

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5816188号  
(P5816188)

(45) 発行日 平成27年11月18日 (2015.11.18)

(24) 登録日 平成27年10月2日 (2015.10.2)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
請求項の数 29 (全 76 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2012-540240 (P2012-540240)	(73) 特許権者	507196491
(86) (22) 出願日	平成22年11月24日 (2010.11.24)		アレシア・バイオセラピューティクス・インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2013-511288 (P2013-511288A)		カナダ・H 2 X・1 Y 4・ケベック・モン
(43) 公表日	平成25年4月4日 (2013.4.4)		トリオール・SB-5100・アヴニュ・
(86) 国際出願番号	PCT/CA2010/001882		プレジダン・ケネディ・141
(87) 国際公開番号	W02011/063523	(73) 特許権者	595006223
(87) 国際公開日	平成23年6月3日 (2011.6.3)		ナショナル リサーチ カウンシル オブ
審査請求日	平成25年10月25日 (2013.10.25)		カナダ
(31) 優先権主張番号	61/263,865		カナダ国, オンタリオ ケー1エー Oア
(32) 優先日	平成21年11月24日 (2009.11.24)		ール6, オタワ, モントリオール ロード
(33) 優先権主張国	米国 (US)		1200
		(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗クラステリン抗体及び抗原結合フラグメント並びに腫瘍容積を低減するためのそれらの使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 8 に記載された軽鎖可変領域及び配列番号 7 に記載された重鎖可変領域を含む、クラステリンに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 2】

定常領域のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 3】

前記定常領域のアミノ酸がヒト抗体に由来する、請求項 2 に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 4】

ヒト I g G 2 定常領域を含む、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 5】

配列番号 10 に記載された軽鎖及び配列番号 9 に記載された重鎖を含む、請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 6】

前記抗原結合フラグメントが s c F v、F a b、F a b' 又は (F a b')<sub>2</sub> である、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 7】

細胞毒性部分と結合している、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその

抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

検出可能部分と結合している、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域及び／若しくは重鎖可変領域、又は、請求項 5 に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメントの軽鎖及び／若しくは重鎖をコードする、単離された核酸。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の単離された核酸を含む、ベクター。

10

【請求項 11】

請求項 9 に記載の単離された核酸若しくは請求項 10 に記載のベクターを含む、又は請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメントを発現する、単離された細胞。

【請求項 12】

前記細胞が哺乳類細胞である、請求項 11 に記載の単離された細胞。

【請求項 13】

請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント及び薬理的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 14】

20

クラステリン又はクラステリン変異体を発現する腫瘍細胞を含む癌の治療に用いる、又は、転移の予防若しくは治療に用いるための、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

クラステリン又はクラステリン変異体を発現する腫瘍細胞を含む癌の検出に用いるための、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物及び化学療法剤を含む併用療法用のキット。

【請求項 17】

前記化学療法剤がタキサンを含む、請求項 16 に記載のキット。

30

【請求項 18】

前記タキサンがパクリタキセル又はドセタキセルである、請求項 17 に記載のキット。

【請求項 19】

前記医薬組成物が化学療法剤と同時に投与されるものである、請求項 16 ないし 18 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 20】

前記医薬組成物が化学療法剤と異なる時間間隔で投与されるものである、請求項 16 ないし 18 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 21】

請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の抗体若しくはその抗原結合フラグメント、請求項 9 に記載の単離された核酸又は請求項 10 に記載のベクターを含む、1 つまたは複数のバイアルを含むキット。

40

【請求項 22】

請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む、クラステリンを発現又は分泌する細胞を含む腫瘍の体積を縮小させる医薬。

【請求項 23】

前記腫瘍が、子宮内膜癌、乳癌、肝細胞癌、前立腺癌、腎細胞癌、卵巣癌、膀胱癌及び結腸直腸癌からなる群から選択される、請求項 22 に記載の医薬。

【請求項 24】

請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む、

50

癌細胞の上皮間葉転換の治療のための医薬。

【請求項 25】

請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントを含む、癌の治療のための医薬組成物。

【請求項 26】

化学療法剤との併用療法において使用されるための、請求項 25 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

癌の治療のための化学療法剤との併用療法において使用されるための、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 28】

癌の治療又は転移の低減のための医薬の製造における、請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントの使用。

【請求項 29】

癌の治療又は転移の低減において使用するための、請求項 1 ないし 8 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗クラステリン抗体及び腫瘍容積を低減するためのそれらの使用に関する。本発明は、さらに詳細には、クラステリンと結合するヒト化抗体、ハイブリッド抗体及び抗原結合フラグメント、並びに腫瘍容積を低減するため、腫瘍成長及び転移を阻害するためのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

最も一般的なヒト悪性腫瘍であるがん腫は、上皮細胞から生じる。上皮がんの進行は、細胞と細胞との接触の中断並びに遊走性（間葉様）表現型の獲得から始まる。上皮間葉移行（EMT）と呼ばれるこの現象は、後期腫瘍進行及び転移における重要な事象であると考えられる。

【0003】

分泌されたタンパク質 TGF- $\beta$  は、最初は主に、上皮起源の腫瘍細胞に対するその成長阻害作用により腫瘍成長を抑制し、その後、後期では、腫瘍細胞進行及び転移を促進する。TGF- $\beta$  が腫瘍進行を促進できる 1 つの機構は、EMT の誘導による。

【0004】

TGF- $\beta$  が発がんにおいて果たす二重の役割のために、TGF- $\beta$  の直接的阻害剤は、後期腫瘍に有益であり得る一方、前新生物病巣も促進し得るので、危険である可能性がある。さらに良好な治療薬は、TGF- $\beta$  の腫瘍抑制剤成長阻害作用は影響を受けないまま残しつつ、TGF- $\beta$  の発がん促進性 EMT 促進作用を阻害するものであり得る。そのような阻害剤を開発するためには、経路の 1 つの分岐におけるメディエータが EMT 応答に関与するが、TGF- $\beta$  に対する成長阻害応答には関与しないような、TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の分岐点がある地点を特定することが必要であろう。TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の EMT 促進分岐にのみあるメディエータを阻害する治療法は、前がん病変部の加速に対してはほとんど又は全く影響を及ぼさず、転移を減少させるであろう。

【0005】

TGF- $\beta$  EMT 促進作用を促進又は媒介するが、TGF- $\beta$  の成長阻害作用には関与しない TGF- $\beta$  シグナル経路特異的成分は、一般的には特定されていない。

【0006】

対照的に、腫瘍抑制作用（成長阻害）は損なわれないうまま、TGF- $\beta$  の腫瘍形成促進性 EMT 作用に干渉（促進に対立するものとして）することができる内因性タンパク質（YY1 核因子）は特定されている（Kurisaki et al., 2004）。

【0007】

10

20

30

40

50

T G F - リガンド、受容体及び S m a d シグナル伝達タンパク質を標的とする阻害剤は公知である。具体的には、可溶性受容体外部ドメイン、抗体及び他の結合タンパク質は、T G F - リガンドと相互作用し、それらを細胞表面受容体から隔離することによって、アンタゴニストとして作用することができる。I 型 T G F - 受容体のキナーゼ活性を阻害する小分子が利用可能であり、S m a d シグナル伝達タンパク質の内因性阻害剤も知られている。これらのシグナル伝達経路成分はすべて、T G F - の発がん促進作用及び抗発がん作用の両方に関与するので、それらを標的とするこれらの阻害剤は、後期腫瘍に有効であり得るが、前がん病変部を促進する可能性もある。

2006年9月13日に出願され、2007年3月22日に国際公開第2007/030930号で公開された国際特許出願第PCT/CA2006/001505号は、クラ

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】国際公開第2007/030930号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0009】

本発明は、その一態様では、クラステリンに対して特異的に結合することができ、ヒト化軽鎖可変領域及び/又はヒト化重鎖可変領域を含む抗体に関する。

【0010】

さらに詳細には、本発明は、クラステリンと特異的に結合できる非ヒト親抗体のヒト化抗体並びにそのハイブリッド抗体及び抗原結合フラグメントを提供する。

【0011】

本発明のヒト化又はハイブリッド抗体は、非ヒト相補性決定領域アミノ酸残基及び天然ヒト抗体のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基を含み得る軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む。

30

【0012】

本発明はまた、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む抗原結合フラグメントに関し、これは非ヒト相補性決定領域アミノ酸残基及びヒトフレームワーク領域アミノ酸残基を含み得る。

【0013】

本発明の抗体及び抗原結合フラグメントを用いて、クラステリンにより誘導される上皮間葉移行を阻害することができる。

【0014】

別の態様では、本発明は、腫瘍容積を低減する際に使用される抗クラステリン抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単離されたヒト抗体、ハイブリッド抗体又はそのフラグメント）及びそれを行うための方法に関する。

40

【0015】

ヒト化抗体の軽鎖可変領域及び/又は重鎖可変領域をコード化する単離された核酸、本明細書中に記載するハイブリッド抗体若しくは抗原結合フラグメント又は本明細書中に記載される単離された抗体も、本発明に含まれる。

【0016】

本明細書中に記載される核酸を含むベクター又は構築物も含まれる。本発明によれば、ベクターは、例えば制限されることなく、ほ乳類発現ベクター、細菌発現ベクターなどであり得る。

【0017】

50

本発明は更に、本発明の抗体若しくは抗原結合フラグメントを含むか又は発現するか、或いは本発明の核酸又はベクターを含む細胞にも関する。

【0018】

さらなる態様では、本発明は、例えば、本明細書中に記載するヒト化抗体、本明細書中に記載するハイブリッド抗体、本明細書中に記載する抗原結合フラグメント、本明細書中に記載する単離された抗体、本明細書中に記載する単離された核酸又は本明細書中に記載するベクターを含み得るバイアル（複数可）を含むキットを提供する。

【0019】

別の態様では、本発明は、例えば、本明細書中に記載するヒト化抗体、本明細書中に記載するハイブリッド抗体、本明細書中に記載する抗原結合フラグメント又は本明細書中に記載する単離された抗体及び薬剤的に許容される担体を含み得る医薬組成物に関する。

10

【0020】

本発明のさらに別の態様は、本明細書中に記載する医薬組成物及び化学療法剤を含む併用療法に関する。

【0021】

ヒト化若しくはハイブリッド抗クラステリン抗体又は抗原結合フラグメントを産生する方法並びにヒト化若しくはハイブリッド抗クラステリン抗体又は抗原結合フラグメントを用いてクラステリン発現又は分泌に関連する疾患を治療する方法も含まれる。

【0022】

本発明のさらなる範囲、適用性及び利点は、以下に記載する非限定的な詳細な説明から明らかになるであろう。しかし、この詳細な説明は、本発明の例示的实施形態を示すが、添付の図面を参照して、例としてのみ記載されると理解されるべきである。

20

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】マウス16B5抗クラステリン抗体の可変領域の相同性3Dモデル。CDRに名称が付されている（軽鎖ではL1、L2、L3、そして重鎖ではH1、H2、H3）。ヒトフレームワーク残基で置換されたマウスフレームワーク残基を球体モデルとして表示する。

【図2】マウス16B5、ヒト化16B5及び選択されたヒトフレームワークの配列アラインメント（NCBIデータベースリンクを記載）。Kababat付番を最上部に示す。CDRを強調する。復帰突然変異の候補残基を、CDRに対する近接性（5：5オングストローム以内）、表面露出（B：埋没）、及び対形成する可変ドメインとの接触にしたがって配列アラインメントの下で反転表示する。

30

【図3】16B5ネズミ及びヒト化抗クラステリン抗体の動態分析。

【図4】h16B5はがん細胞系の遊走をブロックする。h16B5は、マウス乳がん細胞に対するスクラッチアッセイでマウス16B6と少なくとも同程度に活性である。この図面は、種々の構造の抗体がインビトロで細胞の遊走をブロックする能力を示す。

【図5】h16B5の阻害はヒト前立腺がん細胞の浸潤性を低下させる。12ウェルプレートの底部を200μLのGrowth factor reduced matrigel（ベクトン・ジキンソン）で覆った。細胞（ $2.5 \times 10^4$ ）を、200μLのマトリゲル中に再懸濁させ、それをこの上に重ね、最終的に500μLの細胞特異的成長培地をマトリゲルの上部に添加した。h16B5をマトリゲルの各層並びに培地に8μg/mLの濃度で添加した。プレートを37℃で3週間までインキュベートし、この間に成長培地（+/-h16B5）を毎週補充した。矢印は上皮様細胞の部分を示す。

40

【図6】h16B5での前立腺がん腫瘍の治療は、腫瘍の成長を低減し、化学療法に対する応答を増大させる。DU145前立腺がん細胞（ $2 \times 10^6$ ）をSCIDマウスに皮下移植し、腫瘍サイズが約100mm<sup>3</sup>になるまで、成長させた。デジタルノギスを用いて腫瘍を隔週で測定し、腫瘍容積をL×W×Hとして算出した。各群には、治療を開始する前に無作為化した8匹の動物が含まれた。結果をmm<sup>3</sup>±標準誤差として表した。スチューデントT試験を用いてP値を算出した。

50

【図 7】マウス 2 1 B 1 2 抗クラステリン抗体の可変領域の相同性 3 D モデル。C D R に名称が付されている（軽鎖では L 1、L 2、L 3、そして重鎖では H 1、H 2、H 3）。ヒトフレームワーク残基で置換されたマウスフレームワーク残基を球体モデルとして表示する。

【図 8】マウス 1 6 B 5、ヒト化 2 1 B 1 2 及び選択されたヒトフレームワークの配列アラインメント（N C B I データベースリンクを提供）。K a b a t 付番を上部に示す。C D R を強調する。復帰突然変異の候補残基を、C D R に対する近接性（5：5 オングストローム以内）、表面露出（B：埋没）、及び対形成する可変ドメインとの接触にしたがって配列アラインメントの下で反転表示する。

【図 9】2 1 B 1 2 ネズミ及びヒト化抗クラステリン抗体の動態分析。

【図 1 0】h 1 6 B 5 は P C - 3 前立腺腫瘍の成長を阻害する。P C - 3 前立腺がん細胞（ $2 \times 10^6$ ）を S C I D マウスに皮下移植し、腫瘍サイズが約  $100 \text{ mm}^3$  になるまで、成長させた。デジタルノギスを用いて腫瘍を隔週で測定し、腫瘍容積を  $L \times W \times H$  として算出した。各群には、治療を開始する前に無作為化された 8 匹の動物が含まれた。結果を  $\text{mm}^3 \pm$  標準誤差として表した。

【図 1 1】クラステリンはヒト膵臓腫瘍において発現される。膵臓がん細胞系由来の腫瘍（図に示すとおり）を S C I D マウスにおいて成長させ、収集し、ホルマリン中で固定し、切片にし、そして h 1 6 B 5 を用いた免疫組織化学を使用して試験した。H R P 結合二次抗体を使用する標準的方法により陽性染色を可視化した。アイソタイプ対照抗体を用いて同じ条件下で負の対照を実施した。

【図 1 2】H 1 6 B 5 は膵臓がん細胞系の遊走を阻害する。P A N C - 1 細胞を、マトリゲルバリアを含む 2 4 ウェル T r a n s w e l l プレートの上側チャンバー中の無血清培地中に播種した。下側ウェルを、化学誘引物質として 1 0 % の F B S を含む培地で満たした。T G F 及びノ又は h 1 6 B 5（図に示すとおり）の存在下又は非存在下で 2 4 時間インキュベーションした後、マトリゲル層中の細胞の数を染色し、計数した。

【図 1 3】分泌されたクラステリンは、がん細胞において内在化される。組換えヒトクラステリンを 2 9 3 - 6 E 細胞において発現させ、精製し、そして市販のラベリングキット（インビトロゲン）を用いて A l e x a F l u o r 4 8 8 で標識した。B R I - J M 0 1 マウス乳がん細胞をカバーガラス上に播種し、 $250 \text{ ng/ml}$  の標識された分泌クラステリンで処理した。表示された時間で、細胞を氷冷 P B S で洗浄し、2 % のパラホルムアルデヒド中で固定した。スライドに A n t i f a d e G o l d をマウントし、蛍光顕微鏡で画像を作成した。

【図 1 4】H 1 6 B 5 は、がん細胞における分泌されたクラステリンの内在化を阻害する。図 1 3 について記載するようにして実験を実施した。H 1 6 B 5 を  $10 \mu\text{g/ml}$  で添加した。

【図 1 5】ヒトクラステリン（N P \_ 0 0 1 8 2 2）とネズミクラステリン（N P \_ 0 3 8 5 2 0）との間の相同性の領域を示す。

【図 1 6】4 T 1 マウス乳房腫瘍から生成させた固定凍結切片において発現させた h 1 6 B 5（この図中では A B - 1 6 B 5 として表示）のネズミクラステリンに対する結合を示す。免疫組織化学を用いて実験を実施し、H R P 結合二次抗体を用いて検出を行った。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 4】

本発明は、その一態様では、クラステリンに特異的に結合することができ、ヒト化軽鎖可変領域及びノ又はヒト化重鎖可変領域を含む抗体に関する。

【0 0 2 5】

ヒトクラステリンの配列は、R e f S e q 受入番号；N M \_ 0 0 1 8 3 1 . 2（タンパク質 i d . = N P \_ 0 0 1 8 2 2）で見いだすことができ、一方、ネズミクラステリンの配列は、R e f S e q 受入番号；N M \_ 0 1 3 4 9 2 . 2（タンパク質 i d . = N P \_ 0 3 8 5 2 0）で見いだすことができる。

【0 0 2 6】

10

20

30

40

50

本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、クラステリンのネズミ及び／又はヒト形に結合することができる。本発明の抗体又は抗原結合フラグメントはまた、ヒト又はネズミクラステリンと、例えば少なくとも75%（例えば、80%、85%、90%、95%、99%）のアミノ酸同一性を有するクラステリンの天然に存在する変異体並びに合成変異体と結合することもできる。

【0027】

本発明はしたがって、クラステリンと特異的に結合できる非ヒト親抗体のヒト化抗体又はその抗原結合フラグメント並びにハイブリッド抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。

【0028】

本発明の実施形態によれば、ヒト化又はハイブリッド抗体は、クラステリンを発現又は分泌する腫瘍細胞の成長を阻害（低減）することができる。

【0029】

本発明のさらなる実施形態によれば、ヒト化又はハイブリッド抗体は、クラステリンを発現又は分泌する細胞を含む腫瘍の容積を低減することができる。

【0030】

本発明の別の実施形態によれば、ヒト化又はハイブリッド抗体は、クラステリンを発現若しくは分泌する腫瘍細胞の遊走又は浸潤を阻害（低減）することができる。

【0031】

したがって、本発明のさらに別の実施形態によれば、ヒト化又はハイブリッド抗体は、クラステリンを発現又は分泌する腫瘍細胞から起こる転移を阻害（低減）することができる。

【0032】

別の態様では、本発明は、クラステリン発現細胞を含む腫瘍の容積を低減するための方法であって、必要とするほ乳類に、抗クラステリン抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単離されたヒト抗体、ハイブリッド抗体又はそのフラグメント）を投与することを含み得る方法に関する。当該方法は、さらに詳細には、キメラ、ヒト化又はハイブリッド抗体を投与することを想定する。

【0033】

一実施形態では、ハイブリッド抗体又はそのフラグメントは、例えば、非ヒト抗体の軽鎖可変領域及びヒト化抗体の重鎖可変領域を含み得る。

【0034】

別の実施形態では、ハイブリッド抗体又はそのフラグメントは、例えば、非ヒト抗体の軽鎖可変領域及びヒト化抗体の重鎖可変領域を含み得る。

【0035】

「抗体」という用語は、無傷抗体、モノクローナル、（完全若しくは部分）ヒト化、ハイブリッド、キメラ又はポリクローナル抗体並びに単離されたヒト抗体を指す。「抗体」という用語はまた、二重特異的抗体などの多特異的抗体も含み得る。ヒト抗体は、通常、それぞれが可変領域及び定常領域を含む2つの軽鎖及び2つの重鎖から構成される。軽鎖可変領域は、フレームワーク領域に並んで配置されているCDRL1、CDRL2及びCDRL3として本明細書中では特定される3つのCDRを含む。重鎖可変領域は、フレームワーク領域に並んで配置されているCDRH1、CDRH2及びCDRH3として本明細書中では特定される3つのCDRを含む。

【0036】

「ヒト化抗体」という用語は、非ヒトCDRアミノ酸残基並びにヒト抗体レパートリー由来であるその重鎖及び／又は軽鎖フレームワーク領域のかなりの部分を含む1～6個のCDRを含む抗体を指す。いくつかの例では、ヒト化抗体の重鎖及び／又は軽鎖フレームワーク領域の全体が、ヒト抗体レパートリー（天然ヒト抗体）によりコード化される（コード化可能な）抗体と同一であり得る。他の例では、ヒト化抗体の重鎖及び／又は軽鎖フレームワーク領域は、ヒト化されようとする非ヒト抗体由来の1～30個のアミノ酸を含

10

20

30

40

50

み得、残りの部分は天然ヒト抗体由来である。さらなる例では、ヒト化抗体は、1～6個の完全非ヒトCDRを含み得、多くの場合、6個のCDRは完全に非ヒトである。さらに別の例では、「ヒト化抗体」は、ヒト又は他の起源（ほ乳類由来）の定常領域を含み得る。

#### 【0037】

「ハイブリッド抗体」という用語は、ヒト化されているか又は天然ヒト抗体（クラスチリンについて親和性を有する）由来のその重鎖若しくは軽鎖可変領域（その重鎖若しくは軽鎖）のうちの1つを含む抗体を指し、重鎖若しくは軽鎖可変領域（重鎖若しくは軽鎖）の残りは非ヒトのままである。

#### 【0038】

「キメラ抗体」という用語は、非ヒト可変領域（複数可）及びヒト定常領域を有する抗体を指す。

#### 【0039】

「天然ヒト抗体」という用語は、ヒト抗体レパートリー、すなわち生殖細胞系配列によってコード化される（コード化可能な）抗体を指す。

#### 【0040】

本明細書中で用いられる場合、単離されたヒト抗体は、この抗体が、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスを免疫化することによるか、又はヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリをスクリーニングすることにより、ヒト免疫グロブリン配列を有する系から得られる場合、特定の生殖細胞系配列から「誘導」される。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列から「誘導」される単離されたヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖細胞系免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較することにより、そのようなものとして同定することができる。選択されたヒト抗体は、典型的には、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によりコード化されるアミノ酸配列に対してアミノ酸配列において少なくとも90%同一であり、他の種の生殖細胞系免疫グロブリンアミノ酸配列（例えば、ネズミ生殖細胞系配列）と比較した場合に、そのヒト抗体をヒトであるとして特定するアミノ酸残基を含む。ある場合では、ヒト抗体は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコード化されるアミノ酸配列に対してアミノ酸において少なくとも95%、又はさらには少なくとも96%、97%、98%、又は99%同一であり得る。典型的には、特定のヒト生殖細胞系配列から誘導されるヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコード化されるアミノ酸配列と10より多くのアミノ酸相違を示すことはない。ある場合では、ヒト抗体は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコード化されるアミノ酸配列と5、又はさらには4、3、2、若しくは1より多くのアミノ酸相違を示すことはない。

#### 【0041】

「抗原結合フラグメント」という用語は、本明細書中で用いられる場合、抗原と結合する能力を保持する抗体の1以上のフラグメントを指す。抗体の抗原結合機能は、無傷抗体のフラグメントによって発揮され得ることが示されている。抗体の「抗原結合フラグメント」という用語に含まれる結合フラグメントの例としては、(i)  $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$  及び  $C_{H1}$  ドメインから構成される一価フラグメントである Fab フラグメント；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合した2つの Fab フラグメントを含む二価フラグメントである  $F(ab')_2$  フラグメント；(iii)  $V_H$  及び  $C_{H1}$  ドメインからなる Fd フラグメント；(iv) 抗体の単一アームの  $V_L$  及び  $V_H$  ドメインからなる Fv フラグメント、並びに (v)  $V_H$  ドメインから構成される dAb フラグメント (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546) が挙げられる。さらに、Fv フラグメントの2つのドメインである  $V_L$  及び  $V_H$  は、別々の遺伝子によってコードされるが、組換え法を用い、 $V_L$  及び  $V_H$  領域が対合して一価分子（単鎖 Fv (scFv)）として知られる；例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; 及び Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 を参照）を形成する、ポリペプチド一本鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって、これらを結合させることができる。そのような一本鎖

10

20

30

40

50



抗体もまた、抗体の「抗原結合フラグメント」という用語に含まれることが意図される。さらに、抗原結合フラグメントは、(i)免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドと融合した結合ドメインポリペプチド(例えば、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、又はリンカーペプチドにより軽鎖可変領域に融合した重鎖可変領域)、(ii)ヒンジ領域と融合した免疫グロブリン重鎖CH2定常領域、及び(iii)CH2定常領域と融合した免疫グロブリン重鎖CH3定常領域を含む結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質を含む。ヒンジ領域は、二量化を防止するように、1以上のシステイン残基をセリン残基と置換することにより修飾することができる。そのような結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質は、米国特許第2003/0118592号及び米国特許第2003/0133939号でさらに開示されている。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の通常の技術を用いて得られ、当該フラグメントは、無傷抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。

10

#### 【0042】

典型的な抗原結合部位は、軽鎖免疫グロブリン及び重鎖免疫グロブリンの対合によって形成される可変領域から構成される。抗体可変領域の構造は、非常に一貫し、非常に類似した構造を示す。これらの可変領域は、典型的には、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる3個の超可変領域を間に挟んだ比較的相同性のフレームワーク領域(FR)から構成される。抗原結合フラグメントの全体的な結合活性は、多くの場合、CDRの配列によって決定される。しかしながら、FRは、多くの場合、最適の抗原結合のためのCDRの適切な位置決め及び三次元のアラインメントに關与する。

20

#### 【0043】

本発明のヒト化又はハイブリッド抗体は、非ヒト相補性決定領域アミノ酸残基及び天然ヒト抗体のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基を含み得る重鎖可変領域並びに相補性軽鎖を含み得る。

#### 【0044】

本発明のヒト化又はハイブリッド抗体は、非ヒト相補性決定領域アミノ酸残基及び天然ヒト抗体のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基並びに相補性重鎖を含み得る軽鎖可変領域を含み得る。

#### 【0045】

本発明のヒト化又はハイブリッド抗体は、転移、腫瘍細胞遊走若しくは浸潤を阻害し得るか、又は、例えばがん細胞をはじめとするクラステリン発現細胞の成長を阻害し得る。実際に、本出願者は、本発明のヒト化又はハイブリッド抗体をはじめとする抗クラステリン抗体がインビボで腫瘍容積を減少させるという予想外の発見にたどり着いた。或いは、本発明のヒト化又はハイブリッド抗体を用いてクラステリン発現細胞を検出することができる。

30

#### 【0046】

非ヒト親抗体のヒト化のために選択される天然ヒト抗体は、非ヒト親抗体の(モデル化された)可変領域に類似した(重ねあわせることができる)三次元構造を有する可変領域を含み得る。したがって、ヒト化又はハイブリッド抗体は、非ヒト親抗体と類似した三次元構造を有する可能性がより高い。

40

#### 【0047】

本発明のヒト化抗体は、クラステリンに対して高い親和性を有する。実際に、ヒト化抗体は、組換えモノマークラステリンと $4.49 \times 10^{-9} \text{ M} \pm 8.5 \times 10^{-10}$ 又はそれより良好な親和性で結合することが本明細書で示されている。

#### 【0048】

本発明によれば、ヒト化又はハイブリッド抗体軽鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基は天然ヒト抗体軽鎖フレームワーク領域由来である。ヒト化目的で選択される天然ヒト抗体の軽鎖フレームワーク領域は、例えば、非ヒト親抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも70%の同一性を有する。好ましくは、ヒト化目的のために選択される天然ヒト抗体は、非ヒト親抗体の軽鎖相補性決定領域とその軽鎖相補性決定領域において同じか

50

又は実質的に同じ数のアミノ酸を有し得る。

【 0 0 4 9 】

本発明の他の実施形態では、ヒト化又はハイブリッド抗体軽鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基は、非ヒト親抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも 75、80、83 % (又はそれ以上) の同一性を有する天然ヒト抗体軽鎖フレームワーク領域由来である。

【 0 0 5 0 】

また本発明によれば、ヒト化又はハイブリッド抗体重鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基は、非ヒト親抗体の重鎖フレームワーク領域と少なくとも 70 % の同一性を有する天然ヒト抗体重鎖フレームワーク領域由来である。好ましくは、ヒト化目的のために選択される天然ヒト抗体は、非ヒト親抗体の重鎖相補性決定領域とその重鎖相補性決定領域において同じか又は実質的に同じ数のアミノ酸を有し得る。

【 0 0 5 1 】

本発明の他の実施形態では、ヒト化又はハイブリッド抗体重鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基は、非ヒト親抗体の重鎖フレームワーク領域と少なくとも 73、75、80 % の同一性を有する天然ヒト抗体重鎖フレームワーク領域由来である。

【 0 0 5 2 】

本発明の実施形態では、ヒト化又はハイブリッド抗体の重鎖可変領域は、したがって少なくとも 1 つの非ヒト相補性決定領域を含み得る。

【 0 0 5 3 】

或いは、本発明の他の実施形態では、ヒト化又はハイブリッド抗体の重鎖可変領域は、少なくとも 2 つの非ヒト相補性決定領域又はさらには 3 つの非ヒト相補性決定領域を含み得る。

【 0 0 5 4 】

本発明のさらなる実施形態では、軽鎖可変領域は少なくとも 1 つの非ヒト相補性決定領域を含み得る。

【 0 0 5 5 】

或いは、本発明のさらなる実施形態では、軽鎖可変領域は、少なくとも 2 つの非ヒト相補性決定領域又はさらには 3 つの非ヒト相補性決定領域を含む。

【 0 0 5 6 】

ヒト化抗体はしたがって、非ヒト抗体の 6 つの C D R 全てを含み得る。二価ヒト化抗体の場合、12 の C D R は全て非ヒト抗体由来であり得る。

【 0 0 5 7 】

ヒト化又はハイブリッド抗体により検出され得るクラステリン発現細胞は、がん細胞を含む。ヒト化又はハイブリッド抗体を用いて、クラステリン発現がん細胞、特にヒトがん細胞の成長を阻害することもできる。

【 0 0 5 8 】

数種のヒトがん細胞、なかでも子宮内膜がん、乳がん、肝細胞がん、前立腺がん、腎細胞がん、卵巣がん、結腸直腸がん、膵臓がん腫などの細胞は、クラステリンを発現又は分泌することが示されている。

【 0 0 5 9 】

本発明の実施形態の一例には、例えば、本明細書中で記載される天然ヒト抗体重鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基と、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R H 2 及び配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 からなる群から選択される重鎖 C D R 並びにそれらの組み合わせ又は配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 12 のアミノ酸配列を有する C D R H 2 及び配列番号 13 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 からなる群から選択される重鎖 C D R 並びにそれらの組み合わせとを含むヒト化若しくはハイブリッド抗体が含まれる。

【 0 0 6 0 】

別の例示的实施形態では、ヒト化又はハイブリッド抗体は、本明細書中で記載される天

10

20

30

40

50

然ヒト抗体重鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基と、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R H 2 及び配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 からなる群から選択される少なくとも 2 つの重鎖 C D R 又は配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する C D R H 2 及び配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 からなる群から選択される少なくとも 2 つの重鎖 C D R 並びにそれらの組み合わせとを含み得る。

【 0 0 6 1 】

或いは、別の例示的实施形態では、本発明のヒト化又はハイブリッド抗体は、本明細書中で記載される天然ヒト抗体重鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基と、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R H 2 及び配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 又は配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する C D R H 2 及び配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 とを含み得る。

【 0 0 6 2 】

本発明のさらに具体的な実施形態では、ヒト化又はハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント）は、配列番号 2 6（h 1 6 B 5 V L コンセンサス 1）を含む軽鎖可変領域を含み得る：

【 化 1 】

DIVMXQSPXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQXP<sub>1</sub>KLLIYWA  
STRESGVPDRFXGSGSGTDFTLT<sub>1</sub>ISSXQAEDXAVYYCKQSYNLWTFGXGTKLEXK

ここで、X により特定される少なくとも 1 つのアミノ酸は、配列番号 2 5 で記載されるポリペプチド中の対応するアミノ酸（ネズミ 1 6 B 5 V L）と比較すると 1 つのアミノ酸置換である。このアミノ酸置換は、例えば、保存的であり得るか、又は非保存的であり得る。本発明によれば、アミノ酸置換は保存的であり得る。

【 0 0 6 3 】

ヒト化若しくはハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント）は、配列番号 2 7 を含む軽鎖可変領域（1 6 B 5 V L コンセンサス 2）を含み得る：

【 化 2 】

DIVMX<sub>a1</sub>QSPX<sub>a2</sub>SLAVSX<sub>a3</sub>GEX<sub>a4</sub>TX<sub>a5</sub>CKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQX<sub>a8</sub>  
PKLLIYWASTRESGVPDRFX<sub>a9</sub>GSGSGTDFTLT<sub>1</sub>ISSX<sub>a10</sub>QAEDX<sub>a11</sub>AVYYCKQSYNLW  
TFGX<sub>a12</sub>GTKLEX<sub>a13</sub>K

ここで、X<sub>a1</sub> は、T 又は S などの中性親水性アミノ酸であり得；

ここで、X<sub>a2</sub> は、例えば D 又は S であり得；

ここで、X<sub>a3</sub> は、L 又は A などの疎水性アミノ酸であり得；

ここで、X<sub>a4</sub> は、R 又は K などの塩基性アミノ酸であり得；

ここで、X<sub>a5</sub> は、A 又は V などの疎水性アミノ酸であり得；

ここで、X<sub>a6</sub> は、I 又は M などの疎水性アミノ酸であり得；

ここで、X<sub>a7</sub> は、例えば N 又は S であり得；

ここで、X<sub>a8</sub> は、例えば P 又は S であり得；

ここで、X<sub>a9</sub> は、S 又は T などの中性親水性アミノ酸であり得；

ここで、X<sub>a10</sub> は、L 又は V などの疎水性アミノ酸であり得；

ここで、X<sub>a11</sub> は、V 又は L などの疎水性アミノ酸であり得；

ここで、X<sub>a12</sub> は、例えば Q 又は G であり得；

ここで、X<sub>a13</sub> は、例えば I 又は F であり得、そして；

ここで、軽鎖可変領域は、配列番号 2 5 と比べて、前記アミノ酸置換のうちの少なくとも 1 つを含み得る。

## 【 0 0 6 4 】

ヒト化若しくはハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント）は、配列番号 28 を含む軽鎖可変領域（16 B 5 V L コンセンサス 3）を含み得る：  
【 化 3 】

DIVMX<sub>a1</sub>QSPX<sub>a2</sub>SLAVSX<sub>a3</sub>GEX<sub>a4</sub>X<sub>a5</sub>TX<sub>a6</sub>X<sub>a7</sub>CKSSQSLLNSRTRKKNYLAWYQQKPGQX  
a8PKLLIYWASTRESGVPDRFX<sub>a9</sub>GSXSGTDFTLTISSX<sub>a10</sub>QAEDX<sub>a11</sub>AVYYCKQSYNLW  
TFGX<sub>a12</sub>GTKLEX<sub>a13</sub>K

ここで、X<sub>a1</sub> は、例えば T 又は S であり得；

10

ここで、X<sub>a2</sub> は、D 又は S であり得；

ここで、X<sub>a3</sub> は、例えば L 又は A であり得；

ここで、X<sub>a4</sub> は、例えば R 又は K であり得；

ここで、X<sub>a5</sub> は、例えば A 又は V であり得；

ここで、X<sub>a6</sub> は、例えば I 又は M であり得；

ここで、X<sub>a7</sub> は、例えば N 又は S であり得；

ここで、X<sub>a8</sub> は、例えば P 又は S であり得；

ここで、X<sub>a9</sub> は、例えば S 又は T であり得；

ここで、X<sub>a10</sub> は、例えば L 又は V であり得；

ここで、X<sub>a11</sub> は、例えば V 又は L であり得；

20

ここで、X<sub>a12</sub> は、例えば Q 又は G であり得；

ここで、X<sub>a13</sub> は、例えば I 又は F であり得、そして；

ここで、軽鎖可変領域は、配列番号 25 と比較して前記アミノ酸置換のうちの少なくとも 1 つを含み得る。

## 【 0 0 6 5 】

本発明の更に具体的な実施形態において、ヒト化又はハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント）は、配列番号 30 を含む重鎖可変領域（16 B 5 V H コンセンサス 1）を含み得る；

## 【 化 4 】

XVQLXQSGAEXXKPGAXVXXSCXXSGFNIKDIYMHVWXQXPXXGLEWXGRIDPAYG  
NTKYDPKFQGXXTITADTSXXTAYXXLSSLXSEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGTXXV  
TVSS

30

ここで、X により特定されるアミノ酸の少なくとも 1 つは、配列番号 29 で記載されるポリペプチド（ネズミ 16 B 5 V H）における対応するアミノ酸と比較すると 1 つのアミノ酸置換である。アミノ酸置換は、例えば保存的であっても、又は非保存的であってもよい。本発明によれば、アミノ酸置換は保存的であってよい。

## 【 0 0 6 6 】

ヒト化若しくはハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント）は、配列番号 31 を含む重鎖可変領域（16 B 5 V H コンセンサス 2）を含み得る；

40

## 【 化 5 】

X<sub>b1</sub>VQLX<sub>b2</sub>QSGAEX<sub>b3</sub>X<sub>b4</sub>KPGAX<sub>b5</sub>VX<sub>b6</sub>X<sub>b7</sub>SCX<sub>b8</sub>X<sub>b9</sub>SGFNIKDIYMHVWX<sub>b10</sub>QX<sub>b11</sub>PX<sub>b12</sub>  
X<sub>b13</sub>GLEWX<sub>b14</sub>GRIDPAYGNTKYDPKFQGX<sub>b15</sub>X<sub>b16</sub>TITADTSX<sub>b17</sub>X<sub>b18</sub>TAYX<sub>b19</sub>X<sub>b20</sub>LSSLX  
b21SEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGTXX<sub>b22</sub>VTSS

ここで、X<sub>b1</sub> は、例えば Q 又は E であり得；

ここで、X<sub>b2</sub> は、例えば V 又は Q であり得；

ここで、X<sub>b3</sub> は、V 又は L などの疎水性アミノ酸であり得；

50

ここで、 $X_{b4}$  は、例えば K 又は V であり得；  
 ここで、 $X_{b5}$  は、T 又は S などの中性親水性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{b6}$  は、K 又は R などの塩基性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{b7}$  は、I 又は L などの疎水性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{b8}$  は、例えば K 又は T であり得；  
 ここで、 $X_{b9}$  は、例えば V 又は T であり得；  
 ここで、 $X_{b10}$  は、Q 又は K などの塩基性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{b11}$  は、例えば A 又は R であり得；  
 ここで、 $X_{b12}$  は、例えば G 又は E であり得；  
 ここで、 $X_{b13}$  は、K 又は Q などの塩基性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{b14}$  は、M 又は I などの疎水性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{b15}$  は、R 又は K などの塩基性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{b16}$  は、V 又は A などの疎水性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{b17}$  は、T 又は S などの中性親水性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{b18}$  は、例えば D 又は N であり得；  
 ここで、 $X_{b19}$  は、M 又は L などの疎水性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{b20}$  は、例えば E 又は Q であり得；  
 ここで、 $X_{b21}$  は、例えば R 又は T であり得；  
 ここで、 $X_{b22}$  は、例えば L 又は S であり得、そして；  
 ここで、重鎖可変領域は、配列番号 29 と比較して少なくとも 1 つの前記アミノ酸置換を  
 含み得る。

# 【0067】

ヒト化若しくはハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメン  
 ト）は、配列番号 32 を含む重鎖可変領域を含み得る（16B5VH コンセンサス 3）；

# 【化 6】

$X_{b1}VQLX_{b2}QSGAEX_{b3}X_{b4}KPGAX_{b5}VX_{b6}X_{b7}SCX_{b8}X_{b9}SGFNIKDIYMHVX_{b10}QX_{b11}PX_{b12}$   
 $X_{b13}GLEWX_{b14}GRIDPAYGNTKYDPKFQGX_{b15}X_{b16}TITADTSX_{b17}X_{b18}TAYX_{b19}X_{b20}LSSLX$   
 $_{b21}SEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGTXX_{b22}VTVSS$

ここで、 $X_{b1}$  は、例えば Q 又は E であり得；  
 ここで、 $X_{b2}$  は、例えば V 又は Q であり得；  
 ここで、 $X_{b3}$  は、例えば V 又は L であり得；  
 ここで、 $X_{b4}$  は、例えば K 又は V であり得；  
 ここで、 $X_{b5}$  は、例えば T 又は S であり得；  
 ここで、 $X_{b6}$  は、例えば K 又は R であり得；  
 ここで、 $X_{b7}$  は、例えば I 又は L であり得；  
 ここで、 $X_{b8}$  は、例えば K 又は T であり得；  
 ここで、 $X_{b9}$  は、例えば V 又は T であり得；  
 ここで、 $X_{b10}$  は、例えば Q 又は K であり得；  
 ここで、 $X_{b11}$  は、例えば A 又は R であり得；  
 ここで、 $X_{b12}$  は、例えば G 又は E であり得；  
 ここで、 $X_{b13}$  は、例えば K 又は Q であり得；  
 ここで、 $X_{b14}$  は、例えば M 又は I であり得；  
 ここで、 $X_{b15}$  は、例えば R 又は K であり得；  
 ここで、 $X_{b16}$  は、例えば V 又は A であり得；  
 ここで、 $X_{b17}$  は、例えば T 又は S であり得；  
 ここで、 $X_{b18}$  は、例えば D 又は N であり得；  
 ここで、 $X_{b19}$  は、例えば M 又は L であり得；  
 ここで、 $X_{b20}$  は、例えば E 又は Q であり得；

ここで、 $X_{b21}$  は、例えば R 又は T であり得；

ここで、 $X_{b22}$  は、例えば L 又は S であり得、そして；

ここで、重鎖可変領域は、配列番号 29 と比較して少なくとも 1 つの前記アミノ酸置換を含み得る。

#### 【0068】

本発明のさらなる具体的な実施形態では、ヒト化若しくはハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント）は、配列番号 34 を含む軽鎖可変領域（21B12VL コンセンサス 1）を含み得る：

#### 【化 7】

DIVMX<sub>c1</sub>QSPX<sub>c2</sub>SLAVSX<sub>c3</sub>GEX<sub>c4</sub>TX<sub>c5</sub>CKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQXPQX<sub>c8</sub>PKLLIYW  
ASTRESGVPDRFXGSGSGTDFTLTISXXAEDXAVYYCQQYYIYPRTFGXGTKLEIK

10

ここで、X により特定されるアミノ酸の少なくとも 1 つは、配列番号 33 で記載されるポリペプチドにおける対応するアミノ酸（ネズミ 21B12VL）と比較すると 1 つのアミノ酸置換である。アミノ酸置換は、例えば保存的であってもよいし、又は非保存的であってもよい。本発明によれば、アミノ酸置換は保存的であり得る。

#### 【0069】

ヒト化若しくはハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント）は、配列番号 35 を含む軽鎖可変領域（21B12VL コンセンサス 2）を含み得る：

20

#### 【化 8】

DIVMX<sub>c1</sub>QSPX<sub>c2</sub>SLAVSX<sub>c3</sub>GEX<sub>c4</sub>X<sub>c5</sub>TX<sub>c6</sub>X<sub>c7</sub>CKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQX<sub>c8</sub>PGQX<sub>c9</sub>  
PKLLIYWASTRESGVPDRFX<sub>c10</sub>GSGSGTDFTLTISX<sub>c11</sub>X<sub>c12</sub>AEDX<sub>c13</sub>AVYYCQQYYIYP  
RTFGX<sub>c14</sub>GTKLEIK

ここで、 $X_{c1}$  は、T 又は S などの中性親水性アミノ酸であり得；

ここで、 $X_{c2}$  は、例えば D 又は S であり得；

ここで、 $X_{c3}$  は、L 又は V などの疎水性アミノ酸であり得；

30

ここで、 $X_{c4}$  は、R 又は K などの塩基性アミノ酸であり得；

ここで、 $X_{c5}$  は、A 又は V などの疎水性アミノ酸であり得；

ここで、 $X_{c6}$  は、I 又は M などの疎水性アミノ酸であり得；

ここで、 $X_{c7}$  は、例えば N 又は S であり得；

ここで、 $X_{c8}$  は、K 又は R などの塩基性アミノ酸であり得；

ここで、 $X_{c9}$  は、例えば P 又は S であり得；

ここで、 $X_{c10}$  は、S 又は T などの中性親水性アミノ酸であり得；

ここで、 $X_{c11}$  は、L 又は V などの疎水性アミノ酸であり得；

ここで、 $X_{c12}$  は、例えば Q 又は K などの塩基性アミノ酸であり得；

ここで、 $X_{c13}$  は、V 又は L などの疎水性アミノ酸であり得；

40

ここで、 $X_{c14}$  は、例えば Q 又は G であり得、そして；

ここで、軽鎖可変領域は、配列番号 33 と比較して少なくとも 1 つの前記アミノ酸置換を含み得る。

#### 【0070】

ヒト化若しくはハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント）は、配列番号 36 を含む軽鎖可変領域（21B12VL コンセンサス 3）を含み得る：

## 【化 9】

DIVMX<sub>c1</sub>QSPX<sub>c2</sub>SLAVSX<sub>c3</sub>GEX<sub>c4</sub>X<sub>c5</sub>TX<sub>c6</sub>X<sub>c7</sub>CKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQX<sub>c8</sub>PGQX<sub>c9</sub>  
 PKLLIYWASTRESGVPDRFX<sub>c10</sub>GSGSGTDFTLTISSX<sub>c11</sub>X<sub>c12</sub>AEDX<sub>c13</sub>AVYYCQQYYIYP  
 RTFGX<sub>c14</sub>GTKLEIK

ここで、X<sub>c1</sub>は、T又はSであり得；

ここで、X<sub>c2</sub>は、D又はSであり得；

ここで、X<sub>c3</sub>は、L又はVであり得；

ここで、X<sub>c4</sub>は、R又はKであり得；

10

ここで、X<sub>c5</sub>は、例えばA又はVであり得；

ここで、X<sub>c6</sub>は、例えばI又はMであり得；

ここで、X<sub>c7</sub>は、例えばN又はSであり得；

ここで、X<sub>c8</sub>は、例えばK又はRであり得；

ここで、X<sub>c9</sub>は、例えばP又はSであり得；

ここで、X<sub>c10</sub>は、例えばS又はTであり得；

ここで、X<sub>c11</sub>は、例えばL又はVであり得；

ここで、X<sub>c12</sub>は、例えばQ又はKであり得；

ここで、X<sub>c13</sub>は、例えばV又はLであり得；

ここで、X<sub>c14</sub>は、例えばQ又はGであり得、そして；

20

ここで、軽鎖可変領域は、配列番号33と比較して少なくとも1つの前記アミノ酸置換を含み得る。

## 【0071】

本発明のさらなる例示的な実施形態では、ヒト化若しくはハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント）は、配列番号38を含む重鎖可変領域（21B12VHコンセンサス1）を含み得る；

## 【化10】

QXQLVQSGXELKKPGXXVKXSCKASGYTFTNYGMHWVXQAPGXGLXWMGWINTY  
 TGEPTYADDFKGRFXFSLXTSXSTAYLQIXXLKXEDTAXYXCARDGFLYFFDYWGQG  
 TXXTVSS

30

ここで、Xにより特定されるアミノ酸の少なくとも1つは、配列番号37で記載されるポリペプチドにおける対応するアミノ酸（ネズミ21B12VH）と比較すると1つのアミノ酸置換である。アミノ酸置換は、例えば保存的であってもよいし、又は非保存的であってもよい。本発明によれば、アミノ酸置換は保存的であり得る。

## 【0072】

ヒト化若しくはハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント）は、配列番号39を含む重鎖可変領域（21B12VHコンセンサス2）を含み得る；

40

## 【化11】

QX<sub>d1</sub>QLVQSGX<sub>d2</sub>ELKKPGX<sub>d3</sub>X<sub>d4</sub>VKX<sub>d5</sub>SCKASGYTFTNYGMHWVX<sub>d6</sub>QAPGX<sub>d7</sub>GLX<sub>d8</sub>  
 WMGWINTYTGEPTYADDFKGRFX<sub>d9</sub>FSLX<sub>d10</sub>TSX<sub>d11</sub>STAYLQIX<sub>d12</sub>X<sub>d13</sub>LKX<sub>d14</sub>EDTAX<sub>d15</sub>  
 YX<sub>d16</sub>CARDGFLYFFDYWGQGTX<sub>d17</sub>X<sub>d18</sub>TVSS

ここで、X<sub>d1</sub>は、V又はIなどの疎水性アミノ酸であり得；

ここで、X<sub>d2</sub>は、例えばS又はPであり得；

ここで、X<sub>d3</sub>は、例えばA又はEであり得；

ここで、X<sub>d4</sub>は、S又はTなどの中性親水性アミノ酸であり得；

50

ここで、 $X_{d5}$  は、V 又は I などの疎水性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{d6}$  は、R 又は K などの塩基性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{d7}$  は、例えば Q 又は K などの塩基性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{d8}$  は、例えば E 又は K であり得；  
 ここで、 $X_{d9}$  は、V 又は A などの疎水性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{d10}$  は、D 又は E などの酸性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{d11}$  は、V 又は A などの疎水性アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{d12}$  は、例えば S 又は N であり得；  
 ここで、 $X_{d13}$  は、例えば S 又は N であり得；  
 ここで、 $X_{d14}$  は、例えば A 又は N であり得；  
 ここで、 $X_{d15}$  は、例えば V 又は T であり得；  
 ここで、 $X_{d16}$  は、Y 又は F などの芳香族アミノ酸であり得；  
 ここで、 $X_{d17}$  は、例えば L 又は T であり得；  
 ここで、 $X_{d18}$  は、V 又は L などの疎水性アミノ酸であり得、そして；  
 ここで、重鎖可変領域は、配列番号 37 と比較して少なくとも 1 つの前記アミノ酸置換を含み得る。

10

## 【0073】

ヒト化若しくはハイブリッド抗体（又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント）は、配列番号 40 を含む重鎖可変領域（21B12VHコンセンサス3）を含み得る；

20

## 【化12】

**QX<sub>d1</sub>QLVQSGX<sub>d2</sub>ELKKPGX<sub>d3</sub>X<sub>d4</sub>VKX<sub>d5</sub>SCKASGYTFTNYGMHWVX<sub>d6</sub>QAPGX<sub>d7</sub>GLX<sub>d8</sub>  
 WMGWINTYTGEPTYADDFKGRFX<sub>d9</sub>FSLX<sub>d10</sub>TSX<sub>d11</sub>STAYLQIX<sub>d12</sub>X<sub>d13</sub>LKX<sub>d14</sub>EDTAX<sub>d1</sub>  
 5YX<sub>d16</sub>CARDGFLYFFDYWGQGTGX<sub>d17</sub>X<sub>d18</sub>TVSS**

ここで、 $X_{d1}$  は、例えば V 又は I であり得；  
 ここで、 $X_{d2}$  は、例えば S 又は P であり得；  
 ここで、 $X_{d3}$  は、例えば A 又は E であり得；  
 ここで、 $X_{d4}$  は、例えば S 又は T であり得；  
 ここで、 $X_{d5}$  は、例えば V 又は I であり得；  
 ここで、 $X_{d6}$  は、例えば R 又は K であり得；  
 ここで、 $X_{d7}$  は、例えば Q 又は K であり得；  
 ここで、 $X_{d8}$  は、例えば E 又は K であり得；  
 ここで、 $X_{d9}$  は、例えば V 又は A であり得；  
 ここで、 $X_{d10}$  は、例えば D 又は E であり得；  
 ここで、 $X_{d11}$  は、例えば V 又は A であり得；  
 ここで、 $X_{d12}$  は、例えば S 又は N であり得；  
 ここで、 $X_{d13}$  は、例えば S 又は N であり得；  
 ここで、 $X_{d14}$  は、例えば A 又は N であり得；  
 ここで、 $X_{d15}$  は、例えば V 又は T であり得；  
 ここで、 $X_{d16}$  は、例えば V 又は F であり得；  
 ここで、 $X_{d17}$  は、例えば L 又は T であり得；  
 ここで、 $X_{d18}$  は、例えば V 又は L であり得、そして；  
 ここで、重鎖可変領域は、配列番号 37 と比較して少なくとも 1 つの前記アミノ酸置換を含み得る。

30

40

## 【0074】

更に具体的な実施形態では、ヒト化又はハイブリッド抗体は、配列番号 7 又は配列番号 17 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み得る。

## 【0075】

50



さらに、本発明のより具体的な実施形態は、配列番号 9 又は配列番号 19 のアミノ酸配列を有する重鎖を含み得るヒト化又はハイブリッド抗体を含む。

【0076】

本発明のヒト化又はハイブリッド抗体は、本明細書中で明記される重鎖又は重鎖可変領域及び相補性軽鎖又は軽鎖可変領域を有し得る。

【0077】

一方では、本発明のヒト化又はハイブリッド抗体は、本明細書中で明記される軽鎖又は軽鎖可変領域及び相補性重鎖又は重鎖可変領域を有し得る。

【0078】

本発明のヒト化又はハイブリッド抗体は、したがって、本明細書中で記載される天然ヒト抗体軽鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基と、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 からなる群から選択される軽鎖 C D R 又は配列番号 14 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 15 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 及び配列番号 16 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 からなる群から選択される重鎖 C D R 並びにそれらの組み合わせとを含み得る。

【0079】

さらなる実施形態では、ヒト化又はハイブリッド抗体は、本明細書中で記載される天然ヒト抗体軽鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基と、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 からなる群から選択される少なくとも 2 つの軽鎖 C D R 又は配列番号 14 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 15 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 及び配列番号 16 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 からなる群から選択される少なくとも 2 つの重鎖 C D R 並びにそれらの組み合わせとを含み得る。

【0080】

さらなる実施形態では、ヒト化又はハイブリッド抗体は、本明細書中で記載される天然ヒト抗体軽鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基並びに配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 又は配列番号 14 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 15 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 及び配列番号 16 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 及びそれらの組み合わせを含み得る。

【0081】

さらに詳細な実施形態では、ヒト化又はハイブリッド抗体は、配列番号 8 又は配列番号 18 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含み得る。

【0082】

なお一層詳細な実施形態では、本発明のヒト化又はハイブリッド抗体は、配列番号 10 又は配列番号 20 のアミノ酸配列を有する軽鎖を含み得る。

【0083】

本発明の他の具体的な実施形態は、配列番号 7 又は配列番号 17 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号 8 又は配列番号 18 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するヒト化抗体を含む。

【0084】

本発明のさらなる具体的な実施形態は、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する重鎖及び配列番号 10 のアミノ酸配列を有する軽鎖を有するヒト化抗体を含む。

【0085】

さらに、本発明のさらなる具体的な実施形態は、配列番号 19 のアミノ酸配列を有する重鎖及び軽鎖配列番号 20 のアミノ酸配列を有する軽鎖を有するヒト化抗体を含む。

【0086】

本発明は、さらなる態様において、クラステリンに対して特異的に結合することができ、そして：

10

20

30

40

50

配列番号 25 と少なくとも 80 % (例えば、85 %、90 %、95 %、99 %) 同一である軽鎖可変領域及び/又は配列番号 29 と少なくとも 80 % (例えば、85 %、90 %、95 %、99 %) 同一である重鎖可変領域を有し得る抗体又はその抗原結合フラグメント (ここで、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 25 又は配列番号 29 と比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含み得、そしてアミノ酸置換が、例えば、相補性決定領域 (CDR) の外側であり得る) ;

配列番号 33 と少なくとも 80 % (例えば、85 %、90 %、95 %、99 %) 同一である軽鎖可変領域及び/又は配列番号 37 と少なくとも 80 % (例えば、85 %、90 %、95 %、99 %) 同一である重鎖可変領域を有し得る抗体又はその抗原結合フラグメント (ここで、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号 33 又は配列番号 37 と比較して少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含み得、そしてアミノ酸置換は、例えば、相補性決定領域 (CDR) の外側であり得る)

からなる群から選択することができる、抗体又はその抗原結合フラグメントに関する。

【0087】

本発明によれば、少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、例えば、軽鎖可変領域中であり得る。

【0088】

本発明によれば、少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、例えば、重鎖可変領域中であり得る。

【0089】

アミノ酸置換は、保存的であってもよいし、又は非保存的であってもよい。更に具体的な実施形態では、アミノ酸置換は保存的であり得る。

【0090】

本発明の実施形態によれば、本発明の抗体及び抗原結合フラグメントはヒトクラスティンと結合する。本発明の別の実施形態によれば、本発明の抗体及び抗原結合フラグメントはネズミクラスティンと結合する。本発明の抗体及び抗原結合フラグメントはまた、ヒトクラスティンのネズミの天然に存在する変異体又は合成変異体とも結合する。そのような変異体は、例えば、ヒトクラスティン又はネズミクラスティンと少なくとも 75 % のアミノ酸配列同一性を有する。

【0091】

Kabat 及び Chothia の定義を用いて、配列番号 29 の CDR (配列番号 30、31、32 及び 7 の CDR と同一) を同定した。対応する CDR 配列は本明細書中では次のように特定される; 重鎖可変領域の CDR 1 は配列番号 1 に対応し、重鎖可変領域の CDR 2 は配列番号 2 に対応し、重鎖可変領域の CDR 3 は配列番号 3 に対応する。

【0092】

配列番号 1、2 及び 3 の短いバージョンは、2006 年 9 月 13 日に出願され、国際公開第 2007/030930 号で公開された、国際出願第 PCT/CA2006/001505 号 (すなわち、1505 出願) で示されている。この特許出願では、配列番号 29 の CDR (1505 出願における配列番号 23 に相当する) を、IMGT 定義を実行する IMGT/V 探索ソフトウェアで同定した。対応する配列は本明細書中では次のように特定される; 重鎖可変領域の CDR 1 は配列番号 44 に対応し、重鎖可変領域の CDR 2 は配列番号 45 に対応し、そして重鎖可変領域の CDR 3 は配列番号 46 に対応する。

【0093】

本明細書中で用いられる場合、配列番号 29 に関して、「相補性決定領域 (CDR) の外側のアミノ酸置換 ~」という用語は、一般に、配列番号 1、2 及び 3 の周りの (外側の) アミノ酸を指す。或いは、いくつかの実施形態では、この用語は、配列番号 44、45 及び 46 の周りの (外側の) アミノ酸を指す場合もある。

【0094】

配列番号 25 の CDR (配列番号 26、27、28 及び 8 の CDR と同一) を、Kabat 及び Chothia の定義を用いて同定した。対応する CDR 配列は本明細書中では次のように

10

20

30

40

50

特定される；軽鎖可変領域のCDR1は配列番号4に対応し、軽鎖可変領域のCDR2は配列番号5に対応し、そして軽鎖可変領域のCDR3は配列番号6に対応する。

【0095】

配列番号4、5及び6の短いバージョンは、2006年9月13日に出願され、そして国際公開第2007/030930号で公開された、国際出願第PCT/CA2006/001505号（すなわち、1505出願）で示されている。この特許出願では、配列番号25のCDR（1505出願における配列番号12に相当する）を、IMGT定義を実施するIMGT/V探索ソフトウェアで同定した。対応する配列は本明細書中では次のように特定される；軽鎖可変領域のCDR1は配列番号47に対応し、軽鎖可変領域のCDR2は「WAS」のアミノ酸配列に対応し、そして軽鎖可変領域のCDR3は配列番号49に対応する。

10

【0096】

本明細書中で用いられる場合、配列番号25に関して、「相補性決定領域（CDR）の外側のアミノ酸置換～」という用語は、一般に、配列番号4、5及び6の周りの（外側の）アミノ酸を指す。或いは、いくつかの実施形態では、この用語は、配列番号47、軽鎖可変領域のCDR2及び49の周りの（外側の）アミノ酸を指す場合もある。

【0097】

配列番号37のCDR（配列番号38、39、40及び17のCDRと同一）を、Kabata及びChothiaの定義を用いて同定した。対応するCDR配列は本明細書中では次のように特定される；重鎖可変領域のCDR1は配列番号11に対応し、重鎖可変領域のCDR2は配列番号12に対応し、そして重鎖可変領域のCDR3は配列番号13に対応する。

20

【0098】

配列番号11、12及び13の短いバージョンは、2006年9月13日に出願され、国際公開第2007/030930号で公開された、国際出願第PCT/CA2006/001505号（すなわち、1505出願）で示された。この特許出願では、配列番号37のCDR（1505出願での配列番号22に相当する）を、IMGT定義を実施するIMGT/V探索ソフトウェアで同定した。対応する配列は本明細書中では次のように特定される；重鎖可変領域のCDR1は、配列番号50に対応し、重鎖可変領域のCDR2は配列番号51に対応し、重鎖可変領域のCDR3は配列番号52に対応する。

【0099】

30

配列番号37に関して本明細書中で用いられる場合「相補性決定領域（CDR）の外側のアミノ酸置換～」という用語は、一般に、配列番号11、12及び13の周りの（外側の）アミノ酸を指す。或いは、いくつかの実施形態では、この用語は、配列番号50、51及び52の周りの（外側の）アミノ酸を指す場合もある。

【0100】

配列番号33のCDR（配列番号34、35、36及び18のCDRと同一）を、Kabata及びChothiaの定義を用いて同定した。対応するCDR配列は本明細書中では次のように特定される；軽鎖可変領域のCDR1は配列番号14に対応し、軽鎖可変領域のCDR2は配列番号15に対応し、軽鎖可変領域のCDR3は配列番号16に対応する。

【0101】

40

配列番号14、15及び16の短いバージョンは、2006年9月13日に出願され、国際公開第2007/030930号で公開された国際出願第PCT/CA2006/001505号（すなわち、1505出願）で示された。この特許出願では、配列番号33のCDR（1505出願での配列番号11に相当する）を、IMGT定義を実施するIMGT/V探索ソフトウェアで同定した。対応する配列は本明細書中では次のように特定される；軽鎖可変領域のCDR1は配列番号53に対応し、軽鎖可変領域のCDR2は「WAS」のアミノ酸配列に対応し、軽鎖可変領域のCDR3は配列番号55に対応する。

【0102】

本明細書中で用いられる場合、配列番号33に関して「相補性決定領域（CDR）の外側のアミノ酸置換～」という用語は、一般に、配列番号14、15及び16の周りの（外

50

側の)アミノ酸を指す。或いは、いくつかの実施形態では、この用語は、配列番号53、軽鎖可変領域のCDR2及び55周辺の(外側の)アミノ酸を指す場合もある。

【0103】

本発明のヒト化抗体(又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント)は、配列番号7、配列番号26又は配列番号27からなる群から選択される軽鎖可変領域及び配列番号8、配列番号29又は配列番号30からなる群から選択される重鎖可変領域を含み得る。

【0104】

本発明のハイブリッド抗体(又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント)は、配列番号7、配列番号26又は配列番号27からなる群から選択される軽鎖可変領域及び配列番号28を含む重鎖可変領域を含み得る。

【0105】

或いは、本発明のハイブリッド抗体(又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント)は、配列番号25を含む軽鎖可変領域及び配列番号8、配列番号29又は配列番号30からなる群から選択される重鎖可変領域を含み得る。

【0106】

本発明のヒト化抗体(又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント)は、配列番号18、配列番号32又は配列番号33からなる群から選択される軽鎖可変領域及び配列番号17、配列番号35又は配列番号36からなる群から選択される重鎖可変領域を含み得る。

【0107】

本発明のハイブリッド抗体(又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント)は、配列番号18、配列番号32又は配列番号33からなる群から選択される軽鎖可変領域及び配列番号34を含む重鎖可変領域を含み得る。

【0108】

或いは、本発明のハイブリッド抗体(又はそれから誘導される任意の抗原結合フラグメント)は、配列番号31を含む軽鎖可変領域及び配列番号17、配列番号35又は配列番号36からなる群から選択される重鎖可変領域を含み得る。

【0109】

本発明のヒト化抗体又は抗原結合フラグメントの別の例示的实施形態には、例えば、配列番号26、配列番号27、配列番号28又は配列番号8のいずれかの少なくとも90の連続したアミノ酸を含み得る軽鎖可変領域を有する抗体又は抗原結合フラグメントが含まれる。

【0110】

本明細書中で用いられる場合「配列番号26の少なくとも90の連続したアミノ酸」という用語には、「少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111又は少なくとも112の連続したアミノ酸」という用語も含まれる。「配列番号26の少なくとも90の連続したアミノ酸」という用語は、配列番号26で見出される少なくとも90の連続したアミノ酸の任意の可能な配列及び特に配列番号26の3つのCDRを含む配列、例えば、配列番号26のアミノ酸6~108、5~109、13~103、9~111を含む配列などを含む。

【0111】

本明細書中で用いられる場合、「配列番号27の少なくとも90の連続したアミノ酸」という用語は、「少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111又は少なくとも112の連続したアミノ酸」という用語も含む。「配列番号27の少なくとも90の連続したアミノ酸」という用語は、配列番号27で見出される少なくとも90の連続したアミノ酸の任意の可能な配列及び特に配列番号27の3つのCDRを含む配列、例えば、配列番号27のアミノ酸7~109、12~104、22~1

10

20

30

40

50

13、18～112などを含む配列を含む。

【0112】

「配列番号28の少なくとも90の連続したアミノ酸」又は「配列番号8の少なくとも90の連続したアミノ酸」という用語は、類似した意味を有する。

【0113】

本発明によれば、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、配列番号8で記載されるような軽鎖可変領域を有し得る。

【0114】

また本発明によれば、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、配列番号10で記載されるような軽鎖を有し得る。

【0115】

本発明のヒト化抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、配列番号30、31、32又は7のいずれかの少なくとも90の連続したアミノ酸を含み得る重鎖可変領域を含む（又はさらに含む）。

【0116】

本明細書中で用いられる場合、「配列番号30の少なくとも90の連続したアミノ酸」という用語はまた、「少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116又は少なくとも117の連続したアミノ酸」という用語も含む。「配列番号30の少なくとも90の連続したアミノ酸」という用語は、配列番号30で見出される少なくとも90の連続したアミノ酸の任意の可能な配列及び特に配列番号30の3つのCDRを含む配列、例えば、配列番号30のアミノ酸1～108、2～112、11～113、7～109を含む配列などを含む。

【0117】

本明細書中で用いられる場合、「配列番号31の少なくとも90の連続したアミノ酸」という用語はまた、「少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116又は少なくとも117の連続したアミノ酸」という用語も含む。「配列番号31の少なくとも90の連続したアミノ酸」という用語は、配列番号31で見出される少なくとも90の連続したアミノ酸の任意の可能な配列及び特に配列番号31の3つのCDRを含む配列、例えば、配列番号31のアミノ酸6～109、8～113、1～108、2～115を含む配列などを含む。

【0118】

「配列番号32の少なくとも90の連続したアミノ酸」又は「配列番号7の少なくとも90の連続したアミノ酸」という用語は、類似した意味を有する。

【0119】

本発明によれば、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、配列番号7で記載される重鎖可変領域を有し得る。

【0120】

また本発明によれば、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、配列番号9で記載される重鎖を有し得る。

【0121】

本発明によれば、抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、

a) 配列番号26の少なくとも90の連続したアミノ酸を含み得る軽鎖可変領域及び配列番号30、配列番号31、配列番号32若しくは配列番号7のいずれかの少なくとも90の連続したアミノ酸を含み得る重鎖可変領域；

b) 配列番号27の少なくとも90の連続したアミノ酸を含み得る軽鎖可変領域及び配列番号30、配列番号31、配列番号32若しくは配列番号7のいずれかの少なくとも90の連続したアミノ酸を含み得る重鎖可変領域；

c) 配列番号28の少なくとも90の連続したアミノ酸を含み得る軽鎖可変領域及び配

10

20

30

40

50

列番号 30、配列番号 31、配列番号 32 若しくは配列番号 7 のいずれかの少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る重鎖可変領域；又は

d) 配列番号 8 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る軽鎖可変領域及び配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32 若しくは配列番号 7 のいずれかの少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る重鎖可変領域を含み得る。

【0122】

本発明のさらに具体的な実施形態によれば、軽鎖可変領域は、配列番号 8 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得、重鎖可変領域は、配列番号 7 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る。

【0123】

本発明のなお一層具体的な実施形態によれば、軽鎖可変領域は、配列番号 8 で記載されるとおりであり得、重鎖可変領域は、配列番号 7 で記載されるとおりであり得る。

【0124】

本発明のヒト化抗体又は抗原結合フラグメントの他の例示的实施例は、配列番号 34、35、36 又は 18 のいずれかの少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る軽鎖可変領域を含み得るものである。

【0125】

本明細書中で用いられる場合、「配列番号 34 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」という用語は、「少なくとも 91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112 又は少なくとも 113 の連続したアミノ酸」という用語も含む。「配列番号 34 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」という用語は、配列番号 34 で見出される少なくとも 90 の連続したアミノ酸の任意の可能な配列及び特に配列番号 34 の 3 つの CDR を含む配列、例えば、配列番号 34 のアミノ酸 6 ~ 103、11 ~ 106、1 ~ 106、3 ~ 110、5 ~ 107 を含む配列などを含む。

【0126】

本明細書中で用いられる場合、「配列番号 35 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」という用語は、「少なくとも 91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112 又は少なくとも 113 の連続したアミノ酸」という用語も含む。「配列番号 35 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」という用語は、配列番号 35 で見出される少なくとも 90 の連続したアミノ酸の任意の可能な配列及び特に配列番号 35 の 3 つの CDR を含む配列、例えば配列番号 35 のアミノ酸 9 ~ 106、10 ~ 113、1 ~ 109、20 ~ 110、7 ~ 107 を含む配列などを含む。

【0127】

「配列番号 36 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」又は「配列番号 18 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」という用語は類似した意味を有する。

【0128】

本発明によれば、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、配列番号 18 で記載される軽鎖可変領域を有し得る。

【0129】

また本発明によれば、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、配列番号 20 で記載される軽鎖を有し得る。

【0130】

本発明のヒト化抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、配列番号 38、39、40 又は 17 のいずれかの少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る重鎖可変領域を含む（又は更に含む）。

【0131】

本明細書中で用いられる場合、「配列番号 38 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」

10

20

30

40

50

という用語は、「少なくとも 91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117 又は少なくとも 118 の連続したアミノ酸」という用語も含む。「配列番号 38 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」という用語は、配列番号 38 で見出される少なくとも 90 の連続したアミノ酸の任意の可能な配列及び特に配列番号 38 の 3 つの CDR を含む配列、例えば配列番号 38 のアミノ酸 6 ~ 111、1 ~ 114、12 ~ 109、5 ~ 113、10 ~ 107 を含む配列などを含む。

【0132】

本明細書中で用いられる場合、「配列番号 39 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」という用語は、「少なくとも 91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117 又は少なくとも 118 の連続したアミノ酸」という用語も含む。「配列番号 39 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」という用語は、配列番号 39 で見出される少なくとも 90 の連続したアミノ酸の任意の可能な配列及び特に配列番号 39 の 3 つの CDR を含む配列、例えば配列番号 39 のアミノ酸 3 ~ 109、1 ~ 115、1 ~ 110、22 ~ 116、20 ~ 115 を含む配列などを含む。

【0133】

「配列番号 40 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」又は「配列番号 17 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸」という用語は類似した意味を有する。

【0134】

本発明によれば、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、配列番号 17 で記載される重鎖可変領域を有し得る。

【0135】

また、本発明によれば、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、配列番号 19 で記載される重鎖を有し得る。本発明によれば、抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、

a) 配列番号 34 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る軽鎖可変領域及び配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40 若しくは配列番号 17 のいずれかの少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る重鎖可変領域；

b) 配列番号 35 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る軽鎖可変領域及び配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40 若しくは配列番号 17 のいずれかの少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る重鎖可変領域；

c) アミノ酸配列番号 36 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る軽鎖可変領域及び配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40 若しくは配列番号 17 のいずれかの少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る重鎖可変領域；又は

d) 配列番号 18 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る軽鎖可変領域及び配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40 若しくは配列番号 17 のいずれかの少なくとも 90 の連続したアミノ酸を含み得る重鎖可変領域

【0136】

本発明のさらに具体的な実施形態によれば、軽鎖可変領域は、配列番号 18 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸を有し得、重鎖可変領域は、配列番号 17 の少なくとも 90 の連続したアミノ酸を有し得る。

【0137】

本発明のなおいっそう具体的な実施形態によれば、軽鎖可変領域は配列番号 18 で記載されるとおりであり得、重鎖可変領域は配列番号 17 で記載されるとおりであり得る。

【0138】

もちろん、本明細書中で記載される軽鎖若しくは重鎖又はそれらの可変領域は、シグナ

10

20

30

40

50

ルペプチドも含み得る。そのようなシグナルペプチドは、元の配列由来であり得るか、又はポリペプチドの特定の細胞局在を最適化するように設計され得る。もちろん、望ましいシグナルペプチドは、ポリペプチドの分泌を可能にするもの（例えば、切断可能）である。

【0139】

本発明のヒト化又はハイブリッド抗体は、定常領域、好ましくはヒト定常領域を有し得る。他のサブタイプを選択することができるが、ヒト化又はハイブリッド抗体は、IgG1、IgG2又はIgG3サブタイプの免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸残基を含み得る。

【0140】

本発明はまた、別の態様では、軽鎖可変領域（又はそのフラグメント）及び重鎖可変領域（又はそのフラグメント）を含む抗原結合フラグメントにも関し、これは非ヒト相補性決定領域アミノ酸残基及びヒトフレームワーク領域アミノ酸残基を含み得る。

【0141】

本発明の抗原結合フラグメントはクラステリンと結合することができ、有利には非ヒト親抗体の抗原結合フラグメントよりも良好な親和性を有し得る。

【0142】

実際、抗原結合フラグメントは組換えモノマークラステリンと  $1.7 \times 10^{-8} \text{ M} \pm 2.97 \times 10^{-9}$  又はそれより良好な親和性で結合することが本明細書中で示されている。

【0143】

例示的な実施形態では、抗原結合フラグメントは、本明細書中で記載される天然ヒト抗体重鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基と、配列番号1のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号2のアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号3のアミノ酸配列を有するCDRH3からなる群から選択される重鎖CDR又は配列番号11のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号12のアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号13のアミノ酸配列を有するCDRH3からなる群から選択される重鎖CDRとを含み得る。

【0144】

別の例示的な実施形態では、抗原結合フラグメントは、本明細書中で記載される天然ヒト抗体重鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基と、配列番号1のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号2のアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号3のアミノ酸配列を有するCDRH3からなる群から選択される少なくとも2つの重鎖CDR又は配列番号11のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号12のアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号13のアミノ酸配列を有するCDRH3からなる群から選択される少なくとも2つの重鎖CDRとを含み得る。

【0145】

更に別の実施形態では、抗原結合フラグメントは、本明細書中で記載される天然ヒト抗体重鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基と、配列番号1のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号2のアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号3のアミノ酸配列を有するCDRH3又は配列番号11のアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号12のアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号13のアミノ酸配列を有するCDRH3とを含み得る。

【0146】

さらに詳細な実施形態では、抗原結合フラグメントは、配列番号7若しくは配列番号17のアミノ酸配列（又はそのフラグメント）を有する重鎖可変領域を含み得る。

【0147】

さらなる例示的な実施形態では、抗原結合フラグメントは、本明細書中で記載される天然ヒト抗体軽鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基と、配列番号4のアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDRL2及び配列番号6のアミノ

10

20

30

40

50



酸配列を有する C D R L 3 からなる群から選択される軽鎖 C D R 又は配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 からなる群から選択される軽鎖 C D R とを含み得る。

【 0 1 4 8 】

更に別の例示的实施形態では、抗原結合フラグメントは、本明細書中で記載される天然ヒト抗体軽鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基と、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 からなる群から選択される少なくとも 2 つの軽鎖 C D R 又は配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 からなる群から選択される少なくとも 2 つの軽鎖 C D R とを含み得る。

10

【 0 1 4 9 】

更に別の例示的实施形態では、抗原結合フラグメントは、本明細書中で記載される天然ヒト抗体軽鎖のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基と、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 又は配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する C D R L 1、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 とを含み得る。

20

【 0 1 5 0 】

更に具体的な実施形態では、抗原結合フラグメントは、配列番号 8 若しくは配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域又はそのフラグメントを含み得る。

【 0 1 5 1 】

本発明によれば、抗原結合フラグメントは、例えば、F a b フラグメント、F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメント、F d フラグメント、F v フラグメント又は d A b フラグメントであり得る。

【 0 1 5 2 】

好ましくは、抗原結合フラグメントは、例えば、F a b フラグメント又は F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメントであり得る。

【 0 1 5 3 】

本発明はさらに、本明細書中に記載する抗原結合フラグメントのアミノ酸配列を含む単離された抗体も含む。単離された抗体は定常領域も含み得る。

30

【 0 1 5 4 】

変異体抗体及び抗原結合フラグメント

齧歯類抗体由来の C D R をヒトフレームワーク中のヒト C D R と置換することは、高い抗原結合親和性を移すのに十分である場合があるが ( Jones, P.T. et al., Nature 321:522-525(1986); Verhoeyen, M. et al., Science 239:1534-1536(1988) )、別の場合では、1 つ ( Riechmann, L. et al., Nature 332:323-327(1988) ) 又は複数 ( Queen, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033(1989) ) のフレームワーク領域残基を更に置換する必要がある。抗体ヒト化の技術分野では依然として実質的に予測不可能である。例えば、米国特許第 7, 537, 931 号では、ネズミ抗体の C D R をヒト抗体中に移すことを試みた結果、抗原に対する結合が失われた。

40

【 0 1 5 5 】

ヒト化プロセスの結果、所望の特性 ( すなわち、特異性、親和性など ) を有するヒト化又はハイブリッド抗体が得られないならば、非ヒトアミノ酸フレームワーク残基をヒトアミノ酸フレームワーク残基の代わりに用いることが可能である。

【 0 1 5 6 】

本発明は、したがって、本明細書中に記載されるヒト化若しくはハイブリッド抗体又は抗原結合フラグメントの変異体を含む。含まれる変異体抗体又は抗原結合フラグメントは、本明細書中に記載されるヒト化若しくはハイブリッド抗体又は抗原結合フラグメントの

50

アミノ酸配列において変動を有するものである。例えば、本発明に含まれる変異体抗体又は抗原結合フラグメントは、非ヒト相補性決定領域アミノ酸残基を含み得る軽鎖可変領域及び重鎖可変領域並びに及び天然ヒト抗体のヒトフレームワーク領域アミノ酸残基を有し、（好ましくはフレームワーク領域において）少なくとも1つのアミノ酸変動を更に含むものである。

【0157】

本発明に含まれる変異体抗体又は抗原結合フラグメントは、例えば、ヒト化若しくはハイブリッド抗体又は抗原結合フラグメントと比較して同様又は改善された特性を有するが、本明細書中に記載するヒト化又はハイブリッド抗体と比較して少なくとも1つのアミノ酸変動を有するものである。

10

【0158】

本発明に含まれる変異体抗体又は抗原結合フラグメントは、挿入、欠失又はアミノ酸置換（保存的若しくは非保存的）を含み得るものである。いくつかの変異体は、したがって、そのアミノ酸配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、その場所に異なる残基が挿入されている可能性がある。

【0159】

置換型突然変異誘発について興味深い部位は、超可変領域（CDR）、フレームワーク領域又はさらには定常領域も含み得る。保存的置換は、以下に記載する群（1～6群）のうちの1つからのアミノを、同じ群の別のアミノ酸と交換することによっておこなうことができる。

20

【0160】

保存的置換の他の例示的实施形態を表1A中、「好ましい置換」の見出しの下に記載する。そのような置換の結果、望ましくない特性が生じるならば、表1A中で「例示的置換」と表示されているか、又はアミノ酸クラスに関して以下でさらに記載するようなさらに実質的な変化を導入することができ、生成物をスクリーニングすることができる。

【0161】

「保存的置換」として特定される置換の例を表1Aに示す。そのような置換の結果、望ましくない変化が生じるならば、表1A中で「例示的置換」と表示されているか、又はアミノ酸クラスに関して以下でさらに記載するような他の種類の置換を導入し、生成物をスクリーニングする。

30

【0162】

機能又は免疫学的同一性における大幅な修飾は、（a）例えばシート若しくはらせん状立体配座としての置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造、（b）標的部位での分子の電荷若しくは疎水性、又は（c）側鎖の嵩の維持に対するそれらの効果が著しく異なる置換を選択することにより、達成することができる。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて分類される：

（1群） 疎水性：ノルロイシン、メチオニン（Met）、アラニン（Ala）、バリン（Val）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）

（2群） 中性親水性：システイン（Cys）、セリン（Ser）、トレオニン（Thr）

40

（3群） 酸性：アスパラギン酸（Asp）、グルタミン酸（Glu）

（4群） 塩基性：アスパラギン（Asn）、グルタミン（Gln）、ヒスチジン（His）、リシン（Lys）、アルギニン（Arg）

（5群） 鎖配向に影響を及ぼす残基：グリシン（Gly）、プロリン（Pro）；及び

（6群） 芳香族：トリプトファン（Trp）、チロシン（Tyr）、フェニルアラニン（Phe）

非保存的置換は、これらのクラスの成員を別のものと交換することを伴う。

## 【表 1 A】

表 1 A アミノ酸置換

元の残基	例示的置換	保存的置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg, Asp	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg,	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

## 【 0 1 6 3 】

変異体抗体又は抗原結合フラグメントのアミノ酸配列における変動は、アミノ酸の付加、欠失、挿入、置換など、1以上のアミノ酸の骨格若しくは側鎖における1以上の修飾、又は1以上のアミノ酸（側鎖若しくは骨格）に対する基若しくは別の分子の付加を含み得る。

## 【 0 1 6 4 】

変異体抗体又は抗原結合フラグメントは、元の抗体又は抗原結合フラグメントアミノ酸配列と比較して、そのアミノ酸配列において相当な配列類似性及び／又は配列同一性を有し得る。2つの配列間の類似性の程度は、同一性（同じアミノ酸）のパーセンテージ及び保存的置換のパーセンテージに基づく。

## 【 0 1 6 5 】

別のフレームワーク領域と比較して、フレームワーク領域の同一性（％）を決定する場合、CDRアミノ酸配列は、好ましくは考慮すべきではない。別のものと比較してのフレームワーク領域の同一性（％）は、好ましくは、フレームワークごとではなく、全フレームワーク領域にわたって決定される。

## 【 0 1 6 6 】

一般的に、可変鎖間の類似性及び同一性の程度は、本明細書中では、B l a s t 2 配列プログラム (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden(1999), “Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) を用い、デフォルトのセッティング、すなわち b l a s t p プログラム、B L O S U M 6 2 マトリックス (オープンギャップ 1 1 及びエクステンションギャップペナルティー 1 ; g a p x d r o p o f f 5 0、期待値 1 0 . 0、ワードサイズ 3) 及び活性化フィルターを使用して決定した。

## 【 0 1 6 7 】

同一性 ( % ) は、したがって元のペプチドと比較して同一であり、同じか又は類似した位置を占める可能性があるアミノ酸を表す。

10

## 【 0 1 6 8 】

類似性 ( % ) は、同一であるアミノ酸及び元のペプチドと比較して同じか又は類似した位置にて保存的アミノ酸置換で置換されたものを示す。

## 【 0 1 6 9 】

本発明の変異体は、したがって元の配列又は元の配列の一部と少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列同一性を有し得るものを含む。

## 【 0 1 7 0 】

20

変異体の例示的实施形態は、本明細書中に記載する配列に対して少なくとも 8 1 % の配列同一性を有し、元の配列又は元の配列の一部と 8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列類似性を有するものである。

## 【 0 1 7 1 】

変異体の他の例示的实施形態は、本明細書中に記載する配列に対して少なくとも 8 2 % の配列同一性を有し、元の配列又は元の配列の一部と 8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列類似性を有するものである。

## 【 0 1 7 2 】

30

変異体のさらなる例示的实施形態は、本明細書中に記載する配列に対して少なくとも 8 5 % の配列同一性を有し、元の配列又は元の配列の一部と 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列類似性を有するものである。

## 【 0 1 7 3 】

変異体の他の例示的实施形態は、本明細書中に記載する配列に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有し、元の配列又は元の配列の一部と 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列類似性を有するものである。

## 【 0 1 7 4 】

40

変異体のさらなる例示的实施形態は、本明細書中に記載する配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有し、元の配列又は元の配列の一部と 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列類似性を有するものである。

## 【 0 1 7 5 】

変異体のさらに別の例示的实施形態は、本明細書中に記載する配列に対して少なくとも 9 7 % の配列同一性を有し、元の配列又は元の配列の一部と 9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列類似性を有するものである。

## 【 0 1 7 6 】

簡潔にするために、本出願者は、本発明により含まれる個々の変異体の例示的实施形態を説明し、特定された配列同一性 ( % ) 及び配列類似性 ( % ) を含む表 1 B を本明細書中

50

で記載する。各「X」は、所与の変異体を示すものと解釈される。

【表 1 B】

表 1 B		配列同一性 (%)																				
配列類似性 (%)		80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0
	80	X																				
	81	X	X																			
	82	X	X	X																		
	83	X	X	X	X																	
	84	X	X	X	X	X																
	85	X	X	X	X	X	X															
	86	X	X	X	X	X	X	X														
	87	X	X	X	X	X	X	X	X													
	88	X	X	X	X	X	X	X	X	X												
	89	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
	90	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X										
	91	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	92	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
	93	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
	94	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
	95	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
	96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
	97	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
	98	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	99	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
100	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

【 0 1 7 7 】

本発明は、したがって、非ヒトアミノ酸フレームワーク残基が再導入されているか、又は他の種類のアミノ酸修飾がなされているヒト化又はハイブリッド抗体を含む。抗体の特性を最適化するために特に選択されるこれらのアミノ酸には、抗原結合に関与するものが含まれる。そのようなアミノ酸の例を図 2 に示す。

【 0 1 7 8 】

例示的な実施形態において、本発明のヒト化又はハイブリッド抗体は、したがって、重鎖可変領域中に 1 ~ 2 1 の非ヒトフレームワーク領域アミノ酸残基を含み得る（復帰突然変異）。

【 0 1 7 9 】

別の例示的な実施形態において、ヒト化又はハイブリッド抗体は、軽鎖可変領域中に 1 ~ 1 2 の非ヒトフレームワーク領域アミノ酸残基を含み得る（復帰突然変異）。

【 0 1 8 0 】

本明細書中で用いられる場合、「1～20」という用語は、個々の値を含み、例えば、1、2、3及び20まで；1～20；1～19；1～18；1～17；1～16；1～15など；2～20；2～19；2～18；2～17など；3～20；3～19；3～18など；4～20；4～19；4～18；4～17；4～16など；5～20；5～19；5～18；5～17などの範囲である。

【0181】

同様に、「1～12」という用語は、個々の値を含み、例えば、1、2、3、及び12まで；1～12；1～11；1～10など；2～12；2～11、2～10；2～9；2～8など；3～12；3～11；3～10；3～9など；4～12；4～11など；5～12；5～11；5～10；5～9；5～8；5～7；などの範囲である。

10

【0182】

同様の用語は、同じように解釈されるものとする。

【0183】

本発明は、別のアミノ酸配列と所望の同一性(%)を有するアミノ酸配列、例えば、「非ヒト親抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも70%の同一性を有する天然ヒト抗体軽鎖フレームワーク領域」又は「非ヒト親抗体の重鎖フレームワーク領域と少なくとも70%の同一性を有する天然ヒト抗体重鎖フレームワーク領域」を含むか又は使用する。

【0184】

「非ヒト親抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも70%の同一性を有する天然ヒト抗体軽鎖フレームワーク領域」という用語は、非ヒト親抗体の軽鎖フレームワーク領域と70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する天然ヒト抗体軽鎖フレームワーク領域を含む。同一性(%)は、好ましくは、全フレームワーク領域(すなわち、CDRを除く)にわたって決定される。

20

【0185】

変異体について前述するように、「非ヒト親抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも70%の同一性を有する軽鎖フレームワーク領域」という用語は、非ヒト親抗体の軽鎖フレームワーク領域と70%の同一性を有し、また非ヒト親抗体の軽鎖フレームワーク領域と71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列類似性も有し得る軽鎖フレームワーク領域を含む。

30

【0186】

「非ヒト親抗体の重鎖フレームワーク領域と少なくとも70%の同一性を有する天然ヒト抗体重鎖フレームワーク領域」という用語は、非ヒト親抗体の重鎖フレームワーク領域と70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列同一性を有する天然ヒト抗体重鎖フレームワーク領域を含む。

40

【0187】

変異体に関して前述するように、「非ヒト親抗体の重鎖フレームワーク領域と少なくとも70%の同一性を有する重鎖フレームワーク領域」という用語は、非ヒト親抗体の重鎖フレームワーク領域と70%の同一性を有し、非ヒト親抗体の重鎖フレームワーク領域と71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の配列類似性も有し得る重鎖フレームワーク領域を含む。

【0188】

50

### 細胞における抗体の産生

本明細書中で開示される抗体は、当業者によく知られている種々の方法（組換えDNA法、化学合成など）により作製することができる。

#### 【0189】

抗体を発現するために、本明細書中に記載する免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のいずれか1つをコード化できるヌクレオチド配列を、特定の宿主において挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳制御のための要素を含むベクター中に挿入することができる。これらの要素としては、調節配列、例えばエンハンサー、構成的及び誘導プロモータ、並びに5'及び3'非翻訳領域を挙げることができる。当業者に周知の方法を用いてそのような発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、及びインビボ遺伝子組換えが挙げられる。

10

#### 【0190】

当業者に公知の種々の発現ベクター/宿主細胞系を用いて、本明細書中で記載する免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のいずれか1つをコード化できるヌクレオチド配列から誘導されるポリペプチド又はRNAを発現することができる。これらとしては、組換えバクテリオファージ、プラスミド、又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物；酵母発現ベクターで形質転換された酵母；バキュロウイルスベクターに感染した昆虫細胞系；ウイルス若しくは細菌発現ベクターで形質転換された植物細胞系；又は動物細胞系が挙げられるが、これらに限定されるものではない。ほ乳類系における組換えタンパク質の長期産生のために、細胞系において安定な発現を実施することができる。例えば、本明細書中で記載する免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のいずれか1つをコード化できるヌクレオチド配列を、ウイルス性複製開始点及び/又は内因性発現要素並びに選択可能又は可視マーカー遺伝子を同じか又は別個のベクター上に含み得る発現ベクターを用いて、細胞系に形質転換することができる。本発明は、用いられるベクター又は宿主細胞により限定されない。本発明のある実施形態では、本明細書中で記載する免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のいずれか1つをコード化できるヌクレオチド配列をそれぞれ別個の発現ベクター中にライゲートし、各鎖を別々に発現させることができる。別の実施形態では、本明細書中で記載する免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のいずれか1つをコード化することができる軽鎖及び重鎖はどちらも1つの発現ベクター中にライゲートすることができ、同時に発現させることができる。

20

30

#### 【0191】

或いは、RNA及び/又はポリペプチドは、本明細書中で記載する免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のいずれか1つをコード化できるヌクレオチド配列を含むベクターから、インビトロ転写系又は結合型インビトロ転写/翻訳系を用いて、発現することができる。

#### 【0192】

一般的に、本明細書中で記載する免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のいずれか1つをコード化できるヌクレオチド配列を含み、及び/又は本明細書中で記載する免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のいずれか1つをコード化できるヌクレオチド配列によりコード化されるポリペプチドを発現する宿主細胞、又はその一部を、当業者に公知の種々の手順によって同定することができる。これらの手順としては、DNA/DNA又はDNA/RNAハイブリダイゼーション、PCR増幅、及び核酸若しくはアミノ酸配列の検出及び/又は定量化のための膜、溶液若しくはチップベースの技術を含むタンパク質バイオアッセイ又はイムノアッセイ技術が挙げられるが、これらに限定されるものではない。ポリペプチドの発現を、特異的ポリクローナル又はモノクローナル抗体のいずれかを用いて検出又は測定するための免疫学的方法は、当該技術分野で公知である。そのような技術の例としては、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、及び蛍光標識細胞分取(FACS)が挙げられる。当業者は、これらの方法を本発明に容易に適応させることができる。

40

#### 【0193】

本明細書中で記載する免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のいずれか1つをコード化できるヌ

50

クレオチド配列を含む宿主細胞を、したがって、対応するRNAの転写及び/又は細胞培養からのポリペプチドの発現のための条件下で培養することができる。細胞によって産生されるポリペプチドは、使用する配列及び/又はベクターに応じて、分泌される可能性があるか、又は細胞内に保持される可能性がある。例示的な実施形態では、本明細書中で記載する免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のいずれか1つをコード化できるヌクレオチド配列を含む発現ベクターは、原核生物又は真核生物細胞膜を通してポリペプチドを分泌させるシグナル配列を含むように設計することができる。

【0194】

重鎖可変領域をコード化する核酸の例示的实施形態を配列番号21及び配列番号22で提供する。

10

【0195】

軽鎖可変領域をコード化する核酸の例示的实施形態を配列番号23及び配列番号24で提供する。

【0196】

遺伝コードの生来の縮重のために、これをコード化する他のDNA配列、実質的に同じであるか又は機能的に等価なアミノ酸配列を産生し、使用して、例えば、本明細書中で記載する免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のいずれか1つをコード化できるヌクレオチド配列によりコード化されるポリペプチドを発現することができる。本発明のヌクレオチド配列は、これらに限定されるものではないが、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、及び/又は発現の修飾をはじめとする種々の目的のためにヌクレオチド配列を変更するために、当該技術分野で一般的に公知の方法を用いて操作することができる。遺伝子フラグメント及び合成オリゴヌクレオチドのランダムフラグメンテーション及びPCRリアセンブリによるDNAシャッフリングを用いて、ヌクレオチド配列を操作することができる。例えば、オリゴヌクレオチド介在性部位定方向突然変異を用いて、新しい制限部位を作製し、グリコシル化パターンを改変し、コドン選好を変更し、スプライス変異体を産生するなどの突然変異を導入することができる。

20

【0197】

加えて、宿主細胞株を、挿入された配列の発現を調節するか、又は望ましい方法で発現されたポリペプチドを処理するその能力について選択することができる。ポリペプチドのそのような修飾としては、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、及びアシル化が挙げられるが、これらに限定されるものではない。例示的な実施形態では、特定のグリコシル化構造又はパターンを含む抗体が望ましい可能性がある。ポリペプチドの「ブレブロ」形態を切断する翻訳後プロセッシングを用いて、タンパク質ターゲティング、フォールディング、及び/又は活性を規定することもできる。翻訳後活性について特異的な細胞機構及び特徴的な機構を有する種々の宿主細胞（例えば、CHO、HeLa、MDCK、HEK293、及びW138）は、商業的に入手可能であり、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）から入手可能であり、発現されたポリペプチドの正しい修飾及びプロセッシングを確実にするために選択することができる。

30

【0198】

当業者は、天然、修飾、又は組換え核酸配列を非相同配列にライゲートして、その結果、前記宿主系のいずれにおいても非相同ポリペプチド部分を含む融合ポリペプチドの翻訳をもたらすことができることを、容易に理解するであろう。そのような非相同ポリペプチド部分は、市販の親和性マトリックスを用いる融合ポリペプチドの精製を促進することができる。そのような部分としては、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質、チオレドキシン、カルモジュリン結合ペプチド、6-His（His）、FLAG、c-myc、ヘマグルチニン（HA）、及び抗体エピトープ、例えばモノクローナル抗体エピトープが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0199】

さらなる態様では、本発明は、融合タンパク質をコード化するヌクレオチド配列を含み得るポリヌクレオチドに関する。融合タンパク質は、本明細書中で記載するポリペプチド

50



(例えば、完全軽鎖、完全重鎖、可変領域、CDRなど)と融合した融合パートナー(例えば、HA、Fcなど)を含み得る。

【0200】

当業者はさらに、核酸及びポリペプチド配列を、全部又は一部において、当該技術分野で周知の化学又は酵素法を用いて合成することができることを容易に認識するであろう。例えば、ペプチド合成は、種々の固相技術を用いて実施することができ、ABI 431Aペプチドシンセサイザー(PEバイオシステムズ)などの機械を用いて合成を自動化することができる。所望により、アミノ酸配列を合成中に改変することができ、及び/又は他のタンパク質からの配列と組み合わせて、変異体タンパク質を産生することができる。

【0201】

軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインのうちの1つだけが利用可能である場合、当該技術分野で公知の方法を用いて相補性可変ドメインのライブラリをスクリーニングすることにより、抗体又は抗原結合フラグメントを再構成することができる(Portolano et al., The Journal of Immunology(1993) 150:880-887, Clarkson et al., Nature(1991) 352:624-628)。このように、所望の抗原結合特異性を有する無傷抗体を再構成するためには、可変領域アミノ酸配列(重鎖可変領域又は軽鎖可変領域)の1つだけがわかっていることで十分であることが多い。したがって、抗体の軽鎖可変領域又は重鎖可変領域をコード化する核酸は、互いに組み合わせた場合に、十分な抗原結合特異性を有する抗原結合フラグメント又は抗体を形成する相補性鎖の同定に有用であり得る。一本鎖核酸(例えば、オリゴ)又は抗体の軽鎖可変領域若しくは重鎖可変領域をコード化する核酸と高レベルの配列同一性を有するその補体は、後者を検出するために、又は高レベルの配列同一性を共有する任意の他の核酸配列を検出するために、有用であり得る。

【0202】

したがって、さらなる態様において、本発明はさらに、本明細書中に記載するヒト化又はハイブリッド抗体の軽鎖可変領域及び/又は重鎖可変領域をコード化し、本明細書中に記載する抗原結合フラグメント又は本明細書中に記載する単離された抗体をコード化する、単離された核酸も提供する。

【0203】

さらなる態様では、本発明は、本明細書中で記載する(単離された)核酸を含むベクター又は構築物を提供する。本発明によれば、ベクターは、例えば、ほ乳類発現ベクター、細菌発現ベクターなどであり得る。

【0204】

本発明はさらに、本明細書中に記載する単離された核酸又は本明細書中に記載するベクターを含む単離された細胞も含む。本発明の抗体又は抗原結合フラグメントを発現する単離された細胞も本発明に含まれる。好適な細胞としては、例えば、ほ乳類細胞、細菌細胞などが挙げられる。

【0205】

本発明のさらに別の態様は、ヒト化又はハイブリッド抗クラステリン抗体を作製する方法であって、クラステリンに対して特異的結合が可能な非ヒト抗体の非ヒト重鎖CDRアミノ酸残基を天然ヒト抗体重鎖可変領域のフレームワーク領域中に導入することを含み得る方法に関する。

【0206】

本発明のさらなる態様は、ヒト化又はハイブリッド抗クラステリン抗体を作製する方法であって、クラステリンに対して特異的結合が可能な非ヒト抗体の非ヒト重鎖CDRアミノ酸残基及び天然ヒト抗体重鎖可変領域のフレームワーク領域アミノ酸を含む重鎖可変領域(又は完全重鎖)をコード化する核酸で細胞を形質転換することを含み得る方法に関する。この方法はさらに、相補性軽鎖可変領域(又は完全軽鎖)をコード化する核酸で細胞を形質転換することも含み得る。

【0207】

別の態様では、本発明は、ヒト化又はハイブリッド抗クラステリン抗体を作製する方法

10

20

30

40

50

であって、クラステリンに対して特異的結合が可能な非ヒト抗体の非ヒト重鎖 C D R アミノ酸残基及び天然ヒト抗体重鎖可変領域のフレームワーク領域アミノ酸を含む重鎖可変領域（又は完全重鎖）を発現することを含み得る方法に関する。この方法はまた、相補性軽鎖可変領域（又は完全軽鎖）を発現することを含み得る。

【 0 2 0 8 】

ヒト化目的のために選択することができる天然ヒト抗体重鎖可変領域は以下の特性を有し得る： a ) 非ヒト抗体の重鎖に類似しているか、又は同一である（重ね合わせることができる）三次元構造、 b ) 非ヒト抗体の重鎖フレームワーク領域に対して少なくとも 7 0 % 同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域、及び / 又は； c ) 非ヒト重鎖 C D R アミノ酸残基と同じであるか又は実質的に同じである重鎖 C D R（例えば、3 つすべての C D R）中の（多数の）アミノ酸残基。

10

【 0 2 0 9 】

方法は、したがって例えば、非ヒト抗体の少なくとも 2 つの C D R の非ヒト重鎖 C D R アミノ酸残基を導入することを含み得る。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、非ヒト抗体の少なくとも 2 つの C D R をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される重鎖可変領域は、したがって、非ヒト抗体の少なくとも 2 つの C D R を含み得る。

【 0 2 1 0 】

方法は、好ましくは、3 つすべての C D R の非ヒト重鎖 C D R アミノ酸残基を導入することを含み得る。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、非ヒト抗体の 3 つの C D R をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される重鎖可変領域は、したがって、非ヒト抗体の 3 つの C D R を含み得る。

20

【 0 2 1 1 】

方法は、したがって配列番号 1、配列番号 2 及び配列番号 3 のアミノ酸配列を含む非ヒト C D R を導入することを含む。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、配列番号 1、配列番号 2 及び配列番号 3 をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される重鎖可変領域は、したがって、配列番号 1、配列番号 2 及び配列番号 3 を含み得る。

【 0 2 1 2 】

30

方法は、したがって、配列番号 1 1、配列番号 1 2 及び配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む非ヒト C D R を導入することを含む。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、配列番号 1 1、配列番号 1 2 及び配列番号 1 3 をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される重鎖可変領域は、したがって、配列番号 1 1、配列番号 1 2 及び配列番号 1 3 を含み得る。

【 0 2 1 3 】

或いは、前記 C D R の短いバージョンを天然ヒト抗体重鎖可変領域のフレームワーク領域に導入することができる。

【 0 2 1 4 】

本発明の方法は、クラステリンに対して特異的結合が可能な非ヒト抗体の非ヒト軽鎖 C D R アミノ酸残基を天然ヒト抗体軽鎖可変領域のフレームワーク領域中に導入することを含み得る。

40

【 0 2 1 5 】

本発明の方法は、クラステリンに対して特異的結合が可能な非ヒト抗体の非ヒト軽鎖 C D R アミノ酸残基及び天然ヒト抗体軽鎖可変領域のフレームワーク領域アミノ酸を含む軽鎖可変領域（又は完全軽鎖）をコード化する核酸の発現を可能にすることを含み得る。この方法は、相補性重鎖可変領域（又は完全重鎖）をコード化する核酸で細胞を形質転換することを含み得る。

【 0 2 1 6 】

別の態様では、本発明は、ヒト化又はハイブリッド抗クラステリン抗体を作製する方法

50

であって、クラステリンに対して特異的結合が可能な非ヒト抗体の非ヒト軽鎖 C D R アミノ酸残基及び天然ヒト抗体軽鎖可変領域のフレームワーク領域アミノ酸を含む軽鎖可変領域（又は完全重鎖）を発現することを含み得る方法に関する。この方法は、相補性重鎖可変領域（又は完全重鎖）を発現することを含み得る。

【 0 2 1 7 】

ヒト化の目的で選択することができる天然ヒト抗体軽鎖可変領域は、次の特徴を有し得る： a ) 非ヒト抗体の軽鎖と類似しているか又は同一（重ね合わせが可能）である三次元構造、 b ) 非ヒト抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも 7 0 % 同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域、及び / 又は； c ) 非ヒト軽鎖 C D R アミノ酸残基と同じか又は実質的に同じである軽鎖 C D R（例えば、3つの C D R 全て）中の（多数の）アミノ酸残基。

10

【 0 2 1 8 】

方法は、したがって、例えば、非ヒト抗体の少なくとも 2 つの C D R の非ヒト軽鎖 C D R アミノ酸残基を導入することを含み得る。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、非ヒト抗体の少なくとも 2 つの C D R をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される軽鎖可変領域は、したがって、非ヒト抗体の少なくとも 2 つの C D R を含み得る。

【 0 2 1 9 】

方法は、好ましくは、3つの C D R 全ての非ヒト軽鎖 C D R アミノ酸残基を導入することを含み得る。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、非ヒト抗体の3つの C D R をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される軽鎖可変領域は、したがって、非ヒト抗体の3つの C D R を含み得る。

20

【 0 2 2 0 】

方法は、したがって、配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 6 のアミノ酸配列を含む非ヒト C D R を導入することを含む。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 6 をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される軽鎖可変領域は、したがって、配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 6 を含み得る。

【 0 2 2 1 】

30

方法は、したがって、配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む非ヒト C D R を導入することを含む。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される軽鎖可変領域は、したがって、配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 を含み得る。

【 0 2 2 2 】

或いは、前記 C D R の短いバージョンを天然ヒト抗体重鎖可変領域のフレームワーク領域中に導入することができる。

【 0 2 2 3 】

本発明のさらなる態様は、ヒト化抗クラステリン抗体を作製する方法であって、クラステリンに対して特異的結合が可能な非ヒト抗体の非ヒト重鎖 C D R アミノ酸残基を天然ヒト抗体重鎖可変領域のフレームワーク領域中に導入し、そしてクラステリンに対して特異的結合が可能な非ヒト抗体の非ヒト軽鎖 C D R アミノ酸残基を天然ヒト抗体軽鎖可変領域のフレームワーク領域中に導入することを含み得る方法に関する。

40

【 0 2 2 4 】

さらに、本発明のさらなる態様は、クラステリンに対して特異的結合が可能な非ヒト抗体の非ヒト重鎖 C D R アミノ酸残基及び天然ヒト抗体重鎖可変領域のフレームワーク領域をコード化する核酸を発現させ、そしてクラステリンに対して特異的結合が可能な非ヒト抗体の非ヒト軽鎖 C D R アミノ酸残基及び天然ヒト抗体軽鎖可変領域のフレームワーク領域をコード化する核酸を発現させることを含み得る、ヒト化抗クラステリン抗体を作製す

50

る方法に関する。

【0225】

ヒト化の目的で選択することができる天然ヒト抗体重鎖可変領域は、次の特性：a) 非ヒト抗体の重鎖フレームワーク領域に対して少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含むこと、及び；b) 非ヒト重鎖CDRアミノ酸残基と同じであるか又は実質的に同じである重鎖CDR（例えば、3つのCDR全て）中に（多数の）アミノ酸残基を有すること、を有し得、一方、ヒト化の目的で選択することができる天然ヒト抗体軽鎖可変領域は、次の特性：a) 非ヒト抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有するフレームワーク領域を含むこと、及び；b) 非ヒト軽鎖CDRアミノ酸残基と同じか又は実質的に同じである軽鎖CDR（例えば、3つのCDR全て）中に（多数の）アミノ酸残基を有すること、を有し得る。天然ヒト抗体可変領域（複数可）は、好ましくは、非ヒト抗体可変領域（複数可）と類似しているか又は同一（重ね合わせ可能）である三次元構造を有する。

10

【0226】

本発明によれば、方法は、非ヒト抗体の少なくとも2つのCDRの非ヒト重鎖CDRアミノ酸残基を導入することを含み得る。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、非ヒト抗体の少なくとも2つのCDRをコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される重鎖可変領域は、したがって、非ヒト抗体の少なくとも2つのCDRを含み得る。

【0227】

20

或いは、方法は、3つのCDR全ての非ヒト重鎖CDRアミノ酸残基を導入することを含み得る。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、非ヒト抗体の3つのCDRをコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される重鎖可変領域は、したがって、非ヒト抗体の3つのCDRを含み得る。

【0228】

また、本発明によれば、方法は、非ヒト抗体の少なくとも2つのCDRの非ヒト軽鎖CDRアミノ酸残基を導入することを含み得る。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、非ヒト抗体の少なくとも2つのCDRをコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される軽鎖可変領域は、したがって、非ヒト抗体の少なくとも2つのCDRを含み得る。

30

【0229】

或いは、方法は、3つのCDR全ての非ヒト軽鎖CDRアミノ酸残基を導入することを含み得る。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、非ヒト抗体の3つのCDRをコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される軽鎖可変領域は、したがって、非ヒト抗体の3つのCDRを含み得る。

【0230】

本明細書中に記載する方法を使用して、配列番号1、配列番号2及び配列番号3のアミノ酸配列を含むCDRを、有利には、天然ヒト抗体重鎖可変領域中に移入する。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、配列番号1、配列番号2及び配列番号3をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される軽鎖可変領域は、したがって、配列番号1、配列番号2及び配列番号3を含み得る。

40

【0231】

本明細書中に記載する方法を使用して、配列番号11、配列番号12及び配列番号13のアミノ酸配列を含むCDRを、有利には、天然ヒト抗体重鎖可変領域中に移入する。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、配列番号11、配列番号12及び配列番号13をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される軽鎖可変領域は、したがって、配列番号11、配列番

50

号 1 2 及び配列番号 1 3 を含み得る。

【 0 2 3 2 】

本明細書中に記載する方法を使用して、配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 6 のアミノ酸配列を含む C D R を、有利には天然ヒト抗体軽鎖可変領域中に移入する。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 6 をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される軽鎖可変領域は、したがって、配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 6 を含み得る。

【 0 2 3 3 】

本明細書中に記載する方法を使用して、配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む C D R を、有利には天然ヒト抗体軽鎖可変領域中に移入する。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で使用される核酸は、したがって、配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 をコード化することができる。ヒト化又はハイブリッド抗体を作製する方法で発現される軽鎖可変領域は、したがって、配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 を含み得る。

【 0 2 3 4 】

別の態様では、本発明は、ヒト化又はハイブリッド抗クラステリン抗体を作製するための方法であって、本明細書中で記載される重鎖可変領域をコード化する核酸で宿主細胞を形質転換することを含む方法に関する。

【 0 2 3 5 】

好適な重鎖可変領域の例示的实施形態は、配列番号 1、配列番号 2 及び配列番号 3 のアミノ酸配列を有する 3 つの C D R 及び非ヒト抗体の重鎖フレームワーク領域に対して少なくとも 70 % 同一であるアミノ酸配列を有する天然ヒト抗体重鎖フレームワーク領域を含み得る非ヒト抗体の重鎖可変領域である。好ましくは、天然ヒト抗体は、非ヒト重鎖の C D R (例えば、3 つの C D R 全て)と同じであるか又は実質的に同じである(多数の)重鎖 C D R アミノ酸残基を含み得る。

【 0 2 3 6 】

好適な重鎖可変領域の例示的实施形態は、配列番号 1 1、配列番号 1 2 及び配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する 3 つの C D R 及び非ヒト抗体の重鎖フレームワーク領域に対して少なくとも 70 % 同一であるアミノ酸配列を有する天然ヒト抗体重鎖フレームワーク領域を含み得る非ヒト抗体の重鎖可変領域である。好ましくは、天然ヒト抗体は、非ヒト重鎖の C D R (例えば、3 つの C D R 全て)と同じであるか又は実質的に同じである(多数の)重鎖 C D R アミノ酸残基を含み得る。

【 0 2 3 7 】

本発明の方法は、相補性軽鎖をコード化する核酸で宿主細胞を形質転換することをさらに含み得る。

【 0 2 3 8 】

望ましいならば、相補性軽鎖は、重鎖をコード化するのと同じ核酸によってコード化され得る。

【 0 2 3 9 】

そのような相補性軽鎖は、配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する 3 つの C D R 及び非ヒト抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも 70 % 同一であるアミノ酸配列を有する天然ヒト抗体軽鎖フレームワーク領域を含み得る非ヒト抗体の軽鎖可変領域を含み得る。好ましくは、天然ヒト抗体は、非ヒト軽鎖の C D R (例えば、3 つの C D R 全て)と同じか又は実質的に同じである(多数の)軽鎖 C D R アミノ酸残基を含み得る。

【 0 2 4 0 】

そのような相補性軽鎖は、配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する 3 つの C D R 及び非ヒト抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも 70 % 同一であるアミノ酸配列を有する天然ヒト抗体軽鎖フレームワーク領域を含み得る非ヒト抗

10

20

30

40

50

体の軽鎖可変領域を含み得る。好ましくは、天然ヒト抗体は、非ヒト軽鎖のCDR（例えば、3つのCDR全て）と同じか又は実質的に同じである（多数の）軽鎖CDRアミノ酸残基を含み得る。

【0241】

更に別の態様では、本発明は、ヒト化又はハイブリッド抗クラステリン抗体を作製する方法であって、軽鎖可変領域をコード化する核酸で宿主細胞を形質転換することを含み得る方法に関する。

【0242】

好適な軽鎖可変領域の例示的实施形態は、配列番号4、配列番号5及び配列番号6のアミノ酸配列を有する3つのCDR及び非ヒト抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有する天然ヒト抗体軽鎖フレームワーク領域を含み得る非ヒト抗体の軽鎖可変領域である。好ましくは、天然ヒト抗体は、非ヒト軽鎖のCDR（例えば、3つのCDR全て）と同じか又は実質的に同じである（多数の）軽鎖CDRアミノ酸残基を含む。

10

【0243】

好適な軽鎖可変領域の例示的实施形態は、配列番号14、配列番号15及び配列番号16のアミノ酸配列を有する3つのCDR及び非ヒト抗体の軽鎖フレームワーク領域と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を有する天然ヒト抗体軽鎖フレームワーク領域を含み得る非ヒト抗体の軽鎖可変領域である。好ましくは、天然ヒト抗体は、非ヒト軽鎖のCDR（例えば、3つのCDR全て）と同じか又は実質的に同じである（多数の）軽鎖CDRアミノ酸残基を含む。

20

【0244】

本発明の方法は、相補性重鎖をコード化する核酸で宿主細胞を形質転換することをさらに含み得る。

【0245】

望ましいならば、相補性重鎖は、軽鎖をコード化するのと同じ核酸によりコード化することができる。

【0246】

抗体の医薬組成物及びそれらの使用

別の態様では、本発明は、例えば、本明細書中で記載するヒト化又はハイブリッド抗体、本明細書中に記載する抗原結合フラグメント又は本明細書中に記載する単離された抗体及び薬剂的に許容される担体を含み得る医薬組成物に関する。

30

【0247】

本発明の更に別の態様は、本明細書中に記載する単離された抗体又は抗原結合フラグメントの、疾患の治療又は診断における使用に関する。

【0248】

本発明のさらに別の態様は、本明細書中に記載する医薬組成物及び化学療法剤を含む併用療法に関する。

【0249】

本発明によれば、医薬組成物は、化学療法剤と同時に投与され得る（投与可能である）。

40

【0250】

また本発明によれば、医薬組成物及び化学療法剤は、異なる時間間隔で投与され得る（投与可能である）。

【0251】

さらに本発明によれば、化学療法剤を抗体又は抗原結合フラグメントに共役させることができる。

【0252】

活性成分に加えて、医薬組成物は、水、PBS、塩溶液、ゼラチン、油、アルコール、並びに活性化化合物を薬剂的に用いることができる製剤に加工するのを促進する他の賦形剤

50

及び助剤を含む、薬剂的に許容される担体を含み得る。他の例では、そのような製剤を滅菌することができる。

【0253】

本明細書中で用いられる場合、「医薬組成物」とは、薬剂的に許容される希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント及び／又は担体とあわせた治療有効量の薬剤を意味する。「治療有効量」とは、本明細書中で用いられる場合、所定の状態及び投与法に対して治療効果を提供する量を指す。そのような組成物は、液体又は凍結乾燥若しくは他の方法で乾燥させた処方であり、種々の緩衝液内容物（例えば、Tris-HCl、酢酸塩、リン酸塩）、pH及びイオン強度の希釈液、表面への吸収を防止するアルブミン又はゼラチンなどの添加剤、界面活性剤（例えば、Tween 20、Tween 80、Pluronic F68、胆汁酸塩）を含む。可溶化剤（例えば、グリセロール、ポリエチレングリセロール）、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、チメロサル、ベンジルアルコール、パラベン）、増量物質又は張性修飾剤（例えば、ラクトース、マンニトール）、ポリエチレングリコールなどのポリマーのタンパク質に対する共有結合、金属イオンとの錯体形成、或いはポリ乳酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲルなどのポリマー化合物の粒子状製剤中若しくは上へ、或いはリポソーム、ミクロエマルジョン、ミセル、単層若しくは多重層ベシクル、赤血球ゴースト、又はスフェロプラスト上への物質の組み入れ。そのような組成物は、物理的状态、溶解度、安定性、インビボの放出速度、及びインビボのクリアランス速度に影響を及ぼすであろう。制御放出又は持続放出性組成物には、親油性デポー（例えば、脂肪酸、ワックス、油）中処方が含まれる。ポリマー（例えば、ポロキサマー又はポロキサミン）でコーティングされた粒子状組成物も本発明に含まれる。本発明の組成物の他の実施形態は、粒子状保護コーティング、プロテアーゼ阻害剤又は非経口、肺、鼻、経口、膣、直腸経路をはじめとする種々の投与経路のための浸透エンハンサーを組み入れる。一実施形態では、医薬組成物は、非経口、がん近傍（paracancerally）、経粘膜、経皮、筋肉内、静脈内、皮内、皮下、腹腔内、心室内、頭蓋内及び腫瘍内投与される。

【0254】

さらに、本明細書中で用いられる場合、「薬剂的に許容される担体」又は「医薬担体」は、当該技術分野で公知であり、0.01~0.1M若しくは0.05Mのリン酸塩緩衝液又は0.8%の食塩水が挙げられるが、これらに限定されるものではない。さらに、そのような薬剂的に許容される担体は、水性又は非水性溶液、懸濁液、及びエマルジョンであり得る。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注入可能な有機エステルである。水性担体としては、水、アルコール性／水性溶液、エマルジョン又は懸濁液（食塩水及び緩衝化媒体を含む）が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル又は不揮発性油が挙げられる。静脈内ビヒクルには、流体及び栄養補給剤、電解質補給剤、例えばリンゲルデキストロースをベースとするものなどが含まれる。防腐剤及び他の添加剤、例えば、抗菌剤、酸化防止剤、照合剤（collating agent）、不活性ガスなども存在し得る。

【0255】

本発明で利用される医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、鞘内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻内、腸内、局所、舌下、又は直腸手段をはじめとするが、これらに限定されない様々な経路により投与することができる。

【0256】

本開示のための「治療」という用語は、治療的処置及び予防的又は防止的手段の両方を指し、この場合、目的は、標的とされる病的状態又は障害を防止又は減速（低減）することである。治療を必要とする者としては、障害にすでに罹っている者並びに障害に罹りやすい者又は障害が予防されるべき者が挙げられる。

【0257】

抗体及び抗原結合フラグメントは、種々の疾患の治療において治療的に有用であり得る

。ある例では、抗体又は抗原結合フラグメントは、対象の抗原を発現する細胞と相互作用し、ADCCを媒介することにより免疫学的反応を誘発することができる。他の例では、抗体又はフラグメントは、抗原とそのタンパク質パートナーとの相互作用をブロックすることができる。さらに別の例では、抗体又はフラグメントは抗原を隔離することができる。

# 【 0 2 5 8 】

「化学療法剤」は、がんの治療で有用な化合物である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えばチオテパ及びシクロホスファミド；スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファン；アジリジン、例えばベンゾドーパ、カルボコン、メツレドパ (meturedopa) 及びウレドパ (uredopa)；エチレンイミン (ethyl enimine) 及びメチルメラミン (methylnamelamine) 例え、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ルアミド (triethylenephosphoramid)、トリエチレンチオホスホルアミド (triethylenethiophosphoramid) 及びトリメチロメラミン (trimethylolomelamine)；窒素マスタード、例えばクロランブシル、クロマファジン (chlom aphazine)、コロホスファミド (cholophosphamid)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、酸化メクロレタミン塩酸塩、メルファラン、ノブエンピキン (nove mbichin)、フェネステリン、ブレドニマスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア (nitrosurea)、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えばアクラシノマイシン (ac lacinomysin)、アクチノマイシン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラピシン (carabycin)、カルミノマイシン、カルチノフィリン (carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、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、クエラマイシン (quelamycin)、ロドルピシン (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、ゾルピシン；抗代謝剤、例えば例え、メトトレキサート及び5 - フルオロウラシル (5 - FU)；葉酸類似体、例えばデノブテリン、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、例えばフルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、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、フロキシウリジン；アンドロゲン、例えばカルステロン、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；抗副腎皮質剤 (anti-adrenals)、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補給剤、例えばフォリン酸 (frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトレキサート (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルチン；ジアジクオン；エルフォミチン (elfomithine)；酢酸エリプチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モビダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィドリル酸 (podophyllinic acid)；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K 7；ラゾキサン；シゾフィラン；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；ウレタン；ビンデシン；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 (「A r a - C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキサン、例えばパクリタキセル及びドセタキセル (doxetaxel)；クロランブシル；ゲムシタビン；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、例えばシスプラチン及びカルボプラチン；ピンブラスチン；白金；エトボシド (V P - 1 6)；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン

10

20

30

40

50



；ナベルピン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタピン；及び前記のいずれかの薬剤的に許容される塩、酸又は誘導体が挙げられる。腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼを阻害する4（5）-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、及びトレミフェン（Fareston）をはじめとする抗エストロゲン剤；並びに抗アンドロゲン剤、例えばフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド及びゴセレリン；並びに前記のいずれかの薬剤的に許容される塩、酸又は誘導体もこの定義に含まれる。

10

#### 【0259】

##### 抗体共役体

本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、検出可能な部分と（すなわち、検出又は診断目的のために）又は治療的部分と（例えば、化学療法剤など、治療目的のために）共役させることができる。

#### 【0260】

「検出可能な部分」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的及び/又は他の物理的手段により検出可能な部分である。検出可能な部分は、直接的及び/又は間接的（例えば、これらに限定されるものではないが、DOTA又はNH<sub>2</sub>S結合などの結合により）のいずれかで本発明の抗体及びそれらの抗原結合フラグメントと、当該技術分野で周知の方法を用いてカップリングさせることができる。様々な検出可能な部分を、必要とされる感受性、結合の容易さ、安定性要件及び利用可能な器具類に応じて選択して、使用することができる。好適な検出可能な部分としては、これらに限定されるものではないが、蛍光標識、放射性標識（例えば、限定されないが、<sup>125</sup>I、In<sup>111</sup>、Tc<sup>99</sup>、I<sup>131</sup>）であり、PETスキャナー用のポジトロン発光同位体等を含む）、核磁気共鳴活性標識、発光標識、化学発光標識、発色団標識、酵素標識（例えば、これらに限定されないが、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）、量子ドット及び/又はナノ粒子が挙げられる。検出可能な部分は、検出可能なシグナルを生成及び/又は産生させることができ、それにより、検出可能な部分からのシグナルが検出されるのを可能にする。

20

30

#### 【0261】

本発明の別の例示的实施形態では、抗体又はその抗原結合フラグメントは、治療部分（例えば、薬剤、細胞毒性部分）をカップリング（修飾）させることができる。

#### 【0262】

例示的な実施形態では、抗体及び抗原結合フラグメントは、化学療法剤又は細胞毒性剤を含み得る。例えば、抗体及び抗原結合フラグメントを化学療法剤又は細胞毒性剤と結合させることができる。本出願の別の箇所に記載されているものに加えて、そのような化学療法剤又は細胞毒性剤としては、これらに限定されないが、イットリウム-90、スカンジウム-47、レニウム-186、ヨウ素-131、ヨウ素-125、及び当業者により認識されている他の多くのもの（例えば、ルテチウム（例えば、Lu<sup>177</sup>）、ピスマス（例えば、Bi<sup>213</sup>）、銅（例えば、Cu<sup>67</sup>））が挙げられる。他の例では、化学療法剤又は細胞毒性剤は、当業者に知られているものの中でも、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、イリノテカン、タキサン、シュードモナスエンドトキシン、リシン、及び他の毒素から構成されていてもよい。

40

#### 【0263】

或いは、本発明の方法を実施するために、また当該技術分野で公知のように、本発明の抗体又は抗原結合フラグメント（結合しているかどうかにかかわらず）と、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントと特異的に結合することができ、所望の検出可能な部分、診断的部分又は治療的部分を有していてもよい第2の分子（例えば、二次抗体など）とを組み合わせ用いることができる。

50

## 【 0 2 6 4 】

治療法

本発明のさらなる態様は、クラステリンを発現するがん細胞の成長を低減するか、又はクラステリン発現細胞を含む腫瘍の容積を低減する方法に関する。この方法は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単離されたヒト抗体、ハイブリッド抗体及びそのフラグメントなどの抗クラステリン抗体を、必要とするほ乳類に投与することを含み得る。

## 【 0 2 6 5 】

この方法は、化学療法剤を投与することをさらに含み得る。

## 【 0 2 6 6 】

本発明はまた、そのさらなる態様において、増大したクラステリン発現又は分泌と関連する疾患の治療法にも関する。この方法は、本明細書中で記載するヒト化若しくはハイブリッド抗体、本明細書中に記載する抗原結合フラグメント又は本明細書中に記載する単離された抗体を、必要とするほ乳類に投与することを含み得る。

## 【 0 2 6 7 】

そのような治療法から恩恵を受ける、必要とするほ乳類としては、例えば、がん腫を有するほ乳類、クラステリンレベルが上昇したほ乳類、血漿又は血液クラステリンレベルが上昇したほ乳類、上皮間葉移行が可能な細胞を有しているか又は有することが可能なほ乳類、クラステリン（プレクラステリン若しくは分泌されたクラステリン）又はクラステリン発現若しくは分泌（血液若しくは血漿クラステリンを含む）の増加したレベルに関連する疾患を有するほ乳類などを挙げることができる。

## 【 0 2 6 8 】

本発明の別の態様は、本明細書中で記載するヒト化又はハイブリッド抗体、本明細書中に記載する抗原結合フラグメント又は本明細書中に記載する単離された抗体の、クラステリン発現若しくは分泌に関連する疾患の治療用医薬の製造における使用に関する。

## 【 0 2 6 9 】

キット及びアッセイ

さらなる態様では、本発明は、例えば、本明細書中で記載するヒト化又はハイブリッド抗体、本明細書中に記載する抗原結合フラグメント又は記載される単離された抗体を含み得るバイアル（複数可）を含むキットを提供する。このキットは、検出目的又は治療目的で用いることができる。

## 【 0 2 7 0 】

別の例示的实施形態では、キットは、本明細書中に記載する単離された核酸又は本明細書中に記載するベクターを含み得る。そのようなキットは、相補性核酸の検出、或いはコード化するタンパク質の発現に有用であり得る。

## 【 0 2 7 1 】

本発明は、したがって、クラステリンを含むか又は含むことが疑われる試料を、本明細書中で記載するヒト化若しくはハイブリッド抗体、本明細書中に記載する抗原結合フラグメント又は記載される単離された抗体と接触させることにより、クラステリン（プレクラステリン及び分泌されたクラステリン）を検出する方法にも関する。検出は、抗原の抗体に対する結合を検出できる適切なセンサーを有する装置（例えば、B I A c o r e（商標）、マイクロプレートリーダー、分光光度計など）で実施される。そのような装置は、コンピュータシステムを備えていてもよい。

## 【 0 2 7 2 】

本明細書中で用いられる場合、可変領域に関して「類似しているか、重ね合わせが可能な三次元構造」という用語は、コンピュータ処理されたモデルを使用すると、指定された可変領域が別の可変領域と類似した方法で抗原結合部位が暴露されるのを可能にする立体配座を有することを意味する。可変領域は、可変領域アミノ酸のコンピュータ処理された表示が別の可変領域の対応するアミノ酸と類似した空間での位置を占める場合、重ね合わせが可能であるとされる。

10

20

30

40

50

## 【0273】

本明細書中で用いられる場合、「モデル化された可変領域」という用語は、密接に関連する抗体可変領域の既知三次元構造から得られる可変領域のコンピュータ処理された表示を意味する。

## 【0274】

本明細書中で用いられる場合、「非ヒト」という用語は、齧歯類（例えば、マウス、ラットなど）、ウサギ又は非ヒト霊長類等を包含するが、これらに限定されるものではない。

## 【0275】

本明細書中で用いられる場合、「非ヒト相補性決定領域アミノ酸残基」という用語は、したがって、相補性決定領域のアミノ酸残基が、非ヒト、典型的にはマウスなどの齧歯類に由来することを意味する。

10

## 【0276】

本明細書中で用いられる場合、「非ヒト親抗体」という用語は、したがって、ヒト化手順の出発物質として用いられるヒト以外から得られる抗体を包含する。

## 【0277】

「宿主細胞を形質転換する」という用語は、所望の核酸を宿主細胞中に移すか又は導入するための当該技術分野で公知のいくつかの技術を含む。そのような技術としては、感染、リポフェクション、注入、形質導入、ヌクレオフェクション (nucleofection)、エレクトロポレーション、ソノポレーション (sonoporation)、熱ショック、マグネトフェクション (magnetofection) などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【0278】

非ヒト重鎖又は軽鎖 C D R アミノ酸残基に関して「移入する」という用語は、物理的及びコンピュータ処理された方法、例えば、クローニング技術、核酸又はタンパク質の化学合成、コンピュータで生成させたヒト化抗体等を包含する。本明細書中で用いられる場合、アミノ酸の数に関して「実質的に同じ」という用語は、 $\pm 3$  アミノ酸、又は好ましくは  $\pm 2$  アミノ酸、又はなおいっそう好ましくは  $\pm 1$  アミノ酸の変動が許容され得ることを意味する。

## 【実施例】

## 【0279】

30

## 実施例 1

抗クラスレリンマウスモノクローナル抗体の設計によるヒト化

マウス 16B5 モノクローナル抗体の可変領域の 3D モデリング

この作業は、2つの異なるマウス抗体 (Protein Data Bank(PDB) コードはそれぞれ 1Q9Q 及び 1TY7) の利用可能な結晶構造において3つの軽鎖残基及び7つの重鎖残基を突然変異させ、続いてテンプレート構造を重ね合わせることにより軽鎖及び重鎖をアセンブリすることによって、容易に達成された。C D R - H 3 ループの一部は、16B5 の重鎖とも高い配列類似性を有するが、マウステンプレート構造とは異なり、C D R - H 3 ループに関して同じ長さを示す、別の抗体構造 (P D B コード U J 3、ヒト化抗体) に基づいていた。結果として得られる構造を A M B E R 力場でのエネルギーの最小化により精製し、次いでその後の分析で使用した。この場合、利用可能な構造テンプレートに対してマウス 16B5 配列の高い相同性が与えられるならば、結果として得られる相同性モデルは良好な品質であることが期待される。それにもかかわらず、本発明者等は、M o d e l l e r 又は C o m p o s e r などの一般的な 3D 相同性モデリングプログラム又は W A M ソフトウェアで実施されるような抗体専門の 3D 相同性モデリングを用いることにより、マウス 16B5 可変領域をモデル化した平行対照相同性モデリング実験で、匹敵する結果が得られた。マウス 16B5 抗体のモデル化された可変領域を図 1 に示す。

40

## 【0280】

16B5 源ドナー (マウス) アミノ酸配列及びモデル化構造の特性化

このステップを実施して、ヒト性指数を推定し、C D R、カノニカル残基、鎖間充填 (

50

VH/VL界面残基)、可変領域/定常領域充填(VH/CH及びVL/CL界面残基)、異常なフレームワーク残基、潜在的なN及びO-グリコシル化部位、埋没残基、バーニアゾーン残基、並びにCDRに対する近接性を表した。インターネットで利用可能な資料及びローカルソフトウェアを使用して、これらの特性を評価した。

#### 【0281】

マウスCDRに対する最良のヒト軽鎖及び重鎖フレームワークの選択

最良のヒト軽鎖及び重鎖フレームワークの選択は、ヒト生殖細胞系データベース(VBASE)の局所コピー、他の配列ライブラリ(Genbank及びSwissProt)、並びにヒトフレームワークコンセンサス配列の組に対する標準配列相同性比較によっておこなった。BLAST検索を実施して、CDRループの長さが一致している一方で、フレームワーク領域のみ(したがって、CDRを除外する)で最高の相同性での配列一致を読み出した。PDBから同定された16B5可変配列と最も類似したヒト又はヒト化可変配列の構造を、構造比較のために、16B5可変領域のモデル化構造上に重ね合わせた。突然変異の候補位置でのアミノ酸のばらつきを評価するために、またヒト化に際して万一親和性消失の場合のバックアップとして好適なフレームワーク配列のプールを提供するために、いくつかの最も類似したヒトフレームワーク配列をまず保持した。最も近いヒトフレームワーク配列を図2でネズミ16B5配列と整列させる。

#### 【0282】

立体配座及び抗原結合に影響を及ぼし得るマウスフレームワーク残基の同定

立体配座及び抗原結合に影響を及ぼし得るマウスフレームワーク残基の同定は、特に注意して対応するヒト配列に変異させなければならないアミノ酸を標識する重要なステップである。これらの残基は、親和性消失の場合に備えてマウス配列に対する復帰突然変異の第1候補である。これは、特に抗体-抗原複合体の実験的構造の非存在下での設計によるヒト化ステップの最も困難で予測不可能なステップである。このステップは、以下の1以上のカテゴリーでの残基の同定に依存する:カノニカル、CDR-H3、バーニアゾーン、異常、CDR近接性(5以内)、鎖間充填、及びグリコシル化部位残基。これらの残基は、抗原結合部位及び親和性に直接的又は間接的に影響を及ぼす可能性がある。16B5抗クラスチリンmAbの最終ヒト化配列は、CDR領域を改変することなく、ネズミ配列に対して、軽鎖において13のフレームワーク突然変異、及び重鎖において22のフレームワーク突然変異を必要とする。驚くべきことに、慎重に構造及び比較配列分析すると、これら全ての突然変異を導入し、したがってCDRグラフト技術により可能な最高のヒト化の程度(すなわち100%、CDRを除外する)に達することを目的とすることにより、高い抗原結合親和性を保持する可能性が高いことが示された。デザインされたヒト化抗体の三次元モデリングは、この予測を支持する。それにもかかわらず、本発明者等は、CDR近接残基(CDRから5以内に、軽鎖では3、重鎖では9)、重鎖と接触した1つの軽鎖残基、並びにマウス配列に戻る可能性がある複数の埋没残基(したがって、免疫原性である可能性が低い)(軽鎖では4、重鎖では6)をはじめとする復帰突然変異の候補残基を特定した。変異残基及び復帰突然変異の候補残基を図1及び図2に示す。

#### 【0283】

さらなる構造分析

ヒト化配列を組換え発現に付す前に、さらなる構造分析には、シグナルペプチドの選択、アイソタイプの選択、及び可変領域/定常領域接合点での構造適合性の分析が含まれていた。加えて、マウスとヒト化抗体との間の鎖間充填及び可変/定常領域充填の比較分析により、16B5ヒト化の場合、ヒト化及びキメラ(マウス可変領域)鎖、すなわち、マウス/マウス(M/M)、マウス/ヒト化(M/H)、ヒト化/マウス(H/M)及びヒト化/ヒト化(H/H)を軽鎖/重鎖対形成として組み合わせがハイブリッド抗体の生成が可能であることが示された。抗クラスチリン抗体について選択されたアイソタイプはヒトIgG2であった。ヒトIgG2は、本明細書中で開示するような阻止抗体の特質である強力なエフェクター機能を有さない。加えて、ヒトIgG2は、タンパク質分解により切断されにくく、これによりこのアイソタイプの抗体はインビボでより安定になる。

## 【0284】

マウス21B12モノクローナル抗体の可変領域の3Dモデリング

21B12マウス抗クラステリン抗体のモデリングは、16B5について前述した教唆にしたがって実施した。結果として得られるヒト化21B12は100のヒト化であり、重鎖で18の突然変異そして軽鎖で14の突然変異を必要とした。変異した残基及び復帰突然変異の候補残基を図7及び図8に示す。

## 【0285】

## 実施例2

## 抗クラステリン抗体の動態分析

これらの研究の目的は、抗クラステリン抗体の動態学的パラメータを決定することである。特に、16B5及び21B12抗クラステリンモノクローナル抗体のヒト化がヒトクラステリンに対するその結合の動態学的パラメータに影響を及ぼすかどうかを判定することである。この目的のために、BIACore 3000を用いた動態分析法を開発した。ヒトクラステリンをセンサーチップ上に固定した。完全長抗体又はFabフラグメントを注入し、固定されたクラステリンと相互作用させた。この実施例は例示的抗体16B5を記載したが、21B12例示的抗体を同様の方法で調製し、試験した。

10

## 【0286】

## クラステリンの固定化

HBS-T (10 mMのHepes pH 7.4、135 mMのNaCl、3.4 mMのEDTA、0.005%のTween 20)を全てのBIACore実験についてランニングバッファーとして使用した。組換えモノマークラステリンをCM3チップ上に通常のアミンカップリング法で5 µl / 分の流速にて固定した。表面を50 mMのNHS / 0.2 MのEDCの混合物35 µlで活性化した。10 mMの酢酸ナトリウムpH 4.5中クラステリンを、所望の量が捕捉されるまで注入した(60 RU未満)。未反応エステルを35 µlの1 Mエタノールアミン塩酸塩 - NaOH pH 8.5で不活性化した。NHS / EDC及びエタノールアミンを同じ方法で注入することにより、対照表面を調製した。

20

## 【0287】

## ヒト化抗クラステリンIgG2抗体の調製

軽鎖及び重鎖免疫グロブリンをコード化するcDNAを含む発現ベクターを、当業者によく知られている一時的トランスフェクション法を用いて293細胞で発現させた。両方の免疫グロブリン鎖のアミノ末端で組み込まれたシグナルペプチドにより、成熟IgG2を細胞の無血清培地から収集した。細胞の成長はトランスフェクション後5日間続き、その後、IgG2キメラモノクローナル抗体の精製のために培地を収集した。タンパク質Aアガロースを製造業者(シグマ・アルドリッチ・カナダ社(オンタリオ州オークビル))による指示どおりに使用して、タンパク質を精製した。

30

## 【0288】

## マウス16B5及びHH16B5Fabの調製

パピンを1:100のモル比で用いて、4時間、室温にてマウス16B5IgGを処理した。4:1モル比のパピン阻害剤E64を添加することにより、消化を停止させた。1 mlのHiTrap Protein Gカラム上クロマトグラフィーによりFcフラグメントからFabフラグメントを分離した。Fabフラグメントを0.1 Mのグリシン、pH 2.7でカラムから溶出させた。100 µlの2 M Tris、pH 9を含む管中に1 mlのフラクションを集めることにより、pHを直ちに中和した。Fab含有画分をプールし、30 kDaのMWカットオフのAmicon Ultra 4遠心濃縮器で濃縮した。試料を、Superose 12サイズ排除カラム(10 x 300 mm)を通して、20 mMのHEPES、pH 7.5、200 mMのNaCl中で通過させて、Fab及びF(ab')<sub>2</sub>の画分を分離した。Fab含有フラクションをプールし、30 kDaのMWカットオフのAmicon Ultra 4遠心濃縮器で濃縮した。

40

## 【0289】

HH16B5Fabの調製に関して、プロトコルは、消化時間が室温で20時間であり

50

、F a b及びF cフラグメントをH i T r a p P r o t e i n Gカラムの代わりにH i T r a p P r o t e i n Aカラム上で分離する以外は、マウスF a bのプロトコルと非常に類似していた。F ( a b ' ) 2の存在を除く目的で小規模の試験から得られた結果に基づいて消化時間を増加させた。サイズ排除プロファイルから、より長時間の消化によりF ( a b ' ) 2フラグメントの存在は減少したが、完全には除去されなかったことが示された。タンパク質Gではなくむしろタンパク質Aに切り替えて、F a bフラグメントをタンパク質Gから溶出するために必要な低いpHにF a bフラグメントが暴露されるのを回避した。F a bフラグメントはタンパク質Aカラムを通して流れ、F cフラグメントはタンパク質Aにより保持された。サイズ排除分離をH E P E S緩衝液の代わりにP B S中で実施した。同じ方法を用いて、2 1 B 1 2 F a bフラグメントを調製した。

10

#### 【0290】

マウス1 6 B 5及びH H 1 6 B 5並びにF a bの動態学的分析

5 0  $\mu$  l / 分の流速で動態学的分析を実施した。完全長抗体（マウス若しくはヒト化）又はF a bをH B S T中で希釈した。濃度範囲は、完全長抗体については1 . 9 5 3 ~ 3 1 . 2 5 n Mの範囲であり、F a bについては1 5 . 6 2 5 ~ 2 5 0 n Mの範囲であった。各濃度をクラスチリン及び対照表面上に5分間注入し、続いて5分間分離洗浄した。クラスチリン表面は各抗体注入間で、5 0  $\mu$  lの2 0 m M H C lで再生した。

#### 【0291】

クラスチリンに対する抗体結合の動態学的分析

図3は、1 6 B 5完全長及びF a b抗クラスチリン抗体の動態学的パラメータの決定について得られた結果をまとめる。

20

完全長ヒト化1 6 B 5（H H 1 6 B 5）の動態学的パラメータは、完全長マウス抗体（1 6 B 5）の動態学的パラメータと非常に類似し、このことは、クラスチリンに対する抗体の結合にヒト化が影響を及ぼさなかったことを示唆する。しかし、ヒト化1 6 B 5 F a b（H H 1 6 B 5 F a b）の動態学的パラメータはF a bマウス抗体（1 6 B 5 F a b）の動態学的パラメータよりも若干良好であり、このこともクラスチリンに対する抗体の結合にヒト化が影響を及ぼさなかったことを示唆する。固定化ヒトクラスチリンとマウス1 6 B 5又はヒト化1 6 B 5との間の相互作用の $K_D$ は低いn M範囲にある。開発された方法を用いて抗クラスチリン抗体のヒト化プロセス中の動態学的パラメータを比較することができる。

30

#### 【0292】

図9は、2 1 B 1 2完全長及びF a b抗クラスチリン抗体の動態学的パラメータを決定するために得られた結果をまとめる。1 6 B 5について記載したように、2 1 B 1 2（H H 2 1 B 1 2）のヒト化の結果、親マウス2 1 B 1 2抗体と類似した結合パラメータが得られた。固定化ヒトクラスチリンとマウス2 1 B 1 2又はヒト化2 1 B 1 2との間の相互作用の $K_D$ は低n M範囲にある。開発された方法を用いて、抗クラスチリン抗体のヒト化プロセス中の動態学的パラメータを比較することができる。

#### 【0293】

##### 実施例3

細胞ベースのアッセイにおけるh 1 6 B 5の生物学的活性

40

これらの研究を実施して、h 1 6 B 5の生物学的活性をマウス1 6 B 5の生物学的活性と比較した。h 1 6 B 5を試験するために、クラスチリンをモノクローナル抗体でブロックすることによりがん細胞系の遊走及び浸潤を軽減できることを以前に示した2つのアッセイを用いた。

#### 【0294】

がん細胞遊走に対する抗クラスチリン抗体の活性を試験するために、標準的創傷治癒、又はスクラッチアッセイを使用した。このアッセイでは、E M T 6細胞（マウス乳がん細胞系）を高密度で蒔き、細胞層に擦過傷を形成することにより傷つけた。0時で、広い露出した領域が明らかであり、これは細胞を3 7 で1 5時間インキュベーションした後に直ちに埋まった（図4中、上の左側の図を参照）。市販の抗クラスチリンポリクローナル

50

(C-18、サンタクルーズバイオテック(カリフォルニア州サンタクルーズ))又は元のハイブリドーマから精製されたマウス16B5のいずれかの存在下で細胞をインキュベーションすると、露出した領域中の細胞数が減少した(図4中の上の右側の図を参照、市販及びハイブリドーマ16B5と表示)。創傷EMT細胞を、キメラ16B5(図4下側のパネルMMを参照)、キメラ軽鎖とヒト化重鎖を含むハイブリッド抗体(図4下側のパネルMHを参照)、キメラ重鎖とヒト化軽鎖を含むハイブリッド抗体(図4下側のパネルHMを参照)、又は完全ヒト化16B5(図4下側のパネルHHを参照)とともにインキュベーションすることにより、細胞の露出した領域中への遊走もブロックされた。実際、ヒト化16B5は最も有効な阻害剤であるように見えた。さらに、キメラ及びマウス-ヒトハイブリッド抗体が遊走を阻害する能力は、どの免疫グロブリン鎖が16B5抗体中に含まれるかに関係なくクラステリンとの相互作用は同じであったことを示す。

10

## 【0295】

本発明者らは次に、種々のレベルの内因性クラステリンを分泌する、ヒト前立腺PC3及びDU145細胞系などの他の細胞系が、それらの浸潤行動及び増殖においてh16B5により影響を受け得るかどうかを判定した。マトリゲル中に蒔いた場合(図5、上側左手のパネル)、PC3腫瘍細胞系は、マトリゲル中に伸びる突起を有する星状形態を示し、これは浸潤性の増大と相関づけられている特性である(Thompson et al., 1992)。h16B5での処理(図5、上側右手のパネル)は、この星状形態を著しく低減し、このことは、クラステリン分泌がPC3細胞の浸潤性の表現型に寄与することを強く示唆する。DU145細胞は、PC3細胞で観察される星状形態を示さず、むしろマトリゲル中で球状構造を形成し(図5、下側左手のパネル)、これはh16B5の存在下で小さく、数も少ないようであった(図5、下側右手のパネル)。これらの結果は、h16B5ががん細胞系の浸潤性を低減する能力は、元のマウス16B5に匹敵することを示し、またヒト化プロセスは、抗体が分泌されたクラステリンの活性と相互作用し、ブロックする能力を改変しなかったことを示す。

20

## 【0296】

4つの異なるヒト膵臓細胞系由来の腫瘍を得、これをホルマリン中で固定し、パラフィン中に埋め、そしてスライドガラス上に切片を載せた。免疫組織化学をh16B5抗体で実施して、このがん徴候由来の腫瘍がクラステリンを発現したかどうかを判定した。腫瘍は、Aspc-1、BxPC-3、PANC-1、及びMiPaCa-2由来であり、これらはすべて膵臓がん患者由来であった(ATCC(バージニア州マナッサス))。パラフィン包埋上皮膵臓腫瘍試料をスライドガラス上に置き、15分間50℃で固定した。2回キシレンで処理することによりパラフィン除去を実施し、続いて連続して5分間、100%、80%、及び70%エタノール中で洗浄して脱水した。スライドをPBS中で2回、5分間洗浄し、抗原回復溶液(クエン酸-EDTA)で処理して、抗原を曝露(unmask)した。スライドをH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とともにメタノール中でインキュベートすることにより内因性過酸化水素反応性種を除去し、スライドを無血清ブロッキング溶液(ダコサイトメーション)とともに20分間室温でインキュベートすることによってブロッキングを実施した。一次mAb(対照IgG又はh16B5)を5µg/mlで1時間、室温にて添加した。ビオチン結合ヒト抗カップと、続いてストレプトアビジン-HRP3次抗体とともにインキュベートすることによって、h16B5反応性クラステリンを検出した。スライドをDAB-過酸化水素基質で5分未満処理し、その後、ヘマトキシリンで対比染色することによって、陽性染色が明らかになった。図11で示すように、4つの腫瘍すべてがクラステリン発現について陽性染色された(図11の右手パネルを参照)。興味深いことに、化学療法に対して耐性であることが知られている腫瘍(PANC-1及びMiPaCa-2)は最高レベルの分泌されたクラステリンを含んでいた。PANC-1細胞系を前立腺がん細胞系について記載したようにして、マトリゲル中で培養し、成長させた(前記参照)。細胞をTGFβ、並びに上皮間葉移行のインデューサー及び成長因子で刺激し、それにより細胞は膜を越えてマトリゲル中に遊走する(図12、上側の右手パネルを参照)。刺激された細胞をh16B5で処理すると、遊走は高度に阻害された(図12、下

30

40

50

側右手パネル)。この結果は、h 1 6 B 5 が膵臓がん細胞の遊走をブロックすることができることを示し、抗体はこのがん徴候でも治療活性である可能性を有することを示す。

#### 【 0 2 9 7 】

##### 実施例 4

##### がんの動物モデルにおける h 1 6 B 5 の生物学的活性

これらの研究を実施して、ヒトがんのモデルにおいて h 1 6 B 5 のインビボ有効性を測定した。アンチセンスオリゴヌクレオチド及び低分子干渉 RNA ターゲティングクラステリンは、前立腺がん異種移植片において、アポトーシス及びインビトロ化学受容性を誘導することが報告されている [ 1 - 4 ]。使用したモデル系は、アンドロゲン非感受性であり、この疾患の最もよく特性化されたモデルのうちの 1 つである D U 1 4 5 ヒト前立腺がん細胞系を含んでいた。したがって、2 0 0 万個の細胞を S C I D マウスの脇腹に皮下移植し、腫瘍を約 1 0 0 m m <sup>3</sup> まで増殖させた。第 1 日に始めて、h 1 6 B 5 を 5 m g / k g の投与量で腹腔内 ( i . p . ) 注射し、そして第 4 日から、タキソテレ ( T x T ) を 1 0 m g / k g の投与量で i . p . 注射した。h 1 6 B 5 注入を 1 週間に 2 回続け、その間、T x T を毎週投与した。図 6 で表すように、( 原発 ) 腫瘍の成長は、h 1 6 B 5 治療を受けた動物では対照と比較して有意に減少した。この効果は、単独療法群 ( 対照を h 1 6 B 5 と比較、P = 0 . 0 1 0 4 ) 及び T x T との併用群 ( T x T を h 1 6 B 5 + T x T と比較、P = 0 . 0 3 9 5 ) の両方で起こった。この結果は、h 1 6 B 5 でのクラステリンのブロッキングは、腫瘍成長減少を引き起こし、T x T に関する腫瘍の化学受容性を増大させることを示す。

#### 【 0 2 9 8 】

P C - 3 前立腺がん細胞を移植することにより、異なる腫瘍モデルにおいて、第 2 の前立腺がんモデル研究を実施した。P C - 3 細胞はホルモン非感受性でもあるが、D U 1 4 5 細胞よりも若干侵入性が高いことが文書に記載されている。上述のように、細胞を S C I D マウスに皮下移植し、腫瘍が約 1 0 0 m m <sup>3</sup> の容積に達した時点で ( 第 1 日と指定する )、治療を開始した。h 1 6 B 5 注射を第 1 日に 5 m g / k g で i . p . 投与し、その後、1 週間に 2 回続け、一方、1 0 m g / k g の 1 回の T x T 注射を第 5 日に i . p . 投与した。T x T スケジュールでこの変更を実施した。なぜなら、P C - 3 細胞は D U 1 4 5 腫瘍と比較してこの化学療法薬に対して著しく感受性が高いことが判明したからである。

#### 【 0 2 9 9 】

この研究の結果を図 1 0 に示す。前述のように、h 1 6 B 5 のみを受けた動物における腫瘍は未治療の動物と比較してほぼ即時の応答を有することが観察された。h 1 6 B 5 治療群において平均腫瘍サイズが有意に減少し、その結果、第 4 3 日で対照群と比較して、3 7 % 減少することが判明した。生存もモニタリングし、対照群で動物が残っていない日 ( 第 4 3 日 ) に、A B - 1 6 B 5 治療群では 6 0 % を越えるマウスが生き残っていることが観察された。全体的な生存率におけるこの増加は、h 1 6 B 5 を受けた動物における 4 7 % 増加に変換できた。

#### 【 0 3 0 0 】

前立腺がん細胞に対する T x T の細胞毒性効果が観察されたが、腫瘍は注射後約 1 8 日でこの治療から回復するようには見えなかった。T x T 群における腫瘍の成長は、A B - 1 6 B 5 を受けた群の腫瘍を上回ってさえいた ( 第 5 0 日、図 1 0 を参照 )。しかし、h 1 6 B 5 と T x T との組み合わせは、腫瘍の成長を有意に遅らせ、その結果、腫瘍は T x T 単独群と比較して 4 1 % 小さくなった。ここでも、h 1 6 B 5 の存在は動物の生存を延長した。まとめると、これらのインビボ研究から得られた結果は、腫瘍における分泌されたクラステリンの機能を阻害する h 1 6 B 5 ヒト化抗体は、固形腫瘍の成長を有意に遅らせることができることを示す。

#### 【 0 3 0 1 】

##### 実施例 5

H 1 6 B 5 はがん細胞における分泌されたクラステリンの内在化を阻害する



前記開示の結果は、上皮間葉移行 ( E M T ) の誘導が、がん細胞によるクラステリンの分泌に至ることを示す。さらに、本発明者等のデータは、これらのがん細胞によって分泌されるクラステリンが E M T の強力なインデューサーであることも示す。これらの発見は、分泌されたクラステリンが細胞外マトリックスにおける他の腫瘍関連因子との相互作用により間接的に、又はがん細胞の細胞表面上の受容体との相互作用により直接的に、のいずれかでこの効果を媒介することを意味する。正常な血清中に存在する分泌されたクラステリンは、補体カスケードの成員、レプチン、種々のアポリポタンパク質などの多くの異なるタンパク質に伴うことが知られているが、がん細胞中又は腫瘍微環境中の分泌されたクラステリンのタンパク質パートナーの存在は、まだ比較的明らかになっていない。数例には、Jo 及び共同研究者らにおける公開された報告 ( Jo et al., 2008 ) があり、血清除去により誘導されるストレス条件下で腫瘍が分泌するクラステリンは I G F - 1 に伴ったことが示された。加えて、前立腺がん細胞系中に含まれるクラステリンは、C O M M D 1 と呼ばれるタンパク質と相互作用することが見出された ( Zoubeidi et al., 2010 ) 。この相互作用の結果、N F - カッパ B 関連経路の活性化が増大し、これにより次に前立腺がん細胞生存が促進された。これらの知見により、分泌されたクラステリンが腫瘍形成に寄与し得る方法のいくつかを解明され始めているが、それがどのように E M T を促進するかについての分子機構は知られていない。

#### 【 0 3 0 2 】

この問題に取り組み始めるために、細胞ベースの実験を実施して、分泌されたクラステリンが、がん細胞と直接相互作用するか、細胞培地中の他の分泌された因子を介してであるかを判定した。これを測定するために、分泌されたクラステリンを蛍光標識し、B R I - J M 0 1 マウス乳がん細胞とともにインキュベートした。処理に 2 4 時間後に、蛍光シグナルが細胞の内部に含まれているのが見出された。短い時点にわたるこれらの細胞の分析により、蛍光標識され、分泌されたクラステリンが細胞により内在化されたことが明らかになった ( 図 1 3 を参照 ) 。示されるように、内在化は、受容体依存性エンドサイトーシス経路と一致して時間と共に増加する。さらに、2 4 時間後に生じる染色の斑点状及び核周辺パターン ( 図 1 3 中の白色矢印を参照 ) が、エンドソーム経路に沿って内在化されるタンパク質中でしばしば観察される。類似の結果が D U 1 4 5 ヒト前立腺がん細胞で観察された。

#### 【 0 3 0 3 】

h 1 6 B 5 がこの活性をブロックできるかどうかを試験することにより、この分泌されたクラステリン内在化をさらに調べた。h 1 6 B 5 又はアイソタイプ対照 I g G の存在下で分泌されたクラステリン - A l e x a 4 8 0 で細胞を処理した。図 1 4 で示されるように、分泌されたクラステリンの J M 0 1 細胞中への内在化は、h 1 6 B 5 の添加によりブロックされた。分泌されたクラステリンの内部核周囲染色が、対照 I g G で処理された細胞において依然として観察された ( 図 1 4 中の白色矢印を参照 ) 。

#### 【 0 3 0 4 】

まとめると、分泌されたクラステリンの内在化が h 1 6 B 5 の添加によって阻害され得ることを示すこれらの結果から、これは、抗体が分泌されたクラステリンにがん細胞における E M T を媒介させない機構の一つであり得ることが示唆される。

#### 【 0 3 0 5 】

本明細書中で記載する実験は、( 例えば、可変領域 ( 複数可 ) 、定常領域、フレームワーク領域又は C D R ( 複数可 ) における ) 抗体のアミノ酸配列における特異的突然変異がどのように抗体の生物学的活性に影響を及ぼすかを判定するために実施することができる。例えば、1 以上の突然変異が h 1 6 B 5 の可変軽鎖又は可変重鎖のフレームワーク領域 ( 又はネズミ 1 6 B 5 ) 中に導入され得、そして腫瘍成長を本明細書中で記載するようにして評価することができる。

#### 【 0 3 0 6 】

変異体抗体及び抗原結合フラグメントのヒト又はネズミクラステリンに対する結合は、例えば、E L I S A 、ウェスタンブロット、表面プラズモン共鳴などのいくつか当該技術

10

20

30

40

50

分野で公知の方法によって試験することができる。

【 0 3 0 7 】

実施例 6

抗クラステリン抗体はクラステリン変異体と結合することができる

本発明の抗体及び抗原結合フラグメントは、クラステリンのヒト及びネズミ形態の両方と結合する。これらの 2 つのタンパク質は、77%のアミノ酸配列同一性及び89%の類似性を共有する(図15を参照)。ネズミ及びヒト形態のアミノ酸配列を比較することにより、抗体がおそらくは両タンパク質において保存される線状又は立体構造エピトープと結合することを理解できる。抗体及び抗原結合フラグメントは、ヒト又はネズミクラステリンと少なくとも75%のアミノ酸同一性(80%、85%、90%、95%、99%、100%を包含する)を有する他の天然に存在する変異体並びに合成変異体(組換えタンパク質を含む)と結合できると予想される。例えば、抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号56(ここで、+は例えば保存的アミノ酸置換などのアミノ酸置換を表す)又は配列番号57を含むアミノ酸配列を有するクラステリン変異体と結合することができる。

10

【 0 3 0 8 】

本発明は、抗クラステリン抗体がヒト腫瘍において発現されるクラステリンを標的とすることを示す。抗クラステリン抗体、例えばh16B5の、ネズミ腫瘍クラステリンとの相互作用を示すために、4T1マウス乳房腫瘍から調製した凍結切片をh16B5とともにインキュベートした。手短に言うと、凍結切片を氷冷アセトンで10分間固定し、非特異的結合を市販のキット(ダコ・カナダ社(Dako Canada, Inc.)、オンタリオ州パーリントン)中で供給される試薬でブロックした。H16B5をマウス腫瘍切片とともに1時間、5µg/mlの濃度でインキュベートした。洗浄後、特異的染色を、HRP共役抗ヒトIgGとともにインキュベートすることによって明らかにした。対照試料をヒトアイソタイプ対照IgGと同じ方法で処理した。図16で示すように、ホースラディッシュペルオキシダーゼ着色から生じる褐色の着色により明らかなように、h16B5は4T1腫瘍においてネズミクラステリンを検出した(右パネルを参照、4T1-AB-h16B5として表示)。対照抗体は抗原を明らかにしなかった(左のパネルを参照、4T1-ctrlとして表示)。この結果は、h16B5により例示されるような抗クラステリン抗体が、マウス腫瘍で発現されるネズミクラステリンと相互作用することを示す。加えて、免疫蛍光法を用いた他の研究により、h16B5が、別のマウス乳がん細胞系であるBRI-JM01細胞で発現されたネズミクラステリンを検出したことが示された。

20

30

【 0 3 0 9 】

本発明の抗体及び抗原結合フラグメントの、天然に存在する変異体又はクラステリンの合成変異体に対する結合は、例えば、前記方法をはじめとする当該技術分野で公知の方法により試験することもできる。

【 0 3 1 0 】

CLU遺伝子は、ヒト、チンパンジー、イヌ、ウシ、マウス、ラット、ニワトリ及びゼブラフィッシュで保存されている。これらのモデルにおける抗体及び抗原結合フラグメントの試験は、本発明に含まれる。

40

【 0 3 1 1 】

【 化 1 3 】

**SEQUENCE LISTING:**

SEQ ID NO.:1

16B5 CDRH1: GFNIKDIYMH

SEQ ID NO.:2

16B5 CDRH2: RIDPAYGNTKYDPKFQG

10

SEQ ID NO.:3

16B5 CDRH3: RYDTAMDY

SEQ ID NO.:4

16B5 CDRL1: KSSQSLLNSRTRKNYLA

SEQ ID NO.:5

16B5 CDRL2: WASTRES

20

SEQ ID NO.:6

16B5 CDRL3: KQSYNLWT

SEQ ID NO.:7

16B5 Humanized heavy chain variable region

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDIYMHVWVQQAPGKGLEWMGRIDPAY  
 GNTKYDPKFQGRVTITADTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQG  
 TLVTVSS

30

SEQ ID NO.:8

16B5 Humanized light chain variable region

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA  
 STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGQGTKLEIK

40

SEQ ID NO.:9

**Complete heavy chain immunoglobulin sequences for h16B5**

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDIYMHVWVQQAPGKGLEWMGRIDPAY  
 GNTKYDPKFQGRVTITADTSTDATYMESSLRSEDTAVYYCArRYDTAMDYwgqgtlvt  
 vsSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV

【化 1 4】

LQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPV  
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY  
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO.:10

**Complete light chain immunoglobulin sequences for h16B5**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSNRTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA  
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGQGTKLEIKVAA  
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

20

SEQ ID NO.:11

21B12 CDRH1: GYTFTNYGMH

SEQ ID NO.:12

21B12 CDRH2: WINTYTGEPTYADDFKG

SEQ ID NO.:13

21B12 CDRH3: DGFLYFFDY

30

SEQ ID NO.:14

21B12 CDRL1: KSSQSLLYSSNQKNYLA

SEQ ID NO.:15

21B12 CDRL2: WASTRES

40

SEQ ID NO.:16

21B12 CDRL3: QQYYIYPRT

SEQ ID NO.:17

21B12 Humanized heavy chain variable region

【化 1 5】

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTY  
TGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDGFLYFFDYWGQG  
TLVTVSS

SEQ ID NO.:18

21B12 Humanized light chain variable region

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWA  
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYIYPRTFGQGTKLEIK

10

SEQ ID NO.:19

**Complete heavy chain immunoglobulin sequences for h21B12**

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTY  
TGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDGFLYFFDYWGQG  
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPC  
PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR  
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

30

SEQ ID NO.:20

**Complete light chain immunoglobulin sequences for h21B12**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWA  
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYIYPRTFGQGTKLEIKRTV  
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

SEQ ID NO.:21

**Complete nucleotide sequence of the heavy chain of h16B5**

ATGGACTGGACCTGGCGGATCCTGTTCTCTGGTGGCCGCTGCTACCGGCACCCACG  
CCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCACCG

## 【化 1 6】

TCAAGATCAGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAACATCAAGGACATCTACATGCACTG  
GGTGCAGCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGATGGGCCGGATCGACCTGCG  
CTACGGCAACACCAAGTACGACCCTAAGTTCCAGGGCCGGGTGACCATCACCGC  
CGACACCTCCACCGACACCGCCTACATGGAAGTGTCTCCCTGCGGTCCGAGGAC  
ACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGAGATACGACACCGCCATGGATTACTGGGGCC  
AGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCCGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC  
CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG  
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAGGCGCTCTGA  
CCAGCGGCGTGACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC  
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCA  
ACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAAT  
GTTGTGTCGAGTGCCCAACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT  
CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC  
ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG  
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAG  
TTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTTGTGCACCAGGACTGGC  
TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCA  
TCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA  
CCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT  
GGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA  
GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC  
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC  
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC  
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

10

20

30

40

【化 1 7】

SEQ ID NO.:22

**Complete nucleotide sequence of the heavy chain of h21B12**

ATGGACTGGACCTGGCGGATCCTGTTTCTGGTGGCCGCTGCTACCGGCACACACG  
CCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCTCCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGT  
GAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAACTACGGCATGCACTGG  
GTGCGCCAGGCACCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCAACACCTAC  
ACCGGCGAGCCTACCTACGCCGACGACTTCAAGGGCAGATTCGTGTTCTCCCTGG  
ACACCTCCGTGTCCACCGCCTACCTGCAGATCTCCTCCCTGAAGGCCGAGGACAC  
CGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGGCTTCTGTACTTCTTCGACTACTGGGGC  
CAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCTGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCC  
CTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCTG  
GTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGA  
CCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTG  
TCCTCCGTGGTGACAGTGCCTTCTCCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCA  
ACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGAGCGGAAGT  
GCTGCGTGGAGTGCCCTCCTTGCTCCTGCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTC  
CTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAGTGA  
CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTA  
CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTT  
CAACTCCACCTTCCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTG  
AACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTGCCCCCTATC  
GAAAAGACCATCTCTAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACC  
CTGCCTCCCTCCCGCGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGG  
TGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAACGGCCAGCC  
TGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC  
CTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTC  
TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGT  
CCCTGTCTCCTGGCAAGTGA

10

20

30

40

【化 1 8】

SEQ ID NO.:23

**Complete nucleotide sequence of the light chain of h16B5**

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCT  
ACGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCCCTGGCCGTGTCCCTGGGCGA  
GAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGTCCCTGCTGAACCTCCCGGACCCGG  
AAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGA  
TCTACTGGGCCTCCACCCGGGAGTCCGGCGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCCGG  
CAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCC  
GTGTACTACTGCAAGCAGTCCTACAACCTGTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGC  
TGGAGATCAAGCGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT  
GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC  
CAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC  
CCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG  
CACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA  
AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA  
GTGTTAG

10

20

SEQ ID NO.:24

**Complete nucleotide sequence of the light chain of h21B12**

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCTGGCGCCTA  
CGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCTCTGGCTGTGTCCCTGGGCGAG  
CGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGTCCCTGCTGTACTCCTCCAACCAGA  
AGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGAT  
CTACTGGGCCTCCACCCGGGAATCTGGCGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGC  
TCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCG  
TGTACTACTGCCAGCAGTACTACATCTACCCTCGGACCTTCGGCCAGGGCACCAA

30

40



【化 19】

GCTGGAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCCCTTCCG  
 ACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCTGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCTA  
 CCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAA  
 CTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTCCCTGTCC  
 TCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCG  
 AAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCTCTCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGA  
 GTGCTGA

10

SEQ ID NO.:25 (murine 16B5 VL)

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW  
 ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEFK

20

SEQ ID NO.:26 (h16B5 VL consensus1)

DIVMXQSPXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQXPKLLIY  
 WASTRESGVPDRFXGSGSGTDFTLTISXQAEDXAVYYCKQSYNLWTFGXGTKLEX  
 K;

X is an amino acid substitution in comparison with a corresponding amino acid in the  
 polypeptide set forth in SEQ ID NO.:25.

30

SEQ ID NO.:27 (h16B5 VL consensus2)

DIVMX<sub>a1</sub>QSPX<sub>a2</sub>SLAVSX<sub>a3</sub>GEX<sub>a4</sub>X<sub>a5</sub>TX<sub>a6</sub>X<sub>a7</sub>CKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQX  
<sub>a8</sub>PKLLIYWASTRESGVPDRFX<sub>a9</sub>GSGSGTDFTLTISX<sub>a10</sub>QAEDX<sub>a11</sub>AVYYCKQSYNL-  
 WTFGX<sub>a12</sub>GTKLEX<sub>a13</sub>K

40

X<sub>a1</sub> is a neutral hydrophilic amino acid such as for example, T or S;X<sub>a2</sub> is D or S;X<sub>a3</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example, L or A;X<sub>a4</sub> is a basic amino acid such as for example R or K;X<sub>a5</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example A or V;X<sub>a6</sub> is an hydrophobic amino acid as for example I or M;

【化 2 0】

X<sub>a7</sub> is N or S;

X<sub>a8</sub> is P or S;

X<sub>a9</sub> is a neutral hydrophilic amino acid such as for example S or T;

X<sub>a10</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example L or V;

X<sub>a11</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example V or L;

X<sub>a12</sub> is Q or G and;

X<sub>a13</sub> is I or F.

10

SEQ ID NO.:28 (h16B5 VL consensus3)

DIVMX<sub>a1</sub>QSPX<sub>a2</sub>SLAVSX<sub>a3</sub>GEX<sub>a4</sub>X<sub>a5</sub>TX<sub>a6</sub>X<sub>a7</sub>CKSSQSLLNSRTRKKNYLAWYQQKPGQX  
a8PKLLIYWASTRESGVPDRFX<sub>a9</sub>GSGSGTDFLTISX<sub>a10</sub>QAEDX<sub>a11</sub>AVYYCKQSYNL-  
WTFGX<sub>a12</sub>GTKLEX<sub>a13</sub>K

X<sub>a1</sub> is T or S; X<sub>a2</sub> is D or S; X<sub>a3</sub> is L or A; X<sub>a4</sub> is R or K; X<sub>a5</sub> is A or V; X<sub>a6</sub> is I or M; X<sub>a7</sub> is N  
or S; X<sub>a8</sub> is P or S; X<sub>a9</sub> is S or T; X<sub>a10</sub> is L or V; X<sub>a11</sub> is V or L; X<sub>a12</sub> is Q or G and; X<sub>a13</sub> is I or  
F.

20

SEQ ID NO.:29 (murine 16B5 VH)

EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTTSGFNIKDIYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPAYG  
NTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGT  
SVTVSS

SEQ ID NO.:30 (h16B5 VH consensus1)

XVQLXQSGAEXXKPGAXVXXSCXXSGFNIKDIYMHVWXQXPXXGLEWXGRIDPA  
YGNTKYDPKFQGXXTITADTSXXTAYXXLSSLXSEDTAVYYCARRYDTAMDYWG  
QGTXTVTVSS;

30

X is an amino acid substitution in comparison with a corresponding amino acid in the  
polypeptide set forth in SEQ ID NO.:29.

SEQ ID NO.:31 (h16B5 VH consensus2)

X<sub>b1</sub>VQLX<sub>b2</sub>QSGAEX<sub>b3</sub>X<sub>b4</sub>KPGAX<sub>b5</sub>VX<sub>b6</sub>X<sub>b7</sub>SCX<sub>b8</sub>X<sub>b9</sub>SGFNIKDIYMHVWX<sub>b10</sub>QX<sub>b11</sub>PX<sub>b12</sub>  
X<sub>b13</sub>GLEWX<sub>b14</sub>GRIDPAYGNTKYDPKFQGX<sub>b15</sub>X<sub>b16</sub>TITADTSX<sub>b17</sub>X<sub>b18</sub>TAYX<sub>b19</sub>X<sub>b20</sub>LSSL  
X<sub>b21</sub>SEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGTX<sub>b22</sub>VTVSS;

40

X<sub>b1</sub> is Q or E;

X<sub>b2</sub> is V or Q;

X<sub>b3</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example V or L;

X<sub>b4</sub> is K or V;

X<sub>b5</sub> is a neutral hydrophilic amino acid such as for example T or S;

## 【化 2 1】

X<sub>b6</sub> is a basic amino acid such as for example K or R;

X<sub>b7</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example I or L;

X<sub>b8</sub> is K or T;

X<sub>b9</sub> is V or T;

X<sub>b10</sub> is a basic amino acid such as for example Q or K;

X<sub>b11</sub> is A or R;

X<sub>b12</sub> is G or E;

X<sub>b13</sub> is a basic amino acid such as for example K or Q;

X<sub>b14</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example M or I;

X<sub>b15</sub> is a basic amino acid such as for example R or K;

X<sub>b16</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example V or A;

X<sub>b17</sub> is a neutral hydrophilic amino acid such as for example T or S;

X<sub>b18</sub> is for example D or N;

X<sub>b19</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example M or L;

X<sub>b20</sub> is E or Q;

X<sub>b21</sub> is R or T and;

X<sub>b22</sub> is L or S.

10

20

SEQ ID NO.:32 (h16B5 VH consensus3)

X<sub>b1</sub>VQLX<sub>b2</sub>QSGAEX<sub>b3</sub>X<sub>b4</sub>KPGAX<sub>b5</sub>VX<sub>b6</sub>X<sub>b7</sub>SCX<sub>b8</sub>X<sub>b9</sub>SGFNIKDIYMHVX<sub>b10</sub>QX<sub>b11</sub>PX<sub>b12</sub>  
X<sub>b13</sub>GLEWX<sub>b14</sub>GRIDPAYGNTKYDPKFQGX<sub>b15</sub>X<sub>b16</sub>TITADTSX<sub>b17</sub>X<sub>b18</sub>TAYX<sub>b19</sub>X<sub>b20</sub>LSSL  
X<sub>b21</sub>SED TAVYYCARRYDTAMDYWGQGTXX<sub>b22</sub>VTVSS;

X<sub>b1</sub> is Q or E; X<sub>b2</sub> is V or Q; X<sub>b3</sub> is V or L; X<sub>b4</sub> is K or V; X<sub>b5</sub> is T or S; X<sub>b6</sub> is K or R; X<sub>b7</sub> is I or L; X<sub>b8</sub> is K or T; X<sub>b9</sub> is V or T; X<sub>b10</sub> is Q or K; X<sub>b11</sub> is A or R; X<sub>b12</sub> is G or E; X<sub>b13</sub> is K or Q; X<sub>b14</sub> is M or I; X<sub>b15</sub> is R or K; X<sub>b16</sub> is V or A; X<sub>b17</sub> is T or S; X<sub>b18</sub> is D or N; X<sub>b19</sub> is M or L; X<sub>b20</sub> is E or Q; X<sub>b21</sub> is R or T and; X<sub>b22</sub> is L or S.

30

SEQ ID NO.:33 (murine 21B12 VL)

DIVMSQSPSSLA VSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQRPQGSPKLLIYWA  
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQYYIYPRTFGGGTKLEIK

40

SEQ ID NO.:34 (h21B12 VL consensus1)

DIVMX<sub>c</sub>QSPXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQXPGQXPKLLIY  
WASTRESGVPDRFXGSGSGTDFTLTISXXAEDXAVYYCQYYIYPRTFGXGKLEIK

X is an amino acid substitution in comparison with a corresponding amino acid in the polypeptide set forth in SEQ ID NO.:33.

## 【化 2 2】

SEQ ID NO.:35 (h21B12 VL consensus2)

DIVMX<sub>c1</sub>QSPX<sub>c2</sub>SLAVSX<sub>c3</sub>GEX<sub>c4</sub>X<sub>c5</sub>TX<sub>c6</sub>X<sub>c7</sub>CKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQX<sub>c8</sub>PGQ  
X<sub>c9</sub>PKLLIYWASTRESGVPDRFX<sub>c10</sub>GSGSGTDFLTISX<sub>c11</sub>X<sub>c12</sub>AEDX<sub>c13</sub>AVYYCQQYYI  
YPRTFGX<sub>c14</sub>GTKLEIK;

X<sub>c1</sub> is a neutral hydrophilic amino acid such as for example T or S;

X<sub>c2</sub> is D or S;

X<sub>c3</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example L or V;

10

X<sub>c4</sub> is a basic amino acid such as for example R or K;

X<sub>c5</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example A or V;

X<sub>c6</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example I or M;

X<sub>c7</sub> is N or S;

X<sub>c8</sub> is a basic amino acid such as for example K or R;

X<sub>c9</sub> is P or S;

X<sub>c10</sub> is a neutral hydrophilic amino acid such as for example S or T;

X<sub>c11</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example L or V;

20

X<sub>c12</sub> is a basic amino acid such as for example Q or K;

X<sub>c13</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example V or L and;

X<sub>c14</sub> is Q or G.

SEQ ID NO.:36 (h21B12 VL consensus3)

DIVMX<sub>c1</sub>QSPX<sub>c2</sub>SLAVSX<sub>c3</sub>GEX<sub>c4</sub>X<sub>c5</sub>TX<sub>c6</sub>X<sub>c7</sub>CKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQX<sub>c8</sub>PGQ  
X<sub>c9</sub>PKLLIYWASTRESGVPDRFX<sub>c10</sub>GSGSGTDFLTISX<sub>c11</sub>X<sub>c12</sub>AEDX<sub>c13</sub>AVYYCQQYYI  
YPRTFGX<sub>c14</sub>GTKLEIK;

30

X<sub>c1</sub> is T or S; X<sub>c2</sub> is D or S; X<sub>c3</sub> is L or V; X<sub>c4</sub> is R or K; X<sub>c5</sub> is A or V; X<sub>c6</sub> is I or M; X<sub>c7</sub> is N  
or S; X<sub>c8</sub> is K or R; X<sub>c9</sub> is P or S; X<sub>c10</sub> is S or T; X<sub>c11</sub> is L or V; X<sub>c12</sub> is Q or K; X<sub>c13</sub> is V or L  
and; X<sub>c14</sub> is Q or G.

SEQ ID NO.:37 (murine 21B12 VH)

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMHWVKQAPGKGLKWMGWINTYT  
GEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLIKNEDETATYFCARDGFLYFFDYWGQGT  
TLTVSS

40

SEQ ID NO.:38 (h21B12 VH consensus1)

QXQLVQSGXELKKPGXXVKXSCKASGYTFTNYGMHWVXQAPGXGLXWMGWINT  
YTGEPTYADDFKGRFXSLXTSXSTAYLQIXXLKXEDTAXYXCARDGFLYFFDYW  
GQGTXXTVSS

X is an amino acid substitution in comparison with a corresponding amino acid in the  
polypeptide set forth in SEQ ID NO.:37.

## 【化 2 3】

SEQ ID NO.:39 (h21B12 VH consensus2)

QX<sub>d1</sub>QLVQSGX<sub>d2</sub>ELKKPGX<sub>d3</sub>X<sub>d4</sub>VKX<sub>d5</sub>SCKASGYTFTNYGMHWVX<sub>d6</sub>QAPGX<sub>d7</sub>GLX<sub>d8</sub>  
WMGWINTYTGEPTYADDFKGRFX<sub>d9</sub>FSLX<sub>d10</sub>TSX<sub>d11</sub>STAYLQIX<sub>d12</sub>X<sub>d13</sub>LKX<sub>d14</sub>EDTAX<sub>d15</sub>YX<sub>d16</sub>CARDGFLYFFDYWGQGTGX<sub>d17</sub>X<sub>d18</sub>TVSS;

X<sub>d1</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example V or I;

X<sub>d2</sub> is S or P;

X<sub>d3</sub> is A or E;

X<sub>d4</sub> is a neutral hydrophilic amino acid such as for example S or T;

X<sub>d5</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example V or I;

X<sub>d6</sub> is a basic amino acid such as for example R or K;

X<sub>d7</sub> is a basic amino acid such as for example Q or K;

X<sub>d8</sub> is E or K;

X<sub>d9</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example V or A;

X<sub>d10</sub> is an acidic amino acid such as for example D or E;

X<sub>d11</sub> is an hydrophobic amino acid such as for example V or A;

X<sub>d12</sub> is S or N;

X<sub>d13</sub> is S or N;

X<sub>d14</sub> is A or N;

X<sub>d15</sub> is V or T;

X<sub>d16</sub> is an aromatic amino acid such as for example Y or F;

X<sub>d17</sub> is L or T and;

X<sub>d18</sub> is hydrophobic amino acid such as for example V or L.

SEQ ID NO.:40 (h21B12 VH consensus3)

QX<sub>d1</sub>QLVQSGX<sub>d2</sub>ELKKPGX<sub>d3</sub>X<sub>d4</sub>VKX<sub>d5</sub>SCKASGYTFTNYGMHWVX<sub>d6</sub>QAPGX<sub>d7</sub>GLX<sub>d8</sub>  
WMGWINTYTGEPTYADDFKGRFX<sub>d9</sub>FSLX<sub>d10</sub>TSX<sub>d11</sub>STAYLQIX<sub>d12</sub>X<sub>d13</sub>LKX<sub>d14</sub>EDTAX<sub>d15</sub>YX<sub>d16</sub>CARDGFLYFFDYWGQGTGX<sub>d17</sub>X<sub>d18</sub>TVSS;

X<sub>d1</sub> is V or I; X<sub>d2</sub> is S or P; X<sub>d3</sub> is A or E; X<sub>d4</sub> is S or T; X<sub>d5</sub> is V or I; X<sub>d6</sub> is R or K; X<sub>d7</sub> is Q or K; X<sub>d8</sub> is E or K; X<sub>d9</sub> is V or A; X<sub>d10</sub> is D or E; X<sub>d11</sub> is V or A; X<sub>d12</sub> is S or N; X<sub>d13</sub> is S or N; X<sub>d14</sub> is A or N; X<sub>d15</sub> is V or T; X<sub>d16</sub> is Y or F; X<sub>d17</sub> is L or T and; X<sub>d18</sub> is V or L.

SEQ ID NO.: 41 (human model of 16B5VL)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA  
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSTPYSFGQGTKLEIK

## 【化 2 4】

SEQ ID NO.: 42 (human model of 16B5VH)

QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDYYMHVWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIY  
AEKFQGRVTITADTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCARIPLFGRDHWGQGTLVTVSR

SEQ ID NO.: 43 (human model of 21B12VL)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYS FGQGTKLEIK

10

SEQ ID NO.: 58 (human model of 21B12VH)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFSTYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPT  
YAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDWGQGTLVTVSSVATIDENWFDP

SEQ ID NO.:44

16B5 CDRH1: GFNIKDIY

SEQ ID NO.:45

16B5 CDRH2: IDPAYGNT

20

SEQ ID NO.:46

16B5 CDRH3: X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>RYDTAMDYX<sub>1</sub> is A;X<sub>2</sub> is R;or X<sub>1</sub> and X<sub>2</sub> are outside the CDRH3

30

SEQ ID NO.:47

16B5 CDRL1: QSLLNSRTRKNY

16B5 CDRL2: WAS

SEQ ID NO.:49

16B5 CDRL3: KQSYNLWT

40

SEQ ID NO.:50

21B12 CDRH1: GYTFTNYG

【化 2 5】

SEQ ID NO.:51

21B12 CDRH2: INTYTGEP

SEQ ID NO.:52

21B12 CDRH3: X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>DGFLYFFDYX<sub>3</sub> is A;X<sub>4</sub> is R;or X<sub>3</sub> and X<sub>4</sub> are outside the CDRH3

10

SEQ ID NO.:53

21B12 CDRL1: QSLLYSSNQKNY

21B12 CDRL2: WAS

SEQ ID NO.:55

21B12 CDRL3: QQYYIYPRT

20

【 0 3 1 2 】

[ 参考文献 ]

**References**

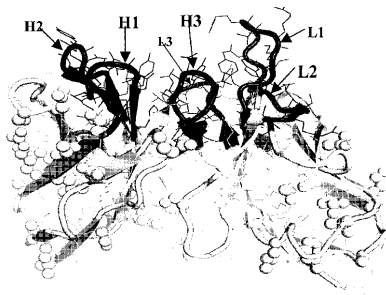
1. Gleave, M.E., et al., *Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, clusterin/testosterone-repressed prostate message 2, to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer*. Urology, 2001. **58**(2 Suppl 1): p. 39-49.
2. Trougakos, I.P., et al., *Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress*. Cancer Res, 2004. **64**(5): p. 1834-42.
3. Gleave, M. and H. Miyake, *Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer*. World J Urol, 2005. **23**(1): p. 38-46.
4. Springate, C.M., et al., *Efficacy of an intratumoral controlled release formulation of clusterin antisense oligonucleotide complexed with chitosan containing paclitaxel or docetaxel in prostate cancer xenograft models*. Cancer Chemother Pharmacol, 2005. **56**(3): p. 239-47.
5. Jo, H., Jia, Y., et al., *Cancer cell-derived clusterin modulates the phosphatidylinositol-3'-kinase-Akt pathway through attenuation of insulin-like growth factor 1 during serum deprivation*. Mol. Cell. Biol. 2008. **28**:4285-4299.
6. Zoubeidi, A., ettinger, S. et al., *Clusterin facilitates COMMD1 and I-kappaB degradation to enhance NF-kappaB activity in prostate cancer cells*. Mol. Cancer Res. 2010, **8**:119-130.

30

40

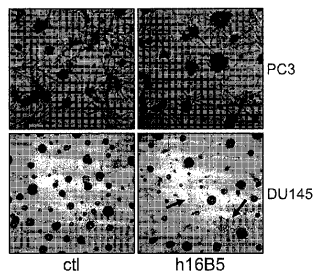
【 図 1 】

FIGURE 1



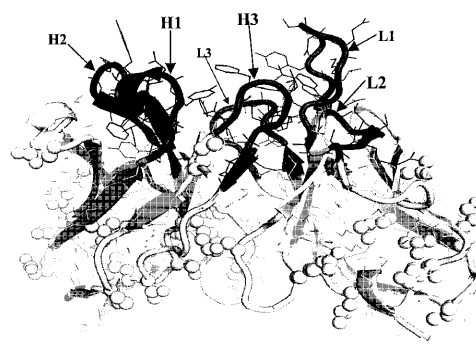
【 図 5 】

FIGURE 5



【 図 7 】

FIGURE 7





VL

復歸突然変異

VH

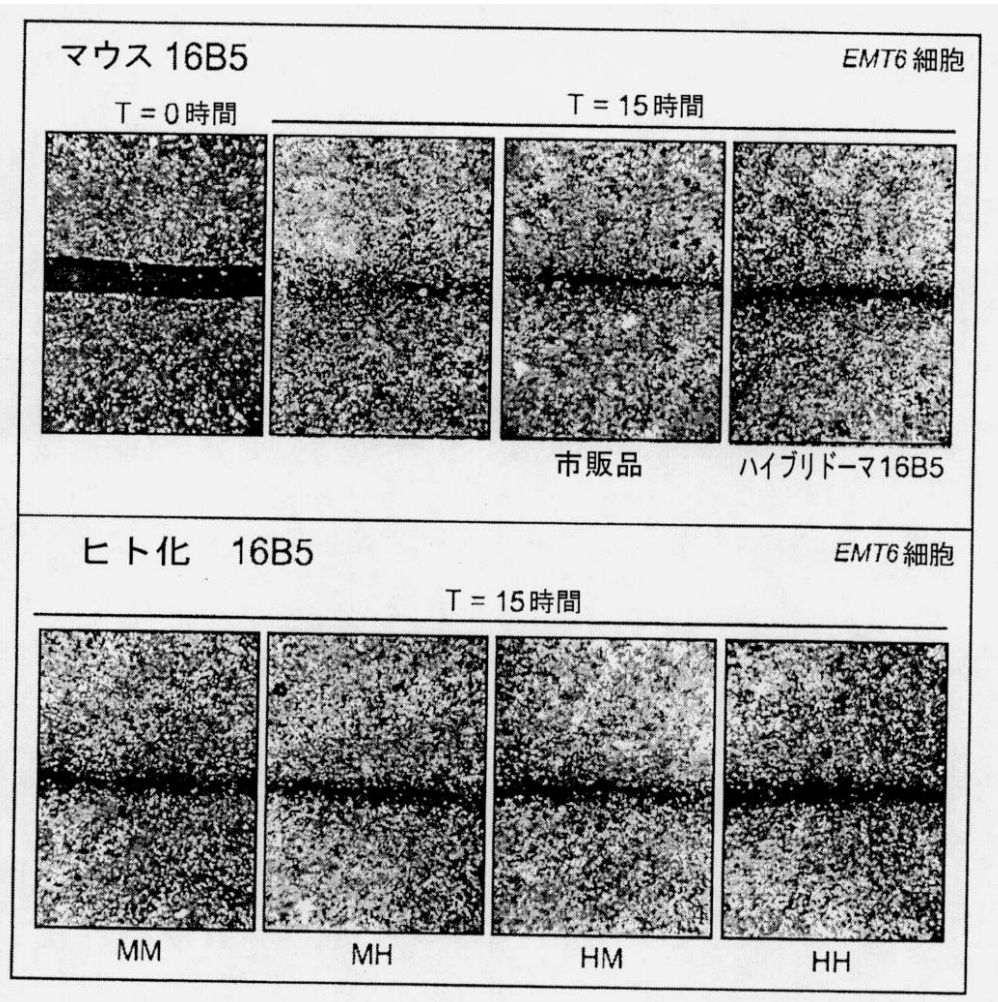
	E	Q	LV	S	R <sub>i</sub>	TT	K	R	EQ	I	KA	SN	LQ	T
復帰突然変異	5			B	B		B	5	B	5	B	B	5	

16B5 マウス VL= 配列番号 .25 (CDRを強調する)  
 16B5 ヒト化 VL= 配列番号 .28 (CDRを強調する)  
 16B5VL=配列番号29のヒトモル = 配列番号 .41  
 16B5 マウス VH= 配列番号 .29 (CDRを強調する)  
 16B5 ヒト化 VH= 配列番号 .27 (CDRを強調する)  
 16B5VL=配列番号29のヒトモル = 配列番号 .42

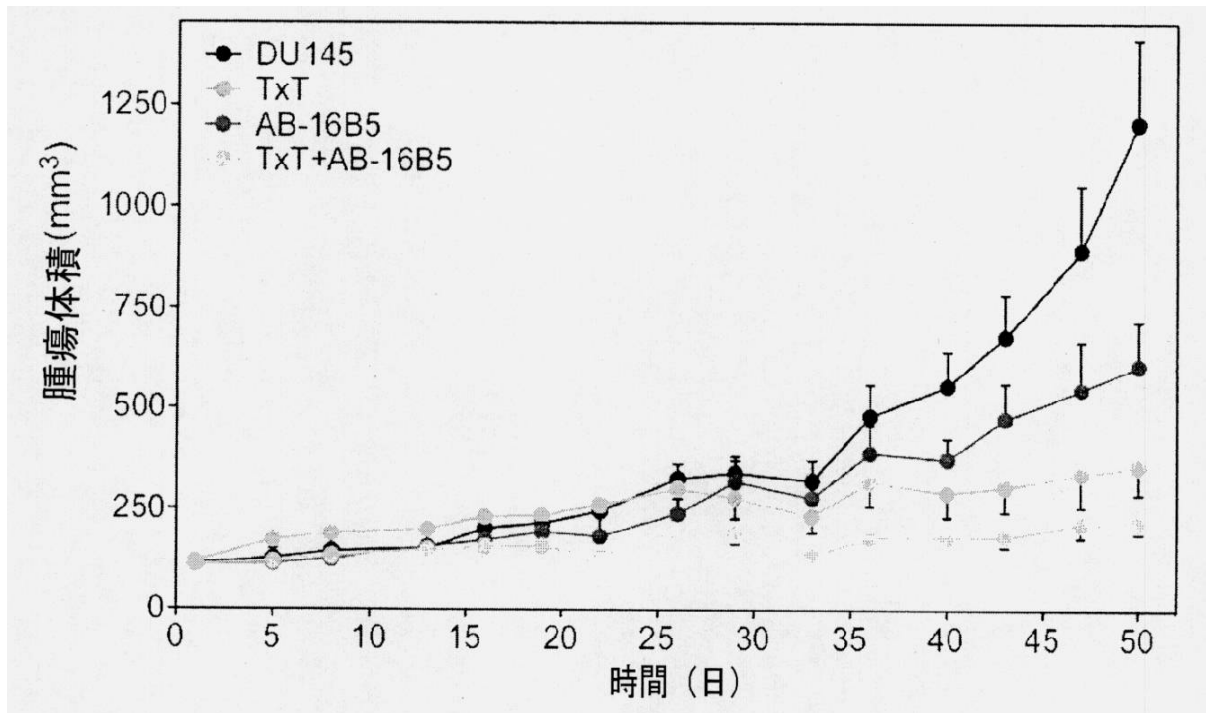
【図 3】

	$K_a$ (1/Ms)		$K_d$ (1/s)		$K_D$ (M)	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
16B5 Fab	7.41e+04	2.03e+04	0.0030	0.0006	4.16e-08	7.87e-09
16B5	3.29e+05	1.16e+05	0.0017	0.0005	6.64e-09	4.66e-09
HH16B5 Fab	1.59e+05	1.89e+04	0.0027	0.0004	1.72e-08	2.97e-09
HH16B5	3.45e+05	4.89e+04	0.0015	0.0005	4.49e-09	8.65e-10

【図 4】



【図 6】



【図 8】

21B12 ヒト化

VL (14 突然変異 , 100% フレームワーク ヒト化 ):

マウス  
DIVMSQSPSSSLAVSGEKTMTSCSSQSLLYSSNQKNYLAWYQORPGQPKLLIYWASTRESGVDPDRFTCSGSGTDFLTITISSVKAEDLAVYCCQYYIYPRTFGGGKLEIK  
ヒト化  
DIVMTQSPDSSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQORPGQPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGGTDFTLTITSSLOAFDVAVYCCQYYIYPRTFGGGKLEIK  
ヒトFR<sup>a</sup> DIVMTQSPDSSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQORPGQPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGGTDFTLTITSSLOAFDVAVYCCQYYIYPRTFGGGKLEIK

複雑突然変異 S S V KV MS R S T VK L G

VH (18 突然変異 , 100% フレームワーク ヒト化 ):

マウス  
QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYTFTNYGMHWYKQAFKGLKMWGWINTYGETTYADDKGRFAFSLETSASTAYLQINNKNEDTATYFCARDGELY---FFDYWGQGTLLTVSS  
ヒト化  
QVQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTNYGMHWYRQAFPGQGLEWMGWINTYGETTYADDKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYCCARDGELY---FFDYWGQGTLLTVSS  
ヒトFR<sup>b</sup> QVQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTSYAMNWYRQAFPGQGLEWMGWINTYGETTYADDKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYCCARDVATIDENWFDFWGQGTLLTVSS

複雑突然変異 I P ET I K K K A E A NN N T F TL

<sup>a</sup>埋没  
<sup>b</sup>CDRから5Å以内 (Kabat定義)  
VHに近接  
VLに近接

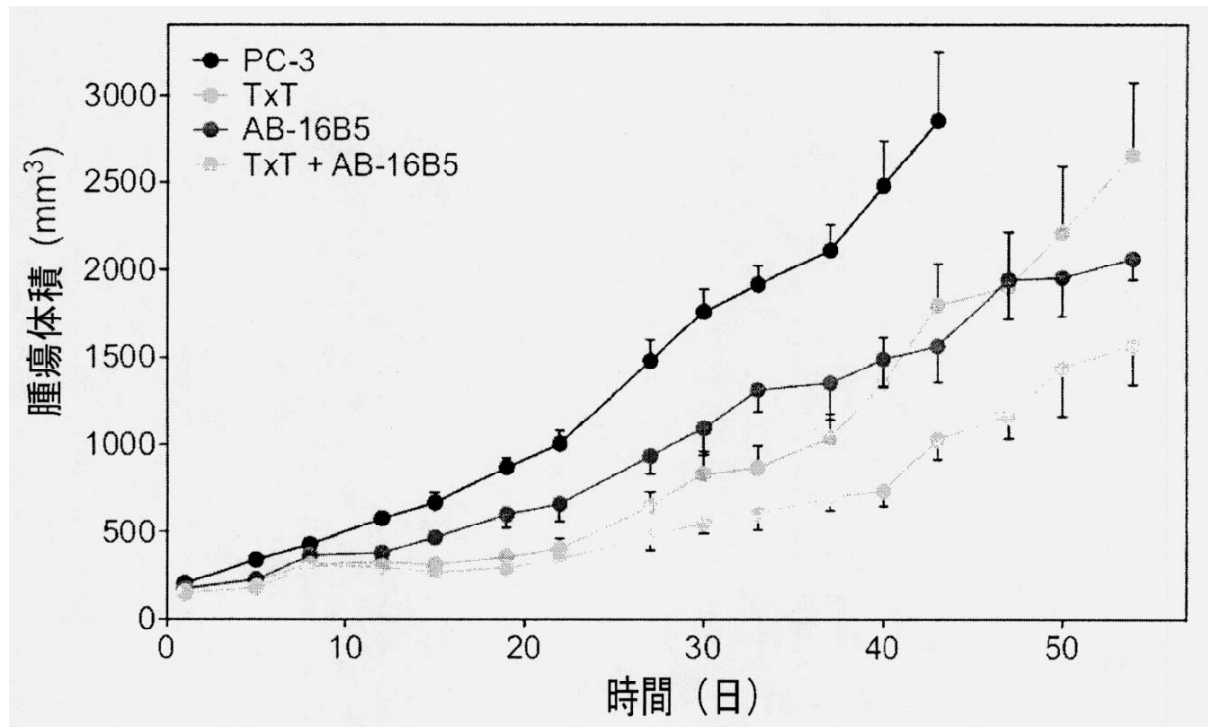
<sup>a</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1730075>  
<sup>b</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/3170803>

21B12 マウス VL= 配列番号 :33 (CDRを強調する)  
21B12 ヒト化 VL= 配列番号 :18 (CDRを強調する)  
21B12 VL-配列番号43のヒトモデル = 配列番号 :43  
21B12 マウス VH= 配列番号 :37 (CDRを強調する)  
21B12 ヒト化 VH= 配列番号 :17 (CDRを強調する)  
21B12 VL-配列番号43のヒトモデル = 配列番号 :58

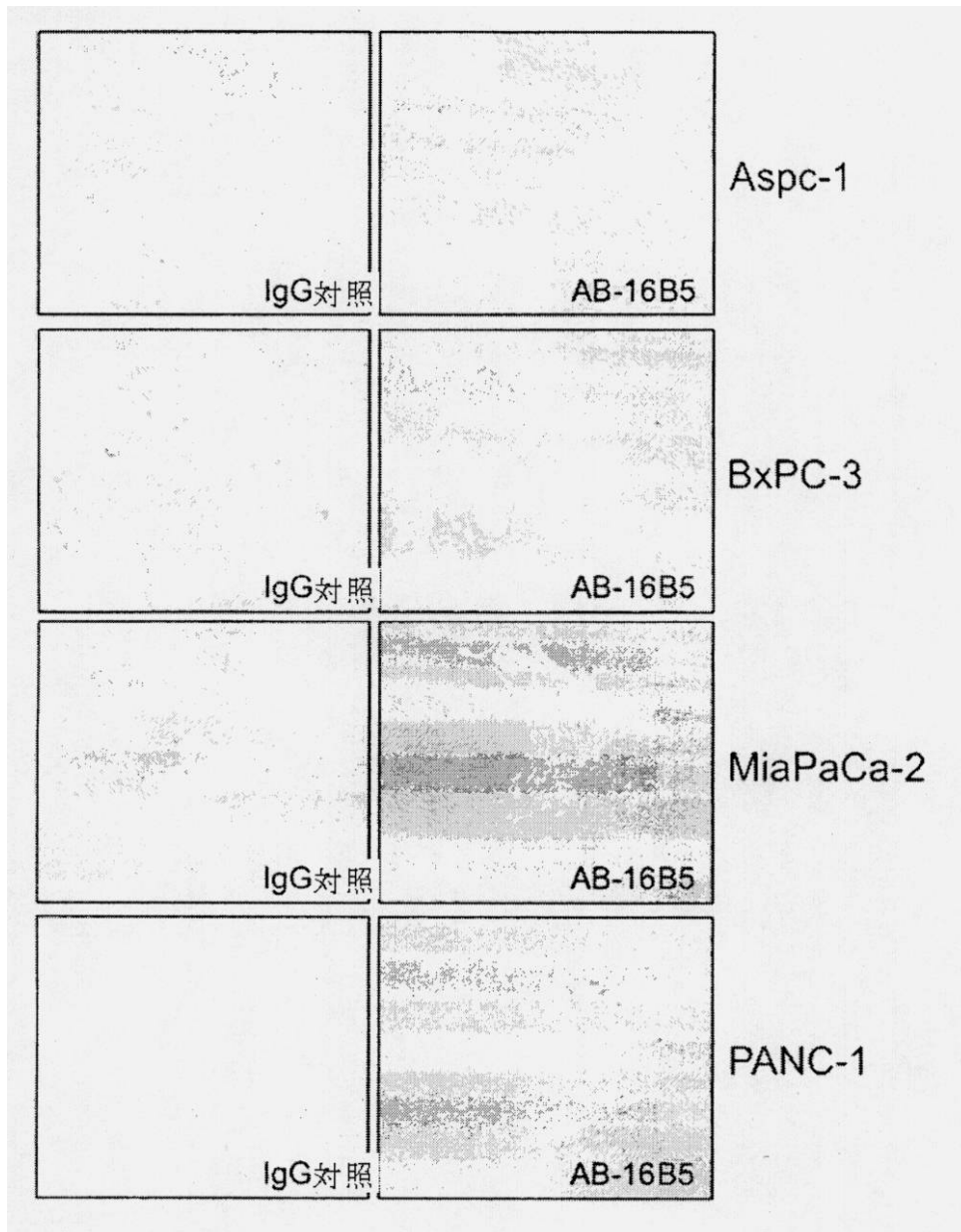
【 図 9 】

	$K_a$ (1/Ms)		$K_d$ (1/s)		$K_D$ (M)	
	平均值	標準偏差	平均值	標準偏差	平均值	標準偏差
21B12 Fab	2.15e+05	4.56e+04	0.00352	0.00092	2.53e-08	8.26e-09
21B12	3.62e+05	1.27e+5	0.0015	0.00074	5.09e-09	3.98e-09
HH21B12	3.74e+05		0.00083		2.23e-09	

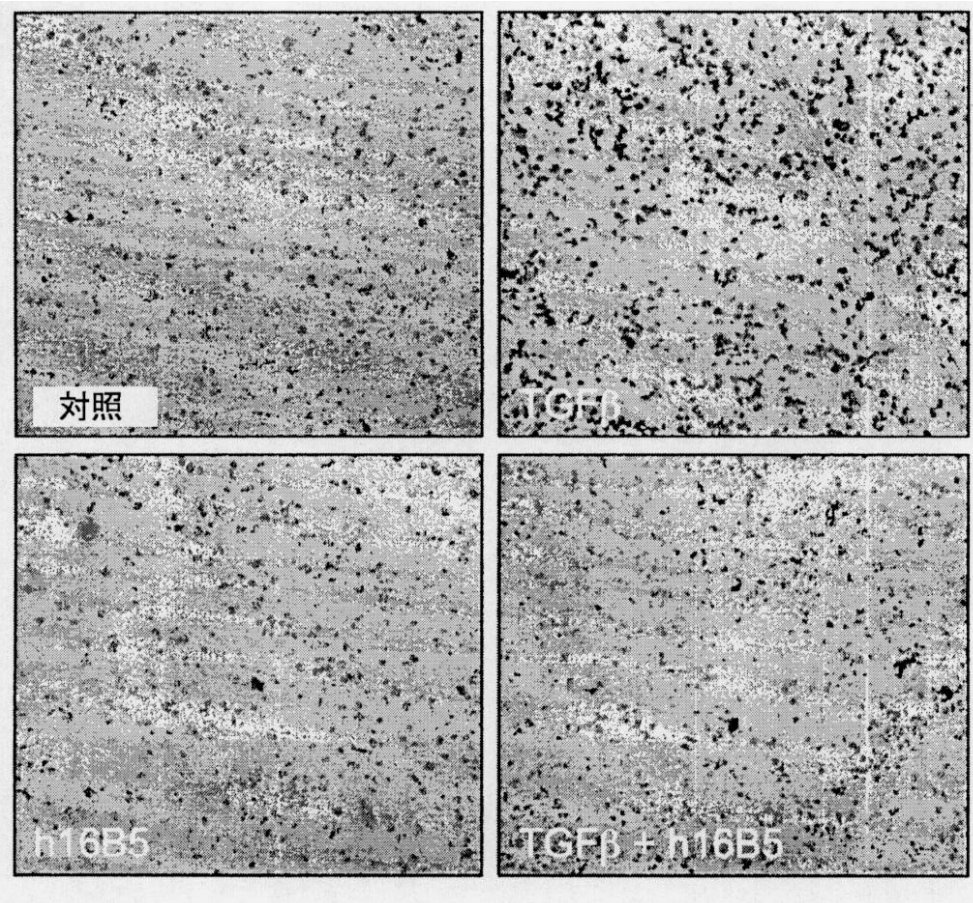
【 図 10 】



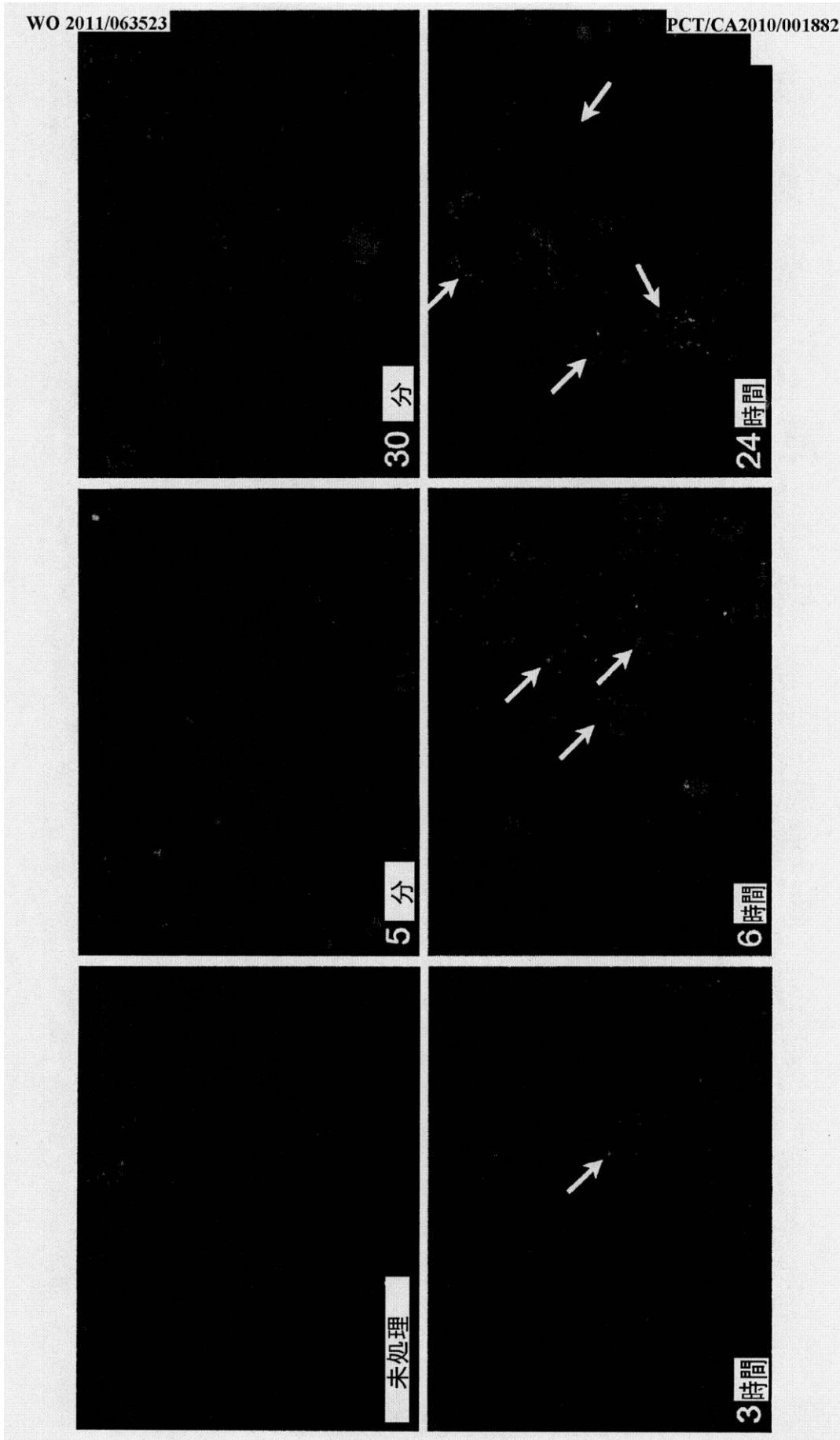
【図 11】



【図 12】

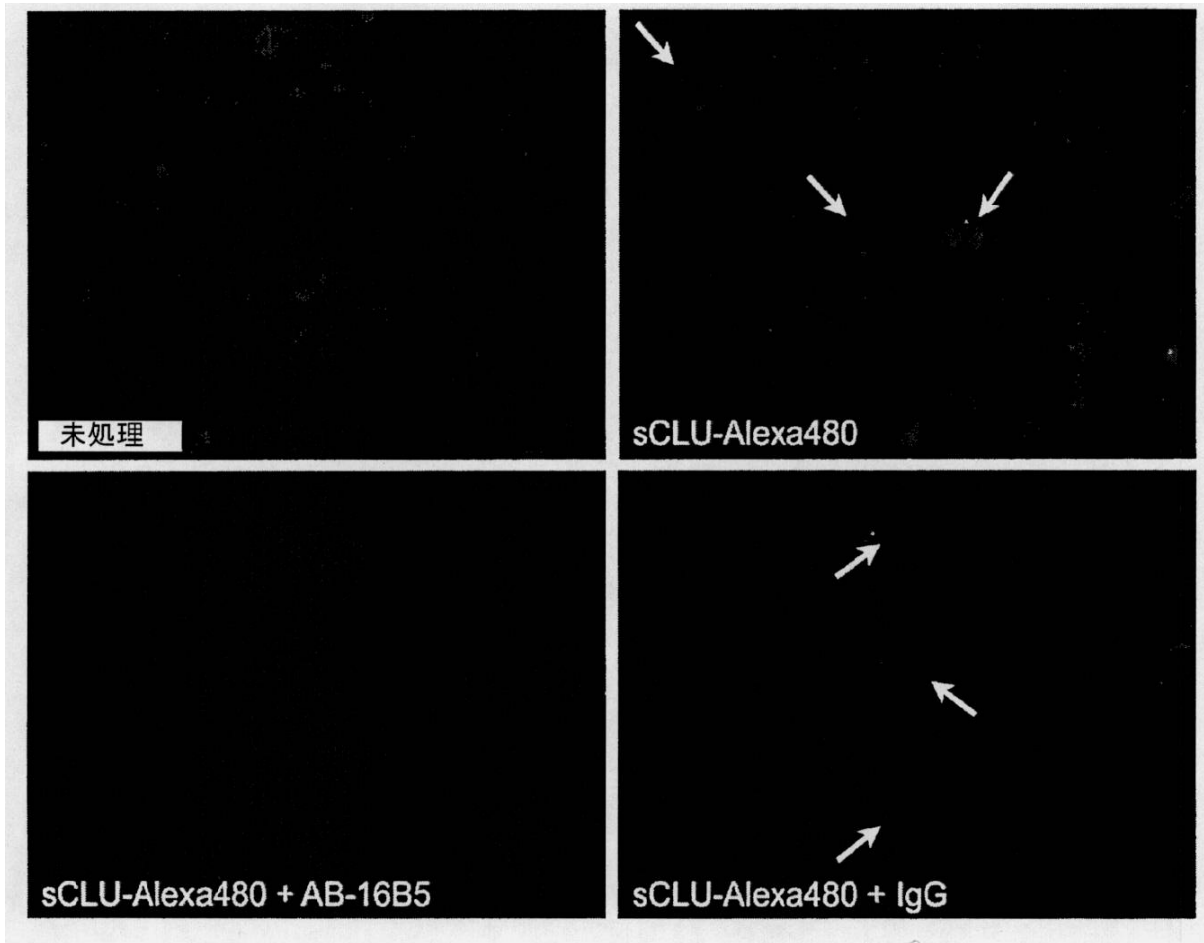


【図 13】





【図 14】



## 【図 15】

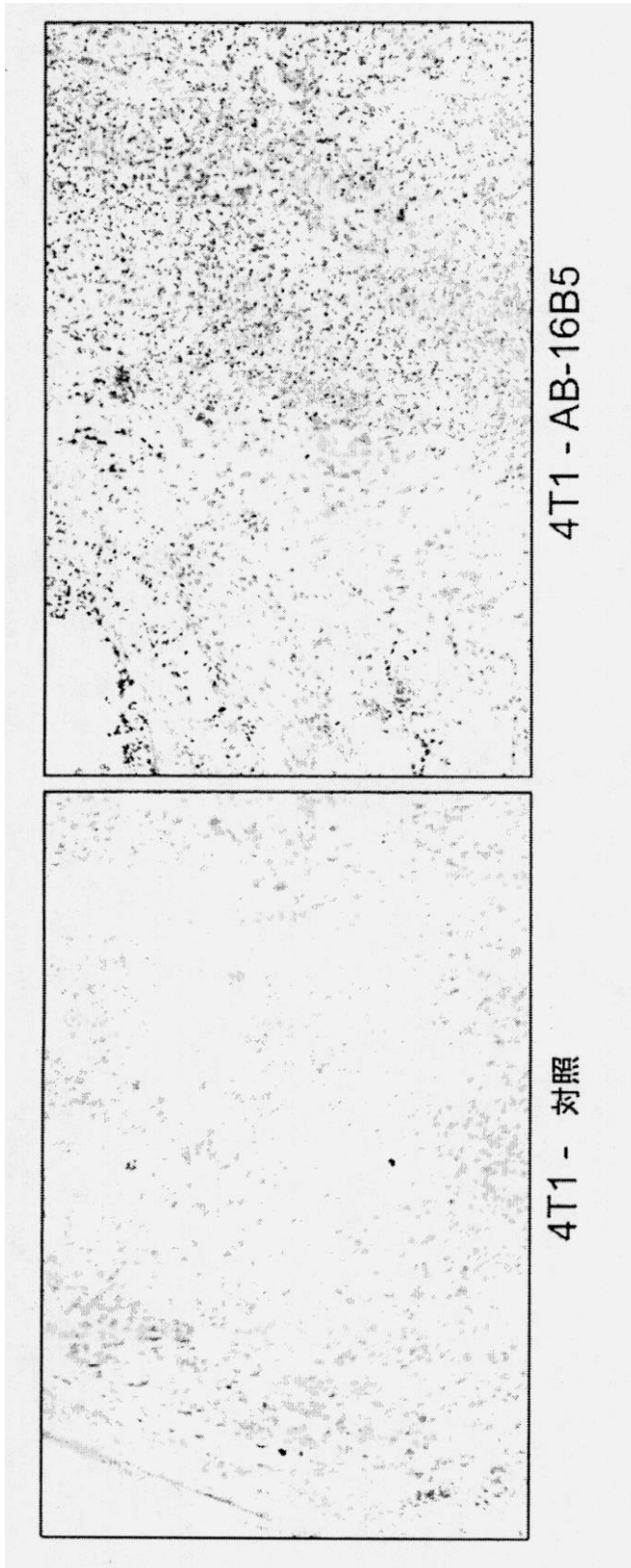
クエリーはヒトクラステリン (NP\_001822)

対象はマウスクラステリン (NP\_038520)

同一性 = 334/435 (77%), 陽性 = 384/435 (89%), ギャップ = 0/435 (0%)

クエリー	67	WESGQVLGDQTVSDNELQEMSNQGSKYVNKEIQNAVNGVKQIKTLIEKTNEERKTLLSNL	126
配列番号	56	W++G VLG+Q VSDNELQE+S QGS+Y+NKEIQNAV GVK IKTLLIEKTN ERK+LL++L	
配列番号	57	W G VLG Q VSDNELQE S QGS Y NKEIQNAV GVK IKTLLIEKTN ERK LL L	
対象	14	WDNGMVLGEQEVSDNELQELSTQGSRYINKEIQNAVQGVKHIKTLLIEKTNAERKSLNSL	73
クエリー	127	EEAKKKKEDALNETRESETKLKELPGVCNETMMALWEECKPCLKQTCMKFYARVCRSGSG	186
配列番号	56	EEAKKKKEDAL +TR+SE KLK P VCNETMMALWEECKPCLK TCMKFYARVCRSGSG	
配列番号	57	EEAKKKKEDAL TR SE KLK P VCNETMMALWEECKPCLK TCMKFYARVCRSGSG	
対象	74	EEAKKKKEDALETRDSEMKLKAFPEVCNETMMALWEECKPCLKHTCMKFYARVCRSGSG	133
クエリー	187	LVGRQLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLLENDRQQTHMLDVMQDHFSSRASSIIDELFQDR	246
配列番号	56	LVG+QLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLLE+DRQQ+ +LD MQD F+RAS IID LFQDR	
配列番号	57	LVG QLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLLE DRQQ LD MQD F RAS IID LFQDR	
対象	134	LVGQQLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLLESDDRQQSQVLDA MQDSFARASGIIDTLFQDR	193
クエリー	247	FFTREPQDTYHYLPFSLPHRRPHFFFPKSRIVRSLMPFSPYEPLNFHAMFQPFLEMIHEA	306
配列番号	56	FF RE D +++ P PH+RPHF +PKSR+VRSLM S Y P +FH MFQPF EMIH+A	
配列番号	57	FF RE D P PH RPHF PKSR VRSLM S Y P FH MFQPF EMIH A	
対象	194	FFARELHDPHYFSPIGFPHKRPFLYPKSRIVRSLMSPSHYGPPSFHNMFPFFEMIHQ	253
クエリー	307	QQAMDIHFHSPAFQHPPTFEFIREGDDDRTVCREIRHNSTGCLRMKDQCCKREILSVDCS	366
配列番号	56	QQAMD+ HSPAFQ P +F+REG+DDRTVC+EIR NSTGCL+MK QC+KC+EILSVDCS	
配列番号	57	QQAMD HSPAFQ P F REG DDRTVC EIR NSTGCL MK QC KC EILSVDCS	
対象	254	QQAMDVQLHSPAFQFPDQVDFLREGEDDRTVCKEIRRNSTGCLKMKGQCEKQCEILSVDCS	313
クエリー	367	TNNPSQAKLRRELDESLOQAERLTRKYNELLSYQWKMLNTSSLLEQLNEQFNWVSRLAN	426
配列番号	56	TNNP+QA LR+EL++SLQVAERLT +Y ELL+S+Q KMLNTSSLLEQLN+QFNWVS+LAN	
配列番号	57	TNNP QA LR EL SLQVAERLT Y ELL S Q KMLNTSSLLEQLN QFNWVS LAN	
対象	314	TNNPAQANLRQELNDSLQVAERLTEQYKELLQSFQSKMLNTSSLLEQLNDQFNWVSQLAN	373
一 号 号	427	LTQGEDQYYLRVTTVASHTSDSDVPSGVTEVVVKLFDSDPITVTVPVEVSRKNPKFMETV	486
	56	LTQGED+YYLRV+TV +H+SDS+VPS VTEVVVKLFDSDPITV +P EVS+ NPKFM+TV	
	57	LTQGED YYLRV TV H SDS VPS VTEVVVKLFDSDPITV P EVS NPKFM TV	
対象	374	LTQGEDKYYLRVSTVTHSSDSEVPSRVTEVVVKLFDSDPITVVLPEEVSKDNPKFMDTV	433
一 号 号	487	AEKALQEYRKKHREE	501
	56	AEKALQEYR+K R E	
	57	AEKALQEYR K R E	
対象	434	AEKALQEYRRKSRAE	448

【図 16】



【配列表】

0005816188000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 E
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00 A
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	31/337	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 K	31/337
			A 6 1 P	35/04

(74)代理人 100064908

弁理士 志賀 正武

(74)代理人 100089037

弁理士 渡邊 隆

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 ギレス・バーナード・トレンブレ

カナダ・ケベック・J 5 R・6 N 8・ラ・プレーリー・ドニーズ・ルマイストル・1 0 0

(72)発明者 マリオ・フィリヨン

カナダ・ケベック・J 4 J・4 M 8・ロングイユ・メーブル・ストリート・7 3 9

(72)発明者 トライアン・スリー

カナダ・ケベック・H 9 J・3 A 2・カークランド・オールド・フォレスト・6 1

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表2009-507476(JP,A)

特表2008-520186(JP,A)

国際公開第2009/117030(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 0 0

A 6 1 K 4 5 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

UniProt/GeneSeq