

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7631309号
(P7631309)

(45)発行日 令和7年2月18日(2025.2.18)

(24)登録日 令和7年2月7日(2025.2.7)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
請求項の数 35 (全68頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-509038(P2022-509038)	(73)特許権者	520307366
(86)(22)出願日	令和2年8月12日(2020.8.12)		アントレラ セラピューティクス インコ
(65)公表番号	特表2022-551380(P2022-551380		ーポレイテッド
	A)		ANT L E R A T H E R A P E U T I
(43)公表日	令和4年12月9日(2022.12.9)		C S I N C .
(86)国際出願番号	PCT/CA2020/051103		カナダ エム5エイチ 2ティー6 オン
(87)国際公開番号	WO2021/026652		タリオ州 トロント ベイ ストリート 3
(87)国際公開日	令和3年2月18日(2021.2.18)		3 3 スイート 2 4 0 0
審査請求日	令和4年8月1日(2022.8.1)	(74)代理人	100102978
(31)優先権主張番号	62/885,781		弁理士 清水 初志
(32)優先日	令和1年8月12日(2019.8.12)	(74)代理人	100205707
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 小寺 秀紀
	米国(US)	(74)代理人	100160923
(31)優先権主張番号	62/886,292		弁理士 山口 裕孝
(32)優先日	令和1年8月13日(2019.8.13)	(74)代理人	100119507
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 F r i z z l e d 受容体抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域を含む、ヒトFrizzled受容体FZD 4のシステ
インリッチドメイン(CRD)に特異的に結合する抗体であって、
前記重鎖可変領域が、相補性決定領域CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、前記
軽鎖可変領域が、相補性決定領域CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、
前記抗体が、SEQ ID NO: 103からなるCDR-L1、SEQ ID NO: 104からなるCDR-L2
、および以下：

(a) SEQ ID NO: 6からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 30からなるCDR-H2、SEQ ID N
O: 66からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 111からなるCDR-L3；

(b) SEQ ID NO: 149からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 150からなるCDR-H2、SEQ I
D NO: 151からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 148からなるCDR-L3；

(c) SEQ ID NO: 166からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 184からなるCDR-H2、SEQ I
D NO: 208からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 153からなるCDR-L3；

(d) SEQ ID NO: 167からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 187からなるCDR-H2、SEQ I
D NO: 211からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 153からなるCDR-L3；

(e) SEQ ID NO: 169からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 190からなるCDR-H2、SEQ I
D NO: 214からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 153からなるCDR-L3；

(f) SEQ ID NO: 1からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 24からなるCDR-H2、SEQ ID N
O: 60からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 105からなるCDR-L3；

—(g) SEQ ID NO: 3からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 26からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 62からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 107からなるCDR-L3；

(h) SEQ ID NO: 1からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 27からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 63からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 108からなるCDR-L3；

(i) SEQ ID NO: 4からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 28からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 64からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 109からなるCDR-L3；

(j) SEQ ID NO: 5からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 29からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 65からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 110からなるCDR-L3；

—(k) SEQ ID NO: 7からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 32からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 68からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 113からなるCDR-L3；

10

(l) SEQ ID NO: 8からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 33からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 69からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 114からなるCDR-L3；

—(m) SEQ ID NO: 9からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 35からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 71からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 116からなるCDR-L3；

(n) SEQ ID NO: 3からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 36からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 72からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 117からなるCDR-L3；

(o) SEQ ID NO: 10からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 28からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 73からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 118からなるCDR-L3；

(p) SEQ ID NO: 11からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 37からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 74からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 119からなるCDR-L3；

20

(q) SEQ ID NO: 5からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 32からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 68からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 120からなるCDR-L3；

—(r) SEQ ID NO: 5からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 39からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 76からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 122からなるCDR-L3；

—(s) SEQ ID NO: 13からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 41からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 79からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 125からなるCDR-L3；

(t) SEQ ID NO: 14からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 42からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 80からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 126からなるCDR-L3；

(u) SEQ ID NO: 3からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 43からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 81からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 127からなるCDR-L3；

30

(v) SEQ ID NO: 15からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 43からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 82からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 128からなるCDR-L3；

(w) SEQ ID NO: 7からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 44からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 83からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 129からなるCDR-L3；

(x) SEQ ID NO: 7からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 45からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 84からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 130からなるCDR-L3；

(y) SEQ ID NO: 16からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 46からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 85からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 131からなるCDR-L3；

(z) SEQ ID NO: 17からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 47からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 87からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 133からなるCDR-L3；

40

(aa) SEQ ID NO: 18からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 48からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 88からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 134からなるCDR-L3；

(bb) SEQ ID NO: 17からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 49からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 89からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 135からなるCDR-L3；

(cc) SEQ ID NO: 3からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 42からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 90からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 136からなるCDR-L3；

(dd) SEQ ID NO: 3からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 51からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 92からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 137からなるCDR-L3；

(ee) SEQ ID NO: 19からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 52からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 93からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 138からなるCDR-L3；

50

—(ff) SEQ ID NO: 1からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 51からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 98からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 143からなるCDR-L3；

(gg) SEQ ID NO: 1からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 42からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 99からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 144からなるCDR-L3；

(hh) SEQ ID NO: 22からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 57からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 100からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 145からなるCDR-L3；

(ii) SEQ ID NO: 23からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 58からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 101からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 146からなるCDR-L3；または

(jj) SEQ ID NO: 3からなるCDR-H1、SEQ ID NO: 59からなるCDR-H2、SEQ ID NO: 102からなるCDR-H3、およびSEQ ID NO: 147からなるCDR-L3、

を含む、

前記抗体。

【請求項 2】

(i) SEQ ID NO: 302の重鎖アミノ酸配列、

(ii) SEQ ID NO: 302の重鎖アミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または

(iii) (i)の保存的に置換されたアミノ酸配列

を含む重鎖可変領域を含み、そのCDRが請求項1に記載されたCDRである、請求項1記載の抗体。

【請求項 3】

(i) SEQ ID NO: 300の軽鎖アミノ酸配列、

(ii) SEQ ID NO: 300の軽鎖アミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列、または

(iii) (i)の保存的に置換されたアミノ酸配列

を含む軽鎖可変領域を含み、そのCDRが請求項1に記載されたCDRである、請求項1または2記載の抗体。

【請求項 4】

約0.2nM～約15.3nMの、表面プラズモン共鳴によって測定される結合親和性を有する、請求項1～3のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 5】

モノクローナル抗体である、請求項1～4のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 6】

ヒト化抗体である、請求項1～5のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 7】

一本鎖抗体である、請求項1～6のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 8】

Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディ、およびそれらの多量体から選択される抗体結合断片である、請求項1～7のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 9】

二価、三価、または四価の抗体である多価抗体である、請求項1～7のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 10】

LRP 5および/またはLRP 6にさらに結合する二重特異性抗体である、請求項1～7のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 11】

非天然グリコシル化パターンを含む、請求項1～7のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 12】

定常領域またはフレームワーク領域にシステインの置換または付加を含む、請求項1～7のいずれか一項記載の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

FZDに対するWntの結合を遮断する、請求項1～12のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 14】

請求項1～13のいずれか一項記載の抗体と、検出可能な標識または細胞傷害剤を含む、イムノコンジュゲート。

【請求項 15】

メイタンシノイド、アウリスタチン、ドラスタチン、チューブリシン、クリプトフィシン、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)二量体、インドリノベンゾジアゼピン二量体、 α -アマニチン、トリコテン、SN-38、デュオカルマイシン、CC1065、カリケアマイシン、エンジンイン抗生物質、タキサン、ドキシソルピシン誘導体、アントラサイクリン、およびそれらの立体異性体、アザノフィド、アイソスター、類似体、または誘導体から選択される細胞傷害剤を含む、請求項14記載のイムノコンジュゲート。

10

【請求項 16】

請求項1～15のいずれか一項記載の抗体をコードする、核酸分子。

【請求項 17】

CDR配列のうちの1つまたは複数が、SEQ ID NO: 219～299および304～427のいずれか1つの核酸によってコードされる、請求項16記載の核酸分子。

【請求項 18】

前記抗体が、

(i) SEQ ID NO: 303の重鎖核酸配列、

20

(ii) SEQ ID NO: 303に記載の重鎖核酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または

(iii) (i) のコドン縮退核酸配列

を含む核酸によってコードされる重鎖可変領域を含み、該抗体のCDRが請求項1に記載されたCDRである、請求項16記載の核酸分子。

【請求項 19】

前記抗体が、

(i) SEQ ID NO: 301の軽鎖核酸配列、

(ii) SEQ ID NO: 301の軽鎖核酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有する核酸配列、または

30

(iii) (i) のコドン縮退核酸配列

を含む核酸によってコードされる軽鎖可変領域を含み、該抗体のCDRが請求項1に記載されたCDRである、請求項16記載の核酸分子。

【請求項 20】

請求項16～19のいずれか一項記載の核酸に機能的に連結された発現制御配列を含む、ベクター。

【請求項 21】

請求項16～19のいずれか一項記載の核酸に機能的に連結された発現制御配列を含む組換え核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項 22】

40

チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である、請求項21記載の宿主細胞。

【請求項 23】

請求項20記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 24】

請求項21～23のいずれか一項記載の宿主細胞を培養する工程を含む、抗FZD抗体を作製するための方法。

【請求項 25】

任意で好適な希釈剤とともに、請求項1～13のいずれか一項もしくは複数項記載の抗体、請求項14～15のいずれか一項記載のイムノコンジュゲート、請求項16～19のいずれか一項記載の核酸分子、請求項20記載のベクター、または請求項21～23記載の宿主細胞を

50

含む、組成物。

【請求項 26】

1つまたは複数の抗体またはイムノコンジュゲートを含み、任意で、薬学的組成物である、請求項25記載の組成物。

【請求項 27】

請求項1～13のいずれか一項もしくは複数項記載の抗体、請求項14～15のいずれか一項記載のイムノコンジュゲート、請求項16～19のいずれか一項記載の核酸分子、請求項20記載のベクター、または請求項21～23記載の宿主細胞を含む、キット。

【請求項 28】

抗体：細胞複合体の形成を許容する条件下で、1つまたは複数の細胞を含む試料と、請求項1～15のいずれか一項記載の1つまたは複数の抗体またはイムノコンジュゲートとを接触させる工程、および任意の抗体複合体の存在を検出する工程を含む、FZD発現を検出する方法。

10

【請求項 29】

検出が、免疫蛍光によるものである、請求項28記載の方法。

【請求項 30】

検出が、フローサイトメトリーによるものである、請求項28記載の方法。

【請求項 31】

FZD受容体へのWntリガンド結合を阻害するか、Wntシグナル伝達経路を妨害するか、Wnt誘導性転写活性を阻害するか、disheveledの活性化を阻害するか、____-カテニン分解複合体の保存を促進するか、____-カテニンの蓄積を促進するか、または細胞の増殖を阻害するインビトロの方法であって、

20

FZD受容体を発現する細胞と、請求項1～15のいずれか一項記載の抗体またはイムノコンジュゲートとを接触させる工程を含む、方法。

【請求項 32】

WntリガンドがWnt3aである、請求項31記載の方法。

【請求項 33】

請求項1～15のいずれか一項記載の抗体またはイムノコンジュゲートの有効量を含む、その必要がある対象の癌を治療するための薬学的組成物。

【請求項 34】

30

癌が、結腸、肺、乳房、卵巣、子宮内膜、膵臓、胃、肝臓、副腎皮質の癌、および骨芽細胞腫の癌細胞から選択される、請求項33記載の薬学的組成物。

【請求項 35】

癌が、急性骨髄性白血病、神経芽細胞腫、肝癌、肺癌、子宮内膜癌、唾液腺様嚢胞癌、結腸直腸癌、前立腺癌、神経膠芽腫、膀胱癌、子宮頸癌、膵癌、結腸癌、乳癌、食道癌、神経膠腫、胃癌、星状細胞腫、および骨肉腫から選択される、請求項33記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

分野

本開示は、frizzled受容体に結合する抗体、特に、frizzled受容体4システインリッチドメインに結合する抗体、およびその使用に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、2019年8月12日に出願された米国仮出願第62/885,781号および2019年8月13日に提出された米国仮出願第62/886,292号の優先日の恩典を主張する。

【背景技術】

【0003】

50

背景

frizzled受容体(FZD)は、発生、細胞増殖、生存、遊走、および幹細胞維持などの多くの重要な生物学的過程に関与する7回膜貫通受容体の重要なクラスである。成体動物では、Wntリガンドが7回膜貫通受容体のFrizzledファミリーと相互作用し、胚発生および組織恒常性中の幹細胞および前駆細胞の再生および細胞分化を制御すると、シグナル伝達経路が活性化される。これらの受容体およびそれらのリガンド(Wnt)の異常な発現およびシグナル伝達は、結腸癌、肺癌、乳癌、および卵巣癌を含む多数の癌に関連している。多くの場合、複数のWntリガンドおよび/またはfrizzled受容体がアップレギュレートされ、腫瘍形成を促進する異常なシグナル伝達をもたらす。したがって、さらに良好な抗癌効果を達成するために、複数のfrizzled受容体の阻害が必要であり得る。さらに、frizzled受容体は、薬物耐性、腫瘍再発、および転移の原因となると考えられている、癌細胞の小さな集団である癌幹細胞にも関与している。したがって、FZD4を含むFZD受容体(1つまたは複数の受容体のいずれか)の阻害は、癌幹細胞を標的とし、様々なタイプの癌を治療するための効果的な方法であり得る。

【0004】

Wntシグナル伝達は、古典的シグナル伝達経路および非古典的シグナル伝達経路の活性化をもたらす。非古典的経路は、核または転写を伴わず、むしろ細胞骨格およびカルシウムレベルを調節する細胞質シグナルを活性化するシグナル伝達分子を活性化する。この経路は、主に、細胞極性または遊走を調節する役割を果たす。

【0005】

古典的経路は、 β -カテニンの細胞質レベルを調節することによって、転写活性を主に制御する。 β -カテニンは、非刺激状態では、Axin、APC、CD1、およびGSKから構成される分解複合体と会合し、これにより、 β -カテニンのリン酸化、ユビキチン化、およびプロテアソーム分解がもたらされる。frizzled(FZD)7回膜貫通受容体および共受容体低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質(co-receptor low density lipoprotein receptor-related protein)(LRP5またはLRP6のいずれか)に、Wntが結合する場合、Wntシグナル伝達は活性である。このシグナル伝達は、一つには、disheveled(Dsh/Dvl)を原形質膜に引き付けることによって複合体を不安定化し、 β -カテニンの蓄積をもたらす、これにより、 β -カテニンが核に移動し、TCF/LEF媒介性転写を活性化する。

【0006】

ヒトのいくつかの癌は、Wnt標的遺伝子のリガンド非依存的活性化をもたらす、WNT経路の細胞質成分内の変異によって引き起こされる。例えば、APC変異の不活性化、および β -カテニン変異の活性化は、ヒトの結腸直腸癌では主要な根本原因である。この経路は細胞表面受容体の下流で活性化されるため、Wnt経路に対する標的療法の開発は困難であることが判明している。ただし、近年、Wntシグナル伝達の負の調節因子であるRNF43(結腸癌、子宮内膜癌、膵癌、胃癌、卵巣癌、肝癌)およびそのホモログZNR3(副腎皮質癌および骨肉腫)に変異を引き起こす癌が同定され、リガンド依存性腫瘍成長が暗示されている。実際、RNF43およびZNR3は、Frizzled受容体を標的とする膜貫通E3ユビキチンリガーゼをコードするWnt標的遺伝子であり、その機能喪失変異は、FZDの高発現をもたらす、腫瘍細胞をWnt依存性シグナル伝達の阻害に対して感受性にし得る。

【発明の概要】

【0007】

概要

以下の概要は、読者に本開示の様々な局面を紹介することを意図しているが、いかなる発明も定義または限定することを意図していない。

【0008】

一局面では、本開示は、軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域を含む、FZD 1、2、4、5、7、8、および9から選択されるヒトFrizzled受容体のうちの1つまたは複数の各々のシステインリッチドメイン(CRD)に特異的に結合する抗体を提供し、重鎖可変領域は、相補性決定領域CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、軽鎖可変領域は、相補性

10

20

30

40

50

決定領域CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、上記CDRのアミノ酸配列は、表1aまたは表3aの配列から選択される配列を含むか、またはそれらからなる。一態様では、CDRは、表1aまたは表3aにおいて同定された抗体から選択される（a）完全な配列セットまたは（b）軽鎖配列セットまたは（c）重鎖配列セットを含む。

【0009】

別の態様では、CDRは、以下の配列を含むか、またはそれらからなり、

CDR-H1は、ISYYYM (SEQ ID NO: 1)、IYSYYM (SEQ ID NO: 2)、LSYYYM (SEQ ID NO: 3)、IYYYSI (SEQ ID NO: 4)、LYSYYM (SEQ ID NO: 5)、LSSYSM (SEQ ID NO: 6)、ISYYII (SEQ ID NO: 7)、LSYSYM (SEQ ID NO: 8)、IYYYYM (SEQ ID NO: 9)、LYYYSI (SEQ ID NO: 10)、ISSYYI (SEQ ID NO: 11)、FSSSSI (SEQ ID NO: 12)、LSYYSI (SEQ ID NO: 13)、LYSYYI (SEQ ID NO: 14)、LSSYYM (SEQ ID NO: 15)、LSYYII (SEQ ID NO: 16)、ISSYYM (SEQ ID NO: 17)、LSYYSM (SEQ ID NO: 18)、LYSYSI (SEQ ID NO: 19)、LYYYII (SEQ ID NO: 20)、IYSYYI (SEQ ID NO: 21)、ISYSYI (SEQ ID NO: 22)、およびISYYSM (SEQ ID NO: 23)からなる群より選択され、

10

CDR-H2は、SIYSYGYTY (SEQ ID NO: 24)、SIYSSSSSTY (SEQ ID NO: 25)、SIYPSSSYTY (SEQ ID NO: 26)、SIYSSSSYTS (SEQ ID NO: 27)、YISSYSGSTY (SEQ ID NO: 28)、SIYSSYGYTY (SEQ ID NO: 29)、YISSYGYTY (SEQ ID NO: 30)、SIYPSSSTY (SEQ ID NO: 31)、SIYSSSGYTY (SEQ ID NO: 32)、YISSYSGSTS (SEQ ID NO: 33)、SISSYGYSTY (SEQ ID NO: 34)、SIYSYGYSTY (SEQ ID NO: 35)、SIYPYSGTY (SEQ ID NO: 36)、YISPYGYTS (SEQ ID NO: 37)、SISSSGYTY (SEQ ID NO: 38)、SIYSYSSTY (SEQ ID NO: 39)、SISPSSSYTY (SEQ ID NO: 40)、YISPYGYTY (SEQ ID NO: 41)、SISPYSSSTY (SEQ ID NO: 42)、SIYSSYGYTY (SEQ ID NO: 43)、SIYSSSSYTY (SEQ ID NO: 44)、SIYPSSGYTY (SEQ ID NO: 45)、SIYPYSGSTY (SEQ ID NO: 46)、SIYPSYGYTY (SEQ ID NO: 47)、YISSYSSYTY (SEQ ID NO: 48)、SIYSYSSTY (SEQ ID NO: 49)、YISSYGYTS (SEQ ID NO: 50)、SISPYSSYTY (SEQ ID NO: 51)、YISPYGYTS (SEQ ID NO: 52)、SIYPYSSYTY (SEQ ID NO: 53)、SISPYGYTS (SEQ ID NO: 54)、SISPSYSSTY (SEQ ID NO: 55)、SISSYSSTY (SEQ ID NO: 56)、SIYPYSGSTS (SEQ ID NO: 57)、SISSYSSSTS (SEQ ID NO: 58)、およびSIYSYGYTY (SEQ ID NO: 59)からなる群より選択され、

20

CDR-H3は、SSFSWAM (SEQ ID NO: 60)、SSFYWAL (SEQ ID NO: 61)、SWFGWGI (SEQ ID NO: 62)、YWFSYGYASYP AF (SEQ ID NO: 63)、HPWYGM (SEQ ID NO: 64)、SAFYWAL (SEQ ID NO: 65)、PAPGHWGF (SEQ ID NO: 66)、SSFFWAM (SEQ ID NO: 67)、SAFYWAM (SEQ ID NO: 68)、HFFAM (SEQ ID NO: 69)、SWWAWAF (SEQ ID NO: 70)、SAFGWAL (SEQ ID NO: 71)、SSFFFAM (SEQ ID NO: 72)、PYYWSGGF (SEQ ID NO: 73)、HPSSSWFSFGAL (SEQ ID NO: 74)、SAFYWAF (SEQ ID NO: 75)、SSYAWAM (SEQ ID NO: 76)、SSFYWAI (SEQ ID NO: 77)、SPWGSGWAGF (SEQ ID NO: 78)、PAVWVGL (SEQ ID NO: 79)、SWVFWAL (SEQ ID NO: 80)、SWVYWGM (SEQ ID NO: 81)、SWVYWAL (SEQ ID NO: 82)、SSYAWAI (SEQ ID NO: 83)、SSFYWAM (SEQ ID NO: 84)、HGASFGSGAPAF (SEQ ID NO: 85)、SCFFWAM (SEQ ID NO: 86)、WAFFGL (SEQ ID NO: 87)、SSFYFAM (SEQ ID NO: 88)、SAFSWAI (SEQ ID NO: 89)、SGFYWAL (SEQ ID NO: 90)、PSVGAAAF (SEQ ID NO: 91)、SWVGWGL (SEQ ID NO: 92)、SSVGIVAM (SEQ ID NO: 93)、SWVYWAF (SEQ ID NO: 94)、YYYSSSVYFWY AAL (SEQ ID NO: 95)、SSFFWAI (SEQ ID NO: 96)、SWVYWAI (SEQ ID NO: 97)、SWVGWGI (SEQ ID NO: 98)、SSVYWAL (SEQ ID NO: 99)、WGGWGS GG YFYAAL (SEQ ID NO: 100)、FWYPM (SEQ ID NO: 101)、およびSSFAWAF (SEQ ID NO: 102)からなる群より選択され、

30

40

CDR-L1はSVSSA (SEQ ID NO: 103)であり、

CDR-L2はSASSLYS (SEQ ID NO: 104)であり、

CDR-L3は、HPWSGGYLI (SEQ ID NO: 105)、PVG YWGVPI (SEQ ID NO: 106)、VSGGAHALI (SEQ ID NO: 107)、VSSAYPI (SEQ ID NO: 108)、FWGVPI (SEQ ID NO: 109)

50

109)、SYHYAALI (SEQ ID NO: 110)、WYYAPI (SEQ ID NO: 111)、SHSYSLI (SEQ ID NO: 112)、SGYGPF (SEQ ID NO: 113)、SWSSPI (SEQ ID NO: 114)、HYSVYASLI (SEQ ID NO: 115)、PHPPSLI (SEQ ID NO: 116)、VAYSHVGLI (SEQ ID NO: 117)、GYGAPI (SEQ ID NO: 118)、SWYSLI (SEQ ID NO: 119)、PGYLF (SEQ ID NO: 120)、VWFGLI (SEQ ID NO: 121)、VYYGSPLF (SEQ ID NO: 122)、HAHSPLI (SEQ ID NO: 123)、SSAYYPF (SEQ ID NO: 124)、GHASPI (SEQ ID NO: 125)、SSGGWSLI (SEQ ID NO: 126)、VAWSSFLI (SEQ ID NO: 127)、SVAAASLI (SEQ ID NO: 128)、SGWWGVSLI (SEQ ID NO: 129)、SYAAYLF (SEQ ID NO: 130)、HGSLF (SEQ ID NO: 131)、YAGVSNLF (SEQ ID NO: 132)、GWPYSALF (SEQ ID NO: 133)、SGYPSLF (SEQ ID NO: 134)、SYHSGSGLI (SEQ ID NO: 135)、HGYSASLI (SEQ ID NO: 136)、APGWALF (SEQ ID NO: 137)、GHSSPI (SEQ ID NO: 138)、GWPSLF (SEQ ID NO: 139)、VPGYPVPI (SEQ ID NO: 140)、HYYSHLI (SEQ ID NO: 141)、GPASSLI (SEQ ID NO: 142)、SVGSSYYLI (SEQ ID NO: 143)、YGPWVLI (SEQ ID NO: 144)、AASWGYPF (SEQ ID NO: 145)、HWSYPI (SEQ ID NO: 146)、およびGGWGP (SEQ ID NO: 147)からなる群より選択される。

【 0 0 1 0 】

さらに別の態様では、CDRは、以下の配列を含むか、またはそれらからなり、

CDR-H1は、ISYYM (SEQ ID NO: 1)、IYSYM (SEQ ID NO: 2)、LSYYM (SEQ ID NO: 3)、IYYSI (SEQ ID NO: 4)、LYSYM (SEQ ID NO: 5)、LSSYM (SEQ ID NO: 6)、ISYYYI (SEQ ID NO: 7)、LSYSM (SEQ ID NO: 8)、IYYM (SEQ ID NO: 9)、LYYSI (SEQ ID NO: 10)、ISSYI (SEQ ID NO: 11)、FSSSI (SEQ ID NO: 12)、LSYYSI (SEQ ID NO: 13)、LYSYI (SEQ ID NO: 14)、LSSYM (SEQ ID NO: 15)、LSYYYI (SEQ ID NO: 16)、ISSYM (SEQ ID NO: 17)、LSYSM (SEQ ID NO: 18)、LYYSI (SEQ ID NO: 19)、LYYYYI (SEQ ID NO: 20)、IYSYI (SEQ ID NO: 21)、ISYSYI (SEQ ID NO: 22)、およびISYSM (SEQ ID NO: 23)からなる群より選択され、

CDR-H2は、SIYSYGYTY (SEQ ID NO: 24)、SIYSSSSTY (SEQ ID NO: 25)、SIYPSSSTY (SEQ ID NO: 26)、SIYSSSYTS (SEQ ID NO: 27)、YISSYSGSTY (SEQ ID NO: 28)、SIYSSYGYTY (SEQ ID NO: 29)、YISSYGYTY (SEQ ID NO: 30)、SIYPSSSTY (SEQ ID NO: 31)、SIYSSSGYTY (SEQ ID NO: 32)、YISSYSGSTS (SEQ ID NO: 33)、SISSYGYTY (SEQ ID NO: 34)、SIYSYGYTY (SEQ ID NO: 35)、SIYPYSGTY (SEQ ID NO: 36)、YISPYGYTS (SEQ ID NO: 37)、SISSSGYTY (SEQ ID NO: 38)、SIYSYSSTY (SEQ ID NO: 39)、SISPSSSYTY (SEQ ID NO: 40)、YISPYGYTY (SEQ ID NO: 41)、SISPYSSSTY (SEQ ID NO: 42)、SIYSSYGSTY (SEQ ID NO: 43)、SIYSSSSYTY (SEQ ID NO: 44)、SIYPSSGYTY (SEQ ID NO: 45)、SIYPYSGSTY (SEQ ID NO: 46)、SIYPSYGSTY (SEQ ID NO: 47)、YISSYSSYTY (SEQ ID NO: 48)、SIYSYSSTY (SEQ ID NO: 49)、YISSYGYTS (SEQ ID NO: 50)、SISPYSSYTY (SEQ ID NO: 51)、YISPYSGYTS (SEQ ID NO: 52)、SIYPYYSYTY (SEQ ID NO: 53)、SISPYGYTS (SEQ ID NO: 54)、SISPSYSSTY (SEQ ID NO: 55)、SISSYSSTY (SEQ ID NO: 56)、SIYPYSGSTS (SEQ ID NO: 57)、SISSYSSSTS (SEQ ID NO: 58)、およびSIYSYGYTY (SEQ ID NO: 59)からなる群より選択され、

CDR-H3は、SSFSWAM (SEQ ID NO: 60)、SSFYWAL (SEQ ID NO: 61)、SWFGWGI (SEQ ID NO: 62)、YWFSYGYASPAF (SEQ ID NO: 63)、HPWYGM (SEQ ID NO: 64)、SAFYWAL (SEQ ID NO: 65)、PAPGHWGF (SEQ ID NO: 66)、SSFFWAM (SEQ ID NO: 67)、SAFYWAM (SEQ ID NO: 68)、HFFAM (SEQ ID NO: 69)、SWWAWAF (SEQ ID NO: 70)、SAFGWAL (SEQ ID NO: 71)、SSFFFAM (SEQ ID NO: 72)、PYYWSGGF (SEQ ID NO: 73)、HPSSSWFSFGAL (SEQ ID NO: 74)、SAFYWAF (SEQ ID NO: 75)、SSYAWAM (SEQ ID NO: 76)、SSFYWAI (SEQ ID NO: 77)、SPWGSWAGF (SEQ ID NO: 78)、PAVWVGL (SEQ ID NO: 79)、SWVFWAL (SEQ ID NO: 80)、SWVYWGM (SEQ ID NO: 81)、SWVYWAL (SEQ ID NO: 82)、SSYAWAI (SEQ ID NO: 83)、SSFYWAM (SEQ ID NO: 84)、HGASFGSGAPAF (SEQ ID NO: 85)、SCFF

WAM (SEQ ID NO: 86)、WAFFGL (SEQ ID NO: 87)、SSFYFAM (SEQ ID NO: 88)、SAFSWAI (SEQ ID NO: 89)、SGFYWAL (SEQ ID NO: 90)、PSVGYAAF (SEQ ID NO: 91)、SWVGWGL (SEQ ID NO: 92)、SSVGYVAM (SEQ ID NO: 93)、SWVYWAF (SEQ ID NO: 94)、YYYSSSVYFWYAAL (SEQ ID NO: 95)、SSFFWAI (SEQ ID NO: 96)、SWVYWAI (SEQ ID NO: 97)、SWVGWGI (SEQ ID NO: 98)、SSVYWAL (SEQ ID NO: 99)、WGGWGS GG YFYAAL (SEQ ID NO: 100)、FWYPM (SEQ ID NO: 101)、およびSSFAWAF (SEQ ID NO: 102)からなる群より選択され、

CDR-L1はSVSSA (SEQ ID NO: 103)であり、

CDR-L2はSASSLYS (SEQ ID NO: 104)であり、

CDR-L3は、HPWSGGYLI (SEQ ID NO: 105)、PVGYWGVPI (SEQ ID NO: 106)、VSGGAHALI (SEQ ID NO: 107)、VSSAYPI (SEQ ID NO: 108)、FWGVPI (SEQ ID NO: 109)、SYHYAALI (SEQ ID NO: 110)、WYYAPI (SEQ ID NO: 111)、SHSYSLI (SEQ ID NO: 112)、SGYGPF (SEQ ID NO: 113)、SWSSPI (SEQ ID NO: 114)、HYSVYASLI (SEQ ID NO: 115)、PHPPSLI (SEQ ID NO: 116)、VAYSHVGLI (SEQ ID NO: 117)、GYGAPI (SEQ ID NO: 118)、SWYSLI (SEQ ID NO: 119)、PGYLF (SEQ ID NO: 120)、VWFGLI (SEQ ID NO: 121)、VYYGSPLF (SEQ ID NO: 122)、HAHSPLI (SEQ ID NO: 123)、SSAYYPF (SEQ ID NO: 124)、GHASPI (SEQ ID NO: 125)、SSGGWSLI (SEQ ID NO: 126)、VAWSSFLI (SEQ ID NO: 127)、SVAAASLI (SEQ ID NO: 128)、SGWWGVSLI (SEQ ID NO: 129)、SYAAYLF (SEQ ID NO: 130)、HGSLF (SEQ ID NO: 131)、YAGVSNLF (SEQ ID NO: 132)、GWPYSALF (SEQ ID NO: 133)、SGYYPPLF (SEQ ID NO: 134)、SYHSGSLI (SEQ ID NO: 135)、HGYSASLI (SEQ ID NO: 136)、APGWALF (SEQ ID NO: 137)、GHSSPI (SEQ ID NO: 138)、GWPSLF (SEQ ID NO: 139)、VPGYPVPI (SEQ ID NO: 140)、HYYSHLI (SEQ ID NO: 141)、GPASSLI (SEQ ID NO: 142)、SVGSSYYLI (SEQ ID NO: 143)、YYGPWVLI (SEQ ID NO: 144)、AASWGYPF (SEQ ID NO: 145)、HWSYPI (SEQ ID NO: 146)、およびGGWGPF (SEQ ID NO: 147)からなる群より選択される。

【0011】

さらなる態様では、本開示は、

(i) 表2に記載の重鎖アミノ酸配列、

(ii) 表2に記載の重鎖アミノ酸配列に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、もしくは少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、アミノ酸配列、または

(iii) (i) の保存的に置換されたアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、保存的に置換されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、前述の抗体を提供する。

【0012】

さらなる態様では、本開示は、

(i) 表2に記載の軽鎖アミノ酸配列、

(ii) 表2に記載の軽鎖アミノ酸配列に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、もしくは少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、アミノ酸配列、または

(iii) (i) の保存的に置換されたアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、保存的に置換されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をさらに含む、抗体を提供する。

【0013】

さらなる態様では、本開示は、FZD4に特異的に結合する抗体を提供する。さらなる態様では、FZD4に特異的に結合する抗体CDR配列は、抗体5017、5027、5030、6499、5038、5040~5044、5046、5047、5049~5053、5055、5058~5064、5066、

5068～5072、5077～5080、または5081から選択される抗体のCDR配列セットである。

【0014】

さらなる態様では、本開示は、FZD4と、FZD1、2、5、7、8、および9から選択される少なくとも1つの他の受容体とに特異的に結合する抗体を提供する。なおさらなる態様では、CDR配列は、抗体5014、5016、5018～5023、5025、5028、5029、5031、5034、5035、5036、5037、6494、6495、6496、6497、6498、6500、5039、5045、5048、5054、5056、5057、5067、および5073～5076から選択される抗体のCDR配列セットである。なおさらなる態様では、抗体は、別のFZD受容体と比較して、Frizzled 4 (FZD4) に優先的に結合する。なおさらなる態様では、CDR配列は、抗体5028、5029、5031、5034、5035、6497、6498、5039、5045、5048、5054、5056、5057、5067、5073、5074、5075から選択される抗体のCDR配列セットである。なおさらなる態様では、抗体は、約0.2nM～約15.3nMの、表面プラズモン共鳴によって測定される結合親和性を有する。

【0015】

なおさらなる態様では、CDR配列は、抗体5017、5027、5030、6499、5038、5040～5044、5046、5047、5049～5053、5055、5058～5064、5066、5068～5072、5077～5080、または5081から選択される抗体のCDR配列セットである。

【0016】

なおさらなる態様では、抗体は、モノクローナル、ヒト化、一本鎖、抗体断片、多価、二重特異性であるか、非天然グリコシル化パターンを含むか、システインの置換もしくは付加を含むか、またはFZDへのWntの結合を遮断する。なおさらなる態様では、抗体断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディ、およびそれらの多量体から選択される断片からなる群より選択される。なおさらなる態様では、多価抗体は、二価、三価、または四価である。なおさらなる態様では、システインの置換は、定常領域またはフレームワーク領域に存在する。なおさらなる態様では、二重特異性抗体は、LRP 5および/または6にさらに結合する。なおさらなる態様では、抗体は、非天然グリコシル化パターンを含む。なおさらなる態様では、システインの置換は、定常領域またはフレームワーク領域にある。なおさらなる態様では、本明細書において記載される抗体は、FZDへのWntの結合を遮断する。

【0017】

別の局面では、本開示は、本明細書において記載される抗体と、検出可能な標識または細胞傷害剤とを含むイムノコンジュゲートを提供する。一態様では、細胞傷害剤は、メイタンシノイド、アウリスタチン、ドラスタチン、チューブリシン (tubulysin)、クリプトフィシン、ピロロベンゾジアゼピン (PBD) 二量体、インドリノベンゾジアゼピン二量体、-アマニチン、トリコテン (trichothene)、SN-38、デュオカルマイシン、CC1065、カリケアマイシン (calicheamincin)、エンジン抗生物質、タキサン、ドキソルピシン誘導体、アントラサイクリン、およびそれらの立体異性体、アザノフィド (azanofide)、アイソスター、類似体、または誘導体から選択される。

【0018】

別の局面では、本開示は、本明細書において記載される抗体をコードする核酸を提供する。一態様では、核酸によってコードされるCDR配列のうちの1つまたは複数は、表1b、表1c、表3b、および表3cに記載される。

【0019】

別の態様では、核酸によってコードされる抗体は、

(i) 表2に記載の重鎖核酸配列、

(ii) 表2に記載の軽鎖核酸配列に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、もしくは少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、核酸配列、または

(iii) (i) のコドン縮退核酸配列 (codon-degenerate nucleic acid sequence) で

10

20

30

40

50

あって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、コドン縮退核酸配列

を含む核酸によってコードされる、軽鎖可変領域を含む。

【0020】

別の態様では、核酸によってコードされる抗体は、

(i) 表2に記載の軽鎖核酸配列、

(ii) 表2に記載の軽鎖核酸配列に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、もしくは少なくとも90%の配列同一性を有する核酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、核酸配列、または

(iii) (i) のコドン縮退核酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、コドン縮退核酸配列

を含む核酸によってコードされる、軽鎖可変領域を含む。

【0021】

さらに別の局面では、本開示は、本明細書において記載される抗体をコードする核酸に機能的に連結された発現制御配列を含むベクターを提供する。

【0022】

なおさらなる局面では、本開示は、本明細書において記載される抗体をコードする核酸に機能的に連結された発現制御配列を含む組換え核酸分子を含む宿主細胞を提供する。一態様では、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。

【0023】

なおさらなる局面では、本開示は、本明細書において記載される宿主細胞を培養する工程を含む、抗FZD抗体を作製するための方法を提供する。

【0024】

なおさらなる局面では、本開示は、任意で好適な希釈剤とともに、本明細書において記載される1つまたは複数の抗体、イムノコンジュゲート、核酸、ベクター、または宿主細胞を含む組成物を提供する。一態様では、組成物は、1つまたは複数の抗体またはイムノコンジュゲートを含み、任意で、組成物は薬学的組成物である。

【0025】

なおさらなる局面では、本開示は、本明細書において記載される1つまたは複数の抗体、イムノコンジュゲート、核酸、ベクター、または宿主細胞を含むキットを提供する。

【0026】

なおさらなる局面では、本開示は、抗体：細胞複合体の形成を許容する条件下で、1つまたは複数の細胞を含む試料と、本明細書において記載される1つまたは複数の抗体またはイムノコンジュゲートとを接触させる工程、および任意の抗体複合体の存在を検出する工程を含む、FZD発現を検出する方法を提供する。一態様では、検出方法は、免疫蛍光によるものである。別の態様では、検出方法は、フローサイトメトリーによるものである。さらに別の態様では、方法は、FZD4発現を検出するためのものであり、抗体またはイムノコンジュゲートは、5017、5027、5030、6499、5038、5040~5044、5046、5047、5049~5053、5055、5058~5064、5066、5068~5072、および5077~5081から選択される抗体に対応するCDR配列セットを含む。

【0027】

なおさらなる局面では、本開示は、FZD受容体へのWntリガンド結合を阻害するか、Wntシグナル伝達経路を妨害するか、Wnt誘導性転写活性を阻害するか、disheveledの活性化を阻害するか、 β -カテニン分解複合体の β -カテニン分解複合体の保存を促進するか、 β -カテニンの蓄積を促進するか、または細胞の増殖を阻害する方法を提供し、本方法は、FZD受容体を発現する細胞と、本明細書において記載される抗体またはイムノコンジュゲートとを接触させる工程を含む方法。別の局面では、本開示は、FZD受容体へのWntリガンド結合を阻害するか、Wntシグナル伝達経路を妨害するか、Wnt誘導性転写活性を阻害するか、disheveledの活性化を阻害するか、 β -カテニン分解複合体の β -カテニン分解複合体の保存を促進するか、 β -カテニンの蓄積を促進するか、または細胞の増殖を阻害す

10

20

30

40

50

るのに使用するための、本明細書において記載される抗体またはイムノコンジュゲートを提供する。さらなる局面では、本開示は、FZD受容体へのWntリガンド結合を阻害するか、Wntシグナル伝達経路を妨害するか、Wnt誘導性転写活性を阻害するか、disheveledの活性化を阻害するか、 β -カテニン分解複合体の β -カテニン分解複合体の保存を促進するか、 β -カテニンの蓄積を促進するか、または細胞の増殖を阻害するための、本明細書において記載される抗体またはイムノコンジュゲートの使用を提供する。なおさらなる局面では、本開示は、FZD受容体へのWntリガンド結合を阻害するか、Wntシグナル伝達経路を妨害するか、Wnt誘導性転写活性を阻害するか、disheveledの活性化を阻害するか、 β -カテニン分解複合体の β -カテニン分解複合体の保存を促進するか、 β -カテニンの蓄積を促進するか、または細胞の増殖を阻害するための医薬品の製造における、本明細書において記載される抗体またはイムノコンジュゲートの使用を提供する。一態様では、WntリガンドはWnt3aである。別の態様では、抗体またはイムノコンジュゲートは、(a) 5017、5027、5030、6499、5038、5040~5044、5046、5047、5049~5053、5055、5058~5064、5066、5068~5072、および5077~5081または(b) 5014、5016、5018~5023、5025、5028、5029、5031、5034、5035、5036、5037、6494、6495、6496、6497、6498、6500、5039、5045、5048、5054、5056、5057、5067、および5073~5076から選択される抗体に対応するCDR配列セットを含む。

【0028】

なおさらなる局面では、本開示は、本明細書において記載される抗体またはイムノコンジュゲートを含む薬学的組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、その必要がある対象の癌を治療する方法を提供する。別の局面では、本開示は、癌を治療するための、本明細書において記載される抗体またはイムノコンジュゲートの使用を提供する。さらに別の局面では、本開示は、癌の治療に使用するための、本明細書において記載される抗体またはイムノコンジュゲートを提供する。さらに別の局面では、本開示は、癌を治療するための医薬品の製造における、本明細書において記載される抗体またはイムノコンジュゲートの使用を提供する。一態様では、癌は、急性骨髄性白血病、神経芽細胞腫、肝癌、肺癌、子宮内膜癌、唾液腺様嚢胞癌(salivary adenoid cystic carcinoma cancer)、結腸直腸癌、前立腺癌、神経膠芽腫、膀胱癌、子宮頸癌、脾癌、結腸癌、乳癌、食道癌、神経膠腫、胃癌、星状細胞腫、および骨肉腫から選択される。別の態様では、方法または使用は、少なくとも1つのアッセイにおいてFZD 1、2、4、5、7、8、および9に特異的に結合し、少なくとも1つのアッセイにおいてWnt3a誘導性シグナル伝達を阻害する抗体またはイムノコンジュゲートを含み、任意で、抗体またはイムノコンジュゲートは、本明細書において記載される抗体またはイムノコンジュゲートである。さらに別の態様では、本方法または使用の抗体またはイムノコンジュゲートは、(a) 5017、5027、5030、6499、5038、5040~5044、5046、5047、5049~5053、5055、5058~5064、5066、5068~5072、および5077~5081または(b) 5014、5016、5018~5023、5025、5028、5029、5031、5034、5035、5036、5037、6494、6495、6496、6497、6498、6500、5039、5045、5048、5054、5056、5057、5067、および5073~5076から選択される抗体に対応するCDR配列セットを含む。なおさらなる態様では、抗体またはイムノコンジュゲートは、5019および5020から選択される抗体に対応するCDR配列セットを含む。なおさらなる態様では、本方法または使用によって治療される癌は、RNF43遺伝子に変異を含む1つまたは複数の癌細胞を含み、抗体および抗体またはイムノコンジュゲートは、抗体5020に対応するCDR配列セットを含む。

【0029】

本開示の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。ただし、詳細な説明および特定の例は、態様を示しているが、単なる例示として与えられており、特許請求の範囲は、例に記載された態様によって限定されるべきではなく、特許請求の範囲には、全体として説明と一致する最も広い解釈が与えられるべきであることを理解されたい。

【0030】

10

20

30

40

50

次に、本開示の一態様を図面に関連して説明する。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、FZD4-CRD-FcおよびFcへのファージクローンの結合を示すグラフである。単一コロニーを使用して96ウェル培養プレートに接種し、一晚ファージ上清を0.05% Tween20/0.5% BSA/PBS（希釈緩衝液）で1:2に希釈して、ELISAで結合について試験した。抗M13-HRP二次抗体（希釈緩衝液中1:5000）を用いてファージを検出し、TMB基質および酸停止剤を用いてプレートを発色させた。示されるように、FZD4-Fcコーティングウェルおよび対照Fcコーティングウェルについて、450nmでの吸光度を読み取った。

【図2】図2は、抗FZD4 Fabの競合ELISA結合を示すグラフである。FZD4 Fabパネルの親和性を推定するためにELISAを行った。384ウェルELISAプレートを、PBS中2 μg/mlのFZD4 CRD-Fc（R&D systems）によって4 °Cで一晚コーティングした。プレートを0.5% BSA/PBSを用いて室温で1時間ブロッキングし、次いで、0.05% Tween20/PBSを用いて3回洗浄した。0.5 μg/mlの最終濃度のFabを、示された濃度のFZD4 CRD-Fcの溶液（0.05% Tween20/0.5% BSA/PBS中）溶液を含む非結合96ウェルELISAプレート内で、室温で1時間プレインキュベートした。このFab抗原混合物を384ウェルプレートに移し、室温で20分間インキュベートした。プレートを6回洗浄し、0.05% Tween20/0.5% BSA/PBS中1:5000で、抗FLAG-HRP二次抗体（Sigma）を用いて結合Fabを検出した。二次抗体を室温で45分間インキュベートし、プレートを洗浄し、次いで、酸停止剤を含むTMB基質を用いて発色させた。450nmでの吸光度を読み取った。競合する可溶性FZD4 CRD-Fcを有するFabウェルの吸光度を、競合する可溶性FZD4 CRD-Fcが存在しないFabウェルの吸光度で割り、これを100倍して、結合率（%）を計算した。

【図3-1】図3は、CHO細胞上に発現されたFZDへの抗FZD4 Fabの結合を示す一連の免疫蛍光染色写真である。mycタグを有するGPI連結ドメインとしてFZD4 CRD領域を安定に発現するCHO過剰発現株の免疫蛍光染色（IF）によって、反応性についてFZD4選択からのFabを試験した。抗F(ab')₂-FITC二次抗体（Jackson Immuno）を用いてFabを検出した。FITC染色を白色領域によって示す。

【図3-2】図3-1の説明を参照。

【図4-1】図4は、CHO細胞への抗FZD4 Fabの結合を示す一連の免疫蛍光染色写真である。GPIリンカーおよびmycタグを用いて安定にトランスフェクトした対照CHO細胞株の免疫蛍光染色（IF）によって、反応性についてFZD4選択からのFabを試験した。抗F(ab')₂-FITC二次抗体（Jackson Immuno）を用いてFabを検出した。FITC染色を白色領域によって示す。

【図4-2】図4-1の説明を参照。

【図5】図5は、IF染色によって決定されたFZDへのFabの結合を示す表である。

【図6】図6は、複数のヒト膵癌細胞株におけるFZDに結合するFab5019およびFab5020の結合を示す一連の免疫蛍光染色写真である。

【図7-1】図7は、フローサイトメトリーによる、膵臓細胞株へのFab5019およびFab5020の結合を示す一連のグラフである。数字は、二次Ab対照と比較したMFIの倍数増加を示す。

【図7-2】図7-1の説明を参照。

【図8A】図8A~Dは、FZDへの抗FZD4 Fabの結合を示す一連のグラフである。

【図8B】図8A~Dは、FZDへの抗FZD4 Fabの結合を示す一連のグラフである。

【図8C】図8A~Dは、FZDへの抗FZD4 Fabの結合を示す一連のグラフである。

【図8D】図8A~Dは、FZDへの抗FZD4 Fabの結合を示す一連のグラフである。

【図9A】図9A~Bは、IFによって決定されたFZDへの抗FZD4 Fabの結合を示す表である。CHO myc GPI細胞株。200nM Fab。- = 結合なし; + = 非常に弱いバインダー; ++ = 弱いバインダー; +++ = 良好なバインダー; ++++ = 非常に良好なバインダー。

【図9B】図9Aの説明を参照

【図10】図10は、SPRによって決定されたFZD4への抗FZD4 Fabの結合親和性を示す

10

20

30

40

50

表である。

【図 1 1】図11は、フローサイトメトリーによって測定された膀胱癌細胞への抗FZD4 Fabの結合を示すグラフである。

【図 1 2】図12A～Bは、抗FZD4 FabによるWNT5A結合の阻害を示す一連のグラフである。(A)市販のキット(Thermo 21329 EZ-link NHS-PEG4-Biotin)を使用してWnt5a(R&D systems)をビオチン化し、3000MWCO Amiconフィルターを使用した緩衝液交換によって過剰のビオチンを除去した。FZD4-CRD-Fcまたは対照Fcタンパク質(R&D systems)を、示された濃度まで1%BSA/0.05%Tween20/PBS(希釈緩衝液)で希釈し、BSAブロック96ウェルTC処理プレート内で、一定量のビオチン化Wnt5aとともに室温で1時間インキュベートした。ビオチン化wnt5aの代わりに緩衝液のみを加えた対照ウェルも含めた。ビオチン化Wnt5aを150ng/ulの最終濃度で加えた。予めブロックしたストレプトアビジンコーティングプレート(R&D systems)に試料を移し、室温で1時間捕捉させた。ウェルを0.05%Tween20/PBSを用いて4回洗浄し、次いで、抗Fc-HRP(希釈緩衝液中1:5000、Jackson Immuno)を、室温で45分間かけてウェルに加えた。ウェルを4回洗浄し、酸停止剤を含むTMB試薬を用いて発色させた。450nmでの吸光度を読み取った。(B)FZD4-CRD-Fcを(A)で予め決定した濃度に希釈して、線形範囲内のELISAシグナルを得、1%BSAを用いて予めブロックした96ウェルTCプレート内で、所望のFabまたは緩衝液対照と室温で1時間インキュベートした。上記のように、Fcタンパク質を含む対照ウェルも含めた。ビオチン化wnt5aをウェルに加え、プレートをさらに1時間インキュベートした。ビオチン化wnt5aの代わりに緩衝液のみを加えた対照ウェルも含めた。ビオチン化Wnt5aを150ng/ulの最終濃度で加えた。Fabタンパク質は、180nMのFab 6494、135nMのFab 6406、および159nMのFab 6500を除いて、400nMの最終濃度であった。異なるタンパク質抗原に特異的な陰性対照Fab、およびFabタンパク質を保存した中和溶出緩衝液からの効果に関する対照(Fab緩衝液対照)を含めた。結合率を計算した。

10

20

【図 1 3】図13は、 β -カテニン促進転写に対するFabの効果を示す表である(TOPFLASHアッセイ)。

【図 1 4 A】図14A～Hは、癌細胞の増殖に対する抗FZD4 Fabの効果を示す一連のグラフである。

【図 1 4 B】図14A～Hは、癌細胞の増殖に対する抗FZD4 Fabの効果を示す一連のグラフである。

30

【図 1 4 C】図14A～Hは、癌細胞の増殖に対する抗FZD4 Fabの効果を示す一連のグラフである。

【図 1 4 D】図14A～Hは、癌細胞の増殖に対する抗FZD4 Fabの効果を示す一連のグラフである。

【図 1 4 E】図14A～Hは、癌細胞の増殖に対する抗FZD4 Fabの効果を示す一連のグラフである。

【図 1 4 F】図14A～Hは、癌細胞の増殖に対する抗FZD4 Fabの効果を示す一連のグラフである。

【図 1 4 G】図14A～Hは、癌細胞の増殖に対する抗FZD4 Fabの効果を示す一連のグラフである。

40

【図 1 4 H】図14A～Hは、癌細胞の増殖に対する抗FZD4 Fabの効果を示す一連のグラフである。

【図 1 5】図15は、SRBスルホローダミンB)アッセイによって決定された、膀胱癌細胞の増殖に対する抗FZD4 Fabの効果を示す表であり、ここで、「na」は試験されていないことを意味する。

【図 1 6】図16は、抗FZD4 Fabの要約表であり、ここで、naは試験されていないことを意味する。抗増殖活性は、FZD 1、2、4、5、7、8、9への結合、およびwnt3a活性の阻害に関連するように見える。このアッセイに示される最も強力な阻害剤は、5014、5019～5023、および6495である。

50

【図17】図17は、抗FZD4抗体が、ヒト膵臓腺癌細胞株（HPAF II）におけるWnt経路調節遺伝子であるAxin2の発現を阻害することを示すグラフである。200nM Fab/IgGを用いて処理した際の遺伝子発現（RT-qPCR）をアクチンに対して正規化した。

【図18A】図18A～Bは、IgG 5019およびIgG 5020の増殖阻害を示す一連のグラフである。（A）は、IgG 5019およびIgG 5020が、アラマープルー増殖アッセイ、200nM Fab/IgGを使用して膵癌細胞の増殖を阻害することを示し、（B）は、IgG 5020が用量依存的に細胞増殖を阻害することを示す。

【図18B-1】図18Aの説明を参照。

【図18B-2】図18Aの説明を参照。

【図19】図19は、IgG 5020がコロニー形成を阻害することを示す一連のコロニー写真である。

10

【図20】図20は、PDAC患者由来異種移植片（PDX）細胞株（GP2AおよびGP14A）におけるFZDへのFab 5019およびFab 5020の結合を示す一連の免疫蛍光染色写真である。

【図21】図21は、アラマープルー増殖アッセイ、200nM Fab/IgGにおけるPDAC PDX細胞株の増殖に対するFab 5019、Fab 5020およびIgG 5020の効果を示すグラフである。

【図22】図22は、Wnt古典的シグナル伝達経路の図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

開示の詳細な説明

1. 定義

20

別途定義されない限り、本開示に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈上別段の要求がない限り、単数形用語は複数形を含み、複数形用語は単数形を含むものとする。例えば、用語「細胞」は、単一の細胞、および複数の細胞、または細胞の集団を含む。一般に、本明細書において記載される細胞および組織の培養、分子生物学、ならびにタンパク質およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの化学およびハイブリダイゼーションに関連して利用される命名法、ならびにそれらの技術は、当技術分野において周知であり、一般的に使用されるものである（例えば、Green and Sambrook, 2012を参照）。

【0033】

本明細書において使用される場合、用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合を介して連結された天然および/または非天然アミノ酸の配列を有する分子を指す。用語「ペプチド」は、典型的には30アミノ酸長以下の短いポリペプチドを指す。ポリペプチドのアミノ酸配列は、その「一次構造」と呼ばれる。用語「タンパク質」は、二次、三次、および/または四次構造、例えば、水素結合によって安定化された構造、二次構造と複数のタンパク質から形成された構造との間の関係を有するポリペプチドを指す。タンパク質は、例えば、炭水化物（糖タンパク質）、脂質（リポタンパク質）リン酸基（リンタンパク質）などの他の結合部分によってさらに修飾され得る。

30

【0034】

本明細書において使用される場合、アミノ酸配列は、その配列内のアミノ酸のみ「からなる」。

40

【0035】

本明細書において使用される場合、第1のアミノ酸配列が、（1）第2のアミノ酸配列を含み、かつ（2）第2のアミノ酸配列よりも1以下、2以下、または3以下長いアミノ酸である場合、第1のアミノ酸配列は、第2のアミノ酸配列「から本質的になる」。

【0036】

本明細書において使用される場合、第2のアミノ酸配列が第1のアミノ酸配列を含む場合、第1のアミノ酸配列は、第2のアミノ酸配列の「断片」である。特定の態様では、第2のアミノ酸配列の断片である第1のアミノ酸配列は、第2のアミノ酸配列よりも1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下、または10個以下少ないアミノ酸を有し得る。

50

【 0 0 3 7 】

本明細書において使用される場合、参照アミノ酸配列の「機能的等価物」は、参照配列と同一ではないが、例えば、1個または数個のアミノ酸の挿入、欠失、または置換などのわずかな変化を含む配列である。機能的に等価な配列は、それが等価である参照配列の機能（例えば免疫原性）を保持する。機能的に等価なアミノ酸配列が参照配列に対する1つまたは複数のアミノ酸の置換を含む場合、これらは一般に保存的アミノ酸置換である。

【 0 0 3 8 】

本明細書において使用される場合、「保存的アミノ酸置換」は、タンパク質の所望の特性を失わずに1つのアミノ酸残基が別のアミノ酸残基によって置換されているものである。好適な保存的アミノ酸置換は、類似の疎水性、極性、およびR鎖長を有するアミノ酸を互いに置換することによって行うことができる。例えば、Watson, et al., "Molecular Biology of the Gene," 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., Menlo Park, CA, p. 224を参照されたい。保存的アミノ酸置換の例には、以下が挙げられる（一部のカテゴリーは相互に排他的でないことに留意されたい）。

【 0 0 3 9 】

保存的置換	
アミノ酸のタイプ	置換可能なアミノ酸
親水性	Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr
スルフィドリル	Cys
脂肪族 (非極性、疎水性)	Ala, Val, Ile, Leu, Met, Gly, Pro
塩基性	Lys, Arg, His
芳香族	Phe, Tyr, Trp

【 0 0 4 0 】

本明細書において使用される場合、用語「実質的に同一」は、第1および第2のアミノ酸配列が共通の構造ドメインおよび/または共通の機能的活性および/または共通の免疫原性を有するように、(i) 第2のアミノ酸配列内のアライメントされたアミノ酸残基と同一であるか、または(ii) 第2のアミノ酸配列内のアライメントされたアミノ酸残基の保存的置換である、十分な数または最小数のアミノ酸残基を含む、第1のアミノ酸配列間の同一性を指す。例えば、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の同一性を有する共通の構造ドメインまたは抗原性ドメインを含むアミノ酸配列は、十分にまたは実質的に同一であると称される。ヌクレオチド配列の文脈では、第1および第2のヌクレオチド配列が共通の機能的活性を有するポリペプチドをコードするか、または共通の構造ポリペプチドドメインまたは共通の機能的ポリペプチド活性をコードするか、または同じ免疫原性特性を有するポリペプチドをコードするように、第2の核酸配列内のアライメントされたヌクレオチドと同一である十分な数または最小数のヌクレオチドを含む第1の核酸配列を指すために、用語「実質的に同一」が本明細書において使用される。

【 0 0 4 1 】

本明細書において使用される場合、用語「抗原」、「免疫原」、および「抗体標的」は、抗体によって認識される、すなわち、抗体によって結合され得る分子、化合物、または複合体を指す。該用語は、抗体によって認識され得る任意の分子、例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、脂質、化学的部分、またはそれらの組合せ（例えば、リン酸化ポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドなど）を指すことができる。当業者であれば、該用語が、分子があらゆる状況において免疫原性であることを示すのではなく、抗体によって標的とされ得ることを単に示すことを理解するであろう。

【0042】

本明細書において使用される場合、用語「エピトープ」は、抗体によって認識および結合される、抗原上の局在部位を指す。エピトープは、数個のアミノ酸、または数個のアミノ酸の一部、例えば、5もしくは6個、またはそれ以上、例えば、20個以上のアミノ酸、またはそれらのアミノ酸の一部を含み得る。場合によっては、エピトープは、例えば、炭水化物、核酸、または脂質由来の非タンパク質成分を含む。場合によっては、エピトープは三次元部分である。したがって、例えば、標的がタンパク質である場合、エピトープは、連続したアミノ酸、またはタンパク質のフォールディングによって近接される、タンパク質の異なる部分からのアミノ酸から構成され得る（例えば、不連続エピトープ）。

【0043】

本明細書において使用される場合、用語「抗体」は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、またはそれらの組合せなどの1つまたは複数の標的抗原を認識し、それに特異的に結合する免疫グロブリンを指す。この結合は、抗原上の1つまたは複数のエピトープでは、免疫グロブリンの可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を介して起こる。可変領域は、結合特異性および親和性に最も重要である。本明細書において使用される場合、用語「抗体」は、抗体が所望の生物学的活性を示す限り、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、抗体断片、一本鎖Fv (scFv) 変異体、多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ハイブリッド抗体、融合タンパク質、および抗原認識部位を含む任意の他の免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、(i) それらの重鎖定常ドメイン- (IgA)、 (IgD)、 (IgE)、 (IgG)、 および μ (IgM) の同一性に基づく免疫グロブリンの5つの主要なクラスの内いずれか、または (ii) そのサブクラス (アイソタイプ) (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2) のものであり得る。軽鎖は、または のいずれかであり得る。抗体は、裸であってもよく、または他の分子、例えば、毒素、薬物、放射性同位体、化学療法剤などにコンジュゲートされていてもよい。

【0044】

一態様では、「インタクトな抗体」は、ポリペプチド鎖の2つの同一の対から構成される四量体を含み、各対は、1つの「軽」鎖 (約25kD) および1つの「重」鎖 (約50~70kD) を有する。重鎖および軽鎖は、様々な免疫グロブリンクラス間で数および量が異なる共有結合および非共有結合 (例えば、ジスルフィド結合) を介して連結される。一態様では、各鎖は、可変領域および定常領域を含む。可変領域の抗原認識部位は、超可変領域または相補性決定領域 (CDR) およびフレームワーク領域から構成される。フレームワーク領域は、典型的には抗原と接触しないが、CDRの構造的な支持を提供する。定常領域は、身体の他の免疫細胞と相互作用する。定常領域と可変領域 (IgMまたはIgEではなく、IgG、IgD、IgAのみ) との間には、2つの重鎖の間の中央に、抗原結合を連結するための柔軟性を提供するヒンジ領域がある。

【0045】

以下は、いずれも抗原結合活性を保持する異なる抗体形態の非網羅的な一覧である：

(1) 全免疫グロブリン (「インタクトな」抗体とも呼ばれる) (2つの軽鎖および2つの重鎖、例えば四量体)。

(2) 免疫グロブリンポリペプチド (軽鎖または重鎖)。

(3) 抗体断片、例えば、Fv (一価または二価の可変領域断片) は、可変領域 (例えば、 V_L および/または V_H)、Fab ($V_L C_L V_H C_H$)、F(ab')₂、Fv ($V_L V_H$)、scFv (一本鎖Fv) (リンカー、例えばペプチドリナーによって連結された V_L および V_H を含むポリペプチド)、(scFv)₂、sc(Fv)₂、二重特異性sc(Fv)₂、二重特異性(scFv)₂、ミニボディ (CH3ドメインに融合したsc(Fv)₂) のみを包含することができ、トリアボディは、三価sc(Fv)₃ または三重特異性sc(Fv)₃ である。

(4) 多価抗体 (2つの異なるエピトープまたはタンパク質に結合する結合領域を含む抗体、例えば「スコーピオン」抗体)。

(5) 別のアミノ酸配列 (蛍光タンパク質など) に融合した免疫グロブリンの結合部分

10

20

30

40

50

を含む、融合タンパク質。

【0046】

本明細書において使用される場合、用語「抗体断片」は、インタクトまたは完全な抗体または抗体鎖よりも少ないアミノ酸残基を含み、抗原に結合するか、インタクトな抗体と競合する、抗体または抗体鎖の一部または部分を指す。断片は、インタクトまたは完全な抗体または抗体鎖の化学的または酵素的な処理によって得ることができる。断片は、組換え手段によって得ることもできる。例えば、F(ab')₂断片は、ペプシンを用いて抗体を処理することによって生成することができる。得られたF(ab')₂断片を処理してジスルフィド架橋を還元して、Fab'断片を生成することができる。パパイン消化は、Fab断片の形成をもたらすことができる。Fab、Fab'およびF(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体断片、ならびに他の断片も、組換え発現技術によって構築することができる。

【0047】

様々な抗体断片が、インタクトな抗体の消化の産物に関して定義されているが、当業者であれば、同様にそのような断片を、デノボ化学的に合成してもよく、または組換えDNA方法を使用して構築し発現させてもよいことを理解するであろう。

【0048】

一本鎖Fv(scFv)とは、リンカー、例えばペプチドリリンカーによって連結されたV_LおよびV_Hを含むポリペプチドを指す。scFvはまた、タンデム(または二価)scFvまたはダイアボディを形成するために使用され得る。タンデムscFvおよびダイアボディの生成および特性は、例えば、Asano et al. (2011) J Biol. Chem. 286: 1812; Kenanova et al. (2010) Prot Eng Design Sel 23: 789; Asano et al. (2008) Prot Eng Design Sel 21: 597に記載されている。

【0049】

抗体断片は、Fd抗体(Fab断片に含まれる重鎖の部分)および単ドメイン抗体をさらに含む。単ドメイン抗体(sdAb)は、組換え法によって生成される重鎖または軽鎖のいずれかの可変ドメインである。

【0050】

本明細書において使用される語句「CDR配列セット」は、本明細書において記載される特定の抗体の3つの重鎖CDRおよび/または3つの軽鎖CDRを指す。「軽鎖」CDR配列セットとは、軽鎖CDR配列を指す。「重鎖」CDR配列セットとは、重鎖CDR配列を指す。「完全な」CDR配列セットとは、重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列の両方を指す。例えば、抗体5017の場合、表1aに示すように、完全なCDR配列セットは、SVSSA(CDR L1)(SEQ ID NO: 103)、SASSLYS(CDR L2)(SEQ ID NO: 104)、AAYHWPPFLF(CDR L3)(SEQ ID NO: 148)、LYYTDM(CDR H1)(SEQ ID NO: 149)、SISLFFGYVS(CDR H2)(SEQ ID NO: 150)、およびYLAM(CDR H3)(SEQ ID NO: 151)を含むか、またはそれらからなる。各CDRのCDR配列は、例えば、表1aまたは3aのCDRを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなることができる。CDRは、IMGT配列アライメントに基づいて予測される。

【0051】

本明細書において使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、抗原上の所与のエピトープに対して単一の結合特異性および親和性を有する抗体のクローン調製物または組成物(「モノクローナル抗体組成物」)を指す。「ポリクローナル抗体」は、単一の抗原に対して生じるが、結合特異性および親和性が異なる抗体の調製物または組成物(「ポリクローナル抗体組成物」)を指す。

【0052】

本明細書において使用される場合、用語「キメラ抗体」は、2つ以上の種に由来するアミノ酸配列を有する抗体を指す。一態様では、軽鎖および重鎖の両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、および能力を有する、哺乳動物の1つの種(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)に由来する抗体の可変領域に対応するが、定常領域は、免疫応答の誘発を

10

20

30

40

50

回避するために別の種（典型的には、治療を受けている対象、例えばヒトにおいて）に由来する配列と相同である。

【0053】

本明細書において使用される場合、用語「ヒト化抗体」は、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト抗体のVH領域およびVL領域から得られたCDRがヒトフレームワーク配列にグラフトされているキメラ抗体を指す。一態様では、ヒト化抗体のフレームワーク残基を修飾して、抗体の特異性、親和性、および能力を、改良および最適化する。ヒト化、すなわち、ヒト抗体の対応する配列に対する非ヒトCDR配列の置換は、例えば、米国特許第5,545,806号、米国特許第5,569,825号、米国特許第5,633,425号、米国特許第5,661,016号、Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327 (1988); Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996)に記載されている方法に従って行うことができる。

10

【0054】

本明細書において使用される場合、用語「ヒト抗体」は、ヒトによって産生される抗体、または当技術分野において公知の任意の技術によって作製された、それに対応するアミノ酸配列を有する抗体を指す。

【0055】

本明細書において使用される場合、用語「ハイブリッド抗体」は、異なる抗原決定基領域を有する抗体由来の重鎖と軽鎖との対が、得られる四量体によって2つの異なるエピトープまたは2つの異なる抗原が認識および結合され得るように、一緒に組み立てられている抗体を指す。ハイブリッド抗体は、二重特異性（2つの異なる抗原またはエピトープに結合する）または多重特異性（1つを超える異なる抗原またはエピトープ）であり得る。

20

【0056】

本明細書において使用される場合、抗体は、その抗原結合部位の全部が同じエピトープに結合する場合、「単一特異性」である。

【0057】

本明細書において使用される場合、抗体は、異なるエピトープまたは抗原にそれぞれ結合する少なくとも2つの異なる抗原結合部位を有する場合、「二重特異性」である。

【0058】

本明細書において使用される場合、抗体は、複数の抗原結合部位を有する場合、「多価」である。例えば、四価の抗体は、4つの抗原結合部位を有する。

30

【0059】

結合の特異性は、抗体、および環境内の他の材料、または一般に無関係な分子に関する解離定数と比較して、標的に対する抗体（または他のターゲティング部分）の比較解離定数（ K_d ）に関して定義され得る。比較的大きい（比較的高い） K_d は、比較的低い親和性相互作用を表す K_d である。逆に、比較的小さい（比較的低い） K_d は、比較的高い親和性相互作用または比較的緊密な結合を表す K_d である。ほんの一例として、標的に特異的に結合する抗体の K_d は、フェムトモル、ピコモル、ナノモルまたはマイクロモルであり得、無関係な材料に結合する抗体の K_d は、ミリモル以上であり得る。結合親和性は、マイクロモル範囲（ $kD = 10^{-4} \sim 10^{-6}$ ）、ナノモル範囲（ $kD = 10^{-7}M \sim 10^{-9}M$ ）、ピコモル範囲（ $kD = 10^{-10}M \sim 10^{-12}M$ ）、またはフェムトモル範囲（ $kD = 10^{-13}M \sim 10^{-15}M$ ）であり得る。

40

【0060】

本明細書において使用される場合、抗体は、 $10^{-4}M$ 未満（すなわち、マイクロモル範囲）の K_d で抗原またはエピトープに結合する場合、抗原またはエピトープに「結合する」か、それを「認識する」。細胞型に関して「結合する」という用語（例えば、癌細胞に結合する抗体）は、典型的には、作用物質が、それらの細胞の純粋な集団内の細胞の大部分に結合することを示す。例えば、所与の細胞型に結合する抗体は、典型的には、示された細胞の集団内の細胞の少なくとも2/3（例えば、67、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%）に結合する。場合によっては、ポリペプチド

50

への結合は、ポリペプチドを提示する細胞への抗体の結合と、ポリペプチドを発現しない細胞への抗体の結合（またはその欠如）とを比較することによって、アッセイすることができる。当業者であれば、結合を決定する方法および/または閾値に応じて、いくらかの変動が生じることを認識するであろう。標的に対する抗体の親和性は、例えば、Ernst et al. Determination of Equilibrium Dissociation Constants, Therapeutic Monoclonal Antibodies (Wiley & Sons ed. 2009) に概説されているように、当技術分野において公知の方法に従って決定することができる。

【0061】

本明細書において使用される場合、本明細書において使用される用語「比較的大きい親和性」は、抗体Xが標的Zよりも強く標的Yに結合し（ K_{on} ）および/または解離定数（ K_{off} ）が小さい場合の抗体結合の相対的な程度を指し、この文脈では、抗体Xは、標的Yに対してZよりも大きい親和性を有する。同様に、本明細書における用語「比較的小さい親和性」は、抗体Xが標的Zよりも弱くおよび/または大きい解離定数で標的Yに結合する場合の抗体結合の程度を指し、この文脈では、抗体Xは、標的Yに対してZよりも小さい親和性を有する。抗体とその標的抗原との間の結合の親和性は、 $1/K_D$ に等しい K_A として表すことができ、ここで、 K_D は k_{on}/k_{off} に等しい。 k_{on} および k_{off} の値は、表面プラズモン共鳴技術を使用して、例えば、Molecular Affinity Screening System (MASS-1) (Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Germany) を使用して、測定することができる。アンタゴニストまたは遮断抗体とは、抗体が存在しない場合の類似の生理学的条件下での活性と比較して、標的抗原に関連する生物学的活性を、部分的または完全に、遮断阻害または中和する抗体である。アンタゴニストは、競合的、非競合的、または不可逆的であり得る。競合的アンタゴニストとは、天然のリガンド-受容体相互作用と同じ部位で天然のリガンドまたは受容体に結合するか、正常な結合を妨げる変化を誘導する様式でアロステリックに結合する物質である。非競合的アンタゴニストは、天然のリガンド-受容体相互作用とは異なる部位で結合するが、相互作用に起因するKDまたはシグナルを低下させる。不可逆的阻害剤は、受容体に共有結合修飾を引き起こし、その後のいかなる結合も妨げる。

【0062】

本明細書において使用される場合、用語「アビディティ」は、抗体と標的抗原との間の結合複合体の全体的な安定性を指す。それは、3つの因子、すなわち、(1) 抗原に対する抗体の固有の親和性、(2) 抗体の結合価、および(3) 相互作用する成分の幾何学的配置によって規定される。親和性は、抗体と単一の標的との間の相互作用の強度であるのに対して、アビディティは、複数の親和性の累積強度である。一態様では、本明細書において開示される抗体は二価である。

【0063】

本明細書において使用される場合、抗体は、第2の抗原よりも大きい親和性で第1の抗原に結合する場合、第2の抗原と比較して第1の抗原に「優先的に結合する」。優先的結合は、2倍、5倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、500倍、または1000倍大きい親和性の少なくともいずれかであり得る。したがって、例えば、抗体は、第2のFZDタンパク質に結合するよりも大きい親和性で第1のFZDタンパク質に結合する場合、第2のFZDタンパク質と比較して第1のFZDタンパク質に優先的に結合する。

【0064】

本明細書において使用される場合、抗体は、 $1 \times 10^{-6} M$ 、 $1 \times 10^{-7} M$ 、 $1 \times 10^{-8} M$ 、 $1 \times 10^{-9} M$ 、 $1 \times 10^{-10} M$ 、 $1 \times 10^{-11} M$ 、 $1 \times 10^{-12} M$ の少なくともいずれかの親和性で標的抗原、または抗原の標的群の各メンバーに結合し、例えば、比較されている非標的抗原に対するその親和性の少なくとも2倍の親和性で、標的抗原、または抗原の標的群の各メンバーに結合する場合、標的抗原、または抗原の標的群に「特異的に結合する」か、または「特異的である」。典型的には、特異的結合は、抗体が抗原またはエピトープを検出するための診断薬として、および/または抗原またはエピトープを標的とする際の治療剤として有用であるのに十分な親和性で抗原に結合することを特徴とする。

【0065】

10

20

30

40

50

抗体がタンパク質の標的群（例えば、Frizzledタンパク質ファミリーの一部または全部のメンバー）に特異的に結合する場合、最も弱く結合する標的群のメンバーに対する抗体の結合親和性は、非標的抗原に対する抗体の結合親和性よりも大きい。一態様では、FZD 1、2、4、5、7、8、9から選択されるヒトFrizzled（FZD）受容体のうちの1つまたは複数の各々のシステインリッチドメイン（CRD）に特異的に結合する抗体とは、さらに一般的には、非選択群メンバーまたは他の抗原と比較して、この群の選択されたメンバーに特異的に結合する抗体を意味する。したがって、例えば、FZD1、FZD2、FZD4、FZD5、およびFZD7からなる標的群のシステインリッチドメインに特異的に結合する抗体は、これらのタンパク質に特異的に結合し、FZD3、FZD8、FZD9、およびFZD10には特異的に結合しない。

10

【0066】

本明細書において使用される場合、および抗体は、リガンドと受容体とのあらゆる相互作用を競合的に低減または防止する場合、リガンドと受容体との結合を「遮断」するか、またはそれに「拮抗」する。一態様では、測定される低減レベルは、対照（例えば、未処理）細胞の5%、10%、25%、50%、80%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.9%の少なくともいずれかであり得る。例えば、FZD受容体へのWntリガンドの結合に拮抗するか、またはそれを遮断する抗体は、FZD受容体とのWntタンパク質の相互作用を、競合的に低減または防止する。これにより、Wntシグナル伝達に関連する下流シグナル伝達事象が減衰または遮断される。これには、例えば、disheveledの活性化、 β -カテニン分解複合体の溶解、 β -カテニンのサイトゾルレベルの低下、および/またはTCF/LEF媒介性転写の活性の低下が含まれる。

20

【0067】

抗体標的（例えば、抗原、分析物、免疫複合体）に関して「捕捉する」という用語は、典型的には、抗体が、純粋な集団内の抗体標的の大部分に結合することを示す（適切なモル比を仮定する）。例えば、所与の抗体標的に結合する抗体は、典型的には、溶液中の抗体標的の少なくとも2/3に結合する（例えば、67、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%の少なくともいずれか）。当業者であれば、結合を決定する方法および/または閾値に応じていくらかの変動が生じることを認識するであろう。

【0068】

30

用語「コンジュゲート」は、検出可能な標識などの部分、または薬物、毒素、もしくは化学療法剤もしくは細胞傷害剤などの生物学的に活性な部分と化学的に結合した第1の分子、例えば抗体（「イムノコンジュゲート」）を指す。したがって、本開示は、1つまたは複数の部分とコンジュゲートされた抗体を企図する。さらに、抗体は、「コンジュゲート抗体」または「非コンジュゲート抗体」（すなわち、部分とはコンジュゲートしていない）であり得る。

【0069】

本明細書において使用される場合、用語「抗体-薬物コンジュゲート」、すなわち（「ADC」）は、薬物とコンジュゲートされた抗体を指す。典型的には、コンジュゲーションは、リンカーを介した共有結合を含む。

40

【0070】

本明細書において使用される場合、用語「標識された」分子（例えば、核酸、タンパク質、または抗体）は、分子に結合した検出可能な標識の存在を検出することによって分子の存在が検出され得るように、リンカーもしくは化学結合を介して共有結合的に、またはイオン結合、ファンデルワールス結合、静電結合、もしくは水素結合を介して非共有結合的に、検出可能な標識に結合している分子を指す。

【0071】

本明細書において使用される場合、用語「検出可能な標識」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、または他の物理的な手段によって検出可能な組成物を指す。検出可能な標識の例は本明細書において記載されており、検出可能な標識の例には、

50

限定されることなく、比色標識、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識、および放射性標識が挙げられる。本開示の目的のために、検出可能な標識はまた、それ自体はシグナルを生成しないが（例えば、ビオチン）、シグナルを生成することができる第2の部分に結合する（例えば、標識アビジン）部分であり得る。

【0072】

抗体に関する用語「架橋された」は、固体マトリックスもしくは半固体マトリックス（例えば、セファロース、ビーズ、マイクロタイプレート）、または別のタンパク質もしくは抗体への抗体の付着を指す。例えば、抗体を多量体化して、複数の（2つを超える）抗原結合部位を有する抗体複合体を作製することができる。高結合価アイソタイプ（例えば、典型的にはそれぞれ2つまたは5つの抗体の複合体を形成するIgAまたはIgM）として抗体を発現させることによって、抗体を多量体化することができる。抗体の多量体化はまた、タンパク質を連結することができる反応性基（例えば、カルボジイミド、NHSエステルなど）を含む架橋剤を使用することによって行うことができる。抗体をマトリックスに架橋するための方法および組成物は、例えば、AbcamおよびNew England Biolabのカタログおよびウェブサイト（abcam.comおよびneb.comで入手可能）に記載されている。様々な反応性基を有する架橋剤化合物は、例えば、Thermo Fisher Scientificのカタログおよびウェブサイト（piercenet.comで入手可能）に記載されている。

10

【0073】

本明細書において使用される場合、用語「イムノアッセイ」は、分析物を認識する抗体と分析物との間の結合を検出することによって分析物を検出する方法を指す。

20

【0074】

本明細書において使用される場合、用語「発現構築物」は、発現の対象となる異種ヌクレオチド配列（すなわち、発現制御配列が本来通常連結されていない配列）と機能的に連結された発現制御配列を含むポリヌクレオチドを指す。本明細書において使用される場合、用語「発現ベクター」は、発現構築物と、宿主細胞内での複製または宿主染色体への挿入に十分な配列とを含むポリヌクレオチドを指す。プラスミドおよびウイルスは、発現ベクターの例である。本明細書において使用される場合、用語「発現制御配列」は、それに機能的に連結されたヌクレオチド配列の転写および/または翻訳を調節するヌクレオチド配列を指す。発現制御配列には、プロモーター、エンハンサー、リプレッサー（転写調節配列）、およびリボソーム結合部位（翻訳調節配列）が含まれる。

30

【0075】

本明細書において使用される用語「ベクター」は、核酸分子が、例えば、原核細胞および/または真核細胞に導入され、および/またはゲノムに組み込まれることを可能にする、核酸分子のための任意の中間ビヒクルを含み、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージ、またはウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターのベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどを含む。本明細書において使用される用語「プラスミド」は、一般に、染色体DNAとは独立して複製することができる染色体外遺伝物質、通常は環状DNA二本鎖の構築物を指す。

【0076】

本明細書において使用される場合、発現制御配列が細胞内で機能してヌクレオチド配列の転写を制御する場合、ヌクレオチド配列は発現制御配列と「機能的に連結されている」。これは、ポリメラーゼとプロモーターとの間の相互作用を介してヌクレオチド配列の転写を促進することを含む。

40

【0077】

本明細書において使用される場合、「宿主細胞」は、発現構築物を含む組換え細胞を指す。

【0078】

本明細書において使用される場合、用語「生物学的試料」は、細胞（例えば、腫瘍細胞）、または細胞に由来する生物学的分子を含有する試料を指す。生物学的試料は、対象、例えば患者から、動物モデルなどの動物から、または培養細胞、例えば、患者から取り出

50

され、観察のために培養で増殖させた細胞株もしくは細胞から、得ることができる。生物学的試料は、組織および/または液体を含むことができる。生物学的試料は、限定されることなく、血液、血液画分（例えば、血清または血漿）、脳脊髄液（CSF）、リンパ液、涙液、唾液、痰、頬側スワブ、母乳、尿、または糞便を含む任意の生物学的供給源から得ることができる。生物学的試料は、生検材料、例えば、組織生検材料、例えば、針生検材料、細針生検材料、外科生検材料などであり得る。試料は、病変または疑わしい病変を有する組織試料を含むことができるが、生物学的試料はまた、別の部位、例えば、転移が疑われる部位、リンパ節、または血液に由来してもよい。生物学的試料は、対象から採取された試料の一部であり得る。組織試料の例には、脳組織試料または神経組織試料が含まれる。限定されることなく、標準的な血液回収手順を含む、そのような生物学的試料を得る方法は、当技術分野において公知である。

10

【0079】

本明細書において使用される場合、用語「診断」は、対象が癌などの障害を有する相対的確率を指す。同様に、用語「予後」は、特定の将来の転帰が対象に起こり得る相対的確率を指す。例えば、本開示の文脈では、予後は、個体が癌を発症する可能性、個体が再発を有する可能性、癌が転移する可能性、癌が治癒する可能性、または疾患の起こり得る重症度（例えば、症状の重症度、機能低下の速度、生存率など）を指すことができる。該用語は、医療診断の分野の当業者によって理解されるように、絶対的であることを意図するものではない。

【0080】

20

本明細書において使用される場合、用語「療法」、「治療」、「治療的介入」、および「改善」は、症状の重症度の低下をもたらす任意の活動を指す。癌の場合、治療とは、例えば、腫瘍サイズ、癌細胞の数、増殖速度、転移活性の低減、非癌細胞の細胞死の低減、悪心および他の化学療法または放射線療法の副作用の低減などを指すことができる。用語「治療する」および「予防する」は、絶対的な用語であることを意図するものではない。治療および予防とは、発症のいずれかの遅延、症状の改善、患者の生存率の改善、生存期間または生存率の増加などを指すことができる。治療および予防は、本介入を用いず生じたであろうよりも少ない新生物細胞が患者に見出されるように、完全（検出不能なレベルの新生物細胞）または部分的であり得る。治療の効果は、治療を受けていない個体、もしくは個体のプール、または治療前、もしくは治療中の異なる時点の同じ患者と比較することができる。いくつかの局面では、疾患の重症度は、例えば、投与前の個体または治療を受けていない対照個体と比較して、少なくとも10%低下する。いくつかの局面では、疾患の重症度は、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、または少なくとも90%低下するか、または場合によっては、標準的な診断技術を使用してもはや検出できない。

30

【0081】

本明細書において使用される場合、用語「有効量」、「有効用量」、および「治療有効量」は、病状の徴候もしくは症状を低減もしくは排除する、または障害を改善するなどの所望の応答を生じさせるのに十分な、抗体またはイムノコンジュゲートなどの作用物質の量を指す。いくつかの例では、「有効量」は、障害または疾患のいずれかの1つまたは複数の症状および/または根本原因を治療する（予防を含む）および/または疾患の進行を予防する有効量である。例えば、所与のパラメータについて、治療有効量は、5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、または少なくとも100%の少なくともいづれかだけ治療効果の増加または減少を示す。治療有効性は、「～倍」の増加または減少として表すこともできる。例えば、治療有効量は、対照に対して1.2倍、1.5倍、2倍、5倍、またはそれ以上の効果の少なくともいづれかを有することができる。

40

【0082】

本明細書において使用される場合、用語「薬学的組成物」は、薬学的化合物（例えば、薬物）と、薬学的に許容される担体とを含む組成物を指す。

50

【 0 0 8 3 】

本明細書において使用される場合、用語「薬学的に許容される」は、薬学的組成物の他の成分と適合性であり、対象に安全に投与することができる担体を指す。該用語は、「生理学的に許容される」および「薬理学的に許容される」と同義に使用される。薬学的組成物ならびにそれらの調製および使用のための技術は、本開示に照らして当業者に公知である。好適な薬理学的組成物およびそれらの投与のための技術の詳細な一覧については、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. 1985; Brunton et al., "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics," McGraw-Hill, 2005; University of the Sciences in Philadelphia (eds.), "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," Lippincott Williams & Wilkins, 2005; および University of the Sciences in Philadelphia (eds.), "Remington: The Principles of Pharmacy Practice," Lippincott Williams & Wilkins, 2008などの文書を参照することができる。

10

【 0 0 8 4 】

薬学的に許容される担体は、一般に、少なくともヒトに使用するために滅菌される。薬学的組成物は、一般に、貯蔵時の緩衝および保存のための作用物質を含み、投与経路に応じて、適切な送達のための緩衝液および担体を含み得る。薬学的に許容される担体の例には、限定されることなく、通常の(0.9%)生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)ハンクス平衡塩類溶液(HBSS)、および複数の電解質溶液、例えばPlasmaLyte ATM(Baxter)が挙げられる。

20

【 0 0 8 5 】

許容される担体、賦形剤、および/または安定化剤は、使用される投与量および濃度でレシipientに対して非毒性であり、緩衝液、例えば、ホスフェート、シトレート、および他の有機酸；アスコルビン酸、グルタチオン、システイン、メチオニン、およびクエン酸を含む酸化防止剤；防腐剤（エタノール、ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、p-クロロ-m-クレゾール、メチルパラベンもしくはプロピルパラベン、塩化ベンザルコニウム、またはそれらの組合せなど）；アミノ酸、例えば、アルギニン、グリシン、オルニチン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、イソロイシン、ロイシン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、プロリン、およびそれらの組合せ；単糖、二糖、および他の炭水化物；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、ゼラチンまたは血清アルブミン；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、トレハロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンノース、マルトース、ガラクトース、フルクトース、ソルボース、ラフィノース、グルコサミン、N-メチルグルコサミン、ガラクトサミン、およびノイラミン酸；および/または非イオン性界面活性剤、例えば、Tween、Pluronic、Triton-X、またはポリエチレングリコール(PEG)を含む。

30

【 0 0 8 6 】

用語「用量」および「投与量」は、本明細書において区別なく使用される。用量とは、各投与時に個体に与えられる活性成分の量を指す。本発明では、用量とは、抗体または関連成分の濃度、例えば、治療剤の量、または放射性標識の投与量を指すことができる。用量は、投与頻度、個体の大きさおよび許容範囲、病状の重症度、副作用のリスク、投与経路、ならびに検出可能な標識（存在する場合）のイメージングモダリティを含む、いくつかの要因に応じて変化する。当業者であれば、上記の要因に応じて、または治療の進行に基づいて、用量が変更され得ることを認識するであろう。用語「剤形」は、医薬品の特定の形式を指し、投与経路に依存する。例えば、剤形は、液体、例えば、注射用の生理食塩水であり得る。

40

【 0 0 8 7 】

本明細書において使用される場合、用語「対象」は、個々の動物を指す。本明細書において使用される用語「患者」は、医師または看護師などの医療提供者のケアまたは管理下にある対象を指す。対象には、哺乳動物、例えば、ヒトおよび非ヒト霊長類、例えばサル

50

、ならびにイヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ブタ、および他の哺乳動物種が含まれる。対象には、鳥類も含まれ得る。患者は、治療、モニタリング、既存の治療レジメンの調整または修正などを求めている個体であり得る。用語「癌対象」は、癌と診断された個体を指す。癌患者には、治療を受けていない個体、現在治療を受けている個体、手術を受けた個体、および治療を中止した個体が含まれ得る。

【0088】

癌の治療の文脈では、治療を必要とする対象とは、癌または前癌状態を有する個体、以前に癌を有しかつ再発のリスクがある個体、癌を有すると疑われる個体、放射線療法または化学療法などの癌の標準治療を受けている個体を指すことができる。

【0089】

「癌」、「腫瘍」、「形質転換された」などの用語は、前癌性細胞、新生物細胞、形質転換細胞、および癌性細胞を含み、固形腫瘍または非固形癌を指すことができる（例えば、Edge et al. AJCC Cancer Staging Manual (7th ed. 2009); Cibas and Ducatman Cytology: Diagnostic principles and clinical correlates (3rd ed. 2009)を参照）。癌には、良性新生物および悪性新生物（異常な増殖）の両方が含まれる。「形質転換」は、自発的または誘導された表現型変化、例えば、細胞の不死化、形態学的変化、異常な細胞増殖、接触阻害、および固定の減少、および/または悪性腫瘍を指す（Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)を参照）。形質転換は、形質転換ウイルスによる感染、および新しいゲノムDNAの組み込み、または外因性DNAの取込みから生じ得るが、自発的に、または発癌物質への曝露後にも生じ得る。

【0090】

用語「癌」は、限定されることなく、白血病、癌腫、肉腫、腺癌、リンパ腫、固形癌、およびリンパ癌などを含む任意の癌を指すことができる。様々なタイプの癌の例には、限定されることなく、肺癌（例えば、非小細胞肺癌、すなわちNSCLC）、乳癌、前立腺癌、結腸直腸癌、膀胱癌、卵巣癌、白血病、肝癌（すなわち、肝細胞癌）、腎癌（renal cancer）（すなわち、腎細胞癌）、甲状腺癌、脾癌、子宮癌、子宮頸癌、精巣癌、食道癌、胃（stomach）（胃（gastric））癌、腎癌（kidney cancer）、中枢神経系の癌、皮膚癌、神経膠芽腫、および黒色腫が挙げられる。

【0091】

本明細書において使用される場合、ポリペプチドなどの化学的実体は、組成物中のその種類（例えば、ポリペプチド）の主要な化学的実体である場合、「実質的に純粋」である。これには、組成物中のその種類の化学的実体の50%超、80%超、90%超、95%超、98%超、99%超、99.5%超、99.9%超、または99.99%超を占める化学的実体が含まれる。

【0092】

語句「単離された抗体」は、抗体を産生した供給源、例えば、動物、ハイブリドーマまたは他の細胞株（抗体を産生する組換え昆虫細胞、酵母細胞、または細菌細胞）から取り出された、インビボまたはインビトロで生成される抗体を指す。

【0093】

「実質的に純粋」または「単離された」は、対象種が、存在する優勢な種であり（すなわち、モル基準で、組成物中の任意の他の個々の高分子種よりも豊富である）、実質的に精製された画分が、対象種が、存在する全高分子種の少なくとも約50%（モル基準）を構成する組成物であることを意味する。一般に、実質的に純粋な組成物とは、組成物中に存在する高分子種の約80%~90%またはそれ以上が、関心対象の精製種であることを意味する。組成物が単一の高分子種から本質的になる場合、対象種は、本質的な均一性まで精製される（従来の検出方法によって、組成物中に汚染種を検出することができない）。溶媒種、小分子（<500ダルトン）、安定化剤（例えばBSA）、および元素イオン種は、この定義の目的では高分子種とは考えられない。

【0094】

本明細書において使用される用語「配列同一性」は、2つのポリペプチド配列または2つの核酸配列間の配列同一性の割合を指す。2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するためには、最適な比較目的のために配列をアライメントする（例えば、第2のアミノ酸配列または核酸配列との最適なアライメントのために、第1のアミノ酸配列または核酸配列の配列にギャップを導入することができる）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列内の位置が、第2の配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められている場合、分子はその位置で同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、配列によって共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、%同一性 = 同一の重複位置の数 / 位置の総数 × 100%）。一態様では、2つの配列は同じ長さである。2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することもできる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例には、Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2264-2268, modified as in Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5877のアルゴリズムがある。そのようなアルゴリズムは、Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。例えば、スコア = 100、ワード長 = 12に設定したNBLASTヌクレオチドプログラムパラメータを用いてBLASTヌクレオチド検索を行って、本出願の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。例えば、スコア = 50、ワード長 = 3に設定したXBLASTプログラムパラメータを用いてBLASTタンパク質検索を行って、本明細書において記載されるタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためにギャップ付きアライメントを得るために、Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載されているGapped BLASTを利用することができる。あるいは、PSI-BLASTを使用して、分子間の距離関係を検出する反復検索を行うことができる（同文献）。BLASTプログラム、Gapped BLASTプログラムおよびPSI-Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる（例えば、NCBIのウェブサイトを参照）。配列の比較のために利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例には、Myers and Miller, 1988, CABIOS 4: 11-17のアルゴリズムがある。そのようなアルゴリズムは、GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120加重残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を使用することができる。2つの配列間のパーセント同一性は、ギャップを許容するかしないかにかかわらず、上記と同様の技術を使用して決定することができる。パーセント同一性の計算では、典型的には、正確な一致のみをカウントする。

【0095】

抗体では、IMGTによって抗体配列が最大にアライメントされた場合に、パーセンテージ配列同一性を決定することができる。アライメント後に、対象抗体領域（例えば、重鎖または軽鎖の成熟可変領域全体）が参照抗体の同じ領域と比較されている場合、対象抗体領域と参照抗体領域との間のパーセンテージ配列同一性は、対象抗体領域および参照抗体領域の両方で同じアミノ酸が占める位置の数を、この2つの領域のアライメントされた位置の総数で割ったものに100を乗じて、パーセンテージに変換したものである。

【0096】

パーセントアミノ酸配列同一性はまた、配列比較プログラムNCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)) を使用して決定され得る。NCBI-BLAST2配列比較プログラムは、National Institute of Health, Bethesda, Mdから入手することができる。NCBI-BLAST2は、いくつかの検索パラメータを使用し、これらの検索パラメータはいずれも、例えば、unmask = yes、strand = all、期待出現数 = 10、最小低複雑度長 = 15/5、マルチパス e 値 = 0.01、マルチパスの定数 = 25、最終的なギャップ付きアライメントのドロップオフ = 25、およびスコアリング行列 = BLOSUM62を含

むデフォルト値に設定される。

【 0 0 9 7 】

アミノ酸配列比較のためにNCBI-BLAST2が使用される状況では、所与のアミノ酸配列Bへの、所与のアミノ酸配列Bとの、または所与のアミノ酸配列Bに対する所与のアミノ酸配列Aの%アミノ酸配列同一性（あるいは、所与のアミノ酸配列Bへの、所与のアミノ酸配列Bとの、または所与のアミノ酸配列Bに対する特定の%アミノ酸配列同一性を有するかまたはそれを含む所与のアミノ酸配列Aと言い表すことができる）は、以下のように計算される：

$$100 \times \text{分率} X / Y$$

式中、Xは、配列アライメントプログラムNCBI-BLAST2によって、そのプログラムのAとBとのアライメントにおいて同一の一致としてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bのアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さに等しくない場合、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性は、Aに対するBの%アミノ酸配列同一性に等しくないことが理解される。本明細書において使用される用語「核酸配列」は、天然に存在する塩基、糖および糖間（骨格）結合からなるヌクレオシドモノマーまたはヌクレオチドモノマーの配列を指し、cDNAを含む。該用語はまた、天然に存在しないモノマーまたはその一部を含む修飾または置換された配列を含む。本出願の核酸配列は、デオキシリボ核酸配列（DNA）またはリボ核酸配列（RNA）であり得、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、およびウラシルを含む天然に存在する塩基を含み得る。配列はまた、修飾された塩基を含み得る。そのような修飾された塩基の例には、アザおよびデアザのアデニン、グアニン、シトシン、チミジン、およびウラシル、ならびにキサンチンおよびヒポキサンチンが挙げられる。転写不可能なヌクレオチド塩基を含むポリヌクレオチドは、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイではプローブとして有用であり得ることが理解される。核酸は、二本鎖または一本鎖のいずれかであり得、センス鎖またはアンチセンス鎖を表す。さらに、用語「核酸」は、相補的核酸配列、およびコドン最適化されたコドン等価物または同義のコドン等価物を含む。

【 0 0 9 8 】

本明細書において使用される用語「単離された核酸」は、組換えDNA技術によって生成された場合、細胞材料もしくは培養培地を実質的に含まない核酸、または化学合成された場合、化学前駆体もしくは他の化学物質を指す。単離された核酸はまた、その核酸が由来する核酸に天然に隣接する配列（すなわち、核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を実質的に含まない。

【 0 0 9 9 】

「少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、溶液中の2つの相補的核酸分子間の選択的ハイブリダイゼーションを促進する条件が選択されることを意味する。ハイブリダイゼーションは、核酸配列分子の全部または一部に対して起こり得る。ハイブリダイズ部分は、典型的には少なくとも15（例えば、20、25、30、40、または50）ヌクレオチド長である。当業者であれば、核酸二本鎖またはハイブリッドの安定性が、ナトリウム含有緩衝液中でナトリウムイオン濃度および温度の関数である T_m （ $T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% (G + C) - 600 / l)$ 、または同様の式）によって決定されることを認識するであろう。したがって、ハイブリッド安定性を決定する洗浄条件のパラメータは、ナトリウムイオン濃度および温度である。公知の核酸分子と類似しているが同一ではない分子を同定するために、1%のミスマッチが、 T_m の約1

の低下をもたらすと仮定することができ、例えば、>95%の同一性を有する核酸分子が求められる場合、最終洗浄温度は約5℃低下する。これらの考察に基づいて、当業者であれば、適切なハイブリダイゼーション条件を容易に選択することができるであろう。好ましい態様では、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が選択される。例として、ストリンジェントなハイブリダイゼーションを達成するために、以下の条件を使用してもよい：上記の式に基づいて、 $T_m - 5$ で5×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）/5×デンハルト液/1.0% SDSでのハイブリダイゼーション、続いて60℃で0.2×SSC/0

10

20

30

40

50

.1% SDSの洗浄。中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、42 °Cの3×SSCでの洗浄工程が含まれる。ただし、同等のストリンジェンシーが、代替の緩衝液、塩、および温度を使用して達成され得ることが理解される。ハイブリダイゼーション条件に関する追加の指針は、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2002、およびSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001に見出され得る。

【0100】

本明細書において使用され、当技術分野においてよく理解されている用語「治療する」または「治療」は、臨床結果を含む有益なまたは所望の結果を得るための手法を意味する。有益なまたは所望の臨床結果には、限定されることなく、検出可能であろうと検出不能であろうと、1つまたは複数の症状または病状の軽減または改善、疾患の程度の減弱、疾患の安定化（すなわち、悪化しない）状態、疾患の拡大の防止、疾患進行の延長または遅延、疾患状態の改善または緩和、疾患の再発の縮小、および寛解（部分的であろうと全体的であろうと）が含まれ得る。「治療する」または「治療」はまた、治療を受けない場合の予測される生存期間と比較して、生存期間を延長することを意味し得る。本明細書において使用される「治療する」または「治療」は、予防的治療も含む。例えば、癌を有する対象は、進行を予防するために治療され得、進行を予防するために、本明細書において記載される抗体、イムノコンジュゲート、核酸、または組成物を用いて治療され得る。

10

【0101】

本明細書において使用される場合、用語「投与」は、腫瘍内投与経路または静脈内投与経路などの効果的な経路によって、有効量の抗体を含む組成物などの作用物質を対象に提供または与えることを意味する。

20

【0102】

本明細書において使用される場合、用語「希釈剤」は、投与される抗体またはイムノコンジュゲートなどの活性化合物の生理学的活性または特性を阻害せず、対象を刺激せず、投与された化合物の生物学的活性および特性を無効にしない薬学的に許容される担体を指す。希釈剤には、当業者に公知なように、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、界面活性剤、酸化防止剤、保存塩、防腐剤、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、そのような同様の材料、およびそれらの組合せが含まれる（例えば、参照により本明細書に組み入れられるRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329を参照）。任意の従来の担体が活性成分と適合しない場合を除いて、薬学的組成物中のその使用が企図される。

30

【0103】

1つまたは複数の列挙された要素を「含む（comprising）」または「含む（including）」組成物または方法は、具体的に列挙されていない他の要素を含んでもよい。例えば、抗体を「含む（comprises）」または「含む（includes）」組成物は、抗体を単独でまたは他の成分と組み合わせで含有し得る。

【0104】

本開示の範囲を理解する上で、本明細書において使用される用語「からなる（consisting）」およびその派生語は、記載された特徴、要素、構成要素、群、整数、および/または工程の存在を指定し、他の記載されていない特徴、要素、構成要素、群、整数、および/または工程の存在を除外する閉じた用語であることを意図している。

40

【0105】

本明細書における端点による数値範囲の列挙は、その範囲内に包含されるすべての数および分数を含む（例えば、1~5は、1、1.5、2、2.75、3、3.90、4、および5を含む）。また、そのすべての数および分数は、用語「約」によって修飾されると推定されることも理解されたい。さらに、冠詞「a」、「an」、および「the」の単数形は、文脈上別途明確に指示されない限り、複数の言及を含むことを理解されたい。例えば、用語「抗体」または「少なくとも1つの抗体」は、それらの混合物を含む複数の抗体を含むことができる。

【0106】

50

用語「Frizzled」および「FZD」は、文脈に応じて、Frizzledファミリーの任意の遺伝子またはタンパク質メンバーを指す。Frizzledタンパク質は、サイトゾル内のDishevelledタンパク質の活性化に関与する。Frizzledは、Frizzled-1、Frizzled-2、Frizzled-3、Frizzled-4、Frizzled-5、Frizzled-6、Frizzled-7、Frizzled-8、Frizzled-9、およびFrizzled-10のいずれかを指す。Frizzled 4 (「FZD4」) (CD344、EVR1、FEVR、FZD4S、Fz-4、Fz4、FzE4、GPCR、hFz4、およびfrizzledクラス受容体4とも称される) は、タンパク質のfrizzled遺伝子ファミリーのメンバーである。この遺伝子は、ENTREZ Gene ID : 8322を有する。このタンパク質は、NCBI参照配列 : NP_036325.2を有する。

【0107】

「リポタンパク質受容体関連タンパク質」、「低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質」(HGNC)、または「プロ低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質」(UniProt)、略して「LRP」は、遺伝子およびタンパク質の群である。それらには、LRP1、LRP1B、LRP2(メガリン)、LRP3、LRP4、LRP5、LRP6、LRP8(アポリポタンパク質e受容体)、LRP10、LRP11、およびLRP12が含まれる。LRP5およびLRP6は、古典的Wnt経路に関与するLRP5/LRP6/Frizzled共受容体群の一部である。LRP5は、LRP5、BMND1、EVR1、EVR4、HBM、LR3、LRP-5、LRP7、OPPG、OPS、OPTA1、VBCH2、およびLDL受容体関連タンパク質5としても知られている。LRP5遺伝子は、ENTREZ遺伝子ID : 4041を有し、該タンパク質は、NCBI参照配列 : NP__002326を有する。LRP6遺伝子は、ENTREZ遺伝子ID : 4040を有し、該タンパク質は、NCBI参照配列 : NP__002327を有する。LRP6は、ADCAD2、STHAG7としても知られている。

【0108】

II. FRZシグナル伝達調節不全に関連する障害

FZDへのWnt結合は、 β -カテニン結合複合体を不安定化し、 β -カテニン分解を引き起こす。その結果、細胞内 β -カテニンのレベルが増加する。したがって、frizzledタンパク質、特にFZD4だけでなく、frizzledファミリーの他のメンバー、例えば、FZD1、FZD2、FZD4、FZD5、FZD7、FZD8、およびFZD9へのWnt結合を遮断する方法が、本明細書において提供される。

【0109】

「FZD関連障害」(例えば、「FZD4関連障害」または「FZD5関連障害」)は、言及される特定のFZD受容体の調節不全と相関する病状または疾患を指す。調節不全とは、正常な β -カテニン媒介性の転写変化、またはこれらの受容体によって規定される任意の他の細胞内シグナル伝達経路を増加させる異常なシグナル伝達を指す。

【0110】

様々なFrizzled受容体が様々な癌に関連している。さらに具体的には、FZD1は神経芽細胞腫に関連している。FZD2は、肝癌、肺癌、子宮内膜癌、および唾液腺様嚢胞癌に関連している。FZD3は結腸直腸癌に関連している。FZD4は、急性骨髄性白血病、前立腺癌、神経膠芽腫、膀胱癌、および子宮頸癌に関連している。FZD5は、膵癌、結腸癌、および前立腺癌に関連している。FZD6は、結腸直腸癌および乳癌に関連している。FZD7は、食道癌、神経膠腫、乳癌、胃癌、および結腸直腸癌に関連している。FZD8は、前立腺癌、乳癌、および肺癌に関連している。FZD9は、星状細胞腫および骨肉腫に関連している。FZD10は、結腸直腸癌および滑膜肉腫に関連している。

【0111】

III. 抗FZD4抗体

A. 抗体

複数のFZDに結合する抗体、およびFZD4に優先的に結合する他の抗体を含む、Frizzled受容体(FZD)に対する抗体が、本明細書において記載される。これらの抗体は、Frizzled受容体に結合し、リガンドWNT結合を遮断し、frizzled受容体シグナル伝達を調節する。これらの抗体はまた、抗増殖効果が、癌、およびfrizzled受容体が調節不全である他の疾患を治療するための治療的可能性を有することを示す。

【 0 1 1 2 】

したがって、本開示の一局面は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む、Frizzled受容体（FZD）システインリッチドメイン（CRD）に特異的に結合する単離された抗体を含み、重鎖可変領域は、相補性決定領域CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、軽鎖可変領域は、相補性決定領域CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、上記CDRのアミノ酸配列は、表1aまたは表3aの配列から選択される配列を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。

【 0 1 1 3 】

一態様では、抗体は、表1aのCDR配列セットから選択されるCDR配列セット、すなわち、クローン5016～5037および6498～6500のCDR配列セットを含む。

10

【 0 1 1 4 】

(表1a) FZD4抗体のCDRアミノ酸配列

クローン ID	ウェル ID	CDR L1	SEQ ID NO:	CDR L2	SEQ ID NO:	CDR L3	SEQ ID NO:	CDR H1	SEQ ID NO:	CDR H2	SEQ ID NO:	CDR H3	SEQ ID NO:
5016		SVSSA	103	SASSLYS	104	GVYLF	152	IHSSSI	157	ATYSSFSGS IT	173	YHHPFGYAL	196
5017	4A1	SVSSA	103	SASSLYS	104	GVYLF AAYHWP PLF	148	LYYTDM	149	SISLFFGYV S	150	YLAM	151
5018	4A2	SVSSA	103	SASSLYS	104	GVYLF	152	IYFSSI	158	SNYPSPFGS NS	174	YHFPFAYSL	197
5019	4A3	SVSSA	103	SASSLYS	104	GVYLF	152	IGSSSI	159	SIYSAFAST S	175	YHFPFGFAL	198
5020	4A4	SVSSA	103	SASSLYS	104	GVYLF	152	VNSSSI	160	AFYSSFGA TS	176	YHFPFGHAL	199
5021	4A5	SVSSA	103	SASSLYS	104	GVYLF	152	IGSSSI	159	AYYSAFAS SS	177	YHYPFHAL	200
5022	4A6	SVSSA	103	SASSLYS	104	GVYLF	152	IHFSSI	161	CSYPSFGS TS	178	YHYPFHAL	200
5014	4A7	SVSSA	103	SASSLYS	104	GVYLF	152	IYSASI	162	SRYPSPFGS TS	179	YHYPFGTAL	201
5023	4A8	SVSSA	103	SASSLYS	104	GVYLF	152	IHSSSI	157	AIYSSFSA NS	180	YHYPFYAL	202
6494	4A9	SVSSA	103	SASSLYS	104	GVYLF	152	IYFSSI	158	SNYPAFGS TS	181	YHYPFYAM	203
5025	4A10	SVSSA	103	SASSLYS	104	GVYLF	152	IYSSSI	163	SIYSAFLST T	182	YHYPHGHAL	204
6495	4A11	SVSSA	103	SASSLYS	104	SSYSLI	153	LSYSFF	164	SIYPSSGY TY	45	PAPFSYHVL	205
6496	4A12	SVSSA	103	SASSLYS	104	SSYSLI	153	LSFYFL	165	SIYPYSGY TY	36	AAPGSYHPM	206
6497	4B1	SVSSA	103	SASSLYS	104	SSYSLI	153	LSSYYM	15	SIYPFHAS TY	183	AAPYFYGVM	207
5027	4B2	SVSSA	103	SASSLYS	104	SSYSLI	153	SSFYFM	166	TVYPYLDY TY	184	AFPGSYHPM	208
5028	4B3	SVSSA	103	SASSLYS	104	SSYSLI	153	LSYYYM	3	SIYPYSRN TF	185	AYPFSYHFM	209
5029	4B4	SVSSA	103	SASSLYS	104	SSYSLI	153	LSYYYM	3	SIYPFSGY ST	186	PSAFSYHPM	210
5030	4B5	SVSSA	103	SASSLYS	104	SSYSLI	153	LSFYYM	167	SIYPYYAY TY	187	PVAGAYHPM	211
5031	4B6	SVSSA	103	SASSLYS	104	SSYSLI	153	IASYFT	168	SIYLSFGY GY	188	SSLGFYNGM	212
6498	4B7	SVSSA	103	SASSLYS	104	SSYSLI	153	FSSSSI	12	CCNSAYR YGP	189	TVRGSKKPY FSGWAM	213
6499	4B8	SVSSA	103	SASSLYS	104	SSYSLI	153	LSYYFM	169	SIYPYAGN TY	190	TYPGYYYIL	214
5034	4B9	SVSSA	103	SASSLYS	104	WAYGPF	154	IYYYPM	170	SFYSYYSF TY	191	SGVGGDHAL	215
5035	4B10	SVSSA	103	SASSLYS	104	YYHPI	155	FSAYNI	171	SLYTSYGY TY	192	VWYVVQ	216
5036	4B11	SVSSA	103	SASSLYS	104	YYSLF	156	FSSSSI	12	YIYPFNGY SY	193	GYFYTWGGM	217
5037	4B12	SVSSA	103	SASSLYS	104	YYSLF	156	FSSSSI	12	YIYPSYDY TY	194	GYFYTWGGM	217
6500	4C1	SVSSA	103	SASSLYS	104	YYSLF	156	IYYFGM	172	YISPPYGF TY	195	GYYYSWGGM	218

20

30

40

【 0 1 1 5 】

(表1b) FZD4抗体のCDR核酸配列

50

クローン ID	ウェル ID	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:		
		CDR L1	CDR L2	CDR L3		
5016	4A1	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	GGTGTTTACCTGTTT	221
5017		CAGCGCT	CTCTACTCT	220	GCTGCTTACCATGGCCG	222
		TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	CCGCTGTTTACAG	222
5018	4A2	CAGCGCT	CTCTACTCT	220	GGTGTTTACCTGTTTACAG	223
5019	4A3	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	GGTGTTTACCTGTTTACAG	223
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5020	4A4	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	GGTGTTTACCTGTTTACAG	223
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5021	4A5	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	GGTGTTTACCTGTTTACAG	223
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5022	4A6	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	GGTGTTTACCTGTTTACAG	223
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5014	4A7	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	GGTGTTTACCTGTTTACAG	223
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5023	4A8	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	GGTGTTTACCTGTTTACAG	223
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
6494	4A9	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	GGTGTTTACCTGTTTACAG	223
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5025	4A10	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	GGTGTTTACCTGTTTACAG	223
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
6495	4A11	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TCTTCTTATTCTCTGATCA	224
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
6496	4A12	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TCTTCTTATTCTCTGATCA	224
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
6497	4B1	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TCTTCTTATTCTCTGATCA	224
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5027	4B2	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TCTTCTTATTCTCTGATCA	224
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5028	4B3	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TCTTCTTATTCTCTGATCA	224
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5029	4B4	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TCTTCTTATTCTCTGATCA	224
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5030	4B5	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TCTTCTTATTCTCTGATCA	224
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5031	4B6	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TCTTCTTATTCTCTGATCA	224
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
6498	4B7	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TCTTCTTATTCTCTGATCA	224
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
6499	4B8	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TGGGCTTACGGTCCGTTT	224
		CAGCGCT	CTCTACTCT			
5034	4B9	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	ACG	225
5035	4B10	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TACTACCATCCGATCACG	226
5036	4B11	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TACTACTCTCTGTTTACAG	227
5037	4B12	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TACTACTCTCTGTTTACAG	227
6500	4C1	TCCGTGTC	TCGGCATCCAGC	220	TACTACTCTCTGTTTACAG	227

【 0 1 1 6 】

(表 1 c) FZD4抗体のCDR核酸配列

10

20

30

40

50

クローン ID	ウェル ID	SEQ ID NO:	CDR H1	SEQ ID NO:	CDR H2	SEQ ID NO:	CDR H3	SEQ ID NO:
5016			ATCCATTCTTC TTCTATA	228	GCTACTTATTCTTCTT TTGGCTCTATTACT	249	TACCATCACCCGTTTCGGTTATGCTTT G	275
5017	4A1		CTCTATTATAC TGATATG	229	TCTATTTCTCTTTTTT TTGGCTATGTTTCT	250	TACTTGGCTATG	276
5018	4A2		ATCTATTTTCT TCTATC	230	TCTAATTATCCTTCTT TTGGCTCTAATTCT	251	TACCATTTCCCGTTTCGCTTATTCTTT G	277
5019	4A3		ATCGGTTCTTC TTCTATC	231	TCTATTTATTCTGCTT TTGCCTCTACTTCT	252	TACCATTTCCCGTTTCGGTTTTGCTTT G	278
5020	4A4		GTCAATTCTTC TTCTATC	232	GCTTTTTATTCTTCTT TTGGCGCTACTTCT	253	TACCATTTCCCGTTTCGGTCATGCTCT G	279
5021	4A5		ATCGGTTCTTC TTCTATC	231	GCTTATTATTCTGCTT TTGCCTCTAGTTCT	254	TACCATTACCCGTTTCGGTCATGCTTT G	280
5022	4A6		ATCCATTTTTC TTCTATC	233	TGTAGTTATCCTTCTT TTGGCTCTACTTCT	255	TACCATTACCCGTTTCGGTCATGCTCT G	281
5014	4A7		ATCTATTCTGC TTCTATC	234	TCTCGTTATCCTTCTT TTGGCTCTACTTCT	256	TACCATTACCCGTTTCGGTACTGCTTT G	282
5023	4A8		ATCCATTCTTC TTCTATC	235	GCTATTTATTCTTCTT TTAGCGCTAATTCT	257	TACCATTACCCGTTTCGGTTATGCTTT G	283
6494	4A9		ATCTATTTTCT TCTATC	230	TCTAATTATCCTGCTT TTGGCTCTACTTCT	258	TACCATTACCCGTTTCGGTTATGCTAT G	284
5025	4A10		ATCTATTCTTC TTCTATC	236	TCTATTTATTCTGCTT TCTCTCTACTACT	259	TACCATTACCCGCACGGTCATGCTT TG	285
6495	4A11		CTCTCTTATTC TTTTTTC	237	TCTATTTATCCTTCTT CTGGCTATACCTAT	260	CCGGCTCCNNTTTTCTTACCATGTTCT G	286
6496	4A12		CTCTCTTTTAT TTTTTG	238	TCTATTTATCCTTATT CTGGCTATACCTAT	261	GCGGCTCCGGGTTCTTACCATCCTA TG	287
6497	4B1		CTTTCTTCTTAT TATATG	239	TCTATTTATCCTTTTT ATGCCTCTACTTAT	262	GCGGCTCCCTATTTTTACGGTGTTAT G	288
5027	4B2		TCCTCTTTTAT TTTATG	240	ACTGTTTATCCTTATC TTGACTATACTTAT	263	GCGTTTCCGGGTTCTTACCATCCTAT G	289
5028	4B3		CTCTCTTATTA TTATATG	241	TCTATTTATCCTTATT CTCGCAATACTTTT	264	CGCGTATCCGTTTTCTTACCATTTTA TG	290
5029	4B4		CTCTCTTATTA TTATATG	241	TCTATTTATCCTTTTT CTGGCTATTCTACT	265	CCGCTCTGCGTTTTCTTACCATCCTAT G	291
5030	4B5		CTCAGTTTTTA TTATATG	242	TCTATTTATCCTTATT ATGCCTATACTTAT	266	CCGGTTGCGGGTGCTTACCATCCTA TG	292
5031	4B6		ATCGCTTCTTA TTTTACG	243	TCTATTTATCCTTCTT TTGGCTATGGTTAT	267	TCGTCTCTGGGTTTTTACAATGGTAT G	293
6498	4B7		TTTTCTTCTCT TCTATA	244	TGTTGTAATTCTGCTT ATCGCTATGGTCCT	268	ACTGTTTCGTGGATCCAAAAACCGT ACTTCTCTGGTTGGGCTATG	294
6499	4B8		CTCTCTTATTA TTTTATG	245	TCTATTTATCCTTATG CTGGCAATACTTAT	269	ACGTATCCGGGTATTACTATATTCT G	295
5034	4B9		ATCTATTATTAT CCTATG	246	TCTTTTTATCCTTATT ATAGCTTTACTTAT	270	TCTGGTGTGGGTGGTGATCACGCTT TG	296
5035	4B10		TTCTCTGCTTA TAATATC	247	TCTCTTTATACTTCTT ATGGCTATACTTAT	271	GTTTGGTACGTTGTTTACG	297
5036	4B11		TTTTCTTCTCT TCTATA	244	TATATTTATCCTTTTA ATGGCTATAGTTAT	272	GGTACTTCTACACTTGGGGTGGA TG	298
5037	4B12		TTTTCTTCTCT TCTATA	244	TATATTTATCCTTCTT ATGACTATACTTAT	273	GGTACTTCTACACTTGGGGTGGA TG	298
6500	4C1		ATCTATTATTT GGTATG	248	TATATTTCTCCTCCTT ATGGCTTTACTTAT	274	GGTACTACTACTCTTGGGGTGGA TG	299

10

20

30

【 0 1 1 7 】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域も、本明細書において記載される。表2は、クローン5017由来のFab重鎖およびFab軽鎖の例示的な可変ドメイン配列を提供する。表2の配列またはそれと実質的に同一の配列を含む抗体であって、CDRが表1aまたは表3aにおいて同定されたCDR配列セットである抗体も企図される。別の態様では、抗体は、以下を含む重鎖可変領域を含む：(i) 表2に記載の重鎖アミノ酸配列、(ii) 表2に記載の重鎖アミノ酸配列に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、アミノ酸配列、または(iii) (i) の保存的に置換されたアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、保存的に置換されたアミノ酸配列。

【 0 1 1 8 】

40

50

別の態様では、抗体は、以下を含む軽鎖可変領域を含む：(i) 表2に記載の軽鎖アミノ酸配列、(ii) 表2に記載の軽鎖アミノ酸配列に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、アミノ酸配列、または(iii) (i)の保存的に置換されたアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、保存的に置換されたアミノ酸配列。

【 0 1 1 9 】

(表 2) FZD4抗体5017の完全長配列の例

軽鎖 (hK) アミノ酸配列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGS
RSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQAAAYHWPLFTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 300)

軽鎖 (hK) 核酸配列:

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCAT
CACCTGCCGTGCCAGTCAGTCCGTGTCCAGCGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAA
AAGCTCCGAAGCTTCTGATTTACTCGGCATCCAGCCTCTACTCTACTCTGGAGTCCCTTCTCG
CTTCTCTGGTAGCCGTTCCGGGACGGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAG
ACTTCGCAACTTATTACTGTCAGCAAGCTGCTTACCATTGGCCGCCGCTGTTACGACGTTTCG
GACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG
AGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG
CAAAGCAGATACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT
CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 301)

重鎖 (hG1) アミノ酸配列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLYYTDHWHVRQAPGKGLEWVVASISLFFGYVSYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYLAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 302)

重鎖 (hG1) 核酸配列:

GAGGTTGAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGT
CCTGTGCAGCTTCTGGCTTCAACCTCTATTATACTGATATGCACTGGGTGCGTCAGGCCCGG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCACTATTCTCTTTTTTTGGCTATGTTTCTTATGCCGATA
GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGA
ACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCTACTTGGCTATGCACTACT
GGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCCTCGGCTAGCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCC
CTGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA
CACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAACTCTTGACAAAACACACATGCCCCACCGTGCCCCA
GCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCCCAAACCCCAAGGACACCCCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACACGAGTGTG
GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCC
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG
CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT
CCCGTGTGCTGGAAGTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (SEQ ID NO: 303)

下線は、CDR配列を同定するものである。

太字は、ライブラリ（本明細書において例として示される抗体クローンID 5017）からのCDRバリエーションを同定するものである。

10

20

30

40

50

イタリックは、定常ドメイン配列を表すものである。

【 0 1 2 0 】

別の態様では、抗体は、表3aのCDR配列セットから選択されるCDR配列セット、すなわち、クローン5038～5081のCDR配列セットを含む。

【 0 1 2 1 】

表3a-FZD4抗体のCDRアミノ酸配列。表3aは、それぞれすべて記載順に、CDR L1配列(「SVSSA」)をSEQ ID NO: 103として、CDR L2配列(「SASSLYS」)をSEQ ID NO: 104として、CDR L3配列をSEQ ID NO: 105～136、134、および137～147として、CDR H1配列をSEQ ID NO: 1～3、1、4～6、1、7～8、1、9、3、10～11、5、3、5、3、12～14、3、15、7、7、16、2、17～18、17、1、19、3、19、7、17、20～21、1、1、22～23、および3として、CDR H2配列をSEQ ID NO: 24～36、28、37、32、38～40、24、41～43、43～46、35、47～49、42、50～56、51、42、および57～59として、かつCDR H3配列をSEQ ID NO: 60～74、68、および75～102として開示する。

(表3a) FZD4抗体のCDRアミノ酸配列

クローンID	ウェルID	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
5038	A01	SVSSA	SASSLYS	HPWSGGYLI	ISYYM	SIYSYGYTY	SSFSWAM
5039	A02	SVSSA	SASSLYS	PVGWGVPI	IYSYM	SIYSSSSTY	SSFYWAL
5040	A03	SVSSA	SASSLYS	VSGGAHALI	LSYYM	SIYSSSYTY	SWFGWGI
5041	A04	SVSSA	SASSLYS	VSSAYPI	ISYYM	SIYSSSYTS	YWFSYGYASYPAF
5042	A05	SVSSA	SASSLYS	FWGVPI	IYYSI	YISSYSGTY	HPWYGM
5043	A06	SVSSA	SASSLYS	SYHYAALI	LYSYM	SIYSSYGYTY	SAFYWAL
5044	A07	SVSSA	SASSLYS	WYYAPI	LSSYM	YISSYGYTY	PAPGHWGF
5045	A08	SVSSA	SASSLYS	SHSYSLI	ISYYM	SIYSSSSTY	SSFFWAM
5046	A09	SVSSA	SASSLYS	SGYGPF	ISYYI	SIYSSSGTY	SAFYWAM
5047	A10	SVSSA	SASSLYS	SWSSPI	LSYSM	YISSYSGTS	HFFAM
5048	A11	SVSSA	SASSLYS	HYSVYASLI	ISYYM	SISSYGYTY	SWWAWAF
5049	A12	SVSSA	SASSLYS	PHPPSLI	IYYYM	SIYSYGYTY	SAFGWAL
5050	B01	SVSSA	SASSLYS	VAYSHVGLI	LSYYM	SIYPYSGTY	SSFFFAM
5051	B02	SVSSA	SASSLYS	GYGAPI	LYYSI	YISSYSGTY	PYYWSGGF
5052	B03	SVSSA	SASSLYS	SWYSLI	ISSYI	YISPYGYTS	HPSSSWFSFGAL
5053	B04	SVSSA	SASSLYS	PGYLF	LYSYM	SIYSSSGTY	SAFYWAM
5054	B05	SVSSA	SASSLYS	VWFGLI	LSYYM	SISSSGTY	SAFYWAF
5055	B06	SVSSA	SASSLYS	VYGSPLF	LYSYM	SIYSYSSSTY	SSYAWAM
5056	B07	SVSSA	SASSLYS	HAHSPLI	LSYYM	SISSSYTY	SSFYWAI
5057	B08	SVSSA	SASSLYS	SSAYYPF	FSSSI	SIYSYGYTY	SPWGSWAGF
5058	B09	SVSSA	SASSLYS	GHASPI	LSYYSI	YISPYGYTY	PAWVGL
5059	B10	SVSSA	SASSLYS	SSGGWSLI	LYSYI	SISPYSSSTY	SWVFWAL
5060	B11	SVSSA	SASSLYS	VAWSSFLI	LSYYM	SIYSYGYTY	SWVYWGM
5061	B12	SVSSA	SASSLYS	SVAAASLI	LSSYM	SIYSSYGYTY	SWVYWAL
5062	C01	SVSSA	SASSLYS	SGWWGVSLI	ISYYI	SIYSSSYTY	SSYAWAI
5063	C02	SVSSA	SASSLYS	SYAAYLF	ISYYI	SIYSSGYTY	SSFYWAM
5064	C03	SVSSA	SASSLYS	HGSLF	LSYYI	SIYPYSGTY	HGASFGSGAPAF
5065	C04	SVSSA	SASSLYS	YAGVSNLF	IYSYM	SIYSYGYTY	SCFFWAM
5066	C05	SVSSA	SASSLYS	GWYPALF	ISSYM	SIYPSYGYTY	WAFFGL
5067	C06	SVSSA	SASSLYS	SGYYPALF	LSYSM	YISSSYTY	SSFYFAM
5068	C07	SVSSA	SASSLYS	SYHSGSLI	ISSYM	SIYSYSSSTY	SAFSWAI
5069	C08	SVSSA	SASSLYS	HGYSASLI	ISYYM	SISPYSSSTY	SGFYWAL
5070	C09	SVSSA	SASSLYS	SGYYPALF	LYYSI	YISSYGYTS	PSVGYAAF
5071	C10	SVSSA	SASSLYS	APGWALF	LSYYM	SISPYSSSTY	SWVWGL
5072	C11	SVSSA	SASSLYS	GHSSPI	LYYSI	YISPYGYTS	SSVGYVAM
5073	C12	SVSSA	SASSLYS	GWPSLF	ISYYI	SIYPYSSSTY	SWVYWAF
5074	D01	SVSSA	SASSLYS	VPGYPVPI	ISSYM	SISPYGYTS	YYYSSVYFWYAL
5075	D02	SVSSA	SASSLYS	HYSHLI	LYYYI	SISPYSSSTY	SSFFWAI
5076	D03	SVSSA	SASSLYS	GPASSLI	IYSYI	SISSSYSSSTY	SWVYWAI
5077	D04	SVSSA	SASSLYS	SVGSSYYLI	ISYYM	SISPYSSSTY	SWVWGI
5078	D05	SVSSA	SASSLYS	YGPWVLI	ISYYM	SISPYSSSTY	SSVYWAL
5079	D06	SVSSA	SASSLYS	AASWGYPF	ISYSI	SIYPYSGTS	WGGWSSGGYFYAAL
5080	D07	SVSSA	SASSLYS	HWSYPI	ISYSM	SISSSYSSSTY	FWYPM
5081	D08	SVSSA	SASSLYS	GGWGP	LSYYM	SIYSYGYTY	SSFAWAF

【 0 1 2 2 】

表3b-FZD4抗体のCDR軽鎖核酸配列。表3bは、それぞれすべて記載順に、CDR L1配列(「TCCGTGTCCAGCGCT」)をSEQ ID NO: 219として、CDR L2配列(「TCGGCATC

CAGCCTCTACTCT」)をSEQ ID NO: 220として、CDR L3配列をSEQ ID NO: 304～334、332、および335～345として開示する。

(表3b) FZD4抗体のCDR核酸配列

クローン ID	ウェル ID	CDR L1	CDR L2	CDR L3	
5038	A01	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	CATCCGTGGTCTGGTGGTTACC TGATC	10
5039	A02	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	CCGGTTGGTACTGGGGTGTTC CGATC	
5040	A03	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GTTCCTGGTGGTGCTCATGCTC TGATC	
5041	A04	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GTTCCTCTGCTTACCCGATC	
5042	A05	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TTCTGGGGTGTTCGATC	
5043	A06	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTTACTACCATACGCTGCTC TGATC	
5044	A07	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TGGTACTACGCTCCGATC	
5045	A08	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTCATTCTTACTCTCTGATC	
5046	A09	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTGGTTACGGTCCGTTT	
5047	A10	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTTGGTCTTCTCCGATC	
5048	A11	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	CATTACTCTGTTTACGCTTCTCT GATC	
5049	A12	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	CCGCATCCGCGTCTCTGATC	20
5050	B01	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GTTGCCTACTCTCATGTTGGTC TGATC	
5051	B02	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GGTTACGGTGCTCCGATC	
5052	B03	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTTGGTACTCTCTGATC	
5053	B04	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	CCGGGTACCTGTTC	
5054	B05	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GTTTGGTTCGGTCTGATC	
5055	B06	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GTTTACTACGGTTCTCCGCTGT TC	
5056	B07	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	CATGCTCATTCTCCGCTGATC	
5057	B08	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTTCTGCTTACTACCGGTTT	
5058	B09	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GGTCATGCTTCTCCGATC	
5059	B10	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTTCTGGTGGTTGGTCTCTGA TC	
5060	B11	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GTTGCTTGGTCTTCTTCTCTGA TC	30
5061	B12	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTGTTGCTGCTGCTTCTCTGA TC	
5062	C01	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTGGTTGGTGGGGTGTTCCTC TGATC	
5063	C02	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTTACGCTGCTTACCTGTTC	
5064	C03	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	CATGGTTCTCTGTTC	
5065	C04	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	***	
5066	C05	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GGTTGGCCGTACTCTGCTCTGT TC	
5067	C06	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTGGTTACTACCGCTCTCTGT TC	
5068	C07	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTTACCATCTCTGGTTCTGGTC TGATC	
5069	C08	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	CATGGTTACTCTGCTTCTCTGA TC	
5070	C09	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTGGTTACTACCGCTCTCTGT TC	
5071	C10	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GCTCCGGGTTGGGCTCTGTTC	40
5072	C11	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GGTCATTCTTCTCCGATC	
5073	C12	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GGTTGGCCGTCTCTGTTC	
5074	D01	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GTTCCGGGTTACCGGTTCCG ATC	
5075	D02	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	CATTACTACTCTCATCTGATC	
5076	D03	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GGTCCGGCTTCTTCTCTGATC	
5077	D04	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TCTGTTGGTTCTTCTTACTACCT GATC	
5078	D05	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	TACTACGGTCCGTGGGTTCTGA TC	
5079	D06	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GCTGCTTCTTGGGGTTACCCGT TC	
5080	D07	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	CATTGGTCTTACCCGATC	
5081	D08	TCCGTGTCCAGCGCT	TCGGCATCCAGCCTCTACTCT	GGTGGTTGGGGTCCGTTT	

【0123】

いくつかの態様では、可変ドメイン配列は、CDR領域の外側で少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%類似しており、CDR配列セットは、表1aまたは表3aに示されるアミノ酸配列に対して100%同一である。

【0124】

表3c-FZD4抗体のCDR重鎖核酸配列。表3cは、それぞれすべて記載順に、CDR H1配列

をSEQ ID NO: 346～357、261、350、358、354、359～361、346、362～364、364～365、260、366～378、373、363、および379～381として、CDR H2配列をSEQ ID NO: 346～350、382、352～354、383、356、367、261、350、358、354、359～361、346、362～364、364～365、260、366～370、363、372～373、384、376～378、373、363、および379～381として、CDR H3配列をSEQ ID NO: 385～399、393、および400～427として開示する。

(表3c) FZD4抗体のCDR核酸配列

クローン ID	ウェル ID	CDR H1	CDR H2	CDR H3
5038	A01	TCTATTTATTCCTTATTATG GCTATACTTAT	TCTATTTATTCCTTATTATGGCTATACTTAT	TCTTCTTTCTCTTGGGCTA TG
5039	A02	TCTATTTATTCCTTCTCTA GCTCTACTTAT	TCTATTTATTCCTTCTCTAGCTCTACTTAT	TCTTCTTTCTACTGGGCTT TG
5040	A03	TCTATTTATCCTTCTTCTA GCTATACTTAT	TCTATTTATCCTTCTTCTAGCTATACTTAT	TCTTGGTTCGGTTGGGGT ATT
5041	A04	TCTATTTATTCCTTCTCTA GCTATACTTCT	TCTATTTATTCCTTCTCTAGCTATACTTCT	TACTGGTTCCTTACGGTT ACGCTTCTTACCCGGCTTT T
5042	A05	TATATTTCTTCTTATTCTG GCTCTACTTAT	TATATTTCTTCTTATTCTGGCTCTACTTAT	CATCCGTGGTACGGTATG
5043	A06	CTCTATTCTTATTATATG	TCTATTTATTCCTTCTTATGGCTATACTTAT	TCTGCTTTCTACTGGGCTT TG
5044	A07	TATATTTCTTCTTATTATG GCTATACTTAT	TATATTTCTTCTTATTATGGCTATACTTAT	CCGGCTCCGGGCTATTGG GGTTTT
5045	A08	TCTATTTATCCTTCTTCTA GCTCTACTTAT	TCTATTTATCCTTCTTCTAGCTCTACTTAT	TCTTCTTTCTTCTGGGCTA TG
5046	A09	TCTATTTATTCCTTCTTCTG GCTATACTTAT	TCTATTTATTCCTTCTTCTGGCTATACTTAT	TCTGCTTTCTACTGGGCTA TG
5047	A10	CTCTCTTATTCCTTCTATG	TATATTTCTTCTTATTCTGGCTCTACTTCT	CATTTCTTCGCTATG
5048	A11	TCTATTTCTTCTTATTATG GCTCTACTTAT	TCTATTTCTTCTTATTATGGCTCTACTTAT	TCTTGGTGGGCTTGGGCT TTT
5049	A12	ATCTATTATTATTATATG	TCTATTTATTCCTTATTATGGCTCTACTTAT	TCTGCTTTCTGGTGGGCTT TG
5050	B01	TCTATTTATCCTTATTCTG GCTATACTTAT	TCTATTTATCCTTATTCTGGCTATACTTAT	TCTTCTTTCTTCTTCGCTAT G
5051	B02	TATATTTCTTCTTATTCTG GCTCTACTTAT	TATATTTCTTCTTATTCTGGCTCTACTTAT	CCGTACTACTGGTCTGGT GGTTTT
5052	B03	TATATTTCTCCTTATTATG GCTATACTTCT	TATATTTCTCCTTATTATGGCTATACTTCT	CATCCGTCTTCTTCTTGGT TCTCTTTCTGGTGGCTTG
5053	B04	TCTATTTATTCCTTCTTCTG GCTATACTTAT	TCTATTTATTCCTTCTTCTGGCTATACTTAT	TCTGCTTTCTACTGGGCTA TG
5054	B05	TCTATTTCTTCTTCTTCTG GCTATACTTAT	TCTATTTCTTCTTCTTCTGGCTATACTTAT	TCTGCTTTCTACTGGGCTT TT
5055	B06	TCTATTTATTCCTTATTCTA GCTCTACTTAT	TCTATTTATTCCTTATTCTAGCTCTACTTAT	TCTTCTTACGCTTGGGCTA TG
5056	B07	TCTATTTCTCCTTCTTCTA GCTATACTTAT	TCTATTTCTCCTTCTTCTAGCTATACTTAT	TCTTCTTTCTNCTGGGCTA TT
5057	B08	TCTATTTATTCCTTATTATG GCTATACTTAT	TCTATTTATTCCTTATTATGGCTATACTTAT	TCTCCGTGGGGTCTGGT TGGGCTGGTTTT
5058	B09	TATATTTCTCCTTATTATG GCTATACTTAT	TATATTTCTCCTTATTATGGCTATACTTAT	CCAGCTGTTTGGGTTGGT TTG
5059	B10	TCTATTTCTCCTTATTCTA GCTCTACTTAT	TCTATTTCTCCTTATTCTAGCTCTACTTAT	TCTTGGGTTTCTGGGCTT TG
5060	B11	TCTATTTATTCCTTCTTATG GCTCTACTTAT	TCTATTTATTCCTTCTTATGGCTCTACTTAT	TCTTGGGTTTACTGGNTAT G
5061	B12	TCTATTTATTCCTTCTTATG GCTCTACTTAT	TCTATTTATTCCTTCTTATGGCTCTACTTAT	TCTTGGGTTTACTGGGCTT TG
5062	C01	TCTATTTATTCCTTCTTCTA GCTATACTTAT	TCTATTTATTCCTTCTTCTAGCTATACTTAT	TCTTCTTACGCTTGGGCTA TT
5063	C02	TCTATTTATCCTTCTTCTG GCTATACTTAT	TCTATTTATCCTTCTTCTGGCTATACTTAT	TCTTCTTTCTACTGGGCTA TG
5064	C03	TCTATTTATCCTTATTCTG GCTCTACTTAT	TCTATTTATCCTTATTCTGGCTCTACTTAT	CATGGTGCTTCTTTCGGTT CTGGTGCTCCGGCTTTT
5065	C04	TCTATTTATTCCTTATTATG GCTCTACTTAT	TCTATTTATTCCTTATTATGGCTCTACTTAT	TCTTGTTTTTCTGGGCTA TG
5066	C05	TCTATTTATCCTTCTTATG GCTCTACTTAT	TCTATTTATCCTTCTTATGGCTCTACTTAT	TGGGCTTCTTCGGTTTG
5067	C06	TATATTTCTTCTTATTCTA GCTATACTTAT	TATATTTCTTCTTATTCTAGCTATACTTAT	TCTTCTTTCTACTTCGCTA TG
5068	C07	TCTATTTATTCCTTATTATA	TCTATTTATTCCTTATTATAGCTCTACTTAT	TCTGCTTTCTCTTGGGCTA

10

20

30

40

		GCTCTACTTAT		TT
5069	C08	ATCTCTTATTATTATG	TCTATTTCTCCTTATTCTAGCTCTACTTAT	TCTGGTTTCTACTGGGCTT
5070	C09	TATATTTCTTCTTCTTATG	TATATTTCTTCTTCTTATGGCTATACTTCT	CGTCTGTGTTGGTTACGCT
5071	C10	GCTATACTTCT		GCTTTT
		TCTATTTCTCCTTATTCTA	TCTATTTCTCCTTATTCTAGCTATACTTAT	TCITGGGTTGGTTGGGGT
		GCTATACTTAT		TTG
5072	C11	CTCTATTCTTATTCTATC	TATATTTCTCCTTATTCTGGCTATACTTCT	TCTTCTGTGGTTACGTTG
				CTATG
5073	C12	ATCTCTTATTATTATATC	***	TCITGGGTTTACTGGGCTT
				TT
5074	D01	TCTATTTCTCCTTATTATG	TCTATTTCTCCTTATTATGGCTATACTTCT	TACTACTACTCTTCTTCTG
		GCTATACTTCT		TTTACTTCTGGTACGCTGC
				TTTG
5075	D02	TNTATTTCTCCTTCTTATA	TNTATTTCTCCTTCTTATAGCTCTACTTAT	TCITCTTCTTCTGGGCTA
		GCTCTACTTAT		TT
5076	D03	TCTATTTCTTCTTCTTATA	TCTATTTCTTCTTCTTATAGCTCTACTTAT	TCITGGGTTTACTGGGCTA
		GCTCTACTTAT		TT
5077	D04	TCTATTTCTCCTTATTCTA	TCTATTTCTCCTTATTCTAGCTATACTTAT	TCITGGGTTGGTTGGGGT
		GCTATACTTAT		ATT
5078	D05	TCTATTTCTCCTTATTCTA	TCTATTTCTCCTTATTCTAGCTCTACTTAT	TCITCTGTTTACTGGGCTT
		GCTCTACTTAT		TG
5079	D06	TCTATTTATCCTTATTCTG	TCTATTTATCCTTATTCTGGCTCTACTTCT	TGGGGTGGTTGGGGTTCT
		GCTCTACTTCT		GGTGGTACTTCTACGCT
				GCTTTG
5080	D07	TCTATTTCTTCTTATTATA	TCTATTTCTTCTTATTATAGCTCTACTTCT	TTCTGGTACCGGGTATG
		GCTCTACTTCT		
5081	D08	TCTATTTATCTTATTCTG	TCTATTTATCTTATTCTGGCTATACTTAT	TCITCTTTGCGTTGGGCTT
		GCTATACTTAT		TT

【 0 1 2 5 】

別の態様では、本明細書において記載されるCDR配列セットを含む抗体と結合について競合する競合抗体も提供される。例えば、競合抗体は、一態様では、FZD4 CDRへの、CDR配列セットを含む抗体の結合を、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%減少させる。

【 0 1 2 6 】

記載されたいくつかの抗体は、複数のFZDに結合することができた。したがって、いくつかの態様では、抗体は、FZD4に特異的に結合し、FZD 1、2、5、7、8、および9のうちの1つまたは複数にさらに特異的に結合する抗体である。例えば、抗体は、CDR配列が抗体5016、5018~5023、5025、6495、6496、5039、5045、5048、5054、5056、5057、5067、および5073~5076から選択される抗体のCDR配列セットである抗体であり得る。

【 0 1 2 7 】

記載されたいくつかの抗体は、FZD4に優先的に結合した。一態様では、抗体は、FZD1、2、5、7、8、9、または10のいずれかと比較して、Frizzled 4 (FZD4) に優先的に結合する抗体である。一態様では、抗体は、FZD1、FZD5、FZD7、およびFZD9と比較して、FZD4に優先的に結合する。一局面では、抗体は、抗体6497のCDR配列セットを含む。別の態様では、抗体は、FZD1およびFZD7と比較して、FZD4に優先的に結合する。一局面では、抗体は、5028、5035、5039、5073から選択される抗体のCDR配列セットを含む。さらに別の態様では、抗体は、FZD9と比較してFZD4に優先的に結合する。一局面では、抗体は、抗体5029のCDR配列セットを含む。さらに別の態様では、抗体は、FZD1、FZD2、およびFZD7と比較して、FZD4に優先的に結合する。一局面では、抗体は、5031、6498、5054、または5075から選択される抗体のCDR配列セットを含む。さらに別の態様では、抗体は、FZD1、FZD2、FZD5、およびFZD7と比較して、FZD4に優先的に結合する。一局面では、抗体は、抗体5034のCDR配列セットを含む。さらに別の態様では、抗体は、FZD1と比較してFZD4に優先的に結合する。一局面では、抗体は、抗体5045または5048のCDR配列セットを含む。さらに別の態様では、抗体は、FZD1、FZD7、およびFZD9と比較して、FZD4に優先的に結合する。一局面では、抗体は、抗体5056のCDR配列セットを含む。さらに別の態様では、抗体は、FZD9およびFZD10と比較して、FZD4に優先的に結合する。一局面では、抗体は、抗体5057のCDR配列セットを含む。さらに別の態様では、抗体は、FZD1およびFZD2と比較して、FZD4に優先的に結合する。一局面では、抗体は、抗体5067のCDR配列セットを含む。

【0128】

特定の抗体、例えば、抗体5018、5019、5022、6494、および5025からのCDRセットを有するものは、FZD4と比較して他のFZDタンパク質に優先的に結合する。（例えば、図5を参照。）。

【0129】

別の態様では、抗体は、抗体5022、5031、6497、6498、および6500から選択される抗体のCDR配列セットであるCDR配列を含む。

【0130】

本明細書において示すように、本明細書において記載される抗体は、FZD4に対して高い親和性を有する。例えば、抗体は、一態様では、約0.2nM～約15.3nMの、表面プラズモン共鳴によって測定される結合親和性を有する。

10

【0131】

抗体は、本明細書において記載されるヒト化抗体またはキメラ抗体であり得る。

【0132】

いくつかの態様では、抗体は、例えば、重鎖および軽鎖またはその一部と一緒に融合することによって得ることができる一本鎖抗体である。

【0133】

いくつかの態様では、抗体は、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディ、およびそれらの多量体から選択される抗体結合断片である。

20

【0134】

いくつかの他の態様では、抗体は結合断片Fabである。いくつかの態様では、結合断片が好ましい。

【0135】

他の態様では、多価抗体、またはIg部分を含む抗体を有することが好ましい場合がある。

【0136】

実施例で示されるように、本開示のFab断片は、IgGなどの免疫グロブリン(Ig)定常領域と組み合わせることができる。一態様では、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である。

30

【0137】

B. 検出可能に標識された抗体

検出可能な標識には、本明細書において記載される抗体に付加または導入され得、直接的または間接的に検出可能なシグナルを生成することができるペプチド配列(myctag、HAtag、V5tag、またはNEtagなど)、蛍光タンパク質または発光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質またはルシフェラーゼ)が含まれ得る。例えば、標識は、放射線不透過性の陽電子放出放射性核種(例えば、PETイメージングに使用するために)、もしくは放射性同位体、例えば、³H、¹³N、¹⁴C、¹⁸F、³²P、³⁵S、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I；蛍光(フルオロフォア)化合物もしくは化学発光(発色団)化合物、例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン；酵素、例えば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ；イメージング剤；または金属イオンであってよい。

40

【0138】

C. 抗体-薬物コンジュゲート

さらなる局面は、本明細書において記載される抗体と、検出可能な標識または細胞傷害剤とを含むイムノコンジュゲートを含む。

【0139】

化学療法(抗癌)剤は、癌増殖を減少させ、癌細胞複製を妨害し、癌細胞を直接または間接的に死滅させ、転移を減少させ、腫瘍血液供給を減少させることなどができる任意の作用物質であり得る。したがって、化学療法剤には、細胞傷害剤が含まれる。細胞傷害剤

50

には、限定されることなく、サポリン、タキサン、ビンカアルカロイド、アントラサイクリン、および白金系薬剤が含まれる。化学療法剤のクラスには、限定されることなく、アルキル化剤、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキセート）、植物アルカロイド（例えば、ビンクリスチン）、および抗腫瘍抗生物質、例えば、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン）、ならびに特定のクラスに分類されない種々雑多な薬物、例えば、ヒドロキシ尿素が含まれる。シスプラチンおよびオキサリプラチンによって例示される白金系薬物は、化学療法薬の主要なクラスである。これらの薬物は、DNAに結合し、複製を妨害する。タキソールによって例示されるタキサンは、化学療法薬の別の主要なクラスである。これらの化合物は、細胞骨格および紡錘体の形成を妨害して細胞分裂を阻害し、それによって、急速に分裂する癌細胞の増殖を防止することによって作用する。他の化学療法薬には、ホルモン療法が含まれる。化学療法薬には、チューブリンの集合または重合を阻害する薬剤、例えば、メイタンシン、メルタンシン、およびアウリスタチンも含まれる。化学療法剤には、カリケアマイシンなどのDNA損傷剤も含まれる。

10

【0140】

化学療法剤には、メイタンシノイド、アウリスタチン、ドラスタチン、チューブリシン、クリプトフィシン、ピロロベンゾジアセピン（PBD）二量体、インドリノベンゾジアセピン二量体、 β -アマニチン、トリコテン、SN-38、デュオカルマイシン、CC1065、カリケアマイシン、エンジン抗生物質、タキサン、ドキソルビシン誘導体、アントラサイクリン、およびそれらの立体異性体、アザノフィド、アイソスター、類似体、または誘導体が含まれ得る。

20

【0141】

IV. 核酸

さらなる局面は、本明細書において記載される核酸分子またはポリヌクレオチド、組換え核酸分子、発現構築物およびベクターを含む。

【0142】

A. 核酸分子

さらなる局面は、表1b、1c、3b、および3cに記載の核酸分子、および例えばストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で上記配列のうちの1つにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。CDRおよび可変ドメイン核酸配列は、例えば、発現構築物を調製するために使用することができる。

30

【0143】

B. 発現構築物およびベクター

核酸分子は、タンパク質の発現を確実にする適切な発現構築物または発現ベクターに公知の方法で組み込まれ得る。発現構築物は、本開示の抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドと機能的に連結された発現制御配列、例えばプロモーターを含むことができる。可能な発現ベクターには、限定されることなく、コスミド、プラスミド、または改変ウイルス（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）が含まれる。ベクターは、使用される宿主細胞と適合性であるべきである。発現ベクターは「宿主細胞の形質転換に適しており」、これは、発現ベクターが本明細書において記載されるエピトープまたは抗体に対応するペプチドをコードする核酸分子を含むことを意味する。

40

【0144】

一態様では、ベクターは、例えば、遺伝子療法によって一本鎖抗体を発現させるのに適している。一態様では、ベクターは、IRESを含み、軽鎖可変領域および重鎖可変領域の発現を可能にする。そのようなベクターは、インピボで抗体を送達するために使用することができる。

【0145】

好適な調節配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物、または昆虫の遺伝子を含む様々な供給源に由来し得る。

【0146】

50

そのような調節配列の例には、転写プロモーターおよびエンハンサーまたはRNAポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含むリボソーム結合配列が挙げられる。さらに、選択される宿主細胞および使用されるベクターに応じて、複製起点、追加のDNA制限部位、エンハンサー、および転写の誘導能を付与する配列などの他の配列を、発現ベクターに組み込んでよい。

【0147】

一態様では、調節配列は、神経組織および/または神経細胞内の発現を導くかまたは増加させる。

【0148】

ベクターは、本明細書において記載される抗体を産生するのに適したベクターを含む任意のベクターであり得る。

【0149】

一態様では、ベクターはウイルスベクターである。

【0150】

組換え発現ベクターはまた、本明細書において記載される抗体またはエピトープペプチドを発現するためのベクターによって形質転換、感染、またはトランスフェクトされた宿主細胞の選択を容易にするマーカー遺伝子を含み得る。

【0151】

組換え発現ベクターはまた、組換えペプチドの発現または安定性の増加、組換えペプチドの溶解度の増加をもたらす融合部分（すなわち、「融合タンパク質」）をコードする発現カセットを含み、例えば、本明細書において記載されるタグおよび標識を含めて、親和性精製でリガンドとして作用することによって標的組換えペプチドの精製を補助してもよい。さらに、タンパク質分解切断部位を標的組換えタンパク質に付加して、融合タンパク質の精製後に融合部分から組換えタンパク質を分離することができる。典型的な融合発現ベクターには、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAをそれぞれ組換えタンパク質に融合するpGEX（Amrad Corp., Melbourne, Australia）、pMAL（New England Biolabs, Beverly, MA）およびpRIT5（Pharmacia, Piscataway, NJ）が含まれる。

【0152】

インビトロおよびインビボの両方で遺伝子に移入するための系には、ウイルス、最も顕著には単純ヘルペスウイルス（Herpes Simplex Virus）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、およびレンチウイルスを含むレトロウイルスに基づくベクターが含まれる。遺伝子送達のための代替的な手法には、裸のプラスミドDNA、およびリボソーム-DNA複合体の使用が含まれる。

【0153】

一局面では、本開示は、抗体フレームワークと、本明細書において記載されるCDR配列セットとを含む核酸分子を合成する工程を含む、本明細書において記載される抗体を作製するための方法を含む。

【0154】

V. 組換え細胞

さらなる局面は、本明細書において記載される抗体を発現する組換え宿主細胞である。

【0155】

本明細書において記載される抗体は、抗体配列をコードする核酸の組換え発現によって作製することができる。

【0156】

本明細書において開示される抗体は、免疫グロブリンポリペプチドをコードする核酸構築物を発現するように操作された細胞を培養することによって作製することができる。

【0157】

組換え宿主細胞は、ポリペプチドの産生に適した、例えば、抗体の産生に適した任意の細胞を使用して生成することができる。例えば、核酸（例えばベクター）を細胞に導入す

10

20

30

40

50

るために、使用されるベクターに応じて、細胞をトランスフェクトするか、形質転換するか、または感染させてもよい。

【0158】

好適な宿主細胞には、多種多様な原核宿主細胞および真核宿主細胞が含まれる。例えば、本明細書において記載されるタンパク質は、細菌細胞、例えば大腸菌 (*E. coli*)、昆虫細胞 (バキュロウイルスを使用)、酵母細胞、または哺乳動物細胞内で発現され得る。

【0159】

一態様では、細胞は、酵母、植物、虫、昆虫、鳥類、魚類、爬虫類、および哺乳動物細胞から選択される真核細胞である。

【0160】

別の態様では、哺乳動物細胞は、CHO細胞、骨髓腫細胞、脾臓細胞、またはハイブリドーマ細胞である。

【0161】

抗体を発現させるのに適した酵母宿主細胞および真菌宿主細胞には、限定されることなく、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ピキア (*Pichia*) 属、またはクルイベロマイセス属 (*Kluyveromyces*)、およびアスペルギルス (*Aspergillus*) 属の様々な種が含まれる。酵母 *S. セレビシエ* における発現のためのベクターの例には、pYepSec1、pMFa、pJRY88、および pYES2 (Invitrogen Corporation、San Diego, CA) が挙げられる。酵母および真菌の形質転換のためのプロトコルは、当業者に周知である。

【0162】

好適であり得る哺乳動物細胞には、とりわけ、COS細胞 (例えば、ATCC番号CRL 1650または1651)、BHK細胞 (例えば、ATCC番号CRL 6281)、CHO細胞 (ATCC番号CCL 61)、HeLa細胞 (例えば、ATCC番号CCL 2)、293細胞 (ATCC番号1573)、およびNS-1細胞が含まれる。哺乳動物細胞内の発現を導くための好適な発現ベクターには、一般に、プロモーター (例えば、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40などのウイルス材料に由来する)、ならびに他の転写制御配列および翻訳制御配列が含まれる。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8およびpMT2PCが挙げられる。

【0163】

VI. 薬学的組成物

さらなる局面は、任意で好適な希釈剤、例えば薬学的に許容される担体とともに、本明細書において記載される抗体、イムノコンジュゲート、核酸分子、ベクター、または組換え細胞を含む、組成物である。

【0164】

組成物は、例えば、1つまたは複数の抗体またはイムノコンジュゲートを含むことができる。

【0165】

抗体および/または細胞を含むポリペプチドに適した希釈剤には、限定されることなく、生理食塩水、pH緩衝液、およびグリセロール溶液、またはポリペプチドおよび/または細胞を凍結するのに適した他の溶液が含まれる。

【0166】

核酸に適した希釈剤には、限定されることなく、水、生理食塩水、およびエタノールが含まれる。

【0167】

一態様では、組成物は、本明細書において開示される抗体、核酸またはベクターのいずれかを含み、任意で希釈剤または担体などの薬学的に許容されるビヒクルを含む薬学的組成物である。

【0168】

本明細書において記載される組成物は、有効量の活性物質を薬学的に許容されるビヒク

10

20

30

40

50

ルと混合して組み合わせるように、対象に投与することができる薬学的に許容される組成物を調製するためのそれ自体公知の方法によって調製することができる。

【0169】

薬学的組成物には、限定されることなく、組成物を意図されるレシピエントの組織または血液と実質的に適合性にする酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、および溶質をさらに含有し得る凍結乾燥粉末、または水性もしくは非水性の滅菌注射用溶液もしくは懸濁液が含まれる。そのような組成物中に存在し得る他の成分には、例えば、水、界面活性剤（Tweenなど）、アルコール、ポリオール、グリセリン、および植物油が含まれる。即時注射溶液および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、錠剤、または濃縮された溶液もしくは懸濁液から調製され得る。組成物は、例えば、限定されることなく、患者への投与前に滅菌水または生理食塩水を用いて再構成される凍結乾燥粉末として供給され得る。

10

【0170】

薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含み得る。好適な薬学的に許容される担体には、薬学的組成物の生物学的活性の効果を妨げない、本質的に化学的に不活性で非毒性の組成物が含まれる。好適な薬学的担体の例には、限定されることなく、水、生理食塩水、グリセロール溶液、エタノール、N-(1(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル)N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)、ジオレシルホスホチジル-エタノールアミン(DOPE)、およびリポソームが挙げられる。そのような組成物は、患者への直接投与のための形態を提供するように、好適な量の担体とともに治療有効量の化合物を含有すべきである。

20

【0171】

組成物は、限定されることなく、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するものなどの遊離アミノ基によって形成されたもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノールに由来するものなどの遊離カルボキシル基によって形成されたものを含む薬学的に許容される塩の形態であり得る。

【0172】

一態様では、組成物は、本明細書において記載される抗体を含む。別の態様では、組成物は、本明細書において記載される抗体と、希釈剤とを含む。一態様では、組成物は滅菌組成物である。

30

【0173】

さらなる局面は、FZDタンパク質、例えば、FZD4に結合した、本明細書において記載される抗体を含む抗体複合体を含む。複合体は、溶液中にあってよく、または任意でインビトロで組織内に含まれていてもよい。

【0174】

本明細書において記載される試薬を作製および使用する方法も提供される。

【0175】

VI. 投与方法および使用方法

本発明の抗FZD抗体は、Wntシグナル伝達を受ける細胞に治療用組成物をインビボで効率的に送達することができる。いくつかの態様では、治療方法または使用法は、有効量の治療用抗FZDコンジュゲート、例えば、治療剤に付着した抗FZD抗体を、個体に投与する工程またはその使用を含む。いくつかの態様では、個体は、癌と診断されている。いくつかの態様では、個体は、癌療法、例えば、手術、放射線療法、または化学療法を受けているか、または受けたことがある。いくつかの態様では、個体は診断されているが、癌は寛解状態にある。

40

【0176】

いくつかの態様では、抗FZDコンジュゲートはリポソームを含む。いくつかの態様では、本方法は、癌の進行について個体をモニタリングする工程をさらに含む。いくつかの態様では、各投与のための抗LRPコンジュゲートの用量は、例えば、個体が治療に十分にตอบสนองしておらず、さらに高用量の化学療法薬が投与される場合、個体の治療の進行に基づい

50

て決定される。

【0177】

いくつかの態様では、本発明は、抗体または抗体標的指向性組成物と、生理学的に（すなわち、薬学的に）許容される担体とを含むことができる。用語「担体」は、診断剤または治療剤のための希釈剤またはビヒクルとして使用される典型的には不活性な物質を指す。該用語はまた、組成物に凝集性を付与する典型的には不活性な物質を包含する。生理学的に許容される担体は、液体、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝液、通常の緩衝食塩水（135～150mM NaCl）、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、安定性を高めるための糖タンパク質（例えば、アルブミン、リポタンパク質、グロブリンなど）などであり得る。生理学的に許容される担体は、投与される特定の組成物によって、および組成物を投与するために使用される特定の方法によって部分的に決定されるため、本発明の薬学的組成物の多種多様な好適な製剤が存在する（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989を参照）。

10

【0178】

本発明の組成物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌されてもよく、または滅菌条件下で生成されてもよい。水溶液は、使用のために包装され得るか、または無菌条件下で濾過され、凍結乾燥され得、凍結乾燥された調製物は、投与前に滅菌水溶液と組み合わせられる。組成物は、生理学的条件に近似するために必要な薬学的に許容される補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、等張性調整剤、湿潤剤など、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、およびトリエタノールアミンオレエートを含むことができる。組成物を安定化するための糖、例えば、凍結乾燥抗体組成物用の安定化剤も含めることができる。

20

【0179】

剤形は、患者への粘膜投与（例えば、鼻、舌下、膣、頬または直腸）、非経口投与（例えば、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、または動脈内注射、ボーラスまたは注入のいずれか）、経口投与、または経皮投与のために調製することができる。剤形の例には、限定されることなく、分散液；坐剤；軟膏；パップ剤（湿布）；ペースト；粉末；包帯剤；クリーム；絆創膏；溶液；パッチ；エアロゾル（例えば、鼻スプレーまたは吸入器）；ゲル；懸濁液（例えば、水性液体懸濁液または非水性液体懸濁液、水中油型エマルジョンまたは油中水型液体エマルジョン）、溶液、およびエリキシル剤を含む、患者への経口投与または粘膜投与に適した液体剤形；患者への非経口投与に適した液体剤形；ならびに患者への非経口投与に適した液体剤形を提供するために再構成され得る滅菌固体（例えば、結晶性固体または非晶質固体）が挙げられる。

30

【0180】

注射可能な（例えば、静脈内）組成物は、水性担体などの許容される担体に懸濁された抗体または抗体標的指向性組成物の溶液を含むことができる。例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.9%等張生理食塩水、0.3%グリシン、5%デキストロースなどの様々な水性担体のいずれかが使用され得、安定性を高めるための糖タンパク質、例えば、アルブミン、リポタンパク質、グロブリンなどを含み得る。多くの場合、通常の緩衝食塩水（135～150mM NaCl）が使用される。組成物は、生理学的条件に近似するための薬学的に許容される補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、等張性調整剤、湿潤剤、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエートなどを含むことができる。いくつかの態様では、抗体標的指向性組成物は、静脈内投与用のキットに製剤化することができる。

40

【0181】

例えば、関節腔内（関節内）経路、静脈内経路、筋肉内経路、腫瘍内経路、皮内経路、腹腔内経路、および皮下経路等による非経口投与に適した製剤には、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、および製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質を含むことができる水性および非水性の等張性滅菌注射溶液、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤

50

、安定化剤、および防腐剤を含むことができる水性および非水性の滅菌懸濁液が含まれる。注射溶液および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調製することもできる。本発明の実施では、組成物は、例えば、静脈内注入によって、局所的に、腹腔内に、膀胱内に、または髄腔内に投与することができる。非経口投与および静脈内投与が好ましい投与方法である。標的指向性組成物の製剤は、アンプルおよびバイアルなどの単位用量または複数用量の密封容器で提供することができる。

【0182】

選択される標的指向性送達組成物は、単独で、または他の好適な成分と組み合わせて、吸入によって投与されるエアロゾル製剤（「噴霧」）にすることができる。エアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、および窒素などの加圧された許容可能な噴射剤に入れることができる。

10

【0183】

薬学的調製物は、単位剤形で包装または調製することができる。そのような形態では、調製物は、例えば、治療剤の用量または抗体の濃度に従って、適切な量の活性成分を含有する単位用量に細分される。単位剤形は包装された調製物であってもよく、包装物は個別の量の調製物を含む。組成物は、所望であれば、他の適合性治療剤も含有することができる。

【0184】

抗体（または抗体標的指向性組成物）は、限定されることなく、静脈内経路、皮下経路、筋肉内経路、または腹腔内経路を含む任意の好適な経路を介した注射または注入によって投与することができる、または使用のためであり得る。薬学的組成物の投与の例には、4で注射用の滅菌等張水性生理食塩水に10mg/mlで抗体を保存すること、および患者に投与する前に注射用の100mlまたは200mlの0.9%塩化ナトリウムのいずれかにそれを希釈することが挙げられる。抗体は、0.2~10mg/kgの用量で1時間にわたって静脈内注入によって投与される。他の態様では、抗体は、15分~2時間の期間にわたる静脈内注入によって投与される。さらに他の態様では、投与手順は皮下ボーラス注射によるものである。

20

【0185】

抗体の用量は、患者に有効な治療を提供するために選択され、患者1例当たり0.1mg/kg体重未満~約25mg/kg体重の範囲または1mg~2gの範囲である。場合によっては、用量は、患者1例当たり1~100mg/kgまたは約50mg~約8000mgの範囲である。抗体の薬物動態（例えば、循環中の抗体の半減期）、および薬力学的応答（例えば、抗体の治療効果の持続時間）に応じて、1日1回~3ヶ月に1回の範囲内であり得る適切な頻度で、用量を反復してもよい。いくつかの態様では、約7日間~約25日間のインビボ半減期と抗体投与とが、週1回~3ヶ月に1回繰り返される。

30

【0186】

投与または使用は周期的であり得る。用量は、投与経路に応じて、例えば、1、3、5、7、10、14、21、もしくは28日ごと、またはそれより長い期間ごとに1回（例えば、2、3、4、または6ヶ月ごとに1回）投与することができる。場合によっては、投与は、1日2回または3回など、さらに頻繁である。当業者によって認識されるように、患者をモニタリングして、治療の進行およびいずれかの有害な副作用に応じて、投与量および投与頻度を調整することができる。

40

【0187】

したがって、いくつかの態様では、追加の投与は患者の進行に依存し、例えば、患者は投与と投与の間にモニタリングされる。例えば、最初の投与または一連の投与後、患者は、腫瘍増殖速度、再発（例えば、術後患者の場合）、または脱力感、疼痛、悪心などの一般的な疾患関連症状についてモニタリングされ得る。

【0188】

癌を治療するための治療的使用では、抗体標的指向性組成物（例えば、治療剤および/または診断剤を含む）は、1日約0.001mg/kg~約1000mg/kgの初期投与量で投与され、経時的に調整され得る。約0.01mg/kg~約500mg/kg、または約0.1mg/kg~約200mg

50

/kg、または約1mg/kg～約100mg/kg、または約10mg/kg～約50mg/kgの1日用量範囲を使用することができる。投与量は、患者の要件、治療される病状の重症度、および使用される標的指向性組成物に応じて変化する。例えば、投与量は、特定の患者では、診断された癌の種類および病期を考慮して経験的に決定され得る。本発明の文脈では、患者に投与される用量は、患者に対する有益な治療応答に経時的に影響を及ぼすのに十分であるべきである。用量のサイズはまた、当業者によって認識されるように、特定の患者に対する特定の標的指向性組成物の投与に伴ういずれかの有害な副作用の存在、性質、および程度によって決定される。

【0189】

VIII. キット

別の局面は、本明細書において含まれる抗体、イムノコンジュゲート、核酸分子、ベクター、組換え細胞、および/または組成物のいずれかを含むキットまたはパッケージである。抗体、イムノコンジュゲート、核酸分子、ベクター、組換え細胞、および/または組成物は、滅菌バイアルまたは他のハウジングなどのバイアルに含めることができる。本明細書において使用される場合、用語「キット」は、一緒に使用することを意図した物品の集合を指す。キットは、任意で、参照剤および/またはその使用説明書を含むことができる。キットは、本明細書において開示される組成物を含むバイアルなどの容器を保持するように適合された輸送容器をさらに含むことができる。

【0190】

IX. 抗体を使用する方法

本明細書において記載される抗体は、いくつかのインビトロ法およびインビボ法で使用することができる。

【0191】

A. FZDの発現を検出する方法

本明細書において示されるように、抗体は、FZD発現を検出するために使用することができる。

【0192】

したがって、本開示は、一局面では、抗体：FZD複合体の形成を許容する条件下で、1つまたは複数の細胞を含む試料と、本明細書において記載される1つまたは複数の抗体またはイムノコンジュゲートとを接触させる工程、および任意の抗体複合体の存在を検出する工程を含む、FZD発現を検出する方法を提供する。典型的には、抗体は、検出可能な標識に結合した抗体を含むイムノコンジュゲートの一部である。

【0193】

試料は、生細胞または細胞抽出物を含むことができる。抗体：FZD複合体は、イムノアッセイ、例えば、免疫蛍光、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、ELISA、SPR、および免疫沈降、続いてSDS-PAGE免疫細胞化学によって検出することができる。いくつかの態様では、検出は免疫蛍光によるものである。いくつかの態様では、検出はフローサイトメトリーによるものである。

【0194】

本明細書において示されるように、同定されたいくつかの抗体は、FZD4を優先的に認識する。したがって、方法がFZD4発現を検出するためのものである態様では、抗体またはイムノコンジュゲートは、5017、5027、5030、6499、5038、5040～5044、5046、5047、5049～5053、5055、5058～5064、5066、5068～5072、および5077～5081から選択される抗体に対応するCDR配列セットを含む。

【0195】

B. FZDへのWNT結合を阻害する方法

本明細書において開示される抗体は、Frizzled受容体、特にFZD4へのWntの結合を阻害する。理論によって制限されることを望むものではないが、FZDタンパク質へのWnt結合の阻害は、FZDが開始に何らかの役割を果たすシグナル伝達に影響を与える。例えば、FZD受容体に結合する抗体は、 β -カテニンリン酸化のFZD促進を阻害する。リン酸化され

10

20

30

40

50

ていない -カテニンは、細胞内での分解を回避し、蓄積する。 -カテニンの蓄積は悪性腫瘍に関連する。

【0196】

FZDを介したWntリガンドシグナル伝達を低減または阻害することが望ましい場合がある。したがって、別の局面は、1つまたは複数のFZDポリペプチドを発現する1つまたは複数の細胞と、本明細書において記載される抗体またはイムノコンジュゲートの有効量とを接触させる工程を含む、FZDへのWntリガンド結合またはWnt誘導性転写活性を阻害する方法である。

【0197】

一態様では、抗体またはイムノコンジュゲートは、本明細書において記載されるクローン、例えば、5014、5017~5023、5027~5031、5034、5036、5037、6496、6498、6499および6500、5035、6495、および5025から選択される抗体に対応するCDR配列セット（完全な軽鎖または重鎖）を含む。

10

【0198】

一態様では、抗体またはイムノコンジュゲートは、本明細書において記載されるクローン、例えば、5014、5018~5023、5025、5036、5037、6495、5027~5031、および6497~6499から選択される抗体に対応するCDR配列セット（完全な軽鎖または重鎖）を含む。

【0199】

接触は、例えば、抗体またはイムノコンジュゲートを対象に投与することによってインビボで行うことができる。そのような阻害は、特にwntシグナル伝達が癌細胞内のように調節不全である場合に望ましい場合がある。

20

【0200】

C. 癌を治療する方法

癌を治療する方法は、その必要がある対象に、FZDに結合する本開示の抗体を含む薬学的組成物を投与する工程を含む。その必要がある対象は、癌に罹患しているか、または癌の再発などの癌のリスクがある対象、例えば人であり得る。

【0201】

理論によって制限されることを望むものではないが、そのような療法は、古典的Wnt経路の活性化を阻害することによって、例えば、FZDへのWnt結合を阻害することによって、Wnt誘導性転写活性を阻害することによって、disheveledの活性化を阻害することによって、 -カテニン分解複合体の阻害を阻害することによって、および -カテニンの蓄積を促進することによって機能し得る。

30

【0202】

本開示は、別の局面では、その必要がある対象に、少なくとも1つのアッセイにおいてFZD 1、2、4、5、7、8、および9に特異的に結合し、少なくとも1つのアッセイにおいてWnt誘導性シグナル伝達を阻害する抗体またはイムノコンジュゲートの有効量を投与する工程を含む、癌を治療するための方法を含む。本開示はまた、少なくとも1つのアッセイにおいてFZD 1、2、4、5、7、8、および9に特異的に結合し、かつ癌の治療に使用するための少なくとも1つのアッセイにおいてWnt誘導性シグナル伝達を阻害する、抗体またはイムノコンジュゲートの有効量を含む。本開示は、少なくとも1つのアッセイにおいてFZD 1、2、4、5、7、8、および9に特異的に結合し、かつ癌の治療に使用するための少なくとも1つのアッセイにおいてWnt誘導性シグナル伝達を阻害する、抗体またはイムノコンジュゲートの有効量の使用を提供する。本開示はまた、少なくとも1つのアッセイにおいてFZD 1、2、4、5、7、8、および9に特異的に結合し、かつ癌を治療するための医薬品の製造における少なくとも1つのアッセイにおいてWnt誘導性シグナル伝達を阻害する、抗体またはイムノコンジュゲートの有効量の使用を提供する。

40

【0203】

一態様では、抗体またはイムノコンジュゲート、例えば抗体-薬物コンジュゲートは、薬学的組成物に含まれる。

50

【0204】

一態様では、癌は、結腸癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、膵癌、胃癌、肝癌、副腎皮質癌、および骨芽細胞腫瘍から選択され、任意で、癌は膵癌である。一態様では、抗体またはイムノコンジュゲートは、5014、5017～5023、5025、5035～5037、6495、および6500から選択される抗体に対応するCDR配列セット（完全な軽鎖または重鎖）を含む。

【0205】

本明細書において示されるように、抗体はまた、癌細胞増殖を阻害することができ、したがって、FZDを発現する1つまたは複数の癌細胞と、少なくとも1つのアッセイにおいてFZD 1、2、4、5、7、8、および9に特異的に結合しかつ少なくとも1つのアッセイにおいてWnt3a誘導性シグナル伝達を阻害する抗体またはイムノコンジュゲートの有効量とを接触させる工程を含む、癌細胞増殖を阻害するための方法も提供される。

10

【0206】

一態様では、抗体またはイムノコンジュゲートは、本明細書において記載される抗体またはイムノコンジュゲート、例えば、5014、5017～5023、5025、5035～5037、6495、および6500から選択される抗体に対応するCDR配列セット（完全な軽鎖または重鎖）を含む抗体またはイムノコンジュゲートである。

【0207】

一態様では、抗体は、本明細書において記載される可変領域配列、5014、5017～5023、5025、5035～5037、6495、および6500から選択される抗体に対応するCDR配列セット（完全な軽鎖または重鎖）を含む。

20

【0208】

一態様では、癌は、急性骨髄性白血病、前立腺癌、神経膠芽腫、膀胱癌、および子宮頸癌から選択される。

【0209】

別の態様では、癌細胞は、結腸癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、膵癌、胃癌、肝癌、副腎皮質癌、および骨芽細胞腫瘍の癌細胞から選択される。

【0210】

別の態様では、癌細胞は膵癌細胞である。一態様では、抗体またはイムノコンジュゲートは、5019および5020から選択される抗体に対応するCDR配列セット（完全な軽鎖または重鎖）を含む。

30

【0211】

また、抗体5020は、RNF43変異癌を治療するのに有効であることが実証されている。したがって、一態様では、癌細胞は、RNF43遺伝子に変異を含むことが分かっているかまたは決定されており、かつ使用される抗体またはイムノコンジュゲートは、抗体5020に対応するCDRのセットを含む。

【0212】

一態様では、方法は、対象の癌がWntシグナル伝達調節不全に関連することを決定する工程、任意で、調節不全である特異的なWntタンパク質を決定する工程、任意で、標的とされるFZDタンパク質ファミリーのメンバーを決定する工程、および対象に抗FZD抗体を投与して、選択された1つまたは複数のFZD受容体への選択された1つまたは複数のWnt結合を遮断する工程を含む。

40

【0213】

上記の開示は、本開示を一般的に説明している。以下の具体例を参照することによって、さらに完全な理解を得ることができる。これらの例は、例示のみを目的として記載されており、本出願の範囲を限定することを意図するものではない。状況から示唆されるか、都合のよいものとなるように、形態の変更および同等物の代替が考慮される。特定の用語が本明細書において使用されているが、そのような用語は説明的な意味で意図されており、限定を目的とするものではない。

【実施例】

50

【0214】

X. 実施例

実施例1

FZD4 FABの抗体選択および機能試験

抗体選択：FZD4バインダーを同定するために、2つの選択手法を行った。

【0215】

1. 以前のFZD7由来バインダーに基づいて設計されたライブラリーを使用して選択を行った。抗体は、抗原としてFZD7 CRD-Fcを使用する選択から、以前に同定されている。これらの抗体は、FZD1、2、5、7、8、および9に結合し、Wnt経路に対して拮抗活性を示し、膀胱癌細胞の増殖および腫瘍成長を阻害する。ライブラリーを使用して、FZD4に結合し、wnt拮抗活性および抗腫瘍活性を有するであろう抗体を同定した。

10

【0216】

(a) Fabファージディスプレイライブラリーの設計および調製。

MBPを認識するFabをコードするIPTG誘導性ディスプレイベクターを用いて、Fabファージディスプレイライブラリーの設計および調製を行った。Fab鑄型はライブラリーFと同一であり、FLAGタグ付き軽鎖を含み、親Fab配列H1、H2、およびH3に変異した二量体化ドメインL1、L2、L3をソフトランダム化して、野生型アミノ酸に対する50%のバイアスおよび任意の他のアミノ酸に対する50%のバイアスを可能にした(70:10:10:10ヌクレオチドミックスを使用)。6つ全部のCDR領域を単一のkunkel変異誘発反応で変異させた。Fabアンタゴニストのパネルに基づいて、第二世代ライブラリーを構築した。マルトース結合タンパク質に特異的なFabをコードするIPTG誘導性ディスプレイベクターをライブラリー鑄型として使用した。軽鎖オリゴを使用して、部位特異的kunkel変異誘発反応を行って、CDR L1、L2、およびL3を親Fab配列に変異させ、CDR H1、H2、およびH3をソフトランダム化した(50%の野生型および50%の任意の他のアミノ酸)。M13 K07に予め感染させたSR320細胞に、精製した変異誘発反応物をエレクトロポレーションした。ライブラリーを500mlの培養物中で一晩レスキューし、PEG/NaClを用いて二重沈殿させ、-20°Cで保存するために50%グリセロールを含むPBSに再懸濁した。

20

【0217】

(b) FZD4に対するFabの選択および生成

第二世代ライブラリーをプールし(cfuに等しい)、Fcタグ(R&D systems)に融合した組換えFZD4システインリッチドメイン(CRD)に対して、4ラウンドにわたりスクリーニングした。カルベネシリン(carbenecillin)(carb)耐性ライブラリーファージおよびカナマイシン(kan)耐性ヘルパーファージについて、インプットファージ力価およびアウトプットファージ力価を計算した。Maxisorbプレートを、FZD4-CRD-FcまたはFcタンパク質のPBS溶液5 µg/ml、および示された数のウェルを用いて、4度で一晩コーティングし、0.5%BSAを用いてブロックした。コーティングされたウェルをPBS/0.5%Tween 20(洗浄緩衝液)を用いて4回洗浄し、ライブラリーファージ(PEGを沈殿させ、0.5%BSA/0.05%Tween20/PBSに再懸濁した)を、最初にFcタンパク質ウェル内で室温で1時間インキュベートした。結合していないファージを、ブロックしたFZD4-CRD-Fcプレートに移し、室温で1時間インキュベートした。示されるようにウェルを洗浄し、次いで、100mM HClを用いて溶出した。その後の選択ラウンドのために、実験室で標準的なプロトコルを使用して、溶出したファージを増幅した。ライブラリーファージ(carb耐性)およびヘルパーファージ(kan耐性)のインプット力価およびアウトプット力価を示す。FZD4選択からのアウトプットファージプールのファージ遺伝子IIIとFab CH1領域との間にHis6-アンバー終止(「His6」はSEQ ID NO:428として開示する)を付加するように設計された部位特異的kunkel変異誘発反応から得られたDNAを、Omnimax細胞に形質転換し、単一コロニーのためにプレートイングした。単一コロニーを使用して96ウェル培養ボックスに接種し、一晩ファージ上清を0.05%Tween20/0.5%BSA/PBS(希釈緩衝液)で1:2に希釈して、ELISA結合を試験した。抗M13-HRP二次抗体(希釈緩衝液中1:5000)を用いてファージを検出し、TMB基質および酸停止剤を用いてプレートを発色させた

30

40

50

。示されるように、FZD4-Fcコーティングウェルおよび対照Fcコーティングウェルについて、450nmでの吸光度を読み取った。重鎖および軽鎖を配列決定して、個々のFabのCDR配列を決定した。CH1-geneIII接合部を配列決定して、Fab発現のためのHisタグおよびアンバー終止コドンの取り込みの成功を決定した。ファージバインダーを細菌発現ベクターにクローニングし、特性評価のためにFabタンパク質として精製した。

【0218】

(c) 抗FZD4バインダーの特性評価。

本明細書において記載される抗体のCDR配列を表1に示す。最初に、ファージバインダーをELISAアッセイで試験して、抗原へのそれらの結合を確認した。図1に示すように、ファージクローンはいずれもFZD4 CRD-Fcに結合するが、Fcタンパク質単独には結合せず、これらのファージバインダーはFcにではなくFZD4 CRDに結合することが示唆されている。第2に、精製Fabを、漸増量の非固定化抗原の存在下で競合ELISAアッセイで試験して、それらの結合親和性を推定した(図2)。50nMの競合遊離抗原(FZD4 CRD)の存在下では、全Fabの結合が50%超減少した。10nMの競合抗原(FZD4 CRD)の存在下では、5つのFab(5022、5031、6497、6498、および6500)の結合が50%超減少したことから、これらの5つのFabは、残りのものよりも高い結合親和性を有し得ることが示唆された。このアッセイでは、Fab 5025および6494について結合が観察されなかったことに留意されたい。この理由は不明であるが、物理的な干渉による可能性が高い。次に、免疫蛍光染色によって、細胞表面に発現されたFZD4への結合についてFabを試験した。FZD4を安定に発現するCHO細胞(図3)では、いずれのFZD4 Fabにも膜染色パターンが観察されたが、CHO細胞(図4)では観察されなかった。IF染色を使用して、これらのFabが他のFZDに結合するかどうかを決定した。表面上に個々のFZDを安定に発現する10のCHO細胞株を用いて、結合を試験した。図5に示すように、Fabは様々な結合プロファイルを示した。Fab 5017、5027、5030、および6499は、FZD4発現CHO細胞のみに結合したのに対して、他のFab(5014、5018~5023、5025、6495、6496)は、FZD1、2、4、5、7、8、9を含む複数のFZDに結合する。ただし、このアッセイでは、FabがFZD3、6、または10に結合することは示されなかった。次に、Fab 5019および5020を例として使用して、免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーの両方によって、癌細胞へのそれらの結合を試験した。図6に示すように、両Fabは、試験した5つの脾臓細胞株では、明確に膜に集中した染色を示した。図7に示すように、フローサイトメトリーによって、これらの癌細胞株へのこれらのFabの結合を確認した。

【0219】

2. ナイーブFabライブラリー(ライブラリーF)を使用した選択。

(a) FZD4に結合するFabの選択に、組換えFZD4-CRD-Fcを使用した。具体的には、非関連タンパク質を有する非特異的バインダーから、Fabファージライブラリー(ライブラリーF)を事前に取り出した。FZD4-CRD-Fcに結合するバインダーを濃縮するために、事前に取り出したFabライブラリーに対して数ラウンドの選択を行った。FZD4-CRD-Fcに特異的に結合するがFcには結合しないバインダーについて、ELISAによって、選択から得られたクローナルファージをスクリーニングした。固有のCDR配列を有する44個のFabを同定した(配列については表3を参照)。

【0220】

(b) 抗FZD4 Fabの特性評価

次いで、抗FZD4ファージバインダークローンを細菌発現ベクターにクローニングし、42個のFabを発現させ、その後の特性評価のために精製した。複数の方法を使用して、FZDに対する結合選択性を決定した。最初に、精製FabをELISAアッセイで試験して、組換え抗原(FZD4-CRD-Fc)への結合および他のFZD(FZD1、2、5、6、7、8、9、および10)への結合を確認した。図8に示すように、Fabはいずれも、FZD4-CRD-Fc(選択に使用した抗原)に結合するが、Fcまたは非関連タンパク質BSAへの結合はほとんど観察されなかった。さらに、これらのFabは、様々な程度まで他のFZDにも結合することが示された(図8)。例えば、FZD4-CRD-Fcへの結合に加えて、FZD2 CRD-FcおよびFZD8 CRD-

Fcへの少量の結合がFabについて検出された(図8A)。Fab 5076は、FZD4に加えて、FZD1、2、5、7、および8に結合する(図8D)。次に、FZD発現CHO細胞の免疫蛍光染色によって、様々なFZDへの抗FZD4 Fabの結合を決定した。結果を図9に要約する。Fab 5038、5040~5044、5046、5047、5049~5053、5055、5058~5064、5066、5068~5072、5077~5081)を含むFabの大部分は、このアッセイではFZD4のみに結合し、他のものは2つ以上のFZDに結合することが示された。さらに、表面プラズモン共鳴(SPR)を使用して、FZD4 CRD-Fcに対する抗FZD4 Fabの結合親和性を決定した。図10に示すように、FZD4由来Fabは、0.2nM~15.3nMの範囲のFZD4に対して高い親和性を示す。これらのFabが膵癌細胞上に発現されたFZDに結合するかどうかを調べるために、フローサイトメトリーを使用してそれらの結合を試験した。図11に要約されるように、ほとんどのFabは、HPAFIIおよびPATU8988に結合することができた。Fab 5049、5064、および5072(PATU8988細胞)では、少量の結合が見られた。

10

【0221】

FZD4 Fabの機能試験：抗FZD4 Fabを特性評価するために、いくつかのアッセイを行った。

【0222】

1. FZD4-CRDへのWntリガンド結合に対する抗FZD4 Fabの効果。

アッセイ条件を最適化するために、漸増濃度のFZD4-CRD-FcまたはFcをビオチン化Wnt5Aと混合し、複合体をストレプトアビジンコーティングプレートによって捕捉した。抗Fc-HRPによって、FZD4-CRD-FcまたはFcの結合を検出した(図12A)。抗FZD4 Fabの遮断活性を試験するために、線形範囲内のELISAシグナルを与えるFZD4-CRD-Fcの濃度を選択した。示されるように、様々なFabの存在下で、FZD4-CRD-Fcをビオチン化Wnt5Aと混合し、図12Aのように、結合したFZD4-CRD-Fcを、抗Fc-HRPによって検出した。図12Bに示すように、Fab 5014、5017~5023、5027~5031、5034、5036、5037、6496、6498、6499、および6500では、結合の80%超の阻害が観察され、Fab 5035および6495では、結合の60%超の阻害が観察され、Fab 5025では、約30%の阻害が観察され、Fab 6494および6497では阻害は見られなかった。

20

【0223】

2. -カテニン促進転写に対する抗FZD4 Fabの効果。

抗FZD4 Fabが -カテニン依存性シグナル伝達に影響を及ぼすかどうかを調べるために、TOPFLASHアッセイにおいて、Wnt3a誘導性転写活性に対する効果についてFabを試験した。図13に示すように、Fab 5014、5018~5023、5025、5036、5037、および6495では、強力な阻害活性(>80%)が観察された。Fab 5027~5031、6497~6499では、それよりも少量の阻害(10~35%)が観察された。Fab 5017、5034、および5035では阻害は見られなかった。

30

【0224】

3. 癌細胞の増殖に対する効果。

抗FZD4 Fabが癌細胞の増殖に影響を及ぼすかどうかを試験するために、2および10μg/mlのFabを用いて膵癌細胞(HPAFIIおよびPATU8988)を処理し、細胞増殖を測定した(図14A~Hを参照)。データを図15に要約した。用量依存的に抗増殖性であったFabには、Fab 5018~5021、5023、5036、および6495が含まれる。Fab 5022および6500は、単回用量レベル(2μg/ml)でのみ試験し、試験した両細胞株に対して阻害性であった。アッセイでは、いくつかのFab(5017、5025、5035、および5037)が、HPAFII細胞株に対して阻害性であることが示された。図16に要約されたデータに基づくと、抗FZD4 Fabの抗増殖活性は、以下の観察結果、すなわち、FZD 1、2、4、5、7、8、および9へのそれらの結合、ならびにWnt3a誘導性転写活性を阻害するそれらの能力に関連するようと思われる。最も強力な抗増殖性Fabには、5014、5019~5023、および6495が含まれる(図16)。

40

【0225】

4. Wnt調節遺伝子Axin2の発現に対する効果。

50

抗FZD4抗体をさらに特性評価するために、いくつかのFabをIgGに変換した。IgG 5020ならびにFab 5019および5020を遺伝子発現アッセイで試験し、Axin2遺伝子のmRNAレベルをRT qPCRによって測定した。図17に示すように、IgG 5020、Fab 5019、および5020はいずれも、抗体処理後にHPAFII細胞のAxin2 mRNAレベルを低下させ、これらの抗体がWnt経路を阻害することが示唆された。

【0226】

5. 癌細胞の増殖に対する抗FZD4 IgGの効果。

4つの膵癌細胞株HPAFII、CAPAN2、AsPC11、およびPATU8988の増殖に対する効果についても、IgGを試験した。これらの細胞株はいずれも、RNF43遺伝子に損傷変異を有することが知られている。アラマブルーアッセイを使用した図18Aに示すように、これらの膵臓細胞の増殖は、それらの対応するFabとともに、IgG 5019および5020によって阻害された。さらに、IgG5020は、用量依存的に癌細胞の増殖を阻害することが示された(図18B)。興味深いことに、RNF43遺伝子に損傷変異を有しないいくつかの膵癌細胞株(BxPC3およびPANC 1)も試験したが、IgG5020に感受性ではなく、FZD4抗体IgG 5020に対する感受性は、RNF43遺伝子の変異に依存し得ることが示唆された。RNF43およびZNRF3は、Frizzled受容体を標的とする膜貫通E3ユビキチンリガーゼをコードするWnt標的遺伝子であり、その機能喪失変異は、FZDの高発現をもたらし、腫瘍細胞をWnt依存性シグナル伝達の阻害に対して感受性にし得る。FZD4抗体がコロニー形成にも影響を及ぼすかどうかを調べるために、5つの膵癌細胞株を用いてIgG5020を試験した(図19)。図18の結果と一致して、IgG5020は、RNF43変異を有する細胞株(HPAFII、AsPC 1およびPATU8988)によるコロニー形成を阻害するが、RNF43変異を有しない細胞株(BxPC3およびPANC 1)のコロニー形成は阻害しない。

【0227】

6. 抗FZD4 Fabは、膵癌患者腫瘍由来細胞に結合し、それらの増殖に影響を及ぼす。

次に、免疫蛍光染色によって、膵癌患者腫瘍由来細胞(PDX)への結合について、Fab 5019および5020を試験した。図20に示すように、PDX細胞株GP2AおよびGP14Aならびに膵臓細胞株CAPAN2上の両Fabでは、膜染色パターンが明確に示された。さらに、これらの抗体を細胞増殖アッセイで試験した(図21)。FabおよびIgG 5020はともに、図18および図19の観察と一致して、RNF43遺伝子に変異を有するPDX細胞株であるPDX細胞株GP2AおよびGP14Aの増殖を阻害することができた。

【0228】

これらの開示された抗FZD4抗体の抗腫瘍活性を実証するために、インビボ有効性試験が進行中である。

【0229】

XI. 例示的態様

1.

軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域を含む、FZD 1、2、4、5、7、8、および9から選択されるヒトFrizzled受容体のうちの1つまたは複数の各々のシステインリッチドメイン(CRD)に特異的に結合する抗体であって、

重鎖可変領域が、相補性決定領域CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含み、軽鎖可変領域が、相補性決定領域CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、前記CDRのアミノ酸配列が、表1aまたは表3aの配列から選択される配列を含むか、またはそれらからなる、抗体。

2.

前記CDRのアミノ酸配列が、下記に記載の配列から選択される配列を含むか、またはそれらからなり、

CDR-H1が、LYYTDM (SEQ ID NO: 149)、IYFSSI (SEQ ID NO: 158)、IGSSSI (SEQ ID NO: 159)、VNSSSI (SEQ ID NO: 160)、IHFSSI (SEQ ID NO: 161)、IYSASI (SEQ ID NO: 162)、IHSSSI (SEQ ID NO: 157)、IYFSSI (SEQ ID NO: 158)、IYSSSI (SEQ ID NO: 163)、LSYSFF (SEQ ID NO: 164)、LSFYFL (SEQ ID NO: 165)、LSSY

YM (SEQ ID NO: 15)、SSFYFM (SEQ ID NO: 166)、LSYYYM (SEQ ID NO: 3)、IASYFT (SEQ ID NO: 168)、FSSSSI (SEQ ID NO: 12)、LSYYFM (SEQ ID NO: 169)、IYYYPM (SEQ ID NO: 170)、FSAYNI (SEQ ID NO: 171)、IYYFGM (SEQ ID NO: 172)、IHSSSI (SEQ ID NO: 157)、およびISYHYM (SEQ ID NO: 429)からなる群より選択され、

CDR-H2が、SISLFFGYVS (SEQ ID NO: 150)、SNYPSFGSNS (SEQ ID NO: 174)、SIYSAFASTS (SEQ ID NO: 175)、AFYSSFGATS (SEQ ID NO: 176)、AYYSAFASSS (SEQ ID NO: 177)、CSYPSFGSTS (SEQ ID NO: 178)、SRYPSFGSTS (SEQ ID NO: 179)、AIYSSFSANS (SEQ ID NO: 180)、SNYPAFGSTS (SEQ ID NO: 181)、SIYSAFLSTT (SEQ ID NO: 182)、SIYPSSGYTY (SEQ ID NO: 45)、SIYPYSGYTY (SEQ ID NO: 36)、SIYPFHASTY (SEQ ID NO: 183)、TVYPYLDYTY (SEQ ID NO: 184)、SIYPSYRNTF (SEQ ID NO: 185)、SIYPFSGYST (SEQ ID NO: 186)、SIYPPYAYTY (SEQ ID NO: 187)、SIYLSFGYGY (SEQ ID NO: 188)、CCNSAYRYGP (SEQ ID NO: 189)、SIYPYAGNTY (SEQ ID NO: 190)、SFYSYYSFTY (SEQ ID NO: 191)、SLYTSYGYTY (SEQ ID NO: 192)、YIYPFNGYSY (SEQ ID NO: 193)、YIYPSYDYTY (SEQ ID NO: 194)、YISPPYGFTY (SEQ ID NO: 195)、ATYSSFGSIT (SEQ ID NO: 173)、およびSIYPNLGYTY (SEQ ID NO: 430)からなる群より選択され、

CDR-H3が、YHHPFGYAL (SEQ ID NO: 196)、YLAM (SEQ ID NO: 151)、YHFPFAYSL (SEQ ID NO: 197)、YHFPFGFAL (SEQ ID NO: 198)、YHFPFGHAL (SEQ ID NO: 199)、YHYPFGBAL (SEQ ID NO: 200)、YHYPFGBAL (SEQ ID NO: 200)、YHYPFGBAL (SEQ ID NO: 201)、YHYPFGBAL (SEQ ID NO: 202)、YHYPFGBAL (SEQ ID NO: 203)、YHYPHGBAL (SEQ ID NO: 204)、PAPFSYHVL (SEQ ID NO: 205)、AAPGSYHPM (SEQ ID NO: 206)、AAPYFYGVM (SEQ ID NO: 207)、AFPGSYHPM (SEQ ID NO: 208)、APYFSYHFM (SEQ ID NO: 209)、PSAFSYHPM (SEQ ID NO: 210)、PVAGAYHPM (SEQ ID NO: 211)、SSLGFYNGM (SEQ ID NO: 212)、TVRGSKKPYFSGWAM (SEQ ID NO: 213)、TPGYYYIL (SEQ ID NO: 214)、SGVGGDHAL (SEQ ID NO: 215)、VWYVVQ (SEQ ID NO: 216)、GYFYTWGGM (SEQ ID NO: 217)、GYFYTWGGM (SEQ ID NO: 217)、GYYSYWGGM (SEQ ID NO: 218)、YHHPFGYAL (SEQ ID NO: 196)、およびAYPFSYHYM (SEQ ID NO: 431)からなる群より選択され、

CDR-L1がSVSSA (SEQ ID NO: 103)であり、

CDR-L2がSASSLYS (SEQ ID NO: 104)であり、および/または

CDR-L3が、AAYHWPLF (SEQ ID NO: 148)、GVYLF (SEQ ID NO: 152)、SSYSLI (SEQ ID NO: 153)、WAYGPF (SEQ ID NO: 154)、YYHPI (SEQ ID NO: 155)、およびYYSLF (SEQ ID NO: 156)からなる群より選択される、
態様1の抗体。

3 .

前記CDRのアミノ酸配列が、下記に記載されるように選択される配列を含むか、またはそれらからなり、

CDR-H1が、ISYYYM (SEQ ID NO: 1)、IYSYYM (SEQ ID NO: 2)、LSYYYM (SEQ ID NO: 3)、IYYYSI (SEQ ID NO: 4)、LYSYYM (SEQ ID NO: 5)、LSSYSM (SEQ ID NO: 6)、ISYYI (SEQ ID NO: 7)、LSYSSM (SEQ ID NO: 8)、IYYYYM (SEQ ID NO: 9)、LYYYSI (SEQ ID NO: 10)、ISSYI (SEQ ID NO: 11)、FSSSSI (SEQ ID NO: 12)、LSYYSI (SEQ ID NO: 13)、LYSYI (SEQ ID NO: 14)、LSSYYM (SEQ ID NO: 15)、LSYYI (SEQ ID NO: 16)、ISSYYM (SEQ ID NO: 17)、LSYYSM (SEQ ID NO: 18)、LYSYSI (SEQ ID NO: 19)、LYYYYI (SEQ ID NO: 20)、IYSYI (SEQ ID NO: 21)、ISYSYI (SEQ ID NO: 22)、およびISYYSM (SEQ ID NO: 23)からなる群より選択され、

CDR-H2が、SIYSYGYTY (SEQ ID NO: 24)、SIYSSSSSTY (SEQ ID NO: 25)、SIYSSSYTY (SEQ ID NO: 26)、SIYSSSYTS (SEQ ID NO: 27)、YISSYSGSTY (SEQ ID NO: 28)、SIYSSYGYTY (SEQ ID NO: 29)、YISSYGYTY (SEQ ID NO: 30)、SIYSSSSTY (SEQ ID NO: 31)、SIYSSSGYTY (SEQ ID NO: 32)、YISSYSGSTS (SEQ ID NO: 33)

33)、SISSYYGSTY (SEQ ID NO: 34)、SIYSYYGSTY (SEQ ID NO: 35)、SIYPYSGYT
Y (SEQ ID NO: 36)、YISPYGYTS (SEQ ID NO: 37)、SISSSSGYTY (SEQ ID NO: 3
8)、SIYSYSSSTY (SEQ ID NO: 39)、SISPSSSYTY (SEQ ID NO: 40)、YISPYGYTY
(SEQ ID NO: 41)、SISPYSSSTY (SEQ ID NO: 42)、SIYSSYGSTY (SEQ ID NO: 43)
、SIYSSSSYTY (SEQ ID NO: 44)、SIYPSSGYTY (SEQ ID NO: 45)、SIYPYSGSTY (S
EQ ID NO: 46)、SIYPSYGSTY (SEQ ID NO: 47)、YISSYSSYTY (SEQ ID NO: 48)、
SIYSYSSSTY (SEQ ID NO: 49)、YISSYGYTS (SEQ ID NO: 50)、SISPYSSYTY (SEQ
ID NO: 51)、YISPYSGYTS (SEQ ID NO: 52)、SIYPYYSYTY (SEQ ID NO: 53)、SIS
PYGYTS (SEQ ID NO: 54)、SISPSYSSSTY (SEQ ID NO: 55)、SISSYSSTY (SEQ ID
NO: 56)、SIYPYSGSTS (SEQ ID NO: 57)、SISSYSSSTS (SEQ ID NO: 58)、およびSI
YSYSGYTY (SEQ ID NO: 59)からなる群より選択され、

10

CDR-H3が、SSFSWAM (SEQ ID NO: 60)、SSFYWAL (SEQ ID NO: 61)、SWFGWG
I (SEQ ID NO: 62)、YWFSYGYASYPAF (SEQ ID NO: 63)、HPWYGM (SEQ ID NO:
64)、SAFYWAL (SEQ ID NO: 65)、PAPGHWGF (SEQ ID NO: 66)、SSFFWAM (SEQ
ID NO: 67)、SAFYWAM (SEQ ID NO: 68)、HFFAM (SEQ ID NO: 69)、SWWAWAF
(SEQ ID NO: 70)、SAFGWAL (SEQ ID NO: 71)、SSFFFAM (SEQ ID NO: 72)、PYY
WSGGF (SEQ ID NO: 73)、HPSSSWFSFGAL (SEQ ID NO: 74)、SAFYWAF (SEQ ID
NO: 75)、SSYAWAM (SEQ ID NO: 76)、SSFYWAI (SEQ ID NO: 77)、SPWGSWGA
GF (SEQ ID NO: 78)、PAVWVGL (SEQ ID NO: 79)、SWVFWAL (SEQ ID NO: 80)
、SWVYWGM (SEQ ID NO: 81)、SWVYWAL (SEQ ID NO: 82)、SSYAWAI (SEQ ID
NO: 83)、SSFYWAM (SEQ ID NO: 84)、HGASFGSGAPAF (SEQ ID NO: 85)、SCFF
WAM (SEQ ID NO: 86)、WAFFGL (SEQ ID NO: 87)、SSFYFAM (SEQ ID NO: 88)、
SAFSWAI (SEQ ID NO: 89)、SGFYWAL (SEQ ID NO: 90)、PSVGYAAF (SEQ ID NO:
91)、SWVGWGL (SEQ ID NO: 92)、SSVGYVAM (SEQ ID NO: 93)、SWVYWAF (SE
Q ID NO: 94)、YYYSSSVYFWYAAL (SEQ ID NO: 95)、SSFFWAI (SEQ ID NO: 96)
、SWVYWAI (SEQ ID NO: 97)、SWVGWGI (SEQ ID NO: 98)、SSVYWAL (SEQ ID
NO: 99)、WGGWGS GG YFYAAL (SEQ ID NO: 100)、FWYPM (SEQ ID NO: 101)、
およびSSFAWAF (SEQ ID NO: 102)からなる群より選択され、

20

CDR-L1がSVSSA (SEQ ID NO: 103)であり、

CDR-L2がSASSLYS (SEQ ID NO: 104)であり、および/または

30

CDR-L3が、HPWSSGGYLI (SEQ ID NO: 105)、PVGYWGVPI (SEQ ID NO: 106)、V
SGGAHALI (SEQ ID NO: 107)、VSSAYPI (SEQ ID NO: 108)、FWGVPI (SEQ ID NO:
109)、SYHYAALI (SEQ ID NO: 110)、WYYAPI (SEQ ID NO: 111)、SHSYSLI (SE
Q ID NO: 112)、SGYGPF (SEQ ID NO: 113)、SWSSPI (SEQ ID NO: 114)、HYSVY
ASLI (SEQ ID NO: 115)、PHPPSLI (SEQ ID NO: 116)、VAYSHVGLI (SEQ ID NO:
117)、GYGAPI (SEQ ID NO: 118)、SWYSLI (SEQ ID NO: 119)、PGYLF (SEQ ID N
O: 120)、VWFGLI (SEQ ID NO: 121)、VYYGSPLF (SEQ ID NO: 122)、HAHSPLI (
SEQ ID NO: 123)、SSAYYPF (SEQ ID NO: 124)、GHASPI (SEQ ID NO: 125)、SSG
GWSLI (SEQ ID NO: 126)、VAWSSFLI (SEQ ID NO: 127)、SVAAASLI (SEQ ID NO:
128)、SGWWGVSLI (SEQ ID NO: 129)、SYAAYLF (SEQ ID NO: 130)、HGSLF (SE
Q ID NO: 131)、YAGVSNLF (SEQ ID NO: 132)、GWPYSALF (SEQ ID NO: 133)、S
GYPSLF (SEQ ID NO: 134)、SYHSGSLI (SEQ ID NO: 135)、HGYSASLI (SEQ ID
NO: 136)、APGWALF (SEQ ID NO: 137)、GHSSPI (SEQ ID NO: 138)、GWPSLF (S
EQ ID NO: 139)、VPGYPVPI (SEQ ID NO: 140)、HYYSHLI (SEQ ID NO: 141)、G
PASSLI (SEQ ID NO: 142)、SVGSSYLI (SEQ ID NO: 143)、YYGPWVLI (SEQ ID
NO: 144)、AASWGYPF (SEQ ID NO: 145)、HWSYPI (SEQ ID NO: 146)、およびGG
WGPF (SEQ ID NO: 147)からなる群より選択される、

40

態様1の抗体。

4 .

(i) 表2に記載の重鎖アミノ酸配列、

50

(ii) 表2に記載の重鎖アミノ酸配列に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、アミノ酸配列、または

(iii) (i)の保存的に置換されたアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、保存的に置換されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、態様2または3の抗体。

5 .

(i) 表2に記載の軽鎖アミノ酸配列、

(ii) 表2に記載の軽鎖アミノ酸配列に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、アミノ酸配列、または

(iii) (i)の保存的に置換されたアミノ酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、保存的に置換されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、態様2~4のいずれか一つの抗体。

6 .

CDR配列が、表1aまたは表3aにおいて同定された抗体から選択される完全なCDR配列セットである、態様1~5のいずれかの抗体。

7 .

CDR配列が、表1aまたは表3aにおいて同定された抗体から選択される軽鎖CDR配列セットまたは重鎖CDR配列セットを含む、態様1~5のいずれかの抗体。

8 .

FZD4に特異的に結合する、態様1~7のいずれかの抗体。

9 .

CDR配列が、抗体5017、5027、5030、6499、5038、5040~5044、5046、5047、5049~5053、5055、5058~5064、5066、5068~5072、5077~5080、または5081から選択される抗体のCDR配列セットである、態様8の抗体。

10 .

FZD4と、FZD1、FZD2、FZD5、FZD7、FZD8、およびFZD9から選択される少なくとも1つの他のFZD受容体とに特異的に結合する、態様1~7のいずれか一つの抗体。

11 .

CDR配列が、抗体5014、5016、5018~5023、5025、5028、5029、5031、5034、5035、5036、5037、6494、6495、6496、6497、6498、6500、5039、5045、5048、5054、5056、5057、5067、および5073~5076から選択される抗体のCDR配列セットである、態様9の抗体。

12 .

FZD1、2、5、7、8、または9と比較して、Frizzled 4 (FZD4) に優先的に結合する、態様1~11のいずれか一つの抗体。

13 .

別のFZD受容体に対して、FZD4に優先的に結合する、態様1~11のいずれかの抗体。

14 .

抗体5028、5029、5031、5034、5035、6497、6498、5039、5045、5048、5054、5056、5057、5067、5073、5074、5075から選択される抗体のCDR配列セットであるCDR配列を含む、態様13の抗体。

15 .

約0.2nM~約15.3nMの、表面プラズモン共鳴によって測定される結合親和性を有する、態様1~13のいずれか一つの抗体。

16 .

モノクローナル抗体である、態様1~15のいずれか一つの抗体。

10

20

30

40

50

17.

ヒト化抗体である、態様1～16のいずれか一つの抗体。

18.

一本鎖抗体である、態様1～17のいずれか一つの抗体。

19.

Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ナノボディ、ミニボディ、ダイアボディ、およびそれらの多量体から選択される抗体結合断片である、態様1～18のいずれか一つの抗体。

20.

二価、三価、または四価の抗体である多価抗体である、態様1～18のいずれか一つの抗体。

10

21.

LPR 5/6にさらに結合する二重特異性抗体である、態様1～18のいずれか一つの抗体。

22.

非天然グリコシル化パターンを含む、態様1～18のいずれか一つの抗体。

23.

定常領域またはフレームワーク領域にシステインの置換または付加を含む、態様1～18のいずれか一つの抗体。

24.

FZDに対するWntの結合を遮断する、態様1～18のいずれか一つの抗体。

20

25.

態様1～21のいずれか一つの抗体と、検出可能な標識または細胞傷害剤とを含む、イムノコンジュゲート。

26.

メイタンシノイド、アウリスタチン、ドラスタチン、チューブリシン、クリプトフィシン、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)二量体、インドリノベンゾジアゼピン二量体、-アマニチン、トリコテン、SN-38、デュオカルマイシン、CC1065、カリケアマイシン、エンジイン抗生物質、タキサン、ドキシソルピシン誘導体、アントラサイクリン、およびそれらの立体異性体、アザノフィド、アイソスター、類似体、または誘導体から選択される細胞傷害剤を含む、態様25のイムノコンジュゲート。

30

27.

態様1～21のいずれか一つの抗体をコードする、核酸分子。

28.

CDR配列のうちの1つまたは複数、表1b、表1c、表3b、または表3cの核酸によってコードされる、態様27の核酸分子。

29.

前記抗体が、

(i) 表2に記載の重鎖核酸配列、

(ii) 表2に記載の重鎖核酸配列に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、もしくは少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、ヌクレオチド配列、または

40

(iii) (i) のコドン縮退核酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、コドン縮退核酸配列を含む核酸によってコードされる重鎖可変領域を含む、態様27の核酸分子。

30.

前記抗体が、

(i) 表2に記載の軽鎖核酸配列、

(ii) 表2に記載の軽鎖核酸配列に対して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少な

50

くとも99%の配列同一性を有する核酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、核酸配列、または

(iii)(i)のコードン縮退核酸配列であって、CDR配列が、表1aもしくは表3aに記載のCDR配列セットである、コードン縮退核酸配列を含む核酸によってコードされる軽鎖可変領域を含む、態様27の核酸分子。

31.

態様27~30のいずれか一つの核酸に機能的に連結された発現制御配列を含む、ベクター。

32.

態様27~30のいずれか一つの核酸に機能的に連結された発現制御配列を含む組換え核酸分子を含む、宿主細胞。

10

33.

チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である、態様32の宿主細胞。

34.

態様31のベクターを含む、宿主細胞。

35.

態様32~34のいずれか一つの宿主細胞を培養する工程を含む、抗FZD抗体を作製するための方法。

36.

任意で好適な希釈剤とともに、態様1~24のいずれか一つもしくは複数の抗体、態様25~26のイムノコンジュゲート、態様27~30の核酸分子、態様31のベクター、または態様34~34の宿主細胞を含む、組成物。

20

37.

1つまたは複数の抗体またはイムノコンジュゲートを含み、任意で、薬学的組成物である、態様3636の組成物。

38.

態様1~24のいずれか一つもしくは複数の抗体、態様25~26のイムノコンジュゲート、態様27~30の核酸分子、態様31のベクター、または態様34~34の宿主細胞を含む、キット。

39.

30

抗体：細胞複合体の形成を許容する条件下で、1つまたは複数の細胞を含む試料と、態様1~26のいずれか一つの1つまたは複数の抗体またはイムノコンジュゲートとを接触させる工程、および任意の抗体複合体の存在を検出する工程を含む、FZD発現を検出する方法。

40.

検出が、免疫蛍光によるものである、態様39の方法。

41.

検出が、フローサイトメトリーによるものである、態様39の方法。

42.

前記方法が、FZD4発現を検出するためのものであり、抗体またはイムノコンジュゲートが、5017、5027、5030、6499、5038、5040~5044、5046、5047、5049~5053、5055、5058~5064、5066、5068~5072、および5077~5081から選択される抗体に対応するCDR配列セットを含む、態様39~41のいずれか一つの方法。

40

43.

FZD受容体へのWntリガンド結合を阻害するか、Wntシグナル伝達経路を妨害するか、Wnt誘導性転写活性を阻害するか、disheveledの活性化を阻害するか、 β -カテニン分解複合体の β -カテニン分解複合体の保存を促進するか、 β -カテニンの蓄積を促進するか、または細胞の増殖を阻害する方法であって、

FZD受容体を発現する細胞と、態様1~26のいずれか一つの抗体またはイムノコンジュゲートとを接触させる工程を含む、方法。

50

4 4 .

WntリガンドがWnt3aである、態様43の方法。

4 5 .

抗体またはイムノコンジュゲートが、(a) 5017、5027、5030、6499、5038、5040~5044、5046、5047、5049~5053、5055、5058~5064、5066、5068~5072、および5077~5081、または(b) 5014、5016、5018~5023、5025、5028、5029、5031、5034、5035、5036、5037、6494、6495、6496、6497、6498、6500、5039、5045、5048、5054、5056、5057、5067、および5073~5076から選択される抗体に対応するCDR配列セットを含む、態様43の方法。

4 6 .

その必要がある対象の癌を治療する方法であって、態様1~26のいずれか一つの抗体またはイムノコンジュゲートを含む薬学的組成物の有効量を、該対象に投与する工程を含む、方法。

4 7 .

癌が、結腸、肺、乳房、卵巣、子宮内膜、膵臓、胃、肝臓、副腎皮質の癌、および骨芽細胞腫の癌細胞から選択される、態様46の方法。

4 8 .

癌が、急性骨髄性白血病、神経芽細胞腫、肝癌、肺癌、子宮内膜癌、唾液腺様嚢胞癌、結腸直腸癌、前立腺癌、神経膠芽腫、膀胱癌、子宮頸癌、膵癌、結腸癌、乳癌、食道癌、神経膠腫、胃癌、星状細胞腫、および骨肉腫から選択される、態様46の方法。

4 9 .

抗体またはイムノコンジュゲートが、少なくとも1つのアッセイにおいてFZD 1、2、4、5、7、8、および9に特異的に結合し、かつ少なくとも1つのアッセイにおいてWnt3a誘導性シグナル伝達を阻害し、任意で、抗体またはイムノコンジュゲートが、態様1~26のいずれか一つの抗体またはイムノコンジュゲートである、態様46の方法。

5 0 .

抗体またはイムノコンジュゲートが、(a) 5017、5027、5030、6499、5038、5040~5044、5046、5047、5049~5053、5055、5058~5064、5066、5068~5072、および5077~5081、または(b) 5014、5016、5018~5023、5025、5028、5029、5031、5034、5035、5036、5037、6494、6495、6496、6497、6498、6500、5039、5045、5048、5054、5056、5057、5067、および5073~5076から選択される抗体に対応するCDR配列セットを含む、態様46の方法。

5 1 .

抗体またはイムノコンジュゲートが、5019および5020から選択される抗体に対応するCDR配列セットを含む、態様46の方法。

5 2 .

前記方法によって治療される癌が、RNF43遺伝子に変異を含む1つまたは複数の癌細胞を含み、抗体および抗体またはイムノコンジュゲートが、抗体5020に対応するCDR配列セットを含む、態様51の方法。

【 0 2 3 0 】

本明細書において使用される場合、特に明記しない限り、以下の意味が適用される。単語「してもよい(may)」は、強制的な意味(すなわち、mustを意味する)ではなく、許容的な意味(すなわち、可能性を有することを意味する)で使用される。単語「含む(include)」、「含む(including)」および「含む(includes)」などは、限定されことなく、含むことを意味する。単数形「a」、「an」および「the」は、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「1つの要素」への言及は、「1つまたは複数」などの1つまたは複数の要素に対する他の用語および語句の使用にもかかわらず、2つ以上の要素の組合せを含む。語句「少なくとも1つ」は、「1つまたは複数(one or more)」、「1つまたは複数(one or a plurality)」および「複数(a plurality)」を含む。用語「または」は、他に示されない限り、非排他的であり、すなわち、「および」および「または」の

10

20

30

40

50

両方を包含する。修飾語と一連のものとの間の用語「のいずれか」は、修飾語が一連のもの各メンバーを修飾することを意味する。したがって、例えば、語句「1、2、または3の少なくともいずれか」は、「少なくとも1、少なくとも2、または少なくとも3」を意味する。用語「から本質的になる」は、特許請求される組合せの基本的かつ新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない列挙された要素および他の要素の包含を指す。

【0231】

本明細書において使用される程度に関する用語、例えば、「約」、「実質的に」、および「およそ」は、最終結果が顕著に変化しないように修飾された用語の妥当な逸脱量を意味する。程度に関するこれらの用語は、この逸脱が修飾する単語の意味を否定しない場合、修飾された用語の少なくとも±5%の逸脱を含むと解釈されるべきである。

10

【0232】

さらに、特定のセクションに記載された定義および態様は、当業者によって理解されるように、それらが好適である、本明細書において記載された他の態様に適用可能であることが意図されている。例えば、以下の節では、本発明の様々な局面がさらに詳細に定義される。そのように定義された各局面は、そうでないことが明確に示されていない限り、任意の他の単数または複数の局面と組み合わせることができる。特に、好ましいまたは有利であると示された任意の特徴は、好ましいまたは有利であると示された任意の他の単数または複数の特徴と組み合わせることができる。

【0233】

説明および図面は、本発明を開示された特定の形態に限定することを意図するものではなく、逆に、その意図は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨および範囲内に入るすべての修正、均等物および代替物を網羅することであることを理解されたい。本発明の様々な局面のさらなる修正および代替の態様は、この説明を考慮すれば当業者には明らかであろう。したがって、この説明および図面は、例示としてのみ解釈されるべきであり、本発明を実施する一般的な方法を当業者に教示する目的のためのものである。本明細書において示され説明される本発明の形態は、態様の例として解釈されるべきであることを理解されたい。本発明のこの説明の恩典を得た後に当業者にいずれも明らかになるように、要素および材料は、本明細書において図示および記載された要素および材料に置き換えられてもよく、部品およびプロセスは逆にされても省略されてもよく、本発明の特定の特徴は独立して利用されてもよい。以下の特許請求の範囲に記載される本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、本明細書において記載される要素に変更を加えることができる。本明細書において使用される見出しは、構成上の目的のためだけのものあり、説明の範囲を限定するために使用されることを意味しない。

20

30

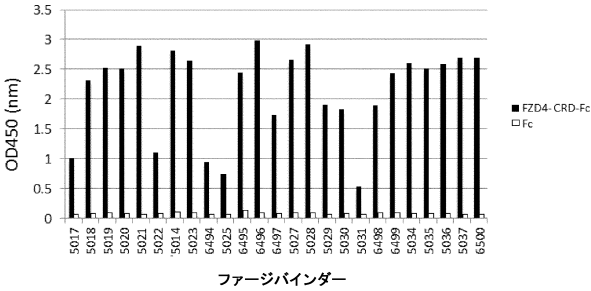
【0234】

本明細書において言及されたすべての刊行物、特許および特許出願は、あたかも各個々の刊行物、特許または特許出願が参照により組み入れられることが具体的かつ個別に示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

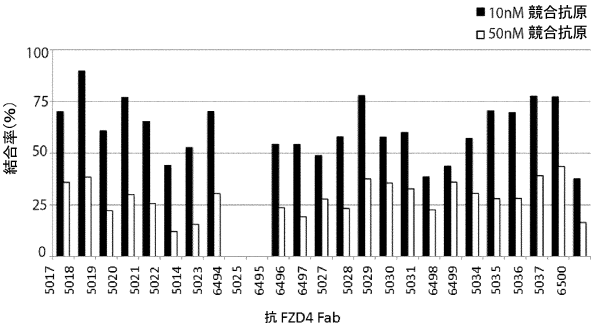
40

【図面】

【図 1】

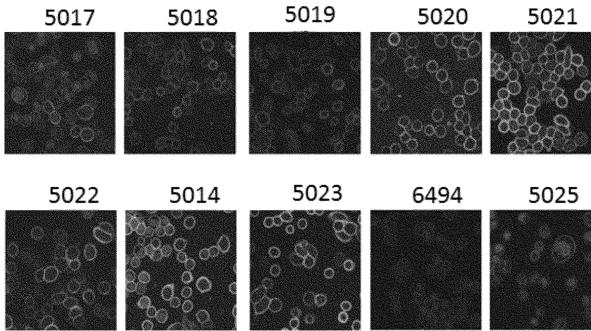


【図 2】

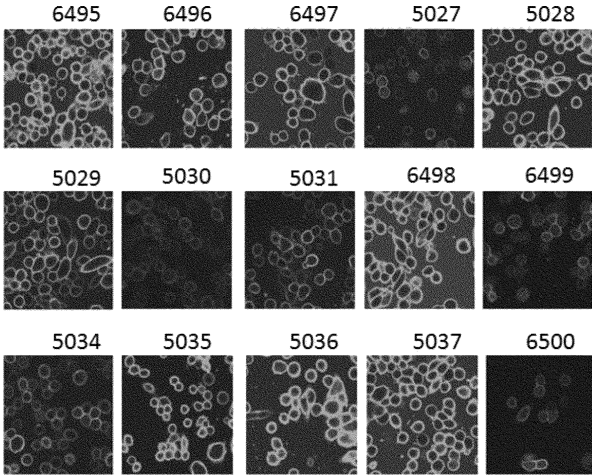


10

【図 3 - 1】

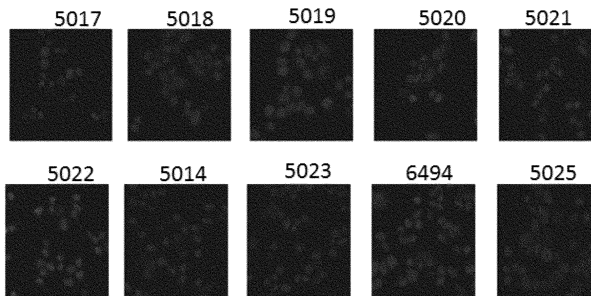


【図 3 - 2】

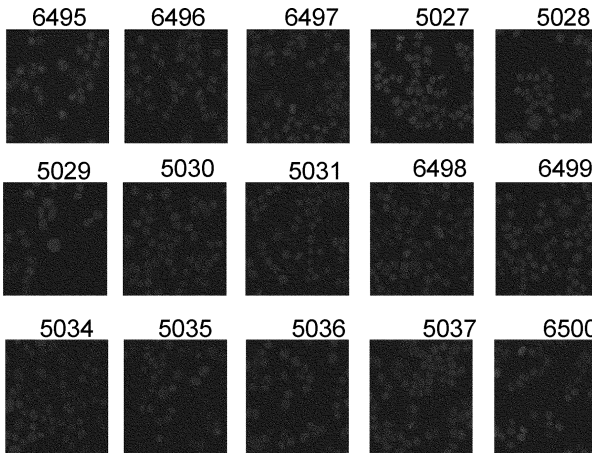


20

【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



30

40

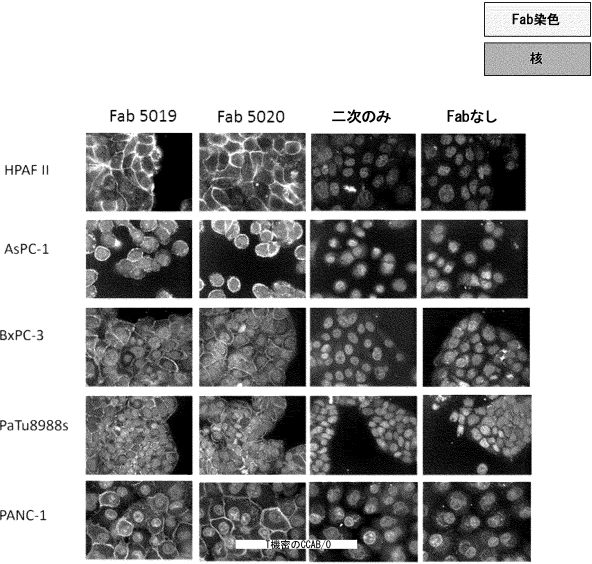
50

【図 5】

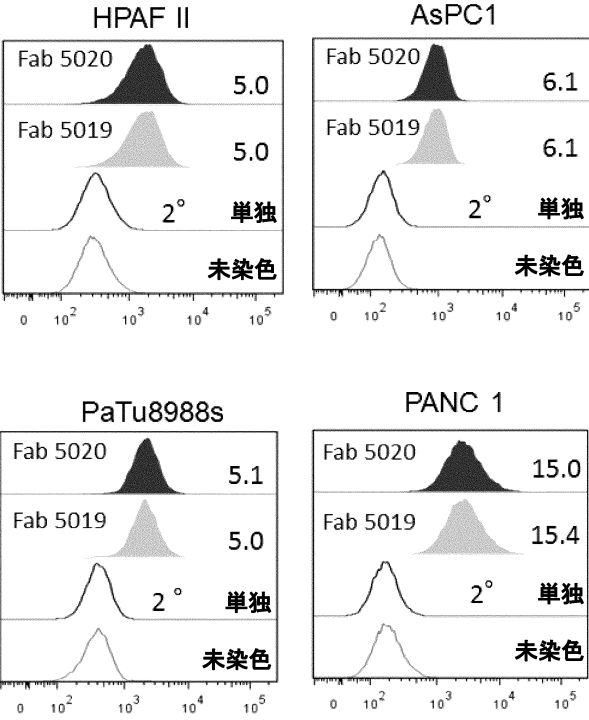
IF結合スコア	概要
-	結合なし
+	非常に弱いバインダー
++	弱いバインダー
+++	良好なバインダー
++++	非常に良好なバインダー

TRAC ID	CHO-FZD1	CHO-FZD2	CHO-FZD3	CHO-FZD4	CHO-FZD5	CHO-FZD6	CHO-FZD7	CHO-FZD8	CHO-FZD9	CHO-FZD10	CHO-GPI	結合プロフィール
5017	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
5018	++++	++++	-	+++	+++	-	+	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
5019	++++	++++	-	+++	+++	-	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
5020	++++	++++	-	++++	+++	-	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
5021	++++	++++	-	++++	+++	-	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
5022	++++	+++	-	++++	++	-	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
5014	++++	++++	-	++++	+++	-	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
5023	++++	++++	-	++++	+++	-	+++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
6494	+++	+	-	++	+	-	+++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
5025	++++	++++	-	++	++	-	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
6495	++++	++++	-	++++	+++	-	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
6496	++++	++++	-	++++	+++	-	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
6497	+	-	-	++++	+	-	++	-	+	-	-	1,4,5,7,9
5027	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	4
5028	++	-	-	++++	-	-	++	-	-	-	-	1,4,7
5029	-	-	-	++++	-	-	-	-	+	-	-	4,9
5030	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	4
5031	++	++	-	++++	-	-	++	-	-	-	-	1,2,4,7
6498	++	++	-	++++	-	-	++	-	-	-	-	1,2,4,7
6499	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	4
5034	+	+	-	+++	+	-	++	-	-	-	-	1,2,4,5,7
5035	+	-	-	++++	-	-	++	-	-	-	-	1,4,7
5036	++++	++++	-	++++	++	-	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
5037	++++	++++	-	++++	++	-	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
6500	++	++	-	+++	++	-	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9

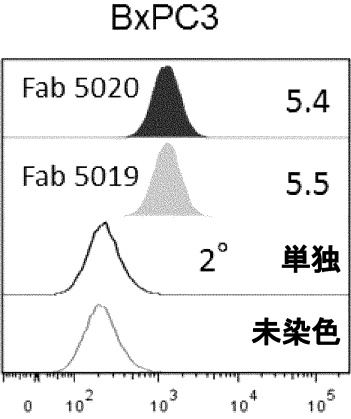
【図 6】



【図 7 - 1】



【図 7 - 2】



10

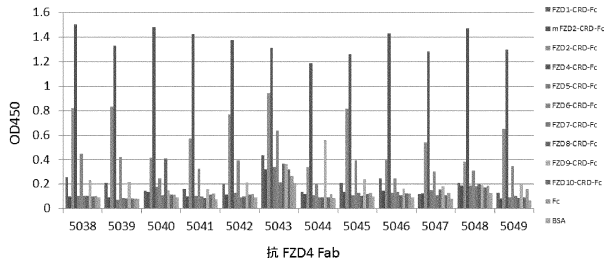
20

30

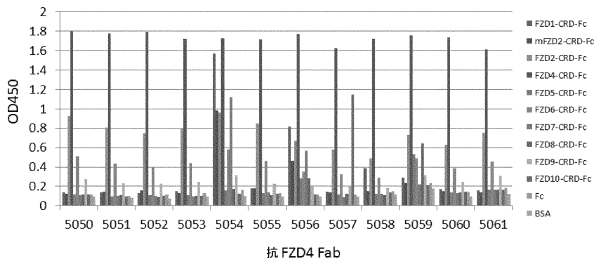
40

50

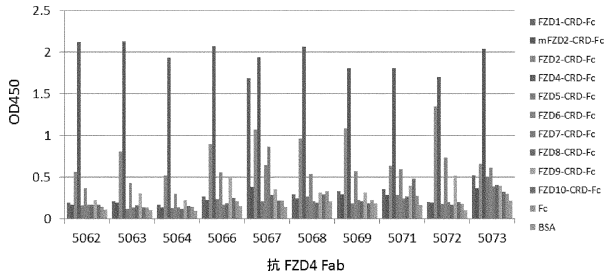
【図 8 A】



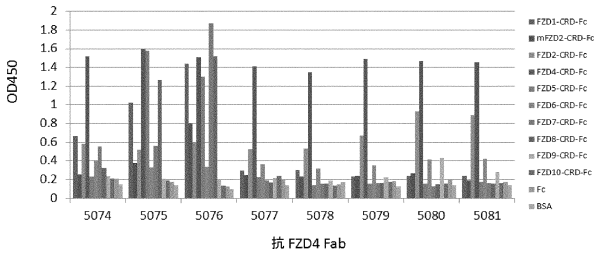
【図 8 B】



【図 8 C】



【図 8 D】



【図 9 A】

TRAC ID		CHO-FZD1	CHO-FZD2	CHO-FZD3	CHO-FZD4	CHO-FZD5	CHO-FZD6
5038	4A1	-	-	-	++++	-	-
5039	4A2	+	-	-	++++	-	-
5040	4A3	-	-	-	++++	-	-
5041	4A4	-	-	-	++++	-	-
5042	4A5	-	-	-	++++	-	-
5043	4A6	-	-	-	++++	-	-
5044	4A7	-	-	-	++++	-	-
5045	4A8	++	-	-	++++	-	-
5046	4A9	-	-	-	++++	-	-
5047	4A10	-	-	-	++++	-	-
5048	4A11	+	-	-	++++	-	-
5049	4A12	-	-	-	++++	-	-
5050	4B1	-	-	-	++++	-	-
5051	4B2	-	-	-	++++	-	-
5052	4B3	-	-	-	++++	-	-
5053	4B4	-	-	-	++++	-	-
5054	4B5	+++	+	-	++++	-	-
5055	4B6	-	-	-	++++	-	-
5056	4B7	++	-	-	++++	-	-
5057	4B8	-	-	-	++++	-	-
5058	4B9	-	-	-	++++	-	-
5059	4B10	-	-	-	++++	-	-
5060	4B11	-	-	-	++++	-	-
5061	4B12	-	-	-	++++	-	-
5062	4C1	-	-	-	++++	-	-
5063	4C2	-	-	-	++++	-	-
5064	4C3	-	-	-	++++	-	-
5066	4C5	-	-	-	++++	-	-
5067	4C6	++	++	-	++++	-	-
5068	4C7	-	-	-	++++	-	-
5069	4C8	-	-	-	++++	-	-
5071	4C10	-	-	-	++++	-	-
5072	4C11	-	-	-	++++	-	-
5073	4C12	+++	-	-	++++	-	-
5074	4D1	+++	+	-	++++	-	-
5075	4D2	+++	-	-	++++	+	-
5076	4D3	+++	++	-	++++	+	-
5077	4D4	-	-	-	++++	-	-
5078	4D5	-	-	-	++++	-	-
5079	4D6	-	-	-	++++	-	-
5080	4D7	-	-	-	++++	-	-
5081	4D8	-	-	-	++++	-	-

【図 9 B】

TRAC ID		CHO-FZD7	CHO-FZD8	CHO-FZD9	CHO-FZD10	CHO-GPI 対照	結合プロファイル
5038	4A1	-	-	-	-	-	4
5039	4A2	+	-	-	-	-	1,4,7
5040	4A3	-	-	-	-	-	4
5041	4A4	-	-	-	-	-	4
5042	4A5	-	-	-	-	-	4
5043	4A6	-	-	-	-	-	4
5044	4A7	-	-	-	-	-	4
5045	4A8	-	-	-	-	-	1,4
5046	4A9	-	-	-	-	-	4
5047	4A10	-	-	-	-	-	4
5048	4A11	-	-	-	-	-	1,4
5049	4A12	-	-	-	-	-	4
5050	4B1	-	-	-	-	-	4
5051	4B2	-	-	-	-	-	4
5052	4B3	-	-	-	-	-	4
5053	4B4	-	-	-	-	-	4
5054	4B5	++	-	-	-	-	1,2,4,7
5055	4B6	-	-	-	-	-	4
5056	4B7	++	-	+	-	-	1,4,7,9
5057	4B8	-	-	++++	++	-	4,9,10
5058	4B9	-	-	-	-	-	4
5059	4B10	-	-	-	-	-	4
5060	4B11	-	-	-	-	-	4
5061	4B12	-	-	-	-	-	4
5062	4C1	-	-	-	-	-	4
5063	4C2	-	-	-	-	-	4
5064	4C3	-	-	-	-	-	4
5066	4C5	-	-	-	-	-	4
5067	4C6	-	-	-	-	-	1,2,4
5068	4C7	-	-	-	-	-	4
5069	4C8	-	-	-	-	-	4
5071	4C10	-	-	-	-	-	4
5072	4C11	-	-	-	-	-	4
5073	4C12	+++	-	-	-	-	1,4,7
5074	4D1	+++	-	-	-	-	1,2,4,7
5075	4D2	++	-	-	-	-	1,2,4,7
5076	4D3	++++	+	+	-	-	1,2,4,5,7,8,9
5077	4D4	-	-	-	-	-	4
5078	4D5	-	-	-	-	-	4
5079	4D6	-	-	-	-	-	4
5080	4D7	-	-	-	-	-	4
5081	4D8	-	-	-	-	-	4

10

20

30

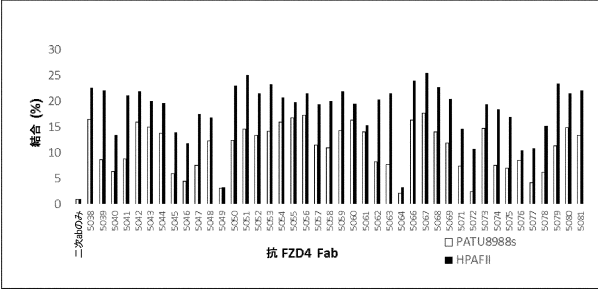
40

50

【表 10】

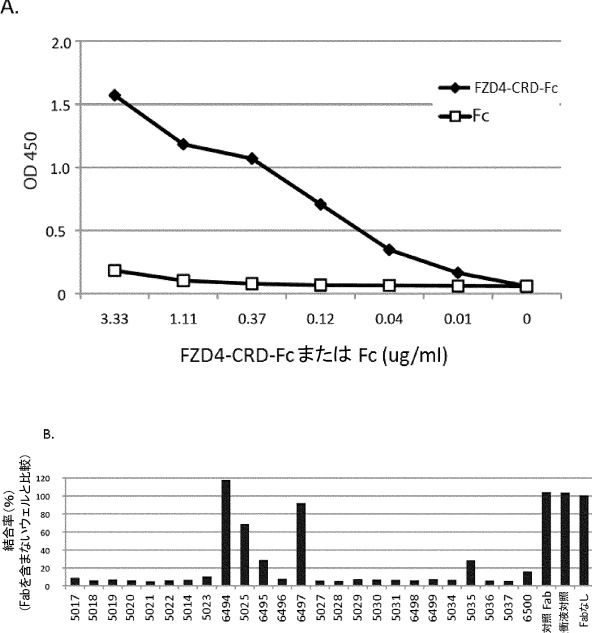
TRAC ID	Fab	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	TRAC ID	Fab	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
5038	F24 A1	2.04E+06	3.79E-03	1.85E-09	5059	F24 B10	1.38E+06	3.08E-03	2.23E-09
5039	F24 A2	6.16E+05	1.58E-03	2.57E-09	5060	F24 B11	2.26E+06	3.64E-03	1.61E-09
5040	F24 A3	3.45E+06	3.42E-03	9.92E-10	5061	F24 B12	1.16E+06	3.12E-03	2.69E-09
5041	F24 A4	2.84E+06	6.02E-04	2.12E-10	5062	F24 C1	1.58E+06	2.56E-03	1.85E-09
5042	F24 A5	2.44E+06	2.78E-03	1.14E-09	5063	F24 C2	5.50E+05	3.32E-03	6.04E-09
5043	F24 A6	8.84E+05	8.51E-04	9.63E-10	5064	F24 C3	1.65E+06	6.80E-03	4.12E-09
5044	F24 A7	1.59E+05	2.42E-03	1.53E-08	5066	F24 C5	2.32E+06	3.13E-03	1.35E-09
5045	F24 A8	1.61E+06	2.10E-03	1.80E-09	5067	F24 C6	2.77E+06	4.50E-03	1.63E-09
5046	F24 A9	1.76E+06	9.69E-04	5.50E-10	5068	F24 C7	2.54E+06	4.41E-03	1.73E-09
5047	F24 A10	2.32E+06	9.21E-03	3.96E-09	5069	F24 C8	1.99E+06	6.43E-03	3.24E-09
5048	F24 A11	8.50E+05	3.16E-03	3.71E-09	5071	F24 C10	1.66E+06	2.75E-03	1.66E-09
5049	F24 A12	3.62E+06	5.14E-03	1.42E-09	5072	F24 C11	3.78E+05	5.77E-04	1.53E-09
5050	F24 B1	2.57E+06	4.65E-03	1.81E-09	5073	F24 C12	3.84E+06	1.41E-03	4.22E-10
5051	F24 B2	3.06E+06	4.56E-03	1.49E-09	5074	F24 D1	1.20E+06	4.34E-03	3.61E-09
5052	F24 B3	2.84E+06	4.46E-03	1.57E-09	5075	F24 D2	9.28E+05	1.10E-03	1.19E-09
5053	F24 B4	2.72E+06	4.38E-03	1.61E-09	5076	F24 D3	1.04E+06	2.61E-03	2.50E-09
5054	F24 B5	1.95E+06	4.21E-03	2.16E-09	5077	F24 D4	9.48E+05	1.80E-03	1.90E-09
5055	F24 B6	2.52E+06	3.73E-03	1.48E-09	5078	F24 D5	6.00E+05	2.83E-03	4.71E-09
5056	F24 B7	2.55E+06	2.92E-03	1.14E-09	5079	F24 D6	1.72E+06	5.48E-03	3.19E-09
5057	F24 B8	1.76E+06	4.50E-03	2.56E-09	5080	F24 D7	2.77E+06	5.07E-03	1.83E-09
5058	F24 B9	1.51E+06	4.28E-03	2.84E-09	5081	F24 D8	2.74E+06	3.74E-03	1.86E-09

【表 11】



10

【表 12】



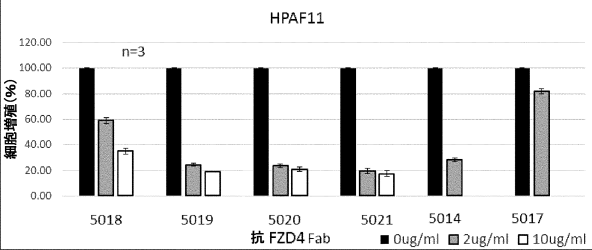
【表 13】

FZD4 Fab	バインダー ID	IF 結合プロフィール	wnt3a TOPflash 阻害 (%)
TRAC ID			
5017	4A1	4	(-7)
5018	4A2	1,2,4,5,7,8,9	97.4
5019	4A3	1,2,4,5,7,8,9	97.9
5020	4A4	1,2,4,5,7,8,9	97.6
5021	4A5	1,2,4,5,7,8,9	97.7
5022	4A6	1,2,4,5,7,8,9	94.5
5014	4A7	1,2,4,5,7,8,9	96.1
5023	4A8	1,2,4,5,7,8,9	97.3
6494	4A9	1,2,4,5,7,8,9	N/A
5025	4A10	1,2,4,5,7,8,9	96.7
6495	4A11	1,2,4,5,7,8,9	97.3
6496	4A12	1,2,4,5,7,8,9	N/A
6497	4B1	1,4,5,7,9	15
5027	4B2	4	11
5028	4B3	1,4,7	23
5029	4B4	4,9	15
5030	4B5	4	12
5031	4B6	1,2,4,7	33
6498	4B7	1,2,4,7	24
6499	4B8	4	28
5034	4B9	1,2,4,5,7	(-7)
5035	4B10	1,4,7	(-19)
5036	4B11	1,2,4,5,7,8,9	87.6
5037	4B12	1,2,4,5,7,8,9	83
6500	4C1	1,2,4,5,7,8,9	N/A

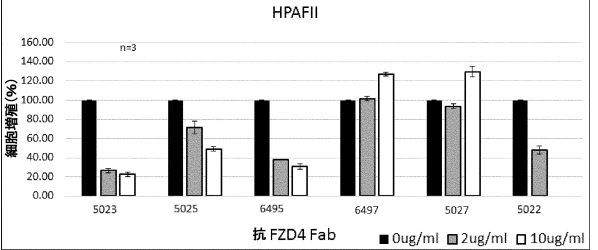
NA-試験せず

30

【表 14 A】



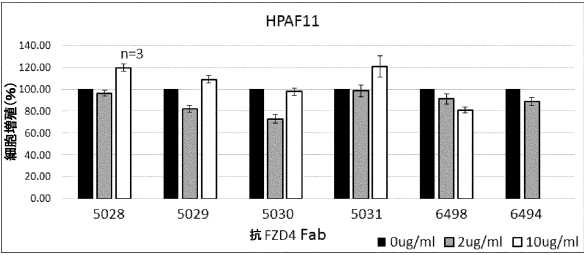
【表 14 B】



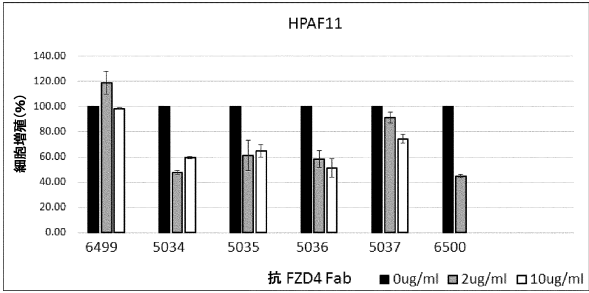
40

50

【図 1 4 C】

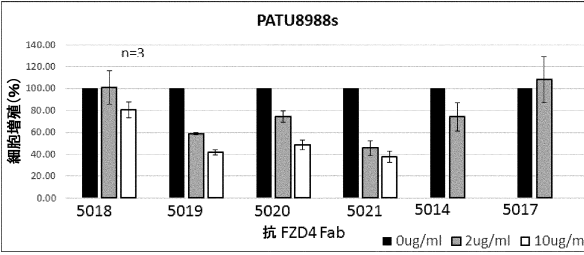


【図 1 4 D】

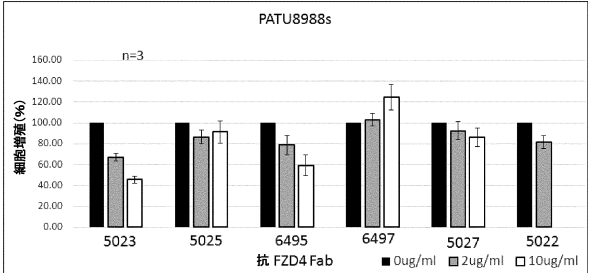


10

【図 1 4 E】

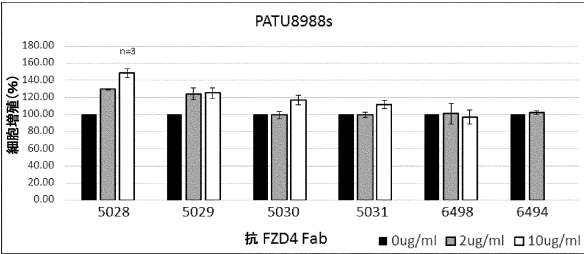


【図 1 4 F】

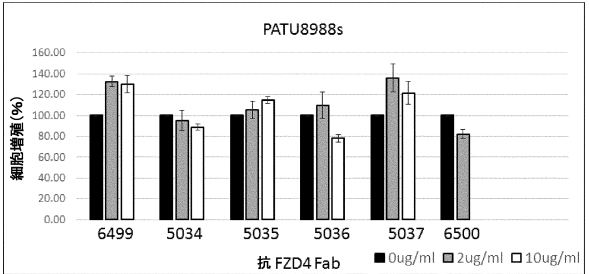


20

【図 1 4 G】



【図 1 4 H】



30

40

50

【 図 1 5 】

TRAC ID	HPAFII				PATU8988s	
	FZD4	阻害	阻害		阻害	阻害
	バインダー ID	(%)	(%)		(%)	(%)
		2ug/ml	10ug/ml		2ug/ml	10ug/ml
5017	4A1	18.2	na		-8.0	na
5018	4A2	41.2	65.1		-0.6	19.7
5019	4A3	75.7	81.3		41.3	58.4
5020	4A4	76.5	79.2		25.7	51.6
5021	4A5	80.4	82.6		54.4	62.5
5022	4A6	52.0	na		18.5	na
5014	4A7	71.9	na		25.8	na
5023	4A8	73.5	77.2		32.9	54.4
6494	4A9	11.1	na		-1.9	na
5025	4A10	28.7	51.0		13.7	8.5
6495	4A11	62.3	69.2		21.1	40.7
6496	4A12	na	na		na	na
6497	4B1	-1.6	-26.7		-3.0	-24.3
5027	4B2	6.3	-29.5		7.5	13.6
5028	4B3	3.8	-19.6		-29.1	-48.0
5029	4B4	17.9	-8.9		-23.7	-24.9
5030	4B5	27.2	2.3		0.9	-16.7
5031	4B6	1.6	-20.6		0.7	-11.4
6498	4B7	8.9	19.2		-0.9	3.2
6499	4B8	-18.4	1.6		-32.5	-29.8
5034	4B9	52.3	40.7		5.0	11.5
5035	4B10	38.8	35.4		-5.1	-14.6
5036	4B11	41.9	48.8		-9.6	22.1
5037	4B12	8.9	25.7		-35.7	-21.3
6500	4C1	55.2	na		18.0	na

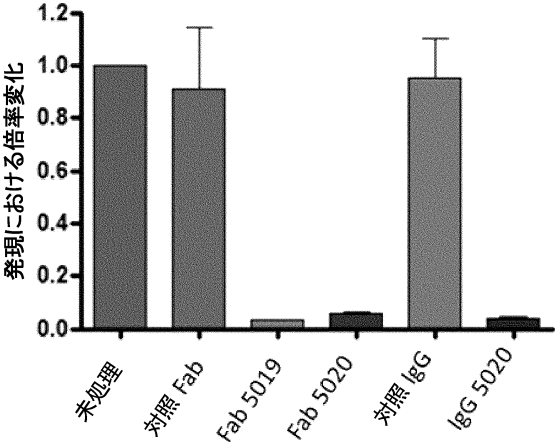
SRBアッセイにより決定
na-試験せず

【 図 1 6 】

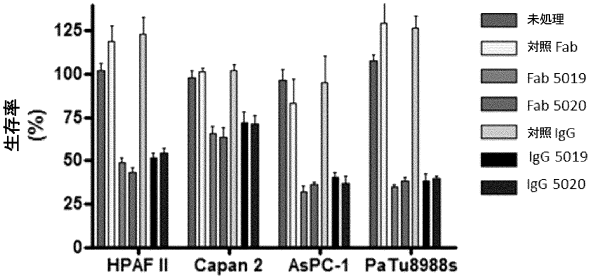
FZD4 Fab	バインダーID	IF結合 プロファイル	wnt3a TOPflash 阻害 (%)	GI% HPAFII 2ug/ml	GI% PATU8988s 2ug/ml
TRAC ID					
5017	4A1	4	-7	18.2	-8
5018	4A2	1,2,4,5,7,8,9	97.4	41.2	-0.6
5019	4A3	1,2,4,5,7,8,9	97.9	75.7	41.3
5020	4A4	1,2,4,5,7,8,9	97.6	76.5	25.7
5021	4A5	1,2,4,5,7,8,9	97.7	80.4	54.4
5022	4A6	1,2,4,5,7,8,9	94.5	52	18.5
5014	4A7	1,2,4,5,7,8,9	96.1	71.9	25.8
5023	4A8	1,2,4,5,7,8,9	97.3	73.5	32.9
6494	4A9	1,2,4,5,7,8,9	na	11.1	-1.9
5025	4A10	1,2,4,5,7,8,9	96.7	28.7	13.7
6495	4A11	1,2,4,5,7,8,9	97.3	62.3	21.1
6496	4A12	1,2,4,5,7,8,9	na	na	na
6497	4B1	1,4,5,7,9	15	-1.6	-3
5027	4B2	4	11	6.3	7.5
5028	4B3	1,4,7	23	3.8	-29.1
5029	4B4	4,9	15	17.9	-23.7
5030	4B5	4	12	27.2	0.9
5031	4B6	1,2,4,7	33	1.6	0.7
6498	4B7	1,2,4,7	24	8.9	-0.9
6499	4B8	4	28	-18.4	-32.5
5034	4B9	1,2,4,5,7	(-7)	52.3	5
5035	4B10	1,4,7	(-19)	38.8	-5.1
5036	4B11	1,2,4,5,7,8,9	87.6	41.9	-9.6
5037	4B12	1,2,4,5,7,8,9	83	8.9	-35.7
6500	4C1	1,2,4,5,7,8,9	na	55.2	18

NA-試験せず

【 図 1 7 】



【 図 1 8 A 】



10

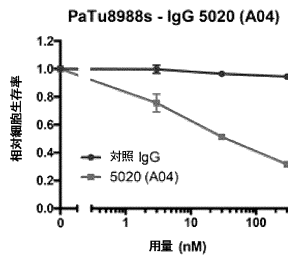
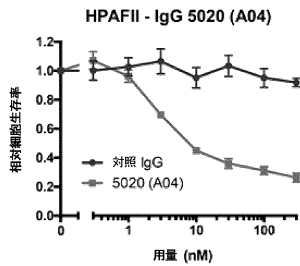
20

30

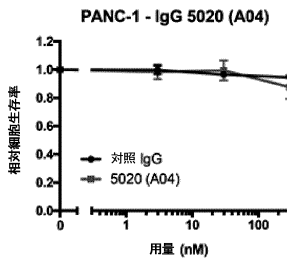
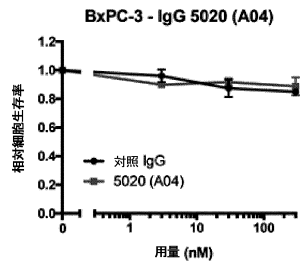
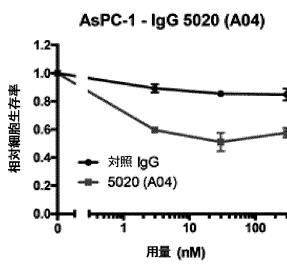
40

50

【図 18B - 1】

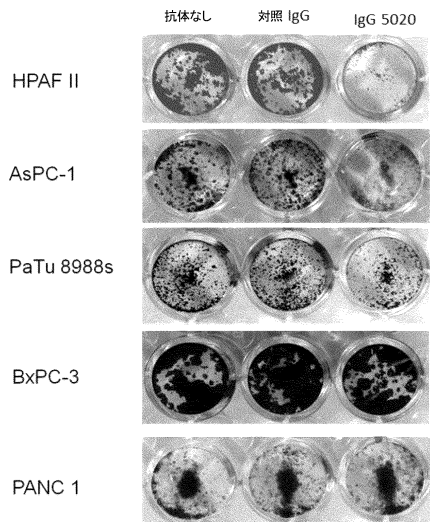


【図 18B - 2】



10

【図 19】



コロニー形成阻害

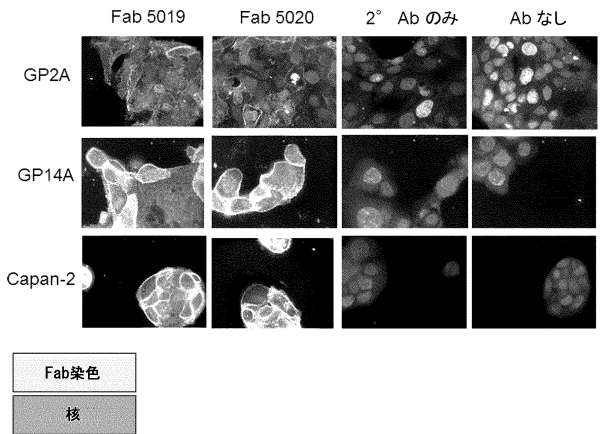
コロニー形成阻害

コロニー形成阻害

効果なし

効果なし

【図 20】



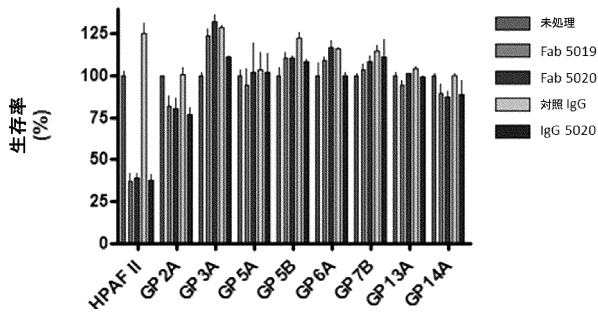
20

30

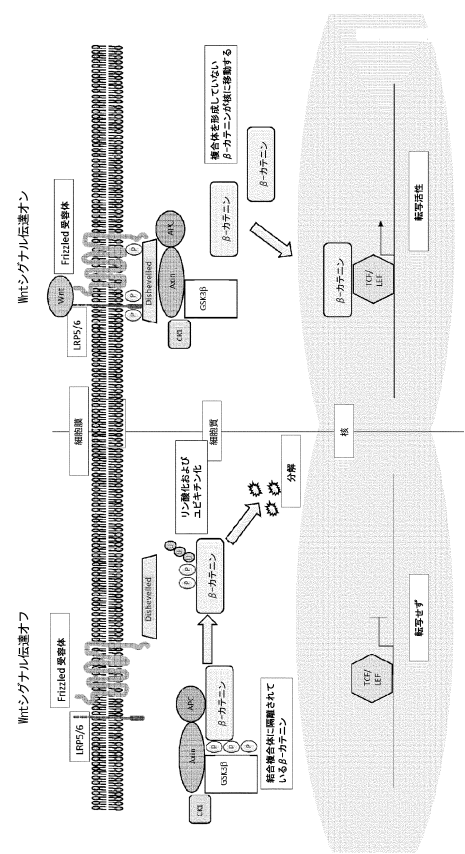
40

50

【図 2 1】



【図 2 2】



【配列表】

0007631309000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 31/537 (2006.01)
 A 6 1 K 38/12 (2006.01)
 A 6 1 K 31/352 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4745 (2006.01)
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)
 G 0 1 N 33/531 (2006.01)
 A 6 1 K 31/704 (2006.01)
 A 6 1 K 31/554 (2006.01)
 A 6 1 K 31/5517 (2006.01)
 A 6 1 K 31/407 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/395 L
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 31/537
 A 6 1 K 38/12
 A 6 1 K 31/352
 A 6 1 K 31/4745
 G 0 1 N 33/53 D
 G 0 1 N 33/531 A
 A 6 1 K 31/704
 A 6 1 K 31/554
 A 6 1 K 31/5517
 A 6 1 K 31/407
 C 1 2 N 15/13 Z N A

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 シドウ サチデフ エス .

カナダ エム5エス 2エム3 オンタリオ州 トロント ブランズウィック アベニュー 135

(72)発明者 バン グオフア

カナダ エル6ジェイ 4アール2 オンタリオ州 オークビル トレローン アベニュー 182

(72)発明者 モファット ジェイソン

カナダ エム5エム 3ビー4 オンタリオ州 トロント グリア ロード 361

(72)発明者 ガカール アマンディーブ

アメリカ合衆国 95125 カリフォルニア州 サンノゼ ウェストゲイト アベニュー 2308

- (72)発明者 アンジェ ステファン
カナダ エル5エム 0エイ1 オンタリオ州 ミシソーガ カリスト コート 29
- (72)発明者 ステインハート ザチャリー
カナダ エル4ジェイ 7ティー7 オンタリオ州 ソーンヒル マルホランド ドライブ 63
- (72)発明者 バヴロヴィック ズヴェズダン
カナダ エヌ1エイチ 1ワイ9 オンタリオ州 ゲルフ エクストラ ストリート 14
- (72)発明者 アダムス ジャレット
カナダ エム4エス 1シー3 オンタリオ州 トロント バリオル ストリート 1502 - 45

審査官 大西 隆史

- (56)参考文献 国際公開第2015/023851(WO, A1)
国際公開第2017/127933(WO, A1)
MABS, 2018年, Vol.10, No.8, PP.1157-1167

- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
- C12N 15/00 - 15/90
C07K 1/00 - 19/00
C12N 1/00 - 7/08
C12P 1/00 - 41/00
A61P 1/00 - 43/00
A61K 35/00 - 51/12
A61K 31/00 - 33/44
G01N 33/48 - 33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
PubMed