

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-517813

(P2019-517813A)

(43) 公表日 令和1年6月27日(2019.6.27)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/13 (2006.01)	C 12 N 15/13	4 B 06 4
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	N 4 B 06 5
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 K 39/395	V 4 C 08 5
A 61 P 35/04 (2006.01)	A 61 P 35/00	4 H 04 5
C 07 K 16/28 (2006.01)	A 61 P 35/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-566226 (P2018-566226)	(71) 出願人	503115205 ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニ ア エニバーシティー アメリカ合衆国 94305-2038 カリフォルニア州 スタンフォード メイ ン クワッド ビルディング 170 サ ード フロア ピー. オー. ボックス 2 0386 オフィス オブ ザ ジェネラ ル カウンセル
(86) (22) 出願日	平成29年6月14日 (2017.6.14)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成31年1月8日 (2019.1.8)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 國際出願番号	PCT/US2017/037533		
(87) 國際公開番号	W02017/218691		
(87) 國際公開日	平成29年12月21日 (2017.12.21)		
(31) 優先権主張番号	62/351,054		
(32) 優先日	平成28年6月16日 (2016.6.16)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD81に対するヒト化及びキメラモノクローナル抗体

(57) 【要約】

ヒト化またはキメラ抗CD81(分化のクラスター81)モノクローナル抗体が提供される。本抗体は、ヒトCD81に結合し、腫瘍転移の低下または防止を含むが限定されることなく、様々な療法的方法において用途を見い出す。重鎖及び軽鎖可変領域配列、ならびに関連した相補性決定領域(CDR)配列がさらに提供される。本発明の実施形態は、単離された抗体ならびにその誘導体及びフラグメント、ヒト化またはキメラ抗CD81モノクローナル抗体のうちの1種または複数種を含む薬学的製剤;ならびにこれらのモノクローナル抗体を産生する細胞株を含む。本抗体のアミノ酸配列も提供される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト C D 8 1 に特異的に結合し、配列番号 1 または配列番号 4 の少なくとも 1 種の C D R 配列を含む、単離されたキメラまたはヒト化抗体。

【請求項 2】

前記抗体の軽鎖は配列番号 4 の C D R 配列のそれぞれを含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

重鎖は配列番号 1 の C D R 配列のそれぞれを含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記重鎖は、配列番号 1 、 2 、または 3 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5】

前記重鎖はヒト F c ポリペプチドを含む、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記ヒト F c ポリペプチドは I g G である、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

前記 I g G ポリペプチドは高い A D C C 活性を提供する、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 8】

前記軽鎖は、配列番号 4 、 5 、または 6 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 9】

前記軽鎖はヒト F c ポリペプチドを含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

増強した A D C C 活性のために操作された F c 領域を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 11】

前記 F c 領域は、糖操作された炭水化物側鎖を含む、請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 12】

前記 F c 領域は、 F c R I I I A への結合を増強するアミノ酸置換を含む、請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 13】

切断可能なリンカーによって連結されたアミノ末端アミノ酸残基を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載される抗体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載される抗体を産生する細胞。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載される抗体を含む薬学的組成物。

【請求項 17】

腫瘍成長または転移を低下させる方法であって、前記方法は、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載される抗体の治療上有効量を対象に投与するステップを含む、前記方法。

【請求項 18】

前記対象はヒトである、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

相互参照

本出願は、2016年6月16日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 3 5 1 , 0 5 4

10

20

30

40

50

号の利益を主張するものであり、その出願は参照によりその全体として本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

CD81は、タンパク質の進化的に保存されたファミリーに属するテトラスパニン分子である。すべての多細胞生物は、このファミリーのメンバーを発現する。テトラスパニンは、短いアミノ及びカルボキシル細胞質末端、ならびに小さい及び大きい細胞外ループ(それぞれSEL及びLEL)に隣接する4つの膜貫通ドメインによって、原形質膜に埋め込まれている。LELの三次元構造は、2つより長い α ヘリックスの柄、及び2つのジスルフィド架橋の助けにより折り畳まれた新規なキノコ様頭部構造から構成される(Zimmerman et al. (2016) Cell 167 (4): 1041-1051. e11を参照のこと)。組換えLELタンパク質との反応性によって明白なように、ほとんどの抗CD81 mAbはLELと反応する。

10

【0003】

テトラスパニンは、シグナル伝達プラットフォームとしての役割を果たす動的な膜実体である細胞内の膜マイクロドメインにおいて互いに結び付く。これらのテトラスパニンに富んだマイクロドメイン(TEM)は、関連タンパク質(パートナータンパク質)を含む。これらの協調関係は、様々な細胞タイプにおいて及びそれらの結び付きの強度の点で異なる。一般的に、テトラスパニンは、細胞タイプ特異的である協調関係においてインテグリンと結び付く傾向がある。ゆえに、いくつかの種のインテグリンを発現する細胞において、これらのインテグリンのうちの1種のみが、特異的なテトラスパニン分子と結び付いて見い出され得る。他のパートナーには、テトラスパニン分子と頻繁に結び付く、CD19及びEWI-2など、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーが含まれる。

20

【0004】

TEMは、細胞内シグナル伝達経路への細胞外刺激の伝達を促す。例えば、それらは、ERMファミリータンパク質のエズリン、ラディキシン、及びモエシンを活性化することによって、細胞骨格アクチンの導きを可能にする。加えて、CD81とEWI-2との結び付きは、T細胞免疫シナプスに α -アクチンを導くことが示された。ゆえに、TEMに埋め込まれたCD81は、細胞膜で受け取られたシグナルを、下流シグナル伝達分子に及びアダプタータンパク質に伝達し、それによって特異的免疫機能に寄与する。例えば、抗原がそれらの同族BCRに関わりかつ同時にCD19/CD81/CD21複合体に結合する場合、B細胞活性化の閾値は下がり、下流シグナル伝達事象を増強する。

30

【0005】

近年、ヒト黒色腫細胞株において外因性CD81を発現させることが、異種移植モデルにおいてその移動、浸潤、及び転移能を増強することが示された。この及び他の証拠は、CD81が腫瘍細胞運動に寄与し得ることを示唆する。

【0006】

腫瘍細胞上でのCD81の発現に加えて、証拠は、CD81が、宿主の適応性及び先天性免疫応答を変調することを示唆する。腫瘍細胞は、免疫回避及び転移性伝播を促す調節性T細胞(Treg)及び先天性骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)を導くことによって、先天性及び適応性の抗腫瘍免疫応答に対抗する。CD81は、これらの細胞の通常の発生には要されないものの、それらの免疫抑制機能に必須であることが示されている。Treg-T細胞相互作用を遮断することを目的とした療法は、腫瘍誘導性免疫抑制を逆転させているため、Treg及びMDSCに対するCD81の機能を変調することは、重要な臨床適用を提供し得る。

40

本発明は、臨床上有用な抗CD81抗体を提供する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

50

【非特許文献1】Zimmerman et al. (2016) Cell 167 (4) : 1041-1051.e11

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の概要

ヒト化またはキメラ抗CD81モノクローナル抗体に関する組成物及び方法が提供される。本発明の抗体は、5A6モノクローナル抗体に由来する配列を含み、ヒトCD81に結合し、腫瘍細胞の浸潤を阻害し、ならびに体内での腫瘍成長及び転移を低下させる。それゆえ、これらの抗体は、がんの治療における様々な療法的方法において用途を見い出す。本発明の実施形態は、単離された抗体ならびにその誘導体及びフラグメント、ヒト化またはキメラ抗CD81モノクローナル抗体のうちの1種または複数種を含む薬学的製剤；ならびにこれらのモノクローナル抗体を産生する細胞株を含む。本抗体のアミノ酸配列も提供される。

10

【0009】

関心対象の抗体には、提供されるヒト化またはキメラ抗体、及びその変種が含まれる。本発明のモノクローナル抗体は、特にがん療法において、ヒトにおけるCD81と関連した疾患の診断及び免疫療法のための試薬としての特定の実用性を見い出す。本発明のモノクローナル抗体の利点は、ヒト化工程及びヒトFc領域の使用に由来する。ゆえに、免疫療法のための本発明のモノクローナル抗体のインビオ使用は、当該抗体に対する重大な宿主免疫応答の問題を大幅に低下させる。

20

【0010】

当該抗体の様々な形態が、本明細書において企図される。例えば、抗CD81抗体は、例えば任意のアイソタイプ、例えばIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgA等のヒト免疫グロブリン定常領域を有する、全長のキメラもしくはヒト化抗体、または抗体フラグメント、例えばF(ab')₂フラグメント及びF(ab)フラグメント等であり得る。例えばイメージング目的のための、CDR領域を含むフラグメントも関心対象である。さらには、抗体は、検出可能な標識で標識され得る。本発明の抗体は、切断可能なリンカーによって連結されたN末端領域に付加された付加的なアミノ酸配列を含み得、それは、体内において無作為な部位への結合を低下させ、リンカーを切断しつつ当該抗体を放出する組織酵素を有する部位（すなわち、腫瘍細胞）でのみの結合を可能にし、それは次いでその標的抗原に自由に結合する。抗体は、固相に固定化され得る、及び/または異種化合物と抱合され得る。抗体は、免疫療法抗原に対するがん抗原を特に含めた、第二の抗原と反応性の二重特異性または多特異性抗体としても提供され得る。

30

【0011】

本発明の実施形態は、通常ではヒト可変領域由来のフレームワーク配列と組み合わせた、または単離されたCDRペプチドとして、本明細書において提供される少なくとも1種、通常では少なくとも3種のCDR配列を含む、単離された抗体ならびにその誘導体及びフラグメントを含む。一部の実施形態において、抗体は、限定されることなくヒトまたはマウス可変領域フレームワークであり得る可変領域フレームワークに位置する本明細書において提供される3種の軽鎖CDR配列を含む少なくとも1本の軽鎖、及び限定されることなくヒトまたはマウス可変領域フレームワークであり得る可変領域フレームワークに位置する本明細書において提供される3種の重鎖CDR配列を含む少なくとも1本の重鎖を含む。

40

【0012】

ヒト化抗体は、可変領域として、配列番号2及び配列番号5、配列番号3及び配列番号5、配列番号2及び配列番号6、または配列番号3及び配列番号6を含み得る。配列番号1、2、または3のいずれかとペアにされ得る重鎖定常領域は、所望の機能における効力に対して選定され得る。例えば、ヒトIgG1は、ヒトエフェクター細胞背景においてADCを向上させること；及びCDCを向上させることが示されている。マウスIgG2

50

Aは、マウスエフェクター細胞の背景において効力を向上させることが示されている。

【0013】

本発明は、当該抗体及びその変種をコードする単離された核酸；ベクターで形質転換された宿主細胞によって認識される制御配列に任意で作動的に連結された、その核酸を含むベクター；そのベクターを含む宿主細胞；当該核酸が発現されるように当該宿主細胞を培養すること、及び任意で、宿主細胞培養物から（例えば、宿主細胞培養培地から）当該抗体を回収することを含む、当該抗体を產生するための工程をさらに提供する。本発明は、ヒト抗CD81抗体のうちの1種または複数種、及び薬学的に許容されるキャリアまたは希釈剤を含む組成物も提供する。療法的用途のための本組成物は、無菌であり、凍結乾燥され得、例えば希釈剤及び送達デバイス、例えば吸入器、シリンジ等とともに、単位用量でプレパックとして提供される。

10

【0014】

がんの治療のための方法も提供され、当該方法は、腫瘍成長及び／または転移を低下させるのに充分な期間、本発明の抗CD81抗体の有効な1回または複数回の用量を投与することを含む。一部の実施形態において、腫瘍はCD81発現腫瘍である。他の実施形態において、例えば抗体が患者のTreg及び／またはMDSC細胞を標的にして免疫抑制を低下させる場合、腫瘍はCD81を発現しない。一部のそのような実施形態において、本発明の療法は、1つまたは複数の付加的な抗腫瘍治療、例えば化学療法、放射線療法、手術、抗腫瘍抗体、免疫調節抗体等と組み合わされる。

20

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明の抗体に対する配列のアライメント。

【図2】図2A. マウス抗ヒトCD81モノクローナル抗体5A6は、ヒト乳癌細胞の浸潤を阻害する。抗ヒトCD81（マウス定常領域IgG1を有する配列番号1／配列番号4）は、細胞外マトリックス（ECM）へのヒト乳癌細胞（MDA-MB-231）の浸潤を阻害することを実証している、3D浸潤アッセイ。MDA-MB-231スフェロイドの浸潤アッセイ画像は、表示される時間に撮られた。上のパネル：マウスIgG1対照抗体を含有するECM；下のパネル：抗ヒトCD81（マウス定常領域IgG1を有する配列番号1／配列番号4）を含有するECM。図2B. 浸潤の阻害は5A6の特性であり、他の抗CD81抗体は、ヒト乳癌細胞の浸潤を阻害しない。3D浸潤アッセイにおいて、抗ヒトCD81（マウス定常領域IgG1を有する配列番号1／配列番号4）は、ヒト乳癌細胞（MDA-MB-231）の浸潤を阻害し得るその能力において、抗CD81Abの間で固有であることを実証している、MDA-MB-231ヒト乳癌細胞の3D浸潤アッセイ。パネル：ECMなし=細胞外マトリックスの非存在下における乳癌細胞スフェロイド、IC=対照マウスIgG1抗体（アイソタイプ対照）を埋め込まれたECM、5A6=抗ヒトCD81（マウス定常領域IgG1を有する配列番号1／配列番号4）、1D6、JS81を埋め込まれたECM、及び1.3.3.22=マウス定常領域IgG1とともに、表示される抗ヒトCD81抗体を埋め込まれたECM。棒グラフは、表示される抗ヒトCD81抗体及び対照の浸潤面積を描写している。t検定、***p値=0.0001。

30

【図3A】マウス抗ヒトCD81モノクローナル抗体5A6は、ヒトB細胞リンパ腫（Raji）を抗原投与されたSCIDマウスの生存を延長させる。ルシフェラーゼを発現するヒトB細胞リンパ腫（Raji-Luc）をSCIDマウスに注射し（1.5×10⁶個／マウス）、腫瘍を100μgのマウス抗ヒトCD81 mAb（マウス定常領域IgG1を有する配列番号1／配列番号4）、100μgの対照マウスIgG1、及び100μgのリツキシマブで週1回×4処理した。腫瘍を生物発光によって可視化し、23日のイメージングが示されている（抗体の2回の投薬を受けた後）。マウスの生存は、マウス抗ヒトCD81（マウス定常領域IgG1を有する配列番号1／配列番号4）による及びリツキシマブ（ヒト定常領域IgG1）による処理の同程度の効力を示している。ログ-ラング検定、5A6対対照マウスIgG1 ***p値=0.0001；リツキシマブ対

40

50

対照マウス IgG1 *** p 値 = 0.0002。

【図3B】定常領域を切り替えることは、5A6及びキメラ抗ヒトCD81抗体の治療効力を増強し、リツキシマブよりも、ヒトB細胞リンパ腫(Raji)による抗原投与からSCIDマウスをより良好に保護する。ルシフェラーゼを発現するヒトB細胞リンパ腫(Raji-Luc)をSCIDマウスに注射した(1.5 × 10⁶個/マウス)。腫瘍を、100 μgの抗ヒトCD81 mAb(マウス定常領域IgG1もしくはIgG2aを有する、またはヒト軽鎖定常領域カッパ及びヒト重鎖定常領域IgG1もしくはIgG4を有する配列番号1/配列番号4)で週1回×4処理した。対照群は、100 μg週1回×3のマウスIgG1(MsIgG1)またはリツキシマブ(ヒト定常領域IgG1)を受けた。22日目に生物発光によって可視化された腫瘍は、マウス抗ヒトCD81(マウス定常領域IgG2aを有する配列番号1/配列番号4)による処理の優位性、それに続くキメラ5A6抗体(ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号1/配列番号4)のそれを示している。t検定、* p 値 = 0.149。

【図4】図4A. マウス抗ヒトCD81モノクローナル抗体5A6は、異種移植モデルにおけるヒト乳癌転移を低下させる。ヒト乳癌細胞(MDA-MB-231)を、SCIDマウスの乳房パッド(mammary pad)へマトリゲル中に注射した(2.5 × 10⁶個/マウス)。マウスを、腫瘍接種後7日目に開始する、100 μgの抗ヒトCD81 mAb(マウス定常領域IgG1を有する配列番号1/配列番号4)、または対照マウスIgG1 mAbで週1回4週間処理した。マウスを75日目に屠殺し、肺を膨らませ、インディアインクを注射して腫瘍転移を可視化した(白点として見える)。左: 対照mAbで処理されたマウスから獲得された肺、右: 抗ヒトCD81 mAb(マウス定常領域IgG1を有する配列番号1/配列番号4)で処理されたマウスから獲得された肺。図4B. 5A6の定常領域を切り替えることは、ヒト乳癌細胞を抗原投与されたSCIDマウスにおける腫瘍成長及び転移を低下させる。ルシフェラーゼを発現する、ヒト乳癌MDA-MB-231のより侵攻性のクローニング細胞(MDA-MB-231-Luc)を、SCIDマウスの乳房パッドへマトリゲル中に注射した(1.5 × 10⁶個/マウス)。マウスを、腫瘍接種後7日目に開始する、100 μgの抗ヒトCD81 mAb(マウス定常領域IgGを有する配列番号1/配列番号4、マウス定常領域IgG2aを有する配列番号1/配列番号4)、または対照マウスIgG1 mAbで週1回3週間処理した(上のパネルに図解される)。腫瘍容積を1日おきに測定した(23日目が示される、下段左のパネル)。マウスを26日目に屠殺し、肺、肝臓、及び脾臓における転移を、生物発光イメージングを用いて測定した。5A6マウス抗ヒトCD81のIgG2aアイソタイプ(マウス定常領域IgG2aを有する配列番号1/配列番号4)は、腫瘍成長(左下のパネル)、ならびに肺、肝臓、及び脾臓への転移を低下させることにおいて最も有効であった。t検定、* p 値 = 0.01、*** p 値 = 0.0023。

【図5-1】図5A. マウス抗ヒトCD81抗体5A6は、他の抗ヒトCD81抗体よりも抗体依存性細胞傷害(ADCC)をより良好に媒介し、5A6は、Raji細胞の直接殺傷においても、他の抗ヒトCD81抗体及びリツキシマブよりも良好である。抗ヒトCD81(マウス定常領域IgG1を有する配列番号1/配列番号4)は、ヒトB細胞リンパ腫(Raji)のADCCを媒介し得るその能力において、抗CD81抗体の間で固有である。抗ヒトCD81(マウス定常領域IgG1を有する配列番号1/配列番号4)による直接殺傷は、リツキシマブ及び他の抗ヒトCD81抗体の両方のそれよりも優れてい。Raji細胞を、1 μg/m1の表示されるmAbのみと、または精製されたヒトNK細胞の存在下で(NK:Raji 5:1)一晩インキュベートし、細胞死をアネキシンV/7AAD陽性によって定量化した。t検定、* p 値 = 0.034、*** p 値 = 0.000。図5B. 5A6の定常領域をヒトIgG1のそれに切り替えることは、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を増加させる。キメラ抗ヒトCD81 mAb(ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号1/配列番号4)は、マウス抗ヒトCD81 mAb(マウス定常領域IgG1を有する配列番号1/配列番号4)よりも有効であり、それはまた、NK細胞媒介性抗体依存性細胞傷害(ADCC)においてリツ

10

20

30

40

50

キシマブよりも有効である。Raji細胞を、0.5 μg/mlの表示されるmAbのみと、または精製されたヒトNK細胞の存在下で(NK:Raji 2:1)一晩インキュベートし、細胞死をアネキシンV/7AAD陽性によって定量化した。図5C.ヒト化抗ヒトCD81抗体は、ADCC及びRaji細胞の直接殺傷をリツキシマブよりも良好に媒介する。ヒト化抗ヒトCD81 mAb(H1L1、ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号2/配列番号5)及びH2L1(ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号3/配列番号5)は、キメラ抗ヒトCD81 mAb(ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号1/配列番号4)と同じぐらい有効である。キメラ抗ヒトCD81 mAbは、バッチ産物に関係なくADCCを媒介する。ヒト化及びキメラ化抗ヒトCD81は、ADCCを媒介することにおいて及びRaji細胞の直接殺傷において、リツキシマブよりも有効である。Raji細胞を、1 μg/mlの表示されるmAbのみと、または精製されたヒトNK細胞の存在下で(NK:Raji 10:1)一晩インキュベートし、細胞死をアネキシンV/7AAD陽性によって定量化した。

【図5-2】図5A.マウス抗ヒトCD81抗体5A6は、他の抗ヒトCD81抗体よりも抗体依存性細胞傷害(ADCC)をより良好に媒介し、5A6は、Raji細胞の直接殺傷においても、他の抗ヒトCD81抗体及びリツキシマブよりも良好である。抗ヒトCD81(マウス定常領域IgG1を有する配列番号1/配列番号4)は、ヒトB細胞リンパ腫(Raji)のADCCを媒介し得るその能力において、抗CD81抗体の間で固有である。抗ヒトCD81(マウス定常領域IgG1を有する配列番号1/配列番号4)による直接殺傷は、リツキシマブ及び他の抗ヒトCD81抗体の両方のそれよりも優れてい。Raji細胞を、1 μg/mlの表示されるmAbのみと、または精製されたヒトNK細胞の存在下で(NK:Raji 5:1)一晩インキュベートし、細胞死をアネキシンV/7AAD陽性によって定量化した。t検定、*p値=0.034、***p値=0.000。図5B.5A6の定常領域をヒトIgG1のそれに切り替えることは、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を増加させる。キメラ抗ヒトCD81 mAb(ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号1/配列番号4)は、マウス抗ヒトCD81 mAb(マウス定常領域IgG1を有する配列番号1/配列番号4)よりも有効であり、それはまた、NK細胞媒介性抗体依存性細胞傷害(ADCC)においてリツキシマブよりも有効である。Raji細胞を、0.5 μg/mlの表示されるmAbのみと、または精製されたヒトNK細胞の存在下で(NK:Raji 2:1)一晩インキュベートし、細胞死をアネキシンV/7AAD陽性によって定量化した。図5C.ヒト化抗ヒトCD81抗体は、ADCC及びRaji細胞の直接殺傷をリツキシマブよりも良好に媒介する。ヒト化抗ヒトCD81 mAb(H1L1、ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号2/配列番号5)及びH2L1(ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号3/配列番号5)は、キメラ抗ヒトCD81 mAb(ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号1/配列番号4)と同じぐらい有効である。キメラ抗ヒトCD81 mAbは、バッチ産物に関係なくADCCを媒介する。ヒト化及びキメラ化抗ヒトCD81は、ADCCを媒介することにおいて及びRaji細胞の直接殺傷において、リツキシマブよりも有効である。Raji細胞を、1 μg/mlの表示されるmAbのみと、または精製されたヒトNK細胞の存在下で(NK:Raji 10:1)一晩インキュベートし、細胞死をアネキシンV/7AAD陽性によって定量化した。

【図6】図6A.マウス抗ヒトCD81 IgG1抗体によって媒介される補体依存性細胞傷害は、定常領域をマウスIgG2aのそれに切り替えることによって、及びヒトIgG1定常領域を用いて抗体をキメラ化することによって非常に増大される。マウス抗ヒトCD81抗体MSIgG2a(マウス定常領域IgG2aを有する配列番号1/配列番号4)及びキメラHuIgG1(ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖定常領域カッパを有する配列番号1/配列番号4)は、補体依存性細胞傷害(CDC)を非常に増大する。対照的に、抗ヒトCD81 MsiG1(マウス定常領域IgG1を有する配列番号1/

10

20

30

40

50

配列番号4)及びキメラHu Ig G4(ヒト重鎖定常領域Ig G4及びヒト軽鎖定常領域カッパを有する配列番号1/配列番号4)、ならびにリツキシマブは、CDCをあまり媒介しない。t検定、**p値=0.0051 Ms Ig G1対5A6 Ms Ig G2a、**p値=0.0015 Ms Ig G1対5A6 Hu Ig G1。図6B.キメラ化抗ヒトCD81 Ig G1によって、及びヒト化抗ヒトCD81 Ig G1抗体によって媒介される補体依存性細胞傷害は、マウス抗ヒトCD81 Ig G1のそれよりも非常に優れている。キメラHu Ig G1(ヒト重鎖定常領域Ig G1及びヒト軽鎖定常領域カッパを有する配列番号1/配列番号4)及びヒト化抗CD81抗体(ヒト重鎖定常領域Ig G1及びヒト軽鎖定常領域カッパを有する配列番号3/配列番号5)は、マウス抗ヒトCD81抗体Ms Ig G1(マウス定常領域Ig G1を有する配列番号1/配列番号4)及びリツキシマブと比較して、CDCの優れた媒介因子である。t検定、p***値=0.001。

【図7A】Raji細胞は、とりわけより低い抗体濃度において、マウス抗ヒトCD81抗体5A6に結合するのにPBMC(健常ドナーに由来する)よりも有効であり、1:1000の比率で存在する場合でさえ、抗CD81媒介性CDCに対してより感受性が高い。PBMC対Raji細胞への、マウス抗ヒトCD81(マウス定常領域Ig G1を有する配列番号1/配列番号4)の相対的結合を判定するために、PBMCをバイオレット追跡色素(VTD)で、Raji細胞をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエスチル(CFSE)で標識し、1:1の比率で混合した。次いで、抗体の連続希釈物を、混合した細胞に添加した。細胞結合アッセイにおいて見られるように(左のパネル)、抗体は低濃度でRaji細胞に結合し、一方でPBMCはより高い抗体濃度でのみ結合する。マウス抗ヒトCD81(マウス定常領域Ig G1を有する配列番号1/配列番号4)によるCDC媒介性殺傷に対するPBMC対Raji細胞の感受性を判定するために、PBMCをVTDで、Raji細胞をCFSEで標識し、PBMC対Raji細胞の漸増する比率で混合した。1:1の混合物において、抗体はRaji細胞の90%を殺傷したが、PBMCのほんの6%のみを殺傷した(中央のパネル)。著しく、Raji細胞は、PBMCに対して1:1000の比率で存在する場合でさえ、抗CD81媒介性CDCに対してより感受性が高かった(右のパネル)。

【図7B】患者由来リンパ腫B細胞は、同じ生検標本に存在する正常T細胞よりも、CD81媒介性CDCに対して感受性が高い。CD81は、濾胞性リンパ腫(FL)腫瘍B細胞上、ならびにFLサンプルの生検内の正常T細胞上で発現される。3つのFL生検標本のB及びT細胞上での、ならびに健常ドナー(HD)PBMC上でのCD81発現のヒストグラムが示されている。同じFL患者の腫瘍B及び正常T細胞に対する、マウス抗ヒトCD81抗体(マウス定常領域Ig G2aを有する配列番号1/配列番号4)によるCDC媒介性殺傷は、腫瘍B細胞が、5A6媒介性殺傷に対して正常T細胞よりも感受性が高いことを明らかにしている。同じ結果が、キメラ抗ヒトCD81抗体(ヒト重鎖定常領域Ig G1及びヒト軽鎖定常領域カッパを有する配列番号1/配列番号4)を用いて獲得された。B細胞(正方形)、T細胞(三角形)。

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

本発明は、CD81に特異的であるヒト化モノクローナル抗体に関する。そのような抗体の核酸及びアミノ酸配列も開示される。本抗体は、CD81と関連した療法的及び診断的方法において用途を見い出す。

【0017】

「治療」とは、療法的治療及び予防的または防止的手段の両方を指す。治療を必要としているものには、すでに障害を有するものならびに障害が防止されるべきものが含まれる。

【0018】

治療の目的のための「哺乳類」とは、ヒト、家畜及び農業用動物、ならびに動物園用、

10

20

30

40

50

運動用、またはペット用動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを含めた、哺乳類として分類される任意の動物を指す。好ましくは、哺乳類はヒトである。

【0019】

「抗体」という用語は、最も広い意味で用いられ、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及びそれらが所望の生物学的活性を呈する限りは抗体フラグメントを具体的に網羅する。抗体（Ab）及び「免疫グロブリン」（Ig）は、同じ構造特徴を有する糖タンパク質である。抗体は、特異的抗原に対する結合特異性を呈する一方で、免疫グロブリンには、抗体、及び抗原特異性を欠く他の抗体様分子の両方が含まれる。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系によって低レベルで及び骨髄腫によって増加したレベルで產生される。

10

【0020】

本発明において使用するとき、「エピトープ」という用語は、抗体のパラトープが結合する、抗原上の任意の抗原決定基を意味する。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸または糖側鎖など、分子の化学的に活性な表面団（grouping）からなり、通常、特異的な三次元構造特徴ならびに特異的電荷特徴を有する。

【0021】

「天然抗体及び免疫グロブリン」とは、通常、2本の同一の軽（L）鎖及び2本の同一の重（H）鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、1つの共有結合性ジスルフィド結合によって重鎖に連結され、とはいえてジスルフィド連結の数は、種々の免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で変動する。各重鎖及び軽鎖は、規則的に間隔を置かれた鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一方の末端に可変ドメイン（V_H）、それに続くいくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端に可変ドメイン（V_L）及びその他の末端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一の定常ドメインと並び、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並んでいる。特定のアミノ酸残基は、軽鎖及び重鎖可変ドメインの間に界面を形成すると考えられる（Clothia et al. , J. Mol. Biol. 186: 651 (1985) ; Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82: 4592 (1985) ）。

20

【0022】

「可変」という用語は、可変ドメインのある特定の部分が、抗体間で配列が幅広く異なり、各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合及び特異性において用いられるという事実を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメインを通して均一に分布しているわけではない。それは、軽鎖及び重鎖可変ドメインの両方における相補性決定領域（CDR）または超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク（FR）と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、4つのFR領域を含み、-シート構造を接続する、ある場合にはその一部を形成するループを形成する3つのCDRによって接続された、-シート立体配置を大きく採用する。各鎖におけるCDRは、FR領域によって及び他方の鎖由来のCDRとともに、ごく接近して一つにまとめられ、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabat et al. , Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991) を参照のこと）。定常ドメインは、抗体を抗原に結合させることに直接関与しないが、抗体依存性細胞毒性への抗体の参加など、様々なエフェクター機能を呈する。

30

【0023】

本発明の抗体は、例えばFc RIIIAへのそれらの結合能を増加させる及びADC活性を増加させることによって、増強したエフェクター機能を有するFc配列を有し得る。例えば、FcのAsn-297におけるN-連結型グリカンに付着したフコースは、FcとFc RIIIAとの相互作用を立体的に妨害し、糖操作によるフコースの除去は

40

50

、 Fc RIIIAへの結合を増加させ得、それは、野生型 IgG1 対照と比較して > 50 倍高い ADC 活性に翻訳される。 IgG1 の Fc 部分におけるアミノ酸変異によるタンパク質操作により、 Fc RIIIAへの Fc 結合のアフィニティーを増加させる複数の変種が作出されている。顕著には、三重アラニン変異体 S298A / E333A / K334A は、 Fc RIIIAへの結合及び ADC 機能の 2 倍の増加を呈示する。 S239D / I332E (2 ×) 及び S239D / I332E / A330L (3 ×) 変種は、インビトロ及びインビボで、 Fc RIIIAへの結合アフィニティーの有意な増加、及び ADC 能の増大を有する。酵母ディスプレイによって同定された他の Fc 変種も、マウス異種移植モデルにおいて、 Fc RIIIAへの結合の向上、及び腫瘍細胞殺傷の増強を示した。例えば、参考により本明細書に具体的に組み入れられる、 Liu et al. (2014) JBC 289 (6) : 3571 - 90 を参考のこと。

10

【0024】

例示的な抗 CD81 重鎖及び軽鎖組み合わせの CDR 配列は、配列表に明記され及び図 1 に示されており、例示的な CDR に下線が引かれている。一部の実施形態において、重鎖に対する配列番号 1、2、または 3；及び軽鎖に対する配列番号 4、5、または 6 の、可変領域における CDR 配列のセットが提供される。一部の実施形態において、 CDR 配列は組み合わせで維持される、すなわちヒト化抗体は、重鎖 CDR 配列及び軽鎖 CDR 配列の両方を含むであろう。

【0025】

抗体のパパイン消化は、それぞれが単一の抗原結合部位を有する、「Fab」フラグメントと呼ばれる 2 つの同一の抗原結合フラグメント、及びその名前は容易に結晶化し得るその能力を反映する、残部の「Fc」フラグメントを産生する。ペプシン処理は、2 つの抗原結合部位を有しかつ依然として抗原を架橋する能力がある、 $F(ab')_2$ フラグメントを産出する。

20

【0026】

「Fv」は、完全な抗原認識部位及び抗原結合部位を含有する最小抗体フラグメントである。二本鎖 Fv 種において、この領域は、緊密な非共有結合性の結び付きにある 1 つの重鎖可変ドメイン及び 1 つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖 Fv 種 (scFv) において、1 つの重鎖可変ドメイン及び 1 つの軽鎖可変ドメインは、軽鎖及び重鎖が、二本鎖 Fv 種におけるそれと類似した「二量体」構造の状態で結び付き得るように、柔軟なペプチドリンカーによって共有結合で連結され得る。各可変ドメインの 3 つの CDR が相互作用して VH - VL 二量体の表面の抗原結合部位を規定するのは、この立体配置においてである。集合的に、6 つの CDR が、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（または、抗原に特異的な 3 つの CDR のみを含む、 Fv の半分）でさえ、結合部位全体よりも低いアフィニティーではあるものの、抗原を認識しかつ結合し得る能力を有する。scFv の概説に関しては、 Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 (1994) を参考のこと。

30

【0027】

Fab フラグメントは、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第一の定常ドメイン (CH1) も含有する。Fab' フラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の 1 つまたは複数のシステインを含めた、重鎖 CH1 ドメインのカルボキシ末端におけるいくつかの残基の付加によって Fab フラグメントとは異なる。Fab' - SH は、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を持つ、Fab' に対する本明細書における指定である。 $F(ab')_2$ 抗体フラグメントは、もともと、それらの間にヒンジシステインを有する Fab' フラグメントのペアとして産生された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも公知である。

40

【0028】

免疫グロブリンの 5 つの主要なクラス： IgA、 IgD、 IgE、 IgG、及び IgM

50

があり、これらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば Ig G₁、Ig G₂、Ig G₃、Ig G₄、Ig A₁、Ig A₂にさらに細分され得る。異なるクラスの免疫グロブリンに相当する重鎖定常ドメインは、それぞれ α 、 β 、 γ 、 δ 及び μ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元立体配置は周知である。本発明の一部の実施形態において、ヒト Ig G₁を含むが限定されることなく、重鎖定常領域は、高いADC活性を提供するように選択される。他の実施形態において、例えばヒト Ig G₄を用いて、またはエフェクター機能がないもしくは低下した「死んだ」Fcを用いて、低いADC活性が選択され得る。

【0029】

ジスルフィド結合を形成し得る領域が欠失されているもの、または天然Fc形態のN末端においてある特定のアミノ酸残基が取り除かれている、もしくはメチオニン残基がそこに付加されているものを含むが限定されることなく、他のFc変種が考え得る。ゆえに、本発明の1つの実施形態において、scFc分子の1つまたは複数のFc部分は、ジスルフィド結合を取り除くための、ヒンジ領域における1つまたは複数の変異を含み得る。さらに別の実施形態において、Fcのヒンジ領域は全面的に除去され得る。なお別の実施形態において、scFc分子はFc変種を含み得る。

【0030】

さらに、Fc変種は、補体結合またはFc受容体結合をもたらすアミノ酸残基を置換する、欠失させる、または付加することによって、エフェクター機能を除去するまたは実質的に低下させるように構築され得る。例えば、かつ限定されることなく、C1q結合部位などの補体結合部位において欠失が起こり得る。免疫グロブリンFcフラグメントのそのような配列誘導体を調製する技法は、国際特許公報第WO97/34631号及び第WO96/32478号に開示されている。加えて、Fcドメインは、リン酸化、硫酸化、アクリレート化（acrylation）、グリコシル化、メチル化、ファルネシル化、アセチル化、アミド化等によって修飾され得る。

【0031】

本明細書において用いられる「抗体フラグメント」及びそのすべての文法的変形は、無傷抗体の抗原結合部位または可変領域を含む、無傷抗体の一部分として定義され、該一部分は、無傷抗体のFc領域の定常重鎖ドメイン（すなわち、抗体アイソタイプに応じて、CH2、CH3、及びCH4）を含んでいない。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、及びFvフラグメント；ダイアボディ；（1）一本鎖Fv（scFv）分子、（2）結び付いた重鎖部分なしの、1つの軽鎖可変ドメインのみを含有する一本鎖ポリペプチド、または軽鎖可変ドメインの3つのCDRを含有するそのフラグメント、及び（3）結び付いた軽鎖部分なしの、1つの重鎖可変領域のみを含有する一本鎖ポリペプチド、または重鎖可変領域の3つのCDRを含有するそのフラグメント、を含むが限定されることなく、連続アミノ酸残基の途切れることのない配列からなる一次構造を有するポリペプチドである任意の抗体フラグメント（本明細書において、「一本鎖抗体フラグメント」または「一本鎖ポリペプチド」と称される）；ならびに抗体フラグメントから形成される多特異性または多価の構造が含まれる。1本または複数本の重鎖を含む抗体フラグメントにおいて、重鎖（複数可）は、無傷抗体の非Fc領域に見い出される任意の定常ドメイン配列（例えば、Ig GアイソタイプにおけるCH1）を含有し得、及び/または無傷抗体に見い出される任意のヒンジ領域配列を含有し得、及び/または重鎖（複数可）のヒンジ領域配列もしくは定常ドメイン配列に融合されたもしくはそこに位置するロイシンジッパー配列を含有し得る。

【0032】

それとは反対であることが具体的に示されていない限り、本明細書において記載される及び主張される「抱合体」という用語は、1つまたは複数のポリマー分子（複数可）への1つまたは複数の抗体フラグメント（複数可）の共有結合性付着によって形成される異種分子として定義され、該異種分子は水溶性、すなわち血液などの生理学的流体中に可溶性であり、及び該異種分子はいかなる構造化された凝集体をも含んでいない。関心対象の抱

10

20

30

40

50

合体は P E G である。前述の定義の文脈において、「構造化された凝集体」という用語は、(1)異種分子がミセルまたは他のエマルション構造なく及び脂質二重層、小胞、またはリポソームに固定されていないような、スフェロイドまたはスフェロイド状の殻構造を有する、水溶液中の分子の任意の凝集体；ならびに(2)水相と接触しても溶液中に異種分子を放出しない、クロマトグラフィービーズマトリックスなど、固体または不溶化形態の分子の任意の凝集体、を指す。したがって、本明細書において定義される「抱合体」という用語は、固体の水和があると水溶液中に異種分子を放出し得る、沈殿物、堆積物、生分解性マトリックス、または他の固体中にある上述の異種分子を包含する。

【0033】

本明細書において用いられる「モノクローナル抗体」(mAb)という用語は、実質的に均質な抗体の集団から獲得される抗体を指し、すなわち該集団を含む個々の抗体は、少量存在し得る考え得る天然に存在する変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、単一の抗原部位に対して向けられている。各mAbは、抗原上の単一の決定基に対して向けられている。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが、他の免疫グロブリンが混入していないハイブリドーマ培養によって合成され得るという点で有利である。「モノクローナル」という修飾語句は、抗体の実質的に均質な集団から獲得されるものとしての抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を要すると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って用いられる対象となるモノクローナル抗体は、不死化 B 細胞もしくはそのハイブリドーマにおいて作製され得る、または組換え DNA 法によって作製され得る。

10

20

【0034】

本明細書におけるモノクローナル抗体には、起源の種または免疫グロブリンのクラスもしくはサブクラス指定にかかわらず、抗 C D 8 1 抗体の可変（超可変を含む）ドメインを定常ドメインで（例えば、「ヒト化」抗体）、もしくは軽鎖を重鎖で、もしくは一方の種由来の鎖を別の種由来の鎖でつなぎ合わせることによって、または異種タンパク質との融合によって產生されるハイブリッド及び組換え抗体、ならびにそれらが所望の生物学的活性を呈する限りは抗体フラグメント（例えば、F ab、F (ab')₂、及び Fv）が含まれる。

【0035】

本明細書におけるモノクローナル抗体には、重鎖及び / または軽鎖の一部分が、特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一でありまたは相同であり、一方で鎖（複数可）の残部が、別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一であるまたは相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、ならびにそれらが所望の生物学的活性を呈する限りはそのような抗体のフラグメントが具体的に含まれる。一部の実施形態において、キメラ抗体は、ヒト定常領域配列に融合した、例えば配列番号 1 及び配列番号 4 に記載されるマウス可変領域を含む。

30

【0036】

「単離された」抗体とは、同定されており、その天然環境の構成要素から分離され及び / または回収されているものである。その天然環境の混入構成要素は、抗体に対する診断的または療法的使用を妨害するであろう材料であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を含み得る。一部の実施形態において、抗体は、(1)ローリー法によって判定される、抗体の 75 重量 % よりも大きい、最も好ましくは 80 重量 %、90 重量 %、もしくは 99 重量 % を上回る割合まで、または(2)クマシープルーもしくは好ましくは銀染色を用いた、還元もしくは非還元条件下での SDS - PAGE による均一性まで、精製される。単離された抗体には、抗体の天然環境の少なくとも 1 種の構成要素も存在しないであろうため、組換え細胞内のインサイチューでの抗体が含まれる。しかしながら、普通、単離された抗体は、少なくとも 1 つの精製ステップによって調製される。

40

【0037】

50

「エピトープタグ付けされた」という用語は、本明細書において用いられる場合、「エピトープタグ」に融合された抗CD81抗体を指す。エピトープタグポリペプチドは、それに対して抗体が作製され得るが、それがCD81抗体の活性を妨害しないように十分短いエピトープを提供するのに十分な残基を有する。エピトープタグは、好ましくは、エピトープに特異的な抗体が、他のエピトープと実質的に交差反応しないように充分に固有である。適切なタグポリペプチドは、一般的には少なくとも6アミノ酸残基、通常では約8～50アミノ酸残基（好ましくは、約9～30残基）を有する。例には、c-mycタグ、ならびにそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7、及び9E10抗体（E van et al., Mol. Cell. Biol. 5 (12) : 3610-3616 (1985)）；ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D（gD）タグ及びその抗体（Paborsky et al., Protein Engineering 3 (6) : 547-553 (1990)）が含まれる。10

【0038】

「標識」という単語は、本明細書において用いられる場合、抗体に直接的または間接的に抱合される、検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自体がそれ自体によって検出可能であり得る（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、または酵素標識の場合には、検出可能である、基質化合物もしくは組成物の化学的変化を触媒し得る。

【0039】

「固相」によって、本発明の抗体が接着し得る非水性マトリックスが意味される。本明細書において包含される固相の例には、ガラス（例えば、制御性細孔ガラス）、多糖（例えば、アガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール、及びシリコーンから部分的または全面的に形成されるものが含まれる。ある特定の実施形態において、背景に応じて、固相にはアッセイプレートのウェルが含まれ得；他において、それは精製カラム（例えば、アフィニティクロマトグラフィーカラム）である。この用語には、米国特許第4,275,149号に記載されるものなど、個別の粒子の非連続的固相も含まれる。20

【0040】

ポリペプチド

1つの態様において、本発明は、CD81と特異的に反応性であるヒト化またはキメラモノクローナル抗体、及びそのような抗体を産生する細胞株に向けられている。例示的な抗体の可変領域が提供される。関心対象の抗体は、これらの提供される組み合わせ、ならびに、例えばF(ab)'抗体を作出するための、適当な定常領域または定常領域のフラグメントへの可変領域の融合を含む。関心対象の可変領域は、提供される抗CD81抗体の少なくとも1種のCDR配列を含み、CDRは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個、またはそれを上回る数のアミノ酸であり得る。あるいは、関心対象の抗体は、提供される抗体に記載される可変領域、または本明細書において記載される可変領域配列のペアを含む。30

【0041】

関心対象の可変領域は、本明細書において提供される可変領域由来の少なくとも1種のCDR配列、通常では少なくとも2種のCDR配列、より通常では3種のCDR配列を含む。例示的なCDR指定は図1に示されており、上記の下線が引かれた残基に相当するが、しかしながら当業者であれば、配列可変性に基づいており、最もよく用いられるKabat定義（「Zhao et al. A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions」Mol Immunol. 2010; 47: 694-700を参照のこと）を含めた、CDRのいくつかの定義がよく用いられることを理解するであろう。Chothia定義は、構造ループ領域の位置に基づく（Chothia et al.「Conformations of immunoglobulin hypervariable regions」Nature. 1989; 342: 877-883）。関心40

10

20

30

40

50

対象の代替的な CDR 定義には、限定されることなく、Honegger, 「Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool」 J Mol Biol. 2001; 309: 657-670; Ofran et al. 「Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes」 J Immunol. 2008; 181: 6230-6235; Almagro 「Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires」 J Mol Recognit. 2004; 17: 132-143; 及び Padlan et al 「Identification of specificity-determining residues in antibodies」 Faseb J. 1995; 9: 133-139 によって開示されるものが含まれ、そのそれぞれは参考により本明細書に具体的に組み入れられる。
10

【0042】

一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、配列番号 1、2、3、4、5、及び 6 のいずれかにおいて記載される、少なくとも約 10 アミノ酸、少なくとも約 15 アミノ酸、少なくとも約 20 アミノ酸、少なくとも約 25 アミノ酸、少なくとも約 30 アミノ酸、最高で完全な提供される可変領域、の連続配列を有する。関心対象のポリペプチドには、本明細書において記載されるアミノ酸配列と比較して、最高で 1 個、最高で 2 個、最高で 3 個、最高で 4 個、最高で 5 個、最高で 6 個、またはそれを上回る数のアミノ酸が異なる可変領域配列も含まれる。他の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、本明細書において記載されるアミノ酸配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 99% 同一である。
20

【0043】

Fab に加えて、CD81 の少なくとも 1 つのエピトープに対する結合特異性を有する、より小さな抗体フラグメント及びエピトープ結合ペプチドも本発明によって企図され、本発明の方法においても用いられ得る。例えば、一本鎖抗体は、参考によりその全体として本明細書に組み入れられる、Ladner らへの米国特許第 4,946,778 号の方法に従って構築され得る。一本鎖抗体は、柔軟なリンカー部分によって接合された軽鎖及び重鎖の可変領域を含む。さらにより小さなものは、単離 VH 単一ドメインを含む、单一ドメイン抗体として知られる抗体フラグメントである。それらが由来する無傷抗体の結合特異性の少なくとも一部を有する单一ドメイン抗体を獲得するための技法は、当技術分野において公知である。例えば、Ward, et al. 「Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from Escherichia coli」 Nature 341: 644-646 は、それに結合するその標的エピトープに対する充分なアフィニティーを有する抗体重鎖可変領域 (H 単一ドメイン抗体) を単離形態で獲得するためのスクリーニングのための方法を開示している。
30

【0044】

本発明は、ヒト化またはキメラ抗 CD81 抗体をコードする単離された核酸、当該核酸を含むベクター及び宿主細胞、ならびに当該抗体の產生のための組換え技法も提供する。関心対象の核酸は、提供される核酸配列と少なくとも約 80% 同一、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 99%、または同一であり得る。一部の実施形態において、少なくとも約 20 nt、少なくとも約 25 nt、少なくと
40

も約 50 nt、少なくとも約 75 nt、少なくとも約 100 nt の、及び最高で完全な提供される配列の、配列番号 1 ~ 6 のいずれか 1 つのポリペプチドをコードする連続ヌクレオチド配列が用いられ得る。そのような連続配列は、CDR 配列をコードし得る、または完全な可変領域をコードし得る。当技術分野において公知であるように、可変領域配列は、任意の適当な定常領域配列に融合され得る。

【0045】

抗体の組換え產生に関して、それをコードする核酸は、さらなるクローニング (DNA の増幅) のためにまたは発現のために、複製可能なベクター内に挿入される。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて (例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)、容易に単離され及びシーケンシングされる。多くのベクターが利用可能である。ベクター構成要素には、一般的に、以下の : シグナル配列、複製の起点、1種または複数種のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列、のうちの 1 つまたは複数が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0046】

本発明の抗 CD81 抗体は、直接的にだけでなく、異種または相同ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても組換えにより產生され得、それには、成熟タンパク質またはポリペプチドの N 末に特異的切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチド、免疫グロブリン定常領域配列等が含まれる。選択される異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識されかつプロセシングされる (すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される) ものであり得る。天然の抗体シグナル配列を認識せずかつプロセシングしない原核生物宿主細胞に関しては、シグナル配列は、選択される原核生物シグナル配列によって置換される。

20

【0047】

「単離された」核酸分子とは、同定されており、抗体核酸の天然供給源においてそれが普通では結び付いている少なくとも 1 種の混入核酸分子から分離されている核酸分子である。単離された核酸分子とは、それが天然において見い出される形態または状況以外にあるものである。それゆえ、単離された核酸分子は、それが天然細胞に存在するような核酸分子とは区別される。しかしながら、単離された核酸分子には、例えば核酸分子が天然細胞のそれとは異なる染色体位置にある場合、抗体を普通に発現する細胞に含有される核酸分子が含まれる。

30

【0048】

DNAをクローニングするまたは発現させるための適切な宿主細胞は、原核生物、酵母、またはより高等な真核生物細胞である。有用な哺乳類宿主細胞株の例は、SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 株 (COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胎児腎臓株 (293、または浮遊培養での成長のためにサブクローニングされた 293 細胞、Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977))；ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO、Ur laub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980))；マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980))；サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌腫細胞 (HELA、ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL 34)；バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75)；ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065)；マウス乳腺腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL 51)；TR1 細胞 (Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1. 982))；MRC 5 細胞；FS4 細胞；及びヒト肝細胞癌株 (Hep G2) である。宿主細胞は、抗 CD81 抗体產生のために上で記載される発現またはクローニングベク

40

50

ターで形質転換され、及びプロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために、必要に応じて改変された従来の栄養培地の中で培養される。

【0049】

細胞から調製された抗体組成物は、例えばハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製され得、アフィニティークロマトグラフィーは好ましい精製技法である。アフィニティーリガンドとしてのプロテインAの適切性は、種、及び抗体に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインのアイソタイプに依存する。プロテインAを用いて、ヒト1、2、または4重鎖に基づく抗体を精製し得る (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、ヒト3に対して推奨される (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。アフィニティーリガンドが付着されるマトリックスは、ほとんどの場合アガロースであるが、他のマトリックスが利用可能である。制御性細孔ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、アガロースで達成され得るよりもより速い流速及びより短い処理時間を可能にする。抗体がCH₃ドメインを含む場合、Bakerbond ABX (商標)樹脂 (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.) が、精製に有用である。回収される対象となる抗体に応じて、イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE (商標)でのクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラムなど)でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿など、タンパク質精製のための他の技法も利用可能である。

10

20

30

【0050】

任意の予備精製ステップ(複数可)の後、関心対象の抗体及び混入物質を含む混合物は、好ましくは低い塩濃度(例えば、約0~0.25Mの塩)で実施される、約2.5~4.5のpHにおける溶出バッファーを用いた低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに供され得る。

【0051】

使用の方法

本発明のヒト化またはキメラモノクローナル抗体は、付加的な免疫療法剤との併用療法において、例えば2種もしくはそれを上回る種類の抗体の組み合わせとして; または二重特異性もしくは他の多特異性様式として含めた、がんの治療において用いられ得る。本発明は、本発明のCD81結合抗体を含む、二重特異的を含むが限定されることなく、多種多様の単一特異的及び多特異的な抗体立体配置を提供する。一部のそのような実施形態において、第二の抗原結合領域が含まれる。一部の実施形態において、第二の抗原結合領域は、腫瘍抗原に特異的に結合する。一部の実施形態において、第二の抗原結合領域は、免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合する。

【0052】

一部の実施形態において、がんの治療のために方法が提供され、当該方法は、それを必要としている個体に、本発明の単一特異的、二重特異的等の抗体の有効用量を投与することを含む。抗体が二重特異的である場合、第二の抗原結合部位は、腫瘍抗原、チェックポイントタンパク質等に特異的に結合し得る。様々な実施形態において、がんは、卵巣癌、乳癌、消化管癌、脳腫瘍、頭頸部癌、前立腺癌、結腸癌、肺癌、白血病、リンパ腫、肉腫、癌腫、神経細胞腫瘍、扁平上皮細胞癌腫、胚細胞腫瘍、転移、未分化腫瘍、精上皮腫、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、混合細胞腫瘍、及び感染性因子によって引き起こされる新生物からなる群より選択される。

40

【0053】

多くの腫瘍細胞は、血流中に放出され得るまたは細胞表面にとどまり得る抗原を産生する。バーキットリンパ腫、神経芽細胞腫、悪性黒色腫、骨肉腫、腎細胞癌腫、乳癌腫、前

50

立腺癌、肺癌腫、及び結腸癌を含めた、ヒトがんのほとんどにおいて抗原が同定されている。免疫系の主な役割は、根絶のための後続の標的化を可能にする、これらの抗原の検出である。しかしながら、それらの異物構造にもかかわらず、腫瘍抗原に対する免疫応答は変動し、腫瘍成長を防止するには不充分であることが多い。

【0054】

腫瘍関連抗原（TAA）は腫瘍細胞に比較的制限され、一方で腫瘍特異的抗原（TSA）は腫瘍細胞に固有である。TSA及びTAAは、主要組織適合性複合体の一部として細胞表面に発現される細胞内分子の部分である。

【0055】

組織特異的分化抗原とは、腫瘍細胞及びそれらの正常細胞対応物に存在する分子である。治療用mAbによって認識されることが公知の腫瘍関連抗原は、いくつかの異なるカテゴリーに入る。造血分化抗原は、分化のクラスター（CD）グループ化と通常関連付けされている糖タンパク質であり、CD20、CD30、CD33、及びCD52を含む。細胞表面分化抗原は、正常細胞及び腫瘍細胞の両方の表面に見い出される糖タンパク質及び炭水化物の多様な群である。成長及び分化シグナル伝達に関与している抗原は、成長因子及び成長因子受容体であることが多い。がん患者において抗体の標的である成長因子には、CEA、上皮成長因子受容体（EGFR；ERBB1としても知られる）、ERBB2（HER2としても知られる）、ERBB3、MET（HGFととしても知られる）、インスリン様成長因子1受容体（IGF1R）、エフリン受容体A3（EPHA3）、腫瘍壞死因子（TNF）関連アポトーシス誘導リガンド受容体1（TRAILR1；TNFRSF10Aとしても知られる）、TRAILR2（TNFRSF10Bとしても知られる）及び核因子- κ Bリガンドの受容体活性化因子（RANKL；TNFSF11としても知られる）が含まれる。血管新生に関する抗原は、通常、血管内皮成長因子（VEGFR）、VEGF受容体（VEGFR）、インテグリン α 3、及びインテグリン α 5を含めた、新たな微小血管系の形成を支持するタンパク質または成長因子である。腫瘍間質及び細胞外マトリックスは、腫瘍に対する不可欠な支持構造である。治療標的である間質及び細胞外マトリックス抗原には、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）及びテネイシンが含まれる。

【0056】

臨床的がん免疫療法の背景において最も活発に研究されている免疫チェックポイント受容体である細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4（CTLA4；CD152としても知られる）及びプログラム細胞死タンパク質1（PD1；CD279としても知られる）は、両方とも阻害性受容体である。これらの受容体のいずれかを遮断する抗体の臨床的活性は、抗腫瘍免疫が多重レベルで増強され得ること、及び組み合わせストラテジーが理的に設計され得、メカニズム的考察及び前臨床モデルによってガイドされることを暗示する。

【0057】

PD1に対する2つのリガンドは、PD1リガンド1（PDL1；B7-H1及びCD274としても知られる）及びPDL2（B7-DC及びCD273としても知られる）である。PDL1はがん細胞上に発現され、T細胞上のその受容体PD1への結合を通じて、それはT細胞活性化／機能を阻害する。

【0058】

リンパ球活性化遺伝子3（LAG3；CD223としても知られる）、2B4（CD244としても知られる）、B及びTリンパ球アテニュエーター（BTLA；CD272としても知られる）、T細胞膜タンパク質3（TIM3；HAVcr2としても知られる）、アデノシンA2a受容体（A2aR）、ならびにキラー細胞阻害受容体のファミリーはそれぞれ、リンパ球活性の阻害、及びある場合にはリンパ球アネルギーの誘導と関連付けされている。これらの受容体の抗体標的化は、本発明の方法において用いられ得る。

【0059】

免疫共刺激分子をアゴナイズする（agonize）作用物質も、本発明の方法において有用である。そのような作用物質には、CD40及びOX40のアゴニストが含まれる

10

20

30

40

50

。 C D 4 0 は、抗原提示細胞 (A P C) 上に見い出される共刺激性タンパク質であり、それらの活性化に要される。これらの A P C には、食細胞 (マクロファージ及び樹状細胞) 及び B 細胞が含まれる。 C D 4 0 は、 T N F 受容体ファミリーの一部である。 C D 4 0 に対する一次活性化シグナル伝達分子は、 I F N 及び C D 4 0 リガンド (C D 4 0 L) である。 C D 4 0 を通じた刺激は、マクロファージを活性化する。

【 0 0 6 0 】

関心対象の抗 C C R 4 (C D 1 9 4) 抗体には、潜在的な抗炎症及び抗新生物活性を有する、 C - C ケモカイン受容体 4 (C C R 4) に対して向けられたヒト化モノクローナル抗体が含まれる。 C C R 2 は、様々な炎症性病状、例えば関節リウマチにおいて見い出され得る炎症性マクロファージ上に発現され；腫瘍促進性マクロファージ上に発現されるものとしても同定されている。 C C R 2 は調節性 T 細胞上にも発現され、 C C R 2 リガンドの C C L 2 は、腫瘍への調節性 T 細胞の導きを媒介する。調節性 T 細胞は、抗腫瘍 T 細胞に対する応答を抑制し、ゆえにそれらの阻害または枯渇が望まれる。

10

【 0 0 6 1 】

好都合なこととして、本発明の抗体または抗体の組み合わせは、キット、すなわち療法的使用のための取扱説明書とともに、所定の量の試薬のパッケージされた組み合わせで提供され得る。加えて、安定剤、バッファーなど、他の添加物が含まれ得る。特に、抗体は、通常では凍結乾燥された乾燥粉末として提供され得、溶解で、適当な濃度を有する試薬溶液を提供するであろう賦形剤を含む。

20

【 0 0 6 2 】

本発明の 1 種または複数種の抗体を含む治療用製剤は、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、所望の程度の純度を有する抗体と任意の生理学的に許容されるキャリア、賦形剤、または安定剤とを混合することによって、保管のために調製される (Remington ' s Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1 9 8 0))。抗体組成物は、適正診療規範 (good medical practice) と合致した形式で製剤化され、投薬され、及び投与される。この背景における考察のための因子には、治療されている特定の障害、治療されている特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、作用物質の送達の部位、投与の方法、投与のスケジュール、及び医師に公知の他の因子が含まれる。投与される対象となる抗体の「治療上有効量」は、そのような考察によって管理され、 C D 8 1 関連疾患を防止するのに必要な最少量である。

30

【 0 0 6 3 】

治療用量は、少なくとも約 0 . 0 1 μ g / k g 体重、少なくとも約 0 . 0 5 μ g / k g 体重、少なくとも約 0 . 1 μ g / k g 体重、少なくとも約 0 . 5 μ g / k g 体重、少なくとも約 1 μ g / k g 体重、少なくとも約 2 . 5 μ g / k g 体重、少なくとも約 5 μ g / k g 体重、かつ多くて約 1 0 0 μ g / k g 体重であり得る。そのような指針が、例えば抗体フラグメントの使用において、または抗体抱合体の使用において、活性剤の分子量に対して調整され得ることは、当業者によって理解されるであろう。投薬量は、局所投与、例えば鼻腔内、吸入等に対して、または全身投与、例えば i . m . 、 i . p . 、 i . v . 等に對しても変動され得る。

40

【 0 0 6 4 】

抗体は、活性を高める、または治療効果を別様に増加させる 1 種または複数種の作用物質とともに製剤化される必要はないが、任意でそれとともに製剤化される。これらは、一般的に、上記で用いられるのと同じ投薬量及び投与経路で、またはこれまで採用された投薬量の約 1 ~ 9 9 % で用いられる。

【 0 0 6 5 】

許容されるキャリア、賦形剤、または安定剤は、採用される投薬量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトарат、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含めた抗酸化物質；防腐剤 (オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウ

50

ム；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含めた、単糖、二糖、及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)；及び/またはTWEEN(商標)、PLURONIC(商標)、もしくはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン性界面活性剤を含む。インピボ投与に用いられる対象となる製剤は、無菌でなければならない。これは、無菌濾過を通した濾過によって容易に達成される。

10

【0066】

活性成分は、例えばコアセルベーション技法によってもしくは界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル内に、コロイド状薬物送達システム(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル)内に、またはマクロエマルジョン内に封入もされ得る。そのような技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

20

【0067】

抗CD81抗体は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、及び鼻腔内を含めた、任意の適切な手段によって投与される。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。加えて、抗CD81抗体は、特に漸減用量の抗体を用いた、パルス注入によって適切に投与される。

20

【0068】

疾患の防止または治療のために、抗体の適当な投薬量は、上記で規定される治療される対象となる疾患のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体が防止目的のために投与されるのかどうか、以前の療法、患者の病歴及び抗体への応答、ならびに主治医の裁量に依存する。抗体は、一度でまたは一連の治療にわたって、患者に適切に投与される。

30

【0069】

本発明の別の実施形態において、上で記載される障害の治療に有用な材料を含有する製造品が提供される。製造品は、容器及びラベルを含む。適切な容器には、例えばボトル、バイアル、シリンジ、及び試験管が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの多様な材料から形成され得る。容器は、病状を治療するのに有効である組成物を保持し、無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能な栓を有する静注液用バッグまたはバイアルであり得る)。組成物中の活性剤は、抗CD81抗体である。容器上のまたはそれと結び付いたラベルは、組成物が、選定される病状を治療するために用いられることを表示する。製造品は、リン酸緩衝生理食塩水、リングル液、及びデキストロース溶液など、薬学的に許容されるバッファーを含む第二の容器をさらに含み得る。それは、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用のための取扱説明書を有する添付文書を含めた、商業的な及びユーザーの立場から望ましい他の材料をさらに含み得る。

40

【0070】

本発明はここで十分に記載されているが、本発明の精神または範囲から逸脱することなく、様々な変更及び改変がなされ得ることは、当業者に明らかであろう。

【0071】

実験

以下の実施例は、本発明をどのように行き及び用いるかについての完全な開示及び説明

50

を当業者に提供するために提示されるものであり、本発明者らが彼らの発明と見なすものの範囲を限定することを意図されず、またはそれらは、下記の実験が、実施されたすべてのもしくは唯一の実験であることを表すことも意図されない。用いられる数（例えば、量、温度等）に関する正確性を保証するために努力がなされたが、いくらかの実験上の誤差及びズレは考慮されるべきである。別様に示されていない限り、部分は重量による部分であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度におけるものであり、及び圧力は大気におけるまたは大気付近のものである。

【0072】

本明細書において引用されるすべての刊行物及び特許出願は、あたかもそれぞれ個々の刊行物または特許出願が、参照により組み入れられることを具体的かつ個々に示されているかのように、参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0073】

本発明は、本発明の実践のための好ましい様態を含むように、本発明者によって見い出されたまたは提案された特定の実施形態の観点から記載されている。本開示に照らして、本発明の意図される範囲から逸脱することなく、例示される特定の実施形態において多数の改変及び変更がなされ得ることは、当業者によって解されるであろう。例えば、コドン冗長性により、タンパク質配列に影響を及ぼすことなく、根本的なDNA配列において変更がなされ得る。さらに、生物学的な機能等価性の考察により、種類または量における生物学的作用に影響を及ぼすことなく、タンパク質構造において変更がなされ得る。すべてのそのような改変は、添付の特許請求の範囲の内に含まれることが意図される。

20

【実施例】

【0074】

実施例 1

ヒトCD81に対して向けられたモノクローナル抗体のクローニング及び作出

本発明の抗体は、ヒト定常領域とのキメラとして產生され得る；例えば互いとペアにされる、または本発明のヒト化可変領域とペアにされる、マウス可変領域、例えば重鎖配列番号1及び軽鎖配列番号4を含む。ヒト化重鎖可変領域には、配列番号2及び配列番号3に記載されるものが含まれ、それは、本明細書において提供される軽鎖可変領域のいずれかとペアにされ得る。ヒト化軽鎖可変領域には、配列番号5及び配列番号6に記載されるものが含まれ、それは、本明細書において提供される重鎖可変領域のいずれかとペアにされ得る。（例示的なCDR配列に下線が引かれている。）

30

【化1】

（配列番号：1）

QIQLVQSGPELKPGETVKISCKASGYIFTDDSIHWVKQAPGKGLKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFAF
SLETSASTAYLQINNLKNEDAATYFCARLSPVVVIFIYWGQGTLVTVSA

（配列番号：2）

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFTDDSIHWVRQAPGQGLEWMGWINTETGEPTYADDFKGRFVF
SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARLSPVVVIFIYWGQGTLVTVSS

40

（配列番号：3）

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFTDDSIHWVKQAPGQGLKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFAF
SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARLSPVVVIFIYWGQGTLVTVSS

（配列番号：4）

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLHSRTRKNYLAWFQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRTG
SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSSYNLYAFGGGTKLEMR

【化2】

(配列番号 :5)

DIVMTQSPLSLPVTPGE~~PASISCKSSQ~~SLLHSRTRKNYLAWYLQKPGQSPQLLIYWASTRESGV~~DR~~FSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQSYNLYAFGQGTKLEIK

(配列番号 :6)

DIVMTQSPLSLPVTPGE~~PASMSCKSSQ~~SLLHSRTRKNYLAWFQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV~~DR~~FSG
SGSGTDFTLKISRVEAEDLAVYYCQSYNLYAFGQGTKLEIK

【0075】

10

機能解析

3D浸潤アッセイを用いて、細胞外マトリックス(ECM)へのヒト乳癌細胞(MDA - MB - 231)の浸潤性の阻害における抗 CD81 抗体の有効性を判定した。図 2 A 及び図 2 B に示されるデータ。MDA - MB - 231 スフェロイドの浸潤アッセイ画像は、表示される時間に撮られた。マウス抗ヒト抗体(マウス定常領域 IgG1 を有する配列番号 1 / 配列番号 4)は、ヒト乳癌細胞の浸潤を阻害する。図 2 B に示されるように、効果は 5A6 抗体に特異的であり、他の抗 CD81 抗体はヒト乳癌細胞の浸潤を阻害しない。

【0076】

20

インビボ異種移植モデルを用いて、マウスエフェクター細胞の背景における抗体有効性を査定した。図 3 A に示されるように、マウス抗ヒト CD81 モノクローナル抗体は、ヒト B 細胞リンパ腫(Raji)を抗原投与された SCID マウスの生存を延長させた。腫瘍を、100 μg のマウス抗ヒト CD81 mAb (マウス定常領域 IgG1 を有する配列番号 1 / 配列番号 4)、100 μg の対照マウス IgG1 、及び 100 μg のリツキシマブで週 1 回 × 4 処理した。生存は、抗 CD81 抗体による及びリツキシマブによる処理に対して同程度であった。マウスエフェクター細胞のこの背景において、定常領域をマウス IgG1 からマウス IgG2a に切り替えることは、 5A6 及びキメラ抗ヒト CD81 抗体の治療効力を増強することがさらに示された(図 3 B を参照のこと)。

【0077】

30

転移に関する異種移植モデルにおいて、マウス抗ヒト CD81 モノクローナル抗体 5A6 は、異種移植モデルにおけるヒト乳癌転移を低下させた(図 4 A に示される)。ヒト乳癌細胞(MDA - MB - 231)を、SCID マウスの乳房パッドヘマトリゲル中に注射した(2.5 × 10⁶ 個 / マウス)。マウスを、腫瘍接種後 7 日目に開始する、 100 μg の抗ヒト CD81 mAb (マウス定常領域 IgG1 を有する配列番号 1 / 配列番号 4)、または対照マウス IgG1 mAb で週 1 回 4 週間処理した。マウスエフェクター細胞のこの背景において、定常領域をマウス IgG1 からマウス IgG2a に切り替えることは、 5A6 及びキメラ抗ヒト CD81 抗体の腫瘍成長及び転移を低下させることにおける治療効力を増強することがさらに示された(図 4 B を参照のこと)。

【0078】

40

図 5 A に示されるように、マウス抗ヒト CD81 抗体 5A6 は、他の抗ヒト CD81 抗体よりも抗体依存性細胞傷害(ADC)をより良好に媒介し、 5A6 は、 Raji 細胞の直接殺傷においても、他の抗ヒト CD81 抗体及びリツキシマブよりも良好である。抗ヒト CD81 (配列番号 1 / 配列番号 4)は、ヒト B 細胞リンパ腫(Raji)の ADC を媒介し得るその能力において、抗 CD81 抗体の間で固有であった。

【0079】

50

図 5 B に示されるように、ヒトエフェクター細胞(精製されたヒト NK 細胞)の背景において、定常領域をヒト Fc 配列に切り替えることは ADC を向上させる。キメラ抗ヒト CD81 mAb (ヒト重鎖定常領域 IgG1 及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号 1 / 配列番号 4)は、マウス抗ヒト CD81 mAb (マウス定常領域 IgG1 を有する配列番号 1 / 配列番号 4)よりも有効であり、それはまた、 NK 細胞媒介性抗体依存性細胞傷害(ADC)においてリツキシマブよりも有効である。

【0080】

図5Cに示されるように、ヒトエフェクター細胞（精製されたヒトNK細胞）の背景において、ヒト化抗ヒトCD81抗体は、ADCC及びRaji細胞の直接殺傷をリツキシマブよりも良好に媒介した。ヒト化抗ヒトCD81 mAb（H1L1、ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号2／配列番号5）及びH2L1（ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号3／配列番号5）は、キメラ抗CD81抗体と同じぐらい有効であり、リツキシマブよりも有効であった。

【0081】

図6Aに示されるように、補体依存性細胞傷害を媒介することにおける抗体の活性は、マウスIgG2a定常領域またはヒトIgG1定常領域の使用によって非常に増大された。対照的に、マウスIgG1及びヒトIgG4は、CDCをあまり媒介しなかった。

10

【0082】

図6Bに示されるように、キメラ化抗ヒトCD81 IgG1（ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号1／配列番号4）によって、及びヒト化抗ヒトCD81 IgG1（ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖領域カッパを有する配列番号3／配列番号5）抗体によって媒介される補体依存性細胞傷害は、マウス抗ヒトCD81 IgG1のそれよりも非常に優れていた。

【0083】

図7Aに示されるように、腫瘍細胞（Raji）細胞は、とりわけより低い抗体濃度において、マウス抗ヒトCD81抗体5A6に結合するのにPBM（健常ドナーに由来する）よりも有効であり、1:1000の比率で存在する場合でさえ、抗CD81媒介性CDCに対してより感受性が高い。図7Bに示されるように、患者由来リンパ腫B細胞も、同じ生検標本に存在する正常T細胞よりも、CD81媒介性CDCに対して感受性が高かった。CD81は、濾胞性リンパ腫（FL）腫瘍B細胞上、ならびにFLサンプルの生検内の正常T細胞上で発現される。同じFL患者の腫瘍B及び正常T細胞に対する、マウス抗ヒトCD81抗体（マウス定常領域IgG2aを有する配列番号1／配列番号4）によるCDC媒介性殺傷は、腫瘍B細胞が、5A6媒介性殺傷に対して正常T細胞よりも感受性が高いことを明らかにしている。同じ結果が、キメラ抗ヒトCD81抗体（ヒト重鎖定常領域IgG1及びヒト軽鎖定常領域カッパを有する配列番号1／配列番号4）を用いて獲得された。

20

30

【図1】

【図1】

VH遺伝子のアミノ酸配列：

CDR1
配列番号：1 QIQLVQSGSPELKKPGETVKISCKASGYIFTDDSIHWWVKQAPGKG
配列番号：2 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTDDSIHWWVKQAPGQQ
配列番号：3 QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYIFTDDSIHWWVKQAPGKG

CDR2
配列番号：1 LKWMGWINETGEPTYADDKGRFAFSLETSASTAYLQINNL
配列番号：2 LEWMGWINETGEPTYADDKGRFAFSLETSASTAYLQISSL
配列番号：3 LKWMGWINETGEPTYADDKGRFAFSLETSASTAYLQISSL

CDR3
配列番号：1 KNEDAATYFCARLSPVVVIFYWGQGTLTVSSA
配列番号：2 KAEDTAVYYCARLSPVVVIFYWGQGTLTVSS
配列番号：3 KAEDTAVYYCARLSPVVVIFYWGQGTLTVSS

VL遺伝子のアミノ酸配列：

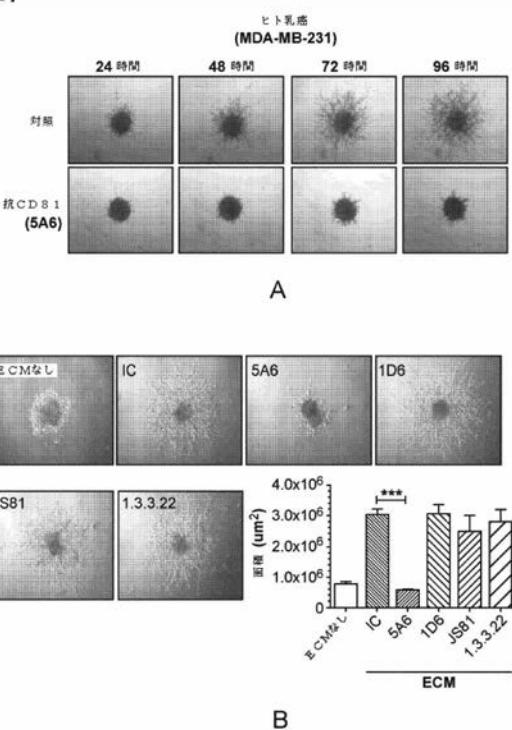
CDR1
配列番号：4 DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLHSRTRKKNYLAWFQ
配列番号：5 DIVMTQSPSLPVPGEPAISCKSSQSLLHSRTRKKNYLAWYL
配列番号：6 DIVMTQSPSLPVPGEPAISCKSSQSLLHSRTRKKNYLAWFQ

CDR2
配列番号：4 QKPGQSPKLLIYWA
RESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAE
配列番号：5 QKPGQSPQLLIYWA
RESGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAE
配列番号：6 QKPGQSPKLLIYWA
RESGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI
SRVEAE

CDR3
配列番号：4 DLAVYYCKQSYNLYAFGGGT
KLEMR
配列番号：5 DVGVYYCKQSYNLYAFGQG
TKLEIK
配列番号：6 DLAVYYCKQSYNLYAFGQG
TKLEIK

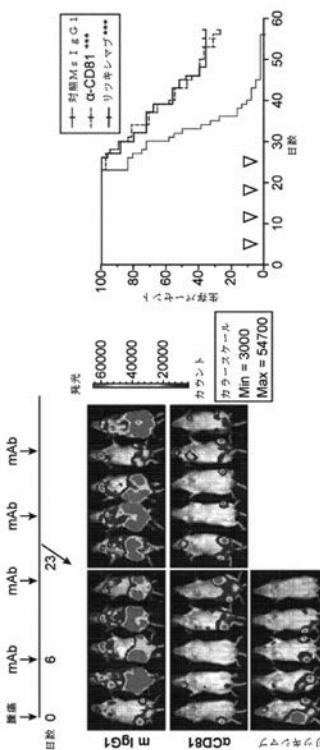
【図2】

【図2】



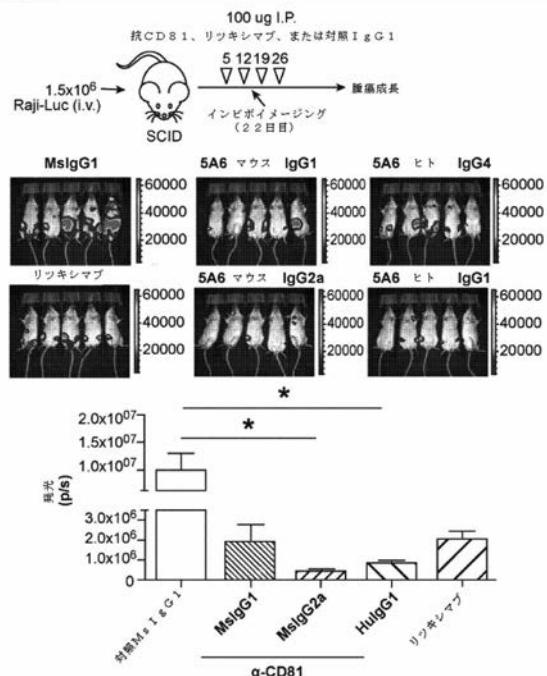
【図3 A】

【図3 A】



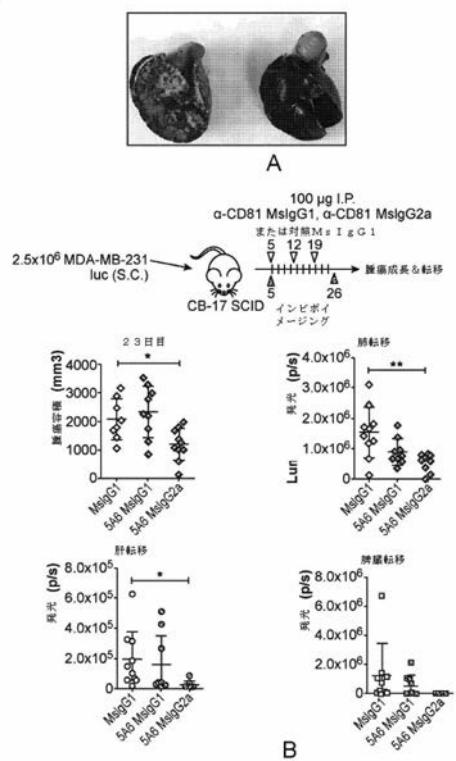
【図3 B】

【図3 B】



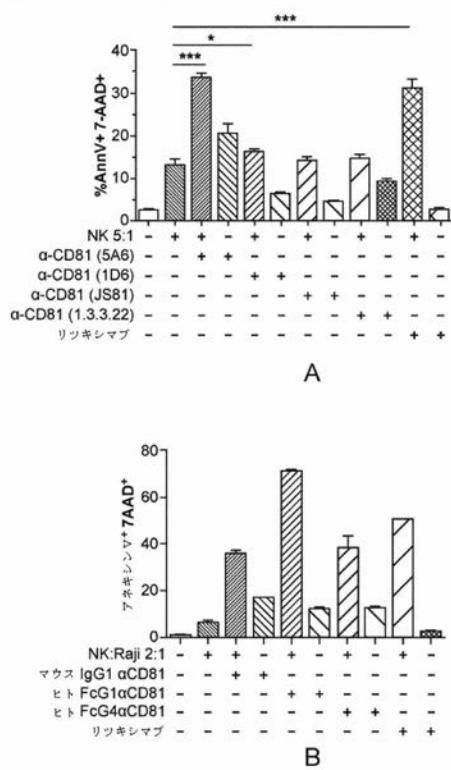
【図4】

【図4】



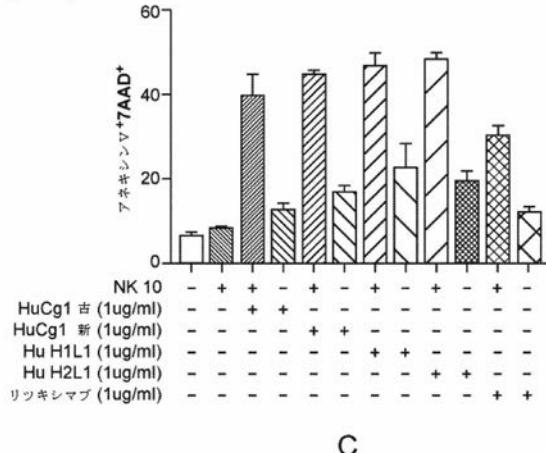
【図5-1】

【図5-1】



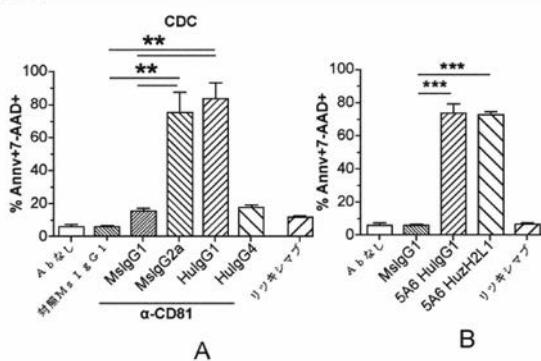
【図5-2】

【図5-2】



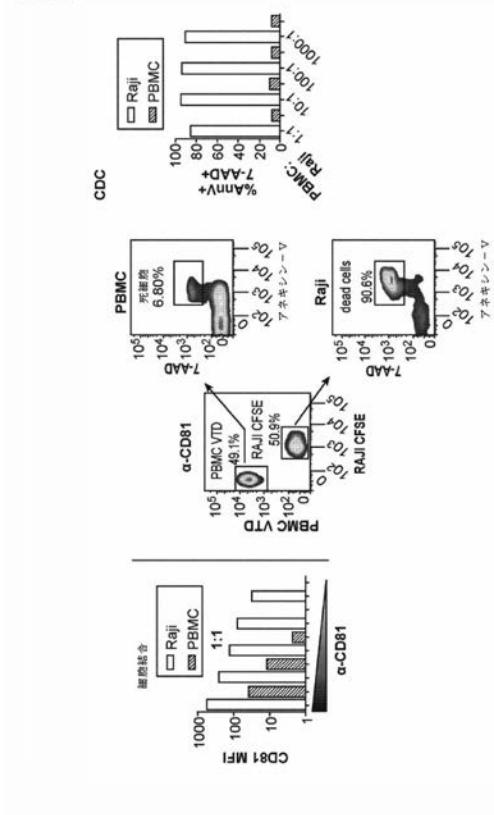
【図6】

【図6】



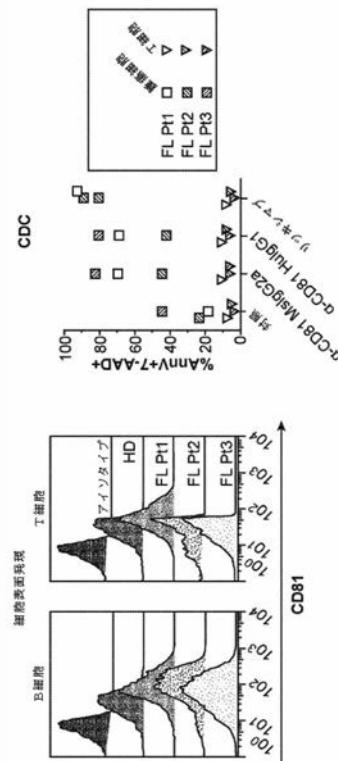
【図 7 A】

【図 7 A】



【図 7 B】

【図 7 B】



【配列表】

2019517813000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/37533
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/00; A61K 39/395; C12P 21/08; C07H 21/04; C12N 15/00; C12N 5/16 (2017.01) CPC - A61K 2039/505; C07K 2317/24; C07K 2317/60; C07K 2317/56; C07K 2317/565; C07H 21/00; C07K 16/28; C12N 15/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2015/0139990 A1 (SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.) 21 May 2015 (21.05.2015), Abstract, para [0111], [0121], [0202], and [0222]	1 ----- 2-3
Y	XU et al., Diversity in the CDR3 Region of VH Is Sufficient for Most Antibody Specificities. Immunity. 2000, Vol. 13(1), p. 37-45. Abstract; pg 39, Fig 3; and pg 40, col 1, top para	1 ----- 2-3
Y	GenPept_S43103, Ig kappa chain V-J region (4B1 VL) - mouse (fragment). GenPept Accession Number: S43103. 24 May 2001. [online]. [Retrieved on 2017.08.10]. Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/S43103 > DEFINITION, Region, and Origin, the region between amino acid residues 56-62	1 ----- 2-3
A	US 2009/0028851 A1 (STUHMER et al.) 29 January 2009 (29.01.2009), Abstract, para [0088], and SEQ ID NO: 166	2, 3/(2)
A	US 2008/0131912 A1 (TU et al.) 05 June 2008 (05.06.2008), Abstract, para [0062], [0067], and SEQ ID NO: 47	2, 3/(2)
A	US 2014/0030771 A1 (YU et al.) 30 January 2014 (30.01.2014), para [0014], and SEQ ID NO: 29(363 a.a), the region between amino acid residues 55-64	3/(1)
A	US 2012/0164160 A1 (SAHIN et al.) 28 June 2012 (28.06.2012), para [0006], [0015], [0107], [0110], and SEQ ID NO: 143, the region between amino acid residues 56-62	1-3
A	US 2009/0053225 A1 (MARZARI et al.) 26 February 2009 (26.02.2009), para [0011], [0016], and SEQ ID NO: 2, the region between amino acid residues 56-62	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 August 2017	Date of mailing of the international search report 21 SEP 2017	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/37533						
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)								
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:								
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:							
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:							
3.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4-18 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).							
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)								
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:								
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.							
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.							
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:							
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:							
<p>Remark on Protest</p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/37533
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAGI et al., Complementary costimulation of human T-cell subpopulations by cluster of differentiation 28 (CD28) and CD81. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012, Vol. 109(5), p. 1613-8. Entire documentation, especially Abstract	1-3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/46	(2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A
C 1 2 N 15/62	(2006.01)	C 0 7 K 16/46
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 15/62
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 N 5/10 C 1 2 P 21/08

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

- (72)発明者 レヴィー, ショシャナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 5, スタンフォード, キャンパス ドライブ 2 6 9, スタンフォード ユニバーシティ メディカル センター, デパートメント オブ メディシン, ディビジョン オブ オンコロジー, シーシーエスアール ビルディング
- (72)発明者 マラベル, オーレリアン
フランス国 セデックス 9 4 8 0 5 ビルジュイフ, リュ エドゥアール - ヴァイян, 1 1 4
- (72)発明者 ラジャパクサ, ランジャニ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 5, スタンフォード, キャンパス ドライブ 2 6 9, スタンフォード ユニバーシティ メディカル センター, デパートメント オブ メディシン, ディビジョン オブ オンコロジー, シーシーエスアール ビルディング
- (72)発明者 ベンセス - カタラン, フェリペ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 5, スタンフォード, キャンパス ドライブ 2 6 9, スタンフォード ユニバーシティ メディカル センター, デパートメント オブ メディシン, ディビジョン オブ オンコロジー, シーシーエスアール ビルディング
- (72)発明者 クオ, チウン - チ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 5, スタンフォード, キャンパス ドライブ 2 6 9, スタンフォード ユニバーシティ メディカル センター, デパートメント オブ メディシン, ディビジョン オブ オンコロジー, シーシーエスアール ビルディング
- (72)発明者 リウ, ジエ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 3, パロ アルト, ストックトン プレイス 3 1 1 9
- (72)発明者 レヴィー, ロナルド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 5, スタンフォード, キャンパス ドライブ 2 6 9, スタンフォード ユニバーシティ メディカル センター, デパートメント オブ メディシン, ディビジョン オブ オンコロジー, シーシーエスアール ビルディング

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA01 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25
CA44
4C085 AA14 AA16 BB36 BB42 EE01

4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74