

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-505144

(P2018-505144A)

(43) 公表日 平成30年2月22日(2018.2.22)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	Z N A	4 B 0 6 4
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00	A	4 C 0 8 4
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46		4 C 0 8 5
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	N	4 H 0 4 5
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 39/395	T	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-532799 (P2017-532799)	(71) 出願人	598176569 キャンサー・リサーチ・テクノロジー・リミテッド CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED イギリス・イーシー1ヴィー・4エーディー・ロンドン・セント・ジョン・ストリート・407・エンジェル・ビルディング
(86) (22) 出願日	平成27年12月11日 (2015.12.11)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(85) 翻訳文提出日	平成29年8月15日 (2017.8.15)	(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(86) 國際出願番号	PCT/EP2015/079384	(74) 代理人	100106208 弁理士 宮前 徹
(87) 國際公開番号	W02016/096640		
(87) 國際公開日	平成28年6月23日 (2016.6.23)		
(31) 優先権主張番号	1422502.3		
(32) 優先日	平成26年12月17日 (2014.12.17)		
(33) 優先権主張国	英國 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CXC L 1 2 抗体分子およびその使用

(57) 【要約】

抗CXC L 1 2 抗体分子およびその使用、そして特に in vitro および in vivo で CXC L 1 2 の生物学的活性を阻害することが可能な抗CXC L 1 2 抗体分子、ならびに CXC L 1 2 介性疾患を治療するためのその使用を開示する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト C X C L 1 2 に特異的に結合し、そして C X C L 1 2 仲介性生物学的活性を阻害する、単離抗 C X C L 1 2 抗体分子であって、抗体分子が、アミノ酸 (a) P 1 0 および R 1 2 、ならびに場合によって、E 1 5 、 I 2 8 、 P 3 2 、 N 4 5 および / または K 5 4 の 1 またはそれより多く、あるいは (b) P 1 0 および Q 4 8 、ならびに場合によって K 5 4 および N 4 5 の 1 またはそれより多くを含む、配列番号 2 4 に示すようなアミノ酸配列を有する C X C L 1 2 のエピトープに結合する、前記抗 C X C L 1 2 抗体分子。

【請求項 2】

C X C L 1 2 誘導性癌細胞増殖阻害、癌細胞遊走阻害、癌細胞接着阻害および / または癌転移阻害より選択される 1 またはそれより多い生物学的活性を有する、請求項 1 の抗 C X C L 1 2 抗体分子。 10

【請求項 3】

血管形成阻害の生物学的活性を有する、請求項 1 または請求項 2 の抗 C X C L 1 2 抗体分子。

【請求項 4】

血管形成が V E G F 誘導性血管形成である、請求項 3 の抗 C X C L 1 2 抗体分子。

【請求項 5】

ヒト C X C L 1 2 に特異的に結合し、そして C X C L 1 2 仲介性生物学的活性を阻害する、単離抗 C X C L 1 2 抗体分子であって、(a) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 、ならびに (b) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 、ならびに (c) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3 を含む、前記抗 C X C L 1 2 抗体分子。 20

【請求項 6】

(d) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列、または 1 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 5 の配列を有する C D R - L 1 、ならびに (e) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 6 の配列を有する C D R - L 2 、ならびに (f) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 7 の配列を有する C D R - L 3 をさらに含む、請求項 5 の抗 C X C L 1 2 抗体分子。 30

【請求項 7】

ヒト C X C L 1 2 に特異的に結合し、そして C X C L 1 2 仲介性生物学的活性を阻害する、単離抗 C X C L 1 2 抗体分子であって：(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 、(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 、ならびに (c) 配列番号 3 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3 を含む、前記抗 C X C L 1 2 抗体分子。 40

【請求項 8】

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 4 の配列を有する C D R - L 1 、(e) 配列番号 5 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 5 の配列を有する C D R - L 2 、ならびに (f) 配列番号 6 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 6 の配列を有する C D R - L 3 をさらに含む、請求項 7 の抗 C X C L 1 2 抗体分子。 50

【請求項 9】

抗体分子の C D R のアミノ酸配列が、配列番号 1 ~ 6 または配列番号 1 2 ~ 1 7 のいずれか 1 つに比較した際、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 のアミノ酸置換、欠失または挿入を含む、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項の抗 C X C L 1 2 抗体分子。

【請求項 10】

C X C L 1 2 に結合し、そして：

1 1 4 _ 3 H 1 V H ドメイン（配列番号 7）、ならびに、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、および場合によって配列番号 1 および配列番号 2 より選択されるアミノ酸配列を含む 1 またはそれより多い V H C D R を含む V H ドメイン、からなる群より選択される、抗体 V H ドメイン；ならびに / あるいは

1 1 4 _ 3 H 1 V L ドメイン（配列番号 9）、ならびに、配列番号 4、5 および 6 より選択されるアミノ酸配列を含む 1 またはそれより多い V L C D R を含む V L ドメイン、からなる群より選択される、抗体 V L ドメイン
を含む、先行する請求項のいずれか一項の抗 C X C L 1 2 抗体分子。

10

【請求項 11】

C X C L 1 2 に結合し、そして：

1 1 3 _ 1 H 1 2 V H ドメイン（配列番号 1 8）、ならびに、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、および場合によって配列番号 1 2 および配列番号 1 3 より選択されるアミノ酸配列を含む 1 またはそれより多い V H C D R を含む V H ドメイン、からなる群より選択される、抗体 V H ドメイン；ならびに / あるいは

20

1 1 3 _ 1 H 1 2 V L ドメイン（配列番号 2 0）、ならびに、配列番号 1 5、1 6 および 1 7 より選択されるアミノ酸配列を含む 1 またはそれより多い V L C D R を含む V L ドメイン、からなる群より選択される、抗体 V L ドメイン
を含む、先行する請求項のいずれか一項の抗 C X C L 1 2 抗体分子。

20

【請求項 12】

(a) 配列番号 7 のアミノ酸配列に、少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、
(b) 配列番号 9 のアミノ酸配列に、少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、
または (c) (a) におけるような V H 配列および (b) におけるような V L 配列を含む、
請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の抗 C X C L 1 2 抗体分子。

30

【請求項 13】

(a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列に、少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、
(b) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列に、少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、
または (c) (a) におけるような V H 配列および (b) におけるような V L 配列を含む、
請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の抗 C X C L 1 2 抗体分子。

30

【請求項 14】

完全抗体、モノクローナル抗体、F a b 断片、F (a b ') ₂ 断片、s c F v、s c F v - F c、イントラボディ、ナノボディ、ディアボディ、トリアボディ、二重特異性抗体およびキメラ抗体である、先行する請求項のいずれか一項の抗 C X C L 1 2 抗体分子。

40

【請求項 15】

ヒト抗体またはヒト化抗体である、先行する請求項のいずれか一項の抗 C X C L 1 2 抗体分子。

40

【請求項 16】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項記載の抗体分子を含む、イムノコンジュゲート。

【請求項 17】

抗体分子が、療法的活性部分、例えば細胞傷害性部分または免疫刺激性部分にコンジュゲート化されている、請求項 1 6 のイムノコンジュゲート。

【請求項 18】

細胞傷害性部分が、アルキル化剤、アルカロイド、白金配位化合物、細胞傷害性ペプチド、放射性剤、または細胞傷害性部分への変換が可能なプロドラッグである、請求項 1 6 または請求項 1 7 のイムノコンジュゲート。

50

【請求項 19】

請求項 1 ~ 18 のいずれか一項記載の抗体分子またはイムノコンジュゲートおよび薬学的に許容されうる賦形剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 20】

ヒトまたは動物の身体の治療法において使用するための、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項記載の抗体分子またはイムノコンジュゲート。

【請求項 21】

C X C L 1 2 仲介性疾患の治療のためである、請求項 20 記載の、ヒトまたは動物の身体の治療法において使用するための、抗体分子またはイムノコンジュゲート。

【請求項 22】

C X C L 1 2 仲介性癌の治療法において使用するための、または W H I M 症候群の治療のための、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項記載の抗体分子またはイムノコンジュゲート。

【請求項 23】

C X C L 1 2 仲介性癌が C X C L 1 2 を過剰発現する、請求項 22 記載の抗体分子またはイムノコンジュゲート。

【請求項 24】

C X C L 1 2 仲介性癌の治療において使用するための薬剤製造における、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項記載の抗体分子またはイムノコンジュゲートの使用。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 18 のいずれか一項記載の抗体分子またはイムノコンジュゲートを、治療の必要がある個体に投与する工程を含む、C X C L 1 2 仲介性癌を有する個体を治療する方法。

【請求項 26】

請求項 22 ~ 25 のいずれか一項の、治療法において使用するための抗体またはイムノコンジュゲート、使用あるいは方法であって、C X C L 1 2 仲介性癌が C X C L 1 2 を過剰発現する、前記抗体またはイムノコンジュゲート、使用あるいは方法。

【請求項 27】

請求項 22 ~ 25 のいずれか一項の、治療法において使用するための抗体またはイムノコンジュゲート、使用あるいは方法であって、抗体が、V E G F 誘導性血管形成を阻害し、そして / または C X C L 1 2 誘導性癌細胞遊走を阻害する、前記抗体またはイムノコンジュゲート、使用あるいは方法。

【請求項 28】

請求項 22 ~ 27 のいずれか一項の、治療法において使用するための抗体、使用または方法であって、癌が、卵巣癌、乳癌、骨癌、前立腺癌、甲状腺癌、肺臓癌、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、眼内リンパ腫、濾胞中心リンパ腫、C M L 、結腸直腸癌、口腔扁平上皮癌、子宮頸癌、神経芽腫、腎臓癌、脳癌、例えば神経膠腫および星状細胞腫、横紋筋肉腫、肺癌、例えば小細胞肺癌、黒色腫、B 細胞悪性腫瘍、例えば B 細胞慢性リンパ球性白血病 (B - C L L) 、および白血病、例えば急性骨髓性白血病 (A M L) または急性リンパ球性白血病である、前記抗体、使用または方法。

【請求項 29】

請求項 22 ~ 28 のいずれか一項の、治療法において使用するための抗体、使用または方法であって、抗体を、化学療法剤、抗体療法、免疫調節療法、手術と組み合わせて、または放射療法と組み合わせて、または細胞仲介性療法と組み合わせて投与する、前記抗体、使用または方法。

【請求項 30】

請求項 22 ~ 29 のいずれか一項の、治療法において使用するための抗体、使用または方法であって、抗体を血管形成阻害剤と組み合わせて投与する、前記抗体、使用または方法。

【請求項 31】

請求項 30 の、治療法において使用するための抗体、使用または方法であって、血管形

10

20

30

40

50

成阻害剤が、血管形成促進性増殖因子受容体をターゲットとする、抗体またはペプチド-抗体融合体、例えばベバシズマブ(アバスチン(登録商標))、セツキシマブ(エルビタックス(登録商標))、ラムシルマブ(シラムザ(登録商標))、イクルクマブ、HuM V833、2C3、アフリベルセプト(ザルトラップ(登録商標))およびIMC-1C11；小分子キナーゼ阻害剤、例えばソラフェニブ(ネキサバール(登録商標))、スニチニブ(ステント(登録商標))、パゾパニブ(ボトリエント(登録商標))、エペロリムス(アフィニトール(登録商標))、AEE788、AAL881、AAL993、ZD4190、ABT-869(リニファニブ)、PTK787(バタラニブ)、AMG706(モテサニブ)、セディラニブ(レセンチン)、アキシチニブ(インライタ(登録商標))、パンデタニブ(カプレルサ(登録商標))、SU6668、ZD1839、テラチニブ、ニンテダニブ(バルガテフ(登録商標))、ブリバニブ・アラニネット、BMS-605541、BMS-645737、CEP-7055、ドビチニブ、CP-547,632、E7080、GW654652、KRN633、チボザニブ、OSI-930、PD173074、PF-00337210、SU1498、セマキサニブ(SU5416)、SU5614、SU11657、SU14813、TKI-28、TKI-31およびZM323881；天然血管形成阻害剤、例えばエンドスタチンおよびアンギオスタチン；ならびに血管形成を阻害可能な薬剤、例えばサリドマイド、スクアラミンおよびアンギオザイムより選択される、前記抗体、使用または方法。

10

【請求項32】

CXCL12仲介性状態を有する患者の診断または予後のための方法において使用するための、請求項1～15のいずれか一項記載の抗体分子。

20

【請求項33】

請求項32の、診断または予後のための方法において使用するための抗体分子であって、方法が、抗体を用いて、試料中のCXCL12の存在または量を決定し、そしてCXCL12阻害剤で患者を治療するありうる転帰と、CXCL12の存在または量を相關させる工程を含む、前記抗体分子。

【請求項34】

画像化法において使用するための、請求項1～18のいずれか一項記載の抗体分子またはイムノコンジュゲート。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗CXCL12抗体分子およびその使用に、そしてより具体的には、CXCL12の生物学的活性を阻害することが可能である抗CXCL12抗体分子、および癌を治療するためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

C-X-Cモチーフ・ケモカイン12(CXCL12)はまた、間質細胞由来因子1(SDF-1)としても知られ、ヒトにおいてはCXCL12遺伝子によってコードされるCXCKモカインタンパク質である。該タンパク質は、2つのGタンパク質共役受容体、CXCR4およびCXCR7に結合することが知られる。該タンパク質は、造血および血管形成を含む、多くの発生および生理学的プロセスに関与する。CXCL12は、CXCR4依存機構を通じて、骨髄から内皮前駆細胞(EPC)を補充することによって血管形成に役割を果たし、これによって、発癌および腫瘍進行に関連する新規血管形成の重要な因子となっている。遊走は、CXCL12が腫瘍発展および進行に影響を及ぼす別の重要な方式である。CXCL12はまた、いくつかの癌の臓器特異的転移にも役割を果たし、ここで受容体CXCR4を発現する癌細胞は、リガンド、CXCL12を放出する転移ターゲット組織に誘引される。CXCL12はまた、CXCR4陽性間質細胞を補充するようにも作用し、そして免疫細胞浸潤を制御する。例えば、CXCL12は制御T細胞の補充を通じて、免疫抑制環境を產生し、転移前ニッヂの形成を補助しうる(Zhaoら,

40

50

Oncobiology, 1(2): 152-161, 2012)。前立腺癌において、癌関連線維芽細胞(CAF)は、CXCL12を通じて単球補充およびM2極性化に関与する(Comitoら, Oncogene, 33: 2423-2431, 2014)。高レベルのCXCL12は、膵臓癌モデルにおいて、少数のT細胞と関連し、そしてPD-L1およびCXCR4阻害剤での組み合わせ治療を通じて、T細胞浸潤を増加させることができた。T細胞浸潤におけるこの増加には、腫瘍体積の有意な減少が付随し、癌の免疫調節におけるCXCL12/CXCR4軸の役割が強調される(Feigら, PNAS, 110(50): p20212-20217, 2013)。

【0003】

10

CXCL12/CXCR4/CXCR7経路は、したがって、腫瘍増殖、生存および血管形成におけるその役割を考慮すると、潜在的な療法ターゲットとしてかなりの関心を呼んできた(Balkwillら, Seminars in Cancer Biology, 14: 171-179, 2004)。

【0004】

20

WO 2008/018641(小野薬品工業およびMedarex, Inc.)は、SDF-1に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を開示し、そして乳癌、多発性骨髄腫および非ホジキンリンパ腫ならびに自己免疫障害を含む、多様なB細胞悪性疾患を治療するためのその医学的使用を提唱する。Zhongら(Clinical Cancer Research, 19: 4433-4445, 2013; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0943)は、ハムスター・モノクローナル抗体30D8のヒト化型を開示し、そして該抗体がin vitroアッセイにおいて、ヒトおよびネズミCXCL12に結合可能であったことを示す。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】WO 2008/018641

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Zhaoら, Oncobiology, 1(2): 152-161, 2012

30

【非特許文献2】Comitoら, Oncogene, 33: 2423-2431, 2014

【非特許文献3】Feigら, PNAS, 110(50): p20212-20217, 2013

【非特許文献4】Balkwillら, Seminars in Cancer Biology, 14: 171-179, 2004

【非特許文献5】Zhongら(Clinical Cancer Research, 19: 4433-4445, 2013; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0943)

40

【発明の概要】

【0007】

広く、本発明は、抗CXCL12抗体分子のアフィニティ成熟、ならびに該抗体分子が、CXCR4誘導性癌細胞遊走を阻害可能であり、そして/またはin vitroでVEGF誘導性血管形成を阻害可能であることを示す、細胞に基づくアッセイおよびin vivoにおける機能検証に基づく。これらの特性のため、本発明の抗体分子は、特に転移およびまたは腫瘍血管新生を阻害することによって、癌の治療において使用されることが可能になる。

【0008】

50

したがって、第一の側面において、本発明は、ヒト、および場合によってネズミCXCL12

L 1 2 に特異的に結合し、そして C X C L 1 2 仲介性生物学的活性を阻害する、単離抗 C X C L 1 2 抗体分子であって、抗体分子が、アミノ酸 (a) P 1 0 および R 1 2 、ならびに場合によって、E 1 5 、 I 2 8 、 P 3 2 、 N 4 5 および / または K 5 4 の 1 またはそれより多く、あるいは (b) P 1 0 および Q 4 8 、ならびに場合によって K 5 4 および N 4 5 の 1 またはそれより多くを含む、配列番号 2 4 に示すようなアミノ酸配列を有するヒト C X C L 1 2 のエピトープに結合する、前記抗 C X C L 1 2 抗体分子を提供する。

【 0 0 0 9 】

さらなる側面において、本発明は： (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 、 (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 、ならびに (c) 配列番号 3 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3 ；そして場合によって (d) 配列番号 4 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 4 の配列を有する C D R - L 1 、 (e) 配列番号 5 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 5 の配列を有する C D R - L 2 、ならびに (f) 配列番号 6 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 6 の配列を有する C D R - L 3 を含む、抗 C X C L 1 2 抗体分子を提供する。

10

20

30

【 0 0 1 0 】

さらなる側面において、本発明は、 (a) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 、ならびに (b) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 、ならびに (c) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3 ；そして場合によって (d) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列、または 1 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 5 の配列を有する C D R - L 1 、ならびに (e) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 6 の配列を有する C D R - L 2 、ならびに (f) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 7 の配列を有する C D R - L 3 を含む、抗 C X C L 1 2 抗体分子を提供する。

30

【 0 0 1 1 】

さらなる側面において、本発明は、本明細書に開示するような抗体分子またはイムノコンジュゲートおよび薬学的に許容されうる賦形剤を含む、薬学的組成物を提供する。

さらなる側面において、本発明は、ヒトまたは動物の身体の治療法において使用するための、本明細書に開示するような抗体分子またはイムノコンジュゲートを提供する。

40

【 0 0 1 2 】

さらなる側面において、本発明は、 C X C L 1 2 仲介性状態の治療法において使用するための、本明細書に開示するような抗体分子またはイムノコンジュゲートを提供する。

さらなる側面において、本発明は、 C X C L 1 2 仲介性状態の治療において使用するための薬剤製造における、本明細書に開示するような抗体分子またはイムノコンジュゲートの使用を提供する。

【 0 0 1 3 】

さらなる側面において、本発明は、本明細書に開示するような抗体分子またはイムノコンジュゲートを、治療の必要がある個体に投与する工程を含む、 C X C L 1 2 仲介性状態を有する個体を治療する方法を提供する。

【 0 0 1 4 】

50

さらなる側面において、本発明は、C X C L 1 2 仲介性状態を有する患者の診断または予後のための方法において使用するための、本発明の抗体分子を提供する。例えば、該方法は、抗体を用いて、試料中のC X C L 1 2 の存在または量を決定し、そしてC X C L 1 2 阻害剤で患者を治療するありうる転帰と、C X C L 1 2 の存在または量を相関させる工程を含む。

【0015】

本発明の医学的使用および治療法において、好ましくは、C X C L 1 2 仲介性状態は、癌および／または免疫細胞遊走および／または転移を含む、癌である。本発明の抗体またはイムノコンジュゲートを用いて治療可能な癌のタイプには、卵巣癌、乳癌、骨癌、前立腺癌、甲状腺癌、膵臓癌、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、眼内リンパ腫、濾胞中心リンパ腫、C M L 、結腸直腸癌、口腔扁平上皮癌、子宮頸癌、神経芽腫、腎臓癌、脳癌、例えば神経膠腫および星状細胞腫、横紋筋肉腫、肺癌、例えば小細胞肺癌、黒色腫、B 細胞悪性腫瘍、例えばB 細胞慢性リンパ球性白血病（B - C L L ）、および白血病、例えば急性骨髓性白血病（A M L ）および急性リンパ球性白血病が含まれる。他の態様において、本発明は、W H I M 症候群の治療のために使用可能である。

10

【0016】

他の使用において、本発明を、C X C L 1 2 シグナル伝達が関与する状態の治療のために、小分子C X C R 4 阻害剤（プレリキサフォル、A M D 3 1 0 0 ）の使用と同様に、例えば細胞可動化、例えば骨髄における幹細胞可動化、例えば細胞移植のための調製において、使用することも可能である。

20

【0017】

本発明の態様は、ここで、付随する図を参照しながら、例として、そして限定ではなく記載されるであろう。しかし、本発明の多様なさらなる側面および態様は、本開示を考慮して、当業者には明らかであろう。

【0018】

本明細書で使用する「および／または」は、他のものを含むまたは含まない、2つの明記する特徴または構成要素の各々の特定の開示として解釈されるものとする。例えば「A および／またはB 」は、ちょうど各々が本明細書に個々に示されるように、（i ）A 、（ii ）B ならびに（iii ）A およびB の各々の特定の開示として解釈されるものとする。

30

【0019】

文脈が別に指示しない限り、上に示す特徴の説明および定義は、本発明のいかなる特定の側面または態様にも限定されず、そして記載するすべての側面および態様に等しく適用される。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】抗C X C L 1 2 抗体を発現するために用いたベクター系。A) p S A N G 1 0 - 3 F ベクターを用いた一本鎖抗体（s c F v ）発現。このプラスミド中、s c F v 遺伝子の転写は、バクテリオファージT 7 プロモーターの調節下にある。制限部位N c o I 、X h o I 、N h e I およびN o t I は、可変重鎖（V H ）および軽鎖（V L ）遺伝子をF a b およびI g G 発現ベクター内にサブクローニングすることを容易にする。B) p B I O C A M - 7 ベクターを用いた、F a b 抗体発現。このプラスミドは、C M V プロモーターの調節下で、ニシストロン性F a b 発現カセットを含有する。重鎖および軽鎖遺伝子間に存在するP 2 A 配列は、リボソームスキップ機構によって、その下流の抗体重鎖ポリペチド（V H - C H 1 ）の放出を可能にする。P 2 A ペプチドは、フューリン切断によって、抗体軽鎖から翻訳後に除去される。C) p B I O C A M 1 - 2 二重プラスミド系を用いたI g G 発現。重鎖（V H - C H 1 - C H 2 - C h 3 ）および軽鎖発現カセットは、2つの異なるプラスミド中に位置する。プラスミドp B I O C A M - 1 は重鎖遺伝子をコードし、そしてp B I O C A M - 2 は重鎖カセットをコードする。抗体遺伝子の転写は、両プラスミド中のC M V プロモーターの調節下にある。p S A N G 1 0 - 3 F およびp B I O

40

50

CAM 7において、抗体遺伝子に融合されたヘキサヒスチジン(6x-His)およびTRIFLAGタグは、発現された抗体の精製および免疫検出を可能にする。

【図2】抗CXCL12 FabおよびIgGのSDS-PAGE分析。リード抗CXCL12抗体およびその親クローニーを、FabおよびIgGとしてHEK-293細胞中で発現させた。SYPRO(登録商標)レッド染色を用いて、還元SDS-PAGEゲル上で、アフィニティ精製抗体を可視化した。クローン093_2D06、093_2A02、114_3H1(114_3H01と表示)および113_1H12をそれぞれ、Fab(レーン1~4)およびIgG(レーン5~8)として装填した。Fab調製のいくつかにおけるVH-CH1バンドのスマアは、Flagタグ付けタンパク質においてしばしば起こる、FLAGタグの切断による可能性があった。

【図3-1】SPRを用いた抗CXCL12抗体のアフィニティ測定。A)ストレプトアビジンチップ(ストレプトアビジンをあらかじめ固定させたカルボキシメチル化デキストランマトリックス)上に固定されたビオチン化CXCL12へのリードおよび親抗CXCL12 Fabの多数の濃度のセンソグラム。B)1:1ラングミュア結合モデルを用いて、114_3H1(114_3H01と表示)の結合定数を決定した。オフ速度が非常に速いため、定常状態結合モデルを用いて、親クローン093_2D06の平衡解離定数(KD)を計算した。C)抗体113_1H12およびその親クローン093_2A02は、二相結合プロファイルを示した。2状態結合モデルを用いて、これらの抗体の結合定数を決定した。すべての計算のため、Biacore T100評価ソフトウェアを用いた。

【図3-2】SPRを用いた抗CXCL12抗体のアフィニティ測定。A)ストレプトアビジンチップ(ストレプトアビジンをあらかじめ固定させたカルボキシメチル化デキストランマトリックス)上に固定されたビオチン化CXCL12へのリードおよび親抗CXCL12 Fabの多数の濃度のセンソグラム。B)1:1ラングミュア結合モデルを用いて、114_3H1(114_3H01と表示)の結合定数を決定した。オフ速度が非常に速いため、定常状態結合モデルを用いて、親クローン093_2D06の平衡解離定数(KD)を計算した。C)抗体113_1H12およびその親クローン093_2A02は、二相結合プロファイルを示した。2状態結合モデルを用いて、これらの抗体の結合定数を決定した。すべての計算のため、Biacore T100評価ソフトウェアを用いた。

【図4】卵巣癌細胞のCXCL12誘導性遊走。A)上部チャンバー中の蛍光標識ヒト卵巣癌細胞(TOV-21G)および下部チャンバー中のCXCL12を、コラーゲンコーティングした多孔性膜によって分離した。膜を渡る細胞の遊走を、蛍光スキャナによって定量化した。B)細胞遊走を誘導するために最適であるヒトCXCL12濃度を、CXCL12の用量設定(20~1200ng/ml)によって決定した。阻害アッセイにおいて、細胞遊走を刺激するために、80ng/ml CXCL12を選択した。すべてのエラーバーは標準偏差に相当する。

【図5】抗CXCL12抗体による癌細胞遊走の阻害。蛍光スキャナを用いて、CXCL12に向かう蛍光標識TOV-21G細胞のトランスウェル遊走を定量化した。0.39~500nMの範囲の114_3H1(114_3H01と表示)および113_1H12_IgGの用量設定を、下部チャンバーにおいて、80ng/ml(10nM)ヒトCXCL12と混合して、CXCL12誘導性遊走に対するこれらの抗体の影響を試験した。抗リゾチーム抗体(500nM)をアイソタイプ対照として用いた。すべてのエラーバーは、標準偏差に相当する。

【図6A】抗CXCL12抗体による血管形成の阻害。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を、ゼラチンコーティングチャンバースライド上で6日間増殖させた線維芽細胞上にプレーティングした。これらの2つの細胞タイプを、VEGF、ならびにリード抗CXCL12抗体114_3H1および113_1H12を含有する培地内で、7日間共培養した。リゾチームに結合するIgG(非特異的IgG)をアッセイのアイソタイプ対照として用いた(パネルA)。共培養7日後、細胞を血小板/内皮接着分子-1(PECAM-

10

20

30

40

50

1、血管形成のマーカー)に関して染色して、光学顕微鏡検査によって、細管の形成および分枝を視覚化した。AngioSys画像分析ソフトウェアを用いて、細管総数、分枝接合部数(図6A)、および細管全長(図6B)を計算した。

【図6B】抗CXCL12抗体による血管形成の阻害。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を、ゼラチンコーティングチャンバースライド上で6日間増殖させた線維芽細胞上にプレーティングした。これらの2つの細胞タイプを、VEGF、ならびにリード抗CXCL12抗体114-3H1および113-1H12を含有する培地内で、7日間共培養した。リゾチームに結合するIgG(非特異的IgG)をアッセイのアイソタイプ対照として用いた(パネルA)。共培養7日後、細胞を血小板/内皮接着分子-1(PECAM-1、血管形成のマーカー)に関して染色して、光学顕微鏡検査によって、細管の形成および分枝を視覚化した。AngioSys画像分析ソフトウェアを用いて、細管総数、分枝接合部数(図6A)、および細管全長(図6B)を計算した。

【図7】CXCL12抗体114-3H1および113-1H12の重鎖および軽鎖配列整列。

【図8】CXCL12抗体114-3H1および113-1H12の重鎖および軽鎖配列整列とWO 2008/018641の抗体との配列整列

【図9】AおよびB。抗体(ヒトIgG2形式の113-1H12(hAB113)、キメラネズミIgG2a形式の113-1H12(mAB113)、およびキメラネズミIgG2a形式の114-3H1(mAB114))が、ヒトCXCL12の存在下でのネズミ転移性黒色腫細胞株(B16F10)およびヒト卵巣癌細胞株(TOV-21)の遊走をブロッキングする際の有効性を決定するための実験の結果を示す遊走トラック。

【図10】肺への遊走および転移の開始のためにCXCR4を必要とするB16F10黒色腫細胞に基づく、in vivo実験転移モデル細胞遊走の結果。B16F10黒色腫細胞を、第0日、尾静脈注射を通じて、C57BLマウス内に導入し、そして治療を第1日に開始した。治療措置は、毎日2回の臨床的CXCR4阻害剤、AMD3100(ブレリキサフォル)5mg/kgか、あるいは週2回のキメラネズミIgG2a形式の抗CXCL12抗体の10、15または20mg/kgのいずれかであった。対照アームのマウスを、20mg/kgの対照抗体で週2回処置した。すべてのマウスを第14日に処分し、そして肺中の転移コロニーの数を定量化した。113-1H12の20mg/kg用量で、AMD3100のものに同等な阻害レベルが達成された。

【図11】本発明の抗CXCL12抗体が、scFv-FcおよびヒトIgG2形式のヒトCXCL12によって誘導されたTOV21G癌細胞の遊走をブロッキングすることを示す、in vitro細胞トランスウェル遊走アッセイの結果。

【発明を実施するための形態】

【0021】

抗CXCL12抗体分子

別に言及しない限り、抗体残基は、本明細書において、Kabat番号付けスキームにしたがって番号付けされる。

【0022】

CXCL12の全長アミノ酸配列を配列番号23として示し、そしてこれは89アミノ酸からなる。例示する抗体を選択するために用いた合成68アミノ酸CXCL12断片のアミノ酸配列を、配列番号24に示す。以下の実施例に記載するエピトープマッピング研究は、配列番号25に示すアミノ酸配列を有する野生型成熟CXCL12ポリペプチドを用い、これはポリヒスチジンタグおよびリンカー配列を含む。好ましくは、本発明の抗体分子は、配列番号23に示すようなアミノ酸1~68、または生物学的に活性であるその断片に少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドを含むCXCL12ポリペプチドに結合することが可能である。本発明の抗体分子またはイムノコンジュゲートの生物学的活性の例には、例えばCXCR4とCXCL12の相互作用、および場合によってまたCXCR7とCXCL12の相互作用をブロッキングする、CXCL12への結合が含まれる。さらに、本発明の抗体分子またはイムノコンジュゲートによって阻害(アンタゴ

10

20

30

40

50

ナイズ)されうるC X C L 1 2の生物学的活性には、in vitroでのV E G F誘導性血管形成の阻害ならびに/あるいはC X C L 1 2誘導性癌細胞遊走および/または伝播および/または転移の阻害が含まれる。本発明の抗体分子またはイムノコンジュゲートはまた、免疫細胞浸潤を制御する際のC X C L 1 2の役割も阻害しうる。癌細胞遊走および転移を決定するためのアッセイを本明細書の実施例に記載する。

【0023】

以下の実施例に詳細に記載するように、一次抗C X C L 1 2抗体のin vitroアフィニティ成熟を2つの工程で行った。最初に、一次抗体配列を、軽鎖シャッフリングによって多様化させて、誘導体ライブラリーを生成した。次に、それぞれに合わせた選択およびスクリーニング法を用いて、軽鎖シャッフリングライブラリーからアフィニティ改善変異体を同定した。一次抗C X C L 1 2抗体を多様化させるために軽鎖シャッフリングを用いる理論的根拠は以下の通りであった。in vivo(免疫前B細胞レパートリー)またはin vitro(「McCaffertyライブラリー」)での未刺激(naive)免疫レパートリーの元来の多様性は、生殖系列可変遺伝子セグメントのコンビナトリアル再編成に由来する。軽鎖可変領域(VL)は、長いV遺伝子セグメントおよび短い連結(J)遺伝子セグメントの組み合わせによってコードされる。対照的に、重鎖可変領域(VH)をコードする遺伝子は、3つの遺伝子セグメント、Vセグメント、Jセグメント、および多様性(D)セグメントから組み立てられ、そしてしたがって、2つの可変鎖のうち、より多様である。特にCDR3領域での、この増加した多様性のため、VHドメインは、抗原結合において、そしてエピトープ特異性定義において、支配的な役割を果たす傾向がある。VLドメインもまた結合アフィニティおよび抗体発現レベルを微調整する際に寄与するため、望ましい発現特性を持つ高アフィニティ抗体を同定するために、ライブラリー中に可能な限り多くのVH-VLの組み合わせを有することが重要である。以下の実施例において、20の抗C X C L 1 2抗体の重鎖可変領域と、カッパおよびラムダ軽鎖可変ドメインのレパートリーを組み合わせることによって、 2×10^8 の軽鎖シャッフリングライブラリーを生成した。したがって、元来の重鎖各々は、およそ1000万の新規軽鎖パートナーと対形成した。ファージディスプレイ選択3ラウンドを、ストリンジメントな条件下で行って、鎖シャッフリングライブラリーから、高アフィニティ結合剤に関して濃縮した。抗原濃度を減少させるか、またはより厳しいおよびより長い洗浄工程を用いるかによって、選択条件のストリンジエンシーを各ラウンドで増加させた。こうした選択法は、より低い解離定数を持つ抗体クローンの優先的な濃縮を容易にする。

【0024】

溶液相において、アフィニティ成熟選択を行い、選択のストリンジエンシーを決定する際に重要なパラメータである、抗原濃度の正確な調節を可能にする。このプロセスで同定された、最低の解離定数を示す2つの抗体(114_3H1および113_1H12)を、詳細な特徴付けおよび最適化のためのリード抗体として選択した。114_3H1および113_1H12ならびにその親クローン(それぞれ、093_2D06および093_2A02)の完全な動力学的分析によって、軽鎖シャッフリング後のアフィニティ改善を確認した。114_3H1に関する1nMの計算アフィニティは、その親抗体093_2D06(KD = 3.8 μM)より3800倍の改善に相当する。もう一方の親抗体093_2A02のアフィニティ(KD = 16.7 nM)は、初めから比較的高く、その娘クローン、113_1H12に対するアフィニティ改善は、KD = 3.7 nMを導いた。

【0025】

結合および動力学的研究に加えて、細胞に基づく機能アッセイにおいて、抗体分子の生物学的特性を試験して、ありうるin vivo強度を決定したが、これは、特に、抗体分子が複雑な生物学的機能を調節するように意図される場合、これが必ずしも結合と相關しないためである。癌転移および腫瘍支持血管系の確立におけるC X C L 1 2の役割を考慮して、本発明の抗体分子の生物学的特性には、in vitroでのC X C L 1 2誘導性癌細胞遊走の阻害および/またはV E G F誘導性血管形成の阻害が含まれる。

【0026】

10

20

30

40

50

トランスウェル遊走アッセイを用いて、C X C L 1 2 誘導性癌細胞遊走を阻害する生物学的特性を決定することも可能であり、本明細書で用いるこのアッセイは、白血球の走化性反応を研究するために用いられたボイデンチャンバー（Boyd e n , J . E x p . M e d . 1 1 5 , 4 5 3 - 4 6 , 1 9 6 2) の修飾型であって、上部チャンバーに植え付けられた蛍光標識癌細胞、例えばヒト卵巣癌細胞 T O V - 2 1 G の、多孔性膜を渡り、そして C X C L 1 2 を含有する下部チャンバー内への遊走を決定する。

【 0 0 2 7 】

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (H U V E C) および線維芽細胞を、抗 C X C L 1 2 抗体および V E G F を含有する培地中で一緒に培養する、細胞に基づくアッセイを用いて、血管形成を阻害する生物学的特性を決定することも可能である。 V E G F の存在下でのこれらの 2 つの細胞タイプの相互作用は、*in vivo* の小さい毛細血管に似た三次元チューブの形成を生じる。 H etheridge ら (Biochem . Soc . Trans . 3 9 , 1 5 9 7 - 1 6 0 0 , 2 0 1 1) を参照されたい。

10

【 0 0 2 8 】

機能的特性を評価するため、*in vitro* 癌細胞遊走アッセイおよび血管形成アッセイを用いて、2つのリード抗体、1 1 4 _ 3 H 1 および 1 1 3 _ 1 H 1 2 を試験した。どちらの抗体も、卵巣癌細胞の C X C L 1 2 誘導性遊走を阻害し、1 1 4 _ 3 H 1 が 1 1 3 _ 1 H 1 2 を上回った。どちらの抗体に関しても、このアッセイで観察される I C ₅₀ は、 S P R 分析から計算される K D 値に匹敵した。さらに、抗体クローン 1 1 3 _ 1 H 1 2 は、 V E G F 誘導性血管形成を有意に阻害し、一方、抗体クローン 1 1 4 _ 3 H 1 は、 V E G F 誘導性血管形成を部分的に阻害した。

20

【 0 0 2 9 】

特定の理論によって束縛されることは望ましくないが、抗体特性のこの相違は、 C X C L 1 2 が C X C R 4 および C X C R 7 の両方との相互作用を通じて血管形成を誘導しうる事実の結果である可能性もある。したがって、1 1 4 _ 3 H 1 は C X C L 1 2 / C X C R 4 相互作用のみをブロッキングするが、 C X C L 1 2 / C X C R 7 をブロッキングせず、血管形成の部分的阻害を生じることが可能でありうる。対照的に、1 1 3 _ 1 H 1 2 は、 C X C R 4 および C X C R 7 両方への C X C L 1 2 結合をブロッキングし、 C X C L 1 2 誘導性血管形成のより優れた阻害を導く可能性もある。

30

【 0 0 3 0 】

したがって、本発明は、抗体クローン 1 1 3 _ 1 H 1 2 または 1 1 4 _ 3 H 1 に基づく抗体分子を提供する。

1 つの側面において、本発明は、抗体 1 1 4 _ 3 H 1 の C D R 配列に基づく以下の C D R 配列：

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 ; ならびに / あるいは

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 ; ならびに / あるいは

40

(c) 配列番号 3 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3 ; ならびに / あるいは

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 4 の配列を有する C D R - L 1 ; ならびに / あるいは

(e) 配列番号 5 のアミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 5 の配列を有する C D R - L 2 ; ならびに / あるいは

(f) 配列番号の 6 アミノ酸配列、または 1 、 2 、 3 若しくはそれより多いアミノ酸置

50

換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 6 の配列を有する C D R - L 3 の少なくとも 1、2、3、4、5、または 6 を含む、抗 C X C L 1 2 抗体分子を提供する。

【 0 0 3 1 】

1つの態様において、抗 C X C L 1 2 抗体分子は、場合によって 1 またはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を含む、上に定義するような 6 つの C D R すべてを含む。

さらなる側面において、本発明は、抗体 1 1 3 _ 1 H 1 2 の C D R 配列に基づく以下の C D R 配列：

(a) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列、または 1、2、3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 ; ならびに / あるいは

(b) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列、または 1、2、3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 ; ならびに / あるいは

(c) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列、または 1、2、3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3 ; ならびに / あるいは

(d) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列、または 1 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 5 の配列を有する C D R - L 1 ; ならびに / あるいは

(e) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列、または 1、2、3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 6 の配列を有する C D R - L 2 ; ならびに / あるいは

(f) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列、または 1、2、3 若しくはそれより多いアミノ酸置換、欠失若しくは挿入を含む配列番号 1 7 の配列を有する C D R - L 3 の少なくとも 1、2、3、4、5、または 6 またはそれより多くを含む、抗 C X C L 1 2 抗体分子を提供する。

【 0 0 3 2 】

1つの態様において、抗 C X C L 1 2 抗体分子は、場合によって 1 またはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を含む、上に定義するような 6 つの C D R (配列番号 1 2 ~ 1 7) すべてを含む。

【 0 0 3 3 】

軽鎖可変領域 (V L) は、長い V 遺伝子セグメントおよび短い連結 (J) 遺伝子セグメントの組み合わせによってコードされる。対照的に、重鎖可変領域 (V H) をコードする遺伝子は、3つの遺伝子セグメント、V セグメント、J セグメント、および多様性 (D) セグメントによって組み立てられ、そしてしたがって、2つの可変鎖よりもより多様である。特に C D R 3 領域での、この増加した多様性のため、V H ドメインは、抗原結合において、そしてエピトープ特異性定義において、支配的な役割を果たす傾向がある。

【 0 0 3 4 】

したがって、いくつかの態様において、本発明は、場合によって、各々 1、2、3 またはそれより多いアミノ酸置換、欠失または挿入を含む、本明細書に定義するような例示する抗体の重鎖の C D R を、異なる抗体分子由来の軽鎖と組み合わせて含む、抗 C X C L 1 2 抗体分子を提供する。

【 0 0 3 5 】

さらなる側面において、本発明は、(a) (i) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 、(i i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 、および (i i i) 配列番号 3 より選択されるアミノ酸配列を含む C D R - H 3 より選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つすべての V H C D R 配列を含む V H ドメイン；ならびに (b) (i) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 、(i i) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 、および (i i i) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 より選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または 3 つすべての V L C D

10

20

30

40

50

R配列を含むV Lドメインを含む、抗C X C L 1 2抗体を提供する。

【0036】

さらなる側面において、本発明の抗体分子は、配列番号7に示すアミノ酸配列、あるいは配列番号7のアミノ酸配列に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列を含むV Hドメインを含む。いくつかの態様において、V H配列は、参照配列に対して、1またはそれより多い置換、挿入、または欠失を含む一方、抗体分子はC X C L 1 2への結合の特性、そして場合によって本明細書に記載するような本発明の抗C X C L 1 2抗体分子の1またはそれより多くの他の生物学的活性を保持する。好ましくは、V Hドメインは、(i)配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii)配列番号3より選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3より選択される1つ、2つ、または3つのCDRを含む。
10

【0037】

さらなる側面において、本発明の抗体分子は、配列番号9に示すアミノ酸配列、あるいは配列番号9のアミノ酸配列に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列を含むV Lドメインを含む。いくつかの態様において、V H配列は、参照配列に対して、1またはそれより多い置換、挿入、または欠失を含む一方、抗体分子はC X C L 1 2への結合の特性、そして場合によって本明細書に記載するような本発明の抗C X C L 1 2抗体分子の1またはそれより多くの他の生物学的活性を保持する。好ましくは、V Lドメインは、(i)配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii)配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii)配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3より選択される1つ、2つ、または3つのCDRを含む。
20

【0038】

いくつかの態様において、本発明の抗体分子は、配列番号7に示すアミノ酸配列、あるいは配列番号7に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列を含むV Hドメイン、および配列番号9に示すアミノ酸配列、あるいは配列番号9に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含むV Lドメインを含む。
30

【0039】

さらなる側面において、本発明は、(a)(i)配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii)配列番号14より選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3より選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのV H CDR配列を含むV Hドメイン；ならびに(b)(i)配列番号15のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii)配列番号16のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii)配列番号17のアミノ酸配列を含むCDR-L3より選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのV L CDR配列を含むV Lドメインを含む、本発明の抗C X C L 1 2抗体を提供する。
40

【0040】

さらなる側面において、本発明の抗体分子は、配列番号18に示すアミノ酸配列、あるいは配列番号18のアミノ酸配列に少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する配列を含むV Hドメインを含む。いくつかの態様において、V H配列は、参照配列に対して、1またはそれより多い置換、挿入、または欠失を含む一方、抗体分子はC X C L 1 2への結合の特性、そして場合によって本明細書に記載するような本発明の抗C X C L 1 2抗体分子の1またはそれより多くの他の生物学的活性を保持する。好ましくは、V Hドメインは、(i)配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii)配列番号14より選択されるアミノ酸配
50

列を含む C D R - H 3 より選択される 1 つ、 2 つ、 または 3 つの C D R を含む。

【 0 0 4 1 】

さらなる側面において、本発明の抗体分子は、配列番号 2 0 に示すアミノ酸配列、あるいは配列番号 2 0 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む V L ドメインを含む。いくつかの態様において、 V H 配列は、参照配列に対して、 1 またはそれより多い置換、挿入、または欠失を含む一方、抗体分子は C X C L 1 2 への結合の特性、そして場合によって本明細書に記載するような本発明の抗 C X C L 1 2 抗体分子の 1 またはそれより多くの他の生物学的活性を保持する。好ましくは、 V L ドメインは、 (i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 、 (i i) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 、および (i i i) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 より選択される 1 つ、 2 つ、 または 3 つの C D R を含む。

10

【 0 0 4 2 】

いくつかの態様において、本発明の抗体分子は、配列番号 1 8 に示すアミノ酸配列、あるいは配列番号 1 8 に少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む V H ドメイン、および配列番号 2 0 に示すアミノ酸配列、あるいは配列番号 2 0 に少なくとも 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む V L ドメインを含む。

20

【 0 0 4 3 】

さらなる側面において、本発明は、アミノ酸 (a) P 1 0 および R 1 2 、ならびに場合によって、 E 1 5 、 I 2 8 、 P 3 2 、 N 4 5 および / または K 5 4 の 1 またはそれより多く、あるいは (b) P 1 0 および Q 4 8 、場合によって K 5 4 および N 4 5 の 1 またはそれより多くを含む、配列番号 2 4 または 2 5 に示すようなアミノ酸配列を有する C X C L 1 2 のエピトープに結合可能である、抗 C X C L 1 2 抗体分子を提供する。例示的な抗体 1 1 4 _ 3 H 1 はエピトープ (a) に結合し、そして抗体 1 1 3 _ 1 H 1 2 はエピトープ (b) に結合する。

【 0 0 4 4 】

E 1 5 は、受容体またはヘパリン結合に関与する領域の外である。すべての他のエピトープ残基は、受容体結合に関与する領域内であり、 U n i P r o t P 4 8 0 6 1 (S D F 1 _ ヒト) の全長タンパク質の番号付けにしたがって、 2 9 ~ 3 3 、 3 9 ~ 4 1 、 4 8 ~ 5 0 、 6 0 ~ 7 0 である。

30

【 0 0 4 5 】

1 つの側面において、本発明は、 C X C L 1 2 に結合し、そして 1 1 4 _ 3 H 1 V H ドメイン (配列番号 7) および / または 1 1 4 _ 3 H 1 V L ドメイン (配列番号 9) を含む、単離抗体分子を提供する。好ましくは、 C X C L 1 2 はヒト C X C L 1 2 であり、そして場合によってまた、ネズミ C X C L 1 2 である。

【 0 0 4 6 】

さらなる側面において、本発明は、 C X C L 1 2 に結合し、そして 1 1 3 _ 1 H 1 2 V H ドメイン (配列番号 1 8) および / または 1 1 3 _ 1 H 1 2 V L ドメイン (配列番号 2 0) を含む、単離抗体を提供する。好ましくは、 C X C L 1 2 はヒト C X C L 1 2 であり、そして場合によってまた、ネズミ C X C L 1 2 である。

40

【 0 0 4 7 】

一般的に、 V H ドメインは、 V L ドメインと対形成して、抗体抗原結合部位を提供するが、以下にさらに論じるように、抗原に結合させるために、 V H ドメインのみを用いることも可能である。好ましい態様において、 1 1 4 _ 3 H 1 または 1 1 3 _ 1 H 1 2 V H ドメイン (配列番号 7 または 1 8) は 1 1 4 _ 3 H 1 または 1 1 3 _ 1 H 1 2 V L ドメイン (配列番号 9 または 2 0) と対形成し、したがって、 1 1 4 _ 3 H 1 または 1 1 3 _ 1 H 1 2 V H および V L ドメインの両方を含む抗体抗原結合部位が形成される。他の態様において、 1 1 4 _ 3 H 1 または 1 1 3 _ 1 H 1 2 V H は、 1 1 4 _ 3 H 1 または 1

50

13_1H12 VL以外のVLドメインと対形成する。軽鎖乱交雑は、当該技術分野でよく確立されている。

【0048】

114_3H1または113_1H12 VHまたはVLドメインから1またはそれより多いCDRを取り、そして適切なフレームワーク内に取り込むことも可能である。これを以下にさらに論じる。114_3H1 VH CDR、H1、H2およびH3を、それぞれ配列番号1、2および3に示す。114_3H1 VL CDR、L1、L2およびL3を、それぞれ配列番号4、5および6に示す。113_1H12 VH CDR、H1、H2およびH3を、それぞれ配列番号12、13および14に示す。113_1H12 VL CDR、L1、L2およびL3を、それぞれ配列番号15、16および17に示す。

10

【0049】

1つの側面において、本発明は、CXC12に結合し、そして：

114_3H1 VHドメイン（配列番号7）、ならびに、配列番号3のアミノ酸配列を含むVH CDR3、および配列番号1および配列番号2より選択されるアミノ酸配列を含む1またはそれより多いVH CDRを含むVHドメイン、からなる群より選択される、抗体VHドメイン；ならびに/あるいは

114_3H1 VLドメイン（配列番号9）、ならびに、配列番号4、5および6より選択されるアミノ酸配列を含む1またはそれより多いVL CDRを含むVLドメイン、からなる群より選択される、抗体VLドメイン
を含む、抗CXC12抗体を提供する。

20

【0050】

1つの側面において、本発明は、CXC12に結合し、そして：

113_1H12 VHドメイン（配列番号18）、ならびに、配列番号14のアミノ酸配列を含むVH CDR3、および場合によって配列番号12および配列番号13より選択されるアミノ酸配列を含む1またはそれより多いVH CDRを含むVHドメイン、からなる群より選択される、抗体VHドメイン；ならびに/あるいは

113_1H12 VLドメイン（配列番号20）、ならびに配列番号15、16および17より選択されるアミノ酸配列を含む1またはそれより多いVL CDRを含むVLドメイン、からなる群より選択される、抗体VLドメイン
を含む、抗CXC12抗体を提供する。

30

【0051】

実施例に示すように、本発明の抗体分子は、親抗体の特性を保持しつつ、CDRの配列に対するいくつかのアミノ酸改変を許容することが可能である。例えば、抗体分子のCDRのアミノ酸配列は、各々、配列番号1~6および12から17のいずれか1つに比較した際、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸置換、欠失または挿入を含むことも可能である。

【0052】

当該技術分野に周知であるように、CDRは、本明細書に開示するような抗体の有用な特性の保持を確実にするために、場合によって1またはそれより多いさらなる配列改変を伴う、ある範囲の異なる抗体タイプまたはフレームワーク領域に存在することも可能である。例えば、図11は、本発明の抗体が、scFc-Fv融合およびヒトIgG2形式で機能することを示す。

40

【0053】

VHおよびVLドメインは各々、典型的には、抗原結合に関与し、フレームワーク領域が散在する、3つの相補性決定領域（CDR）を含む。1つの例示的な態様において、本発明は、それぞれ、配列番号1、2および3の配列を有するCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含むVHドメイン、ならびに/あるいは、それぞれ配列番号4、5および6の配列を有するCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含むVLドメインを含む、抗体分子を提供する。さらなる例示される態様において、本発明は、それぞ

50

れ、配列番号12、13および14の配列を有するCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3を含むVHドメイン、ならびに/あるいは、それぞれ配列番号15、16および17の配列を有するCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含むVLドメインを含む、抗体分子も提供する。

【0054】

本発明はまた、配列番号11または配列番号22に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する、scFv形式の抗CXC L12抗体分子も提供する。

【0055】

一般的に、本発明は、CXC L12の生物学的活性を阻害することが可能な抗体分子、すなわち当業者に理解されるようなアンタゴニスト抗体分子に関する。例として、in vitro癌細胞遊走アッセイおよびin vivo血管形成アッセイにおいて、特性を決定することも可能である。生物学的活性には、CXC L12誘導性癌細胞増殖阻害、癌細胞遊走阻害、癌細胞接着阻害、癌転移阻害、および/または血管形成阻害、例えばVEGF誘導性血管形成阻害が含まれる。場合によって、本発明の抗体分子は、CXC L12に結合し、そして隔離して、それによって、存在する生物学的系において受容体と相互作用することを妨げることによって機能する。

【0056】

標準技術、例えば表面プラズモン共鳴を用いて、例えば以下の実験例に記載するように、例えばBiacore分析を用いて、抗CXC L12抗体分子の結合動力学およびアフィニティ（平衡解離定数Kdとして表される）を決定することも可能である。あるいは、関心対象の抗体のFab型およびCXC L12で、放射標識抗原結合アッセイ（RIA）を用いて、Kdを測定することも可能である。

【0057】

抗CXC L12抗体分子は、50nM未満、40nM未満、30nM未満、20nM未満、10nM未満、または1nM未満のCXC L12に関する解離定数を有することも可能である。例えば、抗体分子は、1~20nM、例えば9~15nMのCXC L12に関するアフィニティを有することも可能である。好ましくは、本発明の抗体分子は、ヒトCXC L12に関して、10nM未満、より好ましくは5nM未満、そして最も好ましくは3nM未満のアフィニティ定数（Kd）を有する。さらに、本発明の抗体は、好ましくはまた、他の種のCXC L12、例えばネズミCXC L12にも結合し、動物疾患モデルと適合する。当業者に周知の技術、例えば以下の実験例に例示するようなBiacore SPR分析を用いて、CXC L12への結合に関するアフィニティ定数を決定することも可能である。

【0058】

上記側面または態様のいずれかに記載の本発明の抗CXC L12抗体分子は、キメラ、ヒト化またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。抗体分子は、抗体断片、例えばFab、Fab'、scFv、scFv-Fc、ディアボディ、またはFab(ab')2完全抗体、トリアボディ、二重特異性抗体またはキメラ抗体であることも可能である。

【0059】

本発明にしたがった抗体の好ましい形式には、IgG、scFv-Fc、FabおよびscFvが含まれる。別の態様において、抗CXC L12抗体分子は、全抗体であってよい。例えば、IgG、IgA、IgEまたはIgMまたは任意のアイソタイプサブクラス、特にIgG1およびIgG4であることも可能である。抗CXC L12抗体分子は、モノクローナル抗体であってよい。抗体分子、ならびにその構築法および使用は、例えばHollinger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9): 1126-1136(2005)に記載される。

【0060】

抗体分子は、通常、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン（VH）および免疫グロブリン軽

10

20

30

40

50

鎖可変ドメイン（V L）を含む抗原結合ドメインを含むが、重鎖可変ドメイン（V H）のみを含む抗原結合ドメインもまた可能である（例えばラクダ科（c a m e l i d）またはサメ抗体）。こうした抗体は、本発明の範囲内に含まれる。

【0061】

いくつかの例において、本発明の抗体分子を修飾して、抗体分子がグリコシル化される度合いを改変することも可能である。これは、親抗体中に存在するグリコシル化部位の1またはそれより多くを生成するかまたは除去するように、アミノ酸配列を改変することによって、達成可能である。特に、抗体分子がF c領域を含む場合、特にF c領域のフコシル化を減少させることによる、F c領域に付着した炭水化物の改変は、抗体分子の特性を変化させることが可能であることが知られ、A D C C機能を増加させることが可能である。
10

【0062】

本明細書に記載するような抗C X C L 1 2抗体分子は、混入物質、例えば他のポリペプチドおよび／または血清構成要素に結合可能な抗体を含まないという意味で、単離されていることも可能である。大部分の目的のため、モノクローナル抗体が好ましいが、ポリクローナル抗体もまた使用可能である。

【0063】

抗C X C L 1 2抗体分子を產生する方法には、哺乳動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヤギ、ヒツジまたはサル）をタンパク質またはその断片で免疫することが含まれる。当該技術分野に知られる多様な技術のいずれかを用いて、免疫動物から抗体を得て、そして好ましくは関心対象の抗原に対する抗体の結合を用いて、スクリーニングすることも可能である。例えば、ウエスタンプロッティング技術または免疫沈降を用いてもよい（Armitageら，1992，Nature 357：80-82）。動物からの抗体および／または抗体産生細胞の単離には、動物を屠殺する工程が伴うことも可能である。
20

【0064】

哺乳動物をペプチドで免疫する代わりにまたはその補助として、例えば表面上に機能する免疫グロブリン結合ドメインをディスプレイするラムダバクテリオファージまたは糸状バクテリオファージを用いて、発現された免疫グロブリン可変ドメインの組換え産生ライプラリーからタンパク質に特異的な抗体を得てもよい。ライプラリーは未刺激であってもよく、すなわちいかなるタンパク質（または断片）でも免疫されていない生物から得た配列から構築されていてもよく、または関心対象の抗原に曝露されている生物から得た配列を用いて構築されたものであってもよい。
30

【0065】

本発明において、実施例に記載する方法を使用して、アンタゴニスト特性を有する抗C X C L 1 2抗体のさらなる例に関してスクリーニングすることも可能である。產生および／または単離後、抗C X C L 1 2抗体分子の生物学的活性を試験してもよい。例えば、C X C L 1 2誘導性癌細胞増殖阻害、癌細胞遊走阻害、癌細胞接着阻害、癌転移阻害および／または血管形成阻害、例えばV E G F誘導性血管形成阻害より選択される1またはそれより多い生物学的活性を決定してもよい。
40

【0066】

例えばE L I S Aを用いて、そして／または1またはそれより多いタグ化されていない抗体分子の存在下で検出可能である特異的レポーター分子を1つの抗体分子にタグ付けて、同じエピトープまたは重複するエピトープに結合する抗体分子の同定を可能にすることによって、抗体分子間の競合をin vitroで容易にアッセイすることも可能である。こうした方法は、一般的の当業者に容易に知られる。

【0067】

本発明はまた、本発明の抗体分子をコードする核酸分子も提供する。核酸分子は、例えば、抗C X C L 1 2抗体分子をコードする核酸に機能可能であるように連結された調節配列を有する発現ベクター内に核酸配列を取り込んで、その発現を調節することによって、
50

抗C X C L 1 2 抗体分子を発現するために有用である。ベクターには、他の配列、例えば挿入された核酸の発現を駆動するプロモーターまたはエンハンサー、抗C X C L 1 2 抗体分子が融合体として產生されるような核酸配列、および／または宿主細胞中で產生されたポリペプチドが細胞から分泌されるような分泌シグナルをコードする核酸が含まれることも可能である。プロモーター配列、ターミネーター断片、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子および適切であるような他の配列を含む、適切な制御配列を含有する、適切なベクターを選択するかまたは構築してもよい。ベクターは、適切であるように、プラスミドまたはウイルス性、例えばファージ、またはファージミドであってもよい。さらなる詳細に関しては、例えばMolecular Cloning: a Laboratory Manual: 第2版, Sambrookら, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Pressを参照されたい。核酸の操作のための、例えば核酸構築物の調製、突然変異誘発、配列決定、細胞へのDNAの導入および遺伝子発現、ならびにタンパク質分析における、多くの既知の技術およびプロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら監修, John Wiley & Sons, 1992に詳細に記載される。

10

20

30

40

【0068】

ベクターが機能する宿主細胞内にベクターを形質転換し、抗C X C L 1 2 抗体分子が產生されるように宿主細胞を培養し、そして宿主細胞または周囲の培地から抗C X C L 1 2 抗体分子を回収することによって、抗C X C L 1 2 抗体分子を得ることも可能である。この目的のために、大腸菌(E. coli)株、昆虫細胞(例えばバキュロウイルスで形質転換されたもの)、酵母、および真核細胞、例えばCOSまたはCHO細胞を含む、原核および真核細胞を用いる。宿主細胞の選択を用いて、これらの細胞において発現される抗C X C L 1 2 抗体分子の特性を調節することも可能であり、例えば宿主細胞においてポリペプチドが沈着する場所を調節するか、またはグリコシリ化およびリン酸化などの特性に影響を及ぼすことも可能である。ポリペプチドが適切なシグナルリーダーペプチドにカップリングされて発現される場合、細胞から培地内に分泌されることも可能である。発現による產生後、場合によっては、本発明の抗体分子を宿主細胞および／または培地から単離および／または精製することも可能であり、そして続いて、望ましいように、例えば本出願において別の箇所に記載するように、1またはそれより多いさらなる構成要素、例えばキャリアーを含んでもよい組成物の配合において、用いることも可能である。

30

40

【0069】

したがって、さらなる側面において、本発明は、本発明の抗C X C L 1 2 抗体分子をコードする核酸、発現を指示する調節配列に機能可能であるように連結された、抗C X C L 1 2 抗体分子をコードする核酸を含む発現ベクター、およびこの発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。さらにさらなる側面において、本発明は、本発明の抗C X C L 1 2 抗体分子を產生する方法であって、宿主細胞を培養し、そしてこうして產生される抗C X C L 1 2 抗体分子を単離する工程を含む、前記方法を提供する。

40

【0070】

誘導体化抗体分子

本発明の抗体分子を誘導体化して、特性、そして特に薬理学的特性、例えば半減期を修飾する(例えば半減期を増加させる)こともまた可能である。例は、ポリペプチド療法剤の半減期または他の薬理学的特性を増進させるために使用可能な、ポリ(アルキレングリコール)分子、特にポリエチレングリコール(PEG)分子への抗体分子のコンジュゲートである。PEG化は、療法ポリペプチド、例えばペプチド、タンパク質および抗体の特性を修飾するための既知の戦略である。一般的に、ポリペプチドへのPEG分子の付着を用いて、コンホメーション、静電または疎水性特性を改変し、そしてその生物学的および薬理学的特性の改善を導き、例えば薬剤可溶性を増加させ、投薬頻度を減少させ、循環半減期を調節し(特に増加させ)、薬剤安定性を増加させ、そしてタンパク質分解的分解に対する耐性を増加させる。PEG化は、ポリペプチドを1またはそれより多いPEGポ

50

リマー分子にコンジュゲート化することによって、療法ポリペプチドの分子量を増加させることにより、働く。これは、完全抗体の断片である抗体分子タイプ、例えば F a b 断片に特に適用可能である。

【 0 0 7 1 】

反応性ポリ(アルキレングリコール)分子と抗体分子中に存在する適切な官能基を反応させることによって、これを本発明の抗体分子に対して実行することも可能である。本発明の抗体分子中で利用可能な官能基に応じて、選択的方式で、例えば抗体分子中の適切な反応性システイン残基を同定することによって、抗体分子を P E G 化することも可能でありうる。ポリ(アルキレングリコール)分子は、当該技術分野において、交換可能にポリ(酸化アルキレン)分子と称され、そしてポリエーテルである。ポリ(アルキレングリコール)分子は、直鎖、分枝、コームまたは星構造を有してもよく、そして一般的に非常に水溶性である。さらに、ヒドロキシ、アミン、カルボン酸、ハロゲン化アルキルまたはチオール基などの 1 またはそれより多い反応性官能基を含む、基本ポリ(アルキレングリコール)構造を提供して、ポリ(アルキレングリコール)分子と、他の種、例えばポリペプチドの反応を促進することも可能である。好ましいポリ(アルキレングリコール)分子には、1 またはそれより多いヒドロキシル位で化学基で置換されているもの、例えば 1 ~ 4 の間の炭素原子を有するアルキル基が含まれる。本発明にしたがって使用するため的好ましいポリ(アルキレングリコール)分子は、ポリエチレングリコール(「 P E G 」)分子であるが、当業者は、他のポリ(アルキレングリコール)分子、例えばポリプロピレングリコールまたはポリエチレン - ポリプロピレングリコールコポリマーを用いて、本発明の抗体分子を誘導体化することが可能であろう。 P E G を含むポリ(アルキレングリコール)分子は、典型的には、約 4 0 0 D a ~ 約 8 0 k D a の間、より好ましくは約 1 k D a ~ 約 6 0 k D a の間、そしてより好ましくは約 5 k D a ~ 約 5 0 k D a の間の分子量、例えば 1 0 k D a 、 2 0 k D a 、 3 0 k D a または 4 0 k D a の分子量を有する。本発明にしたがって使用可能なポリ(アルキレングリコール)分子は、当該技術分野に周知であり、そして公的に、例えば商業的に入手可能な供給源、例えば S i g m a A l d r i c h から入手可能である。

【 0 0 7 2 】

本発明はまた、1 またはそれより多い細胞傷害性剤、例えば化学療法剤または薬剤、増殖阻害剤、毒素(例えば細菌、真菌、植物、または動物起源のタンパク質毒素、酵素活性毒素、あるいはその断片)、または放射性同位体にコンジュゲート化された、本明細書に記載するような抗 C X C L 1 2 抗体分子を含む、イムノコンジュゲートも提供する。

【 0 0 7 3 】

1 つの側面において、本発明のイムノコンジュゲートは、抗体が 1 またはそれより多い薬剤、例えば化学療法薬剤にコンジュゲート化されている、抗体 - 薬剤コンジュゲート(ADC)である。抗体部分は、リンカーを通じて、薬剤に場合によって連結されている。

【 0 0 7 4 】

画像化適用

本発明の抗体分子をさらに標識して、その療法的使用と組み合わせてまたはそれとは独立にのいずれかで、画像化のために使用可能にすることも可能である。ある範囲の画像化および分光適用において抗体を使用可能にする、抗体を標識するための技術は、当該技術分野に周知である。これは、いくつかの異なる医学的または研究適用において、例えば腫瘍学、心臓血管医学または移植片拒絶において、有用でありうる。

【 0 0 7 5 】

画像化のための抗体分子の使用の 1 つの特定の例は、核医学画像化技術、例えば、放射性核種から放出されるガンマ線を検出し、試料または被験体における放射性核種の分布の二次元画像を产生する画像化技術である単光子放出コンピューター断層撮影(SPECT)、および試料または被験体に導入された陽電子放射放射性核種によって間接的に放出されるガンマ線の対を検出することによって、三次元画像を产生する画像化技術である陽電子放射断層撮影(PET)において、放射性核種標識の使用を伴う。放射性核種標識を有

10

20

30

40

50

する抗体分子はまた、1より多い画像化技術において活性である放射性核種を選択することによって、または1より多いタイプの標識で、抗体分子を標識することによってのいずれかで、画像化技術を組み合わせる、多モード研究にも使用可能である。

【0076】

本発明の抗体分子を、放射性核種、例えば、複合体として提供される放射性核種で標識してもよいし、または第二の分子、例えばリンカーにコンジュゲート化して、これを標識と会合させてもよい。画像化技術または療法において使用するための放射性核種の例には、テクネチウム、レニウム、銅、コバルト、ガリウムおよびインジウム同位体、例えばTc-99m、Re-186、Re-188、Co-57、Ga-67、In-111(SPECT)、Cu-64、Cu-60、Cu-61、Cu-62、Cu-67、Tc-94m、Ga-68、Co-55(PET)が含まれる。一般的に、テクネチウム同位体は画像化目的のために、レニウム同位体は療法目的のために、そして銅同位体は画像化および療法の両方の目的のために使用される。10

【0077】

医学的使用

CXCL12は、CDCR4依存性機構を通じて、骨髄から内皮前駆細胞(EPIC)を補充することによって血管形成に関与すると報告されてきており、発癌および腫瘍進行に関連する血管新生において重要な因子となっている。CXCL12はまた、腫瘍転移においても役割を有し、この場合、受容体CDCR4を発現する癌細胞が、リガンドCXCL12を放出する転移ターゲット組織に誘引される。CXCL12/CDCR4/CXCR7経路は、したがって、腫瘍増殖、生存および血管形成における役割を考慮すると、潜在的療法ターゲットとして、かなりの関心を生じてきている。20

【0078】

したがって、CXCL12は、Balkwillら、Seminars in Cancer Biology, 14: 171-179, 2004に概説されるように、腫瘍の臓器特異的転移において重要であることが示されてきている。CXCL12/CDCR4を発現する腫瘍には、卵巣癌、乳癌、骨癌、前立腺癌、甲状腺癌、膵臓癌、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、眼内リンパ腫、濾胞中心リンパ腫、CML、結腸直腸癌、口腔扁平上皮癌、子宮頸癌、神経芽腫、腎臓癌、脳癌、例えば神経膠腫および星状細胞腫、横紋筋肉腫、肺癌、例えば小細胞肺癌、黒色腫、B細胞悪性腫瘍、例えばB細胞慢性リンパ球性白血病(B-CLL)、および白血病、例えば急性骨髓性白血病(AML)が含まれる。30

【0079】

CAFは、CXCL12を分泌することが知られ、そしてこれは、乳癌(Orimotoら、浸潤性ヒト乳癌に存在する間質性線維芽細胞は、SDF-1/CXCL12分泌上昇を通じて、腫瘍増殖および血管形成を促進する、Cell, 121(3): 335-348, 2005)および膵臓癌(Feigら、FAP発現癌関連線維芽細胞由来のCXCL12ターゲティングは、膵臓癌において、抗PD-L1免疫療法と相乗作用するP.N.A.S., 110: 50: 20212-20217, 2013)において、直接、血管形成および腫瘍増殖を増加させる。さらに、高レベルのCXCL12は、膵臓癌モデルにおいて、少数のT細胞と関連し、そしてPD-L1およびCD4阻害剤での組み合わせ治療を通じて、T細胞浸潤を増加させることができた。T細胞浸潤のこの増加には、腫瘍体積の有意な減少が伴い、癌の免疫調節におけるCXCL12/CXCR4軸の役割が強調された(Feigら、PNAS, 110(50): p20212-20217, 2013)。40

【0080】

特定の化学療法剤、抗血管形成剤、および放射線照射は、CXCL12/CXCR4のさらなる上方制御を引き起こすことが示され、これは治療後の腫瘍再発を補助する。CXCL12レベル増加は、内皮前駆細胞の可動化(Shakedら、Cancer Cell, 14(3): 263-273, 2008)および腫瘍への単球の補充(Hu50

g h e s ら , C a n c e r R e s , 7 5 (1 7) : O F 1 - O F 1 3 , 2 0 1 5) を誘発し、これは腫瘍浸潤、血管新生および転移を刺激するとともに、抗腫瘍免疫反応を抑制する。したがって、これらのタイプの CXCL12 / CXCR4 誘導性剤と、本発明の抗 CXCL12 の組み合わせは、臨床的利点がありうる。

【 0 0 8 1 】

他の態様において、本発明の抗体分子またはイムノコンジュゲートを、W H I M 症候群の治療において使用することも可能である。W H I M (いば、低ガンマグロブリン血症、感染および骨髄性細胞貯留症候群) は、慢性非循環的好中球減少によって特徴付けられる稀な先天性免疫不全障害であり、ケモカイン受容体 CXCR4 の突然変異から生じる。

【 0 0 8 2 】

いくつかの態様において、本発明の抗体分子またはイムノコンジュゲートを、さらなる癌療法と組み合わせて、または放射線療法と組み合わせて、投与してもよい。例えば、本発明の抗体分子またはイムノコンジュゲートを、化学療法剤、抗体療法、免疫調節療法、手術と組み合わせて、または放射線療法と組み合わせて、または細胞仲介性療法と組み合わせて、投与してもよい。いくつかの態様において、抗体分子およびさらなる癌療法を、一緒に、場合によって組み合わせ配合物として投与する。あるいは、抗体分子およびさらなる癌療法を、交互に投与してもよく、さらなる癌療法を抗体分子の前に投与するか、またはさらなる癌療法を抗体分子の後に投与するかいずれであってもよい。臨床実施にしたがって、組み合わせを投与してもよく、例えば約 1 週間 ~ 3 週間の間隔で投与してもよい。

【 0 0 8 3 】

1 つの特定の態様において、本発明の抗体分子を血管形成阻害剤と組み合わせて投与する。本発明の抗体分子の作用様式に基づいて、血管形成阻害剤との組み合わせ療法は、相加的または相乗的效果を提供しうる (Liang ら , C X C R 4 / C X C L 1 2 軸は、Akt シグナル伝達経路を通じて、VEGF 仲介性腫瘍血管形成を促進する , B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 3 5 9 (3) : 7 1 6 - 7 2 2 , 2 0 0 7 を参照されたい) 。

【 0 0 8 4 】

本明細書で用いるような血管形成阻害剤には、血管形成、脈管形成、または望ましくない血管浸透性を、直接または間接的にのいずれかで阻害する剤が含まれる。血管形成阻害剤には、血管形成因子またはその受容体に結合し、そしてその血管形成活性をブロックする剤が含まれる。例えば、Grothey および Galanis (2 0 0 9) Nat . Rev . Clin . Oncol . 6 (9) : 5 0 7 - 1 8 (例えば、表 1 は、巨大分子 VEGF 阻害剤を列挙する) 、Ivy , Wicck および Kaufman (2 0 0 9) Nat . Rev . Clin . Oncol . 6 (9) : 5 6 9 - 7 (例えば、補足表 1 は、小分子受容体チロシンキナーゼ阻害剤を列挙する) を参照されたい。

【 0 0 8 5 】

血管形成阻害剤には、血管形成促進性増殖因子受容体をターゲティングする抗体またはペプチド - 抗体融合物、例えばベバシズマブ (アバスチン (登録商標)) 、セツキシマブ (エルビタックス (登録商標)) 、ラムシルマブ (シラムザ (登録商標)) 、イクルクマブ、H u M V 8 3 3 、2 C 3 、アフリベルセプト (ザルトラップ (登録商標)) および I M C - 1 C 1 1 が含まれる。他の血管形成阻害剤には、小分子キナーゼ阻害剤、例えばソラフェニブ (ネキサバール (登録商標)) 、スニチニブ (スーテント (登録商標)) 、パゾパニブ (ボトリエント (登録商標)) 、エベロリムス (アフィニトール (登録商標)) 、A E E 7 8 8 、A A L 8 8 1 、A A L 9 9 3 、Z D 4 1 9 0 、A B T - 8 6 9 (リニニアブ) 、P T K 7 8 7 (バタラニブ) 、A M G 7 0 6 (モテサニブ) 、セディラニブ (リセンチン) 、アキシチニブ (インライタ (登録商標)) 、バンデタニブ (カブレルサ (登録商標)) 、S U 6 6 6 8 、Z D 1 8 3 9 、テラチニブ、ニンテダニブ (バルガテフ (登録商標)) 、ブリバニブ・アラニネット、B M S - 6 0 5 5 4 1 、B M S - 6 4 5 7 3

10

20

30

40

50

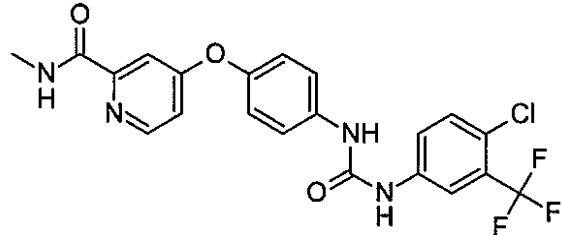
7、C E P - 7 0 5 5、ドビチニブ、C P - 5 4 7 , 6 3 2、E 7 0 8 0、G W 6 5 4 6
5 2、K R N 6 3 3、チボザニブ、O S I - 9 3 0、P D 1 7 3 0 7 4、P F - 0 0 3 3
7 2 1 0、S U 1 4 9 8、セマキサニブ(S U 5 4 1 6)、S U 5 6 1 4、S U 1 1 6 5
7、S U 1 4 8 1 3、T K I - 2 8、T K I - 3 1 およびZ M 3 2 3 8 8 1が含まれる。
天然血管形成阻害剤の例は、エンドスタチンおよびアンギオスタチンである。血管形成を
阻害するために用いられる他の薬剤には、サリドマイド、スクアラミンおよびアンギオザ
イムが含まれる。

【 0 0 8 6 】

ベバシズマブ（アバスチン（登録商標））は、Prestaら（1997）Cancer Res. 57(20): 4593-4599にしたがって生成された、組換えヒト化抗VEGFモノクローナル抗体である。アフィベルセプトは、ヒトIgG1のFc部分に融合したVEGF結合部分からなる組換えペプチド-抗体融合物である。ソラフェニブ（ネキサバール（登録商標））は、受容体チロシンキナーゼ、VEGFR、PDGFR（血小板由来増殖因子受容体）、RAFセリン／スレオニンキナーゼおよびc-KITをブロッキングする、マルチキナーゼ阻害剤である。化学的用語では、ソラフェニブは、4-[4-[[4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]カルバモイルアミノ]フェノキシ]-N-メチル-ピリジン-2-カルボキサミドと名付けられ、そして構造：

【 0 0 8 7 】

【化 1】



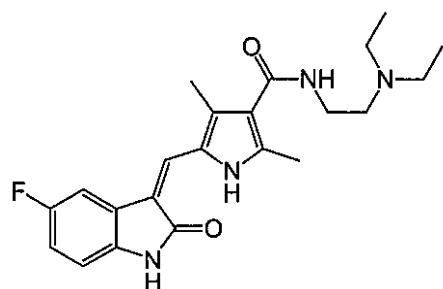
【 0 0 8 8 】

を有する。

スニチニブ(ステント(登録商標))は、癌治療に用いられる、小分子マルチターゲティング受容体チロシンキナーゼ阻害剤である。スニチニブは、PDGFRおよびVEGFRをターゲティングすることによって、細胞シグナル伝達を阻害する。化学的用語では、スニチニブは、N-(2-ジエチルアミノエチル)-5-[(Z) - (5-フルオロ-2-オキソ-1H-インドール-3-イリデン)メチル]-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボキサミドと名付けられ、そして構造：

[0 0 8 9]

【化 2】



【 0 0 9 0 】

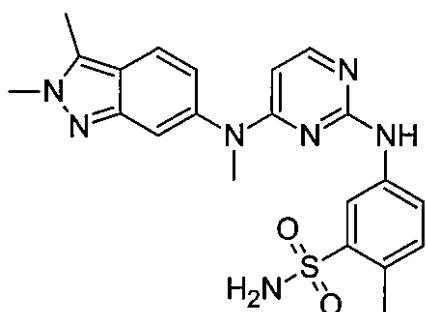
を有する。

パゾパニブ（ボトリエント（登録商標））は、癌の治療において使用されるマルチキナーゼ阻害剤である。パゾパニブは、c-KIT、PDGFRおよびVEGFRをターゲティングすることが知られる。化学的用語では、パゾパニブは、5-[4-[(2,3-ジメチル-2H-インダゾル-6-イル)メチルアミノ]-2-ピリミジニル]アミノ]

- 2 - メチルベンゾスルホンアミドと名付けられ、そして構造：

【0091】

【化3】



10

【0092】

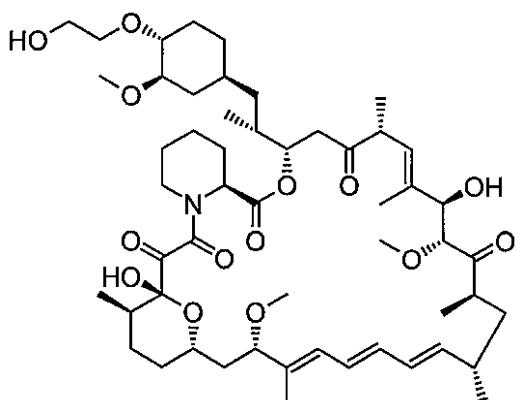
を有する。

エベロリムス（アフィニートール（登録商標））は、mTOR（哺乳動物ラバマイシン・ターゲット）をターゲティングするシグナル伝達阻害剤である。化学的用語では、エベロリムスは、ジヒドロキシ-12-[(2R)-1-[(1S,3R,4R)-4-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-メトキシシクロヘキシリ] プロパン-2-イル]-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[3.0.3.1.0]ヘキサトリアコンタ-16,24,26,28-テトラエン-2,3,10,14,20-ペントンと名付けられ、そして構造：

20

【0093】

【化4】



30

【0094】

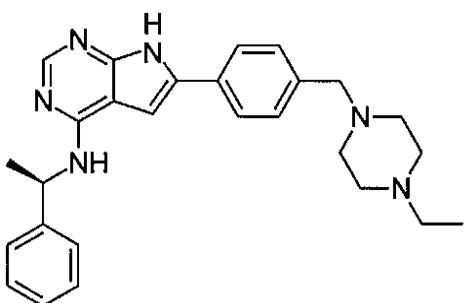
を有する。

AEE788は、癌に関する治療のために評価されている小分子薬剤である。AEE788は、EGFR（上皮増殖因子受容体）およびVEGFRファミリーメンバーの両方の組み合わせ阻害剤である。化学的用語では、AEE788は、6-[4-[(4-エチルピペラジン-1-イル)メチル]フェニル]-N-[(1R)-1-フェニルエチル]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-アミンと名付けられ、そして構造：

40

【0095】

【化5】



【0096】

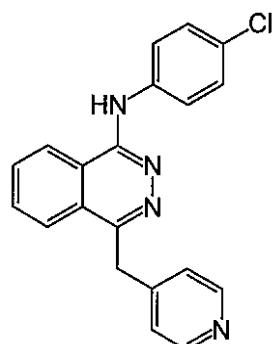
10

を有する。

PTK787(バタラニブ)は、癌治療のために開発されている、血管形成を阻害するプロテインキナーゼ阻害剤である。PTK787は、VEGFR受容体、PDGFR-ベータおよびc-kitを阻害する。化学的用語では、PTK787は、N-(4-クロロフェニル)-4-(ピリジン-4-イルメチル)フタラジン-1-アミンと名付けられ、そして構造:

【0097】

【化6】



【0098】

20

を有する。

さらなる化学療法剤の例には、EGFR経路阻害剤、例えば抗EGFR抗体またはEGFRキナーゼ阻害剤、例えばセツキシマブ、パニツムマブ、イレッサ(ゲフィチニブまたはN-(3-クロロ-4-フルオロ-フェニル)-7-メトキシ-6-(3-モルホリン-4-イルプロポキシ)キナゾリン-4-アミン)、またはタルセバ(エルロチニブまたはN-(3-エチニルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)キナゾリン-4-アミン)、または他の剤、例えばハーセプチンTM(トラスツズマブ)が含まれる。化学療法剤のさらなる例には、アルキル化剤、例えばシスプラチニン、カルボプラチニンおよびオキサリプラチニン、アントラサイクリン、植物アルカロイド、例えばタキサンおよびビンカアルカロイド、ならびにトポイソメラーゼ阻害剤、例えばイリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシドおよびテニポシド、またはフルオロウラシル(5FU)が含まれる。

30

【0099】

40

さらなる可能性において、本発明の抗体分子を、免疫療法剤、例えば免疫経路剤、小分子剤またはPD-1、PDL-1、CTLA-4またはOX40に特異的な抗体とともに投与してもよい。

【0100】

50

さらなる可能性において、本発明の抗体分子は、抗体分子が薬剤または毒素に連結されている抗体-薬剤コンジュゲートであってもよい。これを行って、CXCL12が存在するターゲット部位に、薬剤または毒素を導くことも可能である。このアプローチは、抗体分子を操作して、薬剤または毒素と反応可能な官能基を提供するか、あるいは薬剤または

毒素と反応可能なリンカー基を抗体分子に提供する必要がありうる。本発明のこの側面において、薬剤は、患者において、ターゲット部位で、活性薬剤に変換するためのプロドラッグであってもよい。

【0101】

したがって、本発明は、細胞傷害性部分または免疫刺激性部分にコンジュゲート化された、本発明の抗体分子を含む、イムノコンジュゲートを提供する。例として、細胞傷害性部分は、アルキル化剤、アルカロイド、白金配位化合物、細胞傷害性ペプチド、放射性剤、または細胞傷害性部分への変換が可能なプロドラッグを提供する。

【0102】

さらなる側面において、本発明は、C X C L 1 2 が関与する状態の診断または予後の方
10 法において使用するための抗体分子に関する。いくつかの態様において、全体と見なされ
る、より広い患者クラスよりも、治療に対してより反応性である可能性が高い患者を同定
するためのアッセイにおいて、本発明の抗体分子を用いてもよい。これは次に、例えば本
発明の抗体分子を用いた療法を、最も反応する可能性が高い患者に向ける一方、治療が成
功する可能性がより低い患者に、別の療法形式を提供することを可能にする。関連する側
面に対して、本発明は、試料中のC X C L 1 2 の存在に関してアッセイする方法、C X C
L 1 2 が抗体分子に結合して複合体を形成するように、本発明の抗体分子と試料を接触さ
せ、そしてこうして産生される複合体を検出する工程を含む方法を提供する。別にまたは
さらに、方法はまた、捕捉抗体へのC X C L 1 2 の結合を検出するための試薬として、本
発明の抗体分子を使用してもよい。好ましくは、方法は、抗体を用いて、試料中のC X C
L 1 2 の存在または量を決定し、そしてC X C L 1 2 阻害剤で患者を治療するありうる転
帰と、C X C L 1 2 の存在または量を相關させる工程を含む。

【0103】

この場合、抗体分子をE L I S A型形式において用いてもよいし、または別的方式で、
検出可能な分子、例えば限定されるわけではないが、放射性または蛍光標識、あるいは発
色基質を利用する酵素に連結させてもよい。この技術において使用する放射標識の例は、
³²P、³Hまたは¹⁴Cである。この技術において使用する蛍光分子の例は、緑色蛍光
タンパク質、フルオレセインイソチオシアネート(F I T C)、ローダミンイソチオシア
ネート(T R I C T) Cy 3 およびCy 5 色素である。この技術において使用可能な発色
基質を伴う酵素の例は、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはグルコースオ
キシダーゼである。

【0104】

好ましくは、本発明の方法は、前記個体から得られる試料に対して行うin vitro法である。本発明のいくつかの態様において、方法はしたがって、問題の個体から試料を得るおよび/または分析用の試料を調製する最初の工程を含む。方法において使用するための試料の好ましい例には、血液試料、組織試料または細胞試料が含まれる。

【0105】

当業者に明らかであろう、上記技術のさらなる変型が存在する。

薬学的組成物

本発明の抗C X C L 1 2 抗体分子またはイムノコンジュゲートは、薬学的に許容されうる賦形剤とともに、薬学的組成物中に含まれてもよい。薬学的に許容されうる賦形剤は、二次的反応を誘発せず、そして例えば、抗C X C L 1 2 抗体分子の投与の促進、体内でのその寿命および/または有効性の増加、あるいは溶液中の可溶性の増加を可能にする、薬学的組成物内に入る化合物または化合物の組み合わせであることも可能である。これらの薬学的に許容されうるビヒクルが周知であり、そして抗C X C L 1 2 分子の投与様式に応じて、当業者によって適応されるであろう。

【0106】

いくつかの態様において、抗C X C L 1 2 抗体分子またはイムノコンジュゲートを、投与前に再構成するための凍結乾燥型で提供することも可能である。例えば、凍結乾燥抗体分子を滅菌水中で再構成し、そして個体への投与前に生理食塩水と混合することも可能で

10

20

30

40

50

ある。

【0107】

抗CXCCL12抗体分子は、通常、薬学的組成物の形で投与され、これは、抗体分子に加えて、少なくとも1つの構成要素を含んでもよい。したがって、薬学的組成物は、抗CXCCL12抗体分子に加えて、当業者に周知の、薬学的に許容されうる賦形剤、キャリアー、緩衝剤、安定化剤または他の材料を含むことも可能である。こうした材料は、非毒性でなければならず、そして抗CXCCL12抗体分子の有効性に干渉してはならない。キャリアーまたは他の材料の正確な性質は、ボーラス、注入、注射、または以下に論じるような任意の他の適切な経路であってもよい、投与経路に応じるであろう。

【0108】

例えば注射による、静脈内投与のため、抗CXCCL12抗体分子を含む薬学的組成物は、発熱物質不含であり、そして適切なpH、等張性および安定性を有する非経口的に許容されうる水溶液の形であってもよい。適切な当業者は、例えば、等張性ビヒクル、例えば塩化ナトリウム注射液、リングル注射液、乳酸添加リングル注射液を用いて、適切な溶液を容易に調製可能である。リン酸、クエン酸および他の有機酸；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸およびメチオニン；保存剤（例えば塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサンノール；3'-ペントノール；およびm-クレゾール）；低分子量ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む、单糖、二糖および他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；ならびに／あるいは非イオン性界面活性剤、例えばTWEENTM、PLURONICSTMまたはポリエチレングリコール（PEG）を含む、保存剤、安定化剤、緩衝剤、酸化防止剤および／または他の添加剤を、必要に応じて使用してもよい。

【0109】

抗CXCCL12抗体分子を含む薬学的組成物を、治療しようとする状態に応じて、単独で、あるいは同時にまたは連続してのいずれかで他の治療と組み合わせて、投与することも可能である。

【0110】

本明細書に記載するような抗CXCCL12抗体分子を、予防的治療（例えば個体において状態が生じるリスクを減少させるか；その開始を遅延させるか；または開始後の重症度を減少させるための、個体における状態の開始前の治療）を含む、ヒトまたは動物の身体の治療法において、用いることも可能である。治療法は、治療の必要がある個体への抗CXCCL12抗体分子の投与を含んでもよい。

【0111】

投与は、通常、「療法的に有効な量」であり、これは患者に対する利益を示すために十分である。こうした利益は、少なくとも1つの症状の少なくとも軽減であってもよい。投与の実際の量、ならびに投与速度および時間経過は、治療中のものの性質および重症度、治療中の特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的状態、障害の原因、組成物の送達部位、投与法、投与のスケジューリング、および医療従事者に知られる他の要因に応じるであろう。治療の処方、例えば投薬量に関する決定等は、一般開業医および他の医師の責任の範囲内であり、そして治療中の疾患の症状および／または進行の重症度に応じうる。抗体分子の適切な用量は、当該技術分野に周知である（Ledermann J. A.ら(1991)Int. J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe K. D.ら(1991)Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922）。特定の投

10

20

30

40

50

薬量は、本明細書に、またはPhysician's Desk Reference(2003)に示され、投与しようとする薬剤のタイプにしたがって適切であるように使用可能である。動物モデルにおいて、in vitro活性およびin vivo活性を比較することによって、抗体分子の療法的に有効な量または適切な用量を決定することも可能である。マウスおよび他の試験動物における有効投薬量をヒトに外挿するための方法が知られる。正確な用量は、抗体が予防のためかまたは治療のためか、治療しようとする領域のサイズおよび位置、抗体の正確な性質(例えば全抗体、断片)、ならびに抗体に付着した任意の検出可能標識または他の分子の性質を含む、多くの要因に応じるであろう。

【0112】

典型的な抗体用量は、全身適用に関しては100 μg～1 gの範囲であり、そして局所適用に関しては1 μg～1 mgであろう。最初のより高い装填用量の後、1またはそれより多いより低い用量を投与してもよい。典型的には、抗体は、全抗体、例えばヒンジおよびFc領域におけるアミノ酸配列の相違にしたがって、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4アイソタイプであろう。これらの異なるアイソタイプは、抗体分子のin vivo半減期、およびエフェクター機能を誘導する能力に影響を及ぼす。したがって、IgGアイソタイプの選択を用いて、本発明の抗体分子のin vivo特性を操作することも可能である。中和可溶性抗原、例えばCXCL12に関しては、エフェクター機能はより重要ではなく、そしてしたがって、宿主免疫系の干渉を伴わずにCXCL12中和の利益を決定するためには、エフェクター機能を欠く抗体アイソタイプ(例えばIgG2)の使用が好ましい可能性がある。

10

20

30

【0113】

これは、成体患者の単回治療のための用量であり、小児および幼児には比例的に調節してもよく、そしてまた他の抗体形式に関しては分子量に比例して調節してもよい。治療は、医師の裁量で、毎日、週2回、毎週、毎月間隔で、反復してもよい。治療は、皮下投与に関しては、2～4週ごとであってもよく、そして静脈内投与に関しては、4～8週ごとであってもよい。治療は、周期的であってもよく、そして投与間の期間は、約2週またはそれより長く、例えば約3週またはそれより長く、約4週またはそれより長く、あるいは約月1回である。治療は、術前および/または術後に行ってもよいし、そして/または手術治療もしくは侵襲性処置の解剖学的部位に直接投与するか、または適用してもよい。適切な配合物および投与経路を上に記載する。

【0114】

いくつかの好ましい態様において、抗CXCL12抗体分子の療法的效果は、用量に応じて、数半減期に渡って持続性でありうる。例えば、抗CXCL12抗体分子の単回用量の療法的效果は、個体において、1ヶ月またはそれより長く、2ヶ月またはそれより長く、3ヶ月またはそれより長く、4ヶ月またはそれより長く、5ヶ月またはそれより長く、または6ヶ月またはそれより長く持続しうる。

【実施例】

【0115】

材料および方法

ファージディスプレイ技術によるCXCL12中和抗体の生成

40

CXCL12に関する抗体ライブラリーのパニング

100億を超える、scFv形式の抗体クローニングを含有する「McCafertry未刺激抗体ライブラリー」を抗CXCL12抗体の単離に用い、そして次いで、生じた抗体を、細胞に基づくアッセイにおいてスクリーニングして、CXCL12-CXCR4相互作用をブロッキングする潜在能力を評価した。より詳細には、ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンに固定されたビオチン化CXCL12に関して、2ラウンドのパニングを行った。ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンに結合する抗体クローニングに関する濃縮を回避するため、2つの戦略を使用した。いかなるストレプトアビジン結合剤も欠いていたファージライブラリーを用いて、ストレプトアビジン上に固定されたビオチン化CXCL12に対して、ラウンド1パニングを行った(「脱選択」または「サブトラク

50

「タイプ選択」として知られる）。ラウンド2に関しては、CXCL12を固定するために（ストレプトアビジンの代わりに）ニュートラアビジンを用いた。ラウンド2パニングアウトプットから調製したポリクローナルファージを、CXCL12、ストレプトアビジン、ニュートラアビジンおよび非特異的抗原(NCK1)に対するTRF結合アッセイで試験して、特異的濃縮を確認した。観察される結合シグナルは、CXCL12に特異的であり、そしてストレプトアビジン、ニュートラアビジンおよびNCK1に関する検出可能な結合はまったく観察されなかった。

【0116】

抗CXCL12抗体スクリーニング

ラウンド2パニングアウトプット由来のscFv集団をPCR増幅し、そしてpSANG10-3F発現ベクター内にクローニングし、そしてBL21に形質転換した。pSANG10-3Fは、ヘキサ-ヒスチジンタグ(Niアフィニティ精製のため)およびFLAGタグ(検出のため)をscFv遺伝子下流にコードする。940の個々の形質転換体を10×96ウェル培養プレートに摘み取り、そして自己誘導培地を用いて、抗体発現を誘導した。一晩誘導後、培地上清中に分泌された組換えモノクローナル抗体を、CXCL12への結合に関して試験した。ユーロピウムにコンジュゲート化された抗FLAG抗体を用いて、ビオチン化CXCL12(96ウェルプレート中、ストレプトアビジンに固定されている)へのscFv結合を検出する、TRF結合アッセイのために、分泌されたscFvを含有する培養上清を用いた。1000FU(バックグラウンドの100倍)を超えるシグナルを有するクローンを、CXCL12結合に関して陽性であると見なした。

10

20

。

30

【0117】

スクリーニングしたクローンのうち、およそ24%(224/940)が、CXCL12結合に関して陽性であることが見出された。上位184のクローンを、配列分析およびさらなる特徴付けのために選び取った。4つのプライマーを用い、サンガー配列決定によって、選び取ったクローンの配列を生成し、そして各クローンに関してコンセンサス配列を組み立てた。BLAZE抗体分析ソフトウェアを用いて、コンセンサス配列のCDRおよびフレームワーク領域を分析した。重鎖および軽鎖のCDR3における変動に関する分析に集中することによって、118のユニークなscFv配列が見出された。これらの配列において、他のCDRまたはフレームワーク残基のさらなる変化があり、さらに38のユニークな配列が生じ、すなわち配列決定した184のうち156のユニークな配列があった。フレームワーク領域の詳細な分析によって、特定の重鎖および軽鎖生殖系列ファミリーに関する優先性が明らかになった。Vh3(62%)およびVh1(43%)が最も頻繁に見られた重鎖ファミリーであり、一方、Vk1(59%)、次いでVk2(17%)が軽鎖配列では大部分を占める。

【0118】

【表1】

クローンID	VH生殖系列	VL生殖系列	VH CDR3	VL CDR3
093_1C03	Vh1_DP-5_(1-24)	Vラムダ3_3h	LISGSYRLEDYF.....DH	QAWDSSTG.....YV
093_2G07	Vh3_DP-36_(3-66)	Vk1_DPK1_(018,08)	EASDPRYYDSSGYYYGM...DV	QQYDNLP.....LT
093_2A11	Vh3_DP-42_(3-53)	Vk1_DPK4_(A20)	EASDPRYYDSSGYYYGM...DV	QKYN SAP.....RT
093_2H09	Vh1_DP-88_(1-e)	Vk2_DPK18_(A17)	DYNDWGAF.....EL	VQGTHWP.....WT
093_1H10	Vh1_DP-5_(1-24)	Vk1_DPK4_(A20)	EGYDSSGYGARPRYYYGM...DV	QQSYNTP.....RT
093_1E11,093_1E10	Vh3_DP-53_(3-74)	Vk2_DPK18_(A17)	DSL DGN GSG SWDDAF.....DI	VQGTHWP.....WT
093_2G12	Vh1_DP-5_(1-24)	Vラムダ6_6a	GSAYYYGSGSYYKAPYYYYYGM DV	QSYDSSN.....QV
093_2B01	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vk1_DPK1_(018,08)	GMGYGM.....DL	QQYDNLP.....YT
093_2F10	Vh3_DP-47_(3-23)	Vラムダ2_DPL10_(2b2)	EGGDPTTPTTT.....TV	CSYAGPFT.....VI
093_2F12	Vh3_DP-49_(3-30.5)	Vラムダ1_DPL3_(Ig)	DDSTADL.....DY	AAWDDSLSGP.....YV

10

20

30

40

50

【0119】

表1. 一次CXCL12抗体の配列分析のスナップショット。BLAZEソフトウェアを用いてフレームワークおよびCDR領域を分析し、そしてVHおよびVL CDR3配列における類似性に基づいて、抗体をクラスター決定した（例えば093_E11および093_E10）。

【0120】

CXCR4へのCXCL12結合をブロッキングする抗体の同定

一次スクリーニングおよび配列分析から、ユニークなCXCL12結合剤の大きなパネルを同定した。CXCL12-CXCR4相互作用をブロッキングする抗体を同定するため、フローサイトメトリーを用いた細胞に基づくCXCL12-CXCR4結合アッセイを確立した。ヒト急性リンパ球性白血病細胞株（MOLT-4）は、CXCR7発現に関して陰性であることが見出されたため、CXCL12-CXCR4結合アッセイに関する理想的なCXCR4発現細胞株と同定された。このアッセイにおいて、フィコエリトリンとコンジュゲート化したストレプトアビジン（ストレプトアビジン-P E）を用いて、ビオチン化CXCL12のCXCR4発現MOLT-4細胞への結合を検出した。次いで、抗CXCL12抗体を、この相互作用を阻害する能力に関して試験した。

【0121】

最初に、いくつかのパイロット実験を行って、最大アッセイ感度を達成するための最適アッセイパラメータ（例えば、検出法、CXCL12の量、ブロッキング剤の濃度等）を同定した。1工程結合検出法を試験して、そして2工程結合検出法に比較した。1工程結合検出法は、ストレプトアビジン-P Eとあらかじめ複合体化したMOLT-4細胞のビオチン化CXCL12での直接染色およびフローサイトメトリーによる結合の検出を伴った。対照的に、2工程結合検出法は、MOLT-4細胞とビオチン化CXCL12のインキュベーション、洗浄、そして次いで、フローサイトメトリーによる結合検出前のストレプトアビジン-P Eでの染色を伴った。2工程検出法は、1工程検出法で観察された蛍光の広い分布に比較して、鋭い蛍光ピークを生じた。さらに、CXCL12およびストレプトアビジン-P Eのブレ複合体化は、CXCL12分子の四量体提示を生じるであろう。これは、単量体scFvによるCXCL12-MOLT-4細胞相互作用のブロッキングを妨害しうる、アビディティ効果を生じるであろう。これらの理由のため、CXCL12結合の2工程検出法を、ブロッキングアッセイのために選択した。用量反応分析は、アッセイに関するCXCL12の最適濃度を、7.5 μg/mlと同定した。

【 0 1 2 2 】

40 μg / ml から出発するビオチン化 CXCL12 の 2 倍希釈シリーズを、 CXCR4 を発現する MOLT - 4 細胞とインキュベーションした。細胞への CXCL12 結合を、フローサイトメトリーを用いて、ストレプトアビジン - PE によって検出した。各試験試料に関して観察される平均蛍光を、 CXCL12 濃度に対してプロットした。

【 0 1 2 3 】

ブロッキングに関して一次スクリーニングから同定された 118 の抗 CXCL12 抗体のうち 39 クローンを、重鎖 CDR3 配列多様性および一次スクリーニングにおける結合シグナルに基づいて、このアッセイのために選択した。 scFv 抗体をこれらのクローンから產生し、そして固定金属イオンアフィニティクロマトグラフィによって精製した。次いで、精製抗体（および非特異的抗体）を、 CXCL12 - MOLT - 4 細胞結合アッセイにおいて、ブロッキング活性に関して試験した。 CXCL12 - MOLT - 4 細胞結合の阻害パーセントに基づいて、 45 % より大きいブロッキング活性を持つ 20 の抗体を、さらなる研究のために選択した（表 2 ）。 10

【 0 1 2 4 】

【表2】

ランク	クローン ID	細胞結合アッセイにおけるブロッキングパーセント
1	093_1C03	99
2	093_2A02	96
3	093_2D06	94
4	093_1F01	87
5	093_2G07	86
6	093_2G10	83
7	093_1C04	65
8	093_2C02	64
9	093_2E04	63
10	093_1A10	63
11	093_1A08	59
12	093_1G07	58
13	093_2G09	57
14	093_1A09	54
15	093_1F09	54
16	093_1G10	51
17	093_2E12	51
18	093_2D05	51
19	093_2A10	46
20	093_1A11	45

【0125】

表2. 細胞に基づくCXCL12-CXCR4結合アッセイ由来の上位20のブロッキング抗体

一次抗CXCL抗体のアフィニティ成熟および機能的特徴付け

一次抗体ファージディスプレイ選択およびスクリーニングによって、CXCR4へのCXCL12の結合をブロッキングするいくつかの抗体が同定された。療法適用には、しば

10

20

30

40

50

しば、望ましい臨床効率を達成するため、低ナノモル～ナノモル未満の範囲のアフィニティを持つモノクローナル抗体が必要である。低ストリンジエンシー条件下での「M c C a f f e r t y ライブラリー」からのパニングは、一般的に、 $10\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ の範囲のアフィニティを持つ一次抗体を生じる。こうした抗体は、しばしば、所定の適用のために十分なアフィニティを獲得するため、*in vitro*でアフィニティ成熟される。

【0126】

体液性免疫反応中に起こる*in vivo*プロセスを模倣することによって、抗体の*in vitro*アフィニティ成熟を達成することも可能である。抗原刺激に対する最初の反応は、低アフィニティ抗体を発現するB細胞の巨大でそして多様な免疫前レパートリーからの抗原特異的B細胞の選択を伴う。これらの一次低アフィニティ抗体は、次いで、重鎖および軽鎖可変領域において、点突然変異を蓄積する、体細胞高頻度突然変異と呼ばれるプロセスを経る。高アフィニティ抗体を発現するB細胞は、抗原刺激に関して、低アフィニティ抗体を発現するB細胞と競合して、生存し、そして増殖する。体細胞高頻度突然変異およびより高いアフィニティの抗体を発現するB細胞の優先的な拡大の周期が反復されることによって、免疫系は、次第に、侵入する病原体に対して有効な反応を確立する。*in vivo*プロセスと同様に、一般的に用いられる*in vitro*アフィニティ成熟戦略は、2つの重要な工程、一次抗体配列の多様化、およびファージディスプレイ技術などの選択プラットホームを用いた、アフィニティ改善抗体の選択的な濃縮を伴う。一次抗体配列の多様化は、ランダムまたはターゲティング突然変異誘発を用いて、可変領域に突然変異を導入することによって、行うことも可能である。あるいは、選択した重鎖または軽鎖を、鎖シャッフリングとして知られるプロセスによって、パートナー鎖のレパートリーと組み換えることによって、重鎖および軽鎖可変領域の新規組み合わせを作製することも可能である。

10

20

30

【0127】

抗体のモジュール性を考慮すると、単純なクローニングによって、鎖シャッフリングされたライブラリーを容易に生成することも可能であり、したがって、これは一次抗CXC L12抗体をアフィニティ成熟させるために選択される方法であった。重鎖可変ドメインは、一般的に、抗原結合およびエピトープ特異性定義において、支配的な役割を果たすため、一次抗体の結合エピトープを保存するためには、重鎖シャッフリングよりも軽鎖シャッフリングが好ましい。

30

【0128】

鎖シャッフリングされたライブラリーの構築およびCXC L12に関するストリンジエントなファージディスプレイ選択

軽鎖シャッフリングライブラリーを生成するため、上位20のブロッキング抗体由来の抗体重鎖領域をPCRによって增幅した。生じたPCR産物を、未刺激ラムダおよびカッパ軽鎖可変領域パートナーのレパートリーを含むファージディスプレイ軽鎖ライブラリー調製物内にクローニングした(ベクター-pSANG4中)。得られたプラスミド集団を、大腸菌TG1に形質転換して、 2.6×10^8 scFvクローンを含有するライブラリーを得た。したがって、各オリジナル重鎖を、およそ1000万の新規軽鎖パートナーと対形成させた。重鎖挿入頻度を評価するため、軽鎖シャッフリングライブラリー由来の20のランダムクローンをコロニー-PCRスクリーンによって分析した。20のクローンのうち19が、全長scFv遺伝子の存在を示し(未提示)、ライブラリー中のクローンのおよそ95%が軽鎖シャッフリング組換え体であることが示唆された。

40

【0129】

任意のライブラリーからの高アフィニティ抗体の単離成功には、高アフィニティ結合剤を選択的に濃縮可能であるストリンジエントな選択条件を必要とする。高アフィニティ抗体を、抗原濃度減少を用いた、ファージ選択の反復周期によって濃縮することも可能である。この方法は、限定された量の抗原に関する競合およびより低い解離定数を有する変異体の優先的な濃縮に頼る。抗原濃度の正確な調節のため、溶液相でファージディスプレイ選択を行う。ファージ抗体を溶液中でビオチン化抗原に結合させ、そして続いて、結合し

50

たファージを、洗浄および溶出のために、ストレプトアビジンコーティング表面を用いて捕捉する。いくつかの厳しく、そして長い洗浄工程を含めることによって、選択のストリンジエンシーをこの工程でさらに増加させることも可能である。

【0130】

高アフィニティ抗CXC L12抗体を軽鎖シャッフリングライブラリーから単離するため、ビオチン化CXC L12に対して、3ラウンドの溶液相選択を行った。ある範囲の抗原濃度に対してファージ抗体を選択し、そして「抗原不含」対照とアウトプット数を比較することによって、各周期に関する最適抗原濃度を実験的に決定した。第三ラウンドにはまた、ストリンジエンシーをさらに増加させるため、捕捉されたファージ-抗原複合体を17時間の洗浄(0.2%Tween-20を含有するリン酸緩衝生理食塩水での毎時6回の洗浄)に供する選択セットを含めた。

10

【0131】

アフィニティ成熟モノクローナル結合剤に関する選択アウトプットのスクリーニングラウンド3選択アウトプット由来のscFv集団をPCR增幅し、そしてpSANG10-3F発現ベクター内にクローニングし、そして生じたプラスミドDNAを大腸菌BL21(DE3)細胞内に形質転換した。960の個々の形質転換体を10×96ウェル培養プレート内に摘み取り、そして自己誘導培地を用いて抗体発現を誘導した。一晩誘導後、培養上清内に分泌された組換えモノクローナル抗体を、TRF結合アッセイにおいて、CXC L12に結合する能力に関してスクリーニングした。多様な選択アウトプットからスクリーニングしたクローネンの48%(458/960)が、CXC L12結合に関して陽性であることが見出された。これらのクローネンによって示される結合シグナルは、未刺激ライブラリーから単離されたクローネンのものより有意に優れていた。鎖シャッフリング選択アウトプットからスクリーニングしたクローネンの37%は、10,000蛍光単位(FU)を超える結合シグナルを示した。対照的に、未刺激ライブラリーから単離されたクローネンでは、わずか12%しか10,000FUを超える結合シグナルを示さなかった。スクリーンにおいて試験したクローネンは、発現に関して規準化されなかつたため、CXC L12結合において観察された改善は、改善された発現または改善されたアフィニティのためである可能性もあった。

20

【0132】

BLAZE抗体配列分析ソフトウェアを用いて、CXC L12結合クローネンを分析した。重鎖および軽鎖CDR3多様性の分析は、227のユニークなクローネンを同定した。鎖シャッフリングライブラリーの構築において、20の異なるVH遺伝子を用いたが、同定した227のユニークなクローネンの間で、わずか9のVH遺伝子が示された。このセット内で、4つの主要なクローネンファミリーがあった。これらは、一次クローネン093_2A02(122/227)、093_2D06(38/227)、093_2G07(24/227)および093_2A10(22/227)のVH遺伝子に由來した。未刺激ライブラリーから単離したクローネンと同様、これらの鎖シャッフリングクローネンのVL生殖系列使用は、Vκ1(63%)およびVκ2(22%)生殖系列ファミリーによって大部分が占められた。

30

【0133】

一次スクリーンにおいて、特定のクローネンに関して観察されるCXC L12結合シグナルは、抗体発現およびアフィニティの組み合わせた効果に依存した。抗体発現は、クローネン間で有意に異なり、一次スクリーンにおける結合シグナルによって抗体をランク付けしても、必ずしもそのアフィニティとは相關しない。したがって、発現に依存しない二次スクリーニングアッセイを用いて、優れた結合動力学を持つ高アフィニティ抗CXC L12抗体を同定した。このスクリーニングアッセイにおいて、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて、上位150の抗CXC L12 scFv抗体の解離定数(オフ速度)を分析した。抗体-抗原相互作用の解離定数は、濃度依存性であり、そしてしたがって、示差抗体発現に関する規準化は必要ではなかった。しかし、scFv抗体が溶液中で二量体化する傾向があるため、一価抗体-抗原(1:1)相互作用の正確な測定は、複雑になり、そし

40

50

てしばしば結合定数の誤った決定を生じる。したがって、scFv - SPRスクリーンにおいて低解離定数を示す24抗体のパネルを、別の周期の「オフ速度スクリーン」のために、Fab抗体として再フォーマットした。scFvとは異なり、Fab抗体は、単量体形式で安定であり、そして正確な動力学分析のために最適である。抗体クローン114-3H1(093-2D06由来)および113-1H12(093-2A02由来)は、試験した24のFab抗体のうち、最適なオフ速度(すなわち最低の解離定数)を示した。詳細な特徴付けのため、リード抗CXC12抗体として、これらの2つのクローンを選択した。これらの抗体の配列を配列表に提供する。

【0134】

哺乳動物細胞におけるFabおよびIgGとしての抗CXC12抗体の発現および精製

オフ速度スクリーンの第二の周期までのすべての抗体詳細試験を、scFv形式の抗体で行った。scFv形式は、ファージディスプレイ選択によく適しており、そして大腸菌において効率的に発現されるため、リード抗体パネルを同定するための多数のクローンの続くスクリーニングによく適している。しかし、この形式に関連するいくつかの限界があり、このため、下流生物物理的および生物学的特徴付けには最適ではない。例えば、scFvのアフィニティ決定は、溶液中で二量体化する傾向のために複雑になる。scFv分子は安定性が劣っているため、凝集および沈殿しやすく、それによって、長期保存は限定される。さらに、大腸菌からのscFv沈殿においては、高レベルの内毒素が存在するため、多くの細胞に基づくアッセイにおいて、その使用が制限される。したがって、一次スクリーニングアッセイから同定したscFvを、通常、より大きくそしてより安定な抗体形式に再フォーマットし、そして下流特徴付けおよびin vivo試験のため、哺乳動物細胞において発現させる。2つのリード抗CXC12抗体およびその親クローンを、FabおよびIgGに再フォーマットした。Fabは、結合定数の正確な決定のために最適である。一方、大部分の臨床認可抗体および開発中の抗体に関しては、IgGが好ましい形式である。その優れたin vivo半減期、および宿主免疫系に関与する能力は、疾患、例えは癌の治療に理想的である。さらに、IgG分子の二価性は、in vitroおよびin vivoの両方で、抗原中和能を非常に増進させる。

【0135】

本発明の抗CXC12抗体の配列を、抗体分子の生成のために設計された任意の適切な発現系において、用いることも可能である。この研究において論じるすべてのscFv抗体は、pSANG10-3Fベクターから発現され、このベクターにおいては、単一のT7プロモーターがグリシン-セリンリンカーによって連結される重鎖および軽鎖可変ドメインの発現を駆動する(図1A)。この系において、scFv遺伝子は単一mRNAとして転写され、そして単一のタンパク質として翻訳される。対照的に、一般的に用いられる哺乳動物FabおよびIgG発現系は、重鎖および軽鎖遺伝子を別個に転写し、そして翻訳する、発現カセットを使用する。ここで、本発明者らは、HEK-293細胞における抗CXC12 Fabの一過性発現のため、ニシストロン性ベクター(pBIOCAM-7)を用いた(図1B)。pBIOCAM7において、抗体軽鎖(VL+CL)および重鎖(VH+CH)遺伝子は、ブタ・テッショウウイルス-1由來の「リボソームスキップ」ペプチド(P2Aペプチドとして知られる)をコードする遺伝子セグメントによって分離される。このFab発現系は、全Fabカセットで単一mRNA転写物(VL+CL-P2A-VH+CH)を産生する。しかし、翻訳中、リボソームは、P2AペプチドのC末端でグリシル-プロリルペプチド結合の合成をスキップし、そのすぐ下流のポリペプチド鎖の放出を生じる。次いで、重鎖および軽鎖ポリペプチドは、小胞体(ER)においてフォールディングされ、そして独立に組み立てられて、Fab分子を形成する。軽鎖のC末端でのフューリン切断部位によって、Fabタンパク質からのP2Aペプチドの翻訳後除去が容易になる。

【0136】

IgG形式での抗CXC12抗体の発現のため、重鎖および軽鎖発現カセットが2つ

10

20

30

40

50

の異なるプラスミド上で所持される、二重プラスミド系を用いた(図1C)。これらのプラスミドのHEK-293細胞への同時トランスフェクションに際して、ERにおいてIgG分子に組み立てられる前に、重鎖および軽鎖遺伝子が別個に転写され、そして翻訳される。IgG抗体は、ヒンジおよびFc領域のアミノ酸配列の相違にしたがって、4つのアイソタイプ(IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4)に分けられる。これらの異なるアイソタイプは、抗体分子のin vivo半減期、およびエフェクター機能を誘導する能力に影響を及ぼす。したがって、IgGアイソタイプの選択を用いて、本発明の抗体分子のin vivo特性を操作することも可能である。中和可溶性抗原、例えばCXCL12に関しては、エフェクター機能はより重要ではない。実際、宿主免疫系の干渉を伴わずにCXCL12中和の利益を決定するためには、将来のin vivo実験のために、エフェクター機能を欠く抗体を有することが望ましい。したがって、本発明者らは、減少した抗体依存性細胞仲介性細胞傷害性(ADCC)および補体依存性細胞傷害性(CDCC)を示す、IgG2アイソタイプを選択した。

10

【0137】

FabおよびIgG発現のため、リード抗体(114_3H1および113_1H12)およびその親クローン(093_2D06および093_2A02)の可変領域を、pBIOCAM-7ベクターおよびIgG2発現プラスミド(pBIOCAM-1およびpBIOCAM2-IgG2)内にサブクローニングした。

20

【0138】

トランスフェクション等級のDNAを、これらのプラスミドから調製し、そして一過性抗体発現のため、HEK-293F細胞にトランスフェクションした。それぞれ、ニッケルおよびプロテインGアフィニティクロマトグラフィ法を用いて、細胞培養上清からFabおよびIgG抗体を精製した(トランスフェクション6日後)。図2に例示するように、精製FabおよびIgGは、期待されるサイズの重鎖および軽鎖ドメインで構成された。

20

【0139】

抗CXCL12抗体のアフィニティ測定

リード抗CXCL12抗体およびその親クローンを、完全動力学分析に供して、アフィニティ成熟後の結合定数の改善を決定した。SPRを用いて、ストレプトアビジンチップ上に固定されたビオチン化CXCL12へのFab抗体の結合を分析した(図3)。各結合相互作用に適した結合モデルを用いて、これらの抗体の平衡解離定数(KD)を決定した(図3BおよびC)。試験した4つの抗体のうち、114_3H1は、1nMのKDで、CXCL12に対する最高のアフィニティを有した。これは、鎖シャッフリング後、親クローン093_2D06(KD=3800nM)から、アフィニティで3800倍の改善に相当する。093_2A02およびそのアフィニティ成熟変異体113_1H12はどちらも、二相性結合プロファイルを示し、最初の迅速な解離相の後に、はるかにより緩慢な第二の解離相を生じた。こうした結合プロファイルは、一般的に、2工程結合を生じる、リガンドの抗体(または任意の他の分析物)誘導性のコンホメーション変化を伴う結合相互作用に関連する。113_1H13および092_2A02両方の2つの異なる調製物を、SPRによって分析した。どちらのタンパク質バッチを用いても類似の結果が得られ、観察される結合プロファイルがアーチファクトではなく、また特定のタンパク質調製に関する問題ではないことが確認された。同じVH系譜由来の抗体のみが、二相性結合を示すという事実は、これらの抗体が、二工程結合機構を有するという仮説を支持する。したがって、二状態結合モデルを用いて、これらの抗体のアフィニティを決定した(図3C)。113_1H12および093_2D06の計算される結合アフィニティは、それぞれ、3.7nMおよび16.7nMであり、これは、軽鎖シャッフリング後のアフィニティの4.5倍の改善に相当する。

30

【0140】

リード抗CXCL12抗体による癌細胞遊走の阻害
CXCR4発現癌細胞の、CXCL12リッチ環境への遊走は、多くの悪性腫瘍におい

40

50

て、転移を促進する、重要な要因の1つである。C X C L 1 2 / C X C R 4 依存性癌細胞遊走の阻害は、本発明の療法的抗C X C L 1 2 抗体分子の重要な生物学的特性である。したがって、リード抗体114_3H1および113_1H12を、トランスウェル遊走アッセイを用いて、卵巣癌細胞のC X C L 1 2 誘導性遊走をプロッキングする能力に関して試験した。本明細書で用いるトランスウェル遊走アッセイは、白血球の走化性反応を研究するために用いられたボイデンチャンバーの修飾型であった。このアッセイにおいて、上部チャンバーに植え付けられた蛍光標識ヒト卵巣癌細胞(T O V - 2 1 G)の、多孔性膜を渡り、そしてC X C L 1 2 を含有する下部チャンバー内への遊走を分析した(図4A)。以前の研究によって、より高い濃度でC X C L 1 2 二量体が形成され、細胞遊走を阻害しうることが示されてきている。したがって、細胞遊走を刺激するために最適なC X C L 1 2 濃度を実験的に決定した(図4B)。

10

【0141】

リード抗C X C L 1 2 抗体が卵巣癌細胞のC X C L 1 2 誘導性遊走を阻害する能力を評価するため、上述のトランスウェル遊走アッセイにおいて、114_3H1 IgGおよび113_1H12 IgGの用量設定を行った。どちらの抗体も、用量依存方式で、T O V - 2 1 G 細胞の遊走を阻害する(図5)。114_H01および113_1H12の半最大阻害濃度(I C₅₀)は、それぞれ、4.6(±0.5)nMおよび13.2(±4.1)nMであった。これらの値は、S P R によって決定した平衡解離定数に一致する。さらなる複製実験は、より高い品質データを生じ、これによって、114_H01および113_1H12のI C₅₀ 値は、それぞれ、5nMおよび9nMと確認された。

20

【0142】

リード抗C X C L 1 2 による血管形成の阻害

腫瘍の生存および増殖は、酸素および栄養素の適切な供給を提供する、補助血管ネットワークに非常に依存する。C X C L 1 2 / C X C R 4 軸は、腫瘍補助血管系を確立するための新規血管の形成(血管形成)を促進する際に重要な役割を果たす。C X C L 1 2 およびC X C R 4 は、周知の血管形成促進因子であるV E G F と正のフィードバックループを形成する。このループにおいて、V E G F は、C X C L 1 2 およびC X C R 4 両方の発現を刺激する。逆に、C X C R 4 のC X C L 1 2 誘導性活性化は、内皮細胞によるV E G F の產生を上方制御する。したがって、リード抗C X C L 1 2 抗体を*in vitro* 血管形成アッセイで試験して、細管の形成および分枝を阻害する能力を評価した。

30

【0143】

このアッセイにおいて、ヒト臍帯静脈内皮細胞(H U V E C)および線維芽細胞を、抗C X C L 1 2 抗体およびV E G F を含有する培地内でともに培養した。これらの2つの細胞タイプは、V E G F の存在下で相互作用して、*in vivo* の小さい毛細血管に似た三次元管の形成を生じる。免疫組織化学によって、共培養7日後の抗C X C L 1 2 抗体の阻害効果を分析した(図6)。

【0144】

血管形成を分析するための最も価値あるパラメータは、細管の長さおよび細管あたりの分枝数である。内皮細胞は、V E G F 刺激に際して、長く、そして分枝した細管を形成し、そしてこれは、非特異的抗体の存在によっては影響を受けなかった。113_1H12で、細管形成および分枝の有意な阻害が観察された(図6B)。

40

【0145】

WO 2008 / 018641の抗体との比較

WO 2008 / 018641は、抗C X C L 1 2 抗体の2つの対、1D3および1H2ならびに1C6および2A5を記載する。該抗体対は、C X C L 1 2 の共通のエピトープを認識する。

【0146】

WO 2008 / 018641の抗体の重鎖および軽鎖配列を、本発明の抗体の配列と整列させ、そして図8に整列を示す。これは、本発明の抗体114_H01および113_1H12に比較した際、これらの抗体のC D R 配列において有意な相違があることを示

50

す。

【0147】

抗体のアフィニティもまた比較した。抗体114-H01のヒトCXC L12に関するアフィニティ定数(K_D)は2.4nMであり、そして抗体113-1H12のものは4.2nMであった。これは、1D3 K_D = 151nM; 1H2 K_D = 176nM; 1C6 K_D = 3.6nM; および2A5 K_D = 4.6nMであるWO 2008/018641の抗体に関して報告された値に匹敵する。アフィニティデータは、本発明の抗体114-H01および113-1H12が、IgGではなくFab形式の抗体を用い、これは一般的には先行技術に比較して、本発明の抗体のアフィニティを過小評価するであろうにもかかわらず、WO 2008/018641の抗体に関して報告された最高の結果と同程度に優れているかまたはより優れたアフィニティを有することを示す。10

【0148】

エピトープマッピング

抗体113-1H12および114-H01が結合するエピトープを、WO 2008/018641に開示される4つの例示される抗体が結合するエピトープに比較した。これらの実験は、113-1H12がWO 2008/018641の抗体1D3および1H2とエピトープを共有する一方、114-3H1がWO 2008/018641の抗体と1残基しか共有しないユニークなエピトープを有することを示した。E15は、受容体またはヘパリン結合に関与する領域の外である。すべての他のエピトープ残基は、受容体結合に関与する領域内にあり、これはUniProt P48061(SDF1-ヒト)全長タンパク質の番号付けにしたがって、29~33、39~41、48~50、60~70である。WO 2008/018641は、受容体結合に関与する残基が、アミノ酸残基7~19の間にあることを開示する。20

【0149】

【表3】

抗体	結合を強く減少させる ／排除する置換	結合を部分的に 減少させる置換
114-3H1	P10A, R12A	E15A, I28A, P32A, N45A, K54A
113-1H12	P10A, Q48A	K54A, N45A
1D3 および 1H2	P10A, N45A, Q48A	
2A5 および 1C6	P10A, E15A, N45A, R47A	F13A, I28A, K54A

【0150】

キメラネズミIgG2a主鎖中の抗CXC L12モノクローナル抗体の特性

113-1H12および114-3H1の可変領域を、ネズミIgG2a発現系内にクローニングし、ネズミ定常領域およびヒト可変領域を含む、キメラ抗体の産生を可能にした。このタイプのキメラ抗体は、完全ヒト抗体の投与に際して生じうる、抗体に対する免疫反応を減少させるため、免疫適格性動物におけるin vivo試験に好ましい可能性がある。40

10

20

30

40

50

【0151】

A) 遊走アッセイ

ネズミ転移性黒色腫細胞株（B16F10）およびヒト卵巣癌細胞株（TOV21G）を用いて、キメラネズミIgG2aおよび完全ヒトIgG2形式の抗体が、ヒトおよびネズミ細胞株の細胞遊走をブロッキングする能力を調べた。

【0152】

すべての抗体を、 $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で用いた。ヒトCXCL12リガンド（Peprotech）を $500\text{ ng}/\text{ml}$ の濃度で用いた。D MEM（B16F10研究のため）またはRPMI（TOV21G研究のため）中で、抗体およびリガンドを調製した。各タイムラプス遊走アッセイに関して、 $3 \sim 4 \times 10^6$ 細胞を、カバースリップ遊走チャンバー内部で、コラーゲン-細胞混合物中で用いた。細胞懸濁物を、1（細胞）：2（コラーゲン）の比で、コラーゲン混合物と合わせた。コラーゲン混合物は、1：2；15比の重炭酸ナトリウム、 $10\times$ MEMおよびコラーゲン（ $3\text{ mg}/\text{ml}$ 、Sigma）で構成された。細胞-コラーゲン混合物に抗体を添加して、そして生じた混合物を、遊走チャンバー内に入れ、この内で、37℃で30分間インキュベーションすることによって、コラーゲンを重合させた。ひとたび重合したら、CXCL12リガンドを添加して、ケモカイン勾配を産生し、そしてCXCL12に向かう細胞の移動を、タイムラプス画像化を用いて決定した。3.5~4時間の期間に渡って、1写真/分の間隔で画像を採取した。タイムラプス画像化によって、細胞遊走トラックの可視化を可能にし、これを次いで、Image Jソフトウェアを用いて分析し、細胞遊走の度合いを決定した。

10

20

30

【0153】

CXCL12および3つのブロッキング抗体の存在下での、B16F10細胞の遊走距離を、図9AおよびBに示す。

すべての抗体、ヒトIgG2形式の113_1H12（hAB113）、キメラネズミIgG2a形式の113_1H12（mAB113）、およびキメラネズミIgG2a形式の114_3H1（mAB114）は、B16F10細胞において、細胞遊走を実質的にブロッキングするのに有効であり、そしてTOV-21細胞においてもまた、ある程度までブロッキングした。このアッセイにおいて、ヒトIgG2形式の113_1H12（hAB113）は、TOV21G細胞遊走のブロッキングに関しては不活性であり、一方、mAB113は完全に活性であり、そしてmAB114はその中間であった。しかし、図5の結果から、本発明者らは、ヒトIgG2形式の113_1H12抗体は、CXCL12に向かうTOV21G細胞株の遊走を阻害可能であることを知っており、したがって、この不活性結果は、例外である可能性が高い。これらの結果を図9Aに要約する。

40

【0154】

さらに、すべての3つの抗体は、B16F10細胞のCXCL12依存性遊走の阻害に有効であった。これを図9Bに図式的に示す。したがって、これらの実験によって、キメラネズミIgG2a形式の抗体が、in vitro遊走アッセイで働き、そして癌細胞遊走を阻害可能であることを確認する。

【0155】

B) 血清安定性試験

キメラネズミIgG2a形式の抗体114_3H1および113_1H12の血清安定性を試験した。ヒト血清を用いて、血清安定性アッセイを行った。抗体を $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、血清中、6、12、24および48時間インキュベーションした。抗体含有血清をD MEMまたはRPMI中で $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度まで希釈し、そしてAに上述するようなタイムラプス遊走アッセイに用いた。これらの実験によって、キメラネズミIgG2a形式の抗体が、血清中で48時間に渡って安定であり、そして血清中で48時間後もなお、CXCL12依存性B16F10細胞遊走を阻害する際に活性であることが見出された。これは、どちらの抗体も、血清中で非常に安定であることを確認する。

【0156】

50

C) i n v i v o 肺転移

B16F10黒色腫細胞は、肺への遊走および転移の開始にCXCR4を必要とする。単純な実験転移in vivoモデルを用いて、キメラネズミIgG2a抗体が、CXCL12に干渉し、そしてしたがって転移発展をプロッキングする能力を評価した。第0日、尾静脈注射を通じて、B16F10黒色腫細胞をC57BLマウス内に導入し、そして第1日に治療を開始した。治療措置は、臨床的CXCR4阻害剤AMD3100(プレリキサフォル)の5mg/kgを毎日2回、あるいは10、15または20mg/kgいずれかのネズミIgG2a形式の抗CXCL12抗体を週2回のいずれかであった。対照アームのマウスは、20mg/kgのネズミIgG2a对照抗体で週2回治療された。すべてのマウスを第14日に処分し、そして肺中の転移性コロニーの数を、手動計数によって定量化した。図10に示すように、キメラネズミ114_3H1および113_1H12抗体は、どちらも、転移発展阻害に活性であった。特に、抗体113_1H12がより強力であり、そしてCXCR4の小分子アンタゴニスト、AMD3100の5mg/kgで見られるものと同等の阻害を20mg/kgで生じた。したがって、どちらの抗体もCXCR4依存性肺転移を阻害する際に、in vivoで有効である。

【0157】

【化7-1】

配列表

抗体 114_3H1

配列番号1: CDR-H1 アミノ酸配列 (Ab114_3H1 由来)

ELSMH

10

配列番号2: CDR-H2 アミノ酸配列 (Ab114_3H1 由来)

GFDPEDGETIYAQKFQG

配列番号3: CDR-H3 アミノ酸配列 (Ab114_3H1 由来)

RVWGSYRPNDNAFDI

20

配列番号4: CDR-L1 アミノ酸配列 (Ab114_3H1 由来)

RASQSISDYVN

配列番号5: CDR-L2 アミノ酸配列 (由来 Ab114_3H1)

AASTSQS

30

配列番号6: CDR-L3 アミノ酸配列 (由来 Ab114_3H1)

QQSYSPPYT

配列番号7: VH ドメインアミノ酸配列

40

114_3H1 可変重鎖

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKF
QGRVTMTEDTSTDAYMELSSLGSEDTAVYYCARRVWGSYRPNDNAFDIWGQGTLVTVSS

【0 1 5 8】

【化7-2】

配列番号8: VH ドメイン核酸配列

>114_3H1_VH

CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT
 GCAAGGTTCCGGATACACCCTCACTGAATTATCCATGCACGGTGCGACAGGCTCCTGGAAA
 AGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTGATCCTGAAGATGGTGAAACAATCTACGCACAGAAGTTC
 CAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
 TGGGATCTGAGGACACGCCGTGTATTACTGTGCGAGACGCCTTGGGGAGTTATGCCCAA
 TGATGCTTTGATATCTGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

10

配列番号9: VL ドメインアミノ酸配列

114_3H1 可変軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISDYVNWYQQKPGKAPNLLMFAASTSQSGVPSRFTG
 SGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQSYSPPYTFQGQGTKVEIKR

20

配列番号10: VL ドメイン核酸配列

>114_3H1_VL

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGCGACAGAGTCACCATCA
 CTTGCCGGCAAGTCAGAGCATAAGCGACTATGTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGC
 CCCAACCTCCTGATGTTGCTGCATCCACTTCGCAAAGTGGGTCCCGTCAAGGTTCACTGGC
 AGCGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTT
 ACTTCTGTCAACAGAGTTACAGTCCGCCCTACACTTTGCCAGGGACCAAGGTGGAGATCAA
 ACGT

30

配列番号11: 114_3H1_scFv

リード抗体配列

>114_3H1

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIYAQKF
QGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLGSEDTAVYYCARRVWGSYRPNDAFDIWGQGTIVTVSSLEGGG
 GSGGGGSGGGASDIQM**TQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISDYVNWYQQKPGKAPNLLMFAAS**
TSQSGVPSRFTGSGSGTDFLTISLQPEDFATYFCQQSYSPPYTFQGQGTKVEIKRAAASAHHH
 HHHKLDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

40

【0159】

【化7 - 3】

抗体 113_1H12

配列番号 12: CDR-H1 アミノ酸配列 113_1H12

NYGIS

配列番号 13: CDR-H2 アミノ酸配列 113_1H12

WISAYNGNTNYAQKLQG

10

配列番号 14: CDR-H3 アミノ酸配列 113_1H12

AGGVYYDYFTDY

20

配列番号 15: CDR-L1 アミノ酸配列 113_1H12

SGSRSNIGSNSVN

配列番号 16: CDR-L2 アミノ酸配列 113_1H12

NNDERPS

30

配列番号 17: CDR-L3 アミノ酸配列 113_1H12

AAWDDSLNVGEL

配列番号 18: VH ドメインアミノ酸配列

113_1H12 可変重鎖

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKTSGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKL
QGRVTMTTDSTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAGGVYYDYFTDYWGQGTMVTVSS

40

【0160】

【化7-4】

配列番号19: VH ドメイン核酸配列

>113_1H12_VH

ATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTGAAGG
 TCTCCTGCAAGACTTCTGGTTACACCTTACCAAATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
 TGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACGAACATGCACAG
 AAGCTCCAGGGCAGAGTCACCAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGA
 GGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCGTGTATTACTGCGCGAGAGCCGGCGAGTCTATTACGA
 TTATTCACGGACTACTGGGCCAGGGACAATGGTCACCGTCTTTCA

10

配列番号20: VL ドメインアミノ酸配列

113_1H12 可変軽鎖

QSELTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNSVNWYQQLPGTAPKLLIYNNDERPSGVPDRFS
 GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNVGELFGGGTKLTVLG

20

配列番号21: VL ドメイン核酸配列

>113_1H12_VL

CAGTCTGAGCTGACTCAGCCACCCCTCAGCGTCTGGACCCCCGGCAGAGGGTCACCATCTCTT
 GTTCTGGAAGCCGCTCCAACATCGGAAGTAATTCTGTAAACTGGTACCAGCAGCTCCAGGAAC
 GGCCCCCAACTCTCATTATAAATGATGAGCGGCCCTCAGGGTCCAGGTCTGAGGATGAGGCTG
 GGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCGGCCATCAGTGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTG
 ATTATTCCTGTGCAGCATGGATGACAGCCTGAATGTCGGGAGCTATTCGGCGGAGGGACCAA
 GCTGACCGTCCTAGGT

30

配列番号22: 113_1H12 scFv

リード抗体配列

>113_1H12_scFv

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKTSGYTFNYG1SWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKL
QGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARAGGVYYDYFTDYWGQGTMVTVSSLEGGGGS
 GGGGSGGGASQSELTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNSVNWYQQLPGTAPKLLIYNND
ERPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNVGELFGGGTKLTVLGAAASAH
 HHHHHKLDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

40

【0161】

【化7-5】

配列番号23：CXCL12アミノ酸配列（全長配列）

>sp|P48061-2|SDF1_ヒト 間質細胞由来因子1 OS=ホモ・サピエンス (Homo sapiens) GN=CXCL12

MNAKVVVVLVLVLTALCLSDGKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLK
NNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK

10

配列番号24：抗体選択に用いた合成 CXCL12 アミノ酸配列。全長 CXCL12 タンパク質のアミノ酸 22～89 に相当する

KPVSLSYRCPCRF FESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEK
ALNK

20

配列番号25：エピトープマッピングのため、大腸菌中で発現された組換え「野生型」
CXCL12 (Hisタグおよびリンカー)

KPVSLSYRCPCRF FESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEK
ALNKAAASAHHHHHHKL

【0162】

参照：

本明細書に言及するすべての文書は、その全体が本明細書に援用される。

30

【図 1】

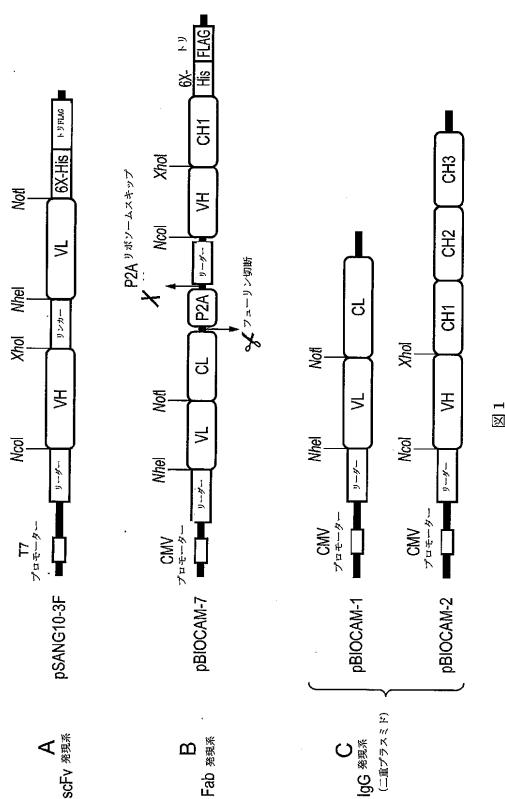


図 1

【図 2】

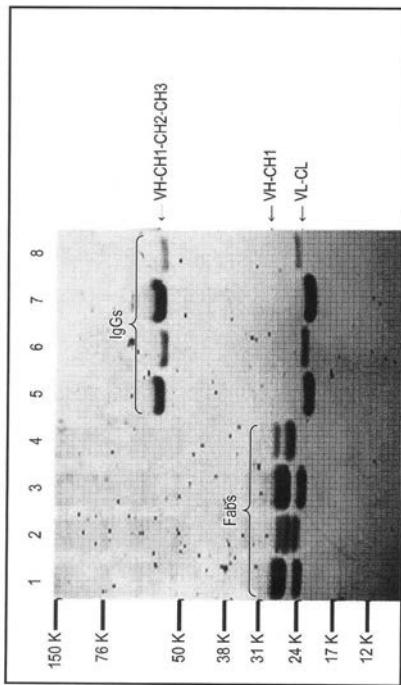
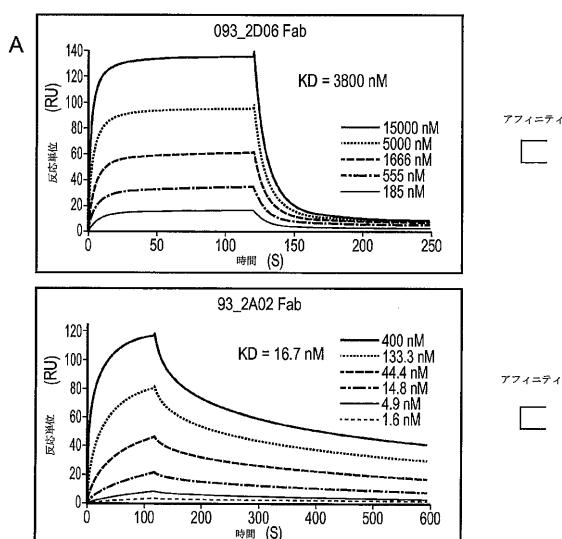


図 2

【図 3 - 1】



抗体	ka (1/Ms)
093_2D06	ND
114_3H01	4.9 x 10 ⁵

抗体	ka 1 (1/Ms)	kd 1 (1/s)
093_2A02	2.0 x 10 ⁵	0.01
113_1H12	5.1 x 10 ⁵	0.04

図 3

【図 3 - 2】

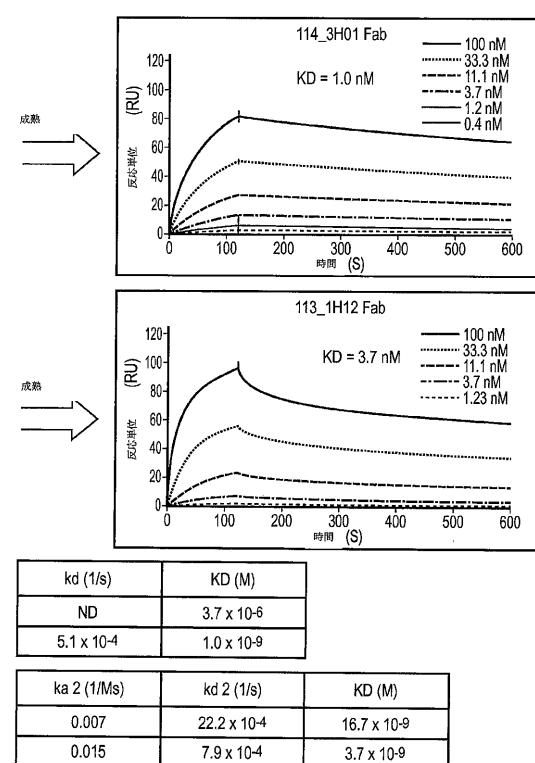
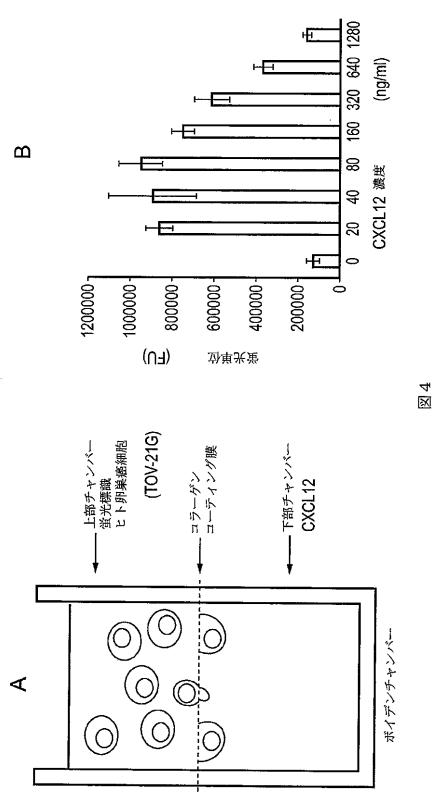
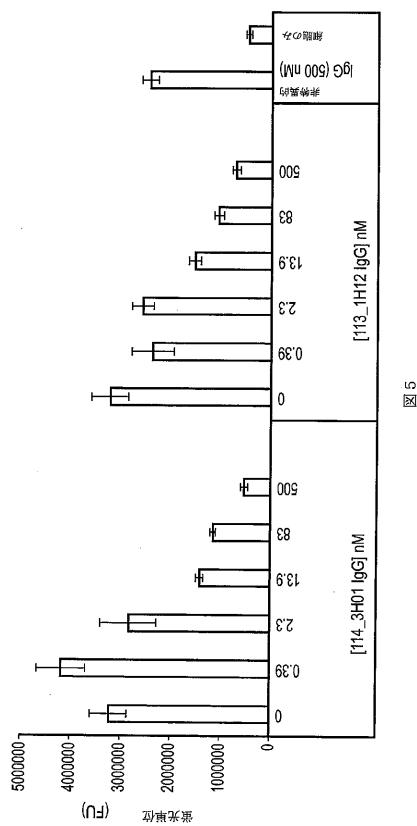


図 3 (続き)

【図4】



【図5】



【図6 A】

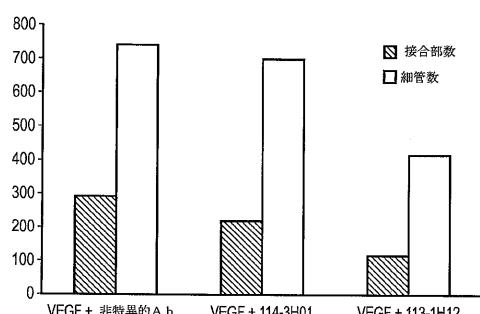


図6 A

【図6 B】

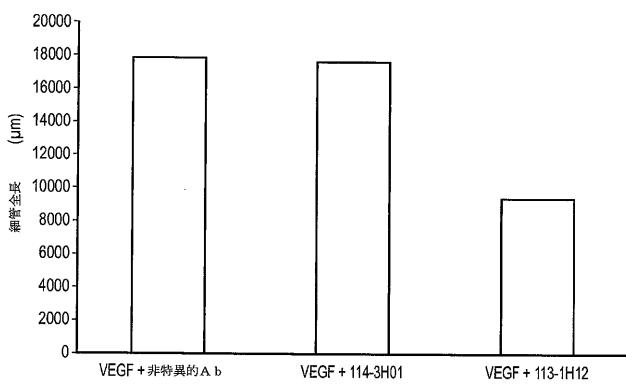


図6 B

【図7】

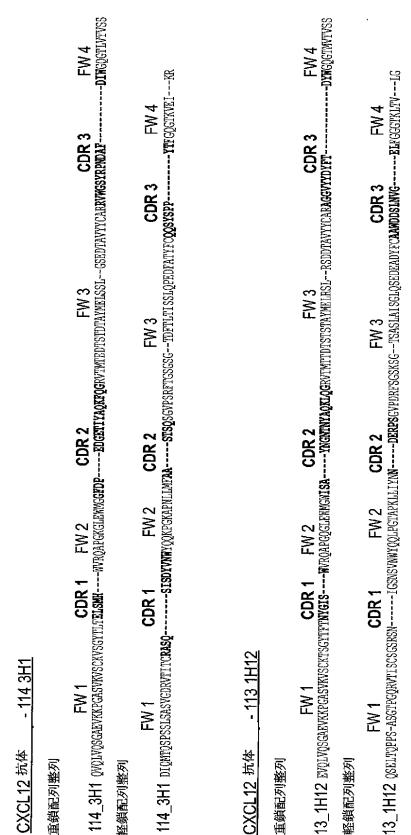
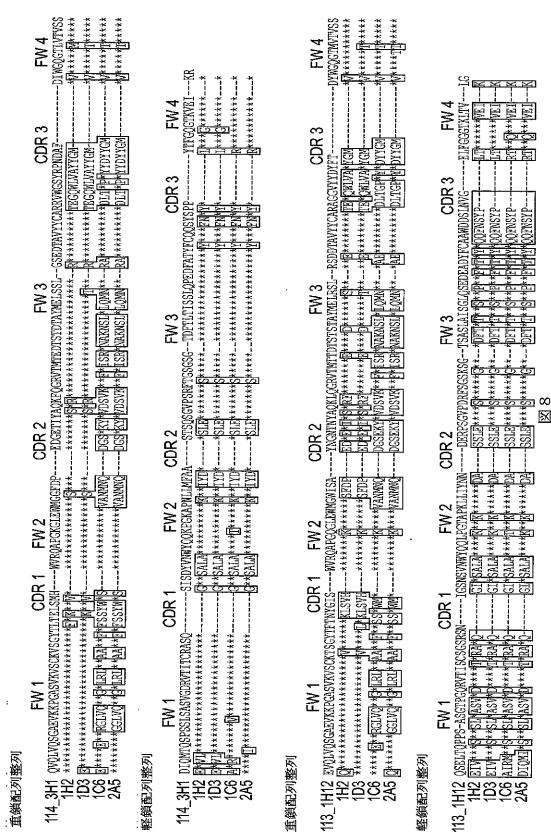
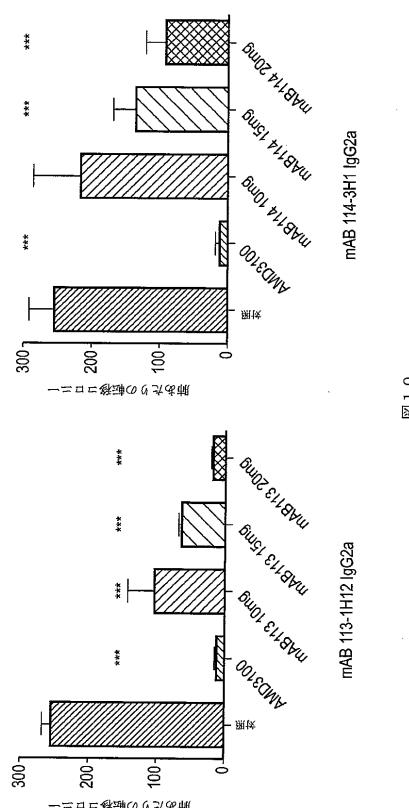


図7

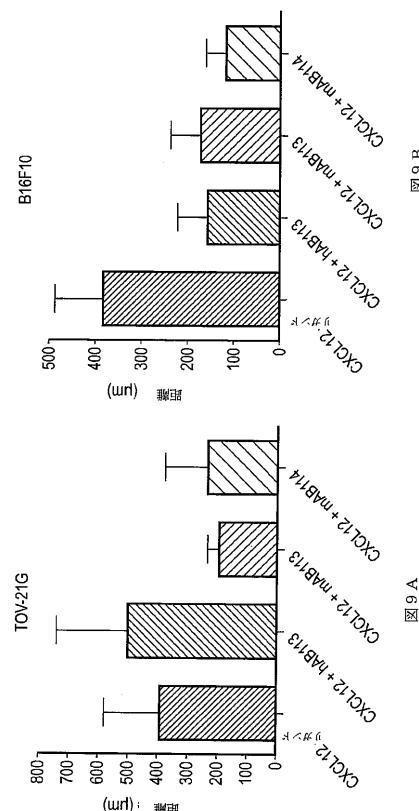
(四 8)



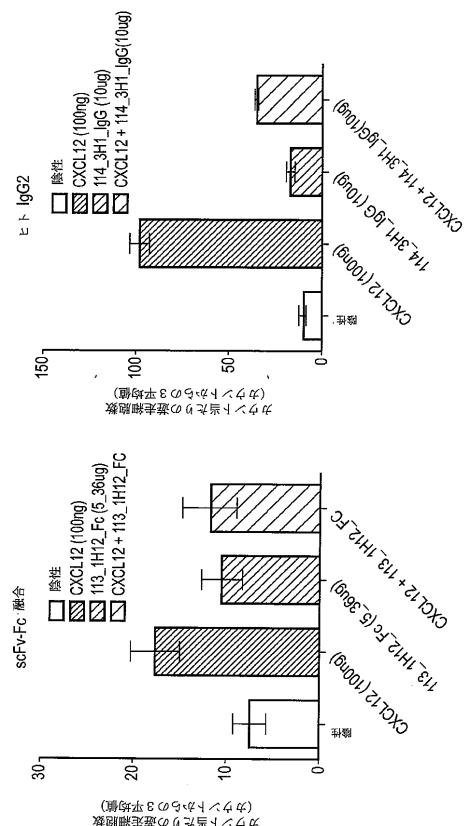
【 义 1 0 】



〔 四 9 〕



【 1 1 】



【配列表】

2018505144000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/EP2015/079384
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input checked="" type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP2015/079384

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

7, 8(completely); 1-4, 9-34(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/079384

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 A61P35/00 C07K16/24
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/018641 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO [JP]; MEDAREX INC [US]; POGUE SARAH L [US]; KORM) 14 February 2008 (2008-02-14) example 7 ----- C. ZHONG ET AL: "Development and Preclinical Characterization of a Humanized Antibody Targeting CXCL12", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19, no. 16, 15 August 2013 (2013-08-15), pages 4433-4445, XP055260304, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0943 page 4440, right-hand column; figures 4, 5 ----- -/-	1-4,7-34
X		1-4,7-34

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 23 March 2016	Date of mailing of the international search report 24/06/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Cilensek, Zoran

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/079384

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PHANOURIOS TAMAMIS ET AL: "Elucidating a Key Component of Cancer Metastasis: CXCL12 (SDF-1[alpha]) Binding to CXCR4", JOURNAL OF CHEMICAL INFORMATION AND MODELING, vol. 54, no. 4, 28 April 2014 (2014-04-28), pages 1174-1188, XP055260324, US ISSN: 1549-9596, DOI: 10.1021/ci500069y page 1182, right-hand column, paragraph 2; figures 1, 2 ----- A WO 2008/077945 A2 (ABLYNX NV [BE]; BLANCHETOT CHRISTOPHE [NL]; SAUNDERS MICHAEL JOHN SCOT) 3 July 2008 (2008-07-03) examples 14, 15 -----	1-4,7-34
1		

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) [April 2005]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2015/079384

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2008018641	A1 14-02-2008	EP	2046834 A1	15-04-2009
		ES	2396220 T3	20-02-2013
		JP	5244785 B2	24-07-2013
		JP	2010500005 A	07-01-2010
		TW	200817437 A	16-04-2008
		US	2010158902 A1	24-06-2010
		WO	2008018641 A1	14-02-2008
<hr/>				
WO 2008077945	A2 03-07-2008	AU	2007337983 A1	03-07-2008
		CA	2672944 A1	03-07-2008
		EP	2097451 A2	09-09-2009
		US	2010092460 A1	15-04-2010
		WO	2008077945 A2	03-07-2008
<hr/>				

International Application No. PCT/ EP2015/ 079384

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 7, 8(completely); 1-4, 9-34(partially)

An isolated anti-CXCL12 antibody molecule which specifically binds to human CXCL12 and inhibits CXCL12-mediated biological activity, wherein the antibody molecule binds to an epitope of CXCL12 having the amino acid sequence as set out in SEQ ID NO: 24 that comprises amino acids P10 and R12, and optionally one or more of E15, 128, P32, N45 and/or K54. An isolated anti-CXCL12 antibody molecule which specifically binds to human CXCL12 and inhibits CXCL12-mediated biological activity, wherein the antibody molecule comprises: (a) a CDR-H1 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 with one, two, three or more amino acid substitutions, deletions or insertions, (b) a CDR-H2 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 with one, two, three or more amino acid substitutions, deletions or insertions and (c) a CDR-H3 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3, or the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 with one, two, three or more amino acid substitutions, deletions or insertions.

2. claims: 5, 6(completely); 1-4, 9-34(partially)

An isolated anti-CXCL12 antibody molecule which specifically binds to human CXCL12 and inhibits CXCL12-mediated biological activity, wherein the antibody molecule binds to an epitope of CXCL12 having the amino acid sequence as set out in SEQ ID NO: 24 that comprises amino acids P10 and Q48, and optionally one or more of K54 and N45.

An isolated anti-CXCL12 antibody molecule which specifically binds to human CXCL12 and inhibits CXCL12-mediated biological activity, wherein the antibody molecule comprises (a) a CDR-H1 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12, or the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12 with one, two, three or more amino acid substitutions, deletions or insertions, and (b) a CDR-H2 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13, or the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 with one, two, three or more amino acid substitutions, deletions or insertions, and (c) a CDR-H3 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14, or the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14 with one, two, three or more amino acid substitutions, deletions or insertions.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 19/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 13/08	(2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 5/14	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 P 1/18	(2006.01)	A 6 1 P 13/08
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 5/14
A 6 1 P 1/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/18
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 1/00
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	A 6 1 P 11/00 A 6 1 P 17/00 C 1 2 P 21/08

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,Th,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74) 代理人 100120112

弁理士 中西 基晴

(74) 代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72) 発明者 バルクウィル, フランシス・ローズマリー

イギリス国ロンドン イーシー1ワイ 2エイエヌ, シティ・ロード 40, ザ・レキシントン
37

(72) 発明者 マクカフェルティー, ジョン

イギリス国ケンブリッジ シービー22 3エイティー, バブラハム, ソーストン・ロード, チャーチ・ファーム・コテージ 47

(72) 発明者 グラハム, ジェラルド・ジョン

イギリス国グラスゴー ジー46 7エイエイ, ギフノック, ベリーヒル・ドライブ 39

(72) 発明者 ヴェラット, アニッシュ・カラット

イギリス国ケンブリッジ シービー23 7ディーエヌ, コンバートン, セント・トーマス・クロース 31

(72) 発明者 スラヴニー, ピーター

イギリス国ロンドン イーシー1ヴィー 4エーディー セント・ジョン・ストリート 407,
エンジェル・ビルディング, キャンサー・リサーチ・テクノロジー・リミテッド

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA05

4C084 AA19 MA02 NA05 ZB261 ZB262 ZC412

4C085 AA13 AA14 AA16 AA21 AA26 BB41 BB42 BB43 BB50 CC07
CC23 CC32 DD62 EE01 GG01 GG02 GG04
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA50 BA71 BA72 CA40 DA76 EA28
FA74