

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6677638号
(P6677638)

(45) 発行日 令和2年4月8日(2020.4.8)

(24) 登録日 令和2年3月17日(2020.3.17)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 16/18	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
C12P 21/08	(2006.01)
C12N 1/15	(2006.01)
C12N 1/19	(2006.01)
C07K 16/18	Z N A
C12N 15/13	15/13
C12P 21/08	21/08
C12N 1/15	1/15
C12N 1/19	1/19

請求項の数 21 (全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-523206 (P2016-523206)
(86) (22) 出願日	平成26年10月17日(2014.10.17)
(65) 公表番号	特表2016-538832 (P2016-538832A)
(43) 公表日	平成28年12月15日(2016.12.15)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/061215
(87) 國際公開番号	W02015/058132
(87) 國際公開日	平成27年4月23日(2015.4.23)
審査請求日	平成29年10月16日(2017.10.16)
(31) 優先権主張番号	61/893, 141
(32) 優先日	平成25年10月18日(2013.10.18)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31) 優先権主張番号	62/056, 324
(32) 優先日	平成26年9月26日(2014.9.26)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(74) 代理人	110002077 園田・小林特許業務法人
(72) 発明者	ストーム, エレイン アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー／オージェネンテック, インコーポレイテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗R S P O 2 及び／又はR S P O 3 抗体及びそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) (i) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む超可変領域 - L 1 (H V R - L 1) ;
 (i i) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び (i i i) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン (V L) 、及び (b) (i) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; (i i) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; 及び (i i i) 配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン (V H) を含む、 R スポンジン 2 (R S P O 2) に結合する単離された抗体。

【請求項 2】

配列番号 1 0 5 の配列に対して少なくとも 9 0 % 同一である V L 配列、及び配列番号 1 0 6 の配列に対して少なくとも 9 0 % 同一である V H 配列を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 3】

配列番号 1 0 5 の配列に対して少なくとも 9 5 % 同一である V L 配列、及び配列番号 1 0 6 の配列に対して少なくとも 9 5 % 同一である V H 配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の単離された抗体。

【請求項 4】

配列番号 1 0 5 の V L 配列、及び配列番号 1 0 6 の V H 配列を含む、請求項 1 - 3 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

10

20

【請求項 5】

1 つから 5 つの挿入、置換、及び / 又は欠損を除く配列番号 105 の配列を含む V L 配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 6】

1 つから 5 つの挿入、置換、及び / 又は欠損を除く配列番号 106 の配列を含む V H 配列を含む、請求項 1、2、又は 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

R S P O 2 媒介性 w n t シグナル伝達を阻害する、請求項 1 - 6 の何れか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 8】

R N F 4 3 と R S P O 2 の相互作用を阻害する、請求項 1 - 7 の何れか一項に記載の単離された抗体。

10

【請求項 9】

R S P O 2 と L G R 4 との間の相互作用を亢進する、請求項 1 - 8 の何れか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 10】

R S P O 2 と L G R 5 との間の相互作用を亢進する、請求項 1 - 8 の何れか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 11】

ヒト化、又はキメラ抗体である、請求項 1 - 10 の何れか一項に記載の単離された抗体。

20

【請求項 12】

完全長 I g G 1 又は I g G 2 a 抗体である、請求項 1 - 11 の何れか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 13】

F v、F a b、F a b'、s c F v、ダイアボディ、又は F (a b') 2 断片を含む抗体断片である、請求項 1 - 11 の何れか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 14】

二重特異性抗体又は多重特異性抗体である、請求項 1 - 11 の何れか一項に記載の単離された抗体。

30

【請求項 15】

請求項 1 - 14 の何れか一項に記載の抗体及び細胞傷害剤を含むイムノコンジュゲート。

【請求項 16】

請求項 1 - 14 の何れか一項に記載の抗体又は請求項 15 に記載のイムノコンジュゲート、及び薬学的に許容可能な担体を含む薬学的製剤。

【請求項 17】

付加的治療剤を更に含む、請求項 16 に記載の薬学的製剤。

【請求項 18】

請求項 1 - 14 の何れか一項に記載の抗体をコードする単離された核酸。

40

【請求項 19】

請求項 18 に記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項 20】

抗体が產生されるように、請求項 19 に記載の宿主細胞を培養することを含む、請求項 1 - 14 の何れか一項に記載の抗体を產生する方法。

【請求項 21】

宿主細胞から抗体を回収することを更に含む、請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

関連出願の相互参照

この出願は、2013年10月18日に出願された米国仮出願番号61/893,141、及び2014年9月26日に出願された米国仮出願番号62/056324に対して、米国特許法第119条の下で優先権を主張し、その内容は参照することにより本明細書中にその全体が援用される。

【0002】

配列表

本出願は、EFS-Web 経由で提出された配列表を含み、その全体が本明細書中で参考することにより援用される。2014年10月14日に作成された前記ASCIコピーは、P5719R1-WO_Sequence Listing.txt と命名され、大きさは124950バイトである。

10

【0003】

本明細書に提供されるのは、抗RSPo抗体、特に、抗RSPo2抗体及び/又は抗RSPo3抗体、並びにその使用方法である。

【背景技術】

【0004】

Rスpongin (RSPo) ファミリーは、脊椎動物の胚及び成体で広く発現された4つの分泌タンパク質 (RSPo1-RSPo4) の小さなグループである。RSPoは、Wnt 経路の活性化を強く増強することにより、発生及び肝細胞増殖において多面的機能を有している (Kazanskaya et al., Dev. Cell 7:525-534 (2004); Kim et al., Cell Cycle 5:23-26 (2006); 国際公開第2005/040418号)。哺乳動物のRSPo1-RSPo4は、40% - 60% のアミノ酸配列同一性を共有し、シグナルペプチド、隣接する二つのフリン様システインリッチドメイン (FU-のCRD) とそれに続くトロンボスpongin I型リピート (TSR) ドメイン、及び正に荷電したC末端領域からなる。2つのFU-CRDはWnt / カテニンシグナル伝達を促進するために不可欠かつ十分である (Kazanskaya et al., Dev. Cell 7:525-534 (2004); 国際公開第2005/040418号)。

20

【0005】

LGR4 (ロイシンリッチリピート [LRR] 含有Gタンパク質共役型受容体 [GPCR] 4)、LGR5、及びLGR6 (Hsu et al., Mol. Endocrinol. 12:1830-1845 (1998) 及びHsu et al., Mol. Endocrinol. 14:1257-1271 (2000) は、RSPoに対する受容体である。LGR4/5/6受容体の共通の特徴は、異なる型の成体幹細胞におけるそれらの発現である。LGR5は、小腸、大腸、胃、及び毛包を含む、Wnt 依存性コンパートメント内における常在性幹細胞のマーカーとして既に記載されている (Barker and Clevers Gastroenterology 138:1681-1696 (2010); Seshagiri et al., Nature 488:660-664 (2012))。LGR6はまた、表皮における多能性幹細胞のマーカーとしての役割を果たしている (Snippert et al., Science 327:1385-1389 (2010))。LGR4は広く増殖細胞中で発現され (Van Schoore et al., Histochem Cell Biol. 124:35-50 (2005))、そのノックアウトマウスは、骨、腎臓、精巣、皮膚、及び胆嚢を含む多くの器官における発生異常を示す (Mustata et al., EMBO Rep 12:558-564 (2011))。LGR4/5/6受容体は、7つの膜貫通ヘリックスの前の細胞外ドメインにおいてN末端及びC末端の両方でシステインに富む配列に隣接される17のLRR中央配列を有し、その細胞外ドメインはRSPoとの高親和性結合のために不可欠かつ十分である (de Lau et al., Genome Biol. 13:242 (2011) 及びWang et al., Genes & Dev. 27:1339-1344 (2013))。

30

【0006】

LGR4/5/6受容体は、RSPoを認識した後、物理的に低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質5/6 (LRP5/6) と相互作用することができ、それによってRSPo及びWntリガンドは、Wnt / カテニンシグナル伝達を活性化するために連携する (de Lau et al., Genome Biol. 13:242 (2011); Carmon et al., Proc Natl Acad Sci 108:11452-11457 (2012))。RSPoは、Frizzled及びLRP5/6受容体

40

50

を安定化させることにより、Wnt / カテニンシグナル伝達を促進することができる (Hao et al., *Nature* 485:195-200 (2012))。亜鉛及びRINGフィンガー3 (ZNRF3) 及びそのホモログ、RINGフィンガー43 (RNF43) は、細胞表面上のFrizzled及びLRP6受容体のターンオーバーを促進する膜貫通E3ユビキチナーゼである (Hao et al., *Nature* 485:195-200 (2012); Koo et al., *Nature* 488:665-669 (2012))。RSPOは、LGR4/5/6の細胞外ドメインとZNRF3/RNF43と相互作用することによって、膜からZNRF3のクリアランスを誘導することができ、Frizzled及びLRP6受容体を安定させ、Wnt / カテニンシグナル伝達を増強する (Hao et al., *Nature* 485:195-200 (2012))。

【0007】

10

特許出願及び刊行物を含む、本明細書に引用される全ての参考文献は、その全体が参考により援用される。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、抗RSPO抗体、特に、RSPO2、RSPO3、及び/又はRSPO2とRSPO3の両方に結合する抗体、及びその使用方法を提供する。

【0009】

20

本明細書に提供されるのは、RSPO2に結合する単離された抗体であり、ここで抗体は、膜貫通E3ユビキチナーゼとのRSPO2の相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、膜貫通E3ユビキチナーゼは、ZNRF3及び/又はRNF43である。

【0010】

20

幾つかの実施態様において、抗体は、LGR4、LGR5、及び/又はLGR6の一以上とのRSPO2の相互作用を阻害しない (例えば、LGR4、LGR5、及び/又はLGR6の一以上とのRSPO2の相互作用を増強する)。例えば、本明細書に提供されるのは、RSPO2に結合する単離された抗体であり、ここで、抗体は、(a)(i)配列番号53のアミノ酸配列を含む超可変領域-L1 (HVR-L1) ; (ii)配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-L2 ; 及び(iii)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む軽鎖可変ドメイン (VL) 、及び(b)(i)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-H1 ; (ii)配列番号57のアミノ酸配列を含むHVR-H2 ; 及び(iii)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む重鎖可変ドメイン (VH) を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、(a)配列番号105のVL配列、及び配列番号106のVH配列を含む。

【0011】

30

幾つかの実施態様において、抗体は、LGR4、LGR5、及び/又はLGR6の一以上とのRSPO2の相互作用を阻害する。例えば、本明細書に提供されるのは、RSPO2に結合する単離された抗体であり、ここで、抗体は、(a)(i)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むVL ; 及び(i)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むVH ; (b)(i)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号66のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号67のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むVL ; 及び(i)配列番号68のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号69のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むVH ; 又は(c)(i)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むVL ; 及び(i)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むVHを含む。幾つかの実施態様において、単離された抗体は、(a)配列

40

50

番号 107 の VL 配列及び配列番号 108 の VH 配列；(b) 配列番号 109 の VL 配列及び配列番号 110 の VH 配列；又は(c) 配列番号 111 の VL 配列及び配列番号 112 の VH 配列を含む。

【0012】

また本明細書に提供されるのは、RSP03 に結合する単離された抗体であり、ここで抗体は、膜貫通 E3 ユビキチナーゼとの RSP03 の相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、膜貫通 E3 ユビキチナーゼは、ZNRF3 及び / 又は RNF43 である。

【0013】

幾つかの実施態様において、抗体は、RSP03 と、LGR4、LGR5、及び / 又は LGR6 の一以上との相互作用を阻害しない(例えば、LGR4、LGR5、及び / 又は LGR6 の一以上への RSP03 の結合を増強する)。

【0014】

幾つかの実施態様において、抗体は、LGR4、LGR5、及び / 又は LGR6 の一以上との RSP03 の相互作用を阻害する。例えば、本明細書に提供されるのは、RSP03 に結合する単離された抗体であり、ここで、抗体は、(a) (i) 配列番号 5 のアミノ酸を含む HVR-L1、(ii) 配列番号 6 のアミノ酸を含む HVR-L2、及び (i) 配列番号 7 のアミノ酸を含む HVR-L3 を含む VL；及び (i) 配列番号 8 のアミノ酸を含む HVR-H1、(ii) 配列番号 9 のアミノ酸を含む HVR-H2、及び (i) 配列番号 10 のアミノ酸を含む HVR-H3 を含む VH；(b) (i) 配列番号 11 のアミノ酸を含む HVR-L1、(ii) 配列番号 12 のアミノ酸を含む HVR-L2、及び (i) 配列番号 13 のアミノ酸を含む HVR-L3 を含む VL；及び (i) 配列番号 14 のアミノ酸を含む HVR-H1、(ii) 配列番号 15 のアミノ酸を含む HVR-H2、及び (i) 配列番号 16 のアミノ酸を含む HVR-H3 を含む VH；(c) (i) 配列番号 17 のアミノ酸を含む HVR-L1、(ii) 配列番号 18 のアミノ酸を含む HVR-L2、及び (i) 配列番号 19 のアミノ酸を含む HVR-L3 を含む VL；及び (i) 配列番号 20 のアミノ酸を含む HVR-H1、(ii) 配列番号 21 のアミノ酸を含む HVR-H2、及び (i) 配列番号 22 のアミノ酸を含む HVR-H3 を含む VH；(d) (i) 配列番号 23 のアミノ酸を含む HVR-L1、(ii) 配列番号 24 のアミノ酸を含む HVR-L2、及び (i) 配列番号 25 のアミノ酸を含む HVR-L3 を含む VL；及び (i) 配列番号 26 のアミノ酸を含む HVR-H1、(ii) 配列番号 27 のアミノ酸を含む HVR-H2、及び (i) 配列番号 28 のアミノ酸を含む HVR-H3 を含む VH；(e) (i) 配列番号 29 のアミノ酸を含む HVR-L1、(ii) 配列番号 30 のアミノ酸を含む HVR-L2、及び (i) 配列番号 31 のアミノ酸を含む HVR-L3 を含む VL；及び (i) 配列番号 32 のアミノ酸を含む HVR-H1、(ii) 配列番号 33 のアミノ酸を含む HVR-H2、及び (i) 配列番号 34 のアミノ酸を含む HVR-H3 を含む VH；(f) (i) 配列番号 35 のアミノ酸を含む HVR-L1、(ii) 配列番号 36 のアミノ酸を含む HVR-L2、及び (i) 配列番号 37 のアミノ酸を含む HVR-L3 を含む VL；及び (i) 配列番号 38 のアミノ酸を含む HVR-H1、(ii) 配列番号 39 のアミノ酸を含む HVR-H2、及び (i) 配列番号 40 のアミノ酸を含む HVR-H3 を含む VH；又は (g) (i) 配列番号 41 のアミノ酸を含む HVR-L1、(ii) 配列番号 42 のアミノ酸を含む HVR-L2、及び (i) 配列番号 43 のアミノ酸を含む HVR-L3 を含む VL；及び (i) 配列番号 44 のアミノ酸を含む HVR-H1、(ii) 配列番号 45 のアミノ酸を含む HVR-H2、及び (i) 配列番号 46 のアミノ酸を含む HVR-H3 を含む VH を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、(i) 配列番号 23 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、(ii) 配列番号 24 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び (iii) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を含む VL；及び (i) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、(ii) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び (iii) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 を含む VH を含む。幾つかの実施態様において、抗体は、(i) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、(ii) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む HVR-L2

10

20

30

40

50

、及び(i i i)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むVL；及び(i)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(i i)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(i i i)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むVHを含む。更に、本明細書に提供されるのは、RSPO3に結合する単離された抗体であり、ここで、抗体は、(a)(i)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(i i)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(i i i)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むVL；及び(i)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(i i)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(i i i)配列番号188のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むVH；又は(b)(i)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(i i)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(i i i)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むVL；及び(i)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(i i)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(i i i)配列番号189のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むVHを含む。幾つかの実施態様において、RSPOに結合する単離された抗体は、(i)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(i i)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(i i i)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むVL；及び(i)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(i i)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(i i i)配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むVHを含む。幾つかの実施態様において、RSPOに結合する単離された抗体は、(i)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(i i)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(i i i)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むVL；及び(i)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(i i)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(i i i)配列番号188のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むVHを含む。幾つかの実施態様において、RSPOに結合する単離された抗体は、(i)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(i i)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(i i i)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むVL；及び(i)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(i i)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(i i i)配列番号189のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むVHを含む。

【0015】

幾つかの実施態様において、抗体は、(a)配列番号89のVL配列及び配列番号90のVH配列；(b)配列番号91のVL配列及び配列番号92のVH配列；(c)配列番号93のVL配列及び配列番号94のVH配列；(d)配列番号95のVL配列及び配列番号96のVH配列；(e)配列番号97のVL配列及び配列番号98のVH配列；(f)配列番号99のVL配列及び配列番号100のVH配列；(g)配列番号101のVL配列及び配列番号102のVH配列；を含む。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合する単離された抗体は、(a)配列番号208のVL配列及び配列番号209のVH配列、(b)配列番号212のVL配列及び配列番号213のVH配列；又は(c)配列番号214のVL配列及び配列番号205のVH配列を含む。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合する単離された抗体は、(a)配列番号208のVL配列、及び配列番号209のVH配列を含む。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合する単離された抗体は、(a)配列番号212のVL配列、及び配列番号213のVH配列を含む。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合する単離された抗体は、(a)配列番号214のVL配列、及び配列番号215のVH配列を含む。

【0016】

本明細書に提供されるのは、RSPO2及びRSPO3に結合する単離された抗体(抗RSPO2/3抗体)である。幾つかの実施態様において、抗体は、膜貫通E3ユビキチナーゼとのRSPO2及びRSPO3の相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、膜貫通E3ユビキチナーゼは、ZNRF3及び/又はRNF43である。幾つかの実施

10

20

30

40

50

態様において、抗体は、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6の一以上とのR S P O 3の相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗体は、R S P O 3と、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6の一以上との相互作用を阻害しない（例えば、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6の一以上へのR S P O 3の結合を増強する）。幾つかの実施態様において、抗体は、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6の一以上とのR S P O 2の相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗体は、R S P O 2と、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6の一以上との相互作用を阻害しない（例えば、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6の一以上へのR S P O 2の結合を増強する）。

【0017】

例えば、本明細書に提供されるのは、R S P O 2及びR S P O 3に結合する抗体であり、ここで、抗体は、(a)(i)配列番号47のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(i i)配列番号48のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(i i i)配列番号49のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含むV L；及び(b)(i)配列番号50のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(i i)配列番号51のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(i i i)配列番号52のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含むV Hを含む。幾つかの実施態様において、抗体は、(a)配列番号103のV L配列、及び配列番号104のV H配列を含む。

【0018】

抗R S P O 2 / 3抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、第一の可変ドメイン及び第二の可変ドメインを含み、ここで、第一の可変ドメインは六つのH V Rの第一の組を含み、第二の可変ドメインは六つのH V Rの第二の組を含み、ここで、六つのH V Rの第一及び第二の組は同一である。幾つかの実施態様において、六つのH V Rの第一の組及び六つのH V Rの第二の組は26E11の六つのH V Rである。

【0019】

抗R S P O 2 / 3抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、第一の可変ドメイン及び第二の可変ドメインを含み、ここで、第一の可変ドメインは六つのH V Rの第一の組を含み、第二の可変ドメインは六つのH V Rの第二の組を含み、ここで、六つのH V Rの第一及び第二の組は異なる。幾つかの実施態様において、六つのH V Rの第一の組は、4H1、4D4、5C2、5D6、5E11、6E9、及び21C2の何れか一の六つのH V Rであり、六つのH V Rの第二の組は、1A1、11F11、36D2、及び49G5の何れか一の六つのH V Rである。幾つかの実施態様において、六つのH V Rの第一の組は、4H1、4D4、5C2、5D6、5E11、6E9、及び21C2の何れか一の六つのH V Rであり、六つのH V Rの第二の組は、1A1の六つのH V Rである。

【0020】

また本明細書に提供されるのは、R S P O 3に結合する単離された抗体であり、ここで、抗体は、(a)(i)配列番号77のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(i i)配列番号78のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(i i i)配列番号79のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含むV L；及び(i)配列番号80のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(i i)配列番号81のアミノ酸配列を含むH V R - H 2；及び(i i i)配列番号82のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含むV H；又は(b)(i)配列番号83のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(i i)配列番号84のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(i i i)配列番号85のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含むV L；及び(i)配列番号86のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(i i)配列番号87のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(i i i)配列番号88のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含むV Hを含む。また本明細書に提供されるのは、R S P O 3に結合する単離された抗体であり、ここで、抗体は、(a)(i)配列番号77のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(i i)配列番号78のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(i i i)配列番号79のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含むV L；及び(i)配列番号80のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(i i)配列番号81のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(i i i)配列番号216のアミノ酸配列を含むH V

10

20

30

40

50

R - H 3 を含む V H を含む。

【 0 0 2 1 】

また本明細書に提供されるのは、 R S P O 3 に結合する単離された抗体であり、ここで、抗体は、 R S P O 3 のアミノ酸 4 7 - 1 0 8 内の領域（例えば、 4 9 - 1 0 8 ）に結合する。

【 0 0 2 2 】

また本明細書に提供されるのは、 R S P O 3 のエピトープに結合する単離された抗体であり、抗体の何れかの幾つかの実施態様において、 R S P O 3 のエピトープは、 R S P O 3 のアミノ酸残基： G l n 7 2 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、及び L y s 9 4 を含む。幾つかの実施態様において、 R S P O 3 のエピトープは、 R S P O 3 のアミノ酸： A s n 5 2 、 L e u 5 5 、 P h e 6 3 、 G l n 7 2 、 T y r 8 9 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、 L y s 9 4 、及び L y s 9 7 を含む。幾つかの実施態様において、 R S P O 3 のエピトープは、 R S P O 3 のアミノ酸残基： S e r 4 9 、 A s n 5 2 、 C y s 5 4 、 L e u 5 5 、 S e r 5 6 、 P h e 6 3 、 L e u 6 5 、 G l n 7 2 、 I l e 7 3 、 G l y 7 4 、 T y r 8 4 、 T y r 8 9 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、 I l e 9 2 、 L y s 9 4 、 L y s 9 7 、及び L y s 1 0 8 を含む。 10

【 0 0 2 3 】

また本明細書に提供されるのは、 R S P O 3 のエピトープに結合する単離された抗体であり、抗体の何れかの幾つかの実施態様において、 R S P O 3 のエピトープは、 R S P O 3 のアミノ酸： T h r 4 7 、 L e u 5 5 、 G l n 7 2 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、及び L y s 9 4 を含む。幾つかの実施態様において、 R S P O 3 のエピトープは、 R S P O 3 のアミノ酸： T h r 4 7 、 A s n 5 2 、 L e u 5 5 、 P h e 6 3 、 G l n 7 2 、 T y r 8 9 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、 I l e 9 2 、 L y s 9 4 、及び L y s 9 7 を含む。幾つかの実施態様において、 R S P O 3 のエピトープは、 R S P O 3 のアミノ酸残基： T h r 4 7 、 A s n 5 2 、 C y s 5 4 、 L e u 5 5 、 S e r 5 6 、 P h e 6 3 、 L e u 6 5 、 G l n 7 2 、 T y r 8 4 、 T y r 8 9 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、 I l e 9 2 、 A s n 9 3 、 L y s 9 4 、 L y s 9 7 、及び L y s 1 0 8 を含む。 20

【 0 0 2 4 】

また本明細書に提供されるのは、 R S P O 3 のエピトープに結合する単離された抗体であり、抗体の何れかの幾つかの実施態様において、 R S P O 3 のエピトープは、 R S P O 3 の S e r 4 9 、 A s n 5 2 、 C y s 5 4 、 L e u 5 5 、 S e r 5 6 、 P h e 6 3 、 L e u 6 5 、 G l n 7 2 、 I l e 7 3 、 G l y 7 4 、 T y r 8 4 、 T y r 8 9 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、 I l e 9 2 、 L y s 9 4 、及び L y s 1 0 8 から選択される一以上のアミノ酸を含む。幾つかの実施態様において、 R S P O 3 のエピトープは、 R S P O 3 のアミノ酸残基： S e r 4 9 、 A s n 5 2 、 C y s 5 4 、 L e u 5 5 、 S e r 5 6 、 P h e 6 3 、 L e u 6 5 、 G l n 7 2 、 I l e 7 3 、 G l y 7 4 、 T y r 8 4 、 T y r 8 9 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、 I l e 9 2 、 L y s 9 4 、及び L y s 1 0 8 を含む。 30

【 0 0 2 5 】

また本明細書に提供されるのは、 R S P O 3 のエピトープに結合する単離された抗体であり、抗体の何れかの幾つかの実施態様において、 R S P O 3 のエピトープは、 R S P O 3 の S e r 4 9 、 A s n 5 2 、 C y s 5 4 、 L e u 5 5 、 S e r 5 6 、 P h e 6 3 、 L e u 6 5 、 G l n 7 2 、 I l e 7 3 、 G l y 7 4 、 T y r 8 4 、 T y r 8 9 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、 I l e 9 2 、 L y s 9 4 、 L y s 9 7 、及び L y s 1 0 8 から選択される一以上のアミノ酸を含む。幾つかの実施態様において、 R S P O 3 のエピトープは、 R S P O 3 のアミノ酸残基： S e r 4 9 、 A s n 5 2 、 C y s 5 4 、 L e u 5 5 、 S e r 5 6 、 P h e 6 3 、 L e u 6 5 、 G l n 7 2 、 I l e 7 3 、 G l y 7 4 、 T y r 8 4 、 T y r 8 9 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、 I l e 9 2 、 L y s 9 4 、 L y s 9 7 、及び L y s 1 0 8 を含む。 40

【 0 0 2 6 】

また本明細書に提供されるのは、 R S P O 3 のエピトープに結合する単離された抗体で 50

あり、R S P O 3 のエピトープは、R S P O 3 の Th r 4 7 、 A s n 5 2 、 C y s 5 4 、 L e u 5 5 、 S e r 5 6 、 P h e 6 3 、 L e u 6 5 、 G l n 7 2 、 T y r 8 4 、 T y r 8 9 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、 I l e 9 2 、 A s n 9 3 、 L y s 9 4 、 L y s 9 7 、 及び L y s 1 0 8 から選択される一以上のアミノ酸を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 3 のエピトープは、R S P O 3 のアミノ酸残基： Th r 4 7 、 A s n 5 2 、 C y s 5 4 、 L e u 5 5 、 S e r 5 6 、 P h e 6 3 、 L e u 6 5 、 G l n 7 2 、 T y r 8 4 、 T y r 8 9 、 P r o 9 0 、 A s p 9 1 、 I l e 9 2 、 A s n 9 3 、 L y s 9 4 、 L y s 9 7 、 及び L y s 1 0 8 を含む。

【 0 0 2 7 】

抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、膜貫通 E 3 ユビキチナーゼとの R S P O 2 及び R S P O 3 の相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、膜貫通 E 3 ユビキチナーゼは、 Z N R F 3 及び / 又は R N F 4 3 である。幾つかの実施態様において、抗体は、 L G R 4 、 L G R 5 、及び / 又は L G R 6 の一以上の R S P O 3 の相互作用を阻害する。

10

【 0 0 2 8 】

抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、 R S P O 2 及び / 又は R S P O 3 媒介性 w n t シグナル伝達を阻害する。抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、 R S P O 2 及び / 又は R S P O 3 に結合する抗体断片である。抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体断片は、 R S P O 2 及び / 又は R S P O 3 媒介性 w n t シグナル伝達を阻害する。抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、がん幹細胞の増殖を阻害する。抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、がん細胞（例えば、がん幹細胞）の分化（例えば、前駆細胞への最終分化及び / 又は分化）を誘導し及び / 又は促進する。

20

【 0 0 2 9 】

抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、モノクローナル抗体である。抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、ヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である。抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、完全長 I g G 1 抗体である。抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、減少又は枯渇したエフェクター機能を有する。抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗 R S P O 抗体は、 E U 番号付け規則に従って、アミノ酸位置 2 9 7 に操作されたアラニンを含む。抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗 R S P O 抗体は、 E U 番号付け規則に従って、アミノ酸位置 2 6 5 に操作されたアラニンを含む。

30

【 0 0 3 0 】

抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、医薬として使用するためのものである。抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、がんの治療において使用するためのものである。幾つかの実施態様において、がんは、消化管がん、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、又は直腸がんである。幾つかの実施態様において、がんは、基準と比較して、一以上の R S P O （例えば、 R S P O 2 及び / 又は R S P O 3 ）の増加した発現によって特徴付けられる。幾つかの実施態様において、がんは、 R S P O 転座（例えば、 R S P O 2 転座及び / 又は R S P O 3 転座）によって特徴付けられる。抗 R S P O 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗体は、 w n t シグナル伝達を阻害すること、血管新生及び / 又は脈管形成を阻害すること、及び / 又は細胞増殖を阻害することに使用するためのものである。

40

【 0 0 3 1 】

また本明細書に提供されるのは、本明細書に記載される抗体をコードする単離された核酸である。更に本明細書に提供されるのは、本明細書に記載される抗体の核酸を含む宿主細胞である。本明細書に提供されるのは、抗体が産生されるように、本明細書に記載の抗体の核酸を含む宿主細胞を培養することを含む、本明細書に記載される抗体を産生する方法である。幾つかの実施態様において、産生する方法は、宿主細胞から抗体を回収するこ

50

とを更に含む。

【0032】

本明細書に提供されるのは、本明細書に記載の抗体と細胞傷害剤を含むイムノコンジュゲートである。

【0033】

更に本明細書に提供されるのは、本明細書に記載される抗体及び薬学的に許容可能な担体を含む薬学的製剤である。幾つかの実施態様において、薬学的製剤は付加的な治療剤を更に含む。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、タキサンである。幾つかの実施態様において、タキサンは、パクリタキセル又はドセタキセルである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、白金剤である。幾つかの実施態様において、白金剤は、カルボプラチニン、オキサリプラチニン及び／又はシスプラチニンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、トポイソメラーゼ阻害剤である。幾つかの実施態様において、トポイソメラーゼ阻害剤はイリノテカン、トポテカン、エトポシド、及び／又はミトキサントロンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、フォリン酸（例えば、ロイコボリン）である。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、ヌクレオシド代謝阻害剤である。幾つかの実施態様において、ヌクレオシド代謝阻害剤は、フルオロウラシル、カベシタビン、及び／又はゲムシタビンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、フォリン酸、5-フルオロウラシル、及び／又はオキサリプラチニンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、5-フルオロウラシル及びイリノテカンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、タキサン及び白金剤である。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、パクリタキセル及びカルボプラチニンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、ペメトレキセド（pemetrexate）である。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、ヘッジホッグ阻害剤（例えば、ビスマデギブ）である。

【0034】

本明細書に提供されるのは、がんの治療のための医薬の製造における、本明細書に記載の抗体の使用である。幾つかの実施態様において、がんは、消化管がん、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、又は直腸がんである。幾つかの実施態様において、がんは肺がんである。幾つかの実施態様において、がんは、基準と比較して、一以上のRSPO（例えば、RSPO2及び／又はRSPO3）の増加した発現によって特徴付けられる。幾つかの実施態様において、がんは、RSPO転座（例えば、RSPO2転座及び／又はRSPO3転座）によって特徴付けられる。更に、本明細書に提供されるのは、wntシグナル伝達を阻害するため、血管新生及び／又は脈管形成を阻害するため、及び／又は細胞増殖を阻害するための医薬の製造における、本明細書に記載の抗体の使用である。幾つかの実施態様において、抗RSPO抗体は、付加的治療薬と組み合わせて使用される（例えば、逐次に又は同時に投与される）。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、タキサンである。幾つかの実施態様において、タキサンは、パクリタキセル又はドセタキセルである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、白金剤である。幾つかの実施態様において、白金剤は、カルボプラチニン、オキサリプラチニン及び／又はシスプラチニンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、トポイソメラーゼ阻害剤である。幾つかの実施態様において、トポイソメラーゼ阻害剤はイリノテカン、トポテカン、エトポシド、及び／又はミトキサントロンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、フォリン酸（例えば、ロイコボリン）である。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、ヌクレオシド代謝阻害剤である。幾つかの実施態様において、ヌクレオシド代謝阻害剤は、フルオロウラシル、カベシタビン、及び／又はゲムシタビンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、フォリン酸、5-フルオロウラシル、及び／又はオキサリプラチニンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、5-フルオロウラシル及びイリノテカンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、タキサン及び白金剤である。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、パクリタキセル及びカルボプラチニンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、ペメトレキセド（pemetrexate）である。

10

20

30

40

50

te)である。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、ヘッジホッグ阻害剤（例えば、ビスマデギブ）である。

【0035】

本明細書に提供されるのは、本明細書に記載の抗体の有効量を個体に投与することを含む、がんを有する個体を治療する方法である。幾つかの実施態様において、がんは、消化管がん、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、又は直腸がんである。幾つかの実施態様において、がんは肺がんである。幾つかの実施態様において、本方法は、付加的な治療剤を個体へ投与することを更に含む。幾つかの実施態様において、がんは、基準と比較して、一以上のRSPO（例えば、RSPO2及び/又はRSPO3）の増加した発現によって特徴付けられる。幾つかの実施態様において、がんは、RSPO転座（例えば、RSPO2転座及び/又はRSPO3転座）によって特徴付けられる。また、本明細書に提供されるのは、Wntシグナル伝達を阻害するため、血管新生及び/又は脈管形成を阻害するため、及び/又は細胞増殖を阻害するために、本明細書に記載の抗体の有効量を個体に投与することを含む、個体において、Wntシグナル伝達を阻害する、血管新生及び/又は脈管形成を阻害する、及び/又は細胞増殖阻害する方法を提供する。幾つかの実施態様において、本方法は、付加的治療薬を投与することを含む。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、タキサンである。幾つかの実施態様において、タキサンは、パクリタキセル又はドセタキセルである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、白金剤である。幾つかの実施態様において、白金剤は、カルボプラチニン、オキサリプラチニン及び/又はシスプラチニンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、トポイソメラーゼ阻害剤である。幾つかの実施態様において、トポイソメラーゼ阻害剤はイリノテカン、トポテカン、エトポシド、及び/又はミトキサンtronである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、フォリン酸（例えば、ロイコボリン）である。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、ヌクレオシド代謝阻害剤である。幾つかの実施態様において、ヌクレオシド代謝阻害剤は、フルオロウラシル、カペシタビン、及び/又はゲムシタビンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、フォリン酸、5-フルオロウラシル、及び/又はオキサリプラチニンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、5-フルオロウラシル及びイリノテカンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、タキサン及び白金剤である。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、パクリタキセル及びカルボプラチニンである。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、ペメトレキセド（pemetrexate）である。幾つかの実施態様において、付加的治療薬は、ヘッジホッグ阻害剤（例えば、ビスマデギブ）である。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1A-B】抗RSPO2及び抗RSPO3抗体のパネルは、組換えヒト（rh）RSPO2-刺激性（A）及び/又はrhRSPO3-刺激性（B）WNTレポーター活性を遮断する能力について試験された。抗体のサブセットはrhRSPO2-及び/又はrhRSPO3-刺激性WNTレポーター活性を遮断する。WNTレポーター細胞を、10ng/mlの組換えマウス（rm）Wnt3a、50pMのrhRSPO2（A）又はrhRSPO3（B）を用いて、示された抗体クローニングの濃度を増加させて刺激した。データは、抗体の非存在下において存在する刺激の量に対して正規化された。

【図2A-I】抗RSPO2及び抗RSPO3抗体のパネルは、RSPO3発現細胞ペレット（A-C）、RSPO2発現細胞ペレット（D-F）、RSPO1発現細胞ペレット（G）、RSPO4発現細胞ペレット（H）、及び非RSPO1-4発現細胞（293細胞）（I）に反応性であるIHCについて試験された。図2に示すように、抗体49G5は、IHCによって決定される場合、RSPO2発現細胞ペレットに対する反応性を認識したが、一方RSPO3、RSPO1、RSPO4、及び非RSPO1-4発現細胞ペレットを認識しなかった。IHC反応性について試験した抗体の完全な表は、表4に示される。表4の全ての試験された抗体は、IHC反応性によって決定される場合、RSPO1、RSPO4、非RSPO1-4発現細胞ペレットを認識しなかった。

10

20

30

40

50

【図3 A - D】抗RSP02及び抗RSP03抗体のパネルは、wntレポーター活性のrhRSP02 (A)、組換えカニクイザル (rcyno) RSP02 (B)、マウス (m) RSP02 (C)、及びrhRSP02 L186P変異体 (D)による刺激を阻害する能力について試験された。WNTレポーター細胞を、10ng/mLのrmWnt3aと、50pMのrhRSP02 (A)、8pMのrcyno RSP02 (Genentech) (B)、90pMのmRSP02 (R&D Systems) (C)、又は38pMのrhRSP02 L186P (Genentech) (D)の何れかを用いて、示された抗体クローニングの濃度を増加させて刺激した。

【図4 A - D】抗RSP02及び抗RSP03抗体のパネルは、rhRSP03 (A)、rcyno RSP03 (B)、mRSP03 (C)、及びPTPRK融合 - RSP03 (D)によって刺激される、WNTレポーター活性を阻害する能力について試験された。WNTレポーター細胞を、10ng/mLのrmWnt3aと、50pMのrhRSP03 (A)、13pMのcyno RSP03 (Genentech) (B)、又は17pMのmRSP03 (R&D Systems) (C)の何れかを用いて、示された抗体クローニングの濃度を増加させて刺激した。図4 Dにおいて、WNTレポーター細胞を、5ug/mlの抗RSP03の非存在下又は存在下で、10ng/mlのrmWNT3aと、示されたDNAを用いてトランスフェクトした293T細胞から調製した馴化培地を用いて刺激した。

【図5】9つの抗RSP02及び抗RSP03クローニングの親和性及びIC50測定示された組換え (r) RSP02及びrRSP03について示されたクローニングのFabの親和性は、表面プラズモン共鳴によって測定された。示されたクローニングのIC50の測定は、示されたrSP0のEC50でWNTレポーターアッセイを刺激し、各抗体の濃度を増加させることによって決定された。H、ヒト；C、カニクイザル；M、マウス；-、結合無し又はIC50 > 500nM。

【図6 A - B】抗RSP02及び抗RSP03抗体のパネルは、rhRSP02 (A)及びrhRSP03 (B)へのLGR4結合を阻害する能力について試験された。個々の抗体クローニングを、競合結合ELISAによって、rhRSP02 (A)又はrhRSP03 (B)の何れかに対するLGR4 - ECDの結合を阻害する能力について試験した。同様の結果がLGR5で見られた（データ非表示）。結果の概要については、表5を参照のこと。

【図7 A - B】抗RSP02及び抗RSP03抗体のパネルは、rhRSP02 (A)及びrhRSP03 (B)へのRNF43結合を阻害する能力について試験された。個々の抗体クローニングを、競合結合ELISAによって、rhRSP02 (A)又はrhRSP03 (B)に対するRNF43 - ECDの結合を阻害する能力について試験した。同様の結果がLGR5で見られた（データ非表示）。結果の概要については、表5を参照のこと。

【図8 A - B】Fab26E11との複合体中の結晶化したRSP03 (33-210)のモデル (A)。Fab26E11 / RSP03相互作用の拡大が (B) に示される。

【図9 A - B】5D6、26E11、4H1、5C2、5E11、4D4、6E9及び21C2の可変軽鎖領域配列 (A) 及び可変重鎖領域配列 (B) のアラインメント。Kabatの定義によるCDR配列には下線が引かれている。

【図10 A - B】11F11、1A1、36D2、及び49G5の可変軽鎖領域配列 (A) 及び可変重鎖領域配列 (B) のアラインメント。Kabatの定義によるCDR配列には下線が引かれている。

【図11 A - D】30mg/kgの抗RSP03抗体 (5D6) 又は抗ブタクサ抗体 (対照) で処置された結腸直腸がん患者由来の4つのモデル (A - D) の平均腫瘍体積 (mm³) の変化。また図11Dは、イリノテカン (100mg/kg、0日目及び3日目) と組み合わせた抗RSP03抗体 (5D6) 又は抗ブタクサ抗体 (対照) 及びイリノテカン (100mg/kg、0日目及び3日目) で処置されたCRC結腸直腸がん患者由来のモデルの平均腫瘍体積 (mm³) の変化を示す。

【図12 A - D】抗ブタクサ抗体 (対照) 又は抗RSP03抗体 (5D6) を30mg/

kg で処置された結腸直腸がん患者由来のモデル腫瘍の、最後の投薬後 2 ~ 3 週間でのヘマトキシリン及びエオシン染色 (H & E 染色) (A 及び C) 及びアルシアンブルー染色 (B 及び D)。抗 R S P O 3 で処置した腫瘍は、異なる病理組織学を有し、特に、抗ブタクサ抗体の対照と比較してアルシアンブルー染色によって示されるように粘液の有意な増加を有する。

【図 13 A - C】(A) は、(i) 抗 R S P O 3 抗体 (5 D 6)、(ii) 抗ブタクサ抗体 (対照)、(iii) イリノテカン (100 mg / kg、0 日目) と組み合わせた抗 R S P O 3 抗体 (5 D 6)、又は抗ブタクサ抗体 (対照) 及びイリノテカン (100 mg / kg、0 日目) で処置された C R C C 結腸直腸がん患者由来のモデルの平均腫瘍体積 (mm³) を示す。(B - C) は、結腸直腸がん患者由来のモデルが、(a) 抗 R S P O 3 抗体 (5 D 6) 又は抗ブタクサ抗体 (対照; 30 mg / kg) の何れかで処置され、(b) 移植されて、抗 R S P O 3 抗体 (5 D 6) 又は抗ブタクサ抗体 (対照) で処置された連続移植実験を示す。(B) は、最初に又は連続移植時の何れかで抗 R S P O 3 抗体 (5 D 6) による処置による、連続移植した腫瘍 (移植) 生着率のパーセンテージの実質的な減少を示す。(C) は、最初に又は連続移植時の何れかで抗 R S P O 3 抗体 (5 D 6) による処置による、連続移植した腫瘍の平均腫瘍体積の変化の有意な減少を示す。

【図 14 A - B】5 D 6、5 D 6 v 1、5 D 6 v 2 . 1、5 D 6 v 2 . 2、5 D 6 v 2 . 3、5 D 6 v 2 . 4、5 D 6 v 2 . 8、5 D 6 v 2 . 10、5 D 6 v 3 . 2、5 D 6 v 3 . 3、5 D 6 v 4 . 1、5 D 6 v 4 . 3、5 D 6 v 5 . 1、及び 5 D 6 v 5 . 2 の可変軽鎖領域配列 (A) 及び可変重鎖領域配列 (B) のアラインメント。Kabat の定義による C D R 配列には下線が引かれている。

【発明を実施するための形態】

【0037】

I. 定義

用語「R スポンジン」及び「R S P O」とは本明細書では、別段の指示がない限り、靈長類 (例えば、ヒト) 及び齧歯類 (例えば、マウス及びラット) などの哺乳類を含む任意の脊椎動物供給源由来の任意の天然 R S P O (例えば、R S P O 1、R S P O 2、R S P O 3、及び / 又は R S P O 4) のことである。前記用語は、「完全長」非プロセス型 R S P O 並びに細胞におけるプロセシングから生じる任意の形態の R S P O を包含する。前記用語は、R S P O の天然に存在する変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体も包含する。幾つかの実施態様において、例示的なヒト R S P O のアミノ酸配列は、例えば、配列番号 3 に示されるように、R S P O 1 である。幾つかの実施態様において、例示的なヒト R S P O のアミノ酸配列は、例えば、配列番号 1 に示されるように、R S P O 2 である。幾つかの実施態様において、例示的なヒト R S P O のアミノ酸配列は、例えば、配列番号 2 に示されるように、R S P O 3 である。幾つかの実施態様において、例示的なヒト R S P O のアミノ酸配列は、例えば、配列番号 4 に示されるように、R S P O 4 である。

【0038】

用語「R スポンジン 2」及び「R S P O 2」とは本明細書では、別段の指示がない限り、靈長類 (例えば、ヒト) 及び齧歯類 (例えば、マウス及びラット) などの哺乳類を含む任意の脊椎動物供給源由来の任意の天然 R S P O 2 のことである。前記用語は、「完全長」非プロセス型 R S P O 2 並びに細胞におけるプロセシングから生じる任意の形態の R S P O 2 を包含する。前記用語は、R S P O 2 の天然に存在する変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体も包含する。幾つかの実施態様において、例示的なヒト R S P O 2 のアミノ酸配列は、2013 年 10 月 18 日現在、UNIPROT Q6UX9 - 1 である。幾つかの実施態様において、例示的なヒト R S P O 2 のアミノ酸配列は、2013 年 10 月 18 日現在、UNIPROT Q6UX9 - 2 である。幾つかの実施態様において、例示的なヒト R S P O 2 のアミノ酸配列は、2013 年 10 月 18 日現在、UNIPROT Q6UX9 - 3 である。幾つかの実施態様において、例示的なヒト R S P O 2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 に示される。

10

20

30

40

50

【0039】

用語「Rスボンジン3」及び「R S P O 3」とは本明細書では、別段の指示がない限り、靈長類（例えば、ヒト）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類を含む任意の脊椎動物供給源由來の任意の天然R S P O 3のことである。前記用語は、「完全長」非プロセス型R S P O 3並びに細胞におけるプロセシングから生じる任意の形態のR S P O 3を包含する。前記用語は、R S P O 3の天然に存在する変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体も包含する。幾つかの実施態様において、例示的なヒトR S P O 2のアミノ酸配列は、2013年10月18日現在、UNIPROT Q9BX4-1である。幾つかの実施態様において、例示的なヒトR S P O 2のアミノ酸配列は、2013年10月18日現在、UNIPROT Q9BX4-2である。幾つかの実施態様において、例示的なヒトR S P O 3のアミノ酸配列は、配列番号2に示される。10

【0040】

本明細書での目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、下で定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク由來の軽鎖可変ドメイン（VL）フレームワーク又は重鎖可変ドメイン（VH）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「由來の」アクセプターヒトフレームワークは、それと同じアミノ酸配列を含むことがあり、又はアミノ酸配列変化を含有することもある。幾つかの実施態様では、アミノ酸変化の数は10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。幾つかの実施態様では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。20

【0041】

「親和性」とは、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）の間の非共有結合的相互作用の総和の強度のことである。他の方法で指示されていなければ、本明細書で使用されるように、「結合親和性」とは、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1対1の相互作用を反映する内因性結合親和性のことである。分子XのそのパートナーYに対する親和性は一般には解離定数（Kd）により表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当技術分野で公知の一般的方法により測定することができる。結合親和性を測定するための特定の説明的で例となる実施態様は以下に記載されている。30

【0042】

「親和性成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数の超可変領域（HVR）において一又は複数の改変を持つ抗体である。

【0043】

用語「抗R S P O 2抗体」及び「R S P O 2に結合する抗体」は、抗体が、R S P O 2を標的とし、診断薬剤及び/又は治療的薬剤として有用であるように、十分な親和性でR S P O 2に結合することができる抗体を指す。一実施態様において、抗R S P O 2抗体の、無関係な、非R S P O 2タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）によって測定される場合、抗体のR S P O 2への結合の約10%未満である。ある実施態様において、R S P O 2へ結合する抗体は、1 μM、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、又は0.001 nM（例えば、10⁻⁸ M以下、例えば、10⁻⁸ Mから10⁻¹³ M、例えば、10⁻⁹ Mから10⁻¹³ M）の解離定数（Kd）を有する。ある実施態様において、抗R S P O 2抗体は、異なる種由來のR S P O 2間で保存されているR S P O 2のエピトープに結合する。40

【0044】

用語「抗R S P O 3抗体」及び「R S P O 3に結合する抗体」は、抗体が、R S P O 3を標的とし、診断薬剤及び/又は治療的薬剤として有用であるように、十分な親和性でR S P O 3に結合することができる抗体を指す。一実施態様において、抗R S P O 3抗体の50

、無関係な、非R S P O 3タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ (R I A) によって測定される場合、抗体のR S P O 3への結合の約 10 %未満である。ある実施態様において、R S P O 3へ結合する抗体は、1 μ M、100 n M、10 n M、1 n M、0.1 n M、0.01 n M、又は0.001 n M (例えば、10⁻⁸ M以下、例えば、10⁻⁸ Mから10⁻¹³ M、 例えば、10⁻⁹ Mから10⁻¹³ M) の解離定数 (K d) を有する。ある実施態様において、抗R S P O 3抗体は、異なる種由来のR S P O 3間で保存されているR S P O 3のエピトープに結合する。

【 0 0 4 5 】

用語「抗R S P O 2 / 3抗体」及び「R S P O 2及びR S P O 3に結合する抗体」は、抗体が、R S P O 2及びR S P O 3を標的とし、診断薬剤及び/又は治療的薬剤として有用であるように、十分な親和性でR S P O 2及びR S P O 3に結合することができる抗体を指す。一実施態様において、抗R S P O 2 / 3抗体の、無関係な、非R S P O 2又は非R S P O 3タンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ (R I A) によって測定される場合、抗体のR S P O 2及びR S P O 3への結合の約 10 %未満である。ある実施態様において、R S P O 2及びR S P O 3へ結合する抗体は、1 μ M、100 n M、10 n M、1 n M、0.1 n M、0.01 n M、又は0.001 n M (例えば、10⁻⁸ M以下、例えば、10⁻⁸ Mから10⁻¹³ M、 例えば、10⁻⁹ Mから10⁻¹³ M) の解離定数 (K d) を有する。ある実施態様において、抗R S P O 2 / 3抗体は、異なる種由来のR S P O 2及び/又はR S P O 3間で保存されているR S P O 2及び/又はR S P O 3のエピトープに結合する。

【 0 0 4 6 】

本明細書における用語「抗体」は最も広い意味で用いられ、様々な抗体構造を包含し、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体 (例えば二重特異性抗体) 、及び、所望の抗原結合活性を示す限り、抗体断片を含む。

【 0 0 4 7 】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原を結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されないが、F v、F a b、F a b'、F a b' - S H、F (a b')₂；ダイアボディ；直鎖状抗体；单鎖抗体分子 (例えば、s c F v) ；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体を含む。

【 0 0 4 8 】

参照抗体「と結合を競合する抗体」とは、競合アッセイにおいて 50 %以上、参照抗体のその抗原への結合をブロックする抗体を指し、逆に、参照抗体は、競合アッセイにおいて 50 %以上、その抗体のその抗原への結合をブロックする。典型的な競合アッセイが、本明細書において提供される。

【 0 0 4 9 】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部分が特定の起源又は種から由来し、一方重鎖及び/又は軽鎖の残りは異なる起源又は種から由来する抗体を指す。

【 0 0 5 0 】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の 5 つの主要なクラス : I g A、I g D、I g E、I g G 及び I g M があり、それらの幾つかは更にサブクラス (アイソタイプ) 、例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁ 及び I g A₂ に分類される。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 及び μ と呼ばれる。

【 0 0 5 1 】

「エフェクター機能」とは、抗体のアイソタイプにより変わる、抗体 F c 領域に起因する生物学的活性を指す。抗体のエフェクター機能の例には、C 1 q 結合及び補体依存性細胞障害 (C D C) ；F c 受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞障害 (A D C C) ；貪食作用；細胞表面受容体 (例えば、B 細胞受容体) のダウンレギュレーション；及び B 細胞活性化が含まれる。

10

20

30

40

50

【0052】

用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。その用語は、天然配列Fc領域と変異体Fc領域を含む。一実施態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226又はPro230から重鎖のカルボキシル末端まで伸長する。しかし、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は、存在しても、存在しなくてもよい。本明細書に明記されていない限り、Fc領域又は定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるように、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。

10

【0053】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的に4つのFRのドメイン: FR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。したがって、HVR配列及びFR配列は、一般に、VH(又はVL)中の次の配列、FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4に出現する。

【0054】

用語「全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」は、本明細書では、互換的に使用されて、天然の抗体構造と実質的に類似している構造を有する、又は本明細書で定義したFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

20

【0055】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養」は互換的に使用され、外因性の核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含める。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」を含み、継代の数に関係なく、それに由来する初代形質転換細胞及び子孫が含まれる。子孫は、親細胞と、核酸含有物において完全に同一ではなく、変異を含む場合もある。元来の形質転換細胞において、スクリーニング又は選択された場合に、同様の機能又は生物活性を有する変異子孫がここに含まれる。

【0056】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により産生されるか、又はヒト抗体のレパートリー又は他のヒト抗体をコードする配列を利用した非ヒト起源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

30

【0057】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」とは、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的には、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからのものである。一般的には、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3にあるサブグループである。一実施態様において、VLについて、サブグループは上掲のKabatに記載のサブグループカッパIである。一実施態様において、VHについて、サブグループは上掲のKabatに記載のサブグループカッパIIである。

40

【0058】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基、及びヒトFR由来アミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。ある実施態様において、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含み、HVR(例えば、CDR)の全て又は実質的に全てが、非ヒト抗体のものに対応し、FRの全て又は実質的に全てが、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意選択的に、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでいてもよい。抗体の「ヒト化型」、例えば、非ヒト抗体は、ヒト化を遂げた抗体を指す。

50

【0059】

本明細書で使用される用語「超可変領域」又は「HVR」は、配列が超可変（「相補性決定領域」又は「CDR」）であるか、及び／又は構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成するか、及び／又は抗原接触残基（「抗原接触」）を含む抗体可変ドメインの各領域を指す。一般的に、抗体は、6つのHVR：VH（H1、H2、H3）に3つ、及びVL（L1、L2、L3）に3つを含む。本明細書における典型的なHVRは、

(a) アミノ酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)、及び96-101(H3)で生じる超可変ループ(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))；

(b) アミノ酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)、及び95-102(H3)で生じるCDR(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))；

(b) アミノ酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)、及び93-101(H3)で生じる抗原接触(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))；及び

(d) HVRアミノ酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)、及び94-102(H3)を含む、(a)、(b)、及び／又は(c)の組合せ

を含む。

【0060】

一実施態様において、HVR残基は、図9A-B及び／又は図10A-B、又は本明細書の他の箇所で同定されるものを含む。

【0061】

特に断らない限り、可変ドメイン内のHVR残基及び他の残基（例えば、FR残基）は、上掲のKabatらに従い、本明細書において番号が付けられる。

【0062】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に関する抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然型抗体の可変重鎖ドメイン及び軽鎖（それぞれVH及びVL）は、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）と3つの超可変領域（HVR）を含む各ドメインを有し、一般的に似たような構造を有する。（例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 第6版, W.H. Freeman and Co., 91頁 (2007)を参照）。単一のVH又はVLドメインが、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。更に、抗原に結合する抗体由来のVH又はVLドメインを使用して、それぞれ相補的なVL又はVHドメインのライブラリーをスクリーニングし、特定の抗原を結合する抗体を単離することができる。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)を参照。

【0063】

本明細書で使用される、用語「ベクター」は、それがリンクされている別の核酸を伝播することができる核酸分子を指す。この用語には、自己複製核酸構造物としてのベクター及びそれが導入されている宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターが含まれる。ある種のベクターは、作動可能に連結された核酸の発現を指令することができる。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と言う。

【0064】

「イムノコンジュゲート」は、一以上の異種分子にコンジュゲートした抗体であり、限定されないが、細胞傷害剤を含む。

【0065】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から分離されたものである。幾つかの実施態様において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動

10

20

30

40

50

(IEF)、キャピラリー電気泳動)又はクロマトグラフィー(例えば、イオン交換又は逆相HPLC)により決定される場合、95%以上又は99%の純度に精製される。純度の評価法の総説としては、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照のこと。

【0066】

「単離された」核酸は、その自然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸としては、核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子が挙げられるが、核酸分子は、染色体外に、又はその天然の染色体上の位置とは異なる染色体上の位置にも存在する。

【0067】

「抗RSP02抗体をコードする単離された核酸」は、抗体の軽鎖及び重鎖(又はその断片)をコードする1種又は複数の核酸分子を指す。これには、単一のベクター又は別々のベクター中のそうした核酸分子(複数可)が含まれ、そうした核酸分子(複数可)は、宿主細胞の1か所又は複数の位置に存在する。

【0068】

「抗RSP03抗体をコードする単離された核酸」は、抗体の軽鎖及び重鎖(又はその断片)をコードする1種又は複数の核酸分子を指す。これには、単一のベクター又は別々のベクター中のそうした核酸分子(複数可)が含まれ、そうした核酸分子(複数可)は、宿主細胞の1か所又は複数の位置に存在する。

【0069】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、例えば、天然に生じる変異を含み、又はモノクローナル抗体製剤の製造時に発生し、一般的に少量で存在している変異体などの、可能性のある変異体抗体を除き、集団を構成する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。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体の調製物とは異なり、モノクローナル抗体の調製物の各モノクローナル抗体は、抗原の单一の決定基に対するものである。「モノクローナル」なる修飾語句は、抗体の、実質的に均一な抗体の集団から得られたものであるという特性を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないと解釈されるべきものではない。例えば、本発明に従つて使用されるモノクローナル抗体は、これらに限定されないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン座の全て又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含めた種々の手法によって作製することができ、モノクローナル抗体を作製するためのそうした方法及び他の例示的方法は、本明細書に記載されている。

【0070】

「ネイキッド抗体」とは、異種の部分(例えば、細胞傷害性部分)又は放射性標識にコンジュゲートしていない抗体を指す。ネイキッド抗体は薬学的製剤中に存在してもよい。

【0071】

「天然型抗体」は、天然に生じる様々な構造をとる免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然型IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から成る、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VH)、続いて3つの定常ドメイン(CH1、CH2及びCH3)を有する。同様に、N末端からC末端に、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VL)、続いて軽鎖定常領域とも呼ばれる定常軽鎖(CL)ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)とラムダ(λ)と呼ばれる、2つのタイプの何れかに割り当てることができる。

【0072】

用語「添付文書」は、効能、用法、用量、投与、併用療法、禁忌についての情報、及び/又はそのような治療用製品の使用に関する警告を含む、治療用製品の商用パッケージに

10

20

30

40

50

慣習的に含まれている説明書を指すために使用される。

【0073】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入した後、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、参照ポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、ソースコードは米国著作権庁、Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテク社、South San Francisco co., Californiaを通して公的に入手可能であり、ソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、特にデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0074】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される: 分率X/Yの100倍

ここで、Xは、A及びBのプログラムアラインメントにおいて、配列アラインメントプログラムALIGN-2によって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基の全数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと一致しない場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは一致しないと評価されるであろう。特に断らない限りは、ここで使用される全ての%アミノ酸配列同一性値は、直前のパラグラフに記載したように、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。

【0075】

用語「Rスponジン転座」及び「R SPO転座」とは本明細書では、例えば、Rスponジン、変異体、もしくはその断片又は第二の遺伝子、変異体、もしくはその断片を含む切れた染色体の一部が異なる染色体位置、例えば、Rスponジン天然位置とは異なる染色体位置又は第二の遺伝子の天然位置とは異なるRスponジン天然位置中及び/もしくはその周囲の染色体位置に再結合するRスponジンのことである。Rスponジン転座は、R SPO1転座、R SPO2転座、R SPO3転座、及び/又はR SPO4転座であってもよい。

【0076】

用語「Rスponジン転座融合ポリヌクレオチド」及び「R SPO転座融合ポリヌクレオチド」とは本明細書では、Rスponジン転座遺伝子産物又は融合ポリヌクレオチドの核酸配列のことである。Rスponジン転座融合ポリヌクレオチドは、R SPO1転座融合ポリヌクレオチド、R SPO2転座融合ポリヌクレオチド、R SPO3転座融合ポリヌクレオチド、及び/又はR SPO4転座融合ポリヌクレオチドであってもよい。用語「Rスponジン転座融合ポリペプチド」及び「R SPO転座融合ポリペプチド」とは本明細書では、

R スポンジン転座遺伝子産物又は融合ポリヌクレオチドのアミノ酸配列のことである。R スポンジン転座融合ポリペプチドは、R S P O 1 転座融合ポリペプチド、R S P O 2 転座融合ポリペプチド、R S P O 3 転座融合ポリペプチド、及び／又はR S P O 4 転座融合ポリペプチドであってもよい。

【0077】

用語「検出」は直接的検出と間接的検出を含む、いかなる検出手段でも含む。

【0078】

本明細書で使用される用語「バイオマーカー」とは、試料中で検出することができる、例えば、予測的、診断的及び／又は予後の指標物質のことである。バイオマーカーは、ある種の分子的、病態的、組織学的、及び／又は臨床的特長に特徴のある疾患又は障害（例えば、癌）の特定のサブタイプの指標物質としての働きをすることができる。幾つかの実施態様では、バイオマーカーは遺伝子である。幾つかの実施態様では、バイオマーカーは遺伝子の変異体（例えば、変異及び／又は多型）である。幾つかの実施態様では、バイオマーカーは転座である。バイオマーカーには、ポリヌクレオチド（例えば、D N A 及び／又はR N A ）、ポリペプチド、ポリペプチドとポリヌクレオチド修飾（例えば、翻訳後修飾）、炭水化物、及び／又は糖脂質ベースの分子マーカーが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0079】

個体にとっての臨床的利益の増加と関連するバイオマーカーの「存在」、「量」、又は「レベル」は、試料における検出可能なレベルである。これらは当業者に公知であり本明細書でも開示されている方法により測定することができる。評価されるバイオマーカーの発現レベル又は量を使用して、治療に対する応答を判定することができる。

20

【0080】

用語「発現のレベル」と「発現レベル」は一般に互換的に使用され、一般には試料中のバイオマーカーの量のことである。「発現」とは一般には、（例えば、遺伝子にコードされた及び／又はエピジェネティックな）情報が細胞内に存在し作用する構造物に変換されるプロセスのことである。したがって、本明細書で使用されるように、「発現」とはポリヌクレオチドへの転写、ポリペプチドへの翻訳、又はポリヌクレオチド及び／もしくはポリペプチド修飾（例えば、ポリペプチドの翻訳後修飾）さえも指すことがある。転写されたポリヌクレオチド、翻訳されたポリペプチド、又はポリヌクレオチド及び／もしくはポリペプチド修飾（例えば、ポリペプチドの翻訳後修飾）の断片も、選択的スプライシングにより生成された転写物又は分解した転写物由来であれ、例えば、タンパク質分解によりポリペプチドの翻訳後プロセシング由来であれ、発現されたと見なすことにする。「発現された遺伝子」には、m R N A としてポリヌクレオチドに転写され、その後ポリペプチドに翻訳される遺伝子、及びR N A に転写されるがポリペプチドには翻訳されない（例えば、トランスクルーポン RNA 及びリボソームR N A ）遺伝子も含まれる。

30

【0081】

「上昇した発現」、「上昇した発現レベル」、又は「上昇したレベル」とは、疾患又は障害（例えば、癌）に罹っていない個体（単数又は複数）などの対照、又は内部対照（例えば、ハウスキーピングバイオマーカー）と比べて個体におけるバイオマーカーの増加した発現又は増加したレベルのことである。

40

【0082】

「減少した発現」、「減少した発現レベル」、又は「減少したレベル」とは、疾患又は障害（例えば、癌）に罹っていない個体（単数又は複数）などの対照、又は内部対照（例えば、ハウスキーピングバイオマーカー）と比べて個体におけるバイオマーカーの減少した発現又は減少したレベルのことである。

【0083】

用語「ハウスキーピングバイオマーカー」とは、典型的にはあらゆる細胞型に類似して存在するバイオマーカー又はバイオマーカーの群（例えば、ポリヌクレオチド及び／又はポリペプチド）のことである。幾つかの実施態様では、ハウスキーピングバイオマーカー

50

は「ハウスキーピング遺伝子」である。「ハウスキーピング遺伝子」とは本明細書では、その活性が細胞機能の維持に不可欠なタンパク質をコードし、典型的にはあらゆる細胞型に類似して存在する遺伝子又は遺伝子の群のことである。

【0084】

本明細書で使用される「増幅」とは一般に、所望の配列の複数のコピーを產生するプロセスのことである。「複数のコピー」は少なくとも2つのコピーを意味する。「コピー」は鑄型配列に対して必ずしも完全な配列相補性又は同一性を意味するわけではない。例えば、コピーには、デオキシイノシンなどの類似物、意図的配列変化（例えば、鑄型にハイブリダイズすることが可能であるが相補的ではない配列を含むプライマーを通じて導入される配列変化）、及び／又は増幅中に生じる配列エラーが含まれうる。

10

【0085】

用語「診断」は本明細書では、分子状態又は病理学的状態、疾患又は状態（例えば、癌）の同定又は分類を指すのに使用される。例えば、「診断」は特定種類の癌の同定を指すことがある。「診断」は、例えば、組織病理学的基準による、又は分子特長（例えば、バイオマーカー（例えば、特定の遺伝子又は前記遺伝子によりコードされるタンパク質）のうちの1つ又は組合せの発現に特徴のあるサブタイプ）による癌の特定のサブタイプの分類を指すこともある。

【0086】

試料には、一次細胞もしくは培養細胞又は細胞系統、細胞上澄み、細胞可溶化物、血小板、血清、血漿、硝子体液、リンパ液、滑液、卵胞液、精液、羊水、乳、全血、血液由来細胞、尿、脳脊髄液、唾液、痰、涙、発汗、粘液、腫瘍可溶化物、及び組織培養培地、均質化された組織などの組織抽出物、腫瘍組織、細胞抽出物、ならびにその組合せが含まれるがこれらに限定されない。

20

【0087】

「基準試料」、「基準細胞」、「基準組織」、「対照試料」、「対照細胞」、又は「対照組織」とは、本明細書で使用されるように、比較目的で使用される試料、細胞、組織、標準、又はレベルのことである。一実施態様では、基準試料、基準細胞、基準組織、対照試料、対照細胞、又は対照組織は、同じ被験体又は個体の身体（例えば、組織又は細胞）の健康な及び／又は非疾患部分から得られる。例えば、疾患細胞又は組織に隣接する健康な及び／又は非疾患性細胞又は組織（例えば、腫瘍に隣接する細胞又は組織）である。別の実施態様では、基準試料は同じ被験体又は個体の身体の非治療組織及び／又は細胞から得られる。更に別の実施態様では、基準試料、基準細胞、基準組織、対照試料、対照細胞、又は対照組織は被験体でも個体でもない個体の身体（例えば、組織又は細胞）の健康な及び／又は非疾患性部分から得られる。更に別の実施態様では、基準試料、基準細胞、基準組織、対照試料、対照細胞、又は対照組織は、被験体でも個体でもない個体の身体の非治療組織及び／又は細胞から得られる。

30

【0088】

語句「実質的に類似する」は、本明細書で使用されるように、当業者であれば2つの値の差を、前記値（例えば、Kd値）により測定される生物学的特徴という文脈内で統計的に有意ではないと見なすほど2つの数値（一般には、1つは分子に関連しもう1つは基準／コンパレーター分子に関連する）間の十分高度な類似性のことである。前記2つの値の差は、基準／コンパレーター値の関数として、例えば、約20%未満、約10%未満、及び／又は約5%未満であってもよい。

40

【0089】

語句「実質的に異なる」とは、当業者であれば2つの値の差を、前記値（例えば、Kd値）により測定される生物学的特徴という文脈内で統計的に有意であると見なすほど2つの数値（一般には、1つは分子に関連しもう1つは基準／コンパレーター分子に関連する）間の十分に高度な差のことである。前記2つの値の差は、基準／コンパレーター分子の値の関数として、例えば、約10%よりも大きい、約20%よりも大きい、約30%よりも大きい、約40%よりも大きい、及び／又は約50%よりも大きくてよい。

50

【0090】

本明細書で使用される用語「細胞傷害剤」とは、細胞機能を阻害するもしくは妨害するかつ／又は細胞死もしくは破壊を引き起こす物質のことである。細胞傷害剤には、放射性同位元素（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及び Lu の放射性同位元素）；化学療法剤もしくは薬物（例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンプラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシリ、ダウノルビシンもしくは他の挿入剤）；増殖阻害剤；核酸分解酵素などの酵素及びその断片；抗生物質；細菌、真菌、植物もしくは動物起源の小分子毒素もしくは酵素的に活性な毒素などの毒素、その断片及び／もしくは変異体も含む；ならびに下に開示される様々な抗腫瘍もしくは抗癌剤が含まれるがこれらに限定されない。

【0091】

「化学療法剤」とは、癌の治療に有用な化学化合物のことである。化学療法剤の例には、チオテバ及びシクロホスファミド（CYTOXAN（登録商標））などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンなどのアルキルスルホン酸塩；ベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）、及びウレドーパ（uredopa）などのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド（triethylenethiophosphoramide）、トリメチロメラミンを含むエチレンイミン及びメチラメラミン（methylmelamines）；アセトゲニン（特に、プラタシン及びプラタシノン（bulatacinone））；デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））；ベータ-ラパコン；ラパコール；コルヒチン、ベツリン酸；カンプトテシン（合成類似物トボテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレチン、及び9-アミノカンプトテシンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン（callystatin）；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼルシン及びビゼレシン合成類似物を含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸（podophyllinic acid）；テニポシド；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似物KW-2189及びCB1-TM1を含む）；エリュテロビン；パンクラチスタチン（pancratistatin）；サルコジクチイン（sarcodeictyin）；スponギスタチン（spongistatin）；クロラムブシリ、クロルナファジン、クロロホスファミド（chlorophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムビシン（novembichin）；フェネステリン（phenesterine）、プレドニマスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターなどのナイトロジエンマスター；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムスチンなどのニトロソウレア；エンジイン抗生物質などの抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシンガンマ1I及びカリケアマイシンオメガI1（例えば、Nicolaouら、Angew. Chem. Int'l. Ed. Engl.、33:183~186（1994）参照）；CDP323、経口アルファ-4インテグリン阻害剤；ダイネミシン（dynemicin）Aを含むダイネミシン；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォア及び関連色素タンパク質エネジイン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン（aclacinomysins）、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン（carabacin）、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン（detorubicin）、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン（ADRIAMYCIN（登録商標））、モルフォリノ-ドキソルビシン、シア

10

20

30

40

50

ノモルフォリノ - ドキソルビシン、2 - ピロリノ (pyrrolino) - ドキソルビシン、ドキソルビシン H C 1 リポソームインジェクション (DOXIL (登録商標))、リポソーマルドキソルビシン (liposomal doxorubicin) TLC D - 99 (MYOCET (登録商標))、ペグ化リポソーマルドキソルビシン (CAELYX (登録商標))、及びデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン (esorubicin)、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシン Cなどのマイトイマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン (queelamycin)、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトレキセート、ゲムシタビン (GEMZAR (登録商標)) 10
 、テガフル (UFTORAL (登録商標))、カペシタビン (XELODA (登録商標))、エポチロン、及び 5 - フルオロウラシル (5 - FU) などの抗代謝剤；デノブテリン、メトレキセート、ブテロブテリン、トリメトレキセートなどの葉酸類似物；フルダラビン、6 - メルカブトブリン、チアミブリン、チオグアニンなどのブリン類似物；アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなどのピリミジン類似物；カルステロン、プロピオニ酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗アドレナル (anti-adrenals)；フォリン酸などの葉酸補液；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド (aldophosphamide glycoside)；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル (bestrabucil)；ビスマントレン；エダトレキセート；デフォファミン (defofamine)；デメコルシン；ジアジクオン；エルフロルニチニン (elfornithine)；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン (lonidaanine)；マイタンシン及びアンサマイタンシンなどのメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール (mopidanmol)；ニトラエリン (nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット (phenamett)；ピラルビシン；ロソキサントロン；2 - エチルヒドライド；プロカルバジン；PSK (登録商標) ポリサッカライド複合体 (JHS 天然物、Eugene、OR)；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2' - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン (特に、T - 2 毒素、ベラクリン (verrucurin) A、ロリジン A 及びアングイジン)；ウレタン；ビンデシン (ELDISINE (登録商標)、FILDESIN (登録商標))；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ビポブロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド (「Ara - C」)；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル (TAXOL (登録商標))、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤 (ABRAXANE (商標))、及びドセタキセル (TAXOTERE (登録商標))；クロランブシル (chlorambucil)；6 - チオグアニン；メルカブトブリン；メトレキセート；シスプラチン、オキサリプラチニン (例えば、ELOXATIN (登録商標))、及びカルボプラチニンなどの白金薬剤；ビンプラスチン (VELBAN (登録商標))、ビンクリスチン (ONCOVIN (登録商標))、ビンデシン (ELDISINE (登録商標)、FILDESIN (登録商標))、及びビノレルビン (NAVELBINE (登録商標)) を含む、チューブリン重合が微小管を形成するのを妨げるビンカ；エトポシド (VP - 16)；イホスファミド；ミトキサントロン；ロイコボリン；ノバントロン (novantrone)；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノブテリン；イバンドロン酸；トポイソメラーゼ阻害剤 RES 2000；ジフルオロメチルオルニチニン (DMFO)；ベキサロテン (TARGETIN (登録商標)) を含む、レチノイン酸などのレチノイド；クロドロン酸 (例えば、BONEFOS (登録商標) 又は OSTAC (登録商標))、エチドロン酸 (DIDROCAL (登録商標))、NE - 58095、ゾレドロン酸 / ゾレドロネート (ZOMETA (20
 30
 40
 50

登録商標)) 、アレンドロン酸 (F O S A M A X (登録商標)) 、パミドロン酸 (A R E D I A (登録商標)) 、チルドロン酸 (S K E L I D (登録商標)) 、又はリセドロン酸 (A C T O N E L (登録商標)) などのビスホスホネート ; トロキサシタビン (1 , 3 - デオキソランスクレオシドシトシン類似物) ; アンチセンスオリゴスクレオチド、特に、例えば、P K C - アルファ、R a f 、H - R a s 、及び上皮増殖因子受容体 (E G F - R) などの、異常な細胞増殖に関係するシグナル伝達経路における遺伝子発現を阻害するアンチセンスオリゴスクレオチド ; T H E R A T O P E (登録商標) ワクチン及び遺伝子療法ワクチン、例えば、A L L O V E C T I N (登録商標) ワクチン、L E U V E C T I N (登録商標) ワクチン、及びV A X I D (登録商標) ワクチンなどのワクチン ; トポイソメラーゼ1阻害剤 (例えば、L U R T O T E C A N (登録商標)) ; r m R H (例えば、A B A R E L I X (登録商標)) ; B A Y 4 3 9 0 0 6 (ソラフェニブ ; B a y e r) ; S U - 1 1 2 4 8 (スニチニブ、S U T E N T (登録商標) 、P f i z e r) ; ペリフォシン、C O X - 2 阻害剤 (例えば、セレコキシブ又はエトリコキシブ) 、プロテオソーム阻害剤 (例えば、P S 3 4 1) ; ボルテゾミブ (V E L C A D E (登録商標)) ; C C I - 7 7 9 ; ティピファニブ (R 1 1 5 7 7) ; オラフェニブ、A B T 5 1 0 ; オブリメルセンナトリウムなどのB c 1 - 2 阻害剤 (G E N A S E N S E (登録商標)) ; ピクサントロン ; E G F R 阻害剤 (下の定義参照) ; チロシンキナーゼ阻害剤 (下の定義参照) ; ラパマイシンなどのセリン - スレオニンキナーゼ阻害剤 (シロリムス、R A P A M U N E (登録商標)) ; ロナファーニブなどのファルネシルトランスフェラーーゼ阻害剤 (S C H 6 6 3 6 、S A R A S A R (商標)) ; ならびに上記の何れかの薬学的に許容される塩、酸又は誘導体 ; ならびに、C H O P (シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、及びプレドニゾロンの併用療法を表す略字) ; ならびにF O L F O X (オキサリプラチン (E L O X A T I N (商標)) を5 - F U 及びロイコボリンと併用した治療レジメンを表す略字) などの上記のうちの2つ以上の薬剤の組合せが含まれる。

【 0 0 9 2 】

本明細書に定義される化学療法剤には、癌の増殖を促進することができるホルモンの効果を調節する、減少する、ブロックする又は阻害するように作用する「抗ホルモン剤」又は「内分泌療法」が含まれる。化学療法剤は、タモキシフェン (N O L V A D E X (登録商標)) 、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン (F A R E S T O N (登録商標)) 、イドキシフェン、ドロロキシフェン (d r o l o x i f e n e) 、ラロキシフェン (E V I S T A (登録商標)) 、トリオキシフェン (t r i o x i f e n e) 、ケイキシフェン (k e o x i f e n e) 、及びS E R M 3などの選択的エストロゲン受容体モジュレーター (S E R M) を含む、混合アゴニスト / アンタゴニストプロファイルを有する抗エストロゲン ; フルベストラント (F A S L O D E X (登録商標)) 、及びE M 8 0 0 (そのような薬剤はエストロゲン受容体 (E R) 二量体化をブロックし、D N A 結合を阻害し、E R ターンオバーを増加させ、及び / 又はE R レベルを抑制しうる) などのアゴニスト特性のない純粋な抗エストロゲン ; ホルメスタン及びエキセメスタン (A R O M A S I N (登録商標)) などのステロイドアロマターゼ阻害剤、ならびにアナストロゾール (a n a s t r a z o l e) (A R I M I D E X (登録商標)) 、レトロゾール (F E M A R A (登録商標)) 及びアミノグルテチミドなどの非ステロイドアロマターゼ阻害剤を含むアロマターゼ阻害剤、ならびに他のアロマターゼ阻害剤にはボロゾール (R I V I S O R (登録商標)) 、酢酸メゲストロール (M E G A S E (登録商標)) 、ファドロゾール、及び4 (5) - イミダゾールが含まれる ; リュープロリド (L U P R O N (登録商標) 及びE L I G A R D (登録商標)) 、ゴセレリン、ブセレリン、及びトリプテレリンを含む、黄体ホルモン放出ホルモンアゴニスト ; 酢酸メゲストロール及び酢酸メドロキシプロゲステロンなどのプロゲスチン、ジエチルスチルベストロール及びプレマリンなどのエストロゲン、ならびにフルオキシメステロン、オールトランスレチオニン酸 (a l l t r a n s r e t i o n i c a c i d) 及びフェンレチニドなどのアンドロゲン / レチノイドを含む、性ステロイド ; オナプリiston (o n a p r i s t o n e) ; 抗プロゲステロン (a n t i - p r o g e s t e r o n e s) ; エストロゲン受容体下方調節因子 (E R D 10) 20) 40) 50) 50)

) ; フルタミド、ニルタミド及びビカルタミドなどの抗アンドロゲン ; ならびに上記の何れかの薬学的に許容される塩、酸又は誘導体 ; ならびに上記のうちの 2 つ以上の組合せを含むが、これらに限定されず、ホルモンそれ自体でもよい。

【 0 0 9 3 】

用語「細胞増殖抑制剤」とは、インピトロ又はインピボの何れかにおいて、細胞の増殖を停止する化合物又は組成物を指す。従って、細胞増殖抑制剤は、S 期の細胞の割合を有意に減少させるものであってもよい。細胞増殖抑制剤の更なる例は、G 0 / G 1 停止又はM 期停止を誘導することによって、細胞周期の進行を遮断する薬剤を含む。ヒト化抗H e r 2 抗体のトラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))はG 0 / G 1 停止を誘導する細胞分裂阻害剤の例である。古典的なM 期ブロッカーには、ビンカ(ビンクリスチニン及びビンプラスチニン)、タキサン、及び例えはドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンなどのトポイソメラーゼ I I 阻害剤が含まれる。またG 1 停止させるある薬剤は、S 期停止にも波及し、例えは、D N A アルキル化剤、例えは、タモキシフェン、ブレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチニン、メトトレキセート、5 - フルオロウラシル、及びアラ - C である。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編、第1章、表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」、Murakamiら(WB Saunders: Philadelphia, 1995)の例えは13頁に見出すことができる。タキサン類(パクリタキセル及びドセタキセル)は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、ローン・ブーラン ローラー)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、ブリストル - マイヤー スクウェイブ)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

【 0 0 9 4 】

本明細書で使用される場合、用語「E G F R 阻害剤」は、E G F R に結合するか又はそうでなければE G F R に直接相互作用し、そのシグナル伝達活性を妨げるか又は減少させる化合物を意味するか、あるいは、「E G F R アンタゴニスト」と呼ばれる。このような薬剤の例は、E G F R に結合する抗体及び小分子を含む。E G F R に結合する抗体の例は、M A b 5 7 9 (ATCC C R L H B 8 5 0 6)、M A b 4 5 5 (ATCC C R L H B 8 5 0 7)、M A b 2 2 5 (ATCC C R L 8 5 0 8)、M A b 5 2 8 (ATCC C R L 8 5 0 9)(米国特許第4943533号、M e n d e l s o h n らを参照)及びその変異体、例えはキメラ化225(C225又はセツキシマブ; E R B I T U X(登録商標))及び再形成ヒト225(H225)(国際公開第96/40210号、I m c l o n e S y s t e m s I n c . を参照); I M C - 1 1 F 8 , 完全ヒトE G F R 標的抗体(I m c l o n e); タイプI I 変異体E G F R に結合する抗体(米国特許第5212290号); 米国特許第5891996号に記載されているようなE G F R に結合するヒト化及びキメラ化抗体; 及びE G F R に結合するヒト抗体、例えはA B X - E G F 又はパニツムマブ(国際公開第98/50433, A b g e n i x / A m g e n を参照); E M D 5 5 9 0 0 (S t r a g l i o t t o ら、E u r . J . C a n c e r 3 2 A : 6 3 6 - 6 4 0 (1996)); E M D 7 2 0 0 (マツズマブ), E G F R 結合についてE G F 及びT G F - 双方と競合するE G F R に対するヒト化E G F R (E M D / M e r c k); ヒトE G F R 抗体, H u M a x - E G F R (G e n M a b); E 1 . 1 、 E 2 . 4 、 E 2 . 5 、 E 6 . 2 、 E 6 . 4 、 E 2 . 1 1 、 E 6 . 3 及びE 7 . 6 . 3 として知られ、米国特許第6235883号に記載されている完全なヒト抗体; M D X - 4 4 7 (M e d a r e x I n c .); 及びm A b 8 0 6 又はヒト化m A b 8 0 6 (J o h n s 等, J . B i o l . C h e m . 2 7 9 (29): 3 0 3 7 5 - 3 0 3 8 4 (2004))を含む。抗E G F R 抗体は細胞傷害剤とコンジュゲートされることができ、よってイムノコンジュゲートを生じる(例えは、欧州特許出願公開第659439A2号、M e r c k P a t e n t G m b Hを参照)。E G F R アンタゴニストは、小分子、例えは米国特許第5616582号、同第5457105号、同第5475001号、同第5654307号

10

20

30

40

50

、同第5679683号、同第6084095号、同第6265410号、同第6455534号、同第6521620号、同第6596726号、同第6713484号、同第5770599号、同第6140332号、同第5866572号、同第6399602号、同第6344459号、同第6602863号、同第6391874号、同第6344455号、同第5760041号、同第6002008号、及び同第5747498、並びに次のPCT公報：国際公開第98/14451号、国際公開第98/50038号、国際公開第99/09016号、及び国際公開第99/24037号に記載されている化合物を含む。特定の小分子EGFRアンタゴニストは、OSI-774 (CP-358774、エルロチニブ、タルセバ(登録商標)Genentech/OSI Pharmaceuticals)；PD 183805 (CI 1033、2-プロペンアミド、N-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[3-(4-モルホリニル)プロポキシ]-6-キナゾリニル]、二塩酸塩, Pfizer Inc.)；ZD 1839、ゲフィチニブ (IRESSATM) 4-(3'-クロロ-4'-フルオロアニリノ)-7-メトキシ-6-(3-モルホリノプロポキシ)キナゾリン、AstraZeneca)；ZM 105180 ((6-アミノ-4-(3-メチルフェニル-アミノ)-キナゾリン、Zeneca)；BIBX-1382 (N8-(3-クロロ-4-フルオロ-フェニル)-N2-(1-メチル-ピペリジン-4-イル)-ピリミド[5,4-d]ピリミジン-2,8-ジアミン, Boehringer Ingelheim)；PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-フェニルエチル)アミノ]-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-6-イル]-フェノール)；(R)-6-(4-ヒドロキシフェニル)-4-[(1-フェニルエチル)アミノ]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン)；CL-387785 (N-[4-[(3-プロモフェニル)アミノ]-6-キナゾリニル]-2-ブチナミド)；EKB-569 (N-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-3-シアノ-7-エトキシ-6-キノリニル]-4-(ジメチルアミノ)-2-ブチナミド) (Wyeth)；AG 1478 (Pfizer)；及びAG 1571 (SU 5271；Pfizer)、二重EGFR/HER2チロシンキナーゼ阻害剤、例えば、ラパチニブ(タイケルブ(TYKERB))(登録商標)、GSK572016又はN-[3-クロロ-4-[(3フルオロフェニル)メトキシ]フェニル]6[5[[2メチルスルホニル]エチル]アミノ]メチル]-2-フラニル]-4-キナゾリンアミン；グラクソスミスクライン)を含む。

【0095】

本明細書で用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての新生細胞成長及び増殖、及び全ての前癌性及び癌性の細胞及び組織を意味する。「がん」、「がん性」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」という用語はここで意味するように相互排他的ではない。

【0096】

用語「細胞増殖性障害」及び「増殖性疾患」は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する障害を言う。一実施態様において、細胞増殖性疾患は癌である。

【0097】

用語「癌」及び「癌性」は、無秩序な細胞成長／細胞増殖を典型的に特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を記述する。がんの例には、限定されないが、癌腫、リンパ腫(例えば、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫)、芽細胞腫、肉腫、及び白血病を含む。そのような癌のより具体的な例は、扁平上皮がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜がん、肝細胞がん、消化器がん、脾臓がん、神経膠腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、肝癌、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝癌、白血病、及びその他のリンパ増殖性疾患、及び様々な型の頭頸部がんを包含する。

【0098】

用語「結腸腫瘍」又は「結腸がん」は、結腸の任意の腫瘍又はがん(盲腸から直腸までの大腸)を指す。

10

20

30

40

50

【0099】

用語「結腸直腸腫瘍」又は「結腸直腸がん」は、結腸（盲腸から直腸までの大腸）及び直腸を含む大腸の任意の腫瘍又はがんを指し、例えば、腺癌及び一般的でない形態のリンパ腫及び扁平上皮癌などを含む。

【0100】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的又予防的結果を達成するために必要な用量及び期間での有効な量を指す。

【0101】

用語「薬学的製剤」は、その中に有効で含有される活性成分の生物学的活性を許容するような形態であって、製剤を投与する被験体にとって許容できない毒性である他の成分を含まない調製物を指す。10

【0102】

「薬学的に許容可能な担体」は、被験体に非毒性であり、有効成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体は、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含む。

【0103】

「個体」又は「被験体」は、哺乳動物である。哺乳動物は、限定されないが、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、靈長類（例えば、ヒト、及びサルなどの非ヒト靈長類）、ウサギ、並びにげっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含む。ある実施態様において、個体又は被験体はヒトである。20

【0104】

本明細書で使用されるように、「治療」（及び、「治療する（treat）」又は「治療すること（treating）」などのその文法的変形）とは、治療を受けている個体の自然経過を変える試みにおける臨床的介入のことであり、予防のために又は臨床病理の経過中に実施することができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生又は再発を予防すること、症状の軽減、疾患のいかなる直接的又は間接的病理学的結果も減少すること、転移を予防すること、疾患進行の速度を減少すること、疾患状態の寛解又は緩和、及び寛解又は予後改善が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施態様では、本発明の抗体は、疾患の発生を遅延させる又は疾患の進行を遅らせるために使用される。

【0105】

「減少させる」又は「阻害する」は、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又はそれよりも多い全体的減少を引き起こす能力を意味する。幾つかの実施態様において、減少させる又は阻害するとは、基準（例えば、生物学活性（例えば、wntシグナル伝達）又は結合の基準レベル）に対する相対的減少を言及することができる。幾つかの実施態様において、減少させる又は阻害するとは、治療する疾患の症状、転移の存在又は大きさ、又は原発腫瘍のサイズを言及することができる。

【0106】

当業者によって理解されるように、本明細書中の「およそ（約）」の値又はパラメータへの言及は、その値又はパラメーター自体に対する実施態様を含む（及び説明する）。例えば、「およそ（約）X」との記載には「X」の記載が含まれる。40

【0107】

本明細書に記載される本発明の態様及び実施態様は、態様及び実施態様「からなる」及び「本質的になる」を含む。本明細書で使用されるように、単数形の「a」、「a n」及び「the」は、特に指示がない限り、複数への参照が含まれる。

【0108】

I I . 組成物及び方法

本明細書中で提供されるのは、抗RSP0抗体及びその使用である。ある実施態様において、RSP02及び「又はRSP03に結合する抗体が提供される。提供される抗体は、例えば、結腸直腸がんなどのがんの診断又は治療のために、有用である。50

【0109】

幾つかの態様において、本明細書に提供されるのは抗RSP0抗体のパネルである。限定されないが、RSP02及び/又はRSP03に結合する能力、IHCによってRSP02及び/又はRSP03を検出する能力、RSP02及び/又はRSP03とLGRポリペプチド、例えばLGR4及び/又はLGR5との相互作用を阻害する能力、RSP02及び/又はRSP03とE3ユビキチナーゼポリペプチド、例えばRNF43及び/又はZNRF3との相互作用を阻害する能力、並びにRSP02、RSP03、RSP02多型、及び/又はRSP02転座産物、及びサブセットによって刺激されるwntシグナル伝達を阻害する能力に基づく複数の特性において特徴づけられる抗体のパネルが同定された。

10

【0110】

一態様において、本明細書に提供されるのは、RSP02及び/又はRSP03に結合する単離された抗体である。幾つかの実施態様において、抗体はRSP02に結合する。幾つかの実施態様において、抗体はRSP02に結合し、RSP03には有意に結合しない。幾つかの実施態様において、抗体はRSP03に結合する。幾つかの実施態様において、抗体はRSP03に結合し、RSP02には有意に結合しない。幾つかの実施態様において、抗体はRSP02とRSP03の両方に結合する。幾つかの実施態様において、抗体は、多重特異性抗体である。幾つかの実施態様において、多重特異性抗体は二重特異性抗体である。幾つかの実施態様において、二重特異性抗体は、RSP02に結合する第一の可変ドメイン、及びRSP03に結合する第二の可変ドメインを含む。

20

【0111】

ある実施態様において、RSP02及び/又はRSP03に結合する抗体は、RSP02に結合する抗体である。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体はRSP02に結合し、ここでRSP02は配列番号1に記載の配列を有する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体はRSP02に結合し、ここでRSP02はシグナルペプチド配列を欠いている（例えば、配列番号1のアミノ酸22-243内のアミノ酸に結合する）。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、RSP02の一以上のフリン様システィンリッチドメインに結合する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、配列番号1のアミノ酸34から134内の領域に結合する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、配列番号1のアミノ酸39から134内の領域に結合する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、配列番号1のアミノ酸34から84内の領域に結合する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、配列番号1のアミノ酸90から134内の領域に結合する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、RSP02のトロンボスpongin1型ドメインに結合しない（例えば、配列番号1のアミノ酸144-204内の領域に結合しない）。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、RSP02のトロンボスpongin1型ドメインに結合する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、配列番号1のアミノ酸144-204内の領域に結合する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、wntシグナル伝達を阻害する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、個体におけるwntシグナル伝達を阻害し、及び/又はRSP02多型（例えば、RSP02 L186P多型）を有するがんを阻害する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、RSP02と、LGR4、LGR5、及び/又はLGR6の一以上の相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、RSP02と、LGR4、LGR5、及び/又はLGR6の一以上の相互作用を阻害しない（例えば、LGR4、LGR5、及び/又はLGR6の一以上のRSP02の結合を増強する）。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、RSP02と、膜貫通E3ユビキチナーゼ（例えば、ZNRF3及び/又はRNF43の一以上）との相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、RSP02と、シンデカン（例えば、Sdc4）との相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗RSP02抗体は、RSP02と、LGR4、LGR5、及び/又はLGR6の一以上の相互作用を阻害し、RSP02と、膜貫通E3ユビキチナーゼ（例えば

30

40

50

、Z N R F 3 及び / 又は R N F 4 3 の一以上)との相互作用を阻害する(例えば、1 1 F 1 1、3 6 D 2、4 9 G 5、及び / 又は 2 6 E 1 1)。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 2 抗体は、R S P O 2 と、膜貫通 E 3 ユビキチナーゼ(例えば、Z N R F 3 及び / 又は R N F 4 3 の一以上)との相互作用を阻害し、R S P O 2 と、L G R 4、L G R 5、及び / 又は L G R 6 の一以上との相互作用を阻害しない(例えば、L G R 4、L G R 5、及び / 又は L G R 6 の一以上への R S P O 2 の結合を増強する)(例えば、1 A 1)。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 2 抗体は、がん幹細胞の増殖を阻害する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 2 抗体は、がん細胞(例えば、がん幹細胞)の分化(例えば、前駆細胞への最終分化及び / 又は分化)を誘導し及び / 又は促進する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、がん細胞(例えば、がん幹細胞)の腸細胞、杯細胞、及び / 又は腸内分泌細胞への分化を誘導し及び / 又は促進する。

【0112】

ある実施態様において、R S P O 2 及び / 又は R S P O 3 に結合する抗体は、R S P O 3 に結合する抗体である。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は R S P O 3 に結合し、ここで R S P O 3 は配列番号 2 に記載の配列を有する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は R S P O 3 に結合し、ここで R S P O 3 はシグナルペプチド配列を欠いている(例えば、配列番号 2 のアミノ酸 2 2 - 2 7 2 内のアミノ酸に結合する)。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、R S P O 3 の一以上のフリン様システィンリッチドメインに結合する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、配列番号 2 のアミノ酸 3 5 から 1 3 5 内の領域に結合する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、配列番号 2 のアミノ酸 3 5 から 8 6 内の領域に結合する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、配列番号 2 のアミノ酸 9 2 から 1 3 5 内の領域に結合する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、R S P O 3 のトロンボスponジン 1 型ドメインに結合しない(例えば、配列番号 2 のアミノ酸 1 4 7 - 2 0 7 内のアミノ酸に結合しない)。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、R S P O 3 のトロンボスponジン 1 型ドメインに結合する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、配列番号 2 のアミノ酸 1 4 7 - 2 0 7 内の領域に結合する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、w n t シグナル伝達を阻害する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、R S P O 3 と、L G R 4、L G R 5、及び / 又は L G R 6 の一以上との相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、R S P O 3 と、L G R 4、L G R 5、及び / 又は L G R 6 の一以上との相互作用を阻害しない(例えば、L G R 4、L G R 5、及び / 又は L G R 6 の一以上への R S P O 3 の結合を増強する)。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、R S P O 3 と、膜貫通 E 3 ユビキチナーゼ(例えば、Z N R F 3 及び / 又は R N F 4 3 の一以上)との相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、R S P O 3 と、シンデカン(例えば、S d c 4)との相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、R S P O 3 と、L G R 4、L G R 5、及び / 又は L G R 6 の一以上との相互作用を阻害し、R S P O 3 と、膜貫通 E 3 ユビキチナーゼ(例えば、Z N R F 3 及び / 又は R N F 4 3 の一以上)との相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、がん幹細胞の増殖を阻害する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、がん細胞(例えば、がん幹細胞)の分化(例えば、前駆細胞への最終分化及び / 又は分化)を誘導し及び / 又は促進する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、がん細胞(例えば、がん幹細胞)の T A 細胞への分化を誘導し及び / 又は促進する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、がん細胞(例えば、がん幹細胞)の腸細胞、杯細胞、及び / 又は腸内分泌細胞への分化を誘導し及び / 又は促進する。

【0113】

幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、配列番号 2 のアミノ酸 4 9 から 1 0 8 内の領域に結合する。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、R S P O 3 (例えば、配列番号 2) の S e r 4 9、A s n 5 2、C y s 5 4、L e u 5 5、S e r 5 6、P h e 6 3、L e u 6 5、G l n 7 2、I l e 7 3、G l y 7 4、T y r 8 4、T y r

10

20

30

40

50

89、Pro90、Asp91、Ile92、Lys94及びLys108から選択される一以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。幾つかの実施態様において、抗RSPO3抗体は、RSPO3(例えば、配列番号2)のアミノ酸Ser49、Asn52、Cys54、Leu55、Ser56、Phe63、Leu65、Gln72、Ile73、Gly74、Tyr84、Tyr89、Pro90、Asp91、Ile92、Lys94及びLys108を含むエピトープに結合する。幾つかの実施態様において、抗RSPO3抗体は、RSPO3のアミノ酸残基(例えば、配列番号2):Ser49、Asn52、Cys54、Leu55、Ser56、Phe63、Leu65、Gln72、Ile73、Gly74、Tyr84、Tyr89、Pro90、Asp91、Ile92、Lys94、Lys97及びLys108を含むエピトープに結合する。幾つかの実施態様において、抗RSPO3抗体は、RSPO3(例えば、配列番号2)のアミノ酸Ser49、Asn52、Cys54、Leu55、Ser56、Phe63、Leu65、Gln72、Ile73、Gly74、Tyr84、Tyr89、Pro90、Asp91、Ile92、Lys94、Lys97及びLys108を含むエピトープに結合する。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合した抗RSPO3抗体は、RSPO3(例えば、配列番号2)のSer49、Asn52、Cys54、Leu55、Ser56、Phe63、Leu65、Gln72、Ile73、Gly74、Tyr84、Tyr89、Pro90、Asp91、Ile92、Lys94及びLys108の一以上のアミノ酸から4オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合した抗RSPO3抗体は、RSPO3のアミノ酸残基(例えば、配列番号2):Ser49、Asn52、Cys54、Leu55、Ser56、Phe63、Leu65、Gln72、Ile73、Gly74、Tyr84、Tyr89、Pro90、Asp91、Ile92、Lys94、Lys97及びLys108の一以上のアミノ酸から4オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合した抗RSPO3抗体は、RSPO3のアミノ酸残基(例えば、配列番号2):Ser49、Asn52、Cys54、Leu55、Ser56、Phe63、Leu65、Gln72、Ile73、Gly74、Tyr84、Tyr89、Pro90、Asp91、Ile92、Lys94、Lys97及びLys108から4オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合した抗RSPO3抗体は、RSPO3(例えば、配列番号2)のAsn52、Leu55、Phe63、Gln72、Tyr89、Pro90、Asp91、Lys94及びLys97の一以上のアミノ酸から3.5オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合した抗RSPO3抗体は、RSPO3(例えば、配列番号2)のAsn52、Leu55、Phe63、Gln72、Tyr89、Pro90、Asp91、Lys94及びLys97から3.5オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合した抗RSPO3抗体は、RSPO3(例えば、配列番号2)のGln72、Pro90、Asp91及びLys94の一以上のアミノ酸から3オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合した抗RSPO3抗体は、RSPO3(例えば、配列番号2)のGln72、Pro90、Asp91及びLys94から3オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、RSPO3に結合した抗RSPO3抗体は、上記に提供された一以上のアミノ酸から約4、3.75、3.5、3.25、又は3オングストロームの何

れかに位置する。幾つかの実施態様において、一以上のアミノ酸及び／又は一以上のアミノ酸残基は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、及び／又は12のアミノ酸及び／又はアミノ酸残基の何れかである。幾つかの実施態様において、エピトープは結晶学（例えば、実施例に記載の結晶学的方法）によって決定される。

【0114】

幾つかの実施態様において、抗R S P O 3抗体は、配列番号2のアミノ酸47から108内のアミノ酸に結合する。幾つかの実施態様において、抗R S P O 3抗体は、R S P O 3（例えば、配列番号2）のThr 47、Asn 52、Cys 54、Leu 55、Ser 56、Phe 63、Leu 65、Gln 72、Tyr 84、Tyr 89、Pro 90、Asp 91、Ile 92、Asn 93、Lys 94、Lys 97及びLys 108から選択される一以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。幾つかの実施態様において、抗R S P O 3抗体は、R S P O 3（例えば、配列番号2）のアミノ酸Thr 47、Asn 52、Cys 54、Leu 55、Ser 56、Phe 63、Leu 65、Gln 72、Tyr 84、Tyr 89、Pro 90、Asp 91、Ile 92、Asn 93、Lys 94、Lys 97及びLys 108を含むエピトープに結合する。幾つかの実施態様において、抗R S P O 3抗体は、R S P O 3のアミノ酸残基（例えば、配列番号2）：Thr 47、Asn 52、Cys 54、Leu 55、Ser 56、Phe 63、Leu 65、Gln 72、Tyr 84、Tyr 89、Pro 90、Asp 91、Ile 92、Asn 93、Lys 94、Lys 97及びLys 108を含むエピトープに結合する。幾つかの実施態様において、R S P O 3に結合した抗R S P O 3抗体は、R S P O 3（例えば、配列番号2）のSer 49、Asn 52、Cys 54、Leu 55、Ser 56、Phe 63、Leu 65、Gln 72、Tyr 84、Tyr 89、Pro 90、Asp 91、Ile 92、Asn 93、Lys 94、Lys 97及びLys 108の一以上のアミノ酸から4オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、R S P O 3に結合した抗R S P O 3抗体は、R S P O 3（例えば、配列番号2）のThr 47、Asn 52、Cys 54、Leu 55、Ser 56、Phe 63、Leu 65、Gln 72、Tyr 84、Tyr 89、Pro 90、Asp 91、Ile 92、Asn 93、Lys 94、Lys 97及びLys 108から4オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、R S P O 3に結合した抗R S P O 3抗体は、R S P O 3（例えば、配列番号2）のThr 47、Asn 52、Leu 55、Phe 63、Gln 72、Tyr 89、Pro 90、Asp 91、Ile 92、Lys 94及びLys 97の一以上のアミノ酸から3.5オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、R S P O 3に結合した抗R S P O 3抗体は、R S P O 3（例えば、配列番号2）のアミノ酸Thr 47、Asn 52、Leu 55、Phe 63、Gln 72、Tyr 89、Pro 90、Asp 91、Ile 92、Lys 94及びLys 97から3.5オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、R S P O 3に結合した抗R S P O 3抗体は、R S P O 3（例えば、配列番号2）のThr 47、Leu 55、Gln 72、Pro 90、Asp 91及びLys 94の一以上のアミノ酸から3オングストローム以内に位置する。幾つかの実施態様において、R S P O 3に結合した抗R S P O 3抗体は、上記に提供された一以上のアミノ酸から約4、3.75、3.5、3.25、又は3オングストロームの何れかに位置する。幾つかの実施態様において、一以上のアミノ酸及び／又は一以上のアミノ酸残基は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、及び／又は12のアミノ酸及び／又はアミノ酸残基の何れかである。幾つかの実施態様において、抗R S P O 3抗体はまた、R S P O 2に結合する。幾つかの実施態様において、エピトープは結晶学（例えば、実施例に記載の結晶学的方法）によって決定される。

【0115】

幾つかの実施態様において、結晶学的によって決定されるエピトープは、R S P O 3の

アミノ酸M33-E210を用いて決定される。幾つかの実施態様において、結晶学的に
よって決定されるエピトープは、100nLのシッティングドロップを使用して複数の疎
行列結晶スクリーンを設定するLabcyte Echo液体ハンドラーを用いて行われ
る。スクリーンは、18で保存された。幾つかの実施態様において、結晶は、母液とし
て100mMのMIBのpH9及び25%PEG1500を含有するドロップ中で得るこ
とができる。幾つかの実施態様において、結晶は、母液として200mMのギ酸ナトリウ
ム及び20%（w/v）のPEG3,350を含有するドロップ中で得ることができる。
幾つかの実施態様において、結晶は回収され、10秒間、抗凍結剤溶液に浸漬され、液体
窒素中で急速凍結されうる。幾つかの実施態様において、抗凍結剤溶液は、1μLの70
%グリセロールを1.8μLのリザーバー溶液と混合することによって作ることができる
。幾つかの実施態様において、結晶は、PEGベースの条件で、例えば、約20-25%
のPEG3,350中で成長させることができる。幾つかの実施態様において、結晶は、
約20%のPEG6000、約20-25%のPEG4000、及び約25%のPEG1
500中で成長させることができる。幾つかの実施態様において、pHは、約3.5-9
の範囲、例えば、約7から約8の間であってもよい。幾つかの実施態様において、塩濃度
は、約200mMである。
10

【0116】

ある実施態様において、RSPO2及び/又はRSPO3に結合する抗体は、RSPO
2及びRSPO3に結合する抗体（例えば、抗RSPO2/3抗体）である。幾つかの実
施態様において、抗RSPO2/3抗体は、配列番号1に記載の配列を有するRSPO2
に結合し、配列番号2に記載の配列を有するRSPO3に結合する。幾つかの実施態様に
において、抗RSPO2/3抗体は、wntシグナル伝達を阻害する。
20

【0117】

幾つかの態様において、抗体は、RSPO2及びRSPO3の両方と交差反応するこ
とができると同定された。これらの抗RSPO2/3抗体の活性の非限定的な例は、RSPO
2及びRSPO3に結合し、IHCによってRSPO2及びRSPO3を検出し、RS
PO2及びRSPO3とLGRポリペプチド、例えばLGR4及び/又はLGR5との相
互作用を阻害し、RSPO2及びRSPO3とE3ユビキチナーゼポリペプチド、例えば
RNF43及び/又はZNRF3との相互作用を阻害し、及び/又はRSPO2、RSPO
3、RSPO2多型、及びRSPO2転座産物によって刺激されるwntシグナル伝達
30を阻害する能力を含む。

【0118】

当業者であれば、幾つかの実施態様において、任意の抗RSPO2抗体及び/又は抗RSPO3抗体は、抗体形態、特に、RSPO2及びRSPO3の両方との反応性を可能に
するであろう二重特異性形態に操作することができることを更に理解するであろう。これら
の抗RSPO2/3二重特異性抗体は、RSPO2及びRSPO3に結合し、IHCによ
ってRSPO2及びRSPO3を検出し、RSPO2及びRSPO3とLGRポリペ
チド、例えばLGR4及び/又はLGR5との相互作用を阻害し、RSPO2及びRSPO
3とE3ユビキチナーゼポリペプチド、例えばRNF43及び/又はZNRF3との相
互作用を阻害し、及び/又はRSPO2、RSPO3、RSPO2多型、及びRSPO2
転座産物によって刺激されるwntシグナル伝達を阻害する能力を含むことができる。
40

【0119】

抗RSPO2/3抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗RSPO2/3抗体は
、RSPO2及びRSPO3と、LGR4、LGR5、及び/又はLGR6の一以上との
相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗体は、デュアルアーム抗体である。
幾つかの実施態様において、抗RSPO2/3抗体は、各可変ドメインに25E11の六
つのHVRを含む第一及び第二の可変ドメインを含む。幾つかの実施態様において、抗体
は二重特異性抗体である。幾つかの実施態様において、抗RSPO2/3抗体は、5D6
又は5E11の六つのHVRを含む第一の可変ドメイン及び36D2の六つのHVRを含
む第二の可変ドメインを含む。
50

【0120】

抗R S P O 2 / 3 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗R S P O 2 / 3 抗体は、R S P O 3と、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6の一以上との相互作用を阻害し、R S P O 2と、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6の一以上との相互作用を阻害しない（例えば、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6の一以上へのR S P O 2の結合を増強する）。幾つかの実施態様において、抗体は二重特異性抗体である。幾つかの実施態様において、抗R S P O 2 / 3 抗体は、5 D 6 又は5 E 1 1 の六つのH V R を含む第一の可変ドメイン及び1 A 1 の六つのH V R を含む第二の可変ドメインを含む。

【0121】

抗R S P O 2 / 3 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗R S P O 2 / 3 抗体は、R S P O 2 及びR S P O 3 と、膜貫通E 3 ユビキチナーゼ（例えば、Z N R F 3 及び／又はR N F 4 3 の一以上）との相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗体は、デュアルアーム抗体である。幾つかの実施態様において、抗R S P O 2 / 3 抗体は、各可変ドメインに2 5 E 1 1 の六つのH V R を含む第一及び第二の可変ドメインを含む。幾つかの実施態様において、抗体は二重特異性抗体である。幾つかの実施態様において、抗R S P O 2 / 3 抗体は、5 D 6 又は5 E 1 1 の六つのH V R を含む第一の可変ドメイン及び3 6 D 2 又は1 A 1 の六つのH V R を含む第二の可変ドメインを含む。

【0122】

抗R S P O 2 / 3 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗R S P O 2 / 3 抗体は、R S P O 2 及びR S P O 3 と、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6 の一以上及びR S P O 2 との相互作用を阻害し、R S P O 2 及びR S P O 3 と、膜貫通E 3 ユビキチナーゼ（例えば、Z N R F 3 及び／又はR N F 4 3 の一以上）との相互作用を阻害する。幾つかの実施態様において、抗体は、デュアルアーム抗体である。幾つかの実施態様において、抗R S P O 2 / 3 抗体は、各可変ドメインに2 5 E 1 1 の六つのH V R を含む第一及び第二の可変ドメインを含む。幾つかの実施態様において、抗体は二重特異性抗体である。幾つかの実施態様において、抗R S P O 2 / 3 抗体は、5 D 6 又は5 E 1 1 の六つのH V R を含む第一の可変ドメイン及び3 6 D 2 の六つのH V R を含む第二の可変ドメインを含む。

【0123】

抗R S P O 2 / 3 抗体の何れかの幾つかの実施態様において、抗R S P O 2 / 3 抗体は、R S P O 3 と、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6 の一以上及びR S P O 2 との相互作用を阻害し、R S P O 2 及びR S P O 3 と、膜貫通E 3 ユビキチナーゼ（例えば、Z N R F 3 及び／又はR N F 4 3 の一以上）との相互作用を阻害し、R S P O 2 と、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6 の一以上との相互作用を阻害しない（例えば、L G R 4、L G R 5、及び／又はL G R 6 の一以上へのR S P O 2 の結合を増強する）。幾つかの実施態様において、抗体は二重特異性抗体である。幾つかの実施態様において、抗R S P O 2 / 3 抗体は、5 D 6 又は5 E 1 1 の六つのH V R を含む第一の可変ドメイン及び1 A 1 の六つのH V R を含む第二の可変ドメインを含む。

【0124】

一態様において、本明細書に提供されるのは、抗体4 H 1、4 D 4、5 C 2、5 D 6、5 E 1 1、6 E 9、2 1 C 2、及び／又は2 6 E 1 1 の一以上と同じ又は重複するエピトープに結合する抗R S P O 3 抗体である。更に、一態様において、本明細書に提供されるのは、R S P O 3への結合について、抗体4 H 1、4 D 4、5 C 2、5 D 6、5 E 1 1、6 E 9、2 1 C 2、及び／又は2 6 E 1 1 の一以上と競合する抗R S P O 3 抗体である。一態様において、本明細書に提供されるのは、抗体1 A 1、1 1 F 1 1、2 6 E 1 1、3 6 D 2、及び／又は4 9 G 5 の一以上と同じ又は重複するエピトープに結合する抗R S P O 2 抗体である。更に、一態様において、本明細書に提供されるのは、R S P O 2への結合について、抗体1 A 1、1 1 F 1 1、2 6 E 1 1、3 6 D 2，及び／又は4 9 G 5 の一以上と競合する抗R S P O 2 抗体である。一態様において、本明細書に提供されるのは、1 A 1と同じ又は重複するエピトープに結合する抗R S P O 2 抗体である。更に、一態様

10

20

30

40

50

において、本明細書に提供されるのは、R S P O 2への結合について、1 A 1と競合する抗R S P O 2抗体である。幾つかの実施態様において、抗体は、B I A C O R E、競合E L I S A、及び/又は本明細書に記載される当該分野で周知の任意の他の方法により、別の抗体と結合について競合する。エピトープを決定する方法は、当該分野で公知であり、本明細書中に記載される。幾つかの実施態様において、エピトープは、線状エピトープである。幾つかの実施態様において、エピトープは、立体構造的エピトープである。幾つかの実施態様において、エピトープは、ペプチド断片に結合する抗体によって決定される。幾つかの実施態様において、エピトープは、質量分析によって決定される。幾つかの実施態様において、エピトープは結晶学(例えば、結晶構造の解析)によって決定される。

【0125】

10

モノクローナル抗体4 H 1及びその他の特定の抗体の実施態様

一態様において、本発明は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むH V R - H 1；(b)配列番号9のアミノ酸配列を含むH V R - H 2；(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3；(d)配列番号5のアミノ酸配列を含むH V R - L 1；(e)配列番号6のアミノ酸配列を含むH V R - L 2；及び(f)配列番号7のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのH V Rを含む抗R S P O 3抗体を提供する。

【0126】

20

一態様において、本発明は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むH V R - H 1；(b)配列番号9のアミノ酸配列を含むH V R - H 2；(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3から選択される、少なくとも一つのV H H V R配列、少なくとも二つのV H H V R配列、又は三つ全てのV H H V R配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3、及び配列番号7のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3、配列番号7のアミノ酸配列を含むH V R - L 3、及び配列番号9のアミノ酸配列を含むH V R - H 2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むH V R - H 1；(b)配列番号9のアミノ酸配列を含むH V R - H 2；及び(c)配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3を含む。

30

【0127】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号5のアミノ酸配列を含むH V R - L 1；(b)配列番号6のアミノ酸配列を含むH V R - L 2；及び(c)配列番号7のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される、少なくとも一つのV L H V R配列、少なくとも二つのV L H V R配列、又は三つ全てのV L H V R配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号5のアミノ酸配列を含むH V R - L 1；(b)配列番号6のアミノ酸配列を含むH V R - L 2；及び(c)配列番号7のアミノ酸配列を含むH V R - L 3を含む。

【0128】

40

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号8のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(ii)配列番号9のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(iii)配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - H 3から選択される少なくとも一つのV H H V R配列、少なくとも二つのV H H V R配列、又は三つ全てのV H H V R配列を含むV Hドメイン；及び(b)(i)配列番号5のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(ii)配列番号6のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c)配列番号7のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される少なくとも一つのV L H V R配列、少なくとも二つのV L H V R配列、又は三つ全てのV L H V R配列を含むV Lドメインを含む。

【0129】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号8のアミノ酸配列を含むH V R - H 1；(b)配列番号9のアミノ酸配列を含むH V R - H 2；(c)配列番号10のアミノ

50

酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号7から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0130】

その他の態様において、抗RSP03抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号89及び配列番号90のそれぞれVH及びVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0131】

モノクローナル抗体4D4及びその他の特定の抗体の実施態様

10

一態様において、本発明は、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP03抗体を提供する。

【0132】

一態様において、本発明は、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

20

【0133】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0134】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHDメイン；及び(b)(i)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

40

【0135】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号16のア

50

ミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号13から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0136】

その他の態様において、抗RSP03抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号91及び配列番号92のそれぞれVH及びVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0137】

モノクローナル抗体5C2及びその他の特定の抗体の実施態様

10

一態様において、本発明は、(a)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP03抗体を提供する。

【0138】

一態様において、本発明は、(a)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

20

【0139】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0140】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHDメイン；及び(b)(i)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

40

【0141】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号22のア

50

ミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号19から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0142】

その他の態様において、抗RSP03抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号93及び配列番号94のそれぞれVH及びVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0143】

モノクローナル抗体5D6及びその他の特定の抗体の実施態様

10

一態様において、本発明は、(a)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP03抗体を提供する。

【0144】

一態様において、本発明は、(a)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

20

【0145】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0146】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHDメイン；及び(b)(i)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

40

【0147】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号28のア

50

ミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号25から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0148】

一態様において、本発明は、(a)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号188又は配列番号189のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP03抗体を提供する。幾つかの実施態様において、HVR-H3は、配列番号188のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様において、HVR-H3は、配列番号189のアミノ酸配列を含む。10

【0149】

一態様において、本発明は、(a)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号188又は配列番号189のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号188又は配列番号189のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。別の実施態様において、抗体は、配列番号188又は配列番号189のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号188又は配列番号189のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号188又は配列番号189のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。幾つかの実施態様において、HVR-H3は、配列番号188のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様において、HVR-H3は、配列番号189のアミノ酸配列を含む。20

【0150】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。30

【0151】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号188又は配列番号189から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び(b)(i)配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。幾つかの実施態様において、HVR-H3は、配列番号188のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様において、HVR-H3は、配列番号189のアミノ酸配列を含む。40

【0152】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号26のアミノ酸配列を含むHVR-50

H 1 ; (b) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; (c) 配列番号 1 8 8 又は配列番号 1 8 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ; (d) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; (e) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び (f) 配列番号 2 5 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む抗体を提供する。幾つかの実施態様において、H V R - H 3 は、配列番号 1 8 8 のアミノ酸配列を含む。幾つかの実施態様において、H V R - H 3 は、配列番号 1 8 9 のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 5 3 】

その他の態様において、抗 R S P O 3 抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載の V H 、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載の V L を含む。一実施態様において、抗体は、配列番号 9 5 及び配列番号 9 6 のそれぞれ V H 及び V L 配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

10

【 0 1 5 4 】

上記実施態様の何れかにおいて、抗 R S P O 3 抗体はヒト化されている。一実施態様において、抗 R S P O 3 抗体は、上記実施態様の何れかに記載の H V R を含み、更に、ヒトアクセプターフレームワーク、例えばヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークを含む。ある実施態様において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒト V L カッパ I コンセンサス (V L _{K I}) フレームワーク及び / 又は V H フレームワーク V H ₁ である。ある実施態様において、ヒトアクセプターフレームワークは、以下の変異の何れか一を含む、ヒト V L カッパ I コンセンサス (V L _{K I}) フレームワーク及び / 又は V H フレームワーク V H ₁ である。

20

【 0 1 5 5 】

別の態様において、抗 R S P O 3 抗体は、配列番号 1 9 1 、 1 9 3 、 1 9 5 、 1 9 7 、 1 9 9 、 2 0 1 、 2 0 3 、 2 0 5 、 2 0 7 、 2 0 9 、 2 1 1 、 2 1 3 又は 2 1 5 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 又は 1 0 0 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン (V H) 配列を含む。ある実施態様において、配列番号 1 9 1 、 1 9 3 、 1 9 5 、 1 9 7 、 1 9 9 、 2 0 1 、 2 0 3 、 2 0 5 、 2 0 7 、 2 0 9 、 2 1 1 、 2 1 3 、 又は 2 1 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 又は 9 9 % の同一性を有する V H 配列は、参照配列に対して置換 (例えば保存的置換) 、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗 R S P O 3 抗体は、 R S P O 3 へ結合する能力を保持する。ある実施態様において、総計 1 から 1 0 のアミノ酸が、配列番号 1 9 1 、 1 9 3 、 1 9 5 、 1 9 7 、 1 9 9 、 2 0 1 、 2 0 3 、 2 0 5 、 2 0 7 、 2 0 9 、 2 1 1 、 2 1 3 、 又は 2 1 5 において、置換され、挿入され、及び / 又は欠失している。ある実施態様において、総計 1 から 5 のアミノ酸が、配列番号 1 9 1 、 1 9 3 、 1 9 5 、 1 9 7 、 1 9 9 、 2 0 1 、 2 0 3 、 2 0 5 、 2 0 7 、 2 0 9 、 2 1 1 、 2 1 3 、 又は 2 1 5 において、置換され、挿入され、及び / 又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、 H V R 外の領域で (すなわち F R 内で) 生じる。任意で、抗 P R O 3 抗体は、配列番号 1 9 1 、 1 9 3 、 1 9 5 、 1 9 7 、 1 9 9 、 2 0 1 、 2 0 3 、 2 0 5 、 2 0 7 、 2 0 9 、 2 1 1 、 2 1 3 、 又は 2 1 5 の V H 配列を、その配列の翻訳後修飾を含み、含む。特定の実施態様において、 V H は、 (a) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、 (b) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、 及び (c) 配列番号 2 8 、 配列番号 1 8 8 、 又は配列番号 1 8 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される一つ、二つ、又は三つの H V R を含む。

30

【 0 1 5 6 】

別の態様において、抗 R S P O 3 抗体が提供され、該抗体は、配列番号 1 9 0 、 1 9 2 、 1 9 4 、 1 9 6 、 1 9 8 、 2 0 0 、 2 0 2 、 2 0 4 、 2 0 6 、 2 0 8 、 2 1 0 、 2 1 2 又は 2 1 4 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 又は 1 0 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。ある実施態様において、配列番号 1 9 0 、 1 9 2 、 1 9 4 、 1 9 6 、 1 9 8 、 2 0 0 、 2 0 2 、 2 0 4 、 2 0 6 、 2 0 8 、 2 1 0 、 2 1 2 、 又は 2 1

40

50

4のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するV L配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗R S P O 3抗体は、R S P O 3へ結合する能力を保持する。ある実施態様において、総計1から10のアミノ酸が、配列番号190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、又は214において、置換され、挿入され、及び/又は欠失している。ある実施態様において、総計1から5のアミノ酸が、配列番号190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、又は214において、置換され、挿入され、及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、H V R外の領域で（すなわちF R内で）生じる。任意で、抗P R O 3抗体は、配列番号190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、又は214のV L配列を、その配列の翻訳後修飾を含み、含む。特定の実施態様において、V Lは、(a)配列番号23のアミノ酸配列を含むH V R-L 1、(b)配列番号24のアミノ酸配列を含むH V R-L 2、及び(c)配列番号25のアミノ酸配列を含むH V R-L 3から選択される一つ、二つ、又は三つのH V Rを含む。

【0157】

その他の態様において、抗R S P O 3抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載のV H、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載のV Lを含む。

10

20

【0158】

一実施態様において、抗体は、配列番号190及び配列番号191のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号192及び配列番号193のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号194及び配列番号195のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号196及び配列番号197のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号198及び配列番号199のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号200及び配列番号201のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号202及び配列番号203のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号204及び配列番号205のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号206及び配列番号207のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号208及び配列番号209のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号210及び配列番号211のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号212及び配列番号213のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。一実施態様において、抗体は、配列番号214及び配列番号215のそれぞれV H及びV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

30

40

【0159】

更なる態様において、本明細書に提供されるのは、本明細書に提供される抗R S P O 3抗体と同じエピトープに結合する抗体である。例えば、ある実施態様において、配列番号191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、又は215のV H配列及び配列番号190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、又は214のV L配列をそれぞれ含む抗R S P O 3抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。幾つかの実施態様において、エピトープは、結晶学によって決定される。

50

【0160】

本発明の更なる態様では、上記実施態様の何れかに記載の抗RSP03抗体は、ヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施態様において、抗RSP03抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、又はFab(ab')₂断片である。その他の実施態様において、抗体は、全長抗体、例えば、IgG1抗体、IgG2a抗体又は本明細書において定義される他の抗体クラス又はアイソタイプである。

【0161】

モノクローナル抗体5E11及びその他の特定の抗体の実施態様

一態様において、本発明は、(a)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP03抗体を提供する。

10

【0162】

一態様において、本発明は、(a)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

20

【0163】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0164】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び(b)(i)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

40

【0165】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号31から

50

選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0166】

その他の態様において、抗RSP03抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号97及び配列番号98のそれぞれVH及びVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0167】

モノクローナル抗体6E9及びその他の特定の抗体の実施態様

一態様において、本発明は、(a)配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP03抗体を提供する。

【0168】

一態様において、本発明は、(a)配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0169】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0170】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び(b)(i)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

【0171】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号38のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号40のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号37から

10

20

30

40

50

選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0172】

その他の態様において、抗RSP03抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号99及び配列番号100のそれぞれVH及びVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0173】

モノクローナル抗体21C2及びその他の特定の抗体の実施態様

一態様において、本発明は、(a)配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号45のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号46のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP03抗体を提供する。

10

【0174】

一態様において、本発明は、(a)配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号45のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号46のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号46のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号46のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号46のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号45のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号45のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号46のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

20

【0175】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0176】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号45のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号46のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び(b)(i)配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号43のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

40

【0177】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号44のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号45のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号46のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号41のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号42のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号43から

50

選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0178】

その他の態様において、抗RSP03抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号101及び配列番号102のそれぞれVH及びVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0179】

モノクローナル抗体26E11及びその他の特定の抗体の実施態様

一態様において、本発明は、(a)配列番号50のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号47のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号48のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号49のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP02/3抗体を提供する。
10

【0180】

一態様において、本発明は、(a)配列番号50のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号49のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号49のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号50のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。
20

【0181】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号47のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号48のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号49のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号47のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号48のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号49のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。
30

【0182】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号50のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び(b)(i)配列番号47のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号48のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号49のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。
40

【0183】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号50のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号47のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号48のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号49から
50

選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0184】

その他の態様において、抗RSP02/3抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号103及び配列番号104のそれぞれVH及びVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0185】

抗RSP03モノクローナル抗体及びその他の特定の抗体の実施態様

一態様において、本発明は、(a)配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP03抗体を提供する。

10

【0186】

一態様において、本発明は、(a)配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

20

【0187】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0188】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び(b)(i)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

40

【0189】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号79から

50

選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0190】

一態様において、本発明は、(a)配列番号86のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号87のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号83のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号84のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP03抗体を提供する。

【0191】

一態様において、本発明は、(a)配列番号86のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号87のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号87のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号86のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号87のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0192】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号83のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号84のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号83のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号84のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0193】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号86のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号87のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び(b)(i)配列番号83のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号84のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

【0194】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号86のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号87のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号88のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号83のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号84のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号85から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0195】

モノクローナル抗体1A1及びその他の特定の抗体の実施態様

一態様において、本発明は、(a)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号57のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号58のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)

10

20

30

40

50

) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び (f) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つの H V R を含む抗 R S P O 2 抗体を提供する。

【 0 1 9 6 】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; (b) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; (c) 配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される、少なくとも一つの V H H V R 配列、少なくとも二つの V H H V R 配列、又は三つ全ての V H H V R 配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 、及び配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 、配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、及び配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; (b) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; 及び (c) 配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。

【 0 1 9 7 】

その他の態様において、本発明は、(a) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; (b) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び (c) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも一つの V L H V R 配列、少なくとも二つの V L H V R 配列、又は三つ全ての V L H V R 配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; (b) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び (c) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

【 0 1 9 8 】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a) (i) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、(i i) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、及び (i i i) 配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される少なくとも一つの V H H V R 配列、少なくとも二つの V H H V R 配列、又は三つ全ての V H H V R 配列を含む V H ドメイン；及び (b) (i) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、(i i) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、及び (c) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される少なくとも一つの V L H V R 配列、少なくとも二つの V L H V R 配列、又は三つ全ての V L H V R 配列を含む V L ドメインを含む。

【 0 1 9 9 】

その他の態様において、本発明は、(a) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; (b) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; (c) 配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ; (d) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; (e) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び (f) 配列番号 5 5 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む抗体を提供する。

【 0 2 0 0 】

その他の態様において、抗 R S P O 2 抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載の V H 、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載の V L を含む。一実施態様において、抗体は、配列番号 1 0 5 及び配列番号 1 0 6 のそれぞれ V H 及び V L 配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【 0 2 0 1 】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; (b) 配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; (c) 配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ; (d) 配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; (e) 配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び (f) 配列番号 6 1 のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP02抗体を提供する。

【0202】

一態様において、本発明は、(a)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

10

【0203】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

20

【0204】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び(b)(i)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号61のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

30

【0205】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号62のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号63のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号64のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号59のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号60のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号61から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

40

【0206】

その他の態様において、抗RSP02抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号107及び配列番号108のそれぞれVH及びVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0207】

モノクローナル抗体36D2及びその他の特定の抗体の実施態様

一態様において、本発明は、(a)配列番号68のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号69のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号66のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号67のアミノ酸

50

配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP02抗体を提供する。

【0208】

一態様において、本発明は、(a)配列番号68のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号69のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号67のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号67のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号69のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号68のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号69のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

10

【0209】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号66のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号67のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号66のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号67のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

20

【0210】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号68のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号69のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び(b)(i)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号66のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号67のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

30

【0211】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号68のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号69のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号65のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号66のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号67から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

40

【0212】

その他の態様において、抗RSP02抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号109及び配列番号110のそれぞれVH及びVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0213】

モノクローナル抗体49G5及びその他の特定の抗体の実施態様

一態様において、本発明は、(a)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号73のアミノ酸

50

配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つ、二つ、三つ、四つ、五つ、又は六つのHVRを含む抗RSP02抗体を提供する。

【0214】

一態様において、本発明は、(a)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

10

【0215】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

20

【0216】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び(b)(i)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

30

【0217】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号73から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

40

【0218】

その他の態様において、抗RSP02抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかに記載のVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号111及び配列番号112のそれぞれVH及びVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0219】

上記実施態様の何れかにおいて、抗RSP0抗体はヒト化されている。例えば、上記抗RSP0抗体の何れかのヒト化型。一実施態様において、抗RSP0抗体は、上記実施態様の何れかに記載のHVRを含み、更に、アクセプターヒトフレームワーク、例えばヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークを含む。

【0220】

50

本発明の更なる態様では、上記実施態様の何れかに記載の抗 R S P O 抗体は、キメラ、ヒト化又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施態様において、抗 R S P O 抗体は、抗体断片、例えば、F v、F a b、F a b'、s c F v、ダイアボディ、又はF (a b')₂ 断片である。その他の実施態様において、抗体は、全長抗体、例えば、インタクトなI g G 1 抗体又はI g G 2 a 抗体又は本明細書において定義される他の抗体クラス又はアイソタイプである。

【0221】

更なる態様にて、以下のセクション1 - 7で説明されるように、上記実施態様の何れかに記載の抗 R S P O 抗体は、単独又は組み合わせで、任意の特徴を組み込むことができる。

10

【0222】

1. 抗体親和性

ある実施態様において、本明細書において与えられる抗体は、1 μM、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、又は0.001 nM(例えば、10⁻⁸ M未満、例えば、10⁻⁸ Mから10⁻¹³ M、例えば、10⁻⁹ Mから10⁻¹³ M)の解離定数(Kd)を有する。

【0223】

一実施態様において、Kdは放射性標識抗原結合アッセイ(RIA)によって測定される。一実施態様において、RIAは、目的の抗体のF a bバージョン及びその抗原により実施される。例えば、抗原に対するF a bの溶液結合親和性は、非標識抗原の滴定シリーズの存在下でF a bを最小濃度の(125I)-標識抗原で平衡にし、次に結合抗原を抗F a b被覆プレートで捕捉することにより測定される(例えば、Chenら、J. Mol. Biol. 293: 865~881(1999)参照)。前記アッセイの条件を確立するため、MICRO TITER(登録商標)マルチウェルプレート(Thermo Scientific)は、50 mMの炭酸ナトリウム(pH 9.6)中5 μg/mlの捕捉抗F a b抗体(Cappel Labs)で一晩被覆され、それに続いて室温(およそ23)で2から5時間、PBS中2%(w/v)ウシ血清アルブミンでブロックされる。非吸着性プレート(Nunc #269620)では、100 pM又は26 pMの(125I)-抗原は対象のF a bの段階希釈を用いて混合される(例えば、Prestaら、Cancer Res. 57: 4593~4599(1997)における抗VEGF抗体、F a b-12の評価と一致する)。次に、対象のF a bは一晩インキュベートされるが、インキュベーションは平衡に達していることを確実にするためにさらに長い期間(例えば、約65時間)続いててもよい。その後、前記混合物は室温でのインキュベーション(例えば、1時間)のために捕捉プレートに移される。次に、溶液は取り除かれ、プレートはPBS中0.1%のポリソルベート20(TWEEN-20(登録商標))で8回洗浄される。プレートが乾燥すると、150 μl/ウェルのシンチラント(MICROSCINT-20(商標); Packard)が添加され、プレートは10分間TOP COUNT(商標)ガンマカウンター(Packard)上で計測される。最大結合の20%以下を与えるそれぞれのF a bの濃度が、競合結合アッセイにおいて使用するために選択される。

20

【0224】

別の実施態様によれば、Kdは、BIACORE(登録商標)表面プラズモン共鳴アッセイを用いて測定される。例えば、BIACORE(登録商標)-2000又はBIACORE(登録商標)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いるアッセイが、~10反応単位(RU)で固定した抗原CM5チップを用いて25℃で実施される。一実施態様において、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5、BIACORE, Inc.)は、供給業者の使用説明書に従って、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)で活性化される。抗原は、流量5 μl/分での注入前に10 mMの酢酸ナトリウム、pH 4.8で5 μg/ml(約0.2 μM)まで希釈されて、およそ10応答単位(RU)の連結タンパク質を達成する。抗原の注

30

40

50

入に続いて、1Mのエタノールアミンが注入されて、未反応基をブロックする。動態測定では、Fabの2倍の段階希釈液(0.78nMから500nM)が、25、流量およそ25μl/分で、0.05%ポリソルベート20(TWEEN-20(登録商標))界面活性剤(PBST)と一緒にPBSに注入される。会合速度(k_{on})及び解離速度(k_{off})は、会合及び解離センサーグラムを同時に適合させることにより、単純な1対1Langmuir結合モデル(BIACORE(登録商標)Evaluation Softwareバージョン3.2)を使用して計算される。平衡解離定数(K_d)は比 k_{off}/k_{on} として計算される。例えば、Chenら、J. Mol. Biol. 293: 865~881(1999)を参照されたい。上記の会合速度($on-rate$)が表面プラズモン共鳴アッセイにより $10^6\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ を超える場合、会合速度は、流動停止を備えたスペクトロフォーメーター(spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた800シリーズSLM-AMINC(商標)分光光度計(Thermo Spectronic)などの分光計において測定される場合、漸増濃度の抗原の存在下、25でPBS中20nMの抗-抗原抗体(Fab形態)、pH 7.2の蛍光放出強度の増加又は減少を測定する(励起=295nm; 放出=340nm、16nmバンドパス)蛍光消光技術を使用することにより決定することができる。

【0225】

2. 抗体断片

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は抗体断片である。抗体断片には、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv及びscFv断片ならびに下に記載される他の断片が含まれるが、これらに限定されない。ある種の抗体断片の概説については、Hudsonら、Nat. Med. 9: 129~134(2003)を参照されたい。scFv断片の概説については、例えば、Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、第113巻、Rosenburg及びMoore編、(Springer-Verlag、New York)、269~315ページ(1994)を参照されたい。国際公開第93/16185号;ならびに米国特許第5571894号及び米国特許第5587458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含みインビボ半減期が増大しているFab及びF(ab')₂断片の考察については、米国特許第5869046号を参照されたい。

【0226】

ダイアボディは、二価又は二重特異性のこともある2つの抗原結合部位のある抗体断片である。例えば、EP404,097;国際公開第1993/01161号;Hudsonら、Nat. Med. 9: 129~134(2003);及びHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444~6448(1993)を参照されたい。トリアボディ及びテトラボディもHudsonら、Nat. Med. 9: 129~134(2003)に記載されている。

【0227】

単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部又は軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部を含む抗体断片である。ある特定の実施態様では、単一ドメイン抗体はヒト単一ドメイン抗体である(Domantis, Inc.、Waltham, MA; 例えば、米国特許第6248516号を参照)。

【0228】

抗体断片は、本明細書に記載されているように、インタクトな抗体のタンパク質消化及び組換え宿主細胞(例えば、大腸菌(E. coli)又はファージ)による產生を含むがこれらに限定されない種々の技法により作製することができる。

【0229】

3. キメラ及びヒト化抗体

ある特定の実施態様では、本明細書に提供される抗体はキメラ抗体である。ある種のキ

メラ抗体は、例えば、米国特許第4 8 1 6 5 6 7号及びMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81:6851~6855(1984)に記載されている。一例では、キメラ抗体は非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサルなどの非ヒト靈長類由来の可変領域)及びヒト定常領域を含む。更なる例では、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体のクラス又はサブクラスから変えられている「クラス転換された」抗体である。キメラ抗体にはその抗原結合断片が含まれる。

【0230】

ある特定の実施態様では、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトへの免疫原性を抑えるために親非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持したままヒト化される。一般的には、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR(又はその部分)が非ヒト抗体由来でFR(又はその部分)がヒト抗体配列由来である1つ又は複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、場合によって、ヒト定常領域の少なくとも一部も含むことになる。幾つかの実施態様では、ヒト化抗体中の一部のFR残基は、例えば、抗体特異性又は親和性を回復又は改善するために非ヒト抗体(例えば、HVR残基が由来する抗体)由來の対応する残基で置換される。

【0231】

ヒト化抗体及びそれを作製する方法は、例えば、Almagro及びFransson、Front. Biosci. 13:1619~1633(2008)で概説されており、例えば、Riechmannら、Nature 332:323~329(1988); Queenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029~10033(1989); 米国特許第5821337号、米国特許第7527791号、米国特許第6982321号、及び米国特許第7087409号; Kashmiriら、Methods 36:25~34(2005)(特異性決定領域(CDR)移植法を記載している); Padlan、Mol. Immunol. 28:489~498(1991)(「リサーフェイシング」を記載している); Dall'Aquilaら、Methods 36:43~60(2005)(「FRシャフリング」を記載している); ならびにOsbourneら、Methods 36:61~68(2005)及びKlimkaら、Br. J. Cancer. 83:252~260(2000)(FRシャフリングへの「誘導選択」アプローチを記載している)に更に記載されている。

【0232】

ヒト化のために使用されるヒトフレームワーク領域には、「ベストフィット」法を使用して選択されるフレームワーク領域(Simsら、J. Immunol. 151:2296(1993)); 軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列由来のフレームワーク領域(Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:4285(1992)); 及びPrestaら、J. Immunol. 151:2623(1993)); ヒト成熟(体細胞的に変異した)フレームワーク領域又はヒト生殖系列フレームワーク領域(Almagro及びFransson、Front. Biosci. 13:1619~1633(2008)); 及びFRライブライマーをスクリーニングすることに由来するフレームワーク領域(Bacaら、J. Biol. Chem. 272:10678~10684(1997)及びRosokら、J. Biol. Chem. 271:22611~22618(1996))が含まれるが、これらに限定されない。

【0233】

4. ヒト抗体

ある特定の実施態様では、本明細書に提供される抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は当技術分野で公知の種々の技術を使用して产生することができる。ヒト抗体は一般的には、van Dijk及びvan de Winkel、Curr. Opin. Pharmacol. 5:368~74(2001)ならびにLonberg、Curr. Opin. Immunol. 20:450~459(2008)に記載されている。

10

20

30

40

50

【0234】

ヒト抗体は、抗原投与に応答してヒト可変領域を有するインタクトなヒト抗体又はインタクトな抗体を産生するように改変されているトランスジェニック動物に免疫原を投与することにより調製しうる。そのような動物は典型的には、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含有しており、その遺伝子座は内在性免疫グロブリン遺伝子座に取って代わる、又は染色体外に存在するもしくは動物の染色体中に無作為に取り込まれる。そのようなトランスジェニックマウスでは、内在性免疫グロブリン遺伝子座は一般的には不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lönnberg、Nat. Biotech. 23: 1117~1125 (2005) を参考されたい。例えば、XENOMOUSETM (商標) 技術を記載している米国特許第6075181号及び米国特許第6150584号；HuMab (登録商標) 技術を記載している米国特許第5770429号；K-M MOUSE (登録商標) 技術を記載している米国特許第7041870号及びVelociMouse (登録商標) 技術を記載している米国特許出願公開第2007/0061900号も参考されたい。そのような動物により産生されるインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることにより更に改変しうる。

【0235】

ヒト抗体はハイブリドーマベースの方法によっても作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞系は記載されている。(例えば、Kozbor J. Immunol. 133: 3001 (1984) ; Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) ; 及びBoernerら、J. Immunol. 147: 86 (1991) を参考されたい)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して産生されるヒト抗体も、Liら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 3557~3562 (2006) に記載されている。追加の方法には、例えば、米国特許第7189826号(ハイブリドーマ細胞系からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載している)及びNi、Xiandai Miyanyixue、26(4): 265~268 (2006) (ヒト-ヒトハイブリドーマを記載している)に記載されている方法が含まれる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ(Trioma)技術)も、Vollmers及びBrandlein、Histology and Histopathology、20(3): 927~937 (2005) ならびにVollmers及びBrandlein、Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology、27(3): 185~91 (2005) に記載されている。

【0236】

ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択されるFvクローニング可変ドメイン配列を単離することによっても産生しうる。次に、そのような可変ドメイン配列は所望のヒト定常ドメインと組み合わせうる。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択する技法は下に記載されている。

【0237】

5. ライブラリー由来抗体

本発明の抗体は、1種又は複数の所望の活性を有する抗体を求めてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより単離しうる。例えば、ファージディスプレイライブラリーを作製し所望の結合特徴を有する抗体を求めてそのようなライブラリーをスクリーニングするための種々の方法は当技術分野では公知である。そのような方法は、Hoogenboomら、Methods in Molecular Biology 178: 1~37 (O'Brienら編、Human Press、Totowa, NJ, 2001) で概説されており、例えば、McCaffertyら、Nature 348: 552~554; Clacksonら、Nature 352: 624~628 (1995) に記載されている。

1) ; Marksら、J. Mol. Biol. 222: 581~597 (1992) ; Marks及びBradbury、Methods in Molecular Biology 248: 161~175 (Lo編 Human Press、Totowa、NJ、2003) ; Sidhuら、J. Mol. Biol. 338 (2) : 299~310 (2004) ; Leeら、J. Mol. Biol. 340 (5) : 1073~1093 (2004) ; Fellouse、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34) : 12467~12472 (2004) ; ならびにLeeら、J. Immunol. Methods 284 (1-2) : 119~132 (2004) に更に記載されている。

【0238】

10

ある種のファージディスプレイ法では、Winterら、Ann. Rev. Immunol. 12: 433~455 (1994) に記載されているように、VH及びVL遺伝子のレパートリーはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により別々にクローニングされ、ファージライブリーにおいて無作為に組み換えられ、これは次に抗原結合ファージを求めてスクリーニングすることができる。ファージは典型的には、一本鎖Fv (scFv) 断片として又はFab断片としての何れかで抗体断片を提示する。免疫源由来のライブラリーは、ハイブリドーマの構築を要することなく免疫原に対して高親和性の抗体を提供する。代わりに、Griffithsら、EMBO J. 12: 725~734 (1993) により記載されているように、未処置のレパートリーをクローニングして (例えば、ヒトから) いかなる免疫化もせずに広範な非自己抗原及び自己抗原にも単一源の抗体を提供することができる。最後に、Hoogenboom及びWinter、J. Mol. Biol. 227: 381~388 (1992) により記載されているように、幹細胞から再配列されていないV-遺伝子セグメントをクローニングし、高度に可変性のCDR3領域をコードし、インビトロで再配列を実現するランダム配列を含有するPCRプライマーを使用することにより、未処置のライブラリーを合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブリーを記載する特許公報には、例えば、米国特許第5750373号、ならびに米国特許出願公開第2005/0079574号、米国特許出願公開第2005/0119455号、米国特許出願公開第2005/0266000号、米国特許出願公開第2007/0117126号、米国特許出願公開第2007/0160598号、米国特許出願公開第2007/0237764号、米国特許出願公開第2007/0292936号、及び米国特許出願公開第2009/0002360号が含まれる。

20

【0239】

30

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体又は抗体断片は、本明細書ではヒト抗体又はヒト抗体断片と見なされる。

【0240】

6. 多特異的抗体

ある特定の実施態様では、本明細書に提供される抗体は多特異的抗体、例えば、二重特異的抗体である。多特異的抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある種の実施態様では、結合特異性の1つは、RSPO (例えば、RSPO2及び/又はRSPO3) であり、他は、他の任意の抗原に対してである。ある特定の実施態様では、二重特異的抗体はRSPOの2つの異なるエピトープに結合しうる。二重特異的抗体はまた、RSPO (例えば、RSPO2及び/又はRSPO3) を発現する細胞に細胞傷害剤を局在化させるために使用することもできる。幾つかの実施態様において、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体) は、RSPO2及びRSPO3に結合する。幾つかの実施態様において、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体) は、5E11のHVRを含む第一可変ドメイン及び36D2のHVRを含む第二可変ドメインを含む。幾つかの実施態様において、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体) は、5D6のHVRを含む第一可変ドメイン及び36D2のHVRを含む第二可変ドメインを含む。幾つかの実施態様において、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体) は、5E11のHVRを含む第一可変ドメイン及び1A1のHVRを含む第二可変ドメイン

40

50

を含む。幾つかの実施態様において、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）は、5 D 6 の H V R を含む第一可変ドメイン及び 1 A 1 の H V R を含む第二可変ドメインを含む。二重特異的抗体は、完全長抗体又は抗体断片として調製することができる。

【 0 2 4 1 】

多特異的抗体を作製するための技法には、異なる特異性を有する 2 つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の組換え同時発現 (M i l s t e i n 及び C u e l l o 、 N a t u r e 3 0 5 : 5 3 7 (1 9 8 3) 、国際公開第 9 3 / 0 8 8 2 9 号及び T r a u n e c k e r ら、 E M B O J . 1 0 : 3 6 5 5 (1 9 9 1) 参照) 、及び「ノブインホール」工学（例えば、米国特許第 5 7 3 1 1 6 8 号参照）が含まれるが、これらに限定されない。抗体 F c ヘテロダイマー分子を作製するために静電気的ステアリング効果を操作する（国際公開第 2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4 号（A 1 ））；2 つ又はそれよりも多い抗体又は断片を架橋する（例えば、米国特許第 4 6 7 6 9 8 0 号及び B r e n n a n ら、 S c i e n c e 、 2 2 9 : 8 1 (1 9 8 5) 参照）；ロイシンジッパーを使用して二重特異的抗体を產生する（例えば、K o s t e l n y ら、 J . I m m u n o l . 、 1 4 8 (5) : 1 5 4 7 ~ 1 5 5 3 (1 9 9 2) 参照）；二重特異的抗体断片を作製するために「ダイアボディ」技術を使用する（例えば、H o l l i n g e r ら、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、 9 0 : 6 4 4 4 ~ 6 4 4 8 (1 9 9 3) 参照）；及び一本鎖 F v (s F v) ダイマーを使用する（例えば、G r u b e r ら、 J . I m m u n o l . 、 1 5 2 : 5 3 6 8 (1 9 9 4) 参照）；ならびに T u t t ら、 J . I m m u n o l . 1 4 7 : 6 0 (1 9 9 1) に記載されている三重特異的抗体を調製することにより、多特異的抗体を作製してもよい。

【 0 2 4 2 】

「オクタパス抗体」を含む、3 つ又はそれよりも多い機能的抗原結合部位を有する操作された抗体も本明細書に含まれる（例えば、米国特許第 2 0 0 6 / 0 0 2 5 5 7 6 号を参照）。

【 0 2 4 3 】

本明細書の抗体又は断片には、複数の R S P O (例えば、R S P O 2 及び / 又は R S P O 3) に結合する抗原結合部位を含む「二重作用 F A b 」又は「 D A F 」も含まれる（例えば、米国特許第 2 0 0 8 / 0 0 6 9 8 2 0 号を参照）。

【 0 2 4 4 】

7 . 抗体変異体

ある実施態様において、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列変異体が意図される。例えば、抗体の結合親和性及び / 又は他の生物学的特性を改善することが望まれ得る。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することにより、又はペプチド合成によって調製することができる。このような改変は、例えば、抗体のアミノ酸配列内における、残基の欠失、及び / 又は挿入及び / 又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有していることを条件として、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが、最終コンストラクトに到達させるために作成され得る。

【 0 2 4 5 】

a) 置換、挿入、及び欠失変異体

ある実施態様において、一つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換型変異誘発の対象となる部位は、H V R と F R を含む。保存的置換は、表 1 の「好ましい置換」の見出しの下に示されている。より実質的な変更が、表 1 の「例示的置換」の見出しの下に与えられ、アミノ酸側鎖のクラスを参照して以下に更に説明される。アミノ酸置換は対象の抗体に導入され、生成物は、所望の活性、例えば、保持された / 改善された抗原結合性、減少した免疫原性、又は改善された A D C C もしくは C D C についてスクリーニングされうる。

10

20

30

40

表 1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【0246】

アミノ酸は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

(1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 中性の親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 塩基性：His、Lys、Arg；

(5) 鎖配向に影響する残基：Gly、Pro；

(6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe

【0247】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを必要とする。

【0248】

置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体）の1つ又は複数の高頻度可変領域残基を置換することを伴う。一般に、更なる研究のために選択される1つ又は複数のこうして得られる変異体は、親抗体と比べてある種の生物学的特性（例えば、増加した親和性、減少した免疫原性）に変更（例えば、改善）を有することになる及び/又は親抗体のある種の生物学的特性を実質的に保持していることになる。例となる置換変異体は親和性成熟抗体であり、この抗体は、例えば、本明細書に記載されている技法などのファージデ

10

20

30

40

50

イスプレイベースの親和性成熟技術を使用して簡便に產生しうる。手短に言えば、1つ又は複数のHVR残基は変異され、変異体抗体はファージ上に提示され、特定の生物活性（例えば、結合親和性）を求めてスクリーニングされる。

【0249】

例えば、抗体親和性を改善するために、HVRにおいて変更（例えば、置換）を加えることもできる。かかる改変はHVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程中に高頻度で変異を受けるコドンによりコードされている残基（例えば、Chowdhury、Methods Mol. Biol. 207: 179~196 (2008) 参照）、及び／又は抗原に接触する残基において加えることができ、こうして得られる変異体VH又はVLは結合親和性について試験される。二次ライブラリーを構築しそこから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboomra, in Methods in Molecular Biology 178: 1~37 (O'Brienら、編、Human Press、Totowa, NJ (2001)) に記載されている。親和性成熟の幾つかの実施態様では、種々の方法（例えば、エラープローンPCR、チェインシャフッリング、又はオリゴヌクレオチド指向性突然変異）のうちの何れかにより成熟のために選択された可変遺伝子に多様性が導入される。次に、二次ライブラリーが作製される。次に、前記ライブラリーはスクリーニングされて、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を同定する。多様性を導入する別 の方法は、幾つかのHVR領域（例えば、1度に4~6残基）がランダム化されるHVR指向性アプローチを伴う。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発又はモデリングを使用して、特異的に同定しうる。CDR-H3及びCDR-L3は特に標的にされることが多い。

【0250】

ある特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、そのような変更が抗原に結合する抗体の能力を実質的に減少させない限り、1つ又は複数のHVR内で起こってもよい。例えば、結合親和性を実質的に減少させない保存的改変（例えば、本明細書で提供される保存的置換）をHVR内で行うことができる。そのような改変は、例えば、HVR内の抗原接触残基の外側であってよい。上に提供される変異体VH及びVL配列のある特定の実施態様では、それぞれのHVRは、改変されない、又は1つ以下、2つ以下又は3つ以下のアミノ酸置換を含有する。

【0251】

変異誘発のために標的にされうる抗体の残基又は領域の同定のための有用な方法は、Cunningham及びWells (1989) Science, 244: 1081~1085により記載されているように、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、残基又は残基のグループ（例えば、Arg、Asp、His、Lys、及びGluなどの荷電残基）は中性又は負電荷を帯びたアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）により同定され置き換えられて、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうかが決定される。追加の置換が前記アミノ酸位に導入されて、最初の置換に対する機能的感受性を実証してもよい。その代わりに、又はそれに加えて、抗体と抗原の間の接触点を同定する抗原-抗体複合体の結晶構造。そのような接触残基及び隣接残基が、置換の候補として標的とされるか又は排除され得る。変異体はそれらが所望の特性を含むかどうかを決定するためにスクリーニングされ得る。

【0252】

アミノ酸配列挿入には、1残基から100又はそれよりも多い残基を含有するポリペプチドまでの長さに及ぶアミノ-及び／又はカルボキシル末端融合物、ならびに单一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体には、抗体の血清半減期を増加させる酵素（例えば、ADEPTのため）又はポリペプチドへの抗体のN-又はC-末端の融合が含まれる。

【0253】

b) グリコシル化変異体

10

20

30

40

50

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加又は減少させるように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加又は削除は、1つ又は複数のグリコシル化部位が作り出される又は取り除かれるようにアミノ酸配列を変化させることにより都合よく実現しうる。

【0254】

抗体がF c領域を含む場合、それに結合している炭水化物を変化させうる。哺乳動物細胞により產生された未処置の抗体は典型的には、一般的にはF c領域のC H 2ドメインのA s n 2 9 7へのN連結により結合している分岐した二分岐オリゴ糖を含む。例えば、W r i g h tら、T I B T E C H 1 5 : 2 6 ~ 3 2 (1 9 9 7)を参照されたい。オリゴ糖は種々の炭水化物、例えば、マンノース、N - アセチルグルコサミン (G l c N A c) 10 、ガラクトース、及びシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造体の「幹」においてG l c N A cに結合しているフコースを含むことがある。幾つかの実施態様では、本発明の抗体におけるオリゴ糖の改変は、ある種の改善された特性を有する抗体変更体を生み出すためになされうる。

【0255】

一実施態様では、F c領域に結合している（直接的に又は間接的に）フコースを欠く炭水化物構造体を有する抗体変異体が提供される。例えば、そのような抗体中のフコースの量は、1 % ~ 8 0 %、1 % ~ 6 5 %、5 % ~ 6 5 %又は2 0 % ~ 4 0 %まででもよい。フコースの量は、例えば、国際公開第2 0 0 8 / 0 7 7 5 4 6号に記載されているように、M A L D I - T O F質量分析により測定された場合、A s n 2 9 7に結合している全てのグリコ構造体（例えば、複合体、ハイブリッド及び高マンノース構造体）の合計と比べたA s n 2 9 7での糖鎖内のフコースの平均量を計算することにより決定される。A s n 2 9 7とは、F c領域のおおよそ2 9 7位 (F c残基のE u番号付け) に位置しているアスパラギン残基のことであるが、A s n 2 9 7は、抗体中の小さな配列変動のせいで、2 9 7位から約±3アミノ酸上流又は下流、すなわち、2 9 4位~3 0 0位までの間に位置していることもある。そのようなフコシル化変異体は改善されたA D C C機能を有することがある。例えば、米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8号 (P r e s t a , L .) ; 米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1号 (Ky o w a H a k k o K o g y o C o . , L t d)を参照されたい。「脱フコシル化 (d e f u c o s y l a t e d) 」又は「フコース欠損」抗体変異体に關係する出版物の例には、米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8号 ; 国際公開第2 0 0 0 / 6 1 7 3 9号 ; 国際公開第2 0 0 1 / 2 9 2 4 6号 ; 米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 1 1 5 6 1 4号 ; 米国特許出願公開第2 0 0 2 / 0 1 6 4 3 2 8号 ; 米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1号 ; 米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 1 3 2 1 4 0号 ; 米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 1 1 0 7 0 4号 ; 米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 1 1 0 2 8 2号 ; 米国特許出願公開第2 0 0 4 / 0 1 0 9 8 6 5号 ; 国際公開第2 0 0 3 / 0 8 5 1 1 9号 ; 国際公開第2 0 0 3 / 0 8 4 5 7 0号 ; 国際公開第2 0 0 5 / 0 3 5 5 8 6号 ; 国際公開第2 0 0 5 / 0 3 5 7 7 8号 ; 国際公開第2 0 0 5 / 0 5 3 7 4 2号 ; 国際公開第2 0 0 2 / 0 3 1 1 4 0号 ; Ok a z a k i ら、J . M o l . B i o l . 3 3 6 : 1 2 3 9 ~ 1 2 4 9 (2 0 0 4) ; Y a m a n e - O h n u k i ら、B i o t e c h . B i o e n g . 8 7 : 6 1 4 (2 0 0 4)が含まれる。脱フコシル化抗体を產生することができる細胞系の例には、タンパク質フコシル化を欠損するL e c 1 3 C H O細胞 (R i p k a ら、A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s . 2 4 9 : 5 3 3 ~ 5 4 5 (1 9 8 6) ; 米国特許出願公開第2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8号、P r e s t a , L ; 及びW O 2 0 0 4 / 0 5 6 3 1 2、A d a m s ら、特に実施例1 1) ; 及びアルファ-1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、F U T 8、ノックアウトC H O細胞などのノックアウト細胞系（例えば、Y a m a n e - O h n u k i ら、B i o t e c h . B i o e n g . 8 7 : 6 1 4 ページ (2 0 0 4) ; K a n d a , Y . ら、B i o t e c h n o l . B i o e n g . 9 4 (4) : 6 8 0 ~ 6 8 8 (2 0 0 6) ; 及び国際公開第2 0 0 3 / 0 8 5 1 0 7号) が含まれる。

【0256】

10

20

30

40

50

二分されたオリゴ糖を有する、すなわち、抗体の Fc 領域に結合した二分岐オリゴ糖が G1cNAc により二分されている抗体変異体が更に提供される。そのような抗体変異体は減少したフコシル化及び / 又は改善された ADC C 機能を有しうる。そのような抗体変異体の例は、例えば、国際公開第 2003/011878 号 (Jean-Mairetら) ; 米国特許第 6602684 号 (Umanaら) ; 及び米国特許出願公開第 2005/0123546 号 (Umanaら) に記載されている。Fc 領域に結合しているオリゴ糖中に少なくとも 1 つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。そのような抗体変異体は改善された CDC 機能を有しうる。そのような抗体変異体は、例えば、国際公開第 1997/30087 号 (Pate1ら) ; 国際公開第 1998/58964 号 (Raju, S.) ; 及び国際公開第 1999/22764 号 (Raju, S.) に記載されている。10

【0257】

c) Fc 領域変異体

ある特定の実施態様では、1 つ又は複数のアミノ酸改変を本明細書に提供される抗体の Fc 領域に導入し、それにより Fc 領域変異体を產生しうる。前記 Fc 領域変異体は、1 つ又は複数のアミノ酸位にアミノ酸改変 (例えば、置換) を含むヒト Fc 領域配列 (例えば、ヒト IgG1、IgG2、IgG3 又は IgG4 Fc 領域) を含みうる。

【0258】

ある特定の実施態様では、本発明は、幾つかのしかし全てではないエフェクター機能を有する抗体変異体であって、そのエフェクター機能のおかげで、インビボでの抗体の半減期は重要であるがある種のエフェクター機能 (例えば、補体及び ADC C) は必要ではない又は有害である適用のための望ましい候補になる抗体変異体を想定している。インビトロ及び / 又はインビボ細胞傷害性アッセイを行えば、CDC 及び / 又は ADC C 活性の減少 / 枯渇を確認することができる。例えば、Fc 受容体 (FcR) 結合アッセイを行えば、抗体が FcR 結合を欠く (したがって、おそらく ADC C 活性を欠く) が、FcRn 結合力は保持していることを確認することができる。ADC C を媒介するための一次細胞、すなわち NK 細胞は FcR III のみを発現するが、単球は FcR I 、 FcR I 以及 FcR III を発現する。造血細胞上の FcR 発現は、Ravetch 及び Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457 ~ 492 (1991) の 464 ページ表 3 に要約されている。対象の分子の ADC C 活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的例は、米国特許第 5,500,362 号 (例えば、Hellstrom, I. ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059 ~ 7063 (1986) 参照) 及び Hellstrom, I. ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499 ~ 1502 (1985) ; 米国特許第 5821337 号 (Bruggemann, M. ら、J. Exp. Med. 166: 1351 ~ 1361 (1987) 参照) に記載されている。代わりに、非放射アッセイ法を用いることもある (例えば、ACTI (商標) non-radioactive cytotoxicity assay for flow cytometry (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA) ; 及び Cytotox 96 (登録商標) non-radioactive cytotoxicity assay (Promega、Madison、WI) 参照)。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血单核球 (PBMC) 及びナチュラルキラー (NK) 細胞が含まれる。代わりに、又は加えて、対象の分子の ADC C 活性は、インビボで、例えば、Clynes ら、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652 ~ 656 (1998) に開示されている動物モデルなどの動物モデルで評価しうる。C1q 結合アッセイも実施して、抗体が C1q に結合することができずしたがって CDC 活性を欠くことを確認しうる。例えば、国際公開第 2006/029879 号及び国際公開第 2005/100402 号における C1q 及び C3c 結合 ELISA を参照されたい。補体活性化を評価するため、CDC アッセイを実施しうる (例えば、Gazzano-Santoro ら、J. Immunol. Methods 202: 163 (1996) ; Cragg, M. S. ら、Blo
20
30
40
50

o d 1 0 1 : 1 0 4 5 ~ 1 0 5 2 (2 0 0 3) ; ならびに C r a g g , M . S . 及び M . J . G l e n n i e , B l o o d 1 0 3 : 2 7 3 8 ~ 2 7 4 3 (2 0 0 4) 参照) 。 F c R n 結合及びインビオ排除 / 半減期決定も、当技術分野で公知の方法を使用して実施することができる（例えば、 P e t k o v a , S . B . ら、 I n t ' l . I m m u n o l . 1 8 (1 2) : 1 7 5 9 ~ 1 7 6 9 (2 0 0 6) 参照 ）。

【 0 2 5 9 】

エフェクター機能が減少した抗体には、 F c 領域残基 2 3 8 、 2 6 5 、 2 6 9 、 2 7 0 、 2 9 7 、 3 2 7 及び 3 2 9 のうちの 1 つ又は複数の置換がある抗体が含まれる（米国特許第 6 , 7 3 7 , 0 5 6 号）。そのような F c 変異体には、残基 2 6 5 及び 2 9 7 のアラニンへの置換があるいわゆる「 D A N A 」 F c 変異体を含む、アミノ酸 2 6 5 位、 2 6 9 位、 2 7 0 位、 2 9 7 位及び 3 2 7 位のうちの 2 つ又はそれよりも多い位での置換のある F c 変異体が含まれる（米国特許第 7 , 3 3 2 , 5 8 1 号）。幾つかの実施態様において、抗体は、 E U 番号付け規則に従って、アミノ酸位置 2 6 5 に操作されたアラニンを含む。幾つかの実施態様において、抗体は、 E U 番号付け規則に従って、アミノ酸位置 2 9 7 に操作されたアラニンを含む。

【 0 2 6 0 】

F c R s への結合が改善されている又は減少しているある種の抗体変異体が記載されている（例えば、米国特許第 6 7 3 7 0 5 6 号；国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 6 3 1 2 号、及び S h i e l d s ら、 J . B i o l . C h e m . 9 (2) : 6 5 9 1 ~ 6 6 0 4 (2 0 0 1) 参照 ）。

【 0 2 6 1 】

ある特定の実施態様では、抗体変異体は A D C C を改善する 1 つ又は複数のアミノ酸置換、例えば、 F c 領域の 2 9 8 位、 3 3 3 位、及び / 又は 3 3 4 位での置換のある F c 領域を含む（残基の E U 番号付け ）。

【 0 2 6 2 】

幾つかの実施態様では、例えば、米国特許第 6 1 9 4 5 5 1 号、国際公開第 9 9 / 5 1 6 4 2 号、及び I d u s o g i e ら、 J . I m m u n o l . 1 6 4 : 4 1 7 8 ~ 4 1 8 4 (2 0 0 0) に記載されているように、変化した（すなわち、改善された又は減少した） C 1 q 結合及び / 又は補体依存性細胞傷害（ C D C ）をもたらす変化が F c 領域においてなされる。

【 0 2 6 3 】

半減期が増加し、母性 I g G の胎児への移行の原因となる（ G u y e r ら、 J . I m m u n o l . 1 1 7 : 5 8 7 (1 9 7 6) 及び K i m ら、 J . I m m u n o l . 2 4 : 2 4 9 (1 9 9 4) ）新生児 F c 受容体（ F c R n ）への結合が改善された抗体は米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 1 4 9 3 4 号（ H i n t o n ら ）に記載されている。それらの抗体は、 F c 領域の F c R n への結合を改善する 1 つ又は複数の置換がその中にある F c 領域を含む。そのような F c 変異体には、 F c 領域残基 2 3 8 、 2 5 6 、 2 6 5 、 2 7 2 、 2 8 6 、 3 0 3 、 3 0 5 、 3 0 7 、 3 1 1 、 3 1 2 、 3 1 7 、 3 4 0 、 3 5 6 、 3 6 0 、 3 6 2 、 3 7 6 、 3 7 8 、 3 8 0 、 3 8 2 、 4 1 3 、 4 2 4 又は 4 3 4 のうちの 1 つ又は複数に置換、例えば、 F c 領域残基 4 3 4 の置換のある F c 変異体が含まれる（米国特許第 7 3 7 1 8 2 6 号）。 F c 領域変異体の他の例に関しては、 D u n c a n & W i n t e r 、 N a t u r e 3 2 2 : 7 3 8 ~ 4 0 (1 9 8 8) ；米国特許第 5 6 4 8 2 6 0 号；米国特許第 5 6 2 4 8 2 1 号；及び国際公開第 9 4 / 2 9 3 5 1 号も参照されたい。

【 0 2 6 4 】

d) システイン操作抗体変異体

ある特定の実施態様では、抗体の 1 つ又は複数の残基がシステイン残基で置換されているシステイン操作抗体、例えば、「チオ M A b 」を作り出すのが望ましいことがある。特定の実施態様では、置換される残基は抗体の接触可能部位に存在する。更に本明細書で説明されるように、それらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基はそれにより抗体の接触可能部位に置かれ、この基を使用して抗体を、薬物部分又はリンク

10

20

30

40

50

—薬物部分などの他の部分にコンジュゲートさせて、免疫コンジュゲートを作り出しうる。ある特定の実施態様では、以下の残基：軽鎖のV205（Kabat番号付け）；重鎖のA118（EU番号付け）；及び重鎖Fc領域のS400（EU番号付け）のうちの任意の1つ又は複数をシステインで置換しうる。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第7521541号に記載される通りに產生しうる。

【0265】

e) 抗体誘導体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、当技術分野で知られ、容易に入手される追加の非タンパク質部分を含むように更に改変することができる。抗体の誘導体化に適した部分としては、限定されないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例は、限定されないが、ポリエチレン glycol (PEG) 、エチレン glycol / プロピレン glycol の共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン / 無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（単独重合体又はランダム共重合体の何れか）及びデキストラン又はポリ (n-ビニルピロリドン) ポリエチレン glycol 、プロピレン glycol 単独重合体、プロピレンオキシド / エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール（例えばグリセロール）、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物を包含する。ポリエチレン glycol プロピオンアルデヒドはその水中での安定性に起因して製造における利点を有し得る。ポリマーは何れかの分子量のものであってよく、そして分枝鎖又は未分枝鎖であってよい。抗体に結合するポリマーの数は変動してよく、そして、一以上の重合体が結合する場合は、それらは同じか又は異なる分子であることができる。一般的に、誘導体化に使用するポリマーの数及び / 又は種類は、限定されないが、向上させるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が限定された条件下で治療に使用されるのか等を含む考慮に基づいて決定することができる。

【0266】

別の実施態様において、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る抗体と非タンパク質部分とのコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク質性部分はカーボンナノチューブである（Kamら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600 ~ 11605 (2005)）。放射線は、任意の波長であって良いが、限定されないものの、通常の細胞に害を与えないが、抗体 - 非タンパク質部分の近位細胞が死滅される温度に非タンパク質部分を加熱する波長が含まれる。

【0267】

B . 組換え法及び組成物

抗体は、例えば、米国特許第4816567号に記載されている組換え法及び組成物を使用して產生しうる。一実施態様では、本明細書に記載される抗RSPo抗体をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列、及び / 又は抗体のVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖及び / 又は重鎖）をコードし得る。更なる実施態様において、そのような核酸を含む一以上のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。更なる実施態様において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。一つのそのような実施態様では、宿主細胞は、（1）抗体のVLを含むアミノ酸配列、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は（2）抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一ベクター、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二ベクターを含む（例えば、これらのベクターで形質転換されている）。一実施態様において、宿主細胞は、真核生物、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、又はリンパ系細胞（例えば、Y0、NS0、Sp20細胞）である。一実施態様において、抗RSPo抗体を作製する方法であって、抗体の発現に適した条件下で、上に提供される抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養し、場合により、宿主細胞（又は宿主細胞培養培地）から抗体及び / 又はポリペプチドを回収することを含む方法が提供される。

10

20

30

40

50

【0268】

組換え产生では、例えば、上に記載される抗体をコードする核酸は単離され宿主細胞における更なるクローニング及び／又は発現のために1つ又は複数のベクター内に挿入される。そのような核酸は従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）容易に単離され塩基配列決定される。

【0269】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適切な宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞を含む。例えば、抗体は、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要ではない場合は細菌において产生しうる。細菌における抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5648237号、米国特許第5789199号、及び米国特許第5840523号を参照されたい。（大腸菌における抗体断片の発現を記載しているCharlton, METHODS IN MOL. BIOL., 248巻（B. K. C. Lo, 編、Human Press, Totowa, NJ, 2003）、245～254ページも参照）。発現後、抗体は可溶画分中の細菌細胞ペーストから単離しうる。

10

【0270】

原核生物に加えて、そのグリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的に又は完全にヒトグリコシル化パターンで抗体が产生される真菌及び酵母株を含む、纖維状真菌又は酵母などの真核微生物は、抗体をコードするベクターに適したクローニング又は発現宿主である。Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409～1414 (2004)、及びLiria, Nat. Biotech. 24: 210～215 (2006)を参照されたい。

20

【0271】

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞も多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）に由来する。無脊椎動物細胞の例には植物及び昆虫細胞が含まれる。特にスパドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)細胞のトランスフェクションのために昆虫細胞と併せて使用しうる多数のバキュロウイルス株が同定されている。

【0272】

植物細胞培養物も宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5959177号、米国特許第6040498号、米国特許第6420548号、米国特許第7125978号、及び米国特許第6417429号（トランスジェニック植物において抗体を產生するためのPLANTIBODIESTM技術を記載している）を参照されたい。

30

【0273】

脊椎動物細胞も宿主として使用しうる。例えば、懸濁液で増殖するように適合されている哺乳動物細胞系統は有用でありうる。有用な哺乳動物細胞系統の他の例は、SV40で形質転換されているサル腎臓CV1系統、ヒト胚性腎臓系統（例えば、Grahamら、J. Gen Virol. 36: 59 (1977)に記載されている293又は293細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）、マウスセルトリ細胞（例えば、Mathew、 Biol. Reprod. 23: 243～251 (1980)に記載されているTM4細胞）、サル腎臓細胞（CV1）、アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）、ヒト子宮頸癌細胞（HELA）、イヌ腎臓細胞（MDCK）、バッファローラット肝細胞（BRL 3A）、ヒト肺細胞（W138）、ヒト肝細胞（Hep G2）、マウス乳房腫瘍（MMT060562）、例えば、Mathewら、Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44～68 (1982)に記載されているTRI細胞、MRC-5細胞、及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞系統には、DHFRC-CHO細胞（Urbaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)）を含む、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ならびにY0、NS0及びSP2/0などの骨髄腫細胞系が含まれる。抗体产生及び／又は結合ポリペプチド产生に適したある種の哺乳動物宿主細胞系の概説については、例えば、Yazaki及

40

50

びWu、METHODS IN MOL. BIOL.、248巻(B. K. C. Lo、編、Humana Press、Totowa、NJ)、255~268ページ(2003)を参照されたい。

【0274】

C. アッセイ

本明細書で提供される抗RSPO抗体は、当技術分野で公知の様々なアッセイによってその物理的/化学的性質及び/又は生物学的活性について同定され、スクリーニングされ、又は特徴づけることができる。

【0275】

1. 結合アッセイとその他のアッセイ

一態様において、本発明の抗体は、例えばELISA、ウエスタンプロット法など公知の方法により、その抗原結合活性について試験される。

【0276】

結合親和性を決定する方法は当該分野において既知である。幾つかの実施態様において、結合親和性は、本明細書において実施例1に記載されるようにBIAcore(登録商標)アッセイによって決定され得る。具体的には、幾つかの実施態様において、Kdは、BIACORE(登録商標)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を使用して、表面プラズモン共鳴アッセイによって測定され得る。

【0277】

RSPOのLGR(例えば、LGR4、5及び/又は6)、シンデカン(例えば、SDC4)、及び/又はE3ユビキチナーゼ(例えば、ZNRF3及び/又はRNF43)への結合を妨害及び/又は阻害する抗RSPO抗体の能力を決定する方法は当該分野において既知である。例えば、それらの全体が参照により本明細書に援用される、国際公開第2011/076932号、国際公開第2013012747号、Lau et al. Nature 476: 293-297 (2011), Hao et al. Nature 485:195-200 (2012)を参照。幾つかの実施態様において、R-スponジン(RSPO)のLGR、シンデカン、及び/又はE3ユビキチナーゼへの結合を有意に妨害する抗RSPO抗体の能力は、BIAcoreアッセイ、及び/又はELISA(例えば、競合結合ELISA)によって決定され得る。幾つかの実施態様において、RSPOのLGR(例えば、LGR4、5及び/又は6)、シンデカン(例えば、SDC4)、及び/又はE3ユビキチナーゼ(例えば、ZNRF3及び/又はRNF43)への結合を妨害及び/又は阻害する抗RSPO抗体の能力は、本明細書において実施例1に記載されるように競合結合ELISAによって決定され得る。

【0278】

別の態様において、競合アッセイは、RSPO(例えば、RSPO2及び/又はRSPO3)への結合について、4H1、4D4、5C2、5D6、5E11、6E9、21C2、26E11、1A1、11F11、36D2、及び/又は49G5と競合する抗体を同定するために使用され得る。

【0279】

抗体競合を決定する方法は当該分野において既知である。例示的競合アッセイにおいて、固定化RSPO(例えば、RSPO2及び/又はRSPO3)は、RSPO(例えば、RSPO2及び/又はRSPO3)(例えば、4H1、4D4、5C2、5D6、5E11、6E9、21C2、26E11、1A1、11F11、36D2、及び/又は49G5)に結合する第一標識抗体及び第一抗体とRSPO(例えば、RSPO2及び/又はRSPO3)への結合について競合するその能力について試験される第二非標識抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第二抗体はハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定化RSPO(例えば、RSPO2及び/又はRSPO3)が、第二未標識抗体でなく、第一標識抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第一抗体のRSPO(例えば、RSPO2及び/又はRSPO3)への結合を許容する条件下でインキュベートした後、過剰の未結合の抗体が除去され、固定化RSPO(例えば、RSPO2及び/又はRSPO3)に結合した標識の量が測定される。もし、固定化RSPO(例えば、RS

10

20

30

40

50

P O 2 及び / 又は R S P O 3) に結合した標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に減少している場合、それは、第二抗体が、 R S P O (例えば、 R S P O 2 及び / 又は R S P O 3) への結合に対して、第一抗体と競合していることを示している。 Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照。

【 0 2 8 0 】

エピトープビニング及び / 又は 2 つの抗体が結合について競合するかどうかを決定するために有用である別の例示的競合アッセイは、実施例 1 に記載される。幾つかの実施態様において、エピトープビニング及び / 又は 2 つの抗体が結合について競合するかどうかを決定することは、本明細書において実施例 1 に記載されるように、 Octet (登録商標) 10 アッセイによって決定され得る。

【 0 2 8 1 】

ある実施態様において、抗体は、 4 H 1 、 4 D 4 、 5 C 2 、 5 D 6 、 5 E 1 1 、 6 E 9 、 2 1 C 2 、 2 6 E 1 1 、 1 A 1 、 1 1 F 1 1 、 3 6 D 2 、 及び / 又は 4 9 G 5 に結合される同じエピトープ (例えば、線形又は構造的エピトープ) に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な典型的な方法が、 *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) の Morris (1996) " Epitope Mapping Protocols , ") に提供されている。幾つかの実施態様において、エピトープは、ペプチド競合によって決定される。幾つかの実施態様において、エピトープは、質量分析によって決定される。幾つかの実施態様において、エピトープは、結晶学によって決定される。結晶学の例示的方法が実施例 1 に記載される。 20

【 0 2 8 2 】

2. 活性のアッセイ

一態様において、アッセイは、生物学的活性を有するそれらの抗 R S P O 抗体を同定するため与えられる。生物学的活性は、例えば、 w n t シグナル伝達を阻害する、血管新生を阻害する、細胞増殖を阻害する、がん幹細胞の増殖を阻害する、及び / 又はがん幹細胞を枯渇させることを含み得る。インビボ及び / 又はインビトロでこのような生物学的活性を有する抗体もまた提供される。

【 0 2 8 3 】

w n t / - カテニンシグナル伝達を妨害する抗 R S P O 抗体の能力を決定する方法は当該技術分野で知られている。例えば、その全体が参考により本明細書に援用される、国際公開第 2 0 0 5 / 0 4 0 4 1 8 号及び国際公開第 2 0 1 3 / 0 1 2 7 4 7 号を参照。幾つかの実施態様において、 w n t / - カテニンシグナル伝達を有意に妨害する抗 R S P O 抗体の能力は、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定され得る。幾つかの実施態様において、 w n t / - カテニン応答性プロモーター (例えば、多量体化 T C F / L E F D N A 結合部位を含むプロモーター) の制御下で、レポーター遺伝子を含むレポーター・コンストラクト (例えば、ルシフェラーゼ遺伝子など) を細胞にトランスフェクトすることができる。次いで、細胞を、抗 R S P O 抗体の存在下及び非存在下で、 W n t 3 a などの W n t リガンド、及び R S P O 1 、 R S P O 2 、 R S P O 3 、及び / 又は R S P O 4 などの R S P O と接触させ、ルシフェラーゼ発現が測定される。 40

【 0 2 8 4 】

血管新生及び / 又は脈管形成を阻害する抗 R S P O 抗体の能力を決定する方法は当該技術分野で知られている。例えば、その全体が参考により本明細書に援用される、国際公開第 2 0 0 8 / 0 4 6 6 4 9 号を参照。アッセイの例は、インビボマトリゲルプラグ及び角膜血管新生アッセイ、インビボ / インビトロヒヨコ絨毛膜 (C A M) アッセイ、インビトロ細胞性 (増殖、移動、管形成) 及び器官型 (大動脈リング) アッセイ、ヒヨコ大動脈弓アッセイ、及びマトリゲルスポンジアッセイを含む。

【 0 2 8 5 】

幹細胞分化及び / 又はがん幹細胞枯渇を誘導する抗 R S P O 抗体の能力を決定する方法は当該技術分野で知られている。例えば、その全体が参考により本明細書に援用される、 50

国際公開第2013/036867号を参照。幾つかの実施態様において、幹細胞の分化は、小腸における高速サイクリング幹細胞である陰窩基底部円柱細胞（CBC）の、抗RSPo抗体の存在下及び非存在下での、例えば、腸細胞、杯細胞、及び/又は腸内分泌細胞への分化能力を決定することによりアッセイされ得る。

【0286】

ある実施態様において、本発明の抗体は、本明細書中及び及びその全体が参照により本明細書に援用される国際公開第2005/040418号、国際公開第2008/046649号、国際公開第2011/076932号、国際公開第2013/012747号、国際公開第2013/054307号、Lau et al. *Nature* 476:293-297 (2011), Hao et al. *Nature* 485:195-200 (2012)に記載されるアッセイにより、かかる生物学的活性及び/又は結合相互作用について試験される。

【0287】

幾つかの実施態様において、エピトープは、結晶学によって決定される。幾つかの実施態様において、結晶学的によって決定されるエピトープは、RSPo3のアミノ酸M33-E210を用いて決定される。幾つかの実施態様において、結晶学的によって決定されるエピトープは、100nLのシッティングドロップを使用して複数の疎行列結晶スクリーンを設定するLabcyte Echo液体ハンドラーを用いて行われる。スクリーンは、18で保存された。幾つかの実施態様において、結晶は、母液として100mMのMIBのpH9及び25%PEG1500を含有するドロップ中で得ることができる。幾つかの実施態様において、結晶は、母液として200mMのギ酸ナトリウム及び20%（w/v）のPEG3,350を含有するドロップ中で得ることができる。幾つかの実施態様において、結晶は回収され、10秒間、抗凍結剤溶液に浸漬され、液体窒素中で急速凍結されうる。幾つかの実施態様において、抗凍結剤溶液は、1μLの70%グリセロールを1.8μLのリザーバー溶液と混合することによって作ることができる。幾つかの実施態様において、結晶は、PEGベースの条件で、例えば、約20-25%のPEG3,350中で成長させることができる。幾つかの実施態様において、結晶は、約20%のPEG6000、約20-25%のPEG4000、及び約25%のPEG1500中で成長させることができる。幾つかの実施態様において、pHは、約3.5-9の範囲、例えば、約7から約8の間であってもよい。幾つかの実施態様において、塩濃度は、約200mMである。

【0288】

D. イムノコンジュゲート

本発明はまた、化学療法剤又は薬物、成長抑制剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、又は動物起源の酵素活性毒素、又はそれらの断片）、又は放射性同位元素など、1つ以上の細胞傷害性薬物にコンジュゲートした本明細書中の抗RSPo抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

【0289】

一実施態様では、イムノコンジュゲートは、メイタンシノイド（米国特許第5208020号、米国特許第5416064号及び欧州特許EP0425235B1参照）；モノメチルオーリスタチン薬物部分DE及びDF（MMAE及びMMAF）などのオーリスタチン（米国特許第5635483号及び米国特許第5780588号及び米国特許第7498298号参照）；ドラスタチン；カリチアマイシンもしくはその誘導体（米国特許第5712374号、米国特許第5714586号、米国特許第5739116号、米国特許第5767285号、米国特許第5770701号、米国特許第5770710号、米国特許第5773001号、及び米国特許第5877296号；Hinmanら、Cancer Res. 53:3336~3342 (1993)；及びLodeら、Cancer Res. 58:2925~2928 (1998)参照）；ダウノマイシンもしくはドキソルビシンなどのアントラサイクリン（Kratzら、Current Med. Chem. 13:477~523 (2006)；Jeffreyら、Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358~362 (2006)；Torgo

10

20

30

40

50

vら、*Bioconj. Chem.* 16: 717~721 (2005) ; Nagyら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 829~834 (2000) ; Dubowchikら、*Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12: 1529~1532 (2002) ; Kingら、*J. Med. Chem.* 45: 4336~4343 (2002) ; 及び米国特許第6,630,579号参照) ; メトレキセート ; ピンデシン ; ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセルなどのタキサン ; トリコテシン ; ならびにCC1065を含むがこれらに限定されない1つ又は複数の薬物に抗体がコンジュゲートされている抗体-薬物コンジュゲート(ADC)である。

【0290】

10

別の実施態様では、イムノコンジュゲートは、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖(绿膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファサルシン、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチン(*dianthin*)タンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(*Phytolaca americana*)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、ニガウリ(*momordica charantia*)阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ(*sapaponaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン(*mitogellin*)、レストリクトシン、フェノマイシン(*phenomycin*)、エノマイシン(*enomycin*)、及びトリコテセン(*tricotecenes*)を含むがこれらの限定されない酵素的に活性な毒素又はその断片にコンジュゲートされた本明細書に記載される抗体を含む。

【0291】

20

別の実施態様では、イムノコンジュゲートは、放射性原子にコンジュゲートされて放射性コンジュゲートを形成する本明細書に記載される抗体を含む。放射性コンジュゲートの产生には種々の放射性同位元素が利用可能である。例には、 ^{113}I 、 ^{131}I 、 ^{211}At 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{212}Pb 及び ^{111}Lu の放射性同位体が含まれる。放射性コンジュゲートが検出に使用される場合、シンチグラフィー研究用の放射性原子、例えば、 ^{99}Tc もしくは ^{123}I 、又は再びヨウ素123、ヨウ素131、インジウム111、フッ素19、炭素13、窒素15、酸素17、ガドリニウム、マンガン又は鉄などの核磁気共鳴(NMR)画像法(磁気共鳴画像法、MRIとしても知られる)用のスピニ標識を含むことがある。

【0292】

30

抗体と細胞傷害性薬剤のコンジュゲートは、N-サクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸(SPPD)、サクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩(SMCC)、イミノチオラン(ITT)、イミドエステルの二機能性誘導体(例えば、アジドイミド酸ジメチルHC1)、活性エステル(例えば、スペリン酸ジサクシニミジル)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアニ酸(例えば、トルエン2,6-ジイソシアニ酸)、及びビス活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)などの種々の二機能的タンパク質カップリング剤を使用して作製しうる。例えば、リシン免疫毒素は、*Vitetta*ら、*Science* 238: 1098 (1987)に記載される通りに調製することができる。炭素14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペニタ酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドを抗体にコンジュゲートするための例となるキレート剤である。国際公開第94/11026号を参照されたい。前記リンクマーは、細胞中の細胞傷害性薬の放出を促進する「切断可能リンクマー」でありうる。例えば、酸不安定リンクマー、ペプチダーゼ感受性リンクマー、感光性リンクマー、ジメチルリンクマー又はジスルフィド含有リンクマー(*Chariali*ら、*Cancer Res.* 52: 127~131 (1992) ; 米国特許第5208020号)を使用してもよい。

40

50

【0293】

本明細書のイムノコンジュゲート又はADCは、市販されているBMP5、EMCS、GMB5、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMB5、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、ならびにSVSB（サクシニミジル-（4-ビニルスルホン）安息香酸（例えば、Pierce Biotechnology, Inc.、Rockford, IL.、U.S.A.から）を含むがこれらの限定されない架橋剤試薬で調製されたそのようなコンジュゲートを明確に想定しているが、これらに限定されない。

【0294】

10

E. 診断及び検出のための方法及び組成物

ある実施態様において、本明細書で提供される抗RSPo抗体の何れかは、試料中のRSPoの存在を検出するため有用である。本明細書で使用する「検出」という用語は、定量的又は定性的検出を包含する。ある実施態様において、試料は、消化管、胃、食道、大腸、直腸、及び/又は結腸直腸組織などの細胞又は組織を含む。幾つかの実施態様において、試料は、腎臓、膀胱、脳、乳房、子宮頸部、結腸、頭部及び頸部、腎臓、白血病、肝臓、肺、リンパ節、卵巣、脾臓、前立腺、直腸、皮膚、胃、甲状腺、及び/又は子宮組織などの細胞又は組織を含む。幾つかの実施態様において、試料は、肺、卵巣、乳房、肝臓、又は多発性骨髄腫の組織などの細胞又は組織を含む。

【0295】

20

一実施態様において、診断又は検出の方法で使用するための抗RSPo抗体が提供される。更なる態様において、試料中のRSPoの存在を検出する方法が提供される。ある実施態様において、本方法は、抗RSPo抗体のRSPoへの結合を許容する条件下で、本明細書に記載のように抗RSPo抗体と生物学的試料を接触させること、及び複合体が抗RSPo抗体とRSPoとの間に形成されているかどうかを検出することを含む。そのような方法は、インビトロ又はインビボでの方法であり得る。一実施態様において、例えばRSPoが患者の選択のためのバイオマーカーであるなど、抗RSPo抗体が抗RSPo抗体による治療にふさわしい被験体を選択するために使用される。幾つかの実施態様において、RSPoはRSPo2である。幾つかの実施態様において、RSPoはRSPo3である。幾つかの実施態様において、RSPoはRSPo2及びRSPo3である。幾つかの実施態様において、個体及び/又はがんは、一以上のバイオマーカーの増加した発現を有する幾つかの実施態様において、幹細胞バイオマーカーは、Myo、Axin2、LGR5、TERT、BIRC5、及び/又はAscl2を含む。幾つかの実施態様において、個体及び/又はがんは、分化の一以上のバイオマーカーの減少した発現を有する。幾つかの実施態様において、分化のバイオマーカーは、CEACAM7、SLC26A3、CA1、SYT15、CA4、TFF1、及び/又はKRT20を含む。

【0296】

30

例えば、本明細書に提供されるのは、抗RSPo抗体の有効量を個体に投与することを含む、がんが一以上のバイオマーカーを含む個体においてがんを治療する方法である。また本明細書に提供されるのは、治療が一以上のバイオマーカーを含むがんを有する個体に基づいた、抗RSPo抗体の有効量を個体に投与することを含む、個体においてがんを治療する方法である。

【0297】

40

転座は、それらがしばしば標的遺伝子に複数の影響を及ぼすため非常に強力ながん変異である：単一「変異」においては、それらは劇的に発現を変化させ、調節ドメインを除去し、オリゴマー化を強制し、タンパク質の細胞内局在を変化させ、又はそれを新規の結合ドメインに連結する。これは幾つかの腫瘍は、特定の融合遺伝子の存在に応じて分類又は管理されているという事実に臨床的に反映されている。方法の何れかの幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーは表2に記載の一以上の遺伝子の転座（例えば、染色体内転座、染色体間転座、再配列及び/又は融合）を含む。

50

【0298】

何れかの方法の幾つかの実施態様において、転座は P V T 1 である。幾つかの実施態様において、P V T 1 転座は、P V T 1 及び M Y C を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 2 転座は、P V T 1 及び I n c D N A を含む。何れかの方法の幾つかの実施態様において、転座は R スポンジン転座である。幾つかの実施態様において、R スポンジン転座は R S P O 2 である。幾つかの実施態様において、R S P O 2 転座は、E M C 2 及び R S P O 2 を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 2 転座は、E I F 3 E 及び R S P O 2 を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 2 転座は、E I F 3 E エクソン 1 及び R S P O 2 エクソン 2 を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 2 転座は、E I F 3 E エクソン 1 及び R S P O 2 エクソン 3 を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 2 転座は、配列番号 7 1 を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 2 転座は、配列番号 1 1 4 、 1 4 3 及び / 又は 1 4 5 を含むプライマーにより検出可能である。幾つかの実施態様において、R S P O 2 転座は、E I F 3 E プロモーターによって駆動される。幾つかの実施態様において、R S P O 2 転座は、R S P O 2 プロモーターによって駆動される。幾つかの実施態様において、R スポンジン転座は R S P O 3 転座である。幾つかの実施態様において、R S P O 3 転座は、P T P R K 及び R S P O 3 を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 3 転座は、P T P R K エクソン 1 及び R S P O 3 エクソン 2 を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 3 転座は、P T P R K エクソン 7 及び R S P O 3 エクソン 2 を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 3 転座は、配列番号 1 7 1 及び / 又は配列番号 1 7 2 を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 3 転座は、配列番号 1 1 5 、 1 1 6 、 1 4 5 及び / 又は 1 4 6 を含むプライマーにより検出可能である。幾つかの実施態様において、R S P O 3 転座は、P T P R K プロモーターによって駆動される。幾つかの実施態様において、R S P O 3 転座は、R S P O 3 プロモーターによって駆動される。幾つかの実施態様において、R S P O 3 転座は、P T P R D 分泌シグナル配列を含む（及び / 又は R S P O 3 分泌シグナル配列を含まない）。

表2-遺伝子融合

5' 遺伝子名	3' 遺伝子名	タイプ	ゲノム位置	5' PCR プライマー	3' PCR プライマー
PVT1	ENST00000502082	染色体内	8:128806980-8:128433074	CTTGGCGAAAGGATGTTGG (配列番号 113)	TGGTATCCAGAGAGAAAGC (配列番号 142)
EMC2	RSPO2		8:109455927-8:109095035	CAACCGCTGGCTAGTTCTGGAAAGATGGCG AAGGTCAGCTTACATGCACTGGAAAG (配列番号 179)	GTTCGTTGGAGAGATGCTGACGCTGAACTGCGCCGGGGTGAATG GCAGTCCTCC (配列番号 180)
EF5E(e1)	RSPO2(e2)	消失	8:109260842-8:109095035	ACTACTGGCATCGGCACCT (配列番号 14)	GGGAGGACTCAGGGAGAC (配列番号 143)
EF5E(e1)	RSPO2(e2)	消失	8:109260842-8:109095035	ACTACTGGCATCGGCACCT (配列番号 14)	GGGAGGACTCAGGGAGAC (配列番号 143)
EF5E(e1)	RSPO2(e3)	消失	8:109260842-8:109095035	ACTACTGGCATCGGCACCT (配列番号 14)	TGCAGGGACTCTCCATACTG (配列番号 144)
EF5E(e1)	RSPO2(e3)	消失	8:109260842-8:109095035	ACTACTGGCATCGGCACCT (配列番号 14)	TGCAGGGACTCTCCATACTG (配列番号 144)
PPRK(e1)	RSPO3(e2)	逆位	6:128841404-6:127469793	AAACTCGGCTGGATACGAC (配列番号 115)	GCTTCATGCCAA TTCTTCC (配列番号 145)
PPRK(e1)	RSPO3(e2)	逆位	6:128841404-6:127469793	AAACTCGGCTGGATACGAC (配列番号 115)	GCTTCATGCCAA TTCTTCC (配列番号 145)
PPRK(e1)	RSPO3(e2)	逆位	6:128841404-6:127469793	AAACTCGGCTGGATACGAC (配列番号 115)	GCTTCATGCCAA TTCTTCC (配列番号 145)
PPRK(e1)	RSPO3(e2)	逆位	6:128841404-6:127469793	AAACTCGGCTGGATACGAC (配列番号 115)	GCTTCATGCCAA TTCTTCC (配列番号 145)
PTPRK(e7)	RSPO3(e2)	逆位	6:12850557-6:127469793	TGAGTCAATGTCGAACTT (配列番号 116)	GCCAATTTCTTCAGGCGAA (配列番号 146)
ETV6	NTRK3	染色体間	12:1202993-15:88483984	AAAGCCATCAACCTCTCA (配列番号 117)	GGGCTGAGGTGAGCACTC (配列番号 145)
ANXA2	RORA	染色体内	15:6067454-15:60824050	CTCTAGCCCCAAAGTCAT (配列番号 118)	TGACACCATATGGATTCCTG (配列番号 148)
TUBGCP3	FDS5B	逆位	13:113200013-13:3332/470	AAAGGAGACCCCTACATGC (配列番号 119)	AAAGGGCACAGATGCCATA (配列番号 149)
ARHGEF18	NCRNA00157	染色体間	19:7460133-21:192/2970	CCAGCTGCTAGTACTGTGGA (配列番号 120)	ACTAGGTGGTCCAGGGTGTG (配列番号 150)
NT5C2	ASAH2	消失	10:104399163-10:51978390	TGACACCGAGTTAGCAATGG (配列番号 121)	TGCTCAGCAGGTAAGATGCA (配列番号 151)
NRBP2	VPS28	染色体内	8:14491921-8:145049651	TGATGAACTTGGACCCACT (配列番号 122)	ATGGTCCTCATAGCTCTCG (配列番号 152)
CDG42SE2	KIAA0146	染色体間	5:130651837-8:486/2965	AGGGCAGATTGAGTGT (配列番号 123)	AAACTGAAAATCCCCGCTGT (配列番号 153)
MED13L	LAG3	逆位	12:11667573-12:6886657	GTGTATGGCTGTGATGTC (配列番号 124)	GCTCCAGTCACCAAAAGGAG (配列番号 154)
PEX5	LOC389634	逆位	12:7362838-12:8509737	CATGTGGAGAACATCTGGGA (配列番号 125)	TGTGGAGCTCTGGCTGTGTC (配列番号 155)
PLCE1	CYP2C19	消失	10:98792009-10:96602994	CCTTACTGCCCTGGAGGA (配列番号 126)	TGGGGATGAGGTGCGATGTAT (配列番号 156)
TMEM3	NTRK1	逆位	1:154142876-1:156844363	CAGAGACCGCTGTGAGTT (配列番号 127)	CCAAAAGGTGTTCTGCTCTT (配列番号 157)
PAN3	RFC3	消失	13:2875072-13:34395269	GACITGGTGCCTCAACAT (配列番号 128)	CAATTTCACCTCAACACC (配列番号 158)
CNC27	RNF180	染色体内	5:64181373-5:63665442	AACCGGAACACTCTAGAGCA (配列番号 129)	CATGTCAAACCAACCATCAC (配列番号 159)
CAPN1	SPDYC	染色体内	11:6496217-11:64939414	GAGACTCATGGGGAGTC (配列番号 130)	ATCTGGAAAGCAGGGCTCTT (配列番号 160)
COG8	TERF2	染色体内	16:68337079-16:68391464	TGGCTCTGGCTAACTACAAAGA (配列番号 131)	TCCCCATATTCTGCACCTC (配列番号 161)
TADA2A	MEF2B	染色体間	17:35767040-19:19293492	GCTCTTGGGGGATTAA (配列番号 132)	GGAGCTACTGTGCCCT (配列番号 162)
STRBP	DENNDA1A	染色体内	9:129935986-9:126220176	GTTGCAAAAGGCTTGTGAT (配列番号 133)	ACGAAGGCCTCCTCACAGAA (配列番号 163)
CXorf56	UBE2A	逆位	X:18694231-X:18717090	TGATGAGTCGCAAA (配列番号 134)	OACGCTTTCAATTCCCGT (配列番号 164)
MED13L	CD4	逆位	12:116675273-12:6923308	GTGTATGGCTGTGATGTC (配列番号 124)	TCCCAAAAGGCTCTCTG (配列番号 165)
PRR12	PRR2	染色体内	19:50097872-19:50093/57	ATGAACCTTACITGGCCCT (配列番号 135)	GTCGTGACCCCAAGAGCT (配列番号 166)
ATP9A	ARFGEF2	逆位	20:5030728-20:4760/1266	ATGTGAGCAGAAAGCCA (配列番号 136)	GTGCAGGAATTGGGCATGT (配列番号 167)
ANKRD17	HS3ST1	消失	4:73956384-4:11401737	GGAAAATCTCTATAITGCCA (配列番号 137)	AGCAGGGAAAGCCTCTAGTC (配列番号 168)
RBM47	ATP8A1	染色体内	4:40517884-4:428291/26	AGACCCAGGAGGAGTGGGT (配列番号 138)	GGTCAGCCAGTGGCTCTTC (配列番号 169)
FRS2	RAP1B	染色体内	12:68924740-12:69042479	AGATGCCAGATGCAAAAGT (配列番号 139)	CAAAGCAGACTTCCAAAGCG (配列番号 170)
CHEK2	PARVB	逆位	22:29137757-22:44553562	GGCTGAGGGTGGAGTTGTA (配列番号 140)	CTTCTGATCGAAGCTTTCG (配列番号 171)
SF1	TPST2	逆位	22:31904362-22:26940641	CCCCAGTTAGAAGGGGAAAGA (配列番号 141)	CACTCTCATCTGGCTCC (配列番号 172)
					190

【 0 2 9 9 】

幾つかの実施態様において、R スポンジン転座は R S P O 4 転座である。幾つかの実施態様において、R スポンジン転座は、（例えば、R スポンジン転座を有しない基準と比較

して) R スポンジンの上昇した発現レベルをもたらす。幾つかの実施態様において、R スポンジン転座は、(例えば、R スポンジン転座を有しない基準と比較して) R スポンジンの上昇した活性及び/又は活性化をもたらす。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーの存在は、表 2 における転座などの R スポンジン転座、並びに K R A S 及び/又は B R A F を含む。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーの存在は、表 2 における転座などの R スポンジン転座(例えば、再配列及び/又は融合)、並びに K R A S 及び/又は B R A F におけるバリエーション(例えば、多型又は変異)の存在である。幾つかの実施態様において、個体及び/又はがんは、K R A S 及び/又は B R A F におけるバリエーション(例えば、多型又は変異)を含む。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーの存在は、表 2 における転座などの R スポンジン転座の存在であり、一以上のバイオマーカーの非存在は、C T N N B 1 及び/又は A P C におけるバリエーション(例えば、多型又は変異)の非存在である。

【0300】

転座(例えば、染色体内転座、染色体間転座、再配列及び/又は融合)の何れかの幾つかの実施態様において、転座(例えば、染色体内転座、染色体間転座、再配列及び/又は融合)は、体細胞転座(例えば、染色体内転座、染色体間転座、再配列及び/又は融合)である。幾つかの実施態様において、転座は染色体内転座である。幾つかの実施態様において、転座は染色体間である。幾つかの実施態様において、転座は逆位である。幾つかの実施態様において、転座は欠失である。幾つかの実施態様において、転座は、機能的転座融合ポリヌクレオチド(例えば、機能的 R スポンジン - 転座融合ポリヌクレオチド)及び/又は機能的転座融合ポリペプチド(例えば、機能的 R スポンジン - 転座融合ポリペプチド)である。幾つかの実施態様において、機能的転座融合ポリペプチド(例えば、機能的 R スポンジン - 転座融合ポリペプチド)は、転座遺伝子の一つにより調節されることが知られた経路(例えば、w n t シグナル伝達経路)を活性化する。幾つかの実施態様において、経路は、標準的 w n t シグナル伝達経路である。幾つかの実施態様において、経路活性化を決定する方法は当該分野で公知であり、本明細書に記載されるルシフェラーゼレポーターアッセイを含む。幾つかの実施態様において、方法は、それらの全体が参照により本明細書に援用される、Seshagiri et al., Nature 488:660-664 (2012) 及び/又は国際公開第 2013 / 120056 号に記載される一以上的方法である。

【0301】

本発明の抗体を用いて診断することができる例示的な障害は、腫瘍、細胞増殖性障害、がん、消化器がん、胃がん、結腸直腸がん、大腸がん、及び/又は直腸がんを含む。本発明の抗体を用いて診断することができる例示的な障害は、更に、副腎がん、膀胱がん、脳がん、乳がん、子宮頸部がん、結腸がん、頭頸部がん、腎臓がん、白血病、肝臓がん、肺がん(例えば、N S C L C)、リンパ系がん、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、直腸がん、皮膚がん(例えば、黒色腫)、胃がん、甲状腺がん、及び/又は子宮がんを含む。また、本発明の抗体を用いて診断することができる例示的な障害は、肺がん(例えば、N S C L C)、卵巣がん、乳がん、肝臓がん、又は多発性骨髄腫を含む。

【0302】

試料には、一次細胞もしくは培養細胞又は細胞系統、細胞上澄み、細胞可溶化物、血小板、血清、血漿、硝子体液、リンパ液、滑液、卵胞液、精液、羊水、乳、全血、血液由来細胞、尿、脳脊髄液、唾液、痰、涙、発汗、粘液、腫瘍可溶化物、及び組織培養培地、均質化された組織などの組織抽出物、腫瘍組織、細胞抽出物、ならびにその組合せが含まれるがこれらに限定されない。幾つかの実施態様において、試料は、消化管、胃、食道、大腸、直腸、及び/又は結腸直腸組織からの試料である。幾つかの実施態様において、試料は、腎臓、膀胱、脳、乳房、子宮頸部、結腸、頭部及び頸部、腎臓、白血病、肝臓、肺、リンパ節、卵巣、脾臓、前立腺、直腸、皮膚、胃、甲状腺、及び/又は子宮組織からの組織である。幾つかの実施態様において、試料は、肺、卵巣、乳房、肝臓、又は多発性骨髄腫の組織からの組織である。

10

20

30

40

50

【0303】

ある実施態様において、標識された抗R S P O抗体が与えられる。標識は、限定されるものではないが、（例えば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、放射性標識など）直接検出される標識又は部分、並びに、例えば、酵素反応又は分子間相互作用を介して間接的に検出される酵素又はリガンドのような部分が含まれる。典型的な標識は、限定されないが、ラジオアイソトープ³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³I、フルオロフォア、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシェフェラーゼ、例えばホタルルシェフェラーゼ及び細菌ルシェフェラーゼ（米国特許第4737456号）、ルシェフェリン、2,3-ジヒドロタルジネジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）、アルカリフォスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘテロサイクリックオキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、色素前駆体を酸化する過酸化水素を利用する酵素、例えばH R P、ラクトペルオキシダーゼ、又はマイクロペルオキシダーゼと共に役したもの、ビオチン／アビジン、スピニラベル、バクテリオファージラベル、安定な遊離ラジカルなどが含まれる。

【0304】

何れかの方法の幾つかの実施態様において、上昇した発現は、参照サンプル、参照細胞、基準組織、対照試料、対照細胞又は対照組織と比較して、本明細書に記載のものなどの標準的な既知の方法によって検出される、バイオマーカー（例えば、タンパク質又は核酸（例えば、遺伝子又はm R N A））のレベルにおいて、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又はそれ以上の何れかの全体的な増加を指す。ある実施態様において、上昇した発現とは、サンプル中のバイオマーカーの発現レベル／量の増加を指し、ここでその増加は、参照試料、参照細胞、基準組織、対照試料、対照細胞又は対照組織と比較して、それぞれのバイオマーカーの発現レベル／量の少なくとも約1.5X、約1.75X、約2X、約3X、約4X、約5X、約6X、約7X、約8X、約9X、約10X、約25X、約50X、約75X、又は約100Xの何れかである。幾つかの実施態様において、上昇した発現は、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、対照組織、又は内部対照（例えば、ハウスキーピング遺伝子）と比較して、約1.5倍、約1.75倍、約2倍、約2.25倍、約2.5倍、約2.75倍、約3.0倍、又は約3.25倍を超える全体的な増加を指す。

【0305】

何れかの方法の幾つかの実施態様において、減少した発現は、参照試料、参照細胞、基準組織、対照試料、対照細胞又は対照組織と比較して、本明細書に記載のものなどの標準的な既知の方法によって検出される、バイオマーカー（例えば、タンパク質又は核酸（例えば、遺伝子又はm R N A））のレベルにおいて、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%又はそれ以上の何れかの全体的な減少を指す。ある実施態様において、減少した発現とは、サンプル中のバイオマーカーの発現レベル／量の減少を指し、ここでその減少は、参照サンプル、参照細胞、基準組織、対照試料、対照細胞又は対照組織において、それぞれのバイオマーカーの発現レベル／量の少なくとも約0.9X、約0.8X、約0.7X、約0.6X、約0.5X、約0.4X、約0.3X、約0.2X、約0.1X、約0.05X、又は約0.01Xの何れかである。

【0306】

試料中の種々のバイオマーカーの存在及び／又は発現レベル／量は、幾つかの方法論によって分析することができ、このうちの多くは、当該技術分野で知られ、当業者によって理解されており、免疫組織化学（「I H C」）、ウェスタンプロット分析、免疫沈降、分子結合アッセイ、E L I S A、E L I F A、蛍光標識細胞分取（「F A C S」）、M a s

10

20

30

40

50

S A R R A Y、プロテオミクス、定量血液系アッセイ（例として血清 E L I S A）、生化学酵素活性アッセイ、インサイツハイブリダイゼーション、サザン分析、ノーザン分析、全ゲノム配列決定、定量リアルタイム P C R（「q R T - P C R」）及び例え、分岐鎖 D N A、S I S B A、T M A 等の他の増幅型の検出法を含む、ポリメラーゼ連鎖反応（「P C R」）、R N A - S e q、F I S H、マイクロアレイ分析、遺伝子発現プロファイリング、及び／又は遺伝子発現の連鎖解析（「S A G E」）、ならびにタンパク質、遺伝子、及び／又は組織アレイ分析によって行うことができる多種多様なアッセイのうちの任意のものが含まれるが、これらに限定されない。遺伝子及び遺伝子産物の状態の評価のための典型的なプロトコルは、例えば、Ausubel et al., eds., 1995, *Current Protocols In Molecular Biology*, ユニット 2（ノーザンプロット法）、4（サザンプロット法）、15（イムノプロット法）、及び 18（P C R 分析）に見出される。R u l e s B a s e d M e d i c i n e 又は M e s o S c a l e D i s c o v e r y（「M S D」）から利用可能なものの等の、マルチプレックス免疫測定法もまた使用され得る。 10

【0307】

幾つかの実施態様において、バイオマーカーの存在及び／又は発現レベル／量は、（a）遺伝子発現プロファイリング、P C R（例えば、r t P C R など）、R N A - s e q、マイクロアレイ分析、S A G E、M a s s A R R A Y 技術、又は試料（例えば、被験体のがん試料）上でのF I S H を行い；b）試料中のバイオマーカーの存在及び／又は発現レベル／量を決定すること含む方法を用いて決定される。幾つかの実施態様において、マイクロアレイ法は、上述した遺伝子をコードする核酸分子とストリンジエントな条件下でハイブリダイズすることができる一又は複数の核酸分子を有する、又は上述した遺伝子によってコードされるタンパク質の一以上に結合することができる一以上のポリペプチド（例えば、ペプチド又は抗体など）を有するマイクロアレイチップの使用を含む。一実施態様のいて、P C R 法は q R T - P C R である。一実施態様のいて、P C R 法は多重 P C R である。幾つかの実施態様において、遺伝子発現は、マイクロアレイにより測定される。幾つかの実施態様において、遺伝子発現は、q R T - P C R により測定される。幾つかの実施態様において、発現は、多重 P C R により測定される。 20

【0308】

F . 薬学的製剤

本明細書に記載の抗 R S P O 抗体の薬学的製剤は、所望の程度の純度を有するその抗体と任意の薬学的に許容される一以上の担体（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.: Williams and Wilkins PA, USA (1980)）とを、凍結乾燥製剤又は水性溶液の形態で混合することによって調製される。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量及び濃度でレシピエントに毒性でなく、そしてこれには、限定しないが、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸のような緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチオルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3 - ペンタノール；及び m - クレゾール）；低分子量（約 10 残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン；マンノサッカライド、ジサッカライド、及びグルコース、マンノース又はデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えば、E D T A；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体（例えば、Z n - タンパク質錯体）；及び／又はポリエチレングリコール（P E G）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。本明細書における典型的な薬学的に許容される担体は、水溶性の中性アクトィブヒアルロニダーゼ糖タンパク質（s H A S E G P）などの介在性薬物分散剤、例えば、r H u P H 2 0（H Y L E N E X（登録商標）、B a x t e r I n t e r n a t i o n a l , I n c . ）などのヒト可溶性 P H - 30

20 ヒアルロニダーゼ糖タンパク質を更に含む。特定の例示的 s H A S E G P 及び使用方法は、r H u P H 20 を含めて、米国特許公開第 2005/0260186 号及び第 2006/0104968 号に記載されている。一態様において、s H A S E G P は、コンドロイチナーゼなどの一以上の付加的なグルコサミノグリカナーゼと組み合わされる。

【0309】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第 6267958 号に記載されている。水性の抗体製剤は、米国特許第 6171586 号及び国際公開第 2006/044908 号に記載されているものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン - 酢酸緩衝液を含む。

【0310】

本明細書の製剤はまた、治療を受けている特定の徴候のために必要な一以上の活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものが含まれる場合がある。このような活性成分は、意図した目的のために有効な量で組み合わされ適切に存在する。

【0311】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合法によって、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン - マイクロカプセル及びポリ(メチルメタクリレート(methyl methacrylate))マイクロカプセルにより、コロイド薬物送達系に(例えばリポソーム、アルブミンミクロスフィア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロ・エマルジョンで調製されたマイクロカプセルに封入されてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示されている。

【0312】

徐放製剤を調製してもよい。徐放性調製物の好適な例には、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが含まれ、このマトリックスは成形品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形態である。

【0313】

インビオ投与に使用される製剤は、一般的に無菌である。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜を通して濾過することにより達成することができる。

【0314】

G. 治療的方法及び組成物

本明細書で提供される抗 R S P O 抗体の何れかを、治療方法で使用することができる。

【0315】

一態様では、医薬として使用のための抗 R S P O 抗体が提供される。更なる態様において、腫瘍、細胞増殖性障害、及び/又はがんの治療において使用のための抗 R S P O 抗体が提供される。幾つかの実施態様において、抗 T P O 抗体は、がん細胞の最終分化を含む細胞の分化を促進することに使用のために提供される。ある実施態様において、治療の方法において使用のための抗 R S P O 抗体が提供される。ある実施態様において、本発明は、個体に抗 R S P O 抗体の有効量を投与することを含む、腫瘍、細胞増殖性障害、及び/又はがんを有する個体を治療する方法における使用のための抗 R S P O 抗体を提供する。幾つかの実施態様において、がんは結腸直腸がんである。一つのそのような実施態様において、本方法は、例えば後述するように、少なくとも一の付加的治療剤の有効量を個体に投与することを更に含む。幾つかの実施態様において、R S P O は R S P O 2 である。幾つかの実施態様において、R S P O は R S P O 3 である。幾つかの実施態様において、R S P O は R S P O 2 及び R S P O 3 である。更なる実施態様において、本発明は、w n t シグナル伝達を阻害すること、血管新生を阻害すること、細胞増殖を阻害すること、がん幹細胞の増殖を阻害すること、及び/又はがん幹細胞を枯渇させることにおいて使用のための抗 R S P O 抗体を提供する。ある実施態様において、本発明は、w n t シグナル伝達を阻害するため、血管新生を阻害するため、細胞増殖を阻害するため、がん幹細胞の増殖を阻害するため、及び/又はがん幹細胞を枯渇させるために、抗 R S P O 抗体の有効量を個体に投与することを含む、個体において w n t シグナル伝達を阻害する、血管新生を阻害する、細胞増殖を阻害する、がん幹細胞の増殖を阻害する、及び/又はがん幹細胞を枯

10

20

30

40

50

渴させる方法において使用のための抗 R S P O 抗体を提供する。上記実施態様の何れかに記載の「個体」は、好ましくはヒトである。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、一以上のバイオマーカーを有する。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーは、R S P O 転座を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 転座は、R S P O 2 及び／又はR S P O 3 転座を含む。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、一以上のバイオマーカーの増加した発現を有する幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーは、R S P O、例えばR S P O 2 及び／又はR S P O 3 を含む。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーは、幹細胞バイオマーカーを含む。幾つかの実施態様において、幹細胞バイオマーカーは、M y c、A x i n 2、L G R 5、T E R T、B I R C 5、及び／又はA s c l 2 を含む。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、分化の一以上のバイオマーカーの減少した発現を有する。幾つかの実施態様において、分化の一以上のバイオマーカーは、C E A C A M 7、S L C 2 6 A 3、C A 1、S Y T 1 5、C A 4、T F F 1、及び／又はK R T 2 0 を含む。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 抗体による処置は、一以上の幹細胞バイオマーカー、例えば、M y c、A x i n 2、L G R 5、T E R T、B I R C 5、及び／又はA s c l 2 の発現を減少させる。幾つかの実施態様において、抗 R S P O 抗体による処置は、分化の一以上のバイオマーカー、例えば、C E A C A M 7、S L C 2 6 A 3、C A 1、S Y T 1 5、C A 4、T F F 1、及び／又はK R T 2 0 の発現を増加させる。幾つかの実施態様において、がんは、副腎がん、膀胱がん、脳がん、乳がん、子宮頸部がん、結腸がん、頭頸部がん、腎臓がん、白血病、肝臓がん、肺がん（例えば、N S C L C）、リンパ系がん、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、直腸がん、皮膚がん（例えば、黒色腫）、胃がん、甲状腺がん、及び／又は子宮がんである。幾つかの実施態様において、がんは、肺がん（例えば、N S C L C）、卵巣がん、乳がん、肝臓がん、又は多発性骨髄腫である。幾つかの実施態様において、がんは結腸直腸がんである。
10
20

【 0 3 1 6 】

更なる態様にて、本発明は、医薬の製造又は調製における抗 R S P O 抗体の使用を提供する。一実施態様において、医薬は、腫瘍、細胞増殖性障害、及び／又はがんの治療のためのものである。更なる実施態様において、本医薬は、腫瘍、細胞増殖性障害、及び／又はがんを有する個体に、医薬の有効量を投与することを含む、腫瘍、細胞増殖性障害、及び／又はがんを治療する方法において使用のためのものである。幾つかの実施態様において、がんは結腸直腸がんである。一つのそのような実施態様において、本方法は、例えば後述するように、少なくとも一の付加的治療剤の有効量を個体に投与することを更に含む。更なる実施態様において、医薬は、w n t シグナル伝達を阻害するため、血管新生を阻害するため、細胞増殖を阻害するため、がん幹細胞の増殖を阻害するため、及び／又はがん幹細胞を枯渇させるためのものである。更なる実施態様において、医薬は、w n t シグナル伝達を阻害するため、血管新生を阻害するため、細胞増殖を阻害するため、がん幹細胞の増殖を阻害するため、及び／又はがん幹細胞を枯渇させるためのものである。更なる実施態様において、医薬は、w n t シグナル伝達を阻害するため、血管新生を阻害する、細胞増殖を阻害する、がん幹細胞の増殖を阻害する、及び／又はがん幹細胞を枯渇させる方法において使用のためのものである。上記実施態様の何れかに記載の「個体」は、ヒトであり得る。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、一以上のバイオマーカーを有する。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーは、R S P O 転座を含む。幾つかの実施態様において、R S P O 転座は、R S P O 2 及び／又はR S P O 3 転座を含む。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、一以上のバイオマーカーの増加した発現を有する幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーは、R S P O、例えばR S P O 2 及び／又はR S P O 3 を含む。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーは、幹細胞バイオマーカーを含む。幾つかの実施態様において、幹細胞バイオマーカーは、M y c、A x i n 2、L G R 5、T E R T、B I R C 5、及び／又はA s c l 2 を含む。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、分化の一以上のバイオマーカーの減少した発現を有する。幾つかの実施態様において、分化のバイオ
30
40
50

マークーは、CEACAM7、SLC26A3、CA1、SYT15、CA4、TFF1、及び／又はKRT20を含む。幾つかの実施態様において、抗RSPo抗体による処置は、一以上の幹細胞バイオマークー、例えば、Myo、Axin2、LGR5、TERT、BIRC5、及び／又はAscl2の発現を減少させる。幾つかの実施態様において、抗RSPo抗体による処置は、分化の一以上のバイオマークー、例えば、CEACAM7、SLC26A3、CA1、SYT15、CA4、TFF1、及び／又はKRT20の発現を増加させる。幾つかの実施態様において、がんは、副腎がん、膀胱がん、脳がん、乳がん、子宮頸部がん、結腸がん、頭頸部がん、腎臓がん、白血病、肝臓がん、肺がん（例えば、NSCLC）、リンパ系がん、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、直腸がん、皮膚がん（例えば、黒色腫）、胃がん、甲状腺がん、及び／又は子宮がんである。幾つかの実施態様において、がんは、肺がん（例えば、NSCLC）、卵巣がん、乳がん、肝臓がん、又は多発性骨髄腫である。

【0317】

更なる態様において、本発明は、腫瘍、細胞増殖性障害、及び／又はがんを治療するための方法を提供する。一実施態様において、本方法は、かかる腫瘍、細胞増殖性障害、及び／又はがんを有する個体に、抗RSPo抗体の有効量を投与することを含む。幾つかの実施態様において、がんは結腸直腸がんである。一つのそのような実施態様において、この方法は、後述するように、少なくとも1つの付加的治療剤の有効量を個体に投与することを更に含む。上記実施態様の何れかに記載の「個体」は、ヒトであり得る。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、一以上のバイオマークーを有する。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマークーは、RSPo転座を含む。幾つかの実施態様において、RSPo転座は、RSPo2及び／又はRSPo3転座を含む。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、一以上のバイオマークーの増加した発現を有する幾つかの実施態様において、一以上のバイオマークーは、RSPo、例えばRSPo2及び／又はRSPo3を含む。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマークーは、幹細胞バイオマークーを含む。幾つかの実施態様において、幹細胞バイオマークーは、Myo、Axin2、LGR5、TERT、BIRC5、及び／又はAscl2を含む。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、分化の一以上のバイオマークーの減少した発現を有する。幾つかの実施態様において、分化のバイオマークーは、CEACAM7、SLC26A3、CA1、SYT15、CA4、TFF1、及び／又はKRT20を含む。幾つかの実施態様において、抗RSPo抗体による処置は、一以上の幹細胞バイオマークー、例えば、Myo、Axin2、LGR5、TERT、BIRC5、及び／又はAscl2の発現を減少させる。幾つかの実施態様において、抗RSPo抗体による処置は、分化の一以上のバイオマークー、例えば、CEACAM7、SLC26A3、CA1、SYT15、CA4、TFF1、及び／又はKRT20の発現を増加させる。幾つかの実施態様において、がんは、副腎がん、膀胱がん、脳がん、乳がん、子宮頸部がん、結腸がん、頭頸部がん、腎臓がん、白血病、肝臓がん、肺がん（例えば、NSCLC）、リンパ系がん、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、直腸がん、皮膚がん（例えば、黒色腫）、胃がん、甲状腺がん、及び／又は子宮がんである。幾つかの実施態様において、がんは、肺がん（例えば、NSCLC）、卵巣がん、乳がん、肝臓がん、又は多発性骨髄腫である。

【0318】

更なる態様において、本発明は、個体において、wntシグナル伝達を阻害する、血管新生を阻害する、細胞増殖を阻害する、がん幹細胞の増殖を阻害する、及び／又はがん幹細胞を枯渇させる方法を提供する。一実施態様において、本方法は、wntシグナル伝達を阻害するため、血管新生を阻害するため、細胞増殖を阻害するため、がん幹細胞の増殖を阻害するため、及び／又はがん幹細胞を枯渇させるために、抗RSPo抗体の有効量を個体に投与することを含む。一実施態様において、「個体」はヒトである。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、一以上のバイオマークーを有する。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマークーは、RSPo転座を含む。幾つかの実施態様において、RSPo転座は、RSPo2及び／又はRSPo3転座を含む。幾つかの実施態様

10

20

30

40

50

において、個体及び／又はがんは、一以上のバイオマーカーの増加した発現を有する幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーは、R S P O、例えばR S P O 2 及び／又はR S P O 3を含む。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーは、幹細胞バイオマーカーを含む。幾つかの実施態様において、幹細胞バイオマーカーは、M y c、A x i n 2、L G R 5、T E R T、B I R C 5、及び／又はA s c l 2を含む。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、分化の一以上のバイオマーカーの減少した発現を有する。幾つかの実施態様において、分化のバイオマーカーは、C E A C A M 7、S L C 2 6 A 3、C A 1、S Y T 1 5、C A 4、T F F 1、及び／又はK R T 2 0を含む。幾つかの実施態様において、抗R S P O抗体による処置は、一以上の幹細胞バイオマーカー、例えば、M y c、A x i n 2、L G R 5、T E R T、B I R C 5、及び／又はA s c l 2の発現を減少させる。幾つかの実施態様において、抗R S P O抗体による処置は、分化の一以上のバイオマーカー、例えば、C E A C A M 7、S L C 2 6 A 3、C A 1、S Y T 1 5、C A 4、T F F 1、及び／又はK R T 2 0の発現を増加させる。幾つかの実施態様において、がんは、副腎がん、膀胱がん、脳がん、乳がん、子宮頸部がん、結腸がん、頭頸部がん、腎臓がん、白血病、肝臓がん、肺がん（例えば、N S C L C）、リンパ系がん、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、直腸がん、皮膚がん（例えば、黒色腫）、胃がん、甲状腺がん、及び／又は子宮がんである。幾つかの実施態様において、がんは、肺がん（例えば、N S C L C）、卵巣がん、乳がん、肝臓がん、又は多発性骨髄腫である。幾つかの実施態様において、がんは結腸直腸がんである。

【0319】

10

更なる態様において、本発明は、例えば、上記の治療法の何れかに使用される、本明細書で提供される抗R S P O抗体の何れかを含む薬学的製剤を提供する。一実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗R S P O抗体の何れか、及び薬学的に許容される担体を含む。その他の実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗R S P O抗体の何れかと、少なくとも一の付加的治療剤を、例えば後述するように含む。幾つかの実施態様において、R S P OはR S P O 2である。幾つかの実施態様において、R S P OはR S P O 3である。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、一以上のバイオマーカーの増加した発現を有する幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーは、R S P O、例えばR S P O 2 及び／又はR S P O 3を含む。幾つかの実施態様において、一以上のバイオマーカーは、幹細胞バイオマーカーを含む。幾つかの実施態様において、幹細胞バイオマーカーは、M y c、A x i n 2、L G R 5、T E R T、B I R C 5、及び／又はA s c l 2を含む。幾つかの実施態様において、個体及び／又はがんは、分化の一以上のバイオマーカーの減少した発現を有する。幾つかの実施態様において、分化のバイオマーカーは、C E A C A M 7、S L C 2 6 A 3、C A 1、S Y T 1 5、C A 4、T F F 1、及び／又はK R T 2 0を含む。幾つかの実施態様において、抗R S P O抗体による処置は、一以上の幹細胞バイオマーカー、例えば、M y c、A x i n 2、L G R 5、T E R T、B I R C 5、及び／又はA s c l 2の発現を減少させる。幾つかの実施態様において、抗R S P O抗体による処置は、分化の一以上のバイオマーカー、例えば、C E A C A M 7、S L C 2 6 A 3、C A 1、S Y T 1 5、C A 4、T F F 1、及び／又はK R T 2 0の発現を増加させる。幾つかの実施態様において、がんは、副腎がん、膀胱がん、脳がん、乳がん、子宮頸部がん、結腸がん、頭頸部がん、腎臓がん、白血病、肝臓がん、肺がん（例えば、N S C L C）、リンパ系がん、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、直腸がん、皮膚がん（例えば、黒色腫）、胃がん、甲状腺がん、及び／又は子宮がんである。幾つかの実施態様において、がんは、肺がん（例えば、N S C L C）、卵巣がん、乳がん、肝臓がん、又は多発性骨髄腫である。幾つかの実施態様において、がんは結腸直腸がんである。

【0320】

30

本発明の抗体は、治療において、単独で、又は他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体は少なくとも1つの更なる治療剤と同時投与され得る。ある実施態様において、付加的治療剤は、細胞障害剤、化学療法剤、細胞増殖抑制剤、抗ホ

40

50

ルモン剤、及び / 又は E G F R 阻害剤である。

【 0 3 2 1 】

上述される併用療法は、併用投与（二以上の治療剤が同一又は別々の製剤中に含まれている場合）及び、本発明の抗体の投与が、付加的治療剤又は薬剤の投与の前に、同時に、及び / 又は後に生じ得る、別々の投与を包含する。一実施態様において、抗 R S P O 抗体の投与及び付加的治療剤の投与は、互いに、約 1 ヶ月以内、又は約 1 、 2 、又は 3 週間以内、又は約 1 、 2 、 3 、 4 、 5 又は 6 日以内に生じる。本発明の抗体はまた、放射線療法と組み合わせて使用することができる。

【 0 3 2 2 】

本発明の抗体（及び任意の付加的治療剤）は、任意の適切な手段によって投与することができる、非経口、肺内、及び鼻腔内、並びに局所治療が所望される場合、病巣内投与が含まれる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が含まれる。投薬は、その投与が短期間か又は長期であるかどうかに部分的に依存し、任意の適切な経路、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射により行うことができる。限定されないが、様々な時間点にわたる、单一又は複数回投与、ボーラス投与、パルス注入を含む様々な投与スケジュールが本明細書で考えられている。

10

【 0 3 2 3 】

本発明の抗体は良好な医療行為に合致した方法で処方され、投与され、投薬される。これに関連した考慮因子としては、治療すべき具体的な障害、治療すべき具体的な哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール及び医師にとって既知の他の因子が挙げられる。抗体は、必要ではないが任意で、問題となる障害の予防又は治療のために、現在使用中の一又は複数の薬剤とともに処方される。そのような他の薬剤の有効量は製剤中に存在する抗体の量、障害又は治療の種類及び上記した他の要因に依存する。これらは一般的には本明細書に記載されるのと同じ用量及び投与経路において、又は、本明細書に記載された用量の 1 % から 9 9 % で、又は経験的に / 臨床的に妥当であると決定された任意の用量及び任意の経路により使用される。

20

【 0 3 2 4 】

疾患の予防又は治療のためには、本発明の抗体の適切な用量（単独で使用されるか、又は、一以上の更なる治療的薬剤との組み合わされる場合）は治療すべき疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体を予防又は治療目的のいずれにおいて投与するか、以前の治療、患者の臨床的履歴及び抗体に対する応答性、及び担当医の判断に依存する。抗体は一時的又は一連の治療にわたって患者に適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一回以上の別個の投与によるか、連続注入によるかに関わらず、抗体約 $1 \mu g / kg$ から $15 mg / kg$ （例えば $0.1 mg / kg$ から $10 mg / kg$ ）が患者への投与のための初期候補用量となり得る。1つの典型的な一日当たり用量は上記した要因に応じて約 $1 \mu g / kg$ から $100 mg / kg$ 又はそれ以上の範囲である。数日間以上に渡る反復投与の場合には、状態に応じて、治療は疾患症状の望まれる抑制が起こるまで持続するであろう。1つの例示される抗体用量は約 $0.05 mg / kg$ から約 $10 mg / kg$ の範囲である。従って、約 $0.5 mg / kg$ 、 $2.0 mg / kg$ 、 $4.0 mg / kg$ 又は $10 mg / kg$ の 1 つ以上の用量（又はこれらの何れかの組み合わせ）を患者に投与してよい。かかる用量は、断続的に、例えば、毎週又は 3 週間毎に（例えば、患者が抗体の約 2 ~ 約 20 回、又は例えば、約 6 回用量を受容するように）投与されてもよい。しかしながら、他の投薬レジメンが有用であってもよい。この治療法の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

30

【 0 3 2 5 】

上記の製剤又は治療方法の何れかが、抗 R S P O 抗体の代わりか又は抗 R S P O に加えて、本発明のイムノコンジュゲートを用いて行うことができることが理解される。

40

【 0 3 2 6 】

H . 製造品

50

本発明の別の態様において、上述した障害の治療、予防、及び／又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。製造品は、容器とラベル又は容器上にある又は容器に付属する添付文書を含む。好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ、IV輸液バッグ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成される。容器は、疾患の治療、予防、及び／又は診断に有効である、それ自体か、又はその他の組成物と併用される化合物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針による穴あきストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも一の活性剤は本発明の抗体である。ラベル又は添付文書は、組成物が選択した症状の治療のために使用されることを示している。更に、製造品は、(a)組成物が本発明の抗体を包含する組成物を含む第一の容器；及び(b)組成物が更なる細胞障害性又はその他の治療的薬剤を包含する組成物を含む第2の容器を含み得る。本発明の本実施態様における製造品は、組成物が特定の疾患を治療することに用いることができることを示す添付文書を更に含んでいてもよい。別法として、又は加えて、製造品は、薬学的に許容される緩衝液、例えば注射用静菌水(BWF1)、リン酸緩衝化塩水、リンガー溶液及びデキストロース溶液を含む第二(又は第三)の容器を更に含んでもよい。これは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的及びユーザーの立場から望まれる他の物質を更に含んでもよい。

【0327】

上記の製造品の何れかは、抗RSP0抗体の代わりか又はそれに加えて、本発明のイムノコンジュゲートを含み得ることが理解される。

10

【実施例】

【0328】

I I I . 実施例

以下は本発明の方法及び組成物の例である。上記提供される一般的な説明を前提として、他の様々な実施態様が実施され得ることが理解される。

【0329】

方法

クローニング及び精製：FLAGタグ付きRNF43は、抗FLAG親和性クロマトグラフィー(Genentech)、続いてサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 75, GE Healthcare)により精製された。FLAGタグ付きR-スボンジン(hRSPO2, hRSPO2 L186, cynoRSPO2, hRSPO3、及びcynoRSPO3FLAG)は、抗FLAG親和性クロマトグラフィー、続いて陽イオン交換クロマトグラフィー(Mono S, GE Healthcare)により精製された。ヒトIgG1のFcタグ付きLGR細胞外ドメインは、親和性クロマトグラフィー(MabSelect Sure, GE Healthcare)、続いてサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 200, GE Healthcare)により精製された。

30

【0330】

WNTレポーターアッセイ：96ウェルプレートに、ウェル当たり4,500293のT細胞が、2.5%ウシ胎児血清を補充した90μlのDMEMに播種された。培養の16～20時間後、細胞を、Fugene6(Promega, Madison, WI)を使用して10ulのトランスフェクションミックス中で0.04ugのTopbrighte 25及び0.02ugのSV40 Renilla DNAで同時トランスフェクトした。更なる16～20時間の培養後、細胞を、セ氏37度で6時間、25μlの5×溶液で刺激した。上清のスクリーニングのために、細胞を、50ng/mlのrmWNT3a(R&D Systems, Minneapolis, MN)及び250pMのrhRSPO2又はrhRSPO3(R&D Systems, Minneapolis, MN)で補充したハイブリドーマ上清を用いて刺激した。クローニングされた抗体を用いたアッセイのために、10%ウシ胎児血清、50ng/mlのrmWNT3a、250pM又は5×の計算されたEC50のrRSPO(示されるように)を補充したDMEM及

40

50

び漸増濃度の抗体が添加された。馴化培地を試験するアッセイについては、培地は、製造業者の説明書に従って Fugene 6 を用いて (Promega, Madison, WI)、示された遺伝子で 293T をトランスフェクトすることによって調製した。馴化培地は、トランスフェクションの 3 日後に収集され、50 ng / ml の rmWNT3a + / - 抗 RSPo 抗体を補充され、レポーター細胞に添加された。6 時間の刺激後、ルシフェラーゼ活性は、Promega Dual-Glo システム (Promega, Madison, WI) を用いて検出された。データは、ホタル / ウミシイタケの比 (RLU / WNT レポーター) 又は抗体の非存在下で正規化された値 (抗体がある場合の RLU / 抗体が無い場合の RLU) の何れかとして分析された。IC50 の測定は、抗体の濃度を増加させて、rRSPo の EC50 で細胞を刺激することによって決定された。対数変換されたデータは、GraphPad Prism を使用して、4 パラメータ用反応式により適合された。

【0331】

RSPo 発現細胞ペレットの生成 : pGCG は、pGIPZ (Open Biosystems) の Zeo^R - CMV_{ie} - tGFP - IRES - Puro^R - shRNA - WRE 内容物を CMV_{ie}E プロモーター、多重クローニング部位 (MCS) 、内部リボソーム侵入部位 (IRES) 及び高感度緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を含む断片と置換することによって作成された HIV ベースの自己不活性化レンチウイルスベクターである。ヒト RSPo リンジン 1 - 4 のオーブンリーディングフレーム (ORF) は、PCR によって C 末端で HA エピトープ (YPYDVPDYA) でタグ付けし、pGCG の MCS に挿入された。HEK-293 細胞は、トランスフェクションの 24 時間前に、10% 热不活性化 FBS を含む DMEM 高グルコース中に、 15×10^6 細胞 / プレートで 15 cm のディッシュ上に蒔かれた。レンチウイルス上清は、6 ug の pGCG - hRSPo 、12 ug のパッケージングベクター 8.9 (Zufferey et al., 1997) 、3 ug のエンベロープベクター pVSV-G (Clontech) 及びトランスフェクション試薬 Genejuice (Novagen) を用いて共トランスフェクションすることにより調製された。培地はトランスフェクションの 12 時間後に交換され、24 時間後ウイルス上清が回収され、0.45 μ m の PES フィルター (Nalgene) を通して濾過され、更なる処理まで 4 度保存された。HEK-293 細胞は、10% 热不活性化 FBS を含む DMEM 高グルコース中に、 1×10^6 細胞 / プレートで 10 cm のディッシュ上に蒔かれた。細胞を 12 時間付着させ、その後、培地を 10 ml のウイルス上清と置き換えた。ウイルス上清は、60 時間細胞上にとどまり、その後、細胞は回収され、FACS による蛍光タンパク質の発現について分析された。ゲートは、各ウイルス構築物に対して、 2×10^5 の、低、中、高の eGFP 発現細胞を選別するように設定された。細胞株を増殖させ、HIV-1 p24 抗原 ELISA 2.0 キット (Zeptometrix Corporation) を用いて、複製能力のあるウイルス (RCV) 産生が無いことについて試験された。ヒト RSPo の発現及び分泌は、濃縮された細胞培養上清の抗 HA ウエスタンブロッティングにより確認され、eGFP 発現レベルと良く相關した。

【0332】

IHC 反応性スクリーニング : ホルマリン固定パラフィン包埋細胞ペレットを、4 μ m で切断した。スライドを 20 分間セ氏 99 度でクエン酸ベースの pH 6.0 の緩衝液 (Dako カタログ番号 S1699、Carpinteria, CA) で前処理した。10% 血清阻止後、抗 RSPo 血清は 1:250 で使用され、ハイブリドーマ上清が流された。1:250 での免疫前血清又は 10 ug / ml の総濃度のナイーブマウス IgG1、2a、及び 2b が陰性対照として使用された。ビオチン化ロバ抗マウス二次抗体 (Jackson Immuno カタログ番号 715-065-151, West Grove, PA) が 5 ug / ml で使用された。VECTASTAIN Elite ABC キット (Standard*) (Vector Labs カタログ番号 PK-6100) が検出に使用され、シグナルは Pierce Metal Enhanced DAB で可視化された (Thermo カタログ番号 34065, Rockford, IL)。

10

20

30

40

50

【0333】

エピトープビニング：抗RSPo抗体のエピトープビニングはOctet RED384機器(ForteBio)を用いて行われた。組換えRSPo(R&D System, Minneapolis, MN)がビオチン化され、120秒間、10 μg/mlで、 streptavidin-biotin センサー上に捕獲された。飽和に至るまでの第一抗体の結合は、600秒間、10 μg/mlで添加することによって達成された。同じバイオセンサーが、5 μg/mlの競合抗体に浸漬され、結合は300秒間測定された。第一抗体の飽和量の存在下における第二抗体の結合不全は、2つの抗体が同じエピトープビンに存在することを示していた。

【0334】

親和性の測定：抗RSPo抗体の結合親和性は、ビアコアTM-2000機器を用いた表面ラズモン共鳴(SPR)により測定された。CM5バイオセンサーチップは、供給者(GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ)の説明書に従って、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドヒドロクロリド(EDC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)試薬により活性化された。RSPo抗原は、約250応答単位(RU)を達成するために、バイオセンサーチップ上に固定化され、続いて1Mのエタノールアミンで遮断された。

【0335】

反応速度測定のために、抗RSPoのFabの2倍連続希釈液が、25で30 μl/分の流速により、HBS-P緩衝液(0.01MのHEPES pH7.4、0.15MのNaCl、0.005%の界面活性剤P20)中に注入された。会合速度(k_{on})及び解離速度(k_{off})は、単純な一対一のラングミュア結合モデル(BIAcore Evaluation Softwareバージョン3.2)を用いて計算された。平衡解離定数(KD)は k_{off}/k_{on} 比として計算された。

【0336】

競合結合ELISA：LGR4及び-5ECDのRSPoへの結合を遮断することにおける抗RSPo抗体の活性を測定するために、マキシソープ384ウェルマイクロウェルプレート(Thermo Scientific Nunc, Roskilde, Denmark)が、4で一晩、50mMの炭酸緩衝液、pH9.6中の0.5 μg/mlのhRSPo2又はhRSPo3(Genentech)の25 μl/ウェルでコーティングされた。プレートは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、pH7.4中、0.5%ウシ血清アルブミン、15 ppmのProclin 300の80 μl/ウェルで遮断された。アッセイ緩衝液(PBS中、0.5%BSA、0.05%のポリソルベート20、15 ppmのProclin 300)中、0.1 μg/mlのLGR4-Fc又は0.015 μg/mlのLGR5-Fcを含有する連続的に希釈した抗RSPo抗体(3倍連続希釈と緩衝液ブランクで0.078-10 ng/ml)が、25 μl/ウェルでプレートに添加された。2時間のインキュベーションの後、プレートに結合したLGR4-Fc及びLGR5-Fcが、ペルオキシダーゼ標識ヤギFab'(ab')2抗ヒトFc(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)を使用して検出された。1時間のインキュベーション後、基質3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(Moss Inc., Pasadena, Maryland)がプレートに添加され、反応は1Mのリン酸を加えることにより停止された。工程で、プレートを、0.05%のTween 20を含む、PBS、pH7.4で洗浄し、コーティング工程の後の全てのインキュベーション工程は、オービタルシェーカー上で室温で行われた。吸光度は、マルチスキャナセントリーダー(Thermo Scientific, Hudson, NH)上で450 nmで読み取られた。

【0337】

RSPoへのRNF43の結合を遮断する抗RSPo抗体の活性は、(RSPo2をコーティングしたプレート上で)0.5 ng/mlのビオチン化RNF43-Flag又は(RSPo3をコーティングしたプレート上で)20 ng/mlのビオチン化RNF43

10

20

30

40

50

-Flagを使用して同様に測定された。結合したビオチン化RNF43-Flagは、上述のように、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビシン(GE Health care, Piscataway, NJ)、続いて基質を用いて検出された。

【0338】

抗RSP03抗体のヒト化：モノクローナル抗体5D6は、以下に記載するようにヒト化された。残基番号は、Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)に従っている。

【0339】

5D6のヒト化の間に構築された変異体は、Fabの形で評価された。マウス5D6由来のVL及びVHドメインを、ヒトVLカッパI(VLKI)及びヒトVHサブグループI V (VH4)コンセンサス配列と整列させた。マウス抗体の超可変領域は、VLKI及びVH Iアクセプターフレームワーク中に操作された。具体的には、mu 5D6 VLドメインから、位置24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)がVLKI中に移植され、mu 5D6 VHドメインから、位置26-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3)がVH I中に移植された。mu 5D6からの全てのVL及びVHのバーニア位置は、それぞれ、VLK1とVH4に移植された。この移植片はv1と称される。

【0340】

このセクションでの抗体の結合親和性は、BIAcoreTM T200フォーマットによって決定された。簡潔には、供給者の説明書に従って、BIAcoreTM研究グレードCM5チップを1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)試薬により活性化させた。huRSP03が、各フローセルで約50応答単位(RU)を達成するために、固定化された。未反応のカッピング基を1Mのエタノールアミンで遮断した。反応速度測定のために、変異体抗体の4倍連続希釈液が、25で30μl/分の流速により、HBS-P緩衝液(0.01MのHEPES pH7.4、0.15MのNaCl、0.005%の界面活性剤P20)中に注入された。会合速度(k_{on})及び解離速度(k_{off})は、1:1ラングミュア結合モデル(BIAcore Evaluation Softwareバージョン2.0)を用いて計算された。平衡解離定数(K_d)を k_{off}/k_{on} 比として算出した。

【0341】

結晶学のRSP03(M33-E210)の精製：N末端のHistidine-MBPタグのN末端を含むRSP03(M33-E210)は、キフネンシンで処置した培地内で増殖させたSF9細胞中でタグなしEndoHと共に発現された。細胞上清を回収し、洗浄緩衝液(25mMのトリス-HCl pH7.5、500mMのNaCl、20mMのイミダゾール、5%グリセロール)で事前に平衡化した10mLのニッケルNTAアガロースカラムに通した。次いで、カラムを洗浄緩衝液の10カラム容積で洗浄した。タンパク質は、溶出緩衝液の5カラム容量(25mMのトリス-HCl pH7.5、500mMのNaCl、300mMのイミダゾール、10%グリセロール)を用いてカラムから溶出され、30mL未満まで濃縮された。TEVプロテアーゼが添加され、試料は透析緩衝液(25mMトリス塩酸pH7.5、500mMのNaCl、10mMイミダゾール、10%グリセロール)に対して4で一晩透析された。透析後、試料は、洗浄緩衝液で予め平衡化された5mLのHistrapカラムに通された。次いで、試料は2未満mLに濃縮され、ゲル濃過緩衝液(25mMのトリス-HCl pH7.5、300mMのNaCl、5%グリセロール)で予め平衡化されたスーパーデックス7516/60カラムに適用された。RSP03(M33-E210)を含む画分をプールし、濃縮した。アリコートを-80で保存した。

【0342】

結晶学のFab精製：Fab 5D6及び26E11は、大腸菌細胞中で発現させた。

10

20

30

40

50

細胞ペーストは、溶解緩衝液（25 mMのEDTA及び1 mMのPMSFを補足したPBS）に再懸濁され、細胞はマイクロフルイダイザーを介して3継代溶解された。次いで、溶解物は1時間12,000 rpmで遠心分離され、清澄溶解物は、0.8 μmのフィルターを通して濾過された。清澄溶解物は、25 mMのEDTAを補充したPBSで予め平衡化された25 mLのプロテインGカラムに直接適用された。カラムは、PBSの10カラム容量で洗浄され、タンパク質は0.58%酢酸で溶出された。溶出液は、その後、緩衝液A（20 mMのMES pH 5.5）で予め平衡化されたHiTrap SP HPカラムにロードされた。カラムは緩衝液Aの10カラム容積で洗浄され、タンパク質は、緩衝液Aから緩衝液B（20 mMのMES pH 5.5、500 mMのNaCl）の20カラム容量の直線勾配上で溶出された。Fabを含有する画分はプールされ、2 mL未満まで濃縮され、ゲル濾過緩衝液で予め平衡化されたスーパーデックス7526/60カラムに適用された。Fabを含む画分をプールし、濃縮した。アリコートを-80 で保存した。 10

【0343】

結晶学のRSP03/Fab複合体の精製：複合体を形成するために、RSP03（M33-E210）の1.25倍モル過剰が、ゲル濾過緩衝液を含む800 μLの結合反応物中で150 nmolの何れかのFabに添加された。結合反応物は、氷上で1時間インキュベートされた。反応物はその後、4 で13,000 rpmで遠心され、ゲル濾過緩衝液で予め平衡化されたスーパーデックス7516/60カラムにロードされた。複合体を含む画分をプールし、20 mg/mLに濃縮した。アリコートを-80 で保存した。 20

【0344】

結晶学：RSP03（M33-E210）/Fab 5D6については、Labcyte Echo液体ハンドラーが、100 nLのシッティングドロップを使用する複数の疎行列結晶スクリーンを設定するために使用された。スクリーンは、18 で保存された。結晶は、母液として100 mMのMIB（pH 9）及び25%PEG1500を含有するドロップ中で得られた。抗凍結剤溶液は、1.8 μLのリザーバー溶液と1 μLの70%グリセロールを混合することによって作製された。単結晶が回収され、10秒間、抗凍結剤溶液に浸漬され、液体窒素中で急速凍結された。

【0345】

RSP03（M33-E210）/Fab 26E11については、Labcyte Echo液体ハンドラーが、100 nLのシッティングドロップを使用する複数の疎行列結晶スクリーンを設定するために使用された。スクリーンは、18 で保存された。結晶は、母液として200 mMのギ酸ナトリウム及び20%（w/v）のPEG3,350を含有するドロップ中で得られた。抗凍結剤溶液は、1.8 μLのリザーバー溶液と1 μLの70%グリセロールを混合することによって作製された。単結晶が回収され、10秒間、抗凍結剤溶液に浸漬され、液体窒素中で急速凍結された。 30

【0346】

両方の複合体は、同様の条件の広い範囲で結晶化された。ほぼ全ての結晶はPEGベースの条件で成長し、最も一般的なのは20-25%のPEG3350であった。成功した他の沈殿剤は、20%のPEG6000、20-25%のPEG4,000、及び25%のPEG1,500を含んでいた。pHは3.5-9の範囲に及び、大部分の結晶成長は7と8の間で見られた。200 mM濃度での様々な塩が結晶成長を支援した。 40

【0347】

結晶構造決定及び精密化2つのRSP03/Fab複合体についての回折データはシンクロトロンで収集した。データは、XDS及びSCALAを用いて指数づけされ、積分され、スケーリングされた。RSP03/5D6及びRSP03/26E11の結晶構造は、サーチモデルとしてFabの構造を用いた分子置換により解かれた。初期分子置換の解の位相は、PHENIXを使用して溶媒平滑化及び電子密度修飾によって改善された。精密化及び再構築の反復ラウンドが、RSP03構造を構築するために使用された。RSP03/5D6及びRSP0/26E11についての結晶学的統計は以下の通りである。 50

表 1. データ収集及び精密化の統計値

	RSPO3/5D6	RSPO3/26E11
波長(Å)	1.0	0.976
分解能範囲(Å)	46.94 - 2.15 (2.22 - 2.15)	48.0 - 2.51 (2.6 - 2.51)
空間群	P 1 21 1	P 1 21 1
単位格子	87.6 52.1 91.8 90 116.87 90	95.7 47.7 96.4 90 114.7 90
ユニークな反射	40700 (3821)	27615 (2713)
多重度	3.4 (3.6)	3.7 (3.7)
完全性(%)	99.40 (95.05)	99.87 (99.67)
平均 I/シグマ(I)	10.92 (2.52)	13.2 (2.8)
ウィルソン B-因子	37.38	42.12
R-merge	0.046 (0.4)	0.083 (0.388)
R/Rfree	0.191/0.237 (0.276/0.314)	0.185/0.241 (0.249/0.296)
非水素原子の数	4888	4731
タンパク質残基	596	594
RMS(結合)	0.029	0.004
RMS(角度)	1.06	0.83
ラマチャンドラン F/A/D	86.2/13.8/0	81.6/18.3/0

最高分解能のシェルの統計が括弧内に示される。

【 0 3 4 8 】

インビボ有効性の実験：RSPO3融合陽性患者由来の腫瘍をBalb/C/ヌードマウスの皮下で増殖させた。腫瘍が約200mm³のサイズに達したら、マウスを3~4週間、週二回、対照抗体又は抗RSPO3抗体(5D6)の何れかを30mg/kgで処置した。抗RSPO3抗体(5D6)をイリノテカンと組み合わせて使用した実験では、上記のように抗RSPO3抗体が投与され、イリノテカンは0日目又は0日目と3日目に100mg/kgで投与された。

【 0 3 4 9 】

連続移植研究のために、RSPO3融合陽性患者由来の腫瘍を移植したマウスは、上述のように対照抗体又は抗RSPO3抗体で処置された。増殖曲線が分離し始めると、腫瘍断片は除去され、ナイーブBalb/C/Nudeマウスに移植された。移植された腫瘍断片を有するマウスは、その後、上記のように対照又は抗RSPO3抗体の何れかで処置された。

【 0 3 5 0 】

結果

10

20

30

40

50

機能遮断及びIHC反応性抗RSPo抗体の產生

抗RSPo抗体を產生する試みにおいて、マウス及びハムスターは、組換えヒトRSPo2及び/又はヒトRSPo3で免疫され、ハイブリドーマ細胞株が作製された。これらの細胞から上澄液は、最初に、ELISAによってhRSPo1、hRSPo2、hRSPo3及びhRSPo4への結合についてスクリーニングされた。hRSPo2及び/又はhRSPo3結合を示す上清は、その後、WNTレポーター活性のhRSPo2及びhRSPo3刺激を遮断する能力について試験された。候補は、その後、クローニングされ、発現され、精製された。図1に示すように、精製されたクローナンのサブセットは、r hRSPo2刺激WNTレポーター活性(図1A)及び/又はr hRSPo3刺激WNTレポーター活性(図1B)を強力に阻害した。

10

【0351】

更に、上清は、IHC試薬として使用することができる抗RSPo抗体を同定するためにはスクリーニングされた。ホルマリン固定パラフィン包埋細胞ペレットは、高、中、又は低レベルのhRSPo2又はhRSPo3を安定して発現する293細胞から調製された。更に、細胞ペレットは、293細胞及びhRSPo1又はhRSPo4を安定して発現する293細胞から調製された。ハイブリドーマ上清及び抗体のクローナンは、調製した細胞ペレット上でIHC反応性について試験された。図2に示されるように、抗体49G5は、IHC反応性により、高、中、又は低レベルのhRSPo2発現(D-F)を認識したが、一方、RSPo3(A-C)、hRSPo1(G)、hRSPo4(H)、又は非hRSPo1-4(I)を認識しなかった。試験した全ての抗体についての結果の概要を以下の表4に示す。抗体4H1、4D4、5C2、5D6、5E11、21C2は、特異的にhRSPo3を認識する。抗体1A1、36D2、49G5は、特異的にhRSPo2を認識する。抗体6E9及び26E11は、特異的にhRSPo2及びhRSPo3を認識する。

20

表 4-抗 RSPO 抗体のパネルの IHC 反応性

抗体	RSPO2 高	RSPO2 中間	RSPO2 低	293 無し	RSPO3 高	RSPO3 中間	RSPO3 低	RSPO1 高	RSPO4 高
4H1	+	-	-	-	++ 90%	++ 60%	+	-	-
4D4	+	-	-	-	++ > 95%	++ 70%	++ 40%	-	-
5C2	+	-	-	-	++ > 95%	++ 60%	++ 40%	-	-
5D6	-	-	-	-	++ > 95%	++ 70%	++ 30%	-	-
5E11	-	-	-	-	+++ 90%	++ 80%	++ 20%	-	-
6E9	++ 50%	+	10%	-	++ > 95%	++ 70%	+	-	-
21C2	+	-	-	-	++ 95%	++ 60%	+	-	-
26E11	++ 70%	+	40%	+	+++ 90%	++ 70%	++ 50%	-	-
1A1	++ 80%	+	40%	+	30%	-	-	-	-
11F11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36D2	++ > 95%	++ 50%	+	<5%	-	-	-	-	-
49G5	++ 95%	++ 60%	+	40%	-	-	-	-	-
IgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ナイーブ マウス IgG2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-, +, ++, +++は相対強度を示し、-は有意な染色でなく、+++は最高レベルの染色である；
パーセンテージは細胞染色の相対的な割合を示す。

【 0 3 5 2 】

抗 R S P O 抗体のエピトープビニング

抗 R S P O 抗体を更に特徴づけるために、抗体が分類される固有のエピトープビンの数が、O C T E T R E D アッセイを用いて決定された。抗体は、最初に親和性がランク付けされた。最も高い親和性を有する抗体は、h R S P O 2 又は h R S P O 3 結合バイオセンサーへ飽和に至るまで結合させた。二次抗体による結合が、その後評価された。試験された抗 R S P O 2 抗体は、1 A 1 又は 11 F 1 1 の何れかと競合する能力によって定義される 2 つの固有のエピトープビンに分類された。第一の固有のエピトープビンは 1 A 1 、4 9 G 5 、及び 3 6 D 2 を含み、第二の固有のエピトープビンは 11 F 1 1 を含んでいた。試験された抗 R S P O 3 抗体は、2 6 E 1 1 、4 H 1 、又は 2 1 C 2 と競合する能力によって定義される 3 つの固有のエピトープビンに分類された。第一の固有のエピトープビンは、2 6 E 1 1 、5 D 6 、5 E 1 1 、及び 6 E 9 を含み、第二の固有のエピトープビンは 4 H 1 を含み、第三の固有のエピトープビンは 5 C 2 及び 2 1 C 2 を含んでいた。

【 0 3 5 3 】

抗 R S P O 抗体の結合特異性及び親和性

抗 R S P O 抗体を更に特徴づけるために、それらの機能遮断活性がマウス R S P O 2 (R & D S y s t e m s) 及びカニクイザル R S P O 2 (G e n e n t e c h) に対して

10

20

30

40

50

試験された。抗体クローニングのサブセットは、WNTレポーター細胞のhRSP02、cynoRSP02、及びmRSP02刺激を遮断できた(図3A-C)。RSP02中の位置186での多型は、ヒト集団において同定された。この多型に対する抗RSP0抗体の機能遮断活性及びこの患者集団における潜在的有用性を評価するために、hRSP02-L186Pタンパク質が最初に精製され、次いでWNTレポーター細胞を刺激するために使用された。抗RSP0抗体のサブセットは、hRSP02-L186Pの機能を遮断できた(図3D)。

【0354】

更に、抗RSP0抗体は、マウスRSP03(R&D Systems)及びカニクイザルRSP03(Genentech)の機能を遮断する能力について試験された。抗体のサブセットは、hRSP03、cynoRSP03、mRSP03のWNTレポーター細胞刺激を阻害することができた(図4A-C)。抗RSP0抗体は、更に、結腸直腸腫瘍において最近同定されたRSP03融合遺伝子を阻害する能力について試験された(Se shagiri et al., Nature 488:660-664 (2012))。馴化培地は、同定された2つのPTP RD-RSP03融合遺伝子(配列番号176及び178)をコードする構築物をトランスフェクトすることにより調製された。RSP03又はRSP03融合遺伝子を含む馴化培地は、WNTレポーター活性を刺激することができた。抗RSP03抗体は、レポーター細胞のRSP03融合遺伝子の刺激を阻害することができた(図4D)。この結果は、抗RSP03抗体がRPSO転座媒介性wntシグナル伝達を阻害することができることを示している。

10

【0355】

表面プラズモン共鳴は、ヒト、マウス、及びカニクイザルRSP0に対する結合特異性及び親和性を確認するために使用された。抗体クローニングからのFab断片は、消化され、精製され、その後、組換えタンパク質への結合についてBIACoreTM-2000機器を用いてアッセイされた。抗体は、三つのグループ: RSP02に特異的なもの、RSP03に特異的なもの、及びある程度の交差反応性を有するものに分類された(図5)。結合親和性は低ナノモル範囲内(0.073-80nMの範囲)にあった。

20

【0356】

抗RSP0抗体の結合特性

以前に、RSP0タンパク質は、膜貫通タンパク質の2つの異なるクラス: E3-リガーゼ(RNF43及びZNRF3)及びLGR(LGR4及びLGR5)(Hao et al., Nature 485(7397):195-200 (2012))に結合することが示されている。抗RSP0抗体がこの2つのクラスのタンパク質との結合を阻害することができるかどうかを試験するために、競合結合ELISAアッセイが開発された。LGR4又はLGR5のhRSP02及びhRSP03への結合を阻害する能力について試験するとき、抗RSP0抗体は、次の3つのカテゴリに分類された: LGR4及びLGR5の相互作用を阻害できたもの、阻害しなかったもの、及び促進したもの(図6A-B、データは示さず)。同様に、抗RSP0抗体のパネルのサブセットは、RNF43のhRSP02又はRSP03への結合を阻害した(図7A-B)。抗RSP0結果の概要は以下の通りである(表5)。

30

【0357】

抗RSP0抗体のヒト化

ヒト化5D6v1(hu5D6v1と称される)抗体の結合親和性が、キメラ5D6と比較された。hu5D6v1のマウスバーニア位置は、hRSP03に結合するマウスバーニア位置の寄与を評価するために、ヒト残基に変換された。4つの付加的軽鎖(L1:v1+Y36(v2.1と称される)、v1+L46(v2.2と称される)、v1+T69(v2.3と称される)、v1+F71(v2.4と称される))及び4つの付加的重鎖(v1+V71(v2.8と称される)、v1+R94(v2.10と称される)、v1+W47+I48+F78(v3.2と称される)、v1+W47+I48+v67+F78(v3.3と称される))。上述の変異体抗体の結合親和性評価に基づいて(データは示さず)、軽鎖上のF36及びT46は、鍵となるマウスのバーニア残基であり

40

50

、重鎖上のV71及びR94は、鍵となるマウスのバーニア残基であると決定された。キメラ5D6は、3.3E-11MのKDで結合したが、一方、v1+T69(LC)+(W47+I48+V67+F78(HC))(hu5D6v4.1と称される)、v1+T69(LC)+(W47+I48+F78(HC))(hu5D6v4.3と称される)は、それぞれ、6.3E-11M、及び7.0E-11MのKDで結合した。

【0358】

結合アッセイにおいてカニクイザル又はマウスRSP03がhuRSP03と置換したのを除き、上述のように、hu5D6v4.1及びキメラ5D6は、カニクイザル及びマウスRSP0に結合するそれらの能力について試験された。ヒト化抗体の結合特性は以下の表5に示される。

10

抗体	huKD (M)	huka (1/Ms)	hukd (1/s)	cynoKD (M)	cynoka (1/Ms)	cynokd (1/s)	muKD (M)	muka (1/Ms)	mukd (1/s)
5D6 キメラ	3.31 E-11	3.51 E+06	1.16 E-04	4.53 E-11	4.96 E+06	2.24 E-04	5.78 E-11	4.10 E+06	2.37 E-04
Hu5D6v4.1	6.35 E-11	3.60 E+06	2.29E-04	8.11 E-11	5.35 E+06	4.34 E-04	9.93 E-11	4.26 E+06	4.23 E-04

【0359】

20

ヒト化抗体hu5D6v4.1は、熱応力(40、pH5.5、2週間)及び2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)ヒドロクロリド(AAPH)分析の下で試験された。次いで、試料は、製品の貯蔵期間にわたって安定性を模倣するために、熱的にストレスが加えられた。試料は、20mMにヒスチジン酢酸、240mMのスクロース、pH5.5に緩衝液交換され、1mg/mLの濃度に希釈された。試料の1mLを2週間40

でストレスが加えられ、2番目のは対照として-70で保存された。両方の試料は、次いで、液体クロマトグラフィー(LC)-質量分析(MS)分析を用いて分析することができるペプチドを作成するために、トリプシンを用いて消化された。各ペプチドに対して、LCからの試料保持期間並びに高分解能精密質量及びペプチドイオンのフラグメンテーション情報(アミノ酸配列情報)がMSで取得された。抽出されたイオンクロマトグラム(XIC)が、+-10ppmでのウインドウで、データセットから目的のペプチド(天然型及び修飾型ペプチドイオン)について取得され、ピークは面積を決定するために積分された。修飾の相対的な割合は、(修飾されたペプチドの面積)を(修飾されたペプチドの面積と天然ペプチドの面積)で割って、100を乗じて、各試料について計算された。

30

【0360】

熱ストレス試験によって決定されるように、hu5D6v4.1は、CDR-H3にW^{100b}を有しており、これは酸化に対して感受性である(トリプトファンの酸化において11.5%増加。AAPHストレス後に、対照の24.1%から35.6%)。F100b(hu5D6v5.1と称される)及びW100bH(hu5D6v5.2と称される)変異体が潜在的酸化を減少させるために構築された。

40

【0361】

結晶学によるエピトープマッピング

抗RSP0抗体を更に特徴付けるために、RSP03/Fab複合体(5D6及び26E11)の結晶が上記のように調製され、結晶構造が決定された。図8を参照。表6は、5D6の重鎖(HC)及び軽鎖(LC)とRSP03(F鎖)との間の接触のリストを含む。表6におけるカットオフは4オングストロームである。表7は、26E11の重鎖(HC)及び軽鎖(LC)とRSP03(F鎖)との間の接触のリストを含む。表7におけるカットオフは4オングストロームである。5D6及び26E11の両方における接触の大部分はRSP03のフリン1ドメインである。

50

表 5-抗RSPO 抗体の結果の概要

	阻害 hRSPO2 wnt シグ ナル伝達	阻害 L186P wnt シグナ ル伝達	阻害 エビトープ ビン 26E11	阻害 エビトープ ビン 4H1	阻害 エビトープ ビン 21C2	阻害 エビトープ ビン 1A1	阻害 LGR4/ RSPO3	阻害 LGR4/ RSPO2	阻害 LGR5/ RSPO3	阻害 LGR5/ RSPO2	阻害 RNF43/ RSPO3
4H1	+	++	+	No	Yes	No	ND	ND	-	++	-
4D4	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5C2	-	+++	-	No	No	Yes	ND	ND	+	+++	-
5D6	-	+++	-	Yes	No	No	ND	ND	+	+++	-
5E11	-	+++	-	Yes	No	No	ND	ND	+	+++	-
6E9	+	++	-	Yes	No	No	ND	ND	+++	++	+++
21C2	-	ND	ND	No	No	Yes	ND	ND	-	+++	ND
26E11	++	+++	++	Yes	No	No	ND	ND	+++	++	+++
1A1	+++	-	+++	ND	ND	Yes	No	No	(増強され た結合)	-	+++
11F11	++	-	++	ND	ND	No	Yes	-	-	-	-
36D2	+++	-	+++	ND	ND	Yes	No	++	-	+++	-
49G5	-	-	ND	ND	ND	Yes	No	++	-	+	-

10

20

30

40

表 6- RSPO3 と 5D6 の重鎖及び軽鎖の接触残基

抗体鎖	残基	原子名	原子	RSPO3	残基	原子名	原子	距離
/H/	316(GLY)	O	O]:	/F/	49(SER)	OG	O]:	3.94
/H/	316(GLY)	CA	C]:	/F/	54(CYS)	O	O]:	3.59
				/F/	55(LEU)	CA	C]:	3.9
/H/	314(GLY)	CA	C]:	/F/	55(LEU)	O	O]:	3.51
/H/	314(GLY)	C	C]:	/F/	55(LEU)	O	O]:	3.56
/H/	315(TYR)	N	N]:	/F/	55(LEU)	O	O]:	3.53
/H/	316(GLY)	N	N]:	/F/	55(LEU)	O	O]:	3.03
/H/	316(GLY)	CA	C]:	/F/	55(LEU)	O	O]:	3.55
/H/	317(GLY)	N	N]:	/F/	55(LEU)	CD1	C]:	3.34
/H/	314(GLY)	N	N]:	/F/	55(LEU)	CD1	C]:	4
/H/	316(GLY)	C	C]:	/F/	55(LEU)	CD1	C]:	3.92
/H/	317(GLY)	CA	C]:	/F/	55(LEU)	CD1	C]:	3.46
/H/	313(TYR)	O	O]:	/F/	56(SER)	CB	C]:	3.62
/H/	315(TYR)	CD2	C]:	/F/	63(PHE)	CB	C]:	3.92
/H/	315(TYR)	CB	C]:	/F/	63(PHE)	CG	C]:	3.56
				/F/	63(PHE)	CD1	C]:	3.41
				/F/	63(PHE)	CD2	C]:	3.89
				/F/	63(PHE)	CE1	C]:	3.6
/H/	316(GLY)	N	N]:	/F/	63(PHE)	CE2	C]:	3.59
/H/	316(GLY)	CA	C]:	/F/	63(PHE)	CE2	C]:	3.77
/H/	315(TYR)	C	C]:	/F/	63(PHE)	CZ	C]:	3.83
/H/	315(TYR)	O	O]:	/F/	63(PHE)	CZ	C]:	3.97
/H/	315(TYR)	CB	C]:	/F/	63(PHE)	CZ	C]:	3.92
/H/	316(GLY)	N	N]:	/F/	63(PHE)	CZ	C]:	3.71
/H/	316(GLY)	CA	C]:	/F/	63(PHE)	CZ	C]:	3.76
/H/	264(TYR)	OH	O]:	/F/	89(TYR)	CB	C]:	3.79
/H/	315(TYR)	OH	O]:	/F/	89(TYR)	CD1	C]:	3.8
				/F/	89(TYR)	CE1	C]:	3.95
/H/	264(TYR)	OH	O]:	/F/	90(PRO)	N	N]:	3.5
				/F/	90(PRO)	CA	C]:	3.74
				/F/	90(PRO)	C	C]:	3.58
/H/	264(TYR)	CE1	C]:	/F/	90(PRO)	O	O]:	3.62
/H/	264(TYR)	CZ	C]:	/F/	90(PRO)	O	O]:	3.61
/H/	264(TYR)	OH	O]:	/F/	90(PRO)	O	O]:	2.72
/H/	271(THR)	O	O]:	/F/	90(PRO)	CB	C]:	3.81
/H/	264(TYR)	OH	O]:	/F/	90(PRO)	CB	C]:	3.5
/H/	271(THR)	O	O]:	/F/	90(PRO)	CG	C]:	3.33
/H/	264(TYR)	OH	O]:	/F/	90(PRO)	CG	C]:	3.91

10

20

30

40

				/F/	90(PRO)	CD	C]:	3.55
/H/	247(TYR)	OH	O]:	/F/	91(ASP)	C	C]:	3.66
/H/	247(TYR)	CE2	C]:	/F/	91(ASP)	O	O]:	3.55
/H/	247(TYR)	CZ	C]:	/F/	91(ASP)	O	O]:	3.52
/H/	247(TYR)	OH	O]:	/F/	91(ASP)	O	O]:	2.62
/H/	267(TYR)	CE2	C]:	/F/	91(ASP)	O	O]:	3.7
/H/	267(TYR)	OH	O]:	/F/	91(ASP)	O	O]:	3.7
/H/	266(SER)	CB	C]:	/F/	91(ASP)	CB	C]:	3.65
/H/	266(SER)	OG	O]:	/F/	91(ASP)	CB	C]:	3.56
/H/	267(TYR)	CE2	C]:	/F/	91(ASP)	CB	C]:	3.74
/H/	267(TYR)	CZ	C]:	/F/	91(ASP)	CB	C]:	3.93
/H/	267(TYR)	OH	O]:	/F/	91(ASP)	CB	C]:	3.88
/H/	268(SER)	OG	O]:	/F/	91(ASP)	CG	C]:	3.45
/H/	266(SER)	CB	C]:	/F/	91(ASP)	CG	C]:	4
/H/	266(SER)	OG	O]:	/F/	91(ASP)	CG	C]:	3.34
/H/	270(LYS)	NZ	N]:	/F/	91(ASP)	CG	C]:	3.97
/H/	267(TYR)	CE2	C]:	/F/	91(ASP)	CG	C]:	3.97
/H/	267(TYR)	CZ	C]:	/F/	91(ASP)	CG	C]:	3.71
/H/	267(TYR)	OH	O]:	/F/	91(ASP)	CG	C]:	3.68
/H/	268(SER)	CB	C]:	/F/	91(ASP)	OD1	O]:	3.47
/H/	268(SER)	OG	O]:	/F/	91(ASP)	OD1	O]:	2.47
/H/	270(LYS)	CG	C]:	/F/	91(ASP)	OD1	O]:	3.83
/H/	266(SER)	CB	C]:	/F/	91(ASP)	OD1	O]:	3.39
/H/	266(SER)	OG	O]:	/F/	91(ASP)	OD1	O]:	2.4
/H/	268(SER)	N	N]:	/F/	91(ASP)	OD1	O]:	3.78
/H/	270(LYS)	CB	C]:	/F/	91(ASP)	OD1	O]:	3.92
/H/	270(LYS)	NZ	N]:	/F/	91(ASP)	OD1	O]:	3.99
/H/	267(TYR)	CZ	C]:	/F/	91(ASP)	OD1	O]:	3.94
/H/	268(SER)	OG	O]:	/F/	91(ASP)	OD2	O]:	3.71
/H/	270(LYS)	NZ	N]:	/F/	91(ASP)	OD2	O]:	3.35
/H/	267(TYR)	CZ	C]:	/F/	91(ASP)	OD2	O]:	3.96
/H/	267(TYR)	OH	O]:	/F/	91(ASP)	OD2	O]:	3.54
/H/	270(LYS)	CD	C]:	/F/	91(ASP)	OD2	O]:	3.95
/H/	247(TYR)	CE2	C]:	/F/	92(ILE)	CB	C]:	3.92
/H/	247(TYR)	CZ	C]:	/F/	92(ILE)	CB	C]:	3.94
/H/	247(TYR)	OH	O]:	/F/	92(ILE)	CB	C]:	3.57
				/F/	92(ILE)	CG1	C]:	3.77
/H/	315(TYR)	CE2	C]:	/F/	92(ILE)	CG1	C]:	3.59
/H/	264(TYR)	OH	O]:	/F/	92(ILE)	CG2	C]:	3.8
/H/	247(TYR)	CZ	C]:	/F/	92(ILE)	CD1	C]:	3.92
/H/	247(TYR)	OH	O]:	/F/	92(ILE)	CD1	C]:	3.86

10

20

30

40

/H/	312(TYR)	CE1	C]:	/F/	92(ILE)	CD1	C]:	3.99
/H/	315(TYR)	CD2	C]:	/F/	92(ILE)	CD1	C]:	3.78
/H/	315(TYR)	CE2	C]:	/F/	92(ILE)	CD1	C]:	3.51
/H/	315(TYR)	CZ	C]:	/F/	94(LYS)	CB	C]:	3.95
/H/	315(TYR)	CD2	C]:	/F/	94(LYS)	CB	C]:	3.96
/H/	315(TYR)	CE2	C]:	/F/	94(LYS)	CB	C]:	3.56
/H/	315(TYR)	OH	O]:	/F/	94(LYS)	CG	C]:	3.98
/H/	315(TYR)	CE1	C]:	/F/	94(LYS)	CD	C]:	3.59
/H/	315(TYR)	CZ	C]:	/F/	94(LYS)	CD	C]:	3.33
/H/	315(TYR)	OH	O]:	/F/	94(LYS)	CD	C]:	3.28
/H/	315(TYR)	CE2	C]:	/F/	94(LYS)	CD	C]:	3.86
/L/	53(ARG)	NH2	N]:	/F/	52(ASN)	O	O]:	3.58
/L/	53(ARG)	NE	N]:	/F/	52(ASN)	CB	C]:	3.98
/L/	53(ARG)	CZ	C]:	/F/	52(ASN)	CB	C]:	3.29
/L/	53(ARG)	NH1	N]:	/F/	52(ASN)	CB	C]:	3.24
/L/	53(ARG)	NH2	N]:	/F/	52(ASN)	CB	C]:	3.37
/L/	53(ARG)	CD	C]:	/F/	52(ASN)	CG	C]:	3.99
/L/	53(ARG)	NE	N]:	/F/	52(ASN)	CG	C]:	3.54
/L/	53(ARG)	CZ	C]:	/F/	52(ASN)	CG	C]:	3.39
/L/	53(ARG)	NH1	N]:	/F/	52(ASN)	CG	C]:	3.62
/L/	53(ARG)	NH2	N]:	/F/	52(ASN)	CG	C]:	3.75
/L/	53(ARG)	CD	C]:	/F/	52(ASN)	ND2	N]:	3.41
/L/	53(ARG)	NE	N]:	/F/	52(ASN)	ND2	N]:	3.47
/L/	53(ARG)	CZ	C]:	/F/	52(ASN)	ND2	N]:	3.56
/L/	53(ARG)	NH1	N]:	/F/	52(ASN)	ND2	N]:	3.53
/L/	53(ARG)	NE	N]:	/F/	52(ASN)	OD1	O]:	3.9
/L/	53(ARG)	CZ	C]:	/F/	52(ASN)	OD1	O]:	3.96
/L/	32(TYR)	OH	O]:	/F/	63(PHE)	CD1	C]:	3.43
/L/	32(TYR)	CE1	C]:	/F/	63(PHE)	CE1	C]:	3.84
/L/	32(TYR)	OH	O]:	/F/	63(PHE)	CE1	C]:	3.49
				/F/	65(LEU)	CG	C]:	3.61
/L/	30(ASP)	O	O]:	/F/	65(LEU)	CD1	C]:	3.64
/L/	32(TYR)	CZ	C]:	/F/	65(LEU)	CD1	C]:	3.98
/L/	32(TYR)	OH	O]:	/F/	65(LEU)	CD1	C]:	3.94
/L/	50(LEU)	CD1	C]:	/F/	65(LEU)	CD2	C]:	3.81
/L/	53(ARG)	NH2	N]:	/F/	72(GLN)	C	C]:	3.55
/L/	53(ARG)	NE	N]:	/F/	72(GLN)	O	O]:	3.85
/L/	53(ARG)	CZ	C]:	/F/	72(GLN)	O	O]:	3.57
/L/	53(ARG)	NH2	N]:	/F/	72(GLN)	O	O]:	2.47
/L/	31(SER)	CB	C]:	/F/	72(GLN)	NE2	N]:	3.62
/L/	31(SER)	OG	O]:	/F/	72(GLN)	NE2	N]:	3.34

10

20

30

40

/L/	53(ARG)	NH2	N]:	/F/	73(ILE)	CA	C]:	3.66
				/F/	74(GLY)	N	N]:	3.93
/L/	30(ASP)	OD2	O]:	/F/	84(TYR)	CE2	C]:	3.77
/L/	94(PHE)	CD2	C]:	/F/	89(TYR)	CG	C]:	3.72
				/F/	89(TYR)	CD1	C]:	3.66
				/F/	89(TYR)	CD2	C]:	3.85
				/F/	89(TYR)	CE1	C]:	3.74
/L/	94(PHE)	CB	C]:	/F/	89(TYR)	CE2	C]:	3.89
/L/	94(PHE)	CD2	C]:	/F/	89(TYR)	CE2	C]:	3.93
/L/	94(PHE)	N	N]:	/F/	89(TYR)	CZ	C]:	3.57
/L/	94(PHE)	CD2	C]:	/F/	89(TYR)	CZ	C]:	3.87
/L/	93(GLU)	C	C]:	/F/	89(TYR)	OH	O]:	3.74
/L/	94(PHE)	N	N]:	/F/	89(TYR)	OH	O]:	3.14
/L/	93(GLU)	CA	C]:	/F/	89(TYR)	OH	O]:	3.35
/L/	93(GLU)	CB	C]:	/F/	89(TYR)	OH	O]:	3.39
/L/	92(ASP)	O	O]:	/F/	94(LYS)	CD	C]:	3.68
				/F/	94(LYS)	CE	C]:	3.55
/L/	32(TYR)	CE2	C]:	/F/	94(LYS)	CE	C]:	3.63
/L/	32(TYR)	CZ	C]:	/F/	94(LYS)	CE	C]:	3.66
/L/	92(ASP)	OD1	O]:	/F/	94(LYS)	CE	C]:	3.96
/L/	92(ASP)	CA	C]:	/F/	94(LYS)	NZ	N]:	3.95
/L/	92(ASP)	C	C]:	/F/	94(LYS)	NZ	N]:	3.76
/L/	92(ASP)	O	O]:	/F/	94(LYS)	NZ	N]:	2.89
/L/	32(TYR)	CE2	C]:	/F/	94(LYS)	NZ	N]:	3.74
/L/	92(ASP)	CG	C]:	/F/	94(LYS)	NZ	N]:	3.85
/L/	92(ASP)	OD1	O]:	/F/	94(LYS)	NZ	N]:	2.81
/L/	28(ASP)	OD2	O]:	/F/	97(LYS)	CD	C]:	3.7
				/F/	97(LYS)	CE	C]:	3.96
/L/	30(ASP)	OD1	O]:	/F/	97(LYS)	CE	C]:	4
/L/	28(ASP)	CG	C]:	/F/	97(LYS)	NZ	N]:	3.82
/L/	28(ASP)	OD1	O]:	/F/	97(LYS)	NZ	N]:	3.85
/L/	28(ASP)	OD2	O]:	/F/	97(LYS)	NZ	N]:	3.11
/L/	27(GLN)	NE2	N]:	/F/	108(LYS)	NZ	N]:	3.9

10

20

30

表 7- RSPO3 と 26E11 の重鎖及び軽鎖の接触残基

抗体鎖	残基名	原子名	原子	RSPO3	残基名	原子名	原子	距離
/H/	313(HIS)	CE1	C	/F/	47(THR)	CB	C	3.72
/H/	313(HIS)	NE2	N	/F/	47(THR)	CB	C	3.73
/H/	313(HIS)	CE1	C	/F/	47(THR)	CG2	C	3.82
/H/	313(HIS)	NE2	N	/F/	47(THR)	CG2	C	3.3
/H/	313(HIS)	CE1	C	/F/	47(THR)	OG1	O	2.92
/H/	313(HIS)	NE2	N	/F/	47(THR)	OG1	O	3.25
/H/	316(GLY)	CA	C	/F/	54(CYS)	O	O	3.93
/H/	316(GLY)	CA	C	/F/	55(LEU)	CA	C	3.89
/H/	316(GLY)	C	C	/F/	55(LEU)	CA	C	3.86
/H/	316(GLY)	N	N	/F/	55(LEU)	C	C	3.92
/H/	316(GLY)	CA	C	/F/	55(LEU)	C	C	4
/H/	314(GLY)	CA	C	/F/	55(LEU)	O	O	3.72
/H/	314(GLY)	C	C	/F/	55(LEU)	O	O	3.63
/H/	315(TYR)	N	N	/F/	55(LEU)	O	O	3.66
/H/	316(GLY)	N	N	/F/	55(LEU)	O	O	2.92
/H/	316(GLY)	CA	C	/F/	55(LEU)	O	O	3.34
/H/	316(GLY)	C	C	/F/	55(LEU)	O	O	3.7
/H/	317(GLY)	N	N	/F/	55(LEU)	O	O	3.63
/H/	313(HIS)	ND1	N	/F/	55(LEU)	CB	C	3.96
/H/	313(HIS)	CE1	C	/F/	55(LEU)	CB	C	3.45
/H/	316(GLY)	C	C	/F/	55(LEU)	CD2	C	3.96
/H/	316(GLY)	O	O	/F/	55(LEU)	CD2	C	3.29
/H/	313(HIS)	CE1	C	/F/	56(SER)	CB	C	3.92
/H/	313(HIS)	CE1	C	/F/	56(SER)	OG	O	3.74
/H/	313(HIS)	NE2	N	/F/	56(SER)	OG	O	3.86
/H/	315(TYR)	CB	C	/F/	63(PHE)	CG	C	3.69
/H/	315(TYR)	CB	C	/F/	63(PHE)	CD2	C	3.48
/H/	315(TYR)	O	O	/F/	63(PHE)	CE2	C	3.86
/H/	315(TYR)	CB	C	/F/	63(PHE)	CE2	C	3.89
/H/	316(GLY)	N	N	/F/	63(PHE)	CE1	C	3.9
/H/	316(GLY)	CA	C	/F/	63(PHE)	CE1	C	3.82
/H/	315(TYR)	O	O	/F/	63(PHE)	CZ	C	3.95
/H/	315(TYR)	C	C	/F/	63(PHE)	CZ	C	3.98
/H/	316(GLY)	N	N	/F/	63(PHE)	CZ	C	3.87
/H/	316(GLY)	CA	C	/F/	63(PHE)	CZ	C	3.67
/H/	264(TYR)	OH	O	/F/	89(TYR)	CB	C	3.67
/H/	315(TYR)	OH	O	/F/	89(TYR)	CD2	C	3.53
/H/	315(TYR)	OH	O	/F/	89(TYR)	CE2	C	3.65

10

20

30

40

/H/	264(TYR)	OH	O	/F/	90(PRO)	N	N	3.57
/H/	264(TYR)	OH	O	/F/	90(PRO)	CA	C	3.96
/H/	264(TYR)	OH	O	/F/	90(PRO)	C	C	3.76
/H/	264(TYR)	CE1	C	/F/	90(PRO)	O	O	3.73
/H/	264(TYR)	CZ	C	/F/	90(PRO)	O	O	3.74
/H/	264(TYR)	OH	O	/F/	90(PRO)	O	O	2.86
/H/	264(TYR)	OH	O	/F/	90(PRO)	CB	C	3.87
/H/	271(THR)	O	O	/F/	90(PRO)	CG	C	3.48
/H/	264(TYR)	OH	O	/F/	90(PRO)	CD	C	3.51
/H/	247(TYR)	CE2	C	/F/	91(ASP)	C	C	3.95
/H/	247(TYR)	OH	O	/F/	91(ASP)	C	C	3.46
/H/	247(TYR)	CE2	C	/F/	91(ASP)	O	O	3.35
/H/	247(TYR)	CZ	C	/F/	91(ASP)	O	O	3.28
/H/	247(TYR)	OH	O	/F/	91(ASP)	O	O	2.37
/H/	267(PHE)	CE2	C	/F/	91(ASP)	O	O	3.8
/H/	266(SER)	CB	C	/F/	91(ASP)	CB	C	3.71
/H/	266(SER)	OG	O	/F/	91(ASP)	CB	C	3.73
/H/	267(PHE)	CE2	C	/F/	91(ASP)	CB	C	3.83
/H/	267(PHE)	CZ	C	/F/	91(ASP)	CB	C	3.81
/H/	266(SER)	CB	C	/F/	91(ASP)	CG	C	3.91
/H/	266(SER)	OG	O	/F/	91(ASP)	CG	C	3.36
/H/	270(LYS)	CD	C	/F/	91(ASP)	CG	C	3.75
/H/	268(SER)	OG	O	/F/	91(ASP)	CG	C	3.4
/H/	267(PHE)	CZ	C	/F/	91(ASP)	CG	C	3.84
/H/	266(SER)	CB	C	/F/	91(ASP)	OD2	O	3.35
/H/	266(SER)	OG	O	/F/	91(ASP)	OD2	O	2.48
/H/	270(LYS)	CB	C	/F/	91(ASP)	OD2	O	3.25
/H/	270(LYS)	CG	C	/F/	91(ASP)	OD2	O	3.29
/H/	270(LYS)	CD	C	/F/	91(ASP)	OD2	O	3.16
/H/	268(SER)	OG	O	/F/	91(ASP)	OD2	O	2.77
/H/	270(LYS)	NZ	N	/F/	91(ASP)	OD2	O	3.91
/H/	270(LYS)	CD	C	/F/	91(ASP)	OD1	O	3.97
/H/	267(PHE)	CE1	C	/F/	91(ASP)	OD1	O	3.83
/H/	268(SER)	OG	O	/F/	91(ASP)	OD1	O	3.41
/H/	270(LYS)	NZ	N	/F/	91(ASP)	OD1	O	3.97
/H/	267(PHE)	CZ	C	/F/	91(ASP)	OD1	O	3.61
/H/	247(TYR)	OH	O	/F/	92(ILE)	CA	C	3.82
/H/	247(TYR)	CE2	C	/F/	92(ILE)	CB	C	3.92
/H/	247(TYR)	CZ	C	/F/	92(ILE)	CB	C	3.72
/H/	247(TYR)	OH	O	/F/	92(ILE)	CB	C	3.26
/H/	315(TYR)	CD2	C	/F/	92(ILE)	CG1	C	3.8

10

20

30

40

/H/	315(TYR)	CE2	C	/F/	92(ILE)	CG1	C	3.61
/H/	247(TYR)	OH	O	/F/	92(ILE)	CG1	C	3.48
/H/	264(TYR)	OH	O	/F/	92(ILE)	CG2	C	3.72
/H/	315(TYR)	CD2	C	/F/	92(ILE)	CD1	C	3.65
/H/	315(TYR)	CE2	C	/F/	92(ILE)	CD1	C	3.62
/H/	247(TYR)	CE1	C	/F/	92(ILE)	CD1	C	3.88
/H/	247(TYR)	CZ	C	/F/	92(ILE)	CD1	C	3.81
/H/	247(TYR)	OH	O	/F/	92(ILE)	CD1	C	3.73
/H/	315(TYR)	CD2	C	/F/	93(ASN)	O	O	3.79
/H/	315(TYR)	CE2	C	/F/	93(ASN)	O	O	3.86
/H/	315(TYR)	CD2	C	/F/	94(LYS)	CB	C	3.57
/H/	315(TYR)	CE2	C	/F/	94(LYS)	CB	C	3.46
/H/	315(TYR)	CE2	C	/F/	94(LYS)	CG	C	3.73
/H/	315(TYR)	CZ	C	/F/	94(LYS)	CG	C	3.84
/H/	315(TYR)	CD1	C	/F/	94(LYS)	CD	C	3.83
/H/	315(TYR)	CE1	C	/F/	94(LYS)	CD	C	3.45
/H/	315(TYR)	CD2	C	/F/	94(LYS)	CD	C	3.99
/H/	315(TYR)	CE2	C	/F/	94(LYS)	CD	C	3.62
/H/	315(TYR)	CZ	C	/F/	94(LYS)	CD	C	3.33
/H/	315(TYR)	OH	O	/F/	94(LYS)	CD	C	3.73
/L/	53(ARG)	NH2	N	/F/	52(ASN)	O	O	3.44
/L/	53(ARG)	CZ	C	/F/	52(ASN)	CB	C	3.48
/L/	53(ARG)	NH1	N	/F/	52(ASN)	CB	C	3.31
/L/	53(ARG)	NH2	N	/F/	52(ASN)	CB	C	3.72
/L/	53(ARG)	CD	C	/F/	52(ASN)	CG	C	3.8
/L/	53(ARG)	CZ	C	/F/	52(ASN)	CG	C	3.44
/L/	53(ARG)	NH1	N	/F/	52(ASN)	CG	C	3.54
/L/	53(ARG)	NH2	N	/F/	52(ASN)	CG	C	3.96
/L/	53(ARG)	NE	N	/F/	52(ASN)	CG	C	3.53
/L/	53(ARG)	CD	C	/F/	52(ASN)	ND2	N	3.82
/L/	53(ARG)	NH1	N	/F/	52(ASN)	ND2	N	3.99
/L/	53(ARG)	CD	C	/F/	52(ASN)	OD1	O	3.72
/L/	53(ARG)	CZ	C	/F/	52(ASN)	OD1	O	3.42
/L/	53(ARG)	NH1	N	/F/	52(ASN)	OD1	O	3.96
/L/	53(ARG)	NH2	N	/F/	52(ASN)	OD1	O	3.76
/L/	53(ARG)	NE	N	/F/	52(ASN)	OD1	O	3.25
/L/	32(TYR)	OH	O	/F/	63(PHE)	CD2	C	3.3
/L/	32(TYR)	CE1	C	/F/	63(PHE)	CE2	C	3.9
/L/	32(TYR)	OH	O	/F/	63(PHE)	CE2	C	3.47
/L/	32(TYR)	OH	O	/F/	65(LEU)	CG	C	3.91
/L/	30(ASP)	O	O	/F/	65(LEU)	CD1	C	3.62

10

20

30

40

/L/	53(ARG)	NH2	N	/F/	72(GLN)	O	O	2.93
/L/	31(SER)	OG	O	/F/	72(GLN)	CD	C	3.94
/L/	31(SER)	OG	O	/F/	72(GLN)	NE2	N	3.81
/L/	31(SER)	CB	C	/F/	72(GLN)	OE1	O	3.48
/L/	31(SER)	OG	O	/F/	72(GLN)	OE1	O	3.24
/L/	30(ASP)	OD2	O	/F/	84(TYR)	CE2	C	3.77
/L/	94(PHE)	CD2	C	/F/	89(TYR)	CG	C	3.57
/L/	94(PHE)	CE2	C	/F/	89(TYR)	CG	C	4
/L/	94(PHE)	CD2	C	/F/	89(TYR)	CD1	C	3.69
/L/	94(PHE)	CE2	C	/F/	89(TYR)	CD2	C	3.49
/L/	94(PHE)	CE2	C	/F/	89(TYR)	CD2	C	3.83
/L/	94(PHE)	CB	C	/F/	89(TYR)	CE1	C	3.79
/L/	94(PHE)	CD2	C	/F/	89(TYR)	CE1	C	3.74
/L/	94(PHE)	CD2	C	/F/	89(TYR)	CE2	C	3.54
/L/	94(PHE)	CB	C	/F/	89(TYR)	CZ	C	3.96
/L/	94(PHE)	N	N	/F/	89(TYR)	CZ	C	3.59
/L/	94(PHE)	CD2	C	/F/	89(TYR)	CZ	C	3.66
/L/	94(PHE)	O	O	/F/	89(TYR)	OH	O	3.79
/L/	93(GLU)	CA	C	/F/	89(TYR)	OH	O	3.67
/L/	93(GLU)	C	C	/F/	89(TYR)	OH	O	3.85
/L/	94(PHE)	N	N	/F/	89(TYR)	OH	O	3.05
/L/	93(GLU)	CB	C	/F/	89(TYR)	OH	O	3.56
/L/	92(ASP)	O	O	/F/	94(LYS)	CD	C	3.91
/L/	92(ASP)	O	O	/F/	94(LYS)	CE	C	3.31
/L/	32(TYR)	CD2	C	/F/	94(LYS)	CE	C	3.85
/L/	32(TYR)	CE2	C	/F/	94(LYS)	CE	C	3.35
/L/	32(TYR)	CZ	C	/F/	94(LYS)	CE	C	3.57
/L/	32(TYR)	OH	O	/F/	94(LYS)	CE	C	3.85
/L/	92(ASP)	OD1	O	/F/	94(LYS)	CE	C	3.54
/L/	92(ASP)	C	C	/F/	94(LYS)	NZ	N	3.72
/L/	92(ASP)	O	O	/F/	94(LYS)	NZ	N	2.61
/L/	92(ASP)	OD1	O	/F/	94(LYS)	NZ	N	3.14
/L/	30(ASP)	CG	C	/F/	97(LYS)	CG	C	3.96
/L/	30(ASP)	OD2	O	/F/	97(LYS)	CG	C	3.81
/L/	28(ASP)	CG	C	/F/	97(LYS)	CD	C	3.72
/L/	28(ASP)	OD1	O	/F/	97(LYS)	CD	C	3.81
/L/	28(ASP)	OD2	O	/F/	97(LYS)	CD	C	3.53
/L/	28(ASP)	OD2	O	/F/	97(LYS)	CE	C	3.96
/L/	30(ASP)	CG	C	/F/	97(LYS)	CE	C	3.71
/L/	30(ASP)	OD1	O	/F/	97(LYS)	CE	C	3.47
/L/	28(ASP)	CG	C	/F/	97(LYS)	NZ	N	3.74

10

20

30

40

/L/	28(ASP)	OD1	O	/F/	97(LYS)	NZ	N	3.59
/L/	28(ASP)	OD2	O	/F/	97(LYS)	NZ	N	3.2
/L/	27(GLN)	NE2	N	/F/	108(LYS)	CD	C	4

【0362】

インビボ有効性

抗R S P O 3抗体の有効性は、結腸直腸がんP T P R D - R S P O融合患者由来の腫瘍モデルにおいて試験された。P T P R D - R S P O融合患者由来の腫瘍モデル及び/又はN S C L C組織において、抗R S P O 3抗体(5 D 6)は、腸管幹細胞マーカー：M y c、A x i n 2、L G R 5、T E R T、B I R C 5、及び/又はA s c 1 2のマーカーの遺伝子発現を有意に減少させたが、一方、分化のマーカー、例えば、C E A C A M 7、S L C 2 6 A 3、C A 1、S Y T 1 5、C A 4、T F F 1、及びK R T 2 0は、抗R S P O 3抗体による処置の前の発現レベルに比較して増加した(データは示さず)。いかなる特定の理論に縛られることを望まないが、これらの結果は、抗R S P O 3抗体(5 D 6)は、遺伝子発現マーカーによって決定されるように、幹細胞様マーカープロファイルから分化マーカープロファイルへの遷移を促進することが可能であることを示唆している。

【0363】

経時的な腫瘍体積における影響(例えば、腫瘍増殖阻害)が、また、結腸直腸がんP T P R D - R S P O融合患者由来の腫瘍モデルにおいて、図11A - Dに示されている抗R S P O 3抗体(5 D 6)での処置の際に試験された。抗R S P O 3抗体(5 D 6)による該モデルの処置は、腫瘍増殖の有意な減少又は腫瘍増殖の示した。モデルでは、退縮及び/又は静止の発生は、抗R S P O 3抗体(5 D 6)で処理する際は即時ではなかった; 処置の開始後における退縮又は静止の発生の遅延があった。更に、抗ブタクサ抗体又は抗R S P O 3抗体(5 D 6)で処置した結腸直腸がん患者由来のモデル腫瘍をH & E染色及びアルシアンブルー染色で染色した場合、図12A - Dに示すように、組織病理学の著しい差があった。抗R S P O 3(5 D 6)処置腫瘍では、腫瘍細胞の数の有意な減少があった。残りの細胞のほとんどの組織学は、分化、成熟した非増殖性杯細胞と一致した。更に、抗ブタクサ抗体対照と比較して、アルシアンブルー染色によって示されるように、粘液の有意な増加があった。従って、測定された腫瘍体積は、実際には、腫瘍体積によってでなく、かなりの部分が粘液により占有されている可能性があり、従って、腫瘍増殖阻害における効果は、実際には過小評価されている可能性がある。いかなる特定の理論に縛られることを望まないが、これらの有効性データはR S P O 3融合陽性腫瘍の階層的な組織と一致している:がん幹細胞の増殖は、R S P Oタンパク質に依存し、抗R S P O 3抗体(5 D 6)による処置により、がん幹細胞は死滅するか、T A (t r a n s i t - a m p l i f y i n g)細胞に分化する。それらの補充を確実にするために幹細胞源の非存在下で、後者は、限られた数の細胞分裂を受け、その後、それらは最終分化し、それらの枯渇へとつながる。従って、反応速度及びT A細胞集団の全体的な大きさは、腫瘍増殖阻害の発生を決定し得る。

【0364】

再び、いかなる特定の理論に縛られることを望まないが、記載されたR S P O 3融合陽性腫瘍の階層的な組織の理論に基づいて、化学療法剤との併用治療は、T A細胞集団を死滅させることによる退縮及び/又は静止の発生の遅延を減少させ、そして、P T P R D - R S P O融合患者由来の腫瘍モデルにおける化学療法剤単独による治療と比較して、有効性を高めるはずである、この理論と一致して、かつ図11D及び図13Aに示されるように、イリノテカンと組み合わせた抗R S P O 3抗体(5 D 6)は、C R C D及びC R C C結腸直腸がんP T P R D - R S P O融合患者由来の腫瘍モデルにおいて、イリノテカン単独による治療と比較した場合、退縮及び/又は静止の発生の遅延を有意に減少させ、腫瘍増殖を減少させた。化学療法と組み合わせて抗R S P O 3抗体を投与することにより、がん幹細胞とT A細胞の両方は、腫瘍増殖の早期の退縮又は静止のための標的とされる。

【0365】

更に、いかなる特定の理論に縛られることを望まないが、上に記載された R S P O 3 融合陽性腫瘍の階層的な組織の理論、並びに、腫瘍移植アッセイによって測定されるように、幹細胞コンパートメントは、発がんイニシエーションに対する原因となるという考え方に基づいて、抗 R S P O 3 抗体で処置された移植 P T P R D - R S P O 融合患者由来の腫瘍モデルは、減少した幹細胞集団を有するはずであり、これは連続 P T P R D - R S P O 融合患者由来の腫瘍の確立及び腫瘍増殖を減少させるはずである。再び、この理論と一致して、図 13 B - C に示されるように、連続移植実験において、抗 R S P O 3 抗体 (5 D 6) による処置は、連続移植後に抗 R S P O 3 で処置された断片から確立され増殖する少數の腫瘍をもたらす。

10

【0366】

前述の発明は、理解を明確にする目的のために例示及び実施例によってある程度詳細に説明してきたが、説明や例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。全ての特許及び本明細書に引用される科学文献の開示は、参照によりその全体が援用される。

配列番号 1 > s p | Q 6 U X X 9 | R S P O 2 _ H U M A N R - スポンジン - 2 O
S = ホモサピエンス GN = R S P O 2

MQ F R L F S F A L I I L N C M D Y S H C Q G N R W R R S K R A S Y V S N P I C
K G C L S C S K D N G C S R C Q Q K L F F F L R R E G M R Q Y G E C L H S C P S
G Y Y G H R A P D M N R C A R C R I E N C D S C F S K D F C T K C K V G F Y L H
R G R C F D E C P D G F A P L E E T M E C V E G C E V G H W S E W G T C S R N N
R T C G F K W G L E T R T R Q I V K K P V K D T I L C P T I A E S R R C K M T M
R H C P G G K R T P K A K E K R N K K K R K L I E R A Q E Q H S V F L A T D R
A N Q

20

配列番号 2 > s p | Q 9 B X Y 4 | R S P O 3 _ H U M A N R - スポンジン - 3 O
S = ホモサピエンス GN = R S P O 3

M H L R L I S W L F I I L N F M E Y I G S Q N A S R G R R Q R R M H P N V S Q G
C Q G G C A T C S D Y N G C L S C K P R L F F A L E R I G M K Q I G V C L S S C
P S G Y Y G T R Y P D I N K C T K C K A D C D T C F N K N F C T K C K S G F Y L
H L G K C L D N C P E G L E A N N H T M E C V S I V H C E V S E W N P W S P C T
K K G K T C G F K R G T E T R V R E I I Q H P S A K G N L C P P T N E T R K C T
V Q R K K C Q K G E R G K K G R E R K R K K P N K G E S K E A I P D S K S L E S
S K E I P E Q R E N K Q Q Q K K R K V Q D K Q K S V S V S T V H

30

配列番号 3 > s p | Q 2 M K A 7 | R S P O 1 _ H U M A N R - スポンジン - 1 O
S = ホモサピエンス GN = R S P O 1

M R L G L C V V A L V L S W T H L T I S S R G I K G K R Q R R I S A E G S Q A C
A K G C E L C S E V N G C L K C S P K L F I L L E R N D I R Q V G V C L P S C P
P G Y F D A R N P D M N K C I K C K I E H C E A C F S H N F C T K C K E G L Y L
H K G R C Y P A C P E G S S A A N G T M E C S S P A Q C E M S E W S P W G P C S
K K Q Q L C G F R R G S E E R T R R V L H A P V G D H A A C S D T K E T R R C T
V R R V P C P E G Q K R R K G G Q G R R E N A N R N L A R K E S K E A G A G S R
R R K G Q Q Q Q Q Q G T V G P L T S A G P A

40

配列番号 4 > s p | Q 2 I 0 M 5 | R S P O 4 _ H U M A N R - スポンジン - 4 O
S = ホモサピエンス GN = R S P O 4

M R A P L C L L L L V A H A V D M L A L N R R K K Q V G T G L G G N C T G C I I
C S E E N G C S T C Q Q R L F L F I R R E G I R Q Y G K C L H D C P P G Y F G I

50

R G Q E V N R C K K C G A T C E S C F S Q D F C I R C K R Q F Y L Y K G K C L P
 T C P P G T L A H Q N T R E C Q G E C E L G P W G G W S P C T H N G K T C G S A
 W G L E S R V R E A G R A G H E E A A T C Q V L S E S R K C P I Q R P C P G E R
 S P G Q K K G R K D R R P R K D R K L D R R L D V R P R Q P G L Q P

名称	配列	配列番号
4H1-HVR L1	RSSQSIVHSNGNTYLE	5
4H1-HVR L2	RISNRFS	6
4H1-HVR L3	FQGSHVPYT	7
4H1-HVR H1	NFAMS	8
4H1-HVR H2	EINNGGNYAYYQDTVTG	9
4H1-HVR H3	EDYVNYEAYFAY	10
4D4-HVR L1	RSSQSIVHSNGNTYLE	11
4D4-HVR L2	RISNRFS	12
4D4-HVR L3	FQGSHVPYT	13
4D4-HVR H1	NFAMS	14
4D4-HVR H2	EINNGGNYAYYQDTVTG	15
4D4-HVR H3	EDYVNYEAYFAY	16
5C2-HVR L1	RASQDISNYLN	17
5C2-HVR L2	YTSRLHS	18
5C2-HVR L3	QQGDTLPPT	19
5C2-HVR H1	SYGVH	20
5C2-HVR H2	VIWTGGSTNYNSALMS	21
5C2-HVR H3	VDGYYYFDY	22
5D6-HVR L1	KASQDIDSYLS	23
5D6-HVR L2	LTNRLVD	24
5D6-HVR L3	LHYDEFPLT	25
5D6-HVR H1	SGYWN	26
5D6-HVR H2	YISYSGKTYQNPSLKS	27
5D6-HVR H3	YYGYGGPWFAY	28
5E11-HVR L1	RASQDISNYLN	29
5E11-HVR L2	YTSRLHS	30
5E11-HVR L3	QHGDTLPPT	31
5E11-HVR H1	SYAVH	32
5E11-HVR H2	VIWSGGSTDYNAAFIS	33
5E11-HVR H3	NDGYYYFDY	34
6E9-HVR L1	RASQDISNYLN	35
6E9-HVR L2	YTSRLHS	36
6E9-HVR L3	QQGDTLPPTA	37
6E9-HVR H1	SYGVH	38
6E9-HVR H2	VIWSGGSTDYNAAFIS	39
6E9-HVR H3	NDGYYYFDY	40
21C2-HVR L1	RASESVDSYGNNTFMH	41
21C2-HVR L2	LASNLES	42
21C2-HVR L3	QQNNEDPYT	43
21C2-HVR H1	DYVIH	44
21C2-HVR H2	VITTYYGDASYNQKFKG	45
21C2-HVR H3	GAYGNSPSYWYFDV	46
26E11-HVR L1	KASQDIDSYLS	47
26E11-HVR L2	LTNRLID	48
26E11-HVR L3	LQYDEFPVT	49
26E11-HVR H1	SGYWS	50
26E11-HVR H2	YISFSGKTYYIPSLKS	51

26E11-HVR H3	YHGYGGPWFAY	52
1A1-HVR L1	TLSSQHSTNYIE	53
1A1-HVR L2	VRDGSHSKGD	54
1A1-HVR L3	GLSDVSLYL	55
1A1-HVR H1	DYFMS	56
1A1-HVR H2	HIYTKTYNYATYYSGSVKG	57
1A1-HVR H3	DEDWYFDF	58
11F11-HVR L1	TLSSQHSSYGIT	59
11F11-HVR L2	LRSDGSHSKGD	60
11F11-HVR L3	VTYDSTVGV	61
11F11-HVR H1	EYYVT	62
11F11-HVR H2	DIDPENGDTDYNQKFQG	63
11F11-HVR H3	GYDYAFDS	64
36D2-HVR L1	TRSSGNIGSNYVS	65
36D2-HVR L2	KFDQRPS	66
36D2-HVR L3	LSGYDKYV	67
36D2-HVR H1	SSDWS	68
36D2-HVR H2	YMNYGGGTYYNPSLEN	69
36D2-HVR H3	ERPHPYAYFDV	70
49G5-HVR L1	TLSSQYNTYYIE	71
49G5-HVR L2	LSDGSHSKGD	72
49G5-HVR L3	GVSDVSLYV	73
49G5-HVR H1	SYNIH	74
49G5-HVR H2	AVWRGGGTYYNSNLKS	75
49G5-HVR H3	EELRYVYFDV	76
COMP1-HVR L1	KASQDIDSYLS	77
COMP1-HVR L2	LTNRXL ₁ D ここで X_1 は V 又は I である。	78
COMP1-HVR L3	L _{X₁} YDEFPX ₂ T ここで X_1 は H 又は Q であり、 X_2 は L 又は V である。	79
COMP1-HVR H1	SGYWX ₁ ここで X_1 は N 又は S である。	80
COMP1-HVR H2	YISX ₁ SGKTYX ₂ X ₃ PSLKS ここで X_1 は Y 又は F であり、 X_2 は Q 又は Y であり、 X_3 は N 又は I である。	81
COMP1-HVR H3	YX ₁ GYGGPWFAY ここで X_1 は Y 又は H である。	82
COMP2-HVR L1	RASQDISNYLN	83
COMP2-HVR L2	YTSRLHS	84
COMP2-HVR L3	QX ₁ GDTLPPX ₂ ここで X_1 は Q 又は H であり、 X_2 は T 又は A である。	85
COMP2-HVR H1	SYX ₁ VH ここで X_1 は A 又は G である。	86
COMP2-HVR H2	VIWX ₁ GGSTX ₂ YNX ₃ AX ₄ X ₅ S ここで X_1 は S 又は T であり、 X_2 は D 又は N であり、 X_3 は A 又は S であり、 X_4 は L 又は F であり、 X_5 は M 又は I である。	87
COMP2-HVR H3	X ₁ DGYYYFDY X_1 は N 又は V である。	88
4H1 V _L	SIVMTQTPLSLPVSLGQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI YRISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGG TKLEIK	89
4H1 V _H	EVKLVESGGGFVKPGGLKLSKAASGFTFSNFAMSWVRQSPEKRLEWVAEINN GGNYAYYQDTVTGRFTISRDNAKNTLYLEMSSLRSEDTAMYFCAREDYVNYEA YFAYWGQGTTLTVSS	90
4D4 V _L	DIQMNQSHKFMSTSVDGRVSITWKASQDVGTAVAWEYQQKPGQSPKLLIYWAST RHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSSITFGAGTKLELK	91
4D4 V _H	QVQLQQSGPELVRPGESVKISCKGSGYSFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGIISI YYDNTNYNQKFGRATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARGGNGYYV MDYWGQGTSTVSS	92

10

20

30

40

5C2 V _L	DIVMTQSTSSLSASLGDRV TISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSR LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYFCQQGDTLPPTFGGGTKLEI K	93	
5C2 V _H	EVQLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWT GGSTNYNSALMSRLSISKD NSKSQVFLKMNSLQTD DTAMYYCARVDGYYYFDY WGQGTTLT VSS	94	
5D6 V _L	DIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIDS YLSWFQQKPGKSPKTLIYLTNR LVDGVPSRFSGSGSGD YSLTIS SLEYEDMG IYYCLHYDEFPLTFGAGTKLEI K	95	
5D6 V _H	EVQLQESGP SLVKPSQ TL SLCV TGSITSGYWNWIRKFPGNKFEYMGYISY SGKTYQNPSLKSRSI SITR DTSKNQYHLQ LNSVTTEDTATYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLTVSSA	96	
5E11 V _L	DIVMTQSTSSLSASLGDRV TISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSR LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEKEDVATYFCQHGD TLPPTFGGGTKLEI K	97	10
5E11 V _H	QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLSSYAVHWVRQSPGEGLEWLGVIWS GGSTDYNAAFISRMSITKD NSKSQVFFKMNSLQADDTAIYFCARNDGYYYFDY WGQGTTLT VSS	98	
6E9 V _L	DIKMTQSTSSLSASLGDRV TISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSR LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGDTLPFAFGGGTKLEI K	99	
6E9 V _H	QVQLKESGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTSYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWS GGSTDYNAAFISRSL SISKD NSKSQVFFKMNSLQADDTAIYFCARNDGYYYFDY WGQGTTLT VSS	100	
21C2 V _L	DIVLTQSPASLT VSLGQRATISCRASESVD SYGNTFMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPV EADDAATYYCQ QNNEDPYTFGGGT KLEIK	101	
21C2 V _H	QVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGSGYTFDTDYVIHWVKQSHAKSLEWIGVITT YYGDASYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARGAYGNSPS YWWFDVWAGT STVSS	102	20
26E11 V _L	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIDS YLSWFQQKPGKSPKTLIYLTNR LIDGVPSRFSGSGSGD YSLTINSLEYEDMG IYYCLQYDEFPVTFGAGTRLEI K	103	
26E11 V _H	EVQLQESGP SLVKPSQ TL SLCV TGSITSGYWSWIRKFPGNKLEFMGYISF SGKTYYIPSLKSRSI SITR DTSKNQYYLQ LNSVTTEDTATYYCATYHGYGGPWF AYWGQGTLTVSS	104	
1A1 V _L	QPVL TQSPSVSASLGASV KLTCTLSSQHST NYIEWYQQHPDKSPKFLM QVRDG SHSKGDGT PDRFSGSSSGAHR YLSISNLQLEDEAIYYCGLSDVSLYLF GSGT Q LTLL	105	
1A1 V _H	EVQLVESGGGLV KPEGSLKLSCV ASGFTFS DYFMSWVRQAPGQGLEWVAHIYT KTINYATYYSGSVKGRFSISR DDSRN M VYLQMN NLRTEDTATYYCTT DEDWYF DFWGQGT QVT VSS	106	
11F11 V _L	QPVL TQSPSASASLGASV KLTCTLSSQHSSYGITWLQHQPKAPKCV MYL RSD GSHSKGDGIPDRFSGSSSGAHR YLSISNVQPEDEAIYFCVTDSTGVFGSGT QLTVP	107	30
11F11 V _H	QVQLQQSGPQLV KPGFSVKFSCKASGITFT EYYV T WVKQ RAGQGLEWVG DIDP ENG DTDY NQK FQG KATITADKSSSTAYMELSSLTSEDS AYYCATGYD YAFDS WGQGTLTVSS	108	
36D2 V _L	ELVFTQPQSVSGSLGQEISI SICTRSSGNIGSNYVSWYQQQSNKPRLLIYKFD QRPSGV PDRFSGSTDSSNSGIL TISRLQPEDEG DYYCLSGYDKYVFGSGT Q TLL	109	
36D2 V _H	QIQLQESGPGLV KPSQSL SLCV TGSITSSDW SWIRQFPGK KLEWMGYM NY GGGTYYNPSLENRISITR DTSKNQFFLHLKSVTTEDTATYYCARERPHYAYF DVWGQGIQVT VSS	110	
49G5 V _L	QPLLTQSPSVSASLGASV KLTCTLSSQYNTYYIEWYQQHPDKSPKFLM QLS DG SHSKGDGIPDRFSGSSSGAHR YLSISNLQLEDEAIYYC GVS D VSLYVFGSGT Q LTVL	111	
49G5 V _H	QVQLKESGPGLVQPSQ TL SLCV TGSITSGYNIHWVRQPPGKGLEWMGA VWR GGGTYYNSNLKSRVIITR DTSKSQVLLK LNNLQHEDTAMYYCAREELRYVYFD VWGQGIQVT VSS	112	40
5D6v5.1-HVR-H3	YYGYGGPFFAY	188	

5D6v5.2-HVR-H3	YYGYGGPHFAY	189
5D6v1 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEI K	190
5D6v1 V _H	EVQLVESGPLVKPSETSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEYMGYISY SGKTYQNPSLKSRSRITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLTVSS	191
5D6v2.1 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEI K	192
5D6v2.1 V _H	EVQLVESGPLVKPSETSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEYMGYISY SGKTYQNPSLKSRSRITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLTVSS	193
5D6v2.2 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKLLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEI K	194
5D6v2.2 V _H	EVQLVESGPLVKPSETSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEYMGYISY SGKTYQNPSLKSRSRITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLTVSS	195
5D6v2.3 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEI K	196
5D6v2.3 V _H	EVQLVESGPLVKPSETSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEYMGYISY SGKTYQNPSLKSRSRITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLTVSS	197
5D6v2.4 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEI K	198
5D6v2.4 V _H	EVQLVESGPLVKPSETSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEYMGYISY SGKTYQNPSLKSRSRITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLTVSS	199
5D6v2.8 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEI K	200
5D6v2.8 V _H	EVQLVESGPLVKPSETSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEYMGYISY SGKTYQNPSLKSRSRITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLTVSS	201
5D6v2.10 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEI K	202
5D6v2.10 V _H	EVQLVESGPLVKPSETSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEYMGYISY SGKTYQNPSLKSRSRITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCARYYYGYGGPWF AYWGQGTLTVSS	203
5D6v3.2 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEI K	204
5D6v3.2 V _H	EVQLVESGPLVKPSETSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEYWIGYISY SGKTYQNPSLKSRSRITISRDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLTVSS	205
5D6v3.3 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEI K	206
5D6v3.3 V _H	EVQLVESGPLVKPSETSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEYWIGYISY SGKTYQNPSLKSRSRVTISRDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLTVSS	207
5D6v4.1 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEI K	208
5D6v4.1 V _H	EVQLVESGPLVKPSETSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEYWIGYISY SGKTYQNPSLKSRSRVTISRDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLTVSS	209

10

20

30

40

5D6v4.3 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEIK	210
5D6v4.3 V _H	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEWIGYISY SGKTYQNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLVTVSS	211
5D6v5.1 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEIK	212
5D6v5.1 V _H	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEWIGYISY SGKTYQNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPWF AYWGQGTLVTVSS	213
5D6v5.2 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDIDSYLSWFQQKPGKAPKTLIYLTNR LVDGVPSRSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLHYDEFPLTFGQGTKVEIK	214
5D6v5.2 V _H	EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIROQPPGKGLEWIGYISY SGKTYQNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATYYGYGGPHF AYWGQGTLVTVSS	215
COMP1-HVR H3	YX ₁ GYGGPX ₂ FAY ここで X ₁ は Y 又は H であり、X ₂ は W、F、又は H である。	216

E I F 3 E (e 1) - R S P O 2 (e 2) 転座融合ポリヌクレオチド (配列番号 173)

GAGCACAGACTCCCTTTCTTTGGCAAGATGGCGGAGTAC
GACTTGACTACTCGCATCGCGCAGTTTGGATCGGCATC
TAGTCTTCCGCTTCTGAATTCTCTCTGTAAAGGAGGT
TCGTGGCGGAGAGATGCTGATCGCGCTGAAC TGACCGGTG
CGGCCCGGGGTGAGTGGCGAGTCCTCTGAGTCCTCC
CCAGCAGCGGCCGGCGCCGGCTCTTGGCGAACCCCTC
CAGTTCTAGACTTTGAGAGGGCGTCTCTCCCCCGCCCGAC
CGCCCAGATGCAGTTCGCCTTTCTCCTTGCCTCATC
ATTCTGAAC TGCA TGGATTACAGCCACTGCCAAGGCAACC
GATGGAGACGCAGTAAGCGAGCTAGTTATGTATCAAATCC
CATTTGCAAGGGTTGTTGCTTGTCAAAGGACAATGGG
TGTAGCCGATGTCAACAGAAAGTTGTTCTTCTTCCTCGAA
GAGAAGGGATGCGCCAGTATGGAGAGTGCCCTGCATTCTG
CCCATCCGGGTACTATGGACACCGAGCCCCAGATATGAAAC
AGATGTGCAAGATGCAGAAATAGAAAAACTGTGATTCTTGCT
TTAGCAAAGACTTTGTACCAAGTGCAAGTAGGCTTTTA
TTTGCATAGAGGCCGTTGCTTGTATGAATGTCCAGATGGT
TTTGCACCATAGAAAGAACATGGAATGTGTGGAAAGGAT
GTGAAGTTGGTCATTGGAGCGAATGGGAACCTTGTAGCAG
AAATAATCGCACATGTGGATTAAATGGGGTCTGGAAACC
AGAACACGGCAAATTGTTAAAAAGCCAGTGAAAGACACAA
TACTGTGTCACCCATTGCTGAATCCAGGGAGATGCAAGAT
GACAATGAGGCATTGTCAGGGAGGGAAAGAGAACACCAAAG
GCGAAGGGAGAAGAGGAACAAGAAAAAGAAAAAGGAAGCTGA
TAGAAAGGGCCCAGGAGCAACACAGCGTCTTCCTAGCTAC
AGACAGAGCTAACCAATAA

E I F 3 E (e 1) - R S P O 2 (e 2) 転座融合ポリペプチド配列 (配列番号 174)

MAEYDLTTTRIAHFDRHLVFPPLLEFLSVKEVRGGEMLIAL
NMQFRLFSFALIILNCMDYSHCQGNRWRRSKRASYVSNPI
CKGCLSCSKDNGCSRQCQQKLFFFRLREGMRQYGECLHSCP
SGYYGHRAPDMNRCARCRRIENCDSCFSKDFCTKCKVGFYL
HRGRCFDEC PDGFAPLEETMEC VEGCEVGHWSEWGTC SRN
NRTCGFKWGLET RTRQIVKKPVKDTILCPTIAESRRCKMT

10

20

30

40

50

MRHCPGGKRTPKAKEKRNKKKKRKLIERAQEQQHSVFLATD
RANQ

PTPRK (e1) - RSP03 (e2) 転座融合ポリヌクレオチド配列 (配列番号 175)

ATGGATACGACTGCGGCCGGCGCTGCCCTGCTTTGTGG
CGCTCTTGCTCCTCTCTCCCTTGGCCTCTCCTGGGATCGGC
CCAAGGCCAGTTCTCCGCAGTGCATCCTAACGTTAGTCAA
GGCTGCCAAGGAGGCTGTGCAACATGCTCAGATTACAATG
GATGTTGTCATGTAAGCCCCAGACTATTTTGCTCTGGA 10
AAGAATTGGCATGAAGCAGATTGGAGTATGTCCTCTTCA
TGTCCAAGTGGATATTATGGAACCTCGATATCCAGATATAA
ATAAGTGTACAAATGCAAAGCTGACTGTGATAACCTGTT
CAACAAAAATTCTGCACAAATGTAAGAGTGGATTTAC
TTACACCTTGGAAAGTGCCTTGACAAATTGCCAGAAGGGT
TGGAAAGCCAACAACCAACTATGGAGTGTGTCAGTATTGT
GCACTGTGAGGTCA GTGAATGGAATCCTTGGAGTCCATGC
ACGAAGAAGGGAAAAACATGTGGCTTCAAAAGAGGGACTG
AAACACGGGTCCGAGAAATAATACAGCATTCTCAGCAA
GGGTAACCTGTGCCCCAACAAATGAGACAAAGAAAGTGT 20
ACAGTGCAAAGGAAGAAGTGTCAAGAAGGGAGAACGAGGAA
AAAAAGGAAGGGAGAGGAAAAGAAAAAACCTAATAAAGG
AGAAAGTAAAGAAGCAATACCTGACAGCAAAAGTCTGGAA
TCCAGCAAAGAAATCCCAGAGCAACGAGAAAACAAACAGC
AGCAGAAGAAGCGAAAAGTCCAAGATAAACAGAAATCGGT
ATCAGTCAGCACTGTACACTAG

PTPRK (e1) - RSP03 (e2) 転座融合ポリペプチド配列 (配列番号 176)

MDTTAAAALPAFVALLLSPWPLLGSAQGQFSAVHPNVSQ
GCQGGCATCSDYNGCLSKPRLFFALERIGMKQIGVCLSS 30
CPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDCDFNKNFCTKCKSGFY
LHLGKCLDNCPEGLEANNHTMECVSIVHCEVSEWNPWSPC
TKKGKTCGFKRGTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTRKCT
TVQRKKCQKGGERGKKGR

PTPRK (e7) - RSP03 (e2) 転座融合ポリヌクレオチド配列 (配列番号 177)

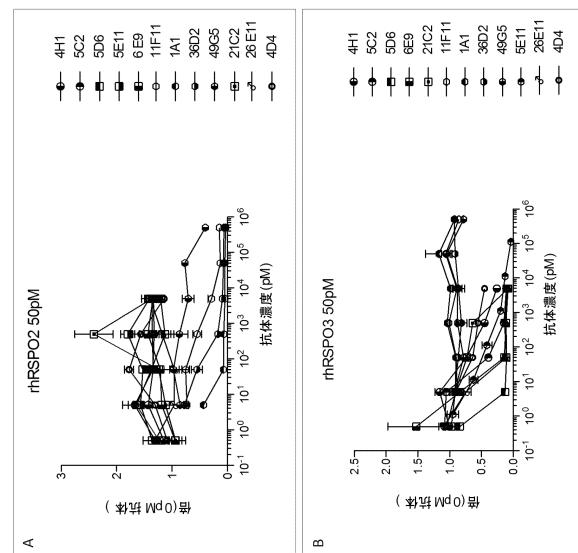
ATGGATACGACTGCGGCCGGCGCTGCCCTGCTTTGTGG
CGCTCTTGCTCCTCTCTCCCTTGGCCTCTCCTGGGATCGGC
CCAAGGCCAGTTCTCCGCAGGTGGCTGTACTTTGATGAT 40
GGTCCAGGGGCCTGTGATTACCAACCAGGATCTGTATGATG
ACTTTGAATGGGTGCATGTTAGTGCTCAAGAGCCTCATT
TCTACCAACCGAGATGCCAACAGGTTCTATATGATAGTG
GACTCTTCAGATCACGACCCCTGGAGAAAAAGCCAGACTTC
AGCTGCCCTACAATGAAGGGAGAACGACACTCACTGCATTGA
TTTCAGTTACCTATTATATAGCCAGAAAGGACTGAATCCT
GGCACCTTGAAACATATTAGTTAGGGTGAATAAGGACCTC
TTGCCAATCCAATTGGAAATGTGACTGGATTCACGGTAG
AGATTGGCTTCGGGCTGAGCTAGCAGTGGAGCACCCTTTGG
CCCAATGAATATCAGGTAATATTGAAAGCTGAAGTCTCAG 50

GAGGGAGAAGTGGTTATATTGCCATTGATGACATCCAAGT
 ACTGAGTTATCCTTGTGATAAAATCTCCTCATTTCCCTCCGT
 CTAGGGGATGTAGAGGTGAATGCAGGGCAAAACGCTACAT
 TTCAGTGCATTGCCACAGGGAGAGATGCTGTGCATAACAA
 GTTATGGCTCCAGAGACGAAATGGAGAAGATATAACAGTA
 GCCCAGACTAAGAACATCAATCATAGAAGGTTGCCGCTT
 CCTTCAGATTGCAAGAAGTGACAAAAACTGACCAGGATT
 GTATCGCTGTGTAACTCAGTCAGAACGAGGTTCCGGTGTG
 TCCAATTGGCTCAACTTATTGTGAGAGAACCGCCAAGAC
 CCATTGCTCCTCCTCAGCTTCTGGTGTGGCCTACATA 10
 TTTGCTGATCCAACATAAATGCCAACTCGATCATTGGCGAT
 GGTCCTATCATCCTGAAAGAAGTAGAGTACCGAATGACAT
 CAGGATCCTGGACAGAAACCCATGCAGTCATGCTCCAAC
 TTACAAATTATGGCATTAGATCCAGATAACCGAATATGAG
 ATCCGAGTTCTACTTACAAGACCTGGTGAAGGTGGAACGG
 GGCTCCCAGGACCTCCACTAATCACCAAGAACAAATGTGC
 AGTGCATCCTAACGTTAGTCAGGCTGCCAAGGAGGCTGT
 GCAACATGCTCAGATTACAATGGATGTTGTCATGTAAGC
 CCAGACTATTTTGCTCTGGAAAGAATTGGCATGAAGCA
 GATTGGAGTATGTCCTCTTCATGTCACAGTGGATATTAT
 GGAACTCGATATCCAGATATAAAATAAGTGTACAAATGCA
 AAGCTGACTGTGATACCTGTTCAACAAAAATTCTGCAC
 AAAATGTAAGGGATTACTTACACCTTGGAAAGTGC 20
 CTTGACAATTGCCAGAAGGGTTGGAGGCCAACACCATA
 CTATGGAGTGTGTCAGTATTGTGCACTGTCAGGTCACTGA
 ATGGAATCCTTGGAGTCCATGCACGAAGAACACGGGTTGG
 TGTGGCTTCAAAAGAGGGACTGAAACACGGGTCGGAGAAA
 TAATACAGCATCCTCAGCAAAGGGTAAACCTGTCATGTC
 AACAAATGAGACAAAGAACAGTGTACAGTGCACAGGAAG
 TGTCAGAAGGGAGAACGAGGAAAAAGGAAGGGAGAGGA 30
 AAAGAAAAAAACCTAATAAAGGAGAAAGTAAAGAACGCAAT
 ACCTGACAGCAAAAGTCTGGAATCCAGCAAAGAACCTCC
 GAGCAACGAGAAAACAAACAGCAGCAGAACAGCGAAAAG
 TCCAAGATAAACAGAAATCGGTATCAGTCAGCACTGTACA
 CTAG

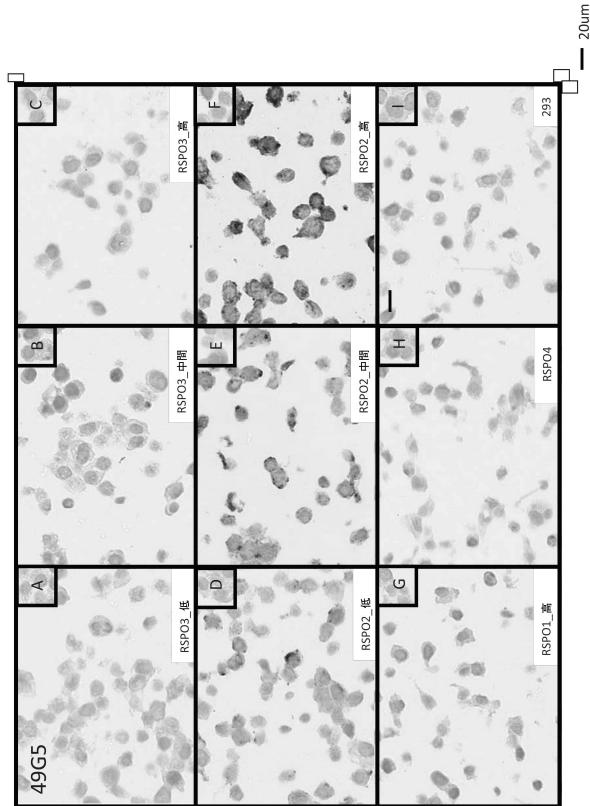
PTPRK (e7) - RSP03 (e2) 転座融合ポリペプチド配列 (配列番号 178)
 MDTTAAAALPAFVALLLSPWPLLGSAQGQFSAGGCTFDD
 GPGACDYHQDLYDDFEWVHVSAQEPhYLPPEMPQGSYMIIV
 DSSDHDPGEKARLQLPTMKENDTHC1DFSYLLYSQKGLNP 40
 GTLNILVRVNKGPLANPIWNVTGFTGRDWLRAELAVSTFW
 PNEYQVIFEAEVSGGRSGYIAIDDIQVLSYPCDKSPHFLR
 LGDVEVNAGQNATFQCIATGRDAVHNKLWLQRRNGEDI
 PV
 AQTKNINHRRFAASFRLQEVTKTDQDLYRCVTQSERGS
 GV
 SNFAQLIVREPPRPIAPPQLLGVGPTYLLIQLNANSI
 IGD
 GPIILKEVEYRMTSGSWTEETHAVNAPTYKLWHL
 DPDTEYE
 IRVLLTRPGEGGTGLPGPPLITRTKCAVHPNV
 SQGCQGGC
 ATCSDYNGCLSKPRLFFALERIGMKQIGVCLSSCP
 SGYY
 GTRYPDINKCTKCKADC
 DTCFNKNFCTKCKSGFY
 LHLGKCLDN
 CPEGLEANNHTMECV
 SIVHCEVSEWN
 PWSPCTKKGKT 50

C G F K R G T E T R V R E I I Q H P S A K G N L C P P T N E T R K C T V Q R K K
 C Q K G E R G K K G R E R K R K K P N K G E S K E A I P D S K S L E S S K E I P
 E Q R E N K Q Q Q K K R K V Q D K Q K S V S V S T V H

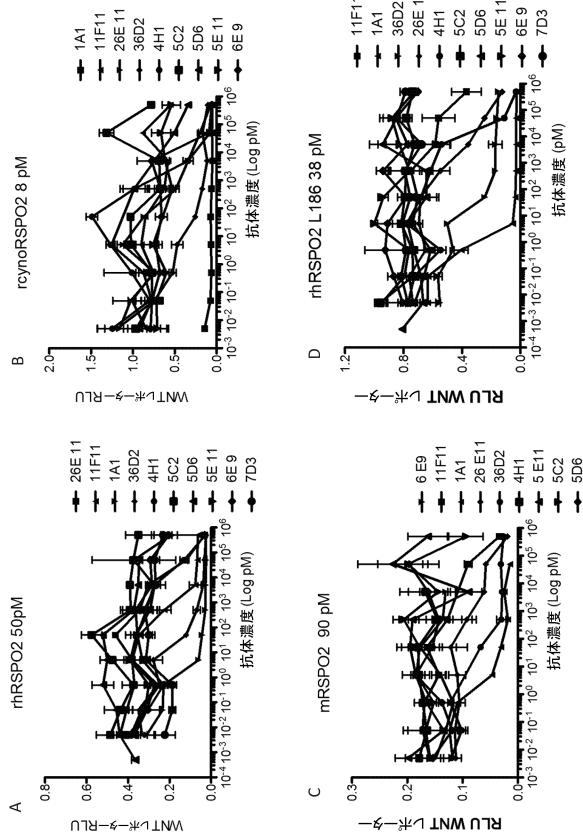
【図 1 A - B】



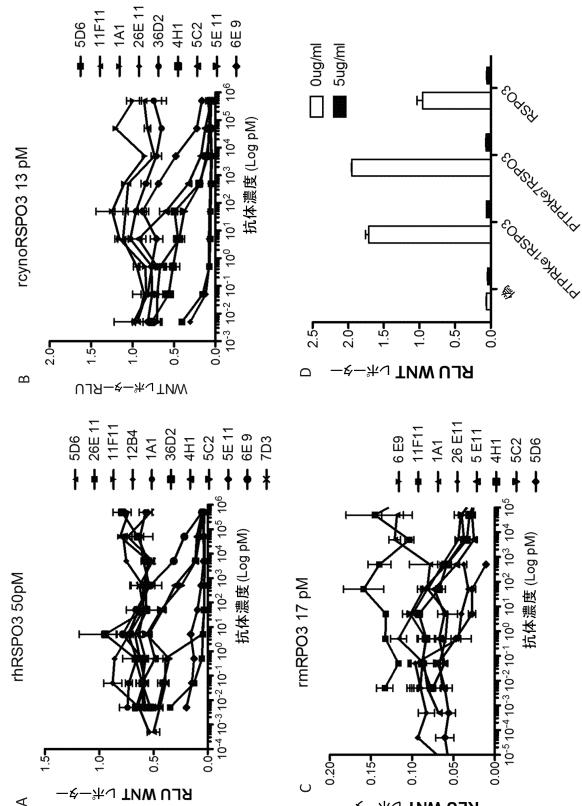
【図 2 A - I】



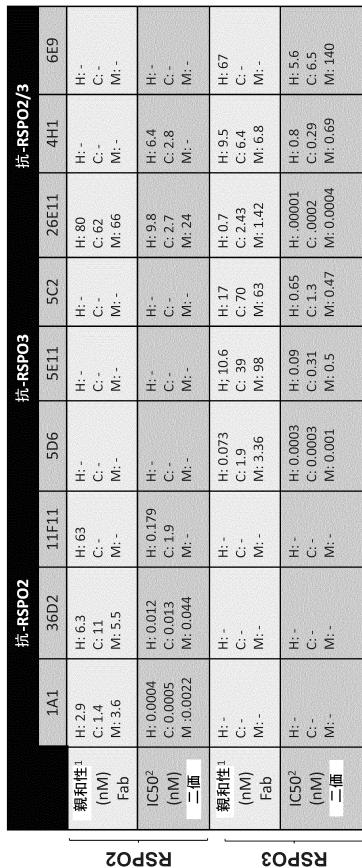
【図 3 A - D】



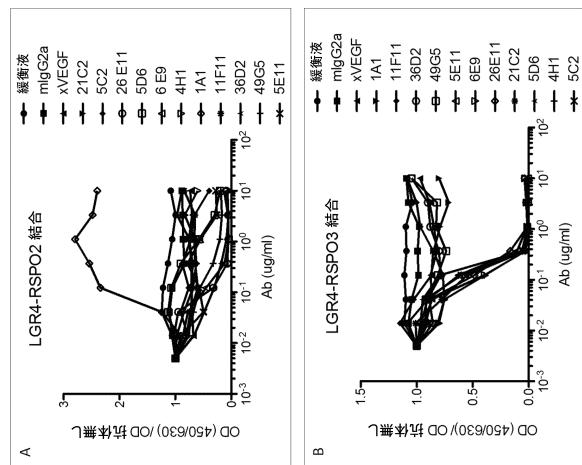
【図 4 A - D】



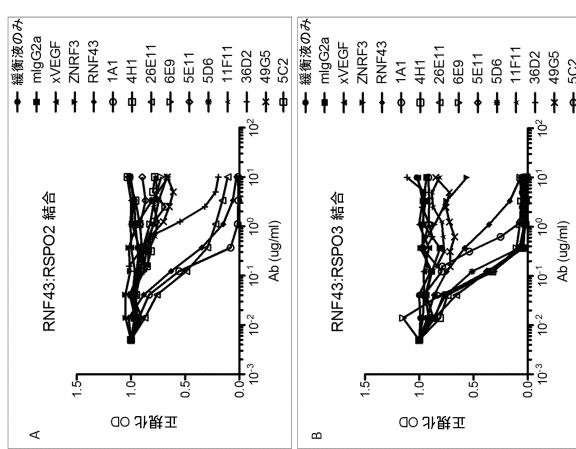
【図 5】



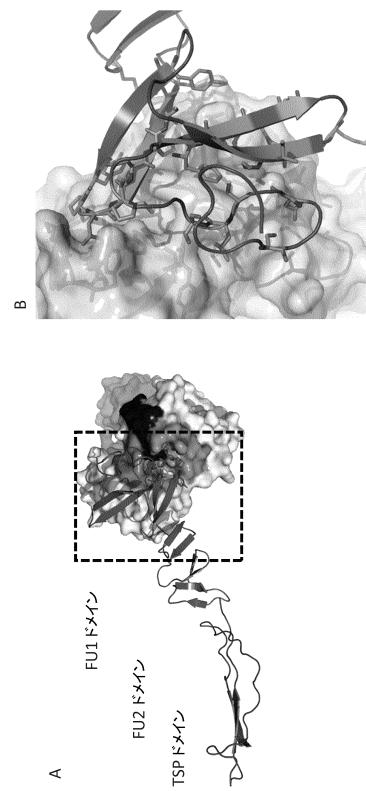
【図 6 A - B】



【図7A-B】



【図 8 A - B】

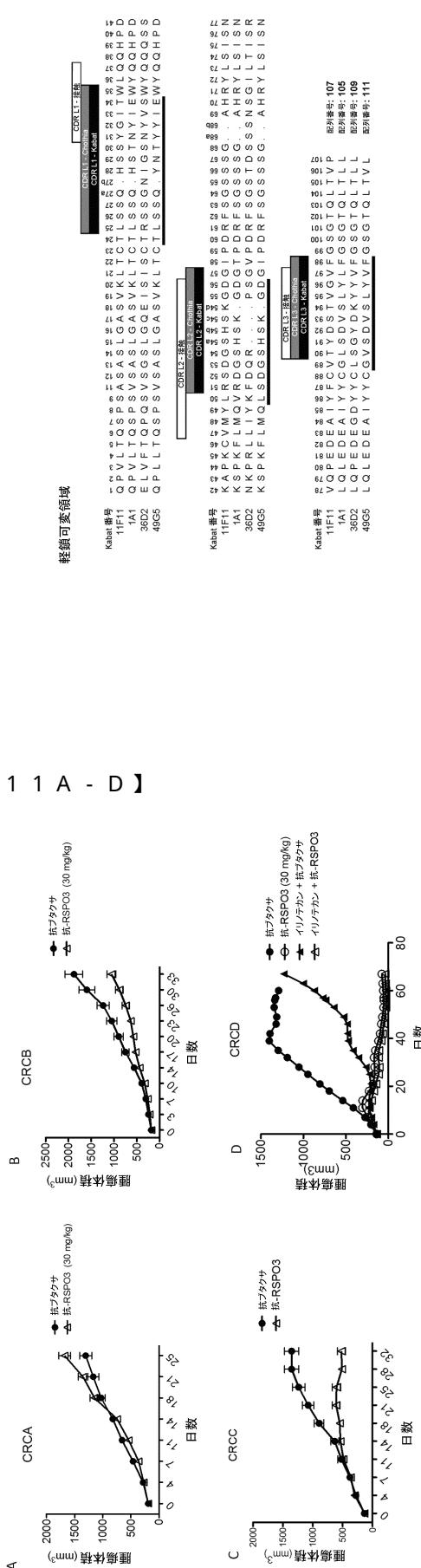


【図 9 A】

輕鎖可變領域

【図9B】

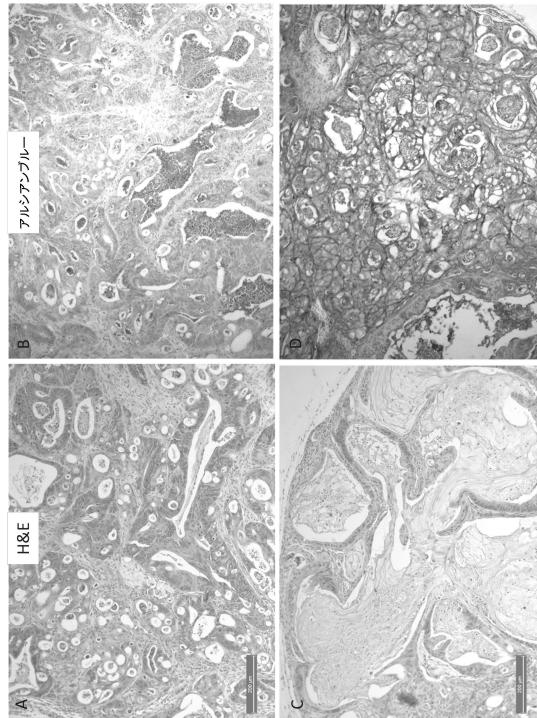
【図 10 A】



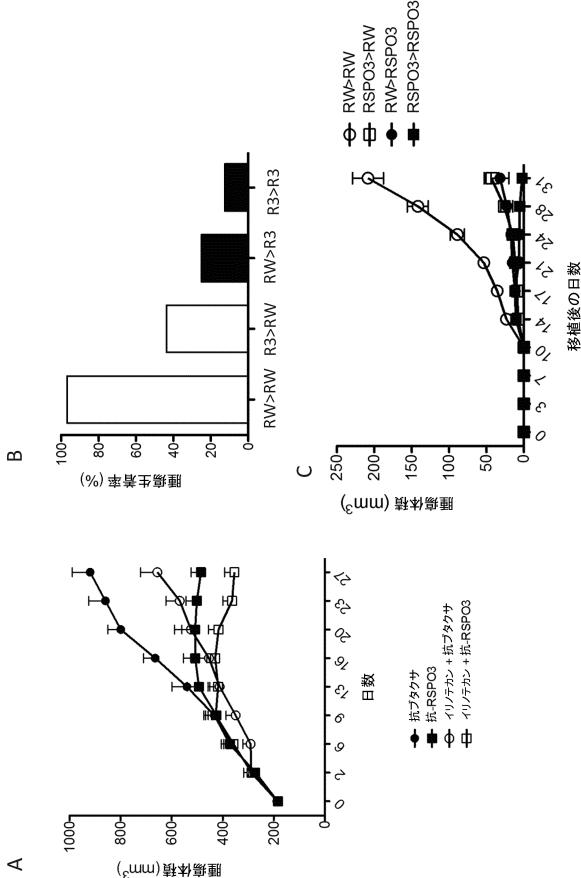
【図10B】

【図11A-D】

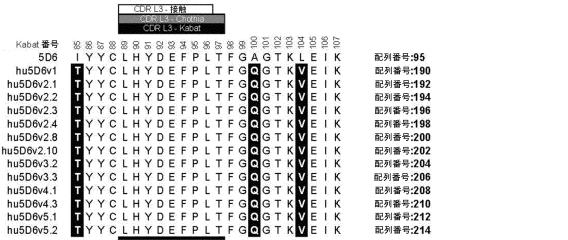
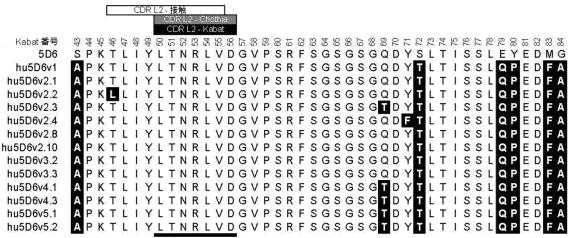
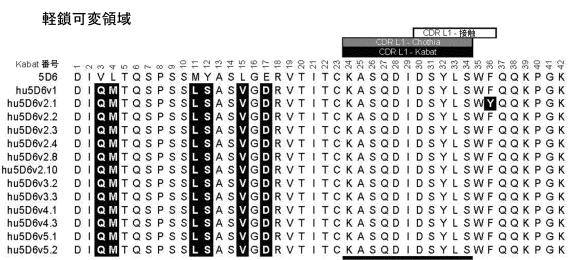
【図12A-D】



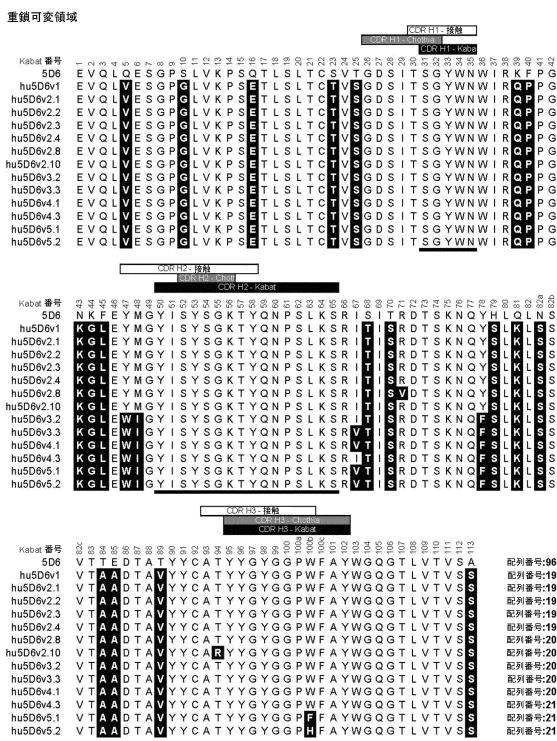
【図 13 A - C】



【図 14 A】



【図 14 B】



【配列表】

0006677638000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
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 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46

(72)発明者 ドゥ ソヴァージュ, フレデリック ジエ .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーウェイ 1, シー / オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 マリー, ジェレミー エム .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーウェイ 1, シー / オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 ノーランド, キャメロン エル .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーウェイ 1, シー / オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 ウー, イエン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーウェイ 1, シー / オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 タン, クリストイーン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーウェイ 1, シー / オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 ホンゴ, ジョ - アン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーウェイ 1, シー / オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72)発明者 チエン, ヨンメイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエーウェイ 1, シー / オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 国際公開第2013/012747 (WO, A1)
 国際公開第2013/090787 (WO, A1)
 国際公開第2011/076932 (WO, A1)
 特表2010-506871 (JP, A)
 国際公開第2014/012007 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 16 / 18 - 16 / 4 6
 C 1 2 N 15 / 1 3
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
 (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q