

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6691872号
(P6691872)

(45) 発行日 令和2年5月13日(2020.5.13)

(24) 登録日 令和2年4月15日(2020.4.15)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 28 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-571061 (P2016-571061)
 (86) (22) 出願日 平成27年5月29日(2015.5.29)
 (65) 公表番号 特表2017-521054 (P2017-521054A)
 (43) 公表日 平成29年8月3日(2017.8.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/033402
 (87) 国際公開番号 W02015/184403
 (87) 国際公開日 平成27年12月3日(2015.12.3)
 審査請求日 平成30年5月29日(2018.5.29)
 (31) 優先権主張番号 62/005,887
 (32) 優先日 平成26年5月30日(2014.5.30)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(73) 特許権者 516359779
 ヘンリクス バイオテック カンパニー
 リミテッド
 台湾 タイペイ 11494, セクショ
 ン 6 ミンカン イースト ロード,
 レーン 15, 36番, 5エフ
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 チアン, ウェイトン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 951
 29, サン ノゼ, イラファ コート
 1438

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗上皮増殖因子受容体 (EGFR) 抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) (1) アミノ酸配列 NYGVH (配列番号1) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 YGNEFTSRF (配列番号8) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 DYYDYEFAY (配列番号11) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 IGTNIH (配列番号15) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 KYASESIS (配列番号21) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 NWP TS (配列番号27) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ;

(b) (1) アミノ酸配列 NYGVH (配列番号1) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 YATEFTSRF (配列番号7) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 DYYDYEFAY (配列番号11) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 IGTNIH (配列番号15) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 KYASESIS (配列番号21) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 NWP TS (配列番号27) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ;

(c) (1) アミノ酸配列 TYGVH (配列番号3) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 YGNEFTSRF (配列番号8) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 DYYDYEFAY (配列番号11) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 IRTNIH (配列番号16) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 KYGSESIS (配列番号22) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 NWP TS (配列番号27) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 又

10

20

は

(d) (1) アミノ酸配列 T Y G V H (配列番号 3) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y G N E F T S R F (配列番号 8) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号 11) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I S T N I H (配列番号 19) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y G S E S I S (配列番号 22) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T S (配列番号 27) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; を含む、抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

(1) アミノ酸配列 N Y G V H (配列番号 1) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y G N E F T S R F (配列番号 8) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号 11) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I G T N I H (配列番号 15) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y A S E S I S (配列番号 21) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T S (配列番号 27) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 1 に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3】

(1) アミノ酸配列 N Y G V H (配列番号 1) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y A T E F T S R F (配列番号 7) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号 11) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I G T N I H (配列番号 15) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y A S E S I S (配列番号 21) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T S (配列番号 27) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 1 に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4】

(1) アミノ酸配列 T Y G V H (配列番号 3) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y G N E F T S R F (配列番号 8) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号 11) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I R T N I H (配列番号 16) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y G S E S I S (配列番号 22) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T S (配列番号 27) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 1 に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5】

(1) アミノ酸配列 T Y G V H (配列番号 3) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y G N E F T S R F (配列番号 8) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号 11) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I S T N I H (配列番号 19) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y G S E S I S (配列番号 22) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T S (配列番号 27) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 1 に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 6】

a) 配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び配列番号 37 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン ;

b) 配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び配列番号 38 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン ;

c) 配列番号 33 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び配列番号 36 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、又は

d) 配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び配列番号 36 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン

を含む、請求項 1 に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

10

20

30

40

50

【請求項 7】

配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び配列番号 3 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
を含む、請求項 1 に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 8】

配列番号 3 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び配列番号 3 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
を含む、請求項 1 に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 9】

配列番号 3 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び配列番号 3 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
を含む、請求項 1 に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 10】

配列番号 3 4 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、及び配列番号 3 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
を含む、請求項 1 に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 11】

抗体がヒト I g G の F c 配列を含む、請求項 1 - 1 0 の何れか一項に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 12】

抗原結合断片が、F a b、F a b'、F (a b) ' ₂、一本鎖 F v (s c F v)、F v 断片、ダイアボディ、及び線状抗体からなる群から選択される、請求項 1 - 1 1 の何れか一項に記載の抗 E G F R 抗体の抗原結合断片。

20

【請求項 13】

抗体が多重特異性抗体である、請求項 1 - 1 1 の何れか一項に記載の抗 E G F R 抗体。

【請求項 14】

抗体がアフコシル化抗体である、請求項 1 - 1 3 の何れか一項に記載の抗 E G F R 抗体。

【請求項 15】

治療剤にコンジュゲートした、請求項 1 - 1 4 の何れか一項に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

30

【請求項 16】

標識にコンジュゲートした、請求項 1 - 1 4 の何れか一項に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 17】

標識が放射性同位体、蛍光色素、及び酵素からなる群から選択される、請求項 1 6 に記載の抗 E G F R 抗体。

【請求項 18】

請求項 1 - 1 4 の何れか一項に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子。

40

【請求項 19】

請求項 1 8 の核酸分子をコードする発現ベクター。

【請求項 20】

請求項 1 9 の発現ベクターを含む細胞。

【請求項 21】

請求項 2 0 の細胞を培養すること及び細胞培養物から抗体を回収することを含む、抗体を産生する方法。

【請求項 22】

請求項 1 - 1 5 の何れか一項に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片及び薬学的に許容可能な担体を含む、組成物。

50

【請求項 23】

請求項 1 - 10 の何れか一項に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片を試料に接触させること、及び E G F R タンパク質に結合した抗 E G F R 抗体を検出することにより、患者からの試料中の E G F R タンパク質を検出する方法。

【請求項 24】

抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片が免疫組織化学アッセイ (I H C) 又は E L I S A アッセイで使用される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 1 - 15 の何れか一項に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片、又は請求項 22 に記載の組成物を含む、被験体におけるがんを治療することに使用するための組成物。

10

【請求項 26】

がんが、咽喉がん、結腸直腸がん、肺がん、及び頭頸部がんから選択される、請求項 25 に記載の使用のための組成物。

【請求項 27】

抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤、及び細胞傷害性剤からなる群から選択される更なる治療剤との共投与のために製剤化される、請求項 25 に記載の使用のための組成物。

【請求項 28】

放射線療法と組み合わせて投与するために製剤化される、請求項 25 に記載の使用のための組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、その内容全体が参照により本明細書に援用される、2014年5月30日に出願された米国仮出願第62/005887号の優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

上皮増殖因子受容体 (E G F R 、 E r b B - 1 及び H E R 1 としても知られている) は、 E G F R (E r b B - 1) 、 H E R 2 / c - n e u (E r b B - 2) 、 H e r 3 (E r b B - 3) 及び H e r 4 (E r b B - 4) を含む、4つの密接に関連する受容体チロシンキナーゼのサブファミリーである、 E r b B ファミリーの受容体の細胞表面受容体である。 E G F R のリガンド (例えば、上皮増殖因子 (E G F) 、 トランスフォーミング増殖因子 a (T G F) 、 H B - E G F 、 アンフィレグリン、 ベータセルリン / B T C 、 エピゲン / E P G N 、 又はその他) は、 E G F R の C 末端ドメインにおける幾つかのチロシン (Y) 残基 (Y 9 9 2 、 Y 1 0 4 5 、 Y 1 0 6 8 、 Y 1 1 4 8 、 及び Y 1 1 7 3) の受容体二量体化及び自己リン酸化を誘導する。この自己リン酸化は、 M A P K 、 A k t 、 及び J N K 経路を含む幾つかのシグナル伝達カスケードの下流での活性化を誘発し、細胞移動、接着及び細胞増殖を導く。

30

40

【0003】

E G F R 若しくはファミリーメンバーの変異、増幅又は誤調節は、全ての上皮がんの約 30% に関与している。例えば、 E G F R の過剰発現又は過剰活性をもたらす変異は、肺がん、肛門がん、頭頸部がん及び多形性グリア芽細胞腫を含む多くのがんに関連している。がん遺伝子としての E G F R の同定は、 E G F R に対する抗がん剤の開発の必要性を導いた。本発明は、この必要性及び他の必要性を満たしている。

【0004】

発明の概要

本発明により提供されるのは、(1) アミノ酸配列 N / T / Q - Y G V H (配列番号 4) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y - N / A / G / D - T / D / N - P / K /

50

E - F T S R F (配列番号 9) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 T / D - Y / L - Y D Y - E / N - F A Y (配列番号 1 4) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I - G / R / S - T / L / P - N I H (配列番号 2 0) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y - A / G - S E - S / T - I - S / R (配列番号 2 4) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T - T / L / S / A / Y (配列番号 3 0) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む抗上皮増殖因子受容体 (E G F R) 抗体又はその抗原結合断片である。

【 0 0 0 5 】

幾つかの実施態様において、抗体は、(1) 配列番号 1 - 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - H 1 ; (2) 配列番号 5 - 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2 ; 及び (3) 配列番号 1 0 - 1 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) 配列番号 1 5 - 1 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1 ; (2) 配列番号 2 1 - 2 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 2 ; 及び (3) 配列番号 2 5 - 2 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗体は、(1) アミノ酸配列 N Y G V H (配列番号 1) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y N T P F T S R F (配列番号 5) を含む C D R - H 2 及び (3) アミノ酸配列 T Y Y D Y E F A Y (配列番号 1 0) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I G T N I H (配列番号 1 5) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y A S E S I S (配列番号 2 1) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T T (配列番号 2 5) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗体は、(1) アミノ酸配列 N Y G V H (配列番号 1) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y N T P F T S R F (配列番号 5) を含む C D R - H 2 及び (3) アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号 1 1) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I G T N I H (配列番号 1 5) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y A S E S I S (配列番号 2 1) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T S (配列番号 2 7) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗体は、(1) アミノ酸配列 N Y G V H (配列番号 1) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y G N E F T S R F (配列番号 8) を含む C D R - H 2 及び (3) アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号 1 1) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I G T N I H (配列番号 1 5) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y A S E S I S (配列番号 2 1) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T S (配列番号 2 7) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。

【 0 0 0 6 】

上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗体は、(1) アミノ酸配列 N Y G V H (配列番号 1) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y A T E F T S R F (配列番号 7) を含む C D R - H 2 及び (3) アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号 1 1) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I G T N I H (配列番号 1 5) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y A S E S I S (配列番号 2 1) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T S (配列番号 2 7) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗体は、(1) アミノ酸配列 N Y G V H (配列番号 1) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y D D K F T S R F (配列番号 6) を含む C D R - H 2 及び (3) アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号 1 1) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I G T N I H (配列番号 1 5) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K

10

20

30

40

50

Y A S E S I S (配列番号 21) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T S (配列番号 27) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗体は、(1) アミノ酸配列 T Y G V H (配列番号 3) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y G N E F T S R F (配列番号 8) を含む C D R - H 2 及び (3) アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号 11) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I R T N I H (配列番号 16) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y G S E S I S (配列番号 22) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T S (配列番号 27) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗体は、(1) アミノ酸配列 T Y G V H (配列番号 3) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y G N E F T S R F (配列番号 8) を含む C D R - H 2 及び (3) アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号 11) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I S T N I H (配列番号 19) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y G S E S I S (配列番号 22) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T S (配列番号 27) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。

10

【0007】

また本発明により提供されるのは、アミノ酸配列 Y - A / G / D - D / N - K / E - F T S R F (配列番号 31) を含む選択された C D R - H 2 を含む重鎖可変ドメインを含む、アグリコシル化された C D R - H 2 抗上皮増殖因子受容体 (E G F R) 抗体又はその抗原結合断片である。幾つかの実施態様において、重鎖可変ドメインは、アミノ酸配列 N / T / Q - Y G V H (配列番号 4) を含む C D R - H 1 及びアミノ酸配列 T / D - Y / L - Y D Y - E / N - F A Y (配列番号 14) を含む C D R - H 3 を更に含む。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列 I - G / R / S - T / L / P - N I H (配列番号 20) を含む C D R - L 1 ; アミノ酸配列 K Y - A / G - S E - S / T - I - S / R (配列番号 24) を含む C D R - L 2 ; 及びアミノ酸配列 N W P T - T / L / S / A / Y (配列番号 30) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を更に含む。

20

【0008】

上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗体は、ヒト I g G の F c 配列を含む。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗原結合断片は、F a b、F a b'、F (a b)'₂、一本鎖 F v (s c F v)、F v 断片、ダイアボディ及び線状抗体からなる群から選択される。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗体は多重特異性抗体である。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片は治療剤にコンジュゲートされる。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片は標識にコンジュゲートされる。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、標識は、放射性同位体、蛍光色素、及び酵素からなる群から選択される。

30

40

【0009】

上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗体はアフコシル化抗体である。

【0010】

上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片は細胞傷害性剤にコンジュゲートされる。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、細胞傷害性剤はメイタンシン又はその誘導体である。上記の実施態様の何れかに従う (又は適用される) 幾つかの実施態様において、メイタンシン又はその誘導体は D M - 1 である。

【0011】

50

本発明は、上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）抗EGFR抗体又はその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子を提供する。また、上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）核酸分子をコードする発現ベクターも提供される。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）発現ベクターを含む細胞もまた提供される。本発明はまた、上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）細胞を培養すること及び細胞培養物から抗体又はその抗原結合断片を回収することを含む抗体を産生する方法を提供する。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、細胞は哺乳動物細胞である。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、哺乳動物細胞はCHO細胞である。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、細胞は安定な哺乳動物細胞株である。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、安定な哺乳動物細胞株はCHO細胞株である。

10

【0012】

本発明は、上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）抗EGFR抗体又はその抗原結合断片及び薬学的に許容可能な担体を含む組成物を提供する。

【0013】

本発明は、上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を試料に接触させること、及びEGFRタンパク質に結合した抗EGFR抗体を検出することにより、患者からの試料中のEGFRタンパク質を検出する方法を提供する。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は免疫組織化学アッセイ（IHC）又はELISAアッセイで使用される。

20

【0014】

また、従うか（又は適用される）組成物の有効量を被験体に投与することを含む、被験体におけるがんを治療する方法も提供される。また提供されるのは、がんの治療に使用のための、上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を含む組成物である。提供されるのは、がんを治療するための医薬の製造における、上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）抗EGFR抗体又はその抗原結合断片の使用である。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、がんは、結腸直腸がん、肺がん、及び頭頸部がんから選択される。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、被験体は、抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤及び細胞傷害性剤からなる群から選択される治療剤を更に投与される。

30

【0015】

上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、がんは咽喉がんである。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、被験体は、放射線療法を更に施される。

【0016】

上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、被験体は、抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤及び細胞傷害性剤からなる群から選択される治療剤を更に投与される。

40

【0017】

上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を含む組成物が投与される被験体は、KRASについて野生型である。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を含む組成物が投与される被験体は、KRAS^{G13D}変異を有する。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を含む組成物が投与される被験体は、BRAFについて野生型である。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、本明細書

50

に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を含む組成物が投与される被験体は、BR A F^{V600E}変異を有する。

【0018】

上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を含む組成物が投与される被験体は、アービタックス（Erbix）又はそのバイオシミラーに耐性がある。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を含む組成物が投与される被験体は、アービタックス（Erbix）又はそのバイオシミラーに対して進行している。上記の実施態様の何れかに従う（又は適用される）幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を含む組成物が投与される被験体は、アービタックス（Erbix）又はそのバイオシミラーに抵抗性である。

10

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、CDR-L3/CDR-H3ライブラリーから得られた抗EGFR Fab変異体のEGFRへの結合を比較するために行われたELISAの結果を示す。

【図2】図2は、CDR-L3/CDR-H3ライブラリーから得られた全長抗EGFR IgG抗体変異体のEGFRへの結合を比較するために行われたELISAの結果を示す。

【図3】図3は、HLX05抗体（すなわち、社内で製造されたERBITUXバイオシミラー抗体）及びCDR-H2ライブラリーから得られた抗EGFR抗体変異体のEGFRに対するオフ速度（off rate）を比較するために行われたオフ速度ELISAの結果を示す。

20

【図4】図4は、HLX05抗体（すなわち、社内で製造されたERBITUXバイオシミラー抗体）、Merck KGaAから購入したErbix（登録商標）、抗EGFR抗体1-26/2-68、1-26/3-67、#8/#33、#34/#33、及びリツキシマブの直接EGFR結合を比較するために行われたELISAの結果を示す。

【図5】図5は、HLX05、ERBITUX（登録商標）、リツキシマブ、及び抗EGFR抗体11-26/2-68、1-26/3-67、#8/#33、及び#34/#33のEGFR結合を比較するための競合的ELISAの結果を示す。

30

【図6A-6B】図6A-6Bは、HLX05、ERBITUX（登録商標）、リツキシマブ、及び抗EGFR抗体11-26/2-68、1-26/3-67、#8/#33、#34/#33において行われたグリカン分析の結果を示す。

【図7】図7は、HLX05、ERBITUX（登録商標）、及び抗EGFR抗体1-26/2-68、1-26/3-67、#8/#33、#34/#33のFc I I I結合を比較するためのELISAの結果を示す。

【図8A】図8Aは、HLX05と抗EGFR抗体1-26/2-68のADCC活性を比較するために行われた分析の結果を示す。

【図8B】図8Bは、HLX05と抗EGFR抗体#8/#33のADCC活性を比較するために行われた分析の結果を示す。

40

【図8C】図8Cは、抗EGFR抗体1-26/2-68及び1-26/3-67のADCC活性を比較するために行われた分析の結果を示す。

【図8D】図8Dは、HLX05と抗EGFR抗体1-26/3-67のADCC活性を比較するために行われた分析の結果を示す。

【図8E】図8Eは、HLX05と抗EGFR抗体#34/#33のADCC活性を比較するために行われた分析の結果を示す。

【図8F】図8Fは、抗EGFR抗体#8/#33及び#34/#33のADCC活性を比較するために行われた分析の結果を示す。

【図8G】図8Gは、HLX05、1-26/2-68、1-26/3-67、#8/#33、及び#34/#33のADCC活性を比較するために行われた分析の定量化された

50

結果を示す。

【図9A】図9Aは、A431細胞に対するHLX05及び抗EGFR抗体1-26/2-68の抗増殖効果を比較するために行われた分析の結果を示す。

【図9B】図9Bは、A431細胞に対するHLX05及び抗EGFR抗体#8/#33の抗増殖効果を比較するために行われた分析の結果を示す。

【図9C】図9Cは、A431細胞に対する抗EGFR抗体1-26/2-68及び1-26/3-67の抗増殖効果を示す。

【図9D】図9Dは、A431細胞に対するHLX05及び抗EGFR抗体1-26/3-67の抗増殖効果を比較するために行われた分析の結果を示す。

【図9E】図9Eは、A431細胞に対するHLX05及び抗EGFR抗体#34/#33の抗増殖効果を比較するために行われた分析の結果を示す。

【図9F】図9Fは、A431細胞に対する抗EGFR抗体#8/#33及び#34/#33の抗増殖効果を比較するために行われた分析の結果を示す。

【図9G】図9Gは、A431細胞に対するHLX05、1-26/2-68、1-26/3-67、#8/#33、及び#34/#33の抗増殖効果を比較するために行われた分析の定量化された結果を示す。

【図10】図10は、ERBITUX（登録商標）、#34/#33、1-26/3-67、及び1-26/2-68の腫瘍増殖を阻害する能力を測定するA431腫瘍異種移植アッセイの結果を示す。

【図11】図11は、3日目及び35日目の両日の#34/#33、1-26/3-67、1-26/2-68、及びERBITUX（登録商標）の血清レベルを示す。

【図12】図12は、HLX05、1-26/3-67、ERBITUX（登録商標）、及びプラセボの腫瘍増殖を阻害する能力を測定するFadu腫瘍異種移植アッセイの結果を示す。

【図13】図13は、1-26/3-67+放射線療法、ERBITUX（登録商標）、+放射線療法及びプラセボ+放射線療法の腫瘍増殖を阻害する能力を測定するFadu腫瘍異種移植アッセイの結果を示す。

【図14A】図14Aは、DiFi細胞（KRAS^{WT}、BRAF^{WT}）の増殖を阻害するHLX07-DM1、HLX07、及び対照抗体の能力を評価するために行われたインビトロ実験の結果を示す。

【図14B】図14Bは、HCT-116細胞（KRAS^{G13D}）の増殖を阻害するHLX07-DM1、HLX07、及び対照抗体の能力を評価するために行われたインビトロ実験の結果を示す。

【図14C】図14Cは、HT29細胞（BRAF^{V600E}）の増殖を阻害するHLX07-DM1、HLX07、及び対照抗体の能力を評価するために行われたインビトロ実験の結果を示す。

【図15A】図15Aは、PBMCエフェクター細胞を用いたDiFi細胞（KRAS^{WT}）に対する1-26/3-67-FF（すなわち、「フコースフリー」）、1-26/3-67、及び対照抗体のADCC活性を示す。

【図15B】図15Bは、PBMCエフェクター細胞を用いたHCT-116細胞（KRAS^{G13D}）に対する1-26/3-67-FF（すなわち、「フコースフリー」）、1-26/3-67、及び対照抗体のADCC活性を示す。

【図15C】図15Cは、PBMCエフェクター細胞を用いたHT29細胞（BRAF^{V600E}）に対する1-26/3-67-FF（すなわち、「フコースフリー」）、1-26/3-67、及び対照抗体のADCC活性を示す。

【図16A】図16Aは、カニクイザルにおける経時的な34/33及び3/67の血清濃度を比較するために行われたELISAの結果を示す。

【図16B】図16Bは、カニクイザルにおける経時的なHLX05（すなわち、1-3）、及びERBITUX（登録商標）（すなわち、4-6）の血清濃度を比較するために行われたELISAの結果を示す。

10

20

30

40

50

【図17】図17は、安定な細胞株によって産生される時間に対する1-26/3-67抗体の濃度(mg/ml)を示す。

【0020】

発明の詳細な説明

本発明は、新規な抗上皮増殖因子受容体(EGFR)抗体を提供する。出願人は驚くべきことに、本明細書に記載の抗EGFR抗体は、転移性結腸直腸がん及び頭頸部がんの治療のために使用されるFDA承認抗EGFR抗体であるERBITUX(登録商標)(セツキシマブ)と比較して増強された治療効果を示すことを見いだした。本明細書に記載の抗EGFR抗体はまた、ERBITUX(登録商標)よりも長い半減期を示す。

【0021】

関連する態様において、本発明は、CDR-H2にN-グリコシル化モチーフを欠く新規抗EGFR抗体を提供する。抗体の軽鎖可変領域及び/又は重鎖可変領域内のグリコシル化、例えばERBITUX(登録商標)のV_H領域のAsn99でのN-グリカンなどは、抗原結合を妨害することによって抗体の治療効果を低下させることができる。更に、このようなグリコシル化は、変化した機能、免疫原性、又は安定性をもたらす得る抗体のバッチ内で不均一性を引き起こし得る。CDR-H2にグリコシル化モチーフを欠く抗EGFR抗体の産生バッチに存在するグリコフォームはより少ない。

【0022】

また、本明細書に記載のイムノコンジュゲート、新規抗EGFR抗体をコードする核酸、及び組成物(薬学的組成物など)も提供される。本発明はまた、試料(例えば、インビボ又はエキソビボの試料)中のEGFRを検出するための新規抗EGFR抗体を使用する方法、がんの治療に使用のためのこのような抗体を含む組成物、及びがんの治療のための医薬の製造におけるこのような抗体の使用に関する。

【0023】

定義

本明細書で使用する「治療」又は「治療する」は、臨床結果を含む有益な又は所望の結果を得るためのアプローチである。この発明の目的では、有益な又は所望の結果は、限定するものではないが、次のものの一又は複数を含む：疾患から生じる一又は複数の症状を軽減させること、疾患の程度を減少させること、疾患を安定化させること(例えば、疾患の悪化を防止又は遅延させる)、疾患の広がり(例えば、転移)を予防又は遅延させること、疾患の再発を予防又は遅延させること、疾患の進行を遅延又は緩慢にすること、疾患状態を寛解させること、疾患の寛解(部分的又は完全)を提供すること、疾患を治療するために必要とされる一又は複数の他の医薬の用量を減少させること、疾患の進行を遅延させること、生活の質を向上又は改善すること、体重増加を増やすこと、及び/又は生存を延長すること。また、「治療」に包含されるのは、がんの病理学的帰結(例えば、腫瘍体積など)の減少である。本明細書で提供される方法は、治療のこれらの態様の何れか一又は複数を含む。

【0024】

「再発(recurrence)」、「再発(relapse)」又は「再発(relapsed)」という用語は、疾患の消失を臨床的に評価した後のがん又は疾患の再発(return)を指す。遠隔転移又は局所再発の診断は再発とみなすことができる。

【0025】

用語「難治性」又は「耐性」とは、治療にตอบสนองしないがん又は疾患を指す。

【0026】

「補助療法」という用語は、一次療法(通常は外科手術)後に施される治療を意味する。がん又は疾患のための補助療法には、免疫療法、化学療法、放射線療法、又はホルモン療法が含まれ得る。

【0027】

「維持療法」という用語は、以前の治療効果を維持するのに役立つよう与えられるスケジュールされた再治療を指す。維持療法は、がんを寛解状態に保つのを助けるために、又

10

20

30

40

50

は疾患の進行にかかわらず特定の療法への応答を延長するために、しばしば施される。

【0028】

用語「侵襲性がん」とは、正常な周囲組織に始まった組織の層を越えて広がっているがんを指す。浸潤性がんは転移性である場合と転移性でない場合がある。

【0029】

用語「非侵襲性がん」とは、非常に初期のがん又は起源の組織を超えて広がっていないがんを指す。

【0030】

腫瘍学における「無増悪生存期間」という用語は、がんが増殖しない治療中及び治療後の期間を指す。無増悪生存期間には、患者が完全な応答又は部分応答を経験した時間、並びに患者が安定した疾患を経験した時間が含まれる。

10

【0031】

腫瘍学における「進行性疾患」という用語は、治療の開始以来、腫瘍の質量の増加又は広がり起因した、20%以上の腫瘍増殖を指すことができる。

【0032】

「障害」は、抗体による治療から利益を得るであろう任意の状態である。例えば、異常なEGFR活性に罹患しているか又は予防が必要な哺乳類。これには、哺乳動物に問題の疾患に罹らせる病的状態を含む慢性及び急性の障害又は疾患が含まれる。本明細書において治療される障害の非限定的な例には、がん（頭頸部がん、咽喉がん、結腸直腸がん、肺がんなど）が含まれる。

20

【0033】

本明細書で用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍細胞成長及び増殖、及び全ての前がん性及びがん性の細胞及び組織を意味する。

【0034】

用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、具体的には、例えば、単一モノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト及び中和抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、及び抗体断片（それらが本発明の生物学的活性又は免疫学的活性を示す限り）（以下を参照されたい）を含み得る。一実施態様によれば、抗体は、オリゴマー形態の標的タンパク質（例えば、三量体形態）に結合する。別の実施態様によれば、抗体はタンパク質に特異的に結合し、この結合は本発明のモノクローナル抗体（例えば、本発明の寄託抗体など）によって阻害され得る。抗体の「機能的断片又は類似体」という語句は、それが参照される抗体と共通の定性的な生物活性を有する化合物である。例えば、本発明の抗体の機能的断片又は類似体は、EGFRに特異的に結合することができるものであり得る。一実施態様において、抗体は、EGFRが細胞増殖を誘導する能力を予防するか、又は実質的に低下させることができる。

30

【0035】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質を含むことができる。好ましい実施態様において、抗体は、（1）ローリー法により判定して抗体95重量%超、及び最も好ましくは99重量%超まで、（2）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、N末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、又は（3）クーマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を用いる還元もしくは非還元条件下でSDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一の成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

40

【0036】

基本的な4鎖抗体単位は、2つの同一の軽（L）鎖及び2つの同一の重（H）鎖からなるヘテロ四量体糖タンパク質である（IgM抗体は、J鎖と呼ばれる付加的ポリペプチド

50

と共に5つの基本的なヘテロ四量体単位からなり、従って、10の抗原結合部位を含み、一方分泌型IgA抗体は重合し、J鎖と共に2つから5つの基本的な4鎖単位を含む多価集合体を形成することができる)。IgGの場合、4鎖単位は一般的に約150000ダルトンである。各L鎖は一つの共有ジスルフィド結合によりH鎖に連結している一方、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに連結されている。また各H及びL鎖は、規則的に離間した鎖内ジスルフィド架橋を有している。各H鎖は、N末端に可変ドメイン(VH)と、これに続く 及び 鎖それぞれに対しては3つの定常ドメイン(CH)と、 μ 及び アイソタイプに対しては4つのCHドメインを有する。各L鎖は、N末端に可変ドメイン(VL)と、これに続く定常ドメイン(CL)をその他端に有する。VLはVHに整列しており、CLは重鎖の第1定常ドメイン(CH1)に整列している。特定のアミノ酸残基は軽鎖と重鎖の可変ドメインの界面を形成すると考えられている。VHとVLは対になって単一の抗原結合部位を形成する。異なったクラスの抗体の構造及び特性について、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8版、Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (編)、Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁、6章を参照のこと。

10

【0037】

任意の脊椎動物種からのL鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ及びラムダと呼ばれる明確に区別される2つのタイプのタイプを割り当てることができる。それらの重鎖の定常ドメイン(CH)のアミノ酸配列に基づき、免疫グロブリンは、種々のクラス又はアイソタイプに割り当てることができる。免疫グロブリンには、それぞれ、 、 、 及び μ と命名された重鎖を有するIgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの5つのクラスがある。 及び クラスは更にCH配列及び機能の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えばヒトでは、次のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2を発現する。

20

【0038】

「可変」なる用語は、可変ドメインの所定のセグメントが抗体間で配列の点で広範囲に相違していることを意味する。Vドメインは抗原結合を媒介し、特定の抗体のその特定の抗原に対する特異性を定める。しかしながら、可変性は可変ドメインの110アミノ酸全長にわたって均一に分布しているのではない。その代わりに、V領域は、それぞれ9-12アミノ酸長である「高頻度可変領域」と呼ばれる極度の可変性のより短い領域により分離した15-30のアミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる相対的に不変の伸長部からなる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、 シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループを形成する、3つの高頻度可変領域により連結された シート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖の超可変領域はFRによって極く近傍に一緒に保持され、他の鎖からの超可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照)。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係しないが、例えば抗体依存性細胞傷害性(ADCC)における抗体の関与のような様々なエフェクター機能を示す。

30

【0039】

本明細書中で使用される場合、用語「CDR」又は「相補性決定領域」は、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見出される非連続抗原結合部位を意味することが意図される。これらの特定の領域は、Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); by Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); 及びMacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)により記載され、ここではその定義は、互いに比較した場合に、アミノ酸残基の重複又はサブセットを含む。それにもかかわらず、抗体若しくは移植抗体又はその変異体のCDRを意味する何れかの定義の適用は、本明細書において定義され、使用される場合の用語の範囲内にあることを意図している。上記の引用文献の各々によって定義されるように、CDRを包含するア

40

50

ミノ酸残基が、比較として以下の表 1 に記載されている。

表 1: CDR の定義

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

10

¹残基番号付けは、上記のKabatらの命名法に従う。

²残基番号付けは、上記のChothiaらの命名法に従う。

³残基番号付けは、上記のMacCallumらの命名法に従う。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在することができる可能な自然に生じる突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であって、単一の抗原部位に対するものである。更に、典型的には、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含む、ポリクローナル抗体製剤とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対して指向される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが、他の抗体により汚染されずに合成されることができる点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、Kohler et al. Nature. 256:495 (1975) によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって調製することができ、又は細菌、真核生物の動物又は植物細胞において組換え DNA 法を用いて作製することができる（例えば、米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号参照）。また「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991), Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)、及び以下の実施例に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

20

30

【 0 0 4 1 】

本発明のモノクローナル抗体は、重鎖及びノ又は軽鎖の一部が特定の種に由来する又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一又は相同であるが、その（それらの）鎖の残部は別の種に由来する又は別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗体、並びにそのような抗体の断片（但し、それらが本発明の生物学的活性を示すことを条件とする）であり得る（米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)）。本明細書における対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば旧世界ザル、類人猿など）及びヒト定常領域配列に由来する可変ドメイン抗原結合配列を含む霊長類化抗体が含まれる。

40

【 0 0 4 2 】

「インタクトな」抗体は、抗原結合部位並びに C L 及び少なくとも重鎖定常ドメイン、C H 1、C H 2 及び C H 3 を含むものである。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列定常ドメイン）又はそのアミノ酸配列変異体であることができる。好ましくは、インタクトな抗体は、一又は複数のエフェクター機能を有する。

【 0 0 4 3 】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例には、F a b、F a b'、F (a b')₂ 及び F v 断片

50

；ダイアボディ；直鎖状抗体（米国特許第5641870号の実施例2；Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]参照）；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

【0044】

「直鎖状抗体」という表現は、一般的には、Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995)に記載された抗体を意味する。簡単に言えば、これらの抗体は、相補的な軽鎖ポリペプチドと共に抗原結合領域の対を形成する一対の直列のFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)を含む。直鎖状抗体は二重特異性であっても単一特異性であってもよい。

【0045】

抗体のパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片と、残りの「Fc」断片（容易に結晶化する能力を反映する命名である）を生成する。Fab断片は、L鎖全体並びにH鎖の可変領域ドメイン(VH)、及び一つの重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)からなる。各Fab断片は、抗原結合に関して一価であり、すなわち単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理により単一の大きなF(ab')₂断片が生じ、これは凡そ、二価の抗原結合活性を有するジスルフィド結合した二つのFab断片に対応し、依然として抗原に架橋することができる。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の一又は複数のシステインを含むCH1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基を更に有している点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、本明細書において、Fab'の一般名称であり、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を持つ。F(ab')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生成された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

【0046】

Fc断片は、ジスルフィドによって一緒に保持された両方のH鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域内の配列によって決定される。この領域は、特定の細胞型に見られるFc受容体(FcR)によって認識される部分でもある。

【0047】

「変異体Fc領域」は、本明細書に定義される少なくとも一つの「アミノ酸修飾」により、天然配列Fc領域とは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、変異Fc領域は、天然配列Fc領域又は親ポリペプチドのFc領域と比較して、少なくとも一つのアミノ酸置換を、例えば、天然配列Fc領域又は親ポリペプチドのFc領域に、約1から約10のアミノ酸置換、及び好ましくは約1から約5のアミノ酸置換を有する。一実施態様において、本明細書の変異体Fc領域は、天然配列Fc領域と少なくとも約80%の相同性、少なくとも約85%の相同性、少なくとも約90%の相同性、少なくとも約95%の相同性又は少なくとも約99%の相同性を有する。別の実施態様において、本明細書の変異体Fc領域は、親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の相同性、少なくとも約85%の相同性、少なくとも約90%の相同性、少なくとも約95%の相同性又は少なくとも約99%の相同性を有する。

【0048】

「Fc領域含有ポリペプチド」という用語は、Fc領域を含む抗体又はイムノアドヘンシ(本明細書の他の箇所の定義を参照のこと)などのポリペプチドを指す。Fc領域のC末端リジン(EU番号付けシステムによれば残基447)は、例えば、ポリペプチドの精製中に、又はポリペプチドをコードする核酸を組換え的に遺伝子操作することによって取り除かれてもよい。従って、本発明によるFc領域を有する抗体を含むポリペプチドを含む組成物は、全てのK447残基が除去されたポリペプチド集団、K447残基が除去されていないポリペプチド集団、又はK447残基を有するポリペプチドと有さないポリペプチドの混合物を有するポリペプチド集団を含むことができる。

【0049】

抗体「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に起因しうる生物学的活性を指し、抗体のアイソタイプにより変化する

10

20

30

40

50

。抗体のエフェクター機能の例は：C1q結合及び補体依存性細胞傷害；Fc受容体結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）；貪食作用；細胞表面受容体のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化を含む。「天然配列Fc領域」は、天然にみられるFc領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む。Fc配列の例は、例えば、限定されるものではないが、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)に記載される。

【0050】

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小抗体断片である。この断片は、一つの重鎖及び一つの軽鎖可変領域ドメインが、堅固な非共有結合をなした二量体からなる。これら二つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの超可変ループ（H鎖及びL鎖それぞれ由来の3つのループ）が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に対して特異的な三つのCDRのみを含むFvの半分）でさえ、結合部位全体よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

10

【0051】

「sFv」又は「scFv」とも略称される「単鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖内に結合したVH及びVL抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、sFvポリペプチドはVH及びVLドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それはsFvが抗原結合のために望まれる構造を形成することを可能にする。sFvの総説については、Plickthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infraを参照のこと。

20

【0052】

用語「ダイアボディ（diabodies）」は、鎖間ではなく鎖内でVドメインを対形成させ、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、VHとVLドメインとの間に短いリンカー（約5-10残基）を有するsFv断片（前の段落を参照）を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは、二つの抗体のVHドメインとVLドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する二つの「クロスオーバー」Fv断片のヘテロ二量体である。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号；国際公開第93/11161号；及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により完全に記載されている。

30

【0053】

非ヒト（例えばげっ歯類）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト抗体に由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大抵の場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、非ヒト種、例えば、所望の抗体特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト霊長動物の超可変領域（ドナー抗体）由来の残基により置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。幾つかの例においては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）の残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。更に、ヒト化抗体はレシピエント抗体又はドナー抗体において見いだされない残基を含むことが可能である。これらの修飾は、抗体の性能を更に改良するために作成される。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの全てを実質的に含み、ここでは超可変ループの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRの全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、場合によっては、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれも含むであろう。更なる詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照。

40

【0054】

50

本明細書において同定されたポリペプチド及び抗体配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」又は「相同性」は、任意の保存的置換を配列同一性の一部として考慮して配列を整列させた後に、比較されるポリペプチド中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、当分野の技術の範囲内にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、ここでの目的のためには、%

10

【0055】

20

「Fc受容体」又は「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合する受容体を記述するために使用される。一実施態様において、本発明のFcRは、IgG抗体(受容体)に結合するものであり、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスを受容体を含み、これらの受容体の対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcRII受容体は、FcRIIA(「活性化受容体」)及びFcRIIB(「阻害受容体」)を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化FcRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫受容体チロシン-ベース活性化モチーフ(ITAM)を有する。阻害受容体FcRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫受容体チロシン-ベース活性化モチーフ(ITIM)を有する(概説Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234(1997)を参照)。その用語には、FcRI

30

【0056】

「FcRn」という用語は、新生児Fc受容体(FcRn)を指す。FcRnは主要組織適合複合体(MHC)と構造的に類似しており、2-マイクログロブリンに非共有結合した鎖からなる。新生児Fc受容体FcRnの複数の機能は、Ghetie and Ward (2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766に総説される。FcRnは、母親から子どもへの免疫グロブリンIgGの受動的送達及び血清IgGレベルの調節において役割を果たす。FcRnは、サルベージ受容体として作用し、細胞内及び細胞間のインタクトな形態の貪食されたIgGを結合及び輸送し、それらをデフォルトの分解経路から救出することができる。

40

【0057】

ヒトIgGFc領域の「CH1ドメイン」(「H1」ドメインの「C1」とも称される)は、通常約アミノ酸118から約アミノ酸215(EU番号付けシステム)に及ぶ。

50

【0058】

「ヒンジ領域」は、通常、ヒトIgG1のG1u216からPro230まで延びていると定義される (Burton, Molec. Immunol. 22:161-206, 1985)。他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、同じ位置に内部重鎖S-S結合を形成する最初と最後のシステイン残基を配置することによりIgG1と整列させることができる。

【0059】

Fc領域の「下部ヒンジ領域」は、通常、ヒンジ領域のすぐC末端の残基、すなわちFc領域の残基233から239のストレッチとして定義される。以前の報告では、FcR結合は、一般に、IgG Fc領域の下部ヒンジ領域のアミノ酸残基によるものである。

【0060】

ヒトIgG Fc領域の「CH2ドメイン」(「H2」ドメインの「C2」とも称される)は、通常約アミノ酸231から約アミノ酸340に及ぶ。CH2ドメインは、別のドメインと密接に対合しないという点で独特である。代わりに、2つのN結合分岐型糖鎖が、インタクトな天然型IgG分子の2つのCH2ドメインの間に挿入される。糖鎖はドメイン-ドメイン対合の代替物を提供し、CH2ドメインの安定化を助けることができると推測される。Burton, Molec Immunol. 22:161-206 (1985)。

【0061】

「CH3ドメイン」(「C2」又は「H3」ドメインとも称される)は、Fc領域のC末端からCH2ドメインまでの残基のストレッチ(すなわち、抗体配列のアミノ酸残基約341からC末端まで、典型的にはIgGのアミノ酸残基446又は447まで)を含む。

【0062】

「機能的Fc領域」は、天然型配列Fc領域の「エフェクター機能」を有する。例示的な「エフェクター機能」には、C1q結合、補体依存性細胞傷害作用(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC)、食作用、細胞表面受容体(例えばB細胞受容体;BCR)の下方制御などが含まれる。そのようなエフェクター機能は、通常、Fc領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わせることを必要とし、例えばここに開示される様々なアッセイを使用して評価することができる。

【0063】

「C1q」は、免疫グロブリンのFc領域の結合部位を含むポリペプチドである。C1qは、2つのセリンプロテアーゼC1r及びC1sとともに、補体依存性細胞傷害(CDC)経路の第1成分である複合体C1を形成する。ヒトC1qは、例えばQuidel、San Diego、CAから商業的に購入することができる。

【0064】

「結合ドメイン」という用語は、別の分子に結合するポリペプチドの領域を指す。FcRの場合、結合ドメインは、Fc領域の結合に関与するポリペプチド鎖の一部(例えば、そのアルファ鎖)を含むことができる。有用な結合ドメインの1つは、FcRアルファ鎖の細胞外ドメインである。

【0065】

「改変された」FcR結合親和性又はADCC活性を有する変異体IgG Fcを有する抗体は、親ポリペプチド又は天然配列Fc領域を含むポリペプチドと比較して、FcR結合活性(例えば、FcR又はFcRn)及び/又はADCC活性の何れかを増強又は低下させたものである。FcRに対して「増加した結合を示す」変異体Fcは、親ポリペプチド又は天然配列IgG Fcよりも高い親和性(例えば、低い見かけのKd又はIC50値)で少なくとも1つのFcRに結合する。幾つかの実施態様によれば、親ポリペプチドと比較した結合の改善は、約3倍、好ましくは約5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200, 最大500倍又は約25%から1000%の結合の改善である。FcRに対して「減少した結合を示す」ポリペプチド変異体は、親ポリペプチドよりも低い親和性(例えば、高い見かけのKd又はIC50値)で少なくとも1つのFcRに結合する。親ポリペプチドと比較した結合の減少は、結合の約40%以上の減少であり得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

「抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性」又はADC Cは、ある種の細胞傷害細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球及びマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcRs）と結合した分泌Igにより、これらの細胞傷害エフェクター細胞が抗原担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞傷害性の形態を意味する。抗体は細胞傷害性細胞を「作動可能にし」、このような死滅に絶対的に必要とされる。ADC Cを媒介する主要な細胞であるNK細胞がFcRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象の分子のADC C活性をアッセイするために、米国特許第5500362号若しくは同第5821337号又は以下の例に記載されているようなインビトロADC Cアッセイを実施することができる。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞を含む。代わりに、又は更に、対象の分子のADC C活性は、インビボで、例えばClynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)に開示されている動物モデルなどの動物モデルで評価されうる。

10

【 0 0 6 7 】

野生型IgGFc又は親ポリペプチドを有するポリペプチドよりも効果的にヒトエフェクター細胞の存在下で「ADC Cを増加させる」、又は抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADC C）を媒介する変異体Fc領域を含むポリペプチドは、変異体Fc領域を有するポリペプチド及び野生型Fc領域を有するポリペプチド（又は親ポリペプチド）の量が本質的に同じである場合、インビトロ又はインビボでADC Cを媒介する上で実質的により効果的であるものである。一般に、そのような変異体は、例えば動物モデルにおいてADC C活性を測定するためのアッセイ又は方法など、当技術分野で公知の任意のインビトロADC Cアッセイを用いて同定されるであろう。一実施態様において、好ましい変異体は、野生型Fc（又は親ポリペプチド）よりもADC Cを媒介する点において、約5倍から約100倍、例えば約25倍から約50倍、より有効である。

20

【 0 0 6 8 】

「補体依存性細胞傷害」又は「CDC」は、補体の存在下での標的細胞の溶解を指す。標準的補体経路の活性化は、補体系の第1の成分（C1q）の、それらの同種抗原に結合した（適切なサブクラス）抗体への結合により開始される。補体活性化を評価するために、CDCアッセイが、例えば、Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)に記載されるように実施することができる。Fc領域アミノ酸配列が改変されてC1q結合能力が向上したか又は低下したポリペプチド変異体は、米国特許第619455B1号及び国際公開第99/51642号に記述されている。これらの特許文献の内容は出典明示により本明細書に援用される。また、Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)も参照のこと。

30

【 0 0 6 9 】

本明細書に開示される抗EGFR抗体（又はその断片）又は組成物の「有効量」は、具体的に述べられた目的を実行するのに十分な量である。「有効量」は、経験的に、及び記載された目的に関連する公知の方法によって決定することができる。

40

【 0 0 7 0 】

「治療的有效量」という用語は、哺乳動物（別名患者）の疾患又は障害の「治療」のために有効な、本明細書に開示される抗EGFR抗体（又はその断片）又は組成物の量を指す。がんの場合は、本明細書に開示される抗EGFR抗体（又はその断片）又は組成物の治療的有效量は、がん細胞の数を減少させる；腫瘍の大きさ又は重さを小さくする；がん細胞の周辺器官への浸潤を阻害する（すなわち、ある程度まで遅くする、好ましくは止める）；腫瘍の転移を阻害する（すなわち、ある程度まで遅くする、好ましくは止める）；腫瘍の増殖をある程度まで阻害する；及び/又はがんに関連する一又は複数の症状をある程度まで和らげることが可能である。本明細書に開示される抗EGFR抗体（又はその断

50

片)又は組成物が、現存のがん細胞の増殖を妨げ及び/又は死滅させる範囲において、それは細胞分裂停止性及び/又は細胞傷害性である。一実施態様では、治療的有効量は増殖阻害量である。別の実施態様では、治療的有効量は、患者の生存期間を延長する量である。別の実施態様では、治療的有効量は、患者の無増悪生存期間を改善する量である。

【0071】

本発明の本明細書に開示される抗EGFR抗体(又はその断片)又は組成物の「増殖阻害量」は、インビトロ又はインビボの何れかで細胞、特に腫瘍、例えばがん細胞の増殖を阻害することができる量である。腫瘍細胞増殖を阻害する目的のための本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「増殖阻害量」は、経験的に、及び既知の方法又は本明細書で提供される実施例により決定することができる。

10

【0072】

本発明の抗EGFR抗体(又はその断片)又は組成物の「細胞傷害性量」は、インビトロ又はインビボの何れかで細胞、特に腫瘍、例えばがん細胞の破壊を引き起こすことができる量である。腫瘍細胞増殖を阻害する目的のための本発明の抗EGFR抗体(又はその断片)又は組成物の「細胞傷害性量」は、経験的に、及び当技術分野で公知の方法により決定することができる。

【0073】

本発明の抗EGFR抗体(又はその断片)又は組成物の「増殖阻害量」は、インビトロ又はインビボの何れかで細胞、特に腫瘍、例えばがん細胞の増殖を阻害することができる量である。腫瘍細胞増殖を阻害する目的のための本発明の抗EGFR抗体(又はその断片)又は組成物の「増殖阻害量」は、経験的に、及び既知の方法又は本明細書で提供される実施例により決定することができる。

20

【0074】

本明細書中で使用される場合、「薬学的に許容可能」又は「薬理的に適合性」とは、生物学的又はその他の点で所望されなくない物質を意味し、例えば、物質は、有意な所望されない生物学的効果を引き起こすことなく、又はそれが含まれる組成物の他の成分の何れかと有害な様式で相互作用することなく、患者に投与される薬学的組成物に組み込むことができる。薬学的に許容可能な担体又は賦形剤は、好ましくは、毒物学及び製造試験の要求基準を満たしているか、及び/又は米国食品医薬品局によって作成された不活性成分ガイドに含まれている。

30

【0075】

「検出する」という用語は、物質の存在又は非存在を決定すること又は物質(EGFRなど)の量を定量することを含むことを意図する。従って、その用語は、定性的及び定量的測定のための本発明の材料、組成物、及び方法の使用を指す。一般に、検出に使用される特定の技術は、本発明の実施には重要ではない。

【0076】

例えば、本発明による「検出する」とは、EGFR遺伝子産物、mRNA分子、又はEGFRポリペプチドの存在又は非存在;EGFRポリペプチドのレベル又は標的に結合した量の変化;EGFRポリペプチドの生物学的機能/活性の変化を観察することを含み得る。幾つかの実施態様において、「検出する」は、野生型EGFRレベル(例えば、mRNA又はポリペプチドレベル)を検出することを含み得る。検出するとは、対照と比較した場合、10%から90%の間の任意の値、又は30%から60%の間の任意の値、又は100%を超える任意の値の変化(増加又は減少)を定量化することを含み得る。検出するとは、2倍から10倍までの間の任意の値、又はそれ以上、例えば100倍の変化を定量化することが含まれ得る。

40

【0077】

本明細書で使用する場合、「標識」という単語は、抗体に直接的又は間接的にコンジュゲートした検出可能な化合物又は組成物を指す。標識がそれ自体で検出可能(例えば放射性標識又は蛍光性標識)であってもよく、又は酵素標識の場合は、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的变化を触媒するものであってもよい。

50

【 0 0 7 8 】

本明細書において「約」の値又はパラメーターへの言及は、この技術分野における当業者に容易に知られるそれぞれの値についての通常の誤差範囲を指す。本明細書において「約」の値又はパラメーターへの言及は、その値又はパラメーター自体を対象にする態様を含む（及び記載する）。例えば、「約X」に言及する記述は「X」の記述が含まれる。

【 0 0 7 9 】

本明細書に記載される本発明の態様及び実施態様は、態様及び実施態様を「含む」、「からなる」及び/又は「から本質的になる」を含む。

【 0 0 8 0 】

特許出願及び刊行物を含む、本明細書に引用される全ての参考文献は、その全体が参考により本明細書に援用される。

10

【 0 0 8 1 】

抗上皮増殖因子受容体（EGFR）抗体

本発明は、上皮増殖因子受容体（EGFR）に結合する新規な抗体の同定に基づく。抗EGFR抗体は、様々な治療方法及び診断方法において使用することができる。例えば、頭頸部がん、咽喉がん、結腸直腸がん、肺がんなどを含む、異常なEGFR発現又は異常なEGFR活性を特徴とする疾患の治療において、抗EGFR抗体を単独で、又は他の薬剤と組み合わせて使用することができる。本明細書で提供される抗体は、抗EGFR抗体を患者に投与し、患者からの試料中において（例えば、インビボ又はエクスピボで）EGFRタンパク質に結合した抗EGFR抗体を検出することによって、又は患者からの試料と抗EGFR抗体とを接触させ、EGFRタンパク質に結合した抗EGFR抗体を定性的に又は定量的に検出することによって、患者又は患者試料中のEGFRタンパク質を検出するために使用することもできる。

20

【 0 0 8 2 】

上皮増殖因子受容体又は「EGFR」（ERBB、ERBB1、HER1、PIG61、mENA、細胞増殖抑制タンパク質40、細胞増殖誘導タンパク質61及びEC2.7.10.1としても知られている）は、4つの密接に関連する受容体チロシンキナーゼのサブファミリーである、ErbBファミリーの受容体のメンバーである。EGFRは、その特異的リガンド（上皮増殖因子（EGF）、TGF、ヘパリン結合性EGF様増殖因子、アンフィレグリン、ベータセルリン（BTC）、エピゲン（EPGN）など）の結合によって活性化され、その上でEGFRが二量体化及びチロシン自己リン酸化を受ける。自己リン酸化は、例えばホスファチジル3-キナーゼ（PI3K）、ホスホリパーゼ（PL）C-g1、Akt、Ras、Raf及びマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）、並びに細胞増殖、運動性、接着及び移動に関連する他のシグナル伝達カスケードの下流の活性化につながる。異常なEGFR発現又はEGFR活性は、多くのがん（頭頸部がん、咽喉がん、結腸直腸がん、肺がんなど）に関連する。

30

【 0 0 8 3 】

抗EGFR抗体は、十分な親和性及び特異性でEGFRに結合する抗体である。好ましくは、本明細書で提供される抗EGFR抗体（又はその抗原結合断片）は、EGFR活性が関与する疾患又は状態を標的としかつ妨げる治療剤として使用することができる。抗EGFR抗体は、通常、Her2/Neu/ErbB2、Her3/ERBB3又はHer4/ERBB4などの他のERBBファミリーに結合しないであろう。好ましくは、抗EGFR抗体は、組換えヒト化抗EGFRモノクローナル抗体である。一実施態様によれば、抗EGFR抗体は、本明細書中に開示される抗体の何れか1つのCDR、可変重鎖領域、及び/又は可変軽鎖領域を含む。

40

【 0 0 8 4 】

ある実施態様において、抗EGFR抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列NYGVH（配列番号1）を含むCDR-H1；アミノ酸配列YNTPTFTSRF（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列TYDYEFAY（配列番号10）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；及びアミノ酸配列IGTNIH（配列番号

50

15)を含むCDR-L1;アミノ酸配列KYASESIS(配列番号21)を含むCDR-L2;及び(3)アミノ酸配列NWP TT(配列番号25)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む抗EGFR抗体の変異体であり、ここで該変異体は、配列番号5,10,15,21、及び/又は25の1つ又は複数における少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。幾つかの実施態様において、変異体は、配列番号5,10,15,21、及び/又は25のうちの1つ又は複数において、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、又は少なくとも10個のアミノ酸置換を含む。ある実施態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。ある実施態様において、アミノ酸置換は、抗体が抗原に結合する能力を実質的に低下させない。例えば、EGFR結合親和性を実質的に低下させない保存的変更(例えば本明細書において提供される保存的置換)が作成され得る。抗EGFR抗体変異体の結合親和性は、以下の実施例に記載の方法を用いて評価することができる。

10

【0085】

保存的置換は、表2の「保存的置換」の見出しの下に示されている。より実質的な変更が、表2の「典型的な置換」の見出しの下に与えられ、アミノ酸側鎖のクラスを参照して以下に更に説明される。アミノ酸置換は対象の抗体に導入され、生成物は、所望の活性、例えば、保持された/改善されたEGFR結合性、減少した免疫原性、又は改善されたADCCもしくはCDCについてスクリーニングされうる。

表2: 保存的置換

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【 0 0 8 6 】

非保存的置換は、これらのクラスのうちのークラスのメンバーを別のクラスのもと交換することを必要とするであろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば本明細書に記載のファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を用いて、簡便に生成することができる。簡潔に言えば、一以上のCDR残基が変異され、変異体抗体は、ファージ上に表示され、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。改変（例えば、置換）は、例えば抗体の親和性を向上させるために、HVRで行うことができる。このような改変は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程で高頻度で変異を受けるコドンにコードされた残基で（例えば、Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)を参照）、及び/又はSDR（a-CDR）で行うことができ、得られた変異体VH又はVLが結合親和性について試験される。二次ライブラリから構築し選択し直すことによる親和性成熟が、例えば、Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)に記載されている。

【 0 0 8 7 】

親和性成熟の幾つかの実施態様において、多様性が、種々の方法（例えば変異性PCR

、鎖シャッフリング又はオリゴヌクレオチド指定突然変異誘発)の何れかにより、成熟のために選択された可変遺伝子に導入される。次に、二次ライブラリーが作製される。次に、前記ライブラリーはスクリーニングされて、所望の親和性を有る任意の抗体変異体を同定する。多様性を導入するもう一つの方法は、幾つかのHVR残基(例えば、一度に4から6残基)がランダム化されたHVR指向のアプローチを含む。抗原結合に關与するHVR残基は、例えばアラニンスキャニング突然変異誘発又はモデリングを用いて特異的に同定することができる。特に、CDR-H3及びCDR-L3が多くの場合標的とされる。

【0088】

ある実施態様において、抗EGFR抗体(又はその抗原結合断片)は、アミノ酸配列N/T/Q-YGVH(配列番号4)を含むCDR-H1;アミノ酸配列Y-N/A/G/D-T/D/N-P/K/E-FTSRF(配列番号9)を含むCDR-H2;及びアミノ酸配列T/D-Y/L-YDY-E/N-FAY(配列番号14)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列;並びにアミノ酸配列I-G/R/S-T/L/P-NIH(配列番号20)を含むCDR-L1;アミノ酸配列KY-A/G-SE-S/T-I-S/R(配列番号24)を含むCDR-L2;及びアミノ酸配列NWPT-T/L/S/A/Y(配列番号30)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。ある実施態様において、抗EGFR抗体(又はその抗原結合断片)は、配列番号1-3からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H1;配列番号5-8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2;及び配列番号10-13からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列;並びに配列番号15-19からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1;配列番号21-23からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L2;及び配列番号25-29からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。本明細書に記載のCDRの配列を以下の表3に示す。

表3

配列番号1	NYGVH	配列番号11	DYYDYEFAY	配列番号21	KYASESIS
配列番号2	QYGVH	配列番号12	TYDYDNFAY	配列番号22	KYGSEISIS
配列番号3	TYGVH	配列番号13	TLYDYEFAY	配列番号23	KYASETIR
配列番号4	N-Q-T-YGVH	配列番号14	T/D-Y/L-YDY-E/N-FAY	配列番号24	KY-A/G-SE-S/T-I-S/R
配列番号5	YNTPFTSRF	配列番号15	IGTNIH	配列番号25	NWPTT
配列番号6	YDDKFTSRF	配列番号16	IRTNIH	配列番号26	NWPTL
配列番号7	YATEFTSRF	配列番号17	IGLNIH	配列番号27	NWPTS
配列番号8	YGNEFTSRF	配列番号18	IGPNIH	配列番号28	NWPTA
配列番号9	Y-N/A/G/D-T/D/N-P/K/E-FTSRF	配列番号19	ISTNIH	配列番号29	NWPTY
配列番号10	TYDYDYEFAY	配列番号20	I-G/R/S-T/L/P-NIH	配列番号30	NWPT-T/L/S/A/Y

【0089】

10

20

30

40

50

ある実施態様において、抗EGFR抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列NYGVH（配列番号1）を含むCDR-H1；アミノ酸配列YNTPTFSRF（配列番号5）を含むCDR-H2及びアミノ酸配列TYDYEFAY（配列番号10）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列IGTNIH（配列番号15）を含むCDR-L1；アミノ酸配列KYASESIS（配列番号21）を含むCDR-L2；及び（3）アミノ酸配列NWPTT（配列番号25）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。

【0090】

ある実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列NYGVH（配列番号1）を含むCDR-H1；アミノ酸配列YNTPTFSRF（配列番号5）を含むCDR-H2及びアミノ酸配列DYDYEFAY（配列番号11）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列IGTNIH（配列番号15）を含むCDR-L1；アミノ酸配列KYASESIS（配列番号21）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列NWPTS（配列番号27）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。

10

【0091】

ある実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列NYGVH（配列番号1）を含むCDR-H1；アミノ酸配列YGNEFTFSRF（配列番号8）を含むCDR-H2及びアミノ酸配列DYDYEFAY（配列番号11）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列IGTNIH（配列番号15）を含むCDR-L1；アミノ酸配列KYASESIS（配列番号21）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列NWPTS（配列番号27）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。

20

【0092】

ある実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列NYGVH（配列番号1）を含むCDR-H1；アミノ酸配列YATEFTFSRF（配列番号7）を含むCDR-H2及びアミノ酸配列DYDYEFAY（配列番号11）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列IGTNIH（配列番号15）を含むCDR-L1；アミノ酸配列KYASESIS（配列番号21）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列NWPTS（配列番号27）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。

30

【0093】

ある実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列NYGVH（配列番号1）を含むCDR-H1；アミノ酸配列YDDKFTFSRF（配列番号6）を含むCDR-H2及びアミノ酸配列DYDYEFAY（配列番号11）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列IGTNIH（配列番号15）を含むCDR-L1；アミノ酸配列KYASESIS（配列番号21）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列NWPTS（配列番号27）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。

【0094】

ある実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列TYGVH（配列番号3）を含むCDR-H1；アミノ酸配列YGNEFTFSRF（配列番号8）を含むCDR-H2及びアミノ酸配列DYDYEFAY（配列番号11）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列IRTNIH（配列番号16）を含むCDR-L1；アミノ酸配列KYGSESIS（配列番号22）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列NWPTS（配列番号27）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。

40

【0095】

ある実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列TYGVH（配列番号3）を含むCDR-H1；アミノ酸配列YGNEFTFSRF（配列番号8）

50

)を含むCDR-H2及びアミノ酸配列DYYDYEFAY(配列番号11)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列;並びにアミノ酸配列ISTNIH(配列番号19)を含むCDR-L1;アミノ酸配列KYGSEESIS(配列番号22)を含むCDR-L2;及びアミノ酸配列NWP TS(配列番号27)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む。

【0096】

ある実施態様において、抗EGFR抗体は、配列番号32-35の何れか1つに記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(V_L)を含む。ある実施態様において、抗EGFR抗体は、配列番号36-39に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。配列番号32-39のアミノ酸配列が以下に提供される。

10

配列番号32

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAPRLLIKYASEESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQNNNWPTSFGGGKVEIKRT

配列番号33

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIRTNIHWYQQKPGQAPRLLIKYGSEESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQNNNWPTSFGGGKVEIKRT

20

配列番号34

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISTNIHWYQQKPGQAPRLLIKYASEESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQNNNWPTSFGGGKVEIKRT

配列番号35

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAPRLLIKYASEESISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQNNNWPTTTFGGGKVEIKRT

30

配列番号36

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFSLT TYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGNTDYGN EFTSRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALDYDYEFAYWGQGTMTVTVSSA

配列番号37

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFSLT NYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGNTDYGN EFTSRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALDYDYEFAYWGQGTMTVTVSSA

40

配列番号38

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFSLT NYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGNTDYATEFTSRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALDYDYEFAYWGQGTMTVTVSSA

配列番号39

EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFSLT NYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPF TSRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALTYDYEFAYWGQGTMTVTVSSA

【0097】

50

ある実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、配列番号32に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号38に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、配列番号32に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号37に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、配列番号33に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号36に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、配列番号34に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号36に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、配列番号35に記載

10

【0098】

重鎖及び軽鎖可変ドメインは、可能な全てのペアワイズの組み合わせで組み合わせ、幾つかの抗EGFR抗体を生成する。

【0099】

ある実施態様において、抗EGFR抗体は、CDR-H2においてN-グリコシル化モチーフを欠いている(「アグリコシル化CDR-H2抗EGFR抗体」)。V_H領域のAsn99におけるN-グリカン又はERBITUX(登録商標)のような治療用抗体の重鎖又は軽鎖可変領域におけるグリコシル化は、改変された機能、免疫原性、又は安定性を

20

【0100】

ある実施態様において、アグリコシル化(aglycosylated)CDR-H2抗EGFR抗体は、アミノ酸配列Y-A/G/D-D/N-K/E-FTSRF(配列番号31)を含むCDR-H2を含む重鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、アグリコシル化(aglycosylated)CDR-H2抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列N/T/Q-YGVH(配列番号4)を含むCDR-H1及びアミノ酸配列T/D-Y/L-YDY-E/N-FAY(配列番号14)を含むCDR-H3を含む重鎖を更に含む。ある実施態様において、アグリコシル化(aglycosylated)CDR-H2抗EGFR抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列I-G/R/S-T/L/P-NIH(配列番号20)を含むCDR-L1;アミノ酸配列KY-A/G-SE-S/T-I-S/R(配列番号24)を含むCDR-L2;及びアミノ酸配列NWPT-T/L/S/A/Y(配列番号30)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を更に含む。上記のCDRの配列が以下の表4に提供される。

30

表4

配列番号 4	N/T/Q-YGVH
配列番号 14	T/D-Y/L-YDY-E/N-FAY
配列番号 20	I-G/R/S-T/L/P-NIH
配列番号 24	KY-A/G-SE-S/T-I-S/R
配列番号 30	NWPT-T/L/S/A/Y
配列番号 31	Y-A/G/D-D/N-K/E-FTSRF

40

【0101】

抗体グリコシル化を分析する方法には、限定されないが、例えばクロマトグラフィー(陽イオン交換クロマトグラフィー(CEX)又は液体クロマトグラフィーなど)、質量分析(エレクトロスプレーイオン化質量分析など)及びキャピラリー電気泳動-ドデシル硫酸ナトリウムが含まれる。そのような方法は、例えば、以下に記載される。Jung et al. (2011) Curr Op Biotechnol. 22(6):858-67; Cummings RD, Etzler ME. Antibodies and

50

Lectins in Glycan Analysis. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 45; Mulloy B, Hart GW, Stanley P. Structural Analysis of Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 47; Leymarie, et al. (2012) Anal Chem. 84(7): 3040-3048; Fernandez (2005) European Biopharmaceutical Review. pp 106 -110; and Raju, T. (2013) Methods Mol Biol. 988: 169-180.

【0102】

ある実施態様において、抗EGFR抗体は、Her2/ERBB2、Her3/ERBB3、又はHer4/ERBB4などのEGFRホモログに対して有しているよりも、EGFRに対する強い結合親和性を有する。通常、抗EGFR抗体は、EGFRに「特異的に結合する」（すなわち、約 1×10^{-7} M以下、好ましくは約 1×10^{-8} M以下、最も好ましくは約 1×10^{-9} M以下の結合親和性(Kd)値を有する)が、EGFRに対するその結合親和性よりも少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い、ERBBファミリーのメンバーに対する結合親和性を有する。EGFRに特異的に結合する抗EGFR抗体は、上で定義した様々な型の抗体の何れでもありうるが、好ましくはヒト化又はヒト抗体である。

10

【0103】

幾つかの実施態様において、非標的タンパク質(Her2/ERBB2、Her3/ERBB3、又はHer4/ERBB4など)に対する抗EGFR抗体の結合の程度は、ELISA、蛍光活性化細胞選別(FACS)分析、又はラジオイムノ沈降(RIA)などの当技術分野で公知の方法によって決定されるように、抗体のEGFRへの結合の約10%未満である。特異的結合は、例えば、一般には結合活性を有さない類似の構造の分子である対照分子の結合と比較した分子の結合を測定することによって測定することができる。例えば、特異的結合は、標的、例えば標識していない過剰な量の標的に類似したコントロール分子との競合により決定することができるこの場合、プローブに対する標識した標的の結合が、標識していない過剰な量の標的により競合的に阻害された場合、特異的結合が示される。本明細書で使用される特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープに対する「特異的結合」又は「に特異的に結合する」又は「に特異的である」といった用語は、例えば、少なくとも約 10^{-4} M、あるいは少なくとも約 10^{-5} M、あるいは少なくとも約 10^{-6} M、あるいは少なくとも約 10^{-7} M、あるいは少なくとも約 10^{-8} M、あるいは少なくとも約 10^{-9} M、あるいは少なくとも約 10^{-10} M、あるいは少なくとも約 10^{-11} M、あるいは少なくとも約 10^{-12} M、又はそれ以上の標的に対するKd有する分子によって示されることができる。一実施態様では、用語「特異的な結合」は、分子が他のいかなるポリペプチド又はポリペプチドエピトープに実質的に結合せずに特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに結合する結合を指す。

20

30

【0104】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)は、腫瘍細胞に対する治療用抗体の作用機序である。ADCCは、免疫系のエフェクター細胞が、膜表面抗原が特異的抗体(例えば、本明細書に記載の抗EGFR抗体など)によって結合されている標的細胞(例えば、がん細胞)を能動的に溶解する細胞媒介性免疫防御である。幾つかの実施態様において、抗EGFR抗体は、例えば、実施例に記載のアッセイによって示されるように、ERBITUX(登録商標)と類似の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)エフェクター機能を示す。例えば、ある実施態様において、本明細書に記載の抗EGFR抗体のADCCエフェクター機能活性は、ERBITUX(登録商標)のADCCエフェクター機能活性の、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%

40

50

、少なくとも約100%、又は100%超（例えば、約105%、約106%、約107%、約108%、約109%、約110%、約111%、約112%、約113%、約114%、約115%、約116%、約117%、約118%、約119%、約120%、約121%、約122%、約123%、約124%、約125%、又は約130%）であり、これらの値の間の任意の範囲を含む。ある実施態様において、抗EGFR抗体は、ERBITUX（登録商標）と類似のFcRIIIaに対する類似の結合親和性を示す。ある実施態様において、FcRIIIaへの結合は、実施例に記載されるように、ELISAによって実証される。例えば、FcRIIIaに対する抗EGFR抗体の結合親和性は、FcRIIIaに対するERBITUX（登録商標）（セツキシマブ）の結合親和性よりも約1%、約5%、約10%、約15%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、又は約100%超高い（例えば、約105%、約106%、約107%、約108%、約109%、約110%、約111%、約112%、約113%、約114%、約115%、約116%、約117%、約118%、約119%、約120%、約121%、約122%、約123%、約124%、約125%、又は125%を超える）。

10

【0105】

ある実施態様において、抗EGFR抗体は、約0.1pMから200pM（0.2nM）の間のKd、例えば、約0.1pM、約0.25pM、約0.5pM、約0.75pM、約1pM、約5pM、約10pM、約20pM、約30pM、約40pM、約50pM、約60pM、約70pM、約80pM、約90pM、約100pM、約110pM、約120pM、約130pM、約140pM、約150pM、約160pM、約170pM、約180pM、約190pM、又は約190pMを超える）（これらの値の間の任意の範囲を含む）でヒトEGFRに結合する。ある実施態様において、EGFRに対する抗EGFR抗体の結合親和性は、EGFRに対するERBITUX（登録商標）（セツキシマブ）の結合親和性よりも、約1%、約5%、約10%、約15%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、又は約100%超高い（例えば、約105%、約110%、約120%又は約130%）。ある実施態様において、EGFRに対する抗EGFRの結合親和性は、ERBITUX（登録商標）（セツキシマブ）とEGFRとの結合親和性よりも、約1.1倍、約1.2倍、約1.3倍、約1.4倍、約1.5倍、約1.6倍、約1.7倍、約1.8倍、約1.9倍、約2倍、約2.25倍、約2.5倍、約2.75倍、約3倍、約3.25倍、約3.5倍、約3.75倍、約4倍、約4.25倍、約4.5倍、約4.75倍、又は約4.75倍超高い（これらの値の間の任意の範囲を含む）。

20

30

【0106】

ある実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体は、ERBITUX（登録商標）と比較して、インビボでの半減期が延長されている。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EGFR抗体のインビボ半減期は、ERBITUX（登録商標）のインビボ半減期よりも短くはない。

40

【0107】

ある実施態様において、本明細書において提供される抗EGFR抗体は、ERBITUX（登録商標）（セツキシマブ）又はそのバイオシミラーのものと同様である薬物動態学的特性を示す。ある実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体は、ERBITUX（登録商標）（セツキシマブ）又はそのバイオシミラーの血清濃度 - 時間プロファイルの約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、又は95%超（例えば、約96%、約97%、約98%、約99%、又は約99%超）（これらの値の間の任意の範囲を含む）であるAUC（曲線下面積）を示す。

【0108】

50

ある実施態様において、抗体は、ヒトIgG、例えばヒトIgG1又はヒトIgG4のFc配列を含む。ある実施態様において、Fc配列は、しばしばFc受容体(FcR)への結合に関連する抗体依存性細胞傷害(ADCC)エフェクター機能を欠如するように改変又は変化されている。エフェクター機能を改変し得るFc配列に対する変化又は突然変異の多くの例が存在する。例えば、国際公開第00/42072号及びShields et al. J Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)は、FcRへの結合が改善又は減少した抗体変異体が記載されている。これらの出版物の内容は出典明示により本明細書に援用される。抗体は、Fab、Fab'、F(ab)'₂、一本鎖Fv(scFv)、Fv断片；ダイアボディ及び線状抗体の形態であり得る。また、抗体は、EGFRに結合するが、しかしまた一以上の他の標的に結合し、それらの機能を阻害する多特異的抗体であり得る。抗体は、治療剤(例えば、細胞傷害性剤、放射性同位元素及び化学療法剤)又は又は患者試料中若しくはインビボで画像化(例えば、放射性同位元素、蛍光色素及び酵素)によりEGFRを検出するための標識にコンジュゲートさせることができる。他の修飾には、本明細書で提供される抗EGFR抗体への毒素のコンジュゲーションが含まれる。

10

【0109】

抗EGFR抗体をコードする核酸分子、本明細書に記載のCDR及び/又は重鎖可変ドメイン及び/又は軽鎖可変ドメインをコードする核酸分子を含む発現ベクター並びに核酸分子を含む細胞もまた意図される。これらの抗体は、本明細書中に記載される療法において、かつ患者試料中のEGFRタンパク質を(例えば、FACS、免疫組織化学(IHC)、ELISAアッセイを介して)検出するために使用することができる。

20

【0110】

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、例えば、Kohler and Milstein、Nature、256:495(1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を用いて調製することができ、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)若しくは以下の実施例において本明細書に記載の方法により作製することができる。ハイブリドーマ法においては、ハムスター、マウス、又は他の適切な宿主動物は、免疫剤に特異的に結合するであろう抗体を産生する、又は産生することができるリンパ球を誘発するために、免疫剤で典型的に免疫される。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。

30

【0111】

免疫剤は、典型的には、目的のタンパク質のポリペプチド若しくは融合タンパク質又はタンパク質を含む組成物を含む。一般には、ヒト起源の細胞が所望される場合には、末梢血リンパ球(「PBL」)が使用され、又は非ヒト哺乳動物供給源が所望される場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いてリンパ球を不死化細胞株と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成させる。Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシ及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウス骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、融合されていない不死化細胞の増殖又は生存を阻害する1つ又は複数の物質を好ましくは含有する好適な培地で培養することができる。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチングアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPR T)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

40

【0112】

好適な不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、HAT培地などの培地に対して感受性である細胞である。より好適な不死化細胞株は、例えば、カリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Center及びバージニア州マナッサスのアメリカンタイプカルチャーコレクションから得ることができるマウス骨髄腫株で

50

ある。ヒト骨髄腫及びマウス - ヒトヘテロ骨髄腫細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている。Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al. MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63.

【 0 1 1 3 】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイすることができる。ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ (R I A) 又は酵素結合免疫吸着検定 (E L I S A) によって測定することができる。そのような技術及びアッセイは、当技術分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980) のスキャッチャード分析によって決定することができる。

10

【 0 1 1 4 】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、限界希釈法によってクローンをサブクロニングし、標準的な方法で増殖させることができる。Goding, supra. この目的に対して好適な培地は、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地及び R P M I - 1 6 4 0 培地を含む。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳類の腹水としてインビボで増殖させることができる。

【 0 1 1 5 】

サブクロンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテイン A - セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティクロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培養培地又は腹水から単離又は精製することができる

20

【 0 1 1 6 】

モノクローナル抗体は、米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号に記載されているような組換え DNA 法によっても作製することができる。本明細書で提供されるモノクローナル抗体をコードする DNA は、(例えば、ネズミ抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって) 従来の手順を用いて容易に単離及び配列決定することができる。本明細書で提供されるハイブリドーマ細胞は、そのような DNA の好ましい供給源としての役割を果たす。ひとたび単離されたならば、DNA を発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外ではイムノグロブリンタンパク質を産生しない、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、又は骨髄腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。DNA は、また例えばヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を相同的マウス配列に代えて置換することにより (米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号 ; Morrison et al., 上掲)、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって、修飾することができる。そのような非免疫グロブリンポリペプチドは、本明細書で提供される抗体の定常ドメインと置換することができ、又はキメラ二価抗体を作製するために本明細書で提供される抗体の 1 つの抗原結合部位の可変ドメインと置換することができる。

30

40

【 0 1 1 7 】

ある実施態様において、本発明により提供される抗 E G F R 抗体は、安定な哺乳動物細胞株によって発現される。ある実施態様において、本発明により提供される抗 E G F R 抗体は、安定な哺乳動物細胞株から、約 2 . 0 グラム / リットル、約 2 . 5 グラム / リットル、約 3 . 0 グラム / リットル、約 3 . 5 グラム / リットル、約 4 . 0 グラム / リットル、約 4 . 5 グラム / リットル、約 5 . 0 グラム / リットル、約 5 . 5 グラム / リットル、約 6 グラム / リットル、約 6 . 5 グラム / リットル、約 7 . 0 グラム / リットル、又は約 7 . 0 グラム / リットル超の力価 (t i t e r) (これらの値の間の任意の範囲を含む) で発現される。ある実施態様において、本発明により提供される抗 E G F R 抗体が発現さ

50

れる安定な哺乳動物細胞株は、CHO細胞株である。

【0118】

ある実施態様において、抗体は一価抗体である。一価抗体を調製するための方法は、当技術分野で公知である。例えば、1つの方法は、免疫グロブリン軽鎖及び修飾された重鎖の組換え発現を含む。重鎖は、重鎖の架橋を防止するために、Fc領域の任意の点で一般的に切断される。あるいは、関連するシステイン残基を別のアミノ酸残基で置換するか、又は架橋を防止するために欠失させる。

【0119】

インビトロ法はまた、一価抗体を調製するために適している。抗体断片、特にFab断片を産生するための抗体の消化は、限定されないが、当該分野で公知の技術を用いて達成され得る。

【0120】

ヒト及びヒト化抗体

抗体は、ヒト化抗体又はヒト抗体であり得る。非ヒト（例えばマウス）抗体のヒト化型とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、又はその断片（例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を典型的に含むものである。ヒト化抗体はレシピエントのCDR由来の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）のCDR由来の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含むことができる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは殆ど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは殆ど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含むことができる。ヒト化抗体は、好ましくは、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれも含むであろう。Jones et al. *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)。

【0121】

一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。一実施態様によれば、ヒト化は、Winter及び共同研究者（Jones et al. *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al. *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al. *Science*, 239: 1534-1536 (1988)）の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより本質的に実施することができる。従って、このような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換された抗体（米国特許第4816567号）である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が、げっ歯類抗体の類似部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。

【0122】

ヒト化の代わりに、ヒト抗体を生成することができる。例えば、内在性免疫グロブリン産生の非存在下で、免疫化により、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生することが可能なトランスジェニック動物（例えば、マウス）を生み出すことが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域（JH）遺伝子のホモ接合型欠失は、内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような生殖系列突然変異体マウスへのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原チャレンジ時にヒト抗体の産生をもたらすであろう。例えば、Jakobovits et al. *PNAS USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggem

10

20

30

40

50

ann et al. *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); 米国特許第 5 5 4 5 8 0 6 号、第 5 5 6 9 8 2 5 号、第 5 5 9 1 6 6 9 号; 第 5 5 4 5 8 0 7 号; 及び国際公開第 9 7 / 1 7 8 5 2 号を参照。あるいは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することによって、ヒト抗体を作製することができる。チャレンジすると、遺伝子再構成、アセンブリ、及び抗体レパートリーを含む、ヒトの全ての点で見られるものに非常に類似したヒト抗体産生が観察される。このアプローチは、例えば、米国特許第 5 5 4 5 8 0 7 号; 第 5 5 4 5 8 0 6 号; 第 5 5 6 9 8 2 5 号; 第 5 6 2 5 1 2 6 号; 第 5 6 3 3 4 2 5 号; 及び第 5 6 6 1 0 1 6 号、並びに Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fish wild et al. *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995) に記載されている。

【 0 1 2 3 】

あるいは、ファージディスプレイ技術 (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 [1990]) を使用して、免疫されていないドナー由来の免疫グロブリン可変 (V) ドメイン遺伝子レパートリーからヒト抗体及び抗体断片をインビトロで産生させることができる。この技術の一実施態様によれば、抗体 V ドメイン配列は、繊維状バクテリオファージ、例えば M 1 3 又は f d のメジャー又はマイナーコートタンパク質遺伝子の何れかにインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として提示される。ファージディスプレイは、例えば以下の実施例の項で説明するように、又は例えば、Johnson, Kevin S. 及び Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993) に総説されたように、様々なフォーマットで実施することができる。V 遺伝子セグメントの幾つかの供給源がファージディスプレイのために使用可能である。Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) は、免疫マウスの脾臓に由来する V 遺伝子の小さなランダムコンビナトリアルライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。免疫されていないヒトドナー由来の V 遺伝子のレパートリーを構築す、抗原 (自己抗原を含む) の異なるアレイに対する抗体を、Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)、又は Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993) に記載の技術に本質的に従って単離することができる。また、米国特許第 5 5 6 5 3 3 2 号及び第 5 5 7 3 9 0 5 号を参照のこと。

【 0 1 2 4 】

上で検討した通り、ヒト抗体はインビトロで活性化された B 細胞によって産生されうる (米国特許第 5 5 6 7 6 1 0 号及び第 5 2 2 9 2 7 5 号を参照のこと)。

【 0 1 2 5 】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーを含む、当技術分野で公知の様々な技術を用いて産生することができる。Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)。Cole ら、及び Boerner らの技法は、ヒトモノクローナル抗体の調製にも利用可能である。Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) 及び Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)。

【 0 1 2 6 】

多重特異性抗体

多重特異性抗体は、2 つ以上の異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル、好ましくはヒト又はヒト化抗体である (例えば、二重特異性抗体は少なくとも 2 つの抗原に対する結合特異性を有する)。例えば、結合特異性の 1 つは a 5 - 1 タンパク質のためのものであり、他方は任意の他の抗原のためのものであり得る。1 つの好ましい実施態様によれば、他の抗原は細胞表面タンパク質又は受容体又は受容体サブユニットである。例えば、細胞表面タンパク質は、ナチュラルキラー (NK) 細胞受容体であり得る。従って、一実施態様によれば、本発明の二重特異性抗体は、EGFR 及び例えば第 2 の細胞表

10

20

30

40

50

面受容体の両方に結合することができる。

【0127】

二重特異性抗体を作製するための適切な方法は、当技術分野において周知である。例えば、二重特異性抗体の組換え産生は、2つの重鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づいている。Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな分類のために、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10種の異なる抗体分子の潜在的な混合物を生成し、そのうちの1つだけが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。類似の手順が国際公開第93/08829号、及びTraunecker et al., *EMBO*, 10: 3655-3659 (1991)に開示されている。

10

【0128】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合することができる。融合は、好ましくは、ヒンジの少なくとも一部、CH2及びCH3領域を含むイムノグロブリン重鎖定常ドメインとである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合体、及び所望される場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時導入される。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986)を参照のこと。

【0129】

組換え細胞培養物から二重特異性抗体断片を直接作製及び単離するための種々の技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。Fos及びJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なる抗体のFab'部分に結合させた。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、次いで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成した。この方法は、抗体ホモ二量体の産生のために利用することもできる。Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)によって記載された「ダイアボディー」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替の機構を提供している。断片は、同じ鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーによってVLに連結されたVHを含む。従って、一方の断片のVH及びVLドメインは、別の断片の相補的なVL及びVHドメインと強制的に対を形成し、それによって2つの抗原結合部位を形成する。一本鎖Fv(sFv)二量体の使用によって二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略も報告されている。Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)を参照。

20

30

【0130】

3価以上の抗体が考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991)。

【0131】

ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4676980号]及びHIV感染の治療のために提案されている。国際公開第91/00360号; 国際公開第92/200373号; EP03089。この抗体は、架橋剤を含むものを含む合成タンパク質化学における既知の方法を用いてインビトロで調製することができると考えられる。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を用いて、又はチオエーテル結合を形成することによって構築することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミダート、及び例えば米国特許第4676980号に開示されたものが含まれる。

40

【0132】

エフェクター機能工学

50

例えばがんを治療する際の抗体の有効性を高めるために、エフェクター機能に関して本明細書で提供される抗体を改変することが望ましい場合がある。例えば、例えば、システイン残基をFc領域に導入することができ、それによってこの領域内に鎖間ジスルフィド結合を形成させることができる。このようにして生成されたホモ二量体抗体は、改善された内在化能力及び/又は補体媒介性細胞死滅並びに抗体依存性細胞傷害(ADCC)を有することができる。Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992)及びShapes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)を参照。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体は、Wolff et al., Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993)に記載されているようなヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製することもできる。あるいは、二重のFc領域を有し、それによって亢進された補体溶解及びADCC能を有するように抗体を操作

10

【0133】

Fc領域の配列の変異又は改変は、FcR結合(例えば、FcR、FcRn)を改善するために行うことができる。一実施態様によれば、本発明の抗体は、天然型IgG又は親抗体と比較して、ADCC、CDC、及び改善されたFcRn結合からなる群から選択される少なくとも1つの変化したエフェクター機能を有する。幾つかの有用な特異的変異の例は、例えば、Shields, RL et al. (2001) JBC 276(6)6591-6604; Presta, L.G., (2002) Biochemical Society Transactions 30(4):487-490; 及び国際公開第00/42072号に記載される。

20

【0134】

一実施態様によれば、Fc受容体変異は、Fc領域の38、239、246、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438又は439からなる群から選択される少なくとも1つの位置での置換であり、ここでFc領域の残基の番号付けはEU番号付けシステムに従う。幾つかの実施態様において、Fc受容体変異はD265A置換である。幾つかの実施態様において、Fc受容体変異はN297A置換である。更なる適切な変異は、米国特許第7,332,581号に記載されている。

30

【0135】

ある実施態様において、本明細書において提供される抗EGFR抗体は、アフコシル化される(afucosylated)(すなわち、「アフコシル化抗EGFR抗体」又は「非アフコシル化抗EGFR抗体」)。「アフコシル化抗体」又は「非アフコシル化抗体」とは、Asn297でのFc領域のグリコシル化パターンが改変され、フコース残基の量が低下しているIgG1又はIgG3アイソタイプの抗体を指す。ヒトIgG1又はIgG3のグリコシル化は、コアアフコシル化された二分岐複合オリゴ糖のグリコシル化が最大2つのGal残基で終結している場合、Asn297で生じる。これらの構造は、末端Gal残基の量に応じて、G0、G1(a1,6又はa1,3)、又はG2グリカン残基と命名される(Raju, T.S., Bioprocess Int. 1(2003) 44-53)。抗体のFc部分のCHO型グリコシル化は、例えば、Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14(1997) 201-207により記載されている。非糖修飾されたCHO宿主細胞で組換えにより発現している抗体は、通常、少なくとも85%の量で、Asn297でアフコシル化されている。ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、低下したレベルのフコース残基を有する。ある実施態様において、本明細書において提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、そのグリコシル化パターンにおいてフコースを有しない。抗体における典型的なグリコシル化残基の位置は、EU番号付けシステムに従って位置297のアスパラギ

40

50

ンであることが一般に知られている(「Asn297」)。

【0136】

従って、ある実施態様において、本明細書において提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、そのグリコシル化パターンにおいてフコース残基の減少したレベルを有するか又はフコースを有しないように、改変されるか又はさもなければ変化したFc配列を含む。ある実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体は、EU番号付けシステムに従って位置297に改変を有するFc配列を含む。

【0137】

ある実施態様において、本明細書において提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、低又はアフコシル化グリカンを産生することができる宿主細胞によって産生される。アフコシル化抗体を産生することができる安定な哺乳動物宿主細胞株が確立されており、例えば、Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng.* 87, 614-622; Mori et al. (2004) *Biotechnol Bioeng.* 88, 901-908; Kanda et al (2006) *Biotechnol Bioeng.* 94, 680-688; Kanda (2007) *J Biotechnol.* 130, 300-310; Imai-Nishiya (2007) *BMC Biotechnol* 7, 84; Yamane-Ohnuki and Satoh (2009) *mAbs* 1, 230-236に記載される。ある実施態様において、本明細書において提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、b(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性を発現するように操作された糖修飾宿主細胞において発現される。ある実施態様において、本明細書において提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性が減少又は消失した糖修飾宿主細胞において発現される。糖修飾された宿主細胞の生産に関する詳細については、例えば、米国特許第6,946,292号を参照されたい。抗体のフコシル化の量は、例えば、発酵条件(例えば発酵時間)によって又はフコシル化した量が異なる少なくとも二つの抗体の組み合わせによっての何れかにより、予め決定することができる。このようなアフコシル化抗体及びそれぞれの糖操作方法は、国際公開第2005/044859号、国際公開第2004/065540号、国際公開第2007/031875号、Umana et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180、国際公開第99/154342号、国際公開第2005/018572号、国際公開第2006/116260号、国際公開第2006/114700号、国際公開第2005/011735号、国際公開第2005/027966号、国際公開第97/028267号、米国特許出願公開第2006/0134709号、米国特許出願公開第2005/0054048号、米国特許出願公開第2005/0152894号、国際公開第2003/035835号、国際公開第2000/061739号に記載されている。これらの糖操作された抗体は、増加したADCCを有する。本発明によるアフコシル化抗体を産生する他の糖鎖工学方法は、例えば、Niwa, R. et al., *J. Immunol. Methods* 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T., et al., *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 3466-3473; 国際公開第03/055993号又は米国特許出願公開第2005/0249722号に記載される。

【0138】

ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、インビトロ技術を用いて産生される。ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、化学的に合成される。(例えば、単球走化性タンパク質3(MCP-3)の非フコシル化形態の化学合成を記載しているYamamoto et al. (2008) *JACS* 130, 501-510を参照されたい)。ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、IgG上のフコース残基を除去するためにフコシダーゼを使用することによって産生される。(例えば、Yazawa et al. (1986) *Biochem Biophys Res Commun.* 136, 563-569を参照)。

【0139】

ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、例えば実施例に記載のアッセイによって示されるように、ERBITUX(登録商標)と比較して改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を有する。例えば、ある実施態様において、本明細書に記載の抗EGFR抗体のADCCエフェクター機能活性は、ER

10

20

30

40

50

B I T U X (登録商標) の A D C C エフェクター機能活性の、少なくとも約 1 4 0 %、少なくとも約 1 5 0 %、少なくとも約 1 6 0 %、少なくとも約 1 7 0 %、少なくとも約 1 8 0 %、少なくとも約 1 9 0 %、少なくとも約 1 9 0 %、少なくとも約 2 0 0 %、少なくとも約 2 1 0 %、少なくとも約 2 2 0 %、少なくとも約 2 3 0 %、少なくとも約 2 4 0 %、少なくとも約 2 5 0 %、少なくとも約 2 6 0 %、少なくとも約 2 7 0 %、少なくとも約 2 8 0 %、少なくとも約 2 9 0 %、又は少なくとも約 3 0 0 % であり、これらの値の間の任意の範囲を含む。ある実施態様において、本明細書に記載の抗 E G F R 抗体の A D C C エフェクター機能活性は、E R B I T U X (登録商標) の A D C C エフェクター機能活性の約 3 0 0 % 超であり、E R B I T U X (登録商標) の A D C C エフェクター機能活性の少なくとも約 3 5 0 %、少なくとも約 3 6 0 %、少なくとも約 3 7 0 %、少なくとも約 3 8 0 %、少なくとも約 3 9 0 %、少なくとも約 4 0 0 %、少なくとも約 4 1 0 %、少なくとも約 4 2 0 %、少なくとも約 4 3 0 %、少なくとも約 4 4 0 %、少なくとも約 4 5 0 %、少なくとも約 4 6 0 %、少なくとも約 4 7 0 %、少なくとも約 4 8 0 %、少なくとも約 4 9 0 %、少なくとも約 5 0 0 %、少なくとも約 5 1 0 %、少なくとも約 5 2 0 %、少なくとも約 5 3 0 %、少なくとも約 5 4 0 %、少なくとも約 5 5 0 %、少なくとも約 5 6 0 %、少なくとも約 5 7 0 %、少なくとも約 5 8 0 %、少なくとも約 5 9 0 %、又は少なくとも約 6 0 0 0 % を含み、これらの値の間の任意の範囲を含む。

【 0 1 4 0 】

ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 E G F R 抗体は、野生型 K R A S を有する被験体において、E R B I T U X (登録商標) よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) エフェクター機能を示す。ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 E G F R 抗体は、K R A S 変異を有する被験体において、E R B I T U X (登録商標) よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) エフェクター機能を示す。ある実施態様において、K R A S 変異は、K R A S 遺伝子のコドン 1 2 における変異である。ある実施態様において、K R A S 変異は、K R A S 遺伝子のエクソン 2 におけるコドン 1 3 の変異である。ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 E G F R 抗体は、K R A S ^{G 1 3 D} 変異を有する被験体において、E R B I T U X (登録商標) よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) エフェクター機能を示す。ある実施態様において、K R A S 変異は、K R A S 遺伝子のコドン 6 1 における変異である。ある実施態様において、K R A S 変異は、K R A S 遺伝子のコドン 1 1 7 における変異である。ある実施態様において、K R A S 変異は、K R A S 遺伝子のコドン 1 4 6 における変異である。

【 0 1 4 1 】

ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 E G F R 抗体は、野生型 B R A F を有する被験体において、E R B I T U X (登録商標) よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) エフェクター機能を示す。ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 E G F R 抗体は、B R A F 変異を有する被験体において、E R B I T U X (登録商標) よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) エフェクター機能を示す。ある実施態様において、B R A F 変異は、B R A F 遺伝子のコドン 6 0 0 における変異である。ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 E G F R 抗体は、B R A F ^{V 6 0 0 E} 変異を有する被験体において、E R B I T U X (登録商標) よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) エフェクター機能を示す。ある実施態様において、B R A F 変異は、B R A F 遺伝子のコドン G 4 6 6 における変異である。ある実施態様において、B R A F 変異は、B R A F 遺伝子のコドン G 4 6 9 における変異である。ある実施態様において、B R A F 変異は、B R A F 遺伝子のコドン L 5 9 7 における変異である。

【 0 1 4 2 】

ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 E G F R 抗体は、野生型 P T E N を有する被験体において、E R B I T U X (登録商標) よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) エフェクター機能を示す。ある実施態様において、

本明細書で提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、PTEN変異を有する被験体において、ERBITUX（登録商標）よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）エフェクター機能を示す。ある実施態様において、PTEN変異は、PTEN遺伝子のエクソン3における変異である。ある実施態様において、PTEN変異は、PTEN遺伝子のエクソン4における変異である。ある実施態様において、PTEN変異は、PTEN遺伝子のエクソン5における変異である。ある実施態様において、PTEN変異は、PTEN遺伝子のエクソン6における変異である。ある実施態様において、PTEN変異は、PTEN遺伝子のエクソン7における変異である。ある実施態様において、PTEN変異は、PTEN遺伝子のエクソン8における変異である。ある実施態様において、PTEN変異は、PTEN遺伝子のコドン233における変異である。

10

【0143】

ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、野生型NRASを有する被験体において、ERBITUX（登録商標）よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）エフェクター機能を示す。ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、NRAS変異を有する被験体において、ERBITUX（登録商標）よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）エフェクター機能を示す。ある実施態様において、NRAS変異は、NRAS遺伝子のコドン12における変異である。ある実施態様において、NRAS変異は、NRAS遺伝子のコドン13における変異である。ある実施態様において、NRAS変異は、NRAS遺伝子のコドン61における変異である。

20

【0144】

ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、野生型PIK3CAを有する被験体において、ERBITUX（登録商標）よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）エフェクター機能を示す。ある実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗EGFR抗体は、PIK3CA変異を有する被験体において、ERBITUX（登録商標）よりも改善された抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）エフェクター機能を示す。ある実施態様において、PIK3CA変異は、PIK3CA遺伝子のエクソン20における変異である。

【0145】

ある実施態様において、本明細書に記載のアフコシル化抗EGFR抗体を投与される被験体は、アービタックス又はそのバイオシミラーに耐性がある。ある実施態様において、本明細書に記載のアフコシル化抗EGFR抗体を投与される被験体は、アービタックス又はそのバイオシミラーで進行している。ある実施態様において、本明細書に記載のアフコシル化抗EGFR抗体を投与される被験体は、アービタックス又はそのバイオシミラーに対して難治性である。

30

【0146】

イムノコンジュゲート

本発明はまた、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、又はその断片）などの細胞傷害性剤、あるいは放射性同位体（すなわち、放射性コンジュゲート）にコンジュゲートした抗体を含むイムノコンジュゲートに関する。

40

【0147】

使用可能な酵素的に活性な毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖（シュドモナス・アエルギノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン（*modiccina*）A鎖、アルファ-サルシン（*sarcina*）、アレウライツ・フォルディイ（*Aleurites fordii*）プロテイン、ジアンチンタンパク質、フィトラッカ・アメリカナ（*Phytolacca americana*）プロテイン（PAPI、PAPII及びPAP-S）、モモルディカ・キャランティア（*momordica charantia*）阻害剤、クルシン（*curcina*）、クロチン、サパオナリア（*saponaaria*）オフィシナリス阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン（*mitogellin*

50

)、レストリクトシン (r e s t r i c t o c i n)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテシン (t r i c o t h e c e n e s) が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。その例は、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、及び ^{186}Re を含む。このようなイムノコンジュゲートの生成に有用な例示的な化学療法剤としては、本明細書の他の箇所に記載されているものが挙げられる。

【0148】

ある実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体（例えば、アグリコシル化CDR-H2抗EGFR抗体、アフコシル化抗EGFR抗体、又はアフコシル化されているアグリコシル化CDR-H2抗EGFR抗体）は、メイタンシノイド、メイタンシノイド、又はカリケアマイシンにコンジュゲートされる。ある実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体（例えば、アグリコシル化CDR-H2抗EGFR抗体及び/又はアフコシル化抗EGFR抗体）は、メイタンシノイドDM1にコンジュゲートされる。

10

【0149】

抗体及び細胞傷害性剤の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPD P)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビスジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science, 238: 1098(1987)に記載されているように調製することができる。炭素14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)は、抗体への放射性ヌクレオチドのコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である。国際公開第94/11026号を参照。

20

【0150】

別の実施態様では、腫瘍プレターゲットングに利用するために、抗体を「受容体」(例えば、ストレプトアビジン)に結合させることができ、ここでは抗体-受容体コンジュゲートを患者に投与し、続いてクリアリング剤を用いて循環から未結合コンジュゲートを除去し、次いで細胞傷害性剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートした「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

30

【0151】

共有結合性修飾

抗EGFR抗体及びその断片の共有結合性修飾は、本発明の範囲内に含まれる。共有結合性修飾の1つのタイプは、ポリペプチドの標的化アミノ酸残基を、ポリペプチドの選択された側鎖又はN-又はC-末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることを含む。二官能性薬剤による誘導体化は、例えば、抗体を精製するための方法における使用のためにポリペプチドを水不溶性支持マトリックス又は表面に架橋するのに有用であり、逆もまた同様である。一般に用いられる架橋剤は、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジル-プロピオナート)のようなジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタンのような二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダートなどの薬剤が挙げられる。

40

【0152】

他の修飾は、グルタミニル残基及びアスパラギニル残基の、それぞれ対応するグルタミ

50

ル残基及びアスパルチル残基への脱アミド化、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化 [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、並びに任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0153】

ポリペプチドの共有結合性修飾の別のタイプは、ポリペプチドを種々の非タンパク質様ポリマーの一つ、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4640835号；第4496689号；第4301144号；第4670417号；第4791192号又は第4179337号に記載された方法で結合させることを含む。

10

【0154】

キメラ分子

本発明の抗EGFR抗体（又はその断片）は、別の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列（例えば、イムノアドヘシン又はペプチボディ）に融合されたポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法において有利であれば修飾することもできる。

【0155】

一実施態様において、このようなキメラ分子は、例えば、ヒト免疫不全ウイルスTATタンパク質のタンパク質導入ドメインを用いて、ポリペプチドと、そのポリペプチドを様々な組織へ、より具体的には脳血液関門を越えて送達するための標的とするタンパク質導入ドメインとの融合を含む (Schwarze et al., 1999, *Science* 285: 1569-72)。

20

【0156】

別の実施態様において、そのようなキメラ分子は、ポリペプチドと、抗タグ抗体が選択的に結合することができるエピトープを提示するタグポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般に、ポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に配置される。そのようなエピトープタグが付加された形態のポリペプチドの存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する別のタイプの親和性マトリックスを用いたアフィニティー精製によってポリペプチドを容易に精製することを可能にする。様々なタグポリペプチド及びそれらのそれぞれの抗体は、当技術分野で公知である。例としては、ポリヒスチジン（ポリHis）又はポリヒスチジングリシン（ポリHis-gly）タグ；インフルエンザHAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]；並びに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグ及びその抗体 [Pabor sky et al., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)] が挙げられる。他のタグポリペプチドは、Fla g - ペプチド [Hopp et al., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)]；- チュープリンエピトープペプチド [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)] を含む。

30

40

【0157】

代替的な実施態様において、キメラ分子は、ポリペプチドと免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（例えば、「イムノアドヘシン」）について、このような融合は、IgG分子のFc領域に対するものであり得る。本発明のIg融合物は、Ig分子内の少なくとも1つの可変領域の代わりに、おおよそ又は僅かにヒトの残基94-243、残基33-53又は残基33-52を含むポリペプチドを含む。特に好ましい実施態様において、免疫グロブリン融合体は、IgG1分子の、ヒンジ、CH2及びCH3の領域、又はヒンジ、CH1、CH2、CH3の領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日に発行された米国

50

特許第 5 4 2 8 1 3 0 号も参照のこと。

【 0 1 5 8 】

免疫リポソーム

本明細書中に開示される抗体はまた、免疫リポソームとして処方され得る。抗体を含むリポソームは、Epstein et al., PNAS USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., PNAS USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第 4 4 8 5 0 4 5 号及び同第 4 5 4 4 5 4 5 号に記載されるような当該分野で公知の方法によって調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第 5 0 1 3 5 5 6 号に開示されている。

【 0 1 5 9 】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及び P E G 誘導体化ホスファチジルエタノールアミン (P E G - P E) を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成することができる。リポソームは、所定の細孔サイズのフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体の F a b ' 断片は、Martinet al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームにコンジュゲートすることができる。抗腫瘍剤、増殖阻害剤、又は化学療法剤 (例えば、ドキソルビシン) も任意でリポソーム内に含まれる。Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989)を参照。

【 0 1 6 0 】

抗上皮増殖因子受容体 (E G F R) 抗体を用いた治療

本明細書で提供される抗 E G F R 抗体 (又はその断片) 及び / 又は組成物は、例えば、がん (頭頸部がん、咽喉がん、結腸直腸がん、肺がんなど) を含む異常な E G F R 活性に
20
関与する疾患及び障害を処置するために被験体 (例えば、ヒトなどの哺乳動物) に投与することができる。ある実施態様において、本発明は、被験体におけるがん (例えば、頭頸部がん、肺がん又は結腸直腸がんなど) の処置のための医薬の製造における使用のための、本明細書に記載の抗 E G F R 抗体 (又はその断片) を提供する。ある実施態様において、本発明は、被験体におけるがん (例えば、頭頸部がん、咽喉がん、結腸直腸がん、肺がんなど) の処置における使用のための、本明細書に記載の抗 E G F R 抗体 (又はその断片) を提供する。ある実施態様において、本発明は、被験体におけるがん (例えば、頭頸部がん、咽喉がん、結腸直腸がん、肺がんなど) の処置における使用のための、本明細書に
30
おいて提供される抗 E G F R 抗体 (又はその断片) を含む薬学的組成物を提供する。ある実施態様において、処置される被験体は哺乳動物 (例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ラット、マウス、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコなど) である。ある実施態様において、被験体はヒトである。ある実施態様において、被験体は、臨床患者、臨床試験ボランティア、実験動物などである。ある実施態様において、被験体は、がん (頭頸部がん、咽喉がん、結腸直腸がん、肺がんなど) を有するか、又は有するリスクがあると疑われているか、或いはがん又は異常な E G F R 発現若しくは活性を有する他の疾患と診断されている。幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗 E G F R 抗体が投与される被験体は、K R A S について野生型である。ある実施態様において、本明細書に記載の抗 E G F R 抗体が投与される被験体は、K R A S ^{G 1 3 D} 変異を有する。幾つかの実施態様において、本明細書に記載の抗 E G F R 抗体が投与される被験体は、B R A F について野生型
40
である。ある実施態様において、本明細書に記載の抗 E G F R 抗体が投与される被験体は、B R A F ^{V 6 0 0 E} 変異を有する。ある実施態様において、本明細書に記載の抗 E G F R 抗体を投与される被験体は、アービタックス又はそのバイオシミラーに耐性がある。ある実施態様において、本明細書に記載の抗 E G F R 抗体を投与される被験体は、アービタックス又はそのバイオシミラーで進行している。ある実施態様において、本明細書に記載の抗 E G F R 抗体を投与される被験体は、アービタックス又はそのバイオシミラーに対して難治性である。

【 0 1 6 1 】

ある実施態様において、本明細書に記載の D M 1 コンジュゲート型抗 E G F R 抗体は、野生型 K R A S を有する被験体に投与される。ある実施態様において、本明細書に記載の

10

20

30

40

50

DM1 コンジュゲート型抗EGFR抗体は、KRAS^{G13D}変異を有するがん患者に投与される。ある実施態様において、本明細書に記載のDM1 コンジュゲート型抗EGFR抗体は、野生型BRAFを有するがん患者に投与される。ある実施態様において、本明細書に記載のDM1 コンジュゲート型抗EGFR抗体は、BRAF^{V600E}変異を有する被験体に投与される。ある実施態様において、本明細書に記載のDM1 コンジュゲート型抗EGFR抗体は、アービタックス又はそのバイオシミラーに耐性がある被験体に投与される。ある実施態様において、本明細書に記載のDM1 コンジュゲート型抗EGFR抗体は、アービタックス又はそのバイオシミラーで進行している。ある実施態様において、本明細書に記載のDM1 コンジュゲート型抗EGFR抗体は、アービタックス又はそのバイオシミラーに対して難治性である被験体に投与される。

10

【0162】

異常なEGFR活性を示すがん（頭頸部がん、咽喉がん、結腸直腸がん、肺がんなど）又は他の疾患のための多くの診断方法及びそれらの疾患の臨床的描写は、当技術分野で公知である。そのような方法としては、限定されないが、例えば、免疫組織化学、PCR、蛍光インサイツハイブリダイゼーション（FISH）が挙げられる。異常なEGFR活性又は発現の診断方法に関する更なる詳細は、例えば、Gupta et al. (2009) *Mod Pathol.* 22(1): 128-133; Lopez-Rios et al. (2013) *J Clin Pathol.* 66(5): 381-385; Ellison et al. (2013) *J Clin Pathol* 66(2): 79-89; 及びGuha et al. (2013) *PLoS ONE* 8(6): e67782に記載される。

【0163】

20

投与は、例えば、静脈内、筋肉内、又は皮下などの任意の適切な経路によって行うことができる。幾つかの実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体（又はその断片）及び/又は組成物は、第2、第3又は第4の薬剤（例えば、抗腫瘍剤、増殖阻害剤、細胞傷害性剤、又は化学療法剤を含む）を用いて、異常なEGFR活性に関与する疾患又は障害を治療する。そのような薬剤には、例えば、ドセタキセル、ゲフィチニブ、FOLFIRI（イリノテカン、5-フルオロウラシル及びロイコポリン）、イリノテカン、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ペバシズマブ（抗VEGF抗体）、FOLFEX-4（注入フルオロウラシル、ロイコポリン及びオキサリプラチン、アフアチニブ、ゲムシタピン、カペシタピン、ペニトレキシド、チバンチニブ、エベロリムス、CpG-ODN、ラパマイシン、レナリドマイド、ベムラフェニブ、エンドスタチン、ラパチニブ、PX-866、Imprime PGG及びirrotinibを含む。幾つかの実施態様において、抗EGFR抗体（又はその断片）は、付加的薬剤にコンジュゲートされる。

30

【0164】

ある実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体（又はその断片）及び/又は組成物は、放射線療法、外科手術、化学療法及び/又は標的療法などの1つ又は複数の付加的療法と組み合わせて投与される。ある実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体（又はその断片）及び/又は組成物は、放射線療法と組み合わせて投与される。ある実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体（又はその断片）及び/又は組成物並びに放射線療法は、頭頸部がんを治療するために使用される。ある実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体（又はその断片）及び/又は組成物並びに放射線療法は、咽喉がんを治療するために使用される。ある実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体（又はその断片）及び/又は組成物並びに放射線療法は、結腸直腸がんを治療するために使用される。ある実施態様において、本明細書で提供される抗EGFR抗体（又はその断片）及び/又は組成物並びに放射線療法は、肺がんを治療するために使用される。

40

【0165】

処置すべき適応症及び当該分野の医師が熟知している用量に関連する因子に依存して、本明細書で提供される抗体は、毒性及び副作用を最小限に抑えながらその適応症の治療に有効な用量で投与されるであろう。がん（例えば、頭頸部がん、咽喉がん、結腸直腸がん

50

、肺がんなど)の治療のために、典型的な用量は、例えば、0.001から1000 μ gとすることができるが；しかしながら、この例示的な範囲より下又は上の用量は本発明の範囲内である。1日の用量は、約0.1 μ g/kgから約100mg/kg全体重(例えば、約5 μ g/kg、約10 μ g/kg、約100 μ g/kg、約500 μ g/kg、約1mg/kg、約50mg/kg、又は上記の値の何れか2つによって規定される範囲)、好ましくは約0.3 μ g/kgから約10mg/kg全体重(例えば約0.5 μ g/kg、約1 μ g/kg、約50 μ g/kg、約150 μ g/kg、約300 μ g/kg、約750 μ g/kg、約1.5mg/kg、約5mg/kg、又は上記の値の何れか2つによって定義される範囲)、より好ましくは約1 μ g/kgから1mg/kg全体重(例えば、約3 μ g/kg、約15 μ g/kg、約75 μ g/kg、約300 μ g/kg、約900 μ g/kg、又は上記の値の任意の2つによって規定される範囲)、更により好ましくは約0.5から10mg/kg体重/日(例えば、約2mg/kg、約4mg/kg、約7mg/kg、約9mg/kg、又は上記の値の任意の2つの値によって規定される範囲、上記値の間の任意の範囲を含む)とすることができる。上記のように、治療的又は予防的有効性は、治療された患者の定期的な評価によってモニターすることができる。数日又はそれ以上にわたる反復投与では、状態に応じて、治療は疾患症状の所望の抑制が生じるまで反復される。しかしながら、他の投薬レジメンが有用であり得、本発明の範囲内である。所望の投与量は、組成物の単回ボラス投与、組成物の複数回のボラス投与、又は組成物の連続注入投与によって送達することができる。

10

【0166】

20

抗EGFR抗体を含む医薬組成物は、1日に1、2、3又は4回投与することができる。組成物はまた、毎日よりも少ない頻度で、例えば、週に6回、週に5回、週に4回、週に3回、週に2回、週に1回、2週間に1回、3週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、6ヶ月に1回、又は6ヶ月に1回投与することができる。組成物はまた、ある期間にわたって使用するために組成物を徐々に放出し、かつ組成物の投与頻度を1ヶ月に1回、2から6ヶ月に1回、毎年1回、又は実に1回の投与など低くすることができるインプラントのような徐放性製剤で投与することができる。持続放出デバイス(ペレット、ナノ粒子、微粒子、ナノスフェア、マイクロスフェアなど)は、注射によって投与することができる。

【0167】

30

抗体(又はその抗原結合断片)は、1日1回の投与で投与してもよく、又は1日総用量を1日2回、3回又は4回の分割投与で投与してもよい。組成物はまた、毎日よりも少ない頻度で、例えば、週に6回、週に5回、週に4回、週に3回、週に2回、週に1回、2週間に1回、3週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、6ヶ月に1回、又は6ヶ月に1回投与することができる。組成物はまた、ある期間にわたって使用するために組成物を徐々に放出し、かつ組成物の投与頻度を1ヶ月に1回、2から6ヶ月に1回、毎年1回、又は実に1回の投与など低くすることができるインプラントのような徐放性製剤で投与することができる。持続放出デバイス(ペレット、ナノ粒子、微粒子、ナノスフェア、マイクロスフェアなど)は、注射によって投与することができ、又は様々な場所に外科的に埋め込むことができる。

40

【0168】

がん治療は、限定するものではないが、例えば、腫瘍再発、腫瘍重量ないしサイズの収縮、進行時間、生存期間、進行がない生存、全体の応答速度、応答の継続期間、生活の質、タンパク質の発現及び/又は活性などで評価されてもよい。例えば放射線画像法による応答の測定を含む、治療の有効性を判定するためのアプローチを用いることができる。

【0169】

幾つかの実施態様において、処置の有効性は、式100 - (T/C x 100)を用いて計算した腫瘍増殖阻害率(%TGI)として測定され、ここで、Tは治療された腫瘍の平均相対腫瘍体積であり、Cは非処置腫瘍の腫瘍体積である。ある実施態様において、%TGIは、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約

50

80%、約90%、約91%、約92%、93%、約94%、約95%、又は95%超である。ある実施態様において、抗EGFRの%TGIは、ERBITUX（登録商標）の%TGIと同じか又はそれ以上、例えば約1.1倍、約1.2倍、約1.3倍、約1.4倍、約1.5倍、約1.6倍、約1.7倍、約1.8倍、約1.9倍、約2倍、約2.1倍、約2.2倍、約2.3倍、約2.4倍、約2.5倍、約2.6倍、約2.7倍（これらの値の間の任意の範囲を含む）であるか、又はERBITUX（登録商標）の%TGIよりも約2.7倍大きい。

【0170】

薬学的製剤

抗EGFR抗体（又はその断片）は、それらが投与に適しているように、適切な担体又は賦形剤と共に製剤化することができる。抗体の適切な製剤は、所望の純度を有する抗体（又はその断片）を任意の薬学的に許容可能な担体、賦形剤又は安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することによって凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で得ることができる。許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存料（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）又はTWEENTM、PLURONICSTM又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。例示的な抗体製剤は、参照により本明細書に援用される国際公開第97/56418号に記載されている。皮下投与に適した凍結乾燥製剤は、国際公開第97/04801号に記載されている。そのような凍結乾燥製剤は、適切な希釈剤を用いて高タンパク質濃度まで再構成することができ、再構成製剤は、本明細書で治療される哺乳動物に皮下投与することができる。

【0171】

本明細書の製剤は、治療される特定の徴候に必要な2つ以上の活性化化合物、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものも含み得る。例えば、抗腫瘍剤、増殖阻害剤、細胞傷害性剤、又は化学療法剤を更に提供することが望ましい場合がある。そのような分子は、意図される目的のために有効な量で組み合わせられて適切に存在する。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、疾患若しくは障害又は治療の種類、及び上記の他の要因に依存する。これらは一般には本明細書に記載されるように同じ投薬量及び投与経路で又はこれまでに用いられている投薬量のおよそ1から99%で使用される。活性成分もまた、例えばコアセルベーション法又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれコロイド薬剤送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンで、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル、及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに封入されうる。このような技術は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例は、アンタゴニストを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形をしている。徐放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、又はポリ（ビ

10

20

30

40

50

ニルアルコール)、ポリ乳酸(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタメートの共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸共重合体、例えばLUPRON DEPOSITTM(乳酸-グリコール酸共重合体及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なマイクロスフィア)、及びポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸を含む。

【0172】

リポフェクチン又はリポソームを用いて、本発明のポリペプチド及び抗体(又はその断片)又は組成物を細胞に送達することができる。抗体断片が使用される場合には、標的タンパク質の結合ドメインに結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、ペプチド分子は、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するように設計できる。そのようなペプチドは、化学的に合成することができ、及び/又は組換えDNA技術によって産生することができる。例えば、Marasco et al., PNAS USA, 90: 7889-7893 (1993)を参照。

10

【0173】

活性成分もまた、例えばコアセルベーション法又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれコロイド薬剤送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョンで、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル、及びポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに封入されることができる。このような技術は、上掲のRemington's PHARMACEUTICAL SCIENCESにおいて開示される。

20

【0174】

徐放性製剤を調製することができる。徐放性製剤の好適な例は、抗体(又はその断片)を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形をしている。徐放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリ乳酸(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタメートの共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸共重合体、例えばLUPRON DEPOSITTM(乳酸-グリコール酸共重合体及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なマイクロスフィア)、及びポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸のようなポリマーは、100日に亘る分子の放出を可能にする一方、特定のハイドロゲルは、それよりも短期間に亘ってタンパク質を放出する。カプセル化された抗体が体内に長時間残ると、それらは37%の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。関与する機序に応じて、安定化のために合理的な戦略を講じることができる。例えば、凝集の機序が、チオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが発見された場合、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結、水分含有率の制御、適切な添加剤の使用、及び特定のポリマー基質組成物の開発により、安定化させることができる。

30

【0175】

ある実施態様において、製剤は、本明細書に記載の抗EGFR抗体を、約0.5mg/ml超、約1mg/ml超、約2mg/ml超、約3mg/ml超、約4mg/ml超、約5mg/ml超、約6mg/ml超、約7mg/ml超、約8mg/ml超、約9mg/ml超、約10mg/ml超、約11mg/ml超、約12mg/ml超、約13mg/ml超、約14mg/ml超、約15mg/ml超、約16mg/ml超、約17mg/ml超、約18mg/ml超、約19mg/ml超、約20mg/ml超、約21mg/ml超、約22mg/ml超、約23mg/ml超、約24mg/ml超、約25mg/ml超、約26mg/ml超、約27mg/ml超、約28mg/ml超、約29mg/ml超、又は約30mg/ml超(これらの値の間の任意の範囲を含む)の濃度で含む。

40

【0176】

50

ある実施態様において、抗EGFR抗体は、クエン酸塩、NaCl、酢酸塩、コハク酸塩、グリシン、ポリソルベート80(Tween80)、又はこれらの任意の組み合わせを含む緩衝液中で、(例えば、約0.5mg/ml超、約1mg/ml超、約5mg/ml超、約10mg/ml超、約15mg/ml超、約20mg/ml超、又は約25mg/ml超(これらの値の間の任意の範囲を含む)の濃度で)処方される。ある実施態様において、抗EGFR抗体は、約100mMから約150mMのグリシンを含む緩衝液中で、(例えば、約0.5mg/ml超、約1mg/ml超、約5mg/ml超、約10mg/ml超、約15mg/ml超、約20mg/ml超、又は約25mg/ml超(これらの値の間の任意の範囲を含む)の濃度で)処方される。ある実施態様において、抗EGFR抗体は、約50mMから約100mMのNaClを含む緩衝液中で処方される。ある実施態様において、抗EGFR抗体は、約10mMから約50mMの酢酸塩を含む緩衝液中で、(例えば、約0.5mg/ml超、約1mg/ml超、約5mg/ml超、約10mg/ml超、約15mg/ml超、約20mg/ml超、又は約25mg/ml超(これらの値の間の任意の範囲を含む)の濃度で)処方される。ある実施態様において、抗EGFR抗体は、約10mMから約100mMのコハク酸塩を含む緩衝液中で処方される。ある実施態様において、抗EGFR抗体は、約0.005%から約0.02%のポリソルベート80を含む緩衝液中で、(例えば、約0.5mg/ml超、約1mg/ml超、約5mg/ml超、約10mg/ml超、約15mg/ml超、約20mg/ml超、又は約25mg/ml超(これらの値の間の任意の範囲を含む)の濃度で)処方される。ある実施態様において、抗EGFR抗体は、約5.1から5.6のpHを有する緩衝液中で処方される。ある実施態様において、抗EGFR抗体を、10mMのクエン酸塩、100mMのNaCl、100mMのグリシン、及び0.01%のポリソルベート80を含む緩衝液(製剤はpH=5.5)に処方する。

【0177】

ある実施態様において、本明細書に記載のEGFR抗体を含む製剤(例えば、10mMクエン酸塩、100mMのNaCl、100mMのグリシン、及び0.01%ポリソルベート80を含む緩衝液を含む処方物であって、製剤はpH=5.5である)は、(例えば、約0.5mg/ml超、約1mg/ml超、約5mg/ml超、約10mg/ml超、約15mg/ml超、約20mg/ml超、又は約25mg/ml超(これらの値の間の任意の範囲を含む)の濃度で)、室温で(約20-25など)、約0.5週間、1.0週間、1.5週間、2.0週間、2.5週間、3.5週間、4.0週間、4.5週間、又は5.0週間(これらの値の間の任意の範囲を含む)安定である。ある実施態様において、本明細書に記載のEGFR抗体を含む製剤(例えば、10mMクエン酸塩、100mMのNaCl、100mMのグリシン、及び0.01%ポリソルベート80を含む緩衝液を含む処方物であって、製剤はpH=5.5である)は、(例えば、約0.5mg/ml超、約1mg/ml超、約5mg/ml超、約10mg/ml超、約15mg/ml超、約20mg/ml超、又は約25mg/ml超(これらの値の間の任意の範囲を含む)の濃度で)、加速条件下(約37での保存など)で、約0.5週間、1.0週間、1.5週間、2.0週間、2.5週間、3.5週間、4.0週間、4.5週間、又は5.0週間(これらの値の間の任意の範囲を含む)安定である。

【0178】

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)は、物理的及び化学的不安定性に対応する、潜在的な断片化及び凝集を検出するためのタンパク質安定性試験に使用される周知の広く使用される方法である。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EGFR抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤は、SECを使用して測定される場合、37で1週間後に最初の高分子量種の%に対して、高分子量種(HMWs)の約1.6%、1.4%、1.2%、1.0%、0.8%、0.6%、0.4%、0.2%、又は0.1%未満(これらの値の間の任意の範囲を含む)の増加を示す。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EGFR抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤は

10

20

30

40

50

、SECを使用して測定される場合、37 で2週間後に最初の高分子量種の%に対して、高分子量種の約2.0%、1.8%、1.6%、1.4%、1.2%、1.0%、0.8%、0.6%、0.4%、0.2%、又は0.1%未満(これらの値の間の任意の範囲を含む)の増加を示す。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤は、SECを使用して測定される場合、37 で4週間後に最初の高分子量種の%に対して、高分子量種の約3.3%、3.2%、3.1%、3.0%、2.9%、2.8%、2.7%、2.6%、2.5%、2.4%、2.2%、2.0%、1.8%、1.6%、1.4%、1.2%、1.0%、0.8%、0.6%、0.4%、0.2%、又は0.1%未満(これらの値の間の任意の範囲を含む)の増加を示す。

10

【0179】

ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤は、SECを使用して測定される場合、37 で1週間後に最初の低分子量種の%に対して、低分子量種(LMWS)の約1.6%、1.4%、1.2%、1.0%、0.8%、0.6%、0.4%、0.2%、又は0.1%未満(これらの値の間の任意の範囲を含む)の増加を示す。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤は、SECを使用して測定される場合、37 で2週間後に最初の低分子量種の%に対して、低分子量種の約2.0%、1.8%、1.6%、1.4%、1.2%、1.0%、0.8%、0.6%、0.4%、0.2%、又は0.1%未満(これらの値の間の任意の範囲を含む)の増加を示す。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤は、SECを使用して測定される場合、37 で4週間後に最初の低分子量種の%に対して、低分子量種の約2.4%、2.2%、2.0%、1.8%、1.6%、1.4%、1.2%、1.0%、0.8%、0.6%、0.4%、0.2%、又は0.1%未満(これらの値の間の任意の範囲を含む)の増加を示す。

20

【0180】

ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤は、SECを使用して測定される場合、37 で1週間後に最初の単量体の%に対して、単量体の約0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、又は3.5%未満(これらの値の間の任意の範囲を含む)の減少を示す。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤は、SECを使用して測定される場合、37 で2週間後に最初の単量体の%に対して、単量体の約0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、又は3.5%未満(これらの値の間の任意の範囲を含む)の減少を示す。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤は、SECを使用して測定される場合、37 で2週間後に最初の単量体の%に対して、単量体の約0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、又は3.5%未満(これらの値の間の任意の範囲を含む)の減少を示す。

30

40

50

【0181】

陽イオン交換クロマトグラフィー（CEX）は、脱アミド化又は酸化などのタンパク質分解事象を検出するためのよく知られて広く使用されているツールである（Moorhouse et al. (1997) J. Pharm. Biomed. Anal. 16, 593-603）。分解生成物は、典型的には、より高い見かけのpIを有する生成物と比較して、酸性又は塩基性種と称される。酸性種は、CEXの主ピークよりも早く溶出する変異体であるが、塩基性種はCEXの主ピークより後に溶出する変異体である。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤の酸性ピーク画分は、CEXを使用して測定される場合、37 で1週間後に、総タンパク質の約7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、又は15%未満（これらの値の間の任意の範囲を含む）である。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤の酸性ピーク画分は、CEXを使用して測定される場合、37 で2週間後に、総タンパク質の約8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、又は18%未満（これらの値の間の任意の範囲を含む）である。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤の酸性ピーク画分は、CEXを使用して測定される場合、37 で2週間後に、総タンパク質の約8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、又は27%未満（これらの値の間の任意の範囲を含む）である。

10

20

【0182】

ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤の塩基性ピーク画分は、CEXを使用して測定される場合、37 で1週間後に、総タンパク質の約39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、又は46%未満（これらの値の間の任意の範囲を含む）である。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤の塩基性ピーク画分は、CEXを使用して測定される場合、37 で2週間後に、総タンパク質の約39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、又は46%未満（これらの値の間の任意の範囲を含む）である。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤の塩基性ピーク画分は、CEXを使用して測定される場合、37 で4週間後に、総タンパク質の約39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、又は46%未満（これらの値の間の任意の範囲を含む）である。

30

【0183】

ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤の主要ピーク画分は、CEXを使用して測定される場合、37 で1週間後に、総タンパク質の約32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、又は46%以上（これらの値の間の任意の範囲を含む）である。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤の塩基性ピーク画分は、CEXを使用して測定される場合、37 で2週間後に、総タンパク質の約32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、又は46%以上（これらの値の間の任意の範囲を含む）である。ある実施態様において、本明細書に記載の抗EFG R抗体5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml又は25mg/mlを含む製剤の塩基性ピーク画分は、CEXを使用して測定される場合、37 で4週間後に、総タンパク質の約32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、4

40

50

3%、44%、45%、又は46%以上（これらの値の間の任意の範囲を含む）である。

【0184】

インビボ投与に使用される製剤は滅菌されていなければならない。これは、例えば、滅菌濾過膜による濾過によって容易に達成される。

【0185】

抗上皮増殖因子受容体抗体を用いた診断及び画像化の方法

E G F Rポリペプチドに特異的に結合する、標識抗E G F R抗体、その断片、及びその誘導体及び類似体は、E G F Rの発現、異常な発現及び/又は活性に関連する疾患及び/又は障害を検出、診断又はモニターする診断目的のために使用することができる。例えば、本明細書において提供される抗E G F R抗体（又はその断片）は、インサイツ、インビボ、10 エクスビボ、及びインビトロ診断アッセイ又は画像化アッセイにおいて使用され得る。（a）本発明の1つ以上の抗体を用いて個体の細胞（例えば、組織）又は体液中のポリペプチドの発現をアッセイすること及び（b）遺伝子発現のレベルを標準的な遺伝子発現レベルと比較することを含む、E G F Rポリペプチドの発現を検出するための方法であって、それによって、標準的な発現レベルと比較してアッセイされた遺伝子発現レベルの増加又は減少が、異常な発現を示す、方法。

【0186】

本明細書で提供される更なる実施態様は、動物（例えば、ヒトなどの哺乳類）におけるE G F Rの発現又は異常発現に関連する疾患又は障害を診断する方法を含む。本方法は、哺乳動物においてE G F R分子を検出することを含む。ある実施態様において、診断は、20 （a）有効量の標識抗E G F R抗体（又はその断片）を哺乳動物に投与すること、（b）標識抗E G F R抗体（又はその断片）が、E G F R分子が発現される被験体の部位に優先的に集中すること（未結合の標識分子がバックグラウンドレベルまでクリアされること）を可能にするために、投与後の時間間隔を待機する；（c）バックグラウンドレベルを決定すること；（d）バックグラウンドレベルを上回る標識分子の検出が、被験体がE G F Rの発現又は異常発現に関連する特定の疾患又は障害を有することを示すように、被験体における標識分子を検出することを含む。バックグラウンドレベルは、検出された標識分子の量を、特定の系について以前に決定された標準値と比較することを含む様々な方法によって決定することができる。

【0187】

本明細書で提供される抗E G F R抗体（又はその断片）は、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を用いて、生物学的試料中のタンパク質レベルをアッセイするために使用することができる（例えば、Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)を参照）。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な他の抗体ベースの方法には、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）及びラジオイムノアッセイ（R I A）のようなイムノアッセイが含まれる。適切な抗体アッセイ標識は、当該分野で公知であり、酵素標識、例えば、グルコースオキシダーゼ；放射性同位体、例えば、ヨウ素（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In ）、及びテクネチウム（ ^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、タリウム（ ^{201}Ti ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、キセノン（ ^{133}Xe ）、フッ素（ ^{18}F ）、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru ；ルミノール；及びフルオレセイン及びローダミンなどの蛍光標識、及びビオチンが挙げられる。

【0188】

当該分野で公知の技術は、本明細書で提供される標識抗体（又はその断片）に適用され得る。そのような技術には、限定されないが、二官能性結合剤の使用が含まれる（例えば、米国特許第5756065号；第5714631号；第5696239号；第5652361号；第5505931号；第5489425号；第5435990号；第5428

10

20

30

40

50

139号；第5342604号；第5274119号；第4994560号；及び第5808003号を参照）。あるいは、又はそれに加えて、例えば、EGFRをコードする核酸又はその相補物に対応する核酸ベースのプロブを用いた蛍光インサイツハイブリダイゼーションを介して、細胞内のEGFRポリペプチドをコードする核酸又はmRNAのレベルを測定することができる；（FISH；1998年10月公開の国際公開第98/45479号を参照）、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、又はリアルタイム定量PCR（RT-PCR）などのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術）。例えば抗体に基づくアッセイを用いて、血清などの生物学的流体中の脱落抗原を測定することによってEGFR過剰発現を研究することもできる（例えば、1990年6月12日に発行された米国特許第4933294号；1991年4月18日に公開された国際公開第91/05264号；1995年3月28日に発行された米国特許第5401638号；及びSias et al., J. Immunol. Methods132:73-80 (1990)も参照）。上記のアッセイとは別に、様々なインビボ及びエクスピボアッセイが当業者に利用可能である。例えば、哺乳動物の体内の細胞を、検出可能な標識、例えば、放射性同位元素で任意に標識された抗体に曝露することができ、抗体への抗体の結合は、例えば、放射能の外部走査によって、又は抗体に前もって曝露された哺乳動物から採取された試料（例えば、生検又は他の生物学的試料）を分析することによって評価することができる。

10

【0189】

製造品及びキット

本明細書で提供される別の実施態様は、頭頸部がん、肺がん、又は結腸直腸がん（例えば、腫瘍）などのがんの治療に有用な物質を含有する製造品である。製造品は、容器と、容器上又は容器に付随したラベル又は添付文書を含むことができる。好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成されうる。容器は、ガラス又はプラスチックのような様々な材料から形成されてよい。一般に、容器は、症状の治療に有効である組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針により貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本明細書で提供される抗EGFR抗体（又はその断片）である。ラベル又は添付文書は、組成物が特定の疾患の治療に用いられることを示す。ラベル又は添付文書は、抗体組成物を患者に投与するための説明書を更に含むであろう。また、本明細書中に記載の併用治療薬を含む製造品及びキットも考慮される。

20

30

【0190】

添付文書は、そのような治療用製品の使用に関する適応症、使用法、用量、投与、禁忌及び/又は警告に関する情報を含む治療用製品の市販パッケージに慣例的に含まれる説明書を指す。一実施態様において、添付文書は、組成物ががん（頭頸部がん、肺がん、又は結腸直腸がんなど）を治療するために使用されることを示す。

【0191】

更に、製造品は、静菌注射用水（BWFI）、リン酸緩衝化生理食塩水、リンゲル液及びデキストロース溶液などの薬学的に許容可能な緩衝液を含む第2の容器を更に含むことができる。それは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む商業的及びユーザーの観点から望ましい他の物質を更に含み得る。

40

【0192】

任意に製造品と組み合わせて、様々な目的、例えば患者におけるEGFRの単離又は検出のために有用なキットも提供される。EGFRの単離及び精製のために、キットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）に結合した本明細書で提供される抗EGFR抗体（又はその断片）を含み得る。例えば、ELISA又はウエスタンブロットにおいて、EGFRを検出及び定量するための抗体（又はその断片）を含むキットが提供されうる。製造物品と同様に、キットは、容器と、容器に付随したラベル又は添付文書を含む。例えば、容器は、本明細書で提供される少なくとも1つの抗EGFR抗体を含む組成物を保持する。例えば、希釈剤及び緩衝液、対照抗体を含有する追加の容器を含めることができる。ラ

50

ベル又は添付文書は、組成物の説明並びに意図されたインビトロ又は診断使用のための指示を提供することができる。

【実施例】

【0193】

実施例1．グリコシル化及びアグリコシル化CDR-H2抗上皮増殖因子抗体の生成及び親和性成熟

生殖系列重鎖可変領域VH3.48及び生殖系列軽鎖可変領域VK3.11を用いて、ヒト化抗EGFR抗体348311を生成した。次いで、348311は、改良された結合性能を有するクローンを生成するために、インビトロファージディスプレイに基づく親和性成熟実験に使用された。最初に、CDR-L3/CDR-H3核酸ライブラリーをPCRにより生成し、ファージディスプレイベクターにクローニングし、大腸菌に形質転換してファージライブラリーを作製した。2ラウンドのパニングの後、284のFabクローンをELISAによってスクリーニングし、7つのクローン(すなわち、1-15, 1-16, 1-26, 1-86, 2-48, 1-13及び3-66)が348311と同等又はそれ以上の結合性能を有することが判明した(図1)。更なるELISAを、以下の軽鎖/重鎖の組合せを含む全長IgGクローンを用いて行った: 348311/348311(LC/HC)、1-15/348311(LC/HC)、1-26/348311(LC/HC)、1-86/348311(LC/HC)、2-48/348311(LC/HC)、348311/1-26(LC/HC)、1-15/1-26(LC/HC)、1-26/1-26(LC/HC)、1-86/1-26(LC/HC)、及び2-48/1-26(LC/HC)。HLX05(すなわち、社内で製造されたERBITUX(登録商標)バイオシミラー抗体)も試験した。1-26の重鎖を含むクローンは、348311の重鎖を含むクローンよりもEGFRに対するより良好な結合性能を示した。(図2を参照)。

【0194】

1-26重鎖を選択し、グリコシル化部位の欠失のためのCDR-H2ライブラリーを作製するための基礎として使用した。CDR-H2核酸ライブラリーをPCRにより生成し、ファージディスプレイベクターにクローニングし、大腸菌に形質転換してファージライブラリーを作製した。2ラウンドのパニング後、2つのクローン、すなわち2-68及び3-67をELISAによってスクリーニングし、改善された結合特性を有することが見いだされた。オフレートELISAを、社内で製造されたEGFR抗原でコートされたウェル及び以下の軽鎖/重鎖の組合せを含む抗EGFR抗体クローンで行った: 1-26/2-68(LC/HC)、1-26/3-67(LC/HC)、1-26/1-26(LC/HC)及び348311/1-26(LC/HC)。1-26/2-68(LC/HC)、1-26/3-67(LC/HC)、及び348311/1-26(LC/HC)を含むクローンは、オフレートELISAにおいてHLX05よりもEGFR結合の親和性がより高いことが見いだされた(図3)。

【0195】

CDR-L1/CDR-L2/CDR-H1ライブラリーを作製するための基礎として、クローン3-67を用いた。CDR-L1/CDR-L2/CDR-H1核酸ライブラリーをPCRにより生成し、ファージディスプレイベクターにクローニングし、大腸菌に形質転換してファージライブラリーを作製した。2ラウンドのパニングの後、ELISAによってクローン#8、#31、#33及び#34をスクリーニングし、ERBITUX(登録商標)と類似の親和性でEGFRに結合することが示された。

【0196】

クローン1-26、2-68、3-67、#8、#31、#33、及び#34の重鎖及び軽鎖をシャッフルして追加の抗EGFR抗体変異体を作製し、これもまたELISAで試験した。以下のリード抗体を、直接結合ELISAにおける更なる分析のために選択した: 1-26/2-68(LC/HC)、1-26/3-67(LC/HC)、#8/#33(LC/HC)、及び#34/#33(LC/HC)。簡潔には、各クローン、HL

10

20

30

40

50

X05、Merck KGaAから購入したERBITUX（登録商標）及びリツキシマブ（すなわち、抗CD20抗体）の連続希釈物を、マイクロタイターディッシュのウェルにヤギ抗fd抗体で捕捉した。抗ヒトカップ-HRPコンジュゲート二次抗体を用いて各ウェル中の捕捉された抗体の量を定量した。HRPコンジュゲート二次抗体をウェルに添加し、インキュベーション後、過剰の二次抗体を洗い流した。TMBをウェルに添加し、インキュベーション後反応を停止させ、HRP活性を450nmでの吸光度の増加をモニターすることによって測定した。EGFR結合は、EGFR-AP融合タンパク質をウェルに添加することによって測定した。インキュベーション及び洗浄後、pNPPをウェルに添加し、30分間インキュベートした。AP活性は、405nmにおける吸光度の増加をモニターすることによって測定した。抗体濃度をAP活性の関数としてプロットした（図4）。図4に示すように、クローン1-26/2-68（LC/HC）、1-26/3-67（LC/HC）は、HLX05及びMerck KGaAから購入したERBITUX（登録商標）と類似のEGFRに対する結合親和性を有することが示された。

10

【0197】

クローン1-26/2-68（LC/HC）、1-26/3-67（LC/HC）；#8/#33（LC/HC）、#34/#33（LC/HC）、HLX05、Merck KGaAから購入したERBITUX（登録商標）及びリツキシマブをビオチン化HLX05とのEGFR結合について競合的ELISAで試験した。簡潔には、各抗体の試料をビオチン化HLX05と予め混合した。次に、アルカリホスファターゼコンジュゲートEGFRを予混合溶液に加え、室温で1時間プレインキュベートした。次に、プレインキュベーション混合物を、アビジンでコーティングされたマイクロタイターウェルに添加した。1時間のインキュベーション後、全てのウェルをPBSTで洗浄し、pNPPを各ウェルに添加した。37で2回目のインキュベーション後、反応を停止した。アルカリホスファターゼ活性は、405nmにおける吸光度の増加をモニターすることによって測定した。試験した全てのクローンは、HLX05又はMerck KGaAから購入したERBITUX（登録商標）よりも高い競合能力を示した（図5）。このような結果はまた、試験した全てのクローンがERBITUX（登録商標）と同じEGFREピトープに結合することを証明する。

20

【0198】

クローン1-26/2-68（LC/HC）、1-26/3-67（LC/HC）；#8/#33（LC/HC）、及び#34/#33（LC/HC）の各々は、グリコシル化部位を除去するように操作されたCDR-H2を含む。全IgGクローン1-26/2-68（LC/HC）、1-26/3-67（LC/HC）；#8/#33（LC/HC）、及び#34/#33（LC/HC）、Merck KGaAから購入したERBITUX（登録商標）及びHLX05のグリコシル化プロファイルをHPLCで分析した。G0F及びG1Fは試験されたクローンの中のほとんどのタイプのグリカンを示すが、G0はMerck KGaAからのERBITUX（登録商標）及びHLX05（図6）の両方で検出された。更なるグリカン分析が、1-26/3-67（LC/HC）、Merck KGaAから購入したERBITUX（登録商標）、及びHLX05のFab断片及びFc断片で実施された。G0F及びG1Fは1-26/3-67のFc上で検出されたが、1-26/3-67のFab上ではグリカンは検出されなかった。対照的に、G2FならびにG0F及びG1Fのトレースは、Merck KGaAから購入したERBITUX（登録商標）及びHLX05の両方からのFc断片上で検出された。G2F+2*Gal及びG2F+Gal+SA（NeuAc）は、Merck KGaAから購入したERBITUX（登録商標）のFab断片上で検出され、G2F+2*SA（NeuAc）及びG2F+Gal+SA（NeuAc）はHLX05のFab断片上で検出された（図6）。

30

40

【0199】

SPRは社内で製造されたHLX05、348311/2-68（LC/HC）、1-26/2-68（LC/HC）、348311/3-67（LC/HC）、及び1-26

50

/ 3 - 6 7 (L C / H C) で実施された。結果を以下の表 5 に示す。

表5

LC/HC	ka (1/(M*s))	kd (1/s)	K _D (M)	K _D の倍率差
HLX05	5.02E6 (±1.28E3)	6.38E-4 (±8.89E-6)	1.27E-10 (±1.81E-12)	1
348311/2-68	5.80E6 (±2.49E3)	7.29E-4 (±8.83E-6)	1.26E-10 (±1.58E-12)	1
1-26/2-68	6.48E6 (±8.14E2)	4.21E-4 (±9.60E-6)	6.49E-11 (±1.49E-12)	2.0
348311/3-67	6.10E6 (±3.31E3)	1.51E-3 (±6.58E-6)	2.47E-10 (±1.21E-12)	0.5
1-26 /3-67	5.09E6 (±1.52E3)	5.53E-4 (±1.13E-5)	1.09E-10 (±2.24E-12)	1.2

10

【 0 2 0 0 】

クローン 1 - 2 6 / 2 - 6 8 は、 6.49×10^{-11} の K_d を有するものとして測定され、すなわち E G F R に対する親和性は H L X 0 5 の 2 倍である。1 - 2 6 / 3 - 6 7 は、 1.09×10^{-10} の K_d を有するものとして測定され、すなわち E G F R に対する親和性は H L X 0 5 の 1.2 倍である。

20

【 0 2 0 1 】

1 - 2 6 軽鎖及び 2 - 6 8 又は 3 - 6 7 の何れかの重鎖を含む I g G クロームは、H L X 0 5 よりも E G F R に対して 2 から 3 倍高い親和性を実証した。(下記の表 6 を参照)

。

表6

LC/HC	ka (1/(M*s))	kd (1/s)	K _D (M)	K _D の倍率差
HLX05	8.31E6 (±8.82E4)	2.07E-3 (±1.88E-4)	2.49E-10 (±2.52E-11)	1
1-26/2-68	8.82E6 (±2.73E3)	7.18E-4 (±7.36E-4)	8.14E-11 (±8.34E-11)	3.1
1-26/3-67	8.93E6 (±1.69E3)	9.95E-4 (±2.58E-4)	1.11E-10 (±2.89E-11)	2.2
#8/#33	6.09E6 (±1.33E5)	1.02E-4 (±1.13E-5)	1.67E-11 (±2.22E-12)	13.9
#31/#33	7.24E6 (±2.75E5)	5.47E-4 (±2.69E-5)	7.56E-11 (±6.59E-12)	3.3
#34/#33	8.25E6 (±8.15E4)	6.17E-4 (±1.34E-5)	7.48E-11 (±2.37E-12)	3.3
#8/3-67	6.68E6 (±6.42E3)	6.15E-4 (±1.06E-3)	9.21E-11 (±1.58E-10)	2.7
#8/#31	7.52E5 (±5.26E3)	1.00E-3 (±5.81E-4)	1.33E-10 (±7.74E-11)	1.9
#31/3-67	6.45E6 (±1.68E3)	1.16E-3 (±4.10E-4)	1.80E-10 (±6.36E-11)	1.4

30

40

【 0 2 0 2 】

親和性成熟により生成した抗 E G F R 抗体クローンの F c R I I I A 結合を E L I S A によりアッセイした。簡潔には、マイクロタイターウェルを F c R I I I A でコーティングし、B S A でブロックした。以下の抗体を $1 \mu\text{g} / \text{m l}$ の濃度で加えた：社内で製

50

造されたHLX05、1-26/2-68(LC/HC)、1-26/3-67(LC/HC)、#8/#33(LC/HC)、#34/#33(LC/HC)及びMerck KGaAから購入したERBITUX(登録商標)。1時間のインキュベーション後、抗ヒトカッパ軽鎖-HRPコンジュゲート抗体を各ウェルに添加した。TMB基質をウェルに添加し、7分間インキュベートした。反応停止後、HRP活性を450nmにおける吸光度の上昇をモニターすることにより測定した。図7に示すように、1-26/2-68(LC/HC)、1-26/3-67(LC/HC)、#8/#33(LC/HC)、#34/#33(LC/HC)の各々は、Merck KGaAから購入したERBITUX(登録商標)のそれ及びHLX05のそれと類似の親和性でFcRIIIaに結合する。

10

【0203】

親和性成熟によって生成した抗体クローンのADCC活性を、社内で製造されたHLX05のADCC活性と比較した。アッセイは、Suzuki et al. (2007) "A Nonfucosylated Anti-HER2 Antibody Augments Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Breast Cancer Patients." Clin Cancer Res 13, 1875-1882に記載されたように実施された。試験された全てのクローンは、社内で製造されたHLX05と類似のADCC活性を示すことが示された。#34/#33(LC/HC)はわずかに改善されたADCC活性を有することが見いだされた(図8A-G)。

【0204】

1-26/2-68(LC/HC)、1-26/3-67(LC/HC)、#8/#33(LC/HC)、#34/#33(LC/HC)、及びHLX05の抗増殖効果は、ヒトA431類表皮癌細胞に対してであり、MTTアッセイで比較された。MTT比色アッセイは、増殖及び細胞毒性研究における生存細胞数を決定する確立された方法である。このアッセイは、ミトコンドリア酵素による可溶性青ホルマザン生成物を形成する黄色テトラゾリウム塩、MTTの切断に基づいており、生成されるホルマザンの量は、MTT暴露中に存在する生存細胞の数に直接比例する(Mosmann (1983) J Immunol Methods 1983, 65:55-63を参照)。1-26/2-68(LC/HC)、1-26/3-67(LC/HC)、#8/#33(LC/HC)、#34/#33(LC/HC)又はHLX05を漸増濃度で細胞に添加した。インキュベーション後、MTT試薬を細胞に添加した。得られたMTT生成物を、570nmでの吸光度を測定することによって決定した。細胞生存度は、式：

20

$$\text{生存率}\% = (\text{試料の光学密度} / \text{対照の光学密度}) \times 100$$

を用いて決定された。

30

【0205】

IC₅₀値は、試験したいずれの細胞株においても増殖の50%阻害を示す濃度として算出した。図9に示すように、1-26/2-68(LC/HC)、1-26/3-67(LC/HC)、#8/#33(LC/HC)、及び#34/#33(LC/HC)は、HLX05と比較して改善された抗増殖効果を有することが示された。

【0206】

ヒトA431類表皮癌腫瘍異種移植片を保有するマウスを、本明細書に記載の抗EGFR抗体の治療有効性をアッセイするために使用した。簡潔には、ヒトA431上皮癌細胞(接種=2×10⁶細胞)を雄のBALB/cヌードマウスに移植した。マウスを無作為に5群に分けた。各群は、以下の表7に記載の投与計画の1つにより処置した：

40

表7

群	動物	腫瘍	処置剤(Ab)	用量	処置スケジュール
1	BALB/c NU 雄 6週齢	A431 接種= 2×10^6 細胞	#34/#33	2 mg/kg	接種後7日 目; 5週間、1 週間に2回
2	7匹のマウス ／群		1-26/3-67		
3	BALB/c NU 雄 6週齢 6匹のマウス ／群		1-26/2-68		
4			ERBITUX(登録 商標) (Merck KGaA) バッチ: 161734		
5			プラセボ		

10

20

【0207】

処置開始の35日後、ERBITUX(登録商標)で処置したマウスの腫瘍は、プラセボを受けたマウスの腫瘍より約26%小さかった。1-26/2-68で処置したマウスの腫瘍は、プラセボを受けたマウスの腫瘍より約31%小さかった($p < 0.05$)。#8/#33又は#34/#33で処置したマウスの腫瘍は、プラセボを受けたマウスの腫瘍より約50%小さく($p < 0.01$)、ERBITUX(登録商標)を埋めたマウスよりも約50%小さかった($p < 0.05$)。図10及び下記の表8を参照。

表8

	TV ¹ (35日間)	RTV ² (35日間)	TV/CV % ³ (35日間)	TGI % ⁴ (35日間)	TV ⁵ のp値 (35日間)	
#34/#33 (2 mg/kg)	1116	657%	50%	54%	0.003	p < 0.01
1-26/3-67 (2 mg/kg)	1102	670%	50%	54%	0.002	p < 0.01
1-26/2-68 (2 mg/kg)	1535	911%	69%	33%	0.045	p < 0.05
ERBITUX(登録 商標) (Merck KGaA) バッチ: 161734 (2 mg/kg)	1652	991%	74%	27%	0.104	p > 0.05
プラセボ	2219	1261%				

¹TV: 腫瘍体積(mm³)

²RTV: 最初に対する腫瘍体積

³TV/CV%: 処置群の体積/対照群の体積

⁴TGI%: 腫瘍増殖阻害率 = 1 - (T35-T0)/(C35-C0)%

⁵p値: <0.05 = * <0.01 = ** <0.001 = ***

【 0 2 0 8 】

3 4 / # 3 3、1 - 2 6 / 3 - 6 7、1 - 2 6 / 2 - 6 8又はERBITUX(登録商標)の血清濃度をこれらの2つの時点で測定するために、3日目及び35日目に各マウスから血清試料を採取した。簡潔には、マイクロタイターディッシュのウェルを、8倍に希釈したEGFR-APでコーティングした。血清試料を5000倍に希釈し、ウェルに添加した。ヤギ抗ヒトIgG-Fc-HRPコンジュゲート二次抗体を用いて各ウェル中の捕捉された抗体の量を定量した。この実験は2回実施され、その結果を図11に示す。3日目及び35日目の両日の#34/#33、1-26/3-67、1-26/2-68の血清レベルは、及びERBITUX(登録商標)の血清レベルよりも高い。

【 0 2 0 9 】

実施例2. FaDu下咽頭扁平上皮細胞癌腫瘍異種移植アッセイ

ヒトFaDu下咽頭扁平上皮癌腫瘍異種移植片を保有するマウスを、本明細書に記載の抗EGFR抗体の治療有効性をアッセイするために使用した。簡潔には、ヒトFaDu下咽頭扁平上皮癌細胞(接種=2×10⁶細胞)を雌のBALB/cヌードマウスに皮下移植した。マウスを7匹のマウスを各々含む4群に無作為に分けた。各群は、以下の表9に記載の投与計画の1つにより処置した:

表9

群	動物	腫瘍	処置剤(Ab)	用量	処置スケジュール
1	BALB/c NU 雌 6週齢 7匹のマウス ／群	FaDu 接種= 2×10^6 細胞	HLX05	2 mg/kg	接種後7日 目; 2-3週 間、1週間に 2回のIP注射
2			1-26/3-67		
3			ERBITUX(登 録商標) (Merck KGaA) バッチ: 164362		
4			プラセボ	10 ml/kg	

10

20

【0210】

処置開始の17日後、ERBITUX(登録商標)で処置したマウスの腫瘍は、プラセボを受けたマウスの腫瘍より約38%小さかった。HLX05で処置したマウスの腫瘍は、プラセボを受けたマウスの腫瘍より約29%小さかった($p < 0.05$)。1-26/3-67で処置したマウスの腫瘍は、プラセボを受けたマウスの腫瘍より約51%小さかった($p < 0.01$)。下記の図12及び表10を参照。

30

表10

	TV (17日間)	RTV (17日間)	TV/CV % (17日間)	TGI% (17日間)	TVのp値 (17日間)	
HLX05 2 mg/kg	605	493%	76%	29%	0.03	p < 0.05
HLX07 1-26/3-67 2 mg/kg	458	350%	58%	51%	0.0014	p < 0.01
ERBITUX (Merck KGaA) バッチ: 164362 2 mg/kg	538	470%	68%	38%	0.003	p < 0.01
プラセボ 10 ml/kg	794	705%				

10

【0211】

別の一連の実験では、NOD - SCIDマウスに抗体治療 + 放射線療法 (XRT) が施された。簡潔には、ヒトFaDu下咽頭扁平上皮癌細胞 (接種 = 1×10^6 細胞) を雄のNOD - SCIDマウスに皮下移植した。マウスを無作為に3群に分けた。各群は、以下の表11に記載の投与計画の1つにより処置した：

20

表11

群	動物	腫瘍	抗体/ 用量	放射線療法 の処置スケ ジュール	抗体処置ス ケジュール
1	NOD/SCID 雄 8週齢 5匹のマウス /群	FaDu 接種 = 1×10^6 細胞	なし	10 Gy x 1,接 種後 14 日目 の QOD	接種後 13 日 目から開始; Abは IP 注射 により 5 日間 投与される
2			ERBITUX (登 録商標) (Merck KGaA) 250 μ g/マウ ス		
3			1-26/3-67 250 μ g/マウ ス		

30

40

【0212】

5日間の治療後、ERBITUX及びXRT併用処置を与えられたマウスの腫瘍は、XRT単独を与えたマウスの腫瘍より91%小さかった。ERBITUX及びXRT併用処置を与えられたマウスの腫瘍は、XRT単独を与えたマウスの腫瘍より105%小さかった。図13及び下記の表12を参照。(RT = 放射線療法)

表12

	TV (17日間)	RTV (17日間)	TV/CV (17日間)	TGI% (17日間)	TVのp値 (17日間)	
RT_ビヒクル	591	480%	-	-	-	-
RT_ERBITUX (登録商標) (Merck KGaA) 250 μ g/マウス	156	137%	26%	91%	1.76E-6	p<0.001
RT_1-26/3-67 250 μ g/マウス	102	77%	17%	105%	3.69E-7	p<0.001

10

【0213】

実施例3．抗表皮増殖因子抗体 - 薬物コンジュゲート

DM1 (N2'-デアセチル-N2'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)メイトンシン) は、有糸分裂停止を誘導することが示されている微小管集合の強力な阻害剤である (例えば、Chan (2008) Acc Chem Res 41, 98-107; Oroudjev et al. (2010) Mol Cancer Ther 9, 2700-2713; 及び Remillard et al. (1975) Science 189, 1002-1005 を参照)。HLX07 - DM1 コンジュゲートを調製し、抗がん剤としてのその有効性を下記のように評価した。

20

【0214】

PD10 脱塩カラムを用いて HLX07 を PBS、pH 6.5 に処方した。HLX07 の最終濃度を同じ緩衝液を用いて 7.5 mg/mL に調整した。別々の管で、DM1 及び SMCC を 10 mM の DMF 溶液として調製した。等量の DM1 及び SMCC 溶液を混合し、室温で 30 分間で反応を完結させた。次いで、DM1 - SMCC を、4.5 : 1 のモル比で HLX07 溶液に添加した。混合溶液を室温で 2 時間インキュベートした。PD10 カラムを使用して過剰量の小反応物を除去した。抗体 - 薬物コンジュゲートの濃度は、A252 からの適切な修正を伴って、A280 を用いて決定した。A280 / A252 の比を用いて薬物対抗体比を決定した。

30

【0215】

EGFR 陽性ヒト結腸がん細胞の阻害を媒介する HLX07 - DM1 の能力を、DiFi (KRAS^{WT} 及び BRAF^{WT})、HCT-116 (KRAS^{G13D})、及び HT-29 (BRAF^{V600E}) 細胞株を用いて、一連のインビトロ実験で測定した。全ての研究において、各細胞株由来の細胞を、漸増濃度の HLX07 - DM1、HLX07 又は対照抗体 (抗 CD20) (連続して 3 倍) と共に 37 °C で 3 日間インキュベートした。増殖阻害は、MTT アッセイを用いて測定した。活性代謝を有する生存細胞は、MTT (すなわち、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド、黄色染料) を 565 nm の吸光度を有する紫色のホルマジン生成物に変換する。図 14A に示すように、HLX07 - DM1 及び HLX07 の増殖阻害効果は、EGFR 野生型 DiFi ヒト直腸癌細胞において同様であった。しかし、HLX07 - DM1 のみが、KRAS 変異型 HCT-116 (図 14B) 及び BRAF 変異型 HT-29 細胞 (図 14C) に対して抗増殖効果を示した。

40

【0216】

実施例4．アフコシル化抗表皮増殖因子抗体

フコースを含まない HLX07 (すなわち、HLX07 - FF) の抗体依存性細胞媒介

50

性細胞傷害活性を評価するために、エフェクター細胞として健康なヒトドナー由来のPBM C及び標的細胞としてK R A Sについて野生型であるヒト直腸癌細胞株であるD i F iを用いてA D C Cアッセイを行った。ヒトP B M Cを、H i s t o p a q u e (登録商標) - 1 0 7 7 (S i g m a - A l d r i c h)を用いて健康なドナーの全血から新たに調製し、 5×10^6 細胞/mLの密度でR P M I培地 (L - グルタミン、25 mMのH E P E S、ペニシリン、ストレプトマイシン及び10% F B Sを含むR P M I - 1 6 4 0)に懸濁した。D i F i標的細胞をR P M I培地に懸濁し、96ウェルU底マイクロタイタープレートに 1×10^4 細胞/ウェルで播種した。H L X 0 7 - F F、H L X 0 7、及び対照抗体 (抗C D 2 0) の連続希釈物を、 1.5 pg/mL から 3.3 ng/mL の様々な濃度で個々のウェルに添加した。次に、P B M Cをウェルに添加してエフェクター細胞：標的細胞比25：1を達成し、プレートを37で5時間インキュベートした。次いで、プレートを遠心分離し、上清を乳酸デヒドロゲナーゼ活性についてアッセイした。490 nmでの上清の吸光度を記録し、C y t o s c a n ^{T M} - L D H細胞毒性アッセイキット (G - B i o s c i e n c e)を用いて乳酸脱水素酵素の放出を測定した。E C ₅₀値は、試験した細胞株においてA D C Cの50%誘導を示す濃度として算出した。図15 Aに示すように、H L X 0 7 - F Fは 1.69 ng/mL で50%誘導を示し、50%誘導を示すのに必要なH L X 0 7の濃度 (すなわち 4.388 ng/mL) より60%低い濃度であった。

10

【0217】

K R A S変異は、転移性結腸がんにおいてE R B I T U Xに対する耐性の予測バイオマーカーである。「抗E G F Rモノクローナル抗体、セツキシマブ (アービタックス) 及びパニツムマブ (ベクティビックス) のクラスラベリングの変化：K R A S変異」米国食品医薬品局2010-01-11を参照のこと。K R A S変異細胞におけるH L X 0 7 - F F及びH L X 0 7のA D D C活性を比較するために、H C A S - 1 1 6、すなわちK R A S ^{G 1 3 D}変異を有するヒト結腸癌細胞株を標的細胞として用いて上記アッセイを繰り返した。アッセイは、30：1エフェクター細胞：標的細胞比を用いて実施された。H L X 0 7 - F F、H L X 0 7、及び対照抗体 (抗C D 2 0) の連続希釈物を、連続3倍希釈後に 0.1 μg/mL から 5.1 pg/mL の様々な濃度で個々のウェルに添加した。図15 Bに示すように、H L X 0 7 - F Fは、非フコシル化H L X 0 7よりもH C T - 1 1 6細胞において4.8倍高いA D C C活性を示した。

20

30

【0218】

B R A F変異は、転移性結腸がんにおいてE R B I T U Xに対する耐性の予測バイオマーカーである。Di Nicolitano et al. (2008) J. Clin Oncol. 26, 5705-5712を参照。B R A F変異細胞におけるH L X 0 7 - F F及びH L X 0 7のA D D C活性を比較するために、H T 2 9、B R A F ^{V 6 0 0 E}変異を有するヒト結腸直腸腺癌細胞株を標的細胞として用いて、上述されるように上記アッセイを繰り返した。アッセイは、30：1エフェクター細胞：標的細胞比を用いて実施された。H L X 0 7 - F F、H L X 0 7、及び対照抗体 (抗C D 2 0) の連続希釈物を、連続3倍希釈後に 0.1 μg/mL から 5.1 pg/mL の様々な濃度で個々のウェルに添加した。図15 Cに示すように、H L X 0 7 - F Fは、フコシル化H L X 0 7よりもH T 2 9細胞において4.7倍高いA D C C活性を示した。

40

【0219】

実施例5．抗表皮増殖因子抗体の薬物動態プロファイル

2匹のカニクイザル (1匹の雄及び1匹の雌) に 24 mg/kg の抗体 (すなわち、33/34-#1、33/34-#2、3/67-#3、及び3/67-#4) を静脈内を経由して注射した。抗E G F R抗体の血清濃度を、注入後の様々な時点でE L I S A法によって測定した。この実験をカニクイザルの第2セットで繰り返した。図16 Aの血清濃度 - 時間プロファイルに示されるように、抗体3/67は、抗体34/33より約100倍長い間、カニクイザルの血清中で検出することができる。図16 Bは、カニクイザルにおけるH L X 0 5 (1 - 3) 及びE R B I T U X (登録商標) (すなわち、4 - 6) の血

50

清濃度 - 時間プロファイルを示す。

【 0 2 2 0 】

実施例 6 . 安定した細胞株からの抗表皮増殖因子抗体の産生

H L X 0 7 1 - 2 6 / 3 - 6 7 のトップサブクローンは、確立された D A S G I P バイオリクタープラットホームに組み込むことによってスクリーニングされた。流加給餌スケジュールにより、酪酸塩を添加し、p H 7 での制御を伴うより低温のインキュベーション条件により、サブクローン 1 - 2 6 / 3 - 6 7 - 4 5 - 9 は 1 7 日目に 4 . 9 g / L に達した。図 1 7 を参照。

【 0 2 2 1 】

実施例 7 . 抗表皮増殖因子抗体の安定性

5 m g / m l 、 1 0 m g / m l 、 1 5 m g / m l 、 2 0 m g / m l 及び 2 5 m g / m l を含む H L X 0 7 抗体製剤が最大 4 週間まで加速保存条件 (すなわち 3 7) に供される安定性試験が実施された。0 週間、1 週間、2 週間、及び 4 週間の時点で各製剤から試料を採取し、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 及び陽イオン交換クロマトグラフィー (C E X) によって分析した。S E C は、抗体凝集体 (すなわち、高分子量種、又は H M W S) 、単量体及び断片 (すなわち、低分子量種、又は L M W S) を検出するために広く使用されている。陽イオン交換クロマトグラフィー (C E X) は、脱アミド化又は酸化などのタンパク質分解事象を検出するためのよく知られて広く使用されているツールである (Moorhouse et al. (1997) J. Pharm. Biomed. Anal. 16, 593-603) 。分解生成物は、典型的には、主要種と比較して酸性又は塩基性種と称される。酸性種は、より低い見かけの p I を有する変異体であり、塩基性種は、より高い見かけの p I を有する変異体である。酸性種は、C E X の主ピークよりも早く溶出する変異体であるが、塩基性種は C E X の主ピークより後に溶出する変異体である。加速条件下で保存された製剤から採取した試料の S E C 及び C E X 分析の結果を以下の表 1 3 に示す。

10

20

表13

試料濃度 (mg/ml)	時点	37°Cでの安定性試験					
		SEC			CEX (%)		
		% HMWS	% 単量体	% LMWS	酸性 ピーク	主要 ピーク	塩基性 ピーク
25	0週	0.9	99.1	0	13	42.6	44.4
	1週	1.2	97.9	0.8	14.6	41	44.4
	2週	1.4	97.7	1	16.9	39.7	43.4
	4週	1.6	97.1	1.3	25	33.8	41.3
20	0週	0.8	99.2	0	13	42.6	44.4
	1週	1.2	98	0.8	14.9	40.6	44.5
	2週	1.3	97.7	1	17.1	39.8	43.2
	4週	1.4	97.2	1.3	24.9	34	41.1
15	0週	0.9	99.1	0	13	42.6	44.4
	1週	1.1	98	0.9	14.9	40.5	44.6
	2週	1.2	97.7	1.1	17.5	38.7	43.8
	4週	1.3	97.3	1.4	25.1	33.1	41.9
10	0週	0.9	99.1	0	13	42.6	44.4
	1週	1.1	98	1	16	39.9	44
	2週	1.3	97.6	1.1	21.6	38.1	40.4
	4週	1.6	96.9	1.5	27.6	33.2	39.2
5	0週	0.9	99.1	0	13	42.6	44.4
	1週	1	98	1	15.1	41.2	43.7
	2週	1.2	97.6	1.2	17.3	39.9	42.8
	4週	1.2	97.4	1.5	25.3	34	40.7

【0222】

前述の実施例は、説明の目的でのみ提供されており、決して本発明の範囲を限定するものではない。本明細書に示され記載されたものに加えて、本発明の様々な改変は、前述の説明から当業者には明らかであり、添付の特許請求の範囲に含まれる。

【0223】

実施態様の一覧

本発明によって提供される実施態様には、限定するものではないが、以下が含まれる。

【0224】

1. (1) アミノ酸配列 N / T / Q - Y G V H (配列番号4) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 Y - N / A / G / D - T / D / N - P / K / E - F T S R F (配列番号9) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 T / D - Y / L - Y D Y - E / N - F A Y (配列番号14) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 I - G / R / S - T / L / P - N I H (配列番号20) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 K Y - A / G - S E - S / T - I - S / R (配列番号24) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 N W P T - T / L / S / A / Y (配列番号30) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む抗上皮増殖因子受容体 (E G F R) 抗体又はその抗原結合断片。

【0225】

2. 抗体が、(1) 配列番号1 - 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - H 1 ; (2) 配列番号5 - 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R -

H2；及び(3)配列番号10-13からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びに(1)配列番号15-19からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1；(2)配列番号21-23からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L2；及び(3)配列番号25-29からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様1に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片。

【0226】

3. 抗体が、(1)アミノ酸配列NYGVH(配列番号1)を含むCDR-H1；(2)アミノ酸配列YNTPTSRF(配列番号5)を含むCDR-H2；及び(3)アミノ酸配列TYDYEFAY(配列番号10)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びに(1)アミノ酸配列IGTNIH(配列番号15)を含むCDR-L1；(2)アミノ酸配列KYASESIS(配列番号21)を含むCDR-L2；及び(3)アミノ酸配列NWPTT(配列番号25)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様2に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片。

10

【0227】

4. 抗体が、(1)アミノ酸配列NYGVH(配列番号1)を含むCDR-H1；(2)アミノ酸配列YNTPTSRF(配列番号5)を含むCDR-H2；及び(3)アミノ酸配列DYDYEFAY(配列番号11)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びに(1)アミノ酸配列IGTNIH(配列番号15)を含むCDR-L1；(2)アミノ酸配列KYASESIS(配列番号21)を含むCDR-L2；及び(3)アミノ酸配列NWPTS(配列番号27)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様2に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片。

20

【0228】

5. 抗体が、(1)アミノ酸配列NYGVH(配列番号1)を含むCDR-H1；(2)アミノ酸配列YGNFTSRF(配列番号8)を含むCDR-H2；及び(3)アミノ酸配列DYDYEFAY(配列番号11)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びに(1)アミノ酸配列IGTNIH(配列番号15)を含むCDR-L1；(2)アミノ酸配列KYASESIS(配列番号21)を含むCDR-L2；及び(3)アミノ酸配列NWPTS(配列番号27)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様2に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片。

30

【0229】

6. 抗体が、(1)アミノ酸配列NYGVH(配列番号1)を含むCDR-H1；(2)アミノ酸配列YATEFTSRF(配列番号7)を含むCDR-H2；及び(3)アミノ酸配列DYDYEFAY(配列番号11)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びに(1)アミノ酸配列IGTNIH(配列番号15)を含むCDR-L1；(2)アミノ酸配列KYASESIS(配列番号21)を含むCDR-L2；及び(3)アミノ酸配列NWPTS(配列番号27)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様2に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片。

【0230】

7. 抗体が、(1)アミノ酸配列NYGVH(配列番号1)を含むCDR-H1；(2)アミノ酸配列YDDKFTSRF(配列番号6)を含むCDR-H2；及び(3)アミノ酸配列DYDYEFAY(配列番号11)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列；並びに(1)アミノ酸配列IGTNIH(配列番号15)を含むCDR-L1；(2)アミノ酸配列KYASESIS(配列番号21)を含むCDR-L2；及び(3)アミノ酸配列NWPTS(配列番号27)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様2に記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片。

40

【0231】

8. 抗体が、(1)アミノ酸配列TYGVH(配列番号3)を含むCDR-H1；(2)アミノ酸配列YGNFTSRF(配列番号8)を含むCDR-H2；及び(3)アミノ酸配列DYDYEFAY(配列番号11)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイ

50

ン配列；並びに(1)アミノ酸配列 I R T N I H (配列番号16)を含む C D R - L 1；(2)アミノ酸配列 K Y G S E S I S (配列番号22)を含む C D R - L 2；及び(3)アミノ酸配列 N W P T S (配列番号27)を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様2に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【0232】

9. 抗体が、(1)アミノ酸配列 T Y G V H (配列番号3)を含む C D R - H 1；(2)アミノ酸配列 Y G N E F T S R F (配列番号8)を含む C D R - H 2；及び(3)アミノ酸配列 D Y Y D Y E F A Y (配列番号11)を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列；並びに(1)アミノ酸配列 I S T N I H (配列番号19)を含む C D R - L 1；(2)アミノ酸配列 K Y G S E S I S (配列番号22)を含む C D R - L 2；及び(3)アミノ酸配列 N W P T S (配列番号27)を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様2に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

10

【0233】

10. アミノ酸配列 Y - A / G / D - D / N - K / E - F T S R F (配列番号31)を含む選択された C D R - H 2 を含む重鎖可変ドメインを含む、アグリコシル化された C D R - H 2 抗上皮増殖因子受容体 (E G F R) 抗体又はその抗原結合断片。

【0234】

11. 重鎖可変ドメインが、アミノ酸配列 N / T / Q - Y G V H (配列番号4)を含む C D R - H 1 及びアミノ酸配列 T / D - Y / L - Y D Y - E / N - F A Y (配列番号14)を含む C D R - H 3 を更に含む、実施態様10に記載のアグリコシル化 C D R - H 2 抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

20

【0235】

12. 抗体又はその抗原結合断片が、アミノ酸配列 I - G / R / S - T / L / P - N I H (配列番号20)を含む C D R - L 1；アミノ酸配列 K Y - A / G - S E - S / T - I - S / R (配列番号24)を含む C D R - L 2；及びアミノ酸配列 N W P T - T / L / S / A / Y (配列番号30)を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列を更に含む、実施態様10又は実施態様11に記載のアグリコシル化 C D R - H 2 抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【0236】

13. 抗体がヒト I g G の F c 配列を含む、実施態様1-12の何れか一に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

30

【0237】

14. 抗原結合断片が、F a b、F a b'、F (a b)'₂、一本鎖 F v (s c F v)、F v 断片、ダイアボディ、及び線状抗体からなる群から選択される、実施態様1-13の何れか一に記載の抗 E G F R 抗体の抗原結合断片。

【0238】

15. 抗体が多重特異性抗体である、実施態様1-13の何れか一に記載の抗 E G F R 抗体。

【0239】

16. 抗体がアフコシル化抗体である、実施態様1-15の何れか一に記載の抗体。

40

【0240】

17. 治療剤にコンジュゲートした、実施態様1-16の何れか一に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【0241】

18. 標識にコンジュゲートした、実施態様1-16の何れか一に記載の抗 E G F R 抗体又はその抗原結合断片。

【0242】

19. 標識が放射性同位体、蛍光色素、及び酵素からなる群から選択される、実施態様18に記載の抗体。

【0243】

50

20. 実施態様1-16の何れかーに記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子。

【0244】

21. 実施態様20の核酸分子をコードする発現ベクター。

【0245】

22. 実施態様21の発現ベクターを含む細胞。

【0246】

23. 実施態様22の細胞を培養すること及び細胞培養物から抗体を回収することを含む、抗体を産生する方法。

【0247】

10

24. 実施態様1-17の何れかーに記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片及び薬学的に許容可能な担体を含む組成物。

【0248】

25. 実施態様1-16及び18-19の何れかーに記載の抗EGFR抗体又はその抗原結合断片を試料に接触させること、及びEGFRタンパク質に結合した抗EGFR抗体を検出することにより、患者からの試料中のEGFRタンパク質を検出する方法。

【0249】

26. 抗EGFR抗体又はその抗原結合断片が免疫組織化学アッセイ(IHC)又はELISAアッセイで使用される、実施態様25に記載の方法。

【0250】

20

27. 実施態様26に記載の組成物の有効量を被験体に投与することを含む、被験体におけるがんを治療する方法。

【0251】

28. がんが、咽喉がん、結腸直腸がん、肺がん、及び頭頸部がんから選択される、実施態様27に記載の方法。

【0252】

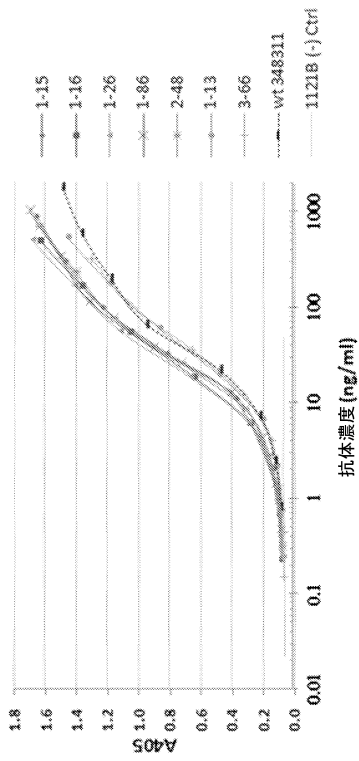
29. 被験体が、抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤及び細胞傷害性剤からなる群から選択される治療剤を更に投与される、実施態様27に記載の方法。

【0253】

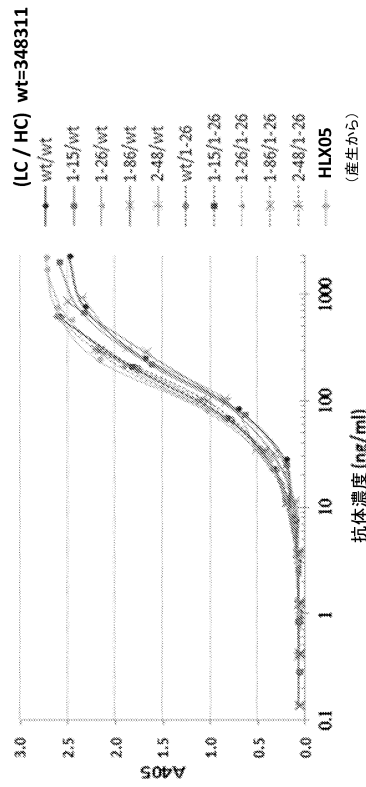
30. 被験体が放射線療法を更に施される、実施態様27に記載の方法。

30

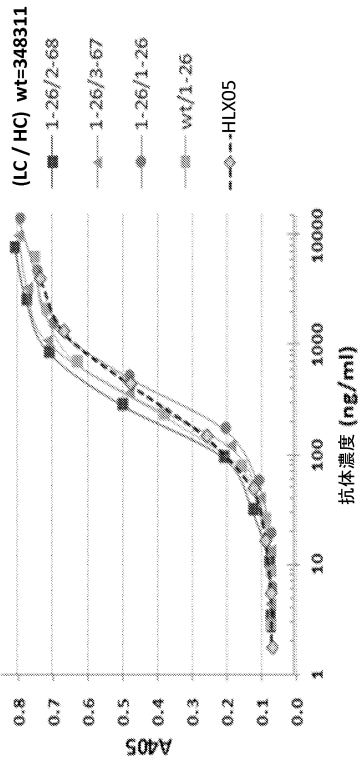
【 図 1 】



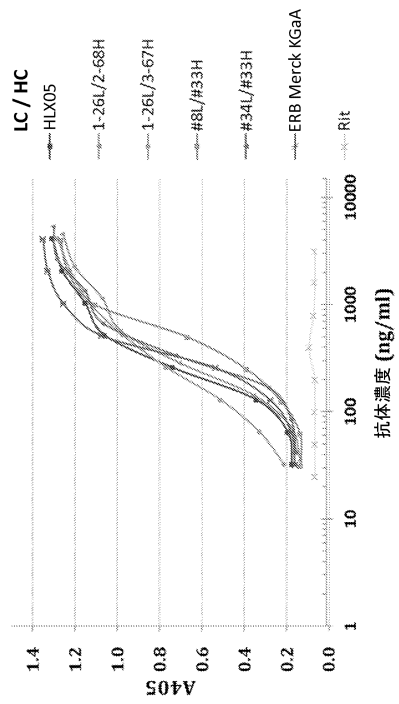
【 図 2 】



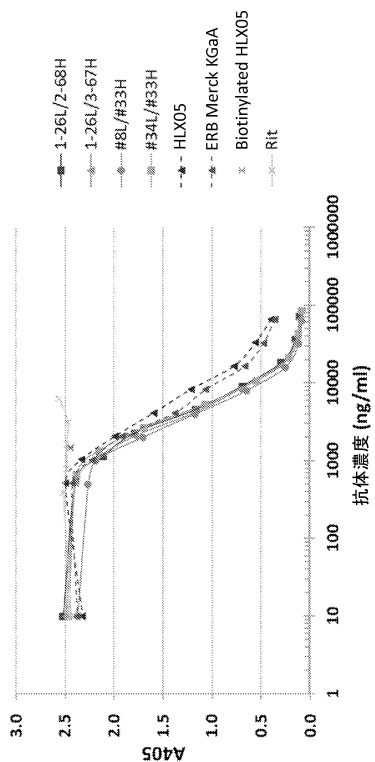
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 A 】

(全 IgG)

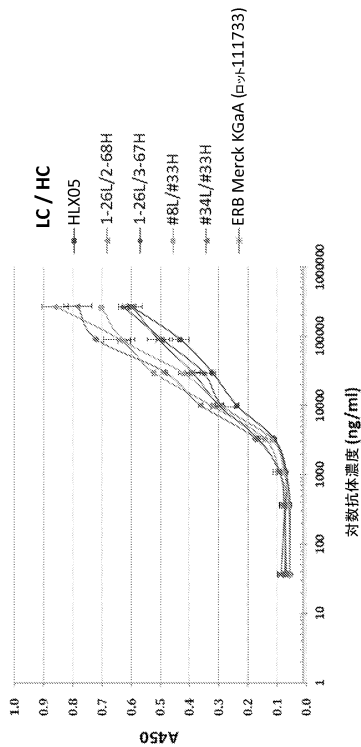
面積 %	HPLC 2-AB 糖鎖グリカン分析		
	G0	G1F	G2F
ERBITUX KGaA	1.6	51.1	39.5
HLX05	2.5	61.2	32.4
1-26/2-68	1.8	73.9	22.6
1-26/3-67	3.2	78.4	17.2
8/33	2.0	70.2	25.8
34/33	1.3	56.0	37.4

【 図 6 B 】

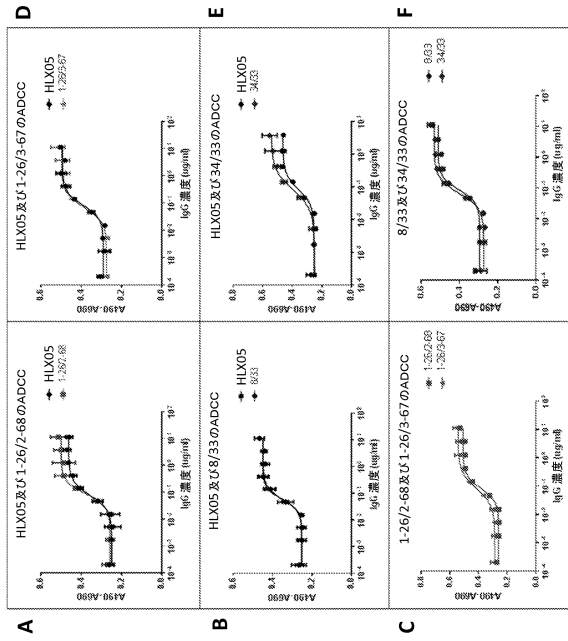
(130619) Fab/Fc についてのグリカンの結論

試料	断片	グリカンプロファイル
アービタックス (Merck) KGaA	Fc	G0F G1F (微量) G2F (微量)
	Fab	G2F+2*Gal G2F+Gal+SA(Neu6c)
	Fc	G0F G1F (微量) G2F (微量)
	Fab	G2F+SA(NeuAc) G2F+2*SA(NeuAc)
HLX05	Fc	G0F G1F (微量) G2F (微量)
	Fab	G2F+SA(NeuAc) G2F+2*SA(NeuAc)
1-26/3-67	Fc	G0F G1F
	Fab	...

【 図 7 】



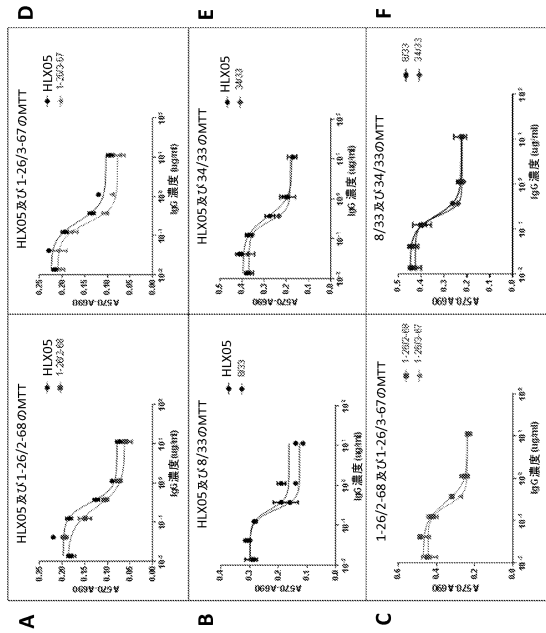
【 8 A - F 】



【 8 G 】

(ng/ml)	ADCC (PBMC 400K/フェル)		ADCC (PBMC 600K/フェル)	
	Avg EC50	活性の%	Avg EC50	活性の%
HLX05	99.7	100	80.6	100
1-26/2-68	118.7	84	84.7	95
1-26/3-67	110.2	90	74.2	109
8/33	91.4	109	87.0	93
34/33	80.3	124	72.9	111

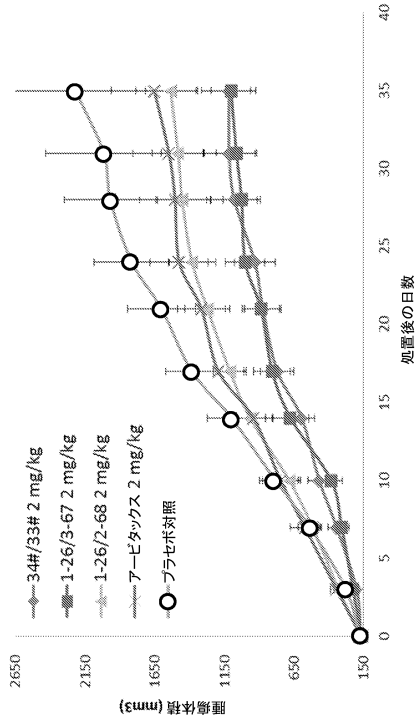
【 9 A - F 】



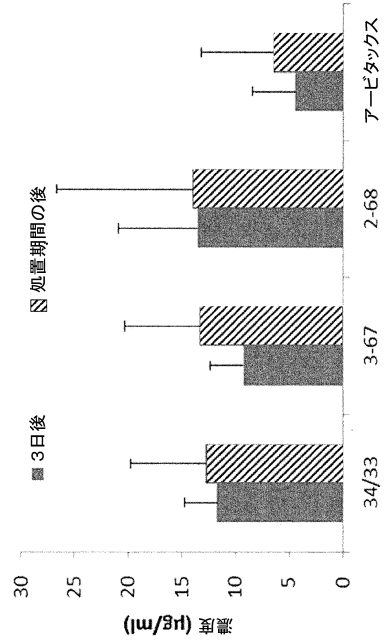
【 9 G 】

(ng/ml)	MTT	
	Avg IC50	活性の%
HLX05	285.9	100
1-26/2-68	254.5	112
1-26/3-67	220.2	130
8/33	217.2	132
34/33	236.2	121

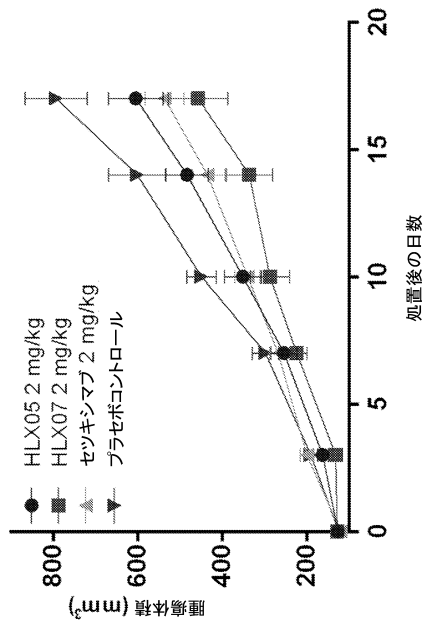
【 図 1 0 】



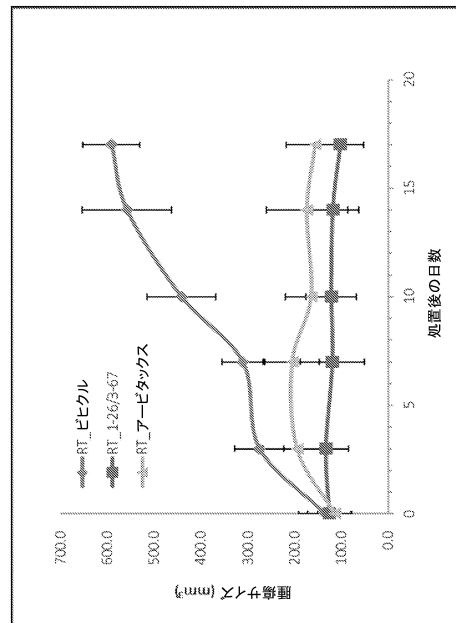
【 図 1 1 】



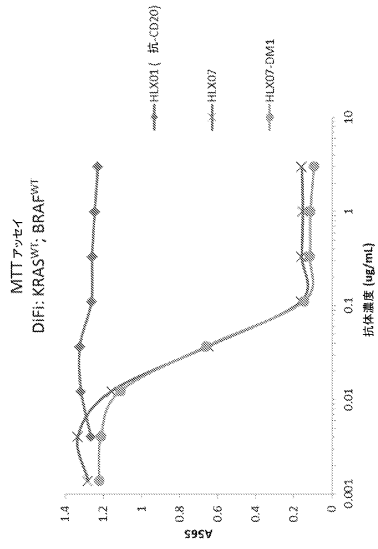
【 図 1 2 】



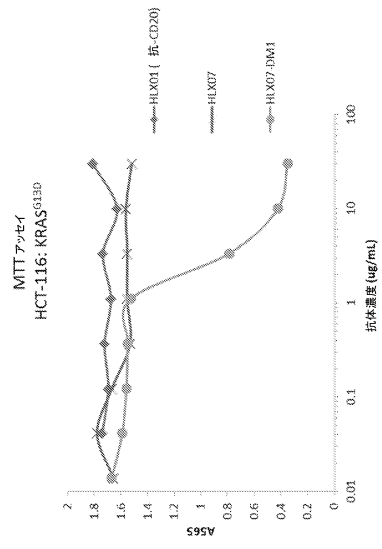
【 図 1 3 】



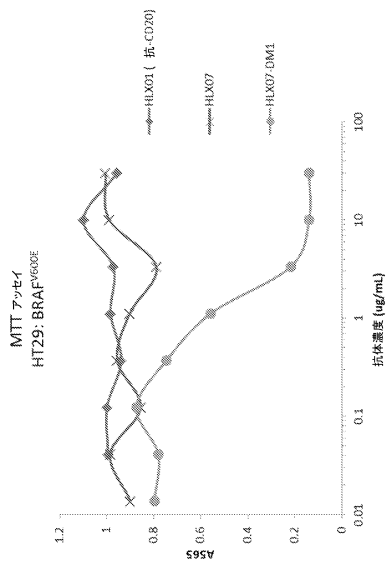
【 図 1 4 A 】



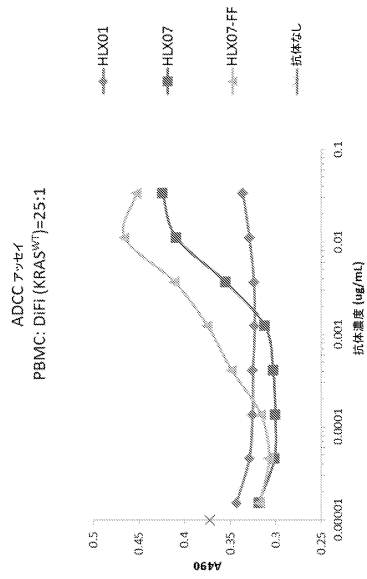
【 図 1 4 B 】



【 図 1 4 C 】

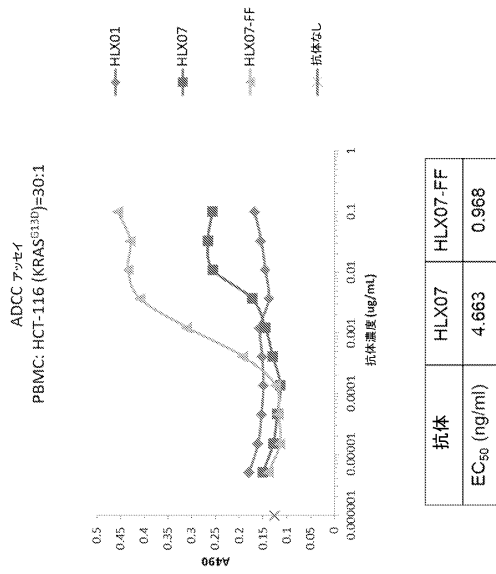


【 図 1 5 A 】

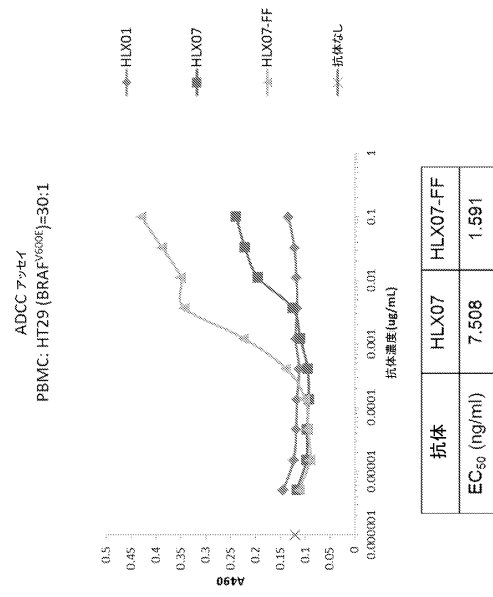


抗体	HLX07	HLX07-FF
EC ₅₀ (ng/ml)	4.388	1.69

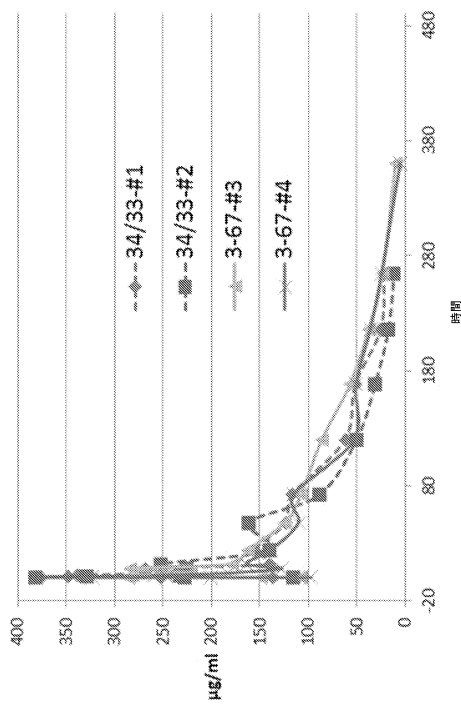
【 図 1 5 B 】



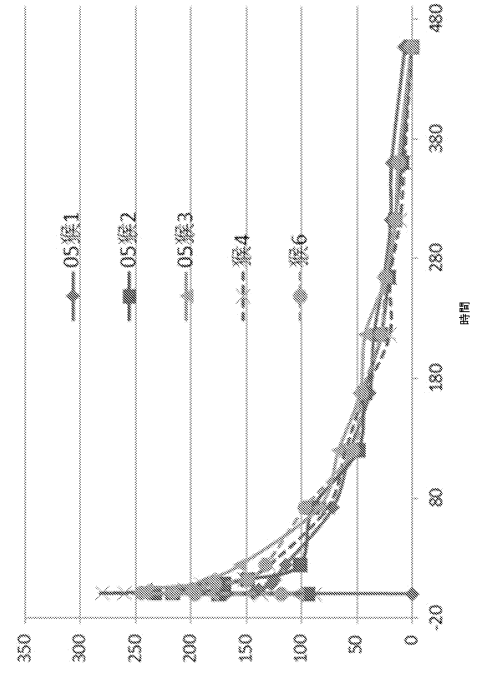
【 図 1 5 C 】



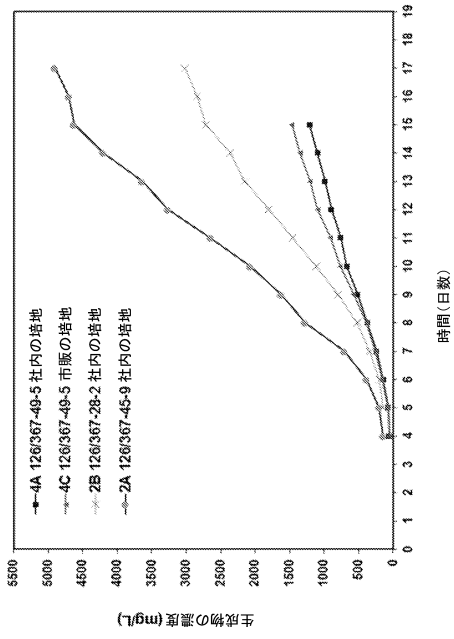
【 図 1 6 A 】



【 図 1 6 B 】



【 図 17 】



【 配列表 】

[0006691872000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 N
G 0 1 N	33/536 (2006.01)	G 0 1 N	33/536 C
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 H
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00

(72)発明者 リン, ペイ - ホア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 7, サニーヴェール, サニーヴェール サラトガ
 ロード 1 2 3 4, アパートメント 2

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 3 4 7 4 3 (W O , A 1)
 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 1 1 7 1 1 0 (U S , A 1)
 特表 2 0 0 9 - 5 1 5 8 7 8 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 2 / 1 3 0 4 7 1 (W O , A 1)
 特表 2 0 1 4 - 5 0 0 7 1 1 (J P , A)
 Nakanishi T et al, Development of an affinity-matured humanized anti-epidermal growth factor receptor antibody for cancer immunotherapy, Protein Engineering Design and Selection, 2 0 1 3 年, Vol.26, No.2, pp.113-122
 Chang K et al, Affinity Maturation of an Epidermal Growth Factor Receptor Targeting Human Monoclonal Antibody ER414 by CDR Mutation, Immune Network, 2 0 1 2 年, Vol.12, No.4, pp.155-164
 Lippow S et al, Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation, Nature Biotechnology, 2 0 0 7 年, No.25, No.10, pp.1171-1176
 Friedman M et al, Directed Evolution to Low Nanomolar Affinity of a Tumor-Targeting Epidermal Growth Factor Receptor-Binding Affibody Molecule, J Mol Biol, 2 0 0 8 年, Vol.376, pp.1388-1402
 Baumann M et al, EGFR-targeted anti-cancer drugs in radiotherapy: preclinical evaluation of mechanisms, Radiother Oncol, 2 0 0 7 年, Vol.83, pp.238-248
 Gerdes C et al, GA201 (RG7160): a novel, humanized, glycoengineered anti-EGFR antibody with enhanced ADCC and superior in vivo efficacy compared with cetuximab, Clin Cancer Res, 2 0 1 3 年, Vol.19, No.5, pp.1126-1138

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

专利名称(译)	抗表皮生长因子受体 (egfr) 抗体		
公开(公告)号	JP6691872B2	公开(公告)日	2020-05-13
申请号	JP2016571061	申请日	2015-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	汉霖生技股份有限公司		
[标]发明人	チアンウェイトン リンペイホア		
发明人	チアン, ウェイ-トン リン, ペイ-ホア		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/46 G01N33/53 G01N33/536 A61K39/395 A61P35/00		
CPC分类号	A61K47/6803 A61K47/6849 A61P35/00 C07K16/2863 C07K2317/565 C07K2317/71 C07K2317/732 C07K2317/92 A61K39/39591 A61K2039/505 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/41 C07K2317/73 G01N33/5748 G01N2333/71		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/46 G01N33/53.N G01N33/536.C A61K39/395.H A61P35/00		
优先权	62/005887 2014-05-30 US		
其他公开文献	JP2017521054A5 JP2017521054A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了抗表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体, 无糖基化的CDR-H2抗EGFR抗体及其抗原结合片段。还提供了编码抗EGFR抗体或其抗原结合片段的分离的核酸分子, 相关的表达载体和宿主细胞。提供了制备抗表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体, 无糖基化CDR-H2抗EGFR抗体及其抗原结合片段的方法。还提供了相关的药物组合物及其用于治疗受试者的方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6691872号 (P6691872)
(45) 発行日 令和2年5月13日 (2020. 5. 13)	(24) 登録日 令和2年4月15日 (2020. 4. 15)	
(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	
請求項の数 28 (全 72 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2016-571061 (P2016-571061)	(73) 特許権者 516359779	
(86) (22) 出願日 平成27年5月29日 (2015. 5. 29)	ヘンリクス バイオテック カンパニー	
(65) 公表番号 特表2017-521054 (P2017-521054A)	リミテッド	
(43) 公表日 平成29年8月3日 (2017. 8. 3)	台湾 タイペイ 11494, セクショ	
(88) 国際出願番号 PCT/US2015/033402	ン 6 ミンカン イースト ロード,	
(87) 国際公開番号 W02015/184403	レーン 15, 36番, 5エフ	
(87) 国際公開日 平成27年12月3日 (2015. 12. 3)	110002077	
審査請求日 平成30年5月28日 (2018. 5. 28)	(74) 代理人 園田・小林特許業務法人	
(31) 優先権主張番号 62/005, 887	チアン, ウェイ-トン	
(32) 優先日 平成26年5月30日 (2014. 5. 30)	アメリカ合衆国 カリフォルニア 951	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	29, サンノゼ, イラファ コート	
	1438	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 抗上皮増殖因子受容体 (E G F R) 抗体		