

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7213549号

(P7213549)

(45)発行日 令和5年1月27日(2023.1.27)

(24)登録日 令和5年1月19日(2023.1.19)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 0 7 K 16/30 (2006.01)

C 0 7 K 16/30

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 41 (全89頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-511427(P2019-511427)

(86)(22)出願日 平成29年8月22日(2017.8.22)

(65)公表番号 特表2020-500003(P2020-500003
A)

(43)公表日 令和2年1月9日(2020.1.9)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/048074

(87)国際公開番号 WO2018/039274

(87)国際公開日 平成30年3月1日(2018.3.1)

審査請求日 令和2年6月29日(2020.6.29)

(31)優先権主張番号 62/378,102

(32)優先日 平成28年8月22日(2016.8.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 519058941

シーエイチオー ファーマ インコーポレ
イテッド台湾 1 1 5 タイペイ, ナンカン ディ
ストリクト, パーク ストリート, ナ
ンバー 3, ビルディング エフ, 1 8
エフ

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体、結合性断片、および使用の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 置換されていない配列番号 1 0 の配列、または配列番号 1 0 において 1 位が S e
r に置換され、かつ / もしくは 5 位が T h r に置換された配列を有する、H - C D R 1、(i i) 置換されていない配列番号 1 1 の配列、または配列番号 1 1 において 1 位、4
位および / もしくは 1 3 位が A l a に置換された配列を有する、H - C D R 2、(i i i) 置換されていない配列番号 1 2 の配列、または配列番号 1 2 において 3 位が
A r g に置換された配列を有する、H - C D R 3、(i v) 置換されていない配列番号 1 5 の配列、または配列番号 1 5 において 6 位が、
I l e もしくは A l a に置換された配列を有する、L - C D R 1、(v) 置換されていない配列番号 1 6 の配列、または配列番号 1 6 において 3 位が T y
r に置換されている配列を有する、L - C D R 2、ならびに(v i) 置換されていない配列番号 1 7 の配列、または配列番号 1 7 において 3 位が A
l a に置換され、かつ / もしくは 6 位が P h e に置換された配列を有する、L - C D R 3
を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片であって、前記抗体が
結合する標的または前記結合性断片の標的が、構造 N e u 5 A c 2 3 G a l 1 3
G a l N A c 1 3 G a l 1 4 G a l 1 4 G l c 1 を有する炭水化物抗原 S
S E A 4 である、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 2】

重鎖における A 1 0 0 R、N 3 1 S、T 6 2 A のうちの 1 つもしくは複数、および / ま

たは軽鎖におけるS 5 2 Yから選択される、CDRにおけるアミノ酸置換を含み、A 1 0 0 Rは配列番号13の100位のA l aのA r gでの置換であり、N 3 1 Sは配列番号13の31位のA s nのS e rでの置換であり、T 6 2 Aは配列番号13の62位のT h rのA l aでの置換であり、S 5 2 Yは配列番号198の52位のS e rのT y rでの置換である、請求項1に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項3】

重鎖におけるV 5 0 A、G 5 3 A、S 3 5 Tのうちの1つもしくは複数、および/または軽鎖におけるV 3 0 I / A、G 9 1 A、Y 9 4 Fのうちの1つもしくは複数から選択される、CDRにおけるアミノ酸置換を含み、V 5 0 Aは配列番号13の50位のV a lのA l aでの置換であり、G 5 3 Aは配列番号13の53位のG l yのA l aでの置換であり、S 3 5 Tは35位のS e rのT h rでの置換であり、V 3 0 I / Aは配列番号198の30位のV a lのI l eまたはA l aでの置換であり、G 9 1 Aは配列番号198の91位のG l yのA l aでの置換であり、Y 9 4 Fは配列番号198の94位のT y rのP h eでの置換である、請求項1に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

10

【請求項4】

(i) 配列番号13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、または173を有する重鎖可変ドメイン、ならびに

(ii) 配列番号18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、または178を有する軽鎖可変ドメイン

20

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片であって、前記抗体が結合する標的または前記結合性断片の標的が、構造Neu5Ac 2 3Gal 1 3GalNAc 1 3Gal 1 4Gal 1 4Glc 1を有する炭水化物抗原SSEA4である、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項5】

(i) 配列番号10、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、または170を有するH - CDR1、配列番号11、41、51、61、71、81、101、121、131、141、151、または171を有するH - CDR2、配列番号12、42、52、62、72、82、102、122、132、142、152、または172を有するH - CDR3を含む、重鎖可変ドメイン、ならびに

30

(ii) 配列番号15、45、55、65、75、85、105、125、135、145、155、または175を有するL - CDR1、配列番号16、46、56、66、76、86、106、126、136、146、156、または176を有するL - CDR2、ならびに配列番号17、47、57、67、77、87、107、127、137、147、157、または177を有するL - CDR3を含む、軽鎖可変ドメイン

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片であって、前記抗体が結合する標的または前記結合性断片の標的が、構造Neu5Ac 2 3Gal 1 3GalNAc 1 3Gal 1 4Gal 1 4Glc 1を有する炭水化物抗原SSEA4である、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項6】

40

(i) 配列番号13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、または173を有する重鎖可変ドメイン、ならびに

(ii) 配列番号15、45、55、65、75、85、105、125、135、145、155、または175を有するL - CDR1、配列番号16、46、56、66、76、86、106、126、136、146、156、または176を有するL - CDR2、ならびに配列番号17、47、57、67、77、87、107、127、137、147、157、または177を有するL - CDR3を含む、軽鎖可変ドメインを含む、

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片であって、前記抗体が結合する標的または前記結合性断片の標的が、構造Neu5Ac 2 3Gal 1 3GalNAc 1 3Gal 1 4Gal 1 4Glc 1を有する炭水化物抗原SSEA

50

4である、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 7】

(i) 配列番号 1 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、1 0 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、または 1 7 0 を有する H - C D R 1、配列番号 1 1、4 1、5 1、6 1、7 1、8 1、1 0 1、1 2 1、1 3 1、1 4 1、1 5 1、または 1 7 1 を有する H - C D R 2、配列番号 1 2、4 2、5 2、6 2、7 2、8 2、1 0 2、1 2 2、1 3 2、1 4 2、1 5 2、または 1 7 2 を有する H - C D R 3 を含む、重鎖可変ドメイン、ならびに

(i i) 配列番号 1 8、2 8、3 8、4 8、5 8、6 8、7 8、8 8、1 0 8、1 2 8、1 3 8、1 4 8、1 5 8、または 1 7 8 を有する軽鎖可変ドメイン

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片であって、前記抗体が結合する標的または前記結合性断片の標的が、構造 Neu5Ac 2 3Gal 1 3GalNAc 1 3Gal 1 4Gal 1 4Glc 1 を有する炭水化物抗原 SEA 4 である、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

10

【請求項 8】

以下の (1) ~ (1 4) に規定される配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片：

- (1) 配列番号 1 0 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 1 1 に記載の H - C D R 2 ;
配列番号 1 2 に記載の H - C D R 3 ;
配列番号 1 3 に記載の重鎖可変ドメイン ;
配列番号 1 5 に記載の L - C D R 1 ;
配列番号 1 6 に記載の L - C D R 2 ;
配列番号 1 7 に記載の L - C D R 3 ; および
配列番号 1 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ;
- (2) 配列番号 2 3 に記載の重鎖可変ドメイン ; および
配列番号 2 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ;
- (3) 配列番号 3 3 に記載の重鎖可変ドメイン ; および
配列番号 3 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ;
- (4) 配列番号 4 0 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 4 1 に記載の H - C D R 2 ;
配列番号 4 2 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 4 3 に記載の重鎖可変ドメイン ;
配列番号 4 5 に記載の L - C D R 1 ;
配列番号 4 6 に記載の L - C D R 2 ;
配列番号 4 7 に記載の L - C D R 3 ; および
配列番号 4 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ;
- (5) 配列番号 5 0 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 5 1 に記載の H - C D R 2 ;
配列番号 5 2 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 5 3 に記載の重鎖可変ドメイン ;
配列番号 5 5 に記載の L - C D R 1 ;
配列番号 5 6 に記載の L - C D R 2 ;
配列番号 5 7 に記載の L - C D R 3 ; および
配列番号 5 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ;
- (6) 配列番号 6 0 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 6 1 に記載の H - C D R 2 ;
配列番号 6 2 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 6 3 に記載の重鎖可変ドメイン ;
配列番号 6 5 に記載の L - C D R 1 ;
配列番号 6 6 に記載の L - C D R 2 ;

20

30

40

50

- 配列番号 6 7 に記載の L - C D R 3 ; および
配列番号 6 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ;
- (7) 配列番号 7 0 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 7 1 に記載の H - C D R 2 ;
配列番号 7 2 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 7 3 に記載の重鎖可変ドメイン ;
配列番号 7 5 に記載の L - C D R 1 ;
配列番号 7 6 に記載の L - C D R 2 ;
配列番号 7 7 に記載の L - C D R 3 ; および
配列番号 7 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ; 10
- (8) 配列番号 8 0 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 8 1 に記載の H - C D R 2 ;
配列番号 8 2 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 8 3 に記載の重鎖可変ドメイン ;
配列番号 8 5 に記載の L - C D R 1 ;
配列番号 8 6 に記載の L - C D R 2 ;
配列番号 8 7 に記載の L - C D R 3 ; および
配列番号 8 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ;
- (9) 配列番号 1 0 0 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 1 0 1 に記載の H - C D R 2 ; 20
配列番号 1 0 2 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 1 0 3 に記載の重鎖可変ドメイン ;
配列番号 1 0 5 に記載の L - C D R 1 ;
配列番号 1 0 6 に記載の L - C D R 2 ;
配列番号 1 0 7 に記載の L - C D R 3 ; および
配列番号 1 0 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ;
- (1 0) 配列番号 1 2 0 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 1 2 1 に記載の H - C D R 2 ;
配列番号 1 2 2 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 1 2 3 に記載の重鎖可変ドメイン ; 30
配列番号 1 2 5 に記載の L - C D R 1 ;
配列番号 1 2 6 に記載の L - C D R 2 ;
配列番号 1 2 7 に記載の L - C D R 3 ; および
配列番号 1 2 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ;
- (1 1) 配列番号 1 3 0 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 1 3 1 に記載の H - C D R 2 ;
配列番号 1 3 2 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 1 3 3 に記載の重鎖可変ドメイン ;
配列番号 1 3 5 に記載の L - C D R 1 ;
配列番号 1 3 6 に記載の L - C D R 2 ; 40
配列番号 1 3 7 に記載の L - C D R 3 ; および
配列番号 1 3 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ;
- (1 2) 配列番号 1 4 0 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 1 4 1 に記載の H - C D R 2 ;
配列番号 1 4 2 に記載の H - C D R 1 ;
配列番号 1 4 3 に記載の重鎖可変ドメイン ;
配列番号 1 4 5 に記載の L - C D R 1 ;
配列番号 1 4 6 に記載の L - C D R 2 ;
配列番号 1 4 7 に記載の L - C D R 3 ; および
配列番号 1 4 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ; 50

(1 3) 配列番号 1 5 0 に記載の H - C D R 1 ;
 配列番号 1 5 1 に記載の H - C D R 2 ;
 配列番号 1 5 2 に記載の H - C D R 1 ;
 配列番号 1 5 3 に記載の重鎖可変ドメイン ;
 配列番号 1 5 5 に記載の L - C D R 1 ;
 配列番号 1 5 6 に記載の L - C D R 2 ;
 配列番号 1 5 7 に記載の L - C D R 3 ; および
 配列番号 1 5 8 に記載の軽鎖可変ドメイン ; または

(1 4) 配列番号 1 7 0 に記載の H - C D R 1 ;
 配列番号 1 7 1 に記載の H - C D R 2 ;
 配列番号 1 7 2 に記載の H - C D R 1 ;
 配列番号 1 7 3 に記載の重鎖可変ドメイン ;
 配列番号 1 7 5 に記載の L - C D R 1 ;
 配列番号 1 7 6 に記載の L - C D R 2 ;
 配列番号 1 7 7 に記載の L - C D R 3 ; および
 配列番号 1 7 8 に記載の軽鎖可変ドメイン。

10

【請求項 9】

前記抗体または抗原結合性断片が、

- a) キメラ抗体もしくはその断片であるか、または
- b) ヒト化抗体もしくはその断片であるか、または
- c) ヒト抗体もしくはその断片であるか、または

20

d) F a b、F a b'、F v、s c F v、d s F v、F (a b)₂、F d、およびダイアボディからなる群から選択される抗原結合性断片である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体または抗原結合性断片。

【請求項 1 0】

前記抗体が、I g G である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体または抗原結合性断片。

【請求項 1 1】

前記抗体が、標的細胞に結合すると、C D C および / または A D C C 誘導活性を有する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体または抗原結合性断片。

30

【請求項 1 2】

請求項 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性断片と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 1 3】

1 つまたは複数の治療剤をさらに含む、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

前記治療剤が、治療用抗体、化学療法剤、またはサイトカインから選択される、請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗体と、細胞毒性剤とを含む、イムノコンジュゲート。

40

【請求項 1 6】

式 A B - (L - D) p を有し、式中、

- (a) A B が、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗体であり、
- (b) L が、リンカーであり、
- (c) D が、好適な細胞毒性薬物であり、
- (d) p が、1 から 8 の範囲である、請求項 1 5 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 1 7】

前記薬物が、M M A E または M M A F である、請求項 1 6 に記載のイムノコンジュゲート (A D C)。

50

【請求項 18】

前記リンカーが、切断可能なリンカーである、請求項 16 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 19】

前記切断可能なリンカーが、アルコキシアミン切断性リンカーである、請求項 18 に記載のADC。

【請求項 20】

請求項 15 ~ 19 のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む、医薬製剤。

【請求項 21】

追加の治療剤をさらに含む、請求項 20 に記載の医薬製剤。

【請求項 22】

請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の抗体をコードする、単離された核酸 (cDNA)。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 24】

抗体を産生する方法であって、前記抗体が産生されるように、請求項 23 に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。

【請求項 25】

SS E A 4 陽性がんを有する対象を処置するための、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の医薬組成物または請求項 20 もしくは 21 に記載の医薬製剤。

【請求項 26】

前記SS E A 4 陽性がんが、脳、肺、乳房、口腔、食道、胃、肝臓、胆管、膵臓、結腸、腎臓、子宮頸、卵巣、および/または前立腺のがんである、請求項 25 に記載の医薬組成物または医薬製剤。

【請求項 27】

前記処置が1つまたは複数の追加の治療モダリティまたは薬剤を組み合わせ、個体に投与することをさらに含む、請求項 25 に記載の医薬組成物または医薬製剤。

【請求項 28】

組み合わせられた処置モダリティが、治療用抗体、細胞療法、放射線、サイトカイン、および/または化学療法剤である、請求項 27 に記載の医薬組成物または医薬製剤。

【請求項 29】

SS E A 4 陽性細胞の増殖を阻害するための請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の医薬組成物または請求項 20 もしくは 21 に記載の医薬製剤であって、前記医薬組成物または医薬製剤は、前記細胞に、前記抗体/断片/ADCが、炭水化物抗原を発現する前記細胞の表面上のSS E A 4 に結合するのを許容する条件下において曝露され、それによって前記細胞の増殖を阻害する、医薬組成物または医薬製剤。

【請求項 30】

SS E A 4 陽性がんを有する対象を処置するための請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の医薬組成物または請求項 20 もしくは 21 に記載の医薬製剤であって、前記SS E A 4 陽性がんが、第1の治療剤に対して耐性である、医薬組成物または医薬製剤。

【請求項 31】

前記SS E A 4 陽性がんが、脳、肺、乳房、口腔、食道、胃、肝臓、胆管、膵臓、結腸、腎臓、子宮頸、卵巣、および/または前立腺のがんである、請求項 30 に記載の医薬組成物または医薬製剤。

【請求項 32】

前記第1の治療剤が、SS E A 4 以外の抗原に結合する第1の抗体/結合性断片/ADC、および/または放射線、および/または化学療法剤を含む、請求項 30 に記載の医薬組成物または医薬製剤。

10

20

30

40

50

【請求項 3 3】

生物学的試料において S S E A 4 を検出する方法であって、前記生物学的試料を、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の抗 S S E A 4 抗体と、前記抗 S S E A 4 抗体が、天然に存在する S S E A 4 に結合するのを許容する条件下において接触させることと、前記生物学的試料において、前記抗 S S E A 4 抗体と天然に存在する S S E A 4 との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、方法。

【請求項 3 4】

前記生物学的試料が、がん試料である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

S S E A 4 陽性がんを検出するための、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の抗 S S E A 4 抗体を含む医薬組成物であって、前記検出は (i) 標識した抗 S S E A 4 抗体を、炭水化物抗原を発現する腫瘍を有するかまたはそれを有する疑いのある対象に投与するステップと、(i i) 前記対象において、前記標識した抗 S S E A 4 抗体を検出するステップであって、前記標識した抗 S S E A 4 抗体の検出が、前記対象における S S E A 4 陽性がんを示す、ステップとを含む、医薬組成物。

10

【請求項 3 6】

S S E A 4 陽性がんを検出するための方法であって、(i) 標識した抗 S S E A 4 抗体を、炭水化物抗原を発現する腫瘍を有するかまたはそれを有する疑いのある対象に由来する試料と接触させるステップであって、前記標識した抗 S S E A 4 抗体が、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の抗 S S E A 4 抗体を含む、ステップと、(i i) 前記試料において、前記標識した抗 S S E A 4 抗体を検出するステップであって、前記標識した抗 S S E A 4 抗体の検出が、前記試料における S S E A 4 陽性がんを示す、ステップとを含む、方法。

20

【請求項 3 7】

10^{-7} M より低い親和性定数で、S S E A 4 に特異的に結合する、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 3 8】

I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 である、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 3 9】

I g G 1 または I g G 1 である、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

30

【請求項 4 0】

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合性部分が、 1×10^{-7} M またはそれより低い K_D で、S S E A 4 に結合し、前記 K_D が、表面プラズモン共鳴 (B i a c o r e) 分析によって測定される、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分。

【請求項 4 1】

結合親和性が、50 n M より低い、請求項 4 0 に記載の単離された抗 S S E A 4 抗体またはその結合性断片。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2016年8月22日に提出された米国仮出願番号第62/378,102号に基づく優先権の利益を主張しており、その内容は、その全体が参考として援用される。

【0002】

発明の分野

本開示は、がんを含む増殖性障害の処置における免疫療法のための抗体および結合性断片、ならびにその診断の方法を対象とする。具体的には、本開示は、免疫原性オリゴ糖 S

50

S E A 4 に対する抗体および / または結合性断片、ならびに医薬組成物を含む、炭水化物関連の免疫療法に関する。さらに、本開示は、過剰増殖性状態、および異常な細胞に発現される腫瘍学関連または特異的な炭水化物の検出および / または診断に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

ステージ特異的胎児抗原 4 (S S E A 4) は、グロボ系列スフィンゴ糖脂質 (G S L) に属する六糖であり、Neu5Ac₂Gal₁GalNAc₁Gal₁Gal₁Glc₁の構造を含む。S S E A 4 は、1983 年に、ヒト奇形癌腫細胞から初めて単離され (K a n n a g i R ら、1983 年)、現在のところ、ヒト胚性幹細胞 (h E S C) を定義するための表面マーカーとして広く使用されている。過去数十年間で、ますます多くの研究が、中核的な構造 Gal₁GalNAc₁Gal₁Gal₁Glc₁ (S S E A 3) が S S E A 4 と共通している G S L である G l o b o H が、卵巣がん、胃がん、前立腺がん、肺がん、乳がん、および膵臓がんを含む、多数の上皮がんにおいて過剰発現されることを示している (Z h a n g S ら、1997 年)。高いレベルの S S E A 4 の発現は、腎細胞癌 (S a i t o S ら、1997 年) および多型膠芽細胞腫 (L o u Y W ら、2014 年) において観察されている。さらに興味深いことに、S S E A 3 および G l o b o H とともに、S S E A 4 の発現は、乳房腫瘍細胞だけでなく、乳がん幹細胞においても見出されている (C h a n g W W ら、2008 年、H u a n g Y L ら、2013 年)。

【0004】

しかしながら炭水化物抗原はしばしば免疫系に耐容性であるため、結果として誘導される免疫応答は、弱いまたは非特異的である (S t e i n K E ら、1992 年、S n a p p e r C M ら、1996 年)。炭水化物抗原は、抗原提示細胞 (A P C)、たとえば、マクロファージ、B 細胞、または樹状細胞による内部移行および消化が不可能であり、したがって、ヘルパー T (T h) 細胞に提示できないことが提唱されている。A P C から T 細胞への刺激が欠如しているため、結果として、抗体の成熟およびアイソタイプスイッチが存在しない。したがって、炭水化物抗原に対しては、主として、親和性が低く、クラススイッチが生じない I g M 抗体が産生される (M u s h e r D M ら、1990 年、L o r t a n J E ら、1993 年)。この欠陥に対処するために、様々なアプローチが、開発されている。炭水化物抗原を、担体タンパク質にコンジュゲートして、免疫原性を改善することは、1950 年代から開発されている (L i n d b e r g A A ら、1999 年)。そのような種類の高度に免疫原性のタンパク質としては、ジフテリアトキソイド (D T)、破傷風トキソイド (T T)、CRM197 (ジフテリア毒素の非毒性バリエーション)、ならびに N . m e n i n g i t i d i s 由来の複合体外膜タンパク質 (O M P) 混合物が挙げられる (A d a G . ら、1999 年)。これらのタンパク質の本質的な免疫原性特性に加えて、レシピエントが、これらのトキソイドで以前に免疫処置されている場合には、追加免疫作用が期待される。担体タンパク質 - 炭水化物抗原コンジュゲートは、ある特定の炭水化物抗原とコンジュゲートしたペプチドをもたらし、これが、M H C I I 分子を通じて A P C によって処理され提示される。T h 細胞からの共刺激により、ある特定の炭水化物抗原に対する T 細胞および B 細胞が、次いで、活性化される。抗体のアイソタイプスイッチおよび成熟の後に、高い親和性および特異性を有するある特定の炭水化物抗原に対する I g G 抗体が、さらに生成され得る (B a z e n d a l e H E ら、2000 年)。国際公開第 2016029071 号は、免疫原性担体ジフテリア毒素交差反応性材料 197 (C R M 197) にリンカーを介して化学的にコンジュゲートされた合成 S S E A 4 類似体を含む、炭水化物に基づくワクチンを提供している。

【0005】

炭水化物ワクチン接種では担体タンパク質により、免疫原性を改善するための解決策がもたらされるが、この戦略には、いくつかの新規および既存の問題がある (I n g a l e S ら、2007 年)。第 1 に、外来の担体タンパク質および結合リンカーは、強力な免疫

10

20

30

40

50

応答を誘起し得、それによって、炭水化物抗原に対する抗体応答の抑制を引き起こし得る。第2に、化学的コンジュゲーションは、基本的に、タンパク質表面のリシンにおけるものである。実験プロセスは、制御が困難であり、結果として、組成物および最終的な構造が不均質となる。不確かな組成物は、様々な免疫応答を引き起こす可能性が高い。第3に、細胞表面上の炭水化物の発現を模倣するコンジュゲーションは、理想的ではなく、それによって、誘導される抗体は、何らかの理由で、炭水化物クラスターを認識できない。代替的なアプローチ、たとえば、炭水化物のペグ化 (Giorgi MEら、2014年) が、残っている問題を克服するために調査されている。

【0006】

いずれにせよ、上述の能動免疫処置療法は、低免疫の状態にあるがん患者においては十分に機能しない。特に、化学療法および放射線療法を受ける患者、ならびに末期がん患者に関して、能動免疫介入の有効性は、多くの場合、限られている。

前述の点を考慮すると、ワクチン接種の代わりに、受動免疫を適応するように、がん炭水化物エпитープに対する治療用抗体を開発する必要性が存在する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【文献】国際公開第2016/029071号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

要旨

本開示は、例示的な単離された抗SSEA4モノクローナル抗体、その結合性断片、それをコードする核酸、ならびにそのような抗体およびその断片を含む組成物、ならびに腫瘍成長を阻害および/または低減するため、ならびにがんの処置のためのそれらの使用方法を提供する。本明細書において提供される例示的なモノクローナル抗SSEA4抗体および結合性断片は、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性 (ADCC) および/または補体依存性細胞毒性 (CDC) 活性を媒介して、SSEA4を発現する腫瘍細胞を標的とし、殺滅させることができる。加えて、本明細書において提供されるモノクローナル抗SSEA4抗体は、例示的な診断適用において、腫瘍試料および/または切片内のSSEA4を発現する腫瘍細胞を検出するために使用することができる。

【0009】

したがって、SSEA4またはその誘導体および断片に特異的に結合する新規な組換え抗SSEA4抗体、ならびに抗腫瘍免疫療法、たとえば、がんの処置におけるそれらの使用方法が、本明細書において提供される。がん抗原に結合すると、抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性を誘導し、補体系を活性化し、腫瘍の成長を阻害することができる。

【0010】

一実施形態では、SSEA4は、脳腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、口腔腫瘍細胞、食道腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、肝臓腫瘍細胞、胆管腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、腎臓腫瘍細胞、子宮頸腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、前立腺腫瘍細胞を含む、様々な腫瘍細胞に高度に発現される。

【0011】

一実施形態では、モノクローナル抗SSEA4抗体は、SSEA4分子および誘導体に特異的に結合する。

【0012】

一実施形態では、本明細書において記載される抗SSEA4抗体を含む組成物は、抗がん療法において有用である。具体的には、本実施形態は、様々な抗SSEA4結合部分において使用することができる、特定の抗SSEA4抗体の相補性決定領域 (CDR) 配列を提供する。具体的には、本発明は、SSEA4またはその誘導体に結合することができる、ヒト化もしくはキメラ抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

ある特定の実施形態では、C D R 配列は、K a b a t の方法によって規定される。

【 0 0 1 4 】

ある特定の実施形態では、抗 S S E A 4 抗体は、S S E A 4 陽性細胞または S S E A 4 を発現する細胞に結合すると、腫瘍成長を阻害する活性を有する。

【 0 0 1 5 】

ある特定の実施形態では、単離された抗 S S E A 4 抗体は、モノクローナル抗体である。S S E A 4 に対するモノクローナル抗体は、当技術分野における知識および技能に従って、作製することができる。たとえば、それは、試験対象に、ヒト胚性癌腫細胞を注射し、次いで、所望される配列または機能的特徴を有する抗体を発現するハイブリドーマを単離することによって、作製することができる。

10

【 0 0 1 6 】

一実施形態では、本開示は、S S E A 4 に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分であって、標的に結合すると、抗体が、C D C 誘導活性を有する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分を提供する。

【 0 0 1 7 】

一実施形態では、本開示は、S S E A 4 に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分であって、標的に結合すると、抗体が、A D C C 誘導活性を有する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分を提供する。

20

【 0 0 1 8 】

一態様では、本開示は、

(i) 配列番号 1 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 1 0 0 、 1 2 0 、 1 3 0 、 1 4 0 、 1 5 0 、 および 1 7 0 から選択される H - C D R 1 、またはその 8 0 % またはそれより高く保存された配列相同体、

(i i) 配列番号 1 1 、 4 1 、 5 1 、 6 1 、 7 1 、 8 1 、 1 0 1 、 1 2 1 、 1 3 1 、 1 4 1 、 1 5 1 、 および 1 7 1 から選択される H - C D R 2 、またはその 8 0 % またはそれより高く保存された配列相同体、

(i i i) 配列番号 1 2 、 4 2 、 5 2 、 6 2 、 7 2 、 8 2 、 1 0 2 、 1 2 2 、 1 3 2 、 1 4 2 、 1 5 2 、 および 1 7 2 から選択される H - C D R 3 、またはその 8 0 % またはそれより高く保存された配列相同体、

30

(i v) 配列番号 1 5 、 4 5 、 5 5 、 6 5 、 7 5 、 8 5 、 1 0 5 、 1 2 5 、 1 3 5 、 1 4 5 、 1 5 5 、 および 1 7 5 から選択される L - C D R 1 、またはその 8 0 % またはそれより高く保存された配列相同体、

(v) 配列番号 1 6 、 4 6 、 5 6 、 6 6 、 7 6 、 8 6 、 1 0 6 、 1 2 6 、 1 3 6 、 1 4 6 、 1 5 6 、 および 1 7 6 から選択される L - C D R 2 、またはその 8 0 % またはそれより高く保存された配列相同体、ならびに

(v i) それぞれ、配列番号 1 7 、 4 7 、 5 7 、 6 7 、 7 7 、 8 7 、 1 0 7 、 1 2 7 、 1 3 7 、 1 4 7 、 1 5 7 、 および 1 7 7 から選択される L - C D R 3 、またはその 8 0 % またはそれより高く保存された配列相同体

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

40

【 0 0 1 9 】

一態様では、本開示は、

(i) 配列番号 1 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 1 0 0 、 1 2 0 、 1 3 0 、 1 4 0 、 1 5 0 、 および 1 7 0 から選択される H - C D R 1 、またはその 5 個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、

(i i) 配列番号 1 1 、 4 1 、 5 1 、 6 1 、 7 1 、 8 1 、 1 0 1 、 1 2 1 、 1 3 1 、 1 4 1 、 1 5 1 、 および 1 7 1 から選択される H - C D R 2 、またはその 5 個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、

(i i i) 配列番号 1 2 、 4 2 、 5 2 、 6 2 、 7 2 、 8 2 、 1 0 2 、 1 2 2 、 1 3 2 、 1 4 2 、 1 5 2 、 および 1 7 2 から選択される H - C D R 3 、またはその 5 個未満のアミ

50

ノ酸置換を含む保存された配列相同体、ならびに

(i v) 配列番号 1 5、4 5、5 5、6 5、7 5、8 5、1 0 5、1 2 5、1 3 5、1 4 5、1 5 5、および 1 7 5 から選択される L - C D R 1、またはその 5 個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、

(v) 配列番号 1 6、4 6、5 6、6 6、7 6、8 6、1 0 6、1 2 6、1 3 6、1 4 6、1 5 6、および 1 7 6 から選択される L - C D R 2、またはその 5 個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、ならびに

(v i) 配列番号 1 7、4 7、5 7、6 7、7 7、8 7、1 0 7、1 2 7、1 3 7、1 4 7、1 5 7、および 1 7 7 から選択される L - C D R 3、またはその 5 個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 0 2 0 】

ある特定の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片は、重鎖における A 1 0 0 R、N 3 1 S、T 6 2 A のうちの 1 つもしくは複数、および / または軽鎖における S 5 2 Y から選択される、C D R におけるアミノ酸置換をさらに含む。

【 0 0 2 1 】

ある特定の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片は、重鎖における V 5 0 A、G 5 3 A、S 3 5 T のうちの 1 つもしくは複数、および / または軽鎖における V 3 0 I / A、G 9 1 A、Y 9 4 F のうちの 1 つもしくは複数から選択される、C D R におけるアミノ酸置換をさらに含む。

【 0 0 2 2 】

一態様では、本開示は、(i) 配列番号 1 3、2 3、3 3、4 3、5 3、6 3、7 3、8 3、1 0 3、1 2 3、1 3 3、1 4 3、1 5 3、および 1 7 3 から選択される重鎖可変ドメイン、またはその 8 0 % またはそれより高く保存された配列相同体、ならびに (i i) 配列番号 1 8、2 8、3 8、4 8、5 8、6 8、7 8、8 8、1 0 8、1 2 8、1 3 8、1 4 8、1 5 8、および 1 7 8 から選択される軽鎖可変ドメイン、またはその 8 0 % またはそれより高く保存された配列相同体を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 0 2 3 】

一実施形態では、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片は、(i) 配列番号 1 3、2 3、3 3、4 3、5 3、6 3、7 3、8 3、1 0 3、1 2 3、1 3 3、1 4 3、1 5 3、および 1 7 3 から選択される重鎖可変ドメイン、またはその 8 0 % またはそれより高く保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号 1 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、1 0 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、および 1 7 0 から選択される H - C D R 1、配列番号 1 1、4 1、5 1、6 1、7 1、8 1、1 0 1、1 2 1、1 3 1、1 4 1、1 5 1、および 1 7 1 から選択される H - C D R 2、配列番号 1 2、4 2、5 2、6 2、7 2、8 2、1 0 2、1 2 2、1 3 2、1 4 2、1 5 2、および 1 7 2 から選択される H - C D R 3 を含む、重鎖可変ドメイン、ならびに (i i) 配列番号 1 8、2 8、3 8、4 8、5 8、6 8、7 8、8 8、1 0 8、1 2 8、1 3 8、1 4 8、1 5 8、および 1 7 8 から選択される軽鎖可変ドメイン、またはその 8 0 % またはそれより高く保存された配列相同体であって、さらに、配列番号 1 5、4 5、5 5、6 5、7 5、8 5、1 0 5、1 2 5、1 3 5、1 4 5、1 5 5、および 1 7 5 から選択される L - C D R 1、ならびに配列番号 1 6、4 6、5 6、6 6、7 6、8 6、1 0 6、1 2 6、1 3 6、1 4 6、1 5 6、および 1 7 6 から選択される L - C D R 2、ならびに配列番号 1 7、4 7、5 7、6 7、7 7、8 7、1 0 7、1 2 7、1 3 7、1 4 7、1 5 7、および 1 7 7 から選択される L - C D R 3 を含む、軽鎖可変ドメインをさらに含む。

【 0 0 2 4 】

一態様では、本開示は、(i) 配列番号 1 3、2 3、3 3、4 3、5 3、6 3、7 3、8 3、1 0 3、1 2 3、1 3 3、1 4 3、1 5 3、および 1 7 3 から選択される重鎖可変

10

20

30

40

50

ドメイン、またはその１０個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、ならびに（ｉｉ）配列番号１８、２８、３８、４８、５８、６８、７８、８８、１０８、１２８、１３８、１４８、１５８、および１７８から選択される軽鎖可変ドメイン、またはその１０個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【００２５】

一実施形態では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片は、（ｉ）配列番号１３、２３、３３、４３、５３、６３、７３、８３、１０３、１２３、１３３、１４３、１５３、および１７３から選択される重鎖可変ドメイン、またはその１０個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号１０、４０、５０、６０、７０、８０、１００、１２０、１３０、１４０、１５０、および１７０から選択されるＨ－ＣＤＲ１、配列番号１１、４１、５１、６１、７１、８１、１０１、１２１、１３１、１４１、１５１、および１７１から選択されるＨ－ＣＤＲ２、配列番号１２、４２、５２、６２、７２、８２、１０２、１２２、１３２、１４２、１５２、および１７２から選択されるＨ－ＣＤＲ３を含む、重鎖可変ドメイン、ならびに（ｉｉ）配列番号１８、２８、３８、４８、５８、６８、７８、８８、１０８、１２８、１３８、１４８、１５８、および１７８から選択される軽鎖可変ドメイン、またはその１０個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体であって、さらに、配列番号１５、４５、５５、６５、７５、８５、１０５、１２５、１３５、１４５、１５５、および１７５から選択されるＬ－ＣＤＲ１、ならびに配列番号１６、４６、５６、６６、７６、８６、１０６、１２６、１３６、１４６、１５６、および１７６から選択されるＬ－ＣＤＲ２、ならびに配列番号１７、４７、５７、６７、７７、８７、１０７、１２７、１３７、１４７、１５７、および１７７から選択されるＬ－ＣＤＲ３を含む、軽鎖可変ドメインをさらに含む。

【００２６】

一態様では、本開示は、（ｉ）配列番号１３、２３、３３、４３、５３、６３、７３、８３、１０３、１２３、１３３、１４３、１５３、および１７３から選択される重鎖可変ドメイン、またはその１０個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、ならびに（ｉｉ）配列番号１８、２８、３８、４８、５８、６８、７８、８８、１０８、１２８、１３８、１４８、１５８、および１７８、または１０個未満の保存されたアミノ酸置換を含むその配列相同体から選択され、さらに、配列番号１５、４５、５５、６５、７５、８５、１０５、１２５、１３５、１４５、１５５、および１７５から選択されるＬ－ＣＤＲ１、ならびに配列番号１６、４６、５６、６６、７６、８６、１０６、１２６、１３６、１４６、１５６、および１７６から選択されるＬ－ＣＤＲ２、ならびに配列番号１７、４７、５７、６７、７７、８７、１０７、１２７、１３７、１４７、１５７、および１７７から選択されるＬ－ＣＤＲ３を含む、軽鎖可変ドメインをさらに含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【００２７】

一態様では、本開示は、（ｉ）配列番号１３、２３、３３、４３、５３、６３、７３、８３、１０３、１２３、１３３、１４３、１５３、および１７３から選択される重鎖可変ドメイン、またはその１０個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号１０、４０、５０、６０、７０、８０、１００、１２０、１３０、１４０、１５０、および１７０から選択されるＨ－ＣＤＲ１、配列番号１１、４１、５１、６１、７１、８１、１０１、１２１、１３１、１４１、１５１、および１７１から選択されるＨ－ＣＤＲ２、配列番号１２、４２、５２、６２、７２、８２、１０２、１２２、１３２、１４２、１５２、および１７２から選択されるＨ－ＣＤＲ３を含む、重鎖可変ドメイン、ならびに（ｉｉ）配列番号１８、２８、３８、４８、５８、６８、７８、８８、１０８、１２８、１３８、１４８、１５８、および１７８から選択される軽鎖可変ドメイン、またはその１０個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体をさらに含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【００２８】

10

20

30

40

50

一態様では、本開示は、表 2 A ~ 2 D においてそれぞれのバリエーションで記載された、それぞれの対応する V H、V L、ならびにそれぞれの H - C D R および L - C D R を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【 0 0 2 9 】

ある特定の実施形態では、単離された抗体または抗原結合性断片は、

- a . キメラ抗体もしくはその断片であるか、または
- b . ヒト化抗体もしくはその断片であるか、または
- c . ヒト抗体もしくはその断片であるか、または
- d . F a b、F a b'、F v、s c F v、d s F v、F (a b)₂、F d、およびダイアボディからなる群から選択される抗原結合性断片である。

10

【 0 0 3 0 】

ある特定の実施形態では、単離された抗体または抗原結合性断片は、I g G である。

【 0 0 3 1 】

ある特定の実施形態では、単離された抗体またはその抗原結合性断片は、構造 N e u 5 A c 2 3 G a l 1 3 G a l N A c 1 3 G a l 1 4 G a l 1 4 G l c 1 を有する炭水化物抗原 S S E A 4 を標的とする。

【 0 0 3 2 】

ある特定の実施形態では、単離された抗体または抗原結合性断片は、標的細胞に結合すると、C D C および / または A D C C 誘導活性を有する。

【 0 0 3 3 】

20

ある特定の実施形態では、単離された抗体またはその抗原結合性断片と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【 0 0 3 4 】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、1 つまたは複数の抗腫瘍剤をさらに含む。

【 0 0 3 5 】

ある特定の実施形態では、抗腫瘍剤が、化学療法剤である、医薬組成物。

【 0 0 3 6 】

ある特定の実施形態では、抗体と、細胞毒性剤とを含む、イムノコンジュゲート。

【 0 0 3 7 】

ある特定の実施形態では、式 A B - (L - D) p を有し、式中、(a) A B が、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載の抗体であり、(b) L が、リンカーであり、(c) D が、好適な細胞毒性薬物であり、(d) p が、1 ~ 8 の範囲である、イムノコンジュゲート。

30

【 0 0 3 8 】

ある特定の実施形態では、薬物が、M M A E である、イムノコンジュゲート。

【 0 0 3 9 】

ある特定の実施形態では、リンカーが、切断可能なリンカーである、イムノコンジュゲート。

【 0 0 4 0 】

ある特定の実施形態では、リンカーが、アルコキシアミン切断性リンカーである、A D C。

40

【 0 0 4 1 】

ある特定の実施形態では、請求項に記載のイムノコンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む、医薬製剤。

【 0 0 4 2 】

ある特定の実施形態では、医薬製剤は、追加の治療剤をさらに含む。

【 0 0 4 3 】

ある特定の実施形態では、抗体または結合性断片をコードする単離された核酸 (c D N A) が本明細書において開示される。

【 0 0 4 4 】

50

ある特定の実施形態では、抗体または結合性断片をコードする核酸を含む、宿主細胞が本明細書において開示される。

【0045】

ある特定の実施形態では、本開示は、抗体を産生する方法であって、抗体が産生されるように、宿主細胞を培養することを含む、方法を提供する。

【0046】

ある特定の実施形態では、本開示は、

(a) それぞれ、配列番号15、45、55、65、75、85、105、125、135、145、155、および175から選択されるL-CDR1、ならびに配列番号16、46、56、66、76、86、106、126、136、146、156、および176から選択されるL-CDR2、ならびに配列番号17、47、57、67、77、87、107、127、137、147、157、および177から選択されるL-CDR3の配列を有する、3つのVLDメインCDRをコードする核酸を提供するステップと、

(b) それぞれ、配列番号10、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、および170から選択されるH-CDR1、配列番号11、41、51、61、71、81、101、121、131、141、151、および171から選択されるH-CDR2、配列番号12、42、52、62、72、82、102、122、132、142、152、および172から選択されるH-CDR3の配列を有する、3つのVHドメインCDRをコードする核酸のレパートリーを、3つのVLDメインCDRをコードする核酸と組み合わせて、3つのVLDメインCDRをコードする核酸および3つのVHドメインCDRのレパートリーの産生物レパートリーを提供するステップと、

(c) 産生物レパートリーの核酸を発現させるステップと、

(d) SSEA4に特異的に結合し、産生物レパートリーの核酸から発現される、可変ドメインを含む、抗原結合性断片を選択するステップと、

(e) 抗原結合性断片を含む抗体を産生するステップと、
によって産生される、抗体を提供する。

【0047】

ある特定の実施形態では、本開示は、SSEA4陽性がんを有する対象を処置する方法であって、それを必要とする対象に、有効量の、本明細書において開示される医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【0048】

ある特定の実施形態では、本開示は、SSEA4陽性がんが、脳、肺、乳房、口腔、食道、胃、肝臓、胆管、膵臓、結腸、腎臓、子宮頸、卵巣、および前立腺のがんから選択される、方法を提供する。

【0049】

ある特定の実施形態では、本開示は、追加の治療モダリティまたは薬剤を組み合わせ、個体に投与することをさらに含む、方法を提供する。

【0050】

ある特定の実施形態では、本開示は、組み合わせられた処置モダリティが、治療用抗体、細胞療法、放射線、サイトカイン、および/または化学療法剤から選択される、方法を提供する。

【0051】

ある特定の実施形態では、本開示は、SSEA4陽性細胞の増殖を阻害する方法であって、細胞を、本明細書において開示される医薬製剤に、抗体/断片/ADCが、炭水化物抗原を発現する細胞の表面上のSSEA4に結合するのを許容する条件下において曝露し、それによって細胞の増殖を阻害することを含む、方法を提供する。

【0052】

ある特定の実施形態では、SSEA4陽性がんを有する対象を処置する方法であって、本方法は、SSEA4陽性がんが、第1の治療剤に対して耐性であり、方法が、個体に、

10

20

30

40

50

有効量の、本明細書において開示される医薬製剤を投与することを含む。

【0053】

ある特定の実施形態では、SSEA4陽性がんが、脳、肺、乳房、口腔、食道、胃、肝臓、胆管、膵臓、結腸、腎臓、子宮頸、卵巣、および/または前立腺のがんである、方法。

【0054】

ある特定の実施形態では、第1の治療剤が、SSEA4以外の抗原に結合する第1の抗体/結合性断片/ADC、および/または放射線、および/または化学療法剤を含む、方法。

【0055】

ある特定の実施形態では、生物学的試料においてSSEA4を検出する方法であって、生物学的試料を、本明細書において開示される抗SSEA4抗体と、抗SSEA4抗体が、天然に存在するSSEA4に結合するのを許容する条件下において接触させることと、生物学的試料において、抗SSEA4抗体と天然に存在するSSEA4との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、方法。

10

【0056】

ある特定の実施形態では、生物学的試料が、がん試料である、方法。

【0057】

ある特定の態様では、本開示は、SSEA4陽性がんを検出するための方法であって、(i)標識した抗SSEA4抗体を、炭水化物抗原を発現する腫瘍を有するかまたはそれを有する疑いのある対象に投与するステップであって、標識した抗SSEA4抗体が、本明細書において開示される抗SSEA4抗体を含む、ステップと、(ii)対象において、標識した抗SSEA4抗体を検出するステップであって、標識した抗SSEA4抗体の検出が、対象におけるSSEA4陽性がんを示す、ステップとを含む、方法を提供する。

20

【0058】

ある特定の実施形態では、 10^{-7} Mより低い親和性定数で、SSEA4に特異的に結合する、単離された抗体。

【0059】

ある特定の実施形態では、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である、単離された抗体。

【0060】

ある特定の実施形態では、IgG1またはIgG1である、単離された抗体。

30

【0061】

ある特定の実施形態では、 1×10^{-7} Mまたはそれより低い K_D で、SSEA4に結合し、 K_D が、表面プラズモン共鳴(Biacore)分析によって測定される、モノクローナル抗体または抗原結合性部分。

【0062】

ある特定の実施形態では、結合親和性が、50 nMより低い、単離された抗SSEA4抗体またはその結合性断片。

【0063】

本開示は、本発明の態様/実施形態のいずれかによる、SSEA4に特異的に結合する抗体およびその結合性断片を対象とする。一態様では、本開示は、SSEA4に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその結合性断片であって、標的に結合すると、抗体が、ADCC誘導活性を有する、単離されたモノクローナル抗体またはその結合性断片を提供する。

40

【0064】

ある特定の実施形態によると、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0065】

ある特定の実施形態によると、抗体は、キメラまたはヒト化抗体である。

【0066】

ある特定の実施形態によると、抗体は、二重特異性抗体である。

50

【0067】

ある特定の実施形態によると、本発明により、SSEA4に選択的に結合するキメラ抗原受容体(CAR)が開示された。この実施形態では、CARは、可変重鎖(V_H)および可変軽鎖(V_L)を有する、抗原結合性ドメインを含み得る。

【0068】

一態様では、抗体またはその結合性断片は、ELISA結合アッセイによると、約5、10、15、20、15、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250ナノグラム/mL、または本明細書において列挙された任意の2つの値の間の値のEC₅₀で、SSEA4への半最大結合を有する。

10

【0069】

一態様では、結合親和性が、50 nMより低い(50 nMに満たない)、単離された抗SSEA4抗体またはその結合性断片。ある特定の実施形態では、結合親和性は、5 nMより低い、10 nMより低い、15 nMより低い、20 nMより低い、25 nMより低い、30 nMより低い、35 nMより低い、40 nMより低い、45 nMより低い、または50 nMより低い範囲であり得る。

【0070】

本開示の一実施形態によると、医薬組成物は、(1)治療有効量の、本開示の態様/実施形態のいずれかによる抗体または抗原結合性断片と、任意選択で、(2)薬学的に許容される担体とを含む。

20

【0071】

一態様では、本発明は、がんの処置を、それを必要とする対象において行うための医薬組成物であって、本明細書において開示される例示的なH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2、およびL-CDR3を含む単離された抗体またはその抗原結合性断片と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物を対象とする。

【0072】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、過剰増殖性疾患、たとえば、がんに対する処置において、有用である。例示的な過剰増殖性疾患としては、たとえば、表4に列挙されている腫瘍のうちの1つまたは複数を挙げることができる。

30

40

50

【表 4】

表4:腫瘍細胞株におけるグロボ系列スフィンゴ糖脂質の発現

グロボ系列GSLの発現を、フローサイトメトリーによって判定した。全細胞の15%を上回るものがフローサイトメトリーにおいて陽性であった細胞株を、陽性と標識する。

腫瘍起源	SSEA-4 ⁺	SSEA-3 ⁺	Globo H ⁺
脳	12/17	9/17	6/17
肺	13/20	5/20	13/20
乳房	17/23	6/23	14/23
口腔	8/13	2/13	11/13
食道	1/2	0/2	2/2
胃	4/6	3/6	6/6
肝臓	6/10	4/10	9/10
胆管	2/5	1/5	3/5
膵臓	8/8	3/8	6/8
結腸	5/7	0/7	6/7
腎臓	5/6	0/6	5/6
子宮頸	3/4	2/4	1/4
卵巣	8/9	2/9	5/9
前立腺	4/4	1/4	1/4

10

20

【0073】

表4. 腫瘍細胞株におけるグロボ系列スフィンゴ糖脂質の発現の一覧。グロボ系列スフィンゴ糖脂質を高度に発現する様々な腫瘍細胞、たとえば、脳腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、口腔腫瘍細胞、食道腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、肝臓腫瘍細胞、胆管腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、腎臓腫瘍細胞、子宮頸腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、前立腺腫瘍細胞。

【0074】

ある特定の態様では、本開示は、がんの処置を、それを必要とする対象において行う方法であって、対象に、治療有効量の代表的な医薬組成物を投与し、それによって投与された抗体が、前記対象においてADCまたはCDC活性を強化することを含む、方法を提供する。

30

【0075】

ある特定の実施形態では、提供される方法は、脳がん、肺がん、乳がん、口腔がん、食道がん、胃がん、肝臓がん、胆管がん、膵臓がん、結腸がん、腎臓がん、骨がん、皮膚がん、子宮頸がん、卵巣がん、および前立腺がんからなる群から選択されるがんを処置する。

【0076】

本開示の実施形態によると、本方法は、対象に、有効量の、抗体を含む医薬組成物および/または本開示の態様/実施形態のいずれかによる医薬組成物を投与することを含む。

【0077】

ある特定の実施形態では、本開示は、がんを診断するための方法を提供する。

40

【0078】

本明細書において使用されるとき、グリカンおよび関連する構造を説明するための記号、図、および文字の命名法は、たとえば、Ajit Varkiらによる「Symbols Nomenclatures for Glycan Representation」、Proteomics、2009年12月、9巻(24号):5398~5399頁を含め、当技術分野において十分に確立されており、理解されている。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1A】図1Aは、代表的なAb6抗体および/または結合性断片のCDR配列である

50

。C D R配列は、それぞれ、K a b a t、A b M、C h o t h i a、C o n t a c t、およびI M G Tの方法によって規定される。

【図1B】図1Bは、C D R修飾を有する抗S S E A 4抗体を示す。

【図1C】図1Cは、可変ドメイン修飾を有する抗S S E A 4抗体を示す。

【図1D】図1Dは、h A b 6 - 3、h A b 6 - 3 . 1 / 2 / 3 / 4の配列アライメントであり、非保存的C D R修飾を有する抗S S E A 4抗体を示す。

【図1E】図1Eは、h A b 6 - 3、およびh A b 6 - 3 . 1 0 1 / 1 0 3 / 1 0 5 / 1 0 6 / 1 0 7 / 1 0 8 / 1 1 0の配列アライメントであり、保存的C D R修飾を有する抗S S E A 4抗体を示す。

【0080】

【図2】図2は、可変ドメインに6個または10個のアミノ酸置換を有する代表的なヒト化A b 6配列である。C D R領域を下線で示し、置換されたアミノ酸を枠で示す。

【0081】

【図3】図3は、c h A b 6重鎖可変ドメインのK a b a t番号である。

【0082】

【図4】図4は、c h A b 6軽鎖可変ドメインのK a b a t番号である。

【0083】

【図5】図5は、表面プラズモン共鳴による、例示的なキメラおよびヒト化A b 6の動態結合アッセイである。h A b 6 - 3 . 1、h A b 6 - 3、およびc h A b 6の抗原結合親和性を、B i a c o r eシステムを使用して判定した。h A b 6 - 3 . 1、h A b 6 - 3、およびc h A b 6の計算されたK d値は、それぞれ、23 . 1、17 . 8、および10 . 11 n Mである。

【0084】

【図6A】図6Aは、E L I S Aによる、1つの例示的なc h A b 6の、S S E A 4への結合親和性の判定である。例示的なキメラA b 6 (c h A b 6) は、用量依存性様式で、S S E A 4に結合する。c h A b 6のS S E A 4への結合のE C 5 0は、約50 n g / m Lである。

【0085】

【図6B】図6Bは、E L I S Aによる、他の例示的なキメラおよびヒト化A b 6の、S S E A 4への結合親和性の判定である。例示的なキメラおよびヒト化A b 6は、用量依存性様式で、S S E A 4に結合する。c h A b 6、h A b 6 - 3、およびh A b 6 - 3 . 1の、S S E A 4への結合のE C 5 0は、それぞれ、約106、125、および98 n g / m Lである。

【0086】

【図6C】図6Cは、非保存的に修飾されたアミノ酸置換の結合親和性の実証を表す。

【図6D】図6Dは、保存的に修飾されたアミノ酸置換の結合親和性の実証を表す。

【0087】

【図7】図7は、グリカンアレイ分析による、例示的なc h A b 6のS S E A 4への結合特異性である。様々なオリゴ糖に対するc h A b 6の結合特異性を試験し、結果として、c h A b 6が、S S E A 4 (スポットA) およびS S E A 4類似体S S E A 4 G c (S S E A 4のアミン基にG c置換されたシアル酸、スポットB) に結合することが示された。

【0088】

【図8】図8A ~ 8Bは、c h A b 6およびヒト化A b 6の乳がん細胞株への結合である。フローサイトメトリー分析による、c h A b 6、h A b 6 (h A b 6 - 2、h A b 6 - 3) の、(図8A) M D A - M B - 2 3 1および(図8B) M C F - 7への結合の特徴付けである。

【0089】

【図9】図9A ~ 9Bは、例示的なc h A b 6およびヒト化A b 6の乳がん細胞株への結合である。c h A b 6、h A b 6 - 2、およびh A b 6 - 3の、(図9A) M D A - M B - 2 3 1細胞および(図9B) M C F 7細胞への結合を、フローサイトメトリー分析によ

10

20

30

40

50

って試験した。染色に使用した抗体の濃度は、1ミリリットル当たり1マイクログラムであった。

【0090】

【図10】図10A～10Bは、フローサイトメトリー分析による、例示的なc h A b 6の、膵臓がん細胞株HPACへの結合親和性の判定である。(図10A)例示的なキメラAb6(c h A b 6、20 μ g/mL)は、(図10Bに示されるように)用量依存性様式で、高い発現レベルのSSEA4を有する例示的な膵臓腫瘍細胞株であるHPACに結合する。HPAC細胞への結合のEC₅₀は、約4 μ g/mLである。

【0091】

【図11A】図11A～11Bは、例示的なキメラおよびヒト化Ab6の乳がん細胞株および膵臓がん細胞株への結合である。c h A b 6、h A b 6-3、およびh A b 6-3.1の、(11A)MDA-MB-231細胞および(11B)HPAC細胞への結合を、フローサイトメトリー分析によって試験した。染色に使用した抗体の濃度は、1ミリリットル当たり5マイクログラムであった。

10

【図11B】図11A～11Bは、例示的なキメラおよびヒト化Ab6の乳がん細胞株および膵臓がん細胞株への結合である。c h A b 6、h A b 6-3、およびh A b 6-3.1の、(11A)MDA-MB-231細胞および(11B)HPAC細胞への結合を、フローサイトメトリー分析によって試験した。染色に使用した抗体の濃度は、1ミリリットル当たり5マイクログラムであった。

【0092】

【図11C】図11Cは、非保存的CDR修飾を有する例示的なヒト化Ab6の、MDA-MB-231細胞株への結合を示す。

20

【図11D】図11Dは、非保存的CDR修飾を有する例示的なヒト化Ab6の、MCF7細胞株への結合を示す。

【0093】

【図11E】図11Eは、保存的CDR修飾を有する例示的なヒト化Ab6の、MDA-MB-231細胞株への結合を示す。

【図11F】図11Fは、保存的CDR修飾を有する例示的なヒト化Ab6の、MCF7細胞株への結合を示す。

【0094】

【図12】図12は、例示的なc h A b 6の、膵臓腫瘍細胞株HPACに対するADCC活性を示す。代表的なc h A b 6は、用量依存性様式で、ADCCを誘導して、HPAC細胞を殺滅させる。EC₅₀は、5ng/mLである。ヒトIgG1カップパ(h IgG1、カップパ)を、対照として使用する。

30

【0095】

【図13】図13は、例示的なc h A b 6およびヒト化Ab6の、MDA-MB-231細胞に対するADCC活性である。例示的なc h A b 6、h A b 6は、用量依存性様式で、ADCCを媒介して、MDA-MB-231細胞を殺滅させる。EC₅₀は、c h A b 6およびh A b 6について、それぞれ、約5ng/mLおよび10ng/mLである。

【0096】

【図14】図14A～14Bは、例示的なヒト化Ab6の、乳がん細胞株に対するADCC活性である。例示的なh A b 6-3および例示的なh A b 6-3.1の両方が、用量依存性様式で、ADCCを媒介して、(図14A)MDA-MB-231細胞および(図14B)MCF7細胞を殺滅させた。この研究では、h A b 6-3によって媒介される、MDA-MB-231およびMCF7を殺滅させるADCCのEC₅₀は、それぞれ、39.2および39.5ng/mLである。h A b 6-3.1によって媒介される、MDA-MB-231およびMCF7を殺滅させるADCCについては、それぞれ、32.6および38.9ng/mLである。

40

【0097】

【図15A】図15Aは、例示的なc h A b 6の、HPAC細胞に対するCDC活性を示

50

す。代表的な c h A b 6 は、用量依存性様式で、C D C を誘導して、H P A C 細胞を殺滅させる。E C 5 0 は、3 μ g / m L である。ヒト I g G 1、カッパ (h I g G 1、k) を、この研究において陰性対照として使用する。

【図 1 5 B】図 1 5 B は、例示的なヒト化 A b 6 の、乳がん細胞株に対する C D C 活性を示す。例示的なヒト化抗 S S E A 4 抗体 h A b 6 - 3 および h A b 6 - 3 . 1 は、用量依存性様式で、C D C を誘導して、M C F 7 細胞を殺滅させた。E C 5 0 は、h A b 6 - 3 および h A b 6 - 3 . 1 について、それぞれ、約 4 . 4 および約 2 . 6 μ g / m L である。

【 0 0 9 8 】

【図 1 6】図 1 6 A ~ 1 6 B は、H P A C 異種移植片モデルにおける代表的な抗 S S E A 4 抗体の i n v i v o 抗腫瘍効果を示す。ピヒクル対照群と比較して、腫瘍の成長は、抗 S S E A 4 抗体で処置したマウスでは、有意に抑制される。さらに、図に示されるように、c h A b 6 で処置したマウスにおける平均腫瘍体積 (図 1 6 A) および重量 (図 1 6 B) は、h M C 4 1 で処置したものよりも有意に小さく、この例示的な c h A b 6 が、予想外に驚くべき i n v i v o 抗腫瘍活性を有することを示す。

【 0 0 9 9 】

【図 1 7】図 1 7 は、M D A - M B - 2 3 1 同所性モデルにおける例示的なヒト化 A b 6 の i n v i v o 抗腫瘍効果を示す。i n v i v o での腫瘍成長は、腫瘍保持マウスを、例示的な抗 S S E A 4 抗体 h A b 6 - 3 および h A b 6 - 3 . 1 で処置することによって、対照群 (ピヒクルおよびハーセプチン) と比較して、有意に抑制された。ハーセプチンは、この研究において、対照抗体として使用した。

【 0 1 0 0 】

【図 1 8】図 1 8 は、M C F 7 同所性モデルにおける例示的なヒト化 A b 6 の i n v i v o 抗腫瘍効果を示す。ピヒクル対照処置と比較すると、腫瘍の成長は、h A b 6 - 3 . 1 の処置下では、用量依存性様式で、有意に抑制された。

【 0 1 0 1 】

【図 1 9】図 1 9 は、診断上の有用性、例示的な c h A b 6 を使用した腫瘍組織における S S E A 4 発現の検出を示す。免疫組織化学的染色の結果は、c h A b 6 が、腫瘍試料における S S E A 4 発現を検出するために適用することができることを示した。

【 0 1 0 2 】

【図 2 0】図 2 0 は、S D S - P A G E による糖鎖操作 h A b 6 - 3 . 1 の特徴付けである。レーン 1 は、哺乳動物細胞から産生された天然の抗体であり、レーン 2 は、モノ - G l c N A c を有する抗体であり、レーン 3 ~ 4 は、3 0 分および 6 0 分で産生された糖鎖操作 (G l y o - e n g i n e e r e d) h A b 6 - 3 . 1 であり、レーン 5 は、精製された糖鎖操作抗体である。

【 0 1 0 3 】

【図 2 1】図 2 1 は、細胞フローサイトメトリーによる、糖鎖操作 h A b 6 - 3 . 1 の結合特性である。糖鎖操作抗体 (赤色の線) は、S S E A 4 を発現する細胞株である M D A - M B - 2 3 1 に対して、天然の抗体 (青色の線) に類似の結合特性を呈する。結果として、糖鎖操作は、h A b 6 - 3 . 1 の抗原結合特性に影響を及ぼさないことが示された。

【 0 1 0 4 】

【図 2 2】図 2 2 は、F c ガンマ受容体 I I I A 結合である。h A b 6 - 3 . 1 の F c ガンマ受容体 I I I A への結合 (E C 5 0) は、糖鎖操作により劇的に強化された。天然の抗体および糖鎖操作抗体の E C 5 0 は、それぞれ、0 . 8 4 および 0 . 0 4 7 μ g (マイクログラム) / m L である。

【 0 1 0 5 】

【図 2 3】図 2 3 は、天然の h A b 6 - 3 . 1 および糖鎖操作 h A b 6 - 3 . 1 の、M D A - M B - 2 3 1 細胞に対する A D C C 活性である。天然の h A b 6 - 3 . 1 および糖鎖操作 h A b 6 - 3 . 1 の両方が、用量依存性様式で、A D C C を媒介して、M D A - M B - 2 3 1 細胞を殺滅させた。h A b 6 - 3 . 1 の A D C C 活性は、糖鎖操作によって有意に改善された。天然の h A b 6 - 3 . 1 および糖鎖操作 h A b 6 - 3 . 1 の E C 5 0 は、

それぞれ、約 50.29 および約 6.02 ng/ml である。

【0106】

【図24A】図24Aは、ADC形成のためのFcグリカンへの薬物のオキシム(oximine)ライゲーションである。

【図24B】図24Bは、ADC複合体形成のSDS-PAGEプロファイルである。レーン1：マーカー、レーン2：ケトンタグしたhAb6-3.1、レーン3：hAb6-3.1-A01。

【0107】

【図25A】図25Aは、フローサイトメトリーによる、hAb6-3.1-A01の、SSEA4を発現する細胞への結合能力である。SSEA4を発現する細胞株であるMCF7およびSKOV3を、PBSで洗浄し、 1×10^5 個の細胞を、FACS緩衝液(2%FBSおよび0.1%NaN₃を含有するPBS)中、10ug/mLのhAb6-3.1またはhAb6-3.1-A01とともに、氷上で1時間インキュベートした。PBSで洗浄した後、細胞を、Alexa-Fluor 488で標識した抗ヒトIgG抗体で染色し、氷上で0.5時間インキュベートした。抗体の細胞結合のシグナルを、フローサイトメトリーによって検出した(図XX11AB)。結果として、hAb6-3.1-A01の、SSEA4を発現する細胞への結合特性は、親抗体hAb6-3.1と類似であることが示された。

【図25B】図25Bは、hAb6-3.1およびhAb6-3.1-A01の細胞結合特性の比較である。

【0108】

【図26】図26は、SSEA4を発現する乳房細胞株であるMCF7に対する細胞毒性におけるhAb6-3.1-A01の有効性の、抗体hAb6-3.1との比較である。

【0109】

【図27】図27は、SSEA4を発現する卵巣細胞株SKOV3に対する細胞毒性におけるhAb6-3.1-A01の有効性の、抗体hAb6-3.1との比較である。

【発明を実施するための形態】

【0110】

詳細な説明

したがって、広範なスペクトルのがんを診断および処置するときに使用するためのマーカーを対象とする抗体の方法および組成物が、提供される。抗SSEA4抗体を、開発し、本明細書において開示した。使用の方法としては、限定されないが、がんの治療および診断が含まれる。本明細書において記載される抗体は、SSEA4を発現する広範なスペクトルの腫瘍細胞に結合することができ、それによって、がんの診断および処置を促進することができる。抗体によって標的とされ得る細胞としては、癌腫、たとえば、脳、肺、乳房、口腔、食道、胃、肝臓、胆管、脾臓、結腸、腎臓、子宮頸、卵巣、前立腺などのがんにおけるものが含まれる。

定義

【0111】

本明細書において別途定義されない限り、本開示において用いられる科学用語および技術用語は、当業者によって一般に理解され、使用されている意味を有するものとする。文脈によって別途必要とされない限り、単数形の用語は、その複数形を含むものとし、複数形の用語は、単数形を含むものとするのが理解されよう。具体的には、本明細書および特許請求の範囲において使用されるとき、単数形の「1つの(a)」および「1つの(an)」は、文脈により別途明確に示されない限り、複数形の参照物を含む。さらに、本明細書および特許請求の範囲において使用されるとき、「少なくとも1つ」および「1つまたは複数」という用語は、同じ意味を有し、1つ、2つ、3つ、またはそれより多くを含む。

【0112】

本発明の広範な範囲について記載する数値範囲およびパラメーターは、近似値ではある

が、特定の実施例において記載される数値は、可能な限り正確に報告されている。任意の数値は、しかしながら、それぞれの試験測定において見出される標準偏差から必然的に生じるある特定の誤差を本質的に含む。さらに、本明細書において使用されるとき、「約」という用語は、一般に、示された値または範囲の10%、5%、1%、または0.5%以内を意味する。あるいは、「約」という用語は、当業者が考慮した場合に、許容可能な平均の標準誤差の範囲内を意味する。作業例/実施例におけるもの以外、または別途明確に示されない限り、本明細書において開示される材料の量、時間の期間、温度、操作条件、量の比に関するものなど、数値範囲、量、値、および割合はすべて、いずれの事例においても、「約」という用語によって修飾されていると理解されるものとする。したがって、別途示されない限り、本開示および添付の特許請求の範囲において記載される数値パラメーターは、所望に応じて変動し得る近似値である。最後に、それぞれの数値パラメーターは、少なくとも、報告された有効桁の数を考慮し、通常の端数処理技法を適用することによって、解釈されるべきである。

10

【0113】

別途指定されない限り、標準的な使用法および慣例に従い、本明細書において使用されるポリヌクレオチドの表記では、左手側が、5'末端側であり、右手側が、3'末端側であり、本明細書において使用されるペプチドの表記では、左手側が、アミノ末端(N末端)側であり、右手側が、カルボキシル末端(C末端)側である。

【0114】

本明細書において互換可能に使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチドもしくは塩基、および/またはそれらの類似体、またはDNAもしくはRNAポリメラーゼによって、または合成反応によって、ポリマーに組み込まれ得る任意の基質であり得る。

20

【0115】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書において使用されるとき、一般に、短い、一般的には長さが約200ヌクレオチド未満であるが必ずしもそうとは限らない、一般的には一本鎖で一般的には合成のポリヌクレオチドを指す。「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語は、相互に排他的ではない。ポリヌクレオチドに関する上述の記述は、オリゴヌクレオチドにも同等かつ完全に適用可能である。

30

【0116】

本明細書において使用されるとき、「ベクター」という用語は、それに連結している別の核酸を輸送することができる核酸分子を指すことを意図する。ベクターの1つの種類には、「プラスミド」があり、これは、追加のDNAセグメントがライゲーションされ得る環状の二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターは、ファージベクターである。別の種類のベクターには、ウイルスベクターがあり、ここで、追加のDNAセグメントが、ウイルスゲノムにライゲーションされ得る。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製することができる(たとえば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター)。他のベクター(たとえば、非エピソード哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ得、それによって、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある特定のベクターは、それらが作動可能に連結されている遺伝子の発現を誘導することができる。そのようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」(または単に「組換えベクター」と称される。一般に、組換えDNA技法において有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。プラスミドは、最も広く使用されるベクターの形態であるため、本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、互換可能に使用され得る。

40

【0117】

「グリカン」という用語は、多糖またはオリゴ糖を指す。グリカンはまた、グリココンジュゲート、たとえば、糖タンパク質、糖脂質、糖ペプチド、グリコプロテオーム、ペプチドグリカン、リポ多糖、またはプロテオグリカンなどの炭水化物部分を指して、本明細

50

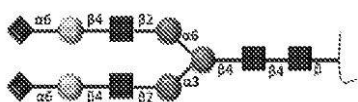
書において使用される。グリカンは、通常、単糖間のO - グリコシド結合のみからなる。グリカンは、単糖残基のホモポリマーまたはヘテロポリマーであり得、直鎖または分岐鎖であり得る。グリカンは、糖タンパク質およびプロテオグリカンにあるように、タンパク質に結合して見出され得る。それらは、通常、細胞の外表面上に見出される。O結合型およびN結合型グリカンは、真核生物では非常に一般的であるだけでなく、原核生物においても、あまり一般的ではないが、見出され得る。N結合型グリカンは、シークオンにおいて、アスパラギンのR基窒素(N)に結合して見出される。シークオンは、A s n - X - S e rまたはA s n - X - T h r配列であり、ここで、Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である。

【0118】

「ユニバーサルグリカン」という用語は、グリカン配列 $S i a_2 (2 - 6) G a l_2 G l c N A c_2 M a n_3 G l c N A c_2$ を指す。

構造は、以下であり、

【化1】



式中、

【化2】



は、シアル酸(S i a)であり、

【化3】



は、ガラクトース(G a l)であり、

【化4】



は、N - アセチルグルコサミン(G l c N A c)であり、

【化5】



は、マンノース(M a n)である。

【0119】

「抗原」という用語は、本明細書において使用されるとき、免疫応答を誘起することができる物質として定義される。前記免疫応答は、抗体の産生もしくは免疫学的に適合性のある特定の細胞の活性化のいずれか、またはその両方を伴い得る。

【0120】

「エピトープ」という用語は、従来的に、免疫グロブリンV_H/V_Lペアによって結合される構造の単位を指す。エピトープは、抗体に対する最小限の結合部位を定めるものであり、したがって、抗体の特異性の標的を表す。

【0121】

本明細書において使用されるとき、「免疫原」という用語は、抗体の産生を誘導することができる抗原を指す。

【0122】

10

20

30

40

50

本明細書において使用されるとき、「免疫原性」という用語は、一般に、免疫原または抗原が免疫応答を刺激する能力を指す。

【 0 1 2 3 】

「ワクチン」という用語は、疾患を引き起こす生物全体（死滅もしくは弱毒化されている）またはそのような生物の成分からなり、その生物が引き起こす疾患に対する免疫を付与するために使用される、抗原を含む調製物、たとえば、タンパク質、ペプチド、または多糖を指す。ワクチン調製物は、天然であってもよく、合成であってもよく、または組換え DNA 技術によって誘導されてもよい。

【 0 1 2 4 】

本明細書において使用されるとき、「抗原特異的」という用語は、特定の抗原または抗原の断片の供給により、特定の細胞の増殖が生じる、細胞集団の特性を指す。

10

【 0 1 2 5 】

本明細書において使用されるとき、「特異的に結合する」という用語は、結合ペア（たとえば、抗体および抗原）の間の相互作用を指す。様々な事例では、特異的に結合するとは、約 10^{-6} モル/リットル、約 10^{-7} モル/リットル、または約 10^{-8} モル/リットル、またはそれより低い親和性定数によって具現化され得る。追加または代替的な実施形態では、抗体の、そのそれぞれの抗原への結合は、抗体特異性の点で、特異的と称される。本明細書において、「特異的」という用語は、一般に、結合ペアの一方のメンバーが、その特定の結合パートナー以外の分子に対して有意な結合を全く示さない、たとえば、本明細書において示されるもの以外の任意の他の分子とは、約 30 % より低い、好ましくは 20 %、15 %、10 %、5 %、または 1 % より低い交差反応性しか有さない状況を指して、使用される。

20

【 0 1 2 6 】

「結合親和性」という用語は、一般に、分子（たとえば、抗体）の単一の結合部位と、その結合パートナー（たとえば、抗原）との間の非共有結合的相互作用の総計の強度を指す。別途示されない限り、本明細書において使用されるとき、「結合親和性」は、結合ペアのメンバー（たとえば、抗体および抗原）間での 1 : 1 の相互作用を反映する、本質的な結合親和性を指す。分子 X の、そのパートナー Y に対する親和性は、一般に、解離定数 (K_d) によって表すことができる。親和性は、本明細書において記載されるものを含め、当技術分野において公知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性の抗体は、一般に、抗原に結合するのが遅く、解離するのが容易な傾向があり、一方で、高親和性の抗体は、一般に、抗原に結合するのが早く、より長く結合したままとどまる傾向にある。結合親和性を測定する様々な方法が、当技術分野において公知であり、それらのうちのいずれかを、本発明の目的で使用するすることができる。

30

【 0 1 2 7 】

本明細書において使用されるとき、「解離定数 (K_d)」という用語は、複合体が、その構成要素である分子に分解されるとき、大きな物体が、より小さな構成要素へと可逆的に解離する傾向を測定する、特定の種類の平衡定数である。反応 $A \times B \rightleftharpoons A + B$ に関して、解離定数は、 $K_d = [A] \times [B] / [A \times B]$ と定義され、ここで、 $[A]$ 、 $[B]$ 、および $[A \times B]$ は、それぞれ、A、B、および $A \times B$ の濃度である。具体的には、 K_d 値は、Biacore 表面プラズモン共鳴システムまたは酵素結合免疫吸着法 (ELISA) によって判定される。

40

【 0 1 2 8 】

本明細書において使用されるとき、SSEA4 に「特異的に結合する」抗体は、 1×10^{-7} M もしくはそれより低い、より好ましくは 5×10^{-8} M もしくはそれより低い、より好ましくは 1×10^{-8} M もしくはそれより低い、より好ましくは 5×10^{-9} M もしくはそれより低い K_D で SSEA4 に結合するか、または 1×10^{-8} M ~ 1×10^{-10} M もしくはそれより低い範囲の K_D で SSEA-4 に結合する、抗体を指すことを意図する。

【 0 1 2 9 】

「K_{assoc}」または「K_a」という用語は、本明細書において使用されるとき、特定

50

の抗体 - 抗原相互作用の結合速度を指すことを意図し、一方で、「 K_{dis} 」または「 K_d 」という用語は、本明細書において使用されるとき、特定の抗体 - 抗原相互作用の解離速度を指すことを意図する。「 K_D 」という用語は、本明細書において使用されるとき、 K_d の K_a に対する比（すなわち、 K_d / K_a ）から得られ、モル濃度（ M ）として表される、解離定数を指すことを意図する。抗体の K_D 値は、当技術分野において十分に確立された方法を使用して、判定することができる。抗体の K_D を判定するための好ましい方法は、表面プラズモン共鳴を使用すること、好ましくは、*Biacore*（登録商標）システムなどのバイオセンサーシステムを使用することによるものである。

【0130】

本明細書において使用されるとき、*IgG*抗体に対する「高い親和性」という用語は、標的抗原に対して、 $10^{-8} M$ またはそれより低い、より好ましくは $10^{-9} M$ またはそれより低い、さらにより好ましくは $10^{-10} M$ またはそれより低い K_D を有する抗体を指す。しかしながら、「高い親和性」の結合は、他の抗体アイソタイプに対しては変動し得る。たとえば、*IgM*アイソタイプに対する「高い親和性」の結合は、 $10^{-7} M$ またはそれより低い、より好ましくは $10^{-8} M$ またはそれより低い、さらにより好ましくは $10^{-9} M$ またはそれより低い K_D を有する抗体を指す。

【0131】

「半数効果濃度（ EC_{50} ）」という用語は、指定された曝露時間の後に、ベースラインと最大値との中間の応答を誘導する、薬物、抗体、または毒物の濃度を指す。これは、薬物の強度の尺度として使用される。

【0132】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、広義では互換可能に使用され、モノクローナル抗体（たとえば、全長またはインタクトなモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、一価、多価抗体、多重特異性抗体（たとえば、二重特異性抗体）が含まれ、また、ある特定の抗体断片も含まれ得る。ほとんどの抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖がジスルフィド結合によって互いに連結されているという、同じ構造上の特徴を有する糖タンパク質である。軽鎖は、1つの可変ドメイン（ V_L ）および1つの定常ドメイン（ C_L ）を含み、一方で、重鎖は、1つの可変ドメイン（ V_H ）および3つの定常ドメイン（ C_{H1} 、 C_{H2} 、および C_{H3} 、集合的に C_H と称される）を含む。軽鎖（ V_L ）および重鎖（ V_H ）の両方の可変領域が、抗原に対する結合の認識および特異性を決定する。 V_H および V_L 領域は、超可変領域（ HVR ）と称される超可変性の領域にさらに分割することができ、そこには、フレームワーク領域（ FR ）と称される保存性の高い領域が点在している。軽鎖（ C_L ）および重鎖（ C_H ）の定常領域ドメインは、抗体鎖の結合、分泌、胎盤を通じた移動性、補体結合、および Fc 受容体（ FcR ）への結合など、重要な生物学的特性を付与する。重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体には、異なるクラスが割り当てられ得る。免疫グロブリンには、*IgA*、*IgD*、*IgE*、*IgG*、および*IgM*の5つの主要なクラスが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、たとえば、*IgG1*、*IgG2*、*IgG3*、*IgG4*、*IgA1*、および*IgA2*にさらに分割され得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、および μ と称される。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニットの構造および三次元立体配置は、周知であり、概して、たとえば、*Abbasら*、*Cellular and Mol. Immunology*、第4版、（2000年）に記載されている。抗体は、抗体と、1つまたは複数の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合または非共有結合によって形成される、より大きな融合分子の一部であってもよい。抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化、および/または親和性成熟であり得る。

【0133】

任意の脊椎動物種に由来する抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」には、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、 κ （ κ ）および λ （ λ ）と称される2つの異なる種類のうちの1つが割り当てられる。一実施形態では、鎖は、 κ 型である。別の実施形態では、鎖は、 λ 型である。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 4 】

本明細書において使用されるとき、「可変ドメイン」とは、超可変領域（HVR）およびフレームワーク領域（FR）のアミノ酸配列を含む、抗体分子の軽鎖および重鎖の部分を指す。本明細書において使用される方法によると、HVRおよびFRに割り当てられるアミノ酸位は、Kabatに従って定義され得る（Sequences of Proteins of Immunological Interest、National Institutes of Health、Bethesda、Md.、1987年および1991年）。抗体または抗原結合性断片のアミノ酸の番号付けもまた、Kabatのものに従う。

【 0 1 3 5 】

本明細書において使用されるとき、「Kabatにおける可変ドメイン残基の番号付け」または「Kabatにおけるアミノ酸位の番号付け」という用語、およびそれらの変形は、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md.、（1991年）において、抗体のコンピレーションの重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに使用されている番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを使用すると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFRまたはHVRの短縮形に相当する、より少ないアミノ酸を含み得るか、またはそれへの挿入に相当する、追加のアミノ酸を含み得る。たとえば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後に、単一のアミノ酸挿入（Kabatによる残基52a）、および重鎖FR残基82の後に、挿入された残基（たとえば、Kabatによる残基82a、82b、および82cなど）を含み得る。所与の抗体に関するKabatの残基番号付けは、その抗体の配列の相同性の領域における、標準的なKabatで番号付けした配列とのアライメントによって、決定され得る。

【 0 1 3 6 】

本明細書において使用されるとき、「フレームワーク領域」（FR）残基という用語は、本明細書において定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【 0 1 3 7 】

本明細書において使用されるとき、「超可変領域」（HVRまたはHV）および「相補性決定領域」（CDR）という用語は、互換可能に使用され、本明細書において使用される場合、配列が超可変であり、および/または構造的に定義されるループを形成する、抗体の可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、6つの超可変領域を含み、3つがV_Hにあり（H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3）、3つがV_L（L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3）にある。いくつかの超可変領域の表記が使用されており、本明細書において包含される。Kabatの相補性決定領域（CDR）は、配列可変性に基づくものであり、最も一般的に使用されている（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md.、（1991年））。Chothiaは、代わりに、構造的ループの位置を指す（ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol.、196巻：901～917頁（1987年））。AbMの超可変領域は、KabatのCDRとChothiaの構造的ループとの折衷案を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアで使用されている。「Contact」超可変領域は、利用可能な複合体の結晶構造の分析に基づくものである。「IMGT」（国際ImMuNoGeneTics情報システム）は、免疫グロブリンおよびT細胞受容体可変ドメインならびにIgスーパーファミリーV様ドメインに関する固有の番号付けを提供する。Kabat、AbM、Chothia、およびContactによって定義されるこれらの超可変領域のそれぞれに由来する残基を、以下に示し、IMGTは、ウェブサイト：<http://www.imgt.org/>で予測される。

10

20

30

40

50

【表 A】

ループ	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24 -- L34	L24 -- L34	L24 -- L34	L30 -- L36
L2	L50 -- L56	L50 -- L56	L50 -- L56	L46 -- L55
L3	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L96
H1	H31 -- H35B	H26 -- H35B	H26 -- H32, 34	H30 -- H35B
(Kabat の番号付け)				
H1	H31 -- H35	H26 -- H35	H26 -- H32	H30 -- H35
(Chothia の番号付け)				
H2	H50 -- H65	H50 -- H58	H52 -- H56	H47 -- H58
H3	H95 -- H102	H95 -- H102	H95 -- H102	H93 -- H101

10

【0138】

「全長抗体」、「インタクトな抗体」、および「完全抗体」という用語は、本明細書において互換可能に使用され、以下に定義される抗体断片ではなく、実質的にインタクトな形態である抗体を指す。これらの用語は、具体的に、F c 領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

【0139】

「抗体断片」という用語は、インタクトな抗体の一部分のみを含み、ここで、この一部分は、インタクトな抗体に存在する場合にその部分と通常関連付けられている機能のうちの少なくとも1つ、およびほとんど、またはすべてを保持する。一実施形態では、抗体断片は、インタクトな抗体の抗原結合性部位を含み、したがって、抗原に結合する能力を保持する。別の実施形態では、抗体断片、たとえば、F c 領域を含むものは、F c 領域がインタクトな抗体に存在する場合にF c 領域と通常関連付けられている生物学的機能、たとえば、F c R n 結合、抗体半減期の調整、A D C C 機能、および補体結合のうちの少なくとも1つを保持する。一実施形態では、抗体断片は、インタクトな抗体に実質的に類似する *in vivo* 半減期を有する一価抗体である。たとえば、そのような抗体断片は、*in vivo* での安定性をその断片に付与することができる F c 配列と連結された抗原結合アームを含み得る。

20

【0140】

本明細書において使用されるとき、「F c 領域」という用語は、本明細書において、天然配列の F c 領域およびバリエーションの F c 領域を含む、免疫グロブリン重鎖の C 末端領域を定義して使用される。免疫グロブリン重鎖の F c 領域の境界は、多様であり得るが、ヒト Ig G 重鎖 F c 領域は、通常、C y s 226 位または P r o 230 位のアミノ酸残基から、そのカルボキシル末端までの一片として定義される。F c 領域の C 末端リシン (E U 番号付けシステムによると残基 447) は、たとえば、抗体の産生もしくは精製中に、または抗体の重鎖をコードする核酸を組換え操作することによって、除去されてもよい。したがって、インタクトな抗体の組成物は、すべての K 447 残基が除去された抗体集団、K 447 残基が除去されていない抗体集団、ならびに K 447 残基ありおよびなしの抗体の混合物を有する抗体集団を含み得る。本発明の抗体において使用するのに好適な天然配列の F c 領域には、ヒト Ig G 1、Ig G 2 (Ig G 2 A、Ig G 2 B)、Ig G 3、および Ig G 4 が含まれる。

30

【0141】

本明細書において使用されるとき、「F v 領域」という用語は、完全な抗原認識および結合部位を含む、最小限の抗体断片である。二本鎖 F v 種の場合、この領域は、1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインの緊密な非共有結合での結合による二量体からなる。一本鎖 F v 種の場合、軽鎖および重鎖が、二本鎖 F v 種のものと類似の「二量体」構造で結合し得るように、1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインが、可動性ペプチドリンカーによって共有結合で連結され得る。この構成において、それぞれの可変ドメインの3つの C D R が相互作用して、V_H - V_L 二量体の表面上の抗原結合性部位が定まる。これらの

40

50

6つのCDRが集合的に、抗原結合特異性を抗体に付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）であっても、結合性部位全体より低い親和性ではあるが、抗原を認識し、それに結合する能力を有する。

【0142】

本明細書において使用されるとき、「Fab断片」という用語は、Fv領域、軽鎖の定常ドメイン、および重鎖の第1の定常ドメイン（ C_H1 ）を含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域に由来する1つまたは複数のシステインを含め、重鎖 C_H1 ドメインのカルボキシル末端にいくつかの残基の付加があることが、Fab断片とは異なる。

【0143】

「抗原結合性断片」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の全長または1つもしくは複数の断片を指す。抗体の抗原結合性機能は、全長抗体の断片によって実施され得ることが示されている。「抗原結合性断片」という用語に包含される結合性断片の例としては、Fab断片；Fv断片；一本鎖Fv（scFv）断片；ダイアボディ；定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有するFab'の表記である、Fab'-SH断片；ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片である、 $F(ab)_2$ 断片； V_H および C_H1 ドメインからなるFd断片； V_H ドメインからなるdAb断片（Wardら、1989年、Nature、341巻：544～546頁）；可動性リンカーペプチドによって接続された2つの異なるジスルフィド安定化Fv抗体断片である、dsFv断片；ならびに単離された相補性決定領域（CDR）；またはそのような抗原結合性断片を含む、任意の融合タンパク質が挙げられる。

【0144】

「一本鎖Fv」または「scFv」抗体断片という用語は、抗体の V_H および V_L ドメインを含み、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖で存在する。一般に、scFvポリペプチドは、 V_H ドメインと V_L ドメインとの間に、scFvが抗原結合のために所望される構造を形成するのを可能にする、ポリペプチドリinkerをさらに含む。scFvの考察に関しては、Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、113巻、RosenburgおよびMoore編、Springer-Verlag、New York、269～315頁（1994年）を参照されたい。

【0145】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合性部位を有する小さな抗体断片を指し、これらの断片は、重鎖可変ドメイン（ V_H ）が、軽鎖可変ドメイン（ V_L ）に、同じポリペプチド鎖（ V_H-V_L ）で、接続されたものを含む。同じ鎖の2つのドメイン間でのペア形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは、強制的に、別の鎖の相補性ドメインとペア形成することになり、2つの抗原結合性部位が作製される。ダイアボディは、たとえば、欧州特許第404,097号、国際公開第93/1161号、およびHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：6444～6448頁（1993年）に、より詳細に記載されている。

【0146】

「モノクローナル抗体（mAb）」という用語は、本明細書において使用されるとき、実質的に均質な抗体集団から得られた抗体を指し、たとえば、集団を構成する個々の抗体は、わずかな量で存在し得る可能性のある天然の変異を除き、同一である。たとえば、「モノクローナル」という修飾語は、異なる抗体の混合物ではないという抗体の特徴を示す。そのようなモノクローナル抗体は、典型的に、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、ここで、この標的に結合するポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から、単一の標的に結合するポリペプチド配列を選択することを含むプロセスによって得られたものである。たとえば、選択のプロセスは、複数のクローン、たとえば、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、または組換えDNAクローンのプールから、固有のクローンを選択することであり得る。この選択された、標的に結合する配列を、たとえば、標的に対する親和性の向上、標的結合配列のヒト化、細胞培養におけるその産生の改善

10

20

30

40

50

、*in vivo*でのその免疫原性の低減、多重特異性抗体の作製などを行うようにさらに改変してもよいこと、ならびに改変された、標的に結合する配列を含む抗体もまた、本発明のモノクローナル抗体であることを理解されたい。典型的には異なるエピトープを対象とする異なる抗体を含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体のそれぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープを対象とする。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、それらには、典型的に他の免疫グロブリンが混入していないという点で、有利である。「モノクローナル」という修飾語は、抗体が、実質的に同種の抗体集団から得られているという特徴を示すものであり、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものと解釈されるものではない。たとえば、本発明により使用されるモノクローナル抗体は、たとえば、ハイブリドーマ法（たとえば、Kohlerら、*Nature*、256巻：495頁（1975年）、Harlowら、*Antibodies: A Laboratory Manual*、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版、1988年)、Hammerlingら、*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*、563～681頁(Elsevier、N.Y.、1981年)、組換えDNA法（たとえば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）、ファージディスプレイ技術（たとえば、Clacksonら、*Nature*、352巻：624～628頁（1991年）、Marksら、*J. Mol. Biol.*、222巻：581～597頁（1992年）、Sidhuら、*J. Mol. Biol.*、338巻（2号）：299～310頁（2004年）、Leeら、*J. Mol. Biol.*、340巻（5号）：1073～1093頁（2004年）、Fellouse、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、101巻（34号）：12467～12472頁（2004年）、およびLeeら、*J. Immunol. Methods*、284巻（1～2号）：119～132頁（2004年）を参照されたい）、ならびにヒト免疫グロブリン遺伝子座またはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子のうちの一部またはすべてを有する動物においてヒトまたはヒト様抗体を産生するための技術（たとえば、国際公開第98/24893号、同第96/34096号、同第96/33735号、同第91/10741号、Jakobovitsら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、90巻：2551頁（1993年）、Jakobovitsら、*Nature*、362巻：255～258頁（1993年）、Bruggemannら、*Year in Immunol.*、7巻：33頁（1993年）、米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016号、Marksら、*Bio. Technology*、10巻：779～783頁（1992年）、Lonbergら、*Nature*、368巻：856～859頁（1994年）、Morrison、*Nature*、368巻：812～813頁（1994年）、Fishwildら、*Nature Biotechnol.*、14巻：845～851頁（1996年）、Neuberger、*Nature Biotechnol.*、14巻：826頁（1996年）、ならびにLonbergおよびHuszar、*Intern. Rev. Immunol.*、13巻：65～93頁（1995年）を参照されたい）を含む、様々な技法によって、作製され得る。

【0147】

「キメラ抗体」という用語は、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同であり、一方で鎖の残りの部分が、別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同であるものである。具体的には、本発明では、キメラ抗体は、非ヒト抗体の抗原結合性配列/可変ドメインが、ヒト抗体フレームワーク領域にグラフトされている、ヒト化抗体であり得る。そのような抗体は、所望される生物学的活性を呈していさえすればよい（米国特許第4,816,567号、およびMorrisonら、*Proc. Natl. Acad.*

10

20

30

40

50

Sci. USA、81巻：6851～6855頁（1984年））。

【0148】

本明細書において使用されるとき、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含む、キメラ抗体である。一実施形態では、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域に由来する残基が、所望される特異性、親和性、および/または能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域に由来する残基で置き換えられている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。一部の事例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域の残基が、対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、実質的にすべて、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを含むことになり、ここで、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRのすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、任意選択で、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのものを含み得る。さらなる詳細については、Jonesら、Nature、321巻：522～525頁（1986年）、Riechmannら、Nature、332巻：323～329頁（1988年）、およびPresta、Curr. Op. Struct. Biol.、2巻：593～596頁（1992年）を参照されたい。また、以下の総説論文およびそこに引用されている参考文献を参照されたい：VaswaniおよびHamilton、Ann. Allergy, Asthma & Immunol.、1巻：105～115頁（1998年）、Harris、Biochem. Soc. Transactions、23巻：1035～1038頁（1995年）、HurleおよびGross、Curr. Op. Biotech.、5巻：428～433頁（1994年）。

【0149】

「ヒト抗体」という用語は、ヒトによって産生される抗体のアミノ酸配列に対応するものを有するもの、および/または本明細書において開示されるヒト抗体を作製する技法のうちのいずれかを使用して作製されたものである。ヒト抗体のこの定義は、具体的には、非ヒト抗原結合性残基を含むヒト化抗体を除外する。

【0150】

「親和性成熟抗体」は、その1つまたは複数のHVRに、改変を有さない親抗体と比較して、抗体の抗原に対する親和性の改善をもたらす、1つまたは複数の改変を有するものである。一実施形態では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモルまたはさらにはピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野において公知の手順によって産生される。Marksら、BioTechnology、10巻：779～783頁（1992年）は、V_HおよびV_Lドメインシャッフリングによる親和性成熟について記載している。CDRおよび/またはフレームワーク残基のランダム変異生成は、Barbasら、Proc Nat. Acad. Sci. USA、91巻：3809～3813頁（1994年）、Schierら、Gene、169巻：147～155頁（1995年）、Yeltonら、J. Immunol.、155巻：1994～2004頁（1995年）、Jacksonら、J. Immunol.、154巻（7号）：3310～9頁（1995年）、およびHawkinsら、J. Mol. Biol.、226巻：889～896頁（1992年）によって説明されている。

【0151】

「単離された抗体」は、特定され、その天然の環境の成分から分離および/または回収されているものである。その天然の環境の混入成分は、抗体の研究、診断、または治療上の使用を妨害するであろう材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を挙げることができる。一実施形態では、抗体は、（1）たとえば、ローリー法によって判定される場合に、抗体の90重量%を上回って、また一部の実施形態では、95重量%を上回って、（2）たとえば、スピニングカップシェークエネーター

の使用によって、N末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15個の残基を得るのに十分な程度に、または(3)たとえば、クーマシーブルー染色もしくは銀染色を使用して還元もしくは非還元条件下において、SDS-PAGEにより均質性となるまで、精製されることになる。単離された抗体は、その抗体の天然の環境の少なくとも1つの成分が存在しないことになるため、組換え細胞内の*in situ*の抗体を含む。通常は、しかしながら、単離された抗体は、少なくとも1つの精製ステップによって調製されることになる。

【0152】

「遮断抗体」または「アンタゴニスト抗体」は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害または低減するものである。ある特定の遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を実質的にまたは完全に阻害する。

10

【0153】

「アゴニスト」抗体は、本明細書において使用されるとき、目的のポリペプチドの機能的活性のうちの少なくとも1つを模倣する、抗体である。

【0154】

「キメラ抗原受容体(CAR)」という用語は、T細胞シグナル伝達ドメインに連結された、抗体の抗原結合性ドメイン(たとえば、scFv)を含む、人工的に構築されたハイブリッドタンパク質またはポリペプチドである。CARの特徴としては、モノクローナル抗体の抗原結合特性を利用し、非MHC制限型の様式で、T細胞特異性と再活性を、選択された標的へと再指向する能力が挙げられる。非MHC制限型の抗原認識は、CARを発現するT細胞に、抗原プロセッシングから独立して抗原を認識する能力を付与し、したがって、腫瘍エスケープの主要な機序をバイパスする。さらに、T細胞に発現される場合、CARは、有利なことに、内在性T細胞受容体(TCR)アルファ鎖およびベータ鎖と二量体を形成しない。

20

【0155】

「障害」は、本発明の抗体を用いた処置が有益であろう任意の状態である。これには、哺乳動物が問題の障害を罹患する素因となる病態を含め、慢性および急性の障害または疾患が含まれる。本明細書において処置しようとする障害の非限定的な例としては、がんが挙げられる。

【0156】

「細胞増殖性障害」または「増殖性障害」という用語は、何らかの程度の異常な細胞増殖と関連付けられた障害を指す。一実施形態では、細胞増殖性障害は、がんである。

30

【0157】

「腫瘍」という用語は、本明細書において使用されるとき、悪性であるか良性であるかにかかわらず、すべての腫瘍性細胞成長および増殖、ならびにすべての前がん性およびがん性細胞および組織を指す。「がん」、「がん性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」、および「腫瘍」という用語は、本明細書において言及される場合、相互に排他的ではない。

【0158】

「がん」または「がん性」という用語は、典型的には無制御な細胞成長/増殖によって特徴付けられる、哺乳動物における生理学的状態を指すか、またはそれを説明する。がんの例としては、癌腫、リンパ腫(たとえば、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫)、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられるが、これらに限定されない。そのようながんのより具体的な例としては、脳がん、口腔がん、扁平上皮細胞がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜のがん、肝細胞がん、胃腸がん、膵臓がん、膠芽腫、子宮頸がん、卵巣がん、胃がん、胆管がん、膀胱がん、肝細胞癌、乳がん、結腸がん、骨がん、結腸直腸がん、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰部がん、甲状腺がん、肝臓癌、白血病および他のリンパ増殖性障害、ならびに様々な種類の頭頸部がんが挙げられる。

40

【0159】

50

本明細書において使用されるとき、「個体」または「対象」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含むことを意図する。好ましい対象としては、免疫および/または抗増殖性および/または抗がん治療応答の強化を必要とするヒト患者が挙げられる。本方法は、*in vivo*でのがん細胞の処置に好適なヒト患者を処置するのに特に好適である。

【0160】

本明細書において使用されるとき、「治療剤」という用語は、過剰増殖性疾患を低減および/または阻害することができる任意の薬剤により特徴付けられる。例示的な治療剤としては、細胞毒性剤、化学療法剤、抗増殖剤、免疫調節剤、ホルモン調節剤、サイトカイン、ならびに他の抗がん物質および/またはモダリティを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0161】

「細胞毒性剤」という用語は、本明細書において使用されるとき、細胞の機能を阻害もしくは予防する、および/または細胞の破壊を引き起こす、物質を指す。この用語は、放射性同位体（たとえば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、および Lu の放射性同位体）、化学療法剤（たとえば、メトトレキサート、アドリマイシン、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド）、ドキソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシン、または他のインターカレート剤、酵素およびその断片、たとえば、核酸分解酵素、抗生物質、ならびに毒素、たとえば、小分子毒素、または細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素（その断片および/もしくはバリエーションを含む）、ならびに以下に開示される様々な抗腫瘍剤および抗がん剤を含むことが意図される。他の細胞毒性剤を、以下に記載する。本明細書において使用されるとき、殺腫瘍剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。細胞毒性剤および化学療法剤は、相互に排他的ではない。

【0162】

追加または代替として、細胞毒素または細胞毒性剤には、細胞にとって有害な（たとえば、細胞を殺滅させる）任意の薬剤が含まれ得る。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびビユーロマイシン、ならびにそれらの類似体または相同体が挙げられる。治療剤としてはまた、たとえば、抗代謝剤（たとえば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（たとえば、メクロレタミン、チオテパ（*thioepa*）、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（*BSNU*）、およびロムスチン（*CCNU*）、シクロホスファミド（*cyclophosphamide*）、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金（*II*）（*DDP*）シスプラチン）、アントラサイクリン（たとえば、ダウノルピシン（以前のダウノマイシン）およびドキソルピシン）、抗生物質（たとえば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（*AMC*））、ならびに抗有糸分裂剤（たとえば、ビンクリスチンおよびピンブラスチン）が挙げられる。

【0163】

「化学療法剤」という用語は、がんの処置において有用な化学的化合物である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、たとえば、チオテパおよびCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミド；スルホン酸アルキル、たとえば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファン；アジリジン、たとえば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、およびトリメチロールメラミン（*trim*

10

20

30

40

50

ethylolomelamine)を含む、エチレンイミンおよびメチラメラミン(methylamelamine);アセトゲニン(特に、プラタシンおよびプラタシノン);デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標));ベータ-ラパコン;ラパコール;コルヒチン;ベツリン酸;カンプトテシン(合成類似体トボテカン(HYCAMTIN(登録商標))、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン、および9-アミノカンプトテシンを含む);プリオスタチン;カリスタチン;CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類似体を含む);ポドフィロトキシン;ポドフィリン酸;テニポシド;クリプトフィシン(特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8);ドラスタチン;デュオカルマイシン(合成類似体、KW-2189およびCB1-TM1を含む);エロイテロビン(eleutherobin);パンクラチスタチン(pancratistatin);サルコジクチン;スポンジスタチン(spongistatin);ナイトロジェンマスタード、たとえば、クロラムブシル、クロマファジン(chlomaphazine)、コロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード;ニトロソ尿素(nitrosurea)、たとえば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン;抗生物質、たとえば、エンジン抗生物質(たとえば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシガンマ1I、およびカリケアマイシンオメガI1(たとえば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33巻:183~186頁(1994年)を参照されたい);ダイネミシンAを含む、ダイネミシン;エスペラミシン;ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エンジン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン(carabycin)、カミノマイシン(caminomycin)、カルジノフィリン、クロモマイシン(chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキシソルビシン(モルホリノ-ドキシソルビシン、シアノモルホリノ-ドキシソルビシン、2-ピロリノ-ドキシソルビシン、およびデオキシドキシソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、たとえば、マイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン;抗代謝剤、たとえば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU);葉酸類似体、たとえば、デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート;プリン類似体、たとえば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン(thiamiprine)、チオグアニン;ピリミジン類似体、たとえば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン;アンドロゲン、たとえば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン;抗副腎剤(anti-adrenal)、たとえば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン;葉酸補液(folic acid replenisher)、たとえば、フロリン酸(frolinic acid);アセグラトン;アルドホスファミドグリコシド(aldophosphamide glycoside);アミノレブリン酸;エニルウラシル;アムサクリン;ベストラブシル(bestrabucil);ビスアントレン;エダトラキサート(edatraxate);デフォファミン(defofamine);デメコルチン;ジアジクオン;エル

10

20

30

40

50

フォミチン (elformithine) ; 酢酸エリブチニウム ; エポチロン ; エトグルシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン ; ロニダイニン (lonidainine) ; マイタンシノイド、たとえば、マイタンシンおよびアンサマイトシン ; ミトグアゾン ; ミトキサントロン ; モピダンモール (mopidanmol) ; ニトラエリン (nitraerine) ; ペントスタチン ; フェナメット ; ピラルピシン ; ロソキサントロン ; 2 - エチルヒドラジド (2 - ethylhydrazide) ; プロカルバジン ; P S K (登録商標) 多糖複合体 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.) ; ラゾキサン ; リゾキシン ; シゾフラン (sizofuran) ; スピロゲルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジクオン ; 2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン (特に、T - 2 毒素、ベラクリン A、ロリジン A、およびアングイジン) ; ウレタン ; ビンデシン (ELDISINE (登録商標)、FILDESIN (登録商標)) ; ダカルバジン ; マンノムスチン ; ミトブロニトール ; ミトラクトール ; ピボプロマン ; ガシトシン (gacytosine) ; アラビノシド (Ara - C) ; チオテパ ; タキソイド、たとえば、TAXOL (登録商標) パクリタキセル (Bristol - Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、ABRAXANE (商標) Cremophor 不含、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)、および TAXOTERE (登録商標) ドセタキセル (Rhône - Poulenc Rorer, Antony, France) ; クロランブシル (chloranbucil) ; ゲムシタピン (GEMZAR (登録商標)) ; 6 - チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキサート ; 白金類似体、たとえば、シスプラチンおよびカルボプラチン ; ビンブラスチン (VELBAN (登録商標)) ; 白金 ; エトボシド (VP - 16) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ピンクリスチン (ONCOVIN (登録商標)) ; オキサリプラチン ; ロイコボピン (leucovorin) ; ピノレルピン (NAVELBINE (登録商標)) ; ノバントロン ; エダトレキサート ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; イバンドロネート ; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000 ; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO) ; レチノイド、たとえば、レチノイン酸 ; カペシタピン (XELODA (登録商標)) ; 上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体 ; ならびに上記のうちの2つまたはそれより多くの組合せ、たとえば、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチン、およびブレドニゾロンの組合せ療法

10

20

30

【0164】

本明細書において使用されるとき、「サイトカイン」という用語には、Kiefferら、2016年、Immunol. Revs.、270巻：178～192頁に列挙されている例が含まれるが、それらに限定されない。例示的な好適なサイトカインとしては、G - CSF、GM - CSF、IFN、IFN、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 6、IL - 7、IL - 9、IL - 12、IL - 13、IL - 15、IL - 17、IL - 21、IL - 23、およびTNFが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0165】

一実施形態では、サイトカインは、リシン残基間の架橋を介して結合性ドメインに連結される。

【0166】

「治療用抗体」という用語は、疾患の処置において有用な抗体である。治療用抗体の例としては、エタラシズマブ、アトリズマブ、トシリズマブ、タカツズマブテトラキセタン (tacatuzumab tetraxetan)、ルプリズマブ (ruplizumab)、オフアツムマブ、テフィバズマブ (tefibazumab)、ペバシズマブ、ベリムマブ、トシツモマブ、ブロンツベトマブ (blontuветmab)、メボリズマブ、ラベツズマブ、アルシツモマブ、セルトリズマブペゴール、ラムシルマブ、TRB

50

S07、セツキシマブ、ビシロマブ、オビヌツズマブ、トラスツズマブ、クリバツズマブ、テトラキセタン、ボツムバブ、ザノリムマブ、ザルツムマブ、アダリムマブ、フォントリズマブ、アルツモマブペンテテート、カナキヌマブ、イゴボマブ (igovomab)、トラスツズマブエムタンシン、アレムツズマブ、ロベリズマブ (rovelizumab)、スレソマブ、ラニビズマブ、FBTA05、ベクツモマブ、リツキシマブ、エフングマブ (efungumab)、ゲムツズマブオゾガマイシン、イムシロマブ、ファノレソマブ、モタビズマブ、ビジリズマブ、ペルツズマブ、ニボルマブ、ムロモナブ - cd3、オレゴボマブ、エドレコロマブ、デノスマブ、カプロマブベンデチド、エファリズマブ、インフリキシマブ、カツマキソマブ、ギレンツキシマブ、アブシキシマブ、エルツマキソマブ、ベシレソマブ、ゴリムマブ、バシリキシマブ、エクリズマブ、ウステキヌマブ、パリビズマブ、タムツベツマブ (tamtuetmab)、ニモツズマブ (nimotuzumab)、ペムツモマブ、ナタリズマブ、パニツムマブ、ノフェツモマブメルペンタン、オマリズマブ、イピリムマブ、ダクリズマブ、イブリツモマブチウキセタンがある。

【0167】

本明細書において使用されるとき、「処置」は、処置されている個体または細胞の自然な経過を改変するよう試みる、臨床介入を指し、予防のため、または臨床病理の過程の間のいずれかで行われ得る。処置の所望される効果としては、疾患の発症または再発を予防すること、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理結果の減少、炎症および/または組織/器官の損傷の予防または減少、疾患進行の速度の減少、疾患状態の軽減または緩和、ならびに寛解または予後の改善が挙げられる。一部の実施形態では、本発明の抗体は、疾患または障害の発症を遅延させるために使用される。

【0168】

処置の目的で、「哺乳動物」という用語は、ヒト、飼育動物および家畜、ならびに動物園の動物、競技動物、または愛玩動物、たとえば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを含む、哺乳動物として分類される任意の動物を指す。ある特定の実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。

【0169】

「有効量」という用語は、必要とされる投薬量および期間で、所望される治療的または予防的結果を達成するのに有効な量を指す。

【0170】

本明細書において使用されるとき、本発明の物質/分子の「治療有効量」という用語は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重などの因子、ならびにその物質/分子が個体において所望される応答を誘起する能力に応じて、変動し得る。治療有効量はまた、物質/分子の任意の毒性または有害な作用を、治療上有益な作用が上回るものである。「予防有効量」は、必要とされる投薬量および期間で、所望される予防的結果を達成するのに有効な量を指す。予防的用量は、疾患の前または早期段階で、対象に使用されるため、典型的には、予防有効量は、治療有効量よりも少なくなるが、必ずしもそうとは限らない。

【0171】

本明細書において使用されるとき、「予防有効量」という用語は、必要とされる投薬量および期間で、所望される予防的結果を達成するのに有効な量を指す。予防的用量は、疾患の前または早期段階で、対象に使用されるため、典型的には、予防有効量は、治療有効量よりも少なくなるが、必ずしもそうとは限らない。

【0172】

「薬学的に許容される担体」という用語は、過度の副作用（たとえば、毒性、刺激、およびアレルギー応答）を伴うことなく、妥当な利益/危険性比に合った、対象に使用するのに好適なものである。また、それぞれの担体は、医薬組成物の他の成分と適合性があるという点で、「許容される」必要がある。担体は、固体、半固体、または液体希釈剤、クリーム、またはカプセルの形態であり得る。担体は、製剤の他の成分と適合性であるという点で、「許容される」必要があり、対象において、活性剤の任意の分解を最小限に抑え、任意の副作用を最小限に抑えるように選択される。

【 0 1 7 3 】

「実質的に類似」、「実質的に同じ」、「同等」、または「実質的に同等」という語句は、本明細書において使用されるとき、2つの数値（たとえば、一方が、ある分子に関連するものであり、他方が参照／比較分子に関連するものである）間における十分に高い程度の類似性を指し、結果として、当業者であれば、2つの値の間の差に関して、前記値によって測定される生物学的特徴（たとえば、 K_d 値、抗ウイルス効果など）の文脈において、生物学的および／または統計学的有意性がほとんどないか全くないとみなされよう。前記2つの値の間の差は、例えば、参照／比較分子の値の関数として、約50%より低い、約40%より低い、約30%より低い、約20%より低い、および／または約10%より低い。

10

【 0 1 7 4 】

「実質的に低減された」または「実質的に異なる」という語句は、本明細書において使用されるとき、2つの数値（一般に、一方がある分子に関連するものであり、他方が、参照／比較分子に関連するものである）の間における十分に高い程度の差を示し、結果として、当業者であれば、2つの値の間の差に関して、前記値によって測定される生物学的特徴（たとえば、 K_d 値）の文脈において、統計学的有意性があるとみなされよう。前記2つの値の間の差は、例えば、参照／比較分子の値の関数として、約10%を上回る、約20%を上回る、約30%を上回る、約40%を上回る、および／または約50%を上回る。

【 0 1 7 5 】

本明細書において特定されるアミノ酸配列に関する「アミノ酸配列同一性の割合（%）」という用語は、配列をアライメントし、最大の配列同一性パーセントが達成されるように、必要に応じてギャップを導入した後に、特定のポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合として定義され、いずれの保存的置換も配列同一性の一部とは考えない。配列同一性の割合を決定する目的のアライメントは、当業者の技能の範囲内である様々な手段で、たとえば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign（DNASTAR）ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して、達成することができる。当業者であれば、比較されている配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含む、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。本明細書の目的で、2つのアミノ酸配列間の配列比較は、National Center for Biotechnology Information（NCBI）によってオンラインで提供されているコンピュータプログラムBlastp（タンパク質-タンパク質BLAST）を使用して行った。具体的には、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bに対するアミノ酸配列同一性の割合（これは、代替として、所与のアミノ酸配列Aが、所与のアミノ酸配列Bに対して、ある特定のアミノ酸配列同一性%を有するとして表記され得る）は、以下の式によって計算される。

20

$$(X \div Y) \times 100\%$$

30

【 0 1 7 6 】

式中、Xは、配列アライメントプログラムBLASTによるAおよびBのアライメントにおいて同一なマッチとしてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Yは、AまたはBのいずれか短い方のアミノ酸残基の総数である。

40

【 0 1 7 7 】

指定されたアミノ酸配列に関する配列同一性または相同性は、本明細書において、配列をアライメントし、最大の相同性パーセントが達成されるように、必要に応じてギャップを導入した後に、指定された残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合として定義され、いずれの保存的置換も、配列同一性の一部とは考えない。指定された配列に対するN末端、C末端、または内部における伸長、欠失、または挿入のいずれも、相同性に影響を及ぼすと解釈しないものとする。本発明において行われるすべての配列アライメントは、そのような最大の相同性のアライメントである。本明細書において考察されるように、タンパク質／ポリペプチドのアミノ酸配列におけるわずかな変動は、ここに開示

50

され特許請求される発明の概念によって包含されることが企図されるが、アミノ酸配列における変動により、少なくとも80%、たとえば、少なくとも81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、および99%が維持されることを条件とする。
【0178】

「保存的に修飾されたアミノ酸置換」が、企図される。保存的に修飾されたアミノ酸置換は、その側鎖に関連して、あるファミリーのアミノ酸内で行われるものである。遺伝子的にコードされるアミノ酸は、一般に、次のファミリーに分類される：

- (1) 酸性：アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、
- (2) 塩基性：リシン(K)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)、
- (3) 非極性：グリシン(G)、アラニン(A)、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、プロリン(P)、フェニルアラニン(F)、メチオニン(M)、トリプトファン(W)、ならびに
- (4) 非荷電極性：アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、システイン(C)、セリン(S)、スレオニン(T)、チロシン(Y)。

【0179】

より好ましいファミリーには、次のものがある：

- (3-1) 脂肪族：アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン、
- (3-2) 芳香族：フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン、
- (4-1) 脂肪族-ヒドロキシル：セリンおよびスレオニン、
- (4-2) アミド含有：アスパラギンおよびグルタミン。

【0180】

たとえば、ロイシンとイソロイシンもしくはバリンとの単独置換、アスパラギン酸とグルタミン酸との単独置換、スレオニンとセリンとの単独置換、またはあるアミノ酸と構造的に関連したアミノ酸との類似の置換は、特に、置換がフレームワーク部位内のアミノ酸に関係しない場合に、結果として得られる分子の結合または特性に大きな影響を有しないと予測することは、妥当である。アミノ酸の変化が、機能的ペプチドをもたらすかどうかは、ポリペプチド誘導体の特定の活性をアッセイすることによって、容易に判定することができる。タンパク質/ポリペプチドの断片または類似体は、当業者によって容易に調製することができる。断片または類似体の好ましいアミノ末端およびカルボキシル末端は、機能的ドメインの境界付近に生じる。さらなる群のアミノ酸はまた、たとえば、Creighton、(1984年)、Proteins: Structure and Molecular Properties、(第2版、1993年)、W. H. Freeman and Companyに記載されている原理を使用して製剤化することもできる。

【0181】

ある特定の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、参照配列(たとえば、CDR、VH、VL、フレームワーク、全長など)とは、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、または30個、またはそれより多くの置換されたアミノ酸残基が異なる、配列相同体を含み得る。

誘導体

【0182】

本開示はまた、SSEA4に特異的な抗体を得るための方法を提供する。そのような抗体のCDRは、表2および本明細書の他の箇所において特定されるVHおよびVLの特定の配列に限定されず、SSEA4に特異的に結合する能力を保持するこれらの配列のバリエーションを含み得る。そのようなバリエーションは、当業者によって、当技術分野において周知の技法を使用して、以下に列挙される配列およびその保存的置換から導出され得る。

10

20

30

40

【表 B - 1】

もとの残基 例示的な置換	代表的な置換
Ala (A) Val, Leu, Ile	Val
Arg (R) Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N) Gln	Gln

【表 B - 2】

もとの残基 例示的な置換	代表的な置換
Asp (D) Glu	Glu
Glu (E) Asp	Asp
Cys (C) Ser, Ala	Ser
Gln (Q) Asn	Asn
Gly (G) Pro, Ala, Gly	Ala
His (H) Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I) Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノロイシン	Leu
Leu (L) ノロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K) Arg, 1,4-ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met (M) Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F) Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P) Ala, Gly	Gly
Ser (S) Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T) Ser	Ser
Trp (W) Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y) Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V) Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノロイシン	Leu

【0183】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、H - C D R 1、H - C D R 2、および H - C D R 3 配列を含む重鎖可変領域、ならびに L - C D R 1、L - C D R 2、および L - C D R 3 配列を含む軽鎖可変領域を含み、ここで、これらの C D R 配列のうちの 1 つまたは複数は、本明細書において記載される好ましい抗体に基づく特定のアミノ酸配列またはその保存的修飾形態を含み、それらの抗体は、本発明の抗 S S E A 4 抗体の所望される機能的特性を保持する。したがって、本発明は、H - C D R 1、H - C D R 2、および H - C D R 3 配列を含む重鎖可変領域、ならびに L - C D R 1、L - C D R 2、および L - C D R 3 配列を含む軽鎖可変領域、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換バリエーション、ならびに 3 つすべての重鎖および / または軽鎖 C D R を含むそれらの全長配列および相同体を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分を提供する。

操作および修飾された抗体

【0184】

本発明の抗体は、さらに、本明細書において開示される V_H 配列および / または V_L 配列のうちの 1 つまたは複数を含む抗体を、修飾された抗体を操作するための出発材料として使用して、調製することができ、この修飾された抗体は、出発抗体から改変された特性を有し得る。抗体は、一方または両方の可変領域（すなわち、V_H および / または V_L）内の、たとえば、1 つもしくは複数の C D R 領域内の、および / または 1 つもしくは複数のフレームワーク領域内の、1 個または複数の残基を修飾することによって、操作され

得る。追加または代替として、抗体は、たとえば、抗体のエフェクター機能を改変するために、定常領域内の残基を修飾することによって、操作することができる。

【0185】

行われ得る可変領域操作の1つの種類としては、CDRグラフトがある。抗体は、主として、6つの重鎖および軽鎖相補性決定領域(CDR)に位置するアミノ酸残基を通じて、標的抗原と相互作用する。このため、CDR内のアミノ酸配列は、CDRの外側の配列よりも個々の抗体間での多様性が高い。CDR配列は、ほとんどの抗体-抗原相互作用を担うため、異なる特性を有する異なる抗体に由来するフレームワーク配列にグラフトされた特定の天然に存在する抗体に由来するCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって、特定の天然に存在する抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現させることが可能である(たとえば、Riechmann, L.ら、(1998年)、Nature、332巻:323~327頁、Jones, P.ら、(1986年)、Nature、321巻:522~525頁、Queen, C.ら、(1989年)、Proc. Natl. Acad., U.S.A., 86巻:10029~10033頁、Winterに對する米国特許第5,225,539号、ならびにQueenらに對する米国特許第5,530,101号、同第5,585,089号、同第5,693,762号、および同第6,180,370号を参照されたい)。

10

【0186】

したがって、本発明の別の実施形態は、H-CDR1、H-CDR2、およびH-CDR3配列を含む重鎖可変領域、ならびにL-CDR1、L-CDR2、およびL-CDR3配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分に関する。したがって、そのような抗体は、本明細書において記載されるモノクローナル抗体のV_HおよびV_L CDR配列を含み、さらに、これらの抗体とは異なるフレームワーク配列を含んでもよい。

20

【0187】

そのようなフレームワーク配列は、生殖細胞系列の抗体遺伝子配列を含む公的なDNAデータベースまたは公開されている参考文献から得ることができる。たとえば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖細胞系列配列データベース(インターネット上でwww.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseにおいて利用可能)に、ならびにKabat, E. A.ら、(1991年)、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH公開番号91-3242; Tomlinson, I. M.ら、(1992年)、「The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops」、J. Mol. Biol., 227巻:776~798頁; およびCox, J. P. L.ら、(1994年)、「A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage」、Eur. J. Immunol., 24巻:827~836頁に見出すことができ、それらのそれぞれの内容は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。別の例として、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系列DNA配列は、GenBankデータベースにおいて見出すことができる。たとえば、HCo7 HuMAbマウスにおいて見出される以下の重鎖生殖細胞系列配列は、付随するGenBank受託番号において利用可能である: 1~69(NG_0010109、NT_024637、およびBC070333)、3~33(NG_0010109およびNT_024637)、および3~7(NG_0010109およびNT_024637)。別の例として、HCo12 HuMAbマウスにおいて見出される以下の重鎖生殖細胞系列配列は、付随するGenBank受託番号において利用可能である: 1~69(NG_0010109、NT_024637、およびBC070333)

30

40

50

、 5 ~ 5 1 (N G _ 0 0 1 0 1 0 9 および N T _ 0 2 4 6 3 7) 、 4 ~ 3 4 (N G _ 0 0 1 0 1 0 9 および N T _ 0 2 4 6 3 7) 、 3 ~ 3 0 . 3 (A J 5 5 6 6 4 4) 、 ならびに 3 ~ 2 3 (A J 4 0 6 6 7 8) 。

【 0 1 8 8 】

C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列は、フレームワーク配列が由来する生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子において見出されるものと同一の配列を有するフレームワーク領域にグラフトされてもよく、またはC D R 配列は、生殖細胞系列配列と比較して、1つもしくは複数の変異を含むフレームワーク領域にグラフトされてもよい。たとえば、ある特定の事例では、抗体の抗原結合能力を維持または強化するために、フレームワーク領域内の残基を変異させることが有益であることが見出されている（たとえば、Queen 10
らに対する米国特許第 5 , 5 3 0 , 1 0 1 号、同第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号、同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号、および同第 6 , 1 8 0 , 3 7 0 号を参照されたい）。

【 0 1 8 9 】

別の種類の可変領域修飾は、それぞれの重鎖または軽鎖のC D R 1、C D R 2、および / またはC D R 3 領域内のアミノ酸残基を変異させ、それによって、目的の抗体の1つまたは複数の結合特性（たとえば、親和性）を改善することである。部位特異的変異生成またはP C R 媒介性変異生成を行って、変異を導入することができ、抗体結合または目的とされる他の機能的特性に対する効果を、本明細書において記載され実施例に提供されている *in vitro* または *in vivo* アッセイにおいて評価することができる。好ましくは、保存的修飾（上記で考察されたような）が導入される。変異は、アミノ酸の置換、付加、または欠失であり得るが、好ましくは、置換である。さらに、典型的には、C D R 領域内の1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、または5個以下の残基が、改変される。 20

【 0 1 9 0 】

本発明の操作された抗体には、たとえば、抗体の特性を改善するために、V_Hおよび / またはV_K内のフレームワーク残基に修飾が行われているものが含まれる。典型的には、そのようなフレームワーク修飾は、抗体の免疫原性を減少させるために行われる。たとえば、1つのアプローチは、1個または複数のフレームワーク残基を、対応する生殖細胞系列配列に「復帰変異」させることである。より具体的には、体細胞変異を受けた抗体は、その抗体が由来する生殖細胞系列配列とは異なるフレームワーク残基を含み得る。そのような残基は、抗体のフレームワーク配列を、抗体が由来する生殖細胞系列配列と比較することによって、特定することができる。 30

【 0 1 9 1 】

フレームワーク領域またはC D R 領域内において行われる修飾に加えて、またはその代替として、本発明の抗体は、典型的には、抗体の1つまたは複数の機能的特性、たとえば、血清半減期、補体結合、F_c受容体結合、および / または抗原依存性細胞毒性を改変するように、F_c領域内における修飾を含むように操作され得る。さらに、本発明の抗体は、ここでも、抗体の1つまたは複数の機能的特性を改変するように、化学的に修飾され得るか（たとえば、1つもしくは複数の化学的部分が抗体に結合され得る）、またはそのグリコシル化を改変するように修飾され得る。 40

【 0 1 9 2 】

さらに別の実施形態では、抗体のグリコシル化が、修飾される。たとえば、非グリコシル化抗体を、作製することができる（すなわち、抗体は、グリコシル化を欠いている）。グリコシル化は、たとえば、抗体の抗原に対する親和性を増加させるように改変され得る。追加または代替として、改変型のグリコシル化を有する抗体、たとえば、フコシル残基の量が低減された低フコシル化抗体、または二分枝型G1cNac構造が増加した抗体を、作製することができる。このような改変されたグリコシル化パターンは、抗体のA D C 能力を増加させることが実証されている。

【 0 1 9 3 】

本発明によって企図される本明細書における抗体の別の修飾は、ペグ化である。抗体は 50

、たとえば、抗体の生物学的（たとえば、血清）半減期を増加させるように、ペグ化することができる。抗体をペグ化するために、抗体またはその断片を、典型的に、ポリエチレングリコール（PEG）、たとえば、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体と、1個または複数のPEG基が、抗体または抗体断片に結合した状態となるような条件下において、反応させる。好ましくは、ペグ化は、反応性PEG分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を通じて行われる。本明細書において使用されるとき、「ポリエチレングリコール」という用語は、他のタンパク質、たとえば、モノ（C1～C10）アルコキシ-またはアリーロキシ-ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール-マレイミドを誘導体化するために使用されているPEGのあらゆる形態を包含することが意図される。ある特定の実施形態では、ペグ化しようとする抗体は、非グリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は、当技術分野において公知であり、本発明の抗体に適用することができる。たとえば、Nishimuraらによる欧州特許第0154316号およびIshikawaらによる欧州特許第0401384号を参照されたい。

【0194】

本発明の抗体を操作する方法のある特定の実施形態では、変異を、抗PD-1抗体をコードする配列のすべてまたは一部に、ランダムまたは選択的に導入することができ、結果として得られる修飾された抗SSEA4抗体を、結合活性および/または本明細書において記載される他の機能的特性に関して、スクリーニングすることができる。変異方法は、当技術分野において説明されている。たとえば、ShortによるPCT国際公開第02/092780号は、飽和変異生成、合成ライゲーションアセンブリ、またはそれらの組合せを使用して、抗体の変異形態を作製し、スクリーニングする方法について記載している。あるいは、LazarらによるPCT国際公開第03/074679号は、抗体の物理化学的特性を最適化するためにコンピュータによるスクリーニング方法を使用する方法について記載している。

本発明の抗体をコードする核酸分子

【0195】

本発明の別の態様は、本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、全細胞、細胞ライセート、または部分的に精製されたかもしくは実質的に純粋な形態で、存在し得る。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンド形成、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動、および当技術分野において周知の他のものを含む、標準的な技法によって、他の細胞成分または他の混入物、たとえば、他の細胞内核酸もしくはタンパク質から精製される場合、「単離」されているまたは「実質的に純粋」となっている。F. Ausubelら編、(1987年)、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing and Wiley Interscience、New Yorkを参照されたい。本発明の核酸は、たとえば、DNAまたはRNAであり得、イントロン配列を含む場合も含まない場合もある。好ましい実施形態では、核酸は、cDNA分子である。ある特定の実施形態では、核酸は、ベクターによって発現される。

【0196】

本発明の核酸は、標準的な分子生物学技法を使用して得ることができる。ハイブリドーマ（たとえば、以下にさらに記載されるようなヒト免疫グロブリン遺伝子を保持するトランスジェニックマウスから調製されたハイブリドーマ）によって発現される抗体については、ハイブリドーマによって作製された抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAは、標準的なPCR増幅またはcDNAクローニング技法によって得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから（たとえば、ファージディスプレイ技法を使用して）得られる抗体については、抗体をコードする核酸は、ライブラリーから回収され得る。

【0197】

本発明の例示的な核酸分子は、例示的なAb6モノクローナル抗体のV_HおよびV_Lアミノ酸配列をコードするものである（表2A～2Dを参照されたい）。

【 0 1 9 8 】

フレームワーク領域（ F R ）に例示的なアミノ酸置換を有する配列を、表 2 B に示す。 S S E A 4 および S S E A 4 を発現する細胞に対する結合活性の確認は、実施例の節において例証される結合アッセイによって示される。本発明者らは、結合親和性機能が、それぞれの例示的な軽鎖および重鎖のフレームワークに最大 3 / 5 個のアミノ酸置換を有する例示的なバリエーションにおいてさえも、保存および保持されていることを確認した。

【 0 1 9 9 】

C D R に例示的な非保存的に修飾されたアミノ酸置換を有する配列を、表 2 C に示す。 S S E A 4 および S S E A 4 を発現する細胞に対する結合活性の確認は、実施例の節において例証される結合アッセイによって示される。本発明者らは、結合親和性および機能が、軽鎖および重鎖の C D R に以下の非限定的な例示的なアミノ酸置換を有する例示的なバリエーションにおいて、保存および保持されていることを確認した：たとえば、限定されないが、重鎖： A 1 0 0 R 、 N 3 1 S 、 T 6 2 A 。軽鎖： S 5 2 Y 。

【 0 2 0 0 】

C D R に例示的な保存的に修飾されたアミノ酸置換を有する配列を、表 2 D に示す。 S S E A 4 および S S E A 4 を発現する細胞に対する結合活性の確認は、実施例の節において例証される結合アッセイによって示される。本発明者らは、結合親和性および機能が、軽鎖および重鎖の C D R に非限定的な例示的なアミノ酸置換を有する例示的なバリエーションにおいて、保存および保持されていることを確認した：たとえば、限定されないが、重鎖： V 5 0 A 、 G 5 3 A 、 S 3 5 T 。軽鎖： V 3 0 I / A 、 G 9 1 A 、 Y 9 4 F

表 2 A ： 例示的な親抗体

【 0 2 0 1 】

【表 2 A - 1】

chAb6配列(番号01x)

抗体/配列	配列番号	アミノ酸または核酸配列
H-CDR1	番号10	NYGVS
H-CDR2	番号11	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	番号12	PGAGYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号13	QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVS GFSLKNGVSWVRQPPGKGLEWL GVIWGDGSTNYHSTLRSRLTISKDN SKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAKP GAGYAMDYWGQGTSTVTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号14	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCT GGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTG TCCATCACATGCACTGTCTCAGGGTTCTCA TTAAAAAACTATGGTGTAAGCTGGGTTTCG CCAGCCTCCAGGAAAGGTCTGGAGTG GCTGGGAGTAATATGGGGTGACGGGAG CACAAATTATCATTCAACTCTCAGATCCA GACTGACCATCAGCAAGGATAATTCCAA

10

20

30

40

50

【表 2 A - 2】

		GAGCCAACTTTTCTTAAACTGAACAGAC TGCAAACCTGATGACACAGCCACGTACTA CTGTGCCAAACCTGGGGCGGGTTATGCTA TGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC ACCGTCTCCTCA
L-CDR1	番号 15	SASSSVSYMH
L-CDR2	番号 16	DTSKLTS
L-CDR3	番号 17	FQSGGYPLT
軽鎖可変ドメイン	番号 18	QIVLTQSPAIMSVYPGEKVTMTC SASSSVSYMHWYQQKSSTSPKL WIYDTSKLTS GVPGRFSGSGSGN SYSLTISSMEAEDVATYYCFQSGS YPLTFGGGKLEIKR
軽鎖のヌクレオチド	番号 19	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAA TCATGTCTGTATATCCAGGGGAAAAGGT CACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAG TGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAG AAGTCAAGCACCTCCCCAACTCTGGA TTTATGACACATCCAACTGACTTCTGG AGTCCCAGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGG TCTGGAACTCTTACTCTCTCACGATCAG CAGCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTT ATTACTGTTTTCAGGGGAGTGGGTACCCA CTCACGTTTCGAGGGGGGACCAAGCTG GAAATAAAACGG

10

20

表 2 B : フレームワーク領域に修飾を有する例示的な抗体の実施形態

【 0 2 0 2 】

【表 2 B - 1】

hAb6-2配列(番号02x)

30

重鎖可変ドメイン	番号 23	QVQLKESGPGLVAPSQTLSTCTVS GFSLKNYGVSWVRQPPGKLEWI GVIWGDGSTNYHSTLRSRVTISKD NSKSQLFLKLNRLQTDDTATYYCAK PGAGYAMDYWGQGTSTVTVSS
軽鎖可変ドメイン	番号 28	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCSA SSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWIYD TSKLTS GVPGRFSGSGSGNSYTLTIS SMEAEDVATYYCFQSGGYPLTFGG GTKLEIKR

40

【 0 2 0 3 】

50

【表 2 B - 2 - 1】

hAb6-3配列(番号03x)

重鎖可変ドメイン	番号 33	QVQLQESGPGLVAPSQTL SI TCTVSGFSLKNYGVS WVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQTDDTATYYCAKPG AGYAMDYWGQGTLVTVSS
軽鎖可変ドメイン	番号 38	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLW

10

【表 2 B - 2 - 2】

		IYDTSKLTSGVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQGS GYP LTFGGGTKVEIKR
--	--	--

表 2 C : C D R に非保存的修飾を有する例示的な抗体の実施形態
【 0 2 0 4】

20

30

40

50

【表 2 C - 1 - 1】

hAb6-3.1配列(番号04x、H-CDR3:A100R)

H-CDR1	番号40	NYGVS
H-CDR2	番号41	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	番号42	PGR _R GYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号43	QVQLQESGPGLVAPSQTL TCTVSGFSLK _R NYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRV _R TISKDNSKSQLF LKL _R NRLQTDDTATYYCAKPG R _R GYAMDYWGQGT _R LTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号44	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGACCAG GACTGGTGGCTCCCAGCCAGACCCTGTCT ATCACCTGCACAGTGTCTGGCTTCTCCCTG AAGAACTACGGCGTGAGCTGGGTGAGAC AGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGAT CGGCGTGATCTGGGGCGACGGCTCTACC AATTATCACTCCACACTGAGGAGCCGGG TGACCATCTCCAAGGATAACTCCAAGAG CCAGCTGTTTCTGAAGCTGAATCGCCTG CAGACAGACGATACCGCCACATACTATT GCGCTAAGCCAGGCCGGGGCTACGCTA TGGACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGG TGACAGTGTCCAGC
L-CDR1	番号45	SASSSVSYM _H
L-CDR2	番号46	DTSKLTS
L-CDR3	番号47	FQSGSYPLT
軽鎖可変ドメイン	番号48	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSSVSYMHWYQ _R KSSTSPKLW IYDTSKLTS _R GV _R PG _R FS _R GS _R SG _R NSY TLTISSMEAEDAATYYCFQSGSGYP LTFGGG _R TKVEIK _R
軽鎖のヌクレオチド	番号49	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCA TCCAGTCCGTGTACCCAGGCGAGAAGG TGACCATGACATGTTCCGCTTCTTCCAG CGTGAGCTACATGCATTGGTATCAGCAG AAGTCTTCCACATCTCCCAAGCTGTGGA TCTACGACACCTCTAAGCTGACATCCGG AGTGCCTGGCAGGTTCTCTGGATCCGGA AGCGGCAACAGCTATAACCTGACAATCA GCTCTATGGAGGCTGAGGATGCCGCTAC CTACTATTGTTTCCAGGGCTCTGGCTATC

10

20

30

【表 2 C - 1 - 2】

		CCCTGACCTTTGGCGGCGGCACAAAGG TGGAGATCAAGCGT
--	--	---

40

【 0 2 0 5 】

50

【表 2 C - 2】

hAb6-3.2配列(番号05x、H-CDR1:N31SおよびH-CDR3:A100R)

H-CDR1	番号 50	SYGVS
H-CDR2	番号 51	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	番号 52	PGRGYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号 53	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI TCTVSGFSLKSYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGTLLTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号 54	
L-CDR1	番号 55	SASSSVSYMH
L-CDR2	番号 56	DTSKLTS
L-CDR3	番号 57	FQGSGYPLT
軽鎖可変ドメイン	番号 58	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSSVSYMHWYQKSSTSPKLW IYDTSKLTSQVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQSGGYP LTFGGGTKEIKR
軽鎖のヌクレオチド	番号 59	

10

20

【 0 2 0 6 】

【表 2 C - 3】

hAb6-3.3配列(番号06x、H-CDR2:T62AおよびH-CDR3:A100R)

H-CDR1	番号 60	NYGVS
H-CDR2	番号 61	VIWGDGSTNYHSAALRS
H-CDR3	番号 62	PGRGYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号 63	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSAALRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGTLLTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号 64	
L-CDR1	番号 65	SASSSVSYMH
L-CDR2	番号 66	DTSKLTS
L-CDR3	番号 67	FQGSGYPLT
軽鎖可変ドメイン	番号 68	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSSVSYMHWYQKSSTSPKLW IYDTSKLTSQVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQSGGYP LTFGGGTKEIKR
軽鎖のヌクレオチド	番号 69	

30

40

【 0 2 0 7 】

50

【表 2 C - 4】

hAb6-3.4配列(番号07x、L-CDR2:S52YおよびH-CDR3:A100R)

H-CDR1	番号 70	NYGVS
H-CDR2	番号 71	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	番号 72	PGRGYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号 73	QVQLQESGPGLVAPSQTL TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNLRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLTVTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号 74	
L-CDR1	番号 75	SASSSVSYMH
L-CDR2	番号 76	DTYKLTS
L-CDR3	番号 77	FQGSGYPLT
軽鎖可変ドメイン	番号 78	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSSVSYMHWYQKSSSTSPKLW IYDTYKLTSGLVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQSGGYP LTFGGGTKVEIKR
軽鎖のヌクレオチド	番号 79	

10

20

表 2 D : CDR に保存的修飾を有する例示的な抗体の実施形態

【0208】

【表 2 D - 1】

hAb6-3.101配列(番号08x、H-CDR2:V50AおよびH-CDR3:A100R)

H-CDR1	番号 80	NYGVS
H-CDR2	番号 81	AIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	番号 82	PGRGYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号 83	QVQLQESGPGLVAPSQTL TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGAIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNLRLQTDDTATYYCAKPG RGYAMDYWGQGLTVTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号 84	
L-CDR1	番号 85	SASSSVSYMH
L-CDR2	番号 86	DTSKLTS
L-CDR3	番号 87	FQGSGYPLT
軽鎖可変ドメイン	番号 88	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSSVSYMHWYQKSSSTSPKLW IYDTSKLTSGLVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQSGGYP LTFGGGTKVEIKR
軽鎖のヌクレオチド	番号 89	

30

40

【0209】

50

【表 2 D - 2】

hAb6-3.103配列(番号10x、H-CDR2:G53AおよびH-CDR3:A100R)

H-CDR1	番号 100	NYGVS
H-CDR2	番号 101	VIW[A]DGSTNYHSTLRS
H-CDR3	番号 102	PGR[RGYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号 103	QVQLQESGPGLVAPSQTLST TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIW[A]DGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQTDDTATYYCAKPG [R]GYAMDYWGQGTLLTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号 104	
L-CDR1	番号 105	SASSSVSYMH
L-CDR2	番号 106	DTSKLTS
L-CDR3	番号 107	FQGSGYPLT
軽鎖可変ドメイン	番号 108	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLW IYDTSKLTSQVPGRFSGSGSNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQGSGYP LTFGGGGTKVEIKR
軽鎖のヌクレオチド	番号 109	

10

20

【 0 2 1 0】

【表 2 D - 3】

hAb6-3.105配列(番号12x、H-CDR1:S35TおよびH-CDR3:A100R)

H-CDR1	番号 120	NYGV[T]
H-CDR2	番号 121	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	番号 122	PGR[RGYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号 123	QVQLQESGPGLVAPSQTLST TCTVSGFSLKNYGV[T]WVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNRLQTDDTATYYCAKPG [R]GYAMDYWGQGTLLTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号 124	
L-CDR1	番号 125	SASSSVSYMH
L-CDR2	番号 126	DTSKLTS
L-CDR3	番号 127	FQGSGYPLT
軽鎖可変ドメイン	番号 128	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLW IYDTSKLTSQVPGRFSGSGSNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQGSGYP LTFGGGGTKVEIKR
軽鎖のヌクレオチド	番号 129	

30

40

【 0 2 1 1】

50

【表 2 D - 4 - 1】

hAb6-3.106配列(番号13x、L-CDR1:V30IおよびH-CDR3:A100R)

H-CDR1	番号 130	NYGVS
H-CDR2	番号 131	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	番号 132	PGRGYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号 133	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI

【表 2 D - 4 - 2】

		TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNLQTDDTATYYCAKPG R ₁ GYAMDYWGQGT ₁ LVTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号 134	
L-CDR1	番号 135	SASSS ₁ SYMH
L-CDR2	番号 136	DTSKLTS
L-CDR3	番号 137	FQGSGYPLT
軽鎖可変ドメイン	番号 138	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSS ₁ SYMHWYQQKSSTSPKLW IYDTSKLTS ₁ GVPRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQSGGYP LTFGGG ₁ TKVEIKR
軽鎖のヌクレオチド	番号 139	

【 0 2 1 2 】

【表 2 D - 5】

hAb6-3.107配列(番号14x、L-CDR1:V30AおよびH-CDR3:A100R)

H-CDR1	番号 140	NYGVS
H-CDR2	番号 141	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	番号 142	PGRGYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号 143	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNLQTDDTATYYCAKPG R ₁ GYAMDYWGQGT ₁ LVTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号 144	
L-CDR1	番号 145	SASSS ₁ A ₁ SYMH
L-CDR2	番号 146	DTSKLTS
L-CDR3	番号 147	FQGSGYPLT
軽鎖可変ドメイン	番号 148	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSS ₁ A ₁ SYMHWYQQKSSTSPKLW IYDTSKLTS ₁ GVPRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQSGGYP LTFGGG ₁ TKVEIKR
軽鎖のヌクレオチド	番号 149	

【 0 2 1 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 D - 6 - 1】

hAb6-3.108配列(番号15x、L-CDR3:G91AおよびH-CDR3:A100R)

H-CDR1	番号 150	NYGVS
H-CDR2	番号 151	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	番号 152	PGR ^R GYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号 153	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNLRLQTDDTATYYCAKPG

10

【表 2 D - 6 - 2】

		R ^R GYAMDYWGQGT ^R LVTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号 154	
L-CDR1	番号 155	SASSSVSYMH
L-CDR2	番号 156	DTSKLTS
L-CDR3	番号 157	FQA ^A SGYPLT
軽鎖可変ドメイン	番号 158	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLW IYDTSKLTS ^R GVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQA ^A SGYP LTFGGGTKVEIKR
軽鎖のヌクレオチド	番号 159	

20

【0 2 1 4】

【表 2 D - 7】

hAb6-3.110配列(番号17x、L-CDR3:Y94FおよびH-CDR3:A100R)

H-CDR1	番号 170	NYGVS
H-CDR2	番号 171	VIWGDGSTNYHSTLRS
H-CDR3	番号 172	PGR ^R GYAMDY
重鎖可変ドメイン	番号 173	QVQLQESGPGLVAPSQTLSI TCTVSGFSLKNYGVSWVRQ PPGKGLEWIGVIWGDGSTN YHSTLRSRVTISKDNSKSQLF LKLNLRLQTDDTATYYCAKPG R ^R GYAMDYWGQGT ^R LVTVSS
重鎖のヌクレオチド	番号 174	
L-CDR1	番号 175	SASSSVSYMH
L-CDR2	番号 176	DTSKLTS
L-CDR3	番号 177	FQGS ^G FE ^F PLT
軽鎖可変ドメイン	番号 178	EIVLTQSPAIQSVYPGEKVTMTCS ASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLW IYDTSKLTS ^R GVPGRFSGSGSGNSY TLTISSMEAEDAATYYCFQGS ^G FE ^F P LTFGGGTKVEIKR
軽鎖のヌクレオチド	番号 179	

30

40

【0 2 1 5】

本発明の抗体またはその抗原結合性部分をコードする核酸分子もまた、本発明に包含され、同様に、そのような核酸を含む発現ベクターおよびそのような発現ベクターを含む宿主細胞もまた、本発明に包含される。さらに、本発明は、ヒト免疫グロブリン重鎖および

50

軽鎖導入遺伝子を含み、本発明の抗体を発現する、トランスジェニックマウスを提供し、同様に、そのようなマウスから調製され、本発明の抗体を産生する、ハイブリドーマもまた、提供する。

本発明のモノクローナル抗体の産生

【0216】

本発明のモノクローナル抗体 (mAb) は、従来のモノクローナル抗体手法、たとえば、KohlerおよびMilstein、(1975年)、Nature、256巻：495頁の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技法を含む、様々な技法によって産生され得る。体細胞ハイブリダイゼーション手順が好ましいが、原理上、モノクローナル抗体を産生するための他の技法、たとえば、Bリンパ球のウイルス性または発がん性形質転換を利用してもよい。

10

【0217】

ハイブリドーマを調製するための好ましい動物系は、マウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ産生は、非常に十分に確立された手順である。融合のために免疫処置した脾細胞を単離するための免疫処置プロトコルおよび技法は、当技術分野において公知である。融合パートナー（たとえば、マウス骨髄腫細胞）および融合手順もまた、公知である。

【0218】

本発明のキメラまたはヒト化抗体は、上述のように調製されたマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製することができる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、目的のマウスハイブリドーマから得ることができ、標準的な分子生物学技法を使用して、非マウス（たとえば、ヒト）免疫グロブリン配列を含むように操作することができる。たとえば、キメラ抗体を作製するために、マウス可変領域を、当技術分野において公知の方法を使用して、ヒト定常領域に連結させることができる（たとえば、Cabillyらに対する米国特許第4,816,567号を参照されたい）。ヒト化抗体を作製するために、マウスCDR領域を、当技術分野において公知の方法を使用して、ヒトフレームワークに挿入することができる（たとえば、Winterに対する米国特許第5,225,539号、ならびにQueenらに対する米国特許第5,530,101号、同5,585,089号、同5,693,762号、および同6,180,370号を参照されたい）。

20

30

【0219】

ある実施形態では、本発明の抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。SSEA4を対象とするそのようなヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなく、ヒト免疫系の部分を有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウスを使用して、生成することができる。これらのトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソームマウスには、それぞれ、本明細書においてHuMAbマウスおよびKM Mice（商標）と称されるマウスが含まれ、これらは、本明細書において集合的に「ヒトIgマウス」と称される。

【0220】

HuMAbマウス (Medarex, Inc.) は、再編成されていないヒト重鎖 (μ および) ならびに 軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を、内在性μ および 鎖遺伝子座を不活性化する標的化された変異とともに含む（たとえば、Lonbergら、(1994年)、Nature、368巻(6474号)：856～859頁を参照されたい）。したがって、マウスは、マウスIgMまたはKの低減された発現を示し、免疫処置にตอบสนองして、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子が、クラススイッチおよび体細胞変異を受けて、高親和性ヒトIgGKモノクローナルが生成される (Lonberg, N.ら、(1994年)、上記; Lonberg, N., (1994年)、Handbook of Experimental Pharmacology、113巻：49～101頁; Lonberg, N. および Huszar, D., (1995年)、Intern. Rev. Immunol., 13巻：6

40

50

5～93頁、ならびにHarding, F.およびLonberg, N.、(1995年)、Ann. N.Y. Acad. Sci.、764巻:536～546頁にて概観される)。HuMa bマウスの調製および使用、ならびにそのようなマウスによって保持されるゲノム修飾は、Taylor, L.ら、(1992年)、Nucleic Acids Research、20巻:6287～6295頁;Chen, J.ら、(1993年)、International Immunology、5巻:647～656頁;Tuail lonら、(1993年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻:3720～3724頁;Choiら、(1993年)、Nature Genetics、4巻:117～123頁;Chen, J.ら、(1993年)、EMBO J.、12巻:821～830頁;Tuail lonら、(1994年)、J. Immunol.、152巻:2912～2920頁;Taylor, L.ら、(1994年)、International Immunology、6巻:579～591頁;およびFishwild, D.ら、(1996年)、Nature Biotechnology、14巻:845～851頁にさらに記載されており、これらのすべての内容は、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み込まれる。さらに、すべてLonbergおよびKayに対する米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,789,650号、同第5,877,397号、同第5,661,016号、同第5,814,318号、同第5,874,299号、および同第5,770,429号、Suraniらに対する米国特許第5,545,807号、すべてLonbergおよびKayに対するPCT国際公開第92/03918号、同第93/12227号、同第94/25585号、同第97/13852号、同第98/24884号、および同第99/45962号、ならびにKormanらに対するPCT国際公開第01/14424号を参照されたい。

【0221】

別の実施形態では、本発明のヒト抗体は、導入遺伝子および導入染色体にヒト免疫グロブリン配列を保有するマウス、たとえば、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入染色体を保有するマウスを使用して、作製することができる。本明細書において「KM Mice (商標)」と称されるそのようなマウスは、Ishidaらに対するPCT国際公開第02/43478号に詳細に記載されている。

【0222】

なおもさらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替的なトランスジェニック動物系が、当技術分野において入手可能であり、本発明の抗PD-1抗体を作製するために使用することができる。たとえば、Xenomouse (Abgenix, Inc.) と称される代替的なトランスジェニック系を使用することができ、そのようなマウスは、たとえば、Kucherlapatiらに対する米国特許第5,939,598号、同第6,075,181号、同第6,114,598号、同第6,150,584号、および同第6,162,963号に記載されている。

【0223】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替的なトランスクロモソーム動物系が、当技術分野において入手可能であり、本発明の抗SS E A 4抗体を惹起するために使用することができる。たとえば、「TCマウス」と称される、ヒト重鎖導入染色体およびヒト軽鎖導入染色体の両方を保有するマウスを使用することができ、そのようなマウスは、Tomizukaら、(2000年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97巻:722～727頁に記載されている。さらに、ヒト重鎖および軽鎖導入染色体を保有するウシが、当技術分野において説明されており(Kuroiwaら、(2002年)、Nature Biotechnology、20巻:889～894頁)、本発明の抗PD-1抗体を作製するために使用することができる。

【0224】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を使用して、調製することもできる。

ヒト抗体を単離するためのそのようなファージディスプレイ法は、当技術分野において確立されている。たとえば、Ladnerらに対する米国特許第5,223,409号、同第5,403,484号、および同第5,571,698号、Dowerらに対する米国特許第5,427,908号および同第5,580,717号、McCaffertyらに対する米国特許第5,969,108号および同第6,172,197号、ならびにGriffithsらに対する米国特許第5,885,793号、同第6,521,404号、同第6,544,731号、同第6,555,313号、同第6,582,915号、および同第6,593,081号を参照されたい。

【0225】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、免疫処置したときにヒト抗体応答が生じ得るように、ヒト免疫細胞が再構成されているSCIDマウスを使用して、調製することもできる。そのようなマウスは、たとえば、Wilsonらに対する米国特許第5,476,996号および同第5,698,767号に記載されている。

本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの生成

【0226】

本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生成するために、免疫処置したマウスに由来する脾細胞および/またはリンパ節細胞を、単離し、適切に不死化した細胞株、たとえば、マウス骨髄腫細胞株と融合することができる。得られたハイブリドーマを、抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングすることができる。

本発明のモノクローナル抗体を産生するトランスフェクトーマの生成

【0227】

本発明の抗体はまた、当技術分野において周知のように、たとえば、組換えDNA技法および遺伝子トランスフェクション法の組合せを使用して、宿主細胞トランスフェクトーマにおいて、産生することもできる（たとえば、Morrisson, S., (1985年)、Science、229巻：1202頁）。

【0228】

「抗体依存性細胞媒介性細胞毒性」または「ADCC」という用語は、分泌されたIgが、ある特定の細胞毒性細胞（たとえば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcR）に結合することにより、これらの細胞毒性エフェクター細胞が、抗原を保持する標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒素により標的細胞を殺滅させることを可能にする、細胞毒性の形態を指す。抗体は、細胞毒性細胞を「装備（arm）」し、この機序による標的細胞の殺滅に必要である。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞は、FcRIIのみを発現するが、一方で単球は、FcRI、FcRII、およびFcRIIIを発現する。造血系細胞におけるFcの発現は、RavetchおよびKinet、Annu. Rev. Immunol., 9巻：457～92頁（1991年）の464頁の表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するために、in vitro ADCCアッセイ、たとえば、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号に記載されているものを、行ってもよい。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。代替として、または追加として、目的の分子のADCC活性は、in vivoで、たとえば、例として、Clynesら、PNAS USA、95巻：652～656頁（1998年）に開示されているものなど、動物モデルにおいて、評価することができる。

【0229】

「補体依存性細胞毒性」または「CDC」という用語は、補体の存在下における標的細胞の溶解を指す。古典的な補体経路の活性化は、補体系の第1の成分（C1q）の、同種抗原に結合した抗体（適切なサブクラスのもの）への結合によって開始される。補体活性化を評価するために、CDCアッセイ、たとえば、Gazzano-Santoroら、J. Immunol. Methods、202巻：163頁（1996年）に記載されているものを、行うことができる。改変されたFc領域アミノ酸配列および増加もしくは

10

20

30

40

50

減少した C 1 q 結合能力を有する抗体バリエーションは、米国特許第 6, 194, 551 号 B 1 および国際公開第 99/51642 号に記載されている。それらの特許公開の内容は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。Idusogiera, J. Immunol., 164 巻: 4178~4184 頁 (2000 年) もまた、参照されたい。

【0230】

「成長を阻害する」という用語 (たとえば、細胞、たとえば、腫瘍細胞に言及して) は、抗 S S E A 4 抗体と接触した場合の、抗 S S E A 4 抗体と接触していない同じ細胞の成長と比較して、細胞成長における任意の測定可能な減少、たとえば、細胞培養物の成長の少なくとも約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、または 100% の阻害を含むことが意図される。細胞成長におけるそのような減少は、様々な機序、たとえば、エフェクター細胞ファゴサイトーシス、A D C C、C D C、および/またはアポトーシスによって生じ得る。

10

【0231】

別の態様では、本発明は、治療用部分、たとえば、細胞毒素、薬物 (たとえば、免疫抑制剤)、または放射性毒素にコンジュゲートした、抗 S S E A 4 抗体またはその断片を特徴とする。

【0232】

本発明の抗体にコンジュゲートすることができる治療用細胞毒素の他の例としては、デュオカルマイシン、カリケアマイシン、マイタンシン、およびオーリスタチン、ならびにそれらの誘導体が挙げられる。カリケアマイシン抗体コンジュゲートの例は、市販され入手可能である (Mylotarg (商標)、Wyeth-Ayerst)。

20

【0233】

細胞毒素は、リンカー技術を使用して、本発明の抗体にコンジュゲートすることができる。細胞毒素にコンジュゲートするために使用されているリンカー種の例としては、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィド、およびペプチド含有リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。たとえば、リソソームコンパートメント内で低 pH によって切断されやすいか、またはプロテアーゼ、たとえば、カテプシン (たとえば、カテプシン B、C、D) など、腫瘍組織において優先的に発現されるプロテアーゼによって切断されやすい、リンカーを選択することができる。

【0234】

30

治療剤を抗体にコンジュゲートするための細胞毒素、リンカー、および方法の種類に関するさらなる考察については、Saito, G. ら、(2003 年)、Adv. Drug Deliv. Rev., 55 巻: 199~215 頁、Trail, P. A. ら、(2003 年)、Cancer Immunol. Immunother., 52 巻: 328~337 頁、Payne, G., (2003 年)、Cancer Cell, 3 巻: 207~212 頁、Allen, T. M., (2002 年)、Nat. Rev. Cancer, 2 巻: 750~763 頁、Pastan, I. および Kreitman, R. J., (2002 年)、Curr. Opin. Investig. Drugs, 3 巻: 1089~1091 頁、Senter, P. D. および Springer, C. J., (2001 年)、Adv. Drug Deliv. Rev., 53 巻: 247~264 頁もまた、参照されたい。

40

【0235】

抗体-薬物コンジュゲート (ADC) には、抗原を発現する腫瘍細胞に強力な細胞毒性薬物を標的付けることによって (Teicher, B. A., (2009 年)、Current Cancer Drug Targets, 9 巻: 982~1004 頁)、抗体および細胞毒性薬物の両方の特性を組み合わせ、それによって、有効性を最大限にし、標的外毒性を最小限に抑えることにより治療指数を強化する (Carter, P. J. および Senter P. D., (2008 年)、The Cancer Jour., 14 巻 (3 号): 154~169 頁、Chari, R. V., (2008 年) Acc. Chem. Res., 41 巻: 98~107 頁、標的化された化学療法分子が含まれ得

50

る。

【0236】

本発明のADC化合物には、抗がん活性を有するものが含まれる。一部の実施形態では、ADC化合物には、薬物部分にコンジュゲートされた、すなわち、共有結合で結合された、抗体が含まれる。一部の実施形態では、抗体は、リンカーを介して薬物部分に共有結合で結合される。本発明の抗体-薬物コンジュゲート(ADC)は、有効用量の薬物を腫瘍組織に選択的に送達し、それによって、より高い選択性、すなわち、より低い有効用量を達成し、同時に治療指数(「治療ウインドウ」)を増加させることができる。

【0237】

ある特定の実施形態では、ADCは、式 $AB-(L-D)_p$ を有し、式中、ABは、本明細書において記載される抗体またはその結合性断片であり、Lは、リンカーであり、Dは、好適な細胞毒性薬物であり、pは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、またはそれを上回る範囲であり得る。

【0238】

ADCの構築に好適な例示的なリンカー「L」としては、6-マレイミドカプロイル(MC)、マレイミドプロパノイル(MP)、バリン-シトルリン(val-cit)、アラニン-フェニルアラニン(ala-phen)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(PAB)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(SPP)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(SMCC)、N-スクシンイミジル(4-ヨード-アセチル)アミノ安息香酸(STAB)、グルクロニダーゼ基質、およびPEGからなる群から選択される「L」を挙げる
20
ことができる。

【0239】

抗体-薬物コンジュゲート(ADC)の薬物部分(D)は、細胞毒性作用または細胞静止作用を有する任意の化合物、部分、または基を挙げることができる。薬物部分は、チューブリン結合、DNA結合もしくはインターカレーション、およびRNAポリメラーゼ、タンパク質合成、および/またはトポイソメラーゼの阻害を含むがこれらに限定されない、機序によって、細胞毒性作用および細胞静止作用を付与し得る。例示的な薬物部分としては、マイタシンノイド、ドラスタチン、オーリスタチン、カリケアマイシン、ピロロペンゾジアゼピン(PBD)、モノメチルオーリスタチンE(MMAE)、モノメチルオーリスタチンF(MMAF)、ネモルピシンおよびその誘導体、PNU-159682、アントラサイクリン、デュオカルマイシン、ビンカアルカロイド、タキサン、トリコセセン、CC1065、カンプトテシン、エリナフィド、ならびに細胞毒性活性を有するそれらの立体異性体、同配体、類似体、および誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0240】

また、本発明の抗体を、放射性同位体にコンジュゲートして、放射性イムノコンジュゲートとも称される、細胞毒性放射性医薬を生成することもできる。

二重特異性分子

【0241】

別の態様では、本発明は、本発明の抗SSEA4抗体またはその断片を含む、二重特異性分子を特徴とする。本発明の抗体またはその抗原結合性部分は、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子を生成するように、誘導体化することができるか、または別の機能性分子、たとえば、別のペプチドもしくはタンパク質(たとえば、別の抗体もしくは受容体のリガンド)に連結させることができる。本発明の抗体は、実際に、誘導体化されるか、1つを上回る他の機能性分子に連結されて、2つを上回る異なる結合部位および/または標的分子に結合する多重特異性分子を生成し得る。そのような多重特異性分子もまた、本明細書において使用されるとき、「二重特異性分子」という用語に包含されることが意図される。本発明の二重特異性分子を作製するために、本発明の抗体を、二重特異性分子が得られるように、1つまたは複数の他の結合性分子、たとえば、別の抗体、抗体断片、ペプチド、または結合性模倣体に機能的に連結させる(た
40
50

例えば、化学的結合、遺伝子融合、非共有結合、またはその他の方法によって）ことができる。

医薬組成物

【0242】

別の態様では、本発明は、薬学的に許容される担体と一緒に製剤化された、本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分のうちの1つまたは組合せを含む、組成物、たとえば、医薬組成物を、提供する。そのような組成物は、（たとえば、2つまたはそれより多くの異なる）本発明の抗体、またはイムノコンジュゲート、または二重特異性分子のうちの1つまたは組合せを含み得る。たとえば、本発明の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープに結合するか、または補完的活性を有する、抗体（またはイムノコンジュゲートまたは二重特異性）の組合せを含み得る。

10

【0243】

本発明の医薬組成物はまた、組合せ療法において投与することができる、すなわち、他の薬剤と組み合わせることができる。たとえば、組合せ療法は、少なくとも1つの他の抗炎症剤または免疫抑制剤と組み合わせ、本発明の抗SSEA4抗体を含み得る。組合せ療法において使用することができる治療剤の例は、本発明の抗体の使用に関する節において、以下により詳細に記載されている。

【0244】

本明細書において使用されるとき、「薬学的に許容される担体」には、生理学的に適合性のある、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられる。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄、または上皮投与（たとえば、注射または注入による）に好適である。投与経路に応じて、活性化化合物、すなわち、抗体、イムノコンジュゲート（immunoc conjugate）、または二重特異性分子は、酸および化合物を不活性化し得る他の天然条件の作用から保護するために、それらの化合物に、材料がコーティングされてもよい。

20

【0245】

本発明の医薬化合物は、1つまたは複数の薬学的に許容される塩を含み得る。「薬学的に許容される塩」とは、親化合物の所望される生物学的活性を保持し、いずれの望ましくない毒物学的作用も付与しない塩を指す（たとえば、Berge, S. M.ら、(1977年)、J. Pharm. Sci., 66巻: 1~19頁を参照されたい）。そのような塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、非毒性無機酸、たとえば、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などに由来するもの、ならびに非毒性有機酸、たとえば、脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などに由来するものが挙げられる。塩基付加塩としては、アルカリ土類金属、たとえば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどに由来するもの、ならびに非毒性有機アミン、たとえば、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどに由来するものが挙げられる。

30

【0246】

本発明の医薬組成物はまた、薬学的に許容される抗酸化剤を含み得る。薬学的に許容される抗酸化剤の例としては、(1)水溶性抗酸化剤、たとえば、アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど、(2)油溶性抗酸化剤、たとえば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロールなど、および(3)金属キレート化剤、たとえば、クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などが挙げられる。

40

【0247】

本発明の医薬組成物において用いられ得る、好適な水溶性および非水溶性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、

50

ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの好適な混合物、植物油、たとえば、オリーブ油、ならびに注射用有機エステル、たとえば、オレイン酸エチルが、挙げられる。適切な流動性は、たとえば、コーティング材料、たとえば、レシチンの使用によって、分散液の場合には必要とされる粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。

【0248】

これらの組成物はまた、アジュバント、たとえば、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤も含有し得る。微生物の存在の防止は、上記の滅菌手順によって、また様々な抗菌剤および抗真菌剤、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などを含めることの両方によって、確実にすることができる。等張剤、たとえば、糖、塩化ナトリウムなどを組成物中に含めることが望ましい場合もある。さらに、吸収を遅延する薬剤、たとえば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによって、注射用医薬品形態の長期吸収をもたらすことができる。

10

【0249】

薬学的に許容される担体としては、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質にそのような媒体および薬剤を使用することは、当技術分野において公知である。任意の従来的な媒体または薬剤は、活性化合物と不適合である場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるその使用が企図される。補助的な活性化合物もまた、組成物中に組み込まれ得る。

【0250】

治療用組成物は、典型的に、製造および保管の条件下において、無菌かつ安定でなくてはならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬物濃度に好適な他の秩序構造として、製剤化され得る。担体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの好適な混合物を含有する、溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、たとえば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には、必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。多くの場合、組成物中に、等張剤、たとえば、糖、多価アルコール、たとえば、マンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを含めることが好ましいであろう。吸収を遅延する薬剤、たとえば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを、組成物中に含めることによって、注射用組成物の長期吸収をもたらすことができる。

20

30

【0251】

滅菌注射溶液は、必要に応じて、上記で列挙された成分のうち1つまたは組合せとともに、適切な溶媒中に、必要な量の活性化合物を組み込み、続いて、滅菌精密濾過することによって、調製することができる。一般に、分散液は、活性化合物を、基礎分散媒および上記に列挙されたものから必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによって、調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌粉末の場合には、調製の好ましい方法として、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）があり、これは、事前に滅菌濾過されたその溶液から、活性成分に加えて、任意のさらなる所望される成分の粉末が得られるものである。

40

【0252】

単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は、処置される対象および特定の投与様式に応じて変わるであろう。単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせることができる活性成分の量は一般に、治療効果をもたらす組成物の量であろう。一般に、100%のうち、この量は、薬学的に許容される担体と組み合わせる活性成分約0.01%から約99%、好ましくは約0.1%から約70%、最も好ましくは約1%から約30%の範囲であろう。

投薬および投薬量

【0253】

投薬レジメンは、最適な所望される応答（たとえば、治療応答）をもたらすように調節

50

される。たとえば、単回ボラスを投与してもよく、いくつかの分割用量を、経時的に投与してもよく、または用量を、治療状況の緊急性によって示されるように比例的に低減もしくは増加させてもよい。投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、非経口組成物を、投薬単位形態で製剤化することが、特に有利である。本明細書において使用されるとき、投薬単位形態とは、治療しようとする対象の単位投薬量として好適な物理的に別個の単位を指し、それぞれの単位は、必要とされる薬学的担体と関連して所望される治療効果をもたらすように計算された、所定の量の活性化合物を含有する。本発明の投薬単位形態の仕様は、(a) 活性化合物の固有の特徴および達成しようとする特定の治療効果、ならびに(b) 個体において感受性のそのような処置のための活性化合物の配合の技術分野に固有の制限によって決定され、それらに直接左右される。

10

【0254】

抗体の投与のために、投薬量は、約0.0001~100mg/宿主体重1kg、より通例的には、0.01~5mg/宿主体重1kgの範囲である。たとえば、投薬量は、0.3mg/体重1kg、1mg/体重1kg、3mg/体重1kg、5mg/体重1kg、もしくは10mg/体重1kg、または1~10mg/kgの範囲内であり得る。例示的な処置レジメンは、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1ヶ月に1回、3ヶ月に1回、または3~6ヶ月に1回の投与を必要とする。本発明の抗PD-1抗体の好ましい投薬レジメンとしては、静脈内投与を介した1mg/体重1kgまたは3mg/体重1kgが挙げられ、抗体は、以下の投薬スケジュールのうちの1つを使用して与えられる：(i) 4週間に1回で、6回の投薬の後、3ヶ月に1回、(ii) 3週間に1回、(iii) 3mg/体重1kgで1回の後、1mg/体重1kgで3週間に1回。

20

【0255】

いくつかの方法では、異なる結合特異性を有する2つまたはそれより多くのモノクローナル抗体が、同時に投与され、その場合には、投与されるそれぞれの抗体の投薬量は、示される範囲内に入る。抗体は、通常、複数の機会に投与される。単回投薬の間隔は、たとえば、週ごと、月ごと、3ヶ月ごと、または年ごとであり得る。間隔はまた、患者における標的抗原に対する抗体の血中レベルを測定することによって示されるように、不規則であってもよい。いくつかの方法では、投薬量は、約1~1000μg/ml、いくつかの方法では、約25~300μg/mlの血漿抗体濃度を達成するように調節される。

30

【0256】

あるいは、抗体は、持続放出製剤として投与されてもよく、その場合、必要とされる投与の頻度は、より低くなる。投薬量および頻度は、患者における抗体の半減期に応じて変動する。一般に、ヒト抗体が、最も長い半減期を示し、ヒト化抗体、キメラ抗体、および非ヒト抗体が続く。投薬量および投与の頻度は、処置が予防的であるか治療的であるかに応じて変動し得る。予防的適用では、比較的低い投薬量が、比較的低い頻度間隔で、長期間にわたって投与される。一部の患者は、生涯、処置を受け続ける。治療的適用では、疾患の進行が低減または停止されるまで、好ましくは、患者が、疾患の症状の部分的または完全な緩和を示すまで、比較的低い間隔で、比較的高い投薬量が、必要とされることもある。その後、患者には、予防的レジメンが投与されてもよい。

40

【0257】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、患者にとって毒性とはならず、特定の患者、組成物、および投与様式に所望される治療応答を達成するのに有効な活性成分の量が得られるように、変動し得る。選択される投薬量レベルは、用いられる本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与の経路、投与の時間、用いられる特定の化合物の排出速度、処置の期間、用いられる特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物、および/または材料、処置を受けている患者の年齢、性別、体重、状態、一般的な健康状態、およびこれまでの病歴、ならびに医薬品の分野において周知の同等の因子を含む、様々な薬物動態因子に依存するであろう。

【0258】

50

本発明の抗 S S E A 4 抗体の「治療有効投薬量」は、好ましくは、疾患症状の重症度の減少、疾患症状のない期間の頻度および期間の増加、または疾患苦痛による機能障害もしくは能力障害の予防をもたらす。たとえば、腫瘍の処置に関して、「治療有効投薬量」は、未処置の対象と比べて、好ましくは、細胞成長または腫瘍成長を、少なくとも約 20 %、より好ましくは、少なくとも約 40 %、さらにより好ましくは、少なくとも約 60 %、なおもさらにより好ましくは、少なくとも約 80 % 阻害する。化合物が腫瘍成長を阻害する能力は、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系において評価することができる。あるいは、組成物のこの特性は、化合物が阻害する能力、そのような阻害を、*in vitro*で、当業者に公知のアッセイによって試験することにより、評価することができる。治療有効量の治療用化合物は、腫瘍サイズを減少させ得るか、またはそれ以外では対象における症状を緩和し得る。当業者であれば、対象のサイズ、対象の症状の重症度、および選択された特定の組成物または投与経路などの因子に基づいて、そのような量を決定することができる。

10

【0259】

別の態様では、本開示は、本明細書において記載されるように、抗 S S E A 4 抗体を含む部分の薬学的キットを提供する。キットはまた、過剰増殖性疾患（たとえば、本明細書において記載されるがん）の処置において使用するための説明書をさらに含み得る。別の実施形態では、抗 S S E A 4 抗体は、たとえば、PD - 1 調整剤および / または CAR - T 治療剤などとともに、単位剤形に共パッケージングされ得る。

【0260】

20

別の態様では、本開示は、任意の他の「細胞療法」または獲得免疫療法モダリティと組み合わせる投与することができる治療方法および組成物を提供する。例示的な獲得免疫療法モダリティは、たとえば、Mausら、*Annu. Rev. Immunol.*、2014年、32巻：189～225頁に記載されており、キメラ抗原受容体（CAR - T）療法、抗 PD - 1 療法、抗 PD - L1 療法、および抗 CTL4 療法などを挙げることができる。

【0261】

本発明の組成物は、当技術分野において公知の様々な方法のうちの1つまたは複数を使用して、1つまたは複数の投与経路を介して投与することができる。当業者には明らかであろうが、投与経路および / または投与様式は、所望される結果に応じて変わるであろう。本発明の抗体の好ましい投与経路としては、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄、または他の非経口投与経路、たとえば、注射もしくは注入によるものが挙げられる。

30

「非経口投与」という語句は、本明細書において使用されるとき、経腸および局所投与以外の、通常、注射による投与様式を意味し、限定するものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨内の注射および注入が挙げられる。

【0262】

あるいは、本発明の抗体は、非経口ではない経路、たとえば、局所、上皮、または粘膜投与経路を介して、たとえば、鼻腔内、経口、経膣、経直腸、舌下、または局所的に、投与することができる。

40

【0263】

インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達システムを含む、制御放出製剤など、化合物を急速な放出から保護する担体を用いて、活性化合物を調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸など、生体分解性で生体適合性のポリマーを使用することができる。このような製剤を調製するための多数の方法に、特許が付与されているか、またはそれらは、一般に、当業者に公知である。たとえば、*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*、J. R. Robinson 編、Marcel Dekker, Inc.、New York、1978年を参照されたい。

50

【0264】

治療用組成物は、当技術分野において公知の医療デバイスを用いて投与することができる。たとえば、好ましい実施形態では、本発明の治療用組成物は、ニードルレス皮下注射デバイス、たとえば、米国特許第5,399,163号、同第5,383,851号、同第5,312,335号、同第5,064,413号、同第4,941,880号、同第4,790,824号、または同第4,596,556号に開示されているデバイスを用いて投与することができる。本発明において有用な周知のインプラントおよびモジュールの例としては、制御された速度で医薬を分配するための埋め込み可能な微量注入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号、皮膚を通じて医薬を投与するための治療用デバイスを開示する米国特許第4,486,194号、正確な注入速度で医薬を送達するための医薬注入ポンプを開示する米国特許第4,447,233号、連続的な薬物送達のための可変流動埋め込み可能注入装置を開示する米国特許第4,447,224号、マルチチャンパーコンパートメントを有する浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,439,196号、および浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,475,196号が挙げられる。これらの特許は、参照により本明細書に組み込まれる。多数の他のこのようなインプラント、送達システム、およびモジュールが、当業者に公知である。

10

【0265】

ある特定の実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗体は、*in vivo*での適切な分布を確実にするように製剤化することができる。たとえば、血液脳関門(BBB)は、多数の高度に親水性の化合物を排除する。本発明の治療用化合物が、BBBを通過することを確実にするために(所望される場合)、それらを、たとえば、リポソームに製剤化することができる。リポソームを製造する方法については、たとえば、米国特許第4,522,811号、同第5,374,548号、および同第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または器官に選択的に輸送され、したがって、標的化された薬物送達を強化する、1つまたは複数の部分を含み得る(たとえば、V. V. Ranade、(1989年)、J. Clin. Pharmacol.、29巻:685頁を参照されたい)。例示的な標的化部分としては、葉酸またはビオチン(たとえば、Lowらに対する米国特許第5,416,016号を参照されたい)、マンノシド(Umezawaら、(1988年)、Biochem. Biophys. Res. Commun.、153巻:1038頁)、抗体(P. G. Bloemanら、(1995年)、FEBS Lett.、357巻:140頁、M. Owaisら、(1995年)、Antimicrob. Agents Chemother.、39巻:180頁)、界面活性剤プロテインA受容体(Briscoeら、(1995年)、Am. J. Physiol.、1233巻:134頁)、p120(Schreierら、(1994年)、J. Biol. Chem.、269巻:9090頁)が挙げられ、K. Keinänen、M. L. Laukkanen、(1994年)、FEBS Lett.、346巻:123頁、J. J. Killion、I. J. Fidler、(1994年)、Immunomethods、4巻:273頁も参照されたい。

20

30

本発明の使用および方法

【0266】

本発明の抗体、抗体組成物、および方法は、多数の*in vitro*および*in vivo*関連での有用性を有する。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、ヒト抗体である。たとえば、これらの分子は、*in vitro*もしくは*ex vivo*で培養細胞に投与してもよく、または様々な状況において免疫性を強化するために、たとえば、*in vivo*で、ヒト対象に投与してもよい。したがって、一態様では、本発明は、対象におけるADCC応答が修飾されるように、対象に、本発明の抗体またはその抗原結合性部分を投与することを含む、対象におけるADCC応答を修飾する方法を提供する。好ましくは、応答は、強化、刺激、または上方制御される。

40

【0267】

したがって、一実施形態では、本発明は、対象において腫瘍細胞の成長を阻害する方法

50

であって、対象に、治療有効量の抗 S S E A 4 抗体またはその抗原結合性部分を投与することを含む、方法を提供する。好ましくは、抗体は、ヒト抗 S S E A 4 抗体（たとえば、本明細書において記載されるヒト抗 S S E A 4 抗体のうちのいずれか）である。追加または代替として、抗体は、キメラまたはヒト化抗 S S E A 4 抗体であってもよい。

【0268】

ある特定の実施形態では、本明細書において考察される治療用抗体の組合せは、薬学的に許容される担体中の単一の組成物として同時に、または薬学的に許容される担体中にそれぞれの抗体を有する別個の組成物として同時に、投与され得る。

腫瘍成長を阻害する抗体

【0269】

S S E A 4 またはその誘導体に特異的に結合する新規な組換え抗 S S E A 4 抗体、および抗腫瘍免疫療法、たとえば、がんの処置におけるそれらの使用方法が、本明細書において提供される。がん抗原に結合すると、抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性を誘導し、補体系を活性化し、腫瘍の成長を阻害することができる。

【0270】

一実施形態では、S S E A 4 は、脳腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、口腔腫瘍細胞、食道腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、肝臓腫瘍細胞、胆管腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、腎臓腫瘍細胞、子宮頸腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、前立腺腫瘍細胞を含む、様々な腫瘍細胞に高度に発現される。

【0271】

一実施形態では、モノクローナル抗 S S E A 4 抗体は、S S E A 4 分子に特異的に結合する。

【0272】

一実施形態では、本明細書において記載される抗 S S E A 4 抗体を含む組成物は、抗がん療法において有用である。具体的には、本実施形態は、様々な抗 S S E A 4 結合部分において使用することができる、特定の抗 S S E A 4 抗体の相補性決定領域（CDR）配列を提供する。具体的には、本発明は、S S E A 4 またはその誘導体に結合することができる、ヒト化もしくはキメラ抗体、またはその抗原結合性断片を提供する。

【0273】

ある特定の実施形態では、CDR 配列は、K a b a t の方法によって規定される。

【0274】

ある特定の実施形態では、抗 S S E A 4 抗体は、腫瘍成長を阻害する活性を有する。

【0275】

ある特定の実施形態では、単離された抗 S S E A 4 抗体は、モノクローナル抗体である。S S E A 4 に対するモノクローナル抗体は、当技術分野における知識および技能に従って、作製することができる。たとえば、それは、試験対象に、ヒト胚性癌腫細胞を注射し、次いで、所望される配列または機能的特徴を有する抗体を発現するハイブリドーマを単離することによって、作製することができる。

【0276】

一実施形態では、本開示は、S S E A 4 に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分であって、標的に結合すると、抗体が、CDC 誘導活性を有する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分を提供する。

【0277】

一実施形態では、本開示は、S S E A 4 に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分であって、標的に結合すると、抗体が、ADCC 誘導活性を有する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分を提供する。

【0278】

一態様では、本開示は、(i) 配列番号 13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および 173 から選択される重鎖可変領域、またはその少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%

10

20

30

40

50

、 87%、88%、89%、90%、91%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性の保存された配列相同体、ならびに (i i) 配列番号 18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および 178 から選択される軽鎖可変領域、またはその少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性の保存された配列相同体を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【0279】

一態様では、本開示は、(i) 配列番号 13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および 173 から選択される重鎖可変領域、またはその 15 個、14 個、13 個、12 個、11 個、10 個、9 個、8 個、7 個、6 個、5 個、4 個、3 個、2 個、もしくは 1 個未満またはそれに等しいアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、ならびに (i i) 配列番号 18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および 178 から選択される軽鎖可変領域、またはその 15 個、14 個、13 個、12 個、11 個、10 個、9 個、8 個、7 個、6 個、5 個、4 個、3 個、2 個、もしくは 1 個未満またはそれに等しいアミノ酸置換を含む保存された配列相同体を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

【0280】

一実施形態では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片は、(i) 配列番号 13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および 173 から選択される重鎖可変領域、またはその 80% またはそれより高く保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号 10、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、および 170 から選択される H - C D R 1、またはその 5 個、4 個、3 個、2 個、もしくは 1 個未満またはそれに等しいアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、配列番号 11、41、51、61、71、81、101、121、131、141、151、および 171 から選択される H - C D R 2、またはその 5 個、4 個、3 個、2 個、もしくは 1 個未満またはそれに等しいアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、配列番号 12、42、52、62、72、82、102、122、132、142、152、および 172 から選択される H - C D R 3、またはその 5 個、4 個、3 個、2 個、もしくは 1 個未満またはそれに等しいアミノ酸置換を含む保存された配列相同体を含む、重鎖可変領域、ならびに (i i) 配列番号 18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および 178 から選択される軽鎖可変領域、またはその 80% またはそれより高く保存された配列相同体であって、さらに、配列番号 15、45、55、65、75、85、105、125、135、145、155、および 175 から選択される L - C D R 1、またはその 5 個、4 個、3 個、2 個、もしくは 1 個未満またはそれに等しいアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、ならびに配列番号 16、46、56、66、76、86、106、126、136、146、156、および 176 から選択される L - C D R 2、またはその 5 個、4 個、3 個、2 個、もしくは 1 個未満またはそれに等しいアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、ならびに配列番号 17、47、57、67、77、87、107、127、137、147、157、および 177 から選択される L - C D R 3、またはその 5 個、4 個、3 個、2 個、もしくは 1 個未満またはそれに等しいアミノ酸置換を含む保存された配列相同体を含む、軽鎖可変領域をさらに含む。

【0281】

一実施形態では、(i) 配列番号 13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および 173 から選択される重鎖可変領域、またはその 10 個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号 10、40、50、60、70、80、100、120、130、14

0、150、および170から選択されるH - CDR1、配列番号11、41、51、61、71、81、101、121、131、141、151、および171から選択されるH - CDR2、配列番号12、42、52、62、72、82、102、122、132、142、152、および172から選択されるH - CDR3を含む、重鎖可変領域、ならびに(i i)配列番号18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および178から選択される軽鎖可変領域、またはその10個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号15、45、55、65、75、85、105、125、135、145、155、および175から選択されるL - CDR1、ならびに配列番号16、46、56、66、76、86、106、126、136、146、156、および176から選択されるL - CDR2、ならびに配列番号17、47、57、67、77、87、107、127、137、147、157、および177から選択されるL - CDR3を含む、軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

10

【0282】

一態様では、本開示は、(i)配列番号13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および173から選択される重鎖可変領域、ならびに(i i)配列番号18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および178から選択される軽鎖可変領域、またはその10個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体であって、さらに、配列番号15、45、55、65、75、85、105、125、135、145、155、および175から選択されるL - CDR1、ならびに配列番号16、46、56、66、76、86、106、126、136、146、156、および176から選択されるL - CDR2、ならびに配列番号17、47、57、67、77、87、107、127、137、147、157、および177から選択されるL - CDR3を含む、軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

20

【0283】

一態様では、本開示は、(i)配列番号13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および173から選択される重鎖可変領域、またはその10個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号10、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、および170から選択されるH - CDR1、配列番号11、41、51、61、71、81、101、121、131、141、151、および171から選択されるH - CDR2、配列番号12、42、52、62、72、82、102、122、132、142、152、および172から選択されるH - CDR3を含む、重鎖可変領域、ならびに(i i)配列番号18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および178から選択される軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

30

【0284】

一態様では、本開示は、表2A～2Dにおいてそれぞれのバリエーションで記載されるように、それぞれの対応するVH、VL、ならびにそれぞれのH - CDRおよびL - CDRを含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を提供する。

40

【0285】

本明細書において使用されるとき、相同体または保存された配列相同体は、本明細書において開示される参照配列と比較して、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する、かつ/または参照配列と比較して、40個、39個、38個、37個、36個、35個、34個、33個、32個、31個、30個、29個、28個、27個、26個、25個、24個、23個、22個、21個、20個、19個、18個、17個、16個、15個、14個、13個、12個、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3

50

個、2個、もしくは1個未満またはそれに等しいアミノ酸置換を有する、それぞれの対応するVH、VL、ならびにそれぞれのH-CDRおよびL-CDRを含む、SSEA4を標的とする単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片を含み得る。

【0286】

ある特定の実施形態では、抗SSEA4抗体は、モノクローナル抗体である。

【0287】

ある特定の実施形態では、抗SSEA4抗体は、キメラまたはヒト化抗体である。

【0288】

一態様では、フレームワーク配列は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列またはヒト生殖細胞系列フレームワーク配列に由来する。

【0289】

さらなる態様では、重鎖可変ドメイン、抗体、または抗原結合性断片は、少なくともCH1ドメインをさらに含む。

【0290】

さらなる態様では、重鎖可変ドメイン、抗体、または抗原結合性断片は、CH1、CH2、およびCH3ドメインをさらに含む。

【0291】

さらなる態様では、可変領域軽鎖、抗体、または抗体断片は、CLドメインをさらに含む。

【0292】

さらなる態様では、抗体は、CH1、CH2、CH3、およびCLドメインをさらに含む。

【0293】

さらなる特定の態様では、抗体は、ヒトまたはマウス定常ドメインをさらに含む。

【0294】

なおもさらなる態様では、ヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4からなる群から選択される。

【0295】

さらなる態様では、核酸は、前述の抗SSEA4抗体のいずれかをコードする核酸の発現に好適なベクターをさらに含む。なおもさらなる特定の態様では、ベクターは、核酸の発現に好適な宿主細胞をさらに含む。なおもさらなる特定の態様では、宿主細胞は、真核生物細胞または原核生物細胞である。特定の態様では、真核生物細胞は、哺乳動物細胞、たとえば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)である。別の態様では、細胞は、酵母細胞である。

【0296】

ある実施形態では、本発明は、抗SSEA4抗体またはその抗原結合性断片を作製するプロセスであって、発現に好適な形態で、前述の抗SSEA4抗体または抗原結合性断片のいずれかをコードする核酸を含む宿主細胞を、そのような抗体または断片を産生するのに好適な条件下において、培養すること、ならびに抗体または断片を回収することを含む、プロセスを提供する。

【0297】

ある実施形態では、本発明は、本明細書において提供される抗SSEA4抗体またはその抗原結合性断片と、少なくとも1つの薬学的に許容される担体とを含む、組成物を提供する。

【0298】

一態様では、本開示は、SSEA4に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分であって、標的に結合すると、抗体が、ADCCおよびCDC誘導活性を有する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分を提供する。

【0299】

本明細書において記載される抗体のいずれかは、全長抗体またはその抗原結合性断片で

10

20

30

40

50

あり得る。一部の例では、抗原結合性断片は、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、または一本鎖 F v 断片である。一部の例では、抗原結合性断片は、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、または一本鎖 F v 断片 (s c F v) である。一部の例では、単離された抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または一本鎖抗体である。

【 0 3 0 0 】

本明細書において記載される抗体のいずれかは、

a) 組換え抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体断片、二重特異性抗体、単一特異性抗体、一価抗体、I g G 抗体、もしくは抗体の誘導体であること、

b) ヒト、マウス、ヒト化、もしくはキメラ抗体、抗体の抗原結合性断片、もしくは誘導体であること、

c) 一本鎖抗体断片、マルチボディ、F a b 断片、ならびに / または I g G、I g M、I g A、I g E、I g D アイソタイプ、および / もしくはそのサブクラスの免疫グロブリンであること、

d) 以下の特徴 : (i) がん細胞の A D C C および / もしくは C D C を媒介すること、(i i) がん細胞のアポトーシスを誘導および / もしくは促進すること、(i i i) がん細胞の標的細胞の増殖を阻害すること、(i v) がん細胞のファゴサイトーシスを誘導および / もしくは促進すること、ならびに / または (v) 細胞毒性剤の放出を誘導および / もしくは促進することのうちの 1 つまたは複数を有すること、

e) 腫瘍特異的炭水化物抗原である、腫瘍関連炭水化物抗原に特異的に結合すること、

f) 非がん細胞、非腫瘍細胞、良性がん細胞、および / もしくは良性腫瘍細胞に発現される抗原には結合しないこと、ならびに / または

g) がん幹細胞および通常のがん細胞に発現される腫瘍関連炭水化物抗原に特異的に結合すること、のうちの 1 つまたは複数の特徴を有する。

【 0 3 0 1 】

抗体は、好適には、高い親和性 (低い K_D 値) でその標的エピトープに結合し、好ましくは、K_D は、ナノモル範囲またはそれより低い。親和性は、当技術分野において公知の方法、たとえば、表面プラズモン共鳴などによって、測定することができる。

【 0 3 0 2 】

ある特定の実施形態では、例示的な抗 S S E A 4 抗体または抗原結合性断片は、1 つまたは複数の細胞毒性剤、化学療法剤、または治療用抗体との組合せによって、腫瘍成長を阻害または低減させる。

【 0 3 0 3 】

ある実施形態では、本発明は、スパーサーによって、抗 C D 3 抗体またはその抗原結合性断片を含むがこれに限定されない T 細胞結合分子に融合または連結された、例示的な抗 S S E A 4 抗体またはその抗原結合性断片を含む、二重特異性抗体の組成物を提供する。

【 0 3 0 4 】

別の実施形態では、本発明は、例示的な抗 S S E A 4 抗体またはその抗原結合性断片を含む細胞外ドメイン、C A R を細胞膜に固定する膜貫通ドメイン、および C A R が S S E A 4 に結合すると、免疫細胞に活性化シグナルを伝送する細胞内ドメインを含む、キメラ抗原受容体 (C A R) の組成物を提供する。C A R は、S S E A 4 を発現するがん細胞を標的とし、それらを殺滅させるように、T 細胞、N K 細胞、および N K T 細胞を含むがこれらに限定されない免疫細胞に、遺伝的 / 人工的に発現させることができる。

【 0 3 0 5 】

本発明を、以下の実施例によってさらに例証するが、これらは、さらなる制限と解釈されるものではない。本出願を通じて引用される、すべての図面、ならびにすべての参考文献、特許、および公開特許出願の内容は、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

【 実施例 】

【 0 3 0 6 】

(実施例 1)

10

20

30

40

50

様々ながん細胞株におけるグロボ系列スフィンゴ糖脂質の発現の検出

脳腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、口腔腫瘍細胞、食道腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、肝臓腫瘍細胞、胆管腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、腎臓腫瘍細胞、子宮頸腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、前立腺腫瘍細胞を含む、様々ながん細胞株（表4）の細胞（ 1×10^5 個）を、氷上で30分間、50 μ LのFACS緩衝液（1% FBSを含むPBS溶液）中、0.5 μ gのAlexa Flour 488にコンジュゲートした抗SSEA3 mAb抗体（MC-631）、抗SSEA4 mAb抗体（MC813-70）、またはアロフィコシアニン（APC）にコンジュゲートした抗GloboH mAb抗体（VK9、Philip O. Livingston、Memorial Sloan-Kettering Cancer Center、New Yorkより寄贈）で、染色した。レクチン染色のために、細胞を、氷上で30分間、ビオチン化したレクチン含有するレクチン結合緩衝液[1% BSA、0.5 \times Carbo-Free ブロッキング緩衝液（Vector Laboratories）、2mM $MgCl_2$ 、2mM $CaCl_2$]中でインキュベートした。レクチン結合緩衝液で2回洗浄した後、細胞を、ストレプトアビジン-APC（FACS緩衝液中で1:500希釈、Biolegend）とともにインキュベートした。200 μ LのFACS緩衝液で2回洗浄した後、細胞を、1 μ g/mLのヨウ化プロピジウム（PI）を含有する200 μ LのFACS緩衝液中に再懸濁させ、分析に供した。データ取得は、FACS Divaソフトウェア（BD Biosciences）を用いてFACS Canto（BD Biosciences）で行い、データ分析は、Flow Joソフトウェア（TreeStar）を使用して行った。PI-生細胞を、分析のためにゲーティングした。メタノール洗浄のために、細胞を、室温で15分間、PBS中4%（重量/体積）パラホルムアルデヒドで洗浄し、固定した後、10分間メタノール中でインキュベートし、その後の特異的抗体で染色した。

（実施例2）

例示的なモノクローナル抗SSEA4抗体を生成および産生させるための代表的な手法【0307】

SSEA4に特異的および/またはSSEA4を標的とする、モノクローナル抗体を生成するために、ハイブリドーマ技術を利用した。たとえば、6週齢の雌Balb/cマウス（Biolasco、Taiwan）に、 10^7 個のNCCIT細胞を、2週間間隔で3回、腹腔内注射した。3回目の免疫処置の1週間後に、血清を採取し、抗SSEA4 IgGおよび/またはIgM抗体の力価を、ELISAによって測定した。ELISAは、0.1 μ gのBSAにコンジュゲートしたSSEA4でコーティングした、96ウェルのアッセイプレートを使用することによって行った。1週間後に、融合基準を満たしたマウスには、次いで、 10^7 個のNCCIT細胞で最後の追加免疫処置を行った。最後の追加免疫処置の3日後に、マウスを、殺処分し、これらのマウスに由来する脾臓細胞を、ハイブリドーマの生成に使用した。BSAにコンジュゲートしたSSEA4に陽性であり、BSAに陰性であったハイブリドーマクローンを、さらなるサブクロニングに選択して、すべてのハイブリドーマクローンが、単一の細胞に由来することを確実にした。1回の例示的な実行で、合計10個のSSEA4陽性ハイブリドーマクローンを、5,000個を上回るクローンから選択した。これらのクローンのうち、Ab6のみがIgGであり、他はIgM抗体である。Ab6のサブクラスを、さらに、抗体アイソタイプ判定キットによって判定し、その結果、Ab6のアイソタイプが、IgG3、カッパであることが示された。シーケンシングの後に、Ab6のマウス可変領域（ V_H および V_L ）を、PCR増幅し、ヒトIgG1の定常領域（ C_H および C_L ）を含む発現ベクターにサブクロニングして、ヒト-マウスキメラ抗体であるchAb6を生成した。

（実施例3）

ELISAによる、例示的な抗SSEA4抗体の、SSEA4への結合

例示的なキメラおよびヒト化抗SSEA4抗体のSSEA4への結合親和性を、ELISAによって判定した。簡単に述べると、抗体を、示されている濃度でPBS中に希釈し、次いで、96ウェルのアッセイプレートにおいて、室温で1時間、BSAにコンジュゲ

ートしたSSEA4とともにインキュベートさせた。洗浄サイクルの後に、HRPにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG抗体(PBS中に1:10,000希釈、Jackson Immuno Research)を、ウェルに添加し、さらに1時間、室温でインキュベートした。洗浄サイクルの後に、TMB ELISA基質(Abcam)を、顕色のために添加し、等量の2N H₂SO₄を添加することによって反応を停止させた。光学密度450nmでの吸光度を読み取り、M5 ELISAリーダー(Molecular Device)によって記録した。(図6A~6D)

(実施例4)

chAb6の膵臓がん細胞株HPACへの結合親和性

【0308】

フローサイトメトリー分析のために、 5×10^5 個のHPAC細胞を、FACS緩衝液(PBS中1%のFBS)中で、4℃で30分間、示されている濃度のchAb6とともにインキュベートした。FACS緩衝液によって洗浄した後、細胞を、次いで、PEにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG抗体(FACS緩衝液中に1:250希釈、Jackson Immuno Research)とともに、4℃で30分間インキュベートした。抗SSEA4抗体の細胞への結合を、次いで、BD FACSVerseフローサイトメーターによって分析した。(図10A~10B)

(実施例5)

例示的な抗SSEA4抗体の結合特異性

【0309】

例示的な抗SSEA4抗体の結合特異性を、152個の化学的に合成したグリカンを用いてグリカンマイクロアレイを使用することによって分析した(図7)。簡単に述べると、グリカンマイクロアレイを、37℃で1時間、示されている濃度の抗体とともにインキュベートした。PBST(PBS中0.05% Tween 20)によって洗浄した後、グリカンマイクロアレイを、次いで、室温で1時間、FITCで標識したヤギ抗ヒトIgG抗体とともにインキュベートした。さらなる洗浄サイクルの後に、グリカンマイクロアレイを空気乾燥させ、マイクロアレイ蛍光チップリーダー(4000B、GenePix)によって、635nmでスキャンした。データを、次いで、GenePix Pro-6.0(Axon Instruments)によって分析した。

(実施例6)

chAb6の、膵臓腫瘍細胞株HPACに対する抗体依存性細胞毒性(ADCC)活性

【0310】

カルセインAMで標識したHPAC細胞、すなわち、高度なSSEA4発現を有するヒト膵臓腫瘍細胞株を、まず、PBMCと混合し、抗SSEA4抗体を、次いで、示されている濃度で添加し、37℃で4時間インキュベートさせた。インキュベーションの後に、培養上清を採取し、励起485nm/放出535nmで検出し、細胞の細胞毒性の割合を、(実験値 - 自発的溶解) / (最大溶解 - 自発的溶解) $\times 100$ として計算した。(図12)

(実施例7)

chAb6の、膵臓腫瘍細胞株HPACに対する補体依存性細胞毒性(CDC)活性

【0311】

CDCアッセイのために、 2×10^5 個のHPAC細胞を、37℃で1時間、15%のヒト血清および示される濃度の抗SSEA4抗体とともにインキュベートした。インキュベーションの後に、死細胞を、室温で5分間、ヨウ化プロピジウム(PI)によって染色し、次いで、BD FACSVerseフローサイトメーターによって計数および分析した(図15A)。

(実施例8)

HPAC異種移植片モデルにおける例示的な抗SSEA4抗体のin vivo抗腫瘍効果

【0312】

in vivoでの例示的な抗SSEA4抗体の抗腫瘍効果を評価するために、8週齢

10

20

30

40

50

の雄 C B 1 7 . S C I D マウス (B i o l a s c o , T a i w a n) に、 5×10^6 個の H P A C 細胞を皮下注射した。腫瘍が形成され、体積が $50 \sim 100 \text{ mm}^3$ に達する間に、ビヒクルまたは例示的な抗 S S E A 4 抗体 (20 mpk) を、1 週間に 2 回、尾静脈に静脈内注射した。ノギスを用いて垂直方向の腫瘍直径、長さ (L)、および幅 (W) を測定することによって、腫瘍の成長を、1 週間に 2 回、モニタリングした。腫瘍の体積 (V) を、式 $V = L W^2 / 2$ によって計算した。24 日目 (移植の 24 日後) に、マウスを、殺処分して、腫瘍の重量を測定した。すべての結果は、平均 \pm 標準偏差として示し (それぞれの群について、 $n = 3$ 匹)、スチューデント t 検定を、統計学的分析に使用した。 (図 16 A ~ 16 B)

(実施例 9)

例示的な c h A b 6 を使用することによる、腫瘍組織に発現される S S E A 4 の検出

【 0 3 1 3 】

免疫組織化学的検査 (I H C) を用いて、腫瘍組織における S S E A 4 の存在を検出した (図 19)。簡単に述べると、H P A C 異種移植片腫瘍の凍結切片を、まず、室温で 10 分間、10 % 中性緩衝ホルマリン (S i g m a - A l d r i c h) で固定し、内在性ペルオキシダーゼ活性を、室温で 15 分間、切片を ddH_2O 中 0 . 3 % 過酸化水素 / 0 . 1 % アジ化ナトリウムに浸漬させることによって、停止させた。洗浄サイクル (P B S、3 回、それぞれ 5 分間) の後に、切片を、4 で一晩、 $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ の F I T C で標識した c h A b 6 またはヒト I g G 1、カップとともにインキュベートした。一晩インキュベートした後、切片を、次いで、洗浄し、室温で 1 時間、H R P で標識したヤギ抗 F I T C 抗体 (1 : 200、K P L) とともにインキュベートした。さらなる洗浄サイクルの後に、D A B 基質 (V e c t o r l a b o r a t o r i e s) を、顕色に使用し、ヘマトキシリン (S i g m a - A l d r i c h) を、対比染色に使用した。

(実施例 10)

障害の処置

【 0 3 1 4 】

がんの危険性があるかまたはがんを罹患する対象は、免疫応答の増大を必要とし得、可溶性形態の本発明の S S E A 4 抗体での処置が有益であろう。最も一般的には、抗体は、外来環境において、約 $0.1 \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量で、緩徐な静脈内 (I V) 注入によって、週ごとの投与により投与される。アンタゴニストの適切な治療有効用量は、処置担当医師によって選択され、およそ $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 20 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 1 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $10 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 1 \text{ mg} / \text{kg}$ 、 $10 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $100 \mu\text{g} \sim 1 \text{ mg} / \text{kg}$ 、および $500 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 5 \text{ mg} / \text{kg}$ の範囲となるであろう。本発明の S S E A 4 抗体は、1 ヶ月に 1 回またはそれより低い頻度で投与されることが想定される。処置の期間は、1 ヶ月から数年間の範囲に及び得る。

【 0 3 1 5 】

ヒトにおける抗体の臨床上的有効性を試験するために、がんを有する個体を特定し、ランダムに処置群に分けた。処置群には、プラセボ群、および S S E A 4 抗体 (異なる用量) での処置を受ける 1 ~ 3 個の群が含まれる。個体は、1 ~ 3 年間、将来的に追跡される。処置を受けている個体は、改善を示すことが想定される。

(実施例 11)

表面プラズモン共鳴による例示的な抗 S S E A 4 抗体の動態結合アッセイ

【 0 3 1 6 】

例示的な抗 S S E A 4 抗体の動態結合を、B i a c o r e T 200 システムを使用して、表面プラズモン共鳴 (S P R) によって分析した。まず、ビオチン化した S S E A 4 を、S e n s o r C h i p S A に固定した。代表的な抗 S S E A 4 抗体 h A b 6 - 3 . 1、h A b 6 - 3、および c h A b 6 を、泳動緩衝液 ($1 \times \text{P B S}$ 緩衝液、0 . 05 % T w e e n - 20 を含有、 $\text{pH} 7.4$) 中に連続希釈し、100、33 . 3、11 . 1、3 . 7、1 . 2 nM の濃度にした後、単一サイクルモードを使用して、 $30 \mu\text{L} / \text{分}$ で 5 分

10

20

30

40

50

間、注射した。パラメーターの分析を、B I A e v a l u a t i o nソフトウェアによって行った。(図5)

(実施例12)

フローサイトメトリー分析による、例示的な抗S S E A 4抗体の、細胞への結合

【0317】

フローサイトメトリー分析のために、 3×10^5 個のがん細胞、たとえば、乳がん細胞株MDA-MB-231、MCF7を、FACS緩衝液(PBS中1%のFBS)中で、4で30分間、示されている濃度の例示的な抗S S E A 4抗体とともにインキュベートした。FACS緩衝液によって洗浄した後、細胞を、次いで、PEまたはAlexa Fluor 488にコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG抗体(FACS緩衝液中に1:250~1:400希釈、Jackson Immuno Research)とともに、4で30分間インキュベートした。抗S S E A 4抗体の細胞への結合を、次いで、BD FACSVerseフローサイトメーターによって分析した。(図9A~9Bおよび図11A~11Fを参照されたい)

10

(実施例13)

例示的なキメラおよびヒト化Ab6の、乳がん細胞株および膵臓がん細胞株に対する抗体依存性細胞毒性(ADCC)活性

【0318】

MDA-MB-231、MCF7、およびHPAC細胞を、30分間、20uMのカルセインAMで標識した。洗浄した後、カルセインAMで標識した標的細胞(1×10^4 個の細胞/ウェル)を、新しく単離したヒトPBMC(2.5×10^5 個の細胞/ウェル、E/T比=25/1)とともにコインキュベートし、連続希釈した抗S S E A 4抗体ありまたはなしで4時間処置した。カルセインAMの放出を、M5 ELISAリーダー(励起485、放出520)によって検出し、相対的な細胞毒性の評価に使用した。(図13、図14A~14B)

20

(実施例14)

例示的なキメラおよびヒト化Ab6の、乳がん細胞株および膵臓がん細胞株に対する補体依存性細胞毒性(CDC)活性

【0319】

HPACについては、 2×10^5 個の細胞を、37で1時間、15%のヒト血清および示されている濃度の抗S S E A 4抗体とともにインキュベートした。インキュベーションの後に、死細胞を、室温で5分間、ヨウ化プロピジウム(PI)によって染色し、次いで、BD FACSVerseフローサイトメーターによって計数および分析した。(図15A)

30

【0320】

MCF7については、細胞を、まず、30分間、20uMのカルセインAMで標識した。洗浄した後に、カルセインAMで標識した標的細胞(アッセイ当たり 1×10^4 個の細胞)を、10%のヒト血清とともにコインキュベートし、37で2時間、示されている濃度の抗S S E A 4抗体ありまたはなしで、処置した。カルセインAMの放出を、M5 ELISAリーダー(励起485、放出520)によって検出し、相対的な細胞毒性の評価に使用した。(図15B)

40

(実施例15)

MDA-MB-231異種移植片モデルにおける抗S S E A 4抗体の*in vivo*抗腫瘍効果

【0321】

*in vivo*での抗S S E A 4抗体の抗腫瘍効果を評価するために、8週齢の雌Balb/cヌードマウス(NLAC、Taiwan)に、 5×10^6 個のMDA-MB-231細胞を、同所的に注射した。腫瘍が形成され、体積が $100 \sim 150 \text{ mm}^3$ に達する間に、ビヒクル、ハーセプチン、または抗S S E A 4抗体(20mpk)を、1週間に2回、尾静脈に静脈内注射した。ノギスを用いて垂直方向の腫瘍直径、長さ(L)、および

50

幅 (W) を測定することによって、腫瘍の成長を、1 週間に 2 回、モニタリングした。腫瘍の体積 (V) を、式 $V = LW^2 / 2$ によって計算した。すべての結果は、平均 ± 標準誤差として示し (それぞれの群について、 $n = 8$ 匹)、スチューデント t 検定を、統計学的分析に使用した。(図 17)

(実施例 16)

MCF7 異種移植片モデルにおける抗 SSEA4 抗体の *in vivo* 抗腫瘍効果

【0322】

MCF7 異種移植片モデルを構築するために、1 日目に、雌 Balb/c ノードマウス (8 週齢、BioLasco、Taiwan から購入した) に、17-β-エストラジオールベレットを皮下に埋め込んだ。500 万個の MCF7 細胞を、Matrigel と混合し、次いで、乳房脂肪パッドに同所的に注射した。腫瘍が形成され、体積が $150 \sim 200 \text{ mm}^3$ に達する間に、ピヒクルまたは hAb6-3.1 (示されている用量で) を、1 週間に 2 回、尾静脈に静脈内注射した。ノギスを用いて垂直方向の腫瘍直径、長さ (L)、および幅 (W) を測定することによって、腫瘍の成長を、1 週間に 2 回、モニタリングした。腫瘍の体積 (V) を、式 $V = LW^2 / 2$ によって計算した。すべての結果は、平均 ± 標準誤差として示し (それぞれの群について、 $n = 7$ 匹)、スチューデント t 検定を、統計学的分析に使用した。(図 18)

(実施例 17)

糖鎖操作 hAb6-3.1 の開発のための例示的な手法

糖鎖操作 hAb6-3.1 の産生

【0323】

例示的な抗 SSEA4 抗体 hAb6-3.1 のグリカン、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼおよびフコシダーゼとともにコインキュベートすることにより、加水分解して、モノ-GLcNAc 形態にした。糖鎖操作抗体を、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ変異体の存在下において、ユニバーサルグリカンを、モノ-GLcNAc にグリコシル基転移させることによって産生させ、r プロテイン A クロマトグラフィーの精製を行った。糖鎖操作 hAb6-3.1 の特徴付けを、SDS-PAGE およびフローサイトメトリー分析 (それぞれ、図 20 および 21) によって行った。

糖鎖操作 hAb6-3.1 の *in vitro* 機能性アッセイ

【0324】

糖鎖操作は、抗体の、免疫細胞に発現される Fc ガンマ受容体への結合親和性を向上させることが示されており、これは、免疫系の保護機能に寄与する。本発明者らは、糖鎖操作 hAb6-3.1 の Fc ガンマ受容体 IIIA 結合および ADCC 機能 (抗体依存性細胞媒介性細胞毒性) を、以下の通り示した。

Fc ガンマ受容体 IIIA 結合

【0325】

Fc ガンマ受容体 IIIA を、ELISA プレートにコーティングし、示されている濃度の天然および糖鎖操作抗体とともにインキュベートした。結合活性を、次いで、HRP にコンジュゲートした抗ヒト IgG H+L および TMB 基質を使用することによって判定した。(図 22)

ADCC アッセイ

【0326】

カルセイン AM で標識した MDA-MB-231 細胞、すなわち、高度な SSEA-4 発現を有するヒトリプルネガティブ乳がん細胞株を、まず、PBMC と混合し、天然または糖鎖操作抗 SSEA-4 抗体を、次いで、示されている濃度で添加し、37 °C で 4 時間、インキュベートさせた。インキュベーションの後に、培養上清を採取し、励起 485 / 放出 535 で検出し、細胞の細胞毒性の割合を、(実験値 - 自発的溶解) / (最大溶解 - 自発的溶解) × 100 として計算した。(図 23)

【0327】

抗 SSEA-4 抗体の糖鎖操作は、抗体の Fc ガンマ受容体 IIIA への結合を有意に

10

20

30

40

50

強化し、天然の抗体と比較して、改善された抗体依存性細胞毒性 (ADCC) 活性をもたらした。

(実施例 18)

抗体 - 薬物コンジュゲーション複合体の開発 / 形成のための代表的な手法

【0328】

抗体 - 薬物のコンジュゲーションには、いくつかの化学的アプローチ、たとえば、リシンおよびシステイン残基におけるチオール - マレイミド形成 (Lewis Phillips ら、2008 年)、セレノシステイン残基におけるセレノール - マレイミド形成 (Hofer ら、2009 年)、修飾 Fc グリカンへのオキシム (oxime) ライゲーション (Zhou ら、2014 年)、クリックケミストリー (Axup ら、2012 年)、ホルミルグリシン (formylglycine) 残基への Hydrazino - iso - Pictet - Spengler ライゲーション (Drake ら、2014 年) が、利用可能であった。本発明者らは、代表的な修飾 Fc グリカンへのオキシムライゲーションの使用を、例示的な ADC 形成アプローチとして適用した。抗体上の修飾グリカンとペイロード化合物 A1 (アルコキシアミン切断性リンカーを有する細胞毒性薬物である MMAE、分子量: 1348.7265) との間のオキシムライゲーションを、25 で、100 mM 酢酸緩衝液、pH 4.5 中、抗体 (8 mg/mL) および A01 (3 mM) の存在下において行った。反応を、48 時間インキュベートし、生成物を、r プロテイン A、Captor S、および Captor Q カラムによって、逐次的に精製した。hAb6 - 3.1 - A01 複合体形成の結果を、SDS - PAGE によって分析した (図 24A ~ B)。

10

20

(実施例 19)

フローサイトメトリーによる、hAb6 - 3.1 - A01 の、SSEA4 を発現する細胞への結合能力

【0329】

SSEA4 を発現する細胞株である MCF7 および SKOV3 を、PBS で洗浄し、 1×10^5 個の細胞を、FACS 緩衝液 (2% FBS および 0.1% NaN₃ を含有する PBS) 中、10 μ g/mL の hAb6 - 3.1 または hAb6 - 3.1 - A01 とともに、氷上で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後、細胞を、Alexa - Fluor 488 で標識した抗ヒト IgG 抗体で染色し、氷上で 0.5 時間インキュベートした。抗体の細胞結合のシグナルを、フローサイトメトリーによって検出した (図 XX11 AB)。結果として、hAb6 - 3.1 - A01 の、SSEA4 を発現する細胞への結合特性は、親抗体 hAb6 - 3.1 と類似であることが示された (図 25A ~ B)。

30

(実施例 20)

乳がん細胞株における in vitro 細胞毒性アッセイ

【0330】

SSEA4 を発現する乳がん細胞株 MCF7 を、96 ウェルの白色プレートに播種し (1×10^3 個の細胞 / ウェル)、37 で一晩インキュベートした。細胞を、連続希釈した hAb6 - 3.1 または hAb6 - 3.1 - A01 で処置し、さらに 5 日間インキュベートした。処置の後に、培養培地を除去し、細胞を、Cell Titer Glo 試薬 (Promega) で処置した。発光シグナルを、10 分間のインキュベーションの後に、ELISA リーダー (M5) によって検出し、細胞生存率を計算した (未処置細胞のシグナルを、生存率 100% として設定した)。

40

【0331】

図 26 に示されるように、hAb6 - 3.1 - A01 は、用量依存性様式で、細胞毒性を示した。ADC は、シグモイド曲線を示し、標的 SSEA - 4 への特異的な結合を示す。対照的に、hAb6 - 3.1 単独では、それほどの細胞毒性は有さない。この結果は、ADC が、特異性および細胞毒性の両方の利点を達成することを示す。細胞毒性の保存により、期待される治療効果が達成され、同時に、特異性により、がん細胞が標的とされ、正常細胞には影響が及ばず、それによって副作用が最小限に抑えられるであろう。

(実施例 21)

50

卵巣がん細胞株における *in vitro* 細胞毒性アッセイ

【0332】

SSEA4を発現する卵巣がん細胞株SKOV3を、hAb6-3.1-A01の有効性を示すために適用した。細胞毒性アッセイの方法は、実施例20に記載されていた。hAb6-3.1-A01は、ナノモルレベルで、SKOV3に対する細胞毒性のさらに強力な効果を示した。

【0333】

特定されたすべての特許および他の刊行物は、たとえば、本発明と併せて使用することができる、そのような刊行物に記載されている手法を説明および開示する目的で、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。これらの刊行物は、本出願の出願日より前の開示のために提供されているにすぎない。この点に関して、先行発明により、または任意の他の理由で、本発明者らがそのような開示に先立つ権利を有さないことを認めると解釈されるものは存在しない。これらの文書の日付に関する陳述または内容に関する描写は、本出願者らに利用可能な情報に基づくものであり、これらの文書の日付または内容の正確さに関して何らかの承認を構成するものではない。

【0334】

別途定義されない限り、本明細書に使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって広く理解されているものと同じ意味を有する。いずれの公知の方法、デバイス、および材料も、本発明の実施または試験において使用することができるが、これに関する方法、デバイス、および材料が、本明細書において記載されている。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

(i) 配列番号10、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、および170から選択されるH-CDR1、または(i)の80%またはそれより高く保存された配列相同体、

(ii) 配列番号11、41、51、61、71、81、101、121、131、141、151、および171から選択されるH-CDR2、または(ii)の80%またはそれより高く保存された配列相同体、

(iii) 配列番号12、42、52、62、72、82、102、122、132、142、152、および172から選択されるH-CDR3、または(iii)の80%またはそれより高く保存された配列相同体、

(iv) 配列番号15、45、55、65、75、85、105、125、135、145、155、および175から選択されるL-CDR1、または(iv)の80%またはそれより高く保存された配列相同体、

(v) 配列番号16、46、56、66、76、86、106、126、136、146、156、および176から選択されるL-CDR2、または(v)の80%またはそれより高く保存された配列相同体、ならびに

(vi) 配列番号17、47、57、67、77、87、107、127、137、147、157、および177から選択されるL-CDR3、または(vi)の80%またはそれより高く保存された配列相同体

をそれぞれ含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

(項目2)

(i) 配列番号10、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、および170から選択されるH-CDR1、または(i)の5個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、

(ii) 配列番号11、41、51、61、71、81、101、121、131、141、151、および171から選択されるH-CDR2、または(ii)の5個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、

(iii) 配列番号12、42、52、62、72、82、102、122、132、

10

20

30

40

50

142、152、および172から選択されるH-CDR3、または(iii)の5個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、

(iv)配列番号15、45、55、65、75、85、105、125、135、145、155、および175から選択されるL-CDR1、または(iv)の5個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、

(v)配列番号16、46、56、66、76、86、106、126、136、146、156、および176から選択されるL-CDR2、または(v)の5個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、ならびに

(vi)配列番号17、47、57、67、77、87、107、127、137、147、157、および177から選択されるL-CDR3、または(vi)の5個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体

をそれぞれ含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

(項目3)

重鎖におけるA100R、N31S、T62Aのうちの1つもしくは複数、および/または軽鎖におけるS52Yから選択される、CDRにおけるアミノ酸置換をさらに含む、項目1または2に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

(項目4)

重鎖におけるV50A、G53A、S35Tのうちの1つもしくは複数、および/または軽鎖におけるV30I/A、G91A、Y94Fのうちの1つもしくは複数から選択される、CDRにおけるアミノ酸置換をさらに含む、項目1または2に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

(項目5)

(i)配列番号13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および173から選択される重鎖可変ドメイン、またはその80%またはそれより高く保存された配列相同体、ならびに

(ii)配列番号18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および178から選択される軽鎖可変ドメイン、またはその80%またはそれより高く保存された配列相同体

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

(項目6)

(i)配列番号13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および173から選択される重鎖可変ドメイン、またはその10個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体、ならびに

(ii)配列番号18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および178から選択される軽鎖可変ドメイン、またはその10個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体

を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

(項目7)

(i)配列番号13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および173から選択される重鎖可変ドメイン、またはその80%またはそれより高く保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号10、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、および170から選択されるH-CDR1、配列番号11、41、51、61、71、81、101、121、131、141、151、および171から選択されるH-CDR2、配列番号12、42、52、62、72、82、102、122、132、142、152、および172から選択されるH-CDR3を含む、重鎖可変ドメイン、ならびに

(ii)配列番号18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および178から選択される軽鎖可変ドメイン、またはその80%またはそれより高く保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号15、45、55、65、75、85、105、125、135、145、155、およ

10

20

30

40

50

び175から選択されるL-CDR1、配列番号16、46、56、66、76、86、106、126、136、146、156、および176から選択されるL-CDR2、ならびに配列番号17、47、57、67、77、87、107、127、137、147、157、および177から選択されるL-CDR3を含む、軽鎖可変ドメインを含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

(項目8)

(i) 配列番号13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および173から選択される重鎖可変ドメイン、またはその10個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号10、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、および170から選択されるH-CDR1、配列番号11、41、51、61、71、81、101、121、131、141、151、および171から選択されるH-CDR2、配列番号12、42、52、62、72、82、102、122、132、142、152、および172から選択されるH-CDR3を含む、重鎖可変ドメイン、ならびに

10

(ii) 配列番号18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および178から選択される軽鎖可変ドメイン、またはその10個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号15、45、55、65、75、85、105、125、135、145、155、および175から選択されるL-CDR1、配列番号16、46、56、66、76、86、106、126、136、146、156、および176から選択されるL-CDR2、ならびに配列番号17、47、57、67、77、87、107、127、137、147、157、および177から選択されるL-CDR3を含む、軽鎖可変ドメインを含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

20

(項目9)

(i) 配列番号13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および173から選択される重鎖可変ドメイン、ならびに

(ii) 配列番号18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および178から選択される軽鎖可変ドメイン、またはその10個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号15、45、55、65、75、85、105、125、135、145、155、および175から選択されるL-CDR1、配列番号16、46、56、66、76、86、106、126、136、146、156、および176から選択されるL-CDR2、ならびに配列番号17、47、57、67、77、87、107、127、137、147、157、および177から選択されるL-CDR3を含む、軽鎖可変ドメインをさらに含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

30

(項目10)

(i) 配列番号13、23、33、43、53、63、73、83、103、123、133、143、153、および173から選択される重鎖可変ドメイン、またはその10個未満のアミノ酸置換を含む保存された配列相同体であって、さらに、それぞれ、配列番号10、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、および170から選択されるH-CDR1、配列番号11、41、51、61、71、81、101、121、131、141、151、および171から選択されるH-CDR2、配列番号12、42、52、62、72、82、102、122、132、142、152、および172から選択されるH-CDR3を含む、重鎖可変ドメイン、ならびに

40

(ii) 配列番号18、28、38、48、58、68、78、88、108、128、138、148、158、および178から選択される軽鎖可変ドメインをさらに含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

(項目11)

表2A~2Dにおいてそれぞれのバリエントで記載された、それぞれの対応するV_H、V_L、ならびにそれぞれのH-CDRおよびL-CDRを含む、単離されたモノクローナル

50

抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 1 2)

前記抗体または抗原結合性断片が、

a) キメラ抗体もしくはその断片であるか、または

b) ヒト化抗体もしくはその断片であるか、または

c) ヒト抗体もしくはその断片であるか、または

d) F a b、F a b'、F v、s c F v、d s F v、F (a b)₂、F d、およびダイアボディからなる群から選択される抗原結合性断片である、項目 1 から 1 1 のいずれか一項に記載の単離された抗体または抗原結合性断片。

(項目 1 3)

前記抗体が、I g G である、項目 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の単離された抗体または抗原結合性断片。

(項目 1 4)

前記抗体が結合する標的または前記結合性断片の標的が、構造 N e u 5 A c 2 3 G a l 1 3 G a l 1 N A c 1 3 G a l 1 4 G a l 1 4 G l c 1 を有する炭水化物抗原 S S E A 4 である、項目 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 1 5)

前記抗体が、標的細胞に結合すると、C D C および / または A D C C 誘導活性を有する、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の単離された抗体または抗原結合性断片。

(項目 1 6)

項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の単離された抗体またはその抗原結合性断片と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

(項目 1 7)

1 つまたは複数の治療剤をさらに含む、項目 1 6 に記載の医薬組成物。

(項目 1 8)

前記治療剤が、治療用抗体、化学療法剤、またはサイトカインから選択される、項目 1 7 に記載の医薬組成物。

(項目 1 9)

項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗体と、細胞毒性剤とを含む、イムノコンジュゲート。

(項目 2 0)

式 A B - (L - D) p を有し、式中、

(a) A B が、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗体であり、

(b) L が、リンカーであり、

(c) D が、好適な細胞毒性薬物であり、

(d) p が、1 から 8 の範囲である、項目 1 9 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 2 1)

前記薬物が、M M A E または M M A F である、項目 2 0 に記載のイムノコンジュゲート (A D C) 。

(項目 2 2)

前記リンカーが、切断可能なリンカーである、項目 2 0 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 2 3)

前記切断可能なリンカーが、アルコキシアミン切断性リンカーである、項目 2 2 に記載の A D C 。

(項目 2 4)

項目に記載のイムノコンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む、医薬製剤。

(項目 2 5)

追加の治療剤をさらに含む、項目 2 4 に記載の医薬製剤。

(項目 2 6)

10

20

30

40

50

項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗体をコードする、単離された核酸 (c D N A)。

(項目 2 7)

項目 2 6 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

(項目 2 8)

抗体を産生する方法であって、前記抗体が産生されるように、項目 2 7 に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。

(項目 2 9)

(a) 配列番号 1 5、4 5、5 5、6 5、7 5、8 5、1 0 5、1 2 5、1 3 5、1 4 5、1 5 5、および 1 7 5 から選択される L - C D R 1、ならびに配列番号 1 6、4 6、5 6、6 6、7 6、8 6、1 0 6、1 2 6、1 3 6、1 4 6、1 5 6、および 1 7 6 から選択される L - C D R 2、ならびに配列番号 1 7、4 7、5 7、6 7、7 7、8 7、1 0 7、1 2 7、1 3 7、1 4 7、1 5 7、および 1 7 7 から選択される L - C D R 3、またはそれぞれの L - C D R の 5 個またはそれより少ない保存されたアミノ酸置換を有する保存された配列相同体の配列を有する、3 つの V L ドメイン C D R をコードする、核酸を提供するステップと、

10

(b) 配列番号 1 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、1 0 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、および 1 7 0 から選択される H - C D R 1、配列番号 1 1、4 1、5 1、6 1、7 1、8 1、1 0 1、1 2 1、1 3 1、1 4 1、1 5 1、および 1 7 1 から選択される H - C D R 2、配列番号 1 2、4 2、5 2、6 2、7 2、8 2、1 0 2、1 2 2、1 3 2、1 4 2、1 5 2、および 1 7 2 から選択される H - C D R 3、またはそれぞれの H - C D R の 5 個またはそれより少ない保存されたアミノ酸置換を有する保存された配列相同体の配列を有する、3 つの V H ドメイン C D R をコードする核酸のレパートリーを、

20

前記 3 つの V L ドメイン C D R をコードする前記核酸と組み合わせて、前記 3 つの V L ドメイン C D R をコードする核酸および前記 3 つの V H ドメイン C D R のレパートリーの産生物レパートリーを提供するステップと、

(c) 前記産生物レパートリーの核酸を発現させるステップと、

(d) S S E A 4 に特異的に結合し、前記産生物レパートリーの前記核酸から発現される、可変ドメインを含む、抗原結合性断片を選択するステップと、

(e) 前記抗原結合性断片を含む抗体を産生するステップと

30

によって産生される、抗体。

(項目 3 0)

S S E A 4 陽性がんを有する対象を処置する方法であって、それを必要とする前記対象に、有効量の、項目 1 6、1 7、1 8、2 4、および 2 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

(項目 3 1)

前記 S S E A 4 陽性がんが、脳、肺、乳房、口腔、食道、胃、肝臓、胆管、膵臓、結腸、腎臓、子宮頸、卵巣、および前立腺のがんから選択される、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

1 つまたは複数の追加の治療モダリティまたは薬剤を組み合わせ、個体に投与することをさらに含む、項目 3 0 に記載の方法。

40

(項目 3 3)

組み合わせられた処置モダリティが、治療用抗体、細胞療法、放射線、サイトカイン、または化学療法剤から選択される、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

S S E A 4 陽性細胞の増殖を阻害する方法であって、前記細胞を、項目 1 6、1 7、1 8、2 4、および 2 5 のいずれか一項に記載の医薬製剤に、前記抗体 / 断片 / A D C が、炭水化物抗原を発現する前記細胞の表面上の S S E A 4 に結合するのを許容する条件下において曝露し、それによって前記細胞の増殖を阻害することを含む、方法。

(項目 3 5)

50

S S E A 4 陽性がんを有する対象を処置する方法であって、前記 S S E A 4 陽性がんが、第 1 の治療剤に対して耐性であり、前記方法が、個体に、有効量の、項目 1 6、1 7、1 8、2 4、および 2 5 のいずれか一項に記載の医薬製剤を投与することを含む、方法。
(項目 3 6)

前記 S S E A 4 陽性がんが、脳、肺、乳房、口腔、食道、胃、肝臓、胆管、膵臓、結腸、腎臓、子宮頸、卵巣、および / または前立腺のがんである、項目 3 5 に記載の方法。
(項目 3 7)

前記第 1 の治療剤が、S S E A 4 以外の抗原に結合する第 1 の抗体 / 結合性断片 / A D C、および / または放射線、および / または化学療法剤を含む、項目 3 5 に記載の方法。
(項目 3 8)

生物学的試料において S S E A 4 を検出する方法であって、前記生物学的試料を、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗 S S E A 4 抗体と、前記抗 S S E A 4 抗体が、天然に存在する S S E A 4 に結合するのを許容する条件下において接触させることと、前記生物学的試料において、前記抗 S S E A 4 抗体と天然に存在する S S E A 4 との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、方法。
(項目 3 9)

前記生物学的試料が、がん試料である、項目 3 8 に記載の方法。
(項目 4 0)

S S E A 4 陽性がんを検出するための方法であって、(i) 標識した抗 S S E A 4 抗体を、炭水化物抗原を発現する腫瘍を有するかまたはそれを有する疑いのある対象に投与するステップであって、前記標識した抗 S S E A 4 抗体が、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗 S S E A 4 抗体を含む、ステップと、(i i) 前記対象において、前記標識した抗 S S E A 4 抗体を検出するステップであって、前記標識した抗 S S E A 4 抗体の検出が、前記対象における S S E A 4 陽性がんを示す、ステップとを含む、方法。
(項目 4 1)

S S E A 4 陽性がんを検出するための方法であって、(i) 標識した抗 S S E A 4 抗体を、炭水化物抗原を発現する腫瘍を有するかまたはそれを有する疑いのある対象に由来する試料と接触させるステップであって、前記標識した抗 S S E A 4 抗体が、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗 S S E A 4 抗体を含む、ステップと、(i i) 前記試料において、前記標識した抗 S S E A 4 抗体を検出するステップであって、前記標識した抗 S S E A 4 抗体の検出が、前記試料における S S E A 4 陽性がんを示す、ステップとを含む、方法。
(項目 4 2)

10^{-7} M より低い親和性定数で、S S E A 4 に特異的に結合する、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の単離された抗体。
(項目 4 3)

I g G₁、I g G₂、I g G₃、または I g G₄ である、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の単離された抗体。
(項目 4 4)

I g G₁ または I g G₁ である、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の単離された抗体。
(項目 4 5)

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合性部分が、 1×10^{-7} M またはそれより低い K_D で、S S E A 4 に結合し、前記 K_D が、表面プラズモン共鳴 (B i a c o r e) 分析によって測定される、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合性部分。
(項目 4 6)

結合親和性が、50 nM より低い、項目 4 5 に記載の単離された抗 S S E A 4 抗体またはその結合性断片。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 A】

FIG. 1A

それぞれ、Kabat、AbM、Chothia、Contact、およびIMGTの方法における代表的な抗SSEA4抗体chAb6のCDR

H-CDR1		
方法	定義	配列
Kabat	H31-H35B	NYGVS
AbM	H26-H35	GFSLKNYGV
Chothia	H26-H32...H34	GFSLKNY[GV]
Contact	H30-H35	KNYGV
IMGT	オンラインで予測	GFSLKNY
H-CDR2		
方法	定義	配列
Kabat	H50-H65	VIWGDGSTNYHSTLRS
AbM	H50-H58	VIWGDGSTN
Chothia	H52-H56	WGDGS
Contact	H47-H58	WLGVIWGDGSTN
IMGT	オンラインで予測	IWGDGST
H-CDR3		
方法	定義	配列
Kabat	H95-H102	PGAGYAMDY
AbM	H95-H102	PGAGYAMDY
Chothia	H95-H102	PGAGYAMDY
Contact	H93-H101	AKPGAGYAMD
IMGT	オンラインで予測	AKPGAGYAMDY
L-CDR1		
方法	定義	配列
Kabat	L24-L34	SASSSVSYMH
AbM	L24-L34	SASSSVSYMH
Chothia	L24-L34	SASSSVSYMH
Contact	L30-L36	VSVMHWY
IMGT	オンラインで予測	SSSVY
L-CDR2		
方法	定義	配列
Kabat	L50-L56	DTSKLTS
AbM	L50-L56	DTSKLTS
Chothia	L50-L56	DTSKLTS
Contact	L46-L55	LWIYDTSKLT
IMGT	オンラインで予測	DTS
L-CDR3		
方法	定義	配列
Kabat	L89-L97	FQGSGYPLT
AbM	L89-L97	FQGSGYPLT
Chothia	L89-L97	FQGSGYPLT
Contact	L89-L96	FQGSGYPL
IMGT	オンラインで予測	FQGSGYPLT

【図 1 B】

FIG. 1B

重鎖		H-CDR1	H-CDR2
chAb6		QVQLKESGPGLVAPSGQLSITCTVSGFSLKNYGVSWRQPPGKGLEWLGVMWGDGSTNYH	
hAb6-3.1		QVQLKESGPGLVAPSGQLSITCTVSGFSLKNYGVSWRQPPGKGLEWLGVMWGDGSTNYH	
		H-CDR3	
chAb6		STLRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSLTVSS	
hAb6-3.1		STLRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSLTVSS	
軽鎖		L-CDR1	L-CDR2
chAb6		QVLTQSPAIVSYYPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR	
hAb6-3.1		EVLVTQSPAIVSYYPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR	
		L-CDR3	
chAb6		FSGSGSGNSYLTISSEAEADATYYCFQGSGYPLTFGGGTKEIKR	
hAb6-3.1		FSGSGSGNSYLTISSEAEADATYYCFQGSGYPLTFGGGTKEIKR	

10

20

【図 1 C】

FIG. 1C

重鎖		
chAb6		QVQLKESGPGLVAPSGQLSITCTVSGFSLKNYGVSWRQPPGKGLEWLGVMWGDGSTNYH
hAb6-2		QVQLKESGPGLVAPSGQLSITCTVSGFSLKNYGVSWRQPPGKGLEWLGVMWGDGSTNYH
hAb6-3		QVQLKESGPGLVAPSGQLSITCTVSGFSLKNYGVSWRQPPGKGLEWLGVMWGDGSTNYH
chAb6		STLRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSLTVSS
hAb6-2		STLRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSLTVSS
hAb6-3		STLRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSLTVSS
軽鎖		
chAb6		QVLTQSPAIVSYYPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
hAb6-2		EVLVTQSPAIVSYYPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
hAb6-3		EVLVTQSPAIVSYYPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
chAb6		FSGSGSGNSYLTISSEAEADATYYCFQGSGYPLTFGGGTKEIKR
hAb6-2		FSGSGSGNSYLTISSEAEADATYYCFQGSGYPLTFGGGTKEIKR
hAb6-3		FSGSGSGNSYLTISSEAEADATYYCFQGSGYPLTFGGGTKEIKR

【図 1 D】

FIG. 1D

重鎖		
hAb6-3		QVQLKESGPGLVAPSGQLSITCTVSGFSLKNYGVSWRQPPGKGLEWLGVMWGDGSTNYH
hAb6-3.1		QVQLKESGPGLVAPSGQLSITCTVSGFSLKNYGVSWRQPPGKGLEWLGVMWGDGSTNYH
hAb6-3.2		QVQLKESGPGLVAPSGQLSITCTVSGFSLKNYGVSWRQPPGKGLEWLGVMWGDGSTNYH
hAb6-3.3		QVQLKESGPGLVAPSGQLSITCTVSGFSLKNYGVSWRQPPGKGLEWLGVMWGDGSTNYH
hAb6-3.4		QVQLKESGPGLVAPSGQLSITCTVSGFSLKNYGVSWRQPPGKGLEWLGVMWGDGSTNYH
hAb6-3		STLRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSLTVSS
hAb6-3.1		STLRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSLTVSS
hAb6-3.2		STLRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSLTVSS
hAb6-3.3		STLRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSLTVSS
hAb6-3.4		STLRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSLTVSS
軽鎖		
hAb6-3		EVLVTQSPAIVSYYPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
hAb6-3.1		EVLVTQSPAIVSYYPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
hAb6-3.2		EVLVTQSPAIVSYYPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
hAb6-3.3		EVLVTQSPAIVSYYPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
hAb6-3.4		EVLVTQSPAIVSYYPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSTSPKLWYDTSKLTSGVPGR
hAb6-3		FSGSGSGNSYLTISSEAEADATYYCFQGSGYPLTFGGGTKEIKR
hAb6-3.1		FSGSGSGNSYLTISSEAEADATYYCFQGSGYPLTFGGGTKEIKR
hAb6-3.2		FSGSGSGNSYLTISSEAEADATYYCFQGSGYPLTFGGGTKEIKR
hAb6-3.3		FSGSGSGNSYLTISSEAEADATYYCFQGSGYPLTFGGGTKEIKR
hAb6-3.4		FSGSGSGNSYLTISSEAEADATYYCFQGSGYPLTFGGGTKEIKR

30

40

50

【 図 1 E 】

FIG. 1E

重鎖

hAb6-3
hAb6-3.101
hAb6-3.103
hAb6-3.105
hAb6-3.106
hAb6-3.107
hAb6-3.108
hAb6-3.110

hAb6-3
hAb6-3.101
hAb6-3.103
hAb6-3.105
hAb6-3.106
hAb6-3.107
hAb6-3.108
hAb6-3.110

軽鎖

hAb6-3
hAb6-3.101
hAb6-3.103
hAb6-3.105
hAb6-3.106
hAb6-3.107
hAb6-3.108
hAb6-3.110

hAb6-3
hAb6-3.101
hAb6-3.103
hAb6-3.105
hAb6-3.106
hAb6-3.107
hAb6-3.108
hAb6-3.110

【 図 2 】

FIG. 2

chAb6

重鎖
QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLKNGVSWVRQPPGKGLWGVWGDGSTNYHST
LRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSTVTVSS

軽鎖
QIVLTQSPAIVSYVPEGEKVTMTCSASSSVSYMHYQKSSSTSPKLWIYDTSKLTSGVPGGRFS
GSGSGNSYLTITSSMEADVATYYCFQSGGYPLTFGGGKLEIKR

ヒト化 Ab6-2

重鎖
QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLKNGVSWVRQPPGKGLWGVWGDGSTNYHST
LRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSTVTVSS

軽鎖
QIVLTQSPAIVSYVPEGEKVTMTCSASSSVSYMHYQKSSSTSPKLWIYDTSKLTSGVPGGRFS
GSGSGNSYLTITSSMEADVATYYCFQSGGYPLTFGGGKLEIKR

ヒト化 Ab6-3

重鎖
QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLKNGVSWVRQPPGKGLWGVWGDGSTNYHST
LRSRLTISKDNKSQLFLKLNRLQTDATATYCAKPGAGYAMDYWGQGTSTVTVSS

軽鎖
QIVLTQSPAIVSYVPEGEKVTMTCSASSSVSYMHYQKSSSTSPKLWIYDTSKLTSGVPGGRFS
GSGSGNSYLTITSSMEADVATYYCFQSGGYPLTFGGGKLEIKR

10

20

【 図 3 】

FIG. 3

H01 H02 H03 H04 H05 H06 H07 H08 H09 H10 H11 H12 H13 H14 H15
Q V Q L K E S G P G L V A P S

H16 H17 H18 H19 H20 H21 H22 H23 H24 H25 H26 H27 H28 H29 H30
Q S L S I T C T V S G F S L K

H31 H32 H33 H34 H35 H36 H37 H38 H39 H40 H41 H42 H43 H44 H45
N Y G V S W V R Q P P G K G L

H46 H47 H48 H49 H50 H51 H52 H53 H54 H55 H56 H57 H58 H59 H60
E W L G V I W G D G S T N Y H

H61 H62 H63 H64 H65 H66 H67 H68 H69 H70 H71 H72 H73 H74 H75
S T L R S R L T I S K D N S K

H76 H77 H78 H79 H80 H81 H82 H82A H82B H82C H83 H84 H85 H86 H87 H88 H89 H90
S Q L F L K L N R L Q T D D T A T Y

H91 H92 H93 H94 H95 H96 H97 H98 H99 H100 H100A H101 H102 H103 H104 H105
Y C A K P G A G Y A M D Y W G Q

H106 H107 H108 H109 H110 H111 H112 H113 H114
G T S V T V S S -

【 図 4 】

FIG. 4

L01 L02 L03 L04 L05 L06 L07 L08 L09 L10 L11 L12 L13 L14 L15
Q I V L T Q S P A I M S V Y P

L16 L17 L18 L19 L20 L21 L22 L23 L24 L25 L26 L27 L28 L29 L30
G E K V T M T C S A S S - S V

L31 L32 L33 L34 L35 L36 L37 L38 L39 L40 L41 L42 L43 L44 L45
S Y M H W Y Q Q K S S T S P K

L46 L47 L48 L49 L50 L51 L52 L53 L54 L55 L56 L57 L58 L59 L60
L W I Y D T S K L T S G V P G

L61 L62 L63 L64 L65 L66 L67 L68 L69 L70 L71 L72 L73 L74 L75
R F S G S G S G N S Y S L T I

L76 L77 L78 L79 L80 L81 L82 L83 L84 L85 L86 L87 L88 L89 L90
S S M E A E D V A T Y Y C F Q

L91 L92 L93 L94 L95 L96 L97 L98 L99 L100 L101 L102 L103 L104 L105
G S G Y P L T F G G G T K L E

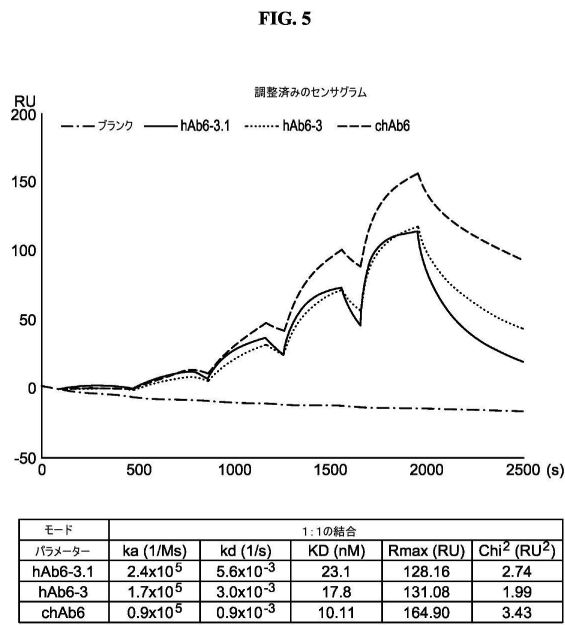
L106 L107 L108 L109 L110 L111
I K R - - -

30

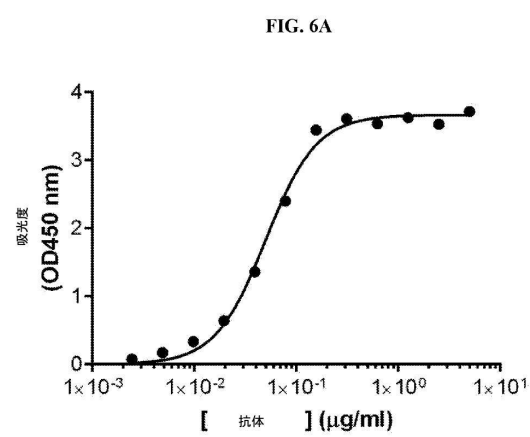
40

50

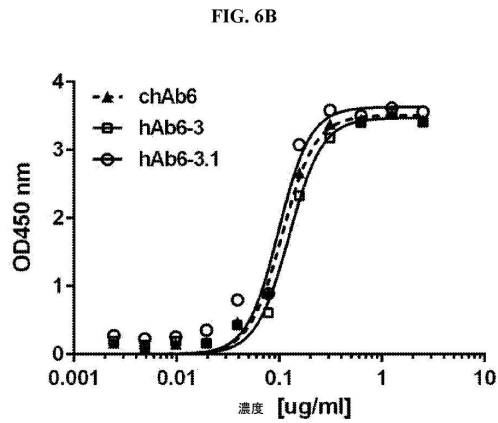
【 図 5 】



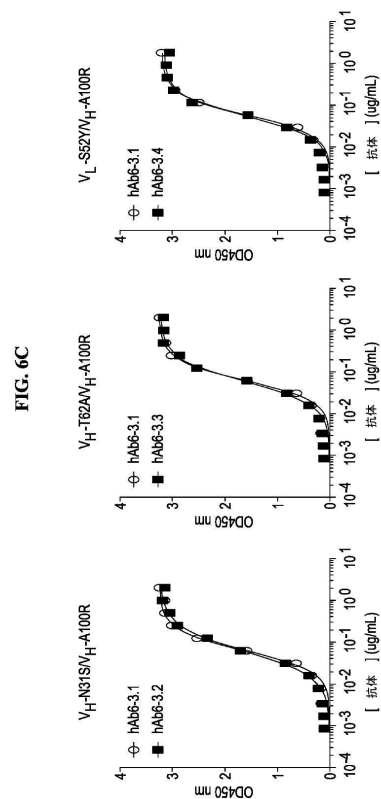
【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



10

20

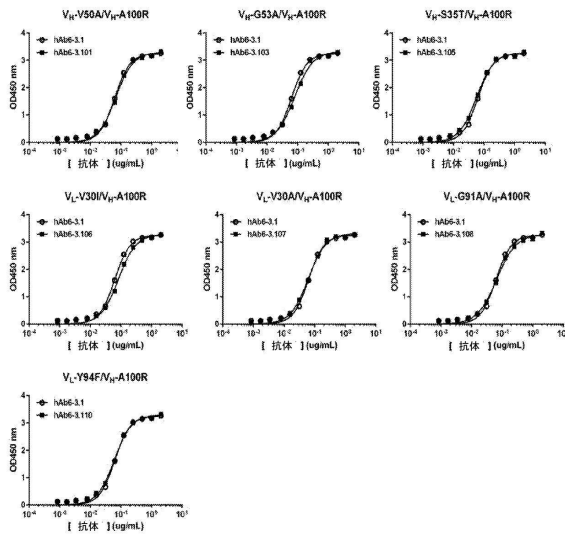
30

40

50

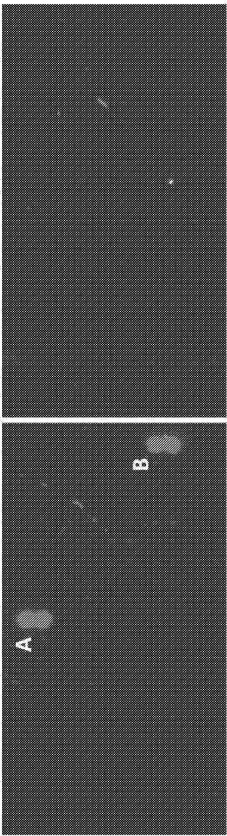
【 図 6 D 】

FIG. 6D



【 図 7 】

FIG. 7



10

20

【 図 8 】

FIG. 8A

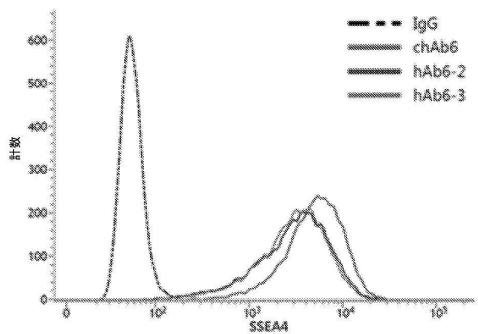
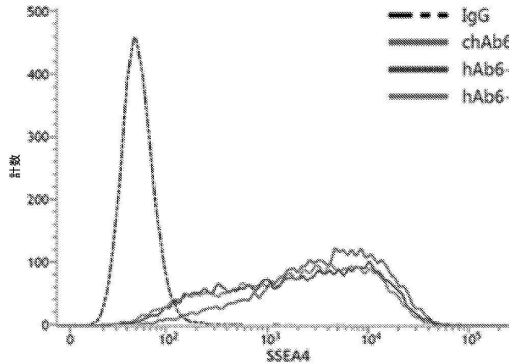


FIG. 8B



【 図 9 】

FIG. 9A

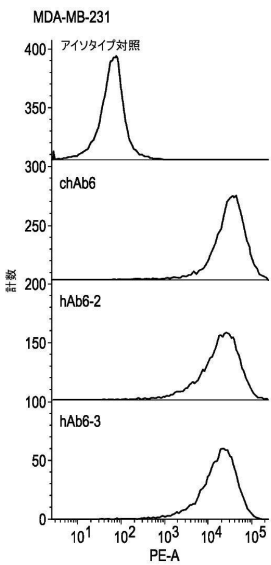
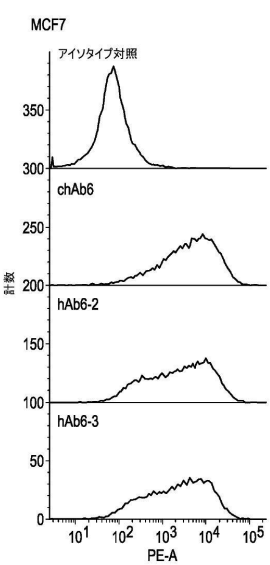


FIG. 9B

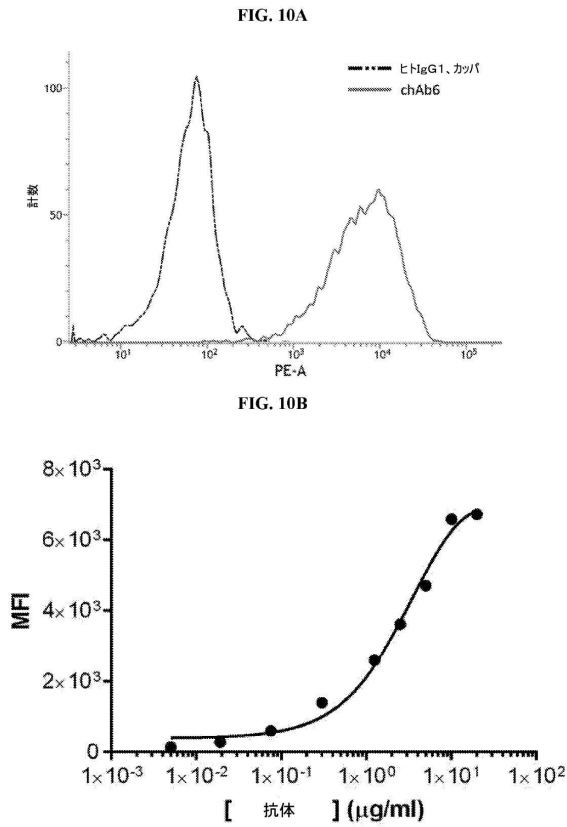


30

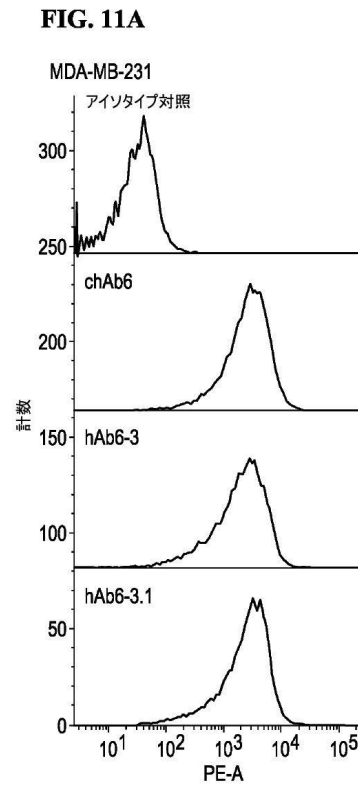
40

50

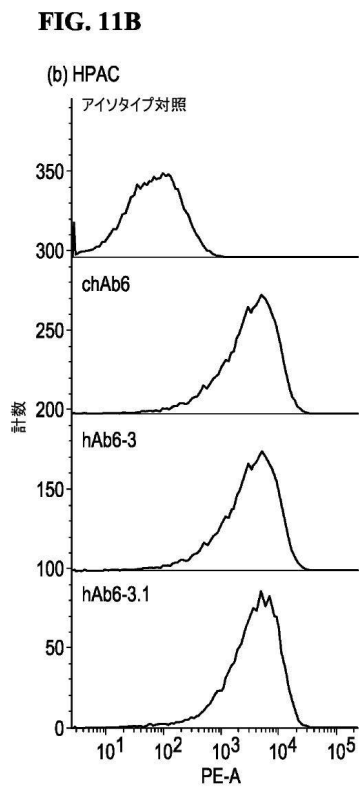
【図 1 0】



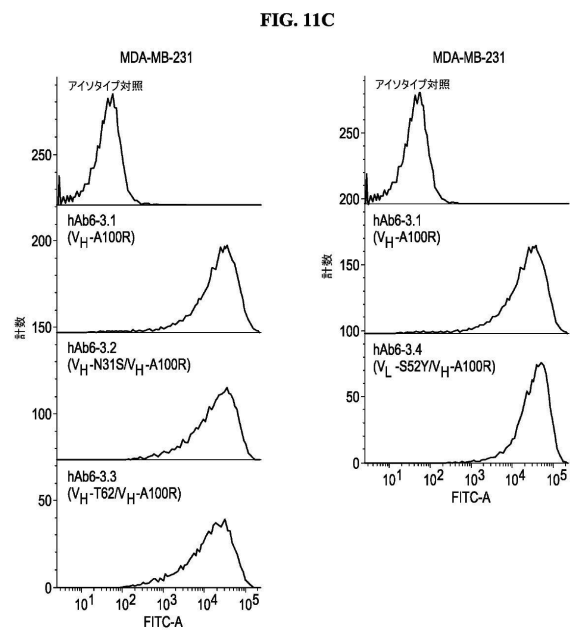
【図 1 1 A】



【図 1 1 B】



【図 1 1 C】



10

20

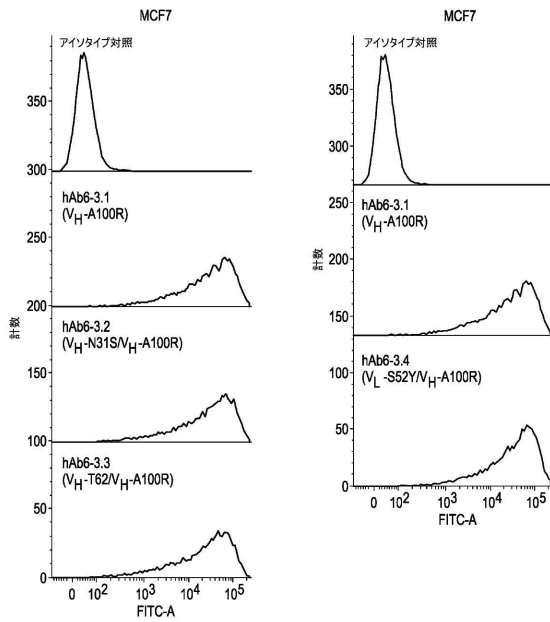
30

40

50

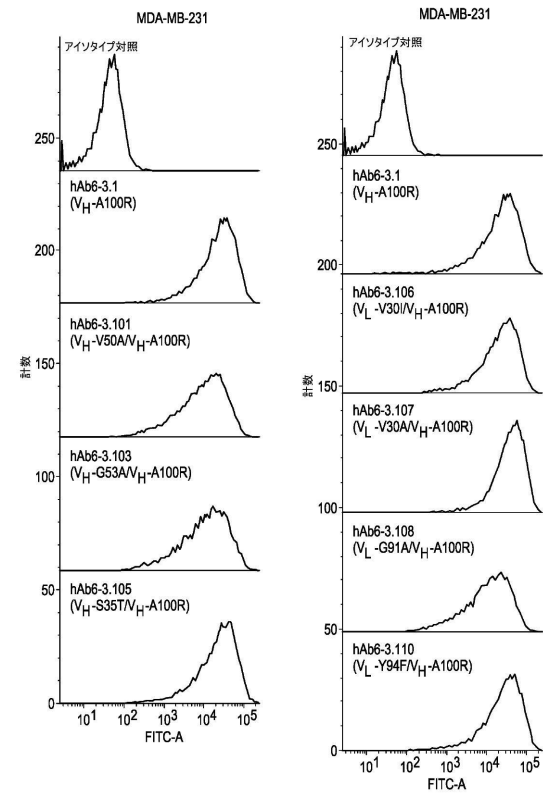
【図 11D】

FIG. 11D



【図 11E】

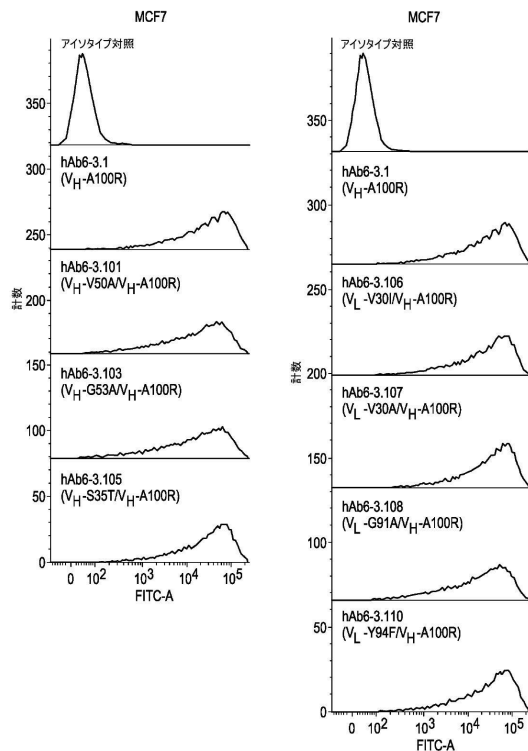
FIG. 11E



【図 11F】

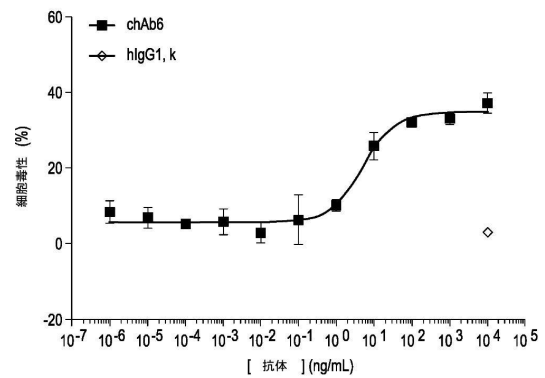
FIG. 11F

保存的CDR修飾を有する例示的なトヒ化Ab6の、
MCF7細胞株への結合の実証



【図 12】

FIG. 12



10

20

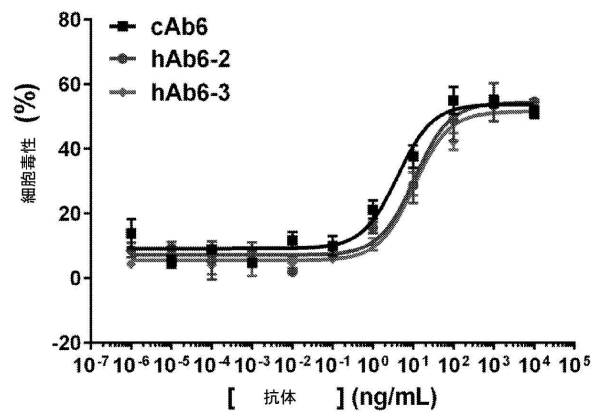
30

40

50

【 図 1 3 】

FIG. 13



【 図 1 4 】

FIG. 14A

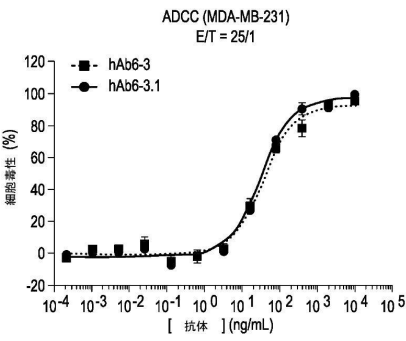
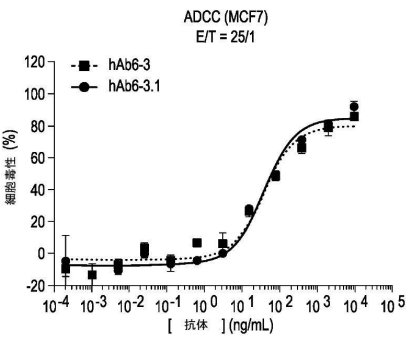
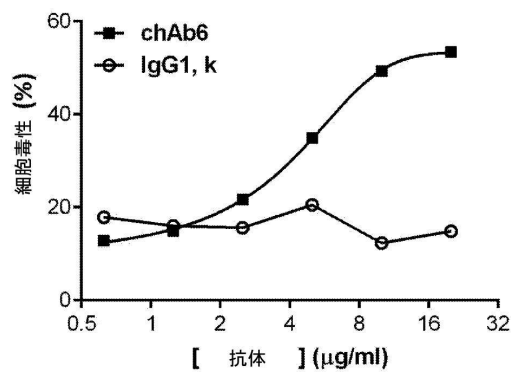


FIG. 14B



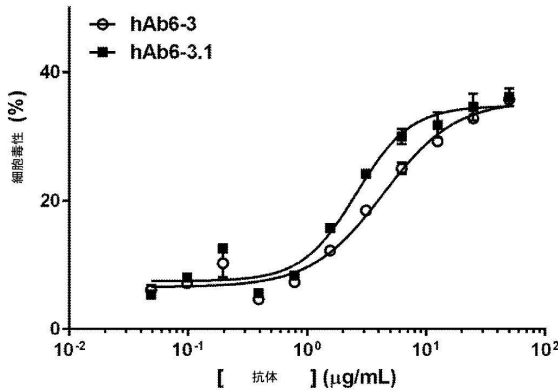
【 図 1 5 A 】

FIG. 15A



【 図 1 5 B 】

FIG. 15B



10

20

30

40

50

【図 16】

FIG. 16A

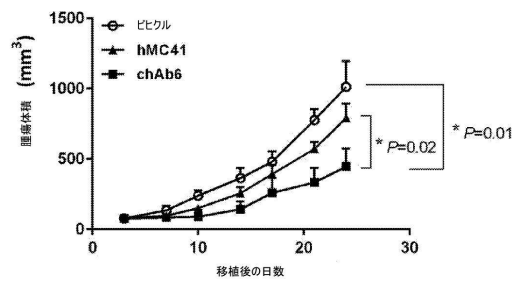
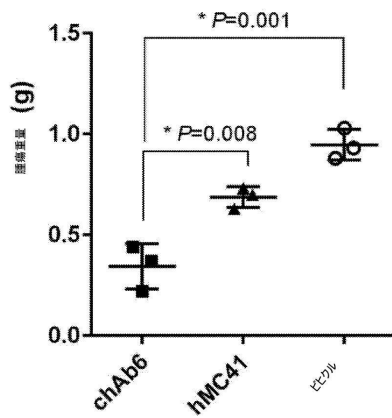
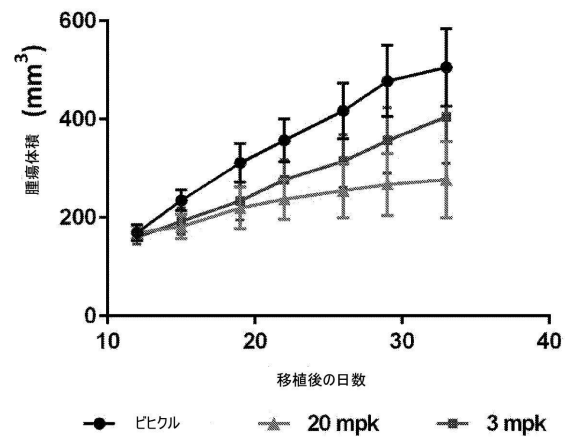


FIG. 16B



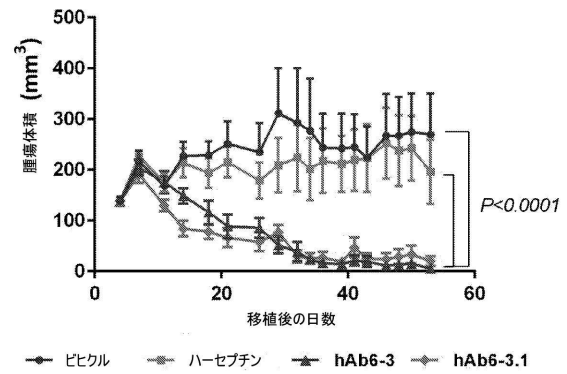
【図 18】

FIG. 18



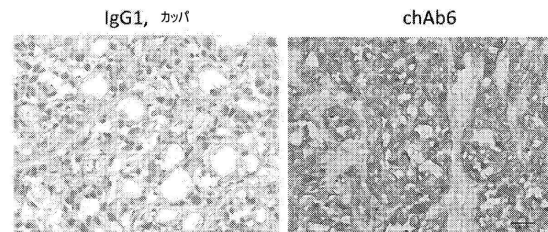
【図 17】

FIG. 17



【図 19】

FIG. 19



10

20

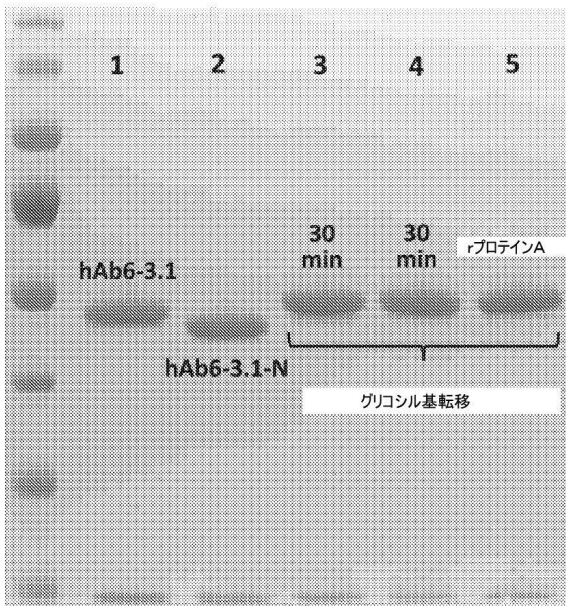
30

40

50

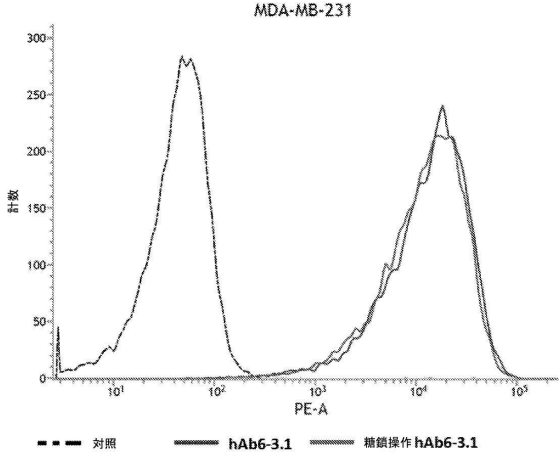
【 図 2 0 】

FIG. 20



【 図 2 1 】

FIG. 21

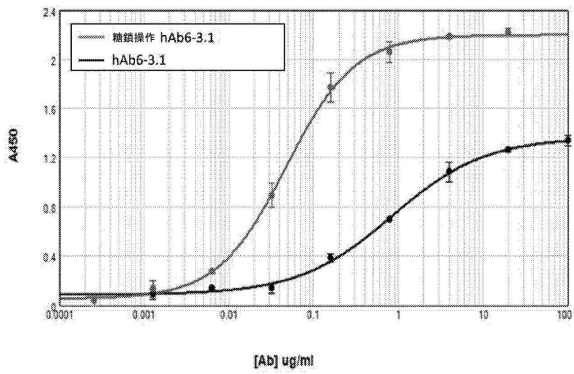


10

20

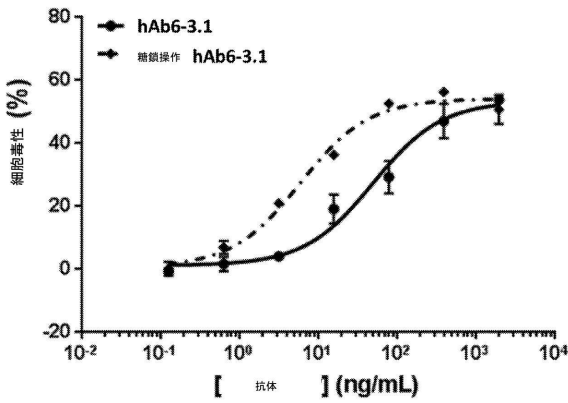
【 図 2 2 】

FIG. 22



【 図 2 3 】

FIG. 23

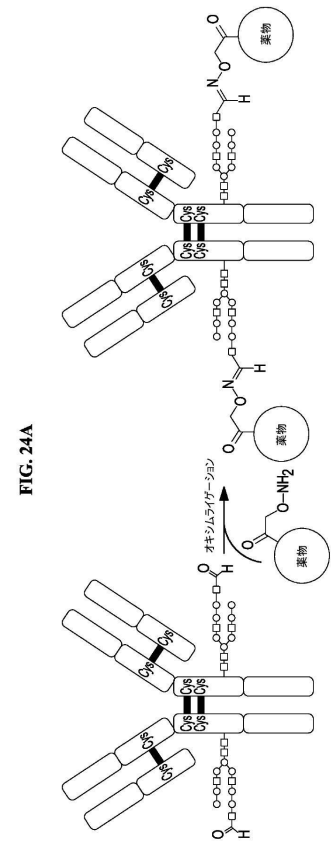


30

40

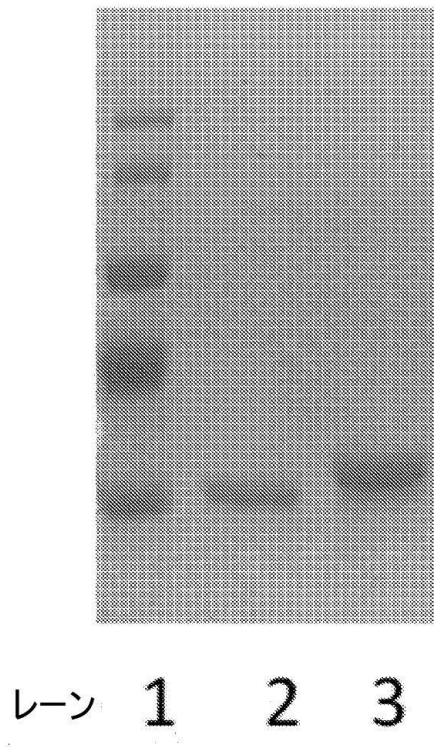
50

【図 2 4 A】



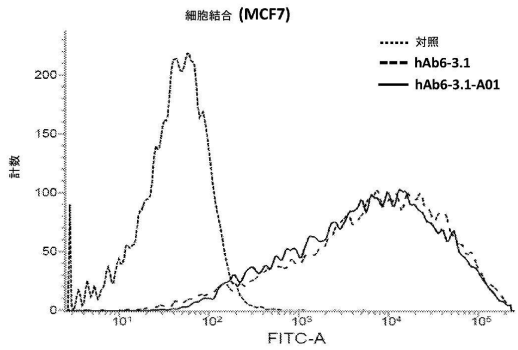
【図 2 4 B】

FIG. 24B



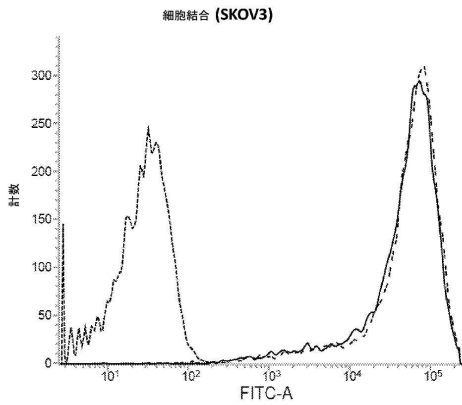
【図 2 5 A】

FIG. 25A



【図 2 5 B】

FIG. 25B



10

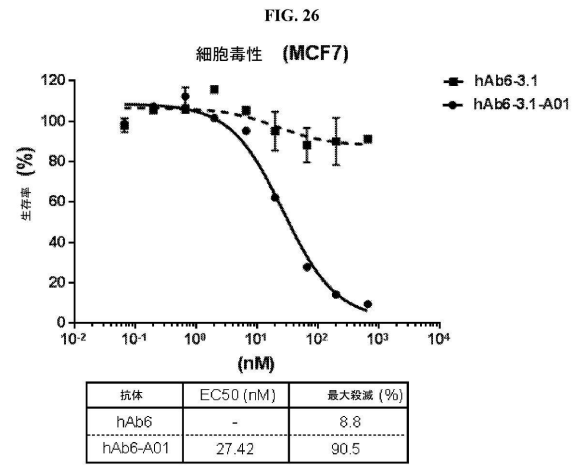
20

30

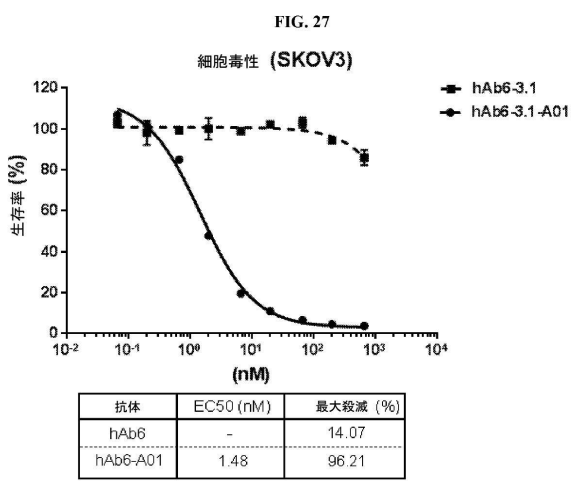
40

50

【 図 2 6 】



【 図 2 7 】



10

【 配 列 表 】

0007213549000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
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	T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	S
		G 0 1 N	33/574	B

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 リン, ナン - ホーン

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 0 6 1, バーノン ヒルズ, ウェスト シカモア ストリート 4 3 2

(72)発明者 ファン, チウ - チェン

台湾 1 1 5 タイペイ, ナンカン ディストリクト, パーク ストリート, ナンバー 3, ビル
ディング エフ, 1 8 エフ, シーエイチオー ファーマ インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 チェン, チェン - ユー

台湾 1 1 5 タイペイ, ナンカン ディストリクト, パーク ストリート, ナンバー 3, ビル
ディング エフ, 1 8 エフ, シーエイチオー ファーマ インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 チュー, クオ - チン

台湾 1 1 5 タイペイ, ナンカン ディストリクト, パーク ストリート, ナンバー 3, ビル
ディング エフ, 1 8 エフ, シーエイチオー ファーマ インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ウォン, チ - ヒューイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 6 7, ランチョ サンタ フェ, ポスト オフィス ボッ
クス 8 1 5 4

(72)発明者 ウー, ハン - チュン

台湾 1 1 5 タイペイ, ナンカン ディストリクト, パーク ストリート, ナンバー 3, ビル
ディング エフ, 1 8 エフ, シーエイチオー ファーマ インコーポレイテッド 気付

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 1 0 2 1 5 1 (U S , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

A 6 1 K

A 6 1 P

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)

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