

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7678768号
(P7678768)

(45)発行日 令和7年5月16日(2025.5.16)

(24)登録日 令和7年5月8日(2025.5.8)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	16/40 (2006.01)	C 0 7 K	16/40	Z N A
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	P
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	51/10 (2006.01)	A 6 1 K	51/10	1 0 0
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
請求項の数 19 (全98頁)				
(21)出願番号	特願2021-578267(P2021-578267)	(73)特許権者	522003486	
(86)(22)出願日	令和2年7月2日(2020.7.2)		テリックス ファーマシューティカルズ	
(65)公表番号	特表2022-540384(P2022-540384 A)		(イノベーションズ) ピーティーワイ	
			リミテッド	
(43)公表日	令和4年9月15日(2022.9.15)		オーストラリア国 3 0 5 1 ヴィクトリ	
(86)国際出願番号	PCT/AU2020/050689		ア州 ノース メルボルン、プレミントン	
(87)国際公開番号	WO2021/000017		ロード 5 5、レベル 4	
(87)国際公開日	令和3年1月7日(2021.1.7)	(74)代理人	100136629	
審査請求日	令和5年6月30日(2023.6.30)		弁理士 鎌田 光宣	
(31)優先権主張番号	2019902343	(74)代理人	100080791	
(32)優先日	令和1年7月2日(2019.7.2)		弁理士 高島 一	
(33)優先権主張国・地域又は機関	オーストラリア(AU)	(74)代理人	100125070	
前置審査			弁理士 土井 京子	
		(74)代理人	100121212	
			弁理士 田村 弥栄子	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新生児 F C 受容体に対する低下した親和性を有する、C A I X に対する抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

クラス I g G の野生型抗体と比較して低下した F c R n 結合親和性を有する抗体であって、

E U 番号付けによる H i s 3 1 0 A l a 及び H i s 4 3 5 G l n のアミノ酸置換を含む、重鎖定常領域

を含み；

前記抗体は、炭酸アンヒドラーゼ I X (C A I X) に特異的に結合し；

配列番号 4 9 で表される相補性決定領域 (C D R) 1、配列番号 5 0 で表される C D R 2 及び配列番号 5 1 で表される C D R 3 を含む、可変重鎖 (V H)、及び

配列番号 1 2 9 で表される C D R 1、配列番号 1 3 0 で表される C D R 2 及び配列番号 1 3 1 で表される C D R 3 を含む、可変軽鎖 (V L)

を含む抗原結合ドメインを含む、抗体。

【請求項 2】

(i) 前記 V H のアミノ酸配列が配列番号 5 2 に示され、前記 V L のアミノ酸配列が配列番号 1 3 2 に示される、

(i i) 前記 V H のアミノ酸配列が配列番号 8 4 に示され、V L の前記アミノ酸配列が配列番号 1 6 4 に示される、

(i i i) 前記 V H のアミノ酸配列が配列番号 8 4 に示され、前記 V L のアミノ酸配列が配列番号 1 8 0 に示される、

(i v) 前記 V H のアミノ酸配列が配列番号 84 に示され、前記 V L のアミノ酸配列が配列番号 196 に示される、

(v) 前記 V H のアミノ酸配列が配列番号 100 に示され、前記 V L のアミノ酸配列が配列番号 164 に示される、

(v i) 前記 V H のアミノ酸配列が配列番号 100 に示され、前記 V L のアミノ酸配列が配列番号 180 に示される、又は

(v i i) 前記 V H のアミノ酸配列が配列番号 100 に示され、前記 V L のアミノ酸配列が配列番号 196 に示される、

請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体は、前記クラス I g G の野生型抗体と比較して、1 つ以上の F c ガンマ受容体に対する前記抗体の親和性を低下させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗体は、前記クラス I g G の野生型抗体と比較して、前記抗体における C H 1 - C H 2 ヒンジ領域の安定性を増加させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体の前記重鎖定常領域は、E U 番号付けによる S e r 2 2 8 P r o 及び L e u 2 3 5 G l u のアミノ酸置換も含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体の重鎖定常領域が、配列番号 226 又は配列番号 228 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

配列番号 231 及び 234 に示されるアミノ酸配列を含む請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

配列番号 233 及び 234 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

前記抗体にコンジュゲートされた非タンパク質剤をさらに含み；

前記非タンパク質剤は、治療剤又は診断剤を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 10】

前記治療剤が細胞毒又は前記治療剤又は診断剤が放射性元素である、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

前記非タンパク質剤は、放射性同位元素である、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 12】

前記放射性同位元素は、アクチニウム-225 (^{225}Ac)、アスタチン-211 (^{211}At)、ビスマス-212 及びビスマス-213 (^{212}Bi 、 ^{213}Bi)、銅-64 及び銅-67 (^{64}Cu 、 ^{67}Cu)、ガリウム-67 及びガリウム-68 (^{67}Ga 及び ^{68}Ga)、インジウム-111 (^{111}In)、ヨウ素-123、-124、-125 又は -131 (^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、鉛-212 (^{212}Pb)、ルテチウム-177 (^{177}Lu)、ラジウム-223 (^{223}Ra)、サマリウム-153 (^{153}Sm)、スカンジウム-44 及びスカンジウム-47 (^{44}Sc 、 ^{47}Sc)、ストロンチウム-90 (^{90}Sr)、テクネチウム-99 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、イットリウム-86 及びイットリウム-90 (^{86}Y 、 ^{90}Y) 並びにジルコニウム-89 (^{89}Zr) からなる群から選択される、請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記放射性同位元素は、アクチニウム-225 (^{225}Ac)、アスタチン-211 (^{211}At)、ルテチウム-177 (^{177}Lu) 及びジルコニウム-89 (^{89}Zr) から選択される、請求項12に記載の抗体。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体及び薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項15】

請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体を含む、腎癌又はCAIXの発現によって特徴づけられる他の癌の治療に使用されるための医薬組成物。

【請求項16】

請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体を含む、対象における疾患、障害又は感染症を診断、監視又は予測に使用するための医薬組成物。

【請求項17】

前記抗体が、放射性標識にコンジュゲートされた、請求項16に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項18】

前記放射性標識が、アクチニウム-225 (^{225}Ac)、アスタチン-211 (^{211}At)、ビスマス-212 及びビスマス-213 (^{212}Bi 、 ^{213}Bi)、銅-64 及び銅-67 (^{64}Cu 、 ^{67}Cu)、ガリウム-67 及びガリウム-68 (^{67}Ga 及び ^{68}Ga)、インジウム-111 (^{111}In)、ヨウ素-123、-124、-125 又は -131 (^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、鉛-212 (^{212}Pb)、ルテチウム-177 (^{177}Lu)、ラジウム-223 (^{223}Ra)、サマリウム-153 (^{153}Sm)、スカンジウム-44 及びスカンジウム-47 (^{44}Sc 、 ^{47}Sc)、ストロンチウム-90 (^{90}Sr)、テクネチウム-99 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、イットリウム-86 及びイットリウム-90 (^{86}Y 、 ^{90}Y) 及びジルコニウム-89 (^{89}Zr) からなる群から選択される、請求項17に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項19】

前記放射性標識が、ガリウム-67 及びガリウム-68 (^{67}Ga 及び ^{68}Ga)、ヨウ素-124 (^{124}I) 及びジルコニウム-89 (^{89}Zr) から選択される、請求項18に記載の使用のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、放射免疫療法において使用するための、低下した血清半減期を有する抗体、組成物及び抗体、特に放射性同位元素にコンジュゲートされた抗体を生成するための方法に関する。

【0002】

関連出願

本出願は、オーストラリア仮特許出願オーストラリア特許出願公開第2019902343号明細書からの優先権を主張し、この出願の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

放射線療法は、腫瘍療法の重要な形態である。腫瘍を処置するための放射線療法の様々な方法が開発されている。とりわけ、放射免疫療法 (RAIT) は、放射線療法の提供に対する1つの新たなアプローチである。これは、抗体又は抗体断片を使用して放射性同位元素を特定の組織及び細胞に指向させ、それにより腫瘍処置の特異性を向上させ、毒性を低下させる。RAITは、低線量率放射線を使用することにより、その副作用を更に低下させる。

【0004】

10

20

30

40

50

健康な組織及び器官に対する放射線損傷は、放射線療法に関連した主要な問題である。このような損傷は、放射線発生活性酸素種に主に起因し、この活性酸素種は、核酸、炭水化物、脂質及びリポタンパク質などの機能的に重要な生物学的分子を酸化し、組織及び細胞を損傷する。活性酸素種は、多様な生物学的プロセス、例えば抗菌防御、炎症、発癌及び老化に関与する。体重減少に反映されるように、白血球（WBC）及び血小板数の減少並びに造血毒性などの骨髄抑制及び血球減少は、放射線障害の最も注目すべき結果である。この毒性は、RAITの放射線量を厳しく制限し、腫瘍処置の有効性を低下させる。

【0005】

放射線の造血毒性を軽減しようとする多くの方法が開発されている。幹細胞移植（SCT）及び骨髄移植（BMT）は、最も頻繁に用いられる方法である。しかしながら、これらのアプローチは、侵襲的で高価であり、処置を受けている個体のより長期の入院に寄与する可能性がある。

10

【0006】

他の方法には、免疫系を刺激するためのサイトカイン及び放射線曝露期間中に造血をオフにするためのHP5bのような血液調節タンパク質を使用することが含まれる。これらの方法は、小規模な研究において造血毒性に対処することにおいて様々な程度の成功を達成したが、ここでもまた、患者を更なる投薬及び処置に曝すことを必要とし、従って大部分が未使用のままである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0007】

放射線免疫療法に関連する毒性を軽減するための新しい方法が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本明細書におけるいかなる先行技術への言及も、この先行技術が任意の管轄区域における共通の一般的知識の一部を形成すること、又はこの先行技術が、当業者により、他の先行技術と理解され、関連すると見なされ、且つ／若しくは組み合わせることが合理的に期待され得ることの承認又は示唆ではない。

【0009】

30

本発明は、放射免疫療法において使用するためのクラスIgGの改変抗体を提供し、抗体は、クラスIgGの野生型抗体と比較して1つ以上のアミノ酸置換を有する重鎖定常領域を含み、1つ以上のアミノ酸置換は、新生児Fc受容体（FcRn）に対する抗体の親和性を低下させ、それによりクラスIgGの野生型抗体と比較して改変抗体の血清半減期を低下させる。

【0010】

一実施形態では、1つ以上のアミノ酸置換は、IgG分子の重鎖定常領域2（CH2）における置換から選択され、FcRnに対するIgG分子の親和性を低下させる。代替的に、1つ以上のアミノ酸置換は、IgG分子の重鎖定常領域3（CH3）に存在し得、それによりFcRnに対するIgG分子の親和性を低下させる。また更に、アミノ酸置換は、IgG分子のCH2領域における少なくとも1つの置換と、CH3領域における少なくとも1つの置換とを含み得、それにより、置換は、FcRnに対するIgGの親和性を低下させる。

40

【0011】

特定の好ましい実施形態では、1つ以上のアミノ酸置換は、IgGの残基His310、His433、His435、His436又はIle253の1つ以上に存在し得る。好ましくは、アミノ酸置換は、重鎖定常領域における位置His310又はHis435での置換を含む。より好ましくは、FcRnに対する抗体の親和性を低下させるアミノ酸置換は、His310及びHis435の両方におけるものである。

【0012】

50

特定の実施形態では、改変抗体は、1つ以上のFc-γ受容体に結合する能力を保持し、従って、特定の実施形態では、改変抗体は、エフェクター応答（ADCCを含む）を刺激する能力を保持する。

【0013】

代替的な実施形態では、FcRn受容体に対する親和性を低下させる1つ以上のアミノ酸改変は、Fcγ受容体に対する親和性も低下させる。改変抗体は、クラスIgGの野生型抗体と比較して1つ以上のアミノ酸置換を更に含み得、ここで、アミノ酸置換は、1つ以上のFcγ受容体に対する抗体の親和性を更に低下させる。

【0014】

更なる実施形態では、改変抗体は、クラスIgGの野生型抗体と比較して1つ以上のアミノ酸置換を更に含み、ここで、アミノ酸置換は、クラスIgGの野生型抗体と比較して、改変抗体におけるCH1-CH2ヒンジ領域の安定性を増加させる。

【0015】

一実施形態では、改変抗体は、診断又は治療剤にコンジュゲートされる。診断又は治療剤は、例えば、アミノ酸残基のハロゲン化により、抗体に直接又は間接的にコンジュゲートされ得る。好ましくは、診断又は治療剤は、リンカー又はキレーター部分によって抗体に間接的にコンジュゲートされる。一例では、改変抗体は、以下からなる群から選択されるキレート化部分にコンジュゲートされる：TMT（6，6'-ビス[N，N'，N''-トリ（カルボキシメチル）アミノメチル]-4'-（3-アミノ-4-メトキシフェニル）-2，2':6'，2''-ターピリジン）、DOTA（1，4，7，10-テトラアザシクロ 20 ドデカン-NN'，N''（N'''-四酢酸）、TCMC、DO3A、CB-DO2A、NOTA、Diamsar、DTPA、CHX-A'-DTPA、TETE、Te2A、HBED、DFO、DFOsq及びHOPO又は本明細書に記載される他のキレート化剤。

【0016】

別の例では、改変抗体は、二官能性リンカー、例えばブromoアセチル、チオール、スクシンイミドエステル、TFPエステル、マレイミドにコンジュゲートされるか、又は当技術分野で公知の任意のアミン若しくはチオール-改変化学を使用してコンジュゲートされる。

【0017】

好ましくは、診断又は治療剤は、放射性同位元素である。適切な同位元素の例としては、アクチニウム-225（²²⁵Ac）、アスタチン-211（²¹¹At）、ビスマス-212及びビスマス-213（²¹²Bi、²¹³Bi）、銅-64及び銅-67（⁶⁴Cu、⁶⁷Cu）、ガリウム-67及びガリウム-68（⁶⁷Ga及び⁶⁸Ga）、インジウム-111（¹¹¹In）、ヨウ素-123、-124、-125又は-131（¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I）（¹²³I）、鉛-212（²¹²Pb）、ルテチウム-177（¹⁷⁷Lu）、ラジウム-223（²²³Ra）、サマリウム-153（¹⁵³Sm）、スカンジウム-44及びスカンジウム-47（⁴⁴Sc、⁴⁷Sc）、ストロンチウム-90（⁹⁰Sr）、テクネチウム-99（^{99m}Tc）、イットリウム-86及びイットリウム-90（⁸⁶Y、⁹⁰Y）、ジルコニウム-89（⁸⁹Zr）が挙げられる。

【0018】

クラスIgGの非改変抗体と比較して低下したFcRn結合親和性を有するクラスIgG改変抗体は、診断又は治療剤を生物学的部位に標的化するのに有用な任意の抗体であり得る。抗体は、IgG1（ヒト又はネズミ）、IgG2、IgG4、ネズミIgG2aを含む任意のIgGクラスであり得る。好ましい例では、抗体は、診断又は治療剤を癌細胞に標的化又は送達するのに有用な任意の抗体である。適切な抗体の例としては、IgG1抗体トラスツマブ（Herceptin（登録商標））、リツキシマブ（Rituxan（登録商標））、ベバシズマブ（Avastin（登録商標））、ジヌツキシマブ（Unituxin（登録商標））、IgG2抗体パニツマブ（Vectibix（登録商標））、IgG4抗体、ペムプロリズマブ（Keytruda（登録商標））、ニボルマブ（Opdivo（登録商標））、ネズミIgG2a抗体トシツモマブ（Bexxar（

10

30

40

50

登録商標)) 及びネズミ Ig G 1 抗体イブリツモマブ (Z e v a l i n (登録商標)) が挙げられる。他の例としては、ゲムツズマブ (M y l o t a r g (登録商標)) 、ブレンツキシマブ (A d c e t r i s (登録商標)) 、イノツズマブ (B e s p o n s a (登録商標)) 、グレンバツムマブ (C D X - 0 1 1) 、アネツマブ (B A Y 9 4 - 9 3 4 3) 、ミルベツキシマブ (I M G N 8 5 3) 、デパツキシズマブ (A B T - 4 1 4) 、ロバルピツズマブ (R o v a - T) 及びロバルピツズマブタリリン (S G N - C D 3 3 A) が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

本発明は、クラス Ig G の非改変抗体と比較して又はクラス Ig G の野生型抗体と比較して低下した F c R n 結合親和性を有するクラス Ig G の改変抗体も提供し、抗体は、

－ クラス Ig G の野生型抗体と比較して1つ以上のアミノ酸置換を有する重鎖定常領域であって、1つ以上のアミノ酸置換は、新生児 F c 受容体 (F c R n) に対する抗体の親和性を低下させ、それによりクラス Ig G の野生型抗体と比較して改変抗体の血清半減期を低下させる、重鎖定常領域を含み、

前記抗体は、前立腺特異的膜抗原 (P S M A) に特異的に結合し、前記抗体は、

F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 - リンカー - F R 1 a - C D R 1 a - F R 2 a - C D R 2 a - F R 3 a - C D R 3 a - F R 4 a

を含み、ここで、

F R 1 、 F R 2 、 F R 3 及び F R 4 は、それぞれフレームワーク領域であり；

C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 は、それぞれ相補性決定領域であり；

F R 1 a 、 F R 2 a 、 F R 3 a 及び F R 4 a は、それぞれフレームワーク領域であり；

C D R 1 a 、 C D R 2 a 及び C D R 3 a は、それぞれ相補性決定領域であり；

相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表 1 に記載のアミノ酸配列を有する。好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表 1 に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 が V H からの配列であり、C D R 1 a 、 C D R 2 a 及び C D R 3 a が V L からの配列であるか、又は C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 が V L からの配列であり、C D R 1 a 、 C D R 2 a 及び C D R 3 a が V H からの配列であるものも含む。

【 0 0 2 0 】

より詳細には、本発明は、クラス Ig G の非改変抗体と比較して又はクラス Ig G の野生型抗体と比較して低下した F c R n 結合親和性を有するクラス Ig G の改変抗体を提供し、抗体は、

－ 重鎖定常領域であって、位置 H i s 3 1 0 、 H i s 4 3 3 、 H i s 4 3 5 、 H i s 4 3 6 、 I l e 2 5 3 における1つ以上のアミノ酸残基は、非改変抗体又はクラス Ig G の野生型抗体に存在する残基と異なる、重鎖定常領域を含み、

前記抗体は、前立腺特異的膜抗原 (P S M A) に特異的に結合し、前記抗体は、

F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 - リンカー - F R 1 a - C D R 1 a - F R 2 a - C D R 2 a - F R 3 a - C D R 3 a - F R 4 a

を含み、ここで、

F R 1 、 F R 2 、 F R 3 及び F R 4 は、それぞれフレームワーク領域であり；

C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 は、それぞれ相補性決定領域であり；

F R 1 a 、 F R 2 a 、 F R 3 a 及び F R 4 a は、それぞれフレームワーク領域であり；

C D R 1 a 、 C D R 2 a 及び C D R 3 a は、それぞれ相補性決定領域であり；

相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表 1 に記載のアミノ酸配列を有する。好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表 1 に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 が V H から

の配列であり、CDR1a、CDR2a及びCDR3aがVLからの配列であるか、又はCDR1、CDR2及びCDR3がVLからの配列であり、CDR1a、CDR2a及びCDR3aがVHからの配列であるものも含む。

【0021】

一実施形態では、PSMAに特異的に結合する抗体は、(NからC末端又はCからN末端の順に)配列番号4又は20のアミノ酸から本質的になるか又はそれからなる抗原結合部位を含む。

【0022】

更なる実施形態では、PSMAに特異的に結合する抗体は、以下の少なくとも1つを含む：

(i) 配列番号1又は17に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含む相補性決定領域(CDR)1、配列番号2又は18に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR2及び配列番号3又は19に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR3を含むVH；

(ii) 配列番号4又は20に示される配列に対して少なくとも約95%、又は96%、又は97%、又は98%、又は99%同一の配列を含むVH；

(iii) 配列番号33に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR1、配列番号34に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR2及び配列番号35に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR3を含むVL；

(iv) 配列番号36に示される配列に対して少なくとも約95%同一の配列を含むVL；

(v) 配列番号1又は17に示される配列を含むCDR1、配列番号2又は18間に示される配列を含むCDR2及び配列番号3又は19に示される配列を含むCDR3を含むVH；

(vi) 配列番号4又は20に示される配列を含むVH；

(vii) 配列番号33に示される配列を含むCDR1、配列番号34に示される配列を含むCDR2及び配列番号45に示される配列を含むCDR3を含むVL；

(viii) 配列番号36に示される配列を含むVL；

(ix) 配列番号1又は17に示される配列を含むCDR1、配列番号2又は18間に示される配列を含むCDR2及び配列番号3又は19に示される配列を含むCDR3を含むVH；並びに配列番号33に示される配列を含むCDR1、配列番号34に示される配列を含むCDR2及び配列番号35に示される配列を含むCDR3を含むVL；又は

(x) 配列番号4又は20に示される配列を含むVH及び配列番号36に示される配列を含むVL。

【0023】

好ましくは、重鎖定常領域は、His310及びHis435の両方におけるアミノ酸置換を含む。抗体は、定常重鎖領域のSer228及びLeu235と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。

【0024】

任意の実施形態では、抗体は、配列番号235～237の任意の1つに示されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含み、好ましくは、重鎖定常領域は、配列番号236に示さ

10

20

30

40

50

れる配列を含む。

【0025】

なお更なる実施形態では、抗体の重鎖は、配列番号239～242の任意の1つに示される、好ましくは配列番号239に示される配列を含む。

【0026】

また更に、好ましい実施形態では、抗体の軽鎖定常領域は、配列番号238に示される配列を含む。より好ましくは、抗体は、配列番号243に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0027】

特に好ましい実施形態では、抗体は、配列番号239に示されるアミノ酸配列及び配列番号243に示される配列を含む。

【0028】

本発明は、クラスIgGの非改変モノクローナル抗体のものと比較して又はクラスIgGの野生型抗体と比較して低下したFcRn結合親和性を有するクラスIgGの改変抗体も提供し、抗体は、

－ クラスIgGの野生型抗体と比較して1つ以上のアミノ酸置換を有する重鎖定常領域であって、1つ以上のアミノ酸置換は、新生児Fc受容体(FcRn)に対する抗体の親和性を低下させ、それによりクラスIgGの野生型抗体と比較して改変抗体の血清半減期を低下させる、重鎖定常領域

を含み、

前記抗体は、炭酸アンヒドラーゼIX(CAIX)に特異的に結合し、前記抗体は、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-リンカー-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

を含み、ここで、

FR1、FR2、FR3及びFR4は、それぞれフレームワーク領域であり；

CDR1、CDR2及びCDR3は、それぞれ相補性決定領域であり；

FR1a、FR2a、FR3a及びFR4aは、それぞれフレームワーク領域であり；

CDR1a、CDR2a及びCDR3aは、それぞれ相補性決定領域であり；

相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表2に記載のアミノ酸配列を有する。好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表2に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、CDR1、CDR2及びCDR3がVHからの配列であり、CDR1a、CDR2a及びCDR3aがVLからの配列であるか、又はCDR1、CDR2及びCDRであるものも含む。

【0029】

本発明は、クラスIgGの非改変モノクローナル抗体のものと比較して又はクラスIgGの野生型抗体と比較して低下したFcRn結合親和性を有するクラスIgGの改変抗体も提供し、抗体は、

－ 重鎖定常領域であって、位置His310、His433、His435、His436、Ile253における1つ以上のアミノ酸残基は、非改変抗体又はクラスIgGの野生型抗体に存在する残基と異なる、重鎖定常領域

を含み、

前記抗体は、炭酸アンヒドラーゼIX(CAIX)に特異的に結合し、前記抗体は、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-リンカー-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

を含み、ここで、

FR1、FR2、FR3及びFR4は、それぞれフレームワーク領域であり；

CDR1、CDR2及びCDR3は、それぞれ相補性決定領域であり；

FR1a、FR2a、FR3a及びFR4aは、それぞれフレームワーク領域であり；

CDR1a、CDR2a及びCDR3aは、それぞれ相補性決定領域であり；

相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表 2 に記載のアミノ酸配列を有する。好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表 2 に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 が V H からの配列であり、CDR 1 a、CDR 2 a 及び CDR 3 a が V L からの配列であるか、又は CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 が V L からの配列であり、CDR 1 a、CDR 2 a 及び CDR 3 a が V H からの配列であるものも含む。

【0030】

一実施形態では、CAIX 特異的に結合する抗体は、(N から C 末端又は C から N 末端の順に) 配列番号 52、68、84、100 又は 116 のアミノ酸から本質的になるか又はそれからなる抗原結合部位を含む。

【0031】

更なる実施形態では、CAIX に特異的に結合する抗体は、以下の少なくとも 1 つを含む：

(i) 配列番号 49、65、81、97 又は 113 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む相補性決定領域 (CDR) 1、配列番号 50、66、82、98 又は 114 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む CDR 2 及び配列番号 51、67、83、99 又は 115 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む CDR 3 を含む V H ；

(ii) 配列番号 52、68、84、100 又は 116 に示される配列に対して少なくとも約 95%、又は 96%、又は 97%、又は 98%、又は 99% 同一の配列を含む V H ；

(iii) 配列番号 129、145、161、177、193 又は 209 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む CDR 1、配列番号 134、146、162、178、194 又は 210 に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む CDR 2 及び配列番号 131、147、163、179、195 又は 211 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む CDR 3 を含む V L ；

(iv) 配列番号 132、148、164、180、196 又は 212 に示される配列に対して少なくとも約 95% 同一の配列を含む V L ；

(v) 配列番号 49、65、81、97 又は 113 に示される配列を含む CDR 1、配列番号 50、66、82、98 又は 114 間に示される配列を含む CDR 2 及び配列番号 51、67、83、99 又は 115 に示される配列を含む CDR 3 を含む V H ；

(vi) 配列番号 52、68、84、100 又は 116 に示される配列を含む V H ；

(vii) 配列番号 129、145、161、177、193 又は 209 に示される配列を含む CDR 1、配列番号 130、146、162、178、194 又は 210 に示される配列を含む CDR 2 及び配列番号 131、147、163、179、195 又は 211 に示される配列を含む CDR 3 を含む V L ；

(viii) 配列番号 132、148、164、180、196 又は 212 に示される配列を含む V L ；

(ix) 配列番号 49、65、81、97 又は 113 に示される配列を含む CDR 1、配列番号 50、66、82、98 又は 114 間に示される配列を含む CDR 2 及び配列番号 51、67、83、99 又は 115 に示される配列を含む CDR 3 を含む V H ；並びに配列番号 129、145、161、177、193 又は 209 に示される配列を含む C D

10

20

30

40

50

R 1、配列番号 1 3 0、1 4 6、1 6 2、1 7 8、1 9 4 又は 2 1 0 に示される配列を含む C D R 2 及び配列番号 1 3 1、1 4 7、1 6 3、1 7 9、1 9 5 又は 2 1 1 に示される配列を含む C D R 3 を含む V L ; 又は

(x) 配列番号 5 2、6 8、8 4、1 0 0 又は 1 1 6 に示される配列を含む V H 及び配列番号 1 3 2、1 4 8、1 6 4、1 8 0、1 9 6 又は 2 1 2 に示される配列を含む V L。

【0032】

好ましくは、重鎖定常領域は、H i s 3 1 0 及び H i s 4 3 5 の両方におけるアミノ酸置換を含む。抗体は、定常重鎖領域の S e r 2 2 8 及び L e u 2 3 5 と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。

【0033】

好ましくは、抗体は、配列番号 2 2 5 ~ 2 2 8 の任意の 1 つに示される、好ましくは 2 2 6 に示される配列を含む重鎖定常領域を含む。

【0034】

なお更なる実施形態では、抗体は、好ましくは、配列番号 2 3 0 ~ 2 3 3 の任意の 1 つに示される、好ましくは配列番号 2 3 1 に示される配列を含む重鎖を含む。

【0035】

任意の実施形態では、抗体は、配列番号 2 2 9 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。好ましくは、抗体は、配列番号 2 3 4 示すアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0036】

特定の好ましい実施形態では、抗体は、配列番号 2 3 1 に示される配列及び配列番号 2 3 4 に示される配列を含む。

【0037】

本発明は、免疫グロブリン部分及びそれにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子も提供し、

免疫グロブリン部分は、腫瘍関連抗原に特異的に結合し、

免疫グロブリン部分は、野生型免疫グロブリンと比較して、F c R n 受容体に対する低下又は消失した親和性を有し；

非タンパク質剤は、細胞毒又は放射性元素などの治療的部分を含む。

【0038】

免疫グロブリン部分は、トラスツズマブ (H e r c e p t i n (登録商標))、リツキシマブ (R i t u x a n (登録商標))、ベバシズマブ (A v a s t i n (登録商標))、ジヌツキシマブ (U n i t u x i n (登録商標))、パニツムマブ (V e c t i b i x (登録商標))、ペムブロリズマブ (K e y t r u d a (登録商標))、ニボルマブ (O p d i v o (登録商標))、トシツモマブ (B e x x a r (登録商標))、イブリツモマブ (Z e v a l i n (登録商標))、ゲムツズマブ (M y l o t a r g (登録商標))、ブレンツキシマブ (A d c e t r i s (登録商標))、イノツズマブ (B e s p o n s a (登録商標))、グレンバツムマブ (C D X - 0 1 1)、アネツマブ (B A Y 9 4 - 9 3 4 3)、ミルベツキシマブ (I M G N 8 5 3)、デパツキシズマブ (A B T - 4 1 4)、ロバルピツズマブ (R o v a - T) 及びロバルピツズマブタリリン (S G N - C D 3 3 A) 又は本明細書に記載される任意の他の抗体を含むが、これらに限定されない、腫瘍関連抗原への結合に有用な任意の抗体を含み得る。

【0039】

本発明は、免疫グロブリン部分及びそれにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子を提供し、

免疫グロブリン部分は、P S M A に特異的に結合し、且つ

F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 - リンカー - F R 1 a - C D R 1 a - F R 2 a - C D R 2 a - F R 3 a - C D R 3 a - F R 4 a を含む抗原結合部位を含み、ここで、

F R 1、F R 2、F R 3 及び F R 4 は、それぞれフレームワーク領域であり；

C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 は、それぞれ相補性決定領域であり；

10

20

30

40

50

FR1a、FR2a、FR3a及びFR4aは、それぞれフレームワーク領域であり；
CDR1a、CDR2a及びCDR3aは、それぞれ相補性決定領域であり；
相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表1に記載のアミノ酸配列を有し、
免疫グロブリン部分は、野生型免疫グロブリンと比較して、FcRn受容体に対する低下又は消失した親和性を有し；

非タンパク質剤は、細胞毒又は放射性元素などの治療的部分を含む。

【0040】

好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表1に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、CDR1、CDR2及びCDR3がVHからの配列であり、CDR1a、CDR2a及びCDR3aがVLからの配列であるか、又はCDR1、CDR2及びCDR3がVLからの配列であり、CDR1a、CDR2a及びCDR3aがVHからの配列であるものも含む。好ましくは、免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域におけるHis310及び／又はHis435と均等な残基におけるアミノ酸置換を有する。免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域のSer228及びLeu235と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。

【0041】

好ましくは、非タンパク質剤は、放射性元素を含む。

【0042】

本発明は、免疫グロブリン部分及びそれにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子も提供し、

免疫グロブリン部分は、PSMAに特異的に結合し、且つ（NからC末端又はCからN末端の順に）配列番号4又は20のアミノ酸から本質的になるか又はそれからなる抗原結合部位を含み；

免疫グロブリン部分は、野生型免疫グロブリンと比較して、FcRn受容体に対する低下又は消失した親和性を有し；

非タンパク質剤は、細胞毒又は放射性元素などの治療的部分を含む。

【0043】

好ましくは、免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域におけるHis310及び／又はHis435と均等な残基におけるアミノ酸置換を有する。免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域のSer228及びLeu235と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。

【0044】

本発明は、免疫グロブリン部分及びそれにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子も提供し、

免疫グロブリン部分は、野生型免疫グロブリンと比較して、FcRn受容体に対する低下又は消失した親和性を有し、免疫グロブリン部分は、PSMAに特異的に結合し、且つ以下の少なくとも1つを含む：

(i) 配列番号1又は17に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含む相補性決定領域(CDR)1、配列番号2又は18に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR2及び配列番号3又は19に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR3を含むVH；

(ii) 配列番号4又は20に示される配列に対して少なくとも約95%、又は96%、又は97%、又は98%、又は99%同一の配列を含むVH；

(iii) 配列番号33に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR1、配列番号34に対して少なくとも約80%、少

10

20

30

40

50

なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む CDR2 及び配列番号 35 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む CDR3 を含む VL ;

(iv) 配列番号 36 に示される配列に対して少なくとも約 95% 同一の配列を含む VL ;

(v) 配列番号 1 又は 17 に示される配列を含む CDR1、配列番号 2 又は 18 間に示される配列を含む CDR2 及び配列番号 3 又は 19 に示される配列を含む CDR3 を含む VH ;

(vi) 配列番号 4 又は 20 に示される配列を含む VH ;

(vii) 配列番号 33 に示される配列を含む CDR1、配列番号 34 に示される配列を含む CDR2 及び配列番号 45 に示される配列を含む CDR3 を含む VL ;

(viii) 配列番号 36 に示される配列を含む VL ;

(ix) 配列番号 1 又は 17 に示される配列を含む CDR1、配列番号 2 又は 18 間に示される配列を含む CDR2 及び配列番号 3 又は 19 に示される配列を含む CDR3 を含む VH ; 並びに配列番号 33 に示される配列を含む CDR1、配列番号 34 に示される配列を含む CDR2 及び配列番号 35 に示される配列を含む CDR3 を含む VL ; 又は

(x) 配列番号 4 又は 20 に示される配列を含む VH 及び配列番号 36 に示される配列を含む VL 。

【0045】

好ましくは、免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域における His310 及び／又は His435 と均等な残基におけるアミノ酸置換を有する。免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域の Ser228 及び Leu235 と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。好ましくは、非タンパク質剤は、放射性元素を含む。

【0046】

任意の実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号 235～237 の任意の 1 つに示されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含み、好ましくは、重鎖定常領域は、配列番号 236 に示される配列を含む。

【0047】

なお更なる実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号 239～242 の任意の 1 つ、好ましくは 239 に示される配列を含む。

【0048】

任意の実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号 238 の配列を含む軽鎖定常領域を含む。一実施形態において、免疫グロブリンは、配列番号 243 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。

【0049】

特に好ましい実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号 239 及び 243 に示される配列を含む。

【0050】

本発明は、免疫グロブリン部分及びそれにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子も提供し、

免疫グロブリン部分は、CAIX に特異的に結合し、且つ

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-リンカー-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

を含む抗原結合部位を含み、ここで、

FR1、FR2、FR3 及び FR4 は、それぞれフレームワーク領域であり；

CDR1、CDR2 及び CDR3 は、それぞれ相補性決定領域であり；

FR1a、FR2a、FR3a 及び FR4a は、それぞれフレームワーク領域であり；

CDR1a、CDR2a 及び CDR3a は、それぞれ相補性決定領域であり；

10

20

30

40

50

相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表 2 に記載のアミノ酸配列を有し、

免疫グロブリン部分は、野生型免疫グロブリンと比較して、FcRn 受容体に対する低下又は消失した親和性を有し；

非タンパク質剤は、細胞毒又は放射性元素などの治療的部分を含む。

【0051】

好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表 2 に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、CDR1、CDR2 及び CDR3 が V_H からの配列であり、CDR1a、CDR2a 及び CDR3a が V_L からの配列であるか、又は CDR1、CDR2 及び CDR3 が V_L からの配列であり、CDR1a、CDR2a 及び CDR3a が V_H からの配列であるものも含む。

10

【0052】

好ましくは、免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域における His310 及び／又は His435 と均等な残基におけるアミノ酸置換を有する。免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域の Ser228 及び Leu235 と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。好ましくは、非タンパク質剤は、放射性元素を含む。

【0053】

本発明は、免疫グロブリン部分及びそれにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子も提供し、

免疫グロブリン部分は、CAIX に特異的に結合し、且つ（N から C 末端又は C から N 末端の順に）配列番号 52、68、84、100 又は 116 のアミノ酸から本質的になるか又はそれからなる抗原結合部位を含み；

20

免疫グロブリン部分は、野生型免疫グロブリンと比較して、FcRn 受容体に対する低下又は消失した親和性を有し；

非タンパク質剤は、細胞毒又は放射性元素などの治療的部分を含む。

【0054】

好ましくは、免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域における His310 及び／又は His435 と均等な残基におけるアミノ酸置換を有する。免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域の Ser228 及び Leu235 と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。好ましくは、非タンパク質剤は、放射性元素を含む。

30

【0055】

本発明は、免疫グロブリン部分及びそれにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子も提供し、

免疫グロブリン部分は、野生型免疫グロブリンと比較して、FcRn 受容体に対する低下又は消失した親和性を有し、且つ CAIX に特異的に結合し、且つ以下の少なくとも 1 つを含む：

(i) 配列番号 49、65、81、97 又は 113 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む相補性決定領域 (CDR) 1、配列番号 50、66、82、98 又は 114 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む CDR2 及び配列番号 51、67、83、99 又は 115 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む CDR3 を含む V_H；

40

(ii) 配列番号 52、68、84、100 又は 116 に示される配列に対して少なくとも約 95%、又は 96%、又は 97%、又は 98%、又は 99% 同一の配列を含む V_H；

(iii) 配列番号 129、145、161、177、193 又は 209 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む CDR1

50

、配列番号130、146、162、178、194又は210に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR2及び配列番号131、147、163、179、195又は211に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR3を含むVL；

(iv) 配列番号132、148、164、180、196又は212に示される配列に対して少なくとも約95%同一の配列を含むVL；

(v) 配列番号49、65、81、97又は113に示される配列を含むCDR1、配列番号50、66、82、98又は114間に示される配列を含むCDR2及び配列番号51、67、83、99又は115に示される配列を含むCDR3を含むVH；

(vi) 配列番号52、68、84、100又は116に示される配列を含むVH；

(vii) 配列番号129、145、161、177、193又は209に示される配列を含むCDR1、配列番号130、146、162、178、194又は210に示される配列を含むCDR2及び配列番号131、147、163、179、195又は211に示される配列を含むCDR3を含むVL；

(viii) 配列番号132、148、164、180、196又は212に示される配列を含むVL；

(ix) 配列番号49、65、81、97又は113に示される配列を含むCDR1、配列番号50、66、82、98又は114間に示される配列を含むCDR2及び配列番号51、67、83、99又は115に示される配列を含むCDR3を含むVH；並びに配列番号129、145、161、177、193又は209に示される配列を含むCDR1、配列番号130、146、162、178、194又は210に示される配列を含むCDR2及び配列番号131、147、163、179、195又は211に示される配列を含むCDR3を含むVL；又は

(x) 配列番号52、68、84、100又は116に示される配列を含むVH及び配列番号132、148、164、180、196又は212に示される配列を含むVL。

【0056】

好ましくは、非タンパク質剤は、放射性元素を含む。好ましくは、免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域におけるHis310及び／又はHis435と均等な残基におけるアミノ酸置換を有する。免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域のSer228及びLeu235と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。好ましくは、非タンパク質剤は、放射性元素を含む。

【0057】

任意の実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号225～228の任意の1つ、好ましくは226に示される配列を含む重鎖定常領域を含む。

【0058】

なお更なる実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号230～233の任意の1つに示される、好ましくは配列番号231に示される配列を含む重鎖を含む。

【0059】

任意の実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号229に示される配列を含む軽鎖定常領域を含む。一実施形態では、軽鎖は、配列番号234の配列を含む。

【0060】

特定の好ましい実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号231及び234に示されるアミノ酸配列を含む。

【0061】

本発明は、個体における癌を処置する方法も提供し、方法は、それを必要とする個体に、免疫グロブリン部分及び前述のようにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子を投与することを含む。

【0062】

本発明は、放射免疫療法における使用に適した抗体を生成する方法も提供し、方法は、

- － 放射免疫療法を必要とする細胞又は組織上に存在するエピトープに特異的に結合する抗原結合部位を有する抗体を提供すること；

- － 抗体の重鎖定常領域に少なくとも1つのアミノ酸置換を導入して、改変抗体を生成することであって、少なくとも1つのアミノ酸置換は、残基H i s 3 1 0、H i s 4 3 5及びI l e 2 5 3におけるアミノ酸置換からなる群から選択され、それにより前記抗体のF c R nに対する結合親和性及び／又は血清半減期の変化を引き起こす、生成すること；

- － 改変抗体を放射性元素とコンジュゲートすること

を含み、それにより放射免疫療法における使用に適した抗体を生成する。

【0063】

特定の実施形態では、抗体は、下記の表1及び2に記載の相補性決定領域、フレームワーク領域、可変軽鎖又は可変重鎖領域のいずれかを有する抗体を含む、本明細書に記載される抗体である。好ましくは、改変抗体は、定常重鎖領域のS e r 2 2 8及びL e u 2 3 5と均等な残基におけるアミノ酸置換も含む。好ましくは、放射性元素は、キレート化剤、例えばD O T Aを使用して改変抗体にコンジュゲートされる。

【0064】

本発明は、疾患の処置において使用するための抗体－放射性同位元素イムノコンジュゲートを生成する方法も提供し、方法は、

- － 放射免疫療法を必要とする細胞又は組織上に存在するエピトープに特異的に結合する抗原結合部位を有する抗体を提供すること；

- － 抗体の重鎖定常領域に少なくとも1つのアミノ酸置換を導入して、改変抗体を生成することであって、少なくとも1つのアミノ酸置換は、アミノ酸残基H i s 3 1 0、H i s 4 3 5及びI l e 2 5 3における置換からなる群から選択され、それにより前記抗体のF c R nに対する結合親和性及び／又は血清半減期の変化を引き起こす、生成すること；

- － 改変抗体を放射性元素とコンジュゲートすること

を含み、それにより疾患の処置において使用するための抗体－放射性同位元素イムノコンジュゲートを生成する。

【0065】

好ましくは、抗体は、下記の表1及び2に記載の相補性決定領域、フレームワーク領域、可変軽鎖又は可変重鎖領域のいずれかを有する抗体を含む、本明細書に記載される抗体である。好ましくは、改変抗体は、定常重鎖領域のS e r 2 2 8及びL e u 2 3 5と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み、好ましくは、放射性元素は、キレート化剤、例えばD O T Aを使用して改変抗体にコンジュゲートされる。より好ましくは、改変抗体は、アミノ酸置換H i s 3 1 0 A l a及びH i s 4 3 5 G l nを含む。

【0066】

好ましくは、疾患は、前立腺癌又は腎細胞癌を含む癌である。

【0067】

本発明は、改変抗体であって、非改変形態の抗体と比較して、F c R nに対する変化した結合親和性及び／又は変化した血清半減期を有する改変抗体を生成する方法を更に提供し、前記方法は、

- (a) 免疫グロブリン重鎖の少なくとも定常領域をコードする核酸分子に作動可能に連結された適切なプロモーターを含む発現ベクター（好ましくは複製可能な発現ベクター）を提供することであって、アミノ酸残基H i s 3 1 0、H i s 4 3 5及びI l e 2 5 3からなる群から選択される、重鎖定常領域からの少なくとも1つのアミノ酸は、非改変抗体に存在するものと異なるアミノ酸で置換され、それによりF c R n結合親和性及び／又は血清半減期の変化を引き起こす、提供することと；

- (b) 宿主細胞を前記ベクターで形質転換することと；

- (c) 前記形質転換された宿主細胞を培養して、前記改変抗体を生成することと

を含む。

【0068】

10

20

30

40

50

任意選択的に、このような方法は、相補的な免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAに作動可能に連結されたプロモーターを含む第2の発現ベクター（好ましくは複製可能な発現ベクター）を調製し、且つ前記細胞株を前記第2のベクターで更に形質転換することを更に含む。

【0069】

放射免疫療法において使用するための抗体の血清半減期を変更するための方法であって、

－ 放射免疫療法を必要とする細胞又は組織上に存在するエピトープに特異的に結合する抗原結合部位を有する抗体を提供すること；

－ 抗体の重鎖定常領域に少なくとも1つのアミノ酸置換を導入して、改変抗体を生成することであって、少なくとも1つのアミノ酸置換は、アミノ酸残基His310、His435及びIle253における置換からなる群から選択され、それにより前記抗体のFcRnに対する結合親和性及び血清半減期の変化を引き起こす、生成することを含む方法である。

【0070】

好ましくは、本方法は、改変抗体を放射性元素とコンジュゲートすることを更に含む。好ましくは、抗体は、下記の表1及び2に記載の相補性決定領域、フレームワーク領域、可変軽鎖又は可変重鎖領域のいずれかを有する抗体を含む、PSMA又はCAIXへの結合のための、本明細書に記載される抗体である。好ましくは、改変抗体は、Ser228Pro及び／又はLeu235Gluを含む、定常重鎖領域のSer228及びLeu235と均等な残基におけるアミノ酸置換も含む。より好ましくは、改変抗体は、アミノ酸置換His310Ala及びHis435Glnを含む。

【0071】

放射免疫療法において使用するための抗体の毒性を低下させるための方法であって、

－ 放射免疫療法を必要とする細胞又は組織上に存在するエピトープに特異的に結合する抗原結合部位を有する抗体を提供すること；

－ 抗体の重鎖定常領域に少なくとも1つのアミノ酸置換を導入して、改変抗体を生成することであって、少なくとも1つのアミノ酸置換は、アミノ酸残基His310、His435及びIle253における置換からなる群から選択され、アミノ酸置換は、改変抗体の血清半減期を低下させ、且つ／又は循環からの改変抗体のクリアランスを増加させる、生成すること

を含み、それにより、抗体が放射免疫療法において使用するために放射性元素とコンジュゲートされるとき、抗体の毒性を低下させる、方法である。

【0072】

任意の実施形態では、抗体の毒性を低下させることは、さもなければ循環中での放射性同位元素のより長期の滞留から生じるであろう多くの毒性効果（血液学的毒性、骨中への吸収及び骨髄照射を含む）を低下させることを含む。

【0073】

任意の実施形態では、本明細書に記載される放射標識抗体又は放射性免疫複合体の毒性は、個体への投与後、抗体又はイムノコンジュゲートの腫瘍：血液比を決定することによって評価される。

【0074】

本発明の任意の実施形態では、本発明の改変抗体の腫瘍：血液比は、抗体の投与から少なくとも8時間後に比を決定した場合、本明細書に記載される重鎖定常領域に対する改変を有さない非改変抗体の少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも6倍、少なくとも8倍若しくは少なくとも10大きいか又はそれを超える。代替的に、比は、個体への抗体の投与から少なくとも24、48、72又は120時間後に決定される。特定の実施形態では、本発明の改変抗体の腫瘍：血液比は、抗体の投与から少なくとも120時間後に比を決定した場合、本明細書に記載される重鎖定常領域に対する改変を有さない非改変抗体の少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも200倍又は少なくとも300倍大きい。

【0075】

本発明の任意の実施形態では、非改変抗体と比較して低下又は変化した血清半減期を有する、本明細書に記載される改変抗体は、非改変抗体の少なくとも2倍、少なくとも3倍速いか又はそれを超える血清クリアランス速度を有する。

【0076】

本発明の特に好ましい実施形態では、本明細書に記載される抗体は、セラノスティック対における使用に適しており、ここで、セラノスティック対は、1) 造影剤に結合した抗体、及び2) 治療用の薬剤に結合した抗体を含む。例えば、抗体は、第1に、放射線画像化における使用に適した放射性同位元素に結合されるときに診断薬として使用され得、第2に、抗体は、治療での使用に適した放射性同位元素又は細胞毒性剤に結合されるときに治療薬として使用され得る。

10

【0077】

本発明は、対象における疾患、障害又は感染症を診断、監視又は予測するインビボでの方法も提供し、方法は、

(a) 有効量の、本明細書に記載される改変抗体を対象に投与することであって、前記改変抗体は、疾患、障害又は感染症に関連する抗原に特異的に結合する、投与することと；

(b) 前記抗原が見出される前記対象における部位において、改変抗体を濃縮させることと；

(c) 前記改変抗体を検出することと

を含み、それにより、前記改変抗体のバックグラウンド又は標準レベルを超える検出は、対象が前記疾患、障害又は感染症を有することを示す。

20

【0078】

本発明は、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) に結合するか又は特異的に結合する抗原結合部位を提供する。好ましくは、本発明の抗原結合部位は、ヒトPSMAに結合するか又は特異的に結合する。

【0079】

本発明は、PSMAへの結合のための抗原結合部位を提供し、抗原結合部位は、

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-リンカー-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

を含み、ここで、

FR1、FR2、FR3及びFR4は、それぞれフレームワーク領域であり；
CDR1、CDR2及びCDR3は、それぞれ相補性決定領域であり；
FR1a、FR2a、FR3a及びFR4aは、それぞれフレームワーク領域であり；
CDR1a、CDR2a及びCDR3aは、それぞれ相補性決定領域であり；
フレームワーク領域又は相補性決定領域のいずれかの配列は、本明細書に記載されている。

30

【0080】

本発明は、PSMAへの結合のための抗原結合部位を提供し、抗原結合部位は、

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-リンカー-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a

を含み、ここで、

FR1、FR2、FR3及びFR4は、それぞれフレームワーク領域であり；
CDR1、CDR2及びCDR3は、それぞれ相補性決定領域であり；
FR1a、FR2a、FR3a及びFR4aは、それぞれフレームワーク領域であり；
CDR1a、CDR2a及びCDR3aは、それぞれ相補性決定領域であり；

相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表1に記載のアミノ酸配列を有する。好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表1に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、CDR1、CDR2及びCDR3がVHからの配列であり、CDR1a、CDR2a及びCDR3aがVLからの配列であるか、又は

40

50

C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が V L からの配列であり、C D R 1 a、C D R 2 a 及び C D R 3 a が V H からの配列であるものも含む。

【0081】

本発明は、（N から C 末端又は C から N 末端の順に）配列番号 4 又は 20 のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか又はそれからなる抗原結合部位を提供する。

【0082】

本発明は、抗体の抗原結合ドメインを含む抗原結合部位も提供し、抗原結合ドメインは、P S M A に結合するか又は特異的に結合し、抗原結合ドメインは、以下の少なくとも 1 つを含む：

（i）配列番号 1 又は 17 に示される配列に対して少なくとも約 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 % 同一の配列を含む相補性決定領域（C D R）1、配列番号 2 又は 18 に示される配列に対して少なくとも約 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 % 同一の配列を含む C D R 2 及び配列番号 3 又は 19 に示される配列に対して少なくとも約 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 % 同一の配列を含む C D R 3 を含む V H；

10

（i i）配列番号 4 又は 20 に示される配列に対して少なくとも約 95 %、又は 96 %、又は 97 %、又は 98 %、又は 99 % 同一の配列を含む V H；

（i i i）配列番号 33 に示される配列に対して少なくとも約 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 % 同一の配列を含む C D R 1、配列番号 34 に対して少なくとも約 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 % 同一の配列を含む C D R 2 及び配列番号 35 に示される配列に対して少なくとも約 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 % 同一の配列を含む C D R 3 を含む V L；

20

（i v）配列番号 36 に示される配列に対して少なくとも約 95 % 同一の配列を含む V L；

（v）配列番号 1 又は 17 に示される配列を含む C D R 1、配列番号 2 又は 18 間に示される配列を含む C D R 2 及び配列番号 3 又は 19 に示される配列を含む C D R 3 を含む V H；

30

（v i）配列番号 4 又は 20 に示される配列を含む V H；

（v i i）配列番号 33 に示される配列を含む C D R 1、配列番号 34 に示される配列を含む C D R 2 及び配列番号 45 に示される配列を含む C D R 3 を含む V L；

（v i i i）配列番号 36 に示される配列を含む V L；

（i x）配列番号 1 又は 17 に示される配列を含む C D R 1、配列番号 2 又は 18 間に示される配列を含む C D R 2 及び配列番号 3 又は 19 に示される配列を含む C D R 3 を含む V H；並びに配列番号 33 に示される配列を含む C D R 1、配列番号 34 に示される配列を含む C D R 2 及び配列番号 35 に示される配列を含む C D R 3 を含む V L；又は

40

（x）配列番号 4 又は 20 に示される配列を含む V H 及び配列番号 36 に示される配列を含む V L。

【0083】

本発明の任意の態様では、抗原結合ドメインは、以下の少なくとも 1 つを更に含む：

（i）配列番号 9 又は 25 に示される配列に対して少なくとも約 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 % 同一の配列を含むフレームワーク領域（F R）1、配列番号 10 又は 26 に示される配列に対して少なくとも約 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 %、少なくとも 99 % 同一の配列を含む F R 2、配列番号 11 又は 27 に示される配列に対して少なくとも約 80 %、少なく

50

とも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR3 及び配列番号 12 又は 28 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR4 を含む VH；

(ii) 配列番号 41 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR1、配列番号 42 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR2、配列番号 43 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR3 及び配列番号 44 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR4 を含む VL；

(iii) 配列番号 9 又は 25 に示される配列を含む FR1、配列番号 10 又は 26 間に示される配列を含む FR2、配列番号 11 又は 27 に示される配列を含む FR3 及び配列番号 12 又は 28 に示される配列を含む FR4 を含む VH；

(iv) 配列番号 41 に示される配列を含む FR1、配列番号 42 間に示される配列を含む FR2、配列番号 43 に示される配列を含む FR3 及び配列番号 44 に示される配列を含む FR4 を含む VL；又は

(v) 配列番号 9 又は 25 に示される配列を含む FR1、配列番号 10 又は 26 間に示される配列を含む FR2、配列番号 11 又は 27 に示される配列を含む FR3 及び配列番号 12 又は 28 に示される配列を含む FR4 を含む VH；並びに配列番号 41 に示される配列を含む FR1、配列番号 42 間に示される配列を含む FR2、配列番号 43 に示される配列を含む FR3 及び配列番号 44 に示される配列を含む FR4 を含む VL。

【0084】

任意の実施形態では、抗原結合部位は、配列番号 235～237 の任意の 1 つに示されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含み、好ましくは、重鎖定常領域は、配列番号 236 に示される配列を含む。

【0085】

なお更なる実施形態では、抗原結合部位は、配列番号 239～242 の任意の 1 つ、好ましくは 239 に示される配列を含む。

【0086】

任意の実施形態では、抗原結合部位は、配列番号 238 の配列を含む軽鎖定常領域を含む。一実施形態では、抗原結合部位の軽鎖は、配列番号 243 の配列を含む。

【0087】

特に好ましい実施形態では、抗原結合部位は、配列番号 239 及び 243 に示される配列を含む。

【0088】

本発明は、炭酸アンヒドラーゼ IX (CAIX) に結合するか又は特異的に結合する抗原結合部位も提供する。好ましくは、本発明の抗原結合部位は、ヒト CAIX に結合するか又は特異的に結合する。

【0089】

本発明は、CAIX への結合のための抗原結合部位を提供し、抗原結合部位は、

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-リンカー-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a
を含み、ここで、

FR1、FR2、FR3 及び FR4 は、それぞれフレームワーク領域であり；

CDR1、CDR2 及び CDR3 は、それぞれ相補性決定領域であり；

FR1a、FR2a、FR3a及びFR4aは、それぞれフレームワーク領域であり；
CDR1a、CDR2a及びCDR3aは、それぞれ相補性決定領域であり；
フレームワーク領域又は相補性決定領域のいずれかの配列は、本明細書に記載されている。

【0090】

本発明は、CAIXへの結合のための抗原結合部位を提供し、抗原結合部位は、
FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-リンカー-FR1a-CDR1a-FR2a-CDR2a-FR3a-CDR3a-FR4a
を含み、ここで、

FR1、FR2、FR3及びFR4は、それぞれフレームワーク領域であり；
CDR1、CDR2及びCDR3は、それぞれ相補性決定領域であり；
FR1a、FR2a、FR3a及びFR4aは、それぞれフレームワーク領域であり；
CDR1a、CDR2a及びCDR3aは、それぞれ相補性決定領域であり；
相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表2に記載のアミノ酸配列を有する。好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表2に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、CDR1、CDR2及びCDR3がVHからの配列であり、CDR1a、CDR2a及びCDR3aがVLからの配列であるか、又はCDR1、CDR2及びCDR3がVLからの配列であり、CDR1a、CDR2a及びCDR3aがVHからの配列であるものも含む。

【0091】

本発明は、(NからC末端又はCからN末端の順に)配列番号52、68、84、100又は116のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか又はそれからなる抗原結合部位を提供する。

【0092】

本発明は、抗体の抗原結合ドメインを含む抗原結合部位も提供し、抗原結合ドメインは、CAIXに結合するか又は特異的に結合し、抗原結合ドメインは、以下の少なくとも1つを含む：

(i) 配列番号49、65、81、97又は113に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含む相補性決定領域(CDR)1、配列番号50、66、82、98又は114に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR2及び配列番号51、67、83、99又は115に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR3を含むVH；

(ii) 配列番号52、68、84、100又は116に示される配列に対して少なくとも約95%、又は96%、又は97%、又は98%、又は99%同一の配列を含むVH；

(iii) 配列番号129、145、161、177、193又は209に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR1、配列番号130、146、162、178、194又は210に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR2及び配列番号131、147、163、179、195又は211に示される配列に対して少なくとも約80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%同一の配列を含むCDR3を含むVL；

(iv) 配列番号132、148、164、180、196又は212に示される配列に対して少なくとも約95%同一の配列を含むVL；

(v) 配列番号 49、65、81、97 又は 113 に示される配列を含む CDR1、配列番号 50、66、82、98 又は 114 間に示される配列を含む CDR2 及び配列番号 51、67、83、99 又は 115 に示される配列を含む CDR3 を含む VH；

(vi) 配列番号 52、68、84、100 又は 116 に示される配列を含む VH；

(vii) 配列番号 129、145、161、177、193 又は 209 に示される配列を含む CDR1、配列番号 130、146、162、178、194 又は 210 に示される配列を含む CDR2 及び配列番号 131、147、163、179、195 又は 211 に示される配列を含む CDR3 を含む VL；

(viii) 配列番号 132、148、164、180、196 又は 212 に示される配列を含む VL；

(ix) 配列番号 49、65、81、97 又は 113 に示される配列を含む CDR1、配列番号 50、66、82、98 又は 114 間に示される配列を含む CDR2 及び配列番号 51、67、83、99 又は 115 に示される配列を含む CDR3 を含む VH；並びに配列番号 129、145、161、177、193 又は 209 に示される配列を含む CDR1、配列番号 130、146、162、178、194 又は 210 に示される配列を含む CDR2 及び配列番号 131、147、163、179、195 又は 211 に示される配列を含む CDR3 を含む VL；又は

(x) 配列番号 52、68、84、100 又は 116 に示される配列を含む VH 及び配列番号 132、148、164、180、196 又は 212 に示される配列を含む VL。

【0093】

本発明の任意の態様では、抗原結合ドメインは、以下の少なくとも1つを更に含む：

(i) 配列番号 57、73、89、105 又は 124 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含むフレームワーク領域 (FR) 1、配列番号 58、74、90、106 又は 122 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR2、配列番号 59、75、91、107 又は 123 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR3 及び配列番号 60、76、92、108 又は 124 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR4 を含む VH；

(ii) 配列番号 137、153、169、185、201 又は 217 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR1、配列番号 138、154、170、186、202 又は 218 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR2、配列番号 139、155、171、187、203 又は 219 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR3 及び配列番号 140、156、172、188、204 又は 220 に示される配列に対して少なくとも約 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 92%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 99% 同一の配列を含む FR4 を含む VL；

(iii) 配列番号 57、73、89、105 又は 124 に示される配列を含む FR1、配列番号 58、74、90、106 又は 122 間に示される配列を含む FR2、配列番号 59、75、91、107 又は 123 に示される配列を含む FR3 及び配列番号 60、76、92、108 又は 124 に示される配列を含む FR4 を含む VH；

(iv) 配列番号 137、153、169、185、201 又は 217 に示される配列

10

20

30

40

50

を含むFR1、配列番号138、154、170、186、202又は218間に示される配列を含むFR2、配列番号139、155、171、187、203又は219に示される配列を含むFR3及び配列番号140、156、172、188、204又は220に示される配列を含むFR4を含むVL；又は

(v) 配列番号57、73、89、105又は124に示される配列を含むFR1、配列番号58、74、90、106又は122間に示される配列を含むFR2、配列番号59、75、91、107又は123に示される配列を含むFR3及び配列番号60、76、92、108又は124に示される配列を含むFR4を含むVH；並びに配列番号137、153、169、185、201又は217に示される配列を含むFR1、配列番号138、154、170、186、202又は218間に示される配列を含むFR2、配列番号139、155、171、187、203又は219に示される配列を含むFR3及び配列番号140、156、172、188、204又は220に示される配列を含むFR4を含むVL。

【0094】

一実施形態では、VHは、配列番号84若しくは100に示される配列に対して少なくとも約95%、若しくは96%、若しくは97%、若しくは98%、若しくは99%同一の配列を含むか、又は配列番号84若しくは100に示される配列を含み、及びVLは、配列番号164、180若しくは196に示される配列に対して少なくとも約95%、若しくは96%、若しくは97%、若しくは98%、若しくは99%同一の配列を含むか、又は配列番号164、180若しくは196に示される配列を含む。好ましくは、VHは、配列番号84若しくは100に示される配列に対して少なくとも約95%、若しくは96%、若しくは97%、若しくは98%、若しくは99%同一の配列を含むか、又は配列番号84若しくは100に示される配列を含み、及びVLは、配列番号180若しくは196に示される配列に対して少なくとも約95%、若しくは96%、若しくは97%、若しくは98%、若しくは99%同一の配列を含むか、又は配列番号180若しくは196に示される配列を含む。より好ましくは、VHは、配列番号84に示される配列に対して少なくとも約95%、若しくは96%、若しくは97%、若しくは98%、若しくは99%同一の配列を含むか、又は配列番号84に示される配列を含み、及びVLは、配列番号196に示される配列に対して少なくとも約95%、若しくは96%、若しくは97%、若しくは98%、若しくは99%同一の配列を含むか、又は配列番号196に示される配列を含む。代替的に、VHは、配列番号100に示される配列に対して少なくとも約95%、若しくは96%、若しくは97%、若しくは98%、若しくは99%同一の配列を含むか、又は配列番号100に示される配列を含み、及びVLは、配列番号180若しくは196、好ましくは196に示される配列に対して少なくとも約95%、若しくは96%、若しくは97%、若しくは98%、若しくは99%同一の配列を含むか、又は配列番号180若しくは196、好ましくは196に示される配列を含む。

【0095】

前述の抗原結合部位は、抗体の抗原結合ドメインと呼ぶこともできる。

【0096】

好ましくは、本明細書に記載される抗原結合部位は、抗体又はその抗原結合断片である。典型的には、抗原結合部位は、抗体、例えばモノクローナル抗体である。

【0097】

本明細書に記載されるように、抗原結合部位は、以下の形態のものであり得る：

(i) 単鎖Fv断片(scFv)；

(ii) 二量体scFv(ジ-scFv)；

(iii) 抗体の定常領域、Fc又は重鎖定常ドメイン(CH)2及び／若しくはCH3に結合した(i)又は(ii)の1つ；又は

(iv) 免疫エフェクター細胞に結合するタンパク質に結合した(i)又は(ii)の1つ。

【0098】

更に、本明細書に記載されるように、抗原結合部位は、以下の形態のものであり得る：

(i) ダイアボディ；

(ii) トリアボディ；

(iii) テトラボディ；

(iv) Fab；

(v) F(ab')₂；

(vi) Fv；

(vii) 抗体の定常領域、Fc又は重鎖定常ドメイン(CH)₂及び／若しくはCH₃に結合した(i)～(vi)の1つ；又は

(viii) 免疫エフェクター細胞に結合するタンパク質に結合した(i)～(vi)の1つ。

10

【0099】

任意の態様又は実施形態において、抗体は、裸の抗体である。詳細には、抗体は、非コンジュゲート形態であり、コンジュゲートを形成するように適合されていない。

【0100】

本発明は、本明細書に記載される抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、dab(単ドメイン抗体)、ジ-scfv、scfv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子又は多特異的抗体を含む融合タンパク質も提供する。

【0101】

20

本発明は、標識又は細胞毒性剤にコンジュゲートされた、本明細書に記載される抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、dab、ジ-scfv、scfv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体又は融合タンパク質の形態のコンジュゲートも提供する。

【0102】

本発明は、本明細書に記載される抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、dab、ジ-scfv、scfv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体、融合タンパク質又はコンジュゲートへの結合のための抗体も提供する。

30

【0103】

好ましい実施形態では、抗原結合部位は、野生型抗体Fc領域に対して、新生児Fc受容体(FcRn)に対する抗体の結合を改変する、抗体定常ドメイン、CH₂-CH₃領域における1つ以上のアミノ酸置換を含むIgG免疫グロブリンである。1つ以上のアミノ酸改変は、FcRnに対する抗体定常ドメイン、Fc領域又はそのFcRn結合断片の親和性を変え、それにより抗原結合部位の血清半減期を変化させる。

【0104】

好ましくは、置換は、非改変野生型抗体に対して、FcRnに対する結合親和性及び／又は前記改変抗体の血清半減期を変化させる。本発明は、非改変抗体と比較して低下したFcRnに対する結合親和性及び／又は低下した血清半減期を有する改変抗体を更に提供し、ここで、CH₂ドメインからの位置Ile253若しくはHis310及び／又はCH₃ドメインからの残基His435における任意の1つ以上のアミノ酸残基は、非改変抗体に存在するものと異なるか又は非改変IgGと異なる別のアミノ酸で置換されている。

40

【0105】

一例では、1つ以上のアミノ酸改変は、His310及びHis435と均等な残基におけるアミノ酸置換から選択される。更なる例では、抗体は、His310及びHis435残基の両方におけるアミノ酸置換を含む。

【0106】

アミノ酸置換は、ヒスチジン残基からアラニン、グルタミン、グルタミン酸又はアスパラギン酸への置換を含み得る。好ましくは、His310におけるアミノ酸置換は、アラ

50

ニンヘのものである。好ましくは、H i s 4 3 5におけるアミノ酸置換は、グルタミンヘのものである。好ましくは、I l e 2 5 3におけるアミノ酸置換は、アラニンである。

【0107】

更なる実施形態では、抗原結合部位は、抗体の結合を改変してF cガンマ受容体を活性化する1つ以上のアミノ酸置換を含む抗体である。1つ以上のアミノ酸改変は、任意の1つ以上のF cガンマ受容体に対する抗体定常ドメイン、F c領域又はF cガンマ受容体結合断片の親和性を変える。好ましくは、アミノ酸改変は、L e u 2 3 5と均等な残基におけるものである。より好ましくは、アミノ酸改変は、L e u 2 3 5からグルタミン酸ヘのものである。

【0108】

一実施形態では、アミノ酸改変は、S e r 2 2 8におけるヒンジ安定化変異である。好ましくは、S e r 2 2 8におけるアミノ酸改変は、プロリンヘのものである。

【0109】

本発明の一実施形態では、抗体は、S e r 2 2 8、L e u 2 3 5、H i s 3 1 0及びH i s 4 3 5における変異を含む。好ましくは、アミノ酸改変は、S e r 2 2 8 P r o、L e u 2 3 5 G l u、H i s 3 1 0 A l a及びH i s 4 3 5 G l nである。

【0110】

アミノ酸改変は、好ましくは、I g G 1アイソタイプを有する抗体又はI g G 4アイソタイプに対して行われる。

【0111】

好ましい実施形態では、抗体は、配列番号225～228又は235～238の任意の1つに示される重鎖定常領域を含む。

【0112】

本発明は、本明細書に記載される抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、d a b、ジ- s c F v、s c F v、F a b、F a b'、F (a b') 2、F v断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体、融合タンパク質又はコンジュゲートをコードする核酸も提供する。

【0113】

一例では、そのような核酸は、核酸がプロモーターに作動可能に連結される発現コンストラクトに含まれる。そのような発現コンストラクトは、ベクター、例えばプラスミドにあり得る。

【0114】

単一ポリペプチド鎖抗原結合部位に関する本発明の例において、発現コンストラクトは、ポリペプチド鎖をコードする核酸に連結されたプロモーターを含み得る。

【0115】

抗原結合部位を形成する多数のポリペプチド鎖に関する例において、発現コンストラクトは、例えば、プロモーターに作動可能に連結されたV Hを含むポリペプチドをコードする核酸及び例えばプロモーターに作動可能に連結されたV Lを含むポリペプチドをコードする核酸を含む。

【0116】

別の例では、発現コンストラクトは、例えば、作動可能に連結された以下の構成要素を5'から3'の順で含むバイシストロニックな発現コンストラクトである：

(i) プロモーター

(i i) 第1のポリペプチドをコードする核酸；

(i i i) 内部リボソーム進入部位；及び

(i v) 第2のポリペプチドをコードする核酸、

ここで、第1のポリペプチドは、V Hを含み、第2のポリペプチドは、V Lを含むか又は逆も可能である。

【0117】

本発明は、別個の発現コンストラクトも意図し、その一方は、V Hを含む第1のポリペ

10

20

30

40

50

プチドをコードし、他方は、V Lを含む第2のポリペプチドをコードする。例えば、本発明は、以下を含む組成物も提供する：

(i) プロモーターに作動可能に連結されたV Hを含むポリペプチドをコードする核酸を含む第1の発現コンストラクト；及び

(ii) プロモーターに作動可能に連結されたV Lを含むポリペプチドをコードする核酸を含む第2の発現コンストラクト。

【0118】

本発明は、本明細書に記載されるベクター又は核酸を含む細胞を提供する。好ましくは、細胞は、単離されるか、実質的に精製されるか、又は組換え体である。一例では、細胞は、本発明の発現コンストラクト又は：

(i) プロモーターに作動可能に連結されたV Hを含むポリペプチドをコードする核酸を含む第1の発現コンストラクト；及び

(ii) プロモーターに作動可能に連結されたV Lを含むポリペプチドをコードする核酸を含む第2の発現コンストラクト

を含み、ここで、第1及び第2のポリペプチドは、結合して、本発明の抗原結合部位を形成する。

【0119】

本発明の細胞の例には、菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞が含まれる。

【0120】

本発明は、抗原結合部位を含むか、又は本明細書に記載されるC D R及び／若しくはF R配列又は本明細書に記載される免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、d a b（単ドメイン抗体）、ジ- s c F v、s c F v、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体、融合タンパク質又はコンジュゲート及び薬学的に許容され得る担体、希釈剤又は賦形剤を含む医薬組成物も提供する。

【0121】

本発明は、抗原結合部位を含むか、又は本明細書に記載されるC D R及び／若しくはF R配列又は本明細書に記載される抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、d a b、ジ- s c F v、s c F v、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体、融合タンパク質又はコンジュゲート、希釈剤及び任意選択的に標識を含む診断組成物も提供する。好ましくは、抗原結合部位は、放射性同位元素にコンジュゲートされたモノクローナル抗体である。

【0122】

本発明は、抗原結合部位を含むか、又は本明細書に記載されるC D R及び／若しくはF R配列又は本明細書に記載される免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、d a b、ジ- s c F v、s c F v、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体、融合タンパク質又はコンジュゲートを含むキット又は製品も提供する。

【0123】

好ましくは、抗原結合部位は、放射性同位元素にコンジュゲートされたモノクローナル抗体である。

【0124】

本明細書に記載される抗原結合部位、タンパク質又は抗体は、ヒト定常領域、例えばI g G定常領域、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3又はI g G 4定常領域又はそれらの混合物を含み得る。抗体又はタンパク質がV H及びV Lを含む場合、V Hは、重鎖定常領域に結合し得、V Lは、軽鎖定常領域に結合し得る。

【0125】

一例では、本明細書に記載されるタンパク質若しくは抗体又は本明細書に記載されるタンパク質若しくは抗体の組成物は、C末端リシン残基を完全に又は部分的に有する又は有

10

20

30

40

50

さない配列の混合物を含む、安定化重鎖定常領域を含む重鎖定常領域を含む。

【0126】

一例では、本発明の抗体は、IgG4定常領域又は安定化IgG4定常領域（例えば、上述したような）に結合又は融合した、本明細書に開示されるVHを含み、VLは、カッパ軽鎖定常領域に結合又は融合されている。

【0127】

本発明の抗原結合部位の機能的特性は、必要な変更を加えて本発明の抗体に適用されると解釈されるであろう。

【0128】

本明細書に記載される抗原結合部位は、精製され、実質的に精製され、単離され、且つ／又は組換え体であり得る。

【0129】

本発明は、対象における癌を処置又は予防する方法も提供し、方法は、本発明の抗原結合部位を対象に投与することを含む。この点について、抗原結合部位は、状態の再発を予防するために使用することができ、これは、状態の予防と見なされる。

【0130】

例示的な癌としては、前立腺癌が挙げられる。PSMAに対する親和性を有する抗体がこの目的に有用であることが理解されるであろう。

【0131】

他の例示的な癌には、腎癌が含まれる。CAIXに対する親和性を有する本発明の抗体がこの目的に有用であることが理解されるであろう。

【0132】

本発明は、対象における疾患、障害又は感染症を診断、監視又は予測するインビボでの方法も提供し、方法は、

(a) 有効量の本明細書に記載される抗体を対象に投与することであって、前記抗体は、疾患、障害又は感染症に関連する抗原に特異的に結合する、投与することと；

(b) 前記抗原が見出される前記対象における部位において、抗体を濃縮させることと；

(c) 前記抗体を検出することと

を含み、それにより、前記抗体のバックグラウンド又は標準レベルを超える検出は、対象が前記疾患、障害又は感染症を有することを示す。

【0133】

本明細書で使用される場合、文脈が特に必要としない限り、用語「含む (comprise)」及び用語の変形、例えば「含むこと」、「含む (comprises)」及び「含まれる」は、更なる付加物、構成要素、整数又は工程を排除することを意図するものではない。

【0134】

本発明の更なる態様及び先行する段落に記載された態様の更なる実施形態は、実施例により与えられる以下の説明から、付随する図面を参照して明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図1】本発明の抗体の平均半減期及び半減期のチューキーの多重比較。エラーバーは、平均の標準誤差を表す。A: ChGmAb = キメラギレンツキシマブ。HuGmAb = ヒト化ギレンツキシマブ；HuGmAb - FcRn = アミノ酸置換H310A及び435Qを有するヒト化ギレンツキシマブ。HuGmAb - FcRg = アミノ酸置換S228P、235E、H310A及び435Qを有するヒト化ギレンツキシマブ。B. J591 IgG = PSMAの結合についての対照HuJ591抗体。ANT4044-K-DOTA = DOTAにコンジュゲートされた抗体ANT4044リシン。ANT4044-A2-K-DOTA-DOTAにコンジュゲートされた抗体ANT4044-A2リシン。ANT4044-FcRn-K-DOTA = FcRn結合領域にアミノ酸置換を有する抗体ANT4044、DOTAにコンジュゲートされたリシン。ANT4044-FcRg-K

10

20

30

40

50

—DOTA=FcRn及びFcガンマ受容体結合領域にアミノ酸置換を有する抗体ANT4044、DOTAにコンジュゲートされたリシン。

【図2】本発明の選択抗体についての平均曲線下面積（AUC）及びクリアランス（CL）。J591 IgG=PSMAの結合についての対照HuJ591抗体。ANT4044-K-DOTA=DOTAにコンジュゲートされた抗体ANT4044リシン。ANT4044-A2-K-DOTA-DOTAにコンジュゲートされた抗体ANT4044-A2リシン。ANT4044-FcRn-K-DOTA=FcRn結合領域にアミノ酸置換を有する抗体ANT4044、DOTAにコンジュゲートされたリシン。ANT4044-FcRg-K-DOTA=FcRn及びFcガンマ受容体結合領域にアミノ酸置換を有する抗体ANT4044、DOTAにコンジュゲートされたリシン。

10

【図3】PET画像のROI分析により決定された8時間における抗体の体内分布。

【図4】PET画像のROI分析により決定された24時間における抗体の体内分布。

【図5】エキスピボガンマ計数により決定された48時間における全抗体の体内分布。

【図6】PET画像のROI分析により決定された48時間における抗体の体内分布。

【図7】注射後5日までの抗体の血中濃度。

【図8】画像化により決定された抗体の腫瘍蓄積（8時間、24時間、48時間）。

【図9】腫瘍中の抗体の血液に対する比。抗体のそれぞれについての腫瘍：血液比（インビボでの腫瘍：尾の血液）を8時間、24時間及び48時間の時点について決定した。抗体JN005及びhJ591と比較して、JN006及びJN007の比は、全時点で有意に高い。

20

【図10】腫瘍中の抗体の血液に対する比。抗体のそれぞれについての腫瘍：血液比（エキスピボ：エキスピボ）を48時間及び120時間の時点について決定した。抗体JN005及びhJ591と比較して、JN006及びJN007の比は、全時点で有意に高い。

【図11】本発明の例示的な抗体のインビボ画像化及びインビボ分布。本発明の抗-PSMA、FcRn-K-DOTA-Lu-改変抗体を受容したLNCap異種移植マウスのSPECT画像化。

【図12】本発明の例示的な抗体の血液薬物動態。本発明の抗-PSMA、FcRn-K-DOTA-Lu-改変抗体の投与後のマウスの血中で測定した放射能のレベル。

【図13】本発明の例示的な抗体で処置したLNCap保持異種移植マウスにおける有効性試験。本発明の抗PSMA、K-DOTA-Lu FcRn-改変抗体による処置は、0日目と比較して14日目に腫瘍体積の変化がないことから明らかなように、腫瘍増殖を有意に抑制した。対照（PBS）グループでは、腫瘍体積の全体的な増加があり、FcRn-K-DOTA-Lu処置グループの対応する時間と比較した場合、腫瘍は、9、12及び14日において有意に大きくなった。

30

【図14】本発明の例示的な抗体の投与後の、LNCap保持異種移植マウスにおける腫瘍：血液比。FcRn結合を低下させるように改変された本発明の抗PSMA、K-DOTA-Lu抗体（HuX592R-DOTA-Lu177）の処置を受けたマウスについての腫瘍：血液比を示す。対照マウスに抗PSMA、K-DOTA-Lu抗体（HuJ591-DOTA-Lu177）を投与した。非改変抗体を受けたマウスと比較して、特に24時間及び48時間の時点で、FcRn改変抗体を受けたマウスでは比がより大きい。

40

【図15】腫瘍への $^{89}\text{Zr-DFOsq-FcRn-GmAb}$ 及び $^{89}\text{Zr-DFOsq-cGmAb-CHO}$ 取込みの時間活性曲線及び組織に対する腫瘍の比。PET画像を分析した。結果を平均 $\pm$ SEM、 $n=3$ 、**** $P<0.0001$ として示す。

【図16】エキスピボ体内分布分析。 $^{89}\text{Zr-DFOsq-FcRn-GmAb}$ （上パネル）及び $^{89}\text{Zr-DFOsq-cGmAb-CHO}$ （下パネル）を有するマウスを24、48及び144時間p.i.で安楽死させた。組織を回収し、秤量し、ガンマカウンターで計数した。トレーサー取込みをパーセント注射用量／グラム組織として表す。データは、24時間cGmAb-CHO（ $n=2$ ）を除いて、平均 $\pm$ SEM、 $n=3$ を表す。

【図17】エキスピボガンマ計数により測定した、健康なオスBalb/cヌードマウスにおける ^{177}Lu -標識HuX592R及びHuJ591体内分布。Aは、投与後24、

50

48及び72時間で評価したHuX592R体内分布を示す一方、Bは、投与後72時間のHuX592Rの体内分布をHuJ591と比較する。

【図18】HuX592R (FcRn-K-DOTA-Lu) の投与後の各治療コホート又は非処置対照におけるLNCaP異種移植腫瘍の退縮。

【図19】TLX592 (FcRn-K-DOTA-Lu)、TLX591 (K-DOTA-Lu抗体、本明細書でHuJ591-DOTA-Lu177とも呼ばれる) の投与後又は非処置対照の試験期間中のコホート生存のプロット。

【図20】本発明の例示的な $^{225}\text{-Ac-DOTA-}$ 又は $^{177}\text{-Lu-DOTA-}$ 標識ヒト化抗CAIX結合抗体の治療有効性。非処置対照と比較した $^{225}\text{-Ac-DOTA-hG250}$ 又は $^{177}\text{-Lu-DOTA-hG250}$ の投与後の経時的な平均腫瘍サイズ (mm^3) の変化。

10

【発明を実施するための形態】

【0136】

本明細書に開示及び定義される本発明は、言及されるか又は文章若しくは図面から明らかな個々の特徴の2つ以上の代替的組み合わせの全てに拡張されることが理解されるであろう。これらの異なる組み合わせの全ては、本発明の様々な代替的態様を構成する。

【0137】

本発明の更なる態様及び先行する段落に記載された態様の更なる実施形態は、実施例により与えられる以下の説明から、付随する図面を参照して明らかとなるであろう。

【0138】

20

ここで、本発明の特定の実施形態を詳細に参照する。本発明は、実施形態と共に記載されるが、本発明をそれらの実施形態に限定しないことを意図することが理解されるであろう。むしろ、本発明は、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に含まれ得る全ての代替形態、修正形態及び均等物を包含することが意図される。

【0139】

本発明は、部分的には、放射免疫療法において使用するための放射性免疫複合体の毒性を低下させるための新たなアプローチの特定に関する。特に、本発明の方法は、放射性免疫複合体の治療可能性に有意に影響を及ぼすことなく毒性を低下させる。

【0140】

上記に概述したように、健康な組織及び細胞に対する放射線損傷は、放射免疫療法に関連した主要な問題である。この毒性は、RAITの放射線量を厳しく制限し、腫瘍処置の有効性を低下させる。

30

【0141】

しかしながら、本発明者らは、抗体の定常重鎖に対する改変により、新生児Fc受容体 (FcRn) に対する抗体の親和性を低下させることにより、野生型抗体と比較して低下した血清半減期を有する、放射免疫療法において使用するための抗体を開発した。従って、本発明者らによって開発された抗体は、様々な免疫療法において使用するための有意な利点を有する。

【0142】

治療抗体のFcRn結合ドメインの改変は以前に報告されているが、そのような改変は、FcRn親和性の増加、例えば治療抗体の血清半減期の増加及び循環中での治療抗体の滞留の延長を目的として開発されている。先行技術のアプローチとは対照的に、本発明は、治療剤の血清半減期を低下させることを目的としている。

40

【0143】

驚くべきことに、本発明者らは、血清半減期の低下 (及び投与後の体循環からのクリアランス率の増加) にもかかわらず、本発明の抗体が、腫瘍部位に送達され、且つその部位で蓄積されるための、非改変抗体と同様の能力を有することを見出した。これらの結果は、それが改変抗体と非改変抗体の腫瘍負荷が統計的に異ならないことを示す点で驚くべきことであり、本発明者らにより採用されたアプローチが、血清半減期を有意に低下させ、それにより毒性を有意に低下させる一方、抗体がそれらの標的エピトープに結合する能力

50

にも、標的部位に送達される抗体の能力にも負の影響を与えないことを示す。

【0144】

より重要なことに、本発明者らは、本発明の改変抗体が、増加したクリアランスにもかかわらず、腫瘍部位に滞留し続けることを示した。従って、本発明者らの研究は、放射性標識抗体のFcRn又はFcRn及びFcガンマ受容体結合ドメインの改変が腫瘍中に蓄積するその能力に関して抗体の治療可能性に影響を及ぼすことなく、循環中の放射性同位元素の量を減少させるのに有意な有用性を有することを示す。これは、さもなければ循環中の放射性同位元素のより長期の滞留から生じるであろう多くの毒性効果（骨髄照射及び骨への吸収の結果としての血液毒性を含む）を減少させることを含む、多くの利点を有する。更に、これまでの多くのRAIT療法の用量制限毒性がこの延長された血液循環及び骨髄の照射の直接の結果としての血液毒性であることを考慮すると、本発明は、より高いレベルでの許容可能な投与の可能性を与え；従ってより効果的な治療をもたらす。骨への吸収及び骨髄照射）。

【0145】

予想外に、本発明者らは、定常重鎖に対するアミノ酸改変が、FcRn結合を妨げる一方、抗体がタンパク質G及びいくつかのタンパク質A精製樹脂に結合する能力に影響を及ぼさないことも見出した。従って、他の免疫治療薬と比較して低下した血清半減期を有する本発明の抗体は、通常の抗体のために開発された同じ既存の／標準化された生成プラットフォームを使用して生成され得る。これは多くの他の操作された抗体形式、例えばミニボディ、ダイアボディなど（これらは、生成が煩わしく、IgG分子よりも安定性が低い）のいくつかを上回る重要な利点である。また、身体に対して「天然」である分子形式として、全長抗体は、操作された抗体又は抗体断片よりも免疫原性応答の可能性が減少する傾向もある。

【0146】

本発明の抗体の更なる利点は、セラノスティクスの分野における適用のためのそれらの特定の適合性である。より詳細には、上述のように、抗体が適切な量の放射性物質を腫瘍に送達することができる一方、循環から迅速に排除されるため、抗体の低下した血清半減期は、放射性同位元素に結合される場合、抗体を治療に特に有用にする。加えて、抗体の低下した血清半減期は、抗体に結合され、画像化のために選択された放射性同位元素の迅速な排除が望ましい診断方法における使用に、抗体を特に適したものとする。診断としての最初の例における抗体の使用は、それにより抗体の治療形態の使用及び投与を知らせる（即ち抗体が治療に適した放射性同位元素に結合される場合）。従って、本発明の抗体は、異なる放射性同位元素に結合され、続いて「セラノスティック対」として使用される場合、有用性を見出す。

【0147】

上記に加えて、本発明者らは、炭酸アンヒドラーゼ（CAIX）への結合のための新規なヒト化抗体及び前立腺特異的膜抗原（PSMA）への結合のための抗体を本明細書に記載する。これらの抗体は、非改変抗体として又は重定常鎖のFcRn及びFcガンマ受容体結合部分に対する改変を有する抗体としての両方の使用のために本明細書に記載される。

【0148】

一般事項

本明細書を通して、特に明記しない限り又は文脈が特に要求しない限り、単一の工程、物質の組成物、工程の群又は物質の組成物の群は、それらの工程、物質の組成物、工程の群又は物質の組成物の群の1つ及び複数（即ち1つ以上）を包含するものとする。従って、本明細書で使用される場合、単数形「1つの（a）」、「1つの（an）」及び「その」は、文脈が明確に特に指示しない限り、複数の態様を含み、逆も同様である。例えば、「1つの（a）」に対する参照は、単一及び2つ以上を含み；「1つの（an）」に対する参照は、単一及び2つ以上を含み；「その」に対する参照は、単一及び2つ以上を含む、などである。

【0149】

当業者は、本発明が、詳細に記載されたもの以外の変更及び修正を受け入れる余地があることを認識するであろう。本発明はそのような変更及び修正の全てを含むことを理解すべきである。本発明は、本明細書で参照又は示された工程、特徴、組成物及び化合物の全て並びに前記工程若しくは特徴の任意の及び全ての組み合わせ又は前記工程若しくは特徴の任意の2つ以上の組み合わせを個々に又は集学的にも含む。

【0150】

当業者は、本発明の実践に使用できる、本明細書に記載されるものと類似の又は均等な多くの方法及び材料を認めるであろう。本発明は、記載された方法及び材料に決して限定されない。

【0151】

本明細書で参照される特許及び公開の全ては、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0152】

本発明は、例示の目的のみが意図される、本明細書に記載される特定の例によってその範囲が限定されない。機能的に均等な生成物、組成物及び方法は、本発明の範囲内に明確に含まれる。

【0153】

本明細書の本発明の任意の例又は実施形態は、特に詳細に明記しない限り、必要な変更を加えて、本発明の任意の他の例又は実施形態に適用されると解釈するものとする。

【0154】

特に詳細に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、当業者（例えば、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学及び生化学における）により通常理解されるものと同じ意味を有すると解釈するものとする。

【0155】

特に示さない限り、本開示で使用される組換えタンパク質、細胞培養及び免疫学的技術は、当業者に周知の標準的な手順である。そのような技術は、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T. A. Brown (編集者), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D. M. Glover and B. D. Hames (編集者), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996) 及び F. M. Ausubel et al. (編集者), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在までの全ての更新を含む)、Ed Harlow and David Lane (編集者) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988) 及び J. E. Coligan et al. (編集者) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (現在までの全ての更新を含む) などの情報源の文献全体に記載及び説明されている。

【0156】

本明細書の可変領域及びその一部、免疫グロブリン、抗体及びその断片の記載及び定義は、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991、Bork et al., J Mol. Biol. 242, 309-320, 1994、Chothia and Lesk J. Mol Biol. 196:901-917, 1987、Chothia

10

20

30

40

50

et al. Nature 342, 877-883, 1989及び／又はAl-Lazikani et al., J Mol Biol 273, 927-948, 1997における考察において更に明確化され得る。

【0157】

用語「及び／又は」、例えば「X及び／又はY」は、「X及びY」又は「X又はY」のいずれかを意味すると理解されるものとし、両方の意味又はいずれかの意味の明示的な支持を提供すると解釈されるものとする。

【0158】

本明細書で使用される場合、用語「に由来する」は、特定の整数が、特定の供給源から、必ずしもその供給源から直接ではないが、得ることができることを示すと解釈されるものとする。

【0159】

選択された定義

本明細書で使用される場合、腫瘍：血液比は、個体の血液中の抗体の量に対する同じ抗体（又は放射標識抗体）の量の比を指す。当業者は、腫瘍：血液比を計算するための標準的な技術に精通しているであろう。例えば、放射性同位元素（又は標識抗体）のエクスピボ活性濃度を測定し、組織（又は血液）1グラム当たりの減衰補正注入活性のパーセントとして表し、注入線量／g（%ID／g）の百分率として近似する。次いで、腫瘍対血液比を、血液中で検出された活性に対する腫瘍中で検出された活性として計算する。

【0160】

本明細書で使用される場合、用語「セラノスティック」は、診断及び治療のために使用される化合物／材料の能力を指す。用語「セラノスティック試薬」は、患者の疾患又は状態の検出、診断及び／又は処置の両方に適した任意の試薬に関する。セラノスティック化合物／材料の目的は、異なる診断剤と治療剤との間に存在し得る、体内分布及び選択性における望ましくない差異を克服することである。セラノスティック対を用いて、画像化放射性核種を含むセラノスティック化合物はまず、疾患を同定するか、又は身体中の罹患領域の位置を特定するために患者に投与される。同定／位置決定されると、疾患は、画像化放射性核種及び治療放射性核種の体内分布が同じであるため、標的特異的な様式で治療放射性核種を含むセラノスティック化合物を投与することによって処置され得る。

【0161】

本発明に関連して、本発明の抗体は、例えば、抗体が画像化又は診断目的のために放射性同位元素にコンジュゲートされ、同じ抗体が、治療に適した異なる放射性同位元素又は細胞毒性剤とコンジュゲートされる、セラノスティック対における包接に特に有用である。抗体の抗原結合部位は、診断（腫瘍分布、腫瘍サイズ、腫瘍密度を含む）を容易にするために、診断用放射性同位元素を腫瘍の部位に向けるか又はその部位を標的とする一方、抗体の同じ抗原結合部位は、治療のために放射性同位元素を腫瘍に向ける。

【0162】

本明細書で使用される用語「Fc領域」は、ときに「Fc」又は「Fcドメイン」と呼ばれ、IgG分子のパパイン消化によって得られる結晶性断片と相関するIgG分子の部分を指す。Fc領域は、ジスルフィド結合によって連結されたIgG分子の2つの重鎖のC末端半分からなる。それは抗原結合活性を有さないが、炭水化物部分並びに補体及びFcRn受容体を含むFc受容体のための結合部位を含む。Fc領域は、第2の定常ドメインCH2全体（EUインデックス番号付けシステムによれば、Kabatsシステムにおける残基244～360としても定義される、ヒトIgG1の残基231～340）及び第3の定常ドメインCH3（残基341～447 EUインデックス／361～478 Kabat）を含む（例えば、CH2の配列については国際公開第2015175874号パンフレットの配列番号1又は図1C及びCH3の配列については配列番号2；図1D（参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたく；また、免疫グロブリンのFc領域における様々な残基に使用される番号付け慣例の対比については、<http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/H>

u_IGHGnber.html#refsを参照されたい)。

【0163】

本明細書で使用される場合、「EUインデックス」又は「EU番号付けスキーム」は、EU抗体の番号付けを指す(Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85、全体が参照により本明細書に組み込まれる)。本明細書で使用される場合、「Kabatシステム」は、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991を指す。当業者は、所与のアミノ酸配列がEU又はKabatシステムのいずれに従って番号付けされるかを容易に決定することができるであらう。

10

【0164】

用語「単離されたタンパク質」又は「単離されたポリペプチド」は、その起源又は誘導源により、天然の状態でそれに付随する天然に結合した成分と結合していない；同じ供給源からの他のタンパク質を実質的に含まないタンパク質又はポリペプチドである。タンパク質は、当技術分野で公知のタンパク質精製技術を使用して、単離により、天然に結合する成分を実質的に含まないようにするか、又は実質的に精製することができる。「実質的に精製された」は、タンパク質が汚染物質を実質的に含まない、例えば汚染物質を少なくとも約70%、又は75%、又は80%、又は85%、又は90%、又は95%、又は96%、又は97%、又は98%、又は99%含まないことを意味する。

20

【0165】

用語「組換え体」は、人工遺伝子組換えの産物を意味すると理解されるものとする。従って、抗体抗原結合ドメインを含む組換えタンパク質に関連して、この用語は、B細胞成熟中に生じる天然の組換えの産物である対象の体内に天然に存在する抗体を包含しない。しかしながら、このような抗体が単離される場合、それは、抗体抗原結合ドメインを含む単離されたタンパク質と見なされるべきである。同様に、タンパク質をコードする核酸が組換え手段を用いて単離及び発現する場合、得られるタンパク質は、抗体抗原結合ドメインを含む組換えタンパク質である。組換えタンパク質は、例えば、それが発現する細胞、組織又は対象内にある場合、人工組換え手段によって発現したタンパク質も包含する。

【0166】

用語「タンパク質」は、単一のポリペプチド鎖、即ちペプチド結合によって連結された一連の連続するアミノ酸又は互いに共有結合若しくは非共有結合で連結された一連のポリペプチド鎖(即ちポリペプチド複合体)を含むと解釈されるものとする。例えば、一連のポリペプチド鎖は、適切な化学結合又はジスルフィド結合を用いて共有結合され得る。非共有結合の例には、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力及び疎水性相互作用が含まれる。

30

【0167】

用語「ポリペプチド」又は「ポリペプチド鎖」は、ペプチド結合によって連結された一連の連続アミノ酸を意味することが前記の段落から理解されるであらう。

【0168】

本明細書で使用される場合、用語「抗原結合部位」は、「抗原結合ドメイン」と互換的に使用され、抗原に特異的に結合することができる抗体の領域、即ちVH若しくはVL又はVH及びVLの両方を含むFvを意味すると解釈されるものとする。抗原結合ドメインは、抗体全体に関連するものである必要はなく、例えば単離されている(例えば、ドメイン抗体)か、又は例えばscFvなどの本明細書に記載されるような別の形態であり得る。

40

【0169】

本開示の目的のために、用語「抗体」は、Fvに含まれる抗原結合ドメインにより、1つ又は数個の密接に関連した抗原に特異的に結合することができるタンパク質を含む。この用語は、4鎖抗体(例えば、2つの軽鎖及び2つの重鎖)、組換え又は改変抗体(例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、CDRグラフト抗体、霊長類抗体、脱免疫抗体

50

、合成ヒト化抗体、半抗体、二重特異性抗体）を含む。抗体は、一般には、定常領域又は定常断片又は結晶化可能な断片（Fc）に配置することができる定常ドメインを含む。抗体の例示的な形態は、それらの基本単位として4鎖構造を含む。全長抗体は、共有結合した2つの重鎖（約50～70kD）と、2つの軽鎖（それぞれ約23kDa）とを含む。軽鎖は、一般には、可変領域（存在する場合）及び定常ドメインを含み、哺乳動物では、κ軽鎖又はλ軽鎖のいずれかである。重鎖は、一般に、可変領域及びヒンジ領域によって更なる定常ドメインに結合された1又は2つの定常ドメインを含む。哺乳動物の重鎖は、α、δ、ε、γ又はμのタイプの1つのものである。各軽鎖は、重鎖の1つにも共有結合している。例えば、2つの重鎖及び重鎖と軽鎖は、鎖間ジスルフィド結合と、非共有結合相互作用とによって一緒に保持されている。鎖間ジスルフィド結合の数は、異なるタイプの抗体間で変動し得る。各鎖は、N末端可変領域（VH又はVL、それぞれは、約110アミノ酸長である）及びC末端における1つ以上の定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメイン（約110アミノ酸長のCL）は、重鎖の第1の定常ドメイン（330～440アミノ酸長のCH1）と整列し、ジスルフィド結合されている。軽鎖可変領域は、重鎖の可変領域と整合されている。抗体重鎖は、2つ以上の更なるCHドメイン（例えば、CH2、CH3など）を含み得、CH1及びCH2定常ドメイン間にヒンジ領域を含み得る。抗体は、任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）又はサブクラスのものであり得る。一例では、抗体は、ネズミ（マウス又はラット）抗体又は霊長類（ヒトなど）抗体である。一例では、抗体重鎖は、C末端リシン残基を欠いている。一例では、抗体はヒト化、合成ヒト化、キメラ、CDR移植又は脱免疫化される。

【0170】

用語「全長抗体」、「無傷抗体」又は「全抗体」は、抗体の抗原結合断片とは対照的に、実質的に無傷の形態の抗体を指すために互換的に使用される。詳細には、全抗体は、Fc領域を含む重鎖及び軽鎖を有するものを含む。定常ドメインは、野生型配列定常ドメイン（例えば、ヒト野生型配列定常ドメイン）又はそのアミノ酸配列変異体であり得る。

【0171】

本明細書で使用される場合、「可変領域」は、抗原に特異的に結合し得る、本明細書で定義されるような抗体の軽鎖及び／又は重鎖の部分を指し、相補性決定領域（CDR）；即ちCDR1、CDR2及びCDR3並びにフレームワーク領域（FR）のアミノ酸配列を含む。例えば、可変領域は、3つのCDRと共に3又は4つのFR（例えば、FR1、FR2、FR3及び任意選択的にFR4）を含む。VHは、重鎖の可変領域を指す。VLは、軽鎖の可変領域を指す。

【0172】

本明細書で使用される場合、用語「相補性決定領域」（同義語CDR；即ちCDR1、CDR2及びCDR3）は、抗体可変領域のアミノ酸残基を指し、その存在は、特異的抗原結合に対する主要な寄与因子である。各可変領域ドメイン（VH又はVL）は、典型的にはCDR1、CDR2及びCDR3と識別される3つのCDRを有する。VHのCDRは、本明細書ではそれぞれCDRH1、CDRH2及びCDRH3とも呼ばれ、ここで、CDRH1はVHのCDR1に対応し、CDRH2はVHのCDR2に対応し、CDRH3はVHのCDR3に対応する。同様に、VLのCDRは、本明細書ではそれぞれCDRL1、CDRL2及びCDRL3とも呼ばれ、ここで、CDRL1はVLのCDR1に対応し、CDRL2はVLのCDR2に対応し、CDRL3はVLのCDR3に対応する。一例では、CDR及びFRに割り当てられるアミノ酸位置は、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991（本明細書では「Kabat番号付けシステム」とも呼ばれる）に従って定義される。別の例では、CDR及びFRに割り当てられるアミノ酸位置は、拡張Chothia番号付けスキーム（<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>）に従って定義される。本発明は、K

10

20

30

40

50

abat番号付けシステムによって定義されるFR及びCDRに限定されず、標準の番号付けシステム又はChothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342:877-883, 1989; 及び／若しくはAl-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948, 1997の番号付けシステム; Honnegger and Plueckthun J. Mol. Biol. 309:657-670, 2001の番号付けシステム; 又はGiudicelli et al., Nucleic Acids Res. 25:206-211 1997に論じられるIMGTシステムを含む全ての番号付けシステムを含む。一例では、CDRは、Kabab番号付けシステムに従って定義される。任意選択的に、Kabab番号付けシステムによる重鎖CDR2は、本明細書に列挙される5つのC末端アミノ酸を含まないか、又はそれらのアミノ酸の任意の1つ以上は、別の天然に存在するアミノ酸で置換されている。この点に関して、Padlan et al., FASEB J., 9:133-139, 1995は、重鎖CDR2の5つのC末端アミノ酸が一般に抗原結合に関与しないことを確立した。

【0173】

「フレームワーク領域」(FR)は、CDR残基以外の可変領域残基である。VHのFRは、本明細書ではそれぞれFR H1、FR H2、FR H3及びFR H4とも呼ばれ、ここで、FR H1はVHのFR 1に対応し、FR H2はVHのFR 2に対応し、FR H3はVHのFR 3に対応し、FR H4はVHのFR 4に対応する。同様に、VLのFRは、本明細書ではそれぞれFR L1、FR L2、FR L3及びFR L4と呼ばれ、ここで、FR L1はVLのFR 1に対応し、FR L2はVLのFR 2に対応し、FR L3はVLのFR 3に対応し、FR L4はVLのFR 4に対応する。

【0174】

本明細書で使用される場合、用語「Fv」は、VL及びVHが結合して、抗原結合ドメインを有する複合体を形成する、即ち抗原に特異的に結合することができる、多数のポリペプチド又は単一のポリペプチドから構成されているかにかかわらず、任意のタンパク質を意味すると解釈されるものとする。抗原結合ドメインを形成するVH及びVLは、単一のポリペプチド鎖又は異なるポリペプチド鎖であり得る。更に、本発明のFv(及び本発明の任意のタンパク質)は、同じ抗原に結合し得るか又は結合し得ない多数の抗原結合ドメインを有し得る。この用語は、組換え手段を用いて生成された抗体に直接由来する断片、そのような断片に対応するタンパク質を包含すると理解されるものとする。いくつかの例では、VHは重鎖定常ドメイン(CH)1に連結されず、且つ／又はVLは軽鎖定常ドメイン(CL)に連結されない。ポリペプチド又はタンパク質を含む例示的なFvとしては、Fab断片、Fab'断片、F(ab')断片、scFv、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ若しくはより高次の複合体又はその定常領域若しくはドメイン、例えばCH2若しくはCH3ドメイン、例えばミニボディに連結した前述のいずれかが挙げられる。「Fab断片」は、免疫グロブリンの一価抗原結合断片からなり、全抗体を酵素パパイニンで消化して、無傷軽鎖と重鎖の一部とからなる断片を得ることにより生成することができるか、又は組換え手段を用いて生成することができる。抗体の「Fab'断片」は、全抗体をペプシンで処理した後、還元して、無傷軽鎖とVH及び単一定常ドメインを含む重鎖の一部とからなる分子を得ることによって得ることができる。2つのFab'断片は、この方法で処理した抗体毎に得られる。Fab'断片は、組換え手段によっても生成され得る。抗体の「F(ab')2断片」は、2つのジスルフィド結合によって一緒に保持された2つのFab'断片の二量体からなり、抗体分子全体を酵素ペプシンで処理することにより、その後の還元なしに得られる。「Fab2」断片は、例えば、ロイシンジッパー又はCH3ドメインを使用して連結された2つのFab断片を含む組換え断片である。「単鎖Fv」又は「scFv」は、軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域が適切な柔軟なポリペプチドリンカーによって共有結合されている抗体の可変領域断片(Fv)を含む組換え分子である。

【0175】

本明細書で使用される場合、抗原結合部位又はその抗原結合ドメインと抗原との相互作用に関する用語「結合する」は、相互作用が抗原上の特定の構造（例えば、抗原決定基又はエピトープ）の存在に依存することを意味する。例えば、抗体は、一般にタンパク質ではなく、特定のタンパク質構造を認識し、それに結合する。抗体がエピトープ「A」に結合する場合、標識「A」及びタンパク質を含む反応において、エピトープ「A」を含む分子（又は遊離の非標識「A」）の存在は、抗体に結合した標識「A」の量を低下させるであろう。

【0176】

本明細書で使用される場合、用語「～に特異的に結合する」又は「特異的に～に結合する」は、本発明の抗原結合部位が、代替的抗原又は細胞と比較して、より頻繁に、より迅速に、より長い持続時間及び／又はより高い親和性で、特定の抗原又はそれを発現している細胞と反応又は結合すること意味すると解釈されるものとする。例えば、抗原結合部位は、他の抗原に対するものよりも実質的に高い親和性（例えば、1.5倍又は2倍又は5倍又は10倍又は20倍又は40倍又は60倍又は80倍～100倍又は150倍又は200倍）で、PSMA又はCAIXに結合する。

【0177】

本明細書で使用される場合、用語「エピトープ」（同義語「抗原決定基」）は、抗体の抗原結合ドメインを含む抗原結合部位が結合する、細胞表面タンパク質（PSMA又はCAIXなど）の領域を意味すると理解されるものとする。

【0178】

本明細書で使用される場合、用語「状態」は、正常な機能の破壊又は妨害を指し、任意の特定の状態に限定されるべきではなく、疾患又は障害を含む。

【0179】

本明細書で使用される場合、「予防すること」、「予防する」又は「予防」は、本発明の抗原結合部位を投与することにより、状態の少なくとも1つの症状の発現を停止又は妨げることを含む。この用語は、再発を予防又は妨げるための寛解期の対象の処置も包含する。

【0180】

本明細書で使用される場合、用語「処置すること」、「処置する」又は「処置」は、本明細書に記載される抗原結合部位を投与することにより、特定の疾患又は状態の少なくとも1つの症状を低下させ又は排除することを含む。

【0181】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、ヒト、例えば哺乳動物を含む任意の動物を意味すると解釈されるものとする。例示的な対象としては、ヒト及び非ヒト霊長類が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、対象は、ヒトである。

【0182】

改変抗体

本発明は、部分的にはIgG抗体に対する改変に関し、これは、FcRnに対する抗体の親和性を低下又は消失させ、それにより抗体の血清半減期を低下させる、抗体の領域に対する1つ以上のアミノ酸置換を含む。

【0183】

本発明によれば、血清半減期の低下が所望される任意の抗体が、本明細書に記載される方法に従って改変され得ることが理解されるであろう。更に、好ましい実施形態では、血清半減期が低下するように改変された抗体は、診断又は治療用途、より詳細にはセラノスティック用途に有用な抗体であることが理解されるであろう。

【0184】

本発明の方法による使用に適した抗体の例としては、トラスツズマブ（Herceptin（登録商標））、リツキシマブ（Rituxan（登録商標））、ベバシズマブ（Avastin（登録商標））、ジヌツキシマブ（Unituxin（登録商標））、パニツムマブ（Vectibix（登録商標））、ペムブロリズマブ（Keytruda（登

10

20

30

40

50

録商標))、ニボルマブ (Opdivo (登録商標))、トシツモマブ (Bexxar (登録商標))、イブリツモマブ (Zevalin (登録商標))が挙げられる。しかしながら、本発明は、抗体がさもなければFcRnによる結合を受けやすいことを条件として、特定の抗体に限定されるものではないことも理解されるであろう。

【0185】

本発明は、腫瘍抗原を標的とする抗体薬物コンジュゲートの使用も意図し、ここで、コンジュゲートは、細胞毒性ペイロードを含む。そのような抗体の例としては、ゲムツズマブ (Mylotarg (登録商標))、ブレンツキシマブ (Adcetris (登録商標))、イノツズマブ (Besponsa (登録商標))、グレンバツムマブ (CDX-011)、アネツマブ (BAY 94-9343)、ミルベツキシマブ (IMGN853)、デパツキシズマブ (ABT-414)、ロバルピツズマブ (Rova-T) 及びロバルピツズマブタリリン (SGN-CD33A) が挙げられる。更なる例は、Lambert et al., 2017, Adv Ther (2017) 34:1015-1035 (参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【0186】

特定の実施形態では、FcRnに対する親和性を低下させる本発明による改変に適している抗体は、表1及び2に示される配列の1つ以上を有する抗体である。

【0187】

本発明は、本明細書に開示される配列に対して少なくとも80%の同一性を有する、それをコードする抗原結合部位又は核酸も提供する。一例では、本発明の抗原結合部位又は核酸は、本明細書に開示される配列に対して少なくとも約85%、又は90%、又は95%、又は97%、又は98%、又は99%同一の配列を含む。

【0188】

代替的又は追加的に、抗原結合部位は、任意の例に従って本明細書に記載されるV_H又はV_LのCDRに対して少なくとも約80%、又は85%、又は90%、又は95%、又は97%、又は98%、又は99%同一のCDR (例えば、3つのCDR) を含む。

【0189】

別の例では、本発明の核酸は、任意の例に従って本明細書に記載される機能を有する抗原結合部位をコードする配列に対して少なくとも約80%、又は85%、又は90%、又は95%、又は97%、又は98%、又は99%同一の配列を含む。本発明は、遺伝暗号の縮重の結果、本明細書に例示される配列と異なる、本発明の抗原結合部位をコードする核酸も包含する。

【0190】

核酸又はポリペプチドの%同一性は、GAP (Needleman and Wunsch, Mol. Biol. 48, 443-453, 1970) 分析 (GCGプログラム) により、ギャップ形成ペナルティ=5及びギャップ伸長ペナルティ=0.3を用いて決定される。クエリ配列は、少なくとも50残基長であり、GAP分析は、2つの配列を少なくとも50残基の領域にわたって整合する。例えば、クエリ配列は、少なくとも100残基長であり、GAP分析は、2つの配列を少なくとも100残基の領域にわたって整合する。例えば、2つの配列は、それらの全長にわたって整合される。

【0191】

本発明は、本明細書に記載される抗原結合部位をコードする核酸に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸も意図する。「中程度のストリンジェンシー」は、本明細書では、2xSSC緩衝液、0.1% (w/v) SDS中、45℃~65℃の範囲の温度で又は均等な条件で行われるハイブリダイゼーション及び／又は洗浄と定義される。「高ストリンジェンシー」は、本明細書では、0.1xSSC緩衝液、0.1% (w/v) SDS又はより低い塩濃度中、少なくとも65℃の温度で又は均等な条件で行われるハイブリダイゼーション及び／又は洗浄と定義される。本明細書における特定のレベルのストリンジェンシーへの言及は、当業者に公知のSSC以外の洗浄／ハイブリダイゼーション溶液を使用する均等な条件を包含する。例えば、二本鎖核酸の

鎖が解離する温度（融解温度又は T_m としても知られる）を計算するための方法は、当技術分野で公知である。核酸の T_m に類似する（例えば、 5°C 以内又は 10°C 以内）又は等しい温度は、高ストリンジェンシーと見なされる。中間のストリンジェンシーは、核酸の計算 T_m の $10^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ 又は $10^{\circ}\text{C} \sim 15^{\circ}\text{C}$ 以内であると見なされる。

【0192】

本発明は、本明細書に示される配列と比較して1つ以上の保存的アミノ酸置換を含む、本発明の抗原結合部位の突然変異体形態も意図する。いくつかの例では、抗原結合部位は、10以下、例えば9又は8又は7又は6又は5又は4又は3又は2又は1つの保存的アミノ酸置換を含む。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖及び／又はハイドロパシー及び／又は親水性を有するアミノ酸残基で置き換えられたものである。

10

【0193】

類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されており、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β -分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。ハイドロパシー指数は、例えば、Kyte and Doolittle J. Mol. Biol., 157: 105-132, 1982に記載されており、親水性指数は、例えば、米国特許第4554101号明細書に記載されている。

20

【0194】

本発明は、非保存的アミノ酸変化も意図する。例えば、荷電アミノ酸の、別の荷電アミノ酸及び中性又は正に荷電したアミノ酸との置換は、特に興味深い。いくつかの例では、抗原結合部位は、10以下、例えば9又は8又は7又は6又は5又は4又は3又は2又は1つの非保存的アミノ酸置換を含む。

【0195】

一例では、変異は、本発明の抗原結合部位の抗原結合ドメインのFR内に生じる。別の例では、変異は、本発明の抗原結合部位のCDR内に生じる。

【0196】

抗原結合部位の突然変異体形態を生成する例示的な方法には、

- ・DNA (Thie et al., Methods Mol. Biol. 525: 309-322, 2009) 又はRNA (Kopsidas et al., Immunol. Lett. 107: 163-168, 2006; Kopsidas et al. BMC Biotechnology, 7: 18, 2007; 及び国際公開第1999/058661号パンフレット) の変異誘発;

- ・ポリペプチドをコードする核酸を変異誘発物細胞、例えばXL-1Red、XL-mutS及びXL-mutS-Kanr細菌細胞に導入すること (Stratagene);

- ・例えば、Stemmer, Nature 370: 389-91, 1994に開示されているDNAシャッフリング; 並びに

- ・例えば、Dieffenbach (ed) and Dveksler (ed) (PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, NY, 1995において) に記載されている部位特異的変異誘発が含まれる。

40

【0197】

本発明の突然変異体抗原結合部位の生物学的活性（例えば、抗原結合）を決定する例示的な方法は、当業者に明らかであり、且つ／又は本明細書に記載されている。例えば、抗原結合、結合の競合阻害、親和性、結合、解離及び治療有効性を決定する方法は、本明細書に記載されている。

【0198】

50

定常領域

本発明は、抗体の定常領域を含む、本明細書に記載される抗原結合部位及び／又は抗体を包含する。これには、Fcに融合された抗体の抗原結合断片が含まれる。

【0199】

本発明のタンパク質を生成するのに有用な定常領域の配列は、多数の異なる供給源から得ることができる。いくつかの例では、タンパク質の定常領域又はその部分は、ヒト抗体に由来する。定常領域又はその部分は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEを含む任意の抗体クラス並びにIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含む任意の抗体アイソタイプに由来し得る。一例では、定常領域は、ヒトアイソタイプIgG4又は安定化IgG4定常領域である。

【0200】

好ましい改変

本発明は、Fc領域又は定常領域を含む抗体又は抗原結合部位に対する改変を特に意図する。

【0201】

新生児Fc-受容体(FcRn)は、IgGクラスの抗体のインビボでの代謝運命に重要である。FcRnはリソソーム分解経路からIgGを救うように機能し、低下したクリアランス及び増加した半減期をもたらす。2つのポリペプチド：50kDaクラスI主要組織適合性複合体様タンパク質(α -FcRn)及び15kDa p2-ミクログロブリン(β 2 η 1)からなるヘテロ二量体タンパク質である。FcRnは、クラスIgGの抗体のFc-領域のCH2-CH3部分に高い親和性で結合する。クラスIgGの抗体とFcRnとの間の相互作用は、pH依存性であり、1:2化学量論で起こり、即ち、1つのIgG抗体分子は、その2つの重鎖Fc-領域ポリペプチドを介して2つのFcRn分子と相互作用し得る(例えば、Huber, A. H., et al., J. Mol. Biol. 230 (1993) 1077-1083を参照されたい)。

【0202】

従って、IgGのインビトロでのFcRn結合特性／特徴は、その血液循環中でのインビボ薬物動態特性を示すものである。FcRnとIgGクラスの抗体のFc-領域との間の相互作用には、重鎖CH2-及びCH3ドメインの異なるアミノ酸残基が関与する。

【0203】

FcRn結合に影響を及ぼし、それによって血液循環中の半減期に影響を及ぼす様々な変異は公知である。マウスFc-領域-マウスFcRn相互作用に重要なFc-領域残基は、部位特異的変異誘発(例えば、Dall'Aquila, W. F., et al., J. Immunol. 169 (2002) 5171-5180を参照されたい)によって同定されている。残基Ile253、His310、His433、Asn434及びHis435(EUインデックス番号付けシステムによる番号付け)は、相互作用に関与する(Medesan, C, et al., Eur. J. Immunol. 26 (1996) 2533-2536; Firan, M., et al., Int. Immunol. 13 (2001) 993-1002; Kim, J. K., et al., Eur. J. Immunol. 24 (1994) 542-548)。(Kabattシステムを使用すると、関連残基は、Ile266、His329、His464、Asn465及びHis466である)。残基Ile253、His310及びHis435は、ヒトFc-領域とネズミFcRnとの相互作用に重要であることが見出された(Kim, J. K., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819-2885)。

【0204】

より詳細には、抗体は、タンパク質の半減期を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含み得る。例えば、抗体は、新生児Fc領域(FcRn)に対するFc領域の親和性を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含むFc領域を含む。

【0205】

本発明は、天然に存在するクラスIgG抗体定常領域と実質的に同一の定常領域を有す

10

20

30

40

50

る抗体も提供し、ここで、残基 H i s 3 1 0、H i s 4 3 5 及び I l e 2 5 3 からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基は、天然に存在するクラス I g G 抗体に存在するものと異なり、それにより前記抗体の F c R n 結合親和性及び／又は血清半減期を、天然に存在する抗体に対して変化させる。好ましい実施形態では、天然に存在するクラス I g G 抗体は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 2 M 3、I g G 3 又は I g G 4 分子の重鎖定常領域を含む。

【0206】

また好ましい実施形態では、天然に存在するクラス I g G 抗体と実質的に同一の定常領域を有する抗体の重鎖定常領域からのアミノ酸残基 3 1 0 又は残基 4 3 5 は、ヒスチジンではない任意のアミノ酸であり、F c R n に対する定常領域の親和性を低下させる。例えば、残基 3 1 0 又は 4 3 5 におけるアミノ酸は、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ロイシン、イソロイシン、アルギニン、プロリン、グルタミン、メチオニン、セリン、スレオニン、リシン、アスパラギン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、バリン又はグリシンであり得る。

【0207】

好ましくは、位置 3 1 0 における残基は、アラニン又はグルタミン酸若しくはグルタミンから選択され；又は重鎖定常領域からのアミノ酸残基 4 3 5 は、アルギニン、グルタミン若しくはアラニンから選択される。他の好ましい実施形態では、天然に存在するクラス I g G 抗体と実質的に同一の定常領域を有する抗体は、位置 3 1 0 におけるアラニン残基及び位置 4 3 5 におけるグルタミン残基を有する。

【0208】

本発明の好ましい実施形態では、改変抗体の F c R n に対する結合親和性及び／又は血清半減期は、少なくとも約 3 0 %、5 0 %、8 0 %、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、1 0 倍、1 5 倍、2 0 倍、2 5 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、6 0 倍、7 0 倍、8 0 倍、9 0 倍又は 1 0 0 倍低下する。本発明の好ましい実施形態では、前記改変抗体の F c R n に対する結合親和性及び／又は血清半減期は、少なくとも約 2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % 低下する。

【0209】

加えて、本発明の抗体は、任意の1つ以上の F c ガンマ受容体に対する抗体の親和性を改変する1つ以上の変異を含み得る。

【0210】

本発明の好ましい実施形態では、定常領域の F c 領域は、エフェクター機能を誘導する能力を保持する。一例では、定常領域の F c 領域は、野生型 I g G と比較してエフェクター機能を増加させることを含む、エフェクター機能を調節する1つ以上のアミノ酸置換を含む。

【0211】

一例では、定常領域の F c 領域は、エフェクター機能を誘導する能力が、例えば、天然又は野生型ヒト I g G 1 又は I g G 3 F c 領域と比較して低下している。一例では、エフェクター機能は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性 (A D C C) 及び／又は抗体依存性細胞媒介性食作用 (A D C P) 及び／又は補体依存性細胞傷害性 (C D C) である。タンパク質を含む F c 領域のエフェクター機能のレベルを評価する方法は、当技術分野で公知であり、且つ／又は本明細書に記載されている。

【0212】

一例では、抗体がエフェクター機能を誘導する能力を改変するアミノ酸置換は、重鎖定常領域からの残基 I l e 2 5 3 におけるアミノ酸置換である。一例では、置換は、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ロイシン、イソロイシン、アルギニン、プロリン、グルタミン、メチオニン、セリン、スレオニン、リシン、アスパラギン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、バリン又はグリシンから選択される任意のアミノ酸へのものであり、この置換は、抗体がエフェクター機能を誘導する能力を低下させる。好ましい実施形態では、残基 2 5 3 における I l e からの置換は、アルギニン、プ

ロリン又はアスパラギン酸塩、より好ましくはアラニンへのものである。

【0213】

一例では、Fc領域は、IgG4 Fc領域（即ちIgG4定常領域から）、例えばヒトIgG4 Fc領域である。適切なIgG4 Fc領域の配列は、当業者に明らかであり、且つ／又は公に入手可能なデータベースで入手可能（例えば、National Center for Biotechnology Informationから入手可能）である。

【0214】

一例では、定常領域は、安定化IgG4定常領域である。用語「安定化IgG4定常領域」は、Fabアーム交換若しくはFabアーム交換を受ける傾向又は半抗体の形成若しくは半抗体の形成の傾向が低下するように改変されたIgG4定常領域を意味すると理解される。「Fabアーム交換」は、IgG4重鎖及び結合した軽鎖（半分子）が別のIgG4分子からの重鎖－軽鎖対と交換される、ヒトIgG4についてのタンパク質改変のタイプを指す。従って、IgG4分子は、2つの異なる抗原を認識する2つの異なるFabアームを獲得し得る（二重特異性分子をもたらす）。Fabアーム交換は、インビボで自然に起こり、また、精製血液細胞又は還元グルタチオンなどの還元剤によってインビトロで誘導され得る。「半抗体」は、IgG4抗体が解離して、それぞれが単一重鎖及び単一軽鎖を含む2つの分子を形成する際に形成される。

【0215】

一例では、安定化IgG4定常領域は、Kabatsのシステムによるヒンジ領域の位置241にプロリンを含む（Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 and/or 1991）。この位置は、EU番号付けシステムによるヒンジ領域の位置228に対応する。ヒトIgG4では、この残基は、一般にセリンである。プロリンをセリンに置換した後、IgG4ヒンジ領域は、配列CPPCを含む。この点において、当業者は「ヒンジ領域」が、抗体の2つのFabアームに可動性を付与するFc及びFab領域を連結する抗体重鎖定常領域のプロリンリッチ部分であることを認識するであろう。ヒンジ領域は、重鎖間ジスルフィド結合に関与するシステイン残基を含む。これは、一般に、Kabatsの番号付けシステムによるヒトIgG1のGlu226からPro243（又はEUインデックスを用いてGlu216からPro230）への伸長として規定される。他のIgGアイソタイプのヒンジ領域は、最初及び最後のシステイン残基を配置して、同じ位置で重鎖間ジスルフィド（S－S）結合を形成することにより、IgG1配列と整列され得る（例えば、国際公開第2010/080538号パンフレットを参照されたい）。

【0216】

安定化IgG4抗体の更なる例は、ヒトIgG4の重鎖定常領域の位置409（EU番号付けシステムによる）におけるアルギニンが、リシン、スレオニン、メチオニン又はロイシンで置換されている抗体である（例えば、国際公開第2006/033386号パンフレットに記載されているように）。定常領域のFc領域は、追加的又は代替的に：405（EU番号付けシステムによる）に対応する位置におけるアラニン、バリン、グリシン、イソロイシン及びロイシンからなる群から選択される残基を含み得る。任意選択的に、ヒンジ領域は、位置241にプロリンを含む（即ちCPPC配列）（上述のように）。

【0217】

別の例では、Fc領域は、低下したエフェクター機能を有するように改変された領域、即ち「非免疫賦活性Fc領域」である。例えば、Fc領域は、268、309、330及び331からなる群から選択される1つ以上の位置における置換を含むIgG1 Fc領域である。別の例では、Fc領域は、以下の変化E233P、L234V、L235A及びG236の削除の1つ以上並びに／又は以下の変化A327G、A330S及びP331Sの1つ以上を含むIgG1 Fc領域である（Armour et al., Eur

J Immunol. 29:2613-2624, 1999; Shields et al., J Biol Chem. 276(9):6591-604, 2001)。非免疫賦活性Fc領域の更なる例は、例えば、Dall'Acqua et al., J Immunol. 177:1129-1138 2006; 及び／又はHezareh J Virol; 75:12161-12168, 2001)に記載されている。

【0218】

別の例では、Fc領域は、例えば、IgG4抗体からの少なくとも1つのCH2ドメインと、IgG1抗体からの少なくとも1つのCH3ドメインとを含むキメラFc領域であり、ここで、Fc領域は、240、262、264、266、297、299、307、309、323、399、409及び427（EU番号付け）からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸位置における置換を含む（例えば、国際公開第2010/085682号パンフレットに記載されているように）。例示的な置換には、240F、262L、264T、266F、297Q、299A、299K、307P、309K、309M、309P、323F、399S及び427Fが含まれる。

【0219】

抗体生成

好ましくは、任意の例による、本明細書に記載される抗原結合部位は、組換え体である。

【0220】

組換えタンパク質の場合、これをコードする核酸を、発現コンストラクト又はベクターにクローニングすることができ、次いでこれを宿主細胞、例えば大腸菌（E. coli）細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胚腎臓（HEK）細胞又は骨髓腫細胞（さもないければタンパク質を生成しない）にトランスフェクトする。タンパク質の発現のために使用される例示的な細胞は、CHO細胞、骨髓腫細胞又はHEK細胞である。これらの目的を達成するための分子クローニング技術は、当技術分野で公知であり、例えばAusubel et al., (編集者), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在までの全ての更新を含む) 又は Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されている。非常に様々なクローニング及びインビトロ増幅方法が、組換え核酸の構成に適している。組換え抗体の生成方法は、当技術分野でも公知であり、例えば米国特許第4816567号明細書又は米国特許第5530101号明細書を参照されたい。

【0221】

単離後、核酸は、更なるクローニング（DNAの増幅）のために又は無細胞システム中若しくは細胞中での発現のために、発現コンストラクト又は発現ベクター中のプロモーターに作動可能に連結するように挿入される。

【0222】

本明細書で使用される場合、用語「プロモーター」は、その最も広い文脈で解釈されるべきであり、例えば発生及び／若しくは外部刺激に応答して又は組織特異的な様式で核酸の発現を変化させる更なる調節エレメント（例えば、上流活性化配列、転写因子結合部位、エンハンサー及びサイレンサー）を有する又は有さない、正確な転写開始に必要なTATAボックス又はイニシエーターエレメントを含むゲノム遺伝子の転写調節配列を含む。本発明の文脈では、用語「プロモーター」は、プロモーターが作動可能に連結された核酸の発現を付与、活性化又は増強する、組換え、合成若しくは融合核酸又は誘導体を記載するのにも使用される。例示的なプロモーターは、1つ以上の特定の調節エレメントの更なるコピーを含んで、発現を更に増強し、且つ／又は前記核酸の空間的発現及び／若しくは時間的発現を変化させ得る。

【0223】

本明細書で使用される場合、用語「作動可能に連結された」は、核酸の発現がプロモーターによって制御されるような、核酸に対するプロモーターの位置付けを意味する。

【0224】

細胞中での発現のための多数のベクターが入手可能である。ベクター成分は、一般に、以下の1つ以上を含むが、これらに限定されない：シグナル配列、タンパク質をコードする配列（例えば、本明細書に提供される情報に由来する）、エンハンサーエレメント、プロモーター及び転写終結配列。当業者は、タンパク質の発現に適した配列を認識するであろう。例示的なシグナル配列としては、原核生物分泌シグナル（例えば、*pelB*、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、*Ipp*又は熱安定性エンテロトキシンII）、酵母分泌シグナル（例えば、インベルターゼリーダー、 α 因子リーダー又は酸性ホスファターゼリーダー）又は哺乳動物分泌シグナル（例えば、単純ヘルペスgDシグナル）が挙げられる。

10

【0225】

哺乳動物細胞中で活性な例示的なプロモーターには、サイトメガロウイルス即時初期プロモーター（CMV-IE）、ヒト伸長因子1- α プロモーター（EF1）、核内低分子RNAプロモーター（U1a及びU1b）、 α -ミオシン重鎖プロモーター、サルウイルス40プロモーター（SV40）、ラウス肉腫ウイルスプロモーター（RSV）、アデノウイルス主要後期プロモーター、 β -アクチンプロモーター；CMVエンハンサー/ β -アクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター又はその活性な断片を含むハイブリッド調節エレメントが含まれる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換された猿腎臓CV1株（COS-7、ATCC CRL 1651）；ヒト胚腎臓株（縣濁液培養物中での増殖のためにサブクロニングされた293又は293細胞；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL 10）；又はチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）である。

20

【0226】

例えば、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、サッカロマイセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）及び*S. pombe*を含む群から選択される酵母細胞などの酵母細胞内での発現に適した典型的なプロモーターとしては、ADH1プロモーター、GAL1プロモーター、GAL4プロモーター、CUP1プロモーター、PHO5プロモーター、*nmt*プロモーター、RPR1プロモーター又はTEF1プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0227】

発現のために、それを含む単離された核酸又は発現コンストラクトを細胞に導入する手段は、当業者に公知である。所与の細胞に使用される技術は、公知の成功した技術に依存する。組換えDNAを細胞に導入するための手段には、マイクロインジェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、例えばリポフェクタミン（Gibco、MD、USA）及び／又はセルフェクチン（Gibco、MD、USA）を使用することによるリポソーム媒介トランスフェクション、PEG媒介性DNA取込み、電気穿孔及び例えばとりわけDNA被覆タングステン又は金粒子（Agracetus Inc.、WI、USA）を使用することによる微粒子銃法が含まれる。

40

【0228】

タンパク質の生成に使用される宿主細胞は、使用される細胞タイプに応じて、多様な培地中で培養され得る。Ham's F10（Sigma）、Minimal Essential Medium（MEM）、（Sigma）、RPML-1640（Sigma）及びDulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM）、Sigmaなどの市販の培地は、哺乳動物細胞を培養するのに適している。本明細書で論じられる他の細胞タイプの培養のための培地は、当技術分野で公知である。

【0229】

タンパク質の単離

タンパク質の単離方法は、当技術分野で公知であり、且つ／又は本明細書に記載されて

50

いる。

【0230】

抗原結合部位が培養培地に分泌される場合、そのような発現システムからの上清は、最初に、市販のタンパク質濃度フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して濃縮され得る。タンパク質分解を阻害するためにPMSFなどのプロテアーゼ阻害剤が前述の工程のいずれかに含まれ得、付随的な汚染物質の増殖を防止するために抗生物質が含まれ得る。代替的又は追加的に、上清は、濾過され、且つ／又は例えば連続遠心分離を用いて、タンパク質を発現している細胞から分離され得る。

【0231】

細胞から調製された抗原結合部位は、例えば、イオン交換、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、親和性クロマトグラフィー（例えば、タンパク質A親和性クロマトグラフィー又はタンパク質Gクロマトグラフィー）又は前述の任意の組み合わせを用いて精製され得る。これらの方法は、当技術分野で公知であり、例えば国際公開第99/57134号パンフレット又はEd Harlow and David Lane（編集者）Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)に記載されている。

【0232】

当業者は、タンパク質が精製又は検出を容易にするためにタグ、例えばポリヒスチジンタグ、例えばヘキサヒスチジンタグ、又はインフルエンザウイルスヘマグルチニン（HA）タグ、又はサルウイルス5（V5）タグ、又はFLAGタグ、又はグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）タグを含むように改変され得ることも認識するであろう。次いで、得られたタンパク質を親和性精製などの当技術分野で公知の方法を用いて精製する。例えば、ヘキサヒスタグを含むタンパク質は、タンパク質を含むサンプルを、固体又は半固体担体上に固定されたヘキサヒスタグに特異的に結合するニッケル-ニトリロ三酢酸（Ni-NTA）と接触させ、サンプルを洗浄して非結合タンパク質を除去し、続いて結合タンパク質を溶出することによって精製される。代替的に又は加えて、タグに結合するリガンド又は抗体を親和性精製方法において使用する。

【0233】

抗体への放射性同位元素の結合

本発明の任意の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、診断又は治療剤に直接又は間接的に結合され得、好ましくは、診断又は治療剤は、放射性同位元素である。

【0234】

適切な同位元素の例としては、アクチニウム-225 (^{225}Ac)、アスタチン-211 (^{211}At)、ビスマス-212及びビスマス-213 (^{212}Bi 、 ^{213}Bi)、銅-64及び銅-67 (^{64}Cu 、 ^{67}Cu)、ガリウム-67及びガリウム-68 (^{67}Ga 及び ^{68}Ga)、インジウム-111 (^{111}In)、ヨウ素-123、-124、-125又は-131 (^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I) (^{123}I)、鉛-212 (^{212}Pb)、ルテチウム-177 (^{177}Lu)、ラジウム-223 (^{223}Ra)、サマリウム-153 (^{153}Sm)、スカンジウム-44及びスカンジウム-47 (^{44}Sc 、 ^{47}Sc)、ストロンチウム-90 (^{90}Sr)、テクネチウム-99 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、イットリウム-86及びイットリウム-90 (^{86}Y 、 ^{90}Y)、ジルコニウム-89 (^{89}Zr) が挙げられる。当業者は、いずれの放射性同位元素が診断剤としての使用に好ましいか及び治療剤としての使用に好ましいかを知っているであろう。

【0235】

放射性同位元素は、本発明の抗体に直接（キレート化剤又は補欠分子族又はリンカーを介して）又は抗体中の単一若しくは多数のアミノ酸残基への結合（例えば、チロシン残基のハロゲン化）を介して間接的に、コンジュゲートし得ることが理解されるであろう。

【0236】

代替的な実施形態では、放射性同位元素を抗体にコンジュゲートするためにキレート化剤又はリンカーが使用され得る。一例では、抗体は、以下からなる群から選択されるキレート化部分にコンジュゲートされ得る：TMT（6，6'-ビス[N，N'，N'-テトラ（カルボキシメチル）アミノメチル]-4'-（3-アミノ-4-メトキシフェニル）-2，2':6'，2'-ターピリジン）、DOTA（1，4，7，10-テトラアザシクロドデカン-NN'，N'（N'-四酢酸、テトラキセタンとしても既知）、TCMC（DOTAのテトラ-1級アミド）、DO3A（1，4，7，10-テトラアザシクロドデカン-1，4，7-トリス（酢酸）-10-（2-チオエチル）アセトアミド）、CB-DO2A（4，10-ビス（カルボキシメチル）-1，4，7，10-テトラアザビシクロ[5.5.2]テトラデカン）、NOTA（1，4，7-トリアザシクロノナン-三酢酸）、Diamsar（3，6，10，13，16，19-ヘキサアザビシクロ[6.6.6]エイコサン-1，8-ジアミン）、DTPA（ペンテ酸又はジエチレントリアミン五酢酸）、CHX-A'-DTPA（[(R)-2-アミノ-3-（4-イソチオシアナトフェニル）プロピル]-trans-（S，S）-シクロヘキサン-1，2-ジアミン-五酢酸）、TETA（1，4，8，11-テトラアザシクロテトラデカン-1，4，8）、11-四酢酸、Te2A（4，11-ビス（カルボキシメチル）-1，4，8，11-テトラアザビシクロ[6.6.2]ヘキサデカン）、HBED、DFO（デフェロキサミン）、DFOsq（DFO-スクアラミド）及びHOPO（3，4，3-（LI-1，2-HOPO）又は本明細書に記載される他のキレート化剤。

【0237】

放射性金属及び他のハロゲン化放射性同位元素を有するキレーターは、1つ以上のリシン残基、チロシン残基又はチオール部分を含むが、これらに限定されない、抗体における1つ以上のアミノ酸残基又は反応性部分を介して、本発明の抗体に結合され得る。

【0238】

別の例では、改変抗体は、二官能性リンカー、例えばブロモアセチル、チオール、スクシンイミドエステル、TFPエステル、マレイミドにコンジュゲートされるか、又は当技術分野で公知の任意のアミン若しくはチオール改変化学を使用してコンジュゲートされる。

【0239】

当業者は、キレート化剤を抗体及びその誘導体又は断片にコンジュゲートするための標準的な方法に精通しているであろう。加えて、当業者は、例えば、Chem. Soc. Rev.，2014，43，260（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、放射性金属と対をなす関連キレート化剤を選択するためのアプローチに精通しているであろう。

【0240】

抗原結合部位の活性のアッセイ

PSMA又はCAIXへの結合

本明細書の開示から、当業者は、本発明の好ましい抗原結合部位がPSMA又はCAIXに結合することが明らかであろう。タンパク質の結合を評価する方法は当技術分野で公知であり、例えばScopes（Protein purification：principles and practice，Third Edition，Springer Verlag，1994において）に記載されている通りである。そのような方法は、一般に、抗原結合部位を固定し、それを標識抗原と接触させることを含む。洗浄して非特異性結合タンパク質を除去した後、標識及びその結果として結合抗体の量が検出される。当然のことながら、抗原結合部位を標識し、抗原を固定し得る。パニングタイプのアッセイも用いることができる。代替的又は追加的に、表面プラズモン共鳴アッセイを用いることができる。

【0241】

治療、診断及びセラノスティック方法

本発明の抗体は、放射免疫療法による処置を必要とする多数の状態の処置に有用である。典型的には、そのような状態は、癌を含む。

【0242】

例示的な癌は、肛門組織、胆管、膀胱、血液細胞、腸、脳、乳房、カルチノイド、子宮頸部、眼、食道、頭部及び頸部、腎臓、喉頭、白血病、肝臓、肺、リンパ節、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、骨髄腫、卵巣、膵臓、陰茎、前立腺、皮膚（例えば、扁平上皮癌）、肉腫、胃、精巣、甲状腺、腔、外陰における腫瘍を含む、嚢胞性及び固形腫瘍、骨及び軟組織腫瘍を含む。軟組織腫瘍は、良性神経鞘腫モノソミー、デスモイド腫瘍、脂肪芽細胞腫、脂肪腫、子宮筋腫、淡明細胞肉腫、皮膚線維肉腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液型軟骨肉腫、脂肪肉腫粘液型、胞巣状横紋筋肉腫及び滑膜肉腫を含む。特定の骨腫瘍は、非骨化性線維腫、単発性骨嚢腫、内軟骨腫、動脈瘤様骨嚢胞、骨芽細胞腫、軟骨芽細胞腫、軟骨粘液線維腫、骨形成性線維腫及びアダマンチノーマ、巨細胞腫、線維性骨異形成症、ユーイング肉腫、好酸球形肉芽腫、骨肉腫、軟骨腫、軟骨肉腫、悪性線維性組織球腫及び転移性癌を含む。白血病は、急性リンパ性、急性骨髄芽球性、慢性リンパ性及び慢性骨髄性を含む。

10

【0243】

他の例は、乳房腫瘍、結腸直腸腫瘍、腺癌、中皮腫、膀胱腫瘍、前立腺腫瘍、胚細胞腫瘍、肝細胞腫／胆管、癌腫、神経内分泌腫瘍、下垂体腫瘍、小円形細胞腫瘍、扁平上皮癌、黒色腫、異型線維黄色腫、精上皮腫、非精巣上皮腫、間質ライディッヒ細胞腫瘍、セルトリ細胞腫瘍、皮膚腫瘍、腎臓腫瘍、精巣腫瘍、脳腫瘍、卵巣腫瘍、胃腫瘍、口腔腫瘍、膀胱腫瘍、骨腫瘍、頸部腫瘍、食道腫瘍、喉頭腫瘍、肝臓腫瘍、肺腫瘍、経膈腫瘍及びウィルムス腫瘍を含む。

20

【0244】

好ましくは、本発明の抗原結合部位は、PSMA又はCAIXの存在により特徴付けられる癌の処置に有用である。例えば、PSMAに結合する抗体は、前立腺癌を含む、PSMAの発現の増加により特徴付けられる癌の処置に有用である。CAIXに結合する抗体は、腎細胞癌を含む、CAIXの発現の増加により特徴付けられる癌の処置に有用である。

【0245】

当業者は、本明細書に開示される状態を診断するラジオイメージングに使用される放射性同位元素を含む、本発明の抗体と共に使用される適切な診断剤を選択する方法に精通しているであろう。更に、当業者は、本明細書に記載される診断試薬と共に使用される画像化技術に精通しているであろう。

30

【0246】

本明細書で使用される場合、セラノスティック方法は、腫瘍細胞及び／又は転移のインビトロ及び／又はインビボでの可視化、同定及び／又は検出の方法並びに癌を処置する方法である。

【0247】

一実施形態では、本発明は、

（１）診断的に有効な量の本発明の抗体を患者又は対象に投与することであって、抗体は、少なくとも１つの診断的に有用な標識を含む、投与することと、

（２）治療的有效量の本発明の抗体を、それを必要とする患者又は対象に投与することであって、抗体は、腫瘍治療薬（例えば、放射性同位元素、毒素、薬物）を含む、投与することと

40

を含むセラノスティック方法を含む。

【0248】

好ましくは、工程１及び工程２は、連続して行われ、工程１及び工程２の抗体は同じである。

【0249】

タンパク質を含む抗体結合ドメイン

単ドメイン抗体

いくつかの例では、本発明の抗原結合部位又はタンパク質は、単ドメイン抗体（これは、用語「ドメイン抗体」又は「dAb」と互換的に使用される）であるか又はそれを含

50

む。単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変領域の全部又は一部分を含む単一ポリペプチド鎖である。特定の例では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である（D o m a n t i s, I n c.、W a l t h a m、M A；例えば米国特許第 6 2 4 8 5 1 6 号明細書を参照されたい）。

【0250】

ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ

いくつかの例では、本発明のタンパク質は、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ又は例えば国際公開第 9 8 / 0 4 4 0 0 1 号パンフレット及び／若しくは国際公開第 9 4 / 0 0 7 9 2 1 号パンフレットに記載されているものなどのより高次のタンパク質複合体であるか又はそれを含む。

【0251】

例えば、ダイアボディは、2つの結合ポリペプチド鎖を含むタンパク質であり、各ポリペプチド鎖は、構造 $V_L - X - V_H$ 又は $V_H - X - V_L$ を含み、 V_L は抗体軽鎖可変領域であり、 V_H は抗体重鎖可変領域であり、 X は、単一ポリペプチド鎖における V_H 及び V_L が結合する（又は F_v を形成する）ことを可能にするように不十分な残基を含むリンカーであるか又は存在せず、一方のポリペプチド鎖の V_H は、他方のポリペプチド鎖の V_L に結合して、抗原結合ドメインを形成し、即ち 1 つ以上の抗原に特異的に結合することができる F_v 分子を形成する。 V_L 及び V_H は、各ポリペプチド鎖中で同じであり得るか、又は V_L 及び V_H は、二重特異性ダイアボディを形成するように各ポリペプチド鎖中で異なり得る（即ち異なる特異性を有する 2 つの F_v を含む）。

【0252】

単鎖 F_v (s c F v)

当業者は、s c F v が単一ポリペプチド鎖中の V_H 及び V_L 領域を含み、 V_H 及び V_L 間にポリペプチドリンカーを含み、これは s c F v が抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする（即ち単一ポリペプチド鎖の V_H 及び V_L が互いに結合して F_v を形成する）ことを認識するであろう。例えば、リンカーは、12 を超えるアミノ酸残基を含み、(G l y₄ S e r)₃ は、s c F v のためのより好ましいリンカーの 1 つである。

【0253】

本発明は、ジスルフィド安定化 F_v （即ち d i F v 又は d s F v）も意図し、ここで、単一システイン残基が V_H の F R 及び V_L の F R に導入され、システイン残基がジスルフィド結合により連結されて安定な F_v を提供する。

【0254】

代替的に又は加えて、本発明は、二量体 s c F v を包含し、即ち、2つの s c F v 分子を含むタンパク質は、例えば、ロイシンジッパードメイン（例えば、F o s 又は J u n に由来する）により、非共有又は共有結合により連結される。代替的に、2つの s c F v は、例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 6 0 2 6 3 3 6 7 号明細書に記載されているように、十分な長さのペプチドリンカーによって連結されて、s c F v の形成と、抗原への結合の両方を可能にする。

【0255】

重鎖抗体

重鎖抗体は、それらが重鎖を含むが軽鎖を含まないという点で、抗体の多くの他の形態とは構造的に異なる。従って、これらの抗体は「重鎖のみの抗体」とも呼ばれる。重鎖抗体は、例えば、ラクダ類及び軟骨魚（I g N A R と呼ばれる）に見出される。

【0256】

天然に存在する重鎖抗体中に存在する可変領域は、一般に、従来の 4 - 鎖抗体中に存在する重鎖可変領域（「 V_H ドメイン」と呼ばれる）及び従来の 4 - 鎖抗体中に存在する軽鎖可変領域（「 V_L ドメイン」と呼ばれる）と区別するために、ラクダ類抗体において「 V_{HH} ドメイン」及び I g N A R において $V - N A R$ と呼ばれる。

【0257】

ラクダ類からの重鎖抗体及びその可変領域並びにそれらの生成及び／又は単離及び／又

10

20

30

40

50

は使用の方法の一般的記載は、とりわけ、以下の参考文献、国際公開第94/04678号パンフレット、国際公開第97/49805号パンフレット及び国際公開第97/49805号パンフレットに見出される。

【0258】

軟骨魚からの重鎖抗体及びその可変領域並びにそれらの生成及び／又は単離及び／又は使用の方法の一般的記載は、とりわけ、国際公開第2005/118629号パンフレットに見出される。

【0259】

他の抗体及びその抗原結合ドメインを含むタンパク質

本発明は、以下の他の抗体及びその抗原結合ドメインを含むタンパク質を意図する。

(i) 米国特許第5731168号明細書に記載されているような「キー・アンド・ホール」二重特異性タンパク質；

(ii) 例えば、米国特許第4676980号明細書に記載されているようなヘテロコンジュゲートタンパク質；

(iii) 例えば、米国特許第4676980号明細書に記載されているような化学クロスリンカーを使用して生成されたヘテロコンジュゲートタンパク質；及び

(iv) Fab₃（例えば、欧州特許第19930302894号明細書に記載されているような）。

【0260】

組成物

いくつかの例では、本明細書に記載される抗原結合部位は、従来の無毒の薬学的に許容され得る担体を含む投与製剤中で、経口的に、非経口的に、吸入噴霧、吸着、吸収により、局所的に、直腸内、鼻腔内、頬内、膈内、脳室内、移植リザーバーを介して又は任意の他の都合のよい剤形により投与することができる。用語「非経口的に」は、本明細書で使用される場合、皮下、静脈内、筋内、腹腔内、くも膜下腔内、脳室内、胸骨内及び頭蓋内注射又は注入技術を含む。

【0261】

抗原結合部位を対象への投与に適した形態（例えば、医薬組成物）に調製する方法は、当技術分野で公知であり、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences (18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990) 及びU. S. Pharmacopeia: National Formulary (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1984) に記載されている方法を含む。

【0262】

本発明の医薬組成物は、非経口投与、例えば静脈内投与又は体腔若しくは器官の管腔若しくは関節への投与に特に有用である。投与用の組成物は、薬学的に許容され得る担体、例えば水性担体に溶解された抗原結合部位の溶液を通常含むであろう。多様な水性担体、例えば生理食塩水などを使用することができる。組成物は、pH調整及び緩衝剤、毒性調整剤など、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどの生理学的状態の近似に必要な薬学的に許容され得る補助物質を含み得る。これらの製剤中の本発明の抗原結合部位の濃度は、広く変動し得、選択される特定の投与モード及び患者の必要性に従い、主に流体体積、粘度、体重などに基づいて選択されるであろう。例示的な担体としては、水、生理食塩水、リンゲル液、右旋糖溶液及び5%ヒト血清アルブミンが挙げられる。混合油及びオレインエチルなどの非水性ビヒクルも使用することができる。リポソームも担体として使用することができる。ビヒクルは、等張性及び化学的安定性を向上させる少量の添加剤、例えば緩衝液及び保存剤を含み得る。

【0263】

投与量及び投与のタイミング

本発明の抗原結合部位の適切な投与量は、抗原結合部位の特異性、処置される状態及び／又は処置される対象に応じて変動するであろう。例えば、準最適投与量から開始し、投

10

20

30

40

50

与量を増分的に変更して最適な又は有用な投与量を決定することによって適切な投与量を決定することは、熟練した医師の能力の範囲内である。代替的に、処置／予防のための適切な投与量を決定するために、細胞培養アッセイ又は動物試験からのデータを使用し、ここで、適切な用量は、毒性が殆ど又は全くない活性化合物のED₅₀を含む循環濃度の範囲内である。投与量は、使用される剤形及び投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。治療的／予防的有効用量は、当初は細胞培養アッセイによって見積もることができる。用量は、細胞培養において決定されたIC₅₀（即ち症状の半最大阻害を達成する化合物の濃度又は量）を含む、循環血漿濃度範囲を達成するように、動物モデルにおいて処方され得る。このような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するのに使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。

10

【0264】

いくつかの例では、本発明の方法は、予防的又は治療的有効量の本明細書に記載されるタンパク質を投与することを含む。

【0265】

用語「治療的有効量」は、処置が必要な対象に投与されると、対象の予後及び／若しくは状態を改善し、且つ／又は本明細書に記載される臨床状態の1つ以上の症状を、その状態の臨床的診断若しくは臨床的特徴として観察及び許容されるものを下回るレベルに低下させる、量である。対象に投与される量は、処置される状態の特定の特徴、処置される状態のタイプ及び段階、投与モード並びに対象の特徴、例えば一般的健康、他の疾患、年齢、性別、遺伝子型及び体重に依存するであろう。当業者は、これら及び他の因子に応じて、適切な投与量を決定することができるであろう。従って、この用語は、本発明を特定の量に、例えばタンパク質の重量又は量を限定するよう解釈されるべきではなく、本発明は、対象において明記された結果を達成するのに十分な任意の量の抗原結合部位を包含する。

20

【0266】

本明細書で使用される場合、用語「予防的有効量」は、臨床状態の1つ以上の検出可能な症状を予防若しくは阻害するか又はその開始を遅延させるのに十分なタンパク質の量を意味すると解釈されるものとする。当業者は、そのような量が、例えば、投与される特定の抗原結合部位及び／又は特定の対象及び／又は状態のタイプ若しくは重篤さ若しくはレベル及び／又は状態に対する素因（遺伝的又はそれ以外）に応じて変動することを認識するであろう。従って、この用語は、本発明を特定の量に、例えば抗原結合部位の重量又は量を限定するよう解釈されるべきではなく、本発明は、対象において明記された結果を達成するのに十分な任意の量の抗原結合部位を包含する。

30

【0267】

キット

本発明は加えて、以下の1つ以上を含むキットを含む：

- (i) 本発明の抗体又はそれをコードする発現コンストラクト；
- (ii) 本発明の分子；
- (iii) 本発明の複合体；又は
- (iii) 本発明の医薬組成物。

【0268】

癌の検出のためのキットの場合、キットは、例えば、本発明の抗原結合部位に結合した、検出手段を更に含み得る。

40

【0269】

治療的／予防的使用のためのキットの場合、キットは、薬学的に許容され得る担体を更に含み得る。

【0270】

任意選択的に、本発明のキットは、任意の例による本明細書に記載される方法における使用のための説明書と共に包装される。

【0271】

50

【表 1】

表1: 本発明のPSMA結合抗体についてのアミノ酸及びヌクレオチド配列の概略

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
ANT4044 可変重鎖	HCDR1 (タンパク質)	1	EYTIH
	HCDR2 (タンパク質)	2	NINPNNGGTTYNQKFED
	HCDR3 (タンパク質)	3	GWNFDY
	VH (タンパク質)	4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFEYTIHW VRQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVITV DKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAAGWNFDYWGQ GTTVTVSS
	HCDR1 (DNA)	5	GAATACACCATCCAC
	HCDR2 (DNA)	6	AACATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTACCTACAAC CAGAAGTTCGAGGAC
	HCDR3 (DNA)	7	GGTTGGAACTTTGACTAC
	VH (DNA)	8	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATCC ACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGA GTGGATTGAAACATTAATCCTAACAAATGGTGGTA CTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCACA ATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCTACAT GGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCA GTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACTTTGACTA CTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	HFR1 (タンパク質)	9	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
	HFR2 (タンパク質)	10	WVRQAPGKGLEWIG
	HFR3 (タンパク質)	11	RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCAA
	HFR4 (タンパク質)	12	WGQGGTTVTVSS
	HFR1 (DNA)	12	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCTTCTGGATACACATTCACT
	HFR2 (DNA)	14	TGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGT GGATTGGA
	HFR3 (DNA)	15	AGAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCAC AGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAG GATACTGCAGTCTATTACTGTGCAGCT
	HFR4 (DNA)	16	TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
ANT4044-A2 可変重鎖	HCDR1 (タンパク質)	17	EYTIH

【 0 2 7 2 】

10

20

30

40

50

【表 2】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	HCDR2 (タンパク質)	18	NINPNNGGTTYNQKFED
	HCDR3 (タンパク質)	19	YWLFDY
	VH (タンパク質)	20	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHW VRQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVITV DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA YWLFDYWGQ GTTVTVSS
	HCDR1 (DNA)	21	GAATACACCATCCAC
	HCDR2 (DNA)	22	AACATTAATCCTAACAATGGTGGTACTACCTACAAC CAGAAGTTCGAGGAC
	HCDR3 (DNA)	23	TACTGGCTGTTCGACTAC
	VH (DNA)	24	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCTTCTGGATACACATTCCTGAATACACCATCC ACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGA GTGGATTGGAACATTAATCCTAACAATGGTGGTA CTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCACA ATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCTACAT GGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCA GTCTATTACTGTGCAGCTTACTGGCTGTTTCTGACTA CTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	HFR1 (タンパク質)	25	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
	HFR2 (タンパク質)	26	WVRQAPGKGLEWIG
	HFR3 (タンパク質)	27	RVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA
	HFR4 (タンパク質)	28	WGQGTTVTVSS
	HFR1 (DNA)	29	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCTTCTGGATACACATTCCT
	HFR2 (DNA)	30	TGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGT GGATTGGA
	HFR3 (DNA)	31	AGAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCAC AGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAG GATACTGCAGTCTATTACTGTGCAGCT
	HFR4 (DNA)	32	TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
ANT4044/ ANT4044-A2 可変軽鎖	LCDR1 (タンパク質)	33	KASQDVGTAVD

【 0 2 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 3】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	LCDR2 (タンパク質)	34	WASTRHT
	LCDR3 (タンパク質)	35	QQYNSYPLT
	VL (タンパク質)	36	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWY QQKPGQAPKLLIWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFT LTISRLQPEDFAVYYCQQYNSYPLTFGQGTKVDIK
	LCDR1 (DNA)	37	AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGAC
	LCDR2 (DNA)	38	TGGGCATCCACCCGGCACACT
	LCDR3 (DNA)	39	CAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACG
	VL (DNA)	40	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCCTGTC CGCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACTTGCA AGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTG GTATCAACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTAC TGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTC CCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAA GACTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAACAGC TATCCTCTCACGTTCTGGCCAGGGGACCAAGGTGG ATATCAAA
	LFR1 (タンパク質)	41	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC
	LFR2 (タンパク質)	42	WYQQKPGQAPKLLIY
	LFR3 (タンパク質)	43	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYC
	LFR4 (タンパク質)	44	FGQGTKVDIK
	LFR1 (DNA)	45	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCCTGTC CGCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACTTGC
	LFR2(DNA)	46	TGGTATCAACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACT ACTGATTTAC
	LFR3 (DNA)	47	GGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGCAG CCTGAAGACTTTGCAGTTTATTACTGT
	LFR4 (DNA)	48	TTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA

【 0 2 7 4 】

10

20

30

40

50

【表 4】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
ANT4044/ANT404 4-A2__ 非改変ヒト IgG1 重鎖 定常領域	IgG1 HC (タンパク質)	235	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
ANT4044/ANT404 4-A2 改変ヒト IgG1 重鎖 定常領域	IgG1 H310A H435Q HC (タンパク質)	236	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNQYTQKSL SLSPGK
ANT4044/ANT404 4-A2____ 改変ヒト IgG4 定常鎖領域	IgG4 S228P L235E H310A H435Q HC (タンパク質)	237	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVEPKYGPCCPPC PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSIVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNQYTQKSLSLSL GK
ANT4044/ANT404 4-A2 カッパ 軽鎖 定常領域	Human κ LC 定常領域	238	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 2 7 5 】

10

20

30

40

50

【表 5】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
ANT4044 RADmAb IgG1 重鎖 (HuX592r)	FcRn-ヌル, IgG1 アロタイプ G1m(3) H310A H435Q	239	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHW VRQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVITIV DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN QYTQKSLSLSPGK
ANT4044 RADmAb IgG4 重鎖	FcRn+FcRy-ヌル, IgG4 S228P L235E H310A H435Q	240	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHW VRQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVITIV DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNQYT QKSLSLSLGK
ANT4044-A2 RADmAb IgG1 重鎖	FcRn-ヌル, IgG1 H310A H435Q	241	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHW VRQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVITIV DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAYWLFYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN QYTQKSLSLSPGK

【 0 2 7 6 】

10

20

30

40

50

【表 6】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
ANT4044-A2 RADmAb IgG4 重鎖	FcRn+FcRγ-ヌル IgG4 S228P L235E H310A H435Q	242	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHW VRQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITV DKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCAAYWLFDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK YGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNQYT QKSLSLSLGK
ANT4044- ANT4044-A2 Vk 軽鎖	Vk 軽鎖	243	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWY QQKPGQAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFT LTISRLQPEDFAVYYCQQYNSYPLTFGQGTKVDIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 2 7 7 】

10

20

30

40

50

【表 7】

表2: 本発明のCAIX結合抗体についてのアミノ酸及びヌクレオチド配列の概略

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
ギレンツキシマブ キメラ VHO 可変重鎖	HCDR1(タンパク質)	49	NYYSMS
	HCDR2(タンパク質)	50	AINSDGGITYYLDTVKG
	HCDR3(タンパク質)	51	HRSGYFSMDY
	VH (タンパク質)	52	DVKLVESGGGLVKLGSLKLSAASGFTFSNYYSMSWW RQTPEKRLELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAL NTLYLQMSSSLKSEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQG TSVTVSS
	HCDR1 (DNA)	53	AACTATTACATGTCT
	HCDR2 (DNA)	54	GCCATTAATAGTGATGGTGGTATCACCTACTATCTAG ACACTGTGAAGGGC
	HCDR3 (DNA)	55	CACCGCTCGGGCTACTTTTCTATGGACTAC
	VH (DNA)	56	GACGTGAAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCTTGGAGGATCCCTGAACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACTTTCAGTAACTATTACATGTCTTGG GTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTTGGT CGCAGCCATTAATAGTGATGGTGGTATCACCTACTA TCTAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATTTCAAG AGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAG CAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCTTGTTTACTG TGCAAGACACCGCTCGGGCTACTTTTCTATGGACTA CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
	HFR1 (タンパク質)	57	DVKLVESGGGLVKLGSLKLSAASGFTFS
	HFR2 (タンパク質)	58	WVRQTPEKRLELVA
	HFR3 (タンパク質)	59	RFTISRDNALNTLYLQMSSSLKSEDTALFYCAR
	HFR4 (タンパク質)	60	WGQGTSTVTVSS
	HFR1 (DNA)	61	GACGTGAAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCTTGGAGGATCCCTGAACTCTCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACTTTCAGT
	HFR2 (DNA)	62	TGGGTTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTT GGTCGCA

【 0 2 7 8 】

10

20

30

40

50

【表 8】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	HFR3 (DNA)	63	CGATTCAACCATTTCAAGAGACAATGCCAAGAACACC CTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGAC ACAGCCTTGTTTTACTGTGCAAGA
	HFR4 (DNA)	64	TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
ギレンツキシマブ ヒト化 VH1 可変重鎖	HCDR1(タンパク質)	65	NYYS
	HCDR2(タンパク質)	66	AINSDGGITYYLDTVKG
	HCDR3(タンパク質)	67	HRSGYFSMDY
	VH (タンパク質)	68	DVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYMSW VRQAPGKGLELVA AINSDGGITYYLDTVKG RFTISRDN AKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCARHRSGYFSMDYWG QGTSVTVSS
	HCDR1 (DNA)	69	AACACTACATGAGC
	HCDR2 (DNA)	70	GCCATTAAACAGTGACGGTGGCATCACCTACTACCTG GACACCGTGAAGGGC
	HCDR3 (DNA)	71	CACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTAC
	VH (DNA)	72	GACGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGAGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTAACTACTACATGAGCT GGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGCT GGTTGCCGCCATTAAACAGTGACGGTGGCATCACCTA CTACCTGGACACCGTGAAGGGCCGATTACCATCTC CAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTATCTGCAAAT GAGCAGCCTGAAGAGCGAGGACACGGCCCTGTATT ACTGTGCGAGACACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGG ACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTCACTGTCTCC TCA
	HFR1 (タンパク質)	73	DVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
	HFR2 (タンパク質)	74	WVRQAPGKGLELVA
	HFR3 (タンパク質)	75	RFTISRDN AKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCAR
	HFR4 (タンパク質)	76	WGQTSVTVSS
	HFR1 (DNA)	77	GACGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGAGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGT

【 0 2 7 9 】

10

20

30

40

50

【表 9】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	HFR2 (DNA)	78	TGGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGC TGTTGCC
	HFR3 (DNA)	79	CGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACC CTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAAGAGCGAGGA CACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGA
	HFR4 (DNA)	80	TGGGGCCAGGGCACCAGCGTCACTGTCTCCTCA
ギレンツキシマブ ヒト化 VH3 可変重鎖	HCDR1(タンパク質)	81	NYYSMS
	HCDR2(タンパク質)	82	AINSDGGITYYLDTVKG
	HCDR3(タンパク質)	83	HRSGYFSMDY
	VH (タンパク質)	84	DVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYSMSW VRQAPGKGLELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHRSGYFSMDYWG QGTLVTVSS
	HCDR1 (DNA)	85	AACTACTACATGAGC
	HCDR2 (DNA)	86	CCATTAACAGTGACGGTGGCATCACCTACTACCTGG ACACCGTGAAGGGC
	HCDR3 (DNA)	87	CACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTAC
	VH (DNA)	88	GACGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGAGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTAACTACTACATGAGCT GGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGCT GGTTGCCGCCATTAACAGTGACGGTGGCATCACCTA CTACCTGGACACCGTGAAGGGCCGATTACCATCTC CAGGGACAACGCCAAGAACCCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACGGCCCTGTATT ACTGTGCGAGACACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGG ACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACTGTCTCC TCA
	HFR1 (タンパク質)	89	DVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
	HFR2 (タンパク質)	90	WVRQAPGKGLELVA
	HFR3 (タンパク質)	91	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAR
	HFR4 (タンパク質)	92	WGQGTTLVTSS

【 0 2 8 0 】

10

20

30

40

50

【表 10】

抗体 ID	領域	配列番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	HFR1 (DNA)	93	GACGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGAGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGT
	HFR2 (DNA)	94	TGGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGC TGGTTGCC
	HFR3 (DNA)	95	CGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACC CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGA CACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGA
	HFR4 (DNA)	96	TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCCTCA
ギレンツキシマブ ヒト化 VH4 可変重鎖	HCDR1(タンパク質)	97	NYYMS
	HCDR2(タンパク質)	98	AINSDGGITYYLDTVKG
	HCDR3(タンパク質)	99	HRSGYFSMDY
	VH (タンパク質)	100	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSW VRQAPGKGLLELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHRSGYFSMDYWG QGTLVTVSS
	HCDR1 (DNA)	101	AACTACTACATGAGC
	HCDR2 (DNA)	102	GCCATTAAACAGTGACGGTGGCATCACCTACTACCTG GACACCGTGAAGGGC
	HCDR3 (DNA)	103	CACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTAC
	VH (DNA)	104	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGAGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTAACTACTACATGAGCT GGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGCT GGTTGCCGCCATTAACAGTGACGGTGGCATCACCTA CTACCTGGACACCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTC CAGGGACAACGCCAAGAACCCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACGGCCCTGTATT ACTGTGCGAGACACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGG ACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCC TCA
	HFR1 (タンパク質)	105	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
	HFR2 (タンパク質)	106	VWRQAPGKGLLELVA
	HFR3 (タンパク質)	107	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAR

【0281】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	HFR4 (タンパク質)	108	WGQGTLLTVSS
	HFR1 (DNA)	109	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGAGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGT
	HFR2 (DNA)	110	TGGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGC TGTTGCC
	HFR3 (DNA)	111	CGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACC CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGA CACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGA
	HFR4 (DNA)	112	TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCCTCA
ギレンツキシマブ ヒト化 VH5 可変重鎖	HCDR1(タンパク質)	113	NYYMS
	HCDR2(タンパク質)	114	AINSDGGITYYLDTVKG
	HCDR3(タンパク質)	115	HRSGYFSMDY
	VH (タンパク質)	116	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSW VRQAPGKGLEWVA AINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHRSGYFSMDYWG QGTLTVSS
	HCDR1 (DNA)	117	AACTACTACATGAGC
	HCDR2 (DNA)	118	GCCATTAAACAGTGACGGTGGCATCACCTACTACCTG GACACCGTGAAGGGC
	HCDR3 (DNA)	119	CACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGGACTAC
	VH (DNA)	120	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGAGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGTAACTACTACATGAGCT GGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GGTTGCCGCCATTAAACAGTGACGGTGGCATCACCTA CTACCTGGACACCGTGAAGGGCCGATTACCATCTC CAGGGACAACGCCAAGAACCCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACGGCCCTGTATT ACTGTGCGAGACACAGGAGCGGCTACTTCTCTATGG ACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCC TCA
	HFR1 (タンパク質)	121	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
	HFR2 (タンパク質)	122	VWRQAPGKGLEWVA

【 0 2 8 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	HFR3 (タンパク質)	123	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAR
	HFR4 (タンパク質)	124	WGQGTLLTVSS
	HFR1 (DNA)	125	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CAAGCCTGGAGGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTACCTTCAGT
	HFR2 (DNA)	126	TGGGTGCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GGGTTGCC
	HFR3 (DNA)	127	CGATTACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACC CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGA CACGGCCCTGTATTACTGTGCGAGA
	HFR4 (DNA)	128	TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCCTCA
ギレンツキシマブ キメラ Vκ0 可変軽鎖	LCDR1 (タンパク質)	129	KASQNVVSAVA
	LCDR2 (タンパク質)	130	SASNRYT
	LCDR3 (タンパク質)	131	QQYSNYPWT
	VL (タンパク質)	132	DIVMTQSQRFMSTTVGDRVSITCKASQNVVSAVAWYQ QKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLT SNMQSEDLADFFCQQYSNYPWTFGGGTKLEIK
	LCDR1 (DNA)	133	AAGGCCAGTCAGAATGTGGTTTCTGCTGTTGCC
	LCDR2 (DNA)	134	TCAGCATCCAATCGGTACACT
	LCDR3 (DNA)	135	CAACAATATAGCAACTATCCGTGGACG
	VL (DNA)	136	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAGATTCATGTCC ACAACAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAA GGCCAGTCAGAATGTGGTTTCTGCTGTTGCCTGGTA TCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAACTACTGATT TACTCAGCATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCTGAT CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT CTCACCATTAGCAATATGCAGTCTGAAGACCTGGCT GATTTTTTCTGTCAACAATATAGCAACTATCCGTGGA CGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAA
	LFR1 (タンパク質)	137	DIVMTQSQRFMSTTVGDRVSITC
	LFR2 (タンパク質)	138	WYQQKPGQSPKLLIY
	LFR3 (タンパク質)	139	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADFFC

【 0 2 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 13】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	LFR4 (タンパク質)	140	FGGGTKLEIK
	LFR1 (DNA)	141	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAGATTCATGTCC ACAACAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGC
	LFR2 (DNA)	142	TGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTA CTGATTAC
	LFR3 (DNA)	143	GGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATATGCAGTCT GAAGACCTGGCTGATTTTTTCTGT
	LFR4 (DNA)	144	TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
ギレンツキシマブ ヒト化 可変軽鎖	LCDR1 (タンパク質)	145	KASQNVVSAVA
	LCDR2 (タンパク質)	146	SASNRYT
	LCDR3 (タンパク質)	147	QQYSNYPWT
	VL (タンパク質)	148	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITICKASQNVVSAVAWYQ QKPGQAPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLT SSLQSEDLADYFCQQYSNYPWTFGGGTKVEIK
	LCDR1 (DNA)	149	AAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCC
	LCDR2 (DNA)	150	AGCGCCTCCAACAGGTACACC
	LCDR3 (DNA)	151	CAACAGTACAGCAATTACCCTTGGACG
	VL (DNA)	152	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAG GCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCCTGGTA TCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAAGCTCCTGAT CTATAGCGCCTCCAACAGGTACACCGGGTCCCAG ACAGGTTACCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCA CTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGAGCGAAGATCTG GCAGACTATTTCTGTCAACAGTACAGCAATTACCCTT GGACGTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
	LFR1 (タンパク質)	153	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITIC
	LFR2 (タンパク質)	154	WYQQKPGQAPKLLIY
	LFR3 (タンパク質)	155	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQSEDLADYFC

【0284】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	LFR4 (タンパク質)	156	FGGGTKVEIK
	LFR1 (DNA)	157	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
	LFR2 (DNA)	158	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAAGCT CCTGATCTAT
	LFR3 (DNA)	159	GGGGTCCCAGACAGGTTACCCGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGAG CGAAGATCTGGCAGACTATTTCTGT
	LFR4 (DNA)	160	TTCGCGCGCGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
ギレンツキシマブ ヒト化 可変軽鎖	LCDR1 (タンパク質)	161	KASQNVVSAVA
	LCDR2 (タンパク質)	162	SASNRYT
	LCDR3 (タンパク質)	163	QQYSNYPWT
	VL (タンパク質)	164	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVVSAVAWYQ QKPGQAPRLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGDFTLT SSLQAEDLADYFCQQYSNYPWTFGGGTKVEIK
	LCDR1 (DNA)	165	AAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCC
	LCDR2 (DNA)	166	AGCGCCTCCAACAGGTACACC
	LCDR3 (DNA)	167	CAACAGTACAGCAATTACCCCTGGACG
	VL (DNA)	168	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAG GCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCCTGGTA TCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCTCCTGA TCTATAGCGCCTCCAACAGGTACACCGGGGTCCCA GACAGGTTACCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT CACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAAGATCT GGCAGACTATTTCTGTCAACAGTACAGCAATTACCC TTGGACGTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGAAATCA AA
	LFR1 (タンパク質)	169	DIVMTQSPSSLSASVGDRTITC
	LFR2 (タンパク質)	170	WYQQKPGQAPRLIY

【 0 2 8 5 】

10

20

30

40

50

【表 15】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	LFR3 (タンパク質)	171	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDLADYFC
	LFR4 (タンパク質)	172	FGGGTKVEIK
	LFR1 (DNA)	173	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
	LFR2 (DNA)	174	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCT CCTGATCTAT
	LFR3 (DNA)	175	GGGGTCCCAGACAGGTTACCGGCAGTGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGC CGAAGATCTGGCAGACTATTTCTGT
	LFR4 (DNA)	176	TTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAATCAAA
ギレンツキシマブ ヒト化 可変軽鎖	LCDR1(タンパク質) Vk3	177	KASQNVVSAVA
	LCDR2 (タンパク質)	178	SASNRYT
	LCDR3 (タンパク質)	179	QQYSNYPWT
	VL (タンパク質)	180	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQNVVSAVAWYQ QKPGQAPRLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDLADYFCQQYSNYPWTFGGGTKVEIK
	LCDR1 (DNA)	181	AAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCC
	LCDR2 (DNA)	182	AGCGCCTCCAACAGGTACACC
	LCDR3 (DNA)	183	CAACAGTACAGCAATTACCTTGGACG
	VL (DNA)	184	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAG GCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCCTGGTA TCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCTCCTGA TCTATAGCGCCTCCAACAGGTACACCGGGTCCCA GACAGGTTCAAGCGCAGTGGATCTGGGACAGATTT CACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAAGATCT GGCAGACTATTTCTGTCAACAGTACAGCAATTACCC TTGGACGTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAATCA AA
	LFR1 (タンパク質)	185	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC

【0286】

10

20

30

40

50

【表 16】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	LFR2 (タンパク質)	186	WYQQKPGQAPRLIY
	LFR3 (タンパク質)	187	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYFC
	LFR4 (タンパク質)	188	FGGGTKVEIK
	LFR1 (DNA)	189	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
	LFR2 (DNA)	190	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCT CCTGATCTAT
	LFR3 (DNA)	191	GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGC CGAAGATCTGGCAGACTATTTCTGT
	LFR4 (DNA)	192	TTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
ギレンツキシマブ ヒト化 可変軽鎖	LCDR1(タンパク質) Vk4	193	KASQNVVSAVA
	LCDR2 (タンパク質)	194	SASNRYT
	LCDR3 (タンパク質)	195	QQYSNYPWT
	VL (タンパク質)	196	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVVSAVAWYQ QKPGQAPRLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISLQAEDLADYYCQQYSNYPWTFGGGTKVEIK
	LCDR1 (DNA)	197	AAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCC
	LCDR2 (DNA)	198	AGCGCCTCCAACAGGTACACC
	LCDR3 (DNA)	199	CAACAGTACAGCAATTACCCTTGGACG
	VL (DNA)	200	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAG GCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCCTGGTA TCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCTCCTGA TCTATAGCGCCTCCAACAGGTACACCGGGGTCCCA GACAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT CACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAAGATCT GGCAGACTATTACTGTCAACAGTACAGCAATTACCC TTGGACGTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAAATCA AA

【0287】

10

20

30

40

50

【表 17】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	LFR1 (タンパク質)	201	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC
	LFR2 (タンパク質)	202	WYQQKPGQAPRLLIY
	LFR3 (タンパク質)	203	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYYC
	LFR4 (タンパク質)	204	FGGGTKVEIK
	LFR1 (DNA)	205	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
	LFR2 (DNA)	206	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGCT CCTGATCTAT
	LFR3 (DNA)	207	GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGC CGAAGATCTGGCAGACTATTACTGT
	LFR4 (DNA)	208	TTCGGCGGGCGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
ギレンツキシマブ ヒト化 可変軽鎖	LCDR1(タンパク質) Vk5	209	KASQNVVSAVA
	LCDR2 (タンパク質)	210	SASNRYT
	LCDR3 (タンパク質)	211	QQYSNYPWT
	VL (タンパク質)	212	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCASQNVVSAVAWYQ QKPGQAPRRLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISLQAEDLADYYCQQYSNYPWTFGGGTKVEIK
	LCDR1 (DNA)	213	AAGGCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCC
	LCDR2 (DNA)	214	AGCGCCTCCAACAGGTACACC
	LCDR3 (DNA)	215	CAACAGTACAGCAATTACCCTTGGACG

【0288】

【表 18】

抗体 ID	領域	配列番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	VL (DNA)	216	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAAG GCAAGTCAGAACGTGGTGAGTGCTGTGGCCTGGTA TCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGAGGCTGA TCTATAGCGCCTCCAACAGGTACACCGGGTCCCA GACAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT CACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAAGATCT GGCAGACTATTACTGTCAACAGTACAGCAATTACCC TTGGACGTTTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAAATCA AA
	LFR1 (タンパク質)	217	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
	LFR2 (タンパク質)	218	WYQQKPGQAPRRLIY
	LFR3 (タンパク質)	219	GVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDLADYYC
	LFR4 (タンパク質)	220	FGGGTKVEIK
	LFR1 (DNA)	221	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCAGCCTGTCT GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGC
	LFR2 (DNA)	222	TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGGCTCCTAGGAG GCTGATCTAT
	LFR3 (DNA)	223	GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGC CGAAGATCTGGCAGACTATTACTGT
	LFR4 (DNA)	224	TTCGGCGGCGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
ギレンツキシマブ 非改変ヒトIgG1 定常鎖領域	IgG1 (タンパク質)	HC 225	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0289】

10

20

30

40

50

【表 19】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
ギレンツキシマブ 改変ヒト IgG1 定常鎖領域	IgG1 H310A H435Q HC (タンパク質)	226	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNQYTKLSLSLSPGK
ギレンツキシマブ 改変ヒト IgG4 定常鎖領域	IgG4 S228P L235E HC (タンパク質)	227	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
ギレンツキシマブ 改変ヒト IgG4 定常鎖領域	IgG4 S228P L235E H310A H435Q HC (タンパク質)	228	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLAQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNQYTKLSLSLSLGK
ギレンツキシマブ カッパ軽鎖 定常鎖領域	ヒト κ LC 定常鎖領域	229	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAK VQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0290】

10

20

30

40

50

【表 2 0】

抗体 ID	領域	配列 番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
ギレンツキシマブ 天然 IgG1 アロタイプ Gm (1,17) 重鎖	IgG1 VH4 重鎖	230	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSW VRQAPGKGLELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHRSGYFSMDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
hギレンツキシマブ IgG1 アロタイプ Gm (1,17) RADmAb VH4 重鎖	FcRn-ヌル IgG1 アロタイプ H130A H435Q	231	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSW VRQAPGKGLELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHRSGYFSMDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNQYTQKSLSLS PGK

【 0 2 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

抗体 ID	領域	配列番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
h ギレンツキシマブ IgG4 RADmAb VH4 重鎖	FcR γ -ヌル IgG4 S228P L235E	232	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSW VRQAPGKGLELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHRSGYFSMDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVWTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VWVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHNAHNNHYTQKSLSLSLG K
h ギレンツキシマブ IgG4 RADmAb VH4 重鎖	FcR α +FcR γ -ヌル IgG4 S228P L235E H310A H435Q	233	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSW VRQAPGKGLELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHRSGYFSMDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVWTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VWVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHNAHNNHYTQKSLSLSL GK
h ギレンツキシマブ Vk軽鎖	Vk軽鎖	234	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVVSAVAWYQ QKPGQAPRLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDLADYYCQYSNYPWTFGGGKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

【実施例】

【0292】

実施例 1：CAIX への結合のための抗体

概要

ヒト化抗体可変領域遺伝子を、非改変ヒト IgG1 重鎖定常ドメイン及びヒトカッパ軽鎖定常ドメインをコードするベクターにクローン化した。キメラ抗体を更に、FcR α 及びタンパク質 A 結合を消失させる変異 H310A 及び H435Q を含む改変ヒト IgG1 重鎖定常ドメイン (Andersen et al、2012) 又は変異 S228P (ヒンジを安定化するため (Angal et al、1993)) 及び L235E (エフェクター機能を除去するため (Reddy et al、2000)) 並びに上記の FcR α 消失変異を含む改変ヒト IgG4 重鎖コンストラクトのいずれかをコードするベクターにクロ

ーニングした。キメラ及びヒト化抗体をHEK E BNA細胞中で一過性に発現させ、B i a c o r e単一サイクル動態分析を用いてヒト炭酸アンヒドラーゼIX (CAIX)への結合について試験した。選択されたリード抗体をタンパク質A又はタンパク質Gによって精製し、分析SEC、競合ELISA及びB i a c o r e多サイクル動態分析によって分析した。

【0293】

キメラ抗体に類似の結合を有する3つのリード候補ヒト化抗体を同定した。続いて、これらを、上述のように、ヒトIgG1重鎖定常ドメイン(H310A、H435Q)及びIgG4重鎖定常ドメイン(S241P、L235E、H310A、H435Q)をコードするベクターにクローニングした。キメラ及びリードヒト化抗体をCHO細胞中で一過性に発現させ、B i a c o r e単一サイクル動態分析を用いてヒト炭酸アンヒドラーゼIX (CAIX)への結合について試験した。抗体をタンパク質A又はタンパク質Gのいずれかによって精製し、分析SEC及びB i a c o r e多サイクル動態分析によって分析した。

【0294】

方法

Composite Human Antibody (商標) 可変領域配列の設計

ギレンツキシマブ抗体V領域の構造モデルを、Swiss PDBを用いて作製し、抗体の結合特性に必須である可能性のある重要な「拘束」アミノ酸を同定するために分析した。CDR内に含まれる殆どの残基(Kabat及びChothiaの両方の定義を使用する)は、数個のフレームワーク残基と共に重要であると考えられた。ギレンツキシマブのVH及びVK配列は、典型的なフレームワーク残基並びに多くのネズミ抗体と同等のCDR1、2及び3モチーフを含む。

【0295】

上記の分析から、ギレンツキシマブの複合ヒト配列は、CDRの外側の代替残基に対して広い寛容度を有するが、CDR配列内では可能な残基の狭いメニューのみを有するように作製され得ると考えられた。予備分析は、いくつかのヒト抗体由来の対応する配列セグメントを組み合わせて、マウス配列中のものと類似又は同一のCDRを作製し得ることを示した。CDRの外側のCDRに隣接する領域については、ヒト配列セグメントの広範な選択が、新規なヒト化V領域の可能な成分として同定された。

【0296】

CD4+ T細胞エピトープ回避

構造分析に基づいて、ギレンツキシマブヒト化変異体を作製するために使用することができる配列セグメントの大きい予備セットを同定した。これらのセグメントは、ヒトMHCクラスII対立遺伝子に結合するペプチドのインシリコ分析のためのiTope (商標) 技術を使用して(Perry et al, 2008)、且つ既知の抗体配列関連T細胞エピトープのTCED (商標) を使用して(Bryson et al, 2010) 選択及び分析した。ヒトMHCクラスIIに対する有意な非ヒト生殖系列結合剤として同定されたか、又はTCED (商標) に対する有意なヒットをスコア付けした配列セグメントを廃棄した。これはセグメントの減少したセットをもたらし、これらの組み合わせは、セグメント間の結合が潜在的なT細胞エピトープを含まないことを確実にするために、上記のように再び分析された。選択された配列セグメントは、有意なT細胞エピトープを欠く完全なV領域配列に組み立てられた。次いで、5つの重鎖(VH0 (キメラ)、VH1、VH3、VH4及びVH5) 及び6つの軽鎖(VK0 (キメラ)、VK1~VK5) 配列を、哺乳動物細胞における遺伝子合成及び発現のために選択した(表2を参照されたい)。

【0297】

キメラ抗体及びヒト化変異体の構築

キメラVH0及びVK0ギレンツキシマブ配列及びそのヒト化変異体を、非改変ヒトIgG1重鎖(アロタイプG1m 1, 17; ギレンツキシマブアロタイプと均等)(pANT68) 及びカップ軽鎖(pANT13.2) のためのAbzenaのpANT発現ベ

10

20

30

40

50

クター系にクローニングするためのフランキング制限酵素部位で合成した。VH領域をMlu I制限部位とHind III制限部位との間にクローニングし、Vk領域をBssH I制限部位とBamH I制限部位との間にクローニングした。全てのコンストラクトを配列決定によって確認した。

【0298】

FcRn消失変異、H310A及びH435Qは、ヒトIgG1重鎖（ギレンツキシマブと均等なアロタイプ）（pANT69）又はヒトIgG4（S228P、L235E）重鎖（pANT70）のいずれかのために、部位特異的変異誘発によって表現ベクターに組み込まれた。VH0は、IgG4（S228P、L235E）をコードするpANT36.2に加えて、これら2つのベクターにクローニングされた。

10

【0299】

HEK293 EBNA細胞における抗体の発現

キメラギレンツキシマブ（VH0/Vk0）、2つの対照抗体（VH0/Vk1、VH1/Vk0）並びにVH鎖及びVk鎖の組み合わせ（合計20対）を、PEITransfection方法を用いて、HEK EBNA細胞（LGC Standards、Teddington、UK）中でIgG1として一過性に発現させた。細胞をトランスフェクション後7日間インキュベートした。加えて、HEK EBNA細胞を、同様にIgG1（H310A、H435Q）重鎖ベクター、IgG4（S228P、L235E）重鎖ベクター及びIgG4（S228P、L235E、H310A、H435Q）重鎖ベクター中のキメラギレンツキシマブVH0及びVk0でトランスフェクトした。上清抗体力価をELISAによって決定した。

20

【0300】

炭酸アンヒドラーゼIXへのキメラ及びヒト化変異体結合の動態分析

全てのギレンツキシマブComposite Human Antibody（商標）変異体の結合を評価するために、一過性にトランスフェクトされたHEK EBNA細胞培養物からの上清について、単一サイクル動態分析を行った。動態実験を、Biacore T200 ControlソフトウェアV2.0.1及びEvaluationソフトウェアV3.0（GE Healthcare、Uppsala、Sweden）を実行するBiacore T200（シリアル番号1909913）で行った。全ての単一サイクル動態実験を、HBS-P+泳動緩衝液（pH7.4）（GE Healthcare、Little Chalfont、UK）を用いて25℃で行った。直接比較のために、全ての抗体をタンパク質Gチップ（GE Healthcare、Uppsala、Sweden）上に捕捉した。

30

【0301】

抗体を、ELISA力価によって評価された濃度に基づいて、0.5 µg/mlの最終濃度まで泳動緩衝液中で希釈した。各サイクルの開始時に、抗体をタンパク質Gチップ（GE Healthcare、Little Chalfont、UK）のFc2、Fc3及びFc4にロードした。IgGを10 µl/分の流速で捕捉して、約79 RUの固定化レベル（RL）を与え、これは約50 RUのRmaxを得る理論値であった。次いで、表面を安定化させた。単一サイクル動態データを、30 µl/分の流速で、分析物として炭酸アンヒドラーゼIX（CAIX、Strattech、Newmarket、UK）を用いて得て、任意の潜在的な質量輸送制限を最小限にした。参照キメラ抗体（VH0/Vk0 IgG1）を用いた複数の反復を行って、動態サイクルにわたる表面及び分析物の安定性をチェックした。参照チャンネルFc1（抗体なし）からのシグナルをFc2、Fc3及びFc4のシグナルから差し引いて、参照表面への非特異的結合の差を補正した。各濃度間で再生を伴わない3.125 nM～25 nM CAIXの4点、2倍希釈範囲を使用した。CAIXの濃度を増加させた4回の注入の結合相を、それぞれ200秒間監視し、CAIXの最後の注入後300秒間、単一の解離相を測定した。タンパク質G表面の再生は、10 mMグリシン-HCl（pH1.5）の注入、続いて0.5% P20を含む10 mMグリシン-HCl（pH1.5）の注入を用いて行った。

40

50

【0302】

変異体を、相対KDの計算に使用した参照キメラ(VH0/Vκ0 IgG1)を用いて分析した。各抗体ブランク泳動からのシグナルを差し引いて、表面安定性の差を補正した。単一サイクル動態データは、VH5及び/又はVκ5を含むものを除いて(これらの変異体がCAIXに対してより低い親和性を示したため)、全てのヒト化変異体が参照キメラ抗体の2倍以内でCAIXに結合することを実証した。

【0303】

キメラ及びリードヒト化抗体の精製

6つのIgG1リード抗体、VH3/Vκ2、VH3/Vκ3、VH3/Vκ4、VH4/Vκ2、VH4/Vκ3及びVH4/Vκ4を、ヒト化(humanness)及び単一サイクル動態データに基づいて精製した。キメラIgG1抗体、リードヒト化IgG1抗体及びキメラIgG4(S228P、L235E)抗体を、タンパク質Aセファロースカラム(GE Healthcare、Little Chalfont、UK)を用いて細胞培養上清から精製した。キメラIgG1(H310A、H435Q)及びIgG4(S228P、L325E、H310A、H435Q)抗体を、H310A H435Q二重突然変異がいくつかのタンパク質A樹脂への結合に悪影響を及ぼすことが示されているため、HiTrap(商標)タンパク質G HPカラム(GE Healthcare、Little Chalfont、UK)を使用して細胞培養上清から精製した。全ての抗体を1×PBS(pH7.2)に緩衝液交換し、予想アミノ酸配列に基づく吸光係数(Ec(0.1%))を用いてOD280nmにより定量した。2μgの負荷抗体の還元SDS-PAGEによって抗体を分析し、典型的な抗体のプロファイルに対応するバンドを観察した。

【0304】

キメラ及びリード抗体の多サイクル動態分析

Biacore T200評価ソフトウェアV3.0.1(Uppsala、Sweden)を実行するBiacore T200(シリアル番号1909913)装置を使用して、精製キメラ抗体及び6つのリードIgG1抗体について多サイクル動態分析を行って炭酸アンヒドラーゼIXに対する正確な親和性を確立した。精製した抗体をHBS-P+中で1μg/mlの濃度に希釈した。各サイクルの開始時に、各抗体をタンパク質G表面上に捕捉して、約79RUのRLを得た。捕捉後、表面を安定化させた。任意の潜在的な物質移動効果を最小限にするために、30μl/分の流速を使用して、動態データを得た。動態分析のために、炭酸アンヒドラーゼIX(CAIX)を使用した。ブランクの複数の反復(CAIX)及び分析物の単一濃度の反復を動態ランにプログラムして、動態サイクルにわたる表面及び分析物の両方の安定性をチェックした。動態分析のために、2倍希釈範囲を50nM~0.078nM CAIXから選択した。CAIXの結合相を280秒間監視し、解離相を300秒間監視した。タンパク質G表面の再生は、10mMグリシン-HCL(pH1.5)の注入、続いて0.5% P20を含む10mMグリシン-HCL(pH1.5)の注入を用いて行った。参照チャネルFc1からのシグナルをFc2、Fc3及びFc4のシグナルから差し引いて、参照表面への非特異的結合の差を補正し、全体的なRmaxパラメーターを1対1結合モデルにおいて使用した。相対KDは、ヒト化変異体のKDを同じチップ上のキメラ抗体のKDで割ることによって計算した。全てのリードヒト化IgG1変異体及び異なるIgGバックボーン上のキメラ抗体は、キメラIgG1抗体の2倍以内の相対KDを示した。

【0305】

炭酸アンヒドラーゼIX競合ELISA

リード精製IgG1変異体並びに種々のIgG定常ドメイン(IgG1、IgG1(H310A、H435Q)、IgG4(S228P、L235E)及びIgG4(S228P、L235E、H310A、H435Q))で発現したキメラ抗体を、ビオチン化(Innova Biosciences、Cambridge、UKからのビオチン化キット)キメラギレンツキシマブIgG1に対する競合を用いてCAIXへのそれらの結合につ

いて試験した。無関係なヒトIgG1抗体を、CAIXへの結合についての陰性対照として試験した。

【0306】

CAIXを1×PBS中で0.5 μg/mlに希釈し、100 μl/ウェルを96ウェルELISAプレート上において4℃で一晩コーティングした。翌日、プレートを1×PBS/0.05% Tween (PBST) で3回洗浄し、200 μlの2% BSA/PBSで室温において1時間ブロックした。96ウェル希釈プレートにおいて、固定濃度のビオチン化ギレンツキシマブキメラIgG1抗体(0.3 μg/ml最終濃度)を、試験抗体の3倍タイトレーション系列(ブロッキング緩衝液で希釈した20 μg/mlから開始(10 μg/ml最終濃度))に等しい体積で添加した。

10

【0307】

プレートをPBSTで3回洗浄した後、100 μlのキメラ/試験抗体混合物をELISAプレートに添加した。

【0308】

室温で1時間インキュベートした後、プレートをPBSTで3回洗浄し、PBSTで1:1000に希釈したストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ結合二次抗体(Sigma、Dorset、UK) 100 μlを室温で1時間適用して、結合したビオチン化ギレンツキシマブキメラIgG1抗体を検出した。発色のために、プレートをPBSTで3回洗浄した後、100 μlのTMB基質を添加し、室温で約5分間インキュベートした。反応を50 μlの3.0 M塩酸で停止させ、Dy nexプレートリーダーを用いて450 nmで直ちに吸光度を読み取った。

20

【0309】

各変異体についてIC₅₀値を計算し、ヒト化変異体のIC₅₀を、同じプレート上でアッセイしたギレンツキシマブキメラIgG1抗体のIC₅₀で割ることにより、相対IC₅₀値を計算した。全てのリードヒト化変異体及び異なるIgGバックボーン上のキメラ抗体は、ギレンツキシマブキメラIgG1抗体の2倍以内のIC₅₀値を示した。

【0310】

生成された全てのデータ(iTope (商標) 分析、ヒト化率、多サイクル動態データ及び競合ELISAデータを含む)の分析から、IgG1、IgG1(H310A、H435Q)及びIgG4(S228P、L235E、H310A、H435Q)として、更なる発現及び分析のためのリードとして、3つの抗体、VH3/Vκ4、VH4/Vκ3及びVH4/Vκ4を選択した。

30

【0311】

CHO細胞におけるリードヒト化ギレンツキシマブの発現

重鎖可変ドメインを、上で概説したようにFcヌルベクターpANT69(Ig1(H310A、H435Q))及びpANT70(IgG4(S228P、L235E、H310A、H435Q))にクローニングした。

【0312】

対応するプラスミドでのFreeStyle (商標) CHO-S細胞(ThermoFisher、Loughborough、UK)の一過性のトランスフェクション及びMaxCytte STX (登録商標) エレクトロポレーションシステム(MaxCytte Inc.、Gaithersburg、USA)の使用に続いて、キメラ(VH0/Vκ0)、VH3/Vκ4、VH4/Vκ3及びVH4/Vκ4をIgG1、IgG1(H310A、H435Q)及びIgG4(S228、L235E、H310A、H435Q)(合計12の組み合わせ)として発現させた。細胞回収に続いて、8 mM L-グルタミン(ThermoFisher、Loughborough、UK)及び1xヒポキサンチン-チミジン(ThermoFisher、Loughborough、UK)を含むCD Opti-CHO培地(ThermoFisher、Loughborough、UK)中で細胞を3×10⁶細胞/mlに希釈した。トランスフェクションの24時間後、培養温度を32℃に下げ、1 mM 酪酸ナトリウム(Sigma、Dorset、UK)を

40

50

加えた。培養物には、1日目に30% CD Efficient Feed B (ThermoFisher、Loughborough、UK) 及び3.3% FunctionMAX (商標) TiterEnhancer (ThermoFisher、Loughborough、UK) を与え、7日目に再び15% CD Efficient Feed B (ThermoFisher、Loughborough、UK) 及び1.65% FunctionMAX (商標) TiterEnhancer (ThermoFisher、Loughborough、UK) を与えた(百分率は、出発培養体積に基づく)。IgG上清力価をIgG ELISAによって監視し、トランスフェクトした細胞を、上清を回収する前に14日間まで培養した。

【0313】

異なるIgGとして発現するキメラ及びリードヒト化抗体の精製

キメラ(VH0/Vκ0)、VH3/Vκ4、VH4/Vκ3及びVH4/Vκ4 IgG1抗体並びにVH4/Vκ4 IgG4(S228P、L235E)抗体を、タンパク質Aセファロースカラムを使用して細胞培養上清から精製した。IgG1(H310A、H435Q)及びIgG4(S228P、L325E、H310A、H435Q)として発現したキメラ(VH0/Vκ0)、VH3/Vκ4、VH4/Vκ3及びVH4/Vκ4を、タンパク質Gカラムを使用して精製した。精製した抗体を、上記に概説したように処理した。2μgの負荷抗体の還元SDS-PAGEによって抗体を分析し、典型的なIgGのプロファイルに対応するバンドを観察した。

【0314】

異なるIgGとして発現するキメラ抗体及びリードヒト化抗体の多サイクル動態分析

炭酸アンヒドラーゼIXに対する正確な親和性を確立するために、Biacore T200評価ソフトウエアV3.0.1(Uppsala、Sweden)を実行するBiacore T200(シリアル番号1909913)装置を使用して、種々のIgGバックボーン上のキメラ(VH0/Vκ0)、VH3/Vκ4、VH4/Vκ3及びVH4/Vκ4抗体について多サイクル動態分析を行った。多サイクル動態は、セクション2.7で概説したように行った。VH0/Vκ0 IgG1は、各ランのFc2上の参照として実行した。相対KDは、ヒト化変異体のKDを同じIgG定常ドメインを有するキメラ抗体のKDで割ることによって計算した。リード変異体は、3つのIgGバックボーン全てにおいて、同じIgGバックボーンを有するVH0/Vκ0の2倍以内で結合した。

【0315】

結論及び考察

ギレンツキシマブ抗体からのV領域遺伝子を、4つのヒト化VH領域及び5つのヒト化Vκ領域(Composite Human Antibody(商標)技術を用いて設計された)と共に、IgG1(ギレンツキシマブと同じアロタイプ)重鎖及びカップ軽鎖ベクターにクローニングした。キメラ(VH0/Vκ0)を更にVHベクターIgG1(H310A、H435Q)及びIgG4(S228P、L235E、H310A、H435Q)にクローニングした。ここで、変異H310A及びH435Qは、FcRn結合を消失させる。

【0316】

HEK293 EBNA細胞に一過性にトランスフェクトされた抗体を、単一サイクルBiacore分析によってCAIXに対する結合に関して試験した。6つのIgG1リード抗体(VH3/Vκ2、VH3/Vκ3、VH3/Vκ4、VH4/Vκ2、VH4/Vκ3及びVH4/Vκ4)を、発現レベル及び単一サイクル動態データに基づいて同定した。Biacore多サイクル分析及び競合ELISAによって試験した精製リードは、IgG1キメラ抗体の2倍以内で結合することが示された。

【0317】

iTope(商標)分析、百分率ヒト化、多サイクル動態データ及び競合ELISAデータに基づいて、6つのリードを3つ; VH3/Vκ4、VH4/Vκ3及びVH4/Vκ4に絞った。これらの3つのリード変異体を再クローニングし、抗体を3つの異なるバ

10

20

30

40

50

ックボーン上でCHO-S細胞中で一過性に発現させた(IgG1、IgG1(H310A、H435Q)及びIgG4(S228P、L235E、H310A、H435Q))。全ての抗体を精製し、次いで、Biacore多サイクル動態分析によって試験した。リードヒト化変異体は、3つのIgGバックボーン全てにおいて、同じIgGバックボーンを有するVH0/Vκ0の2倍以内の結合を示した。

【0318】

実施例2：PSMAへの結合のための抗体

概要

2つの抗体、ANT4044及びANT4044-A2の抗体VH遺伝子配列を、非改変IgG1、変異H310A及びH435Q(FcRn結合及びタンパク質A結合を消失させる(Andersen, et al., 2012))を有するIgG1(IgG1(H310A、H435Q))と呼ばれる)及び上記と同じFcRn消失変異を有する改変IgG4を、ヒンジ安定化S228P変異(Angal, et al., 1993)及びFcサイレンシングL235E変異(Reddy, et al., 2000)(IgG4(S228P、L235E、H310A、H435Q))と呼ばれる)と共にコードする3つの異なるヒトIgG二重発現ベクターにクローニングした。各二重発現ベクターは、ANT4044及びANT4044-A2の両方に共通の抗体Vκ遺伝子配列も含んでいた。

【0319】

合計5つの抗体を一過性にトランスフェクトし、CHO細胞中で発現させ、タンパク質A(ANT4044-A2 IgG1)又はタンパク質G(IgG1(H310A、H435Q)及びIgG4(S228P、L235E、H310A、H435Q))の両方としてANT4044及びANT4044-A2の両方)のいずれかを用いて精製した。親和性クロマトグラフィーに続いて、分取サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を行った。

【0320】

抗体の完全性をSDS-PAGE、分析SEC、熱安定性及びBiacoreによるPSMAへの抗原結合によって評価した。更なる試験を、Biacore単一サイクル分析を用いて、ヒトFcガンマ受容体のパネル(FcγRIIIA176F、FcγRIIIA176V、FcγRIIIIB、FcγRIIA167R、FcγRIIIA167H、FcγRIIB、FcγRI)及び新生児受容体、FcRnに対して行った。

【0321】

方法及び結果

抗体-発現プラスミドの構築

ヒト化抗体ANT4044及び親和性成熟したヒト化抗体ANT4044-A2のVH及びVκ配列を使用して、IgG1(pANT18)、IgG1(H310A、H435Q)(pANT71)及びIgG4(S228P、L235E、H310A、H435Q)(pANT73)のpANT二重発現ベクターへのクローニングのための隣接制限酵素部位を有するDNA断片を生成した。VH領域を、各アイソタイプベクター内のMluI制限部位とHindIII制限部位との間にクローニングし、Vκ領域をBssHII制限部位とBamHI制限部位との間にクローニングした。5つの全てのコンストラクトをDNA配列決定によって確認した。

【0322】

抗体の一過性言発現

5つの抗体コンストラクトに対応する無エンドドキシンドNAを調製し、MaxCyte STX(登録商標)エレクトロポレーションシステム(MaxCyte Inc.、Gaithersburg、USA)を使用してCHO-S細胞(ThermoFisher、Loughborough、UK)に一過性にトランスフェクトした。回収に続いて、8mM L-グルタミン(ThermoFisher、Loughborough、UK)及び1xヒポキサンチン-チミジン(ThermoFisher、Loughborough、UK)を含むCD OptiCHO培地(ThermoFisher、Loughborough、UK)中で細胞を 3×10^6 細胞/mlに希釈した。トランスフェ

クシンの24時間後、培養温度を32℃に下げ、1mM酪酸ナトリウム（Sigma、Dorset、UK）を加えた。

【0323】

培養物には、3.6%（出発体積の）供給物（2.5% CHO CD Efficient Feed A（ThermoFisher、Loughborough、UK）、0.5% Yeastolate（BD Biosciences、Oxford、UK）、0.25mM Glutamax（ThermoFisher、Loughborough、UK）及び2g/Lブドウ糖（Sigma、Dorset、UK））の添加により毎日供給した。IgG上清力価をIgG ELISAによって監視し、トランスフェクトした細胞を、上清を回収する前に14日間まで培養した。

【0324】

抗体精製

細胞培養上清を、タンパク質A（ANT4044-A2 IgG1）又はタンパク質G（IgG1（H310A、H435Q）及びIgG4（S228P、L235E、H310A、H435Q）の両方としてANT4044及びANT4044-A2の両方）Sepharoseカラム（GE Healthcare、Little Chalfont、UK）のいずれかに通した。全抗体を1xPBS、pH7.2に緩衝液交換した。タンパク質A又はタンパク質G精製材料を、移動相として1xPBSを使用して、HiLoad（商標）26/600 Superdex（商標）200pg分取SECカラム（GE Healthcare、Little Chalfont、UK）上で流し、その間、モノマー画分を収集し、プールし、濾過滅菌した。SECプロファイルは、抗体、特にANT4044-A2が、IgG4（S228P、L235E、H310A、H435Q）として発現する場合、他のIgGアイソタイプとして発現する抗体と比較して、凝集のより高いレベル（22%まで）を示すことを明らかにした。

【0325】

抗体は、OD280nmを測定し、それらの予測アミノ酸配列に基づいて吸光係数（E_c（0.1%））を使用することによって定量した。

【0326】

分析SEC及びSDS-PAGE

ストックANT4044 IgG1及びタンパク質A又はタンパク質G、続いて分取SEC精製材料を、Superdex（商標）200 Increase 10/300 GL分析カラム（GE Healthcare、Little Chalfont、UK）及び移動相として1xPBSを使用して、分析SECにより分析した。溶出プロファイルは、IgGの正しく折り畳まれたモノマー種に典型的であった。抗体は、非還元SDS-PAGE及び還元SDS-PAGEによっても分析した。VH及びVk鎖の予測サイズに対応するバンドが観察された。

【0327】

熱安定性分析

ストックからの5つの精製抗体及びANT4044 IgG1の熱安定性を評価するために、蛍光ベースの熱シフトアッセイを用いて融解温度（タンパク質ドメインの50%が展開される温度）を決定した。全ての抗体を、SYPRO（登録商標）Orange（ThermoFisher、Loughborough、UK）を含む1xPBS中で100µg/mlの作業濃度に希釈し、StepOnePlusリアルタイムPCRシステム（ThermoFisher、Loughborough、UK）上で25℃から99℃の温度勾配に56分間かけて供した。融解曲線を、タンパク質熱安定性ソフトウェア（バージョン1.2）を使用して分析し、T_mを一次導関数データに基づいて計算した。

【0328】

ANT4044及びANT4044-A2の両方について、IgG1バックボーンは最も熱的に安定であるように見え、両方についての最低融解温度は69.3℃であった。異なるIgGバックボーンを比較すると、ANT4044は、ANT4044-A2と比較

10

20

30

40

50

してより大きい熱安定性を示した。

【0329】

PSMAへの結合の評価

前立腺特異的膜抗原 (PSMA) への結合を評価するために、精製した抗体のそれぞれについて多サイクル動態分析を行った。分析は、Biacore T200評価ソフトウェアV3.0.1 (Uppsala, Sweden) を実行するBiacore T200 (シリアル番号1909913) 装置を用いて行った。直接比較のために、全ての抗体をタンパク質Gチップ (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 上に捕捉した。

【0330】

精製した抗体をHBS-EP+中で $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に希釈した。各サイクルの開始時に、各抗体をタンパク質G表面上に捕捉して、約50RUのRLを得た。捕捉後、表面を安定化させた。任意の潜在的な物質移動効果を最小限にするために、 $35\mu\text{L}/\text{分}$ の流速を使用して動態データを得た。動態分析のために、PSMA (R&D Systems, Minneapolis, U.S.A) を使用した。ブランクの複数の反復 (PSMA) 及び分析物の単一濃度の反復を動態ランにプログラムして、動態サイクルにわたる表面及び分析物の両方の安定性をチェックした。動態分析のために、2倍希釈範囲を25nM ~ 1.5625nM PSMAから選択した。PSMAの結合相を600秒間監視し、解離相を2400秒間監視した。タンパク質G表面の再生は、各サイクルの終わりに、0.5% P20を含む10mMグリシン-HCL (pH1.5) の2回の注入を用いて行った。

【0331】

参照チャンネルFc1からのシグナルをFc2、Fc3及びFc4のシグナルから差し引いて、参照表面への非特異的結合の差を補正し、全体的なRmaxパラメーターを1対1結合モデルにおいて使用した。相対KDは、各抗体のKDを同じチップ上のANT4044 IgG1のKDで割ることによって計算した。

【0332】

ヒトFcRnへの結合の評価

精製された抗体のFcRnへの結合を、Biacore T200評価ソフトウェアV3.0.1 (Uppsala, Sweden) を実行するBiacore T200 (シリアル番号1909913) 装置を用いて、定常状態親和性分析によって評価した。FcRn (Sino Biological, Beijing, China) を、300RUへの標準アミンカップリングを使用して、酢酸ナトリウム (pH5.5) 中 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ でCM5チップ上にコーティングした。

【0333】

精製した抗体を、pH6.0又はpH7.4のいずれかで0.05% P20を含むPBS中37nM~3000nMの5点希釈で滴定した。抗体を、 $30\mu\text{L}/\text{分}$ の流速及び25℃において漸増濃度でチップ上を通過させた。注入時間は30秒、解離時間は100秒であった。単一の解離に続いて、チップを0.1M Tris pH8.0で再生した。

【0334】

予想通り、H310A H435Q変異は、pH6.0でFcRnへの抗体結合を有意に低下させた。非改変IgG1として試験したANT4044及びANT4044-A2抗体の両方は、pH6.0でFcRnに対して類似の親和性を示した。抗体のいずれについても、結合はpH7.4で殆ど観察されなかった。

【0335】

ヒトFcガンマ受容体への結合の評価

高及び低親和性Fcガンマ受容体への精製抗体の結合を、Biacore T200評価ソフトウェアV3.0.1 (Uppsala, Sweden) を実行するBiacore T200 (serial no. 1909913) 装置を使用する単一サイクル分析により、流速 $30\mu\text{L}/\text{分}$ で作動させて評価した。ヒトFc受容体、FcγRI、FcγR

10

20

30

40

50

I I a (167R及び167H多型の両方)、FcγRIIb、FcγRIIIa (176F及び176V多型の両方) 及びFcγRIIbをSino Biological (Beijing, China) から得た。FcγRをHiscapture キット (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を使用して、標準的なアミン化学を用いて予め結合させたCM5センサチップ上に補足した。

【0336】

各サイクルの開始時に、HBS-P+で希釈したHisタグ化Fcγ受容体を、特定のRUレベルまで負荷した。各濃度間で再生しない抗体の5点、3倍希釈範囲を各受容体について使用した。全ての場合において、解離後、チップをグリシン (pH1.5) の2回の注入で再生した。参照チャンネルFc1 (ブランク) からのシグナルを、受容体を負荷したFcのシグナルから差し引いて、参照表面への非特異的結合の差を補正した。

【0337】

センサグラムを、高親和性Fcガンマ受容体FcγRIについての1:1動態について且つ低親和性Fcガンマ受容体についての定常状態結合によって分析した。

【0338】

代表的なセンサグラム

非改変IgG1として発現したANT4044及びANT4044-A2は、全ての高親和性及び低親和性ヒト活性化Fcγ受容体に結合した。IgG1におけるH310A及びH435Qの変異の導入は、この結合に影響を与えなかったが、低親和性ヒトFcγ受容体へのわずかな結合低下傾向が観察された。予想通り、IgG4 (S228P、L235E、H310A、H435Q) 抗体は、全ての活性化Fcγ受容体への顕著に低下した結合を示した。試験した全ての抗体は、阻害性受容体FcγRIIbへの低い親和性結合を示した。従って、IgG1及びIgG1 (H310A、H435Q) の両方はエフェクター機能を刺激できる可能性があるが、IgG4 (S228P、L235E、H310A、H435Q) は、エフェクター機能を刺激する可能性が低い。

【0339】

結論

ヒト化抗PSMA抗体ANT4044及びその親和性成熟変異体ANT4044-A2に対応する可変重鎖及び軽鎖配列を、非改変ヒトIgG1、変異H310A及びH435Q (FcRn結合を消失させる) 又はヒトIgG4 (S228P、L235E、H310A、H435Q) を有するヒトIgG1のいずれかをコードする二重発現ベクターにクローニングした。CHO細胞を一過性にトランスフェクトし、5つの抗体をタンパク質A又はタンパク質G親和性クロマトグラフィー及び分取SECにより精製した。分析SECは、モノマーIgGと一致するプロファイルを示し、凝集の証拠は殆どなかった。ANT4044 IgG1 (ストックから) を含む全ての抗体は、それらの熱安定性と、PSMA、ヒトFcRn及びヒトFcγ受容体への結合の点で特徴付けられた。

【0340】

ANT4044及びANT4044-A2の両方について、IgG1バックボーンは最も熱的に安定であるように見えたが、ANT4044抗体はANT4044-A2抗体と比較してより大きい熱安定性を示した。IgG1 (H310A、H435Q) 及びIgG4 (S228P、L235E、H310A、H435Q) 形式の両方における全ての抗体は、非改変IgG1として発現するそれらの対応物と同様のPSMAへの結合を示した。親和性成熟ANT4044-A2抗体は、ANT4044と比較してPSMAに対して2~3倍大きい親和性を示した。

【0341】

pH6.0でのFcRnへの結合は、H310A、H435Q変異の導入によって有意に低下したが、pH7.4でのFcRnへの結合は、抗体のいずれについても殆ど観察されなかった。

【0342】

ヒトFcγ受容体への抗体結合の分析から、IgG4として発現する抗体におけるL2

10

20

30

40

50

35E変異（S228P、L235E、H310A、H435Q）によって結合が消失することが確認された。変異H310A及びH435Qは、ヒトFcγ受容体への抗体結合に有意な影響を及ぼさず、従って、IgG1及びIgG1（H310A、H435Q）の両方は、同様のエフェクター機能特性を示すと予想される。

【0343】

実施例3：抗体のコンジュゲーション

抗体ANT4044-IgG1、ANT4044-A2-IgG1、ANT4044-IgG1 H310A H435Q（別名ANT4044-IgG1-2M）及びANT4044-IgG4 S228P L235E H310A H435Q（別名ANT4044-IgG4-4M）を、ThioBridge（商標）-PEG（6u）-DOTA試薬又はNHS-DOTA試薬のいずれかにコンジュゲートした。

【0344】

ThioBridge（商標）は、PolyThericsの独自のジスルフィドコンジュゲーションリンカーであり、記載されている。

【0345】

DOTAは、キレーターペイロード、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸モノアミドである。

【0346】

ThioBridge（商標）DOTAコンジュゲーション評価：ANT4044-IgG1を、反応緩衝液（20mMリン酸ナトリウム、pH7.5、150mM NaCl、20mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA））中の6~10mg/mL溶液として調製した。反応緩衝液（6~10mg/mL、40℃）中のANT4044-IgG1に、抗体又はDTT 10mM当たり6~10当量のトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）を添加した。反応緩衝液で希釈することにより、抗体濃度を5mg/mLに調整した。還元混合物を37~40℃で1時間インキュベートした。還元混合物を22℃に冷却した後、試薬を添加した。アセトニトリル中の5.6~8当量のThioBridge（商標）-PEG（6u）-DOTAを混合物に添加し、これを更に反応緩衝液で4mg/mLに希釈した。混合物中のアセトニトリルの百分率は、5%であった。反応混合物を22℃で22時間までインキュベートした。緩衝液交換及び過剰な試薬の除去を、Vivaspin 20フィルター（30kDa MWCO、PES膜、Generon）を用いて14,000rcfでの超遠心分離により行った。サンプルをVivaspin 20フィルター（30kDa MWCO、PES膜、Generon）を用いてDulbeccoのPBS pH7.2~7.5中に7~9回交換した。抗体-ThioBridge（商標）DOTAコンジュゲート濃度をUV-visにより測定し、DulbeccoのPBS pH7.2~7.5を用いて4.0mg/mLに補正し、滅菌濾過し（0.22μm酢酸セルロースフィルター）、-80℃で保存した。

【0347】

リシン-DOTAコンジュゲーション評価：ANT4044-IgG1を、0.1M NaHCO₃及び20mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、pH8~9（反応緩衝液）中の6mg/mL溶液として調製した。次に、DulbeccoのPBS pH7.2~7.5中の1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸モノ-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルヘキサフルオロホスフェートトリフルオロ酢酸塩（NHS-DOTA試薬）を5.0mg/mLで調製した。10~25当量のNHS-DOTA試薬溶液を加え、反応緩衝液を加えて抗体濃度を4.0mg/mLに補正した。22℃で2~3時間インキュベートした。次に、0.2M酢酸ナトリウム、pH5.5（4:1v/v）を加えてクエンチし、Vivaspin 20フィルター（30kDa MWCO、PES膜、Generon）を用いて14,000rcfで超遠心分離した。希釈及び超遠心分離を更に2回繰り返した。次いで、緩衝液をVivaspin 20フィルター（30kDa MWCO、PES膜、Generon）を用いてDulbeccoのPBS pH7.2~7.5中に4回交換した。抗体-DOTAコンジュゲ

ート濃度をUV-visにより測定し、DulbeccoのPBS pH7.2~7.5を用いて4.0mg/mLに修正し、滅菌濾過し(0.22μm酢酸セルロースフィルター)、-80℃で保存した。小規模反応及び精製を最初に行って、適切なコンジュゲーション条件を同定した。コンジュゲーションの程度、純度及び存在する残留試薬を確認するために、分析SEC及び分析LC-MS方法を開発した。コンジュゲーションは両方の試薬について有効であることが見出された。いずれの試薬も、コンジュゲーション中又はコンジュゲーション後に凝集をもたらさなかった。リシンコンジュゲートは、より広い範囲の様々なDOTA負荷種を示し、LC-MS分析のためにThioBridge(商標)コンジュゲートよりも多い量を必要とした。試験した全てのサンプルは、LC-MSにより、4.0~4.2の平均DAR(ThioBridge(商標)コンジュゲート)及び3.8~4.9の平均DAR(リシンコンジュゲート)を有することが示された。

【0348】

実施例4 CAIXに結合する抗体の薬物動態分析

本発明の様々な抗体の薬物動態(PK)特性をマウスモデル、B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJにて決定した。

【0349】

B6.Cg-Fcgrt^{tm1Dcr} Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJマウス(Tg32)は、ヒト内因性FcRnプロモーターにより駆動されるそれらの導入遺伝子により、FcRn(hFcRn)発現についてヒト化されている。公開された組織FcRn発現及びヒトIgG PKデータは、ヒト患者データと酷似しており、IgG PK分析のゴールドスタンダードとしての役割を有するもの、非ヒト霊長類から得られたデータよりも、ヒトのデータとの相関が高い。このPK試験で使用されたTg32マウスは、Tg(FCGRT)32Dcr導入遺伝子についてヘミ接合性であり、抗体の半減期が中間範囲で最適以下に最大化され、抗体-hFcRn親和性差が測定されることを可能にする。

【0350】

以下の抗体の薬物動態を決定した：キメラギレンツキシマブ(ChGmAb)、ヒト化ギレンツキシマブ(HuGmAb)、FcRn結合ドメイン(HuGmAb-FcRn)にアミノ酸置換を含むヒト化ギレンツキシマブ並びにFcRn結合及びFcガンマ受容体結合ドメイン(HuGmAb-FcRg)にアミノ酸置換を含むヒト化ギレンツキシマブ。

【0351】

方法

抗体のそれぞれを、5mL/kgの体積で5mg/kgでTg32ヘミ接合性マウスに静脈内投与した。

a) インビボ試験設計

i) Tg32マウスを表1に概述されるように、6マウス/グループで4グループに分配する。

ii) 全マウスを秤量し、25μL血液サンプルを、化合物投与の1日前、時間0において、抗凝血薬としてのK3EDTAと共に収集して、プレブリード(pre-bleed)として機能させた。小径キャピラリーチューブ(Drummond #1-000-0250)を使用して血液を後眼窩洞から収集し、血液サンプルを処理して血漿とした。10マイクロリットルの血漿サンプルを保存緩衝液(PBS中50%グリセロール)で1/10に希釈し、特殊96ウェル保存プレート内で瞬間冷凍し、-20℃で保存した。

iii) 0時間において、試験物品をIV注射として、用量体積5mL/kgの5mg/kgでTg32マウスに投与した。

iv) 血液サンプルを出血スケジュールに従って30分並びに1、2、3、5、7、10及び14日に各マウスから収集した。血液サンプルを処理して血漿とし、上述のように貯蔵した。

v) 14日インビボ実験の終わりに、試験サンプルをELISAで評価した。

【0352】

結果

図1 Aは、試験した抗体の血清半減期を示す。結果は、FcRn結合部位又はFcRn及びFcガンマ受容体結合部位にアミノ酸置換を有する抗体の抗体半減期の有意な低下を明らかに示す。

【0353】

実施例5：PSMAに結合する抗体の薬物動態分析

実施例1に記載したものと類似の方法論を用いて、以下の抗体の血清半減期を評価した：J591 IgGリシンDOTAコンジュゲート（PSMAへの結合についての対照抗体）、ANT4044リシンDOTAコンジュゲート（ANT4044-K-DOTA）、ANT4044-A2リシンDOTAコンジュゲート（ANT4044-A2-K-DOTA）、FcRn結合領域にアミノ酸置換を有するANT4044、リシンDOTAコンジュゲート（ANT4044-FcRn-K-DOTA）並びにFcRn及びFcガンマ受容体結合領域にアミノ酸置換を有するANT4044、リシンDOTAコンジュゲート（ANT4044-FcRg-K-DOTA）。結果を図1 Bに示す。

10

【0354】

図2は、各試験抗体についての平均曲線下面積（AUC、上）及びクリアランス（CL、下）を示す。エラーバーは、平均の標準誤差を表す。

【0355】

実施例6：体内分布及び腫瘍蓄積試験

マウスモデルにおけるLNCaP細胞への本発明の異なる抗体の比較標的化の定量分析を評価した。

20

【0356】

抗体の放射標識及びTLC分析。

試験抗体は、

1. ANT4044-IgG1+DOTA（「JN005」）
2. ANT4044-A2-IgG1+DOTA（「JN008」）
3. ANT4044-IgG1（FcRn）+DOTA（「JN007」）
4. ANT4044-IgG4（FcRn/FcRガンマ）+DOTA（「JN006」）
5. HuJ591 IgG1+DOTA（PSMAへの結合についての対照）であった。

【0357】

全ての抗体を0.1M pH5.5酢酸アンモニウム緩衝液中で、生体分子の200倍過剰で⁶⁴Cuと共に室温で45分間インキュベートした。各溶液のサンプルを採取し、50mM EDTAと1:1で混合した。5μLの各溶液をTLC紙（シリカゲルを含浸させたAgilent iTLC-SG Glassマイクロファイバークロマトグラフィ紙）上にスポットし、50:50 H₂O:エタノールで流した。次いで、プレートをCarestream MSFX画像化システム上で、放射性同位元素リン光スクリーンを用いて画像化した。必要な場合、非結合銅を7 K MWCO Zeba Spinカラム（Thermo Scientific）を使用して、製造業者のプロトコルに従って除去した。全てのサンプルは、>95%標識を示した。

30

【0358】

対照実験を行って、遊離Cu-64及びEDTAに結合したCu-64の溶出挙動を品質管理のために監視した。

40

【0359】

腫瘍開始及び増殖

8週齢のオスBalb/Cヌードマウスに、100μLリン酸緩衝生理食塩水中の5×10⁶ LNCaP細胞を各マウスの右脇腹にて皮下注射した（27G針）。

【0360】

抗体溶液を、尾静脈（29G）を介して注射し、次いでマウスをSiemens Inveon PET-CT 装置を使用して画像化するか、又は尾切断により血液を収集し、示された時点での血液濃度分析のためにガンマカウンターにより活性を測定した。

50

【0361】

画像化プロトコル

マウスに、イソフルラン (IsoFlo、Abbott Laboratories) で、閉鎖した麻酔誘導チャンバ内において用量2%で麻酔をかけた。マウスを眼球及び足反射を用いて監視して、深い麻酔を確認した。マウスに深い麻酔をかけた後、マウスを適切な動物ベッド上に置き、ここで、麻酔空気混合物(1%)を、鼻円錐部を通して鼻及び口腔に送達した。生理学的監視(センサプローブを使用した呼吸)を、動物監視システム (BioVet™システム、m2m Imaging、Australia) を使用して、全実験を通して達成した。画像は、抗体の尾静脈内注射後、Siemens Inveon PET-CTスキャナーを使用して獲得した。

10

【0362】

注射器を放射性同位元素溶液(約150 µL)で満たし、注射器内の活性を、校正係数35を有する線量キャリブレーター (Capintec CRC-25) を使用して測定した。尾静脈注射後の注射器内に残留した活性を、同じ線量キャリブレーターを使用して測定し、各マウスに注射した総体積を計算した。

【0363】

PET/CTスキャナーの校正は、放射線源としてCu-64溶液の線量を含む自社製ファントムを用いて行った。

【0364】

マウスをスキャナーベッド上に位置付け(社内で開発したベッドを使用して1スキャン当たりn=4)、解剖学的同時登録用のマイクロCTスキャンを獲得した。マウスのCT画像を、電圧を80 kVに設定し、電流を500 µAに設定して、X線源を介して獲得した。スキャンは120の回転ステップを有する360°回転を用いて、低拡散率及びビニング係数4で行った。曝露時間は230 msであり、有効ピクセルサイズは106 µmであった。Fieldkamp再構成ソフトウェア (Siemens) を使用してCT画像を再構成した。CT画像化後、放射性トレーサの注射から8時間、24時間及び48時間後、30~60分の静的取得を用いてPETスキャンを獲得した。PET画像を、サブセット化による期待値最大化法 (ordered-subset expectation maximisation) (OSEM2D) アルゴリズムを用いて再構成し、CT及びPET画像の融合と目的の領域 (ROI) の画定を可能にするInveon Research Workplaceソフトウェア (IRW 4.1) (Siemens) を使用して分析した。個々の各動物のCT及びPETデータセットを、IRWソフトウェア (Siemens) を使用して整合して、目的の器官の良好な重ね合わせを確実にした。3つの三次元ROIを、形態的CT情報を使用して、全身並びに心臓、腎臓、肺、膀胱、肝臓、脾臓、腸及び腫瘍などの目的の全器官内に配置して器官を描写した。1ボクセル当たりの活性を、既知の活性のCu-64で満たした円筒形ファントムをスキャンすることにより得られた変換係数を使用してnci/ccに変換して、PETスキャナー効率を明らかにした。次いで、活性濃度を、組織1 cm³当たりの減衰補正注入活性のパーセントとして表した。これは注入線量/g (%ID/g) の百分率として近似され得る。

20

30

【0365】

次いで、腫瘍対血液比を、血液中で検出された活性に対する腫瘍中で検出された活性として計算した。

40

【0366】

結果

マウスを注射後8、24及び48時間で画像化した。48時間の時点後、器官をガンマ計数及び器官分布の定量のために回収した。

【0367】

目的の領域を腫瘍縁 (CTスキャンにより描写された) の周りで描き、抗体の濃度を画像検査において (%注入線量に基づいて) 各マウスについて計算した。図3~6及び8は、インビボ及びエクスピボで (ガンマカウンターにより) 測定した器官蓄積を示す。イン

50

ビボとエクスピボとの間の量の変動は、インビボプロットのためのROI及びバックグラウンドシグナルに起因して生じる。 $n s \quad P > 0.05$ 、 $* P \leq 0.05$ 、 $** P \leq 0.01$ 、 $*** P \leq 0.001$ 、 $**** P \leq 0.0001$

【0368】

図7は、注射後5日までの抗体の血中濃度を示す。

【0369】

インビボ画像化は、全抗体について腫瘍蓄積及び長期局在化（2日を超える）を示した。異なる抗体間で統計的有意差はなく、腫瘍中の量は、48時間後に約5% ID/gであった。

【0370】

エクスピボ分析は、全抗体について48時間の体内分布を示した。この時点で、腫瘍蓄積は抗体の最高濃度を有し、肝臓、脾臓及び肺が続いた。

【0371】

JN005は、他の変異体（J591を除いて）よりも低い肝臓及び脾臓蓄積を示す。これは、遥かに長い循環時間においても明らかである（120時間において約10% ID/gのJN005がなお循環している）。

【0372】

120時間後に血液サンプルを採取することによって薬物動態評価を行った。最も注目すべき観察事項は、他の抗体と比較して速いJN007のクリアランスであった。

【0373】

血液サンプルは、抗体の腫瘍：血液比の計算のためにも使用した。抗体のそれぞれについての腫瘍：血液比（インビボ：テールブリード（tail bleed））を、8時間、24時間及び48時間の時点について決定した。結果を図9に示す。図10は、48時間及び120時間での腫瘍：血液比（エクスピボ：エクスピボ）を示す。

【0374】

腫瘍：血液比は、抗体JN005（ANT4044-IgG1+DOTA）及びJ591と比較して、抗体JN006（ANT4044-IgG4（FcRn/FcRガンマ）+DOTA）及びJN007（ANT4044-IgG1（FcRn）+DOTA）が全ての時点で有意に高い。120時間での比が特に著しく、FcRn結合改変及びFcRn/Rfガンマ受容体結合改変抗体についての腫瘍：血液比が非改変抗体の比の約200倍であった。

【0375】

考察

試験抗体のいくつかは、有意に低下した血清半減期（及び増加したクリアランス）を有するにもかかわらず、腫瘍に蓄積する全抗体の量は統計的に異ならなかった。これらの結果は、それが抗体のそれぞれの腫瘍負荷が同じであり、FcRn及びFcガンマ受容体改変がJN007及びJN006抗体のクリアランスを有意に増加させ、血清半減期を低下させたにもかかわらず、全ての抗体がそれらの標的エピトープに対して同様の結合親和性を有し、また全ての抗体が標的部位に送達される同様の能力を有したことを示す点で、驚くべきことである。

【0376】

この結果は、放射性標識抗体のFcRn又はFcRn及びFcガンマ受容体結合ドメインの改変が腫瘍中に蓄積するその能力に関して抗体の治療可能性に影響を及ぼすことなく、循環中の放射性同位元素の量を減少させるのに有意な有用性を有することを示す。これは、さもなければ循環中の放射性同位元素のより長期の滞留から生じるであろう多くの毒性効果（血液毒性、骨への吸収及び骨髄照射を含む）を減少させることを含む、多くの利点を有する。

【0377】

実施例7：本発明の例示的な抗体の ^{177}Lu 画像化及び放射線療法有効性試験
試験物品

10

20

30

40

50

1. TXP02-JN007 (ANT4044-FcRn-K-DOTA)
2. TXP02-JN005 (ANT4044-K-DOTA)
3. PSMA-617 (PSMA結合ペプチド)

第1相化学：画像化試験

標識の概要：JN007、JN005。

【0378】

ANT4044は、本明細書に記載されている抗PSMA抗体である。ANT4044-FcRnは、重鎖定常鎖のFcRn結合領域が、血清半減期を低下させるように改変されている、抗体の改変形態である。ANT4044-FcRn-K-DOTAは、リシン残基を介してキレーターDOTAにコンジュゲートされたANT4044-FcRnである。

10

【0379】

150 μ gのANT4044-FcRnを500MBqのLu-177で、37℃での2時間のインキュベーションで標識した。標識効率は、81%であった。反応混合物をNAP-5カラム上でPBS中に精製し、その後の標識効率は98%であった。標識抗体を含む画分を収集した。20MBqのLu-177で標識されたそれぞれ10 μ g、100 μ g及び370 μ gを含む用量を、適切な量の非標識ANT4044-FcRn抗体及びPBSを加えることにより調製した。

【0380】

500 μ gのANT4044抗体を100MBqのLu-177で、37℃での2時間のインキュベーションで標識した。標識効率は98.2%であった。製剤をPBS中に希釈し、更に精製することなく使用した。

20

【0381】

第2相化学：有効性試験

標識の概要：PSMA-617、ANT4044-FcRn。

6 μ g (4 nmol)のPSMA-617 (6 μ lの水中1mg/ml溶液)を0.1M酢酸アンモニウム緩衝液(pH5.5)中で200MBq Lu-177で標識し、95℃まで10分間加熱した。標識効率は97.6%であった。製剤をPBS中に希釈し、更に精製することなく使用した。

【0382】

300 μ g ANT4044-FcRnを120MBq Lu-177で標識した。37℃で2時間のインキュベーション後の標識効率は、96.5%であった。製剤を5 μ l 0.1M EDTAを加えることによりクエンチし、PBS中に希釈し、更に精製することなく使用した。

30

【0383】

第1相 — 画像化試験設計

1. 第1相試験のために、適切な腫瘍サイズ(150~300mm³)を有する動物を、試験中、以下の投与量を有するn=3の4グループに配置した。

a. グループ1：200 μ lの10 μ g [¹⁷⁷Lu] TXP02-ANT4044-FcRn、外側尾静脈中への静脈内(iv)注射。

40

b. グループ2：200 μ lの100 μ g [¹⁷⁷Lu] TXP02-ANT4044-FcRn、外側尾静脈中へのIV注射。

c. グループ3：200 μ lの370 μ g [¹⁷⁷Lu] TXP02-ANT4044-FcRn、外側尾静脈中へのIV注射。

d. グループ4：200 μ lの100 μ g [¹⁷⁷Lu] TXP02-ANT4044、外側尾静脈中へのIV注射。

2. 抗体体内分布を、SPECT/CT画像化を介して抗体注射後4、24及び48時間で評価した。

a. 全身静的SPECT画像を獲得した後、解剖学的参照に関する全身CTを獲得した。

b. SPECTスキャン時間は、1スキャン当たり40分であり、CTスキャン時間は

50

12分であった。

c. 動物を多マウスホテル内で、1度に3匹画像化した。

3. 腫瘍体積を週に3回、キャリパー測定により評価した。動物を任意の悪影響について検査し、規則的に秤量した。

4. 動物を選択するために、組織を更なるエクスピボ分析のために収集した。

5. 残りの動物を殺し、死体を廃棄した。

【0384】

第2相 — 有効性試験設計

1. 有効性試験のために、適切な腫瘍サイズ ($150 \sim 300 \text{ mm}^3$) を有する動物を、試験中、以下の投与量を有する $n = 6$ の3グループに配置した。

a. グループ1: $200 \mu\text{L}$ の $50 \mu\text{g}$ [^{177}Lu] TXP02-ANT4044-FcRn、IV

b. グループ2: $200 \mu\text{L}$ の 600 ng [^{177}Lu] PSMA-617、IV

c. グループ3: $200 \mu\text{L}$ PBS、IV

2. 試験薬剤注射後、腫瘍サイズをキャリパー測定により週に3回、3週間評価した。

3. 動物を任意の悪影響について検査し、規則的に秤量した。

4. 血液サンプルを尾穿刺方法によりグループ1及び2の動物から0.5、4、8、24、48、72、96、120時間に採取し、ガンマ計数により評価した。

5. 全血サンプルを秤量した後、参照基準を有するガンマカウンターで計数した。

6. 初期の試験では、目的は処置後5週間の腫瘍増殖を監視することであった。この時間枠は、[^{177}Lu] TXP02-ANT4044-FcRnマウスの数匹に観察された放射線障害のために減少させた。

7. 動物を選択するために、組織を更なるエクスピボ分析のために収集した。

8. 残りの動物を殺し、死体を廃棄した。

【0385】

結果及び考察

図11は、異種移植マウスにおける [^{177}Lu] TXP02-ANT4044-FcRn分布の例示的な画像である。

【0386】

図12は、マウスからの血液中で測定した [^{177}Lu] TXP02-ANT4044-FcRn放射能レベルのプロットである。

【0387】

図13は、本試験で決定された腫瘍増殖のプロットである。ANT4044-FcRn-DOTA-Lu処置は、0日目と比較して14日目に腫瘍体積の変化がないことから明らかのように、腫瘍増殖を有意に抑制した。対照 (PBS) グループでは、腫瘍体積の全体的な増加があり、ANT4044-FcRn-DOTA-Lu処置グループの対応する時間と比較した場合、腫瘍は、9、12及び14日において有意に大きくなった。

【0388】

試験 (JN007) 及び比較 (comparator) (JN005) 抗体の両方の標識は成功であり ($> 96\%$ 標識効率)、 $2 \text{ MBq} / \mu\text{g}$ の最大特異的活性が達成された。

【0389】

画像化試験は、試験及び比較抗体の両方の、LNCaP腫瘍異種移植片への取込みを示した (表3を参照されたい)。

【0390】

心臓の左心室内に描かれた小さいROIにより推測されるように、血液クリアランスは、注射後48時間で、JN005抗体の同じ時点と比較して、全グループについてJN007抗体がより速かった (表4を参照されたい)。

【0391】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表3: 4、24及び48時間における ^{177}Lu TXP02-JN007及び ^{177}Lu TXP02-JN005腫瘍
取込み

グループ	質量用量 (μg /動物)	画像化トレーサー	線量放射能 (Mbq /動物, 平均 $\pm$ SD)	4時間: 腫瘍 %ID/g (平均 $\pm$ SD) ^t	24時間: 腫瘍 %ID/g (平均 $\pm$ SD)	48時間: 腫瘍 %ID/g (平均 $\pm$ SD)
1	100	^{177}Lu TXP02- JN007	19.4 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.4	6.9 $\pm$ 1.2	8.3 $\pm$ 1.7
2	100	^{177}Lu TXP02- JN005	19.7 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 0.2	16.8 $\pm$ 1.2	23.7 $\pm$ 0.8

10

【 0 3 9 2】

【表 2 3】

表4: 4、24及び48時間における ^{177}Lu TXP02-JN007及び ^{177}Lu TXP02-JN005
心臓(血液)取込み

グループ	質量用量 (μg /動物)	画像化トレーサー	線量放射能 (Mbq /動物, 平均 $\pm$ SD)	4時間: 血液 %ID/g (平均 $\pm$ SD)	24時間: 血液 %ID/g (平均 $\pm$ SD)	48時間: 血液 %ID/g (平均 $\pm$ SD)
1	100	^{177}Lu TXP02- JN007	19.4 $\pm$ 0.6	11.7 $\pm$ 1.7	3.0 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1
2	100	^{177}Lu TXP02- JN005	19.7 $\pm$ 0.7	16.5 $\pm$ 1.1	10.0 $\pm$ 0.6	7.8 $\pm$ 0.9

20

30

【 0 3 9 3】

図 1 4 は、J N 0 0 7 抗体 (F c R n 結合を低下させるように改変した本発明の抗 P S M A、K - D O T A - L u 抗体 - H u X 5 9 2 R - D O T A - L u 1 7 7 と呼ばれる) の投与後のマウスにおける腫瘍：血液比のプロットである。

【 0 3 9 4】

対照マウス (J N 0 0 5、即ち F c R n 結合領域に改変を有さない抗 P S M A、K - D O T A - L u 抗体 H u J 5 9 1 - D O T A - L u 1 7 7 を受けた) と比較して、F c R n 改変抗体を受けたマウスは、血液と比較して腫瘍中の抗体の比が高かった。

40

【 0 3 9 5】

実施例 8：P E T 造影剤のインビボ評価

試験抗体

F c R n - G m A b = ^{89}Zr - D F O s q - F c R n - G m A b (F c R n 結合を低下させるように改変した本発明の抗 C A I X 結合抗体、ジルコニウムで標識)。

c G m A b - C H O = ^{89}Zr - D F O s q - c G m A b - C H O (F c R n 結合を低下させるための改変を含まない、本発明の抗 C A I X 結合抗体、ジルコニウムで標識)。

【 0 3 9 6】

実験方法

50

・メスBalb／Cマウス（Australian BioResources、NSW、8週齢）の右脇腹の皮下に、50% Matrigel中の 5×10^6 HT-29細胞を接種した；

・9匹のHT-29腫瘍保持マウスの静脈内に3 MBq FcRn-GmAb又は3 MBq cGmAb-CHOを体積120～130 μ lでそれぞれ注射した；

・注射後4、24、48及び144、3匹のマウスにイソフルランを使用して麻酔をかけ、G8 PET／CTスキャナー（Perkin Elmer）の画像化ベッド上に置いた；

・CTスキャンを行い、直後に10分の静的PETスキャンを行った；

・PET画像を最尤推定－期待値最大化（maximal likelihood and expectation maximization）（ML-EM）アルゴリズムを使用して再構成し、VivoQuant（Invicro）を使用して分析した。腫瘍SUVmax、腫瘍SUVmax／バックグラウンド平均（TBR）（ここで、バックグラウンドは、縦隔取込み、腫瘍SUVmax／肝臓平均（腫瘍：肝臓）及び腫瘍SUVmax／骨平均（腫瘍：骨）を表し、骨は、腓骨と脛骨との間の関節の周りの高い取込み領域を表す）を決定した。

・3匹の動物のコホートを24時間、48時間及び144時間での画像化後に安楽死させ、選択された組織を除去し、秤量し、ガンマカウンターで計数した。トレーサー取込みを、パーセント注射用量／グラム組織として計算した。

・データの統計分析をGraphPad Prism 7を使用して行った。

【0397】

結果

FcRn-GmAb及びcGmAb-CHOを注射したマウスのPET画像を得た。PET画像の定量化を図15に示す。各トレーサーについての組織体内分布データを図16に概述する。

【0398】

FcRn-GmAb PET画像は、4時間p.i.で相当の肝臓蓄積と144時間p.i.で中程度の腫瘍取込みを示す。対照的に、cGmAb-CHO画像は、144時間p.i.で最少の肝臓蓄積と高い腫瘍取込みを示す。PET画像の分析は、cGmAb-CHOの腫瘍取込みが4～48時間に直線的に増加し、その後、レベルが定常に達し始めたことを示す（図15、左上パネル）。FcRn-GmAbの最大腫瘍取込みは、24時間に見られ、トレーサーウォッシュアウトは144時間に明らかであった。cGmAb-CHO腫瘍SUVmaxは、24、48及び144時間p.i.で、FcRn-GmAbのものよりも有意に高かった。（ $P < 0.0001$ 、Sidakの多重比較検定）。

【0399】

バックグラウンドに対するcGmAb-CHO腫瘍の比（TBR）は、4～144時間にわたって直線的に増加した一方、FcRn-GmAb TBRは、4時間～24時間で増加した後定常に達した（144時間まで）（図15、右上パネル）。肝臓に対するcGmAb-CHO腫瘍の比（TLR）は48時間まで直線的に増加し、その後、定常に達する一方、FcRn-GmAb TLRは24時間まで増加し、その後、144時間に4時間レベルに低下した（図15、左下パネル）。

【0400】

PET画像化結果と一致して、体内分布データ（図16）は、（i）FcRn-GmAbと比較して遅い、血液、肺、腎臓、筋肉、骨及び腫瘍からのcGmAb-CHOのウォッシュアウト；（ii）24、48及び144時間でのFcRn-GmAbよりも低いcGmAb-CHOの肝臓及び脾臓取込み；（iii）cGmAb-CHOの腫瘍取込み及び保持は、0.0002、t検定）においてFcRn-GmAbよりも有意に高かったことを示す。cGmAb-CHOグループにおいて、 $n = 2$ として24時間での分析は行わなかった。

【0401】

10

20

30

40

50

実施例 9：本発明の例示的な抗体の治療有効性

試験抗体

1. HuX592R (ANT4044-FcRN)。
2. HuJ591 (ANT4044)。

【0402】

抗体の放射標識及びTLC分析

全ての抗体を0.1M pH5.5酢酸アンモニウム緩衝液中で、HuX592R及びHuJ591について各生体分子の50倍又は100倍過剰で ^{177}Lu と共に室温で45分間インキュベートした。各溶液のサンプルを採取し、50mM DTPAと1:1で混合した。5 μL の各DTPAインキュベートサンプル又はニート溶液をTLC紙（シリカゲルを含浸させたAgilent iTLC-SG Glassマイクロファイバークロマトグラフィー紙）上にスポットし、50:50 H₂O:エタノールで流した。次いで、Eckert及びZiegler Mini-Scan及びFlow-Countシステムを使用して放射標識種移動の検出を達成した。全てのサンプルは、>90%標識を示した。対照実験を行って、遊離 ^{177}Lu 及びDTPAに結合した ^{177}Lu の溶出挙動を品質管理のために監視した。

【0403】

細胞結合

Lu-標識コンストラクトHuX592R及びHuJ591を細胞結合について評価した。

【0404】

要約すれば、0.100mL PBS中の 1.25×10^5 PC-3腫瘍細胞（陰性対照）又は 1.25×10^5 LNCaP腫瘍細胞を含むエッペンドルフチューブを、5 μL (0.030MBq) の標識抗体と共に37°Cでインキュベートする。インキュベーションは、分析のために以下の時点で停止した：1時間、2時間、4時間及び24時間。

【0405】

非結合分率の決定。

各インキュベーション期間の終わりに、エッペンドルフチューブを500gで5分間遠心分離する。遊離Lu-177抗体を含む上清を別個のチューブに回収し、ガンマ分析を用いて計数した。Lu-177 標識抗体と結合した細胞を含むペレットを、0.200mLのPBS溶液で洗浄し、500gで5分間、3回繰り返して遠心分離した。各洗浄の上清を収集及び計数し、値を回収したインキュベーション上清と組み合わせて、遊離非結合抗体の合計を得た。

【0406】

表面結合分率の決定。

ペレットを、pH4.0の0.1mL PBS中に20分間、氷冷温度で再懸濁した。次いで、エッペンドルフチューブを4°Cにおいて500gで5分間遠心分離し、上清を計数のために収集した。氷冷PBS pH4.0で更に3回洗浄した後、上清をガンマ計数のために収集した。

【0407】

内部化分率の決定。

洗浄及び遠心分離後、細胞ペレットを内部化分率として計数した。

【0408】

タンパク質濃度

細胞を1M NaOHで可溶化し、タンパク質濃度を決定した。

【0409】

計算

腫瘍細胞へのLu-177抗体の結合（表面結合及び内部化分率）及び非結合抗体を計算し、タンパク質の1mg当たりインキュベートした総放射能の百分率として報告した。

【0410】

動物

6週齢の健康なオスB a l b / Cヌードマウス（約20 g）をA R C（W e s t e r n A u s t r a l i a）から獲得し、この試験に使用した。細胞の注射前に環境に順化させるために、マウスを試験前に1週間監視した。全動物に、実験前及び実験中、食物及び水への自由なアクセスを提供した。

【0411】

投与

注射器を放射標識抗体溶液（約100 μ L）で満たし、注射器内の活性を、較正係数35を有する線量キャリブレーター（C a p i n t e c C R C - 2 5）を使用して測定した。尾静脈注射後の注射器内に残留した活性を、同じ線量キャリブレーターを使用して測定し、各マウスに注射した総体積を計算した。

【0412】

耐容性

健康なオスB a l b / Cヌードマウス（1投与コホート当たり $n=3$ ）に、 ^{177}Lu -標識H u X 5 9 2 Rを合計3回、7日間隔で注射（29 G、約100 μ L生理食塩水中での尾静脈注射）して、1マウス当たり約100 μ gの大量投与で6、9又は12 MBqの注入線量を与えた。次いで、注射後にマウスの健康を監視し、最初の注射の28日後に全マウスを殺し、器官をP F A中に固定し、30%ショ糖に移動し、必要であれば、将来の分析のために凍結保存する前に崩壊させた。

【0413】

体内分布

健康なオスB a l b / Cヌードマウス（1コホート当たり $n=3$ ）に、 ^{177}Lu -標識コンストラクトを注射（29 G、尾静脈注射生理食塩水）して、1マウス当たり100（H u X 5 9 2 R）又は140（H u J 5 9 1） μ gの大量投与で6 MBqの注入線量を与えた。次いで、動物を注射後24、48及び72時間（H u X 5 9 2 Rの場合）及び72時間（H u J 5 9 1の場合）で犠牲にした。血液をサンプリングし、組織を収集し、過剰な血液を洗浄し、エクスピボ分析のために秤量した。P e r k i n P e r k i n E l m e r 2 4 8 0 A u t o m a t i cガンマカウンターを使用して組織中の放射能を測定した。ガンマカウンターを ^{177}Lu の既知のサンプルを使用して較正し、測定した活性を注射活性に基づく組織重量の% I D / gとして表した。

【0414】

腫瘍開始及び増殖

オートラジオグラフィー及び治療試験のために、8～12週齢のオスB a l b / Cヌードマウスに、50 μ L 50:50リン酸緩衝生理食塩水中の 4×10^6 L N C a P細胞を各マウスの右脇腹にて皮下注射した（27 G針）。細胞注射時に潰瘍の証拠は存在せず；動物を綿密に監視し、腫瘍をキャリパーで測定し、固形腫瘍の増殖とは別に良好な状態を維持した。腫瘍増殖はL N C a P腫瘍に度々観察されるように散発的であり、腫瘍が100～200 mm³に達したらマウスを適切な試験アームに登録した。

【0415】

オートラジオグラフィー

腫瘍保持オスB a l b / Cヌードマウス（1コホート当たり $n=2$ ）に、 ^{177}Lu -標識コンストラクトを注射（29 G、約100 μ L生理食塩水中での尾静脈注射）して、1マウス当たり100（H u X 5 9 2 R）又は140（H u J 5 9 1） μ gの大量投与で6 MBqの注入線量を与えた。次いで、動物を注射の7日後に犠牲にし、腫瘍サンプルをイソペンタンドライアイススラリー中でスナップ凍結した後、切片化のためにO C T化合物中に包埋した。20 μ m切片をスライド上に収集し、風乾した後、密閉カセット中の蛍光スクリーン上で約3.5時間露光した。次いで、A m e r s h a m T y p h o o n P h o s p h o r i m a g eを使用して、感度設定1000で ^{177}Lu に対して最適化して、50 gmのピクセルサイズ（スキャン時間20～30分）を使用して画像を得た。I m a g e Q u a n t T Lソフトウェアを使用して、画像を分析した。

【0416】

治療試験

腫瘍保持オスB a l b / Cヌードマウス（1コホート当たりn = 6）に、 ^{177}Lu -標識コンストラクトを注射（29 G、約100 μL 生理食塩水中での尾静脈注射）して、1マウス当たり100 μg のHuX592R又は140 μg のHuJ591の大量投与で6若しくは8 MBqのHuX592R又は6 MBqのHuJ591の注入線量を与えた。治療に応答する腫瘍増殖を、ビヒクルのみの対照と比較して、90日間にわたって監視した。

【0417】

結果

HuX592R及びHuJ591の両方が、 ^{177}Lu 標識の成功を示した。これらの ^{177}Lu 標識コンストラクトを、細胞結合、耐容性、体内分布及び治療有効性試験に直接使用した。

【0418】

細胞結合

^{177}Lu -標識HuX592R及びHuJ591の結合を、LNCaP（PSMA+）及びPC3（PSMA-）細胞株に対して評価した。非結合、表面結合及び細胞ペレット結合分率を、細胞にコンストラクトを加えた1、2及び4時間後に評価した。細胞アッセイは、HuJ591及びHuX592Rの両方が、PSMA発現細胞株において向上した蓄積を示し、細胞ペレットにおいて観察された最高濃度は、アッセイ期間中（全ての時点で）の内部化の成功を示した。最小限の結合／内部化が一般にPSMA陰性細胞株（PC3）において観察され、結合は受容体依存性であり、標識は受容体への抗体結合を有意に妨害しないことが示された。

【0419】

耐容性

健康なオスB a l b / cヌードマウス（1コホート当たりn = 3）における ^{177}Lu -標識HuX592Rの耐容性を、1週間隔で3回投与した3用量レベル、12、9及び6 MBqで評価した。動物の健康を、動物の体重及び動物スコアシートにより、治療的投与の3週間を含む4週間評価した。この試験では、12 MBqの線量が高すぎることが見出され、それにより全試験は6 MBq及び8 MBqの線量を用いて行った。

【0420】

体内分布

健康なオスB a l b / cヌードマウス（1コホート当たりn = 3）における ^{177}Lu -標識コンストラクトの体内分布を、HuX592Rでは投与の24、48及び72時間後に（図17A）、HuJ591では投与の72時間後のみに（図17B）評価した。結果は、HuX592Rと比較してHuJ591の循環時間が有意に高いことを示し、肝臓及び脾臓などのクリアランス器官における蓄積は同等に低いレベルであり、系によるより急速なクリアランスを示唆した。

【0421】

オートラジオグラフィー

^{177}Lu -標識コンストラクトを腫瘍保持オスB a l b / Cヌードマウスに投与した。動物を注射から1週間後に犠牲にし、腫瘍をOCT中で凍結し、切片化し、オートラジオグラフィー画像を獲得した。全体的な結果は、両コンストラクトによる腫瘍蓄積及び浸透と一致し、この時点でHuX592Rと比較してHuJ591の蓄積が高かった。更に、放射線治療薬（radiotherapeutic）の分布は、両抗体について腫瘍全体に十分に分散しているように見えた。

【0422】

治療試験

側腹部LNCaP異種移植腫瘍を有するオスB a l b / Cヌードマウスを治療コホートに割り付け、以下のいずれかの3線量を1週間隔で投与した；

1. ビヒクル対照

2. 6 MBq [^{177}Lu] - HuX592R
3. 8 MBq [^{177}Lu] - HuX592R
4. 6 MBq [^{177}Lu] - HuJ591

【0423】

腫瘍退縮（図19）及び動物の体重により評価した動物の健康を100日間監視した。結果は、HuX592R 8 MBqにおいて2マウスでHuX592R（図18）の有意な腫瘍増殖阻害を示し、HuJ591（図示せず）コホートの4マウスは完全な腫瘍退縮を示し、ここで、腫瘍負荷は、キャリパーによって測定できなかった。治療を開始した37日後（全てのコホートが $n=6$ で統計的比較が可能な最後のデータポイント）、6 MBqのHuX592R（ $p=0.0105$ ）、8 MBqのHuX592R（ $p=0.0086$ ）及び6 MBqのHuJ591（ $p=0.0056$ ）の3つの処置の全ては、2元配置分散分析により決定して、対照コホートと比較して腫瘍増殖に有意な低下を生じた。

【0424】

投与グループのいずれも、体重の変化により評価して、有意な健康障害を示さない。

【0425】

マウス生存期間（図19）は、対照コホート（中央値生存期間83.5日）と比較して、3処置コホートの全てで統計的により長い（Mantel-Cox検定により $p<0.05$ ）（中央値生存期間>試験期間）。上向きのチェックマークは、非腫瘍／健康関連問題のために安楽死させた動物を示す。

【0426】

製剤（6 MBqのHuJ591）及びHuX592R（6 MBq及び8 MBqの両方の）の両方は、PSMA発現腫瘍に対する有効性を示した。HuJ591（6 MBqの）及びHuX592R（8 MBqの）の両方は、試験の100日間中、処置／腫瘍関連死を有さず、HuX592R 8 MBqの2マウス及びHuJ591 グループの4マウスが腫瘍の完全な退縮（キャリパーにより測定不可能）を示した。生存プロットに関しては、抗体を用いた全処置グループが対照グループよりも統計的に良好であった。

【0427】

実施例10：本発明の ^{225}Ac -DOTA-及び ^{177}Lu -DOTA-標識抗CAIX結合抗体の体内分布、治療有効性及び耐容性。

CAIX結合のためのヒト化抗体の例（例えば、実施例1に示したアミノ酸配列を含む）を、 α 粒子放射放射性同位元素（アクチニウム225）又は β 粒子放射放射性同位元素（ルテチウム177）のいずれかで標識した。放射標識は、本明細書に記載される標準的なコンジュゲーション方法（即ちDOTAキレート化剤を使用する）を用いて行った。

【0428】

SK-RC-52異種移植を有するBalb/cヌードマウスを以下のように4つの処置グループ及び1つの対照グループに割り付けた：

1. ^{225}Ac -hG250 5 kBq
2. ^{225}Ac -hG250 15 kBq
3. ^{225}Ac -hG250 25 kBq
4. ^{177}Lu -hG250 13 MBq

5. 対照

1グループ当たり $N=10$ 。

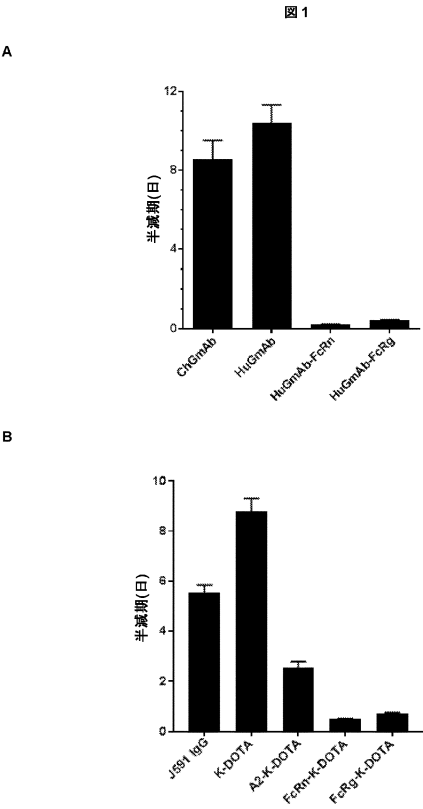
【0429】

腫瘍増殖率及び腫瘍サイズを各グループについて評価した。図20は、処置後の期間にわたる平均腫瘍サイズ（ mm^3 ）を示す。結果は、非処置対照と比較した、経時的な腫瘍サイズの急速且つ持続的な低下を示す。

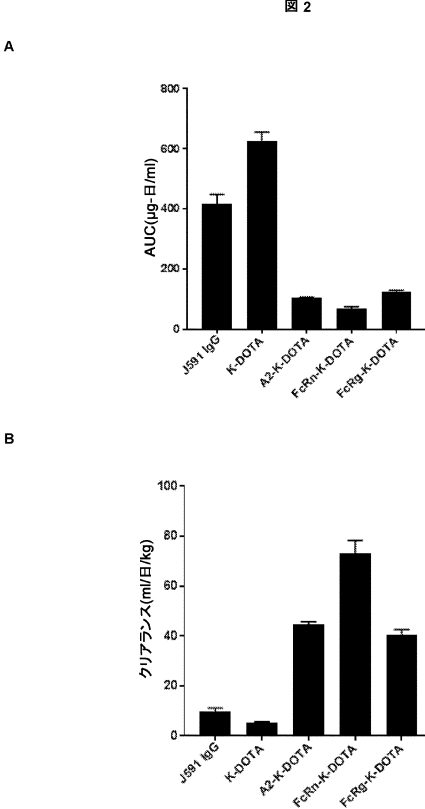
【0430】

本明細書に開示及び定義される本発明は、言及されるか又は文章若しくは図面から明らかな個々の特徴の2つ以上の代替的組み合わせの全てに拡張されることが理解されるであろう。これらの異なる組み合わせの全ては、本発明の様々な代替的態様を構成する。

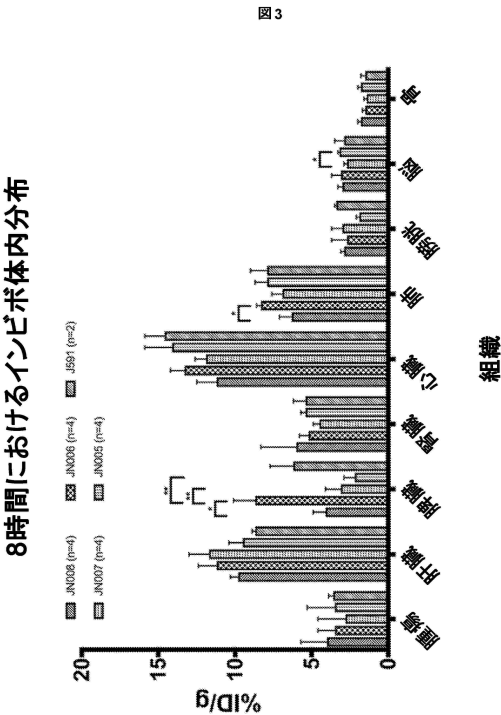
【図面】
【図 1】



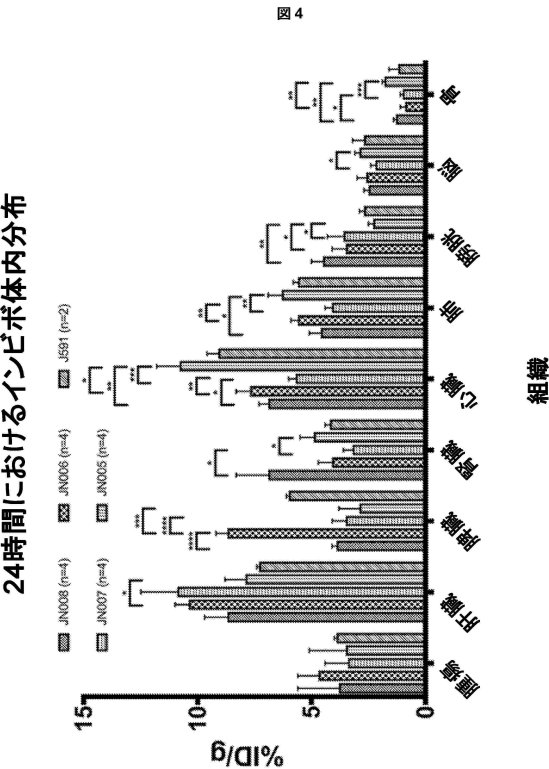
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

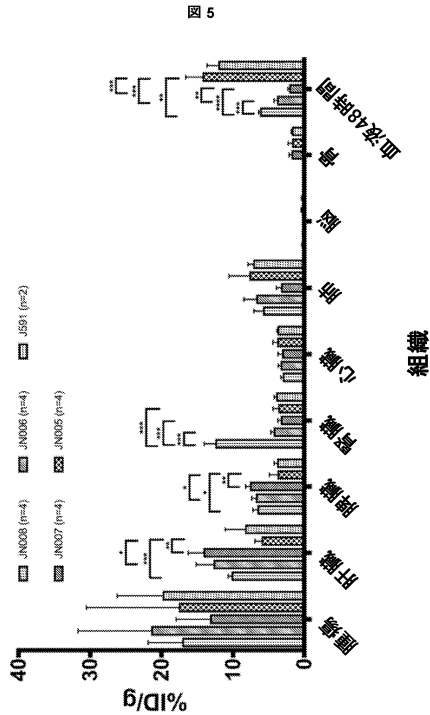
30

40

50

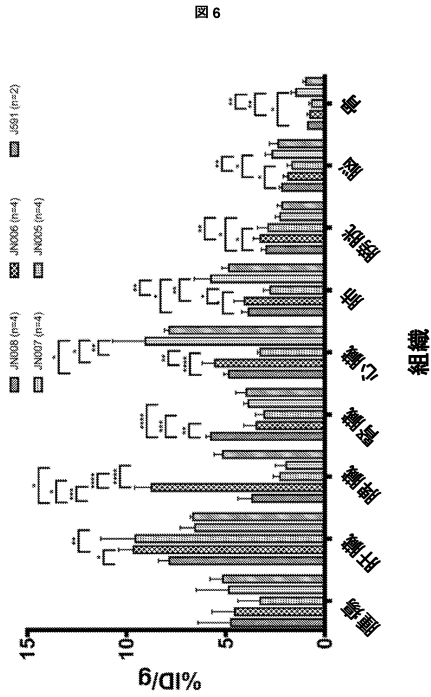
【図 5】

48時間におけるエクスピボ体内分布



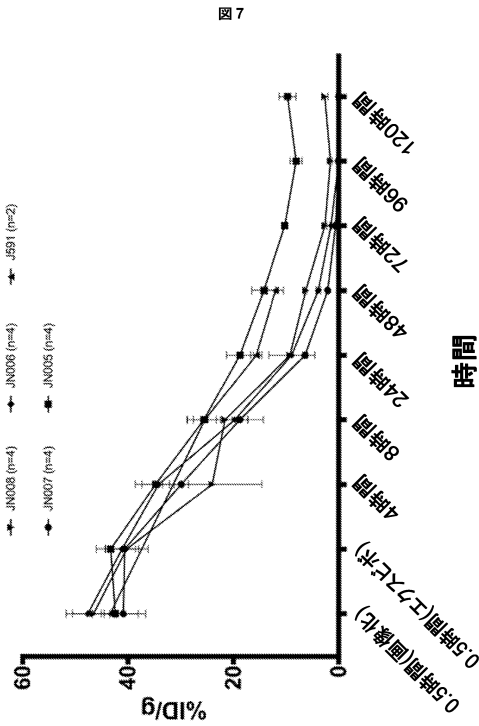
【図 6】

48時間におけるエクスピボ体内分布



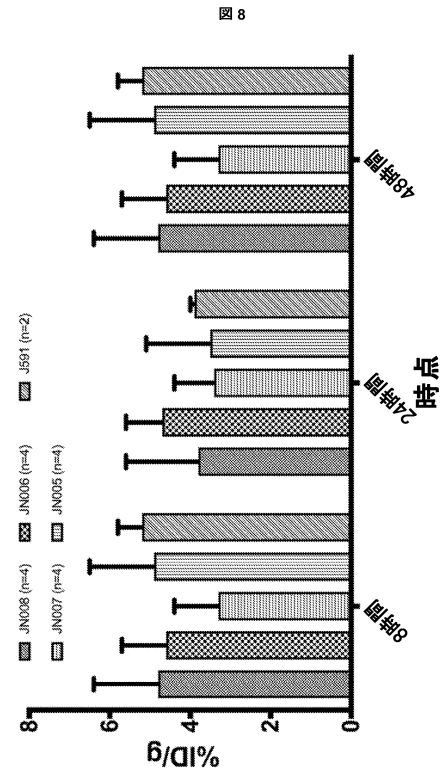
【図 7】

血液サンプル



【図 8】

腫瘍蓄積



10

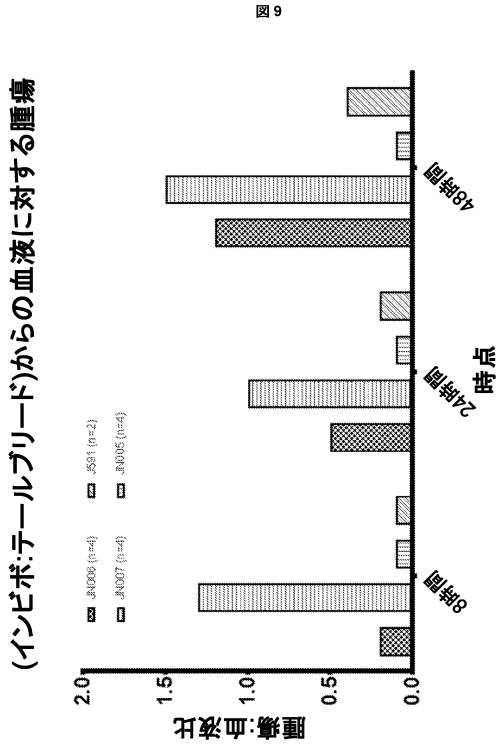
20

30

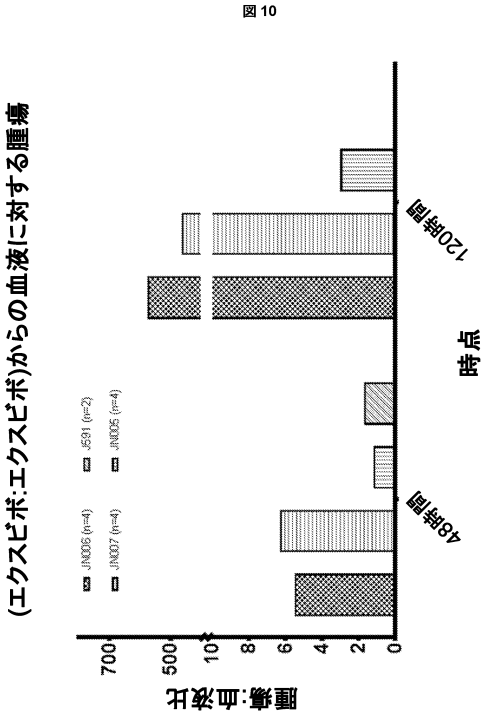
40

50

【図 9】



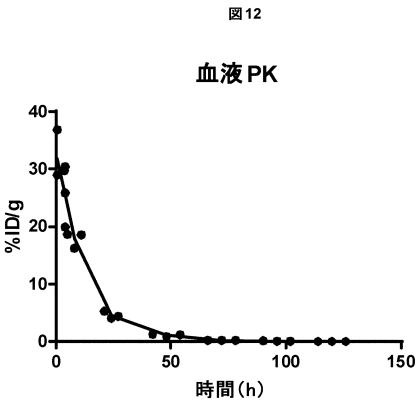
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

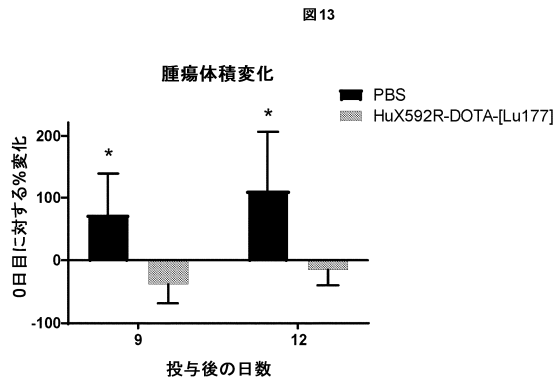
20

30

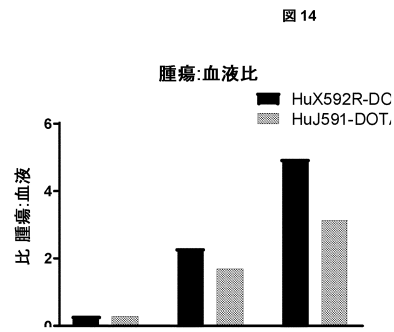
40

50

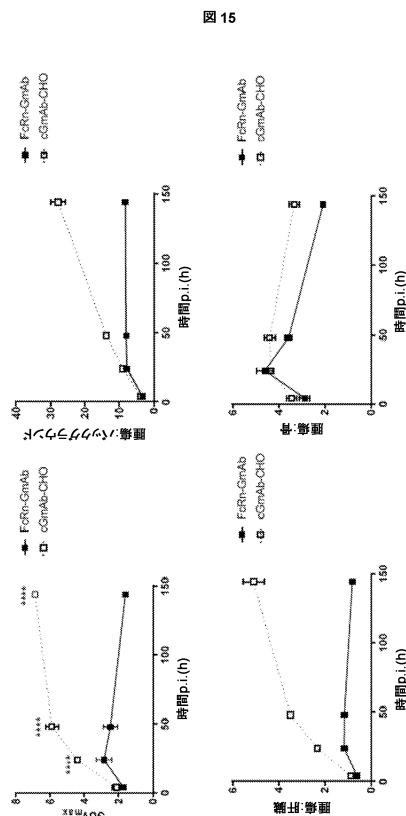
【図 1 3】



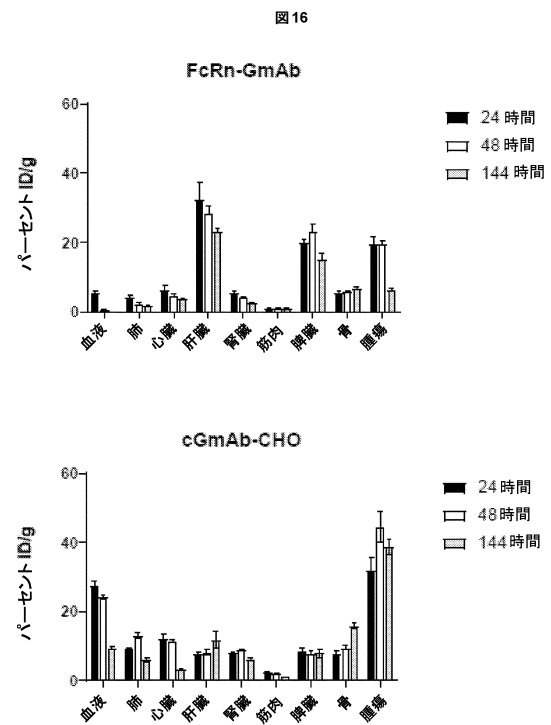
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007678768000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100174296
弁理士 富麻 博文
- (74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子
- (74)代理人 100152308
弁理士 中 正道
- (74)代理人 100201558
弁理士 亀井 恵二郎
- (72)発明者 ウィートクロフト、マイケル ポール
オーストラリア国、3051 ヴィクトリア州、ノース メルボルン、フレミントン ロード 55
、スイート 226 気付
- (72)発明者 ベーレンブルッフ、クリスチャン ピーター
オーストラリア国、3051 ヴィクトリア州、ノース メルボルン、フレミントン ロード 55
、スイート 226 気付
- 審査官 坂井田 京
- (56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0162382 (US, A1)
特表2016-528168 (JP, A)
特表2011-502126 (JP, A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C07K 1/00-19/00
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)