

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6951973号

(P6951973)

(45) 発行日 令和3年10月20日 (2021. 10. 20)

(24) 登録日 令和3年9月29日 (2021. 9. 29)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/30 (2006. 01)	C O 7 K 16/30 Z N A
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46
C O 7 K 19/00 (2006. 01)	C O 7 K 19/00
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13

請求項の数 49 (全 187 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-526592 (P2017-526592)	(73) 特許権者	503188759
(86) (22) 出願日	平成27年11月12日 (2015. 11. 12)		シージェン インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2018-503600 (P2018-503600A)		アメリカ合衆国 ワシントン州 9802
(43) 公表日	平成30年2月8日 (2018. 2. 8)		1、ボセル、サーティース ドライブ エ
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/060287		ス. イー. 21823
(87) 国際公開番号	W02016/077526	(74) 代理人	100105957
(87) 国際公開日	平成28年5月19日 (2016. 5. 19)		弁理士 恩田 誠
審査請求日	平成30年11月9日 (2018. 11. 9)	(74) 代理人	100068755
(31) 優先権主張番号	62/078, 610		弁理士 恩田 博宣
(32) 優先日	平成26年11月12日 (2014. 11. 12)	(74) 代理人	100142907
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 本田 淳
(31) 優先権主張番号	62/102, 527	(74) 代理人	100152489
(32) 優先日	平成27年1月12日 (2015. 1. 12)		弁理士 中村 美樹
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリカン相互作用化合物及び使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 配列番号 108 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、
 (b) 配列番号 123 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、
 (c) 配列番号 135 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、
 (d) 配列番号 81 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、
 (e) 配列番号 84 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、
 (f) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、を含む抗体またはその抗体

断片であって、

前記抗体またはその抗体断片が、シアリル化された T n 抗原 (S T n) に結合する、抗体またはその抗体断片。

【請求項 2】

モノクローナル抗体またはその抗体断片である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗体断片。

【請求項 3】

ヒト化抗体またはその抗体断片である、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗体断片。

【請求項 4】

I g G 1 アイソタイプまたは I g G 2 アイソタイプである、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片。

10

20

【請求項 5】

前記抗体またはその抗体断片はN - アセチルノイラミンシアリルT n抗原 (A c S T n) 及びN - グリコリルノイラミンシアリルT n抗原 (G c S T n) の少なくとも一方に特異的に結合する、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片。

【請求項 6】

前記 A c S T n および G c S T n の少なくとも一方は9 - O - アセチル基を含む、請求項 5 に記載の抗体またはその抗体断片。

【請求項 7】

前記抗体またはその抗体断片は二重特異的抗体を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片。

10

【請求項 8】

配列番号 3 7 のアミノ酸配列と 9 5 % 以上同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (V H) と、

配列番号 3 8 のアミノ酸配列と 9 5 % 以上同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (V L) とを含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗体断片。

【請求項 9】

配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (V H) と、
配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (V L) とを含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗体断片。

20

【請求項 1 0】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片と、治療剤または細胞傷害剤とを含む、抗体薬物複合体。

【請求項 1 1】

細胞傷害剤を含む、請求項 1 0 に記載の抗体薬物複合体。

【請求項 1 2】

前記細胞傷害剤は前記抗体またはその抗体断片に直接接合されている、請求項 1 1 に記載の抗体薬物複合体。

【請求項 1 3】

前記細胞傷害剤はリンカーを介して前記抗体またはその抗体断片に接合されている、請求項 1 1 に記載の抗体薬物複合体。

30

【請求項 1 4】

前記リンカーは切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカーである、請求項 1 3 に記載の抗体薬物複合体。

【請求項 1 5】

前記抗体薬物複合体は細胞傷害剤を含んでおり、前記細胞傷害剤はDNA損傷剤または細胞骨格阻害剤である、請求項 1 0 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の抗体薬物複合体。

【請求項 1 6】

前記細胞骨格阻害剤は、メイタンシンまたはアウリスタチンである、請求項 1 5 に記載の抗体薬物複合体。

【請求項 1 7】

前記アウリスタチンは、モノメチルアウリスタチン E (M M A E) 又はモノメチルアウリスタチン F (M M A F) である、請求項 1 6 に記載の抗体薬物複合体。

40

【請求項 1 8】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗体断片、または、請求項 1 0 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の抗体薬物複合体を含む薬学組成物。

【請求項 1 9】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗体断片、または、請求項 1 0 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の抗体薬物複合体、及びこれの使用指針を含むキット。

【請求項 2 0】

腫瘍細胞を死滅させるための薬学組成物であって、

50

前記組成物の前記抗体が前記腫瘍細胞に接触させられる、請求項 1 8 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 1】

治療が必要な対象において癌を治療するための薬学組成物であって、前記組成物が前記対象に投与される、請求項 1 8 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 2】

前記癌は上皮癌を含む、請求項 2 1 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 3】

前記癌は乳癌、大腸癌、肺癌、膀胱癌、子宮頸癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌及び肝癌の少なくとも 1 つである、請求項 2 1 に記載の薬学組成物。

10

【請求項 2 4】

前記癌は小細胞肺癌、子宮内膜癌、胃癌、または膵臓癌である、請求項 2 1 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 5】

対象で腫瘍容積を減少させるための薬学組成物であって、前記組成物が前記対象に投与される、請求項 1 8 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 6】

対象で抗腫瘍細胞免疫活性を増加させるための薬学組成物であって、前記組成物の前記抗体が 1 つ以上の免疫耐性腫瘍細胞に接触させられる、請求項 1 8 に記載の薬学組成物。

20

【請求項 2 7】

前記抗腫瘍細胞免疫活性は先天的免疫活性を含む、請求項 2 6 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 8】

前記先天的免疫活性はナチュラルキラー（NK）細胞の抗腫瘍細胞活性を含む、請求項 2 7 に記載の薬学組成物。

【請求項 2 9】

前記抗腫瘍細胞免疫活性は後天的免疫活性を含む、請求項 2 6 に記載の薬学組成物。

【請求項 3 0】

前記後天的免疫活性は B 細胞の抗腫瘍細胞活性を含む、請求項 2 9 に記載の薬学組成物。

30

【請求項 3 1】

前記後天的免疫活性は樹状細胞（DC）の抗腫瘍細胞活性を含む、請求項 2 9 に記載の薬学組成物。

【請求項 3 2】

前記組成物は CD 8 0、CD 8 6、IL - 1 2、及び TNF - α からなる群から選ばれた 1 つ以上の因子の DC 発現を増加させる、請求項 3 1 に記載の薬学組成物。

【請求項 3 3】

治療が必要な対象で免疫耐性腫瘍を治療するための薬学組成物であって、前記組成物が前記対象に投与される、請求項 1 8 に記載の薬学組成物。

【請求項 3 4】

対象から癌幹細胞（CSC）を減少または取り除くための薬学組成物であって、前記組成物が前記対象に投与される、請求項 1 8 に記載の薬学組成物。

40

【請求項 3 5】

前記 CSC は乳房組織、卵巣組織、膵臓組織、膀胱組織、子宮頸組織、大腸組織、及び肺組織の少なくとも 1 つに存在する、請求項 3 4 に記載の薬学組成物。

【請求項 3 6】

前記 CSC は CD 1 3 3 及び CD 4 4 バイオマーカーの少なくとも一方を含む、請求項 3 4 または 3 5 に記載の薬学組成物。

【請求項 3 7】

前記対象に 1 つ以上の化学療法剤がさらに投与される、請求項 2 1 ～ 3 6 のいずれか一

50

項に記載の薬学組成物。

【請求項 3 8】

前記 1 つ以上の化学療法剤はパクリタキセル及びカルボプラチンからなる群から選ばれる、請求項 3 7 に記載の薬学組成物。

【請求項 3 9】

(a) 配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、
 (b) 配列番号 1 2 3 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、
 (c) 配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、
 (d) 配列番号 8 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、
 (e) 配列番号 8 4 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、
 (f) 配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、を含む、可変ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、

10

前記可変ドメインが、シアリル化された T n 抗原 (S T n) に結合する、キメラ抗原受容体 (C A R)。

【請求項 4 0】

前記可変ドメインは、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (V H) と、配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (V L) とを含む、請求項 3 9 に記載の C A R。

【請求項 4 1】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片をコードする、核酸分子である構造体。

20

【請求項 4 2】

請求項 3 9 または 4 0 に記載の C A R をコードする、核酸分子である構造体。

【請求項 4 3】

請求項 4 1 または 4 2 に記載の構造体を含む単離細胞。

【請求項 4 4】

請求項 4 1 または 4 2 に記載の構造体を含むウィルス。

【請求項 4 5】

S T n を発現する細胞及び組織の少なくとも一方を同定する試験管内方法であって、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片を、前記細胞及び組織の少なくとも一方に接触させることを含む、方法。

30

【請求項 4 6】

組織または器官における癌性細胞を同定する試験管内方法であって、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片を、前記組織または器官の試料に接触させることを含む、方法。

【請求項 4 7】

前記組織または器官は乳房、卵巣または膵臓である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

組織または器官における癌性細胞を同定するための、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片を含む、薬学組成物。

40

【請求項 4 9】

前記組織または器官は乳房、卵巣または膵臓である、請求項 4 8 に記載の薬学組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

[関連する出願の参照]

本出願は 2 0 1 4 年 1 1 月 1 2 日に「グリカン相互作用化合物及び使用方法」という発明の名称で出願された米国特許仮出願第 6 2 / 0 7 8、6 1 0 号、2 0 1 5 年 1 月 1 2 日に「グリカン相互作用化合物及び使用方法」という発明の名称で出願された米国特許仮出願第 6 2 / 1 0 2、5 2 7 号、2 0 1 5 年 4 月 9 日に「癌幹細胞を標的化する組成物及び

50

方法」という発明の名称で出願された米国特許仮出願第62/145、214号、2015年6月10日に「グリカン相互作用化合物及び使用方法」という発明の名称で出願された米国特許仮出願第62/173、560号、及び2015年7月1日に「グリカン相互作用化合物及び使用方法」という発明の名称で出願された米国特許仮出願第62/187、587号に対する優先権を主張し、それぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる。

【0002】

[政府の資金援助]

本発明は、米国国立衛生研究所により与えられた助成金番号第HHSN261201400027C号の下で、米国政府の支援によってなされた。米国政府は、本発明に対する

10

【0003】

[配列表]

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、そのすべての内容は参照により本願に組み込まれる。このようなASCII複写本は2015年11月1日に生成され、名称は2033_1012PCT_SL.txtであり、そのサイズは144、772バイトである。

【0004】

[技術分野]

本発明は、有機体由来のグリコシル化 (glycosylation) された物質の検出及び／または除去のための抗体を含むがこれに限定されない化合物及び組成物の開発方法に関する。

20

【背景技術】

【0005】

異常な糖鎖形成 (glycosylation) は、癌腫 (carcinoma) でよく発見される他の突然変異のいくつかを伴う。すべての癌腫の約80%は、切断されたグリカンであるTn抗原及びシアリル化された形態のシアリルTn (STn) を発現すると推測される。ほぼ例外なく、Tn及びSTnは正常の健康な組織では発現されない。また、非ヒト免疫原性のシアル酸であるN-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) は、Neu5Gc-STn (GcSTn) の形態で乳癌のような癌腫で特異的に発現されると見られる。

30

【0006】

多数の異常な糖化形態がヒトの癌において記述されており、特定腫瘍の標的化に適切な細胞表面分子の部類として特定のグリカンが同定された (非特許文献1)。例えば、多様なヒトの癌の類型 (例えば、その中でも膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、肺癌、及び卵巣癌) は、正常なヒトの組織では珍しく、高いSTn抗原の発現を表す (非特許文献2、非特許文献3)。また、腫瘍-関連ムチン上のSTnの存在は予後不良の癌に関連しており、そのために癌の検出及び標的治療に対する魅力的なエピトープ (epitope) とされる (非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8)。Tn及びSTnの形成は、活性化T-シンターゼの形成に要求される分子シャペロンをコードする遺伝子Cosmcにおける体細胞の突然変異と関連がある (非特許文献9、非特許文献10)。これは、またシアリル転移酵素であるST6GalNAc-Iの増加された発現から起こり得る (非特許文献11、非特許文献12)。STnのデノボ (de-novo) 発現は癌腫細胞を調節して、悪性表現型を変化させて、より攻撃的な細胞行動を起こすことができる (非特許文献13)。STnは悪性組織において高度に発現されるが、健康なヒトの細胞でも低いレベルで発見される (非特許文献14、非特許文献15)。STnのみが癌の検出及び治療の標的として注目されている (非特許文献16)。STnはまた癌幹細胞に係るムチンにも存在し (非特許文献17)、STnは免疫抑制に関与する (非特許文献18)。

40

【0007】

50

S T n の存在以外に、他の糖化の変化が癌において記述されてきた。このうちの一つは Neu 5 G c に関連している。N - アセチルノイラミン酸 (Neu 5 A c) 及び Neu 5 G c は、哺乳類の細胞表面上の 2 種の主要なシアル酸である。Neu 5 A c と Neu 5 G c は、Neu 5 G c が 5 番炭素に付いている化学基に係る追加の酸素原子を含むということのみが異なる。機能的な遺伝子の損失により、ヒトは Neu 5 A c の形態でのみシアル酸を合成し、Neu 5 G c は合成することができない。しかし、Neu 5 G c は赤身肉のような動物由来の食餌供給源から代謝的にヒトに取り込まれる (非特許文献 19、非特許文献 20、特許文献 1、特許文献 2、特許文献 3、特許文献 4、及び特許文献 4)。Neu 5 G c は、ヒトの腫瘍の間に相当に豊富で (非特許文献 21、非特許文献 22、非特許文献 23、非特許文献 24、非特許文献 25、非特許文献 26 及び非特許文献 27)、正常なヒトの組織においては顕著に低い、これは数十年にわたって看過されてきた (非特許文献 28、非特許文献 29、非特許文献 30)。健康なヒトの組織に比べ、癌組織で食餌 - 誘導された Neu 5 G c の代謝蓄積の増加は少なくとも 3 つの要因: すなわち、競争的な内因性 Neu 5 A c の生産不足を伴う急速な成長、成長因子によって誘導された増加したマクロピノサイトシス (macropinositosis) (非特許文献 31、非特許文献 32、非特許文献 33、非特許文献 34)、及び、低酸素症によるリソソームのシアル酸トランスポーター遺伝子シアリンの遺伝子発現の上向き調節 (非特許文献 35) によって説明される。また、現在まで試験されたヒトはすべて非ヒト Neu 5 G c に対するポリクローナル抗体の貯蔵所を含むが、これは異種 (xeno) - 自家抗原の第一例になる (非特許文献 36、非特許文献 37)。抗 Neu 5 G c 反応に直面した悪性腫瘍における食餌 Neu 5 G c の蓄積は、低度の慢性炎症を誘導することで腫瘍の進行を促進させることが明らかになった (非特許文献 38)。従って、ヒトの腫瘍上にグリカンエピトープを含有する Neu 5 G c は薬物標的化のための重要な可能性を表す。最近の研究は癌患者における Neu 5 A c - S T n (AcSTn) でない Neu 5 G c - 含有 S T n (GcSTn) に対する抗体の存在を示唆し、癌検出のための特定バイオマーカーとしてこれの可能性を探求する (非特許文献 39)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献 1】米国特許第 7, 682, 794 号明細書

【特許文献 2】米国特許第 8, 084, 219 号明細書

【特許文献 3】米国特許出願公開第 2012/0142903 号明細書

【特許文献 4】国際公開第 2010/030666 号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献 1】Cheever, M. A. など、Clin Cancer Res. 2009 Sep 1; 15 (17): 5323 - 37

【非特許文献 2】Karlen, P. など、Gastroenterology. 1998 Dec; 115 (6): 1395 - 404

【非特許文献 3】Ohno, S. など、Anticancer Res. 2006 Nov - Dec; 26 (6A): 4047 - 53

【非特許文献 4】Cao, Y. など、Virchows Arch. 1997 Sep; 431 (3): 159 - 66

【非特許文献 5】Julien, S. など、Br J Cancer. 2009 Jun 2; 100 (11): 1746 - 54

【非特許文献 6】Itzkowitz, S. H. など、Cancer. 1990 Nov 1; 66 (9): 1960 - 6

【非特許文献 7】Motoo, Y. など、Oncology. 1991; 48 (4): 321 - 6

【非特許文献 8】Kobayashi, H. など、J Clin Oncol. 1992

10

20

30

40

50

- Jan; 10 (1) : 95 - 101
- 【非特許文献9】Ju、T. など、Nature. 2005 Oct 27; 437 (7063) : 1252
- 【非特許文献10】Ju、T. など、Cancer Res. 2008 Mar 15; 68 (6) : 1636 - 46
- 【非特許文献11】Ikehara、Y. など、Glycobiology. 1999 Nov; 9 (11) : 1213 - 24
- 【非特許文献12】Brockhausen、I. など、Biol Chem. 2001 Feb; 382 (2) : 219 - 32
- 【非特許文献13】Pinho、S. など、Cancer Lett. 2007 May 10 8; 249 (2) : 157 - 70
- 【非特許文献14】Jass、J. R. など、J Pathol. 1995 Jun; 176 (2) : 143 - 9
- 【非特許文献15】Kirkeby、S. など、Arch Oral Biol. 2010 Nov; 55 (11) : 830 - 41
- 【非特許文献16】Cheever、M. A. など、Clin Cancer Res. 2009 Sep 1; 15 (17) : 5323 - 37
- 【非特許文献17】Engelmanなど、Cancer research、2008、68、2419 - 2426
- 【非特許文献18】Carrascal、M. A. 、など、Molecular Oncology. 2014. 8 (3) : 753 - 65 20
- 【非特許文献19】Tangvoranuntakul、P. など、Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Oct 14; 100 (21) : 12045 - 50
- 【非特許文献20】Nguyen、D. H. など、J Immunol. 2005 Jul 1; 175 (1) : 228 - 36
- 【非特許文献21】Higashi、H. など、Cancer Res. 1985 Aug; 45 (8) : 3796 - 802
- 【非特許文献22】Miyoshi I. など、Mol Immunol. 1986. 23 : 631 - 638 30
- 【非特許文献23】Hirabayashi、Y. など、Jpn J Cancer Res. 1987. 78 : 614 - 620
- 【非特許文献24】Kawachi、S. など、Int Arch Allergy Appl Immunol. 1988. 85 : 381 - 383
- 【非特許文献25】Devine、P. L. など、Cancer Res. 1991. 51 : 5826 - 5836
- 【非特許文献26】Malykh、Y. N. など、Biochimie. 2001. 83 : 623 - 634
- 【非特許文献27】Inoue、S. など、2010. Glycobiology. 20 (6) : 752 - 762 40
- 【非特許文献28】Diaz、S. L. など、PLoS One. 2009. 4 : e4241
- 【非特許文献29】Tangvoranuntakul、P. など、Proc Natl Acad Sci U S A. 2003. 100 : 12045 - 12050
- 【非特許文献30】Varki、A. など、Glycoconj J. 2009. 26 : 231 - 245
- 【非特許文献31】Dharmawardhane、S. など、Mol Biol Cell. 2000 Oct; 11 (10) : 3341 - 52
- 【非特許文献32】Simonsen、A. など、Curr Opin Cell Biol. 2001 Aug; 13 (4) : 485 - 92 50

【非特許文献33】Johannes、L. など、Traffic. 2002 Jul ; 3 (7) : 443 - 51

【非特許文献34】Amyere、M. など、Int J Med Microbiol . 2002 Feb ; 291 (6 - 7) : 487 - 94

【非特許文献35】Yin、J. など、Cancer Res. 2006 Mar 15 ; 66 (6) : 2937 - 45

【非特許文献36】Padler - Karavani、V. など、Glycobiology. 2008 Oct ; 18 (10) : 818 - 30

【非特許文献37】Varki、N. M. など、Annu Rev Pathol. 2011 ; 6 : 365 - 93

【非特許文献38】Hedlund、M. など、Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 2 ; 105 (48) : 18936 - 41

【非特許文献39】Padler - Karavani、V. など、Cancer Res . 2011 May 1 ; 71 (9) : 3352 - 63

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

疾病並びに疾患のある細胞及び組織に関連するグリカンを含む、各種のグリカンに結合できる抗体に対する必要性が当業界に残っている。このような抗体は、腫瘍細胞及び癌組織を標的化して癌を患っている対象の治療に使用される。また、このような抗体を開発するより良い方法だけでなく、グリカン相互作用抗体によって結合されたエピトープの特異的な特性分析のための方法に対する必要性が依然として存在する。本発明はグリカンを標的化する抗体を提供し、抗グリカン抗体の開発方法を提供し、疾患の診断及び治療において癌細胞及び組織の確認及び標的化で抗グリカン抗体を使用する方法を提供することでこのような要求を満たす。

【課題を解決するための手段】

【0011】

一部の具現例において、本発明は可変ドメインを含む抗体を提供し、このような可変ドメインは配列番号15～52、またはこの断片からなる群から選択されたアミノ酸配列と95%以上のアミノ酸配列の同一性を含む。一部の場合、このような抗体は配列番号29及び配列番号30と、配列番号15及び配列番号16と、配列番号17及び配列番号18と、配列番号19及び配列番号20と、配列番号21及び配列番号22と、配列番号23及び配列番号24と、配列番号25及び配列番号26と、配列番号27及び配列番号28と、配列番号31及び配列番号32と、配列番号35及び配列番号36と、配列番号37及び配列番号38と、配列番号39及び配列番号40と、配列番号42及び配列番号32と、配列番号44及び配列番号45と、配列番号46及び配列番号32と、配列番号47及び配列番号32と、配列番号48及び配列番号50と、配列番号48及び配列番号49と、配列番号51及び配列番号52と、からなる群から選択された可変ドメイン対を含む。

【0012】

本発明の一部の抗体は、配列番号81～148、配列番号152～155、及び配列番号159～164からなる群から選択されたアミノ酸配列と約60%～約95%の配列同一性を含む一つ以上の相補性決定領域(CDR)を含む。一部の場合、このような抗体は配列番号81～99、配列番号143～148、及び配列番号152～155からなる群から選択されたアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を含む重鎖の可変ドメイン(VH)CDR(CDR-H)を有するCDRを含む。一部の抗体は配列番号90～99、及び配列番号152～155からなる群から選択されたアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。一部の場合、抗体は配列番号100～142、及び配列番号159～164からなる群から選択されたアミノ酸配列と70%以上の配列同一性を含む軽鎖の可変ドメイン(VL)CDR(CDR-L)を含む。このような抗体は配列番号127～142からなる群

から選択されたアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む。

【0013】

一部の具現例において、本発明は(1)配列番号100~114、及び配列番号159~167からなる群から選択されたCDR-L1と、(2)配列番号115~126、及び配列番号168~170からなる群から選択されたCDR-L2と、(3)配列番号127~142、及び配列番号171~173からなる群から選択されたCDR-L3と、(4)配列番号81~83、及び配列番号143、及び144からなる群から選択されたCDR-H1と、(5)配列番号84~89、及び配列番号145~151からなる群から選択されたCDR-H2と、(6)配列番号90~99、及び配列番号152~158からなる群から選択されたCDR-H3と、を含む抗体を提供する。

10

【0014】

本発明の一部の抗体はモノクローナル抗体である。一部の抗体はIgG1アイソタイプ(isotype)を含む。他の抗体はIgG2アイソタイプを含む。一部の場合、本発明の抗体は第1群抗体、第2群抗体、第3群抗体及び第4群抗体からなる群から選択された抗体群に属する。一部の抗体はN-アセチルノイラミンシアリルTn抗原(AcSTn)及びN-グリコリルノイラミンシアリルTn抗原(GcSTn)からなる群から選択された抗原を特異的に標的化する。このような抗体は9-O-アセチル基を含む抗原を標的化する。一部の抗体は2つ以上のグリカンからなるクラスターに結合する。追加の抗体は二重特異性(bispecific)抗体を含む。

20

【0015】

一部の具現例において、本発明の抗体は抗体-薬物接合体を含む。一部の抗体-薬物接合体は治療剤を含む。一部の抗体-薬物接合体は細胞傷害剤を含む。一部の場合、細胞傷害剤は抗体に直接接合される。一部の場合、細胞傷害剤はリンカー(linker)を介して抗体に接合される。このようなリンカーは切断可能なリンカー、または切断-不可能なリンカーを含んでもよい。一部の場合、細胞傷害剤はDNA損傷剤である。一部の場合、細胞傷害剤は細胞骨格阻害剤である。

【0016】

一部の具現例によると、本発明の抗体は腫瘍関連炭水化物抗原(TACA)に結合する。このようなTACAはTn抗原、シアリル化されたTn抗原(STn)、トムゼン・フリーデンライヒ(Thomsen-Friedenreich)抗原、ルイス^Y(Le^Y)抗原、ルイス^X(Le^X)抗原、シアリルルイス^X(SLe^X)抗原、シアリルルイス^A(SLe^A)抗原、グロボ(Globo)H、段階特異性胚抗原-3(SSEA-3)、シアル酸を含むグリコスフィンゴリピド、ガングリオシドGD2、ガングリオシドGD3、ガングリオシドGM2、フコシルGM1、ガングリオシドNeu5GcGM3、またはポリシアル酸-関連抗体を含む。

30

【0017】

一部の具現例において、本発明は腫瘍細胞を本発明の抗体と接触させることを含む、腫瘍細胞を死滅させる方法を提供する。

他の具現例によると、本発明は癌の治療を必要とする対象において癌を治療する方法を提供し、このような方法は対象に本発明の抗体を投与することを含む。一部の場合、このような方法は上皮癌の治療に用いられる。このような上皮癌は乳癌、大腸癌、肺癌、膀胱癌、子宮頸癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌及び／または肝臓癌を含む。

40

【0018】

一部の態様において、本発明は本発明の抗体を1つ以上含む組成物を提供する。また、このような組成物及びこの使用指針を含むキットが提供される。

一部の具現例において、本発明は対象に本発明の組成物を投与することを含む、対象において腫瘍の大きさを減少させる方法を提供する。一部の場合、本発明の方法は1つ以上の免疫耐性腫瘍細胞を本発明の抗体と接触させることで抗腫瘍細胞の免疫活性を増加させることに使用される。このような抗腫瘍細胞の免疫活性は、先天的な免疫活性(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞の抗腫瘍細胞活性)を含む。一部の場合、抗腫瘍細胞の活

50

性は後天的な免疫活性（例えば、B細胞の抗腫瘍細胞活性、または樹状細胞（DC）の抗腫瘍細胞活性）を含む。一部の場合、本発明の組成物はCD80、CD86、IL-12、及びTNF- α からなる群から選択された1つ以上の因子のDC発現を増加させる。また、本発明の方法は、免疫-耐性腫瘍の治療を必要とする対象に本発明の組成物を投与することでこれを治療することを含む。

【0019】

一部の具現例によると、本発明は対象に本発明の抗体を投与することを含む、対象から腫瘍幹細胞（CSC）を減少、または除去する方法を提供する。一部の場合、CSCは乳房、卵巣、脾臓、膀胱、子宮頸部、大腸及び／または肺組織に存在する。一部の場合、CSCはCD133及び／またはCD44のバイオマーカーを含む。一部の場合、CSCを減少、または除去する方法は1つ以上の化学療法剤の投与を含む。このような化学療法剤はパクリタキセル及びカルボプラチンから選択される。

10

【0020】

一部の態様において、本発明は配列番号15～52及びこの断片からなる群から選択されたアミノ酸配列と95%以上のアミノ酸配列の同一性を含む可変ドメインを含むイントラボディ（intrabody）を提供する。一部のイントラボディは配列番号29及び配列番号30と、配列番号15及び配列番号16と、配列番号17及び配列番号18と、配列番号19及び配列番号20と、配列番号21及び配列番号22と、配列番号23及び配列番号24と、配列番号25及び配列番号26と、配列番号27及び配列番号28と、配列番号31及び配列番号32と、配列番号35及び配列番号36と、配列番号37及び配列番号38と、配列番号39及び配列番号40と、配列番号42及び配列番号32と、配列番号44及び配列番号45と、配列番号46及び配列番号32と、配列番号47及び配列番号32と、配列番号48及び配列番号50と、配列番号48及び配列番号49と、配列番号51及び配列番号52と、からなる群から選択された可変ドメイン対を含む。

20

【0021】

他の態様において、本発明は配列番号15～52及びこの断片からなる群から選択されたアミノ酸配列と95%以上のアミノ酸配列の同一性を含む可変ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）を提供する。一部のCARは配列番号29及び配列番号30と、配列番号15及び配列番号16と、配列番号17及び配列番号18と、配列番号19及び配列番号20と、配列番号21及び配列番号22と、配列番号23及び配列番号24と、配列番号25及び配列番号26と、配列番号27及び配列番号28と、配列番号31及び配列番号32と、配列番号35及び配列番号36と、配列番号37及び配列番号38と、配列番号39及び配列番号40と、配列番号42及び配列番号32と、配列番号44及び配列番号45と、配列番号46及び配列番号32と、配列番号47及び配列番号32と、配列番号48及び配列番号50と、配列番号48及び配列番号49と、配列番号51及び配列番号52と、からなる群から選択された可変ドメイン対を含む。

30

【0022】

一部の具現例において、本発明は本発明の抗体をコードする構造体を提供する。このような構造体は配列番号192～233及びこの断片からなる群から選択されたヌクレオチド配列と95%以上の配列同一性を有する1つ以上のヌクレオチド配列を含む。一部の場合、本発明の構造体は本発明のイントラボディまたはCARをコードする。

40

【0023】

また、本発明の1つ以上の構造体を含む細胞が提供される。また、本発明の構造体を含むウイルスが提供される。

一部の具現例によると、本発明は本発明の抗体によってSTnを発現する細胞及び／または組織を同定する方法を提供する。また、本発明の抗体として組織、または器官で癌細胞を同定する方法が提供される。このような組織または器官は乳房、卵巣及び脾臓を含む。

【0024】

一部の具現例において、本発明の抗体の配列分析に基づいた変異体を含む抗体変異体を

50

提供する。このような抗体変異体は改善されたエピトープの特異性及び／または親和性を含む。一部の抗体変異体はCDRの長さの改変（例えば、CDR-H3の長さの改変）を含む。一部の抗体変異体1つ以上のCDRで1つ以上のアミノ酸の置換を含む。一部の場合、抗体変異体は1つ以上の生息細胞の遺伝子改変を含む。一部の抗体変異体はscFv、モノボディ（monobody）、ディアボディ（diabody）、イントラボディ、CARまたは抗体模倣体を含む。

【0025】

一部の態様において、本発明は（1）本発明の2つ以上の抗体間の可変ドメインのアミノ酸配列を整列するステップと、（2）整列された抗体間で定常及び可変アミノ酸を同定するステップと、（3）抗体断片のディスプレイライブラリーを構築するステップと、を含む、抗体断片のディスプレイライブラリーを開発する方法を提供し、ここで、ライブラリー構成要素の間の可変性は同定された可変アミノ酸のアミノ酸の変動に制限される。追加の具現例はこのような方法によって製造された抗体断片のディスプレイライブラリーを提供する。追加の具現例はこのような抗体断片のディスプレイライブラリーから単離された可変ドメインを含む抗体を提供する。このような抗体はscFv、モノボディ、ディアボディ、イントラボディ、CAR、または抗体模倣体を含む。

【0026】

前述した目的及び他の目的、特徴及び利点は添付の図面に示されたように、本発明の特定の具現例に対する以下の説明から明白になるだろう。図面は、必ずしも実際の尺度に比例する図ではなく、むしろ本発明の多様な具現例の原理を説明することに主眼を置いたものとなっている。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A】 $\alpha 2, 6$ -シアリル化N-アセチルガラクトサミン（STn）及び抗STn抗体結合に係る推定エピトープを示す図面である。図1A～図1Dの各図において、最も大きい楕円は4つの抗体群それぞれによって標的化されたSTnの特定領域を示す。このような群は第1群抗体（図1Aに示された大きい楕円領域に結合する）、第2群抗体（図1Bに示された大きい楕円領域に結合する）、第3群抗体（図1Cに示された大きい楕円領域に結合する）、及び第4群抗体（図1Dに示された大きい楕円領域に結合する）を含む。

【図1B】 $\alpha 2, 6$ -シアリル化N-アセチルガラクトサミン（STn）及び抗STn抗体結合に係る推定エピトープを示す図面である。図1A～図1Dの各図において、最も大きい楕円は4つの抗体群それぞれによって標的化されたSTnの特定領域を示す。このような群は第1群抗体（図1Aに示された大きい楕円領域に結合する）、第2群抗体（図1Bに示された大きい楕円領域に結合する）、第3群抗体（図1Cに示された大きい楕円領域に結合する）、及び第4群抗体（図1Dに示された大きい楕円領域に結合する）を含む。

【図1C】 $\alpha 2, 6$ -シアリル化N-アセチルガラクトサミン（STn）及び抗STn抗体結合に係る推定エピトープを示す図面である。図1A～図1Dの各図において、最も大きい楕円は4つの抗体群それぞれによって標的化されたSTnの特定領域を示す。このような群は第1群抗体（図1Aに示された大きい楕円領域に結合する）、第2群抗体（図1Bに示された大きい楕円領域に結合する）、第3群抗体（図1Cに示された大きい楕円領域に結合する）、及び第4群抗体（図1Dに示された大きい楕円領域に結合する）を含む。

【図1D】 $\alpha 2, 6$ -シアリル化N-アセチルガラクトサミン（STn）及び抗STn抗体結合に係る推定エピトープを示す図面である。図1A～図1Dの各図において、最も大きい楕円は4つの抗体群それぞれによって標的化されたSTnの特定領域を示す。このような群は第1群抗体（図1Aに示された大きい楕円領域に結合する）、第2群抗体（図1Bに示された大きい楕円領域に結合する）、第3群抗体（図1Cに示された大きい楕円領域に結合する）、及び第4群抗体（図1Dに示された大きい楕円領域に結合する）を含む。

。

【図2】抗体結合データを示す棒グラフであり、図2AはOVCA R3細胞による抗体結合の結果を示す棒グラフ、図2Bは、SNU-16細胞による抗体集合の結果を示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0028】

[序論]

本発明によると、本願においてグリカンと称される炭水化物基を含むエピトープに特異的であるか、またはこれと相互作用する抗体である。本願に記載された一部のグリカン相互作用抗体は生物学的治療剤として使用されることができる。他の具現例はこのようなグリカン相互作用抗体を製造する方法を提供する。

10

【0029】

本来、グリカンはN - アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) またはN - グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) によってシアリル化される。本発明によるグリカン相互作用抗体は、 $\alpha 2, 6$ - シアリル化N - アセチルガラクトサミン (STn) を含む癌関連グリカンに向けられる。このような抗体は任意のSTn (pan-STn抗体)、Neu5Acを特異的に有するSTnを含むグリカン (AcSTn) またはNeu5Gcを特異的に含むSTnを有するグリカン (GcSTn) を標的化することができる。一部の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体は他の癌関連グリカン抗原を標的化する。

20

【0030】

一部の具現例において、本発明はグリカン相互作用抗体を製造する方法を提供する。このような方法はSTn (例えば、AcSTn及び／またはGcSTn) を含む1つ以上の抗原に対して免疫反応を生成するためのマウスの使用を含む。本願に記載されたように、マウスの免疫化を介して生産された生成された抗体を操作するために多数の方法が用いられる。このような方法は免疫化されたマウスの系統及び／または性別を変化させること、使用された抗原を変化させること、抗原投与に含まれる補助剤の種類及び投与量及びハイブリドーマ融合の開始前に免疫化の時間経過を変化させることを含む。

【0031】

一部の具現例において、本発明はグリカン相互作用抗体を使用して癌幹細胞を取り除く方法を提供する。他の具現例において、本発明はグリカン相互作用抗体を使用して癌幹細胞を除去することによって対象において癌を治療する方法を提供する。一部の態様において、グリカン相互作用抗体は単独で使用される。他の態様において、グリカン相互作用抗体は化学療法剤と併用して使用される。

30

【0032】

また、最適化かつヒト化され、接合された形態のグリカン相互作用抗体が提供される。追加で、本発明の抗体及び／または方法を含むキット、分析法及び試薬が提示される。

[定義]

隣接した：本願において用いられたように、用語「隣接した」は与えられた実体と隣接する、隣り合う、または隣に位置することを称する。一部の具現例において、「隣接した残基」は互いが連結されたグリカン鎖内の糖残基である。一部の具現例において、「隣接したグリカン」は直接接触するか、または近接で2つの間に他のグリカンがない隣り合うグリカン鎖である。

40

【0033】

併用投与される：本願において用いられたように、用語「併用投与される」または「併用された投与」は、対象がある時点で同時に両方に露出されるように、及び／または対象において各製剤の効果が重畳されるように、対象が投与される2種以上の製剤に同時に露出されるか、またはある時間の間隔以内に露出されることを意味する。一部の具現例において、1つ以上の製剤の1回以上の投与量は、1つ以上の他の製剤の1回以上の投与量の約24時間、12時間、6時間、3時間、1時間、30分、15分、10分、5分または1分以内に投与される。一部の具現例において、投与は重畳された投与療法で発生する。

50

本願において用いられたように、「投与療法」は時間上の離隔された複数の投与を称する。このような投与は一定間隔で発生するか、または投与のうち1つ以上の中断を含む。一部の具現例において、本願に記載されたように1つ以上のグリカン相互作用抗体の個別的な投与量の投与は、併用的（例えば、上昇的）効果が達成されるように互いに十分に近く離隔されている。

【0034】

アミノ酸：本願において用いられたように、用語「アミノ酸」及び「複数のアミノ酸」はすべて自然発生的なL-アルファアミノ酸及び非自然発生的なアミノ酸を称する。アミノ酸は以下のように1文字または3文字で示される：アスパラギン酸（Asp：D）、イソロイシン（Ile：I）、トレオニン（Thr：T）、ロイシン（Leu：L）、セリン（Ser：S）、チロシン（Tyr：Y）、グルタミン酸（Glu：E）、フェニルアラニン（Phe：F）、プロリン（Pro：P）、ヒスチジン（His：H）、グリジン（Gly：G）、リジン（Lys：K）、アラニン（Ala：A）、アルギニン（Arg：R）、システイン（Cys：C）、トリプトファン（Trp：W）、バリン（Val：V）、グルタミン（Gln：Q）、メチオニン（Met：M）、アスパラギン（Asn：N）、ここで、アミノ酸は最初の3桁と1桁の文字コードがそれぞれ括弧内に表示される。

10

【0035】

動物：本願において用いられたように、用語「動物」は動物界の任意の構成要素を称する。一部の具現例において、「動物」は任意の発達段階のヒトを称する。一部の具現例において、「動物」は任意の発達段階の非ヒト動物を称する。特定の具現例において、非ヒト動物は哺乳類（例えば、齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、犬、猫、羊、牛、霊長類または豚）である。一部の具現例において、動物は非制限的に哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類及び虫を含む。一部の具現例において、動物は形質転換動物、遺伝的に操作された動物または複製動物である。

20

【0036】

抗体：本願において用いられたように、「抗体」は最広義の意味で使用され、非制限的にモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、2つ以上のインタクト抗体から形成された二重特異性抗体）及び、これらが目的とする生物学的活性を表す限りディアボディなどの抗体断片を含む特に多様な具現例を包含する。抗体は主にアミノ酸を基礎とする分子であるが、糖部分構造のような1つ以上の修飾を含んでもよい。

30

【0037】

抗体断片：本願において用いられたように、用語「抗体断片」はインタクト抗体の一部を称し、好ましくはこの抗原結合領域を含む。抗体断片の例はFab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片と、ディアボディと、線状抗体と、一本鎖抗体分子と、抗体断片から形成される多重特異性抗体と、を含む。抗体のパパイン消化は「Fab」断片とも呼ばれる2つの同一の抗原結合断片を生成し、それぞれは単一抗原結合部位を有する。また、残余「Fc」断片が生成され、この名称は容易に結晶化（crystallize）される能力を反映する。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋結合させ得るF(ab')₂断片を生成する。グリカン相互作用抗体は、1つ以上のこのような断片を含む。本願の目的のため、抗体は重鎖及び軽鎖の可変ドメインのみならず、Fc領域を含む。

40

【0038】

およそ：本願において用いられたように、1つ以上の関心対象の値に適用されるものとして、「およそ」または「約」という用語は言及された基準値と類似した値を称する。特定の具現例において、用語「およそ」または「約」は、別に言及されるか、文脈上明らかな場合でなければ、言及された基準値のいずれかの方向に（超過または未満）25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%またはこの未満以内の値の範囲を称する（可能な値の100%を超える数は除く）。

50

【0039】

結合された：本願において用いられたように、用語「結合された」、「接合された」、「連結された」、「付着された」及び「束ねられた」は、2つ以上の部分構造に対して使用される場合、部分構造が直接的にまたはリンカーとして作用する1つ以上の追加の部分構造を介して互いに物理的に結合または連結され、構造体を使用される条件、例えば生理学的な条件下部分構造が物理的に結合されたままで維持されるように十分に安定した構造を形成することを意味する。「結合」は直接的な共有化学結合を介した厳格なものである必要はない。これは、また「結合された」実体が物理的に結合された状態を維持するように十分に安定したイオン結合または水素結合または混成化ベース連結を示唆する。

【0040】

二機能性：本願において用いられたように、用語「二機能性」は2つ以上の作用を行うか、または維持する任意の物質、分子または部分構造を意味する。このような作用は同一の結果または異なる結果に影響を及ぼす。このような作用を生成する構造体は同一であるか、または異なる。

【0041】

生体分子：本願において用いられたように、用語「生体分子」はアミノ酸ベース、核酸ベース、炭水化物ベースまたは脂質ベースなどの任意の天然分子である。

二重特異性抗体：本願において用いられたように、用語「二重特異性抗体」は2つの異なる抗原に結合する抗体を称する。このような抗体は典型的に2つ以上の異なる抗体からの領域を含む。二重特異性抗体はRietz et al., *Cancer Immunology*, 12:12-18, Marvin, J. S. など, 2005. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(6):649-58及びSchaefer, W. など, 2011. *PNAS*, 108(27):11187-92 (これらのそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる)に記載された任意のものを含む。

【0042】

分枝：本願において用いられたように、用語「分枝」は本(main)実体または源から連結されるか、または延びる実体、部分構造または付属体を称する。一部の具現例において、「分枝鎖」または「分枝された鎖」は母鎖から延長された1つ以上の残基(非制限的に糖残基を含む)を含む。本願において用いられたように「母鎖」は分子鎖が連結された残基(非制限的に糖残基を含む)の鎖を称するのに使用される。多数の分子を有するグリカンの場合、母鎖は、このようなすべての分枝が直接または間接的に付着する源の鎖を称してもよい。ヘキソース残基の鎖を含むポリサッカライドの場合、母鎖連結は典型的には隣接した残基の1番炭素と4番炭素の間で生じる一方、分枝鎖は、分枝残基の1番炭素とその分枝が延長された母残基の3番炭素の間の連結を介して、母鎖に付着される。本願において用いられたように、用語「分枝残基」は分枝鎖のうち母鎖に付着された残基を称する。

【0043】

癌幹細胞：本願において用いられたように、癌幹細胞(CSC)は自家再生能力を有した腫瘍細胞の下位部類を称する。CSCは多様な細胞類型を再生させることができる。一部の場合、このような細胞は腫瘍の手術的かつ化学的治療を介して除去することが難しいか、または不可能である。

【0044】

化合物：本願において用いられたように、用語「化合物」は別個の化学的な実体を称する。一部の具現例において、特定の化合物は1つ以上の異性体または同位体形態(非制限的に立体異性体、幾何異性体及び同位体を含む)で存在する。一部の具現例において、化合物はこのような単一形態でのみ提供されるか、または利用される。一部の具現例において、化合物は2種以上のこのような形態の混合物(非制限的に立体異性体のラセミ混合物を含む)として提供されるか、または利用される。当業者は一部の化合物がこのような異なる形態で存在し、異なる特性及び/または活性(非制限的に生物学的な活性を含む)を

10

20

30

40

50

表すことを認知する。このような場合、本発明に従って使用するために特定形態の化合物を選択するか、または回避することは当業者の通常の技術範囲以内である。例えば、非対称的に置換された炭素原子を含有する化合物は光学的に活性またはラセミ形態に単離される。光学的に活性である出発物質から光学的に活性な形態を製造する方法は、ラセミ混合物の分離または立体選択的な合成によるもののように当業界によく知られている。

【0045】

環状または環状の：本願において用いられたように、用語「環状」は連続の輪（loop）の存在を称する。環状分子は円形である必要はなく、ただ連結されてサブユニットの非切断された鎖を形成する。

【0046】

シチジンモノホスファート - N - アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ：本願において用いられたように、用語「シチジンモノホスファート - N - アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ」または「CMAH」はヒトには存在しないが、大半の他の哺乳類（非制限的にマウス、豚及びチンパンジーを含む）には存在する、N - アセチルノイラミン酸からN - グリコルノイラミン酸の形成を触媒する酵素を称する。ヒトにおけるこのような酵素の不在は、フレームシフト（frameshift）突然変異によってCMAH転写体が早期に終結され、非 - 機能的なたんぱく質の生産に起因する。

【0047】

細胞傷害性²⁰の：本願において用いられたように、用語「細胞傷害性の」は細胞（例えば、哺乳類の細胞（例えば、ヒト細胞））、バクテリア、ウィルス、菌類、原生動物、寄生虫、プリオンまたはこれらの組み合わせを死滅させるか、またはこれに有害、毒性、または致命的な影響を及ぼす製剤を称する。

【0048】

送達：本願において用いられたように、「送達」は化合物、物質、実体、部分構造、輸送物または搭載物を意図された目的地に輸送する行為または方式を称する。

送達剤：本願において用いられたように、「送達剤」は化合物、物質、実体、部分構造、輸送物または搭載物の生体内送達を最小限に部分的に容易にする任意の物質を称する。

【0049】

検出可能な標識：本願において用いられたように、「検出可能な標識」はまた他の実体に付着、統合または結合された1つ以上のマーカー、信号または部分構造を称し、このようなマーカー、信号または部分構造は放射線、蛍光、化学発光、酵素活性、吸光度などをはじめ当業界に公知の方法によって容易に検出される。検出可能な標識は、放射線同位体、蛍光物質、発色物質、酵素、染料、金属イオン、リガンド、例えばビオチン、アビジン、ストレプトアビジン及びハプテン、量子ドットなどを含む。検出可能な標識は付着、統合または結合されている実体の任意の位置に配置される。例えば、ペプチドまたはタンパク質に付着、統合または結合される場合、これらはアミノ酸、ペプチドまたはタンパク質内にあるか、またはN - またはC - 末端に位置する。

【0050】

ディスプレイライブラリー：本願において用いられたように、用語「ディスプレイライブラリー」は、生体分子の相互作用を確認するための科学的発見で使用されるツールを称する。バクテリオファージ、酵母及びリボソームの利用を含むディスプレイライブラリーの異なる変形が存在する。それぞれの場合、与えられたライブラリー内のタンパク質（本願において「ライブラリー構成要素」とも称される）はタンパク質をコードする核酸に（物理的にまたは宿主との結合を介して）連結される。標的分枝がディスプレイライブラリーの構成要素と共に培養（incubation）される場合、標的に結合する任意のライブラリーの構成要素は単離され、結合されたタンパク質をコードする配列は連結された核酸の分析を介して決定される。一部の具現例において、ディスプレイライブラリーは「ファージディスプレイライブラリー」であり、この際、このようなディスプレイライブラリーはバクテリオファージウィルス粒子（本願において「ファージ粒子」とも称される）から構成され、この際、核酸がファージゲノムに統合され、導入された核酸によってコー

10

20

30

40

50

ドされたタンパク質と融合されたウィルス外皮タンパク質を生産する。このような融合されたタンパク質は組み立てられたファージ粒子の外部表面上に「ディスプレイ」され、与えられた標的と相互作用することができる。

【0051】

遠位 (d i s t a l) : 本願において用いられたように、用語「遠位」は中心から遠くなるか、または関心のある地点または領域から遠ざかって位置することを意味する。

操作された: 本願において用いられたように、本発明の具現例は出発点、野生型または天然分子から変化した構造的または化学的特徴または特性を有するように考案される場合に「操作」される。従って、操作された製剤または実体は考案及び／または生産にヒトの行為が含まれたものである。

10

【0052】

エピトープ: 本願において用いられたように、「エピトープ」は非制限的に抗体を含む、免疫系の構成成分と相互作用できる分子の表面または領域を称する。一部の具現例において、エピトープは標的部位を含む。エピトープは対応する抗体によって特異的に認識されて結合される抗原上の領域または2つ以上の抗原間の領域を含む。一部のエピトープは1つ以上のグリカンに沿って1つ以上の糖残基を含む。このようなエピトープは1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個以上の糖残基を含む。エピトープはまた、複数の実体の間に1つ以上の相互作用領域を含む。一部の具現例において、エピトープは2つの糖残基の間、分枝鎖と母鎖との間またはグリカンとタンパク質との間の接合部を含む。

【0053】

エーテル結合: 本願において用いられたように、「エーテル結合」は2つの炭素原子の間に結合された酸素を含む化学的結合を称する。一部の具現例において、エーテル結合は、糖残基を、非制限的に他の糖残基を含む他の実体に連結させてグリカン鎖を形成する。このような結合は、また「グリコシド結合 (b o n d)」または「グリコシド結合 (l i n k a g e)」とも称される。1つ以上の糖残基という文脈で、用語「連結」及び／または「結合」はまた本願においてグリコシド結合を称する場合に使用される。一部の具現例において、結合は、非制限的にタンパク質、脂質、リン脂質及びスフィンゴ脂質を含む他の実体にグリカンを連結させることができる。一部の具現例において、糖残基は、典型的には糖残基とアミノ酸残基の間に連結を形成して、タンパク質に連結される。このようなアミノ酸残基はセリン及びトレオニンを含む。一部の具現例において、エーテル結合は結合形成に参加する炭水化物のリンカーを含むグリカンアレイにグリカンを連結させる。グリコシド結合はこの立体化学的特性が異なる。一部の具現例において、アルファ配向されたグリコシド結合（「アルファ結合」とも称される）は、エーテル結合の結合された酸素と糖残基のシクロヘキサン環との間に軸配向を引き起こす。一部の具現例において、ベータ配向されたグリコシド結合（「ベータ結合」とも称される）は、エーテル結合の結合された酸素と糖残基のシクロヘキサン環との間に赤道 (e q u a t o r i a l) 配向を引き起こす。

20

30

【0054】

発現: 本願において用いられたように、「発現」は以下の事象のうち1つ以上を称する: (1) DNA配列からRNA鋳型の生産 (例えば、転写によって) と、(2) RNA転写体の処理 (例えば、スプライシング、編集、5' キャップの形成、及び／または3' 末端処理によって) と、(3) RNAをポリペプチドまたはタンパク質に翻訳と、(4) ポリペプチドまたはタンパク質の折り畳みと、(5) ポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後の修飾 (例えば、糖化によって)。

40

【0055】

特徴: 本願において用いられたように、「特徴」は性質、特性または区別される要素を称する。

製剤: 本願において用いられたように、「製剤」は処方によって調製された物質または混合物を称し、1つ以上の抗体、化合物、物質、実体、部分構造、輸送物または搭載物及び送達剤、担体または賦形剤を含む。

50

【0056】

機能的な：本願において用いられたように、「機能的な」生物学的分枝はこれが特徴化される特性及び／または活性を表す構造及び形態を有する生物学的な実体である。本願において用いられたように、「官能基」または「化学基」はより大きい分子の一部分の原子または化学的結合の特徴的な基を称する。一部の具現例において、官能基は異なる分子と結合されるが、これが分子の一部分であるかとは関係なく類似した化学反応に参加できる。通常の官能基は非制限的にカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、アセチル基（ $-\text{COH}$ ）、アミノ基（ $-\text{NH}_2$ ）、メチル基（ $-\text{CH}_3$ ）、サルフェート（ $-\text{SO}_3\text{H}$ ）及びアセチル基を含む。一部の具現例において、分子に1つ以上の官能基を追加することは末端の「 $-\text{ylated}$ 」の炭水化物部分に官能基の名称を変形させる用語を使用して伝達される。

10

【0057】

グリカン：本願において用いられたように、用語「グリカン」、「オリゴサッカライド」及び「ポリサッカライド」は相互交換的に使用され、糖単量体から構成された重合体を称し、典型的に結合として本願において用いられたように称されるグリコシド結合によって結合される。一部の具現例において、用語「グリカン」、「オリゴサッカライド」及び「ポリサッカライド」は糖接合体（例えば、糖タンパク質、糖脂質またはプロテオグリカン）の炭水化物部分を称することに使用される。

【0058】

グリカン鎖：本願において用いられたように、用語「グリカン鎖」は2つ以上の糖を含む糖重合体を称する。一部の具現例において、グリカン鎖はタンパク質上でセリンまたはトレオニンを介してタンパク質に共有的に連結される。

20

【0059】

グリカン豊富組成物：本願において用いられたように、用語「グリカン豊富組成物」はグリカンを大きい比率で含める組成物を称する。一部の具現例において、グリカン豊富組成物内のグリカンは約1%～約10%、約5%～約15%、約20%～約40%、約30%～約50%、約60%～約80%、約70%～約90%または100%以上の組成物の総重量の量を含む。

【0060】

グリコシド結合：本願において用いられたように、用語「グリコシド結合」は炭水化物と、他の化学基との間に形成された共有結合を称する。一部の具現例において、グリコシド結合は1つの糖分子の還元末端と第2の糖分子またはポリサッカライド鎖の非還元末端の間に形成される。このようなグリコシド結合は結合された糖の間の酸素（またはエーテル結合）のためにO-グリコシド結合とも知られている。一部の具現例において、2つの糖の間または糖とリンカーの間のグリコシド結合はまた「結合」としてよく知られている。

30

【0061】

試験管内：本願において用いられたように、用語「試験管内」は有機体（例えば、動物、植物、微生物）内よりは人工的な環境、例えば試験管または反応容器、細胞培養、ペトリ皿などで発生する事象を称する。

40

【0062】

生体内：本願において用いられたように、用語「生体内」は有機体（例えば、動物、植物、微生物またはその細胞または組織）内で発生する事象を称する。

単離された：本願において用いられたように、用語「単離され」は「分離された」と同意語であるが、これは介入分離（*inference separation*）がヒトに手によって行われたことを称する。1つの具現例において、単離された物質または実体は（自然または実験環境と関係なく）これが以前関わった構成要素の最小限の一部分から分離されたものである。単離された物質はこれが結合された物質と関連して多様な水準の純度を有する。単離された物質及び／または実体は、これが初期に結合された他の構成成分の約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%

50

、または約90%以上に分離される。一部の具現例において、単離された製剤は約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約99%超で純粋である。本願において用いられたように、物質はこれが他の構成成分が実質的にない場合「純粋」である。

【0063】

キット：本願において用いられたように、用語「キット」は協働的な目的のために合わせられた1つ以上の構成成分及びその使用指針を含むセットを称する。

ノックアウト：本願において用いられたように、用語「ノックアウト」は既存の遺伝子が典型的にはヒトの手による処理を介して不活性化された有機体を称する。ノックアウト有機体において、不活性化された遺伝子は「ノックアウト」されたと称される。一部に具現例において、ノックアウトされた遺伝子はヌクレオチド配列を遺伝子に挿入することで、または遺伝子を全体的に置換することで不活性化される。

【0064】

リンカー：本願において用いられたように、用語「リンカー」は2つ以上のドメイン、部分構造または実体を連結する部分構造を称する。1つの具現例において、リンカーは10、11、12、13、14または15個以上の原子を含む。追加の具現例において、リンカーは原子群、例えば10～1000個の原子を含み、非制限的に炭素、アミノ、アルキルアミノ、酸素、硫黄、スルホキシド、スルホニル、カルボニル、及びイミンのような原子または基を含む。一部の具現例において、リンカーはアミノ酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含む。一部の具現例において、リンカーによって結合された部分構造は、非制限的に原子、化学基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核塩基、糖、核酸、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質複合体、搭載物（例えば、治療剤）またはマーカー（非制限的に化学マーカー、蛍光マーカー、放射線マーカーまたは生物発光マーカーを含む）を含む。リンカーは任意の有用な目的、例えば多量体または接合体の形成のみならず、本願に記載されたように搭載物の投与に使用される。リンカーに統合される化学基の例は非制限的にアルキル、アルケニール、アミド、アミノ、エーテル、チオエーテル、エステル、アルキルレン、ヘテロアルキルレン、アーリル、またはヘテロシクリルを含み、これらはそれぞれ本願に記載されたように選択的に置換される。リンカーの例は非制限的に不飽和されたアルカン、ポリエチレングリコール（例えば、エチレンまたはプロピレングリコール単量体単位、例えば、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、トリエチレングリコール、トリプロピレングリコール、テトラエチレングリコール、またはテトラエチレングリコール）及びデキストラン重合体を含む。他の例は、非制限的に還元剤または光分解を使用して切断できるリンカー内に切断可能な部分構造、例えば、ジスルフィド結合（-S-S-）またはアゾ結合（-N=N-）を含む。選択的に切断可能な結合の非制限的な例は、例えば、トリス（2-カルボキシエチル）ホスホン（TCPE）、または他の還元剤、及び／または光分解の使用によって切断されるアミドの結合のみならず、例えば酸または塩基の加水分解によって切断されるエステル結合を含む。一部の具現例において、リンカーはグリカンを含む物質、例えばグリカンアレイに連結することに使用された炭水化物部分構造である。このような炭水化物リンカーは非制限的に $-O(CH_2)_2CH_2HN_2$ 及び $-O(CH_2)_3NHCOCH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$ を含む。

【0065】

ムチン：本願において用いられたように、用語「ムチン」は高度に糖化されたタンパク質の群を称する。一部の具現例において、ムチンは顎下腺によって生成されて唾液及び粘液で発見される。

【0066】

陰性選択：本願において用いられたように、用語「陰性選択」は標的抗原を含まない組成物の実体及び／または構成成分に結合するこれらの能力に基づいてディスプレイライブラリーからライブラリーの構成要素を選択することを称する。一部の具現例において、陰性選択は非特異的に標的に結合する要素を取り除くために陽性選択の前に使用される。

【0067】

非標的：本願において用いられたように、用語「非標的」は1つ以上の標的、遺伝子または細胞転写体に対する任意の意図されない影響を称する。

患者：本願において用いられたように、用語「患者」は治療を求めるか、または必要とする、治療を要求する、治療を受ける途中の、治療を受ける予定である対象、または特定の疾患または状態に対して訓練された（例えば、免許がある）専門家によって治療中の対象を称する。

【0068】

ペプチド：本願において用いられたように、用語「ペプチド」は長さが50アミノ酸以下、例えば長さが約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50アミノ酸のタンパク質またはポリペプチドである。

10

【0069】

薬学的に許容される：語句「薬学的に許容される」は健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応または他の問題または合併症なしに合理的な利益／危険比率に対応する、ヒト及び動物の組織との接触に適切な化合物、物質、組成物、及び／または投与形態を称するために本願で使用される。

【0070】

薬学的に許容される賦形剤：本願において用いられたように、語句「薬学的に許容される賦形剤」は薬学的な組成物に存在し、患者に実質的に非毒性で非炎症性の特性を有する、活性剤（例えば、本願に記載されたように）以外の任意の成分であることを称する。一部の具現例において、薬学的に許容される賦形剤は活性剤を懸濁または溶解させるビヒクルである。賦形剤は例えば以下を含む：抗付着剤、抗酸化剤、結合剤、コーティング剤、圧縮補助剤、崩解剤、染料（着色剤）、軟化剤、柔和剤、充填剤（希釈剤）、フィルム形成剤またはコーティング剤、風味剤、香味剤、滑沢剤（流動改善剤）、潤滑剤、保存剤、印刷用インキ、吸着剤、懸濁剤または分散剤、甘未剤及び水和水。例示的な賦形剤は非制限的に以下を含む：ブチル化されたヒドロキシトルエン（BHT）、カルシウムカーボネート、カルシウムフォスフェート（2塩基性）、カルシウムステアレート、クロスカメロース、架橋結合されたポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスポビドン、システイン、エチルセルロース、ゼラチン、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、ラクトース、マグネシウムステアレート、マルチトール、マンニトール、メチオニン、メチルセルロース、メチルパラベン、微細結晶質セルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、アルファ前ゼラチン化デンプン、プロピルパラベン、レチニルパルミテート、シェラック、シリコンダイオキサイド、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クエン酸ナトリウム、デンプングリコール酸ナトリウム、ソルビトール、デンプン、ステアリン酸、スクロース、タルク、二酸化チタン、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC及びキシリトール。

20

30

【0071】

薬学的に許容される塩：本願に記載された化合物の薬学的に許容される塩は酸または塩基部分構造がその塩形態である（例えば、遊離塩基の基と適切な有機酸の反応によって生成された）開示された化合物の形態である。薬学的に許容される塩の例は、非制限的に塩基性残基、例えばアミンの無機または有機酸塩と、酸性残基、例えばカルボキシル酸のアルカリまたは有機塩などと、を含む。代表的な酸付加塩はアセテート、アジペート、アルジネート、アスコルベート、アスパテート、ベンゼンスルホナート、ベンゾアート、ビスルファイト、ボレート、ブチラート、カンファレート、カンファースルホネート、シトレート、シクロペンタンプロピオナート、ジグルコネート、ドデシルスルフェート、エタンスルホネート、フマレート、グルコヘプトネート、グリセロホスフェート、ヘミスルフェート、ヘプトエート、ヘキサノエート、ヒドロプロマイド、ヒドロクロリド、ヒドロヨージド、2-ヒドロキシ-エタンスルホネート、ラクトビオネート、ラクテート、ラウレート、ラウリルスルホネート、マレート、マレエート、マロネート、メタンスルホネート、2-ナフタレンスルホネート、ニコチネート、ニトレート、オレエート、オキサレート

40

50

、パルミテート、パモエート、ペクチネート、ペルスルフェート、3-フェニルプロピオネート、ホスフェート、ピクラー、ピバレート、プロピオナート、ステアレート、サクシネート、サルフェート、タルトレート、チオシアネート、トルエンスルホナート、ウンデカノエート、バレレート塩などを含む。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩はソディウム、リチウム、ポタシウム、カルシウム、マグネシウムなどだけでなく、非制限的にアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンなどをはじめ、非毒性アンモニウム、4次アンモニウム及びアミン陽イオンを含む。薬学的に許容される塩は通常、非毒性塩、例えば非毒性無機または有機酸を含む。一部の具現例において、薬学的に許容される塩は通常、化学方法によって塩基性または酸性の部分構造を含む母化合物から製造される。一般的に、このような塩はこのような化合物の遊離酸または塩基形態を水または有機溶媒のうち、またはこの2つの混合物のうち（一般的に非水性媒質、例えば、エーテル、エチルアセテート、エタノール、イソプロパノールまたはアセトニトリルが好ましい）適切な塩基または酸の化学量論的な量と反応させることで製造される。適切な塩目録はRemington's Pharmaceutical Sciences、17th ed., Mack Publishing Company、Easton、Pa., 1985、p. 1418、Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use、P. H. Stahl及びC. G. Wermuth (eds.)、Wiley-VCH、2008、及びBergerなど、Journal of Pharmaceutical Science、66、1-19 (1977)で発見され、これらのそれぞれはすべて参照により本願に含まれる。

10

20

【0072】

薬学的に許容される溶媒化物：本願において用いられたように、用語「薬学的に許容される溶媒化物」は適切な溶媒の分子が決定格子内に混入されている場合、化合物の結晶形態を称する。例えば、溶媒化物は有機溶媒、水、またはこれらの混合物を含む溶液から結晶化、再結晶化または沈殿によって製造される。適切な溶媒の例はエタノール、水（例えば、一、二、三水和物）、N-メチルピロリジドン（NMP）、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N、N'-ジメチルホルムアミド（DMF）、N、N'-ジメチルアセトアミド（DMAC）、1、3-ジメチル-2-イミダゾリジノン（DMEU）、1、3-ジメチル-3、4、5、6-テトラヒドロ-2-(1H)-ピリミジノン（DMPU）、アセトニトリル（ACN）、プロピレングリコール、エチルアセテート、ベンジルアルコール、2-ピロリドン、ベンジルベンゾアートなどである。水が溶媒である場合、溶媒化物は「水和物」と称される。一部の具現例において、溶媒化物に混合された溶媒は溶媒化物が投与された（例えば、薬学的組成物の単位投与量の形態で）有機体に生理学的に許容される類型または水準である。

30

【0073】

薬物動態学：本願において用いられたように、用語「薬物動態学」は生きている有機体に投与された物質の運命を決定することと関連するように、分子または化合物の任意の1つ以上の特性を称する。薬物動態学は吸収、分布、代謝及び排泄の程度及び速度を含めていくつかの領域に分けられる。これは通常、ADMEと称され、この際、（A）吸収（Absorption）は血液循環に入る物質の過程であり、（D）分布（Distribution）は身体の体液及び組織全般にわたって分散または分布される過程であり、（M）代謝（Metabolism）（または生体内変化（Biotransformation））は母化合物の娘代謝物質への不可逆の転換で、（E）排泄（Excretion）（または除去（Elimination））は身体からの物質を除去する過程を称する。稀な場合に、一部の薬物は身体組織に不可逆的に蓄積される。

40

【0074】

物理化学的：本願において用いられたように、「物理化学的」は物理的及び／または化学的性質を意味するか、またはこれと関連がある。

50

陽性選択：本願において用いられたように、用語「陽性選択」は特定の實體の群から与えられた實體の選択を称する。このような實體及びこの群は例えば抗体であってもよい。一部の場合に、これは抗体断片またはこのような抗体断片を発現する製剤と関連して発現された抗体断片（例えば、ディスプレイライブラリーからのライブラリー構成要素）であってもよい。選択は目的の標的またはエピトープに結合する選択された個体の能力に基づく。一部の具現例において、陽性選択は目的の標的に結合する s c F v を発現するファージ粒子を同定するためのファージディスプレイライブラリーと共に使用される。他の具現例において、陽性選択は抗体プールのうち抗体候補の選択を称する。他の場合、實體は細胞、細胞株またはハイブリドーマ選別の間のクローンの選択と同一のクローンであってもよい。このような場合、陽性選択はこのようなクローンによって生成された抗体の 1 つ以上の特性（例えば、1 つ以上の目的とするエピトープに対する特異性）に基づくクローン選別を称する。一部の場合、陽性の選択方法で目的のエピトープは S T n（例えば、A c S T n 及び／または G c S T n）を含む。

10

【0075】

反対に、本願において用いられたように「陰性選択」は陽性選択に対して記載された同一の原理及び例を含むが、これは特定の實體の群から目的としない實體を取り除くために使用されるということで区別される特性を有する。

【0076】

予防：本願において用いられたように、用語「予防」は感染、疾患、障害及び／または状態の発病を部分的に、または完全に遅延させることと、特定の感染、疾患、障害及び／または状態の 1 つ以上の症状、特徴または臨床学的な様相の発病を部分的にまたは完全に遅延させることと、特定の感染、疾患、障害及び／または状態の 1 つ以上の症状、特徴または様相の発病を部分的にまたは完全に遅延させることと、感染、特定の疾患、障害及び／または状態の進行を部分的にまたは完全に遅延させることと、及び／または感染、疾患、障害及び／または状態と係る病理学的発達の危険を減少させることと、を称する。

20

【0077】

プロドラッグ：本開示は、また本願に記載された化合物のプロドラッグを含む。本願において用いられたように、「プロドラッグ」は化学的または物理的な変更に応じて治療剤として作用する物質、分子または實體に対する述語形態の任意の物質、分子または實體を称する。プロドラッグはいくつかの方式で共有結合または分離され、哺乳類を対象に投与される前に、投与されてすぐに、または投与された後に活性薬物部分構造として放出されるか、または転換される。プロドラッグは、通常の方法でまたは生体内で修飾が切断されるような方式で化合物に存在する官能基を母化合物に改変させることで調製される。プロドラッグはヒドロキシ、アミノ、スルフヒドリル、またはカルボキシル基が任意の基に結合されている場合、哺乳類を対象に投与されるときに切断されてそれぞれ遊離ヒドロキシ、アミノ、スルフヒドリル、またはカルボキシル基を形成する化合物を含む。プロドラッグの製造及び使用が T. Higuchi 及び V. Stella、「Pro-drugs as Novel Delivery Systems、」Vol. 14 of the A. C. S. Symposium Series、及び Bioreversible Carriers in Drug Design、ed. Edward B. Roche、American Pharmaceutical Association and Pergamon Press 1987 に議論されており、この 2 つの文献の両方はすべて参照により本願に組み込まれる。

30

40

【0078】

近接した：本願において用いられたように、用語「近接した」は中心、または関心地点または領域により近く位置するものを意味する。

相互作用領域：本願において用いられたように、用語「相互作用領域」は任意の 2 つ以上の實體が相互作用するか、または重畳されるような 2 つ以上の實體による領域を称する。一部の具現例において、相互作用領域は第 2 のグリカン鎖と接触する 1 つのグリカン鎖による 1 つ以上の糖残基を含む。一部の具現例において、グリカン鎖は同一の母鎖から分

50

枝された鎖である。一部の具現例において、相互作用領域は1つの鎖が分枝鎖であり、第2の鎖が母鎖である2つのグリカン鎖の間に発生する。グリカン鎖の場合、相互作用領域は1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個以上の糖残基を含む。一部の具現例において、相互作用領域はまたグリカンとタンパク質の間、またはグリカンと脂質の間に発生する。

【0079】

残基：本願において用いられたように、用語「残基」は重合体と結合されるか、または重合体と結合され得る単体量を称する。一部の具現例において、残基は、非制限的にグルコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸を含む糖分子を含む。一部の具現例において、残基はアミノ酸を含む。

10

【0080】

試料：本願において用いられたように、用語「試料」は供給源から取得された、及び／または、分析または処理のために提供されたアリコート、または部分を称する。一部の具現例において、試料は生物学的な供給源、例えば組織、細胞、または構成成分の部分（例えば、非制限的に血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、羊水、臍帯血、尿、腔液及び精液を含む体液）から由来したものである。一部の具現例において、試料は、非制限的に例えば、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚、呼吸器、内臓及び尿生殖路、涙、唾液、乳、血液細胞、腫瘍、器官の外部部分をはじめ、全体の有機体またはこの組織、細胞、構成成分の部分、またはこの分画、または部分のサブセットから製造された均質物、溶解物、または抽出物を含む。一部の具現例において、試料は、例えば細胞の構成成分、例えばタンパク質または核酸分子を含有する栄養ブロスまたはゲルのような培地を含む。一部の具現例において、1次試料は供給源からのアリコートである。一部の具現例において、分析または他の用途のための試料の調製するために、1次試料は1つ以上の処理（例えば、分離、精製など）ステップに供される。

20

【0081】

シアリル：本願において用いられたように、用語「シアリル」及び用語「シアリル化（された）」はシアル酸を含む化合物を記述する。

一本鎖可変断片：本願において用いられたように、用語「一本鎖可変断片」及び「scFv」はリンカーによって連結された抗体可変ドメインを含む融合されたタンパク質を称する。一部の具現例において、scFvはこれらがファージ外皮タンパク質と結合して発現され、与えられた抗原に対する高親和性ペプチドの同定で使用される場合、ファージディスプレイ方法と共に利用される。

30

【0082】

単一単位投与量：本願において用いられたように、「単一単位投与量」は1回投与量／1回／単一経路／単一接触点、すなわち、単一投与事象で投与される任意の治療剤の投与量である。一部の具現例において、単一単位投与量は別個の投与形態（例えば、錠剤、カプセル、パッチ、充填された注射器、バイアルなど）として提供される。

【0083】

分割された投与量：本願において用いられたように、「分割された投与量」は単一単位投与量、または総一日投与量を2回以上の投与量に分けたものである。

40

安定した：本願において用いられたように、「安定した」は反応混合物から有用な程度の純度で単離されることを耐えるのに十分に強固で、好ましくは効果的な治療剤として製剤化される化合物または実体を称する。

【0084】

安定化された：本願において用いられたように、用語「安定化」、「安定化された」または「安定化された領域」は安定にするか、または安定になったことを意味する。一部の具現例において、安定性は絶対値に対して相対的に測定される。一部の具現例において、安定性は基準化合物または実体に対して相対的に測定される。

【0085】

対象：本願において用いられたように、用語「対象」または「患者」は本発明による組

50

成物が例えば実験、診断、予防的、及び／または治療的目的のために投与される任意の有機体を称する。典型的な対象は動物（例えば、哺乳類、例えばマウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類及びヒト）及び／または植物を含む。

【0086】

顎下腺：本願において用いられたように、用語「顎下腺」または「下顎腺」は口腔の下に位置する粘液産生腺を称する。このような腺はムチンを生成し、一部の具現例において、ムチンの供給源として哺乳類から抽出される。

【0087】

患っている：疾患、障害及び／または状態を「患っている」個人は疾患、障害及び／または状態の1つ以上の症状で診断されるか、またはこれを表す。

10

脆弱な：疾患、障害及び／または状態に「脆弱な」個人は疾患、障害及び／または状態の症状として診断され／されるか、またはこれを表さないが、疾患またはこの症状を発達させる傾向を有している。一部の具現例において、疾患、障害及び／または状態（例えば、癌）に脆弱な個人は以下のうち1つ以上によって特徴化される：（1）疾患、障害及び／または状態の発達に係る遺伝子突然変異と、（2）疾患、障害及び／または状態に係る遺伝子多形性と、（3）疾患、障害及び／または状態に係るタンパク質及び／または核酸の増加した及び／または減少した発現及び／または活性と、（4）疾患、障害及び／または状態に係る習慣及び／または生活様式と、（5）疾患、障害及び／または状態の家族歴と、（6）疾患、障害及び／または状態の発達に係る微生物への露出及び／または感染。一部の具現例において、疾患、障害及び／または状態に脆弱な個体は疾患、障害及び／または状態を発達させるだろう。一部の具現例において、疾患、障害及び／または状態に脆弱な個人は疾患、障害及び／または状態を発達させないだろう。

20

【0088】

合成の：用語「合成の」はヒトの手によって生産、準備及び／または製造されたものを意味する。ポリヌクレオチド、またはポリペプチド、または本発明の他の分子の合成は化学的、または酵素的である。

【0089】

標的：本願において用いられたように、用語「標的」は作用によって影響を受ける対象、または実体を称する。一部の具現例において、標的は抗原に特異的に結合する抗体の開発に使用される抗原を称する。

30

【0090】

標的選別：本願において用いられたように、用語「標的選別」は標的物質を使用してこのような物質に対する結合パートナーを確認することを称する。

標的部位：本願において用いられたように、用語「標的部位」は細胞、細胞外空間、組織、器官及び／または有機体内の1つ以上のグリカン、生体分子及び／または生体構造体上の、またはこれらの内部の標的を称する。一部の具現例において、グリカンの標的部位は1つの糖残基上のみ独占的に存在するか、または2つ以上の残基によって形成される。一部の具現例において、標的部位は2つのグリカンの間に形成される。一部の具現例において、標的部位は同一のグリカンの分枝鎖の間、または1つ以上の分枝鎖と母鎖の間に形成される。

40

【0091】

標的化された細胞：本願において用いられたように、「標的化された細胞」は任意の1つ以上の関心細胞を称する。このような細胞は試験管内、生体内、その位置、または有機体の組織、または器官上で発見される。このような有機体は動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒト及びもっとも好ましくは患者である。

【0092】

末端残基：本願において用いられたように、用語「末端残基」は重合体鎖の最後の残基を称する。一部の具現例において、末端残基はポリサッカライド鎖の非還元末端に位置する糖残基である。

【0093】

50

治療剤：用語「治療剤」は対象に投与される場合、治療的、診断的、及び／または予防的効果を有し／有するか、または目的の生物学的及び／または薬理学的な効果を表す任意の製剤を称する。

【0094】

治療の有効量：本願において用いられたように、用語「治療の有効量」は感染、疾患、障害及び／または状態を患っているか、または脆弱な対象に投与される場合、感染、疾患、障害及び／または状態を治療、この症状を改善、診断、予防、及び／または発病を遅延させることに十分な送達される製剤（例えば、核酸、薬物、治療剤、診断、予防剤など）の量を意味する。一部の具現例において、治療有効量は単一投与量として提供される。一部の具現例において、治療有効量は多数の投与量を含む投与療法で投与される。当業者は、一部の具現例において、単位投与形態が特定の製剤、または実体がこのような投与療法の一部として投与されるときに効果的な量を含む場合、効果的な量を含むこととみなされることを認知するだろう。

10

【0095】

治療の有効結果：本願において用いられたように、用語「治療の有効結果」は感染、疾患、障害及び／または状態を患っているか、または脆弱な対象で感染、疾患、障害及び／または状態の治療、この症状の改善、診断、予防、及び／または発病を遅延させることに十分な結果を意味する。

【0096】

総一日投与量：本願において用いられたように、「総一日投与量」は24時間周期に与えられるか、または処方された量である。これは単一単位投与量として投与される。

20

形質転換の：本願において用いられたように、用語「形質転換の」はその有機体で自然的に発見されない有機体ゲノム内に統合された1つ以上の遺伝子を含む有機体を称する。

【0097】

治療：本願において用いられたように、用語「治療」は特定の感染、疾患、障害及び／または状態の1つ以上の症状を部分的に、または完全に軽減、改善、向上、緩和、この発病を遅延、この進行を阻害、この深刻性を減少、及び／またはこの発生率を減少させることを称する。例えば、癌を「治療」することは腫瘍の生存、成長及び／または拡散を阻害することを称する。治療は疾患、障害及び／または状態の兆候を表さない対象及び／または疾患、障害及び／または状態の単なる早期兆候を表す対象に疾患、障害及び／または状態に係る病理を発達させる危険を減少させる目的で投与される。

30

【0098】

可変ドメイン：本願において用いられたように、用語「可変ドメイン」または「可変ドメイン」は抗体間の配列が広範囲に異なって、この特定抗原に対するそれぞれの特定の抗体の結合及び特異性に使用される特異的な抗体ドメインを称する。

【0099】

全体 (whole) IgG：本願において用いられたように、用語「全体IgG」は完全なIgG分子を称する。一部の具現例において、全体IgGは2種以上の他の有機体で自然的に発見される領域を含む。

【0100】

野生型：本願において用いられたように、用語「野生型」は天然のゲノムを含む（他の有機体から由来した遺伝子のない）有機体を称する。

40

[I. 本発明の組成物]

本発明は1つ以上のグリカン相互作用抗体を含む化合物及び組成物を提供する。グリカン内で、モノサッカライド単量体はすべて同一であるか、または異なる。通常の単量体は非制限的にトリオース、テトロース、ペントース、グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、リキソース、アロース、アルトロース、マンノース、グロース、イオドース、リボース、マンノヘプツロース、セドヘプツロース及びタロースを含む。アミノ糖がまたグリカン内の単体量であってもよい。このような糖を含むグリカンは本願においてアミノグリカンと称される。本願において用いられたように、アミノ糖

50

はヒドロキシ基の代わりにアミノ基を含む糖分子であるか、または一部の具現例においてはこのような糖から由来した糖である。アミノ糖の例は、非制限的にグルコサミン、ガラクトサミン、N - アセチルグルコサミン、N - アセチルガラクトサミン、シアル酸（非制限的に、N - アセチルノイラミン酸及びN - グリコリルノイラミン酸を含む）及びL - ダウノサミンを含む。

【0101】

本願において用いられたように、用語「グリカン相互作用抗体」はグリカン部分構造と相互作用できる抗体を称する。グリカン相互作用抗体はグリカン、またはグリカン結合された分子、または実体に結合、これを変更、活性化、阻害、安定化、分解及び／または調節する機能を行う。そのようにして、グリカン相互作用抗体は一時的、予防的、または持続的な治療組成物であっても、治療剤として機能する。一部の具現例において、グリカン相互作用抗体は他の分子との接合または組み合わせを含む。一部の具現例において、グリカン相互作用抗体は1つ以上のアミノ糖を含むグリカンに対して向けられる。追加の具現例において、1つ以上のアミノ糖はシアル酸である。追加の具現例において、1つ以上のシアル酸はN - アセチルノイラミン酸及びN - グリコリルノイラミン酸である。

【0102】

[抗体]

グリカン相互作用抗体は、全体の抗体またはこの断片を含む。本願において用いられたように、用語「抗体」は、最広義の意味で使用され、特に多様な具現例を含み、多様な具現例としては、非制限的にモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、2つ以上のインタクト抗体から形成された二重特異性抗体）、抗体接合体（非制限的に、抗体 - 薬物接合体を含む）、抗体変異体〔非制限的に、抗体模倣体、キメラ抗体（例えば、1つを超える種から由来したアミノ酸配列を有する抗体）及び合成変異体を含む〕、及び、これらが目的とする生物学的活性を表す限りディアボディなどの抗体断片を含む。抗体は主にアミノ酸に基づく分子であるが、糖部分構造は同一の1つ以上の修飾を含んでもよい。

【0103】

本願において用いられたように、用語「抗体断片」はインタクト抗体、またはこの融合タンパク質の部分とを称し、一部の場合、1つ以上の抗原結合領域を含む。抗体断片の例はFab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、一本鎖可変断片(scFvs)と、ディアボディ、トライ(ア)ボディと、線状抗体と、一本鎖抗体分子と、抗体断片から形成された多重特異性抗体と、を含む。抗体のパパイン消化は「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片を生成し、それぞれは単一抗原結合部位を有する。また、残余「Fc」断片が生成され、この名称は簡単に結晶化(crystallize)される能力を反映する。ペプシン処理は2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋結合させ得るF(ab')₂断片を生成する。グリカン相互作用抗体は1つ以上のこのような断片を含む。

【0104】

「天然抗体」は通常2つの同一の軽鎖(L)及び2つの同一の重鎖(H)から構成された、約150、000ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質である。抗体重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子がよく知られており、それぞれを構成するセグメント(segment)が特性化されて記載された(Matsuda, F. など、1998. The Journal of Experimental Medicine. 188(11); 2152 - 62及びLi, A. など、2004. Blood. 103(12): 4602 - 9、このそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる)。それぞれの軽鎖は1つの共有結合であるジスルフィド結合によって重鎖に連結され、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンのアイソタイプの重鎖の間で多様である。それぞれの重鎖及び軽鎖はまた規則的に離隔された鎖内のジスルフィド架橋を有する。それぞれの重鎖は1つの末端に可変ドメイン(V_H)及びその後多数の定常ドメインを有する。それぞれの軽鎖は1つの末端に可変ドメイン(V_L)及びこの他の末端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ド

メインは重鎖の一番目の定常ドメインに合わせて整列され、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインに合わせて整列される。

【0105】

本願において用いられたように、用語「可変ドメイン」は抗体間の配列が広範囲に異なり、この特定抗原に対するそれぞれの特定抗体の結合及び特異性に使用される抗体重鎖と軽鎖の両方で見られる特異的な抗体ドメインを称する。可変ドメインは超可変ドメインを含む。本願において用いられたように、用語「超可変ドメイン」は抗原結合を担当するアミノ酸の残基を含む可変ドメイン内の領域を称する。超可変ドメイン内に存在するアミノ酸は抗体の抗原結合部位の一部になる相補性決定領域(CDR)の構造を決定する。本願において用いられたように、用語「CDR」はこの標的抗原、またはエピトープに対して相補的な構造を含む抗体の領域を称する。抗原と相互作用しない、可変ドメインの他の部分はフレームワーク(FW)領域と称される。抗原結合部位(抗原結合(combining)部位、またパラトープとも称される)は特定抗原と相互作用するうえで欠かせないアミノ酸残基を含む。抗原結合部位を構成する正確な残基は典型的に結合された抗原として共(co)結晶学によって説明されるが、他の抗体との比較に基づいてコンピュータ的な評価がまた使用される(Strohl、W. R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p47 - 54、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる)。CDRを構成する残基決定は非制限的に、Kabat [Wu、T. T. など、1970、JEM、132(2):211 - 50及びJohnson、G. など、2000、Nucleic Acids Res. 28(1):214 - 8、このそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる]、Chothia [Chothia及びLesk、J. Mol. Biol. 196、901(1987)、Chothiaなど、Nature 342、877(1989)及びAl-Lazikani、B. など、1997、J. Mol. Biol. 273(4):927 - 48、このそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる]、Lefranc (Lefranc、M. P. など、2005、Immunome Res. 1:3)及びHonegger、A. 及びPluckthun、A. 2001. J. Mol. Biol. 309(3):657 - 70、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる)によって教示されたことをはじめ、番号を付ける体系の使用を含む。

【0106】

VH及びVLドメインはそれぞれ3つのCDRを有する。VL CDRは、可変ドメインポリペプチドに沿ってN - 末端からC - 末端へ移動する場合、生じる順にCDR - L1、CDR - L2及びCDR - L3と本願において称される。VH CDRは、可変ドメインポリペプチドに沿ってN - 末端からC - 末端へ移動する場合、生じる順にCDR - H1、CDR - H2及びCDR - H3と本願において称される。それぞれのCDRは抗原結合ドメインで多様な3次元構造を引き起こす抗体間の配列及び長さが非常に可変的であるアミノ酸配列を含むCDR - H3を除いて好まれる標準構造を有する(Nikoloudis、D. など、2014. Peer J. 2:e456)。一部の場合、CDR - H3は抗体の多様性を評価するために関連する抗体パネルの間で分析される。CDR配列を決定する多様な方法は当業界によく知られており、公知の抗体配列に適用される(Strohl、W. R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3. p47 - 54、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる)。

【0107】

本願において用いられたように、用語「Fv」は完全な抗原結合部位を形成するために要求される抗体上の最小限の断片を含む抗体断片を称する。このような領域は、堅固で非共有結合された1つの重鎖と1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなっている。Fv断片はタンパク質の分解切断によって生成されるが、大半は不安定である。典型的には軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの間の可撓性リンカーの挿入を介して[一本鎖Fv(sc

10

20

30

40

50

Fv)を形成するため]、または重鎖と軽鎖可変ドメインの間にジスルフィド架橋の導入を介して安定したFv断片を製造するための組換え方法が当業界によく知られている(S trohl, W. R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 3, p46 - 47、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる)。

【0108】

任意の脊椎動物種の抗体「軽鎖」は、これらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパ及びラムダと称される2種類の明確に区分される種類のうち1つに該当される。これらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列によって、抗体は異なる部類に該当される。インタクト抗体は5つの主要部類であるIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらのうちいくつかは下位部類(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2に更に分けられる。[00141]本願において用いられたように、用語「単鎖Fv」または「scFv」はVH及びVL抗体ドメインの融合タンパク質を称し、この際、このようなドメインは可撓性ペプチドリンカーによって単一のポロペプチド鎖とともに連結される。一部の具現例において、FvポロペプチドリンカーはscFvが抗原結合のための目的とする構造を形成するようにする。一部の具現例において、scFvはファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、または他のディスプレイ方法とともに利用され、これらは表面構成要素(例えば、ファージ外皮タンパク質)と結合されて発現され、与えられた抗原に対する高親和性ペプチドの同定に使用される。

【0109】

用語「ディアボディ」は2つの抗原結合部位を有する小さい抗体断片を称し、この際、断片は同一のポリペプチド鎖で軽鎖可変ドメインV_Lに連結された重鎖可変ドメインV_Hを含む。同一の鎖上で2つのドメインの間に対をなすことには非常に短いリンカーを使用することで、ドメインは他の鎖の相補的なドメインと対を強制的になすようにして、2つの抗原結合部位を形成するようにする。ディアボディは例えば、欧州特許第EP404、097号と、国際公開第WO93/11161号と、Hollingerなど、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444-6448(1993)により完全に記載されており、このそれぞれの内容はすべて参照により組み込まれている。

【0110】

用語「イントラボディ」は、これが生産される細胞から分泌されず、代わりに1つ以上の細胞内のタンパク質を標的する抗体の形態を称する。イントラボディは、非制限的に細胞内輸送(traffic)、転写、翻訳、代謝過程、増殖シグナル伝達及び細胞分裂を含む、多数の細胞過程に影響を及ぼすために使用される。一部の具現例において、本発明の方法はイントラボディに基づいた治療を含む。このような一部の具現例において、本願に開示された可変ドメインの配列及び/またはCDR配列はイントラボディに基づいた治療のために1つ以上の構造体内に統合される。一部の具現例において、本発明のイントラボディは1つ以上の糖化された細胞内タンパク質を標的化するか、または1以上の糖化された細胞内タンパク質と代案的なたんぱく質間の相互作用を調節する。

【0111】

本願において用いられたように、用語「キメラ抗原受容体」または「CAR」は人工的な受容体(「キメラ免疫受容体」、「人工的なT細胞受容体」または「キメラT細胞受容体」ともよく知られている)を称し、これは免疫効果細胞(immune effector cell)の表面上で発現されるように調査されて、このような免疫効果細胞がこのような人工的な受容体に高親和性で結合する実体を発現する細胞を特異的に標的化する。CARは抗体の1つ以上のセグメント、scFv、抗体可変ドメイン、及び/または抗体CDRを含むように考案され、従って、このようなCARが免疫効果細胞上で発現される場合、免疫効果細胞はCARの抗体部分によって認識された任意の細胞に結合してこれを取り除く。一部の具現例において、CARは癌細胞に特異的に結合するように考案され、癌細胞の免疫調節された除去を誘導する。CARに関連して使用された語句「抗原特異性を有する

」及び「抗原特異的な反応を誘導する」はC A Rが抗原に特異的に結合して、これを免疫学的に認識して免疫反応を誘導することを意味する。

【0112】

本願において用いられたように、用語「モノクローナル抗体」は実質的に均質な細胞（またはクローン）集団から獲得された抗体を称し、すなわち、集団を含む個別的な抗体はモノクローナル抗体の生産中に発生する可能性のある変異体、例えば一般的に少量に存在して変異体を取り除き、同一で／同一であるか、または同一のエピトープに結合される。典型的に異なる決定基（エピトープ）に指示された異なる抗体を含むポリクローナル抗体製剤とは違って、それぞれのモノクローナル抗体は抗原上の単一決定基に対して向けられる。

10

【0113】

修飾語「モノクローナル」は実質的に均質な抗体集団から獲得された抗体の特性を称し、任意の特定方法によって抗体の生産を要求するとは解釈されない。本願において、モノクローナル抗体は重鎖及び／または軽鎖の一部が特定種から由来した抗体、または特定の抗体部類、または下位部類に属する抗体に対応する配列と同一であるか、または相同性であるが、鎖の残りがまた他の種から由来した抗体、またはまた他の抗体部類、または下位部類に属する抗体のみならず、このような抗体の断片に対応する配列と同一であるか、または相同性の「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を含む。

【0114】

非ヒト（例えば、ネズミ）抗体の「ヒト化された」形態は、非ヒト免疫グロブリンから由来した最小限の配列を含有するキメラ抗体である。大半の場合、ヒト化された抗体は、レシピエント抗体の超可変ドメインからの残基が非ヒト種、例えば目的とする特異性、親和性及び受容力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類の抗体（ドナー抗体）としての超可変ドメインの残基に代替される、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。

20

【0115】

一部の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体は抗体模倣体である。用語「抗体模倣体」は抗体の機能、または効果を模倣して、この分子標的に特異的及び高親和性で結合する任意の分子を称する。一部の具現例において、抗体模倣体はタンパク質支持体としてのフィブロネクチンの類型I I Iドメイン（F n 3）に混合されるように考案されたモノボディである（米国特許第U S 6、6 7 3、9 0 1号、米国特許第U S 6、3 4 8、5 8 4号）。一部の具現例において、抗体模倣体は、非制限的にアフィボディ分子、アフィリン、アフィチン、アンチカリン、アビマー、D A R P i n、フィノマー及びクニッツ及びドメインペプチドをはじめ、同業界に公知のものであろう。他の具現例において、抗体模倣体は1つ以上の非ペプチド領域を含む。

30

【0116】

本願において用いられたように、用語「抗体変異体」は天然抗体と比較してこのアミノ酸配列、組成物、または構造に一部の違いを含む構造及び／または機能を有する抗体と類似した生体分子を称する。

【0117】

[抗体開発]

本発明のグリカン相互作用抗体は本願に記載されたような抗原に結合するように開発される。本願において用いられたように、「抗原」は有機体で免疫反応を誘導するか、または誘発する実体である。免疫反応は有機体の細胞、組織及び／または器官が外来実体の存在に対して反応することを特徴とする。このような免疫反応は典型的に有機体によって外来実体、例えば抗原または抗原の一部に対して1つ以上の抗体の生産を誘導する。一部の場 合、免疫化方法は1つ以上の目的とする免疫化結果に基づいて変更される。本願において用いられたように、用語「免疫化結果」は免疫化の1つ以上の目的とする効果を称する。例示は高い抗体価及び／または関心標的に対する増加された抗体特異性を含む。

40

【0118】

50

本発明の抗原はグリカン、糖接合体（非制限的に糖タンパク質及び糖脂質を含む）、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質、または任意の前述されたものを含み、1つ以上の別個の補助剤、または異種タンパク質に接合されるか、または複合化される。一部の具現例において、本発明の方法によって使用された抗原はシアリル化されたグリカン、例えばSTnを含む。STnを含む抗原はムチンを含む。ムチンは高度に糖化されたタンパク質の群（family）である。これは上皮細胞から由来した多数の腫瘍の構成成分である（Ishida, A. など、2008. Proteomics. 8: 3342-9、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。これらは顎下腺によって高度に発現され、唾液及び粘液で高い水準で発見される。動物由来の顎下腺ムチンは免疫原性の宿主で抗STn抗体を生成するための抗原として使用される。異なる種からの顎下腺ムチンはAcSTn対GcSTnの形態と関連してこれらのSTn含量が異なる。豚の顎下腺ムチン（PSM）はGcSTnが特に豊富で、総STnの約90%を構成する。牛の顎下腺ムチン（BSM）からのSTnは概ね同一のパーセントのGcSTnとAcSTnを含む。羊の顎下腺ムチン（OSM）はAcSTnが特に豊富で、総STnの約90%を構成する。一部の場 10
合、免疫化のために調製された溶液はこのような免疫化による抗体の目的とする標的に応じて1つ以上のPSM、BSM及びOSMを含むように改変される。PSMはGcSTnにより特異的である免疫原性の宿主で抗体を生成するための免疫化に使用される。PSMはGcSTnで装飾されたNeu5Gc含有ムチンの類型である、糖タンパク質が豊富である。現在、高いNeu5Gc含量の供給源として知られているものは赤身の肉類であり、特に顎下腺はNeu5Gc前駆体であるCMP-Neu5Acを生産するよう 20
に反応を触媒するCMAH酵素の高い発現に起因するNeu5Gcの豊富な供給源のように以前に記載されたものである。一部の場 合、PSMはpan-抗Neu5Gc反応を予防し、GcSTnに対してより特異的な免疫反応を誘導するために使用される。OSMはAcSTnに対してより特異的である免疫原性の宿主で抗体を生成するための免疫化に使用される。

【0119】

一部の具現例において、本発明はGcSTn特異的なグリカン相互作用抗体を提供する。このような抗体はNeu5Ac-STn、またはTnに対する交差反応性が殆どない。このような抗体はGcSTnに結合されるが、AcSTnに対する減少された親和性を有する。 30

【0120】

一部の具現例において、抗原は免疫原性の宿主で生成された免疫反応を調節するために免疫化の前に酵素的に消化される。一実施例において、顎下腺ムチンは免疫化の前にトリプシン、またはプロテイナーゼK酵素で処理される。このような酵素の活性は切断及びこれによる非STnエピトープの比率及び可変性の減少を容易にする。グリカン部分構造は酵素的タンパク質分解から付着されたペプチド領域を遮蔽してそのまま維持することができる。免疫化に起因する抗体価はこのような免疫化に使用された抗原の類型及び量に応じて異なる水準を含む。一部の場 40
合、特定抗原は予想される力価に基づいた免疫化に使用するために選択される。

【0121】

本願において用いられたように、「補助剤」は他の製剤の効果を改変させる薬学的、または免疫学的製剤である。本発明による補助剤は、非制限的に化学組成物、生体分子、治療剤、及び／または治療法を含む。補助剤はフロイント（Freund）補助剤（完全及び／または不完全）、免疫刺激オリゴヌクレオチド〔例えば、CpGオリゴジオキシヌクレオチド（ODN）〕、無機物含有組成物、バクテリアADPリボシル化毒素、生体接着剤、粘膜接着剤、極微粒子、脂質、リポソーム、ムラミルペプチド、N-酸化ポリエチレン-ピペラジン誘導體、サポニン及び／または免疫刺激複合体（ISCO）を含む。一部の具現例において、補助剤は水中油型エマルジョン（例えば、超微細水中油型エマルジョン）を含む。本発明による補助剤はまた米国特許公開第US20120027813号及び／または米国特許第US8506966号（このそれぞれの内容はすべて参照により 50

本願に組み込まれる)に開示された任意のものを含む。

【0122】

本発明の抗体は当業界に公知の方法、または本出願に記載された方法によって生産されたポリクローナル、またはモノクローナルの組換えであってもよい。一部の具現例において、本発明の抗体は当業者によって公知の検出可能な標識で検出するための目的のために標識される。このような標識は、放射線同位体、蛍光化合物、化学発光化合物、酵素または酵素補因子、または当業界に公知の任意の他の標識であってもよい。一部の態様において、目的とする抗原に結合する抗体は標識されていないが、1次抗体に特異的に結合する標識された2次抗体の結合によって検出される。

【0123】

本発明の抗体(例えば、グリカン相互作用抗体)は、非制限的にポリクローナル、モノクローナル、多重特異性、ヒト、ヒト化された、またはキメラ抗体、一本鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、Fab発現ライブラリーによって生産された断片、抗イディオタイプ(抗-Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗-Id抗体を含む)、細胞内で製造された抗体(すなわち、イントラボディ)、及び前述された任意のエピトープ結合性断片を含む。本発明の抗体(例えば、グリカン相互作用抗体)は鳥類及び哺乳類を含んで任意の動物から由来される。好ましくは、このような抗体はヒト、ネズミ(例えば、マウス及びラット)、ロバ、羊、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、馬または鶏の由来である。本発明の抗体は単一特異性、または多重特異性(例えば、二重特異性、三重特異性またはそれ以上の多重特異性)であってもよい。多重特異性抗体は本発明の標的抗原の異なるエピトープに対して特異的であるか、または本発明の標的抗原と異種グリカン、ペプチドまたは固形支持体物質のような異種エピトープの両方に対して特異的である(例えば、国際公開第WO93/17715号と、第WO92/08802号と、第WO91/00360号と、第WO92/05793号と、Tutt, A. など、Trispecific F(ab')₃ derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells. J Immunol. 1991 Jul 1;147(1):60-9と、米国特許第4,474,893号と、第4,714,681号と、第4,925,648号と、第5,573,920号と、第5,601,819号と、Kostelny, S. A. など、Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. J Immunol. 1992 Mar 1;148(5):1547-53と、を参照)。

【0124】

モノクローナル抗体を含む本発明のグリカン相互作用抗体は、当業者によって公知のよく確立された方法を使用して製造される。1つの具現例において、モノクローナル抗体はハイブリドーマ手法を用いて製造される(Kohler, G. など、Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7)。ハイブリドーマ形成のために、まず、マウス、ハムスターまたは他の適切な宿主動物は典型的に免疫化剤(例えば、本発明の標的抗原)で免疫化され、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生産するか、または生産し得るリンパ球が誘導される。他には、リンパ球は試験管内で免疫化される。リンパ球は次に適切な融合剤、例えばポリエチレングリコールを用いて不死化された細胞株と融合させてハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, J. W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press. 1986;59-1031)。不死化された細胞株は通常、形質転換された哺乳類細胞、特に齧歯類、ウサギ、牛及びヒト起源の骨髓腫細胞である。通常、ラットまたはマウスの骨髓腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは

10

20

30

40

50

非融合された、不死化された細胞の成長または生存を阻害する1つ以上の物質を含有する適切な培養培地で培養される。例えば、母細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシル転移酵素（HGPRTまたはHPRT）が欠乏している場合、ハイブリドーマ用培養培地は典型的にヒポキサンチン、アミノプテリン及び、チミジン（「HAT培地」）を含み、このような物質はHGPRT欠乏細胞の成長を妨害する。

【0125】

好ましくは不死化された細胞株は効率的に融合されて選択された抗体生産細胞によって抗体の安定でかつ高い水準の発現を支持し、HAT培地のような培地に敏感な細胞株である。より好ましい不死化された細胞株は、例えばカリフォルニア州サンディエゴ所在のSalk Institute Cell Distribution Center及びバージニア州マナサス所在のAmerican Type Culture Collectionから入手されるマウス骨髄腫である。ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトの異種骨髄腫細胞株がまたヒトモノクローナル抗体の生産のために記述されている（Kozbor、D. など、A human hybrid myeloma for production of human Monoclonal Antibodies. J Immunol. 1984 Dec; 133 (6): 3001-5と、Brodeur、B. など、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc., New York. 1987; 33: 51-63）。

【0126】

一部の具現例において、骨髄腫細胞は遺伝的に操作される。このような操作は本願に記載されたようにジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）の突然変異の誘発を使用して行われる。他には、当業界に公知の形質移入（transfection）方法が使用される。NS0骨髄腫細胞、または他のマウス骨髄腫細胞株が使用される。例えば、Sp2/0-Ag14がハイブリドーマ開発のための代案的な細胞株であってもよい。

【0127】

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）誘導された遺伝子編集は、代案的な遺伝子のノックアウト方法を提供する。TALENは、TAL作動因子のDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合させることで生成された人工的な制限酵素である。ZFNと類似するように、TALENは、エラーが発生しやすい（error prone）NHEJによって修復され得る目的の遺伝子座に二重鎖の切断を誘導して、切断部位での挿入／欠失を引き起こす（Wood、A. J. など、Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. Science. 2011 Jul 15; 333 (6040): 307）。Collectis Bioresearch（マサチューセッツ州ケンブリッジ所在）は、TALENの考案及びプラスミド構築サービスを提供する。ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は以降のモノクローナル抗体の存在に対して分析される。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生産されるモノクローナル抗体の結合特異性（すなわち、特異的な免疫反応性）が免疫沈降反応によって、または試験内の結合分析法、例えば放射免疫分析法（RIA）または酵素結合免疫吸着分析法（ELISA）によって測定される。このような手法及び分析法が当業者によってよく知られている。モノクローナル抗体の結合特異性は、例えばスキャッチャード（Scatchard）分析によって測定される（Munson、P. J. など、Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. Anal Biochem. 1980 Sep 1; 107 (1): 220-39）。一部の場合、与えられた抗原の領域に対する抗体特異性は抗体結合を分析する前に抗原を化学的に変更させることで特性化される。一実施例において、過ヨウ素酸塩処理がシアル酸のC6側鎖を破壊させるために使用される。分析法は未処理試料における結合がシアル酸特異的であるのかを特定するために過ヨウ素酸塩を処理するか、または処理せずに行われる。一部の場合、9-O-アセ

チル化されたシアル酸を含む抗原は弱い塩基で（例えば、0.1 M NaOHで）処理され、9-O-アセチル基を破壊する。分析法は未処理試料での結合がシアル酸の9-O-アセチル化に依存するかを特定するために弱い塩基で処理するか、または処理せずに行われる。

【0128】

目的のハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンは制限希釈過程によってサブクローニングされ、標準方法によって増殖される。このような目的のための適切な培養培地は、例えばDulbeccoの変更されたイーグル培地及びRPMI-1640培地を含む。他には、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物の腹水において生体内で増殖される。

【0129】

ハイブリドーマをクローニングするための代案的な方法は、STEMCELL Technologies（カナダブリティッシュコロンビア州バンクーバー所在）のハイブリドーマクローンの選別及び増殖を補助するためのメチルセルロースベースの半固体培地、他の培地及び試薬を含むキット、例えばCLONACELL（商標）-HYキットを含む。しかし、このキット内の培地はFCSを含有しており、これは、Neu5Gc取り込みについて外因性の供給源を提供する。内因性Neu5Gcの合成のための機構はCmah-/-ハイブリドーマで破壊されているが、培養培地から取り込まれたNeu5Gcもまた、一部の場合に問題を引き起こす恐れがある（Bardor, M. など、Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells. J Biol Chem. 2005. 280:4228-4237）。このような場合、培養培地はNeu5Acが補充されて、代謝競争によりNeu5Gc取り込みを排除される（Ghaderi, D. など、Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. Nat Biotechnol. 2010. 28:863-867）。

【0130】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は通常免疫グロブリン精製過程、例えばタンパク質-A-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析または親和性クロマトグラフィーによって、培養培地または腹水液から単離されるか、または精製される。

【0131】

また他の具現例において、本発明のモノクローナル抗体はまた、例えば米国特許第4、816、567号（この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）に記載されたように組換えDNA方法によって製造される。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは通常の方法（例えば、ネズミ抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて）を使用して容易に単離され、配列分析され得る。本発明のハイブリドーマ細胞はDNAの好ましい供給源として作用する。単離が行われれば、DNAは発現ベクター内に置かれ、これは次に宿主細胞、例えば免疫グロブリンタンパク質を他の方式で生産しないサル（simian）のCOS細胞、チャイニーズハムスターの卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞でモノクローナル抗体の合成を獲得できる。DNAはまた、例えば相同性のネズミ配列（米国特許第4、816、567号）の代わりにヒトの重鎖及び軽鎖の定常ドメインに対するコード配列を置換するか、または免疫グロブリンのコード配列を非免疫グロブリンポリペプチドに対するコード配列の全部、または一部に共有結合的に結合させることで改変される。このような非免疫グロブリンポリペプチドは本発明の抗体の定常ドメインを置換するか、または本発明の抗体の抗原結合部位の可変ドメインを置換してキメラ性二価抗体を生成させる。

【0132】

一部の具現例において、本発明の抗体（例えば、グリカン相互作用抗体）は当業者によって公知の多様な方法によって生産される。生体内でポリクローナル抗体を生産するために、宿主動物、例えば、ウサギ、ラット、マウス、牛、馬、ロバ、鶏、サル、羊、またはヤギが、例えば腹腔内注射及び／または皮内注射によって遊離型のまたは担体にカップリングされた抗原に免疫化される。一部の具現例において、注射物質は約100 µgの抗原または担体タンパク質を含有するエマルジョンであってもよい。一部の具現例において、注射物質は溶液中にグリカン豊富組成物、例えば非ヒト哺乳類の顎下腺ムチンを含む。宿主種に応じて、免疫学的反応を増加させるために多様な補助剤がまた使用される。補助剤は、非制限的にフロイント（完全及び不完全）、無機ゲル、例えばアルミニウムヒドロキシド、表面活性物質、例えばリゾレシチン、フルロンポリオール、ポリアニオン、ペプチドまたはオイルエマルジョン、T I T E R M A X（登録商標）（C y t R C o r p、カリフォルニア州ロサンゼルス所在）、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、及び潜在的に有用なヒト補助剤、例えばB C G（バシル・カルメット・ゲラン）及びコリネバクテリウムパルブムを含む。例えば、個体表面に吸着されたグリカン及び／または遊離ペプチドを使用するE L I S A分析法によって検出される有用な力価の抗体を提供するため、例えば約2週間の間隔でいくつかのブースタ注射を必要とする。免疫化された動物の血清のうち抗体価は抗体の選別によって、例えば個体支持体上への抗原の吸着及び当業界に公知の方法に従って選別された抗体の溶離によって増加される。

【0133】

グリカン相互作用抗体、この変異体及び断片は高性能方法の発見を使用して選別されて生産される。1つの具現例において、合成抗体、この変異体及び断片を含むグリカン相互作用抗体はディスプレイライブラリーの使用を介して生産される。本願において用いられたように、用語「ディスプレイ」は与えられた宿主の表面上でタンパク質、またはペプチドの発現、または「ディスプレイ」を称する。本願において用いられたように、用語「ライブラリー」は独特のc D N A配列及び／またはこれによってコードされたタンパク質の集合を称する。ライブラリーは最小限に2つの独特のc D N Aから数十億個の固有のc D N Aまで含有する。好ましい具現例において、合成抗体を含むグリカン相互作用抗体は抗体ディスプレイライブラリー、または抗体断片ディスプレイライブラリーを使用して生産される。本願において用いられたように、用語「抗体断片ディスプレイライブラリー」は、それぞれの構成要素が抗体の1つ以上の可変ドメインを含有する抗体断片をコードするディスプレイライブラリーを称する。このような抗体断片は好ましくはF a b断片であるが、他の抗体断片、例えば一本鎖可変断片（s c F v）がまた考慮される。F a b抗体の断片ライブラリーにおいて、コードされたそれぞれのF a bは、F a b断片の相補性決定領域（C D R）の可変ループ内に含有されたアミノ酸配列を除いては同一である。代案的または追加の具現例において、個別的なV_H及び／またはV_L領域内のアミノ酸配列もまた異なる。

【0134】

ディスプレイライブラリーは、非制限的に酵母、バクテリオファージ、バクテリア及びレトロウイルスをはじめ、多数の可能な宿主で発現される。使用される追加のディスプレイ手法はリボゾームディスプレイ、マイクロビーズディスプレイ及びタンパク質-D N A結合手法を含む。好ましい具現例において、F a bディスプレイライブラリーは酵母またはバクテリオファージ（本願に「ファージ」または「ファージ粒子」とも称される）で発現される。発現される場合、F a bはこれらが与えられた抗原と相互作用することができるファージまたは酵母の表面を装飾する。目的の標的からグリカンまたは他の抗原を含む抗原は、その抗原に対してもっとも高い親和性を有する抗体断片を発現するファージ粒子または酵母細胞を選別することに使用される。次に、結合された抗体断片のC D RをコードするD N A配列は結合された粒子、または細胞を使用する配列分析を介して決定される。一具現例において、陽性選択が抗体開発において使用される。一部の具現例において、陰性選択が抗体開発で使用される。一部の具現例において、陽性及び陰性選択方法の両方がディスプレイライブラリーを使用する抗体の開発において多様なステップの選別の間に使

10

20

30

40

50

用される。

【0135】

酵母ディスプレイにおいて、異なる抗体断片をコードするcDNAが酵母細胞内に導入されてそこで発現され、抗体断片はChaoなどによって記載されたように細胞表面上で「ディスプレイ」される(Chao、G. など、Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. Nat Protoc. 2006; 1(2): 755-68)。酵母表面ディスプレイにおいて、発現された抗体断片は酵母凝集素タンパク質のAgapを含む追加のドメインを含有する。このようなドメインは抗体断片溶融タンパク質が表面に発現されたAgalpとのジスルフィド結合の形成を介して酵母細胞の外部表面に付着されるようにする。このような結果は特定の抗体断片でコーティングされた酵母細胞である。このような抗体断片をコードするcDNAのディスプレイライブラリーは初期に利用され、この際、抗体断片のそれぞれは独特の配列を有する。このような融合タンパク質は、目的の抗原性標的抗原と相互作用できる数百万個の酵母細胞の細胞表面で発現され、細胞とともに培養される。標的抗原は適切な抗体断片との成功的な結合が発生した後、効率的に細胞が分類されるように化学的、または磁気的な基で共有的にまたは他の方式で修飾される。回収は磁気活性化細胞分離(MACS)、蛍光活性化細胞分類(FACS)、または当業界に公知の他の細胞分類方法による方式であってもよい。酵母細胞の下位群が選別されれば、対応するプラスミドを分析してCDR配列を決定する。

【0136】

バクテリオファージディスプレイ手法は、非制限的にfd、F1及びM13ビリオンをはじめ、繊維状ファージを典型的に利用する。このような菌種は非溶菌性であるため、宿主の継続された増殖及びウィルス力価の増加を可能とする。本発明の抗体を製造することに使用されるファージディスプレイ方法の例は、Mierschなど(Miersch、S. など、Synthetic antibodies: Concept, potential and practical consideration. Methods. 2012 Aug; 57(4): 486-98)、Bradburyなど(Bradbury、A. R. など、Beyond natural antibodies: the power of in vitro display Technologies. Nat Biotechnol. 2011 Mar; 29(3): 245-54)、Brinkmanなど(Brinkmann、U. など、Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments. J Immunol Methods. 1995 May 11; 182(1): 41-50)と、Amesなど(Ames、R. S. など、Conversion of murine Fabs isolated from a combinatorial phage display library to full length immunoglobulins. J Immunol Methods. 1995 Aug 18; 184(2): 177-86)と、Kettleboroughなど(Kettleborough、C. A. など、Isolation of tumor cell-specific single-chain Fv from immunized mice using phage-antibody libraries and the re-construction of whole antibodies from these antibody fragments. Eur J Immunol. 1994 Apr; 24(4): 952-8)と、Persicなど(Persic、L. など、An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. Gene. 1997 Mar 10; 187(1): 9-18)と、PCT国際特許出願第PCT/GB91/01134号と、PCT国際公開第WO90/02809号と、第WO91/10737号と、第WO92/010

47号と、第WO92/18619号と、第WO93/11236号と、第WO95/15982号と、第WO95/20401号と、及び米国特許第5、698、426号と、第5、223、409号と、第5、403、484号と、第5、580、717号と、第5、427、908号と、第5、750、753号と、第5、821、047号と、第5、571、698号と、第5、427、908号と、第5、第516、637号と、第5、780、225号と、第5、658、727号と、第5、733、743号及び第5、969、108号（これらのそれぞれはすべて参照により本願に組み込まれる）に開示されたものと、を含む。バクテリオファージにおける抗体断片の発現は、断片をコードするcDNAをウイルス外皮タンパク質を発現する遺伝子に挿入することで行われる。糸状バクテリオファージのウィルス外皮は単一鎖のゲノムによってコードされた5つの外皮タンパク質からなる。外皮タンパク質pIIIが典型的にN-末端で抗体断片を発現させるための好ましいタンパク質である。抗体断片の発現がpIIIの機能を脅かす場合、ウィルス機能は野生型pIIIの同時発現を介して回復されるが、このような発現がウィルス外皮上で発現される抗体断片の数を減少させると考えられるにもかかわらず、標的抗原による抗体断片の接近性が向上する。ウイルス及び抗体断片のタンパク質の発現は代案的に多数のプラスミド上にコードされる。このような方法は感染性プラスミド全体のサイズを減少させ、形質転換の効率を向上させるために使用される。

10

【0137】

前述されたように、高親和性抗体または抗体断片（例えば、グリカン相互作用抗体）を発現する宿主を選別した後、抗体または抗体断片からのコード領域は単離されてヒト抗体を含めて全体の抗体、または任意の他の目的の抗原結合の断片を生産することに使用され、例えば、以下に詳細に説明されるように哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母及びバクテリアを含んで任意の目的とする宿主から発現される。

20

【0138】

高親和性抗体をコードするDNA配列は、親和性成熟（maturation）として公知された追加の選別段階で突然変異される。本願において用いられたように、用語「親和性成熟」は、抗体が、抗体-または抗体断片-コードcDNA配列の突然変異及び選別の連続的な段階を介して与えられた抗原に対する親和性を増加させることで、生産される方法を称する。一部の場合、このような方法は試験管内で行われる。これを達成するために、CDRコード配列の増幅は、非制限的に点突然変異、局地的突然変異、挿入突然変異及び欠失突然変異を含む、突然変異を含有する数百万個のコピーを生成するために、エラーが発生しやすいPCRを使用して行われる。本願において用いられたように、用語「点突然変異」は、ヌクレオチド配列内の1つのヌクレオチドが異なるヌクレオチドに変化された核酸突然変異を称する。本願において用いられたように、用語「局地的突然変異」は、2つ以上の連続的なヌクレオチドが異なるヌクレオチドに変化された核酸突然変異を称する。本願において用いられたように、用語「挿入突然変異」は、1つ以上のヌクレオチドがヌクレオチド配列内に挿入された核酸突然変異を称する。本願において使用されたように、用語「欠失突然変異」は1つ以上のヌクレオチドが核酸配列から取り除かれた核酸突然変異を称する。挿入または欠失突然変異は開始コドンの1つまたは2つのヌクレオチドを変更させることで全体コドンの完全な置換、または1つのコドン进行他のコドンに変化させることを含む。

30

40

【0139】

突然変異の誘発はCDRをコードするcDNA配列上で行われ、CDR重鎖及び軽鎖の領域で単一突然変異を有する数百個の突然変異が生成される。他のアプローチでは、無作為突然変異が親和性を向上させる可能性が最も大きいCDR残基でのみ導入される。このように新たに生成された突然変異誘発性ライブラリーは標的抗原に対するより高い親和性を有する抗体断片をコードするクローンを選別する過程を繰り返すために使用される。継続される突然変異及び選別段階はより大きく、より大きい親和性を有するクローンの合成を促進する（Chao, G. など、Isolating and engineering human antibodies using yeast surface d

50

display. Nat Protoc. 2006; 1 (2) : 755 - 68)。

【0140】

抗体及び抗体断片、例えばFab及びscFvを生産することに使用される手法の例は、米国特許第4、946、778号及び第5、258、498号と、Mierschなど (Miersch、S. など、Synthetic antibodies: Concepts, potential and practical considerations. Methods. 2012 Aug; 57 (4) : 486 - 98)、Chaoなど (Chao、G. など、Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. Nat Protoc. 2006; 1 (2) : 755 - 68)、Hustonなど (Huston、J. S. など、Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. Methods Enzymol. 1991; 203 : 46 - 88) と、Shuなど (Shu、L. など、Secretion of a single-gene-encoded immunoglobulin from myeloma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Sep 1; 90 (17) : 7995 - 9) と、Skerraなど (Skerra、A. など、Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. Science. 1988 May 20 ; 240 (4855) : 1038 - 41) (これらはそれぞれすべて参照により本願に組み込まれる) に記載されたことを含む。

【0141】

ヒトにおける抗体 (例えば、グリカン相互作用抗体) の生体内使用及び試験管内の検出分析をはじめ、一部の用途において、キメラ性抗体、ヒト化された抗体またはヒト抗体を使用することが好ましい。キメラ抗体は抗体の異なる部分が異なる動物種から由来した分子、例えば、ネズミモノクローナル免疫グロブリン由来の可変ドメインとヒト免疫グロブリン定常領域とを有する抗体である。キメラ抗体の製造方法は当業界によく知られている (Morrison、S. L. , Transfectomas provide novel chimeric Antibodies. Science. 1985 Sep 20 ; 229 (4719) : 1202 - 7 と、Gillies、S. D. など、High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes. J Immunol Methods. 1989 Dec 20 ; 125 (1 - 2) : 191 - 202 と、米国特許第5、807、715号と、第4、816、567号及び第4、816、397号、これらはすべて参照により本願に組み込まれる)。

【0142】

ヒト化された抗体は、目的とする抗原に結合するとともに非ヒト種由来の1つ以上の相補性決定領域 (CDR) とヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを有する、非ヒト種由来の抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域のうちフレームワーク残基が、抗原結合を変更、好ましくは改善すべく、ドナー抗体のCDR及びフレームワーク領域由来の対応する残基と置換される。このようなフレームワーク置換は、当業界に公知の方法、例えば抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDR及びフレームワーク残基の相互作用のモデル化によって、及び、特定の位置での非通常のフレームワーク残基を同定するための配列比較によって、同定される (米国特許第5、693、762号及び第5、585、089号と、Riechmann、L. など、Reshaping human antibodies for therapy. Nature. 1988 Mar 24 ; 332 (6162) : 323 - 7、これらはすべて参照により本願に組み込まれる)。抗体は、例えばCDR-グラフティング (欧州特許第239、400号と、PCT国際公開第WO91/09967号と、米国特許第5、225539号と、第5、530、101号と、第5、585、089号) と、ベニアリングまたは再

表面化 (resurfacing) (欧州特許第592、106号と、欧州特許第519、596号と、Padlan、E. A., A Possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. Mol Immunol. 1991 Apr-May; 28 (4-5): 489-98と、Studnicka、G. M. など、Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementary-modulating residues. Protein Eng. 1994 Jun; 7 (6): 805-14と、Roguska、M. A. など、Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1; 91 (3): 969-73) と、鎖シャッフリング (米国特許第5、565、332号) (これらのそれぞれはすべて参照により本願に組み込まれる) と、を含んで、当業界に公知の多様な手法を用いてヒト化される。本発明のヒト化された抗体は目的とする結合特異性、補体依存性細胞傷害、及び抗体依存性細胞媒介性細胞傷害などに対して開発される。

【0143】

完全なヒト抗体 (例えば、グリカン相互作用抗体) は、外来タンパク質に対する免疫反応を回避するか、または緩和させるために、ヒト患者の治療的処置のために特に好ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列から由来した抗体ライブラリーを使用し、前述した抗体ディスプレイ方法を含む、当業者に公知の多様な方法によって作成される。また、米国特許第4、444、887号及び第4、716、111号と、及びPCT国際公開第WO98/46645号、第WO98/50433号、第WO98/24893号、第WO98/16654号、第WO96/34096号、第WO96/33735号、及び第WO91/10741号 (これらのそれぞれはすべて参照により本願に組み込まれる) と、を参照してほしい。

【0144】

ヒト抗体 (例えば、グリカン相互作用抗体) はまた機能的な内因性免疫グロブリンを発現できないが、ヒト免疫グロブリンポリヌクレオチドは発現できる形質転換マウスを使用して製造される。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリンポリヌクレオチド複合体は無作為に、または相同性組換えによってマウス胚性幹細胞内に導入される。他には、ヒト可変ドメイン、定常領域及び多様性領域はヒト重鎖及び軽鎖ポリヌクレオチドに追加してマウス胚性幹細胞内に導入される。マウス重鎖及び軽鎖免疫グロブリンポリヌクレオチドは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入とは別に、また同時に非機能性になる。特に、J_H領域のホモ接合体の欠失は内因性抗体の生産を妨害する。改変された胚性幹細胞は拡張され、胚盤胞内に微細注入されてキメラマウスが製造される。以降、キメラマウスは繁殖されてヒト抗体を発現するホモ接合の子孫を生産する。形質転換マウスは選択された抗原、例えばグリカン、糖接合体及び/または本発明のポリペプチドの全部または一部で正常の方式で免疫化される。

【0145】

従って、このような手法を用いて、有用なヒトIgG、IgA、IgD及びIgE抗体を生産することができる。ヒト抗体生産に対する技術の概要について、Lonberg及びHuszar (Lonberg、N. など、Human antibodies from transgenic mice. Int Rev Immunol. 1995; 13 (1): 65-93) を参照してほしい。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体の生産技術及びこのような抗体の生産プロトコールに関する詳細な議論について、例えばPCT国際公開第WO98/24893号と、第WO92/01047号と、第WO96/34096号と、第WO96/33735号と、米国特許第5、413、923号と、第5

10

20

30

40

50

、625、126号と、第5、633、425号と、第5、569、825号と、第5、661、016号と、第5、545、806号と、第5、814、318号と、第5、885、793号と、第5、916、771号と、第5、939、598号と、第6、075、181号と、及び第6、114、598号（これらのそれぞれはすべて参照により本願に組み込まれる）と、を参照してほしい。また、会社、例えばAbgenix、Inc.（カリフォルニア州フリーモント所在）、Protein Design Labs、Inc（カリフォルニア州マウンテンビュー所在）及びGenpharm（カリフォルニア州サンノゼ所在）は前述された技術と類似した技術を用いて選択された抗原に対して指示されたヒト抗体を提供するように契約される。

【0146】

10

本発明の抗体分子が動物、細胞株、化学的な合成または組換え発現によって生産されれば、これは免疫グロブリンまたはポリペプチド分子の精製のために当業界に公知の任意の方法によって、例えばクロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、特に特定の抗原に対する親和性、タンパク質A及びサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、差別化された溶解度によって、またはタンパク質精製のための任意の他の標準手法によって精製（すなわち、単離）される。また、本発明の抗体またはこの断片は本願に記載されているか、または他に当業界に公知の異種ポリペプチド配列に融合されて精製を容易にすることができる。

【0147】

抗原と標的、またはリガンド（例えば、与えられた抗体の生産に使用された抗原）の間の親和性は、本願に記載されたように1つ以上の結合分析法を用いて K_D という用語で測定される。与えられた抗体の目的とする適用に応じて、多様な K_D 値が好ましい。高親和性抗体は典型的に約 10^{-5} M以下、例えば約 10^{-6} M以下、約 10^{-7} M以下、約 10^{-8} M以下、約 10^{-9} M以下、約 10^{-10} M以下、約 10^{-11} M以下または約約 10^{-12} M以下の K_D を有するリガンド結合する形成する。

20

【0148】

一部の具現例において、本発明の抗体はその半数効果濃度または半数阻害濃度（それぞれ EC_{50} または IC_{50} ）によって特性化される。一部の場合、このような値は最も高い濃度の抗体で観察された最大抑制の半分に当たる水準でSTnを発現する細胞を阻害（例えば、死滅、増殖減少及び／または1つ以上の細胞機能が減少）することに必須の抗体の濃度を表す。このような IC_{50} 値は約0.001 nM～約0.01 nM、約0.005 nM～約0.05 nM、約0.01 nM～約1 nM、約0.05 nM～約5 nM、約0.1 nM～約10 nM、約0.5 nM～約25 nM、約1 nM～約50 nM、約5 nM～約75 nM、約10 nM～約100 nM、約25 nM～約250 nM、約200 nM～約1000 nMまたは約1000 nM超であってもよい。

30

【0149】

モノクローナルまたはポリクローナルの製造が当業界によく知られている。抗体生産手法が当業界によく知られており、例えばHarlow及びLane「Antibodies、A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988及びHarlow及びLane「Using Antibodies：A Laboratory Manual」Cole Spring Harbor Laboratory Press、1999に記載されている。

40

【0150】

[標的]

本発明のグリカン相互作用抗体は、結合を介して（可逆的または非可逆的に）1つ以上のグリカンまたはグリカン相互作用抗体またはグリカン関連標的に対するこれらの効果を発揮する。一部の具現例において、グリカン相互作用抗体は本願に教示された標的の任意の領域から製造される。一部の具現例において、本発明の標的はグリカンを含む。抗体の生産に使用されたグリカンは2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個

50

以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、15個以上、16個以上、17個以上、18個以上、19個以上または20個以上の残基を含む糖鎖を含んでもよい。好ましくは、抗体の生産に使用されたグリカンは約2個の残基～5個の残基を含む。

【0151】

一部の具現例において、グリカン相互作用抗体の標的抗原はシアル酸を含む。N - アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) 及びN - グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) は哺乳類の細胞表面上の主要なシアル酸である。このうち、Neu5Acはヒトから自然的に生産される。Neu5Gcは、CMP - Neu5AcからCMP - Neu5Gcの生産を担当するシチジンモノホスファート (CMP) - N - アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ (CMAH) 遺伝子からの突然変異に起因して、ヒトを除いた大半の哺乳類から自然的に生産される。ヒトにおけるNeu5Gcは実際に抗Neu5Gc抗体を発現するほぼすべてのヒトにとって免疫原性である。生産不足にもかかわらず、大半のヒト界は食餌摂取によって一定水準のNeu5Gcを含む。このような外来生成物は次にヒト糖タンパク質に混入される。このような糖タンパク質が本発明の標的として考慮される。本発明のグリカン標的抗原は非制限的に表1に並べられたものを含む。

【0152】

【表 1 - 1】

表 1. グリカン標的抗原

グリカン	
GalNAc α -R	
Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Gal β 1,3GalNAc β -R	10
Gal β 1,3GlcNAc α -R	
Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β -R	
Gal β 1,3GlcNAc β -R	
Gal β 1,4GlcNAc6S β -R	
Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Gal β 1,4Glc β -R	20
KDN α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
KDN α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R	
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	30
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,6GalNAc α -R	
Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R	40
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β -R	

【 0 1 5 3】

【表 1 - 2】

Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R	10
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β -R	
Neu5Ac α 2,6(KDN α 2,3)Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,6(Neu5Ac α 2,3)Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,6(Neu5Gc α 2,3)Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,6GalNAc α -R	20
Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,6Gal β -R	
Neu5Ac α 2,8KDN α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	30
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	40
Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R	
Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R	
Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R	

【表 1 - 3】

Neu5Gc9Acα2,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gc9Acα2,3Galβ-R
Neu5Gc9Acα2,6GalNAcα-R
Neu5Gc9Acα2,6Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gc9Acα2,6Galβ-R
Neu5GcOMeα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,3GalNAcα-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,3GalNAcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,3GlcNAcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAc6Sβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,4(Fucα1,3)GlcNAcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,4GlcNAc6Sβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gcα2,3Galβ-R
Neu5Gcα2,6GalNAcα-R
Neu5Gcα2,6Galβ1,4GlcNAcβ-R
Neu5Gcα2,6Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gcα2,6Galβ-R
Neu5Gcα2,8Neu5Acα2,3Galβ1,4Glcβ-R
Neu5Gcα2,8Neu5Gcα2,3Galβ1,4Glcβ-R

10

20

30

以下の略語が本願において使用される：G l c：グルコース、G a l：ガラクトース、G l c N A c：N - アセチルグルコサミン、G a l N A c：N - アセチルガラクトサミン、G l c N A c 6 s：スルホ - N - アセチルグルコサミン、K D N：2 - ケト - 3 - ジオキシ - グリセロ - D - ガラクトノノン酸、N e u 5 , 9 A c 2：N - アセチル - 9 - O - アセチルノイラミン酸、F u c：フコース及びN e u 5 G c O M e：2 - O - メチル - N - グリコリルノイラミン酸。O - グリコシド結合は結合によって連結された2つの残基の間の相対的な化学量論を表すα及びβで並べられたグリカン内の各残基の間に存在し、この際、αは軸配向を表し、βは赤道配向を表す。それらのα及びβに続く、形式x、x中の数値は結合形成に参加するそれぞれの隣接した残基のそれぞれの炭素数を表す。表1に並べられたグリカンは考慮された個別的なグリカン標的抗原を表すが、本発明はまた以上に提示されたグリカンが提示された1つのものよりα及びβ配向されたO - グリコシド結合の異なる組換えを含む具現例を含む。また、表1において、Rはグリカンがカップリン

40

50

グされる実体を表す。一部の具現例において、Rはグリカンが典型的にセリンまたはトレオニン残基に連結されたタンパク質である。一部の具現例において、Rはグリカンを経由して物質、例えばグリカンアレイに結合されることに使用されるリンカー分子である。一部の具現例において、Rは $-(CH_2)_2CH_2NH_2$ 、または $-(CH_2)_3NHCOCH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$ を含むリンカーである。一部の具現例において、Rはビオチン、アルブミン、プロNH₂、 $-CH-$ 、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 、 $-OCH_2CH_3$ 、 $-H$ 、ヒドリド、ヒドロキシ、アルコキシル、酸素、炭素、硫黄、窒素、ポリアクリルアミド、リン、NH₂、プロNH₂=O $(CH_2)_2CH_2NH_2$ 、 $(OCH_2CH_2)_6NH_2$ 、O $(CH_2)_3NHCOCH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$ 、蛍光標識2-アミノベンズアミド(AB)及び/または2-アミノ安息香酸(AA)、アルキルアミンを含有する2-アミノベンズアミド類似体(AEAB)、アミノオキシ基、メチルアミノオキシ基、ヒドラジド基、アミノリピド1、2-ジヘキサデシル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DHPE)、アミノオキシ(AO)機能化されたDHPE及びグリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)である。Rの供給源または性質を制限するための意図はなく、これはグリカン残基の物理的な離隔に影響を及ぼす構造を含む。一部の具現例において、R基は本願に提示されたR基の組み合わせ、例えばビオチニル化されたポリアクリルアミドを含む。一部の具現例において、基底基質と組み合わせられたR基はグリカン残基を離隔することに影響を及ぼす。

【0155】

本発明のグリカン標的は抗体認識領域を含む。本願において用いられたように用語「抗体認識領域」は分子の任意の部分、付着された基上に位置するか、またはグリカンと非制限的にまた他のグリカンをはじめ、また他の分子間の相互作用領域に位置する1つ以上の領域を称する。一部の具現例において、抗体認識領域はインターチェイン(interchain)標的部位に位置し、この際、用語インターチェインは本発明の重合体性鎖内を意味する。インターチェインの標的部位は1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個以上の残基を含む抗体認識領域、残基の間の結合、または残基と結合の組み合わせを含む。一部の具現例において、抗体認識領域は1つ以上のグリカン鎖の間の相互作用領域に位置する。このような領域は2、3、4、または5個以上のグリカン鎖の間である。

【0156】

一部の具現例において、抗体認識領域は共通の母鎖に連結されたグリカン分枝鎖の間の相互作用領域に位置する。一部の具現例において、抗体認識領域はグリカン分枝鎖と母鎖間の相互作用領域に位置する。一部の具現例において、抗体認識領域は、グリカンとタンパク質の間の相互作用領域に位置する。このような相互作用領域は、非制限的に共有結合、イオン結合、流体静力学的な結合、疎水性結合及び水素結合をはじめ、グリカンとタンパク質の間に化学的結合を含む。一部の具現例において、抗体認識領域はグリカンと非制限的に脂質及び核酸をはじめ、他の生体分子の間の相互作用領域に位置する。このような相互作用領域は、非制限的に共有結合、イオン結合、流体静力学的な結合、疎水性結合及び水素結合をはじめ、グリカンと生体分子の間に化学的結合を含む。

【0157】

一部の具現例において、本発明のグリカン標的は糖集合体の構成成分である。本願において用いられたように、用語「糖接合体」はグリカン部分構造を含む任意の実体を称する。一部の具現例において、糖接合体は糖脂質である。本願において用いられたように、用語「糖脂質」は炭水化物部分構造が共有的に付着された脂質部類を称する。一部の具現例において、炭水化物部分構造はグリカンを含む糖脂質上に存在する。一部の具現例において、糖脂質の脂質構成成分はセラミド部分構造を含む。本発明の標的として考慮される糖脂質の例は、非制限的にグリセログリコリピド(非制限的に、ガラクトリピド及びスルホリピドを含む)、グリコスフィンゴリピド(非制限的に、セレブロシド(例えば、ガラクトセレブロシド、グルコセレブロシド及びスルファチド)を含む)、ガングリオシド、グロボシド、及びグリコホスホスフィンゴリピド)、及びグリコシルホスファチジルイノシトールを含む。細胞膜内に位置する場合、糖脂質のグリカン部分構造は細胞シグナル伝達

10

20

30

40

50

リガンドのみならず、他の細胞と相互作用できる膜の細胞外の側面上に位置する (Maccioni, H. J. など、Organization of synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex, FEBS Lett. 2011 Jun 6; 585 (11): 1691 - 8)。

【0158】

一部の具現例において、本発明の糖接合体の標的は糖タンパク質及び／またはプロテオグリカンである。糖タンパク質はグリカンに共有的に結合された任意のタンパク質を称する。プロテオグリカンはたびたび陰電荷を有するグリカンで高度に糖化されたタンパク質部類である。このような特性はこれらを非常に親水的で結合組織の重要な構成部分になるようにする。

10

【0159】

[組換え抗体]

本発明の組換え抗体 (例えば、グリカン相互作用抗体) は、当業界に公知の標準手法を用いて生産される。一部の具現例において、組換え抗体は抗グリカン抗体である。また、抗体は抗STn抗体 (例えば、抗GcSTnまたは抗AcSTn抗体) である。本発明の組換え抗体は本願に記載された方法によって製造されたハイブリドーマ細胞 - 由来の抗体から獲得された可変ドメインを使用して生産される。抗体の重鎖及び軽鎖可変ドメインのcDNA配列は標準生化学的手法を用いて決定される。総RNAは抗体生産ハイブリドーマ細胞から抽出されて逆転写酵素 (RT) の重合酵素鎖反応 (PCR) によってcDNAに転換される。PCR増幅は可変ドメインの遺伝子を増幅するために生産されたcDNA上で行われる。このような増幅は重鎖及び軽鎖配列の増幅に特異的なプライマーの使用を含む。他の具現例において、組換え抗体は他の供給源から獲得された可変ドメインを使用して生産される。これは1つ以上の抗体断片ライブラリー、例えば抗原パニングに使用されたscFvライブラリーから選択された可変ドメインの使用を含む。次に、生成されたPCR産物は配列分析のためにプラスミド内にサブクローニングされる。配列が決定されれば、抗体コード配列は発現ベクター内に配置される。ヒト化のため、ヒト重鎖及び軽鎖の定常ドメインのコード配列は相同性のネズミ配列を置換するために使用される。生成された構造体は次に大規模な翻訳のために哺乳類細胞内に形質移入される。

20

【0160】

[抗Tn抗体]

一部の具現例において、本発明の組換え抗体 (例えば、グリカン相互作用抗体) は抗Tn抗体である。このような抗体はTnを含む標的に結合する。抗Tn抗体はTnに特異的であるか、または他の改変された形態のTn、例えば非制限的に追加的な炭水化物残基をはじめ、他の部分構造に連結されたTnに結合する。一部の場合、抗Tn抗体は抗シアリルTn抗体である。このような抗体はNeu5Acを含むシアリル化されたTnを含む標的及び／またはNeu5Gcを含むシアリル化されたTnを含む標的に結合する。一部の抗Tn抗体はTn抗原のクラスターに特異的に結合する。

30

【0161】

[抗STn抗体]

一部の具現例において、本発明の抗体 (例えば、グリカン相互作用抗体) はSTnを含む抗原に特異的に結合する。本発明の抗STn抗体はSTn抗原の特定部分に対するこれらの結合及び／またはAcSTn対GcSTnに対するこれらの特異性によって分類される。一部の場合、本発明の抗STn抗体は第1群抗体である。本発明による「第1群」抗体はAcSTn及びGcSTnに結合する抗体である。このような抗体はまたより広い範囲のSTn構造と結合するこれらの能力に起因してpan-STnとも本願において称される。一部の具現例において、第1群抗体は図1Aの大きい楕円で表示されるSTnの部分に結合する。一部の場合、本発明の抗STn抗体は第2群抗体である。本発明による「第2群」抗体はSTn及び、セリンまたはトレオニンに対するO-結合を含むいくつかに係る構造に結合する抗体である。一部の具現例において、第2群抗体はシアリル化された

40

50

ガラクトース残基を含むグリカンに結合する。一部の場合、第2群抗体は図1Bの大きい楕円で表示されたSTnの部分に結合する。一部第2群抗体は好ましくはGcSTnを有する構造上にAcSTnを有する構造に結合する。追加の抗STn抗体は第3群抗体である。本願において言及されたように、「第3群」抗体はSTnに結合する抗体であるが、より大きいセットに係る構造にもまた結合する。第2群抗体とは異なって、第3群抗体はこのような構造がセリンまたはトレオニンに対するO-結合を有することを要求しない。一部の具現例において、第3群抗体は図1Cの大きい楕円に表示されたSTnの部分に結合する。最後に、本発明の一部の抗STn抗体は第4群抗体である。本願に言及されたように、「第4群」抗体はAcSTn及びGcSTnの両方のみならず、非シアリル化されたTn抗原に結合し、従ってより広い特性を有する。一部の具現例において、第4群抗体は図1Dの大きい楕円で表示されたSTnの部分に結合される。

10

【0162】

一部の具現例において、抗STn抗体は特定抗原または細胞表面上のSTnクラスターに特異的に結合する。一部のこのような抗体は、隣接したSTn構造の間の接触領域を含むエピトープを含んで、STnのクラスター化によって形成されたエピトープを認識することができる。このようなエピトープは2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはこれ以上のSTn構造のクラスター化によって形成される。

【0163】**[抗体構成成分]**

一部の場合、本発明の抗体またはこの抗原結合の断片は本願に提供された可変ドメイン及び／またはCDRAミノ酸配列を含む。一部の抗体または抗原結合の断片はこのような配列の異なる組み合わせを含む。一部の場合、本発明の抗体または抗原結合の断片は表2に並べられた1つ以上の可変ドメイン配列を含む。「X」で表示された残基は存在しないか、または任意のアミノ酸残基から選択される。表示提示された軽鎖可変ドメインはC-末端アルギニン残基を有しているか、または有せずに発現される。このような残基は典型的に軽鎖可変ドメインを軽鎖定常ドメインに連結させ、軽鎖可変ドメインの代わりに軽鎖定常ドメインの一部として発現される。一部の場合、抗体またはこの抗原結合の断片は表2に並べられた1つ以上の可変ドメイン配列またはこの断片（例えば、N-末端断片、C-末端断片または内部断片）と約50%～約99.9%の配列同一性（例えば、約50%～約60%、約55%～約65%、約60%～約70%、約65%～約75%、約70%～約80%、約75%～約85%、約80%～約90%、約85%～約95%、約90%～約99.9%、約95%～約99.9%、約97%、約97.5%、約98%、約98.5%、約99%、約99.5%、約99.6%、約99.7%または約99.8%）を有するアミノ酸配列を含む。

20

30

【0164】

【表 2 - 1】

表 2. 可変ドメイン配列

抗体番号	可変 ドメイ ン	配列	配列 番号
18D2	重鎖	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSNMGIGWIR QPSGKGLEWLAHIWWHDDKYYNPSLKSRLTISKDISNN QVFLKITSVDTADTATYYCAQVPFYGYGTSFDVWGTGTT VTVSS	1
18D2	軽鎖1	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQ KSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEP EDVGVIYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELK	2
18D2	軽鎖2	QIVLTQSPAIMASAPGETVTMTCSASSSITYMHYQQKP GTSPKRWIYDTSKLAGVPARFSGSGSGTSYSLTISSME AEDAATYYCHQRSSYTFGGGKLEIKR	3
18C7	重鎖	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTFGMGVWIR QPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNPALKSRLTISKDTSK NQVFLKIANVDTADTATYYCARIAYYGSERDYWGQG TTLTVSS	4
18C7	軽鎖	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSISYMHYHQKP GTSPKRWIYDTSKLAGVPARFSGSGSGTSYSLTISSME AEDAATYYCHQRSSYTFGGGKLEIKR	5
10A5 - 2A 12	重鎖	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTSYGVSWVRQ PPGKGLEWLGVWGDGSTNYHSSLISRLSISKDNSKSQV FLKLNSLQTDDTATYYCARAFVYWGQGLTVTSA	6
10A5 - 2A 12	軽鎖	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYIHWYQQKS GTSPKRWIYDTSKLAGVPARFSGSGSGTSYSLTISSME AEDAATYYCQQWSSNPMLTFGAGTKLELK	7
8C11 - 1D 10	重鎖	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTSYGVSWVRQ PPGKGLEWLGVWGDGSTNYHSALISRLIISKDNSKSQV FLKLNSLQTDDTATYYCTKGFTYWGQGLTVTSA	8

【表 2 - 2】

8C11 - 1D 10	軽鎖	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHWFQKK SGTSPKRWIFDTSKLGSGVAPARFSGSGSGTSYSLTISSME AEDAATYYCQQWSSNLLTFGAGTKLELK	9
2D4 - 1B4	重鎖	QVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLISYGVNWVRQ PPGKGLEWLGVWGDGSTNYQSALISRLIISKDNSKSQV FLKLNSLQTDDTATYYCTKGFAYWGQGLTVTVSA	10
2D4 - 1B4	軽鎖	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHWFQKK SGTSPKRWIYDTSKLGSGVAPARFSGSGSGTSYSLTISSME AEDAATYYCQQWSSNLLTFGAGTKLELK	11
7G9 - 1A8	重鎖	QVQLKESGPGLVAPSQNLITCTVSGFSLTSYGVNWVR QPPGKGLEWLGVWGDGSTNYHSALISRLIISKENSQS VFLKLNSLQTNDTATYYCTKGFVYWGQGLTVTVSA	12
7G9 - 1A8	軽鎖	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMHWFQKK SGTSPKRWIFDTSKLGSGVAPARFSGSGSGTSYSLTISSME AEDAATYYCQQWSSNLLTFGAGTKLELK	9
1A12 - 2B 2	重鎖	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTSYGVSWVRQ PPGKGLEWLGVWGDGSTNYHSALISRLSISKDNSKSQV FLKLNSLQTDDTATYYCAKGGYFDYWGQGTTLTVSS	13
1A12 - 2B 2	軽鎖	QIVLTQSPAVMSAPGEKVAITCSASSSVSYMHWFQKK PGTSPKLWIYSTSNLASGVAPARFSGSGSGTSYSLTISRME AEDAATYYCQQRSSYPWTFGGGKLEIK	14
7D3 - 2C1 0	重鎖	QVQLQYDAELVKPGGSVKISCKASGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYSEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSITTPYWGQGLTVTVSA	15
7D3 - 2C1 0	軽鎖	DIQMNQSPSSLSASLGDITITICHASQNINWLSWYQKK PGNIPKLLIYKVSNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQP EDIATYYCQQDQSYPTYFGGGTKLKK	16
A5 - 2G12	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSITTSYWGQGLTVTVSA	17

【表 2 - 3】

A5 - 2G12	軽鎖	NIVMTQSPKSMSSVGERVTLTCKASENVVIYVSWYQ QKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTSS VQAEDLADYHCGQGYSPYTFGGGKLEIKR	18
1A5 - 2C9	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHWVK QKPEQGLEWIGYVSPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKSS STAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSLIGDYWGQGTTLTVS S	19
1A5 - 2C9	軽鎖	DIVMTQSQKFMSSVGDRTITCKASQNVGTAVAWYQ QKPGQSPKFLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISN MQSEDLADYFCQYSSYRLTFGGGKLEIK	20
4D9 - 2C1 1	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHWVK QKPEQGLEWIGYLSPGNDDIKYSEKFKDKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSIGGDHWGQGTTLTVSS	21
4D9 - 2C1 1	軽鎖	DIQMNQSPSSLSASLGDITITCHASQNINWLNWYQQK PGNIPKLLIYKASNLHTGVPDRFSGSGSGTGFTLTIGSLQ PEDIATYYCQQGQSYPTFGGGKLEIKR	22
2F4 - 1E2	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYFCQRQLGQGYWGQGTTLTVS S	23
2F4 - 1E2	軽鎖	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGVEYFCSQNTHPYTFGGGKLEIKR	24
2F4 - 1H8	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYFCQRQLGQGYWGQGTTLTVS S	23
2F4 - 1H8	軽鎖	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSYGNTYLH WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGVEYFCSQNTHPYTFGGGKLEIKR	24

10

20

30

【表 2 - 4】

2C6 - 2F11	重鎖	QVQLQQSDAELGKPGASVKISCKASGYTFS DHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYFCERSMIGVYWGQGTTLTVS A	25
2C6 - 2F11	軽鎖	DVVMQTPTLSLTVSLGDQASISCRFSQSLVQSNGNTYLQ WYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFCGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEADLG VYFCSQSTHAPLTFGAGTKLELK	26
2B2 - 2A7	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKTSGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNDIKYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLSSLTPEDSAVYFCKISYYGIWGQGTTLTVSS	27
2B2 - 2A7	軽鎖	DIQMTQSPASLSVSVGESVTITCRLSEDIYSNLAWFQQR PGKSPQLLVYKATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSL QSEDFGTYYCQHFHWGTPFTFGSGTKVEIK	28
5G2 - 1B3	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFKVKATLTADKSS STAYMQLTSLTSEDSAVYFCKRSYYGDWGQGTTLTVSS	29
5G2 - 1B3	軽鎖	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSHLAWYQQK QGKSPQLLVYGATNLADGVPSRFSGSGSGTQFSLKIHSL QSEDFGSYYCQHFHWGAPFTFGSGTKLEIK	30
7A6 - 2A2	重鎖	QIQLQQSDAELVKPGTSVKMSCKASGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNVKFKGKATLTADKSS STAYMQLNSLTSEDSAVYFCSVGYALDYWGLGTTTLTVS S	31
7A6 - 2A2	軽鎖	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTVYSWYQ QKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISS VQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGKLEIKR	32
10C9 - 2G 7	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGTTVKISCKASGYTFTDHAIHWVK EKPEQGLEWIGYISPGNDDIKYSEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSDDSAVYFCKRSLSTPYWGQGTTLTVSA	33

10

20

30

【表 2 - 5】

10C9 - 2G 7	軽鎖	知られていない	
1C11 - 2G 9	重鎖	知られていない	
1C11 - 2G 9	軽鎖	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCRSSQSLLNSGNQKNY LTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTD FTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIKR	34
1F6 - 1B7 (また、1F6 - 1C10配 列)	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHWV MQMPEQGLEWIGYISPGNGDVKYSERFKGRATLTADKS SSSAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSLSTPYWGQGLTVT S	35
1F6 - 1B7 (また、1F6 - 1C10配 列)	軽鎖	DIVMTQSPSSLTVTAGERVMTMSCKSSQSLLNSGNQKSYL TWYQQKPGQPPKLLISWASTRDSGVPDRFTGSGSGTDF TLTISVQAEDLAVYYCQSDYSYPYTFGGGKLEIKR	36
2G12 - 2B 2	重鎖	QVQLQQSDXELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHWVK QKPEQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFRGKATLTADKSS STAYMQLNSLSSDDSAVYFCKRSLSTPYWGQGLXTVS A	37
2G12 - 2B 2	軽鎖	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNRGNHKNY LTWYRQKPGLPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF ALTISSVQAEDLAVYYCQNDYTYPYTFGGGKLEIKR	38
5E6 - 2E7	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASMKISCKASGYTFTDHAHWV KQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYNEKFKVKATLTADKS SSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSITTPYWGQGLTVT SA	39
5E6 - 2E7	軽鎖	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGKTKNY LTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTD FTLTISVQAEDLAVYYCKNDYSYPYTFGGGKLEIKR	40

10

20

30

【 0 1 6 9 】

【表 2 - 6】

9E5 - 1A8	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKTSGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNDDIKYTEKFKGKVTLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSITTPYWGQGLVTVSA	41	10
9E5 - 1A8	軽鎖	知られていない		
9F11 - 1F7	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASMKISCKASGYTFTDHAIHWV KQKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYNEKFKVKATLTADKS SSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSITTPYWGQGLVTV SA	39	20
9F11 - 1F7	軽鎖	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGKTKNY LTWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTD FTLTISSVQAEDLAVYYCKNDYSYPYTFGGGKLEIKR	40	
10F4 - 2F2	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYDEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSITTSYWGQGLVTVSA	42	30
10F4 - 2F2	軽鎖	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTVYVSWYQ QKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTIS VQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGKLEIKR	32	
2B8 - 2F10	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVFFCKRSITTSYWGQGLVTVSA	43	40
2B8 - 2F10	軽鎖	知られていない		
4G8 - 1E3	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMHLNSLTSEDSAVYFCKRSITTSYWGQGLVTVSA	44	50
4G8 - 1E3	軽鎖	DIQMNQSPSSLSASLGDITITICHASQHINFWLSWYQQK PGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLLP EDVATYYCQQDQSYPMFGGGKLEIKR	45	
6B11 - 2E3	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNDDIKYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMLNSLTSEDSAVYFCKRSITTSYWGQGLVTVSA	46	

【表 2 - 7】

6B11 - 2E3	軽鎖	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTVVSWYQ QKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTSS VQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGKLEIKR	32	10
8C2 - 2D6	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYNEKFKGKATLTADTSST TAYMQLNSLTSEDSAMYFCKRSITTSYWGQGTLLTVSA	47	
8C2 - 2D6	軽鎖	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTVVSWYQ QKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTSS VQAEDLADYHCGQGYSYPYTFGGGKLEIKR	32	20
7D4 - 2A2 - 2F2	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYIEKFRGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSLSTPYWGQGTLLTVSA	48	
7D4 - 2A2 - 2F2	軽鎖	NILMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVNYVSWYQ QKPEQSPKLLIFGASNRYSGVPDRFTGSGSATDFTLTSS VQAEDLADYHCGSKWITSYPYTFGGGKLEIKR	49	
7D4 - 1H1 2 - 2B3	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYIFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYIEKFRGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSLSTPYWGQGTLLTVSA	48	
7D4 - 1H1 2 - 2B3	軽鎖	NILMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVNYVSWYQ QKPEQSPKLLIYGASNRYSGVPDRFTGSGSATDFTLTSS VQAEDLADYHCGARVTSYPYTFGGGKLEIKR	50	30
2C2 - 2C5	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGTSVKISCRASGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSDDSAVYFCKRSITTPYWGQGTLLTVSS	51	
2C2 - 2C5	軽鎖	SFVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVNNVAVWYQ QKPGQSPKQLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTIY TVQAEDLAVYFCQQGYSSPWTFGGGKLEIKR	52	
10F4 - 2A9	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVK QKPEQGLEWIGYISPGNGDIKYDEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRSITTSYWGQGTLLTVSA	42	

【表 2－8】

3F1	重鎖	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAHWVK QKPEQGLDWIGYISPGNGDIKYNEKFKDKVTLTADKSSS TACMHLNSLTSEDSAVYFCKRSLALDYWGQGTTLTVS S	53
3F1	軽鎖	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTNIAWYQQ KPGRSPKVLIIYSASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNV QSEDLDYFCQQYSSFPLTFGVGKLELK	54

10

一部の具現例において、本発明の抗体は上記の表に提示された任意の可変ドメイン配列から由来した1つ以上のCDRを使用して開発される。一部の場合、CDR配列は、非制限的にKabat [Wu、T. T. など、1970、JEM、132(2):211-50及びJohnson、G. など、2000、Nucleic Acids Res. 28(1):214-8、このそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる]、Chothia [Chothia及びLesk、J. Mol. Biol. 196、901(1987)、Chothiaなど、Nature 342、877(1989)及びAl-Lazikani、B. など、1997、J. Mol. Biol. 273(4):927-48、このそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる]、Lefranc (Lefranc、M. P. など、2005、Immunome Res. 1:3)及びHonegger (Honegger、A. 及びPluckthun、A. 2001、J. Mol. Biol. 309(3):657-70、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる)を含む1つ以上のナンバリング計画の使用を介して可変ドメイン配列から決定される。

20

【0172】

一部の具現例において、本発明の抗体またはこの抗原結合の断片は表3に並べられた1つ以上のCDRアミノ酸配列を含む。「X」で表示された残基は存在しないか、または任意のアミノ酸残基から選択される。一部の場合、抗体またはこの抗原結合の断片は表3に並べられた1つ以上のCDR配列と約50%～約99.9%の配列同一性（例えば、約50%～約60%、約55%～約65%、約60%～約70%、約65%～約75%、約70%～約80%、約75%～約85%、約80%～約90%、約85%～約95%、約90%～約99.9%、約95%～約99.9%、約97%、約97.5%、約98%、約98.5%、約99%、約99.5%、約99.6%、約99.7%または約99.8%）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、本発明の抗体またはこの抗原結合の断片は表3に並べられた任意の配列1つ以上の断片を含むアミノ酸配列を含む。表において、「一致」は最も保存された残基が一致する配列を形成するために使用された多重配列の整列から由来した抗体配列を称する。B72.3 (Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサム所在)及びCC49 (Muraro、R. など、1988、Cancer Res. 48:4588-96を参照)は商業的に利用可能な抗体である。

30

40

【0173】

【表 3 - 1】

表 3. CDR 配列

抗体番号	CDR	配列	配列番号
18D2	CDR - H1	GFSLSTSNMG	55
18C7	CDR - H1	GFSLSTFGMG	56
10A5 - 2A12	CDR - H1	GFSLTSYG	57
8C11 - 1D10	CDR - H1	GFSLTSYG	57
2D4 - 1B4	CDR - H1	GFSLISYG	58
7G9 - 1A8	CDR - H1	GFSLTSYG	57
1A12 - 2B2	CDR - H1	GFSLTSYG	57
18D2	CDR - H2	IWWHDDK	59
18C7	CDR - H2	IWWDDDK	60
10A5 - 2A12	CDR - H2	IWGDGST	61
8C11 - 1D10	CDR - H2	IWGDGST	61
2D4 - 1B4	CDR - H2	IWGDGST	61
7G9 - 1A8	CDR - H2	IWGDGST	61
1A12 - 2B2	CDR - H2	IWGDGST	61
18D2	CDR - H3	AQVPFYGTSGDV	62
18C7	CDR - H3	ARIAYYYGGERDY	63
10A5 - 2A12	CDR - H3	ARAFVY	64
8C11 - 1D10	CDR - H3	TKGFTY	65
2D4 - 1B4	CDR - H3	TKGFAY	66
7G9 - 1A8	CDR - H3	TKGFVY	67
1A12 - 2B2	CDR - H3	AKGGYFDY	68
18C7	CDR - L1	SSISY	69
10A5 - 2A12	CDR - L1	SSVSY	70
8C11 - 1D10	CDR - L1	SSVSY	70
2D4 - 1B4	CDR - L1	SSVSY	70
7G9 - 1A8	CDR - L1	SSVSY	70
1A12 - 2B2	CDR - L1	SSVSY	70
18D2	CDR - L1	QSIDY	71
18D2	CDR - L1	SSITY	72

【 0 1 7 4】

【表 3 - 2】

18C7	CDR - L2	DTS	73
10A5 - 2A12	CDR - L2	DTS	73
8C11 - 1D10	CDR - L2	DTS	73
2D4 - 1B4	CDR - L2	DTS	73
7G9 - 1A8	CDR - L2	DTS	73
1A12 - 2B2	CDR - L2	STS	74
18D2	CDR - L2	YAS	75
18D2	CDR - L2	DTS	73
18C7	CDR - L3	HQRSSYT	76
10A5 - 2A12	CDR - L3	QQWSSNPPMLT	77
8C11 - 1D10	CDR - L3	QQWSSNLLT	78
2D4 - 1B4	CDR - L3	QQWSSNLLT	78
7G9 - 1A8	CDR - L3	QQWSSNLLT	78
1A12 - 2B2	CDR - L3	QQRSSYPWT	79
18D2	CDR - L3	QNGHSFPLT	80
18D2	CDR - L3	HQRSSYT	76
7A6 - 2A2	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
2B2 - 2A7	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
5G2 - 1B3	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
4D9 - 2C11	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
2F4 - 1E2	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
2F4 - 1H8	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
1A5 - 2C9	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
1F6 - 1B7 (また、1F6 - 1C10配列)	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
2C2 - 2C5	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
2G12 - 2B2	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
10C9 - 2G7	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
2C6 - 2F11	CDR - H1	GYTFSDHAIHWV	82
7D4 - 2A2 - 2F2	CDR - H1	GYIFTDHAIHWV	83
7D4 - 1H12 - 2B3	CDR - H1	GYIFTDHAIHWV	83

【 0 1 7 5】

【表 3 - 3】

7D3 - 2C10	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
8C2 - 2D6	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
9E5 - 1A8	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
5E6 - 2E7	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
9F11 - 1F7	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
4G8 - 1E3	CDR - H1	GYIFTDHAIHWV	83
10F4 - 2F2	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
10F4 - 2A9	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
6B11 - 2E3	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
2B8 - 2F10	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
7A5 - 2G12	CDR - H1	GYTFTDHAIHWV	81
7A6 - 2A2	CDR - H2	FSPGNDDIKY	84
2B2 - 2A7	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85
5G2 - 1B3	CDR - H2	FSPGNDDIKY	84
4D9 - 2C11	CDR - H2	LSPGNDDIKY	86
2F4 - 1E2	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85
2F4 - 1H8	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85
1A5 - 2C9	CDR - H2	VSPGNNGDIKY	87
1F6 - 1B7 (また、1F6 - 1C10配列)	CDR - H2	ISPGNGDVKY	88
2C2 - 2C5	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85
2G12 - 2B2	CDR - H2	FSPGNDDIKY	84
10C9 - 2G7	CDR - H2	ISPGNDDIKY	89
2C6 - 2F11	CDR - H2	ISPGNDDIKY	89
7D4 - 2A2 - 2F2	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85
7D4 - 1H12 - 2B3	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85
7D3 - 2C10	CDR - H2	FSPGNDDIKY	84
8C2 - 2D6	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85
9E5 - 1A8	CDR - H2	ISPGNDDIKY	89
5E6 - 2E7	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85
9F11 - 1F7	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85

【 0 1 7 6 】

【表 3 - 4】

4G8 - 1E3	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85
10F4 - 2F2	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85
10F4 - 2A9	CDR - H2	ISPGNGDIKY	85
6B11 - 2E3	CDR - H2	ISPGNDDIKY	89
2B8 - 2F10	CDR - H2	ISPGNDDIKY	89
7A5 - 2G12	CDR - H2	ISPGNDDIKY	89
7A6 - 2A2	CDR - H3	SVGYALDY	90
2B2 - 2A7	CDR - H3	KISYYGI	91
5G2 - 1B3	CDR - H3	KRSYYGD	92
4D9 - 2C11	CDR - H3	KRSIGGDH	93
2F4 - 1E2	CDR - H3	QRQLGQGY	94
2F4 - 1H8	CDR - H3	QRQLGQGY	94
1A5 - 2C9	CDR - H3	KRSLIGDY	95
1F6 - 1B7 (また、1F6 - 1C10配列)	CDR - H3	KRSLSTPY	96
2C2 - 2C5	CDR - H3	KRSITTPY	97
2G12 - 2B2	CDR - H3	KRSLSTPY	96
10C9 - 2G7	CDR - H3	KRSLSTPY	96
2C6 - 2F11	CDR - H3	ERSMIGVY	98
7D4 - 2A2 - 2F2	CDR - H3	KRSLSTPY	96
7D4 - 1H12 - 2B3	CDR - H3	KRSLSTPY	96
7D3 - 2C10	CDR - H3	KRSITTPY	97
8C2 - 2D6	CDR - H3	KRSITTSY	99
9E5 - 1A8	CDR - H3	KRSITTPY	97
5E6 - 2E7	CDR - H3	KRSITTPY	97
9F11 - 1F7	CDR - H3	KRSITTPY	97
4G8 - 1E3	CDR - H3	KRSITTSY	99
10F4 - 2F2	CDR - H3	KRSITTSY	99
10F4 - 2A9	CDR - H3	KRSITTSY	99
6B11 - 2E3	CDR - H3	KRSITTSY	99
2B8 - 2F10	CDR - H3	KRSITTSY	99

【 0 1 7 7 】

【表 3 - 5】

7A5 - 2G12	CDR - H3	KRSITTSY	99
7A6 - 2A2	CDR - L1	ENVVTY	100
2B2 - 2A7	CDR - L1	EDIYSN	101
5G2 - 1B3	CDR - L1	ENIYSH	102
4D9 - 2C11	CDR - L1	QNIN VW	103
2F4 - 1E2	CDR - L1	QSLVHSYGNTY	104
2F4 - 1H8	CDR - L1	QSLVHSYGNTY	104
1A5 - 2C9	CDR - L1	QNVGTA	105
1F6 - 1B7 (また、1F6 - 1C10配列)	CDR - L1	QSLNLSGNQKSY	106
2C2 - 2C5	CDR - L1	QSVNNN	107
2G12 - 2B2	CDR - L1	QSLNLRGNHKNY	108
2C6 - 2F11	CDR - L1	QSLVQSNGNTY	109
7D4 - 2A2 - 2F2	CDR - L1	ENVVNY	110
7D4 - 1H12 - 2B3	CDR - L1	ENVVNY	110
7D3 - 2C10	CDR - L1	QNIN VW	103
8C2 - 2D6	CDR - L1	ENVVTY	100
5E6 - 2E7	CDR - L1	QSLNLSGKTKNY	111
9F11 - 1F7	CDR - L1	QSLNLSGKTKNY	111
4G8 - 1E3	CDR - L1	QHINFW	112
10F4 - 2F2	CDR - L1	ENVVTY	100
10F4 - 2A9	CDR - L1	ENVVTY	100
6B11 - 2E3	CDR - L1	ENVVTY	100
7A5 - 2G12	CDR - L1	ENVVIY	113
1C11 - 2G9	CDR - L1	QSLNLSGNQKNY	114
7A6 - 2A2	CDR - L2	GASNRYT	115
2B2 - 2A7	CDR - L2	KATNLAD	116
5G2 - 1B3	CDR - L2	GATNLAD	117
4D9 - 2C11	CDR - L2	KASNLHT	118
2F4 - 1E2	CDR - L2	KVSNRFS	119
2F4 - 1H8	CDR - L2	KVSNRFS	119

【 0 1 7 8 】

【表 3 - 6】

1A5 - 2C9	CDR - L2	SASNRYT	120
1F6 - 1B7 (また、1F6 - 1C10配列)	CDR - L2	WASTRDS	121
2C2 - 2C5	CDR - L2	YASNRYT	122
2G12 - 2B2	CDR - L2	WASTRES	123
2C6 - 2F11	CDR - L2	KVSNRFC	124
7D4 - 2A2 - 2F2	CDR - L2	GASNRYS	125
7D4 - 1H12 - 2B3	CDR - L2	GASNRYS	125
7D3 - 2C10	CDR - L2	KVSNLHT	126
8C2 - 2D6	CDR - L2	GASNRYT	115
5E6 - 2E7	CDR - L2	WASTRES	123
9F11 - 1F7	CDR - L2	WASTRES	123
4G8 - 1E3	CDR - L2	KASNLHT	118
10F4 - 2F2	CDR - L2	GASNRYT	115
10F4 - 2A9	CDR - L2	GASNRYT	115
6B11 - 2E3	CDR - L2	GASNRYT	115
7A5 - 2G12	CDR - L2	GASNRYT	115
1C11 - 2G9	CDR - L2	WASTRES	123
7A6 - 2A2	CDR - L3	GQGYSYPYT	127
2B2 - 2A7	CDR - L3	QHFWGTPFT	128
5G2 - 1B3	CDR - L3	QHFWGAPFT	129
4D9 - 2C11	CDR - L3	QQGQSYPT	130
2F4 - 1E2	CDR - L3	SQNTHTVPYT	131
2F4 - 1H8	CDR - L3	SQNTHTVPYT	131
1A5 - 2C9	CDR - L3	QQYSSYRLT	132
1F6 - 1B7 (また、1F6 - 1C10配列)	CDR - L3	QSDYSYPYT	133
2C2 - 2C5	CDR - L3	QQGYSSPWT	134
2G12 - 2B2	CDR - L3	QNDYTYPYT	135
2C6 - 2F11	CDR - L3	SQSTHAPLT	136
7D4 - 2A2 - 2F2	CDR - L3	GSKWITSYPYT	137

【 0 1 7 9】

【表 3 - 7】

7D4 - 1H12 - 2B3	CDR - L3	GARVTSYPYT	138
7D3 - 2C10	CDR - L3	QQDQSYPT	139
8C2 - 2D6	CDR - L3	GQGYSYPYT	127
5E6 - 2E7	CDR - L3	KNDYSYPYT	140
9F11 - 1F7	CDR - L3	KNDYSYPYT	140
4G8 - 1E3	CDR - L3	QQDQSYPTM	141
10F4 - 2F2	CDR - L3	GQGYSYPYT	127
10F4 - 2A9	CDR - L3	GQGYSYPYT	127
6B11 - 2E3	CDR - L3	GQGYSYPYT	127
7A5 - 2G12	CDR - L3	GQGYSYPYT	127
1C11 - 2G9	CDR - L3	QNDYSYPYT	142
8C2 - 2D6	CDR - H1	GYTFTDHAIH	143
4G8 - 1E3	CDR - H1	GYIFTDHAIH	144
2G12 - 2B2	CDR - H1	GYTFTDHAIH	143
5G2 - 1B3	CDR - H1	GYTFTDHAIH	143
5E6 - 2E7	CDR - H1	GYTFTDHAIH	143
2C2 - 2C5	CDR - H1	GYTFTDHAIH	143
3F1	CDR - H1	GYTFTDHAIH	143
CC49	CDR - H1	GYTFTDHAIH	143
B72.3	CDR - H1	GYTFTDHAIH	143
共通	CDR - H1	GYTFTDHAIH	143
8C2 - 2D6	CDR - H2	YISPGNGDIKYNEKFKG	145
4G8 - 1E3	CDR - H2	YISPGNGDIKYNEKFKG	145
2G12 - 2B2	CDR - H2	YFSPGNDDIKYNEKFRG	146
5G2 - 1B3	CDR - H2	YFSPGNDDIKYNEKFKV	147
5E6 - 2E7	CDR - H2	YISPGNGDIKYNEKFKV	148
2C2 - 2C5	CDR - H2	YISPGNGDIKYNEKFKG	145
3F1	CDR - H2	YISPGNGDIKYNEKFKD	149
CC49	CDR - H2	YFSPGNDDFKYNEKFKG	150
B72.3	CDR - H2	YISPGNDDIKYNEKFKG	151
共通	CDR - H2	YISPGNGDIKYNEKFKG	145

10

20

30

40

【 0 1 8 0 】

【表 3 - 8】

8C2 - 2D6	CDR - H3	SITTSY	152
4G8 - 1E3	CDR - H3	SITTSY	152
2G12 - 2B2	CDR - H3	SLSTPY	153
5G2 - 1B3	CDR - H3	SYYGD	154
5E6 - 2E7	CDR - H3	SITTPY	155
2C2 - 2C5	CDR - H3	SITTPY	155
3F1	CDR - H3	SLLALDY	156
CC49	CDR - H3	SLNMAY	157
B72.3	CDR - H3	SYYGH	158
共通	CDR - H3	SITTSY	152
8C2 - 2D6	CDR - L1	KASENVVTVVS	159
4G8 - 1E3	CDR - L1	HASQHINFWLS	160
2G12 - 2B2	CDR - L1	KSSQSLLNRGNHKNYLT	161
5G2 - 1B3	CDR - L1	RASENIYSHLA	162
5E6 - 2E7	CDR - L1	KSSQSLLNSGKTKNYLT	163
2C2 - 2C5	CDR - L1	KASQSVNNNVA	164
3F1	CDR - L1	KASQDVGTNIA	165
CC49	CDR - L1	KSSQSLLYSGNQKNYLA	166
B72.3	CDR - L1	RASENIYSNLA	167
8C2 - 2D6	CDR - L2	GASNRYT	115
4G8 - 1E3	CDR - L2	KASNLHT	118
2G12 - 2B2	CDR - L2	WASTRES	123
5G2 - 1B3	CDR - L2	GATNLAD	117
5E6 - 2E7	CDR - L2	WASTRES	123
2C2 - 2C5	CDR - L2	YASNRYT	122
3F1	CDR - L2	SASTRHT	168
CC49	CDR - L2	WASARES	169
B72.3	CDR - L2	AATNLAD	170
8C2 - 2D6	CDR - L3	GQGYSYPYT	127
4G8 - 1E3	CDR - L3	QQDQSYPYM	141
2G12 - 2B2	CDR - L3	QNDYTYPYT	135

【表 3 - 9】

5G2 - 1B3	CDR - L3	QHFWGAPFT	129
5E6 - 2E7	CDR - L3	KNDYSYPYT	140
2C2 - 2C5	CDR - L3	QQGYSSPWT	134
3F1	CDR - L3	QQYSSFPLT	171
CC49	CDR - L3	QQYYSYPLT	172
B72.3	CDR - L3	QHFWGTPYT	173

10

一部の場合、本発明の抗体または抗原結合の断片は表 4 に並べられた 1 つ以上の可変ドメインの配列を含むヌクレオチド配列によってコードされる。「N」で表示された残基は存在しないか、またはヌクレオチド A、C、G または T から選択される。一部の場合、抗体またはこの抗原結合の断片は表 4 に並べられた 1 つ以上の可変ドメインの配列と約 50 % ~ 約 99.9 % の配列同一性（例えば、約 50 % ~ 約 60 %、約 55 % ~ 約 65 %、約 60 % ~ 約 70 %、約 65 % ~ 約 75 %、約 70 % ~ 約 80 %、約 75 % ~ 約 85 %、約 80 % ~ 約 90 %、約 85 % ~ 約 95 %、約 90 % ~ 約 99.9 %、約 95 % ~ 約 99.9 %、約 97 %、約 97.5 %、約 98 %、約 98.5 %、約 99 %、約 99.5 %、約 99.6 %、約 99.7 % または約 99.8 %）を含むヌクレオチド配列によってコードされる。一部の場合、本発明の抗体またはこの抗原結合の断片は表 4 に並べられた任意の配列の 1 つ以上の断片を含むヌクレオチド配列によってコードされる。

20

【0182】

【表 4 - 1】

表 4. 可変ドメインのヌクレオチド配列

抗体番号	可変鎖	配列	配列番号
18D2	重鎖	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGG GATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCT GACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGC ACTTCTAATATGGGTATAGGCTGGATTTCGT CAGCCTTCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGCT GGCACACATTTGGTGGCATGATGATAAGT ACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTC ACAATCTCCAAGGATATCTCCAACAACCA GGTATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACAC TGCAGATACTGCCACGTACTACTGTGCTCA AGTCCCGTTTTACTACGGAACCTCGTTCGA TGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCG TCTCCTCA	174
18D2	軽鎖1	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACC CTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGAGTCTCT CTTTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGC GACTACTTACACTGGTATCAACAAAAATC ACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAATA TGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTC CAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAG ATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAAC CTGAAGATGTTGGAGTGTATTACTGTCAAA ATGGTCACAGCTTTCCTCTCACGTTCCGGTG CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC	175
18D2	軽鎖2	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATC ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGACGGTCAC CATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAA CTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCA GGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGA CACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGC TCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTC TTATTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGC TGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCATCA GCGGAGTAGTTACACGTTCCGAGGGGGGA CCAAGCTGGAAATAAAACG	176
18C7	重鎖	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGG GATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCT GACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGC ACTTTTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTTCGT CAGCCTTCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCT	177

【 0 1 8 4 】

10
20
30
40

【表 4－3】

		CCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATAT GTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCA TCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCA CCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTG TTGTGGTAGACATCAGCCAGGATGATCCC GAGGTCAGTTCAGCTGTTTGTAGATGATGT GGAAGTGCACACAGCTCAAAACAACCCCC CGAGAGGACATTTTACAAACATTTCCGCTCA TCAGTGAATTTCCCATCTGCACAAGACTGC TTAATGGCAAGAGTTAAATGCAGGTCAAA GGGCAGTTTCCTGCCCCATCAAAAACTTTT CAAAA		10
18D2(2)	軽鎖	ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTC CTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATACTGTCC AGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCA GCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAC GGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAA GTATAACTTACATGCACTGGTACCAGCAG AAGCCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGAT TTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGT CCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG GACCTCTTATTCTCTCACAATCAGCAGCAT GGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTG CCATCAGCGGAGTAGTTACACGTTCCGGAG GGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCT GATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCA CCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGG TGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCT CTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGA AGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGC GTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAG CAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCA CCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAA CGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCAC TCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAA GAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG	180	20
18C7(2)	重鎖	ATGGACAGGCTTACTTCCTCATTCTGTTA CTGATTGTCCCTGCATATGTCCGTGCCAG GTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATA TTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACT TGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTT TTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTCGTCAGC CTTCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCA	181	30
				40

【 0 1 8 6 】

10
20
30
40

【表 4 - 5】

		TGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCCTC CAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAG ATTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAAC CTGAAGATGTTGGAGTGTATTACTGTCAAA ATGGTCACAGCTTTCCTCTCACGTTCCGGTG CTGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGGCT GATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCA CCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGG TGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCT CTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGA AGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGC GTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAG CAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCA CCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAA CGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCAC TCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAA GAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAG		
10A5 - 2 A12	重鎖	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGG CCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCAT CACATGCACTGTCTCAGGGTTCTCATTAAC CAGCTATGGTGTAAAGCTGGGTTCCGCCAGCC TCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TAATATGGGGTGACGGAAGCACAATTAT CATTCTCTCTCATATCCAGACTGAGCATC AGCAAGGATAACTCCAAGAGCCAAGTTTT CTTAAACTGAACAGTCTGCAAAGTATG ACACAGCCACGTAATACTGTGCCAGAGCC TTTGTTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA	183	10 20
10A5 - 2 A12	軽鎖	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATC ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC CATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTA GTTACATACTGGTACCAGCAGAAGTCA GGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGA CACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGC TCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTC TACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGC TGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCA GTGGAGTAGTAACCCACCCATGCTCACGTT CGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC	184	30
8C11 - 1D 10	重鎖	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGG CCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCAT CACATGCACTGTCTCAGGGTTCTCATTAAC	185	40

【表 4 - 6】

		CAGCTATGGTGTAAAGCTGGGTTCGCCAGCC TCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TAATATGGGGTGACGGGAGCACAAATTAT CATTAGCTCTCATATCCAGACTGATCATC AGCAAGGATAACTCCAAGAGCCAAGTTTT CTTAAACTGAACAGTCTGCAAAGTATG ACACAGCCACCTACTACTGTACCAAAGGC TTACTTACTGGGGCCAGGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA		10
8C11 - 1D 10	軽鎖	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATC ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC CATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTA GTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCA GGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTTTGAC ACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCT CGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCT TACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCT GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAG TGGAGTAGTAACCTGCTCACGTTTCGGTGCT GGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC	186	20
2D4 - 1B4	重鎖	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGG CCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCAT CACATGCACTGTCTCAGGGTTCTCATTAAT CAGCTATGGTGTAAACTGGGTTCGCCAGCC TCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TGATATGGGGTGACGGGAGCACAAATTAT CAGTCAGCTCTCATATCCAGACTGATCATC AGCAAGGATAACTCCAAGAGCCAAGTTTT CTTAAACTGAACAGTCTGCAAAGTATG ACACAGCCACGTACTACTGTACCAAAGGC TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA	187	30
2D4 - 1B4	軽鎖	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATC ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC CATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTA GTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAGTCA GGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGA CACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGC TCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTC TACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGC TGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCA GTGGAGTAGTAACCTGCTCACGTTTCGGTGC TGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC	188	40

【 0 1 8 8 】

【表 4 - 7】

7G9 - 1A 8	重鎖	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGG CCTGGTGGCGCCCTCACAGAACCTGTCCAT CACATGCACTGTCTCAGGGTTCTCATTAAC CAGTTATGGTGTAAACTGGGTTCCGCCAGCC TCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TAATATGGGGTGACGGGAGCACAAATTAT CATTCAGCTCTCATTTCCAGACTGATCATC AGCAAGGAAAACCTCCAAGAGCCAAGTTTT CTTAAAACCTGAACAGTCTGCAAACCTAATG ACACAGCCACGTATTACTGTACCAAAGGC TTTGTTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA	189
7G9 - 1A 8	軽鎖	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATC ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC CATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTA GTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCA GGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTTTGAC ACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCT CGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCT TACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCT GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAG TGGAGTAGTAACCTGCTCACGTTCCGTGCT GGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC	186
1A12 - 2B 2	重鎖	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGG CCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCAT CACATGCACTGTCTCAGGGTTCTCATTAAC CAGCTATGGTGTAAAGCTGGGTTCCGCCAGCC TCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAG TAATATGGGGTGACGGGAGCACAAATTAT CATTCAGCTCTCATATCCAGACTGAGCATC AGCAAGGATAACTCCAAGAGCCAAGTTTT CTTAAAACCTGAACAGTCTGCAAACCTGATG ACACAGCCACGTACTACTGTGCCAAAGGG GGCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA	190
1A12 - 2B 2	軽鎖	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAGTC ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCGC CATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTA GTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAGCCA GGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAGC ACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCT CGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCT TACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCT	191

10

20

30

40

【 0 1 8 9 】

【表 4 - 8】

		GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAA AGGAGTAGTTACCCGTGGACGTTCCGGTGG AGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC	
7D3 - 2C1 0	重鎖	CAGGTTTCAGTTGCTGCAGTATGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGGGTCAGTGAAGAT ATCGTGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCAC TGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGA AGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGA TATTTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAG TACAGTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAC ACTGACTGCAGACAAGTCCTCCAGCACTG CCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTG AGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGAT CCATTACTACGCCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	192
7D3 - 2C1 0	軽鎖	GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGT CTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATTACC ATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAAT GTTTGGTTAAGCTGGTACCAGCAGAAACC AGGAAATATTCCTAAACTATTGATCTATAA GGTTTCCAACCTGCACACAGGCGTCCCATC AAGGTTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAG GTTTCACATTAACCATCAGCAGCCTGCAGC CTGAAGACATTGCCACTTACTACTGTCAAC AGGATCAAAGTTATCCGTACACGTTTCGA GGGGGGACCAAGCTGAAAAAAA	193
A5 - 2G1 2	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGATGATATTA GTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCCATTACTACGTCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	194
A5 - 2G1 2	軽鎖	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAC CTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGG TTATTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAAC CAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACG	195

10

20

30

40

【 0 1 9 0 】

【表 4 - 9】

		GGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCC GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAAC AGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCA GGCTGAAGACCTTGCAGATTATCACTGTGG ACAGGGTTACAGCTATCCGTACACGTTTCGG AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG	
1A5 - 2C9	重鎖	CAGGTTTCAGTTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCCATTTCATTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATGTTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATC GGAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAG ATCTTTAATTGGAGACTATTGGGGCCAAGG CACCCTCTCACAGTCTCCTCA	196
1A5 - 2C9	軽鎖	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTC ATGTCCTCATCAGTAGGAGACAGGGTCAC CATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG GTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAA CCAGGACAATCTCCTAAATTTCTGATTAC TCGGCATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCT GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGAC AGATTTCACTCTCACGATCAGCAATATGCA GTCTGAAGACCTGGCAGATTATTTCTGCCA GCAATATAGCAGCTATCGTCTGACGTTTCGG TGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC	197
4D9 - 2C1 1	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA ATTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCAGTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATCTTTCTCCCGGAAATGATGATATTAA GTACAGTGAGAAGTTCAAGGACAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCCATAGGGGGGGGACCACTGGGGCCAAGG CACCCTCTCACAGTCTCCTCA	198
4D9 - 2C1 1	軽鎖	GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGT CTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATTACC	199

10

20

30

40

【 0 1 9 1 】

【表 4 - 1 0】

		ATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAAT GTTTGGTTAAACTGGTACCAGCAGAAACC AGGAAATATTCCTAAACTATTGATCTATAA GGCTTCCAACCTGCACACAGGCGTCCCATC AAGGTTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAG GTTTCACATTAACCATCGGCAGCCTGCAGC CTGAAGACATTGCCACTTACTACTGTCAAC AGGGTCAAAGTTATCCGTTTACGTTTCGGAG GGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG		10
2F4 - 1E2	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAACAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTATAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTCAAAGA CAACTGGGACAAGGCTACTGGGGCCAAGG CACCCTCTCACAGTCTCCTCA	200	20
2F4 - 1E2	軽鎖	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCC CTGCCTGTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCC ATCTCTTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTTGTA CACAGTTATGGAAACACCTATTTACATTGG TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAA GCTCCTGATTTACAAAGTTTCCAACCGATT TTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCA GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGG AGTTTATTTCTGCTCTCAAATAACACATGT TCCGTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGC TGGAAATAAAACG	201	30
2F4 - 1H8	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAACAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTATAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTCAAAGA	200	40

【表 4 - 1 1】

		CAACTGGGACAAGGCTACTGGGGCCAAGG CACCCTCTCACAGTCTCCTCA	
2F4 - 1H8	軽鎖	GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCC CTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCC ATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTA CACAGTTATGGAAACACCTATTTACATTGG TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAA GCTCCTGATTTACAAAGTTTCCAACCGATT TTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCA GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGG AGTTTATTTCTGCTCTCAAAATACACATGT TCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGC TGGAAATAAAACG	201
2C6 - 2F1 1	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGGGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA GTGACCATGCTATTTACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATCTCTCCCGAAACGATGATATTAA GTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTGAAAGA TCGATGATTGGGGTTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	202
2C6 - 2F1 1	軽鎖	GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCC CTGACTGTCAGTCTTGGCGATCAAGCCTCC ATCTCTTGCAGATTTAGTCAGAGCCTTGTA CAAAGTAATGGAAATACCTATTTACAGTG GTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAA AGCTCCTGATTTACAAAGTCTCCAACCGAT TTTGTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCA GTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGG AGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGC TCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCT GGAGCTGAAAC	203
2B2 - 2A7	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGACTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCAATTTACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG	204

10

20

30

40

【表 4 - 1 2】

		ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CCCTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACTG CCTATATGCAGCTCAGCAGCCTGACACCTG AGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAATAT CTTACTACGGTATTTGGGGCCAAGGCACCA CTCTCACAGTCTCCTCA		
2B2 - 2A7	軽鎖	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCC CTATCTGTATCTGTGGGAGAGTCTGTCACC ATCACATGTCGACTAAGTGAAGATATTTAC AGTAATTTAGCATGGTTTCAGCAGAGACC GGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTTTATAA AGCAACAACTTAGCAGACGGTGTGCCAT CAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACA CAGTATTCCTCAAGATCAACAGCCTGCAG TCTGAAGATTTTGGGACTTATTACTGTCAA CATTTTGGGGTACTCCATTACGTTTCGGC TCGGGGACCAAGGTGGAAATAAAAC	205	10
5G2 - 1B3	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATTTTCTCCCGGAAATGATGATATTAA GTATAATGAGAAGTTCAAGGTCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAACTCACCAGCCTGACATCT GAAGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCTTACTACGGTGATTGGGGCCAAGGCACC ACTCTCACAGTCTCCTCA	206	20
5G2 - 1B3	軽鎖	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCC CTATCTGTTTCTGTGGGAGAACTGTCACC ATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTA CAGTCATTTAGCATGGTATCAACAGAAAC AGGGAAAATCTCCTCAACTCCTGGTCTATG GTGCAACTAACTTAGCAGATGGTGTGCCAT CAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACA CAGTTTTCCCTCAAGATCCACAGCCTGCAG TCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAA CATTTTGGGGTGCTCCATTACGTTTCGGC TCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAAC	207	30
7A6 - 2A 2	重鎖	CAAATTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGACTTCAGTGAAGA	208	40

【表 4 - 1 3】

		TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATTTTCTCCCGGAAATGATGATATTAA GTATAATGTGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAAGATTCTGCAGTGTATTTCTGTTCTGGTG GGATACGCCCTTGACTACTGGGGCCTAGG CACCCTCTCACAGTCTCCTCA		10
7A6 - 2A 2	軽鎖	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAC CTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGG TACTTATGTTTCTGGTATCAACAGAAAC CAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACG GGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCC GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAAC AGATTTCCTCTGACCATCAGCAGTGTGCA GGCTGAAGACCTTGACAGATTATCACTGTGG ACAGGGTTACAGCTATCCGTACACGTTTCGG AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG	209	20
10C9 - 2G 7	重鎖	CAGGTTACAGCTGCAACAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGACTACAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGGAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATCGG ATATATTTCTCCCGGAAATGATGATATTAA GTACAGTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCTTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GATGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCGCTTAGTACGCCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	210	30
10C9 - 2G 7	軽鎖	TTTTTAATACGACTCCCTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAATGCAGATTACAAGGGGGAA AGGCATCAGACCAGCATGGGCATCAAGGT GGAATCACAGACTCTGGTCTTCATATCCAT ACTGTTTGGGTATATGGAGCTGATGGGAA CACATTAATGACCCAATCTCCCATATCCAT GTACATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCT TGACTTGCAAGGCCAGTGAGAATGAGATT AATTATGTTTCTGGTATCAACAGAAACCA GAGCAGTCTCCTAAACTGTTGATATACGGG	211	40

【表 4 - 1 4】

		GCATCCAACCGGTACTCTGGGGTCCCCGAT CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGA TTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGC TGAAGACCTTGCAGATTATCCCTGTGGAGC AAGGGATTAAGTAGCTATCCGTACACGTTT GGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAC GGGC	
1C11 - 2G 9	重鎖	知られていない	
1C11 - 2G 9	軽鎖	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCC CTGACTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTCAC TATGAGCTGCAGGTCCAGTCAGAGTCTGTT AAACAGTGGAAATCAAAAGAACTACTTGA CCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCT CCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACA GGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCT GGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAG TTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCA AGCTGGAAATAAAACG	212
1F6 - 1B7 (また、1F6 - 1C10配 列)	重鎖	CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGATGCAGA TGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGA TATATTTCTCCCGGAAATGGTGATGTTAAG TACAGTGAGAGGTTCAAGGGCAGGGCCAC ACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCTCTGC CTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGA GGATTCTGCAGTTTATTTCTGTAAAAGATC GCTTAGTACGCCTTACTGGGGCCAAGGGA CTCTGGTCACTGTCTCTG	213
1F6 - 1B7 (また、1F6 - 1C10配 列)	軽鎖	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCC CTGACTGTGACAGCAGGAGAGAGGGTCAC TATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTT AAACAGTGGAAATCAAAAGAGCTACTTGA CCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCT CCTAAACTGTTGATCTCCTGGGCATCCACT AGGGATTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACA GGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCT GGCAGTTTATTACTGTCAGAGTGATTATAG	214

10

20

30

40

【表 4 - 1 5】

		TTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCA AGCTGGAAATAAAAACG	
2G12 - 2B 2	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGNTGA GTTGGTGAAACCGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATTTTCTCCCGGAAATGATGATATTAA GTACAATGAGAAGTTTAGGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGTCATCT GATGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCGCTTAGTACGCCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGNCACTGTCTCTGCA	215
2G12 - 2B 2	軽鎖	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCC CTGACTGTGACAGCAGGAGAGAAAGTCAC TATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTT AAACCGTGGAATCATAAGAACTACTTGA CCTGGTACCGGCAGAAACCAGGGCTGCCT CCTAAACTGTTGATTTACTGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACA GGCAGTGGATCTGGAACAGATTTGCTCTC ACCATCAGCAGTGTTTCAGGCTGAAGACCT GGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAC TTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCA AGCTGGAGATAAAAACG	216
5E6 - 2E7	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAATGAAGA TTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTACAATGAGAAGTTCAAGGTCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCGATTACTACGCCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	217
5E6 - 2E7	軽鎖	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCC CTGACTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTAC TATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTT AAACAGTGGAACAAAGAACTACTTGA CGTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCT	218

10

20

30

40

【表 4 - 1 6】

		CCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACA GGCAGTGGATCTGGAACAGATTCTACTCTC ACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCT GGCAGTTTATTACTGTAAGAATGATTATAG TTATCCGTACACGTTCTGGAGGGGGGACCA AGCTGGAAATAAAACG		
9E5 - 1A8	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA ATTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGACTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATCTCTCCCGGAAATGATGATATTAA GTACACTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGTCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTCTATTTCTGTAAAAGA TCGATTACTACGCCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	219	10
9E5 - 1A8	軽鎖	TTTTTATACGCCACTTTCTAATACGCCTCA CTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAG ATTACAAAGGGGAAAGGAATCAGACCGAC TCGCGCATCAAGATGGAATCACAGACTCT GGTCTTCATATCCAGTACGCTCGGGGACTA TGGAGNGGAACAGTACATTTTAATGACCC AATGTCCCAAAGGCAAGAACATGTCAGTA GGAGAGAGGGTCACTCAGAGTGCAAGGCC AGGAGAAATCAAAACACTTATGTTTCCTG GTATCAACAGAAACCAGAGCANNCTNTAA AATGNNGATTACGGGGCATCCAACCGGGA ATCTGGGGTCNCCGATCGCTTCACAGGCA GTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCA TCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCNGGCA GTNTTCACTGTGGACAGGGNTACAGTTATC CGTACACGTTCTGGAGGGGGGACCAAGCTG AAAAAAACGGGC	220	20
9F11 - 1F 7	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAACCTGGGGCTTCAATGAAGA TTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGAATTTAA GTACAATGAGAAGTTCAAGGTCAAGGCCA	217	30
				40

【表 4 - 1 7】

		CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCGATTACTACGCCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA		
9F11 - 1F 7	軽鎖	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCC CTGACTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTCAC TATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTT AAACAGTGGAAAAACAAAGAACTACTTGA CGTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCT CCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACA GGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTC ACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCT GGCAGTTTATTACTGTAAGAATGATTATAG TTATCCGTACACGTTCTGGAGGGGGGACCA AGCTGGAAATAAAACG	218	10
10F4 - 2F 2	重鎖	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTACGATGAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCTCCACTG CCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTG AAGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGAT CGATTACTACCTCTTACTGGGGCCAAGGGA CTCTGGTCACTGTCTCTGCA	221	20
10F4 - 2F 2	軽鎖	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAC CTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGG TACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAAC CAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACG GGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCC GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAAC AGATTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCA GGCTGAAGACCTTGACAGATTATCACTGTGG ACAGGGTTACAGCTATCCGTACACGTTCTGG AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG	209	30
2B8 - 2F1 0	重鎖	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA	222	40

【表 4 - 1 8】

		CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGATGATATTAA GTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAGTCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTTTTCTGTAAAAGA TCGATTACTACCTCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA		10
2B8 - 2F1 0	軽鎖	TTNATAGGACTCAATATAGGGCAAGCAGT GGTATTAACGCCGAGTACATGGGGAGGGC AAGGGCAGAAAGTCACTTTCAGTGAGGAT ACACCATCAGCATGAGGGTCCTTGTGAGC TCCTGGGGGGGCTGGTGTNTGCTTTTTAG GTGTGAGATGTGACATCCAGATGAACCAG TCTCCATCCAGTCTGTNTGCATCCTTTGGA GACACAATTACCATCATTTGCCATTCCAGT CAGAACATTAATGTTTGGTTAAGATGGTAC CAGCAGAAACCAGGAAATATTCCTAAAAT ATTGATATATAAGGGTTCCAAGTTGTACAC AGGCGTCCCATCAAGGTTTAGTGGCAGTG GATTTGGAACAGGTTTCACATTAACCATCA GCAGCGTGCAGCGGGAAGACATTGCCACT TACTACTGTCAACAGGATCAAAGTTATCCG TACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGAA ATAAAACGGGC	223	20
4G8 - 1E3	重鎖	CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGACGCCGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCATCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGATTTCTGTAAAAGA TCGATTACTACCTCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	224	30
4G8 - 1E3	軽鎖	GACATCCAGATGAACCAGTCCCCATCCAG TCTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATTAC CATCACTTGCCATGCCAGTCAGCACATTAA TTTTTGGTTAAGCTGGTACCAGCAGAAACC AGGAAATATTCCTAAACTCTTGATCTATAA	225	40

【 0 2 0 0 】

【表 4 - 1 9】

		GGCTTCCAACCTTGCACACAGGCGTCCCATC AAGGTTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAG GTTTCACATTAACCATCAGCAGCCTGCTGC CTGAAGACGTTGCCACTTACTACTGTCAAC AGGATCAAAGTTATCCGTATATGTTCTGGAG GGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG		
6B11 - 2E 3	重鎖	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGATGATATTAA GTACAATGAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCTGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCGATTACTACCTCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	226	10
6B11 - 2E 3	軽鎖	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAC CTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGG TTACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAAC CAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACG GGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCC GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAAC AGATTTCACTTTGACCATCAGCAGTGTGCA GGCTGAAGACCTTGACAGATTATCACTGTGG ACAGGGTTACAGCTATCCGTACACGTTTCGG AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG	227	20
7D3 - 2C1 0	重鎖	CAGGTTTCAGTTGCTGCAGTATGACGCTGAG TTGGTGAAACCTGGGGGGTTCAGTGAAGAT ATCGTGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCA TGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAGA AGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGA TATTTTCTCCCGGAAATGATGATATTAAAG TACAGTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAC ACTGACTGCAGACAAAGTCCTCCAGCACTG CCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTG AGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGAT CCATTACTACGCCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	192	30
7D3 - 2C1 0	軽鎖	GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGT CTGTCTGCATCCCTTGAGACACAATTACC	193	40

【表 4 - 2 0】

		ATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAAT GTTTGGTTAAGCTGGTACCAGCAGAAACC AGGAAATATTCCTAAACTATTGATCTATAA GGTTTCCAACCTTGCACACAGGCGTCCCATC AAGGTTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAG GTTTCACATTAACCATCAGCAGCCTGCAGC CTGAAGACATTGCCACTTACTACTGTCAAC AGGATCAAAGTTATCCGTACACGTTCCGA GGGGGGACCAAGCTGAAAAAAA		10
7A5 - 2G 12	重鎖	CAGGTTGAGCTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGATGATATTAA GTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCCATTACTACGTCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	194	20
7A5 - 2G 12	軽鎖	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAC CTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGG TTATTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAAC CAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACG GGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCC GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAAC AGATTTCCTCTGACCATCAGCAGTGTGCA GGCTGAAGACCTTGCAGATTATCACTGTGG ACAGGGTTACAGCTATCCGTACACGTTCCG AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG	195	30
1A5 - 2C9	重鎖	CAGGTTGAGTTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCCATTGTTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATGTTTCTCCCGGAAATGGTGTATTTAA GTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATC GGAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAG ATCTTTAATTGGAGACTATTGGGGCCAAGG	196	40

【表 4 - 2 1】

		CACCACTCTCACAGTCTCCTCA	
1A5 - 2C9	軽鎖	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTC ATGTCCTCATCAGTAGGAGACAGGGTCAC CATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG GTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAA CCAGGACAATCTCCTAAATTTCTGATTTAC TCGGCATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCT GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGAC AGATTTCACTCTCACGATCAGCAATATGCA GTCTGAAGACCTGGCAGATTATTTCTGCCA GCAATATAGCAGCTATCGTCTGACGTTTCGG TGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC	197
8C2 - 2D6	重鎖	CAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTACAATGAGAAGTTCAAGGGTAAGGCCA CACTGACTGCAGACACTTCCTCCACCACTG CCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTG AGGATTCTGCAATGTATTTCTGTAAAAGAT CCATTACTACGTCTTACTGGGGCCAAGGGA CTCTGGTCACTGTCTCTGCA	228
8C2 - 2D6	軽鎖	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAC CTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGG TACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAAC CAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACG GGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCC GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAAC AGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCA GGCTGAAGACCTTGCAATTATCACTGTGG ACAGGGTTACAGCTATCCGTACACGTTTCGG AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG	209
7D4 - 2A 2 - 2F2	重鎖	CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCA CTGACCATGCAATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTACATTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT	229

10

20

30

40

【表 4 - 2 2】

		GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCGCTTAGTACGCCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	
7D4 - 2A 2 - 2F2	軽鎖	AACATTTTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAC CTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGG TTAATTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAAC CAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATTCG GGGCATCCAACCGGTACTCTGGGGTCCCC GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAAC AGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCA GGCTGAAGACCTTGCAGATTATCACTGTGG AAGCAAGTGGATTACTAGCTATCCGTACA CGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATA AAACG	230
7D4 - 1H 12 - 2B3	重鎖	CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCA CTGACCATGCAATTCAGTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTACATTGAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GAGGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCGCTTAGTACGCCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	229
7D4 - 1H 12 - 2B3	軽鎖	AACATTTTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAC CTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGG TTAATTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAAC CAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACG GGGCATCCAACCGGTACTCTGGGGTCCCC GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAAC AGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCA GGCTGAAGACCTTGCAGATTATCACTGTGG AGCAAGGGTTACTAGCTATCCGTACACGTT CGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAC G	231
2C2 - 2C5	重鎖	CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGACTTCAGTGAAGA TATCCTGCAGGGCTTCTGGCTACACCTTCA	232

10

20

30

40

【表 4 - 2 3】

		CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACT GCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCT GACGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGA TCCATTACTACGCCTTACTGGGGCCAAGGC ACCACTCTCACAGTCTCCTCA	
2C2 - 2C5	軽鎖	AGTTTTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTC CTGCTTGTGTCAGCAGGAGACAGGGTTAC CATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGA ATAATAATGTAGCTTGGTACCAACAGAAG CCAGGGCAGTCTCCTAAACAGCTGATATA CTATGCATCCAATCGCTACACTGGAGTCCC TGATCGCTTCACTGGCAGTGGATATGGGAC GGATTTCACTTTCACCATCTACACTGTGCA GGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTCA GCAGGGTTATAGCTCTCCGTGGACGTTTCG TGGAGGCACCAAGCTGAAA	233
10F4 - 2A 9	重鎖	CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGACGCTGA GTTGGTGAAACCTGGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CTGACCATGCTATTCACTGGGTGAAGCAG AAGCCTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGG ATATATTTCTCCCGGAAATGGTGATATTAA GTACGATGAGAAGTTTAAAGGCCAAGGCCA CACTGACTGCAGACAAATCCTCCTCCACTG CCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTG AAGATTCTGCAGTGTATTTCTGTAAAAGAT CGATTACTACCTCTTACTGGGGCCAAGGGA CTCTGGTCACTGTCTCTGCA	221
10F4 - 2A 9	軽鎖	AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCC ATGTCCATGTCACTAGGAGAGAGGGTCAC CTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGG TTACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAAC CAGAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACG GGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCC GATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGCAAC AGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCA GGCTGAAGACCTTGACAGATTATCACTGTGG ACAGGGTTACAGCTATCCGTACACGTTTCG AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG	209

一部の場合、本発明の抗体または抗原結合の断片は表 5 に並べられた I g G 2 a 重鎖及び／またはカッパ軽鎖の定常ドメインの配列を含む。一部の場合、抗体またはこの断片は表 5 に並べられた 1 つ以上の定常ドメインの配列と約 50 % ～ 約 99.9 % の配列同一性（例えば、約 50 % ～ 約 60 %、約 55 % ～ 約 65 %、約 60 % ～ 約 70 %、約 65 % ～ 約 75 %、約 70 % ～ 約 80 %、約 75 % ～ 約 85 %、約 80 % ～ 約 90 %、約 85 % ～ 約 95 %、約 90 % ～ 約 99.9 %、約 95 % ～ 約 99.9 %、約 97 %、約 97.5 %、約 98 %、約 98.5 %、約 99 %、約 99.5 %、約 99.6 %、約 99.7 % または約 99.8 %）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、本発明の抗体またはこの断

10

20

30

40

50

片は表5に並べられた任意の配列の1つ以上の断片を含むアミノ酸配列を含む。

【0205】

【表5】

表5. 定常ドメインの配列

ドメイン	配列	配列番号
IgG2a重鎖 の定常ド メイン	AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPC PPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTC VVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHRED YNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLF APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTL TCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL SDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLH NHHTTKSFSRTPGK	234
カッパ 軽鎖 の定常ド メイン	RADAAPTVISIFPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKD INVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSS TLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE C	235

一部の場 合、抗体はヌクレオチド配列 A T G G A G A C C G A C A C C C T G C T G C
 T C T G G G T G C T G C T G C T C T G G G T G C C C G G C T C C A C C G G A C A
 G G T T C A G C T G C A G C A G T C T G A C G C T G A G T T G G T G A A A C C T
 G G G G C T T C A G T G A A G A T A T C C T G C A A G G C T T C T G G C T A C A
 C C T T C A C T G A C C A T G C T A T T C A C T G G G T G A A G C A A A A G C C
 T G A A C A G G G C C T G G A C T G G A T T G G A T A T A T T T C T C C C G G A
 A A T G G T G A T A T T A A G T A C A A T G A G A A G T T C A A G G A C A A G G
 T C A C A C T G A C T G C A G A C A A A T C C T C C A G C A C T G C C T G C A T
 G C A C C T C A A C A G C C T G A C A T C T G A G G A T T C T G C A G T G T A T
 T T C T G C A A A A G A T C C C T A C T A G C T C T T G A C T A C T G G G G C C
 A A G G C A C C A C T C T C A C A G T C T C C T C A G C T A A A A C A A C A G C
 C C C A T C G G T C T A T C C A C T G G C C C C T G T G T G T G G A G A T A C A
 A C T G G C T C C T C G G T G A C T C T A G G A T G C C T G G T C A A G G G T T
 A T T T C C C T G A G C C A G T G A C C T T G A C C T G G A A C T C T G G T T C
 C C T G T C C A G T G G T G T G C A C A C C T T C C C A G C T G T C C T G C A G
 T C T G A C C T C T A C A C C C T C A G C T C A A G C G T G A C T G T A A C C A
 G C T C G A C C T G G C C C A G C C A G T C C A T C A C C T G C A A T G T G G C
 C C A C C C G G C A A G C A G C A C C A A G G T G G A C A A G A A A A T T G A G
 C C C A G A G G G C C C A C A A T C A A G C C C T G T C C T C C A T G C A A A T
 G C C C A G C A C C T A A C C T C T T G G G T G G A C C A T C C G T C T T C A T
 C T T C C C T C C A A A G A T C A A G G A T G T A C T C A T G A T C T C C C T G
 A G C C C C A T A G T C A C A T G T G T A G T C G T T G A T G T G A G C G A G G
 A T G A C C C A G A T G T C C A G A T C A G C T G G T T T G T G A A C A A C G T
 G G A A G T G C A C A C T G C T C A G A C A C A G A C G C A T A G A G A G G A T
 T A C A A C A G T A C T C T C C G G G T T G T C A G T G C C C T C C C C A T C C
 A G C A C C A G G A C T G G A T G A G T G G C A A G G A G T T C A A A T G C A A

GGTCAACAACAAGACCTCCAGCGCCCATCGAGAGAACC
ATCTCAAAACCCAAAGGGTCAAGTAAGAGCTCCACAGGTAT
ATGTCTTGCCCTCCACCAGAAGAGGAGATGACTAAGAAACA
GGTCACTCTGACCTGCATGGTTCACAGACTTCATGCCTGAA
GACATTTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGC
TAAACTACAGAACAACCTGAACCAAGTCCCTGGACTCTGATGG
TTCTTACTTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAGAAGAAG
AACTGGGTGGAGAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAGTGGTCC
ACGAGGGTCTGCACAATCACCCACACGACTAAGAGCTTCTC
CCGGACTCCGGGTAAATAG (配列番号 237) またはこの最適化されたバ
ージョンによってコードされる重鎖の配列 QVQLQQSDAELVKPGASVKIS
CKASGYTFTHDAIHWVKQKPEQGLDWIGYISPGNGDIKYN
EKFKDKVTLTADKSSSTACMHLNSLTSEDSAVYFCKRSL
ALDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTL
GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTSL
SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSSTKVDKKIEPRGPTIK
PCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMISSLSPIVTCV
VVDVSEDDPDVQISWFFVNNVEVHTAQTTQTHREDYNSTLRV
VSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGS
VRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT
NNGKTELNKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNS
YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (配列番号 236) を含む。一部
の場合、本発明の抗体はヌクレオチド配列 ATGGAGACCGACACCCCTGCTG
CTCTGGGTGCTGCTGCTCTGGGTGCCCGGCTCCACCCGGAG
ACATTTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATC
AGTAGGAGACAGGGTCAAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAAG
GATGTGGGCACTAATATAGCCTGGTATCAACAGAAACCAAG
GCCGATCTCCTAAAGTACTGATTTACTCGGCATCCACCCG
GCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTTCACAGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCAATTAGCAATGTGCAGTCTG
AAGACTTGACAGATTATTTCTGTCAAGCAATATAGCAGCTT
TCCTCTCACGTTTCGGTGTTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
CGGGCAGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCACCAT
CCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTG
CTTCTTGAAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAG
TGGAAGATTGATGGCAGTGAAACGACAAAATGGCGTCTCTGA
ACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAAGACAGCACCTACAG
CATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAA
CGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACAT
CAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTG
TTGA (配列番号 239) またはこの最適化されたバージョンによってコードされる軽
鎖アミノ酸配列 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTNI
AWYQQKPKGRSPKVL IYSASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTL
TISNVQSEDLTDYFCQQYS SFPLTFGVGTKLELKRADAAP
TVSIFPPSSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKIDGS
ERQNGVLNSWTDQDSKDSSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYT
CEATHKTSSTSPIVKSFNRNEC (配列番号 238) を含む。一部の場合、
抗体またこの断片は配列番号 236 及び／または 227 の 1 つ以上のアミノ酸配列と約 5
0%～約 99.9% の配列同一性 (例えば、約 50%～約 60%、約 55%～約 65%、
約 60%～約 70%、約 65%～約 75%、約 70%～約 80%、約 75%～約 85%、

10

20

30

40

50

約 80%～約 90%、約 85%～約 95%、約 90%～約 99.9%、約 95%～約 99.9%、約 97%、約 97.5%、約 98%、約 98.5%、約 99%、約 99.5%、約 99.6%、約 99.7% または約 99.8%) を有するアミノ酸配列を含む。一部の
場合、本発明の抗体またはこの断片は配列番号 236 及び／または 238 の任意の配列の
1 つ以上の断片を含むアミノ酸配列を含む。一部の場合、抗体またはこの断片は配列番号
237 及び／または 239 の 1 つ以上のヌクレオチド配列と約 50%～約 99.9% の配
列同一性（例えば、約 50%～約 60%、約 55%～約 65%、約 60%～約 70%、約
65%～約 75%、約 70%～約 80%、約 75%～約 85%、約 80%～約 90%、約
85%～約 95%、約 90%～約 99.9%、約 95%～約 99.9%、約 97%、約 9
7.5%、約 98%、約 98.5%、約 99%、約 99.5%、約 99.6%、約 99.7% または約 99.8%) を有するヌクレオチド配列によってコードされる。

10

【0206】

[IgG 合成]

本願に提示された 1 つ以上の可変ドメイン及び／または CDR アミノ酸配列を含む Ig
G 抗体（例えば、IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4）（またはこの断片または
変異体）は追加の試験及び／または生産開発のために合成される。このような抗体は目的
とするアミノ酸配列を cDNA の 1 つ以上のセグメントを IgG 生産に適切な発現ベク
ターに挿入させることで生産される。発現ベクターは、哺乳類の細胞で IgG を発現する
上で適切な哺乳類の発現ベクターを含む。IgG の哺乳類の発現は生産された抗体が哺乳
類のタンパク質特性の改変（例えば、糖化）を含むようにして／するか、または抗体製剤
が耐毒素及び／またはバクテリア発現システムから製造されたタンパク質に存在する他の
汚染源がないようにするために行われる。

20

【0207】

[癌関連標的]

一部の具現例において、本発明の標的は癌関連抗原またはエпитープである。本願にお
いて使用されたように、用語「癌関連」は癌、癌性細胞及び／または癌性組織といかなる
形でも関連する実体を記述することに使用される。グリカンを含む多数の癌関連抗原また
はエピトープが腫瘍細胞と関連して発現することと確認された (Heimburg-Mo
linaro, J. など, Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. Vaccine. 2011 Nov 8; 29 (48):
8802-26)。これは本願において「腫瘍関連炭水化物抗原」または「TACA」と
称される。TACA は、非制限的にムチン関連抗原 [非制限的に Tn、シアリル Tn (S
Tn) 及び トムゼン - フリーデンライヒ抗原を含む]、血液型ルイス関連抗原 [非制限的
にルイス^Y (Le^Y)、ルイス^X (Le^X)、シアリルルイス^X (SLe^X) 及びシアリ
ルルイス^A (SLe^A) を含む]、グリコスフィンゴリピド関連抗原 [非制限的にグロー
ボ H、段階特異性胚抗原 - 3 (SSEA-3) 及びシアル酸を含むグリコスフィンゴリピ
ドを含む]、ガングリオシド関連抗原 [非制限的にガングリオシド GD2、GD3、GM
2、フコシル GM1 及び Neu5Gc GM3 を含む] 及びポリシアル酸関連抗原を含む。
多数のこのような抗原は国際特許出願第 PCT/US2011/021387 号に記載さ
れており、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる。

30

40

【0208】

一部の具現例において、本発明の TACA 標的はルイス血液型の抗原を含む。ルイス血
液型の抗原は $\alpha 1-3$ 連結、または $\alpha 1-4$ 連結によって GlcNAc に連結されたフコ
ース残基を含む。これは糖脂質及び糖タンパク質の両方で発見される。ルイス血液群の抗
原はこのような抗原の分泌者である個別の体液で発見される。赤血球上でのこの出現は、
赤血球による血清からのルイス抗原の吸収に起因する。

【0209】

一部の具現例において、本発明の TACA 標的は Le^Y を含む。Le^Y (CD174 と
も知られる) は、Fuc α (1, 2) Gal β (1, 4) Fuc α (1, 3) GlcNAc
エピトープを生産する $\alpha 1, 2$ - 及び $\alpha 1, 3$ - 連結されたフコース残基を含む Gal

50

$\beta 1$ 、 4Gl cNAc からなる。これは $\alpha 1$ 、 3 フコースを母鎖の Gl cNAc 残基に付着させる $\alpha 1$ 、 3 フコシルの転移酵素によってH抗原から合成される。 Le^Y は、非制限的に卵巣癌、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肺癌及び上皮癌をはじめ、多様な癌で発現される。正常な組織でのこの低い発現及び多数の癌での上昇した発現水準に起因して、 Le^Y 抗原は治療用抗体の魅力的な標的である。

【0210】

一部の具現例において、本発明のTACA標的は Le^X を含む。 Le^X はエピトープ $\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{Gl cNAc}\beta-R$ を含む。これはまたCD15及び段階特異性胚抗原-1(SSEA-1)とも知られている。このような抗原はF9奇形癌腫細胞によって免疫化されたマウスから獲得された血清と免疫反応を表すものと初めて認識された。 Le^X はまた特定段階で胚の発達と関連があることが明らかになった。これはまた癌の存在及び不在の両方において多様な組織で発現されるが、癌性細胞によってのみ発現される乳癌及び卵巣癌からも発見される。

10

【0211】

一部の具現例において、本発明のTACA標的は SL e^A 及び／または SL e^X を含む。 SL e^A 及び SL e^X は構造 $[\text{Neu5Ac}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-4)\text{Gl cNAc}\beta-R]$ 及び $[\text{Neu5Ac}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{Gl cNAc}\beta-R]$ をそれぞれ含む。これらの発現は癌細胞において上向き調節される。血清でこのような抗原の存在は悪性及び予後不良に係る。 SL e^X は大体ムチン末端のエピトープとして発見される。これは乳癌、卵巣癌、黒色腫、大腸癌、肝臓癌、肺癌及び前立腺癌をはじめ、多数の異なる癌で発現される。本発明の一部の具現例において、 SL e^A 及び SL e^X の標的は Neu5Gc を含む(本願においてそれぞれ GcSL e^A 及び GcSL e^X と称される)。

20

【0212】

一部の場合、本発明の癌関連標的はムチンを含む。*Ishida*などは、MUC2と樹状細胞(抗腫瘍活性を有する)の相互作用が樹状細胞の細胞自滅を誘導することを示している(*Ishida*、A. など、2008. *Proteomics*、8:3342-9、この内容はすべて参照により本願に含まれる)。一部の態様において、本発明は樹状細胞の細胞自滅を予防して抗腫瘍活性を指示するための、抗体を提供する。

【0213】

一部の具現例において、本発明のTACA標的は非制限的にグリコスフィンゴリピドをはじめ、糖脂質及び／または糖脂質に存在するエピトープを含む。グリコスフィンゴリピドはセラミドヒドロキシ基によってグリカンに連結された脂質セラミドを含む。細胞膜上で、クラスターからのグリコスフィンゴリピドは「脂質ラフト(*raft*)」とも称される。

30

【0214】

一部の具現例において、本発明のTACA標的はグローボ(*Globo*)Hを含む。グローボHは乳癌細胞で初めて確認された癌関連グリコスフィンゴリピドである。グローボHのグリカン部分は $\text{Fuc}\alpha(1-2)\text{Gal}\beta(1-3)\text{GalNAc}\beta(1-3)\text{Gal}\alpha(1-4)\text{Gal}\beta(1-4)\text{Gl c}\beta(1)$ を含む。多数の正常な上皮組織で発見されるが、グローボHは、非制限的に小細胞肺腫瘍、乳房腫瘍、前立腺腫瘍、肺腫瘍、膵臓腫瘍、胃腫瘍、卵巣腫瘍及び内膜腫瘍をはじめ、多数の腫瘍組織と関連して確認されている。

40

【0215】

一部の具現例において、本発明の癌関連グリコスフィンゴリピドの標的はガングリオシドを含む。ガングリオシドはシアル酸を含むグリコスフィンゴリピドである。グリコスフィンゴリピドの命名法によると、Gはガングリオシドに対する略語として使用される。このような略字の後ろには付着されたシアル酸残基を称する文字M、DまたはT(それぞれ1、2、または3)が付いている。最後に、数字1、2または3は、薄層クロマトグラフィーによって分析される場合に各移動距離の順序を称することに使用される(3つの最も大

50

きい距離を移動した後2及び次に1)。ガングリオシドは癌関連成長及び転移に係り、腫瘍細胞の細胞表面上で発現すると知られている。腫瘍細胞上で発現されるガングリオシドは、非制限的にGD2、GD3、GM2及びフコシルGM1（本願においてFuc-GM1とも称される）。本発明の一部の具現例において、グリカン相互作用抗体はGD3に対して向けられる。GD3は細胞成長の調節者である。一部の具現例において、GD3指向性抗体は細胞成長及び／または新生血管生成を調節するために使用される。一部の具現例において、GD3指向性抗体は細胞付着を調節するために使用される。一部の腫瘍細胞に係るGD3は9-O-アセチル化されたシアル酸残基を含む（Mukherjee、K. など、2008、J Cell Biochem. 105:724-34及びMukherjee、K. など、2009、Biol Chem. 390:325-35、このそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。一部の場合、本発明の抗体は9-O-アセチル化されたシアル酸残基に対して選択的である。一部の抗体は9-O-アセチル化されたGD3に対して特異的である。このような抗体は9-O-アセチル化されたGD3を発現する腫瘍細胞を標的化するために使用される。本発明の一部の具現例において、グリカン相互作用抗体はGM2に対して向けられる。一部の具現例において、GM2-指示された抗体は細胞と細胞の接触を調節するために使用される。一部の具現例において、本発明のガングリオシドの標的はNeu5Gcを含む。一部の具現例において、このような標的はNeu5Gcを含むGM3変異体（本願においてGcGM3と称される）を含む。GcGM3のグリカン構成成分はNeu5Gc α 2-3Gal β 1-4Glcである。GcGM3は腫瘍細胞の構成成分としてよく知られている（Casadesus、A. V. など、2013、Glycoconj J. 30(7):687-99、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。

10

20

【0216】

一部の具現例において、本発明の腫瘍関連炭水化物の抗原はNeu5Gcを含む。

[免疫原性宿主]

一部の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体は本願で「免疫原性宿主」と称される、免疫化のための宿主として非ヒト動物を使用することにより開発される。一部の具現例において、免疫原性動物は哺乳類である。一部の具現例において、免疫原性宿主は形質転換されたノックアウトマウスである。グリカン相互作用抗体の標的部位及び／またはエピトープの標的を含む抗原は、免疫原性宿主で免疫反応を刺激して導入された抗原上に存在する標的部位及び／またはエピトープの標的に特異的に結合する抗体を生産するために免疫原性宿主を接触させることに使用される。

30

【0217】

本発明の一部の方法によると、抗STn抗体の開発はCmah遺伝子が破壊されたマウスを免疫化させるステップを含む。このような突然変異はシアル酸の免疫原性の非ヒト形態のNeu5Gcがこのようなマウスでこれ以上生産されないことからよりヒトと類似した生理学を引き起こす。また、Neu5Gcが発現されないハイブリドーマ生産のための、回収可能な限り、抗GcSTnの量を減少させることでGcSTnモノクローナル抗体の生産のためのCmah^{-/-}骨髓腫細胞が提供されるか、またはハイブリドーマはこのようなハイブリドーマに再び結合された抗体に起因して死滅し始めるだろう。他の遺伝子はCmah^{-/-}骨髓腫細胞の背景でノックアウトされる。例えば、ヒトに対して高度に免疫原性であるエピトープの形成に重要な酵素をコードするアルファ1、3-ガラクトシル転移酵素遺伝子（Chung、C. H. など、Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- α 1,3-galactose. N Engl J Med. 2008 Mar 13; 358(11):1109-17）がCmah^{-/-}骨髓腫細胞の背景でノックアウトされる。

40

【0218】

本発明の他の方法によると、野生型マウスが免疫化に使用される。このような方法はたまたまAcSTnまたはpan-STnエピトープと相互作用する抗体の生産で好まれる。

50

一部の場合、野生型マウスにおける免疫反応はより強力である。

【0219】

免疫化を介して生産された抗体は免疫原性宿主の血清から単離される。免疫原性宿主から抗体を生産する細胞は、また目的とする抗体を生産する細胞株を生産するために使用される。一部の具現例において、免疫原性宿主からの抗体及び／または抗体生産細胞の選別は酵素結合免疫吸着分析法（E L I S A）及び／またはグリカンアレイを使用することにより行われる。

【0220】

[補助剤]

本願に記載された抗原で免疫原性宿主を免疫化させることは1つ以上の補助剤の使用を含む。補助剤はこのような免疫原性宿主でより高い免疫反応を引き起こすことに使用される。このように、本発明によって使用された補助剤は、抗体の力価に影響を及ぼすこれらの能力に基づいて選択される。

【0221】

一部の具現例において、油中水エマルジョンが補助剤として有用である。油中水エマルジョンは移動性抗原の貯蔵所を形成し、遅い抗原の放出を容易にして免疫構成成分に対して抗原の提示を向上させることで作用する。フロイント補助剤が乾燥されて不活性化されたマイコバクテリア粒子を含む完全なフロイント補助剤（C F A）、またはこのような粒子がない不完全なフロイント補助剤（I F A）として使用される。他の油中水ベースの補助剤は、E M U L S I G E N（登録商標）（MVP Technologies、ネブラスカ州オマハ所在）を含む。E M U L S I G E N（登録商標）は、動物ベースの構成成分にはないミクロンサイズの水滴を含む。これは単独でまたは非制限的にアルミニウムヒドロキシド及びC A R B I G E N（商標）（MVP Technologies、ネブラスカ州オマハ所在）をはじめ、他の補助剤を組み合わせ使用される。

【0222】

一部の具現例において、T I T E R M A X（登録商標）補助剤が使用される。T I T E R M A X（登録商標）はスクアレンのみならず、ソルビタンモノオレート80（乳化剤として）及び他の構成成分を含むまた他の油中水エマルジョンである。一部の場合、T I T E R M A X（登録商標）は免疫原性宿主に対する減少された毒性を有するより高い免疫反応を提供する。

【0223】

免疫促進のオリゴヌクレオチドがまた補助剤として使用される。このような補助剤はC p Gオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）を含む。C p G ODNは、ツール（T o l l）様受容体9（T L R 9）によって認識されて強力な免疫促進の効果を引き起こす。類型CのC p G ODNはプラズマサイトイド樹状細胞（p D C）から強力なI F N - α の生産を誘導し、T補助（T_H）細胞からB細胞の刺激及びI F N - γ の生産を誘導する。C p G ODN補助剤はマウスで肺炎球菌ポリサッカライド（19F及び類型6B）特異的なI g G 2 a及びI g G 3を顕著に向上させることが明らかになった。C p G ODNはまたタンパク質の送達剤CRM197、特にCRM197特異的なI g G 2 a及びI g G 3に対する抗原反応を向上させた（Chuなど、Infection Immunity 2000、vol 68（3）：1450-6）。追加に、C p G - ODNを有する肺炎球菌のカプセルのポリサッカライド血清型14（PPS14）を利用した高齢マウスの免疫化は若い成人水準に対するI g G抗PPS14反応を回復させた（Senなど、Infection Immunity、2006、74（3）：2177-86）。本発明によるC p G ODNの使用はA、BまたはC部類のODNを含む。一部の具現例において、ODNは商業的に利用可能な任意のもの、例えば、ODN-1585、ODN-1668、ODN-1826、ODN-2006、ODN-2007、ODN-2216、ODN-2336、ODN-2395及び／またはODN-M362を含み、それぞれは例えば、InvivoGen、（カリフォルニア州サンディエゴ所在）から購入することができる。一部の場合、ODN-2395が用いられる。ODN-2395はヒト及びマ

ウスTLR9を特異的に刺激するC部類のCpG ODNである。このようなODNはホスホロチオエート骨格及び回文構造のCpG回文構造モチーフを含む。

【0224】

一部の具現例において、免疫刺激複合体（ISCOM）が補助剤として使用される。ISCOMは、特定の化学量論の下でコレステロール、リン脂質及びキラヤサポニンと共に混合される場合に自発的に形成された球形のオープンケージ型の構造（典型的に直径40 nm）である。ISCOM手法は大きい糖タンパク質、例えばエプスタイン-バー（Epstein-Barr）ウィルスからのgp340（80%の炭水化物からなる340 kDa抗原）から担体接合された合成ペプチド及び小さいハプタン、例えばビオチンに至るまでの非常に多様な抗原に対して立証される。一部のISCOMは、 T_{H1} 及び T_{H2} 特性の両方を有するバランスの取れた免疫反応を生成する。ISCOMに対する免疫反応は排出リンパ節から始まるが、脾臓に効率的に再配置され、モノクローナル抗体の生産にもまた特に適切である。一部の具現例において、ISCOM補助剤のAbISCO-100（Isconova、スウェーデンウプサラ所在）が使用される。AbISCO-100は、他のサポニンに対して敏感になり得る免疫原性宿主、例えばマウスで使用するために特別に開発されたサポニン基材の補助剤である。

10

【0225】

本発明の具現例によると、免疫化溶液の補助剤の構成成分は目的とする結果を達成するために多様であってもよい。このような結果は免疫反応の全体的な水準及び／または免疫原性宿主における毒性水準の調節を含む。

20

【0226】

〔抗体配列及び構造分析及び最適化〕

一部の具現例において、本発明の抗体は配列分析及び／または構造分析されるが、この際、これは親和性、特異性、タンパク質の折りたたみ、安定性、製造、発現、及び／または免疫原性（すなわち、このような抗体で処理された対象における免疫反応）に影響を及ぼす特性に対して分析される。このような分析は同一か、または類似したエピトープに結合する抗体間の比較を含む。

【0227】

同一のエピトープに結合する抗体の抗体配列は軽鎖及び／または重鎖配列における変異に対して分析される。このような分析は生殖細胞配列及び／またはCDR配列を含む。このような分析から獲得された情報は、保存アミノ酸残基と、アミノ酸の保存セグメントと、保存側鎖の特性を有するアミノ酸の位置と、保存CDRの長さと、同一のエピトープに結合する抗体の間で保存された他の特性を同定（及び任意選択的に改変、欠失、置換または修復）することに使用される。このような情報は変異体を考案するか、または抗体の親和性、特異性、タンパク質の折りたたみ、安定性、製造、発現及び／または免疫原性を改善するための抗体の最適化方法に対する情報を獲得することに使用される。

30

【0228】

配列分析は、類似性を同定するために同一または類似したエピトープに結合する2つ以上の抗体を整列することを含む。このような分析は抗体領域（例えば、CDR、可変ドメイン、生殖細胞セグメント）の配列及び／または長さを比較することができる。アミノ酸の挿入、アミノ酸の欠失、及び置換が確認され、評価される。配列の差が抗体の親和性及び／または特異性に対して比較される。

40

【0229】

一部の場合、配列分析は1つ以上の対にならないシステインまたは異常なジスルフィドと、糖化部位（例えば、N-連結されたNXS/T部位）と、酸の切断部位、アミノ酸の酸化部位、マウス生殖細胞配列との適合性と、アスパラギン脱アミド化部位とアスパルテート異性化部位と、N末端ピログルタメート形成部位と、CDRで凝集しやすいパッチと、を確認（及び任意選択的に改変、欠失、置換または修復）するために行われる。

【0230】

一部の場合、本発明は配列分析・情報化された本発明の抗体変異体を提供する。本願に

50

において使用されたように、用語「配列分析・情報化された変異体」は抗体配列の分析から由来した1つ以上の結果に基づいて改変された抗体変異体を称する。一部の場合、本発明の抗体は抗体の親和性、特異性、タンパク質の折りたたみ、安定性、製造、発現及び／または免疫原性のうち1つ以上に対する改変を含む抗体変異体を生産するために改変される。

【0231】

一部の配列分析・情報化された変異体は1つ以上のCDRの長さの改変を含む。CDRの長さが改変された抗体は本来の抗体配列に対して1つ以上のCDRで1つ以上の付加または欠失されたアミノ酸配列を含む。一部の場合、配列分析・情報化された変異体はまた他の抗体（例えば、同一または類似したエピトープに結合する抗体）から由来した1つ以上のCDRによる1つ以上のCDRの置換を含む。一部の場合、配列分析・情報化された変異体はまた他の抗体（例えば、同一または類似したエピトープに結合する抗体）からの重鎖または軽鎖の可変ドメインの置換を含む。配列分析・情報化された変異体は抗体がこれから発現される1つ以上の生殖細胞の遺伝子改変を含む。このような改変は点突然変異、局所的突然変異、挿入突然変異または欠失突然変異を含む。一部の場合、生殖細胞の遺伝子改変はCDRを公知の生殖細胞の遺伝子からまた他の場所へ移動させるために行われる。配列分析・情報化された変異体は、非制限的にscFv、モノバディ、ディアボディ、イントラボディ、CAR抗体の模倣体などをはじめ、本願に記載された他の変異体を含む。

10

【0232】

一部の具現例において、配列及び／または構造分析は抗体断片のディスプレイライブラリー（非制限的にscFvライブラリー、ファージディスプレイライブラリー及び酵母ディスプレイライブラリーを含む）の構築を知らせるために使用される。一実施例において、配列整列は2つ以上の抗体を共通の抗原またはエピトープに沿って整列させるために行われ、整列された抗体の間に保存されたアミノ酸残基または整列された抗体の間で可変的なアミノ酸残基が確認される。この場合、抗体断片のディスプレイライブラリーはライブラリー構成要素の間の可変性が主に配列分析で確認された可変アミノ酸に制限されるように構築される。一部の場合、このようなライブラリーは標的抗原（例えば、STn）に対する変更された抗原性及び／または特異性、または標的抗原の特異的なエピトープ（例えば、以下の実施例1に記載された第1、2、3及び4群抗体によって認識されるエピトープ）を有する変異体を確認することに使用される。

20

30

【0233】

一部の具現例において、本発明の抗体は1つ以上の対をなさないシステイン残基を除去、置換または他の方式で除去するように改変される。一部の場合、対をなさないシステイン残基は反応性であり、一部の場合は抗体の親和性及び／または特異性に影響を及ぼす。従って、本発明の抗体は対をなさないシステイン残基を除去するために改変される。一部の場合、このような変異体は改変されたエピトープの特異性及び／または親和性を有する。一部の場合、対をなさないシステイン残基の改変は抗体の折りたたみを変更させる。一部の場合、このような変異体は対をなさないシステイン残基からの好ましくない効果を予防または減少させるための1つ以上の追加的なアミノ酸残基（非制限的に、1つ以上のシステイン残基の追加を含む）を含む。一部の場合、システイン残基は疎水性側鎖（例えば、チロシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニンまたはトリプトファン）を有するアミノ酸に置換される。

40

【0234】

[抗体試験及び特性分析]

本願に記載された抗体は多様な方法を用いて試験され／されるか、または特性分析される。このような方法は、非制限的に抗体の親和性と、特異性と、活性（例えば、細胞シグナル伝達経路、または細胞または生物学的活性の活性化または阻害）と、を含む多様な特性を決定することに使用される。

【0235】

50

[細胞ベースアッセイ]

一部の具現例において、本発明の抗体は1つ以上の細胞ベースアッセイを使用することにより試験されるか、または特性分析される。このような細胞ベースアッセイは培養中の細胞を用いて試験管内で行われる。一部の場合、細胞ベースアッセイは生体内で行われる。生体内における細胞ベースアッセイの例は腫瘍細胞が注入または他の方式により宿主に導入された腫瘍モデルを含む。

【0236】

一部の場合、細胞ベースアッセイに用いられた細胞は1つ以上の本発明の抗体によって認識される1つ以上の標的グリカンを発現する。このようなグリカンはこのような細胞によって自然的に発現されるか、また他には、細胞は特定分析法の目的のために1つ以上の目的とするグリカンを発現するように誘導される。誘導された発現は糖化されたタンパク質または糖化を調節する酵素の発現を上向き調節する1つ以上の処理を介したものであってもよい。他の場合、誘導された発現は形質移入、形質導入または1つ以上の糖化されたタンパク質または糖化調節に係る酵素の内因性発現のために1つ以上の遺伝子または転写体の他の形態の導入を含む。

10

【0237】

一部の場合、本願に用いられた細胞ベースアッセイは癌細胞の使用を含む。多数の癌細胞株が本発明の抗体を試験するための実験に用いられる。このような細胞は標的グリカンを発現するか、または標的グリカンを発現するように誘導される。追加に、癌幹細胞を代表する癌細胞株が本発明の抗体を試験する上で用いられる。癌幹細胞(CSC)の細胞株は培養から成長した癌細胞から単離されるか、または分化される(例えば、癌細胞株に特異的なマーカーに基づいた分類を介して)。

20

【0238】

一部の具現例において、卵巣癌の細胞株が用いられる。このような細胞株は、非制限的にSKOV3、OVCAR3、OV90及びA2870細胞株を含む。一部の場合、CSC細胞はCD44及び/またはCD133細胞マーカーを発現する細胞を単離することでこのような細胞から単離される。

【0239】

OVCAR3細胞は進行性の卵巣腺癌を患っている患者から獲得された悪性腹水を用いて初めて樹立された(Hamilton, T. C. など、1983. Cancer Res. 43: 5379-89)。癌幹細胞集団は特異的な細胞表面マーカー、例えばCD44(細胞付着及び移動に係る)、CD133及びCD117に基づいた選別を介してOVCAR3細胞から単離される(Liang, D. など、2012. BMC Cancer. 12: 201、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる)。OV90細胞はヒトの腹水から類似して由来した上皮卵巣癌細胞である(米国特許第5,710,038号を参照)。OV-90細胞はまた活性化された場合にCD44を発現する(Meunier, L. など、2010. Transl Oncol. 3(4): 230-8)。

30

【0240】

一部の具現例において、胃癌から由来した細胞株が用いられる。このような細胞株は、非制限的にSNU-16細胞を含む(Park J. G. など、1990. Cancer Res. 50: 2773-80の説明を参照、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる)。SNU-16細胞はSTnを自然的に発現するがその水準は低い。

40

【0241】

[グリカンアレイ]

一部の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体はグリカンアレイを使用することにより開発される。本願において使用されたように、用語「グリカンアレイ」はアレイ基質に連結された任意の多数の異なるグリカンと相互作用する製剤を確認するため使用されるツールを称する。一部の具現例において、グリカンアレイは本願において「グリカンプローブ」と呼ばれる多数の化学的に合成されたグリカンを含む。一部の具現例において、グリカンアレイは2個以上、5個以上、10個以上、20個以上、30個以上、40個

50

以上、50個以上、60個以上、70個以上、80個以上、90個以上、100個以上、150個以上、350個以上、1000個以上または1500個以上のグリカンプロブを含む。一部の具現例において、グリカンアレイは目的とするグリカンプロブセットを提示するためにカスタマイズされる。一部の具現例において、グリカンプロブはリンカーの分子によってアレイ基質に付着される。このようなリンカーは非制限的に $-(O(CH_2)_2CH_2)NH_2$ 及び $O(CH_2)_3NHCOCH_2(OCH_2CH_2)_6NH_2$ を含む分子を含む。

【0242】

一部の具現例において、グリカンアレイは70個を超える化学的に合成されたグリカン
を有し、これらの大半はNeu5Ac及びNeu5Gc含有グリカン対として提示される
。グリカンプロブの一部の例示は以下を含む。Neu5Ac- α -2-6-GalNAc (AcSTn) と、Neu5Gc- α -2-6-GalNAc (GcSTn) と、Neu5,9Ac2- α -2,6-GalNAc と、Neu9Ac5Gc- α -2,6-GalNAc と、GalNAc (Tn)。AcSTn対GcSTnに対する抗体結合の特異性はアレイまたは当業界によく知られた他の特異性の決定方法を用いて決定される。追加に、O-アセチル化されたSTnに対する抗体結合のプロファイルが決定される。STn上におけるO-アセチル化の消失は癌関連発現が抗原によって増加されたSTnの認識に係るために癌と関連がある (Ogata, S. など、Tumor-associated sialylated antigens are constitutively expressed in normal human colonic mucosa. Cancer Res. 1995 May 1; 55 (9): 1869-74)。一部の
場合、グリカンアレイはSTn対Tnの認識を決定することに使用される。

【0243】

[抗体断片のディスプレイライブラリー選別手法]

一部の具現例において、本発明の抗体は発見の高性能方法を用いて生産され/されるか、または最適化される。このような方法は国際特許出願第WO2014074532号 (この内容はすべて参照により本願に組み込まれる) に開示された任意のディスプレイ手法 (例えば、ディスプレイライブラリー選別手法) を含む。一部の具現例において、合成抗体はディスプレイ手法 (例えば、ファージディスプレイ手法) を用いて標的抗原を選別することで考案、選択または最適化される。ファージディスプレイライブラリーは数百万～数十億のファージ粒子を含み、それぞれはこのウィルス外皮上に独特の抗体断片を発現する。このようなライブラリーは1つ以上の関心抗原に対して多様な水準の親和性を有した潜在的に数百個の抗原断片を選択する上で使用される多様な資源を豊富に提供する (McCafferty, など、1990. Nature. 348: 552-4; Edwards, B. M. など、2003. JMB. 334: 103-18; Schofield, D. など、2007. Genome Biol. 8, R254及びPershad, K. など、2010. Protein Engineering Design and Selection. 23: 279-88。このそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる)。たまたにこのようなライブラリーに存在する抗原断片は可撓性リンカーによって結合されたV_H及びV_L抗体ドメインの融合タンパク質を含むscFv抗体断片を含む。一部の
場合、scFvは相補性決定領域 (CDR) の可変ループをコードする独特な配列を除いては同一の配列を含有する。一部の
場合、scFvsはウィルスの外皮タンパク質 (例えば、ウィルスpIII外皮タンパク質のN末端) に連結された融合タンパク質として発現される。V_L鎖は、ウィルスの外皮内に複合体を混合させる前に周辺細胞質でV_H鎖との組み立てのために個別に発現される。沈殿されたライブラリー構成要素は目的のscFvをコードするcDNAを獲得するために結合されたファージから配列分析される。このような配列は組換え抗体の生産のために抗体配列内に直接混入されるか、または試験管内の親和性成熟により追加に最適化するために突然変異化され、利用される。

【0244】

[細胞傷害抗体の開発]

一部の具現例において、本発明の抗体は抗体依存性細胞媒介細胞傷害（ADCC）及び／または抗体依存性細胞食作用（ADCP）を誘導する。ADCCは免疫細胞攻撃の結果として細胞が溶解される免疫メカニズムである。このような免疫細胞はCD56+細胞、CD3-ナチュラルキラー（NK）細胞、単核細胞及び好中球を含む（Stroh1、W. R. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, Philadelphia PA. 2012. Ch. 8、p186、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。

【0245】

一部の場合、本発明の抗体は抗体結合時にADCCまたはADCPが好ましいかどうかによって与えられたアイソタイプを含むように操作される。このような抗体は、例えばAlderson、K. L. など、J Biomed Biotechnol. 2011. 2011:379123）により開示された任意の方法によって操作される。マウス抗体の場合、抗体の異なるアイソタイプがADCC誘導により効果的である。例えば、IgG2aがIgG2bよりもADCC促進により効果的である。マウスIgG2b抗体を含む一部の発明の抗体はIgG2a抗体を含むように組み替えられる。このような組換え抗体は細胞結合抗原に結合する際にADCC誘導により効果的である。

【0246】

一部の具現例において、本発明の方法によって開発された抗体の可変ドメインをコードする遺伝子はヒトFc領域をコードする哺乳類発現ベクター内にクローニングされる。このようなFc領域はヒトIgG1_kからのFc領域を含む。IgG1_k Fc領域はFc受容体結合及び抗体依存性細胞媒介細胞傷害（ADCC）を向上させることで知られているアミノ酸突然変異を含む。

【0247】

一部の具現例において、本発明の抗体は抗体薬物複合体（ADC）の治療剤への適用のために開発される。ADCは1つ以上の輸送物（例えば、治療剤または細胞傷害剤）が付着された抗体である[例えば、直接またはリンカー（例えば、切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカー）を介して]。ADCはこのような治療剤または細胞傷害剤を1つ以上の標的細胞または組織に送達することに有用である（Panowski、S. など、2014. mAbs 6:1、34-45）。一部の場合、ADCは標的化された細胞上の表面抗原に結合するように考案される。結合されれば、全体の抗体抗原複合体は内在化されて細胞リソソームに向けられる。次にADCは分解されて結合された輸送物を放出する。輸送物が細胞傷害剤である場合、標的細胞は死ぬか、または他の方式で不能化されるだろう。細胞傷害剤は、非制限的に細胞骨格阻害剤[例えば、チューブリン重合抑制剤、例えばメイタンシンまたはアウリスタチン（例えば、モノメチルアウリスタチンE [MMAE] 及びモノメチルアウリスタチンF [MMAF]）]及びDNA損傷剤（例えば、DNA重合抑制剤、例えばカリケアマイシン及びデュオカルマイシン）を含む。

【0248】

一部の具現例において、本発明の抗体はADCとして開発される場合にこれらの細胞死滅を促進する能力に対して試験される。細胞生存能分析は2次抗体薬物複合体の存在及び不在で行われる。強力な細胞成長の抑制を有する抗体は次に抗体薬物複合体（ADC）を考案することに使用される。細胞ベース細胞傷害分析法でこのような2次抗体薬物複合体の使用は多数のADC候補の迅速な事前全別を可能にする。このような分析法に基づいて、非接合された抗体候補群が1つ以上の細胞傷害剤（本願において2oADCと称される）に接合された2次抗体の存在の下で細胞に直接添加される。抗体/2oADCを標的化された抗原を高い密度で発現する細胞内に内在化させることは細胞内で容量依存的な薬物放出を達成することができて、細胞（例えば、腫瘍細胞）を死滅させる細胞傷害効果を誘発する反面、標的化された抗原を低い密度で発現する細胞（例えば、正常細胞）は影響を受けない。

【0249】

本発明のADCは癌細胞を標的するように考案される。このようなADCは1つ以上の

10

20

30

40

50

腫瘍関連炭水化物抗原（TACA）に指示された抗体を含む。一部の場合、本発明のADCは抗STn抗体を含む。

【0250】

〔キメラ抗原受容体の開発〕

一部の具現例において、本発明の抗体配列はキメラ抗原受容体（CAR）の開発に用いられる。CARは標的細胞（例えば、腫瘍細胞）の認識及び死滅を促進させる免疫細胞上で発現される膜貫通受容体である。CARは典型的に3つの基本部分を含む。これはエクストドメイン（認識ドメインとも知られている）、膜貫通ドメイン及び細胞内（シグナル伝達）ドメインを含む。エクストドメインは標的細胞上の細胞抗原に対する結合を容易にする反面、細胞内ドメインは典型的に結合された標的細胞の死滅を促進させる細胞のシグナル伝達機能を含む。追加に、これらは本願に記載された1つ以上の抗体可変ドメインまたはこの断片を有する細胞外ドメインを有する。本発明のCARはまた膜貫通ドメイン及び細胞質尾部を含む。CARは抗体、抗体可変ドメイン及び／または抗体CDRの1つ以上のセグメントを含むように考案され、これによって、このようなCARが免疫エフェクター細胞で発現される場合、免疫エフェクター細胞はCARの抗体部分によって認識される任意の細胞に結合されてこれを除去する。

【0251】

CARの特徴はモノクローナル抗体の抗原結合特性を利用した、非MHC制限された方式で選択された標的に対するT細胞特異性のリダイレクト及び再活性能力を含む。このような非MHC制限された抗原認識はCARを発現するT細胞が抗原処理とは無関係に抗原を認識する能力を付与し、従って、腫瘍エスケープの主なメカニズムを迂回する。また、T細胞で発現される場合、CARは内因性のT細胞受容体（TCR）及びアルファ及びベータ鎖と有利に二量体化されない。

【0252】

腫瘍を標的するように操作されたCARは1つ以上の腫瘍関連炭水化物抗原（TACA）に対する特異性を有する。一部の具現例において、このようなCARのエクストドメインは1つ以上の抗体可変ドメインまたはこの断片を含む。一部の具現例において、CARはT細胞で発現され、「キメラ抗原受容体発現T細胞」または「CAR-T」と称される。CAR-Tは1つ以上の抗体可変ドメインを有するCARエクストドメインを用いて捜査される。

【0253】

〔キメラ抗原受容体の構造的特徴〕

遺伝子送達手法を用いて、T細胞はこの表面上で抗体を安定に発現するように操作されて目的の抗原特異性が与えられる。キメラ抗原受容体（CAR）は特異的な抗体の抗原認識ドメインをCD3ゼータ鎖またはT細胞活性化の特性を有するFCγRIタンパク質の細胞内ドメインと結合させて単一キメラ融合タンパク質を生成する。CAR手法はT細胞による標的細胞のMHC非制限された認識を提供する。T細胞のMHC制限の除去は任意の患者でこのような分子の使用を容易にし、また、CD⁸⁺及びCD⁴⁺T細胞の両方で一般的にMHC部類IまたはIIエピトープにそれぞれ制限される。Ab結合領域の使用はT細胞がタンパク質のみならず、炭水化物及び脂質によって形成されたエピトープに対して反応するようにする。このようなキメラ受容体のアプローチは癌の免疫療法に特に適しており、MHC下向き調節、補助刺激分子の発現不足、CTL耐性及びT細胞抑制誘導とともに腫瘍が免疫認識を回避する多数のメカニズムを迂回するようにし、この際、CD⁸⁺CTL及びCD⁴⁺T細胞の両方の使用は最適の抗腫瘍効能に対する最善の結合である。このようなアプローチはHIVのようなウィルス以外に広範囲の腫瘍抗原に適用されることが立証された（Finney、など、J. Immunology、2004、172：104-113）。

【0254】

キメラ抗原受容体が内因性T細胞受容体と類似した方式でT細胞活性化を誘発させるが、実際にはCAR技術の臨床的な適用はキメラ抗原受容体のT細胞の不適切な生体内膨張

によって妨害されてきた。例えば、第1世代CARはこれらのシグナル伝達ドメインとしてCD3 ζ またはFC受容体 γ 鎖の細胞質領域を含めた。このような第1世代CARが卵巣癌、心臓癌、リンパ腫及び神経芽細胞腫を有する患者の第1相臨床研究で試験されており、T細胞の細胞傷害を効果的にリダイレクトすることで最善の反応を誘導しているが、反復的に抗原に露出される際にT細胞の増殖及び生存を不可能にすることが明らかになった。第2世代CARの原型 (prototype) はCD28及びCD3 ζ の両方を受容する受容体を含み、第2世代CARはB細胞の悪性腫瘍及び他の癌の治療のために試験された (Sadelain、など、(2009) Current Opinion in Immunology、21(2):215-223)。従って、CARは他の機能的な特性を有する受容体の多様なアレイとして急速に拡張されてきた。

10

【0255】

より最近では、CAR媒介T細胞反応は補助刺激ドメインを追加することで向上されることが明らかになった。前臨床モデルにおいて、CD137(4-1BB)シグナル伝達ドメインを含むことが、CD3ゼータ鎖を単独で含むことに比べて抗腫瘍活性及びキメラ抗原受容体の生体内持続性を顕著に増加させることが明らかになった (Porter、など、N. Engl. J. Med. 2011、365:725-733)。

【0256】

従って、本開示の一部の具現例において、本発明の抗体配列はキメラ抗原受容体 (CAR) を開発することに使用される。一部の具現例において、CARは標的細胞 (例えば、腫瘍細胞) の認識及び死滅を容易にする免疫細胞上の膜貫通受容体である。

20

【0257】

多数の癌において、標的化のための腫瘍特異的な抗原は定義されていないが、B細胞新生物 (neoplasm) において、CD19は魅力的な標的である。CD19の発現は正常及び悪性B細胞及びB細胞前駆体に制限される。抗CD19キメラ抗原受容体 (CAR T19) を発現する自家T細胞としての治療のための試験的な臨床試験が行われたp53欠乏慢性リンパ性白血病 (CLL) の患者において行われた。骨髓で、CD19特異的な免疫反応の生産が一時的なサイトカイン放出及びキメラ抗原受容体のT細胞のピーク浸透と一致する白血病細胞の切除によって立証された (Porter、など、N. Engl. J. Med. 2011、365:725-733)。

【0258】

30

CARの追加の構造的な特徴はCity of Hopeに譲渡され、共通の発明者としてMichael Jensenを有するいくつかのPCT国際公開に開示された任意のものを含む。例えば、PCT国際公開第WO00/23573号はCD20に特異的な受容体、細胞内シグナル伝達ドメイン及び膜貫通ドメインを含む細胞外ドメインを有する細胞表面タンパク質を発現する、遺伝的に操作されたCD20特異的リダイレクトT細胞を記載する。CD20⁺悪性腫瘍の細胞免疫療法及び任意の不適切なB細胞機能の廃止のためのこのような細胞の使用。一具現例において、細胞表面タンパク質は単鎖FvFC ζ 受容体であり、この際、Fvはペプチドによって連結されたCD20に対する単鎖モノクローナル抗体のVH及びVL鎖を表し、FcはヒトIgG1のヒンジ-CH2-CH3領域を表し、 ζ はヒトCD3のゼータ鎖の細胞内シグナル伝達ドメインを表す。受容体をコードするネイキッド (naked) DNAを用いて電気穿孔法によってキメラT細胞の受容体を発現するリダイレクトされたT細胞を製造する方法。同様に、PCT国際公開第WO02/077029号はCD19に特異的な受容体、細胞内シグナル伝達ドメイン及び膜貫通ドメインを含む細胞外ドメインを有する細胞表面タンパク質を発現する、遺伝的に操作されたCD19特異的にリダイレクトされた免疫細胞を記載する。CD19⁺悪性腫瘍の細胞免疫療法及び任意の不適切なB細胞機能の廃止のためのこのような細胞の使用。1つの具現例において、免疫細胞はT細胞であり、このような細胞表面タンパク質は単鎖scFvFC ζ 受容体であって、この際、scFvはCD19に対する単鎖モノクローナル抗体のVH及びVL鎖を表し、FcはIgG1の定常領域の最小限の一部を表し、ゼータはT細胞抗原受容体複合体のゼータ鎖 (ヒトCD3のゼータ鎖) の細胞内

40

50

シグナル伝達ドメインを表す。細胞外ドメイン s c F v F C と細胞内ドメインゼータは膜貫通ドメイン、例えば C D 4 の膜貫通ドメインによって連結される。受容体をコードするネイキッド D N A を用いて電気穿孔法によってキメラ T 細胞の受容体を発現するリダイレクトされた T 細胞を製造する方法。このようなキメラ抗原受容体は T 細胞で発現される場合、モノクローナル抗体の特異性に基づいて抗原認識をリダイレクトする能力を有する。 s c F v F C の考案：腫瘍細胞表面エピトープに対する標的の特異性を有する受容体は既存の抗腫瘍免疫に依存しないために養子 (a d o p t i v e) 治療用の抗腫瘍免疫エフェクト細胞を生産するために概念的に魅力的な戦略である。このような受容体は M H C の独立的方式で抗原に結合するということで「普遍的」であり、従って、1つの構造体は抗原陽性腫瘍を有する患者集団を治療するのに使用される。C i t y o f H o p e の P C T 国際公開第 W O 0 2 / 0 8 8 3 3 4 号、第 W O 2 0 0 7 / 0 5 9 2 9 8 号及び第 W O 2 0 1 0 / 0 6 5 8 1 8 号は細胞外ドメインを細胞表面、膜貫通領域及び細胞内シグナル伝達ドメインに連結させられる支持体領域に連結された可溶性受容体リガンドを含む細胞外ドメインとして構成された「ゼータカイン (Z e t a k i n e) 」を記載する。ゼータカインは、Tリンパ球の表面で発現される場合、T細胞活性を可溶性受容体リガンドが特異的な受容体を発現する特定の細胞として指示する。

【0259】

C A R の追加的な特徴は、U n i v e r s i t y o f T e x a s に譲渡され、共通発明者として L a w r e n c e C o o p e r を有する2つの P C T 国際公開のうち任意のものを含む。P C T 国際公開第 W O 2 0 0 9 / 0 9 1 8 2 6 号は細胞内シグナル伝達ドメイン、膜貫通ドメイン及び、C D 1 9 結合領域を含む細胞外ドメインを含むヒト C D 1 9 特異的なキメラ T 細胞受容体 (またキメラ抗原受容体、C A R) ポリペプチド (h C D 1 9 C A R と称される) を含む組成物を記述している。また他の態様において、C D 1 9 結合領域は F (a b ') 2 、F a b ' 、F a b 、F v または s c F v である。細胞内ドメインはヒト C D 3 ζ の細胞内シグナル伝達ドメインを含み、ヒト C D 2 8 細胞内のセグメントを追加に含む。特定の態様において、膜貫通ドメインは C D 2 8 膜貫通ドメインである。P C T 国際公開第 W O 2 0 1 3 / 0 7 4 9 1 6 号は T 細胞受容体及び／または H L A の発現を取り除くために遺伝的に改変された C A R ⁺ T 細胞を用いる免疫療法のための方法及び組成物を記述している。特定の具現例において、T細胞受容体陰性及び／または H L A 陰性 T 細胞は、例えばジンクフィンガーヌクレアーゼを用いて生産される。同種異系 (a l l o g e n e i c) の健康な供与者の C A R ⁺ T 細胞は移植片対宿主病 (G V H D) を引き起こすことなく任意に患者に投与されることができ、癌、自己免疫及び感染のような医学的な状態の既成の治療のための不変的な試薬として作用する。

【0260】

米国国立衛生研究所に譲渡された P C T 国際公開第 W O 2 0 1 1 / 0 4 1 0 9 3 号は K D R - 1 1 2 1 または D C 1 0 1 抗体、細胞外ヒンジドメイン、T細胞受容体膜貫通ドメイン及び細胞内 T 細胞受容体シグナル伝達ドメインの抗原結合ドメインを含む抗血管内皮増殖因子受容体 - 2 キメラ抗原受容体、及び癌治療においてこの使用を記述している。

【0261】

P C T 国際公開第 W O 2 0 1 2 / 0 7 9 0 0 0 号及び第 W O 2 0 1 3 / 0 4 0 5 5 7 号 (このそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる) は U n i v e r s i t y o f P e n n s y l v a n i a に譲渡され、共通の発明者として C a r l H . J u n e を共有し、それらの特許公開は、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、補助刺激シグナル伝達領域、及び C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む C A R 、及び R N A キメラ抗原受容体 (C A R) の形質移入された T 細胞の生産方法をそれぞれ記述している。

【0262】

同様に U n i v e r s i t y o f P e n n s y l v a n i a に譲渡され、共通の発明者として C a r l H . J u n e を共有する P C T 国際公開第 W O 2 0 1 3 / 1 2 6 7 1 2 号は癌治療に有用な、リガンド独立的で外因性サイトカインまたはフィーダー (f e e d e r) 細胞の添加に独立的な培養物から延長された指数成長を表す T 細胞の持続的な

10

20

30

40

50

個体群を生成する組成物及び方法を記述している。一部の具現例において、抗原結合ドメインは抗cMet結合ドメインである。一部の具現例において、抗原結合ドメインは抗メソテリン結合ドメインである。一部の具現例において、抗原結合ドメインは抗CD19結合ドメインである。ヒンジドメインはIgG4であり、膜貫通ドメインはCD28膜貫通ドメインである。一部の具現例において、補助刺激シグナル伝達領域はCD28シグナル伝達領域である。また、キメラ抗原受容体(CAR)、及び抗原結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、補助刺激シグナル伝達領域、及びCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むCARをコードする核酸配列を含むベクターが提供される。

【0263】

University of Pennsylvaniaに譲渡されたPCT国際公開第WO2014/039513号は細胞の細胞溶解活性を向上させるために細胞において1つ以上のジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)アイソフォーム(isoform)を抑制するための組成物及び方法を記述している。細胞は、細胞がキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように改変された養子T細胞の送達に用いられる。養子T細胞の送達に用いられたT細胞におけるDGKの抑制はT細胞の細胞溶解活性を増加させるために、癌、感染及び免疫障害を含む多様な状態の治療に用いられる。

【0264】

University of Pennsylvaniaに譲渡されたPCT国際公開第WO2014/055771号は卵巣癌の治療用組成物及び方法を記述している。特に、この発明は卵巣癌を治療するためのアルファ葉酸塩受容体(FR-アルファ)結合ドメイン及びCD27補助刺激ドメインを有する遺伝的に改変されたT細胞を投与することに関する。一部の具現例において、FR-アルファ結合ドメインは完全にヒト化されたとしているため、宿主免疫反応を予防する。

【0265】

一部の具現例において、本発明のCARは腫瘍を標的するように操作される。このようなCARは1つ以上のTACAに対する特異性を有する。一部の具現例において、このようなCARのエクトドメインは本願に提示された1つ以上の抗体可変ドメインまたはこの断片を含む。一部の具現例において、本発明のCARは本源において「キメラ抗原受容体発現T細胞」または「CAR-T」と称されるT細胞で発現される。CAR-Tは本願に提示された1つ以上の抗体可変ドメインを有するCARエクトドメインを用いて操作される。

【0266】

[多重特異性抗体]

一部の具現例において、本発明の抗体は1つを超えるエピトープに結合する。本願において使用されたように、用語「マルチボディ」または「多重特異性抗体」は2つ以上の可変ドメインが異なるエピトープに結合する抗体を称する。エピトープは同一であるか、または異なる標的であり得る。特定の具現例において、多重特異性抗体は同一または異なる抗原上の2つの異なるエピトープを認識する「二重特異性抗体」である。

【0267】

[二重特異性抗体]

二重特異性抗体は2つの異なる抗原に結合する。このような抗体は典型的に2つ以上の異なる抗体からの抗原結合領域を含む。例えば、二重特異性モノクローナル抗体(BsMAb、BsAb)は2つの異なるモノクローナル抗体の断片から構成された人工的なタンパク質であるために、BsAbが2つの異なる抗原類型に結合するようにする。このような技術の1つの共通的な適用は癌免疫療法であり、この際、BsMAbは細胞傷害細胞(CD3のような受容体を用いる)及び破壊される腫瘍細胞のような標的に同時に結合するように操作される。

【0268】

二重特異性抗体は、Rietz et al., G., 2012. Cancer Immunology. 12:12-18と、Marvin, J. S. など、2005. Acta Pharmacologica Sinica. 26(6):649-58と、Scha

10

20

30

40

50

e f e r、W. など、2011. PNAS. 108 (27) : 11187 - 92 (このそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる) と、に記載された任意のものを含む。

【0269】

「三官能性二重特異性」抗体と呼ばれる新しい世代のBsMAbが開発された。これらは2つの重鎖及び2つの軽鎖からなり、2つの異なる抗体のそれぞれの1つで、2つのFab領域(腕)は2つの抗原に対して指示され、Fc領域(足)は2つの重鎖を含み、第3の結合部位を形成する。

【0270】

二重特異性抗体の可変ドメインの上部を形成する2つのパラトープのうち、1つは標的抗原に対して指示され、もう1つはCD3のようなTリンパ抗原に対して向けられる。三官能性抗体の場合、Fc領域は大食細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞または樹状細胞のような、Fc受容体を発現する細胞に追加に結合する。要するに、標的化された細胞は免疫系の1つまたは2つの細胞に連結されてこれを破壊する。

【0271】

他の類型の二重特異性抗体が特定の問題、例えば短い半減期、免疫原性及びサイトカイン放出によって引き起こされた副作用を克服するために考案された。これらは、Fab領域のみで構成された、化学的に連結されたFab及び多様な類型の2価及び3価の一本鎖可変断片(scFv)である、2つの抗体の可変ドメインを模倣する融合タンパク質を含む。このような新しい類型のうち最も発展されたものはFc定常領域の代わりにFcab抗原結合断片を含有するように操作された抗体である二重特異性T細胞誘導抗体(BiTE)及びmAb2'である。

【0272】

二重特異性の一本鎖抗体Fv断片(Bs-scFv)は、癌細胞を死滅させるのに成功裏に使用された。一部のヒトの癌は野生型p53を用いた遺伝子治療によって回復されるp53に機能的な欠損を引き起こす。Weisbartは生きている大腸癌細胞に浸透し、細胞内p53に結合し、標的化及びこの野生型機能を回復させる二重特異性の一本鎖抗体の構造体及び発現を記述している(Weisbart、など、Int. J. Oncol. 2004 Oct; 25(4) : 1113 - 8と、Weisbart、など、Int. J. Oncol. 2004 Dec; 25(6) : 1867 - 73)。このような研究において、二重特異性の一本鎖抗体Fv断片(Bs-scFv)は、(i) 生きている細胞に浸透して核に位置するmAb 3E10の単一鎖Fv断片、及び(ii) p53のC端末に結合する非浸透抗体mAb PAb421の単一鎖Fv断片から構築された。PAb421結合はSW480ヒト大腸癌細胞を含み、一部p53突然変異の野生型機能を回復させる。Bs-scFvはSW480細胞に浸透して細胞傷害を表して突然変異p53に対する活性を回復させる能力を示唆した。COS-7細胞(野生型p53を有するサルの腎臓細胞)はPAb421のp53に対する結合を抑制するSV40ラージT抗原の存在によってPAb421に反応しないために対照群として使用される。Bs-scFvはCOS-7細胞に浸透するが細胞傷害がないためp53結合と関連のないBs-scFvの非特異的な毒性を取り除く。単独のFv断片は細胞傷害有しておらず、これはp53の形質導入に起因する死滅を意味する。PAb421 VHのCDR1における単一突然変異は細胞浸透を変更せずに、Bs-scFvのp53に対する結合を取り除き、SW480細胞に対する細胞傷害を阻害し、細胞傷害のためのp53に対するPAb421結合要件を追加的に裏付けた(Weisbart、など、Int. J. Oncol. 2004 Oct; 25(4) : 1113 - 8と、Weisbart、など、Int. J. Oncol. 2004 Dec; 25(6) : 1867 - 73)。

【0273】

一部の具現例において、本発明の抗体はディアボディであり得る。ディアボディは機能的な二重特異性の一本鎖抗体(bscAb)である。このような2価抗原結合分子はscFvの非共有結合二量体からなり、組換え方法を用いて哺乳類において生産される(例え

10

20

30

40

50

ば、Mackなど、Proc. Natl. Acad. Sci., 92:7021-7025、1995を参照)。いくつかのディアボディが臨床開発に進入した。City of HopeのBeckman Research Instituteにより後援を受けた研究(Clinicaltrials.gov NCT00647153)にて、抗CEAキメラ抗体cT84.66のコード123標識のディアボディバージョンが大腸癌の手術前の免疫シンチグラフィ検出に対して評価された(Nelson、A. L., MAbs. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83)。

【0274】

分子遺伝学を用いて、2つのscFvが「タンデム(tandem)scFv(tascFv)」と呼ばれるリンカードメインによって分離された単一ポリペプチド内に直列に操作される。TascFvはよく溶解されないことが明らかになり、バクテリアで生産される場合にリフォールディングを必要とするか、またはこれらは哺乳類培養システムで製造され、これはリフォールディングの要件を避けられるが、不良な歩留まりを表す。2つの異なるscFvに対する遺伝子を有数するtascFvの構造体は「二重特異性一本鎖可変断片(bis-scFvs)」を生成する。ただ、2つのtascFvが商業的な企業によって臨床的に開発され、両方は腫瘍兆候に対してMicrometによる活性初期段階発達において二重特異性の製剤であり、「二重特異性T細胞誘導体(BiT E)」と記述される。ブリナツモマブ(blinatumomab)は2相でB細胞非ホジキンリンパ腫に対するT細胞反応を強化させる抗CD19/抗CD3二重特異性tascFvである。MT110は1相で固形腫瘍に対するT細胞反応を強化させる抗EP-CAM/抗CD3二重特異性tascFvである。二重特異性、4価「TandAbs」もまたAffimedによって研究されている(Nelson、A. L., MAbs. 2010. Jan-Feb; 2(1):77-83)。

【0275】

また、IgGのマキシボディ(maxibody)(Fc(CH2-CH3ドメイン)のアミノ酸末端に融合された2価scFv)が含まれている。

二重特異性T細胞誘導(BiT E)抗体は選択された標的細胞の溶解のために一時的に細胞傷害性T細胞に結合するように考案される。BiT E抗体の臨床活性は体外で拡張された、腫瘍組織から由来した、または特異性T細胞受容体に形質移入された自家T細胞が固形腫瘍の治療において治療的な潜在力を示したという事実を裏付ける。このような個人化されたアプローチはT細胞のみで後期段階の癌であっても相当な治療活性を有することを立証するが、広範囲に行うには煩わしい。これは腫瘍特異性T細胞クローンの生成を促進させる細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)抗体と、癌細胞溶解のために患者のT細胞のラージ部分を直接的に連結する二重-及び三重特異性抗原に対しても異なる。T細胞誘導抗体によるヒト癌治療のための全般的なT細胞誘導可能性が活発に研究されている。(Baeuerle PA、など、Current Opinion in Molecular Therapeutics. 2009、11(1):22-30)。

【0276】

第3世代分子は「小型化された」抗体を含む。mAb小型化の最もよい例はTrubion Pharmaceuticalsの小モジュラー免疫薬(SMIP)である。1価または2価であり得るこのような分子は1つのV_L、1つのV_H抗原結合ドメイン及び1つまたは2つの定常「エフェクター」ドメインを含有し、このすべてがリンカードメインによって連結されている組換え単一鎖分子である。おそらく、このような分子は定常ドメインによって与えられた免疫エフェクター機能を保有するとともに、断片によって主張された増加した組織または腫瘍浸透の利点を提供することができる。3以上の「小型化された」SMIPは臨床開発段階に進入している。Wyeth社と共同で開発した抗CD20

SMIPであるTRU-015は関節リウマチ(RA)に対する2相を進行中の最も発展されたプロジェクトである。全身性エリテマトーデス(SLE)及びB細胞リンパ種における初期の試みは結局中断された。Trubion及びFacet BiotechnologyはCLL及びその他のリンパ性腫瘍の治療のために抗CD37 SMIPであ

10

20

30

40

50

るTRU-016の開発を共同で進めており、このプロジェクトは2相に到達している。Wyeth社はRA、SLE及び可能性がある多発性硬化症をはじめ、自己免疫疾患の治療のための抗CD20 SMIP SBI-087の許可を取得したが、このようなプロジェクトは臨床試験の初期段階にとどまっている(Nelson, A. L., MAb s. 2010. Jan - Feb; 2 (1) : 77-83)。

【0277】

Genmabはヒンジ領域がIgG4分子から除去されたこれらの「ユニーボディ(unibody)」技術の適用を研究している。IgG4分子は不安定で軽鎖/重鎖の異種二量体を交換できるが、ヒンジ領域の除去は重鎖/軽鎖の組み合わせを完全に遮断して、生体内安定性及び半減期を保障するFc領域は維持される反面、高度に特異的な1価軽鎖/重鎖異種二量体が残される。このような形態(configuration)はIgG4がFcRと不良に相互作用して1価のユニーボディが細胞内シグナル伝達複合体の形成を促進させないことにより、免疫活性化または発癌成長の危険を最小限に抑えることができる。しかし、このような内容は臨床的証拠というよりは実験室によって主に裏付けられる。Biotechnolがまた前臨床研究で「圧縮された」100KDaの抗HER2抗体である「小型化された」mAbであるCAB051を開発している(Nelson, A. L., MAb s. 2010. Jan - Feb; 2 (1) : 77-83)。

【0278】

単一抗原結合ドメインからなる組換え治療剤がまた開発されているが、これらは現在臨床パイプラインの単なる4%のみを占めている。このような分子は非常に小さく、全体の大きさのmAbで観察される分子量の約1/10である。Arana及びDomantisはヒト免疫グロブリン軽鎖または重鎖の抗原結合ドメインからなる分子を操作するが、Aranaのみが乾癬及び関節リウマチの治療のための2相研究で臨床試験における候補群である、抗TNF α 分子であるART-621を有する。Ablynxはラクダ及びラマで発見される重鎖抗体の抗原結合重鎖可変ドメイン領域(V_HHs)から由来した、軽鎖のない「ナノボディ」を生産する。2相開発段階である急性冠症候群に対する経皮的冠動脈介入術を受ける患者の血栓症を予防するための静脈治療剤としてALX-0081、及び急性冠症候群及び血栓性血小板減少性紫斑病を有する患者両方のために意図された皮下投与用1相分子であるALX-0681をはじめ、2つのAblynx抗フォンヴィレブランド因子ナノボディが臨床開発段階に発展された(Nelson, A. L., MAb s. 2010. Jan - Feb; 2 (1) : 77-83)。

【0279】

[多重特異性抗体の開発]

一部の具現例において、本発明の抗体配列は多重特異性抗体(例えば、二重特異性、三重特異性、またはより大きい多重特異性)を開発するのに用いられる。多重特異性抗体は本発明の標的抗原の異なるエピトープに対して特異的であるか、または本発明の標的抗原、及び異種グリカン、ペプチドまたは固形支持体物質のような異種エピトープの両方に対して特異的である(例えば、国際公開第WO93/17715号と、第WO92/08802号と、第WO91/00360号と、第WO92/05793号と、Tutt, A. など、Trispecific F(ab')₃ derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells. J. Immunol. 1991 Jul 1; 147 (1) : 60-9と、米国特許第4,474,893号と、第4,714,681号と、第4,925,648号と、第5,573,920号と、第5,601,819号と、Kostelny, S. A. など、Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. J. Immunol. 1992 Mar 1; 148 (5) : 1547-53を参照)と、米国特許第5,932,448号。

【0280】

Memorial Sloan-Kettering Cancer CenterのPCT国際公開第WO2014144573号に公開されて請求されたものは、二量体化能力のない、多重特異性結合製剤に比べて改善された特性を有する二量体多重特異性結合製剤（例えば、抗体構成成分を含む融合タンパク質）の製造のための多量体化技術である。

【0281】

Merck Patent GmbHのPCT国際公開第WO2014144357号に開示されて請求されたものは、4価二重特異性抗体（TetBiAb）、癌または免疫障害の診断及び治療のためのTetBiAbの製造方法及び使用方法である。TetBiAbは抗体のC末端に付着された第2の抗原特異性を有するFab断片の第2対を特徴とするために、2つの抗原特異性のそれぞれに対して2価である分子を提供する。4価抗体は抗体重鎖をFab重鎖と同時に発現されるこの同族（cognate）と結合された、Fab軽鎖に共有結合的に連結されることで、遺伝工学的方法によって生産される。

10

【0282】

IBC Pharmaceuticals, Inc. のPCT国際公開第WO2014028560号に開示されて請求されたものは、疾患の治療のためにT細胞抗原に対して1つ以上の結合部位及び疾患のある細胞または病原体上の抗原に対する1つ以上の結合部位を有する、T細胞リダイレクト二重特異性抗体（bsAb）である。好ましくは、このようなbsAbは抗CD3 x 抗CD19二重特異性抗体であるが、他のT細胞抗原及び／または疾患関連抗原に対する抗体が用いられる。このような複合体はエフェクターT細胞を標的化して疾患、例えば癌、自己免疫疾患または炎症疾患と関連する細胞のT細胞媒介細胞傷害を誘発する。細胞傷害免疫反応はインターフェロン-α、インターフェロン-bgrと、インターフェロン-λ1、インターフェロン-λ2またはインターフェロン-λ3と、を含むインターフェロンベース製剤の同時投与によって向上される。

20

【0283】

Synimmune GmbHのPCT国際公開第WO2013092001号に開示されて請求されたものは、二重特異性抗体分子及びこの製造方法、この用途及びこのような二重特異性抗体分子をコードする核酸分子である。特に、免疫細胞の標的細胞制限活性化を媒介する抗体分子が提供される。

【0284】

PCT国際公開第WO2012007167号に開示されて請求されたものは、腫瘍細胞の表面上に最小限のグリコエピトープ及びerbB部類の受容体に特異的に結合してグリコエピトープと受容体を架橋結合させる多重特異性結合抗体であり、このような抗体はNK細胞と独立的に細胞溶解に影響を及ぼす細胞死滅活性を有する。

30

【0285】

PCT国際公開第WO2012048332号及び第WO2013055404号に開示されて請求されたものは、メディトープ、メディトープ結合抗体、メディトープ送達システム及びメディトープのためのモノクローナル抗体フレームワーク結合インターフェース、及びこれらの使用方法である。特に、2つの抗体結合ペプチドであるC-QFDLSTRRLK-C（「cQFD」；前記公開特許で配列番号1；本願において配列番号240）及びC-QYNLSSRAALK-C（「cQYN」；前記公開特許で配列番号2；本願において配列番号241）は新規のmAb結合特性を有することが明らかになった。「メディトープ」とも称されるcQFD及びcQYNは抗EGFR mAb セツキシマブのFabフレームワーク領域に結合して抗原を結合する相補性決定領域（CDR）には結合しないことが明らかになった。Fabフレームワーク上の結合領域は他のフレームワーク結合抗原、例えば超抗原（superantigen）スタフィロコッカスタンパク質A（SpA）（Grailleなど、2000）及びペプトストレプトコッカスマグヌスタンパク質L（PpL）（Grailleなど、2001）と区分される。従って、開示された1つの具現例は環状メディトープに結合する独特なネズミ-ヒト抗体またはこれの機能的な断片のフレームワーク領域を含むフレームワーク結合インターフェースである。

40

50

【0286】

興味深い例示的な特許及び公開特許は以下のようなものである。米国特許第5、585、089号と、第5、693、761号と、第5、693、762号（すべて1995年6月7日に出版される）、及び米国特許第6、180、370号。これらすべてはProtein Design Labs、Inc. に譲渡され、1つ以上の相補性決定領域（CDR）及び供与免疫グロブリンからの可能な追加のアミノ酸及びヒト免疫グロブリンからのフレームワーク領域を有するヒト化された免疫グロブリンの生産方法、及びこの組成物を記述している。それぞれのヒト化された免疫グロブリンは通常、CDR以外に、例えば、CDRと相互作用して結合親和性に影響を及ぼす供与免疫グロブリンのフレームワークからのアミノ酸、例えば供与免疫グロブリン内のCDRに直ぐに隣接するか、または分子モデリングによって予測された約3 Å以内の1つ以上のアミノ酸を含むを記述している。重鎖及び軽鎖は多様な位置基準のうち、任意の1つまたはすべてを用いてそれぞれ考案される。インタクト抗体内に結合される場合、本発明のヒト化された免疫グロブリンはヒトにおいて実質的に非免疫源性で、このような抗原、例えばエピトープを含有するタンパク質または他の化合物に対する供与免疫グロブリンと実質的に同一の親和性を保有すると記述している。

10

【0287】

Universite Catholique De Louvain及びBio Transplant、Inc. に譲渡された米国特許第5、951、983号はTリンパ球に対するヒト化された抗体を記述している。HUM5400（EMBLアクセスX55400）と命名され、ヒト抗体クローンAmu 5-3（GenBankアクセス番号U00562）から由来したヒトVカッパ遺伝子からのフレームワーク領域が前記特許に記載されている。

20

【0288】

Creative Biomolecules、Inc. の米国特許第5、091、513号は予め選択された抗原に対する親和性を有する合成タンパク質群を記述している。このようなタンパク質は生物合成抗体結合部位（BABS）として行動する領域を構成する1つ以上のアミノ酸配列を特徴とする。このような部位は（1）非共有結合的に結合されているか、またはジスルフィドで結合された合成V_H及びV_L二量体、（2）V_H及びV_Lがポリペプチドリンカーによって付着されたV_H-V_LまたはV_L-V_H単鎖、または（3）個別のV_HまたはV_Lドメインを含む。結合ドメインは別途の免疫グロブリンから誘導される連結されたCDR及びFR領域を含む。このようなタンパク質はまた、例えば酵素、毒素、結合部位、または固定化媒質または放射性原子に対する付着部位として機能する他のポリペプチド配列を含む。抗体の生体内生成によって誘導される任意の特異性を有するBABSを考案して、この類似体を生産するための、タンパク質の生産方法が開示されている。

30

【0289】

Alcon BioMedical Research Unit、LLCのESBATechの米国特許第8、399、625号は、抗体受容体のフレームワーク及び特によく合う抗体受容体のフレームワークを用いて非ヒト抗体、例えばウサギ抗体を移植する方法を記述している。

40

【0290】

[イントラボディ]

一部の具現例において、本発明の抗体はイントラボディであり得る。イントラボディはこれが生産される細胞から分泌されない抗体の形態であるが、代わりに1つ以上の細胞内のタンパク質を標的化する。イントラボディは細胞内で発現されて機能し、非制限的に細胞内の輸送、転写、翻訳、代謝処理、増殖シグナル伝達及び細胞分裂をはじめ、多様な細胞処理に影響を及ぼすことに使用される。一部の具現例において、本願に記述された方法はイントラボディベース治療剤を含む。一部のこのような具現例において、本願に開示された可変ドメイン配列及び／またはCDR配列はイントラボディベース治療剤のための1

50

つ以上の構造体内に混入される。例えば、イントラボディは1つ以上の糖化された細胞内タンパク質を標的するか、または1つ以上の糖化された細胞内タンパク質と異なるタンパク質間の相互作用を調節することができる。

【0291】

20年以上の前に、細胞内標的に対する細胞内抗体が初めて記述された (Biocca、Neuberger及びCattaneo EMBO J. 9:101-108、1990)。哺乳類細胞の異なる区画におけるイントラボディの細胞内の発現は内因性分子の機能を遮断または調節することができる (Biocca、など、EMBO J. 9:101-108、1990と、Colbyなど、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:17616-21、2004)。イントラボディはタンパク質の折りたたみ、タンパク質-タンパク質、タンパク質-DNA、タンパク質-RNAの相互作用及びタンパク質改変を変更させることができる。これらは表現型ノックアウトを誘導し標的抗原に直接結合するか、またはこれの細胞内の輸送を迂回するか、またはこれの結合パートナーとの結合を抑制することで作動する。これらは研究ツールとして主に用いられており、ウィルス病理、癌及びミスフォールディング (misfolding) 疾患のようなヒト疾患の治療のための治療分子として浮上している。組換え抗体が急成長しているバイオ市場は、治療においてこれらの使用のために、より低い免疫性ととも向上された結合特異性、安定性及び溶解度を有するイントラボディを提供する (Biocca、抄録 Antibody Expression and Production Cell Engineering Volume 7、2011、pp. 179-195)。

【0292】

一部の具現例において、イントラボディは干渉RNA (iRNA) よりも利点を有する。例えば、iRNAは多数の非特異的な効果を発揮する反面、イントラボディは標的抗原に対する高い特異性及び親和性を有することが明らかになった。また、タンパク質として、イントラボディはiRNAより遥かに長い活性半減期を有する。従って、細胞内の標的分子の活性半減期が長い場合、iRNAを介した遺伝子の沈黙は効果を出すのに遅い反面、イントラボディ発現の効果はほぼ即刻であり得る。最後に、特定の標的分子の特定の結合相互作用を遮断するようにイントラボディを考案すると同時に他の分子を節約することができる。

【0293】

[イントラボディの開発]

イントラボディはたまに組換え核酸分子から発現された一本鎖可変断片 (scFv) であり、細胞内に維持されるように操作される (例えば、細胞質、小胞体または周辺細胞質に維持される)。イントラボディは、例えばイントラボディが結合するタンパク質の除去に用いられる。イントラボディの発現はまたイントラボディを含む核酸発現ベクターで誘導性プロモーターの使用を介して調節される。イントラボディは、例えば以下に開示されて検討されたことのような、当業界に公知の方法を用いて生産される。(Marascoなど、1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:7889-7893と、Chenなど、1994、Hum. Gene Ther. 5:595-601と、Chenなど、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91:5932-5936と、Maciejewskiなど、1995、Nature Med., 1:667-673; Marasco、1995、Immunotech、1:1-19と、Mhashilkar、など、1995、EMBO J. 14:1542-51と、Chenなど、1996、Hum. Gene Therap., 7:1515-1525; Marasco、Gene Ther. 4:11-15、1997; Rondon and Marasco、1997、Annu. Rev. Microbiol. 51:257-283と、Cohen、など、1998、Oncogene 17:2445-56と、Probaなど、1998、J. Mol. Biol. 275:245-253と、Cohenなど、1998、Oncogene 17:2445-2456と、Hassanzadeh、など、1998、FEBS Lett. 437:81-6と、Ric

hardsonなど、1998、Gene Ther. 5:635-44; Ohage and Steipe、1999、J. Mol. Biol. 291:1119-1128と、Ohageなど、1999、J. Mol. Biol. 291:1129-1134; Wirtz and Steipe、1999、Protein Sci. 8:2245-2250と、Zhuなど、1999、J. Immunol. Methods 231:207-222と、Arafatなど、2000、Cancer Gene Ther. 7:1250-6と、der Maurなど、2002、J. Biol. Chem. 277:45075-85と、Mhashilkarなど、2002、Gene Ther. 9:307-19と、Wheelerなど、2003、FASEB J. 17:1733-5、及びこれらに引用された参考文献)。特に、CCR5イントラボディはSteinbergerなど、2000、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:805-810)によって生産される。一般的に、Marasco、WA、1998、「Intrabodies: Basic Research and Clinical Gene Therapy Applications」Springer: New Yorkを参照し、scFvにレビューに対してPluckthunのthe Pharmacology of Monoclonal Antibodies、1994、vol. 113、Rosenburg及びMoore eds. Springer-Verlag、New York、pp. 269-315を参照してほしい。

【0294】

一部の具現例において、抗体配列がイントラボディ開発に用いられる。イントラボディは細胞内で単ドメインの断片であって、例えば単離されたVH及びVLドメインとしてまたは一本鎖可変断片(scFv)抗体として組換え的に発現される。例えば、イントラボディはたまに可撓性リンカーのポリペプチドによって結合された重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含む一本鎖抗体を形成するために単一ポリペプチドとして発現される。イントラボディは典型的にジスルフィド結合が欠如されており、この特異的な結合活性を介して標的遺伝子の発現または活性を調節することができる。一本鎖抗体は、また軽鎖定常領域に結合された単一鎖可変ドメインの断片として発現される。

【0295】

当業界によく知られているように、イントラボディは組換えポリヌクレオチドベクター内に操作されて、このNまたはC末端で細胞内(sub-cellular)輸送信号をコードして標的タンパク質が位置する細胞内の区画で高濃度に発現される。例えば、小胞体(ER)を標的化するイントラボディは先導(leader)ペプチド、及び選択的にC末端ER保有信号、例えばKDEL(配列番号242)アミノ酸モチーフを含むように操作される。核で活性を発揮するように意図されたイントラボディは核位置化信号を含むように操作される。イントラボディを原形質膜の細胞質側に結合させるために脂質部分構造がイントラボディに結合される。イントラボディはまた細胞質で機能を発揮するように標的化される。例えば、細胞質イントラボディは細胞質内で因子を分離させるために用いられ、これによってこれらがこの自然的な細胞の目的地に運搬されることが防止される。

【0296】

イントラボディの発現には特定の技術的な困難がある。特に、細胞内で新しく合成されたイントラボディのタンパク質の形態的(conformational)折りたたみ及び構造的な安定性は細胞内環境の条件を還元させることで影響を受ける。ヒトの臨床治療において、細胞内でイントラボディの発現を達成するために用いられる形質移入された組換えDNAの適用をめぐる安定性に対する懸念がある。この中で遺伝子組織で通常的に用いられる多様なウィルスベクターが特に懸念される。従って、このような問題を回避するための1つのアプローチは「細胞透過性」抗体または「トランスボディ」を作るためにscFv抗体にタンパク質の形質導入ドメイン(PTD)を融合させることである。トランスボディはタンパク質の形質導入ドメイン(PTD)が一本鎖可変断片(scFv)抗体と融合された、細胞透過性抗体である(Heng及びCao、2005、Med Hypotheses. 64:1105-8)。

【0297】

標的遺伝子と相互作用すれば、イントラボディは標的タンパク質機能を調節して／するか、または例えば、非物理的な細胞内区画で標的タンパク質分解を促進して標的タンパク質を分離するようなメカニズムによって表現型的／機能的なノックアウトを達成する。イントラボディ媒介の遺伝子不活性化の他のメカニズムは標的タンパク質上の触媒部位、またはタンパク質-タンパク質、タンパク質-DNA、またはタンパク質-RNAの相互作用に参与するエピトープに対する結合とともに、イントラボディが指示されたエピトープに依存する。

【0298】

1つの具現例において、イントラボディは核で標的を捕獲するのに用いられ、これによって、核内でこの活性が阻害される。核標的信号は目的とする標的化を達成するためにこのようなイントラボディ内に操作される。このようなイントラボディは特定の標的ドメインに特異的に結合するように考案される。また他の具現例において、標的タンパク質に特異的に結合する細胞質イントラボディが核への接近性を獲得することを防止するのに用いられ、これによって核内の任意の生物学的活性の発揮が阻害される（例えば、標的が異なる因子とともに転写複合体を形成することを阻害する）。

10

【0299】

特定の細胞に対するこのようなイントラボディの発現を特異的に指示するため、イントラボディの転写体は適切な腫瘍特異的プロモーター及び／またはエンハンサーの調節性の管理下に置かれる。イントラボディの発現を前立腺に特異的に標的化するため、例えばP

20

SAプロモーター及び／またはプロモーター／エンハンサーが用いられる（例えば、1999年7月6日に発行された米国特許第5、919、652号を参照）。

【0300】

タンパク質の形質導入ドメイン（PTD）は、非定型の分泌または内在化経路を介してタンパク質が細胞膜を横切って転位されて細胞質内で内在化されるようにする短いペプチド配列である。細胞内で発現される既存のイントラボディよりも「トランスボディ」が多数の特徴的な利点を有している。最初は、標的細胞内に導入される前に「正しい」形態的な折りたたみ及びジスルフィド結合の形成が発生し得る。より重要には、細胞透過性抗体または「トランスボディ」の使用は細胞内でイントラボディの発現に要求さる、ヒト臨床治療で組換えDNA技術の直接的な適用を巡る圧倒的な安定性と倫理的な懸念を回避でき

30

ることである。細胞内に導入された「トランスボディ」は任意の永久的な遺伝的変更なしに制限的な活性半減期のみを有する。これはヒト臨床療法でこれらの適用に係る安全問題を緩和すると考えられる。（Heng及びCao 2005、Med Hypotheses 64:1105-8）。

【0301】

イントラボディは、病理学的アイソフォームを含むタンパク質の異なる形態を特異的に認識するこれらの実質的に無限大の能力を有するので、そしてこれらが潜在的な凝集部位（細胞内及び細胞外部位の両方）を標的化するので、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病及びプリオン病を含む、ミスフォールディング疾患を治療するための有望な治療剤である。このような分子はアミロイド生成性のタンパク質に対する中和剤としてこれらの凝集、及び／または潜在的な凝集部位からタンパク質を再ルーティングさせることで細胞内輸送の分子シャンター（shunter）として機能することができる（Cardinale、及びBiocca、Curr. Mol. Med. 2008、8:2-11）。

40

【0302】

細胞内抗体またはイントラボディを記述している例示的な公開特許が以下に記載されており、このそれぞれはすべて参照により本願に組み込まれる。

Cattaneoなどに許与されたPCT国際公開第03014960号及び米国特許第7、608、453号は、細胞内抗体の1つ以上の一致配列を確認（ICS）する細胞内抗体の捕獲技術方法を記述しており、これは以下のステップを含む。検証された細胞内

50

抗体の配列を含むデータベース（V I D Aデータベース）を生成してK a b a tによって検証された細胞内抗体の配列を整列するステップと、整列された抗体のそれぞれの位置で特定のアミノ酸が発生する頻度を測定するステップと、70%～100%の範囲で頻度の閾値（L Pまたは一致閾値）を選択するステップと、特定のアミノ酸の頻度がL P値を超えるかまたはこれと同等の位置を確認するステップと、前記整列の位置で最も頻繁なアミノ酸を確認するステップ。

【0303】

全てM e d i c a l R e s e a r c h C o u n c i lに譲渡され、発明者C a t t a n e oなどを含むP C T国際公開第W O 0 0 5 4 0 5 7号と、第W O 0 3 0 7 7 9 4 5号と、第W O 2 0 0 4 0 4 6 1 8 5号と、第W O 2 0 0 4 0 4 6 1 8 6号と、第W O 2 0 0 4 0 4 6 1 8 7号と、第W O 2 0 0 4 0 4 6 1 8 8号と、第W O 2 0 0 4 0 4 6 1 8 9号と、米国特許出願第U S 2 0 0 5 2 7 2 1 0 7号と、第U S 2 0 0 5 2 7 6 8 0 0号と、第U S 2 0 0 5 2 8 8 4 9 2号と、第U S 2 0 1 0 1 4 3 9 3 9号と、米国登録特許第7、569、390号及び第7、897、347号及び欧州登録特許第E P 1 5 6 0 8 5 3号と、E P 1 1 6 6 1 2 1と、は細胞内細胞内の単一ドメイン免疫グロブリン、及び細胞内環境において標的と結合する免疫グロブリン単一鎖ドメインの能力を決定する方法、及び細胞内抗体を生産する方法を記述している。

【0304】

発明者としてC a t t e n e oという名称で、S . I . S . S . A . S c u o l a I n t e r n a z i o n a l e S u p e r i o r eに譲渡されたP C T国際公開第W O 2 3 5 2 3 7号と、米国特許出願第2 0 0 3 2 3 5 8 5 0号及び欧州登録特許第E P 1 3 2 8 8 1 4号は細胞内抗原のエピトープの生体内の同定のための方法を記述している。

【0305】

L a y L i n e G e n o m i c s S P Aに譲渡され、発明者としてC a t t e n e oという名称のP C T国際公開第W O 2 0 0 4 0 4 6 1 9 2号及び欧州特許第E P 1 5 6 5 5 5 8号は細胞内部のタンパク質リガンドxとタンパク質リガンドyの間の相互作用を破壊して中和させる細胞内抗体を単離する方法を記述している。また、xとyの間で相互作用できる細胞内抗体を使用して公知のyリガンドに結合できるタンパク質リガンドxを同定する方法と、与えられた細胞（相互作用物）のタンパク質-タンパク質相互作用の相当な部分に対する、または細胞内経路またはネットワークを構成するタンパク質相互作用に対する抗体断片セットの単離方法と、を開示する。

【0306】

「免疫反応のイントラボディ媒介調節」という発明の名称で、D a n a F a r b e r C a n c e r I n s t i t u t e I n c . に譲渡され、発明者の名前がM a r a s c o及びM h a s h i l k a rである米国特許出願 第2 0 0 6 0 3 4 8 3 4号及びP C T国際公開第W O 9 9 1 4 3 5 3号は、免疫反応調節物質（I R M）について、例えば細胞内的に発現された抗体、またはイントラボディを有する細胞を形質導入させることを含む、細胞上のI R M個別またはこの部類を選択的に標的化することで、免疫系の調節を変更させる方法に関するものである。好ましい具現例において、イントラボディはI R M、例えばM H C - 1分子に対する一本鎖抗体を含む。

【0307】

D a n a F a r b e r C a n c e r I n s t i t u t e I n c . 及びW h i t e h e a d B i o m e d i c a l I n s t i t u t eに譲渡され、発明者の名前がB r a d n e r、R a h l及びY o u n gであるP C T国際公開第W O 2 0 1 3 0 3 3 4 2 0号は、プロモドメインタンパク質と免疫グロブリン（I g）調節要素の間の相互作用を阻害してI g遺伝子座に転位された癌遺伝子の発現を下向き調節するために有用な、そしてI g遺伝子座に転位された癌遺伝子の増加した発現を特徴とする癌（例えば、血液学的悪性腫瘍）の治療に有用な方法及び組成物を記述している。イントラボディが一般的に記述される。

【0308】

発明の名称が「真核細胞でイントラボディを生産または同定する方法」で、University of Rochester Medical Centerに譲渡され、発明者の名前がZauderer、Wei及びSmithであるPCT国際公開第WO20086096号及び米国特許出願第2003104402号は3分子組換え方法を使用して真核細胞において細胞内免疫グロブリン分子及び細胞内免疫グロブリンライブラリーを発現する高効率方法を記述している。また、細胞内免疫グロブリン分子及びこの断片に対する選択及び選別方法、及び細胞内免疫グロブリン分子の生産、選別及び選択のためのキットのみならず、このような方法を使用して生産された細胞内免疫グロブリン分子及び断片が提供される。

【0309】

10

Affinity Biosciences PTY LTDに譲渡され、発明者の名前がBeasley、Niven及びKieffelであるPCT国際公開第WO2013023251号はポリペプチド、例えば抗体分子及びこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びこのライブラリーを記述しており、高い安定性及び可溶性を表す発現されたポリペプチドが記述されている。特に、還元または細胞内環境において可溶性発現及び折りたたみを表す対をなすVL及びVHドメインを含むポリペプチドが記述されており、ここで、ヒトscFvライブラリーが選別されており、ヒト生殖細胞配列と同一のフレームワーク領域及び顕著な熱安定性及びscFv足場へのCDR3移植耐性を表した。

【0310】

20

Esbatech AG及びUniversity of Zurichに譲渡され、発明者の名前がEwert、Huber、Honneger及びPluckthunである欧州特許出願第EP2314622号及びPCT国際公開第WO03008451号は、ヒト可変ドメインの改変を記述しており、非常に安定で可溶性である単一鎖Fv抗体断片の生成のためのフレームワークとして有用な組成物を提供する。このようなフレームワークは細胞内性能のために選択されており、従って適用のためのscFv抗体断片またはscFv抗体ライブラリーの生成に理想的に適合しており、ここで、安定性及び溶解度は細胞環境の還元のように抗体断片の性能を制限する要素である。このようなフレームワークはまた向上した溶解度及び安定性を表す、高度に保存された残基及び一致配列を確認するために使用される。

30

【0311】

「治療剤のイントラボディ標的化された送達及び再搭載のためのシステム装置及び方法」という発明の名称のPCT国際公開第WO02067849号及び米国特許出願第2004047891号は、分子のイントラボディ標的化された送達のためのシステム、装置及び方法を記述している。さらに特に、一部の具現例において、位置化されて適切な方式で対象の組織領域に対して治療剤の標的化された送達を可能とする再搭載可能な薬物送達システムに関するものである。

【0312】

Amgen Inc. に譲渡され、発明者の名前がZhou、Shen及びMartinであるPCT国際公開第WO2005063817号及び米国特許第7、884、054号はイントラボディを含めて機能的な抗体を同定する方法を記述している。特に、同種二量体のイントラボディが記述されており、ここで、同種二量体の各ポリペプチド鎖はFC領域、scFv、及び細胞内位置化配列を含む。このような細胞内位置化配列はイントラボディをERまたはゴルジに位置化させることができる。選択的に、各ポリペプチド鎖は1つ以下のscFvを含む。

40

【0313】

Permeon Biologics Inc. に譲渡されたVoganなどのPCT国際公開第WO2013138795号は、細胞内抗体及び抗体様部分構造の送達のための細胞浸透性組成物及びこれら（本願において「AAM部分構造ら」または「AAM部分構造」と称される）を細胞内に送達する方法を記述している。理論に縛られず、本発明は

50

、少なくとも部分的に、A A M部分構造がA A M部分構造を表面正電荷を有する細胞浸透性ポリペプチド（本願において「S u r f + 浸透性ポリペプチド」と称される）と複合体化されることで細胞内に送達されうるということに基づく。イントラフィリン（i n t r a p h i l i n）技術の一部の適用例がまた提供される。

【0314】

P a s t e u r I n s t i t u t eに譲渡されたP C T国際公開第W O 2 0 1 0 0 0 4 4 3 2号はラクダ科（ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ及びアルパカ）からの免疫グロブリンを記述しており、この約50%は軽鎖のない抗体である。このような重鎖抗体はV H H（ら）、V H Hドメイン（ら）またはV H H抗体（ら）と称されるただ1つの単一鎖ドメインによって抗原と相互作用である。軽鎖の不在にもかかわらず、このような同種二量体性抗体はこの超可変領域を拡張させることで広い抗原結合レパートリーを表し、試験管内及び生体内でトランスボディ及び／またはイントラボディとして作用することができ、この際、V H Hドメインは細胞内標的に対して向けられる。

10

【0315】

P C T国際公開第W O 2 0 1 4 1 0 6 6 3 9号は、細胞表現型を改変させるイントラボディを同定してイントラボディの直接または間接的な細胞標的を確認することで細胞表現型に係る細胞標的を同定する方法を記述している。特に、イントラボディ3 H 2 - 1、3 H 2 - V H及び5 H 4はアレルギー刺激によって誘発された肥満細胞で脱顆粒反応を抑制することができる。また、イントラボディ3 H 2 - 1及び5 H 4はそれぞれA B C F 1群及びC 1 2 0 R F 4群タンパク質を直接または間接的に標的化した。このようなA B C F 1及びC 1 2 0 R F 4抑制剤は治療、特にアレルギー及び／または炎症性疾患の治療に有用であると記述している。

20

【0316】

U r o g e n e s i s I n c. に譲渡されたP C T国際公開第W O 0 1 4 0 2 7 6号は細胞内抗体（イントラボディ）を用いてS T E A P（前立腺の6つの膜貫通上皮抗原）タンパク質の抑制可能性を一般的に記述している。

【0317】

U n i v e r s i t y o f M a n c h e s t e rに譲渡されたP C T国際公開第W O 0 2 0 8 6 5 0 5号及び発明者の名前がS i m o n及びB e n t o nである米国特許出願第U S 2 0 0 4 1 1 5 7 4 0号、標的分子の細胞内分析方法（その場合、イントラボディが好ましい）を記述している。一具現例において、C F Pに連結された抗M U C 1 イントラボディを発現できるベクター（p S c F v - E C F Pと命名される）が記述されている。

30

【0318】

G e n e T h e r a p y S y s t e m s I n c. に譲渡されたP C T国際公開第W O 0 3 0 9 5 6 4 1号及び第W O 0 1 4 3 7 7 8号は細胞内タンパク質送達組成物及び方法を記述しており、イントラボディが一般的に記述されている。

【0319】

S e l e c t i v e G e n e t i c s I n c. に譲渡されたP C T国際公開第W O 0 3 0 8 6 2 7 6号は細胞内感染治療のためのプラットフォーム技術を記述している。この特許に記述された組成物及び方法は感染に係る細胞表面受容体／部分構造を介して結合して内在化される連結されたリガンドを介して感染可能な細胞を標的化する非標的特異的なベクターを含む。このようなベクターは標的細胞内に内在化されるときに発現される外因性核酸配列を含む。ベクターに係るリガンド及び核酸分子は異なる感染性製剤を標的するために変更される。また、前記発明はベクターの内在化を指示することができ、ウィルス実体を遮断するエピトープ及びリガンドを同定する方法を提供する。

40

【0320】

E r a s m u s U n i v e r s i t yに譲渡されたP C T国際公開第W O 0 3 0 6 2 4 1 5号は異種抗原ガラクトースアルファ1、3ガラクトースの生産の触媒作用を妨害する細胞内抗体をコードするポリヌクレオチド構造体及び／またはP E R V粒子タンパク質

50

のようなレトロウイルスタンパク質に特異的に結合する細胞内抗体をコードするポリヌクレオチド構造体を含む形質転換有機体を記述している。形質転換有機体の細胞、組織及び器官が異種移植に使用される。

【0321】

「タンパク質構造を検出する方法及びこの適用」という発明の名称のPCT国際 公開特許第WO2004099775号は構造的なタンパク質状態を特異的に検出するために構造特異的な抗体としてscFv断片の使用を記述しており、生きている細胞で細胞内発現がなされるときに内因性タンパク質の行動センサーとして適用されると記述している。

【0322】

Imclone Systems Inc. に譲渡されたPCT国際公開第WO2008070363号は、非受容体チロシンキナーゼのTec群の構成要素である内皮及び上皮チロシンキナーゼであるEtkのような細胞内タンパク質または細胞内タンパク質の細胞内ドメインに結合する単ドメインのイントラボディを記述している。また、細胞内酵素を抑制する方法、及びイントラボディまたはイントラボディを発現する核酸を投与することで患者において腫瘍を治療する方法に提供される。

【0323】

Cornell Research Foundation Inc. に譲渡されたPCT国際公開第WO2009018438号は、標的分子に結合するタンパク質をコードするDNA分子を含む構造体を提供することで標的分子に結合して細胞内作用性を有するタンパク質を同定する方法を記述しており、このようなDNA分子は中断(stall)配列に結合されている。宿主細胞を構造体に形質転換させた後、翻訳が中断されたタンパク質、タンパク質をコードするmRNA及びリボゾーム複合体を形成するのに効果的な条件下で宿主細胞と一緒に培養した。複合体状態であるタンパク質は適切に折り畳まれら活性状態であり、このような複合体は細胞から回収される。このような方法は宿主細胞の代わりにリボゾームを含有する細胞がない抽出物で行われる。本発明はまた標的分子に結合するタンパク質をコードするDNA分子及びこのようなDNA分子に結合されたSecM中断配列を含む構造体に関するものである。このようなDNA分子とSecMの中断配列は細胞内で適切に折り畳まれた活性の形態で、これらのコードされたタンパク質の発現ができるようにこれらの間に十分な距離をおいて結合される。イントラボディの使用が一般的に記述されている。

【0324】

Mogam Biotech Research Instituteに譲渡されたPCT国際公開第WO2014030780号は遺伝子構造体を製造することで、より高い可溶性及び優れた熱安定性を有する標的タンパク質、特にヒト生殖細胞から由来した免疫グロブリンの可変ドメイン(VHまたはVL)を選別するための、Tat関連タンパク質操作(TAPE)という名称の方法を記述しており、ここで、標的タンパク質及び抗生剤抵抗タンパク質がTat信号配列に連結されており、次にこれをE. Coli内で発現する。また、TAPE方法で選別された、可溶性及び優れた熱安定性を有するヒトまたは操作されたVH及びVLドメイン抗体抗体、またはヒトまたは操作されたVH及びVLドメイン抗体支持体が提供される。また、TAPE方法で選別されたヒトまたは操作されたVHまたはVLドメイン抗体足場内に無作為CDR配列を含むライブラリー、この製造方法、このようなライブラリーを用いて選別された標的タンパク質に結合する能力を有するVH及びVLドメイン抗体、及びこのようなドメイン抗体を含む薬学組成物が提供される。

【0325】

欧州特許出願第EP2422811号は細胞内エピトープに結合する抗体を記述しており、このようなイントラボディは抗原に特異的に結合する抗体の少なくとも一部分を含み、好ましくはこの分泌をコードする作動的な配列を含有しないために細胞内に維持される。一具現例において、イントラボディはscFvを含む。scFvポリペプチドはVHとVLドメインの間でポリペプチドリンカーを追加に含み、scFvが抗原結合のための目的とする構造を形成するようにする。また、特定の具現例において、イントラボディがE

10

20

30

40

50

p h 受容体の細胞質ドメインに結合してこのシグナル伝達（例えば、自己リン酸化）を遮断させるということを記述している。また他の特定の具現例において、イントラボディは B 類型エフリン（例えば、エフリン B 1、エフリン B 2 またはエフリン B 3）の細胞質ドメインに結合する。

【0326】

P C T 国際公開第 W O 2 0 1 1 0 0 3 8 9 6 号及び欧州特許出願第 E P 2 2 7 5 4 4 2 号は、増殖細胞核抗原（P C N A）に特異的に結合するポリペプチドをコードする核酸分子を用いて製造された細胞内の機能的な P C N A クロモボディを記述している。1 つまたは 2 つのフレームワーク領域に 1 つ以上のアミノ酸の保存的置換を含むこのようなポリペプチドの例は、ポリペプチドのフレームワーク領域を含めて前記特許において配列番号 1 6 及び 1 8 で表示される。実施例において、P C N A の結合に関与するフレーム領域及び C D R 領域が決定された。

【0327】

欧州特許出願第 E P 2 7 0 3 4 8 5 号は原形質細胞または原形質芽細胞の選択方法のみならず、標的抗原特異的な抗体及び新規のモノクローナル抗体の生産方法を記述している。一具現例において、細胞内免疫グロブリンを発現する細胞が同定された。

【0328】

〔タンパク質及び変異体〕

本発明のグリカン相互作用抗体は全体のポリペプチド、多数のポリペプチドまたはポリペプチド断片として存在し、これらは独立的に 1 つ以上の核酸、多数の核酸、核酸断片または任意の前述されたものの変異体によってコードされる。本願において使用されたように、「ポリペプチド」はペプチド結合によって最も頻繁に一緒に連結されるアミノ酸残基（天然または非天然）の重合体を意味する。本願において使用されたように、本用語は任意の大きさ、構造または機能のタンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを称する。一部の例において、コードされたポリペプチドは約 5 0 個のアミノ酸より小さく、このようなポリペプチドはペプチドと称される。ポリペプチドがペプチドの場合、これは長さが約 2、3、4 個以上または 5 個以上のアミノ酸であるだろう。従って、ポリペプチドは遺伝子の産物、自然発生のポリペプチド、合成ポリペプチド、同族体、オルソログ（o r t h o l o g）、断片及び他の均等物、変異体及び前述されたものの類似体を含む。ポリペプチドは単一分子であるか、または多重分子複合体、例えば二量体、三量体または四量体であり得る。これはまた単一鎖または多重鎖ポリペプチドを含んでもよく、結合または連結される。用語 ポリペプチドはまた 1 つ以上のアミノ酸残基が対応する自然発生のアミノ酸の人口化学的な類似体であるアミノ酸重合体に適用することができる。

【0329】

用語「ポリペプチド変異体」は天然または基準配列とこのアミノ酸配列が異なる分子を称する。アミノ酸配列変異体は天然または基準配列に比べて、アミノ酸配列内の特定の位置で置換、欠失及び／または挿入を有する。一般に、変異体は天然または基準配列に対して約 5 0 % 以上の同一性（相同性）を有し、好ましくはこれは天然または基準配列に対して約 8 0 % 以上、より好ましくは約 9 0 % 以上の同一性（相同性）を有するだろう。

【0330】

一部の具現例において、「変異体模倣体」が提供される。本願において使用されたように、用語「変異体模倣体」は活性化された配列を模倣する 1 つ以上のアミノ酸を含有するものである。例えば、グルタメートはホスホトレオニン及び／またはホスホセリンに対する模倣体として作用する。或いは、変異体模倣体は不活性化を招くか、または模倣体を含む不活性化された生成物を引き起こし、例えば、フェニルアラニンはチロシンに対する置換体を不活性化させることと同じく作用するか、またはアラニンはセリンに対する置換体を不活性化させることのように作用する。本発明のグリカン相互作用抗体のアミノ酸配列は自然発生のアミノ酸を含み、例えばそのものでタンパク質、ペプチド、ポリペプチドまたはこれの断片としてみなされる。或いは、グリカン相互作用抗体は自然及び非自然的発生のアミノ酸の両方を含むことができる。

【0331】

用語「アミノ酸配列変異体」は天然または出発配列に比べてこのアミノ酸配列に若干の違いを有する分子を称する。アミノ酸配列変異体はこのようなアミノ酸配列内の特定の位置に置換、欠失及び／または挿入を有する。「天然」または「出発」配列は野生型配列と混同されてはならない。本願において使用されたように、天然または出発配列は比較になる元来の分子を表す相対的な用語である。「天然」または「出発」配列または分子は野生型（自然で発見された配列）を表すが、野生型配列になる必要はない。

【0332】

通常、変異体は天然配列に対して約70%以上の相同性を有し、好ましくは、これは天然配列に対して約80%以上、より好ましくは約90%以上の相同性であるだろう。アミノ酸配列に適用されたように「相同性」は、配列を整列して、最大のパーセンテージの相同性を達成するために必要な場合にギャップを導入した後、第2の配列のアミノ酸配列で残基と同一の候補アミノ酸配列内の残基の百分率として定義される。整列のための方法及びコンピュータープログラムが当業界によく知られている。相同性は同一性パーセンテージの計算にかかっているが、計算に導入されたギャップ及び不利益（penalty）によって値が異なり得ることが理解される。

10

【0333】

アミノ酸配列に適用されたように「相同体」は第2種の第2配列に対して実質的な同一性を有する他の種の対応する配列を意味する。「類似体」は1つ以上のアミノ酸の変更、例えば母ポリペプチドの特性は依然として維持するアミノ酸残基の置換、付加または欠失による異なるポリペプチド変異体を含むことを意味する。

20

【0334】

本発明は変異体及び誘導体を含むアミノ酸ベースのいくつかのタイプのグリカン相互作用抗体を考慮する。これは置換、挿入、欠失及び共有結合変異体及誘導体を含む。このように、置換、挿入及び／または付加、欠失及び共有結合的改変を含有するグリカン相互作用抗体の分子が本発明の範囲内に含まれる。例えば、配列タグまたはアミノ酸、例えば1つ以上のリシンが本発明のペプチド配列に付加される（例えば、N末端またはC末端の最後に）。配列タグはペプチド精製及び位置化に使用される。リシンがペプチド可溶性を増加させるか、またはビオチン化を可能にするために使用される。或いは、ペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列のカルボキシ及びアミノ末端領域に位置するアミノ酸残基は選択的に欠失されて切断された配列が提供される。特定のアミノ酸（例えば、C末端またはN末端残基）は配列の用途に応じて、例えば可溶性であるかまたは個体支持体に連結されたより大きい配列の一部として配列の発現によって欠損される。

30

【0335】

タンパク質を称する際に「置換変異体」は天然または出発配列内の1つ以上のアミノ酸残基が除去され、同一の位置で異なるアミノ酸がこの位置に挿入されたタンパク質である。このような置換は分子内の1つのアミノ酸のみが置換された単一であるか、または2つ以上のアミノ酸が同一の分子内で置換された複数であり得る。

【0336】

本願において使用されたように、用語「保存的なアミノ酸置換」は配列に正常に存在するアミノ酸を類似した大きさ、電荷または極性を有する異なるアミノ酸に置換することを称する。保存的置換の例は非極性（疎水性）残基、例えばイソロイシン、バリン及びロイシンを他の非極性残基に置換することを含む。同様に、保存的置換の例は1つの極性（親水性）残基をアルギニンとリシンの間、グルタミンとアスパラギン酸の間、及びグリシンとセリンの間の他のものに置換することを含む。追加に塩基性残基、例えばリシン、アルギニンまたはヒスチジンを他のものに置換すること、1つの酸性残基、例えばアスパラギン酸またはグルタミン酸をまた他の酸性残基に置換することが保存的置換の追加例である。非保存的置換の例は非極性（疎水性）アミノ酸残基、例えばイソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、メチオニンを極性（疎水性）残基、例えばシステイン、グルタミン、グルタミン酸またはリシン及び／または非極性残基を極性残基に置換することを含む。

40

50

【0337】

タンパク質を称する際に「挿入突変変異体」は天然または出発配列の特定の位置でアミノ酸に直ぐ隣接して挿入された1つ以上のアミノ酸を有するものである。アミノ酸に「直ぐ隣接した」とはアミノ酸のアルファカルボキシまたはアルファアミノ官能基のうち1つに連結されたことを意味する。

【0338】

タンパク質を称する際に「欠失突然変異体」は天然または出発アミノ酸が取り除かれた1つ以上のアミノ酸を有するものである。通常、欠失突然変異体は分子の特定の領域に欠失された1つ以上のアミノ酸を有するものである。

【0339】

本願において使用されたように、用語「誘導体」は用語「変異体」と同意語で使用され、基準分子または出発分子に対して任意の方式で改変または変化された分子を称する。一部の具現例において、誘導体は有機タンパク質性または非タンパク質性誘導体化剤に改変された天然または出発タンパク質、及び翻訳後の改変を含む。共有結合改変は伝統的にタンパク質の標的化されたアミノ酸残基を選択された側鎖または末端残基と反応し得る有機誘導体化剤と反応させるか、または選択された組換え宿主細胞で機能する翻訳後の改変メカニズムを利用することで導入される。生成された共有結合誘導体は生物学的活性、免疫、分析法、または組換え糖タンパク質の免疫親和性精製の抗タンパク質抗体の製造に重要な残基を確認するプログラムで有用である。このような改変は当業者の通常の技術範囲内にあり、過度な実験なく行われる。

【0340】

特定の翻訳後の修飾は発現されたポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミル及びアスパラギン残基はたまに翻訳後に脱アミド化されて対応するグルタミン及びアスパルチル残基になる。或は、このような残基は弱酸性条件下で脱アミド化される。このような残基の形態のいずれかは本発明によって使用されるタンパク質に存在し得る。

【0341】

他の翻訳後の修飾はプロリン及びリシンのヒドロキシ化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシ基のリン酸化、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のアルファ-アミノ基のメチル化を含む。(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79 - 86 (1983))。

【0342】

共有結合変異体は特に本発明のタンパク質が非タンパク質性重合体に共有結合されている融合タンパク質を含む。非タンパク質性重合体は通常親水性合成重合体、すなわち自然で発見されない重合体である。しかし自然に存在して組換え的にまたは試験管内方法で生産された重合体は自然で単離された重合体と同様に有用である。親水性ポリビニル重合体が本発明の範囲内にあり、例えば、ポリビニルアルコール及びポリビニルピロリドンである。ポリビニルアルキレンエーテル、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールが特に有用である。タンパク質は米国特許第4、640、835号と、第4、496、689号と、第4、301、144号と、第4、670、417号と、第4、791、192号または第4、179、337号に記述された方式で多様な非タンパク質性重合体、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンに連結される。

【0343】

タンパク質を称する際に「特徴」は分子の特徴的なアミノ酸配列ベースの構成成分と定義される。本発明のタンパク質の特徴は表面発現、局所形態的形状、折り畳み、ループ、半ループ、半ドメイン、部位、末端またはこれらの任意の組み合わせを含む。

【0344】

本願において使用されたように、タンパク質を称する際に用語「表面発現」は最も外側

10

20

30

40

50

の表面上に現れるタンパク質のポリペプチドベースの構成成分を称する。

本願において使用されたように、タンパク質を称する際に用語「局所形態的形状」はタンパク質の定義可能な空間内に位置するタンパク質のポリペプチドベースの構造的発現を意味する。

【0345】

本願において使用されたように、タンパク質を称する際に用語「折り畳み」はエネルギーの最小化時のアミノ酸配列の結果的な形態を意味する。折り畳みは折り畳み過程の2次または3次水準で発生し得る。2次水準の折り畳みの例はベータシート及びアルファヘリックスを含む。3次折り畳みの例はエネルギー力の凝集または分離によって形成されたドメイン及び領域を含む。このような方式で形成された領域は疎水性及び親水性ポケットなどを含む。

10

【0346】

本願において使用されたように、タンパク質形態に係る用語「回転 (turn)」はペプチドまたはポリペプチドの骨格の方向を改変させる曲がり (bend) を意味し、1、2または3個以上のアミノ酸残基が含まれてもよい。

【0347】

本願において使用されたように、タンパク質を称する際に用語「ループ」はペプチドまたはポリペプチドの骨格の方向を逆転させて5個以上のアミノ酸残基を含むペプチドまたはポリペプチドの構造的な特徴を称する。Olivaなどは5個以上の部類のタンパク質ループを同定した (J. Mol Biol 266 (4) : 814 - 830 ; 1997) 。

20

【0348】

本願において使用されたように、タンパク質を称する際に用語「半ループ」はアミノ酸残基の数の半分以上がこれが由来したループのような確認されたループの一部を称する。ループが常に偶数のアミノ酸残基を含有しないことが理解される。従って、ループが奇数のアミノ酸を含有するか、または含むことが確認された場合、奇数番目のループの半ループはループの全体の数 (whole number) 部分または次の全体の数 (ループのアミノ酸の数 $\div 2 + \text{ } - 0.5$ アミノ酸) を含むだろう。例えば、7個のアミノ酸ループと確認されたループは3個のアミノ酸または4個のアミノ酸の半ループを含むだろう ($7 \div 2 = 3.5 + \text{ } - 0.5$ は3または4である) 。

30

【0349】

本願において使用されたように、タンパク質を称する際に用語「ドメイン」は1つ以上の識別可能な構造または機能特性及び性質 (例えば、タンパク質 - タンパク質相互作用のための部位として作用する結合能) を有するポリペプチドのモチーフを称する。

【0350】

本願において使用されたように、タンパク質を称する際に用語「半ドメイン」はこれが由来したドメインのアミノ酸残基の数の半分以上を有する確認されたドメインの一部を意味する。ドメインは常に偶数のアミノ酸残基を含有しないことが理解される。従って、ドメインが奇数のアミノ酸を含有する、または含むと確認された場合、奇数番目のドメインの半ドメインはドメインの全体の数 (ループのアミノ酸の数 $\div 2 + \text{ } - 0.5$ アミノ酸) 部分または次の全体の数 (ドメインのアミノ酸の数 $\div 2 + \text{ } - 0.5$ アミノ酸) を含むだろう (ドメインのアミノ酸の数 $\div 2 + \text{ } - 0.5$ アミノ酸)。例えば、7個のアミノ酸ドメインと確認されたドメインは3個のアミノ酸または4個のアミノ酸の半ドメインを生成することができる ($7 \div 2 = 3.5 + \text{ } - 0.5$ は3または4である)。また、サブドメインがドメインまたは半ドメイン内で確認され、このようなサブドメインはこれらが由来したドメインまたは半ドメインで確認されたすべての構造的または機能的な特性より小さいものを有することが理解される。また、本願の任意のドメインタイプを含むアミノ酸はポリペプチドの骨格に沿って隣接する必要がないことが理解される (すなわち、非隣接したアミノ酸が構造的に折り畳まれてドメイン、半ドメインまたはサブドメインを生成することができる) 。

40

【0351】

50

本願において使用されたように、タンパク質を称する際に「アミノ酸残基」及び「アミノ酸側鎖」と同意語として使用される「部位」はアミノ酸ベースの具現例に係る用語を意味する。部位は本発明のポリペプチドベース分子内で改変、操作、変更、誘導体化、または変化されるペプチドまたはポリペプチド以内の位置を表す。

【0352】

本願において使用されたように、タンパク質を称する際に用語「末端または複数の末端」はペプチドまたはポリペプチドの最端を称する。このような最端はペプチドまたはポリペプチドの最初または最後の部位のみに限定されず、末端領域に追加のアミノ酸を含むことができる。本発明のポリペプチドベースの分子はN末端（遊離アミノ基（NH₂）を有するアミノ酸によって終結される）及びC末端（遊離カルボキシル基（COOH）を有するアミノ酸によって終結される）の両方を有することを特徴とする。本発明のタンパク質は一部の場合、ジスルフィド結合によってまたは非共有結合力によって結合された多数のポリペプチド鎖から構成される（多量体、オリゴマー）。このような種類のタンパク質は多数のN末端及びC末端を有するだろう。或は、ポリペプチドの末端は場合によって有機接合体のような非ポリペプチドベースの部分構造で始まるか、または終わるように改変される。

10

【0353】

任意の特徴が本発明の分子の構成成分として確認されるかまたは定義されれば、このような特徴の任意のいくつかの操作及び／または改変が移動、交換（swapping）、反転、削除、無作為化または複製によって行われる。また、特徴の操作は本発明の分子に対する改変によって同一の結果を招くことが理解される。例えば、ドメインを削除することに係る操作は全長分子よりも少ない量をコードする核酸の改変と同様に分子の長さの変更を招く。

20

【0354】

改変及び操作は部位が指定された突然変異の誘発のように当業界に公知の方法によって行われる。生成された改変分子は次に試験管内または生体内分析法、例えば本願に記述されたことまたは当業界に公知の任意の他の適切な選別分析法を用いて活性に対して試験を行うことができる。

【0355】

〔同位体変異体〕

本発明のグリカン相互作用抗体は同位体である1つ以上の原子を含有することができる。本願において使用されたように、用語「同位体」は1つ以上の追加の中性子を有する化学的な要素を称する。一具現例において、本発明の化合物は重水素化される。本願において使用されたように、用語「重水素化された」は1つ以上の水素原子が重水素同位体に置換された物質を称する。重水素同位体は水素の同位体である。水素の核は1つ以上の陽子を含有する反面、重水素の核は陽子と中性子の両方を含有する。グリカン相互作用抗体は化合物の物理的特性、例えば安定性を改変するかまたは化合物が診断及び実験的適用に使用されるように重水素化される。

30

【0356】

〔接合体及び組み合わせ〕

本発明のグリカン相互作用抗体は1つ以上の同種または異種分子と一緒に複合体化、接合または組み合わせられることが本発明によって考慮される。本願において使用されたように、「同種分子」は出発分子と関連して構造または機能の1つ以上が類似した分子を意味する反面、「異種分子」は出発分子と関連して構造または機能のうち1つ以上が異なるものである。構造的な同族体は、従って実質的に構造的に類似した分子である。これらは同一であってもよい。機能的な同族体は実質的にかつ機能的に類似した分子である。これらは同一であってもよい。

40

【0357】

本発明のグリカン相互作用抗体は接合体を含む。本発明のこのような接合体は自然発生的な物質またはリガンド、例えばタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、

50

低密度脂質タンパク質（LDL）、高密度脂質タンパク質（HDL）、またはグロブリン）と、炭水化物（例えば、デキストラン、プルラン、キチン、キトサン、インスリン、シクロデキストリンまたはヒアルロン酸）と、脂質と、を含む。リガンドはまた組換えまたは合成分子、例えば合成重合体、例えば合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド（例えば、アプタマー）であってもよい。ポリアミノ酸の例はポリリシン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン無水マレイン酸共重合体、ポリ（L-ラクチド-コ-グリコリド）共重合体、ジビニルエーテル無水マレイン酸共重合体、N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド共重合体（HMPA）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール（PVA）、ポリウレタン、ポリ（2-エチルアクリル酸）、N-イソプロピルアクリルアミド重合体、またはポリホスファゼンであるポリアミノ酸を含む。ポリアミンの例は以下を含む：ポリエチレンイミン、ポリリシン（PLL）、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、偽ペプチド-ポリアミン、ペプチド模倣体ポリアミン、デンドリマーポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、陽イオン脂質、陽イオン性ポルフィリン、ポリアミン四級塩、またはアルファヘリックスペプチド。

10

【0358】

接合体はまた標的化基、例えば細胞または組織標的化剤または基、例えば、レクチン、糖タンパク質、脂質またはタンパク質、例えば腎臓細胞のような特定の細胞類型に結合する抗体を含む。標的化基はチロトロピン、メラノトロピン、レクチン、糖タンパク質、界面活性タンパク質A、ムチン炭水化物、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン多価マンノース、多価フコース、糖化されたポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホネート、ポリグルタメート、ポリアスパルテート、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ビオチン、RGDペプチド、RGDペプチド模倣体またはアプタマーであってもよい。

20

【0359】

標的化基はタンパク質、例えば糖タンパク質またはペプチド、例えば共リガンドに対して特異的な親和性を有する分子、抗体、例えば癌細胞、表皮細胞または骨細胞のような特定の細胞類型に結合する抗体である。標的化基は、またホルモンまたはホルモン受容体を含んでもよい。これはまた非ペプチド種、例えば脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補助因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン多価マンノース、多価フコースまたはアプタマーを含んでもよい。

30

【0360】

標的化基は特定の受容体を標的化できる任意のリガンドであってもよい。その例として制限なく葉酸、GalNAc、ガラクトース、マンノース、マンノース-6P、アプタマー、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、PSMA、エンドセリン、GCP11、ソマトスタチン、LDL、及びHDLリガンドを含む。特定の具現例において、標的化基はアプタマーである。このようなアプタマーは非改変されるかまたは本願に開示された改変の任意の組み合わせを有する。

40

【0361】

また他の具現例において、グリカン相互作用抗体は細胞透過性ポリペプチドに共有結合的に結合されている。細胞透過性ペプチドはまた信号配列を含んでもよい。本発明の接合体は増加した安定性、増加した細胞形質転換及び／または変更された生体分布（例えば、特定の組織または細胞類型に標的される）を有するように考案される。

【0362】

接合体部分構造がグリカン相互作用抗体に追加されてもよく、これによってこれらは除去のための標的を標識し得る。このようなタグ／標識化分子は、非制限的にユビキチン、蛍光分子、ヒトインフルエンザヘマグルチニン（HA）、c-myc [配列EQKLISEEDL（配列番号243）を有するヒト癌原遺伝子mycの10個のアミノ酸配列]、

50

ヒスチジン (His)、フラッグ [配列 DYKDDDDK (配列番号 244) の短いペプチド]、グルタチオン s-転移酵素 (GST)、V5 (サル (simian) ウィルス 5 エピトープのパラミクソウイルス)、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 及びジゴキシゲニンを含む。

【0363】

一部の具現例において、グリカン相互作用抗体は疾患または状態の治療で互いにまたは他の分子と組み合わせられる。

[核酸]

本発明は核酸分子を含む。一部の具現例において、核酸は本発明の抗体 (非制限的に、抗体、抗体断片、イントラボディ及びキメラ受容体抗原を含む) をコードする。このような核酸分子は、制限なく DNA 分子、RNA 分子、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、mRNA 分子、ベクター、プラスミド及び他の構造体を含む。本願において使用されたように、用語「構造体」は非制限的にプラスミド、コスミド、自己複製ポリヌクレオチド分子または線状または環状単鎖または二重鎖 DNA または RNA ポリヌクレオチド分子をはじめとする任意の組換え核酸分子を称する。本発明はまたグリカン相互作用抗体をコードする核酸分子を発現するためにプログラム化されたまたは生産された細胞を含む。このような細胞は形質移入、電気穿孔法、ウィルス伝達などを介して生産される。本発明の構造体で操作されたウィルスは、非制限的に、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス及びファージを含む。一部の場合、本発明の核酸はコドン最適化された核酸を含む。コドン最適化された核酸の製造方法が当業界によく知られており、非制限的に米国特許第 5、786、464 号及び第 6、114、148 号 (このそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる) に記述されたものを含む。

【0364】

[I I. 方法及び用途]

[治療剤]

[癌関連適用]

異常な糖化は癌細胞形質転換の特徴である。多数の異常な糖化形態がヒト癌で記述されており、特定の癌関連炭水化物抗原 (TACA) を、特定の腫瘍の標的化に適切な細胞表面分子の部類として同定した (Cheever, M. A. など, Clin Cancer Res. 2009 Sep 1; 15 (17): 5323-37)。TACA 抗原発現は、非制限的に乳癌、大腸癌、肺癌、膀胱癌、子宮頸癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌及び肝臓癌を含む上皮癌で発見された。TACA 抗原の発現は、非制限的に卵黄嚢腫瘍及び生殖細胞腫を含む胎児性癌で発見された。また、TACA 抗原の発現は多様な組織の多くの黒色腫、癌腫及び白血病で発見された (Heimburg-Molinaro など, Vaccine. 2011 Nov 8; 29 (48): 8802-8826)。1つ以上の TACA を標的化する本発明の抗体は本願において「抗 TACA 抗体」と称される。

【0365】

MUC1 は、通常は高度に糖化されるものの腫瘍細胞では糖化が不十分である、主要な細胞表面の糖タンパク質である。MUC1 の希薄な糖化は免疫原性抗原の露出を引き起こす。これは MUC1 コアペプチド配列に沿うかまたはコア炭水化物残基に沿って存在する。このような TACA は、非制限的に N-アセチルガラクトサミン (Tn)、シアリル ($\alpha 2, 6$) N-アセチルガラクトサミン (STn) 及びガラクトース ($\beta 1-3$) N-アセチルガラクトサミン (トムゼン-フリーデンライヒ抗原または TF と知られている) を含む。すべての癌腫の約 80% が MUC1 のコア炭水化物のうち Tn を発現し、STn はヒト癌腫細胞で強く発現され、癌の進行及び転移に係るものと推測される。ほぼ例外なく、Tn 及び STn は正常の健康な組織では発現されていない。シアリ酸は STn 上で重要なエピトープを形成する。本発明の異常な Neu5Gc-STn (GcSTn) グリカン発現が多様な癌腫に対して高度に特異的なものとして現れるという事実を用いる。

【0366】

MUC1 の場合、STn への Neu5Gc の取り込みは、腫瘍組織治療のための抗体ベ

10

20

30

40

50

ース治療法の魅力的な標的の部位である腫瘍特異的な標的を生みだす。本発明の一部の具現例において、グリカン相互作用抗体はNeu5Gcを含む癌細胞を発現するMUC1を標的化する。現在まで、Neu5Gcは、非制限的に大腸癌、網膜芽細胞腫の組織、黒色腫、乳癌及び卵黄嚢腫瘍組織とはじめとする多数のヒト癌組織の糖接合体で検出された。本発明の一部の具現例において、Neu5Gcを含む癌細胞の存在を特徴とする、このような形態の癌のみならず本願に具体的に列挙されていない他の形態の癌のグリカン相互作用抗体の治療方法が考慮される。

【0367】

グリカンを含む追加の抗原が癌と関連して発現することが確認された(Heimburg-Molinaro, J. など、Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. Vaccine. 2011 Nov 8; 29(48): 8802-26)。このような腫瘍関連の炭水化物抗原は、非制限的に血液型ルイス関連の抗原[非制限的に、ルイス^Y(Le^Y)、ルイス^X(Le^X)、シアリルルイス^X(SLe^X)及びシアリルルイス^A(SLe^A)を含む]、グリコスフィンゴリピド関連抗原[非制限的に、グローボH、段階特異的胚抗原-3(SSEA-3)及びシアリ酸を含むグリコスフィンゴリピドを含む]、ガングリオシド関連抗原[非制限的に、ガングリオシドGD2、GD3、GM2、フコシルGM1及びNeu5GcGM3を含む]及びポリシアリ酸関連抗原を含む。

【0368】

一部の具現例において、本発明の治療剤はルイス血液型抗原に対して向けられる。ルイス血液型抗原はα1-3連結またはα1-4連結によってGlcNAcに連結されたフコース残基を含む。これは糖脂質と糖タンパク質の両方で発見される。ルイス血液型抗原はこのような抗原の分泌者である個別の体液で発見される。赤血球におけるこれらの出現は赤血球による血清からのルイス抗原の吸収に起因する。

【0369】

一部の具現例において、本発明の治療剤はLe^Yに対して向けられる。Le^Y(CD174とも知られている)はα1、2及びα1、3連結されたフコース残基を含めてFucα(1,2)Galβ(1,4)Fucα(1,3)GlcNAcエピトープを生成するGalβ1,4GlcNAcからなっている。これはα1、3フコースを母鎖のGlcNAc残基に付着させるα1、3フコシル転移酵素によってH抗原から合成される。Le^Yは、非制限的に卵巣癌、乳癌、前立腺癌、大腸癌、肺癌、及び表皮癌を含む多様な癌で発現される。正常の組織におけるこの低い発現水準及び多数の癌におけるこの上昇した発現水準に起因して、Le^Y抗原は治療抗体のための魅力的な標的である。

【0370】

一部の具現例において、本発明の治療剤はLe^Xに対して向けられる。Le^XはエピトープGalβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-Rを含む。これはCD15及び段階特異的胚抗原-1(SSEA-1)とも知られている。このような抗原はF9奇形腫細胞で免疫化されたマウスから採取した血清と免疫反応を表すことで初めて認識された。Le^Xはまた特定段階の胚発達に係る。これはまた癌の存在及び不在の両方に存在する多様な組織で発現されるが、癌細胞によってのみ発現される場合に乳癌及び卵巣癌でもまた発見される。

【0371】

一部の具現例において、本発明の治療剤はSLe^A及び/またはSLe^Xに対して向けられる。SLe^A及びSLe^Xはそれぞれ[Neu5Acα2-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ-R]及び[Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-R]構造を含む。これらの発現は癌細胞で上向き調節される。血清においてこのような抗原の存在は悪性腫瘍と及び予後不良と関連がある。SLe^Xは大半がムチン末端のエピトープで発見される。これは乳癌、卵巣癌、黒色腫、大腸癌、肝臓癌、肺癌及び前立腺癌を含む多数の異なる癌で発現される。本発明の一部の具現例において、SLe^A及びSLe^X標的は少ないNeu5Gcを含む(本願においてそれぞれ

G c S L e ^A 及び G c S L e ^X と称される)。

【0372】

一部の具現例において、本発明の治療剤は、非制限的にグリコスフィンゴリピドを含み、糖脂質及び／または糖脂質上に存在するエピトープに対して向けられる。グリコスフィンゴリピドはセラミドヒドロキシ基によってグリカンに連結された脂質セラミドを含む。細胞膜上で、グリコスフィンゴリピドは「脂質ラフト」と称されるクラスターを形成する。

【0373】

一部の具現例において、本発明の治療剤はグローボHに対して向けられる。グローボHは乳癌細胞で初めて確認された癌関連グリコスフィンゴリピドである。グローボHのグリカン部分は F u c α (1 - 2) G a l β (1 - 3) G a l N A c β (1 - 3) G a l α (1 - 4) G a l β (1 - 4) G l c β (1) を含む。多数の正常な表皮組織で発見されるが、グローボHは、非制限的に小細胞肺癌、乳癌、前立腺癌、肺癌、膵臓癌、胃癌、卵巣癌及び子宮内膜腫瘍を含む多数の腫瘍組織と関連して確認された。

【0374】

一部の具現例において、本発明の治療剤はガングリオシドに対して向けられる。ガングリオシドはシアル酸を含むグリコスフィンゴリピドである。ガングリオシドの命名法によると、Gはガングリオシドの略語として使用される。このような略語の後ろには付着されたシアル酸残基の数を称する文字M、DまたはT（それぞれお1、2または3）が付いている。最後に、数字1、2または3は薄層クロマトグラフィーによって分析される場合、各移動距離の順序を称するのに使用される（3個の最も大きい距離を移動した後に2及び次に1）。ガングリオシドは癌関連成長及び転移に関与して腫瘍細胞の細胞表面上で発現されることが知られている。腫瘍細胞上で発現されるガングリオシドは、非制限的に G D 2、G D 3、G M 2 及びフコシル G M 1（本願において F u c - G M 1 と称される）を含む。本発明の一部の具現例において、グリカン相互作用抗体は G D 3 に対して向けられる。G D 3 は細胞成長の調節子である。一部の具現例において、G D 3 指示された抗体は細胞成長及び／または新生血管生成を調整するために使用される。一部の具現例において、G D 3 指示された抗体は細胞付着を調節するために使用される。本発明の一部の具現例において、グリカン相互作用抗体は G M 2 に対して向けられる。一部の具現例において、G M 2 指示された抗体は細胞と細胞の接触を調節するために使用される。一部の具現例において、本発明のガングリオシド標的は N e u 5 G c を含む。一部の具現例において、このような標的は N e u 5 G c を含む G M 3 変異体を含むことができる（本願において G c G M 3 と称される）。G c G M 3 のグリカン構成成分は N e u 5 G c α 2 - 3 G a l β 1 - 4 G l c である。G c G M 3 は腫瘍細胞の構成成分として知られている。

【0375】

一部の具現例において、本発明の抗 T A C A 抗体によって標的化された T A C A は、非制限的に米国公開特許第 U S 2 0 1 3 / 0 2 3 6 4 8 6 A 1 号、第 U S 2 0 1 3 / 0 1 0 8 6 2 4 A 1 号、第 U S 2 0 1 0 / 0 1 7 8 2 9 2 A 1 号、第 U S 2 0 1 0 / 0 1 0 4 5 7 2 A 1 号、第 U S 2 0 1 2 / 0 0 3 9 9 8 4 A 1 号、第 U S 2 0 0 9 / 0 1 9 6 9 1 6 A 1 号、及び第 U S 2 0 0 9 / 0 0 4 1 8 3 6 A 1 号（これらのそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる）に列挙された任意のものを含む。

【0376】

[癌の中の S T n]

免疫系は先天的及び後天的な免疫活性の両方を含む抗腫瘍細胞の免疫活性を促進させる多数のメカニズムを有する。本願において使用されたように、用語「抗腫瘍細胞の免疫活性」は腫瘍細胞の成長及び／または増殖を死滅させるかまたは予防する免疫系の任意の活性を称する。一部の場合、抗腫瘍の免疫活性はナチュラルキラー（NK）細胞による認識及び腫瘍細胞の死滅、及び大食細胞による食菌作用を含む。後天的な抗腫瘍の免疫反応は腫瘍特異的な抗体の分泌でT細胞の抗腫瘍活性及び／またはB細胞の拡張調節を引き起こす腫瘍抗原の摂取及び抗原提示細胞（APC）、例えば樹状細胞（DC）による提示を含

10

20

30

40

50

む。腫瘍特異的な抗体が腫瘍に結合すれば、腫瘍細胞死滅の抗体依存性細胞・細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC）メカニズムを引き起こし得る。

【0377】

本願において使用されたように、用語「免疫耐性腫瘍細胞」は抗腫瘍細胞の免疫活性を減少させるかまたは回避する腫瘍細胞を称する。一部の研究は腫瘍細胞の表面または腫瘍細胞の微細環境内に分泌されたSTn（公知のTACA）の発現が抗腫瘍免疫活性の腫瘍細胞回避を促進し得ることを表している。本願において使用されたように、用語「腫瘍細胞の微細環境」は腫瘍細胞に隣接するかまたは腫瘍細胞を囲んだ任意の領域を称する。このような領域は、非制限的に腫瘍細胞の間、腫瘍と非腫瘍細胞の間、細胞外基質の周辺体液及び周辺の構成成分を含む。

10

【0378】

STnを含むシアリル化されたムチンはOgataなどによって腫瘍細胞のNK細胞の標的化を減少させることが立証された（Ogata、S. など、1992. Canc. Res. 52: 4741-6、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。このような研究は羊、牛及び豚顎下腺ムチン（それぞれおOSM、BSM及びPSM）の存在が細胞傷害のほぼ100%の抑制を誘発することを発見した（Ogataなどの表2を参照）。Jandusなどによる追加の研究は一部の腫瘍細胞がNK細胞のシグレック（siglec）受容体と相互作用するシアログリカンリガンドの発現によってNK破壊を回避してNK抑制を誘導する一部の腫瘍細胞を立証した（Jandus、C. など、2014、JCI. pii: 65899、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。

20

【0379】

Todaなどによる研究は、STnがこのB細胞上のCD22受容体に結合し、減少したシグナル伝達及び減少したB細胞の活性化を引き起こすことを立証した（Toda、M. など、2008. Biochem Biophys Res Commun. 372 (1): 45-50、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。樹状細胞（DC）はT細胞の活性を調節することで後天的な免疫活性に影響を及ぼし得る。Carrascalなどによる研究は膀胱癌細胞によるSTn発現はDCで耐性を誘導してT細胞で抗腫瘍細胞の免疫活性を誘導するこれらの能力を減少させることを発見した（Carrascal、MAなど、2014. Mol Oncol. pii: S1574-7891 (14) 00047-7、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。このような研究はSTn陽性膀胱癌細胞と接触するDCがCD80、CD86、IL-12及びTNF- α の低い発現を有する免疫寛容発現プロファイルを表すことを明らかにした。また、DCはT細胞がIFN γ の低い発現及びFoxP3の高い発現を有するように調節性T細胞を調節することが明らかになった。van Vlietなどによる他の研究は大食細胞ガラクトース類型レクチン（MGL）のDC表面発現は腫瘍組織に対するこのような細胞の標的化を誘導することを表す（van Vliet、S.J. , 2007. Amsterdam: Vrije Universiteit. p1-232及びvan Vliet、S.J. など、2008. J Immunol. 181 (5): 3148-55、Nollau、P. など、2013. J Histochem Cytochem. 61 (3): 199-205、これらのそれぞれの内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。MGL相互作用によって組織に到着するDCは3つの方式のうち1つでTヘルパー（TH）細胞に影響を及ぼし得る。DCはT細胞耐性、T細胞免疫活性またはエフェクターT細胞の下向き調節を誘導する。MGLはAcSTn及びGcSTnの両方に結合することが明らかになり、この親和性について深みのある分析が行われた（Mortezai、N. など、2013. Glycobiology. 23 (7): 844-52、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。興味深いことに、腫瘍におけるMUC1発現は免疫除去から腫瘍細胞を保護してT細胞寛容を引き起こすことが明らかになった。

30

40

【0380】

一部の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体（非制限的に、抗STn抗体を含む）は1つ以上のTACAを発現する1つ以上の腫瘍細胞を含む対象の治療に使用され

50

る。一部の場合、本発明のグリカン相互作用抗体（非制限的に、抗S T n抗体を含む）はS T nを発現する腫瘍細胞に対して抗腫瘍細胞の免疫活性を増加させるのに使用される。このような抗体は免疫耐性腫瘍細胞に対する後天的免疫反応及び／または先天的免疫反応を増加させる。一部のグリカン相互作用抗体はN K抗腫瘍細胞活性を増加させるのに使用させる。このようなグリカン相互作用抗体は、一部の場合、N K細胞上で発現されたグリカン受容体と癌細胞または周辺組織上のS T nグリカン間の相互作用を遮断する。

【0381】

一部の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体（非制限的に、抗S T n抗体を含む）はB細胞の抗腫瘍細胞活性を増加させるのに使用される。このような抗体はB細胞上のC D 2 2受容体と癌細胞または周辺組織上のS T nグリカンの間の相互作用を減少させる。S j o b e r gなどによる研究は糖タンパク質上の $\alpha 2, 6$ 連結されたシアル酸の9 - O - アセチル化がまたB細胞のC D 2 2受容体とこのような糖タンパク質間の相互作用を減少させることを立証した（S j o b e r g, E. R. など1994, J C B, 126（2）：549 - 562）。S h iなどによるまた他の研究はマウス赤白血病細胞上のより高い水準の9 - O - アセチル化されたシアル酸残基はこのような細胞を補体媒介細胞溶解に対してより敏感にすることを明らかにした（S h i, W - X. など、1996, J o f B i o l C h e m, 271（49）：31526 - 32、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。一部の具現例において、本発明の抗S T n抗体は非9 - O - アセチル化されたS T nに選択的に結合して全体的なS T n結合を減少させられるが、腫瘍細胞の成長及び／または増殖を減少させる（例えば、増加したB細胞の抗腫瘍活性及び増加した補体媒介腫瘍細胞の破壊を介して）。一部の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体（非制限的に、抗S T n抗体を含む）はD C抗腫瘍活性を増加させるのに使用される。このような抗体は腫瘍細胞に対するD C寛容を減少させるのに使用される。減少されたD C寛容はC D 8 0、C D 8 6、I L - 1 2及び／またはT N F - α のD C発現を増加させることを含む。一部の場合、D C抗腫瘍細胞活性はT細胞の抗腫瘍細胞活性の促進を含む。このような抗体はD C M G Lと癌細胞または癌細胞周辺で発現されたグリカン間の結合を防止できる。

【0382】

I b r a h i mなどの研究は、内分泌治療により高い水準の抗S T n抗体は転移性乳癌を有する女性において全体生存率と進行時間（T T P）を増加させることを示唆する（I b r a h i m, N. K. など、2013, 4（7）：577 - 584、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。このような研究において、抗S T n抗体水準はキーホールリンペットヘモシアニン（keyhole - limpet Hemocyanin、K L H）に連結されたS T nで予防接種してから増加した。一部の具現例において、本発明の抗S T n抗体は内分泌治療剤（例えば、タモキシフェン及び／またはアロマターゼ阻害薬）と併用して使用される。

【0383】

[治療標的としての癌幹細胞]

癌幹細胞またはC S C（腫瘍開始細胞とも称される）は1次腫瘍及び転移性腫瘍の開始、成長、拡散、及び再発を誘導する異種腫瘍集団内の細胞の下位集団であり（K a r s t e n及びG o l e t z, S p r i n g e r P l u s, 2013, 2, 301）、腫瘍の類型によって総人口の多様な比率で発生し得る。C S Cは自己再生能力及び非C S Cの分化された子孫を引き起こす能力によって末端分化細胞から区別される（G u p t aなど、N a t u r e M e d i c i n e, 2009, 15, 1010 - 1012）。このような特性は正常の幹細胞と類似している。正常の幹細胞とC S Cの間のこのような区分は治療に重要な影響を有している。

【0384】

増加した数の細胞表面バイオマーカーは非C S C対応物からC S Cの分化を表すことが確認された（M e d e m aなど、N a t u r e c e l l b i o l o g y, 2013, 15, 338 - 344；Z o l l e r, C a n c e r, 2011, 11, 254 - 267

10

20

30

40

50

）。これらのうち多数はマウス腫瘍及びヒト細胞株の研究から由来したが、一部は1次ヒト腫瘍試料を使用して検証された。これらのうち1つである、多様な腫瘍類型の構成成分であって広く知られている膜貫通 (membrane-spanning) CD44糖タンパク質またはヒアルロン酸受容体は最近ヒトの癌で本物の (bona fide) CSCマーカーとして受け止められていることが明らかになり、実際に最も頻繁に観察されている (Loboなど、2007、23、675-699)。

【0385】

CD44は全長CD44遺伝子の20番エクソン及び19番イントロンの間で発生する選択的なスプライシング事象によって複数の変異体アイソフォームとして存在する (Williamsなど、Experimental biology and Medicine、2013、238、324-338)。増加する実験的証拠は、CSCの先天性転移及び薬物耐性の表現型に寄与し (Negiなど、Journal of drug targeting、2012、20、561-573)、部分的には細胞内シグナル伝達経路の調節に寄与する (Williamsなど、Experimental biology and Medicine、2013、238、324-338) CD44及びこの変異体の役割を裏付けていることを表している。また、CD44細胞の高い水準を表すいくつかの他の癌類型とともに、3重陰性の乳癌患者は予後不良及びより高い死亡率を有すると知られている (Negiなど、Journal of drug targeting、2012、20、561-573)。このような観察は成熟した癌細胞以外にCD44を標的化することがCSCの抑制または除去を介した癌治療の手段を提供するという概念を裏付けている。実際に、CD44を標的化する数多くのアプローチが多様な程度の成功で実験的に試みられている。これは接合及び非接合抗体、ナノ運搬体薬物システム及びヒアルロン酸接合された薬物の使用を含む広範囲の技術を含む (Negiなど、Journal of drug targeting、2012、20、561-573)。しかし、いくつかの場合に、生体内研究で毒性効果が観察されており、このような意外な副作用な、標的化されたCSC及び成熟した腫瘍細胞の表面上でこの存在以外に、大半の脊椎動物細胞の膜上にCD44及び変異体が広く広がることに起因する (Naorなど、Seminars in cancer biology、2008、18、260-267)。正常なヒト幹細胞を構成する (Williamsなど、Experimental biology and Medicine、2013、238、324-338) CD44タンパク質の標的化はまた正常な幹細胞機能を害する恐れがある (Leth-Larsenなど、Molecular Medicine、2012、18、1109-1121)。多数の研究は成熟した腫瘍細胞のみならず、CSCでCD44タンパク質を標的化することが好ましいと表しているが、このようなアプローチの本質的な問題は正常な幹細胞のみならず、余分の正常組織を回避する抑止剤を考案することが現在の課題として残っている。

【0386】

CSC生物学に対する影響を有するまた他の公知の腫瘍抗原は上皮ムチンMUC1であり、これは大半の腺癌で高い水準で異なって発現されるが、正常な上皮細胞で低い水準でまたはまったく発現されない膜に結合された糖タンパク質である。MUC1は乳癌 (Engelmannなど、Cancer research、2008、68、2419-2426)、及び膵臓癌を含む多様な新生物に対するCSCバイオマーカーとして最近確認されており、この発現は高い転移及び予後不良と関係がある。CSCの構成成分として、MUC1は細胞付着、増殖、生存、及びシグナル伝達で機能することが明らかになり (Engelmannなど、Cancer Research、2008、68、2419-2426)、またCD44と一緒に発現される (Leth-Larsenなど、Molecular medicine、2012、18、1109-1121)。癌でMUC1を標的するための免疫療法アプローチはワクチンのみならず、他のアプローチを使用して推進されているが、主に成熟した癌細胞治療の脈絡から推進されている (Julienなど、Biomolecules、2012、2、435-466; Acresなど、Ex

10

20

30

40

50

p e r t r e v i e w o f v a c c i n e s、2005、4、493 - 502）。
【0387】

癌幹細胞は転移部位で発生する上皮間葉転換（EMT）（G u p t a など、N a t u r e m e d i c i n e、2009、15、1010 - 1012）及び／または逆に間葉上皮転換（MET）を介して生成されることが仮定されてきた（L e t h - L a r s e n など、M o l e c u l a r m e d i c i n e、2012、18、1109 - 1121）（非CSCがCSCを起こす場合CSC塑性とも称される）。このような発見は腫瘍集団でCSCと非CSCの両方を取り除く必要性をさらに強調する。

【0388】

豊富なCSC集団に対する最近の研究は、このような細胞が大量の腫瘍とは違って相対的に停止状態であり、化学療法及び放射線を含む多様な種類の現在に治療法に優先的に耐性があることを明らかにした（L e t h - L a r s e n など、M o l e c u l a r m e d i c i n e、2012、18、1109 - 1121）。従って、現在の治療戦略は腫瘍の非CSC構成成分を標的にし、ほとんど影響を受けないCSCは適切な端緒の後に再出現して初期の部位で再発性1次腫瘍を再形成するか、または遠い部位に拡散させ、コロニー化して転移性疾患を形成し、これは癌死亡率の主な原因である。

【0389】

癌幹細胞の特性に対する現在の理解は腫瘍に存在する多数の細胞を標的にする必要性を強調し、現在の実行のように、完治に潜在的な影響を及ぼすためにCSC区画を強調する。

【0390】

前述のように、バイオマーカーに係る腫瘍（CSCを含む）に基づいて開発された戦略は、ほとんどの癌のバイオマーカーが正常な幹細胞を含む正常な細胞でも存在する課題に直面している。CSCを取り除くためのタンパク質バイオマーカーを標的にする治療法はまた正常な幹細胞を標的化し、正常な細胞の除去を引き起こす。

【0391】

〔CSCの腫瘍特異的なグリカン〕

トムセンヌーボー（Tn）抗原（G a l N A c - O - S e r / T h r）の出願を含む異常な形態の糖化は多数のヒト癌で記述されており、特定の腫瘍標的化に適切な完全に新規の部類の腫瘍関連炭水化物抗原はグリカンであることが確認された（R a b u など、F u t u r e o n c o l o g y、2012、8、943 - 960）。シアリル誘導体のTn（STn）形成は $\alpha 2, 6$ 連結のシアリ酸をTn抗原に付加するシアリル転移酵素のST6GalNAc-Iによって媒介される。STnのシアリル化は追加の糖を付加することを防止して追加のグリカン拡張を切断する（S c h u l t z など、C a n c e r m e t a s t a s i s r e v i e w s、2012、31、501 - 518）。

【0392】

ヒト成人正常組織におけるSTnの存在は珍しいが、他のものの中で卵巣癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌及び肺癌を含む多様なヒト癌で発生する（F e r r e i r a など、M o l e c u l a r o n c o l o g y、2013、7、719 - 731と、K i n n e y など、C a n c e r、1997、80、2240 - 2249）。また、腫瘍におけるSTnの存在は転移性疾患、予後不良及び全体的な生存減少と関連がある（F e r r e i r a など、M o l e c u l a r o n c o l o g y、2013、7、719 - 731と、K i n n e y など、C a n c e r、1997、80、2240 - 2249）。従って、STnは癌検出及び治療のための非常に魅力的な標的とみなされる。シアリ酸の2つの別個の形態 Neu5Ac及びNeu5Gc がSTnの末端位置に位置している。Neu5Acシアリル化された形態はヒトがCMP-Neu5Acヒドロキシラーゼ（CMAH）遺伝子の不活性化に起因してNeu5Gcを合成できないためにヒトに優勢である。しかし、Neu5Gcが豊富な食品の摂取はヒト細胞、特に癌腫で外来Neu5Gcの混入を引き起こす。従来の研究は固形腫瘍がシアリ酸のNeu5Gc形態を摂取して発現することを明らかにした（I n o u e など、G l y c o b i o l o g y、2010、20、75

10

20

30

40

50

2 - 762と、Malykhなど、Biochimie、2001、83、623 - 634と、Padler-Karavaniなど、Cancer research、2011、71、3352 - 3363）。潜在的な癌標的であるSTnのグリコ／アイソフォームの両方に結合するmAbはNeu5Ac-STn (AcSTn) 及びNeu5Gc-STn (GcSTn) を標的する（すなわち、pan-STn抗体と命名される）。

【0393】

STn蓄積は固形腫瘍で繰り返して観察される特定の体細胞突然変異、及び活性Tシクターゼの形成に必要な分子シャペロンCosmcをコードする遺伝子の不活性化と関連がある（Juなど、Nature、2005、437、125）。TシクターゼはGalNAc基質に対してST6GalNAc-Iと競争するために突然変異によって不活性化される場合、上昇したSTn合成を引き起こす。追加に、STn蓄積はまたよく観察される増加したST6GalNAc-Iの発現から引き起こされる（Brockhausenなど、Biological chemistry、2001、382、219 - 232と、Ikeharaなど、Glycobiology、1999、9、1213 - 1224）。STnの新規発現は癌腫細胞を調節し、悪性表現型を変化させ、より攻撃的な細胞行動を引き起こし得る（Pinhoなど、Cancer letters、2007、249、157 - 170）。このようにSTnは興味深い癌バイオマーカー及び治療標的であるだけでなく、STn機能の干渉は相当な機能的、抗転移性治療の利点を有する興味深い潜在力を提供する。

【0394】

細胞糖タンパク質の糖化が癌で変更されることが広く知られているが、異常な糖化は問題の糖タンパク質及びグリカンの両方に対して選択的に表れる。実は、ヒト腫瘍CSCでのみCD44及びMUC1がSTn抗原の主な担体であり（Cazetなど、Breast Cancer research: BCR、2010、12、204と、Julienなど、Glycobiology、2006、16、54 - 64）、成熟な腫瘍細胞のみならず、CSCを標的化するための選択的なアプローチを直ちに提案する。一方で、MUC1は障壁機能を果たす一部の上皮細胞の正常な表面構成成分である。腫瘍関連MUC1は成熟な癌細胞で観察されることと同一の方式でCSC上で低糖化（hypoglycosylation）及び増加したシアリル化を特徴とし、STnはCSC及び成熟な腫瘍細胞の両方に対する特異的なマーカーとして現れる（Curryなど、Journal of surgical oncology、2013、107、713 - 722）。MUC1の異常なオリゴサッカライドプロファイルは新規マーカー（neomarker）、例えばシアリルLe^a（CA19-9試験で用いられる）、シアリルLe^x、及びシアリルTn（TAG-72）の発現及び潜在的なエпитープ、例えば癌（例えばCSC）におけるTnの発現を引き起こす。また、低糖化によって、ムチンのペプチドコアが露出されてコア内のエпитープ（正常な組織由来のMUC1内で接近不可能）が潜在的な抗原として作用する。

【0395】

よって、STnを標的にする臨床的なアプローチは、今まで単なるSTnワクチンのみで行われている。最も進んだ臨床候補はキーホールリンペットヘモシアニンに結合されたSTnからなるワクチンのテラトープ（Theratope）である。生体内マウスの研究においてテラトープの免疫化は注入されたSTnを発現する乳房癌腫細胞の成長遅延を仲裁すると明らかになった強力な抗体反応を誘導した（Julienなど、British journal of cancer、2009、100、1746 - 1751）。しかし、テラトープは転移性乳癌の3相臨床試験で1次評価項目を満たすことができなかった。テラトープ試験が1次評価項目から消えた理由に対する先導的な仮説は患者数が登録前にSTn発現に対して評価されていないということである。乳癌におけるSTn発現は研究と検出方法によって患者の間で25%～80%で非常に異質的であるために、STn発現を反応と関連させる能力が不足すればテラトープの任意の利点を隠し得る。さらに重要なことは、ホルモン療法を受ける患者の一部はテラトープで治療したときにホルモン

療法単独に比べて全般的な平均生存期間が7.5か月伸びて（Ibrahimなど、Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology、2004、22、2547と、Milesなど、The oncologist、2011、16、1092-1100）、特定の患者集団でSTnを治療する治療的な潜在力を立証した。また、免疫反応はよくワクチン化された患者の間はかなり多様であるために、ワクチンのアプローチは抗体価を統制するかまたは調節する能力がないために患者の間で広範囲に治療用抗体が露出される。それにもかかわらず、テラトープは最小限の毒性で耐薬性に優れて癌治療のためのSTn標的の安定性を示す。

【0396】

10

癌細胞におけるSTn発現の分子的基礎に対する理解の増加は任意の細胞表面タンパク質上でSTnを発現する細胞が多数の（全部ではない場合）他のO-糖化された細胞表面タンパク質上でSTnを発現することを示唆し、広範囲に分散された優秀な癌関連治療の標的になる。従って、STn陽性癌細胞集団はCSCに対して豊富である。また、最近のデータはSTn発現を中断すれば転移性行動が相当に減少して癌細胞の攻撃性が減少することを示す（Gillなど、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2013、110、E3152-3161）。

【0397】

〔癌治療としてCSCを標的化する抗STn抗体〕

20

いくつかの抗STn抗体が当該記述分野において記述されてきたが、一部はSTn抗原またはシアリル化されたアイソフォームに対して低い特異性を表す。例えば、商業的なB72.3抗STn抗体はSTnのみならず、Tn抗原にも結合することで現れた（Bapat、S. A. (2010) Human ovarian cancer stem cells. Reproduction 140、33-41）。抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び／または補体依存性細胞傷害（CDC）を誘導するように操作されるか、または細胞傷害搭載物〔例えば、抗体薬物接合体（ADC）〕と接合された、STnを標的化するモノクローナル抗体（mAb）の利用可能性はSTnを発現する腫瘍を有する癌患者に相当な治療利益の潜在力を提供する。また、このような抗体はまた治療に反応する可能性が最も高い患者を事前選別するための同伴診断の開発を可能にする。

30

【0398】

STnはしばしば1つ以上のCSC表面抗原に存在し、これと共にCSCに係る幹細胞性及び化学耐性の特性を促す役割を果たす。従って、抗STn抗体は直接結合及び／またはADCCを介してCSCを直接死滅させる潜在力のみならず、広いアレイの細胞表面タンパク質に結合し、CSCの生存、自己再生及び複製に欠かせないこれらの関連機能を阻害する独特な機会を提供するCSC関連癌標的化剤を提供する。

【0399】

本願において議論されているように、CSCでSTnを標的化する理由及び利点としては以下を含む。（1）多数の腫瘍特異的な切断された糖タンパク質が癌でSTnを輸送することと、（2）STnはCD44、MUC1、及びCSC及び成熟な腫瘍細胞の両方で潜在的に他の重要な細胞表面マーカーに優先的に発現される独特なグリカン標的であり、増殖状態とは無関係に、単一治療剤によりこのような腫瘍構成成分の両方を標的化することと、（3）STnはまた卵巣癌及び他の癌のバイオマーカーであるCA-125の構成成分であることと、（4）STnは卵巣CSCマーカーであるCD44の構成成分であることと、である。従って、Tnに連結されたシアリ酸のNeu5Ac及びNeu5Gc形態の両方を含むエピトープを標的化するpan-STnネズミmAbを使用することはCSC、及び共通のエピトープによって非CSC腫瘍細胞に結合してこれを死滅させるかまたはこの機能を損傷させるだろう。

40

【0400】

一部の具現例において、本発明はヒトCSC及び成熟な腫瘍細胞の特異的な除去のため

50

の新規の抗pan STn mAbを提供する。本発明の一態様において、抗STn抗体はCD44、MUC1またはCSC及び非CSC腫瘍集団の両方における他のSTn糖化されたマーカーに対する広範囲な結合可能性を提供しなければならない、特定のグリコペプチドまたは輸送タンパク質でない、検証されたSTnグリカンそのものを標的化するだろう。

【0401】

腫瘍関連STnの標的化に優れた特異性がある場合、本発明は正常の成体幹細胞を含む正常の組織を保存し、それによって優れた治療範囲を保つことができる。

本発明によると、腫瘍区画内に含まれたCSC及び成熟な癌細胞の両方を取り除くことでヒト腫瘍形成(neoplasias)を根絶することを目的とする独特な免疫療法の解決策が本願において提供される。本発明は現在、CSCを標的化することを含む、腫瘍を特異的に標的化する治療法及び方法を提供し、従って、このような潜在的な標的に係る腫瘍特異的な炭水化物部分構造を標的化することで治療範囲を拡張させる。このような除去は癌幹細胞をはじめ、癌組織に固有に存在する腫瘍関連の細胞表面シアリル化されたTn抗原(STn)構造を標的化することで特異的に付与される。

【0402】

[卵巣CSC]

卵巣癌は2013年中においてアメリカ女性に主要な影響を与えた婦人科癌である。22,240名の女性が診断され、14,030名がこのような疾患によって死亡すると推定され、これはアメリカで5番目の主要な女性関連癌死亡及び最も致命的な婦人科悪性腫瘍の主要な原因となっている(Siegelなど、Cancer statistics、2013、CA:a cancer journal for clinicians 63、11-30)。このような高い死亡率は、症状のない発病、後期段階の初期診断、このようなタイプの癌の攻撃性及び治療的標的化可能な遺伝的変化の一般的な不在によるものである可能性がある。現在の標準治療表は腫瘍減量(debulking)後のタキサン及びプラチナに基づいた化学療法である。このような初期治療により約70%の患者が初期の完全な臨床的反応を達成するが、このような患者の大半は不幸にも化学耐性疾患が再発する(Fosterなど、Cancer letters、2013、338、147-157と、McCannなど、PloS one、2011、6、e28077)。一部分において、再発性疾患は他の癌類型と同様に全体腫瘍集団内でCSCの存在に寄与する。実際に卵巣CSCは化学療法及び放射線療法に対して耐性があることが明らかになった。(Burgos-Ojedaなど、Cancer letters、2012、322、1-7)。従って、再び他の形態の癌と同様に、腫瘍集団で成熟細胞とともにCSCを取り除くことは再発性疾患を管理して理想的な治療効果に対する最善の希望を提供する。

【0403】

本発明の一部の具現例において、卵巣CSCは卵巣癌治療に標的化される。CD133が推定の卵巣CSCマーカーのうち最も広く研究されてきたが、上述したように、STnの運搬体(carrier)として知られたCD44が卵巣癌と関連があり、卵巣CSCを確認するためのマーカーセットに含まれると認識されている(Zhangなど、Cancer research、2008、68、4311-4320と、Fosterなど、Cancer letters、2013、338、147-157と、Zoller、Cancer、2011、11、254-267)。また、STnは広く知られている卵巣癌バイオマーカーのCA-125(MUC16)及びMUC1上で発現され、血清でのこのようなSTn関連ムチンの水準は最近になって癌性対卵巣疾患の追加的な差別化要素として用いられている。上昇したSTnの血清水準は卵巣癌患者から約50%で発生し、5年未満の生存率と関連がある(Kobayashiなど、Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology、1991、9、983-987と、Kobayashiなど、Journal of cl

inical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology、1992、10、95 - 101と、Chenなど、Journal of proteome research、2013、12、1408 - 1418）。最後に、Vathipadietalなどのヒト原発性卵巣癌腫CSCと非CSC集団の間の異なる遺伝子発現の研究は、STn生成シアリル転移酵素ST6GalNAc - Iの発現が2つの区画の細胞間で違いがないことが発見された。

【0404】

一部の具現例において、本発明はCSCに係る癌を予防するかまたは治療するためにCSCを標的化する抗体を提供する。このような抗体は、非制限的に国際特許出願第PCT / US 14 / 60079号（この内容はすべて参照により本願に組み込まれる）に記載された任意のものを含み、抗STn抗体を含む。また、抗STn抗体は、3F1及び／またはヒト化された誘導体からのCDRを有する組換え抗体を含み、3F1抗体（SBH Sciences、マサチューセッツ州ネイティック所在）またはこの誘導体を含む。

【0405】

〔癌の併用療法〕

一部の具現例において、本発明の化合物及び組成物は1つ以上の追加的形態の癌治療と併用される。一部の場合、このような追加的形態は化学療法治療を含む。

【0406】

本願において使用されたように、用語「化学療法」は化学物質を用いる治療形態を称する。このような化学物質は本願において「化学療法剤」と称される。癌治療において、化学療法剤は1つ以上の抗癌剤を含む。一部の具現例において、本発明の方法によってまたは本発明の化合物または組成物と併用して用いられる化学療法剤は、非制限的にカペシタビン、ゲムシタビン、アブラキサン（登録商標）（注射可能な懸濁用のパクリタキセルタンパク質の結合粒子）、ドセタキセル、フルオロウラシル（5 - FU）、オキサリプラチン、シスプラチン、カルボプラチン、イリノテカン、トポテカン、パクリタキセル、ロイコボリン、ドキシソルビシン、及びこれらの組み合わせを含む。

【0407】

〔免疫関連標的〕

一部の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体は免疫調節抗体であり得る。本願において使用されたように、免疫調節抗体は1つ以上の免疫機能または経路を向上させるかまたは抑制する抗体である。

【0408】

多数のバクテリアグリカンはシアル酸を含むことで知られている。一部の場合、このようなグリカンはバクテリアにして非制限的にヒトを含む宿主の先天的な免疫系を回避できるようにする。一例において、バクテリアグリカンはH因子認識を介して代案的な補体経路の活性化を抑制する。また他の例において、バクテリアグリカンは抗原性であり得る基底残基を遮蔽する。一部のバクテリアグリカンは特定のシアリル化された部分構造を含む実体に対する免疫反応を弱化させるシアル酸結合Ig様レクチン（Siglec）の抑制活性化を介して細胞のシグナル伝達事象に関与する（Chen、X. など、Advances in the biology and chemistry of sialic acids. ACS Chem Biol. 2010 Feb 19; 5 (2): 163 - 76）。一部の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体はバクテリアグリカンに係る免疫合併症を治療するのに用いられる。

【0409】

本願に記載されたようにNeu5Gcの外来的な特性によって、一部のNeu5Gcグリカンは免疫原性を有するために、このようなグリカンが発現される細胞及び他の実体の免疫関連破壊を引き起こす。このような自己免疫破壊は病原性であり得る。一部の具現例において、グリカン相互作用抗体はNeu5Gcグリカンに係る自己免疫障害を患っている患者の治療に用いられる。

10

20

30

40

50

【0410】

一部の具現例において、本発明の免疫調節抗体はT細胞媒介免疫を促すかまたは抑制するのに用いられる。このような抗体はT細胞、T細胞関連タンパク質及び／またはT細胞と相互作用する1つ以上の他の細胞類型に存在する1つ以上のグリカンと相互作用する。T細胞媒介免疫を向上させる免疫調節抗体は癌細胞のT細胞媒介標的化を促すのに用いられる。

【0411】

一部の腫瘍において腫瘍関連マクロファージ（TAM）による浸潤は、腫瘍細胞の生存を成長を促す免疫抑制を誘導する。これはTAM上に存在する骨髄C型レクチン受容体（CLR）と腫瘍関連ムチン間の相互作用を介して発生する免疫抑制細胞のシグナル伝達に起因すると考えられる（Allavena, P. など, Clin Dev Immunol, 2010; 2010: 547179）。一部の具現例において、本発明の免疫抑制抗体が1つ以上の腫瘍関連ムチンまたTACAに結合するものはTAMで免疫抑制細胞のシグナル伝達を遮断する。

【0412】

[抗ウィルスの適用]

一部の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体はウィルスを標的化する。ウィルス外皮タンパク質及びウィルス外膜（envelope）はしばしば本願においてウィルス表面グリカンと称されるグリカンを含む。このようなグリカンはグリカン相互作用抗体を標的化する。一部の具現例において、ウィルス表面グリカンはシアリルSTnを含む。追加の具現例において、ウィルス表面グリカンはGcSTnを含む。グリカン相互作用抗体によって標的化されるウィルスは、非制限的にHIV、インフルエンザ、ライノウィルス、帯状疱疹、ロタウイルス、ヘルペス（例えば、1型及び2型）、肝炎（例えば、A、B、C、D及びE型）、黄熱及びヒト乳頭腫ウィルスを含む。

【0413】

[他の治療的適用]

一具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体はタンパク質分解事象を変更させるかまたは制御できるように作用する。一部の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体は標的に結合する前に細胞内に内在化される。

【0414】

[獣医学的適用]

本発明のグリカン相互作用抗体は、非ヒト脊椎動物の治療及び処置含む獣医学的な治療領域で有用性を発見するものと予想される。本願において使用されたように、用語「非ヒト脊椎動物」は、野生動物及び家畜の種、例えば伴侶動物及び家畜をはじめ、ホモサピエンスを除いたすべての脊椎動物を含む。非ヒト脊椎動物は哺乳類、例えばアルパカ、バンテン（banteng）、野牛、ラクダ、猫、牛、鹿、犬、ロバ、ガヤル、ヤギ、モルモット、馬、ラマ、ラバ、豚、兎、トナカイ、羊、水牛及びヤクを含む。家畜は食料、労働、繊維及び化学物質のような派生商品のような物質を生産するために農業環境で育った家畜を含む。一般に、家畜は潜在的に農業的な重要性を有するすべての哺乳類、鳥類及び魚類を含む。特に四足の屠畜動物は去勢牛（steer）、若雌牛、牛、子牛、雄牛、畜牛、豚及び羊を含む。

【0415】

[生物学的処理]

本発明の一部の具現例は、遺伝子発現を調節するかまたは生産されたグリカンの水準及び／または類型を変更させる1つ以上のグリカン相互作用抗体（例えば、抗体または融合タンパク質）に細胞を接触させることで宿主で生物学的産物を生産するための方法であり、この際、このような調節または変更は生物学的産物の生産を向上させる。本発明によると、生物工程の方法は本発明の1つ以上のグリカン相互作用抗体を用いることで向上される。これはまた1つ以上のグリカン相互作用抗体を補充、代替または添加することで向上される。

【0416】

〔診断〕

一部の具現例において、本発明の化合物及び組成物は診断として用いられる。一部の場合、本発明の抗体は標的抗原を発現する細胞、組織、器官などを確認、標識または染色するために用いられる。追加の具現例において本発明の抗体は癌性細胞を有するものとして知られるかまたは疑われる組織を含み、組織切片（すなわち、組織学的な組織切片）に存在するSTnを確認するために用いられる。本発明の抗体を用いるこのような方法は、一部の場合に組織切片で癌性細胞または腫瘍を確認するのに用いられる。組織切片は、非制限的に乳房、大腸、膵臓、卵巣、脳、肝臓、腎臓、脾臓、肺、皮膚、胃、内臓、食道または骨を含む任意の組織または器官から由来したものであり得る。

10

【0417】

〔I I I . 薬学組成物〕

本願に記載された薬学組成物は1つ以上の生体利用率、治療範囲及び／または分布容積によって特性化される。

【0418】

〔生体利用率〕

グリカン相互作用抗体は、本願に記載されたような送達／製剤化製剤またはビヒクルとともに組成物として製剤化される場合、本願に記載されたような送達剤が欠乏した組成物に比べて生体利用率が増加することを表す。本願において使用されたように、用語「生体利用率」は哺乳類に投与された、与えられた量のグリカン相互作用抗体の全身的な利用可能性を称する。生体利用率は哺乳類に化合物を投与した後、変更されていない形態の化合物曲線下面積（AUC）または最高血清中または血漿中濃度（ C_{max} ）を測定することで評価される。AUCは横軸（X軸）に沿った時間に対して縦軸（Y軸）に沿った化合物の血清または血漿濃度をプロットした曲線下面積の測定である。一般に、特定化合物のAUCは当業者に公知の方法及びG. S. Banker, Modern Pharmaceuticals, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v. 72, Marcel Dekker, New York, Inc., 1996（本願に参照により組み込まれる）に記載されたような方法を用いて計算される。

20

【0419】

C_{max} 値は哺乳類に化合物を投与した後、哺乳類の血清または血漿で達成される化合物の最大濃度である。特定化合物の C_{max} 値は当業者に公知の方法を用いて測定される。本願において使用されたように、語句「生体利用率を増加させる」または「薬力学を向上させる」は哺乳類においてAUC、 C_{max} または C_{min} として測定されたグリカン相互作用抗体の全身的な利用可能性が、本願に記載されたような送達剤とともに同時に投与された場合、このような同時投与が発生していない場合に比べて大きいことを意味する。一部の具現例において、グリカン相互作用抗体の生体利用率は約2%以上、約5%以上、約10%以上、約15%以上、約20%以上、約25%以上、約30%以上、約35%以上、約40%以上、約45%以上、約50%以上、約55%以上、約60%以上、約65%以上、約70%以上、約75%以上、約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上または約100%まで増加する。

30

40

【0420】

〔治療範囲〕

グリカン相互作用抗体は、本願に記載されたような送達剤とともに組成物として製剤化される場合、本願に記載されたような送達剤が欠乏した、投与されたグリカン相互作用抗体組成物の治療範囲に比べ、投与されたグリカン相互作用抗体組成物の治療範囲の増加を表すことができる。本願において使用されたように、「治療範囲」は治療効果を誘導する可能性が高い血漿濃度の範囲、または作用部位における治療的活性物質水準の範囲を称する。一部の具現例において、グリカン相互作用抗体の治療範囲は本願に記載された送達剤と当時投与される場合、約2%以上、約5%以上、約10%以上、約15%以上、約20

50

%以上、約25%以上、約30%以上、約35%以上、約40%以上、約45%以上、約50%以上、約55%以上、約60%以上、約65%以上、約70%以上、約75%以上、約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、約100%まで増加する。

【0421】

〔分布容積〕

グリカン相互作用抗体は、本願に記載されたような送達剤とともに組成物として製剤化される場合、本願に記載されたような送達剤が欠乏した組成物に比べ向上した、例えば減少した、または標的化された分布容積 ($V_{d \text{ i s t}}$) を表すことができる。分布容積 ($V_{d \text{ i s t}}$) は体内薬物の量を血液または血漿の薬物濃度と関連づける。本願において使用されたように、用語「分布容積」は血液または血漿: $V_{d \text{ i s t}}$ は身体の薬物の量/血液または血漿の薬物濃度と同一であるように同一の濃度で体内に薬物の総量を含有するために要求される流体量 ($f \text{ l u i d v o l u m e}$) を称する。例えば、10mgの投与量及び10mg/Lの血漿濃度に対して、分布容積は1Lになるだろう。分布容積は薬物が血管外組織に存在する程度を反映する。大きい分布容積は化合物が血漿タンパク質結合と比較して組織の構成成分に結合する傾向を反映する。臨床環境において、 $V_{d \text{ i s t}}$ は一定の状態の濃度に到達するための搭載量を決定するのに用いられる。一部の具現例において、グリカン相互作用抗体の分布容積は、本願に記載されたような送達剤とともに同時投与された場合、約2%以上、約5%以上、約10%以上、約15%以上、約20%以上、約25%以上、約30%以上、約35%以上、約40%以上、約45%以上、約50%以上、約55%以上、約60%以上、約65%以上、約70%以上減少する。

【0422】

一部の具現例において、グリカン相互作用抗体は1つ以上の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせられた組成物及び/または複合物を含む。薬学組成物は選択的に1つ以上の追加的な活性物質、例えば治療的及び/または予防的な活性物質を含む。薬学製剤の製剤化及び/または製造で一般的に考慮されることは例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins、2005 (参照により本願に組み込まれる) で確認することができる。

【0423】

一部の具現例において、組成物はヒト、ヒト患者または対象に投与される。本開示の目的において、語句「活性成分」は一般的に、本願に記載されたように送達されるグリカン相互作用抗体を称する。

【0424】

本願に提供された薬学組成物の説明は主にヒトに投与するのに適切な薬学組成物に関するものであるが、当業者はこのような組成物が一般的に任意の他の動物、例えば非ヒト動物、例えば非ヒト哺乳類に投与するのに適切であることを理解するだろう。組成物を多様な動物に投与するのに適切にするためにヒトに投与されるに適切な薬学組成物を改変することがよく知られており、通常の熟練された獣医薬理学者はもし必要であれば単なる通常の実験でこのような改変を考案及び/または遂行することができる。薬学組成物の投与が考慮される対象は、非制限的にヒト及び/または他の霊長類と、商業的に係る哺乳類、例えば牛、豚、馬、羊、猫、犬、マウス及び/またはラットを含む哺乳類と、商業的に係る鳥類、例えば家禽類、鶏、カモ、ガチョウ及び/または七面鳥を含む鳥類と、を含む。

【0425】

本願に記載された薬学組成物の製剤は薬理学分野に広く知られるかまたは以後に開発される任意の方法によって製造される。一般に、このような製造方法は活性成分を賦形剤及び/または1つ以上の他の付属成分と結合させる段階を含み、次に、必要であれば及び/または好ましくは生成物を目的とする単一または多重投与単位に分割、成型及び/または梱包する段階を含む。

【0426】

本発明による薬学組成物は単一単位投与量として及び／または複数の単一単位投与量としての製造、梱包及び／または大量販売される。本願において使用されたように、「単位投与量」は所定量の活性成分を含む薬学組成物の分離された量である。活性成分の量は一般的に対象に投与される活性成分の投与量及び／またはこのような投与量の便利な分率、例えばこのような投与量の $1/2$ または $1/3$ に対応する。

【0427】

本発明による薬学組成物の中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤及び／または任意の追加成分の相対的な量は対象の正体 (i d e n t i t y)、サイズ及び／または状態によって、そして追加に組成物に投与される経路によって異なると考えられる。例えば、組成物は $0.1\% \sim 100\%$ 、例えば、 $0.5 \sim 50\%$ 、 $1 \sim 30\%$ 、 $5 \sim 80\%$ または 80% (w/w) 以上の活性成分を含むだろう。一具現例において、活性成分は癌細胞に対して指示された抗体である。

10

【0428】

[製剤]

本発明のグリカン相互作用抗体は以下の目的のために1つ以上の賦形剤を用いて製剤化される。(1) 安定性を増加させるために、(2) 細胞浸透性を増加させるために、(3) 持続または遅延された放出を許容するために(例えば、グリカン相互作用抗体の製剤から)、及び／または(4) 生体分布を変更させるために(例えば、グリカン相互作用抗体を特定の組織または細胞類型に標的化)。伝統的な賦形剤、例えば任意の及びすべての溶媒、分散媒質、希釈剤または他の液体ビヒクル、分散または懸濁補助剤、界面活性剤、等張化剤、増粘剤または乳化剤、保存剤以外に、本発明の製剤は、非制限的にリポソーム、脂質ナノ粒子、重合体、リポブレックス、コアシェルナノ粒子、ペプチド、タンパク質、グリカン相互作用抗体に形質移入された細胞(例えば、対象への移植のためである)及びこれらの組み合わせを含む。

20

【0429】

[賦形剤]

本願において使用されたように、用語「賦形剤」は使用前の本発明の化合物及び／または組成物と組み合わせられた任意の物質を称する。一部の具現例において、賦形剤は不活性であり、主に本発明の化合物及び／または組成物に対する担体、希釈剤またはビヒクルとして用いられる。薬学組成物の製剤化のための多様な賦形剤及び組成物の製造手法が当業界によく知られている(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006を参照。参照により本願に組み込まれる)。

30

【0430】

任意の通常の賦形剤媒質が、例えば任意の目的としない生物学的効果を生成するかまたは他の方式の有害な方式で薬学組成物の任意の他の成分と相互作用することで物質またはこの誘導体と両立できない場合を除いて、通常の賦形剤媒質の使用が本発明の範囲内で考慮される。

【0431】

本願に記載された薬学組成物の製剤は薬理学分野に広く知られているかまたは以降に開発される任意の方法によって製造される。一般に製造方法は活性物質を賦形剤及び／または1つ以上の他の補助成分と結合させる段階を含む。

40

【0432】

本開示による薬学組成物は単一単位投与量として、及び／または複数の単一単位投与量で製造、梱包及び／または大量販売される。

本発明による薬学組成物の中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤及び／または任意の追加成分の相対的な量は対象の正体、サイズ及び／または状態によって、そして追加に組成物が投与される経路によって異なると考えられる。

【0433】

50

一部の具現例において、薬学的に許容される賦形剤は 95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、または 100%純粋である。一部の具現例において、賦形剤はヒト及び動物用としての使用を承認されている。一部の具現例において、賦形剤は米国食品医薬品局により承認されている。一部の具現例において、賦形剤は薬学等級である。一部の具現例において、賦形剤は米国薬局方（USP）、欧州薬局方（EP）、英国薬局方及び／または国際薬局方の標準を満たしている。

【0434】

薬学組成物の製造に用いられる薬学的に許容された賦形剤は、非制限的に、不活性希釈剤、分散剤及び／または顆粒化剤、界面活性剤及び／または乳化剤、崩解剤、結合剤、保存剤、緩衝剤、潤滑剤、及び／またはオイルを含む。このような賦形剤が薬学組成物に選択的に含まれる。

10

【0435】

例示的な希釈剤は、非制限的に炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウムラクトース、スクロース、セルロース、微結晶セルロース、カオリン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、コーンスターチ、粉糖など、及び／またはこれらの組み合わせを含む。

【0436】

例示的な顆粒化剤及び／または分散剤は、非制限的に、ジャガイモ澱粉、コーンスターチ、タピオカ澱粉、デンプングリコール酸ナトリウム、粘土、アルギン酸、グアーガム、シトラスパルプ、アガー、ベントナイト、セルロース及び木工品、天然海綿、陽イオン交換樹脂、炭酸カルシウム、ケイ酸塩、炭酸ナトリウム、架橋結合されたポリ（ビニルピロリドン）（クロスポビドン）、デンプングリコール酸ナトリウム（デンプングリコール酸ナトリウム）、カルボキシメチルセルロース、架橋結合されたカルボキシメチルセルロースナトリウム（クロスカルメロース）、メチルセルロース、アルファー化デンプン（澱粉 1500）、微晶質澱粉、非水溶性デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム（VEEGUM（登録商標））、ラウリル硫酸ナトリウム、第四アンモニウム化合物など、及び／またはこれらの組み合わせを含む。

20

【0437】

例示的な界面活性剤及び／または乳化剤は、非制限的に、天然乳化剤（例えば、アカシア、アガー、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、コンドラックス、コレステロール、キサントラン、ペクチン、ゼラチン、卵黄、カゼイン、羊毛脂、コレステロール、ワックス、及びレシチン）、コロイド状粘土（例えば、ベントナイト〔ケイ酸アルミニウム〕及びVEEGUM（登録商標）〔ケイ酸アルミニウムマグネシウム〕）、長鎖アミノ酸誘導体、高分子量アルコール（例えば、ステアリルアルコール、セチルアルコール、オレイルアルコール、トリアセチンモノステアレート、エチレングリコールジステアレート、モノステアリン酸グリセリン、及びプロピレングリコールモノステアレート、ポリビニルアルコール）、カルボマー（例えば、カルボキシポリメチレン、ポリアクリル酸、アクリル酸重合体、及びカルボキシビニル重合体）、カラギーナン、セルロース誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、粉末セルロース、ヒドロキシエチルセルロース、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、メチルセルロース）、ソルビタン脂肪酸エステル（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート〔TWEEN（登録商標）20〕、ポリオキシエチレンソルビタン〔TWEENn（登録商標）60〕、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート〔TWEEN（登録商標）80〕、ソルビタンモノパルミテート〔SPAN（登録商標）40〕、モノステアリン酸ソルビタン〔Span（登録商標）60〕、ソルビタントリスステアレート〔Span（登録商標）65〕、モノオレイン酸グリセリル、モノオレイン酸ソルビタン〔SPAN（登録商標）80〕）、ポリオキシエチレンエステル（例えば、ポリオキシエチレンモノステアレート〔MYRJ（登録商標）45〕、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエトキシ化ヒマシ油、ポリオキシエチレンステアレート、及びSOLUTOL（

30

40

50

登録商標))、ショ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル(例えば、CREMOPHOR(登録商標))、ポリオキシエチレンエーテル、(例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル[BRIJ(登録商標)30])、ポリ(ビニルピロリドン)、ジエチレングリコールモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミン、オレイン酸ナトリウム、オレイン酸カリウム、オレイン酸エチル、オレイン酸、ラウリン酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、PLUORINC(登録商標)F 68、POLOXAMER(登録商標)188、セトリモニウムブロマイド、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンザルコニウム、ドキュセートナトリウム、など及び/またはこれらの組み合わせを含む。

【0438】

例示的な結合剤は、非制限的に、澱粉(例えば、コーンスターチ及び澱粉ペースト)と、ゼラチンと、糖(例えば、スクロース、グルコース、デキストロース、デキストリン、糖蜜、ラクトース、ラクチトール、マンニトール)と、天然及び合成ガム(例えば、アカシア、アルギン酸ナトリウム、アイリッシュモス抽出物、パンワールガム、ガティガム、イサポール穀粘液、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、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、微結晶セルロース、セルロースアセテート、ポリ(ビニルピロリドン)、ケイ酸アルミニウムマグネシウム(VEEGUM(登録商標))、及びラーチ・アラボガラクタン)と、アルジネートと、ポリエチレンオキシドと、ポリエチレングリコールと、無機カルシウム塩と、ケイ酸と、ポリメタクリレートと、ワックスと、水と、アルコールなどと、これらの組み合わせを含む。

【0439】

例示的な保存剤は、非制限的に、酸化防止剤、キレート剤、抗微生物保存剤、抗真菌保存剤、アルコール保存剤、酸性保存剤及び/またはその他の保存剤を含む。例示的な酸化防止剤は、非制限的にアルファトコフェロール、アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール、ジブチルヒドロキシトルエン、モノチオグリセロール、ピロ亜硫酸カリウム、プロピオン酸、プロピルガラート、アスコルビン酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、及び/または亜硫酸ナトリウムを含む。例示的なキレート剤はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、クエン酸一水和物、エデト酸二ナトリウム、エデト酸二カリウム、エデト酸、フマル酸、リンゴ酸、リン酸、エデト酸ナトリウム、酒石酸、及び/またはエデト酸三ナトリウムを含む。例示的な抗微生物保存剤は、非制限的に塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、ベンジルアルコール、プロノポール、セトリミド、塩化セチルピリジニウム、クロルヘキシジン、クロロブタノール、クロロクレゾール、クロロキシレノール、クレゾール、エチルアルコール、グリセリン、ヘキセチジン、イミド尿素、フェノール、フェノキシエタノール、フェニルエチルアルコール、硝酸フェニル水銀、プロピレングリコール、及び/またはチメロサルを含む。例示的な抗真菌保存剤は、非制限的にブチルパラベン、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、安息香酸カリウム、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、及び/またはソルビン酸を含む。例示的なアルコール保存剤は、非制限的に、エタノール、ポリエチレングリコール、フェノール、フェノール化合物、ビスフェノール、クロロブタノール、ヒドロキシベンゾアート、及び/またはフェニルエチルアルコールを含む。例示的な酸性保存剤は、非制限的にビタミンA、ビタミンC、ビタミンE、ベータカロチン、クエン酸、酢酸、デヒドロ酢酸、アスコルビン酸、ソルビン酸、及び/またはフィチン酸を含む。その他の保存剤は、非制限的に、トコフェロール、トコフェリル酢酸、デテルオキシムメシレート、セトリミド、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)、エチレンジアミン、ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム(SLES)、亜硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸カリウム、ピロ亜硫酸カリウム、GLYDANT PLUS(登録商標)、PHENONIP(登録商標)、メチルパラベン、GERMALL(登録商標)115、GERMABEN

10

20

30

40

50

(登録商標) I I、NEOLONE (商標)、KATHON (商標)、及び／またはE U X Y L (登録商標)を含む。

【0440】

例示的な緩衝剤は、非制限的に、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、塩化アンモニウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、グルセプチン酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、D - グルコン酸、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、プロピオン酸、レブリン酸カルシウム、ペント酸、第二リン酸カルシウム、リン酸、第三リン酸カルシウム、水酸化カルシウムリン酸、酢酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、カリウム混合物、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸カリウム混合物、酢酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸ナトリウム混合物、トロメタミン、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、アルギン酸、パイロジェンフリー (pyrogen-free) 水、等張食塩水、リンゲル液、エチルアルコール、など、及び／またはこれらの組み合わせを含む。

【0441】

例示的な潤滑剤は、非制限的に、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、シリカ、タルク、モルト、ベヘン酸グリセリル、硬化植物油、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ラウリル硫酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、など及びこれらの組み合わせを含む。

【0442】

例示的なオイルは、非制限的にアーモンド、アプリコットカーネル、アボカド、ババス、ベルガモット、ブラックカラント種子、ポリジ、ケイド、カモミール、カノーラ、キャラウェイ、カルナバ、カスター、シナモン、ココアバター、ココナッツ、コッドリバー、コーヒー、コーン、綿実、エミュー、ユーカリ、マツヨイグサ、魚類、亜麻の実、ゲラニオール、ヒョウタン、ブドウ種子、ヘーゼルナッツ、ヒソップ、ミリスチン酸イソプロピル、ホホバ、ククイノキ、ラバンジン、ラベンダー、レモン、リツェアクベバ、マカダミアナッツ、マロウ、マンゴー種子、メドウフォーム種子、ミンク、ナツメグ、オリーブ、オレンジ、オレンジラフィー、パーム、パームカーネル、ピーチカーネル、ピーナッツ、ポピーシード、カボチャ種子、ナタネ、米ぬか、ローズマリー、サフラワー、ビャクダン、サザンカ、セイボリー、シーバックソーン、ゴマ、シアバター、シリコーン、大豆、ヒマワリ、ティーツリー、アザミ、ツバキ、ベチバー、くるみ及び麦芽油を含む。例示的なオイルは、非制限的に、ステアリン酸ブチル、カプリル酸トリグリセリド、トリカプリン酸グリセリル、シクロメチコン、ジエチルセバケート、ジメチコン360、ミリスチン酸イソプロピル、鉱油、オクチルドデカノール、オレイルアルコール、シリコーン油、及び／またはこれらの組み合わせを含む。

【0443】

賦形剤、例えばココアバター及び坐剤ワックス、着色剤、コーティング剤、甘味剤、風味剤、及び／または香味剤が製造者の判断によって組成物の中に存在し得る。

[ビヒクル]

[リポソーム、リポプレックス、脂質ナノ粒子]

本発明のグリカン相互作用抗体は1つ以上のリポソーム、リポプレックスまたは脂質ナノ粒子を用いて製剤化される。一具現例において、グリカン相互作用抗体を含む薬学組成物は追加にリポソームを含む。リポソームは主に1つ以上の脂質二重層を含み、栄養素及び薬学製剤の投与のための送達ビヒクルとして用いられる人工的に製造されたビヒクルである。リポソームはサイズが異なり、例えば、非制限的に直径が数百ナノメートルであってもよく、狭い水性区画によって分離された一連の同心二重層を含有できる多重膜小胞体 (MLV)、直径が50 nm未満であり得る小型単層膜小胞体 (SUV)、及び直径が50~500 nmであり得る大型単層膜小胞体 (LUV) であってもよい。リポソームの考案は健康でない組織に対するリポソームの付着を改善するかまたは非制限的に細胞内取込

み作用 (e n d o c y t o s i s) のような事象を活性化させるために、非制限的にオプソニンまたはリガンドを含む。リポソームは薬学製剤の送達を改善するために低いかまたは高い pH を含有する。

【0444】

リポソームの製剤は、物理化学的な特性、例えば非制限的に、捕獲された薬学製剤及びリポソーム成分、脂質小胞が分散された媒質の性格、捕獲された物質の有効濃度及びこの潜在的な毒性、小胞の塗布及び／または送達する間に係る任意の付加的な抗体、意図された塗布のための小胞の最適化サイズ、多重分散度及び貯蔵寿命、及び安全でかつ効率的なリポソーム生産の大量生産のバッチ間再現性及び可能性によって変わる。

【0445】

一具現例において、このような製剤は生体内で受動的にまたは能動的に異なる細胞類型を指示するように構成するかまたは組成物が改変される。

製剤はまたは非制限的に葉酸、トランスフェリン、N - アセチルガラクトサミン (G a l l N A c) 及び抗体標的化されたアプローチで例示化されたようにこれらの表面上に異なるリガンドの発現を介して選択的に標的化される。

【0446】

リポソーム、リポプレックスまたは脂質ナノ粒子はこのような製剤がグリカン相互作用抗体を用いた細胞の形質移入を増加させるようにグリカン相互作用抗体機能の効能を向上させるように用いられる。リポソーム、リポプレックス、または脂質ナノ粒子はまたグリカン相互作用抗体の安定性を増加させるのに用いられる。

【0447】

抗体輸送物に対して特異的に製剤化されたリポソームが当業界に公知の技術、例えば、Eppstein など (Eppstein, D. A. など、Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Jun; 82 (11): 3688 - 92) と、Hwang など (Hwang, K. J. など、Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Jul; 77 (7): 4030 - 4) と、米国特許第 US 4, 485, 045 号及び米国特許第 US 4, 544, 545 号に記載された方法によって製造される。持続循環を有するリポソームの生産がまた米国特許第 US 5, 013, 556 号に記載されている。

【0448】

本発明のグリカン相互作用抗体を含むリポソームは脂質、例えばホスファチジルコリン、コレステロール及びポリエチレングリコール誘導体化されたホスファチジルエタノールアミンを用いる逆相蒸発を使用して生成される。定まった孔隙径を有するフィルターは所望の直径のリポソームを押し出すのに用いられる。また他の具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体は Martin など (Martin, F. J. など、Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. J Biol Chem. 1982 Jan 10; 257 (1): 286 - 8) に記載されたようにジスルフィド交換反応によってリポソームの外部表面に接合される。

【0449】

[重合体及びナノ粒子]

本発明のグリカン相互作用抗体は天然及び／または合成重合体を用いて製剤化される。送達に用いられる重合体の非制限的な例は、非制限的に DMR I / DOP E、ポロキサマー、キトサン、シクロデキストリン、及びポリ乳酸 - グリコール酸共重合体 (PLGA)

10

20

30

40

50

を含む。これらは生分解性であり得る。

【0450】

重合体製剤はグリカン相互作用抗体の持続されたまたは遅延された放出を可能にする（例えば、筋肉内または皮下注射後）。グリカン相互作用抗体の変更された放出プロファイルは、例えば延長された時間にわたってグリカン相互作用抗体の放出を引き起こす。重合体製剤は、またグリカン相互作用抗体の安定性を増加させるのに用いられる。

【0451】

重合体製剤はまた、例えば非制限的に葉酸、トランスフェリン、N - アセチルガラクトサミン (GalNAc) で例示化されたように異なるリガンド発現を介して選択的に標的化される (Benoit など、Biomacromolecules, 2011 12: 2708 - 2714 と、Rozema など、Proc Natl Acad Sci U S A, 2007 104: 12982 - 12887 と、Davis、Mol Pharm, 2009 6: 659 - 668 と、Davis、Nature 2010 464: 1067 - 1070、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる)。

【0452】

本発明のグリカン相互作用抗体は重合体、脂質及び／または他の生分解性剤、例えば非制限的にリン酸カルシウムの組み合わせを用いてナノ粒子として製剤化される。構成成分はコアシェル、ハイブリット及び／または層別構造として結合され、ナノ粒子の微細調整を可能にしてグリカン相互作用抗体の送達を向上させる。グリカン相互作用抗体の場合、生理学的 pH でナノメートルサイズの小胞を形成するために自己組織化された pH 敏感性ジブロック共重合体の、ポリマーソーム (polymer some) でも知られているポリ (2 - (メタクリロイルオキシ) エチルホスホリルコリン) - ブロック - (2 - (ジイソプロピルアミノ) エチルメタクリル酸エチル)、(PMPC - PDPA) が用いられる。このようなポリマーソームは生きている細胞内で比較的の高い抗体搭載物の送達に成功することが明らかになった (Massignani、など、Cellular delivery of antibodies: effective targeted subcellular imaging and new therapeutic tool. Nature Proceedings、May、2010)。

【0453】

一具現例において、PEG 電荷転換重合体 (Pitella など、Biomaterials, 2011 32: 3106 - 3114) が本発明のグリカン相互作用抗体の送達のためのナノ粒子を形成するために用いられる。PEG 電荷転換重合体は PEG ポリアニオンブロック共重合体を酸性 pH でポリカチオンに切断することで向上させ、従ってエンドソーム脱出 (endosomal escape) を向上させる。

【0454】

コアシェルナノ粒子の使用はカチオン架橋結合されたナノゲルコア及び多様なシェルを合成するための高性能アプローチに追加に焦点を当てている (Siegwart など、Proc Natl Acad Sci U S A, 2011 108: 12996 - 13001)。重合体性ナノ粒子の複合化、送達、及び内在化はナノ粒子のコア及びシェルの構成成分の両方で化学的組成物を変更させることで精密に制御される。

【0455】

一具現例において、ポリ (エチレン - 酢酸ビニル共重合樹脂) マトリックスを用いて本発明のグリカン相互作用抗体が送達される。このようなマトリックスが Nature Biotechnology 10、1446 - 1449 (1992) に記載されている。

【0456】

[抗体製剤]

本発明のグリカン相互作用抗体は静脈内投与または血管外投与のために製剤化される (Daugherty、など、Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics, Adv Drug Deliv Rev, 2006 Aug 7; 58 (5 - 6)

：686-706、米国公開特許第2011/0135570号、これらの内容はすべて参照により本願に組み込まれる）。血管外投与の経路は、非制限的に皮下投与、腹腔内投与、脳内投与、眼内投与、病変内投与、局所投与及び筋肉内投与を含む。

【0457】

抗体構造は治療剤としてこの効果を向上させるために改変される。向上は、非制限的に向上された熱力学的安定性、減少されたFc受容体の結合特性及び向上された折り畳み効率を含む。改変は、非制限的にアミノ酸置換、糖化、パルミトイル化及びタンパク質複合を含む。

【0458】

グリカン相互作用抗体は酸化防止剤とともに製剤化されて抗体の酸化を減少される。グリカン相互作用抗体はまた添加材とともに製剤化されてタンパク質の凝集を減少させる。このような添加材は、非制限的にアルブミン、アミノ酸、糖、ウレア、塩化グアニジニウム、ポリアルコール、重合体（例えば、ポリエチレングリコール及びデキストラン）、界面活性剤（非制限的にポリソルベート20及びポリソルベート80を含む）またはさらには他の抗体まで含んでもよい。

【0459】

本発明のグリカン相互作用抗体は抗体構造及び機能に対する水の影響を減少させるように製剤化される。このような製剤における抗体製剤は凍結乾燥される。凍結乾燥された製剤は、抗体構造を保護して安定化させるために炭水化物またはポリオール化合物を含む。このような化合物は、非制限的にスクロース、トレハロース及びマンニトールを含む。

【0460】

本発明のグリカン相互作用抗体は重合体とともに製剤化される。一具現例において、重合体製剤は疎水性重合体含有する。このような重合体は水中油固形カプセル化方法を介してポリ（ラクチド-コ-グリコリド）とともに製剤化された微小球体（microsphere）であり得る。エチレン-酢酸ビニル共重合体を含む微小球体がまた抗体送達のために考慮され、送達部位で抗体放出の時間経過を延長するのに用いられる。また他の具現例において、重合体は水性ゲルであり得る。このようなゲルは、例えばカルボキシメチルセルロースをまた含む。水性ゲルはまたヒアルロン酸ヒドロゲルを含む。抗体は、非制限的に中枢神経系組織を含む、組織で持続された送達を可能にするヒドラゾン結合（hydrazine linkage）を介してこのようなゲルに共有結合的に連結される。

【0461】

[ペプチド及びタンパク質製剤]

本発明のグリカン相互作用抗体はペプチド及び／またはタンパク質とともに製剤化される。一具現例において、ペプチド、例えば非制限的に細胞透過性ペプチド及びタンパク質及び細胞内送達を可能にするペプチドが薬学製剤の送達のために用いられる。本発明の薬学製剤とともに用いられる細胞透過性ペプチドの非制限的な例は細胞内空間への送達を容易にするポリカチオンに付着された細胞透過性ペプチドの配列、例えば、HIV由来のTATペプチド、ペネトラチン、トランスポータン、またはhCT由来の細胞透過性ペプチドを含む（例えば、Caronなど、Mol. Ther. 3(3):310-8(2001); Langel, Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, Boca Raton FL, 2002)と、El-Andaloussiなど、Curr. Pharm. Des. 11(28):3597-611(2003)と、Deshayesなど、Cell. Mol. Life Sci. 62(16):1839-49(2005)と、を参照、これらの内容をすべて参照により本願に組み込まれる）。組成物はまた細胞浸透剤、例えばリポソームを含むように製剤化され、これは組成物を細胞内空間へ送達することを向上させる。本発明のグリカン相互作用抗体は細胞内送達を可能にするためにペプチド及び／またはタンパク質、例えば、非制限的にAileron Therapeutics（マサチューセッツ州ケンブリッジ所在）及びPermeon Biologics（マサチューセッツ州ケンブリッジ所在）のペプチド及び／またはタンパク質と複合化され

10

20

30

40

50

る (Cronican など、ACS Chem. Biol. 2010 5:747-752 と、McNaughton など、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009 106:6111-6116 と、Sawyer、Chem Biol Drug Des. 2009 73:3-6 と、Verdine 及び Hilinski、Methods Enzymol. 2012; 503:3-33、これらの内容はすべて参照により本願に組み込まれる)。

【0462】

一部の具現例において、細胞透過性ポリペプチドは第1ドメイン及び第2ドメインを含む。第1ドメインは過電化されたポリペプチドを含む。第2ドメインはタンパク質結合パートナーを含む。本願において使用されたように、「タンパク質結合パートナー」は、非制限的に、抗体及びこれの機能的な断片、足場タンパク質またはペプチドを含む。細胞透過性ポリペプチドは追加にタンパク質結合パートナーに対する細胞内結合パートナーを含む。細胞浸透性ポリペプチドはグリカン相互作用抗体が導入される細胞から分泌される。

10

【0463】

本発明の製剤において、ペプチドまたはタンパク質はグリカン相互作用抗体による細胞形質移入を増加させるために、またはグリカン相互作用抗体の生体分布を変更させるために (例えば、特定の組織または細胞類型を標的化することで) 混入される。

【0464】

[細胞製剤]

本発明のグリカン相互作用抗体組成物の細胞ベース製剤は細胞形質移入のために (例えば、細胞担体で) または組成物の生体分布を変更させるために (例えば、細胞担体を特定の組織または細胞類型に標的化されることで) 用いられる。

20

【0465】

[細胞移入 (transfer) 方法]

多様な方法が当業界に広く知られており、核酸またはタンパク質、例えばグリカン相互作用抗体を細胞内に導入するのに適切であり、ウィルス及び非ウィルス媒介手法を含む。典型的な非ウィルス媒介手法の例は、非制限的に電気穿孔法、リン酸カルシウム媒介移入、ヌクレオフェクション、超音波穿孔法、ヒートショック、マグネトフェクション、リポソーム媒介移入、微細注射、微細投射媒介移入 (ナノ粒子)、カチオン重合体媒介移入 (DEAE-デキストラン、ポリエチレンイミン、ポリエチレングリコール (PEG) など) または細胞融合を含む。

30

【0466】

超音波穿孔法または細胞超音波処理は細胞の細胞質膜の透過性を改変させるための音 (例えば、超音波周波数) を用いる。超音波穿孔方法は当業界に広く知られており、生体内で核酸を送達するために用いられる (Yoon 及び Park、Expert Opin Drug Deliv. 2010 7:321-330 と、Postema and Gilja、Curr Pharm Biotechnol. 2007 8:355-361 と、Newman 及び Bettinger、Gene Ther. 2007 14:465-475 と、これらはすべて参照により本願に組み込まれる)。超音波穿孔方法は当業界に広く知られており、例えばバクテリアと関連して米国公開特許第20100196983号及び例えば他の細胞類型と関連して米国公開特許第20100009424号に教示されており、これらそれぞれはすべて参照により本願に組み込まれている。

40

【0467】

電気穿孔手法は当業界に広く知られており、生体内で及び臨床的に核酸を送達するのに用いられる (Andre など、Curr Gene Ther. 2010 10:267-280 と、Chiarella など、Curr Gene Ther. 2010 10:281-286 と、Hojman、Curr Gene Ther. 2010 10:128-138 と、これらはすべて参照により本願に組み込まれる)。一具現例において、グリカン相互作用抗体は電気穿孔法により送達される。

【0468】

50

〔投与及び送達〕

本発明の組成物は任意の標準方法または当業界に公知の経路によって投与される。

本発明のグリカン相互作用抗体は治療的に有効な結果を引き起こす任意の経路に投与される。これは、非制限的に、腸、胃腸、硬膜外、経口、経皮、硬膜外（硬膜周辺）、脳内（大脳内へ）、脳室内（大脳脳室内へ）、表皮（皮膚上に塗布）、皮内（皮膚そのものの内へ）、皮下（皮膚下）、鼻腔投与（鼻を介して）、静脈内（静脈内へ）、動脈内（動脈内へ）、筋肉内（筋肉内へ）、心臓内（心臓内へ）、骨内注入（骨髄内へ）、脊椎腔内（脊椎管内へ）、腹腔内（腹腔内注入または注射）、膀胱内注入、眼内（目を介して）、陰茎海綿体内（陰茎基底内へ）、腔内投与、子宮内、羊膜外投与、経皮（全身への分布のために損傷していない皮膚を介して拡散）、経粘膜（粘膜を介して拡散）、吸入（鼻息）、舌下、唇の下、浣腸、眼球点滴（結膜へ）、または耳点滴を含む。特定の具現例において、組成物は血液 - 脳関門、血管障壁（b a r r i e r）または他の上皮障壁を横切り得る態様で投与される。本発明のグリカン相互作用抗体に対する投与の非制限的な経路が以下に記載されている。

【0469】

〔非経口及び注射投与〕

経口および非経口投与のための液体投与形態は、非制限的に薬学的に許容される乳剤、マイクロ乳剤、溶液、懸濁液、シロップ、及び／またはエリキシルを含む。活性成分以外に、液体投与形態は当業界で通常に用いられる不活性希釈剤、例えば水または他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、エチルカーボネート、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1、3 - ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、オイル（特に、綿実、ピーナッツ、コーン、胚芽、オリーブ、カスター及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル、及びこれらの混合物を含む。不活性希釈剤以外に、経口組成物は補助剤、例えば湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、甘味剤、風味剤、及び／または香味剤を含む。非経口投与のための特定の具現例において、組成物は可溶化剤、例えばCREMOPHOR（登録商標）、アルコール、オイル、改変されたオイル、グリコール、ポリソルベート、シクロデキストリン、重合体及び／またはこれらの組み合わせである。他の具現例において、界面活性剤、例えばヒドロキシプロピルセルロースが含まれる。

【0470】

注射可能な製剤、例えば滅菌の注射可能な水性または油性懸濁液は適切な分散剤、湿潤剤、及び／または懸濁剤を用いて当業界に公知の技術によって製剤化される。滅菌の注射可能な製剤は、非毒性の非経口的に許容される希釈剤及び／または溶媒のうち滅菌の注射可能な溶液、懸濁液、及び／または乳剤、例えば1、3 - ブタンジオールの中の溶液であり得る。用いられるビヒクル及び溶媒は水、リンゲル液、U. S. P.、及び等張性塩化ナトリウム溶液であり得る。滅菌の固定されたオイルは溶媒または懸濁媒質として通常的に用いられる。このような目的のために合成モノまたはジグリセリドを含めて任意の混合固定されたオイルが用いられる。脂肪酸、例えばオレイン酸は注射可能な製剤に用いられる。注射可能な製剤は、例えばバクテリア保持フィルターを介した濾過によって、及び／または使用前に滅菌数または他の滅菌の注射可能な媒質のうち溶解されるかまたは分解される滅菌の固体組成物形態の滅菌剤を混入させることで滅菌される。

【0471】

活性成分の効果を延長させるために、しばしば皮下または筋肉内注射から活性成分の吸収を遅らせることが好ましい。これは水溶性が低い結晶質または無定形物質の液体懸濁液を用いることで達成される。次に薬物の吸収速度はこれの溶解速度に依存し、これはまた結晶サイズ及び結晶質の形態に依存する。あるいは、非経口投与薬物形態の遅延吸収はオイルビヒクルに溶解または懸濁させることで達成される。注射可能なデポー（d e p o t）の形態は生分解可能な重合体、例えばポリラクチド - ポリグリコリドのうち薬物のマイクロカプセル化マトリックスを形成することで製造される。薬物対重合体の比率及び使用

された特定の重合体の性質によって、薬物放出の速度は制御される。他の生分解可能な重合体の例はポリオルトエステル及びポリ無水物を含む。デポー注射可能な製剤は薬物の身体組織と両立可能なリポソームまたはマイクロエマルジョンに捕獲させることで製造される。

【0472】

〔直腸および腔投与〕

直腸および腔投与用組成物は典型的に組成物を、周囲温度では固体であるが体温では液体であるために直腸または腔腔内で融合されて活性成分を放出する、適切な非刺激的な賦形剤、例えばココアバター、ポリエチレングリコールまたは座薬ワックスと混合させることで製造される座薬である。

10

【0473】

〔経口投与〕

経口投与用固体投与の形態はカプセル、錠剤、丸剤、粉末及び顆粒を含む。このような固体投与の形態で、活性成分は1つ以上の不活性の薬学的に許容される賦形剤、例えばクエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム及び／または充填剤または増量剤（例えば、澱粉、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール及びシアル酸）、結合剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、アルジネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース及び／またはアカシア）、湿潤剤（例えば、グリセロール）、崩解剤（例えば、アガー、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカ澱粉、アルギン酸、特定のケイ酸塩、及び炭酸ナトリウム）、溶液遅延剤（例えば、パラフィン）、吸収促進剤（例えば、第四アンモニウム化合物）、湿潤剤（例えば、セチルアルコール及びグリセロールモノステアレート）、吸収剤（例えば、カオリン及びベントナイト粘土）、及び潤滑剤（例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム）、及びこれらの混合物とともに混合される。カプセル、錠剤及び丸剤の場合、投与形態は緩衝剤を含む。

20

【0474】

〔局所または経皮投与〕

本願に記載されたように、本発明のグリカン相互作用抗体を含有する組成物は局所的投与のために製剤化される。皮膚はその容易な接近性のために送達のための理想的な標的部位であり得る。遺伝子発現は潜在的に非特定な毒性を避ける皮膚、皮膚内の特定の層及び細胞類型に制限される。

30

【0475】

送達された組成物の皮膚発現の部位は核酸送達の経路に依存するだろう。通常、3つの経路がグリカン相互作用抗体を皮膚に送達するために考慮される：（i）局所塗布（例えば、局所／地域的処理及び／または化粧品塗布）と、（ii）皮内注射（例えば、局所／地域的処理及び／または化粧品塗布）と、（iii）全身性送達（例えば、皮膚及び外皮領域の両方に影響を与える皮膚病の治療用）。グリカン相互作用抗体は当業界に公知のいくつかの異なるアプローチによって皮膚に送達される。

【0476】

一具現例において、本発明は本発明の方法を便利に及び／または効率的に行うための多様なドレッシング（例えば、創傷ドレッシング）または包帯（例えば、接着包帯）を提供する。典型的なドレッシングまたは包帯は、薬学組成物及び／または本願に記載されたグリカン相互作用抗体を十分な量で含んでユーザにして対象の多重治療を行うようにできる。

40

【0477】

一具現例において、本発明は1回以上の注射で送達されるグリカン相互作用抗体を含む組成物を提供する。

組成物の局所及び／または経皮投与用の投与形態は軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、粉末、溶液、スプレー、吸入及び／またはパッチを含む。一般に、活性成分は薬学的に許容される賦形剤及び／または任意の必要な保存剤及び／または要求される緩

50

衝液とともに滅菌の条件下で混合される。

【0478】

追加に、本発明は経皮パッチの使用を考慮し、これはしばしば身体に化合物の制御された送達を提供する追加的な利点を有する。このような投与形態は例えば、化合物を適切な媒質の中に溶解及び／または分散させることで製造される。代わりにまたは追加的に、速度は速度制御膜を提供することで及び／または化合物を重合体マトリックス及び／またはゲルの中に分散させることで制御される。

【0479】

局所投与に適切な製剤は、非制限的に液体及び／または半液体製剤、例えば塗擦剤（*liniment*）、ローション、水中油及び／または油中水乳剤、例えばクリーム、軟膏及び／またはペースト、及び／または溶液及び／または懸濁液を含む。

10

【0480】

局所的に投与可能な製剤は、例えば約1%～約10%（w/w）の活性成分を含むが、活性成分の濃度は溶媒中の活性成分の可溶性の限界まで高くなってもよい。局所投与用製剤は本願に記載された1つ以上の追加成分をさらに含む。

【0481】

[デポー投与]

本願において使用されたように、一部の具現例において、本発明の組成物は延長された放出のためにデポーで製剤化される。一般に、特定の器官または組織（「標的組織」）が投与の標的になる。

20

【0482】

本発明の一部の態様において、グリカン相互作用抗体は標的組織内にまたは近位に空間的に保有される。組成物、特に組成物のグリカン相互作用抗体構成成分が標的組織に実質的に保有された条件では（これは、10、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.99%以上または99.99%超の組成物が標的組織に保持されていることを意味する）1つ以上の標的組織（1つ以上の標的細胞を含む）を組成物と接触させることで哺乳類対象の1つ以上の標的組織に組成物を提供する方法が提供される。有利なことに、保持は標的組織及び／または細胞に入る組成物に存在するグリカン相互作用抗体の水準を測定することで決定される。例えば、対象に投与されたグリカン相互作用抗体の1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.99%以上または99.99%超は投与後の時間周期に細胞内に存在する。例えば、哺乳類を対象とした筋肉内注射は1つ以上のグリカン相互作用抗体及び形質移入試薬を含む水性組成物を用いて行われ、組成物の保持は筋肉細胞に存在するグリカン相互作用抗体の水準を測定することで決定される。

30

【0483】

本発明の特定の様相は組成物が実質的に標的組織に保持された組織で標的組織（1つ以上の標的細胞を含む）を組成物と接触させることで哺乳類を対象とした標的組織に組成物を提供する方法に関する。組成物は関心効果が少なくとも1つの標的細胞で生産されるように有効量のグリカン相互作用抗体を含有する。組成物は一般的に細胞浸透剤及び薬学的に許容される賦形剤を含有するが、「ネイキッド」グリカン相互作用抗体（例えば、細胞浸透剤または他の製剤のないグリカン相互作用抗体）がまた考慮される。

40

【0484】

一部の具現例において、組成物は多数の異なるグリカン相互作用抗体を含み、この際、グリカン相互作用抗体の1つまたは1つ以上は関心グリカンを標的化する。選択的に、組成物はまた組成物の細胞内送達を補助するための細胞浸透剤を含有する。標的組織の予め決定された体積内に含有された細胞の実質的なパーセントで関心グリカンを標的化するのに必要な組成物の投与量が決定される（一般に、予め決定された体積に隣接した組織または標的組織の末端でグリカンを標的化しない）。このような決定の後に、決定された投与量は哺乳類対象の組織内に直接導入される。

50

【0485】

一具現例において、本発明は1回以上の注射または分割投与注射によって送達されるグリカン相互作用抗体を提供する。

[肺投与]

薬学組成物は口腔 (buccal cavity) を介した肺投与に適切な製剤で製造、梱包及び／または販売される。このような製剤は活性成分を追加に含み、約0.5 nm～約7 nmまたは約1 nm～約6 nmの直径を有する乾燥粒子を含む。このような組成物は適切に、粉末を分散させるための推進剤の流れが向けられる乾燥粉末貯蔵所を含む装置を使用して及び／または密閉容器内の低沸点推進剤のうち溶解及び／または懸濁された活性成分を含む装置のような自己推進溶媒／粉末分配容器を使用して投与するための乾燥粉末形態である。このような粉末は重量を基準に98%以上の粒子が0.5 nm超の直径を有し、個数を基準に95%以上の粒子が7 nm未満の直径を有する粒子を含む。あるいは、重量を基準に95%以上の粒子が1 nm超の直径を有し、個数を基準に90%以上の粒子が6 nm未満の直径を有する。乾燥粉末組成物は固形の微細粉末希釈剤、例えば糖を含んでもよく、単位投与量の形態で便利に提供される。

10

【0486】

低沸点推進剤は一般的に大気圧で65°F未満の沸点を有する液体推進剤を含む。一般に、推進剤は組成物の50%～99.9% (w/w) を構成し、活性成分は組成物の0.1%～20% (w/w) を構成する。推進剤は追加の成分、例えば液体非イオン性及び／または固体陰イオン界面活性剤及び／または固体希釈剤 (活性成分を含む粒子と同一程度の粒子サイズ有してもよい) を追加に含む。

20

【0487】

肺送達のために製剤化された薬学組成物は溶液及び／または懸濁液の液滴形態で活性成分を提供する。このような製剤は活性成分を含む、選択的に滅菌された水性及び／または希釈されたアルコール溶液及び／または懸濁液で製造、梱包及び／または販売され、任意の噴霧装置及び／または微粒化装置を使用して便利に投与される。このような製剤は、非制限的に風味剤、例えばサッカリンナトリウム、揮発性油、緩衝剤、界面活性剤及び／または保存剤、例えばメチルヒドロキシベンゾアートをはじめ、1つ以上の付加成分を追加に含む。このような投与経路によって提供される液滴は約0.1 nm～約200 nmの平均直径を有する。

30

【0488】

[鼻腔内投与、鼻腔投与及び口腔投与]

肺送達に有用なもので、本願に記載された製剤は薬学組成物の鼻腔内送達に有用である。鼻腔内投与に適切なまた他の製剤は活性成分を含み、約0.2 m～500 mの平均粒子を有する荒い粉末である。このような製剤は鼻で吸入する方式で、すなわち、鼻の近くに保持された粉末容器から鼻腔通路を介する迅速な吸入によって投与される。

【0489】

鼻腔投与に適切な製剤は、例えば約0.1% (w/w) 程度の少量及び約100% (w/w) 程度の多量の活性成分を含み、1つ以上の追加の本願に記載された成分を含む。薬学組成物は口腔投与に適切な製剤で製造、梱包、及び／または販売される。このような製剤は、例えば通常の方法を使用して製造された錠剤及び／またはトロッチ剤の形態であり、例えば0.1%～20% (w/w) の活性成分、経口溶解性及び／または分解性組成物を含む残留成分、及び選択的に1つ以上の追加の本願に記載された成分である。あるいは、口腔投与に適切な製剤は活性成分を含む粉末及び／またはエアロゾル及び／または微粒化された溶液及び／または懸濁液を含む。このような粉末化された、エアロゾル化された、及び／またはエアロゾル化された製剤は分散される場合、約0.1 nm～約200 nmの平均粒子サイズ及び／または液滴サイズを有し、1つ以上の任意の追加の本願に記載された成分を追加的に含む。

40

【0490】

[眼球投与または耳投与]

50

薬学組成物は眼球投与または耳投与に適切な製剤で製造、梱包、及び／または販売される。例えば、このような製剤は、例えば水性または油性液体の賦形剤のうち活性成分が0.1/1.0% (w/w) の溶液及び／または懸濁液を含む目または耳の点滴形態である。このような点滴は緩衝剤、塩、及び／または1つ以上の他の任意の追加の本願に記載された成分を含む。有用なその他の眼科的に投与可能な製剤は活性成分を微細結晶質の形態及び／またはリポソーム製剤で含むものを含む。網膜下挿入物がまた投与の形態で用いられる。

【0491】

[搭載物 (Payload) 投与]

本願に記載されたグリカン相互作用抗体は生物学的標的に対する物質（「搭載物」）の送達、例えば、標的を検出するための検出可能な物質の送達、または治療剤または診断剤の送達が要求される多数の異なるシナリオで用いられる。検出方法は、非制限的に試験管内映像法及び生体内映像法の両方ともに、例えば免疫組織化学法、生物発光画像法 (BLI)、磁気共鳴画像法 (MRI)、陽電子放出断層撮影法 (PET)、電子顕微鏡法、X線コンピュータ断層撮影法、ラマン映像法、光干渉性断層撮影法、吸収映像法、熱映像法、蛍光反射映像法、蛍光顕微鏡法、蛍光分子断層撮影映像法、核磁気共鳴映像法、X線映像法、超音波映像法、光音響映像法、実験室検定法またはタグ／染色／イメージングが要求される任意の状況を含む。

【0492】

グリカン相互作用抗体は任意の有用な配向にリンカー及び搭載物の両方を含むように考案される。例えば、2つの末端を有するリンカーは1つの末端を搭載物に付着させて他の1つの末端をグリカン相互作用抗体に付着させるために用いられる。本発明のグリカン相互作用抗体は1つ以上の搭載物及び切断可能なリンカーを含む。また他の実施例においてリンカーを介してグリカン相互作用抗体に付着され、蛍光で標識される薬物は生体内で、例えば細胞内で薬物を追跡するのに用いられる。

【0493】

他の実施例において、非制限的に細胞内への可逆的な薬物送達におけるグリカン相互作用抗体の用途を含む。

本願に記載されたグリカン相互作用抗体は特定の細胞器官に対する搭載物、例えば検出剤または治療剤の細胞内標的化に用いられる。また、本願に記載されたグリカン相互作用抗体は治療剤を細胞または組織、例えば生きている動物に送達するために用いられる。例えば、本願に記載されたグリカン相互作用抗体は癌細胞を死滅させるための化学療法剤を送達するために用いられる。リンカーを介して治療剤に付着されたグリカン相互作用抗体は膜透過性を容易にするために治療剤が細胞内標的に到達するようにする。

【0494】

一部の具現例において、搭載物は治療剤、例えば細胞毒素、放射性鉄、化学療法剤または他の治療剤であり得る。細胞毒素または細胞傷害剤は細胞を害する任意の製剤を含む。例示は、非制限的にタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロパノール、ピューロマイシン、メイタンシノイド、例えばメイタンシノール（米国特許第5、208、020号を参照、これはすべて本願に含まれる）、ラケルマイシン（CC-1065、米国特許第5、475、092号、第5、585、499号、及び第5、846、545号を参照、これはすべて参照により本願に含まれる）、及びこの類似体または同族体を含む。放射性イオンは、非制限的に、ヨード（例えば、ヨード 125またはヨード 131）、ストロンチウム 89、リン、パラジウム、セシウム、イリジウム、リン酸、コバルト、イットリウム 90、サマリウム 153及びプラセオジウムを含む。その他の治療剤は、非制限的に抗代謝物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグア

ニン、シタラビン、5 - フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパクロラムブシル、ラケルマイシン(CC - 1065)、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、ロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、及びシス - ジクロロジアンミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルピシン(以前はダウノマイシン)、及びドキシソルピシン)、抗生剤(例えば、ダクチノマイシ(以前はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン(AMC))、及び抗有糸分裂薬(例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、タキソール及びメイタンシノイド)を含む。本発明の抗STn抗体の場合、腫瘍死滅はこのような抗STn抗体に対する毒素の接合によって促進される。

10

【0495】

一部の具現例において、搭載物は検出可能な製剤、例えば多様な有機小分子、無機化合物、ナノ粒子、酵素または酵素基質、蛍光物質、発光物質(例えば、ルミノール)、生物発光物質(例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリン)、化学発光物質、放射性物質(例えば、 ^{18}F 、 ^{67}Ga 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 ^{82}Rb 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{133}Xe 、 ^{201}Tl 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^3H 、または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (例えば、過テクネチウム酸(テクネチウム酸塩(VII)、 TcO_4^-))、及び造影剤(例えば、金(例えば、金ナノ粒子)、ガドリニウム(例えば、キレート化されたGd)、酸化鉄(例えば、超常磁性酸化鉄(SPIO)、単一結晶質酸化鉄ナノ粒子(MION)、及び超小型超常磁性酸化鉄(USPIO))、マンガンキレート(例えば、Mn - DPDP)、硫酸バリウム、ヨード造影剤(イオヘキソール)、微小気泡、またはパーフルオロカーボン)であり得る。このような光学的に検出可能な標識は、例えば、非制限的に、4 - アセトアミド - 4' - イソチオシアン酸スチルベン - 2、2'ジスルホン酸と、アクリジン及び誘導体(例えば、アクリジン及びアクリジンイソチオシアネート)と、5 - (2' - アミノエチル)アミノナフタレン - 1 - スルホン酸(EDANS)と、4 - アミノ - N - [3 - ビニルスルホニル)フェニル]ナフタルイミド - 3、5ジスルホンと、N - (4 - アニリノ - 1 - ナフチル)マレイミドと、アントラニルアミドと、BODIPYと、ブリリアントイエローと、クマリン及び誘導体(例えば、クマリン、7 - アミノ - 4 - メチルクマリン(AMC、クマリン 120)、及び7 - アミノ - 4 - トリフルオロメチルクマリン(クマリン 151))と、シアニン染料と、チアノーゼと、4'、6 - ジアミニジノ - 2 - フェニルインドール(DAPI)と、5'5煤]ジプロモピロガロール - スルホンフタレイン(プロモピロガロールレッド)と、7 - ジエチルアミノ - 3 - (4' - イソチオシアナトフェニル) - 4 - メチルクマリンと、ジエチレントリアミンペンタアセテートと、4、4' - ジイソチオシアン酸ジヒドロ - スチルベン - 2、2' - ジスルホン酸と、4、4' - ジイソチオシアン酸スチルベン - 2、2' - ジスルホン酸と、5 - [ジメチルアミノ] - ナフタリン - 1 - 塩化スルホニル(DNS、ダンシルクロリド)と、4 - ジメチルアミノフェニルアゾフェニル - 4' - イソチオシアネート(DABITC)と、エオシン及び誘導体(例えば、エオシン及びエオシンイソチオシアネート)と、エリスロシン及び誘導体(例えば、エリスロシン B及びエリスロシンイソチオシアネート)と、エチジウムと、フルオレセイン及び誘導体(例えば、5 - カルボキシフルオレセイン(FAM)、5 - (4、6 - ジクロロトリアジン - 2 - イル)アミノフルオレセイン(DTAF)、2'、7' - ジメトキシ - 4'5' - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、X - ローダミン - 5 - (及び - 6) - イソチオシアネート(QFITCまたはXRITC)、及びフルオレスカミン)と、2 - [2 - [3 - [[1、3 - ジヒドロ - 1、1 - ジメチル - 3 - (3 - スルホプロピル) - 2H - ベンゾインドール - 2 - イリデン]エチリデン] - 2 - [4 - (エトキシカルボニル) - 1 - ピペラジニル] - 1 - シクロペンテン - 1 - イル]エチニル] - 1、1 - ジメチル - 3 - (3 - スルホプロピル) - 1H - ベンゾインドリウムヒドロキシド、分子内塩、n、n - ジエチルエタンアミン(1:1)(IR144)を有する化合物と、5 - クロロ - 2 - [2 - [3 - [(5 - クロロ - 3 - エチル - 2(3H) - ベンゾ

20

30

40

50

チアゾール-イリデン)エチリデン]-2-(ジフェニルアミノ)-1-シクロペンテン-1-イル]エチル]-3-エチルベンゾチアゾリウム過塩素酸塩(IR140)と、マラカイトグリーンイソチオシアネートと、4-メチルウンベリフェロンオルトクレゾールフタレインと、ニトロチロシンと、パラローザニリンと、フェノールレッドと、B-フィコエリトリンと、o-フタルアルデヒドと、ピレン及び誘導体(例えば、ピレン、ピレン酪酸、及びスクシンイミジル-1-ピレン)と、酪酸量子ドットと、リアクティブレッド4(CIBACRON(商標)ブリリアントレッド3B-A)と、ローダミン及び誘導体(例えば、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、6-カルボキシローダミン(R6G)、リサミンローダミンB塩化スルホニルローダミン(Rhod)、ローダミンB、ローダミン123、ローダミンXイソチオシアネート、スルホローダミンB、スルホローダミン101、スルホローダミン101のスルホニルクロリド誘導体スルホローダミン101(テキサスレッド、N、N、N'、N'テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)テトラメチルローダミン、及びテトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC))と、リボフラビンと、ロゾール酸と、テルビウムキレート誘導体と、シアニン-3(Cy3)と、シアニン-5(Cy5)と、シアニン-5.5(Cy5.5)、シアニン-7(Cy7)と、IRD700と、IRD800と、アレクサ647と、ラジオルタブルーと、フタロシアニンと、ナフタロシアニンと、を含む。

10

【0496】

一部の具現例において、検出可能な製剤は活性化時に検出可能になる非検出可能な前駆体であり得る。(例えば、蛍光生成テトラジン-蛍光団構造体(例えば、テトラジン-BODIPY FL、テトラジン-オレゴングリーン488、またはテトラジン-BODIPY TMR-X)または酵素活性化が可能な蛍光生成製剤(例えば、PROSENSE(登録商標)(VisEn Medical)))。酵素標識の組成物の試験管内検定法は、非制限的に、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、免疫沈降検定法、免疫蛍光法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、及びウエスタンブロット分析法を含む。

20

【0497】

[併用]

グリカン相互作用抗体は1つ以上の他の治療剤、予防剤、診断剤またはイメージング剤とともに併用して用いられる。「併用して」は、このような送達方法は本開示の範囲以内であるが、製剤が同時に投与されて／されるか、またはともに送達されるように製剤化されなければならないことを意味するように意図されたわけではない。組成物は1つ以上の他の目的とする治療または医学的処置と同時に、その前にまたはその後に投与される、一般に、それぞれの製剤はその薬剤に対して決定された投与量及び／または時間スケジュールで投与されるだろう。一部の具現例において、本開示は医薬的、予防的、診断的、及び／またはイメージング組成物は、これの生体利用率を改善し、これの代謝を低減及び／または変更し、この排泄を抑制するか、または体内でこの分布を変更する製剤と併用して送達されることを含む。

30

【0498】

[投与量]

本開示は薬物送達の科学において可能性のある進歩を考慮した任意の適切な経路による任意の治療的、薬学的、診断的または映像化のためのグリカン相互作用抗体の送達を含む。送達はネイキッドまたは製剤化される。

40

【0499】

[ネイキッド送達]

本発明のグリカン相互作用抗体はネイキッドの形態で細胞、組織、器官または有機体に送達される。本願において使用されたように、用語「ネイキッド」は形質移入または透過性を促進する製剤または改変を使用せずに送達されたグリカン相互作用抗体を称する。ネイキッドグリカン相互作用抗体は当業界に広く知られ、本願に記載された投与経路を用いて細胞、組織、器官及び／または有機体に送達される。ネイキッド送達は単純な緩衝液、

50

例えば食塩水またはPBSの中での製剤化を含む。

【0500】

〔製剤化された送達〕

本発明のグリカン相互作用抗体は本願に記載された方法を用いて製剤化される。製剤化は改変されて／されるかまたは改変されなくてもよいグリカン相互作用抗体を含む。製剤は、非制限的に細胞透過性製剤、薬学的に許容される担体、送達剤、生分解性または生体互換性重合体、溶媒、及び徐放性送達デポを追加に含む。製剤化されたグリカン相互作用抗体は同業界に広く知られ、本願に記載された投与経路を用いて細胞に送達される。

【0501】

組成物はまた、基質、例えば組成物などでコーティングされるかまたは含浸された織物または生分解性物質を用いてゲル、粉末、軟膏、クリーム、ゲル、ローション、及び／または点滴によってカテーテルを介した直接的な吸収またはバッシング (b a t h i n g) を含み、当業界に公知の任意のいくつかの方法で器官または組織に直接送達されるように製剤化される。

【0502】

〔投薬〕

本発明は本発明による1つ以上のグリカン相互作用抗体をこれを必要とする対象に投与することを含む方法を提供する。グリカン相互作用抗体をコードする核酸、グリカン相互作用抗体を含むタンパク質または複合物、またはこれらの薬学的、映像的、診断的、または予防的な組成物が疾患、障害及び／または状態の予防、治療または診断に効果的な任意の投与量及び任意の経路を用いて対象に投与される。要求される正確な量は、対象の年齢及び一般的な状態、疾患の重症度、特定の組成物、この投与方式、この活性方式などによって対象ごとに異なると考えられる。本発明による組成物は典型的に投与の容易さ及び投与量の均一性のための投薬単位の形態で製剤化される。しかし、本発明の組成物の一日総使用量は健全な医学的判断の範囲内で主治医によって決定されることを理解するだろう。任意の特定患者に対する特定の治療効果、予防効果または適切な映像線量レベルは治療する障害及び障害の重症度を含む因子の多様性と、使用された特定化合物の活性と、使用された特定組成物、患者の年齢、体重、一般的な健康、性別及び食餌と、投与時間と、投与経路と、使用された特定化合物の排泄速度と、治療期間と、使用された特定化合物と併用されるかまたは同時に使用された薬物、医学分野に広く知られている類似因子によって異なると考えられる。

【0503】

特定の具現例において、本発明による組成物は一日に1回以上にわたって一日当たり約0.0001mg/kg～約100mg/kg、約0.01mg/kg～約50mg/kg、約0.1mg/kg～約40mg/kg、約0.5mg/kg～約30mg/kg、約0.01mg/kg～約10mg/kg、約0.1mg/kg～約10mg/kg、または約1mg/kg～約25mg/kgの対象体重を送達するのに十分な投与量の水準で投与されて目的とする治療的、診断的、予防的、または映像効果を獲得できる。目的とする投与量は一日に3回、一日に2回、一日に1回、隔日毎、3日毎、毎週、2週毎、3週毎、または4週毎に送達される。特定の具現例において、目的とする投与量は多重投与を使用して送達される(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14またはその以上の投与)。

【0504】

本発明によると、グリカン相互作用抗体は分割投与量療法で投与される。本願において使用されたように、「分割投与量」は単一単位投与量または一日総投与量を2回以上の投与量で分けたもの、例えば単一単位投与量の2回以上の投与である。本願において使用されたように「単一単位投与量」は1回投与量／1回／単一経路／単一接触点で、すなわち単一投与事象で投与された任意の治療剤の投与量である。本願において使用されたように、「一日総投与量」は24時間周期内に与えられるかまたは処方された量である。これは単一単位投与量として投与される。一具現例において、本発明のグリカン相互作用抗体は

分割投与量として対象に投与される。グリカン相互作用抗体は、緩衝剤のうちでのみ製剤化されるかまたは本願に記載された製剤に製剤化される。本願に記載されたようなグリカン相互作用抗体を含む薬学組成物は本願に記載された投与の形態、例えば局所、鼻腔内、器官内（intratracheal）、注射可能な（例えば、静脈内、眼球内、遊離体腔内、筋肉内、心臓内、腹腔内または皮下）形態で製剤化される。薬学製剤の製剤化及び／または製造において一般的な考慮事項は例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins、2005（参照により本願に含まれる）で確認できる。

【0505】

10

〔コーティングまたはシェル〕

錠剤、糖衣錠、カプセル、丸剤及び顆粒の固体投薬の形態はコーティング及びシェル、例えば腸溶コーティング及び薬学的製剤化の分野に広く知られている他のコーティングで製造される。これらは選択的に不透明化剤を含み、選択的に遅延された方式で活性成分のみであるかまたは好ましくは腸管の特定部分で活性成分を放出する組成物であってもよい。使用される内蔵された（embedding）組成物の例は重合体性物質及びワックスを含む。類似した形態の固体組成物はラクトースまたは乳糖のみならず、高分子量のポリエチレングリコールなどのような賦形剤を用いて軟質または硬質充填されたゼラチンカプセル内の充填剤として用いられる。

【0506】

20

〔I V．キット及び装置〕

〔キット〕

本願に記載された任意の組成物はキットに含まれる。非制限的な例示で、抗原分子を含むグリカン相互作用抗体の生産のための試薬がキットに含まれる。キットはグリカン相互作用抗体の生産または合成のための試薬または指針を追加に含む。これはまた1つ以上の緩衝液を含む。本発明のキットはグリカン相互作用抗体のタンパク質または核酸アレイまたはライブラリーを製造するための構成成分を含み、従って、例えば固体支持体を含む。

【0507】

キットの構成成分は水性媒質内にまたは凍結乾燥された形態で梱包される。キットの容器手段は一般的に1つ以上のバイアル、試験管、フラスコ、瓶、注射器または他の容器手段を含み、これらの中に構成成分が配置され、好ましくは適切に等分される。キットに1つ以上の構成成分がある場合（標識試薬及び標識とともに梱包される）、キットはまた一般的に第2、第3または他の追加の容器を含み、これらの中に追加の構成成分が分離されて配置される。キットはまた滅菌の薬学的に許容される緩衝液及び／または他の希釈液を含むための第2の容器手段を含む。しかし、構成成分の多様な組み合わせがバイアル内に含まれる。本発明のキットはまた典型的に商業的販売のために密閉された形態で、グリカン相互作用抗体、例えばタンパク質、核酸、及び任意の他の試薬容器を含有するための手段を含むだろう。このような容器は目的とするバイアルが保持される射出成型またはブロー成型されたプラスチック容器を含む。

30

【0508】

40

キットの構成成分が1つ及び／またはそれ以上の液体溶液で提供される場合、液体溶液は水溶液で、滅菌された水溶液が好ましい。しかし、キットの構成成分は乾燥粉末として提供されてもよい。試薬及び／または構成成分が乾燥粉末として提供される場合、粉末は適切な溶媒の添加によって再構成される。溶媒はまた他の容器手段で提供されることが予想される。一部の具現例において、標識染料が乾燥粉末として提供される。10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900、1000マイクログラムまたは1000マイクログラム以上または最大で10グラムで乾燥された染料が本発明のキットに提供されることが考慮される。次に、染料はDMSOのような任意の適切な溶媒に再懸濁される。

50

【0509】

キットはキット構成成分に対する使用指針及びキットに含まれない任意の他の試薬の使用指針を含む。指針は具現される改変を含む。

〔装置〕

本願に記載された任意の組成物は装置で組み合わせ、コーティング、または内蔵される。装置は、非制限的に歯科インプラント、ステント、骨の代替品、人工関節、弁、脈拍調整器または他の移植可能な治療的装置を含む。

【0510】

〔V. 均等物及び範囲〕

当業者は本願に開示された発明による特定の具現例に対する多数の均等物を通常の実験を使用して認知するかまたは確認するだろう。本発明の範囲は前述した発明の詳細な説明に限定されるものとして意図されず、むしろ添付の請求範囲の説明によって説明したようである。

【0511】

請求範囲において、「1つの」及び「その」のような条項は文脈に反してまたは他に明白に指示されない限り、1つ以上を意味するものとする。群の1つ以上の構成要素の間で「または」を含む請求範囲または説明は1つ、1つ超、またはすべての群の構成要素が存在する、使用される、または他の方式で与えられた生成物、また方法に係る場合、文脈に反するかまたは他に明白に指示されない限り、満たしたものとみなされる。本発明は群の明確な1つの構成要素が存在する、使用される、または他の方式で与えられた生成物または方法に係る具現例を含む。本発明は1つ以上または全体の群の構成要素が存在するかまたは使用される他の方式で与えられた生成物または方法に係る具現例を含む。

【0512】

また、用語「含む」は開放型で許容するが、追加の要素またはステップが含まれることを要求しないことに注目すべきである。用語「含む」が本願に使用される場合、用語「からなる」がまた含まれて開示される。

【0513】

範囲が与えられる場合、エンドポイントが含まれる。また、当業者の文脈及び理解から異なって向けられるかまたは他に明白でない限り、範囲で表現された値は本発明の他の具現例において言及された範囲内で、文脈が異なって明白に指示されない限り、範囲の下限単位の1/10に達する任意の特定値または下位の範囲を取ることが理解されるべきである。

【0514】

また、先行技術に属する本発明の任意の特定具現例は任意の1つ以上の請求範囲から明白に排除されることを理解すべきである。このような具現例は当業者に広く知られたものとしてみなされるために、本願からは排除されると明示していない場合にも排除される。本発明の組成物の任意の特定具現例（例えば、任意の核酸またはこれによってコードされたタンパク質と、任意の生産方法と、任意の使用方法など）は先行技術の存在に係っているかどうかに関係なく如何なる理由であっても1つ以上の請求範囲から除外されることがある。

【0515】

引用文献に明示的に言及されない場合でも、引用されたすべての出典、例えば、参考文献、出版物、データベース、データベース項目及び本願に引用された記述は本出願に参照により組み込まれる。引用された出典と本出願書の言及が相反する場合には、本出願書にある言及が優先される。

【0516】

セクション及び表の題目は制限するための意図ではない。

〔実施例〕

〔実施例1. グリカンアレイの分析〕

最適化されたグリカンアレイを使用して単一実験で多数のグリカンに対する抗体親和性

10

20

30

40

50

及び特異性の試験を行う。本願において使用されるグリカンアレイは、化学的に合成されよく定義された71個のグリカンを含み、これらの大半はNeu5Ac及びNeu5Gcグリカン対を含む。アレイスライドは商業的に獲得され（ArrayIt Corp、カリフォルニア州サニーベール所在）、以下の表に列挙されたグリカンを含んでいる。

【0517】

【表6-1】

表6. アレイグリカン

グリカン 番号	グリカン
1	Neu5,9Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
2	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
3	Neu5,9Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
4	Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
5	Neu5Ac α 2,6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
6	Neu5Gc α 2,6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
7	Neu5,9Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
8	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
9	Neu5,9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
10	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
11	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
12	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
13	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
14	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
15	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
16	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
17	Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
18	Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
19	Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
20	Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
21	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
22	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
23	Neu5,9Ac α 2,6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
24	Neu5Gc9Ac α 2,6GalNAc α O(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂

【0518】

【表 6 - 2】

25	Neu5Aca2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
26	Neu5Gca2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
27	Neu5Aca2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
28	Neu5Gca2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
29	Neu5,9Ac2α2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
30	Neu5Gc9Aca2,3GalβO(CH2)2CH2NH2
31	Neu5,9Ac2α2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
32	Neu5Gc9Aca2,6GalβO(CH2)2CH2NH2
33	Neu5Aca2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
34	Neu5Gca2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
35	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
36	Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
37	Neu5,9Ac2α2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
38	Neu5Gc9Aca2,6Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
39	Neu5,9Ac2α2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
40	Neu5Gc9Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
41	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
42	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
43	Galβ1,4GlcβO(CH2)2CH2NH2
45	Galβ1,4GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
47	GalNAcαO(CH2)2CH2NH2
51	Galβ1,3GalNAcβO(CH2)2CH2NH2
52	Galβ1,3GlcNAcαO(CH2)2CH2NH2
53	Galβ1,3GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
54	Galβ1,4GlcNAc6SβO(CH2)2CH2NH2
55	Neu5Aca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2
56	Neu5Gca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβO(CH2)2CH2NH2

10

20

30

40

【表 6 - 3】

57	Neu5Aca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAc6SβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
58	Neu5Gca2,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAc6SβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
59	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
60	Neu5Aca2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
61	Neu5Gca2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
62	Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcNAc6SβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
63	Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcNAc6SβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
64	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₃ NHCOCH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₆ NH ₂
65	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₃ NHCOCH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₆ NH ₂
66	Neu5Aca2,6(Neu5Aca2,3)Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
67	Neu5Aca2,6(Neu5Gca2,3)Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
68	Neu5Aca2,6(KDNa2,3)Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
69	Neu5Gca2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
70	KDNa2,8Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
71	Neu5Aca2,8Kdna2,6Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
72	Neu5Aca2,8Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
73	Neu5Aca2,8Neu5Gca2,6Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
74	KDNa2,8Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
75	Neu5Gca2,8Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂
76	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,6Galβ1,4GlcβO(CH ₂) ₂ CH ₂ NH ₂

15 ml の 2 M トリス緩衝液 (pH 8) を 0.9 ml の 16.6 M エタノールアミン及び 284.1 ml の精製水と組み合わせて 300 ml のエポキシブロッキング緩衝液を調製する。前記溶液を HCl を用いて最終 pH が 9.0 になるようにする。前記溶液を 0.2 μM のニトロセルロース膜を用いて濾過する。エポキシ緩衝溶液及び 1 L の精製水を 50 °C に事前に加温する。ガラススライドをスライドホルダーに配列して事前に加温したエポキシブロッキング緩衝液がある染色槽に迅速に浸漬させる。スライドをエポキシブロッキング緩衝液とともに 50 °C で 1 時間周期的に振盪しながらインキュベーションしてエポキシの結合部位を不活性化させる。次に、スライドをすすぎ、1 % の OVA が含まれた PBS で 25 °C で 1 時間ブロッキングさせる。ポリクローナル抗体 (1 : 1000) または精製されたモノクローナル抗体 (1 μg / mL) が含まれた血清試料を 1 % OVA が含まれた PBS で希釈して 25 °C で 1 時間グリカンアレイに添加する。広範囲に洗浄した後に、Cy3 接合された抗マウス IgG とともにグリカンマイクロアレイスライドで 1 時間インキュベーションして抗体結合を検出する (Jackson ImmunoResearch、ペンシルベニア州ウェストグロブ所在)。次にスライドを広範囲に洗浄して乾燥させ、Genepix 4000 B スキャナー (100 % レーザー、350 で獲得、10

μm ピクセル)でスキャンする。スキャンイメージからのローデータをGenePixソフトウェアを使用して抽出してローデータ分析を行う。抗体は、これらがAcSTn及びGcSTnの両分子に結合するが、Tnまたはアレイ上の他のグリカンに結合しない場合AcSTn及びGcSTnに対して非常に特異的であるとみなされる。

【0520】

アレイ分析に基づいて、アレイグリカン結合のプロファイルによって抗体を分類する。抗体がグリカン5、6、23及び24に結合する場合、AcSTn及びGcSTnに結合できる「第1群」抗体に分類する。このような抗体はより広い範囲のSTn構造及び図1Aの大きい楕円で表示されたSTn部分に結合できるためにPan-STn抗体と称される。抗体がグリカン5、6、23、24、27及び31に結合する場合、STn及び、セリンまたはトレオニンに対するO-連結を含む一部の関連構造に結合できる「第2群」抗体に分類する。このような抗体は図1Bで大きい楕円で表示されたSTn部分に結合するものと考えられる。一部の第2群抗体は好ましくはGcSTnを有する構造よりはAcSTnを有する構造に結合する。抗体がグリカン5、6、23、24、17、3、19、37、27及び31に結合する場合、「第3群」抗体(STnに結合できるが、関連構造のより広いセットにも結合できる)に分類する。第2群抗体とは違って、第3群抗体はセリンまたはトレオニンに対するO-連結を有する構造を必要としない。第3群抗体は図1Cで大きい楕円で表示されたSTn部分に結合するものと考えられる。最後に、抗体がグリカン5、6、23、24及び47に結合する場合、このような抗体はAcSTn及びGcSTnの両方と非シアリル化されたTn抗原に結合できる(従って、より広い特異性を有する)「第4群」抗体である。第4群抗体は図1Dで大きい楕円で表示されたSTn部分に結合するものと考えられる。

【0521】

[実施例2. 抗体結合のフローサイトメトリーベースの分析]

細胞の表面抗原に対する抗体結合に対する用量反応曲線を明らかにするためにフローサイトメトリーベースの分析を行う。このような分析のために、多様な細胞株を用いる。

【0522】

MDA-MB-231細胞はヒトの乳癌細胞である。これを10%ウシ胎児血清(FCS)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ペニシリン、100 U/ml ストレプトマイシン及び45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシンで補充されたイーグル最小必須培地で培養する。MCF-7細胞もヒトの乳癌細胞であり、MDA-MB-231細胞と同一の条件下で成長させる。GalNAc α 2,6-シアル酸転移酵素(ST6GalNAc1)を過剰発現するMDA-MB-231及びMCF-7細胞に安定的に形質移入されたバージョン(MDA-MB-231細胞に対してはTAH3、P10クローン、及びMCF-7細胞に対してはA12.1クローン)をまた転移遺伝子を発現する細胞を培養するために1 mg/ml のG418を添加した以外には同一の条件下で培養する。ST6GalNAc1はGalNAcをシアリル化させる酵素である。過剰発現の結果、形質移入された細胞はNeu5Ac-STnを高い水準で発現する(Julien, S. など, Glycoconjugate journal, 2001, 18, 883-93を参照、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる)。

【0523】

E3細胞はネズミの乳癌細胞である。これを10%FCSが含まれたダルベッコE4培地で培養する。Neu5Gc-STn(E3-STn)を高い水準で発現する、E3細胞の安定的に形質移入されたバージョンを600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のG418及び200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ハイグロマイシンで培養する。実験細胞の増殖及び維持の間、細胞継代のためにトリプシンは使用しない。

【0524】

OV90及びOVCA3細胞も用いられる。これらはヒトの卵巣癌細胞株であり、前述している。

SNU-16細胞も用いられる。これはSTnを低い水準で発現する胃癌細胞株である

。

【0525】

分析のために、StemPro Accutase (Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド所在)を用いて細胞を回収し、弱い遠心分離によってペレット化する前に5% FBSを含むPBSで洗浄する。細胞の数及び生存能をトリパンブルー色素排除試験法により測定して、5% FBSを含むPBS中で 5×10^6 細胞/mlになるように細胞濃度を調整する。50 μ lの細胞をアッセイプレートの各ウェルに添加する。細胞を50 μ lの分析される抗体溶液または対照群抗体溶液と結合させ、4℃で1時間インキュベーションする。アロフィコシアニン (APC) に結合された1:1、500希釈の抗マウスIgG (Southern Biotech、アラバマ州バーミングハム所在)を含む5% FBSが含有された100 μ l PBSで処理する前に、細胞を5% FBSが含有されたPBSで2回洗浄してペレット化する。細胞を洗浄し、5% FBSが含有されたPBSの中に1:1000で希釈された200 μ l ヨウ化プロピジウム (PI) の中に再懸濁する前に4℃で30分間インキュベーションする。次に処理された細胞をフローサイトメトリー分析を適用して各試料に対して10,000件を収集する。

【0526】

[実施例3：代替抗原及び補助剤で免疫化]

STnに対する抗体を開発するために免疫化研究を行った。40匹のC57BL/6またはBalb/C野生型マウス(雌、6~8週齢)を3日以上順応させて標準食餌(2920X.10、Global 18% Protein Rodent Diet、Harlan、カリフォルニア州サンディエゴ所在)及び酸性化された水(pH2.7~3.0)を試験期間中に自由に摂取させた。マウスを各10匹ずつ4つの群に(合計8つの群)に分けた。マウスを補助剤と混合した10 μ gの投与量でPSM(消化されたPSMを含む)及び/またはOSMを用いて以下の表に提示された研究設計によって免疫化させた。補助剤は、フロイント補助剤(完全または不完全)、またはAbiSCO-100(12 μ g)及びODN-2395(50 μ g)を含む向上補助剤を含む。

【0527】

【表7】

表7. 研究設計

群	系統	免疫原及び補助剤
1	C57Bl/6またはBalb/C	PSM(10 μ g)+AbiSCO-100(12 μ g)+ODN-2395(50 μ g)
2	C57Bl/6またはBalb/C	PSM(10 μ g)またはOSM+AbiSCO-100(12 μ g)+ODN-2395(50 μ g)
3	C57Bl/6またはBalb/C	消化されたPSM(10 μ g)+AbiSCO-100(12 μ g)+ODN-2395(50 μ g)
4	C57Bl/6またはBalb/C	OSM(10 μ g)+AbiSCO-100(12 μ g)+ODN-2395(50 μ g)

マウスを体重及び性別によって個別治療群に配置するために無作為に抽出した。脇下と股周りに皮下(SC)注射でワクチン化した(部位当たり50 μ l、マウス当たり4部位に対して合計200 μ l)。各マウスを試験期間中に皮下注射で0日、14日、28日及び42日目に各4回免疫化した。各マウスを、12 μ g AbiSCO-100及び50 μ g ODN-2395と混合された、10 μ g PSM、消化されたPSMまたはOSM抗原で免疫化した。4回目の皮下注射後に、各マウスを、選択された動物または群によって各マウスの最終免疫化として63、64または70日目に腹腔内(IP)にのみ10 μ g P

S M、消化された P S Mまたは O S Mで免疫化した。詳細な免疫化スケジュールは以下の表に示した。

【0528】

また、各マウスの体重及び健康状態を1週間に2回測定した。研究期間の最後のブースト（すなわち、I Pによる5回目の免疫化）を除き、各免疫化日における免疫化前にすべての動物から血液を採取した。最後の血液試料を51日目に採取した。

【0529】

それぞれの血液を採取する間に、約0.2mlの全血（whole blood）を顔面静脈から採血して血清分離チューブに入れた。次に、このチューブを室温に30分以上放置して凝固させた。次に、血清を同量のアリコートに分けて分析する前まで-80℃で保管した。

【0530】

【表8】

表8. 免疫化スケジュール

群	スケジュール(日)				
	第1次(0日)	第2次(14日)	第3次(28日)	第4次(42日)	第5次(63日または64日または70日)
1	SC、PSM+ 補助剤使用	SC、PSM+補 助剤使用	SC、PSM+補 助剤使用	SC、PSM+補 助剤使用	IP、選択された動物、 PSM、消化されたPSM またはOSM単独(補助 剤なし)
2	SC、PSM+ 補助剤使用	SC、OSM+補 助剤使用	SC、PSM+補 助剤使用	SC、OSM+補 助剤使用	
3	SC、消化さ れたPSM+ 補助剤使用	SC、消化され たPSM+補助 剤使用	SC、消化され たPSM+補助 剤使用	SC、消化され たPSM+補助 剤使用	
4	SC、OSM+ 補助剤使用	SC、OSM+補 助剤使用	SC、OSM+補 助剤使用	SC、OSM+補 助剤使用	

抗S T n血清の力価を、グリカンマイクロアレイで観察された血清プロファイルとともに、ネズミの抗S T n牛顎下腺ムチン（B S M）E L I S A（過ヨウ素酸塩処理または非処理）を用いて測定した。96ウェルプレートに1μg/ウェルB S Mでコーティングして4℃で一晩インキュベーションした。ウェルを0.1M水酸化ナトリウムで処理してB S M抗原のO-アセチル化を取り除いた。ウェルを過ヨウ素酸ナトリウムで処理してS T nの特異的な結合を測定した。過ヨウ素酸塩の処理はシアル酸のC6側鎖を破壊する。従って、S T nに対して生成された抗体は過ヨウ素酸塩処理されたウェルに結合されてはならない。ウェルをP B S 1%オボアルブミン（O V A）でブロッキングした。検定する血清試料をP B S 1%O V Aで連続的に希釈した。商業的に利用可能なマウスの抗S T nモノクローナル抗体である3 F 1（S B H S c i e n c e s、マサチューセッツ州ネイティック所在）を陽性対照群として用いた。この抗体をまた1%O V Aが含有されたP B Sの中に連続的に希釈した。天然の野生型マウスの血清プール（pool）を陰性対照群試料の調製に用いた。H R P接合された抗マウスI g Gヤギポリクローナル抗体（J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h、ペンシルベニア州ウェストグローブ所在）を用いて血清に存在する抗S T n抗体の検出を測定した。硫酸（1.6M）を添加して反応を中断させた。S p e c t r a m a xマイクロプレートリーダー（M o l e c u l a r D e v i c e s、カリフォルニア州サニーベール所在）を用いて490nmで光学密度を測定した。O D値を陰性対照群の光学密度値の平均より2標準偏差の超過で計算されたカッ

トオフ値と比較して血清の力価を得た。平均光学密度の値がカットオフ値より大きい場合、試料試験を陽性とみなした。

【0531】

高い抗STn抗体の力価を有するマウスをハイブリドーマ融合のために選択した。生成されたハイブリドーマを前述のようにBSM ELISAによって選別した（9-Oアセチル化されたSTn変異体間で区別できる抗体を表す過ヨウ素酸塩で処理または非処理）。選択されたハイブリドーマをサブクローニングして、サブクローンをELISA及びフローサイトメトリー分析により追加に特性分析して（前述のように、STnを発現するMDA-MB-231細胞を使用、またはOV90細胞を使用）、このような細胞によって生産された抗体が第1、2、3群または第4群のエピトープに結合できるかどうかを確認した。（図1を参照）。選択された抗体に対して獲得された特性分析データを以下の表に示した。下表において、NBは弱い結合または結合していないことを表し、NDは値が測定されていないことを表す。

【0532】

【表9-1】

表9. 抗STn抗体サブクローンELISA及びフローサイトメトリーの特性分析

クローン	アイソタイプ	BSM ELISA		フローサイトメトリー (MDA - MB - 231 STn+)			フローサイトメトリー (OV90)		
		EC ₅₀ (nM)	ヒルスロープ°	EC ₅₀ (nM)	ヒルスロープ°	高値	EC ₅₀ (nM)	ヒルスロープ°	高値
4D9 - 2D4	IgG1、k	NB	ND	10.8	ND	ND	ND	ND	ND
1A5 - 2C9	IgG3、k	NB	ND	NB	ND	ND	ND	ND	ND
8C2 - 2D6	IgG2a、k	0.4	1.1	2.8	0.9	653	2.8	0.8	1237
7D3 - 2C10	IgG1、k	0.3	0.9	0.6	1.1	211	0.422	0.91	1021
2C6 - 2F11	IgG1、k	0.1	1.7	0.7	1.2	268	11.56	0.35	604
2B2 - 2A7	IgG1、k	NB	ND	0.3	ND	ND	ND	ND	ND
5G2 - 1B3	IgG1、k	0.4	2.7	0.2	1.3	376	1.68	0.79	570
7A5 - 2G12	IgG3、k	0.5	1.3	0.5	1.3	223	3.0	7.0	446
6B11 - 2E3	IgG3、k	0.3	0.5	0.2	1.5	229	0.266	0.89	359
1C11 - 2G9	IgG2a、k	NB	ND	3.3	ND	ND	ND	ND	ND
2G12 - 2B2	IgG2a、k	0.1	0.6	0.3	1.3	489	0.43	0.63	960
9E5 - 1A8	IgG3、k	NB	ND	3.1	ND	ND	ND	ND	ND
10C9 - 2G7	IgG1、k	NB	ND	2.3	ND	ND	ND	ND	ND
2F4 - 1E2	IgG3、k	4.2	9.6	0.36	1.26	144	4.35	0.53	88
2F4 - 1H8	IgG3、k	NB	ND	1.4	ND	ND	ND	ND	ND
2B8 - 2F10	IgG3、k	3.5	ND	5.2	ND	ND	ND	ND	ND
5E6 - 2E7	IgG3、k	5.8	1.1	1.8	1.0	126	1.9	0.8	259
9F11 - 1F7	IgG3、k	4.6	1.0	0.8	0.9	124	1.98	0.89	265
1F6 - 1C10	IgG3、k	0.3	1.2	1.0	0.6	167	0.5	13.0	347
4D9 - 2C11	IgG1、k	NB	ND	2.7	ND	ND	ND	ND	ND

10

20

30

40

50

【 0 5 3 3 】

【表 9 - 2 】

7D4 - 2A2 - 2F2	IgG2a,k	0.7	ND	14.1	ND	ND	ND	ND	ND
7D4 - 1H12 - 2B3	IgG2a,k	1.2	0.9	0.7	1.0	619	0.54	1.13	912
4G8 - 1E3	IgG2a,k	1.0	1.3	0.8	0.8	153	1.0	1.1	221
2C2 - 2C5	IgG3,k	1.1	2.0	1.0	1.1	141	1.08	1.05	342
10F4 - 2A9	IgG3,k	5.1	ND	1.9	ND	ND	ND	ND	ND

10

グリカンアレイの特性分析結果を以下の表に示した。グリカンアレイを分析する間に各抗体に対して獲得された一番高い水準の信号が示され、それぞれの抗体が結合されたグリカン及び各グリカンに対して獲得された信号強度に基づく結果の群及び特異性決定が示されている。実施例 1 の方法によって群を決定した。特異性決定はまた A c 対 G c 構造との結合強度を考慮する。

【 0 5 3 4 】

【表 10】

表 10. 抗 S T n グリカンアレイの特性分析データ

クローン	グリカンアレイ		特異性
	最も高い信号	群	
4D9 - 2D4	700	1	Pan - STn
1A5 - 2C9	5800	1	Pan - STn
8C2 - 2D6	16000	1	Pan - STn
7D3 - 2C10	4000	1	Gc - STn
2C6 - 2F11	1200	1	Pan - STn
2B2 - 2A7	13400	4	Pan - STn及びTn
5G2 - 1B3	14000	4	Pan - STn及びTn
7A5 - 2G12	35000	1	Pan - STn
6B11 - 2E3	25000	1	Pan - STn
1C11 - 2G9	700	1	Gc - STn
2G12 - 2B2	25000	1	Pan - STn
9E5 - 1A8	500	ND	ND
10C9 - 2G7	6000	1	Pan - STn
2F4 - 1E2	25000	4	Pan - STn及びTn
2F4 - 1H8	1900	4	Pan - STn及びTn
2B8 - 2F10	2000	1	Gc - STn
5E6 - 2E7	14000	1	Pan - STn
9F11 - 1F7	16000	1	Gc - STn
1F6 - 1B7	7200	1	Pan - STn
1F6 - 1C10	35000	1	Pan - STn
4D9 - 2C11	1400	1	Pan - STn
7D4 - 2A2 - 2F2	5100	1	Pan - STn
7D4 - 1H12 - 2B3	25000	1	Pan - STn
4G8 - 1E3	35000	1	Pan - STn
2C2 - 2C5	25000	1	Pan - STn
10F4 - 2A9	2400	1	Gc - STn

S T nに結合できる抗体を発現するサブクローンに対してアミノ酸及びヌクレオチド配列を分析した（以下の実施例を参照）。

【0535】

[実施例4：可変ドメイン対]

配列分析されたクローンは以下の表に提示されたアミノ酸の配列を有する可変ドメイン対を生成した。「ND」は配列が決定されていないことを表す。

【0536】

【表 1 1】

表 1 1. 可変ドメイン対

クローン番号	VH、配列番号	VL、配列番号
7D3 - 2C10	15	16
A5 - 2G12	17	18
1A5 - 2C9	19	20
4D9 - 2C11	21	22
2F4 - 1E2	23	24
2F4 - 1H8	23	24
2C6 - 2F11	25	26
2B2 - 2A7	27	28
5G2 - 1B3	29	30
7A6 - 2A2	31	32
10C9 - 2G7	33	ND
1F6 - 1B7(また1F6 - 1C1 0とも称される)	35	36
2G12 - 2B2	37	38
5E6 - 2E7	39	40
9F11 - 1F7	39	40
9E5 - 1A8	41	
10F4 - 2A9	42	32
10F4 - 2F2	42	32
2B8 - 2F10	43	
4G8 - 1E3	44	45
6B11 - 2E3	46	32
8C2 - 2D6	47	32
7D4 - 1H12 - 2B3	48	50
7D4 - 2A2 - 2F2	48	49
2C2 - 2C5	51	52
1C11 - 2G9	ND	34

それぞれの可変ドメインに対する C D R を決定して以下の表に示した。各行は各クロー
ンで確認された 6 つの C D R セットを表す。

【 0 5 3 7 】

【表 1 2 - 1】

表 1 2. CDR配列

クローン番号	CDR - H1	配列番号	CDR - H2	配列番号	CDR - H3	配列番号	CDR - L1	配列番号	CDR - L2	配列番号	CDR - L3	配列番号
7A6 - 2A2	GYTFT DHAIH WV	81	FSPGN DDIK Y	84	SVGY ALD Y	90	ENV VTY	100	GASN RYT	115	GQG YSYP YT	127
2B2 - 2A7	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN GDIK Y	85	KISY YGI	91	EDIY SN	101	KAT NLA D	116	QHF WGT PFT	128
5G2 - 1B3	GYTFT DHAIH WV	81	FSPGN DDIK Y	84	KRSY YGD	92	ENIY SH	102	GAT NLA D	117	QHF WGA PFT	129
4D9 - 2C11	GYTFT DHAIH WV	81	LSPGN DDIK Y	86	KRSI GGD H	93	QNIN VW	103	KASN LHT	118	QGG QSYP FT	130
2F4 - 1E2	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN GDIK Y	85	QRQL GQG Y	94	QSLV HSYG NTY	104	KVSN RFS	119	SQNT HVPY T	131
2F4 - 1H8	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN GDIK Y	85	QRQL GQG Y	94	QSLV HSYG NTY	104	KVSN RFS	119	SQNT HVPY T	131
1A5 - 2C9	GYTFT DHAIH WV	81	VSPG NGDI KY	87	KRSL IGDY	95	QNV GTA	105	SASN RYT	120	QQYS SYRL T	132
1F6 - 1B7	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN GDVK Y	88	KRSL STPY	96	QSL NSGN QKSY	106	WAS TRDS	121	QSDY SYPY T	133
2C2 - 2C5	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN GDIK Y	85	KRSI TTPY	97	QSVN NN	107	YASN RYT	122	QGG YSSP WT	134

【表 1 2 - 2】

2G12 - 2 B2	GYTFT DHAIH WV	81	FSPGN DDIK Y	84	KRSL STPY	96	QSL NRG NHK NY	108	WAS TRES	123	QND YTYP YT	135
2C6 - 2F 11	GYTFS DHAIH WV	82	ISPGN DDIK Y	89	ERSM IGVY	98	QSLV QSNG NTY	109	KVSN RFC	124	SQST HAPL T	136
7D4 - 2 A2 - 2F2	GYIFT DHAIH WV	83	ISPGN GDIK Y	85	KRSL STPY	96	ENV VNY	110	GASN RYS	125	GSK WITS YPYT	137
7D4 - 1 H12 - 2B 3	GYIFT DHAIH WV	83	ISPGN GDIK Y	85	KRSL STPY	96	ENV VNY	110	GASN RYS	125	GAR VTSY PYT	138
7D3 - 2C 10	GYTFT DHAIH WV	81	FSPGN DDIK Y	84	KRSI TTPY	97	QNIN VW	103	KVSN LHT	126	QQD QSYP YT	139
8C2 - 2D 6	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN GDIK Y	85	KRSI TTSY	99	ENV VTY	100	GASN RYT	115	GQG YSYP YT	127
5E6 - 2E 7	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN GDIK Y	85	KRSI TTPY	97	QSL NSGK TKN Y	111	WAS TRES	123	KND YSYP YT	140
9F11 - 1 F7	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN GDIK Y	85	KRSI TTPY	97	QSL NSGK TKN Y	111	WAS TRES	123	KND YSYP YT	140
4G8 - 1E 3	GYIFT DHAIH WV	83	ISPGN GDIK Y	85	KRSI TTSY	99	QHIN FW	112	KASN LHT	118	QQD QSYP YM	141

10

20

30

【表 1 2 - 3】

10F4 - 2 F2	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN GDIK Y	85	KRSI TTSY	99	ENV VTY	100	GASN RYT	115	GQG YSYP YT	127
10F4 - 2 A9	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN GDIK Y	85	KRSI TTSY	99	ENV VTY	100	GASN RYT	115	GQG YSYP YT	127
6B11 - 2 E3	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN DDIK Y	89	KRSI TTSY	99	ENV VTY	100	GASN RYT	115	GQG YSYP YT	127
7A5 - 2 G12	GYTFT DHAIH WV	81	ISPGN DDIK Y	89	KRSI TTSY	99	ENV VIY	113	GASN RYT	115	GQG YSYP YT	127

10

〔実施例 5：抗体内在化のフローサイトメトリー分析の分析〕

抗体内在化の程度を定量化するためにフローサイトメトリー分析を行う。分析のために、高い水準の細胞表面結合された N e u 5 A c - S T n を発現する、M D A - M B - 2 3 1 細胞の安定的に形質移入された変異体 (T A H 3 . P 1 0 クローン) を、弱い遠心分離によってペレット化する前に 1 0 m M E D T A を用いて回収して 1 % B S A を含む P B S で洗浄する。トリパンブルー色素排除試験法により細胞の数及び生存能を測定し、細胞の濃度を 1 % B S A が含有された P B S の中に 5×10^6 細胞 / m l で調整する。5 0 μ l の細胞をアッセイプレートの各ウェルに添加する。細胞を 5 0 μ l の抗体溶液または蛍光性標識の抗体溶液と結合させて 4 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションする。このようなインキュベーションの期間後に細胞を P B S で洗浄して非結合された抗体を取り除き、3 7 $^{\circ}$ C で様々な時間 (1 5 、 3 0 、 6 0 分) の間インキュベーションをするためにアリコートを取り除き、結合された抗体が生理学的に適切な温度で内在化させる。それぞれをインキュベーションした後に、細胞を酸性培地 (1 5 0 m M N a C l 、 p H = 2 . 5) で処理して細胞表面結合された抗体を取り除く。非標識の抗体で処理された細胞を P B S で洗浄し、P B S の中に 3 % パラホルムアルデヒド及び 2 % スクロースを含有するパラホルムアルデヒド固定緩衝液 (P F A) を用いて室温で 1 5 分間固定する。このような細胞を P B S で再びすすいで 1 % ウシ血清アルブミン (B S A) が含有された P B S で製造されたブロッキング緩衝液で処理する。細胞を室温で 3 0 分間インキュベーションして、P B S ですすいで、2 次抗体 (アロフィコシアニン標識のヤギ抗マウス I g G) で室温で 2 時間処理する。次に、すべての細胞を P B S で洗浄して、フローサイトメトリー分析を適用して各試料について 1 0 , 0 0 0 件を記録する。酸処理された試料の中の残留蛍光信号をトリパンブルー染色で処理してさらにクエンチする。

20

30

40

【 0 5 4 0 】

〔実施例 6：細胞生存能検定法による抗体内在化の評価〕

2 次抗体薬物接合体 (2 $^{\circ}$ A D C) の存在及び不在時に本発明の抗 S T n 抗体を選別するために細胞生存能検定を行う。本選別の目的はそれぞれの抗 S T n 抗体が細胞の成長を抑制できるかどうかを確認することである。直接的な抗体薬物接合体 (A D C) を考案するために細胞成長の抑制能を有する抗体を用いる。細胞ベースの細胞傷害検定法でこのような 2 次抗体薬物接合体 (2 $^{\circ}$ A D C) を用いて腫瘍細胞に対する多数の A D C 候補を迅速に事前選別することができる。検定に基づいて、ネイキッド抗体の候補を 2 $^{\circ}$ A D C の存在下で細胞に直接添加する。標的化された抗原を高い密度で発現する細胞内への m A b / 2 $^{\circ}$ A D C 複合体の内在化は、細胞 (例えば、腫瘍細胞) を死滅させる細胞傷害の効果

50

を引き起こし、細胞内で用量依存的な薬物放出を達成できる反面、標的化された抗原を低い密度で発現する細胞（例えば、正常の細胞）は影響を受けない。

【0541】

細胞生存能検定を行うために、本願に記載された細胞株（MDA-MB-231母細胞株、MDA-MB-231-STn+、及びOV-90）を調製して検定のために培養する。96ウェルプレート上で細胞を異なる密度（例えば、ウェル当たり2、000、4、000及び7、500）でプレーティングして96時間の細胞成長を観察することで細胞密度に対して細胞培養を最適化させる。96時間の末期で細胞が約90%のコンフルエンスに達するプレーティング条件を確認した後、最適化された細胞の数を最終生存能検定に使用する。

10

【0542】

2°ADC、例えばFab-MFc-CL-MMAFの存在及び不在時に1つ以上の細胞株で抗体試験を行う。それぞれの抗体候補群を試験するために各細胞株に対して2重複または3重複の細胞プレートを用いる。

【0543】

細胞生存能検定のために、データポイントをそれぞれの抗体候補に対してそれぞれのデータポイントに対して2回重複して収集する。それぞれの抗体候補を0.3pM~20nMの連続濃度で希釈する。一定量のFab-MFc-CL-MMAF（40nM）を生存能検定に用いる。

【0544】

20

あるいは、データポイントをそれぞれの抗体候補に対してそれぞれのデータポイントに対して3回重複して収集した。それぞれの抗体候補を1pM~20nMの連続濃度で希釈した。一定量のFab-MFc-CL-MMAF（40nM）を生存能検定に用いた。

【0545】

Cell-Titer-Glo発光ベース検定法で細胞生存能を測定した。

[実施例7：生体内腫瘍死滅能力の立証]

生体内腫瘍死滅能力をマウス及び／またはヒトの腫瘍細胞株を用いて立証する。STn標的を発現する腫瘍細胞株をマウス内に送達して、抗体候補が生成された腫瘍を死滅させる能力を測定する。

【0546】

30

生体内腫瘍死滅検定法で用いられるマウスの細胞株はC57BL/6マウスから由来し、ST6（アルファ-N-アセチル-ノイラミニル-2、3-ベータ-ガラクトシル-1、3）-N-アセチルガラクトサミニドアルファ-2、6-シアル酸転移酵素1（ST6GalNAc1）で安定的に形質移入された大腸腺癌細胞株MC38を含む。このような細胞に、同系の（syngeneic）Cmah-/-マウスを用いる生体内腫瘍死滅検定を使用する前に、シアル酸（標的によってNeu5Ac及び／またはNeu5Gc）を供給する。

【0547】

あるいは、生体内腫瘍死滅検定のために、高レベルのSTnを発現するように誘導されたヒトの乳癌細胞株（T47-D、MCF-7またはMDA-MB-231）を免疫欠乏FOXN1-/-（ヌード）細胞、非肥満性糖尿病（NOD）細胞、または重症複合免疫不全症（SCID）マウス内に移入する。

40

【0548】

生体内ADCCはヒト末梢血単核細胞（PBMC）または精製されたナチュラルキラー（NK）細胞の受け身移入（passive transfer）によって誘導される。候補抗体が野生型マウス組織に非特異的に結合する場合、免疫欠乏マウスはCmah-/-背景に交配される。

【0549】

[実施例8：ファージライブラリーの構築及び選別]

免疫化に対して強い免疫反応を有するマウスから回収された脾臓からRNAを調製する

50

。マウスの可変（V）領域をPCRで増幅してs c F v発現構造体内にアSEMBルする。S c F v配列をファージミドディスプレイベクター内にクローニングしてM13ファージ粒子の表面上にs c F vディスプレイを可能にする。生成されたライブラリーをE. coli（TG1）内に形質転換させる。大量のE. coli形質転換体を培養してファージ構造（recue）によりファージを調製する。1次選別段階で、PEG沈殿によって培養培地からファージを精製する。

【0550】

S c F v候補を陰性及び陽性選別方法を用いて選別する。陰性選別で、ライブラリーを「破壊された」STn陰性ムチン（例えば、化学的に処理されたPSM）とともにインキュベーションする。陽性選別で、ライブラリーをNeu5AcまたはNeu5Gc（目的とする標的に応じて）の存在下にGcSTnムチン（例えば、PSM及び／または脱-O-アセチル化されたBSM）、AcSTnムチン（例えば、OSM及び／または脱-O-アセチル化されたBSM）またはBSM（及び／または脱-O-アセチル化されたBSM）及び合成グリカン（Neu5Gc及び／またはNeu5Ac）とともにインキュベーションする。

10

【0551】

減少された抗原濃度で3～4回選別した後、合成及び天然グリカン標的を用いてSTn（例えば、Neu5Ac及び／またはNeu5Gc）に対する結合について、ELISAにより1000個のクローンを分析する。GcSTnまたはAcSTnの「誘導」に関係なくジャークット（Jurkat）細胞を用いてGcSTn及び／またはAcSTnに対する結合について、2次フローサイトメトリーベースの細胞検定でリードファージ／s c F v候補の試験を行う。20個以下に選別された関心のあるs c F v候補を追加に分析する。

20

【0552】

IgGへの転換のためにリードs c F v候補を選別する。それぞれのs c F v可変領域を哺乳類発現ベクターの上流CMVプロモーターと下流免疫グロブリンの定常領域の間でクローニングする。重鎖ベクターはネズミIgG1及びκ定常領域を含む。ベクターをHEK293／EBNA細胞に一時的に形質移入させる。抗体試料を精製して陽性及び陰性グリカンエピトープに対する結合により特性を分析する。0.5mg以下の全体のIgGそれぞれの試料を追加に分析する。

30

【0553】

[実施例9：抗体依存性細胞媒介細胞傷害の最適化]

選別されたIgGの可変領域をコードする遺伝子を、Fc-受容体結合及び抗体依存性細胞媒介細胞傷害（ADCC）を向上させると知られているアミノ酸突然変異を含むヒトFc領域（huIgG1κ）をコードする哺乳類の発現ベクター内にクローニングする。ベクターをHEK293／EBNA細胞内に一時的に形質移入させる。2～7日後に、IgG発現を定量化して抗体試料をProtein Aカラム上で精製する。次に、抗体をADCC検定で試験する。Neu5Gc及びNeu5Ac発現ジャークット細胞株を標的細胞として用いて、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）をエフェクター細胞の供給源として用いる。多層壁プレートフォーマット検定に使用するための最適な細胞密度を決定するために、最大の細胞溶解を用いて標的細胞を滴定する。非突然変異IgGとともにADCC突然変異された抗体を標的細胞とともに事前にインキュベーションした後、エフェクター細胞を、様々な標的：エフェクター細胞比率で添加して、培養物を37℃でインキュベーションする。Calcein-AM染料（BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ所在）の放出を用いて生存能パーセントを測定する。0.5mg以下のADCC突然変異されたIgG試料を追加に分析する。

40

【0554】

[実施例10：半安定HEK細胞株からリード抗体の生産]

IgGの可変領域を哺乳類の発現ベクターの上流CMVプロモーターと下流免疫グロブリンの定常領域の間にクローニングする。重鎖ベクターはネズミのIgG1及びκ定常領

50

域を含む。ベクターをHEK293/EBNA細胞内に一時的に形質移入させ、抗体価を72時間目に評価する。半安定発現システムを確立するために、一時的に形質移入されたHEK293/EBNA細胞をハイグロマイシンで選別する。半安定細胞を10リットルに拡張する。Protein Aにより培養上清液から抗体を精製し、PBS内に透析して、生成された沈殿物を(1)サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)による凝集物、(2)リムルスアメーバ様細胞溶解物(Limulus amoebocyte lysate、LAL)試験による内毒素水準(EU/mgで表現される)、及び(3)1次検定における抗原に対する結合について分析する。

【0555】

[実施例11: scFv候補を標的親和性に対して選別するための追加検定]

10

多様な提案された標的を使用してSTn(pan-STn、AcSTn及び/またはGcSTn)の親和性に対して追加の選別方法をscFv候補に適用した。

【0556】

[合成グリカン標的の選別]

本願において使用されたように、用語「標的選別」はその物質に対する結合パートナーを確認するために標的物質を用いることを称する。ビオチンタグがあるポリ(アクリル酸)(PAA)に結合する目的とするSTn標的抗原を用いて合成グリカンの標的選別を行う。目的とするSTn標的抗原及びビオチンタグがあるPAAに結合されたTnを陰性対照群として用いる。候補scFvと結合された細胞をアビジン結合実体を用いる沈殿を介して単離する。

20

【0557】

[生きている細胞上における天然グリカンの標的選別]

シアル酸(目的とする抗体標的によってNeu5Gc及び/またはNeu5Ac)が供給されたジャーカット細胞、または陰性対照群として代案的な形態のシアル酸(目的とする抗体標的によってNeu5Gc及び/またはNeu5Ac)が供給されたジャーカット細胞を用いて、生きている細胞を用いる標的選別を行う。シアル酸(目的とする抗体標的によってまたは陰性対照群の選別に使用されるかどうかによってNeu5Gc及び/またはNeu5Ac)が提供されて安定的に形質移入されたMCF-7またはMDA-MB-231細胞を用いて、生きている細胞を用いる標的選別をまた行う。フローサイトメトリ分析をscFv候補と結合された細胞を単離する場合に用いる。

30

【0558】

[組織上における(生体外)天然グリカンの標的選別]

生検組織試料を用いて生体外組織を使用する標的選別を行う。scFv候補と生体外組織の結合を標準免疫組織化学法を使用して分析する。単一組織の切片及び組織マイクロアレイの切片を用いる。対照群実験で試料をシアリダーゼ及び/または過ヨウ素酸塩で処理するかまたは処理しない。

【0559】

[実施例12: 抗体のヒト化]

完全にヒト化された重鎖及び軽鎖を本願に提示されたCDRで考案する。鋳型として既存の抗体構造を使用して可変領域のタンパク質モデルを生成する。出発重鎖及び軽鎖の可変領域アミノ酸配列のセグメントを完全にヒト化された配列にできる限り含めるためにヒトの配列と比較する。T細胞のエピトープを回避する目的を有するように一連のヒト化された重鎖及び軽鎖の可変領域をヒトの可変領域配列のセグメントから完全に考案する。インシリコ(in silico)技術により決定された潜在的なT細胞エピトープの顕著な発生を有する変異体ヒト配列のセグメントを廃棄する。

40

【0560】

全長遺伝子内にアセンブルされた重複オリゴヌクレオチドからヒト化された重鎖及び軽鎖可変領域の遺伝子をリガーゼ連鎖反応(LCR)を用いて構築する。LCR産物を増幅し、クローニングのために適切に制限部位を発現ベクター内に追加する。PCR産物を中間ベクター内にクローニングして配列分析で確認する。

50

【0561】

ヒト定常領域を有する完全にヒト化された抗体をコードする発現プラスミドを構築するために、哺乳類発現ベクターの上流サイトメガロウイルス極初期プロモーター／エンハンサー（CMV IE）及び免疫グロブリンシグナル配列と下流免疫グロブリン定常領域の遺伝子との間に、それぞれの可変領域のためのDNA配列を挿入する。哺乳類細胞への形質移入のためのDNA試料を調製する。

【0562】

細胞株生産及びリードの完全にヒト化された抗体の選別のために、重鎖及び軽鎖プラスミドDNA対を哺乳類細胞（NS0）内に形質移入させる。ヒト化された抗体を生産する細胞株を拡張して抗体試料を精製する。1次及び2次結合検定で抗体を試験してリード抗体候補を決定する。3つのリード候補を追加の分析で用いる。

10

【0563】

[実施例13：免疫原性試験]

健康なボランティアドナーから少なくとも20個の血液試料を使用して、リード抗体に対してEpiScreen（Antitope、アリゾナ州パラダイスバレー所在）全抗体ヒトT細胞検定を適用する。リード抗体の免疫原性を出発抗体可変領域及びマッピングされたヒト定常領域を有する対照群キメラ抗体と比較する。臨床段階の生物学のために、EpiScreen全体のタンパク質データに対してデータをベンチマークする。

【0564】

[実施例14：細胞株の開発]

CMAH遺伝子にノックダウンに起因して非ヒト糖化がない高レベルの抗体を生産できる能力を有する細胞株を開発する。細胞株を糖化操作してADCCを増加させる。このような細胞株は小規模の生産及び大規模の生産を行う能力を有する。

20

【0565】

[実施例15：STn陽性腫瘍細胞の免疫寛容の抗体依存性の抑制]

本発明の抗STn抗体をSTnグリカンを含む腫瘍細胞及び組織に接触させるために提供し、使用する。STn腫瘍細胞の免疫依存性標的化が増加する。

【0566】

[実施例16：抗STn抗体を用いた免疫寛容腫瘍の治療]

腫瘍細胞及びこの周辺に発現されたSTnグリカンを有する対象を本発明の抗STn抗体で処理する。対象の腫瘍細胞の免疫寛容が減少する。

30

【0567】

[実施例17：S3F抗体の製造]

3F1 IgG1可変ドメイン（SBH Biosciences、マサチューセッツ州ネイティック所在）をIgG2抗体の抗体定常ドメイン領域と結合させてS3F IgG2a抗体を製造した。3F1の重鎖及び軽鎖可変ドメインを配列分析して、IgG2発現ベクター、抗体重鎖に対するプラスミドH1206（LakePharma、カリフォルニア州ベルモント所在）及び抗体軽鎖に対するプラスミドL1206（LakePharma、カリフォルニア州ベルモント所在）、の上流に3F1可変ドメインをコードする構造体を製作した。関連の配列を以下の表に示した。

40

【0568】

【表 1 3】

表 1 3. S 3 F I g G 2 抗体製造に用いられた配列

説明	配列番号
3 F 1 V H ドメイン	5 3
3 F 1 V L ドメイン	5 4
I g G 2 a 重鎖定常ドメイン	2 3 4
カッパ軽鎖定常ドメイン	2 3 5
S 3 F 全長重鎖	2 3 6
S 3 F 全長軽鎖	2 3 8
S 3 F 全長重鎖ヌクレオチド配列	2 3 7
S 3 F 全長軽鎖ヌクレオチド配列	2 3 9

S 3 F I g G 2 a 抗体を発現する安定した細胞株を生成するために、S 3 F の全長重鎖アミノ酸の配列をコードするプラスミド及び S 3 F の全長軽鎖アミノ酸の配列をコードするプラスミドをチャイニーズハムスター卵巣 K 1 (C H O - K 1) 細胞に形質移入させた。この細胞を 3 7 °C の加湿された 5 % C O 2 インキュベーターで L - グルタミンが補充された化学的に解明された培地 (C D - C H O、I n v i t r o g e n、カリフォルニア州カールズバッド所在) で培養した。

【0 5 6 9】

対数期の成長で、S 3 F の全長重鎖及び軽鎖をコードするプラスミドの総 8 0 μ g で電気穿孔法 (M a x C y t e) によって約 8 千万個の懸濁 C H O 細胞を形質移入させた。2 4 時間後に、形質移入された細胞を抗体遺伝子の安定した組み込みについて選別した。選別過程の間に、細胞をスピンドウンし、プール (p o o l) がこの成長速度及び生存能を回復するまで 2 ~ 3 日ごとに新鮮な選別培地で再懸濁させた。細胞を成長、力価及び抗体発現構造体の安定した統合に対してモニタリングした。倍增率 (d o u b l i n g r a t e) は 2 0 時間であった。

【0 5 7 0】

安定的に形質移入された細胞を用いて 2 つの小規模の生産規模の拡張を行った。この細胞を O p t i C H O C D 成長培地 (I n v i t r o g e n) で生産するために生産規模を拡張した。生成物は約 1 2 m g / L の力価で生産された。倍增率は 2 0 時間だった。一時的な形質移入の生産遂行から回収された条件化された培地の上澄液を遠心分離スピニングによって浄化した。タンパク質を P r o t e i n A のカラム上に移して 2 つの異なる緩衝剤 (クエン酸緩衝液及び H E P E S 緩衝液) を用いて溶離させた。0 . 2 μ m の膜フィルタを用いて濾過を行った。サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) を 2 つの配合物に対して行った (下表を参照)。

【0 5 7 1】

【表 1 4】

表 1 4. S E C データ

緩衝液	結果
2 0 m M クエン酸 (p H 5. 5) + 1 5 0 m M N a C l	純度 9 1. 4 %、凝集 3. 4 %
2 0 0 m M H E P E S (p H 7) + 0. 2 % アセテート	純度 9 6. 2 %、凝集 3. 8 %

10

安定した細胞株を大量生産するために培養して、1 0 L の培養物を生産した。安定した細胞プールの生産遂行から回収された条件化された培地を遠心分離して 0. 2 μ m 膜の濾過によって浄化した。抗体を P r o t e i n A 親和性クロマトグラフィーを用いて精製した後、0. 2 μ m 膜フィルタに通過して滅菌させ、微粒子を取り除いた。低い内毒素精製及び濾過後に、濃度を 5 m g / m L に設定して 1 2 0 m g の S 3 F 抗体を回収した。

【0 5 7 2】

[実施例 1 8 : 抗 S T n 抗体を用いた S T n 抗原の発現水準による癌腫癌幹細胞株及び C S C 下位分画の特性分析]

20

C S C を根絶するための本発明の独特の免疫療法アプローチの可能性を試験するために、ヒト卵巣癌腫細胞株及びこれに係る C S C 下位分画 (s u b f r a c t i o n) を標的細胞集団として使用する。

【0 5 7 3】

このような確認された細胞株から適切な卵巣癌腫細胞株及び C S C 下位分画を確認するために、抗 S T n 抗体効能の追加的な試験管内分析のために、S K O V 3、O V C A R 3、O V C A R 4、O V 9 0 及び A 2 8 7 0 を含む異なるヒト卵巣癌細胞株をフローサイトメトリー分析によって卵巣 C S C バイオマーカーである C D 4 4 及び C D 1 3 3 の発現に対して分析する。次に、特異的な抗 S T n 抗体、例えば、抗 S T n 抗体 S 3 F 及び組換え 1 8 D 2 p a n 抗 S T n I g G 2 a m A b [R 1 8 D 2 ; 国際公開第 W O 2 0 1 5 / 0 5 4 6 0 0 号 (この内容はすべて参照により本願に組み込まれる)] に開示された 1 8 D 2 の I g G 2 a バージョン (I g G 2 b である)] を用いて細胞表面 S T n 抗原の同時発現水準に対して、C D 4 4 及び / または C D 1 3 3 陽性 / 発現された卵巣 C S C 下位分画を追加に試験する。強い抗 S T n 染色を表す C S C 下位分画をセルソーティングによって精製して幹細胞特性に対して追加に試験する。選別された C S C 下位分画を連続的なコロニー形成移植検定法を行って「幹様」特性に対して試験する。次に優れたコロニー形成能を表す S T n + 下位分画を効能実験のために確認する。コロニー形成検定法以外に、細胞周期及び耐化学性もまた分析する。

30

【0 5 7 4】

40

これを検証するために、卵巣癌で C S C が豊富であることで知られている表面マーカー (C D 4 4、C D 1 3 3) に基づいて卵巣癌細胞株から C S C 分画を単離する。5 つの異なる卵巣癌細胞株 (S K O V 3、O V 9 0、O V C A R 3、O V C A R 4、及び A 2 8 7 0) を用いる。O V 9 0、O V C A R 4、及び O V C A R 3 のみが一部の幹様特性の様相を表す C D 1 3 3 発現及び / または C D 4 4 発現細胞の下位分画を有している。このような卵巣癌細胞株を F l o w J o ソフトウェアを使用して多重戦略を介して分類してフローサイトメトリー分析 (A r i a を介して) を適用する。

【0 5 7 5】

C D 4 4 及び / または C D 1 3 3 を発現する C S C 下位分画で S T n の発現を特性分析するために、母細胞株のフローサイトメトリー分析を C D 4 4 及び C D 1 3 3 に蛍光団接

50

合された抗体 (Miltenyl Biotech、マサチューセッツ州ケンブリッジ所在) とともに使用してこのようなマーカーのうち1つまたは2つの両方を発現する下位分画のみならず、このようなマーカーのうちいずれも発現しない分画を調製する。次に、標準方法を用いてこのような下位分画のSTn標識水準を決定するために蛍光団接合されたmAb S3Fを用いる。最適の細胞結合条件を確立するために時間経過実験により接合されたS3Fの様々な濃度を試験する。適切な蛍光団接合されたアイソタイプマッチングされた抗体を背景染色を確立するための対照群として用いる。標識の細胞をPBS緩衝液に再懸濁させ、BD FACS Aria器具及びFlowJo 7.6.5 ソフトウェア (TreeStar、オレゴン州アシュランド所在) を使用してフローサイトメトリ分析を行う。

10

【0576】

結果的に、STnを同時発現する観点から卵巣CSCのCD44/133で定義された下位分画を特性化するためにこのような分析を使用する。

また、前述された同一の細胞株をSTn+及びSTn-細胞分画に基づいてFACS分類を行っており、次にCD44及びCD133の発現に基づいて2次分類を行う。このような8個の下位分画をコロニー形成検定にシーディングする。幹細胞は稀に複製されて制限された数の娘細胞のみを生成して結局大量の腫瘍細胞集団を生成することで広く知られている。このような特性は幹細胞を確認して追跡するのに広く利用されている。3~4週間コロニーが形成されるようにした後、PBSの中の1mg/ml ニトロブルーテトラゾリウムクロライドで一晩染色した後、顕微鏡下で計数する。コロニーの数をプレーティングされた細胞の総数で割ってから100をかけてコロニー形成効率を算出した。

20

【0577】

Padler-Karavani など (Padler-Karavani など、Cancer research、2011、71、3352-3363 と、Friel など、Cell cycle、2008、7、242-249) に記載されたように試験管内の連続的な移植方法を行う。ノーブルアガー基層 (Noble agar underlayer) が含有された培養プレートを使用して分類された細胞の下位分画をノーブルアガー重複層に 1×10^4 のシーディング密度でシーディングする。37℃で加湿された5% CO₂ 環境で培養物をインキュベーションする。培養後の約4週後に、細胞をPBSの中の1mg/ml ニトロブルーテトラゾリウムクロライドで一晩染色してから顕微鏡下で計数し、前述のように再びプレーティングする。試験管内で連続的な移植をいくつかの継代の間に継続する (個別細胞株の特性によって)。STnを同時発現するCD44+及び/またはCD133+細胞はCD44-/CD133-/STn-、CD44+/CD133-/STn-、CD44+/CD133+/STn-、CD44-/CD133+/STn-、及びCD44-/CD133-/STn+細胞の下位分画に比べて向上されたコロニー形成の利点を表す。

30

【0578】

追加の細胞株を、PCRを用いてこれらのSTn合成の潜在力に対して分析して、これの生合成を担うと知られている唯一の酵素、すなわち、シアル酸転移酵素ST6GalNAc I の発現を測定する。初期に培養された凍結、分類された下位分画からRNAを単離して定量的なPCRの前に標準方法によってcDNAを調製する。一連のハウスキーピング (housekeeping) 遺伝子 (例えば、PUM1、RPLP0、ACTB) を先に試験して内部基準として使用するにはどちらがより適切であるか (すなわち、どちらが細胞の下位分画で最も均質に発現されるか) を決定する。次に、このような方法でこれらの効率が検証されたPCRプローブセットを使用してST6GalNAc I の発現を測定する。それぞれの分画を、バクテリアプラスミドに挿入されたST6GalNAc I cDNAを含めて陽性対照群、及び記述 (Julien など、Glycoconjugate journal、2001、18、883-893) されたようなST6GalNAc I cDNAで安定的に形質移入された乳癌細胞からの総RNAと追加に比較する。ST6GalNAc I mRNAの水準に基づいて、細胞表面STnが発現さ

40

50

れるように培養条件を操作して追加分析のための研究を行う。

【0579】

3つのCD44/CD133の陽性卵巣癌腫CSCのフローサイトメトリー分析によって決定される多様なCSC下位分画でSTn発現水準を定義するために研究を使用する。追加に、連続的な移植コロニー形成検定を行って、このような3つの系統からのCSC下位分画の特徴的な幹細胞様特性を比較する。STn発現水準及びSTn+下位分画のコロニー形成能に基づいて、3つの卵巣細胞株のうち2つを試験管内及び生体内機能検定のために選択する。

【0580】

[実施例19：試験管内におけるネズミ抗STn mAbの抗CSC活性の決定]

10

試験管内でSTn+下位分画の増殖能及び抗STn mAb（例えば、S3F）の抗CSC活性を試験する。一連の試験管内実験を行って幹細胞増殖でmAb処理影響及びCSC下位分画及び母細胞株のADC誘導された死滅影響を分析した。適切な検定法において、抗STn mAbを標準治療化学療法剤（例えば、カルボプラチン、パクリタキセル）と併用する。

【0581】

CSC下位分画で抗STn抗体S3Fの影響を測定するために使用される後続検定を最適化するために、記述(Frielなど、Cell cycle、2008、7、242-249)されたように増殖検定を必ず行う。2つの選択された卵巣癌腫細胞株それぞれからの可能な8つの分類されたCSC下位分画の組み合わせと2つの母系からの細胞とを24ウェル培養プレートに3重複で(5×10^3 細胞/ウェルで開始して希釈)シーディングする。1、3、5、7、8、及び9日目、または必要な場合それ以上の日にトリパンブルー色素排除によって決定されるように、MTT検定を介して血球計算板及びまたはプレートリーダーを使用して生存細胞を計数する。スチューデントのt検定を用いて群を比較しており、0.05以下のp値を有する比較は有意であるとみなす。このような結果に基づいて、細胞傷害検定を行うための副次的なプロトコルを設ける。

20

【0582】

細胞傷害検定を行って、S3F mAbのみ、S3F+パクリタキセル+カルボプラチン、または、これら化学療法剤混合物のみに対する、各細胞株からの8つのSTn+及びSTn-分類された下位分画、及び母系からの細胞の感受性を評価する。S3F（対照群として、無関係のアイソタイプマッチングされた抗体とともに）を0.1 μ Mから開始していくつかの希釈で試験する。化学療法剤を0.1、1.0、10、及び100 nMで使用する。適切なビヒクル対照群もまた含み、検定は前述(Frielなど、Cell cycle、2008、7、242-249)のように必ず行う。分類されたCSC下位分画を24ウェル培養プレートに細胞増殖検定で決定された細胞の数で3重複でシーディングし、50%のコンフルエンスに到達するようにする。次に、細胞に抑制剤を添加してから24時間飢餓状態にする。細胞生存能を前述のように2、4及び5日目及び必要な場合はそれ以上の日に測定する。スチューデントのt検定を用いて群を比較して、0.05以下のp値を有する比較は有意であるとみなす。

30

【0583】

40

CSCマーカー定義された下位分画(CD44、CD133、及びSTn)のすべての可能な組み合わせ、及び母細胞株の増殖能を評価してこのような細胞で抗STn抗体(+/-標準化学療法)の効能を評価するためのプロトコルを確立するために測定して使用する。幹細胞マーカー陽性細胞は母系及びCSC抗原に対して陰性である下位分画と比較して減少された増殖能を有する。ADCフォーマットのS3F(+/-標準化学療法)の抗CSC効能とこの作用メカニズムを決定する。

【0584】

[実施例20：生体内におけるネズミ抗STnの抗CSCの活性決定]

ネズミSTn抗体がCSCを標的化した結果として生体内で抗腫瘍活性を有するかの可否を決定するために、マウスで生体内毒性学及び薬理学実験を行う。NOD/SCIDマ

50

ウスでCSC下位分画の成長条件を確立して分析する。抗STn抗体を化学療法剤と接合体としてマウスに投与して、処理されたマウスをマウス観察及び体重を介して毒性効能に対して試験する。

【0585】

対応する量の連続的に希釈された陽性及び陰性の下位分画細胞（すなわち、 1×10^5 、 1×10^4 、及び 1×10^3 ／マウス、2～8マウス／群）をNOD／SCIDマウスに皮下（s.c.）注射してこれらの潜在的腫瘍の生成を比較する。腫瘍細胞を注射した後、マウスを腫瘍形成及び一般的な健康の証拠に対して毎日モニタリングする。処理のために、次の4つ以下の供給源からマウスで腫瘍を生成させる。（1）1次卵巢腫瘍と、（2）NOD／SCIDマウスに以前に確立した腫瘍と、（3）低温保存された異種移植腫瘍組織と、または（4）CD133／STn発現に基づいたヒト卵巢癌細胞株または単離された細胞株の下位分画。それぞれの腫瘍類型に対して十分な数のマウスに200～300mm³体積の腫瘍を有するようにした後、マウスを4つの群（n＝8～14匹マウス／群）に無作為抽出して平均群の腫瘍容積が必ず同等になるようにする。第1群は単一アイソタイプ抗体の対照群である200μlビヒクルのうちIgG-MMAE（1～5mg／kg）を毎週1回腹腔内（i.p.）投与し、第2群は200μlビヒクルのうちS3F-MMAE（1～5mg／kg）を毎週1回腹腔内（i.p.）投与し、第3群は200μlビヒクルのうちSIA101-MMAE（1～5mg／kg）を腹腔内注射を介して毎週1回腹腔内（i.p.）投与し、第4群はビヒクルを毎週腹腔内投与する。

【0586】

次に、腫瘍をカリパスで毎週2回測定する〔腫瘍容積＝（Lmm×Wmm×Lmm）／2〕。同時に、マウスを周期的に観察して毎週2回体重を測定して潜在的な毒性効能を評価した。過度な腫瘍負荷を有しているマウスまたは瀕死状態のマウスを安楽死させる。対になっていない試料に対してノンパラメトリックなウィルコクソンの順位和検定を用いて相互異なる部分の腫瘍容積を比較する。

【0587】

S3F-MMAEはCSC腫瘍の成長を遅延させるかまたは根絶させ、卵巢癌に用いられる化学療法剤と併用してmAbの効能を増加させる。

〔実施例21：ADC抗体の試験管内試験〕

S3F、8C2-2D6、2G12-2B2、4G8-1E3及び5G2-1B3抗体をマレイミドカプロイル-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル-モノメチルアウリスタチンE（MC-vc-PAB-MMAE）と接合させた。まず、TCEPで抗体鎖間ジスルフィド結合を還元させた後、薬物のマレイミド部分構造を還元されたシステインと連結させることで接合を行った。接合された抗体をSephadex G50カラム上で脱塩させて残留非反応毒素を取り除いた後、150mM NaClが含まれたpH7.7の30mM HEPESで透析した。248及び280nmでUV吸光度値の比を用いて各接合された抗体に対する薬物抗体比（DAR）を測定した（A₂₄₈及びA₂₈₀、それぞれ下表を参照）。

【0588】

【表 1 5】

表 1 5. MMAE 接合された抗体

抗体	A ₂₄₈ /A ₂₈₀ 比率	薬物：抗体比率
S 3 F	0. 7 3	4. 6
8 C 2 - 2 D 6	0. 7 5	4. 8
2 G 1 2 - 2 B 2	0. 7 3	4. 6
4 G 8 - 1 E 3	0. 7 3	4. 5
5 G 2 - 1 B 3	0. 6 2	3

10

抗体調製物をサイズ排除クロマトグラフィーで分析して純粋な単量体の存在を確認した。

次に、接合された抗体をこれらが S T n を発現する細胞を死滅させる能力に対して試験した。S T n 表面発現があるかまたはない M D A - M B - 2 3 1 細胞を培養した。M D A S T n 陰性細胞を 1 0 % F B S、1 x ペニシリン／ストレプトマイシン及び 4 5 u g / m l ゲンタマイシンが補充された E M E M で成長させた。M D A S T n 陽性細胞を抗生剤選別のために 1 m g / m l の G 4 1 8 を添加したことを除いては同一の培地で成長させた。前述の適切な培地を使用して 9 6 ウェルプレートに細胞を別途シーディングした（4、0 0 0 細胞／ウェル S T n 陰性または 2、0 0 0 / ウェル S T n 陽性）。細胞を一晩成長させた。1 6 ~ 2 0 時間後に、細胞を試験抗体の連続希釈で 3 重複（5 0 n M ~ 0. 0 1 2 n M、培地の中の 1 : 4 連続希釈）して 7 2 時間処理した。処理後、C E L L T I T E R - G L O（登録商標）発光細胞生存能検定による S T n 陰性細胞生存能では有意な減少が観察されていない反面、S T n 陽性細胞培養物のうち接合されたすべての抗体（非 S T n 特異的な対照群接合された抗体を除く）では細胞生存能の減少が観察された。（下表を参照）。

20

【0 5 8 9】

【表 1 6】

30

表 1 6. S T n + M D A 細胞で試験された

MMAE 接合された抗体に対する I C 5 0 の値

抗体	I C 5 0
S 3 F	0. 5 1
8 C 2 - 2 D 6	2. 4 4
2 G 1 2 - 2 B 2	1. 1 9
4 G 8 - 1 E 3	1. 8 0
5 G 2 - 1 B 3	1 1. 1 3
対照群	0. 0

40

試験された接合抗体のうち、S 3 F 抗体が最も低い抑制濃度（I C 5 0）を有していた

50

。2 G 1 2 - 2 B 2、4 G 8 - 1 E 3 及び 8 C 2 - 2 D 6 抗体はすべて一桁のナノモル I C 5 0 を有していた。5 G 2 - 1 B 3 抗体の有効性は 1 0 を超える I C 5 0 を有して最も低かった。これはより低い D A R 及び異なる I g G アイソタイプ（5 G 2 - 1 B 3 は I g G 1 である反面、他のものは I g G 2 a である）に起因するものであるだろう。アイソタイプ対照群接合された抗体は効果が表れなかった。

【0590】

〔実施例 2 2：O V C A R 3 及び S N U - 1 6 細胞株を用いた A D C 試験管内検定〕

上記で行われた実験を O V C A R 3 細胞（適当な水準の S T n を発現するものと示される）または S N U - 1 6 細胞（低い水準の S T n を発現するものと示される）を用いて繰り返した。0. 0 1 % ウシインスリン及び 1 x ペニシリン／ストレプトマイシンが含まれた 1 0 % F B S が含有された R P M I 培地を使用して 9 6 ウェルアッセイプレートに細胞をシーディングした（1 0、0 0 0 細胞／ウェル）。細胞を試験抗体（M M A E 薬物接合体を有するものと及び有しないもの）または無関係な対照群抗体で処理する前に、標準細胞培養の条件で一晩インキュベーションした。細胞を試験抗体の連続希釈で 3 重複処理した（5 0 n M ～ 0. 0 1 2 n M、培地の中で 1：4 連続希釈）。

【0591】

4 日後に、C E L L T I T E R - G L O（登録商標）発光細胞生存能検定により細胞生存能を測定した。以前の検定において、非接合された抗体は細胞生存能に対する効果がなかったが、接合された抗 S T n は投与量が増加するにつれ細胞生存能が減少していた（下表を参照）。

【0592】

【表 1 7】

表 1 7. 試験された抗体に対する I C 5 0 の値

抗体	O V C A R 3 細胞 (I C 5 0、nM)	S N U - 1 6 細胞 (I C 5 0、nM)
S 3 F	0. 7 5	6. 3
8 C 2 - 2 D 6	1 4. 4 5	3 1. 8
2 G 1 2 - 2 B 2	6. 8 2	2 4. 5
4 G 8 - 1 E 3	9. 0 9	2 8. 7
5 G 2 - 1 B 3	1 1. 3	9 6. 3

O V C A R 3 細胞で試験された抗体のうち、接合された S 3 F は最も低い I C 5 0 を有する反面、試験された他の全ての抗体は 5 超の I C 5 0 を有していた。8 C 2 - 2 D 6 及び 5 G 2 - 1 B 3 は 1 0 n M 超の I C 5 0 を有する反面、2 G 1 2 - 2 B 2 及び 4 G 8 - 1 E 3 抗体は単一ナノモル範囲のより好ましい I C 5 0 を有していた。アイソタイプ対照群接合された抗体は効果が表れなかった。

【0593】

類似した結果が S N U - 1 6 細胞で観察されており、接合された S 3 F はより大きい効果を表した。2 G 1 2 - 2 B 2、8 C 2 - 2 D 6 及び 5 G 2 - 1 B 3 はまた S N U - 1 6 細胞を死滅させる強力な能力を表した。

【0594】

〔実施例 2 3：O V C A R 3 結合親和性〕

フローサイトメトリー分析を用いて S 3 F、8 C 2 - 2 D 6、4 G 8 - 1 E 3 及び 2 G 1 2 - 2 B 2 抗体の O V C A R 3 細胞に対する結合試験した。分析のために、細胞を成長させて S t e m P r o A c c u t a s e (L i f e T e c h n o l o g i e s、カリ

フォルニア州カールズバッド所在) を使用して回収し、弱い遠心分離によってペレット化する前に5% FBSが含まれたPBSで洗浄した。トリパンブルー色素排除試験法により細胞の数及び生存能を測定して細胞濃度を5% FBSが含有されたPBSの中の 5×10^6 細胞/mlに調整した。50 μ lの細胞をアッセイプレートの各ウェルに添加した。次に、細胞を試験される抗体または対照群抗体の50 μ l溶液と組み合わせて4℃で1時間インキュベーションした。次に、アロフィコシアニン (APC) と接合された1:1、500希釈の抗マウスIgG (Southern Biotech、アラバマ州バーミングハム所在) を含む5% FBSが含有された100 μ lのPBSで処理する前に、細胞を5% FBSが含有されたPBSで2回洗浄してペレット化した。次に、細胞を洗浄及び5% FBSが含有されたPBSの中に1:1000で希釈された200 μ lのヨウ化プロピジウム (PI) の中に再懸濁させる前に、4℃で30分間インキュベーションした。最後に、処理された細胞に対してフローサイトメトリー分析を適用した。

【0595】

APC蛍光強度の平均を抗体濃度のログに対してプロットしてEC50計算に使用される曲線を生成した。各抗体に対して得られたEC50の値を以下の表に示した。

【0596】

【表18】

表18. OVCAR3結合に効果的な濃度

抗体	EC50
S3F	0.92
8C2-2D6	3.13
2G12-2B2	0.80
4G8-1E3	1.66

全ての抗体は一桁のナノモルEC50の値を有する効果的な結合剤であった。

【0597】

[実施例24: 免疫組織化学法による抗体試験]

S3F、2C2-2C5、5E6-2E7、9F11-1F7、5G2-1B3、4G8-1E3及び8C2-2D6を凍結組織切片、固定された組織切片、及び癌組織マイクロアレイからSTnを検出するこれらの能力に対して試験した。2429-2B2-3B9 (米国公開特許第US2014/0178365号に記載された通りであり、この内容はすべて参照により本願に組み込まれる) をまた試験した。追加に、B72.3抗体 (Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州ウォルサム所在) を陽性対照群として用いた (凍結組織試験を除く)。

【0598】

冷凍組織試料はヒト膵臓癌腫 (Hu14 Neo-1) から由来し、染色は腫瘍細胞、内皮、紡錘細胞及び導管内皮で調べた。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織試料はヒト膵臓癌腫 (Hu3 PA Neo-1) から由来し、染色は腫瘍細胞、脂質 (stroma) 及び内腔 (lumen) で調べた。

【0599】

試験される抗体を用いて組織切片を処理した後、ペルオキシダーゼ標識の2次検出試薬を用いて検出した。組織切片を観察して特異的反応性、特異的反応性を示す細胞の頻度及び特異的反応性の細胞内位置を観察して評価した。

【0600】

染色観測値を以下の表に示した。

【0601】

【表19】

表19. 染色観察に対する略語キー

特異的反応性の強度	特異的反応性を示す細胞頻度	特異的反応性の細胞内位置（適用可能な場合）
0 - 陰性	N - 陰性、反応性なし	M - 膜
1 - 弱い	VR - 非常に稀、このような細胞タイプの5%未満の細胞	C - 細胞質
2 - 若干	R - 稀、このような細胞タイプの5～25%細胞	M>C - より少ない量の細胞質染色を有する膜染色
3 - 中間	O - 時々、このような細胞タイプの26～50%細胞	C>M - より少ない量の膜染色を有する細胞質染色
4 - 強い	F - 頻繁、このような細胞タイプの51～75%細胞	
5 - 非常に強い	VF - 非常に頻繁、このような細胞タイプの76～100%細胞	

10

20

【0602】

【表 20】

表 20. F F P E 組織評価

抗体	濃度	特異的反応性（強度／頻度）		
		Hu3 PA Neo-1 （膵臓癌腫、腫瘍細胞、細胞質＞膜）	脂質（細胞外 基質）	内腔含量
検定対照	0 µg/mL	0/N	0/N	0/N
2C2-2C5	10 µg/mL	3-5/R	1-2/VR	3-5/VR
	1 µg/mL	3-5/VR	1-2/VR	3-5/VR
5E6-2E7	10 µg/mL	1-3/VR	0/N	1-3/VR
	1 µg/mL	1-2/VR	0/N	0/N
9F11-1F7	10 µg/mL	3-5/VR	1/VR	1-2/VR
	1 µg/mL	1-3VR	1/VR	1-2/VR
5G2-1B3	10 µg/mL	2-4/R	1-2/VR	3-5/VF
	1 µg/mL	1-2/VR	0/N	1-3/F
4G8-IE3	10 µg/mL	3-5/O	3-5/VR	4-5/VF
	1 µg/mL	3-5/R	3-5/VR	4-5/R
8C2-2D6	10 µg/mL	3-5/O	3-5/VR	4-5/VF
	1 µg/mL	3-5/O	3-5/VR	4-5/VF
2G12-2B2	10 µg/mL	3-5/O	3-5/VR	4-5/VF
	1 µg/mL	3-5/R	3-5/VR	4-5/R
S3F	10 µg/mL	3-5/O	3-5/VR	4-5/VF
	1 µg/mL	3-5/O	3-5/VR	4-5/VF
2429-2B2-	10 µg/mL	3-5/VR	1/VR	1-3/VR
3B9	1 µg/mL	1-3VR	1/VR	1-3/VR

S 3 F 及び 8 C 2 - 2 D 6 抗体が最も強い染色結果を表した。4 G 8 - I E 3 及び 2 G 1 2 - 2 B 2 がまたより高い濃度（1 µg/mL より高い 10 µg/mL）を使用した場合、強い染色結果を表した。

【0603】

【表 2 1 - 1】

表 2 1. 冷凍組織の評価

抗体	濃度	特異的反応性(強度/頻度)			
		Hu14 PA Neo-1 (膵臓癌腫、腫瘍細胞、細胞質>膜)	内皮 (膜、細胞質)	紡錘型細胞、腫瘍細胞脂質 (細胞質>膜)	導管内皮 (頂端膜、細胞質)
2C2-2C5	10 µg/mL	3-5/O	0/N	0/N	0/N
	1 µg/mL	3-5/O	0/N	0/N	0/N
	検定対照	0/N	0/N	0/N	0/N
5E6-2E7	10 µg/mL	3-5/R	0/N	0/N	0/N
	1 µg/mL	3-5/VR	0/N	0/N	0/N
	検定対照	0/N	0/N	0/N	0/N
9F11-1F7	10 µg/mL	3-5/R	0/N	0/N	0/N
	1 µg/mL	3-5/R	0/N	0/N	0/N
	検定対照	0/N	0/N	0/N	0/N
5G2-1B3	10 µg/mL	3-5/O	0/N	0/N	0/N
	1 µg/mL	3-5/O	0/N	0/N	0/N
	検定対照	0/N	0/N	0/N	0/N
4G8-IE3	10 µg/mL	3-5/F	0/N	1-2/VR	0/N
	1 µg/mL	3-5/O	0/N	1-2/VR	0/N
	検定対照	0/N	0/N	0/N	0/N
8C2-2D6	10 µg/mL	3-5/F	1-2/VR	1-2/R	0/N
	1 µg/mL	3-5/F	0/N	1-2/VR	0/N
	検定対照	0/N	0/N	0/N	0/N
2G12-2B2	10 µg/mL	3-5/F	0/N	1-2/R	0/N
	1 µg/mL	3-5/F	0/N	1-2/VR	0/N
	検定対照	0/N	0/N	0/N	0/N

【0 6 0 4】

【表 2 1 - 2】

S3F	10 µg/mL	4-5/F	2-3/F	1-2/O	1-2
	1 µg/mL	4-5/F	1-2/F	1-2/O	1/VR
	検定対照	0/N	0/N	0/N	0/N
2429-2B2-3 B9	10 µg/mL	3-5/O	0/N	2-3/VR	0/N
	1 µg/mL	2-3/VR	0/N	0/N	0/N
	検定対照	0/N	0/N	0/N	0/N

10

冷凍組織試料で、2 C 2 - 2 C 5、4 G 8 - I E 3、2 G 1 2 - 2 B 2 及び S 3 F は腫瘍細胞で最も強く頻繁な染色を表した。試験された組織で内皮、脂質または導管の全ての抗体はほとんど染色されていなかった。

【0605】

癌組織マイクロアレイの研究で癌性卵巣、肺、膵臓及び膀胱組織で抗体染色を調べた。4 G 8 - I E 3 及び 8 C 2 - 2 D 6 は多数の腫瘍類型に対して最も優秀な全般的な反応性を示しており、正常の組織との反応性が制限的だった。5 G 2 - 1 B 3 及び 5 E 6 - 2 E 7 は正常の組織との低い反応性を有しており、膵臓癌腫と優れた反応性を有している。5 E 6 - 2 E 7 は正常の組織とかなり低い反応性を有し、膵臓腺癌、膀胱での一時的な細胞癌腫、及び卵巣腺癌と若干の反応性を有していた。2 G 1 2 - 2 B 2 は卵巣癌腫、肺癌腫と優れた反応性及び内皮組織と相対的に低い反応性を有していた。

20

【0606】

S 3 F は強い癌腫染色を表したが、内皮細胞では中間程度の染色を表した。このような内皮染色は 2 G 1 2 - 2 B 2 で観察されなかった。このような結果は S 3 F 抗体が対をなしていないシステイン及び／またはより長い C D R - H 3 領域の存在に起因する可能性がある、より広い S T n エピトープを認識することを示唆する。

【0607】

[実施例 2 5：抗体配列の分析]

30

本願に記載された免疫化研究によって生成された抗体に対する多様なドメイン配列を抗体機能、発現、安定性及び／または免疫原性に影響を与える配列の類似性及び特性に対して分析した。

【0608】

C D R 領域で確認された配列分析を以下の表に示した。また、分析の結果、本発明により生成された抗体は重鎖可変ドメインと比較して軽鎖可変ドメインで遥かに可変性が表れることが明らかになった。追加に、当業界に公知の抗 S T n 抗体 [抗体 3 F 1 (S B H S c i e n c e s、マサチューセッツ州ネイティック所在)、抗体 B 7 2 . 3 (C o l c h e r、D. など、1981. P N A S . 7 8 (5) : 3199 - 203を参照)、及び抗体 C C 4 9 (M u r a r o、R. など、1988. C a n c e r R e s . 4 8 : 4 5 8 8 - 9 6を参照)] と共有される生殖細胞遺伝子の1つの生殖細胞遺伝子である m u I G H V 1 S 5 3 から由来した本研究の抗体の重鎖可変ドメインを確認した。このような分析に基づいた重鎖 C D R 配列の比較を以下の表に示した。

40

【0609】

【表 2 2】

表 2 2. CDR 配列重鎖の比較

クローン番号	CDR - H1	配列番号	CDR - H2	配列番号	CDR - H3	配列番号
8C2 - 2 D6	GYTFTDHAI H	143	YISPGNGDIKYNEKFKG	145	SITTSY	152
4G8 - 1 E3	GYIFTDHAI H	144	YISPGNGDIKYNEKFKG	145	SITTSY	152
2G12 - 2 B2	GYTFTDHAI H	143	YFSPGNDDIKYNEKFRG	146	SLSTPY	153
5G2 - 1 B3	GYTFTDHAI H	143	YFSPGNDDIKYNEKFKV	147	SYYG D	154
5E6 - 2 E7	GYTFTDHAI H	143	YISPGNGDIKYNEKFKV	148	SITTPY	155
2C2 - 2 C5	GYTFTDHAI H	143	YISPGNGDIKYNEKFKG	145	SITTPY	155
3F1	GYTFTDHAI H	143	YISPGNGDIKYNEKFKD	149	SLLALDY	156
CC49	GYTFTDHAI H	143	YFSPGNDDFKYNEKFKG	150	SLNMAY	157
B72.3	GYTFTDHAI H	143	YISPGNDDIKYNEKFKG	151	SYYGH	158
一致	GYTFTDHAI H	143	YISPGNGDIKYNEKFKG	145	SITTSY	152

CDR - H3 配列は中間長さに対してプラスまたはマイナス 1 アミノ酸によって多様になっていた。

【0 6 1 0】

興味深いことに、標的特異的な軽鎖は同一の CDR - L2 及び CDR - L3 配列の長さを有している。2つの部類の CDR - L1 配列は持続されて [長い (2G12 - 2B2、5E6 - 2E7 及び CC49) 及び短い (8C2 - 2D6、4G8 - 1E3、5G2 - 1B3、2C2 - 2C5、3F1 及び B72.3)]、潜在的に各部類で統一された位相 (topology) を提示することが明らかになった。軽鎖 CDR 配列の比較を以下の表に示した。

【0 6 1 1】

【表 2 3】

表 2 3. CDR配列軽鎖の比較

クローン番号	CDR - L1	配列 番号	CDR - L2	配列 番号	CDR - L3	配列番 号
8C2 - 2D6	KASENVVTV VS	159	GASNRYT	115	GQGYSPYT	127
4G8 - 1E3	HASQHINFW LS	160	KASNLHT	118	QQDQSYPYM	141
2G12 - 2B2	KSSQSLLNR GNHKNYLT	161	WASTRES	123	QNDYTPYT	135
5G2 - 1B3	RASENIYSH LA	162	GATNLAD	117	QHFWGAPFT	129
5E6 - 2E7	KSSQSLLNS GKTKNYLT	163	WASTRES	123	KNDYSYPYT	140
2C2 - 2C5	KASQSVNN NVA	164	YASNRYT	122	QQGYSSPWT	134
3F1	KASQDVGT NIA	165	SASTRHT	168	QQYSSFPLT	171
CC49	KSSQSLLYS GNQKNYLA	166	WASARES	169	QQYYSYPLT	172
B72.3	RASENIYSN LA	167	AATNLAD	170	QHFWGTPYT	173

まとめると、このような配列分析は特定の軽鎖生殖細胞の対に対応するCDR-H3の多様性の明確なパターンを示唆する。3つの群をこのような対に基づいて確認した。A群は8C2-2D6、4G8-1E3及びS3F抗体を含む。このような抗体はCDR-H3の長さ（余分のアミノ酸を有することでより長いループを形成する）の側面で他の全ての抗体と区別されるS3Fを除いては類似したCDR-H3配列を有している。A群抗体はまた特にCDR残基長で類似性を有する軽鎖CDRを有している。

【0612】

B群は2G12-2B2及びCC49抗体を含む。重鎖配列の類似性の中で、このような抗体はCDR-H2に保存されたF及びD残基及びCDR-H3に保存されたL残基は有している。追加に、B群は非常に類似した軽鎖配列を有している。

【0613】

C群は5G2-1B3及びB72.3抗体を含む。これらの重鎖配列間の類似性の中で、このような抗体はこれらのCDR-H2配列に保存されたD残基及びこれらのCDR-H3配列にYYGモチーフを有している。C群抗体はまた非常に類似した軽鎖配列を有している。

【0614】

確認された限られた数の群は抗STn結合に必要な相対的に珍しい配列の特異性を強調する。抗体群を分けることはエピトープ結合に対する関連群内の配列に基づいた寄与の確認を容易にする。特に、A群内で、S3Fは新しい結合プロファイルに寄与する拡張され

たCDR-H3ループを独自に含有する。興味深いことに、免疫組織化学データはS3Fが内皮細胞に対する目的としない結合を含んでより広い範囲の標的に結合することを表す。

【0615】

[実施例26：抗体変異体]

本願に記載された免疫化研究によって生成された抗体に対する多様なドメイン配列を抗体機能、発現、安定性及び／または免疫原性に影響を与える配列特性について分析した。

【0616】

本研究において生成された多数の抗体はNG残基対を含有するCDR-H2配列を有するためにアスパラギン脱アミド化の影響を受けやすく、時間が経つにつれ3：1の比率でグルタミン酸及びピログルタミン酸に変換される可能性がある。このような配列はこのような部位で脱アミド化を防止するためにNG残基対をSGまたはQG対に転換させる突然変異誘発を適用し得る。あるいは、このような抗体は脱アミド化を減少させるために製剤化される。

【0617】

2B2-2A7及び5G2-1B3抗体はこれらの軽鎖可変ドメインにアスパラギン酸異性化部位(DGアミノ酸残基対で確認される)を有する。このような部位のアスパラギン酸は時間が経つにつれ3：1の比率でグルタミン酸及びピログルタミン酸に転換される。このような配列はこのような部位で異性化を防止するためにDG残基対をSGまたはQGに転換させる突然変異誘発を適用し得る。あるいは、このような抗体は異性化を減少させるために製剤化される。

【0618】

多数の抗体はN末端グルタミン残基を有する重鎖を有している。このような配列はN末端グルタミン残基をグルタミン酸残基に転換させる突然変異誘発を適用し得る。

凝集傾向のあるパッチに対する配列分析の結果、5G2-1B3のCDR-L3でHF Wセグメントが表れ、これは抗体凝集を増加させる多少のリスクがある。凝集傾向の少ない抗体を確認するためにこのようなモチーフの変異体を用いて凝集安定性の研究を行うことができる。

【0619】

[実施例27：癌細胞結合の比較]

フローサイトメトリー分析を用いてS3F、8C2-2D6、4G8-1E3及び2G12-2B2抗体のOVCA R3細胞及びSNU-16細胞に対する結合試験を行った。分析のために、細胞を成長させてStemPro Accutase (Life Technologies、カリフォルニア州カールズバッド所在)を使用して回収して弱い遠心分離によってペレット化する前に5% FBSが含まれたPBSで洗浄した。トリパンブルー色素排除試験法によって細胞の数及び生存能を測定して細胞濃度を5% FBSが含有されたPBSの中の 5×10^6 細胞/mlで調整した。50 µlの細胞をアッセイプレートの各ウェルに添加した。次に、細胞を試験が行われる抗体または対照群抗体の50 µl溶液と組み合わせて4℃で1時間インキュベーションした。次に、アロフィコシアニン(APC)と接合された1：1、500希釈の抗マウスIgG(Southern Biotech、アラバマ州バーミングハム所在)を含む5% FBSが含有された100 µlのPBSで処理する前に、5% FBSが含有されたPBSで細胞を2回洗浄してペレット化した。次に、細胞を洗浄及び5% FBSが含有されたPBSの中で1：1000で希釈された200 µlのヨウ化プロピジウム(PI)の中で再懸濁させる前に、4℃で30分間インキュベーションした。最後に、処理された細胞に対してフローサイトメトリー分析を適用した。

【0620】

陽性結合を有する細胞のパーセントを各細胞類型に対する抗体濃度のログに対してプロットした(図2A及び2Bを参照)。S3F抗体は試験されたすべての濃度で他のSTn抗体と比較して遥かに多い数の細胞に対して結合することと現れ、これは(1)よ

10

20

30

40

50

り広いエピトープまたは（２）特定の細胞類型に対するより乱雑な結合を示唆した。

【０６２１】

次に、平均ＡＰＣ蛍光強度の値を抗体濃度のログに対してプロットして半分の最大結合効率（ＥＣ５０）を観察するのに必要な抗体濃度を決定した。データを以下の表に示した。

【０６２２】

【表２４】

表２４．ＯＶＣＡＲ３及びＳＮＵ－１６細胞に対する抗体結合ＥＣ５０の値

抗体	ＯＶＣＡＲ３結合に対するＥＣ５０（ｎＭ）	ＳＮＵ－１６結合に対するＥＣ５０（ｎＭ）
Ｓ３Ｆ	０．９	６３．９
８Ｃ２－２Ｄ６	３．１	６．３
２Ｇ１２－２Ｂ２	０．８	８．９
４Ｇ８－１Ｅ３	１．７	３２．７

10

この全体データはＳＮＵ－１６細胞がＳＴｎを少なく発現することを示した。興味深いことに、Ａ群抗体（Ｓ３Ｆ及び４Ｇ８－１Ｅ３）はＳＮＵ－１６細胞に対して遥かに弱い結合を表した。

20

【０６２３】

〔実施例２８：拡張された抗体配列分析及び変異体の開発〕

実施例２５による抗体配列分析を行い、ＳＴｎを標的化する更なる抗体を比較する。結果を用いて追加的な配列ベースの傾向及び重鎖及び軽鎖ペアリングパターンを確認する。このような傾向を親和性成熟戦略に対する情報を得るのに使用して結合特性を向上させるための特異的突然変異に基づく抗体断片ディスプレイライブラリーを生成する。

【０６２４】

〔実施例２９：ＳＴＮ／ＣＤ３二重特異的抗体〕

30

ＳＴｎ及びＣＤ３の両方に結合する二重特異的抗体を生成する。このような抗体を用いてＳＴｎ提示癌細胞に結合させてこれをＣＤ３発現細胞傷害細胞に接触させる。

【０６２５】

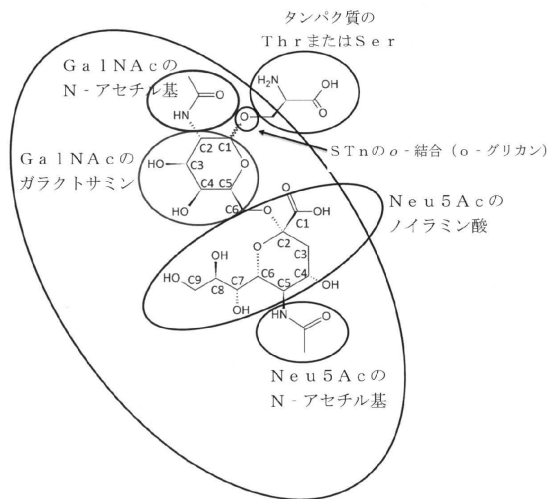
〔実施例３０：異種移植モデルの研究〕

生体内ＡＤＣ抗体を試験するために異種移植モデル研究を行う。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ＳＴｎ＋細胞、ＳＮＵ－１６細胞、ＣＯＬＯ－２０５細胞またはＯＶＡＲ３細胞の注射を介してマウスで腫瘍を誘発する。次に、マウスをＭＭＡＥ接合されたＳ３Ｆ、４Ｇ８－１Ｅ３、２Ｇ１２－２Ｂ２、無関係な対照群抗体またはネイキッド（非接合された）４Ｇ８－１Ｅ３または２Ｇ１２－２Ｂ２抗体対照群で処理する。マウスの体重及び腫瘍容積の変化をモニタリングする。

40

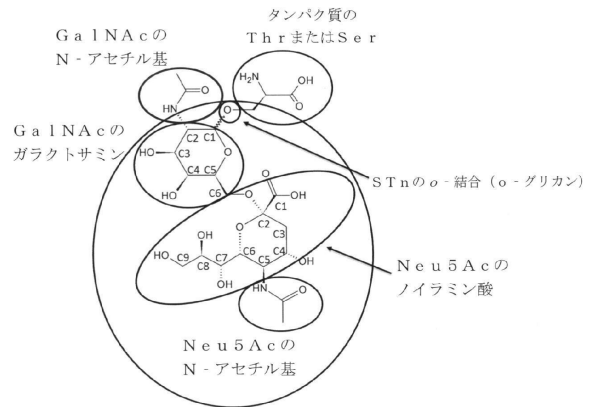
【図 1 A】

STn 結合特異性
(第 1 群)
検出されたエピトープ (一番大きい楕円)



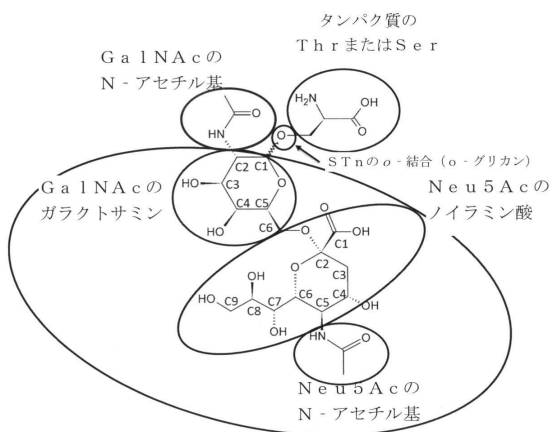
【図 1 B】

STn 結合特異性
(第 2 群)
検出されたエピトープ (一番大きい楕円)



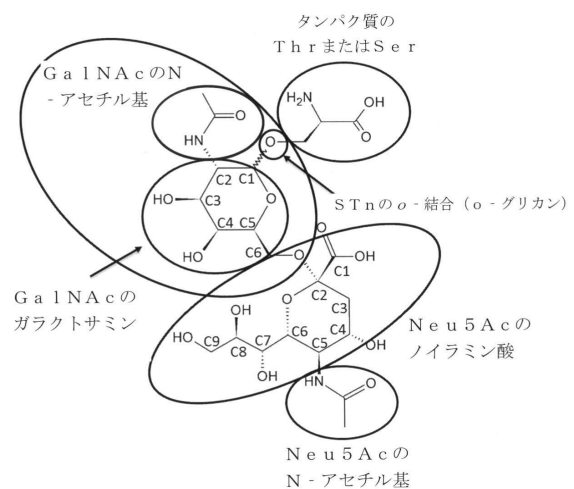
【図 1 C】

STn 結合特異性
(第 3 群)
検出されたエピトープ (一番大きい楕円)

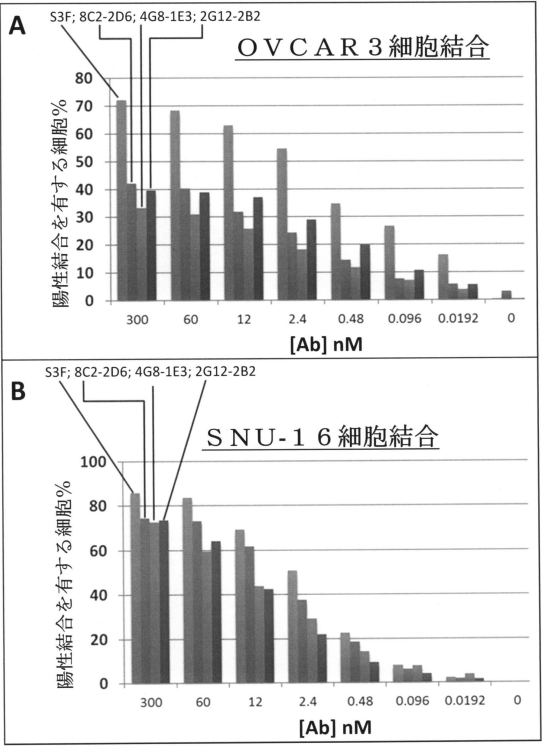


【図 1 D】

STn 結合特異性
(第 4 群)
検出されたエピトープ (一番大きい楕円)



【図 2】



【配列表】

0006951973000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N	7/01	(2006.01)	C 1 2 N 7/01
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q 1/04
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	A 6 1 P 37/04
G 0 1 N	33/531	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 D
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	G 0 1 N 33/574 D
			G 0 1 N 33/53 Y
			G 0 1 N 33/531 A
			C 1 2 P 21/08

(31)優先権主張番号 62/145,214

(32)優先日 平成27年4月9日(2015.4.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/173,560

(32)優先日 平成27年6月10日(2015.6.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/187,587

(32)優先日 平成27年7月1日(2015.7.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 ダ シルバ、アナ パウラ ガウボン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 9 カリフォルニア州 サンディエゴ トリガー ストリート 1 3 0
2 6

(72)発明者 ガデリ、ダライアス

ドイツ連邦共和国 8 8 4 7 1 ラウプハイム エミールネーターシュトラッセ 1 8

(72)発明者 チャン、マイ

アメリカ合衆国 9 2 0 1 1 カリフォルニア州 カールスバッド ターン プレイス 7 1 6 7

(72)発明者 ミーツェ、クリスタン

アメリカ合衆国 0 2 4 2 0 マサチューセッツ州 レキシントン フレッチャー アベニュー
3 1 ナンバー 7

(72)発明者 デサンダー、ジュリー

アメリカ合衆国 0 2 4 7 6 マサチューセッツ州 アーリントン マウント バーノン ストリート 1 3

(72)発明者 ベーレンス、ジェフリー

アメリカ合衆国 0 2 4 6 8 マサチューセッツ州 ニュートン ワイルド ロード 4 8

(72)発明者 イバロン、デービッド エイ.

アメリカ合衆国 0 2 1 7 1 マサチューセッツ州 ノース クインシー ウェスト スクアンタ

- ム ストリート 95 アpartment 1118
(72)発明者 プレンダーガスト、ジリアン エム.
アメリカ合衆国 01754 マサチューセッツ州 メイナード パーク ストリート 18
(72)発明者 ルゴフスキー、アレクセイ アレクサンドロビッチ
アメリカ合衆国 01801 マサチューセッツ州 ウォーバン センター ストリート 24

審査官 小林 薫

- (56)参考文献 国際公開第2013/151649 (WO, A1)
特表2014-507118 (JP, A)
米国特許出願公開第2014/0113979 (US, A1)
欧州特許出願公開第02287202 (EP, A1)
特表平05-502039 (JP, A)
Anticarbohydrate Antibodies, 2012, p.283-306
Archives of Oral Biology, 2010, Vol.55, p.830-841
The American Journal of Surgery, 2005, Vol.190, p.570-571

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00
C12N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)