(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2017-534252
(P2017-534252A)
(43)公表日　平成29年11月24日(2017.11.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B064
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4B065
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4C085
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4H045
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 94 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-513632 (P2017-513632)
(86)(22)出願日　平成27年9月11日 (2015.9.11)
(85)翻訳文提出日　平成29年4月5日 (2017.4.5)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/049746
(87)国際公開番号　WO2016/040839
(87)国際公開日　平成28年3月17日 (2016.3.17)
(31)優先権主張番号　62/049,987
(32)優先日　平成26年9月12日 (2014.9.12)
(33)優先権主張国　米国 (US)

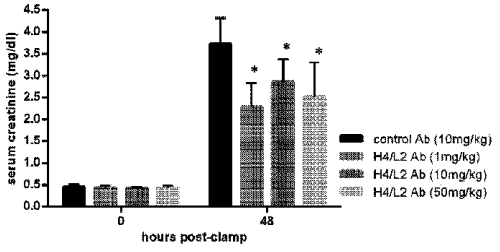
(71)出願人　398050098
バイオジェン・エムエイ・インコーポレイテッド
Ｂｉｏｇｅｎ　ＭＡ　Ｉｎｃ．
アメリカ合衆国０２１４２マサチューセッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリート２５０番
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　キャメロン，　トーマス　オーウェン
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２１３９，　ケンブリッジ，　セイント　ポール　ストリート　３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト化抗アルファＶベータ５抗体及びその使用

(57)【要約】
ａｖβ５に結合するヒト化抗体及び抗体断片を開示する。開示の抗体及び抗体断片を用いてａｖβ５媒介性疾患を治療または予防する方法も開示する。本発明は、例えば、ａｖβ５に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性断片であって、配列番号１から配列番号７のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である重鎖可変領域を含む、前記抗体またはその抗原結合性断片を提供する。一態様では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号１から配列番号７のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である重鎖可変領域を含む。
【選択図】図５

FIGURE 5



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＡｖＢ５に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性断片であって、配列番号１から配列番号７のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である重鎖可変領域を含む、前記抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項２】
配列番号１から配列番号７のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である重鎖可変領域を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項３】
配列番号１から配列番号７のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である重鎖可変領域を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項４】
配列番号１から配列番号７のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である重鎖可変領域を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項５】
配列番号１から配列番号７のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも９８％同一である重鎖可変領域を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項６】
さらに、配列番号８から１２のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である軽鎖可変領域を含む、請求項１から請求項５のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項７】
さらに、配列番号８から１２のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である軽鎖可変領域を含む、請求項１から請求項５のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項８】
さらに、配列番号８から１２のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である軽鎖可変領域を含む、請求項１から請求項５のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項９】
さらに、配列番号８から１２のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である軽鎖可変領域を含む、請求項１から請求項５のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項１０】
さらに、配列番号８から１２のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも９８％同一である軽鎖可変領域を含む、請求項１から請求項５のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項１１】
配列番号３に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である重鎖可変領域、及び配列番号８に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である重鎖可変領域、及び配列番号９に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である軽鎖可変領域、または
配列番号６に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である軽鎖可変領域を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項１２】

配列番号３に示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である重鎖可変領域、及び配列番号８に示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である重鎖可変領域、及び配列番号９に示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である軽鎖可変領域、または
配列番号６に示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも８５％同一である軽鎖可変領域を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項１３】

配列番号３に示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である重鎖可変領域、及び配列番号８に示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である重鎖可変領域、及び配列番号９に示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である軽鎖可変領域、または
配列番号６に示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である軽鎖可変領域を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項１４】

配列番号３に示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である重鎖可変領域、及び配列番号８に示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である重鎖可変領域、及び配列番号９に示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である軽鎖可変領域、または
配列番号６に示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも９５％同一である軽鎖可変領域を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項１５】

配列番号３に示すアミノ酸配列と少なくとも９７％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも９７％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも９７％同一である重鎖可変領域、及び配列番号８に示すアミノ酸配列と少なくとも９７％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも９７％同一である重鎖可変領域、及び配列番号９に示すアミノ酸配列と少なくとも９７％同一である軽鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも９７％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも９７％同一である軽鎖可変領域、または
配列番号６に示すアミノ酸配列と少なくとも９７％同一である重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも９７％同一である軽鎖可変領域を含む、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項１６】

重鎖ＣＤＲ１、２及び３を含んでおり、前記重鎖ＣＤＲ１は、配列番号１３に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１３に示すアミノ酸配列を

含み、前記重鎖ＣＤＲ２は、配列番号１４に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１４に示すアミノ酸配列を含み、前記重鎖ＣＤＲ３は、配列番号１５に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１５に示すアミノ酸配列を含んでいる、請求項１から請求項１５のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項１７】

重鎖ＣＤＲ１、２及び３を含んでおり、前記重鎖ＣＤＲ１は、配列番号１３に示すアミノ酸配列を含み、前記重鎖ＣＤＲ２は、配列番号１４に示すアミノ酸配列を含み、前記重鎖ＣＤＲ３は、配列番号１５に示すアミノ酸配列を含んでいる、請求項１から請求項１５のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項１８】

軽鎖ＣＤＲ１、２及び３を含んでおり、前記軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号１６に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１６に示すアミノ酸配列を含み、前記軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号１７に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１７に示すアミノ酸配列を含み、前記軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号１８に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１８に示すアミノ酸配列を含んでいる、請求項１から請求項１７のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項１９】

軽鎖ＣＤＲ１、２及び３を含んでおり、前記軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号１６に示すアミノ酸配列を含み、前記軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号１７に示すアミノ酸配列を含み、前記軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号１８に示すアミノ酸配列を含んでいる、請求項１から請求項１７のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項２０】

重鎖ＣＤＲ１、２及び３を含んでおり、前記重鎖ＣＤＲ１は、配列番号１３に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１３に示すアミノ酸配列を含み、前記重鎖ＣＤＲ２は、配列番号１４に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１４に示すアミノ酸配列を含み、前記重鎖ＣＤＲ３は、配列番号１５に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１５に示すアミノ酸配列を含み、かつ、

軽鎖ＣＤＲ１、２及び３を含んでおり、前記軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号１６に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１６に示すアミノ酸配列を含み、前記軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号１７に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１７に示すアミノ酸配列を含み、前記軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号１８に示すアミノ酸配列または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１８に示すアミノ酸配列を含んでいる、請求項１から請求項１５のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項２１】

（ａ）前記可変重鎖では、４番目にバリン、５番目にグルタミン、６番目にグルタミン、１６番目にグルタミン酸、２３番目にリジン、３８番目にリジン、６６番目にリジン、６７番目にアラニン、６９番目にロイシン、７１番目にアラニン、７２番目にバリン、７３番目にスレオニン、７５番目にプロリンもしくはセリン、及び／または７８番目にアラニン、及び

（ｂ）前記可変軽鎖では、１番目にアスパラギン、１１番目にロイシン、１２番目にスレオニン、１３番目にバリン、２１番目にメチオニン、２２番目にセリン、４３番目にセリン、６０番目にアスパラギン酸、６３番目にスレオニン、７８番目にバリン、１００番目にアラニン、及び／または１０４番目にロイシン、のアミノ酸（ナンバリングはＫａｂａｔによる）のうち少なくとも１つを含んでいる、請求項１から請求項２０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項２２】

重鎖ＣＤＲ１、２及び３を含んでおり、前記重鎖ＣＤＲ１は、配列番号１３に示すアミノ酸配列を含み、前記重鎖ＣＤＲ２は、配列番号１４に示すアミノ酸配列を含み、前記重鎖ＣＤＲ３は、配列番号１５に示すアミノ酸配列を含み、かつ、
軽鎖ＣＤＲ１、２及び３を含んでおり、前記軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号１６に示すアミノ酸配列を含み、前記軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号１７に示すアミノ酸配列を含み、前記軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号１８に示すアミノ酸配列を含んでいる、請求項１から請求項１５のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項２３】
配列番号１に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、
配列番号２に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、
配列番号３に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、
配列番号４に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、
配列番号６に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、または
配列番号７に示すアミノ酸配列を含む重可変領域を含んでいる、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項２４】
配列番号３に示すアミノ酸配列を含む重可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列を含む軽可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列を含む重可変領域、及び配列番号８に示すアミノ酸配列を含む軽可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列を含む重可変領域、及び配列番号９に示すアミノ酸配列を含む軽可変領域、
配列番号５に示すアミノ酸配列を含む重可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列を含む軽可変領域、または
配列番号６に示すアミノ酸配列を含む重可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列を含む軽可変領域を含んでいる、請求項２３に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項２５】
前記抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４からなる群より選択されるアイソタイプを有している、請求項１から請求項２４のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項２６】
前記抗体は、ＩｇＧ４アイソタイプのＩｇＧ抗体由来のＣＨ１ドメイン及びＣＨ２ドメイン、及びＩｇＧ１アイソタイプのＩｇＧ抗体由来のＣＨ３ドメインを含んでいる、請求項１から請求項２４のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項２７】
前記抗体は、ＩｇＧ４アイソタイプのＩｇＧ抗体由来のＣＨ１ドメイン及びＣＨ２ドメイン、及びＩｇＧ１アイソタイプのＩｇＧ抗体由来のＣＨ３ドメインを含み、前記抗体は、Ｓ２２８Ｐ及びＮ２９７Ｑ変異（Ｋａｂａｔによるナンバリング）を含んでいる、請求項１から請求項２４のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項２８】
前記抗原結合性断片は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ジアボディ、ｓｃＦｖ、及びｓｃ（Ｆｖ）$_2$からなる群より選択される、請求項１から請求項２７のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項２９】
（ｉ）配列番号６９及び７０、
（ｉｉ）配列番号６９及び８２、
（ｉｉｉ）配列番号８０及び８２、または
（ｉｖ）配列番号８１及び７０
に示すアミノ酸配列を含んでいる、抗体。

【請求項３０】
前記抗体は、毒素、放射性核種、蛍光標識、ポリエチレングリコール、及び細胞毒からなる群より選択される物質と結合されている、請求項１から請求項２９のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。
【請求項３１】
請求項１から請求項３０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片、及び薬学的に許容可能な担体を含んでいる、医薬組成物。
【請求項３２】
急性腎障害の治療を必要とするヒト対象に請求項１から請求項３０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含んでいる、前記ヒト対象の急性腎障害を治療する方法。
【請求項３３】
急性肺障害の治療を必要とするヒト対象に請求項１から請求項３０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含んでいる、前記ヒト対象の急性肺障害を治療する方法。
【請求項３４】
脳卒中の治療を必要とするヒト対象に請求項１から請求項３０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含んでいる、前記ヒト対象の脳卒中を治療する方法。
【請求項３５】
目の血管新生疾患の治療を必要とするヒト対象に請求項１から請求項３０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含んでいる、前記ヒト対象の目の血管新生疾患を治療する方法。
【請求項３６】
敗血症の治療を必要とするヒト対象に請求項１から請求項３０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含んでいる、前記ヒト対象の敗血症を治療する方法。
【請求項３７】
心筋梗塞の治療を必要とするヒト対象に請求項１から請求項３０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含んでいる、前記ヒト対象の心筋梗塞を治療する方法。
【請求項３８】
肺水腫の治療を必要とするヒト対象に請求項１から請求項３０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含んでいる、前記ヒト対象の肺水腫を治療する方法。
【請求項３９】
肺線維症の治療を必要とするヒト対象に請求項１から請求項３０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含んでいる、前記ヒト対象の肺線維症を治療する方法。
【請求項４０】
前記肺線維症は通常型間質性肺炎である、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記肺線維症は突発性肺線維症である、請求項３９に記載の方法。
【請求項４２】
癌の治療を必要とするヒト対象に請求項１から請求項３０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含んでいる、前記ヒト対象の癌を治療する方法。
【請求項４３】
血管新生の阻害を必要とするヒト対象に請求項１から請求項３０のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含んでいる、前記ヒト対象における血

管新生を阻害する方法。
【請求項４４】
配列番号９５から１０２、３４、及び５３から５５からなる群より選択されるヌクレオチド配列と少なくとも８５％同一であるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。
【請求項４５】
配列番号９５から１０２、３４、及び５３から５５からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項４４に記載の単離された核酸。
【請求項４６】
配列番号１から７、８から１２、６９、７０、８０、８１、及び８２からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも８５％同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。
【請求項４７】
配列番号１から７、８から１２、６９、７０、８０、８１、及び８２からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項４６に記載の単離された核酸。
【請求項４８】
請求項４４から請求項４７のいずれか１項に記載の核酸によりコードされる、単離されたタンパク質。
【請求項４９】
請求項４４から請求項４７のいずれか１項に記載の核酸を含む、リコンビナントベクター。
【請求項５０】
請求項４９の組換えベクターを含む、宿主細胞。
【請求項５１】
ヒト化抗体の発現に適した条件下で、組換えベクターを含む宿主細胞を培養することを含む、ヒト化抗体を調製する方法であって、前記組換えベクターは、
配列番号９９及び５３に示す核酸配列、
配列番号９９及び１０２に示す核酸配列、
配列番号９７及び１０２に示す核酸配列、
配列番号１００及び５３に示す核酸配列、または
配列番号９９及び３４に示す核酸配列を含んでおり、
ヒト化抗体鎖を発現させて、ヒト化抗体を生産する、方法。
【請求項５２】
さらに、前記ヒト化抗体を単離することを含む、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記宿主細胞はＣＨＯ細胞である、請求項５１または請求項５２に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１４年９月１２日に出願された米国特許仮出願第６２／０４９，９８７号の優先権を主張し、その内容を参照により本明細書に援用する。
【０００２】
本発明は、広くは、アルファｖベータ５（$\alpha v \beta_5$）インテグリンに結合するヒト化抗体またはその抗原結合性断片、及びその使用に関する。
【背景技術】
【０００３】
インテグリンは、細胞外マトリックスタンパク質に結合して、細胞－細胞及び細胞－細胞外マトリックスの相互作用、ならびに細胞－病原体の相互作用を媒介する細胞表面糖タンパク質受容体である。これらの受容体は、非共有結合的に会合しているアルファ（α）

鎖とベータ（β）鎖でできており、鎖の組合せによって細胞特異性及び接着特異性が異なる様々なヘテロ二量体タンパク質となる。これらのタンパク質は、細胞表面リガンド、膜貫通タンパク質、可溶性プロテアーゼ、病原体、及び増殖因子と相互作用できる。

【０００４】

αｖβ５インテグリンは、β５サブユニットを含む唯一のインテグリンである。αｖとβ５はどちらも既に配列決定され特徴づけられている（それぞれ、Ｈｙｎｅｓ、１９９２前掲と、米国特許第５，５２７，６７９号）。αｖβ５は、ＲＧＤペプチド配列を認識してビトロネクチンに結合する（Ｈｙｎｅｓ，　Ｃｅｌｌ，　６９：１１－２５　（１９９２）。それに加えて、αｖβ５は、無傷の細胞骨格及び細胞収縮を必要とする機構により、ＴＧＦ－βを活性化できる。ＴＧＦβ１は通常、ＴＧＦβ１の生理活性ペプチド、潜在関連ペプチドβ１（ＬＡＰ－β１）、及び潜在型ＴＧＦβ（ＬＴＧＦβ）結合性タンパク質１（ＬＴＢＰ－１）を含む３種のタンパク質で構成される複合体として分泌される。ＴＧＦβ１は、ＬＡＰ－β１と非共有結合的複合体を形成し、これは小型潜在型複合体（ＳＬＣ）と呼ばれ、この立体配置ではＴＧＦβ１はその受容体に結合できない。αｖβ５は、ＲＧＤモチーフの認識によって小型潜在型複合体（ＳＬＣ）の潜在関連ペプチドβ１（ＬＡＰ－β１）に結合して、ＴＧＦ－β活性化をもたらす。さらに、αｖβ５は、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）に誘発される血管透過性の増大を特異的に調節する。しかし、αｖβ５による血管透過性の調節は、ＶＥＧＦ誘発性効果だけに限定されない。αｖβ５を妨害することで、ＴＧＦ－β及びトロンビンを含むいくつかの異なる水腫形成アゴニストにより誘発される単層透過性が阻止される。

【０００５】

αｖβ５インテグリンなどのインテグリンの生物学的過程における重要性は、インテグリン異常に続く病的続発症により、またインテグリンサブユニットのノックアウト動物の、多くは重症である表現型からも、強調される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【特許文献１】米国特許第５，５２７，６７９号明細書

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Ｈｙｎｅｓ，　Ｃｅｌｌ，　６９：１１－２５　（１９９２

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本開示は、αｖβ５及び／またはβ５に特異的に結合する抗体及びその抗原結合性断片、ならびにそれらを用いてαｖβ５媒介性疾患または状態を治療し、予防し、またはその症状や重度を減じることを特徴とする。

【０００９】

一態様では、本出願は、αｖβ５及び／またはβ５に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性断片を開示し、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号１から７のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも８０％同一である重鎖可変領域を含んでいる。ある実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号１から７のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一である重鎖可変領域を含んでいる。

【００１０】

ある実施形態では、αｖβ５及び／またはβ５に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、さらに、配列番号８から１２のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なく

とも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一である軽鎖可変領域を含んでいる。

【００１１】

いくつかの実施形態では、αｖβ５及び／またはβ５に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号３に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である重鎖可変領域を含み、かつ配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である軽鎖可変領域を含んでいる。

【００１２】

他の実施形態では、αｖβ５及び／またはβ５に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である重鎖可変領域を含み、かつ配列番号８に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である軽鎖可変領域を含んでいる。

【００１３】

さらに別の実施形態では、αｖβ５及び／またはβ５に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である重鎖可変領域を含み、かつ配列番号９に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である軽鎖可変領域を含んでいる。

【００１４】

ある実施形態では、αｖβ５及び／またはβ５に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号５に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である重鎖可変領域を含み、かつ配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８

％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である軽鎖可変領域を含んでいる。

【００１５】

他の実施形態では、αｖβ５及び／またはβ５に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号６に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である重鎖可変領域を含み、かつ配列番号１０に示すアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である軽鎖可変領域を含んでいる。

【００１６】

上述の抗体は、いくつかの実施形態では、重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）１、２及び３を含み得、重鎖ＣＤＲ１は、配列番号１３、５８、６０、もしくは６２に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１３、５８、６０、もしくは６２に示すアミノ酸配列を含み／からなり、重鎖ＣＤＲ２は、配列番号１４、５９、６１、もしくは６３に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１４、５９、６１、もしくは６３に示すアミノ酸配列を含み／からなり、重鎖ＣＤＲ３は、配列番号１５もしくは６４に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１５もしくは６４に示すアミノ酸配列を含む／からなる。

【００１７】

一実施形態では、上述の抗体は、重鎖ＣＤＲ１、２及び３を含み、重鎖ＣＤＲ１は配列番号１３、５８、６０、または６２に示すアミノ酸配列を含み／からなり、重鎖ＣＤＲ２は配列番号１４、５９、６１、または６３に示すアミノ酸配列を含み／からなり、重鎖ＣＤＲ３は配列番号１５または６４に示すアミノ酸配列を含む／からなる。

【００１８】

別の実施形態では、上述の抗体は、重鎖ＣＤＲ１、２及び３を含み、重鎖ＣＤＲ１は配列番号１３に示すアミノ酸配列を含み／からなり、重鎖ＣＤＲ２は配列番号１４に示すアミノ酸配列を含み／からなり、重鎖ＣＤＲ３は配列番号１５に示すアミノ酸配列を含む／からなる。

【００１９】

上述の抗体は、いくつかの実施形態では、軽鎖ＣＤＲ１、２及び３を含み得、軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号１６もしくは６５に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１６もしくは６５に示すアミノ酸配列を含み／からなり、軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号１７もしくは６６に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１７もしくは６６に示すアミノ酸配列を含み／からなり、軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号１８もしくは６７に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１８もしくは６７に示すアミノ酸配列を含む／からなる。

【００２０】

一実施形態では、上述の抗体は、軽鎖ＣＤＲ１、２及び３を含み、軽鎖ＣＤＲ１は配列番号１６または６５に示すアミノ酸配列を含み／からなり、軽鎖ＣＤＲ２は配列番号１７または６６に示すアミノ酸配列を含み／からなり、軽鎖ＣＤＲ３は配列番号１８または６７に示すアミノ酸配列を含む／からなる。

【００２１】

別の実施形態では、上述の抗体は、軽鎖ＣＤＲ１、２及び３を含み、軽鎖ＣＤＲ１は配列番号１６に示すアミノ酸配列を含み／からなり、軽鎖ＣＤＲ２は配列番号１７に示すア

ミノ酸配列を含み／からなり、軽鎖ＣＤＲ３は配列番号１８に示すアミノ酸配列を含む／からなる。

【００２２】

上述の抗体は、いくつかの実施形態では、重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）１、２及び３を含み得、重鎖ＣＤＲ１は、配列番号１３、５８、６０、もしくは６２に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１３、５８、６０、もしくは６２に示すアミノ酸配列を含み／からなり、重鎖ＣＤＲ２は、配列番号１４、５９、６１、もしくは６３に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１４、５９、６１、もしくは６３に示すアミノ酸配列を含み／からなり、重鎖ＣＤＲ３は、配列番号１５もしくは６４に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１５もしくは６４に示すアミノ酸配列を含み／からなり、さらに、軽鎖ＣＤＲ１、２及び３を含み、軽鎖ＣＤＲ１は、配列番号１６もしくは６５に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１６もしくは６５に示すアミノ酸配列を含み／からなり、軽鎖ＣＤＲ２は、配列番号１７もしくは６６に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１７もしくは６６に示すアミノ酸配列を含み／からなり、軽鎖ＣＤＲ３は、配列番号１８もしくは６７に示すアミノ酸配列、または２つ以下のアミノ酸位置に置換がある配列番号１８もしくは６７に示すアミノ酸配列を含む／からなる。

【００２３】

一実施形態では、本明細書で説明する抗体または抗原結合性断片は、重鎖ＣＤＲ１、２及び３を含み、重鎖ＣＤＲ１は配列番号１３に示すアミノ酸配列を含み／からなり、重鎖ＣＤＲ２は配列番号１４に示すアミノ酸配列を含み／からなり、重鎖ＣＤＲ３は配列番号１５に示すアミノ酸配列を含み／からなり、かつ軽鎖ＣＤＲ１、２及び３を含み、軽鎖ＣＤＲ１は配列番号１６に示すアミノ酸配列を含み／からなり、軽鎖ＣＤＲ２は配列番号１７に示すアミノ酸配列を含み／からなり、軽鎖ＣＤＲ３は配列番号１８に示すアミノ酸配列を含む／からなる。

【００２４】

いくつかの例では、上記開示した抗体または抗原結合性断片は、次のアミノ酸を１つから２６（すなわち１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、または２６）含む：（ａ）可変重鎖では、４番目にバリン、５番目にグルタミン、６番目にグルタミン、１６番目にグルタミン酸、２３番目にリジン、３８番目にリジン、６６番目にリジン、６７番目にアラニン、６９番目にロイシン、７１番目にアラニン、７２番目にバリン、７３番目にスレオニン、７５番目にプロリンもしくはセリン、及び／または７８番目にアラニン、（ｂ）可変軽鎖では、１番目にアスパラギン、１１番目にロイシン、１２番目にスレオニン、１３番目にバリン、２１番目にメチオニン、２２番目にセリン、４３番目にセリン、６０番目にアスパラギン酸、６３番目にスレオニン、７８番目にバリン、１００番目にアラニン、及び／または１０４番目にロイシン（ナンバリングはＫａｂａｔによる）。

【００２５】

ある実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号１に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでいる。他の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号２に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでいる。さらに別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号３に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでいる。他の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号４に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでいる。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号５に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでいる。ある実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号６に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでいる。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号７に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含んでいる。

【００２６】
ある実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号３に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでいる。他の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号５に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号８に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでいる。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号５に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号９に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでいる。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号５に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでいる。ある実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号６に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含んでいる。
【００２７】
上述の抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４からなる群より選択されるアイソタイプを有し得る。ある実施形態では、抗体は、ＩｇＧ１アイソタイプを有する。他の実施形態では、抗体は、ＩｇＧ４アイソタイプを有する。いくつかの例では、抗体は、ＩｇＧ４アイソタイプのＩｇＧ抗体由来のＣＨ１ドメイン及びＣＨ２ドメイン、及びＩｇＧ１アイソタイプのＩｇＧ抗体由来のＣＨ３ドメインを含む。ある例では、抗体はさらに、Ｓ２２８Ｐ及び／またはＮ２９７Ｑ変異を含む（Ｋａｂａｔによるナンバリング）。
【００２８】
いくつかの実施形態では、上述の抗原結合性断片は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ジアボディ、ｓｃＦｖ、及びｓｃ（Ｆｖ）２からなる群より選択される。
【００２９】
ある実施形態では、抗体は、配列番号６９及び７０、配列番号６９及び８２、配列番号８０及び８２、または配列番号８１及び７０に示すアミノ酸配列を含む／からなる重鎖及び軽鎖を含んでいる。
【００３０】
いくつかのケースでは、上述の抗体またはその抗原結合性断片には、毒素、放射性核種、蛍光標識、ポリエチレングリコール、マイクロＲＮＡ、薬物、及び細胞毒からなる群より選択される物質が結合されている。
【００３１】
いくつかの実施形態では、本開示は、上述の抗体またはその抗原結合性断片及び薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。
【００３２】
一態様では、本開示は、急性腎障害の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の急性腎障害を治療する方法を提供する。
【００３３】
別の態様では、本開示は、急性肺障害の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の急性肺障害を治療する方法を提供する。
【００３４】
さらに別の態様では、本開示は、脳卒中（脳出血）の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の脳卒中（脳出血）を治療する方法を提供する。
【００３５】
さらなる態様では、本開示は、肺線維症（たとえばＩＰＦ、ＵＩＰ）の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の肺線維症（たとえばＩＰＦ、ＵＩＰ）を治療する方法を提供する。

【００３６】
一態様では、本開示は、肺水腫の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の肺水腫を治療する方法を提供する。
【００３７】
別の態様では、本開示は、急性呼吸促迫症候群の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の急性呼吸促迫症候群を治療する方法を提供する。
【００３８】
別の態様では、本開示は、喘息の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の喘息を治療する方法を提供する。
【００３９】
別の態様では、本開示は、敗血症の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の敗血症を治療する方法を提供する。
【００４０】
さらに別の態様では、本開示は、癌（たとえば膵臓癌、肺癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、食道癌、皮膚癌、前立腺癌、子宮頸癌、結腸癌、卵巣癌、及び子宮内膜癌）の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の癌を治療する方法を提供する。
【００４１】
一態様では、本開示は、血管新生の阻害を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の血管新生を阻害する方法を提供する。
【００４２】
別の態様では、本開示は、心筋梗塞（ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ　ｉｎｆｒａｃｔｉｏｎ）の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の心筋梗塞（ｍｙｏｃａｒｄｉａｌ　ｉｎｆｒａｃｔｉｏｎ）を治療する方法を提供する。
【００４３】
さらに別の態様では、本開示は、脂質異常症の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の脂質異常症を治療する方法を提供する。
【００４４】
さらに別の態様では、本開示は、肥満の治療を必要とするヒト対象に本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片を投与することを含む、ヒト対象の肥満を治療する方法を提供する。
【００４５】
異なる態様では、本開示は、配列番号９５から１０２、３４、及び５３から５５からなる群より選択されるヌクレオチド配列と少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸を提供する。ある実施形態では、本開示は、これらの核酸によりコードされるタンパク質を包含する。他の実施形態では、本出願は、これらの核酸を含むベクターを含む。ある実施形態では、ベクターを宿主細胞（たとえばＣＨＯ　ＤＧ４４ｉまたはＣＨＯ　Ｋ１　ＧＳ）に導入して形質移入または形質転換する。
【００４６】

異なる態様では、本開示は、配列番号１～７、８～１２、６９、７０、８０、８１、及び８２からなる群より選択されるヌクレオチド配列と少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％同一であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸を提供する。ある実施形態では、本開示は、これらの核酸によりコードされるタンパク質を包含する。他の実施形態では、本出願は、これらの核酸を含むベクターを含む。ある実施形態では、ベクターを宿主細胞（たとえばＣＨＯ　ＤＧ４４ｉまたはＣＨＯ　Ｋ１　ＧＳ）に導入して形質移入または形質転換する。

【００４７】

別の態様では、本開示は、ヒト化抗体を調製する方法を提供する。方法は、上記開示の核酸を含む組換えベクターを含む宿主細胞を培養することを含む。たとえば、核酸配列には、配列番号９９及び５３に示すもの、配列番号９９及び１０２に示すもの、配列番号９７及び１０２に示すもの、配列番号１００及び５３に示すもの、及び配列番号９９及び３４に示すものが含まれる。培養は、抗体（たとえばヒト化抗体）の発現に適切な条件下で実施される。抗体の鎖を発現させて抗体を生産する。ある実施形態では、方法は、抗体を単離することを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞はＣＨＯ細胞（たとえばＣＨＯ　ＤＧ４４ｉまたはＣＨＯ　Ｋ１　ＧＳ）である。

【００４８】

別の態様では、本開示は、ヒト対象の治療や大規模生産及び保管に好適に用いられる、αｖβ５及び／またはβ５に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片を提供する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、マウスαｖβ５抗体（たとえばＡＬＵＬＡ、マウスキメラＡＬＵＬＡ）及び／または他のヒト化抗αｖβ５抗体と比べて改良された結合及び阻害特性を示す。そのような改良された結合及び阻害特性は、実施例６で示すようにして試験できる。それに加えて、抗αｖβ５抗体は、いくつかの実施形態では、より断片化しにくいことを示しており、低ｐＨで他の多くのヒト化抗αｖβ５抗体よりも高いモノマー完全性を維持する。さらに、抗αｖβ５抗体は、いくつかの実施形態では、他のヒト化抗αｖβ５抗体に匹敵する立体構造安定性を示している。また、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、いくつかの実施形態では、温度上昇、冷凍解凍、及び／または撹拌などの加速的過酷条件下でも、他のヒト化抗αｖβ５抗体と比べて、より強い凝集抵抗性を示す。一実施形態では、この態様の抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号５に示すアミノ酸配列を含むＶＨを含む。一実施形態では、この態様の抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号５に示すアミノ酸配列を含むＶＨ、及び配列番号１０に示すアミノ酸配列を含むＶＬを含む。

【００４９】

特に断らない限り、本明細書で使用する全ての科学技術用語は、本発明が属する業界で当業者が通常理解するのと同じ意味をもつ。本明細書で説明する方法及び材料と類似または均等の方法及び材料を本発明の実施または試験に使用できるが、例示的方法及び材料を以下に説明する。本明細書で言及する全ての出版物、特許出願、特許、及びその他の資料の内容を参照により本明細書に援用する。対立する場合は、定義も含めて本出願が優先する。材料、方法、及び例は例示的なものであり、何ら制限するものではない。

【００５０】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び請求項から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【００５１】

【図１】ヒト化抗αｖβ５抗体のエフェクター機能を低減しても、その効果に影響はないことをラット虚血再灌流モデルで決定し、示したグラフである。

【図２】ＡＬＵＬＡ（すなわちマウス抗αｖβ５抗体）のＶＨ領域に対するヒト化ＡＬＵＬＡ　ＶＨ領域７種の可変重鎖（ＶＨ）アミノ酸配列のアラインメントである。ヒト化バ

ージョンＶＨ１～ＶＨ６の変異をヒト化ＶＨ０　ＣＤＲグラフトと比較して太字の小文字で示す。ＡＬＵＬＡ　ＶＨ領域とヒト化ＡＬＵＬＡ　ＶＨ　ＣＤＲグラフトとで異なるアミノ酸にグレーのハイライトを付す。ＣＤＲ領域（ＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２、及びＶＨＣＤＲ３）に下線を引く。

【図３】ＡＬＵＬＡのＶＬ領域に対するヒト化ＡＬＵＬＡ　ＶＬ領域５種の可変軽鎖（ＶＬ）アミノ酸配列のアラインメントである。ヒト化バージョンＶＬ１～ＶＬ４の変異をヒト化ＶＬ０　ＣＤＲグラフトと比較して太字の小文字で示す。ＡＬＵＬＡ　ＶＬ領域とヒト化ＡＬＵＬＡ　ＶＬ　ＣＤＲグラフトとで異なるアミノ酸にグレーのハイライトを付す。ＣＤＲ領域（ＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２、及びＶＬＣＤＲ３）に下線を引く。

【図４】本明細書で説明するヒト化ＡＬＵＬＡ抗体の可溶性精製ヒトαｖβ５タンパク質への結合を、ＡＬＵＬＡに対する競合ＥＬＩＳＡで評価した実験のグラフである。

【図５】ヒト化抗αｖβ５抗体Ｈ４／Ｌ２（配列番号６９及び７０を含む）の、ラット片側虚血クランプモデルにおける腎虚血予防の有効性を決定するために実施した、実験結果のグラフ表示である。

【図６ＡＢ】（図６Ａ）４０℃／７５％ＲＨ（相対湿度）条件で２週間後の、記載の抗体コンストラクトの、分子篩クロマトグラフィー（ＳＥＣ）による凝集レベル（％高分子量（ＨＭＷ）種）を表すグラフ描写である。（図６Ｂ）４０℃／７５％ＲＨ条件で２週間後の、記載の抗体コンストラクトの、ＳＥＣにより決定された、低分子量（ＬＭＷ）タンパク質断片を表すグラフ描写である。

【図６Ｃ】４０℃／７５％ＲＨ条件で２週間後の、記載の抗体コンストラクトの、ＧＸＩＩ　ＬａｂＣｈｉｐによる、モノマーの割合を表すグラフ表示である。

【図７ＡＢ】（図７Ａ）４０℃／７５％ＲＨ条件及び高濃度での２週間後の、記載の抗体コンストラクトの、ＳＥＣによる、凝集増加（％高分子量種）を示す棒グラフである。（図７Ｂ）複数の冷凍－解凍サイクル後の、高濃度の記載の抗体コンストラクトの、ＳＥＣによる、凝集増加（％ＨＭＷ）を表す棒グラフである。

【図７Ｃ】高濃度の、複数日にわたり室温で撹拌した後の、記載の抗体コンストラクトの、ＳＥＣによる、凝集増加（％ＨＭＷ）を示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【００５２】

本開示は、αｖβ５インテグリン及び／またはこのインテグリンのβ５サブユニットに特異的に結合する抗体及び抗原結合性断片を特徴とする。αｖβ５インテグリンは、多種多様なリガンドのＲＧＤペプチド配列を認識する。たとえば、本明細書で説明する抗体及びその抗原結合性断片は、αｖβ５とビトロネクチンなどのリガンドの相互作用を妨害する。それに加えて、本明細書で説明する抗体及びその抗原結合性断片は、αｖβ５と、フィブロネクチン、オステオポンチン、テネイシンＣ、サイトタクチン、フィブリノゲン、ラミニン、マトリックスメタロプロテイナーゼ２、オステオモジュリン（ｏｓｔｅｏｍｏｄｕｌｉｎ）、プロトロンビン、トロンボスポンジン、フォン・ヴィルブランド因子（ｖＷＦ）、及びアデノウイルスペントンベースなどのその他のリガンドのうちの１つ以上との相互作用も妨害できる。本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、αｖβ５とＴＧＦ－βのＬＡＰの相互作用も阻害でき、ＴＧＦ－βの活性化を阻害でき、ラット、マウス、カニクイザル、及びヒトαｖβ５に結合でき、細胞（たとえばＢａＦ３の）表面に出現したαｖβ５にK_D　０．０１～２ｎＭ（たとえば０．０２、０．０４、０．０６、０．０８、１．０、１．２、１．４、１．６、または１．８ｎＭ）で結合でき、組換えαｖβ５に見かけ親和性約５ｐＭ～約５００ｐＭ（たとえば２５ｐＭ～５００ｐＭ、２５ｐＭ～１５０ｐＭ、５０ｐＭ～１００ｐＭ、２５ｐＭ、３０ｐＭ、３５ｐＭ、４０ｐＭ、４５ｐＭ、５０ｐＭ、５５ｐＭ、６０ｐＭ、６５ｐＭ、７０ｐＭ、７５ｐＭ、８０ｐＭ、８５ｐＭ、９０ｐＭ、９５ｐＭ、１００ｐＭ、１２５ｐＭ、または１５０ｐＭ）で結合でき、精製タンパク質を用いるＥＬＩＳＡアッセイでαｖβ５のビトロネクチンへの結合をIC_{50}値約１ｎＭ～約５ｎＭ（たとえば１ｎＭ、１．５ｎＭ、２．０ｎＭ、２．２ｎＭ、２．３ｎＭ、２．４ｎＭ、２．５ｎＭ、２．６ｎＭ、２．７ｎＭ、２．８ｎＭ、２．

９ｎＭ、３．０ｎＭ、３．２ｎＭ、３．５ｎＭ、３．８ｎＭ、４．０ｎＭ、４．５ｎＭ、５．０ｎＭ）で阻害し、及び／または細胞接着アッセイでαｖβ５のビトロネクチンへの結合をIC_{50} ０．１～２ｎＭ（たとえば０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、または１．８ｎＭ）で阻害できる。本明細書で説明する抗体及び抗原結合性断片は、αｖβ５を妨害し、そうすることで炎症及び障害による血管浸透性を阻害し、内皮遊走を阻害し、ＴＧＦ－β活性化及び繊維症を阻害する。これらの抗体及び抗原結合性断片は、急性腎障害、急性肺障害、脳卒中（脳出血）、急性呼吸促迫症候群、肺水腫、肺線維症（たとえば突発性肺線維症（ＩＰＦ）、通常型間質性肺炎（ＵＩＰ））、敗血症、心筋梗塞、癌（たとえば膵臓癌、肺癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頚部癌、食道癌、皮膚癌、前立腺癌、子宮頸癌、結腸癌、卵巣癌、及び子宮内膜癌）、及び目の血管新生疾患などの多種多様な疾患の治療に有用である。それに加えて、本開示の抗体または抗原結合性断片は、病原体による（たとえばウイルス性）感染症の治療または予防に、病原体による感染症が少なくとも部分的には病原体のＲＧＤ含有タンパク質とαｖβ５の相互作用により進行する場合に、用いられ得る。

【００５３】

αｖ：

ヒトαｖタンパク質のアミノ酸配列（Ｕｎｉｐｒｏｔアクセッション番号Ｐ０６７５６－１）を以下に示す。

MAFPPRRRLR LGPRGLPLLL SGLLLPLCRA FNLDVDSPAE YSGPEGSYFG
FAVDFFVPSA SSRMFLLVGA PKANTTQPGI VEGGQVLKCD WSSTRRCQPI
EFDATGNRDY AKDDPLEFKS HQWFGASVRS KQDKILACAP LYHWRTEMKQ
EREPVGTCFL QDGTKTVEYA PCRSQDIDAD GQGFCQGGFS IDFTKADRVL
LGGPGSFYWQ GQLISDQVAE IVSKYDPNVY SIKYNNQLAT RTAQAIFDDS
YLGYSVAVGD FNGDGIDDFV SGVPRAARTL GMVYIYDGKN MSSLYNFTGE
QMAAYFGFSV AATDINGDDY ADVFIGAPLF MDRGSDGKLQ EVGQVSVSLQ
RASGDFQTTK LNGFEVFARF GSAIAPLGDL DQDGFNDIAI AAPYGGEDKK
GIVYIFNGRS TGLNAVPSQI LEGQWAARSM PPSFGYSMKG ATDIDKNGYP
DLIVGAFGVD RAILYRARPV ITVNAGLEVY PSILNQDNKT CSLPGTALKV
SCFNVRFCLK ADGKGVLPRK LNFQVELLLD KLKQKGAIRR ALFLYSRSPS
HSKNMTISRG GLMQCEELIA YLRDESEFRD KLTPITIFME YRLDYRTAAD
TTGLQPILNQ FTPANISRQA HILLDCGEDN VCKPKLEVSV DSDQKKIYIG
DDNPLTLIVK AQNQGEGAYE AELIVSIPLQ ADFIGVVRNN EALARLSCAF
KTENQTRQVV CDLGNPMKAG TQLLAGLRFS VHQQSEMDTS VKFDLQIQSS
NLFDKVSPVV SHKVDLAVLA AVEIRGVSSP DHVFLPIPNW EHKENPETEE
DVGPVVQHIY ELRNNGPSSF SKAMLHLQWP YKYNNNTLLY ILHYDIDGPM
NCTSDMEINP LRIKISSLQT TEKNDTVAGQ GERDHLITKR DLALSEGDIH
TLGCGVAQCL KIVCQVGRLD RGKSAILYVK SLLWTETFMN KENQNHSYSL
KSSASFNVIE FPYKNLPIED ITNSTLVTTN VTWGIQPAPM PVPVWVIILA
VLAGLLLLAV LVFVMYRMGF FKRVRPPQEE QEREQLQPHE NGEGNSET（配列番号：５０）

【００５４】

β５：

ヒトβ５タンパク質のアミノ酸配列（Ｇｅｎｂａｎｋ（登録商標）受託番号ＮＰ＿００２２０４．２）を以下に示す。

MPRAPAPLYACLLGLCALLPRLAGLNICTSGSATSCEECLLIHPKCAWCSKEDFGSPRSI
TSRCDLRANLVKNGCGGEIESPASSFHVLRSLPLSSKGSGSAGWDVIQMTPQEIAVNLRP
GDKTTFQLQVRQVEDYPVDLYYLMDLSLSMKDDLDNIRSLGTKLAEEMRKLTSNFRLGFG
SFVDKDISPFSYTAPRYQTNPCIGYKLFPNCVPSFGFRHLLPLTDRVDSFNEEVRKQRVS
RNRDAPEGGFDAVLQAAVCKEKIGWRKDALHLLVFTTDDVPHIALDGKLGGLVQPHDGQC
HLNEANEYTASNQMDYPSLALLGEKLAENNINLIFAVTKNHYMLYKNFTALIPGTTVEIL

DGDSKNIIQLIINAYNSIRSKVELSVWDQPEDLNLFFTATCQDGVSYPGQRKCEGLKIGD
TASFEVSLEARSCPSRHTEHVFALRPVGFRDSLEVGVTYNCTCGCSVGLEPNSARCNGSG
TYVCGLCECSPGYLGTRCECQDGENQSVYQNLCREAEGKPLCSGRGDCSCNQCSCFESEF
GKIYGPFCECDNFSCARNKGVLCSGHGECHCGECKCHAGYIGDNCNCSTDISTCRGRDGQ
ICSERGHCLCGQCQCTEPGAFGEMCEKCPTCPDACSTKRDCVECLLLHSGKPDNQTCHSL
CRDEVITWVDTIVKDDQEAVLCFYKTAKDCVMMFTYVELPSGKSNLTVLREPECGNTPNA
MTILLAVVGSILLVGLALLAIWKLLVTIHDRREFAKFQSERSRARYEMASNPLYRKPIST
HTVDFTFNKFNKSYNGTVD（配列番号：５１）

【００５５】

マウスβ５タンパク質のアミノ酸配列（Ｇｅｎｂａｎｋ（登録商標）受託番号ＮＰ＿００１１３９３５６．１）を以下に示す。

MPRVPATLYACLLGLCALVPRLAGLNICTSGSATSCEECLLIHPKCAWCSKEYFGNPRSI
TSRCDLKANLIRNGCEGEIESPASSTHVLRNLPLSSKGSSATGSDVIQMTPQEIAVSLRP
GEQTTFQLQVRQVEDYPVDLYYLMDLSLSMKDDLENIRSLGTKLAEEMRKLTSNFRLGFG
SFVDKDISPFSYTAPRYQTNPCIGYKLFPNCVPSFGFRHLLPLTDRVDSFNEEVRKQRVS
RNRDAPEGGFDAVLQAAVCKEKIGWRKDALHLLVFTTDDVPHIALDGKLGGLVQPHDGQC
HLNEANEYTASNQMDYPSLALLGEKLAENNINLIFAVTKNHYMLYKNFTALIPGTTVEIL
HGDSKNIIQLIINAYSSIRAKVELSVWDQPEDLNLFFTATCQDGISYPGQRKCEGLKIGD
TASFEVSVEARSCPGRQAAQSFTLRPVGFRDSLQVEVAYNCTCGCSTGLEPNSARCSGNG
TYTCGLCECDPGYLGTRCECQEGENQSGYQNLCREAEGKPLCSGRGECSCNQCSCFESEF
GRIYGPFCECDSFSCARNKGVLCSGHGECHCGECKCHAGYIGDNCNCSTDVSTCRAKDGQ
ICSDRGRCVCGQCQCTEPGAFGETCEKCPTCPDACSSKRDCVECLLLHQGKPDNQTCHHQ
CKDEVITWVDTIVKDDQEAVLCFYKTAKDCVMMFSYTELPNGRSNLTVLREPECGSAPNA
MTILLAVVGSILLIGMALLAIWKLLVTIHDRREFAKFQSERSRARYEMASNPLYRKPIST
HTVDFAFNKFNKSYNGSVD（配列番号：５２）

【００５６】

抗αｖβ５抗体

本開示は、αｖβ５及び／またはβ５サブユニットに特異的に結合する抗体及び抗原結合性断片を含んでいる。本明細書で開示する抗体は、ハイブリドーマにより生産され、２００４年２月１３日に受託番号ＰＴＡ－５８１７でＡＴＣＣに寄託されたＡＬＵＬＡマウス抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）に基づく。マウス抗αｖβ５抗体ＡＬＵＬＡの成熟ＶＨ及びＶＬ配列を以下に示す（Ｋａｂａｔ定義に基づくＣＤＲに下線を引いてある）。

【００５７】

ＡＬＵＬＡ　ＶＨ：

【化１】

VHCDR1　　VHCDR2
EVQVQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKAKL

VHCDR3
TAVTSPNTAYMELSSLTNEDSAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSA（配列番号７１）

ＡＬＵＬＡ　ＶＬ：

【化２】

VLCDR1　　VLCDR2
NIMMTQSPSSLTVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG

VLCDR3
SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCHQYLSSLTFGAGTKLELK（配列番号７２）

【００５８】

実施例２は、それぞれ配列番号１、２、３、４、５、６、及び７に示すアミノ酸配列を有する７種の例示的ヒト化重鎖可変領域ＶＨ０、ＶＨ１、ＶＨ２、ＶＨ３、ＶＨ４、ＶＨ５、及びＶＨ６、ならびに、それぞれ配列番号８、９、１０、１１及び１２に示すアミノ酸配列を有する５種の例示的ヒト化軽鎖可変領域ＶＬ０、ＶＬ１、ＶＬ２、ＶＬ３、及びＶＬ４を開示している。ＶＨ鎖はそれぞれ、どのＶＬ鎖とでも対合でき、すなわちＶＨ０はＶＬ０、ＶＬ１、ＶＬ２、ＶＬ３、またはＶＬ４と対合でき、ＶＨ１はＶＬ０、ＶＬ１、ＶＬ２、ＶＬ３、またはＶＬ４と対合でき、ＶＨ２はＶＬ０、ＶＬ１、ＶＬ２、ＶＬ３、またはＶＬ４と対合でき、ＶＨ３はＶＬ０、ＶＬ１、ＶＬ２、ＶＬ３、またはＶＬ４と対合でき、ＶＨ４はＶＬ０、ＶＬ１、ＶＬ２、ＶＬ３、またはＶＬ４と対合でき、ＶＨ５はＶＬ０、ＶＬ１、ＶＬ２、ＶＬ３、またはＶＬ４と対合でき、ＶＨ６はＶＬ０、ＶＬ１、ＶＬ２、ＶＬ３、またはＶＬ４と対合できる。したがって、実施例２で開示する重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、３５種の異なるＶＨ－ＶＬ対を形成できる。これらの抗体は全て本開示の一部とされる。これらの抗体は、カッパ軽鎖定常領域を含み得る。一実施形態では、軽鎖定常領域は以下のアミノ酸配列を有している。

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号：５６）

【００５９】

これらの抗体は、重鎖定常領域も含み得る。一実施形態では、重鎖定常領域は以下の配列を有している。

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（配列番号：５７）

【００６０】

実施例２で説明する例示的ヒト化抗αｖβ５抗体の７つの重鎖可変領域と５つの軽鎖可変領域の、重鎖及び軽鎖ＣＤＲ１、２、及び３、ならびにフレームワーク領域（ＦＲ）１、２、３、４のアミノ酸配列を以下に示す。ＣＤＲはＫａｂａｔナンバリングシステムに基づく。

【表Ａ－１】

ドメイン	配列番号	配列
VH CDR1	13	SYWMH
VH CDR2	14	AIYPGNSDTSYNQKFKG
VH CDR3	15	TTYGYDWFAY
VL CDR1	16	KSSQSVLYSSNQKNYLA
VL CDR2	17	WASTRES
VL CDR3	18	HQYLSSLT
VH0 FR1	19	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS
VH0 FR2	20	WVRQAPGKGLEWVG
VH0 FR3	21	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
VH0 FR4	22	WGQGTLVTVSS
VH1 FR1	23	EVQVVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS
VH1 FR2	20	WVRQAPGKGLEWVG
VH1 FR3	24	RFTISADTSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
VH1 FR4	22	WGQGTLVTVSS
VH2 FR1	25	EVQVVQSGGGLVKPGESLRLSCAAS
VH2 FR2	26	WVKQAPGKGLEWVG
VH2 FR3	27	KFTISADTSSNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
VH2 FR4	22	WGQGTLVTVSS
VH3 FR1	28	EVQVVESGGGLVKPGGSLRLSCKAS
VH3 FR2	26	WVKQAPGKGLEWVG
VH3 FR3	29	KFTLSAVTSSNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
VH3 FR4	22	WGQGTLVTVSS
VH4 FR1	30	EVQVVQSGGGLVKPGESLRLSCKAS
VH4 FR2	26	WVKQAPGKGLEWVG
VH4 FR3	31	KFTISADTSPNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
VH4 FR4	22	WGQGTLVTVSS
VH5 FR1	32	EVQVQQSGGGLVKPGGSLRLSCKAS
VH5 FR2	26	WVKQAPGKGLEWVG
VH5 FR3	33	KATLSAVTSPNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
VH5 FR4	22	WGQGTLVTVSS
VH6 FR1	23	EVQVVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS
VH6 FR2	20	WVRQAPGKGLEWVG
VH6 FR3	21	RFTISADTSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
VH6 FR4	22	WGQGTLVTVSS
VH6 CDR2	35	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG
VL0 FR1	36	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC
VL0 FR2	37	WYQQKPGKAPKLLIY
VL0 FR3	38	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC

【表Ａ－２】

ドメイン	配列番号	配列
VL0 FR4	39	FGQGTKVEIK
VL1 FR1	40	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTC
VL1 FR2	37	WYQQKPGKAPKLLIY
VL1 FR3	41	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
VL1 FR4	42	FGQGTKLEIK
VL2 FR1	43	NIQMTQSPSSLSASVGDRVTMSC
VL2 FR2	44	WYQQKPGKSPKLLIY
VL2 FR3	45	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
VL2 FR4	42	FGQGTKLEIK
VL3 FR1	46	DIQMTQSPSSLTVSVGDRVTMSC
VL3 FR2	44	WYQQKPGKSPKLLIY
VL3 FR3	47	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDFATYYC
VL3 FR4	48	FGAGTKLEIK
VL4 FR1	40	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTC
VL4 FR2	37	WYQQKPGKAPKLLIY
VL4 FR3	38	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
VL4 FR4	42	FGQGTKLEIK
VL4 CDR2	49	AASSLQS

【００６１】

本出願は、本開示の抗体においてＫａｂａｔ　ＣＤＲの代わりに用いることができるＡＬＵＬＡの「ａｌｔｅｒｎａｔｅ（代替）ＣＤＲ」も開示する。「ａｌｔｅｒｎａｔｅ（代替）」ＣＤＲとは、Ｋａｂａｔ以外（たとえばＣｈｏｔｈｉａ（ＡｂＹｓｉｓより）、ｅｎｈａｎｃｅｄ　Ｃｈｏｔｈｉａ／ＡｂＭ　ＣＤＲ、または接触の定義）により定義されるＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）を意味する。これらの代替ＣＤＲは、たとえばＡｂＹｓｉｓデータベース（www.bioinf.org.uk/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi）を用いることで得られ得る。ＡＬＵＬＡの重鎖可変領域と軽鎖可変領域の例示的「代替」ＣＤＲ１、２、及び３のアミノ酸配列を、Ｋａｂａｔにより定義されたＣＤＲと以下の表で比較する。

【表Ｂ】

ドメイン	Ｋａｂａｔ	Ｃｈｏｔｈｉａ（ＡｂＹｓｉｓより）	Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ｃｈｏｔｈｉａ／ＡｂＭ	接触
VH CDR1	SYWMH (配列番号 13)	GYTFTSY (配列番号 58)	GYTFTSYWMH (配列番号 60)	TSYWMH (配列番号 62)
VH CDR2	AIYPGNSDTSYN QKFKG (配列番号 14)	YPGNSD (配列番号 59)	AIYPGNSDTS (配列番号 61)	WIGAIYPGNSDT S (配列番号 63)
VH CDR3	TTYGYDWFAY (配列番号 15)	TTYGYDWFAY (配列番号 15)	TTYGYDWFAY (配列番号 15)	TTTTYGYDWFA (配列番号 64)
VL CDR1	KSSQSVLYSSNQ KNYLA (配列番号 16)	KSSQSVLYSSNQKN YLA (配列番号 16)	KSSQSVLYSSNQKNYLA (配列番号 16)	LYSSNQKNYLAW Y (配列番号 65)
VL CDR2	WASTRES (配列番号 17)	WASTRES (配列番号 17)	WASTRES (配列番号 17)	LLIYWASTRE (配列番号 66)
VL CDR3	HQYLSSLT (配列番号 18)	HQYLSSLT (配列番号 18)	HQYLSSLT (配列番号 18)	HQYLSSL (配列番号 67)

【００６２】

いくつかの例では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、それぞれ配列番号１３、１４、及び１５に示すアミノ酸配列を含む／からなるＨ－ＣＤＲ１、Ｈ－ＣＤＲ２、及びＨ－ＣＤＲ３を含むＶＨまたは重鎖を含む。他の例では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、それぞれ配列番号５８、５９、及び１５に示すアミノ酸配列を含む／からなるＨ－ＣＤＲ１、Ｈ－ＣＤＲ２、及びＨ－ＣＤＲ３を含むＶＨまたは重鎖を含む。さらに他の例では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、それぞれ配列番号６０、６１、及び１５に示すアミノ酸配列を含む／からなるＨ－ＣＤＲ１、Ｈ－ＣＤＲ２、及びＨ－ＣＤＲ３を含むＶＨまたは重鎖を含む。ある実施形態では、上述の抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片の全てが、それぞれ配列番号１６、１７、及び１８に示すアミノ酸配列を含む／からなるＬ－ＣＤＲ１、Ｌ－ＣＤＲ２、及びＬ－ＣＤＲ３を含むＶＬまたは軽鎖を含む。上述の抗αｖβ５抗体は、配列番号５６に示す配列を含む／からなる軽鎖定常領域、及び／または配列番号５７に示す配列を含む／からなる重鎖定常領域を有し得る。

【００６３】

いくつかの例では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、それぞれ配列番号６２、６３、及び６４に示すアミノ酸配列を含む／からなるＨ－ＣＤＲ１、Ｈ－ＣＤＲ２、及びＨ－ＣＤＲ３を含むＶＨまたは重鎖を含む。ある実施形態では、これらの抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、それぞれ配列番号６５、６６、及び６７に示すアミノ酸配列を含む／からなるＬ－ＣＤＲ１、Ｌ－ＣＤＲ２、及びＬ－ＣＤＲ３を含むＶＬまたは軽鎖を含む。上述の抗αｖβ５抗体は、配列番号５６に示す配列を含む／からなる軽鎖定常領域、及び／または配列番号５７に示す配列を含む／からなる重鎖定常領域を有し得る。

【００６４】

本明細書で説明する抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、重鎖フレームワーク領域Ｈ－ＦＲ１、Ｈ－ＦＲ２、Ｈ－ＦＲ３、及びＨ－ＦＲ４を含み得、Ｈ－ＦＲ１は配列

番号１９、２３、２５、２８、３０、及び３２からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、Ｈ－ＦＲ２は配列番号２０及び２６より選択されるアミノ酸配列を有し、Ｈ－ＦＲ３は配列番号２１、２４、２７、２９、３１、及び３３からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、Ｈ－ＦＲ４は配列番号２２に示すアミノ酸配列を有する。ある例では、本明細書で説明する抗αｖβ５抗体は、軽鎖フレームワーク領域Ｌ－ＦＲ１、Ｌ－ＦＲ２、Ｌ－ＦＲ３、及びＬ－ＦＲ４を含み得、Ｌ－ＦＲ１は配列番号３６、４０、４３、及び４６からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、Ｌ－ＦＲ２は配列番号３７及び４４より選択されるアミノ酸配列を有し、Ｌ－ＦＲ３は配列番号３８、４１、４５、及び４７からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、Ｌ－ＦＲ４は配列番号３９、４２、または４８に示すアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、（ｉ）重鎖フレームワーク領域Ｈ－ＦＲ１、Ｈ－ＦＲ２、Ｈ－ＦＲ３、及びＨ－ＦＲ４を含み、Ｈ－ＦＲ１は配列番号３６に示すアミノ酸配列を有し、Ｈ－ＦＲ２は配列番号２６に示すアミノ酸配列を有し、Ｈ－ＦＲ３は配列番号３１に示すアミノ酸配列を有し、Ｈ－ＦＲ４は配列番号２２に示すアミノ酸配列を有し、かつ（ｉｉ）軽鎖フレームワーク領域Ｌ－ＦＲ１、Ｌ－ＦＲ２、Ｌ－ＦＲ３、及びＬ－ＦＲ４を含み、Ｌ－ＦＲ１は配列番号４３に示すアミノ酸配列を有し、Ｌ－ＦＲ２は配列番号４４に示すアミノ酸配列を有し、Ｌ－ＦＲ３は配列番号４５に示すアミノ酸配列を有し、Ｌ－ＦＲ４は配列番号４２に示すアミノ酸配列を有している。

【００６５】

本開示はまた、配列番号１から配列番号７のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも７５％、少なくとも７８％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である重鎖可変領域を有するαｖβ５及び／またはβ５に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も有する。いくつかの実施形態では、これらの抗体またはその抗原結合性断片は、２つ以下の置換があるＡＬＵＬＡのＶＨ　ＣＤＲ１、２つ以下の置換があるＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ２、及び２つ以下の置換があるＡＬＵＬＡのＶＨ　ＣＤＲ３を有する。他の実施形態では、これらの抗体またはその抗原結合性断片は、ＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ１、３つ以下の置換があるＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ２、及びＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ３を有する。他の実施形態では、これらの抗体またはその抗原結合性断片は、ＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ１、１つの置換があるＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ２、及びＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ３を有する。ある特定の実施形態では、これらの抗体またはその抗原結合性断片は、ＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ１、ＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ２、及びＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ３を有する。上述の抗体またはその抗原結合性断片は、αｖβ５とビトロネクチンの相互作用を阻害でき、αｖβ５とＴＧＦ－βのＬＡＰの相互作用を阻害でき、及び／またはＴＧＦ－βの活性化を阻害できる。上記で参照したＣＤＲは、Ｋａｂａｔ　ＣＤＲまたは代替ＣＤＲであり得る。

【００６６】

いくつかの実施形態では、これらの抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片はさらに、配列番号８から配列番号１２のいずれか１つに示すアミノ酸配列と少なくとも７５％、少なくとも７８％、少なくとも８０％、少なくとも８１％、少なくとも８２％、少なくとも８３％、少なくとも８４％、少なくとも８５％、少なくとも８６％、少なくとも８７％、少なくとも８８％、少なくとも８９％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、これらの抗体またはその抗原結合性断片は、２つ以下の置換があるＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ１、２つ以下の置換があるＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ２、２つ以下の置換があるＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ３を有する。いくつかの実施形態

では、これらの抗体またはその抗原結合性断片は、ＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ１、２つ以下の置換があるＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ２、及びＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ３を有する。いくつかの実施形態では、これらの抗体またはその抗原結合性断片は、ＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ１、ＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ２、及びＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ３を有する。さらに別の実施形態では、これらの抗体またはその抗原結合性断片は、ＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ１、３つ以下の置換があるＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ２、及びＡＬＵＬＡのＶＨＣＤＲ３、ならびにＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ１、２つ以下の置換があるＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ２、及びＡＬＵＬＡのＶＬＣＤＲ３を有する。ある特定の例では、これらの抗体またはその抗原結合性断片は、ＡＬＵＬＡの重ＣＤＲ及び軽ＣＤＲの全てを含む。上記で参照したＣＤＲは、Ｋａｂａｔ　ＣＤＲまたは代替ＣＤＲであり得る。上述の抗体またはその抗原結合性断片は、αｖβ５とビトロネクチンの相互作用を阻害でき、αｖβ５とＴＧＦ－βのＬＡＰの相互作用を阻害でき、ＴＧＦ－βの活性化を阻害でき、ラット、マウス、カニクイザル、及びヒトαｖβ５に結合でき、細胞（たとえばＢａＦ３の）表面に組換えで出現したαｖβ５にK_D　０．０１～２ｎＭ（たとえば０．０２、０．０４、０．０６、０．０８、１．０、１．２、１．４、１．６、１．８ｎＭ）で結合でき、組換えαｖβ５に見かけ親和性約５ｐＭ～約５００ｐＭ（たとえば２５ｐＭ～５００ｐＭ、２５ｐＭ～１５０ｐＭ、５０ｐＭ～１００ｐＭ、２５ｐＭ、３０ｐＭ、３５ｐＭ、４０ｐＭ、４５ｐＭ、５０ｐＭ、５５ｐＭ、６０ｐＭ、６５ｐＭ、７０ｐＭ、７５ｐＭ、８０ｐＭ、８５ｐＭ、９０ｐＭ、９５ｐＭ、１００ｐＭ、１２５ｐＭ、または１５０ｐＭ）で結合でき、精製タンパク質を用いるＥＬＩＳＡアッセイでαｖβ５のビトロネクチンへの結合をIC_{50}値約１ｎＭ～約５ｎＭ（たとえば１ｎＭ、１．５ｎＭ、２．０ｎＭ、２．２ｎＭ、２．３ｎＭ、２．４ｎＭ、２．５ｎＭ、２．６ｎＭ、２．７ｎＭ、２．８ｎＭ、２．９ｎＭ、３．０ｎＭ、３．２ｎＭ、３．５ｎＭ、３．８ｎＭ、４．０ｎＭ、４．５ｎＭ、または５．０ｎＭ）で阻害でき、及び／または細胞接着アッセイでαｖβ５のビトロネクチンへの結合をIC_{50}　０．１～２ｎＭ（たとえば０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、または１．８ｎＭ）で阻害できる。

【００６７】

本開示はまた、配列番号１、２、３、４、５、６、または７に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のフレームワーク領域のうちの１つ、２つ、３つ、または４つ全部に４つ以下（たとえば４つ、３つ以下、３つ、２つ以下、２つ、または１つ）のアミノ酸置換を有し、及び／または１つ、２つ、または３つ全部のＣＤＲ（または代替ＣＤＲ）に４つ以下（たとえば４つ、３つ以下、２つ以下、または１つ）のアミノ酸置換を有する、αｖβ５及び／またはβ５に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も含んでいる。本出願はまた、配列番号８、９、１０、１１、または１２に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のフレームワーク領域のうちの１つ、２つ、３つ、または４つ全部に４つ以下（たとえば４つ、３つ以下、３つ、２つ以下、２つ、または１つ）のアミノ酸置換を有し、及び／または１つ、２つ、または３つ全部のＣＤＲ（または代替ＣＤＲ）に４つ以下（たとえば４つ、３つ以下、３つ、２つ以下、２つ、または１つ）のアミノ酸置換を有する抗体またはその抗原結合性断片も含んでいる。ある実施形態では、本開示のヒト化抗体は、配列番号１、２、３、４、５、６、または７に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のフレームワーク領域のうちの１つ、２つ、３つ、または４つ全部に４つ以下（たとえば４つ、３つ以下、３つ、２つ以下、２つ、または１つ）のアミノ酸置換を有し、及び／または１つ、２つ、または３つ全部のＣＤＲ（または代替ＣＤＲ）に４つ以下（たとえば４つ、３つ以下、３つ、２つ以下、２つ、または１つ）のアミノ酸置換を有し、かつ配列番号８、９、１０、１１、または１２に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のフレームワーク領域のうちの１つ、２つ、３つ、または４つに４つ以下（たとえば４つ、３つ以下、３つ、２つ以下、２つ、または１つ）のアミノ酸置換を有し、及び／または１つ、２つ、または３つ全部のＣＤＲ（または代替ＣＤＲ）に４つ以下（たとえば４つ、３つ以下、３つ、２つ以下、２つ、または１つ）のアミノ酸置換を有するαｖβ５及び／またはβ５に特異的に

結合する抗体を含んでいる。いくつかの実施形態では、アミノ酸の置換は、保存的アミノ酸置換である。上述の抗体またはその抗原結合性断片は、αｖβ５とビトロネクチンの相互作用を阻害でき、αｖβ５とＴＧＦ－βのＬＡＰの相互作用を阻害でき、ＴＧＦ－βの活性化を阻害でき、ラット、マウス、カニクイザル、及びヒトαｖβ５に結合でき、細胞（たとえばＢａＦ３の）表面に組換えで出現したαｖβ５にＫＤ　０．０１～２ｎＭ（たとえば０．０２、０．０４、０．０６、０．０８、１．０、１．２、１．４、１．６、１．８ｎＭ）で結合でき、組換えαｖβ５に見かけ親和性約５ｐＭ～約５００ｐＭ（たとえば２５ｐＭ～５００ｐＭ、２５ｐＭ～１５０ｐＭ、５０ｐＭ～１００ｐＭ、２５ｐＭ、３０ｐＭ、３５ｐＭ、４０ｐＭ、４５ｐＭ、５０ｐＭ、５５ｐＭ、６０ｐＭ、６５ｐＭ、７０ｐＭ、７５ｐＭ、８０ｐＭ、８５ｐＭ、９０ｐＭ、９５ｐＭ、１００ｐＭ、１２５ｐＭ、または１５０ｐＭ）で結合でき、精製タンパク質を用いるＥＬＩＳＡアッセイでαｖβ５のビトロネクチンへの結合をIC_{50}値約１ｎＭ～約５ｎＭ（たとえば１ｎＭ、１．５ｎＭ、２．０ｎＭ、２．２ｎＭ、２．３ｎＭ、２．４ｎＭ、２．５ｎＭ、２．６ｎＭ、２．７ｎＭ、２．８ｎＭ、２．９ｎＭ、３．０ｎＭ、３．２ｎＭ、３．５ｎＭ、３．８ｎＭ、４．０ｎＭ、４．５ｎＭ、または５．０ｎＭ）で阻害でき、及び／または細胞接着アッセイでαｖβ５のビトロネクチンへの結合をＩＣ５０　０．１～２ｎＭ（たとえば０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、または１．８ｎＭ）で阻害できる。

【００６８】

ある実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、それぞれ配列番号５及び１０に示す、またはそれぞれ配列番号６及び１０に示す、またはそれぞれ配列番号５及び８に示す、またはそれぞれ配列番号５及び９に示す、またはそれぞれ配列番号３及び１０に示す、ＶＨアミノ酸配列及びＶＬアミノ酸配列を含む。

【００６９】

いくつかの実施形態では、ＶＨ及びまたはＶＬ領域は、定常領域（たとえば野生型ヒトＦｃ領域または１つ以上の改変を含むＦｃ領域）に連結され得る。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトカッパ配列由来の軽鎖定常領域を有する。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトラムダ配列由来の軽鎖定常領域を有する。ある特定の実施形態では、軽鎖定常領域は、ヒトサブグループカッパ１配列を含む。ある実施形態では、抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４からなる群より選択されるアイソタイプを有する。重鎖定常領域は、野生型ヒトＦｃ領域、または１つ以上のアミノ酸置換を含むヒトＦｃ領域であり得る。抗体は、当業界で開示されている（たとえばＡｎｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，　３０：１０５－０８　（１９９３））ＩｇＧ４のヒンジ領域の変異などの、免疫グロブリンの２本の重鎖間のジスルフィド結合を安定させる変異を有し得る。たとえばＵＳ２００５－００３７０００も参照されたい。重鎖定常領域は、抗体の特性を修飾する置換も有し得る（たとえば、Ｆｃ受容体結合、抗体のグリコシル化（ｇｌｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ）、脱アミド、補体への結合、またはメチオニン酸化のうちの１つ以上の低下）。いくつかの例では、抗体は、米国特許第５，６２４，８２１号及び同第５，６４８，２６０号で説明されるような変異を有し得る。いくつかの実施形態では、抗体は、エフェクター機能を低減するか排するように修飾される。いくつかの実施形態では、重鎖定常領域は、Ｓ２２８Ｐ、Ｎ２９７Ｑ、及びＴ２９９Ａ（Ｋａｂａｔによるナンバリング）のうちの１つ以上の変異を有する。重鎖定常領域はキメラであり得、たとえばＦｃ領域は、ＩｇＧ４アイソタイプのＩｇＧ抗体のＣＨ１及びＣＨ２ドメイン、及びＩｇＧ１アイソタイプのＩｇＧ抗体のＣＨ３ドメインを含み得る（たとえば米国特許出願第２０１２／０１００１４０Ａ１号を参照のこと。その内容を参照により本明細書に援用する）。ある特定の実施形態では、本明細書で説明するヒト化抗αｖβ５抗体は、ＩｇＧ４アイソタイプのＩｇＧ抗体のＣＨ１及びＣＨ２ドメイン、及びＩｇＧ１アイソタイプのＩｇＧ抗体のＣＨ３ドメインを含むキメラ定常領域を有し、さらに、Ｓ２２８Ｐ及びＮ２９７Ｑ変異（Ｋａｂａｔによるナンバリング）を含む。

【００７０】

本開示のヒト化抗αvβ5抗体の非限定的な例としては、配列番号69に示す重鎖アミノ酸配列及び配列番号70に示す軽鎖アミノ酸配列を含む抗体、配列番号69に示す重鎖アミノ酸配列及び配列番号82に示す軽鎖アミノ酸配列を含む抗体、配列番号80に示す重鎖アミノ酸配列及び配列番号82に示す軽鎖アミノ酸配列を含む抗体、ならびに配列番号81に示す重鎖アミノ酸配列及び配列番号70に示す軽鎖アミノ酸配列を含む抗体が挙げられる。

【0071】

本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、別の因子（たとえば蛍光部分、放射性分子、薬物、マイクロRNA、細胞毒）に結合され得る。細胞毒は、たとえば、放射性核種、生体毒素、酵素活性毒素、細胞分裂阻害剤、プロドラッグ、免疫学的活性リガンド、サイトカイン、アルキル化剤、代謝拮抗剤（antimetabolilte）、抗増殖剤、チューブリン結合剤、ホルモン、またはホルモンアンタゴニストであり得る。例示的細胞毒としては、^{90}Y、^{131}I、モノメチルオーリスタチンE（MMAE）、メルタンシン（mertansine）（DM1）、DM4、ジフテリア毒素、Pseudomonas外毒素（PE38）、及びリシンのA鎖が挙げられる。ある特定の実施形態では、細胞毒はマイタンシノイドである。

【0072】

抗体は、既知のαvβ5抗体よりも改良された有効性、β5に対する高い親和性または結合力、及び／または低減された免疫原性に基づき選択されて使用され得る。抗体の有効性、親和性または結合力、及び免疫原性を決定する方法は、当業者の技術の範囲内である。

【0073】

抗αvβ5抗体を得る方法

上述したような抗体は、たとえば、記載のアミノ酸配列をコードする合成遺伝子を調製して発現させることにより、作ることができる。上記の任意の抗αvβ5抗体バリアント（たとえばアミノ酸置換を含むもの）を生成する方法は当業界では周知である。これらの方法としては、限定ではないが、部位特異的（またはオリゴヌクレオチド媒介）変異誘発、PCR変異誘発、及び抗体またはその任意の部分（たとえばフレームワーク領域、CDR（代替CDR）、定常領域）をコードする調製されたDNA分子のカセット式変異誘発による調製が挙げられる。部位特異的変異誘発は、当業界では周知である（たとえばCarter et al., Nucl. Acids Res., 13：4431－4443（1985）及びKunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82：488（1987）を参照のこと）。PCR変異誘発は、開始ポリペプチドのアミノ酸配列バリアントの作製にも適している。PCR ProtocolsのHiguchi, pp. 177－183（Academic Press, 1990）及びVallette et al., Nucl. Acids Res. 17：723－733（1989）を参照されたい。配列バリアントを調製する別の方法であるカセット式変異誘発は、Wells et al., Gene, 34：315－323（1985）が説明する技法に基づく。

【0074】

親和性成熟

一実施形態では、本明細書で説明する抗αvβ5抗体またはその抗原結合性断片を、たとえば変異誘発により修飾して、修飾抗体プールを準備する。次に修飾抗体を評価して、機能特性が変化した（たとえば結合の改良、安定性の改良、抗原性の低下、またはインビボでの安定性の増大）、1つ以上の抗体を特定する。一実装形態では、ディスプレイ・ライブラリ技法を用いて、修飾抗体プールを選択またはスクリーニングする。その後、第2のライブラリから、たとえば、より高いストリンジェンシーまたはより競争的な結合及び洗浄条件を用いることにより、高親和性抗体を特定する。他のスクリーニング技法も使用できる。

【0075】

いくつかの実装形態では、変異誘発は、結合面に存在するとわかっているかまたは結合面に存在すると思われる領域を標的とする。たとえば特定された結合タンパク質が抗体である場合、変異誘発は、本明細書で説明する重鎖または軽鎖のＣＤＲ領域（または代替ＣＤＲ領域）に向けられる。さらに、変異誘発は、ＣＤＲ付近のまたは隣接するフレームワーク領域、たとえば、特にＣＤＲ（または代替ＣＤＲ）接合部の１０、５、または３アミノ酸以内のフレームワーク領域に向けられ得る。抗体の場合は、たとえば徐々に改良するために、変異誘発は１つまたは少数のＣＤＲ（または代替ＣＤＲ）に限定されることもある。

【００７６】

一実施形態では、変異誘発は、抗体を１つ以上の生殖系列（ｇｅｒｍｌｉｎｅ）配列により類似させるために用いられる。ある例示的な生殖系列法は、単離された抗体の配列に類似の（たとえば特定のデータベース内でもっとも類似の）１つ以上の生殖系列の配列を特定することを含み得る。次に、単離された抗体に、漸増的に、組み合わせて、またはその両方で、（アミノ酸レベルでの）変異をもたらすことができる。たとえば、一部または全部の可能な生殖系列の変異をコードする配列を含む核酸ライブラリを作製する。次に、変異した抗体を評価して、たとえば、単離された抗体に対して相対的に１つ以上の追加の生殖系列残基を有しており、尚も有用な（たとえば機能的活性のある）抗体を特定する。一実施形態では、なるべく多くの生殖系列残基が、単離された抗体に導入される。

【００７７】

一実施形態では、変異誘発は、１つ以上の生殖系列残基をＣＤＲ（または代替ＣＤＲ）領域に挿入または置換するのに用いられる。たとえば、生殖系列ＣＤＲ（または代替ＣＤＲ）残基は、修飾される可変領域に類似の（たとえばもっとも類似の）生殖系列配列に由来し得る。変異誘発後、抗体の活性（たとえば結合活性または他の機能的活性）を評価して、その生殖系列残基（単数または複数）が許容されるかどうかを決定できる。類似の変異誘発をフレームワーク領域で実施できる。

【００７８】

生殖系列配列の選択は、異なるやり方で実施できる。たとえば、ある生殖系列配列は、選択性または類似性の所定の基準に達していれば、たとえばドナーの非ヒト抗体に対して相対的に、少なくともある程度の同一性パーセント、たとえば少なくとも７５、８０、８５、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または９９．５％の同一性があれば、選択され得る。この選択は、少なくとも２つ、３つ、５つ、または１０の生殖系列配列を用いて実施され得る。ＣＤＲ１及びＣＤＲ２の場合、類似の生殖系列配列を特定することは、そのような配列を１つ選択することを含み得る。ＣＤＲ３の場合、類似の生殖系列配列を特定することは、そのような配列を１つ選択することを含み得るが、アミノ末端部分とカルボキシ末端部分に別々に貢献する２つの生殖系列配列を用いることを含み得る。他の実装形態では、２つか３つ以上の生殖系列配列を用いて、たとえばコンセンサス配列が形成される。

【００７９】

２つの配列間の「ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｉｄｅｎｔｉｔｙ（配列の同一性）」の計算は次のように実施する。最適な比較目的のために配列を整列させる（たとえば、第１と第２のアミノ酸の一方または両方、または核酸配列にギャップが導入されて最適な整列を得ることができ、また比較目的のために、非相同性配列は除外され得る）。最適な整列は、ＧＣＧソフトウェアパッケージのＧＡＰプログラムで、ギャップ・ペナルティ１２、ギャップ拡張ペナルティ４、フレームシフト・ギャップ・ペナルティ５のＢｌｏｓｓｕｍ　６２スコアリング・マトリックスを用いて、最高スコアとして決定される。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第１の配列内のある位置が、第２の配列内の対応する位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドと同じもので占められていれば、その位置においては、これらの分子は同一ということになる。２つの配列間の同一性パーセントは、これらの配列間に共通の同一位置の数の関数である。

【００８０】
他の実施形態では、抗体は、修飾されて、改変されたグリコシル化パターンを有し得る（すなわち、元のまたは天然のグリコシル化パターンから改変され得る）。この文脈では、「ａｌｔｅｒｅｄ（改変された）」とは、１つ以上の糖鎖（ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ ｍｏｉｅｔｙ）が欠失された、及び／または元の抗体に１つ以上のグリコシル化部位が付加されたことを意味する。本開示の抗体にグリコシル化部位を付加することは、アミノ酸配列がグリコシル化部位コンセンサス配列を含むように改変することにより達成され得る。そのような技法は当業界では周知である。抗体上の糖鎖の数を増やす別の手段は、抗体のアミノ酸残基にグリコシドを化学的にまたは酵素的に結合させることである。これらの方法は、たとえばＷＯ８７／０５３３０及びＡｐｌｉｎ ａｎｄ Ｗｒｉｓｔｏｎ（１９８１）ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２２：２５９－３０６で説明されている。抗体上に存在している糖鎖の除去は、当業界で説明されているように、化学的にまたは酵素的に実現できる（Ｈａｋｉｍｕｄｄｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．，２５９：５２；Ｅｄｇｅ ｅｔ ａｌ．（１９８１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１１８：１３１及びＴｈｏｔａｋｕｒａ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１３８：３５０）。サルベージ受容体結合エピトープを提供することによりインビボ半減期を延長させる修飾については、たとえば米国特許第５，８６９，０４６号を参照されたい。

【００８１】
一実施形態では、抗体は、配列番号１３～１８のものとは異なるＣＤＲ配列（たとえばＣｈｏｔｈｉａまたはＫａｂａｔ ＣＤＲ）を有している。本明細書で説明するヒト化ＡＬＵＬＡ抗体のものとは異なるＣＤＲ配列は、ＣＤＲが５～７アミノ酸長である場合は１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換、またはＣＤＲが１０アミノ酸以上の長さである場合はそのＣＤＲ配列内の１つ、２つ、３つ、４つ、または５つのアミノ酸の置換などの、アミノ酸の変化を含む。置換されるアミノ酸は、類似の電荷、疎水性、または立体化学的特徴を有し得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換（複数可）は保存的置換である。他の実施形態では、アミノ酸置換（複数可）は非保存的置換である。そのような置換は当業者の技術範囲内である。置換されたＣＤＲを含む抗体またはその抗体断片をスクリーニングして、本明細書で説明する特徴（たとえばαｖβ５に特異的に結合する、αｖβ５のビトロネクチンへの結合を阻害する、など）を１つ以上有する抗体を特定することができる。

【００８２】
ＣＤＲの場合と違って、構造フレームワーク領域（ＦＲ）は、抗体の結合特性に悪影響を与えることなく、より大幅に変化させることができる。ＦＲの変化としては、限定ではないが、非ヒト由来のフレームワークのヒト化、または抗原との接触もしくは結合部位の安定化に重要な特定のフレームワーク残基の操作、たとえば定常領域のクラスもしくはサブクラスを変えること、Ｆｃ受容体結合などのエフェクター機能を改変し得る特定のアミノ酸残基を変えること（Ｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎ．，１４７：２６５７－６２（１９９１）；Ｍｏｒｇａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，８６：３１９－２４（１９９５））、または定常領域が由来する種を変えることが挙げられる。いくつかの例では、抗体またはその抗原結合性断片は、次のアミノ酸を１つから２６（すなわち１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、または２６）含む：（ａ）可変重鎖では、４番目にバリン、５番目にグルタミン、６番目にグルタミン、１６番目にグルタミン酸、２３番目にリジン、３８番目にリジン、６６番目にリジン、６７番目にアラニン、６９番目にロイシン、７１番目にアラニン、７２番目にバリン、７３番目にスレオニン、７５番目にプロリンもしくはセリン、及び／または７８番目にアラニン、（ｂ）可変軽鎖では、１番目にアスパラギン、１１番目にロイシン、１２番目にスレオニン、１３番目にバリン、２１番目にメチオニン、２２番目にセリン、４３番目にセリン、６０番目にアスパラギン酸、６３番目にスレオニン、７８番目にバリン、

１００番目にアラニン、及び／または１０４番目にロイシン（ナンバリングはＫａｂａｔによる）。一実施形態では、ＡＬＵＬＡのＣＤＲを含む抗体またはその抗原結合性断片は、可変重鎖の１６番目にグルタミン酸を有している。別の実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、ＡＬＵＬＡのＣＤＲを含み、可変重鎖の１６番目にグルタミン酸、４番目にバリン、６番目にグルタミン、２３番目にリジン、６６番目にリジン、７１番目にアラニン、７３番目にスレオニン、７５番目にプロリン、及び７８番目にアラニンを有し、可変軽鎖の１番目にアスパラギン、１１番目にロイシン、２１番目にメチオニン、２２番目にセリン、４３番目にセリン、６０番目にアスパラギン酸、及び６３番目にスレオニンを有している。

【００８３】

抗αｖβ５抗体は、全長抗体の形態か、または抗αｖβ５抗体の低分子体（たとえば生物学的に活性のある抗体断片またはミニボディ）の形態、たとえばＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、Ｆｄ、ｄＡｂ、ｓｃＦｖ、及びｓｃ（Ｆｖ）２であり得る。本開示が包含する他の抗αｖβ５抗体としては、ＶＨまたはＶＬなどの可変一本鎖、またはその生物学的に活性のある断片を含む、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）が挙げられる。たとえば、Ｍｏｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ． Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２８５（４９）：３８３４８－３８３６１（２０１０）；Ｈａｒｍｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，７７（１）：１３－２２ （２００７）；ＵＳ２００５／００７９５７４、及びＤａｖｉｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９９６） Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，９（６）：５３１－７を参照されたい。完全抗体（ｗｈｏｌｅ ａｎｔｉｂｏｄｙ）と同様に、ｓｄＡｂは特定の抗原に選択的に結合する能力がある。分子量わずか１２～１５ｋＤａのｓｄＡｂは、一般的な抗体よりもかなり小さく、Ｆａｂ断片や一本鎖可変断片よりもさらに小さい。

【００８４】

本明細書では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片と、その１つ以上の酸性バリアントの混合物を含む組成物を提供し、たとえば、酸性バリアント（複数可）の量は、約８０％未満、約７０％未満、約６０％未満、約６０％未満、約５０％未満、約４０％未満、約３０％未満、約３０％未満、約２０％未満、約１０％未満、約５％未満、または約１％未満である。少なくとも１つの脱アミド化部位を含む抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片を含む組成物も提供され、組成物のｐＨは、約５．０～約６．５であり、抗αｖβ５抗体のたとえば少なくとも約９０％は脱アミド化されていない（すなわち抗体の約１０％未満が脱アミド化されている）。ある実施形態では、抗体の約５％未満、約３％未満、約２％未満または約１％未満が脱アミド化されている。ｐＨは、５．０～６．０、たとえば５．５または６．０であり得る。ある実施形態では、組成物のｐＨは、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４または６．５である。

【００８５】

「ａｃｉｄｉｃ ｖａｒｉａｎｔ（酸性バリアント）」は、対象のポリペプチドよりも酸性である（たとえば陽イオン交換クロマトグラフィーで決定）、対象のポリペプチドのバリアントである。酸性バリアントの一例は、脱アミド化バリアントである。

【００８６】

ポリペプチド分子の「ｄｅａｍｉｄａｔｅｄ（脱アミド化）」バリアントは、もとのポリペプチドの１つ以上のアスパラギン残基（複数可）がアスパラギン酸に変換されたもの、すなわち中性アミド側鎖が全体的に酸性特徴をもつ残基に変換されているポリペプチドである。

【００８７】

抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片を含む組成物に関して本明細書で使用する「ｍｉｘｔｕｒｅ（混合物）」という用語は、所望の抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片、及びその１つ以上の酸性バリアントの両方が存在していることを意味する。酸性バリアントとしては、脱アミド化抗αｖβ５抗体が主であり、他の酸性バリアント（複数可

）の量は少量であり得る。

【００８８】

ある実施形態では、脱アミド化を排除するように変異させた抗体の結合親和性（K_D）、ｏｎ－ｒａｔｅ（K_D ｏｎ）及び／またはｏｆｆ－ｒａｔｅ（K_D ｏｆｆ）は、野生型抗体のものと類似しており、たとえば約５倍未満、約２倍未満、約１倍（１００％）未満、約５０％未満、約３０％未満、約２０％未満、約１０％未満、約５％未満、約３％未満、約２％未満または約１％未満の差を有する。

【００８９】

ある実施形態では、β５に特異的に結合する抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片またはその低分子抗体は、αｖβ５のビトロネクチンへの結合を阻害し、αｖβ５のＴＧＦ－βのＬＡＰへの結合を阻害し、ＴＧＦ－βの活性化を阻害し、ＴＧＦ－βシグナル伝達を阻害し、及び／または、急性腎障害、急性肺障害、脳卒中（脳出血）、急性呼吸促迫症候群、肺水腫、肺線維症（たとえば突発性肺線維症（ＩＰＦ）、通常型間質性肺炎（ＵＩＰ））、敗血症、心筋梗塞、癌（たとえば膵臓癌、肺癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頚部癌、食道癌、皮膚癌、前立腺癌、子宮頸癌、結腸癌、卵巣癌、及び子宮内膜癌）、及び目の血管新生疾患のうちの１つ以上を有するヒト患者に投与されると、症状の重度を軽減する。いくつかの実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、血管新生を阻害または低減し、そうすることで癌の発生を予防または遅延させる。一実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片またはその低分子抗体は、突発性肺線維症モデルにおける疾患発生を阻害する（Ｄｅｇｒｙｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｍｅｄ Ｓｃｉ．，３４１（６）：４４４－９（２０１１））。別の実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、障害誘発血管透過性モデル（たとえばＶＥＧＦ、人工呼吸器誘発、ＩＬ－１β、虚血再灌流障害、ＬＰＳ、腸管穿孔モデル）における血管透過性を阻害する。

【００９０】

抗体断片

αｖβ５結合抗体の抗体断片（たとえばＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｃｂ、及びＦｖ）は、インタクトなαｖβ５抗体のタンパク質消化により調製され得る。たとえば、抗体断片は、完全抗体をパパイン、ペプシン、またはプラスミンなどの酵素で処理することにより得られ得る。完全抗体のパパイン消化によりＦ（ａｂ）２またはＦａｂ断片が生産され、完全抗体のペプシン消化によりＦ（ａｂ’）２またはＦａｂ’が得られ、完全抗体のプラスミン消化によりＦａｃｂ断片が得られる。

【００９１】

あるいは、組換えにより抗体断片を生産することもできる。たとえば、対象の抗体断片をコードする核酸を構築し、発現ベクターに導入し、好適な宿主細胞内で発現させることができる。たとえば、Ｃｏ，Ｍ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：２９６８－２９７６（１９９４）；Ｂｅｔｔｅｒ，Ｍ．ａｎｄ Ｈｏｒｗｉｔｚ，Ａ．Ｈ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１７８：４７６－４９６（１９８９）；Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．ａｎｄ Ｓｋｅｒｒａ，Ａ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１７８：４７６－４９６（１９８９）；Ｌａｍｏｙｉ，Ｅ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１２１：６５２－６６３（１９８９）；Ｒｏｕｓｓｅａｕｘ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，（１９８９）１２１：６６３－６６９（１９８９）；及びＢｉｒｄ，Ｒ．Ｅ．ｅｔ ａｌ．，ＴＩＢＴＥＣＨ，９：１３２－１３７（１９９１））を参照されたい。抗体断片をＥ．ｃｏｌｉから発現させて分泌させることができるので、これらの断片は容易に大量生産できる。抗体断片は、抗体ファージライブラリから単離できる。あるいは、Ｆａｂ’－ＳＨ断片をＥ．ｃｏｌｉから直接回収して化学的に連結してＦ（ａｂ）２断片を形成することもできる（Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：１６３－１６７（１９９２））。別のアプローチにより、Ｆ（ａｂ’）２断片を組換え宿主細胞培養液から直接単離することができる。インビボ半減期が延長された、

サルベージ受容体結合性エピトープ残基を含むＦａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片が米国特許第５，８６９，０４６号で説明されている。

【００９２】

ミニボディ

抗αｖβ５抗体のミニボディとしては、ジアボディ、一本鎖（ｓｃＦｖ）、及び一本鎖（Ｆｖ）２　（ｓｃ（Ｆｖ）２）が挙げられる。

【００９３】

「ｄｉａｂｏｄｙ（ジアボディ）」は、遺伝子融合により構築された二価のミニボディである（たとえば、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，　Ｐ．　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，９０：６４４４－６４４８（１９９３）；　ＥＰ４０４，０９７；ＷＯ９３／１１１６１を参照のこと）。ジアボディは、２本のポリペプチド鎖で構成されている二量体である。ジアボディの各ポリペプチド鎖のＶＬドメインとＶＨドメインはリンカーで連結されている。リンカーを構成するアミノ酸残基の数は、２～１２残基であり得る（たとえば３～１０残基、または５残基、または約５残基）。ジアボディのポリペプチドのリンカーは、典型的には、ＶＬとＶＨが互いに結合するには短すぎる。したがって、同じポリペプチド鎖にコードされているＶＬとＶＨは一本鎖可変領域断片を形成できないが、代わりに別の一本鎖可変領域断片と二量体を形成する。その結果、１つのジアボディは２つの抗原結合領域を有することになる。

【００９４】

ｓｃＦｖは、ＶＨとＶＬをリンカーで連結して得られる一本鎖ポリペプチド抗体である（たとえば、Ｈｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８５：５８７９－５８８３（１９８８）及びＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，“Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ”Ｖｏｌ．１１３，Ｅｄ　Ｒｅｓｅｎｂｕｒｇ　ａｎｄ　Ｍｏｏｒｅ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２６９－３１５，（１９９４）を参照のこと）。連結されるＶＨとＶＬの順序は特に限定されておらず、どのような順序で配置してもよい。配置の例としては、［ＶＨ］リンカー［ＶＬ］、または［ＶＬ］リンカー［ＶＨ］が挙げられる。ｓｃＦｖのＨ鎖Ｖ領域及びＬ鎖Ｖ領域は、本明細書で説明するどの抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片由来であってもよい。

【００９５】

ｓｃ（Ｆｖ）２は、２つのＶＨと２つのＶＬがリンカーで連結されて一本鎖を形成しているミニボディである（Ｈｕｄｓｏｎ，　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，（１９９９）２３１：１７７－１８９（１９９９））。ｓｃ（Ｆｖ）２は、たとえば、ｓｃＦｖをリンカーで接続することにより、調製され得る。本発明のｓｃ（Ｆｖ）２としては、２つのＶＨと２つのＶＬが、一本鎖ポリペプチドのＮ末端から始まって、ＶＨ、ＶＬ、ＶＨ、ＶＬ（［ＶＨ］リンカー［ＶＬ］リンカー［ＶＨ］リンカー［ＶＬ］）の順に好ましくは配置された抗体が挙げられるが、２つのＶＨと２つのＶＬの順はこの順には限られず、どのような順に配置してもよい。配置の例を以下に示す。

［ＶＬ］リンカー［ＶＨ］リンカー［ＶＨ］リンカー［ＶＬ］
［ＶＨ］リンカー［ＶＬ］リンカー［ＶＬ］リンカー［ＶＨ］
［ＶＨ］リンカー［ＶＨ］リンカー［ＶＬ］リンカー［ＶＬ］
［ＶＬ］リンカー［ＶＬ］リンカー［ＶＨ］リンカー［ＶＨ］
［ＶＬ］リンカー［ＶＨ］リンカー［ＶＬ］リンカー［ＶＨ］

【００９６】

４つの抗体可変領域を連結する際、通常３つのリンカーが必要である。使用されるリンカーは同一でも異なっていてもよい。ミニボディのＶＨ領域とＶＬ領域を連結するリンカーには、特に限定はない。いくつかの実施形態では、リンカーは、ペプチドリンカーである。約３～２５（たとえば５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８）残基を含む任意の一本鎖ペプチドをリンカーとして用いることができる。そのようなペプチドリンカーの例としては、Ｓｅｒ；Ｇｌｙ　Ｓｅｒ；Ｇｌｙ　Ｇｌ

ｙ　Ｓｅｒ；Ｓｅｒ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ；Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｓｅｒ（配列番号６８）；Ｓｅｒ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ（配列番号７３）；Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｓｅｒ（配列番号７４）；Ｓｅｒ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ（配列番号７５）；Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｓｅｒ（配列番号７６）；Ｓｅｒ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ（配列番号７７）；Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｓｅｒ（配列番号７８）；Ｓｅｒ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ（配列番号７９）；（Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｓｅｒ（配列番号７４）$_n$（ｎは１以上の整数である）；及び（Ｓｅｒ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ　Ｇｌｙ（配列番号７５）$_n$（ｎは１以上の整数である）が挙げられる。

【００９７】

ある実施形態では、リンカーは、合成化合物リンカー（化学的架橋剤）である。市販されている架橋剤の例としては、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）、ジスクシンイミジルスベラート（ＤＳＳ）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベラート（ＢＳ３）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオナート）（ＤＳＰ）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオナート）（ＤＴＳＳＰ）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシナート）（ＥＧＳ）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシナート）（スルホ－ＥＧＳ）、ジスクシンイミジルタルトラート（ｄｉｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｔａｒｔｒａｒｅ）（ＤＳＴ）、ジスルホスクシンイミジルタルトラート（ｄｉｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　ｔａｒｔｒａｒｅ）（スルホ－ＤＳＴ）、ビス［２－（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（ＢＳＯＣＯＥＳ）、及びビス［２－（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（スルホ－ＢＳＯＣＯＥＳ）が挙げられる。

【００９８】

ミニボディのＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列は、置換、欠失、付加、及び／または挿入などの修飾を含み得る。たとえば、修飾は、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片のＣＤＲ（または代替ＣＤＲ）の１つ以上に存在し得る。ある実施形態では、修飾は、抗αｖβ５ミニボディのＶＨドメイン及び／またはＶＬドメインの１つ以上のＣＤＲ（または代替ＣＤＲ）及び／またはフレームワーク領域に、１つ、２つ、または３つのアミノ酸置換を含む。そのような置換は、抗αｖβ５ミニボディの結合、機能的活性を改良するために、及び／または免疫原性を減じるためになされる。ある実施形態では、置換は、保存的アミノ酸置換である。他の実施形態では、ＶＨとＶＬが会合したときにαｖβ５結合性及び／または機能的活性があるかぎりは、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片のＣＤＲ（または代替ＣＤＲ）の１つ、２つ、または３つのアミノ酸が欠失または付加され得る。修飾されたミニボディは、αｖβ５のビトロネクチンへの結合を阻害し、αｖβ５のＴＧＦ－βのＬＡＰへの結合を阻害し、及び／またはＴＧＦ－βのシグナル伝達を阻害する。

【００９９】

二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも２つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的二重特異性抗体は、αｖβ５タンパク質の２つの異なるエピトープに結合し得る。他のそのような抗体は、αｖβ５結合部位と、別のタンパク質（たとえばαｖβ６、αｖβ８、腫瘍特異的抗原（たとえばアルファフェトタンパク質（ＡＦＰ）、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、ＣＡ－１２５、ＭＵＣ－１、上皮性腫瘍抗原（ＥＴＡ）、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原（ＭＡＧＥ）－１、ＭＡＧＥ－３、ＢＡＧＥ－１、ＧＡＧＥ－１、ＧｎＴＶ、ＫＭ－ＨＮ－１、ＫＫ－ＬＣ－１、ＬＡＧＥ－１、ＮＡ８８－Ａ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＳＡＧＥ、Ｓｐ１７、ＳＳＸ－２、ＴＡＧ－１、ＴＲＡＧ－３、ＴＲＰ２、ＸＡＧＥ－１ｂ、ＨＰＶ１６、ＨＰＶ　Ｅ６、ＨＰＶ　Ｅ７、ＴＡＧ－７２、Ｌ６－抗原、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ３７、ＣＤ５２、ＥＧＦ受容体、ＨＥＲ２受容体、Ｌｅｗｉｓ　Ｙ）、Ｔ細胞抗原（たとえばＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ５、ＣＤ６、ＣＤ７、ＴＣＲ））結合部位とを組み合わせ得る。二重特異性抗体は、全長抗体またはその低分子体（たとえ

ばＦ（ａｂ’）$_2$二重特異性抗体、ｓｃ（Ｆｖ）２二重特異性抗体、ジアボディ二重特異性抗体）として調製され得る。

【０１００】

全長二重特異性抗体の従来の生産は、２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の共発現に基づいており、２つの鎖は異なる特異性を有している（Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３０５：５３７－５３９（１９８３））。別のアプローチでは、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。免疫グロブリン重鎖融合物及び所望により免疫グロブリン軽鎖をコードする各ＤＮＡを、別々の発現ベクターに挿入してから、好適な宿主細胞に同時形質移入する。こうすることで、３つのポリペプチド断片の比率をより柔軟に調節できる。しかし、少なくとも２つのポリペプチド鎖の同比率の発現が高収率となる場合は、単一の発現ベクターに２つまたは３つ全部のポリペプチド鎖のコード配列を挿入することができる。

【０１０１】

米国特許第５，７３１，１６８号で説明されている別のアプローチによると、一対の抗体分子間の界面を操作して、組換え細胞培養液から回収されるヘテロ二量体の割合を最大化できる。好ましい界面は、少なくともＣ$_{Ｈ３}$ドメインの一部を含む。この方法では、第１の抗体分子の界面の１つ以上の小さいアミノ酸側鎖が、より大きい側鎖（たとえばチロシンまたはトリプトファン）で置換される。大きい側鎖（複数可）と同一または類似のサイズの代償的「キャビティ」が、大きいアミノ酸側鎖をより小さいもの（たとえばアラニンまたはスレオニン）で置換することで、第２の抗体分子の界面に作製される。こうして、ホモ二量体などの他の不要な最終産物よりもヘテロ二量体の収率を増加させる機構が提供される。

【０１０２】

二重特異性抗体には、架橋結合または「ｈｅｔｅｒｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ（ヘテロ結合）」抗体が含まれる。たとえば、ヘテロ結合体の抗体の一方はアビジンに連結され得、もう一方はビオチンに連結され得る。ヘテロ結合抗体は、任意の簡便な架橋法により作製され得る。

【０１０３】

「ｄｉａｂｏｄｙ（ジアボディ）」技術は、二重特異性抗体断片を作製する代替機構を提供する。断片は、リンカーによってＶＬに接続されたＶＨを含み、該リンカーは同一鎖の２つのドメインを対合させるには短すぎる。したがって、１つの断片のＶＨドメインとＶＬドメインは、別の断片の相補的ＶＬドメイン及びＶＨドメインと対合せざるを得ず、そうすることで２つの抗原結合部位を形成する。

【０１０４】

多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現している細胞により、二価抗体よりも速く内在化（及び／または分解）され得る。本明細書で説明する抗体は、３つ以上の抗原結合部位を有する多価抗体（たとえば４価抗体）であり得、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に作製され得る。多価抗体は、二量体形成ドメイン及び３つ以上の抗原結合部位を含み得る。例示的二量体形成ドメインは、Ｆｃ領域またはヒンジ領域を含む（または、からなる）。多価抗体は３つ～約８つ（たとえば４つ）の抗原結合部位を含む（または、からなり得る）。多価抗体は、随意で、少なくとも１つのポリペプチド鎖（たとえば少なくとも２つのポリペプチド鎖）を含み、該ポリペプチド鎖（複数可）は、２つ以上の可変ドメインを含む。たとえば、ポリペプチド鎖（複数可）は、ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－（Ｘ２）$_n$－Ｆｃを含み得、式中ＶＤ１は第１の可変ドメインであり、ＶＤ２は第２の可変ドメインであり、ＦｃはＦｃ領域のポリペプチド鎖であり、Ｘ１とＸ２はアミノ酸またはペプチドスペーサーを表し、ｎは０または１である。

【０１０５】

結合抗体

本明細書で開示する抗体は、ポリマー（たとえばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、

ＰＥＧ修飾されたポリエチレンイミン（ＰＥＩ）（ＰＥＩ－ＰＥＧ）、ポリグルタミン酸（ＰＧＡ）（Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド（ＨＰＭＡ）コポリマー）などの高分子物質、ヒアルロン酸、蛍光物質、発光物質、ハプテン、酵素、金属キレート、及び薬物を含む様々な分子に結合している、結合（ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ）抗体であり得る。

【０１０６】

一実施形態では、抗αｖβ５抗体（及びその抗原結合性断片）の細胞毒性作用を向上させ、したがってそれらの治療有効性を向上させるために、抗体を放射性同位体及び細胞毒などの高毒性物質と結合させる。これらの結合体（ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）は、標的部位（すなわち抗体が認識する抗原を発現している細胞）に毒性負荷を選択的に送達できるが、抗体が認識しない細胞は無事である。毒性を最小限化するために、結合体は通常、血清半減期が短い分子に基づき操作される（たとえば抗体断片、マウス配列、及び／またはＩｇＧ３もしくはＩｇＧ４アイソタイプを用いる）。例示的放射性同位体としては、^{90}Ｙ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{123}Ｉ、^{111}Ｉ、^{105}Ｒｈ、^{153}Ｓｍ、^{67}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{166}Ｈｏ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ、及び^{188}Ｒｅが挙げられる。使用できる細胞毒としては、癌治療に使用される細胞障害性薬物が挙げられる。本明細書では、「ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ ａｇｅｎｔ（細胞毒）」は、細胞の成長と増殖にとって有害であり、細胞や悪性腫瘍を減じ、阻害し、または破壊する働きをし得る任意の剤を意味する。例示的細胞毒としては、限定ではないが、放射性核種、生体毒素、酵素活性毒素、細胞分裂停止または細胞毒性治療剤（たとえばアルキル化剤、代謝拮抗剤、抗増殖剤、チューブリン結合剤、ホルモン及びホルモンアンタゴニスト）、プロドラッグ、免疫学的活性リガンド、及びサイトカインなどの生体応答修飾物質が挙げられる。免疫反応細胞または悪性細胞の増殖を妨害または遅延する作用のある細胞毒はすべて本発明の範囲内である。例示的細胞分裂阻害剤としては、メクロレタミン、トリエチレンホスホラミド（ｔｒｉｅｔｈｙｌｅｎｅｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｅ）、シクロホスファミド、イホスファミド、クロランブシル、ブスルファン、メルファランまたはトリアジコンなどのアルキル化物質、及びカルムスチン、ロムスチン、またはセムスチンなどのニトロソウレア化合物が挙げられる。一実施形態では、本明細書で説明する抗体または抗原結合性断片に結合される細胞毒は、マイタンシノイドである。マイタンシノイドとしては、マイタンシン、マイタンシノール、マイタンシノールのＣ－３エステル、ならびにその他のマイタンシノールのアナログ及び誘導体が挙げられることが当業界では知られている（たとえば米国特許第５，２０８，０２０号及び同第６，４４１，１６３号を参照のこと）。マイタンシノールのＣ－３エステルは、天然に存在しても合成的に誘導されてもよい。さらに、天然に存在するＣ－３マイタンシノールエステルも合成のＣ－３マイタンシノールエステルも、単純なカルボン酸を有するＣ－３エステルとして、またはＮ－メチル－Ｌ－アラニンの誘導体を有するＣ－３エステルとして分類され得、後者は前者よりも細胞毒性が強い。合成マイタンシノイドのアナログも当業界では知られており、たとえば、Ｋｕｐｃｈａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２１，３１－３７（１９７８）で説明されている。マイタンシノールならびにそのアナログ及び誘導体を生成する方法は、たとえば、米国特許第４，１５１，０４２号で説明されている。ある実施形態では、マイタンシノイドは、反応性化学基を含む結合部分（ｌｉｎｋｉｎｇ ｍｏｉｅｔｙ）を含んでいる（たとえば、結合部分はジスルフィド結合を含んでおり、付着部分（ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ ｍｏｉｅｔｙ）はＮ－スクシンイミジルまたはＮ－スルホスクシンイミジルエステルを含んでいる、マイタンシノールのＣ－３エステル及びそのアナログ）。ある実施形態では、本明細書で説明する抗体または抗原結合性に結合されたマイタンシノイドは、Ｎ^{2}’－デアセチル－Ｎ^{2}’－（－３－メルカプト－１－オキソプロピル）－マイタンシン（ＤＭ１）またはＮ^{2}’－デアセチル－Ｎ^{2}’－（４－メルカプト－４－メチル－１－オキソペンチル）－マイタンシン（ＤＭ４）である。ある他の実施形態では、細胞毒としては、たとえば、アントラサイクリンファミリーの薬物、ビンカ薬物、ミトマイシン、ブレオマイシン、細胞毒性ヌクレオシド、プテリジンファミリーの薬物、ジイネン、及びポドフィロトキシンが挙

げられる。これらのファミリーのなかで特に有用なメンバーとしては、たとえば、アドリアマイシン、カルミノマイシン、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ドキソルビシン、アミノプテリン、メトトレキサート、メトプテリン、ミトラマイシン、ストレプトニグリン、ジクロロメトトレキサート、ミトマイシンＣ、アクチノマイシンＤ、ポルフィロマイシン、５－フルオロウラシル、フロクスウリジン、フトラフール、６－メルカプトプリン、シタラビン、シトシンアラビノシド、エトポシドまたはエトポシドホスファートなどのポドフィロトキシンまたはポドフィロトキシン誘導体、メルファラン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ロイロシジン、ビンデシン、ロイロシンなどが挙げられる。他の実施形態では、細胞毒としては、タキソール、タキサン、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、テノポシド、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びピュロマイシン、ならびにそのアナログまたはホモログが挙げられる。コルチコステロイド、たとえばプレドニゾン、プロゲスチン、たとえばヒドロキシプロゲステロンもしくはメドロプロゲステロン、エストロゲン、たとえばジエチルスチルベストロール、抗エストロゲン、たとえばタモキシフェン、アンドロゲン、たとえばテストステロン、及びアロマターゼ阻害剤、たとえばアミノグルテチミドといったホルモン及びホルモンアンタゴニストも、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片に結合させられ得る。ある実施形態では、細胞毒は、カリチアマイシン、エスペラマイシン、またはジネミシン（ｄｙｎｅｍｉｃｉｎ）を含む、抗腫瘍抗生物質のエンジインファミリーのメンバーまたは誘導体を含む。これらの毒素は極めて強力で、核ＤＮＡの切断により作用して、細胞死をもたらす。インビボで切断されて、不活性だが免疫原性である多くのポリペプチド断片を生じ得るタンパク質毒素とは違って、カリチアマイシン、エスペラマイシン、及び他のエンジインなどの毒素は、本質的に非免疫原性の小分子である。これらの非ペプチド毒素を、モノクローナル抗体及び他の分子の標識化に既に使用されている技法により、二量体または三量体に化学的に結合（ｌｉｎｋ）させる。これらの結合技術は、コンストラクトのＦｃ部分にのみ存在しているＮ結合型糖残基を介する部位特異的結合を含む。そのような部位特異的結合法には、コンストラクトの結合（ｂｉｎｄｉｎｇ）特性に結合（ｌｉｎｋａｇｅ）が与え得る影響を減じるという利点がある。さらなる実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、リシンサブユニットＡ、アブリン、ジフテリア毒素、ボツリヌス、シアンギノシン、サキシトキシン、シガトキシン、テタヌス、テトロドトキシン、トリコテシン、ベルコロゲン、または毒性酵素などの生体毒素とも結合され得る。そのような生体毒素は、抗体－毒素コンストラクトを直接発現させるような遺伝子操作技法により作製され得る。当業者であれば、一般的な技法により、そのようなコンストラクトを容易に形成できる。細胞毒を結合させる方法は、当業界では周知である（たとえば米国特許第８，０２１，６６１号を参照のこと）。

【０１０７】

ある実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、循環中の、たとえば血中、血清中、または他の組織中の安定化及び／または残留を、たとえば少なくとも１．５、２、５、１０、または５０倍向上させる部分で修飾される。たとえば、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、ポリマー、たとえばポリアルキレンオキシドまたはポリエチレンオキシドなどの実質的に非抗原性のポリマーと結合させられ（ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ）得る（たとえば結合させられ（ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ）得る）。好適なポリマーは、重量により大きく変わる。約２００～約３５，０００ダルトン（または約１，０００～約１５，０００、及び２，０００～約１２，５００）の数平均分子量をもつポリマーを用いることができる。たとえば、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、水溶性ポリマー、たとえば疎水性ポリビニルポリマー、たとえばポリビニルアルコールまたはポリビニルピロリドンに結合させられ得る。そのようなポリマーの例としては、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などのポリアルキレンオキシドのホモポリマー（たとえばＣｈａｐｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１７：７８０－７８３（１９９９）を参照のこと）、またはポリプロピレングリコール、ポリオキシエチレン

化ポリオール、そのコポリマー及びそのブロックコポリマー（ただしブロックコポリマーの水溶性が維持されるという前提）が挙げられる。その他の有用なポリマーとしては、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレンなどのポリオキシアルキレン、及びポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンのブロックコポリマー；ポリメタクリラート；カルボマー、及び分岐または非分岐ポリサッカライドが挙げられる。治療用抗体の有効性は、その血清残留性を増加させることで改良でき、そうすることで高い循環濃度、より少ない投与回数及び投与量の減少が可能になる。ＩｇＧの半減期は、新生児受容体ＦｃＲｎへのｐＨ依存的な結合に依存する。内皮細胞表面に発現させられるＦｃＲｎは、ｐＨ依存的にＩｇＧと結合して劣化を避ける。ＦｃＲｎにｐＨ６．０で選択的に結合するが、ｐＨ７．４では結合しない一部の抗体は、様々な動物モデルでより長い半減期を示している。ある実施形態では、本開示の抗体は、ＣＨ２ドメインとＣＨ３ドメインの界面に、Ｔ２５０Ｑ／Ｍ４２８Ｌ及びＭ２５２Ｙ／Ｓ２５４Ｔ／Ｔ２５６Ｅ＋Ｈ４３３Ｋ／Ｎ４３４Ｆ（ナンバリングはＥＵインデックスによる）などの１つ以上の変異を有しており、そのせいでＦｃＲｎとの結合親和性が増大し、ＩｇＧ１のインビボ半減期が延長される。他の実施形態では、本明細書の抗体は、修飾されたＦｃ領域を有し、野生型ヒトＦｃ領域に対して相対的に少なくとも１つの修飾を含んでおり、該修飾は、４３４Ｓ、２５２Ｙ／４２８Ｌ、２５２Ｙ／４３４Ｓ、及び４２８Ｌ／４３４Ｓからなる群より選択され、ナンバリングはＥＵインデックスによる。

【０１０８】

抗体またはその抗原結合性断片は、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、または抗ｍｉＲと結合させられて、αｖβ５を発現している細胞にｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、または抗ｍｉＲを送達することもできる（たとえばＳｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２３（６）：７０９－１７（２００５）；Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ，１：ｅ４６（２０１２）を参照のこと）。ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、または抗ｍｉＲは、ＴＧＦ－βまたはＴＧＦ－βシグナル経路のコンポーネントを標的とし得る。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、または抗ｍｉＲは、治療されている疾患（たとえば肺線維症、急性肺障害、癌）に関与する遺伝子を標的とし得る。たとえば、肺線維症を治療するために、ｍｉＲ－１４２－３ｐ、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－１９２、ｍｉＲ－１９９ａ／ｂ、ｍｉＲ－２０８、ｍｉＲ－２１、ｍｉＲ－２１５、ｍｉＲ－２１６、ｍｉＲ－２１７、ｍｉＲ－２３ａ、ｍｉＲ－２７ａ、ｍｉＲ－２７ｂ、ｍｉＲ－３２、ｍｉＲ－３３８、ｍｉＲ－３４ａ、ｍｉＲ－３７７、ｍｉＲ－３８２などの抗ｍｉＲからマイクロＲＮＡ；またはｌｅｔ－７ｄ、ｍｉＲ－１０７、ｍｉＲ－１３２、ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－１４１、ｍｉＲ－１５ｂ、ｍｉＲ－１６、ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１８ａ、ｍｉＲ－１９ａ／ｂ、ｍｉＲ－１９４、ｍｉＲ－２００ａ／ｂ、ｍｉＲ－２０４、ｍｉＲ－２１１、ｍｉＲ－２６ａ／ｂ、ｍｉＲ－２９ａ／ｂ／ｃ、ｍｉＲ－３０ｃ、ｍｉＲ－３３５、ｍｉＲ－４４９ａ／ｂ、及びｍｉＲ－５９０などのマイクロＲＮＡのうちの１つ以上がそれと結合させられたαｖβ５抗体またはその抗原結合性断片を用いてαｖβ５発現細胞を標的とさせられ得る。急性肺障害を治療するために、ｍｉＲ－１２７、ｍｉＲ－１６、及び／またはｍｉＲ－１９９ａのうちの１つ以上がそれと結合させられたαｖβ５抗体またはその抗原結合性断片を用いてαｖβ５発現細胞を標的とさせられ得る。ある特定の実施形態では、ヒト化αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片と結合させられた抗ｍｉＲ－２１は、癌（たとえば肝細胞癌）治療に用いられ得、抗ｍｉＲ－１０ｂと結合させられたヒト化αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、膠芽腫などの癌の治療に用いられ得る。

【０１０９】

上述の結合抗体は、本明細書で説明する抗体またはその低分子体に化学的修飾を行うことで調製できる。抗体を修飾する方法は、当業界では周知である（たとえば米国特許第５０５７３１３号及び同第５１５６８４０号）。

【０１１０】

抗体を生産する方法

本開示のαｖβ５抗体またはその抗体結合性断片は、バクテリア細胞または真核細胞内で生産され得る。一部の抗体、たとえばＦａｂは、バクテリア細胞、たとえばＥ．ｃｏｌｉ細胞内で生産され得る。抗体はまた、形質転換された細胞株（たとえばＣＨＯ、２９３Ｅ、ＣＯＳ、３Ｔ３）などの真核細胞内でも生産され得る。それに加えて、抗体（たとえばｓｃＦｖ）は、Ｐｉｃｈｉａ（たとえばＰｏｗｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２５１：１２３－３５（２００１）を参照のこと）、Ｈａｎｓｅｕｌａ、またはＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓなどの酵母細胞内で発現させられ得る。対象の抗体を生産するために、その抗体をコードするポリヌクレオチドを構築し、それを発現ベクターに導入して、好適な宿主細胞内で発現させる。標準的な分子生物学的技法が、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞に形質移入し、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、抗体を回収するのに用いられる。

【０１１１】

抗体をバクテリア細胞（たとえばＥ．ｃｏｌｉ）内で発現させる場合は、発現ベクターは、バクテリア細胞内でベクターの増幅を許容する特徴を有していなくてはならない。それに加えて、ＪＭ１０９、ＤＨ５α、ＨＢ１０１、またはＸＬ１－ＢｌｕｅなどのＥ．ｃｏｌｉを宿主として用いる場合、ベクターは、Ｅ．ｃｏｌｉ内での高効率な発現を許容し得るプロモーター、たとえば、ｌａｃＺプロモーター（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，３４１：５４４－５４６（１９８９）、ａｒａＢプロモーター（Ｂｅｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４０：１０４１－１０４３（１９８８））、またはＴ７プロモーターを有する必要がある。そのようなベクターの例としては、Ｍ１３シリーズのベクター、ｐＵＣシリーズのベクター、ｐＢＲ３２２、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ、ｐＣＲ－Ｓｃｒｉｐｔ、ｐＧＥＸ－５Ｘ－１（Ｐｈａｒｍａｃｉａ社）、「ＱＩＡｅｘｐｒｅｓｓ ｓｙｓｔｅｍ」（ＱＩＡＧＥＮ社）、ｐＥＧＦＰ、及びｐＥＴ（この発現ベクターを使用する場合、宿主は好ましくはＴ７ ＲＮＡポリメラーゼを発現しているＢＬ２１）が挙げられる。発現ベクターは、抗体分泌のシグナル配列を含み得る。Ｅ．ｃｏｌｉの周辺質で生産するために、ｐｅｌＢシグナル配列（Ｌｅｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１６９：４３７９（１９８７））が抗体分泌のシグナル配列として用いられ得る。バクテリアの発現では、塩化カルシウム法または電気穿孔法を用いて、発現ベクターをバクテリア細胞内に導入することができる。

【０１１２】

抗体をＣＨＯ、ＣＯＳ、２９３、２９３Ｔ、及びＮＩＨ３Ｔ３細胞などの動物細胞で発現させる場合、発現ベクターは、これらの細胞での発現に必要なプロモーター、たとえば、ＳＶ４０プロモーター（Ｍｕｌｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２７７：１０８（１９７９））、ＭＭＬＶ－ＬＴＲプロモーター、ＥＦ１αプロモーター（Ｍｉｚｕｓｈｉｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１８：５３２２（１９９０））、またはＣＭＶプロモーターを含んでいる。免疫グロブリンまたはそのドメインをコードしている核酸配列に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞内でのベクターの複製を調節する配列（たとえば複製起点）及び選択可能なマーカー遺伝子などの追加の配列を保持し得る。選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞を選択しやすくする（たとえば米国特許第４，３９９，２１６号、同第４，６３４，６６５号、及び同第５，１７９，０１７号を参照のこと）。たとえば、典型的には、選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞に、Ｇ４１８、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を与える。選択可能マーカーを有するベクターの例としては、ｐＭＡＭ、ｐＤＲ２、ｐＢＫ－ＲＳＶ、ｐＢＫ－ＣＭＶ、ｐＯＰＲＳＶ、及びｐＯＰ１３が挙げられる。

【０１１３】

一実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、哺乳類細胞内で生産される。抗体を発現させる例示的な哺乳類宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ細胞）（たとえばＫａｕｆｍａｎ ａｎｄ Ｓｈａｒｐ（１９８２）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５９：６０１－６２１で説明されているようなＤＨＦＲ選択可能マーカーと一緒に用

いられる、Ｕｒｌａｕｂ ａｎｄ Ｃｈａｓｉｎ（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４２１６－４２２０で説明されているｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞を含む）、ヒト胎児由来肝臓２９３細胞（たとえば２９３、２９３Ｅ、２９３Ｔ）、ＣＯＳ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、リンパ球細胞系、たとえばＮＳ０ミエローマ細胞及びＳＰ２細胞、及び遺伝子導入動物、たとえば遺伝子導入哺乳類の細胞が挙げられる。たとえば、細胞は乳腺上皮細胞である。

【０１１４】

抗体発現の一例示的システムでは、抗αｖβ５抗体の抗体重鎖と抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクター、または抗αｖβ５抗体の抗体重鎖と抗体軽鎖をそれぞれコードする２つの別々の組換え発現ベクターを、リン酸カルシウムが媒介する形質移入によりｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞に導入する。一実施形態では、ＣＨＯ細胞は、ＣＨＯ ＤＧ４４ｉである。別の実施形態では、ＣＨＯ細胞は、ＣＨＯ Ｋ１ ＧＳである。組換え発現ベクター（複数可）内で、抗体の重鎖及び軽鎖の遺伝子は、それぞれエンハンサー／プロモーター調節エレメント（たとえばＳＶ４０、ＣＭＶ、アデノウイルスなどに由来する、ＣＭＶエンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節エレメントまたはＳＶ４０エンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節エレメントなど）に機能的に結合して、高レベルの遺伝子転写を促進する。組換え発現ベクター（複数可）はまた、ＤＨＦＲ遺伝子を保持し、メトトレキサート選択／増幅によりベクターによって形質移入されたＣＨＯ細胞の選択を可能にしている。選択された形質転換宿主細胞を培養して、抗体の重鎖及び軽鎖を発現させ、抗体を培養液から回収することができる。

【０１１５】

抗体は、遺伝子導入動物により生産される場合もある。たとえば、米国特許第５，８４９，９９２号では、遺伝子導入哺乳類の乳腺において抗体を発現させる方法を説明している。導入遺伝子は、乳特異的プロモーター、及び対象の抗体をコードする核酸、及び分泌シグナル配列を含んで構築される。そのような遺伝子導入哺乳類の雌が生産する乳には対象の抗体が分泌されて含まれる。抗体は乳から精製される場合もあるし、用途によっては直接用いられる場合もある。動物はまた、本明細書で説明する１つ以上の核酸を含んで提供される。

【０１１６】

本開示の抗体は、宿主細胞の内部または（培地などの）外部から単離されて、実質的に純粋な同種抗体へと精製され得る。抗体精製のために通常用いられる単離及び精製方法を、抗体の単離と精製に用いることができるが、何ら特定の方法に限定されない。抗体は、たとえば、カラムクロマトグラフィー、濾過、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、及び再結晶を適切に選択し組み合わせることで、単離および精製され得る。クロマトグラフィーとしては、たとえば、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、及び吸着クロマトグラフィーが挙げられる（Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｃｏｕｒｓｅ Ｍａｎｕａｌ．Ｅｄ Ｄａｎｉｅｌ Ｒ．Ｍａｒｓｈａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９６）。クロマトグラフィーは、ＨＰＬＣやＦＰＬＣなどの液相クロマトグラフィーにより実施され得る。アフィニティクロマトグラフィーで使用されるカラムとしては、プロテインＡカラム及びプロテインＧカラムが挙げられる。プロテインＡカラムを用いるカラムの例としては、Ｈｙｐｅｒ Ｄ、ＰＯＲＯＳ、及びＳｅｐｈａｒｏｓｅ ＦＦ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）が挙げられる。本開示は、これらの精製法により高度に精製した抗体も含む。

【０１１７】

抗体の特徴付け

本明細書で説明する抗体のαｖβ５結合特性は、任意の標準的方法により、たとえば、

ＯＣＴＥＴ（登録商標）、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）、ＢＩＡＣＯＲＥ（商標）分析、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、ＥＩＡ（酵素免疫測定法）、ＲＩＡ（放射免疫測定法）、及び蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）といった方法の１つ以上により、測定できる。

【０１１８】

対象のタンパク質（抗αｖβ５抗体）と標的（たとえばβ５）の結合相互作用は、ＯＣＴＥＴ（登録商標）システムを用いて分析できる。この方法では、ＦｏｒｔｅＢｉｏ社製機器のいくつかのバリエーションのうちの１つ（たとえばＯＣＴＥＴ（登録商標）ＱＫ^{e}及びＱＫ）を用いて、タンパク質相互作用、結合特異性、及びエピトープのマッピングを決定する。ＯＣＴＥＴ（登録商標）システムは、特別製チップ内を移動してからセンサに戻る偏光の変化を測定することにより、リアルタイムの結合の監視を容易にする。

【０１１９】

対象のタンパク質（抗αｖβ５抗体）と標的（たとえばβ５）の結合相互作用は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により分析され得る。ＳＰＲまたは生体分子相互作用分析（ＢＩＡ）では、どの相互作用物も標識することなく、生体分子特異的な相互作用をリアルタイムで検出する。ＢＩＡチップの結合表面の質量が変化すると（結合事象を示す）、表面付近の光屈折率が変化する（表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）の光学的現象）。屈折度の変化は、検出可能なシグナルを発生し、このシグナルは生体分子間のリアルタイム反応の示度として測定される。ＳＰＲを用いる方法は、たとえば、米国特許第５，６４１，６４０号；Ｒａｔｈｅｒ（１９８８）Ｓｕｒｆａｃｅ Ｐｌａｓｍｏｎｓ Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ；Ｓｊｏｌａｎｄｅｒ ａｎｄ Ｕｒｂａｎｉｃｚｋｙ（１９９１）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６３：２３３８－２３４５；Ｓｚａｂｏ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５：６９９－７０５、及びＢＩＡｃｏｒｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ社（スウェーデン国、Ｕｐｐｓａｌａ）が提供するオンラインリソースで説明されている。ＳＰＲからの情報は、生体分子の標的への結合に関する平衡解離定数（K_d）、及びK_{on}とK_{off}を含む動態パラメータの正確な定量的測定値を提供するために用いられ得る。

【０１２０】

エピトープはまた、ＢＩＡＣＯＲＥクロマトグラフ法により、各種抗体がヒトαｖβ５またはβ５への結合を互いに競う能力を評価することで、直接マッピングされ得る（Ｐｈａｒｍａｃｉａ ＢＩＡｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｈａｎｄｂｏｏｋ，”Ｅｐｉｔｏｐｅ Ｍａｐｐｉｎｇ”，Ｓｅｃｔｉｏｎ ６．３．２，（Ｍａｙ １９９４）；Ｊｏｈｎｅ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，１６０：１９１－１９８も参照のこと）。

【０１２１】

酵素免疫測定法を用いる場合、抗体を含む試料、たとえば、抗体生産細胞の培養上清または精製抗体を、抗原をコートしたプレートに添加する。アルカリホスファターゼなどの酵素で標識した二次抗体を添加して、プレートをインキュベートし、洗浄後に、ｐ－ニトロフェニルホスファートなどの酵素基質を添加し、吸光度を測定して抗原結合活性を評価する。

【０１２２】

抗体を評価するその他の一般的なガイダンス、たとえばウエスターンブロット及び免疫沈降測定は、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ ＬａｎｅのＡｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ｅｄ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ ｐｒｅｓｓ（１９８８））に記載されている。

【０１２３】

修飾されたエフェクター機能をもつ抗αｖβ５抗体

抗体及び抗体－抗原複合体と免疫系の細胞の相互作用は、本明細書ではエフェクター機能と呼ばれる様々な応答を引き起こす。免疫が媒介するエフェクター機能には、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）と補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）の２つの主要な機構が含まれる

。どちらも免疫グロブリンタンパク質の定常領域により媒介される。したがって、抗体Ｆｃドメインは、免疫エフェクター機構との相互作用を定義する部分である。

【０１２４】

ＩｇＧ抗体は、細胞表面Ｆｃγ受容体ファミリーのメンバー及び補体系のＣ１ｑに結合することにより、免疫系のエフェクター経路を活性化する。クラスター化抗体によるエフェクタータンパク質の連結により、炎症性サイトカインの放出、抗原生産の調節、飲食作用、及び細胞死を含む様々な応答が引き起こされる。いくつかの臨床用途では、これらの応答はモノクローナル抗体の有効性にとって重要である。他の用途では、これらは炎症や抗原を担持する細胞の排除などの不要な副作用を誘発する。したがって、本発明は、さらに、改変された、たとえば増強または低減されたエフェクター機能を有する、抗体を含めたαｖβ５結合性タンパク質に関する。

【０１２５】

本発明の抗αｖβ５抗体のエフェクター機能は、多くの既知のアッセイの１つを用いて決定できる。抗αｖβ５抗体のエフェクター機能は、第２の抗αｖβ５抗体に対して相対的に増強または低減され得る。いくつかの実施形態では、第２の抗αｖβ５抗体は、αｖβ５に特異的に結合する任意の抗体であり得る。ある実施形態では、第２の抗αｖβ５抗体は、αｖβ５に特異的に結合する任意のヒト化抗体であり得る。他の実施形態では、第２のαｖβ５特異的抗体は、実施例２及び８で説明されている抗体など、本発明の抗体のどれでもよい。他の実施形態では、対象の抗αｖβ５抗体がエフェクター機能を低減するように修飾されている場合、第２の抗αｖβ５抗体は、抗体の未修飾または親バージョンであり得る。

【０１２６】

エフェクター機能には、抗体が細胞毒性Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、またはマクロファージのＦＣ受容体に結合して細胞死をもたらすＡＤＣＣ、及び補体カスケードの活性化により細胞死が誘発されるＣＤＣが含まれる（Ｄａｅｒｏｎ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５：２０３－２３４（１９９７）；Ｗａｒｄ ａｎｄ Ｇｈｅｔｉｅ，Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２：７７－９４（１９９５）；及びＲａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－４９２（１９９１）で論じている）。そのようなエフェクター機能は、通常、Ｆｃ領域が結合性ドメイン（たとえば抗体可変ドメイン）と組み合わせられることを要し、当業界で知られている標準的なアッセイにより評価され得る（たとえばＷＯ０５／０１８５７２、ＷＯ０５／００３１７５、及び米国特許第６，２４２，１９５号を参照のこと）。

【０１２７】

エフェクター機能は、Ｆｃドメインが欠如したＦａｂ、Ｆａｂ’２、または一本鎖Ｆｖなどの抗体断片を用いることで防止できる。あるいは、ＦｃγＲＩには結合するが、Ｃ１ｑ及びＦｃγＲＩＩ及びＲＩＩＩには結合しにくいＩｇＧ４サブタイプ抗体を用いる。しかし、ＩｇＧ４抗体は、ＩｇＧ１抗体と比べて低ｐＨでの安定性が劣るので、凝集体を形成し得る。ＩｇＧ４抗体の安定性は、４０９番目のアルギニン（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ，１９９１，５thで提案されたＥＵインデックスによる）を、リジン、メチオニン、スレオニン、ロイシン、バリン、グルタミン酸、アスパラギン、フェニルアラニン、トリプトファン、またはチロシンのいずれか１つで置換することにより向上させることができる。あるいは、及びまたはそれに加えて、ＩｇＧ４抗体の安定性は、ＩｇＧ４抗体のＣＨ３ドメインをＩｇＧ１抗体のＣＨ３ドメインで置換することによって、または、ＩｇＧ４のＣＨ２及びＣＨ３ドメインをＩｇＧ１のＣＨ２及びＣＨ３ドメインで置換することによって、向上させることができる。したがって、ＩｇＧ４アイソタイプである本発明の抗αｖβ５抗体は、抗体の安定性を高めつつエフェクター機能を低減するために、４０９番目の修飾、及び／またはＣＨ２及び／またはＣＨ３ドメインのＩｇＧ１ドメインでの置換を含み得る。ＩｇＧ２サブタイプもＦｃ受容体への結合性は弱いが、ＦｃγＲＩＩａのＨ１３１アロタイプ及びＣ１ｑへの有意な結合性は保持している。したがっ

て、全Ｆｃ受容体及びＣ１ｑへの結合を排するような追加の変化がＦｃ配列に必要であり得る。

【０１２８】

ＡＤＣＣを含むいくつかの抗体エフェクター機能は、抗体のＦｃ領域に結合するＦｃ受容体（ＦｃＲ）により媒介される。特定のＦｃＲに対する抗体の親和性、ひいては抗体が媒介するエフェクター活性は、抗体のＦｃ及び／または定常領域のアミノ酸配列の改変及び／または翻訳後修飾により、調節（すなわち増強または低減）され得る。

【０１２９】

ＦｃＲは、免疫グロブリンのアイソタイプに対する特異性によって定義され、ＩｇＧ抗体のＦｃ受容体はＦｃγＲ、ＩｇＥ抗体のＦｃ受容体はＦｃεＲ、ＩｇＡ抗体のＦｃ受容体はＦｃαＲと呼ばれる。ＦｃγＲの３つのサブクラス、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）及びＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）が特定されている。ＦｃγＲＩＩとＦｃγＲＩＩＩは、それぞれＦｃγＲＩＩａ（ＣＤ３２ａ）とＦｃγＲＩＩＢ（ＣＤ３２ｂ）、ＦｃγＲＩＩＩＡ（ＣＤ１６ａ）とＦｃγＲＩＩＩＢ（ＣＤ１６ｂ）という２つのタイプを有する。各ＦｃγＲサブクラスは２つまたは３つの遺伝子でコードされており、選択的ＲＮＡスプライシングは複数の転写物をもたらすので、ＦｃγＲアイソフォームには広範な多様性が存在する。たとえば、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）には、アイソフォームＩＩａ、ＩＩｂ１、ＩＩｂ２ＩＩｂ３、及びＩＩｃが含まれる。

【０１３０】

ヒト及びマウス抗体のＦｃγＲ結合部位は、残基Ｇ２３３～Ｓ２３９からなる、いわゆる「ｌｏｗｅｒ　ｈｉｎｇｅ　ｒｅｇｉｏｎ（ヒンジ領域下部）」に既にマッピングされている（ＥＵインデックスナンバリングは Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，　Ｂｅｔｈｅｓｄａ，　Ｍｄ．（１９９１），Ｗｏｏｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３：３１９－３３０（１９８６）；Ｄｕｎｃａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３３２：５６３（１９８８）；Ｃａｎｆｉｅｌｄ　ａｎｄ　Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７３：１４８３－１４９１（１９９１）；Ｃｈａｐｐｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　ＵＳＡ　８８：９０３６－９０４０（１９９１））。上記引用中、残基Ｇ２３３～Ｓ２３９、Ｐ２３８及びＳ２３９からなるものが、結合に関与する可能性があるとされている。ＦｃγＲへの結合に関与している他の残基は、Ｇ３１６～Ｋ３３８（Ｗｏｏｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２３：３１９－３３０（１９８６））；Ｋ２７４～Ｒ３０１（Ｓａｒｍａｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２１：４３－５１（１９８４））；Ｙ４０７～Ｒ４１６（Ｇｅｒｇｅｌｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓ．１２：７３９－７４３（１９８４）及びＳｈｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７６：６５９１－６６０４（２００１），Ｌａｚａｒ　ＧＡ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　１０３：４００５－４０１０（２００６））；Ｎ２９７；Ｔ２９９；Ｅ３１８；Ｌ２３４～Ｓ２３９；Ｎ２６５～Ｅ２６９；Ｎ２９７～Ｔ２９９；及びＡ３２７～Ｉ３３２である。ＦｃＲ結合に関与しているアミノ酸残基のこれらの、及びその他の範囲または領域は、Ｉｇ－ＦｃＲ複合体の結晶構造を調べれば、当業者には明らかであり得る（たとえばＳｏｎｄｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．２０００　Ｎａｔｕｒｅ　４０６（６７９３）：２６７－７３及びＳｏｎｄｅｒｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．２００２　Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｓｏｃ　Ｔｒａｎｓ．３０（４）：４８１－６を参照のこと）。したがって、本発明の抗αｖβ５抗体は、必要に応じてエフェクター機能を増強または低減するために、前述の残基の１つ以上の修飾を含む。

【０１３１】

モノクローナル抗体のエフェクター機能を改変する別のアプローチとしては、エフェクター結合相互作用に関与する、モノクローナル抗体表面のアミノ酸を変異させることが挙

げられる（Ｌｕｎｄ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７（８）：２６５７－６２；Ｓｈｉｅｌｄｓ，Ｒ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６（９）：６５９１－６０４）。

【０１３２】

抗体のエフェクター機能を増強する方法は、当業界では周知である（たとえば、Ｋｅｌｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，９０１：２７７－９３（２０１２）；Ｎａｔｓｕｍｅ ｅｔ ａｌ．，Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ Ｄｅｖｅｌ Ｔｈｅｒ．，３：７－１６（２００９）；米国特許第８，１８８，２３１号、同第７，９６０，５１２号を参照のこと）。一実施形態では、αｖβ５抗体は、２２１、２２２、２２３、２２４、２２５、２２７、２２８、２３０、２３１、２３２、２３３、２３４、２３５、２３６、２３７、２３８、２３９、２４０、２４１、２４３、２４４、２４５、２４６、２４７、２４９、２５５、２５８、２６０、２６２、２６３、２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７０、２７１、２７２、２７３、２７４、２７５、２７６、２７８、２８０、２８１、２８２、２８３、２８４、２８５、２８６、２８８、２９０、２９１、２９２、２９３、２９４、２９５、２９６、２９７、２９８、２９９、３００、３０１、３０２、３０３、３０４、３０５、３１３、３１７、３１８、３２０、３２２、３２３、３２４、３２５、３２６、３２７、３２８、３２９、３３０、３３１、３３２、３３３、３３４、３３５、３３６、及び３３７からなる群より選択される位置に１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有し、Ｆｃ領域の残基のナンバリングは、ＫａｂａｔのＥＵインデックスのナンバリングである。ある実施形態では、αｖβ５抗体は、Ｄ２２１Ｋ、Ｄ２２１Ｙ、Ｋ２２２Ｅ、Ｋ２２２Ｙ、Ｔ２２３Ｅ、Ｔ２２３Ｋ、Ｈ２２４Ｅ、Ｈ２２４Ｙ、Ｔ２２５Ｅ、Ｔ２２５Ｋ、Ｔ２２５Ｗ、Ｐ２２７Ｅ、Ｐ２２７Ｇ、Ｐ２２７Ｋ、Ｐ２２７Ｙ、Ｐ２２８Ｅ、Ｐ２２８Ｇ、Ｐ２２８Ｋ、Ｐ２２８Ｙ、Ｐ２３０Ａ、Ｐ２３０Ｅ、Ｐ２３０Ｇ、Ｐ２３０Ｙ、Ａ２３１Ｅ、Ａ２３１Ｇ、Ａ２３１Ｋ、Ａ２３１Ｐ、Ａ２３１Ｙ、Ｐ２３２Ｅ、Ｐ２３２Ｇ、Ｐ２３２Ｋ、Ｐ２３２Ｙ、Ｅ２３３Ａ、Ｅ２３３Ｄ、Ｅ２３３Ｆ、Ｅ２３３Ｇ、Ｅ２３３Ｈ、Ｅ２３３Ｉ、Ｅ２３３Ｋ、Ｅ２３３Ｌ、Ｅ２３３Ｍ、Ｅ２３３Ｎ、Ｅ２３３Ｑ、Ｅ２３３Ｒ、Ｅ２３３Ｓ、Ｅ２３３Ｔ、Ｅ２３３Ｖ、Ｅ２３３Ｗ、Ｅ２３３Ｙ、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３４Ｄ、Ｌ２３４Ｅ、Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３４Ｇ、Ｌ２３４Ｈ、Ｌ２３４Ｉ、Ｌ２３４Ｋ、Ｌ２３４Ｍ、Ｌ２３４Ｎ、Ｌ２３４Ｐ、Ｌ２３４Ｑ、Ｌ２３４Ｒ、Ｌ２３４Ｓ、Ｌ２３４Ｔ、Ｌ２３４Ｖ、Ｌ２３４Ｗ、Ｌ２３４Ｙ、Ｌ２３５Ａ、Ｌ２３５Ｄ、Ｌ２３５Ｅ、Ｌ２３５Ｆ、Ｌ２３５Ｇ、Ｌ２３５Ｈ、Ｌ２３５Ｉ、Ｌ２３５Ｋ、Ｌ２３５Ｍ、Ｌ２３５Ｎ、Ｌ２３５Ｐ、Ｌ２３５Ｑ、Ｌ２３５Ｒ、Ｌ２３５Ｓ、Ｌ２３５Ｔ、Ｌ２３５Ｖ、Ｌ２３５Ｗ、Ｌ２３５Ｙ、Ｇ２３６Ａ、Ｇ２３６Ｄ、Ｇ２３６Ｅ、Ｇ２３６Ｆ、Ｇ２３６Ｈ、Ｇ２３６Ｉ、Ｇ２３６Ｋ、Ｇ２３６Ｌ、Ｇ２３６Ｍ、Ｇ２３６Ｎ、Ｇ２３６Ｐ、Ｇ２３６Ｑ、Ｇ２３６Ｒ、Ｇ２３６Ｓ、Ｇ２３６Ｔ、Ｇ２３６Ｖ、Ｇ２３６Ｗ、Ｇ２３６Ｙ、Ｇ２３７Ｄ、Ｇ２３７Ｅ、Ｇ２３７Ｆ、Ｇ２３７Ｈ、Ｇ２３７Ｉ、Ｇ２３７Ｋ、Ｇ２３７Ｌ、Ｇ２３７Ｍ、Ｇ２３７Ｎ、Ｇ２３７Ｐ、Ｇ２３７Ｑ、Ｇ２３７Ｒ、Ｇ２３７Ｓ、Ｇ２３７Ｔ、Ｇ２３７Ｖ、Ｇ２３７Ｗ、Ｇ２３７Ｙ、Ｐ２３８Ｄ、Ｐ２３８Ｅ、Ｐ２３８Ｆ、Ｐ２３８Ｇ、Ｐ２３８Ｈ、Ｐ２３８Ｉ、Ｐ２３８Ｋ、Ｐ２３８Ｌ、Ｐ２３８Ｍ、Ｐ２３８Ｎ、Ｐ２３８Ｑ、Ｐ２３８Ｒ、Ｐ２３８Ｓ、Ｐ２３８Ｔ、Ｐ２３８Ｖ、Ｐ２３８Ｗ、Ｐ２３８Ｙ、Ｓ２３９Ｄ、Ｓ２３９Ｅ、Ｓ２３９Ｆ、Ｓ２３９Ｇ、Ｓ２３９Ｈ、Ｓ２３９Ｉ、Ｓ２３９Ｋ、Ｓ２３９Ｌ、Ｓ２３９Ｍ、Ｓ２３９Ｎ、Ｓ２３９Ｐ、Ｓ２３９Ｑ、Ｓ２３９Ｒ、Ｓ２３９Ｔ、Ｓ２３９Ｖ、Ｓ２３９Ｗ、Ｓ２３９Ｙ、Ｖ２４０Ａ、Ｖ２４０Ｉ、Ｖ２４０Ｍ、Ｖ２４０Ｔ、Ｆ２４１Ｄ、Ｆ２４１Ｅ、Ｆ２４１Ｌ、Ｆ２４１Ｒ、Ｆ２４１Ｓ、Ｆ２４１Ｗ、Ｆ２４１Ｙ、Ｆ２４３Ｅ、Ｆ２４３Ｈ、Ｆ２４３Ｌ、Ｆ２４３Ｑ、Ｆ２４３Ｒ、Ｆ２４３Ｗ、Ｆ２４３Ｙ、Ｐ２４４Ｈ、Ｐ２４５Ａ、Ｋ２４６Ｄ、Ｋ２４６Ｅ、Ｋ２４６Ｈ、Ｋ２４６Ｙ、Ｐ２４７Ｇ、Ｐ２４７Ｖ、Ｄ２４９Ｈ、Ｄ２４９Ｑ、Ｄ２４９Ｙ、Ｒ２５５Ｅ、Ｒ２５５Ｙ、Ｅ２５８Ｈ、Ｅ２５８Ｓ、Ｅ２５８Ｙ、Ｔ２６０Ｄ、Ｔ２６０Ｅ、Ｔ２６０Ｈ、Ｔ２６０Ｙ、Ｖ２６２Ａ、Ｖ２６２Ｅ、Ｖ２６２Ｆ、Ｖ２６２Ｉ、Ｖ２６２Ｔ、Ｖ２６３Ａ、Ｖ

263I、V263M、V263T、V264A、V264D、V264E、V264F、V264G、V264H、V264I、V264K、V264L、V264M、V264N、V264P、V264Q、V264R、V264S、V264T、V264W、V264Y、D265F、D265G、D265H、D265I、D265K、D265L、D265M、D265N、D265P、D265Q、D265R、D265S、D265T、D265V、D265W、D265Y、V266A、V266I、V266M、V266T、S267D、S267E、S267F、S267H、S267I、S267K、S267L、S267M、S267N、S267P、S267Q、S267R、S267T、S267V、S267W、S267Y、H268D、H268E、H268F、H268G、H268I、H268K、H268L、H268M、H268P、H268Q、H268R、H268T、H268V、H268W、E269F、E269G、E269H、E269I、E269K、E269L、E269M、E269N、E269P、E269R、E269S、E269T、E269V、E269W、E269Y、D270F、D270G、D270H、D270I、D270L、D270M、D270P、D270Q、D270R、D270S、D270T、D270W、D270Y、P271A、P271D、P271E、P271F、P271G、P271H、P271I、P271K、P271L、P271M、P271N、P271Q、P271R、P271S、P271T、P271V、P271W、P271Y、E272D、E272F、E272G、E272H、E272I、E272K、E272L、E272M、E272P、E272R、E272S、E272T、E272V、E272W、E272Y、V273I、K274D、K274E、K274F、K274G、K274H、K274I、K274L、K274M、K274N、K274P、K274R、K274T、K274V、K274W、K274Y、F275L、F275W、N276D、N276E、N276F、N276G、N276H、N276I、N276L、N276M、N276P、N276R、N276S、N276T、N276V、N276W、N276Y、Y278D、Y278E、Y278G、Y278H、Y278I、Y278K、Y278L、Y278M、Y278N、Y278P、Y278Q、Y278R、Y278S、Y278T、Y278V、Y278W、D280G、D280K、D280L、D280P、D280W、G281D、G281E、G281K、G281N、G281P、G281Q、G281Y、V282E、V282G、V282K、V282P、V282Y、E283G、E283H、E283K、E283L、E283P、E283R、E283Y、V284D、V284E、V284L、V284N、V284Q、V284T、V284Y、H285D、H285E、H285K、H285Q、H285W、H285Y、N286E、N286G、N286P、N286Y、K288D、K288E、K288Y、K290D、K290H、K290L、K290N、K290W、P291D、P291E、P291G、P291H、P291I、P291Q、P291T、R292D、R292E、R292T、R292Y、E293F、E293G、E293H、E293I、E293L、E293M、E293N、E293P、E293R、E293S、E293T、E293V、E293W、E293Y、E294F、E294G、E294H、E294I、E294K、E294L、E294M、E294P、E294R、E294S、E294T、E294V、E294W、E294Y、Q295D、Q295E、Q295F、Q295G、Q295H、Q295I、Q295M、Q295N、Q295P、Q295R、Q295S、Q295T、Q295V、Q295W、Q295Y、Y296A、Y296D、Y296E、Y296G、Y296H、Y296I、Y296K、Y296L、Y296M、Y296N、Y296Q、Y296R、Y296S、Y296T、Y296V、N297D、N297E、N297F、N297G、N297H、N297I、N297K、N297L、N297M、N297P、N297Q、N297R、N297S、N297T、N297V、N297W、N297Y、S298D、S298E、S298F、S298H、S298I、S298K、S298M、S298N、S298Q、S298R、S298T、S298W、S298Y、T299A、T299D、T299E、T299F、T29

９Ｇ、Ｔ２９９Ｈ、Ｔ２９９Ｉ、Ｔ２９９Ｋ、Ｔ２９９Ｌ、Ｔ２９９Ｍ、Ｔ２９９Ｎ、Ｔ２９９Ｐ、Ｔ２９９Ｑ、Ｔ２９９Ｒ、Ｔ２９９Ｓ、Ｔ２９９Ｖ、Ｔ２９９Ｗ、Ｔ２９９Ｙ、Ｙ３００Ａ、Ｙ３００Ｄ、Ｙ３００Ｅ、Ｙ３００Ｇ、Ｙ３００Ｈ、Ｙ３００Ｋ、Ｙ３００Ｍ、Ｙ３００Ｎ、Ｙ３００Ｐ、Ｙ３００Ｑ、Ｙ３００Ｒ、Ｙ３００Ｓ、Ｙ３００Ｔ、Ｙ３００Ｖ、Ｙ３００Ｗ、Ｒ３０１Ｄ、Ｒ３０１Ｅ、Ｒ３０１Ｈ、Ｒ３０１Ｙ、Ｖ３０２Ｉ、Ｖ３０３Ｄ、Ｖ３０３Ｅ、Ｖ３０３Ｙ、Ｓ３０４Ｄ、Ｓ３０４Ｈ、Ｓ３０４Ｌ、Ｓ３０４Ｎ、Ｓ３０４Ｔ、Ｖ３０５Ｅ、Ｖ３０５Ｔ、Ｖ３０５Ｙ、Ｗ３１３Ｆ、Ｋ３１７Ｅ、Ｋ３１７Ｑ、Ｅ３１８Ｈ、Ｅ３１８Ｌ、Ｅ３１８Ｑ、Ｅ３１８Ｒ、Ｅ３１８Ｙ、Ｋ３２０Ｄ、Ｋ３２０Ｆ、Ｋ３２０Ｇ、Ｋ３２０Ｈ、Ｋ３２０Ｉ、Ｋ３２０Ｌ、Ｋ３２０Ｎ、Ｋ３２０Ｐ、Ｋ３２０Ｓ、Ｋ３２０Ｔ、Ｋ３２０Ｖ、Ｋ３２０Ｗ、Ｋ３２０Ｙ、Ｋ３２２Ｄ、Ｋ３２２Ｆ、Ｋ３２２Ｇ、Ｋ３２２Ｈ、Ｋ３２２Ｉ、Ｋ３２２Ｐ、Ｋ３２２Ｓ、Ｋ３２２Ｔ、Ｋ３２２Ｖ、Ｋ３２２Ｗ、Ｋ３２２Ｙ、Ｖ３２３Ｉ、Ｓ３２４Ｄ、Ｓ３２４Ｆ、Ｓ３２４Ｇ、Ｓ３２４Ｈ、Ｓ３２４Ｉ、Ｓ３２４Ｌ、Ｓ３２４Ｍ、Ｓ３２４Ｐ、Ｓ３２４Ｒ、Ｓ３２４Ｔ、Ｓ３２４Ｖ、Ｓ３２４Ｗ、Ｓ３２４Ｙ、Ｎ３２５Ａ、Ｎ３２５Ｄ、Ｎ３２５Ｅ、Ｎ３２５Ｆ、Ｎ３２５Ｇ、Ｎ３２５Ｈ、Ｎ３２５Ｉ、Ｎ３２５Ｋ、Ｎ３２５Ｌ、Ｎ３２５Ｍ、Ｎ３２５Ｐ、Ｎ３２５Ｑ、Ｎ３２５Ｒ、Ｎ３２５Ｓ、Ｎ３２５Ｔ、Ｎ３２５Ｖ、Ｎ３２５Ｗ、Ｎ３２５Ｙ、Ｋ３２６Ｉ、Ｋ３２６Ｌ、Ｋ３２６Ｐ、Ｋ３２６Ｔ、Ａ３２７Ｄ、Ａ３２７Ｅ、Ａ３２７Ｆ、Ａ３２７Ｈ、Ａ３２７Ｉ、Ａ３２７Ｋ、Ａ３２７Ｌ、Ａ３２７Ｍ、Ａ３２７Ｎ、Ａ３２７Ｐ、Ａ３２７Ｒ、Ａ３２７Ｓ、Ａ３２７Ｔ、Ａ３２７Ｖ、Ａ３２７Ｗ、Ａ３２７Ｙ、Ｌ３２８Ａ、Ｌ３２８Ｄ、Ｌ３２８Ｅ、Ｌ３２８Ｆ、Ｌ３２８Ｇ、Ｌ３２８Ｈ、Ｌ３２８Ｉ、Ｌ３２８Ｋ、Ｌ３２８Ｍ、Ｌ３２８Ｎ、Ｌ３２８Ｐ、Ｌ３２８Ｑ、Ｌ３２８Ｒ、Ｌ３２８Ｓ、Ｌ３２８Ｔ、Ｌ３２８Ｖ、Ｌ３２８Ｗ、Ｌ３２８Ｙ、Ｐ３２９Ｄ、Ｐ３２９Ｅ、Ｐ３２９Ｆ、Ｐ３２９Ｇ、Ｐ３２９Ｈ、Ｐ３２９Ｉ、Ｐ３２９Ｋ、Ｐ３２９Ｌ、Ｐ３２９Ｍ、Ｐ３２９Ｎ、Ｐ３２９Ｑ、Ｐ３２９Ｒ、Ｐ３２９Ｓ、Ｐ３２９Ｔ、Ｐ３２９Ｖ、Ｐ３２９Ｗ、Ｐ３２９Ｙ、Ａ３３０Ｅ、Ａ３３０Ｆ、Ａ３３０Ｇ、Ａ３３０Ｈ、Ａ３３０Ｉ、Ａ３３０Ｌ、Ａ３３０Ｍ、Ａ３３０Ｎ、Ａ３３０Ｐ、Ａ３３０Ｒ、Ａ３３０Ｓ、Ａ３３０Ｔ、Ａ３３０Ｖ、Ａ３３０Ｗ、Ａ３３０Ｙ、Ｐ３３１Ｄ、Ｐ３３１Ｆ、Ｐ３３１Ｈ、Ｐ３３１Ｉ、Ｐ３３１Ｌ、Ｐ３３１Ｍ、Ｐ３３１Ｑ、Ｐ３３１Ｒ、Ｐ３３１Ｔ、Ｐ３３１Ｖ、Ｐ３３１Ｗ、Ｐ３３１Ｙ、Ｉ３３２Ａ、Ｉ３３２Ｄ、Ｉ３３２Ｅ、Ｉ３３２Ｆ、Ｉ３３２Ｈ、Ｉ３３２Ｋ、Ｉ３３２Ｌ、Ｉ３３２Ｍ、Ｉ３３２Ｎ、Ｉ３３２Ｐ、Ｉ３３２Ｑ、Ｉ３３２Ｒ、Ｉ３３２Ｓ、Ｉ３３２Ｔ、Ｉ３３２Ｖ、Ｉ３３２Ｗ、Ｉ３３２Ｙ、Ｅ３３３Ｆ、Ｅ３３３Ｈ、Ｅ３３３Ｉ、Ｅ３３３Ｌ、Ｅ３３３Ｍ、Ｅ３３３Ｐ、

Ｅ３３３Ｔ、Ｅ３３３Ｙ、Ｋ３３４Ｆ、Ｋ３３４Ｉ、Ｋ３３４Ｌ、Ｋ３３４Ｐ、Ｋ３３４Ｔ、Ｔ３３５Ｄ、Ｔ３３５Ｆ、Ｔ３３５Ｇ、Ｔ３３５Ｈ、Ｔ３３５Ｉ、Ｔ３３５Ｌ、Ｔ３３５Ｍ、Ｔ３３５Ｎ、Ｔ３３５Ｐ、Ｔ３３５Ｒ、Ｔ３３５Ｓ、Ｔ３３５Ｖ、Ｔ３３５Ｗ、Ｔ３３５Ｙ、Ｉ３３６Ｅ、Ｉ３３６Ｋ、Ｉ３３６Ｙ、Ｓ３３７Ｅ、Ｓ３３７Ｈ、及びＳ３３７Ｎからなる群より選択される１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つまたはそれ以上のアミノ酸置換を有し、Ｆｃ領域の残基のナンバリングは、ＫａｂａｔのＥＵインデックスのナンバリングである。特定の実施形態では、αｖβ５抗体は、Ｓ２３９Ｄ、Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ、Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ／Ａ３３０Ｌ、Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ／Ｇ２３６Ａ、Ｓ２９８Ａ、Ａ３３０Ｌ　Ｉ３３２Ｅ、Ｅ３３３Ａ、及びＫ３３４Ａの変異を１つ、２つ、または３つ含んでいる。

【０１３３】

オリゴサッカライドの存在、特にＩｇＧ１のＣＨ２ドメインのアスパラギン（ａｓｐａｒｉｇｉｎｅ）－２９７のＮ結合型オリゴサッカライドの存在は、ＦｃγＲならびにＣ１ｑへの結合にとって重要である。抗体のフコース成分を減じることで、エフェクター機能が向上する（たとえば米国特許第８，１６３，５５１号を参照のこと）。ある実施形態で

は、αvβ5抗体は、フコシル化の低減、及びエフェクター機能を増強させるアミノ酸置換（たとえばS298A、E333A、及びK334Aの変異のうちの1つ、2つ、または3つ）を有する。エフェクター機能はまた、本明細書で説明する抗αvβ5抗体を、約60～200ng／mL（たとえば60ng／mL、75ng／mL、100ng／mL、150ng／ml）の濃度のアルファーマンノシダーゼI阻害剤（たとえばkifunensine）の存在下で調製し発現させることでも得ることができる。アルファーマンノシダーゼI阻害剤の存在下で発現させた抗体は、主としてオリゴマンノースタイプのグリカンを含んでおり、概して高いADCC活性及びFcγRIIIAに対する親和性を示すが、C1q結合性は低減している。

【0134】

本開示のエフェクター機能が増強された抗αvβ5抗体には、親または非バリアント抗αvβ5抗体に対して相対的に、1つ以上のFc受容体（FcR）に対する結合親和性が高くなった抗体が含まれる。したがって、FcR結合親和性が高くなった抗αvβ5抗体としては、親または非バリアント抗αvβ5抗体と比べて、1つ以上のFc受容体に対する1．5倍、2倍、2．5倍、3倍、4倍、または5倍以上の結合親和性の増強を示す抗αvβ5抗体が挙げられる。いくつかの実施形態では、エフェクター機能が増強された抗αvβ5抗体は、親または非バリアント抗体に対して相対的に約10倍高い親和性でFcRに結合する。他の実施形態では、エフェクター機能が増強された抗αvβ5抗体は、親または非バリアント抗体に対して相対的に約15倍高い親和性で、または約20倍高い親和性でFcRに結合する。FcR受容体は、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）及びFcγRIII、及びそのアイソフォーム、及びFcεR、FcμR、FcδR、及び／またはFcαRのうちの1つ以上であり得る。特定の実施形態では、エフェクター機能が増強された抗αvβ5抗体は、FcγRIIaとの結合親和性において1．5倍、2倍、2．5倍、3倍、4倍、または5倍以上の増強を示す。

【0135】

いくつかの例では、ヒト化ALULAのエフェクター機能／補体活性化を排除する必要があるが、それは、（1）推定されるALULAの作用機構は、リガンドのαvβ5への結合を阻害することであり、（2）αvβ5はほとんどの細胞種で広く発現し、（3）補体活性化が関連の臨床適応で詳細に記録されており、疾患の原因となる可能性があるためである。したがって、本発明は、さらに、低減されたエフェクター機能を有するαvβ5結合抗体に関する。エフェクター機能を低減するには、異なるサブタイプの配列セグメントの組合せ（たとえばIgG2とIgG4の組合せ）を用いて、どちらか片方のみのサブタイプよりも、Fcγ受容体との結合性を大幅に低減させることができる（Armour et al.，Eur. J. Immunol.，29：2613－1624（1999）；Mol. Immunol.，40：585－593（2003））。一部もしくはすべてのFc受容体サブタイプに対する親和性が（したがってエフェクター機能も）改変された及び／または低減された多数のFcバリアントが当業界では既知である。たとえばUS2007／0224188；US2007／0148171；US2007／0048300；US2007／0041966；US2007／0009523；US2007／0036799；US2006／0275283；US2006／0235208；US2006／0193856；US2006／0160996；US2006／0134105；US2006／0024298；US2005／0244403；US2005／0233382；US2005／0215768；US2005／0118174；US2005／0054832；US2004／0228856；US2004／132101；US2003／158389を参照されたい。米国特許第7，183，387号；同第6，737，056号；同第6，538，124号；同第6，528，624号；同第6，194，551号；同第5，624，821号；同第5，648，260号も参照されたい。

【0136】

エフェクター機能が低減された本発明の抗αvβ5抗体には、親または非バリアント抗

αｖβ５抗体に対して相対的に、１つ以上のＦｃ受容体（ＦｃＲ）に対する結合親和性が低くなった抗体が含まれる。したがって、ＦｃＲ結合親和性が低くなった抗αｖβ５抗体としては、親または非バリアント抗αｖβ５抗体と比べて、１つ以上のＦｃ受容体に対する１．５倍、２倍、２．５倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２０倍、または２５倍以上の結合親和性の低下を示す抗αｖβ５抗体が挙げられる。いくつかの実施形態では、エフェクター機能が低減された抗αｖβ５抗体は、親または非バリアント抗体に対して相対的に、約１０倍低い親和性でＦｃＲに結合する。他の実施形態では、エフェクター機能が低減された抗αｖβ５抗体は、親または非バリアント抗体に対して相対的に、約１５倍低い親和性で、または約２０倍低い親和性でＦｃＲに結合する。ＦｃＲ受容体は、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）及びＦｃγＲＩＩＩ、及びそのアイソフォーム、及びＦｃεＲ、ＦｃμＲ、ＦｃδＲ、及び／またはＦｃαＲのうちの１つ以上であり得る。特定の実施形態では、エフェクター機能が低減された抗αｖβ５抗体は、ＦｃγＲＩＩａとの結合親和性において１．５倍、２倍、２．５倍、３倍、４倍、または５倍以上の低下を示す。

【０１３７】

ＣＤＣでは、抗体－抗原複合体が補体に結合し、結果として補体カスケードが活性化されて、膜侵襲複合体が生じる。古典的補体経路の活性化は、補体系の第１の成分（Ｃ１ｑ）が、同族の抗原に結合している（適切なサブクラスの）抗体に結合することにより開始される。したがって、補体カスケードの活性化は、部分的には、免疫グロブリンのＣ１ｑタンパク質との結合親和性により調節される。補体カスケードを活性化するために、Ｃ１ｑは、抗原標的に付着しているＩｇＧ１、ＩｇＧ２、またはＩｇＧ３のうちの少なくとも２分子に、ＩｇＭの場合は１分子のみに、結合する必要がある（Ｗａｒｄ ａｎｄ Ｇｈｅｔｉｅ，Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２：７７－９４（１９９５）ｐ．８０）。補体活性化を評価するために、たとえばＧａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０２：１６３（１９９６）で説明されているようなＣＤＣアッセイが実施され得る。

【０１３８】

ＣＨ２ドメインのＧｌｕ３１８、Ｌｙｓ３２０及びＬｙｓ３２２残基、同じベータストランドに近接するターンに存在するアミノ酸残基３３１、ヒンジ領域下部に存在するＬｙｓ２３５及びＧｌｙ２３７残基、ならびにＣＨ２ドメインのＮ末端領域に存在する残基２３１～２３８を含む、ＩｇＧ分子の様々な残基がＣ１ｑへの結合に関与している（たとえば、Ｘｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：１５２Ａ（Ａｂｓｔｒａｃｔ）（１９９３），ＷＯ９４／２９３５１；Ｔａｏ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７８：６６１－６６７（１９９３）；Ｂｒｅｋｋｅ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．ｌｍｍｕｎｏｌ．，２４：２５４２－４７（１９９４）；Ｂｕｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ；Ｎａｔｕｒｅ，２８８：３３８－３４４（１９８０）；Ｄｕｎｃａｎ ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：７３８－４０（１９８８）；Ｉｄｕｓｏｇｉｅ ｅｔ ａｌ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １６４：４１７８－４１８４（２０００；米国特許第５，６４８，２６０号、及び同第５，６２４，８２１号を参照のこと）。

【０１３９】

Ｃ１ｑ結合性が向上した抗αｖβ５抗体は、ヒトＩｇＧのＦｃ領域のアミノ酸位置３２６、３２７、３３３及び３３４のうちの１つ、２つ、３つ、または４つにアミノ酸置換を含み得、ここでＩｇＧのＦｃ領域の残基ナンバリングは、ＫａｂａｔのＥＵインデックスのものである。一実施形態では、抗αｖβ５抗体は、アミノ酸置換Ｋ３２６Ｗ／Ｅ３３３Ｓを含んでおり、これはＩｇＧ１抗体のＣ１ｑへの結合性を高めることが知られている（Ｓｔｅｕｒｅｒ Ｗ． ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５５（３）：１１６５－７４（１９９５））．

【０１４０】

Ｃ１ｑ結合性が低下した抗αｖβ５抗体は、ヒトＩｇＧのＦｃ領域のアミノ酸位置２７０、３２２、３２９及び３３１のうちの１つ、２つ、２つ、または４つにアミノ酸置換を

含み得、ここでＩｇＧのＦｃ領域の残基ナンバリングは、ＫａｂａｔのＥＵインデックスのものである。ＩｇＧ１における一例として、ヒトＩｇＧ１のＣＨ２ドメインＣＯＯＨ末端の２つの変異（Ｋ３２２Ａ及びＰ３２９Ａ）は、ＣＤＣ経路を活性化せず、Ｃ１ｑ結合性が１００倍以上低下する結果が示されている（米国特許第６，２４２，１９５号）。

【０１４１】

したがって、ある実施形態では、本発明の抗αｖβ５抗体は、第２の抗αｖβ５抗体に対して相対的に、低減または増強された補体タンパク質への結合性を示す。ある実施形態では、本発明の抗αｖβ５抗体は、第２の抗αｖβ５抗体に対して相対的に、約１．５倍以上、約２倍以上、約３倍以上、約４倍以上、約５倍以上、約６倍以上、約７倍以上、約８倍以上、約９倍以上、約１０倍以上、または約１５倍以上低減または増強されたＣ１ｑ結合性を示す。

【０１４２】

このように、本発明のある実施形態では、本明細書で提供する抗αｖβ５抗体のＣＤＣ活性を増強または低減するために、これらの残基の１つ以上が修飾され、置換され、または除去され得、あるいは１つ以上のアミノ酸残基が挿入され得る。

【０１４３】

ある他の実施形態では、本発明は、１つ以上のＦｃＲ受容体への低減された結合を示すが、補体に結合する（たとえば天然の非バリアントまたは親抗αｖβ５抗体と同様の、または、いくつかの実施形態では、それよりも低い）能力は維持している抗αｖβ５抗体を提供する。したがって、本発明の抗αｖβ５抗体は、たとえばＦｃγＲＩＩａ（たとえば血小板上に発現したＦｃγＲＩＩａ）などのＦｃＲへの低い結合性を示しながらも、補体に結合して活性化し得る。（たとえば血小板上に発現したＦｃγＲＩＩａなどの）ＦｃγＲＩＩａとの結合性が低いかまたは結合しないが、Ｃ１ｑには結合して少なくともある程度は補体カスケードを活性化できるそのような抗体は、おそらくは望ましいエフェクター機能を維持しながら、血栓塞栓事象のリスクを低減する。代替実施形態では、本発明の抗αｖβ５抗体は、１つ以上のＦｃＲへの低減された結合性を示すが、１つ以上の他のＦｃＲに結合する能力は維持している。たとえば、ＵＳ２００７－０００９５２３、２００６－０１９４２９０、２００５－０２３３３８２、２００４－０２２８８５６、及び２００４－０１９１２４４を参照されたい。これらは、ＦｃＲＩ、ＦｃＲＩＩ、及び／またはＦｃＲＩＩＩへの結合性が低減されている抗体を生成する様々なアミノ酸修飾、ならびに、あるＦｃＲへの結合性は増強されるが、別のＦｃＲへの結合性は低減されるアミノ酸置換を説明している。

【０１４４】

したがって、抗αｖβ５抗体の定常領域が関与するエフェクター機能は、定常領域、特にＦｃ領域の特性を改変することにより調節され得る。ある実施形態では、エフェクター機能が低減された抗αｖβ５抗体は、エフェクター機能があってエフェクター機能を媒介する天然の定常またはＦｃ領域を含む非バリアント、天然、または親抗体であり得る第２の抗体と比較される。

【０１４５】

天然の定常領域は、自然界にみられる定常鎖領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含んでいる。好ましくは、相対的なエフェクター機能を評価するのに用いられる対照分子は、試験またはバリアント抗体と同じタイプ／サブタイプのＦｃ領域を含んでいる。バリアントまたは改変Ｆｃまたは定常領域は、少なくとも１つのアミノ酸修飾（たとえば、翻訳後修飾、アミノ酸置換、挿入、または欠失など）によって天然配列の重鎖領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含んでいる。したがって、バリアントの定常領域は、たとえば改変された糖鎖修飾パターンを含む、改変された翻訳後修飾となる１つ以上のアミノ酸置換、欠失または挿入を含み得る。バリアント定常領域は、低減されたエフェクター機能を有し得る。

【０１４６】

改変された（すなわち増強または低減された）エフェクター機能（複数可）を有する抗

体は、バリアント定常、Ｆｃ、または重鎖領域を有する抗体を操作または生産することにより、生産され得る。組換えＤＮＡ技術及び／または細胞培養及び発現条件を用いて、改変された機能及び／または活性をもつ抗体を生産することができる。たとえば、組換えＤＮＡ技術が、エフェクター機能を含む抗体機能に影響のある（たとえばＦｃまたは定常領域などの）領域に１つ以上のアミノ酸置換、欠失、または挿入を操作するのに用いられ得る。あるいは、たとえば糖鎖修飾パターンなどの翻訳後修飾の変更は、抗体が生産される宿主細胞及び細胞培養液及び発現条件を操作することにより実現され得る。

【０１４７】

本発明のある実施形態は、配列番号１～７のいずれか１つの、１つ以上の（１つ、２つ、または３つの）重鎖ＣＤＲ配列（Ｋａｂａｔまたは代替ＣＤＲ）を含むまたはからなる抗αｖβ５抗体に関する。一実施形態では、抗αｖβ５抗体の重鎖ＣＤＲ配列は、配列番号１３、配列番号１４、及び配列番号１５中のアミノ酸配列を含むまたはからなる。これらの抗体はまた、配列番号８～１２のいずれか１つの、１つ以上の（１つ、２つ、または３つの）軽鎖ＣＤＲ配列（Ｋａｂａｔまたは代替ＣＤＲ）も含むまたはからなる場合もある。たとえば、抗αｖβ５抗体の軽鎖ＣＤＲ配列は、配列番号１６、配列番号１７、及び配列番号１８中のアミノ酸配列を含むまたはからなる場合がある。本明細書で説明する抗体は、さらに、天然または親Ｆｃ領域と比べて増強または低減されたエフェクター機能を与えるＦｃ領域を含み得る。ある実施形態では、これらの抗体のＦｃ領域は、ＩｇＧ４のＣＨ１及びＣＨ２ドメイン、及びＩｇＧ１のＣＨ３ドメインを含むキメラである。これらの抗αｖβ５抗体は、（ｉ）αｖβ５とビトロネクチンの相互作用を阻害し、及び／または（ｉｉ）αｖβ５とＴＧＦ－βのＬＡＰの相互作用を阻害し、及び／または（ｉｉｉ）ＴＧＦ－βの活性化を阻害し、及び／または（ｉｖ）ヒトαｖβ５に高親和性で結合する。

【０１４８】

他の実施形態では、本開示は、配列番号１０を含むＶＬ配列、及び配列番号５を含むＶＨ配列を含む抗αｖβ５抗体を提供し、該抗体は、さらに、天然または親Ｆｃ領域と比べて増強または低減されたエフェクター機能を与えるＦｃ領域またはバリアントＦｃ領域を含んでいる。ある特定の実施形態では、本開示は、配列番号７０を含む軽鎖配列、及び配列番号６９を含む重鎖配列を含む抗αｖβ５抗体を提供する。

【０１４９】

上述のアミノ酸置換を含むあらゆる抗αｖβ５抗体バリアントを生成する方法は、当業界で周知である。これらの方法としては、限定ではないが、部位特異的（またはオリゴヌクレオチド媒介）変異誘発、ＰＣＲ変異誘発、及び抗体または少なくとも抗体の定常領域をコードする調製されたＤＮＡ分子のカセット式変異誘発による調製が挙げられる。部位特異的変異誘発は、当業界では周知である（たとえば、Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１３：４４３１－４４４３（１９８５）及びＫｕｎｋｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２：４８８（１９８７）を参照のこと）。ＰＣＲ変異誘発は、開始ポリペプチドのアミノ酸配列バリアントの作製にも適している。ＰＣＲ ＰｒｏｔｏｃｏｌｓのＨｉｇｕｃｈｉ，ｐｐ．１７７－１８３（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９９０）；及びＶａｌｌｅｔｔｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１７：７２３－７３３（１９８９）を参照されたい。配列バリアントを調製する別の方法、カセット式変異誘発は、Ｗｅｌｌｓ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，３４：３１５－３２３（１９８５）が説明する技法に基づく。増強または低減されたエフェクター機能を有する本明細書で説明する抗体は、ＵＳ２０１２／０１００１４０（参照により本明細書に援用）で説明される方法により安定化され得る。

【０１５０】

改変された糖鎖修飾を有する抗αｖβ５抗体

グリカンの除去により、種間のＦｃ受容体ファミリー全メンバーへの結合性を大きく低減させることになる構造変化が生じる。抗αｖβ５抗体などのグリコシル化抗体では、Ｆ

ｃ二量体のＣＨ２ドメインの保存Ｎ結合部位に付着されたグリカン（オリゴサッカライド）は、ＣＨ２ドメイン間に囲われて、糖残基は対向するＣＨ２ドメインの特定のアミノ酸残基と接触している。異なる糖鎖修飾パターンは、抗体の異なる生物学的特性と関連がある（Ｊｅｆｆｅｒｉｓ ａｎｄ Ｌｕｎｄ，１９９７，Ｃｈｅｍ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，６５：１１１－１２８；Ｗｒｉｇｈｔ ａｎｄ Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，１９９７，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１５：２６－３２）。ある特定のグリコフォームは、潜在的に利点のある生物学的特性を与える。グリカンの欠失により、ドメイン間の間隔が変化して互いに対する運動性が高くなり、Ｆｃ受容体ファミリー全メンバーの結合に阻害効果を有すると考えられる。たとえば、様々なグリコシル化抗体のインビトロ研究では、ＣＨ２グリカンの除去によりＦｃ構造が変わって、抗体のＦｃ受容体及び補体タンパク質Ｃ１Ｑへの結合性が大幅に低下することが示されている。エフェクター機能を低減させる別の既知のアプローチは、ＦｃのＣＨ２ドメインの２９７番目（ＥＵナンバリング）のＮ結合型グリカンの生産を阻害するかそれを除去することである（Ｎｏｓｅ ｅｔ ａｌ．，１９８３ ＰＮＡＳ ８０：６６３２；Ｌｅａｔｈｅｒｂａｒｒｏｗ ｅｔ ａｌ．，１９８５ Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２２：４０７；Ｔａｏ ｅｔ ａｌ．，１９８９ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４３：２５９５；Ｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９９０ Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２７： １１４５；Ｄｏｒａｉ ｅｔ ａｌ．，１９９１ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ １０：２１１；Ｈａｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９９２ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．３５：１６５；Ｌｅａｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９１ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ７２：４８１；Ｐｏｕｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９９３ Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３０：２３３；Ｂｏｙｄ ｅｔ ａｌ．，１９９５ Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３２：１３１１）。異なるグリコフォームは、薬物動態、薬力学、受容体－相互作用、及び組織特異的標的化を含む治療剤の特性に大きな影響を与え得ることも知られている（Ｇｒａｄｄｉｓ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｃｕｒｒ Ｐｈａｒｍ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３：２８５－２９７）。具体的には、抗体については、オリゴサッカライド構造は、抗体のエフェクター機能（たとえばＣＤＣを誘発する補体複合体Ｃ１への結合、及びＡＤＣＣ経路の調節を担うＦｃγＲ受容体への結合）に加えて、プロテアーゼ耐性、ＦｃＲｎ受容体が媒介する抗体の血清中半減期、食作用、及び抗体フィードバックに関する特性にも影響し得る（Ｎｏｓｅ ａｎｄ Ｗｉｇｚｅｌｌ，１９８３；Ｌｅａｔｈｅｒｂａｒｒｏｗ ａｎｄ Ｄｗｅｋ，１９８３；Ｌｅａｔｈｅｒｂａｒｒｏｗ ｅｔ ａｌ．，１９８５；Ｗａｌｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９８９； Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９２，ＰＮＡＳ，８９：４２８５－４２８９）。

【０１５１】

したがって、抗体のエフェクター機能を調節する別の手段には、抗体定常領域の糖鎖修飾を改変することが含まれる。改変された糖鎖修飾としては、たとえば、グリコシル化残基数の減または増、グリコシル化残基のパターンまたは所在の変化、ならびに糖構造（複数可）の変化が挙げられる。ヒトＩｇＧに見られるオリゴサッカライドは、そのエフェクター機能の程度に影響する（Ｒａｊｕ，Ｔ．Ｓ．ＢｉｏＰｒｏｃｅｓｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ａｐｒｉｌ ２００３．４４－５３）；ヒトＩｇＧオリゴサッカライドの微小不均一性は、ＣＤＣやＡＤＣＣ、様々なＦｃ受容体への結合、及びＣｌｑタンパク質への結合などの生物学的機能に影響し得る（Ｗｒｉｇｈｔ Ａ．＆ Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ＳＬ．ＴＩＢＴＥＣＨ １９９７，１５ ２６－３２；Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２００１ ２７６（９）：６５９１－６０４；Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２００２；２７７（３０）：２６７３３－４０；Ｓｈｉｎｋａｗａ ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２００３ ２７８（５）：３４６６－７３；Ｕｍａｎａ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９９ Ｆｅｂ；１７（２）：１７６－８０）。たとえば、ＩｇＧがＣ１ｑに結合して補体カスケードを活性化する能力は、２つのＣＨ２ドメイン間に配置された糖鎖（通常はＡｓｎ２９７に固定される）の存在、不存在または修飾に依り得る（Ｗａｒｄ ａｎｄ Ｇｈｅｔｉｅ，Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２：７７－９４（１９９５）。

【０１５２】
Ｆｃを含むポリペプチド、たとえばＩｇＧ抗体などの抗体の糖鎖修飾部位は、標準的な技法により特定され得る。糖鎖修飾部位の特定は、実験的であっても、配列分析またはモデリングデータに基づいてもよい。コンセンサスモチーフ、つまり、様々なグリコシルトランスフェラーゼにより認識されるアミノ酸配列が説明されている。たとえば、Ｎ結合型糖鎖修飾モチーフのコンセンサスモチーフは、多くの場合ＮＸＴまたはＮＸＳであり、Ｘはプロリン以外のどのアミノ酸でもよい。可能な糖鎖修飾モチーフを定めるいくつかのアルゴリズムも説明されている。したがって、抗体またはＦｃを含む断片内の可能な糖鎖修飾部位を特定するには、たとえばＣｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓが提供しているウェブサイトなどの公に入手可能なデータベースを用いるなどして、抗体の配列を調べる（Ｎ結合型糖鎖修飾部位の予測についてはＮｅｔＮＧｌｙｃサービスを、Ｏ結合型糖鎖修飾部位の予測についてはＮｅｔＯＧｌｙｃサービスを参照のこと）。

【０１５３】
インビボの研究で、アグリコシル（ａｇｌｙｃｏｓｙｌ）抗体のエフェクター機能の低減が確認されている。たとえば、アグリコシル抗ＣＤ８抗体は、マウスのＣＤ８担持細胞を枯渇させることができず（Ｉｓａａｃｓ，１９９２ Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：３０６２）、アグリコシル抗ＣＤ３抗体はマウスまたはヒトでサイトカイン放出症候群を誘発しない（Ｂｏｙｄ，１９９５ 前掲；Ｆｒｉｅｎｄ，１９９９ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ６８：１６３２）。

【０１５４】
重要なことには、ＣＨ２ドメインのグリカン除去は、エフェクター機能には大きく影響するようであるが、抗体のその他の機能的物理的特性は改変されないままである。具体的には、グリカン除去は、血清半減期及び抗原結合性にほとんど～まったく影響しなかったということが示されている（Ｎｏｓｅ、１９８３前掲；Ｔａｏ、１９８９前掲；Ｄｏｒａｉ、１９９１前掲；Ｈａｎｄ、１９９２前掲；Ｈｏｂｂｓ、１９９２Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９：９４９）。

【０１５５】
アグリコシルのアプローチはインビボで立証されているが、アグリコシルｍＡｂで残存するエフェクター機能が報告されている（たとえばＰｏｕｎｄ，Ｊ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３０（３）：２３３－４１；Ｄｏｒａｉ，Ｈ．ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ １０（２）：２１１－７を参照のこと）。Ａｒｍｏｕｒ ｅｔ ａｌ．は、ＦｃγＲＩＩａ及びＦｃγＲＩＩｂタンパク質への結合性が残存することを示している（Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（１９９９）２９：２６１３－１６２４；Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４０（２００３）５８５－５９３）。したがって、場合によっては、活性の完全除去を保証するために、エフェクター機能、特に補体活性化をさらに低減することが重要であり得る。このために、低減されたエフェクター機能を有する本発明の方法及び抗体組成物では、ＩｇＧ２及びＩｇＧ４及びＧ１／Ｇ４ハイブリッドの各アグリコシル形態が有用である。

【０１５６】
本発明の抗αｖβ５抗体は、（第２のαｖβ５特異的抗体と比べて）低減されたエフェクター機能（複数可）を引き出すように修飾または改変され得るが、随意でＦｃ部分の他の有用な属性は保持したままである。

【０１５７】
したがって、ある実施形態では、本発明は、抗体Ｆｃ部分のＣＨ２ドメインの保存Ｎ結合部位の修飾により特徴づけられる、エフェクター機能が低減されたアグリコシル抗αｖβ５抗体に関する。Ｆｃ二量体のＣＨ２ドメインの保存Ｎ結合部位の修飾は、アグリコシル抗αｖβ５抗体をもたらし得る。そのような修飾の例としては、Ｆｃ二量体のＣＨ２ドメインの保存Ｎ結合部位の変異、ＣＨ２ドメインのＮ結合部位に付着したグリカンの除去、及び糖鎖修飾の防止が挙げられる。たとえば、アグリコシル抗αｖβ５抗体は、重鎖Ｃ

Ｈ２ドメインの標準的（ｃａｎｏｎｉｃａｌ）Ｎ結合Ａｓｎ部位をＧｌｎ残基に変えることにより生成され得る（たとえば、ＷＯ０５／０３１７５及びＵＳ２００６－０１９３８５６を参照のこと）。

【０１５８】

本発明の一実施形態では、修飾は、重鎖の糖鎖修飾部位での糖鎖修飾を防止するための、この部位の変異を含んでいる。したがって、本発明の一実施形態では、アグリコシル抗αｖβ５抗体は、重鎖の糖鎖修飾部位の変異、すなわちＮ２９８Ｑの変異（ＫａｂａｔナンバリングのＮ２９７Ｑ）により調製されて、適切な宿主細胞内で発現させられる。たとえば、この変異は、Ａｍｅｒｓｈａｍ－Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ社（登録商標）（米国ニュージャージー州ピスカタウェイ）の特有部位変異誘発キットの製造者推薦プロトコルにしたがい実現され得る。

【０１５９】

変異抗体は、宿主細胞（たとえばＮＳＯまたはＣＨＯ細胞）内で安定的に発現させてから精製することができる。一例として、精製は、プロテインＡ及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いて実行できる。当業者にとっては、その他の発現及び精製方法も使用できることは明らかである。

【０１６０】

本発明の別の実施形態では、アグリコシル抗αｖβ５抗体は、低減されたエフェクター機能を有し、該抗体または抗体誘導体のＦｃ部分のＣＨ２ドメインの保存Ｎ結合部位の修飾は、ＣＨ２ドメインのグリカンの除去、すなわち糖鎖除去を含む。これらのアグリコシル抗αｖβ５抗体は、一般的な方法で生成されてから酵素的に糖鎖除去され得る。抗体を酵素的に糖鎖除去する方法は当業者には周知である（Ｗｉｌｌｉａｍｓ，　１９７３；Ｗｉｎｋｅｌｈａｋｅ　＆　Ｎｉｃｏｌｓｏｎ，１９７６　Ｊ．ＢｉｏｌＣｈｅｍ．２５１：１０７４－８０．）。

【０１６１】

本発明の別の実施形態では、糖鎖除去は、ツニカマイシンなどの糖鎖修飾阻害剤を含む培養液中で、抗体を生産する宿主細胞を成長させることにより実現され得る（Ｎｏｓｅ　＆　Ｗｉｇｚｅｌｌ，１９８３）。すなわち、修飾は、該抗体のＦｃ部分のＣＨ２ドメインの保存Ｎ結合部位の糖鎖修飾の低減または防止である。

【０１６２】

本発明の他の実施形態では、組換えＸポリペプチド（またはそのようなポリペプチドを含む細胞または細胞膜）を抗原として用いて抗αｖβ５抗体または抗体誘導体を生成し得、次いでこの抗体は糖鎖除去され得る。

【０１６３】

代替実施形態では、アグリコシル（ａｇｙｃｌｏｓｙｌ）抗αｖβ５抗体または糖鎖修飾が低減された抗αｖβ５抗体は、Ｔａｙｌｏｒ　ｅｔ　ａｌ．（ＷＯ０５／１８５７２及びＵＳ２００７－００４８３００）で説明さている方法により生産され得る。たとえば、一実施形態では、抗αｖβ５アグリコシル抗体は、第１のアミノ酸残基を改変することにより（たとえば置換、挿入、欠失により、または化学的修飾により）生産され得、改変された第１のアミノ酸残基は、立体障害または電荷のいずれか、またはその両方により、第２の残基の糖鎖修飾を阻害する。ある実施形態では、第１のアミノ酸残基はアミノ酸置換により修飾される。さらなる実施形態では、アミノ酸置換はＧｌｙ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｔｒｐ、Ｐｒｏ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒ、Ｃｙｓ、Ｍｅｔ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、及びＨｉｓからなる群より選択される。他の実施形態では、アミノ酸置換は、一般的ではない（ｎｏｎ－ｔｒａｄｉｔｉｏｎａｌ）アミノ酸残基である。第２のアミノ酸残基は、糖鎖修飾モチーフ、たとえばアミノ酸配列ＮＸＴまたはＮＸＳを含むＮ結合型糖鎖修飾モチーフの付近または内部に存在し得る。一例示的実施形態では、第１のアミノ酸残基はアミノ酸２９９であり、第２のアミノ酸残基はアミノ酸２９７である（Ｋａｂａｔナンバリングによる）。たとえば、第１のアミノ酸置換は、Ｔ２９９Ａ、Ｔ２９９Ｎ、Ｔ２９９Ｇ、Ｔ２９９Ｙ、Ｔ２９９Ｃ、Ｔ２９

９Ｈ、Ｔ２９９Ｅ、Ｔ２９９Ｄ、Ｔ２９９Ｋ、Ｔ２９９Ｒ、Ｔ２９９Ｇ、Ｔ２９９Ｉ、Ｔ２９９Ｌ、Ｔ２９９Ｍ、Ｔ２９９Ｆ、Ｔ２９９Ｐ、Ｔ２９９Ｗ、及びＴ２９９Ｖであり得る（Ｋａｂａｔナンバリングによる）。特定の実施形態では、アミノ酸置換はＴ２９９Ｃである。

【０１６４】

エフェクター機能は、本発明の抗体を該抗体が妨害部分（ｂｌｏｃｋｉｎｇ　ｍｏｉｅｔｙ）を含むように修飾することでも低減され得る。例示的妨害部分は、十分な立体容積及び／または電荷を有する部分を含んでいるので、たとえばグリコシダーゼがポリペプチドをグリコシル化する能力を妨害することによって、低減された糖鎖修飾が生じる。妨害部分は、それに加えて、またはその代わりに、たとえばＦｃ領域が受容体または補体タンパク質に結合する能力を阻害することによって、エフェクター機能を低減し得る。いくつかの実施形態では、本発明は、αｖβ５結合性タンパク質、たとえばバリアントＦｃ領域を含む抗αｖβ５抗体に関し、該バリアントＦｃ領域は、第１のアミノ酸残基及びＮ糖鎖修飾部位を含み、該第１のアミノ酸残基は側鎖成分（ｓｉｄｅ　ｃｈａｉｎ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ）により修飾されて、未修飾の第１のアミノ酸残基と比べて増加された立体容積または増加された静電電荷を実現し、そうすることでＮ糖鎖修飾部位の糖鎖修飾のレベルが低減するかまたは改変される。これらの実施形態のうちのあるものでは、バリアントＦｃ領域は、対照の非バリアントＦｃ領域と比べて低減されたエフェクター機能を与える。さらなる実施形態では、増加した立体容積を有する側鎖は、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、Ｈｉｓ、Ｇｌｕ、Ｇｌｎ、Ａｒｇ、Ｌｙｓ、Ｍｅｔ及びＴｙｒからなる群より選択されるアミノ酸残基の側鎖である。さらなる実施形態では、増加した静電電荷を有する側鎖成分は、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、及びＨｉｓからなる群より選択されるアミノ酸残基の側鎖である。

【０１６５】

したがって、一実施形態では、糖鎖修飾及びＦｃ結合性は、Ｔ２９９をＤ、Ｅ、Ｋ、またはＲなどの電荷をもつ側鎖成分と置換することで調節され得る。得られる抗体は、不利な静電相互作用により、糖鎖修飾が低減され、かつＦｃ受容体とのＦｃ結合親和性も低減している。

【０１６６】

別の実施形態では、アグリコシル化されており、かつシステイン付加物を形成することもできるＴ２９９Ｃバリアント抗体は、同等のグリコシル化抗体と比べて低いエフェクター機能（たとえばＦｃγＲＩ結合性）を示し得る（たとえばＷＯ０５／１８５７２を参照のこと）。したがって、糖鎖修飾モチーフ近傍の第１のアミノ酸の改変は、第２のアミノ酸残基で抗体の糖鎖修飾を阻害することができ、第１のアミノ酸がシステイン残基である場合、抗体はさらに低減されたエフェクター機能を示し得る。それに加えて、ＩｇＧ４サブタイプ抗体の糖鎖修飾の阻害は、他のサブタイプのアグリコシル化（ａｇｙｃｏｓｙｌａｔｉｏｎ）効果と比べて、ＦｃγＲＩ結合性への影響がより大きくなり得る。

【０１６７】

追加の実施形態では、本発明は、１つ以上のＦｃＲ受容体への低減された結合性を示し、随意で１つ以上のＦｃ受容体及び／または補体への増強されたまたは通常の結合性も示す、糖鎖修飾が改変された抗αｖβ５抗体、たとえば、１つ以上のＦｃ受容体及び／または補体への、天然の対照抗αｖβ５抗体と同等または類似の結合親和性を少なくとも維持している、糖鎖修飾が改変された抗体に関する）。たとえば、$Man_5GlcNAc_2$Ｎ－グリカンが優勢なグリカン構造として存在する（たとえば、$Man_5GlcNAc_2$Ｎ－グリカン構造が、Ｉｇ組成物の次位の優勢なグリカン構造よりも少なくとも約５モル％多く存在する）抗αｖβ５抗体では、$Man_5GlcNAc_2$Ｎ－グリカン構造が優勢ではない抗αｖβ５抗体集団と比べて、改変されたエフェクター機能を示し得る。このグリカン構造が優勢な抗体は、ＦｃγＲＩＩａ及びＦｃγＲＩＩｂへの低減された結合性、ＦｃγＲＩＩＩａ及びＦｃγＲＩＩＩｂへの増強された結合性、及びＣ１複合体のＣｌｑサブユニットへの増強された結合性を示す（ＵＳ２００６－０２５７３９９を参照のこと）

。このグリカン構造は、それが優勢なグリカン構造である場合、増強されたＡＤＣＣ、増強されたＣＤＣ、延長された血清半減期、増強されたＢ細胞の抗体生産性、及び低減されたマクロファージによる食作用性を与える。

【０１６８】

一般に、糖タンパク質上の糖鎖修飾構造は、発現宿主及び培養条件により変わってくる（Ｒａｊｕ，ＴＳ．ＢｉｏＰｒｏｃｅｓｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ａｐｒｉｌ ２００３．４４－５３）。そのような差は、エフェクター機能と薬物動態の両方の変化につながり得る（Ｉｓｒａｅｌ ｅｔ ａｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１９９６；８９（４）：５７３－５７８；Ｎｅｗｋｉｒｋ ｅｔ ａｌ．Ｐ．Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．，１９９６；１０６（２）：２５９－６４）。たとえば、ガラクトシル化は、細胞培養条件により変わり得、特定のガラクトースパターンに応じて免疫性であるいくつかの免疫グロブリン組成物を提供し得る（Ｐａｔｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９２．Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ．２８５：８３９－８４５）。非ヒト哺乳類細胞により生産された糖タンパク質のオリゴサッカライド構造は、ヒト糖タンパク質のオリゴサッカライド構造とより密に関連する傾向がある。さらに、優勢なＩｇグリコフォームが発現するようにタンパク質発現宿主系を操作または選択してもよいし、あるいは優勢なグリカン構造を有する糖タンパク質を自然に生産させてもよい。優勢なグリコフォームを有する糖タンパク質を生産する、操作されたタンパク質発現宿主系の例としては、遺伝子ノックアウト／変異（Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，２００２，ＪＢＣ，２７７： ２６７３３－２６７４０）；の遺伝子操作（Ｕｍａｎａ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．，１７：１７６－１８０）またはその両方の組合せが挙げられる。あるいは、特定の細胞、たとえば、ニワトリ、ヒト及びウシは、優勢なグリコフォームを自然に発現する（Ｒａｊｕ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ，１０：４７７－４８６）。したがって、当業者は、多くの発現宿主系のうち少なくとも１つを選択することにより、改変された糖鎖修飾（たとえば優勢な１つの特定のグリカン構造）を有する抗αｖβ５抗体または抗体組成物を発現させることができる。本発明の抗αｖβ５抗体を生産するのに使用できるタンパク質発現宿主系としては、動物、植物、昆虫、細菌の細胞などが挙げられる。たとえば、ＵＳ２００７－００６５９０９、２００７－００２０７２５、及び２００５－０１７０４６４は、細菌細胞中でのアグリコシル化免疫グロブリン分子の生産を説明している。さらに一例としては、Ｗｒｉｇｈｔ ａｎｄ Ｍｏｒｒｉｓｏｎは、糖鎖修飾が欠如したＣＨＯ細胞株で抗体を生産して（１９９４ Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １８０：１０８７－１０９６）、この細胞株で生産した抗体は、補体媒介細胞溶解ができないことを示した。糖タンパク質の生産に関して当業界に見られる他の発現宿主系の例としては、ＣＨＯ細胞：ＲａｊｕＷＯ９９／２２７６４及びＰｒｅｓｔａ ＷＯ０３／３５８３５；ハイブリドーマ細胞：Ｔｒｅｂａｋ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，２３０：５９－７０；昆虫細胞：Ｈｓｕ ｅｔ ａｌ．，１９９７，ＪＢＣ，２７２：９０６２－９７０、及び植物細胞：Ｇｅｒｎｇｒｏｓｓ ｅｔ ａｌ．，ＷＯ０４／７４４９９が挙げられる。所与の細胞または抽出物で所与のモチーフの糖鎖修飾が得られた場合、そのモチーフがグリコシル化されたかどうかを決定するための当業界で認識された、たとえばゲル電気泳動法及び／または質量分析法を用いる諸技法が利用可能である。

【０１６９】

抗体の糖鎖修飾部位を改変するその他の方法が、たとえば米国特許第６，３５０，８６１号及び同第５，７１４，３５０号、ＷＯ０５／１８５７２及びＷＯ０５／０３１７５で説明されており、これらの方法は、糖鎖修飾が改変または低減された、あるいは糖鎖修飾がない、本発明の抗αｖβ５抗体を生産するために用いられ得る。

【０１７０】

エフェクター機能が低減されたアグリコシル抗αｖβ５抗体は、修飾を含む抗体であり得、または、機能部分（ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｍｏｉｅｔｙ）を含むように結合される抗体であり得る。そのような部分としては、妨害部分（たとえばＰＥＧ部分、システイン付加物など）、検出部分（たとえば蛍光部分、ラジオアイソトープ部分、放射線不透過部

分などであり、診断部分も含む）、治療部分（たとえば細胞毒、抗炎症剤、免疫調節剤、抗感染剤、抗癌剤、抗神経変性剤、放射性核種など）、及び／または結合部分またはベイト（たとえば抗体がまずは腫瘍を標的とし、次いで第２の分子に結合するのを許容し、上述したような補体結合部分またはプレイ及び検出部分または治療部分で構成されている）が挙げられる。

【０１７１】

適応

本明細書で説明する抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、αｖβ５を妨害し、炎症及び障害による血管浸透性を阻害する。それに加えて、これらの抗体または抗原結合性断片は、内皮遊走を阻害できる。さらに、これらの抗体または抗原結合性断片は、ＴＧＦ－β活性化及び繊維症を阻害できる。これらの抗体またはその抗原結合性断片は、多種多様な疾患または状態の症状または重度を治療、予防、または軽減するのに使用され得る。そのような疾患または状態としては、急性腎障害、急性肺障害、脳卒中（脳出血）、急性呼吸促迫症候群、喘息、肺水腫、肺線維症（たとえば突発性肺線維症（ＩＰＦ）、通常型間質性肺炎（ＵＩＰ））、敗血症、心筋梗塞、癌（たとえば膵臓癌、肺癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頚部癌、食道癌、皮膚癌、前立腺癌、子宮頸癌、結腸癌、卵巣癌、及び子宮内膜癌）、脂質異常症、肥満、及び目の血管新生疾患が挙げられる。

【０１７２】

ある実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、急性肺障害の症状または重度を治療または軽減するのに使用され得る。ある実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、肺水腫（たとえば肺障害に伴う水腫）の症状または重度を治療または軽減するのに使用され得る。ある実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、敗血症の症状または重度を治療または軽減するのに使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は肺線維症（たとえばＩＰＦ、ＵＩＰ）の治療に使用され得る。他の実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、上皮及び／または内皮細胞障害を防御するのに使用され得る。ある実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、肺胞上皮障害を軽減または予防するのに使用され得る。さらに別の実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、上皮癌（たとえば頚頭部（口腔、喉頭、咽頭、食道を含む）、乳房、肺、前立腺、子宮頚、結腸、膵臓、皮膚（基底細胞癌）及び卵巣の癌）の治療に使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、抗血管新生剤として使用され得る。さらなる実施形態では、本明細書で説明する抗体またはその抗原結合性断片は、αｖβ５受容体と、ＲＧＤ含有リガンド、たとえばウイルスまたはその他の病原体の表面のタンパク質の相互作用を妨害し、そうすることで感染を軽減または予防するのに使用され得る。

【０１７３】

本発明の抗体の有効性は、当業界では周知の様々な動物モデルで評価できる。急性肺障害の動物モデルとしては、肺虚血／再灌流障害モデル（Ｓａｋｕｍａ Ｔ．ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｌｕｎｇ Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ．，２７６：Ｌ１３７－Ｌ１４５，（１９９９）；ＷＯ２００５／０９４３９１）；非肺虚血／再灌流障害モデル（Ｋｏｉｋｅ Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｓｕｒｇ Ｒｅｓ．，５２：６５６－６６２（１９９２））；オレイン酸モデル（Ｓｃｈｕｓｔｅｒ，Ａｍ Ｊ Ｒｅｓｐｉｒ Ｃｒｉｔ Ｃａｒｅ Ｍｅｄ，１４９：２４５－２６０（１９９４））；ＬＰＳモデル（Ｗｉｅｎｅｒ－Ｋｒｏｎｉｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ，８８：８６４－８７５（１９９１）；酸吸引（ａｃｉｄ ａｓｐｉｒａｔｉｏｎ）モデル（Ｍｏｄｅｌｓｋａ Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｒｅｓｐｉｒ Ｃｒｉｔ Ｃａｒｅ Ｍｅｄ，１６０：１４５０－１４５６，（１９９９））；過酸素症モデル（Ｆｒａｎｋ Ｌ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ａｐｐｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ．，４５：６９９－７０４（１９７８））；ブレオマイシンモデル（Ｍｏｏｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｐｈｙｓｉｏｌ Ｌｕｎｇ Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ．，２９４：Ｌ１５２－Ｌ１６０（

２００８））；生理食塩水灌流モデル（Ｌａｃｈｍａｎｎ Ｂ．ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ａｎａｅｓｔｈｅｓｉｏｌ Ｓｃａｎｄ．，２４：２３１－２３６，（１９８０））；腸管穿孔モデル（Ｖｉｌｌａｒ Ｊ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ Ｃａｒｅ Ｍｅｄ．，２２：９１４－９２１（１９９４））；及び肺内細菌モデル（Ｆｏｘ－Ｄｅｗｈｕｒｓｔ Ｒ．ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｒｅｓｐｉｒ Ｃｒｉｔ Ｃａｒｅ Ｍｅｄ．，１５５：２０３０－２０４０（１９９７）が挙げられる。肺線維症のマウスモデルとしては、ブレオマイシン誘発性肺線維症（Ｐｉｔｔｅｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１０７（１２）：１５３７－１５４４（２００１）；及びＭｕｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，９６：３１９－３２８（１９９９））及び照射誘発性肺線維症（Ｆｒａｎｋｏ ｅｔ ａｌ．，Ｒａｄ．Ｒｅｓ．，１４０：３４７－３５５（１９９４））が挙げられる。敗血症の動物モデルは当業界で知られており、毒素血症（ｔｏｘａｅｍｉａ）モデル（たとえばＬＰＳ注射）、細菌感染モデル、宿主バリア破壊モデル（Ｄｏｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１１９（１０）：２８６８－２８７８（２００９）；ＷＯ２０１１／０１１７７５）が挙げられる。最後に、本明細書で説明するαｖβ５抗体は、腫瘍増殖、進行、及び転移を阻害する能力について、標準的なインビボ腫瘍増殖及び転移モデルで評価できる。たとえばＲｏｃｋｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．，４９：７３５（１９７２）；Ｇｕｙ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，１２：９５４（１９９２）；Ｗｙｃｋｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，６０：２５０４（２０００）；及びＯｆｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．，８：１２４３（１９９８）を参照されたい。

【０１７４】

治療の有効性は、身体的診察、血液検査、肺機能検査、瘢痕もしくは線維化病変の観察及びスコア付け、コラーゲン、平滑筋アクチン及びフィブロネクチンなどの細胞外マトリックス析出、超音波、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）、及びＣＴスキャンを含む、多数の利用可能な診断ツールにより測定され得る。

【０１７５】

医薬組成物

本明細書で説明する抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、たとえば本明細書で説明する疾患を治療するために対象に投与される医薬組成物として製剤され得る。典型的には、医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体を含む。本明細書では、「ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｌｙ ａｃｃｅｐｔａｂｌｅ ｃａｒｒｉｅｒ（薬学的に許容可能な担体）」としては、任意のあらゆる種類の溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤など、生理学的に適合性のある剤が挙げられる。組成物は、薬学的に許容可能な塩、たとえば酸付加塩または塩基付加塩を含み得る（たとえばＢｅｒｇｅ，Ｓ．Ｍ．，ｅｔ ａｌ．（１９７７）Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．６６：１－１９を参照のこと）。

【０１７６】

医薬製剤は確立された分野であり、たとえばＧｅｎｎａｒｏ（ｅｄ．），Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２０ｔｈｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ（２０００）（ＩＳＢＮ：０６８３３０６４７２）；Ａｎｓｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，７ｔｈ Ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ（１９９９）（ＩＳＢＮ：０６８３３０５７２７）；及びＫｉｂｂｅ（ｅｄ．），Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ，３ｒｄ ｅｄ．（２０００）（ＩＳＢＮ：０９１７３３０９６Ｘ）でさらに説明されている。

【０１７７】

医薬組成物は、様々な剤形をとり得る。これらには、たとえば、溶液（たとえば注射液

や輸液）、分散液または懸濁液、錠剤、丸薬、粉末、リポソーム及び座薬などの、液剤、半固形剤、及び固形剤が含まれる。好ましい剤形は、目的の投与モードや治療用途により得る。典型的には、本明細書で説明する剤の組成物の剤形は、注射液または輸液である。

【０１７８】

一実施形態では、本明細書で説明する抗αｖβ５抗体は、クエン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム七水和物（ｓｏｄｉｕｍ ｄｉｂａｓｉｃ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｈｅｐｔａｈｙｄｒａｔｅ）、一塩基リン酸ナトリウム、Ｔｗｅｅｎ－８０、及び安定剤などの賦形剤と一緒に製剤される。抗体は、たとえば、緩衝液中好適な濃度で準備され得、２～８℃で保存され得る。いくつかの他の実施形態では、組成物のｐＨは、約５．５～７．５（たとえば５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５）である。

【０１７９】

医薬組成物は、製剤された際にαｖβ５抗体またはその抗原結合性断片の凝集を低減する剤も含み得る。凝集低下剤の例としては、メチオニン、アルギニン、リジン、アスパラギン酸、グリシン、及びグルタミン酸からなる群より選択される１つ以上のアミノ酸が挙げられる。これらのアミノ酸は、約０．５ｍＭ～約１４５ｍＭ（たとえば０．５ｍＭ、１ｍＭ、２ｍＭ、５ｍＭ、１０ｍＭ、２５ｍＭ、５０ｍＭ、１００ｍＭ）の濃度で製剤に添加され得る。医薬組成物は、糖（たとえばスクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、またはキシリトール）及び／または浸透圧調節剤（たとえば塩化ナトリウム、マンニトール、またはソルビトール）及び／または界面活性剤（たとえばポリソルベート－２０またはポリソルベート－８０）も含み得る。

【０１８０】

そのような組成物は、非経口式投与（たとえば静脈内、皮下、腹腔内、または筋肉内注射）され得る。一実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片の組成物は、皮下投与される。一実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片の組成物は、静脈内投与される。本明細書では、「ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ（非経口投与）」及び「ａｄｍｉｎｉｓｔｅｒｅｄ ｐａｒｅｎｔｅｒａｌｌｙ（非経口投与される）」という語句は、腸内投与及び外用を除く、通常は注射による投与方式を意味し、限定ではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、鼻内、経口吸引、硬膜外及び胸骨内（ｉｎｔｒａｓｔｅｒｎａｌ）注射及び輸液が含まれる。

【０１８１】

組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、またはその他の高濃度での安定保管に適した秩序構造（ｏｒｄｅｒｅｄ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ）として製剤され得る。滅菌注射液は、本明細書で説明する剤の必要な量を、必要に応じて上記成分のうちの１つまたは組合せを有する適切な溶媒と一体化させ、次いで濾過滅菌することにより調製され得る。一般に、分散液は、本明細書で説明する剤を、基本（ｂａｓｉｃ）分散媒及び上記した内の必要な他の成分を含む滅菌溶媒と一体化させることにより調製される。滅菌注射液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、滅菌濾過溶液中の本明細書で説明する剤及び任意のその他の所望な成分の粉末が得られる真空乾燥及び凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、たとえばレシチンなどのコーティング剤を使用することで、分散液の場合は所要の粒子サイズを維持することで、及び界面活性剤を使用することで、維持することができる。注射用組成物の吸収を長引かせることは、たとえばモノステアリン酸塩及びゼラチンなどの吸収を遅らせる剤を組成物に含めることにより、実現され得る。

【０１８２】

ある実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、インプラントを含む放出調整剤や、マイクロカプセル化送達システムなど、化合物がすぐに放出されないように保護する担体と一緒に調製され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコ

ール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの生分解性、生体適合性のポリマーが使用され得る。そのような製剤の多数の調製法が特許付与され、または一般に知られている。たとえばＳｕｓｔａｉｎｅｄ ａｎｄ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｊ．Ｒ．Ｒｏｂｉｎｓｏｎ，ｅｄ．，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９７８）を参照されたい。

【０１８３】

一実施形態では、医薬製剤は、約０．５ｍｇ／ｍＬ～５００ｍｇ／ｍＬ（たとえば０．５ｍｇ／ｍＬ、１ｍｇ／ｍＬ、５ｍｇ／ｍＬ、１０ｍｇ／ｍＬ、２５ｍｇ／ｍＬ、３０ｍｇ／ｍＬ、３５ｍｇ／ｍＬ、４０ｍｇ／ｍＬ、４５ｍｇ／ｍＬ、５０ｍｇ／ｍＬ、５５ｍｇ／ｍＬ、６０ｍｇ／ｍＬ、６５ｍｇ／ｍＬ、７０ｍｇ／ｍＬ、７５ｍｇ／ｍＬ、８０ｍｇ／ｍＬ、８５ｍｇ／ｍＬ、９０ｍｇ／ｍＬ、９５ｍｇ／ｍＬ、１００ｍｇ／ｍＬ、１２５ｍｇ／ｍＬ、１５０ｍｇ／ｍＬ、１７５ｍｇ／ｍＬ、２００ｍｇ／ｍＬ、２５０ｍｇ／ｍＬ、３００ｍｇ／ｍＬ、３５０ｍｇ／ｍＬ、４００ｍｇ／ｍＬ、４５０ｍｇ／ｍＬ、５００ｍｇ／ｍＬ）の濃度で、薬学的に許容可能な担体と一緒に調製された、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片を含む。いくつかの実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、滅菌蒸留水またはリン酸緩衝食塩水中で調製される。医薬製剤のｐＨは、５．５～７．５（たとえば５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．３、７．４、７．５）であり得る。

【０１８４】

投与

抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、対象に、たとえばそれを必要とする対象に、たとえばヒト対象に、様々な方法により投与され得る。多くの用途で、投与経路は、静脈内注射または輸液（ＩＶ）、皮下注射（ＳＣ）、腹腔内（ＩＰ）、または筋肉内注射のうちの１つである。関節内送達の利用も可能である。非経口投与の他の方式も用いられ得る。そのような方式の例としては、動脈内、髄腔内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、経気管、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、鼻内、経口吸引、硬膜外、及び胸骨内の注射が挙げられる。いくつかのケースでは、投与は経口であり得る。

【０１８５】

抗体またはその抗原結合性断片の投与経路及び／または方式は、たとえば対象を監視することにより、たとえば断層撮影画像を用いてたとえば腫瘍を可視化することにより、個々の事例に合わせて調節することもできる。

【０１８６】

抗体またはその抗原結合性断片は、固定用量として、またはｍｇ／ｋｇ用量で、投与され得る。用量はまた、抗αｖβ５抗体に対する抗体の生産を低下または回避するように選択され得る。用量レジメンは、所望の応答、たとえば治療に対する応答または組み合わせの治療効果が得られるように調節される。一般に、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片（及び随意で第２の剤）の用量は、対象に生体利用可能量の剤を与えるために用いられ得る。たとえば、０．１～１００ｍｇ／ｋｇ、０．５～１００ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ、０．５～２０ｍｇ／ｋｇ、０．１～１０ｍｇ／ｋｇ、または１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲の用量が投与され得る。他の用量も使用され得る。ある実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片での治療を必要とする対象は、１ｍｇ／ｋｇ～３０ｍｇ／ｋｇの用量で抗体を投与される。いくつかの実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片での治療を必要とする対象は、１ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、４ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、７ｍｇ／ｋｇ　１０ｍｇ／ｋｇ、１２ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ、２５ｍｇ／ｋｇ、２８ｍｇ／ｋｇ、３０ｍｇ／ｋｇ、３５ｍｇ／ｋｇ、４０ｍｇ／ｋｇ、または５０ｍｇ／ｋｇの用量で抗体を投与される。ある実施形態では、毒素と結合された抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片での治療を必要とする対象は、毒素と結合された抗体またはその抗原結合性断片を０．１ｍｇ／ｋｇ～３

０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、毒素と結合された抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片での治療を必要とする対象は、毒素と結合された抗体またはその抗原結合性断片を０．１ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇ、０．３ｍｇ／ｋｇ、０．４ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、０．６ｍｇ／ｋｇ、０．７ｍｇ／ｋｇ、０．７５ｍｇ／ｋｇ、０．８ｍｇ／ｋｇ、０．９ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、４ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、７ｍｇ／ｋｇ　１０ｍｇ／ｋｇ、１２ｍｇ／ｋｇ、１５ｍｇ／ｋｇ、２０ｍｇ／ｋｇ、２５ｍｇ／ｋｇ、２８ｍｇ／ｋｇ、３０ｍｇ／ｋｇ、３５ｍｇ／ｋｇ、４０ｍｇ／ｋｇ、または５０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。ある特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、１ｍｇ／ｋｇ～３ｍｇ／ｋｇの用量で、皮下投与される。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、４ｍｇ／ｋｇ～３０ｍｇ／ｋｇの用量で、静脈内投与される。ある実施形態では、毒素と結合されたバージョンの抗体またはその抗原結合性断片は、０．１ｍｇ／ｋｇ～３０ｍｇ／ｋｇの用量で、静脈内投与される。

【０１８７】

組成物は、約１ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍｌまたは約１０ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍｌまたは約５０～２５０ｍｇ／ｍＬまたは約１００～１５０ｍｇ／ｍｌまたは約１００～２５０ｍｇ／ｍｌの抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片を含み得る。ある実施形態では、組成物中の抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、優勢的に単量体の形態であり、たとえば少なくとも約９０％、９２％、９４％、９６％、９８％、９８．５％または９９％が単量体形態である。ある抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片の組成物は、たとえばＵＶ－Ａ２８０ｎｍで検出すると、約５、４、３、２、１、０．５、０．３または０．１％未満の凝集体を含み得る。ある抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片の組成物は、たとえばＵＶ－Ａ２８０ｎｍで検出すると、約５、４、３、２、１、０．５、０．３、０．２または０．１％未満の断片を含む。

【０１８８】

本明細書では、用量単位形態または「ｆｉｘｅｄ　ｄｏｓｅ（固定用量）」は、治療を受ける対象にとって単位用量として適切な、物理的に別々の単位を指し、各単位には、必要な医薬担体と関連して、及び随意でその他の剤と関連して、所望の治療効果を生じるように計算された所定量の抗αｖβ５抗体が含まれる。単回または反復用量が与えられ得る。あるいは、またはそれに加えて、抗体は連続的な輸液により投与され得る。

【０１８９】

抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片の用量は、たとえば少なくとも２用量、３用量、５用量、１０用量、またはそれ以上を十分に網羅する期間（治療コース）にわたり定期的な間隔で、たとえば１日１回か２回、または１週間に約１～４回、または好ましくは毎週、１週おき（２週に１回）、３週おき、毎月、たとえば、約１～１２週間、好ましくは２～８週間、より好ましくは約３～７週間、さらに好ましくは約４、５、または６週間投与され得る。対象を有効に治療するのに必要な用量とタイミングに影響を及ぼし得る要因としては、たとえば、疾患もしくは障害の重度、製剤、投与経路、以前の治療、対象の全般的な健康状態及び／または年齢、ならびに現在ある他の疾患が挙げられる。さらに、治療有効量の化合物で対象を治療することには、単回治療が含まれ得、または、好ましくは、一連の治療が含まれ得る。

【０１９０】

対象が本明細書で説明する障害を発症するリスクがある場合、抗体は、その障害が完全に発症する前に、たとえば予防策として、投与され得る。そのような予防的治療の持続期間は、抗体の単回用量であり得、または、治療を継続してもよい（たとえば反復投与）。たとえば、障害のリスクのある対象または障害の素因がある対象は、その障害が発生したり電撃的に発症するのを予防するために、何日か、何週間か、何か月か、または何年か、抗体で治療され得る。

【０１９１】

医薬組成物は「ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃａｌｌｙ　ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ　ａｍｏｕｎｔ

（治療有効量）」の本明細書で説明する剤を含み得る。そのような有効量は、投与された剤の効果、または２種以上の剤を使用する場合は剤の組み合わせ効果に基づき決定され得る。剤の治療有効量はまた、その個体の疾患状態、年齢、性別及び体重、ならびに化合物が所望の応答、たとえば少なくとも１つの障害パラメータの寛解、または障害の少なくとも１つの症状の寛解を個体内で誘発する能力などの要因によっても変わり得る。治療有効量はまた、組成物のどのような毒性または有害な効果よりも、治療上有益な効果のほうが勝る量である。

【０１９２】

ある実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、約１ｍｇ／ｍＬ～約５００ｍｇ／ｍＬ（たとえば１ｍｇ／ｍＬ、２ｍｇ／ｍＬ、３ｍｇ／ｍＬ、４ｍｇ／ｍＬ、５ｍｇ／ｍＬ、１０ｍｇ／ｍＬ、１５ｍｇ／ｍＬ、２０ｍｇ／ｍＬ、２５ｍｇ／ｍＬ、３０ｍｇ／ｍＬ、３５ｍｇ／ｍＬ、４０ｍｇ／ｍＬ、４５ｍｇ／ｍＬ、５０ｍｇ／ｍＬ、５５ｍｇ／ｍＬ、６０ｍｇ／ｍＬ、６５ｍｇ／ｍＬ、７０ｍｇ／ｍＬ、７５ｍｇ／ｍＬ、８０ｍｇ／ｍＬ、８５ｍｇ／ｍＬ、９０ｍｇ／ｍＬ、９５ｍｇ／ｍＬ、１００ｍｇ／ｍＬ、１２５ｍｇ／ｍＬ、１５０ｍｇ／ｍＬ、１７５ｍｇ／ｍＬ、２００ｍｇ／ｍＬ、２２５ｍｇ／ｍＬ、２５０ｍｇ／ｍＬ、２７５ｍｇ／ｍＬ、３００ｍｇ／ｍＬ、３２５ｍｇ／ｍＬ、３５０ｍｇ／ｍＬ、４００ｍｇ／ｍＬ、４５０ｍｇ／ｍＬ）の濃度で皮下投与される。一実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、５０ｍｇ／ｍＬの濃度で皮下投与される。別の実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、約１ｍｇ／ｍＬ～約５００ｍｇ／ｍＬの濃度で静脈内投与される。ある特定の実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、５０ｍｇ／ｍＬの濃度で静脈内投与される。

【０１９３】

抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、それを必要とする患者（たとえば肺線維症患者）に、第２の治療剤と併用で投与され得る。第２の治療剤は、治療されている疾患または障害の種類による。たとえば、第２の治療剤は、他のインテグリン受容体（たとえばα１β１、α４β１、αｖβ８、αｖβ６、αｖβ１他）；サイトカイン（たとえばＴＧＦ－β、ＩＬ－４、ＩＬ－１３、ＩＬ－１７）；ケモカイン（たとえばＣＣＬ２、ＣＸＣＬ８、ＣＸＣＬ１２）；増殖因子（たとえば結合組織増殖因子（ＣＴＧＦ）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、インスリン様増殖因子－１（ＩＧＦ－１））、及び／または小分子分泌型シグナル伝達タンパク質（たとえばＷｎｔタンパク質、エンドセリン－１）の１つ以上のアンタゴニスト（たとえば抗体、ポリペプチドアンタゴニスト、及び／または小分子アンタゴニスト）であり得る。抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片と第２の治療剤は、同時または逐次に投与され得る。ある実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片と第２の治療剤は、治療量以下で、または治療量で、投与され得る。

【０１９４】

患者が急性肺障害、肺水腫、またはＡＲＤＳを患っているかまたは発症するリスクがある、ある実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、利尿剤、気管支拡張剤、麻薬、酸素、及び選択的止血帯使用と組み合わせて投与され得る。それに加えて、本明細書で開示する抗αｖβ５インテグリン抗体は、急性肺障害、ＡＲＤＳ、またはＰＥに関連する代謝経路を標的とする第２の治療剤と併せて投与され得る。たとえば、抗αｖβ５インテグリン抗体またはその抗原結合性断片は、ＴＧＦβ経路阻害剤、活性化プロテインＣ、ステロイド、ＧＭ－ＣＳＦ、血小板阻害剤、β－２アゴニスト、界面活性剤、αｖβ５インテグリンまたはβ５に特異的に結合する他の抗体、αｖβ５インテグリンの第２のアンタゴニスト、αｖβ６インテグリンに特異的に結合する抗体、αｖβ６インテグリンのアンタゴニスト、トロンビン受容体アンタゴニスト、抗トロンビン剤、ｒｈｏキナーゼ阻害剤、及びαｖβ５インテグリンの発現を阻害する、たとえばアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、ｍｉＲＮＡ、及びｓｉＲＮＡを含む核酸と併せて投与され得る。好適なＴＧＦβ経路阻害剤としては、たとえばＬｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍｅ

ｒ．Ｓｏｃ．Ｎｅｐｈｒｏｌ．，１４：３７７－３８８（２００３），ＭｃＣｏｒｍｉｃｋ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６３：５６９３－５６９９（１９９９）、及びＣｏｒｄｅｉｒｏ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，５（２）：１９９－２０３（２００３）で説明されているようなＴＧＦ－β抗体（ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３またはその任意の組合せを特異的に妨害するものを含む）；たとえばＤａＣｏｓｔａ Ｂａｙｆｉｅｌｄ，Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，６５（３）：７４４－５２（２００４），Ｌａｐｉｎｇ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，３（２）：２０４－８（２００３），Ｌａｐｉｎｇ，Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，６２（ｌ）：５８－６４（２００２）で説明されているようなＴＧＦ－β受容体タイプＩＩ阻害剤またはＴＧＦ－β受容体タイプＩキナーゼ阻害剤；たとえばＰｉｔｔｅｔ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１０７：１５３７－１５４４（２００１）；Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ，Ｅｘｐ Ｌｕｎｇ Ｒｅｓ．，２８（６）：４０５－１７（２００２）及びＷａｎｇ，Ｔｈｏｒａｘ，５４（９）：８０５－１２（１９９９）で説明されているような可溶性ＴＧＦ－β受容体タイプＩＩ；たとえばＺｈａｎｇ，Ｊ Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．，１２１（４）：７１３－９（２００３）で説明されているような可溶性潜在関連ペプチド；たとえばＣｒａｗｆｏｒｄ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ，９３：１１５９－１１７０（１９９８），Ｒｉｂｅｒｉｒｏ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７４：１３５８６－１３５９３（１９９９），及びＳｃｈｕｌｔｚ－Ｃｈｅｒｒｙ ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６９：２６７７５－２６７８２（１９９４）で説明されているようなトロンボスポンジンＩ阻害剤が挙げられる。好適なβ－２アゴニストとしては、たとえばアルブテロール、ビトルテロール、ホルモテロール、イソプロテレノール、レブアルブテロール、メタプロテレノール、ピルブテロール、サルメテロール、及びテルブタリンが挙げられる。好適な界面活性剤としては、たとえばＴａｅｕｓｃｈ ｅｔ ａｌ，Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｓｉｎ ２３ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ：１１－１５（２００２）で説明されているような、ｅｘｏｓｕｒｆ、ｉｎｆａｓｕｒｆ、ＫＬ－４、ｐｕｍａｃｔａｎｔ、ｓｕｒｖａｎｔａ、ｖｅｎｔｉｃｕｔｅ、及び界面活性剤ＴＡが挙げられる。好適な抗トロンビン剤としては、たとえヒルジン、Ｈｉｒｕｌｏｇ（バイオゲン）、アルガトロバン、ｅｆｅｇａｔｒａｎ、及び米国特許第６，５１８，２４４号で説明されている化合物が挙げられる。好適なトロンビン受容体アンタゴニストは、たとえば米国特許第６，５４４，９８２号；同第６，５１５，０２３号；同第６，４０３，６１２号；同第６，３９９，５８１号；及び同第５，４４６，１３１号で説明されている。好適なｒｈｏキナーゼ阻害剤としては、たとえばＴａｓａｋａ ｅｔ ａｌ，Ａｍ Ｊ Ｒｅｓｐｉｒ Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．，３２（６）：５０４－１０（２００５）で説明されているようなＹ－２７６３２；たとえばＮｉｓｈｉｋｉｍｉ ｅｔ ａｌ，Ｊ Ｈｙｐｅｒｔｅｎｓ．，２２（９）：１７８７－９６（２００４）で説明されているようなファスジル；Ｓａｓａｋｉ ｅｔ ａｌ，Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ．，９３（２－３）：２２５－３２（２００２）で説明されているような１－（５－イソキノリンスルホニル）－ホモピペラジン（ＨＡ－１０７７）、（Ｓ）－（＋）－２－メチル－１－［（４－メチル－５－イソキノリン）スルホニル］－ホモピペラジン（Ｈ－１ １５２Ｐ）、及びたとえば米国特許第６，４５１，８２５号及び同第６，２１８，４１０号及び米国特許公報第２００５００１４７８３号及び同第２００３０１３４７７５号で説明されているような追加のｒｈｏキナーゼ阻害剤が挙げられる。それに加えて、αｖβ５インテグリンのアンタゴニストが、米国特許出願第２００２０１９２１８６号で説明されているようなアデノウイルス発現ＡＴＰａｓｅと一緒に；米国特許出願第２００２０００４０４２号で説明されているようなβ２アドレナリン受容体と一緒に；米国特許第６，２８４，７５１号で説明されているようなＶＥＧＦβアンタゴニストと一緒に；米国特許第５，２３１，１１４号で説明されているような脂質過酸化阻害剤と一緒に；及び、たとえば米国特許出願第２０００／４００１９２０６号、同第２００４／００１９０３７号、同第２００４／００１９０３５号、同第２００４／００１８１９２号、同第２００４／００１００２３号、同第２００３／０１８１４４０号、同第２００３／０１７１２７１号、同第２００

３／０１３９３９８号、同第２００２／００３７８８９号、同第２００２／００７７３２１号、同第２００２／００７２５００号、米国特許第６，６８３，０５１号及びＧｏｏｄｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ　Ｃｈｅｍ．４５（５）：１０４５－５１（２００２）で説明されているようなαｖβ６、αｖβ５、及びαｖβ３インテグリンの小分子阻害剤と一緒に、組み合わせて投与され得る。

【０１９５】

患者が敗血症を患っているか発症するリスクがある、ある実施形態では、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、たとえば抗生物質、スタチン、ステロイド、活性化プロテインＣ、利尿剤、血管収縮剤、または筋肉収縮剤を含む、敗血症の任意の標準的治療薬と併用で投与され得る。抗生物質治療が一般的であり、特定の感染を標的とするように医療専門家が最適な選択をし得る。例示的抗生物質としては、たとえばペニシリン、エリスロマイシン、環状リポペプチド（ダプトマイシン）、グリシルサイクリン（チゲサイクリン）、及びオキサゾリジノン（リネゾリド）が挙げられる。スタチン（ＨＭＧ－ＣｏＡレダクターゼ阻害剤）としては、たとえばシンバスタチンまたはアトロバスタチンが挙げられる。それに加えて、抗αｖβ５インテグリン抗体またはその抗原結合性断片は、敗血症に関連する代謝経路を標的とする剤と併せて投与され得る。たとえば、αｖβ５インテグリンのアンタゴニストは、ＴＧＦβ経路阻害剤、活性化プロテインＣ、ＧＭ－ＣＳＦ、αｖβ５インテグリンまたはβ５に特異的に結合する抗体、αｖβ５インテグリンの第２のアンタゴニスト、αｖβ６インテグリンに特異的に結合する抗体、αｖβ６インテグリンのアンタゴニスト、トロンビン受容体アンタゴニスト、抗トロンビン剤、ｒｈｏキナーゼ阻害剤、及びαｖβ５インテグリンの発現を阻害する、たとえばアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、ｓｉＲＮＡ、マイクロＲＮＡを含む核酸と併せて投与され得る。

【０１９６】

治療用デバイス及びキット

抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片を含む医薬組成物は、医療デバイスで投与され得る。デバイスは、たとえば訓練を受けていない対象または救急隊員が医療設備や他の医療機器がないところで緊急時に使用できるように、携帯性、室温保管、及び使いやすさなどの特徴を有して設計され得る。デバイスは、たとえば抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片を含む医薬調製物を収容できる１つ以上のハウジングを含み得、抗体の１つ以上の単位用量を送達できるように構成されている。デバイスは、さらに、第２の剤、たとえば化学療法剤を、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片も含んでいる単一の医薬組成物として、または２つの別個の医薬組成物として、投与するように構成され得る。

【０１９７】

医薬組成物は、シリンジで投与され得る。医薬組成物は、米国特許第５，３９９，１６３号；同第５，３８３，８５１号；同第５，３１２，３３５号；同第５，０６４，４１３号；同第４，９４１，８８０号；同第４，７９０，８２４号；または同第４，５９６，５５６号で説明されているようなデバイスなどの無針皮下注射デバイスで投与される場合もある。周知のインプラントやモジュールの例としては、制御された速度で薬物を供給する埋め込み可能なマイクロ輸液ポンプを開示している米国特許第４，４８７，６０３号；経皮的に薬物を投与する治療デバイスを開示している米国特許第４，４８６，１９４号；精密な注入速度で薬物を送達する薬物輸液ポンプを開示している米国特許第４，４４７，２３３号；継続的薬物送達用に可変流量の埋め込み可能な輸液装置を開示している米国特許第４，４４７，２２４号；複数チャンバのコンパートメントを有する浸透圧薬物送達システムを開示している米国特許第４，４３９，１９６号；及び浸透圧薬物送達システムを開示している米国特許第４，４７５，１９６号が挙げられる。他にも多くのデバイス、インプラント、送達システム、及びモジュールが知られている。

【０１９８】

抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、キットで提供され得る。一実施形態では、キットは、（ａ）抗αｖβ５抗体を含む組成物を収容する容器、及び随意で（ｂ）情報資料を含んでいる。情報資料は、説明書、使用説明、宣伝広告、またはその他の本明細書

で説明する方法及び／または治療効果のある剤の使用に関する資料であり得る。

【０１９９】

一実施形態では、キットは、本明細書で説明する障害を治療する第２の治療剤も含んでいる（たとえば、（たとえば、他のインテグリン受容体（たとえばα１β１、α４β１、αｖβ８、αｖβ５、αｖβ１他）；サイトカイン（たとえばＴＧＦ－β、ＩＬ－４、ＩＬ－１３、ＩＬ－１７）；ケモカイン（たとえばＣＣＬ２、ＣＸＣＬ８、ＣＸＣＬ１２）；増殖因子（たとえば結合組織増殖因子（ＣＴＧＦ）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、インスリン様増殖因子－１（ＩＧＦ－１））、小分子分泌型シグナル伝達タンパク質（たとえばＷｎｔタンパク質、エンドセリン－１）の１つ以上のアンタゴニスト（たとえば抗体、ポリペプチドアンタゴニスト、及び／または小分子アンタゴニスト）、ステロイド、細胞毒性化合物、放射性同位体、プロドラッグ活性化酵素、コルヒチン、酸素、抗酸化剤（たとえばＮ－アセチルシステイン）、金属キレート剤（たとえばテラチオモリブテート（ｔｅｒａｔｈｉｏｍｏｌｙｂｄａｔｅ）、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、アルファ－アンチトリプシン）。たとえば、キットは、抗αｖβ５抗体を含む組成物を収容する第１の容器、及び第２の治療剤を含む第２の容器を含んでいる。

【０２００】

キットの情報資料の形態は特に限定されない。一実施形態では、情報資料は、化合物の製造に関する情報、化合物の分子量、濃度、使用期限、バッチまたは製造場所の情報などを含み得る。一実施形態では、情報資料は、本明細書で説明する免疫障害を患っているかそのリスクがある対象を治療するために、抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片をたとえば好適な用量で、剤形で、または投与方式で投与する方法（たとえば本明細書で説明する用量、剤形、または投与方式）に関する。情報は印刷物、コンピューターで読み取り可能な資料、動画記録物、または視聴記録物、あるいはたとえばインターネット上の実際の資料へのリンクもしくはアドレスを提供する情報を含む様々なフォーマットで提供され得る。

【０２０１】

抗体に加えて、キット内の組成物は、溶媒もしくは緩衝液、安定剤、または保存剤などの他の成分も含み得る。抗体は、たとえば液体、乾燥もしくは凍結乾燥形態などの任意の形態で、好ましくはほぼ純粋及び／または無菌状態で提供され得る。剤が溶液中で提供される場合、溶液は好ましくは水溶液である。ある実施形態では、溶液中の抗体またはその抗原結合性断片の濃度は、約２５ｍｇ／ｍＬ～約２５０ｍｇ／ｍＬ（たとえば４０ｍｇ／ｍＬ、５０ｍｇ／ｍＬ、６０ｍｇ／ｍＬ、７５ｍｇ／ｍＬ、８５ｍｇ／ｍＬ、１００ｍｇ／ｍＬ、１２５ｍｇ／ｍＬ、１５０ｍｇ／ｍＬ、２００ｍｇ／ｍＬ）である。抗体または抗原結合性断片が凍結乾燥品として提供される場合、抗体または抗原結合性断片は約７５ｍｇ／バイアル～約２００ｍｇ／バイアル（たとえば１００ｍｇ／バイアル、１２５ｍｇ／バイアル、１５０ｍｇ／バイアル）である。凍結乾燥粉末は、通常、好適な溶媒を添加することにより再構成される。溶媒、たとえば滅菌水または緩衝液（たとえばＰＢＳ）は、随意でキット内に提供される。ある実施形態では、凍結乾燥品は、約１００ｍｇ／バイアルであり、濃度７５ｍｇ／ｍＬで溶液に再構成される。

【０２０２】

キットは、剤を含有している組成物（単数または複数）の１つ以上の容器を含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、組成物と情報資料の別々の容器、区切り、またはコンパートメントを収容している。たとえば、組成物は瓶、バイアル、またはシリンジに収容され得、情報資料はプラスチックのスリーブまたはパケット内に収容され得る。他の実施形態では、キットの別個の要素は、単一の区切られていない容器に収容される。たとえば、組成物は、情報資料がラベルとして貼り付けられた瓶、バイアルまたはシリンジに収容されている。いくつかの実施形態では、キットは、剤の１つ以上の単位剤形（たとえば本明細書で説明する剤形）をそれぞれが収容している複数の（たとえば１組の）個々の容器を含む。容器は、併用単位用量を、たとえば抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片

と第２の剤の両方をたとえば所望の割合で含む単位を、含んでいる。たとえば、キットは、複数のシリンジ、アンプル、ホイルパケット、ブリスター包装、または医療デバイスを含んでおり、たとえばそれぞれが単一の併用単位用量を収容している。キットの各容器は、気密性、防水性（たとえば水分や蒸発の変化を不透過）、及び／または遮光性であり得る。

【０２０３】

キットは、随意で、組成物の投与に適したデバイス、たとえばシリンジまたは他の好適な送達デバイスを含んでいる。デバイスは、剤のうち一方または両方を予め充填してあるか、充填に適した空の状態で、提供され得る。

【０２０４】

診断用途

抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片は、αｖβ５の存在を生体外または生体内で検出する診断方法（たとえば対象のインビボ画像法）で用いられ得る。たとえば、抗αｖβ５抗体は、対象内でαｖβ５を検出するために対象に投与され得る。たとえば、抗体は、たとえばＭＲＩ検出可能標識または放射標識で、標識され得る。対象は、検出可能な標識を検出する手段を用いて評価され得る。たとえば、対象は、スキャンされて、対象内の抗体の局在性を評価され得る。たとえば、対象は、たとえばＮＭＲまたは他の断層撮影手段により、撮像される。

【０２０５】

診断画像法で有用な標識の例としては、^{131}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{99m}Ｔｃ、^{32}Ｐ、^{33}Ｐ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、及び^{188}Ｒｈなどの放射標識、フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光標識、核磁気共鳴活性標識、陽電子放出断層撮影（「ＰＥＴ」）スキャナーで検出可能な陽電子放出アイソトープ、ルシフェリンなどの化学発光物質、及びペルオキシダーゼまたはホスファターゼなどの酵素マーカーが挙げられる。短域検出プローブで検出可能なアイソトープなどの短域放射線エミッターも使用され得る。タンパク質リガンドは、既知の技法により、そのような試薬で標識され得る。たとえば、抗体の放射標識に関する技法についてはＷｅｎｓｅｌ ａｎｄ Ｍｅａｒｅｓ（１９８３）Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏｉｍａｇｉｎｇ ａｎｄ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ及びＣｏｌｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１２１：８０２－８１６を参照されたい。

【０２０６】

対象は、たとえばガンマカメラまたは放出断層撮影を用いる放射核（ｒａｄｉｏｎｕｃｌｅａｒ）スキャニングなどの既知の技法により、インビボで「ｉｍａｇｅｄ（撮像され）」得る。たとえばＡ．Ｒ．Ｂｒａｄｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，“Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｉｍａｇｉｎｇ”，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，Ｒ．Ｗ．Ｂａｌｄｗｉｎ ｅｔ ａｌ．，（ｅｄｓ．），ｐｐ ６５－８５（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９８５）を参照されたい。あるいは、放射標識が陽電子を放出する場合は（たとえば^{11}Ｃ、^{18}Ｆ、^{15}Ｏ、及び^{13}Ｎ）、Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ所在の指定Ｐｅｔ ＶＩなどの陽電子放出軸横断断層撮影スキャナーを用いることができる。

【０２０７】

磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）では、生体対象の内部特徴を可視化するのにＮＭＲを用い、予後、診断、治療、及び手術に有用である。ＭＲＩの明瞭な利点としては、放射性トレーサー化合物なしで使用できる。いくつかのＭＲＩ技法がＥＰ０５０２８１４Ａに要約されている。一般に、異なる環境の水陽子の緩和時間定数Ｔ１及びＴ２に関する差が画像形成に用いられる。しかし、これらの差は、明瞭な高解像度画像を提供するには不十分であり得る。

【０２０８】

これらの緩和時間定数の差は、造影剤により強調できる。そのような造影剤の例として

は、いくつかの磁性剤、常磁性剤（主としてＴ１を改変する）及び強磁性または超常磁性剤（主としてＴ２応答を改変する）が挙げられる。キレート剤（たとえばＥＤＴＡ、ＤＴＰＡ及びＮＴＡキレート剤）が、いくつかの常磁性物質（たとえばFe^{3+}、Mn^{2+}、Gd^{3+}）の付着（及び毒性の低減）に用いられ得る。他の剤は、たとえば直径が１０μｍ未満から約１０ｎｍの粒子の形態であり得る）。粒子は、強磁性、抗強磁性または超常磁性の特性を有し得る。粒子としては、たとえばマグネタイト（Fe_3O_4）、γ－Fe_2O_3、フェライト、及び他の遷移元素の磁性鉱物化合物が挙げられ得る。磁性粒子は、非磁性物質を含むかまたは含まない、１種以上の磁性結晶を含み得る。非磁性物質は、合成または天然ポリマーを含み得る（セファロース、デキストラン、デキストリン、デンプンなど）。

【０２０９】

抗αｖβ５抗体またはその抗原結合性断片はまた、ＮＭＲ活性^{19}Ｆ原子を含む指示基、または複数のそのような原子で標識され得るが、それは（ｉ）自然界に豊富に存在するフッ素原子のほぼ全部が^{19}Ｆアイソトープなので、実質的にすべてのフッ素含有化合物はＮＭＲ活性であり、（ｉｉ）無水トリフルオロ酢酸などの化学的活性のある多くの多フッ素化（ｐｏｌｙｆｌｕｏｒｉｎａｔｅｄ）化合物が比較的低価格で市販されており、（ｉｉｉ）ヘモグロビンの代わりに酸素を運ぶのに用いられる多フッ素化ポリエーテルなど、多くのフッ素化化合物がヒトでの使用に医学的に許容可能であることがわかっているためである。インキュベーション時間が経過した後、Ｐｙｋｅｔｔ（１９８２）Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｍｅｒｉｃａｎ，２４６：７８－８８により説明されているような装置を用いて全身ＭＲＩを行って、αｖβ５分布をつきとめ、撮像する。

【０２１０】

別の態様では、本開示は、試験管内の試料（たとえば血清、血漿、組織、生検などの生体試料）中のαｖβ５の存在を検出する方法を提供する。この方法は、障害、たとえば急性肺障害、肺線維症、または癌（たとえば膵臓、肺、乳房、結腸直腸、頚頭部、食道、皮膚、または子宮内膜）の診断に用いられ得る。方法は、（ｉ）試料または対照試料を抗αｖβ５抗体と接触させること、及び（ｉｉ）たとえば抗αｖβ５抗体とαｖβ５の複合体形成を検出することによって、または、抗体またはαｖβ５の存在を検出することによって、αｖβ５の存在について試料を評価することを含む。たとえば、抗体をたとえば支持体上に固定して、支持体上に保持される抗原を検出することもできるし、及び／またはその逆もあり得る。使用される抗体は、たとえばフルオロフォアで標識され得る。対照試料が含まれ得る。陽性対照は、評価されている疾患または障害があるとわかっている試料であり得、陰性対照は、評価されている疾患または障害がない試料であり得る。試料中の複合体形成の変化が対照試料に対して相対的に統計学的に有意であれば、試料中にαｖβ５が存在するという示度になり得る。一般に、抗αｖβ５抗体は、蛍光偏光法、顕微鏡観察、ＥＬＩＳＡ、遠心分離、クロマトグラフィー、及び細胞選別（たとえば蛍光励起細胞選別）を含む用途で使用され得る。ある実施形態では、抗αｖβ５抗体は、ヒト化ＡＬＵＬＡ抗体またはその抗原結合性断片である。組織試料は、たとえば膵臓、肺、乳房、結腸直腸、頚頭部、食道、皮膚、子宮内膜の癌のヒト患者の、たとえば皮膚生検であり得る。

【実施例】

【０２１１】

実施例１：ＡＬＵＬＡのインビボ有効性に関するエフェクター機能の役割

Ｆｃエフェクター機能（Ｆｃ－ガンマ受容体及び／または補体Ｃ１ｑへの結合により媒介される）がＡＬＵＬＡのインビボ有効性において果たす役割を評価するために、異なるマウスＦｃドメインを有するコンストラクトを用いてラット虚血再灌流モデルを実施した。ｍＩｇＧ２ａ（最高のエフェクター機能）またはｍＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｑ）Ａｇｌｙ（最低のエフェクター機能）定常ドメインのいずれかと融合させたヒト化ＡＬＵＬＡ可変ドメイン重鎖配列（ここでは「Ｄｅｓｉｇｎ－Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｈ１（設計リファレンスＨ１）」と呼ぶ）を含む２種のキメラバリアントを作製した。これらの重鎖を、マウスカッパ定常ドメインと融合させたヒト化可変ドメイン軽鎖配列（ここでは「Ｄｅｓｉｇｎ

－Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　Ｌ１（設計リファレンスＬ１）」と呼ぶ）を含むキメラ軽鎖と対合させた。対合させた設計リファレンスＨ１と設計リファレンスＬ１を、ヒト化αｖβ５設計と呼ぶ。上述の２種のキメラｍＡｂを、オリジナルのＡＬＵＬＡ　ＩｇＧ２ｂコンストラクト、及びマウスＩｇＧ２ｂアイソタイプ対照と並行して、ラット虚血再灌流モデルで試験した。図１に示すように、３種のＡＬＵＬＡ抗体全てが、アイソタイプ対照に対して相対的に、血清クレアチニンレベルを大きく低下させ、これらの３種の異なるＡＬＵＬＡ形態の間に有意差は認められなかった。これらのデータは、エフェクター機能の低減は、αｖβ５を標的とする抗体治療の有効性に影響を与えないことを示している。

【０２１２】

実施例２：ヒト化ＡＬＵＬＡ設計

成熟マウスＡＬＵＬＡ抗体のＣＤＲ（重鎖領域はＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２及びＣＤＲ－Ｈ３、軽鎖領域はＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、及びＣＤＲ－Ｌ３）を、ヒト生殖系列のｈｕｍＩＧＨＶ３－１５とｈｕｍＩＧＫＶ１－１２に基づき、ヒトアクセプターフレームワークにグラフトして、ＣＤＲグラフト鎖ＶＨ０とＶＬ０をそれぞれ作製した。ＣＤＲグラフト鎖と比較して、ＣＤＲグラフトのヒトアクセプターフレームワークでいくつかの変異（以下で述べる）を組み合わせることによって、さらに６種の重鎖領域（ＶＨ１～６）、及びさらに４種の軽鎖領域（ＶＬ１～４）を作製した。ヒトアクセプターフレームワークに作製した変異のほとんどは、ＡＬＵＬＡ成熟マウスＣＤＲの構造が維持できるように、成熟マウスフレームワークのアミノ酸への逆変異であった。

【０２１３】

設計ＶＨ１～ＶＨ５及びＶＬ１～ＶＬ３は、ＣＤＲグラフト、すなわちヒトアクセプターフレームワークにグラフトされた全成熟ＡＬＵＬＡ　ＣＤＲに基づいている。しかし、設計ＶＨ６及びＶＬ４は、ＡＬＵＬＡのＣＤＲ１とＣＤＲ３の両方を含むが、ＣＤＲ２はヒトアクセプターフレームワーク由来が維持されている。ＡＬＵＬＡの第２のＣＤＲは、親マウス生殖系列から成熟マウスに成熟しなかったが、このことは第２のＣＤＲ領域が抗原に接触しない可能性を示しており、したがって第２のＣＤＲは不要であり得るので、曝露されたマウス配列の免疫原性リスクを低減するためにこのＣＤＲをヒトアクセプター配列で置換した。

【０２１４】

ヒトアクセプターフレームワークにおける変異：

１．重鎖

１．１　ＶＨ１、ＶＨ２、ＶＨ３、ＶＨ４、ＶＨ５、ＶＨ６における変異

上述のＶＨ領域に作製した３つの変異を以下に述べる。

【０２１５】

成熟マウスＣＤＲ残基Ｙ３２及び／またはＰ５２ａの場所を作るために、第１の、フレームワーク変異Ｒ７１Ａを作製した。１つの側（ｓｉｄｅ）で溶媒和されており、この位置のＡはヒトでは一般的（Ａ１５１／５４４、Ｒ２２７／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）なので、この変異の免疫原性リスクはないはずである。

【０２１６】

第２の変異Ｄ７３Ｔは、ＣＤＲ－Ｈ２のＨａｉｄａｒ位置である。１つの側で溶媒和されたこのアミノ酸は、ＣＤＲ－Ｈ１及びＣＤＲ－Ｈ２と接触する。この位置のＴはヒトでは一般的（Ｔ１６４／５４４、Ｎ１６４／５４４、Ｋ１１４／５４４、Ｄ３９／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）なので、この変異の免疫原性リスクは非常に低い。

【０２１７】

第３の変異Ｌ４Ｖは、マウス生殖系列のＬから成熟マウスのＶに超変異（ｈｙｐｅｒｍｕｔａｔｅ）させる。この位置のＶはマウスでは一般的ではなく（Ｖ１３／９４３対Ｌ９２７／９４３）、ヒトでも一般的ではない（Ｖ９／５４４対Ｌ５２９／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）が、この側鎖は埋没

しているので、この変異の免疫原性リスクは低い。Ｌ４Ｖ変異はＣＤＲ－Ｈ３構造に影響し得、超変異Ｔ９４（アクセプターでもＴ）との適合性を向上させる。

【０２１８】

１．２　ＶＨ２、ＶＨ３、ＶＨ４、Ｈ５における変異

上述のＶＨ領域に作製した３つの変異を以下に述べる。

【０２１９】

第１の、Ｒ６６Ｋは、ＣＤＲ－Ｈ２のＨａｉｄａｒ位置である。Ｋは１つの側で溶媒和されているが、多数の塩橋を有してフレームワーク残基に達し、そのＣＤＲ－Ｈ２の端部を所定の位置に保持していると推定される。ＣＤＲグラフト後、Ｒ６６は同様に相互作用できるが、ＣＤＲ構造を改変し得る。この位置のＫはヒトでは一般的である（Ｋ１７６／５４４、Ｒ３４７／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）。

【０２２０】

第２の変異Ｌ７８Ａは、ＣＤＲ－Ｈ２のＨａｉｄａｒ位置サポートである。この位置は、埋没して、ＣＤＲ－Ｈ２と接触する。アクセプターと比べて成熟マウスで異なっている近隣は、ＣＤＲ－Ｈ２のＰ５２ａ及びＲ７１Ａに変異されている７１である。Ｒ７１ＡとともにＬ７８Ａ変異も何らリスクを追加しないはずであり、Ｒ７１Ａが成熟マウス立体構造を実現するのを助ける。この位置のＡはヒトでは一般的であり（Ａ２１４／５４４対Ｌ１６３／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）、埋没しているので、この変異による免疫原性リスクはない。

【０２２１】

第３の変異Ｒ３８Ｋは、フレームワークの中に半埋没している。ＣＤＲグラフトで生成されたＣＤＲ－Ｈ２のＦ６３とこのＲの組合せは、込み合ってＣＤＲ構造に影響を及ぼし得る。Ｒ３８Ｋは、成熟ＣＤＲ立体構造を保持するのに役立ち得る。ここのＫはヒトでは極めて一般的である（Ｋ１５３／５４４、Ｒ３８５／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）。ここのＫは、尚も普通どおりに塩橋を形成すると考えられる。

【０２２２】

１．３　ＶＨ４、ＶＨ５における変異

上述のＶＨ領域に作製した変異はＫ７５Ｐである。この位置は溶媒和されて、ＣＤＲ－Ｈ２の近傍に位置する。この位置は、ＡからＰに超変異させた。Ｐはヒトでは（マウスでも）この位置で観察されないので（Ｐ０／５４４対Ｋ２２５／５４４、Ｓ１４２／５４４、Ｔ５６／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）、この変異は免疫原性のリスクがある。それが超変異するということは、それが抗原との結合に重要であり得ることを意味するが、その位置に基づき、抗原と接触する見込みはない。そのループも超変異Ｎ７６を含んでおり、こちらのほうが抗原と接触する見込みがある。この位置のプロリンへの超変異は、そのループの主鎖立体構造を改変し得ることを示唆するが、成熟マウス相同モデルは非プロリンでも良好に作用するファイ／プシー（ｐｈｉ／ｐｓｉ）角度をそれに与える。

【０２２３】

１．４　ＶＨ２、ＶＨ３における変異

上述のＶＨ領域に作製した変異はＫ７５Ｓである。この変異では、大きい、荷電されたＫが除去されて、ヒトには見られないＰではなく一般的なＳで置換されているので、免疫原性のリスクがはるかに少ない。

【０２２４】

１．５　ＶＨ３、ＶＨ４、ＶＨ５における変異

上述のＶＨ領域に作製した変異はＡ２３Ｋであり、これは溶媒和されて、ＣＤＲ－Ｈ１の近傍に位置し、ループは超変異Ｐ７５及び超変異Ｎ７６を含む。Ａ２３ＫはＮ７６を支持でき、ここの正電荷をもつマウスＫは溶解性も向上させ得る。ＫとＡはヒトでは一般的である（Ｋ１９８／５４４、Ａ１５４／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース

中のこれらのアミノ酸の頻度である）。この変異は設計ＶＨ２から省いたので、設計ＶＨ２はＫ７５の置換が容易であるが、Ｋ７５Ｐ及びＤ７２Ｖの免疫原性リスクを回避する。

【０２２５】

１．６　ＶＨ３、ＶＨ５における変異

上述のＶＨ領域に作製した２つの変異を以下に述べる。

【０２２６】

第１の、Ｄ７２Ｖは、溶媒和されており、ＣＤＲの近傍に位置する。しかし、これは超変異Ｐ７５　Ｎ７６を有するフレームワークループ内なので、抗原と接触し得る。この位置は、アミノ酸７５と相互作用できる。位置７２と７５は急なターンの両側に存在するので、これらが同じ電荷ではターンが不安定化し得る。成熟マウスでは、７２と７５はＶとＰであり、アクセプターでは、ＤとＫである。したがって、Ｋ７５Ｐ変異が存在する場合、Ｄ７２Ｖも変異されているはずである。この位置のＶはヒトでは一般的ではないので（Ｖ８／５４４、Ｄ５１４／５４４、Ｅ１７／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）、この変異ではある程度免疫原性リスクがある。

【０２２７】

第２の変異Ｉ６９Ｌは埋没しており、ＣＤＲ－Ｈ２を支持する。Ｉ６９Ｌ変異はマウスＣＤＲ構造の保持を助け得るが、その他の周囲の残基は成熟マウスとアクセプターで差異は無い。ここのＬも一般的であり（Ｉ１２２／５４４、Ｌ３４２／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）、埋没しているので、この変異では免疫原性リスクはない。

【０２２８】

１．７　ＶＨ２、ＶＨ４における変異

上述のＶＨ領域に作製した変異はＧ１６Ｅである。この変異は、いくつかの他の抗体で、ｓｃＦｖドメインの安定性を向上させている。この位置は、ＣＤＲから遠く離れた屈曲部の近くで、溶媒曝露されている。この位置のＥはヒトではさほど一般的でない（Ｅ４４／５４４対Ｇ１７５／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）。この変異は、ＶＨ１が最優先の変化のみを有するように、ＶＨ１から省き、また、ＶＨ３とＶＨ５をもっともマウス様の設計としておくために、設計ＶＨ３及びＶＨ５から省いた。

【０２２９】

１．８　ＶＨ２、ＶＨ４、ＶＨ５における変異

上述のＶＨ領域における変異はＥ６Ｑであり、これはほぼ埋没しており、ＣＤＲから遠く離れて配置されている。この変異は、いくつかの他の抗体で、ｓｃＦｖの安定性を向上させている。この場合は、成熟マウスＱへの逆変異である。この位置のＱはヒトでは一般的だが、発明者らのアクセプターフレームワークのサブグループＨｅａｖｙ３ではあまり一般的ではない。この変異は、ＶＨ１が最優先の変化のみを有するように、設計ＶＨ１から省き、また、この特定の変異の効果を試験するために設計Ｈ３から省いた。

【０２３０】

１．９　ＶＨ５における変異

ＶＨ５に作製した２つの変異を以下に述べる。

【０２３１】

第１の変異Ｆ６７Ａは、ＣＤＲ－Ｈ２のＨａｉｄａｒ位置であり、埋没している。巨大なＦはグラフトＣＤＲ上でＦ６３と衝突し得るので、成熟ＣＤＲの立体構造を保持するためにＦ６７Ａ変異を必要とする。他方で、アクセプターフレームワークのＦはＡよりもはるかに大きいので、フレームワークとＣＤＲ－Ｈ２の間に埋没したこの領域内に突き出すが、ＣＤＲグラフトモデルは良好に適合するようである。マウス生殖系列由来の成熟がなかったＣＤＲ－Ｈ２の遠端に位置するため、この変異の免疫原性リスクは低い。この位置のＦまたはＡはヒトでは一般的であり（Ｆ２３２／５４４、Ａ１５１／５４４）、この位置は埋没しているので、免疫原性リスクはない。ここにＦを残すことはＦ６３とＦ６７の

両方がＦであることを意味することになり、それはヒト生殖系列では珍しく、２つのサブグループの７配列にのみ現れる。

【０２３２】

第２の変異Ｖ５Ｑは、溶媒和されており、親和性に影響を与えないはずである。Ｖ５Ｑ変異は溶解性を向上させ得る。この位置のＶまたはＱはヒトでは一般的である（Ｖ２１２／５４４対Ｑ１８２／５４４は、５４４のヒト重鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）。

【０２３３】

２．軽鎖

２．１　ＶＬ１、ＶＬ２、ＶＬ３、ＶＬ４における変異

上述のＶＬ領域に作製した３つの変異を以下に述べる。

【０２３４】

第１の変異Ｖ１１Ｌは、そのベータストランドと別の（Ｖ１９を含む）ＣＤＲ－Ｌ１につながるものとの間で、１つの側で溶媒和されている。この残基は空間的に残基１０４に近いので、成熟マウス配列の（アクセプターのＶ及びＶに対して）わずかに大きいＬ１１及びＬ１０４はＣＤＲ－Ｌ１構造に影響を及ぼし得る。この位置のアクセプターフレームワークのＶは、ヒトでは一般的ではないので（Ｖ４／４９６対Ｌ４１０／４９６、Ｍ６３／４９６は、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）、マウスＬへの逆変異は、免疫原性を増加させるのではなく、減少させる見込みがある。

【０２３５】

第２の変異Ｉ２１Ｍは、埋没しており、ＣＤＲ－Ｌ１を３位置後に開始させるストランド上に配置されているので、ＣＤＲ－Ｌ１に影響を及ぼし得る。この位置のＭまたはＩはＬ１０４及びＬ１１とほとんど接触し得る。この位置のＭはヒトでは一般的であり（Ｍ９１／４９６、対Ｉ３０６／４９６、Ｌ７５／４９６は、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）、この位置は埋没しているので、免疫原性リスクはない。

【０２３６】

第３の変異Ｖ１０４Ｌは、埋没しており、ＣＤＲから遠く離れて配置されている。この位置はＶ１１の隣に詰め込まれ、この領域への詰め込みはＣＤＲに影響を及ぼす可能性がある。この位置のＬはヒトではもっとも一般的である（Ｌ３７４／４９６対Ｖ１２１／４９６は、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）。

【０２３７】

２．２　ＶＬ１、ＶＬ２、ＶＬ３における変異

上述のＶＬ領域に作製した変異はＳ６０Ｄであり、溶媒和されている。この位置は抗原に接触する可能性があり、ＣＤＲ－Ｌ２の５４と相互作用する。成熟マウスでは、５４とこの６０は、ＲとＤであり、アクセプターでは、ＬとＳである。この位置のＤもヒトでは一般的である（Ｄ２０２／４９６、Ｓ１８８／４９６は、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）。

【０２３８】

２．３　ＶＬ２、ＶＬ３における変異

上述のＶＬ領域に作製した３つの変異を以下に述べる。

【０２３９】

第１の変異Ｔ２２Ｓは、溶媒に曝露され、ＣＤＲ－Ｌ１よりも２位置前に配置されている。その近隣はすべて、成熟マウスとアクセプターとで同じ配列を有している。アクセプターのＴ２２は、Ｓ７の主鎖の酸素と水素結合し、成熟マウスの配列の対応するＳも同様の結合ができるはずであるが、このモデルではしない。これがＣＤＲ－Ｌ１構造または抗原結合性に影響を及ぼす可能性はわずかである。この位置のＳはヒトでは一般的なので（Ｓ２５７／４９６対Ｔ１９９／４９６は、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中の

これらのアミノ酸の頻度である）、この変異には免疫原性リスクはない。
【０２４０】
第２の変異Ａ４３Ｓは、１つの側で溶媒和されており、ＣＤＲから遠く離れて配置されている。この位置は、ＶＨ鎖にＶＨ　Ｇ１０４で接触する。この接触付近のＶＨ領域は、成熟マウスとアクセプターとで同じ配列を有するので、この差異が対合に影響を及ぼすことはないが、ＣＤＲ－Ｈ３から遠くないので、この接触がＣＤＲ－Ｈ３構造に影響を及ぼすわずかな可能性はある。この位置のＳはヒトでは一般的である（Ｓ２６８／４９６対Ａ１３５／４９６は、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）。
【０２４１】
第３の変異Ｓ６３Ｔは、溶媒に曝露され、ＣＤＲ－Ｌ２に隣接しているが、接触はしない。これが抗原に接触し得た可能性はある。この位置のＴもヒトでは一般的である（Ｔ９０／４９６対Ｓ３８９／４９６は、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）。
【０２４２】
２．４　ＶＬ３における変異
上述のＶＬ領域に作製した４つの変異を以下に述べる。
【０２４３】
第１の変異Ｓ１２Ｔは、溶媒和されており、ＣＤＲ及び抗原から遠い距離だけ及び鎖距離だけ離れている。このフレームワーク位置のＴは、マウス生殖系列のＡからの超変異であるが、おそらくは無意味な超変異と考えられる。この位置のＴはヒトでは（マウスでも）一般的ではないので（Ｔ８／４９６対Ｓ２９７／４９６、Ａ９０／４９６、Ｐ８８／４９６は、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）、この変異ではある程度の免疫原性リスクがある。
【０２４４】
第２の変異Ｑ１００Ａは、溶媒中に突き出し、ＣＤＲの近くにはないが、ＣＤＲ－Ｌ３の鎖のそれほど遠位ではない。構造モデルでは、ここのＱはＳ９と相互作用し、または位置５及び６の主鎖と相互作用する。この位置は、ＣＤＲ－Ｌ３に影響を及ぼし得るが、この位置のヒトＱはほとんど溶媒内に伸長するので、その可能性は小さい。この位置のＡはヒトではかなり一般的である（Ａ６４／４９６対Ｇ２２３／４９６、Ｑ１４３／４９６、Ｓ５８／４９６は、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）。
【０２４５】
第３の変異Ａ１３Ｖは、１つの側で溶媒和されており、位置１３～１８でベータターンの直前に配置さており、それらのストランドの１つは遠位のＣＤＲ－Ｌ１につながる。成熟マウスＶがＣＤＲ－Ｌ１構造にとって重要である可能性がある。この位置のＶはヒトでは一般的なので（Ｖ２５５／４９６、Ａ１９１／４９６は、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）、この変異にはほとんど免疫原性リスクがない。
【０２４６】
第４の変異Ｌ７８Ｖは、ＣＤＲから遠くで埋没している。この位置のＶはヒトでは一般的なので（Ｖ２３６／４９６対Ｌ２１９／４９６は、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）、この変異の免疫原性リスクは極めて低い。
【０２４７】
２．５　ＶＬ２における変異
ＶＬ２領域に作製した変異Ｄ１Ｎは、ＣＤＲ－Ｌ１のＨａｉｄａｒ位置であり、溶媒和されている。抗原と接触し得、ＣＤＲ－Ｌ３のＳ９３　Ｓ９４及びＣＤＲ－Ｈ２のＱ５６とも接触し得る。この位置は、ＣＤＲグラフト後に長さがマイナス１だけ変化すると、ＣＤＲ－Ｌ３に影響を及ぼし得る。成熟マウス（ｍｕｒｉｎｅ）由来のこの位置のＮはマウス（ｍｏｕｓｅ）では珍しく（Ｎ７／９２８対Ｄ５９８／９２８、Ｅ１３５／９２８、Ｑ

１１２／９２８）、またヒトでも珍しいので（６／４９６、対３７９／４９６Ｄ、６１／４９６Ｅは、４９６のヒトカッパ鎖配列のデータベース中のこれらのアミノ酸の頻度である）、この変異は低～中度の相対的な免疫原性リスクがある。この変異は、Ｄ１Ｎ変異の効果を試験するために設計ＶＬ３から省かれた。

【０２４８】

ＡＬＵＬＡ　ＶＨ及びＶＬ領域、ならびに７種のヒト化ＡＬＵＬＡ可変重鎖領域及び５種のヒト化ＡＬＵＬＡ可変軽鎖領域の各配列を以下に示す。各アミノ酸配列のＣＤＲ１、２、及び３に下線を引く。

【０２４９】

可変重鎖配列：

ＡＬＵＬＡ　ＶＨ可変重鎖アミノ酸配列

EVQVQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKAKLTAVTSPNTAY
MELSSLTNEDSAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSA（配列番号７１）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ０可変重鎖アミノ酸配列

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNSDTSYNQKFKGRFTISRDDSKNTLY
LQMNSLKTEDTAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSS（配列番号１）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ０可変重鎖核酸配列

GAGGTGCAGC TTGTGGAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGGCTC CCTGAGGCTG
TCCTGCGCCG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAGGCAGGCC
CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
AACCAGAAGT TCAAGGGCAG GTTCACCATC TCCAGGGACG ACTCCAAGAA CACCCTGTAC
CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGC（配列番号９５）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ１可変重鎖アミノ酸配列

EVQVVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNSDTSYNQKFKGRFTISADTSKNTLY
LQMNSLKTEDTAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSS（配列番号２）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ１可変重鎖核酸配列

GAGGTGCAGG TGGTGGAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGGCTC CCTGAGGCTG
TCCTGCGCCG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAGGCAGGCC
CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
AACCAGAAGT TCAAGGGCAG GTTCACCATC TCCGCCGACA CCTCCAAGAA CACCCTGTAC
CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGC
（配列番号９６）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ２可変重鎖アミノ酸配列

EVQVVQSGGGLVKPGESLRLSCAASGYTFTSYWMHWVKQAPGKGLEWVGAIYPGNSDTSYNQKFKGKFTISADTSSNTAY
LQMNSLKTEDTAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSS（配列番号３）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ２可変重鎖核酸配列

GAGGTGCAGG TGGTGCAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGAGTC CCTGAGGCTG
TCCTGCGCCG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAAGCAGGCC
CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
AACCAGAAGT TCAAGGGCAA GTTCACCATC TCCGCCGACA CCTCCTCCAA CACCGCCTAC
CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGC（配列番号９７）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ３可変重鎖アミノ酸配列

EVQVVESGGGLVKPGGSLRLSCKASGYTFTSYWMHWVKQAPGKGLEWVGAIYPGNSDTSYNQKFKGKFTLSAVTSSNTAY
LQMNSLKTEDTAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSS（配列番号４）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ３可変重鎖核酸配列

GAGGTGCAGG TGGTGGAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGGCTC CCTGAGGCTG
TCCTGCAAGG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAAGCAGGCC
CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
AACCAGAAGT TCAAGGGCAA GTTCACCCTG TCCGCCGTGA CCTCCTCCAA CACCGCCTAC
CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGC
（配列番号９８）
ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ４可変重鎖アミノ酸配列
EVQVVQSGGGLVKPGESLRLSCKASGYTFTSYWMHWVKQAPGKGLEWVGAIYPGNSDTSYNQKFKGKFTISADTSPNTAY
LQMNSLKTEDTAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSS（配列番号５）
ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ４可変重鎖核酸配列
GAGGTGCAGG TGGTGCAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGAGTC CCTGAGGCTG
TCCTGCAAGG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAAGCAGGCC
CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
AACCAGAAGT TCAAGGGCAA GTTCACCATC TCCGCCGACA CCTCCCCCAA CACCGCCTAC
CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGC
（配列番号９９）
ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ５可変重鎖アミノ酸配列
EVQVQQSGGGLVKPGGSLRLSCKASGYTFTSYWMHWVKQAPGKGLEWVGAIYPGNSDTSYNQKFKGKATlSAVTSPNTAY
LQMNSLKTEDTAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSS（配列番号６）
ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ５可変重鎖核酸配列
GAGGTGCAGG TGCAGCAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGGCTC CCTGAGGCTG
TCCTGCAAGG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAAGCAGGCC
CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
AACCAGAAGT TCAAGGGCAA GGCCACCCTG TCCGCCGTGA CCTCCCCCAA CACCGCCTAC
CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGC
（配列番号１００）
ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ６可変重鎖アミノ酸配列
EVQVVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMHWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISADTSKNT
LYLQMNSLKTEDTAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSS（配列番号７）
ｈＡＬＵＬＡ　ＶＨ６可変重鎖核酸配列
GAGGTGCAGG TGGTGGAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGGCTC CCTGAGGCTG
TCCTGCGCCG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAGGCAGGCC
CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCAGG ATCAAGTCCA AGACCGACGG CGGTACCACC
GACTACGCCG CCCCCGTGAA GGGCAGGTTC ACCATCTCCG CCGACACCTC CAAGAACACC
CTGTACCTGC AGATGAACTC CCTGAAGACC GAGGACACCG CCGTGTACTA CTGCACCACC
ACCACCTACG GCTACGACTG GTTCGCCTAC TGGGGCCAGG GCACCCTGGT GACCGTCTCG
AGC（配列番号１０１）
【０２５０】
可変軽鎖配列：
ＡＬＵＬＡ　ＶＬ可変軽鎖アミノ酸配列
NIMMTQSPSSLTVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT
ISSVQAEDLAVYYCHQYLSSLTFGAGTKLELK（配列番号７２）
ｈＡＬＵＬＡ　ＶＬ０可変軽鎖アミノ酸配列
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCHQYLSSLTFGQGTKVEIK（配列番号８）
ｈＡＬＵＬＡ　ＶＬ０可変軽鎖核酸配列
GACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCTCC GTGTCCGCCT CCGTGGGCGA CAGGGTGACC

ATCACCTGCA AGTCCTCCCA GTCCGTGCTG TACAGCTCCA ACCAGAAGAA CTACCTGGCC
TGGTACCAGC AGAAGCCCGG CAAGGCCCCC AAGCTGCTGA TCTACTGGGC CTCCACCAGG
GAGTCCGGCG TGCCCTCCAG GTTCTCCGGC TCCGGCTCCG GCACCGACTT CACCCTGACC
ATCTCCTCCC TGCAGCCCGA GGACTTCGCC ACCTACTACT GCCACCAGTA CCTCTCGAGC
CTGACCTTCG GCCAGGGCAC CAAGGTGGAG ATCAAG（配列番号１０２）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＬ１可変軽鎖アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCHQYLSSLTFGQGTKLEIK（配列番号９）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＬ１可変軽鎖核酸配列

GACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCTCC CTGTCCGCCT CCGTGGGCGA CAGGGTGACC
ATGACCTGCA AGTCCTCCCA GTCCGTGCTG TACAGCTCCA ACCAGAAGAA CTACCTGGCC
TGGTACCAGC AGAAGCCCGG CAAGGCCCCC AAGCTGCTGA TCTACTGGGC CTCCACCAGG
GAGTCCGGCG TGCCCGACAG GTTCTCCGGC TCCGGCTCCG GCACCGACTT CACCCTGACC
ATCTCCTCCC TGCAGCCCGA GGACTTCGCC ACCTACTACT GCCACCAGTA CCTCTCGAGC
CTGACCTTCG GCCAGGGCAC CAAGCTGGAG ATCAAG（配列番号３４）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＬ２可変軽鎖アミノ酸配列

NIQMTQSPSSLSASVGDRVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGKSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCHQYLSSLTFGQGTKLEIK（配列番号１０）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＬ２可変軽鎖核酸配列

AACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCTCC CTGTCCGCCT CCGTGGGCGA CAGGGTGACC
ATGTCCTGCA AGTCCTCCCA GTCCGTGCTG TACAGCTCCA ACCAGAAGAA CTACCTGGCC
TGGTACCAGC AGAAGCCCGG CAAGTCCCCC AAGCTGCTGA TCTACTGGGC CTCCACCAGG
GAGTCCGGCG TGCCCGACAG GTTCACCGGC TCCGGCTCCG GCACCGACTT CACCCTGACC
ATCTCCTCCC TGCAGCCCGA GGACTTCGCC ACCTACTACT GCCACCAGTA CCTCTCGAGC
CTGACCTTCG GCCAGGGCAC CAAGCTGGAG ATCAAG（配列番号５３）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＬ３可変軽鎖アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLTVSVGDRVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGKSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT
ISSVQPEDFATYYCHQYLSSLTFGAGTKLEIK（配列番号１１）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＬ３可変軽鎖核酸配列

GACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCTCC CTGACCGTGT CCGTGGGCGA CAGGGTGACC
ATGTCCTGCA AGTCCTCCCA GTCCGTGCTG TACAGCTCCA ACCAGAAGAA CTACCTGGCC
TGGTACCAGC AGAAGCCCGG CAAGTCCCCC AAGCTGCTGA TCTACTGGGC CTCCACCAGG
GAGTCCGGCG TGCCCGACAG GTTCACCGGC TCCGGCTCCG GCACCGACTT CACCCTGACC
ATCTCCTCCG TGCAGCCCGA GGACTTCGCC ACCTACTACT GCCACCAGTA CCTCTCGAGC
CTGACCTTCG GCGCCGGCAC CAAGCTGGAG ATCAAG（配列番号５４）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＬ４可変軽鎖アミノ酸配列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCHQYLSSLTFGQGTKLEIK（配列番号１２）

ｈＡＬＵＬＡ　ＶＬ４可変軽鎖核酸配列

GACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCTCC CTGTCCGCCT CCGTGGGCGA CAGGGTGACC
ATGACCTGCA AGTCCTCCCA GTCCGTGCTG TACAGCTCCA ACCAGAAGAA CTACCTGGCC
TGGTACCAGC AGAAGCCCGG CAAGGCCCCC AAGCTGCTGA TCTACGCCGC CTCCTCCCTG
CAGTCCGGCG TGCCCTCCAG GTTCTCCGGC TCCGGCTCCG GCACCGACTT CACCCTGACC
ATCTCCTCCC TGCAGCCCGA GGACTTCGCC ACCTACTACT GCCACCAGTA CCTCTCGAGC
CTGACCTTCG GCCAGGGCAC CAAGCTGGAG ATCAAG（配列番号５５）

【０２５１】

ＡＬＵＬＡ　ＶＨ及びＶＬ、ならびに７種のヒト化ＡＬＵＬＡ可変重鎖領域及び５種のヒト化ＡＬＵＬＡ可変軽鎖領域のアミノ酸配列のアラインメントを図２と図３にそれぞれ示す。

【０２５２】

実施例３：材料及び方法

ヒト可溶性αｖβ５タンパク質の生産：ヒトαｖ及びβ５インテグリンサブユニットの細胞外ドメインを哺乳類発現ベクターにクローン化し、ＣＨＯ細胞に安定形質移入した。標準的な方法でタンパク質を発現させ、アフィニティクロマトグラフィーにより固定化αｖインテグリン特異的モノクローナル抗体上で、条件培地から精製した。

【０２５３】

固相αｖβ５結合アッセイ（ＥＬＩＳＡ）：９６ウェルのマイクロタイタープレートをストレプトアビジンで予めコートしたもの（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅａｃｔｉ－Ｂｉｎｄ ＳｔｒｅｐｔＡｖｉｄｉｎ Ｃｏａｔｅｄ Ｈｉｇｈ Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｃａｐａｃｉｔｙプレート）を用いた。１％のＢＳＡ入りＴＢＳ中のビオチン化可溶性αｖβ５タンパク質（２μｇ／ｍＬ）をウェルに加え、プレートを１時間２５℃でインキュベートした。プレートを洗浄緩衝液（ＰＢＳ中０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０）で洗浄して、１％ＢＳＡ、１ｍＭのＣａＣｌ２、及び１ｍＭのＭｇＣｌ２を含有するＴＢＳ中の精製されたヒト化ＡＬＵＬＡ抗体を加えた（５０μｌ／ウェル）。プレートを１時間２５℃でインキュベートし、洗浄してから、５０μｌ／ウェルのペルオキシド結合ヤギ抗ヒト二次抗体とともに１時間インキュベートした。結合した抗体を３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）を用いて検出した。結合は、４５０ｎｍでの吸光度測定により示された。

【０２５４】

競合ＥＬＩＳＡ：９６ウェルのマイクロタイタープレートを５０μｌ／ウェルの５μｇ／ｍＬ可溶性ヒトαｖβ５タンパク質で４℃で一晩コートした。自動プレートウォッシャーでプレートを洗浄緩衝液（ＰＢＳ中０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０）で４回洗浄した。３００μｌ／ウェルのＰＢＳ中１％ＢＳＡを加えて、１時間２５℃でインキュベートして非特異的結合を妨害した。プレートを上述のように洗浄し、１％ＢＳＡを含有するＰＢＳ中１ｎＭのマウスＡＬＵＬＡと混合したヒト化抗体の希釈物を加えた（５０μｌ／ウェル）。プレートを１時間２５℃でインキュベートし、洗浄してから、１００μｌ／ウェルのペルオキシド結合ヤギ抗マウス抗体とともに４０分インキュベートした。結合した抗体を３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）を用いて検出した。結合は、４５０ｎｍでの吸光度測定により示された。

【０２５５】

ビトロネクチン阻害ＥＬＩＳＡ：９６ウェルのマイクロタイタープレートをＰＢＳで希釈した５μｇ／ｍｌの精製ヒト血漿ビトロネクチン（５０μｌ／ウェル）で４℃で一晩コートした。コーティング後、溶液を除去し、プレートを３００μｌ／ウェルの１％ＢＳＡ／ＴＢＳで２５℃で１時間かけてブロックした。プレートを緩衝液（１ｍＭの$CaCl_2$及び１ｍＭの$MgCl_2$を含有するＴＢＳ中０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０）で洗浄し、１％ＢＳＡ、１ｍＭの$CaCl_2$及び１ｍＭの$MgCl_2$を含有するＴＢＳ中１ｎＭの可溶性$\alpha_v\beta_5$タンパク質と混合したヒト化抗体の希釈物を加え（５０μｌ／ウェル）、２５℃で１時間インキュベートした。自動プレートウォッシャーでプレートを洗浄緩衝液で４回洗浄し、１％ＢＳＡ、１ｍＭの$CaCl_2$及び１ｍＭの$MgCl_2$を含有するＴＢＳ中、５０μｌ／ウェルの抗ベータ５モノクローナル抗体１５Ｆ１１（０．５ｕｇ／ｍＬで）とともに、１時間２５℃で逐次インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で４回洗浄した後、１％ＢＳＡ、１ｍＭの$CaCl_2$及び１ｍＭの$MgCl_2$を含有するＴＢＳ中ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス抗体の１：５０００希釈物を１００μｌ／ウェルで加えて、１時間２５℃でインキュベートした。結合したタンパク質はＴＭＢ基質を用いて検出され、４５０ｎｍでの吸光度測定により示された。

【０２５６】

ビトロネクチン接着アッセイ：９６ウェルのマイクロタイタープレートをリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）で希釈した１０μｇ／ｍｌの精製ヒトビトロネクチン５０μｌ／ウェルで４℃で一晩コートした。プレートをＰＢＳ（１００μｌ／ウェル）で２回洗浄し、ＰＢＳ中１％ＢＳＡ（１００μｌ／ウェル）で１時間２５℃でブロックした。プレートを１００

μｌ／ウェルのアッセイ緩衝液（完全ＴＢＳプラス１ｍＭのＣａＣｌ$_2$及び１ｍＭのＭｇＣｌ$_2$）で２回洗浄した。次に、プレートの各ウェルに２５μｌのハイブリドーマ上清（または精製抗体）及び２５μｌのαｖβ５－ＢａＦ３細胞（５Ｘ１０^{6}細胞／ｍｌ、２μＭのカルセインＡＭで標識）を加えた。プレートを３７℃で１．５時間インキュベートしてから、アッセイ緩衝液で４～６回洗浄した（１００μｌ／ウェル）。プレート上に捕捉された細胞が発する蛍光を記録した。洗浄前蛍光シグナル（すなわち加えられた全ての細胞）と洗浄後蛍光シグナル（すなわち結合された細胞）を比較して結合率を決定した。

【０２５７】

ＦＡＣＳ結合アッセイ：細胞をＰＢＳ中で１回洗浄してから、ＦＡＣＳ緩衝液（１ＸＰＢＳ、１％ＢＳＡ、１ｍＭのＣａＣｌ$_2$、及び１ｍＭのＭｇＣｌ$_2$）中に再懸濁させた。次いで１Ｘ１０^{6}個の細胞を、試験抗体を含む全部で５０μｌのＦＡＣＳ緩衝液中、氷上で１時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を氷冷ＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄して、３μｇ／ｍｌのヤギ抗マウスＩｇＧ　ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ４８８（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ社）を含む５０μｌのＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁し、氷上で３０分インキュベートした。次いで細胞を氷冷ＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄して、１％ＰＦＡ中に一晩固定した。細胞凝集体を４０μｍのフィルタープレート（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社）で濾過して除去し、標識された二次抗体の結合をＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社）でフローサイトメトリーにより監視した。

【０２５８】

片側虚血クランプモデル：体重２５０～３２０ｇの雄のＳｐｒａｇｕｅ－ＤａｗｌｅｙラットをＨａｒｌａｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社から購入して、餌と水を自由に摂らせながら手術前に5日かけて環境に順応させた。動物は、イソフルラン（Ｉｓｏｆｌｕｏｒａｎｅ）／Ｏ２混合物５％で麻酔導入し、１～２％で麻酔維持した。腹部を３ｃｍの正中切開で開いた。各腎臓を隔離して、滅菌した拭取り綿を用いて腎動脈及び静脈の周りの脂肪と結合組織を除去した。右側の腎臓を除去し、腎動脈及び静脈を結紮した。左側の腎臓の虚血は、腎動脈及び静脈を腎茎（ｒｅｎａｌ　ｐｅｄｉｃｌｅ）で非侵襲性クランプにより４０分クランプして開始した。虚血期が終了すると、クランプを除去して、腎臓で血流が直ちに再構築されたかどうかを観察した。術後７２時間で試験終了とし、ラットにペントバルビタールを過剰投与してから頚部脱臼により安楽死させた。試験剤（対照抗体、１Ｅ６、－ｍＩｇＧ１アイソタイプ対照）またはＨ４／Ｌ２抗αｖβ５抗体）をクランプの６時間前に皮下注射により３００μＬ投与した。試験開始時にベースラインのクレアチニン測定のために、また、術後４８時間で病理学的血清クレアチニンレベルの評価のために、０．１５ｍＬの静脈血試料を採取した。クレアチニン濃度はＢｅｃｋｍａｎ　Ｃｒｅａｔｉｎｉｎｅ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　２で測定した。機械を既知の対照で標準化して、試料をピクリン酸と反応させた。

【０２５９】

実施例４：ヒト化ＡＬＵＬＡコンストラクトのスクリーニング

ヒト化コンストラクトのスクリーニングは、可変ドメイン重鎖及び可変軽鎖設計に対応するＣＨＯ細胞で一過的に発現させたタンパク質を用いて実施し、ＶＨドメインはアグリコシル化ヒトＩｇＧ１ドメイン（Ｋａｂａｔナンバリング法により番号付けしたＴｈｒ２９９Ａｌａ変異を含む）と融合させ、及びＶＬドメインはカッパ軽鎖と融合させた。

【０２６０】

重鎖バージョンＶＨ０、ＶＨ１、ＶＨ２、ＶＨ３、ＶＨ４、またはＶＨ５と、軽鎖ＶＬ０、ＶＬ１、ＶＬ２、またはＶＬ３の全組合せのスクリーニングを、条件細胞培地の未精製タンパク質を用いて実施した。各コンストラクトの、ビオチン結合ヒトαｖβ５タンパク質への結合は、固相結合アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を用いて、及びＦＡＣＳにより決定し、各コンストラクトがリガンド結合を妨害する能力は、ビトロネクチン細胞接着アッセイを用いて決定した（表１）。

【表１－１】

表１　未精製 Agly-IgG1 コンストラクトの結合及び阻害データ概要

ヒト化 ALULA 抗体	ELISA, ビオチン-αvβ5 (EC50, nM)	FACS, αvβ5-BaF3 (EC50, nM)	VN 接着阻害, αvβ5-BaF3 (IC50, nM)
VH0/VL0 Agly-hIgG1(T299A)	1.2	1122.5	1769.2
VH0/VL1 Agly-hIgG1(T299A)	1.3	798.3	1620.6
VH0/VL2 Agly-hIgG1(T299A)	1.0	855.2	1969.9
VH0/VL3 Agly-hIgG1(T299A)	0.9	1274.3	494.3
VH1/VL0 Agly-hIgG1(T299A)	1.0	3677.4	3295.2
VH1/VL1 Agly-hIgG1(T299A)	1.9	3356.8	2523.6
VH1/VL2 Agly-hIgG1(T299A)	2.3	5373.1	1728.1
VH1/VL3 Agly-hIgG1(T299A)	2.9	2925.8	1841.1
VH2/VL0 Agly-hIgG1(T299A)	0.5	354.5	475.7
VH2/VL1 Agly-hIgG1(T299A)	1.0	404.6	317.6
VH2/VL2 Agly-hIgG1(T299A)	0.7	645.8	291.6
VH2/VL3 Agly-hIgG1(T299A)	1.0	989.6	303.0
VH3/VL0 Agly-hIgG1(T299A)	ND*	ND	ND
VH3/VL1 Agly-hIgG1(T299A)	1.2	1926.0	360.3
VH3/VL2 Agly-hIgG1(T299A)	0.7	3310.0	124.5
VH3/VL3 Agly-hIgG1(T299A)	1.2	6287.5	227.4
VH4/VL0 Agly-hIgG1(T299A)	0.3	158.5	74.9
VH4/VL1 Agly-hIgG1(T299A)	0.4	125.5	59.8

【表１－２】

VH4/VL2 Agly-hIgG1(T299A)	0.4	155.9	71.8
VH4/VL3 Agly-hIgG1(T299A)	1.7	162.5	64.8
VH5/VL0 Agly-hIgG1(T299A)	0.4	243.7	217.7
VH5/VL1 Agly-hIgG1(T299A)	0.3	147.2	162.9
VH5/VL2 Agly-hIgG1(T299A)	0.4	358.7	83.2
VH5/VL3 Agly-hIgG1(T299A)	1.4	421.9	72.2

＊ＮＤ　発現レベルが低いため決定されず

【０２６１】

重鎖－軽鎖対のサブセットを精製してさらに試験した。

【０２６２】

各コンストラクトの可溶性精製ヒトαｖβ５タンパク質への結合は、マウスＡＬＵＬＡに対する競合ＥＬＩＳＡで決定した（図４）。このアッセイで決定されたＩＣ５０値を以下の表２に示す。Ｈ０を含むコンストラクトは、ＡＬＵＬＡ結合を妨害する能力が顕著に欠けており、ＡＬＵＬＡフレームワークと比較して、Ｈ０鎖におけるアミノ酸変化がＨ０抗体の結合親和性を低減させたことを示している。残りのコンストラクトも同様の振る舞いであり、バージョンＨ４／Ｌ２は、このアッセイで最低のＩＣ５０値を示した。

【０２６３】

並行して、ヒト化ＡＬＵＬＡ抗体を２つの接着アッセイで試験した。１つは、各抗体が可溶性αｖβ５の精製ヒト血漿ビトロネクチンへの結合を阻害する能力を測定した。もう１つのアッセイでは、マウスＢａＦ３細胞株がヒトαｖ及びβ５サブユニットで安定形質移入され、これらの細胞のビトロネクチンへの接着が蛍光エンドポイントにより決定された。両接着アッセイの結果は、Ｈ０を含むコンストラクトは阻害剤として極めて有効性が低いという点で結合アッセイと一致しており、最も有効なもののひとつはＨ４／Ｌ２であった（表２を参照のこと）。

【表２】

表２　精製Ａｇｌｙ－ＩｇＧ１タンパク質の結合及び阻害データ概要

ヒト化 ALULA 抗体	競合 ELISA, 可溶性αvβ5 (IC50, nM)	VN阻害ELISA, 可溶性αvβ5 (IC50, nM)	VN 接着阻害, αvβ5-BaF3 (IC50, nM)
VH4/VL2 Agly-hIgG1(T299A)	1.6	0.6	0.5
VH5/VL2 Agly-hIgG1(T299A)	2.0	1.3	0.9
VH4/VL0 Agly-hIgG1(T299A)	2.0	1.7	1.1
VH4/VL1 Agly-hIgG1(T299A)	2.2	0.9	1.0
VH5/VL0 Agly-hIgG1(T299A)	2.8	3.1	1.0
VH5/VL1 Agly-hIgG1(T299A)	3.0	1.3	0.7
VH2/VL2 Agly-hIgG1(T299A)	2.8	1.1	0.4
VH3/VL2 Agly-hIgG1(T299A)	3.3	2.5	0.6
VH2/VL0 Agly-hIgG1(T299A)	3.4	2.4	1.3
VH0/VL1 Agly-hIgG1(T299A)	14.2	11.9	2.2
VH0/VL0 Agly-hIgG1(T299A)	18.3	11.1	3.0

【０２６４】

実施例５：ヒト化ＡＬＵＬＡのヒト定常ドメインの選択

ヒト化ＡＬＵＬＡコンストラクトの免疫エフェクター機能を最小限化するために、Ｆｃγ受容体及び補体Ｃ１ｑに低親和性で結合することが示されている、操作されたＩｇＧのＦｃドメインが選択された（米国特許公報第２０１２／０１００１４０Ａ１号を参照のこと）。この重鎖（「ＩｇＧ４．Ｐ（Ｓ２２８Ｐ）／ＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｑ）」と称される）は、ヒトＩｇＧ４のＣＨ１及びＣＨ２ドメイン、及びヒトＩｇＧ１のＣＨ３ドメインを含んでいる。ヒンジ領域におけるアミノ酸変化（Ｋａｂａｔナンバリング法によるとＳ２２８Ｐ）は、重鎖鎖間ジスルフィド結合を安定させて、抗体再配列を最小限化し、Ｎ２９７Ｑ変異は、Ｎ糖鎖修飾部位を排除する。軽鎖はヒトカッパＣＬドメインを含んでいる。

【０２６５】

実施例６：ＡＬＵＬＡコンストラクトのスクリーニング

実施例４で上述した結果に基づき、４種のヒト化ＡＬＵＬＡコンストラクト：ＶＨ２／ＶＬ２、ＶＨ４／ＶＬ０、ＶＨ４／ＶＬ２、及びＶＨ５／ＶＬ２を選択し、さらに試験した。これらのＶＨ／ＶＬコンストラクトは、ハイブリッドのアグリコシル化ＩｇＧ４．Ｐ（Ｓ２２８Ｐ）／ＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｑ）ドメイン及びヒトカッパ軽鎖ドメインを有する融合タンパク質として発現させられ、安定形質移入されたＣＨＯ細胞の条件培地から精製

された。各ヒト化ＡＬＵＬＡコンストラクトの結合は、マウスＡＬＵＬＡに対する競合ＥＬＩＳＡによって、及びヒトαｖβ５－形質移入ＢａＦ３細胞を用いるＦＡＣＳによって決定した。各ヒト化ＡＬＵＬＡコンストラクトはまた、ビトロネクチンへの結合／接着妨害について、ＥＬＩＳＡによって、またはヒトまたはカニクイザルαｖβ５で安定形質移入されたＢａＦ３細胞を用いる細胞接着アッセイによって、評価された。ヒト化ＡＬＵＬＡコンストラクトを、ヒトＩｇＧ１重鎖及びヒトカッパ軽鎖ドメインと融合させたマウス重鎖及び軽鎖可変ドメインを含むＡＬＵＬＡキメラ体と比較した。４種のヒト化ＡＬＵＬＡコンストラクトは、各アッセイで類似の振る舞いをし、概してＨ４／Ｌ２は他のコンストラクトと比べて類似かまたはわずかに高い親和性／妨害力を有した（表３を参照のこと）。

【表３】

表３　精製Ａｇｌｙ－ＩｇＧ４Ｐ／ＩｇＧ１タンパク質の結合及び阻害データ概要

コンストラクト (Agly-IgG4P/G1)	ALULA 競合 ELISA (IC_{50}, nM)		αvβ5- ビトロネクチン 妨害 ELISA (IC_{50} nM)		BaF3-hu αvβ5 細胞のビトロネクチンへの接着 (IC_{50}, nM)		BaF3-cyno αvβ5 細胞のビトロネクチンへの接着 (IC_{50}, nM)		FACS BaF3-hu αvβ5 (EC_{50}, nM)	
	IC_{50} (nM)	倍率変化	IC_{50} (nM)	倍率変化	IC_{50} (nM)	倍率変化	IC_{50} (nM)	倍率変化	EC_{50} (nM)	倍率変化
VH4/VL2	1.84	1.0	1.06	0.7	0.10	0.6	0.32	0.5	2.92	0.6
VH4/VL0	1.84	1.0	1.52	1.0	0.09	0.5	0.43	0.7	2.52	0.5
VH5/VL2	1.85	1.0	1.24	0.8	0.29	1.7	0.63	1.0	2.90	0.5
VH2/VL2	2.61	1.4	1.74	1.1	0.30	1.8	0.61	1.0	5.73	1.1
マウスキメラ ALULA	1.81	--	1.60	--	0.17	--	0.61	--	5.06	--

【０２６６】

３種の追加の組合せ（ＶＨ４／ＶＬ４、ＶＨ６／ＶＬ２、及びＶＨ６／ＶＬ４）をＩｇＧ４．Ｐ（Ｓ２２８Ｐ）／ＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｑ）の主鎖（ｂａｃｋｂｏｎｅ）上に製造して、設計ＶＨ６及びＶＬ４に用いたＣＤＲＨ２の変化の効果を決定した。これら３種のコンストラクトはそれぞれ、ＩＣ５０値≧１００ｎＭで、マウスＡＬＵＬＡを妨害し、またαｖβ５－ビトロネクチンの結合を阻害し、このことは、ＶＨ６及びＶＬ４に組み込まれたＣＤＲＨ２の変化は、抗体のαｖβ５への結合を有意に阻害することを示した（データは示さず）。

【０２６７】

実施例７：選択されたヒト化ＡＬＵＬＡコンストラクトのＦａｂのＥＬＩＳＡ結合データ

実施例６の４種のコンストラクトのＦａｂ断片を、対応するＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｑ）バージョンからパパイン消化により生成した。各Ｆａｂが、２ｎＭの可溶性αｖβ５の、固定化ヒト血漿ビトロネクチンへの結合を妨害する能力を、ＥＬＩＳＡにより決定した。表４に示すように、ＶＨ４／ＶＬ２のＦａｂ断片は、キメラマウス抗体に匹敵するＩＣ５０でリガンド結合を妨害したが、その他のバージョンのＩＣ５０値はわずかに高かった。

【表４】

表４　Ｆａｂ断片を用いてのαｖβ５のビトロネクチンへの結合の阻害

Fab源	αvβ5-ビトロネクチン妨害ELISA (IC_{50} nM)	
	IC_{50} (nM)	倍率変化
H4/L2	4.3	0.9
H4/L0	7.5	1.6
H5/L2	6.8	1.4
H2/L2	7.3	1.5
マウスキメラALULA	4.8	--

【０２６８】

実施例８：例示的ヒト化抗αｖβ５抗体

４種の例示的ヒト化抗αｖβ５抗体を以下に記述する。これらは、ＶＨドメインＶＨ４、ＶＨ５、及びＶＨ２ならびにＶＬドメインＶＬ０及びＶＬ２に基づく設計を含んでいる。

【０２６９】

これらの例示的抗体の重鎖は、ＶＨ４、ＶＨ２、またはＶＨ５可変重鎖（図２参照）、ならびにヒトＩｇＧ４ＰのＣＨ１及びＣＨ２ドメイン、及びヒトＩｇＧ１のＣＨ３ドメインを含む定常領域を含んでいる。重鎖はさらに、ヒンジ領域に半抗体（ｈａｌｆ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）の形成を低減するための変異（Ｋａｂａｔナンバリング　Ｓ２２８Ｐ）を、またＣＨ２ドメインにＮ糖鎖修飾部位を除去するための変異（Ｋａｂａｔナンバリング　Ｎ２９７Ｑ）を、含んでいる。各配列で、ＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２、及びＶＨＣＤＲ３に下線を引き、ＩｇＧ４Ｐ定常ドメイン、ＣＨ１及びＣＨ２ドメインを太字体にし、ＩｇＧ１定常ドメイン及びＣＨ３ドメインをイタリック体にし、ＩｇＧ４ＰヒンジのＳ２２８Ｐ変異とＣＨ２ドメインのＮ２９７Ｑ変異の両方を太字下線で示す。

ＶＨ４に基づく重鎖：

【化３】

EVQVVQSGGGLVKPGESLRLSCKASGYTFTSYWMHWVKQAPGKGLEWVGAIYPGNSDTSYNQKF
KGKFTISADTSPNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK
TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAK*GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD*
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG　（配列番号６９）

ＶＨ２に基づく重鎖：

【化４】

EVQVVQSGGGLVKPGESLRLSCAASGYTFTSYWMHWVKQAPGKGLEWVGAIYPGNSDTSYNQKF
KGKFTISADTSSNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT
YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAK*GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD*
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

（配列番号８０）

ＶＨ５に基づく重鎖：

【化５】

EVQVQQSGGGLVKPGGSLRLSCKASGYTFTSYWMHWVKQAPGKGLEWVGAIYPGNSDTSYNQKF
KGKATLSAVTSPNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTTTTYGYDWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK
TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAK*GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD*
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

（配列番号８１）

【０２７０】

例示的軽鎖は、ＶＬ０またはＶＬ２可変軽鎖（図３参照）及びヒトＩｇＧ４Ｐのカッパ軽鎖定常領域を含む定常領域（以下のイタリック体）を含んでいる。Ｋａｂａｔに基づくＣＤＲには下線を引いている。

ＶＬ０に基づく軽鎖：

【化６】

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYLSSLTFGQGTKVEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS*
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号８２）

ＶＬ２に基づく軽鎖：

【化７】

NIQMTQSPSSLSASVGDRVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGKSPKLLIYWASTRESGVP
DRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYLSSLTFGQGTKLEIK*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA*
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号７０）

【０２７１】

実施例９：抗αｖβ５抗体の例示的核酸配列

以下は、上述のヒト化ＡＬＵＬＡＶＨ０～ＶＨ６設計に基づく重鎖をコードする例示的

核酸配列である。これらの例示的抗体の重鎖は、ヒトＩｇＧ４ＰのＣＨ１及びＣＨ２ドメイン、及びヒトＩｇＧ１のＣＨ３ドメインを含む定常領域を有している。重鎖はさらに、ヒンジ領域に半抗体の形成を低減するための変異（Ｋａｂａｔナンバリング　Ｓ２２８Ｐ）を、またＣＨ２ドメインにＮ糖鎖修飾部位を除去するための変異（Ｋａｂａｔナンバリング　Ｎ２９７Ｑ）を、含んでいる。

ＶＨ０に基づく重鎖の核酸配列：

1 GAGGTGCAGC TTGTGGAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGGCTC CCTGAGGCTG
61 TCCTGCGCCG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAGGCAGGCC
121 CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
181 AACCAGAAGT TCAAGGGCAG GTTCACCATC TCCAGGGACG ACTCCAAGAA CACCCTGTAC
241 CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
301 TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGCGCC
361 TCCACCAAGG GCCCATCCGT CTTCCCCCTG GCGCCCTGCT CCAGATCTAC CTCCGAGAGC
421 ACAGCCGCCC TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG
481 AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA
541 CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC GAAGACCTAC
601 ACCTGCAACG TAGATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGAGAGT TGAGTCCAAA
661 TATGGTCCCC CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAGTTCC TGGGGGGACC ATCAGTCTTC
721 CTGTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACTCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACGTGC
781 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA GGAAGACCCC GAGGTCCAGT TCAACTGGTA CGTGGATGGC
841 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAAGAGC AGTTCCAGAG CACGTACCGT
901 GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ACGGCAAGGA GTACAAGTGC
961 AAGGTCTCCA ACAAAGGCCT CCCGTCCTCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
1021 CAGCCCCGAG AGCCACAAGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
1081 CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
1141 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGTT GGACTCCGAC
1201 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
1261 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1321 TCCCTGTCTC CCGGTTGA（配列番号８３）

ＶＨ１に基づく重鎖の核酸配列：

1 GAGGTGCAGG TGGTGGAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGGCTC CCTGAGGCTG
61 TCCTGCGCCG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAGGCAGGCC
121 CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
181 AACCAGAAGT TCAAGGGCAG GTTCACCATC TCCGCCGACA CCTCCAAGAA CACCCTGTAC
241 CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
301 TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGCGCC
361 TCCACCAAGG GCCCATCCGT CTTCCCCCTG GCGCCCTGCT CCAGATCTAC CTCCGAGAGC
421 ACAGCCGCCC TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG
481 AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA
541 CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC GAAGACCTAC
601 ACCTGCAACG TAGATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGAGAGT TGAGTCCAAA
661 TATGGTCCCC CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAGTTCC TGGGGGGACC ATCAGTCTTC
721 CTGTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACTCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACGTGC
781 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA GGAAGACCCC GAGGTCCAGT TCAACTGGTA CGTGGATGGC
841 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAAGAGC AGTTCCAGAG CACGTACCGT
901 GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ACGGCAAGGA GTACAAGTGC
961 AAGGTCTCCA ACAAAGGCCT CCCGTCCTCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
1021 CAGCCCCGAG AGCCACAAGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
1081 CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
1141 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGTT GGACTCCGAC

1201 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
1261 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1321 TCCCTGTCTC CCGGTTGA（配列番号８４）

ＶＨ２に基づく重鎖の核酸配列：

1 GAGGTGCAGG TGGTGCAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGAGTC CCTGAGGCTG
61 TCCTGCGCCG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAAGCAGGCC
121 CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
181 AACCAGAAGT TCAAGGGCAA GTTCACCATC TCCGCCGACA CCTCCTCCAA CACCGCCTAC
241 CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
301 TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGCGCC
361 TCCACCAAGG GCCCATCCGT CTTCCCCCTG GCGCCCTGCT CCAGATCTAC CTCCGAGAGC
421 ACAGCCGCCC TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG
481 AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA
541 CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC GAAGACCTAC
601 ACCTGCAACG TAGATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGAGAGT TGAGTCCAAA
661 TATGGTCCCC CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAGTTCC TGGGGGGACC ATCAGTCTTC
721 CTGTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACTCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACGTGC
781 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA GGAAGACCCC GAGGTCCAGT TCAACTGGTA CGTGGATGGC
841 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAAGAGC AGTTCCAGAG CACGTACCGT
901 GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ACGGCAAGGA GTACAAGTGC
961 AAGGTCTCCA ACAAAGGCCT CCCGTCCTCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
1021 CAGCCCCGAG AGCCACAAGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
1081 CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
1141 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGTT GGACTCCGAC
1201 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
1261 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1321 TCCCTGTCTC CCGGTTGA（配列番号８５）

ＶＨ３に基づく重鎖の核酸配列：

1 GAGGTGCAGG TGGTGGAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGGCTC CCTGAGGCTG
61 TCCTGCAAGG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAAGCAGGCC
121 CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
181 AACCAGAAGT TCAAGGGCAA GTTCACCCTG TCCGCCGTGA CCTCCTCCAA CACCGCCTAC
241 CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
301 TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGCGCC
361 TCCACCAAGG GCCCATCCGT CTTCCCCCTG GCGCCCTGCT CCAGATCTAC CTCCGAGAGC
421 ACAGCCGCCC TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG
481 AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA
541 CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC GAAGACCTAC
601 ACCTGCAACG TAGATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGAGAGT TGAGTCCAAA
661 TATGGTCCCC CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAGTTCC TGGGGGGACC ATCAGTCTTC
721 CTGTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACTCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACGTGC
781 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA GGAAGACCCC GAGGTCCAGT TCAACTGGTA CGTGGATGGC
841 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAAGAGC AGTTCCAGAG CACGTACCGT
901 GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ACGGCAAGGA GTACAAGTGC
961 AAGGTCTCCA ACAAAGGCCT CCCGTCCTCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
1021 CAGCCCCGAG AGCCACAAGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
1081 CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
1141 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGTT GGACTCCGAC
1201 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
1261 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC

1321 TCCCTGTCTC CCGGTTGA（配列番号８６）

ＶＨ４に基づく重鎖の核酸配列：

1 GAGGTGCAGG TGGTGCAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGAGTC CCTGAGGCTG
61 TCCTGCAAGG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAAGCAGGCC
121 CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
181 AACCAGAAGT TCAAGGGCAA GTTCACCATC TCCGCCGACA CCTCCCCCAA CACCGCCTAC
241 CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
301 TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGCGCC
361 TCCACCAAGG GCCCATCCGT CTTCCCCCTG GCGCCCTGCT CCAGATCTAC CTCCGAGAGC
421 ACAGCCGCCC TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG
481 AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA
541 CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC GAAGACCTAC
601 ACCTGCAACG TAGATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGAGAGT TGAGTCCAAA
661 TATGGTCCCC CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAGTTCC TGGGGGGACC ATCAGTCTTC
721 CTGTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACTCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACGTGC
781 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA GGAAGACCCC GAGGTCCAGT TCAACTGGTA CGTGGATGGC
841 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAAGAGC AGTTCCAGAG CACGTACCGT
901 GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ACGGCAAGGA GTACAAGTGC
961 AAGGTCTCCA ACAAAGGCCT CCCGTCCTCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
1021 CAGCCCCGAG AGCCACAAGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
1081 CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
1141 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGTT GGACTCCGAC
1201 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
1261 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1321 TCCCTGTCTC CCGGTTGA（配列番号８７）

ＶＨ５に基づく重鎖の核酸配列：

1 GAGGTGCAGG TGCAGCAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGGCTC CTGAGGCTG
61 TCCTGCAAGG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAAGCAGGCC
121 CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCGCC ATCTACCCCG GGAATTCTGA CACCTCCTAC
181 AACCAGAAGT TCAAGGGCAA GGCCACCCTG TCCGCCGTGA CCTCCCCCAA CACCGCCTAC
241 CTGCAGATGA ACTCCCTGAA GACCGAGGAC ACCGCCGTGT ACTACTGCAC CACCACCACC
301 TACGGCTACG ACTGGTTCGC CTACTGGGGC CAGGGCACCC TGGTGACCGT CTCGAGCGCC
361 TCCACCAAGG GCCCATCCGT CTTCCCCCTG GCGCCCTGCT CCAGATCTAC CTCCGAGAGC
421 ACAGCCGCCC TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG
481 AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA
541 CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC GAAGACCTAC
601 ACCTGCAACG TAGATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGAGAGT TGAGTCCAAA
661 TATGGTCCCC CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAGTTCC TGGGGGGACC ATCAGTCTTC
721 CTGTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACTCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACGTGC
781 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA GGAAGACCCC GAGGTCCAGT TCAACTGGTA CGTGGATGGC
841 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAAGAGC AGTTCCAGAG CACGTACCGT
901 GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ACGGCAAGGA GTACAAGTGC
961 AAGGTCTCCA ACAAAGGCCT CCCGTCCTCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
1021 CAGCCCCGAG AGCCACAAGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
1081 CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
1141 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGTT GGACTCCGAC
1201 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
1261 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1321 TCCCTGTCTC CCGGTTGA（配列番号８８）

ＶＨ６に基づく重鎖の核酸配列：

1 GAGGTGCAGG TGGTGGAGTC CGGCGGCGGC CTGGTGAAGC CCGGCGGCTC CCTGAGGCTG
61 TCCTGCGCCG CCTCCGGCTA CACCTTCACC TCCTACTGGA TGCACTGGGT GAGGCAGGCC
121 CCCGGCAAGG GCCTGGAGTG GGTGGGCAGG ATCAAGTCCA AGACCGACGG CGGTACCACC
181 GACTACGCCG CCCCCGTGAA GGGCAGGTTC ACCATCTCCG CCGACACCTC CAAGAACACC
241 CTGTACCTGC AGATGAACTC CCTGAAGACC GAGGACACCG CCGTGTACTA CTGCACCACC
301 ACCACCTACG GCTACGACTG GTTCGCCTAC TGGGGCCAGG GCACCCTGGT GACCGTCTCG
361 AGCGCCTCCA CCAAGGGCCC ATCCGTCTTC CCCCTGGCGC CCTGCTCCAG ATCTACCTCC
421 GAGAGCACAG CCGCCCTGGG CTGCCTGGTC AAGGACTACT TCCCCGAACC GGTGACGGTG
481 TCGTGGAACT CAGGCGCCCT GACCAGCGGC GTGCACACCT TCCCGGCTGT CCTACAGTCC
541 TCAGGACTCT ACTCCCTCAG CAGCGTGGTG ACCGTGCCCT CCAGCAGCTT GGGCACGAAG
601 ACCTACACCT GCAACGTAGA TCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GAGAGTTGAG
661 TCCAAATATG GTCCCCCATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG AGTTCCTGGG GGGACCATCA
721 GTCTTCCTGT TCCCCCCAAA ACCCAAGGAC ACTCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC
781 ACGTGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCAGGAA GACCCCGAGG TCCAGTTCAA CTGGTACGTG
841 GATGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AAGAGCAGTT CCAGAGCACG
901 TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC
961 AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGGCCTCCCG TCCTCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC
1021 AAAGGGCAGC CCCGAGAGCC ACAAGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC
1081 AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
1141 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGTTGGAC
1201 TCCGACGGCT CCTTCTTCCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG
1261 GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG
1321 AGCCTCTCCC TGTCTCCCGG TTGA（配列番号８９）

【０２７２】

以下は、上述のヒト化ＡＬＵＬＡＶＬ０－ＶＬ４設計に基づく軽鎖をコードする例示的核酸配列である。これらの軽鎖は、ヒトＩｇＧ４Ｐのカッパ軽鎖定常領域を含む定常領域を含んでいる。

ＶＬ０に基づく重鎖の核酸配列：

1 GACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCTCC GTGTCCGCCT CCGTGGGCGA CAGGGTGACC
61 ATCACCTGCA AGTCCTCCCA GTCCGTGCTG TACAGCTCCA ACCAGAAGAA CTACCTGGCC
121 TGGTACCAGC AGAAGCCCGG CAAGGCCCCC AAGCTGCTGA TCTACTGGGC CTCCACCAGG
181 GAGTCCGGCG TGCCCTCCAG GTTCTCCGGC TCCGGCTCCG GCACCGACTT CACCCTGACC
241 ATCTCCTCCC TGCAGCCCGA GGACTTCGCC ACCTACTACT GCCACCAGTA CCTCTCGAGC
301 CTGACCTTCG GCCAGGGCAC CAAGGTGGAG ATCAAGCGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC
361 TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG
421 CTGAATAACT TCTATCCCAG AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA
481 TCGGGTAACT CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
541 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA CGCCTGCGAA
601 GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT TCAACAGGGG AGAGTGTTGA
（配列番号９０）

ＶＬ１に基づく重鎖の核酸配列：

1 GACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCTCC CTGTCCGCCT CCGTGGGCGA CAGGGTGACC
61 ATGACCTGCA AGTCCTCCCA GTCCGTGCTG TACAGCTCCA ACCAGAAGAA CTACCTGGCC
121 TGGTACCAGC AGAAGCCCGG CAAGGCCCCC AAGCTGCTGA TCTACTGGGC CTCCACCAGG
181 GAGTCCGGCG TGCCCGACAG GTTCTCCGGC TCCGGCTCCG GCACCGACTT CACCCTGACC
241 ATCTCCTCCC TGCAGCCCGA GGACTTCGCC ACCTACTACT GCCACCAGTA CCTCTCGAGC
301 CTGACCTTCG GCCAGGGCAC CAAGCTGGAG ATCAAGCGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC
361 TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG
421 CTGAATAACT TCTATCCCAG AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA
481 TCGGGTAACT CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC

541 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA CGCCTGCGAA
601 GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT TCAACAGGGG AGAGTGTTGA

（配列番号９１）

ＶＬ２に基づく重鎖の核酸配列：

1 AACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCTCC CTGTCCGCCT CCGTGGGCGA CAGGGTGACC
61 ATGTCCTGCA AGTCCTCCCA GTCCGTGCTG TACAGCTCCA ACCAGAAGAA CTACCTGGCC
121 TGGTACCAGC AGAAGCCCGG CAAGTCCCCC AAGCTGCTGA TCTACTGGGC CTCCACCAGG
181 GAGTCCGGCG TGCCCGACAG GTTCACCGGC TCCGGCTCCG GCACCGACTT CACCCTGACC
241 ATCTCCTCCC TGCAGCCCGA GGACTTCGCC ACCTACTACT GCCACCAGTA CCTCTCGAGC
301 CTGACCTTCG GCCAGGGCAC CAAGCTGGAG ATCAAGCGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC
361 TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG
421 CTGAATAACT TCTATCCCAG AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA
481 TCGGGTAACT CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
541 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA CGCCTGCGAA
601 GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT TCAACAGGGG AGAGTGTTGA

（配列番号９２）

ＶＬ３に基づく重鎖の核酸配列：

1 GACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCTCC CTGACCGTGT CCGTGGGCGA CAGGGTGACC
61 ATGTCCTGCA AGTCCTCCCA GTCCGTGCTG TACAGCTCCA ACCAGAAGAA CTACCTGGCC
121 TGGTACCAGC AGAAGCCCGG CAAGTCCCCC AAGCTGCTGA TCTACTGGGC CTCCACCAGG
181 GAGTCCGGCG TGCCCGACAG GTTCACCGGC TCCGGCTCCG GCACCGACTT CACCCTGACC
241 ATCTCCTCCG TGCAGCCCGA GGACTTCGCC ACCTACTACT GCCACCAGTA CCTCTCGAGC
301 CTGACCTTCG GCGCCGGCAC CAAGCTGGAG ATCAAGCGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC
361 TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG
421 CTGAATAACT TCTATCCCAG AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA
481 TCGGGTAACT CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
541 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA CGCCTGCGAA
601 GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT TCAACAGGGG AGAGTGTTGA

（配列番号９３）

ＶＬ４に基づく重鎖の核酸配列：

1 GACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCTCC CTGTCCGCCT CCGTGGGCGA CAGGGTGACC
61 ATGACCTGCA AGTCCTCCCA GTCCGTGCTG TACAGCTCCA ACCAGAAGAA CTACCTGGCC
121 TGGTACCAGC AGAAGCCCGG CAAGGCCCCC AAGCTGCTGA TCTACGCCGC CTCCTCCCTG
181 CAGTCCGGCG TGCCCTCCAG GTTCTCCGGC TCCGGCTCCG GCACCGACTT CACCCTGACC
241 ATCTCCTCCC TGCAGCCCGA GGACTTCGCC ACCTACTACT GCCACCAGTA CCTCTCGAGC
301 CTGACCTTCG GCCAGGGCAC CAAGCTGGAG ATCAAGCGAA CTGTGGCTGC ACCATCTGTC
361 TTCATCTTCC CGCCATCTGA TGAGCAGTTG AAATCTGGAA CTGCCTCTGT TGTGTGCCTG
421 CTGAATAACT TCTATCCCAG AGAGGCCAAA GTACAGTGGA AGGTGGATAA CGCCCTCCAA
481 TCGGGTAACT CCCAGGAGAG TGTCACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
541 AGCAGCACCC TGACGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAAGTCTA CGCCTGCGAA
601 GTCACCCATC AGGGCCTGAG CTCGCCCGTC ACAAAGAGCT TCAACAGGGG AGAGTGTTGA

（配列番号９４）

【０２７３】

実施例１０：ＭＡｂ／ＦａｂのＦＡＣＳ結合

この実験は、マウスＢａＦ３細胞上に安定発現させた細胞表面発現αｖβ５に対するＡＬＵＬＡ－Ｈ４／Ｌ２－ＩｇＧ４．Ｐ（Ｓ２２８Ｐ）／ＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｑ）の親和性を確認するために実施した。より少数の細胞を用いて結合曲線を作成して、抗体は細胞上の受容体を単に滴定していたわけではないことを確認した。実験あたり１０，０００個の細胞を用いて、ｍＡｂのK_D値を０．０８±０．０２ｎＭと決定し、一価ＦａｂのK_D値を０．４２±０．０３と決定した。

【０２７４】
実施例１１：ヒト化ＡＬＵＬＡコンストラクトの安定性
すべてアグリコシル化ＩｇＧ４．Ｐ（Ｓ２２８Ｐ）／ＩｇＧ１（Ｎ２９７Ｑ）ドメインを含んでいる精製ヒト化ＡＬＵＬＡ抗体ＶＨ２／ＶＬ２、ＶＨ４／ＶＬ０、ＶＨ４／ＶＬ２、及びＶＨ５／ＶＬ２の熱安定性を、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）により決定した（表５を参照のこと）。これらを同じＦｃドメインに発現させた基準ヒト化αｖβ５設計（設計リファレンスＨ１及び設計リファレンスＬ１；実施例１参照）の対応する値と比較した。

【０２７５】
各抗体で、定常ドメインのＣＨ２領域とＣＨ３領域の（それぞれ５７～５９℃と８４～８５℃での）アンフォールディング、及び可変ドメイン及びＣＨ１定常ドメインを含むＦａｂ領域の（６９～７３℃での）アンフォールディングに対応する、３つの明白なトランジションが観察された。バージョンＶＨ４／ＶＬ２、ＶＨ４／ＶＬ０、及びＶＨ２／ＶＬ２のＦａｂ領域はそれぞれ、ＶＨ５／ＶＬ２または基準ヒト化αｖβ５設計抗体よりもわずかに高い融解温度（Ｔｍ）を有し、より高い熱安定性を示した。なお、ＶＨ４及びＶＨ２重鎖はいずれも１６番目にグルタミン酸残基を有しており、ＶＨ５はこの位置にグリシンを有しており、基準ヒト化αｖβ５設計はアラニンを有している。各ｍＡｂのＡｇｌｙ－ＩｇＧ１（Ｔ２９９Ａ）バージョンのパパイン切断により一価Ｆａｂ断片を作製し、単離されたＦａｂの熱安定性を測定した。ＶＨ２／ＶＬ２、ＶＨ４／ＶＬ０、及びＶＨ４／ＶＬ２の各Ｆａｂは、７５．４～７６．３のＴｍ値を有し、ＶＨ５／ＶＬ２のＦａｂのＴｍは７２．１で、無傷のｍＡｂのこの領域で観察された熱安定性の差異と一貫していた。

【表５】
表５　ＤＳＣを用いて決定された抗体の熱安定性

抗体	Tm(℃)		
	CH2	Fab (V_HV_L + CH1)	CH3
基準ヒト化 αvβ5 設計 hIgG4P agly/hIgG1(CH3)	57.1	70.7	84.2
H2L2 hIgG4P agly / hIgG1(CH3)	57.6	72.7	84.9
H4L0 hIgG4P agly / hIgG1(CH3)	56.5	72.8	84.8
H4L2 hIgG4P agly / hIgG1(CH3)	57.0	72.4	84.8
H5L2 hIgG4P agly / hIgG1(CH3)	59.9	69.3	84.3
H2L2 hIgG1 Fab	-	75.9	-
H4L0 hIgG1 Fab	-	76.3	-
H4L2 hIgG1 Fab	-	75.4	-
H5L2 hIgG1 Fab	-	72.1	-

【０２７６】
実施例１２：Ｈ４／Ｌ２のＦＡＣＳ直接結合アッセイ
Ｈ４／Ｌ２抗体（配列番号６９及び７０）の、細胞表面に発現したαｖβ５への結合を、ヒトαｖ及びヒトβ５インテグリンサブユニットで安定同時形質移入されたＢａＦ３細胞のフローサイトメトリーを用いて決定した。ＢａＦ３細胞は、起源未定のマウスＩＬ－３依存性造血細胞株である。これらの細胞は、マウスアルファ－Ｖ（ならびにアルファ－４、アルファ－５、及びベーター１インテグリン）を内因的に発現するが、ベーター５またはベーター６インテグリンは発現しない。

【０２７７】
Ｈ４／Ｌ２抗体を、氷上で３０分間、ＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ、１％ＢＳＡ、１ｍＭの$CaCl_2$、１ｍＭの$MgCl_2$）中の細胞に加えた。洗浄後、結合した抗体を抗ヒト－ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）４８８二次抗体を用いて検出した。１％パラホルムア

ルデヒド中に固定した細胞をＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒに集めて、平均蛍光強度をＦｌｏｗＪｏソフトウェアを用いて分析した。

【０２７８】

Ｈ４／Ｌ２抗体は、αｖβ５－ＢａＦ３細胞に特異的に結合し、親ＢａＦ３細胞への検出可能な結合はなかった。Ｈ４／Ｌ２抗体の結合は用量依存的であり、EC_{50}は３ｎＭであった。

【０２７９】

実施例１３：Ｈ４／Ｌ２抗体の見かけ結合親和性

Ｈ４／Ｌ２抗体（配列番号６９及び７０）の固定化ヒトαｖβ５（ｈｓ　αｖβ５）に対する見かけ結合親和性を、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）により決定した。精製ｈｓαｖβ５タンパク質を９６ウェルＥＬＩＳＡプレートに２μｇ／ｍＬで直接コートして、Ｈ４／Ｌ２抗体の結合を西洋わさびペルオキシダーゼを結合させたロバ抗ヒトＩｇＧポリクローナル抗体を用いて検出した。このフォーマットでは、αｖβ５に対するＨ４／Ｌ２抗体のEC_{50}は約６５ｐＭであった。

【０２８０】

実施例１４：製造可能性の評価

開発可能性及び製造可能性に関し重要な状況での安定性に関して、Ｈ４／Ｌ２抗体を他の３種（Ｈ４／Ｌ０、Ｈ５／Ｌ２、及びＨ２／Ｌ２）とともに評価した。生物学的治療剤の製造過程の一部として、化合物は、あらゆる潜在的な汚染ウイルスを不活性化するために、低ｐＨで長時間インキュベートされることが多い。モノクローナル抗体の標準的な精製手順にも低ｐＨ条件が組み込まれ得る。したがって、低ｐＨでの安定性は、重要な属性であり得る。何週間かにわたる広範なｐＨでのスクリーニングで、これらの各コンストラクトは、低ｐＨでの複数の測定で、安定性が低下していることが示された（図６Ａ）。しかし、Ｈ４／Ｌ２は、１種を除く他のコンストラクトと比べて断片化が少ないことを示した（図６Ｂ）。Ｈ４／Ｌ２もその他もこのｐＨ範囲では凝集性が高かったが、モノマーの完全性については、Ｈ４／Ｌ２は他の全てのコンストラクトよりも高いレベルを維持した（図６Ｃ）。

【０２８１】

立体構造の安定性を、広範なｐＨの複数の試験で、複数の緩衝系で、及び一般的な賦形剤を含めて、示差走査熱量測定（ＤＳＣ）により評価した。立体構造の安定性に関し、Ｈ４／Ｌ２は、Ｈ５／Ｌ２以外の他のコンストラクトと同等だったが、Ｈ５／Ｌ２は、他のすべてのコンストラクトと比べてこの測定では一貫して安定性が低かった。

【０２８２】

一般的なストレス（たとえば高温、撹拌、または冷凍解凍）に対するタンパク質の安定性は、製造可能性に関しても計画された在庫期間に関しても非常に望ましい。加速的過酷条件下での安定性は、最適条件で保管されるタンパク質のリアルタイムの長期的安定性を予想する場合にツールとしてよく利用される。通常５℃で保管される生物製剤の場合、加速条件は、２５℃／６０％ＲＨ（相対湿度）及び４０℃／７５％ＲＨからなることが多い。高濃度では、加速条件（４０℃／７５％ＲＨ）で、全コンストラクトの凝集的挙動が増加した。しかし、ほとんどの製剤及びｐＨで、Ｈ４／Ｌ２は、加速温度条件での凝集に対する耐性がもっとも高かった（図７Ａ）。この効果は、撹拌に対しても（図７Ｂ）、冷凍解凍に対しても（図７Ｃ）、観察された。高温、撹拌、及び冷凍解凍などのストレスに対する安定性は、タンパク質製造可能性に関しても計画された在庫期間に関しても非常に望ましい。

【０２８３】

実施例１５：腎虚血モデルにおける抗αｖβ５抗体の有効性

ラット片側虚血クランプモデルを用いて、腎虚血予防におけるヒト化抗αｖβ５抗体の有効性を試験した。５～６匹のラットを、単回投与のＨ４／Ｌ２抗体（配列番号６９及び７０を含む）または対照抗体（１Ｅ６）１、１０、または５０ｍｇ／ｋｇで処置し、６時間後に腎動脈をクランプした。ベースライン時と、クランプから４８時間後に血液を採取

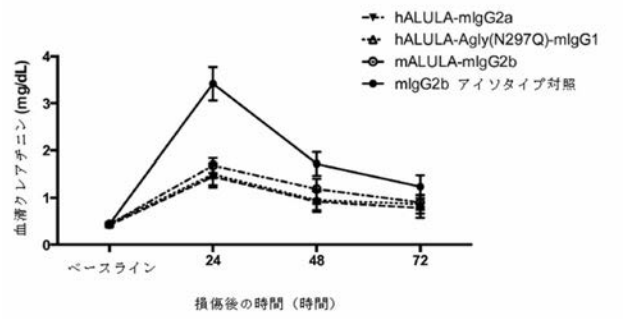
して、血清クレアチニンレベルを評価した。単回用量の抗αｖβ５抗体は、術後の虚血誘発性の血清クレアチニン上昇を有意に減じることができた（図５；＊対照抗体に対しＰ＜０．０５；エラーバー＝ＳＤ）。

【０２８４】

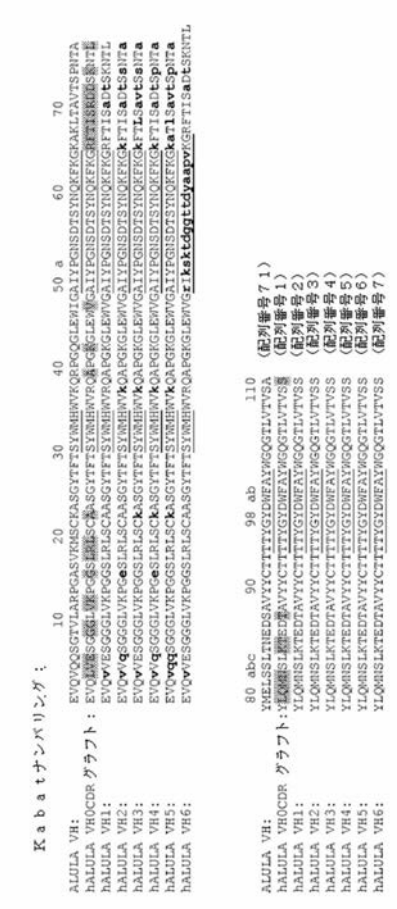
他の実施形態

本発明の詳細な説明と併せて、本発明を説明してきたが、上記の説明の目的は例示であって、本発明の範囲の限定ではなく、本発明の範囲は、添付の請求項により定められるものである。他の態様、利点、及び変更形態は、以下の請求項の範囲内である。

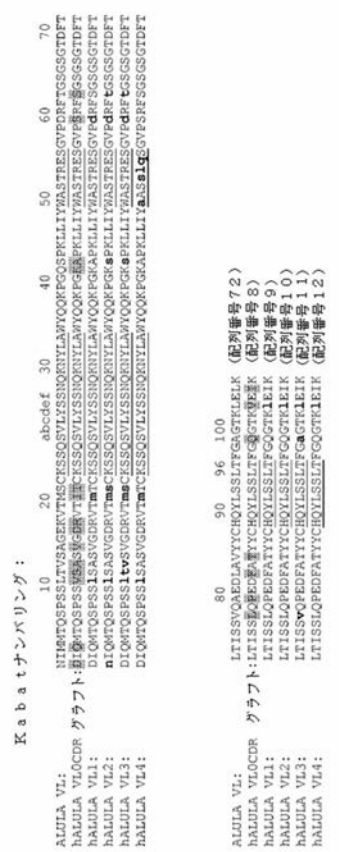
【図１】



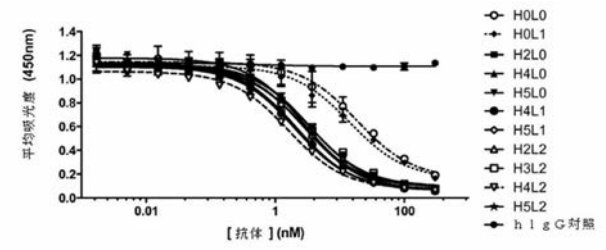
【図２】



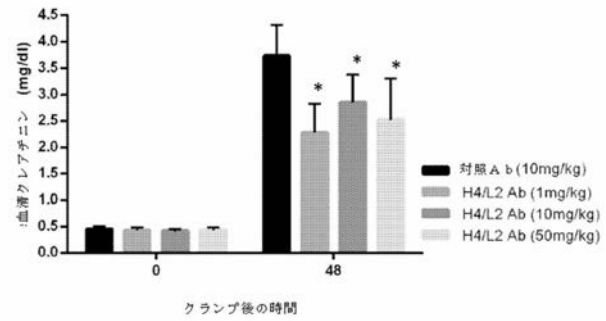
【図３】



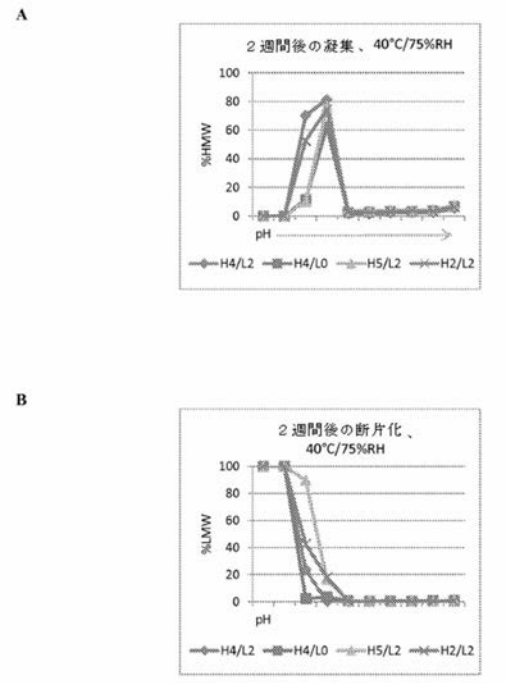
【図４】



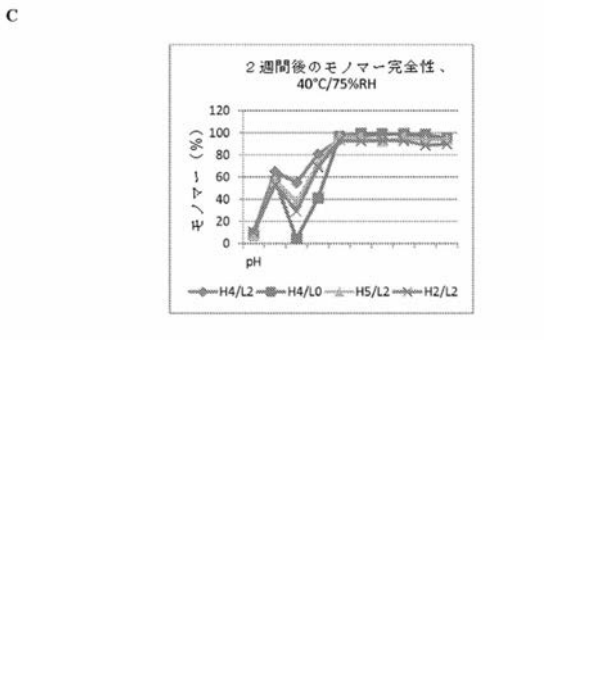
【図５】



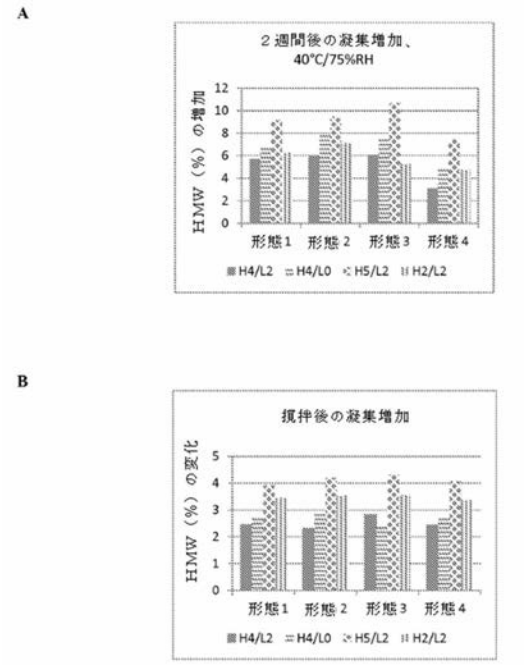
【図６ＡＢ】



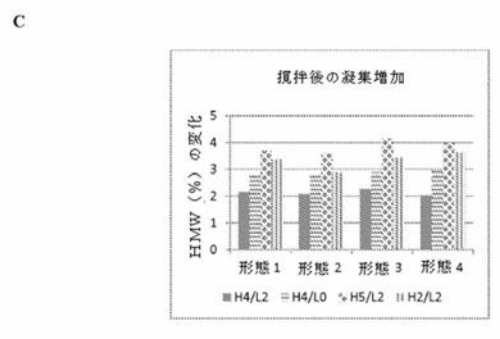
【図６Ｃ】



【図７ＡＢ】



【図７Ｃ】



【配列表】

2017534252000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/049746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/31248 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; JOHANSON KYUNG O [US]; JONAK ZDENKA L [U) 2 June 2000 (2000-06-02) the whole document in particular, pages 2 and 20	1-53
Y	US 2005/226865 A1 (SHEPPARD DEAN [US] ET AL) 13 October 2005 (2005-10-13) the whole document in particular, pages 1 and 5	1-53
Y	WO 2011/011775 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; SHEPPARD DEAN [US]; SU GEORGE [US]; ATAKILIT AMH) 27 January 2011 (2011-01-27) the whole document in particular, pages 2, 3, 19 and 34	1-53

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
11 November 2015	02/12/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Pérez-Mato, Isabel

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/049746

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/12501 A2 (CENTOCOR INC [US]) 14 February 2002 (2002-02-14) the whole document in paritcular, pages 42-44 and 70-74	1-53
Y	"CNTO 95, a fully human monoclonal antibody to integrins alpha v beta3 and alpha v beta5 has direct anti-tumor and antiangiogenic activity", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON, GB, vol. 38, 1 November 2002 (2002-11-01), page S77, XP004403685, ISSN: 0959-8049 abstract	1-53
Y	WO 2012/027745 A1 (UNIV MIAMI [US]; REISER JOCHEN [US]) 1 March 2012 (2012-03-01) the whole document in particular, pages 17-20	1-53
Y	US 7 053 041 B1 (BROOKS PETER C [US] ET AL) 30 May 2006 (2006-05-30) the whole document in particular, cols. 4, 5 and 25	1-53
Y	US 2014/127241 A1 (LEUSCHNER CAROLA [US] ET AL) 8 May 2014 (2014-05-08) sequence 49 page 10 - page 13	1-24,29

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/049746

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0031248 A1	02-06-2000	AT 348882 T	15-01-2007
		DE 69934515 T2	27-09-2007
		EP 1135477 A1	26-09-2001
		ES 2279646 T3	16-08-2007
		JP 2002530108 A	17-09-2002
		US 6160099 A	12-12-2000
		US 2003004317 A1	02-01-2003
		WO 0031248 A1	02-06-2000
US 2005226865 A1	13-10-2005	AU 2005229015 A1	13-10-2005
		CA 2562038 A1	13-10-2005
		CN 1964740 A	16-05-2007
		DK 1734996 T3	10-06-2013
		EP 1734996 A2	27-12-2006
		EP 2394662 A2	14-12-2011
		ES 2411965 T3	09-07-2013
		HK 1098077 A1	22-11-2013
		HR P20130782 T1	30-09-2013
		JP 5223072 B2	26-06-2013
		JP 5681149 B2	04-03-2015
		JP 2007531733 A	08-11-2007
		JP 2013028611 A	07-02-2013
		PT 1734996 E	18-07-2013
		RS 52918 B	28-02-2014
		US 2005226865 A1	13-10-2005
		US 2009280118 A1	12-11-2009
		WO 2005094391 A2	13-10-2005
WO 2011011775 A1	27-01-2011	AU 2010275367 A1	02-02-2012
		CA 2767409 A1	27-01-2011
		CN 102481347 A	30-05-2012
		EP 2456460 A1	30-05-2012
		JP 5755647 B2	29-07-2015
		JP 2013500269 A	07-01-2013
		KR 20120052312 A	23-05-2012
		US 2012328604 A1	27-12-2012
		WO 2011011775 A1	27-01-2011
WO 0212501 A2	14-02-2002	AT 470714 T	15-06-2010
		AU 8316701 A	18-02-2002
		AU 2001283167 A2	18-02-2002
		BR 0113112 A	20-04-2004
		CA 2418962 A1	14-02-2002
		CN 1468307 A	14-01-2004
		DK 1309693 T3	27-09-2010
		EP 1309693 A2	14-05-2003
		EP 2253646 A1	24-11-2010
		ES 2346041 T3	08-10-2010
		HR P20030088 A2	30-04-2007
		HU 0302128 A2	29-09-2003
		JP 5014557 B2	29-08-2012
		JP 2004510414 A	08-04-2004
		KR 20030022369 A	15-03-2003
		MX PA03001230 A	29-01-2004
		NO 20030621 A	01-04-2003
		NZ 524146 A	25-11-2005
		PL 366211 A1	24-01-2005
		PT 1309693 E	09-08-2010

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2015/049746

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2003040044 A1	27-02-2003
		WO 0212501 A2	14-02-2002
		YU 9403 A	25-05-2006
WO 2012027745 A1	01-03-2012	EP 2608804 A1	03-07-2013
		US 2012213775 A1	23-08-2012
		WO 2012027745 A1	01-03-2012
US 7053041 B1	30-05-2006	US 7053041 B1	30-05-2006
		US 2006165703 A1	27-07-2006
US 2014127241 A1	08-05-2014	AU 2013337926 A1	07-05-2015
		CA 2889475 A1	08-05-2014
		EP 2914633 A1	09-09-2015
		IL 238323 A	30-06-2015
		KR 20150095637 A	21-08-2015
		US 2014127241 A1	08-05-2014
		WO 2014070957 A1	08-05-2014

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*13/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｃ	
Ａ６１Ｐ	*11/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12		
Ａ６１Ｐ	*9/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00		
Ａ６１Ｐ	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00		
Ａ６１Ｐ	*31/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ	*9/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04		
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10		
Ｃ０７Ｋ	*16/46*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
			Ｃ０７Ｋ	16/46		

(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,TJ,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,RO,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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,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,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 クラッカウアー, マイケル アダム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４９２, ニーダム, プリマス ロード １４８
(72)発明者 ドリンスキ, ブライアン エム.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２０３８, フランクリン, グウィン ロード ５
(72)発明者 ハンフ, カール ジェイ. エム.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１８２１, ビレリカ, リッジ ロード ９
(72)発明者 マッカーリー, エイミー セレサ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１２５, ボストン, バットンウッド ストリート ３１ アパートメント １
(72)発明者 ペダーソン, ネルス エリック
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２０４８, マンスフィールド, パティズ ロード ７１
(72)発明者 プレイアー, マーティン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４４, サマービル, ウェストン アベニュー ４３ ナンバービー
(72)発明者 チャン, ファン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１７７２, サウスボロー, ムーニー レーン ９
(72)発明者 バイオレット, シェリア エム.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２４２０, レキシントン, シモンズ ロード ９１
(72)発明者 ウェインレブ, ポール ヘンリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０１８１０, アンドーバー, ブランドレット アベニュー １８

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 BJ12 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90Y AA91X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C085 AA13 BB36 BB41 BB43 CC23 DD21 DD61 DD62 EE01 GG02 GG03 GG04 GG06
4H045 AA11 AA20 AA30 BA50 BA57 BA71 BA72 CA40 DA76 EA20 FA74