

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2022年4月14日(14.04.2022)



(10) 国際公開番号  
**WO 2022/075439 A1**

(51) 国際特許分類:  
G01N 33/84 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)  
C07K 14/705 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/037296

(22) 国際出願日: 2021年10月8日(08.10.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2020-170478 2020年10月8日(08.10.2020) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東海国立大学機構 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKAI NATIONAL HIGHER EDUCATION AND RESEARCH SYSTEM) [JP/

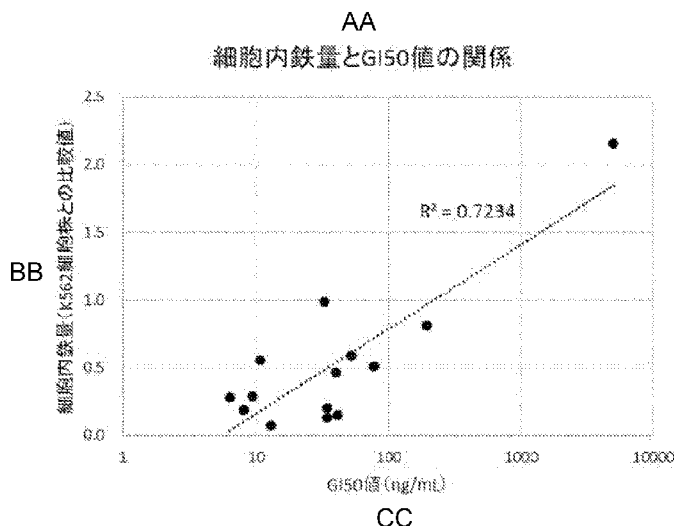
JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP). 株式会社ペルセウスプロテオミクス(PERSEUS PROTEOMICS INC.) [JP/JP]; 〒1530041 東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パークビル Tokyo (JP).

(72) 発明者: 清井 仁 (KIYOI Hitoshi); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP). 石川 裕一 (ISHIKAWA Yuichi); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP). 中島 麻梨絵 (NAKASHIMA Marie); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP). 大平 悠太 (OHIRA Yuta); 〒1530041 東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パークビル 株式会社ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP).

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING SENSITIVITY OR MEDICINAL EFFECT OF ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODY

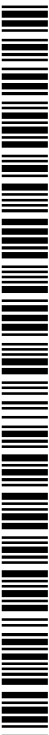
(54) 発明の名称: 抗トランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性の判定方法

[図4]



- AA Relationship between intracellular iron amount and GI50 value
- BB Intracellular iron amount (comparison value with respect to K562 cell strain)
- CC GI50 value

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for determining the sensitivity or medicinal effect of an anti-transferrin receptor antibody. The present invention provides a method that is for determining the sensitivity or medicinal effect of an anti-human transferrin receptor antibody having an effect of inhibiting binding between human transferrin and a human transferrin receptor, and that uses the amount of intracellular iron as an index.



WO 2022/075439 A1

大屋 順平(OYA Junpei); 〒1530041 東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パークビル 株式会社  
ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP). 野村 富美子(NOMURA Fumiko); 〒1530041 東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パークビル 株式会社  
ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP). 勝見 恵子(KATSUMI Keiko); 〒1530041 東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パークビル 株式会社  
ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP). 阪本 愛弥(SAKAMOTO Aya); 〒1530041 東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パークビル 株式会社  
ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP). 鵜飼 由範(UKAI Yoshinori); 〒1530041 東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パークビル 株式会社  
ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP). 松浦 正(MATSUURA Tadashi); 〒1530041 東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パークビル 株式会社  
ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP).

(74) 代理人:特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(57) 要約: 本発明の課題は、抗トランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性の判定方法を提供することである。本発明によれば、細胞内鉄量を指標とする、ヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合を阻害する作用を有する抗ヒトトランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性の判定方法が提供される。

## 明 細 書

発明の名称：

抗トランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性の判定方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、抗トランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性の判定方法に関する。

### 背景技術

[0002] トランスフェリンレセプター (T r a n s f e r r i n r e c e p t o r ; T f R) は、細胞表面に発現する Type I I 膜たんぱく質である。T f R は、リガンドのトランスフェリン (T F) と結合することにより、鉄を細胞内へ運び込み、細胞の生存および分裂を維持する。T f R は、多くの正常細胞においては発現が低く、例えば皮膚表皮基底細胞、小腸上皮細胞などいくつかの細胞において低発現なことが報告されている (非特許文献 1 ~ 3) 。しかし、赤芽球細胞及び胎盤栄養膜細胞では鉄取り込み需要が高いため、T f R が高発現している (非特許文献 4 及び 5) 。

[0003] 特許文献 1 には、抗トランスフェリンレセプター抗体が、血液がんなどのがんの治療に有用であることが記載されている。また、特許文献 2 には、抗トランスフェリンレセプター抗体を含む、細胞内への鉄の取り込み阻害剤が記載されている。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0004] 特許文献 1 : 国際公開 WO 2 0 1 4 / 0 7 3 6 4 1 号公報

特許文献 2 : 国際公開 WO 2 0 2 0 / 1 0 5 6 2 1 号公報

#### 非特許文献

[0005] 非特許文献 1 : P. Ponka, C. N. Lok, The trans-  
ferrin receptor: role in health a-  
nd disease, Int. J. Biochem. Cell

Biol. 31 (1999) 1111-1137.

非特許文献2: D. R. Richardson, P. Ponka, The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells, Biochim. Biophys. Acta 1331 (1997) 1-40.

非特許文献3: Daniels TR, Delgado T, Rodriguez JA, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. Clinical Immunology (2006) 121, 144-158

非特許文献4: J. E. Levy, O. Jin, Y. Fujiwara, F. Kuo, N. C. Andrews, Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system, Nat. Genet. 21 (1999) 396-399.

非特許文献5: Khatun R, Wu Y, Kanenishi K, Ueno M, Tanaka S, Hata T, Sakamoto H., Immunohistochemical study of transferrin receptor expression in the placenta of pre-eclamptic pregnancy., Placenta. 2003;24(8-9):870-6.

**発明の概要**

## 発明が解決しようとする課題

[0006] 上記の通り、抗トランスフェリンレセプター抗体は、がんなどの疾患に対する治療効果を有するが、その薬効又は感受性を判定することについての知見は知られていなかった。本発明は、抗トランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性の判定方法を提供することを解決すべき課題とした。

## 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記課題を解決するために検討した結果、細胞内鉄量を、抗トランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性を判定するための指標（バイオマーカー）として利用できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

<1> 細胞内鉄量を指標とする、ヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合を阻害する作用を有する抗ヒトトランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性の判定方法。

<2> 細胞内鉄量が前記抗体の薬効と相関することを利用した薬効又は感受性の判定方法である、<1>に記載の方法。

<3> 基準サンプルの鉄量との相対値により前記抗体の薬効または感受性を判定する、<1>又は<2>に記載の方法。

<4> 細胞内鉄量が基準値より低い場合に、前記抗体の薬効又は感受性が高いと判定する、<1>から<3>の何れか一に記載の方法。

<5> 前記抗体のがんに対する薬効又は感受性を判定する、<1>から<4>の何れか一に記載の方法。

<6> がんが、血液がんである、<5>に記載の方法。

<7> がんが、急性骨髄性白血病（AML）である、<5>又は<6>に記載の方法。

<8> 前記抗体が、ヒトトランスフェリンレセプターの629番目～633番目のアミノ酸を認識する抗体である、<1>から<7>の何れか一に記載の方法。

<9> 前記抗体が、重鎖第1相補性決定領域 (VH CDR1)、重鎖第2相補性決定領域 (VH CDR2)、重鎖第3相補性決定領域 (VH CDR3) がそれぞれ配列番号1、2、3であり、及び軽鎖第1相補性決定領域 (VL CDR1)、軽鎖第2相補性決定領域 (VL CDR2)、軽鎖第3相補性決定領域 (VL CDR3) がそれぞれ配列番号4、5、6である抗体である、<1>から<8>の何れかーに記載の方法。

<10> 前記抗体が、重鎖が配列番号7を有し、軽鎖が配列番号8を有する抗体である、<1>から<9>の何れかーに記載の方法。

### 発明の効果

[0009] 本発明によれば、抗トランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性を判定することが可能になる。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、それぞれのTfR mutant fragmentのpoint mutationを行う部位を示す。

[図2]図2は、TfR436と可溶性wild type TfR (sTfR) 及びTfR mutant fragmentの反応性を示す。

[図3]図3は、TfR436のTf-TfR結合阻害活性を示す。

[図4]図4は、AML臨床検体における細胞内鉄量とGI50値の関係を示す。

[図5]図5は、Kasumi-1皮下移植モデルにおけるTfR436抗体の抗腫瘍効果を示す。

[図6]図6は、HL60皮下移植モデルにおけるTfR436抗体の抗腫瘍効果を示す。

[図7]図7は、KO52尾静脈移植モデルにおけるTfR436抗体の延命効果を示す。

[図8]図8は、CCRF-CEM静脈移植モデルにおけるTfR436抗体の延命効果を示す。

### 発明を実施するための形態

[0011] 次に、本発明について更に詳細に説明する。

定義および一般的技術

本明細書において別段定義しない限り、本発明に関して使用した科学技術用語は、当業者に通常理解されている意味を含むものとする。一般に、本明細書に記載の細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションに関して使用した命名法およびその技術は、当技術分野で周知のものであり、通常使用されている。

[0012] 本発明の方法および技術は一般に、別段示さない限り、当技術分野で周知である従来の方法に従って、本明細書全体にわたって引用し論じた種々の一般的参照文献およびより具体的な参照文献に記載されているように実施する。

[0013] <本発明の方法>

本発明によるヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合を阻害する作用を有する抗ヒトトランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性の判定方法は、細胞内鉄量を指標とする方法である。抗ヒトトランスフェリンレセプター抗体は、ヒトトランスフェリンレセプターの629番目～633番目のアミノ酸を認識する抗体が好ましい。具体的には、細胞内鉄量が基準値より低い場合に、抗体の薬効又は感受性が高いと判定することができる。

[0014] 本発明の方法は、好ましくは、細胞内鉄量が前記抗体の薬効と相関することを利用した薬効又は感受性の判定方法である。さらに好ましくは、基準サンプルの鉄量との相対値により前記抗体の薬効または感受性を判定することができる。基準サンプルとしては、例えばK562などの基準となる細胞、または基準となる量の鉄を含む対照サンプルを使用することができる。例えば、基準サンプルとしてK562細胞を使用する場合には、K562細胞における細胞内鉄量に対する相対値（比較値）としての、測定対象細胞における細胞内鉄量が1以下である場合、好ましくは0.8以下である場合、より

好ましくは0.7以下である場合、さらに好ましくは0.6以下である場合、抗体の薬効又は感受性が高いと判定することができる。

[0015] 血清中の3価鉄は、トランスフェリンに結合した状態で輸送されている。3価鉄が結合したトランスフェリンは、細胞表面のトランスフェリンレセプターに結合すると細胞内のエンドソームに取り込まれる。トランスフェリンと一緒に細胞内に取り込まれた3価鉄は、エンドソーム内で、メタロレダクターゼSTEAP3により2価鉄に還元される。2価鉄は、DMT1（2価金属トランスポーター1）により細胞質に運ばれ、プールされる（Labile iron poolとも言う）。Labile iron poolの2価鉄は、DNA合成やDNA修復のために利用されたり、ミトコンドリアでのエネルギー生成、ヘム合成及びFe-Sクラスター生合成のために利用されたり、または貯蔵鉄として貯蔵される。また細胞内の2価鉄の一部は、細胞膜に存在するフェロポーチンを介して、細胞の内側から外側へと輸送される。上記の通り、細胞内鉄は、細胞内での鉄利用に関わりがある。本発明においては、細胞内鉄量を指標とすることによって、具体的には、細胞内鉄量が基準値より低い場合に、抗体の薬効又は感受性が高いと判定することができることが見いだされた。

[0016] 本発明の方法により抗トランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性を判定するためには、被験者由来の生体試料（検体）中の、細胞内鉄量を測定すること、及び当該測定結果を、対照レベル（基準値）と比較することにより行うことができる。

[0017] 被験者としては、抗トランスフェリンレセプター抗体による治療を必要とする被験者であり、一例としては、がんを有している被験者が挙げられる。生体試料としては、例えば生検検体（被験者ががん患者である場合には、がん細胞を含む検体など）が挙げられる。

[0018] 細胞内鉄量の測定は、常法により行うことができ、市販の測定キットを用いて行うこともできる。例えば、メタロアッセイ鉄測定LS（フェロジン法）（Metallogenics #FE31M）によれば、試料中の鉄（ $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ）をマイクロプレートリーダー（96穴ウェル）により迅速

に定量することができる。

[0019] 本発明において、抗トランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性を判定するためには、抗トランスフェリンレセプター抗体の投与前において、被験者由来の生体試料中の細胞内鉄量を測定すればよい。

[0020] 細胞内鉄量が、所定の基準値より低いと判断される場合には、その被験者は、抗トランスフェリンレセプター抗体の薬効が高い、即ち、抗トランスフェリンレセプター抗体に対して感受性であると判定できる。従って、細胞内鉄量は、治療効果を期待できる患者に対して積極的に治療を継続するためのマーカーとして使用することができる。一方、細胞内鉄量が、所定の基準値より高いと判断される場合は、その被験者は、抗トランスフェリンレセプター抗体の薬効が低い、即ち、抗トランスフェリンレセプター抗体に対して感受性がないと判定できる。判定は、具体的な数値を基準にして判定することのみならず、色の濃淡等、視覚通じて把握できる数値以外の基準に基づいて判定するものでもよい。

[0021] 本発明においては、抗体のがんに対する薬効又は感受性を判定することが好ましい。がんとしては、固形癌（例えば、肺がん、大腸がん、胃がん、膀胱がん、膵臓がん、前立腺がん、肝がん、子宮頸がん、子宮がん、卵巣がん、乳がん、頭頸部がん、皮膚がんなど）、または血液がん（例えば、白血病、リンパ腫、骨髄腫など）のいずれでもよいが、好ましくは血液がんである。特に好ましくは、がんは急性骨髄性白血病（AML）である。

[0022] <抗体について>

#### T f R

ヒトトランスフェリン受容体（T f R）はヒト三番染色体にコードされる760アミノ酸から構成される一回膜貫通型タンパクである（配列番号9）。このタンパクはCD71抗原としても知られ、細胞の鉄の取り込みに関与し、細胞の増殖に関与すると考えられている。本発明のT f Rは、構造上特別に限定せず、単量体、多量体、細胞膜に発現している *i n t a c t f o r m*、細胞外領域に構成された可溶化 *f o r m*、*t r u n c a t e d f o r m*

m、また、遺伝子の変異や、欠損などにより *mutation form*、リン酸化などにより翻訳後修飾を受けた *form* なども含め、すべてヒト *TfR* を意味する。

[0023] 反応する及び反応性

本明細書において、「反応する」と「反応性」は特別に示さない限り、同じことを意味する。すなわち、抗体が抗原を認識すること。この抗原は、細胞膜に発現する *intact TfR* でもよいし、*truncated form* や、可溶化 *form* でも良い。また、立体構造を保った *TfR* でもよいし、変性した *TfR* でもよい。反応性を検討する手段として、フローサイトメーター (FACS)、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、*western blot*、蛍光微量測定技術 (FMAT)、表面プラズモン共鳴 (BIACore)、免疫染色、免疫沈降などが挙げられる。

[0024] フローサイトメーターに用いる抗体としては、FITCなどの蛍光物質、ビオチンなどにより標識された抗体であっても、標識をされていない抗体であってもよい。用いた抗体の標識の有無、その種類により、蛍光標識アビジン、蛍光標識抗ヒト免疫グロブリン抗体などを使用する。反応性は、十分量の抗 *TfR* 抗体 (通常最終濃度が  $0.01 \sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を検体に加えて行い、陰性対照抗体、陽性対照抗体の反応性との比較を行うことにより評価することができる。

[0025] 抗体

本明細書では必要に応じて、慣習に従い以下の略号 (括弧内) を使用する。

重鎖 (H鎖)、軽鎖 (L鎖)、重鎖可変領域 (VH)、軽鎖可変領域 (VL)、相補性決定領域 (CDR)、第1相補性決定領域 (CDR1)、第2相補性決定領域 (CDR2)、第3相補性決定領域 (CDR3) 重鎖の第1相補性決定領域 (VH CDR1)、重鎖の第2相補性決定領域 (VH CDR2)、重鎖の第3相補性決定領域 (VH CDR3) 軽鎖の第1相補性決定領域 (VL CDR1)、軽鎖の第2相補性決定領域 (VL CDR2)

、軽鎖の第3相補性決定領域（VL CDR3）。

[0026] 本明細書において、「抗体」という用語は、イムノグロブリンと同義であり、当技術分野で通常知られている通りに理解されるべきである。具体的には、抗体という用語は、抗体を作製する任意の特定の方法により限定されるものではない。例えば、抗体という用語には、それだけに限らないが、組換え抗体、モノクローナル抗体、およびポリクローナル抗体がある。

[0027] 本明細書において、「ヒト抗体」という用語は、可変領域および定常領域の配列がヒト配列である任意の抗体を意味する。その用語は、ヒト遺伝子に由来する配列を有するが、例えば、考えられる免疫原性の低下、親和性の増大、望ましくない折りたたみを引き起こす可能性があるシステインの除去などを行うように変化させている抗体を包含する。その用語はまた、ヒト細胞に特有でないグリコシル化を施すことができる、非ヒト細胞中で組換えにより作製されたそのような抗体をも包含する。これらの抗体は、様々な形で調製することができる。

[0028] 本明細書において、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト由来の抗体を指し、非ヒト種の抗体配列に特徴的なアミノ酸残基が、ヒト抗体の対応する位置で認められる残基と置換されている。この「ヒト化」の工程が、その結果得られる抗体のヒトでの免疫原性を低下させると考えられる。当技術分野で周知の技術を使用して、非ヒト由来の抗体をヒト化できることが理解されるであろう。例えば、Winterら、*Immunol. Today* 14:43~46 (1993) を参照されたい。対象とする抗体は、CH1、CH2、CH3、ヒンジドメイン、および／またはフレームワークドメインを対応するヒト配列と置換する組換えDNA技術によって工学的に作製することができる。例えば、WO92/02190、ならびに米国特許第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,761号、第5,693,792号、第5,714,350号、および第5,777,085号を参照できる。本明細書において、「ヒト化抗体」という用語は、その意味の範囲内で、キメラヒト抗体およびCDR移植抗体を含む。

- [0029] 抗体の可変領域においてフレームワーク領域（F R）の配列は、対応する抗原に対する特異的結合性に実質的な影響のない限り、特に限定されない。ヒト抗体のF R領域を用いることが好ましいが、ヒト以外の動物種（例えばマウスやラット）のF R領域を用いることもできる。
- [0030] 抗体の一態様において、可変領域に加えて定常領域を含む（例えばIgG型抗体）。定常領域の配列は特に限定されない。例えば、公知のヒト抗体の定常領域を用いることができる。ヒト抗体の重鎖定常領域（C H）としては、ヒトイムノグロブリン（以下、h I g Gと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、h I g Gクラスのもの好適であり、更にh I g Gクラスに属するh I g G 1、h I g G 2、h I g G 3、h I g G 4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、軽鎖定常領域（C L）としては、h I gに属すればいかなるものでもよく、κクラスあるいはλクラスのものを用いることができる。また、ヒト以外の動物種（例えばマウスやラット）の定常領域を用いることもできる。
- [0031] 本明細書において、「改変体」や「改変抗体」とは、親抗体の可変領域（C D R配列および／またはF R配列）のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入されていることである。
- 本発明において、「親抗体」とは、V Hは配列番号7、V Lは配列番号8で示されたアミノ酸配列を有するT f R 4 3 6抗体である。アミノ酸配列において、1または数個（例えば、1から8個、好ましくは1から5個、より好ましくは1から3個、特に好ましくは1または2個）のアミノ酸が欠失、付加、置換及び／または挿入されている。T f Rに対する結合活性を有する抗体のアミノ酸配列を調製するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法（Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of D

NA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, H J(1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel, TA(1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492) などを用いて、TfRに対する結合活性を有する抗体のアミノ酸配列に適宜変異を導入することにより、TfRに対する結合活性を有する抗体と機能的に同等な改変抗体を調製することができる。このように、抗体の可変領域又は定常領域において、1または数個のアミノ酸が変異しており、TfRに対する結合活性を有する抗体を使用することもできる。

[0032] 本明細書において、「活性が親抗体と同等である」とは、ヒトTfRへの結合活性が同等であることを意味する。「同等」とは、必ずしも同程度の活性である必要はなく、活性が増強されていてもよいし、又、活性を有する限り活性が減少していてもよい。活性が減少している抗体としては、例えば、元の抗体と比較して30%以上の活性、好ましくは50%以上の活性、より好ましくは80%以上の活性、さらに好ましくは90%以上の活性、特に好ましくは95%以上の活性を有する抗体を挙げることができる。

[0033] 結合活性としては、抗原を認識することを意味する。この抗原は、細胞膜に発現する intact TfRでもよいし、truncated formや、可溶化formでも良い。また、立体構造を保ったTfRでもよいし、変性したTfRでもよい。たとえば、結合活性を検討する手段として、フローサイトメーター (FACS)、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、western-blot、蛍光微量測定技術 (FMAT)、表面プラズモン共鳴 (BIAcore) などが挙げられる。

[0034] 抗体のTf-TfR結合阻害活性の測定は以下の通り行うことができる。

TfR溶液を基板（96-well plate等）に分注して静置し、固相化し、ブロッキングする。次いで、HRP標識したTf溶液を分注し、さらに抗体を添加して、室温で反応させる。その後、基板を洗浄し、発色試薬（TMB等）を添加して反応させ、プレートリーダーで吸光度を測定する。上記操作により、当該抗体が、Tf-TfR結合阻害活性を評価することができる。

[0035] 抗体は、その由来で限定されず、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体など、如何なる動物由来の抗体でもよい。又、キメラ化抗体、ヒト化抗体などでもよい。本発明における抗体の好ましい様態の一つとして、ヒト抗体である。

[0036] 抗体は、後述する抗体を産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。例えば、本発明で記載されているアミノ酸配列に翻訳後に修飾を受ける場合も本発明に含まれる。更に、既知の翻訳後修飾以外の部位に対する翻訳後修飾も、本発明に含まれる。また、抗体を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の抗体のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。本発明においては、このような抗体を使用してもよい。既知の翻訳後修飾以外の部位に対する翻訳後修飾も、本発明に含まれる。

[0037] 抗体の作製

（1）ファージディスプレイライブラリーにより抗原と反応するscFvの取得

抗体の取得は、当技術分野で知られているいくつかの方法に従って調製することができる。例えば、ファージディスプレイ技術を使用して、TfRに対する親和性が様々である抗体のレパートリーを含むライブラリーを提供することができる。次いで、これらのライブラリーをスクリーニングして、TfRに対する抗体を同定し単離することができる。好ましくは、ファージライブラリーは、ヒトB細胞から単離されたmRNAから調製されたヒトVLおよびVHcDNAを使用して生成されるscFvファージディスプレイラ

イブラリーである。そのようなライブラリーを調製しスクリーニングする方法は当技術分野で知られている。ヒト T f R を抗原としてスクリーニングした反応性を示すファージクローンから遺伝物質を回収する。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする V H 及び V L の DNA 配列を決定することができる。この s c F v の配列を用いて、s c F v を I g G 化すれば、ヒト抗体を取得することができる。

[0038] (2) s c F v の I g G 化 (ヒト抗体の作製)

H鎖またL鎖の発現ベクターを作製し、宿主細胞に発現させ、分泌した上清の回収・精製によりヒト抗体を取得する。また、V H 及び V L を同一ベクターに発現すること (タンデム型) によりヒト抗体の取得もできる。これらの方法は周知であり、W O 9 2 / 0 1 0 4 7、W O 9 2 / 2 0 7 9 1、W O 9 3 / 0 6 2 1 3、W O 9 3 / 1 1 2 3 6、W O 9 3 / 1 9 1 7 2、W O 9 5 / 0 1 4 3 8、W O 9 5 / 1 5 3 8 8、W O 9 7 / 1 0 3 5 4 などを参考にすることができる。

[0039] 具体的には、V H をコードする DNA を、重鎖定常領域 (C H 1、C H 2 および C H 3) をコードする他の DNA 分子と連結することによって、完全長重鎖遺伝子を取得することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野で知られており (例えば、K a b a t, E. A. ら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242)、これらの領域を包含する DNA 断片は標準的な PCR 増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g E、I g M または I g D の定常領域でよいが、最も好ましくは I g G 1 または I g G 2 の定常領域である。I g G 1 定常領域配列は、G m (1)、G m (2)、G m (3) や G m (17) など、異なる個人間で生じることが知られている任意の様々な対立遺伝子またはアロタイプでよい。これらのアロタイプは、I g G 1

定常領域中の天然に存在するアミノ酸置換に相当する。

[0040] VLをコードするDNAを、軽鎖定常領域CLをコードする他のDNA分子と連結することによって、完全長L鎖遺伝子（ならびにFab軽鎖遺伝子）を取得することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野で知られており（例えば、Kabata, E. A. ら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242）、これらの領域を包含するDNA断片は標準的なPCR増幅によって得ることができる。軽鎖定常領域は、 $\kappa$ または $\lambda$ の定常領域でよい。 $\kappa$ 定常領域は、Inv(1)、Inv(2)やInv(3)など、異なる個人間で生じることが知られている任意の様々な対立遺伝子でよい。 $\lambda$ 定常領域は、3つの $\lambda$ 遺伝子のいずれかに由来するものでよい。

[0041] 上記のように得られたH鎖またL鎖をコードするDNAを発現ベクター中に挿入することにより、発現ベクターを作製し、宿主細胞に発現させ、分泌した上清の回収・精製によりヒト抗体を取得する。発現ベクターには、プラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、カリフラワーモザイクウイルスやタバコモザイクウイルスなどの植物ウイルス、コスミド、YAC、EBV由来エピソームなどが挙げられる。発現ベクターおよび発現調節配列は、使用する発現用宿主細胞と適合するように選択する。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別々のベクター中に挿入することができるし、また両方の遺伝子を同じ発現ベクター中に挿入することもできる。抗体遺伝子を、標準的な方法（例えば、抗体遺伝子断片上の相補的な制限部位とベクターの連結、または制限部位が存在しない場合には平滑末端連結）によって発現ベクター中に挿入する。

[0042] 好都合なベクターは、上記に記載のように任意のVHまたはVL配列を容易に挿入し発現させることができるように工学的に作製された適当な制限部

位を有する機能的に完全なヒトC<sub>H</sub>またはC<sub>L</sub>イムノグロブリン配列をコードするものである。そのようなベクターでは、通常、挿入されたJ領域中のスプライス供与部位とヒトCドメインに先行するスプライス受容部位の間で、またヒトC<sub>H</sub>エキソン内に存在するスプライス領域でもスプライシングが起こる。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域の下流にある天然の染色体部位で起こる。組換え発現ベクターはまた、宿主細胞由来の抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることもできる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドがインフレームでイムノグロブリン鎖のアミノ末端と連結するようにベクター中にクローン化することができる。シグナルペプチドは、イムノグロブリンシグナルペプチドでもよく、あるいは異種性シグナルペプチド（すなわち非イムノグロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）でもよい。

[0043] 抗体の発現ベクターは、抗体遺伝子および制御配列に加えて、宿主細胞中でのベクターの複製を制御する配列（例えば複製起点）や選択マーカー遺伝子などのさらなる配列を有してよい。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を促進する。例えば、通常、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞上に、G418、ハイグロマイシンやメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する。好ましい選択マーカー遺伝子には、デヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子（dhfr-宿主細胞でメトトレキサート選択／増幅とともに使用する）、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（G418選択用）、およびグルタミン酸合成酵素遺伝子がある。

[0044] 以上の方法で作製された抗体遺伝子発現ベクターにより宿主細胞を形質転換する。宿主細胞としては細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、抗体を産生させる可能であればいかなる細胞でもよいが、動物細胞が好ましい。動物細胞として、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO/dhfr（-）細胞CHO/DG44細胞、サル由来細胞COS細胞(A. Wright & S.L. Morrison, J. Immunol. 160, 3393-3402 (1998))、SP2/O細胞(

マウスミエローマ)(K.Motmans et al., Eur.J.Cancer Prev. 5, 512-5199(1996), R.P.Junghans et al., Cancer Res. 50, 1495-1502 (1990)) など挙げられる。また、形質転換にはリポフェクション法(R.W.Malone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 6007 (1989), P.L.Felgner et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 7413 (1987)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(F.L.Graham & A.J.van der Eb, Virology 52, 456-467(1973))、DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。

[0045] 形質転換体を培養した後、形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト抗体を分離する。抗体の分離・精製には、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて利用することができる。

[0046] 抗体断片

抗体を基にして又は抗体をコードする遺伝子の配列情報を基にして抗体断片を作製することができる。抗体断片としてはFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv抗体が挙げられる。

[0047] Fabは、IgGをシステイン存在下パパイン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにCH1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される分子量約5万の断片である。本発明では、上記抗体をパパイン消化することにより得ることができる。また、上記抗体のH鎖の一部及びL鎖をコードするDNAを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体よりFabを調製することもできる。

[0048] Fab'は、後述のF(ab')<sub>2</sub>のH鎖間のジスルフィド結合を切断することにより得られる分子量が約5万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化し、還元剤を用いてジスルフィド結合を切断することにより得られる。また、Fab同様に、Fab'をコードするDNAを用いて遺伝子工学的

に調製することもできる。

[0049]  $F(ab')_2$ は、IgGをペプシン消化することにより得られる、L鎖とH鎖可変領域、並びにCH1ドメイン及びヒンジ部の一部からなるH鎖フラグメントとから構成される断片 ( $F(ab')$ ) がジスルフィド結合で結合した分子量約10万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化することにより得られる。また、 $F(ab)$ 同様に、 $F(ab')_2$ をコードするDNAを用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

[0050]  $scFv$ は、H鎖可変領域とL鎖可変領域とからなる $Fv$ を、片方の鎖のC末端と他方のN末端とを適当なペプチドリンカーで連結し一本鎖化した抗体断片である。ペプチドリンカーとしては例えば柔軟性の高い(GGGGS)<sub>3</sub>などを用いることができる。例えば、上記抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域をコードするDNAとペプチドリンカーをコードするDNAを用いて $scFv$ 抗体をコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体より $scFv$ を調製することができる。

[0051]  $dsFv$ は、H鎖可変領域及びL鎖可変領域の適切な位置にCys残基を導入し、H鎖可変領域とL鎖可変領域とをジスルフィド結合により安定化させた $Fv$ 断片である。各鎖におけるCys残基の導入位置は分子モデリングにより予測される立体構造に基づき決定することができる。本発明では例えば上記抗体のH鎖可変領域及びL鎖可変領域のアミノ酸配列から立体構造を予測し、かかる予測に基づき変異を導入したH鎖可変領域及びL鎖可変領域をそれぞれコードするDNAを構築し、これを適当なベクターに組み込み、そして当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体より $dsFv$ を調製することができる。

[0052] 尚、適当なリンカーを用いて $scFv$ 抗体、 $dcFv$ 抗体などを連結させたり、ストレプトアビジンを融合させたりして抗体断片を多量体化することもできる。

[0053] 以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例に

よって限定されるものではない。

### 実施例

[0054] 以下の実施例においては、国際公開WO2014/073641号公報の段落0090及び0091に記載されているTfR436抗体を使用した。

[0055] TfR436抗体のCDR配列を以下に示す。

VH CDR1 : SYGMH (配列番号1)

VH CDR2 : VISYDGSNKYYADSVKG (配列番号2)

VH CDR3 : DSNFWSGYYSPVDV (配列番号3)

VL CDR1 : TRSSGSIASNSVQ (配列番号4)

VL CDR2 : YEDTQRPS (配列番号5)

VL CDR3 : QSYDSAYHWV (配列番号6)

[0056] TfR436抗体のVH配列及びVL配列を以下に示す。

TfR436 VH (配列番号7)

DVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFKSYGM  
HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF  
TISRDN SKNTLYLQMNSLRGEDTAVYYCARD SNF  
WSGYYSPPVDVWGQGTTVTVSS

[0057] TfR436 VL (配列番号8)

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNSV  
QWYQQRPGSAPITVIYEDTQRPSGVPDRFSGSID  
SSSNSASLTISGLQTEDEADYYCQSYDSAYHWVF  
GGGTKLAVL

[0058] 実施例1 : TfR436抗体の結合部位の同定

TfR436抗体はマウスTfRと交差反応しないが、ハムスターTfRと交差反応性を示した。TfRにおけるTransferrin (TF) 結合部位 (569~760番目のアミノ酸) のアミノ酸配列のアライメントを行った。ヒトTfR配列において、ハムスターと同じ、マウスと異なるアミノ酸をピックアップした。ピックアップされたアミノ酸を図1に示されたよ

うに point mutation を行い、可溶性 TfR mutant fragment を作製した。

[0059] (1) 可溶性 wild type TfR (sTfR) 及び TfR mutant fragment (MF1~MF7) の作製

ヒト TfR 細胞外 domain (89~760 番目のアミノ酸)、あるいは図1に示されたそれぞれ TfR mutant fragment (MF1~MF7) と AAARGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH (配列番号10) をコードする塩基配列を全合成した。発現 vector pCAGGS (非特許文献2. : Niwa et al., 1991) にネオマイシン耐性遺伝子と DHFR 遺伝子を組み込んだベクターのマルチクロニングサイトにそれぞれ合成した遺伝子を挿入し、pCAGGS-Neo-DHFR-sTfR-myc-his 発現 plasmid を作製した。Expifectamine (Thermo Fisher scientific) を用いて Exp i 293 細胞 (Thermo Fisher scientific) に上記 plasmid をトランスフェクションし、37℃、8%CO<sub>2</sub>、135rpmで5日間培養した。その後遠心により培養上清を回収し、AKTA prime (Cytiva) に HisTrap HP (Cytiva) カラムを接続し、結合バッファーに 20mM Imidazole / DPBS、溶出バッファーに 500mM Imidazole / DPBS を用いて sTfR あるいは MF1~MF7 を精製した。溶出したタンパク質は Zeba spin column (Thermo scientific) を用いて 30mM HEPES、5% trehalose、pH7.2 にバッファー交換した。

[0060] (2) TfR436 抗体の結合部位の同定

上記精製した sTfR あるいは MF1~MF7 を PBST (Phosphate Buffered Saline with Tween20, TaKaRa) にて希釈し、600ng/mL から 3 倍希釈で 7 段階に調製した。その後 Ni-NTA HisSorb Strips 96-well plate (QIAGEN) に希釈液を 100µL/well に分注し

、シェーカーに乗せ、室温で反応させた。1時間後PBST Bufferで5回洗浄し、TfR436抗体(1 $\mu$ g/mL)を100 $\mu$ L/wellに分注し、シェーカーに乗せ、室温で1時間反応させた。その後、PBST Bufferで5回洗浄し、50,000倍希釈した二次抗体F(ab')<sub>2</sub> Fragment Anti-Human IgG Fc $\gamma$  (Jackson Immuno Research) 100 $\mu$ L/wellに分注し室温で1時間反応させた。PBST Bufferで5回洗浄後TMB Soluble Reagent (High Sensitivity) (Scy Tek Laboratories)を100 $\mu$ L/wellに分注し、室温、暗所で3分間反応させた後、TMB Stop Buffer (Scy Tek Laboratories)を100 $\mu$ L/well添加し、1分間シェーカーで振とうさせ、プレートリーダーで450nm (ref. 620nm)の吸光度を測定した。

[0061] 結果は図2に示すように、TfR436抗体はTfR mutant fragment MF5との反応性低下がみられたが、その他のmutant fragmentとの反応性の低下は見られなかった。つまり、TfRの629番目、630番目、633番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換すると、TfR436抗体がTfRと認識できなくなる。アミノ酸629番目～633番目はTfR436抗体の認識エピトープであることが示唆された。

[0062] 実施例2：Tf-TfR結合阻害におけるTfR436抗体及び比較用抗体の比較

(1) 比較用抗体A24の作製

特許文献US2008/0193453にヒトTfRに対するA24抗体が記載されている。TfR436抗体とこの抗体を比較するため、寄託されたHybridomaを入手し、抗体を生産した。具体的には、HybridomaをRPMI1640 (Thermo Fisher Scientific)、FBS10%の培地に細胞濃度が1~2 $\times$ 10<sup>5</sup>/mLになるようにまきこみ、37 $^{\circ}$ Cの

5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。拡大培養後、遠心により細胞を回収し、PBSで2回洗浄後無血清培地cosmedium005（コスモバイオ）、0.5% Nutridoma-CS（Roche）にてさらに550mLになるまで拡大培養した。細胞がコンフルエントになってから5日後に遠心により培養上清を回収した。

[0063] 回収された上清をプロテインA担体（Ab-Capcher Extra：プロテノバ社）にアプライし、プロテインAと結合している抗体を0.1Mグリシン塩酸緩衝液（pH2.7）で溶出し、速やかに1M Tris塩酸緩衝液（pH 8.5）で中和した。その後ウルトラセル限外ろ過ディスク（Merck Millipore）を用いてPBSにバッファー交換を行った。

[0064] (2) Tf-TfR結合阻害におけるTfR436抗体及び他社抗体の比較  
実施例1に記載されたsTfRをPBSTにて5.0μg/mLになるように調整し、MaxiSorp 96-well plate（Nunc）に希釈液を100μL/wellに分注して4℃で一晩静置し固相化した。翌日に固相液を捨て、100%ブロックエース（DS Pharma Biomedical）200μL/wellで室温静置しブロッキングした。1時間後PBST Bufferで5回洗浄後、HRP標識したTf（2μg/mL）50μL/wellを分注し、更にTfR436抗体、A24抗体（10μg/mLから2倍希釈系列）またはholo-Tf（Sigma）300μg/mLから2倍希釈系列）を50μL/wellで添加した。室温で1時間反応させた後、PBST Bufferで5回洗浄し、TMB Soluble Reagent（High Sensitivity）を100μL/wellに分注し、室温暗所で反応させた。25分間後、TMB Stop Bufferを100μL/well添加し、1分間シェーカーで震とうさせた。その後、プレートリーダーで450nm（ref. 620nm）の吸光度を測定した。

[0065] 結果は図3に示すように、TfR436抗体は遥かに低い用量で（100

ng/mL) 完全にTf-TfRの結合を阻害した。一方、A24抗体は10μg/mLの用量でも完全にTf-TfRの結合を阻害できず、Tf-TfRの結合を50%しか阻害できなかった。Tf-TfRの結合阻害において、TfR436抗体が優れていることが示唆された。

[0066] 実施例3：AML臨床検体における細胞内鉄量とTfR436抗体による増殖抑制効果(GI50)の比較

AML臨床検体における細胞内鉄量と、TfR436抗体暴露による増殖抑制効果の関係性を検証するため、以下の試験を実施した。

[0067] (1) TfR436抗体によるAML臨床検体の増殖抑制効果

AML臨床検体を用いてTfR436抗体暴露による増殖抑制効果(GI50値)を算出した。具体的には、AML臨床検体(骨髄または末梢血)を単核球分離し、得られた細胞を5000個/90μLとなるようにMethoCult H4534 Classic without EPO (STEM CELL #ST-04534)に懸濁し、96ウェルプレートに播種した。TfR436抗体をRPMI-1640 Medium (ThermoFisher #11875119)で希釈し、最終濃度5000、1000、500、100、50、10、5、1ng/mL、および0(無添加)になるよう、AML臨床検体由来細胞に10μLずつ添加した。37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で7日間培養後、各ウェルに、100μLのCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega #G7572)を添加・混和し、10分後にルミノメーターにて蛍光検出した。培地のみ添加したウェルをblankとして、TfR436抗体無添加ウェルにおける平均値を100%とした時の、各抗体濃度における増殖率を算出した後、XLfitを用いてGI50値を算出した。

[0068] (2) AML臨床検体における細胞内鉄量の測定

AML臨床検体を用いて細胞内鉄量を測定した。具体的には、AML臨床検体から $1.0 \times 10^7$  cellsを採取した後、DPBSにて3回洗浄した

。細胞ペレットに250 $\mu$ LのLysis M Reagent (Roche #04719956001)と2.5 $\mu$ Lの6N-HClを添加・混和し、室温にて1時間静置した。遠心後、回収した上清を鉄定量に用いた。同様の操作により、標準サンプルとしてK562細胞株を調製し、凍結ストックを作成した。鉄定量は、メタロアッセイ鉄測定LS (フェロジン法) (Metallogenics #FE31M)に従い実施した。なお、AML臨床検体の細胞内鉄定量毎に、K562細胞株の細胞内鉄定量も実施し、その比較値を算出した。

[0069] (3) 細胞内鉄量と、TfR436抗体による増殖抑制効果との関係

各AML臨床検体における細胞内鉄量と、TfR436抗体による増殖抑制効果(GI50値)の関係を図4に示した。

その結果、AML臨床検体の細胞内鉄量とGI50値は相関性を示し、細胞内鉄量が低値ならばGI50値も低値となる傾向を示した。このことから、AML臨床検体において細胞内鉄量が低値ならば、TfR436抗体により十分な薬理効果を示す可能性が示唆された。

[0070] 実施例4：細胞株における細胞内鉄量とTfR436抗体による増殖抑制効果(GI50)の比較

実施例3にて検証した細胞内鉄量とTfR436抗体暴露による増殖抑制効果の関係性を実証するため、細胞株を用いて以下の試験を実施した。

[0071] (1) 細胞株における細胞内鉄量の測定

Kasumi-1 (American Type Culture Collection, ATCC #CRL-2724)、HL60 (JCRB細胞バンク #JCRB0085)、KO52 (JCRB細胞バンク #JCRB0123)、CCRF-CEM (ATCC #CCL-119)を用いて細胞内鉄量を測定した。具体的には、各細胞株が $1.0 \times 10^5$  cells/mLとなるように、Kasumi-1およびHL60はRPMI1640+20%FBS培地に、KO52はAlpha-MEM+10%FBS培地に、CCRF-CEMはRPMI1640+10%FBS培地にそれぞれ

れ懸濁し、T75フラスコに20mL播種した。ネガティブコントロールモノクローナル抗体を最終濃度 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ の5% $\text{CO}_2$ インキュベーター内で培養した。96時間後に細胞を回収し、PBSで洗浄した後、各細胞株 $1.0\times 10^7$  cellsあたり、 $250\mu\text{L}$ のLysis M Reagentと $2.5\mu\text{L}$ の6N-HClを添加・混和し、室温にて1時間静置した。遠心後、回収した上清を鉄定量に用いた。標準サンプルとして、RPMI1640+10%FBS培地で他の細胞株と同様に培養して回収し、調製したK562(ATCC #CCL-243)細胞株の上清を鉄定量に用いた。鉄定量は、メタロアッセイ鉄測定LS(フェロジン法)に従い実施した。測定した鉄量は、試料として使用した細胞数で除し、1細胞あたりの細胞内鉄量とした後、K562細胞株の細胞内鉄量に対する各細胞株の細胞内鉄量の比較値を算出した。

[0072] (2) TfR436抗体による細胞株の増殖抑制効果

Kasumi-1、HL60、KO52、CCRF-CEMを用いてTfR436抗体暴露による増殖抑制効果(GI50値)を算出した。具体的には、各細胞株を10000個/ $50\mu\text{L}$ となるように各種最適な細胞培養用培地に懸濁し、96ウェルプレートに播種した。TfR436抗体及びネガティブコントロールモノクローナル抗体を同様の培地を用いて、最終濃度 $5000\text{ng}/\text{mL}$ から公比3.16倍となるようにそれぞれ9段階に希釈した。これらの抗体添加培地と抗体無添加培地を、各細胞株に $50\mu\text{L}$ ずつ添加した。 $37^{\circ}\text{C}$ の5% $\text{CO}_2$ インキュベーター内で96時間培養後、各ウェルに、 $20\mu\text{L}$ のCellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega #G3580)を添加・混和し、 $37^{\circ}\text{C}$ の5% $\text{CO}_2$ インキュベーター内で4時間静置後、 $505\text{nm}$ の吸光度を検出した。培地のみ添加したウェルをブランクとして、抗体無添加のウェルにおける平均値を増殖率100%として、各抗体濃度における増殖率を算出した後、MasterPlex ReaderFitを用いてGI50値を算出した。

[0073] (3) 各細胞株における細胞内鉄量とTfR436抗体による増殖抑制効果  
各細胞株における細胞内鉄量とTfR436抗体による増殖抑制効果（GI50値）を表1に示した。

その結果、実施例3の図4における細胞内鉄量とTfR436抗体による増殖抑制効果（GI50値）の関係性に則り、検証した細胞株はいずれも細胞内鉄量が低値であり、GI50値は低値を示した。TfR436抗体は、これらの細胞内鉄量が低値の細胞株に対して十分な薬理効果を示す可能性が示唆された。

[0074] [表1]

細胞株	K562との比較値	GI50 (ng/mL)
Kasumi-1	0.43	39.0
HL60	0.21	43.5
KO52	0.33	84.0
CCRF-CEM	0.13	37.5

[0075] 実施例5：Kasumi-1皮下移植モデルにおけるTfR436抗体の抗腫瘍効果

cell line-derived xenograft (CDX) モデルにおけるTfR436抗体の薬理効果を検証するため、実施例4にて検証したKasumi-1の皮下移植モデルを用いて以下の試験を実施した。

急性骨髄性白血病細胞株であるKasumi-1をRPMI-1640, 10%FBS, 1%P/Sで培養した。拡大培養した細胞を1,000rpm、5分遠心してペレットを回収し、抗生物質および血清不含RPMI-1640培地に懸濁して $2 \times 10^8$ /mLに調製し、氷冷下で等量のMatrigelを添加、転倒混和し、その100 $\mu$ Lをマウスの右腹側部皮下に移植した。移植細胞数は $1 \times 10^7$ /匹である。

[0076] 移植した個体の平均腫瘍体積を経時的に測定し、腫瘍体積の増加傾向が認められた移植21日後に、生物実験データ統計解析EXSUS (Version 8.1、(株)EPクロア)を用いた腫瘍体積による層別無作為化割付を実

施した。群構成は、 $n = 8$ 、4群である。

投与量を  $10 \text{ mL} / \text{kg}$  として陰性抗体群 ( $10 \text{ mg} / \text{kg}$ ) を対照群として、投与群には、TfR436抗体を1, 3,  $10 \text{ mg} / \text{kg}$  の用量で週1回、計2回投与を実施した。投与後、週2回のノギスによる腫瘍測定を行い、各群の腫瘍体積を求めた。抗腫瘍効果の判定は腫瘍体積により判定した。

[0077] 腫瘍体積は下式にて算出した。

$$\text{腫瘍体積} = (\text{短径})^2 \times \text{長径} \times 0.5$$

[0078] 腫瘍体積平均値の経時的变化を図5に示す。TfR436抗体  $1 \text{ mg} / \text{kg}$  以上の濃度において用量依存的抗腫効果が確認され、陰性抗体群に対して全ての群において有意差が認められた (2群は  $p = 0.0012$ 、3, 4群は  $p < 0.0001$ )。特に  $10 \text{ mg} / \text{kg}$  投与群については、全ての個体の腫瘍が消失し、試験終了日 (移植60日) においても腫瘍の再増殖は確認されなかった。

[0079] 実施例6: HL60皮下移植モデルにおけるTfR436抗体の抗腫瘍効果 cell line-derived xenograft (CDX) モデルにおけるTfR436抗体の薬理効果を検証するため、実施例4にて検証したHL60の皮下移植モデルを用いて以下の試験を実施した。

急性前骨髄性白血病細胞株HL60を RPMI-1640, 10% FBS, 1% P/Sで培養した。拡大培養した細胞を  $1,000 \text{ rpm}$  5分遠心してペレットを回収し、抗生物質および血清不含RPMI-1640培地に懸濁して  $2 \times 10^8 / \text{mL}$  に調製し、氷冷下で等量のMatrigelを添加、転倒混和し、その  $100 \mu\text{L}$  をマウスの右腹側部皮下に移植した。移植細胞数は  $1 \times 10^7 / \text{匹}$  である。

[0080] 移植した個体の平均腫瘍体積を経時的に測定し、腫瘍体積の増加傾向が認められた移植9日後に、生物実験データ統計解析EXSUS (Version 8.1, (株)EPクロア) を用いた腫瘍体積による層別無作為化割付を実施した。群構成は  $n = 5$ 、5群である。

投与量を  $10 \text{ mL} / \text{kg}$  として陰性対照群にCitrate、投与群には

、T f R 4 3 6 抗体を0. 3, 1, 3, 1 0 m g / k g の用量で週1回、計4回投与を実施した。投与後、週2回のノギスによる腫瘍測定を行い、各群の腫瘍体積を求めた。抗腫瘍効果の判定は腫瘍体積により判定した。

[0081] 腫瘍体積は下式にて算出した。

$$\text{腫瘍体積} = (\text{短径})^2 \times \text{長径} \times 0. 5$$

[0082] 腫瘍体積平均値の経時的变化を図6に示す。T f R 4 3 6 抗体1 m g / k g 以上の濃度において有意な用量依存的抗腫効果が確認された。特に1 0 m g / k g 投与群については、全ての個体の腫瘍が消失し、投与終了4 9 日後（移植7 9 日）においても腫瘍の再増殖は認められなかった。統計的有意差は、1 0 m g / k g 群で確認された（ $p = 0. 0 0 1 1$ ）。

[0083] 実施例7：K O 5 2 尾静脈移植モデルにおけるT f R 4 3 6 抗体の延命効果  
c e l l l i n e - d e r i v e d x e n o g r a f t ( C D X ) モデルにおけるT f R 4 3 6 抗体の薬理効果を検証するため、実施例4にて検証したK O 5 2 の尾静脈移植モデルを用いて以下の試験を実施した。

急性骨髓芽球性白血病細胞株K O 5 2 をA l p h a - M E M , 1 0 % F B S , 1 % P / S で培養した。拡大培養をした細胞を1, 0 0 0 r p m 1 0 分遠心してペレットを回収し、注射用生理食塩水に懸濁して $2. 5 \times 1 0^7 / \text{m L}$ に調製した。調製した細胞懸濁液を氷中保存で飼育室に持ち込み、2 9 G マイジェクターに1匹分ずつ充填し、その $2 0 0 \mu \text{L}$ をマウス尾静脈より移植した。移植細胞数は $5 \times 1 0^6 / \text{匹}$ である。

[0084] 細胞を移植した3日後に、生物実験データ統計解析E X S U S ( V e r s i o n 8. 1、(株)EPクロア)を用いた体重による層別無作為化割付を実施した。細胞移植時に細胞液が漏れるなど不具合のあった個体は、あらかじめ群分けより除外した。群構成は $n = 6$ 、3群である。群分け後、週2～3回の頻度でマウスの観察を行い、全身状態の観察により、衰弱や体温低下など瀕死の兆候が確認された場合には、人道的エンドポイントとして安楽死させた。

投与量を1 0 m L / k g として陰性対照群にC i t r a t e、投与群には

TfR436抗体を10mg/kgの用量で2週1回、計2回投与を実施した。2つの投与群の1群には、2回目の投与後、4週目で再び2週1回投与を行い、計4回の投与を実施した。

[0085] 試験期間中マウスの観察を行い、生死判定を実施した。移植後104日に試験終了とし、マウスの生存時間による統計解析を実施した。その結果、TfR436抗体投与群に陰性対照群との比較により2回投与群では、Log-Rank検定は $p=0.0003$ 、Wilcoxon検定は $p=0.0003$ を示し、4回投与群では、Log-Rank検定は $p=0.0019$ 、Wilcoxon検定は $p=0.0016$ を示し、それぞれ有意な延命効果が確認された(図7)。なお、4回投与群の1匹の死亡例は、剖検の結果、KO52移植の影響ではなく、scidマウス特有の自然発生胸腺腫による死亡と判定した。

[0086] 実施例8：CCRF-CEM静脈移植モデルにおけるTfR436抗体の延命効果

cell line-derived xenograft (CDX) モデルにおけるTfR436抗体の薬理効果を検証するため、実施例4にて検証したCCRF-CEMの静脈移植モデルを用いて以下の試験を実施した。

T細胞性急性白血病細胞株CCRF-CEMをRPMI-1640, 10%FBS, 1%P/Sで培養した。拡大培養した細胞を1,000rpm、5分遠心してペレットを回収し、注射用生理食塩水に懸濁して $2.5 \times 10^7$ /mLに調製し、その200 $\mu$ Lをマウス尾静脈より移植した。移植細胞数は $5 \times 10^6$ /匹である。

[0087] 細胞を移植した3日後に、生物実験データ統計解析EXSUS (Version 8.1、(株)EPクロア)を用いた体重による層別無作為化割付を実施した。細胞移植時に細胞液が漏れるなど不具合のあった個体は、あらかじめ群分けより除外した。群構成は、 $n=10$ 、5群である。

[0088] 投与は、群分け日当日の移植3日後および移植7日後を初回投与とし、表2の通りのスケジュールで、計5回、群毎に実施した。試験終了まで、週2

回の頻度でマウスの体重測定を実施した。移植30日後まで週2回、31日以降については試験終了の移植97日後まで毎日マウスの全身状態の観察を実施した。週2回の頻度でマウスの体重測定を実施し、群分け時の体重に対する割合を算出した。体重減少率が20%を超えた場合には人道的エンドポイントとし、マウスを安楽死させた。その他に、全身状態の観察により、衰弱や体温低下などの兆候が確認された場合にも、人道的エンドポイントとした。

[0089] [表2]

群	処置	投与用量 (mg/kg)	n	投与頻度	総投与 回数	投与 経路	初回 投与 日
1	ビヒクル(PBS)	0	10	2回/週	5回	静脈	Day3
2	TfR436	1	10	2回/週	5回	静脈	Day3
3	TfR436	10	10	2回/週	5回	静脈	Day3
4	TfR436	1	10	2回/週	5回	静脈	Day7
5	TfR436	10	10	2回/週	5回	静脈	Day7

[0090] すべての投与群について、陰性対照PBS群との比較において有意な延命効果(Wilcoxon検定)が確認された(図8及び表3の初回投与が移植3日後の高用量群(Day3、10mg/kg)については、試験終了時に80%のマウスが生存しており、顕著な延命効果が確認された。また、低用量群においてもTfR436はマウスの生存期間を有意に延長し、優れた延命効果を示した。

[0091]

[表3]

群	検定	調整p値	マーク
1 PBS	—	—	—
2 (Day 3, 1mg/kg)	Log-Rank	0.0005	***
	Wilcoxon	p<0.0001	***
3 (Day 3, 10mg/kg)	Log-Rank	p<0.0001	***
	Wilcoxon	p<0.0001	***
4 (Day 7, 1mg/kg)	Log-Rank	0.1069	n. s.
	Wilcoxon	0.0074	**
5 (Day 7, 10mg/kg)	Log-Rank	0.0052	**
	Wilcoxon	0.0001	***

n. s. :有意差なし

\* : p<0.05

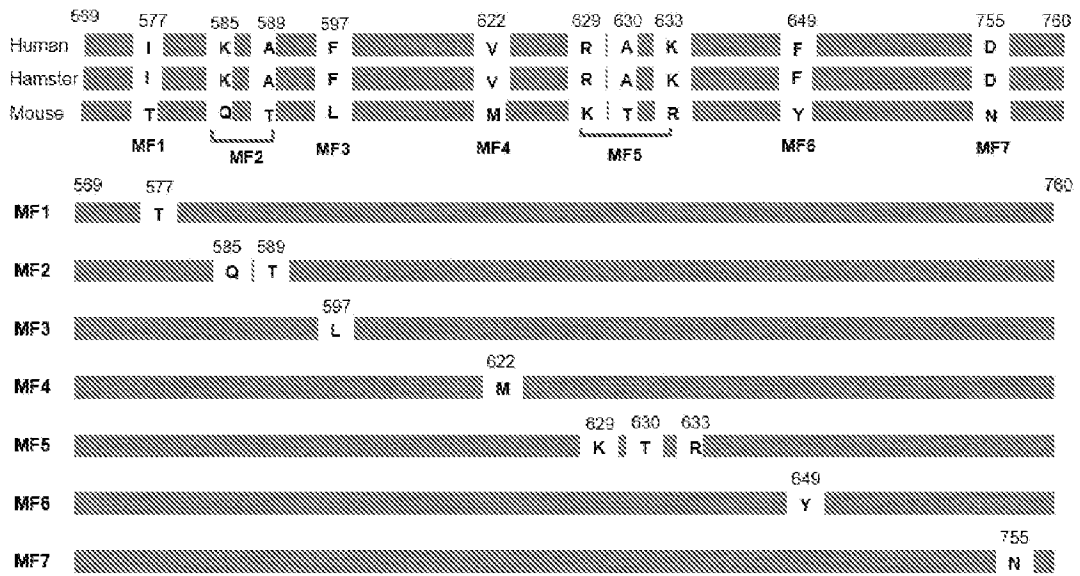
\*\* : p<0.01

\*\*\* : p<0.001

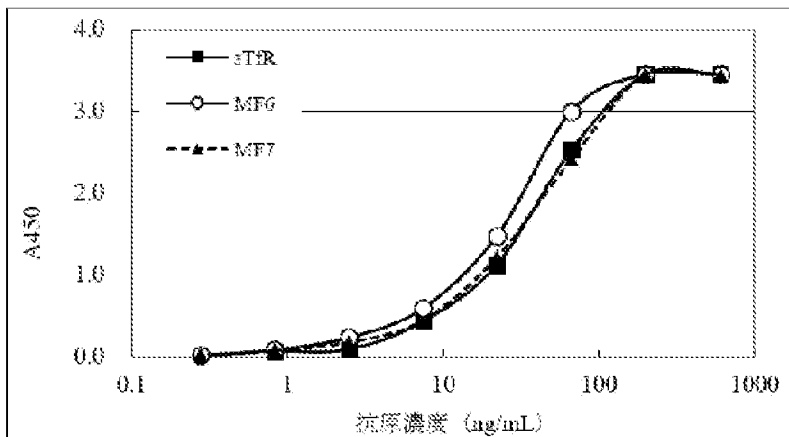
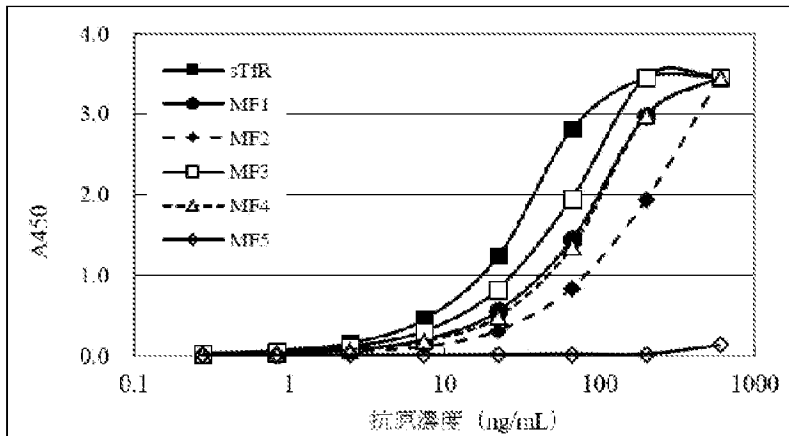
## 請求の範囲

- [請求項1] 細胞内鉄量を指標とする、ヒトトランスフェリンとヒトトランスフェリンレセプターとの結合を阻害する作用を有する抗ヒトトランスフェリンレセプター抗体の薬効又は感受性の判定方法。
- [請求項2] 細胞内鉄量が前記抗体の薬効と相関することを利用した薬効又は感受性の判定方法である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 基準サンプルの鉄量との相対値により前記抗体の薬効または感受性を判定する、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 細胞内鉄量が基準値より低い場合に、前記抗体の薬効又は感受性が高いと判定する、請求項1から3の何れか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記抗体のがんに対する薬効又は感受性を判定する、請求項1から4の何れか一項に記載の方法。
- [請求項6] がんが、血液がんである、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] がんが、急性骨髄性白血病（AML）である、請求項5又は6に記載の方法。
- [請求項8] 前記抗体が、ヒトトランスフェリンレセプターの629番目～633番目のアミノ酸を認識する抗体である、請求項1から7の何れか一項に記載の方法。
- [請求項9] 前記抗体が、重鎖第1相補性決定領域（VH CDR1）、重鎖第2相補性決定領域（VH CDR2）、重鎖第3相補性決定領域（VH CDR3）がそれぞれ配列番号1、2、3であり、及び軽鎖第1相補性決定領域（VL CDR1）、軽鎖第2相補性決定領域（VL CDR2）、軽鎖第3相補性決定領域（VL CDR3）がそれぞれ配列番号4、5、6である抗体である、請求項1から8の何れか一項に記載の方法。
- [請求項10] 前記抗体が、重鎖が配列番号7を有し、軽鎖が配列番号8を有する抗体である、請求項1から9の何れか一項に記載の方法。

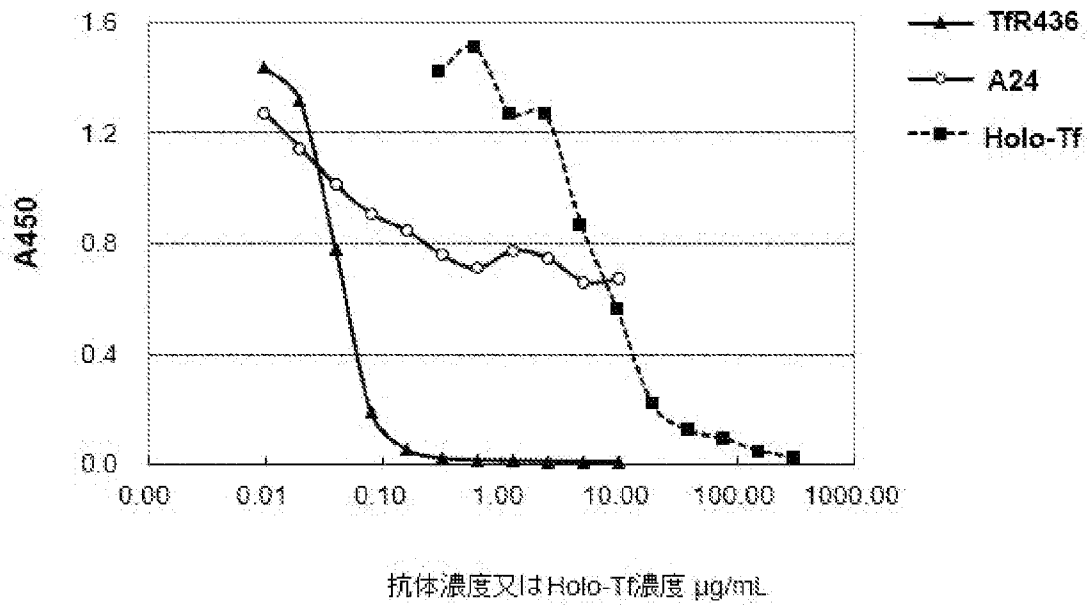
[図1]



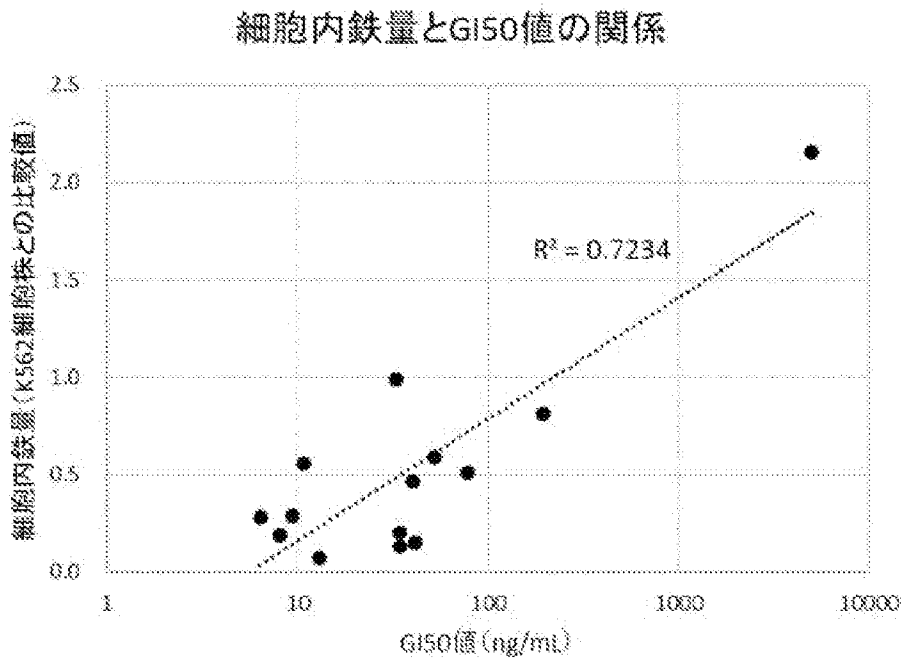
[図2]



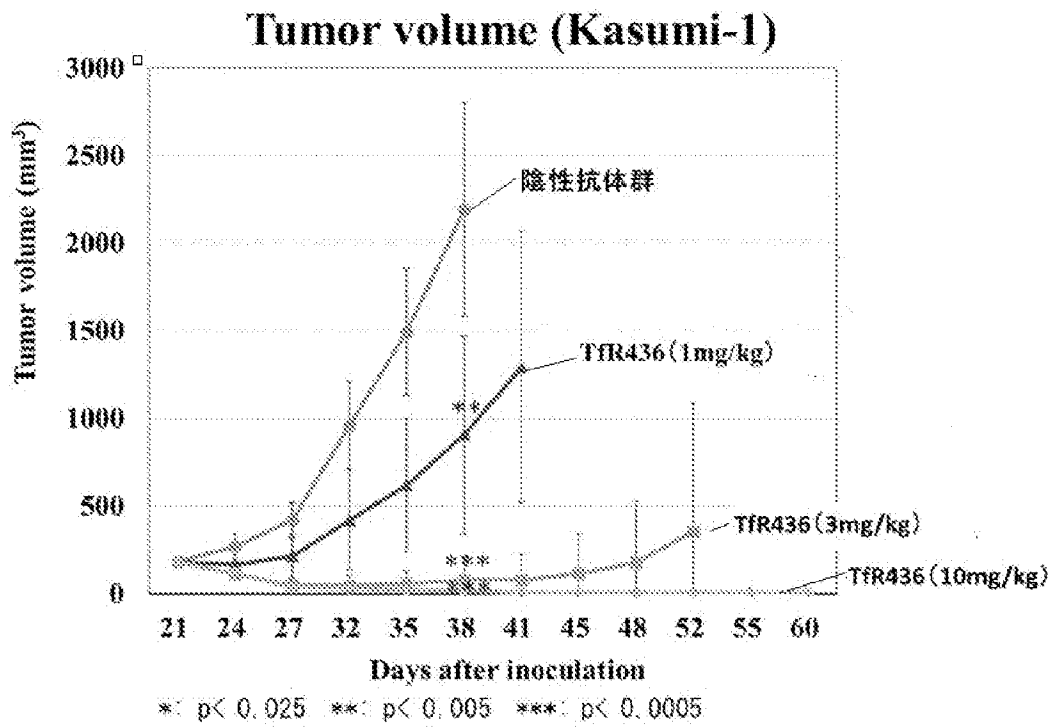
[図3]



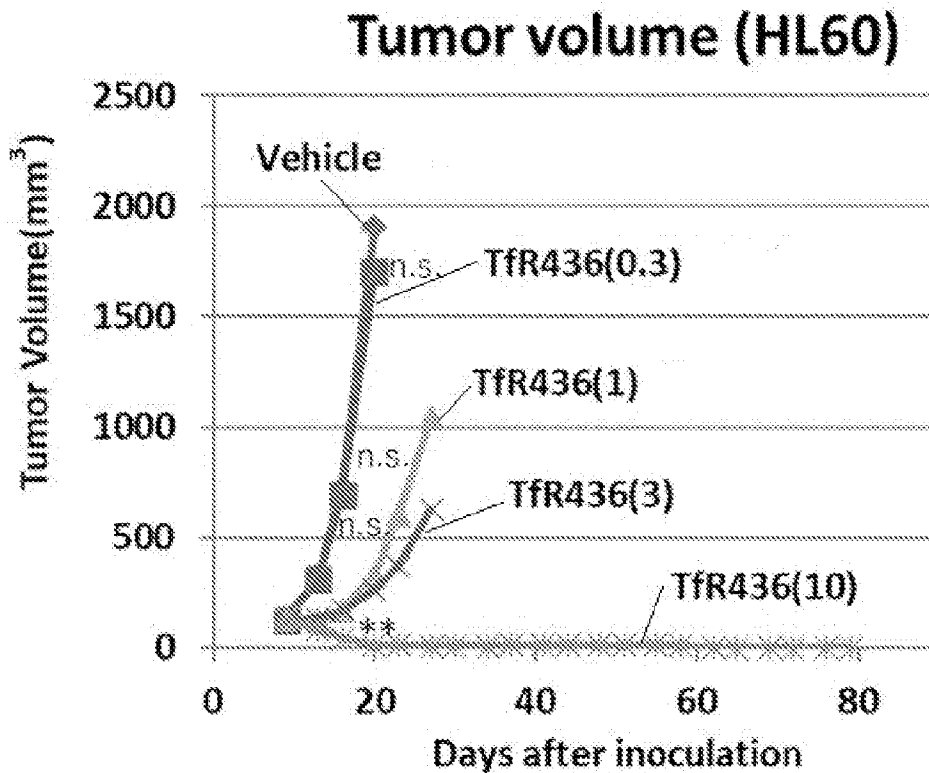
[図4]



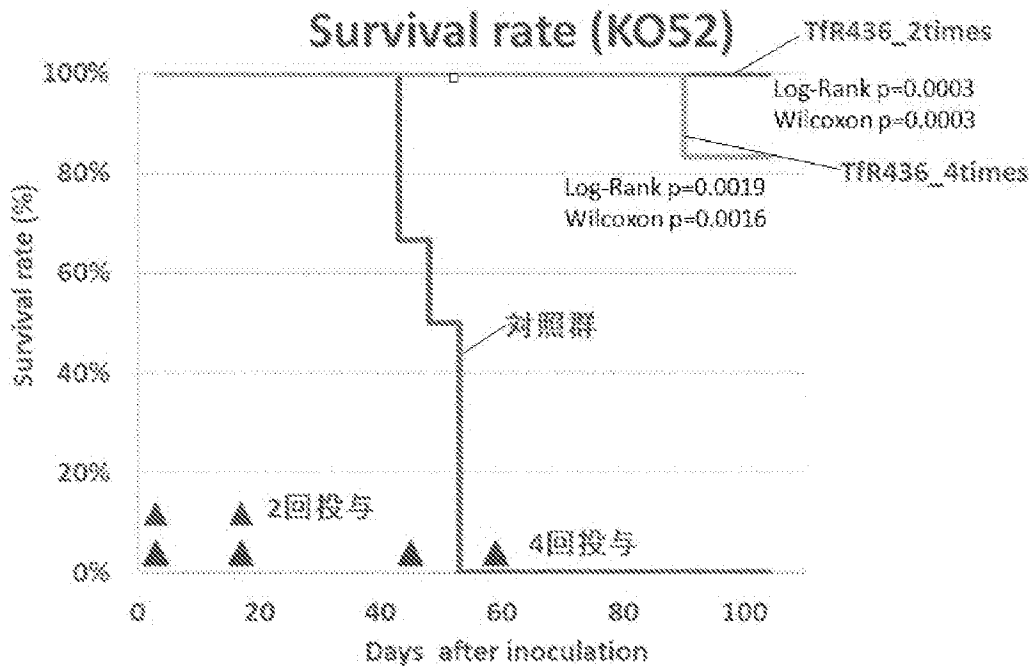
[図5]



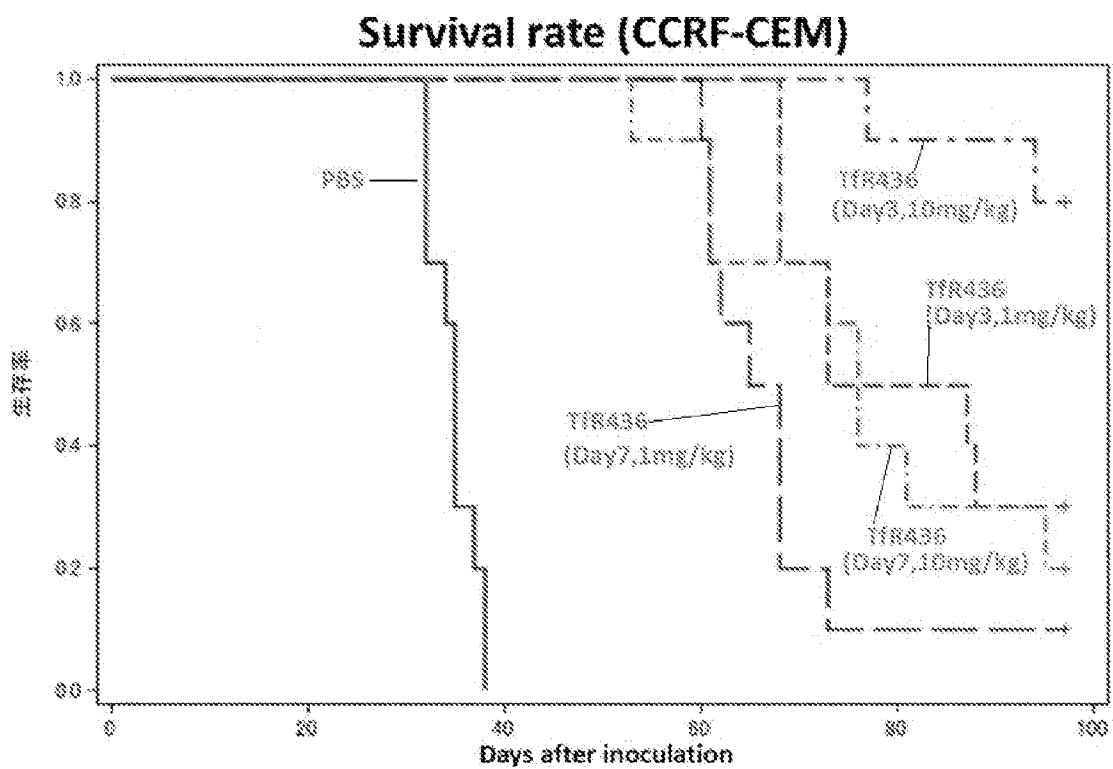
[図6]



[図7]



[図8]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/037296

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>G01N 33/84</i> (2006.01)i; <i>C07K 14/705</i> (2006.01)i; <i>C07K 16/28</i> (2006.01)i; <i>C07K 16/46</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/15</i> (2006.01)i FI: G01N33/84 Z; C07K14/705; C07K16/46; C07K16/28 ZNA; G01N33/15 Z		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/84; C07K14/705; C07K16/28; C07K16/46; G01N33/15		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); MEDLINE/EMBASE (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-303168 A (JAPAN HEALTH SCIENCES FOUNDATION) 18 December 2008 (2008-12-18) claims, paragraphs [0033], [0035]	1-4, 8-10
Y	WO 2020/105621 A1 (PERSEUS PROTEOMICS INC.) 28 May 2020 (2020-05-28) claims	1-4, 8-10
A	JP 2014-93958 A (UNIVERSITY OF MIYAZAKI) 22 May 2014 (2014-05-22) entire text, all drawings	1-10
A	US 2013/0171061 A1 (YANG, Ming-Hua) 04 July 2013 (2013-07-04) entire text, all drawings	1-10
A	JP 2008-508904 A (RAVEN BIOTECHNOLOGIES, INC.) 27 March 2008 (2008-03-27) entire text, all drawings	1-10
A	JP 2006-517032 A (GEORGETOWN UNIVERSITY) 13 July 2006 (2006-07-13) entire text, all drawings	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 <b>16 November 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>30 November 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/108172 A1 (METALLOGENICS CO., LTD.) 23 July 2015 (2015-07-23) entire text, all drawings	1-10
A	US 2019/0101549 A1 (INSTITUTE NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RESEARCHE MEDICALE) 04 April 2019 (2019-04-04) entire text, all drawings	1-10
A	RUDOLPH, Natalie S. et al. Regulation of K562 Cell Transferrin Receptors by Exogenous Iron. Journal of Cellular Physiology, March 1985, vol. 122, no. 3, pp. 441-450 entire text, all drawings	1-10
A	NEIVEYANS, Madeline et al. A recycling anti-transferrin receptor-1 monoclonal antibody as an efficient therapy for erythroleukemia through target up-regulation and antibody-dependent cytotoxic effector functions, mAbs, 18 February 2019., vol. 11, no. 3, pp. 593-605 entire text, all drawings	1-10
A	SHIMOSAKI, Shunsuke et al. Development of a complete human IgG monoclonal antibody to transferrin receptor 1 targeted for adult T-cell leukemia/lymphoma. Biochemical and Biophysical Research Communications, 08 February 2017, vol. 485, pp. 144-151 entire text, all drawings	1-10
A	CREPIN, Ronan et al. Development of Human Single-Chain Antibodies to the Transferrin Receptor that Effectively Antagonize the Growth of Leukemias and Lymphomas. Cancer Research, 08 June 2010, vol. 70, no. 13, pp. 5497-5506 entire text, all drawings	1-10

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2021/037296**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2008-303168	A	18 December 2008	(Family: none)	
WO	2020/105621	A1	28 May 2020	(Family: none)	
JP	2014-93958	A	22 May 2014	(Family: none)	
US	2013/0171061	A1	04 July 2013	TW	201325623 A
JP	2008-508904	A	27 March 2008	US	2006/0039908 A1 entire text
				WO	2005/121179 A2
				EP	1765868 A2
				CA	2569692 A1
				CN	101432305 A
				AU	2005252699 A1
				KR	10-2007-0042959 A
JP	2006-517032	A	13 July 2006	US	2004/0241088 A1 entire text
				WO	2004/066946 A2
				EP	1595142 A2
				CA	2513769 A1
WO	2015/108172	A1	23 July 2015	US	2016/0356796 A1 entire text
				EP	3096143 A1
				CN	105917234 A
US	2019/0101549	A1	04 April 2019	WO	2017/153475 A1 entire text
				EP	3427059 A1

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））                  G01N 33/84(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i;                  G01N 33/15(2006.01)i                  FI: G01N33/84 Z; C07K14/705; C07K16/46; C07K16/28 ZNA; G01N33/15 Z</p>																																			
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））                  G01N33/84; C07K14/705; C07K16/28; C07K16/46; G01N33/15</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）                  JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); MEDLINE/EMBASE (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年																									
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																																		
日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年																																		
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年																																		
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年																																		
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2008-303168 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 18.12.2008 (2008 - 12 - 18) [特許請求の範囲], [0033], [0035]</td> <td>1-4, 8-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2020/105621 A1 (株式会社ペルセウスプロテオミクス) 28.05.2020 (2020 - 05 - 28) [特許請求の範囲]</td> <td>1-4, 8-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2014-93958 A (国立大学法人 宮崎大学) 22.05.2014 (2014 - 05 - 22) 全文, 全図</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013/0171061 A1 (YANG MING-HUA) 04.07.2013 (2013 - 07 - 04) 全文, 全図</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2008-508904 A (レイヴェン バイオテクノロジーズ, インコーポレイテッド) 27.03.2008 (2008 - 03 - 27) 全文, 全図</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2006-517032 A (ジョージタウン・ユニバーシティ) 13.07.2006 (2006 - 07 - 13) 全文, 全図</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	JP 2008-303168 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 18.12.2008 (2008 - 12 - 18) [特許請求の範囲], [0033], [0035]	1-4, 8-10	Y	WO 2020/105621 A1 (株式会社ペルセウスプロテオミクス) 28.05.2020 (2020 - 05 - 28) [特許請求の範囲]	1-4, 8-10	A	JP 2014-93958 A (国立大学法人 宮崎大学) 22.05.2014 (2014 - 05 - 22) 全文, 全図	1-10	A	US 2013/0171061 A1 (YANG MING-HUA) 04.07.2013 (2013 - 07 - 04) 全文, 全図	1-10	A	JP 2008-508904 A (レイヴェン バイオテクノロジーズ, インコーポレイテッド) 27.03.2008 (2008 - 03 - 27) 全文, 全図	1-10	A	JP 2006-517032 A (ジョージタウン・ユニバーシティ) 13.07.2006 (2006 - 07 - 13) 全文, 全図	1-10	* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献	“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																																	
Y	JP 2008-303168 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 18.12.2008 (2008 - 12 - 18) [特許請求の範囲], [0033], [0035]	1-4, 8-10																																	
Y	WO 2020/105621 A1 (株式会社ペルセウスプロテオミクス) 28.05.2020 (2020 - 05 - 28) [特許請求の範囲]	1-4, 8-10																																	
A	JP 2014-93958 A (国立大学法人 宮崎大学) 22.05.2014 (2014 - 05 - 22) 全文, 全図	1-10																																	
A	US 2013/0171061 A1 (YANG MING-HUA) 04.07.2013 (2013 - 07 - 04) 全文, 全図	1-10																																	
A	JP 2008-508904 A (レイヴェン バイオテクノロジーズ, インコーポレイテッド) 27.03.2008 (2008 - 03 - 27) 全文, 全図	1-10																																	
A	JP 2006-517032 A (ジョージタウン・ユニバーシティ) 13.07.2006 (2006 - 07 - 13) 全文, 全図	1-10																																	
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																																		
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの																																		
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの																																		
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	“&” 同一パテントファミリー文献																																		
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献																																			
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献																																			
<p>国際調査を完了した日</p> <p>16.11.2021</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>30.11.2021</p>																																		
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>倉持 俊輔 2J 3209</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3250</p>																																		

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2015/108172 A1 (メタロジェニクス 株式会社) 23.07.2015 (2015 - 07 - 23) 全文, 全図	1-10
A	US 2019/0101549 A1 (INSTITUTE NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RESEARCHE MEDICALE) 04.04.2019 (2019 - 04 - 04) 全文, 全図	1-10
A	RUDOLPH Natalie S. et al., Regulation of K562 Cell Transferrin Receptors by Exogenous Iron, Journal of Cellular Physiology, 1985.03, Vol.122, No.3, pp.441-450 全文, 全図	1-10
A	NEIVEYANS Madeline et al., A recycling anti-transferrin receptor-1 monoclonal antibody as an efficient therapy for erythroleukemia through target up-regulation and antibody-dependent cytotoxic effector functions, mAbs, 2019.02.18, Vol.11, No.3, pp.593-605 全文, 全図	1-10
A	SHIMOSAKI Shunsuke et al., Development of a complete human IgG monoclonal antibody to transferrin receptor 1 targeted for adult T-cell leukemia/ lymphoma, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017.02.08, Vol.485, pp.144-151 全文, 全図	1-10
A	CREPIN Ronan et al., Development of Human Single-Chain Antibodies to the Transferrin Receptor that Effectively Antagonize the Growth of Leukemias and Lymphomas, Cancer Research, 2010.06.08, Vol.70, No.13, pp.5497-5506 全文, 全図	1-10

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/037296

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2008-303168 A	18.12.2008	(ファミリーなし)	
WO 2020/105621 A1	28.05.2020	(ファミリーなし)	
JP 2014-93958 A	22.05.2014	(ファミリーなし)	
US 2013/0171061 A1	04.07.2013	TW 201325623 A	
JP 2008-508904 A	27.03.2008	US 2006/0039908 A1 Whole Document	
		WO 2005/121179 A2	
		EP 1765868 A2	
		CA 2569692 A1	
		CN 101432305 A	
		AU 2005252699 A1	
		KR 10-2007-0042959 A	
JP 2006-517032 A	13.07.2006	US 2004/0241088 A1 Whole Document	
		WO 2004/066946 A2	
		EP 1595142 A2	
		CA 2513769 A1	
WO 2015/108172 A1	23.07.2015	US 2016/0356796 A1 Whole Document	
		EP 3096143 A1	
		CN 105917234 A	
US 2019/0101549 A1	04.04.2019	WO 2017/153475 A1 Whole Document	
		EP 3427059 A1	