

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6728053号

(P6728053)

(45) 発行日 令和2年7月22日(2020.7.22)

(24) 登録日 令和2年7月3日(2020.7.3)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46 Z N A
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
請求項の数 14 (全 48 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2016-557031 (P2016-557031)	(73) 特許権者	513250798
(86) (22) 出願日	平成27年3月12日 (2015.3.12)		プロセナ バイオサイエンシーズ リミテッド
(65) 公表番号	特表2017-518258 (P2017-518258A)		アイルランド ディーO2 ティー8O4
(43) 公表日	平成29年7月6日 (2017.7.6)		ダブリン 2, グランドキャナルドック
(86) 国際出願番号	PCT/IB2015/051786		ランズ ブロックシー, サー ジョン ロ
(87) 国際公開番号	W02015/136469		ジャーソンズ クエイ 77
(87) 国際公開日	平成27年9月17日 (2015.9.17)		77 Sir John Rogerso
審査請求日	平成30年3月9日 (2018.3.9)		n's Quay, Block C, G
(31) 優先権主張番号	61/952, 123		rand Canal Dockland
(32) 優先日	平成26年3月12日 (2014.3.12)		s, Dublin 2, DO2 T8O4
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		, Ireland
(31) 優先権主張番号	62/023, 698	(74) 代理人	110001139
(32) 優先日	平成26年7月11日 (2014.7.11)		SK特許業務法人
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗MCAM抗体及び関連する使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト化抗体であって、

(a) 配列番号 156 の 3 つの K a b a t の C D R を含み、配列番号 156 に対して少なくとも 98% 同一である成熟重鎖可変領域と(ここで、配列番号 156 からの任意の変異は、可変領域フレームワーク内にある)、

(b) 配列番号 160 の 3 つの K a b a t の C D R を含み、配列番号 160 に対して少なくとも 98% 同一である成熟軽鎖可変領域と(ここで、配列番号 160 からの任意の変異は、可変領域フレームワーク内にある)を含む、前記ヒト化抗体。

【請求項 2】

前記成熟重鎖可変領域が配列番号 156 に対して少なくとも 99% 同一であり(ここで、配列番号 156 からの任意の変異は、可変領域フレームワーク内にある)、及び前記成熟軽鎖可変領域が配列番号 160 に対して少なくとも 99% 同一である(ここで、配列番号 160 からの任意の変異は、可変領域フレームワーク内にある)請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 3】

前記成熟重鎖可変領域が配列番号 156 の前記アミノ酸配列を有し、及び前記成熟軽鎖可変領域が配列番号 160 の前記アミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 4】

前記成熟重鎖可変領域が配列番号 156 の前記アミノ酸配列を有し、及び前記成熟軽鎖

10

20

可変領域が配列番号 160 の前記アミノ酸配列を有し、前記ヒト化抗体が、配列番号 173 のアミノ酸配列を有する、C 末端リジンを伴ってまたは伴わない重鎖定常領域と、配列番号 170 のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域とを含む請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 5】

前記成熟重鎖可変領域が配列番号 156 の前記アミノ酸配列を有し、及び前記成熟軽鎖可変領域が配列番号 160 の前記アミノ酸配列を有し、前記ヒト化抗体が、配列番号 173 のアミノ酸配列を有する、C 末端リジンを伴ってまたは伴わない重鎖定常領域と、配列番号 171 のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域とを含む請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 6】

前記成熟重鎖可変領域が配列番号 156 の前記アミノ酸配列を有し、及び前記成熟軽鎖可変領域が配列番号 160 の前記アミノ酸配列を有し、前記ヒト化抗体が、配列番号 174 のアミノ酸配列を有する、C 末端リジンを伴ってまたは伴わない重鎖定常領域と、配列番号 171 のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域とを含む請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 7】

さらに、前記成熟重鎖可変領域の 3 位 (K a b a t の番号付け) が K によって占められるという条件で請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

【請求項 8】

さらに、前記成熟重鎖可変領域の 93 位 (K a b a t の番号付け) が T によって占められるという条件で請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

【請求項 9】

さらに、前記成熟重鎖可変領域の 42 位 (K a b a t の番号付け) が E によって占められるという条件で請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

【請求項 10】

さらに、前記成熟軽鎖可変領域の 43 位 (K a b a t の番号付け) が S によって占められるという条件で請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

【請求項 11】

さらに、前記成熟軽鎖可変領域の 9 位 (K a b a t の番号付け) が S によって占められるという条件で請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

【請求項 12】

さらに、前記成熟軽鎖可変領域の 19 位 (K a b a t の番号付け) が V によって占められるという条件で請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

【請求項 13】

抗原結合断片である請求項 1 ~ 3、7 ~ 12 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

【請求項 14】

前記成熟重鎖可変領域は重鎖定常領域と融合し、且つ前記成熟軽鎖可変領域は軽鎖定常領域と融合する、請求項 1 ~ 3、7 ~ 12 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2014 年 3 月 12 日に出願された米国仮特許出願第 61 / 952 , 123 号、2014 年 7 月 11 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 023 , 698 号、及び 2014 年 10 月 24 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 068 , 438 号に対して優先権を主張し、前述の出願はあらゆる目的でその全体が参照によって本明細書に組み入れられる。

【0002】

配列表、表またはコンピュータプログラムリストへの参照

「抗 M C A M 抗体及び関連する使用方法」について 2015 年 3 月 4 日に作成したファイル 459014 S E Q L I S T . t x t に書き込まれた配列表は 148 キロバイトである。このファイルに含有される情報は参照によって本明細書に組み入れられる。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0003】

TH17細胞（Tヘルパー17細胞）と呼ばれるCD4+T細胞のサブセットは、多数の自己免疫疾患、特に、たとえば、多発性硬化症及び動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）のようなT細胞のCNS浸潤が関与する神経炎症性の状態の病態形成に関与している。TH17細胞はIL-17及びIL-22を含む多数の選ばれたサイトカインを分泌することが報告されている。TH17細胞は特異的な動員及び組織の浸潤を起こすことが報告されている。MCAMはTH17細胞上で発現され、リガンドとしてラミニン-4を結合することが報告されている。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、配列番号156の3つのKababのCDRを含み、及び配列番号156に対して少なくとも97%同一である成熟重鎖可変領域と、配列番号160の3つのKababのCDRを含み、及び配列番号160に対して少なくとも97%同一である成熟軽鎖可変領域とを含むヒト化抗体を提供する。一部の抗体では、成熟重鎖可変領域は配列番号156に対して少なくとも98%または99%同一であり、及び成熟軽鎖可変領域は配列番号160に対して少なくとも98%または99%同一である。一部の抗体では、成熟重鎖可変領域は配列番号156のアミノ酸配列を有し、及び成熟軽鎖可変領域は配列番号160のアミノ酸配列を有する。一部の抗体では、成熟重鎖可変領域の93位（Kababの番号付け）がTによって占められ；成熟重鎖可変領域の42位（Kababの番号付け）がEによって占められ；成熟軽鎖可変領域の43位（Kababの番号付け）がSによって占められ；成熟軽鎖可変領域の9位（Kababの番号付け）がSによって占められ；成熟軽鎖可変領域の19位（Kababの番号付け）がVによって占められる。一部の抗体では、成熟重鎖可変領域の93位（Kababの番号付け）がTによって占められ；成熟重鎖可変領域の42位（Kababの番号付け）がEによって占められ；成熟重鎖可変領域の3位（Kababの番号付け）がKによって占められ；成熟軽鎖可変領域の43位（Kababの番号付け）がSによって占められ；成熟軽鎖可変領域の9位（Kababの番号付け）がSによって占められ；成熟軽鎖可変領域の19位（Kababの番号付け）がVによって占められる。一部の抗体では、成熟重鎖定常領域は配列番号173若しくは174のアミノ酸配列を有し、及び/または成熟軽鎖定常領域は配列番号170若しくは171のアミノ酸配列を有する。

【0005】

本発明はさらに、アミノ酸残基318を含むエピトープにてヒトMCAM（配列番号11）に結合する抗MCAM抗体を提供する。一部のそのような抗体では、エピトープはアミノ酸残基324を含む。一部のそのような抗体では、エピトープはアミノ酸残基326を含む。一部の抗体では、エピトープはアミノ酸残基318を含むヒトMCAMの少なくとも5つの隣接するアミノ酸残基を含む。一部のそのような抗体では、該抗体は、

（a）配列番号18に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号13に相当する成熟軽鎖可変領域とを有するクローン15；

（b）配列番号7に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号2に相当する成熟軽鎖可変領域とを有するクローン17；

（c）配列番号35に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号30に相当する成熟軽鎖可変領域とを有する1174.1.3；

（d）配列番号45に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号40に相当する成熟軽鎖可変領域とを有する1414.1.2；

（e）配列番号55に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号50に相当する成熟軽鎖可変領域とを有する1415.1.1；

（f）配列番号65に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号60に相当する成熟軽鎖可変領域とを有する1749.1.3；

（g）配列番号77に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号70に相当する成熟軽鎖可

10

20

30

40

50

変領域とを有する 2 1 2 0 . 4 . 1 9 ;

(h) 配列番号 8 9 に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号 8 4 に相当する成熟軽鎖可変領域とを有する 2 1 0 7 . 4 . 1 0 ; 及び

(i) モノクローナル抗体、1 1 7 4 . 1 . 3、1 4 1 4 . 1 . 2、1 4 1 5 . 1 . 1、1 7 4 9 . 1 . 3、2 1 2 0 . 4 . 1 9 及び 2 1 0 7 . 4 . 1 0 に実質的に由来する C D R を含む抗体から成る群から選択される抗体ではない。一部のそのような抗体では、該抗体はモノクローナルである。一部のそのような抗体では、該抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、ペニヤ化抗体またはヒト抗体である。

一部のそのような抗体では、該抗体は、

(a) 配列番号 1 8 に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号 1 3 に相当する成熟軽鎖可変領域とを有するクローン 1 5 ;

(b) 配列番号 7 に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号 2 に相当する成熟軽鎖可変領域とを有するクローン 1 7 ;

(c) 配列番号 3 5 に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号 3 0 に相当する成熟軽鎖可変領域とを有する 1 1 7 4 . 1 . 3 ;

(d) 配列番号 4 5 に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号 4 0 に相当する成熟軽鎖可変領域とを有する 1 4 1 4 . 1 . 2 ;

(e) 配列番号 5 5 に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号 5 0 に相当する成熟軽鎖可変領域とを有する 1 4 1 5 . 1 . 1 ;

(f) 配列番号 6 5 に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号 6 0 に相当する成熟軽鎖可変領域とを有する 1 7 4 9 . 1 . 3 ;

(g) 配列番号 7 7 に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号 7 0、7 1 または 7 2 に相当する成熟軽鎖可変領域とを有する 2 1 2 0 . 4 . 1 9 ;

(h) 配列番号 8 9 に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号 8 2 または 8 4 に相当する成熟軽鎖可変領域とを有する 2 1 0 7 . 4 . 1 0 ; 及び

(i) モノクローナル抗体、1 1 7 4 . 1 . 3、1 4 1 4 . 1 . 2、1 4 1 5 . 1 . 1、1 7 4 9 . 1 . 3、2 1 2 0 . 4 . 1 9 及び 2 1 0 7 . 4 . 1 0 に実質的に由来する C D R を含む抗体から成る群から選択される抗体ではない。一部のそのような抗体では、該抗体はモノクローナルである。一部のそのような抗体では、該抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、ペニヤ抗体またはヒト抗体である。

【 0 0 0 6 】

本発明はさらに、上述の抗体のいずれかを含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 0 7 】

本発明はさらに、身体における炎症の部位への M C A M 発現細胞の浸潤を特徴とする炎症性疾患の治療のための薬物の製造における前述の抗体のいずれかの使用を提供する。そのような炎症性疾患は、中枢神経系 (C N S) への M C A M 発現細胞の浸潤を特徴とする C N S の炎症性疾患であってもよい。

【 0 0 0 8 】

本発明はさらに多発性硬化症、パーキンソン病、アレルギー性接触皮膚炎、乾癬、乾癬性関節炎、関節リウマチ、サルコイドーシス、炎症性大腸疾患、クローン病、または、たとえば、黒色腫のような癌 (たとえば、固形腫瘍または血液腫瘍) の治療のための薬物の製造における前述の抗体のいずれかの使用を提供する。

【 0 0 0 9 】

本発明はさらに、炎症の部位への M C A M 発現細胞の浸潤を特徴とする炎症性疾患を治療する方法を提供し、該方法はそれを必要とする哺乳類対象に有効量の上述の抗体のいずれかを投与することを含む。一部の方法では、疾患は、多発性硬化症、パーキンソン病、アレルギー性接触皮膚炎、乾癬、乾癬性関節炎、関節リウマチ、サルコイドーシス、炎症性大腸疾患、クローン病、または、たとえば、黒色腫のような癌 (たとえば、固形腫瘍または血液腫瘍) である。一部の方法では、M C A M 発現細胞は T H 1 7 細胞である。一部の方法では、哺乳類対象はヒトである。方法の一部では、抗体は、ラミニン - 4 を含む

10

20

30

40

50

タンパク質へのM C A Mの結合を阻害する。一部の方法では、哺乳類対象はヒトである。方法の一部では、M C A M発現細胞はT H 1 7細胞である。

【 0 0 1 0 】

本発明はさらに、抗M C A Mモノクローナル抗体を結合するエピトープを含む単離されたペプチドを提供し、その際、該ペプチドはアミノ酸残基3 1 8を含むヒトM C A M（配列番号1 1）の5 ~ 5 0の隣接するアミノ酸残基を含む。これらのペプチドの一部では、該ペプチドはキャリアポリペプチドに連結される。これらのペプチドの一部では、該ペプチドはアジュバントと併用される。

【 0 0 1 1 】

本発明はさらに、

- (a) 上述のペプチドで対象を免疫することと、
- (b) B細胞を対象から単離し、該B細胞が抗体を分泌することと、
- (c) 抗体をスクリーニングしてラミニン - 4鎖へのヒトM C A Mの結合を阻害する抗体を特定することとを含む、ラミニン - 4鎖へのヒトM C A Mの結合を阻害する抗体を生成する方法を提供する。方法の一部では、該方法はさらに
- (d) 培養にてB細胞を不死化した細胞と融合させ、モノクローナルな抗体産生ハイブリドーマ細胞を形成することと、
- (e) 該ハイブリドーマ細胞を培養することと、
- (f) 培養物からモノクローナル抗体を単離することとを含む。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図1】決定的なクローンの特定を示す図である。平均表面発現値の関数としてプロットした1 7 4 9 . 1 . 3の平均結合値（灰色の菱形）。< 3 0 %のモノクローナル抗体の反応性と> 5 0 %のマウス血清の結合の閾値を適用して抗体結合については陰性であるが、表面発現については陽性であるクローン（黒色の菱形）を特定した。

【 0 0 1 3 】

【図2】C 2 7 2、Y 3 1 8、C 3 2 0、V 3 4 0、及びW 3 7 7を含む1 7 4 9 . 1 . 3についての潜在的に決定的な結合部位として特定された5つの残基の位置を示す、ヒトM C A Mの相同性モデルを示す図である。

【 0 0 1 4 】

【図3 A】ヒト化1 7 4 9軽鎖成熟可変領域を伴った1 7 4 9 . 1 . 3のアミノ酸配列の配列比較を示す。A B A 7 1 4 0 7 . 1及びC A I 9 9 8 0 0 . 1はヒトのアクセプターV_L配列である。K a b a tの定義に従ったC D R領域は灰色で強調する。

【 0 0 1 5 】

【図3 B】ヒト化1 7 4 9重鎖成熟可変領域を伴った1 7 4 9 . 1 . 3のアミノ酸配列の配列比較を示す。A A X 8 2 4 9 4 . 1及びA D X 6 5 6 7 6 . 1はヒトのアクセプターH_L配列である。K a b a tの定義に従ったC D R領域は灰色で強調する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

配列の簡単な説明

配列番号1は、抗体クローン17の成熟軽鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【 0 0 1 7 】

配列番号2は、抗体クローン17の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 0 1 8 】

配列番号3は、抗体クローン17のC D R L 1のアミノ酸配列である。

【 0 0 1 9 】

配列番号4は、抗体クローン17のC D R L 2のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 0 】

配列番号5は、抗体クローン17のC D R L 3のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 1 】

配列番号 6 は、抗体クローン 17 の成熟重鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【 0 0 2 2 】

配列番号 7 は、抗体クローン 17 の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 3 】

配列番号 8 は、抗体クローン 17 の C D R H 1 のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 4 】

配列番号 9 は、抗体クローン 17 の C D R H 2 のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 5 】

配列番号 10 は、抗体クローン 17 の C D R H 3 のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 6 】

配列番号 11 は、ヒト M C A M 受入番号 C A A 4 8 3 3 2 のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 7 】

配列番号 12 は、抗体クローン 15 の成熟軽鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【 0 0 2 8 】

配列番号 13 は、抗体クローン 15 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 9 】

配列番号 14 は、抗体クローン 15 の C D R L 1 のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 0 】

配列番号 15 は、抗体クローン 15 の C D R L 2 のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 1 】

配列番号 16 は、抗体クローン 15 の C D R L 3 のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 2 】

配列番号 17 は、抗体クローン 15 の成熟重鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【 0 0 3 3 】

配列番号 18 は、抗体クローン 15 の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 4 】

配列番号 19 は、抗体クローン 15 の C D R H 1 のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 5 】

配列番号 20 は、抗体クローン 15 の C D R H 2 のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 6 】

配列番号 21 は、抗体クローン 15 の C D R H 3 のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 7 】

配列番号 22 は、ヒト M C A M ドメイン 1 (残基 1 9 ~ 1 2 9) のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 8 】

配列番号 23 は、ヒト M C A M ドメイン 2 (残基 1 3 9 ~ 2 4 2) のアミノ酸配列である。

【 0 0 3 9 】

配列番号 24 は、ヒト M C A M ドメイン 3 (残基 2 4 4 ~ 3 2 1) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 0 】

配列番号 25 は、ヒト M C A M ドメイン 4 (残基 3 5 5 ~ 4 2 4) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 1 】

配列番号 26 は、ヒト M C A M ドメイン 5 (残基 4 3 0 ~ 5 1 0) のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 2 】

配列番号 27 は、ヒトラミニン 4 1 1 の 4 - 鎖アイソフォームのアミノ酸配列である (受入番号 N P 0 0 1 0 9 8 6 7 6) 。

【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

50

配列番号 28 は、ヒトラミン 411 の 4 - 鎖アイソフォームのアミノ酸配列である (受入番号 CAA48332)。

【0044】

配列番号 29 は、抗体 1174.1.3 の成熟軽鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【0045】

配列番号 30 は、抗体 1174.1.3 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【0046】

配列番号 31 は、抗体 1174.1.3 の CDR L1 のアミノ酸配列である。

【0047】

配列番号 32 は、抗体 1174.1.3 の CDR L2 のアミノ酸配列である。

【0048】

配列番号 33 は、抗体 1174.1.3 の CDR L3 のアミノ酸配列である。

【0049】

配列番号 34 は、抗体 1174.1.3 の成熟重鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【0050】

配列番号 35 は、抗体 1174.1.3 の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【0051】

配列番号 36 は、抗体 1174.1.3 の CDR H1 のアミノ酸配列である。

【0052】

配列番号 37 は、抗体 1174.1.3 の CDR H2 のアミノ酸配列である。

【0053】

配列番号 38 は、抗体 1174.1.3 の CDR H3 のアミノ酸配列である。

【0054】

配列番号 39 は、抗体 1414.1.2 の成熟軽鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【0055】

配列番号 40 は、抗体 1414.1.2 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【0056】

配列番号 41 は、抗体 1414.1.2 の CDR L1 のアミノ酸配列である。

【0057】

配列番号 42 は、抗体 1414.1.2 の CDR L2 のアミノ酸配列である。

【0058】

配列番号 43 は、抗体 1414.1.2 の CDR L3 のアミノ酸配列である。

【0059】

配列番号 44 は、抗体 1414.1.2 の成熟重鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【0060】

配列番号 45 は、抗体 1414.1.2 の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【0061】

配列番号 46 は、抗体 1414.1.2 の CDR H1 のアミノ酸配列である。

【0062】

配列番号 47 は、抗体 1414.1.2 の CDR H2 のアミノ酸配列である。

【0063】

配列番号 48 は、抗体 1414.1.2 の CDR H3 のアミノ酸配列である。

【0064】

配列番号 49 は、抗体 1415.1.1 の成熟軽鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【0065】

10

20

30

40

50

- 配列番号 50 は、抗体 1415 . 1 . 1 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。
【0066】
配列番号 51 は、抗体 1415 . 1 . 1 の C D R L 1 アミノ酸配列である。
【0067】
配列番号 52 は、抗体 1415 . 1 . 1 の C D R L 2 アミノ酸配列である。
【0068】
配列番号 53 は、抗体 1415 . 1 . 1 の C D R L 3 アミノ酸配列である。
【0069】
配列番号 54 は、抗体 1415 . 1 . 1 の成熟重鎖可変領域をコードする核酸配列である。 10
【0070】
配列番号 55 は、抗体 1415 . 1 . 1 の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。
【0071】
配列番号 56 は、抗体 1415 . 1 . 1 の C D R H 1 のアミノ酸配列である。
【0072】
配列番号 57 は、抗体 1415 . 1 . 1 の C D R H 2 のアミノ酸配列である。
【0073】
配列番号 58 は、抗体 1415 . 1 . 1 の C D R H 3 のアミノ酸配列である。
【0074】
配列番号 59 は、抗体 1749 . 1 . 3 の成熟軽鎖可変領域をコードする核酸配列である。 20
【0075】
配列番号 60 は、抗体 1749 . 1 . 3 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。
【0076】
配列番号 61 は、抗体 1749 . 1 . 3 の C D R L 1 のアミノ酸配列である。
【0077】
配列番号 62 は、抗体 1749 . 1 . 3 の C D R L 2 のアミノ酸配列である。
【0078】
配列番号 63 は、抗体 1749 . 1 . 3 の C D R L 3 のアミノ酸配列である。
【0079】 30
配列番号 64 は、抗体 1749 . 1 . 3 の成熟重鎖可変領域をコードする核酸配列である。
【0080】
配列番号 65 は、抗体 1749 . 1 . 3 の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。
【0081】
配列番号 66 は、抗体 1749 . 1 . 3 の C D R H 1 のアミノ酸配列である。
【0082】
配列番号 67 は、抗体 1749 . 1 . 3 の C D R H 2 のアミノ酸配列である。
【0083】
配列番号 68 は、抗体 1749 . 1 . 3 の C D R H 3 のアミノ酸配列である。 40
【0084】
配列番号 69 は、抗体 2120 . 4 . 19 の成熟軽鎖可変領域をコードする核酸配列である。
【0085】
配列番号 70 は、配列番号 69 で示された抗体 2120 . 4 . 19 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。
【0086】
配列番号 71 は、抗体 2120 . 4 . 19 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。
【0087】
配列番号 72 は、抗体 2120 . 4 . 19 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。 50

【 0 0 8 8 】

配列番号 7 3 は、抗体 2 1 2 0 . 4 . 1 9 の C D R L 1 のアミノ酸配列である。

【 0 0 8 9 】

配列番号 7 4 は、抗体 2 1 2 0 . 4 . 1 9 の C D R L 2 のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 0 】

配列番号 7 5 は、抗体 2 1 2 0 . 4 . 1 9 の C D R L 3 のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 1 】

配列番号 7 6 は、抗体 2 1 2 0 . 4 . 1 9 の成熟重鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【 0 0 9 2 】

配列番号 7 7 は、抗体 2 1 2 0 . 4 . 1 9 の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 3 】

配列番号 7 8 は、抗体 2 1 2 0 . 4 . 1 9 の C D R H 1 のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 4 】

配列番号 7 9 は、抗体 2 1 2 0 . 4 . 1 9 の C D R H 2 のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 5 】

配列番号 8 0 は、抗体 2 1 2 0 . 4 . 1 9 の C D R H 3 のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 6 】

配列番号 8 1 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の成熟軽鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【 0 0 9 7 】

配列番号 8 2 は、配列番号 8 1 で示された抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 8 】

配列番号 8 3 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の成熟軽鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【 0 0 9 9 】

配列番号 8 4 は、配列番号 8 3 で示された抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 0 】

配列番号 8 5 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の C D R L 1 のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 1 】

配列番号 8 6 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の C D R L 2 のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 2 】

配列番号 8 7 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の C D R L 3 のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 3 】

配列番号 8 8 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の成熟重鎖可変領域をコードする核酸配列である。

【 0 1 0 4 】

配列番号 8 9 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 5 】

配列番号 9 0 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の C D R H 1 のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 6 】

配列番号 9 1 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の C D R H 2 のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 7 】

配列番号 9 2 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 の C D R H 3 のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 8 】

配列番号 9 3 は、抗体 1 7 4 9 . 1 . 3 の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 9 】

配列番号 9 4 は、ヒト化抗体 1 7 4 9 のバージョン 1 (V H 1) の成熟重鎖可変領域の

10

20

30

40

50

アミノ酸配列である。

【 0 1 1 0 】

配列番号 9 5 は、ヒト化抗体 1 7 4 9 のバージョン 2 (V H 2) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 1 】

配列番号 9 6 は、重鎖可変フレームワークドナー U 9 6 2 8 2 __ V H のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 2 】

配列番号 9 7 は、抗体 1 7 4 9 . 1 . 3 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 3 】

配列番号 9 8 は、ヒト化抗体 1 7 4 9 のバージョン 1 (V L 1) の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 4 】

配列番号 9 9 は、ヒト化抗体 1 7 4 9 のバージョン 2 (V L 2) の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 5 】

配列番号 1 0 0 は、軽鎖可変フレームワークドナー X 0 2 9 9 0 __ V L のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 6 】

配列番号 1 0 1 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 . 1 8 の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 7 】

配列番号 1 0 2 は、ヒト化抗体 2 1 0 7 のバージョン 1 (V H 1) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 8 】

配列番号 1 0 3 は、ヒト化抗体 2 1 0 7 のバージョン 2 (V H 2) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 9 】

配列番号 1 0 4 は、ヒト化抗体 2 1 0 7 のバージョン 3 (V H 3) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 0 】

配列番号 1 0 5 は、ヒト化抗体 2 1 0 7 のバージョン 4 A (V H 4 A) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 1 】

配列番号 1 0 6 は、ヒト化抗体 2 1 0 7 のバージョン 5 A (V H 5 A) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 2 】

配列番号 1 0 7 は、ヒト化抗体 2 1 0 7 のバージョン 6 (V H 6) のの成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 3 】

配列番号 1 0 8 は、重鎖可変フレームワークドナー A F 0 6 2 1 3 3 __ V H のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 4 】

配列番号 1 0 9 は、抗体 2 1 0 7 . 4 . 1 0 . 1 8 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 5 】

配列番号 1 1 0 は、ヒト化抗体 2 1 0 7 のバージョン 1 (V L 1) の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 6 】

配列番号 1 1 1 は、ヒト化抗体 2 1 0 7 のバージョン 2 (V L 2) の成熟軽鎖可変領域

10

20

30

40

50

のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 7 】

配列番号 1 1 2 は、ヒト化抗体 2 1 0 7 のバージョン 3 (V L 3) の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 8 】

配列番号 1 1 3 は、軽鎖可変フレームワークドナー U 8 6 8 0 3 のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 9 】

配列番号 1 1 4 は、抗体 2 1 2 0 . 4 . 1 9 . 6 の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

10

【 0 1 3 0 】

配列番号 1 1 5 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 1 (V H 1) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 1 】

配列番号 1 1 6 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 2 (V H 2) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 2 】

配列番号 1 1 7 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 3 (V H 3) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 3 】

20

配列番号 1 1 8 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 4 (V H 4) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 4 】

配列番号 1 1 9 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 5 (V H 5) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 5 】

配列番号 1 2 0 は、抗体 2 1 2 0 . 4 . 1 9 . 6 の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 6 】

配列番号 1 2 1 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 1 (V L 1) の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

30

【 0 1 3 7 】

配列番号 1 2 2 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 2 (V L 2) 成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 8 】

配列番号 1 2 3 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 3 (V L 3) 成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 3 9 】

配列番号 1 2 4 は、軽鎖可変フレームワークドナー X 8 4 3 4 3 _ V L のアミノ酸配列である。

40

【 0 1 4 0 】

配列番号 1 2 5 は、ヒト化重鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 1 】

配列番号 1 2 6 は、ヒト化重鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 2 】

配列番号 1 2 7 は、ヒト化重鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 3 】

配列番号 1 2 8 は、ヒト化重鎖 / 軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 4 】

配列番号 1 2 9 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

50

【 0 1 4 5 】

配列番号 1 3 0 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 6 】

配列番号 1 3 1 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 7 】

配列番号 1 3 2 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 8 】

配列番号 1 3 3 は、ヒト化重鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 4 9 】

配列番号 1 3 4 は、ヒト化重鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

10

【 0 1 5 0 】

配列番号 1 3 5 は、ヒト化重鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 5 1 】

配列番号 1 3 6 は、ヒト化重鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 5 2 】

配列番号 1 3 7 は、ヒト化重鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 5 3 】

配列番号 1 3 8 は、ヒト化重鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 5 4 】

配列番号 1 3 9 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 3 (V H 3) の C D R H 1 のアミノ酸配列である。

20

【 0 1 5 5 】

配列番号 1 4 0 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 4 (V H 4) の C D R H 1 のアミノ酸配列である。

【 0 1 5 6 】

配列番号 1 4 1 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 5 (V H 5) の C D R H 1 のアミノ酸配列である。

【 0 1 5 7 】

配列番号 1 4 2 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 5 8 】

配列番号 1 4 3 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

30

【 0 1 5 9 】

配列番号 1 4 4 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 6 0 】

配列番号 1 4 5 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 6 1 】

配列番号 1 4 6 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 6 2 】

配列番号 1 4 7 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 6 3 】

配列番号 1 4 8 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

40

【 0 1 6 4 】

配列番号 1 4 9 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 6 5 】

配列番号 1 5 0 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 6 6 】

配列番号 1 5 1 は、ヒト化抗体 2 1 0 7 のバージョン 1 (V H 1) の C D R H 1 のアミノ酸配列である。

【 0 1 6 7 】

配列番号 1 5 2 は、ヒト化抗体 2 1 0 7 のバージョン 4 (V H 4) の C D R H 1 のアミノ酸配列である。

50

ノ酸配列である。

【 0 1 6 8 】

配列番号 1 5 3 は、ヒト化抗体 2 1 2 0 のバージョン 1 ~ 5 (V H 1 ~ V H 5) の C D R H 3 のアミノ酸配列である。

【 0 1 6 9 】

配列番号 1 5 4 は、ヒト化軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 7 0 】

配列番号 1 5 5 は、ヒト化重鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 7 1 】

配列番号 1 5 6 は、ヒト化抗体 1 7 4 9 のバージョン 3 (V H 3) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。 10

【 0 1 7 2 】

配列番号 1 5 7 は、マウス重鎖可変領域の構造テンプレート P B D # 1 H I L V H のアミノ酸配列である。

【 0 1 7 3 】

配列番号 1 5 8 は、重鎖可変アクセプターフレームワーク A C C # A A X 8 2 4 9 4 . 1 のアミノ酸配列である。

【 0 1 7 4 】

配列番号 1 5 9 は、重鎖可変アクセプターフレームワーク A C C # A D X 6 5 6 7 6 . 1 のアミノ酸配列である。 20

【 0 1 7 5 】

配列番号 1 6 0 は、ヒト化抗体 1 7 4 9 のバージョン 3 (V L 3) の成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【 0 1 7 6 】

配列番号 1 6 1 は、マウス軽鎖可変領域の構造テンプレート P D B # 2 L T Q V L のアミノ酸配列である。

【 0 1 7 7 】

配列番号 1 6 2 は、軽鎖可変アクセプターフレームワーク A C C # A B A 7 1 4 0 7 . 1 のアミノ酸配列である。

【 0 1 7 8 】

配列番号 1 6 3 は、軽鎖可変アクセプターフレームワーク C A I 9 9 8 0 0 . 1 のアミノ酸配列である。 30

【 0 1 7 9 】

配列番号 1 6 4 は、成熟重鎖または成熟軽鎖の可変領域に融合することができる例となるシグナルペプチドをコードする核酸配列である。

【 0 1 8 0 】

配列番号 1 6 5 は、配列番号 1 6 4 の核酸配列によってコードされる例となるシグナルペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 8 1 】

配列番号 1 6 6 は、成熟重鎖または成熟軽鎖の可変領域に融合することができる例となるシグナルペプチドをコードする核酸配列である。 40

【 0 1 8 2 】

配列番号 1 6 7 は、配列番号 1 6 6 の核酸配列によってコードされる例となるシグナルペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 8 3 】

配列番号 1 6 8 は、成熟重鎖または成熟軽鎖の可変領域に融合することができる例となるシグナルペプチドをコードする核酸配列である。

【 0 1 8 4 】

配列番号 1 6 9 は、配列番号 : 1 6 8 の核酸配列によってコードされる例となるシグナルペプチドのアミノ酸配列である。 50

【0185】

配列番号170は、N末端でアルギニンを伴うヒト化1749軽鎖定常領域のアミノ酸配列である。

【0186】

配列番号171は、N末端でアルギニンを伴わないヒト化1749軽鎖定常領域のアミノ酸配列である。

【0187】

配列番号172は、ヒト化1749重鎖定常領域のアミノ酸配列である。

【0188】

配列番号173は、B I Pバージョンの重鎖G1m3アロタイプ定常領域のアミノ酸配列である。

10

【0189】

配列番号174は、B I Pバージョンの重鎖G1m3アロタイプ定常領域のアミノ酸配列である。

【0190】

配列番号175は、ヒト化抗体1749のバージョン3 (V L 3 + 軽鎖定常領域) の成熟軽鎖領域のアミノ酸配列である。

【0191】

配列番号176は、ヒト化抗体1749のバージョン3 (V H 3 + B I Pバージョンの重鎖G1m3アロタイプ定常領域) の成熟重鎖領域のアミノ酸配列である。

20

【0192】

配列番号177は、ヒト化抗体1749のバージョン3 (V H 3 + B I Pバージョンの重鎖G1m3アロタイプ定常領域) の成熟重鎖領域のアミノ酸配列である。

【0193】

配列番号178は、ヒト化抗体2107のバージョン4 B (V H 4 B) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【0194】

配列番号179は、ヒト化抗体2107のバージョン5 B (V H 5 B) の成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【0195】

30

定義

モノクローナル抗体は通常単離された形態で提供される。このことは、抗体は通常、少なくとも50% w/w 純粋なタンパク質及びその製造または精製から生じる他の高分子であるが、その使用を円滑にするように意図される、過剰量の薬学上許容可能なキャリアまたは他のビヒクルにモノクローナル抗体が組み合わせられる可能性を排除しないことを意味する。モノクローナル抗体は、少なくとも60%、70%、80%、90%、95または99% w/w 純粋なタンパク質と製造または精製に由来する他の高分子とであることがある。

【0196】

その標的抗原へのモノクローナル抗体の特異的な結合は、少なくとも 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、または 10^{10} M^{-1} の親和性を意味する。特異的な結合は検出可能に高い規模であり、少なくとも1つの無関係な標的に対して生じる非特異的な結合とは区別可能である。特異的な結合は、特定の官能基間での結合の形成または特定の空間適合（たとえば、鍵と鍵穴型）の形成の結果であり得るのに対して、非特異的な結合は普通、ファンデルワールス力の結果である。しかしながら、特異的な結合は、モノクローナル抗体が1つの標的に結合する及び1つの標的にしか結合しないことを必ずしも意味しない。

40

【0197】

抗体の基本的な構造単位はサブユニットの四量体である。各四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一の対を含み、各対は1つの「軽」鎖（約25 kDa）と1つの「重」鎖（約50~70 kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主として抗原認識に關与する約

50

100～110以上のアミノ酸の可変領域を含む。この可変領域は切断可能なシグナルペプチドに連結されて当初発現される。シグナルペプチドを持たない可変領域は成熟可変領域と呼ばれることがある。従って、たとえば、軽鎖成熟可変領域は軽鎖のシグナルペプチドを持たない軽鎖可変領域を意味する。各鎖のカルボキシ末端部分は主としてエフェクター機能に關与する定常領域を定義する。

【0198】

軽鎖はカップまたはラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類され、それぞれIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEとして抗体のアイソタイプを定義する。軽鎖及び重鎖の範囲内で、可変領域と定常領域は約12以上のアミノ酸の「J」領域によって接合され、重鎖は約10以上のアミノ酸の「D」領域も含む。(一般に、あらゆる目的でその全体が参照によって組み入れられるFundamental Immunology (Paul, W., 編, 第2版, Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7を参照のこと)。

【0199】

各軽鎖/重鎖の対の成熟可変領域は抗体結合部位を形成する。従って、インタクトな抗体は2つの結合部位を有する。二官能性または二重特異性の抗体を除いて、2つの結合部位は同一である。鎖はすべて、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって接合される相対的に保存されたフレームワーク領域(FR)の同一一般構造を示す。各対の2つの鎖に由来するCDRはフレームワーク領域によって調整されて特異的なエピトープへの結合を可能にする。N末端からC末端に向かって、軽鎖及び重鎖の双方はドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当てはKabats Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987及び1991), またはChothia及びLeskのJ. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothiaら, Nature, 342:878-883 (1989)の定義に従う。Kabatsはまた、異なる重鎖間または異なる軽鎖間での対応する残基には同じ番号が割り当てられる(たとえば、H83は成熟重鎖可変領域におけるKabatsの番号付けによる83位を意味し; 同様にL36位は成熟軽鎖可変領域におけるKabatsの番号付けによる36位を意味する、広く使用されている番号付け法(Kabatsの番号付け)も提供している。明白に言及されない限り、抗体の可変領域における位置を参照するには全体を通してKabatsの番号付けを使用する。

【0200】

用語「抗体」には、インタクトな抗体及びその抗原結合断片が含まれる。通常、別々の重鎖、軽鎖のFab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)₂C、二重抗体、Dabs、ナノ抗体、及びFvを含む断片は、標的に対する特異的な結合についてそれらが由来するインタクトな抗体と競合する。断片は、組換えDNA法、またはインタクトな免疫グロブリンの酵素的な若しくは化学的な分離によって作出することができる。

【0201】

用語「抗体」には、二重特異性抗体及び/またはキメラ抗体、及び/またはヒト化抗体も含まれる。二重特異性または二官能性の抗体は、2つの異なる重鎖/軽鎖の対及び2つの異なる結合部位を有する人工的なハイブリッド抗体である(たとえば、Songsilai及びLachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelnyら, J. Immunol. 148:1547-53 (1992)を参照のこと)。一部の二重特異性抗体では、2つの異なる重鎖/軽鎖の対は、ヒト化重鎖/軽鎖の対及び異なるエピトープに特異的な重鎖/軽鎖の対を含んでもよい。

【0202】

一部の二重特異性抗体では、一方の重鎖軽鎖の対は以下でさらに開示されるようなヒト化抗体であり、重鎖軽鎖対は、たとえば、インスリン受容体、インスリン様増殖因子(I

10

20

30

40

50

G F) 受容体、レプチン受容体またはリポタンパク質受容体、またはトランスフェリン受容体のような脳血管関門で発現される受容体に結合する抗体に由来する (Fridenら, PNAS, 88: 4771-4775, 1991; Fridenら, Science, 259: 373-377, 1993)。そのような二重特異性抗体は、受容体が介在するトランスサイトーシスによって脳血管関門を横切って移動することができる。二重特異性抗体を操作して脳血管関門の受容体への親和性を低下させることによって二重特異性抗体の脳での取り込みをさらに高めることができる。受容体への親和性の低下は脳におけるさらに広い分布を生じた (たとえば、Atwalら, Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yuら, Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2011を参照のこと)。

10

【0203】

例となる二重特異性抗体は、(1) 二重可変ドメイン抗体 (DVD-Ig) であることができ、その際、各軽鎖及び重鎖は短いペプチド結合を介して2つの可変ドメインを直列に含有し (Wuら, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig (商標)) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) 標的抗原のそれぞれに対して2つの結合部位を有する四価の二重特異性抗体を生じる2つの単鎖二重特異抗体の融合体であるタンデム二重特異抗体 (Tandab) であることができ; (3) 多価分子を生じる scFv と二重特異抗体との組み合わせであるフレキシボ
ディであることができ; (4) Fab s に適用すると異なる Fab 断片に連結された2つの同一の Fab 断片から成る三価の二重特異性の結合タンパク質を得ることができるタンパク質キナーゼAにおける二量体化及びドッキングドメインに基づいた、いわゆる「ドックアンドロック」分子であることができ; (5) たとえば、ヒトFc領域の両端に融合された2つの scFv を含むいわゆる、いわゆるスコープオン分子であることができる。二重特異性抗体を調製するのに有用なプラットフォームの例には、BiTE (Micromet)、DART (MacroGenics)、Fcab及びMab2 (F-star)、Fc-操作したIgG1 (Xencor) またはDuoBody (Fabアーム交換に基づく、Genmab) が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0204】

用語「エピトープ」は、抗体が結合する抗原における部位を指す。エピトープは、隣接するアミノ酸、または1以上のタンパク質の三次折り畳みによって並置される隣接しないアミノ酸から形成することができる。隣接するアミノ酸から形成されたエピトープは変性溶媒への曝露の際、通常保持されるのに対して、三次折り畳みによって形成されたエピトープは変性溶媒による処理の際、通常失われる。エピトープは通常、独特の空間構成にて少なくとも3、さらに普通では少なくとも5または8~10のアミノ酸を含む。エピトープの空間構成を決定する方法には、たとえば、X線結晶学及び二次元核磁気共鳴が挙げられる。たとえば、Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996) を参照のこと。

30

40

【0205】

「アンタゴニスト」抗体または他の結合作用因子は、それが結合する抗原の生物活性を阻害するものである。そのような抗体は実質的にまたは完全に抗原の生物活性を阻害する。

【0206】

MCAMに関する用語「生物活性」及び「生物学的に活性のある」は、そのリガンド (ラミニン 4鎖、たとえば、ラミニン411の 4鎖) を特異的に結合するその能力及び/またはMCAM発現細胞、たとえば、TH17細胞のCNSへの浸潤を促す能力を指す。

【0207】

50

「阻害する」は、少なくとも1つの標的、たとえば、MCAMの生物活性を低下させる作用因子を意味する。そのような阻害剤は、少なくとも1つの標的の活性を少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約95%または少なくとも約100%阻害する。

【0208】

「対象」には、予防上のまたは治療上の処置を受けるヒトまたは他の哺乳類の対象が含まれる。

【0209】

アミノ酸置換を保存的なものまたは非保存的なものとして分類する目的で、アミノ酸を以下のようにグループ分けする：グループI（疎水性側鎖）：met、ala、val、leu、ile；グループII（中性の親水性側鎖）：cys、ser、thr；グループIII（酸性側鎖）：asp、glu；グループIV（塩基性側鎖）：asn、gln、his、lys、arg；グループV（鎖配向に影響を与える残基）：gly、pro；及びグループVI（芳香族側鎖）：trp、tyr、phe。保存的置換には同一クラスにおけるアミノ酸間の置換が含まれる。非保存的置換はこれらのクラスの1つのメンバーを別クラスのメンバーと交換することに相当する。

【0210】

配列同一性の比率はKabattの番号付け法によって最大限並べられた抗体配列によって決定される。配列比較の後、対象抗体領域（たとえば、重鎖または軽鎖の成熟可変領域全体）が参照抗体の同じ領域と比較されているのであれば、対象抗体と参照抗体の領域の間での配列同一性比率は、ギャップは計数せずに2つの領域の並べられた位置の総数によって割られた対象及び参照の抗体領域双方における同一アミノ酸によって占められる位置の数であり、100を乗じて比率に変換する。

【0211】

1以上の引用された要素を「含む」組成物または方法は、具体的に引用されていない他の要素を含んでもよい。たとえば、抗体を含む組成物は抗体のみを含有してもよいし、または他の成分との組み合わせで抗体を含有してもよい。

【0212】

値の範囲の指定には、範囲の範囲内のまたは範囲を定義するすべての整数及び範囲の範囲内の整数によって定義される部分範囲のすべてが含まれる。

【0213】

文脈から明らかではない限り、用語「約」は言及される値の測定値の標準誤差（SEM）の範囲内の値を包含する。

【0214】

統計的有意性は $p < 0.05$ を意味する。

【0215】

I. 概要

ラミニン411のラミニン4鎖へのMCAMの結合を阻害する有用な特性を持つ抗体はWO/2012/170071及びPCT/US2013/058773にて開示されている。本出願は、とりわけ、(a)1749.1.3抗体の新規のヒト化形態を提供し、(b)1749.1.3抗体が結合するエピトープをマッピングし、(c)同じエピトープに結合する抗体を提供する。

【0216】

用語「1749.1.3」、「m1749」または「マウス1749」抗体は、配列番号93に相当する成熟可変重鎖と配列番号97に相当する成熟可変軽鎖を有するマウス由来のモノクローナル抗体のクローンを指す。「ヒト化1749」または「hu1749」は1749.1.3クローンのヒト化変異体を指す。配列番号156に相当する成熟重鎖可変領域と配列番号160に相当する成熟軽鎖可変領域を有する1749のヒト化変異体

10

20

30

40

50

は本明細書では「h u 1 7 4 9 V H 3 V L 3」と呼ばれる。

【0217】

II. 標的分子

天然のヒト野生型MCAM (CD146及びMUC18としても知られる黒色腫細胞接着分子) は以下のアミノ酸配列を有する646アミノ酸のペプチドである：

M G L P R L V C A F L L A A C C C C P R V A G V P G E A E Q P A P E L V E V E V
G S T A L L K C G L S Q S Q G N L S H V D W F S V H K E K R T L I F R V R Q G Q
G Q S E P G E Y E Q R L S L Q D R G A T L A L T Q V T P Q D E R I F L C Q G K R
P R S Q E Y R I Q L R V Y K A P E E P N I Q V N P L G I P V N S K E P E E V A T
C V G R N G Y P I P Q V I W Y K N G R P L K E E K N R V H I Q S S Q T V E S S G
L Y T L Q S I L K A Q L V K E D K D A Q F Y C E L N Y R L P S G N H M K E S R E
V T V P V F Y P T E K V W L E V E P V G M L K E G D R V E I R C L A D G N P P P
H F S I S K Q N P S T R E A E E E T T N D N G V L V L E P A R K E H S G R Y E C
Q A W N L D T M I S L L S E P Q E L L V N Y V S D V R V S P A A P E R Q E G S S
L T L T C E A E S S Q D L E F Q W L R E E T D Q V L E R G P V L Q L H D L K R E
A G G G Y R C V A S V P S I P G L N R T Q L V K L A I F G P P W M A F K E R K V
W V K E N M V L N L S C E A S G H P R P T I S W N V N G T A S E Q D Q D P Q R V
L S T L N V L V T P E L L E T G V E C T A S N D L G K N T S I L F L E L V N L T
T L T P D S N T T T G L S T S T A S P H T R A N S T S T E R K L P E P E S R G V
V I V A V I V C I L V L A V L G A V L Y F L Y K K G K L P C R R S G K Q E I T L
P P S R K T E L V V E V K S D K L P E E M G L L Q G S S G D K R A P G D Q G E K
Y I D L R H (配列番号11) (受入番号AAA20922.1 (CAA48332) の
もとでのGenBankデータベース)。MCAMは、細胞接着、及び血管組織の細胞間
接合部での内皮単層の接着に関与する免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞表
面の糖タンパク質である。それはまた、黒色腫及び前立腺癌を含む固形腫瘍のような多数
の癌の腫瘍進行も促進する。それは同型/同種親和性で相互作用することが知られており
、他のリガンドにも結合し得る。ヒトMCAMには、配列番号22～26として示される
5つの免疫グロブリンドメイン (1：アミノ酸残基19～129；2：アミノ酸残基13
9～242；3：アミノ酸残基244～321；4：アミノ酸残基335～424；及び
5：アミノ酸残基430～510) が含まれる。

【0218】

文脈から明らかではない限り、MCAMまたはその断片への参照には、上記で示された天然のヒト野生型アミノ酸配列及びそのヒト対立遺伝子変異体が含まれる。

【0219】

ラミニン 4はラミニン分子に見いだされるポリペプチド鎖の1つを指し、それは、ほとんどの細胞及び組織にとってタンパク質ネットワークの基盤である (基底膜の) 基底板にて発現される。ラミニンは原形質膜分子を介して細胞膜に結合し、細胞の接着に寄与することが知られている。ラミニン 4鎖は通常、ラミニン 鎖及びラミニン 鎖と共に複合体を形成する。ラミニン 4鎖は、ラミニン411 (ラミニン8または 4 1 1) ; ラミニン421 (ラミニン9または 4 2 1)、及びラミニン423 (ラミニン1 4または 4 2 3) を含む多数のラミニン分子で見いだされる。ヒトラミニン 4鎖には2つの主なアイソフォームがある：GenBank受入番号NP001098676及びCAA48332 (配列番号27及び28)。「ラミニン411」は3つのポリペプチドのサブユニットまたは鎖： 4鎖、 1鎖及び 1鎖で構成される三量体ポリペプチド複合体を指す。

【0220】

MCAMに対するアンタゴニストには、抗体、IgG定常領域に対する受容体またはリガンドの融合タンパク質、他の生物結合分子、及び小分子が挙げられる。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであることができる。抗体は、たとえば、マウス若しくはラット、非ヒト霊長類のような非ヒト性であることができ、またはヒト性であることができ

る。抗体はキメラ抗体、ペニヤ化抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体等であることができる。

【0221】

M C A M アンタゴニストは、M C A M の (i) そのリガンド：ラミニン 4 鎖、たとえば、ラミニン 4 1 1 の 4 鎖を特異的に結合する能力、及び / または (i i) M C A M 発現細胞、たとえば、T H 1 7 細胞が対象の組織に浸潤するまたは移動するのを促す能力を完全にまたは部分的に阻害するアンタゴニストを指す。M C A M アンタゴニストには、M C A M またはそのリガンドラミニンアルファ 4 に結合する抗体または他のアンタゴニストが挙げられる。

【0222】

I I I . 抗体

A . 抗 M C A M 抗体 1 7 4 9 のヒト化形態

ヒト化抗体は、非ヒト「ドナー」抗体に由来する C D R がヒトの「アクセプター」抗体配列に移植される遺伝子操作された抗体である (たとえば、Q u e e n ら , U S 5 , 5 3 0 , 1 0 1 及び U S 5 , 5 8 5 , 0 8 9 ; W i n t e r ら , U S 5 , 2 2 5 , 5 3 9 ; C a r t e r , U S 6 , 4 0 7 , 2 1 3 ; A d a i r , U S 5 , 8 5 9 , 2 0 5 及び U S 6 , 8 8 1 , 5 5 7 ; 及び F o o t e , U S 6 , 8 8 1 , 5 5 7 を参照のこと)。アクセプター抗体配列は、たとえば、ヒト抗体成熟可変領域配列、そのような配列の複合物、ヒト抗体可変領域配列のコンセンサス配列 (たとえば、K a b a t の軽鎖及び重鎖の可変領域コンセンサス配列、1 9 9 1 上記)、または生殖系列細胞の可変領域配列であることができる。

【0223】

重鎖のアクセプター配列の例は、N C B I 受入コード A A X 8 2 4 9 4 . 1 (G I : 6 2 4 2 1 4 6 1) 及び / または A D X 6 5 6 7 6 . 1 (G I : 3 2 3 4 3 2 0 7 3) を持つヒトの成熟重鎖可変領域である。好ましくは、これらのアクセプターの複合物が本実施例と同様に使用される。重鎖可変領域フレームワークにおいて m 1 7 4 9 重鎖と A A X 8 2 4 9 4 . 1 は 9 1 % の配列同一性を有し、A D X 6 5 6 7 6 . 1 は 8 3 % の配列同一性を有するので、これらのアクセプター配列には、同一の規定形態と捻じれた (k i n k e d) 塩基を持つ同じ長さの C D R - H 3 とを有する 2 つの C D R が含まれる。軽鎖については、アクセプター配列の例は、N C B I 受入コード A B A 7 1 4 0 7 . 1 (G I : 7 7 3 7 9 5 0 2) 及び / または C A I 9 9 8 0 0 . 1 (G I : 9 8 9 5 6 3 2 4) を持つ軽鎖成熟可変領域である。好ましくは、これらの配列の複合物が本実施例と同様に使用される。軽鎖可変領域フレームワークにて m 1 7 4 9 軽鎖と A B A 7 1 4 0 7 . 1 が 8 5 % の配列同一性を有し、C A I 9 9 8 0 0 . 1 が 8 3 % の配列同一性を有するので、これらのアクセプター配列には同じ規定形態を有する 3 つの C D R が含まれる。

【0224】

本発明は、ドナー m 1 7 4 9 抗体に完全にまたは実質的に由来する K a b a t によって定義されたような 3 つの軽鎖 C D R 及び 3 つの重鎖 C D R と、存在するならば、ヒトの抗体配列に完全にまたは実質的に由来する成熟可変領域フレームワーク配列及び定常領域とを有するヒト化抗体を提供する。同様に、ヒト化された重鎖は、m 1 7 4 9 抗体の重鎖に完全にまたは実質的に由来する K a b a t によって定義されたような 3 つの重鎖 C D R と、存在するならば、ヒトの抗体重鎖配列に完全にまたは実質的に由来する成熟重鎖可変配列及び重鎖定常領域配列とを有する重鎖である。同様にヒト化された軽鎖は、m 1 7 4 9 抗体の軽鎖に完全にまたは実質的に由来する K a b a t によって定義されたような 3 つの軽鎖 C D R と、存在するならば、ヒトの抗体軽鎖配列に完全にまたは実質的に由来する成熟軽鎖可変配列及び軽鎖定常領域配列とを有する軽鎖である。一部の抗体は、配列番号 6 6 の K a b a t の C D R 1 : S Y I M S ; 配列番号 6 7 の K a b a t の C D R 2 : T I S S G G S S T Y Y P D S V K G ; 配列番号 6 8 の K a b a t の C D R 3 : D D D Y D V K V F A Y を含むヒト化された重鎖を含む。一部の抗体は、配列番号 6 1 の K a b a t の C D R 1 : K S S R S L L N S R I R K N Y L A ; 配列番号 6 2 の K a b a t の C D R 2 :

W A S T R E S ; 配列番号 63 の K a b a t の C D R 3 : K Q S Y N L L T を含むヒト化された軽鎖を含む。一部の抗体は、配列番号 66、67 及び 68 の 3 つの K a b a t の C D R を含むヒト化された重鎖と、配列番号 61、62 及び 63 の 3 つの K a b a t の C D R を含むヒト化された軽鎖とを含む。C H R H 2 の K a b a t の 60 ~ 65 位が置換され得ることを除いて、残基の少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % が m 1 7 4 9 の対応する C D R における対応する残基と同一であるならば、C D R は実質的に m 1 7 4 9 に由来する。抗体鎖の成熟可変領域フレームワーク配列及び抗体鎖の定常領域配列は、K a b a t によって定義される対応する残基の少なくとも 85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % が同一である場合、それぞれヒトの成熟可変領域フレームワーク配列またはヒトの定常領域配列に実質的に由来する。

10

【0225】

ヒトの成熟可変領域フレームワーク残基に由来する特定のアミノ酸は、幾つかある理由の中で特に、C D R の構造及び / または抗原への結合、重鎖と軽鎖の間の相互作用の介在をすること、定常領域との相互作用、所望のまたは所望ではない翻訳後修飾の部位であること、ヒト可変領域配列のその位置では稀な残基なので潜在的に免疫原性であることに対する考えられる影響に基づいて置換について選択することができる。以下の 6 つの可変領域フレームワークの位置 (D 9 S、A 1 9 V、P 4 3 S、Q 3 K、G 4 2 E、A 9 3 T) は、実施例でさらに特定されるようにこれらの理由の 1 以上についての置換の候補と見なされた。

20

【0226】

他のどこでも同じようにここで、最初に述べた残基はヒトのアクセプターフレームワークに K a b a t の C D R を移植することによって形成されるヒト化抗体の残基であり、二番目に述べた残基はそのような残基を置き換えるために検討される残基である。従って、可変領域フレームワークの範囲内で最初に述べた残基はヒト由来であり、C D R の範囲内で最初に述べた残基はマウス由来である (たとえば、C 9 7 S)。

【0227】

C D R においてアミノ酸置換を行うことができる。考えられる変異の 1 つは、m 1 7 4 9 抗体の C D R における特定の残基を、ヒトの C D R 配列に由来する、通常、例となるヒト化抗体を設計するのに使用されるヒトアクセプター配列の C D R に由来する対応する残基によって置換することである。一部の抗体では、C D R の一部のみ、すなわち、S D R と呼ばれる結合に必要とされる C D R 残基のサブセットのみがヒト化抗体にて結合を保持するのに必要とされる。抗原に接触しない及び S D R 内にない C D R 残基は、以前の研究 (たとえば、C D R H 2 における残基 H 6 0 ~ H 6 5 は必要とされないことが多い) に基づいて、C h o t h i a の超可変ループ (C h o t h i a, J. Mol. Biol. 196 : 901, 1987) の外にある K a b a t の C D R の領域から、分子モデル化によって及び / または経験的に、または G o n z a l e s ら, Mol. Immunol. 41 : 863, 2004 にて記載されたように、特定することができる。そのようなヒト化抗体では、1 以上のドナー C D R 残基が存在しない、またはドナー C D R 残基全体が省略される位置で、その位置を占めるアミノ酸はアクセプター抗体配列における対応する位置 (K a b a t の番号付けによる) を占めるアミノ酸であることができる。含めるための C D R におけるドナーアミノ酸のためのアクセプターのそのような置換の数は競合する考慮すべき事柄のバランスを反映する。そのような置換は、ヒト化抗体におけるマウスのアミノ酸の数を減らすことにおいて、及びその結果潜在的な免疫原性を減らすことにおいて潜在的に有利である。しかしながら、置換は親和性の変化を引き起こすこともでき、親和性の有意な低下は好ましくは回避される。C D R 内の置換の位置及び置換するアミノ酸も経験に基づいて選択されることができる。

30

40

【0228】

C D R 内で置換を行う理由の 1 つは、マウス残基が抗体の発現または集合を妨害し得る翻訳後修飾の部位であることである。

50

【0229】

本発明は、ヒト化重鎖成熟可変領域が配列番号156に対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を示し、及びヒト化軽鎖成熟可変領域が配列番号160に対して少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を示すヒト化1749抗体の変異体を提供する。一部のそのようなヒト化抗体には、マウスのドナー抗体のそれと同じである、h u 1 7 4 9のCDR領域に対して完全にまたは実質的に同一である3つの重鎖CDRと3つの軽鎖CDRが含まれる。CDR領域は、任意の従来の定義（たとえば、Chothia）によって定義することができるが、好ましくはKabattによって定義されたとおりである。

【0230】

ヒト化重鎖成熟可変領域が配列番号156であり、及びヒト化軽鎖成熟可変領域が配列番号160であるヒト化1749抗体は、1749VH3VL3と呼ばれる。ヒト化1749VH3VL3の一部の変異体はh u 1 7 4 9 V H 3 V L 3における逆突然変異の一部またはすべてを保持する。言い換えれば、以下の少なくとも1、2、3、4、5または好ましくは6すべてが存在し：H3はKによって占められ、H42はEによって占められ、H93はTによって占められ、L9はSによって占められ、L19はVによって占められ、及びL43はSによって占められる。

【0231】

h u 1 7 4 9 V H 3 V L 3の逆突然変異の少なくとも1、2、3、4、5または好ましくは6すべてを保持することに加えて、ヒト化1749抗体は可変領域フレームワークにおいても追加の逆突然変異も含有してもよい。そのような逆突然変異の例には、Dによって占められたH1、Dによって占められたH10、Kによって占められたH13、Kによって占められたH19、Aによって占められたH113、Sによって占められたL5、Aによって占められたL15、Kによって占められたL18、Mによって占められたL21、Tによって占められたL63、Vによって占められたL78、Lによって占められたL83、Aによって占められたL100、Lによって占められたL104、及び/またはLによって占められたL106が挙げられる。治療用製品または診断用製品のための逆突然変異の選択については、それらが一般に親和性を改善しない程度及びさらに多くのマウス残基を導入することが免疫原性の高いリスクを生じ得る程度を考慮に入れるべきである。

【0232】

上記抗体のいずれかでは、成熟可変領域フレームワークにて、たとえば、CDRに接触しない残基にて他のアミノ酸置換を行うことができる。変異体ヒト化配列で行われる置換は、置換されたアミノ酸に関して保存性があることが多い。

【0233】

B．定常領域の選択

キメラ抗体、ペニヤ化抗体またはヒト化抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域はヒトの定常領域の少なくとも一部と連結することができる。定常領域の選択はある程度、抗体依存性細胞介在性細胞傷害性、抗体依存性細胞性貪食作用及び/または補体依存性細胞傷害性が所望であるかどうかによって左右される。たとえば、ヒトのアイソタイプIgG1及びIgG3は補体依存性細胞傷害性を有し、ヒトのアイソタイプIgG2及びIgG4は有さない。ヒトのIgG1及びIgG3はヒトのIgG2及びIgG4よりも強力な細胞介在性のエフェクター機能も誘導する。軽鎖定常領域はラムダまたはカッパであることができる。

【0234】

軽鎖及び/または重鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端における1または数個のアミノ酸、たとえば、重鎖のC末端リジンは、ある割合の分子でまたはすべての分子で欠けていてもよく、または誘導体化されてもよい。定常領域にて置換を行って補体依存性細胞傷害性若しくはADCCのようなエフェクター機能を増減することができ（たとえば、Winterら，米国特許第5,624,821号；Tsoraら，米国特許第5,834,597号；及びLazarら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 4005, 2006を参照のこと）、またはヒトにおける半減期を延長することができる（

10

20

30

40

50

たとえば、Hintonら, J. Biol. Chem. 279:6213, 2004を参照のこと)。例となる置換には、抗体の半減期を増やすための250位でのGln及び/または428位でのLeuが挙げられる(この段落では定常領域についてEU番号付けを使用する)。234位、235位、236位及び/または237位のいずれかまたはすべてにおける置換は、Fc受容体、特にFcRI受容体についての親和性を低下させる(たとえば、US6,624,821を参照のこと)。エフェクター機能を低下させるには、ヒトIgG1の234位、235位及び237位におけるアラニン置換を使用することができる。一部の抗体は、エフェクター機能を低下させるためにヒトIgG1の234位、235位及び237位にてアラニン置換を有する。任意で、ヒトIgG2の234位、236位及び/または237位をアラニンによって置換し、235位をグルタミンによって置換する(たとえば、US5,624,821を参照のこと)。一部の抗体では、ヒトIgG1のEU番号付けによる241位、264位、265位、270位、296位、297位、322位、329位、及び331位の1以上における変異を使用する。一部の抗体では、ヒトIgG1のEU番号付けによる318位、320位及び322位の1以上における変異を使用する。一部の抗体では、234位及び/または235位がアラニンによって置換され、及び/または329位がグリシンによって置換される。一部の抗体では、配列番号174におけるように234位及び235位がアラニンによって置換される。一部の抗体では、アイソタイプはヒトのIgG2またはIgG4である。例となるヒト軽鎖カッパ定常領域は配列番号170のアミノ酸配列を有する。配列番号170のN末端アルギニンは省略することができ、その場合、軽鎖カッパ定常領域は配列番号171のアミノ酸配列を有する。例となるヒトIgG1重鎖定常領域は配列番号172のアミノ酸配列を有する(C末端リジンを伴ってまたは伴わずに)。抗体は、2つの軽鎖及び2つの重鎖を含有する四量体として、別々の重鎖、軽鎖として、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFvとして、または重鎖及び軽鎖の成熟可変ドメインがスパーサーを介して連結される単鎖抗体として発現され得る。

【0235】

ヒトの定常領域は、様々な個体間でアロタイプ変異及びイソアロタイプ変異を示し、すなわち、定常領域は1以上の多型位置で様々な個体にて異なることができる。イソアロタイプは、イソアロタイプを認識する血清は1以上の他のアイソタイプの非多型領域に結合するという点でアロタイプとは異なる。従って、たとえば、別の重鎖定常領域はIgG1 G1m3アロタイプものであり、配列番号173のアミノ酸配列を有する。別の重鎖定常領域は、それがC末端リジンを欠くことを除いて配列番号173のアミノ酸配列を有する。別の重鎖定常領域は、配列番号174のアミノ酸配列を有する。さらに別の重鎖定常領域は、それがC末端リジンを欠くことを除いて配列番号174のアミノ酸配列を有する。

【0236】

本発明はさらに、上記定常領域のいずれかをコードする核酸を提供する。任意で、そのような核酸はさらにシグナルペプチドをコードし、定常領域に連結されたシグナルペプチドと共に発現され得る。

【0237】

C. 組換え抗体の発現

抗体を組換え発現によって作出することができる。抗体をコードする核酸は、所望の細胞型(たとえば、CHOまたはSp2/0)における発現のためにコドン最適化することができる。組換え核酸の構築物には通常、天然に会合したまたは異種のプロモータ領域を含む、抗体鎖のコーディング配列に操作可能に連結される発現制御配列が含まれる。発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換するまたはそれに形質移入することが可能であるベクターにおける真核細胞のプロモータ系であることができる。ベクターはいったん適当な宿主に組み込まれると、宿主は、ヌクレオチド配列の高レベル発現、及び交差反応する抗体の回収と精製に好適な条件下で維持される。抗体鎖をコードするベクター(単数)またはベクター(複数)は、たとえば、ジヒドロ葉酸還元酵素のような選択可能な遺伝子を

含有して抗体鎖をコードする核酸のコピー数の増幅を可能にすることもできる。

【0238】

大腸菌は、抗体、特に抗体断片を発現させるのに特に有用な原核細胞宿主である。酵母のような微生物も発現に有用である。サッカロミセスは、所望のような発現制御配列、複製開始点、終結配列等を有する好適なベクターを伴った、酵母宿主の一例である。典型的なプロモータには3-ホスホグリセリン酸キナーゼ及び他の糖分解酵素が含まれる。誘導性の酵母プロモータには、とりわけ、アルコール脱水素酵素、イソチトクロームC、及びマルトースやガラクトースの利用に關与する酵素に由来するプロモータが挙げられる。

【0239】

哺乳類細胞は免疫グロブリンまたはその断片をコードするヌクレオチド断片を発現させるのに使用することができる。Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987)を参照のこと。インタクトな異種タンパク質を分泌することが可能である多数の好適な宿主細胞株が当該技術で開発されており、それには、CHO細胞株、種々のCOS細胞株、HeLa細胞、HEK293細胞、L細胞、及びSp2/0やNS0を含む抗体を産生しない骨髓腫が挙げられる。非ヒト細胞を使用することが有利であり得る。これらの細胞のための発現ベクターは、たとえば、複製開始点、プロモータ、エンハンサのような発現制御配列(Queenら, Immunol. Rev. 89:49(1986))、及び、たとえば、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終結配列のような必要なプロセッシング情報部位を含むことができる。好適な発現制御配列は、内在性遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス等に由来するプロモータである。Corra, J. Immunol. 148:1149(1992)を参照のこと。

【0240】

抗体の重鎖及び軽鎖をコードするベクターを細胞培養物に導入して、無血清培地における増殖生産性及び産物の質について細胞プールをスクリーニングすることができる。次いで最も生産性の高い細胞プールをFACSに基づく単一細胞クローニングに供してモノクローナル株を生成することができる。培養物のL当たり7.5gを超える産物タイターに相当する1日当たり細胞当たり50pgまたは100pgを上回る特定の生産性が有利であり得る。単一細胞クローンによって産生された抗体を、濁度、濾過特性、PAGE、IEF、UV走査、HPSEC、炭水化物/オリゴ糖マッピング、質量分光法、及び、たとえば、ELISAまたはBiacoreのような結合アッセイについて調べることもできる。次いで選択されたクローンを複数のバイアルに貯め、その後の使用のために凍結保存することができる。

【0241】

いったん発現されると、プロテインA捕捉、カラムクロマトグラフィ(たとえば、疎水性相互作用またはイオン交換)、ウイルス不活化用の低pH等を含む、当該技術の標準手順(一般にScopes, Protein Purification(Springer-Verlag, NY, 1982)を参照のこと)に従って抗体を精製することができる。

【0242】

コドンの最適化、プロモータ、転写要素及びターミネータの選択、無血清单一細胞クローニング、細胞バンク、コピー数の増幅のための選択マーカーの使用、CHOターミネータ、無血清单一細胞クローニング、タンパク質タイターの改善を含む抗体の商業的な製造の方法(たとえば、US5,786,464、US5,888,809、US6,063,598、US6,114,148、US7,569,339、WO2004/050884、WO2005/019442、WO2008/012142、WO2008/012142、WO2008/107388及びWO2009/027471を参照のこと)。

【0243】

D. 核酸

本発明はさらに、上述の重鎖及び軽鎖のいずれかをコードする核酸を提供する。通常、核酸は成熟の重鎖及び軽鎖に融合されたシグナルペプチドもコードする（たとえば、配列番号164、166及び168によってコードされ得る配列番号165、167及び169のアミノ酸配列を有するシグナルペプチド）。核酸におけるコーディング配列は、コーディング配列の発現を確保する調節性配列、たとえば、プロモータ、エンハンサ、リボソーム結合部位、転写終結シグナル等と操作可能な連結状態にあることができる。重鎖及び軽鎖をコードする核酸は単離された形態で存在することができ、または1以上のベクターにクローニングすることができる。核酸は、たとえば、重複するオリゴヌクレオチドの固相合成またはPCRによって合成することができる。重鎖及び軽鎖をコードする核酸は、たとえば、発現ベクターの中で1つの隣接する核酸として連結することができ、または、分離して、たとえばそれ自体の発現ベクターにクローニングすることができる。

【0244】

E. 抗体結合のためのMCAMエピトープの性状分析及びそれに結合する抗体の生成

1. 抗体結合のためのMCAMエピトープ

本発明は、ヒトMCAMタンパク質の中での特定のエピトープに結合するモノクローナル抗体を提供する。本発明の一部の抗体は1749.1.3(m1749)と名付けられた抗体と同じまたは重複するエピトープに結合する。

【0245】

本発明は、m1749と名付けられた抗体と同じまたは重複するエピトープに結合する抗体を提供する。MCAMの残基272、318、320、340及び377での変異は、m1749の特異的な結合を妨害する（たとえば、実施例として記載されるように陽性対照の野生型MCAMと比べて変異MCAMに対する<30%の結合）。相対的に少ない残基が結合に影響し、残基は典型的な線状のエピトープ（たとえば、3~20の隣接したアミノ酸）よりも広く間隔を空けているので、これらの結果はm1749が立体構造エピトープに結合するという指摘を提供する。或いは、結合に影響を及ぼす残基の1以上は抗体と直接接触しないのでそのようにアロステリックであって良い。

【0246】

MCAMの残基272、318、320、324、326、340及び377の1以上を含むエピトープに、特に残基318、324及び326の1以上を含むエピトープに結合する抗体は、有用な阻害特性をm1749と共有すると思われる。従って、その特異的な結合がMCAMの残基318、324及び326の1以上、特に残基318の変異誘発によって阻害される抗体は、m1749に類似する特性を共有と思われる。一部のそのような抗体は、MCAMの残基318、324及び/または326を含むまたはそれから成るエピトープに結合する。エピトープは、たとえば、特定のアミノ酸（318、324及び326）の1、2若しくは3を含むエピトープ（たとえば、2~5、3~5、3~10、3~15、3~20、5~10、5~15、5~20、5~30、5~40、5~50、5~60、または5~70の隣接するアミノ酸）のような線状であることができ、または特定のアミノ酸の1、2若しくは3を含むまたはそれから成る立体構造であることができる。

【0247】

2. 特定のMCAMエピトープを結合する抗体の生成

本発明の一部の抗体はm1749抗体と同じまたは重複するエピトープに結合する。ヒトMCAMに対する他の非ヒトモノクローナル抗体、たとえば、マウス、モルモット、霊長類、ウサギまたはラットのモノクローナル抗体の作出は、たとえば、ヒトMCAMまたは所望のエピトープ（免疫原）を含むそのペプチド断片で動物を免疫し、任意でm1749との競合にてMCAMへの結合について得られた抗体をスクリーニングすることによって達成することができる（あらゆる目的で参照によって組み入れられるHarlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSP NY, 1988)を参照のこと）。任意で、免疫原をキャリア分子に抱合する。任意

10

20

30

40

50

で、免疫原をアジュバントと共に投与する。以下に記載されるように幾つかの型のアジュバントを使用することができる。実験動物の免疫には不完全アジュバントがその後続く完全フロイントアジュバントが好まれる。ウサギまたはモルモットは通常ポリクローナル抗体を作製するのに使用される。マウスは通常モノクローナル抗体を作製するのに使用される。抗体は、M C A M内での所望のエピトープに対する特異的な結合についてスクリーニングされる。

【0248】

本発明は、上述のエピトープに向けられた抗体を創り出すのに使用されるM C A Mのペプチド断片を提供する。そのようなペプチドの例には、長さ2～5、3～5、3～10、3～15、3～20、5～10、5～15、5～20、5～30、5～40、5～50、5～60、または5～70の間の隣接するアミノ酸であるペプチドが挙げられ、それにはM C A Mのアミノ酸残基318、324及び326の少なくとも1つが含まれる。これらのペプチドの一部では、ペプチドにはアミノ酸残基318、324及び326の3つすべてが含まれる。

【0249】

免疫原はキャリア分子、通常、キャリアポリペプチドに抱合されてもよいので、キャリアに抱合された断片に対する免疫応答を引き出すのに役立つ。単一の作用因子を単一のキャリアに連結することができ、複数コピーの作用因子を複数コピーのキャリアに連結することができ、それは次々に互いに連結され、複数コピーの作用因子を単一コピーのキャリアに連結することができ、または単一コピーの作用因子を複数コピーのキャリアまたは異なるキャリアに連結することができる。好適なキャリアには、血清アルブミン、スカシガイのヘモシアニン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、卵白アルブミン、破傷風毒素、または、たとえば、ジフテリア（たとえば、CRM₁₉₇）、大腸菌、コレラ、ピロリ菌のような他の病原性細菌に由来する毒素、または弱毒化毒素誘導体が挙げられる。

【0250】

免疫原は薬学上許容可能なアジュバントと共に投与されることが多い。アジュバントは、ペプチドが単独で使用された状況に比べて誘導される抗体の力価を高め、及び/または誘導される抗体の結合親和性を高める。M C A Mの免疫原性断片と組み合わせて種々のアジュバント使用し、免疫応答を引き出すことができる。好まれるアジュバントは応答の定性的形態に影響を与える免疫原に構造変化を生じさせることなく免疫原に対する内在性の応答を増強する。好まれるアジュバントには、水酸化アルミニウム及びリン酸アルミニウム、3De-O-アシル化モノホスホリル脂質A（MPL（商標））（GB2220211（RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, 現在Corixaの一部を参照）が挙げられる。Stimulon（商標）QS-21は南アメリカで見いだされる樹木Quillaja Saponaria Molinaの樹皮から単離されるトリテルペングリコシドまたはサポニンである（Kensilら、in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach（eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995）；US5,057,540を参照のこと）、（Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA；現在Antigenics, Inc., New York, NY）。他のアジュバントは、任意で、モノホスホリル脂質A（Stouteら、N. Engl. J. Med. 336, 86-91（1997）を参照のこと）、プロニックポリマー及び殺傷マイコバクテリアウムのような免疫刺激剤と組み合わせた水中油エマルジョン（たとえば、スクアレンまたはピーナッツ油）である。別のアジュバントはCpG（WO98/40100）である。アジュバントは、活性剤を伴った治療用組成物の成分として投与することができ、または治療剤の投与の前に、それと同時に、若しくはその後別に投与することができる。

【0251】

3. 抗体の種類

抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであることができる。抗体は、たとえば、

マウスまたはラット、非ヒト霊長類のような非ヒト抗体であることができ、またはヒトの抗体であることができる。抗体はキメラ抗体、ベニヤ化抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体等であることができる。

【0252】

モノクローナル抗体は上述の方法及びQueen, US 5, 530, 101及び5, 585, 089; Winter, US 5, 225, 539; Carter, US 6, 407, 213; Adair, US 5, 859, 205、6, 881, 557; Foote, US 6, 881, 557にて記載された方法を用いてヒト化される。

【0253】

本発明はさらに、上述のMCAMエピトープに特異的に結合する非ヒト抗体のキメラ形態及びベニヤ化形態を提供する。

10

【0254】

キメラ抗体は、非ヒト抗体（たとえば、マウス）の軽鎖及び重鎖の成熟可変領域がヒトの軽鎖及び重鎖の定常領域と組み合わせられる抗体である。そのような抗体は実質的にまたは完全にマウス抗体の結合特異性を保持し、約3分の2がヒトの配列である。

【0255】

ベニヤ化抗体は、通常、非ヒト抗体のCDRの一部と非ヒト可変領域フレームワークの一部を保持するが、B細胞若しくはT細胞のエピトープに寄与し得る他の可変領域フレームワーク残基、たとえば、ヒト抗体配列の相当する位置に由来する残基に接触する残基を置き換えるヒト化抗体の一種である(Padlan, Mol. Immunol. 28: 489, 1991)。結果は、CDRが完全にまたは実質的に非ヒト抗体に由来し、非ヒト抗体の可変領域フレームワークが置換によってさらにヒト様にされる抗体である。

20

【0256】

MCAMに対するヒト抗体は以下で記載される種々の技法によって提供される。一部のヒト抗体は、実施例で記載されるマウスモノクローナル抗体の1つのような特定のマウス抗体と同じエピトープ特異性を有するように、競合結合実験によって、Winterの、上記のまたはほかのファージディスプレイ法によって選択される。標的抗原としてのMCAMの断片のみを用いることによって、及び/またはMCAMの欠失変異の回収に対して抗体をスクリーニングすることによって特定のエピトープ特異性についてヒト抗体をスクリーニングすることもできる。

30

【0257】

ヒト抗体の製造方法には、Oestbergら、Hybridoma, 2: 361-367 (1983); Oestberg, 米国特許第4, 634, 664号; 及びEnglemanら, US特許第4, 634, 666号のトリオーマ法、ヒトの免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックマウスの使用(たとえば、Lonbergら、WO93/12227 (1993); US 5, 877, 397、US 5, 874, 299、US 5, 814, 318、US 5, 789, 650、US 5, 770, 429、US 5, 661, 016、US 5, 633, 425、US 5, 625, 126、US 5, 569, 825、US 5, 545, 806、Nature, 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology, 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO91/10741 (1991)を参照のこと)、及びファージディスプレイ法(たとえば、Dowerら、WO91/17271及びMcCaffertyら、WO92/01047、US 5, 877, 218、US 5, 871, 907、US 5, 858, 657、US 5, 837, 242、US 5, 733, 743及びUS 5, 565, 332を参照のこと)が挙げられる。

40

【0258】

キメラ抗体、ヒト化(ベニヤ化を含む)抗体及びヒト抗体は通常、上述のような組換え発現によって作出される。

【0259】

本発明はさらに、非抗体結合分子を提供する。非抗体結合分子には、たとえば、リガン

50

ド結合部位を形成する4つの超可変ループを支える堅い バレルを特徴とするタンパク質構造であるリポカリンの足場に基づくアンチカリンが挙げられる。新規の結合特異性は、機能的なディスプレイ及び誘導された選択と組み合わせた、ループ領域における標的化された無作為な変異誘発によって操作される (Skerra (2008), FEBS J. 275: 2677 - 2683)。他の好適な足場には、たとえば、ヒトのフィブロネクチンIIIの第10細胞外ドメインに基づくアドネクチンまたはモノボディ (Koide 及び Koide (2007) Methods Mol. Biol. 352: 95 - 109)、ブドウ球菌プロテインAのZドメインに基づくアフィボディ (2008) FEBS J. 275: 2668 - 2676); アンキリン反復タンパク質に基づくDAR Pins (Stumppら. (2008), Drug. Discov. Today, 13: 695 - 701); ヒトのFynタンパク質キナーゼのSH3ドメインに基づくフィノマー (Grabulovskiら. (2007), J. Biol. Chem. 282: 3196 - 3204); Sulfolobus acidolarisに由来するSac7dに基づくアフィチン (Krehenbrinkら. (2008), J. Mol. Biol. 383: 1058 - 1068); ヒトのγ-B-クリスタリンに基づくアフィリン (Ebersbachら. (2007), J. Mol. Biol. 372: 172 - 185); 膜受容体タンパク質のAドメインに基づくアビマー (Silvermanら. (2005), Biotechnol. 23: 1556 - 1561); システインが豊富なノッチンペプチド (Kolmar (2008), FEBS J. 275: 2684 - 2690); 及び操作されたKunitz型阻害剤 (Nixon 及び Wood (2006), Curr. Opin. Drug. Discov. Dev. 9: 261 - 268) が挙げられてもよい。概説については、Gebauer 及び Skerra (2009), Curr. Opin. Chem. Biol. 13: 245 - 255を参照のこと。

【0260】

これらの抗体の一部では、抗体は、WO/2012/170071 及び PCT/US 2013/058773 にて記載された抗体に完全にまたは実質的に由来するCDR (Kabatt, Chothia またはそれらの複合物によって定義されるような) を含む抗体のいずれか1つまたは抗体ではなく、特に、WO/2012/170071 にてクローン15 (配列番号12 ~ 21によって定義された) 及びクローン17 (配列番号1 ~ 10によって定義された) と名付けられた抗体及び1174.1.3、1414.1.2、1415.1.1 及び1749.1.3 と名付けられたマウス抗ヒトMCAMモノクローナルクローン及びPCT/US 2013/058773 に記載された2120.4.19 及び2107.4.10 と名付けられたラット抗ヒトMCAMモノクローナル抗体クローンではない。

【0261】

4. 活性について抗体をスクリーニングする方法

本明細書で記載されるMCAM抗体の阻害活性は、同じまたは実質的に類似するエピート (たとえば、m1749) を結合する抗体との競合結合アッセイ及びそのリガンドであるラミニン411のラミニン 4鎖とのMCAMの結合の阻止を含む当該技術で既知の方法によってアッセイすることができる。

【0262】

たとえば、MCAMとラミニン411のラミニン 4鎖との間の相互作用を阻止するMCAM抗体の活性は以下のようにスクリーニングすることができる。MCAM発現細胞を、(a) 候補抗体の存在下または非存在下でラミニン 4鎖、たとえば、ラミニン411の 4鎖を含む組換えポリペプチドと共にインキュベートし; (b) たとえば、蛍光顕微鏡またはフローサイトメトリーによって細胞へのラミニン 4の結合のレベルをモニターし; (c) 候補抗体の非存在下よりも存在下のほうがラミニン 4の結合のレベルが低ければMCAM/ラミニン 4の相互作用の阻害剤として前記候補抗体を特定する。代替のスクリーニングプロトコルには、候補抗体の存在下または非存在下でMCAMと共にインキュベートすることができるラミニン 4鎖を発現している細胞の集団の使用と、モニ

ターされる細胞集団へのM C A Mの結合が関与する。候補抗体の存在下での細胞集団へのM C A Mの結合が非存在下よりも低ければ、候補抗体はM C A Mのアンタゴニストである。

【0263】

モニタリングの他の方法には、蛍光活性化細胞選別 (F A C S) 及び酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) が挙げられる。

【0264】

そのリガンド、たとえば、ラミニン 4 鎖へのM C A Mの結合を阻害するその能力に基づいて特定されるM C A Mアンタゴニストは、M C A M発現細胞の浸潤を特徴とする炎症性状態の治療のための候補である。

【0265】

M C A M抗体の阻害活性は生体内でも評価することができる。M C A M抗体の阻害活性を評価する方法の一例は、実験的自己免疫脳脊髄炎 (E A E) モデルによる。E A Eはヒトにおける多発性硬化症 (M S) の症状に類似する症状を生じるように実験動物で生成される疾患である。たとえば、B a u e r ら、P r o c . N a t ' l . A c a d . S c i . U S A , 106 : 1920 - 1925 (2009) を参照のこと。E A Eは一般に、他の動物の中樞神経系に由来する様々なタンパク質、たとえば、ミエリン塩基性タンパク質及び脊髄全体若しくは脳組織の抽出物を、またはミエリンに特異的に反応するT細胞を動物に注射することによって作出される。E A Eは一般に、M Sの再発または進行形態の経過に従うように使用される。E A EはM Sの治療剤を開発すること及びM Sの特定の疾患過程を研究することの双方で好適な動物モデルとして役立っている。たとえば、G o l d ら、B r a i n , 129 : 1953 - 1971 (2006) を参照のこと ; S t e i n m a n ら、A n n . N e u r o l . 60 : 12 - 21 (2006) も参照のこと。

【0266】

疾患の進行に対するM C A M遮断の効果は、T H 1 7の分極形成が生体内で生じるE A Eの治療モデルで調べることができる。マウスをP L P 139 - 151ペプチドで免疫してE A Eを誘導する。疾患の発症後、候補の抗M C A M抗体またはアイソタイプ対照のいずれかによってマウスを腹腔内で処理し、その後、毎日処理する。マウスを毎日モニターし、盲検法でスコア化し、2 ~ 3日ごとに体重を得た。候補M C A M抗体によって処理したマウスにおける再発の遅延及び症状の重症度の有意な軽減は成功した候補抗体を示す。

【0267】

F . 標識抗体

M C A Mに特異的に結合する標識抗体は、破壊のために癌細胞若しくは腫瘍細胞を標的とすることにおいて、または自己免疫疾患若しくは神経炎症性疾患に関与する細胞を標的とすることにおいて有用であり得る。そのような抗体は、少なくとも部分的にM C A Mの発現が介在する疾患を標的とすることにおいても有用であり得る。たとえば、そのような抗体は、他の治療剤、他のタンパク質、他の抗体、及び/または検出可能な標識で標識することができる。W O 03 / 057838 ; U S 8 , 455 , 622 を参照のこと。そのような治療剤は、たとえば、自己免疫疾患、神経炎症性疾患、または癌のような患者における望ましくない状態または疾患を治療する、それと闘う、それを和らげる、予防するまたは改善するために使用することができる作用因子であることができる。治療剤には、細胞傷害剤、細胞増殖抑制剤、放射性治療剤、免疫調節剤、または抗体の活性を促進する、若しくは高める生物活性剤を挙げることができる。細胞傷害剤は細胞に対して毒性である任意の作用因子であることができる。細胞増殖抑制剤は細胞の増殖を阻害する任意の作用因子であることができる。免疫調節剤は免疫的応答の発生または維持を刺激するまたは阻害する任意の作用因子であることができる。放射性治療剤は放射線を発する分子または化合物であることができる。そのような治療剤が、本明細書で記載される抗体のようなM C A M特異的な抗体に結合されるのであれば、結合された治療剤は、他の細胞よりもM C A M発現細胞 (たとえば、T H 1 7発現細胞のような免疫細胞、または悪性メラニン細胞のような癌細胞) に対して特異的な親和性を有するであろう。その結果、標識抗体の投与は

10

20

30

40

50

、他の周辺細胞及び周辺組織に対する最少限の影響でM C A M発現細胞を直接標的とする。このことは、単独で投与するには毒性でありすぎる治療剤にとって特に有用であることができる。加えて、さらに少量の治療剤を使用することができる。

【0268】

抗体を抗毒素として作用するように修飾することができる。たとえば、米国特許第5,194,594号を参照のこと。たとえば、植物由来の細胞毒素であるリシンは、抗体について二官能性試薬である無水S-アセチルメルカプトコハク酸を用い、リシンについて3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸スクシンイミジルを用いて、抗体に結合することができる。P i e t e r s z ら、C a n c e r R e s . 48(16):4469-4476(1998)を参照のこと。結合は、リシンのB鎖の結合活性の喪失を生じる一方で、リシンのA鎖の毒性能も抗体の活性も損傷しない。同様に、リボソーム集合の阻害剤であるサボリンは、化学的に挿入されたスルフヒドリル基間のジスルフィド結合を介して抗体に結合することができる。P o l i t o ら、L e u k e m i a , 18:1215-1222(2004)を参照のこと。

【0269】

放射性同位元素を抗体に連結することもできる。好まれる放射性同位元素には、イットリウム⁹⁰(⁹⁰Y)、インジウム¹¹¹(¹¹¹In)、¹³¹I、^{99m}Tc、放射性銀-111、放射性銀-199及びビスマス²¹³が挙げられる。放射性同位元素の抗体への結合は従来の二官能性キレートによって行われてもよい。放射性銀-111及び放射性銀-199については、イオウ系リンカーが使用されてもよい。H a z r a ら、C e l l B i o p h y s . 24-25:1-7(1994)を参照のこと。銀放射性同位元素の結合にはアスコルビン酸によって免疫グロブリンを還元することが関与してもよい。111In及び⁹⁰Yのような放射性同位元素については、イブリツモマブ・チウキセタンを用いることができ、それはそのような同位元素と反応してそれぞれ111In/イブリツモマブ・チウキセタン及び⁹⁰Y/イブリツモマブ・チウキセタンを形成する。W i t z i g , C a n c e r C h e m o t h e r . P h a r m a c o l . , 48, S u p p l , 1:S91-S95(2001)を参照のこと。

【0270】

他の治療剤も抗体に連結させてもよい。治療剤は普通、細胞傷害性または細胞増殖抑制性である。たとえば、抗体は、たとえば、マイタンシン、ゲルダナマイシンのような毒性化学療法剤、たとえば、アウリスタチンのようなチューブリン阻害剤、またはカリケアミシンのような副溝結合作用因子に結合することができる。他の代表的な治療剤には、自己免疫疾患、神経炎症性疾患若しくは癌、または自己免疫疾患、神経炎症性疾患若しくは癌の症状の治療、管理または改善に有用であることが知られる作用因子が挙げられる。そのような治療剤の例は本明細書の他のどこかに開示されている。

【0271】

抗体は他のタンパク質にも結合することができる。たとえば、抗体はフィノマーに結合することができる。フィノマーはヒトFynのSH3ドメインに由来する小さな結合タンパク質(たとえば、7kDa)である。それらは安定した、及び可溶性であることができる。フィノマーは、抗体と同じ親和性と特異性で標的分子に結合するように操作することができる。それらは、抗体に基づいて多重特異性の融合タンパク質を創り出すのに好適である。たとえば、フィノマーは、抗体のN末端及び/またはC末端に融合されて異なる構造を持つ二重特異性及び三重特異性のFynomAbを創り出すことができる。フィノマーは、FACS、Biacore、及び最適な特性を持つフィノマーの効率的な選択を可能にする細胞に基づくアッセイを用いたスクリーニング法を介してフィノマーライブラリを用いて選択することができる。フィノマーの例は、G r a b u l o v s k i ら、J . B i o l . C h e m . 282:3196-3204(2007); B e r t s c h i n g e r ら、P r o t e i n E n g . D e s . S e l . 20:57-68(2007); S c h l a t t e r ら、M A b s . 4:497-508(2011); B a n n e r ら、A c t a . C r y s t a l l o g r

. D . B i o l . C r y s t a l l o g r . 6 9 (P t 6) : 1 1 2 4 - 1 1 3 7 (2 0 1 3) ; 及び Brackら、Mol . Cancer Ther . 1 3 : 2 0 3 0 - 2 0 3 9 (2 0 1 4) にて開示されている。

【 0 2 7 2 】

本明細書で開示されている抗体は1以上の他の抗体に結合するまたは抱合することでもできる(たとえば、抗体のヘテロ抱合体を形成するために)。そのような他の抗体はM C A M内の異なるエピトープに結合することができ、または異なる標的抗原に結合することができる。

【 0 2 7 3 】

抗体はまた検出可能な標識にも結合することができる。そのような抗体を、たとえば、自己免疫疾患、神経炎症性疾患、または癌の診断のために、自己免疫疾患、神経炎症性疾患、または癌の進行をモニターするために、及び/または治療の有効性を評価するために使用することができる。そのような抗体は、自己免疫疾患、神経炎症性疾患、若しくは癌を有するまたはそれが疑われる対象にて、またはそのような対象から得られる適当な生物試料にて、そのような判定を行うのに有用であることができる。抗体に結合または連結されてもよい代表的な検出可能な標識には、たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼのような種々の酵素;たとえば、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンのような補欠分子族;たとえば、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリスリンのような蛍光物質;たとえば、ルミノールのような発光物質;たとえば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンのような生物発光物質;たとえば、放射性銀 - 1 1 1、放射性銀 - 1 9 9、ビスマス^{2 1 3}、ヨウ素(^{1 3 1}I、^{1 2 5}I、^{1 2 3}I、^{1 2 1}I)、炭素(^{1 4}C)、イオウ(⁵S)、トリチウム(³H)、インジウム(^{1 1 5}In、^{1 1 3}In、^{1 1 2}In、^{1 1 1}In、)、テクネチウム(^{9 9}Tc)、タリウム(^{2 0 1}Ti)、ガリウム(^{6 8}Ga、^{6 7}Ga)、パラジウム(^{1 0 3}Pd)、モリブデン(^{9 9}Mo)、キセノン(^{1 3 3}Xe)、フルオリン(^{1 8}F)、^{1 5 3}Sm、^{1 7 7}Lu、^{1 5 9}Gd、^{1 4 9}Pm、^{1 4 0}La、^{1 7 5}Yb、^{1 6 6}Ho、^{9 0}Y、^{4 7}Sc、^{1 8 6}Re、^{1 8 8}Re、^{1 4 2}Pr、^{1 0 5}Rh、^{9 7}Ru、^{6 8}Ge、^{5 7}Co、^{6 5}Zn、^{8 5}Sr、^{3 2}P、^{1 5 3}Gd、^{1 6 9}Yb、^{5 1}Cr、^{5 4}Mn、^{7 5}Se、^{1 1 3}Sn、及び^{1 1 7}スズのような放射性物質;種々のポジトロン放出断層撮影を用いたポジトロン放出金属;非放射性的の常磁性金属イオン;並びに特定の放射性同位元素に放射性標識されるまたは抱合される分子が挙げられる。

【 0 2 7 4 】

治療剤、他のタンパク質、他の抗体及び/または検出可能な標識は、当該技術で既知の技法を用いてマウス抗体、キメラ抗体、ベニヤ化抗体またはヒト化抗体に直接または中間体(たとえば、リンカー)を介して間接的に結合されてもよく、または抱合されてもよい。たとえば、Arnonら、"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy,"in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら(編)、pp. 243 - 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstromら、"Antibodies For Drug Delivery,"in Controlled Drug Delivery (第2版)、Robinsonら(編)、pp. 623 - 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,"in Monoclonal Antibodies, 84: Biological And Clinical Applications, Pincheiraら(編)、pp. 475 - 506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeu

10

20

30

40

50

tic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら(編)、pp. 303 - 16 (Academic Press, 1985); 及び Thorpeら、Immunol. Rev., 62: 119 - 58 (1982)を参照のこと。好適なリンカーには、たとえば、切断可能リンカー及び切断可能ではないリンカーが挙げられる。酸性条件下または還元条件下または特定のプロテアーゼへの曝露の際、薬剤を遊離する様々なリンカーを採用することができる。同様に、特定のプロテアーゼへの曝露の際の酸性条件下または還元条件下、または他の定義された条件下、結合された治療剤、タンパク質、抗体及び/または検出可能な標識を遊離する様々なリンカーを採用することができる。

10

【0275】

IV. 治療方法及び医薬組成物

本発明の抗体または他のアンタゴニストは、とりわけ、自己免疫疾患、神経炎症性疾患及び癌を有する(たとえば、DSM-IV-TRまたはDSM-Vのもののような当該技術にて承認された基準を満たす)対象を、または一般集団に比べて自己免疫疾患、神経炎症性疾患及び癌の高いリスクがある対象を治療することまたは対象の予防を達成することに使用することができる。高いリスクは、疾患に関連する1以上の遺伝的マーカー若しくは生化学的マーカーの存在、または疾患と矛盾しないが確定診断を行うには不十分な1以上の症状の存在から評価することができる。上述のカテゴリーまたは疾患は必ずしも相互に互いに排他的ではなく;たとえば、多発性硬化症は神経炎症性または自己免疫性として分類することができる。本方法によって治療可能な一部の具体的な例となる疾患には、多発性硬化症、パーキンソン病、アレルギー性接触皮膚炎、乾癬、乾癬性関節炎、関節リウマチ、サルコイドーシス、炎症性大腸疾患、クローン病、または癌、特に黒色腫のような固形腫瘍が挙げられる。方法の実践はメカニズムの理解に左右されないが、一部の方法では、抗体または他のアンタゴニストは、T細胞(たとえば、TH17細胞)上に発現されるMCAMと内皮細胞の表面上に発現されるラミニン4鎖、たとえば、ラミニン411の4鎖との相互作用を阻害することによって少なくともある程度機能すると考えられる。抗体/薬剤の抱合体は、通常、標的とされる細胞内に取り込まれた後、連結された作用因子の細胞傷害性効果または細胞増殖抑制効果を含む追加の作用機序を有することができる。抗体/薬剤の抱合体は腫瘍関連のマクロファージ毒性も誘導してもよい。

20

30

【0276】

神経炎症性状態は、CNSの炎症及び/または細胞/組織の損傷を特徴とする。兆候には、高いグリア活性、高い炎症誘発性サイトカイン/ケモカイン(たとえば、TNF、INF、IL-1)レベル、脳血管関門の透過性の上昇、及び/または免疫細胞(たとえば、白血球)のCNSへの動員/浸潤の上昇を挙げることができる。神経炎症は、免疫系の細胞の慢性的な活性化(すなわち、自己免疫関連の神経炎症)に関連して慢性であることが多いが、代わりにまたはさらに急性の症状の出現を有し得る。

【0277】

多発性硬化症は、少なくとも4つの亜型のいずれかにて治療について望ましい疾患である。再発/寛解型MS(RR-MS)はMSの最も一般的な形態であり、明瞭に定義される悪化/再発(急性発作)に続く部分的なまたは完全な回復を特徴とする。再発期間の間に疾患の進行はない。当初(診断時)、RR-MSは新しく診断された対象すべての約85%に相当する。再発の定義には、高い体温が無症状の病変または古い病変を暴き得るので、少なくとも24時間存在し、発熱または併発疾患(「風邪」または尿道感染)に関連しない新しい症状または兆候を必要とする。

40

【0278】

原発進行型(PP-MS)は明瞭な再発無しで初めから継続する。安定期(安定の期間)があり得る。MSの対象すべての10~15%はこの群であり、高齢者に生じる傾向がある。女性対男性の比は、女性が約2:1で優勢である他の形態とは異なってこの群では

50

均等である。P P - M S はまた、脳 M R I の変化は少なく、脊髄症 / 脊髄関連の変化が多い傾向がある。

【 0 2 7 9 】

二次進行型 (S P - M S) は R R - M S として出発し、その後、再発を伴ってまたは伴わずに着実な進行が生じる。再発 / 寛解型の対象のおよそ 5 0 % が二次進行型に進む。

【 0 2 8 0 】

個人の約 5 % で生じる進行性再発型 (P R - M S) は混合型の再発 (回復を伴うまたは伴わない) と共に発症から進行性である。

【 0 2 8 1 】

M S の診断は普通、既往症、神経検査、及び磁気共鳴画像診断 (M R I)、誘発電位 (E P) 及び脊髄液の分析を含む種々の検査に基づく。M S の確定診断には、脳、脊髄及び視神経を含む中枢神経系 (C N S) の少なくとも 2 つの別々の領域での損傷の証拠及び損傷が少なくとも 1 ヶ月離れて生じた証拠及び他の考えられる診断すべての排除が必要とされる。当該技術で承認された基準による M S の診断を有する対象を治療上処置することと同様に、本方法を予防上用いて、健康な個体の一般集団に比べて M S の進行の高いリスクに彼らを置く M S の少なくとも 1 つの兆候または症状を有する個体を治療することもできる。たとえば、方法を用いて、M S を発症し始めてもよいし、そうでなくてもよい、初回臨床症状 (C I S) と呼ばれる - M S 様の症状の 1 回の発作 (再発または悪化とも呼ばれる) を有した個体を治療することができる。M S を発症するリスクがある個体は、幾つかある方法の中でその血清中のタンパク質 K I R 4 . 1 に対する抗体の存在によっても特定

10

20

【 0 2 8 2 】

神経炎症性疾患にはパーキンソン病も含まれる。パーキンソン病の症状には、震え (たとえば、手、腕、脚、顎及び顔面の震え)、四肢及び体躯の硬直またはこわばり; 動作の緩慢または遅さ; 姿勢の不安定または損傷されたバランス及び協調; うつ及び他の情動変化; 飲み込み、咀嚼及び会話の困難さ; 排尿問題または便秘; 皮膚の問題; 睡眠障害が挙げられる。パーキンソン病は、そのような症状、及び / または脳の走査、及び / または他の疾患を除外する他の検査から診断することができる。

【 0 2 8 3 】

本方法を用いて癌の増殖または転移を阻害することができる。癌は、造血悪性腫瘍または固形腫瘍、すなわち、前癌様病変を含む良性または悪性の、細胞の過剰な成長または増殖の結果生じる細胞塊であることができる。癌は良性、悪性または転移性であることができる。転移癌はそれが最初に生じた場所から身体の別の場所に広がっている癌を指す。転移性癌細胞によって形成される腫瘍は転移性腫瘍または転移と呼ばれ、それは癌細胞が身体の他の部分に広がる過程を指すのにも使用される用語である。一般に、転移性癌は元々の癌または原発の癌と同じ名称及び同じ型を有する。癌の例には、たとえば、黒色腫、癌腫、芽腫及び肉腫のような固形腫瘍が挙げられる。癌にはまた、たとえば、白血病、またはリンパ腫のようなリンパ系悪性腫瘍のような血液悪性腫瘍も挙げられる。そのような癌のさらに詳しい例には、扁平上皮癌、肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌または胃の癌を含む消化器癌、膵臓癌、神経膠腫、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌、陰茎癌、並びに頭頸部の癌が挙げられる。

30

40

【 0 2 8 4 】

自己免疫疾患には全身性の自己免疫疾患、臓器または組織に特異的な自己免疫疾患、及び自己免疫型の発現を示す疾患が挙げられる。これらの疾患では、生体はそれ自身の抗原の 1 つに対する細胞性の及び / または液性の免疫応答を発生し、その抗原の破壊及び潜在的な不能化及び / または致命的な結末をもたらす。細胞性の応答は、存在するならば、B 細胞または T 細胞またはその双方であることができる。インターロイキン (I L) - 1 7 及び I L - 2 2 の産生を特徴とする T ヘルパー細胞系列である T H 1 7 細胞は組織に侵入

50

して、ヒトにおける多発性硬化症及びマウスにおける実験的自己免疫脳脊髄炎（EAE）を含む病原性の自己免疫応答を促すことが報告されている。たとえば、Cuara, Nature, 421: 744 - 748 (2003); Ivonov, Cell, 126: 1121 - 1133 (2006)を参照のこと。TH17細胞は組織へのその特異的な動員及び浸潤によって炎症性の応答を開始してもよいし、または伝播してもよい。

【0285】

自己免疫疾患の例には、グレーブス病、ハシモト甲状腺炎、多腺性自己免疫性症候群、インスリン依存性糖尿病（1型糖尿病）、インスリン抵抗性糖尿病（2型糖尿病）、免疫介在性不妊症、自己免疫性アジソン病、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、疱疹状皮膚炎、自己免疫性脱毛症、白斑、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性血小板減少性紫斑病、悪性貧血、重症筋無力症、ギラン・バレー症候群、全身硬直症候群、急性リウマチ熱、交感性眼炎、グッドパスチャー症候群、自己免疫性ブドウ膜炎、側頭動脈炎、ベーチェット病、炎症性大腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎、線維筋痛、多発性筋炎、皮膚筋炎、強直性脊椎炎、タカヤス関節炎、脂肪織炎、類天疱瘡、起源の分からない血管炎、ANCA陰性血管炎、ANCA陽性血管炎、全身性エリテマトーデス、乾癬性関節炎、関節リウマチ、強皮症、全身性壊死性血管炎、ワグナー肉芽腫症、CREST症候群、抗リン脂質症候群、シェーグレン症候群、好酸球性胃腸炎、非定型局所皮膚炎、心筋症、感染後症候群、感染後心内膜心筋炎、セリアック病、多発性硬化症、サルコイドーシス及び乾癬が挙げられる。

【0286】

抗体または他のアンタゴニストは、発症を遅らせる、重症度を軽減する、さらなる悪化を抑制する、及び/または治療される疾患（たとえば、癌）の少なくとも1つの兆候若しくは症状を改善する投与量、投与経路及び投与回数を意味する有効な投薬計画で投与される。患者がすでに疾患を患っているのであれば、投薬計画は治療上有効な投薬計画と呼ばれ得る。患者が一般集団に比べて疾患のリスクは高いが、未だに症状を経験していないのであれば、投薬計画は予防上有効な投薬計画と呼ばれ得る。一部の例では、治療上または予防上の有効性は、同じ患者における歴史的対照または過去の経験に比べて個々の患者で観察することができる。他の例では、治療上または予防上の有効性は、未治療患者の対照集団に比した治療された患者の集団における前臨床試験または臨床試験で実証することができる。

【0287】

抗体の例となる投与量は、0.1～20、または0.5～5 mg/kg体重（たとえば、0.5、1、2、3、4または5 mg/kg）または固定投与量として10～1500 mgである。投与量は、患者の状態及び以前の治療への応答、もしあれば、数ある因子の中で、治療が予防上である、または治療上であるか、及び疾患が急性である、または慢性であるかに左右される。

【0288】

投与は、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、クモ膜下、腹腔内、局所、鼻内または筋肉内であることができる。静脈内投与または皮下投与による全身性循環への投与が好まれる。静脈内投与は、たとえば、30～90分間のような時間にわたる点滴によることができる。

【0289】

投与の頻度は、数ある因子の中で、循環における抗体の半減期、患者の状態及び投与の経路に左右される。頻度は、毎日、毎週、毎月、四半期ごとに、または患者の状態若しくは治療される疾患の進行における変化に応じて不定期の間隔であることができる。静脈投与の例となる頻度は、さらに多くのまたは少ない頻度の投与も可能ではあるけれども、治療の持続的な目標に対して毎週と四半期ごととの間である。皮下投与については、例となる投与頻度は、さらに多くのまたは少ない頻度の投与も可能ではあるけれども、毎日から毎月である。

【0290】

投与される投薬の数は疾患が急性であるかまたは慢性であるか、及び治療に対する疾患の応答に左右される。急性の疾患または慢性の疾患の急性悪化については、1～10回の投与が十分であることが多い。場合によっては、単一ボラス容量が、任意で分割した形態にて急性の疾患または慢性の疾患の急性悪化のために十分である。治療は急性の疾患の再発または急性悪化のために繰り返すことができる。慢性の疾患については、抗体は、規則的な間隔で、たとえば、毎週、2週ごとに、毎月、四半期ごとに、6ヵ月ごとに少なくとも1、5または10年間、または患者の生涯、投与することができる。

【0291】

非経口投与のための医薬組成物は好ましくは無菌であり、実質的に等張であり、及びGM P条件下で製造される。医薬組成物は単位剤形（すなわち、単回投与のための剤形）で提供することができる。1以上の生理学的に及び薬学上許容可能なキャリア、希釈剤、賦形剤及び補助剤を用いて医薬組成物を製剤化することができる。製剤化は選択される投与の経路に左右される。注射については、抗体は、水溶液、好ましくは、生理的に適合性緩衝液、たとえば、ハンクス溶液、リンガー溶液、または生理的な生理食塩水または酢酸緩衝液にて製剤化することができる（注射の部位での不快感を軽減するために）。溶液は、たとえば、懸濁剤、安定剤及び/または分散剤のような製剤化剤を含有することができる。あるいは、抗体は、使用前に好適なビヒクル、たとえば、無菌の発熱物質を含まない水で構成するための凍結乾燥された形態であることができる。

【0292】

本発明の抗体による治療は、治療される疾患に対して有効な他の治療と併用することができる。併用治療は別々に投与するために製剤化することができる。多発性硬化症の治療のための追加の治療剤には、以下：テリフルノミド、インターフェロンベータ-1a、インターフェロンベータ-1b、グラチラマー酢酸塩、フィンゴリモド、及びミトキサントロン、または、たとえば、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、若しくはデキサメタゾンのようなコルチコステロイドの1以上が挙げられる。

【0293】

癌のための追加の治療剤には、たとえば、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、プロカルバジン、及びサイクロホスファミドのようなアルキル化剤；たとえば、フルオロウラシル、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、メソトレキセート及びヒドロキシ尿素のような代謝拮抗剤；植物アルカロイド及び抗生物質を含む天然産物、たとえば、プレオマイシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、エトポシド、マイトマイシン、ミトキサントロン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、及びタキソール（パクリタキセル）または関連化合物、たとえばトキソテレ（登録商標）；トポイソメラーゼ1阻害剤イリノテカン；テモゾロミド及びギリアデル（登録商標）、カルムスチン；及びチロシンキナーゼの阻害剤、たとえば、グリベック（登録商標）、ステント（登録商標）（スニチニブリンゴ酸塩）、ネクサパール（登録商標）（ソラフェニブ）及びタルセバ（登録商標）（エルロチニブ）またはイレッサ（登録商標）（ゲフィチニブ）；血管形成の阻害剤；及びHER2抗原に対するハーセプチン（商標）；VEGFに対するアバスチン（登録商標）；または表皮増殖因子（EGF）受容体に対する抗体、たとえば、アービタックス（登録商標）（セツキシマブ）及びベクチピックス（登録商標）（パニツムマブ）を含むモノクローナル抗体が挙げられる。

【0294】

パーキンソン病を治療するための追加の治療剤には、レボドパ、ベンザセリド、カルビドパ、ドーパミンアゴニスト、非麦角系ドーパミンアゴニスト、カテコール-O-メチル（"COMT"）阻害剤、たとえば、エンタコポンまたはトルコポン、モノアミンオキシダーゼ（"MAO"）阻害剤、たとえば、ラサガリン、アマンタジンまたは抗コリン作用因子が挙げられる。

【0295】

V. キット

本発明はさらに、本発明のM C A M抗体または他のアンタゴニスト及び関連用具、たとえば、使用のための指示書（たとえば、「添付文書」）を含むキット（たとえば、容器）を提供する。使用のための指示書は、たとえば、M C A Mアンタゴニストの投与のための指示書及び任意で1以上の添加剤を含有してもよい。M C A Mアンタゴニストの容器は単位用量、大量包装（たとえば、複数回用量の包装）または副次単位用量であってもよい。

【0296】

添付文書は、そのような製品の使用に関する適応、用途、投与量、投与、禁忌及び/または警告についての情報を含む、治療用製品の商業包装に通例含まれる文書を指す。

【0297】

キットはまた、薬学上許容可能な緩衝液、たとえば、注射用の殺菌水（B W F I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液及びデキストロース溶液を含む第2の容器を含むこともできる。それはまた、他の緩衝液、希釈剤、充填剤、針及び注射器を含む、商業的な見地及びユーザーの見地から望ましい他の物質も含むことができる。

【0298】

上記または下記で引用されている特許出願、ウェブサイト、他の出版物、受入番号等は、各個々の項目が具体的に及び個々に参照によって組み入れられるように指示されるかのようにと同じ程度にてあらゆる目的でその全体が参照によって組み入れられる。配列の異なるバージョンが異なる時に受入番号に関連するのであれば、本出願の有効な出願日での受入番号に関連するバージョンを意味する。有効な出願日は、実際の出願日または該当する場合、受入番号を指す優先権出願の出願日のいずれか早い方を意味する。同様に、出版物、ウェブサイト等の異なるバージョンが異なる時に公開されるのであれば、指示されない限り、出願の有効な出願日で最も新しく公開されたバージョンを意味する。本発明の任意の特徴、工程、要素、実施形態または態様は、特に指示されない限り、他と組み合わせ使用することができる。明瞭さと理解を目的として説明と例示のために本発明を多少詳しく記載してきたが、添付のクレームの範囲内で特定の変更及び改変が実践され得ることが明らかであろう。

【実施例】

【0299】

材料及び方法

抗体の生成/性状分析

マウスM C A Mに結合することができる抗体の生成については、ヒトI g GにマウスM C A Mの細胞外ドメインを融合することによってM C A M - F cを生成し、常法を用いてC H O細胞にて産生させた。C F A中100 μ gのM C A M - F cタンパク質（1：1容量）でL o u / Mラットを免疫した。不完全フロイントアジュバント（I F A）中のM C A M - F cタンパク質（1：1容量）によって2週間間隔で2回ラットを追加免疫した。免疫したラットから標準のプロトコルを用いてハイブリドーマを生成し、C l o n e p i xによってクローンを選択した。完全長のマウスM C A M遺伝子でC H O細胞に形質移入し、ネオマイシンと常法を用いて安定な発現について細胞を選抜した。常法を用いて親C H O細胞（M C A M陰性）をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（C F S E）によって蛍光標識し、1：1の比で非標識のM C A Mを形質移入したC H O細胞と混合した。細胞のこの混合物と共にハイブリドーマ上清を30分間インキュベートし、フローサイトメトリーによって可能性のあるM C A M特異的な抗体の結合を蛍光標識した抗ラット二次抗体（J a c k s o n I m m u n o）により検出した。

【0300】

M C A M特異的な抗体について陽性とスクリーニングされたハイブリドーマの上清を蛍光標識したマウスM C A M - F cタンパク質（5 μ g / m L）と共に30分間事前にインキュベートした後、ラミニン 4発現細胞株W M 2 6 6 4に加え、フローサイトメトリーによって細胞株へのM C A M - F cタンパク質の結合の中和を測定した。

【0301】

ヒトM C A Mに結合することができるラット抗体の生成のために、ヒトI g GにヒトM

10

20

30

40

50

CAMの細胞外ドメインを融合することによってhMCAM-Fcを生成し、常法を用いてCHO細胞にて産生させた。CFA中250 μ gのhMCAM-Fcタンパク質(1:1容量)でLou/Mラットを免疫した。不完全フロイントアジュバント(IFA)中のhMCAM-Fcタンパク質(1:1容量)によって2週間間隔で2回ラットを追加免疫した。免疫したラットから標準のプロトコルを用いてハイブリドーマを生成し、Clonепixによってクローンを選択した。完全長のヒトMCAM遺伝子でCHO細胞に形質移入し、ネオマイシンと常法を用いて安定な発現について細胞を選抜した。常法を用いて親CHO細胞(MCAM陰性)をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)によって蛍光標識し、1:1の比で非標識のヒトMCAMを形質移入したCHO細胞と混合した。細胞のこの混合物と共にハイブリドーマ上清を30分間インキュベートし、フローサイトメトリーによって可能性のあるヒトMCAM特異的な抗体の結合を蛍光標識した抗ラット二次抗体(Jackson Immuno)により検出した。

10

【0302】

ヒトMCAMに結合することができるマウス抗体の生成のために、ヒトIgGにヒトMCAMの細胞外ドメインを融合することによってhMCAM-Fcを生成し、常法を用いてCHO細胞にて産生させた。CFA中50 μ gのhMCAM-Fcタンパク質(1:1容量)でBalb/cマウスを免疫した。不完全フロイントアジュバント(IFA)中のhMCAM-Fcタンパク質(1:1容量)によって2週間間隔で2回マウスを追加免疫した。免疫したマウスから標準のプロトコルを用いてハイブリドーマを生成し、Clonепixによってクローンを選択した。完全長のヒトMCAM遺伝子でCHO細胞に形質移入し、ネオマイシンと常法を用いて安定な発現について細胞を選抜した。常法を用いて親CHO細胞(MCAM陰性)をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)によって蛍光標識し、1:1の比で非標識のヒトMCAMを形質移入したCHO細胞と混合した。細胞のこの混合物と共にハイブリドーマ上清を30分間インキュベートし、フローサイトメトリーによって可能性のあるヒトMCAM特異的な抗体の結合を蛍光標識した抗マウス二次抗体(Jackson Immuno)により検出した。

20

【0303】

ヒトMCAM特異的な抗体について陽性とスクリーニングされたハイブリドーマの上清を蛍光標識したhMCAM-Fcタンパク質(5 μ g/mL)と共に30分間事前にインキュベートした後、ラミニン4発現細胞株WM2664に加え、フローサイトメトリーによって細胞株へのhMCAM-Fcタンパク質の結合の中和を測定した。

30

【0304】

核酸及びタンパク質の操作

CDRの決定のために、RNAqueous-4PCRキット(Ambion)を用いてハイブリドーマ細胞から全RNAを単離し、cDNAの合成に使用した。得られたds cDNAの5'末端にライゲーションしたcDNAアダプタによるMarathonのcDNA増幅(Clontech)から改変された方法を用いて第1と第2の鎖のcDNAを合成した。重鎖及び軽鎖双方についての特定の抗体アイソタイプの定常領域の配列に基づいて逆行特異的プライマーを設計し、PfuUltra DNAポリメラーゼ(Stratagene)を用いてVL及びVHの断片双方のPCR増幅にてアダプタプライマーと共に使用した。増幅したPCR産物をpCR-Blunt-TOPO(Invitrogen)にクローニングし、ヌクレオチド配列を決定した。特定されたクローンの配列をVL及びVHの配列の範囲内でパーセント同一性について比較した。

40

【0305】

上清におけるIL-17の濃度の測定については、市販のキット(R&D Systems)を用いてELISAを行った。

【0306】

実施例1：抗MCAMモノクローナル抗体の生成

ヒトのMCAMタンパク質に向けられたマウス及びラットのモノクローナル抗体を上記の材料及び方法で記載されたように生成した。モノクローナル抗体とヒトMCAMとの間

50

での特異的な結合は、ヒトMCAMで形質移入した細胞に結合するモノクローナル抗体の能力を評価することによって確認した。このために、非形質移入細胞をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)で標識し、非標識のヒトMCAMで形質移入した細胞と混合した。したがって、非形質移入細胞は分化することができた。

【0307】

これらの技法を用いて、823の独立したマウス融合クローンを単離し、ヒトMCAMに結合することができる抗体を発現することを示した。さらに、152の独立したラット融合クローンを単離し、ヒトMCAMに結合することができる抗体を発現することを示した。

【0308】

次に、抗ヒトMCAMモノクローナル抗体を用いてそのリガンドへのヒトMCAMの結合を阻止する能力を調べた。ヒトMCAM-Fcタンパク質(5 µg/mL)をアイソタイプ対照抗体または10 µg/mLの試験モノクローナル抗体と共にPBSにて30分間事前にインキュベートした。混合物を健全な脊髄組織切片に加え、その後、上記の材料及び方法で記載されたように蛍光顕微鏡によって性状分析した。さらに、親CHO細胞(CHO K1)またはヒトMCAM遺伝子を形質移入したCHO細胞をCHO培養培地(DMEM)、組換えラミニン411(10 µg/mL)、または組換えラミニン511(すなわち、ラミニン10(511)(10 µg/mL)と共に37で45分間事前にインキュベートした。細胞を洗浄し、フローサイトメトリーによる汎ラミニン抗体によってMCAMへのラミニン511でなくラミニン411の特異的な結合を検出した。ラミニンとのインキュベートに先立ってヒトMCAMを形質移入したCHO細胞を抗MCAM抗体(20 µg/mLで)とともに事前にインキュベートしたことによりラミニン411へのヒトMCAMの結合が消した。

【0309】

この技法を用いて、上述の823の独立したマウス融合クローンのうち87及び152の独立したラット融合クローンのうち26が、ヒトMCAMタンパク質とそのリガンドであるラミニンの-4鎖との間の相互作用を阻止することができる抗体を発現した。

【0310】

実施例2：抗MCAMモノクローナル抗体のさらなる性状分析

(i)ヒトMCAMに結合することができ、及び(ii)ヒトMCAMタンパク質とラミニンの-4鎖との間の相互作用を阻止することができるような、上記実施例1で記載された87の独立したマウス融合クローン及び26の独立したラット融合クローンを以下のようにさらに性状分析した。まず、ヒトMCAMのラミニンの-4鎖への結合を阻止するモノクローナル抗体の能力についてのIC50の定量を以下のように測定した。ヒトMCAMを発現しているCHO細胞を抗ヒトMCAM抗体(種々の濃度で)と共に摂氏4度で30分間インキュベートした。次いで未結合の抗体を洗い流し、細胞を20 µg/mLでの組換えヒトラミニン411と共に摂氏37度で45分間インキュベートした。次いで未結合のラミニンを洗い流し、細胞の表面に結合したラミニンを蛍光標識した抗ラミニン抗体で検出した。洗浄した後、表面に結合したラミニンの量をフローサイトメトリーによって検出し、平均蛍光強度に基づいてIC50を算出した。

【0311】

上述のアッセイを用いて、6つの独立した抗ヒトMCAMモノクローナル抗体が、ヒトMCAMに結合し、及び細胞の表面に発現されたヒトMCAMとそのリガンドであるヒトラミニン411との間の相互作用を阻止する最大の能力を有すると特定された。これら6つの抗MCAMモノクローナル抗体クローンは本明細書では、(i)マウス抗ヒトMCAMモノクローナル抗体クローン、1174.1.3、1414.1.2、1415.1.1、及び1749.1.3、ならびに(ii)ラット抗ヒトMCAMモノクローナル抗体クローン、2120.4.19及び2107.4.10と呼ばれる。これらの抗体の重鎖及び軽鎖、及びそれらの超可変領域のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列は配列番号29~92にて提供されている。さらに具体的には、上記のアッセイでは、モノクローナル抗

体クローン、1174.1.3、1414.1.2、1415.1.1、1749.1.3、2120.4.19、及び2107.4.10についてのIC50はそれぞれ、0.469 ug/ml、0.431 ug/ml、0.307 ug/ml、0.545 ug/ml、0.888 ug/ml、及び0.290 ug/mlであると測定された。さらに、各モノクローナル抗体の特異的な結合親和性を測定するように実施された実験はそれぞれが高い親和性でヒトのMCAMタンパク質に結合することができることを実証した（データは示さず）。そのようなものとして、これら特異的なモノクローナル抗体のそれぞれは、ヒトMCAMに非常によく結合することができ、及び細胞に発現されたヒトMCAMの-4ラミニン結合リガンドとの相互作用を非常によく阻害することができた。対照的に、2つの対照抗体である、非特異的なヒトIgG1抗体と、以前記載されたABX-M A1と呼ばれる完全にヒトの抗MCAM抗体（たとえば、Millsら、Cancer Res. 62:5106(2002)、及び米国特許第6,924,360号、同第7,067,131号及び同第7,090,844号を参照のこと）は双方ともヒトMCAMとそのラミニン411の対応部分との間での結合相互作用を阻止することができなかった。そのようなものとして、上記で特定された6つの特異的なモノクローナル抗体は、(i)生細胞の表面上のヒトMCAMに高親和性で結合する、及び(ii)細胞に発現されたヒトMCAMと-4ラミニンポリペプチド鎖を含むラミニンタンパク質との相互作用を阻止する双方の新規の能力を持つ。

【0312】

実施例3：抗MCAMモノクローナル抗体のドメイン結合分析

ForteBio分析を用いて、モノクローナル抗体クローン、1174.1.3、1414.1.2、1415.1.1、1749.1.3、2120.4.19、及び2107.4.10によって認識され、及び結合されるヒトMCAMタンパク質上の抗原エпитオプの位置を決定した。以下のプロトコールを使用した：ForteBio抗ヒトIgG Fc バイオセンサーを用いて、バイオセンサーの表面に完全長のMCAMhFcタンパク質を含む種々のMCAMhFcドメインを不動化した。これらのドメインまたは完全長のタンパク質への結合の検出のために、これらのセンサーをMCAM特異的な1174.1.3、1414.1.2、1415.1.1、1749.1.3、2120.4.19、及び2107.4.10抗体に浸した。これらの試料を黒色96穴プレートに負荷した後、Octet Redを以下のようにプログラムした：ベースライン#1について60秒；種々のドメインの負荷について180秒；ベースライン#2について60秒；ドメインへの抗体の会合について180秒；及びドメインからの抗体の解離について240秒。

使用した試薬及び用品

1. MCAMhFc 最終濃度@5 ug/ml
2. 抗体クローン、1174.1.3、1414.1.2、1415.1.1、1749.1.3、2120.4.19、及び2107.4.10@5 ug/ml
3. 動態実験用のForteBio抗ヒトIgG Fc 捕捉(AHC) バイオセンサー、カタログ#18-5060
4. Greiner Bio-one、カタログ#655209の黒色96穴プレート
5. ForteBioのOctet Red 機
6. 新鮮な組織培養培地、20% FCSを伴ったDMEMを希釈用培地として使用した。

これらの分析の結果は以下のとおりである。

【0313】

モノクローナル抗体クローン、1174.1.3、1414.1.2、1415.1.1、及び1749.1.3はすべて、ヒトMCAMタンパク質のアミノ酸244~321（配列番号24）によって具体的に定義されるヒトMCAMタンパク質のドメイン3にて見いだされる抗原エпитオプに結合することが示された。これらのモノクローナル抗体は、ヒトMCAMのドメイン1（すなわち、アミノ酸19~129、配列番号22）、ドメイン2（すなわち、アミノ酸139~242、配列番号23）またはドメイン1と2の組

み合わせ（すなわち、アミノ酸19～242）に結合することはできなかった。したがって、モノクローナル抗体クローン、1174.1.3、1414.1.2、1415.1.1、及び1749.1.3はヒトのMCAMタンパク質のドメイン3の中に位置する新規の抗原エピトープを定義する。

【0314】

モノクローナル抗体クローン、2120.4.19、及び2107.4.10はそれぞれ、ヒトMCAMのドメイン1（すなわち、アミノ酸19～129、配列番号22）とドメイン2（すなわち、アミノ酸139～242、配列番号23）の組み合わせによって定義される抗原エピトープに結合することが示された。これら2つ抗体のいずれもヒトMCAMのドメイン1自体には結合しなかった。したがって、モノクローナル抗体クローン、2120.4.19、及び2107.4.10は、ヒトMCAMタンパク質のドメイン1及び2双方の存在によって決定される新規の抗原エピトープを定義する。

【0315】

上記とは対照的に、以前記載された完全にヒト型の抗MCAM抗体であるABX-MA1は、上記のものとは異なる抗原エピトープ、すなわち、ヒトMCAMのドメイン1のみの中で完全に定義され、包含される抗原エピトープに結合する。

【0316】

これらの結果を考えると、モノクローナル抗体クローン、1174.1.3、1414.1.2、1415.1.1、1749.1.3、2120.4.19、及び2107.4.10は(i)ヒトMCAMへの結合することができ、及び(ii)ヒトMCAMと-4ラミニン含有タンパク質との間の相互作用を阻止することができるので、ABX-MA1抗体はヒトMCAMに結合することのみが可能であるが、ヒトMCAMと-4ラミニン含有タンパク質との間の相互作用を阻止しないのに対して、これらの結果はヒトMCAMのドメイン2、ヒトMCAMのドメイン3及びそれらの組み合わせが-4ラミニン鎖との結合相互作用で役割を担うことを実証している。これを考えると、ヒトMCAMのドメイン2、ヒトMCAMのドメイン3及び/またはそれらの組み合わせに結合する抗体は、ヒトMCAMと-4ラミニンとの間の相互作用を阻止することができる作用因子として使用されることになり、それによって、その相互作用から生じる本明細書で記載される種々の因果関係を阻害するのに使用されることは明らかである。それに対して、ヒトMCAMのドメイン1によってのみ定義される抗原エピトープに結合する抗体（たとえば、本明細書で記載されるABX-MA1）は、MCAM/-4ラミニンの相互作用及びその下流の種々の生物学的帰結を阻止するには有用ではない。

【0317】

実施例4：ショットガン変異誘発エピトープマッピング

ショットガン変異誘発と、真核細胞内での変異させた標的タンパク質の大きなライブラリの発現及び分析を可能にする高処理能力細胞発現技術とを用いて、抗MCAM抗体の結合について関心のある種々のアミノ酸残基を特定した。ヒトMCAMタンパク質におけるあらゆる残基を個々にアラニンまたは他の特定された残基に変異させて機能における変化をアッセイした。タンパク質は標準的な哺乳類細胞株の範囲で発現された。

【0318】

表1は、ショットガン変異誘発ライブラリを生成するのに使用された試薬及び方法の要約を示す。

【表 1】

表 1

親プラスミド	hsMCAM-V5/HIS6 (受入番号NP 006491)
最終ライブラリのサイズ	528の変異体クローンに加えて17の追加の部位特異的変異体
変異戦略	アラニン走査変異誘発
細胞型	BHK-S
エピトープタグ	C-末端V5/HIS6

【0319】

10

完全長のヒトMCAMで上手くコドン最適化し、合成し、哺乳類の高発現ベクターにサブクローニングした。次いで、親構築物の配列を検証し、免疫検出法によって哺乳類細胞での発現について正当性を立証した。

【0320】

1749.1.3抗体及びマウス血清のMCAMへの結合の免疫蛍光による検出は高処理能力ショットガン変異誘発方式について上手く最適化された。384穴の形式にて単一希釈の二次抗体によって各一次抗体の連続希釈を調べた。ヒトMCAMを発現している293T細胞及びBHK細胞の検出について抗体を調べた。完全な変異ライブラリをスクリーニングするために最適なアッセイ条件を選択した。

【0321】

20

545のクローン(528/536のアラニン変異体と17/17の部位特異的変異体)から成り、それぞれアラニンへの単一残基の置換(アラニン残基はセリンに置換する)または特定された置換のいずれかを持つMCAM変異ライブラリを創り出し、配列を検証した。残基35、66、161、261、342、380、414、及び435はライブラリでは表されない。マウス血清への結合についての免疫検出によって3つ組で変異ライブラリをスクリーニングした。これによって各変異体クローンについて細胞表面の発現の正当性を立証する。

【0322】

複数回の最適化を行ってマッピングに好適である条件を決定した。以下の変数：複数のラミニン濃度及び抗ラミニン二次抗体の濃度、非特異的な結合を減らすための種々のブロッキング緩衝液、複数の細胞型及び複数の洗浄工程を評価した。

30

【0323】

1749.1.3抗体への結合についての免疫検出によって3つ組で変異ライブラリをスクリーニングした。各変異体について反応性を定量し、結合の喪失を示す点突然変異体を特定した。

【0324】

各変異体クローンについてモノクローナル抗体及び血清の反応性を定量して表面発現に影響を与えることなく結合の喪失を示す点突然変異体を特定した。各変異体クローンの血清の結合プロファイルとモノクローナル抗体の結合プロファイルを比較することによって各抗体について決定的な残基を特定した。

40

【0325】

384穴の形式にて野生型(WT)のMCAMまたはベクター単独のいずれかでBHK細胞に形質移入し、その後免疫検出を行った。WTまたはベクター単独に対する免疫反応性について各抗体の連続希釈(4 µg/mLで開始して)を調べた(表2)。各点は4つの2つ組の平均を表す。

【表 2】

表 2

一次Abの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	MAb 1749.1.3		Ms血清		Ms血清濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
	S/B	Z'	S/B	Z'	
4.00	13.11	0.69	6.49	0.19	1:100
2.00	27.98	0.58	7.69	0.53	1:200
1.00	27.92	0.76	8.32	0.74	1:400
0.50	40.47	0.68	7.91	0.55	1:800
0.25	33.53	0.72	11.65	0.50	1:1600
0.13	29.95	0.79	16.29	0.50	1:3200
0.06	18.22	0.34	10.87	0.54	1:6400
0.03	10.41	0.62	10.22	0.39	1:12800
0.02	4.91	0.79	7.29	-0.19	1:25600
0.00	0.31	-4.83	1.77	-5.95	0.00

10

【0326】

1749.1.3及びMs血清の免疫検出及びエピトープのマッピングについて最適なスクリーニング条件を決定した。これらの条件を用いて各抗体は、確固たるシグナル、高いシグナル対バックグラウンド値及び反復間の低いばらつきを実証した。これらのデータは、これらの条件が上手く行く高処理能力エピトープマッピングに好適であることを示している。1749.1.3については $0.5\mu\text{g/mL}$ の最終スクリーニング濃度を、Ms血清については1:800の希釈を用いた。Jackson ImmunoResearchの二次抗体はMAb及び血清の検出のために1:400で使用した。表3は高処理能力免疫検出のために最適化された実験パラメータを示す。

20

【表 3】

表 3

実験パラメータ	MAb 1749.1.3	Ms血清
細胞を固定するブロッキング緩衝液	BHK-S 4% PFA 10%ヤギ血清	BHK-S 4% PFA 10%ヤギ血清
一次Ab	1749	血清
Ab名の標的	MCAM	MCAM
最適濃度	$0.5\mu\text{g/mL}$	1:800希釈
インキュベート (RT)	60分間	60分間
二次Abの標的	マウスIgG	マウスIgG
最適濃度	1:400 ($3.75\mu\text{g/mL}$)	1:400 ($3.75\mu\text{g/mL}$)
インキュベート	30分間	30分間
製造元	Jackson/ImmunoResearch	Jackson/ImmunoResearch
カタログ番号	115-545-003	115-545-003
抗体ID	Alexa Fluor (登録商標) 488-AffiniPure ヤギ抗マウスIgG (H+L)	Alexa Fluor (登録商標) 488-AffiniPure ヤギ抗マウスIgG (H+L)
洗浄	PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+} を含まない)	PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+} を含まない)
シグナル:バックグラウンド	40:1	8:1

30

40

【0327】

表面発現 (マウス血清の結合) 及びモノクローナル抗体の結合について3つ組にて変異

50

ライブラリをアッセイした。各生データのポイントはバックグラウンドを差し引き、野生型MCAMの反応性の値に対して基準化した。結果を表1に示す。各クローンについてのモノクローナル抗体の平均結合値を表面発現平均値の関数としてプロットする(図1、灰色の菱形)。<30%のモノクローナル抗体の反応性及び>50%のマウス血清の結合の閾値を適用して、モノクローナル抗体の結合については陰性であるが、表面発現については陽性であるクローン(図1、黒色の菱形)を特定した。

【0328】

その全体的な表面発現(血清の平均反応性)に比べた各クローンのモノクローナル抗体の平均反応性を評価することによって1749.1.3について決定的な残基を特定した。抗体結合に關与する残基は、モノクローナル抗体の結合については陰性である(<30%WT)が、表面発現については陽性である(>50%WT)ものとして特定した(表4)。

【表4】

表4

残基ID	変異	MAb 1749.1.3	Ms血清
272	C272A	7.6 (4.7)	54.5 (55.8)
318	Y318A	7.1 (2.4)	111.7 (9.2)
320	C320A	9.3 (11.2)	50 (54.6)
340	V340A	8.7 (8.3)	103.8 (71.3)
377	W377A	13.7 (10.3)	63.4 (18.9)

【0329】

ショットガン変異誘発マッピングによって特定された決定的なアミノ酸は1749.1.3抗体についての結合部位を示唆している。データは1749.1.3がMCAMの第3Igドメインにて立体構造的に複雑なエピトープを結合することを示している。

【0330】

決定的な残基は、第2及び/または第3のIgドメインのジスルフィド結合が寄与する構造的安定性に大きく依存すると思われる。システイン272または320いずれかへの変異が抗体結合を無効にするということは、第3のIgドメインの共有ジスルフィド結合がエピトープを安定化するのに重大な役割を担うことを示唆している。

【0331】

実施例5：抗体及びラミニンの結合についての確証的MCAMエピトープマッピング

ヒトMCAMにて1749.1.3の結合部位を特定するために、Schrodinger Maestroを用いてpdb 3KVQ__A、3V2A__R、2IEP__A及び2YD1__AにてヒトMCAM Ig3の相同性モデルを作り上げた(図2)。構造情報及びショットガン変異誘発の情報に基づいた20の点突然変異体を設計し、生成した。これらの変異体を哺乳類細胞で発現させ、FACS用いて1749.1.3及びラミニン-4のMCAM変異体との結合を調べた。3つのMCAM単一変異体、I141A、D216A及びY318Aはラミニン-4の結合の完全な喪失を明らかにした。Y318A変異体は1749.1.3の結合の完全な喪失を明らかにした。

【0332】

データをさらに裏付けるために、それぞれI141A、P145V、D216A及びY318Aを発現している安定な細胞株を生成した。上述のような精製したタンパク質でFortebioアッセイを行った。対照のABX-MA1抗体は野生型MCAM及びMCAMの変異体に結合した。1749.1.3抗体はMCAMのY318Aへの十分な結合を示さなかった。

【0333】

実施例6：1749.1.3抗体のヒト化

ヒト化のための出発点またはドナー抗体は、WO/2012/170071及びPCT

／US2013/058773に記載されたハイブリドーマによって産生されたマウス抗体1749である。成熟m1749の成熟重鎖可変のアミノ酸配列及び核酸配列はそれぞれ配列番号93及び64として提供されている。成熟m1749の成熟軽鎖可変のアミノ酸配列及び核酸配列はそれぞれ配列番号97及び59として提供されている。重鎖CDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号66、67及び68として提供されている。軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号61、62及び63として提供されている。この実施例の全体にわたってKabatの番号付けを使用する。

【0334】

m1749の可変カップ(Vk)は、ヒトのKabat亜群4に相当するマウスのKabat亜群1に属する。m1749の可変重鎖(Vh)はヒトのKabat亜群3に相当するマウスのKabat亜群3dに属する(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、NIH Publication No. 91-3242, 1991)。17残基のCDR-L1はVkにおける規定クラス3に属し、7残基のCDR-L2は規定クラス1に属し、8残基のCDR-L3は規定クラス3に属する(Martin及びThornton, J. Mol. Biol. 263:800-15, 1996)。5残基のCDR-H1は規定クラス1に属し、17残基のCDR-H2は規定クラス1または3に属する(Martin及びThornton, J. Mol. Biol. 263:800-15, 1996)。CDR-H3は規定クラスを有さないが、11残基のループはShiraiら, FEB S Lett. 455:188-97(1999)のルールに従って多分捻じれた(kinked)塩基を有する。

【0335】

VkドメインとVhドメインの間の界面における残基は一般に見いだされるものである。PDBデータベース(Deshpandeら、Nucleic Acids Res. 33:D233-7, 2005)においてタンパク質配列にて検索を行い、1749の粗構造モデルを提供することになる構造を見いだした。m1749Vkとの良好な全体の配列類似性を有するので、ループについて同じ規定構造を保持する、大腸菌における内在性膜タンパク質DsbBに対する抗体。モデル化ではVk構造について抗DsbB抗体のX線結晶構造(pdbコード2LTQ; Tangら、J. Mol. Biol. 425:1670-82, 2013; 配列番号161)を用いた。インフルエンザウイルス血球凝集素に由来するペプチド免疫原に向けられた抗体は1749Vhの構造に対する良好で全体的な配列類似性を有する。それはまた捻じれた(kinked)塩基を伴った類似の長さのCDR-H3も有する。インフルエンザウイルス血球凝集素に由来するペプチド免疫原に向けられた抗体の構造(1HIL; Riniら、Science, 255:959-65, 1992; 配列番号157)は、理に適った解像度(2.0Å)を有し、モデル化においてVh構造に使用された。加えて、1H1LのCDR-H1及びCDR-H2は、CDR-H1及びCDR-H2について1749Vhのそれと同じ規定構造を有する。Bio Luminate(登録商標)を用いて1749Fvの粗構造をモデル化した。

【0336】

NCBIに由来する非冗長タンパク質配列のデータベースの検索によってその中にマウスCDRを移植するヒトの好適なフレームワークの選択が可能になった。VKについては、2つのヒトのカップ軽鎖を選択し、第1の鎖はNCBI受入コードABA71407.1(GI:77379502; 配列番号162)(Manskeら、Clin. Immunol. 120:106-20, 2006)を持ち、及び第2の鎖はNCBI受入コードCAI99800.1(GI:98956324; 配列番号163)(Suら、J. Immunol. 181:1264-71, 2008)を持つ。これはCDR-L1、L2及びL3について同じ規定クラスを有する。ABA71407.1はマウス1749の軽鎖に対して軽鎖可変領域フレームワークで85%の配列同一性を有する。CAI99800.1は、マウス1749の軽鎖に対して軽鎖可変領域フレームワークで83%の配列同一

性を有する。

【0337】

Vhについては、2つのヒトIg重鎖を選択したが、第1の鎖はNCBI受入コードAAx82494.1 (GI: 62421461; 配列番号158) (Lundquist, Infect. Immun. 74: 3222-31, 2006)を持ち、第2の鎖は受入コードADx65676.1 (GI: 323432073; 配列番号159) (未発表)を持つ。それは1749のCDR-H1及び-H2の規定形態を共有し、H3は予測された捻じれた(kinked)塩基を伴って11残基長い。AAx82494.1は、マウス1749重鎖に対して可変領域フレームワークで91%の配列同一性を有する。ADx65676.1はマウス1749重鎖に対して可変領域フレームワークで83%の配列同一性を有する。

10

【0338】

上記の置換(Hu1749VHv3; 配列番号156及びHu1749VLv3; 配列番号160)を含有するヒト化された軽鎖可変領域の変異体とヒト化された重鎖可変領域の変異体を構築した(図3A及び3B)。Hu1749VHv3及びHu1749VLv3におけるH3、H42、H93、L9、L19、L43でのアミノ酸を表5にて列記する。

【表5】

表5

ヒト化1749抗体における逆突然変異についての一部のフレームワーク残基のKabatの番号付け

20

Kabat 残基番号	線状 残基番号	ABA71407.1 軽鎖	CAI99800.1 軽鎖	AAx82494.1 重鎖	ADx65676.1 重鎖	マウス 1749	Hu1749VLv3	Hu1749VHv3
H3	3	-	-	Q	Q	K	-	K
H42	42	-	-	D	G	E	-	E
H93	97	-	-	A	A	T	-	T
L9	9	D	D	-	-	S	S	-
L19	19	A	A	-	-	V	V	-
L43	49	P	P	-	-	S	S	-

30

【0339】

置換の候補としての上記の位置の選択についての論理的根拠は以下のとおりである。

【0340】

Q3K (フレームワークの逆突然変異について他のどこでも同じようにここでは、最初に述べた残基はヒトの残基であり、2番目はマウスの残基である): KはCDRH3にてY102に接触する。したがって、それはフレームワークにて維持されるべきである。

【0341】

40

G42E: EはヒトのアクセプターAAx82494.1にてDと類似の側鎖を有する。この逆突然変異はタンパク質の安定性に寄与する。

【0342】

A93T: この位置はVk/Vhの界面の残基である。

【0343】

D9S: この残基はCDR及び/または界面に接触せず、または影響を与えない。ヒトのフレームワーク領域にてSの頻度はDより大きい。

【0344】

A19V: ヒトのフレームワーク領域にてV及びAの頻度は類似している。

【0345】

50

P 4 3 S : S は V H における 2 つの界面残基 Y 9 1 と W 1 0 3 に接触する。したがって、それは重要であり、フレームワークで維持されるべきである。

【 0 3 4 6 】

> H u 1 7 4 9 V H v 3

EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMSWVRQTPEKRLEWVA**TISSGGSSTY**
YPDSVKGRRFTISRDNAKNTLYLQMSSSLKSEDTAMYYCTR**DDDYDVKVFAY**WGQGLV
TVSS

【 0 3 4 7 】

> H u 1 7 4 9 V L v 3

DIVMTQSPSSSLAVSLGERVTINC**KSSRSLLSRIRKNYLA**WYQQKPGQSPKLLIY**WAST**
RESGVPDRFGSGSGTDFLT**IS**SLQAEDVAVYYC**KQSYNLLT**FGQGTKVEIKR

【 0 3 4 8 】

実施例 7 : 変異体、ヒト化 1 7 4 9 H 3 L 3 抗体の性状分析

重鎖 H u 1 7 4 9 V H v 3 と軽鎖 H u 1 7 4 9 V L v 3 を含むヒト化 1 7 4 9 抗体の結合動態を性状分析した。

【 0 3 4 9 】

F o r t e B i o O c t e t Q K 機器 (F o r t e B i o , M e n l o P a r k , C A) を用いたバイオ層干渉分光法 (B L I) によってヒト化 1 7 4 9 抗体の結合動態を測定した。キメラ 1 7 4 9 抗体及びヒト化 1 7 4 9 抗体について詳細な結合動態パラメータ (会合速度、見かけの k_a 、解離速度、見かけの k_d 、及び親和性定数、見かけの K_D) を測定した (表 6)。見かけの k_a 、見かけの k_d 、及び見かけの K_D は F o r t e B i o アッセイ形式を用いて得られる結合動態パラメータである。

【 0 3 5 0 】

S E M の範囲内で 1 7 4 9 . 1 . 3 と同じである最低の解離定数 (最高の会合定数) を与える H u 1 7 4 9 H 3 L 3 の変異体を見いだした。

【 表 6 】

表 6

マウス 1 7 4 9 抗体、キメラ 1 7 4 9 抗体及びヒト化 1 7 4 9 抗体の結合動態パラメータ

抗体	見かけの K_D M	見かけの K_a ($M^{-1} s^{-1}$)	見かけの K_d (s^{-1})
マウス 1 7 4 9	2 . 8 6 E - 1 0	1 . 4 1 E + 6	4 . 0 2 E - 0 4
キメラ 1 7 4 9	2 . 2 6 E - 1 0	1 . 9 4 E + 6	4 . 3 9 E - 0 4
ヒト 1 7 4 9 V H 3 V L 3 (H u 1 7 4 9 V H v 3 及び H u 1 7 4 9 V L v 3)	2 . 2 1 E - 1 0	1 . 9 9 E + 6	4 . 4 0 E - 0 4

【 0 3 5 1 】

加えて、動的光散乱 (D L S) による分析は、親 m 1 7 4 9 抗体のそれに類似する h 1 7 4 9 H 3 L 3 抗体の多分散性のレベル (% P D) を示す (表 7)。動的光散乱の測定値は、石英キュベット内の 1 0 マイクロリットルサイズの容量で W y a t t D y n a P r o N a n o s t a r 動的光散乱機器にて得られた。測定値はすべて 3 7 ° で得られ、各測定は 5 秒間の取得時間で 1 0 回の取得を有した。R a y l e i g h S p h e r e s モデルを用いた W y a t t T e c h n o l o g y D y n a m i c s 7 . 0 ソフトウェアによって基準化を行った。

10

20

30

40

50

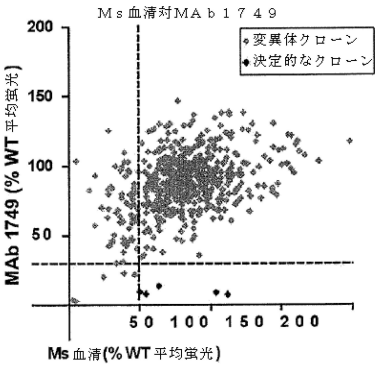
【表 7】
表 7

1749変異体のDLS分析

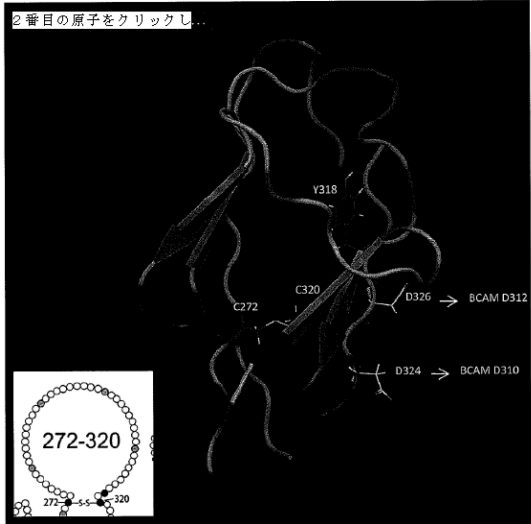
mAb	%Pd
h1749 WT	68.8
h1749 P43S	64.6
m1749	10.2
ch1749	19.6
h1749H3L3	22.0

10

【図 1】



【図 2】



【図 3 A】

大多数	DI VMTQSPFSLAVSLGSEVTI NC <u>SSYSLSSNPKKSN</u> <u>WIAFYQKPGCSFKLLIY</u> <u>WAKG</u>
	10 20 30 40 50 60
1749VL タンパク質	DI VMTQSPSSIAVGLPFPVPECCGSGSSSLSP <u>AKKSN</u> <u>AWYQGRPGSFKLLIY</u> <u>WAKG</u> 60
2LTQVL	DI VMTQSPSSIAVGLPFPVPECCGSGSSSLSP <u>AKKSN</u> <u>AWYQGRPGSFKLLIY</u> <u>WAKG</u> 60
ARA1497.1	DI VMTQSPSSIAVGLPFPVPECCGSGSSSLSP <u>AKKSN</u> <u>AWYQGRPGSFKLLIY</u> <u>WAKG</u> 60
CA189900.1	DI VMTQSPSSIAVGLPFPVPECCGSGSSSLSP <u>AKKSN</u> <u>AWYQGRPGSFKLLIY</u> <u>WAKG</u> 60
h1749VLv3 タンパク質	DI VMTQSPSSIAVGLPFPVPECCGSGSSSLSP <u>AKKSN</u> <u>AWYQGRPGSFKLLIY</u> <u>WAKG</u> 60
大多数	<u>SSGVPRFTQSGSGTGFETLTSSPVQAE</u> <u>DAVYVQGRPGSFKLLIY</u> <u>WAKG</u> <u>FLIKIK</u>
	70 80 90 100 110
1749VL タンパク質	<u>SSGVPRFTQSGSGTGFETLTSSPVQAE</u> <u>DAVYVQGRPGSFKLLIY</u> <u>WAKG</u> <u>FLIKIK</u> 113
2LTQVL	<u>SSGVPRFTQSGSGTGFETLTSSPVQAE</u> <u>DAVYVQGRPGSFKLLIY</u> <u>WAKG</u> <u>FLIKIK</u> 113
ARA1497.1	<u>SSGVPRFTQSGSGTGFETLTSSPVQAE</u> <u>DAVYVQGRPGSFKLLIY</u> <u>WAKG</u> <u>FLIKIK</u> 113
CA189900.1	<u>SSGVPRFTQSGSGTGFETLTSSPVQAE</u> <u>DAVYVQGRPGSFKLLIY</u> <u>WAKG</u> <u>FLIKIK</u> 112
h1749VLv3 タンパク質	<u>SSGVPRFTQSGSGTGFETLTSSPVQAE</u> <u>DAVYVQGRPGSFKLLIY</u> <u>WAKG</u> <u>FLIKIK</u> 113

【図 3 B】

大多數	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTPSVSRSGVVRQTPEKPLEWVAETDSGGKRTYY	
	10 20 30 40 50 60	
174 PVE タンパク質	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTPSVSRSGVVRQTPEKPLEWVAETDSGGKRTYY	60
1HILVH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTPSVSRSGVVRQTPEKPLEWVAETDSGGKRTYY	60
AAZ 52494.1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTPSVSRSGVVRQTPEKPLEWVAETDSGGKRTYY	60
ANK 65676.1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTPSVSRSGVVRQTPEKPLEWVAETDSGGKRTYY	60
h017450 PVE タンパク質	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTPSVSRSGVVRQTPEKPLEWVAETDSGGKRTYY	60
大多數	EDLVSRPTTIRINAKNTLYLQMSLSKSEDTAMVTCARSDGVNRYEAWGQGTATVVS	
	70 80 90 100 110 120	
174 PVE タンパク質	EDLVSRPTTIRINAKNTLYLQMSLSKSEDTAMVTCARSDGVNRYEAWGQGTATVVS	120
1HILVH	EDLVSRPTTIRINAKNTLYLQMSLSKSEDTAMVTCARSDGVNRYEAWGQGTATVVS	120
AAZ 52494.1	EDLVSRPTTIRINAKNTLYLQMSLSKSEDTAMVTCARSDGVNRYEAWGQGTATVVS	120
ANK 65676.1	EDLVSRPTTIRINAKNTLYLQMSLSKSEDTAMVTCARSDGVNRYEAWGQGTATVVS	120
h017450 PVE タンパク質	EDLVSRPTTIRINAKNTLYLQMSLSKSEDTAMVTCARSDGVNRYEAWGQGTATVVS	120

修飾 '修飾 #1': コンセンサスとは異なるボックス中の残基。

【配列表】

0006728053000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
		C 1 2 N 15/09	Z

(31)優先権主張番号 62/068,438

(32)優先日 平成26年10月24日(2014.10.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(74)代理人 100130328

弁理士 奥野 彰彦

(74)代理人 100130672

弁理士 伊藤 寛之

(72)発明者 リウ, ユー

アメリカ合衆国 9 4 4 0 4 カリフォルニア, フォスター シティ, ピアリー レーン 8
1 5

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特許第6 3 3 9 5 7 4 (J P , B 2)

特表2 0 0 6 - 5 1 6 0 8 5 (J P , A)

特表2 0 0 5 - 5 1 4 4 0 9 (J P , A)

国際公開第2 0 1 2 / 1 7 0 0 7 1 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 4 6

C 0 7 K 1 6 / 2 8

C 1 2 N 1 5 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

S w i s s P r o t / G e n e S e q