

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-508984

(P2025-508984A)

(43)公表日 令和7年4月10日(2025.4.10)

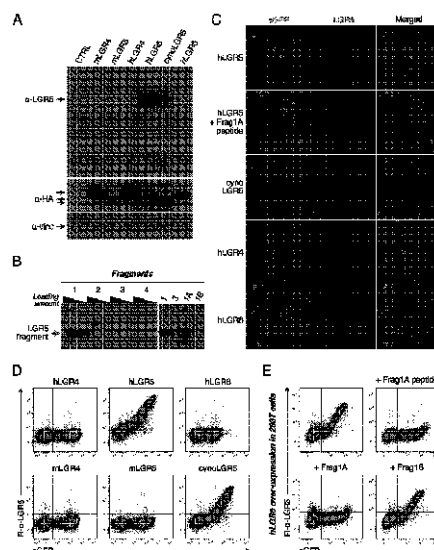
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 7
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全114頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-552419(P2024-552419)	(71)出願人	501484851	ケンブリッジ・エンタープライズ・リミテッド CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED 英国シービー2・1ティエヌ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、トリニティ・レイン、ジ・オールド・スクールズ 504197592 リグスホスピタレット Rigshospitalet デンマーク、デーコー2100コペンハーゲン・エ、ブレグダムスヴェイ9番 524327193 シダンスク・ユニバーシテット 最終頁に続く	
(86)(22)出願日	令和5年3月3日(2023.3.3)				
(85)翻訳文提出日	令和6年9月27日(2024.9.27)				
(86)国際出願番号	PCT/GB2023/050512				
(87)国際公開番号	WO2023/166318				
(87)国際公開日	令和5年9月7日(2023.9.7)				
(31)優先権主張番号	2202990.4				
(32)優先日	令和4年3月3日(2022.3.3)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(71)出願人	504197592		
(31)優先権主張番号	2208544.3				
(32)優先日	令和4年6月10日(2022.6.10)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(71)出願人	524327193		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ)				
		最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 治療抗体

(57)【要約】

LGR5結合剤、特にヒトLGR5に結合する抗体又はその断片、並びに疾患、例えばがん及び炎症疾患の処置、及びLGR5の検出におけるそのような結合剤の使用。

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

LGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体が、配列番号1のアミノ酸22～37内に位置するエピトープに結合する、抗体又はその断片。

【請求項 2】

抗体が、配列番号1のアミノ酸22～37からなるエピトープに結合する、請求項1に記載の抗体又はその断片。

【請求項 3】

抗体のV_Hが、以下のCDR1、CDR2及びCDR3:

- a) 配列番号50のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号51のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号52のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - b) 配列番号2のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号3のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号4のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - c) 配列番号8のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号9のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号10のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - d) 配列番号14のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号15のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号16のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - e) 配列番号20のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号21のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号22のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - f) 配列番号26のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号27のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号28のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - g) 配列番号32のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号33のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号34のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - h) 配列番号38のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号39のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号40のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - i) 配列番号44のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号45のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号46のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - j) 配列番号56のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号57のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号58のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - k) 配列番号62のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号63のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号64のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - l) 配列番号68のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号69のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号70のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
 - m) 配列番号74のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号75のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号76のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列
- を含む、請求項1又は2に記載の抗体又はその断片。

【請求項 4】

抗体のV_Lが、以下のCDR1、CDR2及びCDR3:

- a) 配列番号53のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号54のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号55のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- b) 配列番号5のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号6のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号7のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- c) 配列番号11のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号12のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号13のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- d) 配列番号17のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号18のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号19のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- e) 配列番号23のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号24のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号25のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- f) 配列番号29のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号30のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号31のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- g) 配列番号35のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号36のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号37のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- h) 配列番号41のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号42のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号43のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- i) 配列番号47のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号48のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号49のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- j) 配列番号59のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号60のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号61のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- k) 配列番号65のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号66のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号67のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- l) 配列番号71のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号72のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号73のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- m) 配列番号77のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号78のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号79のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列
- を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項5】

配列番号96、80、82、84、86、88、90、92、94、98、100、102、104から選択されるV_H配列を含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項6】

配列番号97、81、83、85、87、89、91、93、95、99、101、103、105から選択されるV_L配列を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項7】

i) 配列番号96のV_H配列及び配列番号97のV_L配列;

b) 配列番号80のV_H配列及び配列番号81のV_L配列;

10

20

30

40

50

c) 配列番号82のV_H配列及び配列番号83のV_L配列;
d) 配列番号84のV_H配列及び配列番号85のV_L配列;
e) 配列番号86のV_H配列及び配列番号87のV_L配列;
f) 配列番号88のV_H配列及び配列番号89のV_L配列;
g) 配列番号90のV_H配列及び配列番号91のV_L配列;
h) 配列番号92のV_H配列及び配列番号93のV_L配列;
i) 配列番号94のV_H配列及び配列番号95のV_L配列;
j) 配列番号98のV_H配列及び配列番号99のV_L配列;
k) 配列番号100のV_H配列及び配列番号101のV_L配列
l) 配列番号102のV_H配列及び配列番号103のV_L配列;又は
m) 配列番号104のV_H配列及び配列番号105のV_L配列
を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

10

【請求項8】

Table 3(表3)に示される抗体クローンの配列、又はそれと少なくとも70%、80%若しくは90%相同性を有する配列を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項9】

断片が、配列番号211を含むscFv、又はそれと少なくとも70%、80%若しくは90%相同性を有する配列である、請求項1又は2に記載の抗体又はその断片。

【請求項10】

抗体が、ヒトLGR5に結合する、請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

20

【請求項11】

抗体が、モノクローナル抗体である、請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項12】

抗体が、ヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である、請求項1から11のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項13】

抗体が、毒素、酵素、放射性同位体、標識、治療剤又は他の化学部分にコンジュゲートされている、請求項1から12のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

30

【請求項14】

抗体が、およそ4nM未満のK_dでLGR5に結合することが可能である、請求項1から13のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項15】

断片が、Fab、scFv、又は単一ドメイン抗体を含む、請求項1から14のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項16】

治療剤に連結された請求項1から15のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含むイムノコンジュゲート。

40

【請求項17】

前記治療剤が、毒素、酵素、放射性同位体又は他の化学部分である、請求項16に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項18】

請求項1から15のいずれか一項に記載の抗体、請求項16又は17に記載のイムノコンジュゲート、及び薬学的担体を含む医薬組成物。

【請求項19】

医薬として使用するための、請求項1から15のいずれか一項に記載の抗体若しくはその断片、請求項16若しくは17に記載のイムノコンジュゲート、又は請求項18に記載の医薬組成物。

50

【請求項 20】

がん又は炎症疾患の処置又は診断に使用するための、請求項1から15のいずれか一項に記載の抗体若しくはその断片、請求項16若しくは17に記載のイムノコンジュゲート、又は請求項18に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

がんを処置する方法であって、請求項1から15のいずれか一項に記載の抗体若しくはその断片、請求項16若しくは17に記載のイムノコンジュゲート、又は請求項18に記載の医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 22】

がんが、LGR5陽性がんである、請求項20に記載の使用のための抗体若しくはその断片、又は請求項21に記載の方法。

10

【請求項 23】

がんがLGR5を過剰発現する、請求項22に記載の使用のための抗体若しくはその断片、又は請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

がんが、頭部又は頸部のがん、子宮がん、結腸直腸がん、胃がん、子宮内膜癌、食道がん、白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL)、肝臓がん、例えば肝細胞癌、又は膵臓がんから選択される、請求項20、22、若しくは23のいずれか一項に記載の使用のための抗体若しくはその断片、又は請求項21から23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

請求項1から15のいずれか一項に記載の抗体又はその断片をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

20

【請求項 26】

請求項26に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 27】

請求項25に記載の核酸又は請求項26に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 28】

生物試料中のLGR5を検出する方法であって、生物試料を、請求項1から15のいずれか一項に記載の抗体と、LGR5に対する抗体の結合を許容する条件下で接触させる工程、及び複合体が抗体とLGR5の間に形成されるか否かを検出する工程を含む方法。

30

【請求項 29】

生物試料が、頭部又は頸部のがん、子宮がん、結腸直腸がん、胃がん、子宮内膜癌、食道がん、白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL)、肝臓がん、例えば肝細胞癌又は膵臓がんから選択されるがん試料である、請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

LGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体のVHが、以下のCDR1、CDR2及びCDR3:

- a) 配列番号50のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号51のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号52のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- b) 配列番号2のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号3のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号4のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- c) 配列番号8のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号9のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号10のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- d) 配列番号14のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号15のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号16のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
- e) 配列番号20のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号2

40

50

g) 配列番号35のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号36のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号37のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

h) 配列番号41のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号42のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号43のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
i) 配列番号47のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号48のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号49のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
j) 配列番号59のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号60のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号61のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
k) 配列番号65のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号66のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号67のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
l) 配列番号71のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号72のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号73のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
m) 配列番号77のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号78のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号79のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列
を含む、LGR5に結合する、請求項30に記載の抗体又はその断片。

10

20

【請求項32】

配列番号96、80、82、84、86、88、90、92、94、98、100、102、104から選択されるVH配列を含む、請求項30又は31に記載の、LGR5に結合する抗体又はその断片。

【請求項33】

配列番号97、81、83、85、87、89、91、93、95、99、101、103、105から選択されるVL配列を含む、請求項30から32のいずれか一項に記載の、LGR5に結合する抗体又はその断片。

【請求項34】

請求項1から15又は30から33のいずれか一項に記載の抗体又は断片を含むキメラ抗原受容体。

30

【請求項35】

配列番号211、又はそれと少なくとも70%、80%若しくは90%相同性を有する配列を含むCAR。

【請求項36】

請求項34又は35に記載のCARを発現する細胞又は細胞集団。

【請求項37】

細胞が免疫細胞である、請求項36に記載の細胞又は細胞集団。

【請求項38】

免疫細胞が、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)、TCR発現細胞、樹状細胞、又はNK-T細胞、及び調節性T細胞からなる群から選択される、請求項37に記載の細胞又は細胞集団。

40

【請求項39】

細胞が、自己T細胞又は同種T細胞である、請求項36から38のいずれか一項に記載の細胞又は細胞集団。

【請求項40】

適応免疫療法に使用するための、請求項36から39のいずれか一項に記載の細胞又は細胞集団。

【請求項41】

請求項1から15又は30から33のいずれか一項に記載の抗体又は断片を含む、BiTE又はTriKE等の免疫細胞エンゲージャー。

50

【請求項 4 2】

配列番号 211、又はそれと少なくとも 70%、80%、若しくは 90% 相同性を有する配列を含む、請求項 41 に記載の BITE。

【請求項 4 3】

抗体を産生する方法であって、請求項 1 から 15 又は 30 から 33 のいずれか一項に記載の宿主細胞を、抗体をコードするポリヌクレオチドの発現にとって好適な条件下で培養する工程、及び抗体を単離する工程を含む方法。

【請求項 4 4】

ペプチドが、配列番号 1 の残基 22～37 からなる、エピトープを含む単離された合成又は組換えペプチド。

【請求項 4 5】

がんの進行を診断又は評価する方法であって、LGR5 の発現及び / 又は LGR5 のタンパク質レベルを評価する工程を含む方法。

【請求項 4 6】

発現レベルを閾値レベルと比較する工程を更に含む、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記閾値レベルが、正常組織における発現レベルである、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 4 8】

発現レベルが、閾値より上である場合に、処置を選択する工程を更に含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記処置を投与する工程を更に含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 5 0】

処置が、請求項 1 から 15 又は 30 から 33 のいずれか一項に記載の抗体又は抗体断片である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 5 1】

タンパク質レベルが、請求項 1 から 15 又は 30 から 33 のいずれか一項に記載の抗体又は抗体断片を使用して評価される、請求項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、LGR5 結合剤、特に LGR5 に結合する抗体又はその断片及び誘導体、並びに疾患、例えばがん及び炎症疾患の処置、及び LGR5 の検出におけるそのような結合剤の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

Wnt 経路は、後生動物における発達を調整し、成体組織において幹細胞機能を調節する細胞間シグナル伝達経路の中核の 1 つである。Wnt 経路の刺激は、細胞表面上のコグネート Wnt 受容体による細胞外リガンド、一般的に Wnt のエンゲージメント、及び細胞内のシグナルの伝搬によって始まる。その後の一連の分子相互作用は、生物学的出力を媒介するコンテキスト特異的転写プログラムの活性化により頂点に達する。

【0003】

成体幹細胞の自己再生及び増殖の維持における Wnt 経路の主な役割は、消化管、肝臓、乳腺、皮膚に沿った上皮幹細胞区画、及び成熟 B 細胞区画を含む広範囲の組織において機能的に確立されている。異常な標的遺伝子発現をもたらす Wnt 経路の変異による調節解除は、これらの組織及び他の複数の組織におけるがんの発生に関する重要な促進因子の 1 つである。Wnt 経路の発がん性形態は、結腸直腸がん (CRC) においてかなりの注目を集めており、この場合、経路の活性を調節解除する体細胞変異、最も一般的には腫瘍抑制子の adenomatous polyposis coli (APC) の不活化変異が、疾患病因における初期の広汎性の傷害である。他の上皮悪性疾患では、他の Wnt 経路調節構成要素にがん促進因子

10

20

30

40

50

変異スペクトラムが存在しうる;例えば、肝細胞癌の発生では、およそ半数の症例が、 β -カテニンの機能獲得変異又はAXIN1の不活化変異を獲得する。一部の上皮がんでは、異常な経路活性及び調節解除された標的遺伝子発現は、Wnt経路に変異がないにもかかわらず頻繁に認められる特徴であり、他の細胞シグナル伝達経路による収束性の調節の結果でありうる。

【0004】

がん細胞に固有の遺伝子発現シグネチャーを決定することは、予後判断疾患マーカーの同定を可能にし、治療で活用されうる分子脆弱性を決定するための基礎を提供した。1つの注目すべき試験は、体細胞不活化APCを有するCRC細胞株においてWnt標的遺伝子のコホートを同定した。ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質受容体5(LGR5)は、発がん性Wnt経路活性の遺伝子標的として同定され、その後の研究により、これはネズミ及びヒト腸上皮、胃上皮、毛包、胎児乳腺、発達途中の腎臓のネフロン及び再生中の肝臓における原型的な幹細胞マーカーとして確立された。

【0005】

LGR5は、LGR4及びLGR6を含む細胞表面GPCR様受容体ファミリーのメンバーである。LGR4は、全身の増殖性細胞区画において広く発現されるが、LGR6は、汗腺、毛包間表皮、及び爪幹細胞を含む特定の幹細胞区画に対してより限定的な発現を示す。3つのLGRファミリータンパク質は、R-スポンジンファミリータンパク質の共受容体であり、RNF43又はZNRF3は、他の共受容体である。RNF43及びZNRF3は、細胞表面会合Wnt受容体を下方調節するユビキチンリガーゼである。LGR結合R-スポンジンへの動員を通してWnt受容体からRNF43/ZNRF3を排除することは、細胞表面でのWnt経路受容体の定常状態レベル、及びWntリガンドによる刺激に対する経路活性の応答性を増加させるように作用する。

【0006】

LGR5は、経路の活性を調節解除する発がん性変異を有するがんにおけるその過剰発現により、多くの治療上の関心を集めている。数多くの研究が、隣接する正常な腸組織と比較して、CRC腫瘍及び腸腺癌においてLGR5発現が増加することを実証しており、LGR5が、腫瘍及び転移性細胞の浸潤先進部で細胞に会合していることを示している。CRCにおける予後判定マーカーとして、患者試料中のLGR5転写物レベルは、より短い全生存及び無病生存の低減に関連する。

【0007】

機能的には、CRC細胞株におけるLGR5充足性の研究は、増殖能、遊走、化学物質感受性、コロニー形成、及びin vivo移植能における役割に起因する。ヒトCRCオルガノイド異種移植片を使用する試験は、LGR5発現細胞区画が、その非発現相対物より増殖性であることを見出した。

【0008】

多くの他の悪性疾患:基底細胞癌、がん幹細胞マーカーCD133と共局在する上方調節されたLGR5が不良な予後を予測する膠芽腫、卵巣腫瘍、がん発達の際の高いLGR5発現が予後の悪化と相関するER陰性乳がん、及びB細胞悪性疾患が、LGR5過剰発現の増加によって特徴付けられる。

【0009】

まとめると、LGR5は、がんの発達において正の、反対する、又は機能的に重複する役割を有しうるが、細胞表面上のLGR5の過剰発現は、様々ながんのタイプの特徴であり、がん細胞を非悪性組織と識別するための分子手段を提供する。

【0010】

免疫療法は、有望な治療のクラスであり、その一部は、がん細胞上に過剰発現される細胞表面タンパク質の認識のための抗体結合の特異性及び有効性を制御する。実際に、抗体は、今日、最もよく売れているクラスの薬物の1つであり;売り上げ上位10の薬物のうち5つが抗体である。抗体の多用途性及び特異性は、多くのがんのタイプにおけるがん細胞の検出及び特異的殺滅のために広く使用されることが見出されている。治療抗体は、抗体

10

20

30

40

50

依存性細胞傷害性(ADCC)、抗体薬物コンジュゲート(ADC)、キメラ抗原受容体(CAR)、及び二特異性免疫細胞エンゲージャー(例えば、二特異性T細胞エンゲージャー、BiTE)のようなモダリティを含む。

【0011】

LGR5に対する抗体の臨床での有望性にも関わらず、ロバストな検証を受けたものは、あったとしてもごくわずかしかなく、正常組織及び疾患における相対的LGR5タンパク質レベルを決定する、細胞生物学を研究する、又は特定のがんタイプに対する免疫療法を開発する取り組みを妨害している。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0012】

【特許文献1】WO2009/047500号

【特許文献2】米国特許出願公開第2004043401号

【特許文献3】WO2019200007号

【特許文献4】WO2021108613号

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Walsh SJ、Omarjee S、Galloway WRJD、Kwan TTL、Sore H F、Parker JS、Hyvonen M、Carroll JS、Spring DR. A general approach for the site-selective modification of native proteins, enabling the generation of stable and functional antibody-drug conjugates. Chem Sci. 2019; 10(3):694~700頁

20

【非特許文献2】Green and Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、4th ed.、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. (2012)

【非特許文献3】Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic、Zhiqiang An (Editor)、Wiley、(2009)

【非特許文献4】Antibody Engineering、2nd Ed.、Vols 1 and 2、Ontermann and Dubel、eds.、Springer-Verlag、Heidelberg (2010)

【非特許文献5】Kabatら、(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382~391頁

30

【非特許文献6】Kabatら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、Fifth Edition、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242)

【非特許文献7】Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901~917頁(1987)

【非特許文献8】Altschulら(1990) J. Mol. Biol. 215: 405~410頁

【非特許文献9】Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444~2448頁

【非特許文献10】Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195~197頁

【非特許文献11】Altschulら(1997) Nucl. Acids Res. 25 3389~3402頁

【非特許文献12】Edgar (2004a) Nucleic Acids Res 32: 1792~7頁

【非特許文献13】Edgar (2004b) BMC Bioinformatics 5: 113頁

40

【非特許文献14】Gingrich J. How the Next Generation Antibody Drug Conjugates Expands Beyond Cytotoxic Payloads for Cancer Therapy-J. ADC. April 7、2020

【非特許文献15】Maderna and Leverett in "Recent Advances in the Development of New Auristatins: Structural Modifications and Application in Antibody Drug Conjugates"; Mol. Pharmaceuticals、2015、12 (6)、pp 1798~1812頁

【非特許文献16】Mendelsohnら、"Investigation of Hydrophilic Auristatin Derivatives for Use in Antibody Drug Conjugates". Bioconjugate Chem.、Article ASAP DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00530、Publication Date

50

(Web): January 6, 2017

【非特許文献17】Sadelainら、Curr Opin Immunol、21(2):215~223頁、2009

【非特許文献18】Sterner、R.C.、Sterner、R.M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. Blood Cancer J. 11、69、2021

【非特許文献19】Hung-Chang Chenら、LGR5 targeting molecules as therapeutic agents for multiple cancer types Preprint、BioRxiv、<https://doi.org/10.1101/2022.09.01.506182>.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明の目的は、疾患の処置、特に例えばがん及び炎症疾患の処置に使用するための抗体ベースの処置の必要性に取り組むことである。本発明の目的はまた、研究ツールとして使用するための、並びに疾患の処置及び診断に使用するためのLGR5に対する抗体を提供することでもある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、LGR5結合剤に関する。特に、本発明は、ヒト及びカニクイザル(cyno)LGR5に結合する抗体であって、LGR5(配列番号1)のアミノ酸22~37内のエピトープに結合する抗体、並びに疾患、例えばがん及び/又は炎症疾患を処置する関連する方法、及び生物試料中のLGR5の存在を同定する方法に関する。本発明は、LGR5のアミノ酸22~37内の特異的エピトープに対する抗体が、非常に特異的であり、高い親和性を有すること、及びLGR5発現がん細胞に迅速に取り込まれることを見出した、本発明者らの研究に一部基づいている。本発明者らは、本発明の抗体が、高いLGR5発現レベルを有する細胞を、より低いLGR5発現レベルを有する細胞から区別することができることを示した。したがって、本発明の抗体は、優れた研究ツールを表すと共に、がん、特にLGR5を発現するがんの処置等の治療において特に有用である

【0016】

一態様では、本発明は、ヒトLGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体が配列番号1のアミノ酸22~37内に位置するエピトープに結合する抗体又はその断片に関する。

【0017】

一態様では、本発明は、配列番号1のアミノ酸22~37を含むか又はからなるエピトープに結合する抗体又はその断片に関する。

【0018】

一実施形態では、抗体はヒトであるか、又はヒト化されている。一実施形態では、抗体はネズミ抗体である。

【0019】

一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体のV_Hが、以下のCDR1、CDR2、及びCDR3:

a) 配列番号2のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号3のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号4のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

b) 配列番号8のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号9のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号10のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

c) 配列番号14のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号15のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号16のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

d) 配列番号20のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号21のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号22のCDR3若し

10

20

30

40

50

くはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

e) 配列番号26のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号27のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号28のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

f) 配列番号32のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号33のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号34のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

g) 配列番号38のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号39のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号40のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

h) 配列番号44のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号45のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号46のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

i) 配列番号50のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号51のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号52のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

j) 配列番号56のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号57のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号58のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

k) 配列番号62のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号63のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号64のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

l) 配列番号68のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号69のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号70のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

m) 配列番号74のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号75のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号76のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列

を含む抗体又はその断片に関する。

【0020】

一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体のV_Lが、以下のCDR1、CDR2、及びCDR3:

a) 配列番号5のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号6のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号7のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

b) 配列番号11のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号12のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号13のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

c) 配列番号17のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号18のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号19のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

d) 配列番号23のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号24のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号25のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

e) 配列番号29のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号30のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号31のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

f) 配列番号35のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号36のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号37のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

g) 配列番号41のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号42のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号43のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
h) 配列番号47のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号48のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号49のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
i) 配列番号53のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号54のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号55のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
j) 配列番号59のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号60のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号61のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
k) 配列番号65のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号66のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号67のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
l) 配列番号71のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号72のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号73のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は
m) 配列番号77のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号78のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号79のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列
を含む抗体又はその断片に関する。

10

20

【0021】

一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体が、配列番号80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104から選択されるV_H配列を含む、抗体又はその断片に関する。

【0022】

一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体が、配列番号81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105から選択されるV_L配列を含む、抗体又はその断片に関する。

30

【0023】

一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体が:

- a) 配列番号80のV_H配列及び配列番号81のV_L配列;
 - b) 配列番号82のV_H配列及び配列番号83のV_L配列;
 - c) 配列番号84のV_H配列及び配列番号85のV_L配列;
 - d) 配列番号86のV_H配列及び配列番号87のV_L配列;
 - e) 配列番号88のV_H配列及び配列番号89のV_L配列;
 - f) 配列番号90のV_H配列及び配列番号91のV_L配列;
 - g) 配列番号92のV_H配列及び配列番号93のV_L配列;
 - h) 配列番号94のV_H配列及び配列番号95のV_L配列;
 - i) 配列番号96のV_H配列及び配列番号97のV_L配列;
 - j) 配列番号98のV_H配列及び配列番号99のV_L配列;
 - k) 配列番号100のV_H配列及び配列番号101のV_L配列
 - l) 配列番号102のV_H配列及び配列番号103のV_L配列;又は
 - m) 配列番号104のV_H配列及び配列番号105のV_L配列
- を含む抗体又は断片に関する。

40

【0024】

一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体が、Table 3(表3)に示されるクローンに関してV_H、C_H、V_L及びC_L配列番号106~156の組合せ、又はそれと少なくとも70%、80%、若しくは90%相同性を有する配列、又はTable 3(

50

表3)に示される抗体クローンの配列、又はそれと少なくとも70%、80%、若しくは90%相同性を有する配列を含む抗体又はその断片に関する。

【0025】

一実施形態では、抗体又はその断片は、ヒトLGR5に結合する。抗体又は断片はまた、カニクイザル(cyno)LGR5(アミノ酸22~37)における対応する配列に結合しうる。

【0026】

複数の実施形態では、抗体又はその断片は、モノクローナル抗体である。

【0027】

複数の実施形態では、抗体又はその断片は、ヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である。

【0028】

複数の実施形態では、抗体又はその断片は、およそ4nM未満のKdでLGR5に結合することが可能である。

【0029】

複数の実施形態では、断片は、Fab、scFv、又は単ドメイン抗体を含む。

【0030】

複数の実施形態では、抗体又はその断片は、毒素、酵素、放射性同位体、標識、治療分子、又は他の化学部分にコンジュゲートされている。

【0031】

別の態様では、本発明は、治療剤に連結された本発明に従う抗体又はその断片を含むイムノコンジュゲートに関する。

【0032】

治療剤は、毒素、酵素、放射性同位体、又は他の化学部分でありうる。

【0033】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される抗体若しくはその断片、又は本明細書に記載されるイムノコンジュゲート、及び薬学的担体を含む医薬組成物に関する。

【0034】

別の態様では、本発明は、がんを処置する方法であって、本明細書に記載される抗体若しくはその断片、本明細書に記載されるイムノコンジュゲート、又は本明細書に記載される医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法に関する。

【0035】

別の態様では、本発明は、がんの処置のための医薬の製造における、本明細書に記載される抗体若しくはその断片、本明細書に記載されるイムノコンジュゲート、又は本明細書に記載される医薬組成物の使用に関する。

【0036】

別の態様では、本発明は、医薬として使用するための、本明細書に記載される抗体若しくはその断片、本明細書に記載されるイムノコンジュゲート、又は本明細書に記載される医薬組成物に関する。

【0037】

別の態様では、本発明は、がんの処置に使用するための、本明細書に記載される抗体若しくはその断片、本明細書に記載されるイムノコンジュゲート、又は本明細書に記載される医薬組成物に関する。

【0038】

複数の実施形態では、がんは、LGR5陽性がんである。

【0039】

複数の実施形態では、がんはLGR5を過剰発現する。

【0040】

複数の実施形態では、がんは、頭部又は頸部のがん、子宮がん、結腸直腸がん、胃がん、子宮内膜癌、食道がん、白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL)、肝臓がん、例えば肝細胞癌、又は脾臓がんから選択される。

【0041】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される抗体又はその断片をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

【0042】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される核酸を含むベクターに関する。

【0043】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される核酸又は本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞に関する。

【0044】

宿主細胞は、細菌、ウイルス、又は哺乳動物細胞でありうる。

【0045】

なお別の態様では、本発明は、本明細書に記載される抗体を産生する方法であって、本明細書に記載される宿主細胞を、抗体をコードするポリヌクレオチドの発現にとって好適な条件下で培養すること、及び抗体を単離することを含む方法に関する。

【0046】

別の態様では、本発明は、生物試料中のLGR5を検出する方法であって、生物試料を、本明細書に記載される抗体と、抗体のLGR5に対する結合を許容する条件下で接触させること、及び抗体とLGR5の間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む方法に関する。

【0047】

複数の実施形態では、生物試料は、頭部又は頸部のがん、子宮がん、結腸直腸がん、胃がん、子宮内膜癌、食道がん、白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL)、肝臓がん、例えば肝細胞癌、又は膵臓がんから選択されるがん試料でありうる。

【0048】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される抗体、本明細書に記載されるイムノコンジュゲートを、任意選択で使用説明書と共に、又は本明細書に記載される医薬組成物を含むキットに関する。

【0049】

別の態様では、本発明は、結合剤、例えば本明細書に記載される抗体と本質的に同じエピトープに結合する抗体若しくはその断片、又はヒト若しくはカニクイザルLGR5に対する結合に関して本明細書に提供される抗体の1つと競合する抗体若しくはその断片に関する。

【0050】

別の態様では、本発明は、エピトープを含む単離された合成又は組換えペプチドであって、ペプチドが配列番号1の残基22～37からなる、単離された合成又は組換えペプチドに関する。

【0051】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される抗体又はその断片を含むキメラ抗原受容体(CAR)に関する。

【0052】

別の態様では、本発明は、配列番号211、又はそれと少なくとも70%、80%、若しくは90%相同性を有する配列を含むCARに関する。一実施形態では、CARは、クローン2、4のCDRを含む。

【0053】

別の態様では、本発明は、そのようなCARを発現する細胞又は細胞集団に関する。

【0054】

別の態様では、本発明は、適応免疫療法に使用するためのそのような細胞又は細胞集団に関する。

【0055】

別の態様では、本発明は、そのような細胞又は細胞集団を投与することを含む、適応免疫療法のための方法に関する。

10

20

30

40

50

【0056】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される抗体又は断片を含む、免疫細胞エンゲージャー、例えば二特異性T細胞エンゲージャー、すなわちBiTE、又は三特異性キラーエンゲージャー、TriKEに関する。一実施形態では、BiTE又はTriKEは、クローン2.4のCDRを含む。

【0057】

別の態様では、本発明は、配列番号211、又はそれと少なくとも70%、80%、若しくは90%相同性を有する配列を含むBiTEに関する。

【0058】

別の態様では、本発明は、エピトープを含む単離された合成又は組換えペプチドであって、ペプチドが配列番号1の残基22~37からなる単離された合成又は組換えペプチドに関する。

【0059】

別の態様では、本発明は、がんの進行を診断又は評価する方法であって、LGR5の発現を評価すること、及び/又はLGR5のタンパク質レベルを評価することを含む方法に関する。

【0060】

本発明を、以下の非限定的な図面において更に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】新規LGR5特異的抗体の検証を示す図である。A. LGRファミリートランスジェンを発現するHEK293T溶解物を、 α -LGR5ハイブリドーマクローン2 (Table 1(表1)、抗体2)、並びにHA及びピンクリンに対して作製した抗体によってプロービングしたウェスタンブロット分析。B. 100アミノ酸の抗原配列の断片を使用する α -LGR5ハイブリドーマクローン2のエピトープマッピングは、ヒトLGR5 (アミノ酸22~37)のN末端で構成される断片1Aに対するエピトープを追跡する。C. 赤色で蛍光標識された(Alexa647) FL- α -LGR5を使用する、eGFP融合ヒトLGR4-6トランスジェン及びカニクイザルLGR5(緑色)を発現するHEK293T細胞の免疫蛍光。D. 検出のためにFL- α -LGR5を使用するヒトLGR4及びLGR5トランスジェンを発現するHEK293T細胞のフローサイトメトリー分析。E. FL- α -LGR5を、断片1Aペプチドの超化学量論量とブレインキューベートすると、LGR5-eGFP発現細胞におけるシグナルを抑止する。

【図2-1】図2Aは、試験において生成されたLGR5抗体の特異性を示す図である。A. α -LGR5の免疫化及び生成のために使用したヒトLGR5抗原のアミノ酸配列。配列を、RADディスプレイシステムにおいて使用した断片によってアノテートして、 α -LGR5エピトープを断片1Aに局在化させる(図1Aを参照されたい)。以下-LGR5(構造座標は、(Pengら)から得た)の細胞外ドメイン内の抗原領域(赤色)を示す、エピトープマッピング及び構造/位相幾何学的モデルのために使用した断片のアミノ酸配列のアノテーション。図2Bは、試験において生成されたLGR5抗体の特異性を示す図である。B. 抗体検証のために使用したLGRファミリートランスジェニック構築物の立体配置。発現されたLGRタンパク質は全て、共通のN末端ヘマグルチニン(HA)タグ及びC末端でバソプレッシンV2受容体C末端テールの後にeGFPが続く融合体を含有する。図2Cは、試験において生成されたLGR5抗体の特異性を示す図である。C. 指摘したように、 α -LGR5ハイブリドーマクローン1、3、及び4、並びにHA及びピンクリンに対する抗体によってプロービングした、ヒトLGRファミリートランスジェンを発現するHEK293T溶解物のウェスタンブロット分析。免疫反応性もまた、ハイブリドーマクローン12 (データは示していない)について観察した。ウェスタンブロットを、他の13のハイブリドーマクローンについてプロービングした場合には、特異的免疫反応性は観察されなかった。図2Dは、試験において生成されたLGR5抗体の特異性を示す図である。D. 相補性決定領域(CDR)内での α -LGR5ハイブリドーマクローンにおける配列の保存。クローン2~4に関して α -LGR5クローン1と比較して保存されたアミノ酸を破線で表す。アミノ酸の差を黒丸で示す。図2E

10

20

30

40

50

は、試験において生成されたLGR5抗体の特異性を示す図である。E. 図2Aで描写した断片を使用した、図1Bのような、 α -LGR5ハイブリドーマクローン1、3、及び4に関するエピトープマッピング。図2Fは、試験において生成されたLGR5抗体の特異性を示す図である。F. 断片1Aに対応するヒトLGR5のN末端の15アミノ酸と、他のLGRファミリーメンバーの対応する領域との配列アライメント。配列アライメントは、枠で囲んだ3つの不変のシステイン残基に基づいた。カニクイザルの配列におけるアミノ酸の差は、赤色である。

【図2-2】図2Gは、試験において生成されたLGR5抗体の特異性を示す図である。G. Wnt3Aリガンド、R-スポンジン、及びIgG1又は α -LGR5のいずれかのR-スポンジンに対するおよそ10倍モル過剰量レベルによって処置したHEK293T細胞に関するWnt経路レポーターアッセイ(SuperTopFlashアッセイ)。ns、両側のt-検定によって決定した場合に有意差なし。図2Hは、試験において生成されたLGR5抗体の特異性を示す図である。H. 図1Cのように、トランスジェニックLGR4又はLGR5を発現するHEK293T細胞に関する、Fl- α -LGR5を使用する免疫蛍光。

【図3】LGR5発現レベルに関する健康な組織及びがんの調査を示す図である。A. Cambridge ovarian cancer TMAからの27の卵管試料からの正常組織(FT)、28の卵巣がん症例(OvC)、及び14の腹膜がん症例(OmC)におけるLGR5発現レベルの定量。卵巣がん症例(OvC)及び腹膜がん症例(OmC)を、卵管(FT)試料中のLGR5タンパク質レベルと比較する両側のt-検定を使用して計算した有意水準。B. 正常な脳組織(脳)、低悪性度神経膠腫(LGG)及び膠芽腫(GBB)の各々の5つの試料におけるCambridge Brain cancer TMAからの試料中のLGR5発現レベルの定量。低悪性度神経膠腫(LGG)又は膠芽腫(GBM)症例のいずれかを正常な脳組織と比較する両側のt-検定を使用して計算した有意水準。

【図4-1】図4Aは、がんにおけるLGR5発現分析を示す図である。A. 正規化した($\log_2$ 中央値中央化)LGR5遺伝子発現レベルを、各がんのタイプに関して中央値LGR5遺伝子発現(黒い点)順に示す。灰色の水平線は、全てのがん試料に対する中央値のLGR5発現を示す。中央値(灰色の線)より低い又は高いLGR5発現を有する試料をそれぞれ、明るい赤色又は暗い赤色で示す。試料の70%より多くが中央値LGR5発現より高かったがんのタイプを、「高LGR5腫瘍」として定義し、太字で印刷する。図4Bは、がんにおけるLGR5発現分析を示す図である。B. 高LGR5腫瘍に関して、利用可能な場合の、腫瘍(赤色)対正常組織(灰色)におけるLGR5遺伝子発現の比較。灰色の水平線は、全ての汎がん腫瘍に対する中央値LGR5発現を示す。がん対健康な組織の差の有意水準(ウィルコクソン検定)を示す: ** $p \leq 0.01$ 、*** $p \leq 0.001$ 、**** $p \leq 0.0001$ 。

【図4-2】図4Cは、がんにおけるLGR5発現分析を示す図である。C. 卵管組織(左のパネルセット)、卵巣がん(中央のパネルセット)、及び腹膜がん(右のパネルセット)の代表的な画像。卵管試料セットの1つに示される矢印は、LGR5陽性細胞内斑点を含有する上皮細胞の非常にまれな例を示す。挿入図の白い数字は、Cambridge ovarian cancer TMAの採点と整合する相対的に対応するLGR5発現レベルを指す。図4Dは、がんにおけるLGR5発現分析を示す図である。D. 卵管、卵巣がん、及び腹膜がん試料セットにおける β -カテニンの相対的発現レベル。卵管(FT)と、卵巣がん(OvC)又は腹膜がん(OmC)のいずれかの発現データセットの間の有意水準を、両側のt-検定によって計算した。

【図4-3】図4Eは、がんにおけるLGR5発現分析を示す図である。E. 脳組織(左のパネルセット)、GBM(中央のパネルセット)、及びLGG(右のパネルセット)の代表的な画像。挿入図の白い数字は、TMA採点のために使用した基準に基づくLGR5発現レベルを指す。図4Fは、がんにおけるLGR5発現分析を示す図である。F. 健康なドナーPBMCからのB細胞、CD4+ T細胞、及びCD8+ T細胞におけるLGR5タンパク質発現の定量。 α -LGR5ブロッキングペプチドの存在下又は非存在下で、細胞のLGR5発現(平均蛍光強度又は% LGR5発現細胞)に有意差はなかった。

【図5】NALM6及びLoVo細胞株におけるLGR5発現の特徴付けを示す図である。ハウスキーピング遺伝子としてTBPを使用するRT-PCRによって測定したLoVo及びSW480細胞株におけるLGR5転写物レベル。B. 5つのCRC細胞株からの溶解物のLGR5ウェス

タンブロット分析。ピンクリンに対して作製した抗体を、ローディング対照として使用した。C. Fl- α -LGR5(赤色のプロット)又は断片1Aペプチド(黒色のプロット)とプレインキュベートした抗体によるLoVo及びSW480細胞のフローサイトメトリー分析。D. ハウスキーピング遺伝子としてTBPを使用するRT-PCRによって測定したNALM6、REH、及び697 pre-B-ALL細胞株における相対的LGR5転写物レベル。E. pre-B-ALL細胞株からの溶解物におけるLGR5タンパク質レベルのウェスタンブロット分析。F. フローサイトメトリーによって分析した3つのpre-B-ALL細胞株、697、REH、及びNALM6におけるLGR5タンパク質レベル。

【図6】LGR5の細胞内局在を示す図である。A. Fl- α -LGR5による免疫蛍光を使用するNALM6及びLoVo細胞株におけるLGR5の検出。B. Fl- α -LGR5又はLAMP1に対して作製した抗体を使用する、LoVo細胞におけるLGR5又はLAMP1のいずれかによって修飾した斑点の共免疫蛍光検出。

【図7-1】図7Aは、細胞表面LGR5の迅速な内部移行を示す図である。蛍光タグによって修飾したネズミクローン2を使用した(Tables 1(表1)及びTable 2(表2)におけるクローン2を参照されたい)。A. LGR5-eGFP発現HEK293T細胞によるFl- α -LGR5内部移行の時間経過。右上のパネル-拡大画像は、5分後にFl- α -LGR5と細胞辺縁部との会合を示し、その後30分以内に内部LGR5-eGFP会合斑点との共局在を示す(右中央のパネル)。右下のパネル-LGR4-eGFPを発現する細胞に関するFl- α -LGR5の会合又は内部移行なし。スケールバー、10 μ M。図7Bは、細胞表面LGR5の迅速な内部移行を示す図である。蛍光タグによって修飾したネズミクローン2を使用した(Tables 1(表1)及びTable 2(表2)におけるクローン2を参照されたい)。B. 免疫蛍光によって検出したNALM6細胞によるFl- α -LGR5v4(赤色)内部移行の時間経過。複数の時点で、固定した細胞を、蛍光(Alexa488)ファロイジン(緑色)、及びHoechst(青色)によってプロービングした。下のパネル、アイソタイプ対照としてFl- α -LGR5v6(赤色)によって置換したFl- α -LGR5v4。右下のパネルでは、蛍光Alexa488ファロイジンからのシグナルは省略されている。スケールバー、10 μ M。図7Cは、細胞表面LGR5の迅速な内部移行を示す図である。蛍光タグによって修飾したネズミクローン2を使用した(Tables 1(表1)及びTable 2(表2)におけるクローン2を参照されたい)。C. LoVo細胞によるFl- α -LGR5(赤色)内部移行の時間経過。F-アクチン及び核をそれぞれ、Alexa488ファロイジン及びHoechstプローブによって可視化した。右の2つのパネルに関して、Fl- α -LGR5を、断片1Aとプレインキュベートした。一番右の画像では、Alexa488ファロイジンからのシグナルは省略されている。スケールバー、10 μ M。図7Dは、細胞表面LGR5の迅速な内部移行を示す図である。蛍光タグによって修飾したネズミクローン2を使用した(Tables 1(表1)及びTable 2(表2)におけるクローン2を参照されたい)。D. 4°C(上のパネル)又は37°C(下のパネル)で1時間インキュベーション後のNALM6細胞とのFl- α -LGR5(赤色のヒストグラム)又は蛍光アイソタイプ対照(灰色のヒストグラム)の会合のフローサイトメトリーによる検出。数字は、検出可能な蛍光を有する細胞のパーセンテージを表す。図7Eは、細胞表面LGR5の迅速な内部移行を示す図である。蛍光タグによって修飾したネズミクローン2を使用した(Tables 1(表1)及びTable 2(表2)におけるクローン2を参照されたい)。E. フローサイトメトリーによってモニターして検出した、c18対照又はc20 CRISPR/Cas9-LGR5標的化LoVo細胞株によるFl- α -LGR5の内部移行。

【図7-2】図7Fは、細胞表面LGR5の迅速な内部移行を示す図である。蛍光タグによって修飾したネズミクローン2を使用した(Tables 1(表1)及びTable 2(表2)におけるクローン2を参照されたい)。F. Fl-IgG1(オレンジ色)、及びFl- α -HER2(青色)を、いずれかのFl- α -LGR5v4(赤色)と60分間インキュベーション後のLoVo及びNALM6細胞のフローサイトメトリー分析。図7Gは、細胞表面LGR5の迅速な内部移行を示す図である。蛍光タグによって修飾したネズミクローン2を使用した(Tables 1(表1)及びTable 2(表2)におけるクローン2を参照されたい)。G. LoVo細胞とFl- α -LGR5v4及びFl- α -HER2の会合の時間経過。パーセント会合を、視野あたり、表記の時点でFl- α -HER2(明るい灰色の棒グラフ)又はFl- α -LGR5v4(暗い灰色の棒グラフ)からの蛍光シグナルに

関連した細胞の分画として採点した。データポイントは、各々が、2つの独立した実験に対して80~200個の細胞を測定する、6つの個々の採点実験の平均値である。エラーバーは、採点実験におけるSDを示す。LoVo細胞と、Fl- α -LGR5v4又はFl- α -HER2会合の間に、又はいずれの時点の間でも有意差は認められなかった。図7Hは、細胞表面LGR5の迅速な内部移行を示す図である。蛍光タグによって修飾したネズミクローン2を使用した(Tables 1(表1)及びTable 2(表2)におけるクローン2を参照されたい)。H. LoVo細胞によるFl- α -LGR5v4及びFl- α -HER2のパーセント内部移行の時間経過。内部移行データは、2つの独立した実験に対して細胞80~200個の6つの実験の計数を採点する。エラーバーは、SDを示す。Fl- α -LGR5v4又はFl- α -HER2の間の内部移行の有意差は、5~180分の時点で両側のt-検定によって決定した場合に、 $*p < 0.001$ の有意水準である。図7Iは、細胞表面LGR5の迅速な内部移行を示す図である。蛍光タグによって修飾したネズミクローン2を使用した(Tables 1(表1)及びTable 2(表2)におけるクローン2を参照されたい)。I. LoVo細胞における内部移行したFl- α -LGR5v4斑点及び様々な細胞内構成要素のマーカー及びIQGAP1の間の共局在。共局在データは、内部移行したFl- α -LGR5v4の画像における斑点の自動採点及び間接的免疫蛍光によって検出された細胞内マーカーから導出され、2つの個々の実験に対して少なくとも200個の細胞の複合である。右-LoVo細胞における内部移行したFl- α -LGR5v4と、特異的細胞内小胞マーカーとの分画の会合を示す車輪グラフである。図7Jは、細胞表面LGR5の迅速な内部移行を示す図である。蛍光タグによって修飾したネズミクローン2を使用した(Tables 1(表1)及びTable 2(表2)におけるクローン2を参照されたい)。J. 上記のように採点した、NALM6細胞における内部移行したFl- α -LGR5斑点と、様々な細胞内区画のマーカー及びIQGAP1の間の共局在。右-NALM6細胞における内部移行したFl- α -LGR5v4と、特異的細胞内小胞マーカーとの分画の会合を示す車輪グラフである。

10

20

【図8】LGR5のエクソン1のCRISPR/Cas9標的化を示す図である。LGR5座エクソン1のシーケンシングは、クローン20(c20)が、シグナルペプチドのコード領域の7アミノ酸のインフレーム欠失を有することを示す。

【図9】 α -LGR5-ADCによるLGR5発現細胞株のin vitro殺滅を示す図である。NALM6又はREH細胞株を、 α -LGR5-ADCによって処置し、細胞の生存を72時間後に決定した。細胞殺滅データを、非線形EC50シフトモデルにフィットさせてそれぞれ、EC50値4及び10nMを生じた。対照として、NALM6細胞を、切断不能 α -LGR5-ADC^{NC}によって処置し、無処置対照と比較して72時間後に細胞数を低減させなかった。B. LoVo細胞を、非細胞殺滅対照として α -LGR5-ADC又は α -LGR5-ADC^{NC}のいずれかによって処置した。 α -LGR5-ADC媒介細胞殺滅データのモデリングは、EC50 9nMを生じた。この図では、MMAEコンジュゲートによって修飾したネズミクローン2を使用する。配列をTables 1(表1)及びTable 2(表2)に示す。

30

【図10】試験に使用したIgG及び α -LGR5に基づくADCを支持するフォーマット及び化学を示す図である(Walsh SJ、Omarjee S、Galloway WRJD、Kwan TTL、Sore HF、Parker JS、Hyvonen M、Carroll JS、Spring DR. A general approach for the site-selective modification of native proteins, enabling the generation of stable及びfunctional antibody-drug conjugates. Chem Sci. 2019;10(3):694~700頁)。

40

【図11】ネズミ α -LGR5-ADCによるNALM6腫瘍のin vivo標的化を示す図である。A. 実験設計。B. α -LGR5-ADC又はIgG1-ADC対照のいずれかによる処置の過程においてIVISイメージングによって測定したNALM6腫瘍負荷。 $*p < 0.01$ 、 $**p < 0.001$ 。C. 実験のエンドポイントでの対照及び α -LGR5-ADC処置マウスの背面図でのIVIS画像。D. 実験のエンドポイントでの脾臓質量及び脾臓におけるNALM6腫瘍細胞の絶対数。E. α -LGR5-ADC又はIgG1-ADC対照によって処置したマウスにおける血液1グラムあたりのNALM6細胞の相対数。F. 2つの処置群からのマウス的大腿骨から抽出したNALM6細胞の数。(D~F) $*p < 0.001$ 。この図では、MMAEコンジュゲートによって修飾したネズミクローン2を使用する。配列をTables 1(表1)及びTable 2(表2)に示す。

50

【図12】NALM6腫瘍の α -LGR5-ADC標的化を示す図である。A. IgG1-ADC(上の列)及び α -LGR5-ADC(下の列)処置マウスの組織切片のH&E染色。肉眼での形態学の差は観察されず、 $\times 20$ 倍のより多くのNALM6細胞が観察された脾臓を除き、実験群の間の組織におけるNALM6細胞の数にいかなる差もなかった(挿入図を参照されたい)。B. Ki67抗原及び β -カテニンに対する抗体を使用したIgG1-ADC(上の列)及び α -LGR5-ADC処置(下の列)マウスからの腸上皮切片の免疫蛍光。腸上皮単層の肉眼での形態学の差は観察されなかった。C. IgG1-ADC(上の列)及び α -LGR5-ADC処置マウスからの腸上皮切片の細胞間接触に近接する細胞辺縁部での β -カテニン染色(左のグラフ)、並びに共焦点区画あたりのKi67陽性核の平均数の評価。

【図13】ヒト化 α -LGR5v4-ADCによるNALM6腫瘍の*in vivo*標的化を示す図である。A. 実験設計。B. α -LGR5v4-ADC又は α -LGR5v4-ADC対照のいずれかによる処置の過程においてIVISイメージングによって測定した背面図でのNALM6腫瘍負荷。 $*p < 0.01$ 、 $**p < 0.001$ 。C. α -LGR5v4-ADC又は α -LGR5v6-ADC対照によって処置したマウスの、実験エンドポイントでのIVIS画像。D. 実験エンドポイントでの脾臓質量及び脾臓におけるNALM6細胞の絶対数。 $*p < 0.001$ 。E. α -LGR5v4-ADC及び α -LGR5v6-ADC対照によって処置したマウスの血液中のNALM6細胞数。F. α -LGR5v4-ADC及び α -LGR5v6-ADC処置マウスの、実験エンドポイントでの骨髓におけるNALM6細胞数。(D~F) $*p < 0.001$ 。

【図14-1】図14Aは、 α -LGR5v4が、NALM6腫瘍を標的化するヒト及びcynoLGR5及び α -LGR5v4-ADCに特異的に結合することを示す図である。A. HAに対する抗体及びヒト化抗体 α -LGR5v4及び α -LGR5v6を使用する、トランスジェニックネズミ、ヒト、及びcynoLGR5発現HEK293T細胞からの溶解物のウェスタンブロット分析。ヒト化 α -LGR5v6は、LGR5に対する全ての結合を失ったことに注意されたい。図14Bは、 α -LGR5v4が、NALM6腫瘍を標的化するヒト及びcynoLGR5及び α -LGR5v4-ADCに特異的に結合することを示す図である。B. α -LGR5v4抗体(赤色)、Alexa488共役ファロイジン F-アクチンプローブをeGFP蛍光イメージングと共に使用する、ヒト及びネズミLGRファミリー発現HEK293T細胞の間接的免疫蛍光分析。下の列の画像では、LGR5発現HEK293T細胞を α -LGR5v6によって染色した。

【図14-2】図14Cは、 α -LGR5v4が、NALM6腫瘍を標的化するヒト及びcynoLGR5及び α -LGR5v4-ADCに特異的に結合することを示す図である。C. α -LGR5v6-ADC(上の列)及び α -LGR5v4-ADC(下の列)処置マウスからの組織切片のH&E染色。肉眼での形態学の差は観察されず、 $\times 20$ 倍のより多くのNALM6細胞が観察された脾臓を除き、実験群の間の組織におけるNALM6細胞の数にいかなる差も検出されなかった(挿入図を参照されたい)。図14Dは、 α -LGR5v4が、NALM6腫瘍を標的化するヒト及びcynoLGR5及び α -LGR5v4-ADCに特異的に結合することを示す図である。D. Ki67抗原及び β -カテニンに対する抗体を使用する、 α -LGR5v6-ADC(上の列)及び α -LGR5v4-ADC(下の列)処置マウスからの腸上皮切片の免疫蛍光。腸上皮単層の肉眼での形態学の差は観察されなかった。図14Eは、 α -LGR5v4が、NALM6腫瘍を標的化するヒト及びcynoLGR5及び α -LGR5v4-ADCに特異的に結合することを示す図である。E. IgG1-ADC(上の列)及び α -LGR5-ADC処置マウスからの腸上皮切片の細胞間接触に近接する細胞辺縁部での β -カテニン染色(左のグラフ)、並びに共焦点区画あたりのKi67陽性核の平均数の評価。(C~E)実験を図13に示す。

【図15-1】CARの細胞殺滅を示す図である。 α -LGR5-CAR細胞殺滅。HEK293細胞に、ヒト(A)及びカニクイザル(B)LGR5をトランスフェクトして、殺滅アッセイにおける標的細胞とした。(C) α -LGR5 CAR NK92細胞は、腫瘍標的細胞と有効なシナプスを形成する。(D)NALM6、REH、及び647 ALL腫瘍細胞株の、表記のエフェクター:標的比での5時間での腫瘍細胞殺滅。

【図15-2】CARの細胞殺滅を示す図である。 α -LGR5-CAR細胞殺滅。HEK293細胞に、ヒト(A)及びカニクイザル(B)LGR5をトランスフェクトして、殺滅アッセイにおける標的細胞とした。(C) α -LGR5 CAR NK92細胞は、腫瘍標的細胞と有効なシナプス

10

20

30

40

50

を形成する。(D)NALM6、REH、及び647 ALL腫瘍細胞株の、表記のエフェクター:標的比での5時間での腫瘍細胞殺滅。

【図16-1】図16Aは、 α -LGR5ニ特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)は、活性化T細胞であり、効率的な腫瘍細胞破壊をもたらすことを示す図である。(A)PBMCを、 α -LGR5 scFv対照、 α -LGR5 LC、又はCL BiTEの存在下でそれぞれ、NALM6腫瘍細胞とインキュベートした。CD4⁺及びCD8⁺ T細胞活性化を、24時間後のCD69及びCD25発現のフローサイトメトリー分析によって決定した。

【図16-2】図16Bは、 α -LGR5ニ特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)は、活性化T細胞であり、効率的な腫瘍細胞破壊をもたらすことを示す図である。(B)NALM6腫瘍細胞を、 α -LGR5 scFv対照、 α -LGR5 LC、又はCL BiTEの存在下でそれぞれ、健康なドナーPBMCから生成した細胞傷害性CD8⁺ T細胞と共培養した。腫瘍細胞の殺滅を、5時間後にエフェクター対標的比5:1で評価した。

【図17】LGR5発現の分析を示す図である。A. NALM6(ALL)、LoVo(CRC)、及びHepG2 (HCC)ヒト細胞株におけるLGR5 mRNA発現。RNAを細胞株から複数の時点で抽出し、Taqmanプローブを使用してLGR5のqRT-PCR分析に供した。TBPは、ハウスキーピング遺伝子として作用した。B. HepG2細胞におけるLGR5タンパク質発現レベルのウェスタンブロット分析。HepG2細胞を溶解し、ウェルあたりタンパク質40 μ gをロードした。膜を、 α -LGR5抗体(19-24-1、(1:1000)、4°C、一晚)と共にインキュベートした後、ヤギ抗マウスIgG-HRP ((1:15000)、RT、1時間)と共にインキュベートした。アクチンはローディング対照として作用する。

【図18】異なるレベルのLGR5を発現するCRCオルガノイド細胞株の、 α -LGR5-ADCによる処置に対する感受性を示す図である。A. LGR5に対するヒト化抗体を使用するCRCオルガノイド株1及び2の免疫蛍光イメージングを使用して、LGR5タンパク質の相対レベルを定量した。LGR5タンパク質発現は、CRCオルガノイド株1において検出可能であり、CRCオルガノイド2よりおよそ4倍高かった。B. α -LGR5-ADC処置後24時間でのCRCオルガノイド株1及び2における切断型カスパーゼ3の存在を、 α -LGR5-ADCによる処置に応答してアポトーシスを受ける細胞の代用として使用した。CRCオルガノイド株1は、CRCオルガノイド株2より、 α -LGR5-ADCによる処置に対する感受性が低かった;オルガノイド細胞アポトーシスの推定のEC50レベルはそれぞれ、5nM及び100nMであった。

【図19】 α -LGR5-BiTEは、LGR5⁺腫瘍細胞の存在下でヒトCD4⁺及びCD8⁺ T細胞の特異的活性化をもたらし、in vitroで効率的な腫瘍細胞破壊を誘導することを示す図である。A. 24時間後にフローサイトメトリーによってCD25及びCD69の組合せ発現を有するパーセント細胞として決定した、NALM6腫瘍細胞の存在下又は非存在下で健康なドナーPBMC中のCD4⁺ T細胞(左のパネル)及びCD8⁺ T細胞(右のパネル)のCL(CD3/LGR5)-及びLC(LGR5/CD3)-BiTE媒介活性化。分子を添加していない対照(ctrl)、scFvは、 α -LGR5^{scFv}断片による処置を指す。エラーバーは、異なる健康なドナーPBMCを使用する3つの独立した活性化アッセイのSDを表す。scFv及びLC又はCL BiTE分子のいずれかの添加の間のT細胞活性化の有意差を、両側のt検定によって決定し、**p < 0.001の有意水準で示した。B. α -LGR5-BiTEは、in vitroで効率的な腫瘍細胞破壊をもたらす。scFv又はLC又はCL BiTEの非存在下(ctrl)又は添加の5時間後の細胞傷害性CD8⁺ T細胞のNALM6標的細胞殺滅を示す。示されるデータは、3人のドナーからのデータであり、エラーバーは、SDを表す。エフェクター対標的細胞比はそれぞれ、10:1及び5:1である。CD8⁺ T細胞殺滅の有意差を、両側のt検定によって*p < 0.005及び**p < 0.001の有意水準で決定した。

【図20】 α -LGR5-CAR NK92細胞は、LGR5を過剰発現するHEK293細胞を効率的に殺滅し、LGR5^{HIGH}発現腫瘍細胞を優先的に殺滅することを示す図である。A. α -LGR5-CAR NK92細胞は、LGR5を過剰発現するHEK293細胞を効率的に殺滅する。NK92細胞、又は α -LGR5-CAR-CD28-若しくは α -LGR5-CAR-4-1BBを発現するNK92細胞の細胞殺滅活性。hLGR5-eGFP過剰発現HEK293T標的細胞を、エフェクターNK9

2細胞と共にエフェクター対標的比2.5:1及び10:1でそれぞれ、5時間又は9時間インキュベートした。エラーバーは、3回の独立した実験のSDを表す。標的細胞殺滅の有意差を、両側のt検定によって決定し、* $p < 0.05$ 及び** $p < 0.001$ で示す。5:1又は10:1の細胞比の間の標的細胞殺滅に有意差はなかった。B. α -LGR5-CAR NK92細胞は、LGR5^{HIGH}発現腫瘍細胞を優先的に殺滅する。NK92細胞、又は α -LGR5-CAR-CD28若しくは α -LGR5-CAR-4-1BB CARを発現するNK92細胞をエフェクター対標的比2.5:1及び10:1で12時間インキュベーション後の(それぞれ、上及び下のパネル)NALM6(左のパネル、LGR5^{HIGH})及びREH(右のパネル、LGR5^{LOW})標的細胞殺滅活性。エラーバーは、3回の独立した実験のSDを表す。標的細胞殺滅の有意差を、両側のt検定によって、* $p < 0.05$ 及び** $p < 0.01$ で決定した。

10

【図21】 α -LGR5-CAR NK92細胞は、HepG2腫瘍細胞を効率的に殺滅することを示す図である。HepG2細胞を、96ウェルプレートにおいてアッセイ前24時間、事前に播種した。NK92細胞及び α -LGR5-CAR NK92細胞を、標的細胞に5:1の比で添加した。細胞死を、Apotracker Greenを使用して評価し、Incucyte SX5 (Sartorius)を使用して15時間モニターした。エラーバーは、6つの異なるウェルのSEMを表す。

【図22】 α -LGR5-CAR NK92細胞が、*in vivo*でNALM6腫瘍を殺滅することを示す図である。1×10⁶個のNALM6細胞をNSGマウスに*i.v.*注射した;5、7、及び10日目に、マウスに、10×10⁶個の親NK92細胞又は α -LGR5-CAR NK92細胞を*i.v.*注射した。マウスを、12日目に得て、脾臓中のNalm6細胞を計数した。(NK92細胞処置マウスのNALM6計数の平均値:20664、 α -LGR5-CAR NK92細胞処置NSGマウスの平均値:11630)。グラブス検定後に1つの外れ値を除去した。

20

【図23】 α -LGR5-CAR T細胞が、HepG2腫瘍細胞を効率的に殺滅することを示す図である。HepG2細胞を、96ウェルプレートにおいてアッセイ前24時間、事前に播種した。非形質導入T細胞及び α -LGR5-CAR T細胞を、5:1(A)又は10:1(B)の比で標的細胞に添加した。細胞死を、Apotracker Greenを使用して評価し、Incucyte SX5 (Sartorius)を使用して15時間モニターした。エラーバーは、6個の異なるウェルのSEMを表す。

【図24】 α -LGR5-CAR T細胞がLoVo腫瘍細胞を効率的に殺滅することを示す図である。LoVo細胞を、96ウェルプレートにおいてアッセイ前24時間、事前に播種した。非形質導入T細胞及び α -LGR5-CAR T細胞を、5:1(A)又は10:1(B)の比で標的細胞に添加した。細胞死を、Apotracker Greenを使用して評価し、Incucyte SX5 (Sartorius)を使用して15時間モニターした。エラーバーは、6個の異なるウェルのSEMを表す。

30

【図25】 α -LGR5-CAR T細胞は、*in vivo*でNALM6腫瘍細胞を殺滅する。1×10⁶個のNALM6-LucYFP細胞を、NSGマウスに*i.v.*注射した。4及び7日目に、マウスに2.5×10⁶個の非形質導入T細胞又は α -LGR5-CAR T細胞又は1×10⁶個の α CD19-CAR T細胞をそれぞれ与えた。A. 10日目のIVISイメージング。非形質導入T細胞(陰性対照)、 α -LGR5-CAR T細胞、又は α -CD19-CAR T細胞(陽性対照、基準)によって処置した11日目のNSGマウスの骨髄(1つの脛骨から採取した)中のNALM6細胞数。B. 非形質導入T細胞処置NSGマウスのNALM6計数の平均値:22355、 α -LGR5-CAR T細胞処置NSGマウスの平均値:6296、 α -CD19-CAR T細胞処置NSGマウスの平均値:10。

40

【図26】 α -LGR5-CAR-NK92細胞が、ヒトLGR4、LGR6、又はマウスLgr5を過剰発現するHEK細胞を殺滅しないことを示す図である。 α -LGR5-CAR NK92細胞は、ヒトLGR4、LGR6を過剰発現するHEK293細胞を標的とせず、マウスLgr5を過剰発現する細胞をかなり弱い程度に標的とする。NK92細胞、又は α -LGR5-CAR-CD28若しくは α -LGR5-CAR-4-1BBを発現するNK92細胞の細胞殺滅活性。表記のタンパク質を過剰発現するHEK293T標的細胞を、エフェクターNK92細胞と共に、エフェクター対標的比2.5:1及び10:1で9時間インキュベートした。エラーバーは、3回の独立した実験のSDを表す。

【図27】 α -LGR5-CAR-T細胞のNALM6細胞の標的化を示す図である。 α -LGR5-CAR T細胞は、NALM6腫瘍細胞を効率的に殺滅する。 α -LGR5-41BB CAR-T細胞の表記

50

のエフェクター対標的比でのNALM6腫瘍標的細胞殺滅活性を、6時間後にVITALアッセイによって評価した。エラーバーは、3人の異なる健康なドナーのPBMCから生成された3つの α -LGR5-CAR T細胞バッチのSDを表す。

【発明を実施するための形態】

【0062】

本発明を、以下に詳しく説明する。以下の節では、本発明の異なる態様をより詳細に定義する。そのように定義された各態様を、明白に逆であることを示していない限り、任意の他の態様又は複数の態様と組み合わせてもよい。特に、好ましい又は有利であることが示された任意の特性を、好ましい又は有利であることが示された他の任意の特性又は複数の特性と組み合わせてもよい。

【0063】

一般的に、本明細書に記載される細胞及び組織培養、病理学、腫瘍学、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学並びにタンパク質及び核酸化学、並びにハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法、及びそれらの技術は、当技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。本開示の方法及び技術は、特に示していない限り、一般的に、当技術分野で周知の通常の方法に従って、及び本出願を通して列举及び考察されている様々な一般的な及びより特定の参考文献に記載されているように実施される。例えば、Green and Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、4th ed.、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. (2012); Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic、Zhiqiang An (Editor)、Wiley、(2009); and Antibody Engineering、2nd Ed.、Vols 1 and 2、Ontermann and Dubel、eds.、Springer-Verlag、Heidelberg (2010)を参照されたい。

【0064】

酵素反応及び精製技術は、製造元の仕様書に従って、当技術分野で一般的に行われるように、又は本明細書に記載されるように、実施される。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、並びに医薬品化学に関連して使用される命名法、並びに実験手順及び技術は、当技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤及び送達、及び患者の処置に関して標準的な技術が使用される。

【0065】

本発明の発明者らは、驚くべきことに、ヒトLGR5のアミノ酸22～37内の特異的エピトープに結合する抗体を同定した。実施例に実証されるように、抗体は、非常に特異的であり、高い親和性を有し、細胞に急速に取り込まれ、このことにより、抗体は、非常に有効な研究ツールになると共に治療において極めて有用となる。

【0066】

ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質受容体5(LGR5)は、幹細胞及びがん幹細胞マーカーとして特徴付けられている。LGR5転写物レベルに関する以前の分析は、高レベルの発現が、悪性疾患、例えば、結腸直腸がん(CRC)及びpre-B急性リンパ芽球性白血病(pre-B ALL)を、健康な組織と識別することを示しており、LGR5タンパク質発現が予後判定及び処置のための分子手段を提供しうることを示唆している。本発明者らは、結腸直腸がん(CRC)、肝細胞癌(HCC)、及びpre-B ALLにおいて高いLGR5タンパク質レベルを検出する、ヒトLGR5 45の細胞外ドメイン(α -LGR5)に対する高度に特異的な高親和性抗体を開発した。これに対し、正常な結腸及び直腸上皮、肝臓、卵巣組織、脳、及び免疫細胞タイプにおけるLGR5タンパク質は、低レベル乃至検出不能レベルである。LGR5は、細胞膜から急速に内部移行して、リソソームを含む細胞内小胞区画に輸送される。

【0067】

本発明者らは、高LGR5発現CRC及びpre-B ALLがん細胞株を、 α -LGR5の抗体薬物コンジュゲート型(α -LGR5-ADC)によって処置すると、ナノモル濃度で有効な細胞殺滅をもたらすことを示した。pre-B ALL腫瘍の α -LGR5-ADCによるin vivoでの介入処置は、急速な腫瘍の消耗をもたらした。本発明者らは、ヒト化 α -LGR5の治療上の有用

10

20

30

40

50

性を、 α -LGR5キメラ抗原受容体(CAR)及び二特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)の生成のために、対応するscFv断片を使用することによって、実証した。本発明者らは、 α -LGR5-CAR-NK92細胞が、LGR5発現細胞の殺滅に有効であり、一方、 α -LGR5/ α -CD3 BiTEは、T細胞活性化及び細胞傷害性CD8⁺ T細胞によるNALM6細胞の殺滅を誘導したことを実証した。まとめると、本発明は、CRC、HCC、及びpre-B ALL腫瘍細胞を有効に識別して標的化する α -LGR5に基づく治療モダリティを確立する。

【0068】

本発明者らはまた、CRC、HCC、及びpre-B ALLの特徴としてLGR5発現が上昇していることも確立した。重要なことに、それらの組織を、転写及びLGR5タンパク質レベルの両方について調べると、正常組織が、非常に低レベル乃至検出不能なLGR5レベルを有し、このタンパク質を過剰発現する悪性疾患を標的化する治療薬の道を切り開くことを示している。実際に、本発明者らのアプローチは、 α -LGR5に基づく治療薬の優先順位の高いがん標的としてCRC、HCC、及びpre-B ALLを確立し、他の標的化可能ながんのタイプを決定するため、及び予後判定マーカーとしてのLGR5過剰発現を層別化するための将来の研究を可能にする。これは、HCCにおけるLGR5タンパク質レベルの評価にとって特に適切であり、高いLGR5タンパク質発現を使用して、低いT細胞浸潤によって特徴付けられ、したがって免疫砂漠と呼ばれる、 β -カテニンにおいて活性化変異を有するHCCサブセットを更に層別化してもよい。このHCCサブセットは、チェックポイント阻害及び細胞治療の両方に対して不応性であることが予測される。

【0069】

実際に、HCCにおいてニボルマブ(PD1チェックポイント阻害剤)とソラフェニブ(低分子キナーゼ阻害剤)を比較して評価するCheckMate 459臨床試験(NCT02576509)からの最近の報告は、全生存の改善というその評価項目目標を満たすことができなかった。しかし、本発明者らは、高LGR5発現患者コホートを除外することが、臨床試験のアウトカムにおいて重要であることを証明しうることを提唱する。したがって、抗LGR5を使用して高レベルのLGR5を有するHCC患者を層別化することは、 β -カテニン変異体サブセットを報告し、薬物有効性が免疫浸潤に依存しない α -LGR5-ADC等の治療分子の使用を支持する興味深いバイオマーカーの機会を表す。このように、本発明はまた、予後判定マーカーとしてのLGR5の使用及び本明細書に記載される関連する方法にも関する。

【0070】

したがって、本発明は、ヒトLGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体が、配列番号1のアミノ酸22~37内に位置するエピトープに結合するか、又は配列番号1のアミノ酸22~37を含むか若しくはからなるエピトープに結合する、抗体又はその断片、そのような抗体を含むイムノコンジュゲート及び医薬組成物、並びにそのような抗体を産生するための単離された核酸分子、ベクター、及び宿主細胞を提供する。同様に、ヒトLGR5を検出するために本明細書に開示される抗体を使用する方法、疾患、特にがん及び/又は炎症疾患を診断する方法、及び処置する方法も提供する。

【0071】

本発明の抗体は、高い親和性及び特異性でLGR5に結合する。加えて、本発明者らは、本発明の抗体が、細胞によって急速に内部移行されうることを示した。このように、本明細書に記載される抗体は、LGR5の細胞外ドメインに結合すること及び内部移行することが可能である。本発明者らはまた、トラスツズマブを基準として、極めて急速な内部移行(5分以内)を示したが、Teasは40%のみが3時間後に内部移行した。その上、ペイロードにコンジュゲートすると、コンジュゲート抗体は、ナノモル濃度で有効な細胞殺滅を媒介する。

【0072】

抗体のこれらの性質は、それらが、治療的に活用できること、例えばがん及び/又は炎症疾患の処置に利用できることを意味する。例えば、抗体を使用して、治療分子、例えば薬物をLGR5の近位に運ぶことができる。したがって、本発明の抗体を使用して、治療分子をがん、特にLGR5を発現又は過剰発現するがんに特異的に送達することができる。本

発明者らの研究は、本発明の特異的抗体が、オフターゲット毒性を示さず、治療におけるその使用を更に検証することを示している。

【0073】

更に、本発明の抗体は、非常に有効な研究ツールとしてのその使用に加えて、例えば、がん及び/又は炎症疾患を診断する方法において、又は他のバイオマーカー関連方法において造影剤として使用することができる。

【0074】

本発明の抗体及び断片は、野生型ヒトLGR5(UniProt受託番号075473)に特異的に結合する。野生型ヒトLGR5のアミノ酸配列を以下に示す(配列番号1)。

【0075】

【化1】

```
MDTSRLGVLLSLPVLLQLATGGSSPRSGVLLRGCPHCHCEPDGRMLLRVDCSDLGLSELP
SNLSVFTSYLDLSMNNISQLLPNPLPSLRFLEELRLAGNALTYPKGAFGLYSLKVLMLQNN
QLRHVPTEALQNLRLSLRLDANHISYVPPSCFSGLHSLRHLWDDNALTEIPVQAFRSL
ALQAMTLALNKHIPDYAFGNLSSLVVLHLHNNRIHSLGKKCFDGLHSLETDLNYYNLLDEF
PTAIRTLNKLKELGFHSNNIRSIPEKAFVGNPSLTIHFYDNPIQFVGRSAFQHLPELRTLTLNG
ASQITEFPDLTGANLESLTLTGAQISSLPQTVCNQLPNLQVLDLSYNLLEDLPFSVCQKLQ
KIDLRHNEIYEIKVDTFQQLSLRSLNLAWNKIAIHHPNAFSTLPSLIKLDLSSNLLSFPITGLH
GLTHLKLGTGNHALQSLISSENFPELKVIEMPYAYQCCAFGVCENAYKISNQWNKGDNSSMD
DLHKKDAGMFQAQDERDLEDFLDFFEDLKALHSVQCSPSPGPFKPEHLLDGWLIRIGVW
TIAVLALTCNALVTSTVFRSPYISPIKLLIGVIAAVNMLTGVSSAVLAGVDAFTFGSFARHGA
WWENGVGCHVIGFLSIFASESSVFLTLAALERGFVSKYSAKFETKAPFSSLKVIILLCALLAL
TMAAVPLLGGSKYGASPLCLPLPFGEPSTMGYMAVALLNSLCFLMMTIAYTKLYCNLDKGD
LENIWDCSMVKHIALLLFTNCILNCPVAFLSFSSLINLTFISPEVIKIFILLVVVPLPACLNPLLYILF
NPHFKEDLVSLRKQTYVWTRSKHPSLMSINSDDVEKQSCDSTQALVTFTSSSITYDLPPSSV
PSPAYPVTESCHLSSVAFVPCL
```

【0076】

特に指定していない限り、LGR5という用語は、本明細書で使用される場合、ヒトLGR5を指す。LGR5という用語は、ヒトLGR5のバリエーション、アイソフォーム、及び種ホモログを含む。抗体は、細胞外ドメインに結合する。LGR5に結合する抗体は、本明細書において α -LGR5、aLGR5、又は α -LGR5又は α LGR5と呼ばれる。これらの用語は互換的に使用される。

【0077】

本発明の抗体は、LGR5に結合する。「結合する」という用語は、本明細書で使用される場合、抗体が、抗原を発現する標的化細胞又は組織において治療剤として有用であるように十分な親和性で抗原に結合することを意味する。結合反応は、標準的な方法によって、例えば無関係な特異性の抗体を使用する陰性対照試験を参照して示されうる。

【0078】

本発明は、ヒトLGR5に特異的に結合する抗体、具体的にはヒト化抗体を提供する。言い換えれば、LGR5抗原に結合することは、非特異的相互作用とは測定可能に異なる。実施例に示されるように、ヒトに結合する本発明の抗体は、マウスLGR5又はヒトLGR4若しくは6と交差反応しない。好ましくは、本発明の抗体は、ヒトLGR5に結合し、cynoLGR5にも結合する。

【0079】

特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープに対して「特異的結合」、「特異的に結合する」、又は「特異的である」という用語は、本明細書で使用される

10

20

30

40

50

場合、例えば標的に関して、少なくとも約 10^{-4} M、或いは少なくとも約 10^{-5} M、或いは少なくとも約 10^{-6} M、或いは少なくとも約 10^{-7} M、或いは少なくとも約 10^{-8} M、或いは少なくとも約 10^{-9} M、或いは少なくとも約 10^{-10} M、或いは少なくとも約 10^{-11} M、或いは少なくとも約 10^{-12} M、又はそれより高いKdを有する分子によって示されうる。一実施形態では、抗体又は抗体断片は、0.7~3nMのKdを有する。一実施形態では、「特異的結合」という用語は、分子が、任意の他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに結合する結合を指す。

【0080】

「抗体」という用語は、広く、4つのポリペプチド鎖、2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖で構成される任意の免疫グロブリン(Ig)分子、若しくはその抗原結合部分、又はIg分子の本質的なエピトープ結合特性を保持するその任意の機能的断片、変異体、バリエーション、若しくは誘導体を指す。そのような変異体、バリエーション、又は誘導体抗体フォーマットは、当技術分野で公知である。「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体(例えば、二特異性抗体)、及びそれらが抗体の抗原結合能を保持する限り抗体断片を包含する。「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、例えばT細胞エンゲージャー、例えば二特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)も包含する。当業者によって認識されるように、二特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)は、scFvの1つが、CD3受容体を介してT細胞に結合し、他方が、腫瘍特異的分子を介して腫瘍細胞に結合する、異なる抗体の2つのscFvを含む融合タンパク質である。

【0081】

一実施形態では、本明細書に記載されるBiTE又はCARは、配列番号211に示されるscFv、又はそれと少なくとも70%、80%、若しくは90%配列相同性を有する配列、又は配列番号211のCDRを有する配列を含む。このように、一実施形態では、BiTEは、配列番号212、213、及び214としても番号付けられるクローン2.4のCDR、並びに215、216、及び217の重鎖CDRを含む。一実施形態では、本明細書に記載されるBiTE又はCARは、クローン2.4のVH及びVL、又はそれと少なくとも90%配列同一性を有する配列を含む。複数の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体を含みうる。「モノクローナル抗体」という用語は、細胞又は細胞株の単一のクローンから得た抗体を指す。個々の抗体は同一であり、及び/又は同じエピトープに結合する。異なるエピトープに対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体とは異なり、調製物中の各モノクローナル抗体は、単一のエピトープに対するものである。

【0082】

全長の抗体では、各重鎖は、重鎖可変領域又はドメイン(本明細書においてHCVRと略す)及び重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2、及びCH3からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域又はドメイン(本明細書においてLCVRと略す)及び軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLからなる。

【0083】

重鎖及び軽鎖可変領域は、より保存されたフレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域がその間に介在する、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変領域に更に細分することができる。各重鎖及び軽鎖可変領域は、3つのCDR及び4つのFRで構成され、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で整列する。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)又はサブクラスの分子でありうる。

【0084】

「CDR」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖及び軽鎖の可変領域の各々には3つのCDRが存在し、可変領域の各々に関してCDR1、CDR2、及びCDR3と名付けられる。「CDRセット」という用語は、抗原に結合することが可能な単一の

可変領域に存在する3つのCDRの群を指す。これらのCDRの正確な境界は、当技術分野で公知の異なるシステムに従って異なるように定義されうる。

【0085】

Kabat相補性決定領域(CDR)は、配列多様性に基づいており、最も一般的に使用される(Kabatら、(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382~391頁、及びKabatら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。Chothiaは、その代わりに構造ループの位置を指す(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901~917頁(1987))。Kabatナンバリングシステムは、可変ドメインの残基に言及する場合に一般的に使用される(軽鎖のおよその残基1~107、及び重鎖の残基1~113)。

10

【0086】

Kabatによって記載されるシステムを本明細書で使用する。「Kabatナンバリング」、「Kabatの定義」及び「Kabatのラベリング」という用語は、本明細書において互換的に使用される。当技術分野で認識されるこれらの用語は、抗体の重鎖及び軽鎖可変領域又は抗原結合部分における他のアミノ酸残基よりも可変(すなわち、超可変)であるアミノ酸残基をナンバリングするシステムを指す。

【0087】

キメラ抗体は、1つの種に由来する抗体、例えば齧歯類抗体の相補性決定領域(CDR)を含む可変ドメインを含有するが、抗体分子の定常ドメインがヒト抗体のドメインに由来する組換えタンパク質である。獣医学の応用では、キメラ抗体の定常ドメインは、他の種、例えばネコ又はイヌのドメインに由来しうる。

20

【0088】

ヒト化抗体は、1つの種からの抗体、例えば齧歯類抗体からのCDRが、齧歯類抗体の重鎖及び軽鎖可変鎖からヒトの重鎖及び軽鎖可変ドメイン(例えば、フレームワーク領域配列)に移されている組換えタンパク質である。抗体分子の定常ドメインは、ヒト抗体のドメインに由来する。ある特定の実施形態では、親(齧歯類)抗体からの限定数のフレームワーク領域アミノ酸残基が、ヒト抗体フレームワーク領域配列に置換されうる。

【0089】

「抗原結合部位」という用語は、抗原に特異的に結合する領域を含む抗体又は抗体断片の一部を指す。抗原結合部位は、1つ又は複数の抗体可変ドメインによって提供されうる。好ましくは、抗原結合部位は、抗体又は抗体断片の会合したV_H及びV_L内に含まれる。

30

【0090】

本発明に従う抗体断片は、抗体の機能的部分、例えばF(ab')₂、Fab、Fv、sFv、及び類似のものである。このように、用語は、抗原結合性断片を指し、抗体の抗原結合部分と互換的に使用される。全長抗体の機能的断片は、全長抗体の標的特異性を保持する。したがって、組換え機能的抗体断片、例えばFab(断片、抗体)、scFv(一本鎖可変断片)及び単ドメイン抗体(dAbs)は、mAbに基づく治療薬の代替として治療薬を開発するために使用されている。抗体の誘導体もまた、範囲内である。

【0091】

scFv断片(~25kDa)は、2つの可変ドメイン、V_H及びV_Lからなる。天然では、V_H及びV_Lドメインは、疎水性相互作用を介して非共有結合により会合し、解離する傾向がある。しかし、ドメインを親水性のフレキシブルリンカーによって連結し、一本鎖Fv(scFv)を作製することによって、安定な断片を工学操作することができる。一実施形態では、scFvは、配列番号211、又はそれと少なくとも70%、80%、若しくは90%配列同一性を有する配列、又は配列番号211のCDRを有する配列を含む。一実施形態では、scFvは、配列番号212、213、及び214のCDR、並びに215、216、及び217の重鎖CDRを含む。

40

【0092】

最小の抗原結合性断片は、単一の可変断片、すなわちV_H又はV_Lドメインである。軽鎖

50

/重鎖パートナーに対する結合はそれぞれ、標的結合にとって必要ではない。そのような断片は、単ドメイン抗体において使用される。したがって、単ドメイン抗体(約12～15 kDa)は、V_H又はV_Lドメインのいずれかからなるか又はそれを含む。

【0093】

本明細書で使用される場合、「相同性」という用語は、配列を整列させた後、及び一部の実施形態では最大のパーセント相同性を達成するために必要に応じてギャップを導入した後、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮せずに、それが比較される参照ポリペプチドの残基と同一である配列中のアミノ酸残基のパーセンテージを指す。このように、本明細書で使用される場合、2つのアミノ酸配列間のパーセント相同性は、2つの配列間のパーセント同一性と等価である。N-又はC末端伸長、タグ又は挿入はいずれも、同一性又は相同性を低減させるとして解釈されない。アライメントのための方法及びコンピュータープログラムは周知である。2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性又は相同性は、周知の数学的アルゴリズムを使用して決定することができる。

10

【0094】

本明細書で使用される場合、相同性という用語を使用する場合、これは同一性と互換的に使用される。このように、配列相同性に関して言及する場合、これらの値はまた、それぞれ、配列同一性も指す。

【0095】

配列同一性は一般的に、アルゴリズムGAP (Wisconsin GCG package, Accelrys Inc, San Diego USA)を参照して定義される。GAPは、Needleman and Wunschのアルゴリズムを使用して、一致数を最大限にしてギャップの数を最小限にするように2つの完全な配列を整列させる。一般的に、デフォルトパラメーターを使用し、ギャップ作製ペナルティは12に等しく、ギャップ伸長ペナルティは4に等しい。GAPの使用が好ましいが、他のアルゴリズム、例えば、BLAST(Altschulら(1990) J. Mol. Biol. 215: 405～410頁の方法を使用する)、FASTA(Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444～2448頁の方法を使用する)、又はSmith-Watermanのアルゴリズム(Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195～197頁)、又はAltschulら(1990)、上記のTBLASTNプログラムを、一般的にデフォルトパラメーターを使用して使用してもよい。特に、psi-Blastアルゴリズム(Altschulら(1997) Nucl. Acids Res. 25 3389～3402頁)を使用してもよい。配列同一性は、Bioedit、ClustalWアルゴリズムを使用して定義されうる。アライメントは、Snapgeneを使用して、MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation)アルゴリズム(Edgar (2004a) Nucleic Acids Res 32: 1792～7頁; Edgar (2004b) BMC Bioinformatics 5: 113頁)に基づいて実施した。

20

30

【0096】

本発明は、ヒトLGR5(配列番号1)のアミノ酸22～37内に位置するLGR5のエピトープに結合する抗体又はその断片に関する。

【0097】

このように、本発明の抗体は、ヒトLGR5(配列番号1)の残基22～37の1つ又は複数を含むLGR5のエピトープに結合する。例えば、本発明の抗体は、以下の残基:G²²、S²³、S²⁴、P²⁵、R²⁶、S²⁷、G²⁸、V²⁹、L³⁰、L³¹、R³²、G³³、C³⁴、P³⁵、T³⁶、H³⁷の1つ又は複数、例えば全てを含むLGR5のエピトープに結合する。

40

【0098】

本発明はまた、LGR5(配列番号1)のアミノ酸22～37からなるエピトープに結合する抗体にも関する。

【0099】

そのようなエピトープは、以下に詳しく記載するように、直鎖状のエピトープである。

【0100】

「エピトープ」又は「抗原性決定基」という用語は、免疫グロブリン、抗体、又は抗体断片が特異的に結合する抗原(例えば、LGR5)の表面上の部位を指す。一般的に、抗原は

50

、いくつかの又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。特異的にという用語は、直鎖状のエピトープ及びコンフォメーションアルエピトープを含む。

【0101】

タンパク質抗原内のエピトープは、連続アミノ酸(通常、直鎖状のエピトープ)、又はタンパク質の三次フォールディングによって近接する不連続アミノ酸の両方から形成される。連続するアミノ酸から形成されたエピトープは、典型的に、しかし必ずしもそうではないが、変性溶媒に曝露されても保持されるが、三次フォールディングによって形成されたエピトープは典型的に、変性溶媒による処置によって失われる。エピトープは典型的に、独自の空間的立体構造で少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のアミノ酸を含む。どのエピトープに所定の抗体又は抗体断片が結合するかを決定する方法(すなわち、エピトープマッピング)は、当技術分野で周知であり、例えば、イムノプロットティング及び免疫沈殿アッセイを含み、重複する又は連続するペプチドを、所定の抗体又は抗体断片との反応性に関して試験する。

10

【0102】

本発明において、エピトープは、ペプチドマッピングによってマッピングされる。特に、エピトープは、重複するペプチド断片との抗体の反応性を試験することによって、及びウェスタンブロット分析を実施することによってマッピングされた。

【0103】

一実施形態では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、以下のTable 1(表1)に示されるV_L CDR3配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含む抗体に関する。一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、配列番号7、13、19、25、31、37、43、49、55、61、67、73、79から選択されるV_L CDR3配列、又は配列番号7、13、19、25、31、37、43、49、55、61、67、73、79の1つと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含む抗体に関する。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

20

30

【0104】

一実施形態では、抗体は、配列番号7、13、19、25、31、37、43、49、55、61、67、73、79から選択されるアミノ酸配列を含むか若しくはからなるV_L CDR3配列、又はそれと少なくとも90%若しくは少なくとも95%相同性を有する配列を有する。

【0105】

一実施形態では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、以下のTable 1(表1)に示されるV_L CDR1配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含む抗体に関する。一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、配列番号5、11、17、23、29、35、41、47、53、59、65、71、77から選択されるV_L CDR1配列、又は配列番号5、11、17、23、29、35、41、47、53、59、65、71、77の1つと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含む抗体に関する。一実施形態では、前記相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

40

50

【0106】

一実施形態では、抗体は、配列番号5、11、17、23、29、35、41、47、53、59、65、71、77から選択されるアミノ酸配列を含むか若しくははからなるV_L CDR1配列、又はそれと少なくとも少なくとも90%若しくは少なくとも95%相同性を有する配列を有する。

【0107】

一実施形態では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、以下のTable 1(表1)に示されるV_L CDR2配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含む抗体に関する。一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、配列番号6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78から選択されるV_L CDR2配列、又は配列番号6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78の1つと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含む抗体に関する。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

【0108】

一実施形態では、抗体は、配列番号6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78から選択されるアミノ酸配列を含むか若しくははからなるV_L CDR2配列、又はそれと少なくとも少なくとも90%若しくは少なくとも95%相同性を有する配列を有する。

【0109】

一実施形態では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、以下のTable 1(表1)に示されるV_H CDR3配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含む抗体に関する。一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、配列番号4、10、16、22、28、34、40、46、52、58、64、70、76から選択されるV_H CDR3配列、又は配列番号4、10、16、22、28、34、40、46、52、58、64、70、76の1つと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含む抗体に関する。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

【0110】

一実施形態では、抗体は、配列番号4、10、16、22、28、34、40、46、52、58、64、70、76から選択されるアミノ酸配列を含むか若しくははからなるV_H CDR3配列、又はそれと少なくとも少なくとも90%若しくは少なくとも95%相同性を有する配列を有する。

【0111】

一実施形態では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、以下のTable 1(表1)に示されるV_H CDR1配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含む抗体に関する。一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、配列番号2、8、14、40、26、32、38、44、50、56、62、68、74から選択されるV_H CDR1配列、又は配列番号2、8、14、40、26、32、38、44、50、56、62、68、74の1つと少なくとも60%、70%、80%、90%、95

%若しくはそれより高い相同性を有する配列を含む抗体に関する。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

【0112】

一実施形態では、抗体は、配列番号2、8、14、40、26、32、38、44、50、56、62、68、74から選択されるアミノ酸配列を含むか若しくはからなるV_H CDR1配列、又はそれと少なくとも90%若しくは少なくとも95%相同性を有する配列を有する。

10

【0113】

一実施形態では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、以下のTable 1(表1)に示されるV_H CDR2配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含む抗体に関する。一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、配列番号3、9、15、21、27、33、39、45、51、57、63、69、75から選択されるV_H CDR2配列、又は配列番号3、9、15、21、27、33、39、45、51、57、63、69、75の1つと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含む抗体に関する。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

20

【0114】

一実施形態では、抗体は、配列番号3、9、15、21、27、33、39、45、51、57、63、69、75から選択されるアミノ酸配列を含むか若しくはからなるV_H CDR2配列、又はそれと少なくとも90%若しくは少なくとも95%相同性を有する配列を有する。

30

【0115】

一実施形態では、抗体は、Table 1(表1)の配列から選択される、V_H及びV_LのCDR1、2及び3配列の組合せを含む。一態様では、本発明はまた、Table 1(表1)のクローンに関して示されるように、V_H及びV_LのCDR1、CDR2及びCDR3の組合せを有する抗体にも関する。

【0116】

一実施形態では、抗体は、Table 1(表1)のクローンのいずれかに関して示されるCDR1、2、及び3のセットから選択される、V_H及びV_LのCDR1、2及び3配列のセットを含む。一実施形態では、抗体は、配列番号2を有するV_H CDR1、配列番号3を有するV_H CDR2、配列番号4を有するV_H CDR3、配列番号5を有するV_L CDR1、配列番号6を有するV_L CDR2、及び配列番号7を有するV_L CDR3を含む。一実施形態では、抗体は、配列番号8を有するV_H CDR1、配列番号9を有するV_H CDR2、配列番号10を有するV_H CDR3、配列番号11を有するV_L CDR1、配列番号12を有するV_L CDR2、及び配列番号13を有するV_L CDR3を含む。一実施形態では、抗体は、配列番号14を有するV_H CDR1、配列番号15を有するV_H CDR2、配列番号16を有するV_H CDR3、配列番号17を有するV_L CDR1、配列番号18を有するV_L CDR2、及び配列番号19を有するV_L CDR3を含む。一実施形態では、抗体は、配列番号20を有するV_H CDR1、配列番号21を有するV_H CDR2、配列番号22を有するV_H CDR3、配列番号23を有するV_L CDR1、配列番号24を有するV_L CDR2、及び配列番号25を有するV_L CDR3を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号26を有するV_H CDR1、配列番号27を有するV_H CDR2、配列番号28

40

50

を有するV_H CDR3、配列番号29を有するV_L CDR1、配列番号30を有するV_L CDR2、及び配列番号31を有するV_L CDR3を含む。一実施形態では、抗体は、配列番号32を有するV_H CDR1、配列番号33を有するV_H CDR2、配列番号34を有するV_H CDR3、配列番号35を有するV_L CDR1、配列番号36を有するV_L CDR2、及び配列番号37を有するV_L CDR3を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号38を有するV_H CDR1、配列番号39を有するV_H CDR2、配列番号40を有するV_H CDR3、配列番号41を有するV_L CDR1、配列番号42を有するV_L CDR2、及び配列番号43を有するV_L CDR3を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号44を有するV_H CDR1、配列番号45を有するV_H CDR2、配列番号46を有するV_H CDR3、配列番号47を有するV_L CDR1、配列番号48を有するV_L CDR2、及び配列番号49を有するV_L CDR3を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号50を有するV_H CDR1、配列番号51を有するV_H CDR2、配列番号52を有するV_H CDR3、配列番号53を有するV_L CDR1、配列番号54を有するV_L CDR2、及び配列番号55を有するV_L CDR3を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号56を有するV_H CDR1、配列番号57を有するV_H CDR2、配列番号58を有するV_H CDR3、配列番号59を有するV_L CDR1、配列番号60を有するV_L CDR2、及び配列番号61を有するV_L CDR3を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号62を有するV_H CDR1、配列番号63を有するV_H CDR2、配列番号64を有するV_H CDR3、配列番号65を有するV_L CDR1、配列番号66を有するV_L CDR2、及び配列番号67を有するV_L CDR3を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号68を有するV_H CDR1、配列番号69を有するV_H CDR2、配列番号70を有するV_H CDR3、配列番号71を有するV_L CDR1、配列番号72を有するV_L CDR2、及び配列番号73を有するV_L CDR3を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号74を有するV_H CDR1、配列番号75を有するV_H CDR2、配列番号76を有するV_H CDR3、配列番号77を有するV_L CDR1、配列番号78を有するV_L CDR2、及び配列番号79を有するV_L CDR3を含む。

10

20

30

40

50

【0117】

一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体のV_Hが、以下のCDR1、CDR2及びCDR3:

- a) 配列番号2のCDR1若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号3のCDR2若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号4のCDR3若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列;又は
- b) 配列番号8のCDR1若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号9のCDR2若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号10のCDR3若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列;又は
- c) 配列番号14のCDR1若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号15のCDR2若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号16のCDR3若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列;又は
- d) 配列番号20のCDR1若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号21のCDR2若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号22のCDR3若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列;又は
- e) 配列番号26のCDR1若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号27のCDR2若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号28のCDR3若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列;又は
- f) 配列番号32のCDR1若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号33のCDR2若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号34のCDR3若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列;又は
- g) 配列番号38のCDR1若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号39のCDR2若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号40のCDR3若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列;又は
- h) 配列番号44のCDR1若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号45のCDR2若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列、配列番号46のCDR3若しくはそれと少なくとも90%同一性を有する配列;又は

くはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

i) 配列番号50のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号51のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号52のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

j) 配列番号56のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号57のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号58のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

k) 配列番号62のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号63のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号64のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

l) 配列番号68のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号69のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号70のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

m) 配列番号74のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号75のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号76のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列

を含む抗体又はその断片を提供する。

【0118】

一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体のV_Lが、以下のCDR1、CDR2及びCDR3:

a) 配列番号5のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号6のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号7のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

b) 配列番号11のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号12のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号13のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

c) 配列番号17のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号18のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号19のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

d) 配列番号23のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号24のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号25のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

e) 配列番号29のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号30のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号31のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

f) 配列番号35のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号36のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号37のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

g) 配列番号41のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号42のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号43のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

h) 配列番号47のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号48のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号49のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

i) 配列番号53のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号54のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号55のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

j) 配列番号59のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号60のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号61のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

10

20

30

40

50

k) 配列番号65のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号66のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号67のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

l) 配列番号71のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号72のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号73のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列;又は

m) 配列番号77のCDR1若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号78のCDR2若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列、配列番号79のCDR3若しくはそれと少なくとも90%相同性を有する配列

を含む抗体又はその断片を提供する。

10

【0119】

【表1A】

Table 1 本発明の抗体のCDR配列

名称	V _H CDR1 配列	V _H CDR2 配列	V _H CDR3 配列	V _L CDR1 配列	V _L CDR2 配列	V _L CDR3 配列
1	配列番号2 SYWMQ	配列番号3 EIDPSDYY TNYNQKFK G	配列番号4 SLSGYVD Y	配列番号5 RASQDIRN RLN	配列番号6 YRSRLQS	配列番号7 QQGNTLPP T
2	配列番号8 NYWMQ	配列番号9 EIDPSDSY TNYNQKFK G	配列番号10 SLSGYVD Y	配列番号11 RASQDISN RLN	配列番号12 YRSRLHS	配列番号13 QQGNSLPP T
3	配列番号14 SYWMQ	配列番号15 EIDPSDSY SNYNQKFK G	配列番号16 SLSGYVD Y	配列番号17 RASQDISN RLN	配列番号18 YRSRLQS	配列番号19 QQGNTLPP T
4	配列番号20 DYWMQ	配列番号21 EIDPSDSY TNYNQKFQ G	配列番号22 SLSGSVD Y	配列番号23 RASQDISN RLN	配列番号24 YRSRLQS	配列番号25 QQGNTLPP T
12	配列番号26 DYVMN	配列番号27 DINPNNGG TIYNQKFK G	配列番号28 GYLFDY	配列番号29 KSSQSLN SSNQKNY LA	配列番号30 FASTRES	配列番号31 QQHYSTPLT
2.1	配列番号32 NYWMQ	配列番号33 EIDPSDSY TNYNQKFQ G	配列番号34 SLSGYVD Y	配列番号35 RASQDISN RLN	配列番号36 YRSRLHS	配列番号37 QQGNSLPP T
2.2	配列番号38 NYWMQ	配列番号39 EIDPSDSY TNYNQKFQ G	配列番号40 SLSGYVD Y	配列番号41 RASQDISN RLN	配列番号42 YRSRLHS	配列番号43 QQGNSLPP T
2.3	配列番号44 NYWMQ	配列番号45 EIDPSDSY TNYNQKFQ G	配列番号46 SLSGYVD Y	配列番号47 RASQDISN RLN	配列番号48 YRSRLHS	配列番号49 QQGNSLPP T
2.4	配列番号50 NYWMQ	配列番号51 EIDPSDSY TNYNQKFQ G	配列番号52 SLSGYVD Y	配列番号53 RASQDISN RLN	配列番号54 YRSRRHT	配列番号55 QQGNSLPP T
2.9	配列番号56 NYWMQ	配列番号57 EIDPSDSY TNYNQGFT G	配列番号58 SLSGYVD Y	配列番号59 RASQDISN RLN	配列番号60 YRSRLHS	配列番号61 QQGNSLPP T

20

30

40

【0120】

50

【表 1 B】

2.11	配列番号62 NYWMQ	配列番号63 EIDPSDSY TNYNQGFT G	配列番号64 SLSGYVD Y	配列番号65 RASQDISN RLN	配列番号66 YRSRLHS	配列番号67 QQGNSLPP T
2.12	配列番号68 NYWMQ	配列番号69 EIDPSDSY TNYNQGFT G	配列番号70 SLSGYVD Y	配列番号71 RASQDISN RLN	配列番号72 YRSRRHT	配列番号73 QQGNSLPP T
2.16	配列番号74 NYWMN	配列番号75 EIDPSDSY TNYNQGFT G	配列番号76 SLSGYVD Y	配列番号77 RASQDISN RLN	配列番号78 YRSRRHT	配列番号79 QQGNSLPP T

10

【0 1 2 1】

Table 1(表1)では、クローン1、2、3、4及び12は、マウス抗体であり、クローン2.1、2.2、2.3、2.4、2.9、2.11、2.12及び2.16は、クローン2に基づくヒト化抗体である。

【0 1 2 2】

抗体がヒト化抗体である複数の実施形態では、抗体は、クローン2.1、2.2、2.3、2.4、2.9、2.11、2.12及び2.16に関してTable 1(表1)に示されるCDR1、CDR2及びCDR3配列、又はそれと少なくとも90%相同性を有する配列を含みうる。一実施形態では、クローン2.1、2.2、2.3、2.4、2.9、2.11、2.12及び2.16に関してTable 1(表1)に示されるCDR1、CDR2及びCDR3配列は、1、2又は3つのアミノ酸改変、例えば、置換、欠失又は挿入を含む。

20

【0 1 2 3】

一実施形態では、提供される抗体は、クローン2.4に関してTable 1(表1)に示されるCDR1、CDR2及びCDR3配列を含む。クローン2.4はまた、本明細書において、LGR5v4、LGR5バリエント4又はヒトバリエント4とも呼ばれる。例えば、Table 5(表6)を参照されたい。

【0 1 2 4】

一実施形態では、本発明は、ヒトLGR5に結合する抗体又はその断片であって、抗体が、以下のTable 2(表2)に示される配列から選択されるV_H配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含む抗体又はその断片に関する。一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、配列番号80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104から選択されるV_H配列、又は配列番号80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104の1つと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含む抗体に関する。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

30

40

【0 1 2 5】

一実施形態では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、以下のTable 2(表2)に示される配列から選択されるV_L配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含む抗体に関する。一態様では、本発明は、LGR5に結合する抗体であって、配列番号81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105から選択されるV_L配列、又は配列番号81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105の1つと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含む抗体に関する。

50

。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

【0126】

本発明はまた、LGR5に結合する抗体であって、Table 2(表2)に示されるV_H及びV_L配列を含む抗体も提供する。このように、本発明は、LGR5に結合する抗体であって：

- a) 配列番号80のV_H配列及び配列番号81のV_L配列；
 - b) 配列番号82のV_H配列及び配列番号83のV_L配列；
 - c) 配列番号84のV_H配列及び配列番号85のV_L配列；
 - d) 配列番号86のV_H配列及び配列番号87のV_L配列；
 - e) 配列番号88のV_H配列及び配列番号89のV_L配列；
 - f) 配列番号90のV_H配列及び配列番号91のV_L配列；
 - g) 配列番号92のV_H配列及び配列番号93のV_L配列；
 - h) 配列番号94のV_H配列及び配列番号95のV_L配列；
 - i) 配列番号96のV_H配列及び配列番号97のV_L配列；
 - j) 配列番号98のV_H配列及び配列番号99のV_L配列；
 - k) 配列番号100のV_H配列及び配列番号101のV_L配列
 - l) 配列番号102のV_H配列及び配列番号103のV_L配列；又は
 - m) 配列番号104のV_H配列及び配列番号105のV_L配列
- を含む抗体を提供する。

【0127】

一実施形態では、抗体は、クローン2.4に関してTable 2(表2)に示されるV_H及びV_L配列を含む。

【0128】

10

20

30

40

50

【表 2 A】

Table 2 本発明の抗体のV_H及びV_L 配列

名称	V _H	V _L
1	配列番号80 QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCK ASGYTFTSYWMQWVKQRPQGGL EWIGEIDPSDYTYNYNQKFKGKAT LTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCARSLSGYVDYWGGQTTLTVSS	配列番号81 DIQMTQSTSSLSASLGDRVTINCRA SQDIRNRLNWWYQQKPDGTVKLLISY RSRLQSGVPSRFSGSGSGTEYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPPTFGG GTKLEVR
2	配列番号82 QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCK ASGYTFTNYWMQWVKQRPQGGL EWIGEIDPSDSYTYNYNQKFKGKAT LTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCARSLSGYVDYWGGQTTLTVSS	配列番号83 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRA SQDISNRLNWWYQQKPDGTVKLLISY RSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNSLPPTFG GGTKLEVR
3	配列番号84 QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCK ASGYTFTSYWMQWVKQRPQGGL EWIGEIDPSDSYTYNYNQKFKGKAT LTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCARSLSGYVDYWGGQTTLTVSS	配列番号85 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRA SQDISNRLNWWYQQKPDGTVKLLISY RSRLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEEDDIATYFCQQGNTLPPTFGG GTKLEVR
4	配列番号86 QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCK ASGYTFTDYWMQWVKQRPQGGL EWIGEIDPSDSYTYNYNQKFKGKAT LTVDTSSSTAYIQLSSLTSDSAVYY CARSLSGSVDYWGQGTTLTVSS	配列番号87 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRA SQDISNRLNWWYQQKPDGTVKLLISY RSRLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI TNLEQEDIATYFCQQGNTLPPTFGG GTKLEVR
12	配列番号88 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA SGYTFTDYMNWVKQSHGKSLEW IGDINPNNGGTIYNQKFKGKATLTV DKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC ASGYLFDYWGPQTTLTVSS	配列番号89 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCK SSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPG QSPKLLVYFASTRESGVPDRFIGSG SGTDFTLTISVQAEDLAAYFCQQH YSTPLTFGAGTKLELK
2.1	配列番号90 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSK ASGYTFTNYWMQWVRQAPQGGL EWIGEIDPSDSYTYNYNQKFQGRVT LTVDTSTSTAYMELSSLRSEDATVY YCARSLSGYVDYWGGQTTVTVSS	配列番号91 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRA SQDISNRLNWWYQQKPGKAVKLLISY RSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYFCQQGNSLPPTFG GGTKLEIK
2.2	配列番号92 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSK ASGYTFTNYWMQWVRQAPQGGL EWIGEIDPSDSYTYNYNQKFQGRVT LTVDTSTSTAYMELSSLRSEDATVY YCARSLSGYVDYWGGQTTVTVSS	配列番号93 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRA SQDISNRLNWWYQQKPGKAVKLLISY RSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYCQQGNSLPPTFG GGTKLEIK

【0129】

10

20

30

40

50

【表 2 B】

2.3	配列番号94 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTNYYWMQWVRQAPGQGL EWIGEIDPSDSYTNYNQKFQGRVT LTVDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVY YCARSLSGYVDYWGQGTITVTVSS	配列番号95 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQDISNRLNWWYQQKPGQAVRLLISY RSRLHSGVPARFSGSGSGTDYTLTI SSLEPEDFAVYFCQQGNSLPPTFG GGTKLEIK
2.4	配列番号96 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTNYYWMQWVRQAPGQGL EWIGEIDPSDSYTNYNQKFQGRVT LTVDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVY YCARSLSGYVDYWGQGTITVTVSS	配列番号97 EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQDISNRLNWWYQQKPGQAVRLLISY RSRRHTGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLEPEDFAVYFCQQGNSLPPTFG GGTKLEIK
2.9	配列番号98 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCK ASGYTFTNYYWMQWVRQAPGQGL EWIGEIDPSDSYTNYNQGFTGRFV LSVDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARSLSGYVDYWGQGTITVTVSS	配列番号99 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDISNRLNWWYQQKPGKAVKLLISY RSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYFCQQGNSLPPTFG GGTKLEIK
2.11	配列番号100 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCK ASGYTFTNYYWMQWVRQAPGQGL EWIGEIDPSDSYTNYNQGFTGRFV LSVDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARSLSGYVDYWGQGTITVTVSS	配列番号101 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDISNRLNWWYQQKPGKAVKLLISY RSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYFCQQGNSLPPTFG GGTKLEIK
2.12	配列番号102 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCK ASGYTFTNYYWMQWVRQAPGQGL EWIGEIDPSDSYTNYNQGFTGRFV LSVDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARSLSGYVDYWGQGTITVTVSS	配列番号103 DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQDISNRLNWWYQQKPGQAVRLLISY RSRLHSGVPARFSGSGSGTDYTLTI SSLEPEDFAVYFCQQGNSLPPTFG GGTKLEIK
2.16	配列番号104 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCK ASGYTFTNYYWMQWVRQAPGQGL EWMGEIDPSDSYTNYNQGFTGRF VFSVDTSVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSLSGYVDYWGQGTITVTVSS	配列番号105 EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQDISNRLNWWYQQKPGQAVRLLISY RSRRHTGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLEPEDFAVYFCQQGNSLPPTFG GGTKLEIK

10

20

30

【0130】

Table 2(表2)において、クローン1、2、3、4及び12は、ネズミ抗体であり、クローン2.1、2.2、2.3、2.4、2.9、2.11、2.12及び2.16はヒト化抗体である。

【0131】

抗体がヒト化抗体である複数の実施形態では、抗体は、クローン2.1、2.2、2.3、2.4、2.9、2.11、2.12及び2.16に関してTable 2(表2)に示されるV_H及びV_L配列、又はそれと少なくとも90%相同性を有する配列を含みうる。

【0132】

一実施形態では、クローン2.1、2.2、2.3、2.4、2.9、2.11、2.12及び2.16に関してTable 2(表2)に示されるV_H及びV_L配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸改変、例えば、置換、欠失又は挿入を含む。

【0133】

抗体は、CH2ドメインを含みうる。CH2ドメインは、好ましくは、ヒトIgG分子の場合と同様に、CH3ドメインのN末端に位置する。抗体のCH2ドメインは、好ましくはヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4のCH2ドメインであり、より好ましくはヒトIgG1のCH2ドメインである。ヒトIgGドメインの配列は当技術分野で公知である。

【0134】

抗体はまた、CH2ドメインのN末端で免疫グロブリンヒンジ領域、又はその一部を含み

40

50

うる。免疫グロブリンヒンジ領域は、2つのCH2-CH3ドメイン配列を会合させて、二量体を形成することを可能にする。好ましくは、ヒンジ領域又はその一部は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4ヒンジ領域又はその一部である。より好ましくは、ヒンジ領域又はその一部は、IgG1ヒンジ領域又はその一部である。

【0135】

CH3ドメインの配列は特に限定されない。好ましくは、CH3ドメインは、ヒト免疫グロブリンGドメイン、例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4 CH3ドメインであり、最も好ましくはヒトIgG1 CH3ドメインである。

【0136】

本発明の抗体は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4定常領域を含みうる。ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4 CH3ドメインの配列は、当技術分野で公知である。本発明の抗体は、非ヒトIgG定常領域、例えば、ウサギIgG1定常領域を含みうる。

【0137】

別の実施形態では、抗体は、Table 3(表3)の抗体クローンのいずれか1つに関して示されるポリペプチド配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含むか又はからなる。このように、抗体は、Table 3(表3)に示されるクローンに関してV_H、C_H、V_L及びC_L配列の組合せから選択されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含むか又はからなる。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。

【0138】

このように、本発明は、LGR5に結合し：

- a) 配列番号106のV_H配列；配列番号107のC_H配列；配列番号108のV_L配列；及び配列番号109のC_L配列；
- b) 配列番号110のV_H配列；配列番号111のC_H配列；配列番号112のV_L配列；及び配列番号113のC_L配列；
- c) 配列番号114のV_H配列；配列番号115のC_H配列；配列番号116のV_L配列；及び配列番号117のC_L配列；
- d) 配列番号118のV_H配列；配列番号119のC_H配列；配列番号120のV_L配列；及び配列番号121のC_L配列；
- e) 配列番号122のV_H配列；配列番号123のC_H配列；配列番号124のV_L配列；及び配列番号125のC_L配列；
- f) 配列番号126のV_H配列；配列番号127のC_H配列；配列番号128のV_L配列；及び配列番号129のC_L配列；
- g) 配列番号130のV_H配列；配列番号131のC_H配列；配列番号132のV_L配列；及び配列番号133のC_L配列；
- h) 配列番号134のV_H配列；配列番号135のC_H配列；配列番号136のV_L配列；及び配列番号137のC_L配列；
- i) 配列番号138のV_H配列；配列番号139のC_H配列；配列番号140のV_L配列；及び配列番号141のC_L配列；
- j) 配列番号142のV_H配列；配列番号143のC_H配列；配列番号144のV_L配列；及び配列番号145のC_L配列；
- k) 配列番号146のV_H配列；配列番号147のC_H配列；配列番号148のV_L配列；及び配列番号149のC_L配列；
- l) 配列番号150のV_H配列；配列番号151のC_H配列；配列番号152のV_L配列；及び配列番号153のC_L配列；又は
- m) 配列番号154のV_H配列；配列番号155のC_H配列；配列番号156のV_L配列；及び配列番号

号157のC_L配列

を含む抗体を提供する。

【0139】

【表3A】

Table 3 本発明の抗体の全長の配列

名称	全長配列			
	V _H	C _H	V _L	C _L
1	配列番号106 QVQLQQPGAEL VKPGASVKLSCK ASGYTFTSYWM QWVKQRPGQGL EWIGEIDPSDYY TNYNQKFKGKAT LTVDTSSSTAYM QLSSLTSEDSAV YYCARSLSGYV DYWGQGTTTLTV SS	配列番号107 AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMV TLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV PSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKV DKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV FIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDI SKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQT KPREEQINSTFRSVSELPIMHQD WLNQKEFKCRVNSAAFPAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMA KDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQW NGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFV YSKLVNQSNWEAGNTFTCSVLH EGLHNHHTKSLSHSPGK	配列番号108 DIQMTQSTSSL SASLGDRVTIN CRASQDIRNRL NWYQQKPDGT VKLLISYRSRL QSGVPSRFSG SGSGTEYSLTI SNLEQEDIATY FCQQGNTLPP TFGGGTKLEV R	配列番号109 RADAAPTVSIF PPSSEQLTSG GASVVCFLNN FYPKDINVKWK IDGSERQNGV LNSWTDQDSK DSTYSMSSTLT LTKDEYERHNS YTCEATHKTST SPIVKSFNRE C
2	配列番号110 QVQLQQPGAEL VKPGASVKLSCK ASGYTFTNYWM QWVKQRPGQGL EWIGEIDPSDSY TNYNQKFKGKAT LTVDTSSSTAYM QLSSLTSEDSAV YYCARSLSGYV DYWGQGTTTLTV SS	配列番号111 AKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSV TLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSL SSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTV PSSTWPSQTVTCVAHPASSTTV DKKLEPSGPISTINPCPPCKECKH CPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMI SLTPKVTCTVVDVSEDDPDVRI WVFNNEVHTAQTQTHREDYNS TIRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKC KVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAP QVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLV GFNPGDISVEWTSNGHTEENYKD TAPVLDSGYSYFIYSKLDIKTSKW EKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKT SRSPGK	配列番号112 DIQMTQTTSSL SASLGDRVTIS CRASQDISNRL NWYQQKPDGT VKLLISYRSRL HSGVPSRFSG SGSGTDYSLTI SNLEQEDIATY FCQQGNSLPP TFGGGTKLEV R	配列番号113 RADAAPTVSIF PPSSEQLTSG GASVVCFLNN FYPKDINVKWK IDGSERQNGV LNSWTDQDSK DSTYSMSSTLT LTKDEYERHNS YTCEATHKTST SPIVKSFNRE C

【0140】

【表 3 B】

3	配列番号114 QVQLQQPGAEL VKPGASVKLSCK ASGYTFTSYWM QWVKQRPGQGL EWIGEIDPSDSY SNYNQKFKGKA TLTVDTSSTAY MQLSSLTSEDSA VYYCARSLSGYV DYWGQGTTLT VSS	配列番号115 AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMV TLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL SSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV PSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKV DKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV FIFPPKPKDVLITITLPKVTCTVVDI SKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT KPREEQINSTFRSVSELPIMHQD WLNKGEFKCRVNSAAFPAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMA KDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQW NGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFV YSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLH EGLHNHTEKSLSHSPGK	配列番号116 DIQMTQTTSSL SASLGDRVTIS CRASQDISNRL NWKYQKPDGT VKLLISYRSRL QSGVPSRFSG SGSGTDYSLTI SNLEEEEDIATY FCQQGNTLPP TFGGGKLEVR	配列番号117 RADAAPTVSIF PPSSEQLTSG GASVVCFLNN FYPKDINVKWK IDGSERQNGV LNSWTDQDSK DSTYSMSSTLT LTKDEYERHNS YTCEATHKTST SPIVKSFNRC
4	配列番号118 QVQLQQPGAEL VKPGASVKLSCK ASGYTFTDYWM QWVKQRPGQGL EWIGEIDPSDSY TNYNQKFQKKA TLTVDTSSTAYI QLSSLTSDDSAV YVCARSLSGSV DYWGQGTTLT VSS	配列番号119 AKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSV TLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSL SSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTV PSSTWPSQTVTCVAHPASSTTV DKKLEPSGPISTINPCPPCKECKH CPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMI SLTPKVTCTVVDVSEDDPDVRI WVFNNEVEHTAQTQTHREDYNS TIRVVSALPIHQDWMMSGKEFKC KVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAP QVYILPPAEQLSRKDVSLTCLVV GFNPGDISVEWTSNGHTEENYKD TAPVLDSDGSYFIYSKLDIKTSKW EKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKTI SRSPGK	配列番号120 DIQMTQTTSSL SASLGDRVTIS CRASQDISNRL NWKYQKPDGT VKLLISYRSRL QSGVPSRFSG SGSGTDYSLTI TNLEQEDIATY FCQQGNTLPP TFGGGKLEVR	配列番号121 RADAAPTVSIF PPSSEQLTSG GASVVCFLNN FYPKDINVKWK IDGSERQNGV LNSWTDQDSK DSTYSMSSTLT LTKDEYERHNS YTCEATHKTST SPIVKSFNRC
12	配列番号122 EVQLQQSGPEL VKPGASVKISCK ASGYTFTDYWM NWVKQSHGKSL EWIGDINPNNGG TIYNQKFKGKAT LTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAV YYCASGYLFDY WGPGTTLTVSS	配列番号123 AKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSV TLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSL SSGVHTFPALLQSGLYTLSSSVTV TSNTWPSQTITCNVAHPASSTKVD KKIEPRVPITQNPCPLKECPPCA APDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SPMVTCVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLR VVSALPIHQDWMMSGKEFKCKVN NRALPSPIEKTISKPRGPVRAPQV YVLPPEAEEMTKKEFSLTCMITGF LPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTAT VLDSGDSYFMYSKLRVQKSTWE RGSFLACSVVHEGLHNHLTKTIS RSLGK	配列番号124 DIVMTQSPSSL AMSVGQKVTM SCKSSQSLNLS SNQKNYLAWY QQKPGQSPKL LVYFASTRESG VPDRFIGSGSG TOFTLTISVQA EDLAAYFCQQ HYSTPLTFGAG TKLELK	配列番号125 RADAAPTVSIF PPSSEQLTSG GASVVCFLNN FYPKDINVKWK IDGSERQNGV LNSWTDQDSK DSTYSMSSTLT LTKDEYERHNS YTCEATHKTST SPIVKSFNRC

【0141】

10

20

30

40

50

【表 3 C】

2.1	配列番号126 QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSC KASGYTFTNYW MQWVRQAPGQ GLEWIGEIDPSD SYTNYNQKFQG RVTLTVDSTST AYMELSSLRSED TAVYYCARSLSG YVDYWGQGTTV TVSS	配列番号127 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SPGK	配列番号128 DIQMTQSPSSL SASVGDRVTIT CRASQDISNRL NWYQQKPGKA VKLLISYRSRL HSGVPSRFSG SGSGTDYTLTI SSLQPEDFATY FCQQGNSLPP TFGGGTKLEIK	配列番号129 RTVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNMF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFNR GEC
2.2	配列番号130 QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSC KASGYTFTNYW MQWVRQAPGQ GLEWIGEIDPSD SYTNYNQKFQG RVTLTVDSTST AYMELSSLRSED TAVYYCARSLSG YVDYWGQGTTV TVSS	配列番号131 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SPGK	配列番号132 DIQMTQSPSSL SASVGDRVTIT CRASQDISNRL NWYQQKPGKA VKLLISYRSRL HSGVPSRFSG SGSGTDYTLTI SSLQPEDFATY YCQQGNSLPP TFGGGTKLEIK	配列番号133 RTVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNMF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFNR GEC

【 0 1 4 2 】

【表 3 D】

2.3	配列番号134 QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSC KASGYTFTNYW MQWVRQAPGQ GLEWIGEIDPSD SYTNYNQKFQG RVTLTVDSTST AYMELSSLRSED TAVYYCARSLSG YVDYWGQGTTV TVSS	配列番号135 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	配列番号136 DIVMTQSPATL SLSPGERATLS CRASQDISNRL NWYQQKPGQ AVRLLISYRSRL HSGVPARFSG SGSGTDYTLTI SSLEPEDFAVY FCQQGNSLPP TFGGGTKLEIK	配列番号137 RTVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNMF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFNR GEC
2.4	配列番号138 QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSC KASGYTFTNYW MQWVRQAPGQ GLEWIGEIDPSD SYTNYNQKFQG RVTLTVDSTST AYMELSSLRSED TAVYYCARSLSG YVDYWGQGTTV TVSS	配列番号139 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	配列番号140 EIVMTQSPATL SLSPGERATLS CRASQDISNRL NWYQQKPGQ AVRLLISYRSR RHTGIPARFSG SGSGTDYTLTI SSLEPEDFAVY YCQQGNSLPP TFGGGTKLEIK	配列番号141 RTVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNMF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFNR GEC

【 0 1 4 3 】

【表 3 E】

2.9	配列番号142 QVQLVQSGSEL KKPGASVKVSC KASGYTFTNYW MQWVRQAPGQ GLEWIGEIDPSD SYTNYNQGFTG RFVLSVDTSVST AYLQISSLKAEDT AVYYCARSLSGY VDYWGQGTTVT VSS	配列番号143 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SPGK	配列番号144 DIQMTQSPSSL SASVGDRVTIT CRASQDISNRL NWYQQKPGKA VKLLISYRSRL HSGVPSRFSG SGSGTDYTLTI SSLQPEDFATY FCQQGNSLPP TFGGGTKLEIK	配列番号145 RTVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFNR GEC
2.1 1	配列番号146 QVQLVQSGSEL KKPGASVKVSC KASGYTFTNYW MQWVRQAPGQ GLEWIGEIDPSD SYTNYNQGFTG RFVLSVDTSVST AYLQISSLKAEDT AVYYCARSLSGY VDYWGQGTTVT VSS	配列番号147 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SPGK	配列番号148 DIVMTQSPATL SLSPGERATLS CRASQDISNRL NWYQQKPGQ AVRLLISYRSRL HSGVPAFSG SGSGTDYTLTI SSLEPEDFAVY FCQQGNSLPP TFGGGTKLEIK	配列番号149 RTVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFNR GEC

【 0 1 4 4 】

【表 3 F】

2.1 2	配列番号150 QVQLVQSGSEL KKPGASVKVSC KASGYTFTNYW MQWVRQAPGQ GLEWIGEIDPSD SYTNYNQFTG RFVLSVDTSVST AYLQISSLKAEDT AVYYCARSLSGY VDYWGQGTTVT VSS	配列番号151 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	配列番号152 EIVMTQSPATL SLSPGERATLS CRASQDISNRL NWKYQKPGQ AVRLLISYRSR RHTGIPARFSG SGSGTDYTLTI SSLEPEDFAVY YCQQGNSLPP TFGGGTKLEIK	配列番号153 RTVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNMF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFNR GEC
	配列番号154 QVQLVQSGSEL KKPGASVKVSC KASGYTFTNYW MNWVRQAPGQ GLEWMGEIDPS DSYTNYNQFTG GRFVFSVDTSVS TAYLQISSLKAED TAVYYCARSLSG YVDYWGQGTTV TVSS	配列番号155 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	配列番号156 EIVMTQSPATL SLSPGERATLS CRASQDISNRL NWKYQKPGQ AVRLLISYRSR RHTGIPARFSG SGSGTDYTLTI SSLEPEDFAVY YCQQGNSLPP TFGGGTKLEIK	配列番号157 RTVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNMF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFNR GEC

10

20

【0145】

30

Table 3(表3)では、クローン1、2、3、4及び12は、ネズミ抗体であり、クローン2.1、2.2、2.3、2.4、2.9、2.11、2.12及び2.16は、ヒト化抗体である。

【0146】

抗体がヒト化抗体である複数の実施形態では、抗体は、クローン2.1、2.2、2.3、2.4、2.9、2.11、2.12及び2.16に関してTable 3(表3)に示される配列、又はそれと少なくとも90%相同性を有する配列を含みうる。

【0147】

一部の実施形態では、本発明は、上記の抗体、又は1つ若しくは複数のアミノ酸改変、例えば置換、欠失、付加、挿入、又は他の改変を有し、抗体の生物機能を保持する上記の抗体又はその断片のいずれかのバリエーションである抗体を提供する。このように、バリエーション抗体は、配列が工学操作されうる。改変は、天然の抗体又はポリペプチドと比較して、アミノ酸配列の変化をもたらす抗体又はポリペプチドをコードする1つ又は複数のコドンの少なくとも1つの置換、欠失又は挿入を含む。アミノ酸置換は、1つのアミノ酸を、類似の構造及び/又は化学的性質を有する別のアミノ酸と交換した結果、例えばロイシンとセリンの交換、すなわち保存的アミノ酸交換の結果でありうる。挿入又は欠失は、任意選択で約1~5個のアミノ酸の範囲でありうる。許容されるバリエーションは、配列におけるアミノ酸の挿入、欠失、又は置換を系統的に作製すること、及び得られたバリエーションを、全長又は成熟の天然の配列によって示される活性に関して試験することによって決定されうる。本明細書に記載される抗体のバリエーションは、非バリエーション分子に対して少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、8

40

50

7%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%配列相同性、好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%配列相同性を有する。

【0148】

一実施形態では、改変は、保存的配列改変である。本明細書で使用される場合、「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特徴に有意に影響を及ぼさない又は結合特徴を変更しないアミノ酸改変を指すと意図される。そのような保存的改変は、アミノ酸置換、付加、及び欠失を含む。当技術分野で公知の標準的な技術、例えば部位特異的変異誘発及びPCR媒介変異誘発によって、本発明の抗体に改変を導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基に交換されている置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当技術分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、無電荷極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ分岐側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)、及び芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸を含む。このように、本発明の抗体のCDR領域内の1つ又は複数のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基と交換することができ、変更された抗体を、本明細書に記載される機能的アッセイを使用して、保持された機能(すなわち、上記の(c)~(l)に記載の機能)に関して試験することができる。

10

20

【0149】

一実施形態では、本発明は、1つ又は複数の配列改変を含み、非改変抗体と比較して結合親和性、特異性、熱安定性、発現レベル、エフェクター機能、グリコシル化、低減された免疫原性、又は溶解度等の性質の1つ又は複数の改善を有する、Table 3(表3)に示される抗体から選択される抗体のバリエーションである抗体を提供する。配列改変は、CDR1、CDR2、及び/若しくはCDR3、又は1つ若しくは複数のフレームワーク領域に存在する。

【0150】

本発明の抗体は、エフェクター機能を有するヒトIgG Fcを含みうる。

30

【0151】

Fc受容体(FcR)は、抗体媒介性(液性)免疫応答を細胞エフェクター機能と結びつける重要な免疫調節性受容体である。FcγR(IgG)、FcεRI(IgE)、FcαRI(IgA)、FcμR(IgM)及びFcδR(IgD)を含む免疫グロブリンの全てのクラスの受容体が同定されている。白血球において見出されるヒトIgGの3つのクラスの受容体が存在する:CD64(FcγRI)、CD32(FcγRIIa、FcγRIIb及びFcγRIIc)及びCD16(FcγRIIIa及びFcγRIIIb)。FcγRIは、高親和性受容体(ナノモル濃度範囲のKd)として分類されるが、FcγRI I及びFcγRIIIは、低親和性から中等度の親和性(マイクロモル濃度範囲のKd)である。

【0152】

抗体依存性細胞傷害(ADCC)では、エフェクター細胞の表面上のFcγR(ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、及び好酸球)は、それ自体が標的細胞に結合するIgGのFc領域に結合する。結合すると、シグナル伝達経路が誘発され、これは様々な物質、例えば溶解性酵素、パーフォリン、グランザイム、及び標的細胞の破壊を媒介する腫瘍壊死因子の分泌をもたらす。ADCCエフェクター機能のレベルは、IgGサブタイプに関して多様である。これは、アロタイプ及び特異的FcγRに依存するが、簡単に言うとADCCエフェクター機能は、ヒトIgG1及びIgG3に関して高く、IgG2及びIgG4に関して低い。エフェクター機能のIgGサブタイプのバリエーションに関しては、効力が減少する順に順位付けした以下を参照されたい。

40

【0153】

50

FcγRは、ヒンジ及び上部CH2領域を超えて非対称にIgGに結合する。結合部位が分かっていたので、IgGエフェクター機能をモジュレートするための工学操作努力がなされた。

【0154】

本発明の抗体は、エフェクター機能、増強されたエフェクター機能、又は低減されたエフェクター機能を有するFcを有しうる。

【0155】

抗体の効力を、細胞傷害性機能、例えば抗体依存性細胞傷害(ADCC)及び抗体依存性細胞性食作用(ADCP)を媒介する能力の増強によって増加させることができる。Fc受容体の結合を直接又は間接的に増強し、細胞傷害を有意に増強するFcドメイン内の複数の変異: S239D/A330L/I332E ("3M")、F243L又はG236Aが同定されている。或いは、エフェクター機能の増強は、Fcドメインのグリコシル化を改変することによって達成することができ、FcγRは、CH2ドメイン上の糖質と相互作用し、グリカン組成は、エフェクター機能活性に対して実質的な効果を有する。脱フコシル化(非フコシル化)抗体は、FcγRIIIaに対する結合の増加を通して大きく増強されたADCC活性を示す。

【0156】

ADCC及びCDCの活性化は、一部の治療抗体にとって望ましい場合があるが、一部の実施形態では、エフェクター機能を活性化しない抗体が好ましい。エフェクター機能の欠如により、IgG4抗体は、細胞枯渇を伴わない受容体遮断にとって好ましいIgGサブクラスである。しかし、IgG4分子は、Fab-アーム交換と呼ばれる動的プロセスにおいて半分の分子を交換することができる。この現象は、治療抗体と内因性のIgG4の間で起こりうる。S228P変異は、この組換えプロセスを防止して、Fab-アーム交換に関して低減された傾向を有するIgG4抗体の設計を可能にすることが示されている。Fcの工学操作アプローチは、IgG1 FcドメインとFcγ受容体及びC1qとの重要な相互作用部位を決定し、次にこれらの位置を変異させて結合を低減又は排除するために使用されている。アラニンスキャニングを通して、Fcドメインのヒンジ及び上部CH2を包含する領域に対するC1qの結合部位を同定した。本発明の抗体又は断片のCH2ドメインは、1つ又は複数のFcγ受容体、例えばFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIII、及び/又は補体に対するCH2ドメインの結合を減少又は抑止する1つ又は複数の変異を含みうる。ヒトIgGドメインのCH2ドメインは、通常、Fcγ受容体及び補体に結合し、Fcγ受容体に対する結合の減少は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を減少させると予想され、補体に対する結合の減少は、抗体分子の補体依存性細胞傷害(CDC)活性を減少させると予想される。1つ又は複数のFcγ受容体及び/又は補体に対するCH2ドメインの結合を減少又は抑止する変異は、当技術分野で公知である。本発明の抗体分子は、FcγR及びC1q結合をほぼ完全に消失させる改変:K322A/L234A/L235A又はL234F/L235E/P331S ("TM")を有するFcを含みうる。本発明の抗体分子は、EU234及び235位(IMGTナンバリングによる1.3及び1.2位)でアラニン残基を含む("LALA変異")CH2ドメインを含みうる。更に、補体活性化及びADCCを、Pro329(EUナンバリングに従う位置)の、例えばP329A又はP329Gのいずれかへの変異によって減少させることができる。本発明の抗体分子は、EU234及び235位(IMGTナンバリングによる1.3及び1.2位)でアラニン残基、及びEU329位(IMGTナンバリングによる114位)でアラニン(LALA-PA)又はグリシン(LALA-PG)を含むCH2ドメインを含みうる。加えて又は或いは、本発明の抗体分子は、EU297位(IMGTナンバリングによる84.4位)で、アラニン、グルタミン又はグリシンを含みうる。

【0157】

最適なFcR相互作用にとって必要であることが公知であるFcドメインのアスパラギン297でのグリコシル化の改変は、FcRに対する結合の喪失を付与しうる; FcRに対する結合の喪失は、N297点変異で観察されている。本発明の抗体分子は、N297A、N297G又はN297Q変異を有するFcを含みうる。脱フコシル化Fcドメインを有する本発明の抗体分子は、酵素脱グリコシル化によって、グリコシル化阻害剤の存在下での組換え発現によって、又は細菌におけるFcドメインの発現後に得られうる。

【0158】

IgGは、天然においてFcRn媒介リサイクルにより血清中に長期間持続し、典型的な半減期は約21日である。半減期を、pH7.4での最小の結合を保持しながら、FcドメインとFcRnとのpH依存的相互作用を工学操作して、pH6.0での親和性を増加させることによって延長させることができる。T250Q/M428Lバリエーションは、IgG半減期のおよそ2倍の増加を付与したが(アカゲザルにおいて評価した場合)、M252Y/S254T/T256Eバリエーション(YTE")は、IgG半減期のおよそ4倍増加を与えた(カニクイザルにおいて評価した場合)。半減期の延長は、有効性を維持又は改善しながら、投与回数を減少させる可能性を可能にする。

【0159】

本発明の抗体は、好ましくは、実施例に示されるように、およそ4nM未満、およそ3nM未満、およそ2nM未満、およそ1nM未満のKd値を有する。

【0160】

「Kd」という用語は、「平衡解離定数」を指し、平衡時の滴定測定で得られた値、又は解離速度定数(Koff)を結合速度定数(Kon)で除算することによって得られた値を指す。「Ka」は、親和性定数を指す。結合速度定数、解離速度定数、及び平衡解離定数は、抗原に対する抗体の結合親和性を表すために使用される。結合及び解離速度定数を決定する方法は、当技術分野で周知である。蛍光に基づく技術を使用することは、高い感度及び平衡時の生理緩衝液中の試料を調べる能力を提供する。他の実験アプローチ及び機器、例えばBIAcore(登録商標)(生体分子相互作用解析)アッセイを使用することができる。

【0161】

複数の実施形態では、本発明に従う抗体は、ナノモル濃度範囲のKd値を有する。

【0162】

本発明は、残基22~37(配列番号1)を含むか又はからなる単離されたペプチド内のエピトープに対する結合に関して、本明細書に記載される本発明の抗体(例えば、Kabatの命名法によって定義されるHCDR及びLCDRのセット、及び/又はTable 1~3(表1~3)のクローンの任意の1つのVH及び/又はVLアミノ酸配列)と競合することが可能な抗原結合タンパク質、例えば抗体又はその抗原結合性断片を提供する。

【0163】

競合アッセイは、イムノアッセイ、例えばELISA、HTRF;フローサイトメトリー;蛍光マイクロボリュームアッセイ技術(FMAT)アッセイ、Mirrorball、ハイコンテンツイメージングに基づく蛍光イムノアッセイ、放射性リガンド結合アッセイ、バイオレイヤー干渉法(BLI)、表面プラズモン共鳴(SPR)及びサーマルシフトアッセイを含む、細胞に基づく及び無細胞結合アッセイを含む。

【0164】

参照抗体と同じエピトープ又は重複するエピトープに結合する抗体は、競合アッセイにおいて参照抗体がその結合パートナー(例えば、抗原又は「標的」)に結合するのを50%若しくはそれより多く遮断し、及び/又は逆に、参照抗体が、競合アッセイにおいてその結合パートナーに対する抗体の結合を50%若しくはそれより多く遮断する抗体を指す。そのような抗体は、目的のエピトープに対する結合に関して競合すると言われる。

【0165】

本発明は、本発明の抗体をコードする単離された核酸を更に提供する。核酸は、DNA及び/又はRNAを含みうる。

【0166】

一態様では、本発明はこのように、Table 4(表4)に示されるクローンに関して、VH、CH、VL及びCL配列の組合せから選択される配列を含むか又はからなる核酸配列にも関する。Table 4(表4)の核酸配列は、Table 3(表3)に示される抗体をコードする。

【0167】

このように、本発明は、LGR5に結合し、以下の核酸配列:

a) 配列番号158のVH配列;配列番号159のCH配列;配列番号160のVL配列;及び配列番

10

20

30

40

50

号161のC_L配列;

b) 配列番号162のV_H配列;配列番号163のC_H配列;配列番号164のV_L配列;及び配列番号165のC_L配列;

c) 配列番号166のV_H配列;配列番号167のC_H配列;配列番号168のV_L配列;及び配列番号169のC_L配列;

d) 配列番号170のV_H配列;配列番号171のC_H配列;配列番号172のV_L配列;及び配列番号173のC_L配列;

e) 配列番号174のV_H配列;配列番号175のC_H配列;配列番号176のV_L配列;及び配列番号177のC_L配列;

f) 配列番号178のV_H配列;配列番号179のC_H配列;配列番号180のV_L配列;及び配列番号181のC_L配列; 10

g) 配列番号182のV_H配列;配列番号183のC_H配列;配列番号184のV_L配列;及び配列番号185のC_L配列;

h) 配列番号186のV_H配列;配列番号187のC_H配列;配列番号188のV_L配列;及び配列番号189のC_L配列;

i) 配列番号190のV_H配列;配列番号191のC_H配列;配列番号192のV_L配列;及び配列番号193のC_L配列;

j) 配列番号194のV_H配列;配列番号195のC_H配列;配列番号196のV_L配列;及び配列番号197のC_L配列;

k) 配列番号198のV_H配列;配列番号199のC_H配列;配列番号200のV_L配列;及び配列番号201のC_L配列; 20

l) 配列番号202のV_H配列;配列番号203のC_H配列;配列番号204のV_L配列;及び配列番号205のC_L配列;又は

m) 配列番号206のV_H配列;配列番号207のC_H配列;配列番号208のV_L配列;及び配列番号209のC_L配列

を含む抗体又はその断片を提供する。

【0168】

一実施形態では、核酸は配列番号218である。

【0169】

30

40

50

【表 4 A】

Table 4 Table 3に示される本発明の抗体をコードする核酸配列

名称	全長の配列			
	V _H	C _H	V _L	C _L
1	配列番号158 CAGGTCCAAC TGCAGCAGCC TGGGGCTGAG CTTGTGAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAACTG TCCTGCAAGG CTTCTGGCTA CACCTTCACC AGCTACTGGA TGCAGTGGGT AAAACAGAGG CCTGGACAGG GCCTTGAGTG GATCGGAGTG ATTGATCCTC TGATTACTATA CTAACATAAT CAAAAGTTCA AGGGCAAGGC CACATTGACT GTAGACACAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATTA CTGTGCAAGA TCCCTCTCAG GCTACGTTGA CTAAGGGGCT CAAGGCACCA CTCTCACAGT CTCCTCA	配列番号159 GCCAAAACGACACCCCATCTGTCT ATCCACTGGCCCTGGATCTGCTG CCCAACTAACTCCATGGTGACCCT GGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTC CCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGG AACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGT GTGCACACCTTCCAGCTGTCCTG CAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCA GCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCA CCTGGCCCAGCCAGACCGTCACCT GCAACGTTGCCACCCGGCCAGCA GCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG TGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGC CTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGT ATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAA AGCCCAAGGATGTGCTCACCATTAC TCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTT GTGGTAGACATCAGCAAGGATGATC CCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTG TAGATGATGTGGAGGTGCACACAG CTCAGACGAAACCCCGGGAGGAGC AGATCAACAGCACTTCCGTTTCAGT CAGTGAACCTCCCATCATGCACCAG GACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTC AAATGCAGGGTCAACAGTGACGCT TTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGA AGGCTCCACAGGTGTACACCATTC ACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAA GGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATG ATAACAACTTCTTCCCTGAAGACAT TACTGTGGAGTGGCAGTGGAATGG GCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAA CACTCAGCCCATCATGGACACAGAT GGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGC TCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGG AGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTC TGTGTTACATGAGGGCCTGCACAAC CACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCC ACTCTCCTGGTAAA	配列番号160 GATATCCAGAT GACACAGAGT ACATCCTCCC TGTCTGCCTC TCTGGGAGAC AGAGTCACCA TCAATTGCAG GGCAAGTCAG GACATTAGAAA TCGTTTAAACT GGTATCAGCA GAAACCAGAT GGAAGTGTGA AACTCCTGAT CAGCTACAGA TCAAGATTACA GTCAGGAGTC CCATCAAGGT TCAGTGGCAG TGGGTCTGGC ACAGAGTATTC TCTCACCATT GCAACCTGGA GCAAGAAGAC ATTGCCACTTA TTTTGGCCAAC AGGGCAATAC GCTTCCTCCC ACGTTCGGAG GGGGGACCAA GCTGGAAGTG AGA	配列番号160 CGGGCTGAT GCTGCACCA ACTGTATCCA TCTTCCCAC CATCCAGTG AGCAGTTAA CATCTGGAG GTGCCTCAG TCGTGTGCT TCTTGAACA ACTTCTACCC CAAAGACAT CAATGTCAA GTGGAAGAT TGATGGCAG TGAACGACA AAATGGCGT CCTGAACAG TTGGACTGA TCAGGACAG CAAAGACAG CACCTACAG CATGAGCAG CACCCTCAC GTTGACCAA GGACGAGTA TGAACGACA TAACAGCTAT ACCTGTGAG GCCACTCAC AAGACATCA ACTTCACCC ATTGTCAAGA GCTTCAACA GGAATGAGT GT

10

20

30

【0170】

40

50

【表 4 B】

2	配列番号162	配列番号163	配列番号164	配列番号165
	CAAGTCCAAC	GCCAAAACAACACCCCCATCAGTCT	GATATCCAGAT	CGGGCTGAT
	TGCAGCAGCC	ATCCACTGGCCCCTGGGTGTGGAG	GACACAGACT	GCTGCACCA
	TGGGGCTGAG	ATACAACTGGTTCCTCTGTGACTCT	ACATCCTCCC	ACTGTATCCA
	CTTGTAAGC	GGGATGCCTGGTCAAGGGCTACTT	TGTCTGCCTC	TCTTCCCAC
	CTGGGGCTTC	CCCTGAGTCAGTCACTGTGACTTG	TCTGGGAGAC	CATCCAGTG
	AGTGAAGCTG	GAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCAG	AGAGTCACCA	AGCAGTTAA
	TCCTGCAAGG	TGTGCACACCTTCCCAGCTCTCCTG	TCAGTTGCAG	CATCTGGAG
	CTTCTGGCTA	CAGTCTGGACTCTACACTATGAGCA	GGCAAGTCAG	GTGCCTCAG
	CACCTTCACC	GCTCAGTCACTGTCCCTCCAGCA	GACATTAGCAA	TCGTGTGCT
	AACTACTGGAT	CCTGGCCAAGTCAGACCGTCACCT	TCGTTTAACT	TCTTGAACA
	GCAGTGGGTA	GCAGCGTTGCTCACCAGCCAGCA	GGTATCAGCA	ACTTCTACCC
	AAACAGAGGC	GCACCACGGTGGACAAAAAATTG	GAAACCAGAT	CAAAGACAT
	CTGGACAGGG	AGCCCAGCGGGCCCATTTCAACAA	GGAAGTGT	CAATGTCAA
	CCTTGAGTGG	TCAACCCCTGTCTCCATGCAAGGA	AACTCCTGAT	GTGGAAGAT
	ATCGGAGAGA	GTGTACAAATGCCAGCTCCTAAC	CAGCTACAGA	TGATGGCAG
	TTGATCCTTCT	CTCGAGGGTGGACCATCCGTCTTC	TCAAGATTACA	TGAACGACA
	GATAGTTATAC	ATCTTCCCTCCAAATATCAAGGATGT	CTCAGGAGTC	AAATGGCGT
	TAACACAATC	ACTCATGATCTCCCTGACACCCAAG	CCATCAAGGT	CCTGAACAG
	AAAAGTTCAA	GTCACGTGTGTGGTGGTGGATGTG	TCAGTGGCAG	TTGGACTGA
	GGGCAAGGCC	AGCGAGGATGACCCAGACGTCCGG	TGGGTCTGGC	TCAGGACAG
	ACATTGACTGT	ATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGG	ACAGATTATTC	CAAAGACAG
	AGACACATCC	AAGTACACAGCTCAGACACAAAC	TCTCACCATTA	CACCTACAG
	TCCAGCACAG	CCATAGAGAGGATTACAACAGTACT	GCAACCTGGA	CATGAGCAG
	CCTACATGCA	ATCCGGGTGGTCACTGCCCTCCCC	GCAAGAAGAC	CACCCTCAC
	GCTCAGCAGC	ATCCAGCACCAGGACTGGATGAGT	ATTGCCACTTA	GTTGACCAA
	CTGACATCTG	GGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTC	TTTTTGCCAAC	GGACGAGTA
	AGGACTCTGC	AACAACAAAGACCTCCCATCACCCA	AGGGTAATTC	TGAACGACA
	GGTCTATTACT	TCGAGAGAACCATCTCAAAAATTAA	GCTTCCTCCC	TAACAGCTAT
	GTGCAAGATC	AGGGCTAGTCAGAGCTCCACAAGT	ACGTTCCGGAG	ACCTGTGAG
	CCTCTCAGGC	ATACATCTTGCCGCCACCAGCAGAG	GGGGGACCAA	GCCACTCAC
	TACGTTGACTA	CAGTTGTCCAGGAAAGATGTCAGTC	GCTGGAAGTG	AAGACATCA
	CTGGGGCCAA	TCACTTGCCTGGTCTGTTGGCTTCA	AGA	ACTTCACCC
	GGCACCACCTC	ACCCTGGAGACATCAGTGTGGAGT		ATTGTCAAGA
	TCACAGTCTC	GGACCAGCAATGGGCATACAGAGG		GCTTCAACA
	CTCA	AGAAGTACAAGGACACCGCACCCAG		GGAATGAGT
		TCCTGGACTCTGACGGTTCTTACTT		GT
		CATATACAGCAAGCTCGATATAAAAA		
		CAAGCAAGTGGGAGAAAACAGATT		
		CCTTCTCATGCAACGTGAGACACGA		
		GGGTCTGAAAAATTACTACCTGAAG		
		AAGACCATCTCCCGGTCTCCGGGT		
		AAA		

10

20

30

40

50

【0171】

【表 4 C】

3	配列番号166	配列番号167	配列番号168	配列番号169
	CAGGTCCAAC	GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCT	GATATCCAGAT	CGGGCTGAT
	TGCAGCAGCC	ATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTG	GACACAGACT	GCTGCACCA
	TGGGGCTGAG	CCCAAATAACTCCATGGTGACCCT	ACATCCTCCC	ACTGTATCCA
	CTTGTGAAGC	GGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTC	TGTCTGCCTC	TCTTCCCAC
	CTGGGGCTTC	CCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGG	TCTGGGAGAC	CATCCAGTG
	AGTGAAGCTG	AACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGT	AGAGTCACCA	AGCAGTTAA
	TCCTGCAAGG	GTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTG	TCAGTTGCAG	CATCTGGAG
	CTTCTGGCTA	CAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCA	GGCAAGTCAG	GTGCCTCAG
	CACCTTCACC	GCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCA	GACATTAGCAA	TCGTGTGCT
	AGCTACTGGA	CCTGGCCCAGCCAGACCGTCACCT	TCGTTTAACT	TCTTGAACA
	TGCAGTGGGT	GCAACGTTGCCACCCGGCCAGCA	GGTATCAGCA	ACTTCTACCC
	AAAACAGAGG	GCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG	GAAACCAGAT	CAAAGACAT
	CCTGGACAGG	TGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGC	GAACTGTTA	CAATGTCAA
	GCCTTGAGTG	CTTGCAATGTACAGTCCCAGAAGT	AACTCCTGAT	GTGGAAGAT
	GATCGGAGAG	ATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAA	CAGCTACAGA	TGATGGCAG
	ATTGATCCTTC	AGCCCAGGATGTGCTCACCATTAC	TCAAGATTACA	TGAACGACA
	TGATAGCTATA	TCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTT	GTCAGGAGTC	AAATGGCGT
	GTAATAACAAT	GTGGTAGACATCAGCAAGGATGATC	CCATCAAGGT	CCTGAACAG
	CAAAAGTTCA	CCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTG	TCAGTGGCAG	TTGGACTGA
	AGGGCAAGGC	TAGATGATGTGGAGGTGCACACAG	TGGGTCTGGC	TCAGGACAG
	CACATTGACT	CTCAGACGAAACCCCGGGAGGAGC	ACAGATTATTC	CAAAGACAG
	GTAGACACAT	AGATCAACAGCACTTTCGGTTCAGT	TCTCACCATTA	CACCTACAG
	CCTCCAGCAC	CAGTGAACCTCCCATCATGCACCAG	GCAACCTGGA	CATGAGCAG
	AGCCTACATG	GACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTC	GGAAGAAGAC	CACCCTCAC
	CAGCTCAGCA	AAATGCAGGGTCAACAGTGACAGT	ATTGCCACCTA	GTTGACCAA
	GCCTGACATC	TTCCTGCCCCCATCGAGAAAACCA	TTTTTGCCAAC	GGACGAGTA
	TGAGGACTCT	TCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGA	AGGGTAATAC	TGAACGACA
	GCGGTCTATTA	AGGCTCCACAGGTGTACACCATTCC	CCTTCCTCCC	TAACAGCTAT
	CTGTGCAAGA	ACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAA	ACGTTCTGGAG	ACCTGTGAG
	TCCCTCTCAG	GGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATG	GGGGGACCAA	GCCACTCAC
	GCTACGTTGA	ATAACAACTTCTTCCCTGAAGACAT	GCTGGAAGTG	AAGACATCA
	CTACTGGGGC	TACTGTGGAGTGGCAGTGGAATGG	AGA	ACTTCACCC
	CAAGGCACCA	GCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAA		ATTGTCAAGA
	CTCTCACAGT	CACTCAGCCCATCATGGACACAGAT		GCTTCAACA
	CTCCTCA	GGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGC		GGAATGAGT
		TCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGG		GT
		AGGCAGGAAATACTTTCACCTGCTC		
		TGTGTTACATGAGGGCCTGCACAAC		
		CACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCC		
		ACTCTCCTGGTAAA		

10

20

30

【0172】

40

50

【表 4 D】

4	配列番号170	配列番号171	配列番号172	配列番号173
	CAGGTCCAAC	GCCAAAACAACACCCCATCAGTCT	GATATCCAGAT	CGGGCTGAT
	TGCAGCAGCC	ATCCACTGGCCCCTGGGTGTGGAG	GACACAGACT	GCTGCACCA
	TGGGGCTGAG	ATACAACTGGTTCCTCTGTGACTCT	ACTTCCTCCC	ACTGTATCCA
	CTTGTGAAGC	GGGATGCCTGGTCAAGGGCTACTT	TGTCTGCCTC	TCTTCCAC
	CTGGGGCTTC	CCCTGAGTCAGTGACTGTGACTTG	TCTGGGAGAC	CATCCAGTG
	AGTGAAGCTG	GAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCAG	AGAGTCACCA	AGCAGTTAA
	TCCTGCAAGG	TGTGCACACCTTCCCAGCTCTCCTG	TCAGTTGCAG	CATCTGGAG
	CTTCTGGCTA	CAGTCTGGACTCTACACTATGAGCA	GGCAAGTCAG	GTGCCTCAG
	CACCTTCACC	GCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCA	GACATTAGCAA	TCGTGTGCT
	GACTACTGGA	CCTGGCCAAGTCAGACCGTCACCT	TCGTTTAACT	TCTTGAACA
	TGCAGTGGGT	GCAGCGTTGCTCAGCCAGCCAGCA	GGTATCAGCA	ACTTCTACCC
	AAAACAGAGG	GCACCACGGTGGACAAAAAAGTTG	GAAACCAGAT	CAAAGACAT
	CCTGGACAGG	AGCCCAGCGGGCCATTTCACAA	GGAAGTGTTA	CAATGTCAA
	GCCTTGAGTG	TCAACCCCTGTCTCCATGCAAGGA	AACTCCTGAT	GTGGAAGAT
	GATCGGAGAG	GTGTCAAAATGCCAGCTCCTAAC	CAGCTACAGA	TGATGGCAG
	ATTGATCCTTC	CTCGAGGGTGGACCATCCGTCTTC	TCAAGATTACA	TGAACGACA
	TGATAGCTATA	ATCTTCCCTCCAAATATCAAGGATGT	GTCAGGAGTC	AAATGGCGT
	CTAACTACAAT	ACTCATGATCTCCCTGACACCCAAG	CCATCAAGGT	CCTGAACAG
	CAAAAGTTCC	GTCACGTGTGTGGTGGTGGATGTG	TCAGTGGCAG	TTGGACTGA
	AGGGCAAGGC	AGCGAGGATGACCCAGACGTCCGG	TGGGTCTGGC	TCAGGACAG
	CACATTGACT	ATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGG	ACAGATTATTC	CAAAGACAG
	GTAGACACAT	AAGTACACACAGCTCAGACACAAAC	TCTCACCATTA	CACCTACAG
	CCTCCAGCAC	CCATAGAGAGGATTACAACAGTACT	CCAACCTGGA	CATGAGCAG
	AGCCTACATC	ATCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCC	GCAAGAAGAC	CACCCTCAC
	CAGCTCAGCA	ATCCAGCACCAAGGACTGGATGAGT	ATTGCCACTTA	GTTGACCAA
	GCCTGACATC	GGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTC	TTTTTGCCAAC	GGACGAGTA
	TGACGACTCT	AACAACAAAGACCTCCCATCACCCA	AGGGTAATAC	TGAACGACA
	GCGGTCTATTA	TCGAGAGAACCATCTCAAAAATTAA	GCTTCCTCCC	TAACAGCTAT
	CTGTGCAAGA	AGGGCTAGTCAGAGCTCCACAAGT	ACGTTCGGAG	ACCTGTGAG
	TCCCTCTCAG	ATACATCTTGCCGCCACCAGCAGAG	GGGGGACCAA	GCCACTCAC
	GCTCCGTTGA	CAGTTGTCCAGGAAAGATGTCAGTC	GCTGGAAGTG	AAGACATCA
	CTACTGGGGC	TCACTTGCCTGGTCGTGGGCTTCA	AGA	ACTTCACCC
	CAAGGCACCA	ACCCTGGAGACATCAGTGTGGAGT		ATTGTCAAGA
	CTCTCACAGT	GGACCAGCAATGGGCATACAGAGG		GCTTCAACA
	CTCCTCA	AGAACTACAAGGACACCGCACCCAG		GGAATGAGT
		TCCTGGACTCTGACGGTTCTTACTT		GT
		CATATACAGCAAGCTCGATATAAAAA		
		CAAGCAAGTGGGAGAAAACAGATT		
		CCTTCTCATGCAACGTGAGACACGA		
		GGGTCTGAAAAATTACTACCTGAAG		
		AAGACCATCTCCCGGTCTCCGGGT		
		AAA		

10

20

30

40

50

【 0 1 7 3 】

【表 4 E】

12	配列番号174	配列番号175	配列番号176	配列番号177
	GAGGTCCAGC	GCCAAAACAACAGCCCCATCGGTC	GACATTGTGAT	CGGGCTGAT
	TGCAACAATCT	TATCCACTGGCCCCCTGTGTGTGGA	GACACAGTCT	GCTGCACCA
	GGACCTGAGC	GGTACAACCTGGCTCCTCGGTGACT	CCATCCTCCC	ACTGTATCCA
	TGGTGAAGCC	CTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATT	TGGCTATGTCA	TCTTCCCAC
	TGGGGCTTCA	TCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCT	GTAGGACAGA	CATCCAGTG
	GTGAAGATATC	GGAACTCTGGATCCCTGTCCAGTG	AGGTCACAT	AGCAGTTAA
	CTGTAAGGCT	GTGTGCACACCTTCCCAGCTCTCCT	GAGCTGCAAG	CATCTGGAG
	TCTGGATACAC	GCAGTCTGGCCTCTACACCCCTCAG	TCCAGTCAGA	GTGCCTCAG
	GTTCACTGAC	CAGCTCAGTGAACCTCGAAC	GCCTTTTAAAT	TCGTGTGCT
	TACTACATGAA	ACCTGGCCCAGCCAGACCATCACC	AGTAGCAATCA	TCTTGAACA
	CTGGGTGAAG	TGCAATGTGGCCACCCGGCAAGC	AAAGAACTATT	ACTTCTACCC
	CAGAGCCATG	AGCACCAAAGTGGACAAGAAAATTG	TGGCCTGGTA	CAAAGACAT
	GAAAGAGCCT	AGCCCAGAGTGCCATAACACAGA	CCAGCAGAAA	CAATGTCAA
	TGAGTGGATT	ACCCCTGTCCTCCACTCAAAGAGT	CCAGGACAGT	GTGGAAGAT
	GGAGATATTAA	GTCCCCCATGCGCAGCTCCAGACC	CTCCTAAACTT	TGATGGCAG
	TCCTAACATG	TCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCAT	CTGGTATACTT	TGAACGACA
	GTGGTACTATC	CTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTA	TGCATCCACTA	AAATGGCGT
	TACAACCAGA	CTCATGATCTCCCTGAGCCCCATGG	GGGAATCTGG	CCTGAACAG
	AGTTCAAGGG	TCACATGTGTGGTGGTGGATGTGA	GGTCCCTGAT	TTGGACTGA
	CAAGGCCACA	GCGAGGATGACCCAGACGTCCAGA	CGCTTCATAG	TCAGGACAG
	TTGACTGTAG	TCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGG	GCAGTGGATC	CAAAGACAG
	ACAAGTCCTC	AAGTACACACAGCTCAGACACAAAC	TGGGACAGAT	CACCTACAG
	CAGCACAGCC	CCATAGAGAGGATTACAACAGTACT	TTCACTCTTAC	CATGAGCAG
	TACATGGAGC	CTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCC	CATCAGCAGT	CACCCCTCAC
	TCCGCAGCCT	ATCCAGCACCAGGACTGGATGAGT	GTGCAGGCTG	GTTGACCAA
	GACATCTGAG	GGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTC	AAGACCTGGC	GGACGAGTA
	GACTCTGCAG	AACAACAGAGCCCTCCCATCCCCC	AGCTTACTTCT	TGAACGACA
	TCTATTACTGT	ATCGAGAAAACCATCTCAAAACCCA	GTGAGCAACA	TAACAGCTAT
	GCAAGCGGAT	GAGGGCCAGTAAGAGCTCCACAGG	TTATAGCACTC	ACCTGTGAG
	ACCTCTTTGA	TATATGTCTTGCCTCCACCAGCAGA	CGCTCACGTT	GCCACTCAC
	CTACTGGGGC	AGAGATGACTAAGAAAGAGTTCAGT	CGGTGCTGGG	AAGACATCA
	CCAGGCACCA	CTGACCTGCATGATCACAGGCTTCT	ACCAAGCTGG	ACTTCACCC
	CTCTCACAGT	TACCTGCCGAAATTGCTGTGGACTG	AGCTGAAA	ATTGTCAAGA
	CTCCTCA	GACCAGCAATGGGCGTACAGAGCA		GCTTCAACA
		AAACTACAAGAACACCGCAACAGTC		GGAATGAGT
		CTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCA		GT
		TGTACAGCAAGCTCAGAGTACAAA		
		GAGCACTTGGGAAAGAGGAAGTCT		
		TTTCGCCTGCTCAGTGGTCCACGA		
		GGGTCTGCACAATCACCTTACGACT		
		AAGACCATCTCCCGTCTCTGGGTA		
		AA		

【0174】

10

20

30

40

50

【表 4 F】

2.1	配列番号178	配列番号179	配列番号180	配列番号181
	CAAGTGCAGC	GCCAGCACCAAAGGTCCATCCGTG	GACATTCAGAT	AGAACTGTG
	TGGTGCAGAG	TTTCCGCTCGCCCCGTCTCAAAGT	GACACAGAGC	GCCGCGCC
	CGGGGCCGA	CGACCTCCGGAGGCACTGCCGCC	CCTAGCAGCC	GTCAGTGTT
	GGTGAAGAAG	TGGGCTGCCTTGTCAAGGACTATTT	TGAGCGCAAG	TATCTTCCCT
	CCCGGCCGCA	CCCCGAACCTGTCACGGTGTCTTG	CGTGGGCGAC	CCATCGGAT
	GCGTGAAGGT	GAACAGCGGCGCCCTGACTTCCGG	AGAGTGACCA	GAACAGCTT
	GAGCTGCAAG	AGTGCACACCTTCCCCGCCGTCT	TCACCTGCAG	AAGTCCGGC
	GCAAGCGGCT	GCAATCCAGCGGCCTGTACTCACT	AGCAAGCCAA	ACGGCGTCT
	ACACCTTAC	GTCATCCGTTGTGACTGTCCCGTC	GACATCAGCA	GTGGTCTGC
	CAACTACTGG	GTCCAGCCTGGGAACCCAAACCTA	ACAGACTGAA	CTGCTCAATA
	ATGCAGTGGG	CATTTGCAACGTGAATCACAAACCA	CTGGTATCAG	ACTTTTACCC
	TGAGACAAGC	TCGAATACCAAGGTCGATAAGAAAG	CAGAAGCCCG	TAGGGAAGC
	CCCGGCCCAA	TCGAGCCGAAGTCATGCGACAAGA	GCAAGGCCGT	TAAAGTCAA
	GGCCTGGAGT	CTCACACCTGTCCGCCTTGCCAG	GAAGCTGCTG	TGGAAAAGTG
	GGATCGGCGA	CCCCAGAACTGCTCGGCGGCCCTT	ATCAGCTACA	GATAACGCC
	GATCGACCCT	CGGTGTTTTTGTTCGCCGAAGCC	GAAGCAGACT	CTGCAGTCA
	AGCGACAGCT	GAAGGACACTCTGATGATCTCACGC	GCACAGCGGC	GGAAACAGC
	ACACCAACTA	ACTCCAGAGGTGACTTGCCTGGTG	GTGCCTAGCA	CAGGAATCG
	CAATCAGAAG	GTCGATGTTTCGCACGAGGACCCG	GATTCAGCGG	GTTACCGAA
	TTCCAAGGCA	GAAGTGAAATTCAACTGGTATGTCG	CAGCGGCAGC	CAGGACAGC
	GAGTGACCCT	ACGGGGTGGAAGTGCATAATGCCA	GGCACCGACT	AAGGACAGC
	GACCGTGGAC	AGACGAAGCCGAGGGAGGAACAGT	ACACCCTGAC	ACTTACTCCT
	ACAAGCACAA	ACAACCTCACCTACAGAGTGGTTTC	CATCAGCAGC	TGTCGTCTGA
	GCACCGCCTA	AGTCCTTACCGTCTCCATCAAGAT	CTGCAGCCTG	CTCTTACTCT
	CATGGAGCTG	TGGCTGAACGGAAGGAGTACAAA	AGGACTTTCG	GAGCAAGGC
	AGCAGCCTGA	TGTAAGGTGTGCAACAAAGCGTTG	CACCTACTTCT	CGATTACGA
	GAAGCGAGGA	CCGGCCCCCTATCGAAAAGACTATCA	GTCAGCAAGG	GAAGCACAA
	CACCGCCGTG	GCAAGGCCAAAGGACAGCCGCGG	CAACAGCCTG	GGTCTACGC
	TACTACTGCG	GAGCCGCAAGGTACACCCTCCCG	CCCCCACCT	CTGCGAGGT
	CTAGAAGCCT	CCTTCGCGGGACGAGCTGACCAAG	TCGGCGGCG	CACCCATCA
	GAGCGGCTAC	AATCAGGTGTCCCTTACTTGCCTGG	GCACCAAGCT	GGGACTCTC
	GTGGACTACT	TGAAGGGATTCTACCCCTCGGATAT	CGAGATCAAG	GTCCCCGGT
	GGGGCCAAG	CGCAGTCGAATGGGAATCGAATGG		GACCAAATC
	GCACCACCGT	ACAGCCAGAAAACAACATAAGACC		CTTCAATAGA
	GACCGTCTCG	ACTCCCCCGGTGCTCGACTCCGAC		GGCGAATGC
	AGC	GGTTCCTTCTTCTGTAAGTGAAGC		
		TGACCGTGGACAAATCACGCTGGC		
		AGCAGGGAAACGTGTTTAGCTGCA		
		GCGTGATGCATGAGGCGCTGCATA		
		ATCACTACACCCAGAAGTCACTCTC		
		GCTCAGCCCAGGGAAG		

【0175】

10

20

30

40

50

【表 4 G】

2.2	配列番号182	配列番号183	配列番号184	配列番号185
	CAAGTGCAGC	GCCAGCACCAAAGGTCCATCCGTG	GACATTCAGAT	AGAACTGTG
	TGGTGCAGAG	TTTCCGCTCGCCCCGTCTCAAAGT	GACACAGAGC	GCCGCGCC
	CGGGGCCGA	CGACCTCCGGAGGCACTGCCGCC	CCTAGCAGCC	GTCAAGTGT
	GGTGAAGAAG	TGGGCTGCCTTGTCAGGACTATTT	TGAGCGCAAG	TATCTTCCCT
	CCCGGCCGCA	CCCCGAACCTGTACGGGTGTCCTG	CGTGGGCGAC	CCATCGGAT
	GCGTGAAGGT	GAACAGCGGCGCCCTGACTTCCGG	AGAGTGACCA	GAACAGCTT
	GAGCTGCAAG	AGTGACACCTTCCCCGCCGTCTCT	TCACCTGCAG	AAGTCCGGC
	GCAAGCGGCT	GCAATCCAGCGGCTGTACTCACT	AGCAAGCCAA	ACGGCGTCT
	ACACCTTCAC	GTCTATCCGTTGTGACTGTCCCGTC	GACATCAGCA	GTGGTCTGC
	CAACTACTGG	GTCCAGCCTGGGAACCCAAACCTA	ACAGACTGAA	CTGCTCAATA
	ATGCAGTGGG	CATTTGCAACGTGAATCACAAACCA	CTGGTATCAG	ACTTTTACCC
	TGAGACAAGC	TGCAATACCAAGGTCGATAAGAAAG	CAGAAGCCCG	TAGGGAAGC
	CCCCGGCCAA	TCGAGCCGAAGTCATGCGACAAGA	GCAAGGCCGT	TAAAGTCCAA
	GGCCTGGAGT	CTCACACCTGTCCGCCCTTGCCAG	GAAGCTGCTG	TGGAAGTG
	GGATCGGCGA	CCCCAGAACTGCTCGGCGGCCCTT	ATCAGCTACA	GATAACGCC
	GATCGACCTT	CGGTGTTTTTGTTCGCCGAAGCC	GAAGCAGACT	CTGCAGTCA
	AGCGACAGCT	GAAGGACACTCTGATGATCTCACGC	GCACAGCGGC	GGAAACAGC
	ACACCAACTA	ACTCCAGAGGTGACTTGCGTGGTG	GTGCCTAGCA	CAGGAATCG
	CAATCAGAAG	GTCTGATGTTTCGCACGAGGACCCG	GATTCAGCGG	GTTACCGAA
	TTCCAAGGCA	GAAGTGAAATTCACTGGTATGTCG	CAGCGGCAGC	CAGGACAGC
	GAGTGACCTT	ACGGGGTGGAAAGTGCATAATGCCA	GGCACCAGCT	AAGGACAGC
	GACCGTGGAC	AGACGAAGCCGAGGGAGGAACAGT	ACACCCTGAC	ACTTACTCCT
	ACAAGCACAA	ACAACCTCCACCTACAGAGTGGTTTC	CATCAGCAGC	TGTCGTCTGA
	GCACCGCCTA	AGTCCTTACCCTCCTCCATCAAGAT	CTGCAGCCTG	CTCTTACTCT
	CATGGAGCTG	TGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAA	AGGACTTCGC	GAGCAAGGC
	AGCAGCCTGA	TGTAAGGTGTGCAACAAAGCGTTG	CACCTACTACT	CGATTACGA
	GAAGCGAGGA	CCGGCCCCCTATCGAAAAGACTATCA	GTCAGCAAGG	GAAGCACAA
	CACCGCCGTG	GCAAGGCCAAAGGACAGCCGCGG	CAACAGCCTG	GGTCTACGC
	TACTACTGCG	GAGCCGCAAGGTACACCCCTCCCG	CCCCCACCT	CTGCGAGGT
	CTAGAAGCCT	CCTTCGCGGGACGAGCTGACCAAG	TCGGCGGCG	CACCCATCA
	GAGCGGCTAC	AATCAGGTGTCCCTTACTTGCTTGG	GCACCAAGCT	GGGACTCTC
	GTGGACTACT	TGAAGGGATTCTACCCCTCGGATAT	CGAGATCAAG	GTCCCCGGT
	GGGGCCAAAG	CGCAGTCGAATGGGAATCGAATGG		GACCAAATC
	GCACCACCGT	ACAGCCAGAAAACAACATAAGACC		CTTCAATAGA
	GACCGTCTCG	ACTCCCCCGGTGCTCGACTCCGAC		GGCGAATGC
	AGC	GGTTCCTTCTTCTGTACTCGAAGC		
		TGACCGTGGACAAATCACGCTGGC		
		AGCAGGGAAACGTGTTTAGCTGCA		
		GCGTGATGCATGAGGCGCTGCATA		
		ATCACTACACCCAGAAGTCACTCTC		
		GCTCAGCCCAGGGAAG		

10

20

30

【0176】

40

50

【表 4 H】

2.3	配列番号186	配列番号187	配列番号188	配列番号189
	CAAGTGCAGC	GCCAGCACCAAAGGTCCATCCGTG	GACATCGTAAT	AGAACTGTG
	TGGTGCAGAG	TTTCCGCTCGCCCCGTCTCAAAGT	GACACAGAGC	GCCGCGCC
	CGGGGCCGA	CGACCTCCGGAGGCACTGCCGCC	CCCGCGACCC	GTCAGTGTT
	GGTGAAGAAG	TGGGCTGCCTTGTC AAGGACTATTT	TGAGCCTGTC	TATCTTCCCT
	CCCGGCGCAA	CCCCGAACCTGTCACGGTGTCCTG	CCCGGTGAG	CCATCGGAT
	GCGTGAAGGT	GAACAGCGGCGCCCTGACTTCCGG	AGAGCTACCC	GAACAGCTT
	GAGCTGCAAG	AGTGACACACCTTCCCCGCCGTCCT	TGAGCTGCAG	AAGTCCGGC
	GCAAGCGGCT	GCAATCCAGCGGCTGTACTCACT	AGCAAGCCAA	ACGGCGTCT
	ACACCTTCAC	GTCATCCGTTGTGACTGTCCCGTC	GACATCAGCA	GTGGTCTGC
	CAACTACTGG	GTCCAGCCTGGGAACCCAAACCTA	ACAGACTGAA	CTGCTCAATA
	ATGCAGTGGG	CATTTGCAACGTGAATCACAAACCA	CTGGTATCAG	ACTTTTACCC
	TGAGACAAGC	TCGAATACCAAGGTCGATAAGAAAG	CAGAAGCCCG	TAGGGAAGC
	CCCGGCCAA	TCGAGCCGAAGTCATGCGACAAGA	GCCAAGCCGT	TAAAGTCAA
	GGCCTGGAGT	CTCACACCTGTCCGCCCTTGCCAG	GAGACTGCTG	TGGAAAGTG
	GGATCGGCGA	CCCCAGAAGTGTCTGGCGGCCCTT	ATCAGCTACA	GATAACGCC
	GATCGACCCT	CGGTGTTTTTGTTCGCCCGAAGCC	GAAGCAGACT	CTGCAGTCA
	AGCGACAGCT	GAAGGACACTCTGATGATCTCACGC	GCACAGCGGC	GGAAACAGC
	ACACCAACTA	ACTCCAGAGGTGACTTGCGTGGTG	GTGCCCCTA	CAGGAATCG
	CAATCAGAAG	GTCGATGTTTCGCACGAGGACCCG	GATTCAGCGG	GTTACCGAA
	TTCCAAGGCA	GAAGTGAAATTCAACTGGTATGTCG	CAGCGGCAGC	CAGGACAGC
	GAGTGACCCT	ACGGGGTGGAAGTGCATAATGCCA	GGCACCAGCT	AAGGACAGC
	GACCGTGAC	AGACGAAGCCGAGGGAGGAACAGT	ACACCCTGAC	ACTTACTCT
	ACAAGCACAA	ACAACCTCACCTACAGAGTGGTTTC	CATCAGCAGC	TGTCGTCTG
	GCACCGCCTA	AGTCCTTACCGTCTCCATCAAGAT	CTGGAGCCTG	CTCTTACTCT
	CATGGAGCTG	TGGCTGAACGGAAGGAGTACAAA	AGGACTTCGC	GAGCAAGGC
	AGCAGCCTGA	TGTAAGGTGTGCAACAAAGCGTTG	CGTGACTTCT	CGATTACGA
	GAAGCGAGGA	CCGGCCCCCTATCGAAAAGACTATCA	GTCAGCAAGG	GAAGCACAA
	CACCGCCGTG	GCAAGGCCAAAGGACAGCCGCGG	CAACAGCCTG	GGTCTACGC
	TACTACTGCG	GAGCCGCAAGTGACACCCTCCCG	CCCCCACCT	CTGCGAGGT
	CTAGAAGCCT	CCTTCGCGGGACGAGCTGACCAAG	TCGGCGGCG	CACCCATCA
	GAGCGGCTAC	AATCAGGTGTCCCTTACTTGCTGG	GCACCAAGCT	GGGACTCTC
	GTGGACTACT	TGAAGGGATTCTACCCCTCGGATAT	CGAGATCAAG	GTCCCCGGT
	GGGGCCAAAG	CGCAGTCGAATGGGAATCGAATGG		GACCAAATC
	GCACCACCGT	ACAGCCAGAAAACAACTACAAGACC		CTTCAATAGA
	GACCGTCTCG	ACTCCCCCGGTGCTCGACTCCGAC		GGCGAATGC
	AGC	GGTTCCTTCTTCTGTACTCGAAGC		
		TGACCGTGGACAAATCACGCTGGC		
		AGCAGGGAAACGTGTTTAGCTGCA		
		GCGTGATGCATGAGGCGCTGCATA		
		ATCACTACCCGAGAAGTCACTCTC		
		GCTCAGCCCAGGGAAG		

【0177】

10

20

30

40

50

【表 4 I】

2.4	配列番号190	配列番号191	配列番号192	配列番号193
	CAAGTGCAGC	GCCAGCACCAAAGGTCCATCCGTG	GAGATCGTAAT	AGAACTGTG
	TGGTGCAGAG	TTTCCGCTCGCCCCGTCTCAAAGT	GACACAGAGC	GCCGCGCC
	CGGGGCCGA	CGACCTCCGGAGGCACTGCCGCC	CCCGCGACCC	GTCAGTGTT
	GGTGAAGAAG	TGGGCTGCCTTGTCAGGACTATTT	TGAGCCTGTC	TATCTTCCCT
	CCCGGCGCAA	CCCCGAACCTGTACGGTGTCCCTG	CCCCGGTGAG	CCATCGGAT
	GCGTGAAGGT	GAACAGCGGCGCCCTGACTTCCGG	AGAGCTACCC	GAACAGCTT
	GAGCTGCAAG	AGTGACACCTTCCCCGCCGTCCT	TGAGCTGCAG	AAGTCCGGC
	GCAAGCGGCT	GCAATCCAGCGGCTGTACTCACT	AGCAAGCCAA	ACGGCGTCT
	ACACCTTCAC	GTCATCCGTTGTGACTGTCCCGTC	GACATCAGCA	GTGGTCTGC
	CAACTACTGG	GTCCAGCCTGGGAACCCAAACCTA	ACAGACTGAA	CTGCTCAATA
	ATGCAGTGGG	CATTTGCAACGTGAATCACAAACCA	CTGGTATCAG	ACTTTTACCC
	TGAGACAAGC	TGGAATACCAAGTTCGATAAGAAAG	CAGAAGCCCG	TAGGGAAGC
	CCCCGGCCAA	TGAGCCGAAGTCATGCGACAAGA	GCCAAGCCGT	TAAAGTCCAA
	GGCCTGGAGT	CTCACACCTGTCCGCTTGCCCGAG	GAGACTGCTG	TGGAAAGTG
	GGATCGGCGA	CCCCAGAAGTGTCTGGCGGCCCTT	ATCAGCTACA	GATAACGCC
	GATCGACCTT	CGGTGTTTTGTTCCGCCGAAGCC	GAAGCAGAAG	CTGCAGTCA
	AGCGACAGCT	GAAGGACACTCTGATGATCTCACGC	ACACACCGGC	GGAAACAGC
	ACACCAACTA	ACTCCAGAGGTGACTTGCGTGGTG	ATCCCCGCTA	CAGGAATCG
	CAATCAGAAG	GTCGATGTTTCGCACGAGGACCCG	GATTCAGCGG	GTTACCGAA
	TTCCAAGGCA	GAAGTGAAATCAACTGGTATGTCG	CAGCGGCAGC	CAGGACAGC
	GAGTGACCTT	ACGGGGTGGAAGTGCATAATGCCA	GGCACCAGCT	AAGGACAGC
	GACCGTGAGC	AGACGAAGCCGAGGGAGGAACAGT	ACACCCTGAC	ACTTACTCCT
	ACAAGCACAA	ACAACCTCCACCTACAGAGTGGTTTC	CATCAGCAGC	TGTCGTCTGA
	GCACCGCCTA	AGTCTTACCGTCTCCATCAAGAT	CTGGAGCCTG	CTCTTACTCT
	CATGGAGCTG	TGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAA	AGGACTTCGC	GAGCAAGGC
	AGCAGCCTGA	TGTAAGGTGTGCAACAAAGCGTTG	CGTGTACTACT	CGATTACGA
	GAAGCGAGGA	CCGGCCCCCTATCGAAAAGACTATCA	GTCAGCAAGG	GAAGCACAA
	CACCGCCGTG	GCAAGGCCAAAGGACAGCCGCGG	CAACAGCCTG	GGTCTACGC
	TACTACTGCG	GAGCCGCAAGGTACACCCTCCCG	CCCCCACCT	CTGCGAGGT
	CTAGAAGCCT	CCTTCGCGGGACGAGCTGACCAAG	TCGGCGGCG	CACCCATCA
	GAGCGGCTAC	AATCAGGTGTCCCTTACTTGCTGG	GCACCAAGCT	GGGACTCTC
	GTGGACTACT	TGAAGGGATTCTACCCCTCGGATAT	CGAGATCAAG	GTCCCCGGT
	GGGGCCAAG	CGCAGTCGAATGGGAATCGAATGG		GACCAAATC
	GCACCACCGT	ACAGCCAGAAAACAATAACAAGACC		CTTCAATAGA
	GACCGTCTCG	ACTCCCCCGGTGCTCGACTCCGAC		GGCGAATGC
	AGC	GGTTCCTTCTTCTGTACTCGAAGC		
		TGACCGTGGACAAATCACGCTGGC		
		AGCAGGGAAACGTGTTTAGCTGCA		
		GCGTGATGCATGAGGCGCTGCATA		
		ATCACTACACCCAGAAGTCACTCTC		
		GCTCAGCCCAGGGAAG		

10

20

30

40

50

【0178】

【表 4 J】

2.9	配列番号194	配列番号195	配列番号196	配列番号197
	CAAGTGCAGC	GCCAGCACCAAAGGTCCATCCGTG	GACATTCAGAT	AGAACTGTG
	TGGTGCAGAG	TTTCCGCTCGCCCCGTCTCAAAGT	GACACAGAGC	GCCGCGCC
	CGGCAGCGAG	CGACCTCCGGAGGCACTGCCGCC	CCTAGCAGCC	GTCAGTGTT
	CTGAAGAAGC	TGGGCTGCCTTGTCAGGACTATTT	TGAGCGCAAG	TATCTTCCCT
	CCGGCGCAAG	CCCCGAACCTGTACAGGTGTCCTG	CGTGGGCGAC	CCATCGGAT
	CGTGAAGGTG	GAACAGCGGCGCCCTGACTTCCGG	AGAGTGACCA	GAACAGCTT
	AGCTGCAAGG	AGTGCACACCTTCCCCGCCGTCT	TCACCTGCAG	AAGTCCGGC
	CAAGCGGCTA	GCAATCCAGCGGCCTGTACTACT	AGCAAGCCAA	ACGGCGTCT
	CACCTTCACC	GTCATCCGTTGTGACTGTCCCGTC	GACATCAGCA	GTGGTCTGC
	AACTACTGGAT	GTCCAGCCTGGGAACCCAAACCTA	ACAGACTGAA	CTGCTCAATA
	GCAGTGGGTG	CATTTGCAACGTGAATCACAAACCA	CTGGTATCAG	ACTTTTACCC
	AGACAAGCCC	TGCAATACCAAGGTGATAAGAAAG	CAGAAGCCCG	TAGGGAAGC
	CCGGCCAAGG	TCGAGCCGAAGTCATGCGACAAGA	GCAAGGCCGT	TAAAGTCAA
	CCTGGAGTGG	CTCACACCTGTCCGCCTTGCCAG	GAAGCTGCTG	TGGAAAGTG
	ATCGGCGAGA	CCCCAGAAGTGTCCGGCGGCCCTT	ATCAGCTACA	GATAACGCC
	TCGACCCTAG	CGGTGTTTTGTTTCCGCCGAAGCC	GAAGCAGACT	CTGCAGTCA
	CGACAGCTAC	GAAGGACACTCTGATGATCTCACGC	GCACAGCGGC	GGAAACAGC
	ACCAACTACA	ACTCCAGAGGTGACTTGCGTGGTG	GTGCCTAGCA	CAGGAATCG
	ACCAAGGCTT	GTCGATGTTTCGCACGAGGACCCG	GATTCAGCGG	GTTACCGAA
	CACCGGCAGA	GAAGTGAAATTCAACTGGTATGTCG	CAGCGGCAGC	CAGGACAGC
	TTCGTGCTGA	ACGGGGTGGAAGTGATAATGCCA	GGCACCGACT	AAGGACAGC
	GCGTGGACAC	AGACGAAGCCGAGGGAGGAACAGT	ACACCCTGAC	ACTTACTCT
	AAGCGTGAGC	ACAACTCCACCTACAGAGTGGTTTC	CATCAGCAGC	TGTCGTCTGA
	ACCGCCTACC	AGTCCTTACCGTCCTCCATCAAGAT	CTGCAGCCTG	CTCTTACTCT
	TGCAGATCAG	TGGCTGAACGGAAGGAGTACAAA	AGGACTTCGC	GAGCAAGGC
	CAGCCTGAAG	TGTAAGGTGTCGAACAAAGCGTTG	CACCTACTTCT	CGATTACGA
	GCCGAGGACA	CCGGCCCCTATCGAAAAGACTATCA	GTCAGCAAGG	GAAGCACAA
	CCGCCGTGTA	GCAAGGCCAAAGGACAGCCGCGG	CAACAGCCTG	GGTCTACGC
	CTACTGCGCT	GAGCCGCAAGGTACACCCTCCCG	CCCCCACCT	CTGCGAGGT
	AGAAGCCTGA	CCTTCGCGGGACGAGCTGACCAAG	TCGGCGGCG	CACCCATCA
	GCGGCTACGT	AATCAGGTGTCCCTTACTTGCTGG	GCACCAAGCT	GGGACTCTC
	GGACTACTGG	TGAAGGGATTCTACCCCTCGGATAT	CGAGATCAAG	GTCCCCGGT
	GGCCAAGGCA	CGCAGTCGAATGGGAATCGAATGG		GACCAAATC
	CCACCGTGAC	ACAGCCAGAAAACAATAACAAGACC		CTTCAATAGA
	CGTCTCGAGC	ACTCCCCCGGTGCTCGACTCCGAC		GGCGAATGC
		GGTTCCTTCTTCTGTAAGTGAAGC		
		TGACCGTGGACAAATCACGCTGGC		
		AGCAGGGAAACGTGTTAGCTGCA		
		GCGTGATGCATGAGGCGCTGCATA		
		ATCACTACACCCAGAAGTCACTCTC		
		GCTCAGCCCAGGGAAG		

【0179】

10

20

30

40

50

【表 4 K】

2.1	配列番号198	配列番号199	配列番号200	配列番号201
1	CAAGTGCAGC TGGTGCAGAG CGGCAGCGAG CTGAAGAAGC CCGGCGCAAG CGTGAAGGTG AGCTGCAAGG CAAGCGGCTA CACCTTCACC AACTACTGGAT GCAGTGGGTG AGACAAGCCC CCGGCCAAGG CCTGGAGTGG ATCGGCGAGA TCGACCCTAG CGACAGCTAC ACCAACTACA ACCAAGGCTT CACCGGCAGA TTCGTGCTGA GCGTGGACAC AAGCGTGAGC ACCGCCTACC TGCAGATCAG CAGCCTGAAG GCCGAGGACA CCGCCGTGTA CTACTGCGCT AGAAGCCTGA GCGGCTACGT GGACTACTGG GGCCAAGGCA CCACCGTGAC CGTCTCGAGC	GCCAGCACCAAAGGTCCATCCGTG TTTCCGCTCGCCCCGTCTCAAAGT CGACCTCCGGAGGCACTGCCGCC TGGGCTGCCTTGTCAAGGACTATTT CCCCGAACCTGTACGGTGTCCCTG GAACAGCGGCGCCCTGACTTCCGG AGTGACACCTTCCCCGCCGTCTCT GCAATCCAGCGGCCCTGTACTCACT GTCATCCGTTGTGACTGTCCCGTC GTCCAGCCTGGGAACCCAAACCTA CATTTGCAACGTGAATCACAAACCA TCGAATACCAAGGTCGATAAGAAAG TCGAGCCGAAGTCATGCGACAAGA CTCACACCTGTCCGCCCTTGCCAG CCCCAGAAGTGTCTGGCGGCCCTT CGGTGTTTTGTTCCGCCGAAGCC GAAGGACACTCTGATGATCTCACGC ACTCCAGAGGTGACTTGCGTGGTG GTCGATGTTTCGCACGAGGACCCG GAAGTGAAATCAACTGGTATGTCG ACGGGGTGGAAGTGCATAATGCCA AGACGAAGCCGAGGGAGGAACAGT ACAACCTCACCTACAGAGTGGTTTC AGTCCTTACCGTCCCTCATCAAGAT TGGCTGAACGGAAGGAGTACAAA TGTAAGGTGTGGAACAAAGCGTTG CCGGCCCCCTATCGAAAAGACTATCA GCAAGGCCAAAGGACAGCCGCGG GAGCCGCAAGTGACACCCTCCCG CCTTCGCGGGACGAGCTGACCAAG AATCAGGTGTCCCTTACTTGCTGG TGAAGGGATTCTACCCCTCGGATAT CGCAGTCGAATGGGAATCGAATGG ACAGCCAGAAAACAACATAAGACC ACTCCCCCGGTGCTCGACTCCGAC GGTTCCTTCTTCTGTAAGC TGACCGTGGACAAATCACGCTGGC AGCAGGGAAACGTGTTAGCTGCA GCGTGATGCATGAGGCGCTGCATA ATCACTACCCCAGAAGTCACTCTC GCTCAGCCCAGGGAAG	GACATCGTAAT GACACAGAGC CCCGCGACCC TGAGCCTGTC CCCCGGTGAG AGAGCTACCC TGAGCTGCAG AGCAAGCCAA GACATCAGCA ACAGACTGAA CTGGTATCAG CAGAAGCCCG GCCAAGCCGT GAGACTGCTG ATCAGCTACA GAAGCAGACT GCACAGCGGC GTGCCCGCTA GATTCAGCGG CAGCGGCAGC GGCACCAGCT ACACCCTGAC CATCAGCAGC CTGGAGCCTG AGGACTTCGC CGTGTACTTCT GTCAGCAAGG CAACAGCCTG CCCCCACCT TCGGCGGCG GCACCAAGCT CGAGATCAAG	AGAACTGTG GCCGCGCC GTCAGTGTT TATCTTCCCT CCATCGGAT GAACAGCTT AAGTCCGGC ACGGCGTCT GTGGTCTGC CTGCTCAATA ACTTTTACCC TAGGGAAGC TAAAGTCCAA TGGAAGTG GATAACGCC CTGCAGTCA GGAAACAGC CAGGAATCG GTTACCGAA CAGGACAGC AAGGACAGC ACTTACTCT TGTCGTCGA CTCTTACTCT GAGCAAGGC CGATTACGA GAAGCACAA GGTCTACGC CTGCGAGGT CACCCATCA GGGACTCTC GTCCCCGGT GACCAAATC CTTCAATAGA GGCGAATGC

10

20

30

【0180】

40

50

【表 4 L】

2. 1	配列番号202	配列番号203	配列番号204	配列番号205
2	CAAGTGCAGC TGGTGCAGAG CGGCAGCGAG CTGAAGAAGC CCGGCGCAAG CGTGAAGGTG AGCTGCAAGG CAAGCGGCTA CACCTTCACC AACTACTGGAT GCAGTGGGTG AGACAAGCCC CCGGCCAAGG CCTGGAGTGG ATCGGCGAGA TCGACCCTAG CGACAGCTAC ACCAACTACA ACCAAGGCTT CACCGGCAGA TTCGTGCTGA GCGTGGACAC AAGCGTGAGC ACCGCCTACC TGCAGATCAG CAGCCTGAAG GCCGAGGACA CCGCCGTGTA CTACTGCGCT AGAAGCCTGA GCGGCTACGT GGACTACTGG GGCCAAGGCA CCACCGTGAC CGTCTCGAGC	GCCAGCACCAAAGGTCCATCCGTG TTTCCGCTCGCCCCGTCTCAAAGT CGACCTCCGGAGGCACTGCCGCC TGGGCTGCCTTGTCAAGGACTATTT CCCCGAACCTGTCACGGTGTCTG GAACAGCGGCGCCCTGACTTCCGG AGTGACACCTTCCCCGCCGTCT GCAATCCAGCGGCCTGTACTCACT GTCATCCGTTGTGACTGTCCCGTC GTCCAGCCTGGGAACCCAAACCTA CATTTGCAACGTGAATCACAAACCA TCGAATACCAAGGTCGATAAGAAAG TCGAGCCGAAGTCATGCGACAAGA CTCACACCTGTCCGCCCTTGCCAG CCCCAGAAGTGTCTCGCGGCCCTT CGGTGTTTTGTTCCGCCGAAGCC GAAGGACACTCTGATGATCTCACGC ACTCCAGAGGTGACTTGCGTGGTG GTCGATGTTTCGCACGAGGACCCG GAAGTGAAATTCAACTGGTATGTCG ACGGGGTGGAAGTGCATAATGCCA AGACGAAGCCGAGGGAGGAACAGT ACAACCTCACCTACAGAGTGGTTTC AGTCCTTACCGTCCTCCATCAAGAT TGGCTGAACGGAAGGAGTACAAA TGTAAGGTGTGCAACAAAGCGTTG CCGGCCCCCTATCGAAAAGACTATCA GCAAGGCCAAAGGACAGCCGCGG GAGCCGCAAGTGACACCCCTCCCG CCTTCGCGGGACGAGCTGACCAAG AATCAGGTGTCCCTTACTTGCTGG TGAAGGGATTCTACCCCTCGGATAT CGCAGTCGAATGGGAATCGAATGG ACAGCCAGAAAACAACTACAAGACC ACTCCCCCGGTGCTCGACTCCGAC GGTTCCTTCTCCTGTACTCGAAGC TGACCGTGGACAAATCACGCTGGC AGCAGGGAAACGTGTTTAGCTGCA GCGTGATGCATGAGGCGCTGCATA ATCACTACCCCAGAAGTCACTCTC GCTCAGCCCAGGGAAG	GAGATCGTAAT GACACAGAGC CCCGCGACCC TGAGCCTGTC CCCCGGTGAG AGAGCTACCC TGAGCTGCAG AGCAAGCCAA GACATCAGCA ACAGACTGAA CTGGTATCAG CAGAAGCCCG GCCAAGCCGT GAGACTGCTG ATCAGCTACA GAAGCAGAAG ACACACCGGC ATCCCCGCTA GATTCAGCGG CAGCGGCAGC GGCACCAGCT ACACCCTGAC CATCAGCAGC CTGGAGCCTG AGGACTTCGC CGTGTACTACT GTCAGCAAGG CAACAGCCTG CCCCCACCT TCGGCGGCG GCACCAAGCT CGAGATCAAG	AGAACTGTG GCCGCGCC GTCAGTGTT TATCTTCCCT CCATCGGAT GAACAGCTT AAGTCCGGC ACGGCGTCT GTGGTCTGC CTGCTCAATA ACTTTTACCC TAGGGAAGC TAAAGTCCAA TGGAAAGTG GATAACGCC CTGCAGTCA GGAAACAGC CAGGAATCG GTTACCGAA CAGGACAGC AAGGACAGC ACTTACTCCT TGTCGTGCA CTCTTACTCT GAGCAAGGC CGATTACGA GAAGCACAA GGTCTACGC CTGCGAGGT CACCCATCA GGGACTCTC GTCCCCGGT GACCAAATC CTTCAATAGA GGCGAATGC

10

20

30

【0181】

40

50

【表 4 M】

2.1	配列番号206	配列番号207	配列番号208	配列番号209
6	CAAGTGCAGC	GCCAGCACCAAAGGTCCATCCGTG	GAGATCGTAAT	AGAACTGTG
	TGGTGCAGAG	TTTCCGCTCGCCCCGTCCCTCAAAGT	GACACAGAGC	GCCGCGCC
	CGGCAGCGAG	CGACCTCCGGAGGCACTGCCGCC	CCCGCGACCC	GTCAGTGTT
	CTGAAGAAGC	TGGGCTGCCTTGTC AAGGACTATTT	TGAGCCTGTC	TATCTTCCCT
	CCGGCGCAAG	CCCCGAACCTGTCA CGGTGTCCTG	CCCCGGTGAG	CCATCGGAT
	CGTGAAGGTG	GAACAGCGGCGCCCTGACTTCCGG	AGAGCTACCC	GAACAGCTT
	AGCTGCAAGG	AGTGCACACCTTCCCCGCCGTCT	TGAGCTGCAG	AAGTCCGGC
	CAAGCGGCTA	GCAATCCAGCGGCCTGTACTCACT	AGCAAGCCAA	ACGGCGTCT
	CACCTTCACC	GTCATCCGTTGTGACTGTCCCGTC	GACATCAGCA	GTGGTCTGC
	AACTACTGGAT	GTCCAGCCTGGGAACCCAAACCTA	ACAGACTGAA	CTGCTCAATA
	GAACTGGGTG	CATTTGCAACGTGAATCACAACCA	CTGGTATCAG	ACTTTTACCC
	AGACAAGCCC	TCCAATACCAAGGTCGATAAGAAAG	CAGAAGCCCG	TAGGGAAGC
	CCGGCCAAGG	TCGAGCCGAAGTCATGCGACAAGA	GCCAAGCCGT	TAAAGTCAA
	CCTGGAGTGG	CTCACACCTGTCCGCCTTGCCAG	GAGACTGCTG	TGGAAAGTG
	ATGGGCGAGA	CCCCAGAACTGCTCGGCGGCCCTT	ATCAGCTACA	GATAACGCC
	TCGACCCTAG	CGGTGTTTTTGTTCGCCGAAGCC	GAAGCAGAAG	CTGCAGTCA
	CGACAGCTAC	GAAGGACACTCTGATGATCTCACGC	ACACACCGGC	GGAAACAGC
	ACCAACTACA	ACTCCAGAGGTGACTTGCGTGGTG	ATCCCCGCTA	CAGGAATCG
	ACCAAGGCTT	GTCGATGTTTCGACGAGGACCCG	GATTCAGCGG	GTTACCGAA
	CACCGGCAGA	GAAGTGAATTCAACTGGTATGTCG	CAGCGGCAGC	CAGGACAGC
	TTCGTGTTCA	ACGGGGTGGAAGTGCATAATGCCA	GGCACC GACT	AAGGACAGC
	GCGTGGAAC	AGACGAAGCCGAGGGAGGAACAGT	ACACCCTGAC	ACTTACTCT
	AAGCGTGAGC	ACAACCTCCACCTACAGAGTGGTTTC	CATCAGCAGC	TGTCGTCGA
	ACCGCCTACC	AGTCCTTACCGTCTCCATCAAGAT	CTGGAGCCTG	CTCTTACTCT
	TGCAGATCAG	TGGCTGAACGGAAGGAGTACAAA	AGGACTTCGC	GAGCAAGGC
	CAGCCTGAAG	TGTAAGGTGTGCAACAAAGCGTTG	CGTGTA TACT	CGATTACGA
	GCCGAGGACA	CCGGCCCCATCGAAAAGACTATCA	GTCAGCAAGG	GAAGCACAA
	CCGCCGTGTA	GCAAGGCCAAAGGACAGCCGCGG	CAACAGCCTG	GGTCTACGC
	CTACTGCGCT	GAGCCGCAAGTGACACCCTCCCG	CCCCCACCT	CTGCGAGGT
	AGAAGCCTGA	CCTTCGCGGGACGAGCTGACCAAG	TCGGCGGCG	CACCCATCA
	GCGGTACTGT	AATCAGGTGTCCCTTACTTGCTGG	GCACCAAGCT	GGGACTCTC
	GGACTACTGG	TGAAGGGATTCTACCCCTCGGATAT	CGAGATCAAG	GTCCCCGGT
	GGCCAAGGCA	CGCAGTCGAATGGGAATCGAATGG		GACCAAATC
	CCACCGTGAC	ACAGCCAGAAAACA ACTACAAGACC		CTTCAATAGA
	CGTCTCGAGC	ACTCCCCCGGTGCTCGACTCCGAC		GGCGAATGC
		GGTTCCTTCTTCTGTACTCGAAGC		
		TGACCGTGGACAAATCACGCTGGC		
		AGCAGGGAAACGTGTTTAGCTGCA		
		GCGTGATGCATGAGGCGCTGCATA		
		ATCACTACACCCAGAAGTCACTCTC		
		GCTCAGCCCAGGGAAG		

10

20

30

【0182】

一実施形態では、核酸配列は、Table 4(表4)から選択される配列の1つと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%又はそれより高い配列相同性を有する。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%である。

40

【0183】

本発明に従う核酸は、DNA又はRNAを含んでもよく、全て又は部分的に合成又は組換えにより産生されてもよい。本明細書に記載されるヌクレオチド配列という言及は、指定された配列を有するDNA分子を包含し、特にそれ以外であることが必要でない限り、UがTの代わりに置換されている指定された配列を有するRNA分子を包含する。

【0184】

更に、本発明は、上記で定義された少なくとも1つの核酸を含む核酸構築物に関する。

50

構築物は、プラスミド、ベクター、転写又は発現カセットの形態でありうる。

【0185】

本発明はまた、上記の1つ又は複数の核酸構築物を含む単離された組換え宿主細胞にも関する。宿主細胞は、細菌、ウイルス、哺乳動物、又は他の好適な宿主細胞でありうる。一実施形態では、細胞は大腸菌(*E. coli*)細胞である。別の実施形態では、細胞は酵母細胞である。別の実施形態では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。

【0186】

本発明はまた、本明細書に記載される抗体を産生する方法であって、宿主細胞を、抗体をコードするポリヌクレオチドの発現にとって好適な条件下で培養すること、及び抗体を単離することを含む方法も提供する。

【0187】

一実施形態では、本発明の抗体は、毒素、酵素、放射性同位体、標識、治療剤又は他の化学部分にコンジュゲートされている。

【0188】

複数の実施形態では、抗体は、検出可能又は機能的な標識にコンジュゲート(又は標識)されている。標識は、これらに限定されないが、フルオロフォア、蛍光体、放射性標識、酵素、化学発光体、核磁気共鳴活性標識、又は光増感剤を含む、シグナルを産生する又は産生するように誘導することができる任意の分子でありうる。このように、結合は、蛍光又は発光、放射活性、酵素活性、又は光の吸収を検出することによって検出及び/又は測定されうる。

【0189】

本発明は、少なくとも1つの治療剤及び/又は診断剤にコンジュゲートされた本発明の抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

【0190】

複数の実施形態では、治療剤は、毒素、酵素、放射性同位体又は他の化学部分でありうる。一実施形態では、治療剤は、毒素、例えば細胞傷害性放射性核種、化学物質毒素、又はタンパク質毒素を含む。

【0191】

本発明は、このように、(i)本明細書に記載される抗体又はその抗原結合性断片、(ii)ペイロード、例えば細胞を殺滅することが可能な細胞抑制活性を有する毒素、及び(iii)抗体又はその抗原結合性断片に共有結合したペイロード-抗体リンカー部分を含む、抗体薬物コンジュゲート(ADC)に関する。生物学的活性部分を結合させるためのリンカー基は、当技術分野で周知である。

【0192】

ペイロードは、細胞毒素でありうる。別の態様では、ペイロードは、免疫調節分子、例えばTLR8又はTLR7アゴニスト、又はSTINGアゴニスト(Gingrich J. How the Next Generation Antibody Drug Conjugates Expands Beyond Cytotoxic Payloads for Cancer Therapy-J. ADC. April 7, 2020)でありうる。

【0193】

抗体にコンジュゲートされうる毒素の例は、当技術分野で周知であり、例えば、アウリスチン、例えばモノメチルアウリスチンE(MMAE)、及びモノメチルアウリスチンF(MMAF)、又はデュオカルマイシン、カリケアミシン、ピロロベンゾジアゼピン、及びSN-38を含む。複数の実施形態では、イムノコンジュゲートは、MMAEに連結された抗体を含む。MMAEは、合成の抗有糸分裂性の抗新生物剤である。MMAEは、ドキソルビンより100~1000倍強力であるが、その毒性は、それ自身薬物として使用することができないほどである。しかしこれは、MMAEを、がん細胞において発現される特異的マーカーを認識する抗体に連結させてMMAEをがん細胞に方向付ける、抗体薬物コンジュゲート(ADC)の一部として使用されている。

【0194】

抗体をMMAEに連結する構造は、結合基(マレイミド(aml)及びカプロン酸(cap))、ス

10

20

30

40

50

ペーサー(パラアミノ安息香酸)及びカテプシン切断可能リンカー(アミノ酸バリン(Val)及びシトルリン(Cit))を含みうる。ADCが標的化がん細胞抗原に結合してがん細胞に入ると、MMAEを抗体と接続する構造はカテプシンによって切断されてもよく、その後ADCは、毒性のMMAEを放出し、強力な抗有糸分裂機構を活性化させる。ADCは、非常に強力な細胞傷害剤の有害な全身作用を低減させる。

【0195】

MMAFは、一部の実験的抗がんADCにおいて、毒性部分として使用される合成の抗新生物剤である。抗体をMMAFに連結する構造は、マレイミド及びカプロン酸を含みうる。

【0196】

モノメチルアウリスタチンE(MMAE、デスメチルアウリスタチンE)は、合成の抗有糸分裂性の抗新生物剤である。MMAEのIUPAC名称は、(S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-ヒドロキシ-1-フェニルプロパン-2-イル)アミノ)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル)ピロリジン-1-イル)-3-メトキシ-5-メチル-1-オキソヘプタン-4-イル)-N,3-ジメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチルアミノ)ブタンアミド)ブタンアミドである。

【0197】

モノメチルアウリスタチンE又はMMAEは、ドキシソルピシンより100~1000倍強力であるが、その毒性は、それ自身薬物として使用することができないほどである。しかしこれは、MMAEを、がん細胞において発現される特異的マーカーを認識するモノクローナル抗体(mAb)に連結させてMMAEをがん細胞に方向付ける、抗体薬物コンジュゲート又はADCの一部として使用されている。MMAEは毒性であるため、これは、モノクローナル抗体(mAb)にコンジュゲートして、MMAEをがん細胞に標的化する場合に限って治療薬として使用されている。MMAE-mAbコンジュゲートの国際一般名では、「ベドチン」という名称は、MMAEプラスその抗体に対する連結構造を示す。標的化mAbをMMAEに連結する構造は、結合基(マレイミド(mal)及びカプロン酸(cap))、スペーサー(パラアミノ安息香酸)。及びカテプシン切断可能リンカー(アミノ酸バリン(Val)及びシトルリン(Cit))を含みうる。

【0198】

MMAEをモノクローナル抗体と接続するテザーは、細胞外液において安定であるが、抗体薬物コンジュゲートが標的化がん細胞抗原に結合するとカテプシンによって切断され、がん細胞に入り、その後ADCは毒性のMMAEを放出し、強力な抗有糸分裂機構を活性化させる。抗体薬物コンジュゲートは、抗体の抗腫瘍効果を増強し、非常に強力な細胞傷害剤の有害な全身作用を低減させる。

【0199】

モノメチルアウリスタチンF(MMAF、デスメチルアウリスタチンF)は、合成の抗新生物剤である。MMAFのIUPAC名称は、(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-ジメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチルアミノ)ブタンアミド)ブタンアミド)-3-メトキシ-5-メチルヘプタノイル)ピロリジン-2-イル)-3-メトキシ-2-メチルプロパンアミド)-3-フェニルプロピオン酸である。

【0200】

MMAFは、一部の実験的抗がん抗体薬物コンジュゲート、例えばボルセツズマブマホドチン及びSGN-CD19Aにおいて使用される毒性のペイロードである。MMAF抗体コンジュゲートの国際一般名では、名称マホドチンは、MMAFプラス抗体に対するその結合構造を指す。結合基は、マレイミド及びカプロン酸からなりうる。

【0201】

アウリスタチン及びADCの構成要素としてのその使用は、Maderna and Leverett in "Recent Advances in the Development of New Auristatins: Structural Modifications and Application in Antibody Drug Conjugates"; Mol. Pharmaceutics、2015、12 (6)、pp 1798~1812頁によって論評されている。Mendelsohnら、"Investigation of Hydrophilic Auristatin Derivatives for Use in

10

20

30

40

50

Antibody Drug Conjugates". Bioconjugate Chem., Article ASAP DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00530, Publication Date (Web): January 6, 2017は、ピリジン及び他の塩基性アミンを含有する天然物ドラスタチン10の誘導体を記載しており、これらはより親水性のアウリスタチン誘導体がADCにおいて使用するために十分に強力であるか否かを評価するために試験された。ピリジン誘導体であるモノメチルアウリスタチンPYEは、in vivoで試験した場合に最大の効力を示した。

【0202】

MMAEは、バリン-シトルリン(vc)リンカーを介して抗原結合部分にコンジュゲートされていてもよい(vc-MMAE)。MMAFは、HiPEG(商標)技術(WO 2009/047500号)を使用してマレイミドカプロイルリンカー(mc-MMAF)を介して抗原結合部分にコンジュゲートされている。このように、一実施形態では、Dは、バリン-シトルリン(vc)リンカーを介して抗原結合部分にコンジュゲートされたMMAE又はその誘導体である(vc-MMAE)。別の実施形態では、Dは、マレイミドカプロイルリンカーを介して抗原結合部分にコンジュゲートされたMMAF(mc-MMAF)又はその誘導体である。別の実施形態では、L-Dは、ベドチン又はマホドチンである。

10

【0203】

本発明のイムノコンジュゲート、組成物、及び方法は、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)又はモノメチルアウリスタチンF(MMAF)、又はその誘導体のいずれかであるアウリスタチンを特性としうる。

【0204】

抗体が毒素にコンジュゲートされているイムノコンジュゲートを使用して、全身毒性を示すことなくLGR5発現がん細胞の特異的細胞殺滅を媒介することができる。

20

【0205】

診断剤は、上記の検出可能又は機能的標識でありうる。

【0206】

本発明の別の態様では、本発明に従う抗体、又は本発明に従うイムノコンジュゲート、及び任意選択で薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。

【0207】

本発明の抗体、イムノコンジュゲート、又は薬学的組成物は、これらに限定されないが、経口、局所表面、非経口、舌下、直腸、膺、眼、鼻腔内、肺、皮内、硝子体内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、脳内、経皮、経粘膜、吸入、又は局所表面、特に、耳、鼻、眼、若しくは皮膚、又は吸入を含む任意の簡便な経路によって投与することができる。

30

【0208】

非経口投与は、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、腹腔内、鼻腔内、直腸、膀胱内、皮内、局所表面、又は皮下投与を含む。好ましくは、組成物は、非経口投与される。

【0209】

薬学的に許容される担体又はビヒクルは、組成物が、例えば錠剤又は粉末形態であるように微粒子でありうる。「担体」という用語は、本発明の薬物抗体コンジュゲートがそれと共に投与される希釈剤、アジュバント、又は賦形剤を指す。そのような薬学的担体は、液体、例えば水及び油、例えば石油、動物、植物、又は合成起源の油、例えば落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油、及び類似のものでありうる。担体は、食塩水、アカシアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、ウレア、及び類似のものでありうる。加えて、補助剤、安定化剤、濃化剤、潤滑剤、及び着色剤を使用することができる。一実施形態では、動物に投与される場合、本発明の抗体又は組成物、及び薬学的に許容される担体は、無菌的である。本発明の薬物抗体コンジュゲートを静脈内投与する場合には、水は好ましい担体である。食塩水溶液及び水性デキストロース及びグリセロール溶液もまた、特に注射可能溶液のための液体担体として使用することができる。好適な薬学的担体は、賦形剤、例えばデンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、

40

50

プロピレン、グリコール、水、エタノール、及び類似のものも含む。本組成物はまた、望ましければ、微量の湿潤剤又は乳化剤、又はpH緩衝剤も含有しうる。

【0210】

本発明の医薬組成物は、液体、例えば溶液、乳液、又は懸濁液の形態でありうる。液体は、注射、注入(例えば、IV注入)、又は皮下による送達のために有用でありうる。

【0211】

経口投与のために意図される場合、組成物は、好ましくは固体又は液体形態であり、半固体、半液体、懸濁液、及びゲルの形態は、固体又は液体のいずれかとして本明細書で検討される形態に含まれる。

【0212】

経口投与のための固体組成物として、組成物を、散剤、顆粒剤、圧縮錠、丸剤、カプセル剤、チューインガム、ウェーハ、又は類似の形態に製剤化することができる。そのような固体組成物は典型的に、1つ又は複数の不活性希釈剤を含有する。加えて、以下の1つ又は複数が存在しうる:結合剤、例えばカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、結晶セルロース、又はゼラチン;賦形剤、例えばデンプン、ラクトース、又はデキストリン;崩壊剤、例えばアルギン酸、アルギン酸ナトリウム、コーンスターチ、及び類似のもの;潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム;滑剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素;甘味剤、例えばスクロース又はサッカリン;香味剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ香料;並びに着色剤。組成物が、カプセル剤(例えば、ゼラチンカプセル)の形態である場合、これは、上記のタイプの材料に加えて、液体担体、例えばポリエチレングリコール、シクロデキストリン、又は脂肪油を含有しうる。

【0213】

組成物は、液体形態、例えばエリキシル剤、シロップ剤、液剤、乳剤、又は懸濁剤でありうる。液体は、経口投与又は注射による送達のために有用でありうる。経口投与のために意図される場合、組成物は、甘味料、保存料、色素/着色剤、及び風味増強剤の1つ又は複数を含みうる。注射によって投与される組成物では、界面活性剤、保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、緩衝剤、安定化剤、及び等張剤の1つ又は複数も含めることができる。

【0214】

組成物は、1つ又は複数の投与単位の形態をとりうる。

【0215】

特定の実施形態では、組成物を、処置を必要とする領域の局所に、又は静脈内注射若しくは注入によって投与することが望ましい場合がある。

【0216】

特定の障害又は状態の処置において有効/活性である本発明の抗体の量は、障害又は状態の本質に依存し、標準的な臨床技術によって決定することができる。加えて、*in vitro*又は*in vivo*アッセイを任意選択で、最適な用量範囲を同定するのに助けるために使用することができる。組成物において使用される正確な用量は、投与経路、及び疾患又は障害の重症度にも依存し、医師の判断及び各患者の状況に従って決定すべきである。年齢、体重、性別、食事、投与時間、排泄速度、宿主の状態、薬物の組合せ、反応感受性、及び疾患の重症度のような要因を考慮すべきである。

【0217】

典型的に、量は、本発明の抗体の、組成物質量の少なくとも約0.01%である。経口投与のために意図される場合、この量は、組成物質量の約0.1%~約80%の範囲で変化しうる。好ましい経口組成物は、本発明の抗体の、組成物質量の約4%~約50%を含みうる。

【0218】

本発明の好ましい組成物は、非経口投与単位が、本発明の抗体の約0.01%~約2質量%を含有するように調製される。

【0219】

注射による投与の場合、組成物は、典型的に約0.1mg/kg~約250mg/kg動物体重、好ましくは約0.1mg/kg~約20mg/kg動物体重、及びより好ましくは約1mg/kg~約1

10

20

30

40

50

0 mg/kg動物体重を含みうる。一実施形態では、組成物は、約1～30 mg/kg、例えば約5～25 mg/kg、約10～20 mg/kg、約1～5 mg/kg、又は約3 mg/kgの用量で投与される。投与スケジュールは、例えば週に1回から2、3、又は4週間毎に1回まで変化しうる。

【0220】

本発明は、対象、例えば哺乳動物(例えば、ヒト患者)における疾患、例えばがんを処置又は診断する方法であって、本発明の抗体、イムノコンジュゲート、又は医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。本発明は、例えば標的組織におけるLGR5発現を評価することによって、疾患、例えばがんを診断する方法を提供する。方法を、本明細書に詳細に説明する。

10

【0221】

本明細書で使用される場合、「処置する」、「処置している」、又は「処置」は、疾患又は障害を阻害又は軽減することを意味する。例えば、処置は、疾患又は障害に関連する症状の発症の延期、及び/又は前記疾患と共に発症する又は発症することが予想されるそのような症状の重症度の低減を含みうる。用語は、既存の症状を改善する、追加の症状を防止する、及びそのような症状の基礎となる原因を改善又は防止することを含む。このように、用語は、有益な結果が、処置される対象、例えばヒト患者の少なくとも一部に付与されることを示す。多くの医学的処置は、処置を受ける患者の必ずしも全てではないが、一部にとって有効である。

【0222】

「対象」又は「患者」という用語は、処置、観察、又は実験の対象である動物を指す。単なる例として、対象は、これらに限定されないが、哺乳動物、例えばこれらに限定されないが、ヒト又は非ヒト哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、ネズミ、ウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、又はネコを含む。

20

【0223】

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、単独又は追加の治療剤と組み合わせて細胞、組織、又は対象に投与した場合に、投与の条件下で所望の治療効果又は予防効果を達成するために有効である抗体の量を意味する。

【0224】

本発明はまた、疾患の処置又は防止に使用するための本発明の抗体、イムノコンジュゲート、又は医薬組成物にも関する。

30

【0225】

別の態様では、本発明は、がんの処置又は防止に使用するための、本発明の抗体、イムノコンジュゲート又は医薬組成物に関する。

【0226】

別の態様では、本発明は、疾患の処置又は防止における、本発明の抗体、イムノコンジュゲート又は医薬組成物の使用に関する。

【0227】

別の態様では、本発明は、がんの処置又は防止のための医薬の製造における本発明の抗体、イムノコンジュゲート又は医薬組成物の使用に関する。

40

【0228】

本発明の態様では、抗体は、がんを処置するためのCAR-T細胞の一部として使用される。CAR-T細胞は、本発明の抗体、すなわちLGR5に結合する抗体又はその断片を含むキメラ抗原受容体(CAR)を含みうる。

【0229】

養子細胞治療(ACT)は、がんの処置のための技術として多くの注目を集めている。ACTの1つの治療アプローチは、T細胞の表面上にキメラ抗原受容体(CAR)を発現させて特定の腫瘍の標的化を可能にするようにT細胞を遺伝子操作することを伴う。CARがT細胞において発現されると、CAR改変T細胞(CAR-T又はCAR-T細胞)は、抗原特異的認識、活性化、及び増殖を含む性質を獲得し、細胞はこのように、「生きている薬物」として作

50

用する。したがって、T細胞においてCARを発現させる目的は、細胞の免疫反応性を選択した標的へと再度方向付けることである。更に、異なる強度及びシグナル伝達を有するCARはまた、T細胞増大をモジュレートすると共に、T細胞活性化の強度も変更することができる。

【0230】

CARは、典型的に、単一の融合分子において1つ又は複数のシグナル伝達ドメインに会合する標的化/結合部分からなる合成受容体である。CARの結合部分は、典型的に、短いフレキシブルリンカーを介して単一のポリペプチド鎖に融合される、対を形成した抗体の軽鎖及び重鎖可変ドメイン(V_L及びV_H)を含む一本鎖抗体(scFv)の抗原結合ドメインからなる。scFvは、それが由来する全長抗体と同じ特異性及び類似の親和性を保持し、目的の特異的標的に結合することが可能である。細胞外抗原結合ドメインに加えて、CARはまた、膜貫通ドメイン及びシグナル伝達分子、例えば共刺激性エンドドメイン及びCD3ζ鎖も含む。

【0231】

CARは、抗原特異性及びT細胞活性化性質を単一の融合分子に組み合わせる。第1世代CARは、典型的にそのシグナル伝達ドメインとしてCD3ゼータの細胞質領域又はFc受容体γ鎖を含んだ。第1世代CARは、卵巣がん、腎臓がん、リンパ腫、及び神経芽腫を有する患者においてフェーズI臨床試験において試験されており、それらは中等度の応答を誘導した(Sadelainら、Curr Opin Immunol、21 (2): 215~223頁、2009において論評)。CD28及びCD3ゼータの両方のシグナル伝達ドメインを含有する第2世代CARは、組み合わせた活性化及び共刺激シグナルを方向付けるための二重のシグナル伝達を提供する。第3世代CARは、3つ又はそれより多くのシグナル伝達ドメインを有し、より複雑である。

【0232】

「キメラ抗原受容体」又は「CAR」又は「CARs」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原特異性を細胞(例えば、T細胞、例えばナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、又はその組合せ)にグラフトし、このように、抗原結合ドメインの抗原結合性質をT細胞の溶解能及び自己再生と組み合わせる、工学操作された受容体を指す。CARはまた、人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、又はキメラ免疫受容体としても公知である。「抗原結合ドメイン」又は「抗原特異的標的化ドメイン」という用語は、本明細書で使用される場合、上記で説明したように、特異的抗原を標的として結合するCARの領域を指す。CARが宿主細胞において発現される場合、このドメインは、細胞外ドメイン(エクトドメイン)を形成する。

【0233】

当業者は、CARが、追加のエレメントを含みうることを承知しているであろう。

【0234】

当業者はまた、CARのそのようなエレメント(本明細書に記載される抗原特異的標的化ドメイン以外)が、当技術分野で周知であることを知っているであろう。このように、本発明は、本明細書に記載される抗原特異的標的化ドメインに加えてCARの特異的ドメインに限定されない。

【0235】

上記のように、第1世代CARは、がんを有する患者における様々なフェーズI臨床試験において試験されている。第2世代CAR及び第3世代CARもまた、3つ又はそれより多くのシグナル伝達ドメインを有し、より複雑であると記載されている(Sadelainら、Curr Opin Immunol、21 (2): 215~223頁、2009、Sternier、R.C.、Sternier、R.M. CAR-T Cell therapy: current limitations and potential strategies. Blood Cancer J. 11、69、2021において論評)。CARはまた、全てが参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2004043401号、WO2019200007号及びWO2021108613号にも記載されている。

【0236】

10

20

30

40

50

例えば、本発明のCARは、以下の式の分子：LGR5結合scFv-膜貫通ドメイン-細胞内シグナル伝達ドメインを含みうる。例示的なドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインは、以下に記載され、当技術分野で公知である。

【0237】

したがって、本発明は、本発明の抗体又はその断片、例えばscFvを含むキメラ抗原受容体も提供する。一実施形態では、CARを標識してもよい。一実施形態では、CARは、配列番号211に示されるscFv、又は配列番号218によってコードされるようにそれと70%、80若しくは90%配列同一性を有する配列、又はそれと70%、80若しくは90%配列同一性を有する配列を含む。一実施形態では、CARは、本明細書において配列番号212、213及び214として番号付けられるクローン2.4のCDR、及び215、216及び217の重鎖CDRを含むscFvを含む。一実施形態では、CARは、クローン2.4のVH及びVLを含むscFv、又はそれと少なくとも(at least)90%配列同一性を有する配列を含む。

10

【0238】

本発明はまた、本発明のCARを発現する細胞、例えば免疫細胞であって、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)、TCR発現細胞、樹状細胞、又はNK-T細胞、及び調節性T細胞からなる群から選択される免疫細胞にも関する。細胞は、自己T細胞又は同種T細胞でありうる。

【0239】

本発明はまた、本明細書に記載されるCARを含む細胞又は細胞集団にも関する。本発明はまた、例えばがんを処置するための適応免疫療法において使用するための本明細書に記載されるCARを含む細胞集団にも関する。本発明はまた、本明細書に記載されるCARを含む細胞集団を投与することを含む、がんを処置する方法、例えば養子適応免疫療法にも関する。

20

【0240】

本発明はまた、対象における標的細胞集団又は組織に対するT細胞媒介性の免疫応答を刺激する方法であって、対象に、本明細書に記載されるCARを含む細胞又は細胞集団の有効量を投与することを含む方法にも関する。

【0241】

本発明はまた、適応免疫療法に使用するための細胞集団をex vivoで生成する方法であって、前記細胞を、CARをコードする核酸、例えば配列番号218、又はそれと70%、80若しくは90%配列同一性を有する配列によって形質転換することを含む方法にも関する。

30

【0242】

本発明はまた、CARを発現する集団を作製する方法であって：

- (i)細胞(例えば、T細胞、例えば、凍結産物又は新鮮な白血球アフェレーシス産物から単離したT細胞)集団を、CD3/TCR複合体を刺激する作用剤及び/又は細胞表面上の共刺激分子を刺激する作用剤と接触させること；
- (ii)細胞(例えば、T細胞)集団を、配列番号218の核酸分子、又はそれと70%、80若しくは90%配列同一性を有する配列と接触させ、それによって核酸分子を含む細胞(例えば、T細胞)集団を提供すること、及び
- (iii)細胞集団(例えば、T細胞)を、保存(例えば、凍結保存培地中で細胞集団を再製剤化する)又は投与のために採取することを含む方法にも関する。

40

【0243】

当業者によって認識されるように、「キメラ抗原受容体」又は「CAR」という用語は、細胞外認識ドメイン、膜貫通領域及び細胞内シグナル伝達ドメインを含有する組換え分子を指す。

【0244】

細胞外ドメインは、標的腫瘍抗原に対して特異的なリガンド、例えば、本明細書に記載されるLGR5に結合する抗体又はその断片を含む。

【0245】

50

細胞外ドメインは、膜貫通領域に繋がれている。膜貫通領域は、例えば、T細胞受容体のアルファ、ベータ又はゼータ鎖の膜貫通領域、PD-1、4-1BB、OX40、ICOS、CTLA-4、LAG3、2B4、BTLA4、TIM-3、TIGIT、SIRPA、CD28、CD3イプシロン、CD3ゼータ、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137又はCD154から選択されうる。

【0246】

CARの細胞内(細胞質)ドメインは、免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つの活性化を提供しうる。このように、本発明のCARは、細胞内シグナル伝達ドメインを更に含みうる。「細胞内シグナル伝達ドメイン」、「細胞質ドメイン」、又は「エンドドメイン」は、活性化シグナルをT細胞に伝送し、その特殊な機能を実行するように細胞を方向付けるドメインである。

10

【0247】

「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、この用語が本明細書で使用される場合、分子の細胞内部分を指す。細胞内シグナル伝達ドメインは、CAR含有細胞、例えば、CART細胞又はCAR発現NK細胞の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを生成する。例えば、CART細胞又はCAR発現NK細胞における免疫エフェクター機能の例は、サイトカインの分泌を含む、細胞溶解活性及びヘルパー活性を含む。

【0248】

一実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含みうる。例示的な一次細胞内シグナル伝達ドメインは、一次刺激、又は抗原依存的刺激の原因である分子に由来するドメインを含む。一実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激細胞内ドメインを含みうる。例示的な共刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル又は抗原非依存的刺激の原因である分子に由来するドメインを含む。例えば、CARTの場合、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体の細胞質配列を含むことができ、共刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、共受容体又は共刺激分子からの細胞質配列を含むことができる。

20

【0249】

細胞内シグナル伝達ドメインは、シグナル伝達ドメイン、例えばCD28、OX40、及び/又はCD3ゼータを含有する。細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインを含みうる。共刺激ドメインは、CD28、CD8、OX40、4-1BB、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、プログラム細胞死1(PD-1)、誘導型T細胞共刺激因子(ICOS)、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1(CD11a/CD18)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Igアルファ(CD79a)、DAP-10、Fcガンマ受容体、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達性リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、ICAM1l、B7-H3、CD5、ICAM-l、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKP80(KLRF1)、NKP44、NKP30、NKP46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-l、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-l、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83に特異的に結合するリガンドのシグナル伝達領域、又はその任意の組合せである。

30

40

【0250】

本発明の一態様では、抗体は、がんを処置するための二特異性T細胞エンゲージャー(B

50

ite)の一部として使用されうる。BiTEは、本発明の抗体、すなわち、LGR5に結合する抗体又はその断片を含むうる。

【0251】

したがって、本発明は、本発明の抗体を含むBiTEも提供しうる。

【0252】

当業者によって認識されるように、「二特異性T細胞エンゲージャー」又は「BiTE」という用語は、scFvの1つがCD3受容体を介してT細胞に結合し、他方が腫瘍特異的分子(例えば、LGR5に結合する抗体又はその断片)を介して腫瘍細胞に結合する、異なる抗体の2つのscFvを含む融合タンパク質を指す。CD3分子は、T細胞受容体(TCR)と非共有結合により会合して、抗原特異的シグナル伝達に関与し、これはT細胞を活性化して、T細胞による腫瘍細胞の溶解の再方向付けを開始する。

10

【0253】

一実施形態では、BiTEは、配列番号211に示されるscFv、又はそれと70%、80若しくは90%配列同一性を有する配列、又は配列番号211の1つ若しくは複数のCDRを含む。

【0254】

がんは、固形腫瘍又は非固形腫瘍でありうる。例えば、がんは、頭部又は頸部のがん、子宮がん、結腸直腸がん、胃がん、子宮内膜癌、食道がん、白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL)、肝臓がん、例えば肝細胞癌又は膵臓がんから選択されうる。

【0255】

一実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。処置されうる固形腫瘍は、例えば結腸直腸がんを含む。そのような腫瘍の一部の例は、類表皮嚢胞、扁平上皮腫瘍、例えば頭頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍を含む。

20

【0256】

一実施形態では、腫瘍は、非固形腫瘍である。非固形腫瘍の例は、白血病を含む。

【0257】

一実施形態では、がんは、結腸直腸がん(CRC)、肝細胞癌(HCC)、及びpre-B ALLから選択される。

【0258】

一実施形態では、がんは、LGR5陽性がんとして同定される。「LGR5陽性がん」という用語は、本明細書で使用される場合、その細胞がLGR5を発現するがんを意味する。本発明の抗体及び医薬組成物は、異常に高レベルのLGR5を発現するがん、例えばLGR5を過剰発現するがんの処置にとって特に有用である。「過剰発現する」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞が、正常な非がん様細胞において観察されるより多くのLGR5を発現することを意味する。がん細胞は、正常な非がん様細胞において観察されるより、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90%多くのLGR5を発現しうる。当業者は、がんがLGR5陽性であるか、及び/又はLGR5を過剰発現するかを評価する方法を十分に承知している。方法は、例えば蛍光インサイチューハイブリダイゼーション、免疫組織化学アプローチ、フローサイトメトリー、RT-PCRを使用することを含む。

30

【0259】

本発明者らは、本発明の抗体を利用することによって、抗体薬物コンジュゲート(ADC)の形態で毒性のペイロードを、全身毒性を示すことなくそれらの細胞を殺滅するためにLGR5発現がん細胞に送達することができることを見出した。

40

【0260】

一実施形態では、がんは、局所進行、切除不能、転移、又は再発がんである。

【0261】

一実施形態では、がんは、別の処置、例えば化学療法後に進行している。

【0262】

本発明の抗体、イムノコンジュゲート又は医薬組成物は、唯一の活性成分として、又は1つ若しくは複数の他の治療剤と組み合わせて投与されうる。治療剤は、疾患の処置において有用である化合物又は分子である。治療剤の例としては、抗体、抗体断片、薬物、毒

50

素、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、アポトーシス促進剤、抗血管新生剤、ホウ素化合物、光活性剤、又は色素及び放射性同位体が挙げられる。抗体分子は、全長の抗体又はその断片(例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、一本鎖Fv断片(scFv)、又は単ドメイン抗体、例えばV_Hドメイン)又は抗体模倣タンパク質を含む。

【0263】

一実施形態では、処置は、既存の治療又は治療剤、例えば既存の抗がん治療と組み合わせて使用される。このように、別の態様では、本発明は、本発明の抗体、イムノコンジュゲート、又は医薬組成物、及び抗がん治療の投与を含む併用療法にも関する。抗がん治療は、治療剤又は放射線療法剤を含んでもよく、遺伝子治療、ウイルス治療、RNA治療、骨髄移植、ナノ治療、標的化抗がん治療、又は腫瘍溶解薬を含む。他の治療剤の例としては、他のチェックポイント阻害剤、抗新生物剤、免疫原性剤、弱毒化がん様細胞、腫瘍抗原、抗原提示細胞、例えば腫瘍由来抗原又は核酸をパルスした樹状細胞、免疫刺激サイトカイン(例えば、IL-2、IFN α 2、GM-CSF)、標的化低分子及び生体分子(例えば、シグナル伝達経路の構成要素、例えばチロシンキナーゼの調節因子及び受容体チロシンキナーゼの阻害剤、及びEGFRアンタゴニストを含む、腫瘍特異的抗原に結合する作用剤)、抗炎症剤、細胞傷害剤、放射毒性剤、又は免疫抑制剤、及び免疫刺激性サイトカイン(例えば、GM-CSF)をコードする遺伝子をトランスフェクトした細胞、化学療法が挙げられる。一実施形態では、抗体は、手術と組み合わせて使用される。

10

【0264】

本発明の特定の実施形態では、組成物は、化学療法剤又は放射線治療と同時に投与される。別の特定の実施形態では、化学療法剤又は放射線治療は、本発明の組成物の投与前又は投与後に、好ましくは本発明の組成物の投与の少なくとも1時間、5時間、12時間、1日、1週間、1か月、より好ましくは数か月(例えば、最大3か月)前又は後に投与される。

20

【0265】

一部の実施形態では、本発明の抗体、イムノコンジュゲート又は医薬組成物は、2つ又はそれより多くの治療剤と共に投与されうる。

【0266】

本発明の抗体、イムノコンジュゲート又は医薬組成物は、他の治療又は治療化合物、又は治療と同じ時間又は異なる時間に、例えば、同時に、個別に、又は逐次的に投与されうる。

30

【0267】

別の態様では、本発明は、炎症疾患の処置又は防止に使用するための本発明の抗体、イムノコンジュゲート又は医薬組成物に関する。

【0268】

別の態様では、本発明は、炎症疾患の処置又は防止のための医薬の製造における、本発明の抗体、イムノコンジュゲート又は医薬組成物の使用に関する。

【0269】

別の態様では、本発明は、炎症疾患を処置する方法であって、本明細書に記載される抗体、本明細書に記載されるイムノコンジュゲート、又は本明細書に記載される医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法に関する。

40

【0270】

当業者に認識されるように、「炎症疾患」という用語は、例えば腫脹、疼痛、及び機能喪失を引き起こしうる、組織への白血球の動員の増加によって組織が炎症している疾患を指す。炎症疾患は、例えば、関節炎、喘息、クローン病、大腸炎、皮膚炎、刺激性腸症候群を含む。特に、慢性炎症はしばしば、がんの前兆である。炎症疾患はまた、自己免疫疾患及び他の炎症障害、例えば筋炎、強直性脊椎炎、血管炎も含む。

【0271】

複数の実施形態では、炎症疾患は、異常に高レベルのLGR5を発現する炎症疾患、例えばLGR5を過剰発現する炎症疾患である。「過剰発現する」という用語は、本明細書で用いられる場合、細胞が、炎症疾患を有していない正常な細胞において観察されるより多く

50

のLGR5を発現することを意味する。細胞は、正常な細胞において観察されるより5、10、20、30、40、50、60、70、80、90%多くのLGR5を発現しうる。当業者は、炎症疾患がLGR5を過剰発現するかを評価する方法を十分承知しているであろう。方法は、例えば蛍光インサイチューハイブリダイゼーション、免疫組織化学アプローチ、フローサイトメトリー、RT-PCRを含む。

【0272】

理論に拘束されることを望まないが、本発明者らは、慢性炎症組織が、幹細胞経路の上方調節及びLGR5の過剰発現をもたらすという仮説を立てている。したがって、本発明の抗体を使用してLGR5を標的化することにより、本発明者らは、炎症疾患によって影響を受ける細胞を標的化することができる。

【0273】

本発明者らは、本発明の抗体を利用することによって、抗体薬物コンジュゲート(ADC)の形態の毒性薬物ペイロードをLGR5発現細胞に送達して、全身毒性を示すことなくそれらの細胞を殺滅することができることを見出した。

【0274】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される抗体、イムノコンジュゲート又は医薬組成物を含むキットを提供する。

【0275】

別の態様では、本発明は、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートを含む、疾患を処置若しくは防止するため、及び/又は疾患を診断、予後判定、若しくはモニターするためにLGR5を検出するためのキットを提供する。そのようなキットは、他の構成要素、パッケージング、使用説明書、又はLGR5タンパク質の検出を助けるための材料を含有しうる。キットは、上記の本発明の標識抗体、及び標識を検出するための1つ又は複数の化合物を含みうる。

【0276】

別の態様では、本発明は、凍結乾燥形態でパッケージングされた、又は水性媒体中にパッケージングされた本発明の抗体を提供する。

【0277】

本発明はまた、図面及び実施例を参照して本明細書に記載される抗体にも関する。

【0278】

別の態様では、本発明の抗体は、診断試験及びアッセイ等の非治療目的のために使用される。生物試料中のLGR5の存在を検出する方法は、前記試料を、本発明に従う抗体と、LGR5に対する抗体の結合を許容する条件下で接触させること、及び抗体とLGR5の間に複合体が形成されたか否かを検出することを含む。

【0279】

本発明者らは、本発明の抗体が、LGR5を発現するがん細胞に対して高い親和性及び特異性で結合することを示した。したがって、本発明の抗体は、対象からの試料中のがんを検出する方法に使用されうる。

【0280】

したがって、本発明は、対象からの生物試料中のがんを検出する方法であって、試料を、本発明に従う抗体と、LGR5に対する抗体の結合を許容する条件下で接触させること、及び抗体とLGR5の間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む方法を提供する。方法は、LGR5に関して陽性である又はLGR5を過剰発現するがんを検出するために特に有用である。

【0281】

したがって、本発明は、対象からの生物試料中の炎症疾患を検出する方法であって、試料を、本発明に従う抗体と、LGR5に対する抗体の結合を許容する条件下で接触させること、及び抗体とLGR5の間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む方法を提供する。方法は、LGR5を過剰発現する炎症疾患を検出するために特に有用である。

【0282】

方法は、*in vivo*、*in vitro*又は*ex vivo*で行われうる。

【0283】

診断目的のための抗体の改変は、当技術分野で周知である。例えば、抗体を、リガンド基、例えばビオチン、又は検出可能なマーカー基、例えば蛍光基、放射性同位体、又は酵素によって改変してもよい。本発明の化合物を、従来の技術を使用して標識することができる。好適な検出可能標識は、これらに限定されないが、フルオロフォア、発色団、放射活性原子、電子密度の高い試薬、酵素、及び特異的結合パートナーを有するリガンドを含む。

【0284】

生物試料は、例えば組織試料、血液及び血液構成要素(例えば、血清)、粘液、唾液、尿、嘔吐物、便、汗、精液、膺分泌液、涙液、膿、喀痰、又は胸水を含みうる。好ましくは、生物試料は血液試料又は組織試料である。当業者によって認識されるように、したがって、がんを検出する方法は、対象におけるがんを検出する*in vitro*の方法であって、対象から提供された試料について行われる方法でありうる。

【0285】

また、対象からの生物試料中のがんを検出する方法であって、試料を、本発明に従う抗体と、LGR5に対する抗体の結合を許容する条件下で接触させること、及び抗体とLGR5の間で複合体が形成されるか否かを検出することを含む方法も提供される。方法は、LGR5陽性である、又はLGR5を過剰発現するがんを検出するために特に有用である。抗体とLGR5の間に複合体が形成される場合、このことは、対象にがんが存在することを示しうる。そのような場合、方法は、対象にがんの処置を投与することを更に含みうる。複数の実施形態では、処置は、本発明の抗体、イムノコンジュゲート又は医薬組成物、特にイムノコンジュゲート又は医薬組成物を投与することを含んでもよく、抗体は、治療剤、例えば毒素、酵素、放射性同位体又は他の化学部分(上記のように)にコンジュゲートされている。

【0286】

また、対象からの生物試料中の炎症疾患を検出する方法であって、試料を、本発明に従う抗体と、LGR5に対する抗体の結合を許容する条件下で接触させること、及び抗体とLGR5の間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む方法も提供される。方法は、LGR5を過剰発現する炎症疾患を検出するために特に有用である。抗体とLGR5の間に複合体が形成されると、このことは炎症疾患が対象に存在しうることを示している。そのような場合、方法は、対象に処置を投与することを更に含みうる。複数の実施形態では、処置は、本発明の抗体、イムノコンジュゲート又は医薬組成物、特にイムノコンジュゲート又は医薬組成物を投与することを含んでもよく、抗体は、治療剤、例えば毒素、酵素、放射性同位体又は他の化学部分(上記のように)にコンジュゲートされている。

【0287】

好ましい実施形態では、本発明は、試料中の本発明エピトープを検出する*in vitro*の方法であって、本発明の抗原結合タンパク質を、目的の試料とインキュベートすること、及び試料中に存在する本発明のエピトープに対する抗原結合タンパク質の結合を決定することを含み、抗原結合タンパク質の結合が、試料中の本発明のエピトープの存在を示している方法に関する。その標的抗原に対する抗原結合タンパク質の結合を検出する方法は、当技術分野で公知であり、ELISA、ICC、IHC、免疫蛍光、ウェスタンブロット、IP、SPR及びフローサイトメトリーを含む。目的の試料は、個体から得た試料でありうる。個体はヒトでありうる。試料は、これらに限定されないが、脳組織等の組織、脳脊髄液(CSF)、初代培養細胞又は培養細胞又は細胞株、細胞上清、細胞溶解物、血小板、血清、血漿、硝子体液、リンパ液、漿液、卵胞液、精液、羊水、乳汁、全血、血漿、血清、血液由来細胞、尿、唾液、喀痰、涙液、汗、粘液、腫瘍溶解物、及び組織培養培地、組織抽出物、例えばホモジナイズした組織、腫瘍組織、細胞抽出物、及びその組合せを含む。

【0288】

インキュベーション後、抗原結合タンパク質と抗原との結合、例えば抗体と抗原との結

10

20

30

40

50

合を、適切な検出システムを使用して検出する。検出方法は、直接又は間接的であってもよく、蛍光又は発色シグナルを生成してもよい。直接検出は、標識に直接コンジュゲートされた一次抗体の使用を伴う。間接的検出方法は、一次抗原結合タンパク質、例えば抗体、宿主種に対して作製した標識二次抗体を使用する。間接的方法は、シグナル強度を増加させるために増幅工程を含みうる。抗原結合タンパク質-抗原(例えば、抗体-エピトープ)相互作用の可視化(すなわち、検出)のために一般的に使用される標識は、フルオロフォア及び可溶性物質を不溶性の発色最終産物へと変換する酵素を含む。

【0289】

「検出する」という用語は、本明細書で使用される場合、標的分子の定性的及び定量的測定の両方を含むようにその最も広い意味で使用される。検出は、試料中の標的分子の単なる存在を同定すること並びに標的分子が試料中に検出可能なレベルで存在するか否かを決定することを含む。検出は、直接であっても間接的であってもよい。

【0290】

抗原結合タンパク質、例えば抗体にコンジュゲートされうる好適な検出可能な標識は、当技術分野で公知であり、放射性同位体、例えばヨウ素-125、ヨウ素-131、イットリウム-90、インジウム-111及びテクネチウム-99; 蛍光色素、例えばフルオレセイン、ローダミン、フィコエリスリン、テキサスレッド及びシアニン色素誘導体例えば、Cy7、Alexa750及びAlexa Fluor 647; 発色色素、例えばジアミノベンジジン; ラテックスビーズ; 酵素標識、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ; スペクトルが分離された吸収又は放射特徴を有するリン光又はレーザー/蛍光色素; 適当な化学的環境で電気による刺激を介して検出されうる電気化学発光標識、例えばSULFO-TAG; 及び特異的なコグネート検出可能部分、例えば標識アビジン又はストレプトアビジンに対する結合を介して検出されうる化学部分、例えばビオチンを含む。

【0291】

別の態様では、本発明は、エピトープを含む単離された合成又は組換えペプチドであって、配列番号1の22~37の残基からなるペプチドに関する。これは、抗体を同定して選択するための免疫化の方法において使用されうる。このように、断片を使用する免疫化の方法もまた企図される。

【0292】

更に、本発明は、予後判定マーカーとしてのLGR5発現の使用に関する。

【0293】

このように、本発明は、LGR5の発現及び/又はLGR5のタンパク質レベルを評価することを含む、がんの進行を診断又は評価する方法に関する。発現を評価することは、通常の方法を使用して発現を測定することを含む。タンパク質レベルは、本発明の抗体を使用して評価することができる。

【0294】

一実施形態では、方法は、発現レベルを閾値レベルと比較することを更に含む。

【0295】

一実施形態では、閾値レベルは、正常組織における発現レベルである。

【0296】

一実施形態では、方法は、発現レベルが閾値より上である場合に処置を選択することを更に含む。

【0297】

一実施形態では、方法は、前記処置を投与することを更に含む。

【0298】

一実施形態では、処置は、本明細書に記載される抗体又は抗体断片である。

【0299】

一実施形態では、がんは、CRC、HCC及びpre-B ALLである。

【0300】

一実施形態では、がんは、HCCであり、方法は、 β -カテニンにおける変異の存在を評

10

20

30

40

50

価することを更に含みうる。

【0301】

本明細書においてそれ以外であると定義していない限り、本開示に関連して使用される科学技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。前述の開示は、本発明を作製及び使用する方法並びにその最善の様式を含む、本発明の範囲内に包含される一般的な説明を提供するが、以下の実施例は、当業者が本発明を実践して、その完全な記述要件を提供することを更に可能にするために提供される。しかし、当業者は、これらの実施例の詳細が、本発明を限定すると読んではならず、その範囲は本開示に添付される特許請求の範囲及びその均等物から理解されるはずであることを認識するであろう。本発明の様々な更なる態様及び実施形態は、本開示を考慮して当業者に明らかであろう。

10

【0302】

本出願において言及した全ての文書は、遺伝子の受託番号に対する言及及び特許刊行物に対する言及を含む、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0303】

「及び/又は」は、本明細書で使用される場合、互いを伴う又は伴わない2つの指定された特性又は構成要素の各々の特定の開示ととるべきである。例えば、「A及び/又はB」は、あたかも各々が本明細書において個別に記載されているかのように、(i)A、(ii)B、及び(iii)A及びBの各々の具体的開示ととるべきである。本文がそれ以外であることを指示していない限り、上記の特性の説明及び定義は、本発明の任意の特定の態様又は実施形態に限定されず、記載される全ての態様及び実施形態に等しく当てはまる。

20

【0304】

本発明を、非限定的な実施例において更に説明する。

【実施例】

【0305】

本発明者らは、本発明の抗体を開発するための重要な実験に着手し、その過程で、研究ツールとして及び治療目的の両方で使用されうる、高い結合親和性及び特異性を有する抗体を確立した。

【0306】

材料及び方法

プラスミド構築物

30

hLGR5-eGFP発現プラスミドのためのプラスミドは以前に記載されている。試験に使用される他の全てのLGRトランスジーンを、Gibsonアセンブリ(New England Biolabs社)又は制限酵素クローニングのいずれかによって、LGR5コード配列を、対応するLGRファミリーコード配列からのPCRアンプリコンと直接交換することによって構築した。LGRファミリーコード配列の起源は以下の通りであった:hLGR4 (HG15689)、Sino Biological社;mLGR4 (MR219497) Origene社;mLGR5 (MR219702) Origene社;及びhLGR6(LGR6_OHu16329D) GenScript社。

【0307】

抗体ハイブリドーマクローンのシーケンシング並びにヒト化 α -LGR5抗体(α -LGR5v4及び α -LGR5v6)の重鎖及び軽鎖及びscFv断片をコードするプラスミドの生成を、Abso

40

lute Antibody社から得た。

【0308】

細菌の発現からのタンパク質の調製

シグナルペプチドを欠如するヒトLGR5のN末端の100アミノ酸のコード配列を、pGEX-4T1細菌発現ベクターに挿入し、大腸菌XL1 blueにおいて発現させた。発現させたGST融合タンパク質を、グルタチオン-セファロース4B(Sigma-Aldrich)に吸収させた後、カラムをリン酸緩衝食塩水(PBS)によって十分に洗浄し、20mMグルタチオンによって溶出した。溶出液を、2Uトロニンプロテアーゼ(Sigma)によって一晩消化し、LGR5 N末端断片を、AKTA pureシステムにおいてSuperdex 75 10/300ゲル濾過カラムにおいてPBS中で分離した。

50

【0309】

LGR5 N末端断片のRADディスプレイのための細菌発現プラスミドを、Gibsonアセンブリによって生成し、細菌において発現させ、以前に記載されたように(Rossmannら)熱変性及びNi-セファロースアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。

【0310】

哺乳動物細胞株

細胞株を、European Collection of Cell Culturesから購入し、これらは、ショートタンデムリピート(STR)DNAプロファイリングによって認証されている。受領時、細胞株は凍結され、個々のアリコートをし、分析のために典型的に<10代未満の継代で培養した。細胞を、37℃、5%CO₂の湿潤インキュベーター中で成長させ、細胞はマイコプラズマ試験陰性であった(MycoProbe(登録商標)マイコプラズマ検出キット、R&D systems社)。HEK293T細胞、及び結腸直腸がん細胞株LoVo、SW480、HT29、HCT116、CaCo及びDLD1を、10%熱不活化FCS (Gibco社)及び100 U/mlペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco社)を補充したDMEM中で維持した。pre-B ALL細胞株NALM6、REH、697、RS4-11、HAL-01、NALM16、SupB15 KOPN8、及びMHH-CALL2を、10%熱不活化FCS (Gibco社)及び100 U/mlペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco社)を補充したRPMI-1640(Gibco社)培地中で維持した。

10

【0311】

細胞のアッセイ及び操作

間接免疫蛍光、ウェスタンブロット分析、フローサイトメトリー及びTopFlashアッセイは、以前に記載されている。免疫蛍光に関して、検出を、Andor Dragonfly 500 (Oxford Instruments社)を使用して共焦点スピニングディスク顕微鏡によって行った。画像を、Imarisソフトウェア(Bitplane/Oxford Instruments社)を使用して処理した。フローサイトメトリーを、BD FACSDivaソフトウェア(BD Biosciences Inc.社)を使用してBD LSR Fortessa又はBD LSR Symphony細胞アナライザーによって行った。定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)は、以前に記載されており、ヒトLGR5に特異的なTaqmanプローブ(Life Technology社、Hs00969422_m1)及び対照ハウスキーピング遺伝子としてTBP(Life Technology社、Hs00427620_m1)を使用した。Prismソフトウェアパッケージを使用して、TopFlashアッセイ及びqRT-PCR実験からのデータセットをグラフにし、両側のスチューデントt検定を使用して統計分析を行った。

20

30

【0312】

LGRファミリータンパク質の過剰発現に関して、HEK 293T細胞に、lipofectamine 2000(Life Technology社)を使用して製造元の推奨に従って対応するプラスミドをトランスフェクトした。細胞を、一晚トランスフェクトし、培養培地中で更に16時間回復させた後、免疫蛍光、ウェスタンブロット又はフローサイトメトリーを行った。

【0313】

LGR5v4及びα-LGR5v6の生成を、HEK293T 4×T175フラスコに各コードプラスミド(Absolute Antibody社)15 µgをトランスフェクトすることによって行った。抗体を含有する培地をトランスフェクションの2-及び4日後に収集し、プロテインG精製に供した。α-LGR5 (Fl-α-LGR5)、α-LGR5v4 (Fl-α-LGR5v4)及びα-LGR5v6 (Fl-α-LGR5v6)の蛍光型を、Dylight TM650抗体標識キット(Thermo Fisher Scientific社)を使用して生成した。蛍光トラスツズマブ(Fl-α-HER2)を、Dylight TM550抗体標識キットを使用してそれぞれ作製した。フローサイトメトリー及び免疫蛍光に関する一部の対照に関して、Fl-α-LGR5を、RAD表示Frag1A又はFrag1B又はFrag1Aペプチド(Cambridge Peptides社)の超化学量論量と共に10:1のモル比でブレインキュベートした。

40

【0314】

抗体内部移行アッセイを、細胞を、20 µg/ml Fl-α-LGR5又はFl-α-HER2と共に様々な時点でインキュベートした後、4%パラホルムアルデヒドによる固定及び免疫蛍光を

50

行った。細胞のz-スタックに由来する画像を、Fl-a-LGR5v4に関して、及び様々な細胞マーカー、皮質アクチンを可視化するための蛍光ファロイジン、及び核を可視化するためのHoechst 33342に対する抗体からの蛍光シグナルに関して分析した。画像を処理し、Arivis Vision 4Dソフトウェアを使用して分析した。蛍光特性:皮質F-アクチンによって表される全細胞、核、及び斑点を描写するための3Dでの画像のセグメント化を、Blob Finderを使用して行った。次に、Arivis Vision 4Dソフトウェアを使用して、細胞膜又は細胞内に関連する斑点を分類し、LGR5と区画特異的マーカーの間の共局在の程度を決定した-共局在は、LGR5斑点と> 50%の重複として定義される。

【0315】

内部移行動力学実験に関して、画像を、Arivis Vision 4Dソフトウェアを使用して、Cellposeを使用するディープラーニングセグメント化と組み合わせて解析した。2つの領域を定義した:細胞外膜、及び細胞質。Fl-a-LGR5又はFl-a-LGR5v4に対応するセグメント化ドットシグナル、並びにFl- α -HER2に対応するセグメント様シグナルを、これらの2つの領域内でのその位置に従って分類した。比率計測分析を実施して、様々な時点で両方のマーカーの内部移行を定量した。

【0316】

がんにおけるLGR5発現のためのTCGAデータマイニング

The Cancer Genome Atlas (TCGA; <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>)から公開されている遺伝子発現データ(RNAseq V2)を、Firebrowse(<http://firebrowse.org/>)を使用してダウンロードした。遺伝子レベルのリード数を、Voomを使用してクォンタイル正規化し、(log2中央値中央化)LGR5遺伝子発現を、各試料に関して決定した。試料の70%より多くが汎がん中央値LGR5発現より高い腫瘍サブタイプを、「高LGR5腫瘍」としてトリージした。

【0317】

a-LGR5抗体の生成

ジフテリア類毒素に共役させたLGR5 N末端断片グルタルアルデヒド30mgを14日間隔で2回SC免疫化したNMRIマウス又はSPRDラット(Taconic社)の脾細胞から融合体を作製した。抗原を、製造元の推奨に従ってGERBU Paアジュバントと共に投与した。融合の4日前に、動物に、アドレナリンと共に投与する抗原15mgのIV注射ブーストを行った。

【0318】

融合及びスクリーニングは本質的に、融合パートナーとしてマウスSP2骨髓腫細胞株について以前に記載したように実施した。

【0319】

免疫グロブリン分画の精製を、PBS中で平衡にしたプロテインG fast flowセファロースの3ml充填体積にハイブリドーマ上清1Lを吸収させることによって行った。カラムをPBSで十分に洗浄後、免疫グロブリン分画を、100mMグリシン、pH2.7によって溶出させ、200mM Tris pH8.0によって直ちに中和した。

【0320】

ウェスタンブロッティング

HEK293t、LoVo及びNALM6溶解物のウェスタンブロットを、タンパク質40 μ gについて行った。RAD表示ペプチドのウェスタンブロットを、精製タンパク質2.5、12及び60ngについて行った。

【0321】

Wntシグナル伝達レポーターアッセイ

TopFlashアッセイを、以前に報告されたように実施した(de la Rocheら)。

【0322】

抗LGR5マウスモノクローナル抗体のCDR3領域のDNAシーケンシング

Absolute Antibody社に外注した。

10

20

30

40

50

【0323】

抗LGR5マウスモノクローナル抗体のヒト化

Absolute Antibody社に外注した。

【0324】

細胞培養

細胞を全て、37℃及び5%CO₂の湿潤インキュベーター内で成長させた。結腸直腸がん細胞株、LoVo、SW480、HT29、HCT116、CaCo及びDLD1を、10%熱不活化FCS(Gibco社)及び100U/mlペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco社)を補充したDMEM培地中で維持した。HEK 293Tを、100U/mlペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco社)なしで10%熱不活化FCS(Gibco社)を補充したDMEM培地中で維持した。Colo205結腸直腸がん細胞株並びにpre-B-ALL細胞株、NALM6、REH及び697を、10%熱不活化FCS(Gibco社)及び100U/mlペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco社)を補充したRPMI-1640(Gibco社)培地中で再懸濁させて維持した。

10

【0325】

LGR5発現のmRNAレベルでの定量

RNA抽出のために採取した細胞を、氷冷PBS中で2回洗浄し、-80℃フリーザーで保存するためにドライペレットとして瞬間凍結した。総RNAを、獲得した細胞数に従ってSingle cell RNA精製キット(Geneflow社)又はPureLink RNAミニキット(Life Tech社)を使用して製造元の使用説明書に従って抽出した。定量的RT-PCR(qRT-PCR)を、One-Step qRT-PCRキット(Thermo Fisher SuperScript III Platinum)を使用して、ヒトLGR5(Life Technology、Hs00969422_m1)に対して特異的なTaqmanプローブ及び対照ハウスキーピング遺伝子としてのTBP (Life Technology、Hs00427620_m1)によって行った。各実験は、きれいな反応バックグラウンドを保証するために非鋳型水対照を含めた。SuperScript Platinum III RTを、Platinum Taq DNAポリメラーゼ(Life Technology社、カタログ番号10966018)に置換する非RT対照を実施して、ゲノムDNAを増幅するRTの非特異性を制御した。遺伝子転写物の発現レベルを、 Δ Ct法によって計算した。目的の遺伝子のサイクル閾値(Ct)を、ハウスキーピング遺伝子から減算して、因子 $2^{(-\Delta Ct)}$ によって変換し、ハウスキーピング遺伝子に対する発現倍率を与えた。

20

【0326】

患者の試料並びにLGR5及び β -カテニンの免疫蛍光検出

試験に使用したヒト組織生検を全て、パラホルムアルデヒドで固定してパラフィン包埋し、 α -LGR5及び β -カテニンに対する抗体によってプロービングし、Alexa488によって標識したマウス及びAlexa555によって標識したウサギに対する蛍光二次抗体によって可視化した。全ての免疫染色試料を、Phenolmager HT(商標) Automated Quantitative Pathology Imaging System (Akoya Biosciences社)を使用して撮像した。LGR5及び β -カテニンの同時発現に関する全てのヒト生検の採点を、試料の起源に対して盲検の個人が行い、全ての試料セットに関して発現なし-0から高い発現-3まで等級付けした。Prismソフトウェアパッケージを、全ての生検試料セットのLGR5又は β -カテニン発現レベルをプロットするために、及び両側のスチューデントt検定を使用して統計学的差を決定するために使用した。特に記していない限り、アデンプルックス病院(ケンブリッジ、UK)の関連する全ての法律上及び倫理的ガイドラインを、試料の収集及び本発明の試験の提供に関して遵守した。研究応用のためのインフォームドコンセントを、全ての対象から得た。

30

40

【0327】

個々の結腸直腸がん症例及び隣接する健康な組織におけるLGR5発現を、Dr Olivier Giger (OG; (IRAS: 162057)によって提供された生検に関して決定した。これらの組織試料において、連続するH&E切片から、領域を、正常、異形成、又は浸潤性組織としてアノテートした。LGR5及び β -カテニンタンパク質レベルを、Dr Inti Zlobecによって提供されたベルンCRC試料セットを使用して免疫蛍光によってCRCにおいて更に決定

50

した。ベルンCRC試料セットは、決定された表現型特性-性別、年齢、腫瘍のステージ、治療介入、及びMSI状態を有する160人の個々の症例からなる二連の高度アノテーション腫瘍マイクロアレイ(TMA)である。TMAの構築のために使用した生検は、スイス、ベルンカントンの倫理委員会によって認可された倫理学2020-00498の下で収集された。スイス、ベルンカントンのベルン大学病理学研究所(Institute of Pathology, University of Bern, Canton of Bern, Switzerland)の全ての関連するガイドラインを、TMAの構築のために遵守した。

【0328】

ケンブリッジHCC TMAは、104例のヒト肝臓試料からなり、イギリス、ケンブリッジのアデンプルックス病院においてDrs Sarah Aitken及びMatthew Hoareにより、イングランド東部地域倫理委員会(East of England Local Research Ethics Committee)によって承認された手順(16/NI/0196及び20/EE/0109)に従ってインフォームドコンセントを得て収集された。健康と分類された肝臓試料は、肝臓の炎症性腺腫を有する女性(2人)及び限局性結節性過形成を有する女性(2人)、又はHNF1a不活化型腺腫を有する男性からの切除物から得た。健康な肝組織の生検は全て、年齢25〜36歳の間の患者から得た。

【0329】

ケンブリッジ卵巣がんTMAを構成する高悪性度卵巣漿液性嚢胞腺腫(HGSOC)試料は、Prof James Brentonから提供された。腫瘍試料を、施設内倫理委員会によって承認された(REC08/H0306/61)、Cambridge Translational Cancer Research Ovarian Study 04(CTCROV04、略してOV04)試験に登録した患者から得た。試料を、OV04試験設計に概要された標準化された操作プロトコールに従って処理した。組織の品質を、ヘマトキシリン及びエオジン(H&E)切片を使用して評価し、高純度領域を、組織マイクロアレイ(TMA)生成(0.1cmコアを使用する)のために選択した。TMAは、健康な卵管(FT; 27試料)、28の卵巣がん症例(OvC)及び14の腹膜がん症例(OmC)からなった。

【0330】

ケンブリッジ脳がんTMAは、ICARUSバイオレポジトリ、アデンプルックス病院を介して、承認された地域の研究倫理学(LREC 18/EE/0172)に従って収集した5例の健康な脳組織試料、5例の低悪性度神経膠腫、及び5例の膠芽腫からなった。

【0331】

PDAC及び健康な膵臓の切片は、Dr Eva Serraoによって提供され、ケンブリッジ大学組織バンク(Cambridge University Hospital Human Tissue bank)、ケンブリッジ、UKから、ケンブリッジ南部研究倫理委員会(Cambridge South Research Ethics Committee)によって承認された手順(REC18/EE/0227)に従って得た。

【0332】

この試験に使用した初代培養血液悪性疾患試料は、UK血液がん小児白血病細胞バンク(Blood Cancer UK Childhood Leukaemia Cell Bank)(LREC 16/SW/0219)及びケンブリッジ血液幹細胞バイオバンク(Cambridge Blood and Stem Cell Biobank)(LREC 18/EE/0199)、並びにUK血液がんバイオバンク(Blood Cancer UK Biobank)(REC16/SW/0219)によって、ブリストル南西中心部研究倫理委員会(South West-Central Bristol Research Ethics Committee)によって承認された手順に従って提供された。

【0333】

健康なドナーからのバフィーコート、NHS Blood and Transplant (ケンブリッジ)から、適当な倫理学(Research into Altered Lymphocyte Function in Health and Disease、REC参照番号:17/YH/0304)の下で獲得した。PBMCを、SepMate PBMC単離チューブ(Stemcell Technologies)を使用して単離し、B細胞及びCD8+ T細胞を、ヒトCD19マイクロビーズ(Miltenyi Biotec)又はヒトCD8+単離キット(Miltenyi Biotec)を使用してこれらから単離した。

【0334】

ADCの生成及びin vitro殺滅アッセイ

全ての抗体及びIgG1(Sigma-Aldrich社)を、正確な薬物の抗体に対する比4のために重鎖-軽鎖ジスルフィド連結内に挿入されたジビニルピリミジン架橋リンカーを通してMMAEに共役した。In vitro殺滅アッセイの場合、LoVo標的細胞を、不透明な96ウェルプレートに一晩播種し、沈降させた後、切断可能リンカー又は切断不能対照リンカーを有するADCを、30、10、3、1、0.3、及び0.1nMの用量で使用する処置を3日間行った。NALM6及びREH標的細胞を、不透明な96ウェルプレートに播種し、切断可能リンカー又は切断不能対照リンカーを有するADCによって、30、10、3、1、0.3、及び0.1nMの用量で3日間直接処置した。3日目に、細胞生存率を、CellTiter-Glo 2.0細胞生存率アッセイ(Promega社)によって製造元の使用説明書に従って評価した。生物発光を、CLARIOStar(BMG Labtech社)を使用して測定した。

10

【0335】

CRCの標的化における α -LGR5-ADCの有効性を、de la Roche研究所バイオバンクからのCRCオルガノイドモデルにおいて試験した。殺滅アッセイに関して、オルガノイドモデル1及び2を、 α -LGR5-ADCの1~100nMの濃度範囲によって処置した。オルガノイドの殺滅を、切断型カスパーゼ3(CC3)発現細胞のパーセンテージによって24時間後に評価した。

【0336】

LGR5の内部移行に関するフローサイトメトリー分析。

細胞を、ヒトTruStain fcX (Biolegend)によって15分間ブロックした後、エピトープペプチド(Cambridge Peptides社が合成)によるブロッキングの存在下又は非存在下でFl標識 α -LGR5 mAbと共に10:1(ペプチド:mAb)の比率でインキュベートした。インキュベーションを、37°C(表面及び内部移行したLGR5)又は4°C(表面LGR5)で実施した。細胞表面染色の場合、細胞を、氷冷PBSによって2回洗浄し、Fixable Viability dye eFlour780(eBioscience社)と共に室温で遮光しながら10分間インキュベートした。次に細胞を、PBS(Gibco社)、3%FCS (Biosera社)、0.05%アジ化ナトリウム(Sigma社)、及び2mM EDTA(Sigma社)で構成されるFACS緩衝液によって1回洗浄した。次に細胞を、ヒトTruStain fcX (Biolegend)の存在下、フルオロフォアコンジュゲート抗体の適切な希釈液と共に4°Cで遮光しながら30分間インキュベートした。細胞を、FACS緩衝液によって2回洗浄し、BD Fortessa又はSymphony細胞アナライザーにおいてフローサイトメトリー分析を行い、データを、FlowJoソフトウェア(Tree Star Inc.社、バージョン10.4)によって分析した。

20

30

【0337】

免疫蛍光(IF)顕微鏡検査

異なる種(ヒト、マウス、及びマカク)からの異なるLGRの過剰発現に関して。HEK 293T細胞を、カバーガラス上で培養し、一晩培養して成長させた後、lipofectamine 2000(Life Technology社)を使用して製造元の使用説明書に従って様々な発現ベクター(図2B)のトランスフェクションを行った。トランスフェクトした細胞を、更に一晩インキュベートして、トランスジーンを発現させた後、IF染色及び顕微鏡検査に供した。

【0338】

LoVo細胞を、カバーガラス上に播種して2日間培養して成長させた後、IF顕微鏡検査のために染色した。NALM6細胞を、FCSを含まないRPMI培地で2回洗浄し、再懸濁させてスライドガラス上に播種して、37°Cインキュベーターに8分間入れてしっかりと接着させ、更にIF染色及び顕微鏡検査を行った。

40

【0339】

内部移行を可視化するために、NALM6細胞を、陰性対照としてエピトープペプチドによってブロックされたFlコンジュゲート抗LGR5 mAbs又はFlコンジュゲート抗LGR5 mAbと共に完全な培地中、37°Cインキュベーターにおいて5、15、30及び60分間インキュベートした。次に、NALM6細胞を、FCSを含まないRPMI培地によって2回洗浄し、再懸濁させ、スライドガラス上に播種して、37°Cインキュベーターに8分間入れた。L

50

oVoの場合、細胞をカバーガラス上に播種して2日間培養して成長させ、更なるIF染色及び顕微鏡検査のために、陰性対照としてエピトープペプチドによってブロックされたFlコンジュゲート抗LGR5 mAb又はFlコンジュゲート抗LGR5 mAbと共に完全な培地中、37℃インキュベーターにおいて5、15、30及び60分間インキュベートした。

【0340】

細胞を、PBSによって2回洗浄した後、4%PFA(CN Technical Services)によって室温で10分間固定した。スライドガラスを、PBSによって5回洗浄し、1%ウシ血清アルブミン(BSA、Sigma社)及び0.1% TritonX-100 (Alfa Aesar社)を含むPBS中のブロッキング緩衝液によって室温で30分間ブロックした。ブロッキング緩衝液を吸引し、スライドガラスを、ブロッキング緩衝液中の一次Abによって室温で1時間染色し、次に、ブロッキング緩衝液によって5回洗浄した。ブロッキング緩衝液中でFlコンジュゲートファロイジン(Alexa488又はAlexa555、Thermo社)を含む又は含まない二次抗体(抗マウスAlexa488 (Thermo社)及びAlexa647 AffiniPureロバ抗ヒトIgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch社))を、スライドガラスに室温で添加し30分間おいた。インキュベーション後、スライドガラスをブロッキング緩衝液によって5回洗浄し、ブロッキング緩衝液中で調製したHoechst33342(Invitrogen社)によって、室温で遮光しながら5分間染色した。スライドガラスを、ブロッキング緩衝液によって5回洗浄し、ProLong Diamond Antifade Mountant(Fisher社)によってマウントした。過剰なマウント液を拭き取り、スライドガラスを室温で遮光しながら一晩置いた後、撮像した。共焦点スピニングディスク顕微鏡検査を、Andor Dragonfly 500 (Oxford Instruments社)において実施した。画像を、Imarisソフトウェア(Bitplane/Oxford Instruments社)を使用して処理した。

10

20

【0341】

ADCの生成

全ての抗体及びIgG1を、以前に報告されたプロトコール(Walshら)を使用してMMAEに共役させた。

【0342】

CRC及びpre-B ALL細胞株に対するADCのin vitroでの細胞傷害性

LoVo標的細胞を、不透明な96ウェルプレートに一晩播種して沈降させた後、切断可能リンカー又は切断不能対照リンカーを有するADCを30、10、3、1、0.3、及び0.1nMの用量で使用する処置を3日間行った。NALM6及びREH細胞を、不透明な96ウェルプレートに播種し、切断可能リンカー又は切断不能対照リンカーを有するADCによって30、10、3、1、0.3、及び0.1nMの用量で3日間直接処置した。3日目に、細胞生存率を、CellTiter-Glo(登録商標)2.0細胞生存率アッセイ(Promega社)によって製造元の使用説明書に従って評価した。生物発光を、CLARIOStar (BMG Labtech社)によって測定した。

30

【0343】

免疫欠損NSGマウスモデルにおけるヒトNALM6 pre-B ALL細胞に対するマウス及びヒト化ADCのin vivo治療有効性

NSGマウス(NOD scidガンマ;系統NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ)を、Charles River UK Ltd社(Margate、UK)から購入し、ケンブリッジ大学、CRUKケンブリッジ研究所においてUK Home Office規則に従って特定病原体不在条件下で収容した。NALM6細胞に、安定に発現するLucEYFPレポーターを形質導入した。

40

【0344】

免疫欠損NSGマウスに、NALM6細胞を静脈内(i.v)注射することによって生着させ、体重減少に関してモニターし、2〜3日間隔でIVISイメージングを使用して撮像した(図11A及び図13A)。IVISイメージングに関して、マウスに、D-ルシフェリンを150mg/kgの用量でi.p投与した10分後に、イソフルランによる全身麻酔下、IVIS2000によるイメージングを行った。マウスを、生着後5日目に検出された生物発光シグナルに従って対照群及び処置群に無作為化した。mIgG-ADC又はα-LGR5-ADCの5mg/kgによる処置を

50

、6日目に開始して1日おきに4回行うi.v.注射によって行った。 α -LGR5v6-ADC(対照)又は α -LGR5v4-ADCの5mg/kgによる処置を、6及び7日目にi.v.注射によって行った。20日目の実験エンドポイントで、全ての動物を、動物(科学的処置)法(Animals (Scientific Procedures) Act)1986のスケジュール1に従って安楽死させた。脾臓、血液、心臓、腎臓、肺、肝臓、小腸、大腿骨及び脛骨を、組織学及び/又はFACSのために実験エンドポイントで収集した。

【0345】

脾臓、血液、並びに大腿骨及び脛骨の骨髓から調製した単細胞懸濁液を、eflour780 fixable live/deadによって染色後、FACS分析によってNALM6細胞(CD19+ EYFP+)を同定するために、ヒトCD19に対する蛍光コンジュゲート抗体によって染色した。NALM6細胞の絶対数を、AccuCheck Counting Beads (Thermo社)を使用することによって定量した。

【0346】

全心臓、腎臓、肺、肝臓、小腸、及び脾臓の一部を、パラホルムアルデヒドによって固定し、70%エタノールによって脱水した後、パラフィンブロックに包埋した。組織切片を、異なる組織の全般的細胞構造を評価するために、ヘマトキシリン及びエオジン(H&E)によって染色した。小腸切片を、Ki67及び β -カテニンに対する蛍光コンジュゲート抗体によって染色した。

【0347】

LoVo及びNALM6細胞株の工学操作

LGR5及びLGR4遺伝子を、両方の遺伝子の第1エクソンを標的化する以下のガイドRNA(gRNA)-LGR5-5'-GCTGCTGCAGCTGGCGACCGG-3';(配列番号219)、LGR4-5'-GCGCGGCGCCGCTCTCTGCG-3'(配列番号220)を使用するCRISPR-Cas9によって標的化した。

【0348】

gRNAに対応するDNA配列を、pSpCas9(BB)-2A-GFP (Addgeneプラスミド48138)に組み込んだ。LoVo及びNALM6細胞株にgRNAを有するpSpCas9(BB)-2A-GFPプラスミドをトランスフェクトし、翌日、単一のGFP発現細胞を、96ウェルプレートのウェルに播種した。クローン性の標的化細胞株を、標的化領域のPCR増幅及びシーケンシングによって確認した。

【0349】

ルシフェラーゼトランスジーンを、レンチウイルスベクター-lenti-lucによる形質導入によってLoVo及びNALM6細胞株に導入した。

【0350】

患者の試料

CRC患者切片-CRC腫瘍試料を、倫理学に基づいて得た。腫瘍切片を、組織病理学者(O.T.G.)が評価し、正常な結腸上皮、異形成上皮成長及びがんの領域を同定した。

【0351】

ベルンTMA-試験のために、スイス、カントンベルンのベルン大学病理学研究所の全ての関連するガイドラインに従った。全ての対象から、又は対象が18歳未満の場合には、親及び/又は法定後見人からインフォームドコンセントを得た。ngTMAの構築時に、類似の組織タイプ、すなわち正常上皮、腫瘍上皮、又は腫瘍間質を、同じTMAレシピエントブロック上にプールし、したがって、組織パンチの予想含有量に関する事前の知識が利用可能であった。

【0352】

結合親和性の決定

結合親和性を、Octetプラットフォームを使用してバイオレイヤー干渉測定によって決定した。svFv- α -LGR5の場合、Kd値を、 α -LGR5エピトープペプチドN-SSPRSGVLLRGCPHCHC-C (配列番号210)を添加した場合の干渉測定の変化から、Ni-NTAバイオセンサーに吸収されたscFv- α -LGR5に関して導出した。

【0353】

scFv- α -LGR5の調製

6×His-タグscFv- α -LGR5トランスジーンを含有する発現プラスミドを、HEK293T細胞にトランスフェクトして、タンパク質を、Ni-NTA-セファロースを使用して条件培地から精製した。精製タンパク質を、リン酸緩衝食塩水(pH7.2)中で透析した。

【0354】

ケンブリッジ肝臓がんTMA

肝臓及び肝臓がん試料の倫理学は、Rec-20/NI/0109 to M.Hに従う。

【0355】

BiTE産生、T細胞活性化及び殺滅アッセイ

CD3 ϵ のscFv抗体断片に融合した α -LGR5^{scFv}のトランスジェニックBiTE型のコード領域を含有する発現プラスミドを、両方の方向に構築した:N末端でLGR5scFv、LGR5^{scFv}-CD3 ϵ ^{scFv}(LC BiTE)、又はN末端でCD3 ϵ ^{scFv}(CL BiTE)。CL及びLC BiTEを、N末端シグナル配列及びFLAGエピトープタグを含むように工学操作した。両方のBiTEを、トランスフェクトしたHEK293T細胞の条件培地からHiTrapプロテインLカラム(Cytiva)クロマトグラフィーを使用して精製した。

【0356】

T細胞活性化アッセイを、3.7nM CL又はLC BiTEs又は α -LGR5scFvを陰性対照として、 10^6 個PBMC及び 10^6 個NALM6細胞の混合物に添加することによって開始した。24時間インキュベーション後、細胞を、eFlour780 fixable live/dead色素によって染色後、CD4、CD8、CD25及びCD69に対する蛍光コンジュゲート抗体によって染色した。フローサイトメトリーを使用して、CD4+及びCD8+ T細胞上のT細胞活性化マーカーCD25及びCD69の発現を評価した。

【0357】

BiTE媒介殺滅アッセイを、細胞傷害性CD8+ T細胞を使用して行った。このため、CD8+ T細胞を、記載されるようにPBMCから単離し、25 μ L/mL ImmunoCult(商標)ヒトCD3/CD28/CD2 T細胞活性化因子(STEMCELL社)によって72時間刺激した。CD8+ T細胞を、100U/mlヒトIL-2(Miltenyi Biotec社)及び100U/mlペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco社)を補充したTexMACS培地(Miltenyi Biotec社)中で培養した。細胞を、 1×10^6 個/mLの濃度で、1 μ g/mLプレート結合抗CD3 ϵ 抗体(クローンUCHT1、Biolegend社)と共に8~10日目に48時間再刺激した。BiTE媒介殺滅アッセイを、培養14~16日目に行った。NALM6標的細胞を、CellVue膜色素(CellVue Claret Far Red Fluorescent Cell Linker Kit protocol; Sigma-Aldrich社)によって標識し、 6.25×10^4 個又は 1.25×10^5 個の細胞傷害性CD8+ T細胞を、表記のエフェクター対標的比で使用した。37°Cで6時間共培養した後、細胞を、eFluor780 fixable live/dead色素(ThermoFisher社)によって標識し、NALM6細胞を、フローサイトメトリーによって生存率に関して分析した。

【0358】

 α -LGR5 CAR-NK92及びCAR-T細胞の産生

α -CD19-CARレンチウイルスプラスミドは、Dr John James(University of Warwick)の寄贈であり、CD8ストーク及び膜貫通領域、4-1BB又はCD28細胞内共刺激ドメインにそれぞれ、融合された α -CD19 scFvドメイン(クローンFM363)のコード領域、及びmScarletを含有した。ヒト化 α -LGR5 scFv断片(Absolute Antibody社)を使用して、制限酵素消化及びGibsonアセンブリを使用して、 α -CD19-CARレンチウイルスプラスミド(pHR-SIN)中の α -CD19 scFvドメインを交換した。pHR-SIN骨格を、BamHI及びMluIによって切断し、以下のPCRプライマーを使用した。

【0359】

10

20

30

40

50

【表 5】

Table 6

LGR5 scFv: LGR5scFv_F1を増幅するためのフォワードプライマー	Gacagactgagtcgcccgggacgcgtccac catgccgctgc (配列番号221)
LGR5 scFv: LGR5scFv_R1を増幅するためのリバースプライマー	Gcgtcgtggtgctgctcacggtcacgg (配列番号222)
CAR: CAR_F1を増幅するためのフォワードプライマー	Cgtgagcagcaccacgacgcccagcgc (配列番号223)
CAR: CAR_R1を増幅するためのリバースプライマー	Caccatggtggcgaccggtggatcccgaggg ggcagggc (配列番号224)

10

【0360】

レンチウイルスを、HEK293T細胞を使用して産生した。トランスフェクションの場合、OptiMEM(Gibco社、カタログ番号31985070)1.5mLを、1mM HEPES(施設内作製)30μL及びTransIT-293トランスフェクション試薬(Geneflow社、カタログ番号E7-0026)42μLと混合し、RTで5分間インキュベートした。これに並行して、所望のレンチウイルスプラスミド6μgを、レンチウイルスパッケージングプラスミドpCMV8.91 4μg及びレンチウイルスエンベローププラスミドpMDG 4μgと混合した。次に、OptiMEM/TransIT溶液を、ゆっくり添加して、レンチウイルスプラスミドと混合した。RTで15分間インキュベーション後、予め加温した完全DMEM 13mlを添加し、混合物をHEK293T細胞に添加した。

20

【0361】

48時間及び72時間後にそれぞれ、ウイルス上清を採取して、250gで5分間遠心分離した後、0.45mmフィルターを通して、30mlコニカル超遠心チューブに濾過した。ウイルス上清を、SW-28ローター(Beckmann社)を使用して4℃、25000gで90分間超遠心分離した。遠心沈降後、上清を捨て、ペレットを、1%熱不活化FCSを含有するPBS 200~300μlに、ペレット上で気泡を作製することなく、又はペレットを除去することなく、数回ピペッティングすることによりゆっくり再懸濁させた。再懸濁させた濃縮ウイルスを、アリコートにして-80℃で保存した。

30

【0362】

NK92細胞を、MOI 10で形質導入した。この場合、ウイルス保存液を、6μg/ml硫酸プロタミンと混合し、予め洗浄されていて前日に細胞 0.2×10^6 個で播種されているNK92細胞に添加した。Spinfectionを、1800rpm、32℃で15分間行った。mScarlet発現を、48~72時間後に評価し、NK92細胞を、mScarletに関して選別した。95%Scarlet陽性NK92細胞を、全てのin vitro及びin vivoアッセイのために使用した。

【0363】

CD8+ T細胞を、上記のようにPBMCから単離し、25μL/mL ImmunoCult(商標)ヒトCD3/CD28/CD2 T細胞活性化因子(STEMCELL社)によって刺激した。CD8+ T細胞を、100U/mlヒトIL-2 (Miltenyi Biotec社)及び100 U/mlペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco社)を補充したTexMACS培地(Miltenyi Biotec社)中で培養した。24時間後、CD8 T細胞を、MOI 5で形質導入し、刺激後15~20日の間に使用した。α-LGR5-CAR+ CD8 T細胞を、in vitro殺滅アッセイのために選別し、純度は通常90%であった。

40

【0364】

a-LGR5 CAR-NK及びCAR-T細胞殺滅アッセイ

hLGR5-eGFP、mLGR5-eGFP又はcLGR5-eGFPを過剰発現するNALM6、REH又はHEK293T細胞を、VITAL殺滅アッセイにおいて標的細胞として使用し、CellVue膜色素(CellVue Claret Far Red Fluorescent Cell Linker Kit protocol; Sigma-A

50

ldrich社)を事前にロードした。a-LGR5 CAR-NK及びCAR-T細胞又はそれぞれの非形質導入対照細胞を、表記のエフェクター対標的比で添加した。指定された時点のパーセント標的細胞殺滅を、フローサイトメトリーによって評価した。

【0365】

LoVo及びHepG2細胞を、incucyte殺滅アッセイにおいて標的細胞として使用した。この場合、腫瘍細胞を、アッセイの24時間前に96ウェルプレートに播種した。a-LGR5 CAR-NK及びCAR-T細胞又はそれぞれの非形質導入対照細胞を、表記のエフェクター対標的比で添加した。細胞死を、Apotracker Green (Biolegend社、1:200)を使用して評価し、Incucyte SX5 (Sartorius社)を使用して15時間にわたってモニターした。

【0366】

結果

LGR5に対する抗体の生成及び検証

モノクローナル抗体産生に関して、本発明者らは、ヒトLGR5細胞外ドメインのN末端100アミノ酸によってマウスを免疫化した(図2A)。有効な免疫応答を開始するために、抗原をジフテリア毒素に共役する必要があった。融合反応は、18個のハイブリドーマクローンの生成をもたらした。クローンの機能を調べるために、本発明者らは、ヒト及びネズミLGRファミリーメンバーのトランスジェニック型を作製した:全てのヒト及びネズミLGR4-6トランスジーンが、共通のN末端インフルエンザヘマグルチニン(HA)エピトープタグ、及びタンパク質安定化の増強のためにバソプレッシンV2受容体C末端テールに融合され、次にeGFPに融合される融合体からなるC末端伸長部を含有する(図2B)。本発明はまた、対応するカニクイザルLGR5 N末端(cynoLGR5)と一致するようにGly1Ser及びVal8Ala置換を有するヒトLGR5型も作製した。cynoLGR5のN末端100アミノ酸残基は、それ以外の点でヒトタンパク質と同一である。様々なLGRトランスジーンを発現するHEK293T細胞に由来する溶解物のウェスタンブロット分析は、ヒト及びカニクイザルLGR5に対するハイブリドーマクローン1、2、3、及び4の特異的免疫反応性を実証した(図1A、図2C)。ハイブリドーマクローンはいずれも、ネズミLGR5タンパク質に対して反応性ではなく、ヒト又はネズミLGR4及びLGR6タンパク質に対しても反応性ではない。その上、本発明者らは、HEK293T細胞が、経路活性の非存在下では内因性のLGR5を発現しないことから、これらの細胞に対するハイブリドーマクローンのいかなる特異的免疫反応性も観察しなかった。

【0367】

全てのa-LGR5抗体が、LGR5 N末端で共通のエピトープに結合する

シーケンシングすると、本発明者らは、4つのa-LGR5抗体の軽鎖及び重鎖の相補性決定領域(CDR)が高度に保存され、4つのみの可変アミノ酸位置を示すことを見出した(図2D)。a-LGR5クローンが共通のエピトープに結合するか否かを決定するために、本発明者らは、その配列がヒトに対して一意的であるが、ネズミLGR5タンパク質に対しては一意的ではない、100アミノ酸抗原のおよそ35アミノ酸長の重複する4つの断片(断片1~4)を設計した(図2A)。本発明者らは、個々の断片を、RADディスプレイ融合構築物として発現させ、それらを標準的なプロトコールを使用して発現する細菌から精製した。ウェスタンブロット分析は、4つ全てのa-LGR5クローンが、断片1に特異的に結合することを示した(図1B;図2E)。本発明者らは、エピトープを断片1Aにまで更に狭めて、4つ全てのa-LGR5クローンが結合するLGR5タンパク質のN末端の15アミノ酸配列を得た(図1B、図2E)。いずれのクローンも、5つの重複するアミノ酸残基を含有する隣接するLGR5断片1Bに結合しなかった。特に、断片1Aエピトープの配列は、ヒトLGR4/6及びマウスLGR4/5における対応する領域から配列が実質的に散開しており、対応するcynoLGR5配列における2つの残基(図2F)によって、ハイブリドーマクローンの全てがヒト及びカニクイザルLGR5に対して特異的である理由を説明している。

【0368】

a-LGR5クローンとRAD-断片1融合体の間の結合親和性を、Octetプラットフォームを使用して、バイオレイヤー干渉測定によって決定した。抗体の2つのアームの二座結合

10

20

30

40

50

及びLGR5抗体により示される高い結合親和性により、 K_d 値を正確に決定するためは、断片1ペプチドの $10\mu\text{M}$ を含めることが必要であった。本発明者らは、捕捉された断片1Aと元のネズミクローン1及び2の間に高親和性結合を観察し、 K_d 値はそれぞれ、 0.76 及び 1.1nM であった(Table 5(表6))。検出可能な結合は、全てのLGR5抗体と捕捉された断片1Bの間で観察されなかった。

【0369】

【表6】

Table 5 ネズミ、ヒト化、及びADC 改変 α -LGR5 抗体の結合親和性の値

抗体	K_d (nM)	
	断片 1A	断片 1B
α -LGR5 クローン 1	0.76 ± 0.006	ND
α -LGR5 クローン 2	1.1 ± 0.005	ND
α -LGR5 クローン 3	1.0 ± 0.005	ND
α -LGR5 クローン 4	1.4 ± 0.007	ND
IgG2	ND	ND
α -LGR5 ヒト化	3.4 ± 0.019	ND
α -LGR5 バリエント 4	2.0 ± 0.017	ND
α -LGR5 バリエント 6	ND	ND
α -LGR5 バリエント 12	2.0 ± 0.017	ND
IgG2-ADC	ND	ND
α -LGR5 クローン 2-ADC	2.7 ± 0.028	ND
α -LGR5 バリエント 4-ADC	2.0 ± 0.017	ND
α -LGR5 バリエント 6-ADC	ND	ND
scFv 断片	0.77 ± 0.029	ND

ND-検出不能;干渉測定のために使用した 1nm の示差的光路閾値未満

【0370】

ヒト化バリエント4は、Tables 1(表1)及びTable 2(表2)と同様にクローン2.4に対応する。 α -LGR5ヒト化は、ネズミクローン2可変ドメイン配列のヒトIgG足場構造への直接転位である。このヒト化クローンの可変ドメインタンパク質配列は、ネズミクローン2と一致する。

【0371】

ヒト化バリエント6(α -LGR5v6)もまた、本発明者らによって生成された抗体であるが、これは全ての反応性を失っており、ヒト又はカニクイザルLGR5タンパク質のいずれにも結合せず(図14A)又はLGR5エピトープにも結合しなかった。このバリエントを、実験の陰性対照として使用した。

【0372】

Table 5(表6)におけるクローン1、2、3及び4は、Tables 1(表1)及びTable 2(表2)と同様にネズミ抗体1、2、3及び4である。

【0373】

LGR5上の α -LGR5エピトープが、そのR-スポンジンファミリーリガンドの結合部位と近位であるために、本発明者らは、TopFlashアッセイを使用して、抗体結合が、R-スポンジン1がWnt経路活性を増強する能力を妨害するか否かを決定しようとした。本発明者らは、LGR5-eGFP又はeGFP対照を発現するHEK293T細胞を、ネズミIgG1又は α -LGR5の10倍モル過剰量(R-スポンジン1と比較して)の存在下で、Wnt及びR-スポンジ

ン1によって処置した(図2G)。IgG1又は α -LGR5処置細胞の間のWnt/R-スポンジン1活性の増強に有意差は観察されず、抗体がLGR5に結合しても、R-スポンジン1の結合を妨害しないことを示している。

【0374】

まとめると、 α -LGR5抗体は、R-スポンジン1リガンドの結合を妨害しない部位でヒト及びカニクイザルLGR5のN末端に対して高い親和性で結合する。

【0375】

α -LGR5抗体は、ヒトLGR5を発現する細胞を識別するが、他のLGRファミリーメンバーを識別しない。

細胞LGR5発現の検出における抗体の特異性を決定するために、本発明者らは、HEK293T細胞においてLGRトランスジーンを過剰発現させ、Alexa647フルオロフォアに共役させたネズミ α -LGR5クローン2(α -LGR5)(Fl-a-LGR5)により免疫蛍光によって発現をプロービングした。HEK293T細胞は、定常状態で内因性のLGR5を発現せず、このように本発明者らは、トランスジェニック発現の非存在下でFl-a-LGR5からの蛍光シグナルを観察しなかった。本発明者らは、Fl-a-LGR5と過剰発現したヒトLGR5-GFPとの完全な共局在を観察し、抗体からのシグナルは、断片1Aペプチドとのプレインキュベーションによって抑止された(図1C)。Fl-a-LGR5は、過剰発現されたcynoLGR5トランスジーンを検出することができたが(図1C)、ヒトLGR4又はLGR6トランスジーン又はネズミLGRを過剰発現するHEK293T細胞では、シグナルは認められなかった(図1C;図2H)。

【0376】

蛍光 α -LGR5が細胞表面上に発現された天然のLGR5を特異的に検出するか否かを決定するために、本発明者らは、ヒト、ネズミ、及びcynoLGR型を過剰発現する生存HEK293T細胞のフローサイトメトリー分析を行った。ヒト又はcynoLGR5-eGFPのいずれかを発現する細胞を、蛍光 α -LGR5抗体によって検出した。これに対し、ヒトLGR4-eGFP、LGR6-eGFP又はネズミLGRのいずれかを過剰発現するHEK293T細胞は、Fl-a-LGR5を使用するフローサイトメトリーによって検出されなかった(図1D)。重要なことに、LGR5-eGFP発現細胞において観察された蛍光シグナルは、断片1A又はこの配列に基づくブロッキングペプチドの超化学量論的レベル(10:1;図1E)とのプレインキュベーションによって減弱した。

【0377】

健康な組織及びがんにおけるLGR5発現レベルの調査

以前の研究は、複数のがんタイプにおけるLGR5転写物レベルを定量し、マッチさせた正常組織と比較して一部のがんにおいてLGR5 mRNA発現が増加していることを確立している。本研究は、LGR5に基づく治療戦略を使用して、がん細胞を識別及び標的化する興味深い可能性を増大させる。これをより詳細に調べるために、本発明者らは、TCGAデータベースから抽出したデータセットを使用して33のがんのタイプに対してLGR5転写物レベルの包括的調査を行った。リード数を、がんのサブタイプ、試料セット、及び全データセットにわたって決定した抽出されたLGR5データの発現レベルの中央値における直接比較のためにゲノムに対してクォンタイル正規化した(図4A)。本発明者らは、12のがんのタイプを、構成要素症例の70%より多くが中央値より高いLGR5発現レベルを有する「高LGR5発現体」としてトリアーージした。脳がん、卵巣がん、及び子宮癌肉腫は、正常組織試料が入手できなかったためにこの分析から除外した。これらの高いLGR5発現がんに関して、本発明者らはLGR5発現を、マッチさせた健康な組織と比較した。全ての例において、LGR5 mRNA発現の中央値は、副腎がんを除くがんにおいて、マッチさせた健康な組織と比較して高かった。LGR5発現の非常に有意な増加は、頭頸部がん、子宮内膜がん、胃がん、結腸がん、及び直腸がんにおいて観察された(図4B)。

【0378】

本発明者らはまた、ヒト発現データも分析した。Hung-Chang Chenら、LGR5 targeting molecules as therapeutic agents for multiple cancer types Preprint, BioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2022.09.01.506182>を参照されたい。

【0379】

転写データは、卵巣がんを最高のLGR5発現がんとしてランク付けした。しかし、TCGAデータベースにおける卵管のトランスクリプトームデータ、卵巣がんの推定の組織源の欠如により、本発明者らは、これが悪性特異的LGR5過剰発現を表すか否かを決定することができなかった。したがって、本発明者らは、28例の卵巣がん及び14例の腹膜がん症例を含有するTMAと共に、a-LGR5及びb-カテニンによって24例の卵管生検をプロービングした。b-カテニンは、全ての上皮細胞の皮質に発現された;しかし、全てのがんの症例において、本発明者らは、LGR5を発現する個々の細胞が細胞内斑点に局在する非常にまれな例を除き(<0.1%未満の細胞;図4C)、b-カテニン陽性卵管上皮において認識可能なLGR5タンパク質レベルを検出しなかった。卵管試料及び卵巣がん及び腹膜がん症例の間のLGR5発現を比較すると、本発明者らは、タンパク質レベルの有意な増加を観察せず(図3A)、本発明者らは、b-カテニンタンパク質発現の有意差も観察しなかった(図4D)。

10

【0380】

次に本発明者らは、a-LGR5を使用して、悪性及び正常な切除した脳生検を含有するTMAを使用して、LGR5が、脳がん(膠芽腫及び低悪性度神経膠腫;LGG)において上方調節されているか否かを決定した。健康な脳組織及び本発明者らが調べたがんの症例において、LGR5発現は検出されず、切除された非悪性の脳対照と比較してLGR5タンパク質レベルの有意な上方調節は認められなかった(図3B;図4H)。

【0381】

最後に、本発明者らは、健康なドナーからの免疫細胞におけるLGR5タンパク質発現を調べた。ヒト末梢血単核球(PBMC)のFl-a-LGR5によるフローサイトメトリー分析は、LGR5タンパク質を発現するいかなるB細胞、CD4+ T細胞又はCD8+ T細胞も検出しなかった(図4F)。以前の研究と一致して、本発明者らは、急性リンパ芽球性白血病(ALL)患者からの腫瘍細胞におけるLGR5転写物レベルが、非悪性対照と比較して上方調節されたか否かを決定した。更なるヒト発現データ及び本発明者らによる分析に関しては、Hung-Chang Chenら、LGR5 targeting molecules as therapeutic agents for multiple cancer types Preprint, BioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2022.09.01.506182>を参照されたい。

20

【0382】

得られた転写物及びタンパク質データセットは、(i)LGR5過剰発現が多くのがんのタイプに対して特有であること、及び(ii)正常組織とがんの間にLGR5発現の実質的な治療ウィンドウが存在することを確立した。まとめると、データは、細胞のLGR5過剰発現を標的とする戦略による、CRC、HCC及び急性リンパ芽球性白血病における治療介入を支持する。

30

【0383】

α -LGR5は、LGR5の内因性の発現を検出する

本発明者らのCRC及びALL腫瘍によるLGR5発現データに基づき、本発明者らは、内因性の細胞のLGR5発現が、疾患の細胞株モデルにおいて検出されるか否かを決定しようとした。LoVo結腸がん細胞株は、抗体検出のために十分なレベルのLGR5を発現することが以前に示されており、実際に本発明者らは、5つの結腸直腸がん細胞株パネルの中で、LoVo細胞が、SW480細胞株と比較して少なくとも10倍高いLGR5転写物を発現したことを見出した(図5A)。本発明者らは、LoVo、HCT116及びDLD1細胞の溶解物において高いLGR5タンパク質レベルを検出することができたが、SW480及びCaCo細胞からの溶解物では検出できたのは低レベルのタンパク質であった(図5B)。

40

【0384】

細胞表面発現LGR5は、LoVo細胞において、Fl- α -LGR5を使用して検出されたが、抗体を断片1Aペプチドと共にブレインキュベートすることによってこれを抑止することができる(図5C)。LGR5は、SW480細胞においてフローサイトメトリーによって検出されなかった。

【0385】

50

本発明者らは、pre-B-ALL細胞株においてLGR5タンパク質発現を更に調べ、NALM6細胞が、LGR5の最高の転写物レベルを発現し、次いでREH細胞が中間レベル、及び697細胞が最低レベルを発現すると同定した(図5D)。pre-B-ALL細胞株におけるLGR5転写物レベルは、ウェスタンブロット(図5E)及びフローサイトメトリー(図5F)によって検出されたLGR5タンパク質の相対レベルと整合している。

【0386】

LGR5は、一意的細胞内区画に会合する

NALM6及びLoVo細胞における内因性のLGR5発現により、本発明者らは、Fl- α -LGR5を使用してその細胞局在を決定することが可能となった。過剰発現されたトランスジェニックLGR5-eGFPの局在パターンと整合して、大多数の内因性LGR5が、内部斑点に局在する(図6A)。HEK293TにおけるトランスジェニックLGR5過剰発現を使用する以前の研究は、LGR5斑点がLAMP1陽性区画に関連することを決定し、本発明者らは、内因性のタンパク質がLoVo細胞においてそれに従って挙動したか否かを試験した。両方の例において、LAMP1及びLGR5タンパク質に対する抗体は斑点を検出した;しかし、これらは、決して偶然ではなく、別個の細胞区画に局在することを示している(図6B)。

【0387】

LGR5過剰発現細胞株による α -LGR5抗体の急速な内部移行

本発明者らは、次に、それらが外因性のカーゴ、例えばFl- α -LGR5を、LGR5修飾細胞内斑点に標的化することができるか否かを決定しようとした。LGR5-eGFPを過剰発現するHEK293T細胞をFl- α -LGR5によって37°Cで処置すると、抗体の特異的内部移行をもたらした(図7A)。内部移行の動力学は急速であった;5分以内に、Fl- α -LGR5が内部移行し、細胞表面に近接する斑点に局在し、これは最終的に45分の間に細胞内LGR5-eGFP斑点と完全に会合した。LGR4-eGFPをトランスフェクトしたHEK293T細胞は、Fl- α -LGR5に結合又は内部移行することができなかった(図7A)。

【0388】

内因性のLGR5発現が、Fl- α -LGR5内部移行を指示しうるか否かを決定するために、本発明者らは、NALM6細胞を使用して内部移行アッセイを繰り返した。hLGR5を過剰発現するHEK293T細胞と同様に、NALM6細胞は、急速に、15分以内にFl- α -LGR5を内部移行したが、抗体を断片1Aペプチドとブレインキュベートすると内部移行しなかった(図7B)。

【0389】

NALM6細胞において、Fl- α -LGR5の細胞表面結合とその内部移行との間を区別するために、本発明者らはそれぞれ、4°C及び37°Cでアッセイを行った。本発明者らは、NALM6細胞のごく小さい割合(およそ1%)のみに結合する抗体を検出したが、細胞は、30分間のインキュベーション後にFl- α -LGR5を均一に内部移行した(図7C)。

【0390】

LoVo細胞もまた、抗体を断片1Aペプチドとブレインキュベートしない限り、Fl- α -LGR5を急速に5分以内に内部移行した(図7D)。

【0391】

LoVo細胞におけるFl- α -LGR5取り込みによる特異的LGR5内部移行を調べるために、本発明者らは、CRISPR/Cas9を使用してLGR5遺伝子の第1のエクソンを標的化することによってそれらがLGR5を不活化する対照株を生成した。興味深いことに、標的化クローン株の一部は、シグナル配列の7アミノ酸を欠如するタンパク質をコードする、両方のLGR6対立遺伝子における傷害を有した(補則、図5)。変異体タンパク質は、親株と比較して同等のレベルで標的化細胞株において発現された(図5E);しかし、細胞表面LGR5をプロービングするためにFl- α -LGR5を使用するフローサイトメトリー分析は、LGR5標的化細胞株において変異体タンパク質を検出しなかった(図5F)。データは、完全なシグナルペプチドを欠如する変異体LGR5タンパク質が、分泌経路に組み込まれるために及び細胞表面発現のために小胞体において翻訳されないことを示唆している。

【0392】

まとめると、内部移行データは、 α -LGR5が、低い及び一過性の細胞表面LGR5レベルを有する細胞に結合し、その細胞によって急速に内部移行されることを示している。

【0393】

α -LGR5抗体薬物コンジュゲートの検証

本発明者らは次に、正確な4:1化学量論のために重鎖-軽鎖ジスルフィド結合内に挿入されたジビニルピリミジンジスルフィド架橋リンカーを通して微小管毒素MMAEに融合した α -LGR5の型を工学操作した(図10)。2つの型の α -LGR5-MMAEコンジュゲート:スルファターゼ切断可能型(α -LGR5-ADC; (Walshら; Barghら))及び切断不能型(α -LGR5-ADCNC; 図10)を、*in vitro*試験のために生成した。本発明者らはまた、切断可能リンカーを介してMMAEにコンジュゲートされた対照IgG1も生成した。重要なことに、 α -LGR5-ADCは、親抗体に対する類似のエピトープ結合親和性を実証した(表5)。

【0394】

NALM6細胞の α -LGR5-ADCによる単一用量の処置は、3日間にわたってEC50 4nMで有効な細胞殺滅を示した(図9A)。 α -LGR5-ADCは、より低いLGR5レベルを発現するREHpre-B-All細胞株に対してわずかに有効性が低く、EC50は10nMであった。本発明者らは、 α -LGR5-ADCNCによってNALM6細胞を処置しても効果がないことを見出し、このことは、LGR5抗体に基づくADCの切断不能型が細胞殺滅において無効であったことを見出した以前の試験と整合した。LoVo細胞を使用する*in vitro*殺滅アッセイでは、類似の結果を示し、9nMのEC50値で、有効な細胞殺滅を示した。

【0395】

NALM6腫瘍の*in vivo*での標的化

α -LGR5-ADCの*in vivo*有効性を試験するために、本発明者らは、ルシフェラーゼトランスジーンを構成的に発現するNALM6細胞をNSGマウスに移植した。移植後5日目に、IVISイメージングを実施して、マウスを同一の総腫瘍負荷を有する2群に層別化した。移植後6、8、10、及び12日目に、マウスを、5mg/kg α -LGR5-ADCによって尾静脈内注射を介して処置した(図11A)。マウスの対照コホートには、これらの日に5mg/kg IgG1-ADC対照の注射を行った。腫瘍負荷を、IVISイメージングによって2~3日間隔でモニターした。IgG1-ADCによって処置したNALM6腫瘍は、対数速度で成長したが、本発明者らは、 α -LGR5-ADC処置の最初の6日のうちの4日以内に腫瘍の退縮を観察した(図11A)。腫瘍の退縮は、処置の過程を通して持続し、4日間の潜時で、移植後16日目に腫瘍の成長は再開した。20日目での実験のエンドポイントでは、 α -LGR5-ADC処置群は、対照マウスの腫瘍負荷の0.5%未満を有した(図11A、図11B)。本発明者らはまた、 α -LGR5-ADC処置マウスの脾臓質量(およそ2分の1への低減)及び残存NALM6細胞(およそ100分の1への低減;(図11C)並びに血液(100分の1への低減)及び骨髓(50分の1への低減)中のNALM6細胞の絶対数の顕著な低減も認めた(図11D、図11E)。 α -LGR5-ADC処置によって、組織毒性は観察されず、腸陰窩における幹細胞の増殖は、影響を受けなかった(図12)。

【0396】

α -LGR5のヒト化ADC型によるNALM6腫瘍の標的化

潜在的な臨床での使用のためのADC産物を生成するために、本発明者らは、 α -LGR5抗体をヒト化して、ヒトIgG足場構造に基づく16個のバリエーションを生成した。本発明者らは、発現されたヒト又はcynoLGR5に対して特異的免疫反応性(図14A)及び親ネズミ抗体と同等のLGR5エピトープに対する高親和性結合Kd-2nMを示した(Table 5(表6))ヒト化クローンの1つ、バリエーション4(α -LGR5v4)を先に進めた。実験の陰性対照として、本発明者らは、全ての反応性を失い、ヒト又はcynoLGR5タンパク質(図14A)又はLGR5エピトープ(Table 5(表6))のいずれにも結合しなかったヒト化バリエーション6(α -LGR5v6)を使用した。その上、本発明者らは、免疫蛍光プローブとして α -LGR5v4を使用した場合に α -LGR5と本質的に同じ特異性を観察し;ヒト及びカニクイザルの過剰発現されたトランスジェニックLGR5タンパク質を検出したが、他のLGRタンパク質はいずれも検出されなかった(図14B)。

【0397】

本発明者らは、移植後6及び8日目に2用量の処置レジメンによるNALM6担癌マウスの処置のための α -LGR5v4及び α -LGR5v6対照のADC型を生成した。以前のin vivo試験と整合して、本発明者らは、最初の処置日から4日間の潜時期間の後に腫瘍成長の有意な低減を観察し、腫瘍成長の低減は、最後の α -LGR5v4処置後少なくとも2日間持続した(図13A)。IVISイメージングによって測定した全NALM腫瘍負荷は、実験のエンドポイントで対照値の約半分であった(図13A、図13B)。 α -LGR5-ADCによる処置と同様に、本発明者らは、(3分の1への)脾臓質量の低減及び(およそ50分の1への)残存NALM6細胞の低減、並びにおよそ10分の1への、血液中のNALM6細胞の低減を認めた。興味深いことに、この処置レジメンは、骨髄内のNALM6腫瘍負荷の維持を観察したが、総腫瘍細胞数に有意差はなかった。 α -LGR5-ADC処置によって、組織毒性は観察されず、腸陰窩における幹細胞の増殖は影響を受けなかった(図14)。

10

【0398】

まとめると、本発明者らによって得られたin vivo試験データは、 α -LGR5 ADCが、腫瘍成長の抑制において有効であるが、持続的な応答のためには永続的な処置を必要とすることを示している。

【0399】

scFv- α -LGR5の結合親和性定数

本発明者らは、次にLGR5抗体断片を開発して、そのような断片が α -LGR5クローンと同等の結合活性を示したか否かを決定しようとした。本発明者らは、6×His-タグscFv- α -LGR5トランスジーンを含有する発現プラスミドをHEK293T細胞にトランスフェクトする工程、及びタンパク質を条件培地から精製する工程によって、一本鎖可変鎖断片(scFv)を調製した。結合親和性は、Octetプラットフォームにおいてバイオレイヤー干渉法によって決定した。本発明者らは、scFv- α -LGR5とペプチドの間に極めて高い親和性結合を観察し、Kd値は770pMであった(table 5(表6))。

20

【0400】

CAR及びBiTEの生成

本発明者らは次に、本発明の抗体を使用してキメラ抗原受容体(CAR)及び二特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)を開発した。

【0401】

LGR5抗体のヒト化scFv断片(scFv- α -LGR5)を、二特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)として使用するために工学操作した。 α -LGR5-BiTEは、T細胞受容体(TCR)のCD3 ϵ サブユニットに結合する抗体のscFv断片に融合したscFv- α -LGR5のポリペプチド鎖で構成される。2つのBiTEフォーマットは、N末端部分としてscFv- α -LGR5又はscFv- α -CD3 ϵ のいずれかであり、細菌発現又は哺乳動物細胞株における発現のいずれかと適合性であり、これを精製してBiTEとして使用する。

30

【0402】

scFv- α -LGR5を、キメラ抗原受容体(CAR)として使用するために工学操作した。 α -LGR5-CARは、CD8アルファストーク及び膜貫通ドメインに融合し、その後にCD28又は4-1BB共刺激ドメインのいずれかに融合し、CD3ゼータシグナル伝達ドメインで終わるscFv- α -LGR5からなる単一のポリペプチド鎖としてレンチウイルス形質導入細胞から発現された。

40

【0403】

α -LGR5-CARは、T細胞、NK細胞、及び他の免疫細胞における発現に関して適合性である。

【0404】

図15に示されるように、 α -LGR5-CAR NK細胞は、都合のよい殺滅動力学を有する効率的な殺細胞剤である。第2世代CAR構築物を、ヒト化 α -LGR5 scFvを使用して作製した。CAR構築物を、レンチウイルス送達によってNK92細胞に安定に導入した。(A,B) HEK293細胞に、ヒト(A)及びカニクイザル(B)LGR5をトランスフェクトし、これらを

50

殺滅アッセイにおける標的細胞としてした。a-LGR5 CAR NK92細胞を、改変HEK標的細胞と共に表記のエフェクター対標的比でそれぞれ、5及び9時間共培養した。(C)a-LGR5 CAR NK92細胞を、青色細胞色素によって標識したNALM6標的細胞と共に50分間インキュベートして、免疫学的シナプス形成を、共焦点顕微鏡によって評価したところ、a-LGR5 CAR NK92細胞が、腫瘍標的細胞と有効なシナプスを形成することを示した。(D)a-LGR5 CAR NK92細胞を、急性リンパ芽球性白血病(ALL)ヒト腫瘍細胞株と共に、表記のエフェクター対標的比でインキュベートし、特異的腫瘍細胞殺滅を、12時間後に評価した。

【0405】

図16に示されるように、 α -LGR5二特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)は、活性化T細胞であり、効率的な腫瘍細胞破壊をもたらす。BiTE構築物を、ヒト化a-LGR5 scFv及びヒト化a-CD3 scFvを使用して両方の方向(それぞれ、LC及びCL)に生成した。(A)PBMCを、健康なドナーから単離し、 α -LGR5 scFv対照、 α -LGR5 LC又はCL BiTEの存在下でそれぞれ、NALM6腫瘍細胞と共にインキュベートした。CD4+及びCD8+ T細胞活性化を、24時間後のCD69及びCD25発現のフローサイトメトリー分析によって決定した。(B)NALM6腫瘍細胞をそれぞれ、 α -LGR5 scFv対照、 α -LGR5 LC又はCL BiTEの存在下で健康なドナーPBMCから生成した細胞傷害性CD8+ T細胞と共培養した。腫瘍細胞殺滅を、エフェクター対標的比5対1で5時間後に評価した。

【0406】

使用した配列を以下に示す。

【0407】

CAR及びBiTE構築物に関連する実験で使用した α -LGR5 scFv断片、図15～図27を参照されたい。

【0408】

ヒトバリエント4(Table 1(表1)及びTable 2(表2))に示されるクローン2.4)を使用してscFv断片を作製し、したがってCAR及びBiTE構築物に組み入れる。このように、図17～図27で言及したCAR及びBiTEは、ヒトバリエント4を使用する(クローン2.4、同様にTable 2(表2)及びTable 3(表3)を参照されたい)。

【0409】

ペプチド:配列番号211

【0410】

【化2】

MPLLLLLLPLLWAGALAEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNRLNWWYQQKPGQAVRL
LISYRSRRHTIGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGNSLPPTFGGGTKLEIKGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQ
APGQGLEWIGEIDPSDSYTNYNQKFQGRVTLTVDSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSL
SGYVDYWGQGTITVTVSS

【0411】

軽鎖及び重鎖のCDRを下線で示し、以下の通りである(同様に、Table 2(表2)の配列も参照されたい):

RASQDISNRLN CDR1 軽鎖 配列番号212

YRSRRHT CDR2 軽鎖 配列番号213

QQGNSLPPT CDR3 軽鎖 配列番号214

NYWMQ CDR1 重鎖 配列番号215

EIDPSDSYTNYNQKFQG CDR2 重鎖 配列番号216

SLSGYVDY CDR3 重鎖 配列番号217

核酸: 配列番号218

【0412】

【化3】

ATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCCCCCTGCTGTGGGCAGGGGCGCTAGCTGAGATCGTGA
TGA CTCAAAGCCCCGCCACACTGAGCCTATCTCCCGCGAGAGAGCCACGCTGAGCTG
TAGAGCAAGCCAAGACATCAGCAACAGACTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAA
GCCGTGAGACTGCTGATCAGCTACAGAAGCAGAAGACACACCGGCATCCCCGCTAGAT
TCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCCTG
AGGACTTCGCTGTATACTACTGCCAACAAGGCAACAGCCTGCCGCCAACCTTCGGAGG
CGGCACGAAGCTGGAGATCAAGGGCGGTGGTGGATCGGGCGGCGGGGGCAGCGGGG
GTGGTGGTTCTGGTGGAGGGGGCTACAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGGGCCGAGG
TGAAGAAGCCCGGCGCAAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCAAGCGGCTACACCTTCA
CCA ACTACTGGATGCAGTGGGTGAGACAAGCCCCCGGCCAAGGCCTGGAGTGGATCG
GCGAGATCGACCCTAGCGACAGCTACACCAACTACAATCAGAAGTTCCAAGGCAGAGT
GACCCTGACCGTGGACACAAGCACAAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGA
AGCGAGGACACCGCGGTTTACTACTGCGCTAGAAGCCTGAGCGGCTACGTGGACTACT
GGGGCCAAGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC

10

【0413】

20

要約

ヒトのがんに関する本発明者らの調査により、pre-B-ALL、CRC及びHCCは、a-LGR5治療薬の本発明者らのポートフォリオに関する指標疾患であることが判明した(図3)。

【0414】

ヒトpre-B-ALL細胞(NALM6)、CRC細胞(LoVo)、及びHCC細胞(HepG2)は、高レベルのLGR5転写物及びタンパク質を発現する(図5、図17)。

【0415】

a-LGR5 ADCは、NALM、REH及びLoVo細胞のin vitroでの標的化において高い有効性を示し(図9)、及び重要なことにLGR5HIGH患者由来CRCオルガノイドを優先的に殺滅する(図18)。ネズミ及びヒト化α-LGR5 ADCは、ALLのNSGモデル(NALM6)において前臨床有効性を示す(図11)。

30

【0416】

a-LGR5 BiTEは、ヒトCD4+及びCD8+ T細胞を効率的に活性化し、及び重要なことに腫瘍及びヒトCD8+細胞傷害性T細胞の存在下でインキュベートした場合に特異的腫瘍細胞死(NALM6)を効率的にもたらす(図19)。

【0417】

α-LGR5-CAR NK92細胞は、ヒト及びカニクイザルLGR5を過剰発現するHEK293T細胞を効率的かつ特異的に標的化するが、ヒトLGR4、ヒトLGR6を過剰発現するHEK293T細胞を標的化せず、マウスLgr5を発現する細胞をより低い程度に標的化する(図20及び図26)。α-LGR5-CAR NK92細胞はまた、in vitroでLGR5HIGH NALM6細胞を特異的に標的化し、かなり弱い程度にLGR5LOW REH細胞を標的化する(図20)。まとめると、これらの実験は、LGR5低発現細胞(潜在的に幹細胞)を標的化しないことによって、a-LGR5-CARの必須の特異性及び好ましい治療ウィンドウを示している。更に、a-LGR5-CAR NK92細胞は、HepG2細胞を有効に殺滅し(図21)、及びALLのNSGモデル(NALM6)においてin vivoで中等度の前臨床有効性を示す(図27)。

40

【0418】

α-LGR5-CAR T細胞は、NALM6(図23)、HepG2(図24)、及びLoVo腫瘍細胞(PP図13)を、in vitroで効率的に殺滅する。驚くべきことに、本発明者らのα-LGR5-CAR T細胞は、ALLのNSGモデル(NALM6)においてin vivoで優れた前臨床有効性を示す(図25)。

50

【0419】

考察

本発明者らは、研究ツールとしてそれを確立する目的で、及びその潜在的治療応用を決定するために、LGR5の細胞外ドメインに対する新規抗体の広範な検証及び特徴付けを行った。α-LGR5は、LGR5タンパク質上のその標的エピトープ、一意的な可変重鎖及び軽鎖、並びに特にそのエピトープに対する高い結合親和性により、以前に報告された抗LGR5治療抗体とは異なる、

【0420】

LGR5は、遺伝子操作されたマウスモデル(GEMM)による広範な発現解析を通して、多くの上皮組織における幹細胞のマーカーとして確立されている。その上、これは、GEMMにおける機能的研究並びにがん患者データセットの詳細な転写解析を通して、ある特定の悪性疾患のマーカーとして大きい注目を集めている。

【0421】

本発明者らは、開発されたα-LGR5抗体が、健康な組織及び悪性組織におけるLGR5タンパク質の細胞レベル及び局在を決定するための感度のよい特異的ツールであることを示した。本発明者らは、LGR5発現のトランスクリプトーム解析を使用して、様々ながんからの広範囲の臨床試料におけるLGR5タンパク質発現を特徴付け、健康な組織とマッチさせた。それによって本発明者らは、CRC、HCC及びpre-B-ALLを含む様々ながんの特徴としてLGR5発現の上昇を確立した。重要なことに、転写及びLGR5タンパク質レベルの両方で組織を調べると、正常組織が、全般的に非常に低いLGR5レベルを有することを示し、タンパク質を過剰発現する悪性疾患の治療的標的化に関する道を切り開く。

【0422】

本発明者らは、脳及び卵巣がんにおけるLGR5タンパク質レベルに関連するその転写物解析と以前の転写物解析からの結果の間に差があることを観察した;両方の悪性疾患は一貫してLGR5転写物レベルに関して高いスコアを有するが、本発明者らは非常に低いLGR5タンパク質レベルを検出することしかできなかった細胞はほとんどなく、試験した腫瘍の10%未満であった。この相違は、一部、データセットの作成時に使用される異なる症例試料によるものでありうるが、これは、LGR5過剰発現に基づいてがんを標的化する予後判定指標としてLGR5タンパク質レベルを確立する必要性を強調している。

【0423】

本発明者らによって開発された抗体は、細胞膜上の天然のLGR5を特異的に認識し、様々な固定条件下でのLGR5発現を忠実に検出する。これにより、本発明者らによって開発された抗体は優れた研究ツールとなり、本発明者らは、α-LGR5を使用して内因性のLGR5の細胞下局在を特徴付ける。

【0424】

NALM6及びLoVo細胞並びに結腸上皮、CRC腫瘍、HCC、及び調べた一部の卵巣がん症例における全ての検出可能なLGR5タンパク質が、細胞内斑点に局在する。Fl-α-LGR5の急速な内部移行を通してLGR5陽性の細胞内斑点にアクセスできることは、細胞表面上でのLGR5の高度に一過性の集団と、LGR5会合小胞区画との間の動的な往復を支持する。実際に、この仮説は、シグナルペプチドを欠如するLGR5タンパク質が分泌経路に沿って細胞膜へと移動しなかった、というLoVo細胞及びLGR5標的化に関する本発明者らの比較試験によって裏付けられ;これらの細胞はLGR5を内部移行しない。

【0425】

一部のがんによるLGR5タンパク質の過剰発現、及びその内部移行の非常に動的な性質により、LGR5は、ADCに基づく治療薬の理想的な細胞標的となる。本発明者らは、MMAEペイロードをα-LGR5に連結させる最近開発されたプロトコルを使用して、エピトープ結合に関するKd値の変化をほとんど示さず、結合親和性の喪失がないことを示すADCをもたらした。In vitro検証は、LGR5発現NALM6及びLoVo細胞の標的化において、エピトープ結合のKd値と同等の低いナノモル濃度のEC50値を示した。

【0426】

NALM6腫瘍を α -LGR5-ADCによって標的化するin vivo実験は、LoVo腫瘍を標的化する以前の試験と整合する;2日間の不応性期間の後、本発明者らは、処置の経過の間持続する腫瘍の消耗を観察した。 α -LGR5-ADCを除去すると、腫瘍の成長は回復し、このことは処置の過程の間、NALM6細胞が、薬物があまりアクセスできないくぼみに可逆的に局在しうる可能性を示している。この考え方は、 α -LGR5-ADCのヒト化型を使用する臨床試験によって再度強化された。4日間の処置は、NALM6腫瘍を有効に標的化した、腫瘍の成長は、最終的に回復したのである。この例では、骨髄は、低用量標的化レジメンによって消失しなかったNALM6細胞のかなりのレベルを含有する、調べた区画の1つであった。

【0427】

重要なことに、 α -LGR5-ADCの検出可能なオフターゲット毒性は、処置マウスにおいて観察されず、このことは、潜在的な腫瘍細胞のくぼみの標的化において増加した有効性を提供しうる α -LGR5-ADCの増加した処置用量による今後のin vivo臨床試験の道を切り開く。

【0428】

本発明者らは、ヒト及びcynoLGR5に対する新規抗体及び抗体断片を開発して検証した。抗体は、非常に特異的で高い親和性を有し、LGR5発現がん細胞によって急速に取り込まれる。それらは、優れた研究ツールを表すが、ALLのモデルにおいてin vivoでADCとして使用した場合にも大きい有効性を示し、そのため、がん、特にLGR5が過剰発現されているがんを処置するために使用することができる治療ツールを表す。例えば、本発明者らは、例えばがんの処置において使用することができる本発明の抗体を使用するキメラ抗原受容体(CAR)及び二特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)を設計及び開発している。

【0429】

(参考文献)

M. Rossmann, S. J. Greive, T. Moschetti, M. Dinan, M. Hyvönen, Development of a multipurpose scaffold for the display of peptide loops. *Protein Eng. Des. Sel.* 30, 419–430 (2017).

S. J. Walsh, et al., A general approach for the site-selective modification of native proteins, enabling the generation of stable and functional antibody-drug conjugates. *Chem. Sci.* 10, 694–700 (2019).

J. D. Bargh, et al., Sulfatase-cleavable linkers for antibody-drug conjugates. *Chem. Sci.* 11, 2375–2380 (2020).

W. C. Peng, et al., Structure of Stem Cell Growth Factor R-spondin 1 in Complex with the Ectodomain of Its Receptor LGR5. *Cell Rep.* 3, 1885–1892 (2013).

M. De La Roche, A. E. K. Ibrahim, J. Mieszczanek, M. Bienz, LEF1 and B9L shield b-catenin from inactivation by axin, desensitizing colorectal cancer cells to tankyrase inhibitors. *Cancer Res.* 74, 1495–1505 (2014).

10

20

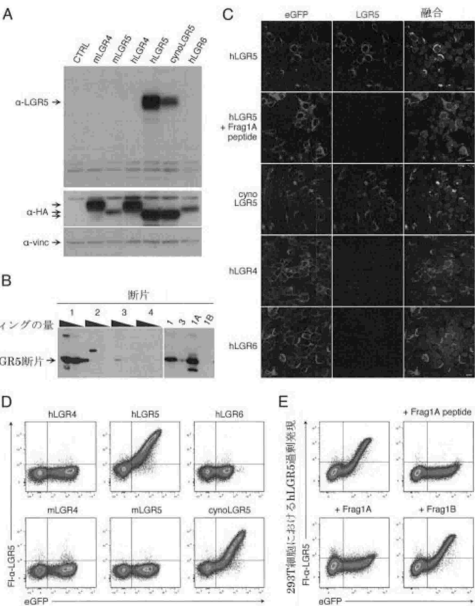
30

40

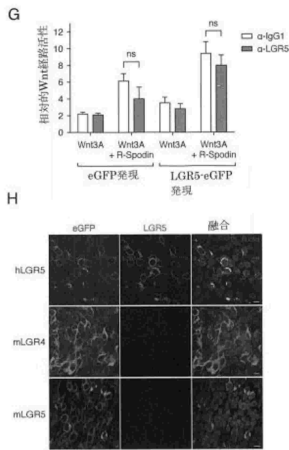
50

【図面】
【図 1】

Figure 1



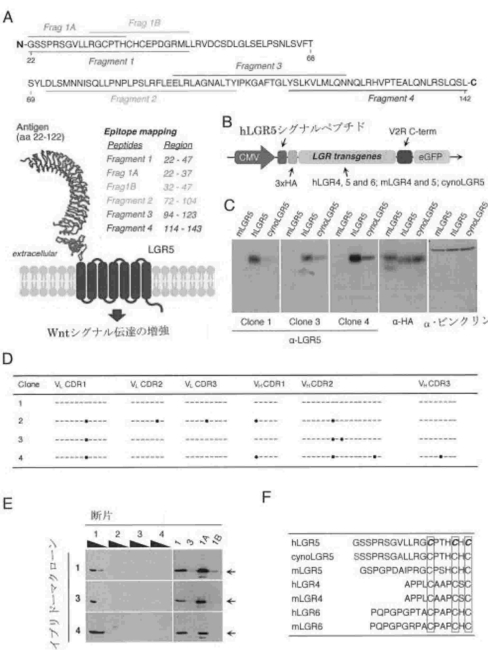
【図 2 - 2】



【図 2 - 1】

Figure 2

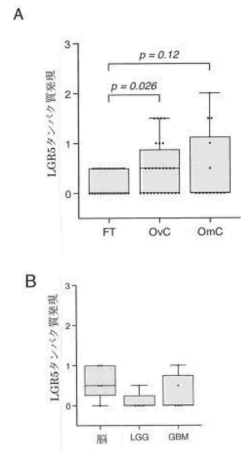
2/34



【図 3】

Figure 3

4/34



10

20

30

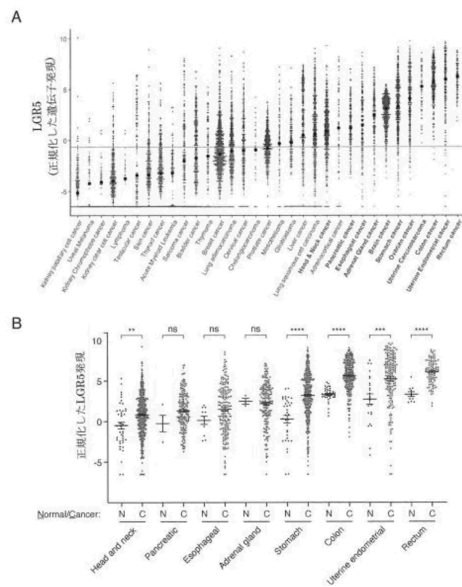
40

50

【図 4 - 1】

Figure 4

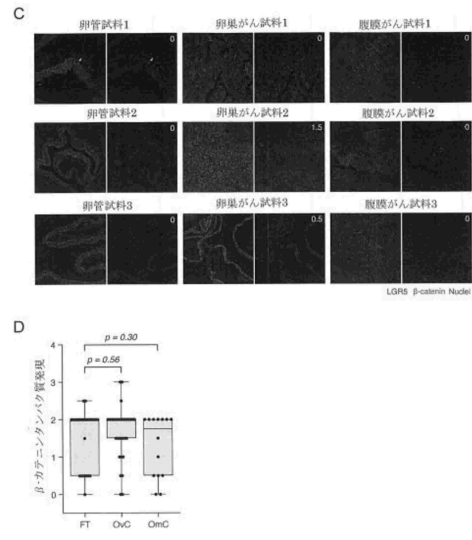
5/34



【図 4 - 2】

Figure 4 Cont.

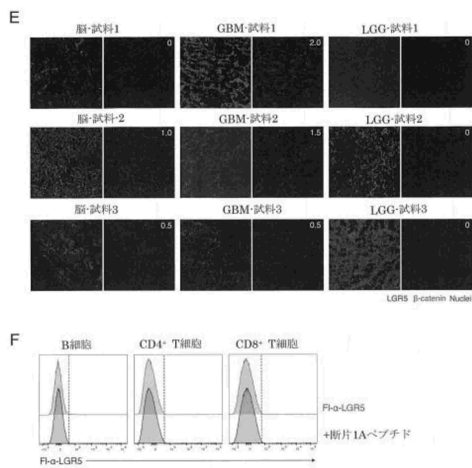
6/34



【図 4 - 3】

Figure 4 Cont.

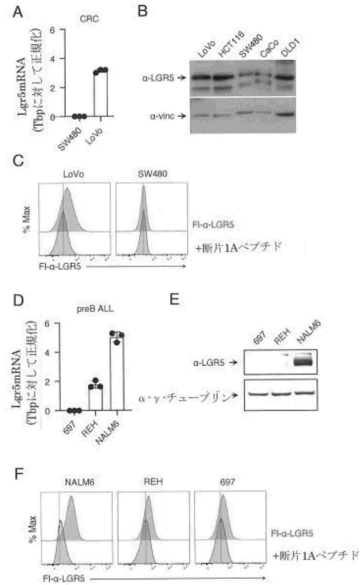
7/34



【図 5】

Figure 5

8/34



10

20

30

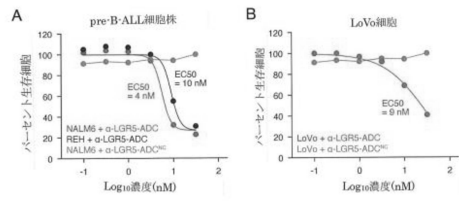
40

50

【図 9】

Figure 9

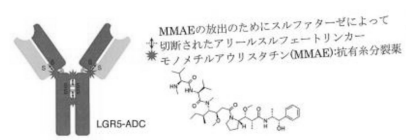
13/34



【図 10】

Figure 10

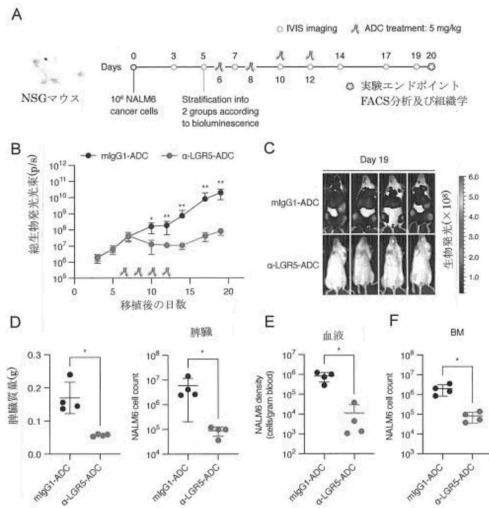
14/34



【図 11】

Figure 11

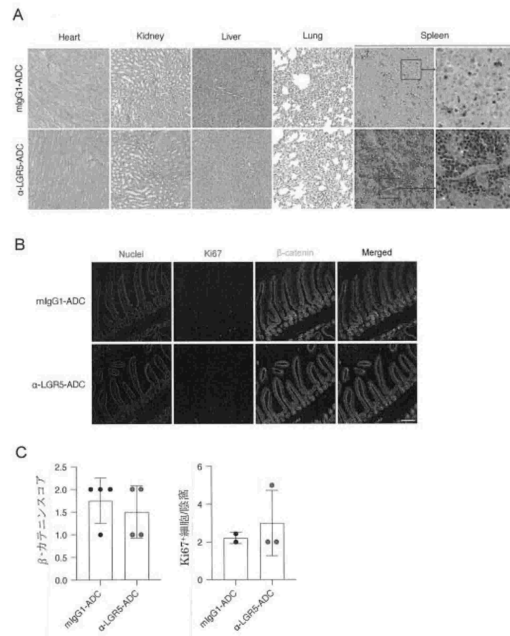
15/34



【図 12】

Figure 12

16/34



10

20

30

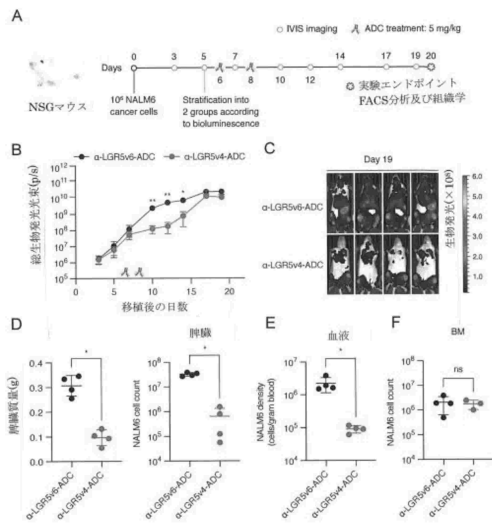
40

50

【図 13】

Figure 13

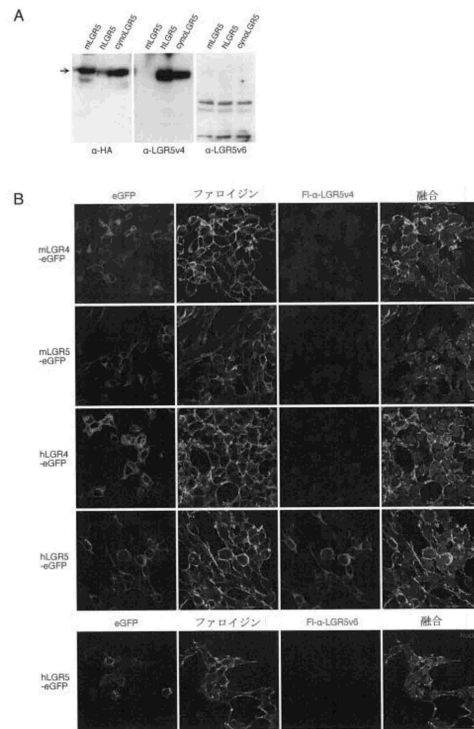
17/34



【図 14 - 1】

Figure 14

18/34



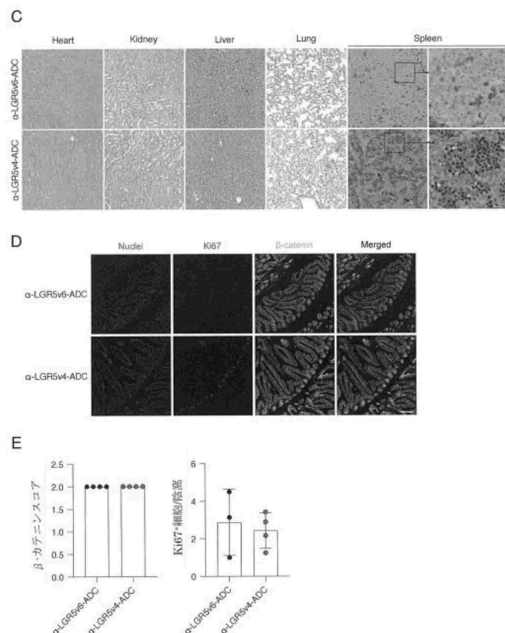
10

20

【図 14 - 2】

Figure 14 Cont.

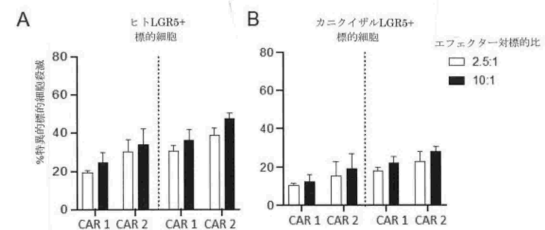
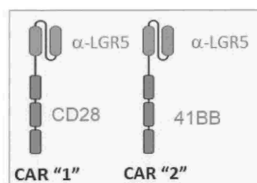
19/34



【図 15 - 1】

Figure 15

20/34



30

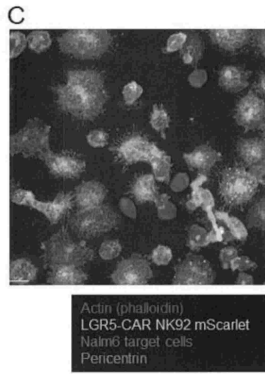
40

50

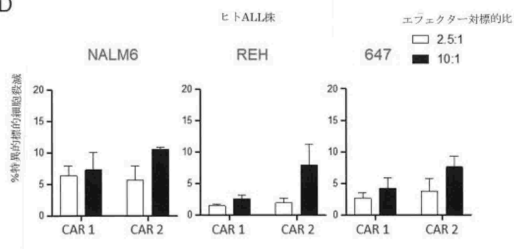
【図 15 - 2】

Figure 15 Cont.

21/34



D

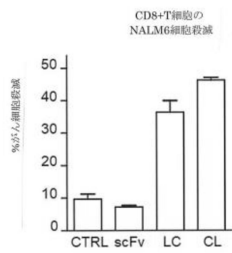


【図 16 - 2】

Figure 16 Cont.

23/34

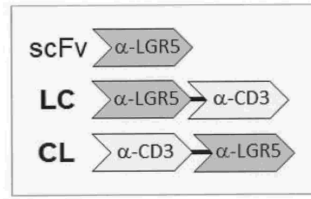
B



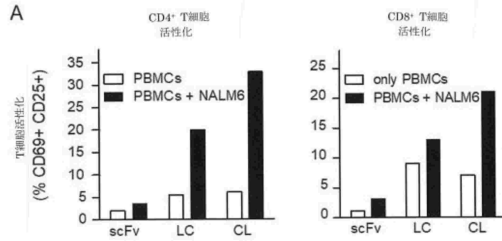
【図 16 - 1】

Figure 16

22/34



A

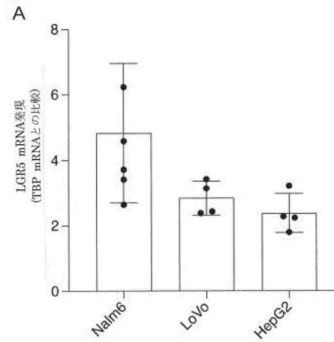


【図 17】

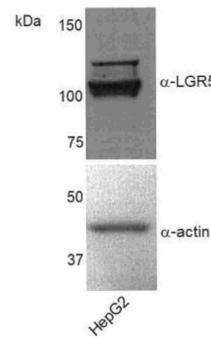
Figure 17

24/34

A



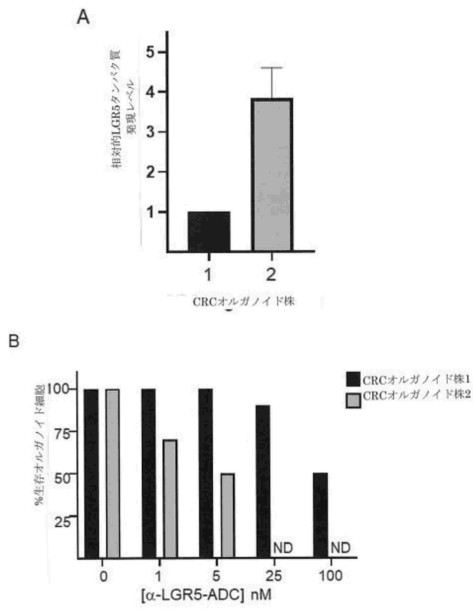
B



【図 18】

Figure 18

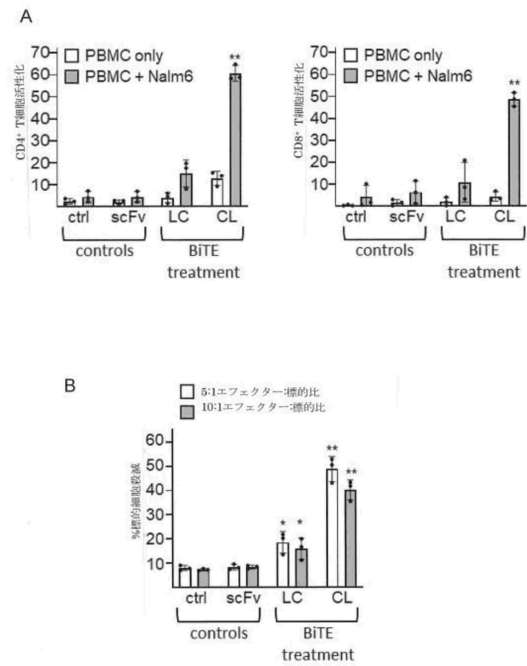
25/34



【図 19】

Figure 19

26/34



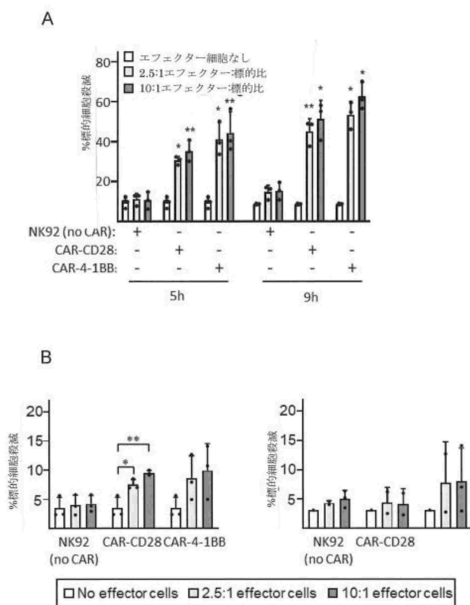
10

20

【図 20】

Figure 20

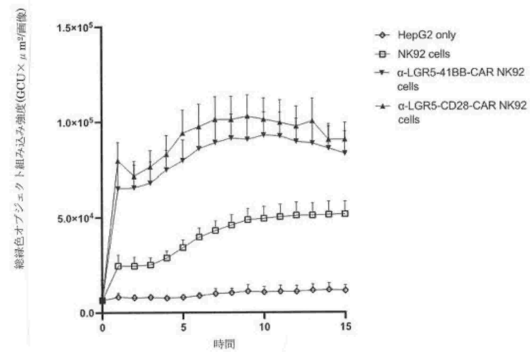
27/34



【図 21】

Figure 21

28/34

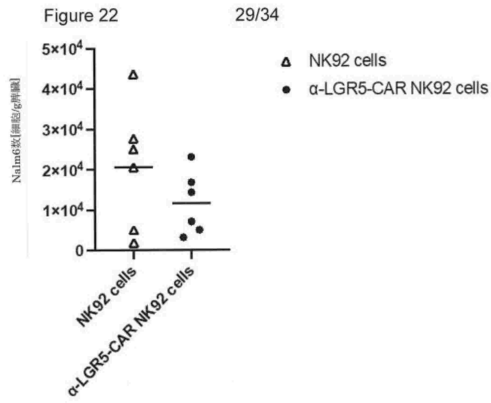


30

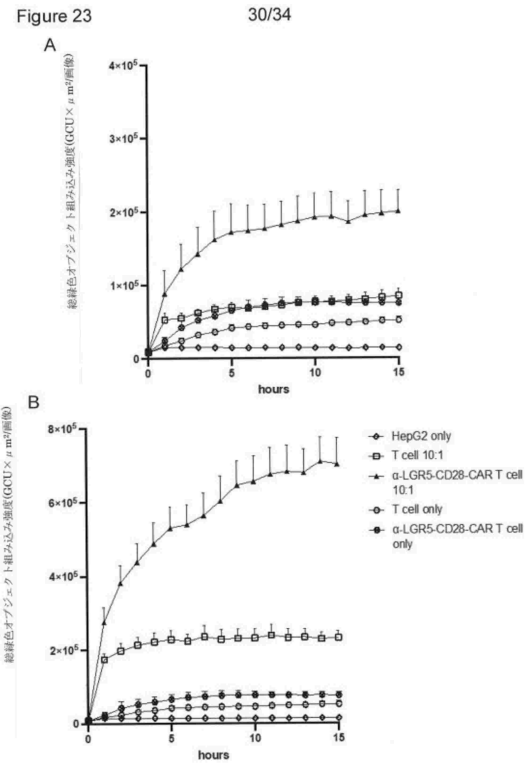
40

50

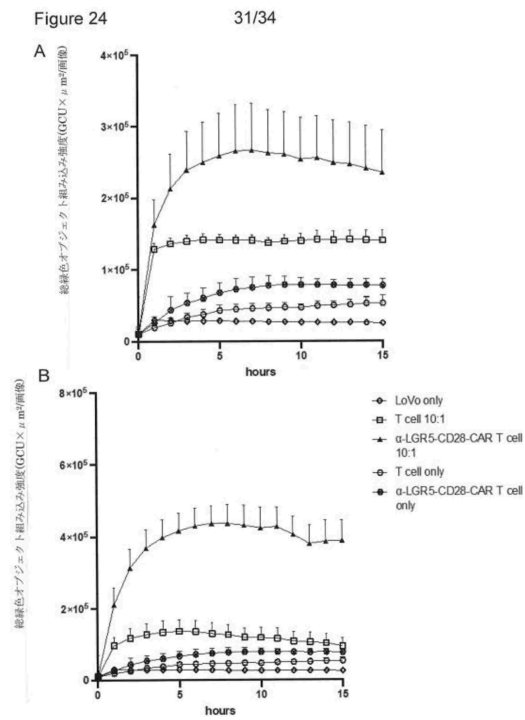
【図 2 2】



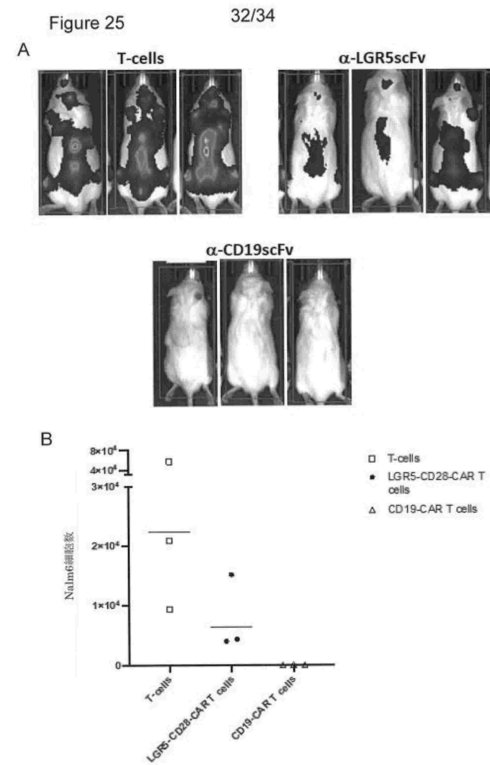
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



10

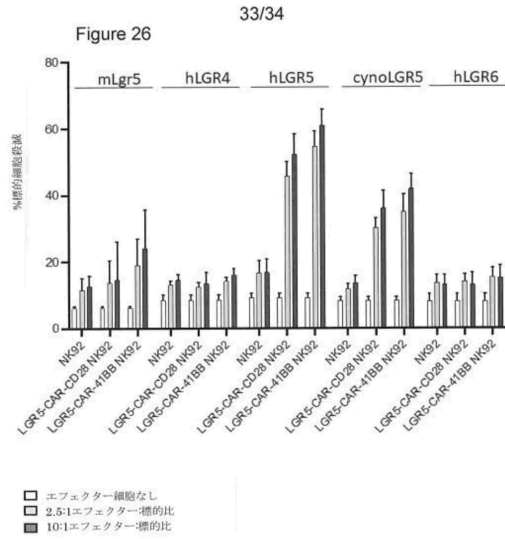
20

30

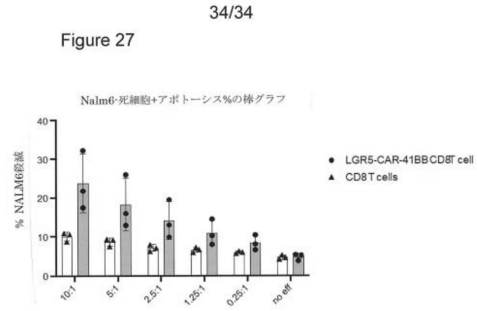
40

50

【図 26】



【図 27】



10

【配列表】

2025508984000001.xml

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2023/050512

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C07K16/28	C07K16/30 A61P35/00 A61K47/68 A61K39/00
	G01N33/68	
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) C07K A61K A61P G01N		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/149159 A1 (GENENTECH INC [US]; HONGO JO-ANNE [US] ET AL.) 3 October 2013 (2013-10-03) paragraph [0464] - paragraph [0474]; sequence 67	1-43, 50, 51
X	WO 2010/016766 A2 (KONINK NL AKADEMIE VAN WETENSCH [NL]; HUBRECHT LAB [NL] ET AL.) 11 February 2010 (2010-02-11) examples 4-6, 11	1-43, 50, 51
	----- -/--	
☒ 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 11 July 2023		Date of mailing of the international search report 12/09/2023
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 Saame, Tina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2023/050512

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XING GONG ET AL: MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 15, no. 7, 1 July 2016 (2016-07-01), pages 1580-1590, XP055497933, US ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0114 page 1584 - page 1585 pages 1587-158 -----	1-43, 50, 51
X	SASAKI Y ET AL: "Establishment of a novel monoclonal antibody against LGR5", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 394, no. 3, 9 April 2010 (2010-04-09) , pages 498-502, XP002685669, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2010.02.166 [retrieved on 2010-03-01] abstract -----	1-43, 50, 51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2023/050512

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

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:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2023/050512

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.: **1-43, 50, 51 (all partially)**
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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.:
1-43 (completely); 50, 51 (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 Application No. PCT/GB2023/050512

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-43(completely); 50, 51(partially)

An antibody or fragment thereof which binds to LGR5, wherein the antibody binds an epitope located within amino acids 22-37 of SEQ ID NO.1, comprising the six CDR sequences represented by SEQ ID Nos 50-55, i.e. the CDR sequences of exemplified antibody clone 2.4.

2. claim: 44

An isolated synthetic or recombinant peptide comprising an epitope, the peptide consisting of residues 22 to 37 of SEQ ID NO: 1.

3. claims: 45-49(completely); 50, 51(partially)

A method of diagnosing or assessing progression of cancer comprising assessing expression of LGR5 and/or protein levels of LGR5.

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/GB2023/050512

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-43, 50, 51(all partially)

The search for invention 1 (see also objection concerning lack of unity) is limited to an antibody or fragment thereof which binds to LGR5, wherein the antibody binds an epitope located within amino acids 22-37 of SEQ ID NO.1, comprising the six CDR sequences represented by SEQ ID Nos 50-55. The reasons for the limitation of the search are set out in the accompanying written opinion of the international search authority (WOISA).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2023/050512

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013149159 A1	03-10-2013	AR 090549 A1	19-11-2014
		AU 2013237892 A1	28-08-2014
		CA 2864311 A1	03-10-2013
		CL 2014002549 A1	16-01-2015
		CN 104411721 A	11-03-2015
		CO 7071096 A2	30-09-2014
		CR 20140441 A	17-11-2014
		EA 201491811 A1	30-01-2015
		EP 2831118 A1	04-02-2015
		HK 1208038 A1	19-02-2016
		JP 6404811 B2	17-10-2018
		JP 2015521027 A	27-07-2015
		JP 2019030303 A	28-02-2019
		KR 20150003162 A	08-01-2015
		PE 20142167 A1	13-12-2014
		PH 12014502132 A1	10-12-2014
		SG 11201405881T A	30-10-2014
		TW 201343674 A	01-11-2013
		US 2013336885 A1	19-12-2013
		US 2016102146 A1	14-04-2016
		WO 2013149159 A1	03-10-2013
WO 2010016766 A2	11-02-2010	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	40/11 (2025.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 K	40/15 (2025.01)	A 6 1 K	40/11	
A 6 1 K	40/31 (2025.01)	A 6 1 K	40/15	
A 6 1 K	40/33 (2025.01)	A 6 1 K	40/31	
A 6 1 K	40/42 (2025.01)	A 6 1 K	40/33	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	40/42	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	G 0 1 N	33/531	A
		C 0 7 K	14/705	

,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,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC
,VN,WS,ZA,ZM,ZW

デンマーク・５２３０・オーデンセ・エム・キャンパスヴァイ・５５

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74)代理人 100188558

弁理士 飯田 雅人

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 マイケ・ド・ラ・ロッシュ

イギリス・ケンブリッジ・ＣＢ２・１ＴＮ・トリニティ・レーン・ジ・オールド・スクールズ・ケ
ンブリッジ・エンタープライズ・リミテッド

(72)発明者 マーク・アンドリュウ・ド・ラ・ロッシュ

イギリス・ケンブリッジ・ＣＢ２・１ＴＮ・トリニティ・レーン・ジ・オールド・スクールズ・ケ
ンブリッジ・エンタープライズ・リミテッド

(72)発明者 ミッケル・オーレ・スクト

デンマーク・２１００・コペンハーゲン・オ・ブレッグダムスヴァイ・９・リグスホスピタレット

(72)発明者 カーステン・スクト

デンマーク・５２３０・オーデンセ・エム・キャンパスヴァイ・５５・シダンスク・ユニバーシテ
ット

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA02 BC01 CA25
CA44 CA46

4C085 AA13 AA14 AA16 AA27 BB01 BB11 CC02 DD52 DD62 EE01
GG01

4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 BB65 CA04 NA14 ZB02 ZB09 ZB26
ZB27

F ターム (参考)

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26