

(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 | Z N A |
| 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 | Z     |
| 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<br>ナショナル リサーチ カウンシル オブ<br>カナダ<br>カナダ国, オンタリオ ケー1エー 0ア<br>ール6, オタワ, モントリオール ロード<br>1 2 0 0 |
| (86)(22)出願日       | 平成30年9月10日(2018.9.10)            | (74)代理人  | 100107456<br>弁理士 池田 成人  |
| (65)公表番号          | 特表2020-533004(P2020-533004<br>A) | (74)代理人  | 100162352<br>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<br>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<br>カナダ, オンタリオ州 ケー1ジー 0<br>イー6, オタワ, リバーサイド ドラ<br>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80、81、及び82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77、78、及び79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86、87及び88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83、84及び85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92、93、及び94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89、90、及び91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98、99及び100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95、96及び97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104、105及び106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101、102及び103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110、111及び112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 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<sub>D</sub> ) 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 75 と 90% 以上の同一性を有する V H 配列、及び配列番号 76 と 90% 以上の同一性を有する V L 配列；

配列番号 119 と 90% 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 120 と 90% 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 121 と 90% 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 122 と 90% 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 123 と 90% 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 124 と 90% 以上の同一性を有する V H H 配列；

配列番号 125 と 90% 以上の同一性を有する V H H 配列；又は

配列番号 126 と 90% 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 39 の V H 配列、及び配列番号 38 の V L 配列；

配列番号 41 の V H 配列、及び配列番号 40 の V L 配列；

配列番号 43 の V H 配列、及び配列番号 42 の V L 配列；

配列番号 45 の V H 配列、及び配列番号 44 の V L 配列；

配列番号 47 の V H 配列、及び配列番号 46 の V L 配列；

配列番号 73 の V H 配列、及び配列番号 74 の V L 配列；

配列番号 75 の V H 配列、及び配列番号 76 の V L 配列；

配列番号 119 の V H H 配列；

配列番号 120 の V H H 配列；

配列番号 121 の V H H 配列；

配列番号 122 の V H H 配列；

配列番号 123 の V H H 配列；

配列番号 124 の V H H 配列；

配列番号 125 の V H H 配列；又は

配列番号 126 の V H H 配列

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

20

【請求項 8】

抗体がバイパルトピック抗体であり、かつ、

配列番号 119 及び配列番号 123 のアミノ酸配列；又は

配列番号 119 及び配列番号 124 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 12 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 14】

請求項 13 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つ又は複数のリボソーム又はナノキャリアに充填されている、請求項 16 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】

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。

20

## 【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】

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つ又は複数のリボソーム又はナノキャリアに充填されている、請求項 22 に記載の組成物。

40

## 【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】

【0001】

[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。

【0002】

[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。

10

【背景技術】

【0003】

[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。

20

【0004】

[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關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、慢性骨髄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; Paccezら、2014年)。

【0005】

[0005]AXLはまた、上皮から間葉への移行 (Gjerdumら、2010年)、悪性細胞の侵襲的運動性及び転移と密接に關連するプロセスに關与している。さらに、AXL発現は、患者の生存と負に關連付けられることが示されている (Lingerら、2008年; Gjerdumら、2010年)。最近のいくつかの研究では、AXL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、AXL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、AXL発現はまた、固形腫瘍がより大きくなり、より侵襲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、AXLを癌の有望な診断、予後、及び治療の標的として示唆する。

30

40

【0006】

[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BOSUTINIB (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

50

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 (Feneyrolles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 BGB324 TM (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 14 nM 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、Abl、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ることが示されている。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腫瘍異種移植片の両方の増殖を減少させた。

20

30

#### 【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。

#### 【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、モノメチルオーリスタチン 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 1 mg / 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 WO 2016 / 005593 A1 (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（ADC）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、ADC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AXL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、AXL特異的抗体を提供することである。AXL特異的モノクローナル及び単ドメイン抗体、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AXL特異的抗体は、細胞表面に発現したヒトAXL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AXLエクドメイン（ECD）の免疫グロブリン様（IgL）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98～100；配列番号92～94；配列番号110～112；配列番号86～88；配列番号80～82；配列番号104～106；配列番号116～118；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（VL）CDR1、CDR2、及びCDR3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38；配列番号40；配列番号42；配列番号44；配列番号46；配列番号74；配列番号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（VL）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95～97；配列番号89～91；配列番号107～109；配列番号83～85；配列番号77～79；配列番号101～103；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択される可変重鎖（VH）CDR1、CDR2、及びCDR3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39；配列番号41；配列番号43；配列番号45；配列番号47；配列番号73；配列番号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（VH）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119～126、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ドメイン（sd）重鎖可変（VHH）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39のVH、及び配列番号38のVL；配列番号41のVH、及び配列番号40のVL；配列番号43のVH、及び配列番号42のVL；配列番号45のVH、及び配列番号44のVL；配列番号47のVH、及び配列番号46のVL；配列番号73のVH、及び配列番号74のVL；配列番号75のVH、及び配列番号76のVL；配列番号119のVHH；配列番号120のVHH；配列番号121のVHH；配列番号122のVHH；配列番号123のVHH；配列番号124のVHH；配列番号125のVHH；配列番号126のVHH；及びそれと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（ADC）、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】A X Lをインビトロ及びインビボで検出する方法が記載される。目的の分子を、A X L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。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】A X Lドメイン構造の概略図である（先行技術）。

【図2】A 5 4 9細胞の生存における抗A X L m A bの効果の結果を示す図である。

【図3】H 2 9 2細胞の細胞表面に発現した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図である。

【図4】H 2 9 2腫瘍細胞株、A 5 4 9細胞株、ヒト乳癌MDA - MB - 2 3 1腫瘍細胞株、及び不死化H a C a Tケラチノサイト細胞における細胞生存率に対する抗A X L - DM 1コンジュゲートの活性の結果を示す。

【図5】ヒトA X Lタンパク質エクドメイン（h A X L - E C D）及び膜貫通ドメインの略図である。ドメイン結合は、h A X L - E C Dの10個のペプチド断片で示される。

【図6】抗r h A X L E C D単ドメイン抗体（s d A b）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、I M G T定義を使用したC D Rを有するm A b V<sub>H</sub> / V<sub>L</sub>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、I M G T定義を使用したC D Rを有するV<sub>H</sub> Hのアミノ酸配列を示す図である。

【図9】肺（H 2 9 2）、乳房（MDA - MB - 2 3 1）、卵巣（S K O V 3）及び神経膠芽腫（U 8 7）細胞株における抗体結合能を示す図である。

【図10】肺（N C I - H 2 9 2）、乳房（MDA - MB - 2 3 1）、及び卵巣（S K O V 3）細胞株における抗A X L h I g G及びs d A b s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h I g G A b s及びs d A b sの増殖阻害結合曲線を示す図である。

【図12】H 2 9 2細胞株におけるG a s 6の存在下及び非存在下でのh I g G - F 1 1 - 5 E 9 - DM 1及びh I g G - F 1 0 7 - 1 0 G 1 - DM 1の増殖阻害結合曲線を示す図である。

【図13】S K O V 3細胞株におけるモノパラトピック親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の増殖阻害結合曲線を示す図である。

【図14】選択された試験抗体によるS K O V 3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S K O V 3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 - 2 3 1 - L u c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h F 1 1 1 - 5 E 9 - DM 1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h F 1 1 1 - 5 E 9 - DM 1の効果を示す図である。

10

20

30

40

50



【図19】実施例18において評価されたFC5Hfc1X0（陽性対照）、TWIN200-hIgG1（陰性対照）及び7つの抗AXL 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】

【0026】

[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AXLモノクローナル抗体及び単ドメイン抗体を提供する。

【0027】

[0045]ヒトAXLエクドメイン（ECD）の免疫グロブリン様（Ig 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。AXL ECD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、AXLのIg L 1又はIg L 2に位置し得る。抗体は、AXLを発現する腫瘍細胞に内在化することができる。

10

【0028】

[0046]抗体は、単ドメイン抗体、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AXL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Ig 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Ig G重鎖由来のフレームワーク領域を含み得る。抗体は、Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、又はIg M由来のフレームワーク領域を含み得る。

20

【0029】

[0047]抗体は、全長Ig 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AXLエクドメインに対して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、AXL ECDのIg 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AXLへの結合と競合しないものであり得る。

【0030】

[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

【0031】

[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。

【0032】

[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

【0033】

[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 を含むものであり得る。

【 0 0 3 4 】

[0052]記載される抗体は、配列番号 1 2 7 ~ 1 2 9 ; 配列番号 1 3 0 ~ 1 3 2 ; 配列番号 1 3 3 ~ 1 3 5 ; 配列番号 1 3 6 ~ 1 3 8 ; 配列番号 1 3 9 ~ 1 4 1 ; 配列番号 1 4 2 ~ 1 4 4 ; 配列番号 1 4 5 ~ 1 4 7 ; 配列番号 1 4 8 ~ 1 5 0 ; 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。

【 0 0 3 5 】

[0053]配列番号 1 1 9 ~ 1 2 6、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

【 0 0 3 6 】

[0054]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 ; 及び 1 1 9 ~ 1 2 6 の V H H 配列、並びにそれと 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が記載される。

【 0 0 3 7 】

[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、 > 9 0 %、 > 9 5 %、又は > 9 8 % の配列同一性を有し得る。

20

【 0 0 3 8 】

[0056]記載された抗体は、配列番号 1、2、及び 1 1 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 1 1 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

【 0 0 3 9 】

[0057]抗体は、配列番号 9、10、及び 1 1 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 1 2、1 3、及び 1 4 の重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列を含み得る。

【 0 0 4 0 】

[0058]或いは、抗体は、配列番号 1 5、1 6、及び 1 1 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 1 7、1 8、及び 1 9 の重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 配列を含み得る。

【 0 0 4 1 】

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

40

【 0 0 4 2 】

[0060]抗体は、バイパラトピックであるものであり得る。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。

【 0 0 4 3 】

[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。

【 0 0 4 4 】

[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。

【 0 0 4 5 】

50

[0063]本明細書に記載される抗体及びヒト I g G 1 F c を含む融合タンパク質が記載される。

【 0 0 4 6 】

[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。

【 0 0 4 7 】

[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。

【 0 0 4 8 】

[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。

【 0 0 4 9 】

[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。

【 0 0 5 0 】

[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 5 0 0 k D a 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。

【 0 0 5 1 】

[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、s i RNA、又はプラスミドを含み得る。

【 0 0 5 2 】

[0070]A X L 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A X L 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。

【 0 0 5 3 】

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

【 0 0 5 4 】

[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E L I S A を使用して行われ得る。

【 0 0 5 5 】

[0073]本明細書には、対象におけるA X L 発現をインビボ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) A X L 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。

【 0 0 5 6 】

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

【 0 0 5 7 】

[0075]目的の分子を、A X L 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、A X L 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。

【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(mAbs)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、Gas6競合及び単ドメイン抗体(sdAb)の特徴付けデータを本明細書に提供する。

【0062】

[0080]Gas6競合。抗AXL ADCでは、AXLへの抗体の結合を遮断するGas6(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Gas6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Gas6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、Gas6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Gas6によって妨害されないことを確実にする。

【0063】

[0081]モノクローナル抗体(mAb)。抗AXLマウスmAbライブラリー内からAXL ADCをスクリーニングして、Gas6の存在に影響されない活性を有する強力なADCインターライザー(IC<sub>50</sub> < 1 nM)を同定した。

【0064】

[0082]単ドメイン抗体(sdAbs)。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単ドメイン抗体(sdAbs、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。Gas6競合及びsdAb特徴付けデータが得られた。一般的に、単ドメイン抗体は、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。

。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 6 】

【0084】用語「抗体」は、当該技術分野では「免疫グロブリン」( I g )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； I g A、 I g D、 I g E、 I g G、 I g Mなどの様々な I g アイソタイプが存在する。単ドメイン s d A b 並びにモノクローナル抗体 m A b 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( V L )ドメイン及び定常( C L )ドメインに折りたたまれるが、一方、重鎖は、可変( V H )ドメイン及び3つの定常( C H、 C H 2、 C H 3 )ドメインに折りたたまれる。重鎖及び軽鎖可変ドメイン( V H 及び V L )の相互作用により、抗原結合領域( F v )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。

10

## 【 0 0 6 7 】

【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、又は単ドメイン( V H H )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、 F a b ' 又は F a b 断片、 V L、 V H、 C L 及び C H 1 ドメインを有することができる一価断片、 F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片、バイパラトピック断片、二価断片、 V H 及び C H 1 ドメインを有する F d 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( C D R )、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。

20

## 【 0 0 6 8 】

【0086】用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単ドメイン抗体、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、 F v、一本鎖 F v ( s c F v ; ペプチドリinkerで接続された V L 及び V H からなる分子)、 F a b、 F ( a b ' )<sub>2</sub>、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。単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。

30

## 【 0 0 6 9 】

【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 s d A b 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 V H H と呼ばれる1つのドメインで構成される。 s d A b はまたサメにおいて観察されていて、 V N A R と呼ばれる。他の s d A b は、ヒト I g 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、「 s d A b 」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 V H、 V H H、 V L、又は V N A R リザーバーから直接単離された s d A b、前述の s d A b に由来する s d A b、組換え生成された s d A b、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 s d A b のさらなる修飾を通じて生成された s d A b を含む。 s d A b 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。

40

## 【 0 0 7 0 】

【0088】 S d A b 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

50

、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 にもたすことができる。

【 0 0 7 1 】

[0089]単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CDR/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CDR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CDR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CDRは、本明細書ではCDR 1、CDR 2、及びCDR 3と呼ばれる。

10

【 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AXLに特異的である。AXL (Entrez Gene: 558) 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II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894個のアミノ酸を含む（先行技術の図1を参照されたい）。AXL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Gas6に結合する。AXL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、AXL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DM1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nM (IC<sub>50</sub>) 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AXL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、AXL受容体を介するシグナル伝達を遮断し得る。

20

【 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(VH)ドメイン及び軽(VL)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(Kabatスキーム)は、VH及びVL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」(CDR)を定義する。別の(Clothiasスキーム)は、VH及びVL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CDR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、「CDR」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(IMG T)が本明細書において使用され、Kabat番号付けもまた示される。IMG 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(Cys 23、Trp 41、Cys 104、Phe / Trp 118、及び89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(FR 1: 1~26位、FR 2: 39~55位、FR 3: 66~104位、及びFR 4: 118~129位)及びCDR (CDR 1: 27~38、CDR 2: 56~65、CDR 3: 105~117)の標

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、I M G Tとして示されるC D R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]C D R / ループは、本明細書では、C D R H 1についてはC h o t h i aスキームに従って、及び他のすべてのC D RについてはK a b a t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C D Rは、軽鎖のC D RについてはC D R L 1、L 2、L 3、及び重鎖のC D RについてはC D R H 1、H 2、H 3と呼ばれる。

【0077】

[0095]配列番号72は、公知のA X L全長H i s 6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(A D C C)又は補体依存性細胞傷害(C D C)をもたらす得る。当業者に公知であるように、A D C C及びC D C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；I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mを含む任意のアイソタイプであり得；限定されないが、F v、s c F v、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub>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V H及びV L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、C D R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。C D R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C D Rをヒト可変領域(V H又はV L)に、或いは他のヒト抗体(I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g M)若しくは断片フレームワーク領域(F v、s c F v、F a b)又はC D R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、N i c a i s eら、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、A X L)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。C D R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C D R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、C D R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(P a d l a n、1991年；G o n z a l e sら、2005年)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 3 】

[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、V i n c k 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、T s u r u s h i t aら、2005年；J o n e sら、1986年；T e m p e s tら、1991年；R i e c h m a n nら、1988；Q u e e nら、1989年；G o n z a l e s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

## 【 0 0 8 4 】

[00102]上記で定義されたV H及びV L、並びにヒトI g G 1フレームワークを含むキメラ抗体であり得る、A X Lに特異的な単離又は精製された抗体。例えば、ヒトI g G 1フレームワークは、ヒトカッパ軽鎖及びヒトI g G 1重鎖を含み得る。

## 【 0 0 8 5 】

## [00103]モノクローナル抗体

[00104]A X Lに対する高親和性モノクローナル抗体（m A b）が記載される。m A bは、遺伝子免疫によって（すなわち、r h A X L - E C DをコードするD N Aを注入することによって）生成された。m A b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

## 【 0 0 8 6 】

[00105]同定された5つの抗h A X L m A bは、抗体-薬物コンジュゲート（A D C）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と呼ばれる。これらの抗ヒトA X L抗体が選択された。これは、以下の細胞株：U 8 7 膠芽腫、A 5 4 9 肺胞腺癌、及びM D A - M B - 2 3 1 乳腺癌の少なくとも2つにおいて、サボ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n M（I C<sub>50</sub>）効力を示したためである。それらはまた、D M 1にコンジュゲートした場合、H 2 9 2 肺癌細胞、A 5 4 9 細胞及びM D A - M B - 2 3 1 細胞に対して毒性を示した。エピトープピニング分析により、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き、これらの抗体の選択により、次のエピトープ：A X LのI g様ドメイン1（F 1 0 7 - 7 H 5及びF 1 0 7 - 8 D 1 2）に位置した2つ、及びI g様ドメイン2（F 1 1 1 - 3 C 8及びF 1 1 1 - 5 E 9）に位置した1つに5つのm A bがすべて結合することが示された。F 1 0 7 - 1 0 G 1の結合はまたI g様ドメイン1にあるが、F 1 0 7 - 7 H 5及びF 1 0 7 - 8 D 1 2とは異なる部位にあることに留意されたい。

30

## 【 0 0 8 7 】

## [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C D R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

## 【 0 0 8 8 】

[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。このような保存的なアミノ酸置換は、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 NCBI BLAST2 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包含される。

【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-Myc、His<sub>5</sub>、His<sub>6</sub>、又はHis<sub>8</sub>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、MVLQTQVFISLLWISGAYG(配列番号59)又はMDWTWRILFLVAAATGTHA(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<sub>5</sub>毒素ファミリーの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ずコイルド-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-jun/Fos相互作用を用いて達成することができる。

#### 【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、IgG、scFv、Fab、V<sub>H</sub>H、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>など)、化学化合物、炭水化物部分、DNAベースの分子(アンチセンスオリゴヌクレオチド、microRNA、siRNA、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ボ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。

#### 【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(NIR)蛍光色素又は色素、例えばCy5.5、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AXL抗体は、近赤外線蛍光(NIRF)画像化色素、例えばCy5.5、Alexa680、Dylight680、又はDylight800に連結され得る。

#### 【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(CAR-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。

#### 【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

体薬物コンジュゲート（ADC）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（メイトンシン及びオーリスタチンなど）、DNA損傷剤（カリケアマイシン及びデュオカルミジンなど）、RNA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、DNAと反応する薬剤（アルキル化剤、配位化合物、白金錯体、DNA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、DNA副溝結合化合物、抗有糸分裂剤（ピ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AXL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

10

【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DNA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。

20

【0099】

【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、多数のヌクレオチド配列は、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。

【0100】

【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、His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（SPR）センサーチップのチャンネル、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。

30

【0101】

【00123】AXL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、AXL-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AXL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、ELISA、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IA（EIA）、ELISA、「迅速な抗原捕捉」、「迅速なクロマ

40

50

トグラフィー I A」、及び「迅速な E I A」などのイムノアッセイ ( I A ) 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 A X L を検出するためのものであり、試料は血清試料である。

#### 【 0 1 0 2 】

##### [00124] A X L 検出及び疾患診断

[00125] 対象における A X L 発現をインビボ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 A X L 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、P E T、S P E C T、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 A X L の発現を検出するのに有用であり得る。

10

#### 【 0 1 0 3 】

[00126] 上述の方法におけるインビボ検出ステップは、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 ( P E T )、検出可能な薬剤は  $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{82}\text{Rb}$  及び  $^{68}\text{Ga}$  などの同位体であり、 $^{18}\text{F}$  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 ( S P E C T )、検出可能な薬剤は、特定の用途に応じて、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{133}\text{Xe}$  などの放射性トレーサーである；磁気共鳴画像法 ( M R I )、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、プラークの検出のための M R I の感度を高める；或いは、造影超音波検査 ( C E U S ) 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、M R I 又はシンチグラフィーよりも安価であり、放射線を伴わないため、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

#### 【 0 1 0 4 】

##### [00127] A X L を発現する細胞への分子の送達

[00128] A X L 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。

30

#### 【 0 1 0 5 】

##### [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、A X L ( 同じ又は異なるエピトープ ) に特異的な抗体を含み得る。抗体はバイパラトピックであり得る。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 A D C を含み得る。

40

#### 【 0 1 0 6 】

[00131] 抗 A X L 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 ( A D C ) 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。

10

【 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、カーゴ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。

20

30

【 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。

40

【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

50

築物をCHO細胞で発現させ、Ni-アガロースによって精製され、及びSDS-PAGEで検証した(データを示していない)。

【0112】

[00139]免疫化：マウスmAb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rhAXL-ECDの発現のために100 µgのpTT40発現プラスミドを使用して、流体力学的尾静脈送達技術(HTV)によって0日目と42日目に免疫した。7~10日後にマウスから採血し、血清力価をELISAで測定した。4~5か月後、100 µgのpTT40-AXL-H8Gを使用したブースター注射が、融合実験の3~4日前にHTVによって行われた。

【0113】

[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IMDM(Hy-Clone)で回収し、PEG融合プロトコールを使用してNS0骨髓腫細胞株に融合させた。この目的のために、脾臓細胞及び骨髓腫細胞をIMDMで洗浄し、RBC溶解緩衝液(Sigma)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、PBS中のPEG 4000(EMD-Millipore)の50%溶液1mlを1分かけて滴下することによって一緒に融合され、37 °Cでさらに90秒間インキュベートされた。22 °Cで2分間かけて30mlのIMDMを添加することにより反応を停止させた。10分間のインキュベーション後、新たに融合した細胞を233 × gで10分間遠心した。細胞は、10%熱不活化FBS(Sigma)を補足したIMDMで1回洗浄し、20%熱不活化FBS、ペニシリン-ストレプトマイシン(Sigma)、1 ng/mlマウスIL-6(Biosource)、HAT培地サプリメント(Sigma)及びL-グルタミンを含むHAT選択培地(IMDM)に1mlあたり2 × 10<sup>5</sup>個のインプット骨髓腫細胞の濃度で懸濁し、37 °C、5%CO<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%熱不活性化FBS、1 ng/mlマウスIL-6及び10 µg/mlのFITC-Fab'2ヤギ抗マウスIgG(H+L)(Jackson)を補足した半固形培地D(StemCell)に1mlあたり2 × 10<sup>5</sup>個のインプット骨髓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(Geneticin)にプレATINGし、さらに37 °C、5%CO<sub>2</sub>で6~7日間インキュベートした。次に、分泌型クローンは、哺乳動物細胞クローンピッカー(CLONEPIX TML, Molecular Devices)を使用して、20%熱不活性化FBS、ペニシリン-ストレプトマイシン(Sigma)、1 ng/mlマウスIL-6(Biosource)、HT培地サプリメント(Sigma)及びL-グルタミンを含むIMDMの200 µlを含む滅菌96-wプレート(Costar)に移され、37 °C、5%CO<sub>2</sub>で2~3日間インキュベートされた。

【0114】

[00141]ハイブリドーマ上清を回収し、rhAXL-ECDタンパク質への結合についてELISAによって評価した。このために、96wハーフエリアプレート(Costar)を、PBS中の5 µg/mlのrhAXL-ECDの25 µlで被覆し、4 °C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、25 µlのハイブリドーマ上清を添加し、37 °C、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 °C、5%CO<sub>2</sub>で1時間、ブロッキング緩衝液で1/3000に希釈した25 µl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)'<sub>2</sub>ヤギ抗マウスIgG(H+L)(Jackson Immunoresearch)とともにインキュベートした。0.05%のPBS-TWEEN(商標)20で4回洗浄した後、25 µlの1 mg/mlのpNPP基質溶液を添加し、さらに37 °Cで1時間インキュベートした。OD405 nmの測定は、マイクロプレートリーダー(Spectramax 340 PC, Molecular Devices)を使用して行われた。

【0115】

[00142]ELISA陽性抗体を選択し(クローンF107-7H5、F107-8D1

10

20

30

40

50

2、F111-5E9、F111-3C8、及びF107-10G1を含む)、10ml体積のハイブ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 pH2.5で2回溶出し、TRIS-HCl 1M pH9.0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】

[00143]実施例2：抗AXL mAbの交差反応性評価

[00144]組換えAXLエク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)<sub>2</sub>ヤギ抗マウスIgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) 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/ml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。OD405nm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。

【0118】

[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。OD405nmでの測定値を示す。

【表1】

| 表1               |       |       |       |       |
|------------------|-------|-------|-------|-------|
| 抗AXL mAbの交差反応性評価 |       |       |       |       |
| 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 |
| 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

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

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 重にしてプレティングされた ) に追加され、細胞生存率へのそれらの影響が、3 7 ° C 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 μ l の R P M I - 5 % F B S 中、2 0 0 0 細胞 / ウェルの密度でプレティングされた。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 μ 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 ° C、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

40

【 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。

【 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50%を超えて低下させ、高細胞傷害性薬物DM1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250を超える一次マウスmAb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( $IC_{50} < 1 \text{ nM}$ )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ADC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AXLへのかなりの結合を示した(図3)。

【0126】

[00155]図3は、細胞表面に発現された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。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。

10

【0127】

[00156]実施例4：DM1コンジュゲーション及びADC試験

[00157]実施例1で精製された抗hAXL - ECDモノクローナル抗体は、リジン残基を介して、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)に結合し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(SMCC)にコンジュゲートした。生成物の純度及び薬物：抗体比は、UPLCベースのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって決定された。

20

【0128】

[00158]コンジュゲーション：精製された抗hAXL - ECD mAb(F107 - 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(100mMリン酸ナトリウム、20mM NaCl、2mM EDTA pH7.2)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mAbの濃度は、コンジュゲーション緩衝液で2mg/mLに調整され、各々合計200µgがコンジュゲーションに使用された。SMCC - DM1の原液をジメチルアセトアミド(DMA)で調製した。DMA原液からのSMCC - DM1を各mAbに添加して、SMCC - DM1：mAbのモル比を10.0にした。溶液を完全に混合し、37で3時間インキュベートした。反応は、0.02% w/vのポリソルベート - 20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。

30

【0129】

[00159]薬物 - 抗体比(DAR)は、280nmと252nmの両方でのUPLC - SEC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、DM1にコンジュゲートしたF107 - 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UPLC - SEC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。

40

【表 2】

| 表 2<br>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      |

10

## 【0130】

[00160]細胞培養。NCI-H292及びA549ヒト非小細胞肺癌(NSCLC)及びMDA-MB-231三重陰性(ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2低)乳癌(TNBC)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。HaCaT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Cell Line Services、DKFZ、Heidelberg、Germany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。

20

## 【0131】

[00161]ADC試験：上記で調製した抗AXL ADCは、非小細胞肺癌(NSCLC)NCI-H292及びA549細胞株、ヒト乳癌MDA-MB-231腫瘍細胞株、並びに不死化されたケラチノサイトを含む、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。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、log(阻害剤)対応答-GraphPad Prism v6.0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(IC<sub>50</sub>)及び有効性(最大阻害%)を測定した。

30

## 【0132】

[00162]図4は、AXLを表現する、H292腫瘍細胞株、A549細胞株、ヒト乳癌MDA-MB-231腫瘍細胞株、並びに不死化されたHaCaTケラチノサイト細胞の細胞生存率における抗AXL-DM1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IgG-DM1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、DM1をコンジュゲートした抗AXL抗体は、良好な効力(55~74%の最大増殖阻害)及び強力な有効性(IC<sub>50</sub><0.1nM)を実証した。対照的に、AXLを発現する、非腫瘍形成性の不死化されたHaCaT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。

40

## 【0134】

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

50

【表 3】

| 表 3<br>抗 AXL 抗体 の ADC 試験 の 結果 |                       |                      |                       |                       |                      |                      |              |
|-------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|--------------|
| 細胞株                           |                       | F107-<br>7H5-<br>DM1 | F107-<br>8D12-<br>DM1 | F107-<br>10G1-<br>DM1 | F111-<br>3C8-<br>DM1 | F111-<br>5E9-<br>DM1 | hIgG-<br>DM1 |
| H292<br>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<br>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<br>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          |

## 【 0 1 3 5 】

[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 h A X L - E C D モノクローナル抗体の細胞表面上の A X L への結合特性は、抗 h A X L - E C D m A b による強力な阻害により、H 2 9 2 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）。

## 【 0 1 3 6 】

[00167]フローサイトメトリーによる表面 A X L への抗体結合の検出。分析の前に、細胞は分析の日に 8 0 % 以下のコンフルエントになるようにプレATINGされた。細胞を P B S で洗浄し、細胞解離緩衝液 ( S i g m a ) を添加して回収した。2 . 5 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞を含む細胞懸濁液 ( 5 0 0 μ l の対応する細胞培養培地中 ) を様々な濃度 ( 0 . 0 1 ~ 1 0 n M ) の抗 A X L 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 1 0 0 μ l の培地中で 2 μ g の D Y L I G H T ( 商標 ) 4 8 8 をコンジュゲートした A f f i n i P u r e ヤギ抗マウス I g G A l e x a 4 8 8 二次抗体 ( 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 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 3 0 0 ~ 5 0 0 μ l の培地に再懸濁し、5 0 μ m 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、B D L S R I I フローサイトメーター ( B e c t o n - D i c k i n s o n B i o s c i e n c e s , C A , U S A ) 及び B D F A C S D i v a ( 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 1 0 , 0 0 0 個の生存細胞について行われた。

## 【 0 1 3 7 】

[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 m a x ( 受容体飽和時の最大蛍光シグナル )、及び K D ( 見かけの細胞結合定数 ) を G r a p h P a d P r i s m v 6 . 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。

## 【 0 1 3 8 】

[00169]結果を図 3 及び表 4 に示す。これらの結果は、m A b 7 H 5、8 D 1 2、及び 5 E 9 が、陰性結合対照 ( 3 0 0 n M マウス I g G ) と比較して、強く結合したことを示した ( 見かけの結合定数は K D 1 n M である )。

## 【 0 1 3 9 】

[00170]表 4 は、H 2 9 2 細胞上の細胞ベースの A X L への抗 A X L m A b の結合特性を提供する。

10

20

30

40

50

【表 4】

| 表 4<br>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：エピトープピニング実験

【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ピニング実験を行った。

【0141】

【00173】抗体は、チップ表面（「mAb1」）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（「mAb2」）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 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、pH 4.5、スルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド（S N H S）、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノピル）-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 μ l / 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）の水平チャンネル（P r o t e o n 制御ソフトウェアの A n a l y t e チャンネル）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 pH 4.5 で 20 μ g / m l に希釈し、別々の垂直（L 1 ~ L 6）チャンネル（P r o t e o n 制御ソフトウェアのリガンドチャンネル）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、マルチチャンネルモジュール（M C M）を回転させ、活性化された水平チャンネル（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 x 脱活性化」の手順を各水平チャンネル（A 2 ~ A 6）で繰り返した。

30

【0143】

【00175】サンドイッチエピトープピニング。2 ステップのサンドイッチエピトープピニングは、検体の配向で 30 μ l / 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 で 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 μ l / 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 のエピトープピ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<br>mAb のエピトープマッピング結果 |           |          |          |          |           |
|--------------------------|-----------|----------|----------|----------|-----------|
|                          | 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        |

## 【 0 1 4 5 】

[00177]表 5 に示される結果から、mAb のうちの 4 つが 2 つのエピトープピンに分類され、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、多数のピ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 III 様ドメイン）を用いて行われたエピトープマッピング実験（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。

## 【 0 1 4 6 】

## [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。

## 【 0 1 4 7 】

[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（Agar2-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。

## 【 0 1 4 8 】

[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

## 【 0 1 4 9 】

[00182]表 6 は、提示された酵母細胞上の A X L 細胞外ドメインの様々な領域への抗 A X L m A b 結合の結果を示す。実施例 1 の m A b は 2 つの領域に結合する：免疫グロブリン様ドメイン 1 ( I g L 1、a a 2 6 ~ 1 3 8 に対応する) 又は免疫グロブリン様ドメイン 2 ( I g L 2、a a 1 3 5 ~ 2 2 6 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<br>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      |

10

## 【 0 1 5 0 】

[00183]エピトープの性質。m A b 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、I g L 1 又は I g L 2 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 E L I S A を使用して m A b への結合をアッセイした。いずれの I g L ドメインのサブ断片も、実施例 1 のいずれかの m A b に有意に結合しないが、これらのサブ断片は、抗 M Y C 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 m A b のエピトープが I g L 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。

20

## 【 0 1 5 1 】

[00184]実施例 8：抗体配列決定

[00185]実施例 1 の抗 h A X L m A b の V H 及び V L ドメインを配列決定し、分析した。

30

## 【 0 1 5 2 】

[00186]V H 及び V L ドメイン並びに C D R 領域の配列を表 7 に示す。V H 及び V L 鎖の C D R 1 - 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、m A b F 1 0 7 - 7 H 5 の V H 領域と V L 領域の両方の C D R 領域が F 1 0 7 - 8 D 1 2 の C D R 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、I g L 1 内の共通の線形エピトープを認識する。対照的に、F 1 0 7 - 1 0 G 1 (選択された I g L 1 結合抗体の大部分とは異なる I g L 1 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 I g L 2 に結合する。

40

【表 7】

| 表 7<br>mAb F107-7H5、F107-8D12、F111-5E9、F111-3C8、及び F107-10G1 の<br>CDR 配列 |                |                               |                |                                |
|--|----------------|-------------------------------|----------------|--------------------------------|
| mAb  | 軽鎖 CDR         |                               | 重鎖 CDR         |                                |
| F107-7H5   | V <sub>L</sub> | 配列番号 38                       | V <sub>H</sub> | 配列番号 39                        |
|  | L1             | KSSQSLNRSRTRKIYLA<br>(配列番号 9) | H1             | GYTFTSYWIN<br>(配列番号 12)        |
|  | L2             | WASTRQS<br>(配列番号 10)          | H2             | NIYPDSSSTNYNEKFKS<br>(配列番号 13) |
|  | L3             | KQSYNLWT<br>(配列番号 11)         | H3             | DTYGGSPDY<br>(配列番号 14)         |
| F107-8D12  | V <sub>L</sub> | 配列番号 40                       | V <sub>H</sub> | 配列番号 41                        |
|  | L1             | KSSQSLNTRTRKNYLA<br>(配列番号 15) | H1             | GYTFISFWIN<br>(配列番号 17)        |
|  | L2             | WASTRES<br>(配列番号 16)          | H2             | NIFPGSSSTNYNEKFKS<br>(配列番号 18) |
|  | L3             | KQSYNLWT<br>(配列番号 11)         | H3             | DYYGGSPDY<br>(配列番号 19)         |
| F111-3C8   | V <sub>L</sub> | 配列番号 42                       | V <sub>H</sub> | 配列番号 43                        |
|  | L1             | SASSSVSYMY<br>(配列番号 26)       | H1             | GYTFTSYWMH<br>(配列番号 29)        |
|  | L2             | RTSNLAS<br>(配列番号 27)          | H2             | NINPNSTSADYNEKFKR<br>(配列番号 30) |
|  | L3             | QQYHNPPT<br>(配列番号 28)         | H3             | PLMGPYWYFDV<br>(配列番号 31)       |
| F111-5E9   | V <sub>L</sub> | 配列番号 44                       | V <sub>H</sub> | 配列番号 45                        |
|  | L1             | RASQDINNYLN<br>(配列番号 20)      | H1             | KYGMN<br>(配列番号 23)             |
|  | L2             | YISRLHS<br>(配列番号 21)          | H2             | WINTYTGEPTYADDFKG<br>(配列番号 24) |
|  | L3             | QQGNTLPFT<br>(配列番号 22)        | H3             | GGYYSNPIYPMDY<br>(配列番号 25)     |
| F107-10G1  | V <sub>L</sub> | 配列番号 46                       | V <sub>H</sub> | 配列番号 46                        |
|  | L1             | KASQDVTTAVA<br>(配列番号 32)      | H1             | NYGMS<br>(配列番号 35)             |
|  | L2             | WASTRHT<br>(配列番号 33)          | H2             | SISGGGGRTYYLDNVKG<br>(配列番号 36) |
|  | L3             | QQHFTTPLT<br>(配列番号 34)        | H3             | GARASYFAMDY<br>(配列番号 37)       |

## 【 0 1 5 3 】

[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。

## 【 0 1 5 4 】

[00189]V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 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。

## 【 0 1 5 5 】

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

10

20

30

40

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MVLQTQVFISLLWISGAYG（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<br>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 |

## 【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（ProtA）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-nickelで精製し、及びSDS-PAGEで検証した（データを示していない）。

## 【0160】

[00197]ラマ単一ドメイン抗体（sdAb）の生成。ラマsdAbs（VHH）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



びに21、28、35及び42日目にフロイント不完全アジュバント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(hcIgG)から別々の従来のIgG(cIgG)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1µgのrhAXLを96ウェルMAXISORP(商標)プレート(Nalge Nunc International, Rochester, NY)に一晩(100µl/ウェル、18時間、4℃)被覆した。プレートを5%スキムミルク/PBSTでブロックし、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;100µg/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℃で1時間添加した。最後のPBS-T洗浄は、100µl/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100µl/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450nm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10µg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鎖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、50µlの合計容量で、次の成分を用いてセットアップされた:5µlのcDNA、5pmolのMJ1-3プライマー混合物、5pmolのCH2又はCH2b3プライマー、5µlの10×反応緩衝液、1µlの10mM 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℃で3分間の最初のステップ、続いて94℃で30秒間、57℃で45秒間、72℃で1分間の30サイクル、及び72℃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に対応する約850bpのバンド、及び重鎖抗体(hcIgG)に対応する約600bp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、1µlのDNAテンプレート、各5pmolのMJ7プライマー及びMJ8プライマー、5µlの10×反応緩衝液、1µlの10mM 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、50µl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℃で3分間の最初のステップ、続いて94℃で30秒、57℃で30秒、及び72℃で1分間の30サイクル、並びに72℃で7分間の最終の伸長ステップで構成された。340bp~420bpの範囲であり、hcIgGのVHH断片に対応する増幅された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。50µgのpMED1ファージミドを50ng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XhoI及びPstI制限酵素を添加し、消化反応を37℃でさらに2時間インキュベートした。T4 DNAリガー

10

20

30

40

50

ゼ (Invitrogen) 及びそのプロトコルを使用して、20 µg の消化されたファージミド DNA を 6 µg 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 µl の最終体積に精製し、5 µl 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。ライブラリーのサイズは、記載されるように決定された。ライブラリーは、2% (w/v) グルコースの存在下、37 °C、250 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 2xYT/Amp/Glu (100 µg/ml アンピシリン及び 2% (w/v) グルコースを含む 2xYT 培地) に再懸濁し、少量ずつ -80 °C で保存した。

10

#### 【0163】

[00200]ファージ提示されたライブラリーは、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ブラリーから選択された。第 1 の戦略では、ライブラリーは、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、ライブラリーは、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。ライブ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、Illumina MiSeq 次世代 DNA シーケンスを使用して調査された。

20

#### 【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 ライブラリーを構築し、上記の方法セクションに記載されるようにライブ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 (ライブラリー) 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-sdAb 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 ライブラリーは、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-sdAb001、配列番号 119; NRC-sdAb002、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-sdAb003、配列番号 121; NRC-sdAb004、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 ライブラリーが rhAXL-ECD に対してパニングされ、VHH が AXL 特異的 mAbs 5E9 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。

30

#### 【0166】

##### [00204]実施例 11: 抗 AXL mAb 及び sdAb 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 sdAb (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。

40

#### 【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, RNeasy) から総 RNA を抽出し、cDNA に逆転写した (SuperScript (商標)、ThermoFisher 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ォ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

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 3730x1装置でサンガー法を使用して配列決定した。

【0168】

[00208]ラマVHH DNA配列の決定のために、ファージ提示されたVHHライブラリーは、様々なインピット選択(実施例10に記載される)に供され、Illumina MiSeq機器で2x250bpの読み取りを使用して配列決定された。目的のVHH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。VHH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 3730x1機器でサンガー法を使用して再度確認した。

10

【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(IGT)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、IGT定義が使用される。CDRのKabata定義は、主に目的のみのために、IGT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IGT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、Kabata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。

20

【0171】

[00212]8つのラマVHHのDNA配列は、イルミナのMiSeq機器で2x250bp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VHHの単離の一部として決定された)。VHH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。

30

【0172】

[00213]図8は、IGT定義を使用した、CDRを伴うVHH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、IGT定義が使用される。CDRのKabata定義は、IGT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AXL細胞外ドメイン(ECD)へのmAb及びsdAbの結合

40

[00215]この実施例の目的は、組換えAXL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。10mL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

50

Healthcare Life 20 Sciences # 28 - 9670 - 70) への吸着により精製し、PBSで洗浄し、200  $\mu$ lのグリシン200 mM pH 2.5で2回溶出し、及びTRIS - HCl 1 M 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  $\mu$ M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

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  $\mu$ l / 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 $K_D$ )、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 $K_D$ ) 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 (aa1 - 451) 及びカニクイザルAXL (aa1 - 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mAb (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、Agap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')<sub>2</sub> - 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】

##### [00224]結果

[00225]マウスmAb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。

20

#### 【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mAbの親和性及び動態を表9に示す。

30

40

50

【表 9】

| 表 9   |                                |                                   |                  |                                |                                   |                   |
|---|--------------------------------|-----------------------------------|------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| 組換えヒト及びカニクイザル AXL ECD に対する mAb の親和性及び動態   |                                |                                   |                  |                                |                                   |                   |
| mAb   | ヒト AXL                         |                                   |                  | カニクイザル AXL                     |                                   |                   |
|   | $k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )    | $k_{off}$ ( $s^{-1}$ )            | $K_D$ (nM)       | $k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )    | $k_{off}$ ( $s^{-1}$ )            | $K_D$ (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<br><sup>b</sup> マルチサイクルの動態を使用して測定した<br><sup>c</sup> 定常状態分析を使用して測定した |                                |                                   |                  |                                |                                   |                   |

10

20

## 【 0 1 8 3 】

[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。

30

40

50

【表 1 0】

| 表 10<br>組換えヒト及びカニクイザル AXL ECD についての<br>ラマ V <sub>H</sub> H の親和性及び動態   |  |  |                                    |  |                                     |                        |
|---|--|--|------------------------------------|--|-------------------------------------|------------------------|
| sdAb  | 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><br>(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><br>(nM) |
| NRC-sdAb001   | 8.5×10 <sup>6a</sup><br>1.3×10 <sup>6c</sup>       | 3.7×10 <sup>-2a</sup><br>7.2×10 <sup>-3c</sup> | 4 <sup>a</sup><br>6 <sup>c</sup>   | 9.2×10 <sup>5c</sup>                               | 7.2×10 <sup>-3c</sup>               | 8 <sup>c</sup>         |
| NRC-sdAb002   | -  | -  | 96 <sup>e</sup>                    | nd   | nd                                  | nd                     |
| NRC-sdAb003   | 8.5×10 <sup>3a</sup>                               | 5.4×10 <sup>-3a</sup>                          | 955 <sup>a</sup>                   | nd   | nd                                  | nd                     |
| NRC-sdAb005   | 1.7×10 <sup>5b</sup><br>1.2×10 <sup>5c</sup>       | 9.7×10 <sup>-3b</sup><br>4.1×10 <sup>-3c</sup> | 58 <sup>b</sup><br>34 <sup>c</sup> | 1.3×10 <sup>5c</sup>                               | 4.6×10 <sup>-3c</sup>               | 35 <sup>c</sup>        |
| NRC-sdAb006   | 2.4×10 <sup>5b</sup><br>8.9×10 <sup>4c</sup>       | 4.5×10 <sup>-3b</sup><br>2.1×10 <sup>-3c</sup> | 19 <sup>b</sup><br>24 <sup>c</sup> | 1.0×10 <sup>5c</sup>                               | 2.6×10 <sup>-3c</sup>               | 26 <sup>c</sup>        |
| NRC-sdAb007   | -  | -  | >100 <sup>c</sup>                  | nd   | nd                                  | nd                     |
| NRC-sdAb008   | 3.3×10 <sup>6d</sup><br>5.3×10 <sup>6c</sup>       | 3.3×10 <sup>-3d</sup><br>8.2×10 <sup>-3c</sup> | 1 <sup>d</sup><br>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)<br><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)<br><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)<br><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)<br><sup>e</sup> 定常状態分析を使用して測定した |  |  |                                    |  |                                     |                        |

## 【 0 1 8 4】

[00228]カニクイザル及びマウス AXL の交差反応性を決定し、結果を以下の表 1 1 に示す。これらのデータは、ELISA における組換えヒト及びマウス AXL ECD への mA b / s d A b 結合の最大半量有効濃度 EC<sub>50</sub>を示す。

10

20

30

40

50

【表 1 1】

| 表 11<br>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         |             |              |

【 0 1 8 5】

[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 1 2 に示される。

【表 1 2】

| 表 12<br>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-<br>HRP |
|                                       | hFC-<br>107-<br>10G1                     | NRC-<br>sdAb0001-<br>Fc | NRC-<br>sdAb0002-<br>Fc | NRC-<br>sdAb0003-<br>Fc | hFC-抗<br>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



## 【 0 1 8 6 】

[00230]エピトープビニングを評価し、データを表 1 3 にまとめられている。抗 A X L m A b / s d A b により標的化されたエピトープピンを示す。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 1 3】

| 表 13<br>抗 AXL mAbs/sdAbs により標的化されたエピトープピン |  |         |
|---|--|---------|
| mAb/sdAb                                  | ドメイン   | エピトープピン |
| mAb F107-10G1                             | Ig1  | 1A      |
| mAb F111-5E9                              | Ig2  | 2       |
| mAb F107-8D12                             | Ig1  | 1B      |
| mAb F107-7H5                              | Ig1  | 1B      |
| mIgG2 F155-3C7                            | ND   | ND      |
| mAb F111-3C8                              | Ig2  | ND      |
| mIgG2 F149-4G4                            | ND   | ND      |
| NRC-sdAb001                               | ND(ビニングに基づく Ig1)<br>は結合競争に基づく 10G1<br>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      |

## 【 0 1 8 7 】

[00231]実施例 1 3 : 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 A X L を発現する腫瘍細胞株への m A b / s d A b の結合を特徴付けることである。

## 【 0 1 8 8 】

[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<sup>-</sup> / PR<sup>-</sup> / HER2 低) 乳癌 (TNBC) は、Cedarlane Labs、Burlington NC、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。

## 【 0 1 8 9 】

[00235]FACS 結合アッセイ。附着細胞を非酵素的 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、100 nM ~ 0.001 nM の範囲の濃度で、又は 100 nM 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

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AlexaFluor（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-ForTESSsa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。

10

【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]

20

【数1】

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

[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 MA b（クローン108724）を使用して、Quantum（商標）Simply 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（10000細胞/試験）を4で2時間標識した。

30

【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。

40

【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。

【表 1 4】

| 表 14<br>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 |                  |                     |                                   |
|---|------------------|---------------------|-----------------------------------|
| 一次 Ab   | SKOV3<br>Kd (nM) | NCI-H292<br>Kd (nM) | MDA-MB-231 ルシフェ<br>ラーゼ<br>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                            |
| hlgG-F107-10G1                                    | 0.0608           | 0.0708              | 0.1012                            |
| hlgG-F107-7H5                                     | 0.0700           | 0.0509              | 0.1696                            |
| hlgG-F111-5E9                                     | ND*              | ND*                 | 0.3659                            |

\*不完全な曲線

## 【 0 1 9 5】

[00246]図 9 は、以下の細胞株：H 2 9 2、M D A - M B - 2 3 1、S K O V、及び U 8 7 神経膠芽腫における受容体密度（受容体 / 細胞）に基づく、A X L の抗体結合能力を

## 【 0 1 9 6】

[00247]図 1 0 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 ) I g G A b 及び s d A b の F A C S 結合曲線を図示する。非特異的結合 ( x ) は、すべての例で無視できることが示されているが、h I g G 曲線 ( F 1 0 7 - 1 0 G 1、F 1 0 7 - 7 H 5、F 1 1 1 - 5 E 9 ) は、いくつかの場合において、s d A b s ( s d A b 0 0 1、s d A b 0 0 8、s d A b 0 0 6 ) よりもわずかに高い平均蛍光強度 ( M F I ) を示す。

## 【 0 1 9 7】

## [00248]実施例 1 4：インビトロ細胞傷害アッセイ

[00249]この実施例では、抗 A X L モノクローナル抗体は、効力 ( I C 5 0 ) 及び最大パーセンテージ増殖阻害 ( 有効性 ) の観点から、A X L 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 ( A D C ) ポテンシャルについて評価された。

## 【 0 1 9 8】

## [00250]材料及び方法

[00251]細胞培養。N C I - H 2 9 2 ヒト非小肺癌 ( N S C L C ) 及び S K O V 3 ( ヒト卵巣腺癌 ) 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。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 ) 株を C e d a r l a n e L a b s 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、P e r k i n E l m e r によって生成された。この細胞株を R P M I - 1 6 4 0 + 5 % F B S 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。

## 【 0 1 9 9】

[00252]増殖阻害アッセイ。抗 A X L A D C は、N C I - H 2 9 2 ( 非小細胞肺癌 )、M D A - M B - 2 3 1 ( ヒト乳癌 ) 及び S K O V 3 ( 卵巣癌 ) 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。細胞は、3 8 4 ウェルプレート ( C o r n i n g ( 登録商標 ) 3 8 4 ウェルホワイトフラットボトムポリスチレン T C 処理したマイクロプレート、カタログ番号 3 5 7 0 ) の 3 つの細胞株に対してそれぞれ 1 2 5、2 0 0、2 0 0 細胞 / ウェルで播種された。細胞は、1 0

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Gas6リガンド(2 µg/mL、R&D CF885)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log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つのパラメーター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】

$$\text{モデル} Y = \frac{\text{Bottom} + (\text{上部} - \text{下部})}{1 + 10^{(\log IC_{50} - X) \times \text{HillSlope}}} \quad (\text{式 III})$$

[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]HillSlope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 dev(N)として表される。

40

50

## 【表 1 5】

| 表 15<br>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)  |

## 【 0 2 0 4】

[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 +/- stdev (N) として表 16 に表される。

10

20

30

40

50

【表 16】

| 表 16<br>Gas6 感度の評価   |                     |                     |
|----------------------|---------------------|---------------------|
|                      | -Gas6<br>IC50 (nM)  | +Gas6<br>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)           |
| mIgG-F155-3C7-DM1    | 0.327 +/- 0.098 (8) | 3.900 +/- 0.780 (2) |
| mIgG-F149-4G4-DM1    | 0.015 +/- 0.009 (8) | 0.013 +/- 0.002 (2) |
| hFc-sdAb005-DM1      | 6.664 +/- 1.718 (6) | 3.777 (1)           |

## 【0205】

[00265]増殖阻害を評価し、3つの腫瘍細胞株におけるhIgG Ab及びsdAb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H292、MDA-MB-231ルシフェラーゼ、及びSKOV3)が示される。生存率(5d)が評価される。

## 【0206】

[00266]クラス1では、hIgG-F107-10G1-DM1対非特異的結合がすべての細胞について示され、sdAb001はまたH292について評価された。

## 【0207】

[00267]クラス2では、hIgG-F107-7H5-DM1及びhIgG-F107-8D12-DM1対非特異的結合曲線が、MDA-MB-231ルシフェラーゼ及びSKOV3細胞について示される。sdAb008及びhIgG-F107-7H5-DM1は、H292の非特異的結合に対して評価された。

## 【0208】

[00268]クラス3では、hIgG-F111-5E9-DM1及びhIgG-F111-5E9-MMAE対非特異的結合がすべての細胞について示され、sdAb006はまたH292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、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。

## 【0210】

[00270]実施例15: バイパラトピックノ一価抗AXL抗体の活性の評価

[00271]この実施例では、バイパラトピックノ一価抗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(Lira, 2016年)。この実施例では、単ドメインの抗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

DC 効力を評価する。ヒト Fc 含有バイパラトピック抗体は、Stropら (2012) により公開された方法に従って構築された。そこでは、相補的変異 (RRR、EEE) がヒト IgG1 Fc 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ADCの活性は、それらが由来するホモ二価モノパラトピック sdAb ベースのADCの効力と比較された。

【0212】

[00273]表17は、SKOV3細胞株におけるモノパラトピック(二価)親ADCと比較した抗AXLバイパラトピック構築物ADCの効力(IC<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。

10

【表17】

| 表 17<br>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(IC <sub>50</sub> )及び有効性(最大阻害%) |          |       |      |                     |              |
|---|----------|-------|------|---------------------|--------------|
| 試料名   | 抗体設計     | MW    | DAR  | IC50 (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           |

20

30

40

【0213】

[00274]予備的な結果は、ドメイン1A/ドメイン2に見られるバイパラトピック sdAbs 指向性エプトープを含むADCの両方 (sdAb 001R/005E-DM1、sdAb 001R/006E-DM1) が、対応する二価Fc含有sdAbsに由来するADCよりもはるかに効力が高い(7~100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。

【0214】

[00275]図13は、SKOV3細胞株におけるモノパラトピック/二価の親ADCと比較した抗AXLバイパラトピック/一価の構築物ADCの増殖阻害結合曲線を示す。5日

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 によるインビボでの腫瘍成長阻害

[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 (Cr1: 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 - ECD 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) 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<sup>-</sup> / PR<sup>-</sup> / 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 0.1 mL の PBS 体積で  $5 \times 10^6$  細胞)。腫瘍を 80 ~ 100 mm<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 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。

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  $[mm^3] =$

[00286]  $/ 6 (長さ [mm]) \times (幅 [mm] \times (高さ [mm])) (式IV)$

[00287]各群の腫瘍体積は、平均  $\pm$  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

[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日目に)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( $mm^3$ )を3日ごとに記録した。各データポイントは平均  $\pm$  SEMを表す( $n = 8$ )。

## 【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( $mm^3$ )は3日ごとに記録された。各データポイントは平均  $\pm$  SEMを表す( $n = 8$ )。

## 【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、 $減少\% = (TV_{対照} - TV_{処理}) / TV_{対照} \times 100$  (式V)として計算された。

10

20

30

40

50

【表 18】

| 表 18<br>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<br>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<br>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 Gas6 感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 のインビボでの有効性に対する Gas6 感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 Gas6 感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<sup>-</sup>、PR<sup>-</sup>、HER2<sup>-</sup>) ヒ

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)を発現する腫瘍原性細胞である。これらの細胞は、ALS処理されたBALB/cマウスでは低分化腺癌(グレード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 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°Cの加湿された5%CO<sub>2</sub>雰囲気中で維持された。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(Cr1: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った。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ー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ト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°C; 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

T e k l a d グローバル 1 4 % タンパク質維持食、 E n v i g o ) を自由に給餌した。

【 0 2 3 5 】

[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 m L の P B S 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。

【 0 2 3 6 】

[00305]腫瘍モニタリング。腫瘍の成長は、処置後 2 9 日間、又は倫理上の理由： 1 ) 4 8 時間以内に体重が回復せずに 1 0 % 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

【 0 2 3 7 】

[00306]腫瘍体積は、式 I V に従って計算された：

[00307]推定腫瘍体積 [  $\text{mm}^3$  ] =

[00308] / 6 ( 長さ [ mm ] ) × ( 幅 [ mm ] × ( 高さ [ mm ] ) ) ( 式 I V )

[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 で保管された。ADC、h F 1 1 1 - 5 E 9 - D M 1 はバッチ番号として準備された：C C 3 1 M A Y 2 0 1 6 。薬物対抗体比 ( D A R ) : 2 . 6 2 ; 濃度 : 1 . 3 1 m g / m L ; アリコート体積 : 3 . 7 m L ; 保管条件 : 4 ; エンドトキシンレベル : < 0 . 1 5 ; M o n t r e a l , Q u e b e c , C a n a d a にある N R C 施設 H H T モントリオールで準備された。

20

【 0 2 3 8 】

[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：2 0 ~ 2 5 ; 供給業者：N R C - H H T M o n t r e a l 。

【 0 2 3 9 】

[00311]用量剤の調製。各製剤は投与日に調製された。5 m g / k g 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 H E P A / U V 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 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

【 0 2 4 0 】

[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。

【 0 2 4 1 】

[00313]処置。マウスには、0 日目と 4 日目 ( 9 6 時間の間隔 ) に 5 m g / k g 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

【 0 2 4 2 】

[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、2 4、4 8、9 6、1 2 0、1 6 8、2 1 6、2 6 4、及び 3 3 6 時間の時間点で 3 匹の動物から下顎静脈を介して収集された。

【 0 2 4 3 】

[00315]図 1 6 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、2 4 時間、4 8 時間、9 6 時間、1 2 0 時間、1 6 8 時間、2 1 6 時間、2 6 4 時間及び 3 3 6 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 1 6 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 8 0 ~

50

100 μL を室温で15～30分間凝固させ、次に、1500g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晚固定し、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（商標）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。グラフス検定を使用して、対照/処置群内の外れ値を決定した（ $\alpha = 0.05$ ）。

【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、5mg/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。

【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5mg/kgのhF111-5E9-DM1のいずれかで2回（0日及び4日）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。

【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、グラフス検定を使用して異常値としてさらに特定された（ $\alpha = 0.05$ ）。

【0250】

[00323]28日目に約90～360mm<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90～60mm<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。

【0251】

[00324]実施例18：インビトロで血液脳関門を通過する抗AXL s d A b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AXL

10

20

30

40

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。 T r a n s w e l l 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 T r a n s w e l l 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 F a l c o n ( 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 ( p H 7.4 ) 中の  $10 \text{ mM}$  H E P E S、 $5 \text{ mM}$  M g C l <sub>2</sub>、及び  $0.1\%$  B S A ;  $1 \text{ mL}$  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 - M S / M S 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 - M R M ) 。

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、M R M 分析について決定された。試験抗体について F c ペプチド ( T T P P V L D S D G S F F L Y S K ; 配列番号 187 )、及び陰性対照について A 20.1 ペプチド ( E F V A A G S S T G R ; 配列番号 188 ) が M R M 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。 F C 5 H f c 1 X 0 を陽性対照として使用し、 T W I N 200 - h I g G 1 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】

| 表 19<br>インビトロ BBB アッセイにおいて使用される試験品(hIgG1 の Fc ドメインに融合した抗 AXL sdAb)及び対照分子* |      |       |                   |          |       |             |       |        |       |             |
|---|------|-------|-------------------|----------|-------|-------------|-------|--------|-------|-------------|
| 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         | AP160408 | 78334 | 1.25        | A20.1 | 140915 | 15670 | 1.25        |
| AOM   | 3    | 90    | NRC-sdAb001-hIgG1 | -        | 76853 | 1.25        | A20.1 | 140915 | 15670 | 1.25        |
| AON   | 2    | 90    | NRC-sdAb002-hIgG1 | -        | 79514 | 1.25        | A20.1 | 140915 | 15670 | 1.25        |
| AOO   | 1    | 90    | NRC-sdAb003-hIgG1 | -        | 77267 | 1.25        | A20.1 | 140915 | 15670 | 1.25        |
| AOP   | 2    | 90    | NRC-sdAb004-hIgG1 | -        | 78810 | 1.25        | A20.1 | 140915 | 15670 | 1.25        |
| AOQ   | 3    | 90    | NRC-sdAb005-hIgG1 | -        | 76915 | 1.25        | A20.1 | 140915 | 15670 | 1.25        |
| AOR   | 3    | 90    | NRC-sdAb006-hIgG1 | -        | 77496 | 1.25        | A20.1 | 140915 | 15670 | 1.25        |
| AOS   | 3    | 90    | NRC-sdAb008-hIgG1 | -        | 77838 | 1.25        | A20.1 | 140915 | 15670 | 1.25        |
| AOT   | 1    | 90    | TWIN200-hIgG1     |          | 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)。

## 【 0 2 5 5 】

## [00330]結果

[00331]FC5Hfc1X0(陽性対照)、TWIN200-hIgG1(陰性対照)及び7つの抗AXLsdAb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15.6kDa(A20.1)及び79.0kDa(TWIN200-hIgG1)の対照分子は、約 $9.0 \sim 15.0 \times 10^{-6}$ cm/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 $175 \times 10^{-6}$ cm/分であった(A20.1の10倍を超える)。すべての抗AXLsdAb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-hIgG1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。

## 【 0 2 5 6 】

[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 2 0】

| 表 20<br>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             |

10

## 【 0 2 5 7】

20

[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。

## 【 0 2 5 8】

[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。

## 【 0 2 5 9】

## [00335]配列

30

[00336]本明細書で参照される配列の統合されたリストは表 2 1 に見出される。

40

50



【表 2 1】

| 表 21<br>配列の統合リスト |   |                               |
|------------------|---|-------------------------------|
| 配列<br>番号         | 配列  | 説明                            |
| 1                | KSSQSLLN <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                | KSSQSLN <sub>1</sub> SRTRKIYLA  | 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               | KSSQSLN <sub>1</sub> TRTRKNYLA  | 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<br>H3-B |
| 20 | RASQDINNYLN  | F111-5E9 CDR<br>L1-B  |
| 21 | YISRLHS  | F111-5E9 CDR<br>L2-B  |
| 22 | QQGNTLPFT  | F111-5E9 CDR<br>L3-B  |
| 23 | KYGMN  | F111-5E9 CDR<br>H1-B  |
| 24 | WINTYTGEPTYADDFKG  | F111-5E9 CDR<br>H2-B  |
| 25 | GGYYSNPIYPMDY  | F111-5E9 CDR<br>H3-B  |
| 26 | SASSSVSYMY   | F111-3C8 CDR<br>L1-B  |
| 27 | RTSNLAS  | F111-3C8 CDR<br>L2-B  |
| 28 | QQYHNPPT   | F111-3C8 CDR<br>L3-B  |
| 29 | GYTFTSYWMH   | F111-3C8 CDR<br>H1-B  |
| 30 | NINPNSTSADYNEKFKR  | F111-3C8 CDR<br>H2-B  |
| 31 | PLMGPYWYFDV  | F111-3C8 CDR<br>H3-B  |
| 32 | KASQDVTTAVA  | F107-10G1 CDR<br>L1-B |
| 33 | WASTRHT  | F107-10G1 CDR<br>L2-B |
| 34 | QQHFTTPLT  | F107-10G1 CDR<br>L3-B |
| 35 | NYGMS  | F107-10G1 CDR<br>H1-B |
| 36 | SISGGGGRTYYLDNVKG  | F107-10G1 CDR<br>H2-B |
| 37 | GARASYFAMDY  | F107-10G1 CDR<br>H3-B |
| 38 | DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKIYLA<br>WYQQKPGQSPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFT<br>LTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGKLEIK            | F107-7H5 VL           |
| 39 | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWWK<br>QRPQGQGLEWIGNIYPDSSSTNYNEKFKSKATLTVDKSSTT<br>AYIQFSSLTSEDSAVYYCTRDYGGSPDYWGQGTTLTVS<br>S | F107-7H5 VH           |

10

20

30

40

50

|    |   |                    |
|----|---|--------------------|
| 40 | DIVMSQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLLNTRTRKKNYL<br>AWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF<br>TLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGKLEIK  | F107-8D12 VL       |
| 41 | QVQLQQPGAELVKPGASVQLSCKASGYTFISFWINWVKQ<br>RPGQGLEWMGNIFPGSSSTNYNEKFKSKATLTVDKSSST<br>AYMQLSSLTSEDSAVYFCARDYYGGSPDYWGQGTTTLV<br>SS  | F107-8D12 VH       |
| 42 | QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVSYMYWYQQKP<br>GSSPKPWYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSME<br>AEDAATYYCQQYHNYPPFTFGGKLEIK   | F111-3C8 VL        |
| 43 | QVQLQQPGAELGKPGTQSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVK<br>RVPQGQLEWIGNINPNSTADYNEKFKRATLTVDKSSST<br>AYMQLSTLTSEDSAVYYCTRPLMGPYWFYDVGWGTGTTV<br>TVSS  | F111-3C8 VH        |
| 44 | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKP<br>DGTVKLLIYYISRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLELE<br>DVATYFCQQGNTLPFTFGSGKLEIK  | F111-5E9 VL        |
| 45 | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTKYGMNWWKQ<br>APGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSAST<br>AYLQINNLTEDMVTYFCAKGGYYSNPIYPMDYWGQGS<br>TVSS   | F111-5E9 VH        |
| 46 | VIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTTAVAWYQQK<br>PGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDYSLTISNV<br>QTEDLAFYYCQQHFTTPTLTFGAGTKLELK  | F107-10G1 VL       |
| 47 | EVNLVESGGGVKPGASLKLSCASGFTFSNYGMSWVR<br>QTSKDRLEWASISGGGGRTYYLDNVKGRFIISRENAKNT<br>LYLQMSSLKSEDTALFYCARGARASYFAMDYWGQGSSV<br>TVSS   | F107-10G1 VH       |
| 48 | DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSTRTRKIYLA<br>WYQQKPGQSPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDF<br>LTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGKLEIKRTVAAP<br>SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDN<br>ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKADYEKHKV<br>YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  | カメラ F107-7H5<br>軽鎖 |
| 49 | QVQLQQPGAELVKPGASVQLSCKASGYTFTSYWINWVK<br>QRPQGQLEWIGNIYDSSSTNYNEKFKSKATLTVDKSSTT<br>AYIQFSSLTSEDSAVYYCTRDTYGGSPDYWGQGTTTLVS<br>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV<br>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT<br>QTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELL<br>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF<br>NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW<br>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<br>TTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPG | カメラ F107-7H5<br>重鎖 |

10

20

30

40

|    |   |                      |
|----|---|----------------------|
| 50 | DIVMSQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLNTRTRKNYL<br>AWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF<br>TLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGKLEIKRTVAA<br>PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD<br>NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHK<br>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC   | キメラ F107-<br>8D12 軽鎖 |
| 51 | QVQLQQPGAELVKPGASVQLSCKASGYTFISFWINWWKQ<br>RPGQGLEWMGNIFPGSSSTNYNEKFKSKATLTVDKSSST<br>AYMQLSSLTSEDSAVYFCARDYYGGSPDYWGQGTTLTV<br>SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT<br>VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG<br>TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE<br>LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ<br>DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL<br>PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN<br>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM<br>HEALHNHYTQKSLSLSPG   | キメラ F107-<br>8D12 重鎖 |
| 52 | QIVLTQSPAIMASASPGEKVTISCSASSSVSYMYWYQQKP<br>GSSPKPWYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSME<br>AEDAATYYCQQYHNPPTFGGKLEIKRTVAAPSVFIFP<br>PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG<br>NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEV<br>THQGLSSPVTKSFNRGEC  | キメラ F111-3C8<br>軽鎖   |
| 53 | QVQLQQPGAELGKPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWWK<br>RVPGQGLEWIGNINPNSTADYNEKFKRKATLTVDKSSST<br>AYMQLSTLTSEDSAVYYCTRPLMGPYWFYFDVWGTGTTV<br>TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS<br>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP<br>EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY<br>TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPG | キメラ F111-3C8<br>重鎖   |
| 54 | DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKP<br>DGTVKLLIYYISRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLELE<br>DVATYFCQQGNTLPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS<br>DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS<br>QESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC  | キメラ F111-5E9<br>軽鎖   |

10

20

30

40

50

|    |   |                      |    |
|----|---|----------------------|----|
| 55 | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTKYGMNWWKQ<br>APGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSAST<br>AYLQINNLTTEDMVTYFCAKGGYYSNPIYPMDYWGGTS<br>VTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSS<br>SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP<br>APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED<br>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP<br>ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG           | カメラ F111-5E9<br>重鎖   | 10 |
| 56 | VIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTTAVAWYQQK<br>PGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDYSLTISNV<br>QTEDLAFYYCQQHFTTPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIF<br>PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS<br>GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE<br>VTHQGLSSPVTKSFNRGEC  | カメラ F107-<br>10G1 軽鎖 |    |
| 57 | EVNLVESGGGVKPGASLKLSCASGFTFSNYGMSWVR<br>QTSKDRLEWVASISGGGGRTYYLDNVKGRFIISRENAKNT<br>LYLQMSSLKSEDTALFYCARGARASYFAMDYWGQSSV<br>TVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSSS<br>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP<br>EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY<br>TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPG                | カメラ F107-<br>10G1 重鎖 | 20 |
| 58 | MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPF<br>VGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWRDQGIL<br>ELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQY<br>QCLVFLGHQTFVSQPGYVGLLEGLPYFLEEPEDRTVAANT<br>PFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSL<br>HVPGLNKTSSFCEAHNAKGVTTSTRATITVLPQQPRNLH<br>LVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQ<br>AGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACT<br>SSQGPPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAF<br>VHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQE<br>VTLELQGDGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAW<br>RPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSSWPWWGSGGGSSTG | rhAXL-ECD            | 30 |
| 59 | MVLQTQVFISLLWISGAYG   | 軽鎖シグナル配<br>列         |    |
| 60 | MDWTWRILFLVAAATGTHA   | 重鎖シグナル配<br>列         | 40 |

|    |   |                     |
|----|---|---------------------|
| 61 | gacattgtagtgcacagtctccatcctccctggctgtgtcagcaggagagaaggt<br>cactatgagctgcaaatccagtcagagctgtgctcaacagtagaaccgaaagat<br>ctactggcttggtagaccagcagaaaccaggctcagctcctaaactgctgatctattg<br>ggcatccactaggcaatctggggtccctgatcgcttcacaggcagtgatctggg<br>acagatttactctcaccatcagcagtggtcagggctgaagacctggcagtttattac<br>tgcaagcaatcttataatctgtggacggtcgggtggaggcaccacagctggaatca<br>aacgg                     | F107-7H5 VL 配<br>列  |
| 62 | caggtccaactgcagcagcctgggctgagctgtgaagcctgggcttcagtg<br>aaactgtcctgcaaggcttctggctacactttcaccagctactggataaactgggtg<br>aagcagaggcctggacaaggccttgagtgattggaaatattatcctgatagta<br>gtagtactaactacaatgagaagttcaagagcaaggccacactgactgtagaca<br>agtctccaccacagcctacatacagttcagcagcctgacatctgaggactctgc<br>ggctattattgtacaagagatacctatggtgtagccctgactactggggccaag<br>gcaccactctcacagtctcctca              | F107-7H5 VH 配<br>列  |
| 63 | gacattgtagtgcacagtctccatcctccctggctgtgtcagcaggagagaggt<br>cactatgagctgcaaatccagtcagagctgtgctcaacactagaaccgaaaga<br>actactggcttggtagaccagcagaaaccaggcagctcctaaactgctgatctac<br>tgggcatccactaggaatctggggtccctgatcgcttcacaggcagtgatctg<br>ggacagatttactctcaccatcagcagtggtcagggctgaagacctggcagttat<br>tactgcaagcaatcttataatctgtggacggtcgggtggaggcaccacagctggaat<br>caaa                             | F107-8D12 VL 配<br>列 |
| 64 | caggtccaactgcagcagcctgggctgagctgtgaagcctgggcttcagtg<br>agctgtcctgcaaggcttctggctacactttcatcagcttctggataaactgggtga<br>agcagaggcctggacaaggccttgagtgattgggaaatattttctggtagtagt<br>agtacgaactacaatgagaagttcaagagcaaggccacactgactgtagacaa<br>atctccagcacagcctacatgagctcagcagcctgacatctgaggactctgcg<br>gtctattttgtcaagagattactatggtgtagccctgactactggggccaaggc<br>accactctcacagtytctca                  | F107-8D12 VH 配<br>列 |
| 65 | gatatccagatgacacagactacatcctcctgtctgctctctgggagacagagt<br>caccatcagttgcaaggcaagtcaggacattaacaattattaaactggtatcagc<br>agaaaccagatggaactgttaaactcctgatctactacatatcaagattactca<br>ggagtcccatacagggtcagtggtcagtggtctggaacagattattctctcaccatt<br>agcaacctggagctagaagatgttgccactactttgccaacagggaataacgct<br>tccattcacggtcggctcggggacaaagtggaaataaaa   | F111-5E9 VL 配<br>列  |
| 66 | cagatccagttggtgtagtctggacctgagctgaagaagcctggagagacagtc<br>aagatctcctgcaaggcttctgggtataccttcacaaaatatggaatgaactgggt<br>aaagcaggctccaggaaagggtttaaagtggatgggctggataaacacctaca<br>ctggagagccaacatatgctgatgactcaagggacggttgccttctctttgaaa<br>cctctgccagcactgcctatttgagatcaacaacctcacaactgaggacatggt<br>cacatatttctgtcaaaaggggggtattatagtaacctatctatctatggactac<br>tgggtcaaggaaacctcagtcaccgtctcctca | F111-5E9 VH 配<br>列  |
| 67 | caaattgtctcaccagctcctcagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggt<br>caccatctcctgagtgccagctcaagtgaagttacatgtattggtaccagcaga<br>agccaggatcctcccccacaccctggattatcgacatccaacctggcttctgga<br>gtccctgctcgtcagtggtcagtggtctgggaccttactctcacaatcagc<br>agcatggaggctgaagatgctgccacttactgcccagcagtatcataattacc<br>accacggtcggaggggggaccaagctggaataaaaacgg  | F111-3C8 VL 配<br>列  |

10

20

30

40

|    |  |                     |
|----|--|---------------------|
| 68 | cagggtccaactgcagcagcctggggctgaactgggcaagcctgggacatcagt<br>gaagctgtcctgcaaggcttctggctacacctcaccagctattggatgcactgggt<br>gaagcgggtgctggaacaaggcctgagtgattggaatattaatcctaatagt<br>actagtgctgactacaatgagaagtcaagaggaaggccacattgactgtagac<br>aaatctccagcacagcctacatgcagctcagcaccctgacatctgaggactctg<br>cggctactactgtacaagaccctaataatgggtccttactggtactctgatgtctggg<br>cacagggaccacgggtcaccgtctcctca   | F111-3C8 VH 配<br>列  |
| 69 | gtcattgtgatgaccagctctcaaaattcatgtccacatcagtaggagacaggggt<br>cagtatcacctgcaaggcagctcaggtatgactactgctgtagcctggtatcaac<br>aaaaaccagggcaatctcctaactactgattactgggcatccaccggcaca<br>ctggagtccctgatcgctcagaggcagtgatctgggacagattattctctacca<br>tcagcaatgtgcagactgaagacctggcattttactgtcagcaacattttacca<br>ctctctcacgttcggtgctgggaccaagttggagctgaaa   | F107-10G1 VL 配<br>列 |
| 70 | gaagtgaacctgggtgagctctgggggaggcgtagtgaaagcctggagcgtctctg<br>aaactctctggaagcctctggattcacttccagtaactatggcatgcttgggttcg<br>ccagacttcagacaagaggctggagtgggtcgatccattagtggtggtggtggt<br>agaacctactatctagacaatgtaaagggccgattcatcatctccagagagaatg<br>ccaagaacacctgtacctgcaaatgagtagtctgaagtctgaggacacggcctt<br>gtttactgtgcaagaggagctcgggctcttactttgctatggactactgggtcaa<br>ggaagttcagtcaccgtctcctca   | F107-10G1 VH<br>配列  |
| 71 | MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPF<br>VGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWLRDQGIL<br>ELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQY<br>QCLVFLGHQTFVVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANT<br>PFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSL<br>HVPGLNKTSSFSCAHNAKGVTTSTRATITVLPQQPRNLH<br>LVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQ<br>AGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACT<br>SSQGPPSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAF<br>VHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQQQDTPEVLMDIGLRQE<br>VTLELQGDGVSNSLTVCAAYTAAGDGPWVSLPVPLEAW<br>RPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWGSGGGSSTGHHH<br>HHHHHG                                 | (rh)AXL-ECD<br>His8 |
| 72 | MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPF<br>VGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWLRDQGIL<br>ELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQY<br>QCLVFLGHQTFVVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANT<br>PFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSL<br>HVPGLNKTSSFSCAHNAKGVTTSTRATITVLPQQPRNLH<br>LVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQ<br>AGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACT<br>SSQGPPSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAF<br>VHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQQQDTPEVLMDIGLRQE<br>VTLELQGDGVSNSLTVCAAYTAAGDGPWVSLPVPLEAW<br>RPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACV<br>LILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRVRSY | AXL-全長 His6         |

10

20

30

40

|    |  |                       |  |
|----|--|-----------------------|--|
|    | SRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGE<br>GEFGAVMEGQLNQDDDSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLS<br>EAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFM<br>KHGDLHSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADIASGMEY<br>LSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVADVDFGLSKKIYNGDY<br>YRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWE<br>IATRGQTPYPGVENSEIYDYLRRGNRLKQPADCLDGLYAL<br>MSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLALPPAQEPDEIL<br>YVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQPDPKDCSCLTAA<br>EVHPAGRYVLCPTTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGAYL<br>ECGRYASHHHHHH |                       |  |
| 73 | QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYIFTNFWINWVKQ<br>RPGQGLEWIGNIFPGSNSSNYNEKFKNKATLTVDKSSST<br>AYMHLSSLTSEDSAVYYCVRDYYGGSPDYWGQGTTLTV<br>SS   | F155-3C7 VH           |  |
| 74 | DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLSKTRKKNYL<br>AWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPARFTGSGSGTDF<br>TLTISSVQAEDLAIYYCKHSYNLWTFGGGTKLEIR   | F155-3C7 VL           |  |
| 75 | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGYTFTYYGINWVKQA<br>PGKGLEWMGWINTYLGEPYADDFKGRFAFSLETSASTA<br>YLQINNLREDEMATYFCTRGTMSYSFDYWGQGTALTVSS  | F149-4G4 VH           |  |
| 76 | QNVLTQSPAISASPGEEVTMTCRASSSVSSSYLHWYQ<br>QKSGASPKLWIYSTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISS<br>VEAEDAATYYCHQYSGDPLTFGSGTKLEVK  | F149-4G4 VL           |  |
| 77 | GFTFSNYG   | F107-10G1 CDR<br>H1-A |  |
| 78 | ISGGGGRT   | F107-10G1 CDR<br>H2-A |  |
| 79 | ARGARASYFAMDY  | F107-10G1 CDR<br>H3-A |  |
| 80 | QDVTTA   | F107-10G1 CDR<br>L1-A |  |
| 81 | WAS  | F107-10G1 CDR<br>L2-A |  |
| 82 | QQHFTTPLT  | F107-10G1 CDR<br>L3-A |  |
| 83 | GYTFTKYG   | F111-5E9 CDR<br>H1-A  |  |
| 84 | INTYTGEF   | F111-5E9 CDR<br>H2-A  |  |
| 85 | AKGGYYSNPIYPMDY  | F111-5E9 CDR<br>H3-A  |  |
| 86 | QDINNY   | F111-5E9 CDR<br>L1-A  |  |
| 87 | YIS  | F111-5E9 CDR<br>L2-A  |  |

10

20

30

40



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

10

20

30

40

50

|     |   |                      |    |
|-----|---|----------------------|----|
| 111 | RTS   | F111-3C8 CDR<br>L2-A |    |
| 112 | QQYHNPPT  | F111-3C8 CDR<br>L3-A |    |
| 113 | GYTFTYYG  | F149-4G4 CDR<br>H1-A |    |
| 114 | INTYLGEP  | F149-4G4 CDR<br>H2-A |    |
| 115 | TRGTMSYSFDY   | F149-4G4 CDR<br>H3-A | 10 |
| 116 | SSSVSSSY  | F149-4G4 CDR<br>L1-A |    |
| 117 | STS   | F149-4G4 CDR<br>L2-A |    |
| 118 | HQYSGDPLT   | F149-4G4 CDR<br>L3-A |    |
| 119 | QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCTASASISSFDIMGWYRQ<br>APGKQRELVAAITTLDIANYRDSVKGRFTISRDNANTVYL<br>QMDSLKPEDTARYHCAAFQSDQNYWGQGTQVTVSS                  | NRC-sdAb001          |    |
| 120 | QVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCATSTRTVSSAVMAWFR<br>QAPEKVRDFVGFITNSGNILYDDSVKGRFTISRDNAQNTV<br>YLQMNSLKPEDTAVYYCAAKWSFSSGYGDLRRAAMYDY<br>WGQGTQVTVSS | NRC-sdAb002          | 20 |
| 121 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVTLDYTAIGWFR<br>QAPGKERELVAAITSGGNTDYAESAKGRFRISRDNKNTI<br>YLQMNSLKPEDTGYYCAARRGGARGEYDYWDQGTQV<br>TVSS           | NRC-sdAb003          |    |
| 122 | QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAFSRGAFDYEIGWFR<br>QAPGKEREFVAAVTRNGDSVYADSLKARFTASRNNAVN<br>TAYLHMNILQPEDTATYYCAANWRPLRTSSGADDYADW<br>GQGTQVTVSS     | NRC-sdAb004          |    |
| 123 | QVKLEESGGGLAQAGGSLRLSCAASGSISSINTIGWFRQA<br>PGKQRELVAASDSGANRNYADSVKGRFTISRDNANTVY<br>LQMNNLKPEDTAIYYCRAWGTGTISTMYWGQGTQVTVS<br>S           | NRC-sdAb005          | 30 |
| 124 | QVKLEESGGGLVQAGASLRLSCVASESIFGFNTMGWYR<br>QAPGNERELVASISNSKRTMYADSVKGRFTISRDNANT<br>VNLQMNNLKPEDTAVYYCRAWGIITSATVYWGQGTQVTV<br>SS           | NRC-sdAb006          |    |
| 125 | QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCATSTRTVSSAVMAWFR<br>QAPEKERDFVGFISNSGSVYYDDSVKGRFTISRDNAQNT<br>VYLQMNSLKPEDTAVYYCAIIWRTSDLTGRFNTWGQGTQ<br>VTVSS       | NRC-sdAb007          | 40 |

10

20

30

40

50

|     |   |                       |
|-----|---|-----------------------|
| 126 | QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSGMINTMGWYR<br>QAPGKQRELVARRSTGGTTNYADSVKGRFTISRDDANNT<br>VYLQMNSLKPEDTAVYYCAIIWRTSDLTGRFNTWGQGTQ<br>VTVSS | NRC-sdAb008           |
| 127 | ASISSFDI  | NRC-sdAb001<br>CDR1-A |
| 128 | ITTLDIA   | NRC-sdAb001<br>CDR2-A |
| 129 | AAFQSDQNY   | NRC-sdAb001<br>CDR3-A |
| 130 | TRTVSSAV  | NRC-sdAb002<br>CDR1-A |
| 131 | ITNSGNI   | NRC-sdAb002<br>CDR2-A |
| 132 | AAKWSFSSGYGDLRRAAMYDY   | NRC-sdAb002<br>CDR3-A |
| 133 | GVTLDYTA  | NRC-sdAb003<br>CDR1-A |
| 134 | ITSGGNT   | NRC-sdAb003<br>CDR2-A |
| 135 | AARRGGARGEYDY   | NRC-sdAb003<br>CDR3-A |
| 136 | RGAFDTYE  | NRC-sdAb004<br>CDR1-A |
| 137 | VTRNGDSV  | NRC-sdAb004<br>CDR2-A |
| 138 | AANWRPLRTSSGADDYAD  | NRC-sdAb004<br>CDR3-A |
| 139 | GSISSINT  | NRC-sdAb005<br>CDR1-A |
| 140 | SDSGANR   | NRC-sdAb005<br>CDR2-A |
| 141 | RAWGTGTISTMY  | NRC-sdAb005<br>CDR3-A |
| 142 | ESIFGFNT  | NRC-sdAb006<br>CDR1-A |
| 143 | ISNSKRT   | NRC-sdAb006<br>CDR2-A |

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

|  |                   |                       |
|--|-------------------|-----------------------|
| 184  | INTMG             | NRC-sdAb008<br>CDR1-B |
| 185  | RRSTGGTTNYADSVKG  | NRC-sdAb008<br>CDR2-B |
| 186  | IWRTSDLTGRFNT     | NRC-sdAb008<br>CDR3-B |
| 187  | TTPPVLDSDGSFFLYSK | 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。<br>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。 |                   |                       |

10

## 【 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.

20

[00342] Baral et al. (2013) Single-domain antibodies and their utility. *Curr Protoc Immunol*. 2013 Nov 18;103:Unit 2.17.

[00343] Feneyrolles c, Spenlinhauer A, Guet L, Fauvel B, Dayde-Cazals B, Warrant 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, Lorens 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.

30

[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-β-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, Frieri 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.

40

[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

50

- ita K, Kirii Y. (2013) Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. *GenesCells*. 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] Paccetz 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, Rickert 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, Seymour 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.

[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.

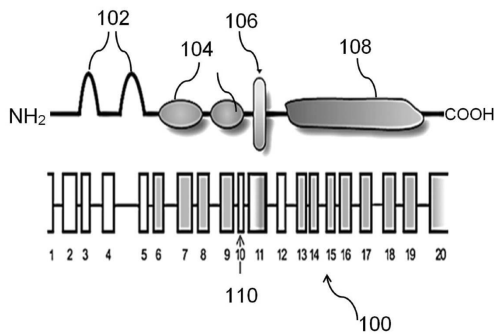
10

20

【図面】

【図 1】

【図 2】



先行技術

FIG. 1

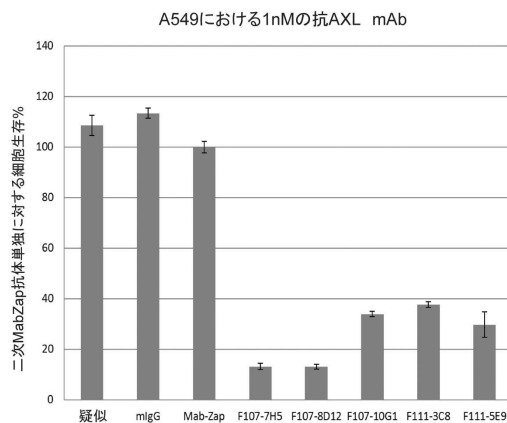


FIG. 2

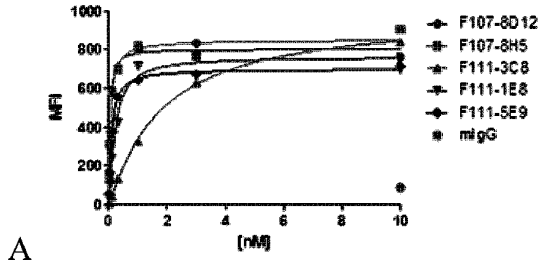
30

40

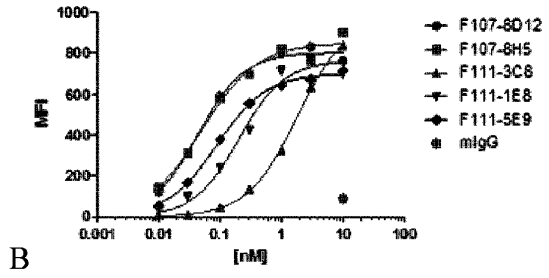
50



【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 図 4 】

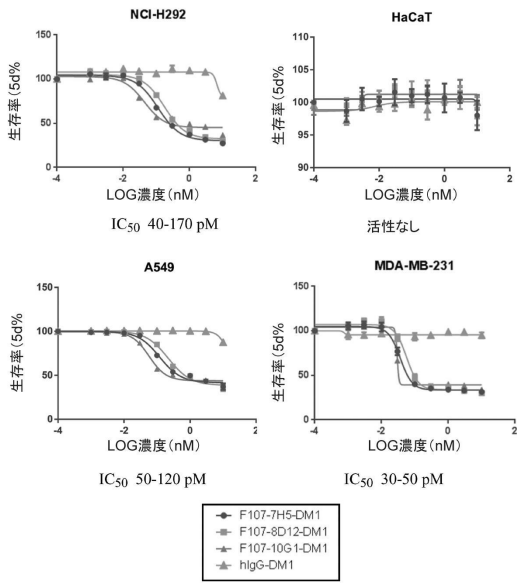


FIG. 4

【 図 5 】

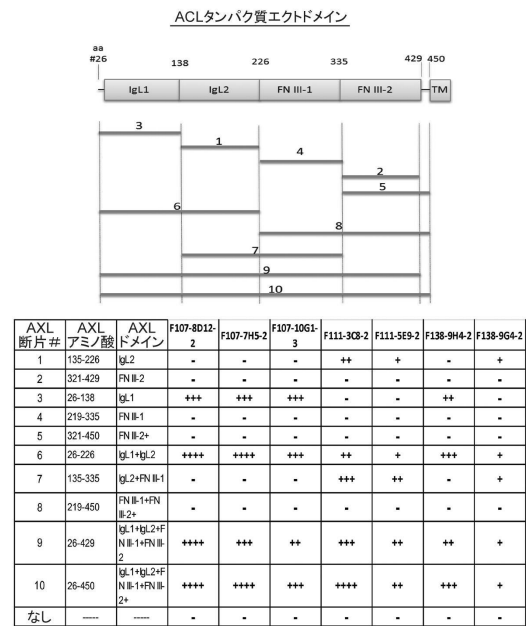


FIG. 5

10

20

30

40

50

【 図 6 】

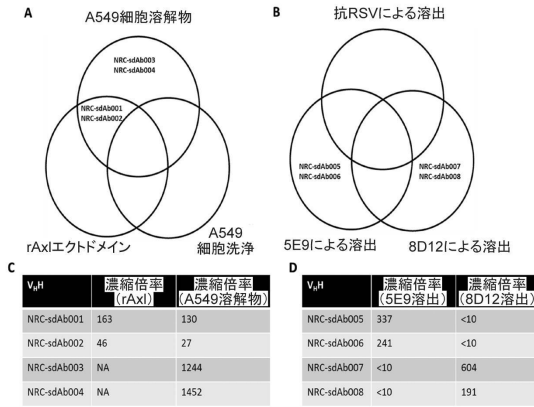


FIG. 6

【 図 7 】

>F107.10G1(heavy)>EVNLVESGGGVKPGASLKLSCEASGFTFSNQLQMSWVRQTSDKRLEWVAHISGGSGRTVYH  
 NVKGRFHSRENKNTLYLQMSLSKSEDALFYCARAGARASVAVMIDVWGQSSVTVSS (SEQ ID:47, 77-79, 85-87)

>F107.10G1(kappa)>VIVMTQSHKFMSTVSGDRVSTIKASQDVTFAVAWYQKPGQSKLLIYWAQTHHTGVDPDR  
 FTGSGSDYSLTISNVQTEDLAFYCCQHFHTPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:46, NO: 80-82 and NO: 83-84)

>F111.5E9(heavy)>QQLVQSGPELKPGETVKISCKASGYFTFISFVWVWVKQAPGKGLWVGMWNTYTGERTVAD  
 DFKRFRFLSLETASSTAYLQINLTEDMVTYFCARVYGGSPDMDVWGQSTVTSS (SEQ:45, 83-85, 93-95)

>F111.5E9(kappa)>DIQMTQTSSLSASLGRVITSCASQDINNYLVWYQKPDGTWKLIIYNSRHFHGVPSRFSGS  
 GSGTDYSLTISNLEEDVATYFCQIGNTLPLTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:44, NO: 86-88 and NO: 89-92)

>F107.8D12(heavy)>QVQLQPGAEVLKPGASVQLSCKASGYFTFISFVWVWVKRQPGQGLEWVGMNIRPGSSSTAYN  
 RFRKATLTVDKSSSTAYMQLSSTSEDAVYFCARVYGGSPDMDVWGQSTLTVSS (SEQ ID NO:41, 89-91, 97-99)

>F107.8D12(kappa)>DIVMSQSPSSLAVSAGERVTMSSCSQSLNTRTFKNIIDVWYQKPGQSKLLIYWAQTHHT  
 GVPDRFTGSGSDFTLTISSVQAEADLAVYCCQVYVYGGSPDMDVWGQSTLTVSS (SEQ ID NO:40, NO: 92-94, 97-99)

>F107.7H5(heavy)>QVQLQPGAEVLKPGASVQLSCKASGYFTFISFVWVWVKRQPGQGLEWVGMNIRPGSSSTAYN  
 RFRKATLTVDKSSSTAYMQLSSTSEDAVYFCARVYGGSPDMDVWGQSTLTVSS (SEQ ID NO:39, 95-97, 103-104)

>F107.7H5(kappa)>DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSSCSQSLNTRTFKNIIDVWYQKPGQSKLLIYWAQTHHT  
 DRFTGSGSDFTLTISSVQAEADLAVYCCQVYVYGGSPDMDVWGQSTLTVSS (SEQ ID NO:38, NO: 98-100, 103-104)

>F155.3C7(heavy)>QVQLQPGAEVLKPGASVQLSCKASGYFTFISFVWVWVKRQPGQGLEWVGMNIRPGSSSTAYN  
 RFRKATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDAVYFCARVYGGSPDMDVWGQSTLTVSS (SEQ NO:73, 101-103, 107-109)

>F155.3C7(kappa)>DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSSCSQSLNTRTFKNIIDVWYQKPGQSKLLIYWAQTHHT  
 PARFTGSGSDFTLTISSVQAEADLAVYCCQVYVYGGSPDMDVWGQSTLTVSS (SEQ:74, 104-106, 108-110)

>F111.3C8(heavy)>QVQLQPGAEVLKPGKPTSVKLSCKASGYFTFISFVWVWVKRVPQGGLEWVGMNIRPGSSSTAYN  
 RFRKATLTVDKSSSTAYMQLSSTSEDAVYFCARVYGGSPDMDVWGQSTLTVSS (SEQ:43, 101-103, 107-109)

>F111.3C8(kappa)>QVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSQSLNTRTFKNIIDVWYQKPGSSPKPWYKTNLQAGV  
 PPARFSGSGSGLTSSMEADAATYCCQVYVYGGSPDMDVWGQSTLTVSS (SEQ ID NO:42, 110-112, and 113-115)

>F149.4G4(heavy)>QQLVQSGPELKPGETVKISCKTSGYFTFISFVWVWVKQAPGKGLWVGMWNTYTGERTVAD  
 DFKRFRFLSLETASSTAYLQINLRDEDMATYFCARVYGGSPDMDVWGQSTLTVSS (SEQ:75, 113-115, 117-119)

>F149.4G4(kappa)>QVLTQSPAIMSASPGEVMTMCSQSLNTRTFKNIIDVWYQKSGSAPKLIWYKTNLQAGV  
 PPARFSGSGSGLTSSVSEADAATYCCQVYVYGGSPDMDVWGQSTLTVSS (SEQ ID NO:76, NO: 116-118, 120-122)

FIG. 7

【 図 8 】

>NRC-sdAb001  
 QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCTASASISSIDIMGWYRQAPGKQRELVAHTEFDIANVRSVYKGRFTISRDNNAKNTVY  
 LQMSLKPEDTARYHCAARIGSDONVWGQGTQVTSS (SEQ ID NO: 119, NO: 127-129, 136-138)

>NRC-sdAb002  
 QVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCATSTRIVSSAVVMAWFRQAPEKVRDFVGFHNSGNLITDPSVYKGRFTISRDNNAQNT  
 WYLMNSLKPEDTAVVYCAAKVSEFSGYDGRRAAMVYDVGQGTQVTSS (SEQ NO:120, 130-132, 136-138)

>NRC-sdAb003  
 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVTLDTFAHWFRQAPGKERELVAHISGGNTDFAEFAKGRFRISRDNKNTIY  
 LQMSLKPEDTGVVYCAARHGARGEYDVGWQGTQVTSS (SEQ ID NO:121, NO: 133-135, 136-138)

>NRC-sdAb004  
 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASASISSEIDIMGWYRQAPGKERELVAHTEFDIANVRSVYKGRFTISRDNNAKNTVY  
 TAYLHMNLQPEDTATYCAANVPLHTSSGADYADVWGQGTQVTSS (SEQ ID NO:122, 136-138, 139-141)

>NRC-sdAb005  
 QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCTASASISSIDIMGWYRQAPGKQRELVAHSDGAGNRYADSVYKGRFTISRDNNAKNTVY  
 YLQMNNSLKPEDTAVVYCAAVGTGTSTMYWGQGTQVTSS (SEQ ID NO:123, NO: 139-141, and 145-147)

>NRC-sdAb006  
 QVKLEESGGGLVQAGASLRLSCVASESIFGNTIMGWYRQAPGNERELVAHISNSKRTMVAADSVYKGRFTISRDNNAKNTVY  
 NLQMNNSLKPEDTAVVYCAAVGITSATVYDVGQGTQVTSS (SEQ ID NO:124, NO: 142-144, 145-147)

>NRC-sdAb007  
 QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCATSTRIVSSAVVMAWFRQAPEKERDFVGFHNSGSVLYDPSVYKGRFTISRDNNAQNTVY  
 YLQMNNSLKPEDTAVVYCAAVRISDTEFRNTVWGQGTQVTSS (SEQ ID NO:125, NO: 145-147, 148-150)

>NRC-sdAb008  
 QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCTASASISSIDIMGWYRQAPGKQRELVAHRSYGGTNYADSVYKGRFTISRDNNAKNTVY  
 TVYLMNSLKPEDTAVVYCAAVRISDTEFRNTVWGQGTQVTSS (SEQ ID NO:126, NO: 148-150, 151-153)

FIG. 8

【 図 9 】

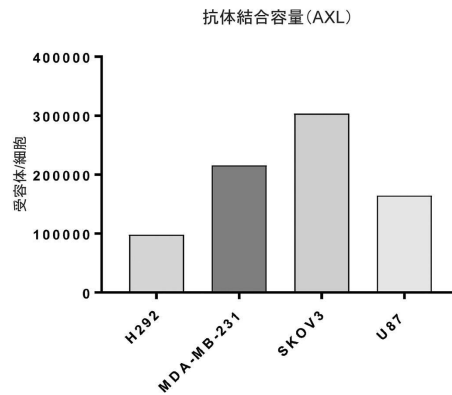


FIG. 9

10

20

30

40

50

【図 1 0】

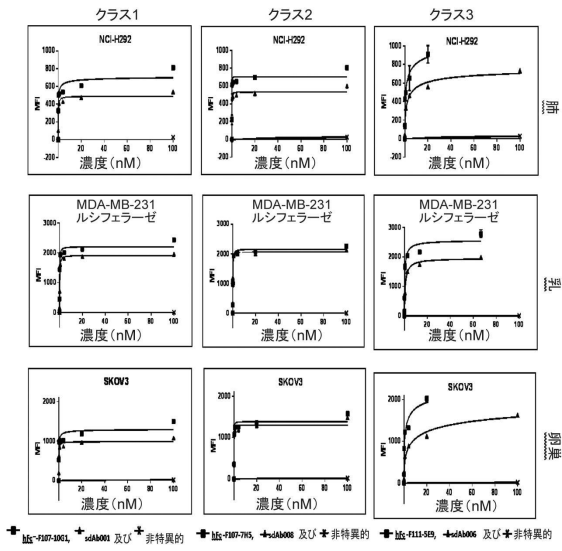


FIG. 10

【図 1 1】

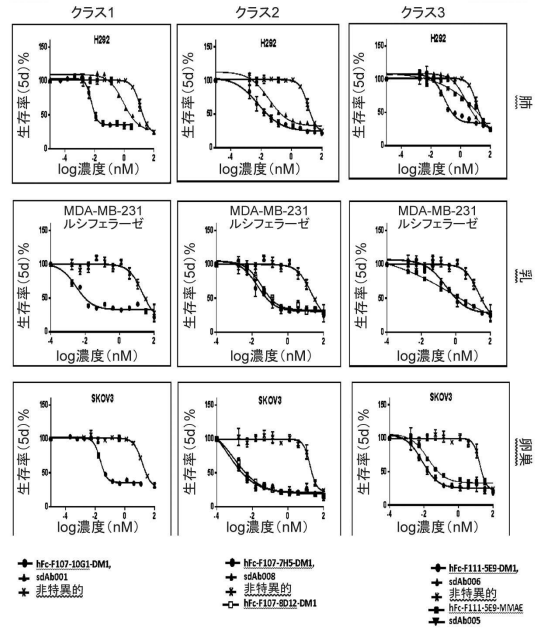


FIG. 11

【図 1 2】

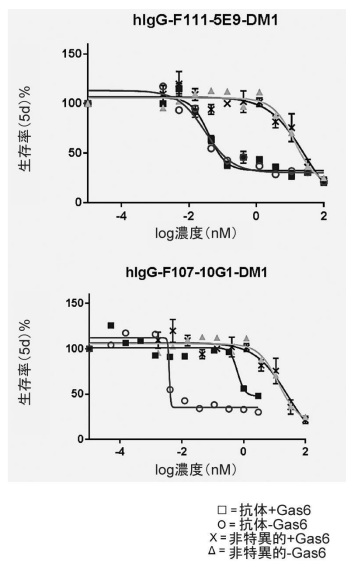


FIG. 12

【図 1 3】

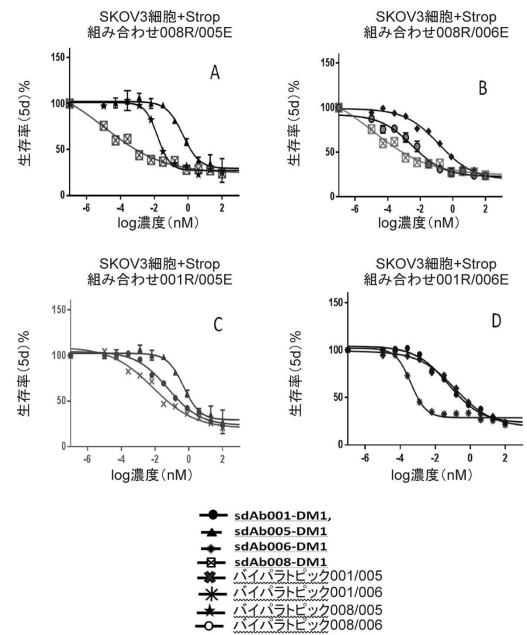


FIG. 13

10

20

30

40

50

【 図 1 4 】

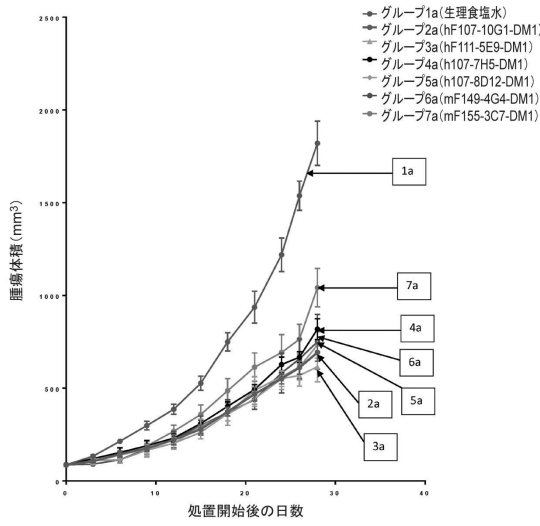


FIG. 14

【 図 1 5 】

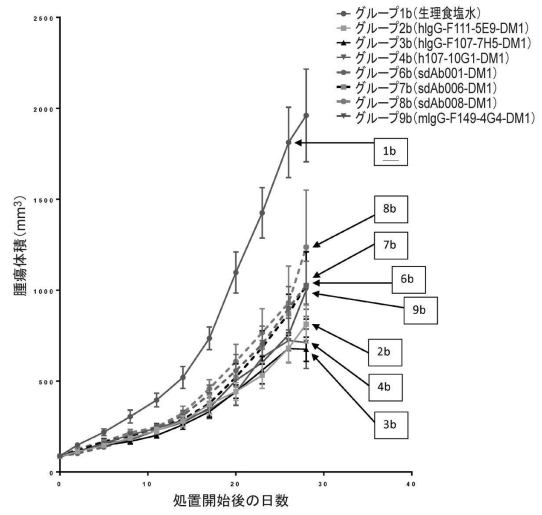


FIG. 15

10

20

【 図 1 6 】

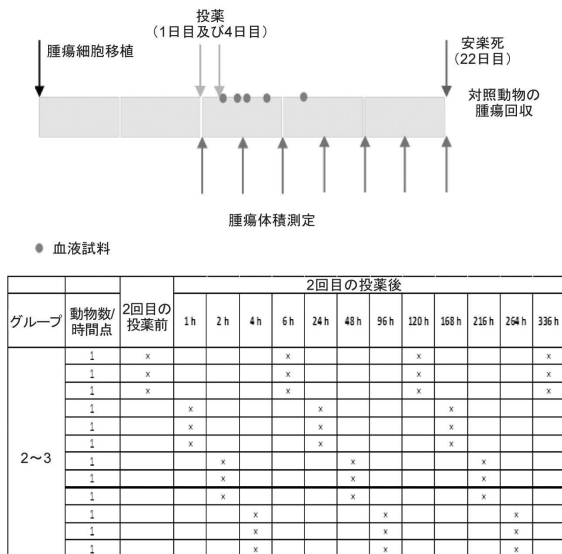


FIG. 16

【 図 1 7 】

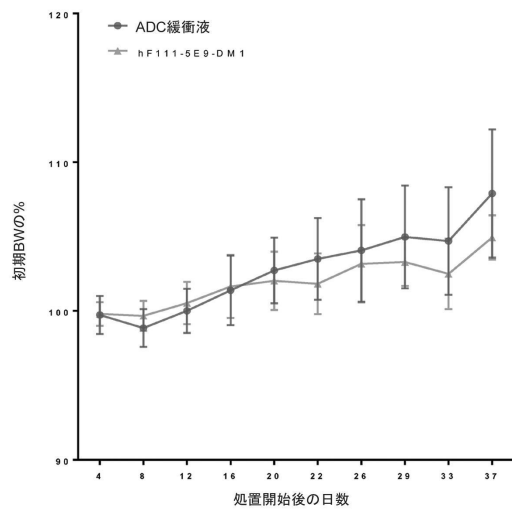


FIG. 17

30

40

50

【 図 18 】

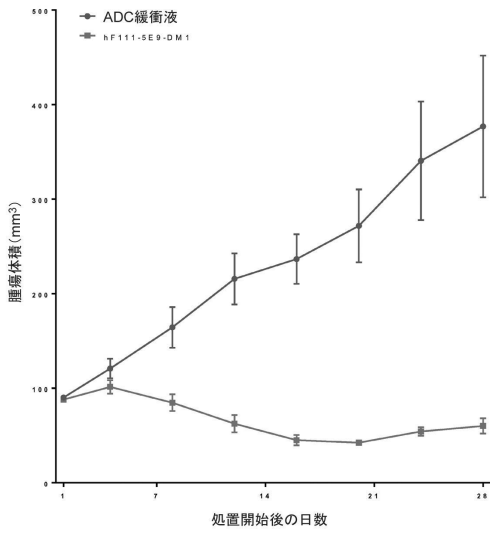


FIG. 18

【 図 19 】

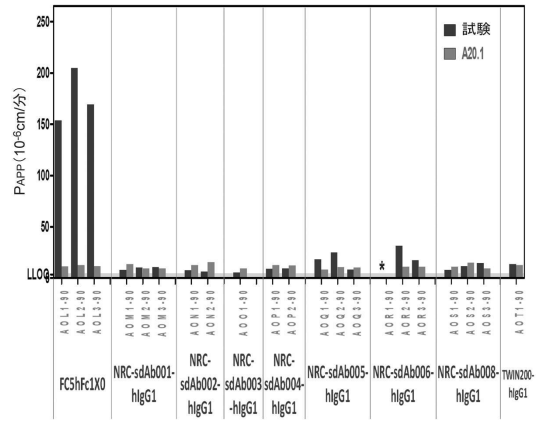


FIG. 19

【 配列表 】

0007366886000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

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

## F I

C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 N 1/21  
 C 1 2 N 5/10  
 A 0 1 K 67/027  
 A 6 1 K 39/395 L  
 A 6 1 K 47/68  
 A 6 1 P 35/00  
 G 0 1 N 33/574 A  
 C 1 2 P 21/08

イブ 8 0 4 - 1 7 2 5

## (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- 1 4 2, ケ  
 アオブ ロイヤルマウント アベニュー 6 1 0 0

## (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 ケー1ジェイ 6ケー9, オタワ, ハメリン クレセント 2 1 9 5

## (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エー6, ピエールフォン, ル グリエ 4 8 0 1

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 )