

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7658946号
(P7658946)

(45)発行日 令和7年4月8日(2025.4.8)

(24)登録日 令和7年3月31日(2025.3.31)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	16/38 (2006.01)	C 0 7 K	16/38	Z N A
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
請求項の数 14 (全58頁)				
(21)出願番号	特願2022-500004(P2022-500004)	(73)特許権者	520345335	
(86)(22)出願日	令和2年7月8日(2020.7.8)		インケア バイオテック, エルエルシー	
(65)公表番号	特表2022-540079(P2022-540079		アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 8 9	
	A)		0 2, ドイルスタウン, オールド イ	
(43)公表日	令和4年9月14日(2022.9.14)		ーストン ロード 3 8 0 5	
(86)国際出願番号	PCT/US2020/041228	(74)代理人	110002077	
(87)国際公開番号	WO2021/007338		園田・小林弁理士法人	
(87)国際公開日	令和3年1月14日(2021.1.14)	(72)発明者	ルー, シュアンヨン	
審査請求日	令和5年7月7日(2023.7.7)		アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 9 0	
(31)優先権主張番号	62/871,565		4 4, ホーシャム, ダウニー ドライブ	
(32)優先日	令和1年7月8日(2019.7.8)		1 2	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ルー, フェリックス	
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 5	
			0 5, バーバンク, ノース バレー ス	
			トリート 2 3 0	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 カザール型抗セリンプロテアーゼ阻害因子 (S P I K) 抗体、免疫複合体、及び使用方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項 1】

A S - S P I K (配列番号 8 2) 上のエピトープに特異的に結合し、且つ N S - S P I K (配列番号 8 3) に結合しない、単離された抗 A S - S P I K 抗体またはその抗原結合フラグメントであって、該単離された抗 A S - S P I K 抗体またはその抗原結合フラグメントが、A S - S P I K 上のエピトープに特異的に結合し、且つ N S - S P I K に結合しない他のクラスの抗体の結合を排除しないものであり、

(a) 配列番号 2 1 の C D R H 1 配列、配列番号 3 1 の C D R H 2 配列、配列番号 4 1 の C D R H 3 配列、配列番号 5 1 の C D R L 1 配列、配列番号 6 1 の C D R L 2 配列、及び配列番号 7 1 の C D R L 3 配列、または

(b) 配列番号 2 3 の C D R H 1 配列、配列番号 3 3 の C D R H 2 配列、配列番号 4 3 の C D R H 3 配列、配列番号 5 3 の C D R L 1 配列、配列番号 6 3 の C D R L 2 配列、及び配列番号 7 3 の C D R L 3 配列、または

(c) 配列番号 2 4 の C D R H 1 配列、配列番号 3 4 の C D R H 2 配列、配列番号 4 4 の C D R H 3 配列、配列番号 5 4 の C D R L 1 配列、配列番号 6 4 の C D R L 2 配列、及び配列番号 7 4 の C D R L 3 配列、または

(d) 配列番号 2 7 の C D R H 1 配列、配列番号 3 7 の C D R H 2 配列、配列番号 4 7 の C D R H 3 配列、配列番号 5 7 の C D R L 1 配列、配列番号 6 7 の C D R L 2 配列、及び配列番号 7 7 の C D R L 3 配列、を含む、抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

前記 C D R H 1 配列、C D R H 2 配列、及び C D R H 3 配列がフレームワーク配列内に存在し、且つ前記 C D R L 1 配列、C D R L 2 配列、及び C D R L 3 配列がフレームワーク配列内に存在する、請求項 1 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

前記フレームワーク配列の少なくとも一部がヒトコンセンサスフレームワーク配列を含む、請求項 2 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

(a) 配列番号 1 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する重鎖可変領域配列及び配列番号 1 1 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列、または

10

(b) 配列番号 3 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する重鎖可変領域配列及び配列番号 1 3 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列、または

(c) 配列番号 4 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する重鎖可変領域配列及び配列番号 1 4 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列、または

(d) 配列番号 7 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する重鎖可変領域配列及び配列番号 1 7 に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域配列、

を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

(a) 配列番号 1 の重鎖可変領域配列及び配列番号 1 1 の軽鎖可変領域配列、または

(b) 配列番号 3 の重鎖可変領域配列及び配列番号 1 3 の軽鎖可変領域配列、または

20

(c) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列及び配列番号 1 4 の軽鎖可変領域配列、または

(d) 配列番号 7 の重鎖可変領域配列及び配列番号 1 7 の軽鎖可変領域配列、

を含む、請求項 4 に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

A S - S P I K 上のエピトープが、配座エピトープである、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

多重特異性であり、任意で二重特異性である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

30

モノクローナルである、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

対象が肝細胞癌 (H C C)、肝内胆管癌 (I C C)、または肝硬変を有するかどうかを判定するためのインビトロ方法であって、

(a) 前記対象由来の生物学的検査試料を請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗 A S - S P I K 抗体または抗原結合フラグメントと接触させて、A S - S P I K - 抗体複合体を生成させることと、

(b) 前記生物学的検査試料中の A S - S P I K - 抗体複合体の濃度を検出することと、

(c) 前記 A S - S P I K - 抗体複合体の濃度を、対照試料中に検出されるかまたは障害を有さない正常で健康な個体の集団由来の試料中に検出される基準値と比較することと、
を含み、前記生物学的検査試料中の前記基準値より大きい A S - S P I K - 抗体複合体の上昇した濃度レベルが、前記対象が肝細胞癌 (H C C)、肝内胆管癌 (I C C)、または肝硬変を有していることを示す、インビトロ方法。

40

【請求項 10】

前記抗体または抗原結合フラグメントが検出可能な標識を含む、請求項 9 に記載のインビトロ方法。

【請求項 11】

対象由来の生物学的検査試料中の A S - S P I K 濃度を検査するためのキットであって、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体、または抗原結合フラグメントを備えるキット。

50

【請求項 1 2】

S P I K に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをさらに備える、請求項 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 3】

A S - S P I K および N S - S P I K の両方に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをさらに備える、請求項 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 4】

A S - S P I K に特異的に結合し、且つ N S - S P I K に結合しない、前記抗体または抗原結合フラグメントが、アッセイ機器に事前に結合される、請求項 1 1 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年7月8日出願の米国仮特許出願第62/871,565号の出願日の優先権を主張し、上記出願の開示はその全体が本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

政府の権利の表示

本発明は、中小企業革新研究 (S B I R) プログラムの下、国立衛生研究所 (N I H) によって授与された助成金第2R44CA165314-02A1号及びFAIN第R44CA165314号の下で、政府の支援によってなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0 0 0 3】

抗A S - S P I K抗体が、かかる抗体の製造方法、かかる抗体を含む医薬組成物を始めとする組成物、ならびにA S - S P I Kの発現を特徴とする障害 (例えば肝臓癌) を診断及び/または治療するためのそれらの使用と共に開示される。上記抗A S - S P I K抗体を含む診断方法及び該抗体を備えるキットも開示される。

【背景技術】

【0 0 0 4】

肝臓は体内で最大の臓器の1つである。肝臓には、食物の消化に必要な酵素や胆汁の産生、グリコーゲン貯蔵の調節、血漿タンパク質の合成、ホルモンの産生、様々な代謝産物の解毒を含む多くの機能がある。肝障害としては、肝細胞癌 (H C C) 及び肝内胆管癌 (I C C) などの肝臓癌、ウイルス性感染症、肝硬変、及びその他の肝臓の炎症性障害が挙げられ、世界中で何百万人もの人々が肝障害に罹患している。例えば、米国では500万人以上、世界中では4億5,000万人以上が、B型肝炎ウイルス (H B V) 感染症及びC型肝炎ウイルス (H C V) 感染症を患っており、これらの感染者の30%以上が肝臓癌を発症する危険性が高い。Kew et al., Pathologie - biologie 2010; 58 (4): 273 - 277; Saraswat et al., J Viral Hepat. 2015; 22 Suppl 1: 6 - 25; El-Serag et al., Hepatology 2014; 60 (5): 1767 - 1775; Kanwal et al., Clinical gastroenterology and hepatology 2015; 13 (4): 805 - 807。診断及び治療の進歩にもかかわらず、肝臓癌は依然として罹患状態及び死亡の両方の重大な原因である。El-Serag, The New England journal of medicine 2011; 365 (12): 1118 - 1127。原発性肝臓癌、すなわち肝臓で最初に生じる癌の5年生存率は10%未満である。但し、肝臓癌が早期に発見され、最も治療可能な段階にある場合、生存率はほぼ40%に増加する。El-Serag et al., Therapeutic advances in gastroenterology 2011; 4 (1): 5 - 10。早期肝臓癌の患者は症状がほとんどないか、またはまったくない場合がある。血清学的方法、超音波、コンピューター断層撮影 (C T) 走査、磁気共鳴画像診断 (M R I)、及び血管造影などの現在の検出方法は、感度が低

10

20

30

40

50

いこと及び技師の誤りの可能性に起因して信頼性がない場合がある。画像診断技法は、費用がかかり、より小さな早期の腫瘍の検出には正確性に劣る場合がある。Yu et al., Clinical gastroenterology and hepatology 2011; 9 (2): 161 - 167; Bruix et al., Hepatology 2011; 53 (3): 1020 - 1022。肝生検は、良性腫瘍と悪性腫瘍を区別するための最も信頼できる方法と今でも考えられているが、侵襲的であり、外科的処置を要する。Lok et al., Gastroenterology 2001; 122 (7): 2092 - 2093。特に肝硬変、肝臓のウイルス性感染症、及び炎症性障害の患者にとって、肝臓癌を診断及び治療するための新たな方法が引き続き必要とされている。

10

【発明の概要】

【0005】

本発明の態様は、

(a) 重鎖可変領域であって、

(i) 配列番号 21 ~ 30 のアミノ酸配列のいずれかに有する置換が 2 つ以下である CDRH1、及び/または

(ii) 配列番号 31 ~ 40 のアミノ酸配列のいずれかに有する置換が 2 つ以下である CDRH2、及び/または

(iii) 配列番号 41 ~ 50 のアミノ酸配列のいずれかに有する置換が 2 つ以下である CDRH3

20

を含む上記重鎖可変領域と、

(b) 軽鎖可変領域であって、

(i) 配列番号 51 ~ 60 のアミノ酸配列のいずれかに有する置換が 2 つ以下である CDR L1、及び/または

(ii) 配列番号 61 ~ 70 のアミノ酸配列のいずれかに有する置換が 2 つ以下である CDR L2、及び/または

(iii) 配列番号 71 ~ 80 のアミノ酸配列のいずれかに有する置換が 2 つ以下である CDR L3

を含む上記軽鎖可変領域と

を含む、AS-SPICK に特異的に結合する抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む。

30

【0006】

いくつかの実施形態において、上記 CDRH1 配列、CDRH2 配列、及び CDRH3 配列はフレームワーク配列内に存在し、且つ上記 CDR L1 配列、CDR L2 配列、及び CDR L3 配列はフレームワーク配列内に存在する。いくつかの実施形態において、上記フレームワーク配列の少なくとも一部はヒトコンセンサスフレームワーク配列を含む。

【0007】

いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、

(a) 配列番号 21 ~ 30 からなる群より選択される CDRH1 配列、及び/または

(b) 配列番号 31 ~ 40 からなる群より選択される CDRH2 配列、及び/または

(c) 配列番号 41 ~ 50 からなる群より選択される CDRH3 配列、及び/または

(d) 配列番号 51 ~ 60 からなる群より選択される CDR L1 配列、及び/または

(e) 配列番号 61 ~ 70 からなる群より選択される CDR L2 配列、及び/または

(f) 配列番号 71 ~ 80 からなる群より選択される CDR L3 配列

を含む。

40

【0008】

いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、

(a) 配列番号 21 ~ 30 からなる群より選択される CDRH1 配列と、

(b) 配列番号 31 ~ 40 からなる群より選択される CDRH2 配列と、

(c) 配列番号 41 ~ 50 からなる群より選択される CDRH3 配列と、

50

- (d) 配列番号 51 ~ 60 からなる群より選択される C D R L 1 配列と、
- (e) 配列番号 61 ~ 70 からなる群より選択される C D R L 2 配列と、
- (f) 配列番号 71 ~ 80 からなる群より選択される C D R L 3 配列と

を含む。

【0009】

いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、

(a) 配列番号 21 の C D R H 1 配列、配列番号 31 の C D R H 2 配列、配列番号 41 の C D R H 3 配列、配列番号 51 の C D R L 1 配列、配列番号 61 の C D R L 2 配列、及び配列番号 71 の C D R L 3 配列、または

(b) 配列番号 22 の C D R H 1 配列、配列番号 32 の C D R H 2 配列、配列番号 42 の C D R H 3 配列、配列番号 52 の C D R L 1 配列、配列番号 62 の C D R L 2 配列、及び配列番号 72 の C D R L 3 配列、または

(c) 配列番号 23 の C D R H 1 配列、配列番号 33 の C D R H 2 配列、配列番号 43 の C D R H 3 配列、配列番号 53 の C D R L 1 配列、配列番号 63 の C D R L 2 配列、及び配列番号 73 の C D R L 3 配列、または

(d) 配列番号 24 の C D R H 1 配列、配列番号 34 の C D R H 2 配列、配列番号 44 の C D R H 3 配列、配列番号 54 の C D R L 1 配列、配列番号 64 の C D R L 2 配列、及び配列番号 74 の C D R L 3 配列、または

(e) 配列番号 25 の C D R H 1 配列、配列番号 35 の C D R H 2 配列、配列番号 45 の C D R H 3 配列、配列番号 55 の C D R L 1 配列、配列番号 65 の C D R L 2 配列、及び配列番号 75 の C D R L 3 配列、または

(f) 配列番号 26 の C D R H 1 配列、配列番号 36 の C D R H 2 配列、配列番号 46 の C D R H 3 配列、配列番号 56 の C D R L 1 配列、配列番号 66 の C D R L 2 配列、及び配列番号 76 の C D R L 3 配列、または

(g) 配列番号 27 の C D R H 1 配列、配列番号 37 の C D R H 2 配列、配列番号 47 の C D R H 3 配列、配列番号 57 の C D R L 1 配列、配列番号 67 の C D R L 2 配列、及び配列番号 77 の C D R L 3 配列、または

(h) 配列番号 28 の C D R H 1 配列、配列番号 38 の C D R H 2 配列、配列番号 48 の C D R H 3 配列、配列番号 58 の C D R L 1 配列、配列番号 68 の C D R L 2 配列、及び配列番号 78 の C D R L 3 配列、または

(i) 配列番号 29 の C D R H 1 配列、配列番号 39 の C D R H 2 配列、配列番号 49 の C D R H 3 配列、配列番号 59 の C D R L 1 配列、配列番号 69 の C D R L 2 配列、及び配列番号 79 の C D R L 3 配列、または

(j) 配列番号 30 の C D R H 1 配列、配列番号 40 の C D R H 2 配列、配列番号 50 の C D R H 3 配列、配列番号 60 の C D R L 1 配列、配列番号 70 の C D R L 2 配列、及び配列番号 80 の C D R L 3 配列

を含む。

【0010】

いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 ~ 10 の配列のいずれか 1 つに対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する重鎖可変領域及び / または配列番号 11 ~ 20 の配列のいずれか 1 つに対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 ~ 10 からなる群より選択される重鎖可変領域配列及び / または配列番号 11 ~ 20 からなる群より選択される軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、

(a) 配列番号 1 の重鎖可変領域配列及び配列番号 11 の軽鎖可変領域配列、または

(b) 配列番号 2 の重鎖可変領域配列及び配列番号 12 の軽鎖可変領域配列、または

(c) 配列番号 3 の重鎖可変領域配列及び配列番号 13 の軽鎖可変領域配列、または

(d) 配列番号 4 の重鎖可変領域配列及び配列番号 14 の軽鎖可変領域配列、または

(e) 配列番号 5 の重鎖可変領域配列及び配列番号 15 の軽鎖可変領域配列、または

10

20

30

40

50

- (f) 配列番号 6 の重鎖可変領域配列及び配列番号 1 6 の軽鎖可変領域配列、または
- (g) 配列番号 7 の重鎖可変領域配列及び配列番号 1 7 の軽鎖可変領域配列、または
- (h) 配列番号 8 の重鎖可変領域配列及び配列番号 1 8 の軽鎖可変領域配列、または
- (i) 配列番号 9 の重鎖可変領域配列及び配列番号 1 9 の軽鎖可変領域配列、または
- (j) 配列番号 1 0 の重鎖可変領域配列及び配列番号 2 0 の軽鎖可変領域配列

を含む。

【 0 0 1 1 】

本発明の態様は、

(a) ヒト V H フレームワーク中に C D R H 1 配列、C D R H 2 配列、及び C D R H 3 配列を含む重鎖可変領域であって、C D R H 配列が、配列番号 2 1 ~ 5 0 からなる群より
10

選択される C D R 配列中に有する置換が 2 つ以下である配列である上記重鎖可変領域と、
(b) ヒト V L フレームワーク中に C D R L 1 配列、C D R L 2 配列、及び C D R L 3 配列を含む軽鎖可変領域であって、C D R L 配列が、配列番号 5 1 ~ 8 0 からなる群より
選択される C D R 配列中に有する置換が 2 つ以下である配列である上記軽鎖可変領域と
を含む、A S - S P I K に特異的に結合し、且つ N S - S P I K に結合しない、単離され
た抗 A S - S P I K 抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態
において、抗体または抗原結合フラグメントは、

(a) ヒト V H フレームワーク中に C D R H 1 配列、C D R H 2 配列、及び C D R H 3 配列を含む重鎖可変領域であって、C D R H 配列が配列番号 2 1 ~ 5 0 からなる群より選
20

択される上記重鎖可変領域と、
(b) ヒト V L フレームワーク中に C D R L 1 配列、C D R L 2 配列、及び C D R L 3 配列を含む軽鎖可変領域であって、C D R L 配列が配列番号 5 1 ~ 8 0 からなる群より選
択される上記軽鎖可変領域と

を含む。

【 0 0 1 2 】

本発明の態様は、

(a) ヒト V H フレームワーク中の配列番号 2 1 の C D R H 1 配列、配列番号 3 1 の C D R H 2 配列、及び配列番号 4 1 の C D R H 3 配列、ならびにヒト V L フレームワーク中の配列番号 5 1 の C D R L 1 配列、配列番号 6 1 の C D R L 2 配列、及び配列番号 7 1 の C D R L 3 配列、または
30

(b) ヒト V H フレームワーク中の配列番号 2 2 の C D R H 1 配列、配列番号 3 2 の C D R H 2 配列、及び配列番号 4 2 の C D R H 3 配列、ならびにヒト V L フレームワーク中の配列番号 5 2 の C D R L 1 配列、配列番号 6 2 の C D R L 2 配列、及び配列番号 7 2 の C D R L 3 配列、または

(c) ヒト V H フレームワーク中の配列番号 2 3 の C D R H 1 配列、配列番号 3 3 の C D R H 2 配列、及び配列番号 4 3 の C D R H 3 配列、ならびにヒト V L フレームワーク中の配列番号 5 3 の C D R L 1 配列、配列番号 6 3 の C D R L 2 配列、及び配列番号 7 3 の C D R L 3 配列、または

(d) ヒト V H フレームワーク中の配列番号 2 4 の C D R H 1 配列、配列番号 3 4 の C D R H 2 配列、及び配列番号 4 4 の C D R H 3 配列、ならびにヒト V L フレームワーク中の配列番号 5 4 の C D R L 1 配列、配列番号 6 4 の C D R L 2 配列、及び配列番号 7 4 の C D R L 3 配列、または
40

(e) ヒト V H フレームワーク中の配列番号 2 5 の C D R H 1 配列、配列番号 3 5 の C D R H 2 配列、及び配列番号 4 5 の C D R H 3 配列、ならびにヒト V L フレームワーク中の配列番号 5 5 の C D R L 1 配列、配列番号 6 5 の C D R L 2 配列、及び配列番号 7 5 の C D R L 3 配列、または

(f) ヒト V H フレームワーク中の配列番号 2 6 の C D R H 1 配列、配列番号 3 6 の C D R H 2 配列、及び配列番号 4 6 の C D R H 3 配列、ならびにヒト V L フレームワーク中の配列番号 5 6 の C D R L 1 配列、配列番号 6 6 の C D R L 2 配列、及び配列番号 7 6 の C D R L 3 配列、または
50

(g) ヒトVHフレームワーク中の配列番号27のCDRH1配列、配列番号37のCDRH2配列、及び配列番号47のCDRH3配列、ならびにヒトVLフレームワーク中の配列番号57のCDRL1配列、配列番号67のCDRL2配列、及び配列番号77のCDRL3配列、または

(h) ヒトVHフレームワーク中の配列番号28のCDRH1配列、配列番号38のCDRH2配列、及び配列番号48のCDRH3配列、ならびにヒトVLフレームワーク中の配列番号58のCDRL1配列、配列番号68のCDRL2配列、及び配列番号78のCDRL3配列、または

(i) ヒトVHフレームワーク中の配列番号29のCDRH1配列、配列番号39のCDRH2配列、及び配列番号49のCDRH3配列、ならびにヒトVLフレームワーク中の配列番号59のCDRL1配列、配列番号69のCDRL2配列、及び配列番号79のCDRL3配列、または

(j) ヒトVHフレームワーク中の配列番号30のCDRH1配列、配列番号40のCDRH2配列、及び配列番号50のCDRH3配列、ならびにヒトVLフレームワーク中の配列番号60のCDRL1配列、配列番号70のCDRL2配列、及び配列番号80のCDRL3配列

を含む、AS-SPICKに特異的に結合し、且つNS-SPICKに結合しない、単離された抗AS-SPICK抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む。

【0013】

いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは多重特異性である。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは二重特異性である。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントはエフェクター細胞に対する結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントはT細胞抗原に対する結合親和性を有する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントはCD3に対する結合親和性を有する。

【0014】

いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントはモノクローナルである。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントはCAR-Tフォーマットである。

【0015】

本発明の態様は、細胞傷害性薬剤に共有結合している、本明細書に記載の抗体を含む免疫複合体を含む。いくつかの実施形態において、上記細胞傷害性薬剤は、毒素、化学療法剤、薬物部分、抗生物質、放射性同位体、及び核酸分解酵素からなる群より選択される。

【0016】

本発明の態様は、式Ab-(L-D)p(式中、
(a) Abは本明細書に記載の抗体であり、
(b) Lはリンカーであり、
(c) Dは薬物部分であり、
(d) pは1~8の範囲の整数である)
を有する免疫複合体を含む。いくつかの実施形態において、Dは、メイタンシノイド、オーリスタチン、及びドロスタチンからなる群より選択される。いくつかの実施形態において、Lは、6-マレイミドカプロイル(MC)、マレイミドプロパノイル(MP)、バリリン-シトルリン(val-cit)、アラニン-フェニルアラニン(ala-phe)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(PAB)、4-(2-ビリジルチオ)ペンタン酸N-スクシンイミジル(SPP)、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸N-スクシンイミジル(SMCC)、4-(2-ビリジルジチオ)酪酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SPDB)、及び(4-ヨードアセチル)アミノ安息香酸N-スクシンイミジル(SIAB)からなる群より選択される1種以上のリンカーを含む。

【0017】

本発明の態様は、本明細書に記載の抗体、抗原結合フラグメント、または免疫複合体を含む医薬組成物を含む。

【0018】

本発明の態様は、AS-SPIKの発現を特徴とする障害の治療方法であって、上記障害を有する対象に、本明細書に記載の抗体、抗原結合フラグメント、もしくは免疫複合体、または本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含む上記方法を含む。

【0019】

本発明の態様は、AS-SPIKの発現を特徴とする障害の治療のための薬剤の製造における、本明細書に記載の抗体、抗原結合フラグメント、または免疫複合体の使用を含む。本発明の態様は、AS-SPIKの発現を特徴とする障害の治療における使用のための、本明細書に記載の抗体、抗原結合フラグメント、または免疫複合体を含む。

10

【0020】

いくつかの実施形態において、上記障害は肝障害である。いくつかの実施形態において、上記肝障害は肝細胞癌である。いくつかの実施形態において、上記肝障害は肝内胆管癌である。いくつかの実施形態において、上記肝障害はウイルス性感染症である。いくつかの実施形態において、上記肝障害は炎症性肝障害である。いくつかの実施形態において、上記炎症性肝障害は肝硬変である。

【0021】

本発明の態様は、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチド、上記ポリヌクレオチドを含むベクター、または上記ベクターを含む宿主細胞を含む。

20

【0022】

本発明の態様は、本明細書に記載の抗体、抗原結合フラグメント、または免疫複合体の製造方法であって、上記抗体または抗原結合フラグメントの発現を許容する条件下で本明細書に記載の宿主細胞を培養すること、及び上記抗体または抗原結合フラグメントを上記細胞から単離することを含む上記方法を含む。

【0023】

本発明の態様は、対象がAS-SPIKの発現を特徴とする障害を有するかまたは上記障害を発症する危険性があるかどうかを判定するための診断方法であって、

(a) 上記対象由来の生物学的検査試料を本明細書に記載のAS-SPIK抗体または抗原結合フラグメントと接触させて、AS-SPIK-抗体複合体を生成させることと、

30

(b) 上記生物学的検査試料中のAS-SPIK-抗体複合体の濃度を検出することと、

(c) 上記AS-SPIK-抗体複合体の濃度を基準値と比較して、上記対象が上記障害を有しているか、または上記障害を発症する危険性があるかどうかを判定することとを含む上記方法を含む。

【0024】

本発明の態様は、対象がAS-SPIKの発現を特徴とする障害を有するかまたは上記障害を発症する危険性があるかどうかを判定するための診断方法であって、

(a) 上記対象由来の生物学的検査試料をSPIKに特異的に結合する第1の抗体または抗原結合フラグメントと接触させて、SPIK-抗体複合体を形成させることと、

40

(b) 上記SPIK-抗体複合体を本明細書に記載のAS-SPIK抗体または抗原結合フラグメントと接触させて、AS-SPIK-抗体複合体を生成させることと、

(c) 上記生物学的検査試料中のAS-SPIK-抗体複合体の濃度を検出することと、

(d) 上記AS-SPIK-抗体複合体の濃度を基準値と比較して、上記対象が上記障害を有しているか、または上記障害を発症する危険性があるかどうかを判定することとを含む上記方法を含む。

【0025】

いくつかの実施形態において、上記抗体または抗原結合フラグメントは検出可能な標識を含む。いくつかの実施形態において、上記障害は肝臓障害である。いくつかの実施形態において、上記肝障害は、肝細胞癌、肝内胆管癌、ウイルス性肝感染症、炎症性肝障害、

50

及び肝硬変からなる群から選択される。

【 0 0 2 6 】

本発明の態様は、本明細書に記載の抗体、抗原結合フラグメント、または免疫複合体を備えるキットを含む。いくつかの実施形態において、上記キットは S P I K に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをさらに備える。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 7 】

【図 1】 A S - S P I K 及び N S - S P I K に対する様々なモノクローナル抗体の相対的結合活性を示す E L I S A の結果を示す図である。

【図 2】 抗体 I M - E 2 を含む試料中の抗体 - 抗原複合体の検出の結果を示す図である。

10

【図 3】 10 種の抗体、すなわち、I M - A 1、I M - A 6、I M - B 1 0、I M - C 6、I M - D 3、I M - D 5、I M - E 2、I M - F 5、I M - G 6、及び I M - G 7 の V H 領域のアラインメントを示す図である。すべての抗体のコンセンサス配列が掲載されている。本明細書で提供される抗体は、I M - A 1、I M - A 6 等々の文字「I M」を含む長い名称で呼ばれるか、または「I M」を使用しないことによる略称、例えば A 1 または A 6 等々で呼ばれる場合がある。

【図 4】 10 種の抗体 A 1、A 6、B 1 0、C 6、D 3、D 5、E 2、F 5、G 6、及び G 7 の V L 領域のアラインメントを示す図である。すべての抗体のコンセンサス配列が掲載されている。

【図 5】 10 種の抗体 A 1、A 6、B 1 0、C 6、D 3、D 5、E 2、F 5、G 6、及び G 7 の V H C D R のアラインメントを示す図である。各 C D R のコンセンサス配列が掲載されている。

20

【図 6】 10 種の抗体 A 1、A 6、B 1 0、C 6、D 3、D 5、E 2、F 5、G 6、及び G 7 の V L C D R のアラインメントを示す図である。各 C D R のコンセンサス配列が掲載されている。

【図 7】 アミノ酸配列及び核酸配列の情報を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 8 】

本発明の実施は、別段の指示がない限り、当技術分野の技術の範囲内である、分子生物学（組換え技術を始めとする）、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の従来の技術を使用する。かかる技法は、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrook et al., 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis et al., ed., 1994); “A Practical Guide to Molecular Cloning” (Perbal Bernard V., 1988); “Phage Display: A Laboratory Manual” (Barbas et al., 2001); Harlow, Lane and Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); 及び Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988) などの文献において詳細に説明されている。

30

40

【 0 0 2 9 】

50

値の範囲が与えられている場合、当該範囲の上限と下限との間に挟まれた、文脈による明確な別段の指示がない限り最下の位の10分の1までのそれぞれの値、及び当該の記載された範囲中の任意の他の記載されたまたは挟まれた値は本発明に包含されると理解されるべきものである。これらのより小さな範囲の上限及び下限は、当該の記載された範囲においていずれかの限界が具体的に排除されることを条件として、独立に上記より小さな範囲に含まれてもよく、また本発明に包含される。記載された範囲が限界の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限界のいずれかまたは両方を排除する範囲もまた本発明に包含される。

【0030】

別段の明示がない限り、本明細書の抗体残基は、Kabat番号付けシステムに従って番号付けされる（例えば、Kabat et al., Sequences of immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。

10

【0031】

以下の説明では、本発明をより完全に理解できるように、多くの特定の詳細が示されている。しかしながら、当業者には、これらの特定の詳細の1つ以上がなくとも本発明を実施することができることは明らかであろう。他の例において、当業者に周知の特徴及び周知の手順は、本発明を不明瞭になることを回避するために記載されていない。

【0032】

20

特許出願及び刊行物を含む、本開示を通して引用されるすべての参考文献は、それらの全体が本明細書に援用される。

【0033】

用語の定義

本明細書の理解を目的に以下の定義が適用され、適当である場合は常に、単数形で使用される用語は複数形も含むこととなり、その逆も同様である。記載されるいずれかの定義が本明細書に援用されるいずれかの文書と矛盾する場合には、以下に記載されている定義が優先するものとする。

【0034】

「エピトープ」は、単一の抗体分子が結合する抗原分子の表面上の部位である。一般に、抗原はいくつかまたは多くの異なるエピトープを有し、多くの異なる抗体と反応する。この用語は、詳細には線状エピトープ及び配座エピトープを包含する。この用語は、抗体に特異的に結合することができる任意の分子決定因子を包含する。特定の実施形態において、エピトープ決定基(epitope determinant)は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニルなどの分子の化学的に活性な表面グループを包含し、特定の実施形態において、特定の三次元構造特性、及び/または特定の電荷特性を有する場合がある。エピトープは、抗体が結合する抗原の領域である。「結合領域」は、結合分子によって結合される結合標的上の領域である。

30

【0035】

「エピトープマッピング」は、標的抗原上の抗体の結合部位、すなわちエピトープを特定するプロセスである。抗体エピトープは、線状エピトープまたは配座エピトープであってよい。線状エピトープはタンパク質中のアミノ酸の連続した配列によって形成される。配座エピトープは、タンパク質配列中では不連続であるが、該タンパク質がその三次元構造に折り畳まれると一体となるアミノ酸から形成される。

40

【0036】

本明細書で定義される「エピトープビニング」とは、抗体の分類プロセスであって、上記抗体が認識するエピトープに基づく上記プロセスである。より詳細には、エピトープビニングは、抗体をそれらのエピトープ認識特性に基づいてクラスター化し、別個の結合特性を有する抗体を識別するための計算プロセスと組み合わせた、異なる抗体のエピトープ認識特性を区別するための方法及びシステムを包含する。

50

【 0 0 3 7 】

2つの抗体が同一または立体的に重複するエピトープを認識する場合、上記抗体は基準の抗体と「本質的に同一のエピトープ」と結合する。2つの抗体が同一または立体的に重複するエピトープに結合するかどうかを判定するために最も広く使用され且つ迅速な方法は、標識抗原または標識抗体のいずれかを使用して、任意の数の異なる方式で構成することができる競合アッセイである。通常、上記抗原が96ウェルプレート上に固定化されており、放射標識または酵素標識を使用し、非標識抗体が標識抗体の結合を遮断する能力を測定する。

【 0 0 3 8 】

本明細書では、アミノ酸残基／位置の「修飾」とは、当初のアミノ酸配列と比較した一次アミノ酸配列の変化であって、上記アミノ酸残基／位置が関与する配列変化に起因する上記変化をいう。例えば、一般的な修飾としては、残基（または上記位置における）の別のアミノ酸による置換（例えば、保存的または非保存的置換）、上記残基／位置に隣接する1つ以上（一般に5または3未満）のアミノ酸の挿入、及び上記残基／位置の欠失が挙げられる。「アミノ酸置換」またはその変化形は、所定の（当初の）アミノ酸配列中の既存のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することをいう。一般的に且つ好ましくは、修飾によって、当初の（または「野生型」の）アミノ酸配列を含むポリペプチドと比較して、変異体ポリペプチドの少なくとも1つの物理的または生化学的活性が変化する。例えば、抗体の場合、変化する物理的または生化学的活性は、標的分子に対する結合親和性、結合能力、及び／または結合効果であってよい。

【 0 0 3 9 】

用語「抗体」は、モノクローナル抗体（免疫グロブリンFc領域を有する完全長抗体を含む）、一本鎖分子、ならびに抗体フラグメント（例えば、Fab、F(ab')₂、及びFv）を包含する。本明細書では、用語「免疫グロブリン」（Ig）は「抗体」と同義で使用される。基本的な4本鎖抗体単位は、2本の同一の軽（L）鎖と2本の同一の重鎖（H）とから構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である。別段の特記がない限り、用語「抗体」は、本明細書において最も広い意味で使用され、詳細には、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgE抗体及びにそれらのフラグメント、好ましくは抗原結合フラグメントを含む、抗体のすべてのイソ型、サブクラス、ならびに形態を含む。

【 0 0 4 0 】

別段の明示がない限り、用語「抗体」は、詳細には、天然に存在する変異体を含む、天然のヒト及び非ヒトIgG1、IgG2（IgG2a、IgG2b）、IgG3、IgG4、IgE、IgA、IgD、及びIgM抗体を含む。

【 0 0 4 1 】

本明細書では、用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体、すなわち、少量存在する場合がある、可能性のある天然に存在する変異を除いて同一である上記集団を構成する個々の抗体をいう。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、単一の抗原部位を指向する。さらに、通常は種々の決定基（エピトープ）を指向する種々の抗体を含む従来の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を指向する。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られる抗体の特徴を示すものであり、いずれかの特定の方法によって該抗体を産生することを要すると解釈されるべきではない。例えば本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al.（1975）Nature 256：495によって最初に報告されたハイブリドーマ法によって作製されてもよく、または組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと）によって作製されてもよい。上記「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al.（1991）Nature 352：624-628；及びMarks et al.（1991）J. Mol. Biol. 222：581-597に記載される技法を使用してファージ抗体ライブラリーから単離されてもよい。

【 0 0 4 2 】

本明細書におけるモノクローナル抗体としては、特に、重鎖及び／または軽鎖の一部が特定の種に由来する抗体中の対応する配列と同一であるかまたは相同である一方、鎖（複数可）の残余の部分が別の種に由来する抗体、ならびに（所望の生物学的活性を示す限り）かかる抗体のフラグメント中の対応する配列と同一であるかまたは相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）（米国特許第4,816,567号；及びMorrisson et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855）が挙げられる。

【0043】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含む抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシ
ピエント抗体）であって、該ヒト免疫グロブリン中の上記レシピエントの超可変領域由来
の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非
ヒト霊長動物などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域由来の残基によって置換されて
いる上記ヒト免疫グロブリンである。場合によっては、上記ヒト免疫グロブリンのFvフ
レームワーク領域（FR）残基も、対応する非ヒト残基に置換される。さらに、ヒト化抗
体は、レシピエント抗体またはドナー抗体中には存在しない残基を含んでいてもよい。こ
れらの修飾は抗体の性能をさらに改良するために行われる。一般に、上記ヒト化抗体は、
少なくとも1つ、一般的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含むこととなり、上
記可変ドメイン中で、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブ
リンのループに対応し、且つ上記FR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブ
リン配列のFR領域である。上記ヒト化抗体は任意選択で、免疫グロブリン定常領域（Fc）
の少なくとも一部、一般的にはヒト免疫グロブリンの定常領域も含むこととなる。さら
なる詳細については、Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-329; 及びPresta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596を参照されたい。

【0044】

基準ポリペプチド配列に対する「パーセント（％）表示アミノ酸配列同一性」とは、候補配列中のアミノ酸残基の百分率であって、上記両配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入して、最大のパーセント表示配列同一性を達成させた後の、基準ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一であり、上記配列同一性の一部としての保存的置換を考慮しない上記百分率として定義される。パーセント表示アミノ酸配列同一性を決定する目的でのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign（DNASTAR）ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用して、当技術分野の技術の範囲内である様々な方法で実現することができる。当業者であれば、比較する配列の全長にわたって最大のアラインメントを実現するために必要な、いずれかのアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適宜のパラメータを決定することができる。但し、本明細書の目的のためには、％表示アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して得る。

【0045】

本明細書では、用語「パーセント表示配列相同性」とは、任意の所与のクエリ配列とサブジェクト配列との間の相同性の程度をいう。例えば、天然に存在するAS-SPICKポリペプチドまたはNS-SPICKポリペプチドをクエリ配列としてもよく、AS-SPICKポリペプチドまたはNS-SPICKポリペプチドのフラグメントをサブジェクト配列としてもよい。同様に、AS-SPICKポリペプチドまたはNS-SPICKポリペプチドのフラグメントをクエリ配列としてもよく、その生物学的に活性な変異体をサブジェクト配列としてもよい。

【0046】

本明細書では、用語「コンセンサス配列」とは、当該配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入して最大の配列一致を実現した後の、配列アラインメント中の各位置に存在

10

20

30

40

50

する最も頻度の高い残基を示すアミノ酸残基配列またはヌクレオチド残基配列であって、配列同一性の一部としてのいずれの保存的置換を考慮していない上記配列を意味する。

【0047】

本明細書における「単離された」抗体とは、組換え宿主細胞における該抗体の天然の環境の成分から識別及び分離され、及び/または回収された抗体である。上記抗体の天然の環境の汚染成分は、上記抗体の診断上または治療上の使用を妨げることとなる物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク性または非タンパク性の溶質、ならびに産生の望ましくない副生物を含む場合がある。好ましい実施形態において、本明細書における単離された抗体は、(1) SDS-PAGE もしくは SEC-HPLC 法によって測定して、95重量%を超える、または98重量%を超える、または99重量%を超えるまで、(2) アミノ酸シーケンサーの使用による少なくとも15残基のN末端または内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度まで、あるいは(3) クマシーブルー染色、好ましくは銀染色を使用した還元または非還元条件下での SDS-PAGE によって均一とされるまで精製されることとなる。通常、単離された抗体は、少なくとも1つの精製ステップによって調製されることとなる。

10

【0048】

IgGの場合、上記4本鎖単位は一般に約150,000ダルトンである。各L鎖は、1つのジスルフィド共有結合によってH鎖と連結される一方、2本のH鎖は、H鎖のイソ型に応じて、1つ以上のジスルフィド結合によって互いに連結される。各H鎖及びL鎖は、規則的に間隔を置いた鎖内ジスルフィド架橋も有する。各H鎖はN末端に可変ドメイン(VH)、それに続いてα鎖及びγ鎖のそれぞれに3つの定常ドメイン(CH)、ならびにμ及びεイソ型に4つのCHドメインを有する。各L鎖はN末端に可変ドメイン(VL)、それに続いてその他端に定常ドメインを有する。上記VLは上記VHと整列し、上記CLは上記重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)と整列する。特定のアミノ酸残基が、上記軽鎖と重鎖の可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。VHとVLとの互いの対合によって単一の抗原結合部位が形成される。

20

【0049】

本明細書において用語「ポリペプチド」は最も広い意味で使用され、ペプチド配列を包含する。用語「ペプチド」は概括的に、ペプチド結合によって共有結合された最大約60個、好ましくは最大約30個のアミノ酸を含むアミノ酸の線状分子鎖を表す。

30

【0050】

用語「特異的結合」または「～に対して特異的に結合する」または「～に対して特異的」であるとは、標的抗原、例えば、特定のポリペプチド、ペプチド、または他の標的(例えば糖タンパク質標的)上のエピトープに対する抗体の結合をいい、非特異的相互作用とは測定可能に異なる結合を意味する(例えば、非特異的相互作用はウシ血清アルブミンまたはカゼインに対する結合であってよい)。特異的結合は、例えば、対照分子への結合と比較した、標的分子への抗体の結合を測定することによって測定することができる。例えば、特異的結合は、標的に類似する対照分子、例えば、過剰の非標識標的との競合によって判定することができる。この場合、プローブに対する標識標的の結合が過剰の非標識標的によって競合的に阻害されれば、特異的結合であることが示される。例えば、少なくとも約200nM、あるいは少なくとも約150nM、あるいは少なくとも約100nM、あるいは少なくとも約60nM、あるいは少なくとも約50nM、あるいは少なくとも約40nM、あるいは少なくとも約30nM、あるいは少なくとも約20nM、あるいは少なくとも約10nM、あるいは少なくとも約8nM、あるいは少なくとも約6nM、あるいは少なくとも約4nM、あるいは少なくとも約2nM、あるいは少なくとも約1nM、またはそれを超える標的に対するKdを有する分子が、本明細書で使用される上記用語、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープ「に対する特異的結合」または上記「に対して特異的に結合する」または上記「に対して特異的」であることを示すことができる。特定の場合において、用語「特異的結合」とは、分子がいずれの他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープにも実質的に結合することなく、特定のポリ

40

50

ペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合する結合をいう。

【0051】

「結合親和性」とは、分子（例えば抗体）の単一の結合部位とその結合相手（例えば抗原）との間の非共有結合的相互作用の総和の強さをいう。別段の指示がない限り、本明細書では、「結合親和性」とは、結合対の構成員（例えば、抗体と抗原）間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性をいう。分子Xの相手Yに対する親和性は、概括的には解離定数（ K_d ）で表すことができる。例えば、上記 K_d は、約200 nM、150 nM、100 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、8 nM、6 nM、4 nM、2 nM、1 nMであるか、またはそれより強くてもよい。親和性は、本明細書に記載されるものを含む、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は一般に抗原にゆっくりと結合し、容易に解離する傾向がある一方、高親和性抗体は一般に抗原により速く結合し、より長く結合した状態を維持する傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当技術分野で公知である。

10

【0052】

本明細書では、「 K_d 」または「 K_d 値」とは、抗体と標的との対に適した技法によって、例えば表面プラズモン共鳴アッセイを使用して、例えば、BIAcore（商標）-2000またはBIAcore（商標）-3000（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を使用して、25 で固定化抗原CM5チップを用い、約10レスポンスユニット（RU）で測定される解離定数をいう。

20

【0053】

本明細書では、用語「価」とは、抗体における特定の数の結合部位の存在を意味する。したがって、用語「二価」とは2つの結合部位の存在を意味する。

【0054】

「ポリエピトープ特異性」とは、同一のまたは異なる標的（複数可）上の2つ以上の異なるエピトープに特異的に結合する能力をいう。「単一特異性の」とは、1つのエピトープのみに結合する能力をいう。いくつかの実施形態において、抗体は、少なくとも 10^{-7} M、もしくは 10^{-8} Mまたはそれよりも良好な親和性で各エピトープに結合する。

【0055】

用語「標的」または「結合標的」は最も広い意味で使用され、詳細には、ポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質、細胞、及び他の分子であって、該分子が天然に存在する場合に生物学的機能を伴うまたは伴わない上記分子を包含するが、これらに限定はされない。

30

【0056】

用語「抗原」とは、抗体に結合するか、または細胞性免疫応答を誘発することができる実体またはそのフラグメントをいう。免疫原とは、生物、特に動物、より詳細にはヒトを始めとする哺乳動物において免疫応答を誘発することができる抗原をいう。用語、抗原は、上記で定義されたように、抗原決定基すなわちエピトープとして知られている領域を包含する。

【0057】

本明細書では、用語「免疫原性」とは、抗体の産生を誘発し、及び/または免疫原の抗原に指向するT細胞及び/または他の反応性免疫細胞を活性化する物質をいう。

40

【0058】

本発明の抗体の「抗原結合部位」または「抗原結合領域」は、通常は、抗原に対する結合部位の親和性に様々な程度で寄与する6つの超可変領域（HVR）を含む。本明細書では、用語「相補性決定領域」すなわち「CDR」は、用語「超可変領域」すなわち「HVR」と同義で使用される。3つの重鎖可変ドメインHVR（HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3）ならびに3つの軽鎖可変ドメインHVR（HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3）が存在する。HVR及びフレームワーク領域（FR）の範囲は、配列間の変動性及び/または抗体/抗原複合体からの構造情報に従ってこれらの領域が定義されているアミノ酸配列のコンパイル済みデータベースとの比較によって決定される。また、より少ないHVRから構成される機能的抗原結合部位（すなわち、結合特異性が

50

3つ、4つ、または5つのHVRによって決定される場合)も、本発明の範囲内に含まれる。一部の結合標的に結合するには、6つのHVRの完全なセット未満で十分な場合がある。したがって、場合によっては、VHまたはVLドメインのHVRだけで十分となる。さらに、特定の抗体は、抗原に対して非HVR関連の結合部位を有する可能性がある。かかる結合部位は明確に本定義内に包含される。

【0059】

本明細書の目的のための「naked抗体」は、細胞傷害性部分または放射標識と複合体化されていない抗体である。

【0060】

「抗体薬物複合体」(ADC)または免疫複合体とは、化学療法剤、薬物、成長阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物由来の酵素的に活性な毒素、またはそれらのフラグメント)、または放射性同位体(すなわち、放射性複合体)などの細胞傷害性薬剤と複合体化された抗体あるいはその抗原結合フラグメントを意味する。

10

【0061】

本明細書では、用語「宿主細胞」とは、本発明にかかる抗体を生成するように操作することができる任意の種類の細胞系を意味する。一実施形態において、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞が宿主細胞として使用される。

【0062】

本明細書では、表現「細胞」、「細胞株」、及び「細胞培養物」は同義で使用され、かかる呼称はすべて後代を含む。したがって、語「形質転換体」及び「形質転換細胞」は、移入の数に関係なく、初代の対象細胞及び該細胞に由来する培養物を含む。また、意図したまたは不注意による変異に起因して、すべての後代のDNAの内容が正確に同一であるとは限らないことも理解されよう。当初形質転換された細胞においてスクリーニングされたものと同じの機能または生物学的活性を有する変異体の後代が包含される。

20

【0063】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に置かれている場合に、「作動可能に連結」されている。例えば、前駆配列または分泌リーダーのDNAは、それがポリペプチドの分泌に関与するタンパク質前駆体として発現される場合、上記ポリペプチドのDNAに作動可能に連結されており;プロモーターまたはエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響を与える場合、上記配列に作動可能に連結されており;または、リボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するように配置されている場合、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、「作動可能に連結された」とは、連結されているDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合は、隣接し且つリーディングフレーム中にあることを意味する。但し、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。連結は、都合のよい制限酵素認識部位におけるライゲーションによって生じる。かかる部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが従来の慣行に従って使用される。

30

【0064】

用語「抗AS-SPICK抗体」、「AS-SPICK抗体」、または「AS-SPICKに結合する抗体」はすべて、抗体が以下のように十分な親和性でAS-SPICKに結合することができる抗体をいい、その結果、上記抗体はAS-SPICKを標的とする診断薬及び/または治療薬として有用である。

40

【0065】

一実施形態において、本明細書では、「AS-SPICK抗体」は、(i)配列番号1~10のいずれか1つにおいて示す重鎖可変ドメイン配列及び/または配列番号11~20のいずれか1つにおいて示す軽鎖可変ドメイン配列を含む;または(ii)配列番号21~80において示すCDRの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、もしくは6つを含む抗AS-SPICKモノクローナル抗体を特に指すために使用される。

【0066】

用語「可変」とは、可変ドメインの特定のセグメントの配列が、抗体間で広範囲にわたって異なるという事実をいう。「可変」すなわち「V」ドメインは抗原結合を媒介し、そ

50

の特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を規定する。但し、上記の変動性は可変ドメインの110アミノ酸の範囲全体にわたって均等に分布しているわけではない。それよりも、V領域は、それぞれが9～12アミノ酸長の「超可変領域」と呼ばれる極端な変動性のより短い領域で区切られた、15～30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不变のストレッチで構成される。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、主にβシート構成をとっており、上記βシート構造を接続し、場合によってはβシート構造の一部を形成するループを形成する3つの超可変領域によって接続される4つのFRを含む。それぞれの鎖中の超可変領域は、FRによって、他の鎖の超可変領域と共に近接して保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照のこと)。

10

【0067】

「インタクトな」抗体とは、特定の抗体クラスの抗原結合部位ならびに軽鎖定常ドメイン(CL)及び少なくとも重鎖定常ドメインを含む抗体である。例えば、インタクトなIgG抗体は、抗原結合部位、軽鎖定常ドメインCL、ならびに少なくとも重鎖定常ドメインCH1(Cy1)、CH2(Cy2)、及びCH3(Cy3)を含む。インタクトなIgM抗体は、抗原結合部位、軽鎖定常ドメインCL、ならびに少なくとも重鎖定常ドメインCM1(Cμ1)、CM2(Cμ2)、CM3(Cμ3)、及びCM4(Cμ4)を含む。インタクトなIgA抗体は、抗原結合部位、軽鎖定常ドメインCL、ならびに少なくとも重鎖定常ドメインCA1(Cα1)、CA2(Cα2)、及びCA3(Cα3)を含む。インタクトなIgD抗体は、抗原結合部位、軽鎖定常ドメインCL、ならびに少なくとも重鎖定常ドメインCD1(Cδ1)、CD2(Cδ2)、及びCD3(Cδ3)を含む。インタクトなIgE抗体は、抗原結合部位、軽鎖定常ドメインCL、ならびに少なくとも重鎖定常ドメインCE1(Cε1)、CE2(Cε2)、CE3(Cε3)、及びCE4(Cε4)を含む。上記定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列の定常ドメイン)またはそれらのアミノ酸配列変異体であってよい。インタクトな抗体は1種以上のエフェクター機能を有することが好ましい。

20

【0068】

抗体の「抗体フラグメント」または「抗原結合フラグメント」は、インタクトな抗体の一部、好ましくは上記インタクトな抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの非限定的な例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFvフラグメント；ダイアボディ；線状抗体(米国特許第5,641,870号、実施例2；Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)を参照のこと)；単鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられる。一実施形態において、抗体フラグメントは、インタクトな抗体の抗原結合部位を含み、したがって抗原に結合する能力を保持する。当業者であれば、抗体フラグメントは、任意のインタクトな抗体、例えば、IgG、IgM、IgA、IgD、またはIgE抗体から、当該の抗体の少なくとも抗原結合部分を、該抗体の軽鎖及び重鎖から分離して、抗原結合フラグメントを作製することによって生成させることができることを理解しよう。特定の実施形態において、抗体フラグメントは、抗体の抗原結合領域、ならびに該抗体の軽鎖及び/または重鎖の1つ以上のさらなるドメインを含んでいてもよい。例えば、いくつかの実施形態において、抗体フラグメントは、VH及びVLドメイン、軽鎖定常ドメインCL、ならびに1つ以上の重鎖定常ドメイン、例えば、CH1(Cy1)ドメイン、CM1(Cμ1)ドメイン、CA1(Cα1)ドメイン、CD1(Cδ1)ドメイン、またはCE1(Cε1)ドメインを含む抗原結合領域を含んでいてもよい。

30

40

【0069】

IgG抗体フラグメントの場合、パパイン消化により、2つの同一の「Fab」フラグ

50

メントと呼ばれる抗原結合フラグメントと、残余部分の、名称が容易に結晶化する能力を反映している「F c」フラグメントとが生成する。上記F a bフラグメントは、H鎖の可変領域ドメイン（V H）、及び一方の重鎖の第1の定常ドメイン（C H 1）と共に、L鎖全体から構成される。それぞれのF a bフラグメントは抗原結合に関して一価であり、すなわち、単一の抗原結合部位を有している。I g G抗体のペプシン処理により、二価の抗原結合活性をもち、なおも抗原を架橋する能力を有する、ジスルフィド結合した2つのF a bフラグメントに略相当する、単一の大きなF（a b'）2フラグメントが生成する。F a b'フラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含むC H 1ドメインのカルボキシ末端にさらにいくつかの残基を有するという点でF a bフラグメントとは異なる。F a b' - S Hは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を有するF a b'に対する本明細書における呼称である。F（a b'）2抗体フラグメントは当初、F a b'フラグメントの対であって、該対の間にヒンジシステインを有する上記対として生成された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも公知である。

10

【0070】

I g G抗体のF cフラグメントは、ジスルフィドによって結合された両方のH鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、F c領域の配列によって決定され、この領域は、特定の種類の細胞上に存在するF c受容体（F c R）によって認識される部分でもある。

【0071】

「天然配列F c領域」は、自然界に存在するF c領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列ヒトF c領域としては、例えば、天然配列ヒトI g G 1 F c領域（非A及びAアロタイプ）；。天然配列ヒトI g G 2 F c領域；天然配列ヒトI g G 3 F c領域；及び天然配列ヒトI g G 4 F c領域、ならびにそれらの天然に存在する変異体が挙げられる。

20

【0072】

「変異型F c領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾、好ましくは1つ以上のアミノ酸置換（複数可）によって、天然配列F c領域のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を含む。変異型F c領域は、天然配列F c領域または親ポリペプチドのF c領域と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、天然配列F c領域中または親ポリペプチドのF c領域中に、約1～約10個のアミノ酸置換、好ましくは約1～約5個のアミノ酸置換を有することが好ましい。本明細書における変異型F c領域は、好ましくは、天然配列F c領域及び/または親ポリペプチドのF c領域と少なくとも約80%の相同性、最も好ましくは上記F c領域と少なくとも約90%の相同性、より好ましくは少なくとも約95%の相同性を有する。

30

【0073】

ヒトI g G 1アミノ酸配列は、UniProtKB第P01857号（その全体が本明細書に援用される）によって示される。ヒトI g G 2アミノ酸配列は、UniProtKB第P01859号（その全体が本明細書に援用される）によって示される。ヒトI g G 3アミノ酸配列は、UniProtKB第P01860号（その全体が本明細書に援用される）によって提供される。ヒトI g G 4アミノ酸配列は、UniProtKB第P01861号（その全体が本明細書に援用される）によって示される。

40

【0074】

「F v」は、完全な抗原認識部位及び結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。このフラグメントは、緊密に非共有により会合している1つの重鎖可変領域ドメイン及び1つの軽鎖可変領域ドメインの二量体から構成される。単鎖F v（s c F v）種においては、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインを柔軟なペプチドリinkerによって共有結合させることができ、その結果、軽鎖と重鎖は、二本鎖F v種における構造と類似した「二量体」構造に会合することができる。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、且つこの抗体に抗原結合特異性を付与する6つの超可変ループ（H鎖及びL鎖からそれぞれ3つのループ）が発出する。但し、単一の可

50

変ドメイン（または抗原に対して特異的な3つのHVRのみを含むFvの半分）でさえも、結合部位全体よりも親和性は低いものの、抗原を認識して結合する能力を有している。

【0075】

「sFv」または「scFv」とも略称される「単鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖へと結合されたVH及びVL抗体ドメインを含む抗体フラグメントである。好ましくは、上記sFvポリペプチドは、VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それにより該sFvは抗原結合にとって望ましい構造を形成することが可能になる。sFvの総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infraを参照されたい。

10

【0076】

用語「キメラ抗原受容体」すなわち「CAR」は、本明細書において最も広い意味で使用され、所望の結合特異性（例えば、モノクローナル抗体または他のリガンドの抗原結合領域）を膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインに融合する、操作された受容体をいう。通常、上記受容体は、モノクローナル抗体の特異性をT細胞上に融合して、キメラ抗原受容体（CAR）を作製するために使用される（Dai et al., J Natl Cancer Inst, 2016; 108(7): djv439; 及びJackson et al., Nature Reviews Clinical Oncology, 2016; 13: 370-383.）。

20

【0077】

本明細書では、用語「エフェクター細胞」とは、免疫応答の認知段階及び活性化段階に対する、免疫応答のエフェクター段階に關与する免疫細胞をいう。一部のエフェクター細胞は特定のFc受容体を発現し、特定の免疫機能を果たす。いくつかの実施形態において、ナチュラルキラー細胞などのエフェクター細胞は抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘導する能力がある。例えば、FcRを発現する単球及びマクロファージは、標的細胞の特異的殺滅及び免疫系の他の構成要素に対する抗原の提示、または抗原を提示する細胞への結合に關与する。いくつかの実施形態において、エフェクター細胞は、標的抗原または標的細胞を貪食する場合がある。

30

【0078】

「ヒトエフェクター細胞」は、T細胞受容体またはFcRなどの受容体を発現し、エフェクター機能を果たす白血球である。上記細胞は少なくともFcγRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を果たすことが好ましい。ADCCを媒介するヒト白血球の例としては、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞、及び好中球が挙げられ、NK細胞が好ましい。上記エフェクター細胞は、それらの天然の供給源、例えば、血液または本明細書で説明されるPBMCから単離することができる。

【0079】

用語「免疫細胞」は、本明細書において最も広い意味で使用され、骨髄またはリンパ起源の細胞、例えばリンパ球（細胞溶解性T細胞（CTL）を始めとするB細胞及びT細胞など）；キラー細胞；ナチュラルキラー（NK）細胞；マクロファージ；単球；好酸球；好中球、顆粒球、肥満細胞、及び好塩基球などの多形核細胞が挙げられるが、これらに限定はされない。

40

【0080】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域（天然配列Fc領域またはアミノ酸配列変異型Fc領域）に起因する生物学的活性をいう。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合、補体依存細胞傷害性、Fc受容体結合、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、貪食、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体；BCR）の下方制御などが挙げられる。

【0081】

50

「抗体依存性細胞傷害」及び「ADCC」は、Fc受容体(FcR)を発現する非特異的細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)が標的細胞上に結合した抗体を認識し、続いて該標的細胞を溶解する細胞媒介反応をいう。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞は、FcγRIIIのみを発現する一方、単球はFcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIを発現する。造血細胞上でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)の464ページの表3にまとめられている。対象となる分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載されるようなインビトロADCCアッセイを行ってもよい。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。あるいは、または上記に加えて、対象となる分子のADCC活性を、インビボで、例えば、Clynes et al. PNAS (USA) 95: 652-656 (1998)に開示されるような動物モデルにおいて評価してもよい。

10

【0082】

「補体依存性細胞傷害性」すなわち「CDC」とは、補体の存在下で標的を溶解する分子の能力をいう。補体活性化経路は、補体系(C1q)の第1の成分が同起源の抗原と複合体を形成した分子(例えば抗体)に結合することによって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)に記載されるようなCDCアッセイを行ってもよい。

20

【0083】

「遮断」抗体または「拮抗剤」抗体または「拮抗性」抗体は、上記抗体が結合する抗原の生物学的活性を阻害または低下させる抗体である。好ましい遮断抗体または拮抗剤抗体は、抗原の生物学的活性を実質的にまたは完全に阻害する能力を有する。

【0084】

対象となる抗原、例えば、AS-SPIKまたはNS-SPIKポリペプチドに「結合する」抗体とは、上記抗原に十分な親和性で結合し、その結果、上記抗原を発現する細胞または組織を標的化する上で治療剤として有用であり、且つ他のタンパク質と有意に交差反応しない抗体である。抗体の標的分子への結合に関して、用語、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープへの「特異的結合」または上記に「特異的に結合する」または上記に「特異的に」とは、非特異的相互作用と測定可能に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、ある分子の結合を対照分子の結合と比較して測定することによって測定することが可能であり、上記対照分子は一般に、結合活性をもたない類似の構造の分子である。例えば、特異的結合は、標的と類似する対照分子、例えば、過剰の標識していない標的との競合によって測定することができる。この場合、プローブへの標識された標的の結合が過剰の標識していない標的によって競合的に阻害される場合、特異的結合であることが示される。一実施形態において、用語「特異的結合」とは、ある分子が他のいずれのポリペプチドまたはポリペプチドエピトープにも実質的に結合することなく、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合する結合をいう。

30

40

【0085】

用語「がん」及び「がん性の」とは一般に、無秩序な細胞増殖を特徴とする哺乳動物における生理学的状態をいうまたは記述する。「腫瘍」は、1種以上のがん性細胞を含む。がんの例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病またはリンパ性悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定はされない。かかるがんのより詳細な例としては、扁平上皮癌(例えば上皮性扁平上皮癌(epithelial squamous cell cancer))、皮膚癌、黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌(「NSCLC」)、肺腺癌、及び肺扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜の癌、消化管癌を含む胃癌または胃癌(gastric or stomach cancer)、膵臓癌(例えば膵管腺癌)、神経膠芽腫

50

胞腫、子宮頸癌、卵巣癌（例えば高悪性度漿液性卵巣癌）、肝臓癌（例えば、肝細胞癌（HCC）、肝内胆管癌（ICC））、膀胱癌（例えば尿路上皮性膀胱癌）、精巣癌（胚細胞腫瘍）、肝細胞癌、乳癌、脳癌（例えば星状細胞腫）、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎癌（kidney cancer）または腎臓癌（renal cancer）（例えば、腎細胞癌、腎芽細胞腫、もしくはウィルムス腫瘍）、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭頸部癌が挙げられる。がんのさらなる例としては、網膜芽細胞腫、卵胞膜細胞腫、男性化細胞腫、肝細胞癌、非ホジキンリンパ腫（NHL）、多発性骨髄腫、及び急性血液悪性腫瘍を含む血液悪性腫瘍、子宮内膜癌または子宮癌、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛癌、唾液腺癌、外陰癌、甲状腺癌、食道癌、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、鼻咽頭癌、喉頭癌、カボジ肉腫、黒色腫、皮膚癌、シュワン腫、乏突起神経膠腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、平滑筋肉腫、及び尿路癌が挙げられるが、これらに限定はされない。

10

【0086】

用語「転移癌」とは、原発の組織のがん細胞が、血管またはリンパ管によって原発部位から体内の他の1つ以上の部位に移動し、原発の組織以外の1つ以上の臓器に1つ以上の続発性腫瘍を形成するがんの状態を意味する。

【0087】

本明細書では、「AS-SPIKの発現を特徴とする障害」の「AS-SPIK関連障害」とは、AS-SPIK遺伝子もしくは遺伝子産物（AS-SPIKポリペプチド）の発現または過剰発現に関連する障害であり、該障害は、適宜の対照細胞と比較して、正常なまたは高いレベルのAS-SPIKを発現する細胞を特徴とする任意の障害であってよい。適宜の対照細胞は、AS-SPIKを発現するもしくは過剰発現する癌に罹患していない個体由来の細胞であるか、または必要とするいずれかの対象由来の非癌性細胞であるか、またはAS-SPIKを発現するもしくは過剰発現する癌に罹患している別の個体由来の非がん性細胞であってよい。AS-SPIK関連障害の1つの顕著な例は肝臓癌である。

20

【0088】

用語「細胞増殖性障害」及び「増殖性障害」とは、何らかの程度の異常な細胞増殖に関連する障害をいう。一実施形態において、上記細胞増殖性障害はがんである。

【0089】

本明細書では、「腫瘍」とは、悪性または良性を問わず、すべての新生物性の細胞の増殖（growth）及び増殖（proliferation）、ならびにすべての前がん性及びがん性の細胞及び組織をいう。

30

【0090】

本明細書では、用語「予測される」及び「予知される」も、予測方法または予知方法によって、該方法を実施する人が、（通常は治療の前に、但し必ずしもそうである必要はない）抗AS-SPIK抗体を含む抗がん剤による治療に対して反応する可能性がより高いと考えられる患者を選択することが可能になるという意味で同義である。

【0091】

本明細書では、用語「治療する（treat）」、「治療」、または「治療する（treating）」とは、治療的処置及び予防的（prophylactic）または予防的（preventative）手段の両方をいい、後者の目的は、標的とされる病的状態または障害を予防または減速（低減）することである。治療を必要とする対象としては、既に特定の疾病または障害に罹患している対象、ならびに当該障害に罹患しやすいまたは当該対象における障害を予防すべき対象が挙げられる。

40

【0092】

発明の詳細な説明

本発明は、特定の障害が特有の形態のカザール型セリンプロテアーゼ阻害因子（SPIK）の発現を特徴とするという発見に、少なくとも部分的に基づいている。顕著な例が、肝細胞癌（HCC）及び肝内胆管癌（ICC）を含むが、これらに限定はされない肝臓癌

50

であれば。より詳細には、本発明者らは、肝臓癌などの特定の癌が、分泌された S P I K ポリペプチドの N 末端にさらなる 2 3 アミノ酸を含む S P I K の形態を発現することを見出した。この 2 3 アミノ酸セグメント（配列番号 8 1）は、膵細胞などの正常な細胞から分泌される S P I K ポリペプチド中には存在しない。このことは、この 2 3 アミノ酸セグメントの最初の 9 アミノ酸が、肝臓癌細胞株によって分泌される未処理の S P I K 中に存在する可能性があるという本発明者らの既報と一致する。Lu et al., Immunology 2011; 134 (4): 398 - 408。この長い形態の S P I K を A S - S P I K、すなわち異常な分泌 S P I K (Abnormal Secreted S P I K) と呼ぶ場合がある。また、肝臓癌細胞によって産生される A S - S P I K を L C - S P I K、すなわち肝臓癌分泌 S P I K (Liver Cancer Secreted S P I K) と呼ぶ場合もある。用語 A S - S P I K 及び L C - S P I K は本明細書において同義で使用される。例示的な A S - S P I K ポリペプチドは、配列番号 8 2 のアミノ酸配列を有する場合がある。本発明者らは、膵細胞などの正常な細胞によって分泌される形態の S P I K を、N S - S P I K、すなわち正常分泌 S P I K (Normal Secreted S P I K) と呼ぶ場合がある。例示的な N S - S P I K ポリペプチドは、配列番号 8 3 のアミノ酸配列を有する場合がある。本発明者らはまた、A S - S P I K の配座（例えば 3 D 構造）が、N S - S P I K の配座と異なることも見出した。

【0093】

したがって、本発明の態様は、A S - S P I K に特異的にまたは優先的に結合し、N S - S P I K に結合しない抗体などの組成物を含む。A S - S P I K 複合体も提供される。本発明の実施形態にかかる A S - S P I K 複合体は、A S - S P I K に特異的にまたは優先的に結合する抗体、及び A S - S P I K ポリペプチド、またはそのフラグメントを含む。

【0094】

本発明の態様は、本明細書に記載の抗体 (A b)、リンカー (L)、及び薬物部分 (D) を含む抗体薬物複合体 (A D C) を含む。いくつかの実施形態において、A D C は式 A b - (L - D) p (式中、p は 1 ~ 8 の範囲の整数である) を有する。

【0095】

本発明の態様はまた、A S - S P I K の発現を特徴とする障害、例えば、肝臓癌、例えば、H C C または I C C などの肝障害の検出のための、本主題の抗体の使用方法も含む。

【0096】

本発明者らは、本発明者らが、A S - S P I K の発現の際に発生する特定の事象を理解していると考えているが、本発明の組成物及び方法は、いずれかの特定の細胞機序に影響を与えることによって機能する組成物及び方法には限定されない。本発明者らは、理論に拘束されるものではないが、S P I K はプロテアーゼ阻害因子であるため、癌細胞における S P I K の過剰発現は、一種のプロテアーゼであるシグナルペプチドペプチダーゼの活性を抑制し、その結果、癌細胞から非弱毒化完全長タンパク質が分泌されるとの仮説を立てている。

【0097】

組成物

本明細書で提供される組成物は、A S - S P I K に特異的にまたは優先的に結合し、且つ N S - S P I K に結合しない抗体を含む。

【0098】

S P I N K 1、P S T I、及び T A T I としても知られるカザール型セリンプロテアーゼ阻害因子 (S P I K) は、トリプシン様プロテアーゼ及びキモトリプシン様プロテアーゼなどの多くの細胞プロテアーゼの活性を広く調節することが明らかになっている小タンパク質である。Greene, L J, J Surg Oncol. 1975; 7 (2): 151 - 154; Horii et al., Biochemical and biophysical research communications 1987; 149 (2): 635 - 641; Stenman, UH, Clin Chem. 2002; 48 (8): 1206 - 1209。S P I K はアポトーシスの阻害の役割も担ってい

る可能性がある。Lu et al., Immunology 2011; 134(4): 398-408。例示的なヒトSPIKアミノ酸配列としては、GenBankアクセッション番号: M11949、GI番号: 190687; GenBankアクセッション番号: NM003122、GI: 657940887; 及びGeneBankアクセッション番号: BC025790、GI: 19343607が挙げられる。

【0099】

抗体

本明細書で提供される抗体は、配列番号82のアミノ酸1~23内のエピトープ、もしくはこの領域内の少なくとも1つのアミノ酸を含むエピトープに特異的にまたは優先的に結合する抗体を含んでいてもよい。上記エピトープは配座エピトープ(配座特異のエピトープ)または線状エピトープであってよい。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号81に示されるAS-SPIKタンパク質配列中のエピトープに特異的にまたは優先的に結合する。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号81の少なくとも1つのアミノ酸を含む配座特異のエピトープに特異的にまたは優先的に結合する。

【0100】

本発明の実施形態に係る抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル、特にモノクローナルであってよく、ヒト、マウス、ウサギ、ヒツジ、もしくはヤギの細胞によって、またはこれらの細胞に由来するハイブリドーマによって産生することができる。いくつかの実施形態において、抗体はヒト化抗体またはキメラ抗体であってよい。

【0101】

本発明の実施形態に係る抗体は様々な立体配置をとることができ、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされる1種以上のポリペプチドからなるタンパク質を包含することができる。インタクトな抗体、抗体多量体、または抗体フラグメントもしくはそれらの他の変異体であって、上記抗体の機能的な、抗原結合領域を含む上記抗体フラグメントもしくはそれらの他の変異体を含む、様々な抗体構造のいずれか1つを使用することができる。用語「免疫グロブリン」は「抗体」と同義で使用することができる。上記抗体は、モノクローナルまたはポリクローナル由来であってよい。上記抗体の出処にかかわらず、好適な抗体としては、インタクトな抗体、例えば、2本の重(H)鎖及び2本の軽(L)鎖を有するIgG四量体、一本鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、相補性決定領域(CDR)移植抗体、ならびに抗体フラグメント、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、及びかかるフラグメントに由来する組換え抗体、例えば、キャメルボディー(camelbodies)、マイクロ抗体、ダイアボディ、及び二重特異性抗体が挙げられる。

【0102】

インタクトな抗体とは、抗原結合可変領域(VH及びVL)ならびに軽鎖定常ドメイン(CL)及び重鎖定常ドメイン、CH1、CH2、及びCH3を含む抗体である。上記定常ドメインは、天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)またはそのアミノ酸配列変異体であってよい。当技術分野で周知のように、上記VH及びVL領域は、より保存されたフレームワーク領域(FR)が点在する「相補性決定領域」(CDR)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化される。抗体の上記CDRは通常、天然免疫グロブリン結合部位の天然Fv領域の結合親和性及び特異性を共に規定するアミノ酸配列を含む。

【0103】

抗AS-SPIK抗体は、任意のクラスの免疫グロブリン、例えば、IgA、IgG、IgE、IgD、IgM(ならびにそれらのサブタイプ(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4))に由来していてもよく、上記免疫グロブリンの軽鎖は、カッパ型またはラムダ型であってよい。認識されているヒト免疫グロブリン遺伝子としては、カッパ、ラムダ、アルファ(IgA1及びIgA2)、ガンマ(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、デルタ、イプシロン、及びミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0104】

用語、免疫グロブリンまたは抗体の「抗原結合部分」とは一般に、標的、この場合、A S - S P I K上の、但しN S - S P I K上にはないアミノ酸残基（配列番号81）を含むエピトープに特異的にまたは優先的に結合する免疫グロブリンの部分という。したがって、免疫グロブリンの抗原結合部分は、分子であって、その中の1つ以上の免疫グロブリン鎖が完全長ではないが、細胞標的に特異的にまたは優先的に結合する上記分子である。抗原結合部分またはフラグメントの例としては、(i) F a bフラグメント、V L C、V H C、C L、及びC H 1ドメインからなる一価フラグメント；(ii) F (a b ') 2フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのF a bフラグメントを含む二価フラグメント；(iii) 抗体のシングルアームのV L C及びV H CドメインからなるF vフラグメント；ならびに(v) 特異的にまたは優先的に結合するのに十分なフレームワークを有する単離されたC D R、例えば、可変領域の抗原結合部分が挙げられる。軽鎖可変領域の抗原結合部分及び重鎖可変領域の抗原結合部分、例えば、F vフラグメントの2つのドメイン、V L C及びV H Cは、組換え法を使用して、V L CとV H Cを、該V L C領域とV H C領域が対合して一価の分子（単鎖F v (s c F v) として知られる）を形成する単一タンパク質鎖とすることができる合成リンカーによって結合することができる。かかるs c F vは、用語、抗体の「抗原結合部分」に包含される。

10

【0105】

「F v」フラグメントは、完全な抗原認識部位及び抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、緊密に共有結合した1本の重鎖可変ドメインと1本の軽鎖可変ドメインの二量体から構成されている。この構成では、各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、V H - V L二量体の表面に抗原結合部位を画成する。6つの超可変領域が抗原結合特異性を付与するが、単一の可変ドメイン（すなわち、抗原に対して特異的な3つの超可変領域のみしか含まないF vの半分）でも、結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識して結合する能力を有する。安定性を向上させるために、V H - V Lドメインを、(G l y 4 S e r) 3などの柔軟なペプチドリンカーによって接続して、単鎖F vすなわちs c F v抗体フラグメントを形成してもよく、またはフレームワーク領域中に2つのシステイン残基を導入することによってジスルフィド結合を形成するように操作して、ジスルフィド安定化F v (d s F v) を生成させてもよい。

20

【0106】

抗体のフラグメントは、該フラグメントが全長抗体の所望の特異性及び/またはA S - S P I Kに結合し且つN S - S P I Kに結合しないための十分な特異性を保持する限り、提供される方法における使用に適する。

30

【0107】

本明細書に記載の抗体の抗原結合ドメインは、T細胞誘導分子（例えば、二重特異性T細胞誘導、別名B i T E分子）ならびにC A R - T構造の産生に利用することができる。T細胞誘導分子は、例えば、Huehls et al., Bispecific T cell engagers for cancer immunotherapy, Immunol Cell Biol. 2015 Mar; 93(3): 290-296に記載される。結合（標的）ドメインとして単一ドメイン抗体を含むC A R - T構造は、例えば、Iri-Sofla et al., 2011, Experimental Cell Research 317: 2630-2641及びJamnani et al., 2014, Biochim Biophys Acta, 1840: 378-386に記載される。

40

【0108】

抗体フラグメントを調製するための方法は、生化学的方法（例えば、インタクトな抗体のタンパク質分解消化、及びそれに続く化学的架橋）ならびに免疫グロブリン配列を所望のフラグメントの合成を指示するように遺伝子操作する組換えDNAに基づく方法の両方を包含する。抗体フラグメントは、非特異的チオールプロテアーゼであるパパインによる全免疫グロブリンのタンパク質分解によって得ることができる。パパイン消化により、「

50

F a b フラグメント」と呼ばれる 2 つの同一の抗原結合フラグメントであって、それぞれが単一の抗原結合部位を有する上記フラグメントと、残余の「F c フラグメント」とが生成する。様々な画分をプロテイン A - セファロースまたはイオン交換クロマトグラフィーによって分離することができる。ウサギ及びヒト由来の I g G から F (a b ') 2 フラグメントを調製するための通常の手順は、酵素ペプシンによる制限タンパク質分解である。インタクトな抗体のペプシン処理により、2 つの抗原結合部位を有し、なおも抗原を架橋する能力を有する F (a b ') 2 フラグメントが生成する。F a b フラグメントは、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第 1 の定常ドメイン (C H 1) を含む。F a b ' フラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の 1 つ以上のシステイン (複数可) を含む重鎖 C H 1 ドメインのカルボキシル末端に、少数の残基が付加されている点で F a b フラグメントと異なる。F (a b ') 2 抗体フラグメントは当初、ヒンジシステインをそれらの間に有する F a b ' フラグメントの対として生成した。

10

【 0 1 0 9 】

抗 A S - S P I K 抗体の製造方法も本発明の範囲内である。例えば、P C R 変異誘発法を使用して免疫グロブリン鎖をコードする D N A 配列を改変することで (例えば、ヒト化免疫グロブリンを生成するために使用される方法を使用して) 、可変領域を構築することができる。

【 0 1 1 0 】

モノクローナル抗体は、抗体産生細胞の単一クローンによって産生される同一の抗原特異性の均一な抗体であり、ポリクローナル抗体は一般に、同一の抗原上の異なるエピトープを認識し、抗体産生細胞の複数のクローンによって産生される。それぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向する。修飾語、モノクローナルとは、当該の抗体の性格が、実質的に均一な抗体の集団から得られるものであることを示すのであって、当該の抗体がいずれかの特定の方法によって産生されることを要すると解釈されるべきものではない。

20

【 0 1 1 1 】

本明細書におけるモノクローナル抗体は、キメラ抗体、すなわち、特定の種に由来する、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同である重鎖及び / または軽鎖の一部を通常有し、上記鎖 (複数可) の残余の部分が、別の種に由来する、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同である抗体、ならびに、所望の生物学的活性を示す限りにおけるかかる抗体のフラグメントを含んでいてもよい。対象となるキメラ抗体としては、非ヒト霊長動物 (例えば、類人猿、旧世界ザル、新世界ザル、原猿) に由来する可変ドメイン抗原結合配列及びヒト定常領域配列を含む霊長動物化抗体が挙げられる。

30

【 0 1 1 2 】

マウスまたはウサギのモノクローナル抗体は、N S - S P I K 中には存在せず、A S - S P I K 中に、N S - S P I K 中及び A S - S P I K 中の両方に存在するアミノ酸配列である共通領域 (配列番号 8 3) に加えて存在する、追加の 2 3 アミノ酸配列 (配列番号 8 1) を有する特別に設計された組換えタンパク質でマウスまたはウサギを免疫することによって生成させた。いくつかの実施形態において、上記組換えタンパク質は、A S - S P I K にのみ結合し、N S - S P I K には結合しないことに有効な抗体を生成させるためには、2 3 アミノ酸配列全体 (配列番号 8 1) を有する必要はない場合がある。A S - S P I K に特異的にまたは優先的に結合する抗体をスクリーニング及び選択するための方法は、実施例 1 に記載されている。

40

【 0 1 1 3 】

図 1 にモノクローナル抗体の試験結果を示しており、これらの結果は、本発明の抗体が A S - S P I K を特異的にまたは優先的に認識することができるが、N S - S P I K を認識することはできないことを示しており、これらの抗体には、I M - A 1、I M - A 6、I M - B 1 0、I M - C 6、I M - D 3、I M - D 5、I M - E 2、I M - F 5、I M - G 6、及び I M - G 7 が含まれるが、これらに限定はされない。試験の説明については実

50

施例 1 を参照されたい。

【 0 1 1 4 】

A S - S P I K に特異的にまたは優先的に結合する（且つ N S - S P I K には結合しない）モノクローナル抗体の軽鎖（V L）及び重鎖（V H）の可変領域の配列を決定した（配列番号 1 ～ 2 0）。これらの抗体のすべての C D R も決定した（配列番号 2 1 ～ 8 0）。図 3 ～ 6 はこれらの領域のコンセンサスアミノ酸配列を示す。表 1 ～ 3 は、1 0 種の本発明の例示的な抗体の様々な V H 及び V L 領域の配列番号を示す。

【 0 1 1 5 】

例えば、I M - A 1 抗体は配列番号 1 に示す V H 領域を有し、配列番号 1 1 に示す V L 領域を有する。上記 V H 領域は配列番号 2 1、3 1、及び 4 1 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。上記 V L 領域は配列番号 5 1、6 1、及び 7 1 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。

10

【 0 1 1 6 】

I M - A 6 抗体は配列番号 2 に示す V H 領域を有し、配列番号 1 2 に示す V L 領域を有する。上記 V H 領域は配列番号 2 2、3 2、及び 4 2 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。上記 V L 領域は配列番号 5 2、6 2、及び 7 2 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。

【 0 1 1 7 】

I M - B 1 0 抗体は配列番号 3 に示す V H 領域を有し、配列番号 1 3 に示す V L 領域を有する。上記 V H 領域は配列番号 2 3、3 3、及び 4 3 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。上記 V L 領域は配列番号 5 3、6 3、及び 7 3 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。

20

【 0 1 1 8 】

I M - C 6 抗体は配列番号 4 に示す V H 領域を有し、配列番号 1 4 に示す V L 領域を有する。上記 V H 領域は配列番号 2 4、3 4、及び 4 4 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。上記 V L 領域は配列番号 5 4、6 4、及び 7 4 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。

【 0 1 1 9 】

I M - D 3 抗体は配列番号 5 に示す V H 領域を有し、配列番号 1 5 に示す V L 領域を有する。上記 V H 領域は配列番号 2 5、3 5、及び 4 5 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。上記 V L 領域は配列番号 5 5、6 5、及び 7 5 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。

【 0 1 2 0 】

I M - D 5 抗体は配列番号 6 に示す V H 領域を有し、配列番号 1 6 に示す V L 領域を有する。上記 V H 領域は配列番号 2 6、3 6、及び 4 6 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。上記 V L 領域は配列番号 5 6、6 6、及び 7 6 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。

30

【 0 1 2 1 】

I M - E 2 抗体は配列番号 7 に示す V H 領域を有し、配列番号 1 7 に示す V L 領域を有する。上記 V H 領域は配列番号 2 7、3 7、及び 4 7 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。上記 V L 領域は配列番号 5 7、6 7、及び 7 7 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。

【 0 1 2 2 】

I M - F 5 抗体は配列番号 8 に示す V H 領域を有し、配列番号 1 8 に示す V L 領域を有する。上記 V H 領域は配列番号 2 8、3 8、及び 4 8 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。上記 V L 領域は配列番号 5 8、6 8、及び 7 8 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。

40

【 0 1 2 3 】

I M - G 6 抗体は配列番号 9 に示す V H 領域を有し、配列番号 1 9 に示す V L 領域を有する。上記 V H 領域は配列番号 2 9、3 9、及び 4 9 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。上記 V L 領域は配列番号 5 9、6 9、及び 7 9 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。

【 0 1 2 4 】

I M - G 7 抗体は配列番号 1 0 に示す V H 領域を有し、配列番号 2 0 に示す V L 領域を有する。上記 V H 領域は配列番号 3 0、4 0、及び 5 0 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。上記 V L 領域は配列番号 6 0、7 0、及び 8 0 に対応する 3 つの C D R 領域を有する。

50

【 0 1 2 5 】

さらに、本発明の実施形態にかかる抗体は、A S - S P I K に特異的にまたは優先的に結合し、N S - S P I K に結合しない任意の天然に存在しない（人工の）抗体であってもよい。

【 0 1 2 6 】

いくつかの実施形態において、抗体は、得られる抗体または抗原結合フラグメントが特異的にまたは優先的に A S - S P I K に結合し、且つ N S - S P I K には結合しないとの条件で、配列番号 1 ~ 1 0 のいずれか 1 つに示す配列を有する V H 領域を含むか、または配列番号 1 ~ 1 0 のいずれか 1 つの重鎖可変領域配列に対する少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列を含む V H 領域を有する。

10

【 0 1 2 7 】

いくつかの実施形態において、抗体は、得られる抗体または抗原結合フラグメントが特異的にまたは優先的に A S - S P I K に結合し、且つ N S - S P I K には結合しないとの条件で、配列番号 1 1 ~ 2 0 のいずれか 1 つに示す配列を有する V L 領域を含むか、または配列番号 1 1 ~ 2 0 のいずれか 1 つの重鎖可変領域配列に対する少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 9 % の同一性を有する配列を含む V L を有する。

【 0 1 2 8 】

いくつかの実施形態において、抗体は、得られる抗体が特異的にまたは優先的に A S - S P I K に結合し、且つ N S - S P I K には結合しない限り、配列番号 2 1 ~ 3 0 のいずれか 1 つに示す配列を有するか、または配列番号 2 1 ~ 3 0 のいずれか 1 つに含むアミノ酸変異が 2 つ以下の V H C D R 1 領域を含む。いくつかの実施形態において、V H C D R 1 領域は以下の構造式を含んでいてもよく、式中、X は可変アミノ酸を示し、これは同定されたアミノ酸：S X₁ X₂ X₃ X₄ S（配列番号 1 0 7）のいずれかであってよく、式中、X₁ は S または A であり、X₂ は Y または N であり、X₃ は A、G、P、または V であり、X₄ は I または V である。

20

【 0 1 2 9 】

いくつかの実施形態において、抗体は、得られる抗体が特異的にまたは優先的に A S - S P I K に結合し、且つ N S - S P I K には結合しない限り、配列番号 3 1 ~ 4 0 のいずれか 1 つに示す配列を有するか、または配列番号 3 1 ~ 4 0 のいずれか 1 つに含むアミノ酸変異が 2 つ以下の V H C D R 2 領域を含む。いくつかの実施形態において、V H C D R 2 領域は以下の構造式を含んでいてもよく、式中、X は可変アミノ酸を示し、これは同定されたアミノ酸：X₅ I X₆ X₇ X₈ G X₉ X₁₀ X₁₁ Y A S W A K S（配列番号 1 0 8）のいずれかであってよく、式中、X₈ は S、G、または Y であり、X₅、X₆、X₇、X₉、X₁₀、及び X₁₁ は任意のアミノ酸である。

30

【 0 1 3 0 】

いくつかの実施形態において、抗体は、得られる抗体が特異的にまたは優先的に A S - S P I K に結合し、且つ N S - S P I K には結合しない限り、配列番号 4 1 ~ 5 0 のいずれか 1 つに示す配列を有するか、または配列番号 4 1 ~ 5 0 のいずれか 1 つに含むアミノ酸変異が 2 つ以下の V H C D R 3 領域を含む。いくつかの実施形態において、V H C D R 3 領域は以下の構造式を含んでいてもよく、式中、X は可変アミノ酸を示し、これは同定されたアミノ酸：R X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅ X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁（配列番号 1 0 9）のいずれかであってよく、式中、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、及び X₂₁ は任意のアミノ酸である。

40

【 0 1 3 1 】

いくつかの実施形態において、抗体は、得られる抗体が特異的にまたは優先的に A S - S P I K に結合し、且つ N S - S P I K には結合しない限り、配列番号 5 1 ~ 6 0 のいずれか 1 つに示す配列を有するか、または配列番号 5 1 ~ 6 0 のいずれか 1 つに含むアミノ酸変異が 2 つ以下の V L C D R 1 領域を含む。いくつかの実施形態において、V L C D

50

R 1 領域は以下の構造式を含んでいてもよく、式中、X は可変アミノ酸を示し、これは同定されたアミノ酸：Q A S X₂₂ X₂₃ I X₂₄ X₂₅ X₂₆ L X₂₇（配列番号 1 1 0）のいずれかであってよく、式中、X₂₂ は Q または E であり、X₂₃ は S、G、D、または N であり、X₂₄ は S、N、E、または G であり、X₂₅ は任意のアミノ酸であり、X₂₆ は Y または A であり、X₂₇ は任意のアミノ酸である。

【 0 1 3 2 】

いくつかの実施形態において、抗体は、得られる抗体が特異的にまたは優先的に A S - S P I K に結合し、且つ N S - S P I K には結合しない限り、配列番号 6 1 ~ 7 0 のいずれか 1 つに示す配列を有するか、または配列番号 6 1 ~ 7 0 のいずれか 1 つに含むアミノ酸変異が 2 つ以下の V L C D R 2 領域を含む。いくつかの実施形態において、V L C D R 2 領域は以下の構造式を含んでいてもよく、式中、X は可変アミノ酸を示し、これは同定されたアミノ酸：X₂₈ A X₂₉ X₃₀ L X₃₁ S（配列番号 1 1 1）のいずれかであってよく、式中、X₂₈ は任意のアミノ酸であり、X₂₉ は S または T であり、X₃₀ は T、Y、または K であり、X₃₁ は A、P、または V である。

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態において、抗体は、得られる抗体が特異的にまたは優先的に A S - S P I K に結合し、且つ N S - S P I K には結合しない限り、配列番号 7 1 ~ 8 0 のいずれか 1 つに示す配列を有するか、または配列番号 7 1 ~ 8 0 のいずれか 1 つに含むアミノ酸変異が 2 つ以下の V L C D R 3 領域を含む。いくつかの実施形態において、V L C D R 3 領域は以下の構造式を含んでいてもよく、式中、X は可変アミノ酸を示し、これは同定されたアミノ酸：X₃₂ Q X₃₃ Y X₃₄ X₃₅ X₃₆ X₃₇ X₃₈ X₃₉ X₄₀ X₄₁（配列番号 1 1 2）のいずれかであってよく、式中、X₃₂ は Q または H であり、X₃₃ は G または D であり、X₃₄ は任意のアミノ酸であり、X₃₅ は任意のアミノ酸であり、X₃₆ は S または N であり、X₃₇ は N、D、V、または G であり、X₃₈ は V、D、または I であり、X₃₉ は D、G、または N であり、X₄₀ は N または V であり、X₄₁ は任意のアミノ酸である。

【 0 1 3 4 】

本発明の実施形態にかかる抗体は、該抗体が A S - S P I K に結合し、且つ N S - S P I K には結合しない限り、前述の相同性またはパーセント表示同一性を有する配列を始めとする、本明細書に記載の V H、V L、V H C D R 1、V H C D R 2、もしくは V H C D R 3、または V L C D R 1、V L C D R 2、もしくは V L C D R 3 領域、あるいはこれらの領域の任意の組み合わせのいずれかを含んでいてもよい。

【 0 1 3 5 】

本明細書に記載の構造式及びコンセンサス配列は、North Carolina State University によって開発されたソフトウェアプログラム「BioEdit」を使用して決定した。

【 0 1 3 6 】

これらすべての抗体の A S - S P I K に対する高い結合活性を検討した。その結果を実施例 1 に示す。

【 0 1 3 7 】

モノクローナル抗体の産生方法は精製ステップを含んでいてもよい。例えば、本抗体を、一般に、例えば、ろ過、遠心分離、及び H P L C またはアフィニティークロマトグラフィーなどの様々なクロマトグラフィー法を使用してさらに精製してもよく、これらのすべては当業者に周知の技法である。これらの精製技法はそれぞれ、混合物の他の成分から所望の抗体を分離するための分画を含む。抗体の調製に特に適した分析方法としては、例えば、プロテイン A - セファロース及び / またはプロテイン G - セファロースクロマトグラフィーが挙げられる。

【 0 1 3 8 】

本発明の抗 A S - S P I K 抗体は、ヒトまたは非ヒト由来の C D R を含んでいてもよい。「ヒト化」抗体は一般に、ヒトの定常領域ドメイン及び / または可変領域ドメインまた

10

20

30

40

50

は特定の変更を有する、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはその他の種由来のキメラあるいは変異モノクローナル抗体である。免疫グロブリンのフレームワークは、ヒト、ヒト化、もしくは非ヒトフレームワーク（例えば、ヒトにおける抗原性を低減するように修飾されたマウスフレームワーク）、または合成フレームワーク（例えばコンセンサス配列）であってよい。ヒト化免疫グロブリンは、フレームワーク残基がヒト生殖細胞系配列に対応し、CDRがV(D)J組換え及び体細胞変異に由来する免疫グロブリンである。但し、ヒト化免疫グロブリンは、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン核酸配列にコードされていないアミノ酸残基も含む場合がある（例えば、エクスピボでのランダムまたは部位特異的変異誘発によって導入される変異）。生殖細胞系配列に基づくが、例えば、インピボの体細胞変異プロセスによって導入されたフレームワーク変異を有する抗体可変ドメイン遺伝子は「ヒト」と呼ばれる。

10

【0139】

ヒト化抗体は、例えば、（１）非ヒト相補性決定領域（CDR）をヒトフレームワーク及び定常領域上に移植すること（当技術分野ではヒト化と呼ばれるプロセス）、あるいは（２）非ヒト可変ドメイン全体を移植する、但し、表面残基の置換によって上記ドメインにヒト様表面を与えること（当技術分野ではベニアリングと呼ばれるプロセス）を含む、当技術分野で公知の様々な方法によって操作してもよい。ヒト化抗体にはヒト化抗体及びベニヤ化抗体（*veneered antibodies*）の両方を含めてもよい。同様に、ヒト抗体は、トランスジェニック動物、例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されているマウスにヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することによって作製することができる。負荷を行うとヒト抗体の産生が観測され、この産生は、遺伝子再配列、アセンブリ、抗体レパートリーを含むあらゆる点で、ヒトにおいて見られる産生と酷似している。

20

【0140】

キメラ抗体及びヒト化抗体に加えて、完全ヒト抗体を、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスから誘導することができる。いくつかの実施形態において、抗体は、scFv-ファージディスプレイライブラリーによって産生及び同定することができる。

【0141】

本抗AS-SPIK抗体を、該抗体の抗原結合親和性、該抗体のエフェクター機能、または該抗体の薬物動態を調節するように修飾することもできる。特に、上記CDR中でランダム変異を行い、産生物をスクリーニングして、より高い親和性及び／またはより高い特異性を有する抗体を識別してもよい。通常、上記CDRは１つまたは２つのアミノ酸が異なっていればよい。

30

【0142】

CDRシャッフリング及び移植技術を、例えば、本明細書で提供される抗体と共に使用してもよい。CDRシャッフリングは、CDR配列を特定のフレームワーク領域に挿入する。CDR移植技法により、CDR配列をランダムに組み合わせる単一のマスターフレームワークにすることができる。かかる技法を使用して、例えば、本抗AS-SPIK抗体のCDR配列を変異誘発に供して複数の異なる配列を生成させ、これを足場配列中に組み込み、得られた抗体変異体を所望の特性、例えばより高い親和性に関してスクリーニングしてもよい。

40

【0143】

本発明者らによるSPIKの機能の検討により、SPIKがグランザイムA（GzmA）に結合し、グランザイムAがアポトーシスを誘導するのを阻害することができることが明らかになっている。Luet al., *Immunology* 2011; 134(4): 398-408. GzmAは活性化されたCTL及びNK細胞によって分泌される細胞傷害性セリンプロテアーゼであり、免疫監視の間に標的細胞を殺滅する。腫瘍前駆体／腫瘍生殖細胞などの悪性細胞の除去におけるGzmA誘導アポトーシスの役割が確認されている。Pardo et al., *Eur J Immunol* 2002; 32(1

50

0) : 2881 - 2887。したがって、肝臓癌細胞におけるAS - SPIKの過剰発現によって、上記細胞が、免疫クリアランスの間にGzmAによって誘導されるアポトーシスに対して耐性になる可能性がある。これにより、これらの癌細胞は免疫経路による殺滅から逃れる。Lu et al., Immunology 2011; 134(4): 398 - 408。この仮説に基づき、理論に拘束されるものではないが、上記AS - SPIKの過剰発現を抑制すること、または過剰発現されたAS - SPIKの活性を阻害することにより、人体の免疫クリアランスの間にGzmAによって誘導される癌細胞の免疫殺滅が回復する可能性があると結論付けている。

【0144】

本発明の実施形態にかかる抗AS - SPIK抗体は、PCT出願第PCT/US19/20999号(該出願の開示はその全体が本明細書に援用される)の開示によって示されるように、AS - SPIKの活性を阻害することができる。したがって、抗AS - SPIK抗体を使用して、AS - SPIKのGzmAとの結合を遮断し、GzmAを解放し、免疫クリアランスを介したこれらの癌細胞のアポトーシスによる殺滅を回復させることが可能である。この目的のために、抗SPIK抗体を、がん、ウイルス感染症、及び炎症を含む、但しこれらに限定されないAS - SPIKの発現を特徴とする障害の治療に使用することができる。

【0145】

抗体の1つの治療上の使用はヒト化を介する。ヒト化モノクローナル抗体による治療は急速に発展している領域であり、上記抗体の特異性及び効力は十分に研究されている。Rothernberg, ME, Cell 2016; 165(3): 509。IM - A1、IM - A6、IM - B10、IM - C6、IM - D3、IM - D5、IM - E2、IM - F5、IM - G6、及びIM - G7、ならびにSPIKの活性を阻害することができる本発明の他の抗体を含む、但しこれらに限定されない、本主題の抗AS - SPIKモノクローナル抗体もヒト化され、疾患の治療に使用することができる。

【0146】

例えば、ファージミド技術を使用する組換え技術によって、様々な抗体をコードする組換え遺伝子由来の、所望の特異性を有する抗体の調製が可能になっている。特定の組換え技術は、免疫動物の脾臓から単離されたRNAから調製されたコンビナトリアル免疫グロブリンファージ発現ライブラリーの免疫学的スクリーニングによる抗体遺伝子の単離を含む。かかる方法では、コンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリーを、免疫動物の脾臓から単離されたRNAから調製することができ、抗原を発現する細胞及び対照細胞を使用したパニングにより、適当な抗体を発現するファージミドを選択することができる。

【0147】

上記に開示したコンビナトリアル免疫グロブリンファージ発現ライブラリーに加えて、1つの分子クローニングによるアプローチは、ヒト抗体ライブラリーを含むトランスジェニックマウスから抗体を調製することである。かかるトランスジェニック動物を使用して、単一のイソ型、より詳細には、IgM及びおそらくIgDなどの、B細胞成熟に必須であるイソ型のヒト抗体を産生することができる。

【0148】

本抗AS - SPIK免疫グロブリンは、グリコシル化を低減または消失させるように修飾することができる。グリコシル化が欠如する免疫グロブリンは、全くグリコシル化されていない、完全にはグリコシル化されていない、または変則的にグリコシル化された(すなわち、上記変異体のグリコシル化パターンは、対応する野生型免疫グロブリンのグリコシル化パターンと異なる)免疫グロブリンであってもよい。上記IgGポリペプチドは、グリコシル化を減弱する、1つ以上(例えば、1つ、2つ、または3つ以上)の変異、すなわち、グリコシル化が欠如する、または完全にはグリコシル化されていない、または変則的にグリコシル化されたIgG CH2ドメインを生じる変異を含む。オリゴ糖構造も、例えば、N - 結合型グリカンからフコース部分を除去することによって、修飾されてい

10

20

30

40

50

てもよい。

【0149】

抗体はまた、非タンパク質ポリマー、例えばポリエチレングリコールなどと複合体化することにより、インビボでの安定性及び／または溶解性を高めるように修飾することもできる。本抗AS-SPIK抗体がAS-SPIKに選択的に結合し、NS-SPIKには結合しない能力を保持している限り、任意のPEG化法を使用することができる。

【0150】

得られるポリペプチドが、標的、すなわちAS-SPIKに特異的な少なくとも1つの結合領域を含む限り、多種多様の抗体／免疫グロブリンフレームワークまたは足場を使用することができる。かかるフレームワークまたは足場としては、ヒト免疫グロブリンの5つの主要なイデオタイプ、またはそれらのフラグメント（本明細書の他の所に開示されているものなど）が挙げられ、また他の動物種の、好ましくはヒト化された状況を有する免疫グロブリンが挙げられる。ラクダ科動物において同定されたものなどの単一重鎖抗体はこの点で特に興味深い。

10

【0151】

本発明の抗AS-SPIK抗体は、AS-SPIK上のエピトープに特異的にまたは優先的に結合し、且つNS-SPIK上のエピトープには結合しない。エピトープとは、パラトープ、すなわち抗体の結合部位によって特異的に結合される標的上の抗原決定基をいう。エピトープ決定基（epitopic determinant）は通常、アミノ酸または糖側鎖などの、分子の化学的に活性な表面グループで構成され、通常、特定の3次元構造上の特徴、ならびに特定の電荷の特徴を有している。エピトープは一般に、約4～約10個、好ましくは4～8個の隣接アミノ酸（線形または連続エピトープ）を有するか、あるいは特定の構造を画成する非隣接アミノ酸のセット（例えば、配座エピトープ）であってもよい。したがって、エピトープは、少なくとも4個、少なくとも6個、少なくとも8個、少なくとも10個、及び少なくとも12個のかかるアミノ酸から構成されてもよい。アミノ酸の空間的配座の決定方法は当技術分野で公知であり、例えば、X線結晶学、2次元核磁気共鳴、及びCLIPS（足場上に化学的に連結されたペプチド（Chemically Linked Peptides on Scaffolds））ペプチドアレイを用いた精密エピトープマッピング（Timmerman, Puijk et al., J Mol Recognit, 20(5), 283-299, (2007)）が挙げられる。

20

30

【0152】

抗体が結合することができる他の潜在的なエピトープを予測する方法としては、Kyte-Doolittle解析（Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105-132 (1982)）、Hopp及びWoods解析（Hopp and Woods, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828 (1981); Hopp and Woods, Mol. Immunol. 20:483-489 (1983); Hopp, J. Immunol. Methods 88:1-18 (1986)）、Jameson-Wolf解析（Jameson and Wolf, Comput. Appl. Biosci. 4:181-186 (1988)）、及びEmini解析（Emini et al., Virology 140:13-20 (1985)）、Chou及びFasman解析（Ponomarenko & Regenmortel, Structural Bioinformatics, 2009）、Karplus-Schulz解析（Kolaskar and Tongaonkar Analysis Kolaskar & Tongaonkar, FEBS Letters, 172-174 (1990)）、ならびにParker解析を挙げることができる。いくつかの実施形態において、潜在的なエピトープは、他の研究からの既知の抗原部位との相関によって決定され、これらの予測技法は、X線結晶学的データなどの構造データと組み合わせることができる。エピトープの予測としては、連続エピトープ及び不連続エピトープの両方を予測する技法も挙げ

40

50

ることができる。不連続エピトープを予測する方法としては、以下、すなわち、Disc oTope、BEpro、ElliPro、SEPPA、EPITOPIA、EPCES、Bpredictor、及びEPMeta(Yao et al., PLOS ONE, (2013))が挙げられるが、これらに限定はされない。いくつかの実施形態において、潜在的なエピトープは、理論上の細胞外ドメインを決定することによって識別される。TMpredなどの解析アルゴリズム(Hofmann and Stoffel, Biol. Chem. 374:166 (1993))またはTMHMM(Krog h et al., J. Mol. Biol., 305(3):567-580 (2001))を参照のこ)を使用して、かかる予測を行うことができる。SignalP 3.0(Bednsten et al., J. Mol. Biol. 340(4):783-795 (2004))などの他のアルゴリズムを使用して、シグナルペプチドの存在を予測し、それらのペプチドが完全長タンパク質から切断される箇所を予測することができる。細胞の外側にあるタンパク質の部分は、抗体相互作用の標的として機能することができる。

【0153】

本発明の組成物は、(1) 閾値レベルの結合活性を示す；(2) 公知の関連ポリペプチド分子と有意に交差反応しない；(3) AS-SPIKに結合し、且つ(4) NS-SPIKに結合しない、本明細書に記載の抗体を含む。抗体の結合親和性は、当業者により、例えば、Scatchard解析(Scatchard, Ann. NY Acad, Sci. 51:660-672 (1949))によって容易に測定することができる。

【0154】

いくつかの実施形態において、本抗AS-SPIK抗体は、それらの標的エピトープまたは模倣デコイに対して、AS-SPIKに対してある程度の相同性を有することが予測される他のタンパク質、例えばNS-SPIKに対するよりも、標的AS-SPIKに対して、少なくとも1.5倍、2倍、5倍、10倍、100倍、103倍、104倍、105倍、106倍、またはそれ以上結合することができる。

【0155】

いくつかの実施形態において、本抗AS-SPIK抗体は、 10^{-4} M以下、 10^{-7} M以下、 10^{-9} M以下の高親和性、またはナノモル以下の親和性(0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 nMまたはそれ以下)で結合する。いくつかの実施形態において、本抗AS-SPIK抗体の、該抗体のそれぞれの標的に対する結合親和性は、少なくとも 1×10^6 Kaである。いくつかの実施形態において、本抗AS-SPIK抗体のAS-SPIKに対する結合親和性は、少なくとも 5×10^6 Ka、少なくとも 1×10^7 Ka、少なくとも 2×10^7 Ka、少なくとも 1×10^8 Ka、またはそれ以上である。抗体は、AS-SPIKへの結合親和性の観点から説明または特定することもできる。いくつかの実施形態において、結合親和性としては、Kdが 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-3} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、もしくは 10^{-15} M、またはそれ未満である結合親和性が挙げられる。すなわち、本明細書では、用語、例えばAS-SPIKに対する/対して、「特異的結合(specific binding)」、「特異的に結合する(specifically binding)」、または「特異的に結合する(specifically bind)」とは、AS-SPIKに結合し、且つNS-SPIKには結合しない抗体をいう。理論に拘束されるものではないが、AS-SPIKに特異的に結合する本発明の抗体は、AS-SPIK中には存在するがNS-SPIK中には存在しない最初の1~23アミノ酸(配列番号82)内にのみ存在するエピトープに結合すると考えられる。本発明の抗体は、AS-SPIKの1~23アミノ酸に跨るだけでなく、共通領域(配列番号83)中のいくつかのアミノ酸も含むエピト

ープに結合する可能性がある。または、本抗体は、A S - S P I Kの最初の1 ~ 2 3 アミノ酸（配列番号8 2）中の少なくとも1つのアミノ酸に結合するだけでなく、共通領域（配列番号8 3）中の少なくとも1つのアミノ酸にも結合する可能性がある。これらの場合、本抗体はN S - S P I Kにも結合する可能性があるが、結合のレベルはバックグラウンドレベル以下である。これは本明細書では、「優先的に結合する」または「優先的な結合」と呼ばれる。アッセイは結合のバックグラウンドレベルを「ノイズ」として差し引くように発展させることができることから、A S - S P I Kに優先的に結合する抗体は診断方法においてなおも有用である。したがって、上記アッセイは、A S - S P I Kの発現を特徴とする障害、例えば肝臓癌などの肝障害を有する患者の診断を下すためには、特定のレベルの結合（特定の閾値レベルを超え、且つバックグラウンドノイズを超える）のみが許容されることになることを示す。

10

【0 1 5 6】

本発明の抗体は、 10^{-4} M以下、 10^{-7} M以下、 10^{-9} M以下の親和性で、またはナノモル以下の親和性（0 . 9、0 . 8、0 . 7、0 . 6、0 . 5、0 . 4、0 . 3、0 . 2、0 . 1 n M、またはそれ未満）で結合することができる。いくつかの実施形態において、本抗A S - S P I K抗体の該抗体のそれぞれの標的に対する結合親和性は少なくとも 1×10^6 K aである。いくつかの実施形態において、本抗A S - S P I K抗体のA S - S P I Kに対する結合親和性は、少なくとも 5×10^6 K a、少なくとも 1×10^7 K a、少なくとも 2×10^7 K a、少なくとも 1×10^8 K a、またはそれ以上である。いくつかの実施形態において、上記結合親和性としては、K dが 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-3} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、もしくは 10^{-15} M未満、またはそれ未満である親和性が挙げられる。それとは対照的に、本明細書では、用語、例えばN S - S P I Kに対して、「非特異的に結合する」とは、「特異的結合」について測定された、例えばA S - S P I Kに対する結合親和性よりも $1 / 1.5$ 、 $1 / 2$ 、5、 $1 / 10$ 、 $1 / 100$ 、 $1 / 10^3$ 、 $1 / 10^4$ 、 $1 / 10^5$ 、 $1 / 10^6$ 以下の、またはそれ未満の小さい結合親和性をいう。K dなどの親和性は、対象となる抗体のF a b版及びその抗原を使用して実施される放射標識抗原結合アッセイ（ラジオイムノアッセイ、R I A）によって測定することができる。別の実施形態によれば、K dは、固定化された抗原を用いた表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定することができる。好ましい実施形態において、本発明の抗体は、A S - S P I Kには特異的にまたは優先的に結合し、且つN S - S P I Kには特異的に結合せず、本抗体のA S - S P I Kに対する親和性は、N S - S P I Kに対するよりも、少なくとも1 . 5 倍、2 倍、5 倍、1 0 倍、1 0 0 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、または 10^6 倍大きい。

20

30

【0 1 5 7】

いくつかの実施形態において、本抗体は、公知の関連するポリペプチド分子に結合せず、例えば、本抗体はA S - S P I Kに結合するが、公知の関連ポリペプチド、例えば、N S - S P I Kには結合しない。公知の関連するポリペプチドに対して抗体をスクリーニングして、A S - S P I Kに特異的にまたは優先的に結合する抗体集団を単離してもよい。例えば、A S - S P I Kに特異的な抗体は、適宜の緩衝液条件下で、不溶性マトリクスに付着させたN S - S P I Kを含むカラムを通過することになる。かかるスクリーニングによって、密接に関連するポリペプチドに対して非交差反応性のポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の単離が可能になる。特異的な抗体のスクリーニング及び単離の他の方法としては、例えば、同時免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（R I A）、放射免疫沈降、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、ドットプロットまたはウエスタンブロットアッセイ、阻害または競合アッセイ、及びサンドウィッチアッセイが挙げられるが、これらに限定はされない。

40

50

【 0 1 5 8 】

本発明の実施形態にかかる抗体は、レポーター（例えば、検出可能なレポーター）と呼ばれる場合もある検出可能な標識を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、検出可能な標識は、タグ付きペプチドの発現もしくは活性の定性的及び／または定量的評価を可能にする、抗体（例えば抗 A S - S P I K 抗体）またはその生物学的に活性なフラグメントに共有結合している任意の分子であってよい。上記活性としては、生物学的活性、物理化学的活性、またはそれらの組み合わせを挙げることができる。当該標識抗体が生物学的活性を保持している限り、上記検出可能な標識の形態及び位置の両方共に変化してよい。多くの異なる標識を使用することができ、特定の標識の選択は、所望の用途に依存することとなる。標識抗 A S - S P I K 抗体は、例えば、生物学的試料、例えば、尿、唾液、脳脊髄液、血液、または生検試料中の A S - S P I K のレベルを評価するために使用することができる。

10

【 0 1 5 9 】

検出可能な標識としては、酵素、光親和性リガンド、放射性同位元素、及び蛍光または化学発光化合物を挙げることができる。例示的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、及びウレアーゼを挙げることができる。酵素に対する抗 A S - S P I K 抗体の共有結合は、種々の方法、例えば、遊離アミノ基を介したグルタルアルデヒドとの結合によって実施することができる。あるいは、抗 A S - S P I K 抗体を、糖残基を介して上記酵素に結合することができる。炭水化物を含む他の酵素もこの方法で抗体に結合することができる。酵素の結合は、6 - (N - マレイミド) ヘキサン酸スクシンイミジルなどのヘテロ二官能性リンカーを使用して、抗体のアミノ基を β -ガラクトシダーゼなどの酵素の遊離チオール基と連結することによっても実施することができる。西洋ワサビペルオキシダーゼ検出システムは、例えば、発色基質であるテトラメチルベンジジン (T M B) と共に使用することができ、T M B は、過酸化水素の存在下で、450 nm において検出可能な可溶性生成物を生成する。アルカリホスファターゼ検出システムは、例えば、発色基質であるリン酸 p - ニトロフェニルと共に使用することができ、リン酸 p - ニトロフェニルは 405 nm で容易に検出可能な可溶性生成物を生成する。同様に、 β -ガラクトシダーゼ検出システムは、発色基質である o - ニトロフェニル - P - D - ガラクトピラノキシド (O N P G) と共に使用することができ、O N P G は、410 nm で検出可能な可溶性生成物を生成する。ウレアーゼ検出システムは、尿素 - プロモクレゾールパープルなどの基質と共に使用することができる。

20

30

【 0 1 6 0 】

検出可能な標識は、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、フィコエリセリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルアルデヒド、及びフルオレスカミンを含む、但しこれらに限定されない蛍光標識；ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、及びシュウ酸エステルからなる群から選択される化学発光化合物；リポソームもしくはデキストラン；または、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、及びエクオリンなどの生物発光化合物であってもよい。あるいは、またはそれらに加えて、検出可能な標識としては、バリウム、ジアトリゾ酸塩、エチオジド化油、クエン酸ガリウム、イオカルム酸、イオセタム酸、ヨーダミド、ヨーダパミド、ヨードキサム酸、イオグラミド、イオヘキソール、イオパミドール、イオパン酸、イオプロセム酸、イオセファム酸、イオセル酸、イオスラミドメグルミン、イオセメチン酸、イオタスル、イオテトル酸、イオタラム酸、イオトロクス酸、イオキサグル酸、イオキシトリゾ酸、イボダート、メグルミン、メトリザミド、メトリゾ酸塩、プロピリオドン、及び塩化第一タリウムなどの放射線不透剤または造影剤が挙げられるが、これらに限定はされない。

40

【 0 1 6 1 】

標識は、合成中または合成後に付加することができる。組換え抗 A S - S P I K 抗体またはそれらの生物学的に活性な変異体も、形質転換された細胞が増殖する培養培地への標識前駆体（例えば放射標識アミノ酸）の添加によって標識することができる。いくつかの

50

実施形態において、検出可能なマーカーの組み込みを容易にするために、ペプチドの類似体または変異体を使用してもよい。例えば、N末端フェニルアラニン残基を、 ^{125}I で容易に標識することができる、チロシンなどの密接に関連する芳香族アミノ酸で置換してもよい。いくつかの実施形態において、効果的な標識化を支援するさらなる官能基を、抗AS-SPIK抗体またはその生物学的に活性な変異体のフラグメントに付加してもよい。例えば、3-トリプチルスズベンゾイル基を天然構造のN末端に付加してもよく、その後トリプチルスズ基を ^{125}I で置換することにより、放射標識ヨードベンゾイル基が生成することとなる。

【0162】

抗体薬物複合体(ADC)

10

本発明の態様は、化学療法剤、薬物、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物由来の酵素的に活性な毒素、またはそれらのフラグメント)、または放射性同位体(すなわち、放射性複合体)などの細胞傷害性薬剤と複合体化された抗体を含む、免疫複合体、あるいは抗体-薬物複合体(ADC)を含む。別の態様において、本発明は、免疫複合体の使用方法をさらに提供する。一態様において、免疫複合体は、細胞傷害性薬剤または検出可能な薬剤に共有結合している上記抗AS-SPIK抗体のいずれかを含む。ADCは、例えば、米国特許第8,362,213号に記載されており、その開示はその全体が本明細書に援用される。

【0163】

細胞傷害性薬剤または細胞増殖抑制剤、すなわち、がんの治療において腫瘍細胞を殺滅するまたは阻害する薬物の局所送達のためのADCの使用(Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549; Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; 米国特許第4,975,278号)によって、腫瘍への薬物部分の標的化された送達、及び腫瘍中での細胞内蓄積が可能になる一方で、これらの非結合薬物剤の全身投与では、排除しようとする腫瘍細胞のみならず、正常な細胞に対しても許容できないレベルの毒性を生じる場合がある(Baldwin et al (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al (eds), pp. 475-506)。治療指数を改善する(すなわち、ADCの最大の効力と最小の毒性)ための努力の焦点は、ポリクローナル抗体(Rowland et al (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)及びモノクローナル抗体(mAbs)の選択性、ならびに薬物の結合及び薬物の放出の特性(Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549)に絞ってきた。ADCで使用される薬物部分としては、ジフテリア毒素などの細菌タンパク質毒素、リシンなどの植物タンパク質毒素、オーリスタチン、ゲルダナマイシンなどの小分子(Mandler et al (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、メイタンシノイド(EP 1391213; Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)

20

30

40

50

、カリケアマイシン (Lode et al (1998) Cancer Res. 58 : 2928 ; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53 : 3336 - 3342)、ダウノマイシン、ドキソルピシン、メトトレキサート、及びビンデシン (Rowland et al (1986) supra) が挙げられる。上記薬物部分は、チューブリン結合、DNA結合、またはトポイソメラーゼ阻害を含む細胞傷害性及び細胞増殖抑制機序に影響を与える場合がある。一部の細胞傷害性薬剤は、大きな抗体またはタンパク質受容体リガンドと複合体化すると、不活性になるまたは低活性になる傾向がある。

【0164】

ドーラスタチンの合成類似体であるオーリスタチンペプチド、オーリスタチンE (AE)、及びモノメチルアウリスタチン (MMAE) (WO02/088172) が、薬物部分として、(i) キメラモノクローナル抗体 cBR96 (癌腫上のルイスYに特異的) ; (ii) 血液悪性腫瘍上のCD30に特異的なcAC10 (Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765 - 773 ; Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778 - 784 ; Francisco et al (2003) Blood 102(4): 1458 - 1465 ; US 2004/0018194 ; (iii) CD20発現癌及び免疫障害の治療のためのリツキサン (WO04/032828) などの抗CD20抗体 ; (iv) 結腸直腸癌の治療のための抗EphB2R抗体2H9 (Mao et al (2004) Cancer Research 64(3): 781 - 788) ; (v) E-セレクチン抗体 (Bhaskar et al (2003) Cancer Res. 63: 6387 - 6394) ; (vi) トラストズマブ (HERCEPTIN (登録商標)、US2005/0238649) ; ならびに (vii) 抗CD30抗体 (WO03/043583) と複合体化されている。オーリスタチンEの変異体が米国特許第5,767,237号及び米国特許第6,124,431号に開示される。モノクローナル抗体に複合体化されたモノメチルオーリスタチンEが、Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented Mar. 28, 2004に開示される。オーリスタチン類似体MMAE及びMMAFが様々な抗体に複合体化されている (US2005/0238649)。

【0165】

薬物部分を抗体に結合する、すなわち共有結合を介して結合する従来手段では一般に、薬物部分が抗体上のいくつかの部位に結合した分子の不均一な混合物が生じる。例えば、細胞傷害性薬剤は通常、多くの場合多数の抗体のリシン残基を介して抗体に結合し、不均一な抗体-薬物複合体混合物が生成する。反応条件に応じて、上記不均一な混合物は、通常0~約8個、またはそれ以上の結合した薬物部分を有する分布をもった抗体を含む。さらに、抗体に対する薬物部分の特定の整数比を有する複合体の各下位群内に、薬物部分が抗体の様々な部位に結合している潜在的に不均一な混合物がある。分析及び調製方法は、複合体化反応から生じる上記不均一な混合物内の抗体-薬物複合体種分子を分離及びキ

【0166】

システインチオールは、pH7付近ではプロトン化されて求核性が低いほとんどのアミンとは異なり、中性pHで反応性がある。遊離チオール (RSH、スルフヒドリル) 基は比較的反応性が高いため、システイン残基を有するタンパク質は多くの場合、ジスルフィド結合したオリゴマーとしての酸化された形態で存在するか、または内部で架橋したジス

10

20

30

40

50

ルフィド基を有する。細胞外タンパク質は一般に遊離チオールを有していない (Garm an, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, at page 55)。抗体のシステインチオール基は一般に、抗体のアミンまたはヒドロキシル基よりも求電子性複合体化反応剤に対してより反応性が高い、すなわち求核性が高い。リガンドとの共有結合を形成するため、または新たな分子内ジスルフィド結合を形成するために、システイン残基が遺伝子工学技法によってタンパク質中に導入されている (Better et al (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4862-4867; Kanno et al (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; 米国特許第6, 248, 564号)。しかしながら、タンパク質の様々なアミノ酸残基をシステインアミノ酸に変異させることによるシステインチオール基の操作は、特に対合していない (遊離 Cys) 残基、または反応もしくは酸化を起こしやすい残基の場合、潜在的に問題がある。タンパク質の濃縮溶液においては、E. coli のペリプラズム、培養液上清、または部分的にもしくは完全に精製されたタンパク質のいずれにおいても、タンパク質の表面上の対合していない Cys 残基が対合し、酸化して分子間ジスルフィド、よってタンパク質二量体または多量体を形成する。ジスルフィド二量体の形成により新たに導入された Cys は、薬物、リガンド、または他の標識との複合体化に対して非反応性になる。さらに、タンパク質が新たに操作された Cys と既存の Cys 残基の間に分子内ジスルフィド結合を酸化的に形成する場合、両方の Cys チオール基は活性部位の関与及び相互作用に利用不可となる。さらに、タンパク質は、誤った折り畳みまたは三次元構造の喪失によって、不活性または非特異的になる可能性がある (Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311:1-9)。

【0167】

システインを操作した抗体が F A B 抗体フラグメント (チオ F a b) として設計されており、完全長の I g G モノクローナル (チオ M a b) 抗体として発現している (Junutula, J. R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41-52; US 2007/0092940、それらの内容は援用される)。チオ F a b 及びチオ M a b 抗体を、チオール反応性リンカー反応剤及び薬物-リンカー反応剤によって、新たに導入されたシステインチオール基の位置で、リンカーを介して複合体化し、抗体薬物複合体 (チオ A D C) を調製した。

【0168】

特許出願及び刊行物を含む、本明細書で引用されるすべての参考文献は、それらの全体が援用される。

【0169】

ポリペプチド

本発明の態様は、S P I K ポリペプチド、例えば、配列番号 104 及び 105 の核酸配列のいずれか 1 つによってコードされる A S - S P I K ポリペプチドを含む組成物を含む。本明細書では、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」は同義で使用されるが、一般的には、上記用語は様々なサイズのペプチド配列をいう。本発明者らは、アミノ酸に基づく本発明の組成物を「ポリペプチド」と呼び、該組成物がアミノ酸残基の線状ポリマーであることを伝え、該組成物を完全長タンパク質と区別するのに役立つ場合がある。本発明の実施形態にかかるポリペプチドは、A S - S P I K ポリペプチドまたは N S - S P I K ポリペプチドのフラグメントを「構成する」または「含む」場合があり、本発明は、A S - S P I K ポリペプチドまたは N S - S P I K ポリペプチドの生物学

的に活性な変異体を構成するまたは含むポリペプチドを包含する。したがって、上記ポリペプチドは、A S - S P I KポリペプチドもしくはN S - S P I Kポリペプチド（またはその生物学的に活性な変異体）のフラグメントのみを含む場合もあるが、その上追加の残基を含んでいてもよいことが理解されよう。生物学的に活性な変異体は、プロテアーゼを阻害するのに十分な活性を保持する。

【0170】

上記アミノ酸残基間の結合は、従来のペプチド結合または別の共有結合（エステルまたはエーテル結合など）であってもよく、上記ポリペプチドは、アミド化、リン酸化、またはグリコシル化によって修飾されていてもよい。修飾はポリペプチド骨格及び/または1つ以上の側鎖に影響を与える可能性がある。化学的修飾は、当該ポリペプチドをコードするmRNAの翻訳に続いてインビボで行われる天然に存在する修飾（例えば、細菌宿主におけるグリコシル化）、またはインビトロで行われる合成的修飾であってもよい。A S - S P I KポリペプチドまたはN S - S P I Kポリペプチドの生物学的に活性な変異体は、天然に存在する（すなわち、インビボで天然に行われる）と合成的修飾（すなわち、インビトロで行われる天然に存在するまたは非天然で生じる修飾）の任意の組み合わせに由来する1つ以上の構造的修飾を含んでいてもよい。修飾の例としては、アミド化（例えば、C末端の遊離カルボキシル基のアミノ基による置換）；ビオチン化（例えば、ビオチン分子によるリシンまたは他の反応性アミノ酸残基のアシル化）；グリコシル化（例えば、アスパラギン、ヒドロキシリシン、セリン、もしくはスレオニン残基のいずれかへのグリコシル基の付加による、糖タンパク質または糖ペプチドの生成）；アセチル化（例えば、通常はポリペプチドのN末端におけるアセチル基の付加）；アルキル化（例えばアルキル基の付加）；イソプレニル化（例えばイソプレノイド基の付加）；リポイル化（例えばリポ酸部分の結合）；及びリン酸化（例えば、セリン、チロシン、スレオニン、またはヒスチジンへのリン酸基の付加）が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0171】

生物学的に活性な変異体中の上記アミノ酸残基の1つ以上は、天然に存在しないアミノ酸残基であってもよい。天然に存在するアミノ酸残基には、遺伝子コードによって天然にコードされているアミノ酸残基、ならびに非標準アミノ酸（例えば、L - 配置の代わりにD - 配置を有するアミノ酸）が含まれる。本発明のペプチドはまた、標準的な残基の修飾バージョンであるアミノ酸残基も含んでいてもよい（例えば、リシンの代わりにピロリシンを使用してよく、システインの代わりにセレノシステインを使用してよく）。天然に存在しないアミノ酸残基は、自然界では発見されていないが、アミノ酸の基本的な式に適合し、ペプチド中に組み込むことができるアミノ酸残基である。天然に存在しないアミノ酸残基としては、D - アロイソロイシン（2R, 3S） - 2 - アミノ - 3 - メチルペンタン酸及びL - シクロペンチルグリシン（S） - 2 - アミノ - 2 - シクロペンチル酢酸が挙げられる。他の例については、教科書またはワールドワイドウェブ（サイトは現在California Institute of Technologyによって維持されており、機能性タンパク質中に組み込むことに成功した非天然アミノ酸の構造を表示している）を参照することができる。

【0172】

あるいは、または上記に加えて、生物学的に活性な変異体中の上記アミノ酸残基の1つ以上は、野生型配列中の対応する位置に存在する天然に存在する残基とは異なる天然に存在する残基であってもよい。換言すれば、生物学的に活性な変異体は、1つ以上、特に1つまたは2つのアミノ酸置換を含んでいてもよい。本発明者らは、アミノ酸残基の置換、付加、または欠失を野生型配列の変異と呼ぶ場合がある。前述のように、置換は、天然に存在するアミノ酸残基を、天然に存在しない残基または単に天然に存在する異なる残基で置き換える場合がある。さらに、置換は、保存的置換または非保存的置換を構成する場合がある。保存的アミノ酸置換としては、通常次の群、すなわち、グリシン及びアラニン；バリン、イソロイシン、及びロイシン；アスパラギン酸及びグルタミン酸；アスパラギン、グルタミン、セリン、及びスレオニン；リシン、ヒスチジン、及びアルギニン；ならび

にフェニルアラニン及びチロシン内の置換が挙げられる。

【0173】

AS - SPIKの生物学的に活性な変異体であるポリペプチドは、それらの配列が対応する野生型ポリペプチドに類似するまたは相同である程度の観点からキャラクタライズすることができる。例えば、生物学的に活性な変異体の配列は、野生型ポリペプチド中の対応する残基と少なくとも80%もしくは約80%相同（または同一）であってよい。例えば、AS - SPIKポリペプチドまたはNS - SPIKポリペプチドの生物学的に活性な変異体は、AS - SPIKまたはNS - SPIKポリペプチド（配列番号81、82、83）またはそのホモログまたはオルソログに対して、少なくとも80%もしくは約80%の配列相同性（例えば、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%のまたは約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、もしくは約99%の配列相同性）（あるいは列挙されるパーセント表示同一性）を有するアミノ酸配列を有していてもよい。

10

【0174】

AS - SPIKポリペプチドまたはNS - SPIKポリペプチドの生物学的に活性な変異体は、本発明の方法に有用であるために十分な生物学的活性を保持することとなる。上記生物学的に活性な変異体は、プロテアーゼ活性の阻害剤として機能するために十分な活性を保持することとなる。上記生物学的活性は当業者に公知の方法で評価することができ、インピットロ切断アッセイまたは機能アッセイが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0175】

20

ポリペプチドは、例えば、組換え技法または化学合成を含む様々な方法によって生成させることができる。ポリペプチドが生成したところで、これらを単離し、任意且つ所望の程度まで精製してもよい。例えば、逆相（好ましくは）もしくは順相HPLC、またはSephadex G - 25などの多糖ゲル媒体上でのサイズ排除もしくは分配クロマトグラフィー、続いて凍結乾燥を使用してもよい。最終的なポリペプチドの組成は、標準的な手段によるペプチドの分解後の、アミノ酸配列決定によるまたはFAB - MS技法によるアミノ酸分析によって確認することができる。ポリペプチドのアミノ基の、酸性塩を含む塩、エステル、アミド、及びN - アシル誘導体は、当技術分野で公知の方法を使用して調製することができ、かかるペプチドは本発明の文脈において有用である。

【0176】

30

AS - SPIK複合体も提供される。本発明の実施形態にかかるAS - SPIK複合体は、AS - SPIK、及びAS - SPIKポリペプチドもしくはそのフラグメントに特異的にまたは優先的に結合する、本明細書に記載の本発明の抗体を含む。上記フラグメントは特に、少なくとも23アミノ酸（配列番号81）、好ましくは少なくとも10アミノ酸の長さを有し、より好ましくは、配列番号81のアミノ酸の少なくとも7番目～23番目のアミノ酸（両端を含む）を有し、さらにより好ましくは、配列番号81の少なくとも8番目～17番目のアミノ酸（両端を含む）を有する。上記抗体は前述の抗AS - SPIK抗体のいずれかであってよい。上記AS - SPIKポリペプチドまたはそのフラグメントは、前述のAS - SPIKポリペプチドまたはそのフラグメントであってよい。いくつかの実施形態において、上記抗体は、抗AS - SPIKモノクローナル抗体、IM - A1、IM - A6、IM - B10、IM - C6、IM - D3、IM - D5、IM - E2、IM - F5、IM - G6、及びIM - G7（配列データに掲載のVL及びVH配列）である。いくつかの実施形態において、上記AS - SPIKポリペプチドは、配列番号82または配列番号81のアミノ酸配列に対して少なくとも98%の相同性（または同一性）を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドである。いくつかの実施形態において、上記AS - SPIKポリペプチドは、配列番号82のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

40

【0177】

IM - A1、IM - A6、IM - B10、IM - C6、IM - D3、IM - D5、IM - E2、IM - F5、IM - G6、及びIM - G7などの抗AS - SPIK抗体の特異的結合は、特定の条件下でAS - SPIKまたはAS - SPIKペプチドと免疫複合体を形

50

成する場合がある。上記複合体を、例えばサンドウィッチ E L I S A 試験でさらに分析するために溶液から沈殿させてもよい。担体としての第 2 の抗 S P I K 抗体を固定化した 96 ウェルプレートを使用して、上記免疫複合体をプレートによって捕捉することができる。上記複合体中の抗体が、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H P R) などのレポーターで標識されている場合、形成された A S - S P I K 免疫複合体の量を測定することができる。上記 A S - S P I K 免疫複合体は、ウエスタンブロット分析のために、プロテイン A または G と結合したアガロースビーズによっても捕捉することができる。

【 0 1 7 8 】

核酸

用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、本明細書において同義で使用され、c D N A、ゲノム D N A、合成 D N A、及び核酸類似体を含む D N A (または R N A) を含む R N A 及び D N A の両方をいい、これらのいずれも本発明のポリペプチドをコードしていてもよく、且つそれらのすべてが本発明に包含される。ポリヌクレオチドは、本質的に任意の三次元構造を有していてもよい。核酸は二本鎖または一本鎖 (すなわち、センス鎖またはアンチセンス鎖) であってよい。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、遺伝子、遺伝子フラグメント、エキソン、イントロン、メッセンジャー R N A (m R N A) 及びその部分、トランスファー R N A、リボソーム R N A、s i R N A、マイクロ R N A、リボザイム、c D N A、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離された D N A、任意の配列の単離された R N A、核酸プローブ、及びプライマー、ならびに核酸類似体が挙げられる。本発明の文脈において、核酸は、天然に存在する A S - S P I K ポリペプチドもしくは N S - S P I K ポリペプチドまたはそれらの生物学的に活性な変異体のフラグメントをコードしていてもよい。本発明の実施形態にかかる核酸配列の非限定的な例としては、配列番号 1 0 4、1 0 5、及び 1 0 6、またはそれらの生物学的に活性なフラグメントもしくは変異体が挙げられる。いくつかの実施形態において、フラグメントは、少なくとも約 6 6 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約 5 4 ヌクレオチドの長さを有していてもよい。1 つの好ましい実施形態において、核酸配列は、配列番号 1 0 5 のヌクレオチド残基 2 8 ~ 1 0 5 を含む。1 つの好ましい実施形態において、核酸配列は、配列番号 1 0 5 のヌクレオチド残基 4 9 ~ 1 0 5 を含む。L u e t a l . , I m m u n o l o g y 2 0 1 1 ; 1 3 4 (4) : 3 9 8 - 4 0 8。

【 0 1 7 9 】

「単離された」核酸は、例えば、天然に存在する D N A 分子またはそのフラグメントであって、天然に存在するゲノムにおいて当該 D N A 分子に隣接して通常存在する核酸配列の少なくとも 1 つが除去されているかまたは存在しないことを条件とする、上記 D N A 分子またはそのフラグメントであってよい。したがって、単離された核酸としては、他の配列とは独立して別個の分子として存在する D N A 分子 (例えば、化学的に合成された核酸、あるいはポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) もしくは制限エンドヌクレアーゼ処理によって生成する c D N A またはゲノム D N A フラグメント) が挙げられるが、これらに限定はされない。単離された核酸とは、ベクター、自律的に複製するプラスミド、ウイルス中、または原核生物もしくは真核生物のゲノム D N A 中に組み込まれた D N A 分子も指す。さらに、単離された核酸は、ハイブリッドまたは融合核酸の一部である D N A 分子などの操作された核酸を含む場合もある。例えば、c D N A ライブラリーもしくはゲノムライブラリー、またはゲノム D N A 制限消化物を含むゲルスライス内の他の核酸の多く (例えば、数十、または数百 ~ 数百万) の中に存在する核酸は、単離された核酸ではない。

【 0 1 8 0 】

単離された核酸分子は、例えば、本明細書に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、本明細書に記載のヌクレオチド配列を含む単離された核酸を得るために使用することができるポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 技法によって生成させることができる。P C R は、全ゲノム D N A または全細胞 R N A 由来の配列を含む、D N A ならびに R N A 由来の特定の配列を増幅するために使用することができる。一般に、目的の領域またはそれ以降の末端からの配列情報を使用して、増幅されるテンプレートの反対の鎖と配

10

20

30

40

50

列が同一または類似であるオリゴヌクレオチドプライマーを設計する。部位特異的ヌクレオチド配列修飾をテンプレート核酸中に導入することができる様々なPCR戦略も利用可能である。

【0181】

単離された核酸は、単一の核酸分子として（例えば、ホスホルアミダイト技法を使用する、3'から5'方向への自動化されたDNA合成を使用して）、または一連のオリゴヌクレオチドとしてのいずれかで、化学的に合成することもできる。例えば、オリゴヌクレオチド対がアニーリングされた際に二重鎖が形成されるような、それぞれの対が相補性の短いセグメント（例えば約15ヌクレオチド）を含む所望の配列を含む、1つ以上の長いオリゴヌクレオチド（例えば>50~100ヌクレオチド）の対を合成することができる。DNAポリメラーゼを使用して上記オリゴヌクレオチドを伸長し、オリゴヌクレオチド対毎に単一の二本鎖核酸分子を生成させ、これをベクターにライゲーションしてもよい。本発明の単離された核酸はまた、例えば、AS-SPIKまたはNS-SPIKをコードするDNAの天然に存在する部分の変異誘発によって得ることもできる（例えば、前述の製法により）。

【0182】

上記の2つの核酸または該核酸がコードするポリペプチドは、互いにある程度の相同性または同一性を有すると記載することができる。例えば、AS-SPIKポリペプチドまたはNS-SPIKポリペプチド及びそれらの生物学的に活性な変異体は、ある程度の相同性または同一性を示すと記載することができる。短いAS-SPIKポリペプチドまたはNS-SPIKポリペプチド配列をProtein Information Research (PIR) サイト (<http://pir.georgetown.edu>) に配置し、続いてNCBIウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 上の「短鎖のほぼ同一の配列 (short nearly identical sequences)」のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) アルゴリズムを用いて解析することにより、アラインメントを集めることができる。

【0183】

配列の相同性または同一性を決定するために、例えばBioEdit (バージョン4.8.5、North Carolina State University) (BioEditでは、核酸配列またはタンパク質配列のアラインメントを、それらの配列の全長にわたって実施することができる (グローバルアラインメント))、または前述のALIGN-2などのコンピュータプログラムを使用して、クエリ核酸配列またはクエリアミノ酸配列を、それぞれ1つ以上のサブジェクト核酸配列またはサブジェクトアミノ酸配列に対してアラインメントを行ってもよい。

【0184】

BioEditは、クエリ配列と1つ以上のサブジェクト配列との間の最適な一致を計算し、上記配列のアラインメントを行い、その結果、同一性、類似性、及び相違性を決定することができる。1つ以上の残基のギャップをクエリ配列、サブジェクト配列、またはそれらの両方に挿入して、配列アラインメントを最大化することができる。核酸配列のペアワイズアラインメントを高速化するために、以下のデフォルトパラメータが使用される。すなわち、ワードサイズ: 2; ウィンドウサイズ: 4; スコアリング方法: 百分率; トップダイアゴナル数: 4; 及びギャップペナルティ: 5である。核酸配列のマルチプルアラインメントには、以下のパラメータが使用される。すなわち、ギャップ開始ペナルティ: 10.0; ギャップ伸長ペナルティ: 5.0; 及び重量トランジション: 有りである。タンパク質配列のペアワイズアラインメントを高速化するために、以下のパラメータが使用される。すなわち、ワードサイズ: 1; ウィンドウサイズ: 5; スコアリング方法: 百分率; トップダイアゴナル数: 5; ギャップペナルティ: 3である。タンパク質配列のマルチプルアラインメントには、以下のパラメータが使用される。すなわち、重み付けマトリクス: b l o s u m; ギャップ開始ペナルティ: 10.0; ギャップ伸長ペナルティ:

0.05；親水性ギャップ：オン；親水性残基：Gly、Pro、Ser、Asn、Asp、Gln、Glu、Arg、及びLys；残基特異的ギャップペナルティ：オンである。出力は配列間の関係を反映する配列アラインメントである。

【0185】

クエリ配列とサブジェクト配列との間のパーセント表示相同性を決定するために、BioEditで、最適なアラインメントの同一性の数値を、比較される残基の数（ギャップ位置は除外）で除し、その結果に100を乗じる。この出力がクエリ配列に対するサブジェクト配列のパーセント表示相同性である。このパーセント表示相同性の値は、最も近い小数点以下1桁に丸めてもよいことに留意されたい。例えば、78.11、78.12、78.13、及び78.14は78.1に切り捨て、78.15、78.16、78.17、78.18、及び78.19は78.2に切り上げる。

10

【0186】

本明細書に記載の核酸及びポリペプチドは、「外因性」と呼ばれることがある。用語「外因性」とは、当該核酸またはポリペプチドが、組換え核酸構築物の一部であるか、もしくは該構築物によってコードされているか、またはその自然環境にないことを示す。例えば、外因性核酸は、ある種から別の種に導入された配列、すなわち異種核酸であってもよい。通常、かかる外因性核酸は、組換え核酸構築物を介して他の種に導入される。外因性核酸は、ある生物に本来的に備わっているものであり、当該生物の細胞中に再導入された配列であってもよい。天然配列を含む外因性核酸は、当該外因性核酸に連結された非天然配列、例えば、組換え核酸構築物中の天然配列に隣接する非天然調節配列が存在することによって、天然に存在する配列と区別することができることが多い。さらに、安定した状態で形質転換された外因性核酸は通常、天然配列が存在する位置以外の位置に組み込まれる。

20

【0187】

本明細書では組換え構築物も提供され、これを使用して、AS-SPIKを発現させるために細胞を形質転換してもよい。組換え核酸構築物は、特定の細胞においてAS-SPIKまたはNS-SPIKを発現するのに適した調節領域に作動可能に連結されたAS-SPIKまたはNS-SPIK配列をコードする核酸を含む。複数の核酸が特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができることが理解されよう。遺伝子コードの縮退は当技術分野において周知である。多くのアミノ酸について、当該アミノ酸のコドンとして機能する複数のヌクレオチドトリプレットが存在する。例えば、AS-SPIKまたはNS-SPIKのコード配列中のコドンを、その生物の適切なコドンバイアステーブルを使用して、特定の生物に最適な発現が得られるように変更することができる。

30

【0188】

本明細書に記載の核酸などの核酸を含むベクターも提供される。「ベクター」は、プラスミド、ファージ、またはコスミドなどのレプリコンであり、該レプリコン中に別のDNAセグメントを挿入し、該挿入されたセグメントを複製するようにすることができる。一般に、ベクターは、適宜の制御要素に関連付けられている場合に複製する能力を有する。好適なベクターの骨格としては、例えば、プラスミド、ウイルス、人工染色体、BAC、YAC、またはPACなどの当技術分野で慣用的に使用される骨格が挙げられる。用語「ベクター」としては、クローニングベクター及び発現ベクター、ならびにウイルスベクター及び組み込みベクターが挙げられる。「発現ベクター」は調節領域を含むベクターである。多種多様な宿主/発現ベクターの組み合わせを使用して、本明細書に記載の核酸配列を発現させることができる。好適な発現ベクターとしては、例えば、バクテリオファージ、バキュロウイルス、及びレトロウイルスに由来するプラスミド及びウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定はされない。

40

【0189】

本明細書で提供されるベクターは、例えば、複製起点、足場付着領域(SAR)、及び/またはマーカーを含んでもよい。マーカー遺伝子は、宿主細胞に選択可能な表現型を与えることができる。例えば、マーカーは、抗生物質（例えば、カナマイシン、G418、ブレオマイシン、またはハイグロマイシン）に対する耐性などの殺生物剤耐性を付与

50

することができる。上記のように、発現ベクターは、発現されたポリペプチドの操作または検出（例えば、精製または局在化）を容易にするように設計されたタグ配列を含んでいてもよい。緑色蛍光タンパク質（GFP）、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、ポリヒスチジン、c-myc、血球凝集素、またはFlag（商標）タグ（Kodak, New Haven, CT）などのタグ配列は通常、コードされたポリペプチドとの融合体として発現される。かかるタグは、カルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかを含む、当該ポリペプチド内の何れの位置にも挿入することができる。

【0190】

さらなる発現ベクターは、例えば、染色体の、非染色体の、及び合成のDNA配列のセグメントを含んでいてもよい。好適なベクターとしては、SV40の誘導体及び公知の細菌プラスミド、例えば、E.coliプラスミドであるcolE1、pCR1、pBR322、pMal-C2、pET、pGEX、pMB9、及びそれらの誘導体、RP4などのプラスミド；ファージDNA、例えば、多数のファージ1の誘導体、例えば、NM989、及び他のファージDNA、例えば、M13及び繊維状一本鎖ファージDNA；2μプラスミドまたはその誘導体などの酵母プラスミド、昆虫または哺乳動物細胞中で有用なベクターなどの、真核細胞中で有用なベクター；ファージDNAまたは他の発現制御配列を使用するように修飾されたプラスミドなどの、プラスミドとファージDNAの組み合わせに由来するベクターが挙げられる。

10

【0191】

上記ベクターは調節領域も含んでいてよい。用語「調節領域」とは、転写または翻訳の開始及び速度、ならびに転写産物もしくは翻訳産物の安定性及び／または移動度に影響を与えるヌクレオチド配列をいう。調節領域としては、プロモーター配列、エンハンサー配列、応答要素、タンパク質認識部位、誘導性要素、タンパク質結合配列、5'及び3'非翻訳領域（UTR）、転写開始部位、停止配列、ポリアデニル化配列、核局在化シグナル、及びイントロンが挙げられるが、これらに限定はされない。

20

【0192】

本明細書では、用語「作動可能に連結された」とは、かかる配列の転写または翻訳に影響を与えるような、調節領域及び転写されるべき配列の核酸中での配置をいう。例えば、コード配列をプロモーターの制御下に置くために、当該ポリペプチドの翻訳リーディングフレームの翻訳開始部位は通常、プロモーターの1～約50ヌクレオチド下流の間に配置される。しかしながら、プロモーターは、翻訳開始部位の約5,000ヌクレオチドもの上流、または転写開始部位の約2,000ヌクレオチド上流に配置してもよい。プロモーターは通常、少なくともコア（基本）プロモーターを含む。プロモーターは、エンハンサー配列、上流要素、または上流活性化領域（UAR）などの少なくとも1つの制御要素を含んでいてもよい。含まれるプロモーターの選択は、効率、選択性、誘導性、所望の発現レベル、及び細胞または組織優先的発現を含む、但しこれらに限定されないいくつかの因子に依存する。コード配列に対してプロモーター及び他の調節領域を適宜に選択及び配置することによってコード配列の発現を調節することは、当業者にとって慣用的な事項である。

30

【0193】

AS-SPIKまたはNS-SPIK核酸配列を含むベクターは、細胞、すなわち、原核生物または真核生物の細胞、例えば、哺乳動物細胞による取り込みを促進するような方法で構築することができる。有用なベクターシステム及び構築は上記のとおりである。いくつかの実施形態において、上記ベクターは、上記組成物を特定の細胞型に送達してもよい。但し、本発明はそうのように限定されるものではなく、例えば、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、リポソーム、リポプレックス、界面活性剤、及び全フッ素置換化学液体を使用する化学的トランスフェクションなどの他のDNA送達方法も企図され、電気穿孔、微量注入、弾道粒子（、及び「遺伝子銃」システムなどの物理的送達方法も同様である。いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドはまた、カチオン性リポソーム、他の脂質含有複合体、及び宿主細胞へのポリヌクレオチドの送達を媒介する能力

40

50

を有する他の高分子複合体などの微小送達ビヒクルと共に使用してもよい。別の送達方法は、発現された産物を細胞内で産生することができる一本鎖DNA産生ベクターを使用することである。

【0194】

使用方法

本明細書に開示の組成物は、一般的に且つ多様に、AS-SPICKの発現を特徴とする障害の診断及び/または治療に有用である。かかる障害としては、がん、ウイルス感染症、及び炎症性障害が挙げられるが、これらに限定はされない。1つの顕著な例は肝臓癌である。他の非限定的な例としては、用語「がん」の定義に関連して本明細書に記載されるがんが挙げられる。したがって、本発明の態様は、上記がんを有する対象、または上記がんを発症する危険性がある対象におけるがん（例えば肝臓癌）を診断及び/または治療する方法を含む。用語「対象」、「患者」、及び「個体」は、本明細書では同義で使用される。

10

【0195】

いくつかの実施形態において、上記方法は、対象由来の生物学的検査試料をAS-SPICK抗体または抗原結合フラグメントと接触させて、AS-SPICK-抗体複合体を生成させることと；上記生物学的検査試料中の上記AS-SPICK-抗体複合体の濃度を検出することと；上記AS-SPICK-抗体複合体の濃度を基準値と比較して、上記対象が上記障害を発症しているか、または上記障害を発症する危険性があるかどうかを判定することを含む。特定の実施形態において、本方法は、生物学的検査試料を、SPICKと結合してSPICK-抗体複合体を生成する第1の抗体または抗原結合フラグメントに接触させることと；上記SPICK-抗体複合体をAS-SPICK抗体または抗原結合フラグメントと接触させて、上記生物学的検査試料中にAS-SPICK-抗体複合体を生成させることと；上記AS-SPICK-抗体複合体の濃度を基準値と比較して、上記対象が上記障害を発症しているか、または上記障害を発症する危険性があるかどうかを判定することを含む。かかる方法において利用することができる抗体のいくつかの非限定的な例が本明細書に記載される。

20

【0196】

いくつかの実施形態において、本方法は、治療有効量の、本明細書に記載の抗体、またはその抗原結合フラグメント、または抗体-薬物複合体を、AS-SPICKの発現を特徴とする疾患または障害に罹患している患者に投与することを含む。

30

【0197】

肝臓癌

AS-SPICKの発現を特徴とする障害の1つの顕著な例は肝臓癌である。肝臓癌は、肝臓に対する損傷及び肝機能障害を引き起こす広範な疾病を包含する。肝臓癌は、例えば、感染因子、疾患、外傷、もしくは遺伝性疾患、または感染因子、疾患、外傷、及び遺伝性疾患の組み合わせに起因する場合がある。

【0198】

肝臓癌としては、原発性肝臓癌、例えば、肝細胞癌、胆管癌、血管肉腫、及び肝芽腫などの異常な細胞増殖を伴う疾患を挙げることができる。かかる癌としては、非常に初期のHCC（バルセロナ臨床肝癌病期分類システム（BCLC）の病期0及び腫瘍サイズ<2cm）、初期（BCLC病期A、腫瘍サイズ2cm~5cm）、中期（BCLC病期B、中腫瘍サイズ>5cm）、後期（BCLC病期C及びD、進行期）、または転移期（Pons et al., HPB 2005; 7(1): 35-41）、ならびにICCの初期のICC（病期I、II、及びIIIIa、腫瘍サイズ<2cm）、中期（病期IIIIb及びIIIIc、腫瘍サイズ2cm）、及び後期（病期IV）（Farges et al., Cancer 2011; 117(10): 2170-2177）などの、疾患進行の任意の病期の癌を挙げることができる。

40

【0199】

肝臓癌は、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎などのウイルスによって引き起こされる感染

50

症によっても誘発される場合もある。特定の肝炎ウイルスを問わず、かかる感染症は急性または慢性のいずれの場合もあり得る。

【0200】

肝臓癌は肝損傷、例えば、肝硬変からも発生する場合がある。肝硬変は、肝臓の後期の癒痕化または線維化であり、様々な形態の肝疾患及び疾病によって引き起こされる場合がある。肝硬変は遺伝性疾患、例えば、ヘモクロマトーシス、嚢胞性線維症、ウィルソン病、及び自己免疫疾患の結果として発生する場合がある。肝硬変は、肝炎ウイルス感染症及びアルコール消費に起因する場合もある。

【0201】

肝臓癌は、アルコール性肝疾患；脂肪肝、非アルコール性脂肪肝疾患、非アルコール性脂肪症、及び肝線維症などの肝臓の異常な脂肪含有量に関連する障害を含む、但しこれらに限定されない他の疾患によっても発生する場合がある。

【0202】

生物学的試料

「生物学的試料」、「検査試料」、または「試料」とは、患者から得られた、または患者に由来する試料をいう。上記試料は、例えば体液試料であってよい。例示的な体液試料としては、血液、血清、血漿、尿、唾液、精液、便、喀痰、脳脊髄液、涙、粘液、羊水、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態において、生物学的試料は組織試料であってよい。例示的な組織試料としては、肝生検標本などの生検標本、または患者の細胞から調製された初代細胞培養標本、または初代培養物の上清が挙げられる。

【0203】

イムノアッセイ

本発明の態様は、診断アッセイ法、例えば、診断イムノアッセイを含み、診断イムノアッセイは検査試料中のAS-SPIKの有無を検出するために使用することができる。AS-SPIKの検出に使用されるイムノアッセイ方式は、様々な形態で構成することができる。上記イムノアッセイとしては、同種及び異種アッセイ、競合的及び非競合的アッセイ、直接及び間接アッセイの両方、ならびに「サンドウィッチ」アッセイを挙げることができる。有用な方式としては、酵素イムノアッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、化学発光免疫アッセイ(CLIA)、電気化学発光アッセイ、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光法、蛍光偏光測定法、免疫沈降法、平衡透析法、免疫拡散法、免疫ブロット法、凝集、ルミネッセントプロキシミティアッセイ、及び比濁分析が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0204】

方式は問わず、上記生物学的試料を本発明の抗AS-SPIK抗体と接触させる。いくつかの実施形態において、上記生物学的試料を固体支持体上に固定化してもよい。いくつかの実施形態において、上記生物学的試料を、固体支持体上に固定化された本発明の抗SPIK抗体と接触させる。上記固体支持体は、例えば、プラスチック表面、ガラス表面、紙もしくは繊維の表面、または粒子表面であってよい。より詳細には、上記支持体としては、マイクロプレート、ビーズ、ポリニフッ化ビニリデン(PVDF)膜、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、多孔質膜、非多孔質膜を挙げることができる。基材の組成は変えることができる。例えば、基材または支持体は、ガラス、セルロース系材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、またはポリエステルなどの熱可塑性ポリマー、粒子状物質(例えば、ガラスまたは様々な熱可塑性ポリマー)からなる焼結構造体、またはニトロセルロース、ナイロン、もしくはポリスルホンからなる流下膜(cast membrane)フィルムを含んでいてもよい。一般的な実施形態において、上記基材は、1種以上の固体支持体(例えば、スライドガラスもしくはコーティングされたプレートなどのガラス、シリカ、プラスチックもしくは誘導体化されたプラスチック、常磁性もしくは非磁性金属)、半固体支持体(例えば、高分子材料、ゲル、アガロース、もしくは他のマトリクス)、及び/または多孔質支持体(例えば、フィルター、ナイロンもしくはニトロセルロース膜または

10

20

30

40

50

他の膜)を含む、その上に抗体またはポリペプチドを固定化することができる任意の表面あるいは支持体であってよい。いくつかの実施形態において、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリメタクリル酸グリシジル、アミノ化もしくはカルボキシル化ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリアミド、及びポリ塩化ビニルを含む合成ポリマーを基材として使用してもよい。

【0205】

いくつかの実施形態において、上記イムノアッセイ方式は、2抗体「サンドウィッチ」アッセイであってよい。上記生物学的試料を、固体支持体、例えばマイクロタイタープレート上に固定化された本発明の抗SPICK抗体と接触させる。上記試料及び第1の抗体を、特異的結合及びSPICK-抗体複合体の形成に有利な条件下でインキュベートする。上記接触ステップに続いて、上記生物学的試料の未結合成分を除去する。次いで、上記複合体を第2の抗SPICK抗体と接触させる。第2の抗体は、第1の抗体が結合したエピトープとは異なるSPICKエピトープと結合する。したがって、第1及び第2の抗体は、SPICKへの結合に関して互いに競合的に阻害することはない。いくつかの実施形態において、第1の抗体は、AS-SPICK及びNS-SPICKの両方に存在するエピトープ、すなわち抗原決定基を認識することができる。本発明者らはかかる抗体を「汎SPICK」抗体と呼ぶ場合がある。あるいは、第1の抗体はAS-SPICK上にのみ存在するエピトープを認識することができる。いくつかの実施形態において、第2の抗体は、AS-SPICK及びNS-SPICKの両方に存在するエピトープ、すなわち、抗原決定基を認識することができる。あるいは、第2の抗体は、AS-SPICKまたはNS-SPICK上にのみ存在するエピトープを認識することができる。したがって、上記サンドウィッチアッセイは、第1の抗体が汎SPICK抗体であり、第2の抗体がAS-SPICKに特異的にまたは優先的に結合し、且つNS-SPICKには特異的に結合しないように構成することができる。あるいは、上記サンドウィッチアッセイは、第1の抗体及び第2の抗体の両方がAS-SPICKに特異的にまたは優先的に結合し、且つNS-SPICKには特異的に結合しないように構成することができる。

【0206】

抗体結合は様々な方法で測定することができる。例えば、検出可能な標識によって発生したシグナルを分析してもよく、該当する場合には、光学走査機または他の画像取得装置及び、複合体形成に関連するシグナル、例えば、蛍光シグナル、発光シグナル、もしくはリン光シグナル、または放射性シグナルの測定を可能にするソフトウェアを使用して定量化してもよい。検出可能なシグナルを測定するための例示的な機器としては、マイクロプレートリーダー、蛍光光度計、分光光度計、及びガンマカウンタを挙げることができるが、これらに限定はされない。

【0207】

基準試料

生物学的試料中のAS-SPICKのレベルを基準試料のレベルと比較してもよい。標準的な基準レベルは、通常、個体の集団に由来する平均AS-SPICKレベルに当たる。上記基準母集団は、対象である個体と類似の年齢、体の大きさ、民族的背景、または全般的な健康状態の個体を含んでいてよい。したがって、患者の試料中のAS-SPICKレベルを、1)肝臓癌があることが判明しており、AS-SPICKを発現し、体液にAS-SPICKが含まれている個体；2)肝臓癌のない、体液に低レベルのAS-SPICKが含まれている個体由来の値と比較してもよい。

【0208】

一般に、AS-SPICKの高いレベルは、対照試料中に存在するAS-SPICKのレベル、または肝臓癌のない正常で健康な個体の集団由来の試料中に存在するAS-SPICKの平均レベル(基準値)のいずれかよりも大きい、好ましくは少なくとも1、2、3、4、または5%大きい、より好ましくは少なくとも5%大きい、任意のAS-SPICKのレベルであってよい。AS-SPICKの低いレベルは、対照試料中に存在するAS-SPICKのレベル、または肝臓癌がある個体の集団由来の試料中に存在するAS-SPICKの平

均レベルのいずれかよりも小さい、任意の A S - S P I K のレベルであってよい。任意の母集団サイズを使用して、正常で健康な個体の集団由来の試料中に存在する A S - S P I K の平均レベルを測定することができる。例えば、2 ~ 2 5 0 の個体、例えば 2、3、4、5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、4 0、5 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、2 5 0 以上の個体の集団を使用して、正常で健康な個体の集団由来の試料中の A S - S P I K の平均レベルを測定することができ、試料集団が大きいほど、測定の精度が高くなる。

【 0 2 0 9 】

いくつかの実施形態において、基準チャートを使用して、試料中の A S - S P I K の特定のレベルが、対照試料またはより大きな集団と比較して上昇しているかどうかを判定することができる。例えば、基準チャートは、対象である個体と同様の年齢、民族的背景、または全般的な健康状態の健康な個体中に存在する A S - S P I K の正常な範囲を含んでいてもよい。この基準チャートを使用して、試料中で測定された A S - S P I K の任意のレベルを、対照試料と比較して、またはより大きな集団に由来する平均値と比較して、低い、正常、または高いとして分類してもよい。用語「高いレベル」とは、基準レベルよりも高い、好ましくは少なくとも 2 % 高い、より好ましくは少なくとも 5 % 高いレベルとして定義される。

10

【 0 2 1 0 】

あるいは、または上記に加えて、生物学的試料中の A S - S P I K のレベルを、1 つ以上のさらなる生物学的マーカー、例えば、その発現が A S - S P I K の発現とは独立である別のマーカーのレベルに対して「正規化」してもよい。すなわち、上記さらなるマーカーのレベルは、A S - S P I K のレベルと、同時にまたは別個の機会にのいずれかで、並行して評価することができる。上記さらなるマーカーは、試料調製、取扱い、保管、及び日毎のアッセイの変動性の内部対照としての役割を果たすことができる。A S - S P I K 及び上記さらなるマーカーのレベルの値は比率として表してもよく、その比率は、基準試料または集団について得られた同様の比率と比較することができる。有用な第 2 のマーカーは α - フェトプロテインである。

20

【 0 2 1 1 】

いくつかの実施形態において、上記方法は、標準的な基準セットの使用を含んでいてもよい。上記基準セットは、精製 S P I K ポリペプチドまたはそのフラグメントの 1 つ以上の試料を含んでいてもよい。複数の試料を使用する場合、これらの試料は異なる濃度の試料であってよい。一実施形態において、上記基準セットは、5 0 n g / m l、3 0 n g / m l、8 n g / m l、3 n g / m l、1 n g / m l、及び 0 n g / m l の A S - S P I K の濃度の組換え A S - S P I K の 6 種の試料を含んでいてもよい。上記組換え A S - S P I K は、I M - C A 2 2 などの抗 A S - S P I K 抗体または抗タグ抗体のいずれかを使用したアフィニティークロマトグラフィー (H P L C) で精製してもよい。血液またはその他の体液における基準値は変化する可能性がある。但し、当業者は、それぞれの集団の異なる体液中の A S - S P I K の平均レベルを決定し、それぞれの基準値を決定する立場にあり、このことにより、判定される肝臓癌を有する患者における A S - S P I K のレベルが上記基準値を十分に上回る一方、検出される肝臓癌に罹患していない患者または健康な個体におけるレベルがそれぞれの基準値を十分に下回ることが確実になる。好ましい実施形態において、上記基準値は、正常で健康な個体の集団由来の試料中に存在する A S - S P I K の平均レベルよりも約 5 %、より好ましくは約 7 %、さらにより好ましくは約 1 0 % 高い。上記生物学的試料及び対照試料中の A S - S P I K のレベルは同一の方法で測定され、その結果、比較可能であることに留意されたい。例えば A S - S P I K レベルの絶対値は、上記の組換え A S - S P I K を使用した検量線を介して測定することができる。

30

40

【 0 2 1 2 】

対照試料

いくつかの実施形態において、陽性対照は、真核細胞または細胞株によって産生された A S - S P I K の試料を含んでいてもよい。例えば、有用な対照は、安定した細胞株 S 2 - 3 由来の 1 0 0 n g / m l の A S - S P I K を含む培地であってよい。これは、A S -

50

S P I Kを過剰発現する人工プロモーターの制御下で、A S - S P I KのD N A配列をH C C細胞の染色体に挿入することにより、本発明者らによって作成された。

【 0 2 1 3 】

本明細書に開示される方法は、肝臓癌を有することが疑われるまたは肝臓癌の危険性がある患者における肝臓癌の検出に有用である。この方法はまた、肝臓癌、例えば肝細胞癌の治療を受けた患者由来の試料の、該患者の肝細胞癌が寛解する危険性があるかどうかを判定するための分析にも使用することができる。本方法は、治療、例えば、小分子薬物または治療用抗体などの治療薬による治療、化学療法、放射線療法、または手術の過程を監視して、治療の有効性を判定し、管理臨床医が必要に応じて治療法を変更することを可能にするためにも使用することができる。この方法はまた、転形、例えば、生物学的試料、例えば、患者から得られた血液または血清試料中のA S - S P I Kのレベルの増加に関連するいずれかの障害に罹患している、もしくは該障害の危険性を有する患者の検出、監視、または分析にも使用することができる。

10

【 0 2 1 4 】

本明細書に開示される方法は、他の標準的な診断方法、例えば、肝酵素または α -フェトプロテインの血清学的分析、超音波（超音波検査）、コンピューター断層撮影（C T スキャン）、磁気共鳴画像法（M R I）、血管造影、腹腔鏡検査、または生検と併用してもよい。

【 0 2 1 5 】

製品

20

本明細書に記載の組成物は、例えば、生物学的試料中のA S - S P I Kの検出、同定、及び定量化用であることが表示された適宜の容器中に包装されていてもよい。「キット」とも呼ばれる上記製品は、抗体、抗体の抗原結合フラグメント、及び/または本発明の抗体-薬物複合体、培地、陽性対照として使用するための抗原の精製試料、またはそれらの任意の組み合わせを備えていてもよい。本キットが備える容器は、A S - S P I Kに特異的にまたは優先的に結合するが、N S - S P I Kには結合しない本発明の抗体を含む組成物を備えていてもよい。キットは、A S - S P I KとN S - S P I Kの両方に結合する抗体を備えていてもよい。検査試料及び抗体を希釈または再構成するための適宜の緩衝液を提供してもよい。一部の構成要素は乾燥形態で提供されてもよく、再構成が必要になる場合がある。上記抗S P I K抗体は、アッセイ機器、例えば、マイクロプレートに事前に結合させてもよい。したがって、一実施形態において、A S - S P I Kの検出、同定、及び定量化のためのキットは、抗A S - S P I K抗体及び汎S P I K抗体を備える。本キットは、任意選択で、検出可能な標識を備えていてもよい。

30

【 0 2 1 6 】

したがって、包装された製品（例えば、貯蔵、輸送、もしくは販売のために、濃縮されたまたはそのまま使用できる濃度で包装された、1種以上の本明細書に記載の組成物を収納する滅菌容器）、及び少なくとも1種の本発明の組成物、例えば抗A S - S P I K抗体を備えるキットも、本発明の範囲内である。製品は、1種以上の本発明の組成物を収納した容器（例えば、バイアル、広口瓶、瓶、袋など）を備えていてもよい。また、製品は、例えば、包装材料、使用説明書、注射器、送達装置、緩衝液、または診断もしくは治療が必要とされる疾病を治療または監視するための他の対照試薬をさらに備えていてもよい。

40

【 0 2 1 7 】

本発明のキット中には、特定のタイプのアッセイ用の試薬が提供されていてもよい。したがって、本キットは、一群のビーズ（例えば、凝集アッセイまたはラテラルフローアッセイに適する）、またはプレート（例えば、E L I S Aアッセイに適するプレート）を備えていてもよい。他の実施形態において、本キットは、ラテラルフローイムノアッセイ装置、分析用回転子、または電気化学的、光学的、もしくは光電子的センサーなどの装置を備える。上記一群のビーズ、上記プレート、及び上記装置は、イムノアッセイを実施するのに有用である。例えば、それらは、第1の薬剤-分析対象物-第2の薬剤複合体の形成を検出するのに有用である場合がある。

50

【0218】

さらに、本キットは、様々な希釈剤及び緩衝液、特異的に結合した抗原もしくは抗体を検出するための標識複合体または他の薬剤、ならびに酵素基質、補因子、色素原などの他のシグナル発生試薬を備えていてもよい。本キットは、様々な濃度の1種以上の基準試料、例えば、精製組換えAS-SPIKを備えていてもよい。本キットは、陽性対照、例えば、AS-SPIKを過剰発現する細胞株由来の細胞上清も備えていてもよい。キットの他の構成要素としては、コーティング試薬、被験抗原もしくは分析対象物に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル捕捉抗体、または2種以上の抗体のカクテル、標準としてのこれらの抗原の精製または半精製抽出物、モノクローナル抗体検出抗体、抗マウス、抗イヌ、抗ニワトリ、または抗ヒト抗体であって、該抗体に複合体化したインジケーター分子を有する上記抗体、比色分析による比較のための指示色図、使い捨て手袋、除染手順説明書、塗布棒または塗布容器、試料準備用カップなどが挙げられる。一実施形態において、キットは、ペプチド-抗体複合体の形成を可能にする反応媒体を構成するのに適当な緩衝液または他の試薬を備える。

10

【0219】

かかるキットは、臨床医が、対象に肝臓癌があるかまたはその危険性があるかどうかを判定するための簡便で効率的な方法を提供する。したがって、特定の実施形態において、本キットは、使用説明書をさらに備える。本製品は、説明文（例えば、印刷されたラベルもしくは添付文書、または製品の使用法を説明するその他の媒体（例えば、音声テープもしくはビデオテープ））を備えていてもよい。上記説明文は上記容器に付帯されていてもよく（例えば、上記容器に貼付される）、アッセイを実施する際に従うべき方法、キットの適応症、及びその他の用途を説明するものであってもよい。

20

【0220】

以下の実施例は例示のみを目的として提示するものであり、本発明の範囲を限定することを何ら意図するものではない。本開示においてはいくつかの実施形態が提示されるが、開示される組成物及び方法は、本開示の趣旨または範囲から逸脱することがなければ、他の多くの特定の形態で実施することができることを理解されたい。本実施例は、例示的であり且つ限定的ではないと考える必要があり、その意図は、本明細書に提示した詳細に限定されるべきものではない。変更、置き換え、及び改変の様々な例は、当業者であれば確認可能であり、本明細書に開示される趣旨及び範囲から逸脱することなくこれらを行うことができる。

30

【実施例】

【0221】

実施例1：AS-SPIKに特異的なウサギモノクローナル抗体の産生

ここに記載の10種のモノクローナル抗体はウサギから生成させた。簡単に説明すれば、ウサギを、23の追加のアミノ酸（配列番号81）の異なるサブセットを含む組換えAS-SPIKで免疫した。3回または4回のimmunization後に、血液をELISAによって検査した。簡単に説明すれば、免疫化したウサギ由来の血液を、組換えAS-SPIKでコーティングしたプレートと反応させた。洗浄後に、このプレートをHRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）で標識した抗ウサギ抗体と共にインキュベートすることにより発色させ、基質TMBとの反応させた後に光学密度を測定した。検査において陽性であった（産生された抗体）ウサギを殺した。次いでモノクローナル抗体を確立し、S2-3細胞（組み込まれた全SPIK遺伝子によって多量のAS-SPIKを発現する細胞株、Lu et al. Tumor-associated protein SPIK/TATI suppresses serine protease dependent cell apoptosis, Apoptosis, 2008 13(4), 483-494）由来の部分的に精製したAS-SPIK、及び膀胱細胞由来のNS-SPIKを固定化したプレートを使用したELISAによってさらにスクリーニングした。最後に、AS-SPIKに強く結合するがNS-SPIKには結合しない10種のモノクローナル抗体を選択した。図1は、IM-A1、IM-A6、IM-B10、IM-C6、I

40

50

M - D 3、IM - D 5、IM - E 2、IM - F 5、IM - G 6、及びIM - G 7と命名した10種のクローンが、AS - SPIKに対して高い結合活性を示す一方、NS - SPIKに対する結合活性は、陰性対照としてのバックグラウンドレベル（図1陰性対照）に過ぎないことを示す。このデータは、本明細書で同定されたウサギモノクローナル抗体はAS - SPIKのみを認識することを示唆する。さらに、10種の抗体のすべてがAS - SPIKに強く結合することができ、AS - SPIKに対して類似の結合親和性を有する。

【0222】

実施例2：IM - E 2を含む試料における抗体 - 抗原複合体の検出

S 2 - 3の培地、P a n C 1の培地、H C C患者の血清、及び健常者の血清中で、抗体IM - A 1、IM - A 6、IM - B 1 0、IM - C 6、IM - D 3、IM - D 5、IM - E 2、IM - F 5、IM - G 6、及びIM - G 7とAS - SPIKから形成される複合体を、サンドウィッチELISAで測定する。簡単に説明すれば、異なる試料中の抗体とAS - SPIKとの免疫複合体は、抗体を上記試料と共に37℃で0.5時間インキュベートすることによって形成させた。次いで、この混合物を、ポリクローナル抗SPIK抗体を固定化した96ウェルプレートと37℃で1時間反応させた。次に、このプレートを、HRPで標識した抗ウサギ抗体と共に37℃で45分間インキュベートした。抗体 - 抗原複合体の量を、基質TMBとの反応後の光学密度によって測定した。図2はIM - E 2の試験結果を示す。他の抗体からも同様の結果が得られた。これらの結果は、IM - E 2はAS - SPIKと抗体 - 抗原複合体を形成することができる（図2；S 2 - 3：OD（1.389））が、NS - SPIKとは複合体を形成しない（図2、P a n C 1：OD（0.061））ことを明確に示している。高いOD（1.477）はH C Cの患者の血清中에서도見られる、健康な人では見られず（健康：OD（0.106））、このことは、ここに記載のIM - E 2などの抗体を、血清AS - SPIKの検出に使用することができることを示唆している。

【0223】

実施例3：抗体の可変重鎖及び可変軽鎖ならびにそれらのCDRの配列

10種すべての抗体の可変重鎖（VH）及び可変軽鎖（VL）の配列を決定した。次に、上記抗体のCDRを同定する。表1は、10種の抗体、すなわち、IM - A 1、IM - A 6、IM - B 1 0、IM - C 6、IM - D 3、IM - D 5、IM - E 2、IM - F 5、IM - G 6、及びIM - G 7のVHならびにVLの配列番号を示す。表2は、これら10種の抗体のVH CDRの配列番号を示し、表3は、これら10種の抗体のVL CDRの配列番号を示す。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1：VH及びVLの配列番号

抗体の名称	VH の配列番号	VL の配列番号
A1	1	11
A6	2	12
B10	3	13
C6	4	14
D3	5	15
D5	6	16
E2	7	17
F5	8	18
G6	9	19
G7	10	20

【表 2】

表 2：VH及びHC CDRの配列番号

抗体の名称	VH の配列番号	VH CDR1 の配列番号	VH CDR2 の配列番号	VH CDR3 の配列番号
A1	1	21	31	41
A6	2	22	32	42
B10	3	23	33	43
C6	4	24	34	44
D3	5	25	35	45
D5	6	26	36	46
E2	7	27	37	47
F5	8	28	38	48
G6	9	29	39	49
G7	10	30	40	50

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3：VL 及び LC CDR の配列番号

抗体の名称	VL の 配列番号	VL CDR1 の 配列番号	VL CDR2 の 配列番号	VL CDR3 の 配列番号
A1	11	51	61	71
A6	12	52	62	72
B10	13	53	63	73
C6	14	54	64	74
D3	15	55	65	75
D5	16	56	66	76
E2	17	57	67	77
F5	18	58	68	78
G6	19	59	69	79
G7	20	60	70	80

10

【0224】

20

実施例 4：VH 及び VL 配列のコンセンサス

BioEdit Sequence Alignment Editor, North Carolina University と名付けたプログラムを使用して、10 種の抗体の VH 及び VL の全配列のアラインメントにより、配列のコンセンサスを決定した。図 3 及び図 4 の最下行は、VH または VL のいずれかにおけるこれらの 10 種の抗体の配列同一性を示す。明らかに、これら 10 種の抗体には、VH 及び VL における配列の高い類似性が存在する。上記 10 種の抗体の配列同一性は 85 ~ 95 % である。

【0225】

実施例 5：CDR 配列のコンセンサス

可変重鎖の CDR の配列のコンセンサスを、上記のソフトウェアを使用して決定した。図 5 は、10 種の抗体すべてが VH CDR 1 の高い類似性を有することを示しており、それらの同一性は 66 ~ 100 % である。10 種の抗体の VH CDR 2 には 66 % の類似性があり、同一性は 50 ~ 66 % である。対照的に、これらの 10 種の抗体の VH CDR 3 の類似性は非常に小さい。VH CDR 3 中のアミノ酸のみが、10 種の抗体すべてにおいて同一である。コンセンサス配列は、これらの 10 種の抗体において、VH よりも VL の CDR の類似性がより高いことを示している。10 種の抗体の VL CDR 1 には 82 % の類似性があり、それらの同一性は 73 ~ 82 % である (図 6)。10 種の抗体の VL CDR 2 には 86 % の類似性があり、それらの同一性は 72 ~ 86 % である。VL CDR 3 に関しては、75 % の 10 種の抗体の類似性があるが、同一性は 45 ~ 75 % である (図 6)。

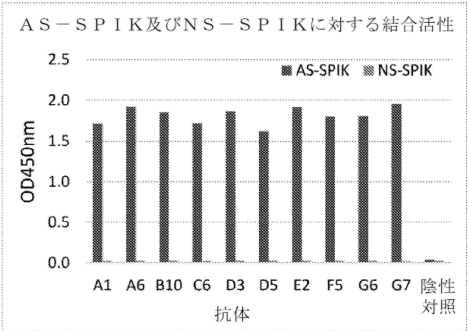
30

40

【図面】

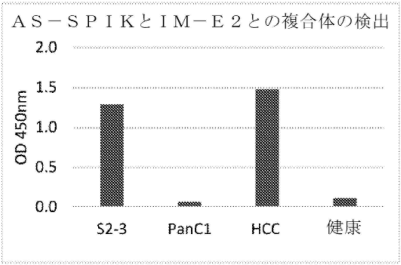
【図 1】

抗体はAS-SPIKに結合するが
NS-SPIKには結合しない



【図 2】

IM-E 2を含む試料中における抗体-抗原複合体の検出



【図 3】

アラインメント: A1、A6、B10、C6、D3、D5、E2、F5、G6、G7のVH
CDRを下線表示。第1の領域はCDR1、第2の領域はCDR2、第3の領域はCDR3。

```

      10      20      30      40      50      60
配列番号 1: A1 VH .....
配列番号 2: A6 VH .....
配列番号 3: B10VH .....
配列番号 4: C6 VH .....
配列番号 5: D3 VH .....
配列番号 6: D5 VH .....
配列番号 7: E2 VH .....
配列番号 8: F5 VH .....
配列番号 9: G6 VH .....
配列番号 10: G7 VH .....
コンセンサス .....
      70      80      90      100     110     120
配列番号 1: A1 VH .....
配列番号 2: A6 VH .....
配列番号 3: B10VH .....
配列番号 4: C6 VH .....
配列番号 5: D3 VH .....
配列番号 6: D5 VH .....
配列番号 7: E2 VH .....
配列番号 8: F5 VH .....
配列番号 9: G6 VH .....
配列番号 10: G7 VH .....
コンセンサス .....
      130     140     150
配列番号 1: A1 VH .....
配列番号 2: A6 VH .....
配列番号 3: B10VH .....
配列番号 4: C6 VH .....
配列番号 5: D3 VH .....
配列番号 6: D5 VH .....
配列番号 7: E2 VH .....
配列番号 8: F5 VH .....
配列番号 9: G6 VH .....
配列番号 10: G7 VH .....
コンセンサス .....
```

【図 4】

アラインメント: A1、A6、B10、C6、D3、D5、E2、F5、G6、G7のVL
CDRを下線表示。第1の領域はCDR1、第2の領域はCDR2、第3の領域はCDR3。

```

      10      20      30      40      50      60
配列番号 11: A1 VL .....
配列番号 12: A6 VL .....
配列番号 13: B10VL .....
配列番号 14: C6 VL .....
配列番号 15: D3 VL .....
配列番号 16: D5 VL .....
配列番号 17: E2 VL .....
配列番号 18: F5 VL .....
配列番号 19: G6 VL .....
配列番号 20: G7 VL .....
コンセンサス .....
      70      80      90      100     110     120
配列番号 11: A1 VL .....
配列番号 12: A6 VL .....
配列番号 13: B10VL .....
配列番号 14: C6 VL .....
配列番号 15: D3 VL .....
配列番号 16: D5 VL .....
配列番号 17: E2 VL .....
配列番号 18: F5 VL .....
配列番号 19: G6 VL .....
配列番号 20: G7 VL .....
コンセンサス .....
      130
配列番号 11: A1 VL .....
配列番号 12: A6 VL .....
配列番号 13: B10VL .....
配列番号 14: C6 VL .....
配列番号 15: D3 VL .....
配列番号 16: D5 VL .....
配列番号 17: E2 VL .....
配列番号 18: F5 VL .....
配列番号 19: G6 VL .....
配列番号 20: G7 VL .....
コンセンサス .....
```

10

20

30

40

50

【図 5】

アラインメント： A1、A6、B10、C6、D3、D5、E2、F5、G6、G7のVH CDR

```
CDR1
      10
      .....|
配列番号 21: A1 VH      SSVAIS
配列番号 32: A6 VH      SSVAIS
配列番号 33: B10VH     SSVAIS
配列番号 24: C6 VH      SSVAIS
配列番号 25: D3 VH      SSVAIS
配列番号 26: D5 VH      SSVAIS
配列番号 27: E2 VH      SSVAIS
配列番号 28: F5 VH      SSVAIS
配列番号 29: G6 VH      SSVAIS
配列番号 30: G7 VH      SSVAIS
コンセンサス          SSVAIS

      10
      .....|
CDR2
配列番号 31: A1 VH      AIGSSGRTTY ASWAKS
配列番号 32: A6 VH      AIGSSGRTTY ASWAKS
配列番号 33: B10VH     SIWSSGRTTY ASWAKS
配列番号 34: C6 VH      AINTYGGTTY ASWAKS
配列番号 35: D3 VH      TIVTSGRTTY ASWAKS
配列番号 36: D5 VH      AIGKSSGRTY ASWAKS
配列番号 37: E2 VH      AINSKSSRTY ASWAKS
配列番号 38: F5 VH      IIVASGRTY ASWAKS
配列番号 39: G6 VH      DIYASGRTY ASWATG
配列番号 40: G7 VH      DIVSRTTY ASWAKS
コンセンサス          -I SG Y ASWAKS

      10
      .....|
CDR3
配列番号 41: A1 VH      RWNITGVTVV RDLI
配列番号 42: A6 VH      KEETVYGAY GM
配列番号 43: B10VH     RGGTGYGAS NI
配列番号 44: C6 VH      RQFDSDAYTS ASGGMDP
配列番号 45: D3 VH      RNLEPAVTT RDLI
配列番号 46: D5 VH      RWGPGVORTA RDLI
配列番号 47: E2 VH      REDTIDYGGA FDP
配列番号 48: F5 VH      REDDTGYTS SI
配列番号 49: G6 VH      RVTSSGRTI --
配列番号 50: G7 VH      RYDMSDAFD P-
コンセンサス          R
```

【図 6】

アラインメント： A1、A6、B10、C6、D3、D5、E2、F5、G6、G7のVL CDR

```
CDR1
      10
      .....|
配列番号 51: A1 VL      QASQISSTA LA
配列番号 52: A6 VL      QASQISSTY LS
配列番号 53: B10VL     QASQISSTY LS
配列番号 54: C6 VL      QASQISSTY LS
配列番号 55: D3 VL      QASQISSTA LA
配列番号 56: D5 VL      QASQISSTA LA
配列番号 57: E2 VL      QASQISSTY LS
配列番号 58: F5 VL      QASQISSTY LS
配列番号 59: G6 VL      QASQISSTY LA
配列番号 60: G7 VL      QASQISSTY LS
コンセンサス          QASQISSTY L

      10
      .....|
CDR2
配列番号 61: A1 VL      GASTLAS
配列番号 62: A6 VL      RASTLAS
配列番号 63: B10VL     RASTLAS
配列番号 64: C6 VL      RASTLAS
配列番号 65: D3 VL      AASTLAS
配列番号 66: D5 VL      GASTLAS
配列番号 67: E2 VL      AASTVLS
配列番号 68: F5 VL      RASTLAS
配列番号 69: G6 VL      RASTLAS
配列番号 70: G7 VL      RASTLAS
コンセンサス          AASTLAS

      10
      .....|
CDR3
配列番号 71: A1 VL      QQGYTSQVD NA
配列番号 72: A6 VL      QQGYTSQVD NY
配列番号 73: B10VL     QQGYTSQVD NI
配列番号 74: C6 VL      QQGYTSQVD VF
配列番号 75: D3 VL      QQGYTSQVD WT
配列番号 76: D5 VL      QQGYTSQVD NA
配列番号 77: E2 VL      QQGYTSQVD HT
配列番号 78: F5 VL      QQGYTSQVD HT
配列番号 79: G6 VL      QQGYTSQVD HT
配列番号 80: G7 VL      QQGYTSQVD HT
コンセンサス          QQGYTSQVD N
```

【図 7 - 1】

配列情報

配列番号: 1 A1の可変領域重鎖

LVAVLKGVCQCSVKESEGGFLFKPTDITLTLCTVSGFSLSSNAISWVRQAPGNGLIEWIGAI
GSSGSTYYASWAKSRSTVTRNTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARWENIGYTNVRLD
LWGGGTLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPS

配列番号: 2 A6の可変領域重鎖

VAVLKGVCQCSVKESEGGFLFKPTDITLTLCTVSGFSLSSYAISWVRQAPGNGLIEWIGRI
NSGGATDYASWAKSRSTITRTNLNTVTLQMTSLTAADTATYFCAKEEYSYGGAYGM
WGPGTLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPS

配列番号: 3 B10の可変領域重鎖

LVAVLKGVCQCSVKESEGGFLFKPTDITLTLCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKGLEWIGS
IWSGGTTDYASWAKSRSTITRTNNTNTVTLKMTSLTAADTATYFCARGGYDGYASN
WGPGTLTVTVSSGQPKAPS

配列番号: 4 C6の可変領域重鎖

LVAVLKGVCQCSVKESEGGFLFKPTDITLTLCTVSGFSLSSYAISWVRQAPGSGLEWIGAI
NTYGGTYAYASWAKSRSTITRTNNTNTVTLKMTSLTAADTATYFCARDFDSDAYTSASG
GMD WGPGTLTVTVSSGQPKAPSEFPLAPCCGDTPR

配列番号: 5 D3の可変領域重鎖

VAVLKGVCQCSVKESEGGFLFKPTDITLTLCTVSGFSLSSYAIWVRQAPGNGLIEWIGTI
VTSGIPYYANWAKSRSTITRTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARNLDPAYSTTRLDL
WGQGTTLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPS

【図 7 - 2】

配列番号: 6 D5の可変領域重鎖

VAVLKGVCQCSVKESEGGFLFKPTDITLTLCTVSGFSLSSYAISWVRQAPGNGLIEWIGAI
GKSGSAYYASWAKSRSTITRTNLNTVSLKMTSLTAADTATYFCARWDSVGTWDARL
DLWGQGTTLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPS

配列番号: 7 E2の可変領域重鎖

LVAVLKGVCQCSVKESEGGFLFKPTDITLTLCTVSGFSLSAYAISWVRQAPGNGLIEWIGA
INSGGSAYYANWAKSRSTITRTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCAREDIYDYGGAFFP
WGPGTLTVTVSTGQPKLHH

配列番号: 8 F5の可変領域重鎖

VAVLKGVCQCSVKESEGGFLFKPTDITLTLCTVSGFSLSIYGVSWVRQAPGNGLIEWIGIY
ASGSADYASWAKSRSTITRTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCAREDDTYGYTSSIWGP
GTLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPS

配列番号: 9 G6の可変領域重鎖

LVAVLKGVCQCSVKESEGGFLFKPTDITLTLCTVSGFSLSSYPISWVRQAPGNGLIEWIGDI
YASGSILYASWATGRSTITRTNLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARVSYSGGTDIWWGP
TLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPS

配列番号: 10 G7の可変領域重鎖

LVAVLKGVCQCSVKESEGGFLFKPTDITLTLCTVSGFSLSSNVISWVRQAPGKGLEWIGDI
YVSGNTDYASWAKSRSTITRTNANLNTVTLKMTSLTAADTATYFCARYDMSSDAFDPW
GPGTLTVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPS

10

20

30

40

50

【 図 7 - 3 】

軽鎖可変領域配列:

配列番号: **11** **A1** の可変領域軽鎖
WLPGARCA YDMTQT PASVEVA VGGTVTIKQASESISTALAWYQQKPGQPPKLLIYGA
STLASGVSSRFKSGSGTGFTLTISGVECADEAATYYCQGYTSDVDNAFGGGTEG

配列番号: **12** **A6** の可変領域軽鎖
WLPGARCA YDMTQT PASVEVA VGGTVTIKQASESISTALAWYQQKPGQPPKLLIYKA
STLASGVPSRFKSGSGTGFTLTISGVQCDDAATYYCQQDYTISNVGNVFGGGTEVVVK
GDPVAPTVLIFFPSAD

配列番号: **13** **B10** の可変領域軽鎖
WLPGARCA YDMTQT PASVEVA VGGTVTIKQASESISTALAWYQQKPGQPPKLLIYRA
STLASGVPSRFKSGSGTGFTLTISDGQCDDAATYYCQGYSVSNVDNIFGGGTEVVVK
GDPVAPTVLIFFPSAD

配列番号: **14** **C6** の可変領域軽鎖
WLPGARCA YDMTQT PASVEVA VGGTVTIKQASQSI NNYSWYQQIPGQPPKLLIYRAS
TLASGVSSRFKSGSGTGFTLTISGVQCADEAATYYCQGYTSNVDNVFGGGTEVVVK
DPVAPTVLIFFPSAD

配列番号: **15** **D3** の可変領域軽鎖
WLPGARCA YDMTQT PASVEVA VGGTVTIKQASESISTALAWYQQKPGQPPKLLIYAAS
YLASGVPSRFKSGSGTGFTLTISDLECADEAATYYCHQGYASNVDNTFGGGTEGGVKG
DPVAPTVLIFFP

【 図 7 - 4 】

配列番号: **16** **D5** の可変領域軽鎖
WLPGARCA YDMTQT PASVEVA VGGTVTIKQASQSISTALAWYQQKPGQPPKLLIYGA
SKLASGVSSRFKSGSGTGFTLTISGVECADEAATYYCQGYETSNVDNAFGGGTEVVVK
GDPVAPTVLIFFPSAD

配列番号: **17** **E2** の可変領域軽鎖
WLPGARCA YDMTQT PASVEVA VGGTVTIKQASQGISSYLSWYQQKPGQPPKLLIYAA
TTLVSGVSSRFKSGSGTGFTLTISGVECADEAATYYCQQDYTTSNVDNTFGGGTEVVVK
GDPVAPTVLIFFPSAD

配列番号: **18** **F5** の可変領域軽鎖
WLPGARCA YDMTQT PASVSA VGGTVTIKQASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYRA
STLASGVSSRFKSGSGTGFTLTISGVECADEAATYYCQQDYSSNNIDNTFGGGTEVVVK
GDPVAPTVLIFFP

配列番号: **19** **G6** の可変領域軽鎖
WLPGARCA YDMTQT PASVEVA VGGTVTIKQASEDIESYLA WYQQKPGQPPKLLIYRA
STLPSGVPSRFKSGSGTGFTLTISDLECADEAATYYCQQDYSSSNVDNTFGGGTEVVVK
GDPVAPTVLIFFP

配列番号: **20** **G7** の可変領域軽鎖
LWLPGARCA YDMTQT PASVEVA VGGTVTIKQASQNISSYLSWYQHKGQRPRLMY
RASTLASGVSSRFKSGSGTGFTLTISGVQCDDAATYYCQGYTNSGVDNTFGGGTEVV
VKGDPVAPTVLIFFPSA

10

【 図 7 - 5 】

C D R H 配列:

抗体の 名称	CDRH1	CDRH2	CDRH3
A1	SSNAIS (配列番号: 21)	AIGSSGTTYASWAKS (配列番号: 31)	RWENIGYTNVRLDL (配列番号: 41)
A6	SAYAISW (配列番号: 22)	RINSGGATDYASWAR(S (配列番号: 32)	KEEYSYGGAYGM (配列番号: 42)
B10	SSYGVS (配列番号: 23)	SIWSGGTTDYASWAKS (配列番号: 33)	RGGYDYGASNI (配列番号: 43)
C6	SYAISW (配列番号: 24)	AINTYGGTTYASWAKS (配列番号: 34)	RDFDSDAYTSASGGMDP (配列番号: 44)
D3	SSYAIG (配列番号: 25)	TIVTSGIPYYANWAKS (配列番号: 35)	RNLDPAYSTIRLDL (配列番号: 45)
D5	SSYAIS (配列番号: 26)	AIGKSGSAYYASWAKS (配列番号: 36)	RWDSVGWTDARLDL (配列番号: 46)
E2	SAYAISW (配列番号: 27)	AINSGGSAYYANWAKS (配列番号: 37)	REDIYDYGAFDP (配列番号: 47)
F5	IYGVSW (配列番号: 28)	IYASGSADYASWAKS (配列番号: 38)	REDDTYGYTSSI (配列番号: 48)
G6	SYPISW (配列番号: 29)	DIYASGSILYASWATG (配列番号: 39)	RVSYSGGTDI (配列番号: 49)
G7	SNVISW (配列番号: 30)	DIYVSGNTDYASWAKS (配列番号: 40)	RYDMSSDAFDP (配列番号: 50)

【 図 7 - 6 】

C D R L 配列:

抗体の 名称	CDRL1	CDRL2	CDRL3
A1	QASQSISTALA (配列番号: 51)	GASTLAS (配列番号: 61)	QQGYTSDVDNA (配列番号: 71)
A6	QASESISTYLS (配列番号: 52)	KASTLAS (配列番号: 62)	QQDYTISNVGNV (配列番号: 72)
B10	QASESISSYLS (配列番号: 53)	RASTLAS (配列番号: 63)	QQGYSVSNVDNI (配列番号: 73)
C6	QASQSI NNYS (配列番号: 54)	RASTLAS (配列番号: 64)	QQGYTSNVDNVF (配列番号: 74)
D3	QASQSISTALA (配列番号: 55)	AASYLAS (配列番号: 65)	HQGYASNVDNNT (配列番号: 75)
D5	QASQSISTALA (配列番号: 56)	GASKLAS (配列番号: 66)	QQGYETSNVDNA (配列番号: 76)
E2	QASQGISSYLS (配列番号: 57)	AATTLVS (配列番号: 67)	QQDYTTSNVDNNT (配列番号: 77)
F5	QASQSISSYLN (配列番号: 58)	RASTLAS (配列番号: 68)	QQDYSSNNIDNT (配列番号: 78)
G6	QASEDIESYLA (配列番号: 59)	RASTLPS (配列番号: 69)	QQDYSSSNVDNT (配列番号: 79)
G7	QASQNISSYLS (配列番号: 60)	MYRASTLAS (配列番号: 70)	QQGYTNSGVDNT (配列番号: 80)

20

30

40

50

【図 7 - 7】

A-S-P-I-K及びN-S-S-P-I-Kタンパク質の配列データ。

配列番号: **81** (A-S-P-I-KのN末端のみに存在し、N-S-S-P-I-Kには存在しない23アミノ酸配列)

MKVTGIFLLSALALLSLSGNTGA

配列番号: **82** (全長A-S-P-I-Kのタンパク質配列)

MKVTGIFLLSALALLSLSGNTGADSLGREAKCYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECV
LCPENRKRQTSILIQKSGPC

配列番号: **83** (全長N-S-S-P-I-Kのタンパク質配列)

DSLGREAKCYNELNGCTKIYDPVCGTDGNTYPNECVLCPENRKRQTSILIQKSGPC

【図 7 - 8】

DNA配列データ

配列番号: **84** A1の可変領域軽鎖

CTGTGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGTCAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCTT
CAAGCCAACGGATACCTGTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCAATG
CAATAAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAACGGGCTGGAATGGATCGGAGCCATTGGTAG
TAGTGGTAGCACATACTACCGGAGCTGGGCGAAAGCCGATCCACCGTCACGAAACACC
AACCTGAACACGGTGACTCTAAAGATGACCAGTCTGACAGCCGGGACACGGCCACCTATTT
CTGTGCGGAGATGGGAGAATATTGGTTATACTAATGTTCCGTTGGATCTCTGGGGCCAGGGCA
CCCTGGTCAACGCTCTCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGGCCCCCTGCT
GCGGGGACACACCCAGCTCC

配列番号: **85** A1の可変領域軽鎖

TGGCTCCAGGTGCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGC
TGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGCACTGCATTAGCCT
GGTATCAGCAGAAACCGGGCAGCCTCCCAAGCTCTGATCTATGGTGATCCACTCTGGCA
TCTGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCAG
CGCGGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTATAGTACTAGTGATG
TTGATAATGCTTTCCGCGGAGGGACCGAGGGGG

配列番号: **86** A6の可変領域軽鎖

GGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGTCAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTTCA
AGCCAACGGATACCTGTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGCA
ATAAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAACGGGCTGGAATGGATCGGGCGCATTAAATAGTG
GTGGTGCCACAGACTACGGGAGCTGGGCGAGAAAGCCGATCCACCATCACCAGAGACACCAA
CCTGAACACGGTGACTCTGCAATGACCAAGTCTGACCGCCGGGACACGGCCACCTATTCTCT
GTGCGAAAGAAGAGTATAGTTATGGTGGTGCTTATGGTATGTGGGGCCAGGCCACTCTGGTC
ACCGTCTCTCCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGCCCCCTGCTGCGGGGA
CACACCCAGCTCC

【図 7 - 9】

配列番号: **87** A6の可変領域重鎖

CTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGTCTGC
AGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGAGCATTAGTACCTACTTAT
CCTGGTTGCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACAAGGCTTCCACTCTG
GCATCTGGGTCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCAT
CAGCGGTGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGATTATACTATTAGTA
ATGTTGGTAATGTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCT
ACTGTCTCATCTTCCCACCATCAGCGGACCA

配列番号: **88** B10の可変領域重鎖

CCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGTCAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCT
TCAAGCCAACGGATACCTGTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTTAT
GGAGTGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGGTCCATTGGGA
GTGGTGTACACAGACTACGGGAGCTGGGCGAAAGCCGATCCACCATAACCAAGAAACAC
CAACGAGAAACCGGTGACTCTGAAAGTGACCAAGTCTGACAGCCGGGACACGGCCACCTAT
TTCTGTGCGAGGGGGGTTATGATTATGGTTATGCCTCGAACATCTGGGGCCAGGCACCTT
GGTCAACCGTCTCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCA

配列番号: **89** B10の可変領域重鎖

CTCTGGTCCCAGGTGCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGT
AGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAAAGCATTAGCAGCTACTTA
TCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACAGGGCTTCCACTCT
GGCATCTGGGGTCCATCGCGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCA
TCAGGCAGGGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTATAGTGTTAGT
AATGTTGATAATATTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTGTGACC
TACTGTCTCATCTTCCCACCATCAGCGGACCA

【図 7 - 10】

配列番号: **90** C6の可変領域軽鎖

CTGGGTGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGTCAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCT
TCAAGCCAACGGATGCCGTGACACTCACTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTAT
GCAATAAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAGCGGGCTGGAATGGATCGGAGCCATTAATA
CTTATGGTGGCACATACTACGGGAGCTGGGCGAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACAC
CAACGAGAAACCGGTGACTCTGAAAATGACCAGTCTGACAGCCGGGACACGGCCACCTAT
TTCTGTGCGAGAGACTTCGATAGTGATGCTTATCTTCTGCTAGTGGGGCATGGACCCCTG
GGGCCACGGGACCCTCGTCAACGCTCTTCCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCTTCCCAC
TGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAG

配列番号: **91** C6の可変領域軽鎖

TCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTA
GCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAAACAACTACTTATC
CTGGTATCAGCAAAATACCAAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGG
CATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATC
AGCGGCGTGCAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTATAGTAGTAATGT
TGATAATGTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTG
TCTCATCTTCCCACCATCAGCGGACCA

配列番号: **92** D3の可変領域軽鎖

GGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTGTCAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTTCA
AGCCAACGGATACCTGTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGCA
ATAGGCTCGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAACGGGCTGGAATGGATCGGAACCAATTGTTACTA
GTGGTATCCCACTACTACGGGAATGGGCGAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACACCAA
CCTGAACACGGTGACTCTGAAAATGACCAAGTCTGACAGCCGGGACACGGCCACCTATTCTCT
GTGCGAGAAATTAGATCTGCTTATAGTACCACTCGGTTGGATCTCTGGGGCCAGGGCACCC
CTGGTCAACCGTCTCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCCTGCCCCCTGCTGC
GGGGACACACCCAGTCT

10

20

30

40

50

【図 7 - 1 1】

配列番号 **93** **D3** の可変領域軽鎖
TCTGGCTCCAGGTGCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGTCTGAA
CCTGTGAGAGGCCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGCACTGCATTAG
CCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGTGCATCCTATCTG
GCCTCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACCTCTCACCAT
CAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCA TCAGGGTTATAGTGCTAGTA
ATGTTGATAATACTTTCCGCGGAGGCCAGGGGGGGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACC
TACTGTCTCATCTTCCACCATC

配列番号 **94** **D5** の可変領域重鎖
GGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAA
AGCCAACGGATACCTTGACACTACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGCA
ATAAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAACGGGCTGGAATGGATCGGAGCCATTGGTAAAA
GTGGTAGCGCATACTACGGAGCTGGCGGAAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACACCAA
CCTGAACACGGTGTCTGCGTGAATGACCACTGTGACAGCCGGGACACGGCCACCTATTCTCT
GTGCGAGATGGGATAGTTGGTTGGACTGATGCTCGGTTGGATCTCTGGGGCCAGGGCACCC
CTGGTCACCGTCTCTCCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACCTGCCCCCTGCTGC
GGGGACACACCCAGCTC

配列番号 **95** **D5** の可変領域軽鎖
CTGGCTCCCAAGGTGCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAG
CTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGCACTGCATTAGC
CTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCGTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCGAAACTGG
CATCTCGGGTCTCATCGCGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATC
AGCGCGTGGAGTGTGCGGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGTTATGAAACTATGATA
TGTTGATAATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTA
CTGTCTCATCTTCCCACCATCAGCGGACCA

【図 7 - 1 3】

配列番号 **99** **F5** の可変領域軽鎖
TGGCTCCAGGTGCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGTCTGCGAC
TGTGGGAGGCCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGCTACTTAAACT
GGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCGCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGGC
ATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCACTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCATCA
GCGCGGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGATTATAGTAGTAATAAT
ATTGATAATACTTTCCGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTAC
TGTCTCATCTTCCCACCAT

配列番号 **100** **G6** の可変領域重鎖
CTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCACTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCTT
CAAGCCAACGGATACCTTGACACTACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATC
CAATAAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAACGGGCTGGAATGGATCGGAGACATTTATGC
TAGTGGTAGTATATTGTACGCGAGCTGGGCGACAGGCCGATCTACCATCACCAAGAAATACCA
ACCTGAACACGGTGACTCTGAAATGACCACTGTGACAGCCGGGACACGGCCACCTATTTC
TGTGCGAGAGTAAGTTATAGTGGTGGTACCGACATCTGGGGCCAGGCACCCCTGGTCAACCT
CTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACCTGCGCCCCCTGCTGCGGGGACACAC
CCAGCTC

配列番号 **101** **G6** の可変領域軽鎖
TCTGGCTCCCAAGGTGCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTA
GCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGGACATTGAAAGCTATTAG
CCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTG
CCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCAT
CAGCGACCTGGAGTGTCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGATTATAGTAGTAGTA
ATGTTGATAATACTTTCCGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCT
ACTGTCTCATCTTCCCACCATC

【図 7 - 1 2】

配列番号 **96** **E2** の可変領域重鎖
CTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCACTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCTT
CAAGCCAACGGATACCTTGACACTACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTGCCTATG
CAATAAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAACGGGCTGGAATGGATCGGAGCCATTAATAG
TGGTGGTAGGCATACTACGGGAACTGGGGCGAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACACC
AACTGAAACACGGTGACTCTGAAAATGACCAAGTCTGACAGCCCGGACACGGCCACCTATTT
CTGTGCGAGGGAAGATATTTATGATTATGGTGGTGCATTCGATCCCTGGGGCCAGGCACCC
TGGTCACCGTCTCCACAGGGCAACCTAAGCTCCATCAT

配列番号 **97** **E2** の可変領域軽鎖
CTGGCTCCCAAGGTGCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTA
CTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGGCAATTAGTAGTTACTTATCC
TGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGCTGCGACCACTCTGGT
ATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCACCATCA
GCGGCGTGGAGTGTGCGGATGCTGCCACTTACTACTGTACAGGAGTTATACTACTAGTAAT
GTTGATAATACTTTCCGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTAC
TGTCTCATCTTCCCACCATCAGCGGACC

配列番号 **98** **F5** の可変領域重鎖
GTGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCACTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCTTCAA
GCCAACGGATACCTTGACACTACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGCATCTATGGAG
TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAACGGGCTGGAATGGATCGGAATCATTTATGCTAGT
GGTAGCGCAGACTACGCGAGCTGGGGGAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACACCAACC
TGAAACACGGTGACTCTGAAGATGACCACTGTGACAGCCGGGACACGGCCACCTATTCTGT
GCGAGAGAGGACGATACTTATGGTTATACTAGTAGTATATGGGGCCAGGCACCCCTGGTAC
CGTCTCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACA
CACCCAGCTC

【図 7 - 1 4】

配列番号 **102** **G7** の可変領域重鎖
CTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCACTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGTCTCTT
CAAGCCAACGGATACCTTGACACTACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCAATG
TAATAAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGAGACATTTATGT
TAGTGGTAAACACAGACTACGCGAGCTGGGGGAAAAGCCGATCCACCATCACCAGAAACGCC
AACTGAAACACGGTGACTCTGAAAATGACCACTGTGACAGCCGGGACACGGCCACCTATTT
CTGTGCGAGATATGATATGAGTAGTGATGCTTTCGATCCCTGGGGCCAGGCACCCCTGGTCA
CGTCTCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCCACTGGCCCCCTGCTGCGGGGAC
ACACCCAGCTCC

配列番号 **103** **G7** の可変領域軽鎖
TCTCTGGCTCCCAAGGTGCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGG
TAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAAACATTGGTAGCTACTTA
TACTGGTATCAGCACAAACAGGGCAGGTCCTCCAGACTCTGATGTACAGGGCATCCACTCT
GGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCA
TCAGCGGTGTGCAGTGTGACAAATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTATACTAATAGT
GGTGTGATAATACTTTCCGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCC
TACTGTCTCATCTTCCCACCATCAGCGG

配列番号 **104** A S－S P I Kにのみ存在し、N S－S P I Kには存在しないD N A配列
ATGAAGGTAACAGGCATCTTTCTTCTCAGTGCCCTGGCCCTGTGAGTCTATCTGGTAACACTG
GAGCT

配列番号 **105** 全長 A S－S P I KのD N A配列
ATGAAGGTAACAGGCATCTTTCTTCTCAGTGCCCTGGCCCTGTGAGTCTATCTGGTAACACTG
GAGCTGACTCCTGGGAAGAGAGGCCAAATGTLACAAATGAACCTAATGGATGCACCAAGATA
TATGACCCGTGTCTGTGGACTGATGGAAATACTTATCCCAATGAATGCGTGTTATGTTTGA
ATCGGAACGCCAGACTTCTATCTCTATTCAAAAATCTTGGGCTTGC

10

20

30

40

50

【図 7 - 1 5】

配列番号 106 全長 NS-SPIK の DNA 配列
GACTCCCTGGGAAGAGAGGCCAAATGTTACAATGAACCTTAATGGATGCACCAAGATATATGA
CCCTGTCTGTGGGACTGATGGAAATACTTATCCCAATGAATGCGTGTATGTTTTGAAAAATCG
GAAACGCCAGACTTCTATCCTCATTCAAAAATCTGGGCCTTGC

配列番号 107 VH CDR1 の構造式
S_{X1}X₂X₃X₄S₅ 式中、X₁はSまたはA； X₂はYまたはN； X₃はA、G、P、またはV；
X₄はIまたはVである。

配列番号 108 VH CDR2 の構造式
X₅I X₆X₇X₈G X₉X₁₀X₁₁Y A S W A K S₁₂ 式中、X₈はS、G、またはY； X₅、X₆、X₇、X₉、X₁₀、
及びX₁₁は任意のアミノ酸である。

配列番号 109 VH CDR3 の構造式
R X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁ 式中、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、
及びX₂₁は任意のアミノ酸である。

配列番号 110 VL CDR1 の構造式
Q A S X₂₂X₂₃I X₂₄X₂₅X₂₆L X₂₇ 式中、X₂₂はQまたはE； X₂₃はS、G、D、またはN；X₂₄はS、N、E、またはG；
X₂₅は任意のアミノ酸； X₂₆はYまたはA； X₂₇は任意のアミノ酸である。

配列番号 111 VL CDR2 の構造式
X₂₈A X₂₉X₃₀L X₃₁S₃₂ 式中、X₂₈は任意のアミノ酸； X₂₉はSまたはT； X₃₀はT、Y、またはK；
X₃₁はA、P、またはVである。

配列番号 112 VL CDR3 の構造式
X₃₃Q X₃₄Y X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀X₄₁ 式中、X₃₂はQまたはH； X₃₃はGまたはD； X₃₄は任意のアミノ酸；
X₃₅は任意のアミノ酸； X₃₆はSまたはN；X₃₇はN、D、V、またはG； X₃₈はV、D、またはI；
X₃₉はD、G、またはN； X₄₀はNまたはV； X₄₁は任意のアミノ酸である。

10

【配列表】

0007658946000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献 米国特許出願公開第2014/0308657(US,A1)

中国特許出願公開第109678950(CN,A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

C12P 21/08

G01N 33/53

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)