明 細 書

発明の名称 :

ヒト化抗Epiregulin抗体および当該抗体を有効成分として含む癌治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、癌の治療方法、ならびに癌細胞の増殖抑制剤および抗癌剤に関する。

背景技術

[0002] 癌は、先進国において、死亡率の主要原因である。癌治療の目的で、多くの化学療法剤が過去50年間に開発された。化学療法剤の大半は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アンスラサイクリン（anthracycline）、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、及び抗腫瘍剤に分類することができる。これらの薬剤すべてが細胞分裂又はDNAの合成に影響し、何らかの形で機能するメカニズムを通して治療効果をもたらす。

[0003] 特定の化学療法剤の有効性は、癌の間で、患者の間で、あるいは個々の患者における時間経過により異なる。化学療法剤に曝露された癌細胞は、こうした化学療法剤に対する耐性を生じ、他の複数の抗癌剤に対しても同様に交差耐性を生じることも多い。さらに、上記の化学療法剤のメカニズムによってこれらの化学療法剤が正常細胞に与える細胞傷害の結果もたらされる副作用を制御するため、化学療法剤の用量または用法は多くの場合制約される。

[0004] 従来の化学療法剤に代わり近年癌細胞に特異的に発現する分子を標的とする分子標的薬の開発が進められている。こうした分子標的薬の登場によって従来の化学療法剤に固有の副作用が回避され癌患者のQOLに寄与する癌治療が可能となっている。こうした分子標的薬には低分子（small molecule）の薬剤のほか抗体等の高分子の薬剤も含まれる。治療抗体は、生体内に生来存在する分子であり生体に与える毒性が低いという利点のほか、エフェクター機能を介した細胞傷害活性等の低分子薬剤以外の作用機序によって標的細胞を特異的に傷害し治療効果を発揮する利点も有するため、近年多くの治療抗体

が上市されてきている。

[0005] こうしたエフェクター機能を介した細胞傷害活性等の低分子薬剤以外の作用機序によって標的細胞を特異的に傷害する抗体として、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、腎癌で高発現しているEpiregulinを標的とする治療抗体が開示されている（特許文献１）。具体的には、抗Epiregulin抗体の補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity; CDC）活性、更に抗体依存性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC）活性を測定したところ、抗Epiregulin抗体はEpiregulinを発現する細胞に対してCDC活性およびADCC活性を有することが見出された。また、抗Epiregulin抗体が、癌細胞株に対し中和作用による増殖抑制効果があることが明らかにされた。更には以上の知見により、抗Epiregulin抗体が、原発性の、あるいは転移性の各種の癌の診断、予防および治療に有効であることが見出された。

[0006] 前記のような抗癌剤を含めいかなる新規の候補薬剤も、市販されるためには厳密な試験を通過しなければならない。例えば、こうした試験は前臨床試験および臨床試験に区分される。そのうち後者は、一般的に、第I相試験、第II相試験、および第III相試験にさらに細分化され、ヒト患者を用いて行われる一方で、前者は動物を用いて実施される。一般的に、前臨床試験の目的は、薬剤候補が作用するとともに、当該薬剤が有効でありそして安全であることを立証することである。具体的には、これらの動物試験の目的は、薬剤が発癌性でなく、突然変異誘発性でなく、または催奇形性でないことを立証するとともに、薬剤の薬物動態学を理解することである。前臨床試験において動物に対する被験薬剤の安全性および被験薬剤が有効性である可能性が確立された場合のみ、当該被験薬剤がヒトに投与される臨床試験が認可される。

[0007] 動物における、低分子（small molecule）の被験薬剤（例えばアンスラサイクリンから誘導される新規抗癌剤）の作用は、多くの場合で、ヒトに対する投与に際して当該薬剤の予想される作用の指標となり得る。したがって、こうした前臨床試験から得られるデータは、一般的に、ヒトに投与された場合の作用に対する高い予測性を与えるであろう。しかしながら、こうした予

測性は、あらゆる種類の被験薬剤で得られるものではなく、前臨床試験の結果からの予測性、および臨床試験に関して薬剤候補が認可される可能性は、非常に減少する。

[0008] 一般的に、抗体は、通常はタンパク質性である標的分子を極めて特異的に認識することによって機能することが可能である。殆どの場合がモノクローナル抗体である被験抗体薬剤は、標的分子上の単一部位、または単一エピトープのみを認識する。モノクローナル抗体が従来有する高い標的の識別機能のため、抗体は薬剤開発のための非常に興味深い候補となっている一方で、この識別機能のために前臨床試験が困難になる場合がある。これは、こうした抗体が結合する標的分子の配列に、種依存的な変異があるためである。ヒトにおいて、例えば、エピトープXを介して分子Yを特異的に認識し、そして当該分子に結合するモノクローナル抗体は、前臨床試験に用いる生物種中の対応標的分子（オルソログ）Y'中に対応して存在するエピトープX'が、ヒトにおいて対応する標的分子中に存在するXと異なる可能性もあるため、しばしば、非ヒト種において、オルソログ分子Y'を特異的に認識し、当該分子に結合することができない。ヒトおよび霊長類抗原に対し反応性を持つモノクローナル抗体群間であってさえ、ヒトおよびチンパンジー抗原相同体としか反応しない抗体の例が多くある。例えば、抗CD3モノクローナル抗体に関してそのような例が観察されている。最も広く用いられそして最もよく性質決定されている、CD3複合体に特異的なモノクローナル抗体の１つはOKT-3であるが、これはチンパンジーCD3と反応するが、他の霊長類、例えばアカゲザルのCD3相同体、あるいはイヌCD3とは反応しない（非特許文献２）。他方、アカゲザル抗原を認識するが、そのヒトオルソログを認識しない、モノクローナル抗体の例も存在する。このグループの一例が、アカゲザル由来のCD3に対するモノクローナル抗体FN-18である（非特許文献２）。

[0009] 前記のようなモノクローナル抗体の高い特異性から生じる前臨床動物試験における問題に対抗するため、いくつかの戦略が採用されている。

[0010] 第一の公知のアプローチは、チンパンジー・モデルを用いて、被験抗体薬

剤の前臨床試験を実施することである。チンパンジーは、遺伝的類縁がヒトに最も近く、そのゲノムは99%に渡ってヒトのゲノムと同一であるため、被験抗体薬剤が特異的に結合する標的分子のチンパンジーにおける変異は、この分子のヒトにおける変異と同一である可能性が非常に高く、実際Schlerethらは$CD3$の変異がヒトとチンパンジーとで共通していることを見出した（非特許文献３）。したがって、チンパンジーにおいて、被験抗体薬剤によってこの分子が認識されない危険性は少ないと考えられる。しかし、チンパンジーを用いた試験は非常に高価であり、そして倫理的問題が伴う。さらに、チンパンジーは絶滅危険動物であるため実験に使用可能な動物の数は非常に限定されている。したがって、被験抗体薬剤の大部分の開発では、チンパンジーにおけるこうした前臨床試験は、排除されている。

[0011] 第二のアプローチは、前臨床試験で用いる分子を、この試験に用いる動物に適応させるアプローチである。このアプローチでは、試験動物へ投与するため、いわゆる「代理（サロゲート）」抗体を構築することによって、前臨床試験において、必須の安全性情報が得られる。一般的に、こうした代理抗体は、非代理抗体、すなわちヒトにおける実際の被験抗体薬剤が結合する標的分子の試験動物のオルソログを特異的に認識し、そして当該オルソログに結合するように修飾されている抗体である。したがって、こうした「代理」抗体を用いたアプローチでは、二つの異なる分子、すなわち被験臨床薬剤と当該被験臨床薬剤の標的特異性に対応する、動物種における前臨床試験のための被験前臨床薬剤を別個に開発し、その安全性等を調べなければならない。こうした代理アプローチの大きな欠点は、前臨床試験のための代理抗体が、被験臨床抗体薬剤の修飾物であることである。したがって、代理抗体を用いた前臨床試験で得られるデータは、しばしば、ヒトに直接適用できないことがある。そのため、これらのアプローチを用いた前臨床研究の試験結果にもとづく臨床試験結果の結果の予見性が減少する可能性がある。

[0012] 上記アプローチは、前臨床試験に用いる動物に適合するように被験薬剤を適応させるアプローチである。他方、他の公知のアプローチは、ヒトへ投与

される薬剤候補に、前臨床試験に用いる動物を適応させるアプローチである。

[0013] ヒトへの投与が意図される被験抗体薬剤に試験動物を適応させる一つの例は、当該試験動物の種に内因性である非ヒト分子に代えて、被験抗体薬剤が特異的に結合するヒト分子を発現するトランスジェニック動物を生成することである。この方式では、前臨床試験において投与される被験抗体薬剤は、当該トランスジェニック試験動物において、ヒト抗原に結合するであろう。このような例として、Bugelskiらによって行われた研究では、ヒト患者における関節リウマチの長期治療を予測するため、ヒトCD4トランスジェニックマウスを用いて、モノクローナル抗体ケリキシマブの前臨床安全性評価が行われた。ケリキシマブは、ヒトおよびチンパンジーのCD4に対する特異性を有するモノクローナル抗体である。Bugelskiらは、ヒトタンパク質を発現するトランスジェニックマウスの使用が、限定された交差種特異性を有する生物薬剤を用いたチンパンジーにおける研究の有用な代替法を提供すると結論している。しかし、試験目的のためのトランスジェニック動物の作製には、多くの労力が必要となるため時間およびコストがかかる。

先行技術文献

特許文献

[0014] 特許文献1：WO2008/047723

非特許文献

[0015] 非特許文献1：J.Med.Primatol. (1986) 15, 441-451

非特許文献2：J.Med.Primatol. (2001) 40, 141-147

非特許文献3：Cancer Immunol. Immunother. (2005) 20, 1-12

非特許文献4：Hum.Exp.Toxicol. (2000) 19, 230-243

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0016] 本発明は、非ヒト動物およびヒト動物間の種交差反応性（cross-species r

eactivity）を示す抗Epiregulin抗体に関する。本発明はさらに、化学的分解が抑制された抗Epiregulin抗体に関する。本発明はまた、等電点が低下した抗Epiregulin抗体に関する。さらに、本発明は、会合体量の低減された抗Epiregulin抗体に関する。また、本発明は、前記の抗Epiregulin抗体を含む医薬組成物、または癌治療剤に関する。さらに、本発明は前記抗Epiregulin抗体の製造方法に関する。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者らはヒトEpiregulinを発現する癌細胞に対して細胞傷害活性および中和活性を発揮することによって癌細胞の増殖を阻害するヒト化EP27抗体の可変領域配列中のアミノ酸残基をアルギニン残基に置換することによって、カニクイザルから単離されたEpiregulinに対する結合活性とヒトEpiregulinに対する結合活性の比が上昇することを見出した。すなわち、本発明者らは非ヒト動物であるカニクイザルおよびヒト動物間の種交差反応性（cross-species reactivity）を示す抗Epiregulin抗体を作出した。また、ヒト化EP27抗体の可変領域配列中のアミノ酸残基を適宜置換することによって、化学的分解が抑制された抗Epiregulin抗体が作出された。さらに、ヒト化EP27抗体の可変領域配列中のアミノ酸残基を適宜置換することによって、等電点が低下した抗Epiregulin抗体が作出された。また、ヒト化EP27抗体の可変領域配列中のアミノ酸残基を適宜置換することによって、会合体量の低減された抗Epiregulin抗体が作出された。また、本発明者らは、これらの性質を有する抗Epiregulin抗体が癌細胞株に対し細胞傷害活性および中和活性による増殖抑制効果を示すことを明らかにした。更には以上の知見により、本発明者らは、抗Epiregulin抗体が、原発性の、あるいは転移性の各種の癌の治療に有効であることを見出して、本発明を完成させた。

[0018] より具体的には、本発明は、以下に関する。

〔１〕配列番号：９、１０および１１で表される重鎖可変領域ＣＤＲならびに配列番号：１２、１３および１４で表される軽鎖可変領域ＣＤＲを含む抗Epiregulin抗体が結合するエピトープに結合する抗体であって、配列番号：１

７０で表されるサルEpiregulinに対するＫＤ値（ｃＥＲＥＧ　ＫＤ）の配列番号：３４で表されるヒトEpiregulinに対するＫＤ値（ｈＥＲＥＧ　ＫＤ）の比（ｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤ）が、配列番号：９、１０および１１で表される重鎖可変領域ＣＤＲならびに配列番号：１２、１３および１４で表される軽鎖可変領域ＣＤＲを含む抗Epiregulin抗体のｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤよりも小さいことを特徴とする抗Epiregulin抗体。

〔２〕ｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤが、４０よりも小さい〔１〕に記載の抗体。

〔３〕ｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤが、１０よりも小さい〔１〕に記載の抗体。

〔４〕ｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤが、６よりも小さい〔１〕に記載の抗体。

〔５〕ｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤが、４よりも小さい〔１〕に記載の抗体。

〔６〕配列番号：９で表される重鎖ＣＤＲ１、配列番号：１６１、１６０、１５９、１５７、１５６、１５５、１５３、１０８、１０７、１０６、１０５、１０４、１０３、１０２、１０１、および１００からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１５８、１５４、１５２、１５１、１１２、１１１、１１０、および１１からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、ならびに、配列番号：１６３、６８、６７および１２からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ１、配列番号：７１、６９、および１３からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１６４、４８、４７および１４からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む〔１〕から〔５〕のいずれかに記載の抗体。

〔７〕配列番号：１５０、１４９、１４８、１４７、１４６、１４５、１４４、１４３、１４２、１４０、１３９、１３８、１３７、１３５、１３４、１３３、１３２、１３１、１２７、１２６、１２５、１２４、１２３、１２２、１２１、１２０、１１９、１１８、１１７、１１６、および１１５から

なる群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：１４１、１３６、１３０、１２９、１２８、９９、８５、８４、８３、８２、８１、８０、５８、５７、および２９からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む〔１〕から〔５〕のいずれかに記載の抗体。

〔８〕以下のいずれかから選択される抗Epiregulin抗体

（１）配列番号：１５０、１４９、１４８、１４７、１４６、１４５、１４４、１４３、１４２、１４０、１３９、１３８、１３７、１３５、１３４、１３３、１３２、１３１、１２７、１２６、１２５、１２４、１２３、１２２、１２１、１２０、１１９、１１８、１１７、１１６、１１５、９８、９７、９６、９５、９４、９３、９２、７９、７８、７７、７６、７５、７４、７３、７２、５６、５５、５４、５３、５２、５１、５０、４９、および３８からなる群から選択される重鎖可変領域を含む抗Epiregulin抗体、

（２）配列番号：１４１、１３６、１３０、１２９、１２８、９９、８５、８４、８３、８２、８１、８０、５８、５７、および２９からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む抗Epiregulin抗体、または

（３）配列番号：１５０、１４９、１４８、１４７、１４６、１４５、１４４、１４３、１４２、１４０、１３９、１３８、１３７、１３５、１３４、１３３、１３２、１３１、１２７、１２６、１２５、１２４、１２３、１２２、１２１、１２０、１１９、１１８、１１７、１１６、１１５、９８、９７、９６、９５、９４、９３、９２、７９、７８、７７、７６、７５、７４、７３、７２、５６、５５、５４、５３、５２、５１、５０、４９、および３８からなる群から選択される重鎖可変領域、ならびに、配列番号：１４１、１３６、１３０、１２９、１２８、９９、８５、８４、８３、８２、８１、８０、５８、５７、および２９からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む抗Epiregulin抗体。

〔９〕配列番号：２６の重鎖定常領域を含む〔６〕から〔８〕のいずれかに記載の抗体。

〔１０〕配列番号：２７の軽鎖定常領域を含む〔６〕から〔９〕のいずれか

に記載の抗体。

〔１１〕中和活性を有する〔1〕から〔１０〕のいずれかに記載の抗体。

〔１２〕細胞傷害活性を有する〔1〕から〔１１〕のいずれかに記載の抗体。

〔１３〕細胞傷害活性がＣＤＣおよび/またはADCCである〔１２〕に記載の抗体。

〔１４〕増殖抑制剤または細胞傷害性物質が連結された〔1〕から〔１２〕のいずれかに記載の抗体。

〔１５〕抗体が低分子抗体である〔１４〕に記載の抗体。

〔１６〕配列番号：２６の重鎖定常領域において、ＥＵナンバリングで表される２３０位、２４０位、２４４位、２４５位、２４７位、２６２位、２６３位、２６６位、２７３位、２７５位、２９９位、３０２位、３１３位、３２３位、３２５位、３２８位および３３２位からなる群から選択されるアミノ酸の少なくとも１つの置換を含む〔１２〕から〔１５〕のいずれかに記載の抗体。

〔１７〕配列番号：９の重鎖ＣＤＲ１、配列番号：１６１、１６０、１５９、１５７、１５６、１５５、１５３、１０８、１０７、１０６、１０５、１０４、１０３、１０２、１０１、および１００からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１５８、１５４、１５２、１５１、１１２、１１１、１１０、および１１からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含むベクター。

〔１８〕配列番号：２６の重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドを含む〔１７〕に記載のベクター。

〔１９〕配列番号：１６３、６８、６７および１２からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ１、配列番号：７１、６９、および１３からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１６４、４８、４７および１４からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含むベクター。

〔２０〕配列番号：２７の軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドを含む〔１９〕に記載のベクター。

〔２１〕（１）配列番号：９で表される重鎖ＣＤＲ１、配列番号：１６１、１６０、１５９、１５７、１５６、１５５、１５３、１０８、１０７、１０６、１０５、１０４、１０３、１０２、１０１、および１００からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１５８、１５４、１５２、１５１、１１２、１１１、１１０、および１１からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、および、

（２）配列番号：１６３、６８、６７および１２からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ１、配列番号：７１、６９、および１３からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１６４、４８、４７および１４からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含むベクター。

〔２２〕（１）配列番号：９で表される重鎖ＣＤＲ１、配列番号：１６１、１６０、１５９、１５７、１５６、１５５、１５３、１０８、１０７、１０６、１０５、１０４、１０３、１０２、１０１、および１００からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１５８、１５４、１５２、１５１、１１２、１１１、１１０、および１１からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、ならびに、配列番号：２６で表される重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチド、および

（２）配列番号：１６３、６８、６７および１２からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ１、配列番号：７１、６９、および１３からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１６４、４８、４７および１４からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、ならびに、配列番号：２７で表される軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドを含むベクター。

〔２３〕配列番号：２６で表される重鎖定常領域をコードするポリヌクレオ

チドにおいて、ＥＵナンバリングで表される221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択されるアミノ酸の少なくとも１つの置換をコードする変異ヌクレオチドを含む〔１８〕または〔２２〕に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

〔２４〕〔１７〕および〔１９〕に記載のベクター、〔１８〕および〔２０〕に記載のベクター、〔２１〕または〔２２〕に記載のベクターを含む宿主細胞。

〔２５〕〔２３〕に記載のベクターを含む宿主細胞。

〔２６〕前記宿主細胞が、糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞である〔２５〕に記載の宿主細胞。

〔２７〕前記糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞が、フコシルトランスフェラーゼ、フコーストランスポーター、ＧＭＤ（ＧＤＰ－マンノース４，６－デヒドラターゼ）、Ｆｘ（ＧＤＰ－ケト－６－デオキシマンノース３，５－エピメラーゼ，４－レダクターゼ）、およびＧＦＰＰ（ＧＤＰ－β－Ｌ－フコースピロフォスフォリラーゼ）からなる群から選択される機能性タンパク質の一つまたはそれ以上が欠損している宿主細胞である〔２６〕に記載の宿主細胞。

〔２８〕前記宿主細胞が、糖鎖にバイセクティングN-アセチルグルコサミン構造を形成する能力を有する宿主細胞である〔２５〕に記載の宿主細胞。

〔２９〕前記糖鎖にバイセクティングN-アセチルグルコサミン構造を形成する能力を有する宿主細胞が、β（１，４）－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有し、およびゴルジ常在ポリペプチドの機能性のゴルジ局在化ドメインをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞である〔２８〕に記載の宿主細胞。

〔３０〕マンノシダーゼＩＩの局在化ドメイン、β（１，２）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩの局在化ドメイン、β（１，２）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩの局在化ドメイン、マンノシダーゼＩの局在化ドメイン、およびα１－６コアフコシルトランスフェラーゼの局在化ドメインからなる群から選択される機能性のゴルジ局在化ドメインをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含み、β（１，４）－ガラクトシルトランスフェラーゼの触媒ドメインを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞である〔２９〕に記載の宿主細胞。

〔３１〕宿主細胞が、ＣＨＯ細胞、ＢＨＫ細胞、ＮＳ０細胞、ＳＰ２／０細胞、ＹＯ骨髄腫細胞、Ｐ３Ｘ６３マウス骨髄腫細胞、ＰＥＲ細胞、ＰＥＲ．Ｃ６細胞、ＨＥＫ２９３細胞、またはハイブリドーマ細胞からなる群から選択される宿主細胞である〔２４〕から〔３０〕のいずれかに記載の宿主細胞。

〔３２〕〔２４〕から〔３１〕のいずれかに記載の宿主細胞の培養液から回収することを含む〔１〕から〔１６〕のいずれかに記載の抗体を製造する方法。

〔３３〕〔３２〕に記載の方法によって製造された抗体。

〔３４〕増殖抑制剤または細胞傷害性物質が連結された〔３３〕に記載の抗体。

〔３５〕〔１〕から〔１６〕または〔３３〕から〔３４〕のいずれかに記載

の抗体を有効成分として含む医薬組成物。

〔３６〕〔１〕から〔１６〕または〔３３〕から〔３４〕のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む癌治療剤または癌の再発もしくは転移抑制剤。

〔３７〕癌が、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、および腎癌からなる群から選択されるいずれかの癌である〔３６〕に記載の癌治療剤または癌の再発もしくは転移抑制剤。

〔３８〕前記大腸癌が、低分化大腸癌、中分化大腸癌、高分化大腸癌である〔３７〕に記載の癌治療剤または癌の再発もしくは転移抑制剤。

〔３９〕前記癌治療剤が投与される対象が、単離された組織標品で検出されたEpiregulinタンパク質が発現している癌細胞を含む対象である、〔３６〕から〔３８〕のいずれかに記載の癌治療剤または癌の再発もしくは転移抑制剤。

[0019] また本発明は、本発明の抗体または本発明の製造方法により製造された抗体を対象へ投与する工程を含む、細胞増殖を抑制する方法、癌を予防もしくは治療する方法、または癌の再発もしくは転移を抑制する方法に関する。また本発明は、本発明の抗体または本発明の製造方法により製造された抗体の、細胞増殖抑制剤、癌予防剤もしくは癌治療剤、または癌の再発もしくは転移の抑制剤の製造における使用に関する。また本発明は、細胞増殖の抑制、癌の予防もしくは治療、または癌の再発もしくは転移の抑制において使用するための、本発明の抗体または本発明の製造方法により製造された抗体に関する。また本発明は、本発明の抗体または本発明の製造方法により製造された抗体を使用する工程を含む、細胞増殖抑制剤、癌予防剤もしくは癌治療剤、または癌の再発もしくは転移の抑制剤を製造する方法に関する。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]各抗体におけるヒトEpiregulinに対するaffinity比（各抗体のKD値/キメラ抗体EP27のKD値）を示したグラフである。抗体名の表記は可変領域のみを記載したが、重鎖はG1d、軽鎖はkappaの定常領域を含む抗体の試験結果である。

[図2]各抗体におけるaffinity比（サルEpiregulinに対するKD値/ヒトEpiregulinに対するKD値）を示したグラフである。抗体名の表記は可変領域のみを記載したが、重鎖はG1d、軽鎖はkappaの定常領域を含む抗体の試験結果である。

[図3]各抗体におけるヒトEpiregulinに対するaffinity比（各抗体のKD値/キメラ抗体EP27のKD値）を示したグラフである。

[図4]各抗体におけるaffinity比（サルEpiregulinに対するKD値/ヒトEpiregulinに対するKD値）を示したグラフである。

[図5]各抗体によるADCC活性（特異的カルセインAM遊離率）を示したグラフである。

[図6]各抗体による中和活性をヒトEpiregulinに依存的なBAF_EGFR細胞増殖阻害率で示したグラフである。

[図7]各抗体における中和活性をサルEpiregulinに依存的なBAF_EGFR細胞増殖阻害率で示したグラフである。

[図8]各抗体によるin vivoヒト腫瘍増殖抑制活性をヒト癌細胞移植マウスモデルにおける抗腫瘍活性で示したグラフである。

[図9]ヒトEpiregulin (hsEREG-His) およびサルEpiregulin (cysEREG-His) の電気泳動パターンを示した泳動像である。

[図10]互いに異なる量のEpiregulinタンパク質を発現する細胞の蛍光染色、および当該細胞が移植されたマウスの組織免疫学染色を示した図である。

[図11]互いに異なる量のEpiregulinタンパク質を発現する細胞に対するADCC活性を示したグラフである。

[図12]in vivoヒト腫瘍増殖抑制活性を互いに異なる量のEpiregulinタンパク質を発現する細胞が移植されたマウスモデルにおける抗腫瘍活性で示したグラフである。

[図13]低分化大腸癌の臨床症例におけるEpiregulinの発現を示す図である。

[図14]大腸癌の転移に対する薬効を表す、大腸癌幹細胞PLR123の腫瘍生着に対するEP27ヒト化Glycomab抗体の薬効を示す図である。

[図15]大腸癌幹細胞の転移に対する薬効を表す、大腸癌幹細胞PLR123の肺転移に対するEP27ヒト化Glycomab抗体の薬効を示す図である。

[図16]低分化大腸癌モデルCOL-53-JCKを用いたEP27ヒト化Glycomab抗体の低分化大腸癌に対する薬効を示す図である。

[図17]中分化大腸癌モデルPLR379を用いたEP27ヒト化Glycomab抗体の中分化大腸癌に対する薬効を示す図である。

[図18]肺腺癌の臨床症例におけるEpiregulinの発現を示す図である。

[図19]ヒト肺腺癌株Calu-3に対するEP27ヒト化Glycomab抗体のADCC活性（特異的カルセインAM遊離率）を示したグラフである。

[図20]肺腺癌モデルCalu-3を用いたEP27ヒト化Glycomab抗体の肺腺癌に対する薬効を示した図である。

[図21]EP27ヒト化Glycomab抗体を含む抗体薬物複合体がEpiregulinを発現するDLD-1細胞株の細胞内にインターナライズし、DLD-1細胞株に対して細胞傷害を引き起こすことを示した図である。

発明を実施するための形態

[0021] 本発明は、非ヒト動物およびヒト動物間の種交差反応性（cross-species reactivity）を示す抗Epiregulin抗体に関する。本発明はさらに、化学的分解が抑制された抗Epiregulin抗体に関する。本発明はまた、等電点が低下した抗Epiregulin抗体に関する。さらに、本発明は、会合体量の低減された抗Epiregulin抗体に関する。また、本発明は、前記の抗Epiregulin抗体を含む医薬組成物、または癌治療剤に関する。さらに、本発明は前記抗Epiregulin抗体の製造方法に関する。

[0022] 以下の定義および詳細な説明は、本明細書において説明する本発明の理解を容易にするために提供される。

[0023] 定義

アミノ酸

本明細書においては、たとえば、Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、T

rp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/Vと表されるように、アミノ酸を1文字コードまたは3文字コード、またはその両方で表記する。なお、本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれるアミノ酸は翻訳後に修飾（例えば、N末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である）を受ける場合もあるが、そのようにアミノ酸が翻訳後修飾された場合であっても当然のことながら本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれる。

[0024] 抗原

本発明が提供する抗体は抗原としてEpiregulinに結合する。Epiregulinは、膜結合型上皮細胞成長因子蛋白質である。そのアミノ酸配列は、GenBank登録番号NP_001423（配列番号：１６７）に開示されている。本発明において、Epiregulinの定義には、全長タンパク質およびその断片の両方が含まれる。断片とは、Epiregulinの任意の領域を含むポリペプチドであり、天然のEpiregulinの機能を有していなくてもよい。断片の例として、Epiregulinの細胞外領域を含む断片が挙げられる。Epiregulinの細胞外領域は配列番号：１６７のアミノ酸配列において30-118番目が相当する。又、膜貫通領域は配列番号：１６７のアミノ酸配列において119-140番目が相当する。また、本明細書においてEpiregulinをEREGと称することもあるが、これらは同義の用語として用いられる。

[0025] 抗原中に存在する抗原決定基を意味するエピトープは、本明細書において開示される抗Epiregulin抗体中の抗原結合ドメインが結合する抗原上の部位を意味する。よって、例えば、エピトープは、その構造によって定義され得る。また、当該エピトープを認識する抗Epiregulin抗体の抗原に対する結合活性によっても当該エピトープが定義され得る。抗原がペプチド又はポリペプチドである場合には、エピトープを構成するアミノ酸残基によってエピトープを特定することも可能である。また、エピトープが糖鎖である場合には、特定の糖鎖構造によってエピトープを特定することも可能である。

[0026] 線状エピトープは、例えばアミノ酸の一次配列中で連続する複数のアミノ

酸からなるエピトープのように、アミノ酸の一次配列から認識されるエピトープである。線状エピトープは、典型的には、少なくとも3つ、および最も普通には少なくとも5つ、例えば約8ないし約10個、6ないし20個のアミノ酸が固有の配列において含まれる。

[0027] 立体構造エピトープは、線状エピトープとは対照的に、エピトープを含むアミノ酸の一次配列が、認識されたエピトープの単一の規定成分ではないエピトープ（例えば、アミノ酸の一次配列が、必ずしもエピトープを規定する抗体により認識されないエピトープ）である。立体構造エピトープは、線状エピトープに対して増大した数のアミノ酸を包含するかもしれない。立体構造エピトープの認識に関して、抗体は、ペプチドまたはタンパク質の三次元構造を認識する。例えば、タンパク質分子が折り畳まれて三次元構造を形成する場合には、立体構造エピトープを形成するあるアミノ酸および/またはポリペプチド主鎖は、並列となり、抗体がエピトープを認識するのを可能にする。エピトープの立体構造を決定する方法には、例えばX線結晶学、二次元核磁気共鳴分光学並びに部位特異的なスピン標識および電磁常磁性共鳴分光学が含まれるが、これらには限定されない。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996)、第66巻、Morris (編) を参照。

[0028] 結合活性

下記に抗体によるEpiregulin、すなわちEpiregulin分子中に存在するエピトープに対する結合の確認方法が例示されるが、下記の方法に限定されるものではなく、当業者は抗体の抗原に対する結合活性を測定する公知の方法を適宜使用することが可能である。

[0029] 例えば、抗Epiregulin抗体が、Epiregulin分子中に存在する線状エピトープを認識することは、たとえば次のようにして確認することができる。上記の目的のためにEpiregulinの細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状のペプチドが合成される。当該ペプチドは、化学的に合成され得る。あるいは、EpiregulinをコードするcDNA（例えば、cDNA配列としてCR541887

（配列番号：１６９）等が、mRNA配列としてNM_001432等がその例として挙げられ得る）中の、細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列をコードする領域を利用して、遺伝子工学的手法により得られる。次に、細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドと、抗Epiregulin抗体との結合活性が評価される。たとえば、固定化された線状ペプチドを抗原とするELISAによって、当該ペプチドに対する当該抗体の結合活性が評価され得る。あるいは、Epiregulin発現細胞に対する当該抗体の結合における、線状ペプチドによる阻害のレベルに基づいて、線状ペプチドに対する結合活性が明らかにされ得る。これらの試験によって、線状ペプチドに対する当該抗体の結合活性が明らかにされ得る。

[0030] また、抗Epiregulin抗体が立体構造エピトープを認識することは、次のようにして確認され得る。上記の目的のために、Epiregulinを発現する細胞が調製される。抗Epiregulin抗体がEpiregulin発現細胞に接触した際に当該細胞に強く結合する一方で、当該抗体が固定化されたEpiregulinの細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドに対して実質的に結合しないとき等が挙げられる。ここで、実質的に結合しないとは、ヒトEpiregulin発現細胞に対する結合活性の80％以下、通常50％以下、好ましくは30％以下、特に好ましくは15％以下の結合活性をいう。

[0031] 抗Epiregulin抗体のEpiregulin発現細胞に対する結合活性を測定する方法としては、例えば、Antibodies A Laboratory Manual記載の方法（Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420）が挙げられる。即ちEpiregulin発現細胞を抗原とするELISAやFACS（fluorescence activated cell sorting）の原理によって評価され得る。

[0032] ELISAフォーマットにおいて、抗Epiregulin抗体のEpiregulin発現細胞に対する結合活性は、酵素反応によって生成するシグナルレベルを比較することによって定量的に評価される。すなわち、Epiregulin発現細胞を固定化したELISAプレートに被験抗体を加え、細胞に結合した被験抗体が、被験抗体を認識する酵素標識抗体を利用して検出される。あるいはFACSにおいては、被験

抗体の希釈系列を作成し、Epiregulin発現細胞に対する抗体結合力価（titer）を決定することにより、Epiregulin発現細胞に対する被験抗体の結合活性が比較され得る。

[0033] 緩衝液等に懸濁した細胞表面上に発現している抗原に対する被験抗体の結合は、フローサイトメーターによって検出することができる。フローサイトメーターとしては、例えば、次のような装置が知られている。

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

FACSCalibur™ （いずれもBD Biosciences社の商品名）

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

Cell Lab Quanta / Cell Lab Quanta SC（いずれもBeckman Coulter社の商品名）

[0034] 例えば、抗Epiregulin抗体のEpiregulinに対する結合活性の好適な測定方法の一例として、次の方法が挙げられる。まず、Epiregulinを発現する細胞と反応させた被験抗体を認識するFITC標識した二次抗体で染色する。被験抗体を適宜好適な緩衝液によって希釈することによって、当該抗Epiregulin抗体が所望の濃度に調製して用いられる。例えば、10μg/mLから10 ng/mLまでの間のいずれかの濃度で使用され得る。次に、FACSCalibur（BD社）により蛍光強度と細胞数が測定される。当該細胞に対する抗体の結合量は、CELL QUEST Software（BD社）を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、被験抗体の結合量によって表される被験抗体の結合活性が測定され得る。

[0035] 抗Epiregulin抗体が、ある抗体とエピトープを共有することは、両者の同

じエピトープに対する競合によって確認され得る。抗体間の競合は、交差ブロッキングアッセイなどによって検出される。例えば競合ELISAアッセイは、好ましい交差ブロッキングアッセイである。

[0036] 具体的には、交差ブロッキングアッセイにおいては、マイクロタイタープレートのウェル上にコートしたEpiregulinタンパク質が、候補となる競合抗体の存在下、または非存在下でプレインキュベートされた後に、被験抗体が添加される。ウェル中のEpiregulinタンパク質に結合した被験抗体の量は、同じエピトープに対する結合に対して競合する候補となる競合抗体の結合能に間接的に相関している。すなわち同一エピトープに対する競合抗体の親和性が大きくなればなる程、被験抗体のEpiregulinタンパク質をコートしたウェルへの結合活性は低下する。

[0037] Epiregulinタンパク質を介してウェルに結合した被験抗体の量は、予め抗体を標識しておくことによって、容易に測定され得る。たとえば、ビオチン標識された抗体は、アビジンペルオキシダーゼコンジュゲートと適切な基質を使用することにより測定される。ペルオキシダーゼなどの酵素標識を利用した交叉ブロッキングアッセイは、特に競合ELISAアッセイといわれる。抗体は、検出あるいは測定が可能な他の標識物質で標識され得る。具体的には、放射標識あるいは蛍光標識などが公知である。

[0038] 候補の競合抗体の非存在下で実施されるコントロール試験において得られる結合活性と比較して、競合抗体が、Epiregulinに対する抗体の結合を少なくとも20%、好ましくは少なくとも20-50%、さらに好ましくは少なくとも50%ブロックできるならば、当該被験抗体は競合抗体と実質的に同じエピトープに結合するか、又は同じエピトープに対する結合に対して競合する抗体である。

[0039] 抗Epiregulin抗体が結合するエピトープの構造が同定されている場合には、被験抗体と対照抗体とがエピトープを共有することは、当該エピトープを構成するペプチドにアミノ酸変異を導入したペプチドに対する両者の抗体の結合活性を比較することによって評価され得る。

[0040] こうした結合活性を測定する方法としては、例えば、前記のELISAフォーマットにおいて変異を導入した線状のペプチドに対する被験抗体及び対照抗体の結合活性を比較することによって測定され得る。ELISA以外の方法としては、カラムに結合した当該変異ペプチドに対する結合活性を、当該カラムに被検抗体と対照抗体を流下させた後に溶出液中に溶出される抗体を定量することによっても測定され得る。変異ペプチドを例えばGSTとの融合ペプチドとしてカラムに吸着させる方法は公知である。

[0041] また、同定されたエピトープが立体エピトープの場合には、被験抗体と対照抗体とがエピトープを共有することは、次の方法で評価され得る。まず、Epiregulinを発現する細胞とエピトープに変異が導入されたEpiregulinを発現する細胞が調製される。これらの細胞がPBS等の適切な緩衝液に懸濁された細胞懸濁液に対して被験抗体と対照抗体が添加される。次いで、適宜緩衝液で洗浄された細胞懸濁液に対して、被験抗体と対照抗体を認識することができるFITC標識された抗体が添加される。標識抗体によって染色された細胞の蛍光強度と細胞数がFACSCalibur（BD社）によって測定される。被験抗体と対照抗体の濃度は好適な緩衝液によって適宜希釈することによって所望の濃度に調製して用いられる。例えば、10μg/mLから10 ng/mLまでの間のいずれかの濃度で使用される。当該細胞に対する標識抗体の結合量は、CELL QUEST Software（BD社）を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、標識抗体の結合量によって表される被験抗体と対照抗体の結合活性を測定することができる。

[0042] 本方法において、例えば「変異Epiregulin発現細胞に実質的に結合しない」ことは、以下の方法によって判断することができる。まず、変異Epiregulinを発現する細胞に対して結合した被験抗体と対照抗体が、標識抗体で染色される。次いで細胞の蛍光強度が検出される。蛍光検出にフローサイトメトリーとしてFACSCaliburを用いた場合、得られた蛍光強度はCELL QUEST Softwareを用いて解析され得る。抗体の存在下および非存在下でのGeometric Meanの

値から、この比較値（ΔGeo-Mean）を下記の計算式（式１）に基づいて算出することにより、抗体の結合による蛍光強度の増加割合を求めることができる。

（式１）

ΔGeo-Mean＝Geo-Mean（抗体存在下）／Geo-Mean（抗体非存在下）

[0043] 解析によって得られる被験抗体の変異Epiregulin発現細胞に対する結合量が反映されたGeometric Mean比較値（変異Epiregulin分子ΔGeo-Mean値）を、被験抗体のEpiregulin発現細胞に対する結合量が反映されたΔGeo-Mean比較値と比較する。この場合において、変異Epiregulin発現細胞及びEpiregulin発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値を求める際に使用する被験抗体の濃度は互いに同一又は実質的に同一の濃度で調製されることが特に好ましい。予めEpiregulin中のエピトープを認識していることが確認された抗体が、対照抗体として利用される。

[0044] 被験抗体の変異Epiregulin発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値が、被験抗体のEpiregulin発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値の、少なくとも80%、好ましくは50%、更に好ましくは30%、特に好ましくは15%より小さければ、「変異Epiregulin発現細胞に実質的に結合しない」ものとする。Geo-Mean値（Geometric Mean）を求める計算式は、CELL QUEST Software User's Guide（BD biosciences社）に記載されている。比較値を比較することによってそれが実質的に同視し得る程度であれば、被験抗Epiregulin抗体と対照抗Epiregulin抗体のエピトープは同一であると評価され得る。

[0045] 抗体

本明細書において、抗体とは、天然のものであるか、または部分的もしくは完全合成により製造された免疫グロブリンをいう。抗体はそれが天然に存在する血漿や血清等の天然資源や抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養上清から単離され得るし、または遺伝子組換え等の手法を用いることによって部分的にもしくは完全に合成され得る。抗体の例としては免疫グロブリンのアイソタイプおよびそれらのアイソタイプのサブクラスが好適に挙げられ

る。ヒトの免疫グロブリンとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgMの9種類のクラス（アイソタイプ）が知られている。本発明の抗体には、これらのアイソタイプのうちIgG1、IgG2、IgG3、IgG4が含まれ得る。

[0046] 所望の結合活性を有する抗体を作製する方法は当業者において公知である。以下に、Epiregulinに結合する抗体（抗Epiregulin抗体）を作製する非限定の一方法が例示される。

[0047] 抗Epiregulin抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として取得され得る。抗Epiregulin抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好適に作製され得る。哺乳動物由来のモノクローナル抗体には、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞によって産生されるもの等が含まれる。なお本願発明のモノクローナル抗体には、「ヒト化抗体」や「キメラ抗体」が含まれる。

[0048] モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、公知技術を使用することによって、例えば以下のように作製され得る。すなわち、Epiregulinタンパク質を感作抗原として使用して、通常の免疫方法にしたがって哺乳動物が免疫される。得られる免疫細胞が通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合される。次に、通常のスクリーニング法によって、Epiregulin分子中のエピトープに結合するモノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって抗Epiregulin抗体を産生するハイブリドーマが選択され得る。

[0049] 具体的には、モノクローナル抗体の作製は例えば以下に示すように行われる。まず、配列番号：１６９にそのヌクレオチド配列が開示されたヒトEpiregulin遺伝子を発現することによって、抗体取得の感作抗原として使用される配列番号：１６７で表されるヒトEpiregulinタンパク質が取得され得る。すなわち、ヒトEpiregulinをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクターに挿入することによって適当な宿主細胞が形質転換される。当該宿主細胞中から所望のヒトEpiregulinタンパク質が公知の方法で精製される。また、培養上

清中から可溶型のヒトEpiregulinを取得するためには、例えば、配列番号：１６７で表されるヒトEpiregulinポリペプチド配列のうち、30から118番目のアミノ酸を含むポリペプチドや、30から108番目のアミノ酸に含まれる配列番号：３４で表されるタンパク質が発現される。また、精製した天然のヒトEpiregulinタンパク質もまた同様に感作抗原として使用され得る。

[0050] 哺乳動物に対する免疫に使用する感作抗原として当該精製Epiregulinタンパク質が使用できる。Epiregulinの部分ペプチドもまた感作抗原として使用できる。この際、当該部分ペプチドはヒトEpiregulinのアミノ酸配列より化学合成によっても取得され得る。また、ヒトEpiregulin遺伝子の一部を発現ベクターに組込んで発現させることによっても取得され得る。さらにはタンパク質分解酵素を用いてヒトEpiregulinタンパク質を分解することによっても取得され得るが、部分ペプチドとして用いるヒトEpiregulinペプチドの領域および大きさは特に特別の態様に限定されない。好ましい領域は配列番号：１６７で表されるアミノ酸配列において30から118番目または30から108番目のアミノ酸に相当するアミノ酸配列から任意の配列が選択され得る。感作抗原とするペプチドを構成するアミノ酸の数は少なくとも5以上、例えば6以上、或いは7以上であることが好ましい。より具体的には8～50、好ましくは10～30残基のペプチドが感作抗原として使用され得る。

[0051] また、Epiregulinタンパク質の所望の部分ポリペプチドやペプチドを異なるポリペプチドと融合した融合タンパク質が感作抗原として利用され得る。感作抗原として使用される融合タンパク質を製造するために、例えば、抗体のFc断片やペプチドタグなどが好適に利用され得る。融合タンパク質を発現するベクターは、所望の二種類又はそれ以上のポリペプチド断片をコードする遺伝子がインフレームで融合され、当該融合遺伝子が前記のように発現ベクターに挿入されることにより作製され得る。融合タンパク質の作製方法はMolecular Cloning 2nd ed. (Sambrook,J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. press) に記載されている。感作抗原として用いられるEpiregulinの取得方法及びそれを用いた免疫方

法は、WO2008/047723等にも具体的に記載されている。

[0052] 当該感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特定の動物に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい。一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が好適に使用される。

[0053] 公知の方法にしたがって上記の動物が感作抗原により免疫される。例えば、一般的な方法として、感作抗原が哺乳動物の腹腔内または皮下注射によって投与されることにより免疫が実施される。具体的には、PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当な希釈倍率で希釈された感作抗原が、所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合され、乳化された後に、当該感作抗原が哺乳動物に4から21日毎に数回投与される。また、感作抗原の免疫時には適当な担体が使用され得る。特に分子量の小さい部分ペプチドが感作抗原として用いられる場合には、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合した当該感作抗原ペプチドを免疫することが望ましい場合もある。

[0054] また、所望の抗体を産生するハイブリドーマは、DNA免疫を使用し、以下のようにしても作製され得る。DNA免疫とは、免疫動物中で抗原タンパク質をコードする遺伝子が発現され得るような態様で構築されたベクターDNAが投与された当該免疫動物中で、感作抗原が当該免疫動物の生体内で発現されることによって、免疫刺激が与えられる免疫方法である。蛋白質抗原が免疫動物に投与される一般的な免疫方法と比べて、DNA免疫には、次のような優位性が期待される。

ーEpiregulinのような膜蛋白質の構造を維持して免疫刺激が与えられ得る

ー免疫抗原を精製する必要が無い

[0055] DNA免疫によって本発明のモノクローナル抗体を得るために、まず、Epiregulinタンパク質を発現するDNAが免疫動物に投与される。Epiregulinをコードするは、PCRなどの公知の方法によって合成され得る。得られたDNAが適当な発現ベクターに挿入され、免疫動物に投与される。発現ベクターとしては

、たとえばpcDNA3.1などの市販の発現ベクターが好適に利用され得る。ベクターを生体に投与する方法として、一般的に用いられている方法が利用され得る。たとえば、発現ベクターが吸着した金粒子が、gene gunで免疫動物個体の細胞内に導入されることによってDNA免疫が行われる。さらに、Epiregulinを認識する抗体の作製は国際公開WO2003/104453に記載された方法を用いても作製され得る。

[0056] このように哺乳動物が免疫され、血清中におけるEpiregulinに結合する抗体力価の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に供される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用され得る。

[0057] 前記免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。ミエローマ細胞は、スクリーニングのための適当な選択マーカーを備えていることが好ましい。選択マーカーとは、特定の培養条件の下で生存できる（あるいはできない）形質を指す。選択マーカーには、ヒポキサンチンーグアニンーホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（以下HGPRT欠損と省略する）、あるいはチミジンキナーゼ欠損（以下TK欠損と省略する）などが公知である。HGPRTやTKの欠損を有する細胞は、ヒポキサンチンーアミノプテリンーチミジン感受性（以下HAT感受性と省略する）を有する。HAT感受性の細胞はHAT選択培地中でDNA合成を行うことができず死滅するが、正常な細胞と融合すると正常細胞のサルベージ回路を利用してDNAの合成を継続することができるためHAT選択培地中でも増殖するようになる。

[0058] HGPRT欠損やTK欠損の細胞は、それぞれ6チオグアニン、8アザグアニン（以下8AGと省略する）、あるいは5'ブロモデオキシウリジンを含む培地で選択され得る。これらのピリミジンアナログをDNA中に取り込む正常な細胞は死滅する。他方、これらのピリミジンアナログを取り込めないこれらの酵素を欠損した細胞は、選択培地の中で生存することができる。この他G418耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって2-デオキシストレプタミン系抗生物質（ゲンタマイシン類似体）に対する耐性を与える。細胞融合に好適な種々のミエローマ細胞が公知である。

[0059] このようなミエローマ細胞として、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123 (4), 1548-1550) 、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7) 、NS-1 (C. Eur. J. Immunol. (1976) 6 (7), 511-519) 、MPC-11 (Cell (1976) 8 (3), 405-415) 、SP2/0 (Nature (1978) 276 (5685), 269-270) 、FO (J. Immunol. Methods (1980) 35 (1-2), 1-21) 、S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. (1978) 148 (1), 313-323) 、R210 (Nature (1979) 277 (5692), 131-133) 等が好適に使用され得る。

[0060] 基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて、前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合が行われる。

[0061] より具体的には、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の栄養培養液中で、前記細胞融合が実施され得る。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG) 、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に融合効率を高めるために所望によりジメチルスルホキシド等の補助剤が添加されて使用される。

[0062] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定され得る。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1から10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用され、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液が好適に添加され得る。

[0063] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温されたPEG溶液 (例えば平均分子量1000から6000程度) が通常30から60% (w/v) の濃度で添加される。混合液が緩やかに混合されることによって所望の融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。次いで、上記に挙げた適当な培養液が逐次添加され、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合

剤等が除去され得る。

[0064] このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択され得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、係る十分な時間は数日から数週間である）上記HAT培養液を用いた培養が継続され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが実施される。

[0065] このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択され得る。例えばHGPRTやTKの欠損を有する細胞は、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択され得る。すなわち、HAT感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT培養液中で、正常細胞との細胞融合に成功した細胞が選択的に増殖し得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、上記HAT培養液を用いた培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、所望のハイブリドーマが選択され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが実施され得る。

[0066] 所望の抗体のスクリーニングおよび単一クローニングが、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施され得る。例えば、Epiregulinに結合するモノクローナル抗体は、細胞表面に発現したEpiregulinに結合することができる。このようなモノクローナル抗体は、たとえば、FACS（fluorescence activated cell sorting）によってスクリーニングされ得る。FACSは、蛍光抗体と接触させた細胞をレーザー光で解析し、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面に対する抗体の結合を測定することを可能にするシステムである。

[0067] FACSによって本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをス

クリーニングするためには、まずEpiregulinを発現する細胞を調製する。スクリーニングのための好ましい細胞は、Epiregulinを強制発現させた哺乳動物細胞である。宿主細胞として使用した形質転換されていない哺乳動物細胞を対照として用いることによって、細胞表面のEpiregulinに対する抗体の結合活性が選択的に検出され得る。すなわち、宿主細胞に結合せず、Epiregulin強制発現細胞に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することによって、Epiregulinモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが取得され得る。

[0068] あるいは固定化したEpiregulin発現細胞に対する抗体の結合活性がELISAの原理に基づいて評価され得る。たとえば、ELISAプレートのウェルにEpiregulin発現細胞が固定化される。ハイブリドーマの培養上清をウェル内の固定化細胞に接触させ、固定化細胞に結合する抗体が検出される。モノクローナル抗体がマウス由来の場合、細胞に結合した抗体は、抗マウスイムノグロブリン抗体によって検出され得る。これらのスクリーニングによって選択された、抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法等によりクローニングされ得る。

[0069] このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは通常の培養液中で継代培養され得る。また、当該ハイブリドーマは液体窒素中で長期にわたって保存され得る。

[0070] 当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清から所望のモノクローナル抗体が取得され得る。あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖せしめ、その腹水からモノクローナル抗体が取得され得る。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに好適なものである。

[0071] 当該ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からクローニングされる抗体遺伝子によってコードされる抗体も好適に利用され得る。クローニングした抗体遺伝子を適当なベクターに組み込んで宿主に導入することによって、当該遺伝子によってコードされる抗体が発現する。抗体遺伝子の単離と、ベクターへ

の導入、そして宿主細胞の形質転換のための方法は例えば、Vandammeらによって既に確立されている（Eur.J. Biochem. (1990) 192 (3), 767-775）。下記に述べるように組換え抗体の製造方法もまた公知である。

[0072] たとえば、抗Epiregulin抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、抗Epiregulin抗体の可変領域（V領域）をコードするcDNAが取得される。そのために、通常、まずハイブリドーマから全RNAが抽出される。細胞からmRNAを抽出するための方法として、たとえば次のような方法を利用することができる。

－グアニジン超遠心法（Biochemistry (1979) 18 (24), 5294-5299）

－AGPC法（Anal. Biochem. (1987) 162 (1), 156-159）

[0073] 抽出されたmRNAは、mRNA Purification Kit （GEヘルスケアバイオサイエンス製）等を使用して精製され得る。あるいは、QuickPrep mRNA Purification Kit （GEヘルスケアバイオサイエンス製）などのように、細胞から直接全mRNAを抽出するためのキットも市販されている。このようなキットを用いて、ハイブリドーマからmRNAが取得され得る。得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域をコードするcDNAが合成され得る。cDNAは、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit（生化学工業社製）等によって合成され得る。また、cDNAの合成および増幅のために、SMART RACE cDNA増幅キット（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 (23), 8998-9002、Nucleic Acids Res. (1989) 17 (8), 2919-2932）が適宜利用され得る。更にこうしたcDNAの合成の過程においてcDNAの両末端に後述する適切な制限酵素サイトが導入され得る。

[0074] 得られたPCR産物から目的とするcDNA断片が精製され、次いでベクターDNAと連結される。このように組換えベクターが作製され、大腸菌等に導入されコロニーが選択された後に、当該コロニーを形成した大腸菌から所望の組換えベクターが調製され得る。そして、当該組換えベクターが目的とするcDNAの塩基配列を有しているか否かについて、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認される。

[0075] 可変領域をコードする遺伝子を取得するためには、可変領域遺伝子増幅用

のプライマーを使った5'-RACE法を利用するのが簡便である。まずハイブリドーマ細胞より抽出されたRNAを鋳型としてcDNAが合成され、5'-RACE cDNAライブラリが得られる。5'-RACE cDNAライブラリの合成にはSMART RACE cDNA 増幅キットなど市販のキットが適宜用いられる。

[0076] 得られた5'-RACE cDNAライブラリを鋳型として、PCR法によって抗体遺伝子が増幅される。公知の抗体遺伝子配列をもとにマウス抗体遺伝子増幅用のプライマーがデザインされ得る。これらのプライマーは、イムノグロブリンのサブクラスごとに異なる塩基配列である。したがって、サブクラスは予めIso Stripマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（ロシュ・ダイアグノスティックス）などの市販キットを用いて決定しておくことが望ましい。

[0077] 具体的には、たとえばマウスIgGをコードする遺伝子の取得を目的とするときには、重鎖としてγ１、γ2a、γ2b、γ3、軽鎖としてκ鎖とλ鎖をコードする遺伝子の増幅が可能なプライマーが利用され得る。IgGの可変領域遺伝子を増幅するためには、一般に3'側のプライマーには可変領域に近い定常領域に相当する部分にアニールするプライマーが利用される。一方5'側のプライマーには、5' RACE cDNAライブラリ作製キットに付属するプライマーが利用される。

[0078] こうして増幅されたPCR産物を利用して、重鎖と軽鎖の組み合せからなるイムノグロブリンが再構成され得る。再構成されたイムノグロブリンの、Epiregulinに対する結合活性を指標として、所望の抗体がスクリーニングされ得る。Epiregulinに対する抗体の取得を目的とするとき、抗体のEpiregulinに対する結合は、特異的であることがさらに好ましい。Epiregulinに結合する抗体は、たとえば次のようにしてスクリーニングされ得る；

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

（２）Epiregulin発現細胞と抗体との結合を検出する工程、および

（３）Epiregulin発現細胞に結合する抗体を選択する工程。

[0079] 抗体とEpiregulin発現細胞との結合を検出する方法は公知である。具体的には、先に述べたFACSなどの手法によって、抗体とEpiregulin発現細胞との結合が検出され得る。抗体の結合活性を評価するためにEpiregulin発現細胞の固定標本が適宜利用され得る。

[0080] 結合活性を指標とする抗体のスクリーニング方法として、ファージベクターを利用したパニング法も好適に用いられる。ポリクローナルな抗体発現細胞群より抗体遺伝子を重鎖と軽鎖のサブクラスのライブラリとして取得した場合には、ファージベクターを利用したスクリーニング方法が有利である。重鎖と軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、適当なリンカー配列で連結することによってシングルチェインFv（scFv）を形成することができる。scFvをコードする遺伝子をファージベクターに挿入することにより、scFvを表面に発現するファージが取得され得る。このファージと所望の抗原との接触の後に、抗原に結合したファージを回収することによって、目的の結合活性を有するscFvをコードするDNAが回収され得る。この操作を必要に応じて繰り返すことにより、所望の結合活性を有するscFvが濃縮され得る。

[0081] 目的とする抗Epiregulin抗体のV領域をコードするcDNAが得られた後に、当該cDNAの両末端に挿入した制限酵素サイトを認識する制限酵素によって当該cDNAが消化される。好ましい制限酵素は、抗体遺伝子を構成する塩基配列に出現する頻度が低い塩基配列を認識して消化する。更に１コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素の挿入が好ましい。上記のように消化された抗IL-6R抗体のV領域をコードするcDNAを適当な発現ベクターに挿入することによって、抗体発現ベクターが取得され得る。このとき、抗体定常領域（C領域）をコードする遺伝子と、前記V領域をコードする遺伝子とがインフレームで融合されれば、キメラ抗体が取得される。ここで、キメラ抗体とは、定常領域と可変領域の由来が異なることをいう。したがって、マウスーヒトなどの異種キメラ抗体に加え、ヒトーヒト同種キメラ抗体も、本発明におけるキメラ抗体に含まれる。予め定常領域を有する発現ベクターに、前記V領域遺伝子を挿入することによって、キメラ

抗体発現ベクターが構築され得る。具体的には、たとえば、所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを保持した発現ベクターの5'側に、前記V領域遺伝子を消化する制限酵素の制限酵素認識配列が適宜配置され得る。同じ組み合わせの制限酵素で消化された両者がインフレームで融合されることによって、キメラ抗体発現ベクターが構築される。

[0082] Epiregulinに結合するモノクローナル抗体を製造するために、抗体遺伝子が発現制御領域による制御の下で発現するように発現ベクターに組み込まれる。抗体を発現するための発現制御領域とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。また、発現した抗体が細胞外に分泌されるように、適切なシグナル配列がアミノ末端に付加され得る。後に記載される実施例ではシグナル配列として、アミノ酸配列MGWSCIILFLVATATGVHS（配列番号：１６８）を有するペプチドが使用されているが、これ以外にも適したシグナル配列が付加される。発現されたポリペプチドは上記配列のカルボキシル末端部分で切断され、切断されたポリペプチドが成熟ポリペプチドとして細胞外に分泌され得る。次いで、この発現ベクターによって適当な宿主細胞が形質転換されることによって、抗Epiregulin抗体をコードするDNAを発現する組換え細胞が取得され得る。

[0083] 抗体遺伝子の発現のために、抗体重鎖（H鎖）および軽鎖（L鎖）をコードするDNAは、それぞれ別の発現ベクターに組み込まれる。H鎖とL鎖が組み込まれたベクターによって、同じ宿主細胞に同時に形質転換（co-transfect）されることによって、H鎖とL鎖を備えた抗体分子が発現され得る。あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAが単一の発現ベクターに組み込まれることによって宿主細胞が形質転換され得る（国際公開WO 1994/011523を参照のこと）。

[0084] 単離された抗体遺伝子を適当な宿主に導入することによって抗体を作製するための宿主細胞と発現ベクターの多くの組み合わせが公知である。これらの発現系は、いずれも本発明の抗原結合ドメインを単離するのに応用され得る。真核細胞が宿主細胞として使用される場合、動物細胞、植物細胞、あるいは真菌細胞が適宜使用され得る。具体的には、動物細胞としては、次のよ

うな細胞が例示され得る。

（１）哺乳類細胞：CHO、COS、ミエローマ、BHK （baby hamster kidney ）、Hela、Vero、HEK (human embryonic kidney) 293など

（２）両生類細胞：アフリカツメガエル卵母細胞など

（３）昆虫細胞：sf9、sf21、Tn5など

[0085] あるいは植物細胞としては、ニコティアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) などのニコティアナ (Nicotiana) 属由来の細胞による抗体遺伝子の発現系が公知である。植物細胞の形質転換には、カルス培養した細胞が適宜利用され得る。

[0086] 更に真菌細胞としては、次のような細胞を利用することができる。

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

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

[0087] また、原核細胞を利用した抗体遺伝子の発現系も公知である。たとえば、細菌細胞を用いる場合、大腸菌 (E. coli) 、枯草菌などの細菌細胞が適宜利用され得る。これらの細胞中に、目的とする抗体遺伝子を含む発現ベクターが形質転換によって導入される。形質転換された細胞をin vitroで培養することにより、当該形質転換細胞の培養物から所望の抗体が取得され得る。

[0088] 組換え抗体の産生には、上記宿主細胞に加えて、トランスジェニック動物も利用され得る。すなわち所望の抗体をコードする遺伝子が導入された動物から、当該抗体を得ることができる。例えば、抗体遺伝子は、乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子の内部にインフレームで挿入することによって融合遺伝子として構築され得る。乳汁中に分泌されるタンパク質として、たとえば、ヤギβカゼインなどが利用され得る。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片はヤギの胚へ注入され、当該注入された胚が雌のヤギへ導入される。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニ

ックヤギ（またはその子孫）が産生する乳汁からは、所望の抗体が乳汁タンパク質との融合タンパク質として取得され得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、ホルモンがトランスジェニックヤギに対して投与され得る（Bio/Technology (1994), 12 (7), 699-702）。

[0089] 本明細書において記載される抗Epiregulin抗体がヒトに投与される場合、当該抗体における抗原結合ドメインとして、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体由来の抗原結合ドメインが適宜採用され得る。遺伝子組換え型抗体には、例えば、ヒト化（Humanized）抗体等が含まれる。これらの改変抗体は、公知の方法を用いて適宜製造される。

[0090] 本明細書において記載される抗Epiregulin抗体における抗原結合ドメインを作製するために用いられる抗体の可変領域は、通常、4つのフレームワーク領域（FR）にはさまれた3つの相補性決定領域（complementarity-determining region ; CDR）で構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む。一方FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い同一性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるとされている。

[0091] ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、たとえばマウス抗体のCDRをヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るための一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウスの抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、たとえばOverlap Extension PCRが公知である。Overlap Extension PCRにおいては、ヒト抗体のFRを合成するためのプライマーに、移植すべきマウス抗体のCDRをコードする塩基配列が付加される。プライマーは4つのFRのそれぞれについて用意される。一般に、マウスCDRのヒトFRへの移植においては、マウスのFRと同一性の高いヒトFRを選択するのが、CDRの機能の維持に

おいて有利であるとされている。すなわち、一般に、移植すべきマウスCDRに隣接しているFRのアミノ酸配列と同一性の高いアミノ酸配列からなるヒトFRを利用するのが好ましい。

[0092] また連結される塩基配列は、互いにインフレームで接続されるようにデザインされる。それぞれのプライマーによってヒトFRが個別に合成される。その結果、各FRにマウスCDRをコードするDNAが付加された産物が得られる。各産物のマウスCDRをコードする塩基配列は、互いにオーバーラップするようにデザインされている。続いて、ヒト抗体遺伝子を鋳型として合成された産物のオーバーラップしたCDR部分を互いにアニールさせて相補鎖合成反応が行われる。この反応によって、ヒトFRがマウスCDRの配列を介して連結される。

[0093] 最終的に3つのCDRと4つのFRが連結されたV領域遺伝子は、その5'末端と3'末端にアニールし適当な制限酵素認識配列を付加されたプライマーによってその全長が増幅される。上記のように得られたDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト型抗体発現用ベクターが作成できる。当該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、当該組換え細胞を培養し、当該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、当該ヒト化抗体が当該培養細胞の培養物中に産生される（欧州特許公開EP239400、国際公開WO1996/002576参照）。

[0094] 上記のように作製されたヒト化抗体の抗原に対する結合活性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに当該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト抗体のFRが好適に選択できる。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもできる。たとえば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。具体的には、FRにアニーリングするプライマーに部分的な塩基配列の変異を導入することができる。このようなプライマーによって合成されたFRには、塩基配列の変異が導入される。アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原

に対する結合活性を上記の方法で測定し評価することによって所望の性質を有する変異FR配列が選択され得る（Cancer Res., (1993) 53, 851-856）。

[0095] また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物（国際公開WO1993/012227、WO1992/003918、WO1994/002602、WO1994/025585、WO1996/034096、WO1996/033735参照）を免疫動物とし、DNA免疫により所望のヒト抗体が取得され得る。

[0096] さらに、ヒト抗体ライブラリを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体のV領域が一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現される。抗原に結合するscFvを発現するファージが選択され得る。選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体のV領域をコードするDNA配列が決定できる。抗原に結合するscFvのDNA配列を決定した後、当該V領域配列を所望のヒト抗体C領域の配列とインフレームで融合させた後に適当な発現ベクターに挿入することによって発現ベクターが作製され得る。当該発現ベクターを上記に挙げたような好適な発現細胞中に導入し、当該ヒト抗体をコードする遺伝子を発現させることにより当該ヒト抗体が取得される。これらの方法は既に公知である（国際公開WO1992/001047、WO1992/020791、WO1993/006213、WO1993/011236、WO1993/019172、WO1995/001438、WO1995/015388参照）。

[0097] また、抗体遺伝子を取得する方法としてBernasconiら（Science (2002) 298, 2199-2202）またはWO2008/081008に記載のようなB細胞クローニング（それぞれの抗体のコード配列の同定およびクローニング、その単離、およびそれぞれの抗体（特に、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4）の作製のための発現ベクター構築のための使用等）の手法が、上記のほか適宜使用され得る。

[0098] EUナンバリングおよびKabatナンバリング

本発明で使用されている方法によると、抗体のCDRとFRに割り当てられるアミノ酸位置はKabatにしたがって規定される（Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 198

7年および1991年）。本明細書において、抗Epiregulin抗体の可変領域のアミノ酸はKabatナンバリングにしたがい、定常領域のアミノ酸はKabatのアミノ酸位置に準じたEUナンバリングにしたがって表される。

[0099] アミノ酸の改変

抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に置換するアミノ酸の改変方法として、複数の公知の方法もまた採用され得る（Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357）。例えば、終止コドンの１つであるUAGコドン（アンバーコドン）の相補的アンバーサプレッサーtRNAに非天然アミノ酸が結合されたtRNAが含まれる無細胞翻訳系システム（Clover Direct (Protein Express)）等も好適に用いられる。

[0100] 本明細書において、アミノ酸の改変部位を表す際に用いられる「および/または」の用語の意義は、「および」と「または」が適宜組み合わされたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば「33位、55位、および/または96位のアミノ酸が置換されている」とは以下のアミノ酸の改変のバリエーションが含まれる；

(a) 33位、(b)55位、(c)96位、(d)33位および55位、(e)33位および96位、(f)55位および96位、(g)33位および55位および96位。

[0101] 免疫原性の低減

本発明の抗体は、ヒト宿主において予測される免疫原性が低減されていることが好ましい。

[0102] 「低免疫原性」とは、治療効果を達成するのに十分な時間において、抗体投与の継続された効果を低下させるのに十分な量の抗体が投与される個体の少なくとも過半数において、抗体が抗体反応を惹起しないことを意味する。

[0103] ヒトにおける免疫原性のレベルは、MHCクラスII結合予測プログラムPropre

d（http://www.imtech.res.in/raghava/propred）を用い、すべての対立遺伝子の1%閾値解析を用いて予測することができる。使用可能な他のプログラムとしては:

－Rankpep（http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html）

－Epibase（Algonomics proprietary software: algonomics.com）

が含まれる。

[0104] 免疫原性が低減された分子は、初期のドナー分子と比較し、標的集団において高度に発現されるMHCクラスII対立遺伝子に結合すると予測されるペプチドを含まないか、当該ペプチドの数が低減されている（Flowerら（Drug Discov. Today（2004）9(2), 82-90））。

[0105] MHCクラスII結合の機能分析は、当該タンパク質に対応する、重複するペプチドを生成し、T細胞活性化を惹起するそれらの能力を試験するか（T細胞増殖分析）、またはレポーターペプチドである、既知のMHCクラスII結合ペプチドを置き換えることにより実施することができる（Hammerら（J. Exp. Med.（1994）180, 2353-2358））。

[0106] 本発明の抗Epiregulin抗体の免疫原性を低減するために、いくつかの方法が採用され得る。第一の方法は、前記した抗体のヒト化を行う方法である。より具体的には、ヒト以外の動物、たとえばマウスから単離された抗Epiregulin抗体のCDRがヒト抗体に移植される。Epiregulinに対する結合を維持または増強するために、追加的にヒト化抗Epiregulin抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基が置換され得る。

[0107] 本発明のマウスから単離された抗Epiregulin抗体のCDRの非限定の一態様としては、配列番号：９で表される重鎖CDR1（HCDR1）、配列番号：１０で表される重鎖CDR2（HCDR2）および配列番号：１１で表される重鎖CDR3（HCDR3）が挙げられる。また、本発明のマウスから単離された抗Epiregulin抗体のCDRの非限定の一態様としては、配列番号：１２で表される軽鎖CDR1（LCDR1）、配列番号：１３で表される軽鎖CDR2（LCDR2）および配列番号：１４で表される軽鎖CDR3（LCDR3）が挙げられる。

[0108] 本発明のヒト抗体のFRの非限定の一態様としては、配列番号：１で表される重鎖FR1（HFR1）、配列番号：２で表される重鎖FR2（HFR2）、配列番号：３で表される重鎖FR3（HFR3）、および配列番号：４で表される重鎖FR4（HFR4）が挙げられる。また、本発明のヒト抗体のFRの非限定の一態様としては、配列番号：５で表される軽鎖FR1（LFR1）、配列番号：６で表される軽鎖FR2（LFR2）、配列番号：７で表される軽鎖FR3（LFR3）、および配列番号：８で表される軽鎖FR4（LFR4）が挙げられる。

[0109] 本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の可変領域の非限定の一態様としては、配列番号：１５で表される重鎖可変領域が挙げられる。また、本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の可変領域の非限定の一態様としては、配列番号：１６で表される軽鎖可変領域が挙げられる。

[0110] また、本発明のヒト抗体のFRの非限定の一態様としては、配列番号：１７で表される重鎖FR1（HFR1）、または配列番号：１８で表される重鎖FR3（HFR3）が挙げられる。また、本発明のヒト抗体のFRの非限定の一態様としては、配列番号：２０で表される軽鎖FR2（LFR2）、配列番号：２１で表される軽鎖FR3（LFR3）または配列番号：２３で表される軽鎖FR3（LFR3）が挙げられる。

[0111] 本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の可変領域の非限定の一態様としては、配列番号：１９で表される重鎖可変領域が挙げられる。また、本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の可変領域の非限定の一態様としては、配列番号：２２または配列番号：２４で表される軽鎖可変領域が挙げられる。

[0112] また、本発明のヒト化抗体のFRの非限定の一態様としては、配列番号：３５で表される重鎖FR3（HFR3）、または配列番号：３６で表される重鎖FR3（HFR3）が挙げられる。本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の可変領域の非限定の一態様としては、配列番号：３７、または配列番号：３８で表される重鎖可変領域が挙げられる。

[0113] 第二の方法は、抗Epiregulin抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸が改変された改変配列を、前記のMHCクラスII結合予測プログラムを用いて解析し、免疫

原性が減弱した改変配列を設計する方法である。本発明の抗Epiregulin抗体の免疫原性を減弱させるためにアミノ酸を改変する部位の非限定の例として、配列番号：３８で表される抗Epiregulin抗体の重鎖配列中のKabatナンバリングで表される87位、および/または101位のアミノ酸が好適に挙げられる。また、抗Epiregulin抗体の免疫原性を減弱させるためにアミノ酸を改変する部位の非限定の例として、配列番号：２９で表される抗Epiregulin抗体の軽鎖配列中のKabatナンバリングで表される24位のアミノ酸が好適に挙げられる。

[0114] 前記のアミノ酸置換の非限定の一態様としては、配列番号：３８で表される抗Epiregulin抗体の重鎖配列中のKabatナンバリングで表される87位のアミノ酸のSer（S）への置換、および/または101位のアミノ酸のTyr（Y）またはPhe（F）への置換が好適に挙げられる。また、前記のアミノ酸置換の非限定の一態様としては、配列番号：２９で表される抗Epiregulin抗体の軽鎖配列中のKabatナンバリングで表される24位のアミノ酸のArg（R）への置換が好適に挙げられる。

[0115] 第三の方法は、例えば、IgG1抗体の定常領域を含む抗Epiregulin抗体を設計する際に、IgG1のアロタイプであるG1m3タイプ（配列番号：３１で表される配列のC末端にGKが付加された配列）、G1m17,1タイプ（配列番号：２６）またはG1m17タイプ（配列番号：３０で表される配列のC末端にGKが付加された配列）から選択されるアロタイプの定常領域を適宜選択する方法である。抗体薬剤が投与されるヒト生物種のアロタイプと当該抗体薬剤のアロタイプの適合性が、当該生物種の免疫応答に影響することが知られている（Genes and Immunity (2011) 12, 213-221）。

[0116] 免疫原性が低減された本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の重鎖の非限定の一態様としては、配列番号：３７、３８、４９－５６、７２－７９、９２－９８、１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖が挙げられる。また、本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の軽鎖の非限定の一態様としては、配列番号：２９、５７

、５８、８０－８５、９９、１２８－１３０、１３６、および１４１からなる群から選択される軽鎖が挙げられる。

[0117] 免疫原性が低減された本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の非限定の一態様としては、配列番号：３７、３８、４９－５６、７２－７９、９２－９８、１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖、および、配列番号：２９、５７、５８、８０－８５、９９、１２８－１３０、１３６、および１４１からなる群から選択される軽鎖を含むヒト化抗Epiregulin抗体が挙げられる。

[0118] 脱アミド化、異性化、加水分解の抑制

本発明の抗Epiregulin抗体は、脱アミド化、異性化、加水分解が抑制されていることが好ましい。

[0119] タンパク質医薬品の会合体量をコントロールすることは、品質管理上、また、薬効および免疫原性に与える影響を考慮した場合大変重要である（Curr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6), 708-714）。一般に会合化はタンパク質溶液環境に起因するcolloidal stability（コロイド安定性）とタンパク質構造に起因するconformational stability（立体配座安定性）の両方に影響される（J. Phar.m Sci. (2010) 100 (4), 1306-1315）。抗体製剤の処方検討により、抗体濃度やpH、緩衝液種、イオン強度、添加剤等をスクリーニングすることでcolloidal stabilityに有効な条件を得ることが可能である。一方、conformational stabilityはアミノ酸配列に依存する部分もあり、抗体の場合はCDRのカノニカル構造やFRのコンセンサス配列、VH/VL界面等の特徴的な構造を維持することが重要とされている（Jungら（J. Mol. Biol. (2001) 309 (3), 701-716）、Xiangら（J. Mol. Biol. (1995) 253 (3), 385-390）、Ewertら（Methods. (2004) 34 (2), 184-199）、Vargas-Madrazo ら（J. Mol. Recognit. (2003) 16 (3) 113-120）、およびMoreaら（J. Mol. Biol. (1998) 275, 269-294）。

[0120] 脱アミド化反応とは、アスパラギンおよびグルタミンの側鎖において非酵素的に起こり、アスパラギンおよびグルタミンの側鎖に存在するアミドがカ

ルボン酸へと変化する反応をいう。また、異性化は、アスパラギンおよびアスパラギン酸の側鎖にあるカルボニル基がC末端側にある残基の窒素原子電子対に攻撃された結果、アスパラギンの脱アミド化若しくはアスパラギン酸の脱水により不安定な環状イミド中間体が形成されることに起因する。この中間体は開裂によって多くがイソアスパラギン酸に、残りがアスパラギン酸に変化する。グルタミンの場合には、脱アミド化速度が一般的にアスパラギンの場合の10分の1であるが、この機構は本質的に同じであり、進行に水分子のみを必要とする。これら抗体等のタンパク質の保存中に起こる脱アミド化、異性化反応は、上述したヘテロジェニティーの原因となることから、可能な限り抑制されることが望まれる。また、脱アミド化反応は、特にアスパラギンとグリシンが隣接した部位（Asn-Gly）で起こりやすいことが報告されている（Geigerら（J. Biol. Chem. (1987) 262, 785-794）。さらに、アスパラギン酸は加水分解反応によりペプチド鎖の切断が起こることが報告されており、特にC末端側にプロリンが存在する配列（Asp-Pro）は酸性条件下での分解が起きやすいとされる（Segalasら（FEBS Letters (1995) 371, 171-175））。

[0121] 脱アミド化、異性化、加水分解を抑制するために、脱アミド化を受ける部位であるグルタミニル残基及びアスパラギニル残基を除去するアミノ酸の改変等が適宜実施され得る。除去が特に有用な脱アミド化部位の非限定の一態様としては、脱アミド化反応が促進される部位、すなわち、NG及びQG配列として表されるモチーフ中のグリシン残基、アスパラギン残基またはグルタミン残基が好適に挙げられる。これらのいずれかのアミノ酸残基（N、QまたはG）の置換は、脱アミド化反応を顕著に抑制することができる（WO2003/057881またはWO2005/067620等）。また、抗体を産生する細胞の培養方法を調整することによって、脱アミド化反応が抑制された抗体を製造するための方法も適宜使用され得る。本発明によって提供される抗Epiregulin抗体としては、前記の脱アミド化反応を抑制する技術が適用された抗Epiregulin抗体もまた含まれる。

[0122] 脱アミド化を受ける部位の非限定な例として、配列番号：３８で表される抗Epiregulin抗体の重鎖配列中のKabatナンバリングで表される31位、52位、54位、56位および/または101位のアミノ酸が好適に挙げられる。また、脱アミド化を受ける部位の非限定な例として、配列番号：２９で表される抗Epiregulin抗体の軽鎖配列中のKabatナンバリングで表される28位、92位、および/または93位のアミノ酸が好適に挙げられる。

[0123] 前記のアミノ酸置換の非限定の一態様としては、配列番号：３８で表される抗Epiregulin抗体の重鎖配列中のKabatナンバリングで表される31位のアミノ酸のAla（A）への置換、および/または55位のアミノ酸のThr（T）、Lys（K）、Phe（F）、Val（V）、Arg（R）またはLeu（L）への置換が好適に挙げられる。また、前記のアミノ酸置換の非限定の一態様としては、配列番号：２９で表される抗Epiregulin抗体の軽鎖配列中のKabatナンバリングで表される92位のアミノ酸のGlu（E）への置換、および/または93位のアミノ酸のArg（R）またはGln（Q）への置換が好適に挙げられる。

[0124] 脱アミド化、異性化、加水分解が抑制された本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の重鎖の非限定の一態様としては、配列番号：４９－５６、９８、１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖が挙げられる。また、脱アミド化、異性化、加水分解が抑制された本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の軽鎖の非限定の一態様としては、配列番号：５７、５８、１２８、および１４１からなる群から選択される軽鎖が挙げられる。

[0125] 脱アミド化、異性化、加水分解が抑制された本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の非限定の一態様としては、配列番号：４９－５６、９８、１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖、および、配列番号：５７、５８、１２８、および１４１からなる群から選択される軽鎖を含むヒト化抗Epiregulin抗体が挙げられる。

[0126] 等電点の改変

本発明の抗Epiregulin抗体は、その等電点が改変されていることが好ましい。抗体の血漿中半減期を制御する方法の一つとして、抗体分子表面に露出するアミノ酸残基を改変し、抗体分子表面電荷をコントロールする方法が知られている（WO2007/114319およびWO2009/041543）。具体的には、抗体が有する等電点（pI）の値を低下させることにより、抗体の血漿中半減期を伸長させることが可能であることが知られている。それとは逆に、抗体の等電点が上昇することにより、血漿中半減期が短縮し、抗体の組織移行性が向上することが知られている（Vaisittiら（J. Biol. Regul. Homeost. Agents. (2005) 19 (3-4), 105-112）、Pardridgeら（J. Pharmacol. Exp. Ther. (1998) 286 (1), 548-554））。その一方で、その等電点を減少させた改変抗体の抗腫瘍効果が、改変前の抗体と比較して増強されていることも知られている（WO2009/041062）。

[0127] 抗体等のタンパク質のpIは、ポリペプチドが実効電荷を帯びるpHとして定義される。当分野では、タンパク質溶解性は、典型的に、当該溶液のpHがタンパク質の等電点（pI）に等しいとき、最も低いことがわかっている。従って、そのpIに基づいて、所与のpH、例えば、pH6におけるタンパク質の溶解性を評価することが可能である。タンパク質のpIはまた、液体製剤におけるタンパク質の粘性の優れた指標でもある。高いpIは高い溶解性および低い粘性を示す（高濃度製剤の場合、特に重要である）。本発明の非限定の一態様では、予め定めた閾値より高いpIをもつ候補ドメインを選択する。抗体のpIは、抗体の生体分布や薬効においても特定の役割を果たす。例えば、抗体のpIが高くなると、その細胞内および/または脈管外局在化が増大することもわかっている。所望の目的を達成するために、どのようなpIの特性が、特定の抗体に最も望ましいかを決定する必要がある。いくつかの実施態様では、pI値が約5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5もしくは9.0以上である抗体が取得され得る。別の非限定の一態様では、pI値が約9.0、8.5、8.0、7.5、7.0、6.5、6.0、5.5もしくは5.0未満である抗体が選択され得る。当業者には、単一のタンパク質が複数の電荷形態を持ちうることは理解されよう。特定の

理論に拘束されるわけではないが、タンパク質の電荷は、多数の様々な作用機構によって改変することができ、このような機構として、限定するものではないが、アミノ酸置換、カチオン化、脱アミノ、カルボキシルー末端アミノ酸不均質性、リン酸化およびグリコシル化などが挙げられる。本明細書で用いるpIは主要電荷形態のpIとして定義される。

[0128] タンパク質のpIは、様々な方法によって決定することができ、そのような方法として、限定するものではないが、等電点電気泳動および各種コンピューターアルゴリズム（例えば、Bjellqvistら（Electrophoresis（1993）14, 1023を参照）が非限定の一態様として挙げられる。非限定の一態様では、多温度（multi temp）三冷却浴再循環ユニットおよびEPS 3501 XL電源を備えたPharmacia Biotech Multiphor 2電気泳動装置を用いて決定される。プレキャストアンホリンゲル（Amersham Biosciences、pI範囲：2.5～10）が5μgのタンパク質と一緒に供される。広範なpIマーカー標準（Amersham、pI範囲：3～10、８μL）を用いて、抗体の相対pIが決定される。1,500Ｖ、50 mAの条件下で105分電気泳動が実施される。次いで、精製水で1xに希釈したSigma固定溶液（5x）を用いて、ゲルが固定される。シンプリーブルー（Simply Blue）染料（Invitrogen）を用いて、室温で一晩の条件下で当該ゲルが染色される。25%エタノール、8%酢酸および67%精製水からなる溶液を用いて当該ゲルが脱染される。Bio-Radデンシトメーターを用いて、標準の較正曲線にもとづいて等電点が決定される。

[0129] 本発明の抗Epiregulin抗体の等電点を変化させるために、抗Epiregulin抗体のアミノ酸配列中で電荷を帯びたアミノ酸を除去する、もしくは抗Epiregulin抗体のアミノ酸配列に電荷を帯びたアミノ酸を付加、または挿入するアミノ酸の改変等が適宜実施され得る。アミノ酸の中には、電荷を帯びたアミノ酸が存在することが知られている。一般的に、正の電荷を帯びたアミノ酸（正電荷アミノ酸）としては、リジン（K）、アルギニン（R）、ヒスチジン（H）が知られている。負の電荷を帯びたアミノ酸（負電荷アミノ酸）としては、アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）等が知られている。これら以外

のアミノ酸は電荷を有さないアミノ酸として知られている。

[0130] 上記「改変されたアミノ酸残基」としては、好ましくは、以下の(a)または(b)いずれかの群に含まれるアミノ酸残基の付加、挿入または除去から適宜選択されるが、特にこれらのアミノ酸に制限されない。

(a) グルタミン酸 (E) 、アスパラギン酸 (D)

(b) リジン (K) 、アルギニン (R) 、ヒスチジン (H)

[0131] なお、元の (改変前の) アミノ酸残基が既に電荷を有する場合、電荷を有さないアミノ酸残基となるように改変することも本発明の好ましい態様の一つである。すなわち、本発明における改変としては、(1)電荷を有するアミノ酸から電荷を有さないアミノ酸への置換、(2)電荷を有するアミノ酸から当該アミノ酸とは反対の電荷を有するアミノ酸への置換、(3)電荷を有さないアミノ酸から電荷を有するアミノ酸への置換、が挙げられる。

[0132] 本発明の抗Epiregulin抗体の等電点を変化させるためにアミノ酸を改変する部位の非限定の例として、配列番号：３８で表される抗Epiregulin抗体の重鎖配列中のKabatナンバリングで表される13位、61位、62位、64位、65位、97位、および/または98位のアミノ酸が好適に挙げられる。また、抗Epiregulin抗体の等電点を変化させるためにアミノ酸を改変する部位の非限定の例として、配列番号：２９で表される抗Epiregulin抗体の軽鎖配列中のKabatナンバリングで表される24位、55位、56位、および/または107位のアミノ酸が好適に挙げられる。

[0133] 前記のアミノ酸置換の非限定の一態様としては、配列番号：３８で表される抗Epiregulin抗体の重鎖配列中のKabatナンバリングで表される14位のアミノ酸のAsn (N) またはLys (K) への置換、61位のアミノ酸のAsp (D) またはGlu (E) への置換、62位のアミノ酸のSer (S) またはGln (Q) への置換、64位のアミノ酸のAsp (D) またはGlu (E) への置換、65位のアミノ酸のAsp (D) またはGlu (E) への置換、97位のアミノ酸のArg (R) への置換、および/または98位のアミノ酸のGlu (E) への置換が好適に挙げられる。また、前記のアミノ酸置換の非限定の一態様としては、配列番号：２９で表される抗Epiregu

lin抗体の軽鎖配列中のKabatナンバリングで表される24位のアミノ酸のGln（Q）またはSer（S）への置換、55位のアミノ酸のGlu（E）への置換、56位のアミノ酸のGlu（E）への置換、および/または106a位のアミノ酸のGlu（E）への置換が好適に挙げられる。

[0134] 等電点が改変された本発明の抗Epiregulin抗体の重鎖の非限定の一態様としては、配列番号：７２－７９、９８、１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖が挙げられる。また、等電点が改変された本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の軽鎖の非限定の一態様としては、配列番号：８０－８５、および９９からなる群から選択される軽鎖が挙げられる。

[0135] 等電点が改変された本発明の抗Epiregulin抗体の非限定の一態様としては、配列番号：７２－７９、９８、１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖、および、配列番号：８０－８５、および９９からなる群から選択される軽鎖を含む抗Epiregulin抗体が挙げられる。

[0136] 安定性の改善

本発明の抗Epiregulin抗体は、その安定性が改善されていることが好ましい。抗体の安定性を表す一以上のパラメーターとして、ドメインの熱融解温度（Tm）値が挙げられる。抗体のTm値は、抗体の熱安定性の優れた指標となり、しかも、抗体の保管期間の指標にもなり得る。Tm値が低いほど、会合体の形成/低い安定性を示すのに対し、Tm値が高いほど、会合体の不形成/高い安定性を示す。従って、Tm値が高い抗体が提供されることが好ましい。本発明の非限定の一態様では、予め定めた閾値よりも高いTm値を有する抗体が選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃、90℃、95℃、もしくは100℃以上のTm値を有する抗体が選択される。

[0137] 抗体の熱融解温度（Tm）は、当分野で周知のあらゆる標準的方法で測定することができる。例えば、Vermeerらは、示差走査熱量測定（DSC）および円

二色性（CD）スペクトロスコピーにより、アイソタイプ2bのモノクローナルマウス抗ラットIgGのアンフォールディングおよび変性を研究した（Biophys. J. (2000) 78, 394-404、Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. (2000) 161, 139-150、J. Colloid Interface Sci. (2000) 225, 394-397、2000, Biophys. J. (2000) 79, 2150-2154）。その結果、IgGのフォールディングおよびアンフォールディングは、２つの主要なトランジションを特徴とすると考えられ、これらのトランジション自体も様々なステップの重なり合ったものであることがわかった。DSCおよびCD実験の両方で認められる双峰分布は、実験における走査速度には左右されなかった。２つのトランジションは独立しているようであり、アンフォールディングは不可逆であった。当該IgGから消化されたFabおよびFcフラグメントの二次構造および熱力学的安定性が、インタクトな免疫グロブリンのそれと比較された（Vermeerら（Biophys. J. (2000) 79, 2150-2154））。インタクトなIgGに認められる２つのピークは、それぞれFabおよびFcフラグメントに割り当てられることがわかった。Vermeerらはまた、熱による誘発以外に、一般にIgGの構造的摂動をpHの変更（ Biophys. J. (2000) 78, 394-404）または疎水性環境との相互作用、例えば、テフロン表面への吸着または界面活性剤との相互作用（Vermeerら、1998, Biochim. Biophys. Acta. (1988) 1425, 1-12、Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. (2000) 161, 139-150、J.Colloid Interface Sci. 225 (2000) 394-397）により誘発できることも明らかにした。

[0138] 本発明の非限定の一態様では、単離された抗体を含むサンプルを用いて、抗体のTm値が測定される。一実施形態では、抗体のTm値は、VP-DSC（MicroCal、LLC）を用いて、走査速度：1.0℃/分および温度範囲：25～120℃の条件下で測定される。５分の走査前調温とともに、フィルター時間８秒が用いられ得る。具体例では、Pierce透析カップ（3.5 kD）を用いて、25 mMヒスチジンーHClへの透析によりサンプルが調製される。平均抗体濃度は50μg/mLであり、これは280 nmの吸光度から決定され得る。装置と一緒に提供されたOriginソフトウエアを用いて、製造者の手順に従い、融解温度が決定される。手短

には、サンプルと対照セルの両方に、多数のベースラインをバッファーと一緒に流し込むことにより、熱平衡が確立される。ベースラインをサンプルサーモグラムから差し引いた後、データを濃度基準化し、デコンボリューション（deconvolution）関数を用いて適合させる。別の実施態様では、抗体の安定性は、以下の方法を用いて評価される。１以上の測定基準はさらに、様々なpH値、様々な温度、様々なせん断応力、および様々な凍結/解凍サイクルからなる群より選択される一以上の様々な条件下における抗体の安定性を表す測定基準が含まれ得る。

[0139] 本発明の非限定の一態様では、DSCはSetaram Micro-DSC III（Setaram、Caluire、フランス）を用いて測定され得る。適切なブランク溶液を含む1 mLの対照セルに対して1 mLのサンプルセルで、熱量計にサンプルが配置される。熱量計内で４時間25℃にてセルが安定化された後、選択された加熱速度で最終温度まで当該セルが加熱される。Setaramソフトウエア（Setaram、バージョン1.3）を用いて、転移温度およびエンタルピーが決定され得る。

[0140] 本発明の非限定の一態様では、熱変性/再生曲線は、円二色性（CD）スペクトロスコピーを用いて取得され得る。温度および/または例えば、pHの関数としてのIgGの二次構造の変化をCDスペクトロスコピーで調べることができる（Fasmanら（Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules.（1996）Plenum Press））。de Jonghらによれば、この方法の利点は、分光信号が周囲の溶液の存在に影響されないことと、明確な手順を用いて、様々な構造エレメントの基準スペクトルに基づき、二次構造を解明できることにある（Biochemistry（1994）33, 14521-14528）。二次構造エレメントの画分はCDスペクトルから取得することができる。

[0141] 本発明の非限定の一態様では、JASCO分光偏光計、モデルJ-715（JASCO International Co.）で測定され得る。0.1 cm光路長の石英キュベットが使用され得る。温度調節は、JASCO PTC-348WI（JASCO International）熱電対を用いて実施され得る。分解能：0.2℃および時定数：16秒のPeltier熱電対を用いて、温度走査が記録される。遠紫外線領域（0.2 nm分解能）での波長走査

は、好適な走査速度をもつ複数の走査の蓄積により取得され得る。

[0142] 熱変性/再生曲線は、分光法により測定することもできる。溶液中のタンパク質が加熱に応答して変性すると、分子は凝集し、溶液はさらに強く光を散乱する。凝集によりサンプルの光学的透明性に変化が起こるため、規定波長の可視または紫外線の吸収の変化をモニタリングすることにより、凝集を測定することができる。

[0143] 本発明の非限定の一態様では、蛍光分光学を用いて、熱変性/再生曲線が取得され得る。一実施態様では、固有タンパク質蛍光、例えば、固有トリプトファン蛍光がモニタリングされる。別の実施形態では、蛍光プローブ分子をモニタリングする。蛍光分光学実験を実施する方法は当業者には周知である。例えば、Bashfordら（Spectrophotometry and Spectrofluorometry: A Practical Approach (1987) 91-114, IRL Press Ltd.）、Bell J.E. (Spectroscopy in Biochemistry (1981) Vol.I, 155-194, CRC Press) またはBrandら（Ann. Rev. Biochem. (1972) 41, 843) を参照のこと。

[0144] その生物学的活性同様、抗体の物理学的および化学構造にもとづいた、抗体組成物の安定性を評価するための様々な方法が利用可能である。例えば、抗体の変性を検討するために、上記の分析のほか、電荷移動吸収、蛍光分光法、NMR、rCGE（還元キャピラリゲル電気泳動）および/またはHPSEC（高速サイズ排除クロマトグラフィ）等の方法が利用可能である（例えば、Wangら（J. Parenteral Science & Technology 42 (Suppl), S4-S26)）

[0145] 還元キャピラリゲル電気泳動および高速サイズ排除クロマトグラフィはタンパク質の会合体やタンパク質の分解物、およびタンパク質の断片の形成を評価するための最も一般的で簡便な方法である。それゆえ、本発明によって提供される抗Epiregulin抗体を含む組成物の安定性はこれらの方法によっても評価され得る。

[0146] 本発明の抗Epiregulin抗体の安定性を改変するために、抗Epiregulin抗体のアミノ酸配列中のアミノ酸の改変等が適宜実施され得る。

[0147] 本発明の抗Epiregulin抗体の安定性の改変のための非限定の一態様として

、抗Epiregulin抗体がIgG1抗体である場合には、ヒトIgG抗体の重鎖C末端配列（G1、配列番号：２５）由来のヘテロジェニティーとして報告されている、C末端アミノ酸のリジン残基の欠損、および、C末端の２アミノ酸のグリシン、リジン両方の欠損によるC末端アミノ基のアミド化（Anal. Biochem. (2007) 360 (1), 75-83）を低減させる方法として、重鎖C末端の2アミノ酸、すなわちEUナンバリングで表される 446位のグリシンおよび447位のリジンを欠損させる改変（WO2009/041613）が好適に挙げられる。本発明の抗Epiregulin抗体の重鎖C末端配列に由来するヘテロジェニティーは存在しないことが望ましいため、ヒトIgG1のEUナンバリングで表される446位のグリシンおよび447位のリジンを欠損させたIgG1配列（G1d、配列番号：２６）が定常領域配列として利用され得る。

[0148] 安定性が改善された本発明の抗Epiregulin抗体の重鎖の非限定の一態様としては、配列番号：３７、３８、４９－５６、７２－７９、９２－９８、１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖が挙げられる。また、安定性が改善された本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の軽鎖の非限定の一態様としては、配列番号：９９、１２８－１３０、１３６、および１４１からなる群から選択される軽鎖が挙げられる。

[0149] 安定性が改善された本発明の抗Epiregulin抗体の非限定の一態様としては、配列番号：３７、３８、４９－５６、７２－７９、９２－９８、１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖、および、配列番号：９９、１２８－１３０、１３６、および１４１からなる群から選択される軽鎖を含む抗Epiregulin抗体が挙げられる。

[0150] 会合体量の低減

本発明の抗Epiregulin抗体は、その会合体量が低減されていることが好ましい。タンパク質医薬品の会合体量をコントロールすることは、品質管理上、また、薬効および免疫原性に与える影響を考慮した場合大変重要である（C

urr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6), 708-714) 。一般に会合化はタンパク質溶液環境に起因するcolloidal stabilityとタンパク質構造に起因するconformational stabilityの両方に影響される (J. Pharm. Sci. (2010) 100 (4), 1306-1315) 。抗体製剤の処方検討により、抗体濃度やpH、緩衝液種、イオン強度、添加剤等をスクリーニングすることでcolloidal stabilityに有効な望ましい条件を得ることが可能である。一方、conformational stabilityはアミノ酸配列に依存する部分もあり、抗体の場合はCDRのカノニカル構造やFRのコンセンサス配列、VH/VL界面等の特徴的な構造を維持することが重要とされている考えられる (Jungら (J. Mol. Biol. (2001) 309 (3), 701-716) 、Xiangら (J. Mol. Biol. (1995) 253 (3), 385-390) 、Ewertら (Methods. (2004) 34 (2), 184-199) 、Vargas-Madrazo ら (J. Mol. Recognit. (2003) 16 (3), 113-120) 、Moreaら (J. Mol. Biol. (1998) 275, 269-294) 、Vargas-Madrazo ら (J. Mol. Recognit. (2003) 16 (3), 113-120)) 。

[0151] タンパク質の物理的および化学的構造、ならびにそれらの生物活性に基づき、抗体製剤を含むタンパク質製剤の安定性を評価するのに様々な方法を利用することができる。例えば、タンパク質の変性を研究するためには、電荷移動吸収、熱分析、蛍光分光法、円二色性 (CD) 、NMR、およびHPSEC、タンジェンシャルフロー濾過 (TFF) 、静的光散乱法 (SLS) 、フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) 、尿素誘発タンパク質アンフォールディング技術、固有トリプトファン蛍光、示差走査熱量測定法、および1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸 (ANS) タンパク質結合技術などの方法を利用できる。例えば、Wangら (J. of Parenteral Science & Technology (1988) 42 (Suppl), S4-S26) に記載された方法から選択して適宜使用することが可能である。

[0152] rCGEおよびHPSECは、タンパク質凝集体の形成、タンパク質分解、およびタンパク質断片化を評価する最も一般的かつ最も簡単方法である。従って、本発明の液体製剤の安定性は、これらの方法によって評価しうる。

[0153] 例えば、本発明の抗Epiregulin抗体の安定性は、HPSECまたはrCGEにより評価することができ、その際、ピーク領域率は、未分解抗体または未分解抗体

フラグメントを表す。非限定の一態様では、約250μgの抗体（前記抗体を10mg/mLで含む液体製剤約25μL）を、TSK SW x1ガードカラム（6.0 mm×4.0 cm）を取り付けたTosoH Biosep TSK G3000SWXLカラム（7.8 mm×30 cm）に注入する。抗体（その抗体フラグメントを含む）は、0.1 M硫酸ナトリウムおよび0.05%アジ化ナトリウムを含む0.1 Mリン酸二ナトリウムを用いて、流量0.8-1.0 mL/minにより均一濃度で溶出させる。溶出タンパク質は、UV吸光度280 nmを使用し検出される。アッセイでは対照として参照標準をランさせ、約12～14分間に観察された、含めた容量ピークを除く他の全てのピークと比較して、生成モノマーピークの領域率としてその結果が報告される。モノマーピークよりも早く溶出するピークが凝集率として記録される。

[0154] 本発明の抗Epiregulin抗体の会合体量を低減させるために、抗Epiregulin抗体の重鎖および軽鎖を含む分子間の疎水性相互作用が減弱される。具体的には、抗Epiregulin抗体の重鎖または軽鎖のアミノ酸配列中の疎水性残基を親水性残基に置換するアミノ酸の改変等が適宜実施される。好適な非限定の一態様では、抗Epiregulin抗体のCDR内に含まれる疎水性残基を親水性残基に置換するアミノ酸の改変等が適宜実施される。アミノ酸の中には、親水性のアミノ酸および疎水性のアミノ酸が存在することが知られている。一般的に、親水性アミノ酸としては、Asp (D) 、Glu (E) 、Arg (R) 、Lys (K) 、His (H) 、Gly (G) 、Ser (S) 、Thr (T) 、Cys (C) 、Asn (N) 、Gln (Q) 、Tyr (Y) が知られている。 疎水性アミノ酸としては、Ala (A) 、Val (V) 、Leu (L) 、Ile (I) 、Met (M) 、Trp (W) 、Phe (F) 、Pro (P) が知られている。前記のアミノ酸の改変としては、好ましくは、前記の疎水性残基の中から選択される一以上のアミノ酸の、前記の親水性残基の中から選択されるアミノ酸への置換から適宜選択されるが、特に特定のアミノ酸に制限されない。

[0155] 本発明の抗Epiregulin抗体の会合体量を低減させるためにアミノ酸を改変する部位の非限定の例として、配列番号：３８で表される抗Epiregulin抗体の重鎖配列中のKabatナンバリングで表される60位、および/または98位のア

ミノ酸が好適に挙げられる。

[0156] 前記のアミノ酸置換の非限定の一態様としては、配列番号：３８で表される抗Epiregulin抗体の重鎖配列中のKabatナンバリングで表される60位のアミノ酸のHis（H）、Lys（K）、Thr（T）、Ser（S）またはArg（R）への置換、および/または98位のアミノ酸のSer（S）またはGlu（E）への置換が好適に挙げられる。

[0157] 会合体量が低減された本発明の抗Epiregulin抗体の重鎖の非限定の一態様としては、配列番号：９２－９８、１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖が挙げられる。

[0158] 会合体量が低減された本発明の抗Epiregulin抗体の非限定の一態様としては、配列番号：９２－９８、１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖、および、配列番号：９９、１２８－１３０、１３６、および１４１からなる群から選択される軽鎖を含む抗Epiregulin抗体が挙げられる。

[0159] 非ヒト動物のEpiregulinおよびヒト動物のEpiregulinに結合する種交差反応性の付与

本発明の抗Epiregulin抗体は、非ヒト動物およびヒト動物間の種交差反応性（cross-species reactivity）を示す抗Epiregulin抗体が好ましい。すなわち、本発明は、配列番号：９、１０および１１で表される重鎖可変領域CDRならびに配列番号：１２、１３および１４で表される軽鎖可変領域CDRを含む抗Epiregulin抗体が結合するエピトープに結合する抗体であって、配列番号：１７０で表されるサルEpiregulinに対するKD値（cEREG KD）の配列番号：３４で表されるヒトEpiregulinに対するKD値（hEREG KD）の比（cEREG KD/hEREG KD）が、配列番号：９、１０および１１で表される重鎖可変領域CDRならびに配列番号：１２、１３および１４で表される軽鎖可変領域CDRを含む抗Epiregulin抗体のcEREG KD/hEREG KDよりも小さいことを特徴とする抗Epiregulin抗体を提供する。

[0160] 具体的には、本発明は、配列番号：９、１０および１１で表される重鎖可変領域CDRならびに配列番号：１２、１３および１４で表される軽鎖可変領域CDRを含む抗Epiregulin抗体の、サルEpiregulinに対する結合活性を改変するために、前記のCDRのアミノ酸配列が改変された。サルEpiregulinとヒトEpiregulinとの構造上の相違も明らかではなかったため、抗Epiregulin抗体のどのアミノ酸残基を改変すれば、サルEpiregulinに対する結合活性を増強することができるのかといったガイダンスは全く示されていなかった。本発明では、CDRの任意の部位のアミノ酸残基が置換された複数の抗体配列がデザインされた。具体的には、前記のCDR配列中のアミノ酸がArg（R）残基に置換された抗Epiregulin抗体が作製された。

[0161] CDR配列中のアミノ酸がArg（R）残基に置換された抗Epiregulin抗体は驚くべきことに、サルEpiregulinに対する結合活性が増強された。すなわち、抗Epiregulin抗体のCDR配列中のアミノ酸をArg（R）残基に置換することによって非ヒト動物のEpiregulinおよびヒト動物のEpiregulinに結合する種交差反応性を付与することが可能であった。

[0162] 配列番号：１７０で表されるサルEpiregulinに対するKD値（cEREG KD）は前記の結合活性の項で記載された方法によって算出され得る。抗Epiregulin抗体のEpiregulinに対する結合活性は当業者に公知の方法により測定することが可能であり、その測定条件については当業者が適宜決定することが可能である。抗Epiregulin抗体のEpiregulinに対する結合活性は、KD（Dissociation constant：解離定数）、見かけのKD（Apparent dissociation constant：見かけの解離定数）、解離速度であるkd（Dissociation rate：解離速度定数）、又は見かけのkd（Apparent dissociation：見かけの解離速度定数）等として評価することが可能である。これらは当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore（GE healthcare）、スキャッチャードプロット、FACS等を用いることが可能である。当該KD値を、配列番号：３４で表されるヒトEpiregulinに対するKD値（hEREG KD）で除することによって、サルEpiregulinに対するKD値（cEREG KD）のヒトEpiregulinに対するKD値（hER

EG KD）の比（cEREG KD/hEREG KD）が決定され得る。

[0163] 本発明において、cEREG KD/hEREG KDは40よりも小さいことが好ましい。また、非限定の一態様では、cEREG KD/hEREG KDは10よりも小さいことが好ましい。別の非限定の一態様では、cEREG KD/hEREG KDは6よりも小さいことが好ましく、さらに異なる非限定の一態様ではcEREG KD/hEREG KDは4よりも小さいことが好適である。

[0164] 本発明によって提供される、非ヒト動物のEpiregulinおよびヒト動物のEpiregulinに結合する種交差反応性を付与するためにアミノ酸を改変する部位の非限定の例として、配列番号：３８で表される抗Epiregulin抗体の重鎖配列中のKabatナンバリングで表される33位、51位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、62位、65位、96位、97位、および/または98位のアミノ酸が好適に挙げられる。また、本発明によって提供される、非ヒト動物のEpiregulinおよびヒト動物のEpiregulinに結合する種交差反応性を付与するためにアミノ酸を改変する部位の非限定の例として、配列番号：２９で表される抗Epiregulin抗体の軽鎖配列中のKabatナンバリングで表される24位、93位、および/または94位のアミノ酸が好適に挙げられる。上記のアミノ酸の一以上のArg（R）への置換がアミノ酸の改変の好適な例として挙げられる。

[0165] 種交差性が付与された本発明の抗Epiregulin抗体の重鎖の非限定の一態様としては、配列番号：１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖が挙げられる。また、等電点が改変された本発明のヒト化抗Epiregulin抗体の軽鎖の非限定の一態様としては、配列番号：１２８－１３０、１３６、および１４１からなる群から選択される軽鎖が挙げられる。

[0166] 種交差性が付与された本発明の抗Epiregulin抗体の非限定の一態様としては、配列番号：９８、１１５－１２７、１３１－１３５、１３７－１４０、および１４２－１５０からなる群から選択される重鎖、および、配列番号：２９、１２８－１３０、１３６、および１４１からなる群から選択される軽鎖を含む抗Epiregulin抗体が挙げられる。

[0167] 中和活性

本発明の抗Epiregulin抗体は、好ましくは中和活性を有する抗体である。一般的に、中和活性とは、ウイルスや毒素など、細胞に対して生物学的活性を有するリガンドの当該生物学的活性を阻害する活性をいう。即ち、中和活性を有する物質とは、当該リガンド又は当該リガンドが結合する受容体に結合し、当該リガンドと受容体の結合を阻害する物質を指す。中和活性によりリガンドとの結合を阻止された受容体は、当該受容体を通じた生物学的活性を発揮することができなくなる。このような中和活性を有する抗体は一般に中和抗体と呼ばれる。当該中和活性は、対象とするリガンドの存在下において、当該生物学的活性をその中和活性を評価する被検物質の存在又は非存在下条件間で比較することにより測定することができる。

[0168] 本発明に係るEpiregulinの主要な受容体として考えられているEGFレセプターの場合、リガンドの結合により二量体を形成し、細胞内に存在する自らのドメインであるチロシンキナーゼを活性化する。活性化されたチロシンキナーゼは自己リン酸化によりリン酸化チロシンを含むペプチドを形成し、それらに様々なシグナル伝達のアクセサリー分子を会合させる。それらは主にPLCγ（ホスフォリパーゼCγ）、Shc、Grb2などである。これらのアクセサリー分子のうち、前二者は更にEGFレセプターのチロシンキナーゼによりリン酸化を受ける。EGFレセプターからのシグナル伝達における主要な経路はShc、Grb2、Sos、Ras、Raf/MAPKキナーゼ/MAPキナーゼの順にリン酸化が伝達される経路である。更に副経路であるPLCγからPKCへの経路が存在すると考えられている。

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

[0169] また、生体内シグナルカスケードの下流に存在する標的遺伝子に対する転

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

[0170] 更に、EGFレセプターは通常は細胞増殖を促進する方向に働くため、標的とする細胞の増殖活性を測定することによって、生体内シグナル伝達の活性化を評価することができる。本発明においては後者の細胞増殖活性を評価することによって本発明の中和抗体の中和活性を評価するが、本方法に限定されるものではなく、選択した標的細胞毎に前記に挙げた方法を好適に採用し評価することができる。

[0171] 即ち、例えば以下のような細胞増殖活性を測定することにより、抗Epiregulin抗体の中和活性を評価又は測定することができる。例えば、培地中に添加した[^{3}H]ラベルしたチミジンの生細胞による取り込みをDNA複製能力の指標として測定する方法が用いられる。より簡便な方法としてトリパンブルー等の色素を細胞外に排除する能力を顕微鏡下で計測する色素排除法や、MTT法が用いられる。後者は、生細胞がテトラゾリウム塩であるMTT（3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide）を青色のホルマザン産物へ転換する能力を有することを利用している。より具体的には、被検細胞の培養液に被験抗体を添加して一定時間を経過した後に、MTT溶液を培養液に加えて一定時間静置することによりMTTを細胞に取り込ませる。その結果、黄色の化合物であるMTTが細胞内のミトコンドリア内のコハク酸脱水素酵素により青色の化合物に変換される。この青色生成物を溶解し呈色させた後にその吸光度を測定することにより生細胞数の指標とするものである。

[0172] MTT以外に、MTS、XTT、WST-1、WST-8等の試薬も市販されており（nacalai tesqueなど）好適に使用することができる。更に、細胞のATPや細胞培養物のインピーダンスを指標として細胞増殖活性を評価する方法も公知である。活

性の測定に際しては、対照抗体として抗Epiregulin抗体と同一のアイソタイプを有する抗体で当該中和活性を有しない結合抗体を、抗Epiregulin抗体と同様に使用して、抗Epiregulin抗体が対照抗体よりも強い中和活性を示すことにより活性を判定することができる。中和活性の測定方法の具体例は、WO2008/047723等にも開示されており、当業者はこれらの公知の測定方法も適宜使用することが可能である。

[0173] 細胞傷害活性

本発明で使用される抗体は、好ましくは細胞傷害活性を有する抗体である。

[0174] 本発明における細胞傷害活性としては、例えば抗体依存性細胞介在性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity：CDC）活性などを挙げることができる。本発明において、CDC活性とは補体系による細胞傷害活性を意味する。一方ADCC活性とは標的細胞の細胞表面抗原に特異的抗体が付着した際、そのFc部分にFcγ受容体保有細胞（免疫細胞等）がFcγ受容体を介して結合し、標的細胞に傷害を与える活性を意味する。本発明で使用される抗体は、CDC活性またはADCC活性を有する抗体であってよく、あるいはCDC活性およびADCC活性を併せもつ抗体であってもよい。

[0175] 抗Epiregulin抗体がADCC活性を有するか否か、又はCDC活性を有するか否かは公知の方法により測定することができる（例えば、Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc.,(1993)等）。

[0176] 具体的には、まず、エフェクター細胞、補体溶液、標的細胞の調製が実施される。

（１）エフェクター細胞の調製

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

胞が調製され得る。

（２）補体溶液の調製

Baby Rabbit Complement（CEDARLANE社製）を10% FBS含有培地（Invitrogen社製）にて10倍希釈し、補体溶液が調製され得る。

（３）標的細胞の調製

Epiregulinタンパク質を発現する細胞を0.2 mCiの^{51}Cr-クロム酸ナトリウム（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）とともに、10% FBS含有DMEM培地中で37℃にて１時間培養することにより当該標的細胞が放射性標識され得る。Epiregulinタンパク質を発現する細胞としては、Epiregulinタンパク質をコードする遺伝子で形質転換された細胞、原発性大腸癌細胞、転移性大腸癌細胞、肺腺癌細胞、膵癌細胞、胃癌細胞、腎癌細胞、大腸癌細胞、食道癌細胞等が利用され得る。放射性標識後、細胞を10% FBS含有RPMI1640培地にて3回洗浄し、細胞濃度を2×10^5/mLに調製することによって、当該標的細胞が調製され得る。

[0177] ADCC活性、又はCDC活性は下記に述べる方法により測定され得る。ADCC活性の測定の場合は、各ウェルに、標的細胞と、抗Epiregulin抗体を50μLずつ加えられた96ウェルU底プレート（Becton Dickinson社製）が氷上にて15分間静置される。その後、各ウェルにエフェクター細胞100μLが加えられたプレートは、炭酸ガスインキュベーター内で4時間インキュベートされる。抗体の終濃度は0または10μg/mLに調製され得る。インキュベーションの後、回収された100μLの上清中の放射活性が、ガンマカウンター（COBRAII AUTO-GAMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company社製）を用いて測定される。細胞傷害活性（%）は得られた値を使用して

（式２）

(A-C) / (B-C) x 100

の計算式に基づいて計算される。Aは各試料における放射活性（cpm）、Bは1% NP-40（nacalai tesque社製）を加えた試料における放射活性（cpm）、Cは標的細胞のみを含む試料の放射活性（cpm）を示す。

[0178] 一方、CDC活性の測定の場合は、各ウェルに、標的細胞と、抗Epiregulin抗体が50μLずつ加えられた96ウェル平底プレート（Becton Dickinson社製）が氷上にて15分間静置される。その後、各ウェルに補体溶液100μLが加えられたプレートは、炭酸ガスインキュベーター内で４時間インキュベートされる。抗体の終濃度は0または3μg/mLに調製される。インキュベーションの後、回収された100μLの上清中の放射活性が、ガンマカウンターを用いて測定される。細胞傷害活性はADCC活性の測定と同様に計算される。

[0179] ADCC活性が増強された抗Epiregulin抗体

本発明の抗Epiregulin抗体としてはADCC活性が増強された抗Epiregulin抗体も好適に使用され得る。前記のように、ADCC活性とは標的細胞の細胞表面抗原に特異的抗体が付着した際、そのFc部分にFcγ受容体発現細胞（免疫細胞等）がFcγ受容体を介して結合し、標的細胞に傷害を与える活性を意味するため、免疫細胞等のFcγ受容体発現細胞のFcγ受容体に対する結合活性を増強することによって、抗Epiregulin抗体が介在するADCC活性を増強することが可能である。免疫細胞等のFcγ受容体発現細胞のFcγ受容体に対する結合活性を増強する方法として、少なくとも下記の三つの公知の方法が利用され得る。

[0180] （１）Fc領域のアミノ酸が改変された抗Epiregulin抗体

本発明の抗Epiregulin抗体に含まれるFc領域のアミノ酸の改変によってFcγレセプターに対する結合活性が増強された抗Epiregulin抗体が取得され得る。改変のための好ましいIgG型免疫グロブリンのFc領域としては、例えばヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体）のFc領域が挙げられる。

[0181] 他のアミノ酸への改変は、Fcγレセプターに対する結合活性が増強されるかぎり、いかなる位置のアミノ酸も改変され得る。本発明の抗Epiregulin抗体が、ヒトFc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、Fcγレセプターに対する結合が、ヒトIgG1由来のFc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変が含まれていることが好ましい。Fcγレセプターに対する結合活

性を増強するためのアミノ酸改変としては、例えばWO2007/024249、WO2007/021841、WO2006/031370、WO2000/042072、WO2004/029207、WO2004/099249、WO2006/105338、WO2007/041635、WO2008/092117、WO2005/070963、WO2006/020114、WO2006/116260およびWO2006/023403などにおいて報告されている。

[0182] そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば、EUナンバリングで表される221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が挙げられる。これらのアミノ酸の改変によって、本発明の抗Epiregulin抗体のFc領域のFcγレセプターに対する結合が増強され得る。本発明の抗Epiregulin抗体は、配列番号：２６の重鎖定常領域において、例えば、EUナンバリングで表される230位、240位、244位、245位、247位、262位、263位、266位、273位、275位、299位、302位、313位、323位、325位、328位および332位からなる群から選択されるアミノ酸の少なくとも1つの置換を含んでもよい。

[0183] 本発明に使用するために、特に好ましい改変としては、例えば、本発明の抗Epiregulin抗体のFc領域のEUナンバリングで表される；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Se

r、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、

292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、

293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、

297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、または

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、一箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、二箇所以上のアミノ酸が改変され得る。二箇所以上のアミノ酸の改変の組合せとしては、例えば表１－１および表１－２に記載されるような組合せが挙げられる。

[0184]

[表1-1]

アミノ酸の組合せ	アミノ酸の組合せ
K370E/P396L/D270E	S239Q/I332Q
Q419H/P396L/D270E	S267D/I332E
V240A/P396L/D270E	S267E/I332E
R255L/P396L/D270E	S267L/A327S
R255L/P396L/D270E	S267Q/A327S
R255L/P396L/D270E/R292G	S298A/I332E
R255L/P396L/D270E	S304T/I332E
R255L/P396L/D270E/Y300L	S324G/I332D
F243L/D270E/K392N/P396L	S324G/I332E
F243L/R255L/D270E/P396L	S324I/I332D
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	S324I/I332E
F243L/R292P/Y300L/P396L	T260H/I332E
F243L/R292P/Y300L	T335D/I332E
F243L/R292P/P396L	V240I/V266I
F243L/R292P/V305I	V264I/I332E
F243L/R292P	D265F/N297E/I332E
S298A/E333A/K334A	D265Y/N297D/I332E
E380A/T307A	F243L/V262I/V264W
K326M/E333S	N297D/A330Y/I332E
K326A/E333A	N297D/T299E/I332E
S317A/K353A	N297D/T299F/I332E
A327D/I332E	N297D/T299H/I332E
A330L/I332E	N297D/T299I/I332E
A330Y/I332E	N297D/T299L/I332E
E258H/I332E	N297D/T299V/I332E
E272H/I332E	P230A/E233D/I332E
E272I/N276D	P244H/P245A/P247V
E272R/I332E	S239D/A330L/I332E
E283H/I332E	S239D/A330Y/I332E
E293R/I332E	S239D/H268E/A330Y
F241L/V262I	S239D/I332E/A327A
F241W/F243W	S239D/I332E/A330I
F243L/V264I	S239D/N297D/I332E
H268D/A330Y	S239D/S298A/I332E
H268E/A330Y	S239D/V264I/I332E
K246H/I332E	S239E/N297D/I332E
L234D/I332E	S239E/V264I/I332E
L234E/I332E	S239N/A330L/I332E
L234G/I332E	S239N/A330Y/I332E
L234I/I332E	S239N/S298A/I332E
L234I/L235D	S239Q/V264I/I332E
L234Y/I332E	V264E/N297D/I332E
L235D/I332E	V264I/A330L/I332E
L235E/I332E	V264I/A330Y/I332E
L235I/I332E	V264I/S298A/I332E
L235S/I332E	Y296D/N297D/I332E

[0185] 表１－２は表１－１の続きの表である。

[表1-2]

L328A/I332D	Y296E/N297D/I332E
L328D/I332D	Y296H/N297D/I332E
L328D/I332E	Y296N/N297D/I332E
L328E/I332D	Y296Q/N297D/I332E
L328E/I332E	Y296T/N297D/I332E
L328F/I332D	D265Y/N297D/T299L/I332E
L328F/I332E	F241E/F243Q/V262T/V264E
L328H/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R
L328I/I332D	F241E/F243Y/V262T/V264R
L328I/I332E	F241L/F243L/V262I/V264I
L328M/I332D	F241R/F243Q/V262T/V264R
L328M/I332E	F241S/F243H/V262T/V264T
L328N/I332D	F241W/F243W/V262A/V264A
L328N/I332E	F241Y/F243Y/V262T/V264T
L328Q/I332D	I332E/A330Y/H268E/A327A
L328Q/I332E	N297D/I332E/S239D/A330L
L328T/I332D	N297D/S298A/A330Y/I332E
L328T/I332E	S239D/A330Y/I332E/K326E
L328V/I332D	S239D/A330Y/I332E/K326T
L328V/I332E	S239D/A330Y/I332E/L234I
L328Y/I332D	S239D/A330Y/I332E/L235D
L328Y/I332E	S239D/A330Y/I332E/V240I
N297D/I332E	S239D/A330Y/I332E/V264T
N297E/I332E	S239D/A330Y/I332E/V266I
N297S/I332E	S239D/D265F/N297D/I332E
P227G/I332E	S239D/D265H/N297D/I332E
P230A/E233D	S239D/D265I/N297D/I332E
Q295E/I332E	S239D/D265L/N297D/I332E
R255Y/I332E	S239D/D265T/N297D/I332E
S239D/I332D	S239D/D265V/N297D/I332E
S239D/I332E	S239D/D265Y/N297D/I332E
S239D/I332N	S239D/I332E/A330Y/A327A
S239D/I332Q	S239D/I332E/H268E/A327A
S239E/D265G	S239D/I332E/H268E/A330Y
S239E/D265N	S239D/N297D/I332E/A330Y
S239E/D265Q	S239D/N297D/I332E/K326E
S239E/I332D	S239D/N297D/I332E/L235D
S239E/I332E	S239D/V264I/A330L/I332E
S239E/I332N	S239D/V264I/S298A/I332E
S239E/I332Q	S239E/V264I/A330Y/I332E
S239N/I332D	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E
S239N/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E
S239N/I332N	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E
S239N/I332Q	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E
S239Q/I332D	S239D/I332E/H268E/A330Y/A327A
S239Q/I332E	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
S239Q/I332N	F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E

[0186] 本明細書において、抗Epiregulin抗体のFc領域のFcγレセプターに対する結合活性が増強されたとは、前記のアミノ酸の改変が施された抗Epiregulin抗体のFc領域のFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIb

のいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性が、これらのヒトFcγレセプターに対する前記のアミノ酸の改変が施される前の抗Epiregulin抗体のFc領域の結合活性よりも高いことをいう。例えば、上記の解析方法にもとづいて、対照とする改変前の抗Epiregulin抗体の結合活性に比較して改変後の抗Epiregulin抗体の結合活性が、105%以上、好ましくは110%以上、115%以上、120%以上、125%以上、特に好ましくは130%以上、135%以上、140%以上、145%以上、150%以上、155%以上、160%以上、165%以上、170%以上、175%以上、180%以上、185%以上、190%以上、195%以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上、3.5倍以上、4倍以上、4.5倍以上、5倍以上、7.5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上の結合活性を示すことをいう。

[0187] （２）Fc領域に結合する糖鎖中のフコース含量が減少している抗Epiregulin抗体

本発明の抗Epiregulin抗体の非限定の一態様として、当該抗Epiregulin抗体のFc領域に結合した糖鎖の組成がフコース欠損糖鎖を結合したFc領域の割合が高くなるように修飾された抗Epiregulin抗体が、好適に挙げられる。後述される糖鎖構造の解析方法にしたがって、当業者はフコース欠損糖鎖を結合したFc領域の割合が高い抗Epiregulin抗体を適宜選択することが可能である。そのようなフコース欠損糖鎖を結合したFc領域の割合は、10%から100%の中から当業者によって適宜選択され得る。非限定の一態様では、当該割合は10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の中から選択され得る。抗体のFc領域に結合するN -グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN -アセチルグルコサミンからフコース残基を除去すると、FcγRIIIaに対する親和性が増強されることが知られている（J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473）。こうしたFc領域を含むIgG1抗体は、後述するADCC活性が増強されていることが知られていることから、当該Fc領域を含む抗Epiregulin抗体は、本発明の医薬組成物に含まれる抗Epiregulin抗体としても有用である。抗体Fc領域

に結合するN -グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN -アセチルグルコサミンからフコース残基が除去された抗体の非限定の一態様として、グリコシル化が修飾された抗体（WO1999/054342）が好適に挙げられる。

[0188] 抗体Fc領域に結合するN -グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN -アセチルグルコサミンからフコース残基が除去された抗体の異なる非限定の一態様として、糖鎖に付加するフコースが欠損した抗体（WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913等）もまた好適に挙げられる。糖鎖修飾を受けるポリペプチドの糖鎖構造を形成する活性が改変された結果、糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞が、糖鎖に付加するフコースが欠損した抗体を作製するために用いられる。当該宿主細胞において所望の抗体遺伝子を発現することによって、当該宿主細胞の培養液からその糖鎖中のフコースが欠損した当該抗体が回収され得る。ポリペプチドの糖鎖構造を形成する活性として、フコシルトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.152）、フコーストランスポーター（SLC35C1）、GMD（GDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ）（EC 4.2.1.47）、Fx（GDP-ケト-6-デオキシマンノース3, 5-エピメラーゼ, 4-レダクターゼ）（EC 1.1.1.271）、およびGFPP（GDP-β-L-フコースピロフォスフォリラーゼ）（EC 2.7.7.30）からなる群から選択される酵素またはトランスポーターの活性が非限定の好適な例として挙げられ得る。これらの酵素またはトランスポーターは、その活性を発揮することができれば必ずしもその構造は特定されない。本明細書においては、これらの活性を発揮することが可能なタンパク質を機能性タンパク質という。これらの活性を改変する方法の非限定の一態様として、これらの活性の欠失が挙げられる。これらの活性が欠失した宿主細胞を作製するために、これらの機能性タンパク質の遺伝子を機能不能に破壊する方法等公知の方法が適宜採用され得る（WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913等）。そのような活性が欠失した宿主細胞は、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髄腫細胞、P3X63マウス骨髄腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞、HEK293細胞、またはハイブリドーマ細胞等に内在性であるこれらの機能性タンパク質の遺伝子を機能不能に破壊する方法等によっ

て作製され得る。

[0189] 抗Epiregulin抗体遺伝子を含む発現ベクターが形質導入された前記の宿主細胞の培養上清から回収することによって、抗体Fc領域に結合するN -グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN -アセチルグルコサミンからフコース残基が除去された抗Epiregulin抗体が回収される。

[0190] （３）バイセクティングN-アセチルグルコサミンが付加されたFc領域を含む抗Epiregulin抗体

本発明の抗Epiregulin抗体の非限定の一態様として、バイセクティングN-アセチルグルコサミンが付加されたFc領域を含む抗Epiregulin抗体も好適に挙げられる。バイセクティングGlcNAc構造を含む糖鎖を有する抗体（WO2002/079255等）が公知である。バイセクティングGlcNAc構造を含む糖鎖を形成する活性を有する宿主細胞が、バイセクティングGlcNAc構造を含む糖鎖が付加された抗体を作製するために用いられる。非限定の好適な一態様では、GnTIII（β-1,4-マンノシル-グリコプロテイン，4-β-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ）（EC 2.4.1.144）活性またはGalT（β-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ）（EC 2.4.1.38）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子を発現する宿主細胞が作製される。別の非限定の好適な一態様では、前記の機能性タンパク質に加えて、ヒトManII（マンノシダーゼII）（3.2.1.114）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、GnTI（β-1,2-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI）（EC 2.4.1.94）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、GnTII（β-1,2-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII）（EC 2.4.1.143）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、ManI（マンノシダーゼ）（EC 3.2.1.113）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、およびα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.68）と共発現する宿主細胞が作製される（WO2004/065540）。前記のようなバイセクティングGlcNAc構造を含む糖鎖を形成する活性を有する宿主細胞は、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髄腫細胞、P3X63マウス骨髄腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞、HEK293細胞、ま

たはハイブリドーマ細胞等に前記の機能性タンパク質の遺伝子を含む発現ベクターを形質導入することによって作製され得る。

[0191] 抗Epiregulin抗体遺伝子を含む発現ベクターが形質導入された前記の宿主細胞の培養上清から回収することによって、バイセクティングN-アセチルグルコサミンが付加されたFc領域を含む抗Epiregulin抗体が回収される。抗体に連結された糖鎖構造を解析するためには公知の方法が使用され得る。非限定の一態様では、本発明の抗Epiregulin抗体に、N-Glycosidase F (Roche diagnostics) を作用させることによって、抗Epiregulin抗体に結合する糖鎖がタンパク質から遊離される (J. Pharm. Sci. (1994) 83(12), 1670-1675)。エタノールを用いた除タンパク質操作の後 (J. Clin. Invest. (2001), 108(11), 1687-95)、遊離糖鎖が濃縮乾固され、次いで2-アミノピリジンまたは2-アミノベンズアミドによって蛍光標識が施される (Anal. Biochem. (1995) 230 (2), 229-238)。得られた2-AP化糖鎖または2-AB化糖鎖が、セルロースカートリッジを用いた固相抽出により脱試薬された後遠心分離により濃縮され、精製2-AB化糖鎖として以後の解析に供される。次に、β-Galactosidase (生化学工業) を精製2-AB化糖鎖に作用させることによって、アガラクトシル2-AB化糖鎖が調製される。本発明の抗Epiregulin抗体から遊離された糖鎖を出発材料として調製されたアガラクトシル2-AB化糖鎖は、アミドカラムTSK gel Amide-80 (東ソー) による順相HPLCによって分析され、そのクロマトグラムが比較される。

[0192] また、抗体のFc領域とFcgRとの相互作用の強さはZn^{2+}イオン濃度依存的であることが報告されている (Immunology Letters 143 (2012) 60-69)。抗体はFc領域のZn^{2+}イオン濃度が高いほど、Fc領域とFcgRとの相互作用は増強される。抗体のFc領域のCH3に存在するHis310、His435がZn^{2+}をキレートすることにより、遠位にあるFc領域の各CH2ドメインが開く。これにより、CH2ドメインとFcgRと相互作用しやすくなり、Fc領域とFcgRの相互作用が増強される。本発明の抗体の非限定な一態様として、EUナンバリングで表される310位のHis、435位のHis、433位のHisおよび/または434位のAsnにZn^{2+}がキレートされた

抗体が挙げられる。

[0193] 抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugate）

本発明の抗Epiregulin抗体の非限定の一態様として、抗Epiregulin抗体に細胞傷害活性を有する薬物が連結された抗Epiregulin抗体薬物複合体も好適に挙げられる。抗体薬物複合体（Antibody-Drug Conjugate）は、以下本明細書において、ADCと指称される場合もある。より具体的には、本発明で使用される抗Epiregulin抗体薬物複合体は、増殖抑制剤、または毒性ペプチドもしくは放射性化学物質などの細胞傷害性物質と適宜連結され得る。本発明において放射性化学物質とは、放射性同位体を含む物質のことをいう。放射性同位体は特に限定されず、如何なる放射性同位体が用いられ得るが、例えば、^{32}P、^{14}C、^{125}I、^{3}H、^{131}I、^{186}Re、^{188}Reなどを用いることが可能である。このような抗Epiregulin抗体薬物複合体は、得られた抗Epiregulin抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。すなわち、増殖抑制剤または細胞傷害性物質と抗Epiregulin抗体が互いに化学的に共役可能（例、共有結合することが可能）なように、リンカー分子は、増殖抑制剤または細胞傷害性物質を抗体に化学結合（上述のような）を介し、連結される。

[0194] 好ましくは、結合剤（リンカー）は、切断可能なリンカーである。より好ましくは、温和な条件（即ち、薬物活性が影響を受けないような細胞内の条件）の下、リンカーは切断される。適した切断可能なリンカーの例としては、ジスルフィドリンカー、酸に不安定なリンカー、光に不安定なリンカー、ペプチダーゼに不安定なリンカー、及びエステラーゼに不安定なリンカーが挙げられる。ジスルフィドを含むリンカーは、生理学的条件の下で起こり得るジスルフィド交換を通じて切断可能なリンカーである。酸に不安定なリンカーは、酸性ｐＨで切断可能なリンカーである。例えば、エンドソーム及びリソソームといった、特定の細胞内コンパートメントは、酸性pH（pH4～5）を有し、酸に不安定なリンカーを切断するのに適した条件を提供する。光に不安定なリンカーは、光に暴露可能な体表面及び多くの体腔において、有用である。更に、赤外線光は、組織を透過し得る。ペプチダーゼに不安定なリ

ンカーは、細胞内又は外の特定のペプチドを切断させるのに用いられ得る（例、Trouetら（Proc.Natl.Acad.Sci.USA（1982）79, 626-629、及びUmemotoらInt.J.Cancer（1989）43, 677-684参照）。

[0195] このようなADCは前記の化学的な修飾のほか、増殖抑制剤、または毒性ペプチドもしくは放射性化学物質などの細胞傷害性物質を認識するように遺伝子組換え技術を用いて設計した二重特異性抗体(bispecific antibody)のような分子型としても取得され得る。本発明における「抗Epiregulin抗体」にはこれらの抗体も包含される。

[0196] また、本発明が提供する抗Epiregulin抗体薬物複合体の非限定の一態様として、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、オンコナーゼ、DNase I、スタフィロコッカスエンテロトキシンA、ポークウイード抗ウイルス蛋白、ゲロニン、ジフテリアトキシン、シュードモナスエクソトキシン、シュードモナスエンドトキシン、L-アスパラギナーゼ、PEG L-アスパラギナーゼなどの毒性ペプチドで修飾された抗Epiregulin抗体も例示される。また別の態様では、一または二以上の増殖抑制剤と毒性ペプチド等の細胞傷害性物質をそれぞれ組み合わせて抗Epiregulin抗体の修飾に使用され得る。前記したように、抗Epiregulin抗体と上記の増殖抑制剤、または毒性ペプチドもしくは放射性化学物質などの細胞傷害性物質との連結には共有結合または非共有結合が利用され得る。これら増殖抑制剤、または毒性ペプチドもしくは放射性化学物質などの細胞傷害性物質が連結されたADCの作製方法は公知である。例えば、抗Epiregulin抗体と増殖抑制剤、または毒性ペプチドもしくは放射性化学物質などの細胞傷害性物質が直接結合される場合の連結基は、例えばその連結に際してSH基が利用されるジスルフィド結合が挙げられる。具体的には、還元剤、例えばジチオトレイトール等にてそのFc領域の分子内ジスルフィド結合が還元された抗Epiregulin抗体、およびその分子内のジスルフィド結合が同様に還元された増殖抑制剤、または細胞傷害性物質をジスルフィド結合にて連結させる。連結前に活性化促進剤、例えばエルマン試薬（Ellman's reagent）にて抗体または増殖抑制剤、もしくは細胞傷害性物質のいずれか一方を活

性化させ両者の間のジスルフィド結合形成が促進され得る。抗Epiregulin抗体と増殖抑制剤、または毒性ペプチドもしくは放射性化学物質などの細胞傷害性物質を直接結合するその他の方法として、例えば、シッフ塩基を用いた方法、カルボジイミド法、活性エステル法（N-hydroxysucccinimide法）、混合アンヒドリド（Mixed anhydride）を用いた方法、ジアゾ反応を用いた方法等を非限定の好適な例として挙げられ得る。

[0197] 本発明で用いられる毒性ペプチドとしては、例えば、以下のものが例示され得る。

ージフテリアトキシンA鎖（Diphtheria toxin A Chain）（Langoneら（Methods in Enzymology（1993）93, 307-308）

ーシュードモナスエクソトキシン（Pseudomonas Exotoxin）（Paiら（Nat. Med.（1996）2（3）, 350-353）

ーリシン鎖（Ricin A Chain）（Fultonら（J. Biol. Chem.（1986）261, 5314-5319）、Sivamら（Cancer Res.（1987）47, 3169-3173）、Cumberら（J. Immunol. Methods（1990）135, 15-24）、Wawrzynczakら（Cancer Res.（1990）50, 7519-7562）、Gheeiteら（J. Immunol. Methods（1991）142, 223-230））

ー無糖鎖リシンA鎖（Deglicosylated Ricin A Chain）（Thorpeら（Cancer Res.（1987）47, 5924-5931）

ーアブリンA鎖（Abrin A Chain）（Wawrzynczakら（Br. J. Cancer（1992）66, 361-366）、;Wawrzynczakら（Cancer Res（1990）50, 7519-7562）、Sivamら（Cancer Res.（1987）47, 3169-3173）、Thorpeら（Cancer Res.（1987）47, 5924-5931）

ーゲロニン（Gelonin）（Sivamら（Cancer Res.（1987）47, 3169-3173）、Cumberら（J. Immunol. Methods（1990）135, 15-24）、Wawrzynczakら（Cancer Res.（1990）50, 7519-7562）、Bolognesiら（Clin. Exp. Immunol.（1992）89, 341-346））

ーポークウイード抗ウイルス蛋白（PAP-sまたはPokeweed anti-viral protei

n fromseeds) (Bolognesiら (Clin. Exp. Immunol. (1992), 89, 341-346))

ーブリオジン (Briodin) (Bolognesiら (Clin. Exp. Immunol. (1992) 89, 341-346))

ーサポリン (Saporin) (Bolognesiら (Clin. Exp. Immunol. (1992), 89, 341-346))

ーモモルジン (Momordin) (Cumberら (J. Immunol. Methods (1990) 135, 15-24)、(Wawrzynczakら (Cancer Res. (1990) 50, 7519-7562) (Bolognesiら (Clin. Exp. Immunol. (1992) 89, 341-346)

ーモモルコキン (Momorcochin) (Bolognesiら (Clin. Exp. Immunol. (1992) 89, 341-346)

ージアンシン32 (Dianthin 32) (Bolognesiら (Clin. Exp. Immunol. (1992) 89, 341-346)

ージアンシン30 (Dianthin 30) (Stirpeら (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

ーモデッシン (Modeccin) (Stirpeら (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

ービスカミン (Viscumin) (Stirpeら (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

ーボルケシン (Volkesin) (Stirpeら (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

ードデカンドリン (Dodecandrin) (Stirpeら (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

ートリチン (Tritin) (Stirpeら (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

ールフィン (Luffin) (Stirpeら (FEBS Let. (1986) 195, 1-8)

ートリコキリン (Trichokirin) (Casellasら (Eur. J. Biochem. (1988) 176, 581-588)、Bolognesiら (Clin. Exp. Immunol. (1992) 89, 341-346)

[0198] タンパク質またはペプチド性の薬剤や毒素は、遺伝子工学的な手法によっても抗Epiregulin抗体と連結され得る。具体的には、たとえば上記毒性ペプチドをコードするDNAと本発明の抗Epiregulin抗体をコードするDNAをインフレームで融合させた組換えDNAが発現ベクター中に組み込まれた組換えベクターが構築され得る。当該ベクターを適切な宿主細胞に導入することにより得

られる形質転換細胞を培養して組み込まれたDNAが当該細胞中で発現する。前記の培養液から単離および精製して、毒性ペプチドが連結された抗Epiregulin抗体薬物複合体が取得され得る。抗体との融合タンパク質を得る場合、一般に、抗体のC末端側にタンパク質性の薬剤や毒素が配置されるようにこれらのDNAが連結されることが多いがこれらに限定されない。抗体と、タンパク質性の薬剤や毒素の間には、ペプチドリンカーを介在させることも可能である。

[0199] 増殖抑制剤

非限定の一態様では、増殖抑制剤として、DNA損傷剤、抗有糸分裂剤および/または代謝拮抗剤が好適に挙げられ得る。DNA損傷剤は、アルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤および/またはDNAインターカレータであり得る。カルボプラチン（DNAアルキル化剤）、エトポシド（トポイソメラーゼIIの阻害剤）、ドキソルビシン（DNAインターカレータ）、ドセタキセル（抗有糸分裂剤）およびGemzar（ゲムシタビン、代謝拮抗剤）等が非限定の好適な増殖抑制剤として例示され得る。

[0200] アルキル化剤は、以下の少なくとも一つから選択され得る。すなわち、クロラムブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、メクロルエタミン、メルファラン、ウラシルマスタード、チオテパ、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、カルボプラチン、シスプラチン、サトラプラチン、オキサリプラチン、アルトレタミン、ET-743、XL119（ベカテカリン）、ダカルバジン、クロルメチン、ベンダムスチン、トロホスファミド、ウラムスチン、ホテムスチン、ニムスチン、プレドニムスチン、ラニムスチン、セムスチン、ネダプラチン、四硝酸トリプラチン、マンノスルファン、トレオスルファン、テモゾロミド、カルボコン、トリアジコン、トリエチレンメラミンおよびプロカルバジン等から選択される少なくとも一つのアルキル化剤が使用され得る。

[0201] トポイソメラーゼ阻害剤は、以下の少なくとも一つから選択され得る。ドキソルビシン（Doxil）、ダウノルビシン、エピルビシン、イダルビシン、アントラセンジオン（Novantrone）、ミトキサントロン、マイトマイシンC、ブ

レオマイシン、ダクチノマイシン、プリカトマイシン、イリノテカン（Camptosar）、カンプトテシン、ルビテカン、ベロテカン、エトポシド、テニポシドおよびトポテカン（Hycamptin）等から選択される少なくとも一つのトポイソメラーゼ阻害剤が使用され得る。

[0202] DNAインターカレータは、プロフラビン、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ダウノルビシン、ダクチノマイシンおよびサリドマイド等から選択される少なくとも一つのトポイソメラーゼ阻害剤が使用され得る。

[0203] 抗有糸分裂剤は、以下の少なくとも一つから選択され得る。パクリタキセル（Abraxane）/Taxol、ドセタキセル（Taxotere）、BMS-275183、Xyotax、Tocosal、ビノルレビン（vinorlebine）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビンゾリジン、エトポシド（VP-16）、テニポシド（VM-26）、イクサベピロン、ラロタキセル、オルタタキセル、テセタキセル（tesetaxel）およびイスピネシブ等から選択される少なくとも一つのトポイソメラーゼ阻害剤が使用され得る。

[0204] 代謝拮抗剤は、以下の少なくとも一つから選択され得る。フルオロウラシル（5-FU）、フロクスウリジン（5-FUdR）、メトトレキセート、Xeloda、Arranon、ロイコボリン、ヒドロキシ尿素、チオグアニン（6-TG）、メルカプトプリン（6-MP）、シタラビン、ペントスタチン、リン酸フルダラビン、クラドリビン（2-CDA）、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、ペメトレキセド、ボルテゾミブ、アミノプテリン、ラルチトレキセド、クロファラビン、エノシタビン、サパシタビンおよびアザシチジン等から選択される少なくとも一つのトポイソメラーゼ阻害剤が使用され得る。

[0205] 抗Epiregulin抗体薬物複合体は細胞内に取り込まれた場合、当該複合体に連結された増殖抑制剤または毒性ペプチド等の細胞傷害性物質によって当該抗体を取り込んだ細胞に細胞死を誘導することが可能である。従って、増殖抑制剤または毒性ペプチド等の細胞傷害性物質が連結された抗体は、さらにインターナライズ活性を有することが好ましい。本発明において「インターナライズ活性を有する抗体」とは、細胞表面上のEpiregulinに結合した際に

細胞内（細胞質内、小胞内、他の小器官内等）に輸送される抗体を意味する。抗体がインターナライズ活性を有するか否かは当業者に公知の方法を用いて確認することができる。例えば、標識物質が結合した抗Epiregulin抗体をEpiregulinを発現する細胞に接触させ当該標識物質が細胞内に取り込まれたか否かを確認する方法、増殖抑制剤または毒性ペプチド等の細胞傷害性物質を結合した抗Epiregulin抗体を、Epiregulinを発現する細胞に接触させた結果、当該Epiregulin発現細胞に細胞死が誘導されたか否かを確認する方法、等により確認することができる。より具体的には下記の実施例に記載の方法等により抗体がインターナライズ活性を有するか否かを確認することが可能である。

[0206] ADCC等の細胞傷害活性を有する抗体は細胞表面に発現する標的抗原に結合した後、当該抗原に対する結合を介して細胞表面にとどまることによりNK細胞等のエフェクター細胞が当該抗体のFc領域に結合する結果、当該エフェクター細胞が標的抗原を発現する細胞に対する細胞傷害を引き起こす。これに対して、ADCとして使用される抗体は抗原に結合した後、細胞内にインターナライズされることが好ましい。前記作用メカニズムから推定されるように、通常、ADCC等の細胞傷害活性によって標的細胞を傷害する抗体のインターナライズ活性は小さいことが好ましく、ADCとして標的細胞を傷害する抗体のインターナライズ活性は大きいことが好ましいと考えられている（Anticancer Research (1993) 13, 2207-2212）。これに対して驚くべきことに、本願の抗Epiregulin抗体は、その中和活性によってEpiregulinを発現する細胞の増殖抑制を発揮するのみならず、ADCC等の細胞傷害活性によってEpiregulinを発現する細胞に対する細胞傷害を引き起こす一方で、本願の抗Epiregulin抗体を含む抗体薬物複合体もEpiregulinを発現する細胞に対して細胞傷害活性を引き起こすことが明らかとなった。

[0207] 低分子抗体

非限定の一態様では本発明の抗Epiregulin抗体薬物複合体に含まれる抗Epiregulin抗体は、低分子抗体でもあり得る。低分子抗体は、全長抗体（whole

antibody、例えばwhole IgG等）の部分が欠損している抗体断片を含む。Epiregulin抗原に対する結合活性を有する限り、抗体分子の部分的な欠損は許容される。本発明における抗体断片は、重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）のいずれか、または両方を含んでいることが好ましい。VHまたはVLのアミノ酸配列は、置換、欠失、付加および/または挿入を含むことができる。さらにEpiregulin抗原に対する結合活性を有する限り、VHおよびVLのいずれか、または両方の部分を欠損させることも可能である。また、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fvなどを挙げることができる。また、低分子抗体の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、scFv（single chain Fv）、ダイアボディー(Diabody)、$sc(Fv)_2$（single chain $(Fv)_2$）などが例示され得る。これらの抗体の多量体（例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、ポリマー）も、本発明の低分子抗体に含まれる。

[0208] 低分子抗体は、抗体を酵素で処理して抗体断片を生成させることによって得ることが可能である。抗体断片を生成する酵素として、例えばパパイン、ペプシン、あるいはプラスミ等が公知である。あるいは、これら抗体断片をコードする遺伝子が挿入された発現ベクターが導入された適切な宿主細胞を培養して発現した抗体断片をその培養液から単離および精製して取得され得る（例えば、Coら（J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Betterら（Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496）、Plueckthunら（Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496）、Lamoyi（Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663）、Rousseauxら（Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669）、Birdら（TIBTECH (1991) 9, 132-137）参照）。

[0209] ダイアボディーは、遺伝子融合により構築された二価（bivalent）の抗体断片を指す（Holligerら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 6444-6448、EP404,097、WO1993/11161等）。ダイアボディーは、二本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーである。通常、ダイマーを構成するポリペプチド鎖は、各々、同じ鎖中でVLおよびVHのリンカーにより結合されている。ダイ

アボディーにおけるリンカーは、一般に、VLとVHが互いに結合できない位に短い。具体的には、リンカーを構成するアミノ酸残基は、例えば、5残基程度である。そのため、同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、単鎖可変領域断片を形成できず、別の単鎖可変領域断片と二量体を形成する。その結果、ダイアボディーは二つの抗原結合部位を有することとなる。 scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより取得され得る。具体的にはH鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結されてscFvが作製され得る(Hustonら (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載された抗Epiregulin抗体のいずれの抗体由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーには、特に構造または性質に制限はない。例えば3から25残基程度からなる任意の一本鎖ペプチドをリンカーとして用いることができる。

[0210] $sc(Fv)_2$は、二つのVHおよび二つのVLをリンカー等で結合して一本鎖にした低分子抗体である (Hudsonら (J. Immunol. Methods (1999) 231, 177-189)。$sc(Fv)_2$は、例えば、scFvをリンカーで連結することによって作製され得る。

[0211] 医薬組成物

別の観点において、本発明は、本発明の抗Epiregulin抗体を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。又、本発明は抗Epiregulin抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤、特に抗癌剤または癌の再発もしくは転移の抑制剤に関する。本発明の細胞増殖抑制剤および抗癌剤または癌の再発もしくは転移の抑制剤は、癌を罹患している対象または現在または将来において罹患している可能性がある対象に投与されることが好ましい。

[0212] 本発明において、抗Epiregulin抗体を有効成分として含有する細胞増殖抑制剤は、抗Epiregulin抗体を対象に投与する工程を含む細胞増殖を抑制する方法、あるいは、細胞増殖抑制剤の製造における抗Epiregulin抗体の使用、あるいは、細胞増殖の抑制において使用するための抗Epiregulin抗体と表現

することもできる。

[0213] また、本発明において、抗Epiregulin抗体を有効成分として含有する抗癌剤または癌の再発もしくは転移の抑制剤は、抗Epiregulin抗体を対象に投与する工程を含む癌を予防もしくは治療する方法または癌の再発もしくは転移を抑制する方法、あるいは、抗癌剤または癌の再発もしくは転移の抑制剤の製造における抗Epiregulin抗体の使用、あるいは、癌の予防もしくは治療または癌の再発もしくは転移の抑制において使用するための抗Epiregulin抗体と表現することもできる。

[0214] 本発明において、抗Epiregulin抗体を有効成分として含有するとは、抗Epiregulin抗体を主要な活性成分として含むという意味であり、抗Epiregulin抗体の含有率を制限するものではない。本発明の医薬組成物（例えば、本発明の細胞増殖抑制剤、抗癌剤。以下同様。）に含有される抗体はEpiregulinタンパク質と結合する限り特に制限はなく、本明細書中に記載された抗体が例示され得る。

[0215] 本発明の医薬組成物は、経口、非経口投与のいずれかによって対象（患者）に投与することができる。好ましくは非経口投与である。係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などによって本発明の医薬組成物が全身または局部的に投与できる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000 mg/bodyの範囲で投与量が選択できる。しかしながら、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

[0216] 本発明の医薬組成物は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定

剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられる。更にこれらに制限されず、その他常用の担体が適宜使用できる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を担体として挙げることができる。

[0217] 抗Epiregulin抗体は、本発明の医薬組成物に含有されるEpiregulinタンパク質に結合する抗体として前記のとおりである。抗Epiregulin抗体が結合する細胞はEpiregulinが発現している細胞であれば特に限定されない。本発明における好ましいEpiregulin発現細胞は癌細胞である。より好ましくは、大腸癌細胞、肺腺癌細胞、膵癌細胞、胃癌細胞、食道癌細胞、および腎癌細胞である。本発明の方法は、これらの癌の、原発巣および転移巣のいずれに対しても適用することができる。さらに好ましい癌細胞は、原発性大腸癌細胞、転移性大腸癌細胞、および膵癌細胞である。

[0218] 本発明において「接触」は、例えば、試験管内で培養しているEpiregulin発現細胞の培養液に抗体を添加することにより行われる。この場合において、添加される抗体の形状としては、溶液又は凍結乾燥等により得られる固体等の形状が適宜使用できる。水溶液として添加される場合にあっては純粋に抗体のみを含有する水溶液であってもよいし、例えば上記記載の界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液であってもよい。添加する濃度は特に限定されないが、培養液中の最終濃度として、好ましくは1 pg/mLから1 g/mLの範囲であり、より好ましくは1 ng/mLから1 mg/mLであり、更に好ましくは1μg/mLから1 mg/mLが好適に使用され得る。

[0219] また本発明において「接触」は更に、別の態様では、Epiregulin発現細胞

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

[0220] Epiregulinタンパク質が発現している癌細胞を含む対象に投与される癌治療剤または癌の再発もしくは転移の抑制剤

本発明はまた、癌治療剤または癌の再発もしくは転移の抑制剤が投与される対象が、単離された組織標品で検出されたEpiregulinタンパク質が発現している癌細胞を含む対象である癌治療剤または癌の再発もしくは転移の抑制剤を提供する。Epiregulinタンパク質の発現量は本明細書に記載された方法のほか、当業者に公知の方法によって決定することが可能である。本発明の癌治療剤または癌の再発もしくは転移の抑制剤が投与される対象であるか否かを決定するために、対象の候補から単離された組織標品におけるEpiregulinタンパク質の発現量が決定され得る。当該標品においてEpiregulinタンパク質が検出されれば、当該標品が由来する対象が本発明の癌治療剤または癌の再発もしくは転移の抑制剤が投与される対象となり得る。Epiregulinタンパ

ク質の発現量は特定の数値に限定されないが、非限定の態様として、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8の数値の桁（オーダー）の範囲から適宜設定され得る。非限定の一態様として、$1x10^3$、$2x10^3$、$3x10^3$、$4x10^3$、$5x10^3$、$6x10^3$、$7x10^3$、$8x10^3$、$9x10^3$、$1x10^4$、$2x10^4$、$3x10^4$、$4x10^4$、$5x10^4$、$6x10^4$、$7x10^4$、$8x10^4$、$9x10^4$、$1x10^5$、$2x10^5$、$3x10^5$、$4x10^5$、$5x10^5$、$6x10^5$、$7x10^5$、$8x10^5$、$9x10^5$、$1x10^6$、$2x10^6$、$3x10^6$、$4x10^6$、$5x10^6$、$6x10^6$、$7x10^6$、$8x10^6$、$9x10^6$、$1x10^7$、$2x10^7$、$3x10^7$、$4x10^7$、$5x10^7$、$6x10^7$、$7x10^7$、$8x10^7$、$9x10^7$、$1x10^8$、$2x10^8$、$3x10^8$、$4x10^8$、$5x10^8$、$6x10^8$、$7x10^8$、$8x10^8$、$9x10^8$のいずれかから選択されるEpiregulinタンパク質の発現量が、投与される対照を選択するための基準として設定され得る数値（閾値）の好適な例として例示され得る。上記の数値は、有効数字一桁として算出された数値であり得るが、この場合において、例えば有効数字一桁で算出されたEREGの発現量が$1x10^3$であるとは、有効数字が二桁として算出された場合にはEREGの発現量が$0.5x10^3$、$0.6x10^3$、$0.7x10^3$、$0.8x10^3$、$0.9x10^3$、$1.0x10^3$、$1.1x10^3$、$1.2x10^3$、$1.3x10^3$、$1.4x10^3$、のいずれかを含む数値であることもある。

[0221] 組織標品

本発明で使用される用語「組織標品」とは、個体、体液（ 例えば、血液、血清、血漿、および髄液）、組織培養物もしくは組織切片等から得られる任意の生物学的標品をいう。生物学的標品として用いられるものとして被験体標品が好適に挙げられる。好ましい被験体標品は、被験体から得られた組織であり、さらに好ましくは、被験体の大腸組織である。大腸組織を採取する方法としては公知の方法である生検（バイオプシー）が好適に用いられる。生検の手段として公知の手段が適宜使用され得る。そのような例として、吸引生検、挟みとり生検、擦過生検、細胞診用生検、内視鏡生検、細針吸引生検、針生検、経気管支的肺生検等の生検（バイオプシー）により、または外科手術の際に得ることができる。

[0222] 本発明においては、組織標品が顕微鏡下で透過光線によって観察されるために、組織標品が顕微鏡に使用される光線を十分に透過する程度に薄切され

る。薄切の前段階として組織標品が固定される。すなわち、組織・細胞の蛋白質に脱水や変性を起こさせて凝固させることによって、組織を構成する細胞が速やかに死滅し、その構造が安定化および不溶化される。まず、固定の対象とされる組織標品が、パラフィン包埋切片を作るのに適した大きさおよび形の断片として手術用メス等の刃物で切り取られる。次いで、固定を実施するために用いられる試薬である固定液中で当該断片が浸漬される。固定液としては、ホルマリン、更に好ましくは中性緩衝ホルマリンが好適に使用される。中性緩衝ホルマリンの濃度は組織標品の特性または物性に応じて適宜選択される。濃度は1～50%、好ましくは5～25%、更に好ましくは10～15%の間で適宜変更されて使用され得る。組織標品が浸漬された固定液が真空ポンプを用いて適宜脱気される。固定は組織標本を常圧および室温の条件下で固定液中に数時間放置することによって実施される。固定に要する時間は、1時間から7日間、好ましくは2時間から3日間、また好ましくは3時間から24時間、更に好ましくは4時間から16時間の範囲で適宜選択され得る。固定の後にリン酸緩衝液等に更に数時間（2時間から48時間、好ましくは3時間から24時間、更に好ましくは4時間から16時間の範囲で適宜選択され得る時間）、適宜浸漬される。

[0223] 次に、固定が適用された組織標品から、凍結切片法またはパラフィン切片法を用いて切片が好適に作製され得る。凍結切片法の好適な例としては、O.C.T.compound（Miles. Inc）中に組織を投入して凍結させたものを、クリオスタット（凍結切片作製装置）を用いて薄切する方法が挙げられる。パラフィン切片法においては、固定が適用された組織標品が包埋剤に浸漬され固められることにより、均一かつ適切な硬度が付与される。包埋剤としては、パラフィンが好適に使用され得る。固定が適用された組織標品はエタノールを用いて脱水される。具体的には、組織標品が70%エタノール、80%エタノール、100%エタノールに順次浸漬されることによって、当該組織標品が脱水される。浸漬に要する時間および回数は、1時間から数日および1回から3回の範囲で適宜選択され得る。また、室温または4℃においても浸漬され得るが、4℃

において浸漬される場合には、浸漬時間は終夜等その時間が長いほうが好ましい。次いでその液相がキシレンに置換された後に、組織標品がパラフィンによって包埋される。その液相のキシレンへの置換に要する時間は１時間から数時間の範囲で適宜選択され得る。その際に、室温で置換され得るし、4℃においても置換され得るが、4℃において置換される場合には、置換の時間は、終夜等その時間が長いほうが好ましい。パラフィン包埋に要する時間および回数は、1時間から数時間および1回から４回の範囲で適宜選択され得る。その際に、室温で包埋され得るし、4℃においても包埋され得るが、4℃において包埋される場合には、包埋の時間は、終夜等その時間が長いほうが好ましい。また、パラフィン包埋反応が自動化処理されるパラフィン包埋装置（EG1160、Leica等）を用いることによって、組織標品が好適にパラフィン包埋され得る。

[0224] 上述のようにしてパラフィン包埋された組織標品を台木に接着することによって「ブロック」が作製され、このブロックがミクロトームよって1から20μｍの厚さから選択される所望の厚さに薄切される。薄切された組織切片は透過性の支持体であるスライドグラス上に静置されることにより固着される。この場合において、組織切片の剥離を防止するためにスライドガラスに0.01％ポリーLーリジン（Sigma）を塗布し乾燥させたスライドグラスも好適に使用され得る。固着された組織切片は数分から1時間の間から選択される適切な時間風乾される。

[0225] 抗原賦活化

本発明の方法においては、ホルマリン固定により抗体との反応性が減弱した抗原の反応性を賦活化する。本発明においては、二つの組織標品のうち一の標品に対して、プロテアーゼ抗原賦活化法（PIER法）を適用し、他方の標品に対して、熱誘導抗原賦活化法（HIER法）を適用し、抗体と反応させたときの両者間の染色程度の相違を数値化する。

[0226] 熱誘導抗原賦活化法は、マイクロ波による加熱方法やオートクレーブによる加熱方法、または、煮沸処理による加熱方法等が適宜用いられる。液温が

約98℃に保たれるように780Wの出力で煮沸処理する場合、処理等賦活化に要する時間は5分－60分の間から適宜選択され、例えば10分間である。抗原の賦活化処理は、10mMクエン酸ナトリウム緩衝液の他、市販のTarget Retrieval Solution (DakoCytomation) 等の中で行うことができる。下記の実施例においてはTarget Retrieval Solutionを使用する。賦活化処理の結果としてEpiregulin抗体が認識する抗原中のエピトープが抗体との結合性を獲得して、後述する抗原と抗体の複合体の検出が可能となるものであれば、いずれの緩衝液、水溶液も好適に用いられる。

[0227] プロテアーゼ抗原賦活化法において使用されるプロテアーゼは、その種類や由来について特に限定されるものでなく、一般的に入手可能なプロテアーゼを適宜選択して使用され得る。用いられるプロテアーゼの例として、0.01N塩酸中0.05%濃度のペプシン、または、pH7.6のTris緩衝液中0.01％濃度の$CaCl_2$を更に含有する0.1%濃度のトリプシン、10mMのEDTAおよび0.5%のSDSを含むpH7.8の10mM Tris塩酸緩衝液中1～50μg/ml濃度のプロテアーゼＫ等が好適に挙げられる。さらにプロテアーゼＫを用いる場合、その反応液のpHは6.5から9.5の間で適宜選択され、SH試薬やトリプシン阻害剤やキモトリプシン阻害剤も適宜利用され得る。本明細書実施例中で記載されるヒストファインHER2キット（MONO）（ニチレイバイオサイエンス）に添付されるプロテアーゼもこうした好適なプロテアーゼの具体例として挙げられる。プロテアーゼ抗原賦活化は通常37℃にて行われるが、反応温度は25℃から50℃の範囲内において適宜変更され得る。プロテアーゼ抗原賦活化が37℃にて行われる場合には、反応時間は例えば1分から5時間の間で適宜選択され、例えば、15分、30分、45分、1時間、2時間、3時間、4時間等である。賦活化処理が終了した後、当該処理が施された組織標品は洗浄用緩衝液によって洗浄される。洗浄用緩衝液はPBS (Phosphate buffer saline) が好適に用いられる他、Tris塩酸緩衝液も好適に使用され得る。通常、洗浄条件としては室温にて5分間の洗浄を3回実施する方法が採用されるが、洗浄の時間および温度は適宜変更され得る。

[0228] 本発明において用いられる検出用物質としては、通常、抗体、核酸、等が

挙げられる。例えば、（１）EREGタンパク質を検出することが可能なEREG抗体を用いた免疫学的手法によってEREGタンパク質を検出すること、（２）EREGをコードするmRNAを検出することが可能な当該mRNAに相補的な核酸分子（例えばDNA、RNA、mRNA）等が用いられるが、好適には相補的核酸分子であり、かかる核酸分子同士のハイブリダイゼーションを利用してEREGをコードするmRNAを検出すること（例えばＦＩＳＨ法）、が可能である。本発明においては、免疫学的手法、特に組織免疫学染色法が好適に使用され得る。

[0229] 組織標品とEpiregulin抗体との反応

熱誘導抗原賦活化法による抗原賦活化処理が施された組織標品およびプロテアーゼ抗原賦活化法による抗原賦活化処理が施された組織標品に対して、Epiregulin抗体を一次抗体として反応させる。当該反応はEpiregulin抗体が抗原中のエピトープを認識して抗原抗体複合体を形成するのに適切な条件下で実施される。通常、当該反応は4℃にて終夜、または37℃にて1時間実施されるが、反応条件は、抗体が抗原中のエピトープを認識して抗原抗体複合体を形成するのに適切な範囲で適宜変更され得る。例えば、反応温度は4℃から50℃の範囲内で変更され得るし、反応時間は1分から7日の間で変更され得る。低温での反応が実施される場合には長い時間反応させることが好ましい。一次抗体反応が終了した後、組織標品は洗浄用緩衝液によって洗浄される。洗浄用緩衝液はPBS（Phosphate buffer saline）が好適に用いられる他、Tris塩酸緩衝液も好適に使用され得る。通常、洗浄条件としては室温にて5分間の洗浄を3回実施する方法が採用されるが、洗浄の時間および温度は適宜変更され得る。

[0230] 次いで、一次抗体反応が施された組織標品に対して、一次抗体を認識する二次抗体を反応させる。通常、二次抗体を可視化するための標識物質によって予め標識された二次抗体が用いられる。標識物質としては、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）やCy2（Amersham）、Alexa488（Molecular Probe）等の蛍光色素、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素、または金コロイド等が好適に挙げられる。

[0231] 二次抗体との反応は、Epiregulin抗体と、当該Epiregulin抗体を認識する二次抗体とが抗原抗体複合体を形成するのに適切な条件下で実施される。通常、当該反応は室温または37℃にて30分乃至1時間実施されるが、Epiregulin抗体と二次抗体とが抗原抗体複合体を形成するのに適切な範囲で適宜変更され得る。例えば、反応温度は4℃から50℃の範囲内で変更され得るし、反応時間は1分から7日の間で変更され得る。低温での反応が実施される場合には長い時間反応させることが好ましい。二次抗体反応が終了した後、組織標品は洗浄用緩衝液によって洗浄される。洗浄用緩衝液はPBS（Phosphate buffer saline）が好適に用いられる他、Tris塩酸緩衝液も好適に使用され得る。通常、洗浄条件としては室温にて5分間の洗浄を3回実施する方法が採用されるが、洗浄の時間および温度は適宜変更され得る。

[0232] 次に、二次抗体反応が施された組織標品に対して、標識物質を可視化する物質を反応させる。二次抗体の標識物質としてペルオキシダーゼを用いた場合には、0.02%過酸化水素水とpH7.2の0.1Mトリス塩酸緩衝液で0.1%濃度に調製されたDAB（ジアミノベンジジン）溶液とをインキュベート直前に等量混合することによって得られる反応液で組織標品がインキュベートされる。DABの他には、DAB-NiやAEC+（以上、DAKO）等の発色基質が適宜選択され得る。インキュベートの過程において、時折顕微鏡下で発色の程度を観察し、適切な発色が確認された段階で組織標品をPBSに浸漬することによって可視化反応が止められる。

[0233] 二次抗体の標識物質として、アルカリフォスファターゼを用いた場合には、BCIP（5－ブロモ－4－クロロ－3－インドリルリン酸）/NBT（ニトロブルーテトラゾリウム）（Zymed）基質溶液（10ｍＭ濃度の$MgCl_2$および28mM濃度のNaClを含有するpH9.8の50mM炭酸ナトリウム緩衝液に、0.4mM濃度でNBTおよび0.38mM濃度でBCIPが溶解されたもの）で組織標品がインキュベートされる。また、BCIPおよびNBTの他には、Permanent Red、Fast Red、またはFuchsin+（以上、DAKO）等も適宜使用されうる。インキュベートに先立って、1mM濃度の内在性アルカリフォスファターゼの阻害剤である塩化レバミソール（ナカラ

イテスク）、0.1M塩化ナトリウムおよび50mM塩化マグネシウムを含む0.1Mトリスー塩酸緩衝液（pH9.5）と、室温にて1分から数時間プレインキュベートしてもよい。インキュベートの過程において、時折顕微鏡下で観察し、反応最終産物である紫色のホルマザンの沈着が観察された段階で、組織標品を水洗または2%ポリビニルアルコールを含むＴＢＳによる反応停止の後、TBST（0.1%のTween20を含むＴＢＳ）にて洗浄される。金コロイドが二次抗体の標識として使用される場合には、銀増感によって金粒子に金属銀が付着されることによって金コロイドが可視化される。銀増感の方法は当業者に公知である。

[0234] FITC（フルオレセインイソチオシアネート）やCy2（Amersham）、Alexa488（Molecular Probe）等の蛍光色素を二次抗体の標識物質として用いた場合には、可視化物質の反応工程は不要であり、当該蛍光物質の励起波長の光を照射して、放出される光が蛍光顕微鏡を用いることによって適宜検出され得る。

[0235] 本発明において、上記のように被験対象から単離された組織標品に含まれるEpiregulinタンパク質が検出される。検出された当該組織標品に含まれるEpiregulinタンパク質が癌細胞を含む組織中に高発現しているか否かは、上記の組織免疫学的染色法によって得られた染色パターンが数値化された染色強度スコアによって判定することが可能である。染色パターンの数値化の非限定な一態様として例えば下記のような判定基準が例示される。

ー染色強度スコア0：検体組織中の腫瘍細胞の中でEpiregulin 陽性を呈している細胞がない。または10%に満たないもの

ー染色強度スコア1：検体組織中の腫瘍細胞の中でEpiregulin 陽性を呈している細胞が10%以上あるが、腫瘍細胞の一部の膜に限局した弱い染色強度を有するもの

ー染色強度スコア2：検体組織中の腫瘍細胞の中でEpiregulin 陽性を呈している細胞が30%以上あるもの、または検体組織中の腫瘍細胞の中でEpiregulin 陽性を呈している細胞が10%以上あり、腫瘍細胞の膜に限局した中程度の

染色強度を有するもの

ー染色強度スコア3：検体組織中の腫瘍細胞の中でEpiregulin 陽性を呈している細胞が60%以上あるもの、または検体組織中の腫瘍細胞の中でEpiregulin 陽性を呈している細胞が10%以上あり、腫瘍細胞の膜に限局した強度の染色強度を有するもの

[0236] また、本発明において、上記の組織免疫学的染色法によって得られた染色パターンが数値化された染色強度スコアにもとづき、被験対象から単離された組織標品に含まれるEpiregulinの発現量の判定を行うに際して、検出校正用に調製された予めEpiregulinタンパク質の発現量が決定された染色パターンの像と比較することも可能である。Epiregulinタンパク質の発現量の決定には、抗原定量のための検量線作成に使用する蛍光標識ビーズを用いた公知の手法（例えば、BD Quantibrite PE™等）が適宜使用され得る。

[0237] 上記の方法によって被験対象から単離された組織標品に含まれるEpiregulin が高発現しているか否かが決定され得る。高発現の例示として、例えば、細胞当りのEpiregulin分子の発現数に換算した場合に、$1x10^4$、$2x10^4$、$3x10^4$、$4x10^4$、$5x10^4$、$6x10^4$、$7x10^4$、$8x10^4$、$9x10^4$、$1x10^5$、$2x10^5$、$3x10^5$、$4x10^5$、$5x10^5$、$6x10^5$、$7x10^5$、$8x10^5$、$9x10^5$、$1x10^6$、$2x10^6$、$3x10^6$、$4x10^6$、$5x10^6$、$6x10^6$、$7x10^6$、$8x10^6$、$9x10^5$、$1x10^7$、$2x10^7$、$3x10^7$、$4x10^7$、$5x10^7$、$6x10^7$、$7x10^7$、$8x10^7$、$9x10^7$の範囲から適宜選択され得る。

[0238] なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0239] 以下本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[0240] 〔実施例１〕 キメラ抗体EP27のヒト化

1ー1．ヒト化用フレームワーク配列の選定

マウス可変領域とヒトIgG1定常領域からなるキメラ抗体EP27（WO2008/047723記載）のヒト化が実施された。CDR、FRの決定はKabatの定義（Kabatナンバ

リング）に従った。

[0241] 初めに、データベース上のヒト抗体可変領域配列とEP27マウス可変領域配列を比較することによって、ヒト化のテンプレートと利用できる以下のヒトFR配列が選択された。データベースとして、IMGT Database（http://www.imgt.org/）およびNCBI GenBank（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/）が利用された。表２に選択されたFR配列を示した。

[0242] [表2]

フレームワーク	登録番号	データベース名	配列番号
H鎖FR1	M99642	IMGT Database	1
H鎖FR2	L22582	IMGT Database	2
H鎖FR3	AJ252274	NCBI GenBank	3
H鎖FR4	J00256	IMGT Database	4
L鎖FR1	M64856	IMGT Database	5
L鎖FR2	X01668	IMGT Database	6
L鎖FR3	M64856	IMGT Database	7
L鎖FR4	J00242	IMGT Database	8

[0243] 次に、EP27可変領域のH鎖およびL鎖のCDR配列（表３、配列番号：９～１４）を上記で選択したヒトFRと連結することによって、ヒト化抗体可変領域配列がデザインされた。これらが、ヒト化H鎖可変領域配列HA（配列番号：１５）、ヒト化L鎖可変領域配列LA（配列番号：１６）とされた。

[0244] [表3]

CDR	配列番号
H鎖 CDR1	9
H鎖 CDR2	１０
H鎖 CDR3	１１
L鎖 CDR1	１２
L鎖 CDR2	１３
L鎖 CDR3	１４

[0245] 1－2. EP27ヒト化可変領域HJのデザイン

表２で選択されたH鎖FR1の配列において、Kabatナンバリングで表される2番、4番、24番、27番、29番のアミノ酸残基はupper coreを形成して抗体構造の安定化に寄与することが報告されている（Ewertら（Methods. 2004 Oct;34(2):184-99））。また、Chothiaの定義ではKabatナンバリングで表される26から30番のアミノ酸残基はCDR1に含まれる（Honeggerら、J. Mol. Biol.（20

01）309, 657-670）。これらの情報から、キメラ抗体EP27と同等の抗原結合活性を持つヒト化抗体を作成するために、上記に該当するアミノ酸残基がEP27マウス可変領域配列に存在する残基に戻された。よって、表２で選択したヒトH鎖FR1（配列番号：１）のKabatナンバリングで表される2番、24番、27番、28番、29番、30番のアミノ酸残基がEP27マウス可変領域配列に存在するアミノ酸残基に戻されたヒト化H鎖FR1（表４、配列番号：１７）が新たにデザインされた。

[0246] 表２で選択されたH鎖FR3の配列において、Kabatナンバリングで表される93番のアミノ酸残基はAlaであるが、EP27マウス可変領域配列のアミノ酸残基はValである。マウスおよびヒトのgermline配列のデータベースIMGT Database（http://www.imgt.org/）から、該当部位にValが含まれている配列は少ない事が確認された。EP27マウス可変領域配列に含まれるKabatナンバリングで表される93番のValは抗原結合に関与すると考えられたため、表２で選択されたヒトH鎖FR3（配列番号：３）のKabat 93番のアミノ酸残基がEP27マウス可変領域配列に存在する残基で置換されたヒト化H鎖FR3（表４、配列番号：１８）が新たにデザインされた。

[0247] ヒト化H鎖可変領域配列HA（配列番号：１５）から、新たにデザインされた表４に示したFR1（表４、配列番号：１７）およびFR3（表４、配列番号：１８）含むヒト化H鎖可変領域配列HJ（配列番号：１９）がデザインされた。

[0248] [表4]

改変 FR	配列番号
H 鎖　FR1	１７
H 鎖　FR3	１８

[0249] 1－3. EP27ヒト化可変領域LB、L18のデザイン

表２で選択されたL鎖FR2の配列において、Kabatナンバリングで表される49番はTyrであるが、EP27マウス可変領域配列ではGlnである。マウスおよびヒトのgermline配列のデータベースIMGT Database（http://www.imgt.org/）から、該当部位にGlnが含まれている配列は少ない事が確認された。よって、EP27マウス可変領域配列に含まれる49番のGlnは抗原結合に関与する可能性が示

唆された。これより、表２で選択されたヒトL鎖FR2（配列番号：６）のKabatナンバリングで表される49番のアミノ酸残基がEP27マウス可変領域配列のアミノ酸残基で置換されたヒト化L鎖FR2（表５、配列番号：２０）が新たにデザインされた。

[0250] 表２で選択されたL鎖FR3の配列において、Kabatナンバリングで表される71番はupper coreを形成して抗体構造の安定化に寄与することが報告されている（Ewertら（Methods. 2004 Oct;34(2):184-99））。キメラ抗体EP27と同等の抗原結合活性を持つヒト化抗体を作成するために、上記に該当するアミノ酸残基をEP27マウス可変領域配列のアミノ酸残基に置換するため、表２で選択されたヒトL鎖FR3（配列番号：７）のKabatナンバリングで表される71番のアミノ酸残基がEP27マウス可変領域配列のアミノ酸残基に置換されたヒト化L鎖FR3（表５、配列番号：２１）が新たにデザインされた。

[0251] ヒト化L鎖可変領域配列LA（配列番号：１６）から、新たにデザインされたFR2、FR3（表５、配列番号：２０、２１）を含むヒト化L鎖可変領域配列LB（配列番号：２２）がデザインされた。

[0252] また、ヒト化L鎖可変領域配列LA（配列番号：１６）から、新たにデザインされたFR2（表５、配列番号：２０）、およびAccession No. AB064134（NCBI GenBank）に記載されたヒト抗体L鎖配列のFR3（表５、配列番号：２３）を含むヒト化L鎖可変領域配列L18（配列番号：２４）がデザインされた。

[0253] [表5]

改変 FR	配列番号
H 鎖　FR2	２０
H 鎖　FR3	２１
H 鎖　FR3	２３

[0254] 1－4. EP27ヒト化抗体配列の作製

初めに、EP27ヒト化可変領域のcDNAを作製するため、H鎖（HJ）、L鎖（LB）について合成オリゴDNAをそれぞれ設計した。次に、各合成オリゴDNAを混和し、アッセンブルPCR法等の当業者公知の方法によりEP27ヒト化抗体の可変領域をコードする遺伝子断片を増幅した。最後に、得られた増幅断片を適当

な動物細胞発現ベクターによりクローニングし、ヒトIgG1定常領域遺伝子と連結した。得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定した。

[0255] ヒトIgG抗体のH鎖C末端配列（G1、配列番号：２５）由来のヘテロジェニティーとして、C末端アミノ酸のリジン残基の欠損、および、C末端の２アミノ酸のグリシン、リジン両方の欠損によるC末端アミノ基のアミド化が報告されている（Anal Biochem. 2007 Jan 1;360(1):75-83.）。これらのヘテロジェニティーを低減させる方法として、H鎖C末端の２アミノ酸、すなわちEUナンバリングで表される 446番のグリシンおよび447番のリジンを欠損させる方法が知られている（WO 2009/041613）。EP27ヒト化抗体の場合も、H鎖C末端配列に由来するヘテロジェニティーは存在しないことが望ましいため、ヒトIgG1のEUナンバリングで表される446番のグリシンおよび447番のリジンを欠損させたIgG1配列（G1d、配列番号：２６）が定常領域配列として利用できる。一方、L鎖定常領域としては、天然型ヒトκ鎖（k、配列番号：２７）が定常領域配列として利用できる。以上のようにして得たEP27ヒト化抗体配列のH鎖としてHJ-G1d（配列番号：２８）、L鎖としてLB-k（配列番号：２９）が作製された。なお、IgG1定常領域にはアロタイプが報告されているが（Jefferisら、mAbs 1:4, 1-7; July/August 2009）、上記で記載されたIgG1のG1m17,1タイプの定常領域（配列番号：２６）以外にも、G1m17タイプ（配列番号：３０）やG1m3タイプ（配列番号：３１）がEP27ヒト化抗体の作製に利用できる。

[0256] 1－5. EP27ヒト化抗体の評価

作成したEP27ヒト化抗体配列を評価するため、H鎖（HJ-G1d、配列番号：２８）およびL鎖（LB-k、配列番号：２９）を共発現させることによって、EP27ヒト化抗体HJ-G1d/LB-kが得られた。具体的には、上記で作製したH鎖発現ベクターおよびL鎖発現ベクターをヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株（Invitrogen）、またはFreeStyle293細胞(Invitrogen)に一過性に導入することによって抗体を発現させた。得られた培養上清からrProtein A SepharoseTM Fast Flow（GEヘルスケア）等を用いた当業者公知の方法で抗体が精製された。抗体を

含む溶液を分光光度計で測定（波長280 nm）し、得られた吸光度とPACE法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度が算出された（Protein Science 1995；4：2411-2423）。また、コントロールとして、キメラ抗体EP27であるcH-G1/cL-kもH鎖（cH-G1、配列番号：３２）およびL鎖（cL-k、配列番号：３３）を用いて同様の手法により作製された。

[0257] キメラ抗体EP27に対するEpiregulin結合阻害評価系（参考例５）によりヒトEpiregulin（配列番号：１６７）に対するEP27ヒト化抗体の結合能が評価された。キメラ抗体EP27（cH-G1/cL-k）のIC50濃度を100とした場合、EP27ヒト化抗体HJ-G1d/ LB-kの値は24であった。

[0258] 1－6. キメラ抗体と同等の活性を持つEP27ヒト化抗体の作製

EP27ヒト化抗体のH鎖配列HJ-G1dのFR配列の一部のアミノ酸残基がEP27マウス可変領域配列のアミノ酸残基に置換された配列がデザインされた。初めに、Kabatナンバリングで表される75-76番のアミノ酸残基がヒトFR3配列のアミノ酸残基であるThr-AspからEP27マウス可変領域配列に含まれているアミノ酸残基であるSer-Asnに置換された配列（配列番号：３５）、また、76番のAspのみがEP27マウス可変領域配列のアミノ酸残基であるAsnに置換された配列（配列番号：３６）がデザインされた（表６）。次に、ヒト化H鎖可変領域配列HJ-G1d（配列番号：２８）を含む発現ベクターに変異を導入することで、表６に示したFR3配列（配列番号：３５）を持つヒト化H鎖可変領域配列であるHS-G1d（配列番号：３７）が作製された。アミノ酸残基置換の導入はPCR法等を用いて当業者公知の方法で行われた。同様に、表６に示されたFR3配列（配列番号：３６）を含むヒト化H鎖可変領域配列であるHY-G1d（配列番号：３８）が作製された。実施例1-4と同様の方法によりEP27ヒト化抗体HS-G1d/LB-k、HY-G1d/LB-kおよびHY-G1d/L18-kが得られた。得られた抗体のヒトEpiregulinに対する結合能が、キメラ抗体EP27に対するEpiregulin結合阻害（参考例５）として評価された。この結果、キメラ抗体EP27（cH-G1/cL-k）のIC50濃度を100とした場合、EP27ヒト化抗体HS-G1d/LB-k、HY-G1d/LB-kおよびHY-G1d/L18-kのIC50濃度はそれぞれ142、146、100であった。

[0259] 以上より、ヒト化によりキメラ抗体EP27と比較して免疫原性リスクが減弱した上に、キメラ抗体EP27と同等の抗原結合能を有するEP27ヒト化抗体配列が見出された。

[0260] [表6]

改変 FR	配列番号
H鎖 FR3	３５
H鎖 FR3	３６

[0261] 〔実施例２〕脱アミド化、異性化、加水分解反応を抑制する変異の導入

医薬品に使用する抗体は、単一の抗体産生細胞に由来するクローンから得られるモノクローナル抗体であるにも関わらず、ヘテロジェニティーが存在する。そのような抗体のヘテロジェニティーは酸化、脱アミド化、異性化、加水分解などの修飾により起こり、抗体をはじめとするタンパク質が長期間の保存中や熱ストレス、光ストレスといったストレス条件下にさらされることで増加することが知られている（Heterogeneity of Monoclonal Antibodies:Journal of pharmaceutical sciences, vol.97,No.7,2426-2447）。しかしながら、抗体を医薬品として開発するにあたり、そのタンパク質の物性、中でも均一性と安定性は極めて重要であり、目的物質のヘテロジェニティーを低減し、可能な限り単一物質であることが望まれる。

[0262] 脱アミド化反応とは、アスパラギンおよびグルタミンの側鎖において非酵素的に起こり、アスパラギンおよびグルタミンの側鎖に存在するアミドがカルボン酸へと変化する反応である。また、異性化は、アスパラギンおよびアスパラギン酸の側鎖にあるカルボニル基がC末端側にある残基の窒素原子電子対に攻撃された結果、アスパラギンの脱アミド化またはアスパラギン酸の脱水により不安定な環状イミド中間体が形成されることに起因する。この中間体は開裂によって多くがイソアスパラギン酸に、残りがアスパラギン酸に変化する。これら抗体等のタンパク質の保存中に起こる脱アミド化、異性化反応は、上述したヘテロジェニティーの原因となることから、可能な限り抑制されることが望まれる。また、脱アミド化反応は、特にアスパラギンとグリシンが隣接した部位（Asn-Gly）で起こりやすいことが報告されている（Geig

erら J. Biol. Chem. 1987; 262:785-794）。さらに、アスパラギン酸は加水分解反応によりペプチド鎖の切断が起こることが報告されており、特にC末端側にプロリンが存在する配列（Asp-Pro）は酸性条件下での分解が起きやすいとされる（Segalasら、FEBS Letters 1995; 371:171-175 ）。

[0263] ヒト化H鎖可変領域配列HYのCDR配列において、アスパラギンおよびアスパラギン酸残基はKabatナンバリングで表される31番（Asp）、52番（Asp）、54番（Asn）、56番（Asn）、101番（Asp）に存在する。ヒト化L鎖可変領域配列LBのCDR配列においては、Kabatナンバリングで表される28番（Asp）、92番（Asp）、93番（Asn）に存在する。これらの部位のアミノ酸残基の置換により、脱アミド化、異性化、加水分解反応が抑制された改変体が得られるかが検討された。

[0264] アミノ酸残基の置換による上記分解反応の抑制を目的として、該当残基が異なる残基に置換された。具体的には、表７に示されたCDR配列（配列番号：３９～４６）を含むH鎖遺伝子として、H71-G1d（配列番号：４９）、H57-G1d（配列番号：５０）、H61-G1d（配列番号：５１）、H65-G1d（配列番号：５２）、H66-G1d（配列番号：５３）、H67-G1d（配列番号：５４）、H23-G1d（配列番号：５５）、H40-G1d（配列番号：５６）が作製された。同様に、表７に示されたCDR配列（配列番号：４７、４８）を含むL鎖遺伝子としてL30-k（配列番号：５７）、L32-k（配列番号：５８）がデザインされた。実施例１の手法により、残基置換が導入されたH鎖遺伝子ベクターをLB-kベクターと共発現し、EP27ヒト化抗体H71-G1d/LB-k、H57-G1d/LB-k、H61-G1d/LB-k、H65-G1d/LB-k、H66-G1d/LB-k、H67-G1d/LB-k、H23-G1d/LB-k、H40-G1d/LB-kが得られた。同様に、残基置換が導入されたL鎖遺伝子ベクターをHY-G1dベクターと共発現し、EP27ヒト化抗体HY-G1d /L32-kが得られた。ヒトEpiregulinに対する得られた抗体の結合能が、キメラ抗体EP27に対するEpiregulin結合阻害（参考例５）として評価された結果を表８に示した。これより、表７で示された配列を含む抗体はキメラ抗体EP27と同等の結合活性を持つことが確認された。以上より、脱アミド化、異性化反応等の化学的分解が抑制されたEP27ヒト

化抗体配列が見出された。

[0265] [表7]

CDR改変体名	改変CDR	配列番号
H71	H鎖 CDR1	３９
H57	H鎖 CDR2	４０
H61	H鎖 CDR2	４１
H65	H鎖 CDR2	４２
H66	H鎖 CDR2	４３
H67	H鎖 CDR2	４４
H23	H鎖 CDR2	４５
H40	H鎖 CDR2	４６
L30	L鎖 CDR3	４７
L32	L鎖 CDR3	４８

[0266] [表8]

改変抗体名	IC50濃度
H71-G1/LB-k	90
H57-G1/LB-k	95
H61-G1/LB-k	74
H65-G1/LB-k	78
H66-G1/LB-k	96
H67-G1/LB-k	101
H23-G1/LB-k	87
H40-G1/LB-k	83
HY-G1/L30-k	89
HY-G1/L32-k	83

（IC50濃度：キメラ抗体EP27（cH-G1/cL-k）のIC50濃度を100とした場合の各抗体のIC50濃度）

[0267] 〔実施例３〕等電点を変化させる変異の導入

抗体の血漿中半減期を制御する方法の一つとして、抗体分子表面に露出するアミノ酸残基を改変し、抗体分子表面電荷をコントロールする方法が知られている（WO2007/114319およびWO2009/041543）。具体的には、抗体が有する等電点（pI）の値を低下させることにより、抗体の血漿中半減期を伸長させることが可能であることが知られている。それとは逆に、抗体の等電点が上昇することにより、血漿中半減期が短縮し、抗体の組織移行性が向上することが知られている（Vaisittiら（J. Biol. Regul. Homeost. Agents. (2005) 19 (3-4), 105-112）、Pardridgeら（J. Pharmacol. Exp. Ther. (1998) 286 (1), 548-554））。

[0268] 以上のことから、等電点を変化させたEP27ヒト化抗体は、血漿中半減期の伸長あるいは組織移行性の向上により、より強い抗腫瘍活性が期待される。そこで、EP27ヒト化抗体の抗原に対する結合活性や、その立体構造に影響を与えることなく、抗体分子表面の電荷を調節することによって抗体の薬物動態を制御することが可能となるアミノ酸残基の同定が試みられた。具体的には、EP27ヒト化抗体HY-G1d/LB-k （H鎖HY-G1d、配列番号：３８、およびL鎖LB-k 、配列番号：２９）の抗原結合阻害活性を大きく低下させることなく、その等電点を低下させることが可能な変異箇所が探索された。

[0269] EP27ヒト化抗体HY-G1d/LB-kの立体構造モデルを用いて、Epiregulinへの結合を大きく低下させることなしに可変領域の等電点を変化させられる残基がスクリーニングされた。具体的には、表９に示されたCDR配列（配列番号：５９～７１）のいずれか、または複数を含むH鎖遺伝子として、H3-G1d（配列番号：７２）、H5-G1d（配列番号：７３）、H6-G1d（配列番号：７４）、H7-G1d（配列番号：７５）、H8-G1d（配列番号：７６）、H9-G1d（配列番号：７７）、H10-G1d（配列番号：７８）、H31-G1d（配列番号：７９）がデザインされた。同様に、表９に示されたCDR配列を含むL鎖遺伝子として、L1-k（配列番号：８０）、L2-k（配列番号：８１）、L12-k（配列番号：８２）、L20-k（配列番号：８３）、L21-k（配列番号：８４）、L23-k（配列番号：８５）がデザインされた。実施例１の手法により、残基置換が導入されたH鎖遺伝子ベクターをLB-kベクターと共発現し、EP27ヒト化抗体H3-G1d/LB-k、H5-G1d/LB-k、H6-G1d/LB-k、H7-G1d/LB-k、H8-G1d/LB-k、H9-G1d/LB-k、H10-G1d/LB-k、H31-G1d/LB-kが得られた。同様に、残基置換が導入されたL鎖遺伝子ベクターをHY-G1dベクターと共発現し、EP27ヒト化抗体HY-G1d /L1-k、HY-G1d /L2-k、HY-G1d /L12-k、HY-G1d /L63-kが得られた。得られた抗体のヒトEpiregulinに対する結合能がキメラ抗体EP27に対するEpiregulin結合阻害（参考例５）として評価された。この結果、表１０に示されたとおり、各EP27ヒト化抗体の抗原結合能はキメラ抗体EP27と同等であった。上記検討より、抗体の等電点が変化し得るEP27ヒト化抗体配列が見出された。

[0270] [表9]

CDR、FR改変体名	改変CDR、改変FR	配列番号
H3	H鎖 CDR2	５９
H5	H鎖 CDR2	６０
H6	H鎖 CDR2	６１
H7	H鎖 CDR2	６２
H8	H鎖 CDR2	６３
H9	H鎖 CDR2	６４
H10	H鎖 CDR2	６５
H31	H鎖 CDR2	６６
L1	L鎖 CDR1	６７
L2	L鎖 CDR1	６８
L12	L鎖 CDR2	６９
L20	L鎖 CDR1, CDR2	６７、６９
L21	L鎖 CDR1, FR4	６７、７０
L23	L鎖 CDR2	７１

[0271] [表10]

改変抗体名	IC50濃度
H3-G1d/LB-k	118
H5-G1d/LB-k	95
H6-G1d/LB-k	108
H7-G1d/LB-k	93
H8-G1d/LB-k	105
H9-G1d/LB-k	99
H10-G1d/LB-k	96
H31-G1d/LB-k	118
HY-G1d /L1-k	98
HY-G1d /L2-k	102
HY-G1d /L12-k	101
HY-G1d /L20-k	91
HY-G1d /L21-k	98
HY-G1d /L23-k	75

（IC50濃度：キメラ抗体EP27（cH-G1/cL-k）のIC50濃度を100とした場合の各抗体のIC50濃度）

[0272] 〔実施例４〕会合体量を低減させる変異の導入

タンパク質医薬品の会合体量をコントロールすることは、品質管理上、また、薬効および免疫原性に与える影響を考慮した場合大変重要である（Curr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6), 708-714）。一般に会合化はタンパク質溶液環境に起因するcolloidal stabilityとタンパク質構造に起因するconformational stabilityの両方に影響される（J. Pharm. Sci. (2010) 100 (4),

1306-1315）。抗体製剤の処方検討により、抗体濃度やpH、緩衝液種、イオン強度、添加剤等をスクリーニングすることでcolloidal stabilityに有効な望ましい条件を得ることが可能である。一方、conformational stabilityはアミノ酸配列に依存する部分もあり、抗体の場合はCDRのカノニカル構造やFRのコンセンサス配列、VH/VL界面等の特徴的な構造を維持することが重要とされている考えられる（Jungら（J. Mol. Biol. (2001) 309 (3), 701-716）、Xiangら（J. Mol. Biol. (1995) 253 (3), 385-390）、Ewertら（Methods. (2004) 34 (2), 184-199）、Vargas-Madrazo ら（J. Mol. Recognit. (2003) 16 (3), 113-120）、Moreaら（J. Mol. Biol. (1998) 275, 269-294）、Vargas-Madrazo ら（J. Mol. Recognit. (2003) 16 (3), 113-120））。

[0273] 上記の観点から、本発明ではより構造的に安定と考えられるヒト化抗体の作製を目指したデザインが行われた。その結果、EP27ヒト化抗体HY-G1d/LB-kが見出された。HY-G1d/LB-kに含まれる会合体量を更に減らすため、HY-G1d/LB-kの CDR内に含まれる疎水性残基を親水性残基に置換し、分子間の疎水性相互作用を減弱させることによる会合化抑制効果が検討された。

[0274] 具体的には、EP27ヒト化抗体HY-G1d/LB-k （H鎖HY-G1d/配列番号：３８、L鎖LB-k /配列番号：２９）に対して表１１に示されたCDR配列（配列番号：８６～９１）のいずれかが導入されたH鎖遺伝子として、H25-G1d（配列番号：９２）、H41-G1d（配列番号：９３）、H42-G1d（配列番号：９４）、H43-G1d（配列番号：９５）、H44-G1d（配列番号：９６）、H45-G1d（配列番号：９７）がデザインされた。実施例１の手法により、残基が置換されたH鎖遺伝子ベクターをLB-kベクターと共発現し、EP27ヒト化抗体H25-G1d/LB-k、H41-G1d/LB-k、H42-G1d/LB-k、H43-G1d/LB-k、H44-G1d/LB-k、H45-G1d/LB-kが得られた。これらのEP27ヒト化抗体に含まれる会合体量をゲルろ過クロマトグラフ法（参考例９）により測定した結果を表１２に示した。これより、キメラ抗体EP27（cH-G1d/cL-k）と比較して大幅に会合体量が減少したEP27ヒト化抗体配列が見出された。

[0275]

[表11]

CDR改変体名	改変CDR	配列番号
H25	H鎖　CDR2	８６
H41	H鎖　CDR2	８７
H42	H鎖　CDR2	８８
H43	H鎖　CDR2	８９
H44	H鎖　CDR2	９０
H45	H鎖　CDR2	９１

[0276] [表12]

改変抗体名	会合体(%)	配列番号(H鎖)	配列番号(L鎖)
cH-G1d/cL-k	15.6	32	33
HY-G1d/LB-k	5.1	38	29
H25-G1d/LB-k	2.0	92	29
H41-G1d/LB-k	1.4	93	29
H42-G1d/LB-k	1.5	94	29
H43-G1d/LB-k	2.1	95	29
H44-G1d/LB-k	1.6	96	29
H45-G1d/LB-k	2.0	97	29

[0277] また、得られた抗体のヒトEpiregulinに対する結合能が、キメラ抗体EP27に対するEpiregulin結合阻害（参考例５）として評価された。表１３に示されるように、各EP27ヒト化抗体の抗原結合能はキメラ抗体EP27と同等であった。上記検討より、その会合体量が抑制され、キメラ抗体EP27と同等の抗原結合能を持つEP27ヒト化抗体配列が見出された。

[0278] [表13]

改変抗体名	IC50濃度
H25-G1d/LB-k	108
H41-G1d/LB-k	106
H42-G1d/LB-k	96
H43-G1d/LB-k	108
H44-G1d/LB-k	94
H45-G1d/LB-k	92

（IC50濃度：キメラ抗体EP27（cH-G1/cL-k）のIC50濃度を100とした場合の各抗体のIC50濃度）

[0279] さらに、実施例１から４で見出されたアミノ酸残基の置換を含む配列が任意に組み合わされたEP27ヒト化抗体としてデザインされた以下の抗体；

H87-G1d/LB-k（H鎖：配列番号：９８、L鎖：配列番号：２９）、

H87-G1d/L21-k （H鎖：配列番号：９８、L鎖：配列番号：８４）、

H87-G1d/L37-k（H鎖：配列番号：９８、L鎖：配列番号：９９）、
が、実施例１の方法により作製された。ヒトEpiregulinに対する結合能がキメラ抗体EP27に対するEpiregulin結合阻害（参考例５）として評価された。その結果、表１４に示したとおり、いずれの抗体もキメラ抗体EP27（cH-G1/cL-k）と同等の結合能を有していた。また、これらのEP27ヒト化抗体に含まれる会合体量がゲルろ過クロマトグラフ法（参考例９）で、Fabの熱変性中間温度（Tm）が示差走査熱量分析計（参考例１０）で、さらに等電点（pI）が等電点電気泳動法（参考例１１）により測定された。表１４に示したように、キメラ抗体EP27（cH-G1d/cL-k）と比較してその会合体量が大幅に減少し、そのTm値は上昇することが確認された。これより、実施例１から４で示された、ヒト化による免疫原性リスク低減、化学的分解の抑制、等電点の低下、会合体量の低減が達成されたEP27ヒト化抗体配列が見出された。

[0280] [表14]

抗体名	IC50濃度	会合体 (%)	Tm (℃)	pI
cH-G1/cL-k	100	15.6	<70	9.1
H87-G1d/LB-k	119	1.3	76.5	8.9
H87-G1d/L21-k	82	1.3	74.6	7.9
H87-G1d/L37-k	71	1.2	74.4	8.5

（IC50濃度：キメラ抗体EP27（cH-G1/cL-k）のIC50濃度を100とした場合の各抗体のIC50濃度）

[0281] 〔実施例５〕サル抗原結合能の改善および免疫原性を低減させる変異の導入

医薬品を開発する際、一般に前臨床試験での毒性・安全性評価は臨床試験での投与量決定や各種リスク評価のための重要な検討と考えられる。抗体医薬品の場合、その抗原結合特異性から前臨床試験に用いる動物種の選択が限定されることがあり、多くの場合、ヒトと遺伝子的に近い霊長類が選択される。しかしながら、目的とする抗体が霊長類の抗原と結合しない、あるいはその結合能がヒト抗原に対する結合能と比べ著しく異なる場合、霊長類を用いた評価が妥当とは判断されないことがある。このような事例に対応するため、使用する動物種の抗原と結合するサロゲート抗体を用いたり、ヒト抗原トランスジェニック動物を使用したりすることで前臨床試験での毒性・安全

性を評価する試みがなされている（Chapmanら（Nat. Rev. Drug Discov. (2007) 6, 120-126））。

[0282] 目的とする抗体の抗原結合能を変化させる方法としては、Phage libraryやRibosome display用いたaffinity maturation等、当業者公知の方法によるアミノ酸残基の置換が有効とされる。また、抗原と抗体可変領域結合部位の立体構造から、計算科学的手法により種交差性を改善させることも可能である（Faradyら、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 19 (2009) 3744-3747）。しかしながら、大規模なスクリーニングや計算科学的手法に頼らず、抗ヒトEpiregulin抗体の抗原に対する結合能を変化させた報告は無い。また、サルEpiregulinとヒトEpiregulinとの構造上の相違も明らかではないため、抗ヒトEpiregulin抗体のどのアミノ酸残基を改変すれば、サルEpiregulinに対する結合活性を増強することができるのかといったガイダンスは全く示されていなかった。本発明では、CDRの任意の部位のアミノ酸残基が置換された複数の抗体配列がデザインされた。実施例１の手法によりこれらの残基が置換された抗体遺伝子の作製と抗体発現を行った。具体的には、表１５に示されるH鎖CDR2およびCDR3、L鎖CDR3がArg残基に置換された配列がデザインされ、表１６に示す抗体が作成された。ヒトおよびサルEpiregulinに対するaffinityは表面プラズモン散乱を利用した装置（BIACORE）を用いて評価された（参考例６）。

[0283] この結果、キメラ抗体EP27と比較してヒトEpiregulinに対するaffinityが低下せず、サルEpiregulinに対するaffinityが増強され、サルEpiregulinとヒトEpiregulinの交差性を示す指標であるaffinity比(＝サルEpiregulinに対するKD値/ヒトEpiregulinに対するKD値)が小さいEP27ヒト化抗体配列が見出された（図１および２）。

[0284]

[表15]

CDR改変体名	改変CDR	配列番号
H111	H鎖　CDR2	１００
H112	H鎖　CDR2	１０１
H116	H鎖　CDR2	１０２
H117	H鎖　CDR2	１０３
H118	H鎖　CDR2	１０４
H119	H鎖　CDR2	１０５
H120	H鎖　CDR2	１０６
H121	H鎖　CDR2	１０７
H123	H鎖　CDR2	１０８
H124	H鎖　CDR1	１０９
H131	H鎖　CDR3	１１０
H132	H鎖　CDR3	１１１
H133	H鎖　CDR3	１１２
L47	L鎖　CDR3	１１３
L48	L鎖　CDR3	１１４

[0285] [表16]

CDR改変体名	配列番号（H鎖）	配列番号（L鎖）	cEREG KD (nM) / hEREG KD (nM)
cH-G1/cL-k	３２	３３	40.9
H87-G1d/LB-k	９８	２９	35.1
H111-G1d/LB-k	１１５	２９	9.0
H111-G1d/L47-k	１１５	１２８	12.6
H111-G1d/L48-k	１１５	１２９	8.4
H112-G1d/LB-k	１１６	２９	16.0
H116-G1d/LB-k	１１７	２９	6.1
H117-G1d/LB-k	１１８	２９	7.9
H118-G1d/LB-k	１１９	２９	7.5
H119-G1d/LB-k	１２０	２９	9.8
H120-G1d/LB-k	１２１	２９	9.1
H121-G1d/LB-k	１２２	２９	8.3
H123-G1d/LB-k	１２３	２９	8.2
H124-G1d/LB-k	１２４	２９	20.6
H131-G1d/LB-k	１２５	２９	4.7
H132-G1d/LB-k	１２６	２９	4.6
H133-G1d/LB-k	１２７	２９	6.1

[0286] また、医療用医薬品の開発において、投与後の医薬品に対する抗体の出現は薬効、安全性上の課題である。そのため、目的とする医薬品の免疫原性を低下させる操作が重要である。バイオロジクスの免疫原性を予測する手法としてはin vivo、in vitro、in silicoの手法が存在し、実際の臨床における抗医薬品抗体の出現率との相関についても報告がなされている（Bakerら（Cu

rr. Drug Saf. (2010) 5 (4), 308-313、Brysonら (BioDrugs. (2010) 24 (1), 1-8) 、Grootら (Curr. Opin. Pharmacol. (2008) 8 (5), 620-626) 。本発明においても参考例１３に記載の手法によりT-cell epitopeを予測することによって、目的とする抗体の抗原結合能を損なわず、かつ、免疫原性リスクを低下させるEP27ヒト化抗体配列が予測可能である。

[0287] 実施例１から４で見出された改変を含む配列に対して、サルEpiregulinに対するaffinityの改善および/または免疫原性を低減させる変異が任意に組み合わされた配列がデザインされた。こうしてデザインされた表１７（配列番号：１１５～１５０）に示されるEP27ヒト化抗体が実施例１の方法により作製された。表１７に記載されたEP27ヒト化抗体の変異CDR配列を表１８に示した。ヒトおよびサルEpiregulinに対するaffinityの評価は表面プラズモン散乱を利用した装置（BIACORE）が用いられた（参考例６）。図３に示したとおり、各EP27ヒト化抗体のヒトEpiregulinに対するaffinityはキメラ抗体EP27（cH-G1/cL-k）のaffintyと同等であった。また、サル抗原とヒト抗原のaffinityの差を示す指標として、affinity比(＝サルEpiregulinに対するKD値/ヒトEpiregulinに対するKD値)を比較したところ、キメラ抗体と比べて各EP27ヒト化抗体の両抗原に対するaffinityの差が大きく減少することが確認された（図４）。これより、ヒトEpiregulinに対するaffinityを低下させずにサルEpiregulinに対するaffinityが改善されたEP27ヒト化抗体配列が見出された。

[0288]

[表17]

抗体名	配列番号（H 鎖）	配列番号（L 鎖）
H111-G1d/L48-k	１１５	１２９
H111-G1d/L50-k	１１５	１３０
H111-G1d/LB-k	１１５	２９
H116-G1d/LB-k	１１７	２９
H117-G1d/LB-k	１１８	２９
H118-G1d/LB-k	１１９	２９
H120-G1d/LB-k	１２１	２９
H121-G1d/LB-k	１２２	２９
H123-G1d/LB-k	１２３	２９
H132-G1d/LB-k	１２６	２９
H150-G1d/L21-k	１３１	８４
H154-G1d/L48-k	１３２	１２９
H154-G1d/LB-k	１３２	２９
H166-G1d/LB-k	１３３	２９
H168-G1d/LB-k	１３４	２９
H183-G1d/L21-k	１３５	８４
H183-G1d/L48-k	１３５	１２９
H183-G1d/L53-k	１３５	１３６
H183-G1d/LB-k	１３５	２９
H193-G1d/LB-k	１３７	２９
H197-G1d/LB-k	１３８	２９
H197-G1d/L48-k	１３８	１２９
H204-G1d/LB-k	１３９	２９
H205-G1d/L53-k	１４０	１３６
H205-G1d/L73-k	１４０	１４１
H205-G1d/LB-k	１４０	２９
H206-G1d/L48-k	１４２	１２９
H206-G1d/L53-k	１４２	１３６
H206-G1d/L73-k	１４２	１４１
H207-G1d/L48-k	１４３	１２９
H207-G1d/LB-k	１４３	２９
H210-G1d/LB-k	１４４	２９
H211-G1d/L48-k	１４５	１２９
H211-G1d/LB-k	１４５	２９
H212-G1d/L48-k	１４６	１２９
H212-G1d/LB-k	１４６	２９
H213-G1d/L48-k	１４７	１２９
H213-G1d/LB-k	１４７	２９
H213-G1d/L53-k	１４７	１３６
H224-G1d/L53-k	１４８	１３６
H231-G1d/L53-k	１４９	１３６
H231-G1d/L73-k	１４９	１４１
H240-G1d/L53-k	１５０	１３６
H240-G1d/L73-k	１５０	１４１

[0289]

[表18]

CDR改変体名	改変CDR	配列番号
H150	H鎖　CDR3	１５１
H154	H鎖　CDR3	１５２
H166	H鎖　CDR2，3	１５３、１５４
H168	H鎖　CDR2，3	１５５、１５４
H183	H鎖　CDR2，3	１５３、１５２
H193	H鎖　CDR2，3	１５６、１５１
H197	H鎖　CDR2，3	１５７、１５１
H204	H鎖　CDR2，3	１５３、１５２
H205	H鎖　CDR2，3	１５３、１５８
H206	H鎖　CDR2，3	１５３、１５２
H207	H鎖　CDR2，3	１５３、１５２
H210	H鎖　CDR2，3	１５９、１５２
H211	H鎖　CDR2，3	１５７、１５２
H212	H鎖　CDR2，3	１６０、１５２
H213	H鎖　CDR2，3	１６１、１５２
H224	H鎖　CDR2，3	１５３、１５８
H231	H鎖　CDR2，3	１５３、１５８
H240	H鎖　CDR2，3	１６０、１５８
L50	L鎖　FR1	１６２
L53	L鎖　CDR1	１６３
L73	L鎖　CDR1，3	１６３、１６４

[0290] さらに、これらのEP27ヒト化抗体に含まれる会合体量がゲルろ過クロマトグラフ法（参考例９）で、これらのEP27ヒト化抗体から調製されたFabの熱変性中間温度（Tm）が示差走査熱量分析計（参考例１０）により測定された。表１９に示したように、キメラ抗体EP27（cH-G1d/cL-k）と比較して会合体量が大幅に減少し、Tm値が上昇することが確認された。これより、実施例１から５に示された、ヒト化による免疫原性リスク低減、化学的分解の抑制、等電点の低下、会合体量の低減、サル抗原に対する結合能の改善が含まれたEP27ヒト化抗体配列が見出された。

[0291]

[表19]

抗体名	会合体(%)	Tm(℃)	hEREG KD比	cEREG KD比	cEREG (nM) / hEREG (nM)	免疫原性スコア
cH-G1/cL-k	18.9	<70	1	1	40.9	800.2
H87-G1d/LB-k	1.0	76.2	0.74	0.99	35.1	589.4
H205-G1d/L53-k	1.0	74.3	1.08	0.23	5.5	516.1
H206-G1d/L53-k	1.7	72.9	0.82	0.11	5.2	606.8
H231-G1d/L53-k	2.2	73.3	1.15	0.27	6.0	541.7
H240-G1d/L53-k	1.3	74.7	1.34	0.28	5.4	515.6
H205-G1d/L73-k	1.8	74.5	0.85	0.12	3.1	519.0
H206-G1d/L73-k	3.6	72.9	0.49	0.08	3.4	609.7
H231-G1d/L73-k	4.0	73.2	0.70	0.12	3.5	544.6
H240-G1d/L73-k	2.8	74.9	0.91	0.15	3.6	518.5

（KD比は、cH-G1/cL-kを１としたときの相対比を表す。）

[0292] 〔実施例７〕ヒト末梢血単核球をエフェクター細胞として用いた各被験抗体のADCC活性

ヒト末梢血単核球（以下、ヒトPBMCと指称する。）をエフェクター細胞として用いて各被験抗体のADCC活性が以下のように測定された。ヒト由来エフェクター細胞は、ヒト末梢血より採取した単核球画分を用いた。その結果、試験に用いられた全てのEP27ヒト化抗体がMIA PaCa-2細胞に対してADCCを誘導することが明らかとなった（参考例７）（図５）。

[0293] 〔実施例８〕抗Epiregulinモノクローナル抗体のヒトまたはサルEpiregulinによる細胞増殖刺激に対する中和活性の測定

実施例５においてサルとのAffinityが増強されたEP27ヒト化抗体配列が見出された。そこで、細胞における活性を評価するために、サルおよびヒトEpiregulinによる細胞増殖刺激に対するEP27ヒト化抗体の中和活性が測定された。細胞はBAF_EGFRを用い、今回評価した全てのEP27ヒト化抗体は、ヒトおよびサルEpiregulinに依存したEGFR_BAF細胞の増殖を阻害する中和活性が検討され（参考例８）、いずれのEP27ヒト化抗体も、キメラ抗体に比べてサルEpiregulinに対する中和活性が増強された。（図６、７）

[0294] 〔実施例９〕in vivoモデルを用いたEP27ヒト化抗体の薬効試験

ヒト腫瘍を移植したマウスモデルを用いて実施例７および実施例８におい

て細胞内で活性が確認されたEP27ヒト化抗体のin vivoでの抗腫瘍活性が評価された（参考例１４）。評価されたMIA PaCa-2およびDLD-1ヒト癌細胞移植マウスモデルにおける各被験抗体の抗腫瘍効果は、投与試料の投与の最終日から7日後の腫瘍体積を測定することによって評価された。その結果、図８に示すとおり、cH-G1/cL-k抗体、H206-G1d/L73-k抗体、H240-G1d/L73-k抗体の各抗体が10 mg/kgで投与された場合、動物モデルにおいても改変されたEP27ヒト化抗体による優れた薬効が確認された。

[0295] 〔実施例１０〕抗epiregulin抗体を用いた免疫組織化学的染色

EP27抗体を用いて、抗原発現量を反映した免疫組織化学的染色方法が確立された。発現量が異なるEREG強制発現細胞株であるSKE-18（その抗原量は7.7x10^3と見積もられた）、SKE-23（その抗原量は6.1x10^4と見積もられた）、SKE-4B2（その抗原量は2.9x10^5と見積もられた）と宿主細胞のSK-HEP-1（抗原量8.4×10^2)がscidマウスに移植された組織のパラフィン包埋ブロックを用いて免疫組織化学的染色が行われた。これらのパラフィンブロックから作成された薄切組織切片におけるEREGの発現が、EP27抗体を一次抗体とするインキュベーションの後に二次抗体としてウサギ抗マウスIgGポリクローナル抗体（Jackson Imunoresearch Laboratories）、三次抗体としてポリマー-HRP（Dakocytomation）と結合したヤギ抗ウサギIgG抗体と反応させることによって、ジアミノベンジジンを基質として可視化された。図１０で示したように、染色された細胞・組織はEREGの発現量に応じて染色性の階調性が認められた。また、これらの細胞の発現量に応じたH240-G1d/L73-k抗体のin vitroでのADCC活性が確認された（図１１）。上記の試験においては、H240-G1d/L73-k抗体として、低フコース抗体が使用された。当該低フコース抗体はWO2004/065540に記載された方法によって作製された。以下では当該低フコース抗体はEP27ヒト化Glycomab抗体とも指称される。上記の4つのEREG強制発現細胞株に加えて抗原量が2.8x10^4と見積もられたSKE-10およびSKE-15に対するH240-G1d/L73-k抗体（EP27ヒト化Glycomab抗体）のin vitroでのADCC活性が確認された。図１１と同様にこれらの細胞の発現量に応じたH240-G1d/L73-k抗体のin vitro

でのADCC活性が確認された（表２０）。さらに、これらの細胞の発現量に応じたH240-G1d/L73-k抗体（EP27ヒト化Glycomab抗体）のin vivoでの腫瘍増殖抑制活性も確認された（図１２）。すなわち、免疫組織化学的染色法によるEREGの発現量の評価と薬効との間に相関が確認された。

[0296] [表20]

クローン名	抗体濃度（μg/mL）	ADCC（%）	EREG 発現量
SKE4B2	0.1	43.8	290000
SKE23	0.1	32.6	61000
SKE10	0.1	24.9	28000
SKE15	0.1	17.4	28000
SKE18	0.1	8.5	7700
SKE1	0.1	4.4	5600
SK-HEP1	0.1	9.1	840

[0297] 〔実施例１１〕臨床低分化大腸癌におけるEREGの発現

低分化大腸癌の臨床9症例でのEREG発現を検討するため、同症例のパラフィン包埋薄切標本を実施例１０に記載される染色法によって染色したところ、7/9症例で明確な陽性像が確認された（図１３）。

[0298] 〔実施例１２〕大腸癌幹細胞の腫瘍生着に対するEP27ヒト化Glycomab抗体の薬効

ヒト大腸癌腫瘍モデルPLR123（WO02012/046797）から単離された細胞数1x10^{6}の大腸癌幹細胞が鼠蹊部に移植されたSCIDマウスに、当該幹細胞の投与の翌日からEP27ヒト化Glycomab抗体が10 mg/kgで週一回投与された。その結果、ウィルコクソンの符号順位検定（SASシステム8.02 TSレベル02M0およびSAS前臨床パッケージVersion 5.00.010720）を行ったところ、移植後29日目で図１４に示す通り抗体群ではコントロール群と比べて有意に腫瘍生着が抑制されていることが確認された。

[0299] 〔実施例１３〕大腸癌幹細胞の転移に対するEP27ヒト化Glycomab抗体の薬効

ヒト大腸癌腫瘍モデルPLR123から単離された細胞数2x10^{6}の大腸癌幹細胞が尾静脈から移植されたSCID-beigeマウスに、当該幹細胞の投与3日後に、EP27ヒト化Glycomab抗体が10 mg/kgで週一回投与された。その結果、移植後５２日目で図１５に示す通り抗体投与群ではコントロール群と比べて、マウス肺

における腫瘍塊数（転移病巣数）、および腫瘍塊サイズ（転移病巣直径）が有意に抑制されていることが確認された。

[0300] 〔実施例１４〕低分化大腸癌に対するEP27ヒト化Glycomab抗体の薬効

ヒト低分化大腸癌腫瘍COL-53-JCK（実験動物中央研究所）の腫瘍組織片が移植されたSCIDマウスに、当該腫瘍組織片の移植後14日目からEP27ヒト化Glycomab抗体が10 mg/kgで週一回投与された。その結果、当該抗体の投与開始後14日目に腫瘍体積を評価したところ、抗体投与群ではコントロール群と比べて有意に腫瘍増殖が抑制されていることが確認された（図１６）。

[0301] 〔実施例１５〕中分化大腸癌に対するEP27ヒト化Glycomab抗体の薬効

ヒト中分化大腸癌腫瘍モデルであるPLR379（PCT/JP2012/072852）における腫瘍はTumor buddingが観察される形態上の特徴を有するが、Epiregulinの発現はTumor buddingの部位によらず検出される。当該PLR379の腫瘍組織片が移植されたSCIDマウスに、当該腫瘍組織片の移植後21日目からEP27ヒト化Glycomab抗体が10 mg/kgで週一回投与された。当該抗体の投与開始後18日目に腫瘍体積を評価したところ、抗体投与群ではコントロール群と比べて有意に腫瘍増殖が抑制されていることが確認された（図１７）。

[0302] 〔実施例１６〕臨床肺腺癌におけるEREGの発現

肺腺癌の臨床7症例でのEREG発現を検討するため、同症例のパラフィン包埋薄切標本が実施例１０に記載される染色法によって染色された。その結果、4/7症例で明確な陽性像が確認された（図１８）。

[0303] 〔実施例１７〕ヒト末梢血単核球をエフェクター細胞として用いたEP27ヒト化Glycomab抗体のADCC活性

ヒト肺腺癌株Calu-3に対してヒトPBMCをエフェクター細胞として用いたADCC活性が評価された。その結果、EP27ヒト化Glycomab抗体がCalu-3細胞に対してADCCを誘導することが確認された。（図１９）。

[0304] 〔実施例１８〕肺腺癌に対するEP27ヒト化Glycomab抗体の薬効

ヒト肺腺癌モデルCalu-3の腫瘍組織片が移植されたSCIDマウスに、当該腫瘍移植片の移植後13日目からEP27ヒト化Glycomab抗体が10 mg/kgで週一回投

与された。当該抗体の投与開始後28日目に腫瘍体積を測定したところ、抗体投与群ではコントロール群と比べて有意に腫瘍増殖が抑制されていることが確認された（図２０）。

[0305] 〔実施例１９〕EP27ヒト化抗体の細胞内在化

EP27ヒト化抗体の細胞内在化は以下の系で評価された。一次抗体が内在化すると、二次抗体に抱合されたリボソーム不活性化タンパク質サポリンは二次抗体の一次抗体への結合を介して、細胞内に輸送される。内在化するとサポリンはIgG抱合体から分離し、タンパク質合成を阻害し、最終的に細胞死を引き起こすことになる。各ウェル当たりEREGを発現する細胞株DLD-1、または対照とする細胞株SK-HEP1がそれぞれ$1x10^3$細胞の細胞密度で播種された96-well マイクロプレートの各ウェルに、播種の翌日に一次抗体としてEP27ヒト化Glycomab抗体、二次抗体としてリボソーム不活性化タンパク質が結合したヒトモノクローナル抗体を認識するヤギIgG、 Hum-ZAP（Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ）が添加された。添加の4日後にWST8 (Dojindo) で細胞生存率が評価された。図２１に示すように、EP27ヒト化Glycomab抗体はEREGを発現する細胞株DLD-1に対してのみ細胞傷害を引き起こした。その一方で対照として用いられた細胞株SK-HEP1に対しては細胞傷害を引き起こさなかった。

[0306] 〔参考例１〕ヒトおよびカニクイサルEpiregulin遺伝子の単離

全長ヒトEREG cDNA (CR541887、配列番号：１６９）は定法により単離され、その遺伝子断片が哺乳細胞発現用ベクター（pMCN）にクローニングされたプラスミドがhEREG/pMCNと命名された。pMCNは、mouse CMVプロモーター（ACCESSION No. U 68299）下で外来遺伝子を発現誘導させることが可能であり、かつ、ネオマイシン耐性遺伝子が挿入されたベクターである。全長カニクイサルEREG cDNAはアカゲサル EREG cDNA (XM_001102069) 配列情報をもとに、カニクイサルcDNAライブラリから定法により単離された遺伝子断片（配列番号：１６５をコードする遺伝子断片）が哺乳細胞発現用ベクター（pMCN）にクローニングされたプラスミドがcyEREG/pMCNと命名された。hEREG/pMCNおよ

びcyEREG/pMCNがCHO細胞 DG44株（Invitrogen）へエレクトロポレーションにより導入され、500μg/mL Geneticinでの選抜により、全長ヒトEREG定常発現CHO細胞および全長カニクイサルEREG定常発現CHOが樹立され、それぞれhEREG_DGおよびcyEREG_DGと命名された。

[0307] 〔参考例２〕ヒトおよびカニクイサル成熟型Epiregulin発現方法の樹立

ヒトおよびカニクイサルEpiregulin遺伝子の成熟型ヒトEREG細胞外領域（それぞれ配列番号：１７０および配列番号：３４で表されるポリペプチドのN末端に配列番号１７１の配列が融合されたポリペプチド）のC末端に６つのヒスチジン繰り返し配列を発現するcDNAがPCR法によって増幅された。これらがそれぞれ挿入された哺乳動物細胞用発現ベクターが制限酵素にて直鎖状にされたのち、Free style 293細胞に293フェクチンを用いて導入することによって、ヒトおよびカニクイサル成熟型Epiregulinを一過性に発現させた。

[0308] 〔参考例３〕Epiregulinの調製

成熟型ヒトEpiregulin遺伝子および成熟型カニクイサルEpiregulin遺伝子がそれぞれ哺乳動物細胞用発現ベクターに挿入された。各遺伝子を下記の方法によって発現させた動物細胞の培養液から単離された成熟型ヒト EREG-6HisおよびカニクイサルEREG-6His融合蛋白が精製された。

[0309] 哺乳動物細胞用発現ベクターに、成熟型ヒトEREG細胞外領域（配列番号：３４のN末端に配列番号：１７１の配列が融合されたポリペプチド）と6つのヒスチジン領域がインフレームで連結された、hsEREG-6His発現ベクターが構築された（発現した融合ポリペプチドは、以下hsEREG-Hisと呼ばれる）。哺乳動物細胞用発現ベクターに、成熟型カニクイサルEREG細胞外領域（配列番号：１７０のN末端に配列番号：１７１の配列が融合されたポリペプチド）と6つのヒスチジン領域がインフレームで連結された、csEREG-6His発現ベクターが構築された（発現したEREGは、以下cysEREG-Hisと呼ばれる）。hsEREG-6His発現ベクターおよびcsEREG-6His発現ベクターはFreeStyle 293細胞（Invitrogen）へ293fectin（Invitrogen）により導入され、 形質導入株が500μg/mL ゼオシンでの選抜により、37℃の8%CO_2 インキュベーター中で6日間培養さ

れた。

[0310] 次に培養上清より hsEREG-HisとcysEREG-Hisが精製された。培養上清に対して終濃度10 mMイミダゾールとなるように4 Mイミダゾールが加えられた混合液は、 HisMicroSpin Purification System (Amersham) のNiレジンと混合された。当該レジンを20 mMイミダゾールおよび50 mMイミダゾールで洗浄後、200 mMイミダゾールでhsEREG-HisまたはcysEREG-Hisが溶出され（溶出画分1）、続いて400 mMイミダゾールでhsEREG-HisまたはcysEREG-Hisが溶出された（溶出画分2）。次に溶出された hsEREG-HisまたはcysEREG-Hisを含む緩衝液は、Bio-tech 透析カップ MWCO8000を用いて、PBSに透析置換された。精製蛋白の定量は280 nmの波長からPACE法を用いてその含有タンパク質量が換算された。

[0311] 精製タンパク質の電気泳動パターンを（図９）に示した。

[0312] 〔参考例４〕Epiregulin ELISA系確立

成熟型EGFドメイン構造をもつ可溶型ヒトEREG断片（^{63}Valから^{108}Leuに相当する配列番号：３４に記載のポリペプチド）は R&D Systems (cat.no. 1195- EP/CF) より購入された。可溶型ヒトEREG断片をnuncイムノプレートにコートし、BSAを含む溶液でブロッキング後に、精製抗EREG抗体の結合反応性が解析された。精製抗EREG抗体を添加してから一時間のインキュベーション後、洗浄されたプレートの各ウェルに、アルカリフォスファターゼ標識した抗ヒトIgG抗体（Zymed）を添加することによって、反応が実施された。各ウェルの洗浄を行ったあと、検出試薬 Sigma p-Nitrophenyl phosphate Tabletsを加えることにより抗体結合量が測定された。

[0313] 〔参考例５〕競合ELISAによるEpiregulin結合阻害系確立

成熟型EGFドメイン構造をもつ可溶型ヒトEREG断片（^{63}Valから^{108}Leuに相当する配列番号：３４に記載のポリペプチド）は R&D Systems (cat.no. 1195- EP/CF) より購入された。可溶型ヒトEREG断片をnuncイムノプレートにコートし、BSAを含む溶液でブロッキング後に、マウスハイブリドーマ由来のEP27に対する精製ヒト化抗EREG抗体の競合結合反応性が解析された。マウスハイブ

リドーマ由来のEP27および精製ヒト化抗EREG抗体を添加してから二時間のインキュベーション後、洗浄されたプレートの各ウェルに、アルカリフォスファターゼ標識した抗ヒトIgG抗体（Zymed)を添加することによって、反応が実施された。各ウェルの洗浄を行ったあと、検出試薬 Sigma p-Nitrophenyl phosphate Tabletsを加えることにより抗体結合量（A405/655検出値）が測定された。

[0314] 〔参考例６〕抗原結合能（affinity測定法）の確立

抗EREG抗体の抗原に対する親和性と結合速度定数を、Biacore™-T100（GEヘルスケア・ジャパン）による表面プラズモン共鳴アッセイのsingle-cycle kinetics法によって測定した。ランニングバッファーには HBS-EP+ （GEヘルスケア・ジャパン）を用い、アミンカップリングキット（GEヘルスケア・ジャパン）を用いて、Protein AをCM5チップ（カルボキシメチルデキストラン被覆チップ）に共有結合させた。ランニングバッファーには HBS-EP+ （GEヘルスケア・ジャパン）を用い、アミンカップリングキット（GEヘルスケア・ジャパン）を用いて、Protein AをCM5チップ（カルボキシメチルデキストラン被覆チップ）に共有結合させた。各抗EREG抗体はProtein A に約 350 RU 捕捉するように調製した。アナライトとして用いたヒトEREGまたはカニクイサルEREGは HBS-EP+ を用いて0、0.7、1.4、2.8、5.6、11.2 nMに調製した。測定はまず抗体溶液をProtein A に捕捉させ、さらに流速30μL/minにて、0.7、1.4、2.8、5.6、11.2 nMのヒトEREGまたはカニクイサルEREG溶液を 各3 minずつ連続してインジェクションすることで反応させ、その後 HBS-EP+ に切り替え15 min解離相を測定した。解離相の測定終了後、25 mM NaOH で洗浄し、センサーチップを再生した。濃度0の測定は同様に抗体溶液をProtein A に捕捉させ、HBS-EP+を各3 minずつ5回連続してインジェクションすることで反応させ、その後 HBS-EP+ に切り替え15 min解離相を測定した。解離相の測定終了後、25 mM NaOH で洗浄し、センサーチップを再生した。得られたセンサーグラムから、Biacore 専用のデータ解析ソフトウェアである Biacore T100 Evaluation Software Version 2.0.1 を用いて速度論的な解析を行い、結合

速度定数（k_a）、解離速度定数（k_d）および速度定数比を算出した。結果を表２１に示した。なお、測定値の日間差を補正するため、図１～４ならびに表１６および１９では同日測定の対照試料（cH-G1/cL-k）の値を1とした比を示した。

[0315] [表21]

抗体名	ヒトEREGに対する親和性			カニクイサルEREGに対する親和性		
	KD (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
cH-G1/cL-k	$2.0x10^{-10}$	$1.1x10^{6}$	$2.2x10^{-4}$	$5.2x10^{-9}$	$9.9x10^{5}$	$5.2x10^{-3}$
H205-G1d/L53-k	$2.2x10^{-10}$	$5.4x10^{5}$	$1.2x10^{-4}$	$1.2x10^{-9}$	$5.8x10^{5}$	$7.0x10^{-4}$
H205-G1d/L73-k	$1.9x10^{-10}$	$3.9x10^{5}$	$7.5x10^{-5}$	$6.9x10^{-10}$	$3.7x10^{5}$	$2.6x10^{-4}$
H206-G1d/L53-k	$1.7x10^{-10}$	$6.6x10^{5}$	$1.1x10^{-4}$	$9.4x10^{-10}$	$6.4x10^{5}$	$6.1x10^{-4}$
H206-G1d/L73-k	$1.3x10^{-10}$	$5.5x10^{5}$	$7.4x10^{-5}$	$4.5x10^{-10}$	$5.0x10^{5}$	$2.3x10^{-4}$
H231-G1d/L53-k	$2.3x10^{-10}$	$4.5x10^{5}$	$1.1x10^{-4}$	$1.4x10^{-9}$	$6.2x10^{5}$	$8.6x10^{-4}$
H231-G1d/L73-k	$1.4x10^{-10}$	$6.2x10^{5}$	$8.7x10^{-5}$	$6.6x10^{-10}$	$4.2x10^{5}$	$2.8x10^{-4}$
H240-G1d/L53-k	$2.7x10^{-10}$	$4.2x10^{5}$	$1.1x10^{-4}$	$1.5x10^{-9}$	$6.1x10^{5}$	$8.9x10^{-4}$
H240-G1d/L73-k	$2.2x10^{-10}$	$3.4x10^{5}$	$7.7x10^{-5}$	$8.7x10^{-10}$	$3.4x10^{5}$	$2.9x10^{-4}$
H87-G1d/LB-k	$1.5x10^{-10}$	$1.3x10^{6}$	$2.0x10^{-4}$	$5.2x10^{-9}$	$8.6x10^{5}$	$4.5x10^{-3}$

[0316] 〔参考例７〕ADCC活性測定法の確立

ヒト由来エフェクター細胞として、ヒト末梢血より採取した単核球画分が用いられた。1000単位/mLのヘパリン溶液（ノボ・ヘパリン注5千単位、ノボ・ノルディスク）があらかじめ200μL注入された注射器を用い、健常人ボランティア（成人男性）より末梢血50 mLが採取された。PBS(-)で2倍に希釈された当該末梢血が、Ficoll-Paque PLUSをあらかじめ注入して遠心分離操作が行われた。Leucosepリンパ球分離管（Greiner bio-one）に加えられた。これを遠心分離（2150 rpm、10分間、室温）した後、単核球画分層が分取された。10% FBS/D-MEMで1回細胞を洗浄した後、10% FBS/D-MEMで細胞密度を5×10^{6}/mLに調製することによって、エフェクター細胞浮遊液が調製された。当該細胞懸濁液がヒトPBMC溶液として以後の実験に供された。

[0317] 標的細胞浮遊液は、試験時に用時調製された。ヒト膵臓癌細胞株MIA PaCa-2細胞（ATCC）は10%FBS、2.5% Horse Serum、4 mmol/L L-Glutamine (Invitrogen)、4.5 g/L glucose (Invitrogen)、1.5 g/L Sodium bicarbonate (Invitrogen) を含むDulbecco's Modified Eagle Media (Invitrogen)（以下、継代用培地という。）中で継代されて維持された。標識試薬は、12μLの4 mg

/mLに調製されたCalcein-AM/DMSO stock溶液（nacalai）を含むチューブに、10%FBS/D-MEMを228μL添加して軽く懸濁しCalcein-AM溶液とした。遠心分離（1200 rpm, 5分間, 4℃）された1×10^6個のMIA PaCa-2細胞株に対して、上記の通りに調製されたCalcein-AM溶液を、細胞ペレット1×10^6/個あたり200μLで添加することによって、細胞懸濁液が調製された。当該懸濁液の全量が、ポリ採血管（日本製薬）に移され、37℃のCO_2 インキュベーター中で2時間培養された。10%FBS/D-MEMで3回洗浄された細胞を、20×10^4/mL（1×10^4/50μL）になるように10%FBS/D-MEMで懸濁することによって、標的細胞浮遊液が調製された。

[0318] 標的細胞浮遊液は96ウェル平底プレートに100μLの培地が添加された。次に、抗 Epiregulinモノクローナル抗体（H206-G1d/L73-k（配列番号：142/141），H240-G1d/L73-k（配列番号：150/141）およびキメラEP27（配列番号：32/33））を培地にて希釈した後に当該プレートの各ウェルに 50μLずつ添加された。抗体は終濃度0.0001～10μg/mLで添加された。続いて、PBMC溶液（1x10^7個/mL)が各ウェルに 50μLずつ添加され、当該プレートが 5%炭酸ガスインキュベーター中で 37℃にて 4時間静置され、特異的カルセイン-AM遊離率が決定された。プレートを遠心分離（1200 rpm、5分間、室温）された当該プレートの各ウェルより回収された100μLの上清の蛍光強度（λ_{ex}=490 nm、λ_{em}=515 nm）が蛍光光度計を用いて測定された。下式（式３）により特異的カルセイン遊離率を求めた。

[0319] （式３）

特異的カルセイン遊離率(%) = (A-C) x 100/(B-C)

[0320] Aは各ウェルにおける蛍光強度、Bは50μL の10% FBS/D-MEMに50μLの標的細胞浮遊液と100μLのNP-40溶液が添加されたウェルにおける蛍光強度の平均値、Cは50μL 10% FBS/D-MEMに50μLの標的細胞浮遊液と100μLの10% FBS/D-MEMが添加されたウェルにおける蛍光強度の平均値を示す。試験はN=3で行い、各抗体濃度の特異的カルセイン遊離率がMicrosoft Office Excel 2007を用いて決定された。

[0321] 〔参考例８〕中和活性測定法

（１）ヒトEGFRキメラレセプターを発現するBa/F3細胞株（EGFR BAF）の樹立

常法により、その配列が配列番号:166（GeneBank Acc. No. NM_005228）で示されるヒトEGFレセプター（以下、「hEGFR」と記載する。）が単離された後に、ヒトEGFレセプターを発現するベクター（pCXZD1/EGFR#3）が作製された。

[0322] Pvu Iで切断することにより直鎖化したhEGFR発現ベクター（pCXZD1/EGFR#3）15μgが、0.33 kV, 950μFDの条件下でBa/F3細胞にエレクトロポーレーション（Gene Pulser; BioRad）により導入された。遺伝子が導入された細胞は10% FBS、300μg/mL Zeocin、及び組み換え体ヒトEpiregulin（R&Dシステムズ社、Cat:1195-EP/CF、200 ng/mL）を含有するRPMI1640培地で選抜され、EGFR_BAF株の単離が行われた。

[0323] （２）抗Epiregulin抗体のヒトEpiregulinまたはサルEpiregulin依存的なEGFR BAF株の細胞増殖に対する中和活性

（１）で記載の方法により単離されたEGFR_BAF株を用いて、ヒトEpiregulinまたはサルEpiregulin依存性細胞増殖に対する抗Epiregulin抗体の中和活性を測定する試験が実施された。培養時のヒトEpiregulinを除去するため細胞が洗浄され、再びhsEREG-HisまたはcysEREG-His（終濃度2.5 ng/mL）および10% FBSを含むRPMI1640培地に懸濁 され、$2x10^4$細胞/100μL/wellの密度にて96穴プレートに播種された。抗Epiregulin抗体が各濃度（0.014～30μg/mL）にて培地により希釈された後に細胞に添加され、その後、細胞は37℃、5% CO_2インキュベーター内で3日培養された。培養後、Cell Counting Kit（同仁化学研究所社）の測定試薬を加えて2時間発色を行い、反応液の吸光度（450/655 nm）がBenchmark Plus（BIO-RAD社）を用いて測定された。抗体濃度0μg/mLの数値を対照値として、細胞増殖抑制率（各抗体濃度におけるOD値/コントロールのOD値x100(%)）が算出された。

[0324] 〔参考例９〕ゲルろ過クロマトグラフ法による会合体量の測定

カラムとしてG3000SW_{XL}（粒子径5μm、7.8 mmI.D.×30 cm、TOSOH製）を用

い、移動相として300 mM NaClを含む50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）を用いた、ゲルろ過クロマトグラフィによって会合体量が測定された。Alliance system（Waters製）に接続されたカラムが流量0.5 mL/minで平衡化された後、当該カラムに5-10μgの抗体溶液が注入された。抗体の溶出が紫外吸光度検出器（215または280 nm）で検出された。得られたクロマトグラムから、総ピーク面積に含まれる会合体ピーク面積の存在比率が算出された。

[0325] 〔参考例１０〕示差走査熱量分析計による熱変性中間温度（Tm）の測定

150 mmol/Lの塩化ナトリウムを含む20 mol/Lの酢酸ナトリウム緩衝溶液（pH6.0）に調製された透析外液に50-100μg相当量の抗体溶液が封入された透析膜を浸すことによって一昼夜透析された。透析外液で抗体濃度が50-100μg/mLに調製されたものが、試料溶液としてTm値の測定に用いられた。

[0326] 適切なDSC装置、例えばDSC-II（Calorimetry Sciences Corporation製）、MicroCal VP-DSC（GE healthcare製）がこの実験のために使用可能である。十分に脱気された試料溶液およびリファレンス溶液（透析外液）をそれぞれ熱量計セルに封入することによって40℃での熱平衡化が十分に行われた。次に、DSC走査が40℃～100℃で約1K～2.5K/分走査速度で実施された。結果は、温度の関数としての変性ピークの頂点として表される。非特許文献（Rodolfoら、Immunology Letters、1999年、p47-52）を参考にFabドメインのピークアサインを行うことによって、試料の熱変性中間温度が算出された。

[0327] 〔参考例１１〕等電点電気泳動によるpI測定

Phastsystem Cassette（AmerchamBioscience）を用いて以下の膨潤液中で30 minほどPhast-Gel Dry IEF（AmerchamBioscience）ゲルを膨潤させた。

[0328] [表22]

組成	用量
20% Glycerol	0.95 mL
ミリQ水	0.95 mL
Bio-Lyte 7/9（BioRad）	10μL
Bio-Lyte3/10（BioRad）	10μL
Pharmalyte 8-10.5 for IEF（AmerchamBioscience）	80μL

[0329] 膨潤したゲルを用いてPhastSystem（AmerchamBioscience）により以下のプ

ログラムで電気泳動が行われた。サンプルはStep 2でゲルに添加された。pIマーカーとして、Calibration Kit for pI (AmerchamBioscience) が使用された。

[0330] [表23]

ステップ	条件
ステップ1	2000 V、2.5 mA、3.5 W、15℃、75 Vh
ステップ2	200 V、2.5 mA、3.5 W、15℃、15 Vh
ステップ3	2000 V、2.5 mA、3.5 W、15℃、410 Vh

Silver staining Kit, protein (AmerchamBioscience) を用い、キットに添付されているプロトコールに従い20 % TCAで固定された泳動後のゲルの銀染色が行われた。染色後、pIマーカーの既知等電点からサンプルの等電点が算出された。

[0331] 〔参考例１２〕アフコシル抗体発現株の構築

相同染色体上の両方のフコーストランスポーター遺伝子の発現が人為的に抑制されている細胞ではフコーストランスポーターの機能が阻害される。この細胞を用いることでフコースが欠損した抗体を得ることが可能である（WO2006/067913等）。また、beta 1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase IIIとGolgi alpha-mannosidase IIが強制発現される細胞で抗体を産生させてもフコースが欠損した抗体を得ることが可能である（Ferrara ら、 Biotechnol. Bioeng. (2006) 93 (5), 851-861）。これら当業者公知の手法により調製されたアフコシル化EREG抗体が検討に用いられた。

[0332] 〔参考例１３〕in silico免疫原性予測ツールEpibaseを用いた免疫原性リスク評価

臨床における抗体医薬品の有用性と薬効は抗医薬品抗体（ADAs）により制限される。ADAsは抗体医薬品の薬効および動態に影響を及ぼし、時に重篤な副作用をもたらすことがある。免疫原性に影響する因子は多数報告されているが、特にT細胞エピトープが抗原に含まれることが重要であるとされる。このT細胞エピトープを予測するin silicoツールとしてはEpibase (Lonza) 、iTope/TCED (Antitope) およびEpiMatrix (EpiVax) 等が利用可能である。こ

れらのツールを用いることで目的とするタンパク質に存在するT細胞エピトープを含む配列を予測できることが報告されている（Expert Opin Biol Ther. 2007 Mar;7(3):405-18.）。

[0333] Epibase Light (Lonza)はFASTER algorism (Expert Opin Biol Ther. 2007 Mar;7(3):405-18.)を用いて、9-merペプチドとmajor DRB1アレルとの結合能を計算するin silicoツールである。本ツールはMHC classIIに対する強い結合および中程度の結合となるT細胞エピトープを同定することができる。

[0334] 各改変抗体のin silico免疫原性スコアはEpibase Light (Lonza)システム内の以下の計算式（式４）により求められる。

[0335] （式４）

免疫原性スコア = Sum (each DRB1 allotype population frequency X number of critical epitopes)

[0336] 計算にはDRB1アロタイプの存在比が反映され、これには以下に示すCaucasianにおける存在比が使用できる。

[0337] DRB1*1501 (24.5%)、DRB1*0301 (23.7%)、DRB1*0701 (23.3%)、DRB1*0101 (15.0%)、DRB1*1101 (11.6%)、DRB1*1302 (8.2%)、DRB1*1401/1454 (4.9%)、DRB1*0901 (2.3%)、DRB1*1502 (0.5%)、DRB1*1202 (0.1%)

[0338] 各改変抗体配列中に含まれる強い結合と中程度の結合の全てのエピトープをFASTER algorismにより求めた後、ヒトジャームライン配列及び可変領域と定常領域の境界配列を除外したものがcritical epitopeとして免疫原性スコア計算に使用される。スコアが低いほど、免疫原性リスクが小さい配列と考えられる。

[0339] 〔参考例１４〕 in vivoモデルを用いた抗Epiregulin抗体の薬効試験

（１）in vivoモデルへの移植に供する細胞株の維持

in vivoモデルとしてMIA PaCa-2細胞（ATCC）およびDLD-1（ATCC）が用いられた。MIA PaCa-2細胞は10%FBS、2.5% Horse Serum、4 mmol/l L-Glutamine (Invitrogen)、4.5 g/l glucose (Invitrogen)、1.5 g/l Sodium bicarbonate (Invitrogen) を含むDulbecco's Modified Eagle Media (Invitrogen

）（以下、継代用培地という。）中で継代されて維持された。DLD-1細胞は10%FBS、10 mmol/l HEPES（Invitrogen）、4.5 g/l glucose（Invitrogen）、1 mmol/l Sodium Pyruvate（Invitrogen）を含むRPMI1640培地（SIGMA）（以下、継代用培地という。）中で継代されて維持された。

[0340] （２）MIA PaCa-2およびDLD-1細胞移植マウスモデルの作製

MIA PaCa-2およびDLD-1細胞の細胞懸濁液が継代用培地とMATRIGEL Matrix（BD Bioscience）を1:1で含む溶液を用いて$5x10^7$細胞/mLになるように調製され、100μlが腹腔内へ投与されたSCIDマウス（メス、5週齢）（日本クレア）の腹部皮下へ当該細胞懸濁液100μl（$5x10^6$細胞/マウス）が移植された。腫瘍体積は、式５を用いて算出され、腫瘍体積の平均が130-330 mm^3になった時点でモデルが成立したものと判断された。

[0341] （式５）

腫瘍体積＝長径×短径×短径/2

[0342] （３）各被験抗体を含む投与試料の調製

cH-G1/cL-k抗体、H206-G1d/L7-3k抗体、H240-G1d/L73-k抗体の各抗体を含む投与試料が、その投与当日に生理食塩水を用いて、0.04 mg/mL（0.4 mg/kg投与群）または0.2 mg/mL（2 mg/kg投与群）となるように調製された。

[0343] （４）抗体を含む投与試料の投与

（２）で作製されたマウスモデルに対するMIA PaCa-2細胞の移植後13日から週に1回ずつ、17日の期間で、DLD細胞上記の移植後12日から週に1回ずつ、14日の期間で、（３）で調製された投与試料が10 mL/kgの投与量で尾静脈より投与された。陰性対照として、生理食塩水を同様に週に1回ずつ、それぞれの期間で、10 mL/kgの投与量で尾静脈より投与された。いずれの群も、5匹を１群として、各群に対して各被験抗体を含む投与試料の投与が実施された。

[0344] （５）各被験抗体の抗腫瘍効果の評価

ヒト癌細胞移植マウスモデルにおける各被験抗体の抗腫瘍効果が、投与試料の投与の最終日から3日または7日後の腫瘍体積を測定することによって評価された。

請求の範囲

[請求項1] 配列番号：９、１０および１１で表される重鎖可変領域ＣＤＲならびに配列番号：１２、１３および１４で表される軽鎖可変領域ＣＤＲを含む抗Epiregulin抗体が結合するエピトープに結合する抗体であって、配列番号：１７０で表されるサルEpiregulinに対するＫＤ値（ｃＥＲＥＧ　ＫＤ）の配列番号：３４で表されるヒトEpiregulinに対するＫＤ値（ｈＥＲＥＧ　ＫＤ）の比（ｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤ）が、配列番号：９、１０および１１で表される重鎖可変領域ＣＤＲならびに配列番号：１２、１３および１４で表される軽鎖可変領域ＣＤＲを含む抗Epiregulin抗体のｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤよりも小さいことを特徴とする抗Epiregulin抗体。

[請求項2] ｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤが、４０よりも小さい請求項１に記載の抗体。

[請求項3] ｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤが、１０よりも小さい請求項１に記載の抗体。

[請求項4] ｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤが、６よりも小さい請求項１に記載の抗体。

[請求項5] ｃＥＲＥＧ　ＫＤ／ｈＥＲＥＧ　ＫＤが、４よりも小さい請求項１に記載の抗体。

[請求項6] 配列番号：９で表される重鎖ＣＤＲ１、配列番号：１６１、１６０、１５９、１５７、１５６、１５５、１５３、１０８、１０７、１０６、１０５、１０４、１０３、１０２、１０１、および１００からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１５８、１５４、１５２、１５１、１１２、１１１、１１０、および１１からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域、ならびに、配列番号：１６３、６８、６７および１２からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ１、配列番号：７１、６９、および１３からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１６４、４８、４７および１

４からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域を含む請求項１から５のいずれかに記載の抗体。

[請求項7] 配列番号：１５０、１４９、１４８、１４７、１４６、１４５、１４４、１４３、１４２、１４０、１３９、１３８、１３７、１３５、１３４、１３３、１３２、１３１、１２７、１２６、１２５、１２４、１２３、１２２、１２１、１２０、１１９、１１８、１１７、１１６、および１１５からなる群から選択される重鎖可変領域、ならびに配列番号：１４１、１３６、１３０、１２９、１２８、９９、８５、８４、８３、８２、８１、８０、５８、５７、および２９からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む請求項１から５のいずれかに記載の抗体。

[請求項8] 以下のいずれかから選択される抗Epiregulin抗体

（１）配列番号：１５０、１４９、１４８、１４７、１４６、１４５、１４４、１４３、１４２、１４０、１３９、１３８、１３７、１３５、１３４、１３３、１３２、１３１、１２７、１２６、１２５、１２４、１２３、１２２、１２１、１２０、１１９、１１８、１１７、１１６、１１５、９８、９７、９６、９５、９４、９３、９２、７９、７８、７７、７６、７５、７４、７３、７２、５６、５５、５４、５３、５２、５１、５０、４９、および３８からなる群から選択される重鎖可変領域を含む抗Epiregulin抗体、

（２）配列番号：１４１、１３６、１３０、１２９、１２８、９９、８５、８４、８３、８２、８１、８０、５８、５７、および２９からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む抗Epiregulin抗体、または

（３）配列番号：１５０、１４９、１４８、１４７、１４６、１４５、１４４、１４３、１４２、１４０、１３９、１３８、１３７、１３５、１３４、１３３、１３２、１３１、１２７、１２６、１２５、１２４、１２３、１２２、１２１、１２０、１１９、１１８、１１７、１１６、１１５、９８、９７、９６、９５、９４、９３、９２、７９

、７８、７７、７６、７５、７４、７３、７２、５６、５５、５４、５３、５２、５１、５０、４９、および３８からなる群から選択される重鎖可変領域、ならびに、配列番号：１４１、１３６、１３０、１２９、１２８、９９、８５、８４、８３、８２、８１、８０、５８、５７、および２９からなる群から選択される軽鎖可変領域を含む抗Epiregulin抗体。

[請求項9] 配列番号：２６の重鎖定常領域を含む請求項６から８のいずれかに記載の抗体。

[請求項10] 配列番号：２７の軽鎖定常領域を含む請求項６から９のいずれかに記載の抗体。

[請求項11] 中和活性を有する請求項１から１０のいずれかに記載の抗体。

[請求項12] 細胞傷害活性を有する請求項１から１１のいずれかに記載の抗体。

[請求項13] 細胞傷害活性がＣＤＣおよび/またはADCCである請求項１２に記載の抗体。

[請求項14] 増殖抑制剤または細胞傷害性物質が連結された請求項１から１２のいずれかに記載の抗体。

[請求項15] 抗体が低分子抗体である請求項１４に記載の抗体。

[請求項16] 配列番号：２６の重鎖定常領域において、ＥＵナンバリングで表される２３０位、２４０位、２４４位、２４５位、２４７位、２６２位、２６３位、２６６位、２７３位、２７５位、２９９位、３０２位、３１３位、３２３位、３２５位、３２８位および３３２位からなる群から選択されるアミノ酸の少なくとも１つの置換を含む請求項１２から１５のいずれかに記載の抗体。

[請求項17] 配列番号：９の重鎖ＣＤＲ１、配列番号：１６１、１６０、１５９、１５７、１５６、１５５、１５３、１０８、１０７、１０６、１０５、１０４、１０３、１０２、１０１、および１００からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１５８、１５４、１５２、１５１、１１２、１１１、１１０、および１１からなる群から選

択される重鎖ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項18] 配列番号：２６の重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドを含む請求項１７に記載のベクター。

[請求項19] 配列番号：１６３、６８、６７および１２からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ１、配列番号：７１、６９、および１３からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１６４、４８、４７および１４からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項20] 配列番号：２７の軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドを含む請求項１９に記載のベクター。

[請求項21] （１）配列番号：９で表される重鎖ＣＤＲ１、配列番号：１６１、１６０、１５９、１５７、１５６、１５５、１５３、１０８、１０７、１０６、１０５、１０４、１０３、１０２、１０１、および１００からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１５８、１５４、１５２、１５１、１１２、１１１、１１０、および１１からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、および、

（２）配列番号：１６３、６８、６７および１２からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ１、配列番号：７１、６９、および１３からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１６４、４８、４７および１４からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項22] （１）配列番号：９で表される重鎖ＣＤＲ１、配列番号：１６１、１６０、１５９、１５７、１５６、１５５、１５３、１０８、１０７、１０６、１０５、１０４、１０３、１０２、１０１、および１００からなる群から選択される重鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１５８、１５４、１５２、１５１、１１２、１１１、１１０、および１１か

らなる群から選択される重鎖ＣＤＲ３を含む重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、ならびに、配列番号：２６で表される重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチド、および

（２）配列番号：１６３、６８、６７および１２からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ１、配列番号：７１、６９、および１３からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ２、ならびに配列番号：１６４、４８、４７および１４からなる群から選択される軽鎖ＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、ならびに、配列番号：２７で表される軽鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドを含むベクター。

［請求項23］ 配列番号：２６で表される重鎖定常領域をコードするポリヌクレオチドにおいて、ＥＵナンバリングで表される221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択されるアミノ酸の少なくとも１つの置換をコードする変異ヌクレオチドを含む請求項１８または２２に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

［請求項24］ 請求項１７および請求項１９に記載のベクター、請求項１８および２０に記載のベクター、請求項２１または請求項２２に記載のベクタ

ーを含む宿主細胞。

[請求項25] 請求項２３に記載のベクターを含む宿主細胞。

[請求項26] 前記宿主細胞が、糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞である請求項２５に記載の宿主細胞。

[請求項27] 前記糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞が、フコシルトランスフェラーゼ、フコーストランスポーター、ＧＭＤ（ＧＤＰ－マンノース４，６－デヒドラターゼ）、Ｆｘ（ＧＤＰ－ケト－６－デオキシマンノース３，５－エピメラーゼ，４－レダクターゼ）、およびＧＦＰＰ（ＧＤＰ－β－Ｌ－フコースピロフォスフォリラーゼ）からなる群から選択される機能性タンパク質の一つまたはそれ以上が欠損している宿主細胞である請求項２６に記載の宿主細胞。

[請求項28] 前記宿主細胞が、糖鎖にバイセクティングN-アセチルグルコサミン構造を形成する能力を有する宿主細胞である請求項２５に記載の宿主細胞。

[請求項29] 前記糖鎖にバイセクティングN-アセチルグルコサミン構造を形成する能力を有する宿主細胞が、β（１，４）－ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を有し、およびゴルジ常在ポリペプチドの機能性のゴルジ局在化ドメインをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞である請求項２８に記載の宿主細胞。

[請求項30] マンノシダーゼＩＩの局在化ドメイン、β（１，２）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩの局在化ドメイン、β（１，２）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩの局在化ドメイン、マンノシダーゼＩの局在化ドメイン、およびα１－６コアフコシルトランスフェラーゼの局在化ドメインからなる群から選択される機能性のゴルジ局在化ドメインをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含み、β（１，４）－ガラクトシルトランスフェラーゼの触媒ドメインを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞である請求項２９に記載の宿主細胞。

[請求項31] 宿主細胞が、ＣＨＯ細胞、ＢＨＫ細胞、ＮＳ０細胞、ＳＰ２／０細胞、ＹＯ骨髄腫細胞、Ｐ３Ｘ６３マウス骨髄腫細胞、ＰＥＲ細胞、ＰＥＲ．Ｃ６細胞、ＨＥＫ２９３細胞、またはハイブリドーマ細胞からなる群から選択される宿主細胞である請求項２４から３０のいずれかに記載の宿主細胞。

[請求項32] 請求項２４から３１のいずれかに記載の宿主細胞の培養液から回収することを含む請求項１から１６のいずれかに記載の抗体を製造する方法。

[請求項33] 請求項３２に記載の方法によって製造された抗体。

[請求項34] 増殖抑制剤または細胞傷害性物質が連結された請求項３３に記載の抗体。

[請求項35] 請求項１から１６または請求項３３から３４のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む医薬組成物。

[請求項36] 請求項１から１６または請求項３３から３４のいずれかに記載の抗体を有効成分として含む癌治療剤または癌の再発もしくは転移抑制剤。

[請求項37] 癌が、大腸癌、肺腺癌、膵癌、胃癌、および腎癌からなる群から選択されるいずれかの癌である請求項３６に記載の癌治療剤または癌の再発もしくは転移抑制剤。

[請求項38] 前記大腸癌が、低分化大腸癌、中分化大腸癌、高分化大腸癌である請求項３７に記載の癌治療剤または癌の再発もしくは転移抑制剤。

[請求項39] 前記癌治療剤が投与される対象が、単離された組織標品で検出されたEpiregulinタンパク質が発現している癌細胞を含む対象である、請求項３６から３８のいずれかに記載の癌治療剤または癌の再発もしくは転移抑制剤。