆａおよびＦｏｏｎ　２００１、ＢｒｏｗｎおよびＬｉｎｇ　１９８８）。

【０４２５】

マウスモノクローナル抗イディオタイプ抗体（抗ｉｄ）を、簡潔に述べると、以下のように作製した。ｃｈ８０６で免疫したマウス由来の脾臓を、ＳＰ２／０－ＡＧ１４プラスマ細胞腫細胞と融合し、そして抗体産生ハイブリドーマを、ｃｈ８０６に対する特異的な結合および抗原に対する競合結合についてのＥＬＩＳＡを通じて選択した（図４０）。２５個のハイブリドーマを、最初に選択し、そして、ｃｈ８０６、ｍＡｂ８０６に対する特異的結合を実証し、そしてｃｈ８０６抗原結合活性またはｍＡｂ８０６抗原結合活性を中和し得た、４つをＬＭＨ－１１分泌抗体、ＬＭＨ－１２分泌抗体、ＬＭＨ－１３分泌抗体およびＬＭＨ－１４分泌抗体と命名した（図４１）。ｃｈ８０６／ｍＡｂ８０６イディオトープまたはＣＤＲ領域の認識を、精製したポリクローナルヒトＩｇＧとの交差反応を欠くことにより実証した。

【０４２６】

血清サンプル中のｃｈ８０６の決定を補助するための容易に利用な可能な組換え抗原ｄｅ２－７　ＥＧＦＲの非存在下で、８０６の可変領域に同時に結合する新規の抗イディオタイプｃｈ８０６抗体の能力を、臨床サンプルにおいてｃｈ８０６を測定するための、高感度の特異的なＥＬＩＳＡの開発において、開発した（図４２）。捕捉のためにＬＭＨ－１２および検出のためにビオチン化－ＬＭＨ－１２を用いて、有効なＥＬＩＳＡは、３ｎｇ／ｍｌの検出限界を用いて、血清中のｃｈ８０６（２μｇ／ｍｌ～１．６ｎｇ／ｍｌ）を測定するための高度に再現性のある結合曲線を実証した。（ｎ＝１２；１～１００ｎｇ／ｍｌ、変動係数＜２５％；１００ｎｇ／ｍｌ～５μｇ／ｍｌ、変動係数＜１５％）。バ

ックグラウンド結合がないことは、試験された３つの健康な血清で明白であり、そして無視出来る結合が、アイソタイプコントロールｈｕ３Ｓ１９３で観察された。ハイブリドーマは、高いレベルの抗体ＬＭＨ－１２を産生し、そして大スケールの産生を、ｃｈ８０６の測定、および臨床試験サンプルにおける任意の免疫応答の定量化を可能にするために計画する（ＢｒｏｗｎおよびＬｉｎｇ１９８８）。

【０４２７】

（結果）

（マウス免疫およびハイブリドーマクローン選択）

免疫前の血清サンプルおよび免疫後の血清サンプルの免疫反応性は、高力価のマウス抗ｃｈ８０６および抗ｈｕＩｇＧ　ｍＡｂの開発を示した。ｃｈ８０６に結合するがｈｕＩｇＧに結合しない抗体を産生する２５個のハイブリドーマを最初に選択した。これらのハイブリドーマのいくつかの結合特性を、図４２Ａおよび４２Ｂに示す。これらの抗ｃｈ８０６ハイブリドーマのうち、高いアフィニティー結合を有する４つ（クローン３Ｅ３、５Ｂ８、９Ｄ６および４Ｄ８）を、引き続いて、限界希釈による単一の細胞からのクローン増殖を行い、そして、それぞれ、Ｌｕｄｗｉｇ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｍｅｌｂｏｕｒｎｅ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ（ＬＭＨ）－１１、－１２、－１３、および－１４と命名した（図４２）。

【０４２８】

（選択した抗イディオタイプ抗体の結合活性およびブロッキング活性）

２つのｃｈ８０６抗体に同時に結合する抗ｃｈ８０６抗体の能力は、血清ｃｈ８０６レベルを決定するためのＥＬＩＳＡにおける試薬としてのそれらの用途について望ましい特徴である。クローンのハイブリドーマである、ＬＭＨ－１１、ＬＭＨ－１２、ＬＭＨ－１３、およびＬＭＨ－１４は、同時結合を実証した（データ示さず）。

【０４２９】

クローン増殖後、ハイブリドーマ培養上清を、ｓＥＧＦＲ６２１とのｃｈ８０６またはｍＡｂ８０６の抗原結合活性を中和する能力について、ＥＬＩＳＡにより試験した。結果は、ｓＥＧＦＲでコートされたプレートに結合するｃｈ８０６およびマウスｍＡｂ８０６の両方の溶液中でのブロッキングを有する、抗イディオタイプｍＡｂであるＬＭＨ－１１、ＬＭＨ－１２、ＬＭＨ－１３、およびＬＭＨ－１４のアンタゴニスト活性を実証した（ＬＭＨ－１１、ＬＭＨ－１２、ＬＭＨ－１３について図４１）。

【０４３０】

ローラーボトル中での大スケール培養の後、確立したクローンハイブリドーマであるＬＭＨ－１１、ＬＭＨ－１２、ＬＭＨ－１３、およびＬＭＨ－１４の結合特異性は、ＥＬＩＳＡにより変化した。ＬＭＨ－１１～ＬＭＨ－１４の抗体を、マウスモノクローナル抗体アイソタイプ決定キットにより、アイソタイプＩｇＧ１κとして同定した。

【０４３１】

（臨床的血清サンプル中のｃｈ８０６：薬物動態学的ＥＬＩＳＡアッセイの開発）

血清サンプル中のｃｈ８０６の決定を補助するために、８０６の可変領域に同時に結合する抗イディオタイプｃｈ８０６抗体の能力を、臨床用サンプル中のｃｈ８０６についての高感度かつ特異的ＥＬＩＳＡアッセイも開発において利用した。３つの精製したクローンＬＨＭ－１１、ＬＨＭ－１２およびＬＨＭ－１３（それぞれ、図４９、Ｂ、およびＣ）を、血清中のｃｈ８０６を捕捉し、そして結合したｃｈ８０６を検出する能力について比較した。捕捉についてＬＭＨ－１２（１０μｇ／ｍｌ）および検出についてビオチン化ＬＭＨ－１２を用いて示された結果は、無視出来るバックグラウンド結合を有する、血清中のｃｈ８０６に対する最も高い感受性（３ｎｇ／ｍｌ）を生じた。

【０４３２】

捕捉および検出に、それぞれ、１μｇ／ｍｌの抗イディオタイプＬＭＨ－１２および１μｇ／ｍｌのビオチン化ＬＭＨ－１２を用いる、最適な薬物動態学的ＥＬＩＳＡ条件を確立することによって、方法の確認を行った。３つの別々のＥＬＩＳＡを、４連で行って、３人の健康なドナー由来のドナー血清中、またはアイソタイプコントロールｈｕ３Ｓ１９

３を有する１％ＢＳＡ／培地のｃｈ８０６を測定した。確認の結果を、図４３に表し、そしてこの結果は、３ｎｇ／ｍｌの検出限界を有する血清においてｃｈ８０６（２μｇ／ｍｌ～１．６ｎｇ／ｍｌ）を測定するための高度に再現性のある結合曲線を実証する。（ｎ＝１２；１～１００ｎｇ／ｍｌ、変動係数＜２５％；１００ｎｇ／ｍｌ～５μｇ／ｍｌ、変動係数＜１５％）。バックグラウンド結合がないことは、試験された３つの血清で明白であり、そして無視出来る結合が、アイソタイプコントロールｈｕ３Ｓ１９３で観察された。

【０４３３】

（参考文献）

これらは、本当は、実施例１７の終りに組み込まれるべきであり、そして全ての実施例の終りに加えられるべきである。

【０４３４】

【表１３】

Brown, G. and N. Ling (1988). Murine Monoclonal Antibodies. Antibodies, Volume I. A Practical Approach. D. Catty. Oxford, England, IRL Press: 81-104.

Bhattacharya-Chatterjee, M., S. K. Chatterjee, et al. (2001). "The anti-idiotype vaccines for immunotherapy." Curr Opin Mol Ther 3(1): 63-9.

Domagala, T., N. Konstantopoulos, et al. (2000). "Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor." Growth Factors 18(1): 11-29

Safa, M. M. and K. A. Foon (2001). "Adjuvant immunotherapy for melanoma and colorectal cancers." Semin Oncol 28(1): 68-92.

Uemura, H., E. Okajima, et al. (1994). "Internal image anti-idiotype antibodies related to renal-cell carcinoma- associated antigen G250." Int J Cancer 56(4): 609-14.

（実施例２３　糖質構造および抗体認識の評価）

実験を、ｍＡｂ８０６抗体による、ＥＧＦＲ（増幅されたＥＧＦＲおよびｄｅ２－７ＥＧＦＲの両方）の結合および認識における糖質構造の役割をさらに評価するために行った。

【０４３５】

糖質構造が、ｍＡｂ８０６エピトープに直接関与するか否かを決定するために、ＣＨＯ細胞において発現される組換えｓＥＧＦＲ発現を、ＰＮＧａｓｅＦを用いて処理して、Ｎ連結グリコシル化を排除した。処置後、タンパク質を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで泳動し、膜に転写し、そしてｍＡｂ８０６を用いて免疫ブロットした（図４４）。予想されるように、脱グリコシル化ｓＥＧＦＲは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上でより速く泳動し、このことは、糖質が首尾よく除去されたことを示した。ｍＡｂ８０６抗体は、脱グリコシル化物質を明白に結合し、このことは、抗体エピトープは本質的にペプチドであり、そしてグリコシル化エピトープではないことを実証した。

【０４３６】

３５Ｓで代謝的に標識した細胞株から調製した溶解物を、ＥＧＦＲに対して指向された異なる抗体を用いて免疫沈降させた（図４５）。予想されるように、５２８抗体は、Ｕ８７ＭＧ．Δ２～７細胞由来の３つのバンドを免疫沈降させた（上のバンドは、野生型（ｗｔ）ＥＧＦＲに対応し、２つの下のバンドは、ｄｅ２－７ＥＧＦＲに対応する）。これらの２つのｄｅ２－７ＥＧＦＲバンドは以前に報告されており、そして異なるグリコシル化を表すと考えられる（Ｃｈｕら（１９９７）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．Ｊｕｎ　１５；３２４（Ｐｔ　３）：８８５－８６１）。対照的に、ｍＡｂ８０６は、２つのｄｅ２－７ＥＧＦＲバンドのみを免疫沈降させ、ｗｔレセプターは、過剰な曝露の後でさえ完全に存在しなかった（データ示さず）。興味深いことに、ｍＡｂ８０６は、より低いｄｅ２－７　ＥＧＦＲバンドとの増加した相対的反応性を示したが、５２８抗体と比較した場合、上のバン

ドとの減少した反応性を示した。ＳＣ－０３抗体（ＥＧＦＲのＣ末端ドメインに対して指向された市販のウサギポリクローナル抗体）は、５２８抗体で見られたように３つのＥＧＦＲバンドを免疫沈降させたが、この抗体により免疫沈降されたレセプターの総量は、極めて少なかった。ｍＡｂ８０６のコントロールとして無関係のＩｇＧ２ｂ抗体を用いる場合、バンドは観察されなかった。

【０４３７】

５２８抗体は、ｗｔレセプターに対応するＵ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞から単一のバンドを免疫沈降させた（図４５）。ｍＡｂ８０６はまた、これらの細胞から単一のバンドを免疫沈降させたが、このＥＧＦＲバンドは、５２８反応性レセプターよりも明らかにより速く移動した。このＳＣ－０３抗体は、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞由来の両方のＥＧＦＲ反応性バンドを免疫沈降させ、このことにより、さらに、ｍＡｂ８０６および５２８は、これらの細胞からの全細胞溶解物中のＥＧＦＲの異なる形態を認識することを確認した。

【０４３８】

Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞で確認されたように、５２８抗体は、Ａ４３１細胞から単一のＥＧＦＲバンドを免疫沈降させた（図４５）。この５２８反応性ＥＧＦＲバンドは、これらの低パーセントゲル（６％）において非常にブロードであり、そして、このことは、恐らく、レセプターグリコシル化の多様性を反映している。単一のＥＧＦＲバンドはまた、ｍＡｂ８０６での免疫沈降の後にも見られた。このＥＧＦＲバンドは、５２８のブロードな反応性バンドの全体よりも、かなり速くは移動しなかったが、これは、再現性のある様式でブロードな５２８バンドの先端に位置付けられた。Ｕ８７ＭＧ．Δ２－７細胞溶解物とは異なり、Ａ４３１溶解物からｍＡｂ８０６により免疫沈降されるＥＧＦＲの総量は、５２８抗体を用いるよりもかなり少なく、結果は、ｍＡｂ８０６のみがこれらの細胞の表面上のＥＧＦＲの部分を認識することを示す、本発明者らのスキャッチャードデータと一致した（上記実施例４を参照のこと）。ＳＣ－０３での免疫沈降は、５２８抗体の場合の単一のブロードなＥＧＦＲバンドを生じた。類似の結果を、ＨＮ５細胞を用いて得た（データ示さず）。まとめると、このデータは、ｍＡｂ８０６は、ＥＧＦＲのより速い移動種と優先的に反応し、これは、レセプターの差次的なグリコシル化形態を表すことを示す。

【０４３９】

ｍＡｂ８０６反応性をプロセスするどの段階のレセプターが、現れたかを決定するために、パルス／チェイス実験を実施した。Ａ４３１およびＵ８７ＭＧ．Δ２－７細胞を、３５Ｓメチオニン／システインと５分間パルスし、次いで、ｍＡｂ８０６または５２８を用いる免疫沈降の前の種々の時間で３７℃にてインキュベートした（図４６）。５２８抗体を用いるＡ４３１細胞における免疫沈降パターンは、ＥＧＦＲに特異的な立体配座依存抗体に特有であった。少量のレセプターを、各時点で増加する標識ＥＧＦＲの量を用いて、０分（すなわち、５分のパルスの後）で免疫沈降させた。時間と共にレセプターの分子量の同時増加もまた存在した。対照的に、ｍＡｂ８０６反応性ＥＧＦＲ物質は、０分に高レベルで存在し、２０分にピークに達し、次いで、さらに各時点で減少した。従って、ｍＡｂ８０６は、プロセスの初期段階で見出されるＥＧＦＲの形態を優先的に認識することが明らかである。

【０４４０】

パルスし標識したＵ８７ＭＧ．Δ２－７細胞において観察される抗体反応性は、さらに複雑である。０分での５２８抗体を用いる免疫沈降は、少量のより低いｄｅ２－７ＥＧＦＲバンドを標識したことを示した（図４６）。時間と共に増加した５２８反応性ｄｅ２－７ＥＧＦＲの下のバンドの量は、６０分でピークに達し、そして２時間および４時間でゆっくりと下降した。有意な量のｄｅ２－７ＥＧＦＲの標識したより上のバンドは、６０分まで検出されなかったが、この後、このレベルは、時間経過の終りまで増加し続けた。このことは、上のｄｅ２－７ＥＧＦＲが、レセプターのより成熟した形態であることを明らかに示す。ｍＡｂ８０６の反応性はまた、経時的研究の間で変化したが、ｍＡｂ８０６は

、ｄｅ２－７ＥＧＦＲの下のバンドを優先的に沈降させた。実際に、標識の４時間後まで、有意なレベルのｍＡｂ８０６の上のバンドは見られなかった。

【０４４１】

上の実験は、ｍａｂ８０６が、未成熟のグリコシル化形態のｄｅ２－７およびｗｔＥＧＦＲと優先的に反応することを示唆する。この可能性は、^{35}Ｓメチオニン／システインで一晩標識した異なる細胞株からＥＧＦＲを免疫沈降させ、次いで、得られた沈殿物を、エンドグリコシダーゼＨ（Ｅｎｄｏ　Ｈ）消化に供することにより試験した。この酵素は、タンパク質から、高マンノース型の糖質（すなわち、未成熟のグリコシル化）を優先的に除去する一方で、複雑な糖質（すなわち、グリコシル化）をインタクトなまま残す。５２８、ｍＡｂ８０６およびＳＣ－０３を用いる、標識されたＵ８７ＭＧ．Δ２－７細胞溶解物の免疫沈降およびＥｎｄｏ　Ｈでの消化は、類似の結果を与えた（図４７）。予想されるように、下のｄｅ２－７ＥＧＦＲバンドは、Ｅｎｄｏ　Ｈ消化に非常に感受性であり、Ｅｎｄｏ　Ｈ消化の後のＳＤＳ－ＰＡＧＥにおいてより速く移動し、このバンドが、ｄｅ２－７ＥＧＦＲの高マンノース形態を表すことを実証した。この上のｄｅ２－７ＥＧＦＲバンド上の糖質は、Ｅｎｄｏ　Ｈ消化に対して本質的に耐性であり、このことは、Ｅｎｄｏ　Ｈ消化の後の移動における非常にわずかな差異のみを示し、大部分の糖質構造が、複雑な型であることを示した。酵素消化の後の上のバンドの分子量の小さいが再現可能な減少は、上のｄｅ２－７ＥＧＦＲバンドが、主に複雑な型をとるが、これはいくつかの高マンノース構造を有することを示唆する。興味深いことに、これらの細胞はまた、５２８免疫沈降の後に明らかに眼に見える、低い量の内因性のｗｔ　ＥＧＦＲを発現する。Ｅｎｄｏ　Ｈ消化の後のｗｔレセプターの分子量における小さいが注目すべき減少もまた存在し、このことは、高マンノース構造もまた含むことを示した。

【０４４２】

Ｅｎｄｏ　Ｈ消化に対する免疫沈降したｗｔ　ＥＧＦＲの感受性は、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞およびＡ４３１細胞の両方に類似した（図４７）。５２８抗体により沈殿した材料の大部分は、Ｅｎｄｏ　Ｈ酵素に対して耐性であったが、少量の材料は、高マンノース形態であった。再度、Ｅｎｄｏ　Ｈ消化の後にｗｔ　ＥＧＦＲの分子量の小さな減少が存在し、このことは、いくつかの高マンノース構造を含むことを示唆した。ＳＣ－０３抗体を用いた結果は、５２８抗体に類似していた。対照的にｍＡｂ８０６により沈降したＥＧＦＲの大部分は、Ｕ８７ＭＧ．ｗｔＥＧＦＲ細胞およびＡ４３１細胞の両方においてＥｎｄｏ　Ｈに感受性であり、このことにより、ｍＡｂ８０６が、ＥＧＦＲの高マンノース形態を優先的に認識することを確認した。類似の結果を、ＨＮ－５細胞を用いて得た。ここで、ｍＡｂ８０６により沈殿した物質の大部分は、Ｅｎｄｏ　Ｈ消化に感受性であったが、ｍＡｂ５２８およびＳＣ－０３により沈降した物質の大部分は、Ｅｎｄｏ　Ｈ消化に対して耐性であった（データ示さず）。

【０４４３】

Ａ４３１細胞株の細胞表面ヨウ素化を、^{125}Ｉを用いて行い、次いで、８０６抗体を用いて免疫沈降させた。表面ヨウ素化のためのプロトコルは以下の通りである：細胞溶解、免疫沈降、Ｅｎｄｏ　Ｈ消化、ＳＤＳ　ＰＡＧＥおよびオートラジオグラフィーは、本明細書中で上に記載される通りである。標識のために、細胞を、１０％ＦＣＳを含む培地中で増殖させ、ＥＤＴＡで剥離させ、ＰＢＳで２回洗浄し、次いで、４００μｌのＰＢＳに再懸濁した（約２～３×１０^{6}細胞）。これに、１５μｌの^{125}Ｉ（１００ｍＣｉ／ｍｌストック）、１００μｌのウシラクトペルオキシダーゼ（１ｍｇ／ｍｌ）ストック、１０μｌ　H_2O_2（０．１％ストック）を添加し、そしてこれを、５分間インキュベートした。次いで、さらに１０μｌのH_2O_2を、添加し、そしてインキュベーションをさらに３分間続けた。次いで、ＰＢＳで細胞を再度３回洗浄し、そして１％Ｔｒｉｔｏｎ中に溶解した。ラクトペルオキシダーゼを用いるＡ４３１細胞株の細胞表面ヨウ素化、次いで８０６抗体を用いる免疫沈降は、上記の総細胞溶解物に類似して、Ａ４３１細胞の細胞表面上に結合した８０６により認識されるＥＧＦＲの主要な形態は、Ｅｎｄｏ　Ｈ消化に対して感受性であったことを示した（図４８）。このことにより、Ａ４３１細胞の細胞表

面上の８０６により結合されるＥＧＦＲの形態は、Ｅｎｄｏ　Ｈ感受性形態であり、これにより高マンノース型であることを確認した。

【０４４４】

本発明は、本発明の精神または本質的特徴から逸脱することなく、他の形態で具現化され得るか、または他の方法で実行され得る。従って、本開示は、全ての局面を例示するためのものであるとみなされるべきであり、そして添付の特許請求の範囲により示される本発明の範囲を制限せず、そして等価な意味および範囲の中で起こる全ての変更は、本発明に包含されることが意図される。

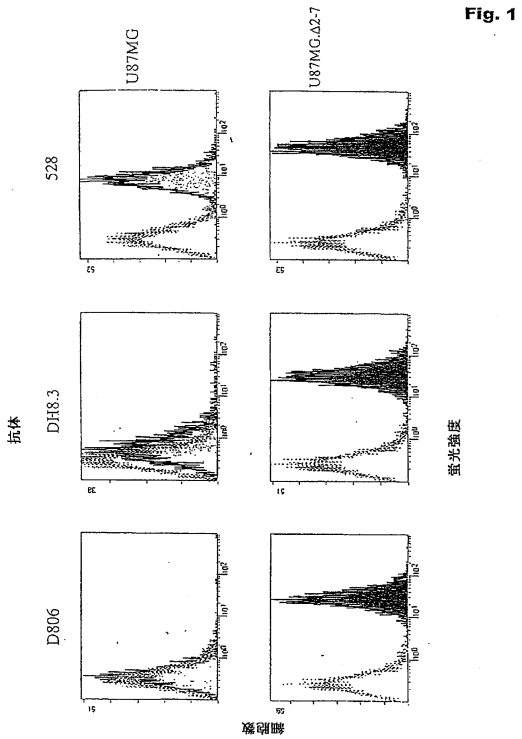
【０４４５】

種々の参考文献を、本明細書を全体を通じて引用し、これらの各々は、その全体が本明細書中で参考として援用される。

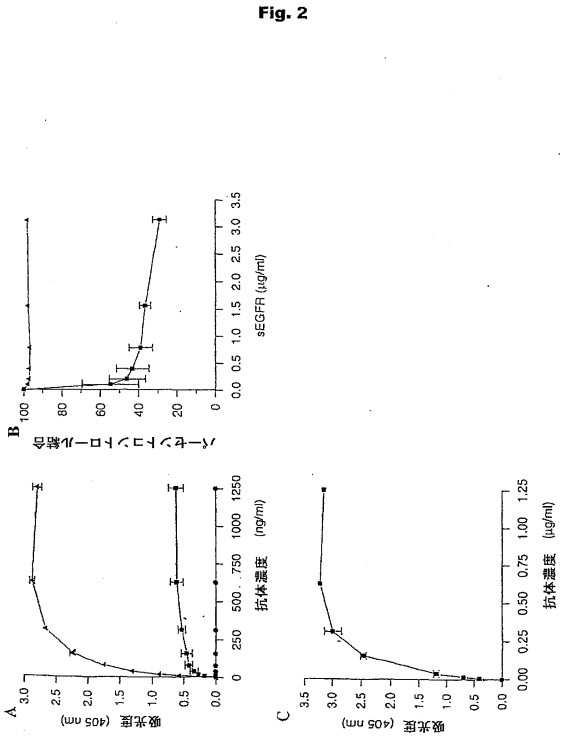
【０４４６】

他の目的および利点は、以下の例示的な図面、および添付の特許請求の範囲に関する引き続く詳細な説明を見れば、当業者に明らかとなる。

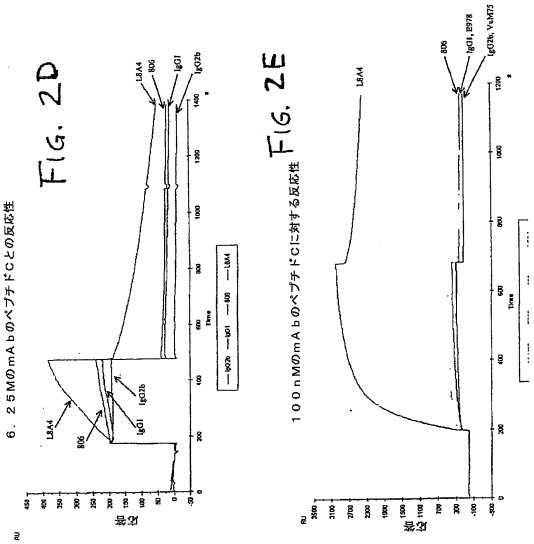
【図１】



【図２－１】

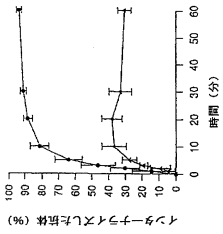


【図２－２】



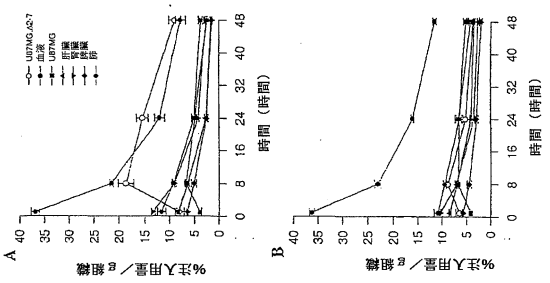
【図３】

Fig. 3



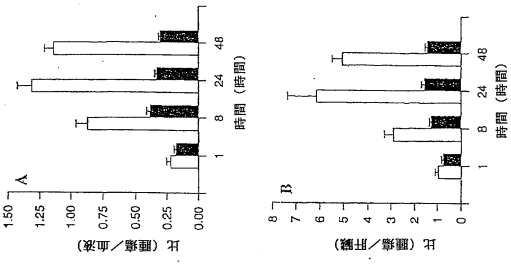
【図４】

Fig. 4



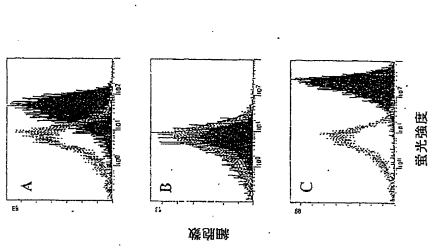
【図５】

Fig. 5



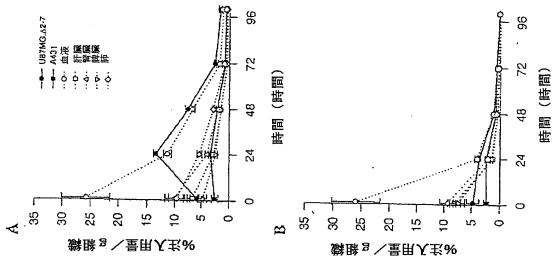
【図６】

Fig. 6



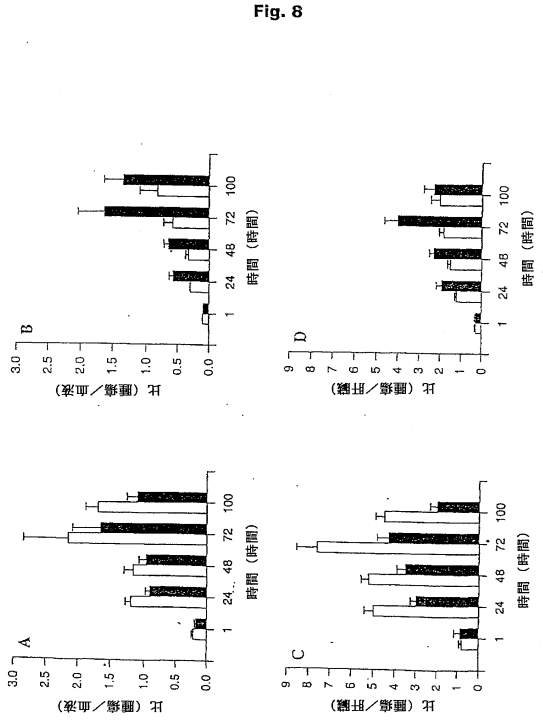
【図７】

Fig. 7



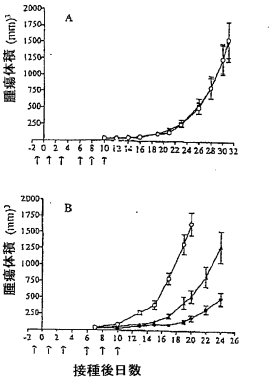
【図８】

Fig. 8



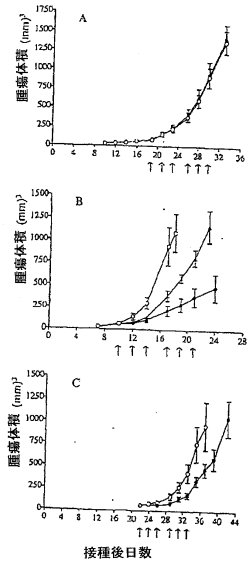
【図９】

Fig. 9



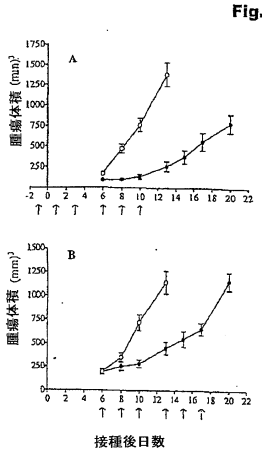
【図１０】

Fig. 10



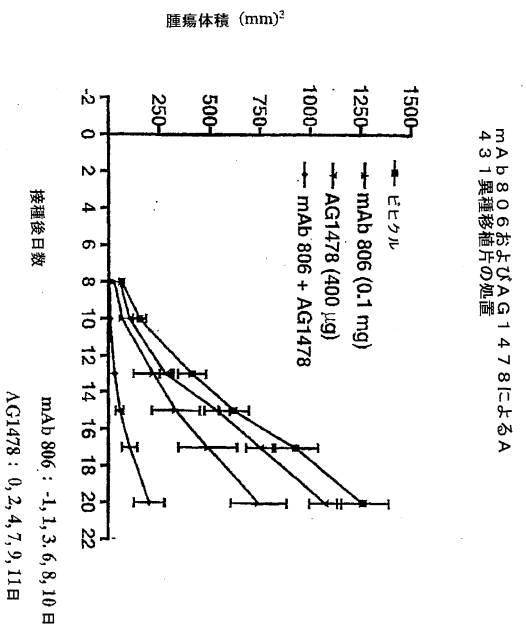
【図１１】

Fig. 11

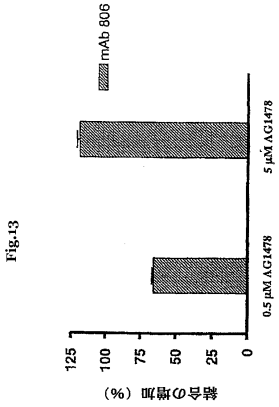


【図１２】

Fig. 12



【図１３】



【図１４】

Fig. 14

８０６ＶＨおよびシグナルペプチドのＤＮＡおよびタンパク質配列

Ａ．ＤＮＡ配列

ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTCACAGCCTTTCCTGGTGTCCTGTCT
GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCT
GTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTTTGCCTGGA
ACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGGATGGGCTACATAAG
TTATAGTGGTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCA
CTCGAGACACATCCAAGAACCAATTCTTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTATT
GAGGACACAGCCACATATTACTGTGTAACGGCGGGACGCGGGTTTCCTTATT
GGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

青色で強調した部分は、シグナルペプチドである。

残りの配列は、８０６ＶＨ領域である。

Ｂ．タンパク質配列

VH

MRVLILLWLFTAFPGVLSDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTC
TVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYN
PSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRG
FPYWGQGTLVTVSA

【図１５】

Fig. 15

８０６ＶＬおよびシグナルペプチドのＤＮＡおよびタンパク質

Ａ．ＤＮＡ配列

ATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTTGCATTCTTGTTGCTTTGGTTTCCAGGTGCA
AGATGTGACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCTGTATCTCTGGG
AGACACAGTCAGCATCACTTGCCATTCAAGTCAGGACATTAACAGTAATATA
GGGTGGTTGCAGCAGAGACCAGGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATG
GAACCAACTTGGACGATGAAGTTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGG
AGCCGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATCTGAAGATTTTGCAGACT
ATTACTGTGTACAGTATGCTCAGTTTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAG
CTGGAAATCAAACGT

強調した部分は、シグナルペプチドである。

残りの配列は、８０６ＶＬ領域である。

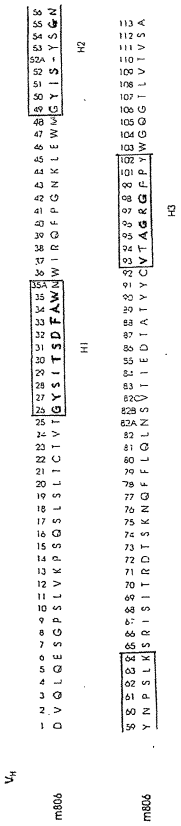
Ｂ．タンパク質配列

VL

MVSTAQFLAFLLLWFPGARCDILMTQSPSSMSVSLGDTVS
ITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDEVPSR
FSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYCVQYAQFPWTFGGG
TKLEIKR

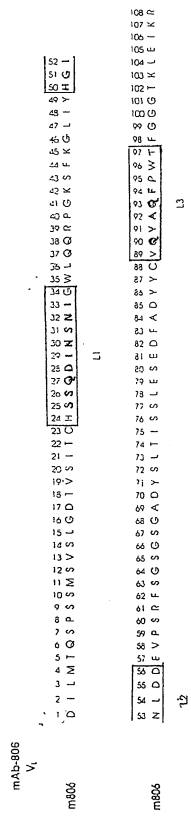
【図１６】

Fig. 16

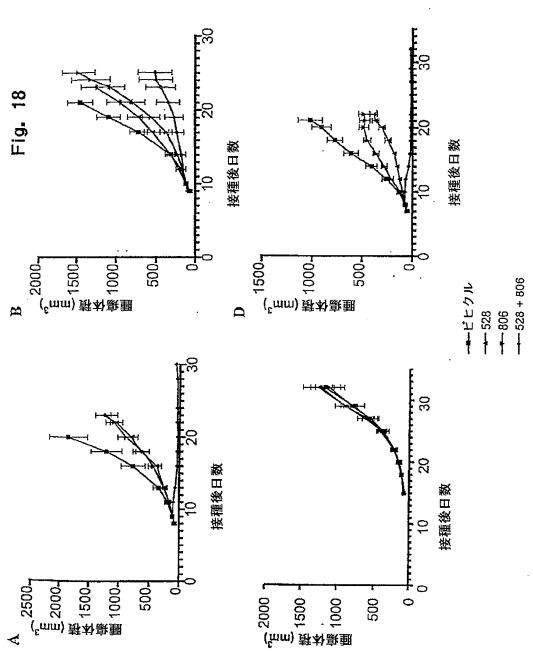


【図１７】

Fig. 17

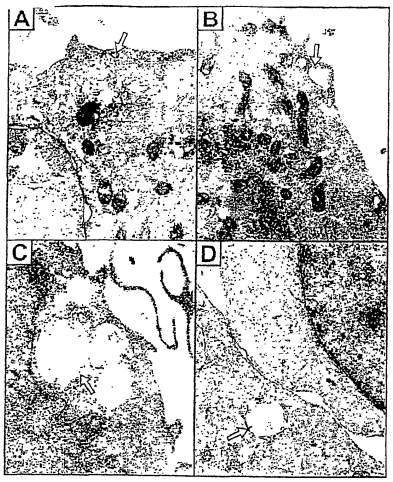


【図１８】



【図１９】

Fig. 19

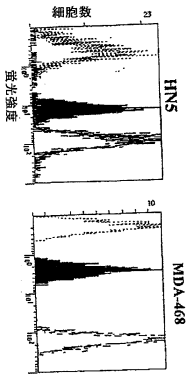


【図２０】

Fig. 20

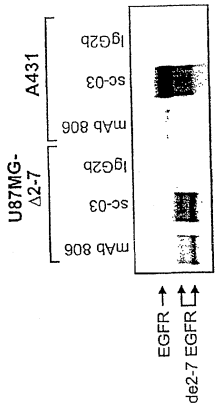
【図２１】

Fig. 21



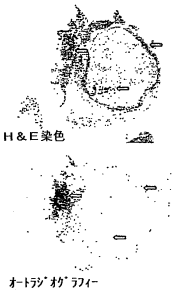
【図２２】

Fig. 22



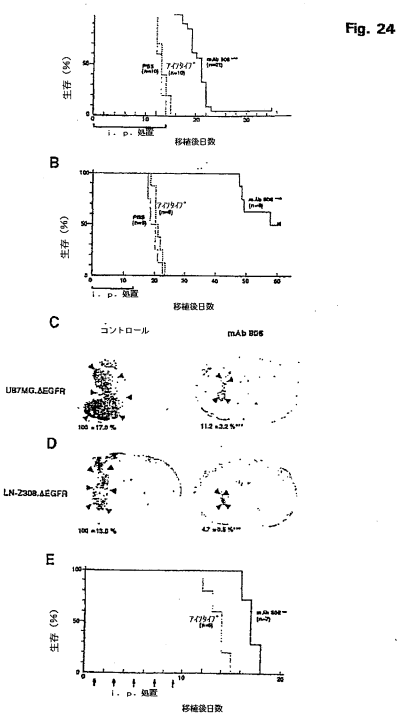
【図２３】

Fig. 23



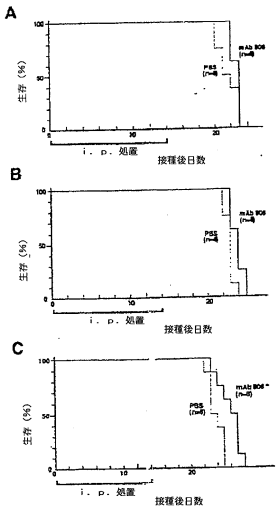
【図２４】

Fig. 24



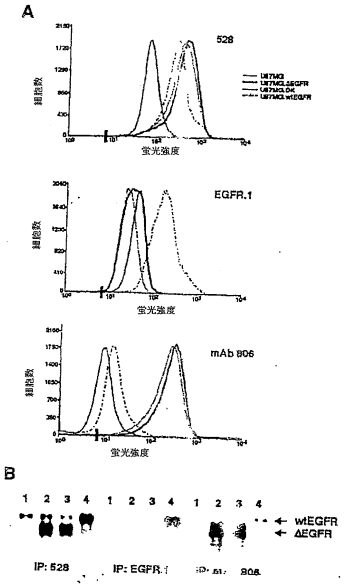
【図２５】

Fig. 25



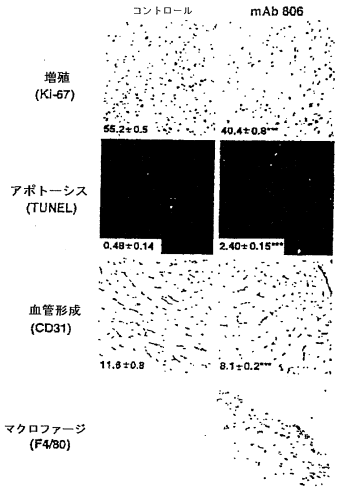
【図２６】

Fig. 26



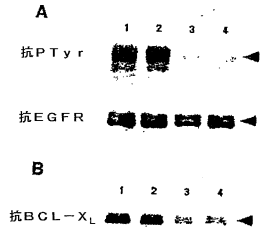
【図２７】

Fig. 27



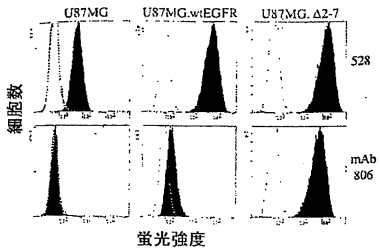
【図２８】

FIG28

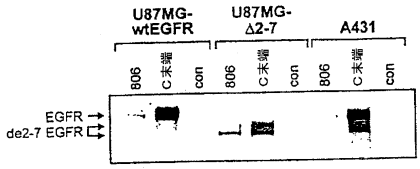


【図２９】

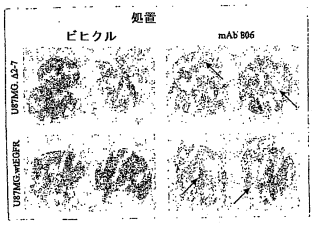
Fig.29



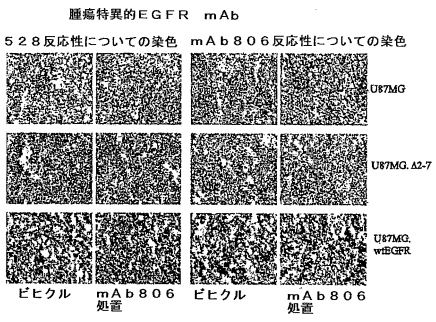
【図３０】



【図３１】



【図３２】



【図３３】

Fig. 33

【図３４】

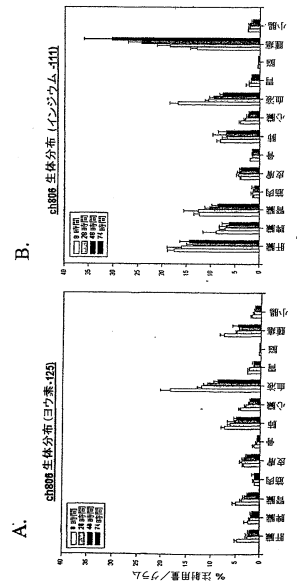


Fig. 34

【図３５】

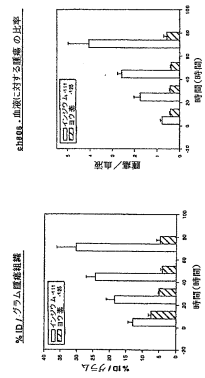


Fig. 35

【図３６】

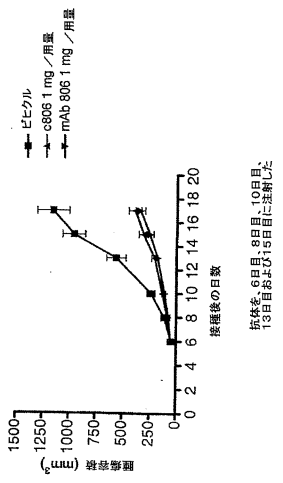


Fig. 36

【図３７】

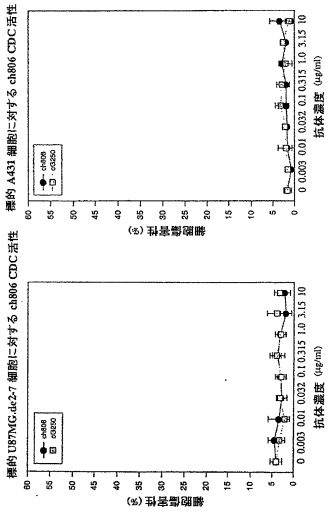


Fig. 37

【図３８】

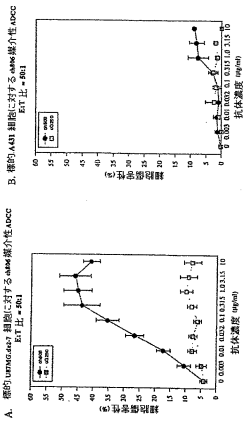


Fig. 38

【図３９】

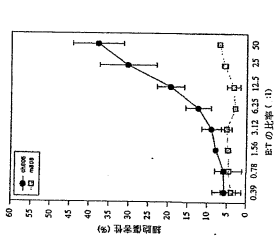


Fig. 39

【図４０】

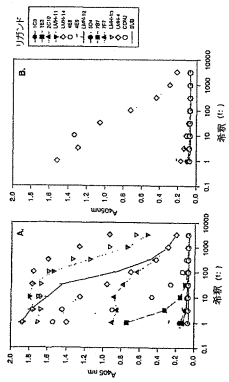


Fig. 40

【図４１】

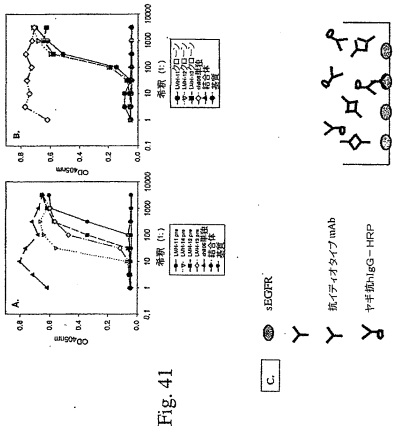


Fig. 41

【図４２】

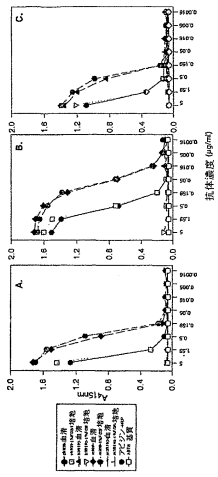


Fig. 42

【図４３】

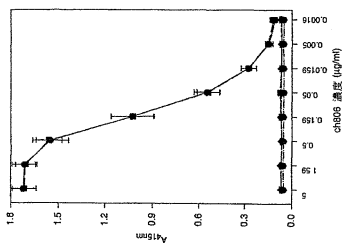


Fig. 43

【図４４】

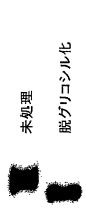


Fig. 44

【図４５】

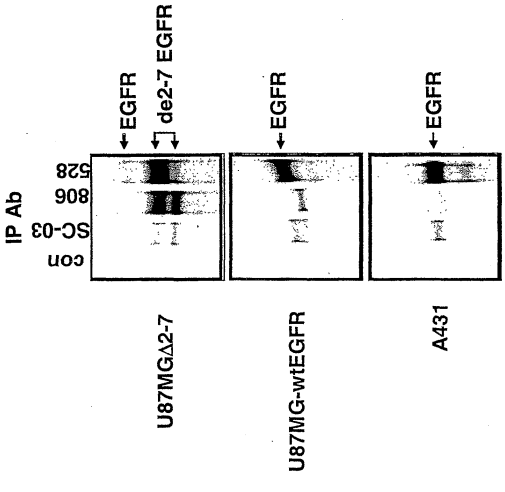


Fig. 45

【図４６】

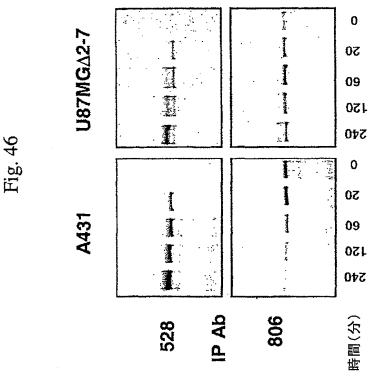


Fig. 46

【図４７】

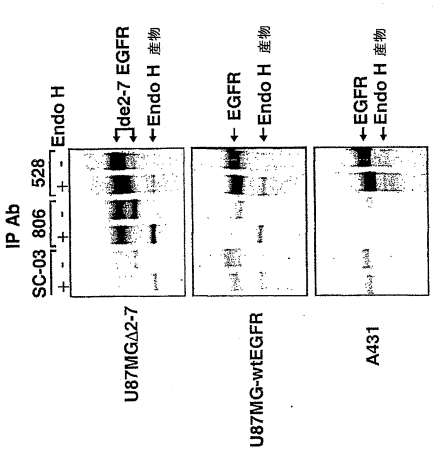


Fig. 47

【図４８】

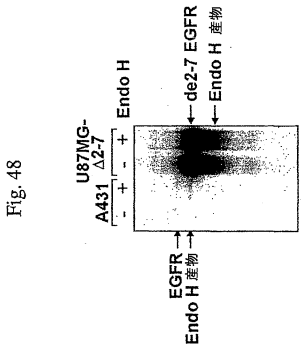


Fig. 48

【配列表】
0006082673000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
A61P 35/00 (2006.01) A61K 45/00
A61P 35/00

(31)優先権主張番号 60/342,258
(32)優先日 平成13年12月21日(2001.12.21)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 テランス グラント ジョンズ
オーストラリア国 ビクトリア ３１３２, ミッチャム, ダンフィールド アベニュー １３
(72)発明者 コン パヌーシス
オーストラリア国 ビクトリア ３０８５, マックロード, エルスカイン ロード ７７
(72)発明者 アンドリュー マーク スコット
オーストラリア国 ビクトリア ３１０１, ケイイーダブリュー., コザム ロード ３６７
(72)発明者 クリストフ レナー
ドイツ国 ホンブルク／ザール ６６４２４, リンクシュトラーセ ８
(72)発明者 ガード リッター
アメリカ合衆国 ニューヨーク １００２１, ニュー ヨーク, イースト ６３アールディー ストリート ４３０, アパートメント １０エイ
(72)発明者 アキム ユングブルース
アメリカ合衆国 ニューヨーク １００２１, ニュー ヨーク, イースト ６３アールディー ストリート ４５０, アパートメント ９ディー
(72)発明者 エリザベス ストッカート
アメリカ合衆国 ニューヨーク １０００２, ニュー ヨーク, イースト ７７ティーエイチ ストリート ４３６
(72)発明者 ピーター コリンズ
イギリス国 シービー２ １エイチエル, ケンブリッジ, パントン ストリート ６７
(72)発明者 ウェブスター ケイ. カヴェニー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２０１４, デル マー, ビスタ デ ラ ティエラ ４６５７
(72)発明者 ヘイージェン ホワン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２０６７, ランチョ サンタ フェ, ピー. オー. ボックス ２４７
(72)発明者 アンソニー ウィルクス バーゲス
オーストラリア国 ビクトリア ３１２４, キャンバーウェル, レンジ ストリート ３２
(72)発明者 エドワード コリンズ ナイス
オーストラリア国 ビクトリア ３１２４, セイント キルダ, オデッサ ストリート, ９

審査官 植原 克典

(56)参考文献 特表平０５－５００１５８（ＪＰ, Ａ）
Int.J.Cancer, 2000, Vol.88, p.962-969

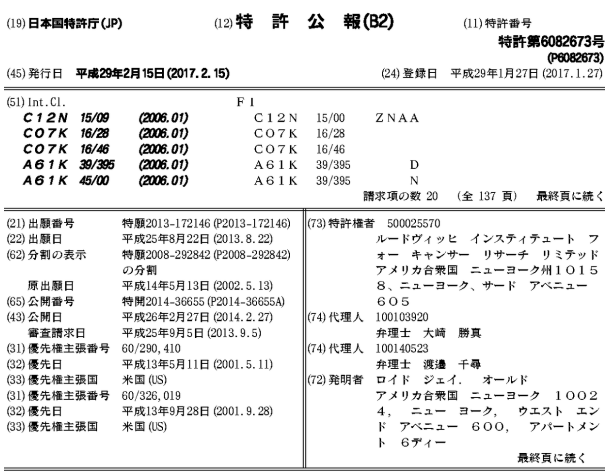
(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ

专利名称(译)	特异性结合蛋白及其用途		
公开(公告)号	JP6082673B2	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	JP2013172146	申请日	2013-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所		
当前申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所有限公司		
[标]发明人	ロイドジェイオールド テランスグラントジョンズ コンパヌーシス アンドリューマークスコット クリストフレナー ガードリッター アキムユングブルース エリザベスストッカート ピーターコリンズ ウェブスターケイカヴェニー ヘイジェンホワン アンソニーウィルクスバーゲス エドワードコリンズナイス		
发明人	ロイド ジェイ. オールド テランス グラント ジョンズ コン パヌーシス アンドリュー マーク スコット クリストフ レナー ガード リッター アキム ユングブルース エリザベス ストッカート ピーター コリンズ ウェブスター ケイ. カヴェニー ヘイ-ジェン ホワン アンソニー ウィルクス バーゲス エドワード コリンズ ナイス		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 G01N33/50 A61K39/00 A61K51/00 C07K16/32 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P35/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/06.100 C12N15/13 C12N15/62.Z C12N5/00.101 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/532.A G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/GG02 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74		

代理人(译)	Masarushin大崎
优先权	60/290410 2001-05-11 US 60/326019 2001-09-28 US 60/342258 2001-12-21 US
其他公开文献	JP2014036655A
外部链接	Espacenet

摘要(译)

（经修改）要解决的问题：提供特异性结合成员，特别是抗体及其活性片段，其识别表皮生长因子受体（EGFR）的异常翻译后修饰形式，特别是异常糖基化形式。 种类代码：A1一种分离的特异性结合成员，其中分离的特异性结合成员识别EGFR表位，其中EGFR表位包含与正常EGFR相比的任何氨基酸序列变化。或者氨基酸序列取代和所述EGFR表位是分离的特异性结合成员，其在致瘤细胞，过度增殖细胞或异常细胞中发现并且在正常细胞中不能被检测到。 。 【选择图】无



(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号 特許第6082673号 (P6082673)

(45)発行日 平成29年2月15日(2017.2.15)　(24)登録日 平成29年1月27日(2017.1.27)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	39/395	N

請求項の数 20　(全 137 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-172146 (P2013-172146)
(22)出願日　平成25年8月22日(2013.8.22)
(62)分割の表示　特願2008-292842 (P2008-292842)の分割
原出願日　平成14年5月13日(2002.5.13)
(65)公開番号　特開2014-36655 (P2014-36655A)
(43)公開日　平成26年2月27日(2014.2.27)
審査請求日　平成25年9月5日(2013.9.5)
(31)優先権主張番号　60/290,410
(32)優先日　平成13年5月11日(2001.5.11)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/326,019
(32)優先日　平成13年9月28日(2001.9.28)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　500025570
ルードヴィッヒ　インスティテュート　フォー　キャンサー　リサーチ　リミテッド
アメリカ合衆国　ニューヨーク州１０１５８、ニューヨーク、サード　アベニュー　６０５
(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真
(74)代理人　100140523
弁理士　渡邊　千尋
(72)発明者　ロイド　ジェイ.　オールド
アメリカ合衆国　ニューヨーク　１００２４，　ニュー　ヨーク，　ウエスト　エンド　アベニュー　６００，　アパートメント　６ディー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】特異的結合タンパク質およびその使用