

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7366886号  
(P7366886)

(45)発行日 令和5年10月23日(2023.10.23)

(24)登録日 令和5年10月13日(2023.10.13)

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15

請求項の数 25 (全78頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-514709(P2020-514709)	(73)特許権者	595006223 ナショナル リサーチ カウンシル オブ カナダ カナダ国, オンタリオ ケ-1エー 0ア ール6, オタワ, モントリオール ロード 1200
(86)(22)出願日	平成30年9月10日(2018.9.10)	(74)代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(65)公表番号	特表2020-533004(P2020-533004 A)	(74)代理人	100162352 弁理士 酒巻 順一郎
(43)公表日	令和2年11月19日(2020.11.19)	(74)代理人	100123995 弁理士 野田 雅一
(86)国際出願番号	PCT/CA2018/051108	(72)発明者	ヘンリー, ケヴィン カナダ, オンタリオ州 ケ-1ジー 0 イ-6, オタワ, リバーサイド ドラ 最終頁に続く
(87)国際公開番号	WO2019/051586		
(87)国際公開日	平成31年3月21日(2019.3.21)		
審査請求日	令和3年9月9日(2021.9.9)		
(31)優先権主張番号	62/557,870		
(32)優先日	平成29年9月13日(2017.9.13)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 A X L 特異的抗体及びその使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト A X L エクトドメイン ( E C D ) の免疫グロブリン様 ( I g L ) ドメインにおけるエピトープに特異的に結合する、単離又は精製された抗体であって、前記抗体が、

それぞれ配列番号 8 0 、 8 1 、 及び 8 2 の可変軽鎖 ( V L ) C D R 1 、 C D R 2 、 及び C D R 3 配列、並びに、それぞれ配列番号 7 7 、 7 8 、 及び 7 9 の可変重鎖 ( V H ) C D R 1 、 C D R 2 、 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 8 6 、 8 7 及び 8 8 の V L C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 配列、並びに、それぞれ配列番号 8 3 、 8 4 及び 8 5 のそれぞれの V H C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 9 2 、 9 3 、 及び 9 4 の V L C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 配列、並びに、それぞれ配列番号 8 9 、 9 0 、 及び 9 1 の V H C D R 1 、 C D R 2 、 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 9 8 、 9 9 及び 1 0 0 の V L C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 配列、並びに、それぞれ配列番号 9 5 、 9 6 及び 9 7 の V H C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 1 0 4 、 1 0 5 及び 1 0 6 の V L C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 配列、並びに、それぞれ配列番号 1 0 1 、 1 0 2 及び 1 0 3 の V H C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 1 1 0 、 1 1 1 及び 1 1 2 の V L C D R 1 、 C D R 2 及び C D R 3

10

20

配列、並びに、それぞれ配列番号 107、108 及び 109 の V H C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 116、117 及び 118 の V L C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列、並びに、それぞれ配列番号 113、114 及び 115 の V H C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 127、128 及び 129 の 単一ドメイン ( s d ) 重鎖可変 ( V H H ) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 130、131 及び 132 の V H H C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 133、134 及び 135 の V H H C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 136、137 及び 138 の V H H C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 139、140 及び 141 の V H H C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 142、143 及び 144 の V H H C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；

それぞれ配列番号 145、146 及び 147 の V H H C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；又は

それぞれ配列番号 148、149 及び 150 の V H H C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列

を含む、抗体。

【請求項 2】

I g A、I g D、I g E、I g G、又はI g M由来のフレームワーク領域を含むか、全長I g G、F v、s c F v、F a b、又はF ( a b ' )<sub>2</sub>、V H H、V L、又はV H を含むか、及び / 或いは、

ヒト A X L エクトドメインに対して 50 n M 以上の平衡解離定数 ( K D ) を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

ヒト化抗体、キメラ抗体、又は二重特異性抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗体が、ヒト I g G 1 由来のフレームワーク領域を含むキメラ抗体である、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

キメラ抗体が、ヒトカッパ軽鎖及びヒト I g G 重鎖由来のフレームワーク領域を含む、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体が、

配列番号 39 と 90 % 以上の同一性を有する V H 配列、及び配列番号 38 と 90 % 以上の同一性を有する V L 配列；

配列番号 41 と 90 % 以上の同一性を有する V H 配列、及び配列番号 40 と 90 % 以上の同一性を有する V L 配列；

配列番号 43 と 90 % 以上の同一性を有する V H 配列、及び配列番号 42 と 90 % 以上の同一性を有する V L 配列；

配列番号 45 と 90 % 以上の同一性を有する V H 配列、及び配列番号 44 と 90 % 以上の同一性を有する V L 配列；

配列番号 47 と 90 % 以上の同一性を有する V H 配列、及び配列番号 46 と 90 % 以上の同一性を有する V L 配列；

配列番号 73 と 90 % 以上の同一性を有する V H 配列、及び配列番号 74 と 90 % 以上の同一性を有する V L 配列；

10

20

30

40

50

配列番号 7 5 と 9 0 % 以上の同一性を有する V H 配列、及び配列番号 7 6 と 9 0 % 以上の同一性を有する V L 配列；

配列番号 1 1 9 と 9 0 % 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 1 2 0 と 9 0 % 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 1 2 1 と 9 0 % 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 1 2 2 と 9 0 % 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 1 2 3 と 9 0 % 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 1 2 4 と 9 0 % 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 1 2 5 と 9 0 % 以上の同一性を有する V H H 配列；又は

配列番号 1 2 6 と 9 0 % 以上の同一性を有する V H H 配列

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 7】

前記抗体が、

配列番号 3 9 の V H 配列、及び配列番号 3 8 の V L 配列；

配列番号 4 1 の V H 配列、及び配列番号 4 0 の V L 配列；

配列番号 4 3 の V H 配列、及び配列番号 4 2 の V L 配列；

配列番号 4 5 の V H 配列、及び配列番号 4 4 の V L 配列；

配列番号 4 7 の V H 配列、及び配列番号 4 6 の V L 配列；

配列番号 7 3 の V H 配列、及び配列番号 7 4 の V L 配列；

配列番号 7 5 の V H 配列、及び配列番号 7 6 の V L 配列；

配列番号 1 1 9 の V H H 配列；

配列番号 1 2 0 の V H H 配列；

配列番号 1 2 1 の V H H 配列；

配列番号 1 2 2 の V H H 配列；

配列番号 1 2 3 の V H H 配列；

配列番号 1 2 4 の V H H 配列；

配列番号 1 2 5 の V H H 配列；又は

配列番号 1 2 6 の V H H 配列

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

20

【請求項 8】

抗体がバイパラトピック抗体であり、かつ、

配列番号 1 1 9 及び配列番号 1 2 3 のアミノ酸配列；又は

配列番号 1 1 9 及び配列番号 1 2 4 のアミノ酸配列

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

30

【請求項 9】

薬物部分にコンジュゲートしている、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体を含む抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 10】

薬物部分が抗癌剤である、請求項 9 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 11】

請求項 9 に記載の抗体薬物コンジュゲート及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。

40

【請求項 12】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体をコードする核酸分子。

【請求項 13】

請求項 1 2 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 14】

請求項 1 3 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体を生成するヒト以外の生物。

50

**【請求項 16】**

表面に固定化されているか、及び／又は、  
カーゴ分子に連結されている、  
請求項 1～8 のいずれか一項に記載の抗体。

**【請求項 17】**

カーゴ分子が、検出可能な薬剤、治療剤、薬物、ペプチド、酵素、増殖因子、サイトカイン、受容体トラップ、その抗体、化学化合物、炭水化物部分、DNAベースの分子、細胞傷害性薬剤、又はウイルスベクターであるか、

カーゴ分子が、1 kDa～500 kDa のサイズであるか、及び／又は

カーゴ分子が 1 つ又は複数のリポソーム又はナノキャリアに充填されている、請求項 1  
6 に記載の抗体。

10

**【請求項 18】**

カーゴ分子が細胞傷害性薬剤であるか、

DNAベースの分子が、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロRNA、siRNA、又はプラスミドを含むか、

ウイルスベクターが、アデノウイルス、レンチウイルス又はレトロウイルスである、並びに／或いは、

ナノキャリアが、1 つ又は複数のナノ粒子、ナノワイヤ、ナノチューブ、又は量子ドットを含む、請求項 17 に記載の抗体。

**【請求項 19】**

20

AXL をインピトロで検出する方法であって、

a) 試料を、検出可能な薬剤に連結された、1 つ又は 2 つ以上の請求項 1～8 のいずれか一項に記載の単離又は精製された抗体と接触させるステップと、

b) 試料中の AXL に結合したその抗体に連結した検出可能な薬剤を検出するステップとを含む方法。

**【請求項 20】**

方法が循環細胞中の AXL を検出し、試料が血清試料であるか、及び／又は、

検出するステップが、光学的画像化、免疫組織化学、分子診断画像化、又はELISA を使用して行われる、

請求項 19 に記載の方法。

30

**【請求項 21】**

対象における AXL 発現を検出するための組成物であって、前記組成物は検出可能な薬剤に連結された、1 つ又は複数の請求項 1～8 のいずれか一項に記載の抗体を含み、前記検出は AXL に結合したその抗体に連結した検出可能な薬剤を検出することによって行われる、組成物。

**【請求項 22】**

対象の AXL を発現する細胞に目的の分子を輸送するための組成物であって、前記組成物は目的の分子に連結された、1 つ又は複数の請求項 1～8 のいずれか一項に記載の抗体を含み、前記抗体が AXL を発現する対象の細胞に目的の分子を送達する、組成物。

**【請求項 23】**

40

目的の分子が、検出可能な薬剤、治療剤、薬物、ペプチド、酵素、増殖因子、サイトカイン、受容体トラップ、その抗体、化学化合物、炭水化物部分、DNAベースの分子、細胞傷害性薬剤、又はウイルスベクターであるか、並びに／或いは

目的の分子が 1 つ又は複数のリポソーム又はナノキャリアに充填されている、請求項 2  
2 に記載の組成物。

**【請求項 24】**

ナノキャリアが、1 つ又は複数のナノ粒子、ナノワイヤ、ナノチューブ、又は量子ドットを含む、請求項 23 に記載の組成物。

**【請求項 25】**

請求項 1～8 のいずれか一項に記載の抗体を含む抗癌抗体薬物コンジュゲートを含む、

50

## 癌を処置するための医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

### 【技術分野】

〔 0 0 0 1 〕

### [ 関連出願の相互参照 ]

[0001]本出願は、参照により本明細書に組み入れられる、2017年9月13日に出願された米国仮特許出願第62/557,870号の優先権の利益を主張する。

【 0 0 0 2 】

[0002]本開示は、AXL特異的抗体及びその使用に関する。このような抗体は、細胞表面に発現したヒトAXLに結合し、融合体又は抗体-薬物コンジュゲートにおいて使用され得る。

## 【背景技术】

【 0 0 0 3 】

[0003]AXLは、Tyro3-AXL-Mer(TAM)受容体チロシンキナーゼサブファミリーのメンバーである。AXLドメイン構造の模式図を図1の先行技術の図に示す。AXLタンパク質の細胞外ドメイン(100)が示され、エクソン(1~20)が示されている。AXLタンパク質(100)は、2つの免疫グロブリン様ドメイン(102)及び2つのフィブロネクチンタイプIII(FNIII)リピート(104)を含む。膜貫通ドメイン(106)は細胞膜に広がり、その後に細胞内キナーゼドメイン(108)が続く。スプライシング(110で示される)は、わずかに短い転写物を生成する。

[ 0 0 0 4 ]

[0004]増殖停止特異的6(Gas6)、ビタミンK依存性タンパク質へのAXL細胞外ドメインの結合後、AXLは、複数の細胞型において、増殖、移動、凝集、及び抗炎症を含むいくつかの細胞機能に関与するシグナルを伝達することができる(Hollandら、2005年；Liら、2009年)。AXLは元々、慢性骨髓性白血病の発癌遺伝子として同定された(O'Bryanら、1991年)。その後、AXLの発現は、乳癌、胃癌、前立腺癌、卵巣癌、及び肺癌などの様々な癌において上方制御されることが報告されている(Lingerら、2008年；Paczekら、2014年)。

【 0 0 0 5 】

[0005] A X L はまた、上皮から間葉への移行 (Gjerdrumら、2010年)、悪性細胞の侵襲的運動性及び転移と密接に関連するプロセスに関与している。さらに、A X L 発現は、患者の生存と負に関連付けられることが示されている (Lingerら、2008年; Gjerdrumら、2010年)。最近のいくつかの研究では、A X L がいくつかの薬剤耐性の癌細胞株において過剰発現し、活性化されることが報告されている (Asieduら、2014年; Meyerら、2013年; Thomsonら、2011年)。これは、A X L は、化学療法及び他の分子標的療法への耐性に役割を果たす可能性があることを示唆している。最近、A X L 発現はまた、固形腫瘍がより大きくなり、より侵攻性になるにつれて頻繁に発生する状態である低酸素症 (Rankinら、2014年) の間に増加することが示されている。まとめると、これらのデータは、A X L を癌の有望な診断、予後、及び治療の標的として示唆する。

【 0 0 0 6 】

[0006]遺伝子ノックアウト又はRNAiを使用する最近の研究は、細胞株及びマウスモデルにおけるAXL阻害の治療的価値を検証している。さらに、いくつかの小分子AXL阻害剤が開発され、販売されていて、SKI-606としても公知であり、Pfizer Inc.の製品番号PF-5208763のBOSULIF(商標)という名称でPfizer Inc.から販売されているタンパク質チロシンキナーゼ阻害剤であるBOSTINTIB(商標)(Leeら、2014年); 製造番号XL184のCOMETRIQ(商標)という名称でExelixisから販売されているチロシンキナーゼc-Met及びVEGFR2の低分子阻害剤であるCABOZANTINIB(商標)(Yakesら、2011年); 及び製造番号SU11248のSUTENT(商標)の名称でPfizer Inc.から販売されているチロシンキナーゼc-Met及びVEGFR1/2の低分子阻害剤であるSUNITINIB(商標)(Yakesら、2007年)である。

zer Inc. から販売されているSUNITINIB(商標)(Kitagawaら、2013年)が挙げられる。これらの薬物は複数のキナーゼを標的とし、それらの主要なキナーゼ標的よりもAXL活性を効果的に阻害しない(Feneyrolesら、2014年)。

【0007】

[0007]現在、AXLの最も強力な選択的阻害剤であるBergenBio(Bergen、Norway)のBGB324TM(以前はR428として公知であった)及びRigel Pharmaceuticals(San Francisco, CA, USA)などの他の小分子薬物は、臨床及び前臨床開発の初期段階にある。IC<sub>50</sub>は14nMであり、試験した他のキナーゼよりもAXLに対してかなり選択的であることが示された(Hollandら、2010年)；しかしながら、それは、Tie-2、Flt-4、Flt-1、Ret、Ab1、並びにTAMファミリーの他のメンバーであるTyro-3及びMerの活性をなおも示す。これは、前臨床の乳房動物モデルにおいて血管新生及び転移を促進するAXLの機能を遮断し(Hollandら、2010)、侵襲性及び転移性の癌の処置のために2013年に臨床第I相に入った。小分子AXL阻害剤の開発は、AXLキナーゼドメインの3次元構造がない場合には困難であり、オフターゲット毒性の可能性は依然として主要な懸念事項である。

10

【0008】

[0008]小分子の欠点のいくつかを回避するために、抗AXL抗体が考慮され得る。Liら(2009年)は、Gas6結合を妨害せず、AXL活性化を阻害し、AXL下方制御を誘発し、及び皮下非小細胞肺癌(NSCLC)モデルにおける腫瘍異種移植片の成長を減少させるAXLに対するモノクローナル抗体(12A11)を開発した。その後、Yeら(2010年)は、ヒトとマウスの両方のAXLの細胞外ドメインを認識し、Gas6結合を遮断するモノクローナル抗体(YW327.6S2)を開発した。この抗体は、NSCLCモデル、並びに乳癌の同所性転移モデルにおける異種移植腫瘍の増殖を減少させている。さらに、YW327.6S2による処置は、NSCLC腫瘍成長の減少におけるエルロチニブ及び化学療法の効果を高め、並びに乳癌及びNSCLCマウス異種移植モデルにおける抗VEGF処置を強化した。Leconetら(2014年)は、Gas6結合を妨害せず、AXL活性化を阻害し、細胞表面からのその下方制御を誘発した抗AXLモノクローナル抗体について報告している。対象の抗体は、インビボで皮下と同所性膜腫瘍異種移植片の両方の増殖を減少させた。

20

【0009】

[0009]AXLの活性を減少させる治療用抗体の1つの欠点は、感度の本質的な欠如による生来の性質、又は処置の選択圧中に生じるバイパスメカニズムによる後天的性質のいずれかで、治療抵抗に遭遇する可能性があるということである。したがって、オフターゲット効果が少なく、毒性又は治療耐性が減少し又は許容され得る、活性であり、特異的なAXL阻害剤が必要である。

30

【0010】

[0010]抗体-薬物コンジュゲートは、典型的にはリンカーを介して抗体を薬物と組み合わせる非常に複雑な実体である。Genmab A/S(Copenhagen, Denmark)及びSeattle Genetics(Washington, USA)が開発中の抗体-薬物コンジュゲートであるHUMAX-AXL-ADC(商標)は、モノメチルオリスタチンE(MMAE)にコンジュゲートしたGas6結合と競合しないAXL特異的モノクローナル抗体を含む。HUMAX-AXL-ADC(商標)は、NSCLC異種移植片モデルで1mg/kgの単回投薬後に腫瘍退縮を強力に誘発し、AXL発現が不均一である患者由来の異種移植片モデルにおいて同様の効果を有した。Gas6結合と競合しないAXLに結合する抗体は、国際特許公開WO2016/005593A1(Breijら)に記載されている。

40

【0011】

[0011]抗AXL抗体が強力な細胞傷害性薬物を送達するために使用される抗体-薬物コ

50

ンジュゲート（A D C）アプローチは、薬物に応答する可能性がある患者集団を増加させる。抗体に対する耐性が獲得された場合でさえ、A D C が役立つ場合がある。

【0012】

[0012]疾患の検出、病期分類及び／又は治療で使用するためのA X L 特異的抗体が必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

[0013]本開示の目的は、A X L 特異的抗体を提供することである。A X L 特異的モノクローナル及び單一ドメイン抗体、並びに抗体とも呼ばれる抗原結合断片、並びにそれらの使用が記載される。このようなA X L 特異的抗体は、細胞表面に発現したヒトA X L に結合する。抗体 - 薬物コンジュゲート及び融合体が記載される。

10

【課題を解決するための手段】

【0014】

[0014]本開示は、ヒトA X L エクトドメイン（E C D）の免疫グロブリン様（I g L）ドメインのエピトープに特異的に結合する単離又は精製された抗体を提供する。

【0015】

[0015]配列番号9 8 ~ 1 0 0；配列番号9 2 ~ 9 4；配列番号1 1 0 ~ 1 1 2；配列番号8 6 ~ 8 8；配列番号8 0 ~ 8 2；配列番号1 0 4 ~ 1 0 6；配列番号1 1 6 ~ 1 1 8；及びそれと実質的に同一である配列からなる群から選択される可変軽鎖（V L）C D R 1、C D R 2、及びC D R 3配列を含む抗体又はその断片もまた提供される。

20

【0016】

[0016]本明細書では、配列番号3 8；配列番号4 0；配列番号4 2；配列番号4 4；配列番号4 6；配列番号7 4；配列番号7 6；及びそれと実質的に同一である配列からなる群から選択される可変軽鎖（V L）配列を含む抗体又はその断片が提供される。

【0017】

[0017]さらに、配列番号9 5 ~ 9 7；配列番号8 9 ~ 9 1；配列番号1 0 7 ~ 1 0 9；配列番号8 3 ~ 8 5；配列番号7 7 ~ 7 9；配列番号1 0 1 ~ 1 0 3；配列番号1 1 3 ~ 1 1 5；及びそれと実質的に同一である配列からなる群から選択される可変重鎖（V H）C D R 1、C D R 2、及びC D R 3配列を含む抗体又はその断片が提供される。

30

【0018】

[0018]本明細書では、配列番号3 9；配列番号4 1；配列番号4 3；配列番号4 5；配列番号4 7；配列番号7 3；配列番号7 5；及びそれと実質的に同一である配列からなる群から選択される可変重鎖（V H）配列を含む抗体又はその断片が提供される。

【0019】

[0019]さらに、配列番号1 1 9 ~ 1 2 6、及びそれと実質的に同一である配列からなる群から選択される單一ドメイン（s d）重鎖可変（V H H）ドメイン配列を含む抗体又はその断片が提供される。

【0020】

[0020]配列番号3 9 のV H、及び配列番号3 8 のV L；配列番号4 1 のV H、及び配列番号4 0 のV L；配列番号4 3 のV H、及び配列番号4 2 のV L；配列番号4 5 のV H、及び配列番号4 4 のV L；配列番号4 7 のV H、及び配列番号4 6 のV L；配列番号7 3 のV H、及び配列番号7 4 のV L；配列番号7 5 のV H、及び配列番号7 6 のV L；配列番号1 1 9 のV H H；配列番号1 2 0 のV H H；配列番号1 2 1 のV H H；配列番号1 2 2 のV H H；配列番号1 2 3 のV H H；配列番号1 2 4 のV H H；配列番号1 2 5 のV H H；配列番号1 2 6 のV H H；及びそれと8 5 %以上の同一性を有する配列からなる群から選択される抗体又はその断片もまた提供される。

40

【0021】

[0021]記載された抗体を含む、抗体薬物コンジュゲート（A D C）、医薬組成物、及び融合タンパク質が記載される。記載された抗体をコードする核酸分子、及びそれを含むベ

50

クター又は宿主細胞もまた提供される。

【0022】

[0022] AXL をインピトロ及びインピボで検出する方法が記載される。目的の分子を、 AXL を発現する細胞に輸送する方法が記載される。抗体薬物コンジュゲートを使用して、癌を処置するための方法、及び癌を処置するための記載された抗体の使用が提供される。

【0023】

[0023] 本開示の他の態様及び特徴は、添付の図面と併せて特定の実施形態の以下の説明を検討すると、当業者には明らかになる。

【0024】

[0024] 本開示の実施形態は、ここで、添付の図面を参照して、単なる例として記載される。

10

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】 AXL ドメイン構造の概略図である（先行技術）。

【図2】 A549 細胞の生存における抗 AXL mAb の効果の結果を示す図である。

【図3】 H292 細胞の細胞表面に発現した AXL に対する抗 AXL mAb の結合特性を決定するフローサイトメトリー実験の結果を示す図である。

【図4】 H292 腫瘍細胞株、 A549 細胞株、ヒト乳腺癌 MDA-MB-231 腫瘍細胞株、及び不死化 HelaT ケラチノサイト細胞における細胞生存率に対する抗 AXL - DM1 コンジュゲートの活性の結果を示す。

20

【図5】 ヒト AXL タンパク質エクトドメイン (hAXL - ECD) 及び膜貫通ドメインの略図である。ドメイン結合は、 hAXL - ECD の 10 個のペプチド断片で示される。

【図6】 抗 rhAXL ECD 単一ドメイン抗体 (sdaAb) を単離するための戦略の略図である。

【図7】 太字の下線付きフォントで示される、 IMGT 定義を使用した CDR を有する mAb VH / VL ドメインのアミノ酸配列を示す図である。

【図8】 太字の下線付きフォントで示される、 IMGT 定義を使用した CDR を有する VH のアミノ酸配列を示す図である。

【図9】 肺 (H292) 、乳房 (MDA-MB-231) 、卵巣 (SKOV3) 及び神経膠芽腫 (U87) 細胞株における抗体結合能を示す図である。

30

【図10】 肺 (NCI-H292) 、乳房 (MDA-MB-231) 、及び卵巣 (SKOV3) 細胞株における抗 AXL hIgG 及び sdaAbs の結合特性を測定するフローサイトメトリー実験の結果を示す図である。

【図11】 3 つの腫瘍細胞株における hIgG Abs 及び sdaAbs の増殖阻害結合曲線を示す図である。

【図12】 H292 細胞株における Gas6 の存在下及び非存在下での hIgG - F11 - 5E9 - DM1 及び hIgG - F107 - 10G1 - DM1 の増殖阻害結合曲線を示す図である。

【図13】 SKOV3 細胞株におけるモノパラトピック親 ADC と比較した、抗 AXL バイパラトピック構築物 ADC の増殖阻害結合曲線を示す図である。

40

【図14】 選択された試験抗体による SKOV3 腫瘍を有するマウスにおける腫瘍成長阻害を示す図である。

【図15】 選択された試験抗体による SKOV3 腫瘍を有するマウスにおける腫瘍成長阻害を示す図である。

【図16】 実施例 17 において、 MDA-MB-231-Luc 腫瘍を有するマウスにおける腫瘍成長測定のための研究設計及び時間点を示す図である。

【図17】 実施例 17 において、処置開始後の 37 日までの体重における hF111 - 5E9 - DM1 の効果を示す図である。

【図18】 実施例 17 において、処置開始後の 28 日までの腫瘍成長に対する hF111 - 5E9 - DM1 の効果を示す図である。

50

【図19】実施例18において評価されたF C 5 H f c 1 X 0（陽性対照）、T W I N 2 0 0 - h I g G 1（陰性対照）及び7つの抗A X L s d A bのP a p p 値を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 6】

[0044]一般的に、本開示は、癌などの疾患の処置、同定／診断、及び病期分類／予後診断において使用するための抗A X Lモノクローナル抗体及び単ードメイン抗体を提供する。

【0 0 2 7】

[0045]ヒトA X Lエクトドメイン（E C D）の免疫グロブリン様（I g L）ドメインのエピトープに特異的に結合する、単離又は精製された抗体が記載される。A X L E C D 10 は、例えば、配列番号71のアミノ酸配列を有し得る。抗体のエピトープは、A X LのI g L 1又はI g L 2に位置し得る。抗体は、A X Lを発現する腫瘍細胞に内在化することができる。

【0 0 2 8】

[0046]抗体は、単ードメイン抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、バイパラトピック抗体、二重特異性抗体であり得るか又はそれらのA X L結合抗体断片であり得る。抗体がキメラ抗体である場合、それは、ヒトI g G 1由来のフレームワーク領域を含み得、ヒトカッパ軽鎖及びヒトI g G重鎖由来のフレームワーク領域を含み得る。抗体は、I g A、I g D、I g E、I g G、又はI g M由来のフレームワーク領域を含み得る。 20

【0 0 2 9】

[0047]抗体は、全長I g G、F v、s c F v、F a b、又はF (a b')<sub>2</sub>、V H H、V L、又はV Hであり得る。抗体は、ヒトA X Lエクトドメインに対して50 n M未満の平衡解離定数（K D）を有し得る。任意選択的に、A X L E C DのI g Lドメインのエピトープへの結合は、増殖停止特異的6（G a s 6）リガンドのA X Lへの結合と競合しないものであり得る。

【0 0 3 0】

[0048]抗体又は断片は、配列番号98、99、及び100；配列番号92、93及び94；配列番号110、111、及び112；配列番号86、87、及び88；配列番号80、81、及び82；配列番号104、105、及び106；配列番号116、117、及び118；及びそれと実質的に同一である配列からなる群から選択される可変軽鎖（V L）C D R 1、C D R 2、及びC D R 3配列を有し得る。 30

【0 0 3 1】

[0049]抗体又はその断片は、配列番号38；40；42；44；46；74；76；及びそれと実質的に同一である配列からなる群から選択される可変軽鎖（V L）配列を含むものであり得る。抗体又は断片は、配列番号95～97；89～91；107～109；83～85；77～79；101～103；113～115；及びそれと実質的に同一である配列からなる群から選択される可変重鎖（V H）C D R 1、C D R 2、及びC D R 3配列を含み得る。

【0 0 3 2】

[0050]配列番号39、41、43、45、47、73、75、及びそれと実質的に同一である配列からなる群から選択される可変重鎖（V H）配列を含む抗体又はその断片が記載される。 40

【0 0 3 3】

[0051]抗体又はその断片は、V L、配列番号98～100及びV H、配列番号95～97；V L、配列番号92～94及びV H、配列番号89～91；V L、配列番号110～112及びV H、配列番号107～109；V L、配列番号86～88及びV H、配列番号83～85；V L、配列番号80～82及びV H、配列番号77～79；V L、配列番号104～106及びV H、配列番号101～103；V L、配列番号116～118及びV H、配列番号113～115；及びそれと実質的に同一である配列からなる群から選 50

択される可変重鎖 (V L) C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列、並びに (V H) C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含むものあり得る。

【0034】

[0052]記載される抗体は、配列番号 127～129；配列番号 130～132；配列番号 133～135；配列番号 136～138；配列番号 139～141；配列番号 142～144；配列番号 145～147；配列番号 148～150；及びそれと実質的に同一である配列からなる群から選択される単一ドメイン (s d) 重鎖可変 (V H H) ドメイン C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含み得る。

【0035】

[0053]配列番号 119～126、及びそれに実質的に同一である配列のいずれか 1 つからなる群から選択される単一ドメイン (s d) 重鎖可変 (V H H) ドメイン配列を有する抗体又はその断片が記載される。 10

【0036】

[0054]配列番号 39 の V H、及び配列番号 38 の V L；配列番号 41 の V H、及び配列番号 40 の V L；配列番号 43 の V H、及び配列番号 42 の V L；配列番号 45 の V H、及び配列番号 44 の V L；配列番号 47 の V H、及び配列番号 46 の V L；配列番号 73 の V H、及び配列番号 74 の V L；配列番号 75 の V H、及び配列番号 76 の V L；及び 119～126 の V H H 配列、並びにそれと 85% 以上の同一性を有する配列からなる群から選択される抗体又はその断片が記載される。

【0037】

[0055]例えば、抗体又はその断片は、本明細書に列挙される具体的に例示された配列と比較して、> 90%、> 95%、又は > 98% の配列同一性を有し得る。 20

【0038】

[0056]記載された抗体は、配列番号 1、2、及び 11 の軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；並びに配列番号 3、4、及び 5 の重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列を含み得、抗体は、A X L の I g L 2 ドメインではなく I g L 1 ドメインにあるエピトープに結合する。抗体は、配列番号 1、6、及び 11 の軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；並びに配列番号 7、8、及び 5 の重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列を含み得、抗体は、A X L の I g L 2 ドメインではなく I g L 1 ドメインにあるエピトープに結合する。 30

【0039】

[0057]抗体は、配列番号 9、10、及び 11 の軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；並びに配列番号 12、13、及び 14 の重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列を含み得る。

【0040】

[0058]或いは、抗体は、配列番号 15、16、及び 11 の軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列；並びに配列番号 17、18、及び 19 の重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列を含み得る。

【0041】

[0059]抗体は、A X L 結合について G a s 6 と競合しないものあり得る。 40

【0042】

[0060]抗体は、バイパラトピックであるものあり得る。このようなバイパラトピック抗体は、例えば、s d A b 0 0 1 / 0 0 5 又は s d A b 0 0 1 / 0 0 6 であり得る。

【0043】

[0061]薬物部分にコンジュゲートしている、本明細書に記載される抗体を含む抗体薬物コンジュゲート (A D C) が記載される。薬物部分は、例えば、抗癌剤であり得る。例示的な薬物部分は D M 1 である。

【0044】

[0062]A D C 及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物が記載される。

【0045】

50

20

30

40

50

[0063]本明細書に記載される抗体及びヒトIgG1Fcを含む融合タンパク質が記載される。

【0046】

[0064]抗体をコードする核酸分子が記載される。核酸分子を含むベクターが記載される。ウイルスベクターは、アデノウイルス、レンチウイルス又はレトロウイルスであり得る。

【0047】

[0065]上述のベクターを含み得る宿主細胞が記載される。宿主細胞は、組換え微生物宿主細胞であり得るか、又は哺乳動物細胞であり得、上記細胞は、本明細書に記載される抗体を生成し得る。

【0048】

[0066]抗体を生成するハイブリドーマ又は生物もまた提供される。

【0049】

[0067]一部の例では、抗体は表面に固定化され得る。さらに、抗体はカーゴ分子に連結され得る。任意選択的に、カーゴ分子は、検出可能な薬剤、治療剤、薬物、ペプチド、酵素、増殖因子、サイトカイン、受容体トラップ、その抗体、化学化合物、炭水化物部分、DNA-ベースの分子、細胞傷害性薬剤、又はウイルスベクターであり得る。

【0050】

[0068]抗体がカーゴ分子を有する場合、カーゴ分子の例示的なサイズは、約1～約500kDaであり得る。カーゴ分子は、リポソーム又はナノキャリアに充填することができる。このようなナノキャリアは、1つ又は複数のナノ粒子、ナノワイヤ、ナノチューブ、又は量子ドットを含み得る。カーゴ分子は細胞傷害性薬剤であり得る。

【0051】

[0069]DNAベースの分子は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロRNA、siRNA、又はプラスミドを含み得る。

【0052】

[0070]AXLをインビトロで検出する方法であって、a)試料を、検出可能な薬剤に連結された1つ又は2つ以上の単離又は精製された抗体と接触させるステップと、b)試料中のAXLに結合したその抗体に連結した検出可能な薬剤を検出するステップとを含む方法が記載される。

【0053】

[0071]試料が血清試料であり得る、循環細胞においてAXLを検出するための方法が記載される。

【0054】

[0072]このような方法において、検出するステップは、光学的画像化、免疫組織化学、分子診断画像化、又はELISAを使用して行われ得る。

【0055】

[0073]本明細書には、対象におけるAXL発現をインビオで検出する方法であって、a)検出可能な薬剤に連結された、本明細書に記載される1つ又は複数の抗体を対象に投与するステップと、b)AXLに結合したその抗体に連結された検出可能な薬剤を検出するステップとを含む方法が記載される。

【0056】

[0074]任意選択的に、検出するステップは、PET、SPECT、又は蛍光画像化を使用して行われ得る。

【0057】

[0075]目的の分子を、AXLを発現する細胞に輸送する方法であって、目的の分子に連結された1つ又は複数の抗体を対象に投与するステップを含み、抗体が、AXLを発現する対象の細胞に目的の分子を送達する方法が記載される。検出可能な薬剤、治療剤、薬物、ペプチド、酵素、増殖因子、サイトカイン、受容体トラップ、その抗体、化学化合物、炭水化物部分、DNAベースの分子、細胞傷害性薬剤、又はウイルスベクターなどの目的の分子であり得る。このような方法では、目的の分子を1つ又は複数のリポソーム又はナ

10

20

30

40

50

ノキャリア上又はその中に充填することができる。ナノキャリアは、1つ又は複数のナノ粒子、ナノワイヤ、ナノチューブ、又は量子ドットを含み得る。さらに、目的の分子は、癌を処置するために使用される細胞傷害性薬剤などの細胞傷害性薬剤を含み得る。

【0058】

[0076]抗癌抗体薬物コンジュゲート（本明細書に記載される抗体を含む）を、それを必要とする対象に投与するステップを含む、癌を処置する方法が記載される。さらに、細胞療法、キメラ抗原受容体（CAR-T細胞）療法、又は腫瘍溶解性ウイルスを投与するステップを含む、癌を処置する方法が本明細書に記載される。

【0059】

[0077]本明細書に記載される抗体の使用は、抗癌抗体薬物コンジュゲートを含む医薬品の調製のためであり得る。抗体は、それを必要とする対象における癌の処置に有用である。抗癌抗体薬物コンジュゲートが、それを必要とする対象の癌を処置するために使用される、さらなる使用が記載される。

10

【0060】

[0078]このような抗体の使用が記載され、抗体は、細胞療法、キメラ抗原受容体（CAR-T細胞）療法、又は腫瘍溶解性ウイルスの調製に使用され得る。

【0061】

[0079]抗AXL抗体薬物コンジュゲートは、癌治療薬としての使用について本明細書に記載される。強力であり、選択的な抗癌活性を有する免疫療法剤及び免疫コンジュゲートを提供することが望ましい。癌標的としてのAXLに基づく癌の処置のための抗体-薬物コンジュゲート（ADC）は、コンジュゲートで機能することができる抗体の開発を必要とする。AXLは、受容体チロシンキナーゼのTAMファミリーに属し、その過剰発現は幅広いヒトの癌で検出されている。いくつかの細胞株癌モデルにおける250を超えるモノクローナル抗体（mAb）の代理ADCスクリーニング、及び毒性試験のためのカニクイザル由来のAXLタンパク質との交差反応に一部基づいて決定された、AXL ADCに適した抗体が本明細書に記載される。ADC開発用の抗AXL抗体が記載され、Gabs競合及び単一ドメイン抗体（sdAb）の特徴付けデータを本明細書に提供する。

20

【0062】

[0080]Gabs競合。抗AXL ADCでは、AXLへの抗体の結合を遮断するGabs（AXLリガンド）の能力は、AXL ADC選択にとって重要な機能である。この能力は、本明細書においてGabs競合と呼ばれる。全身又は腫瘍微小環境に存在する高濃度のGabsリガンド（しかし、培養で増殖した腫瘍細胞株には見られない）は、インビボ対インビトロで見られる抗体結合活性の不一致の原因となり得る。したがって、Gabsによって影響を受けないか又は弱く影響を受ける活性を有する抗体の選択は、抗体結合がインビボでGabsによって妨害されないことを確実にする。

30

【0063】

[0081]モノクローナル抗体（mAb）。抗AXLマウスマAbライブラリー内からAXL ADCをスクリーニングして、Gabsの存在に影響されない活性を有する強力なADCインターナライザー（IC<sub>50</sub> < 1nM）を同定した。

【0064】

40

[0082]単一ドメイン抗体（sdAb）。AXL ADC候補は、ファージ提示ライブラリーからパニングすることにより、分離された抗AXL単一ドメイン抗体（sdAb）、重鎖可変ドメインVHHのみ）から同定される。本明細書において、sdAbの評価に使用される技術には、内在化アッセイ及び競合結合アッセイが含まれる。Gabs競合及びsdAb特徴付けデータが得られた。一般的に、単一ドメイン抗体は、重鎖抗体の1つの可変ドメイン（VH）を含み、長さが最大約110アミノ酸であり得る。sdAbはFc領域を欠いているため、したがって、sdAb-Fc融合体が調製され得る。

【0065】

[0083]エピトープ。エピトープ及び/又は結合ドメインは、本明細書に記載されている。

50

## 【0066】

[0084]用語「抗体」は、当該技術分野では「免疫グロブリン」(Ig)とも呼ばれ、本明細書で使用される場合、対になった重ポリペプチド鎖と軽ポリペプチド鎖から構築されたタンパク質を指す；IgA、IgD、IgE、IgG、IgMなどの様々なIgアイソタイプが存在する。單一ドメインsdAb並びにモノクローナル抗体mAbは本明細書に記載されている。抗体が正しく折りたたまれた場合、各鎖は折りたたまれて、より線状のポリペプチド配列によって接続された多数の異なる球状ドメインになる。例えば、免疫グロブリン軽鎖は、可変(VL)ドメイン及び定常(CL)ドメインに折りたたまれるが、一方、重鎖は、可変(VH)ドメイン及び3つの定常(CH、CH2、CH3)ドメインに折りたたまれる。重鎖及び軽鎖可変ドメイン(VH及びVL)の相互作用により、抗原結合領域(Fv)が形成される。各ドメインは、当業者が精通している十分に確立された構造を有する。

## 【0067】

[0085]「抗体」という用語はまた、免疫グロブリン分子の断片、又は免疫グロブリンについて観察される典型的な匹敵する期間、抗原に特異的に結合する能力を保持する分子の誘導体を指すために使用され得る。抗体の結合領域又は結合ドメインは、免疫グロブリン分子の重鎖と軽鎖の両方の可変領域を含み得るか、又は單一ドメイン(VHH)分子であり得る。「抗体」という用語は、抗原結合を保持する抗体のこのような断片(本明細書では「抗体断片」又は単に「断片」と呼ばれる場合がある)を包含するために使用される。結合能力を保持する断片には、Fab'又はFab断片、VL、VH、CL及びCH1ドメインを有することができる一価断片、F(ab')2断片、バイパラトピック断片、二価断片、VH及びCH1ドメインを有するFd断片、ラクダ科抗体、ナノボディ、単離された相補性決定領域(CDR)、リンカーによって接続された複数の断片、及び他のこのような分子を含み得る。

## 【0068】

[0086]用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、單一ドメイン抗体、抗体様ポリペプチド、ヒト化抗体、キメラ抗体分子、二重特異性抗体又は二重パラトピック抗体、及び抗原結合することができる、本明細書で特に言及されていない任意の断片を包含する。抗体断片は、天然に存在する抗体断片であり得、天然に存在する抗体の操作によって、又は組換え法を使用することによって得ることができ、天然に存在しない抗体又は断片であり得る。例えば、抗体断片には、限定されないが、Fv、一本鎖Fv(scfv；ペプチドリンカーで接続されたVL及びVHからなる分子)、Fab、F(ab')2、及びこれらのいずれかの多価表示が含まれ得る。前述されたものなどの抗体断片は、断片の異なる部分を連結するために、リンカー配列、ジスルフィド結合、又は他のタイプの共有結合を必要とする場合がある；当業者は、様々なアプローチに精通している。單一ドメイン抗体断片及びモノクローナル抗体断片は、「抗体」という用語に包含される。

## 【0069】

[0087]非限定的な例では、抗体断片は、天然に存在する供給源に由来するsdAbであり得る。ラクダ科由来の重鎖抗体は軽鎖を欠いているため、それらの抗原結合部位はVHと呼ばれる1つのドメインで構成される。sdAbはまたサメにおいて観察されていて、VNARと呼ばれる。他のsdAbは、ヒトIg重鎖及び軽鎖配列に基づいて操作され得る。本明細書で使用される場合、「sdAb」という用語は、ファージ提示又は他の技術を通じて任意の起源のVH、VHH、VL、又はVNARリザーバーから直接単離されたsdAb、前述のsdAbに由来するsdAb、組換え生成されたsdAb、並びにヒト化、親和性成熟、安定化、可溶化、ラクダ化、又は抗体操作の他の方法によって、このようなsdAbのさらなる修飾を通じて生成されたsdAbを含む。sdAbの抗原結合機能及び特異性を保持するホモログ、誘導体、又は断片もまた包含される。

## 【0070】

[0088]sdAbは、高い熱安定性、高い界面活性剤耐性、プロテアーゼに対する比較的高い耐性及び高い生産収率などの抗体分子にとって望ましい特性を有する。それらはまた

、免疫ライブラリーからの単離によって、又はインビトロ親和性成熟によって、非常に高い親和性を有するように操作され得る。非標準的なジスルフィド結合の導入などの、安定性を高めるためのさらなる変更もまた s d A b にもたらすことができる。

#### 【 0 0 7 1 】

[0089] 単一ドメイン抗体の構造は確立されており、周知である。s d A b は、免疫グロブリンの折りたたみを保持する単一の免疫グロブリンドメインを含む；最も注目すべきは、3つの C D R / 超可変ループのみが抗原結合部位を形成することである。しかしながら、抗原との結合にすべての C D R が必要なわけではあり得ない。例えば、限定することなく、1つ、2つ、又は3つの C D R は、本明細書に記載される s d A b による抗原の結合及び認識に寄与し得る。s d A b 又は可変ドメインの C D R は、本明細書では C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 と呼ばれる。

#### 【 0 0 7 2 】

[0090] 記載された抗体（その断片を含む）は、受容体チロシンキナーゼサブファミリーの一部である A X L に特異的である。A X L ( E n t r e z G e n e : 5 5 8 ) は、2つの免疫グロブリン様ドメイン及び2つのフィブロネクチンタイプ I I I リピートを含む細胞外ドメイン；膜貫通ドメイン；及びチロシンキナーゼドメインを含む細胞内ドメインに編成された 8 9 4 個のアミノ酸を含む（先行技術の図1を参照されたい）。A X L タンパク質は、ビタミン K 依存性タンパク質であるリガンド G a s 6 に結合する。A X L は、通常、多くの細胞型で発現するが、多数の病状では発現レベルが増加する。

#### 【 0 0 7 3 】

[0091] 抗体は高度の内在化を示すべきである。「高度の内在化」という用語は、A X L を発現することが公知である2つ以上の腫瘍細胞株において、サポリン又は D M 1 をコンジュゲートした二次抗体細胞傷害性スクリーニングアッセイで抗体がサブ n M ( I C 5 0 ) の効力を示すことを意味する。現在記載されている抗体は、細胞表面 A X L 受容体の細胞外ドメインに結合する。次に、抗体は細胞によって内在化され、エンドソーム及びリソソームを含む細胞内小器官に送達され得る。抗体はまた、中和機能を含み得、すなわち、それは、A X L 受容体を介するシグナル伝達を遮断し得る。

#### 【 0 0 7 4 】

[0092] 軽鎖及び重鎖可変領域は、標的抗原の結合に関与し、したがって、抗体間の有意な配列多様性を示すことができる。定常領域は、小さい配列の多様性を示し、多数の天然タンパク質を結合して、重要な生化学的イベントを誘発することに関与する。抗体の可変領域は、分子の抗原結合決定因子を含み、したがって、その標的抗原に対する抗体の特異性を決定する。配列の可変性の大部分は、6つの超可変領域で生じ、可変重 ( V H ) ドメイン及び軽 ( V L ) ドメインごとに3つずつである；超可変領域は、合わさって抗原結合部位を形成し、抗原決定基の結合及び認識に寄与する。抗体の抗原に対する特異性及び親和性は、超可変領域の構造、並びにそれらが抗原に存在する表面のサイズ、形状、及び化学的性質によって決定される。超可変性の領域を同定するための様々なスキームが存在する。そのうちの1つ ( K a b a t スキーム ) は、V H 及び V L ドメインの抗原結合領域での配列可変性に基づいて「相補性決定領域」 ( C D R ) を定義する。別の ( C l o t h i a スキーム ) は、V H 及び V L ドメインにおける構造ループ領域の位置に基づいて「超可変ループ」 ( H 又は L ) を定義する。これらの個々のスキームは、隣接又は重複する C D R 及び超可変ループ領域を定義するため、抗体の技術分野における当業者は、しばしば、「 C D R 」及び「超可変ループ」という用語を交換可能に利用し、それらは本明細書においてそのように使用され得る。国際免疫遺伝情報システム ( I M G T ) が本明細書において使用され、K a b a t 番号付けもまた示される。I M G T 番号付けシステムは、可変ドメインの比較を容易にするために開発された。このシステムでは、保存されたアミノ酸 ( C y s 2 3 、 T r p 4 1 、 C y s 1 0 4 、 P h e / T r p 1 1 8 、 及び 8 9 位の疎水性残基など ) は常に同じ位置にある。さらに、フレームワーク領域 ( F R 1 : 1 ~ 2 6 位、 F R 2 : 3 9 ~ 5 5 位、 F R 3 : 6 6 ~ 1 0 4 位、 及び F R 4 : 1 1 8 ~ 1 2 9 位 ) 及び C D R ( C D R 1 : 2 7 ~ 3 8 、 C D R 2 : 5 6 ~ 6 5 、 C D R 3 : 1 0 5 ~ 1 1 7 ) の標

10

20

30

40

50

準化された区切りが提供される。

【0075】

[0093]本明細書では、IMGTとして示されるCDR配列は、-Aが続く記述名によって識別され、一方、カバット配列の記述名は-Bが続く。

【0076】

[0094]CDR／ループは、本明細書では、CDR\_H1についてはChothiaスキームに従って、及び他のすべてのCDRについてはKabatスキームに従って言及される。本明細書に記載される抗体のCDRは、軽鎖のCDRについてはCDR\_L1、L2、L3、及び重鎖のCDRについてはCDR\_H1、H2、H3と呼ばれる。

【0077】

[0095]配列番号72は、公知のAXL全長Hiss6配列を提供し、情報のみのために提供される。

【0078】

[0096]コンジュゲート又は結合した細胞傷害性薬剤の内在化及び活性化を引き起こすことに加えて、抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)又は補体依存性細胞傷害(CDCC)をもたらし得る。当業者に公知であるように、ADCC及びCDC活性は、様々な抗体構造に存在する定常ドメインを通じて媒介される。

【0079】

[0097]抗体は、任意の供給源、ヒト、マウス、又は他に由来し得；IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMを含む任意のアイソタイプであり得；限定されないが、Fv、scFv、Fab、F(ab')2を含む任意のタイプの断片であり得る。

【0080】

[0098]抗体はまた、キメラであり得、2つ以上の種に由来するタンパク質配列の組み合わせとして形成され得る。当業者に公知であるように、キメラ抗体は、非ヒト供給源(例えば、限定されないが、マウス)からの遺伝物質をヒト由来の遺伝物質と組み合わせることにより作製される。例えば、ヒト定常ドメインは、マウスVH及びVL配列に融合され得る。

【0081】

[0099]抗体は、当該技術分野において公知である任意の適切な方法、例えば、限定されないが、CDRグラフト及びベニアリングを使用して「ヒト化」され得る。抗体のヒト化は、抗原結合能力又は特異性を失うことなく、ヒトコンセンサス配列に見られるように、配列中のアミノ酸をそのヒト対応物で置換することを含む；このアプローチは、ヒト対象に導入した場合、抗体の免疫原性を減少させる。CDRグラフトのプロセスでは、本明細書に定義される1つ又は2つ以上の重鎖CDRをヒト可変領域(VH又はVL)に、或いは他のヒト抗体(IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM)若しくは断片フレームワーク領域(Fv、scFv、Fab)又はCDRを移植できる類似のサイズ及び性質のタンパク質(例えば、Nicai等、2004年を参照されたい)に融合又はグラフトすることができる。このような場合、上記の1つ又は2つ以上の超可変ループの立体構造は、維持される可能性があり、その標的(すなわち、AXL)に対する抗体の親和性及び特異性は、影響が最小限である可能性がある。CDRグラフトは当該技術分野において公知である。このようなヒト化抗体の1つの非限定的な例では、マウス供給源からの上記のCDRをヒト軽鎖及び重鎖フレームワーク領域に移植することができる。

【0082】

[00100]当該技術分野において「可変領域リサーフェシング」とも呼ばれるベニアリングは、抗体の溶媒露出された位置をヒト化することを伴う。したがって、CDR立体構造にとって重要であり得る、埋められた非ヒト化残基は保持され、一方、溶媒曝露された領域に対する免疫学的反応の可能性は最小限に抑えられる。ベニアリングは、当該技術分野において公知であり、本質的に、天然抗体又はその断片のフレームワーク領域の曝露された残基を、それらのヒト対応物中のアミノ酸残基で置換することを含む(Padlan、1991年；Gonzalesら、2005年)。

10

20

30

40

50

## 【0083】

[00101]当業者はまた、このようなヒト化抗体断片を調製する方法及びアミノ酸位置をヒト化する方法を十分に精通している。例えば、Vinc eら、2009年を参照されたい。当業者に公知であるように、結合及び特異性を保持するために、特定の天然アミノ酸残基をヒトフレームワークに組み込むことが必要な場合がある。CDRグラフトによるヒト化は、当該技術分野において公知であり（例えば、Tsurushitaら、2005年；Jonesら、1986年；Tempestら、1991年；Riechmannら、1988；Queenら、1989年；Gonzalesら、2005年を参照されたい）、したがって、当業者は、このようなヒト化抗体又はその断片を調製する方法を十分に精通している。

10

## 【0084】

[00102]上記で定義されたVH及びVL、並びにヒトIgG1フレームワークを含むキメラ抗体であり得る、AXLに特異的な単離又は精製された抗体。例えば、ヒトIgG1フレームワークは、ヒトカッパ軽鎖及びヒトIgG1重鎖を含み得る。

## 【0085】

## [00103]モノクローナル抗体

[00104]AXLに対する高親和性モノクローナル抗体(mAb)が記載される。mAbは、遺伝子免疫によって（すなわち、rhAXL-EC-DをコードするDNAを注入することによって）生成された。mAbは、高度な内在化を示す抗体を同定するために設計された機能アッセイを使用してスクリーニングされた。

20

## 【0086】

[00105]同定された5つの抗rhAXL mAbは、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)としての可能性について機能的に特徴付けられた。これらの抗体は、本明細書ではF107-7H5、F107-8D12、F111-5E9、F111-3C8、及びF107-10G1と呼ばれる。これらの抗ヒトAXL抗体が選択された。これは、以下の細胞株：U87膠芽腫、A549肺胞腺癌、及びMDA-MB-231乳癌の少なくとも2つにおいて、サポリンをコンジュゲートした二次抗体ベースの細胞傷害性スクリーニングアッセイでサブnM(1C50)効力を示したためである。それらはまた、DM1にコンジュゲートした場合、H292肺癌細胞、A549細胞及びMDA-MB-231細胞に対して毒性を示した。エピトープビニング分析により、コンジュゲートした二次抗体スクリーニングアッセイにおける効力に基づく、これらの抗体の選択により、次のエピトープ：AXLのIg様ドメイン1(F107-7H5及びF107-8D12)に位置した2つ、及びIg様ドメイン2(F111-3C8及びF111-5E9)に位置した1つに5つのmAbがすべて結合することが示された。F107-10G1の結合はまたIg様ドメイン1にあるが、F107-7H5及びF107-8D12とは異なる部位にあることに留意されたい。

30

## 【0087】

## [00106]配列同一性及び特徴

[00107]実質的に同一の配列は、1つ又は複数の保存的なアミノ酸突然変異を含み得る。参照配列に対する1つ又は複数の保存的なアミノ酸突然変異が、参照配列と比較して生理学的、化学的、物理化学的又は機能的特性に実質的な変化がない変異ペプチドを生じ得ることが当該技術分野において公知である；このような場合、参照配列及び変異配列は、「実質的に同一」のポリペプチドと見なされる。保存的なアミノ酸置換は、類似の化学的性質（例えば、サイズ、電荷、又は極性）を有する別のアミノ酸残基でのアミノ酸残基の置換として本明細書において定義される。これらの保存的なアミノ酸突然変異は、上記で列挙されたCDR配列及び抗体の全体的な構造を維持しながら、抗体のフレームワーク領域に対して行うことができる；したがって、抗体の特異性及び結合が維持される。

40

## 【0088】

[00108]非限定的な例では、保存的な突然変異はアミノ酸置換であり得る。このような保存的アミノ酸置換は、塩基性、中性、疎水性、又は酸性アミノ酸を同じグループの別の

50

ものに置換することができる。「塩基性アミノ酸」という用語は、典型的には、生理的pHで正に帯電する、7を超える側鎖のpK値を有する親水性アミノ酸を意味する。塩基性アミノ酸には、ヒスチジン(His又はH)、アルギニン(Arg又はR)、及びリジン(Lys又はK)が含まれる。「中性アミノ酸」(「極性アミノ酸」とも呼ばれる)という用語は、生理学的pHでは荷電していないが、2つの原子で共通に共有されている電子対が原子の1つによってより密接に保持されている少なくとも1つの結合を有する、側鎖を有する親水性アミノ酸を意味する。極性アミノ酸には、セリン(Ser又はS)、スレオニン(Thr又はT)、システイン(Cys又はC)、チロシン(Tyr又はY)、アスパラギン(Asn又はN)、及びグルタミン(Gln又はQ)が含まれる。用語「疎水性アミノ酸」(「非極性アミノ酸」もまた)は、正規化されたコンセンサス疎水性スケールによれば、ゼロより大きい疎水性を示すアミノ酸を含むことを意味する。疎水性アミノ酸には、プロリン(Pro又はP)、イソロイシン(Ile又はI)、フェニルアラニン(Phe又はF)、バリン(Val又はV)、ロイシン(Leu又はL)、トリプトファン(Trp又はW)、メチオニン(Met又はM)、アラニン(Ala又はA)、及びグリシン(Gly又はG)が含まれる。「酸性アミノ酸」は、典型的には、生理学的pHで負に帯電している、7未満の側鎖pK値を有する親水性アミノ酸を指す。酸性アミノ酸には、グルタミン酸(Glu又はE)、及びアスパラギン酸(Asp又はD)が含まれる。

#### 【0089】

[00109]配列同一性は、2つの配列の類似性を評価するために使用される；それは、2つの配列が残基の位置間の最大対応のために整列された場合に同じである残基のパーセントを計算することによって決定される。任意の公知の方法を使用して、配列同一性を計算することができる；例えば、コンピュータソフトウェアを使用して、配列の同一性を計算することができる。配列同一性は、例えば、スイス生物研究所によって維持されるNCBIBLAST2サービス、BLAST-P、BLAST-N、若しくはFASTA-N、又は当該技術分野で公知である他の適切なソフトウェアなどのソフトウェアによって計算することができる。

#### 【0090】

[00110]実質的に同一の配列は、本明細書に記載されるように、少なくとも90%同一であり得る；別の例では、実質的に同一の配列は、アミノ酸レベルで、本明細書に記載される配列と少なくとも90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、若しくは100%同一であるか、又はその間の任意のパーセンテージであり得る。重要なことに、実質的に同一の配列は、参照配列の活性及び特異性を保持する。非限定的な実施形態では、配列同一性の差異は、保存的アミノ酸変異(複数可)による可能性がある。非限定的な例では、本明細書に記載される特定の配列と少なくとも85%、90%、95%、98%又は99%同一の配列を含む抗体が含まれる。

#### 【0091】

[00111]配列を比較した場合、mAb 3C7、8D12及び7H5として示される本抗体は、約90%以上の類似性(又は90%同一性)で互いに関連している。それにもかかわらず実質的に同一の活性をもたらす配列の変動は、実質的に同一の配列と見なされる。

#### 【0092】

[00112]ヒト化などの変更による配列の変化は、予測可能であり、当業者に理解される方法で配列を変更することができる。したがって、このような変更された配列は、より多くの数の変更された残基を有する可能性があり、その結果、同一性は上記の90%の値を下回る。配列の変化は、実質的に同一の結合が達成されるという条件で、CDRの外側の領域に存在し得、又はCDR内にあり得る。

#### 【0093】

[00113]抗体はまた、組換え抗体の発現、検出又は精製を補助するための追加の配列を含み得る。当業者に公知である任意のこのような配列又はタグを使用することができる。例えば、抗体は、ターゲティング又はシグナル配列(例えば、限定されないが、ompA

10

20

30

40

50

)、検出 / 精製タグ (例えば、限定されないが、c - M y c、H i s 5、H i s 6、又はH i s 8 G)、又はそれらの組み合わせを含み得る。別の例では、シグナルペプチドは、M V L Q T Q V F I S L L W I S G A Y G (配列番号 59) 又はM D W T W R I L F L V A A A T G T H A (配列番号 60) であり得る。さらなる例では、追加の配列は、ビオチン認識部位であり得る。また、当業者に公知であるように、リンカー配列は、追加の配列又はタグとともに使用され得、又は検出 / 精製タグとして機能し得る。

#### 【0094】

##### [00114]多量体化、連結、及びカーゴ

[00115]抗体は、本明細書では多価表示とも呼ばれる多価提示形式であり得る。多量体化は、当該技術分野において公知である任意の適切な方法によって達成することができる。例えば、いかなる方法にも限定されないが、多量体化は、自己組織化分子を使用して、及び / 又は抗体と A B 5 築素ファミリーの B サブユニットの五量体化ドメインとを含む融合タンパク質を発現させることにより五体を生成することによって達成することができる。次に、五量体化ドメインが集合して五量体になる。多量体はまた、多量体化分子をもたらすコイルド - コイルペプチドとの抗体の融合を説明するために「複合体」形態と呼ばれ得る多量体化ドメインを使用して形成され得る。他の形態の多価提示はまた本明細書に含まれる。例えば、限定することなく、抗体は、二量体、三量体、又は任意の他の適切なオリゴマーとして提示され得る。これは、当該技術分野において公知である方法によって、例えば、ノブ - イントゥ - ホール相互作用を使用して、直接的な連結接続、c - j u n / F o s 相互作用を用いて達成することができる。

10

#### 【0095】

[00116]上記の多量体の各サブユニットは、同じ又は異なる特異性を有し得る同じ又は異なる抗体を含み得る。さらに、多量体化ドメインは、必要に応じて、リンカーを使用して抗体に連結させることができる；このようなリンカーは、2つの分子の柔軟な付着を提供するのに十分な長さ及び適切な組成であるべきであるが、抗体の抗原結合特性を妨げるべきではない。例えば、限定することなく、抗体はカーゴ分子に連結され得る。カーゴ分子は、任意の適切な分子であり得る。例えば、カーゴ分子は、検出可能な薬剤、治療剤、薬物、ペプチド、酵素、増殖因子、サイトカイン、受容体トラップ、抗体又はその断片 (例えば、I g G、s c F v、F a b、V H H、V H、V L など)、化学化合物、炭水化物部分、D N A ベースの分子 (アンチセンスオリゴヌクレオチド、m i c r o R N A、s i R N A、プラスミド)、細胞傷害性薬剤、ウイルスベクター (アデノ - 、レンチ - 、レトロ - )、前述のタイプのカーゴ分子のいずれかを充填した1つ若しくは複数のリポソーム若しくはナノキャリア、又は1つ若しくは複数のナノ粒子、ナノワイヤ、ナノチューブ、若しくは量子ドットであり得る。抗体は、当該技術分野において公知である任意の方法 (組換え技術、化学的コンジュゲーションなど) を使用してカーゴ分子に連結することができる。

20

#### 【0096】

[00117]非限定的な一例では、カーゴ分子は、検出可能な標識、放射性同位元素、ガドリニウム又は酸化鉄などの常磁性標識、フルオロフォア、蛍光剤、近赤外線 (N I R) 蛍光色素又は色素、例えばC y 5 . 5、エコー源性マイクロバブル、親和性標識 (例えば、ビオチン、アビジンなど)、検出可能なタンパク質ベースの分子、ヌクレオチド、量子ドット、ナノ粒子、ナノワイヤ、若しくはナノチューブ、又は画像化法によって検出され得る他の適切な薬剤であり得る。特定の非限定的な例では、抗A X L 抗体は、近赤外線蛍光 (N I R F) 画像化色素、例えばC y 5 . 5、A l e x a 6 8 0、D y 1 i g h t 6 8 0、又はD y 1 i g h t 8 0 0 に連結され得る。

30

#### 【0097】

[00118]本明細書に記載される抗体は、細胞療法、キメラ抗原受容体 (C A R - T 細胞) 療法、腫瘍溶解性ウイルス、及びこれらの調製及び他の治療組成物に使用され得る。

40

#### 【0098】

[00119]別の特定の非限定的な実施形態では、抗体は薬物に連結され、したがって、抗

50

体薬物コンジュゲート（A D C）を提供する。薬物は、任意のタイプの薬物、例えば、限定されないが、細胞傷害性薬剤又は化学療法剤であり得る。細胞傷害性薬剤又は化学療法剤には、限定されないが、微小管阻害剤（メイタンシン及びオーリスタチンなど）、D N A 損傷剤（カリケアマイシン及びデュオカルミジンなど）、R N A ポリメラーゼ阻害剤（アルファ - アマンチンなど）、代謝拮抗剤、D N A と反応する薬剤（アルキル化剤、配位化合物、白金錯体、D N A 架橋化合物など）、転写酵素の阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、D N A 副溝結合化合物、抗有糸分裂剤（ビンカアルキロイド及びタキサンなど）、抗腫瘍抗生物質、ホルモン、酵素、及び他の強力な薬物が含まれ得る。当業者に公知であるように、抗体 - 薬物コンジュゲートは、薬物の標的化送達を可能にし、それにより全身曝露を制限する。この構築物では、抗体は、細胞表面のA X L 受容体の細胞外ドメインに結合する。したがって、抗体に連結した薬物は内在化され、細胞内に送達される。次に、薬剤は、細胞内で直接活性化するか、又はエンドソームを介して最初に活性化されて、細胞に作用することができる

[00120]本明細書に記載されるカーゴ分子は、当該技術分野において公知である任意の適切な方法によって、本明細書では「コンジュゲートした」とも呼ばれ、抗体に連結され得る。例えば、限定することなく、カーゴ分子は、共有結合又はイオン相互作用によってペプチドに連結され得る。連結は、化学的架橋反応によって、又は細菌、酵母若しくは哺乳動物細胞ベースのシステムなどの任意のペプチド発現システムと組み合わせた組換えD N A 方法論を用いる融合によって達成することができる。カーゴ分子を抗体にコンジュゲートする場合、適切なリンカーを使用することができる。抗体を治療薬又は検出可能な薬剤などのカーゴ分子に連結する方法は、当業者に周知である。

#### 【 0 0 9 9 】

[00121]本明細書に記載される分子をコードする核酸配列もまた包含される。遺伝暗号の縮重が与えられると、当業者には容易に理解されるように、多数のスクレオチド配列は、所望のポリペプチドをコードする効果を有する。核酸配列は、様々な微生物における発現のためにコドン最適化され得る。前述された核酸を含むベクターもまた含まれる。さらに、記載されるような核酸及び / 又はベクターを含む細胞が包含される。

#### 【 0 1 0 0 】

[00122]単離又は精製された抗体は、様々な方法論を使用して表面に固定化され得る；例えば、抗体は、H i s タグカップリング、ビオチン結合、共有結合、吸着を介して、又は他の経路によって、表面に連結又はカップリングされ得る。抗体の固定化は、タンパク質を捕捉、精製、又は単離するための様々なアプリケーションで役立つことがある。固体表面は、任意の適切な表面、例えば、限定されないが、マイクロタイタープレートのウェル表面、表面プラズモン共鳴（S P R）センサーチップのチャネル、膜、ビーズ（磁気ベース若しくはセファロースベースのビーズ、又は他のクロマトグラフィーレジンなど）、ガラス、プラスチック、ステンレス鋼、フィルム、又はナノ粒子、ナノワイヤ及びカンチレバー表面などの他の有用な表面であり得る。表面に固定化された精製抗体は、診断方法を含む様々な方法で使用することができる。

#### 【 0 1 0 1 】

[00123]A X L を検出するインビトロ方法であって、試料を、検出可能な薬剤に連結された1つ又は2つ以上の単離又は精製された抗体と接触させるステップを含む方法が記載される。次に、当該技術分野において公知である検出及び / 又は画像化技術を使用して、A X L - 抗体複合体を検出することができる。前述された方法における試料は、任意の適切な組織試料、例えば、限定されないが、血清試料、血管組織試料、又は腫瘍組織試料であり得る；試料はヒト又は動物の対象由来であり得る。接触ステップは、抗体とA X L の複合体の形成のために、当業者に公知である適切な条件下で行われる。検出するステップは、当該技術分野において公知である任意の適切な方法、例えば、限定されないが、光学画像化、免疫組織化学、分子診断画像化、E L I S A、又は他の適切な方法によって達成することができる。例えば、検出可能な薬剤に連結された単離又は精製された抗体は、限定されないが、酵素I A (E I A)、E L I S A、「迅速な抗原捕捉」、「迅速なクロマ

トグラフィーIA」、及び「迅速なEIA」などのイムノアッセイ(IA)において使用され得る。特定の非限定的な実施形態では、インビトロ方法は、循環細胞中のAXLを検出するためのものであり、試料は血清試料である。

【0102】

[00124] AXL検出及び疾患診断

[00125] 対象におけるAXL発現をインビトロで検出する方法が記載される。本方法は、検出可能な薬剤に連結された1つ又は2つ以上の単離又は精製された抗体を対象に投与するステップと、次にAXLに結合した標識抗体を検出するステップとを含む。検出するステップは、当該技術分野において公知である任意の適切な方法、例えば、限定されないが、PET、SPECT、又は蛍光画像化、又は任意の他の適切な方法を含むことができる。前述された方法は、組織、例えば、限定されないが、腫瘍組織におけるAXLの発現を検出するのに有用であり得る。

10

【0103】

[00126] 上述の方法におけるインビトロ検出ステップは、疾患の進行又は処置レジメンに対する宿主応答を評価するための定量的方法での、診断目的の全身画像化、又は限定されないが固形腫瘍成長の部位など特定部位での局所画像化であり得る。上記される方法における検出ステップは、免疫組織化学、又は非侵襲性(分子)診断画像化技術であり得、限定されないが、光学的画像化；陽電子放出断層撮影法(PET)、検出可能な薬剤は<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>18</sup>F、<sup>64</sup>Ca、<sup>62</sup>Ca、<sup>124</sup>I、<sup>76</sup>Br、<sup>82</sup>Rb及び<sup>68</sup>Gaなどの同位体であり、<sup>18</sup>Fが最も臨床的に利用されている；単一光子放出コンピュータ断層撮影(SPECT)、検出可能な薬剤は、特定の用途に応じて、<sup>99m</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>201</sup>Tl、<sup>133</sup>Xeなどの放射性トレーサーである；磁気共鳴画像法(MRI)、検出可能な薬剤は、例えば、限定されないが、ガドリニウム、酸化鉄ナノ粒子及び炭素被覆鉄コバルトナノ粒子であり得、それにより、ブラークの検出のためのMRIの感度を高める；或いは、造影超音波検査(CEUS)又は超音波、検出可能な薬剤は、少なくとも1つの音響的に活性でガスが充填されたマイクロバブルである、が含まれる。超音波は、ヒト疾患のスクリーニング及び早期発見のための普及した技術であり、MRI又はシンチグラフィーよりも安価であり、放射線を伴わないので、放射性核種画像化などの分子画像化モダリティよりも安全である。

20

【0104】

30

[00127] AXLを発現する細胞への分子の送達

[00128] AXLを発現する細胞に目的の分子を輸送する方法が記載される。本方法は、抗体に連結された分子を対象に投与するステップを含む。分子は、前述のように、カーゴ分子を含む任意の所望の分子であり得る；分子は、限定されないが、融合タンパク質としてのコンジュゲーション又は発現を含む、任意の適切な方法を使用して抗体に「連結」され得る。投与は、任意の適切な方法、例えば、限定されないが、静脈内(i.v.)、皮下(s.c.)、及び筋肉内(i.m.)投与を含む非経口投与によるものであり得る。この方法では、抗体が、所望の分子を標的化された方法で細胞に送達させる。

【0105】

40

[00129] 組成物

[00130] 1つ又は2つ以上の単離又は精製された抗体を含む組成物が提供される。組成物は、上記の単一の抗体を含み得るか、又は抗体の混合物であり得る。さらに、抗体の混合物を含む組成物において、抗体は同じ特異性を有し得るか、又はそれらの特異性が異なり得る；例えば、組成物は、AXL(同じ又は異なるエピトープ)に特異的な抗体を含み得る。抗体はバイパラトニックであり得る。組成物はまた、1つ又は2つ以上のカーゴ分子に連結された1つ又は複数の抗体を含み得る。例えば、組成物は、本明細書に記載されるように、1つ又は2つ以上のADCを含み得る。

【0106】

[00131] 抗AXL抗体が強力な細胞傷害性薬物を送達するために使用される抗体-薬物コンジュゲート(ADC)アプローチは、薬物に応答する可能性が高い患者集団を増加さ

50

せる。理論に縛られることなく、これは主に、進行中の A X L 活性の要件ではなくむしろ、A X L 発現の増加の要件に大きく起因する可能性がある。別の利点は、抗体に対する耐性が獲得された場合に A D C が頻繁に与えられ得ることである。

#### 【 0 1 0 7 】

[00132]抗体が提供される組成物はまた、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、又は担体を含み得る。希釈剤、賦形剤、又は担体は、当該技術分野において公知である任意の適切な希釈剤、賦形剤、又は担体であり得、組成物中の他の成分と、組成物を送達する方法と適合しなければならず、組成物の受容者に有害であってはならない。組成物は、任意の適切な形態であり得る；例えば、組成物は、懸濁形態、粉末形態（例えば、限定されないが、凍結乾燥又はカプセル化）、カプセル又は錠剤の形態で提供され得る。例えば、組成物が懸濁形態で提供される場合、担体は、溶解度及び／又は安定性を改善するために、水、生理食塩水、適切な緩衝液、又は添加剤を含み得る；懸濁液を生成するための再構成は、抗体の生存率を確保するために適切な pH の緩衝液中で行われる。乾燥粉末はまた、安定性を改善するための添加剤、及び／又はバルク／体積を増加させるための担体を含み得る；例えば、乾燥粉末組成物は、スクロース又はトレハロースを含み得る。特定の非限定的な例では、組成物は、抗体を対象の胃腸管に送達するように処方することができる。したがって、組成物は、カプセル化、徐放、又は抗体の送達のための他の適切な技術を含み得る。本化合物を含む適切な組成物を調製することは、当業者の能力の範囲内である。

#### 【 0 1 0 8 】

[00133]抗体は、A X L 発現が調節不全である疾患若しくは状態の処置において使用され得るか、又はこのような使用のための医薬品の調製において使用され得る。抗体は、カーボ分子に連結され得るか、又は組成物に含まれ得る。本明細書に記載される抗体を使用して処置され得る疾患及び状態には、限定されないが、固形癌腫瘍、例えば、乳癌、腎臓癌、子宮内膜癌、卵巣癌、甲状腺癌、及び非小細胞肺癌、黒色腫、前立腺癌、肉腫、胃癌及びブドウ膜黒色腫が挙げられ；液性腫瘍、例えば、限定されないが、白血病（特に骨髄性白血病）及びリンパ腫が挙げられ；子宮内膜症、血管疾患／損傷（限定されないが、再狭窄、アテローム性動脈硬化症及び血栓症を含む）、乾癬；黄斑変性症による視覚障害；糖尿病性網膜症及び未熟児の網膜症；腎疾患（限定されないが、糸球体腎炎、糖尿病性腎症及び腎移植拒絶が含まれる）、関節リウマチ；変形性関節症、骨粗鬆症及び白内障が含まれる。処置され得る疾患及び状態には、以下の生物学的プロセスによって影響を受けるものも含まれ得る：癌に現れる浸潤、移動、転移、又は薬剤耐性；癌に現れる幹細胞生物学；浸潤、移動、癒着、又は血管新生；血管リモデリング；骨ホメオスタシス；ウイルス感染；又は肥満に現れる分化。式（I）の化合物はまた、敗血症を処置すること、ワクチンアジュバントとして作用すること、及び／又は免疫無防備状態の患者における免疫応答を増強することにより、炎症過程を調節するために使用され得る。非限定的な一例では、疾患又は状態は転移性癌であり得る。

#### 【 0 1 0 9 】

[00134]本発明は、以下の実施例においてさらに説明される。しかしながら、これらの実施例は、例示目的のみのためであり、いかなる方法でも本発明の範囲を限定するために使用されるべきではないことが理解されるべきである。

#### 【 実施例 】

##### 【 0 1 1 0 】

[00135]

[00136]実施例 1：抗 A X L 抗体の生成

[00137]A X L に対するモノクローナル抗体（m A b）は、組換えヒト A X L タンパク質（r h A X L - E C D；配列番号 5 8）の細胞外ドメインでマウスを免疫することによって、並びに遺伝子免疫化によって生成された。

##### 【 0 1 1 1 】

[00138]r h A X L - E C D の生成：C 末端での H i s 8 タグ付き組換えヒト（r h）A X L 細胞外ドメイン（E C D；配列番号 7 1）の合成した組換え断片を含む p T T 5 構

10

20

30

40

50

築物を C H O 細胞で発現させ、 N i - アガロースによって精製され、及び S D S - P A G E で検証した（データを示していない）。

【 0 1 1 2 】

[00139]免疫化：マウス m A b は、遺伝子免疫化によって生成された。遺伝子免疫のために、マウスから採血し（免疫前血清）、可溶性 r h A X L - E C D の発現のために 1 0 0  $\mu$  g の p T T 4 0 発現プラスミドを使用して、流体力学的尾静脈送達技術（ H T V ）によって 0 日目と 4 2 日目に免疫した。7 ~ 1 0 日後にマウスから採血し、血清力価を E L I S A で測定した。4 ~ 5 か月後、1 0 0  $\mu$  g の p T T 4 0 - A X L - H 8 G を使用したブースター注射が、融合実験の 3 ~ 4 日前に H T V によって行われた。

【 0 1 1 3 】

[00140]融合実験及びハイブリドーマの選択。すべての操作は無菌条件下で行われた。脾臓細胞を I M D M ( H y - C l o n e ) で回収し、 P E G 融合プロトコールを使用して N S 0 骨髄腫細胞株に融合させた。この目的のために、脾臓細胞及び骨髄腫細胞を I M D M で洗浄し、 R B C 溶解緩衝液（ S i g m a ）でカウントし、 5 : 1 比で一緒に混合した。ペレット化した細胞は、 P B S 中の P E G 4 0 0 0 ( E M D - M i l l i p o r e ) の 5 0 % 溶液 1 m l を 1 分かけて滴下することによって一緒に融合され、 3 7 でさらに 9 0 秒間インキュベートされた。2 2 で 2 分間かけて 3 0 m l の I M D M を添加することにより反応を停止させた。1 0 分間のインキュベーション後、新たに融合した細胞を 2 3 3  $\times$  g で 1 0 分間遠心した。細胞は、 1 0 % 热不活性化 F B S ( S i g m a ) を補足した I M D M で 1 回洗浄し、 2 0 % 热不活性化 F B S 、ペニシリン - ストレプトマイシン（ S i g m a ）、 1 n g / m l マウス I L - 6 ( B i o s o u r c e ) 、 H A T 培地サプリメント（ S i g m a ）及び L - グルタミンを含む H A T 選択培地（ I M D M ）に 1 m l あたり 2  $\times$  1 0  $^5$  個のインプット骨髄腫細胞の濃度で懸濁し、 3 7 、 5 % C O <sub>2</sub> でインキュベートされた。翌日、ハイブリドーマ細胞を洗浄し、 5 % 热不活性化 F B S 、 1 n g / m l マウス I L - 6 及び 1 0  $\mu$  g / m l の F I T C - F a b ' 2 ヤギ抗マウス I g G ( H + L ) ( J a c k s o n ) を補足した半固体培地 D ( S t e m C e l l ) に 1 m l あたり 2  $\times$  1 0  $^5$  個のインプット骨髄腫細胞の濃度で懸濁した。細胞混合物をペトリディッシュ（ G e n e t i x ）にプレーティングし、さらに 3 7 、 5 % C O <sub>2</sub> で 6 ~ 7 日間インキュベートした。次に、分泌型クローニングは、哺乳動物細胞クローニングピッカー（ C L O N E P I X T M F L 、 M o l e c u l a r D e v i c e s ）を使用して、 2 0 % 热不活性化 F B S 、ペニシリン - ストレプトマイシン（ S i g m a ）、 1 n g / m l マウス I L - 6 ( B i o s o u r c e ) 、 H T 培地サプリメント（ S i g m a ）及び L - グルタミンを含む I M D M の 2 0 0  $\mu$  l を含む滅菌 9 6 - w プレート（ C o s t a r ）に移され、 3 7 、 5 % C O <sub>2</sub> で 2 ~ 3 日間インキュベートされた。

【 0 1 1 4 】

[00141]ハイブリドーマ上清を回収し、 r h A X L - E C D タンパク質への結合について E L I S A によって評価した。このために、 9 6 w ハーフエリアプレート（ C o s t a r ）を、 P B S 中の 5  $\mu$  g / m l の r h A X L - E C D の 2 5  $\mu$  l で被覆し、 4 で一晩インキュベートした。マイクロプレートを P B S で 3 回洗浄し、 1 % の P B S - B S A でブロックし、 2 5  $\mu$  l のハイブリドーマ上清を添加し、 3 7 、 5 % C O <sub>2</sub> で 2 時間インキュベートした。プレートを 0 . 0 5 % の P B S - T W E E N ( 商標 ) 2 0 で 4 回洗浄し、 3 7 、 5 % C O <sub>2</sub> で 1 時間、ブロッキング緩衝液で 1 / 3 0 0 0 に希釈した 2 5  $\mu$  l の二次抗体アルカリホスファターゼをコンジュゲートした F ( a b ) ' 2 ヤギ抗マウス I g G ( H + L ) ( J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h ) とともにインキュベートした。0 . 0 5 % の P B S - T W E E N ( 商標 ) 2 0 で 4 回洗浄した後、 2 5  $\mu$  l の 1 m g / m l の p N P P 基質溶液を添加し、さらに 3 7 で 1 時間インキュベートした。O D 4 0 5 n m の測定は、マイクロプレートリーダー（ S p e c t r a m a x 3 4 0 P C 、 M o l e c u l a r D e v i c e s ）を使用して行われた。

【 0 1 1 5 】

[00142]E L I S A 陽性抗体を選択し（クローン F 1 0 7 - 7 H 5 、 F 1 0 7 - 8 D 1

10

20

30

40

50

2、F111-5E9、F111-3C8、及びF107-10G1を含む)、10ml体積のハイブリドーマ上清で小規模精製を行った。mAbをProtein G Mag SEPHAROSE(商標)Extra(GE Healthcare Life Sciences #28-9670-70)に吸着させて精製し、PBSで洗浄し、200μlのグリシン 200mM pH 2.5で2回溶出し、TRIS-HCl 1M pH 9.0で中和した。精製された抗体は、PBSであらかじめ平衡化されたZeba Spinレジン(Pierce)を使用して脱塩し、0.22μMメンブレン(Millipore)で濾過滅菌した。抗体溶液の最終濃度は、ナノドロップ(#ND-1000)で決定した。

## 【0116】

10

[00143]実施例2：抗AXL mAbの交差反応性評価

[00144]組換えAXLエクトドメインについての実施例1で精製された抗hAXLモノクローナル抗体の交差反応性結合特性を評価した。

## 【0117】

[00145]TAM受容体チロシンキナーゼサブファミリーの他のメンバーに対するmABの交差反応性を評価するために、mAbのrhAXL-ECD、rhMER-ECD、rhTyro-3及びBSA(陰性対照)への結合をELISAにより測定した。96-wハーフエリアプレート(Costar)を、PBS中5μg/mlのrhAXL-ECD、rhMER-ECD、rhTyro-3又はBSA 25μlで被覆し、4で一晩インキュベートした。マイクロプレートをPBSで3回洗浄し、1%のPBS-BSAでブロックし、1%のPBS-BSAで希釈した10μg/mlの25μlを添加し、37、5%CO<sub>2</sub>で2時間インキュベートした。プレートを0.05%のPBS-TWEEN(商標)20で4回洗浄し、37、5%CO<sub>2</sub>で1時間、ブロッキング緩衝液で1/5000に希釈した25μlの二次抗体アルカリホスファターゼをコンジュゲートしたF(ab)'2ヤギ抗マウスIgG(H+L)(Jackson Immuno Research)とともにインキュベートした。0.05%のPBS-Tween 20で4回洗浄した後、25μgの1mg/ml pNPP基質溶液を添加し、さらに37で1時間インキュベートした。OD 405nmの測定は、マイクロプレートリーダー(Spectra max 340 PC, Molecular Devices)を使用して行われた。

20

## 【0118】

30

[00146]表1は、同じタンパク質ファミリー由来の他の標的に対する抗AXLモノクローナル抗体の交差反応性評価の結果を提供する。OD 405nmでの測定値を示す。

## 【表1】

精製された抗体	被覆抗原				
	AXL	MER	Tyro3	BSA	
	F107-7H5-2	2,403	0,000	0,000	0,000
F107-8D12-2	2,592	0,000	0,000	0,000	40
F107-10G1-3	1,758	0,000	0,000	0,000	
F111-3C8-2	2,301	0,000	0,000	0,000	
F111-5E9-2	1,364	0,000	0,000	0,000	

## 【0119】

[00147]交差反応性評価の結果は、5つのmAbがAXLの細胞外ドメインに特異的に結合する、すなわち、それらがBSA又はTAMファミリーの他のメンバー、すなわちT

50

y r o 3 及び M E R の細胞外ドメインと交差反応しないことを示している。

【 0 1 2 0 】

[00148]実施例 3 : A D C ポテンシャルの機能的特徴付け

[00149]実施例 1 で精製された抗 h A X L - E C D モノクローナル抗体を、 A D C 代替スクリーニングアッセイにおいて、それらの内在化能力及び抗体 - 薬物コンジュゲート ( A D C ) ポテンシャルについて評価した。非小細胞肺癌 ( N S C L C ) A 5 4 9 細胞、乳癌 M D A - M B 2 3 1 細胞、又は膠芽腫 U 8 7 M G 細胞が使用され、これらはすべて中程度から高レベルの A X L を発現する。目的の腫瘍標的 ( すなわち、 A X L ) を発現することが公知である 2 つ以上の腫瘍細胞株において、二次的にコンジュゲートしたサポリンベースの細胞傷害性スクリーニングで低い又はサブ n M ( I C 5 0 ) 効力を示す m A b が選択された。 10

【 0 1 2 1 】

[00150]細胞培養。次の細胞株は、 A T C C から取得され、供給業者の推奨に従って培養された : A 5 4 9 ヒト非小肺癌 ( N S C L C ) 、 M D A - M B - 2 3 1 三重陰性 ( E R - / P R - / H E R 2 低 ) 乳癌 ( T N B C ) 、及び U 8 7 M G 膠芽腫細胞株。一般的に、細胞は、週に 1 ~ 2 回継代され、すべての実験で 4 ~ 6 週間以内に使用された。

【 0 1 2 2 】

[00151]抗体 - 薬物コンジュゲートとしての抗体媒介性細胞傷害の評価。一次マウス抗体 ( 典型的には濃度 1 n M ) は、細胞死を引き起こすために内在化する必要があるリボソーム不活化酵素であるサポリン毒素 ( A d v a n c e d T a r g e t i n g S y s t e m s 、 S a n D i e g o 、 C A ) と化学的にコンジュゲートした等モル濃度の抗マウス二次抗体とともにインキュベートされた。次に、抗体複合体は、示された細胞型 ( 3 重にしてブレーティングされた ) に追加され、細胞生存率へのそれらの影響が、 3 7 での 3 日間のインキュベーション後に測定された。一次抗体なし ( 二次抗体のみ ) 又は無関係な一次抗体 ( 対照ヒト I g G ) とのインキュベーションを使用して、非標的指向性細胞傷害を評価した。細胞の生存率及び代謝は、アラマーブルーのようなレズリジン色素、又はスルホローダミン B などのタンパク質含有量を測定する試薬を使用するなど、従来の方法を使用して測定された。 20

【 0 1 2 3 】

[00152]A 5 4 9 N S C L C 細胞は、 9 6 ウェルプレート中の R P M I - 5 % F B S 中に、 1 0 0  $\mu$  l の R P M I - 5 % F B S 中、 2 0 0 0 細胞 / ウェルの密度でブレーティングされた。翌日、 2 0 n M の抗 A X L m A b を 2 0 n M の M a b - Z a p 二次抗体 ( A d v a n c e d T a r g e t i n g S y s t e m s 、 S a n D i e g o 、 C A ) と混合し、 3 0 分間、室温でインキュベートした ; 1 n M の最終濃度の抗 A X L m A b ( F 1 0 7 - 7 H 5 、 F 1 0 7 - 8 D 1 2 、 F 1 1 1 - 5 E 9 、 F 1 1 1 - 3 C 8 、又は F 1 0 7 - 1 0 G 1 ) とサポリンをコンジュゲートした抗マウス二次抗体 ( M a b - Z a p ) の 1 : 1 複合体が細胞とインキュベートされるように、 1 1  $\mu$  l のこの混合物を細胞に 3 重にして添加した。 7 2 時間のインキュベーション ( 3 7 、 5 % C O 2 、加湿インキュベーター ) の後、アラマーブルーを使用して製造元 ( B I O S O U R C E ) の指示に従って細胞生存率を決定した。続いて、 1 n M の濃度で A 5 4 9 細胞の生存率を 5 0 % を超えて低下させた抗体はまた、上記の方法を使用して乳癌 M D A - M B 2 3 1 細胞、又は神経膠芽腫 U 8 7 M G 細胞株における細胞傷害性の影響を試験された。 30

【 0 1 2 4 】

[00153]図 2 は、抗 h A X L - E C D m A b についての A D C 代理スクリーニングアッセイの結果を示す。アッセイの抗体は、二次コンジュゲートのみ ( M a b - Z a p ) で処理された細胞と比較して、 A 5 4 9 細胞の生存率を著しく低下させた。提示されているのは、 3 重の実験の平均値 + S E M である。 40

【 0 1 2 5 】

[00154]図 2 では、細胞の生存は、 m A b - Z A P 二次コンジュゲートのみの生存 ( 1 0 0 % として示されている ) と比較して表されている。選択した m A b クローン ( F 1 0 50

7 - 7 H 5、F 1 0 7 - 8 D 1 2、F 1 0 7 - 1 0 G 1、F 1 1 1 - 3 C 8、及び F 1 1 1 - 5 E 9 ) は、 A 5 4 9 細胞及び少なくとも 1 つ以上の細胞株で生存率を 5 0 % を超えて低下させ、高細胞傷害性薬物 D M 1 への直接コンジュゲーションのために選択された。試験された 2 5 0 を超える一次マウス m A b の中から、これらの 5 つの抗体に関連する高度の細胞傷害性 ( I C 5 0 < 1 n M ) は、それらが高度の内在化及び適切な細胞内ルーティングを示し、サポリン毒素の活性化を達成し、それらを A D C 開発に理想的なものにすることを実証する。当然のことながら、このスクリーニングで同定された抗体はすべて、腫瘍細胞の表面で A X L へのかなりの結合を示した ( 図 3 ) 。

【 0 1 2 6 】

[00155] 図 3 は、細胞表面に発現された A X L に対する抗 A X L m A b の結合特性を決定するフローサイトメトリー実験の結果を示す。パネル A は線形スケールの用量 - 反応曲線を示し、パネル B は対数スケールの用量 - 反応曲線を示す。

【 0 1 2 7 】

[00156] 実施例 4 : D M 1 コンジュゲーション及び A D C 試験

[00157] 実施例 1 で精製された抗 h A X L - E C D モノクローナル抗体は、リジン残基を介して、N 2 ' - デアセチル - N 2 ' - ( 3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル ) - メイタンシン ( D M 1 ) に結合したスクシンイミジルトランス - 4 - [ マレイイミジルメチル ] シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート ( S M C C ) にコンジュゲートした。生成物の純度及び薬物 : 抗体比は、U P L C ベースのサイズ排除クロマトグラフィー ( S E C ) によって決定された。

【 0 1 2 8 】

[00158] コンジュゲーション : 精製された抗 h A X L - E C D m A b ( F 1 0 7 - 7 H 5、F 1 0 7 - 8 D 1 2、F 1 1 1 - 5 E 9、F 1 1 1 - 3 C 8、又は F 1 0 7 - 1 0 G 1 ; 実施例 1 ) は、コンジュゲーション緩衝液 ( 1 0 0 m M リン酸ナトリウム、 2 0 m M N a C l 、 2 m M E D T A p H 7 . 2 ) に、事前平衡化したスピン脱塩カラムを使用して緩衝液交換された。各 m A b の濃度は、コンジュゲーション緩衝液で 2 m g / m L に調整され、各々合計 2 0 0  $\mu$  g がコンジュゲーションに使用された。 S M C C - D M 1 の原液をジメチルアセトアミド ( D M A ) で調製した。 D M A 原液からの S M C C - D M 1 を各 m A b に添加して、 S M C C - D M 1 : m A b のモル比を 1 0 . 0 にした。溶液を完全に混合し、 3 7 で 3 時間インキュベートした。反応は、 0 . 0 2 % w / v のポリソルベート - 2 0 を添加したコンジュゲーション緩衝液で平衡化した 2 つのスピン脱塩カラムに反応混合物を通すことで停止された。

【 0 1 2 9 】

[00159] 薬物 - 抗体比 ( D A R ) は、 2 8 0 n m と 2 5 2 n m の両方での U P L C - S E C クロマトグラムからの単量体ピークを積分し、これらを同じ波長での非コンジュゲート抗体及び遊離薬物の減衰係数の比と比較することにより決定された。単量体パーセントは、クロマトグラムで観察された単量体、高分子量種、及び低分子量種の合計面積から決定された。結果を表 2 に示す。これは、 D M 1 にコンジュゲートした F 1 0 7 - 7 H 5 、 F 1 0 7 - 8 D 1 2 、 F 1 1 1 - 5 E 9 、 F 1 1 1 - 3 C 8 、及び F 1 0 7 - 1 0 G 1 について U P L C - S E C によって決定された薬物抗体比及び凝集体パーセントを提供する。

10

20

30

40

50

## 【表2】

表2 薬物-抗体比及び凝集体パーセント		
mAb	DAR	凝集体パーセント
F111-3C8	7.21	27.0
F107-7H5	5.46	1.1
F107-8D12	4.90	1.8
F107-10G1	5.21	0.7
F111-5E9	5.22	1.1

## 【0130】

[00160]細胞培養。N C I - H 2 9 2 及び A 5 4 9 ヒト非小細胞肺癌 (N S C L C) 及び M D A - M B - 2 3 1 三重陰性 (E R - / P R - / H E R 2 低) 乳癌 (T N B C) 細胞株を A T C C から入手し、供給業者の推奨に従って培養した。H a C a T 細胞は、自然発生的に不死化されたヒトのケラチノサイト株であり、皮膚の生物学及び分化の研究に広く使用されている。この細胞株を C e l l L i n e S e r v i c e s 、 D K F Z 、 H e i d e l b e r g 、 G e r m a n y から入手し、供給業者の推奨に従って培養した。一般的に、細胞は週に 1 ~ 2 回継代され、すべての実験で 4 ~ 6 週間以内に使用された。

## 【0131】

[00161]A D C 試験：上記で調製した抗 A X L A D C は、非小細胞肺癌 (N S C L C) N C I - H 2 9 2 及び A 5 4 9 細胞株、ヒト乳腺癌 M D A - M B - 2 3 1 腫瘍細胞株、並びに不死化されたケラチノサイトを含む、A X L を発現することが公知である様々な培養細胞株の生存率における影響について試験された。5 日間の曝露後、スルホローダミン B 試薬を使用して細胞増殖 / 生存率を評価し、用量 - 反応曲線を作成して、1 0 g (阻害剤) 対応答 - - G r a p h P a d P r i s m v 6 . 0 ソフトウェアの可変勾配 (4 つのパラメーター) モデルを使用して、効力 (I C 5 0 ) 及び有効性 (最大阻害 % ) を測定した。

## 【0132】

[00162]図 4 は、A X L を表現する、H 2 9 2 腫瘍細胞株、A 5 4 9 細胞株、ヒト乳腺癌 M D A - M B - 2 3 1 腫瘍細胞株、並びに不死化された H a C a T ケラチノサイト細胞の細胞生存率における抗 A X L - D M 1 コンジュゲートの活性の結果を示す。

## 【0133】

[00163]非標的化非関連ヒト I g G - D M 1 コンジュゲート陰性対照と比較して分析された腫瘍細胞株において、D M 1 をコンジュゲートした抗 A X L 抗体は、良好な効力 (5 5 ~ 7 4 % の最大増殖阻害) 及び強力な有効性 (I C 5 0 < 0 . 1 n M) を実証した。対照的に、A X L を発現する、非腫瘍形成性の不死化された H a C a T ケラチノサイト細胞では、毒性はほとんど見られなかった。

## 【0134】

[00164]表 3 は、抗 A X L 抗体の A D C 試験の結果を提供する。最大阻害 % = 最大阻害のパーセント。

10

20

30

40

50

## 【表3】

表3 抗AXL抗体のADC試験の結果							
細胞株		F107-7H5-DM1	F107-8D12-DM1	F107-10G1-DM1	F111-3C8-DM1	F111-5E9-DM1	hIgG-DM1
H292 NSCLC	IC <sub>50</sub> (nM)	0.113	0.176	0.044	0.419	0.159	>10
	最大阻害%	74.0	72.8	57.7	70.3	64.6	不完全
A549 NSCLC	IC <sub>50</sub> (nM)	0.120	0.218	0.058	0.313	0.169	>10
	最大阻害%	58.5	61.8	55.7	71.2	70.0	不完全
231 TNBC	IC <sub>50</sub> (nM)	0.037	0.056	~0.029	0.147	0.067	>10
	最大阻害%	71.4	73.4	64.9	77	69.2	不完全
HaCaT	IC <sub>50</sub> (nM)	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし	効果なし
	最大阻害%	不完全	不完全	不完全	不完全	不完全	不完全

## 【0135】

[00165]実施例5：フローサイトメトリーによる細胞表面結合

[00166]実施例1で精製された抗hAXL-ECMモノクローナル抗体の細胞表面上のAXLへの結合特性は、抗hAXL-ECM mAbによる強力な阻害により、H292細胞株を用いたフローサイトメトリーによって評価された（実施例2を参照されたい）。

## 【0136】

[00167]フローサイトメトリーによる表面AXLへの抗体結合の検出。分析の前に、細胞は分析の日に80%以下のコンフルエントになるようにプレーティングされた。細胞をPBSで洗浄し、細胞解離緩衝液（Sigma）を添加して回収した。2.5×10<sup>5</sup>細胞を含む細胞懸濁液（500 μlの対応する細胞培養培地中）を様々な濃度（0.01~10 nM）の抗AXL抗体と4℃で2時間（内在化を防ぐため）インキュベートした。細胞培養培地で1回洗浄した後、一次抗体を100 μlの培地中で2 μgのDYLIGHT（商標）488をコンジュゲートしたAffiniPureヤギ抗マウスIgG Ale x a 488二次抗体（Jackson ImmunoResearch）とともに1時間、4℃でインキュベートした。分析前に、細胞ペレットを300~500 μlの培地中に再懸濁し、50 μmナイロンメッシュフィルターで濾過して細胞凝集体を除去した。フローサイトメトリー分析は、BD LSR IIフローサイトメーター（Becton-Dickinson Biosciences, CA, USA）及びBD FACS Diva（商標）取得ソフトウェアを備えた標準フィルターセットを使用して、製造元の指示に従って、前方散乱、側方散乱パラメーター、及びヨウ化プロピジウム色素排除でゲートをかけた10,000個の生存細胞について行われた。

## 【0137】

[00168]抗体結合の特異的検出は、一次抗体の非存在下（しかし検出抗体を含む）での結合の平均蛍光強度をバックグラウンドレベルで差し引いた後、各々の一次抗体への結合の平均蛍光強度として計算された。次に、結合パラメーターB<sub>max</sub>（受容体飽和時の最大蛍光シグナル）、及びK<sub>D</sub>（見かけの細胞結合定数）をGraphPad Prism v6.0のヒルスロープモデルによる1部位-特異的結合を使用して決定した。

## 【0138】

[00169]結果を図3及び表4に示す。これらの結果は、mAb 7H5、8D12、及び5E9が、陰性結合対照（300 nMマウスIgG）と比較して、強く結合したことを見た（見かけの結合定数はK<sub>D</sub> 1 nMである）。

## 【0139】

[00170]表4は、H292細胞上の細胞ベースのAXLへの抗AXL mAbの結合特性を提供する。

## 【表4】

表4 H292 細胞での細胞ベースの AXL に対する抗 AXL mAb の結合特性					
最適値	F107-8D12	F107-7H5	F111-3C8	F107-10G1	F111-5E9
Bmax (MFI)	1309	1431	1477	937	1149
Kd (nM)	0.08802	0.1038	1.227	0.1005	0.1767

## 【0140】

10

[00171]実施例6：エピトープビニング実験

[00172]実施例1の抗 h A X L - E C D m A b が同じエピトープ領域に結合するかどうかを評価するために、表面プラズモン共鳴エピトープビニング実験を行った。

## 【0141】

[00173]抗体は、チップ表面（「m A b 1」）上に直接固定化され、その後、r h A X L E C D が流され、続いて同じ又は異なる抗体（「m A b 2」）が流された。すべての実験は、泳動緩衝液として P B S T (0.05% v / v の T w e e n 2 0 を含む P B S) を使用して、25°C で P r o t e O n X P R 3 6 バイオセンサーで行われた。G L M センサーチップ及びカップリング試薬 (10 mM 酢酸ナトリウム、p H 4.5、スルホ-N-ヒドロキシスルホンイミド (S N H S)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミンポルピル) - カルボジアミド塩酸塩 (E D C)、及びエタノールアミド) は、B i o R a d, I n c から購入した (H e r c u l e s, C A)。

20

## 【0142】

[00174]抗体アレイの作製。抗体 (M a b 1) を G L M チップ表面に 30 μl / 分で固定化した。活性化試薬 (水中で 0.4 M E D C 及び 0.1 M S N H S のストック濃度) をそれぞれ、水中で 20 倍に希釈した。上部 (A 1) の水平チャネル (P r o t e o n 制御ソフトウェアの A n a l y t e チャネル) を、希釈した活性化試薬で 3 分間活性化した。次に、m A b (実施例1) をそれぞれ 10 mM 酢酸塩 p H 4.5 で 20 μg / ml に希釈し、別々の垂直 (L 1 ~ L 6) チャネル (P r o t e o n 制御ソフトウェアのリガンドチャネル) で 3 分間注入した後、反応性スポットをブロックするためにエタノールアミンを 3 分間注入した。次に、マルチチャネルモジュール (M C M) を回転させ、活性化された水平チャネル (A 1) でエタノールアミンをさらに 3 分間注入した。次に、この 4 ステップの「活性化 - 結合 - 及び - 2 × 脱活性化」の手順を各水平チャネル (A 2 ~ A 6) で繰り返した。

30

## 【0143】

[00175]サンドイッヂエピトープビニング。2ステップのサンドイッヂエピトープビニングは、検体の配向で 30 μl / 分で行われた。100 nM r h A X L - E C D タンパク質を 3 分間注入し、すぐに 100 nM m A b 2 を 3 分間注入した。固定化された m A b (m A b 1) 表面は、0.85% リン酸を 100 μl / 分で 18 秒間注入することにより再生された。この 2 段階の注入 (r h A X L - E C D - m A b 2) は、個々の m A b 2 ごとに繰り返された。各 m A b はまた、m A b 1 (チップ上に固定化) 及び m A b 2 (溶液中) として同時に試験された。固定化された m A b 1 からの A X L 解離をモニタリングするために、m A b 2 の代わりに P B S T を注入した。

40

## 【0144】

[00176]表5は、m A b のエピトープビニング結果を提供する。「n c」というラベルの付いた細胞は競合がないことを示し、「s c」の細胞は自己競合を示し、「C」の細胞は競合を示す。

50

## 【表5】

表5 mAb のエピトープビニング結果					
	F107-8d12	F107-7H5	F111-3C8	F111-5E9	F107-10G1
F107-8D12	sc	<b>C</b>	nc	nc	nc
F107-7H5	<b>C</b>	sc	nc	nc	nc
F111-3C8	nc	nc	sc	<b>C</b>	nc
F111-5E9	nc	nc	<b>C</b>	sc	nc
F107-10G1	nc	nc	nc	nc	sc

## 【0145】

[00177]表5に示される結果から、mAbのうちの4つが2つのエピトープビンに分類され、すなわち、それらがAXLへの結合について互いに競合することが分かり得る；7H5は8D12と競合し、その逆も同様であり、3C8は5E9と競合し、その逆も同様である。10G1は他のmAbと競合しない。対照的に、ADCサロゲートアッセイで内在化する能力に基づいて選択されなかった抗AXL mAbは、多数のビンにそれ自体を分散する傾向があった（データを示していない）。このデータは、抗体を内在化するための機能的選択が、AXL細胞外ドメインの3つの主要な部位に選択的に結合するサブセットをもたらすことを示唆する。さらに、同様の方法を使用した追加のSPR結合研究により、これらの部位が免疫グロブリン様ドメイン1及び2内の領域に対応することが実証された。個々のAXL細胞外サブドメイン（免疫グロブリン様ドメイン又はフィブロネクチンタイプII様ドメイン）を用いて行われたエピトープビニング実験（上記と同じ方法）により、mAb F107-10G1が免疫グロブリン様ドメイン1の配列に結合し、試験された他のすべてのIgL1結合抗体と競合しないことを示し、これは、完全なAXLエクトドメインを利用した結果と一致する。これらの結果は、ADC mAbが相互作用する免疫グロブリン様ドメイン1内に少なくとも2つの別個のエピトープがあることを示している。

## 【0146】

[00178]実施例7：酵母表面提示によるエピトープマッピング

[00179]酵母表面提示を使用して、実施例1の抗hAXL-ECD mAbが結合する配列をマッピングした。

## 【0147】

[00180]エピトープマッピング。hAXLエクトドメイン（ECD）及びその断片は、酵母表面提示法（Feldhausら、2003年）を使用して、酵母細胞の表面に発現され、共有結合で提示された。YSDベクター（pPNL6）は、米国太平洋北西国立研究所からのものである。hAXL-ECD全体（図5）をカバーするhAXL断片は、酵母細胞表面で融合タンパク質（Agg2-HA-（hAXL）-MYC）として発現された。提示されたhAXL断片を使用して、実施例1の抗hAXL-ECD mAbが結合するhAXLのドメインをマッピングした。酵母細胞へのmAbの結合は、全酵母細胞ELISAを使用して行われた。提示された融合タンパク質の相対量は、抗MYC抗体、続いてHRPをコンジュゲートした二次抗体でプローブすることにより測定され、実施例1のmAbの結合シグナルを正規化するために使用された。

## 【0148】

[00181]図5は、ヒトAXLエクトドメイン及び膜貫通ドメインの略図である。抗AXL mAbの結合エピトープをマッピングするために、hAXL-ECD全体をカバーする10個のペプチドが酵母膜上で発現された。ペプチドが示され、1~10の番号が付けられている。

10

20

30

40

50

## 【0149】

[00182]表6は、提示された酵母細胞上のAXL細胞外ドメインの様々な領域への抗AXL mAb結合の結果を示す。実施例1のmAbは2つの領域に結合する：免疫グロブリン様ドメイン1(IgL1、aa26~138に対応する)又は免疫グロブリン様ドメイン2(IgL2、aa135~226に対応する)。これらの結果は、実施例6で得られた結果と一致している。

## 【表6】

表6 AXL細胞外ドメインの様々な領域への抗AXL mAb結合の結果		
mAb	エピトープの位置	エピトープの立体構造
F107-7H5	IgL1	立体構造的
F107-8D12	IgL1	立体構造的
F111-5E9	IgL2	立体構造的
F111-3C8	IgL2	立体構造的
F107-10G1	IgL1	立体構造的

## 【0150】

[00183]エピトープの性質。mAbのエピトープが連続的(線形)であるか又は非連続的(立体構造的)であるかを決定するために、IgL1又はIgL2ドメインのいずれかの様々な断片を酵母細胞に発現して提示させ、上記のように細胞ELISAを使用してmAbへの結合をアッセイした。いずれのIgLドメインのサブ断片も、実施例1のいずれかのmAbに有意に結合しないが、これらのサブ断片は、抗MYCシグナルのシグナルで判断すると、酵母細胞の表面によく提示される。これらの結果は、実施例1のmAbのエピトープがIgLドメインの完全な配列情報を必要とし、したがって大部分が立体構造的であることを強く示唆する。

## 【0151】

## [00184]実施例8：抗体配列決定

[00185]実施例1の抗hAXL mAbのVH及びVLドメインを配列決定し、分析した。

## 【0152】

[00186]VH及びVLドメイン並びにCDR領域の配列を表7に示す。VH及びVL鎖のCDR1-3領域のコンセンサス結合配列の配列分析は、ウェブベースのソフトウェアを使用して行われた。この分析の結果は、mAb F107-7H5のVH領域とVL領域の両方のCDR領域がF107-8D12のCDR領域と非常に類似していることを示している(2アミノ酸の変化)。これらの抗体は一緒にクラスター化し、IgL1内の共通の線形エピトープを認識する。対照的に、F107-10G1(選択されたIgL1結合抗体の大部分とは異なるIgL1上の部位に結合する)を除いて、残りの抗体は、より小さな分化クラスターを形成する傾向があり、その大部分はIgL2に結合する。

10

20

30

40

50

## 【表7】

表7 mAb F107-7H5、F107-8D12、F111-5E9、F111-3C8、及びF107-10G1の CDR配列				
mAb	軽鎖CDR		重鎖CDR	
F107-7H5	V <sub>L</sub>	配列番号38 KSSQSLLNSRTRKIYLA (配列番号9)	V <sub>H</sub>	配列番号39 GYTFTSYWIN (配列番号12)
	L1	WASTRQS (配列番号10)	H2	NIYPDSSSTNYNEKFKS (配列番号13)
	L2	KQSYNLWT (配列番号11)	H3	DTYGGSPDY (配列番号14)
	L3			
F107-8D12	V <sub>L</sub>	配列番号40 KSSQSLLNTRTRKNYLA (配列番号15)	V <sub>H</sub>	配列番号41 GYTFISFWIN (配列番号17)
	L1	WASTRES (配列番号16)	H2	NIFPGSSSTNYNEKFKS (配列番号18)
	L2	KQSYNLWT (配列番号11)	H3	DYYGGSPDY (配列番号19)
	L3			
F111-3C8	V <sub>L</sub>	配列番号42 SASSSVSYMY (配列番号26)	V <sub>H</sub>	配列番号43 GYTFTSYWMH (配列番号29)
	L1	RTSNLAS (配列番号27)	H2	NINPNSTSADYNEKFKR (配列番号30)
	L2	QQYHNPPT (配列番号28)	H3	PLMGPWYFDV (配列番号31)
	L3			
F111-5E9	V <sub>L</sub>	配列番号44 RASQDINNYLN (配列番号20)	V <sub>H</sub>	配列番号45 KYGMN (配列番号23)
	L1	YISRLHS (配列番号21)	H2	WINTYTGEPTYADDFKG (配列番号24)
	L2	QQGNTLPFT (配列番号22)	H3	GGYYSNPIYPMDY (配列番号25)
	L3			
F107-10G1	V <sub>L</sub>	配列番号46 KASQDVTTAVA (配列番号32)	V <sub>H</sub>	配列番号46 NYGMS (配列番号35)
	L1	WASTRHT (配列番号33)	H2	SISGGGGRTYYLDNVKG (配列番号36)
	L2	QQHFTTPLT (配列番号34)	H3	GARASYFAMDY (配列番号37)
	L3			

10

20

30

40

## 【0153】

[00187]実施例9：組換え抗体の生成及び精製

[00188]大規模なmAb生成及び生成間の一貫性を促進するために、実施例8で同定された抗hAXL-ECD-mAbをCHO細胞中で組換えにより生成した。

## 【0154】

[00189]VH及びVL領域（実施例8を参照されたい）は、ヒトIgG1定常領域（それぞれヒトIgG1重鎖及びヒトカッパ軽鎖）との融合体としてpTT5ベクターにクローニングされ、それによりキメラmAbを生成した。

## 【0155】

[00190]表8は、キメラmAb：hFC-F107-7H5、hFC-F107-8D

50

12、hFC-F111-5E9、hFC-F111-3C8、及びhFC-F107-10G1の各々の配列を提供する。さらに、すべての軽鎖配列は、N末端にシグナル配列MVLQTQVFISSLWLWISGAYG(配列番号59)を含み、一方、重鎖配列は、N末端にシグナル配列MDWTWRILFLVAAATGTHA(配列番号60)を含んだ。

【表8】

表8 キメラ化 mAb の配列	
mAb	配列
hFC-F107-7H5 軽鎖	配列番号48
hFC-F107-7H5 重鎖	配列番号49
hFC-F107-8D12 軽鎖	配列番号50
hFC-F107-8D12 重鎖	配列番号51
hFC-F111-3C8 軽鎖	配列番号52
hFC-F111-3C8 重鎖	配列番号53
hFC-F111-5E9 軽鎖	配列番号54
hFC-F111-5E9 重鎖	配列番号55
hFC-F107-10G1 軽鎖	配列番号56
hFC-F107-10G1 重鎖	配列番号57

10

20

30

【0156】

[00191]キメラmAb発現は、2mLの発現スカウトを介して検証された：CHO細胞は、VL及びVH含有構築物(1:1比)で一過性にトランスフェクトされた；馴化培地(CM)を7日目に回収し、mAb発現レベルをSDS-PAGEで評価した(データを示していない)。キメラmAbは十分に発現し、小規模生成(50mL)は、同じ構築比でCHO細胞を一過性にトランスフェクトすることにより開始された。7日目に馴化培地(CM)を回収し、キメラmAbを精製(Protease)して定量し、SDS-PAGEで評価した。データは、5つすべてのキメラmAbが一過性にトランスフェクトされたCHO細胞によって十分に発現されたことを示した。

【0157】

[00192]組換え的に発現されたキメラmAbがハイブリドーマ発現されたmAbと同様に挙動することを確認するために、SPR結合実験は、AXL結合が損なわれないことを確実にするために行われる。

【0158】

[00193]実施例10：抗AXL mAb及びsdAbの単離

[00194]この実施例では、ヒトAXLエクトドメインに対して指向されたラマsdAbの単離が行われる。

【0159】

[00195]材料及び方法

[00196]組換えヒトAXLエクトドメイン(rhAXL ECD)の生成。C末端でのHis8タグ付き組換えヒトAXL細胞外ドメインの合成した組換え断片を含む哺乳動物発現ベクター(pTT5)をCHO細胞に一過性にトランスフェクトし、Ni-agaroseで精製し、及びSDS-PAGEで検証した(データを示していない)。

40

【0160】

[00197]ラマ単ードメイン抗体(sdAb)の生成。ラマsdAb(sVHH)は、ラマをrhAXL ECDタンパク質で免疫し、続いて、末梢血リンパ球から構築された、ファージ提示されたVHHライブラリーをパニングすることによって生成された。簡単に言うと、一頭のラマ(ラマグラマ)を、0、21、28、35、及び42日目に100μgのrhAXLで免疫した。抗原は、0日目にフロイント完全アジュバントとともに、並

50

びに 21、28、35 及び 42 日目にフロイント不完全アジュvantとともに混合された。血清は、0 日目（免疫前）の最初の免疫化前、並びに 35 及び 49 日目に採取され、次に、プロテイン A 及びプロテイン G アフィニティークロマトグラフィーを使用して、重鎖 IgG (hc IgG) から別々の従来の IgG (c IgG) に分画された。非分画及び分画の血清における rhAXL に対する ELISA を行った。簡単に言えば、PBS で希釈した 1 μg の rhAXL を 96 ウェル MAXISORP (商標) プレート (Nalge Nunc International, Rochester, NY) に一晩 (100 μl / ウェル、18 時間、4°C) 被覆した。プレートを 5% スキムミルク / PBS-T でプロックし、PBS-T (PBS + 0.05% (v/v) Tween 20) で洗浄し、免疫前の総（未分画）血清、免疫後の総血清（35 及び 49 日目）並びに分画された血清（49 日目；100 μg / ml の開始濃度）の連続希釈物を適用した。室温で 1.5 時間インキュベートし、PBS-T で洗浄した後、ヤギ抗ラマ IgG-HRP (PBS で 1:10,000) を 37°C で 1 時間添加した。最後の PBS-T 洗浄は、100 μl / ウェルの TMB 基質 (KPL, Gaithersburg, MD) を 10 分間添加する前に行われた。反応を 100 μl / ウェルの 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> で停止し、BioRad プレートリーダー (Hercules, CA) で 450 nm にて読み取った。

#### 【0161】

[00198] ファージ提示された VHH ライブラリー構築のために、QIAamp RNA 血液ミニキット (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) を使用して、免疫後の 35 日目及び 49 日目に収集された約 5 × 10<sup>7</sup> 個のリンパ球から RNA を単離した。約 10 μg の総 RNA は、First-Strand cDNA 合成キット (GE Healthcare, Baie-d'Urfe, QC, Canada) を使用して、オリゴ dT プライマーを用いた第 1 鎮 cDNA 合成のテンプレートとして使用された。cDNA は、3 つの可変領域特異的センスプライマー (MJ1, MJ2、及び MJ3) 及び 2 つのアンチセンス CH2 特異的プライマー (CH2 及び CH2b3) の等モルの混合物によって PCR 増幅された。簡単に言うと、PCR 反応混合物は、50 μl の合計容量で、次の成分を用いてセットアップされた：5 μl の cDNA、5 pmol の MJ1-3 プライマー混合物、5 pmol の CH2 又は CH2b3 プライマー、5 μl の 10× 反応緩衝液、1 μl の 10 mM dNTP 及び 2.5 ユニットの PLATINUM (登録商標) Taq DNA ポリメラーゼ (Invitrogen / Life Technologies, Burlington, ON, Canada)。PCR プロトコールは、94°C で 3 分間の最初のステップ、続いて 94°C で 30 秒間、57°C で 45 秒間、72°C で 1 分間の 30 サイクル、及び 72°C で 10 分間の最終の伸長ステップで構成された。増幅された PCR 産物を 2% アガロースゲルで泳動し、2 つの主要なバンド：従来の IgG に対する約 850 bp のバンド、及び重鎖抗体 (hc IgG) に対する約 600 bp のバンドが観察された。小さいバンドは、QIAquick ゲル抽出キット (QIAGEN) を使用して切断及び精製され、1 μl の DNA テンプレート、各 5 pmol の MJ7 プライマー及び MJ8 プライマー、5 μl の 10× 反応緩衝液、1 μl の 10 mM dNTP、及び 2.5 ユニットの PLATINUM (登録商標) Taq DNA ポリメラーゼを使用して、50 μl の合計体積で 2 回目の PCR で再増幅された。PCR プロトコールは、94°C で 3 分間の最初のステップ、続いて 94°C で 30 秒、57°C で 30 秒、及び 72°C で 1 分間の 30 サイクル、並びに 72°C で 7 分間の最終の伸長ステップで構成された。340 bp ~ 420 bp の範囲であり、hc IgG の VHH 断片に対する増幅された PCR 産物は、QIAquick PCR 精製キット (QIAGEN) を使用して精製され、SfiI 制限酵素 (New England Biolabs, Pickering, ON, Canada) で消化され、同じキットを使用して再精製された。50 μg の pMED1 ファージミドを 50 μl にて一晩 SfiI で消化した。

#### 【0162】

[00199] 自己連結を最小限にするために、20 ユニットの Xhol 及び PstI 制限酵素を添加し、消化反応を 37°C でさらに 2 時間インキュベートした。T4 DNA リガーゼ

10

20

30

40

50

ゼ ( *In vitro* *g*en ) 及びそのプロトコールを使用して、  $20\ \mu\text{g}$  の消化されたファージミド *DNA* を  $6\ \mu\text{g}$  の消化された *VHH* 断片と 3 時間、 室温で連結した。連結された材料を、 *QIAquick PCR* 精製キットを使用して  $100\ \mu\text{l}$  の最終体積に精製し、  $5\ \mu\text{l}$  の割合で市販のエレクトロコンピテント *TG1* 大腸菌 ( *E. coli* ) 細胞 ( *Stratagene* 、 *La Jolla* 、 *CA* ) に記載されるようにエレクトロポレーションした。ライプラリーのサイズは、記載されるように決定された。ライプラリーは、 2 % ( *w/v* ) グルコースの存在下、  $37^\circ\text{C}$  、  $250\text{ rpm}$  で 2 時間増殖させた。細菌細胞をペレット化し、 35 % ( *v/v* ) グリセロールを含む  $2 \times \text{YT/Amp/Glu}$  (  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリン及び 2 % ( *w/v* ) グルコースを含む  $2 \times \text{YT}$  培地 ) に再懸濁し、 少量ずつ - 80  $\text{μl}$  で保存した。

#### 【0163】

[00200] ファージ提示されたライプラリーは、 *M13K07* ヘルパーファージを使用してレスキューされた。 *AXL* 特異的 *VHH* は、 2 つの戦略を使用してライプラリーから選択された。第 1 の戦略では、ライプラリーは、 *Zhou* ら、 2010 年に記載されるように、固定化された *rhAXL ECD* 及び *A549* 腫瘍細胞に対して同時にパニングされた。2 番目の戦略では、ライプラリーは、 *rhAXL ECD* に対してパニングされ、 *VHH* を提示するファージは、 *Henry* ら、 2016 年に記載されるように、 *AXL* 特異的マウス *mAb* ( *5E9* 及び *10G1* ) と競合的に溶出された。ライプラリーファージ及びパニングから溶出されたファージは、 *Henry* ら、 2016 年に記載されるように、 *11luminamiSeq* 次世代 *DNA* シーケンスを使用して調査された。

#### 【0164】

##### [00201] 結果

[00202] *rhAXL ECD* に対して向けられた *VHH* は、免疫されたラマからファージ提示された *VHH* ライプラリーを構築し、上記の方法セクションに記載されるようにライプラリーの様々な選択を行うことにより同定された。インプット ( ライプラリー ) *VHH* を提示するファージ及びアウトプット ( 溶出される ) *VHH* を提示するファージの配列決定が行われ、特定の選択で選択的に濃縮された個々の *VHH* 配列が同定された。

#### 【0165】

[00203] 図 6 は、抗 *rhAXL ECD* *sda* *Ab* の単離のための戦略を図示する。パネル A 及び C では、 *rhAXL - ECD* で免疫されたラマから構築されたファージ提示された *VHH* ライプラリーは、固定化された *rhAXL* 、及び *AXL + A549* 腫瘍細胞上で同時にパニングされた。 *hAXL ECD* への結合及び *A549* 細胞への内在化が同時に強化された *VHH* ( *NRC-sda* *Ab* 001 、配列番号 119 ; *NRC-sda* *Ab* 002 、配列番号 120 ) 、並びに *A549* 細胞への内在化のみが強化された *VHH* ( *NRC-sda* *Ab* 003 、配列番号 121 ; *NRC-sda* *Ab* 004 、配列番号 122 ) が同定された。パネル B 及び D では、 *rhAXL - ECD* で免疫されたラマから構築されたファージ提示された *VHH* ライプラリーが *rhAXL ECD* に対してパニングされ、 *VHH* が *AXL* 特異的 *mAb* *s5E9* 又は *8D12* を使用して競合的に溶出された。この選択戦略を使用して濃縮された *VHH* は、次世代 *DNA* シーケンシングを使用して同定された。

#### 【0166】

##### [00204] 実施例 11 : 抗 *AXL mAb* 及び *sda* *Ab* の *DNA* 及びアミノ酸配列の決定

[00205] この実施例では、抗 *AXL mAb* 及び *sda* *Ab* ( 実施例 10 に従って単離された ) の *DNA* 及びアミノ酸配列が記載される。

#### 【0167】

##### [00206] 材料及び方法

[00207] マウス *mAb* 配列決定のために、ハイブリドーマクローン ( *Qiagen* 、 *NEasy* ) から総 *RNA* を抽出し、 *cDNA* に逆転写した ( *SuperScript* ( 商標 ) 、 *Thermo Fisher Scientific* 、 *Waltham* 、 *MA* 、 *USA* ) 。 *VH* 及び *VL* ドメインをコードする *DNA* は、 *FR1* でアニーリングする縮退フオワードプライマーと *CH1* でアニーリングする単一のリバースプライマーの混合物 ( *N*

10

20

30

40

50

ovagen / EMD Millipore カタログ番号 69831-3) を使用して、PCR 増幅 (Platinum Taq 又は同等のもの) された。得られたアンプリコンをサブクローニングし (TOPO-TA) 、ABI 3730×1 装置でサンガー法を使用して配列決定した。

【0168】

[00208] ラマ VH H DNA 配列の決定のために、ファージ提示された VH H ライブライナーは、様々なインピトロ選択 (実施例 10 に記載される) に供され、 Illumina MiSeq 機器で 2 × 250 bp の読み取りを使用して配列決定された。目的の VH H 配列は、従来と比較して選択後の頻度を上げることにより同定された。VH H をコードする DNA 構築物を商業的に合成し (Geneart, Life Technologies) 、細菌発現ベクターにサブクローニングし、ABI 3730×1 機器でサンガー法を使用して再度確認した。

【0169】

[00209] 結果

[00210] 7 つのマウス mAb の VH 及び VL ドメインの DNA 配列は、ハイブリドーマ細胞に由来するアンプリコンのサンガー配列決定によって決定された。mAb VH / VL ドメインをコードする DNA 構築物は、断片の結晶化可能領域 (Fc 領域) を含む哺乳動物発現ベクターで商業的に合成され、サンガー配列決定によって検証された。

【0170】

[00211] 図 7 は、太字の下線付きフォントで表された国際的な ImmunoGeneTics (IMGT) 情報システム定義を使用した CDR を伴う mAb VH / VL ドメインのアミノ酸配列を示す。本明細書において CDR 配列を参照する場合、IMGT 定義が使用される。CDR の Kabat 定義は、主に目的のみのために、IMGT の代替定義として、図 7 で陰影付きフォントとして示されている。CDR の IMGT 定義には、N 末端配列がわずかに多く含まれている場合があるが、Kabat 定義では、CDR が後で始まり、C 末端にさらに拡張するように示す。

【0171】

[00212] 8 つのラマ VH H の DNA 配列は、イルミナの MiSeq 機器で 2 × 250 bp の読み取りを使用して決定された (配列は、実施例 10 に記載されるように、これらの VH H の単離の一部として決定された)。VH H をコードする DNA 構築物は、細菌発現ベクターで商業的に合成され (GeneArt, Life Technologies) 、それらの配列はサンガー配列決定を使用して確認された。

【0172】

[00213] 図 8 は、IMGT 定義を使用した、CDR を伴う VH H のアミノ酸配列を示し、太字の下線付きフォントで表される。本明細書において CDR 配列を参照する場合、IMGT 定義が使用される。CDR の Kabat 定義は、IMGT の代わりとして、図 8 の影付きフォントで示される。NRC-sdAb001 ~ NRC-sdAb008 として参照される配列が示される。

【0173】

[00214] 実施例 12 : 組換え AX L 細胞外ドメイン (ECD) への mAb 及び sdAb の結合

[00215] この実施例の目的は、組換え AX L 細胞外ドメイン (ECD) への mAb / sdAb の結合を特徴付け、親和性及び動態、種交差反応性、並びにドメイン及びエピトープマッピングを評価することである。

【0174】

[00216] 材料及び方法

[00217] マウス mAb の生成。マウス mAb は、ハイブリドーマの上清から直接精製されるか、又は CHO 細胞の一過性トランスフェクションにより (ヒト IgG1 Fc 領域を使用して) 組換えで生成された。10 mL のハイブリドーマ上清からの小規模精製では、mAbs を Protein G Mag Sepharose (商標) Extra (GE

10

20

30

40

50

Healthcare Life 20 Sciences # 28 - 9670 - 70)への吸着により精製し、PBSで洗浄し、200 μlのグリシン200 mM pH 2.5で2回溶出し、及びTRIS-HCl 1M pH 9.0で中和した。精製されたmAbは、PBSで事前に平衡化されたZeba Spinレジン(Pierce)を使用して脱塩され、0.22 μMメンブレン(Millipore)で滅菌濾過された。mAbの最終濃度は、ナノドロップ(#ND-1000)によって決定された。組換え生成のために、DNA構築物をCHO細胞に一過性にトランスフェクトし、Raymondら(2015年)に記載されているように精製した。

#### 【0175】

[00218]VHH及びVHH-Fcの生成。VHHは、Baralら(2013年)によって以前に記述されたように、大腸菌で6xHis及びMycタグ付き単量体として生成された。VHH-Fcsは、Zhangら、2009に記載されているように、ヒトIgG1 FcのN末端に融合したVHHをコードするDNAでHEK293細胞を一過性にトランスフェクションすることにより生成された。

10

#### 【0176】

[00219]表面プラズモン共鳴。マウスmAbについて、Biacore T200装置を使用して、ヒト及びカニクイザルAXL ECDへの結合を評価した。簡単に言えば、抗マウス又は抗ヒトFc抗体のいずれかを、酢酸緩衝液中のアミンカップリングを使用して、研究グレードのCM5シリーズSセンサーチップに固定化した。マウス又は組換えキメラマウス-ヒトmAb(マウスVH/VL;ヒト定常領域)を捕捉し、組換えヒト又はカニクイザルAXL ECDは、抗体に応じて異なる濃度範囲(0.1~500 nM)で表面全体に流した。泳動緩衝液はPBS/Tween-20であり、流速は100 μL/分であった。すべての結合研究は25℃で行われた。10 mMグリシン、pH 1.5を使用して表面を再生した。

20

#### 【0177】

[00220]VHH及びVHH-Fcについて、ヒト及びカニクイザルAXL ECDへの結合は、Biacore T200機器又はBiacore 3000機器のいずれかを使用して評価された。ヒトAXL ECD抗体又は抗ヒトFc抗体のいずれかは、研究グレードのCM5シリーズSセンサーチップ(T200、rhAXL ECD)又はC1センサーチップ(3000、抗ヒトFc)に、酢酸緩衝液でアミンカップリングを使用して固定化された。VHH-Fcは、抗ヒトFc表面に捕捉された。単量体VHH(rhAXL ECD表面の場合)又はヒト及びカニクイザルAXL ECD(VHH-Fc表面の場合)のいずれかを異なる濃度範囲で表面全体に流した。泳動緩衝液は、HBS-EP(3000)及びHBS-EP+(T200)であった。流速は10~40 μl/分であった。すべての結合研究は25℃で行われた。10 mMグリシン、pH 1.5を使用して表面を再生した。

30

#### 【0178】

[00221]エピトープビニング実験のために、2つの試験品(VHH又はmAb)を最初に別々に注入し(50 nM mAb; VHH単量体について25倍のKD)、解離させた。次に、mAb(50 nM)を再度注入し、応答のピーク時に、VHH(25倍のKD)とmAb(50 nM)の混合物を注入して、追加の結合を観察した。

40

#### 【0179】

[00222]ELISA。ヒト、カニクイザル、及びマウスのAXL ECDに対するELISAは、Nunc MaxiSorpマイクロプレートのウェルに100 ngの各タンパク質を一晩固定化することにより行われた。ヒトAXL(aaa1-451)及びカニクイザルAXL(aaa1-449)は、実施例10に記載されるように組換えにより生成された。マウスAXLは、Sino(カタログ51026-M08H)から購入した。翌日、プレートをPBS中の5%(w/v)粉ミルクでブロックした。マウスマAb(ハイブリドーマ又は組換えで生成した)又はVHH-Fcsを、1%BSA及び0.1%Tween-20を含むPBSで希釈し、室温で2時間ウェルに添加した。ウェルを、0.1%

50

Tween-20を含むPBSで5回洗浄し、次に、HRP標識したプロテインA(1%BSA及び0.1%Tween(商標)-20を含むPBSで1:1000に希釈した)を室温で1時間ウェルに添加した。ウェルを再びPBS/0.1%Tween-20で5回洗浄し、TMB基質を使用して発色させた。吸光度を450nmで測定した。マウスAXL結合の陽性対照として、市販の抗マウスAXL mAb(クローン175128、R&D Systems MAB8541、ラットIgG2A)を使用し、ロバ抗マウス：HRP二次抗体で検出した。

【0180】

[00223]酵母表面提示。ヒトAXL、Tyro3及びMerの細胞外ドメインの酵母表面提示を行った。簡単に言えば、酵母は、Agap2pタンパク質に融合したmycタグ付きTAMファミリーRTKエクトドメインをコードするDNA構築物で形質転換された。構築物は、完全なAXL ECD(aa1-449)又は個々のサブドメイン(N末端からC末端にIg1、Ig2、Fn1、Fn2)をコードするように設計された。微細なエピトープマッピングについて、AXL ECDの個々のアミノ酸を構築物でAlaに置換した。AXL、Tyro3及びMerの細胞外ドメインを部分的又は完全に発現する得られた酵母細胞をマイクロウェルプレートに吸着させ、mAbs/VHH-Fcsの結合をELISAで評価し、ヤギ抗ヒトF(ab')2-HRPを使用して検出した。抗AXL mAb/VHH-Fc結合は、発現レベルを制御するための抗myc抗体の結合レベルに対して正規化された。

10

【0181】

20

[00224]結果

[00225]マウスマAbのヒト及びカニクイザルAXL ECDへの結合は、組換えにより生成されたキメラマウス-ヒトmAbを使用してSPRで評価された。ヒト及びカニクイザルAXL ECDへのラマVHHの結合は、単量体VHHとキメラ組換えVHH-hIgG1 Fc融合体の両方を使用してSPRで評価された。

【0182】

[00226]SPRによる親和性決定。組換えヒト及びカニクイザルAXL ECDに対するマウスマAbの親和性及び動態を表9に示す。

30

40

50

【表9】

mAb	ヒトAXL			カニクイザルAXL		
	$k_{on}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (nM)	$k_{on}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (nM)
mAb F107-10G1	$1.1 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$5.9 \times 10^{-4}$ <sup>b</sup>	0.5 <sup>a</sup>	$8.2 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$4.3 \times 10^{-4}$ <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>
	$1.2 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$5.6 \times 10^{-4}$ <sup>b</sup>	0.4 <sup>b</sup>	$1.8 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$2.3 \times 10^{-4}$ <sup>b</sup>	0.2 <sup>b</sup>
mAb F111-5E9	$7.8 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$1.8 \times 10^{-3}$ <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	$6.9 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$2.7 \times 10^{-3}$ <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
mAb F107-8D12	$2.7 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$1.3 \times 10^{-2}$ <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	-	-	1835 <sup>c</sup>
mAb F107-7H5	$1.4 \times 10^6$	$1.5 \times 10^{-3}$	1 <sup>a</sup>	-	-	925 <sup>c</sup>
mIgG2 F155-3C7	$5.6 \times 10^5$ <sup>b</sup>	$1.8 \times 10^{-3}$ <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	$2.9 \times 10^5$ <sup>b</sup>	$7.3 \times 10^{-3}$	25 <sup>b</sup>
mAb F111-3C8	$8.6 \times 10^4$ <sup>a</sup>	$1.0 \times 10^{-3}$ <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	$6.0 \times 10^4$	$1.1 \times 10^{-3}$	18 <sup>a</sup>
mIgG2 F149-4G4	$7.5 \times 10^5$ <sup>b</sup>	$1.2 \times 10^{-3}$ <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	-	-	>160 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> 単一サイクルの動態を使用して測定した  
<sup>b</sup> マルチサイクルの動態を使用して測定した  
<sup>c</sup> 定常状態分析を使用して測定した

## 【0183】

[00227]表10のデータは、組換えヒト及びカニクイザルAXL細胞外ドメイン(ECD)に対するラマVHHの親和性及び動態を示す。

10

20

30

40

50

【表10】

sdAb	表10 組換えヒト及びカニクイザル AXL ECD についての ラマ V <sub>H</sub> H の親和性及び動態					
	ヒト AXL			カニクイザル AXL		
	k <sub>on</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (nM)	k <sub>on</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (nM)
NRC-sdAb001	8.5×10 <sup>6</sup> <sup>a</sup> 1.3×10 <sup>6</sup> <sup>c</sup>	3.7×10 <sup>-2</sup> <sup>a</sup> 7.2×10 <sup>-3</sup> <sup>c</sup>	4 <sup>a</sup> 6 <sup>c</sup>		9.2×10 <sup>5</sup> <sup>c</sup>	7.2×10 <sup>-3</sup> <sup>c</sup> 8 <sup>c</sup>
NRC-sdAb002	-	-	96 <sup>e</sup>	nd	nd	nd
NRC-sdAb003	8.5×10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	5.4×10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	955 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
NRC-sdAb005	1.7×10 <sup>5</sup> <sup>b</sup> 1.2×10 <sup>5</sup> <sup>c</sup>	9.7×10 <sup>-3</sup> <sup>b</sup> 4.1×10 <sup>-3</sup> <sup>c</sup>	58 <sup>b</sup> 34 <sup>c</sup>		1.3×10 <sup>5</sup> <sup>c</sup>	4.6×10 <sup>-3</sup> <sup>c</sup> 35 <sup>c</sup>
NRC-sdAb006	2.4×10 <sup>5</sup> <sup>b</sup> 8.9×10 <sup>4</sup> <sup>c</sup>	4.5×10 <sup>-3</sup> <sup>b</sup> 2.1×10 <sup>-3</sup> <sup>c</sup>	19 <sup>b</sup> 24 <sup>c</sup>		1.0×10 <sup>5</sup> <sup>c</sup>	2.6×10 <sup>-3</sup> <sup>c</sup> 26 <sup>c</sup>
NRC-sdAb007	-	-	>100 <sup>c</sup>	nd	nd	nd
NRC-sdAb008	3.3×10 <sup>6</sup> <sup>d</sup> 5.3×10 <sup>6</sup> <sup>c</sup>	3.3×10 <sup>-3</sup> <sup>d</sup> 8.2×10 <sup>-3</sup> <sup>c</sup>	1 <sup>d</sup> 2 <sup>c</sup>		-	- >200 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 単一サイクルの動態を使用して測定した(AXL ECD を固定化し、VHH 単量体を流す)  
<sup>b</sup> マルチサイクルの動態を使用して測定した(AXL ECD を固定化し、VHH 単量体を流す)  
<sup>c</sup> 単一濃度の動態を使用して推定した(VHH-Fc を捕捉し、AXL ECD を流す)  
<sup>d</sup> 単一サイクルの動態を使用して測定した(VHH-Fc を捕捉し、AXL ECD を流す)  
<sup>e</sup> 定常状態分析を使用して測定した

【0184】

[00228]カニクイザル及びマウス A X L の交差反応性を決定し、結果を以下の表11に示す。これらのデータは、E L I S A における組換えヒト及びマウス A X L E C Dへのm A b / s d A b 結合の最大半量有効濃度 E C<sub>50</sub> を示す。

10

20

30

40

50

## 【表 11】

表 11 結合 ELISA の最大半量有効濃度		
mAb/sdAb	ヒト AXL (nM)	マウス AXL (nM)
MAB8541 (R&D)	61	1
mAb F107-10G1	2	n.b.
mAb F111- 5E9	2	n.b.
mAb F107- 8D12	1	n.b.
mAb F107- 7H5	6	n.b.
mIgG2 F155- 3C7	14	n.b.
mAb F111- 3C8	ND	ND
mIgG2 F149-4G4	15	n.b.
NRC-sdAb001	1	n.b.
NRC-sdAb002	ND	ND
NRC-sdAb003	ND	ND
NRC-sdAb005	1	n.b.
NRC-sdAb006	1	n.b.
NRC-sdAb007	ND	ND
NRC-sdAb008	1	n.b.
n.b.、結合なし; ND、決定せず		

## 【0185】

[00229]酵母表面提示を使用したTAMファミリーRTK (Mer、Tyro3)に対する交差反応性が決定され、結果が表12に示される。

## 【表 12】

	表 12 酵母表面ディスプレイを使用したTAMに対する交差反応性					
	約 1:5000 のヤギ抗ヒト F(ab') <sub>2</sub> -HRP					抗 Myc-HRP
	hFC-107-10G1	NRC-sdAb0001-Fc	NRC-sdAb0002-Fc	NRC-sdAb0003-Fc	hFC-抗RSV	myc
huAXL-ECD	1.392	1.026	0.882	0.659	0.087	1.000
cyAXL-ECD	1.141	0.824	0.760	0.668	-0.004	1.000
huMER-ECD	-0.020	-0.010	0.010	-0.009	-0.001	1.000
huTyro3-ECD	-0.023	0.017	-0.004	-0.005	0.059	1.000
pNL6 ベクター	-0.039	-0.025	0.020	-0.025	-0.036	1.000
	非変性酵母: myc 発現レベルに対して正規化					

10

20

30

40

50

## 【0186】

[00230]エピトープビニングを評価し、データを表13にまとめられている。抗AXL mAb / sdAbにより標的化されたエピトープビンを示す。酵母表面提示を使用したドメインマッピングを評価した。

## 【表13】

表13 抗AXL mAbs/sdAbsにより標的化されたエピトープビン		
mAb/sdAb	ドメイン	エピトープビン
mAb F107-10G1	Ig1	1A
mAb F111- 5E9	Ig2	2
mAb F107- 8D12	Ig1	1B
mAb F107- 7H5	Ig1	1B
mlgG2 F155- 3C7	ND	ND
mAb F111- 3C8	Ig2	ND
mlgG2 F149-4G4	ND	ND
NRC-sdAb001	ND(ビニングに基づく Ig1) は結合競合に基づく 10G1 と同様のエピトープである	1A
NRC-sdAb002	ND	ND
NRC-sdAb003	ND(ビンに基づく Ig1)	1A
NRC-sdAb005	ND(ビンに基づく Ig2)	2
NRC-sdAb006	ND(ビンに基づく Ig2)	2
NRC-sdAb007	ND(ビンに基づく Ig1)	1B
NRC-sdAb008	ND(ビンに基づく Ig1)	1B

10

20

30

## 【0187】

[00231]実施例13：腫瘍細胞株への結合の特徴付け

[00232]この実施例の目的は、Kd及び最大抗体結合(Bmax)に関して中程度から高レベルのAXLを発現する腫瘍細胞株へのmAb / sdAbの結合を特徴付けることである。

## 【0188】

[00233]材料及び方法

[00234]細胞培養。NCI-H292ヒト非小細胞肺癌(NSCLC)及びSKOV3(ヒト卵巣腺癌)細胞株をATCCから入手し、供給業者の推奨に従って培養した。MDA-MB-231三重陰性(ER-/PR-/HER2低)乳癌(TNBC)は、Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA, USAから購入した。ホタルルシフェラーゼ遺伝子を有する安定した形質転換体が生成された。この細胞株をRPMI-1640+5%FBSで培養した。実施例3で上述したように、U87膠芽腫細胞を使用した。細胞を週に2回継代し、すべての細胞株について4~6週間以内に使用した。

40

## 【0189】

[00235]FACS結合アッセイ。付着細胞を非酵素的Sigma Cell Dissociation Solution(製品番号C5789)で分離した。細胞懸濁液をポリプロピレンのV底96ウェルプレートに添加し、100nM~0.001nMの範囲の濃度で、又は100nMの単回用量(非特異的対照用)で1次抗体とともに氷上で2時

50

間インキュベートした。インキュベーション及び洗浄後、細胞を氷上で1時間、蛍光標識された二次抗体 (Jacksonカタログ番号709-546-098のAlexa Fluor (登録商標) 488抗ヒトIgG)とともにインキュベートし、次に、洗浄した。細胞生存率は、Fixable viability dye 450 (氷上で20分)を使用して決定した。染色された細胞を4にて1%ホルムアルデヒドで固定し、翌日行われる取得まで4で保存した。

【0190】

[00236]データ取得は、FACS Divaソフトウェア及びHTSユニット(96ウェルプレートにおける自動サンプリング)を備えたLSR-Fortessaフローサイトメーター(Beckton Dickinson)で行われた。FACSデータをExcelデータファイルにエクスポートし、AF488で染色された生存(単一細胞)ピークのMFI(蛍光強度中央値)を計算に採用した。二次抗体の非存在下でインキュベートした細胞のMFI値を使用して、すべてのウェルについてバックグラウンド減算を計算した。

【0191】

[00237]バックグラウンドを差し引いたデータを、Hill勾配非線形回帰曲線適合モデルを用いた1部位特異的結合を使用してGraphPad (商標) 6.0で分析し、試験品の各々について見かけのBmax及びKdを決定した。使用されたモデルは、式Iに従った。

[00238]

【数1】

$$\text{モデル } Y = \frac{B_{max} \times X^h}{Kd^h + X^h} \quad (\text{式 I})$$

[00239]Bmaxは、Yと同じ単位での最大特異的結合である。

[00240]Kdは、Xと同じ単位で表される、平衡で最大結合の半分を達成するのに必要なリガンド濃度である。

[00241]変数「h」は丘の斜面である。

【0192】

[00242]AXL受容体密度測定。10μlのHuman AXL Alexa Fluor 488 MAb (クローン108724)を使用して、Quantum (商標) Simpoly Cellular Beads (カタログ番号814、Bangs Laboratories、Fishers、IN、USA)を4で30分間、又はAXLを発現する細胞株(100000細胞/試験)を4で2時間標識した。

【0193】

[00243]ビーズ及び細胞のデータ取得は、同一のFACS設定の下で行われ、FlowJo (商標)ソフトウェアを使用して分析された。GeoMeanを使用して標準曲線を作成し、各細胞型の値を補間した。ブランクのビーズの値が検出閾値と見なされ、染色されていない細胞の値が各々の場合のGeoMean値から差し引かれた。得られた抗体結合能力は、試験した各々の細胞株の受容体密度の尺度として使用された。

【0194】

[00244]結果

[00245]組換えキメラAbの3つの細胞株への結合は、上記のようにFACSにより評価された。見かけのBmax及びKdの決定を以下の表14に示す。

10

20

30

40

50

## 【表14】

一次 Ab	表14 3つのAXLを発現する細胞株におけるヒトFc含有mAbの見かけのKd		
	SKOV3 Kd (nM)	NCI-H292 Kd (nM)	MDA-MB-231 ルシフェ ラーゼ Kd (nM)
NRC-sdAb001	0.1122	0.1053	0.2327
NRC-sdAb005	2.0330	1.4740	1.4720
NRC-sdAb006	13.4300	2.1170	0.8317
NRC-sdAb008	0.0549	0.0414	0.1216
hIgG-F107-10G1	0.0608	0.0708	0.1012
hIgG-F107-7H5	0.0700	0.0509	0.1696
hIgG-F111-5E9	ND*	ND*	0.3659

\*不完全な曲線

## 【0195】

[00246]図9は、以下の細胞株：H292、MDA-MB-231、SKOV、及びU87神経膠芽腫における受容体密度（受容体/細胞）に基づく、AXLの抗体結合能力を図示する。

## 【0196】

[00247]図10は、肺癌、乳癌及び卵巣癌についての3つの細胞株におけるヒト(h)IgG Ab及びsdAbのFACS結合曲線を図示する。非特異的結合(×)は、すべての例で無視できることが示されているが、hIgG曲線(F107-10G1、F107-7H5、F111-5E9)は、いくつかの場合において、sdAbs(sdAb001、sdAb008、sdAb006)よりもわずかに高い平均蛍光強度(MFI)を示す。

## 【0197】

[00248]実施例14：インピトロ細胞傷害アッセイ

[00249]この実施例では、抗AXLモノクローナル抗体は、効力(ICI<sub>50</sub>)及び最大パーセンテージ増殖阻害(有効性)の観点から、AXLを発現する細胞における増殖阻害アッセイでの内在化能力及び抗体-薬物コンジュゲート(ADC)ポテンシャルについて評価された。

## 【0198】

[00250]材料及び方法

[00251]細胞培養。NCI-H292ヒト非小肺癌(NSCLC)及びSKOV3(ヒト卵巣腺癌)細胞株をATCCから入手し、供給業者の推奨に従って培養した。MDA-MB-231三重陰性(ER-/PR-/HER2低)乳癌(TNBC)株をCedarlane Labsから購入した。ホタルルシフェラーゼ遺伝子を有する安定した形質転換体は、Perkin Elmerによって生成された。この細胞株をRPMI-1640+5%FBSで培養した。細胞は週2回継代され、すべての細胞株に対して4~6週間以内に使用された。

## 【0199】

[00252]増殖阻害アッセイ。抗AXL ADCは、NCI-H292(非小細胞肺癌)、MDA-MB-231(ヒト乳腺癌)及びSKOV3(卵巣癌)を含む、AXLを発現することが公知である様々な培養細胞株の生存率における影響について試験された。細胞は、384ウェルプレート(Corning(登録商標)384ウェルホワイトフラットボトムポリスチレンTC処理したマイクロプレート、カタログ番号3570)の3つの細胞株に対してそれぞれ125、200、200細胞/ウェルで播種された。細胞は、10

10

20

30

40

50

0 nM ~ 0.0017 nM の範囲の試験品又はベンチマーク対照の連続希釈の存在下、及び Gas 6 リガンド (2 μg / mL、R & D C F 885) の存在下又は非存在下で 5 日間増殖させた。5 日後 (37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿インキュベーター)、CellTiter Glo (商標) (Promega、Madison) を使用して、各ウェルに存在する、代謝的に活性な細胞の存在を示す、ATP の定量に基づいて、培養中の生存細胞の数を決定した。

【0200】

[00253] シグナル出力は、0.1 秒の積分時間に設定されたルミネセンスプレートリーダー (Envision、Perkin Elmer) で測定された。積分時間は、高 ATP 濃度でのシグナル飽和を最小限に抑えるように調整される。

10

【0201】

[00254] データ分析。各濃度ポイント (S) は陰性対照ウェル (NC) に対して正規化され、式 II に従って計算された生存率 (%) として表される。

[00255]

【数 2】

$$\text{生存\%} = \frac{NC - S}{NC \times 100} \quad (\text{式 II})$$

[00256] 生存 % 対 10<sup>g</sup> 濃度の用量 - 応答曲線は、IC<sub>50</sub> 及び最大効力を推定するための 4 つのパラメータロジスティックモデルを用いた GraphPad (商標) Prism 6.0 を使用して適合された。モデル Y は、式 III による計算に使用された。

20

[00257]

【数 3】

$$\text{モデル } Y = \frac{Bottom + (\text{上部} - \text{下部})}{1 + 10^{(\log IC50 - X) \times \text{HillSlope}}} \quad (\text{式 III})$$

[00258] IC<sub>50</sub> は、下部と上部の間の中間の応答を与えるアゴニストの濃度である。

[00259] Hill Slope は、曲線の急勾配を記述する。

[00260] 上部及び下部は、Y 軸の単位のプラトーである。

【0202】

30

【00261】 結果

[00262] 3 つの細胞株における、DM1 又は MMAE にコンジュゲートした組換えキメラ Ab の増殖阻害活性を上記のように評価した。

【0203】

[00263] 表 15 に示されるように、直接薬物コンジュゲートとしての細胞傷害性を評価した。3 つの AXL を発現する細胞株における抗 AXL ADC の効力 (IC<sub>50</sub>) 及び有効性 (最大阻害 %)。結果は、平均 + / - std (N) として表される。

40

50

## 【表 15】

	表 15 AXL を発現する細胞株における抗 AXL ADC の効力及び有効性					
	SKOV3		MDA-MB-231-luc		NCI-H292	
	IC50 (nM)	最大阻害%	IC50 (nM)	最大阻害%	IC50 (nM)	最大阻害%
hFc-F111-5E9-VC-MMAE	0.021 +/- 0.006 (2)	75 +/- 3 (2)	0.942 (1)	105 (1)	~1 (1)	不完全な曲線 (1)
hFc-F111-5E9-DM1	0.038 +/- 0.043 (3)	73 +/- 7 (3)	0.452 +/- 0.279 (6)	82 +/- 20 (6)	0.084 +/- 0.060 (9)	78 +/- 9 (9)
hFc-sdAb005-DM1	0.631 +/- 0.202 (2)	78 +/- 6 (2)	ND	ND	6.664 +/- 1.718 (6)	83 +/- 4 (6)
hFc-sdAb006-DM1	0.162 +/- 0.03 (2)	76 +/- 6 (2)	0.869 +/- 0.001 (2)	83 +/- 2 (2)	2.714 +/- 0.871 (2)	87 +/- 13 (6)
hFc-F107-10G1-DM1	0.022 (1)	66 (1)	0.029 +/- 0.037 (2)	62 +/- 9 (2)	0.013 +/- 0.014 (4)	71 +/- 5 (4)
hFc-sdAb001-DM1	0.055 +/- 0.006 (2)	81 +/- 0 (2)	ND	ND	0.887 +/- 0.218 (6)	81 +/- 3 (6)
hFc-F107-7H5-DM1	0.014 +/- 0.019 (2)	91 +/- 31 (2)	0.076 +/- 0.079 (2)	65 +/- 13 (2)	0.014 +/- 0.026 (9)	97 +/- 50 (9)
hFc-F107-8D12-DM1	0.001 (1)	103 (1)	0.033 (1)	72. (1)	0.011 +/- 0.006 (3)	89 +/- 1 (3)
hFc-sdAb008-DM1	~0.001	~80	ND	ND	0.034 +/- 0.012 (6)	83 +/- 8 (6)
mIgG-F155-3C7-DM1	0.092 (1)	89 (1)	0.630 (1)	74 (1)	0.327 +/- 0.098 (8)	82 +/- 5 (8)
mIgG-F149-4G4-DM1	0.005 (1)	90 (1)	0.051 (1)	64 (1)	0.015 +/- 0.009 (8)	79 +/- 4 (8)

## 【0204】

[00264] Gas6 感度の評価。Gas6 リガンド (2 μg / mL) の存在下又は非存在下での NCI-H292 における抗 AXL ADC の効力 (IC50) を評価した。結果は、平均値 +/- standard deviation (N) として表 16 に表される。

10

20

30

40

50

## 【表 16】

表 16 Gas6 感度の評価		
	-Gas6 IC50 (nM)	+Gas6 IC50 (nM)
hFc-F111-5E9-VC-MMAE	~1 (1)	ND
hFc-F111-5E9-DM1	0.084 +/- 0.060 (9)	0.074 +/- 0.050 (2)
hFc-sdAb006-DM1	2.714 +/- 0.871 (2)	2.2.6 (1)
hFc-F107-10G1-DM1	0.013 +/- 0.014 (4)	0.460 (1)
hFc-sdAb001-DM1	0.887 +/- 0.218 (6)	収束しない (1)
hFc-F107-7H5-DM1	0.014 +/- 0.026 (9)	0.098 +/- 0.035 (2)
hFc-F107-8D12-DM1	0.011 +/- 0.006 (3)	0.296 (1)
hFc-sdAb008-DM1	0.034 +/- 0.012 (6)	0.240 (1)
mlgG-F155-3C7-DM1	0.327 +/- 0.098 (8)	3.900 +/- 0.780 (2)
mlgG-F149-4G4-DM1	0.015 +/- 0.009 (8)	0.013 +/- 0.002 (2)
hFc-sdAb005-DM1	6.664 +/- 1.718 (6)	3.777 (1)

10

20

## 【0205】

[00265] 増殖阻害を評価し、3つの腫瘍細胞株における h IgG A b 及び s d A b の増殖阻害結合曲線を図 11 に示す。肺、乳房及び卵巣の細胞株（それぞれ H 292、MDA-MB-231 ルシフェラーゼ、及び SKO V 3）が示される。生存率（5 d）が評価される。

## 【0206】

[00266] クラス 1 では、h IgG - F 107 - 10G1 - DM1 対非特異的結合がすべての細胞について示され、s d A b 0 0 1 はまた H 292 について評価された。

## 【0207】

[00267] クラス 2 では、h IgG - F 107 - 7H5 - DM1 及び h IgG - F 107 - 8D12 - DM1 対非特異的結合曲線が、MDA-MB-231 ルシフェラーゼ及び SKO V 3 細胞について示される。s d A b 0 0 8 及び h IgG - F 107 - 7H5 - DM 1 は、H 292 の非特異的結合に対して評価された。

30

## 【0208】

[00268] クラス 3 では、h IgG - F 111 - 5E9 - DM1 及び h IgG - F 111 - 5E9 - MMAE 対非特異的結合がすべての細胞について示され、s d A b 0 0 6 はまた H 292 について評価された。

## 【0209】

[00269] 図 12 は、非特異的結合と比較した、H 292 細胞株における Gas6 の存在下及び非存在下での h IgG - F 111 - 5E9 - DM1 及び h IgG - F 107 - 10G1 - DM1 の増殖阻害結合曲線を示す。

40

## 【0210】

## [00270] 実施例 15：バイパラトピック / 一価抗 AXL 抗体の活性の評価

[00271] この実施例では、バイパラトピック / 一価抗 AXL 抗体を調製し、効力及び有効性について評価した。

## 【0211】

[00272] 2 つの非重複エピトープを標的とするバイパラトピック抗体は、標的クラスター形成を誘導することができ、これは、順に、HER2 を含む受容体標的の強力な内部移行、リソソーム輸送を促進する（Lillard, 2016 年）。この実施例では、単一ドメインの抗 AXL 抗体のバイパラトピック（同じ標的上の 2 つのエピトープ）の組み合わせの A

50

D C 効力を評価する。ヒト F c 含有バイパラトピック抗体は、S t r o p l a ( 2 0 1 2 )により公開された方法に従って構築された。そこでは、相補的点突然変異 ( R R R 、 E E E ) がヒト I g G 1 F c 領域において操作されて、単量体の半分の交換を促進し、二重特異性抗体を安定化させる。目的の 2 つの抗体を別々に発現及び精製し、適切なレドックス条件下で混合すると、安定した二重特異性抗体の形成をもたらす。すべての場合において、バイパラトピック A D C の活性は、それらが由来するホモ二価モノパラトピック s d A b ベースの A D C の効力と比較された。

【 0 2 1 2 】

[00273]表 1 7 は、S K O V 3 細胞株におけるモノパラトピック ( 二価 ) 親 A D C と比較した抗 A X L バイパラトピック構築物 A D C の効力 ( I C <sub>50</sub> ) 及び有効性 ( 最大阻害 % ) を示す。可能な場合、結果は平均 + / - s t d e v ( N ) として表される。

【 表 1 7 】

表 17					
SKOV 細胞株における抗 AXL バイパラトピック及びモノパラトピック(2価)ADC の効力(I C <sub>50</sub> )及び有効性(最大阻害%)					
試料名	抗体設計	MW	DAR	I C <sub>50</sub> (nM)	最大阻害%
sdAb001-DM1	モノパラトピック	77200	3.13	0.055 +/- 0.006 (2)	81 +/- 0 (2)
sdAb005-DM1	モノパラトピック	77200	3.05	0.631 +/- 0.202 (2)	78 +/- 6 (2)
sdAb006-DM1	モノパラトピック	77800	2.77	0.162 +/- 0.03 (2)	76 +/- 6 (2)
sdAb008-DM1	モノパラトピック	78200	3.08	<0.001	~80
sdAb 001R/005E-DM1	バイパラトピック	77200	3.6	0.008	89
sdAb 001R/006E-DM1	バイパラトピック	77500	3.39	0.0004	73
sdAb 008R/005E-DM1	バイパラトピック	77700	2.61	0.014	78
sdAb 008R/006E-DM1	バイパラトピック	78000	2.69	0.003	70

【 0 2 1 3 】

[00274]予備的な結果は、ドメイン 1 A / ドメイン 2 に見られるバイパラトピック s d A b s 指向性エピトープを含む A D C の両方 ( s d A b 0 0 1 R / 0 0 5 E - D M 1 、 s d A b 0 0 1 R / 0 0 6 E - D M 1 ) が、対応する二価 F c 含有 s d A b s に由来する A D C よりもはるかに効力が高い ( 7 ~ 1 0 0 倍 ) ように見えることを示す。この実施例で試験された他のバイパラトピックの組み合わせは、効力の増加を示さなかった。

【 0 2 1 4 】

[00275]図 1 3 は、S K O V 3 細胞株におけるモノパラトピック / 二価の親 A D C と比較した抗 A X L バイパラトピック / 一価の構築物 A D C の増殖阻害結合曲線を示す。 5 日

10

20

30

40

50

後の生存率を対数濃度 (nM) としてプロットする。パネルAは、SKOV3の組み合わせ008R/005Eのチャートを提供し、sdAb008-DM1(四角形)、sdAb005-DM1(三角形)、及びバイパラトピック008/005(星形)が比較される。パネルBは、図示されたSKOV3の組み合わせ008R/006Eチャートを提供し、sdAb006-DM1(菱形)、sdAb008-DM1(四角形)、及びバイパラトピック008/006(中空円形)が比較される。パネルCは、hFc/sdAb001R/005Eのチャートを提供し、sdAb005-DM1(三角形)、sdAb001-DM1(黒色円形)、及びバイパラトピック001/005構築物(「X」として示される)が比較される。パネルDは、SKOV3の組み合わせ001R/006Eのチャートを提供し、sdAb001-DM1(黒色円形)、sdAb006-DM1(菱形)、及びバイパラトピック001/006構築物(大きなアスタリスク)が比較される。  
10

#### 【0215】

[00276]実施例16: SKOV3腫瘍異種移植マウスモデルにおけるADCによるインビオでの腫瘍成長阻害

[00277]この実施例では、インビトロ細胞傷害性は、SKOV3細胞における腫瘍成長阻害の阻害を使用して評価される。抗hAXL抗体-薬物コンジュゲートADCは、AXLを発現する異種移植モデルで腫瘍成長阻害を引き起こす能力について評価された。

#### 【0216】

##### [00278]材料及び方法

[00279]プロトコール。この研究における動物の世話及び使用に関連するプロトコール及び手順は、オタワ-NRC動物保護委員会(プロトコール番号2014.02)によって審理及び承認された。6週齢の18~20グラムの雌CD1 Albinoマウス(Crl:CD1-Foxn1nu)は、Charles River Canada(St-Constant, Quebec, Canada)に注文した。動物は、カナダ動物保護協議会(CCAC)のガイドラインに従って世話され、使用された。  
20

#### 【0217】

[00280]抗hAXL-ECDDモノクローナル抗体は、実施例1に概説されるように精製され、リジン残基を介して、実施例4に示されるN2'-デアセチル-N2'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン( DM1)に連結されたスクシンイミジルトランス-4-[マレイミジルメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMC-C)にコンジュゲートした。  
30

#### 【0218】

[00281]細胞培養及び腫瘍成長測定。SKOV3(ヒト卵巣腺癌)細胞は、ATCCから入手し、供給業者の推奨に従って培養した。MDA-MB-231三重陰性(ER-/PR-/HER2低)乳癌(TNBC)は、ATCC(Cedarlane Labs)から購入した。ホタルルシフェラーゼ遺伝子を有する安定した形質転換体は、Perkin Elmerによって生成された。この細胞株をRPMI-1640+5%FBSで培養した。

#### 【0219】

[00282]細胞を週2回継代し、すべての細胞株について4~6週間以内に使用した。無菌条件下でイソフルラン麻酔したヌードマウス(n=8)の左側腹部に、細胞を皮下接種した(注射部位あたり0.1mLのPBS体積で5×10<sup>6</sup>細胞)。腫瘍を80~100mm<sup>3</sup>の体積まで成長させ、その後、投薬日の前日に動物を無作為化して、各コホートに様々な腫瘍サイズを有する動物が含まれるようにした。各動物に適切な量の試験品/対照品を投薬日に調製し、静脈内(i.v.)注射した。マウスには、0日目と4日目(96時間の間隔)に5mg/kgの試験品を尾静脈から注射した。対照群は、生理食塩水で処置された。  
40

#### 【0220】

[00283]腫瘍成長は、処置後の29日間、又はそれらが倫理上の理由で安楽死されるまで(人道的エンドポイント)、キャリパー測定によって3日ごとにモニタリングされた。  
50

## 【0221】

[00284]腫瘍体積は、式ⅠⅤに従って計算された：

[00285]推定腫瘍体積 [mm<sup>3</sup>] =

[00286] / 6 (長さ [mm] ) × (幅 [mm] ) × (高さ [mm] ) (式ⅠⅤ)

[00287]各群の腫瘍体積は、平均±SEMとして示され、SKOV3細胞接種後の測定時間の関数としてプロットされる。腫瘍体積データの群比較は、GraphPad Prismバージョン7.0を使用するTukeyの多重比較試験を使用した2因子分散分析を使用して行われた。処置群と対照群の差は、P < 0.05で統計的に有意であった。

## 【0222】

[00288]結果

10

[00289]ビヒクル (PBS対照) 処置された動物と比較して、5mg/kg (mpk) で投与されたAXL ADCは、SKOV3腫瘍異種移植マウスモデルにおいて有意な腫瘍成長阻害を引き起こすことが示された (n = 2)。腫瘍成長の高い再現性は、2つの別々の研究における対照群と処置群の両方で観察された (本明細書では「研究15a」と「研究15b」と称する)。これら2つの別々の研究からのデータを図14及び図15に示す。

## 【0223】

[00290]図14は、5mg/kgの選択されたADCで2回 (0日目及び4日目) 処置されたSKOV3腫瘍を保有するマウスについての研究15aにおける腫瘍成長阻害を示す。使用したADCは、次の通りであった：hF107-10G1-DM1 (2a)、hF111-5E9-DM1 (3a)；hF107-7H5-DM1 (4a)；hF107-8D12-DM1 (5a)；mF149-4G4-DM1 (6a)；生理食塩水との比較のためのmF155-3C7-DM1 (7a) (1a)。腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) を3日ごとに記録した。各データポイントは平均±SEMを表す (n = 8)。

20

## 【0224】

[00291]図15は、5mg/kgの選択されたADCで2回 (0日及び4日) 処置されたSKOV3腫瘍を保有するマウスについての研究15bにおける腫瘍成長阻害を示す。使用したADCは、次の通りであった：hF111-5E9-DM1 (2b)；hF107-7H5-DM1 (3b)；hF107-10G1-DM1 (4b)；sdAb001-DM1 (6b)；sdAb006-DM1 (7b)；sdAb008-DM1 (8b)；生理食塩水対照 (1b)との比較のためのmF149-4G4-DM1 (9b)。腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) は3日ごとに記録された。各データポイントは平均±SEMを表す (n = 8)。

30

## 【0225】

[00292]ADC処理群と生理食塩水処理群の間の腫瘍成長における統計的に有意な (p < 0.05) 効果が13~18日から28日まで観察され、28日目に腫瘍体積が37.0%から66.9%に減少した。

## 【0226】

[00293]表18は、研究15a及び15bのデータについて、処置開始後の28日目に対照群 (生理食塩水) と比較した腫瘍体積減少のパーセンテージを示す (それぞれ図14及び図15を参照されたい)。対照と比較した腫瘍体積 (TV) 減少のパーセンテージは、減少% = (TV対照 - TV処理) / TV対照 × 100 (式V) として計算された。

40

50

## 【表18】

表18 SKOV3 異種移植マウスモデルにおけるADCによる腫瘍体積減少のパーセンテージ		
研究番号	試験 ADC	対照と比較した腫瘍体積減少の%
研究 15A 図 14	hF107-10G1-DM1	57.9 ± 2.9
	hF111-5E9-DM1	62.5 ± 5.0
	hF107-7H5-DM1	48.9 ± 3.2
	hF107-8D12-DM1	55.4 ± 4.4
	mF149-4G4-DM1	54.4 ± 9.0
	mF155-3C7-DM1	38.4 ± 10.7
研究 15B 図 15	hF111-5E9-DM1	61.0 ± 5.1
	hF107-7H5-DM1	66.9 ± 3.1
	hF107-10G1-DM1	63.7 ± 7.3
	sdAb001-DM1	47.6 ± 6.8
	sdAb006-DM1	47.7 ± 9.48
	sdAb008-DM1	37.0 ± 16.0
	mF149-4G4-DM1	54.2 ± 10.3

## 【0227】

[00294] 実施例17：反復静脈内投与後のMDA-MB-231-Luc異種移植マウスにおける抗AXL ADCヒットの有効性の評価

[00295] AXLは、様々なタイプの癌で発現され、侵襲性、転移、並びに血管新生に関連する。生成された抗AXL ADCには、SMCCリンカーを介して微小管阻害剤であるメルタンシン（DM1）にコンジュゲートした抗AXL抗体がある。これらのADCは、様々な細胞株で有望なインビトロ有効性を示し、効力及びGass6感受度に基づいて選択されている。この実施例では、いくつかの抗AXL ADCヒットがスクリーニングされ、抗AXL ADCのインビトロでの有効性に対するGass6感受度の役割が評価される。

## 【0228】

[00296] 雌NU/NUヌードマウスへの2回の静脈内ボーラス投与後の有効性及び薬物動態がいくつかの抗AXL ADCについて評価される。この実施例では、抗AXL ADCの有効性におけるGass6感受度の役割をさらに調べる。

## 【0229】

[00297] 方法

[00298] 細胞株。MDA-MB-231は三重陰性（ER-、PR-、HER2-）ヒ

10

20

30

40

50

ト乳腺腺癌細胞株であり、元々は51歳の白人女性患者に由来する上皮付着細胞である。これらの細胞はヌードマウスにおいて腫瘍形成性であり、原発性卵巣腫瘍と一致する中程度に十分に分化した腺癌を形成している。MDA-MB-231細胞は、上皮細胞増殖因子(EGF)及び形質転換増殖因子アルファ(TGF $\alpha$ )を発現する腫瘍原性細胞である。これらの細胞は、ALSL処理されたBALB/cマウスでは低分化腺癌(グレードI-II)を形成し、ヌードマウスでは低分化腺癌(グレードIII)を形成する。細胞株は、元々、アメリカンティッシュカルチャーコレクション(ATCC、Manassas、Virginia、USA)から入手した。

#### 【0230】

[00299]細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS、Hyclone SH30070.03)を含むATCC処方のRPMI 1640培地(ATCCカタログ番号:30-2001)で最大80%コンフルエンスまで増殖させた。細胞は、37の加湿された5%CO<sub>2</sub>霧囲気で維持された。それらは、トリプシン処理(0.25%トリプシン/EDTA、Gibco/BRL 15090-046)によって回収され、続いて冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中で洗浄され、トリパンブルー色素を排除する能力によって生存率を評価した。マウスの異種移植片としての増殖のためのすべての細胞集団は、少なくとも98%生存可能であった。

#### 【0231】

[00300]動物管理：受領、順化、収容及び取り扱い。この研究における動物の世話及び使用に関連するプロトコール及び手順は、オタワ-NRC動物保護委員会(プロトコール番号2014.02)によって審理され及び承認された。動物の世話及び使用は、カナダ動物愛護評議会(CCAC)のガイドラインに従った。6週齢の18~20グラムの雌CD1アルビノマウス(Crl:CD1-Foxn1nu)は、Charles River Canada(18 LaSalle, St-Constant, Quebec, Canada)に注文した。到着すると、マウスは通常の健康状態を確保するためにスタッフメンバーによる一般的な身体検査を受けた。受け取った動物に明らかな異常は検出されなかつた。マウスを少なくとも5日間順応させて、飼育環境に慣れさせた。マウスは、汚染を避けるためにフィルタートップを備えたトウモロコシの穂軸の寝具のポリカーボネットケージにケージあたり4匹収容された。各ケージは、プロトコール番号、主任研究者の名前、動物の数、性別を示す色分けされたケージカードで明確にラベル付けされた。各マウスは耳パンチを使用して一意に識別された。

#### 【0232】

[00301]マウスを、以下の条件下で1時間あたり75回の空気交換のために設定された陽圧のテクニプラスチックグリーンライン個別換気ケージ(IVC)セットに収容した：温度：23~24；湿度：50%；光サイクル：12時間点灯及び12時間消灯。

#### 【0233】

[00302]マウスを扱う場合、常に無菌技術を使用した。この研究で使用されたすべての機器は、使用前に70%エタノールで滅菌された。動物は、使用前に毎回70%エタノールでまた消毒された生物学的安全キャビネット(BSC)の下で取り扱われた。マウスを扱うすべての個人は、蒸気滅菌ガウン、マスク、ヘアボンネット、滅菌手袋を着用した。1/8インチの照射済みトウモロコシ穂軸寝具(Envigo, Madison, WI)と少量のEnviro-driペーパー(Shepherds Speciality Papers)で満たされたオートクレーブIVCケージは、BSCで少なくとも週1回交換された。

#### 【0234】

[00303]食餌。すべての動物は、食料及び水を自由に利用できた。ウォーター・ボトルに限外濾過水を入れ、キャップを付けて古いマウスシュー・ボックスケージに別々に入れ、蒸気でオートクレーブした。オートクレーブにかけたら、BSCの範囲内で作業中にキャップを取り付けた。水のボトルが週に1回、又は水位が低いときはより頻繁に交換された。動物は、順化期間及び実験期間中に、ガンマ線を照射した維持げっ歯類食餌(2914

10

20

30

40

50

Teklad グローバル 14% タンパク質維持食、Envigo) を自由に給餌した。

【0235】

[00304] 皮下異種移植腫瘍モデル。無菌条件下でイソフルラン麻酔ヌードマウス (n = 8) の左側腹部に、細胞を皮下接種した (注射部位あたり 0.1 mL の PBS の容量で  $5 \times 10^6$  細胞)。腫瘍を  $80 \sim 100 \text{ mm}^3$  の体積まで成長させ、その後、投与日の前日に動物を無作為化して、各コホートに様々な腫瘍サイズを有する動物が含まれるようにした。

【0236】

[00305] 腫瘍モニタリング。腫瘍の成長は、処置後 29 日間、又は倫理上の理由：1) 48 時間以内に体重が回復せずに 10% 以上の体重減少；2)  $2500 \text{ mm}^3$  を超える腫瘍体積；3) 腫瘍潰瘍；及び 4) 不動及びグルーミングの減少などの苦痛の明確な兆候、により安楽死されるまで (人道的エンドポイント)、キャリパー測定によって 3 日ごとにモニタリングされた。

10

【0237】

[00306] 腫瘍体積は、式 IV に従って計算された：

[00307] 推定腫瘍体積 [mm<sup>3</sup>] =

[00308]  $\sqrt{6} (\text{長さ [mm]} \times \text{幅 [mm]} \times \text{高さ [mm]})$  (式 IV)

[00309] 試験品及びビヒクル。すべての試験品は、NRC モントリオールからオタワまで氷上で輸送され、投与前は 4°C で保管された。ADC、hF111-5E9-DM1 はバッチ番号として準備された：CC31MAY2016。薬物対抗体比 (DAR) : 2.62；濃度：1.31 mg / mL；アリコート体積：3.7 mL；保管条件：4°C；エンドトキシンレベル：< 0.15；Montreal、Quebec、Canada にある NRC 施設 HHT モントリオールで準備された。

20

【0238】

[00310] 処置のためのビヒクルは、以下の特徴を有する ADC 緩衝液であった：無菌性；無菌濾過；保管条件：20 ~ 25°C；供給業者：NRC - HHT Montreal。

【0239】

[00311] 用量製剤の調製。各製剤は投与日に調製された。5 mg / kg の用量レベルを得るために、試験 / 対照品の注入量は、それらのストック濃度及び動物の体重に基づいて計算された。最終的な投薬溶液の調製は、生理食塩水を添加して所望の体積を得ることにより、クリーンな HEPA / UV ランプ生物学的フードの下で行われた。試験 / 対照品は、調製期間中 4°C に保った。各動物に適切な体積の試験 / 対照品を静脈内注射した。

30

【0240】

[00312] 臨床観察及び体重。すべての動物は、死亡率及び不健康状態の兆候について 1 日 1 回観察された。動物の個々の体重及び腫瘍の大きさを測定し、処置当日とその後 3 日ごとに記録した。

【0241】

[00313] 処置。マウスには、0 日目と 4 日目 (96 時間の間隔) に 5 mg / kg の試験品を尾静脈から注射した。対照群は生理食塩水で処置された。注射した日の動物の体重及び注射した量を記録した。

40

【0242】

[00314] 試料の収集、処理及び保管。血液試料は、2 回目の投薬後の 1、2、4、6、24、48、96、120、168、216、264、及び 336 時間の時間点で 3 匹の動物から下頸静脈を介して収集された。

【0243】

[00315] 図 16 は、血液試料が、2 回目の投薬前、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、24 時間、48 時間、96 時間、120 時間、168 時間、216 時間、264 時間及び 336 時間で採取された場所を含む研究設計を示す。腫瘍体積測定が行われ、投薬は 1 日目と 4 日目に行われたが、腫瘍体積測定は示された間隔で行われた。図 16 にも示されるように、研究設計の下に、研究のための動物数と時間点である。得られた血液の約 80 ~

50

100  $\mu$  Lを室温で15～30分間凝固させ、次に、1500 gで10分間室温にて遠心分離した。遠心分離後、液体成分（血清）をラベル済みのチューブに即座に移し、ドライアイスで即座に瞬間凍結し、-80°で保存した。

#### 【0244】

[00316]研究の終わりに、腫瘍が収集された。各腫瘍の半分を4%パラホルムアルデヒドで室温にて一晩固定し、PBSで洗浄してパラフィン包埋した。その後、パラフィン包埋腫瘍は、プロジェクトリーダーの裁量により、AXL発現のために処理される。腫瘍の残りの半分は、ドライアイスを使用して急速に凍結し、さらに分析するために-80°で保存した。

#### 【0245】

[00317]統計分析。各群の腫瘍体積は平均±SEMとして示され、MDA-MB-231-Luc細胞接種後の測定時間の関数としてプロットされる。腫瘍体積データの群比較は、GraphPad Prismバージョン7.0を使用したTukeyの多重比較試験を用いる2因子分散分析を使用して行われた。処置群と対照群の差は、 $P < 0.05$ で統計的に有意であった。グラブス検定を使用して、対照/処置群内の外れ値を決定した（ $= 0.05$ ）。

10

#### 【0246】

##### [00318]結果及び考察

[00319]図17は、体重における抗AXL ADCの効果を、5 mg/kgのhF111-5E9-DM1で2回（0日目及び4日目）の処置を受けた後のMDA-MB-231-Luc担腫瘍マウスにおける初期体重（BW）のパーセンテージとして示す。ADC緩衝液群（円形）及びhF111-5E9-DM1群（三角形）が示される。

20

#### 【0247】

[00320]体重は、標的外の潜在的毒性の指標として測定された。対照動物（ADC緩衝液群）とhF111-5E9-DM1処理動物の間に有意差は観察されなかった。実験期間中、両群のマウスの体重は約10%増加した。

#### 【0248】

[00321]図18は、腫瘍体積として評価された、腫瘍成長における抗AXL ADCの効果を示す。ADC緩衝液（CTR）又は5 mg/kgのhF111-5E9-DM1のいずれかで2回（0日目及び4日目）処理されたMDA-MB-231-Luc担腫瘍マウスの腫瘍成長曲線を示し、腫瘍体積（mm<sup>3</sup>）は3日ごとに記録される。各データポイントは、ADC緩衝液群（円形）及びhF111-5E9-DM1群（三角形）の平均±SEMを表す。

30

#### 【0249】

[00322]腫瘍成長における統計的に有意な（ $p < 0.05$ ）効果が、8日目から28日目まで、hF111-5E9-DM1処理群とADC緩衝液処理群の間で観察された。hF111-5E9-DM1群の1匹の動物は、同じ群の残りの動物と比較して有意に高い腫瘍成長率を示した。この動物は、グラブス検定を使用して異常値としてさらに特定された（ $= 0.05$ ）。

#### 【0250】

[00323]28日目に約90～360 mm<sup>3</sup>の腫瘍成長を経験した対照群と比較して、hF111-5E9-DM1処置群における平均腫瘍体積減少は、約90～60 mm<sup>3</sup>であった。腫瘍体積の減少におけるこの著しい差は、抗AXL ADCが乳癌腫瘍モデルの腫瘍体積を減少できることを示す。

40

#### 【0251】

##### [00324]実施例18：インピトロで血液脳関門を通過する抗AXL s d Ab能力の評価

[00325]この実施例では、抗AXL抗体が血液脳関門を通過する能力を評価する。中枢神経系（CNS）におけるAXLの発現により、AXLを標的とし、毒素（例えば、DM1、MMAEなど）に連結された抗体は、血液脳関門（BBB）を通過することができる場合、脳において非常に強力な標的毒性を示す可能性がある。したがって、特定の抗AX

50

L s d A b が B B B を通過する能力は、ヒトのインビトロの B B B モデルを使用して評価される。

【 0 2 5 2 】

[00326]材料及び方法

[00327]ヒト血液脳関門モデル。幹細胞ベースのヒト B B B モデルが使用される。モデルは、ヒト羊水由来の人工多能性幹細胞から生成された脳内皮細胞 ( B E C ) を利用する。このインビトロのヒト血液脳関門 ( B B B ) モデルは、将来の B B B 浸透性化合物及び C N S 標的化抗体の前臨床スクリーニングを可能にする。これらの B E C は、十分に組織化された連続的なタイトジャンクション、高い経内皮電気抵抗 ( T E E R ) 、流出及び受容体を介したトランスサイトーシス ( R M T ) トランスポーターの極性発現などの実質的なバリア特性を示す。

10

【 0 2 5 3 】

[00328]トランスウェルベースのインビトロ B B B モデル。Transwell B B B アッセイは、12 ウェルのコンパニオンプレートに配置されたゼラチン被覆された透過性 Transwell メンブレンインサートに播種された B E C で構成される。B E C は、ラット尾コラーゲン被覆された  $0.83 \text{ cm}^2$  の Falcon ( 商標 ) 細胞インサート、 $1 \mu \text{m}$  ポアサイズのフェノールレッドを含まない  $1 \text{ mL}$  の B E C 供給培地に  $500,000$  細胞 / 膜で播種された。12 ウェルの組織培養プレートのウェル ( すなわち、輸送用の下部チャンバー ) には、フェノールレッドを含まない  $2 \text{ mL}$  の B E C 培地が含まれた。T E E R 値は各インサートについて測定され、T E E R が  $300 \text{ cm}^2$  を超えるインサートのみがトランスサイトーシス研究に使用された。輸送実験は、輸送緩衝液 ( リン酸緩衝生理食塩水 ( pH 7.4 ) 中の  $10 \text{ mM}$  HEPES、 $5 \text{ mM}$  MgCl<sub>2</sub> 、及び  $0.01\%$  BSA ;  $1 \text{ mL}$  の上部チャンバー及び  $2 \text{ mL}$  の下部チャンバー ) 中で、各々  $1.25 \mu \text{M}$  の試験抗体 ( 表 19 ) と陰性対照 ( A 20.1 ) の混合物を上部チャンバーに添加し、から  $15$ 、 $30$ 、 $60$  及び  $90$  分で下部チャンバーから  $100 \mu \text{L}$  のアリコートを回収することによって ( 続いて、各アリコート回収後に下部チャンバー内に  $100 \mu \text{L}$  の輸送緩衝液を置換することによって ) 「多重化」方式で、ナノLC - MS / MS によりすべての試験抗体の同時定量化のために行われた ( 多重反応モニタリング - MRM ) 。

20

【 0 2 5 4 】

[00329]試験品及び A 20.1 の特定のペプチドシグネチャーは、MRM 分析について決定された。試験抗体について Fc ペプチド ( TPPVLDSDGSFFLYSK ; 配列番号 187 ) 、及び陰性対照について A 20.1 ペプチド ( EFVAAAGSSTGR ; 配列番号 188 ) が MRM によって検出された。アッセイ期間中の B B B の完全性は、各試験試料に B B B 非交差 s d A b ( A 20.1 ) を組み込むことによってモニターされた。FC5Hfc1X0 を陽性対照として使用し、TWIN200 - hIgG1 を陰性対照として使用した。この研究において評価された s d A b 及び対照の試験品を表 19 に概説する。実験は 3 重にして行われた。

30

40

50

## 【表19】

コード	挿入回数	時間(分)	試験抗体				陰性対照			
			名称	詳細	MW	トップ $\mu$ M	名称	詳細	MW	トップ $\mu$ M
AOL	3	90	FC5hFc1X0	AP16 0408	78334	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOM	3	90	NRC-sdAb001-hlgG1	-	76853	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AON	2	90	NRC-sdAb002-hlgG1	-	79514	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOO	1	90	NRC-sdAb003-hlgG1	-	77267	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOP	2	90	NRC-sdAb004-hlgG1	-	78810	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOQ	3	90	NRC-sdAb005-hlgG1	-	76915	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOR	3	90	NRC-sdAb006-hlgG1	-	77496	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOS	3	90	NRC-sdAb008-hlgG1	-	77838	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOT	1	90	TWIN200-hlgG1		79009	1.25	A20.1	140915	15670	1.25

\*試験抗体については Fc ペプチド(配列番号 187)を、陰性対照については A20.1 ペプチド(配列番号 188)をモニターした(MRM)。

## 【0255】

## [00330]結果

[00331] FC5HFc1X0 (陽性対照)、TWIN200-hlgG1 (陰性対照) 及び 7 つの抗 AXL sdAb のインビトロでの Papp 値の比較を図 19 に示す。様々な分子量 15.6 kDa (A20.1) 及び 79.0 kDa (TWIN200-hlgG1) の対照分子は、約  $9.0 \sim 15.0 \times 10^{-6} \text{ cm} / \text{分}$  の範囲の同様の低い Papp 値を示した; 対照的に、FC5HFc1X0 の Papp 値は、約  $175 \times 10^{-6} \text{ cm} / \text{分}$  であった (A20.1 の 10 倍を超える)。すべての抗 AXL sdAb は、陰性対照と同様の Papp 値を示し、これは、インビトロでの BBB の有意な浸透性はないことを示す。ただし、それぞれの対照と比較して低い Papp 値 (約 2 倍) を示す NRC-sdAb004 及び NRC-sdAb005 抗体を除く。チャートの下部にある灰色の線は、定量下限 (LLOQ) を示す。NRC-sdAb006-hlgG1 のチャートに表示されているアスタリスクは、リークのある挿入 AOR1 データが削除されたことを示す。

## 【0256】

[00332] 表 20 は、Papp データを提供し、A20.1 (陰性対照) と比較した、試験品の Papp 値の統計分析を示す。

10

20

30

40

50

## 【表 20】

表 20 Papp 値及び統計的有意性			
試験 Ab	試験 Ab の Papp	A20.1 の Papp	p 値(試験対 A20.1)
FC5hFc	175.8 ± 26.3	11.9 ± 0.8	p<0.001
NRC-sdAb001-hlgG1	9.56 ± 1.52	10.7 ± 2.6	ns
NRC-sdAb001-hlgG1	7.02 ± 1.04	14.1 ± 2.2	ns
NRC-sdAb002-hlgG1	5.22 ± 0.0	9.15 ± 0.0	ns
NRC-sdAb003-hlgG1	9.17 ± 0.21	12.5 ± 0.3	ns
NRC-sdAb004-hlgG1	17.1 ± 8.3	9.75 ± 1.25	p=0.01
NRC-sdAb005-hlgG1	24.3 ± 10.2	10.9 ± 0.2	p=0.01
NRC-sdAb006-hlgG1	11.4 ± 3.3	11.8 ± 2.9	ns
NRC-sdAb008-hlgG1	13.6 ± 0.0	12.5 ± 0.0	ns

## 【0257】

[00333]前述の説明では、説明の目的で、実施形態の完全な理解を提供するために、多くの詳細が記述されている。しかしながら、これらの特定の詳細が必要とされないことは、当業者には明らかである。

## 【0258】

[00334]上記の実施形態は、例のみであることを意図している。当業者は、特定の実施形態に対して変更、修飾、及び変形を行うことができる。特許請求の範囲は、本明細書に記載された特定の実施形態によって限定されるべきではなく、全体として明細書と一貫した方法で解釈されるべきである。

## 【0259】

[00335]配列

[00336]本明細書で参照される配列の統合されたリストは表 21 に見出される。

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 21 配列の統合リスト		
配列番号	配列	説明
1	KSSQSLLNX <sub>1</sub> RTRKX <sub>2</sub> YLA, X <sub>1</sub> =S 又は T; X <sub>2</sub> =I 又は N	CDR L1-B コンセンサス
2	WASTRX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> , ここで X <sub>1</sub> =E, H 又は Q 及び X <sub>2</sub> =S 又は T	CDR L2-B コンセンサス
3	GX <sub>1</sub> TFX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> , X <sub>1</sub> =F 又は Y; X <sub>2</sub> =I, S 又は T; X <sub>3</sub> = S, N 又は K; X <sub>4</sub> =F 又は Y; X <sub>5</sub> =G 又は W; X <sub>6</sub> =I 又は M; X <sub>7</sub> =N, S 又は H	CDR H1-B コンセンサス
4	NIX <sub>1</sub> PX <sub>2</sub> SX <sub>3</sub> SX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> YNEKFKX <sub>6</sub> , X <sub>1</sub> =F, N, 又は Y; X <sub>2</sub> =G, N, 又は D; X <sub>3</sub> =S 又は T; X <sub>4</sub> =A 又は T; X <sub>5</sub> =N 又は D; X <sub>6</sub> =S 又は R	CDR H2-B コンセンサス
5	DX <sub>1</sub> YGGSPDY, X <sub>1</sub> =T 又は Y	CDR H3-B コンセンサス
6	WASTRX <sub>1</sub> S, X <sub>1</sub> =E 又は Q	CDR L2-B コンセンサス (2)
7	GYTFTSX <sub>1</sub> WIN, X <sub>1</sub> =F 又は Y	CDR H1-B コンセンサス (2)
8	NIX <sub>1</sub> PX <sub>2</sub> SSSTNYNEKFKS, X <sub>1</sub> =F 又は Y 及び X <sub>2</sub> =G 又は D	CDR H2-B コンセンサス (2)
9	KSSQSLLNSRTRKIYLA	F107-7H5 CDR L1-B
10	WASTRQS	F107-7H5 CDR L2-B
11	KQSYNLWT	F107-7H5/F107 & 8D12 CDR L3-B
12	GYTFTSYWIN	F107-7H5 CDR H1-B
13	NIYPDSSSTNYNEKFKS	F107-7H5 CDR H2-B
14	DTYGGSPDY	F107-7H5 CDR H3-B
15	KSSQSLLNTRTRKNYLA	F107-8D12 CDR L1-B
16	WASTRES	F107-8D12 CDR L2-B
17	GYTFISFWIN	F107-8D12 CDR H1-B
18	NIFPGSSSTNYNEKFKS	F107-8D12 CDR H2-B

10

20

30

40

50

19	DYYGGSPDY	F107-8D12 CDR H3-B
20	RASQDINNYLN	F111-5E9 CDR L1-B
21	YISRLHS	F111-5E9 CDR L2-B
22	QQGNTLPFT	F111-5E9 CDR L3-B
23	KYGMN	F111-5E9 CDR H1-B
24	WINTYTGEPTYADDFKG	F111-5E9 CDR H2-B
25	GGYYSNPIYPMDY	F111-5E9 CDR H3-B
26	SASSSVSYMY	F111-3C8 CDR L1-B
27	RTSNLAS	F111-3C8 CDR L2-B
28	QQYHNYPPPT	F111-3C8 CDR L3-B
29	GYTFTSYWMH	F111-3C8 CDR H1-B
30	NINPNSTSADYNEKFKR	F111-3C8 CDR H2-B
31	PLMGPYWYFDV	F111-3C8 CDR H3-B
32	KASQDVTTAVA	F107-10G1 CDR L1-B
33	WASTRHT	F107-10G1 CDR L2-B
34	QQHFTTPLT	F107-10G1 CDR L3-B
35	NYGMS	F107-10G1 CDR H1-B
36	SISGGGGRTYYLDNVKG	F107-10G1 CDR H2-B
37	GARASYFAMDY	F107-10G1 CDR H3-B
38	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS <u>QSLLNSRTRKIYLA</u> WYQQKPGQSPKLLIY <u>WASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFT</u> LTISSVQAED <u>LAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEIK</u>	F107-7H5 VL
39	QVQLQQPGAEVLKPGASV <u>KLSCKASGYTFTSYWINWVK</u> QRPGQGLEWIGNI <u>YPDSSSTNYNEKFKSATLTVDKSSTT</u> AYIQFSSLTSEDSAVYY <u>CTRDTYGGSPDYWGQGTTLVS</u> S	F107-7H5 VH

10

20

30

40

50

40	DIVMSQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLLNTRTRKNYL AWYQQKPGQSPKLLIYWA <u>STR</u> RESGV <u>PD</u> RTGSGSGTDF TLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWT <u>FGGGT</u> KLEIK	F107-8D12 VL
41	QVQLQQPGAE <u>L</u> VKPGASVQLSCKAS <u>GY</u> T <u>F</u> WINW/KQ RPGQGLEW <u>MGN</u> <u>IF</u> PGSSSTNYNEKF <u>K</u> SKATLTV <u>D</u> KSSST AYMQLSSLTSED <u>SAVY</u> FC <u>CARD</u> YYGGSP <u>DY</u> WGQGTTLV SS	F107-8D12 VH
42	QIVLTQSPA <u>IMS</u> ASP <u>GE</u> KVTISCSASSV <u>SY</u> MYWYQQKP GSSPKP <u>WI</u> YRTSNLASGV <u>PAR</u> FGSGSGT <u>S</u> YSLT <u>ISS</u> ME AEDAATYYCQQYHNYP <u>PT</u> FGGGT <u>K</u> LEIK	F111-3C8 VL
43	QVQLQQPGAE <u>L</u> GKPG <u>T</u> SVKLSCKAS <u>GY</u> T <u>F</u> SYW/MHW/K RPGQGLEW <u>I</u> GNI <u>NP</u> NTSADYNEKF <u>K</u> R <u>K</u> ATLTV <u>D</u> KSSST AYMQLSTLTSED <u>SAVY</u> Y <u>CTR</u> PLMGP <u>WY</u> FD <u>V</u> WGQGTTV TVSS	F111-3C8 VH
44	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQD <u>IN</u> NYLNWYQQKP DGTVKLLIY <u>I</u> Y <u>SR</u> LHSGV <u>PSR</u> FGSGSGT <u>DY</u> SLTISNLELE DVATYFC <u>QQ</u> GNTLP <u>F</u> FGSGT <u>K</u> LEIK	F111-5E9 VL
45	QIQLVQSGPE <u>L</u> KKPGETV <u>K</u> ISCKAS <u>GY</u> T <u>F</u> TKYGMN <u>W</u> KQ APGKGLKWMG <u>W</u> INT <u>Y</u> GEPTYADD <u>F</u> KGR <u>F</u> AFS <u>L</u> ETSA <u>ST</u> AYLQINNL <u>T</u> EDMV <u>T</u> Y <u>FC</u> <u>AK</u> GG <u>Y</u> YSNPI <u>Y</u> PM <u>DY</u> WGQGTS VTVSS	F111-5E9 VH
46	VIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS <u>QD</u> V <u>TT</u> AVAWYQQK PGQSPKLLIY <u>W</u> ASTRHTGV <u>PD</u> RTGSGSGT <u>DY</u> SLTISNV QTE <u>DL</u> A <u>F</u> Y <u>Y</u> C <u>Q</u> QHFTT <u>PL</u> TF <u>G</u> AG <u>T</u> K <u>LE</u> IK	F107-10G1 VL
47	EVNLVESGGVV <u>K</u> PG <u>A</u> SL <u>K</u> L <u>S</u> CEAS <u>G</u> F <u>T</u> FSNYGMSW <u>W</u> R QTSDKR <u>LE</u> W <u>W</u> ASIS <u>GGG</u> R <u>Y</u> LDNV <u>K</u> GR <u>F</u> IISRENAKNT LYLQMSSL <u>K</u> SED <u>T</u> AL <u>F</u> YC <u>C</u> ARG <u>A</u> R <u>AS</u> YFAM <u>DY</u> WGQGSSV TVSS	F107-10G1 VH
48	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNTRKIYL WYQQKPGQSPKLLIYWA <u>STR</u> QSGV <u>PD</u> RTGSGSGTDF LT <u>IS</u> SVQAEDLAVYYCKQSYNLWT <u>FGGGT</u> KLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV <u>V</u> CLNNFYPREAKVQW <u>K</u> VDN ALQSGNSQESVTE <u>EQ</u> DS <u>K</u> DST <u>Y</u> SL <u>S</u> ST <u>T</u> LSKADY <u>E</u> HKV YACEVTH <u>Q</u> GLSSPVT <u>K</u> FS <u>N</u> R <u>G</u> E <u>C</u>	キメラ F107-7H5 軽鎖
49	QVQLQQPGAE <u>L</u> VKPGASVQLSCKAS <u>GY</u> T <u>F</u> SYWINW/K QRPQGLEW <u>I</u> GN <u>Y</u> PD <u>S</u> STNYNEKF <u>K</u> SKATLTV <u>D</u> KSSST AYIQ <u>F</u> SSLTSED <u>SAVY</u> Y <u>CTR</u> D <u>T</u> Y <u>GG</u> SP <u>DY</u> WGQGTTLV SA <u>ST</u> KGPSV <u>F</u> PLAP <u>S</u> KST <u>SG</u> TA <u>AL</u> GCL <u>K</u> DY <u>F</u> PE <u>P</u> VT <u>V</u> SWNS <u>G</u> ALT <u>S</u> GV <u>H</u> TF <u>P</u> AVL <u>Q</u> SS <u>G</u> LY <u>S</u> LS <u>S</u> V <u>V</u> TP <u>SS</u> L <u>G</u> T QTYIC <u>N</u> V <u>N</u> H <u>K</u> PSNT <u>K</u> VD <u>K</u> VE <u>P</u> KSC <u>D</u> K <u>H</u> TC <u>PP</u> C <u>A</u> PE <u>L</u> GGPSVFL <u>F</u> PP <u>K</u> PK <u>D</u> TL <u>M</u> ISRT <u>P</u> E <u>V</u> TC <u>V</u> V <u>D</u> V <u>SH</u> E <u>D</u> PE <u>V</u> K <u>F</u> NWYVDG <u>V</u> E <u>H</u> NA <u>K</u> T <u>K</u> P <u>RE</u> E <u>Q</u> Y <u>N</u> ST <u>Y</u> R <u>V</u> V <u>S</u> LT <u>V</u> L <u>H</u> Q <u>D</u> W LNGKEY <u>K</u> C <u>K</u> V <u>S</u> N <u>K</u> AL <u>P</u> API <u>E</u> K <u>T</u> IS <u>K</u> A <u>G</u> Q <u>P</u> REP <u>Q</u> V <u>Y</u> TL <u>P</u> SR <u>DE</u> LT <u>K</u> N <u>Q</u> V <u>S</u> L <u>T</u> CL <u>V</u> G <u>F</u> Y <u>P</u> SD <u>I</u> AV <u>E</u> W <u>E</u> NG <u>Q</u> P <u>EN</u> NY <u>K</u> TTP <u>P</u> V <u>L</u> D <u>S</u> DG <u>S</u> FF <u>L</u> Y <u>S</u> KL <u>T</u> VD <u>K</u> SR <u>W</u> QQ <u>G</u> N <u>V</u> F <u>C</u> S <u>V</u> M <u>H</u> ALHNHYT <u>Q</u> K <u>S</u> L <u>S</u> L <u>S</u> PG	キメラ F107-7H5 重鎖

10

20

30

40

50

50	DIVMSQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLLNTRTRKNYL AWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDFRTGSGSGTDF TLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEIKRTVA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	キメラ F107- 8D12 軽鎖
51	QVQLQQPGAEVKGPGASVQLSCKASGYTFISFWINWVKQ RPGQGLEWMGNIFPGSSSTNYNEKFKSATLTVDKSSST AYMQLSSLTSEDSAVENTFCARDYYGGSPDYWGQGTTLV SSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNKHPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG	キメラ F107- 8D12 重鎖
52	QIVLTQSPAAMSASPGEKVTISCSASSSVSYMWYQQKP GSSPKPWYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSME AEDAATYYCQQYHNYPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFF PSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	キメラ F111-3C8 軽鎖
53	QVQLQQPGAEKGPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVK RVPGQGLEWIGNINPNSTSADYNEKFKRATLTVDKSSST AYMQLSSLTSEDSAVENTCCTPLMGPWYFDVWGTGTTV TVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNKHPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM MHEALHNHYTQKSLSLSPG	キメラ F111-3C8 重鎖
54	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKP DGTVKLLIYYISRLHSGVPSRFSGSGSGTDSLTIISNLELE DVATYFCQQGNTLPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	キメラ F111-5E9 軽鎖

10

20

30

40

50

55	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTKYGMNWVKQ APGGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSAST AYLQINNLTTEDMVTYFCAKGGYYSNPIYPMDYWGQGTS VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	キメラ F111-5E9 重鎖	10
56	VIVMTQSHKFMSTSVDGRVSITCKASQDVTTAVAWYQQK PGQSPKLLIYWA STRHTGPDRFTGSGSGTDYSLTISNV QTEDLA FYYCQQHFTTPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASV VCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	キメラ F107- 10G1 軽鎖	
57	EVNLVESGGVVKPGASLKLSC EASGFTFSNYGMSW QTSDKRLEWVASISGGGGRTYLDNVKG RFIISRENAKNT LYLQMSSLKSEDTALFYCARGARASYFAM DYWGQGSSV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE P VTVWSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSS LGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNNAKTKP REEQYNSTYRVV SVLTVLH QDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIASKAKGQP REPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPE NNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	キメラ F107- 10G1 重鎖	20
58	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPF VGNGPNITGARGLTGLRCQLQVQGE PPEVHWLRDGQIL ELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITS LQLSDTGQY QCLVFLGHQTFV SQPGYVG LEG LPYF LEEPEDRT VAANT PFNLSCQAQGP PEPV D LLWLQDAV PLATAP GHGP QRSL HV PGLNKT SSFSCEAH NAKG V TTSRT ATITV LPQQ PRNLH L V SRQ P TE LE VA W TP GL SGI Y PL T H CTL Q AVL S DDGM GIQ A GE P DP P EE PL TS Q AS V P PH Q RL G SL L H P H PT Y H IR V ACT SS Q GP SS W T H W L P V E T P E G V P L G P P E N I S A T R N G S Q A F V H W Q E P R A P L Q G T L L G Y R L A Y Q G Q D T P E V L M D I G L R Q E V T L E L Q G D G S V S N L T C V A A Y T A A G D G P W S L P V P L E A W R P G Q A Q P V H Q L V K E P S T P A F S W P W W G S G G S S T G	rhAXL-ECD	30
59	MVLQTQVFISLLLWISGAYG	軽鎖シグナル配 列	
60	MDWTWRILFLVAAATGTHA	重鎖シグナル配 列	40

61	gacattgtatgtcacagtcctccatcccccggctgttcagcaggagagaaggt caactatgagctcaaatccaggcagtcagactgtctcaacagtagaaccggaaagat ctacttggcttggtaccaggcagaaaccaggcagtcgtctctaaactgtatcttgg ggcatccactaggcaatctgggtccctgatcgctcacaggcagtgatctgg acagatttcacttcaccatcagcagtgcaaggctgcaagacactggcagtttattac tgcaagcaatcttataatctgtggacgttcggggaggcacaagctggaaatca aacgg	F107-7H5 VL 配列	
62	caggccaaactgcagcagccctgggctgagctgtgaagcctggggctcagtg aaactgtcctgcagaaggctctggctacacttcaccagctactggataaactgggt aaggcagggcctggacaaggccttgagtggatggaaatatttctgtatgatgt gtactaactacaatgagaagttcaagagacaaggccacactgactgttagaca agtcccccaccacagcctacatacagttcagcagccgtacatctggggactctgc ggcttattattgtacaagagatacctatggtagccctgactactggggccaag gcaccactctcacagtctccca	F107-7H5 VH 配列	10
63	gacattgtatgtcacagtcctccatcccccggctgttcagcaggagaggg caactatgagctcaaatccaggcagtcagactgtctcaacactagaaccggaaaga actacttggcttggtaccaggcagaaaccaggcagtcgtctctaaactgtatctac tggcatccactaggaaatctgggtccctgatcgctcacaggcagtgatctgg ggacagatttcacttcaccatcagcagtgcaaggctgcaagacactggcagttt tactgcaagcaatcttataatctgtggacgttcggggaggcacaagctggaaat caaa	F107-8D12 VL 配列	
64	caggccaaactgcagcagccctgggctgagctgtgaagcctggggctcagtgc agctgcctgcagaaggctctggctacacttcatcagctctggataaactgggt agcagaggcctggacaaggccttgagtggatggaaatatttctgtatgatgt agtacaactacaatgagaagttcaagagacaaggccacactgactgttagaca atcctccagcacagcctacatgcagctcagcagccgtacatctggggactctgc gtcttattttgtcaagagattactatggtagccctgactactggggccaaggc accactctcacagtctccca	F107-8D12 VH 配列	20
65	gatatccagatgacacagactacatcccccgtctgcctctggagagacaggt caccatcagttcagggcaagtccaggacatataacaattattaaactggatcagc agaaaccagatgaaactttaactccgtatctactacatataagattacactca ggagtcccatcaagggtcagttcagttcagtgccgtggatggaaacagatttctcaccatt agcaacctggagactagaagatgttgcacttactttgccaaacaggtaatacgt tccattcacgttcggctggggacaagttggaaataaaaa	F111-5E9 VL 配列	
66	cagatccagttggcagtcgtggacctggagctgaaagaaggcctggagagacagtc aagatctcctgcagaaggctctgggtataccttcacaaaatggatgaactgggt aaaggcaggctccaggaaagggttaagtggatggctggataaaccacactaca ctggagagccaacatatgtatgcgtactcaaggcgggttgcctcttggaaa cctctggcagcactcctattgtcagatcaacaaccctacaactgaggacatgg cacatattctgtgcaaaaagggggtattatagttaaccctatctatcctatggactac tgggtcaaggaacctcagtcaccgtctcc	F111-5E9 VH 配列	30
67	caaattgttctcacccaggcagtcctccagcaatcatgtctgcacatccaggggagaaggt caccatcctgcagtcggcagtcagttcaagttacatgtattggfaccaggcaga agccaggatcctccccaaaccctggatttatcgcacatccaaccctggctctgg gtccctgtcgcctcagttcagtgccgtggatggctggacacttactctcacaatcagc agcatggaggcgtcaagatgtccacttattactgtccagcagtcataattaccc acccacgttcggagggggaccaagctggaaataaaaacgg	F111-3C8 VL 配列	40

68	cagggtccaaactgcagcagccctgggctgaactgggcaagcctggacatcagt gaagctgtcctgcaggcttcggctacaccctcaccagcttggatgcactgggt gaaggcgggtgcctggacaaggcctgagtgatggaaatattaatcctaataagt actagtgtactacaatgagaagttcaagagagaaggccacattgactgttagac aaatccctccagcacagccatgcagctcagcacccatctgaggactctg cggtctactactgtacaagacccataatggcctactggacttcgatgtctgggg cacagggaccacggtcaccgtctccta	F111-3C8 VH 配列	
69	gtcattgtatgacccagtctcacaattcatgtccacatcagtagggagacagggt cagttacccatgcaggccagtcaggatgtactactgtctgtatcaac aaaaaccaggcaatccctaaactactgtattactggcatccaccggcaca ctggagtccctgtatgcctcacaggcagtgtatctggacagattatctctcacca tcagcaatgtgcagactgaagacctggatattactgtcagcaacatttacca ctccttcacgttcggcgtggaccacagttggagctgaaa	F107-10G1 VL 配列	10
70	gaagtgaacctggggagtctggggaggcgttagtgaagcctggagcgtctcg aaactccctgtgaaggccctgtggatttcacttcagtaactatggcatgtctgggtcg ccagacttcagacaagaggctggagtggtcgcatccattagtggtgtgtgt agaacactactatctagacaatgtaaaggcccatttcatcatctccagagagaatg ccaagaacacccctgtacctgcataatgagttactgtctgaggacacggcct gtttactgtcaagaggagctggccttacttgctatggactactgggtcaa ggaagttcagtcaccgtctccta	F107-10G1 VH 配列	
71	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPF VGNPGNITGARGLTGLRCQLQVQGEPPVEHWLRDGQIL ELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQRLRITSQQLSDTGQY QCLVFLGHQTFVSPQPGYVGLEGPLYFLEEPEDRTVAANT PFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSL HVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTSRTATITVLPQQPRNLH LVSQRQTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQ AGEPDPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACT SSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPENISATRNGSQAF VHWQEPRAPLQGTLGYRLAYQGQDTPEVLMIDIGLRQE VTLELQGDGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVLEAW RPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSPWPWWGSGGSSTGHHH HHHHHG	(rh)AXL-ECD His8	20
72	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPF VGNPGNITGARGLTGLRCQLQVQGEPPVEHWLRDGQIL ELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQRLRITSQQLSDTGQY QCLVFLGHQTFVSPQPGYVGLEGPLYFLEEPEDRTVAANT PFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSL HVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTSRTATITVLPQQPRNLH LVSQRQTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQ AGEPDPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACT SSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPENISATRNGSQAF VHWQEPRAPLQGTLGYRLAYQGQDTPEVLMIDIGLRQE VTLELQGDGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVLEAW RPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSPWPWWYVLLGAVVAAACV LILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVRYRVRKSY	AXL-全長 His6	30

	SRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGE GEFGAVMEGQLNQDDSLKVAVKTMKIAICTRSELEDFLS EAVCMKEFDHPNVMRIGVCFQGSERESFPAPVILPFM KHGDLHSFLYSRLGDPVYLPTQMLVKFMADIASGMEY LSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDY YRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWE IATRGQTPYPGVENSEIYDYLRRGNRLKQPADCLDGLYAL MSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEIL YVNMDDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQPDPKDSCSCLTAA EVHPAGRYVLCPPSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGAYL ECGRYASHHHHHH	
73	QVQLQQPGTELVPGASVLSCKASGYIFTNFWINWVKQ RPGQGLEWIGNIFPGSNSSNYNEKFKNKATLTVDKSSST AYMHLSSLTSEDSA <sup>VYY</sup> <u>CVRDYYGGSPD</u> YWGQGTTLV SS	F155-3C7 VH
74	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSKTRKNYL AWYQQKPGQSPKLLI <u>WAST</u> RESGVPARFTGSGSGTDF TLTISSVQAEDLAIYYCKHSYNLWTFGGGTKLEIR	F155-3C7 VL
75	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGYTFYYGINWKQA PGKGLEWMG <u>WINTY</u> LGEP <u>TYADD</u> FKGRFAFSLETSASTA YLQINNLRDEDMATYFCTRGTMSYSFDYWGQGTALT VSS	F149-4G4 VH
76	QNVLTQSPA <sup>IMSASP</sup> GEEVTMTCRASSSVSSSYLHWYQ QKSGASP <sup>KLW</sup> I <u>Y</u> STSKLASGVPARFSGSGSGT <sup>S</sup> YSLTISS VEAEDAATYYCHQYSGDPLTFGSGTKLEVK	F149-4G4 VL
77	GFTFSNYG	F107-10G1 CDR H1-A
78	ISGGGGRT	F107-10G1 CDR H2-A
79	ARGARASYFAMDY	F107-10G1 CDR H3-A
80	QDVTTA	F107-10G1 CDR L1-A
81	WAS	F107-10G1 CDR L2-A
82	QQHFTTPLT	F107-10G1 CDR L3-A
83	GYTFTKYG	F111-5E9 CDR H1-A
84	INTYTGE <sup>P</sup>	F111-5E9 CDR H2-A
85	AKGGYYSNPIYPMDY	F111-5E9 CDR H3-A
86	QDINNY	F111-5E9 CDR L1-A
87	YIS	F111-5E9 CDR L2-A

10

20

30

40

50

88	QQGNTLPFT	F111-5E9 CDR L3-A
89	GYTFISFW	F107-8D12 CDR H1-A
90	IFPGSSST	F107-8D12 CDR H2-A
91	ARDYYGGSPDY	F107-8D12 CDR H3-A
92	QSLLNTRTRKNY	F107-8D12 CDR L1-A
93	WAS	F107-8D12 CDR L2-A
94	KQSYNLWT	F107-8D12 CDR L3-A
95	GYTFTSYW	F107-7H5 CDR H1-A
96	IYPDSSST	F107-7H5 CDR H2-A
97	TRDTYGGSPDY	F107-7H5 CDR H3-A
98	QSLLNSRTRKIY	F107-7H5 CDR L1-A
99	WAS	F107-7H5 CDR L2-A
100	KQSYNLWT	F107-7H5 CDR L3-A
101	GYIFTNFW	F155-3C7 CDR H1-A
102	IFPGSNSS	F155-3C7 CDR H2-A
103	VRDYYGGSPDY	F155-3C7 CDR H3-A
104	QSLLNSKTRKNY	F155-3C7 CDR L1-A
105	WAS	F155-3C7 CDR L2-A
106	KHSYNLWT	F155-3C7 CDR L3-A
107	GYTFTSYW	F111-3C8 CDR H1-A
108	INPNSTSA	F111-3C8 CDR H2-A
109	TRPLMGPYWYFDV	F111-3C8 CDR H3-A
110	SSVSY	F111-3C8 CDR L1-A

10

20

30

40

111	RTS	F111-3C8 CDR L2-A	
112	QQYHNYPPPT	F111-3C8 CDR L3-A	
113	GYTFTYYG	F149-4G4 CDR H1-A	
114	INTYLGEP	F149-4G4 CDR H2-A	
115	TRGTMSYSFDY	F149-4G4 CDR H3-A	10
116	SSSVSSYY	F149-4G4 CDR L1-A	
117	STS	F149-4G4 CDR L2-A	
118	HQYSGDPLT	F149-4G4 CDR L3-A	
119	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCTASASISSFDIMGWYRQ APGKQRELVAAIT <u>TLDIANYRDSVKGRFTISRDNAKNTVYL</u> QMDSLKPEDTARYH <u>CAAFQSDQNYWGQGTQVTVSS</u>	NRC-sdAb001	
120	QVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCATSTRVSSAVMAWFR QAPEKVRDFVGF <u>ITNSGNILYDDSVKGRFTISRDNAQNTV</u> YLQMNSLKPEDTAVYY <u>CAAKWSFSSGYGDLRRAAMYDY</u> WGQGTQVTVSS	NRC-sdAb002	20
121	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVTLDYTAIGWFR QAPGKERELVAITSGGNTDYAESAKGRFRISRDNSKNTI YLQMNSLKPEDTG <u>VYYCAARRGGARGEYDYWDQGTQV</u> TVSS	NRC-sdAb003	
122	QVQLVESGGGVQAGGSLRLSCAFSR <u>GAFDTYEIGWFR</u> QAPGKEREFVAA <u>VTNGDSVYADSLKARFTASRNNAVN</u> TAYLHMN <u>ILQPEDTATYYCAANWRPLRTSSGADDYADW</u> GQGTQVTVSS	NRC-sdAb004	
123	QVKLEESGGGLAQAGGSLRLSCAAS <u>GSISSINTIGWFR</u> QA PGKQRELVA <u>ASDGSANRNYADSVKGRFTISRDNAKNTVY</u> LQMNNLKPEDTA <u>YYCRAWGTGTISTMYWGQGTQVTVS</u> S	NRC-sdAb005	30
124	QVKLEESGGGLVQAGASLRLSCVASE <u>SIFGFNTMGWYR</u> QAPGNERELV <u>ASISNSKRTMYADSVKGRFTISRDNAKNT</u> VNLQMNNLKPEDTA <u>VYYCRAWGIITSATVYWGQGTQVTV</u> SS	NRC-sdAb006	
125	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCATSTRVSSAVMAWFR QAPEKERDFVGF <u>ISNSGSVYYDDSVKGRFTISRDNAQNT</u> VYLQMNSLKPEDTAVYY <u>CAIIWRTSDLTGRFNTWGQGTQ</u> VTVSS	NRC-sdAb007	40

126	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAAS <u>GSSGMINTMGWYR</u> QAPGKQRELVAR <u>RSTGGTTNYADSVKGRFTISRDDANNT</u> VYLQMNSLKP <u>EDTAVYYCAIIWRTSDLTGRFNTWGQGTQ</u> VTVSS	NRC-sdAb008
127	ASISSFDI	NRC-sdAb001 CDR1-A
128	ITTLEDIA	NRC-sdAb001 CDR2-A
129	AAFQSDQNY	NRC-sdAb001 CDR3-A
130	TRTVSSAV	NRC-sdAb002 CDR1-A
131	ITNSGNI	NRC-sdAb002 CDR2-A
132	AAKWSFSSGYGDLRRAAMYDY	NRC-sdAb002 CDR3-A
133	GVTLDYTA	NRC-sdAb003 CDR1-A
134	ITSGGNT	NRC-sdAb003 CDR2-A
135	AARRGGARGEYDY	NRC-sdAb003 CDR3-A
136	RGAFDTYE	NRC-sdAb004 CDR1-A
137	VTRNGDSV	NRC-sdAb004 CDR2-A
138	AANWRPLRTSSGADDYAD	NRC-sdAb004 CDR3-A
139	GSISSINT	NRC-sdAb005 CDR1-A
140	SDSGANR	NRC-sdAb005 CDR2-A
141	RAWGTGTISTMY	NRC-sdAb005 CDR3-A
142	ESIFGFNT	NRC-sdAb006 CDR1-A
143	ISNSKRT	NRC-sdAb006 CDR2-A

10

20

30

40

50

144	RAWGIITSATVY	NRC-sdAb006 CDR3-A
145	TRTVSSAV	NRC-sdAb007 CDR1-A
146	ISNSGSV	NRC-sdAb007 CDR2-A
147	AIIWRTSDLTGRFNT	NRC-sdAb007 CDR3-A
148	GSSGMINT	NRC-sdAb008 CDR1-A
149	RSTGGTT	NRC-sdAb008 CDR2-A
150	AIIWRTSDLTGRFNT	NRC-sdAb008 CDR3-A
151	NFWIN	F155-3C7 CDR H1-B
152	NIFPGSNSSNNYNEKFKN	F155-3C7 CDR H2-B
153	DYYGGSPDY	F155-3C7 CDR H3-B
154	KSSQSLLNSKTRKNYLA	F155-3C7 CDR L1-B
155	WASTRES	F155-3C7 CDR L2-B
156	KHSYNLWT	F155-3C7 CDR L3-B
157	YYGIN	F149-4G4 CDR H1-B
158	WINTYLGEPTYADDPKG	F149-4G4 CDR H2-B
159	GTMSYSFDY	F149-4G4 CDR H3-B
160	RASSSVSSSYLH	F149-4G4 CDR L1-B
161	STSKLAS	F149-4G4 CDR L2-B
162	HQYSGDPLT	F149-4G4 CDR L3-B
163	FDIMG	NRC-sdAb001 CDR1-B
164	AITTLIDIANYRDSVKG	NRC-sdAb001 CDR2-B

10

20

30

40

50

165	FQSDQNY	NRC-sdAb001 CDR3-B
166	SAVMA	NRC-sdAb002 CDR1-B
167	FITNSGNILYDDSVKG	NRC-sdAb002 CDR2-B
168	KWSFSSGYGDLRRAAMYDY	NRC-sdAb002 CDR3-B
169	YTAIG	NRC-sdAb003 CDR1-B
170	AITSGGNTDYAESAKG	NRC-sdAb003 CDR2-B
171	RRGGARGEYDY	NRC-sdAb003 CDR3-B
172	TYEIG	NRC-sdAb004 CDR1-B
173	AVTRNGDSVYADSLKA	NRC-sdAb004 CDR2-B
174	NWRPLRTSSGADDYAD	NRC-sdAb004 CDR3-B
175	ASDSGANRNYADSVKG	NRC-sdAb005 CDR1-B
176	ASDSGANRNYADSVKG	NRC-sdAb005 CDR2-B
177	WGTGTISTMY	NRC-sdAb005 CDR3-B
178	FNTMG	NRC-sdAb006 CDR1-B
179	SISNSKRTMYADSVKG	NRC-sdAb006 CDR2-B
180	WGIITSATVY	NRC-sdAb006 CDR3-B
181	SAVMA	NRC-sdAb007 CDR1-B
182	FISNSGSVYYDDSVKG	NRC-sdAb007 CDR2-B
183	IWRSDLTGRFNT	NRC-sdAb007 CDR3-B

10

20

30

40

50

184	INTMG	NRC-sdAb008 CDR1-B
185	RRSTGGTTNYADSVKG	NRC-sdAb008 CDR2-B
186	IWRRTSDLTGRFNT	NRC-sdAb008 CDR3-B
187	TPPPVLDSDGSFFLYSK	Fc ペプチド
188	EFVAAGSSTGR	A20.1 ペプチド

注釈-CDR 配列の説明の後に「-A」が続く場合は、IMGT CDR 規則を示す。  
CDR 配列の説明の後に「-B」が後に続く場合は、Kabat CDR 規則を示す。

【 0 2 6 0 】

## [00337]参考文献

- [00338] All publications referred to herein are hereby incorporated by reference.
- [00339] International Patent Publication WO2016/005593 A1 (Breij et al.)
- [00340] U.S. Patent Application Publication US2014/0227283 A1 (Robert et al.)
- [00341] Asiedu MK, Beauchamp-Perez FD, Ingle JN, Behrens MD, Radisky DC, Knutson KL. (2014) AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogene*. 33(10):1316-24.
- [00342] Baral et al. (2013) Single-domain antibodies and their utility. *Curr Protoc Immunol*. 2013 Nov 18;103:Unit 2.17.
- [00343] Feneysrolles C, Spenlinhauer A, Guiet L, Fauvel B, Dayde-Cazals B, Warault P, Cheve G, Ysri A. (2014) AXL Kinase as a Key Target for Oncology: Focus on Small Molecule Inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 13; 2141-2148.
- [00344] Gjerdrum C, Tiron C, Hoiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, Collett K, Li S, McCormack E, Gjertsen BT, Micklem DR, Akslen LA, Glackin C, Lorenz JB (2010) AXL is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(3):1124-9.
- [00345] Gonzales NR, DePascalis R, Schlom J, Kashmiri SVS (2005) Minimizing the Immunogenicity of Antibodies for Clinical Application. *Tumor Biol* 26, 31-43.
- [00346] Henry et al., 2016, "Isolation of TGF- $\beta$ -neutralizing single-domain antibodies of predetermined epitope specificity using next-generation DNA sequencing", *Protein Engineering, Design and Selection*, pp. 1-5, 2016-09-08 (PEDS)
- [00347] Holland SJ, Powell MJ, Franci C, Chan EW, Friera AM, Atchison RE, McLaughlin J, Swift SE, Pali ES, Yam G, Wong S, Lasaga J, Shen MR, Yu S, Xu W, Hitoshi Y, Bogenberger J, Nor JE, Payan DG, Lorens JB. (2005) Multiple roles for the receptor tyrosine kinase AXL in tumor formation. *Cancer Res*. 65(20): 9294-303.
- [00348] Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, Duan M, Torneros A, Yu J, Heckrodt TJ, Zhang J, Ding P, Apatira A, Chua J, Brandt R, Pine P, Goff D, Singh R, Payan DG, Hitoshi Y. R428, a selective small molecule inhibitor of AXL kinase blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2010 Feb 15;70(4):1544-54.
- [00349] Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525.
- [00350] Kitagawa D, Yokota K, Gouda M, Narumi Y, Ohmoto H, Nishiwaki E, Ak

10

20

30

40

50

- ita K, Kirii Y. (2013) Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. *Genes Cells*. 18(2):110-22.
- [00351] Leconet et al., (2014) Preclinical validation of AXL receptor as a target for antibody-based pancreatic cancer immunotherapy. *Oncogene* 33, 5405-5414 (20 November 2014).
- [00352] Lee HJ, Jeng YM, Chen YL, Chung L, Yuan RH. (2014) Gas6/ AXL pathway promotes tumor invasion through the transcriptional activation of Slug in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 35:769-775.
- [00353] Li Y, Ye X, Tan C, Hongo JA, Zha J, Liu J, Kallop D, Ludlam MJ, Pei L. (2009) AXL as a potential therapeutic target in cancer: role of AXL in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene*. 28:3442-3455. 10
- [00354] Li JY, Perry SR, Muniz-Medina V, Wang X, Wetzel LK, Rebelatto MC, Hinrichs MJ, Bezabeh BZ, Fleming RL, Dimasi N, Feng H, Toader D, Yuan AQ, Xu L, Lin J, Gao C, Wu H, Dixit R, Osbourn JK, Coats SR. A Biparatopic HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate Induces Tumor Regression in Primary Models Refractory to or Ineligible for HER2-Targeted Therapy. *Cancer Cell*. 2016 Jan 11;29(1):117-29.
- [00355] Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK (2008) TAM receptor tyrosine kinases: Biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res* 100:35-83. 20
- [00356] Meyer AS, Miller MA, Gertler FB, Lauffenburger DA. (2013) The receptor AXL diversifies EGFR signaling and limits the response to EGFR-targeted inhibitors in triple-negative breast cancer cells. *Sci Signal*. 6(287).
- [00357] O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R, 3rd, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET. (1991) AXL, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. 11:5016-5031.
- [00358] Paccez JD, Vogelsang M, Parker MI, Zerbini LF. (2014) The receptor tyrosine kinase AXL in cancer: biological functions and therapeutic implications. *Int J Cancer*. 134(5):1024-33. 30
- [00359] Padlan EA (1991) A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol Immunol* 28, 489-498.
- [00360] Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP, Waldmann TA (1989) A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033.
- [00361] Raymond et al. (2015) Production of 2,6-sialylated IgG1 in CHO cells. *MAbs* 7(3):571-583.
- [00362] Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, Viswanathan K, Finger EC, Diep AN, LaGory EL, Kariolis MS, Chan A, Lindgren D, Axelson H, Miao YR, Krieg AJ, Giaccia AJ. (2014) Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(37):13373-8. 40
- [00363] Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-327.
- [00364] Strop P, Ho WH, Boustany LM, Abdiche YN, Lindquist KC, Farias SE, Rickett M, Appah CT, Pascua E, Radcliffe T, Sutton J, Chaparro-Riggers J, Chen W, Casas MG, Chin SM, Wong OK, Liu SH, Vergara G, Shelton D, Rajpal A, Pons J. Generating bispecific human IgG1 and IgG2 antibodies from any antibody pair. *J Mol Biol* 2012; 420(3):204-219. 50

- [00365] Tempest PR, Bremmer P, Lambert M, Taylor G, Furze JM, Carr FJ, Harris WJ (1991) Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection in vivo. *Biotechnology* 9, 266-271.
- [00366] Thomson S, Petti F, Sujka-Kwok I, Mercado P, Bean J, Monaghan M, Symour SL, Argast GM, Epstein DM, Haley JD. (2011) A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states. *Clin Exp Metastasis*. 28(2):137-55.
- [00367] Tsurushita N, Hinton, RP, Kumar S (2005) Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax. *Methods* 36, 69-83.
- [00368] Vincke C, et al., General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem*. 2009 Jan 30;284(5):3273-84. 10
- [00369] Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi YC, Yu PW, Qian F, Chu FL, Bentzien F, Cancilla B, Orf J, You A, Laird AD, Engst S, Lee L, Lesch J, et al. (2011) Cabozantinib(XL184), a Novel MET and VEGFR2 Inhibitor, Simultaneously Suppresses Metastasis, Angiogenesis, and Tumor Growth. *Molecular cancer therapeutics*. 10:2298-2308.
- [00370] Zhang et al., 2009, Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. *Protein Expression and Purification*, May; 65(1):77-82.
- [00371] Zhou et al., 2010, *J Mol Biol*, Nov 19;404(1):88-99 Internalizing cancer antibodies from phage libraries selected on tumor cells and yeast displayed tumor antigen. 20

【図面】

【図 1】

【図 2】

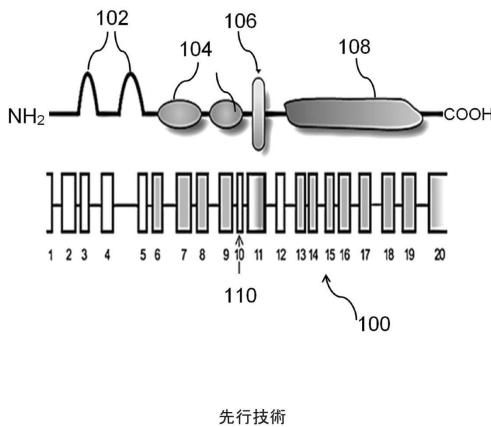


FIG. 1

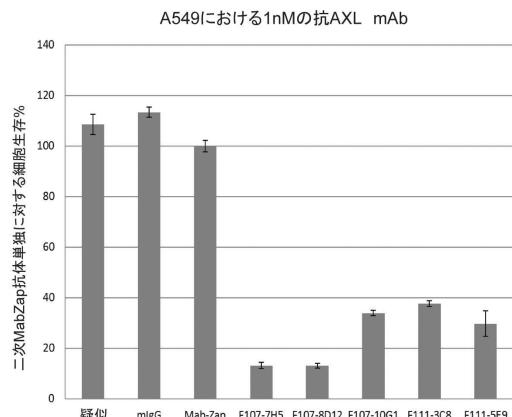


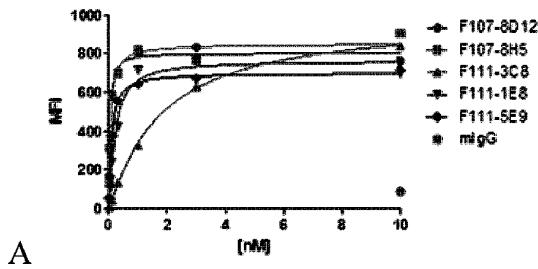
FIG. 2

30

40

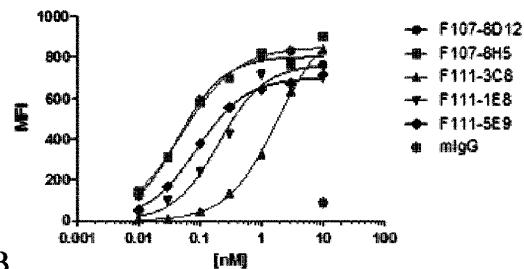
50

【図 3 A】



A

【図 3 B】



B

10

【図 4】

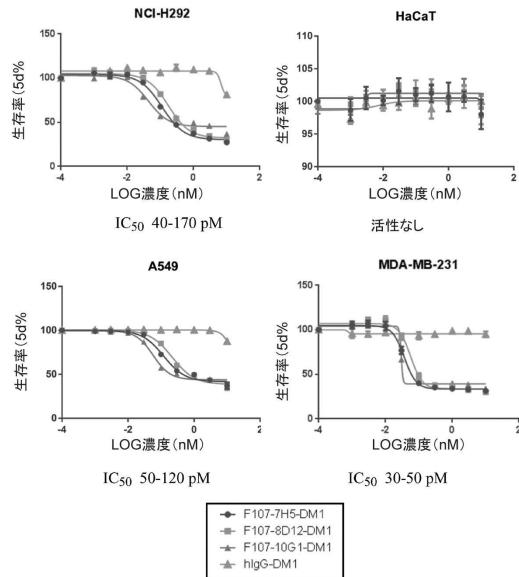


FIG. 4

【図 5】

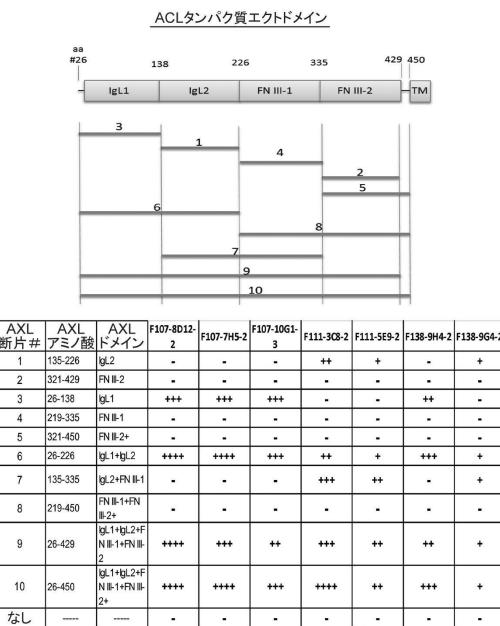


FIG. 5

20

30

40

50

【図6】

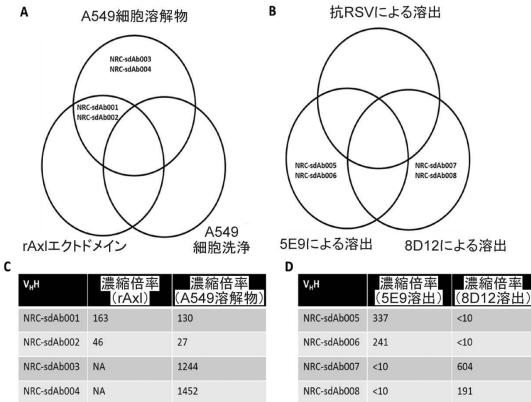


FIG. 6

【図7】

>F107.10G1(heavy)>EVNLVESGGGVVKPGASIKLSEASGFTS~~WVQKAPGKQRELVA~~~~RFTISRDNAKNTV~~  
N~~Y~~~~W~~~~R~~~~F~~~~I~~~~S~~~~R~~~~E~~~~N~~~~A~~~~K~~~~N~~~~T~~~~V~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~S~~~~P~~~~K~~~~L~~~~I~~~~V~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~T~~~~V~~~~L~~~~I~~~~I~~  
>F107.10G1(kappa)>VIVMTQSHKFMS75VGDRVSITC~~K~~~~A~~~~S~~~~G~~~~D~~~~V~~~~T~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Y~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~S~~~~P~~~~K~~~~L~~~~I~~~~V~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~T~~~~V~~~~L~~~~I~~  
>F111.5E9(heavy)>QJQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS~~G~~~~Y~~~~T~~~~F~~~~I~~~~S~~~~V~~~~W~~~~V~~~~K~~~~A~~~~P~~~~G~~~~K~~~~L~~~~W~~~~M~~~~G~~~~N~~~~T~~~~I~~~~Y~~~~G~~~~P~~~~T~~  
D~~E~~~~K~~~~G~~~~R~~~~F~~~~A~~~~S~~~~L~~~~E~~~~T~~~~A~~~~S~~~~T~~~~A~~~~Y~~~~Q~~~~I~~~~N~~~~L~~~~T~~~~E~~~~D~~~~M~~~~V~~~~T~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~K~~~~G~~~~P~~~~I~~~~N~~~~P~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~S~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~  
>F111.5E9(kappa)>DIQMTQTTSSLASLGD~~R~~~~V~~~~T~~~~I~~~~C~~~~R~~~~A~~~~S~~~~G~~~~N~~~~I~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~Y~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~T~~~~V~~~~L~~~~I~~  
I~~S~~~~R~~~~E~~~~N~~~~A~~~~K~~~~N~~~~T~~~~V~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~S~~~~F~~~~G~~  
>F107.8D12(heavy)>QVQLQQPGAEVLPKGASVLSCKAS~~G~~~~Y~~~~T~~~~F~~~~I~~~~S~~~~V~~~~W~~~~V~~~~K~~~~Q~~~~R~~~~P~~~~G~~~~Q~~~~G~~~~L~~~~E~~~~W~~~~M~~  
G~~N~~~~T~~~~I~~~~Y~~~~K~~~~A~~~~T~~~~V~~~~D~~~~K~~~~S~~~~S~~~~T~~~~A~~~~Y~~~~M~~~~Q~~~~L~~~~S~~~~T~~~~E~~~~D~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~R~~~~D~~~~Y~~~~G~~~~S~~~~P~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~L~~~~T~~~~V~~~~S~~  
>F107.8D12(kappa)>DIVMSQSPSSLA~~S~~~~A~~~~G~~~~E~~~~V~~~~T~~~~M~~~~S~~~~C~~~~S~~~~S~~~~L~~~~E~~~~T~~~~R~~~~I~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~Y~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~S~~~~K~~~~L~~~~I~~  
V~~N~~~~P~~~~S~~~~S~~~~S~~~~N~~~~Y~~~~N~~~~E~~  
>F107.7H5(heavy)>QVQLQQPGAEVLPKGASVLSCKAS~~G~~~~Y~~~~T~~~~F~~~~I~~~~S~~~~V~~~~W~~~~V~~~~K~~~~Q~~~~R~~~~P~~~~G~~~~Q~~~~G~~~~L~~~~E~~~~W~~~~M~~  
G~~N~~~~T~~~~I~~~~Y~~~~K~~~~A~~~~T~~~~V~~~~D~~~~K~~~~S~~~~S~~~~T~~~~A~~~~Y~~~~M~~~~Q~~~~L~~~~S~~~~T~~~~E~~~~D~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~R~~~~Y~~~~G~~~~S~~~~P~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~L~~~~T~~~~V~~~~S~~  
>F15.3C7(heavy)>QVQLQQPGAEVLPKGASVLSCKAS~~G~~~~Y~~~~T~~~~F~~~~I~~~~S~~~~V~~~~W~~~~V~~~~K~~~~Q~~~~R~~~~P~~~~G~~~~Q~~~~G~~~~L~~~~E~~~~W~~~~M~~  
G~~N~~~~T~~~~I~~~~Y~~~~K~~~~A~~~~T~~~~V~~~~D~~~~K~~~~S~~~~S~~~~T~~~~A~~~~Y~~~~M~~~~Q~~~~L~~~~S~~~~T~~~~E~~~~D~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~R~~~~Y~~~~G~~~~S~~~~P~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~L~~~~T~~~~V~~~~S~~  
>F15.3C7(kappa)>DIVMSQSPSSLA~~S~~~~A~~~~G~~~~E~~~~V~~~~T~~~~M~~~~S~~~~C~~~~S~~~~S~~~~L~~~~E~~~~T~~~~R~~~~I~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~Y~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~S~~~~K~~~~L~~~~I~~  
V~~N~~~~P~~~~S~~~~S~~~~S~~~~N~~~~Y~~~~N~~~~E~~  
>F111.3C8(heavy)>QVQLQQSPAIMSASPGEVKT~~S~~~~A~~~~S~~~~S~~~~S~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~V~~~~Y~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~S~~~~K~~~~L~~~~I~~  
V~~N~~~~P~~~~S~~~~S~~~~S~~~~N~~~~Y~~~~N~~~~E~~  
>F149.4G4(heavy)>QJQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS~~G~~~~Y~~~~T~~~~F~~~~I~~~~S~~~~V~~~~W~~~~V~~~~K~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~G~~~~K~~~~L~~~~W~~~~M~~  
G~~N~~~~T~~~~I~~~~Y~~~~K~~~~A~~~~T~~~~V~~~~D~~~~K~~~~S~~~~S~~~~T~~~~A~~~~Y~~~~M~~~~Q~~~~L~~~~S~~~~T~~~~E~~~~D~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~R~~~~Y~~~~G~~~~S~~~~P~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~L~~~~T~~~~V~~~~S~~  
>F149.4G4(kappa)>QVNLTQSPAIMSASPGEEVMT~~C~~~~S~~~~S~~~~S~~~~S~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~V~~~~Y~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~S~~~~K~~~~L~~~~I~~  
V~~N~~~~P~~~~S~~~~S~~~~S~~~~N~~~~Y~~~~N~~~~E~~  
>NRC-sdAb001  
QVKLEESGGGLVQAGGSRLRLSCA~~S~~~~A~~~~S~~~~S~~~~S~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~V~~~~Y~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~S~~~~K~~~~L~~~~I~~  
LQMDSLKPEDTARYH~~C~~~~A~~~~A~~~~N~~~~P~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 127-129, NO: 127-129)

>NRC-sdAb002  
QVQLVDGGGLVQAGGSRLRLSCAT~~S~~~~T~~~~R~~~~T~~~~V~~~~S~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~~~F~~~~G~~  
V~~Y~~~~L~~~~Q~~~~M~~~~N~~~~S~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ. NO: 120, NO: 120-132, NO: 120-132)~~

>NRC-sdAb003  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCA~~S~~~~A~~~~S~~~~V~~~~T~~~~D~~~~E~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~~~N~~~~K~~  
LQMSNLKPEDTGVYYCA~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~S~~~~S~~~~G~~~~Y~~~~G~~~~D~~~~B~~~~R~~~~A~~~~M~~~~D~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 121, NO: 133-135, NO: 133-135)

>NRC-sdAb004  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCAF~~S~~~~R~~~~G~~~~A~~~~F~~~~T~~~~E~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~  
TAYLHMN~~I~~~~N~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 122, NO: 136-138, NO: 136-138)~~

>NRC-sdAb005  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCA~~S~~~~A~~~~S~~~~V~~~~T~~~~D~~~~E~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~  
Y~~L~~~~Q~~~~M~~~~N~~~~S~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 123, NO: 139-141, NO: 139-141)~~

>NRC-sdAb006  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCAV~~S~~~~I~~~~F~~~~G~~~~T~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~  
N~~L~~~~Q~~~~M~~~~N~~~~N~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 124, NO: 142-144, NO: 142-144)~~

>NRC-sdAb007  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCA~~S~~~~G~~~~S~~~~G~~~~M~~~~I~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~  
Y~~L~~~~Q~~~~M~~~~N~~~~S~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 125, NO: 145-147, NO: 145-147)~~

>NRC-sdAb008  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCA~~S~~~~G~~~~S~~~~G~~~~M~~~~I~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~  
T~~V~~~~L~~~~Q~~~~M~~~~N~~~~S~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 126, NO: 148-150, NO: 148-150)~~

FIG. 7

【図8】

【図9】

>NRC-sdAb001  
QVKLEESGGGLVQAGGSRLRLSCA~~S~~~~A~~~~S~~~~S~~~~S~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~V~~~~Y~~~~Q~~~~Q~~~~K~~~~P~~~~G~~~~S~~~~K~~~~L~~~~I~~  
LQMDSLKPEDTARYH~~C~~~~A~~~~A~~~~N~~~~P~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 127-129, NO: 127-129)

>NRC-sdAb002  
QVQLVDGGGLVQAGGSRLRLSCAT~~S~~~~T~~~~R~~~~T~~~~V~~~~S~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~~~F~~~~G~~  
V~~Y~~~~L~~~~Q~~~~M~~~~N~~~~S~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ. NO: 120, NO: 120-132, NO: 120-132)~~

>NRC-sdAb003  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCA~~S~~~~A~~~~S~~~~V~~~~T~~~~D~~~~E~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~  
Y~~L~~~~Q~~~~M~~~~N~~~~S~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 121, NO: 133-135, NO: 133-135)~~

>NRC-sdAb004  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCAF~~S~~~~R~~~~G~~~~A~~~~F~~~~T~~~~E~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~  
TAYLHMN~~I~~~~N~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 122, NO: 136-138, NO: 136-138)~~

>NRC-sdAb005  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCA~~S~~~~A~~~~S~~~~V~~~~T~~~~D~~~~E~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~  
Y~~L~~~~Q~~~~M~~~~N~~~~S~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 123, NO: 139-141, NO: 139-141)~~

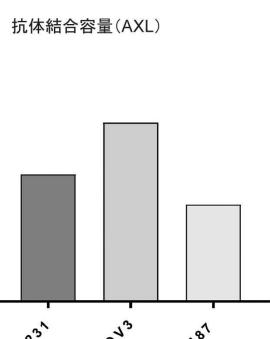
>NRC-sdAb006  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCAV~~S~~~~I~~~~F~~~~G~~~~T~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~  
N~~L~~~~Q~~~~M~~~~N~~~~N~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 124, NO: 142-144, NO: 142-144)~~

>NRC-sdAb007  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCA~~S~~~~G~~~~S~~~~G~~~~M~~~~I~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~  
Y~~L~~~~Q~~~~M~~~~N~~~~S~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 125, NO: 145-147, NO: 145-147)~~

>NRC-sdAb008  
QVQLVESGGGLVQAGGSRLRLSCA~~S~~~~G~~~~S~~~~G~~~~M~~~~I~~~~N~~~~Y~~~~W~~~~F~~~~R~~~~Q~~~~A~~~~P~~~~K~~~~V~~~~R~~~~D~~  
T~~V~~~~L~~~~Q~~~~M~~~~N~~~~S~~~~L~~~~K~~~~P~~~~E~~~~DTA~~V~~~~A~~~~V~~~~Y~~~~C~~~~A~~~~A~~~~Y~~~~W~~~~Q~~~~G~~~~T~~~~Q~~~~V~~~~T~~~~V~~~~S~~ (SEQ ID NO: 126, NO: 148-150, NO: 148-150)~~

FIG. 8

FIG. 9



【図10】

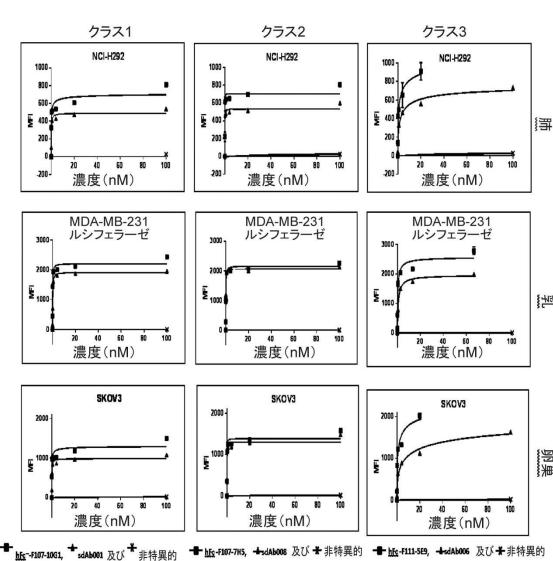


FIG. 10

【図11】

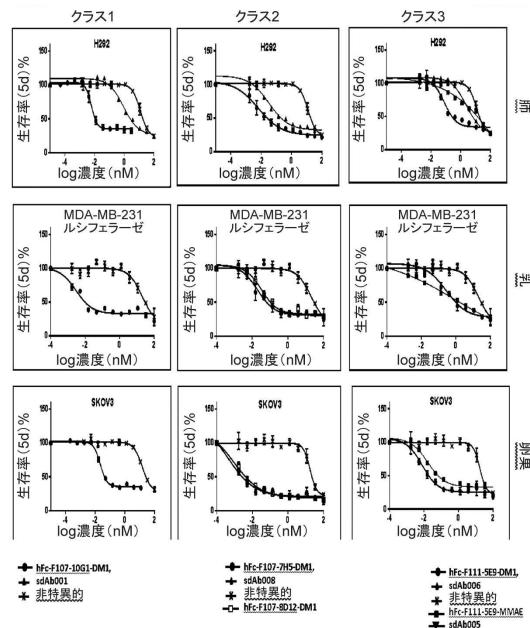


FIG. 11

【図12】

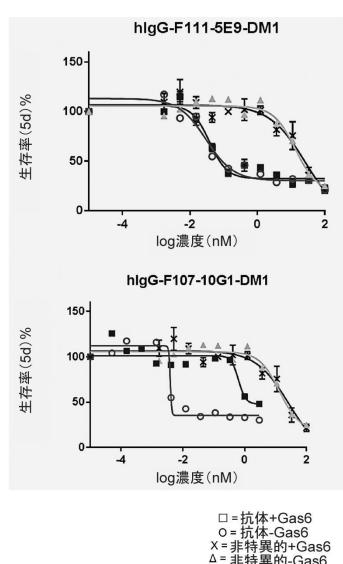


FIG. 12

【図13】

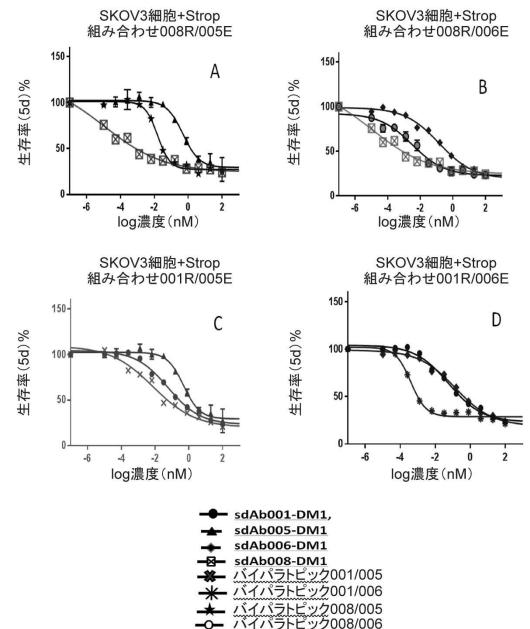


FIG. 13

【図 14】

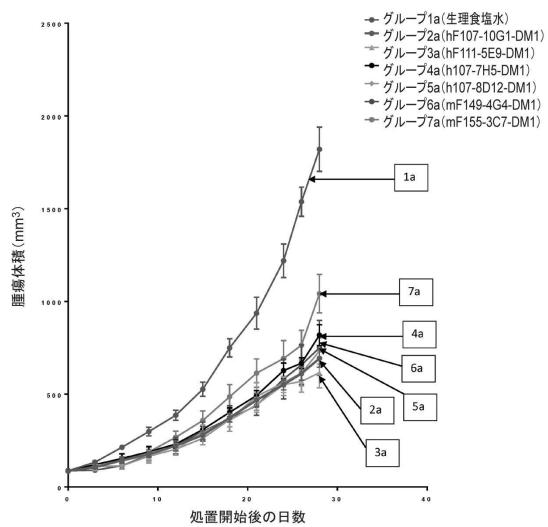


FIG. 14

【図 15】

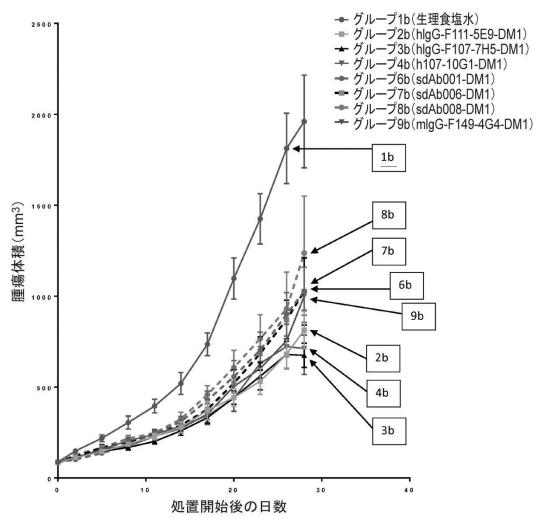
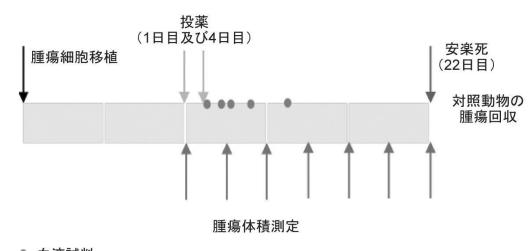


FIG. 15

10

20

【図 16】



● 血液試料

グループ	動物数/時間点	2回目の投薬後	2回目の投薬前											
			1h	2h	4h	6h	24h	48h	96h	120h	168h	216h	264h	336h
2~3	1	x				x			x			x		
	1	x				x			x			x		
	1	x				x			x			x		
	1	x				x			x			x		
	1	x				x			x			x		
	1		x			x			x			x		
	1		x			x			x			x		
	1		x			x			x			x		
	1		x			x			x			x		
	1		x			x			x			x		

FIG. 16

【図 17】

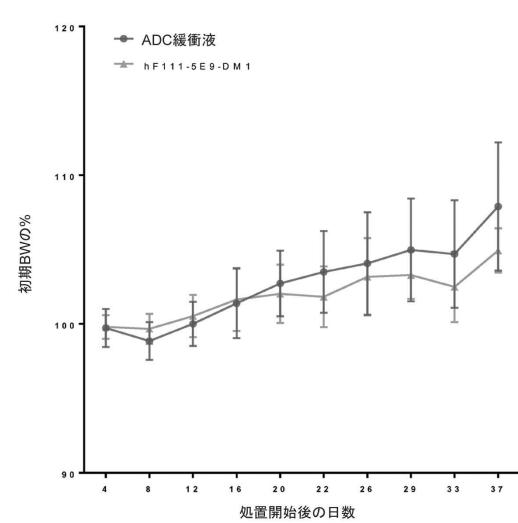


FIG. 17

30

40

50

【図 18】

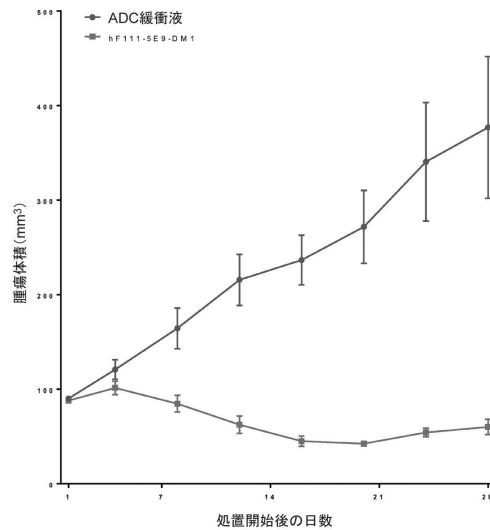


FIG. 18

【図 19】

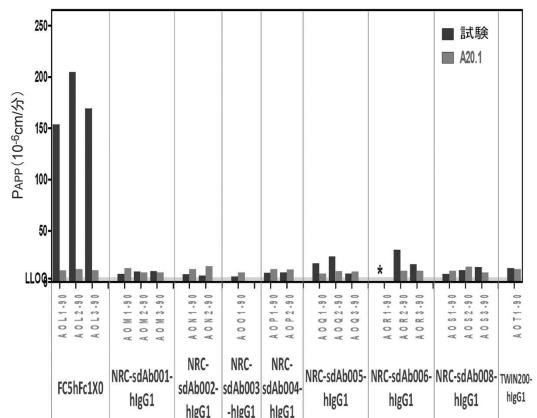


FIG. 19

10

20

【配列表】

0007366886000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F	I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P
			1/19
			1/21
			5/10
			67/027
			39/395
			47/68
			35/00
			33/574
			A
			21/08

イブ 804-1725

(72)発明者 ジャラミロ, マリア ルズ

カナダ, ケベック州 エイチ4ピー 2アール2, モントリオール, ルーム エル-142, ケ  
アオブ ロイヤルマウント アベニュー 6100

(72)発明者 マッケンジー, コリン ロジャー

カナダ, オンタリオ州 ケ-1ジェイ 6ケ-9, オタワ, ハメリング レセント 2195

(72)発明者 マルシル, アン

カナダ, ケベック州 エイチ9ジェイ 2エ-6, ピエールフォン, ル グリエ 4801

審査官 西 賢二

(56)参考文献 特表2017-522871 (JP, A)

国際公開第2017/009258 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00-15/90  
C 0 7 K 1/00-19/00  
C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )