

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6931609号  
(P6931609)

(45) 発行日 令和3年9月8日(2021.9.8)

(24) 登録日 令和3年8月18日(2021.8.18)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/13	(2006.01)
C 07 K 16/28	(2006.01)
C 07 K 16/46	(2006.01)
C 12 N 5/10	(2006.01)
C 12 N 5/16	(2006.01)

C 12 N	15/13	C 12 N	15/13	Z N A
C 07 K	16/28	C 07 K	16/28	
C 07 K	16/46	C 07 K	16/46	
C 12 N	5/10	C 12 N	5/10	
C 12 N	5/16	C 12 N	5/16	

請求項の数 22 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-532709 (P2017-532709)
(86) (22) 出願日	平成27年12月18日(2015.12.18)
(65) 公表番号	特表2018-506961 (P2018-506961A)
(43) 公表日	平成30年3月15日(2018.3.15)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2015/080654
(87) 國際公開番号	W02016/097370
(87) 國際公開日	平成28年6月23日(2016.6.23)
審査請求日	平成30年12月4日(2018.12.4)
(31) 優先権主張番号	1422605.4
(32) 優先日	平成26年12月18日(2014.12.18)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)
微生物の受託番号	ECACC 15121601
微生物の受託番号	ECACC 15121602

(73) 特許権者	512325222 ベルゲン テクノロジオーヴァーフォリン グ エイエス ノルウェー エヌ-5006 ベルゲン, トルモーレンズゲート 51
(73) 特許権者	514276920 ベルゲンビオ アーエスアー ノルウェー国, エン-5009 ベルゲン , ジョナス ライズ ヴェイ 91
(74) 代理人	100107766 弁理士 伊東 忠重
(74) 代理人	100070150 弁理士 伊東 忠彦
(74) 代理人	100091214 弁理士 大貫 進介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗A x 1 アンタゴニスト抗体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

A x 1 と結合する抗体であって、以下の：

A ) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 、及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含む抗体 V H ドメイン；及び、

配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 、及び配列番号 2 8 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を含む抗体 V L ドメイン；又は

B ) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1 、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 、及び配列番号 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含む抗体 V H ドメイン；及び

配列番号 8 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1 、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2 、及び配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を含む抗体 V L ドメイン；を含む、抗体。

## 【請求項 2】

以下の：

i ) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する V H ドメインを含む A ) に記載の抗体；又は  
i i ) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有する V H ドメインを含む B ) に記載の抗体；

である、請求項 1 に記載の抗体。

10

20

**【請求項 3】**

以下の：

- i ) 配列番号 22 のアミノ酸配列を有する V L ドメインを含む A ) に記載の抗体；又は
- i i ) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する V L ドメインを含む B ) に記載の抗体；

である、請求項 2 に記載の抗体。

**【請求項 4】**

当該抗体が、

- ( i ) 抗体の重鎖定常領域及び / 若しくは抗体の軽鎖定常領域の全て若しくは部分；
- ( i i ) 全抗体であって、場合によっては、前記全抗体は Ig G 抗体である全抗体；又は
- ( i i i ) 抗原結合性抗体断片であって、場合によっては、前記抗原結合性抗体断片は、  
F v 、 s c F v 、 d s F V 、 F d 、 F a b 、 F ( a b ' ) 2 、ミニボディ、ダイアボディ  
、一本鎖ダイアボディ、直列型 s c F v 、 T a n d A b 、バイボディ、トリボディ、カッパ(ラムダ)ボディ、 Bi T E 、 D V D - I g 、 S I P 、 S M I P 又は D A R T である抗  
原結合性抗体断片；

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体。

**【請求項 5】**

前記抗体がヒト化抗体又はキメラ抗体である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗  
体。

**【請求項 6】**

前記 A × 1 がヒト A × 1 である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体。

20

**【請求項 7】**

$6 \times 10^{-10} M$  以下の  $K_D$  で A × 1 を結合する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載  
の抗体。

**【請求項 8】**

$8 \times 10^{-5} M^{-1} s^{-1}$  以上の  $k_{on}$  で A × 1 を結合する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一  
項に記載の抗体。

**【請求項 9】**

- ( i )  $10^{-3} M$  超の  $K_D$  でマウス A × 1 を結合する；
- ( i i )  $10^{-3} M$  超の  $K_D$  でヒト M e r を結合する；及び / 又は
- ( i i i )  $10^{-3} M$  超の  $K_D$  でヒト T y r o 3 を結合する；

30

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体。

**【請求項 10】**

A × 1 の G a s 6 への結合を阻害する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体。

**【請求項 11】**

前記抗体が、A × 1 受容体の下流シグナル伝達を阻害する、請求項 1 ~ 10 のいずれか  
一項に記載の抗体。

**【請求項 12】**

細胞死率を増加させる、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体。

**【請求項 13】**

腫瘍成長を阻害する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗体。

40

**【請求項 14】**

検出可能標識、酵素又は毒素と、場合によりペプチジル結合又はリンカーを介して複合  
体化された、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の抗体。

**【請求項 15】**

以下のいずれかから得られる抗体：

- A ) ハイブリドーマ U T - 10 C 9 - B 9 ；又は
- B ) ハイブリドーマ W R - 10 G 5 - E 5 。

**【請求項 16】**

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体の、抗体又は抗体の V H 及び V L ドメイン  
をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。

50

**【請求項 17】**

請求項 16 に記載の核酸で形質転換された宿主細胞。

**【請求項 18】**

抗体又は抗体の V H 及び V L ドメインの作製方法であって、前記抗体又は抗体の V H 及び V L ドメインの作製条件下で、請求項 17 に記載の宿主細胞を培養することを含む、前記方法。

**【請求項 19】**

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体、又はその免疫複合体を、薬学的に許容される賦形剤とともに含む組成物。

**【請求項 20】**

免疫チェックポイントモジュレーター及び / 又は A × 1 以外の標的に特異的な抗腫瘍抗体を更に含む、請求項 19 に記載の組成物。

10

**【請求項 21】**

治療方法における使用のための、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項 19 若しくは 20 のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 22】**

増殖性疾患の治療方法における使用のための、請求項 21 に記載の抗体又は組成物であつて、

場合によっては、前記増殖性疾患ががん又は線維症である、抗体又は組成物。

**【発明の詳細な説明】**

20

**【技術分野】****【0001】**

本開示は、A × 1 タンパク質と特異的に結合する抗体に関する。また、抗 A × 1 抗体の作製方法及び使用方法も開示する。

**【背景技術】****【0002】**

A × 1 は、ビタミン K 依存性リガンド Gas6 (growth arrest-specific 6、増殖停止特異的 6) を共有する TAM (Tyro3 - A × 1 - Mer) 受容体チロシンキナーゼ (RTK) のメンバーである。TAM ファミリー RTK は、細胞生存性、増殖、自食、遊走、血管新生、血小板凝集及びナチュラルキラー細胞分化を含む多様な範囲の細胞応答を調節する。A × 1 は、多くの胚組織に発現し、間葉及び神経の発生に関与すると考えられており、成体組織での発現が主に平滑筋細胞に限定される (MG I Gene Expression Database; www.informatics.jax.org)。A × 1 活性化は、Akt、MAP キナーゼ、NF - B、STAT 及びその他を含む、いくつかのシグナル伝達経路と連係している。A × 1 は、慢性骨髓性白血病患者由来の形質転換遺伝子として最初に同定されて以降、各種の高度悪性癌との関連性、及び予後不良との相関性が示してきた。

30

**【0003】**

広範囲にわたる固形腫瘍及び骨髓性白血病に、A × 1 受容体の過剰発現が認められている (Linger et al., Adv Cancer Res. 100: 35, 2008; Linger et al., Expert Opin Ther Targets. 14: 1073, 2010)。

40

**【0004】**

A × 1 の発現は、悪性進行と相関性があり、膵臓癌 (Song et al., Cancer. 117: 734, 2011)、前立腺癌 (Paccez et al., Oncogene. 32: 698, 2013)、肺癌 (Ishikawa et al., Ann Surg Oncol. 2012; Zhang et al., Nat Genet. 44: 852, 2012)、乳癌 (Gjerdrum, Proc natl Acad Sci USA 107: 1124, 2010)、大腸癌 (Yuen et al., PLoS One, 8: e54211, 2013) 及び急性骨髓性白血病 (AML) (Ben-Ba

50

talla et al, Blood 122:2443, 2013)を含む、いくつかの悪性疾患において患者の全生存期間を低下させる独立予測因子である。

#### 【0005】

腫瘍関連のマクロファージ (Loges et al, Blood. 115:2264, 2010) または自己分泌機構 (Gjerdrum, Proc natl Acad Sci USA 107:1124, 2010) によって分泌されるタンパク質リガンド (Gas6) によって、Ax1シグナル伝達が活性化されると、受容体の二量化、自己リン酸化、及び下流シグナル伝達が、例えばPI3キナーゼ (PI3K) - AKT経路、特にAKT経路及びマイトジエン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) 経路 (Korschunov, Clinical Science. 122:361, 2012) 経由などで誘発される。また、他のチロシンキナーゼ受容体、例えば上皮成長因子 (EGFR)とのヘテロ二量体化も発生することが報告されている (Linger et al, Expert Opin Ther Targets. 14:1073, 2010; Meyer et al Science Signalling 6:ra66, 2013)。  
10

#### 【0006】

腫瘍細胞内でのAx1の異常活性化は、*in vitro*及び*in vivo*の標的療法に対する薬剤耐性の獲得と広範囲にわたり関連している (Zhang et al. Nat Genet. 44:852, 2012; Byers et al. Clin Cancer Res. 19:279, 2013)。Ax1標的薬は腫瘍形成、転移を阻止するとともに、トリプルネガティブ乳癌、ホルモン耐性前立腺癌及び肺腺癌を含む、いくつかの実験的癌モデルにおいてEMT / CSCの形質を転換させることにより薬剤耐性 (例えばエルロチニブに対する) を克服している (Holland et al. Cancer Res. 70:1544, 2010; Gjerdrum, Proc natl Acad Sci USA 107:1124, 2010; Zhang et al. Nat Genet. 44:852, 2012; Paccez et al, Oncogene. 32:698, 2013)。  
20

#### 【0007】

Ax1及び抗Ax1抗体に関する他の出願としては、EP2267454A2 [Ax1の測定による癌細胞浸潤性の診断及び予防 Max Planck]; WO2009063965 [抗Ax1 Chugai Pharmaceutical]; WO2011159980A1 [抗Ax1-Genentech]; WO2011014457A1 [Ax1及びVEGFアンタゴニスト併用療法-Genentech]; WO2012-175692A1 [抗Ax1 20G7-D9-INSERM]; WO2012-175692A1 [抗Ax1-3E3E8-INSERM]; WO2009/062690A1 [抗Ax1-U3 Pharma] 及びWO2010/130751A1 [ヒト化抗Ax1-U3 Pharma] が挙げられる。  
30

#### 【0008】

Ax1が腫瘍形成に果たす役割を考慮すると、Ax1との特異的な結合に有利な特性をもつ抗体の更なる同定が望まれる。本開示はこのような抗体に関する。

#### 【図面の簡単な説明】

40

#### 【0009】

【図1】Mab 10C9及び10G5と、組み換えヒト(rh)Ax1、rhMer及びrhTyro3との相互作用を示す結合性分析から得たセンサーグラムの重ね合わせプロット。プランクの表面シグナル減算後の曲線を示す。

【図2】リガンド (Mab 10C9、Mab 10G5及びrmGas6) と、rhAx1、組み換えマウス(rm)Ax1及びrhTyro3をコーティングしたセンサーチップCM5との相互作用を示すBiacore分析。プランクの表面シグナル減算後の曲線を示す。

【図3】リガンド (Mab 10C9及び10G5) と、組み換えヒトAx1 (rhAx1) 及びカニクイザル由来Ax1抗原 (cyno Ax1) をコーティングしたセンサーチ

50

ツプC M 5との相互作用を示す Bi a c o r e 分析。プランクの表面シグナル減算後の曲線を示す。

【図4】M A b 1 0 C 9 及び 1 0 G 5 と、 Bi a c o r e センサーチップ表面に固定化された r h A x 1 との相互作用の速度論的分析。異なる抗体濃度 ( 1 0 C 9 は 1 . 3 ~ 6 6 6 . 7 n M 、 1 0 G 5 は 0 . 3 ~ 1 6 6 . 7 n M ) でのセンサーグラムの重ね合わせプロットを示す。正確な速度論的分析は、 B I A e v a l u a t i o n ソフトウェア、及び 1 : 1 の L a n g m u i r 結合モデルによるカーブフィッティングを使用して実施した。 2 5 での抗原結合の親和性定数 ( 速度論及び定常状態 ) ならびに算出された半減期を以下の表1に示す。

【表1】

10

MAb	結合速度 ( $k_{on}$ ; M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	解離速度 ( $k_{off}$ ; s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M)	半減期 ( $t_{1/2}$ ; 分)
10C9	1. 61x10 <sup>6</sup>	2. 89x10 <sup>-4</sup>	1. 80x10 <sup>-10</sup>	39. 97分
10G5	8. 29x10 <sup>5</sup>	4. 39x10 <sup>-4</sup>	5. 30x10 <sup>-10</sup>	26. 32分

20

表1

【図5】Bi a c o r e 3 0 0 0 を使用した、 M A b 1 0 C 9 または 1 0 G 5 ( 第 1 のサンプル ) と、抗 A x 1 M A b M A B 1 5 4 ( R & D S y s t e m s ) 、抗体 1 0 C 9 及び 1 0 G 5 、 r h G a s 6 及び r m G a s 6 ( 第 2 のサンプル ) との間の競合性分析。異なる第 2 のサンプルを使用したときのセンサーグラムの重ね合わせプロットを示す。第 1 のサンプル ( 1 0 C 9 または 1 0 G 5 ) 及び第 2 のサンプルの注入開始点を矢印で示す。

30

【図6】3次元 ( 3 D ) 器官型の腫瘍腫瘍の発現に対する抗 A x 1 抗体の効果。高悪性度ヒト乳癌細胞 M D A - M B - 2 3 1 を対照 I g G ( 中上段パネルに示す ) または抗 A x 1 M A b ( 下段パネル ) のいずれかで処置すると同時に細胞外マトリックスの存在下で増殖させ、このような 3 D 器官型モデルを作成した。陽性対照として、 A x 1 発現をノックダウンした M D A - M B - 2 3 1 細胞を示す。

【図7】樹立した 3 D 器官型の腫瘍腫瘍に対する抗 A x 1 抗体 1 0 C 9 及び 1 0 G 5 の効果。ヒト乳癌細胞 ( M D A - M B - 2 3 1 ) の発現後 9 日の星形 3 D 器官型腫瘍を、対照 I g G または抗 A x 1 抗体 1 0 C 9 及び 1 0 G 5 のいずれかで 7 2 時間処置した。画像は明視野を使用して取得した。画像の矢印はアポトーシスにより分解している星形細胞を示す。

40

【図8】いずれかの抗体またはマルチキナーゼ阻害剤フォレチニブによる、 A x 1 受容体発現に対する治療効果を示すウェスタンプロット解析。高悪性度ヒト乳癌細胞 M D A - M B - 2 3 1 を、抗体 ( 無関係な I g G 対照及び抗 A x 1 M A b 1 0 C 9 、 1 0 G 5 及び M A b # 3 ) またはフォレチニブで 2 4 時間処理した後、 S D S - P A A ゲルにロードした。負荷対照としてアクチンタンパク質のレベルを使用した。

【図9】マウスモノクローナル抗体 1 0 C 9 及び 1 0 G 5 の存在下での、 G a s 6 媒介性 A x 1 シグナル伝達の阻害を示すウェスタンプロット解析。 S e r <sup>4 7 3</sup> での A k t のリン酸化を、 A x 1 活性に代わる読み取り値として使用した。 M は分子量マークターである。抗ホスホ - A k t ( S e r <sup>4 7 3</sup> ) 、または負荷対照としての抗 G A P D H ( グリセリンアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ ) を用いて、免疫プロット法により全細胞可溶化

50

物を精査した。

【図10】抗A×1モノクローナル抗体10C9及び10G5由来のVH及びVLドメインのアミノ酸配列。重鎖及び軽鎖のCDR領域に下線が引かれている。10C9 VHドメインのCDR-H1にある推定N-グリコシル化部位を太字で示す。VHドメインの1位のグルタミン(Q)がグルタミン酸(E)と置換された場合の10G5のVH変異体の配列も含まれている。この変異体を「10G5[Q1E]」と称する。

【図11】抗A×1マウス抗体10C9、それに相当するキメラ(マウス可変/ヒト定常)抗体(c10C9)及び抗体10G5のキメラ変異体(c10G5)の、A×1陽性細胞に対する用量依存的結合性。濃度の異なるマウス及びキメラ抗体の、トリプルネガティブ乳癌細胞株MDA-MB-231に対する結合性をフローサイトメトリーで試験した。  
結合したマウス及びキメラ抗体を、マウスIgG(H+L)(1:500希釈)、またはヒトIgG(H+L)(1:300希釈)(いずれもJackson Immuno Research製)それぞれに特異的なAPC複合体ロバF(ab')<sub>2</sub>断片を用いて検出した。細胞染色は、Accuri C6フローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して測定した。MF1は幾何平均蛍光強度である。

【図12】キメラ抗体c10C9及びc10G5、ならびにその相当するマウス抗体と、組み換えヒト(rh)A×1との相互作用を示すBiacore結合性分析から得たセンサーグラムの重ね合わせプロット。プランクの表面シグナル減算後の曲線を示す。

【図13】キメラ抗体c10C9及びc10G5と、Biacoreセンサーチップ表面に固定化されたrhA×1との相互作用の速度論的分析。異なる抗体濃度(c10C9は1.3~666.7nM、c10G5は0.3~166.7nM)でのセンサーグラムの重ね合わせプロットを示す。正確な速度論的分析は、BIAevaluationソフトウェア、及び1:1のLangmuir結合モデルによるカーブフィッティングを使用して実施した。25での抗原結合の親和性定数(速度論及び定常状態)ならびに算出された半減期を以下の表2に示す。

【表2】

MAb	結合速度 (k <sub>on</sub> ; M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	解離速度 (k <sub>off</sub> ; s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (M)	半減期 (t <sub>1/2</sub> ; 分)
c10C9	2.16x10 <sup>6</sup>	2.19x10 <sup>-4</sup>	1.02x10 <sup>-10</sup>	52.75分
C10G5	1.64x10 <sup>6</sup>	1.69x10 <sup>-4</sup>	1.03x10 <sup>-10</sup>	68.36分

表2

【図14】キメラ抗体10G5によるA549異種移植腫瘍成長の阻害。平均腫瘍サイズが100mm<sup>3</sup>に達した時点で、週2回、20mg/kgの抗体の腹腔内投与を開始した。ビヒクル(滅菌PBS)またはキメラ10G5による処置群での腫瘍成長曲線を示す。エラーバーは、平均値の標準誤差(SEM)を表す。統計分析は双方向ANOVAを使用して実施した。\*\*はP<0.01である。

【図15】キメラ抗体10G5によるMv4-11異種移植腫瘍成長の阻害。平均腫瘍サイズが200mm<sup>3</sup>に達した時点で、週2回、30mg/kgの抗体の腹腔内投与を開始した。ビヒクル(滅菌PBS)またはキメラ10G5による処置群での腫瘍成長曲線を示す。エラーバーは、平均値の標準誤差(SEM)を表す。統計分析は双方向ANOVAを

使用して実施した。 \* は  $p < 0.05$  、 \*\* は  $p < 0.01$  、 \*\*\* は  $p < 0.001$  である。

【図16】実施例16からのデータ。抗体G1y<sub>max</sub>-c10G5は、c10G5と比較して、A549腫瘍の成長を有意に減衰させた（P < 0.0001、双方向ANOVAにより決定）。キメラ10G5のwt型と非フコシリ化型の活性に有意差が見られたことは、腫瘍成長の阻害における抗体依存性細胞傷害（ADCC）の重要性を示す。

【図17】実施例17からのデータ。FV1抗体は、対照と比較して、A549腫瘍の成長を有意に減衰させた（P < 0.051、双方向ANOVAにより決定）。2週間の処置後、約25%の阻害が観察された。

【図18】実施例18からのデータ。FV2抗体は、抗EGFR治療抗体セツキシマブ（Erbitux）の抗腫瘍効果と類似した適度な抗腫瘍活性を示した。両方の抗体を併用すると、アイソタイプ対照で処置した動物と比較して、有意な腫瘍成長の遅延が得られた（P < 0.0001；双方向ANOVAにより決定）。FV2またはErbituxのいずれか単独による処置群と比較した場合にも、併用効果が有意であった（P < 0.05；双方向ANOVAにより決定）。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明は、Ax1タンパク質と結合する抗体を提供し、Ax1とそのリガンドGas6との結合を阻害する。この抗体はまた、好ましくはAx1発現の下方調節、Ax1受容体のシグナル伝達阻害、及び／または腫瘍成長の阻害をもたらす。

#### 【0011】

Ax1を結合し、Ax1とそのリガンドGas6との結合を阻害するこのような抗体のうち、2つの具体例を本明細書で開示する。本明細書では、これらの抗体を「10C9」（本明細書に記載されているように、ハイブリドーマUT-10C9-B9から得られる）及び「10G5」（本明細書に記載されているように、ハイブリドーマWR-10G5-E5から得られる）と称する。

#### 【0012】

したがって、本発明は、本明細書に記載されているように、ハイブリドーマUT-10C9-B9から得られる10C9抗体が結合するエピトープと結合する抗体を提供する。また、本明細書に記載されているように、ハイブリドーマWR-10G5-E5から得られる10G5抗体が結合するエピトープと結合する抗体も提供する。

#### 【0013】

好ましくは、この抗体はAx1とそのリガンドGas6との結合を阻害する。更により好ましくは、この抗体はまた、Ax1発現の下方調節、Ax1受容体のシグナル伝達阻害、及び／または腫瘍成長の阻害をもたらす。

#### 【0014】

##### 配列

以下の配列を本明細書で開示する（全配列については、後述する「配列」の項を参照のこと）。

10

20

30

40

配列番号 1	->	1 0 C 9	VHをコードするヌクレオチド配列	
配列番号 2	->	1 0 C 9	VLをコードするヌクレオチド配列	
配列番号 3	->	1 0 C 9	VHをコードするアミノ酸配列	
配列番号 4	->	1 0 C 9	VLをコードするアミノ酸配列	
配列番号 5	->	1 0 C 9	VH CDR 1をコードするアミノ酸配列	10
配列番号 6	->	1 0 C 9	VH CDR 2をコードするアミノ酸配列	
配列番号 7	->	1 0 C 9	VH CDR 3をコードするアミノ酸配列	
配列番号 8	->	1 0 C 9	VL CDR 1をコードするアミノ酸配列	
配列番号 9	->	1 0 C 9	VL CDR 2をコードするアミノ酸配列	
配列番号 10	->	1 0 C 9	VL CDR 3をコードするアミノ酸配列	
配列番号 11	->	1 0 C 9	VH FR 1をコードするアミノ酸配列	
配列番号 12	->	1 0 C 9	VH FR 2をコードするアミノ酸配列	
配列番号 13	->	1 0 C 9	VH FR 3をコードするアミノ酸配列	
配列番号 14	->	1 0 C 9	VH FR 4をコードするアミノ酸配列	
配列番号 15	->	1 0 C 9	VL FR 1をコードするアミノ酸配列	
配列番号 16	->	1 0 C 9	VL FR 2をコードするアミノ酸配列	20
配列番号 17	->	1 0 C 9	VL FR 3をコードするアミノ酸配列	
配列番号 18	->	1 0 C 9	VL FR 4をコードするアミノ酸配列	
配列番号 19	->	1 0 G 5	VHをコードするヌクレオチド配列	
配列番号 20	->	1 0 G 5	VLをコードするヌクレオチド配列	
配列番号 21	->	1 0 G 5	VHをコードするアミノ酸配列	
配列番号 22	->	1 0 G 5	VLをコードするアミノ酸配列	
配列番号 23	->	1 0 G 5	VH CDR 1をコードするアミノ酸配列	30
配列番号 24	->	1 0 G 5	VH CDR 2をコードするアミノ酸配列	
配列番号 25	->	1 0 G 5	VH CDR 3をコードするアミノ酸配列	
配列番号 26	->	1 0 G 5	VL CDR 1をコードするアミノ酸配列	
配列番号 27	->	1 0 G 5	VL CDR 2をコードするアミノ酸配列	
配列番号 28	->	1 0 G 5	VL CDR 3をコードするアミノ酸配列	
配列番号 29	->	1 0 G 5	VH FR 1をコードするアミノ酸配列	
配列番号 30	->	1 0 G 5	VH FR 2をコードするアミノ酸配列	40
配列番号 31	->	1 0 G 5	VH FR 3をコードするアミノ酸配列	
配列番号 32	->	1 0 G 5	VH FR 4をコードするアミノ酸配列	
配列番号 33	->	1 0 G 5	VL FR 1をコードするアミノ酸配列	
配列番号 34	->	1 0 G 5	VL FR 2をコードするアミノ酸配列	

配列番号 3 5	->	1 0 G 5 V L F R 3 をコードするアミノ酸配列	
配列番号 3 6	->	1 0 G 5 V L F R 4 をコードするアミノ酸配列	
配列番号 3 7	->	ヒト A x 1 をコードするアミノ酸配列	
配列番号 3 8	->	マウス A x 1 をコードするアミノ酸配列	
配列番号 3 9	->	ヒト T y r o 3 をコードするアミノ酸配列	10
配列番号 4 0	->	ヒト M e r をコードするアミノ酸配列	
配列番号 4 1	->	ヒト A k t 3 をコードするアミノ酸配列	
配列番号 4 2	->	ヒト G a s 6 をコードするアミノ酸配列	
配列番号 4 3	->	「C y n o - A x 1」をコードするアミノ酸配列	
配列番号 4 4	->	リンカー	
配列番号 4 5	->	1 0 G 5 [Q 1 E] V H をコードするアミノ酸配列	20

## 【 0 0 1 5 】

1 0 C 9 抗体

一態様では、本発明は、A x 1 を結合し、1 0 C 9 のV H ドメイン（配列番号 3 ）及び / または1 0 C 9 のV L ドメイン（配列番号 4 ）で構成される単離された抗体を提供する。好ましくは、これに結合されるA x 1 はヒトA x 1 である。

## 【 0 0 1 6 】

一態様では、本発明は、A x 1 を結合し、1 0 G 5 のV H ドメイン（配列番号 2 1 ）及び / または1 0 G 5 のV L ドメイン（配列番号 2 2 ）で構成される単離された抗体を提供する。好ましくは、これに結合されるA x 1 はヒトA x 1 である。非好適な代替的態様では、本発明は、A x 1 を結合し、1 0 G 5 [ Q 1 E ] V H ドメイン（配列番号 4 5 ）及び / または1 0 G 5 のV L ドメイン（配列番号 2 2 ）で構成される単離された抗体を提供する。好ましくは、これに結合されるA x 1 はヒトA x 1 である。

## 【 0 0 1 7 】

通常、V H ドメインはV L ドメインと対になり、抗体抗原結合部位を形成するが、以下で詳述するように、V H ドメインを単独で用いて抗原と結合させてもよい。好ましい一実施形態では、1 0 C 9 のV H ドメイン（配列番号 3 ）を1 0 C 9 のV L ドメイン（配列番号 4 ）と対にすることで、1 0 C 9 のV H ドメイン及びV L ドメイン両方を含む抗体抗原結合部位を形成する。

## 【 0 0 1 8 】

他の実施形態では、1 0 C 9 のV H は1 0 C 9 のV L 以外のV L ドメインと対である。軽鎖の無差別性（p r o m i s c u i t y ）は従来技術で確立されている。例えば、いくつかの実施形態では、1 0 C 9 のV H ドメイン（配列番号 3 ）は1 0 G 5 のV L ドメイン（配列番号 2 2 ）と対である。

## 【 0 0 1 9 】

1 0 C 9 のV H またはV L ドメインから1 つ以上のC D R を得ることができ、それを適したフレームワークに組み込むことができる。これについては、以下で詳述する。1 0 C

30

40

50

9 の V H C D R 1、2 及び 3 をそれぞれ配列番号 5、6 及び 7 で示す。10 C 9 の V L C D R 1、2 及び 3 をそれぞれ配列番号 8、9 及び 10 で示す。

#### 【0020】

本発明の一態様では、A × 1 を結合し、以下で構成される抗体を提供する：

10 C 9 の V H ドメイン（配列番号 3）、及び配列番号 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 と、場合により配列番号 6 及び配列番号 5 から選択されるアミノ酸配列を有する 1 つ以上の V H C D R とを含む V H ドメインからなる群から選択される抗体 V H ドメイン；ならびに / または

10 C 9 の V L ドメイン（配列番号 4）、及び配列番号 8、配列番号 9 及び配列番号 10 から選択されるアミノ酸配列を有する 1 つ以上の V L C D R を含む V L ドメインからなる群から選択される抗体 V L ドメイン。10

#### 【0021】

例えば、抗体は、配列番号 5、配列番号 6 及び配列番号 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R を含んでいる抗体 V H ドメインを含んでもよい。更に抗体は、配列番号 8、配列番号 9 及び配列番号 10 のアミノ酸配列を有する V L C D R を含んでいる抗体 V L ドメインを含んでもよい。

#### 【0022】

いくつかの実施形態では、抗体は、(i) 配列番号 5、配列番号 6 及び配列番号 7 のアミノ酸配列を有する V H C D R を含んでいる抗体 V H ドメイン、(ii) 配列番号 8、配列番号 9 及び配列番号 10 のアミノ酸配列を有する V L C D R を含んでいる抗体 V L ドメインで構成される。20

#### 【0023】

この抗体は 10 C 9 の V H ドメイン（配列番号 3）を含み、場合により 10 C 9 の V L ドメイン（配列番号 4）を更に含んでもよい。

#### 【0024】

好ましくは、抗体は、10 C 9 の V H ドメイン（配列番号 3）及び 10 C 9 の V L ドメイン（配列番号 4）を含んでいる抗体の A × 1 結合ドメインと、ヒト A × 1 への結合を競合する。

#### 【0025】

好ましくは、抗体は、本明細書に記載されているように、ハイブリドーマ U T - 10 C 9 - B 9 から得られる抗体が結合するエピトープと結合する。30

#### 【0026】

好ましくは、この抗体は A × 1 とそのリガンド G a s 6 との結合を阻害する。更により好ましくは、この抗体はまた、A × 1 発現の下方調節、A × 1 受容体のシグナル伝達阻害、及び / または腫瘍成長の阻害をもたらす。

#### 【0027】

本発明の更に別の態様によれば、本明細書で指定する配列であり、A × 1 に対する抗体として用いることができ、配列改変または突然変異及びスクリーニングといった方法によって得ることができる、V H 及び V L ドメインの変異体が提供される。このような方法もまた、本発明によって提供される。40

#### 【0028】

本明細書で具体的に開示されている配列である V H 及び V L ドメインのいずれかの可変ドメインのアミノ酸配列変異体を、記載されているように本発明に従って用いることができる。個々の変異体には、1 つ以上のアミノ酸配列改変（アミノ酸残基の付加、欠失、置換及び / または挿入）、おそらく約 20 未満の改変、約 15 未満の改変、約 10 未満の改変または約 5 未満の改変（すなわち、4、3、2 または 1）が含まれ得る。改変は、1 つ以上のフレームワーク領域及び / または 1 つ以上の C D R 内に施すことができる。

#### 【0029】

本発明による抗体は、抗原と結合し、かつ本明細書で開示される抗体 V H 及び / または V L ドメイン、本明細書で開示される V H C D R 3、またはこれらのいずれかの変異体50

を含む任意の抗体と、抗原への結合を競合するものであればよい。抗体間の競合は、例えば、E L I S A法を使用して、及び／または、一方の抗体に対して特異的なレポーター分子を標識化し、他方の無標識抗体（複数可）の存在下で検出できるようにして、同じエピトープまたは重複するエピトープと結合する抗体の同定を可能にすることにより、in vitroで容易に分析することができる。

#### 【0030】

したがって、本発明は、本明細書で具体的に開示される、いかなる抗体の変異体も含み、該変異体は、1つ以上のフレームワーク領域内及び／または1つ以上のCDR内に1つ以上のアミノ酸配列改変を含む。例えば、変異体抗体は、いずれか1つのCDR内に4以下の配列改変、例えば、いずれか1つのCDR（例えばVHドメインのCDR3）内に3以下、2以下、1以下の配列改変を含み得る。変異体抗体は、10C9のVHドメイン（配列番号3）及び10C9のVLドメイン（配列番号4）を含んでいる抗体のA×1結合ドメインと、A×1（例えば、ヒトA×1）への結合を競合し得る。

#### 【0031】

したがって、本発明の更なる態様は、ヒトA×1への結合を10C9と競合するヒト抗体抗原結合部位を含んでいる抗体を提供する。

#### 【0032】

一態様では、本発明は、本明細書に記載されているように、ハイブリドーマUT-10C9-B9から得られる抗体を提供する。

#### 【0033】

A×1への結合を10C9と競合し得る、A×1に対する抗体を得るために種々の方法が当技術分野で提供されている。

#### 【0034】

更なる態様では、本発明は、抗原を結合できる1つ以上の抗体を得る方法を提供し、該方法には、本発明による抗体のライプラリと前記抗原とを接触させること、及び前記抗原と結合できるライプラリの1つ以上の抗体メンバーを選択することを含む。

#### 【0035】

このライプラリをバクテリオファージ粒子の表面に提示することができる。各粒子は、その表面に提示される抗体VH可変ドメインをコードする核酸、また存在する場合には提示されたVLドメインもコードする場合がある核酸を含んでいる。

#### 【0036】

抗原を結合でき、バクテリオファージ粒子に提示される抗体を選別した後、前記選別された抗体を提示するバクテリオファージ粒子から核酸を取得することができる。前記選別された抗体を提示するバクテリオファージ粒子から得た核酸配列を有する核酸からの発現により、このような核酸を後続の抗体または抗体VH可変ドメイン（場合により抗体VL可変ドメイン）の作製に使用することができる。

#### 【0037】

前記選別された抗体の抗体VH可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体VH可変ドメインを単離形態で提供することも、このようなVHドメインを含んでいる抗体を提供することもできる。

#### 【0038】

A×1との結合能、またA×1への結合を10C9と競合する能力を更に試験することができる。

#### 【0039】

あるいは、目的とする抗体が結合するA×1上のエピトープと結合する抗体（例えば、10C9または10G5抗体のA×1への結合を阻止するもの）をスクリーニングするため、Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されているような通常のクロスプロッキングアッセイを実施することができる。

10

20

30

40

50

**【 0 0 4 0 】**

本発明による抗体は、10C9の親和性によりA<sub>x</sub>1を結合することができる。

**【 0 0 4 1 】**

本発明の抗体は、マウス、ラット、サル、非ヒト靈長類及び／またはヒトのA<sub>x</sub>1と結合することができる。好ましくは、抗体はヒト及びサルのA<sub>x</sub>1と結合する。いくつかの実施形態では、抗体は靈長類のA<sub>x</sub>1を特異的に結合する。例えば、抗体は、ヒト及びサルのA<sub>x</sub>1を特異的に結合することができる。一実施形態では、抗体はヒトのA<sub>x</sub>1のみを特異的に結合する。

**【 0 0 4 2 】**

抗体は、キメラ化、ヒト化、またはCDR移植した抗A<sub>x</sub>1抗体でもよい。例えば、抗体はヒト／マウスキメラ抗体でもよい。 10

**【 0 0 4 3 】**

異なる抗体の結合親和性及び中和力価を適切な条件下で比較することができる。

**【 0 0 4 4 】**

抗体配列に加えて、本発明による抗体は例えばペプチドまたはポリペプチドを形成する他のアミノ酸、例えばフォールドドメイン、または抗原を結合する能力に加えて他の機能的な特徴を分子に付与できるアミノ酸を含んでもよい。

**【 0 0 4 5 】**

本発明の抗体は、検出可能な標識を保持することも、または毒素（例えば細胞毒）、酵素もしくは有機部分に（例えばペプチジル結合またはリンカーを介して）複合体化することもできる。 20

**【 0 0 4 6 】**

当業者は、タンパク質に分子を化学的に複合体化する数多くの方法を認識している。本発明の一実施形態では、検出可能な蛍光標識、例えばフルオレセインイソチオシアネート（FITC）と、またはレポーター酵素、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）と抗体を複合体化することができる。

**【 0 0 4 7 】**

好ましい実施形態では、抗体は細胞毒性薬と複合体化して、抗体 - 薬物複合体（ADC）を形成する。抗体が医薬用途を目的とする場合、抗体と薬を連結する結合は、循環（例えば、循環血液）中は安定であるが、複合体が細胞内に隔離された後は不安定であることが好ましい。したがって、免疫複合体として複合体化された抗体を、例えば癌の治療方法に用いることができる。 30

**【 0 0 4 8 】**

更なる態様では、本発明は本発明による抗体、VHドメイン及び／またはVLドメインをコードする配列を含む単離した核酸と、本発明の抗体、VHドメイン及び／またはVLドメインの調製方法とを提供し、該方法には、前記抗体、VHドメイン及び／またはVLドメインの産生をもたらす条件下で前記核酸を発現させ、それを回収する方法を含む。

**【 0 0 4 9 】**

本発明による抗体は、ヒトまたは動物の身体の治療方法または診断方法、例えば前記患者に本発明の抗体または複合体、もしくはその薬物 - 複合体を有効量で投与することを含む、ヒト患者での疾患または障害の治療方法（予防治療を含み得る）に使用することができる。本発明による治療が可能な病状は、本明細書に別記するものを含む。 40

**【 0 0 5 0 】**

本発明による抗体は、例えば、抗体が結合する細胞の存在または位置を決定するためのイメージング方法に使用することができる。

**【 0 0 5 1 】**

更なる態様では、本発明は、本発明による抗体及び1つ以上の試薬を含んでいる、抗体の抗原への結合を判定する診断キットを提供する。

**【 0 0 5 2 】**

本発明の更なる態様は、本明細書で開示される抗体VH可変ドメイン（配列番号3）及 50

び／またはV L 可変ドメイン（配列番号4）をコードする核酸、通常は単離した核酸を提供する。いくつかの実施形態では、V Hをコードする核酸は、配列番号1に指定された配列を有する。いくつかの実施形態では、V Lをコードする核酸は、配列番号2に指定された配列を有する。

【0053】

本発明の別の態様は、本明細書で開示されるV H C D RまたはV L C D Rの配列、特に配列番号5、6、及び7から選択されるV H C D Rまたは配列番号8、9または10から選択されるV L C D R、最も好ましくは10C9 C D R 3（配列番号7）をコードする核酸、通常は単離した核酸を提供する。

【0054】

更なる態様は、本発明の核酸で形質転換された宿主細胞を提供する。

10

【0055】

更に別の態様は、抗体V H可変ドメインの作製方法を提供し、該方法にはコード核酸から発現を生じさせることを含む。このような方法には、前記抗体V H可変ドメインの作製条件下で、宿主細胞を培養することを含んでもよい。

【0056】

V L可変ドメインならびにV H及び／またはV Lドメインを含んでいる抗体の類似した作製方法を本発明の更なる態様として提供する。

【0057】

作製方法には、産物の単離及び／または精製工程を含み得る。

20

【0058】

作製方法は、少なくとも1つの添加成分、例えば薬学的に許容される賦形剤を含む組成物に産物を製剤化することを含み得る。

【0059】

本発明の上記及びその他の態様について、以下で更に詳細に述べる。

【0060】

10G5抗体

一態様では、本発明は、A x 1を結合し、10G5のV Hドメイン（配列番号21）及び／または10G5のV Lドメイン（配列番号22）で構成される単離された抗体を提供する。好ましくは、これに結合されるA x 1はヒトA x 1である。非好適な代替的態様では、本発明は、A x 1を結合し、10G5 [ Q 1 E ] V Hドメイン（配列番号45）及び／または10G5のV Lドメイン（配列番号22）で構成される単離された抗体を提供する。好ましくは、これに結合されるA x 1はヒトA x 1である。

30

【0061】

好ましい実施形態では、10G5のV Hドメイン（配列番号21）は10G5のV Lドメイン（配列番号22）と対になることで、10G5のV Hドメイン及びV Lドメイン両方を含む抗体抗原結合部位を形成する。他の実施形態では、10G5のV Hは10G5のV L以外のV Lドメインと対である。軽鎖の無差別性は従来技術で確立されている。例えば、実施形態によっては、10G5のV Hドメイン（配列番号21）は10C9のV Lドメイン（配列番号4）と対である。非好適な代替的態様では、10G5 [ Q 1 E ] V Hドメイン（配列番号45）は10G5のV Lドメイン（配列番号22）と対になることで、10G5のV Hドメイン及びV Lドメイン両方を含む抗体抗原結合部位を形成する。他の実施形態では、10G5のV Hは10G5のV L以外のV Lドメインと対である。軽鎖の無差別性は従来技術で確立されている。例えば、実施形態によっては、10G5 [ Q 1 E ] のV Hドメイン（配列番号45）は10C9のV Lドメイン（配列番号4）と対である。

40

【0062】

10G5のV HまたはV Lドメインから1つ以上のC D Rを得ることができ、それを適したフレームワークに組み込むことができる。これについては、以下で詳述する。10G5のV H C D R 1、2及び3をそれぞれ配列番号23、24及び25に示す。10G5

50

の V L C D R 1、2 及び 3 をそれぞれ配列番号 2 6、2 7 及び 2 8 に示す。

**【 0 0 6 3 】**

本発明の一態様では、A × 1 を結合し、以下で構成される抗体を提供する：  
1 0 G 5 の V H ドメイン（配列番号 2 1）、1 0 G 5 [ Q 1 E ] V H ドメイン（配列番号  
4 5）、及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 と、場合により配列番  
号 2 4 及び配列番号 2 3 から選択されるアミノ酸配列を有する 1 つ以上の C D R とを含む  
V H ドメインからなる群から選択される抗体 V H ドメイン；ならびに / または  
1 0 G 5 の V L ドメイン（配列番号 2 2）、及び配列番号 2 6、配列番号 2 7 及び配列番  
号 2 8 から選択されるアミノ酸配列を有する 1 つ以上の V L C D R を含む V L ドメイン  
からなる群から選択される抗体 V L ドメイン。10

**【 0 0 6 4 】**

例えば、抗体は、配列番号 2 3、配列番号 2 4 及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有す  
る V H C D R を含んでいる抗体 V H ドメインを含んでもよい。更に抗体は、配列番号 2  
6、配列番号 2 7 及び配列番号 2 8 のアミノ酸配列を有する V L C D R を含んでいる抗  
体 V L ドメインを含んでもよい。20

**【 0 0 6 5 】**

いくつかの実施形態では、抗体は、( i ) 配列番号 2 3、配列番号 2 4 及び配列番号 2  
5 のアミノ酸配列を有する V H C D R を含んでいる抗体 V H ドメイン、( i i ) 配列番  
号 2 6、配列番号 2 7 及び配列番号 2 8 のアミノ酸配列を有する V L C D R を含んでい  
る抗体 V L ドメインで構成される。20

**【 0 0 6 6 】**

抗体は、1 0 G 5 の V H ドメイン（配列番号 2 1）を含み、場合により 1 0 G 5 の V L  
ドメイン（配列番号 2 2）を更に含んでもよい。非好適な代替的実施形態では、抗体は 1  
0 G 5 [ Q 1 E ] V H ドメイン（配列番号 4 5）を含み、場合により 1 0 G 5 の V L ドメ  
イン（配列番号 2 2）を更に含んでもよい。20

**【 0 0 6 7 】**

好ましくは、抗体は、1 0 G 5 の V H ドメイン（配列番号 2 1）及び 1 0 G 5 の V L ド  
メイン（配列番号 2 2）を含んでいる抗体の A × 1 結合ドメインと、ヒト A × 1 への結合  
を競合する。30

**【 0 0 6 8 】**

好ましくは、抗体は、本明細書に記載されているように、ハイブリドーマ W R - 1 0 G  
5 - E 5 から得られる抗体が結合するエピトープと結合する。30

**【 0 0 6 9 】**

好ましくは、この抗体は A × 1 とそのリガンド G a s 6 との結合を阻害する。更により  
好ましくは、この抗体はまた、A × 1 発現の下方調節、A × 1 受容体のシグナル伝達阻害  
、及び / または腫瘍成長の阻害をもたらす。40

**【 0 0 7 0 】**

本発明の更に別の態様によれば、本明細書で指定する配列であり、A × 1 に対する抗体  
として用いることができ、配列改変または突然変異及びスクリーニングといった方法によ  
って得ることができる、V H 及び V L ドメインの変異体が提供される。このような方法も  
また、本発明によって提供される。40

**【 0 0 7 1 】**

本明細書で具体的に開示されている配列である V H 及び V L ドメインのいずれかの可変  
ドメインのアミノ酸配列変異体を、記載されているように本発明に従って用いることができる。  
個々の変異体には、1 つ以上のアミノ酸配列改変（アミノ酸残基の付加、欠失、置  
換及び / または挿入）、おそらく約 2 0 未満の改変、約 1 5 未満の改変、約 1 0 未満の改  
変または約 5 未満の改変（すなわち、4、3、2 または 1）が含まれ得る。改変は、1 つ  
以上のフレームワーク領域及び / または 1 つ以上の C D R 内に施すことができる。

**【 0 0 7 2 】**

本発明による抗体は、抗原と結合し、かつ本明細書で開示される抗体 V H 及び / または  
50

V L ドメイン、本明細書で開示される V H C D R 3、またはこれらのいずれかの変異体を含む任意の抗体と、抗原との結合を競合するものであればよい。抗体間の競合は、例えば、E L I S A 法を使用して、及び／または、一方の抗体に対して特異的なレポーター分子を標識化し、他方の無標識抗体（複数可）の存在下で検出できるようにして、同じエピトープまたは重複するエピトープと結合する抗体の同定を可能にすることにより、in vitro で容易に分析することができる。

#### 【0073】

あるいは、目的とする抗体が結合する A × 1 上のエピトープと結合する抗体（例えば、10C9 または 10G5 抗体の A × 1 への結合を阻止するもの）をスクリーニングするため、Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Ed Harlow and David Lane (1988) に記載されているような通常のクロスブロッキングアッセイを実施することができる。

#### 【0074】

したがって、本発明は、本明細書で具体的に開示されるいかなる抗体の変異体も含み、該変異体は、1つ以上のフレームワーク領域内及び／または1つ以上の C D R 内に1つ以上のアミノ酸配列改変を含む。例えば、変異体抗体は、いずれか1つの C D R 内に4以下の配列改変、例えば、いずれか1つの C D R （例えば V H ドメインの C D R 3）内に3以下、2以下、1以下の配列改変を含み得る。変異体抗体は、10G5 の V H ドメイン（配列番号 21）及び 10G5 の V L ドメイン（配列番号 22）を含んでいる抗体の A × 1 結合ドメインと、A × 1（例えば、ヒト A × 1）への結合を競合し得る。

#### 【0075】

したがって、本発明の更なる態様は、ヒト A × 1 への結合を 10G5 と競合するヒト抗体抗原結合部位を含んでいる抗体を提供する。

#### 【0076】

一態様では、本発明は、本明細書に記載されているように、ハイブリドーマ W R - 10 G 5 - E 5 から得られる抗体を提供する。

#### 【0077】

A × 1 への結合を 10G5 と競合し得る、A × 1 に対する抗体を得るために種々の方法が当技術分野で提供されている。

#### 【0078】

更なる態様では、本発明は、抗原と結合できる1つ以上の抗体を得る方法を提供し、該方法には、本発明による抗体のライプラリと前記抗原とを接触させること、及び前記抗原と結合できるライプラリの1つ以上の抗体メンバーを選択する方法を含む。

#### 【0079】

このライプラリをバクテリオファージ粒子の表面に提示することができる。各粒子は、その表面に提示される抗体 V H 可変ドメインをコードする核酸、また存在する場合には提示された V L ドメインもコードする場合がある核酸を含んでいる。

#### 【0080】

抗原を結合でき、バクテリオファージ粒子に提示される抗体を選別した後、前記選別された抗体を提示するバクテリオファージ粒子から核酸を取得することができる。前記選別された抗体を提示するバクテリオファージ粒子から得た核酸配列を有する核酸からの発現により、このような核酸を後続の抗体または抗体 V H 可変ドメイン（場合により抗体 V L 可変ドメイン）の作製に使用することができる。

#### 【0081】

前記選別された抗体の抗体 V H 可変ドメインのアミノ酸配列を有する抗体 V H 可変ドメインを単離形態で提供することも、このような V H ドメインを含んでいる抗体を提供することもできる。

#### 【0082】

A × 1 との結合能、また A × 1 への結合を 10G5 と競合する能力を更に試験すること

10

20

30

40

50

ができる。

【0083】

本発明による抗体は、10G5の親和性によりA×1を結合することができる。

【0084】

本発明の抗体は、マウス、ラット、サル、非ヒト靈長類及び／またはヒトA×1と結合することができる。好ましくは、抗体はヒト及びサルのA×1と結合する。いくつかの実施形態では、抗体は靈長類のA×1を特異的に結合する。例えば、抗体は、ヒト及びサルのA×1を特異的に結合することができる。一実施形態では、抗体はヒトのA×1のみを特異的に結合する。

【0085】

抗体は、キメラ化、ヒト化、またはCDR移植した抗A×1抗体でもよい。例えば、抗体はヒト／マウスキメラ抗体でもよい。

【0086】

異なる抗体の結合親和性及び中和力価を適切な条件下で比較することができる。

【0087】

抗体配列に加えて、本発明による抗体は例えばペプチドまたはポリペプチドを形成する他のアミノ酸、例えばフォールドドメイン、または抗原を結合する能力に加えて他の機能的な特徴を分子に付与できるアミノ酸を含んでもよい。

【0088】

本発明の抗体は、検出可能な標識を保持することも、または毒素（例えば細胞毒）、酵素もしくは有機部分に（例えばペプチジル結合またはリンカーを介して）複合体化することもできる。

【0089】

当業者は、タンパク質に分子を化学的に複合体化する数多くの方法を認識している。本発明の一実施形態では、検出可能な蛍光標識、例えばフルオレセインイソチオシアネート（FITC）と、またはレポーター酵素、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）と抗体を複合体化することができる。

【0090】

好ましい実施形態では、抗体は細胞毒性薬と複合体化して、抗体-薬物複合体（ADC）を形成する。抗体が医薬用途を目的とする場合、抗体と薬を連結する結合は、循環（例えば、循環血液）中は安定であるが、複合体が細胞内に隔離された後は不安定であることが好ましい。したがって、免疫複合体として複合体化された抗体を、例えば癌の治療方法に用いることができる。

【0091】

更なる態様では、本発明は本発明による抗体、VHドメイン及び／またはVLドメインをコードする配列を含む単離した核酸と、本発明の抗体、VHドメイン及び／またはVLドメインの調製方法とを提供し、該方法には、前記抗体、VHドメイン及び／またはVLドメインの產生をもたらす条件下で前記核酸を発現させ、それを回収する方法を含む。

【0092】

本発明による抗体は、ヒトまたは動物の身体の治療方法または診断方法、例えば前記患者に本発明の抗体または複合体、もしくはその薬物-複合体を有効量で投与することを含む、ヒト患者での疾患または障害の治療方法（予防治療を含み得る）に使用することができる。本発明による治療が可能な病状は、本明細書に別記するものを含む。

【0093】

本発明による抗体は、例えば、抗体が結合する細胞の存在または位置を決定するためのイメージング方法に使用することができる。

【0094】

更なる態様では、本発明は、本発明による抗体及び1つ以上の試薬を含んでいる、抗体の抗原への結合を判定する診断キットを提供する。

【0095】

10

20

30

40

50

本発明の更なる態様は、本明細書で開示される抗体VH可変ドメイン（配列番号21）、抗体VH可変ドメイン（配列番号45）及び／またはVL可変ドメイン（配列番号22）をコードする核酸、通常は単離した核酸を提供する。いくつかの実施形態では、VHをコードする核酸は、配列番号19に指定された配列を有する。いくつかの実施形態では、VLをコードする核酸は、配列番号20に指定された配列を有する。

#### 【0096】

本発明の別の態様は、本明細書で開示されるVH CDRまたはVL CDRの配列、特に配列番号23、24、及び25から選択されるVH CDRまたは配列番号26、27または28から選択されるVL CDR、最も好ましくは10G5 CDR3（配列番号25）をコードする核酸、通常は単離した核酸を提供する。

10

#### 【0097】

更なる態様は、本発明の核酸で形質転換された宿主細胞を提供する。

#### 【0098】

更に別の態様は、抗体VH可変ドメインの作製方法を提供し、該方法にはコード核酸から発現を生じさせることを含む。このような方法には、前記抗体VH可変ドメインの作製条件下で、宿主細胞を培養することを含んでもよい。

#### 【0099】

VL可変ドメインならびにVH及び／またはVLドメインを含んでいる抗体の類似した作製方法を本発明の更なる態様として提供する。

#### 【0100】

作製方法には、産物の単離及び／または精製工程を含み得る。

20

#### 【0101】

作製方法は、少なくとも1つの添加成分、例えば薬学的に許容される賦形剤を含む組成物に産物を製剤化することを含み得る。

#### 【0102】

本発明の上記及びその他の態様について、以下で更に詳細に述べる。

#### 【0103】

##### 10C9抗体の特性

##### A×1に対する高親和性

本明細書に記載する10C9抗体は、高親和性でヒトA×1と結合する。実施例5及び13に記載されているように、マウス10C9抗体が0.18nMのK<sub>D</sub>を有することを特定すると同時に、キメラ型が0.10nMのK<sub>D</sub>を有することを特定した。

30

#### 【0104】

したがって、本明細書に記載する10C9抗体及びその変異体は、高親和性でA×1を結合し、好ましくはヒトA×1を高親和性で結合する。いくつかの実施形態では、抗体はA×1（すなわちヒトA×1）と、10<sup>-6</sup>M以下、例えば5×10<sup>-7</sup>M以下、10<sup>-7</sup>M以下、5×10<sup>-8</sup>M以下、10<sup>-8</sup>M以下、5×10<sup>-9</sup>M以下、10<sup>-9</sup>M以下、5×10<sup>-10</sup>M以下、2×10<sup>-10</sup>M以下、1.1×10<sup>-10</sup>M以下、10<sup>-11</sup>M以下、5×10<sup>-11</sup>M以下、10<sup>-11</sup>M以下、5×10<sup>-12</sup>M以下、6×10<sup>-12</sup>M以下、10<sup>-12</sup>M以下、5×10<sup>-13</sup>M以下、10<sup>-13</sup>M以下、5×10<sup>-14</sup>M以下、10<sup>-14</sup>M以下、5×10<sup>-15</sup>M以下または10<sup>-15</sup>M以下のK<sub>D</sub>で結合する。

40

#### 【0105】

いくつかの実施形態では、抗体はA×1（すなわちヒトA×1）と、10<sup>-8</sup>M～10<sup>-10</sup>M、10<sup>-10</sup>M～10<sup>-12</sup>M、10<sup>-12</sup>M～10<sup>-14</sup>M、または10<sup>-14</sup>M～10<sup>-16</sup>MのK<sub>D</sub>で結合する。

#### 【0106】

K<sub>D</sub>は、実施例5または実施例13で述べた方法で測定して算出することができる。

#### 【0107】

本明細書に記載する10C9抗体は、非常に速い会合速度（k<sub>on</sub>）を有することを特

50

徴とする。具体的には、実施例5で、マウス10C9抗体が $k_{on} = 1.61 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ の非常に速い会合速度を有することを特定すると同時に、実施例13で、キメラ10C9抗体がそれよりも速い $k_{on} = 2.16 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ の会合速度を有することを特定した。

#### 【0108】

したがって、本明細書に記載する抗体は、好ましくはヒトA×1を速い会合速度で結合する。いくつかの実施形態では、抗体はA×1(すなわちヒトA×1)と、 $10^4 M^{-1}s^{-1}$ 以上、例えば $5 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $1.5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $2 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $10^7 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $2 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $10^8 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ 以上、または $10^9 M^{-1}s^{-1}$ 以上の $k_{on}$ で結合する。  
10

#### 【0109】

##### 10G5抗体の特性

##### A×1に対する高親和性

本明細書に記載する10G5抗体は、高親和性でヒトA×1と結合する。実施例5及び13に記載されているように、マウス10G5抗体が $0.53 nM$ の $K_D$ を有することを特定すると同時に、キメラ型が $0.10 nM$ の $K_D$ を有することを特定した。

#### 【0110】

したがって、本明細書に記載する10G5抗体及びその変異体は、高親和性でA×1を結合し、好ましくはヒトA×1を高親和性で結合する。いくつかの実施形態では、抗体はA×1(すなわちヒトA×1)と、 $10^{-6} M$ 以下、例えば $5 \times 10^{-7} M$ 以下、 $10^{-7} M$ 以下、 $5 \times 10^{-8} M$ 以下、 $10^{-8} M$ 以下、 $5 \times 10^{-9} M$ 以下、 $10^{-9} M$ 以下、 $6 \times 10^{-10} M$ 以下、 $5 \times 10^{-10} M$ 以下、 $1.1 \times 10^{-10} M$ 以下、 $10^{-10} M$ 以下、 $5 \times 10^{-11} M$ 以下、 $10^{-11} M$ 以下、 $5 \times 10^{-12} M$ 以下、 $10^{-12} M$ 以下、 $5 \times 10^{-13} M$ 以下、 $10^{-13} M$ 以下、 $5 \times 10^{-14} M$ 以下、 $10^{-14} M$ 以下、 $5 \times 10^{-15} M$ 以下または $10^{-15} M$ 以下の $K_D$ で結合する。  
20

#### 【0111】

いくつかの実施形態では、抗体はA×1(すなわちヒトA×1)と、 $10^{-8} M \sim 10^{-10} M$ 、 $10^{-10} M \sim 10^{-12} M$ 、 $10^{-12} M \sim 10^{-14} M$ 、または $10^{-14} M \sim 10^{-16} M$ の $K_D$ で結合する。  
30

#### 【0112】

$K_D$ は、実施例5または実施例13で述べた方法で測定して算出することができる。

#### 【0113】

本明細書に記載する10G5抗体は、非常に速い会合速度( $k_{on}$ )を有することを特徴とする。具体的には、実施例5で、マウス10G5抗体が $k_{on} = 0.83 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ の非常に速い会合速度を有することを特定すると同時に、実施例13で、キメラ10G5抗体がそれよりも速い $k_{on} = 1.64 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ の会合速度を有することを特定した。  
40

#### 【0114】

したがって、本明細書に記載する抗体は、好ましくはヒトA×1を速い会合速度で結合する。いくつかの実施形態では、抗体はA×1(すなわちヒトA×1)と、 $10^4 M^{-1}s^{-1}$ 以上、例えば $5 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $1.5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $2 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $10^7 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $2 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $10^8 M^{-1}s^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ 以上、または $10^9 M^{-1}s^{-1}$ 以上の $k_{on}$ で結合する。

#### 【0115】

##### 10C9及び10G5抗体両方の特性

### 特異的結合性

一般に用語「特異的」及び「特異的に結合する」は、抗体がその特異的結合パートナー（複数可）以外の分子にいかなる有意な結合も示さない状況を指すときに使用することができる。例えば、ヒト A × 1 を「特異的に結合する」抗体は、マウス A × 1 に対していかなる有意な結合も示さない。

#### 【0116】

この用語はまた、例えばいくつかの抗原がもつ特定のエピトープに対して抗体が特異的である場合にも適用できる。この場合、エピトープを「特異的に結合する」抗体は、認識されたエピトープをもつ種々の抗原すべてと結合することが可能である。

#### 【0117】

通常、特異性は、例えば抗原パネルを用いた E L I S A 法などの結合アッセイによって決定することができる。

#### 【0118】

本明細書に記載する 10C9 及び 10G5 抗体は、高特異的にヒト A × 1 と結合する。すなわち、10C9 及び 10G5 抗体は、ヒト A × 1 を「特異的に結合する」。このことを実施例で実証する。示される内容は以下の通りである：

(1) 実施例 2 で、10C9 及び 10G5 は、ヒト T A M 受容体チロシンキナーゼファミリーの他のメンバーである h M e r 及び h T y r o 3 由来の組み換え抗原と有意な結合性を示さない；

(2) 実施例 3 で、10C9 及び 10G5 は、ヒト A × 1 と強く結合するが、マウス A × 1 との結合性は示さない（これはマウス A × 1 リガンドであるマウス G a s 6 が、マウスとヒト両方の A × 1 と強く結合するとともに、ヒト T y r o 3 とも（より弱く）結合することとは対照的である）；

(3) 実施例 4 で、10C9 及び 10G5 は、カニクイザル (M a c a c a f a s c i c u l a r i s ) A × 1 と強く結合する。

#### 【0119】

このように、本明細書に記載する抗体は、靈長類 A × 1 を特異的に結合することが好ましい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載する抗体は、ヒト及びサル（例えは M a c a c a f a s c i c u l a r i s ）の A × 1 を特異的に結合する。一実施形態では、抗体はヒト A × 1 に限り特異的に結合する。

#### 【0120】

本発明のいくつかの実施形態では、本明細書に記載する抗体は、ヒト T y r o 3 及び / またはヒト M e r に有意な結合を示さない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載する抗体は、マウス A × 1 と有意な結合性を示さない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載する抗体は、ヒト T y r o 3 、ヒト M e r またはマウス A × 1 のいずれにも有意な結合性を示さない。

#### 【0121】

抗体が抗原に「有意な結合性を示さない」かどうかは、例えば、実施例 2 及び 3 に記載されている技術を使用して当業者が容易に特定できる。いくつかの実施形態では、抗体が  $10^{-3}$  M 超、例えは  $10^{-2}$  M 超、 $10^{-1}$  M 超または 1 M 超の K<sub>D</sub> で抗原を結合する場合、抗体は特定の抗原に「有意な結合性を示さない」ものと見なす。K<sub>D</sub> は、実施例 5 で述べた方法で測定して算出することができる。

#### 【0122】

##### A × 1 / G a s 6 結合の阻害

本明細書に記載する 10C9 及び 10G5 抗体は、A × 1 とそのリガンド G a s 6 との結合を阻害する。

#### 【0123】

図 5 は、実施例 6 に記載されている競合結合アッセイの結果を示す。結果は、固定化 r h A × 1 が 10C9 で飽和されると、それ以降に追加された 10C9 、または 10G5 、 r h G a s 6 (r h A × 1 のリガンドとして既知) もしくは r m G a s 6 のいずれもが結

10

20

30

40

50

合できないことを示している。これは、10C9、10G5及びGas6が結合するA×1分子の領域が互いに隣接していることを示す。対照的に、10C9の結合は、MAB154抗A×1抗体の結合をまったく阻害しなかった。これは、10C9とMAB154がA×1分子の別々の部分と結合することを意味する。

#### 【0124】

したがって、好ましい実施形態では、本明細書に記載する抗体は、A×1のGas6への（例えば、rhA×1のrhGas6への）結合を阻害する。すなわち、好ましくは、本明細書に記載する抗体は、ヒトA×1への結合をヒトGas6と競合する。最も好ましくは、A×1/Gas6結合が阻害される結果、抗体で飽和したA×1サンプルにGas6の有意な結合がまったく観察できない（例えば、それまで抗体に露出されなかったA×1サンプルに対して観察される結合が1%以下）。Gas6結合の阻害は、実施例6に記載されている競合結合アッセイを使用して評価することができる。10

#### 【0125】

##### A×1受容体発現の阻害

本発明の抗体は、A×1の発現に有意な減少を生じさせる。

#### 【0126】

図8は、実施例9に記載されているウェスタンプロットアッセイの結果を示す。この実施例では、MBA-MD-231細胞を、一連の抗体のいずれかとともに一晩インキュベートした後、A×1発現について試験した。結果は、10C9とともにインキュベートすると、細胞内に存在するA×1受容体タンパク質の量に有意な減少が生じることを示している。これは、10C9抗体の結合がA×1受容体の発現を下方調節することを意味する。20

#### 【0127】

したがって、好ましい実施形態では、本発明の抗体はA×1受容体の発現を下方調節する。

#### 【0128】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、A×1受容体の発現を、抗体と接触させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの80%未満に減少させる。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、A×1受容体の発現を、抗体と接触させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満または10%未満に減少させる。A×1受容体発現のレベルは、実施例9に記載されているアッセイを使用して評価することができる。また当技術分野では、ウェスタンプロット上のバンドを正確に定量化するための方法が数多く知られており、例えば、Taylor et al. Mol Biotechnol. 2013; 55(3): 217-226を参照のこと。30

#### 【0129】

いくつかの実施形態では、A×1受容体発現の下方調節は迅速に発生する。例えば、いくつかの実施形態では、抗体と接触させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの80%未満へのA×1受容体発現の減少が、サンプルを抗体と接触させてから12時間以内、例えばサンプルを抗体と接触させてから12時間以内、6時間以内、3時間以内、または1時間以内で観察される。40

#### 【0130】

いくつかの実施形態では、抗体は、A×1受容体発現の持続的な下方調節を生じさせる。例えば、いくつかの実施形態では、抗体と接触させたサンプルのA×1受容体発現のレベルを、サンプルを抗体と接触させて以降、少なくとも6時間、例えば少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも48時間または少なくとも96時間の間、抗体と接触させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの50%未満に維持する。

#### 【0131】

理論に束縛されるものではないが、A×1発現に観察された下方調節は、抗体/A×1

50

受容体の複合体が内在化して、細胞によって分解されるためであると考えられる。抗体の内在化は、抗体または抗体と連結された分子を標的細胞に到達させることができ望ましい用途において極めて有利である。例えば、標的が癌細胞である場合、抗体は細胞毒性薬と連結されている。

【0132】

したがって、好ましい実施形態では、本発明の抗体は、A<sub>x</sub>1受容体の内在化の速度を増加させる。

【0133】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、A<sub>x</sub>1受容体の内在化の速度を、抗体と接觸させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの少なくとも110%に増加させる。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、A<sub>x</sub>1受容体の内在化の速度を、抗体と接觸させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも160%、少なくとも170%、少なくとも180%、少なくとも190%、少なくとも200%、少なくとも500%、少なくとも1000%に増加させる。10

【0134】

A<sub>x</sub>1受容体の内在化のレベルは、当技術分野で既知のいずれか1つの受容体内在化アッセイを使用して評価することができる。例えば、Koenig et al. Methods in Molecular Biology Volume 259, 2004, pp 249 - 273に記載されている方法である。20

【0135】

A<sub>x</sub>1受容体シグナル伝達の阻害

本発明の抗体が(1)A<sub>x</sub>1受容体の天然リガンド(例えばGas6)との結合を阻害する、また(2)A<sub>x</sub>1受容体の発現を下方調節するという観察と一貫して、本発明の抗体はA<sub>x</sub>1受容体のリガンドによって誘発される下流のシグナル伝達を阻害する。この観察結果を図9に示している。この図から、10C9抗体の存在が、AktのSerine 473がリン酸化される程度を有意に減少させることがわかる。

【0136】

したがって、好ましい実施形態では、本発明の抗体はA<sub>x</sub>1活性を阻害する。阻害される活性は、構成的A<sub>x</sub>1活性であり得る。30

【0137】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、A<sub>x</sub>1の下流のシグナル伝達、例えばSerine 473でのAktのリン酸化を阻害する。いくつかの実施形態では、本発明の抗体と接觸させたサンプルのSerine 473でのAktのリン酸化は、抗体と接觸させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの80%未満である。いくつかの実施形態では、本発明の抗体と接觸させたサンプルのSerine 473でのAktのリン酸化は、抗体と接觸させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満または10%未満である。Serine 473でのAktのリン酸化のレベルは、実施例10に記載されているアッセイを使用して評価することができる。また当技術分野では、ウェスタンプロット上のバンドを正確に定量化するための方法が数多く知られており、例えば、Taylor et al. Mol Biotechnol. 2013; 55(3): 217 - 226を参照のこと。40

【0138】

A<sub>x</sub>1受容体のシグナル伝達を阻害することによって、本発明の抗体はまた、A<sub>x</sub>1受容体のシグナル伝達が担う範囲の作用に影響を及ぼすことが期待される。

【0139】

例えば、A<sub>x</sub>1受容体のシグナル伝達がGas6依存性の細胞増殖を刺激して細胞死を阻害し、その結果、腫瘍成長を助けることが知られている。また、A<sub>x</sub>1受容体のシグナ50

ル伝達は、上皮間葉転換（EMT）を刺激して、その結果、腫瘍転移を促進することも知られている。

#### 【0140】

したがって、いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、例えばアポトーシスによる細胞死を促進する。好ましくは、細胞は、例えば循環腫瘍細胞または転移細胞などの腫瘍細胞である。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、細胞死率を、抗体と接触させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの少なくとも110%に増加させる。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、細胞死率を、抗体と接触させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも160%、少なくとも170%、少なくとも180%、少なくとも190%、少なくとも200%、少なくとも500%、少なくとも1000%に増加させる。細胞死率は、例えば、BrdU取り込みアッセイ、MTT、[<sup>3</sup>H]-チミジンの取り込み（例えば、Top Count アッセイ（PerkinElmer））、細胞生存率アッセイ（例えば、CellTiter-Glo（Promega））、DNA断片化アッセイ、カスパーゼ活性化アッセイ、トリプタンブルー染色による排除、クロマチンの形態分析などにより測定することができる。

10

#### 【0141】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、A×1の下流シグナル伝達を阻害する。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、Gas6依存性の細胞増殖を阻害する。

20

#### 【0142】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、腫瘍関連マクロファージからの炎症性サイトカインの発現を阻害する。

#### 【0143】

##### 腫瘍成長の阻害

腫瘍成長におけるA×1及びEMT経路の役割と一貫して、本発明の抗体は、血液学的腫瘍と非血液学的腫瘍両方の成長速度を低下させる。このことを、実施例14及び15に記載されている方法によって得た、図14及び15に示すデータによって実証している。

#### 【0144】

したがって、好ましい実施形態では、本発明の抗体は、例えば腫瘍間質の機能を調節することによって、腫瘍成長及び/または転移を阻害する。

30

#### 【0145】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、対照腫瘍と比較して少なくとも10%腫瘍成長を阻害する。すなわち、抗体で治療した腫瘍の容積は、対照腫瘍の容積の90%以下である。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、対照腫瘍と比較して少なくとも20%、例えば、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%腫瘍成長を阻害する。

#### 【0146】

いくつかの実施形態では、実施例14に記載されているように、腫瘍成長に対する抗体の効果を分析する。いくつかの実施形態では、実施例15に記載されているように、腫瘍成長に対する抗体の効果を分析する。

40

#### 【0147】

##### 定義

##### 抗体

この用語は、天然であるか、または部分合成もしくは全体合成から產生されたかを問わず、免疫グロブリンを意味する。この用語はまた、抗体抗原-結合ドメインを含んでいる、いかなるポリペプチドまたはタンパク質にも適用される。抗体抗原-結合ドメインを含む抗体断片には、全抗体（例えばカノニカル配置でVH、CH1、CH2、CH3、VL及びCLドメインを含んでいるIgG抗体）、または標的抗原に対する結合活性を保持し

50

ている全抗体の断片を包含する。このような断片としては、Fv(可変断片)、Fab(抗体結合性の断片)及びF(ab')<sub>2</sub>断片、ならびに一本鎖Fv抗体(scfv)、dsFv、ミニボディ、ダイアボディ、一本鎖ダイアボディ、直列型scfv、TandAb、バイボディ、トリボディ、カッパ(ラムダ)ボディ、BiTE、DVD-Ig、SIP、SMIPまたはDARTが挙げられる。更に、抗体及びその断片は、例えばEP239400Aに記載されているヒト化抗体であってよい。例えば、モノクローナル及びポリクローナル抗体、組み換え抗体、抗体のタンパク質分解性断片及び組み換え断片(Fab、Fv、scfv、ダイアボディ)、単ードメイン抗体(VHH、sdAb、ナノボディ、IgNAR、VNAR)、ならびに抗体に無関係なタンパク質であり、これらは、限定されないが、以下のような抗体様特異的結合(抗体模倣体)を有するように操作されている。

## 【0148】

名称	ベース:
アドネクチン/モノボディ イン、10kDa	ヒトフィブロネクチン(10Fn3)III型の第10ドメイ
アフィボディ	プロテインA、Zドメイン、6kDa
アフィリン )	ヒト - クリスタリン / ヒトユビキチン(10 ~ 20kDa)
アフィチン rius由来)、7kDa	Sac7d(Sulfolobus acidocaldara
アンチカリン	リポカリン、20kDa
アビマー	種々の細胞膜受容体のドメイン、9 ~ 18kDa
DARPin	アンキリンリピートモチーフ、14kDa
Eviobody	細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)、15kDa
フィノマー	Fyn、SH3ドメイン、7kDa
クニツツドメインペプチド	種々のプロテアーゼ阻害剤、6kDa

## 【0149】

抗体は、抗体の重鎖定常領域及び/または抗体の軽鎖定常領域のすべてまたは部分を含み得る。

## 【0150】

モノクローナル抗体やその他の抗体を用い、組み換えDNA技術の技法を利用して、元の抗体の特異性を保持する遺伝子操作された抗体またはキメラ分子を作製することが可能である。このような技術には、抗体の免疫プロプリン可変領域、すなわち相補性決定領域(CDR)をコードするDNA断片と、異なる免疫グロブリンの免疫プロプリン定常領域、すなわち定常領域にフレームワーク領域を加えた領域をコードする遺伝子とのライゲーションを伴う場合がある。例えば、EP-A-184187、GB 2188638AまたはEP-A-239400を参照のこと。抗体を产生するハイブリドーマまたはその他細胞に、遺伝子突然変異またはその他の改変を施すことができる。この改変は、產生される抗体の結合特異性を変更するものであっても、変更しないものであってもよい。

## 【0151】

抗体がいくつかの方法で改変できる場合、用語「抗体分子」は、要求される特異性をもつ抗体由来の抗原-結合ドメインを有する、いかなるポリペプチドまたはその他の分子も含むと解釈されるものとする。したがって、この用語は、天然または全合成もしくは部分合成を問わず、免疫グロブリン結合ドメインを含んでいる何らかのポリペプチドを含む、抗体断片及び誘導体にも適用される。したがって、別のポリペプチドと融合された、免疫グロブリン結合ドメインまたは等価物を含むキメラ分子も包含される。キメラ抗体のクローニング及び発現については、EP-A-0120694及びEP-A-0125023に記載されている。

## 【0152】

これには、全抗体の断片が抗原の結合機能を実行できることが示されている。結合性断

10

20

30

40

50

片の例は、(i) VL、VH、CL及びCH1ドメインからなるFab断片；(ii)VH及びCH1ドメインからなるFd断片；(iii)単一抗体のVL及びVHドメインからなるFv断片；(iv)VHドメインからなるdAb断片(Ward, E. S. et al., *Nature* 341, 544-546 (1989))；(v)単離されたCDR領域；(vi)2つの連結されたFab断片を含む二価断片であるFab'2断片；(vii)VHドメインとVLドメインとがペプチドリンクアッセイにより連結され、2つのドメインが会合されて抗原結合部位が形成されている一本鎖Fv分子(scFv)(Bird et al., *Science*, 242, 423-426, 1988; Huston et al., *PNAS USA*, 85, 5879-5883, 1988)；(viii)二重特異性一本鎖Fv二量体(PCT/US92/09965)ならびに(ix)「ダイアボディ」、すなわち遺伝子融合により構築された多価断片または多重特異性断片である(WO94/13804; Hollinger, P. and Winter G. *Current Opinion Biotechnol.* 4, 446-449 (1993))である。Fv、scFvまたはダイアボディ分子は、VHドメインとVLドメインとを連結するジスルフィド結合の組み込みにより安定化することができる(Y. Reiter et al., *Nature Biotech.* 14, 1239-1245, 1996)。CH3ドメインと連結されたscFvを含むミニボディもまた作製することができる(S. Hu et al., *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996)。

#### 【0153】

抗体は、二重特異性であっても、多重特異性であってもよい。二重特異性抗体を使用する場合、この抗体は、さまざまな方法(Hollinger, P. and Winter G. *Current Opinion Biotechnol.* 4, 446-449 (1993))で製造できる従来的な二重特異性抗体(例えば、化学的に調製されたものまたはハイブリッドハイブリドーマから調製されたもの)であっても、上述の二重特異性抗体断片のいずれかであってもよい。ダイアボディ及びscFvは、可変ドメインのみを使用してFc領域なしで構築でき、例えば抗体エフェクター機能による副作用、またはマウス起源の抗体を使用する場合にはヒト抗マウス抗体(HAMA)反応による副作用を低減する可能性をもつ。

#### 【0154】

二重特異性ダイアボディは、二重特異性全抗体と対照的に、細菌(例えばEscherichia coli)内に容易に構築して発現させることができるために、特に有用であり得る。適切な結合特異性のダイアボディ(及び抗体断片などの多数の他のポリペプチド)は、ファージディスプレイ(WO94/13804)を使用して抗体ライブラリから容易に選択することができる。ダイアボディの1本のアームを、例えばA<sub>x</sub>1に対する特異性を有する定常なものにしたい場合は、他方のアームが可変性となり適切な特異性の抗体が選択されるライブラリを作製することができる二重特異性全抗体は、「ノブ印トゥホール」操作(J. B. B. Ridgeway et al., *Protein Eng.*, 9, 616-621, 1996)によって作製することができる。

#### 【0155】

##### サンプル

本明細書で使用される場合、「サンプル」は単一細胞であっても、細胞集団であってもよい。細胞(複数可)は、通常の健康な細胞(複数可)であっても、腫瘍細胞、例えば循環癌細胞であってもよい。

#### 【0156】

サンプルは、in vivo、ex vivo、またはin vitroであり得る。例えば、サンプルはin vivo腫瘍腫瘍であっても、in vitro細胞集団であってもよい。

#### 【0157】

##### 抗原結合ドメイン

これは、抗原の一部または全体を認識して、それと特異的に結合し、それに相補的であ

10

20

30

40

50

る領域を含む抗体分子の一部を意味する。抗原が大きい場合、抗体は、エピトープと呼ばれる、その抗原の特定の部分のみと結合し得る。抗原結合ドメインは、1つ以上の抗体可変ドメイン（例えば、V H ドメインからなる、いわゆる F d 抗体断片）によって構成され得る。好ましくは、抗原結合ドメインは抗体軽鎖可変領域（V L）及び抗体重鎖可変領域（V H）を含む。

#### 【 0 1 5 8 】

特異性タンパク質

ヒト A × 1

本明細書で使用される場合、「ヒト A × 1」とは、受容体チロシンキナーゼのヒト T A M ファミリーの A × 1 メンバーを指す。ヒト A × 1 には以下のアイソフォームが存在する：

Ax1 アイソフォーム	mRNA:NCBIリファレンス	ポリペプチド:NCBIリファレンス
A	NM_001278599.1、GI:520260398、登録更新日:2014年11月28日12:30AM	NP_001265528.1、GI:520260399、登録更新日:2014年11月28日12:30AM(配列番号37)
B	NM_001699.5、GI:520260376、登録更新日:2014年11月28日12:30AM	NP_001690.2、GI:21536468、登録更新日:2014年11月28日12:30AM
C	NM_021913.4、GI:520260356、登録更新日:2014年11月28日12:30AM	NP_068713.2、GI:21536466、登録更新日:2014年11月28日12:30AM

10

20

30

#### 【 0 1 5 9 】

いくつかの実施形態では、ヒト A × 1 ポリペプチドは、上記のアイソフォーム「A」に相当する。いくつかの実施形態では、ヒト A × 1 ポリペプチドは、上記のアイソフォーム「B」に相当する。いくつかの実施形態では、ヒト A × 1 ポリペプチドは、上記のアイソフォーム「C」に相当する。

#### 【 0 1 6 0 】

マウス A × 1

本明細書で使用される場合、「マウス A × 1」とは、受容体チロシンキナーゼのマウス T A M ファミリーの A × 1 メンバーを指す。マウス A × 1 には以下のアイソフォームが存在する：

40

Ax1 アイソフォーム	mRNA:NCBIリファレンス	ポリペプチド:NCBIリファレンス
A	NM_001190974.1、GI:300794859、登録更新日:2014年9月5日08:46PM	NP_001177903.1、GI:300794860、登録更新日:2014年9月5日08:46PM(配列番号38)
B	NM_001190975.1、GI:300794883、登録更新日:2014年9月5日08:46PM	NP_001177904.1、GI:300794884、登録更新日:2014年9月5日08:46PM
C	NM_009465.4、GI:300794836、登録更新日:2014年9月5日08:46PM	NP_033491.2、GI:31542164、登録更新日:2014年9月5日08:46PM

10

## 【0161】

いくつかの実施形態では、マウス A × 1 ポリペプチドは、上記のアイソフォーム「A」に相当する。いくつかの実施形態では、マウス A × 1 ポリペプチドは、上記のアイソフォーム「B」に相当する。いくつかの実施形態では、マウス A × 1 ポリペプチドは、上記のアイソフォーム「C」に相当する。

20

## 【0162】

## ヒトTyro3

本明細書で使用される場合、「ヒトTyro3」とは、受容体チロシンキナーゼのヒトTAMファミリーのTyro3メンバーを指す。いくつかの実施形態では、ヒトTyro3ポリペプチドは、NCBIアクセション番号NP\_006284.2、GI:27597078、登録更新日：2014年11月28日12:30AM(配列番号39)に相当する。一実施形態では、ヒトTyro3ポリペプチドをコードする核酸は、NCBIアクセション番号NM\_006293.3、GI:295842183、登録更新日：2014年11月28日12:30AMに相当する。

30

## 【0163】

## ヒトMer

本明細書で使用される場合、「ヒトMer」とは、受容体チロシンキナーゼのヒトTAMファミリーのMerメンバーを指す。いくつかの実施形態では、ヒトMerポリペプチドは、NCBIアクセション番号NP\_006334.2、GI:66932918、登録更新日：2014年9月6日04:03AM(配列番号40)に相当する。一実施形態では、ヒトMerポリペプチドをコードする核酸は、NCBIアクセション番号NM\_006343、バージョン番号NM\_006343.2 GI:66932917、登録更新日：2014年9月6日04:03AMに相当する。

40

## 【0164】

## ヒトAkt3

本明細書で使用される場合、「ヒトAkt3」とは、セリン/スレオニンプロテインキナーゼのヒトAKTサブファミリーのAkt3メンバーを指す。ヒトAkt3には以下のアイソフォームが存在する：

Akt 3 アイソフォーム	mRNA:NCBIリファレンス	ポリペプチド:NCBIリファレンス
A	NM_001206729.1、GI:332078558、登録更新日：2014年9月6日02:43AM	NP_001193658.1、GI:332078559、登録更新日：2014年9月6日02:43AM(配列番号41)
B	NM_005465.4、GI:332078467、登録更新日：2014年9月6日02:43AM	NP_005456.1、GI:4885549、登録更新日：2014年9月6日02:43AM
C	NM_181690.2、GI:332078557、登録更新日：2014年9月6日02:43AM	NP_859029.1、GI:32307163、登録更新日：2014年9月6日02:43AM

10

20

## 【0165】

いくつかの実施形態では、ヒトAktポリペプチドは、上記のアイソフォーム「A」に相当する。いくつかの実施形態では、ヒトAktポリペプチドは、上記のアイソフォーム「B」に相当する。いくつかの実施形態では、ヒトAktポリペプチドは、上記のアイソフォーム「C」に相当する。

## 【0166】

## ヒトGas6

本明細書で使用される場合、「ヒトGas6」（増殖停止特異的6）とは、受容体チロシンキナーゼのTAMファミリーのリガンドを指す。いくつかの実施形態では、ヒトGas6ポリペプチドは、NCBIアクセション番号NP\_000811.1、GI:4557617、登録更新日：2014年9月6日02:44AM（配列番号42）に相当する。一実施形態では、ヒトGas6ポリペプチドをコードする核酸は、NCBIアクセション番号NM\_000820.3、GI:673038877、登録更新日：2014年9月6日02:44AMに相当する。

30

## 【0167】

## BSA

本明細書で使用される場合、「BSA」とはウシ血清アルブミンを指す。いくつかの実施形態では、BSAは「A9647 - ウシ血清アルブミン」（Sigma Aldrich）に相当する。いくつかの実施形態では、BSAは、Genbankアクセション番号CAA76847、バージョン番号CAA76847.1 GI3336842、登録更新日：2011年1月7日02:30PMに相当する。

40

## 【0168】

## Comprise(を含む)

この用語は一般に、「include(を含む)」、すなわち1つ以上の特徴または成分の存在を許容する意味で使用される。

## 【0169】

## 単離された

この用語は、本発明の抗体またはこのような抗体をコードする核酸が、一般に本発明に従っている状態を指す。抗体及び核酸は、それらが自然に会合する物質、例えば、その天然の環境中で、またはin vitroもしくはin vivoで実施される組み換えD

50

N A 技術によって調製される場合には、その調製環境（例えば、細胞培養）中で共存する他のポリペプチドまたは核酸などの物質を含まないか、または実質的に含まない。抗体及び核酸は希釈剤またはアジュvantとともに製剤化できるが、その場合でも実用目的のため単離でき、例えば、その抗体を、イムノアッセイに使用されるマイクロタイタープレートのコーティングに使用する場合には、通常ゼラチンまたは他の担体と混合し、あるいは診断または療法に使用する場合には、薬学的に許容される担体または希釈剤と混合する。抗体は、天然または異種起源の真核細胞系（例えば、C H O またはN S 0 ( E C A C C 8 5 1 1 0 5 0 3 ) 細胞）によってグリコシル化される場合もあれば、（例えば、原核細胞での発現により産生される場合には）非グリコシル化形態の場合もある。

## 【0170】

10

## 実質的に指定された

「実質的に指定された」とは、本発明の関連するC D R またはV H もしくはV L ドメインが、本明細書で指定した配列を有する特定の領域と同一または極めて類似していることを意味する。「極めて類似」とは、C D R 及び／またはV H もしくはV L ドメイン内に、1～5、好ましくは1～4、例えば1～3または1もしくは2、または3もしくは4つのアミノ酸置換が施され得ることを意味する。

## 【0171】

## C D R を支持するフレームワーク

本発明のC D R を保持する構造は一般に、再構成された免疫グロブリン遺伝子によりコードされる天然に存在するV H 及びV L 抗体可変ドメインのC D R に対応する位置にC D R が配置されている、抗体重鎖もしくは軽鎖配列またはその実質的部分である。免疫グロブリン可変ドメインの構造及び位置は、Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services. 1987及びその改訂版（現在は、インターネット上で利用可能（<http://immuno.bme.nwu.edu>または検索エンジンを使用して「Kabat」を検索））を参照して特定することができる。

20

## 【0172】

30

本発明で使用される可変ドメインは、何らかの生殖細胞株または再構成されたマウスもしくはヒトの可変ドメインから得てもよく、またはマウスもしくはヒトの既知の可変ドメインのコンセンサス配列に基づいた合成可変ドメインであってもよい。本発明のC D R 配列（例えばC D R 3 ）は、組み換えD N A 技術を使用して、C D R （例えばC D R 3 ）が欠失した可変ドメインのレパートリーに導入することができる。

## 【0173】

40

例えば、Marks et al (Bio/Technology, 1992, 10: 779-783) が、抗体可変ドメインのレパートリーの作製方法を記載している。この方法では、抗体可変ドメイン領域の5末端に設定された、または5末端と隣接するコンセンサスプライマーを、ヒトV H 遺伝子の第3フレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーとともに使用することで、C D R 3 が欠失したV H 可変ドメインのレパートリーを提供する。Marks et al. は更に、このレパートリーを特定の抗体のC D R 3 と、どのように組み合わせができるかについても記載している。類似した技術を使用して、本発明のC D R 3 由来の配列を、C D R 3 を欠失したV H またはV L ドメインのレパートリーと一緒にシャッフルし、シャッフルした完全なV H またはV L ドメインを同族のV L またはV H ドメインと組み合わせることにより、本発明の抗体を得ることができる。更に、レパートリーをWO 92 / 01047 のファージディスプレイシステムのような適切な宿主系に提示することにより、適切な抗体を選択することができる。レパートリーは、 $10^4$  を上回る個々の抗体、例えば $10^6 \sim 10^8$  または $10^{10}$  の抗体由来のものからなり得る。

## 【0174】

類似したシャッフリング技術または組み合わせ技術はまた、Stemmer (Nature 50

re, 1994, 370: 389 - 391) によっても開示されており、それには、 - ラクタマーゼ遺伝子と関連するDNAシャッフリング技術が示されているが、この方法を抗体の產生に使用できると述べている。

#### 【0175】

更に別の方では、1つ以上の選択されたVH及び/またはVL遺伝子のランダム突然変異誘発を利用して、完全な可変ドメイン内に突然変異を引き起こすことにより、本発明のCDR由来の配列を保持する新規のVHまたはVL領域を作製する。このような技術は、Gram et al (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 3576 - 3580) に記載されており、ここではエラープローンPCR法が使用されている。

10

#### 【0176】

もう一つの方法として、VHまたはVL遺伝子のCDR領域に突然変異誘発を誘導する方法も使用できる。このような技術は、Barbas et al. (1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3809 - 3813) 及びSchier et al. (1996, J. Mol. Biol. 263: 551 - 567) によって開示されている。

#### 【0177】

上記の技術はすべて当業者に公知であり、それ自体は本発明に属さない。当業者は、このような技術を使用することで、当技術分野での通常の方法論を用いて本発明の抗体を得ることができるであろう。

20

#### 【0178】

##### エピトープ特異的抗体

本発明の更なる態様はA×1エピトープに特異的な抗体を得る方法を提供する。この方法は、本明細書に指定されたVHドメインのアミノ酸配列における1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、置換、または挿入により、VHドメインのアミノ酸変異体であるVHドメインを提供することと、場合により、このようにして提供されるVHドメインを1つ以上のVLドメインと組み合わせることと、VHドメインまたはVH/VLの組み合わせまたは複数の組み合わせを試験して、A×1に特異的な抗体分子または抗体抗原結合ドメインを同定することとを含む。前記VLドメインは、実質的に本明細書に指定されたアミノ酸配列を有し得る。

30

#### 【0179】

目的とする抗体が結合するA×1上のエピトープと結合する抗体(例えば、10C9または10G5抗体のA×1への結合を阻止するもの)をスクリーニングするため、Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Ed Harlow and David Lane (1988) に記載されているような通常のクロスブロッキングアッセイを実施することができる。

#### 【0180】

本明細書に開示されるVLドメインの1つ以上の配列変異体を1つ以上のVHドメインと組み合わせる類似の方法を用いてもよい。

40

#### 【0181】

本発明の更なる態様では、A×1に特異的な抗体を調製する方法を提供する。該方法は、  
 (a) CDR3が置換されているか、またはCDR3コード領域が欠失しているVHドメインをコードする核酸の出発レパートリーを提供することと;  
 (b) 前記レパートリーを、VH CDR3について本明細書に実質的に指定されたアミノ酸配列をコードするドナー核酸と組み合わせることにより、前記ドナー核酸をレパートリー内のCDR3領域に挿入し、それによってVHドメインをコードする核酸の産物レパートリーを提供することと;  
 (c) 前記産物レパートリーの核酸を発現させることと;

50

(d) A × 1 に特異的な抗体を選択することと;

(e) 前記抗体またはそれをコードする核酸を回収することと、を含む。

**【0182】**

この場合も、CDR3が置換されているか、またはCDR3コード領域が欠失しているVLドメインをコードする核酸のレパートリーと本発明のVL CDR3を組み合わせる類似の方法を使用してもよい。

**【0183】**

同様に、1つ以上、または3つすべてのCDRをVHまたはVLドメインのレパートリーに移植した後、それをスクリーニングし、A × 1 に特異的な単一のまたは複数の抗体を検出してもよい。

10

**【0184】**

免疫グロブリンの可変ドメインの実質的な部分は、少なくとも3つのCDR領域に加え、それらを介在するフレームワーク領域を含む。好ましくは、この部分はまた、1番目及び4番目のフレームワーク領域のいずれかまたは両方の少なくとも約50%を含み、この50%は、1番目のフレームワーク領域のC末端50%、及び4番目のフレームワーク領域のN末端50%である。可変ドメインの実質的な部分のN末端またはC末端に位置するその他の残基は、天然に存在する可変ドメイン領域には通常会合しないものであってもよい。例えば、組み換えDNA技術によって作製される本発明の抗体の構築物は、クローニングまたは他の操作工程を容易にするために導入されるリンクァーによってコードされるNまたはC末端残基の導入をもたらす場合がある。他の操作工程は、以下により詳細に述べるように免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン（例えばダイアボディの产生における）またはタンパク質標識を含む更なるタンパク質配列に、本発明の可変ドメインを連結するためにリンクァーを導入することを含む。

20

**【0185】**

本発明の好ましい態様では、VH及びVLドメインの対を含んでいる抗体が好ましいが、VHまたはVLドメイン配列のいずれかによる単一結合ドメインは、本発明の更なる態様を構成する。単一免疫グロブリンドメイン、特にVHドメインは、特異的に標的抗原に結合できることが知られている。

**【0186】**

いずれかの単一結合ドメインの場合、これらドメインを用いて、A × 1 に結合できる2ドメイン抗体を形成可能な相補的ドメインをスクリーニングすることができる。

30

**【0187】**

スクリーニングは、例えば、WO 92 / 01047に開示されている、いわゆる階層的二重コンビナトリアルアプローチを使用したファージディスプレイスクリーニング法によって実現することができる。このアプローチでは、H鎖またはL鎖のいずれかのクローナーを含む個別のコロニーを用いて他方の鎖（LまたはH）をコードするクローナーの完全なライブラリを感染させ、得られた二本鎖抗体を先の参考文献に記載されているようなファージディスプレイ法に従って選択する。この技術は、Marks et al.の同書にも開示されている。

40

**【0188】**

本発明の抗体は、抗体定常領域またはその一部を更に含んでもよい。例えば、本発明の抗体は、CL、CH1、CH2及び/またはCH3ドメイン（または、そのいずれかの組み合わせ）を含んでもよい。VLドメインは、そのC末端で、ヒトCまたはC鎖、好ましくはC鎖を含む抗体軽鎖定常領域に結合することができる。同様に、VHドメインによる抗体は、そのC末端で、任意の抗体アイソタイプ、例えばIgG、IgA、IgE、及びIgM、ならびにアイソタイプサブクラスのいずれかに由来する免疫グロブリン重鎖のすべてまたは一部に結合することができる。WO 99 / 58572に開示されているnab及びnacなどのFc領域を使用してもよい。

**【0189】**

キメラ抗体、ヒト化抗体、CDR移植抗体

50

本明細書で使用される場合、「キメラ」抗体または「ヒト化」抗体または「C D R移植」抗体は、非マウス、好ましくはヒト抗体由来の1種以上のタンパク質またはペプチドと組み合わせた、本明細書に記載する抗A × 1抗体のいずれかの組み合わせまたはそれに由来する何らかのC D Rを含む。

#### 【0190】

キメラ抗体またはヒト化抗体は、C D Rが本明細書に記載する1つ以上の抗A × 1抗体に由来し、抗体の少なくとも一部または残部が1つ以上のヒト抗体から由来するものを含む。したがって、実質的にヒトに免疫原性がない、フレームワーク、C L（例えばCまたはC'）、C Hドメイン（例えば、C H 1、C H 2、C H 3）、ヒンジ領域が抗体のヒト部分に含まれていてもよい。10

#### 【0191】

ヒト抗体由来の抗体領域は、ヒト抗体と100%の同一性を有する必要はない。好ましい実施形態では、免疫原性を無視できるように、マウスのアミノ酸残基は可能な限りほとんど維持されないが、C D Rによって形成される抗原結合部位を支持しつつ、同時に抗体のヒト化を最大化するため、マウス残基は必要に応じて保持され得る。このような変更または変異は、非修飾抗体と比べて、ヒトまたは他の種の免疫原性を場合により、及び好ましくは保持または低減する。

#### 【0192】

尚、ヒト化抗体は、非ヒト動物、すなわち機能的に再編成されたヒト免疫グロブリン（例えば、重鎖及び/または軽鎖）遺伝子を発現できる原核細胞または真核細胞によって產生することができる。更に、抗体が单鎖抗体であるとき、抗体は本来のヒト抗体に存在しないリンカーペプチドを含むことができる。例えば、s c F vは、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域とを接続するリンカーペプチド、例えば2～約20のグリシンまたは他のアミノ酸残基（好ましくはグリシン及びセリン残基（例えば、G 1 y<sub>4</sub> S e rまたはG 1 y<sub>2</sub> S e rリピート））を含み得る。このようなリンカーペプチドは、ヒトに非免疫原性であると考えられる。いくつかの実施形態では、リンカーは少なくとも12アミノ酸長である。20

#### 【0193】

抗体のヒト化は、例えば、個々のヒトフレームワークのプールにインフレーム融合された非ヒト標的モノクローナル抗体の6つすべてのC D Rを含むコンビナトリアルライブラリを合成することにより実施することができる。すべての既知の重鎖及び軽鎖ヒト生殖細胞系配列を表す遺伝子を収容するヒトフレームワークライブラリを利用することができる。得られたコンビナトリアルライブラリを更にスクリーニングして、目的とする抗原との結合を検出することができる。このアプローチは、親抗体に対する結合活性を維持するという観点から、完全なヒトフレームワークの最も好ましい組み合わせの選択が可能である。その後、ヒト化抗体を様々な技術によって更に最適化することができる。30

#### 【0194】

完全長抗体分子の場合、免疫グロブリン遺伝子をハイブリドーマ細胞株のゲノムD N Aまたはm R N Aから得ることができる。その抗体の重鎖及び軽鎖を哺乳動物のベクター系にクローニングする。アセンブリは、当技術分野で既知の方法を使用したシーケンシングによって確認する。抗体構築物は、他のヒトまたは哺乳動物の宿主細胞系で発現させることができる。この構築物を更に、目的とする発現抗体の一過性トランスフェクションアッセイ及びウェスタンプロット解析によって検証することができる。迅速なアッセイ方法を使用して、最大の生産性を有する安定な細胞系を単離してスクリーニングすることができる。40

#### 【0195】

ヒト化抗体、断片及び領域の定常（C）領域をコードするヒト遺伝子は、既知の方法によるヒト胎児肝臓のライブラリに由来し得る。ヒトC領域遺伝子は、ヒト免疫グロブリンを発現して產生するものを含む、いかなるヒト細胞にも由来し得る。ヒトのC H領域は、μ、γ、δ、ε、及びそのサブクラス（例えばG 1、G 2、G 3及びG 4）を含むヒ50

ト重鎖の既知のクラスまたはアイソタイプのいずれかに由来し得る。重鎖アイソタイプは抗体の種々のエフェクター機能の原因となるため、望ましいエフェクター機能、例えば補体結合または抗体依存性細胞傷害（A D C C）活性を基準としてC H ドメインを選択する。好ましくは、C H ドメインはガンマ1（I g G 1）に由来する。

【0196】

ヒトのC L 領域は、ヒトL鎖アイソタイプ、カッパまたはラムダのいずれか、好ましくはカッパに由来し得る。

【0197】

ヒト免疫グロブリンC領域をコードする遺伝子は、標準クローニング技術（Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) and Ausubel, et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology (1987 - 1993)）によってヒト細胞から得られる。ヒトC領域遺伝子は、2種類の軽鎖、5つのクラスの重鎖、及びそのサブクラスを表す遺伝子を含んでいる既知のクローランから容易に得ることができる。  
10

【0198】

キメラ抗体断片、例えばF a b 及びF ( a b ' )<sub>2</sub>は、適切に短縮されたキメラ重鎖遺伝子を設計することによって調製することができる。例えば、F ( a b ' )<sub>2</sub>断片の重鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、短縮された分子を得るために、重鎖のC H 1ドメイン及びヒンジ領域をコードするD N A配列に続いて、翻訳終止コドンを含み得る。  
20

【0199】

非ヒト抗体またはヒト抗体の遺伝子操作方法またはヒト化方法を使用することができ、これらの方法は当技術分野において周知である。一般に、ヒト化抗体または遺伝子操作抗体は、非ヒト起源、例えば、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト靈長類またはその他哺乳動物由来の1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらのヒトアミノ酸残基は「移入」残基と称されることが多く、通常は既知のヒト配列の「移入」可変ドメイン、定常ドメインまたはその他のドメインから得られる。既知のヒトI g 配列は、例えば、www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.ncbi.nlm.nih.gov/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research\_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html. www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fcc1/protocol.html; www.isac-net.org/sites\_geo.html; aximt1.imt.uni-marburg.d  
30  
40  
50

e/.about.rek/AEPStart.html; baserv.uci.ku  
n.nI/.about.jraats/links1.html; www.recab.  
uni-hd.de/immuno.bme.nwvu.edu/; www.mrc-  
cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html;  
www.ibt.unam.mx/vir/V\_mice.html; imgt.cnu  
sc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.  
.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.  
uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html  
; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar  
/SlideOI.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.  
.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/c  
caewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7  
/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx  
/vir/structure/stat\_aim.html; www.biosci.  
missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.  
bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-page  
s/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr\_products.htm  
; www.patents.ibm.con/ibm.html、  
Kabat et al. Sequences of Proteins of Imm  
unological Interest, U.S. Dept. Health (1983  
に開示されており、それぞれ全体が参照により本明細書に組み込まれる。  
10  
20

#### 【0200】

当技術分野で既知のように、このような移入された配列を使用して、免疫原性を低減すること、または結合性、親和性、結合速度、解離速度、結合活性、特異性、半減期または他のいずれかの適切な特性を低減、増強もしくは調節することができる。一般に、可変領域及び定常領域の非ヒト配列はヒトまたは他のアミノ酸と置換されるが、非ヒトまたはヒトCDR配列は一部またはすべてが維持される。

#### 【0201】

また場合により、抗原に対する高親和性及び他の好ましい生物学的特性を保持したまま、抗体をヒト化することもできる。この目的を達成するために、場合により、親配列及びヒト化配列の3次元モデルを使用して、親配列及び種々の概念的ヒト化産物を分析する過程を経て、ヒト化抗体を調製することができる。3次元免疫グロブリンモデルは一般に利用可能であり、当業者に熟知されている。選択された候補免疫グロブリン配列の有望な3次元コンフォメーション構造を図示して表示するコンピュータプログラムが提供されている。この表示を精査することで、候補免疫グロブリン配列の機能において残基に見込まれる役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原結合能に影響する残基の分析が可能になる。このように、FR残基をセンサス配列及び移入配列から選択して組み合わせることにより、望ましい抗体特性、例えば標的抗原（複数可）に対する親和性の増加などが実現される。

#### 【0202】

一般にCDR残基は、抗原結合の作用に直接的かつ最も実質的に関与している。抗体のヒト化または遺伝子操作は、既知のいずれかの方法を使用して実施することができる。例えば、以下に限定されないが、Winter et al., Nature 321:522 1986; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988), Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)、米国特許第5,723,323号、同第5,940

76, 862号、同第5, 824, 514号、同第5, 817, 483号、同第5, 814, 476号、同第5, 763, 192号、同第5, 723, 323号、同第5, 766, 886号、同第5, 714, 352号、同第6, 204, 023号、同第6, 180, 370号、同第5, 693, 762号、同第5, 530, 101号、同第5, 585, 089号、同第5, 225, 539号；同第4, 816, 567号、PCT/US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755；WO90/14443、WO90/14424、WO90/14430、EP229246に記載されているものである。

## 【0203】

10

ヒト化抗体のヒト定常領域は、いかなるクラスまたはアイソタイプ（IgG、IgA、IgM、IgE、IgDなど）でもあり得、カッパまたはラムダ軽鎖を含み得る。一実施形態では、ヒト定常領域は、IgG重鎖または定義済み断片、例えば、IgGサブクラスであるIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のうち、少なくとも1つを含む。

## 【0204】

## 標識抗体

本発明の抗体は、検出可能または機能的標識で標識してもよい。検出可能標識には、[<sup>131</sup>I]または[<sup>99</sup>Tc]などの放射性標識を含み、放射性免疫複合体の技術分野で既知の従来の化学的方法を用いて、これら標識を本発明の抗体に結合させることができる。標識はまた、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素標識を含む。更に標識は、特異的同族の検出可能部分、例えば、標識されたアビジンまたはストレプトアビジンへの結合により検出できるビオチンなどの化学成分を含む。好ましくは、標識は蛍光標識、例えばFITCを含む。

20

## 【0205】

## 有機部分

本発明の修飾抗体及び抗原結合性断片は、抗体と直接的または間接的に共有結合される1つ以上の有機部分を含むことができる。本明細書に記載する抗体または抗原結合性断片に結合される各有機部分は、独立して親水性ポリマー基、脂肪酸基または脂肪酸エステル基であり得る。本明細書で使用される場合、用語「脂肪酸」は、モノカルボン酸及びジカルボン酸を包含する。「親水性ポリマー基」は、本明細書でこの用語が使用される場合、オクタンよりも水に溶解しやすい有機ポリマーを指す。例えば、ポリリジンは、オクタンよりも水に溶解しやすい。したがって、ポリリジンの共有結合により修飾された抗体は本開示に包含される。本明細書に記載する抗体の修飾に適した親水性ポリマーは、直鎖状でも分枝鎖状でもよく、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、モノメトキシ-ポリエチレングリコール(mPEG)、PPGなどのポリアルカルボングリコール、炭水化物（例えば、デキストラン、セルロース、オリゴ糖、多糖類など）、親水性アミノ酸のポリマー（例えば、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリアスパルテートなど）、ポリアルカン酸化物（例えば、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシドなど）及びポリビニルピロリドンが挙げられる。好ましくは、本明細書に記載する抗体を修飾する親水性ポリマーは、独立した分子実体として約800～約150,000ダルトンの分子量を有する。例えば、PEG5000及びPEG20,000を使用することができ、この添字がポリマー平均分子量（ダルトン）である。親水性ポリマー基は、1～約6個のアルキル基、脂肪酸基、または脂肪酸エステル基と置換され得る。脂肪酸基または脂肪酸エステル基と置換される親水性ポリマーは、適切な方法を用いて調製することができる。例えば、アミン基を含むポリマーを、脂肪酸または脂肪酸エステルのカルボキシレートと結合することができ、脂肪酸または脂肪酸エステルの活性化カルボキシレート（例えば、N,N-カルボニルジイミダゾールで活性化されたもの）をポリマーのヒドロキシル基と結合することができる。

30

## 【0206】

本発明に記載される抗体の修飾に適した脂肪酸及び脂肪酸エステルは、飽和されていて

40

50

も、または1つ以上の不飽和単位を含有していてもよい。本発明に記載される抗体の修飾に適した脂肪酸としては、例えば、n-ドデカン酸(C12、ラウリン酸)、n-テトラデカン酸(C14、ミリスチン酸)、n-オクタデカン酸(C18、ステアリン酸)、n-エイコサン酸(C20、アラキジン酸)、n-ドコサン酸(C22、ベヘン酸)、n-トリアコンタン酸(C30)、n-テトラコンタン酸(C40)、c i s - 9 - オクタデカン酸(C18、オレイン酸)、全c i s - 5 , 8 , 11 , 14 - エイコサテトラエン酸(C20、アラキドン酸)、オクタン二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサン二酸などが挙げられる。好適な脂肪酸エステルとしては、直鎖または分枝鎖の低級アルキル基を含んでいるジカルボン酸のモノエステルが挙げられる。低級アルキル基は、1~約12個、好ましくは1~約6個の炭素原子を含むことができる。

10

## 【0207】

修飾ヒト抗体及び抗原結合性断片は、好適な方法を使用して、例えば1つ以上の修飾剤との反応によって調製することができる。「修飾剤」は、本明細書でこの用語が使用される場合、活性基を含む好適な有機基(例えば、親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル)を指す。「活性基」とは、適切な条件下で第2の化学基と反応でき、その反応により修飾剤と第2の化学基との間に共有結合が形成される化学的部分または官能基である。例えば、アミン反応性活性基としては、トシレート、メシレート、ハロ(クロロ、ブロモ、フルオロ、ヨード)、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(NHS)などの求電子性基が挙げられる。チオールと反応することができる活性基としては、例えば、マレイミド、ヨードアセチル、アクリロイル(acryloyl)、ピリジルジスルフィド、5-チオール-2-ニトロ安息香酸チオール(TNB-チオール)などが挙げられる。アルデヒド官能基は、アミンまたはヒドラジド含有分子と結合することができ、アジド基は、三価リン基と反応して、ホスホロアミダートまたはホスホロイミド結合を形成することができる。活性基を分子に導入する好適な方法は、当技術分野で既知である(例えば、Hernanson, G. T., Biocconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)を参照)。活性基は、有機基(例えば、親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル)と、直接またはリンカーパー部分、例えば、二価のC1-C12基(この基は、1個以上の炭素原子が酸素、窒素、またはイオウなどのヘテロ原子と置換され得る)を介して結合することができる。好適なリンカーパー部分としては、例えば、テトラエチレングリコール、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-、及び-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH-NH-が挙げられる。リンカーパー部分を含む修飾剤は、例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)の存在下で、モノ-Boc-アルキルジアミン(例えば、モノ-Boc-エチレンジアミン、モノ-Boc-ジアミノヘキサン)を脂肪酸と反応させ、遊離アミンと脂肪酸カルボキシレートとの間のアミド結合を形成することにより生成することができる。Boc保護基をトリフルオロ酢酸(TFA)処理により生成物から除去して一级アミンを露出させ、これを記載されているように別のカルボキシレートと結合すること、または無水マレイン酸と反応させ、得られた生成物を環化して脂肪酸の活性化マレイミド誘導体を生成することができる。(例えば、Thompson, et al., WO 92/16221を参照のこと)。

20

## 【0208】

本発明の修飾抗体は、ヒト抗体または抗原結合断片を修飾剤と反応させることにより作製することができる。例えば、アミン反応性修飾剤、例えば、PEGのNHSエステルを用いることによって、有機部分を非部位特異的方法で抗体と結合させることができる。抗体または抗原結合断片のジスルフィド結合(例えば鎖内ジスルフィド結合)を還元することによって、修飾ヒト抗体または抗原結合断片を調製することもできる。このとき、還元された抗体または抗原結合断片をチオール反応性修飾剤と反応させて、本明細書に記載される修飾抗体を作製することができる。本明細書に記載される抗体の特異的部位と結合する、有機部分を含んだ修飾ヒト抗体及び抗原結合断片は、好適な方法、例えば、タンパク

30

40

50

質分解の逆反応 (Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6 (10): 2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24 (1): 59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56 (4): 456-463 (1997))、及びHermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, California. (1996) に記載の方法などを使用して調製することができる。

## 【0209】

10

## 免疫複合体

本発明はまた、1種以上の細胞毒性剤、例えば化学療法剤もしくは化学療法薬、成長阻害剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌性の酵素活性毒素、真菌、植物もしくは動物起源、またはそれらの断片）または放射性同位体と複合体化された、本明細書の抗A×1抗体を含んでいる免疫複合体を提供する。

## 【0210】

一実施形態では、免疫複合体は、抗体が1種以上の薬物と複合体化された、抗体-薬物複合体（ADC）であり、例えば薬物としては、以下に限定されないが、メイタンシノイド（米国特許第5,208,020号、同第5,416,064号、及び欧州特許EPO 425235B1を参照）；アウリスタチン、例えばモノメチルアウリスタチン薬部分D E及びDF（MMAE及びMMAF）（米国特許第5,635,483号及び第5,780,588号及び第7,498,298号を参照）；ドラスタチン；カリケアマイシンまたはその誘導体その（米国特許第5,712,374号、同第5,714,586号、同第5,739,116号、同第5,767,285号、同第5,770,701号、同第5,770,710号、同第5,773,001号及び同第5,877,296号；Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993)；及びLode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)を参照）；アントラサイクリン、例えばダウノマイシンまたはドキソルビシン（Kratz et al., *Current Med. Chern.* 13:477-523 (2006)；Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chern. Letters* 16:358-362 (2006)；Torgov et al., *Bioconj. Chern.* 16:717-721 (2005)；Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000)；Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chern. Letters* 12:1529-1532 (2002)；King et al., *J. Med. Chern.* 45:4336-4343 (2002)；及び米国特許第6,630,579号を参照）；メトトレキサート；ビンデシン；タキサン、例えばドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセル；トリコテセン及びCC1065が挙げられる。

## 【0211】

20

別の実施形態では、免疫複合体は、酵素活性毒素またはその断片と複合体化された、本明細書に記載される抗体を含み、酵素活性毒素としては、以下に限定されないが、ジフテリア毒素A鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖（*Pseudomonas aeruginosa*由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンチンタンパク質、*Phytolaca americana*タンパク質（PAPI、PAPII及びPAPS）、*Momordica charantia*阻害剤、クルシン、クロチン、*sapaponaria officinalis*阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセンが挙げられる。

30

40

50

## 【0212】

別の実施形態では、免疫複合体は、放射性原子と複合体化されて放射性免疫複合体を形成する、本明細書に記載される抗体を含む。本発明の放射性免疫複合体の作製に種々の放射性同位体を利用できる。例としては、[<sup>211</sup>At]、[<sup>131</sup>I]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>90</sup>Y]、[<sup>186</sup>Re]、[<sup>188</sup>Re]、[<sup>153</sup>Sm]、[<sup>212</sup>Bi]、[<sup>32</sup>P]、[<sup>212</sup>Pb]及びLuの放射性同位体が挙げられる。放射性免疫複合体を検出に使用する場合、免疫複合体には、シンチグラフィー検査用の放射性原子、例えば[<sup>99</sup>Tc]または[<sup>123</sup>I]、または核磁気共鳴(NMR)イメージング(別名、磁気共鳴イメージング、MRI)用のスピン標識、例えば同じくヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガンまたは鉄を含んでよい。10

## 【0213】

抗体と細胞毒性剤との複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、イミノチオラン(IFT)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えばジメチルアジトイミデートHCl)、活性エステル(例えばジスクシンイミジルスペレート)、アルデヒド(例えばグルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えばビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えばビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えばトルエン2,6-ジイソシアネート)及びビス活性フッ素化合物(例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシンイムノトキシンは、Vitetta et al.(Science 238:1098(1987))に記載のように調製することができる。炭素-14で標識した1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン・トリアミンペント酢酸(MXDTPA)は、抗体と放射性ヌクレオチドを複合体化するキレート剤の典型例である。WO94/11026を参照のこと。20  
本発明のリンカーは、細胞の細胞毒性薬の放出が容易である「切断可能なリンカー」であってもよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー(Chari et al., Cancer Res. 52:127-131(1992);米国特許第5,208,020号)を使用することができる。30

## 【0214】

本明細書の免疫複合体またはADCは、限定されないが、例えばBMP S、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC及びスルホ-SMPB)ならびにSVSB(スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート)を含むがこれに限定されない(例えばPierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.Aから)市販されている架橋試薬を用いて調製された、このような複合体を明示的に企図する。40

## 【0215】

## グリコシリ化変異体

ある特定の実施形態では、本明細書で提供する抗体を改変して、抗体がグリコシリ化される範囲が増減されている。1つ以上のグリコシリ化部位が生成または削除されるようにアミノ酸配列を改変することにより、抗体に対するグリコシリ化部位の付加または除去を好都合に達成することができる。

## 【0216】

抗体がFc領域を含む場合、Fc領域と結合する炭水化物を変更することができる。哺乳動物細胞によって產生される本来の抗体は通常、一般にFc領域のCH2ドメインのAsn297にN結合で結合している、分枝状の二分歧オリゴ糖を含む。Wright e50

t a l . T I B T E C H 15 : 26 - 32 ( 1997 ) を参照のこと。オリゴ糖は種々の炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン ( G1cNAc ) 、ガラクトース及びシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「システム」にある G1cNAc に結合しているフコースを含み得る。いくつかの実施形態では、特定の特性が改善された抗体変異体を作製するために、本発明の抗体のオリゴ糖に修飾を施すことができる。

#### 【 0217 】

一実施形態では、Fc領域に（直接的または間接的に）結合するフコースがない炭水化物構造を有する抗体変異体が提供される。例えば、このような抗体ではフコースの量を1%～80%、1%～65%、5%～65%または20%～40%にすることができる。フコースの量は、例えば、WO2008/077546に記載のように、MALDI-TOF質量分析法により測定される、Asn297に結合した糖鎖構造（例えば、複合型、混合型、及び高マンノース構造）すべての合計と比較した、Asn297にある糖鎖内のフコースの平均量を算出することにより決定される。Asn297は、Fc領域のおよそ297の位置（Fc領域残基のEu番号付け）に位置するアスパラギン残基を指す。ただし、Asn297はまた、抗体の軽微な配列変異により、位置297のおよそ±3アミノ酸上流または下流、すなわち位置294と300との間に位置する場合もある。このようなフコシル化変異体は、ADCC機能を改善し得る。例えば、米国特許公開US2003/0157108（Presta, L.）；US2004/0093621（Kyowa Hakalw Kogyo Co., Ltd.）を参照のこと。「非フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異体に関連した刊行物の例としては、以下が挙げられる：US2003/01571；WO2000/61739；WO2001/29246；US2003/0115614；US2002/0164328；US2004/0093621；US2004/0132140；US2004/0110704；US2004/0110282；US2004/0109865；WO2003/085119；WO2003/084570；WO2005/035586；WO2005/035778；WO2005/053742；WO2002/031140；Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336: 1239 - 1249 (2004)；Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。

#### 【 0218 】

非フコシル化抗体を産生する能力を有する細胞株の例としては、タンパク質フコシル化を欠損しているLec13 CHO細胞（Ripka et al. Arch. Biomed. Biophys. 249: 533 - 545 (1986)；米国特許US2003/0157108 A1, Presta, L.；及びWO2004/056312 A1, Adams et al.、特に実施例11）、及びノックアウト細胞株、例えばアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞（例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)；Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (4) : 680 - 688 (2006)；及びWO2003/085107）を参照）が挙げられる。

#### 【 0219 】

更に、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がG1cNAcによって二分されているバイセクティングオリゴ糖をもつ抗体変異体を提供する。このような抗体変異体は、フコシル化を減少させ得る、及び/またはADCC機能を改善し得る。このような抗体変異体の例は、例えばWO2003/011878（Jean Mairet et al.）；米国特許第6,602,684号（Umana et al.）；及びUS2005/0123546（Umana et al.）に記載されている。Fe領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を持つ抗体変異体もまた提供される。このような抗体変異体はCDC機能を改善し得る。このような抗体変異体は、例えばWO1997/30087（Patel et al.）；WO1998/58964（Raju, S.）；及びWO1999/22764（Raju, S.）に記載されてい

る。

### 【0220】

#### Fc領域変異体

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体のFc領域に1つ以上のアミノ酸改変を導入し、それによってFc領域変異体を生成することができる。Fc領域の変異体は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸改変（例えば置換）を含むヒトFc領域の配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のFc領域）を含み得る。

### 【0221】

ある特定の実施形態では、本発明は、すべてではないが一部のエフェクター機能を有する抗体変異体を企図しており、これはin vivoでの抗体の半減期が重要であるが、ある種のエフェクター機能（例えば補体結合及びADCCなど）は不要または有害であるような用途に望ましい候補となる。in vitro及び/またはin vivoで細胞毒性アッセイを実施すると、CDC活性及び/またはADC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイを実施して、抗体がFc結合を欠失している（それゆえ、ADCC活性の欠失が見込まれる）が、FcRn結合能は保持していることを確認することができる。ADCC、NK細胞を媒介する初代細胞は、FcRIIIのみを発現するが、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現については、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991)の464ページ、表3に要約されている。目的とする分子のADCC活性を評価するためのin vitroアッセイの非限定的な例が、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059-7063 (1986)を参照）及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499-1502 (1985); 5,821,337 (Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166: 1351-1361 (1987)を参照）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いることができる（例えば、フローサイトメトリー用のACTI（商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Cell Technology, Inc. Mountain View, CA）；及びCytoTox 96（登録商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Promega, Madison, WI）を参照）。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。あるいは、または加えて、目的とする分子のADCC活性を、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652-656 (1998)に開示されているように、in vivoで、例えば動物モデルにおいて評価することができる。また、C1q結合アッセイを実施して、抗体がC1qを結合できず、その結果、補体依存性細胞傷害（CDC）活性を欠失していることを確認することができる。例えば、WO2006/029879及びWO2005/100402のC1q及びC3c結合ELISAを参照のこと。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを実施してもよい（例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101: 1045-1052 (2003)；及びCragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103: 2738-2743 (2004)を参照）。また、FcRn結合及びin vivoクリアランス/半減期のFc測定を、当技術分野で既知の方法を使用して実施することができる（例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18 (12): 1759-1769 (2006)を参照）。

### 【0222】

エフェクター機能が減少した抗体には、Fc領域の残基238、265、269、270、297、327及び329のうち、1つ以上の置換を有するものが含まれる（米国特許第6,737,056号）。このようなFc変異体としては、アミノ酸265、269

10

20

30

40

50

、270、297及び327位のうち、2つ以上に置換を有するFc変異体が挙げられ、これには、残基265及び297がアラニンに置換された、いわゆる「DANA」Fc突然変異体を含む（米国特許第7,332,581号）。

#### 【0223】

FcRへの結合を改善または減少させた特定の抗体変異体が記載されている（例えば、米国特許第6,737,056号；WO2004/056312、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9(2) : 6591 - 6604 (2001)を参照）。

#### 【0224】

ある特定の実施形態では、抗体変異体は、ADCC活性を改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298位及び／または333位（残基のEU番号付け）に置換を有するFc領域を含む。 10

#### 【0225】

いくつかの実施形態では、例えば、米国特許第6,194,551号、WO99/51642、及びIdusogie et al. J. Immunol. 164: 4178 - 4184 (2000)に記載されているように、C1q結合及び／またはCDC活性が変化（すなわち改善または減少）するようにFc領域が改変される。

#### 【0226】

半減期が増加し、胎児への母体IgGの移送を担う新生児Fc受容体(FcRn)への結合が改善した抗体(Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976)及びKim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994))が、US2005/0014934A1(Hinton et al.)に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する1つ以上の置換を有するFc領域を含む。このようなFc変異体には、Fc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424または434の1つ以上の置換、例えば、Fc領域の残基434の置換を有するものが含まれる（米国特許第7,371,826号）。その他のFc領域変異体の例に関しては、Duncan & Winter, Nature 322: 738 - 40 (1988)；米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821号；及びWO94/29351も参照のこと。 20

#### 【0227】

##### システィン操作抗体変異体

ある特定の実施形態では、抗体の1つ以上の残基がシスティン残基と置換されているシスティン操作抗体、例えば「thiomaB」を作製することが望ましい場合がある。

#### 【0228】

特定の実施形態では、残基の置換は、抗体の接触可能な部位で生じる。この残基をシスティンと置換すると、接触可能な抗体部位に反応性チオール基が配置されるため、これをを利用して、例えば薬物部分またはリンカー-薬物部分などの他の部分と抗体を複合体化し、本明細書で更に記載されるような免疫複合体を作製することができる。ある特定の実施形態では、以下のいずれか1つ以上の残基をシスティンと置換することができる：軽鎖のV205(Kabat番号付け)；重鎖のA118(EU番号付け)；及び重鎖Fc領域のS400(EU番号付け)。システィン操作抗体は、例えば米国特許第7,521,541号に記載のように生成することができる。 40

#### 【0229】

##### 診断方法及び治療方法

本発明の抗体は、ヒトまたは動物対象、好ましくはヒトの診断方法または治療方法に使用されるように設計される。

#### 【0230】

したがって、本発明の更なる態様は、提供される抗体を1種以上の試薬、例えばFITC 50

Cなどの検出可能な標識と複合体化して投与することを含む、診断方法を提供する。提供される抗体を使用して、迅速性と信頼性のある、生検組織由来癌細胞の検査を開発することができる。例えば、体液、例えば血液またはリンパ中に循環している循環腫瘍細胞などの転移性癌細胞を発見し得る検査に本抗体を使用することができる。目的とする他の癌として、乳癌、肺癌、胃癌、頭頸部癌、大腸癌、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮内膜癌及び前立腺癌、ならびにリンパ腫（例えば、非ホジキンリンパ腫、NHL）及び白血病（特に急性骨髓性白血病、AML）が挙げられる。

#### 【0231】

本発明の更なる態様は、提供される抗体の投与を含む治療方法、このような抗体を含む医薬組成物、治療方法に使用される本明細書に記載される抗体、本明細書に記載される特定の臨床的徵候の治療方法に使用される本明細書に記載される抗体、及び投与用医薬品の製造へのこのような抗体の使用、例えば、抗体を薬学的に許容される賦形剤とともに本抗体を製剤化することを含む医薬品または医薬組成物の製造方法での使用を提供する。10

#### 【0232】

##### 臨床的徵候

ヒトA×1に対して高特異性を有する抗体を使用することで、臨床的利点が得られる臨床的徵候には、A×1が過剰発現している病状、またはA×1拮抗作用が臨床的利点をもたらす病状のいずれをも含む。このような徵候としては、免疫不全、心臓血管疾患、血栓症、糖尿病、免疫チェックポイント障害、線維性障害（線維症）または増殖性疾患、例えば癌、特に転移性癌が挙げられる。更に、A×1は上皮起源の多くの癌に関与することが知られている。20

#### 【0233】

目的とする線維性障害としては、斜視（strabismus）、強皮症、ケロイド、腎性全身性線維症、肺線維症、特発性肺胞線維症（IPF）、囊胞性線維症（CF）、全身性硬化症、心臓線維症、非アルコール性脂肪肝炎（NAASH）、それ以外の種類の肝線維症、原発性胆汁性胆管炎、腎線維症、癌及びアテローム性動脈硬化症が挙げられる。これらの疾患では、組織内での線維症の慢性的発現が、罹患した臓器の構造を著しく変化させ、それに続く臓器能不全を引き起こす。このような臓器の持続的消耗過程の結果、線維症を伴う疾患の多くは、進行性の病状であることが多く、長期的な予後不良を有する（Rockey, D. C., Bell, P. D. and Hill, J. A. (2015), N. Engl. Med., Vol. 372, pp. 1138-1149を参照）。30

#### 【0234】

目的とする免疫チェックポイント傷害としては、慢性ウイルス感染症、黒色腫、大腸癌、乳癌、卵巣癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、前立腺癌、腎細胞癌、膀胱癌、食道癌、膀胱癌、骨髄腫、腎臓癌、膀胱癌、脳腫瘍及びリンパ腫が挙げられる。

#### 【0235】

目的とする癌としては、白血病（例えば、限定されないが、急性白血病、急性リンパ性白血病）、急性骨髓性白血病（例えば、骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄单球性白血病、单球性白血病、赤芽球性白血病及び骨髄異形成症候群）、慢性白血病（例えば、限定されないが、慢性骨髓性（顆粒球性）白血病、慢性リンパ性白血病、有毛細胞白血病）；真性多血症；リンパ腫（例えば、限定されないが、ホジキン病、非ホジキン病）；多発性骨髄腫（例えば、限定されないが、くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌性骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞性白血病、孤立性形質細胞腫及び髄外性形質細胞腫）；ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症；意義不明の单クローニ性免疫グロブリン血症；良性单クローニングロブリン血症；重鎖病；骨及び結合組織肉腫（例えば、限定されないが、骨腫瘍、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーリング肉腫、悪性巨細胞腫、骨線維肉腫、脊索腫、骨膜肉腫、軟組織肉腫、血管肉腫（血管内皮腫）、線維肉腫、カポシ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、転移性癌、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫）；脳腫瘍（例えば、限定されないが、神経膠腫、膠芽腫、星状細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣細胞腫、乏突起神経膠腫、非グリア腫瘍、聴神経腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体細胞腫、松果40  
50

体芽細胞腫及び原発性脳リンパ腫) ; 乳癌(例えば、限定されないが、腺癌、小葉(小細胞)癌、乳管内癌、髄様乳癌、粘液性乳癌、管状乳癌、乳頭状乳癌、原発性癌、ページエット病及び炎症性乳癌) ; 副腎癌(例えば、限定されないが、クロム親和性細胞腫及び副腎皮質癌) ; 甲状腺癌(例えば、限定されないが、乳頭状または濾胞性甲状腺癌、甲状腺髓様悪性腫瘍、甲状腺髓様癌及び甲状腺未分化癌) ; G I S T - 消化管間質腫瘍 ; 膵臓癌(例えば、限定されないが、インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、ビポーマ、ソマトスタチン分泌腫瘍及びカルチノイドまたは胰島細胞腫瘍) ; 下垂体癌(例えば、限定されないが、クッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、先端巨大症及び尿崩症) ; 眼の癌(例えば、限定ないが、眼内黒色腫(例えば、虹彩黒色腫、脈絡膜悪性黒色腫及び毛様体黒色腫)及び網膜芽細胞腫) ; 膀胱癌(例えば、扁平上皮癌、腺癌及び黒色腫) ; 外陰癌(例えば、扁平上皮癌、黒色腫、腺癌、基底細胞癌、肉腫及びページエット病) ; 子宮頸癌(例えば、限定されないが、扁平上皮癌及び腺癌) ; 子宮癌(例えば、限定されないが、子宮内膜癌及び子宮肉腫) ; 卵巣癌(例えば、限定されないが、卵巣上皮癌、境界腫瘍、胚細胞腫瘍及び間質腫瘍) ; 食道癌(例えば、限定されないが、扁平上皮癌、腺癌、腺様囊胞癌、粘表皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫、黒色腫、形質細胞腫、いぼ状癌及び燕麦細胞(小細胞)癌) ; 胃癌(例えば、限定されないが、腺癌、菌状(ポリープ状)、潰瘍性、表在拡大型、びまん性拡大型、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫及び癌肉腫) ; 結腸癌；直腸癌；肝臓癌(例えば、限定されないが、肝細胞癌及び肝芽細胞腫)、胆嚢癌(例えば、腺癌)；胆管癌(例えば、限定されないが、乳頭状、結節状及びびまん性)；肺癌(例えば、非小細胞肺癌(N S C L C)、扁平上皮癌(類表皮癌)、腺癌、大細胞癌及び小細胞肺癌(S C L C))；精巣癌(例えば、限定されないが、生殖細胞腫瘍、精上皮腫、未分化、古典的(定型)、精母細胞性、非精上皮腫性、胎生期癌、奇形癌、絨毛癌(卵黃囊腫)、前立腺癌(例えば、限定されないが、腺癌、平滑筋肉腫及び横紋筋肉腫)；生殖器癌(例えば、陰茎癌)；口腔癌(例えば、限定されないが、扁平上皮癌)；基底癌；唾液腺癌(例えば、限定されないが、腺癌、粘表皮癌及び腺様囊胞癌)；咽頭癌(例えば、限定されないが、扁平上皮癌及びいぼ状癌)；皮膚癌(例えば、限定されないが、基底細胞癌、扁平上皮癌及び黒色腫、表在拡大型黒色腫、結節性黒色腫、悪性黒子型黒色腫、末端黒子型黒色腫)；腎臓癌(例えば、限定されないが、腎細胞癌、腎明細胞癌、腺癌、腎細胞腫、線維肉腫、移行上皮癌(腎孟及び/または尿管))；ウィルムス腫瘍；膀胱癌(例えば、限定されないが、移行上皮癌；扁平上皮癌、腺癌、癌肉腫)が挙げられる。加えて、癌には、粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽細胞腫、上皮癌、囊胞腺癌、気管支原性癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌及び乳頭腺癌が挙げられる。好ましくは、癌は乳癌、黒色腫、前立腺癌、卵巣癌、大腸癌、肺癌または神経膠腫癌から選択される。より好ましくは、癌は転移性乳癌または肺癌である。循環腫瘍細胞の標的化及び治療を想定する。

## 【0236】

転移癌の治療は、原発腫瘍の位置に応じて異なる。乳癌が例えば肺まで拡大した場合であっても、依然それは乳癌であり、癌が現在、肺にあるという事実によってではなく、乳房内を起源とする転移癌により治療が決定される。約5パーセントの確率で、転移癌が発見されても、原発腫瘍を特定できない場合がある。そのような転移癌の治療は、その起源ではなくその箇所に従って行う。転移癌は起源腫瘍(既知である場合)の組織によって命名される。例えば、脳に拡大した乳癌は脳転移乳癌と呼ばれる。

## 【0237】

本発明による抗A×1治療を利用すると、A×1が過剰発現する病状、またはA×1拮抗作用により臨床的利点が得られる病状を有する患者に明らかな利点をもたらすことができる。治療は、注射(例えば静脈内)によってまたは局所送達方法によって行うことができる。提供される抗体は、標的組織への医薬組成物の送達を誘導するために使用することも、または例えば、循環腫瘍細胞(C T C)またはその他の転移細胞を標的とするため全身的に使用することもできる。

## 【0238】

10

20

30

40

50

本発明の更なる態様では、対象の癌幹細胞を阻害する方法を提供し、該方法は、本明細書に記載される抗体（または、その複合体）に対象を接触させることを含む。このような方法に使用される抗体及び複合体も想定される。

【0239】

E G F R の拮抗作用

本発明はまた、本明細書に開示されるいづれかの有効量の抗 A × 1 抗体を個体に投与し、構成的 A × 1 を阻害することを含む、構成的 A × 1 活性の阻害方法を提供する。

【0240】

一態様では、本発明は、E G F R 活性化突然変異または E G F R 遺伝子増幅と関連する癌に罹患している対象の治療方法であって、該対象は E G F R アンタゴニストによる治療に耐性を発現しており、該治療方法には、対象が A × 1 発現、A × 1 活性化突然変異または A × 1 遺伝子増幅を有するかどうかを特定することと、A × 1 活性化突然変異または A × 1 遺伝子増幅を有する該対象に、E G F R アンタゴニスト及び本明細書に記載されるいづれかの抗 A × 1 抗体を投与することを含む方法を提供する。10

【0241】

一態様では、本発明は、E G F R 活性化突然変異または E G F R 遺伝子増幅と関連する癌に罹患している対象の治療方法であって、(i) E G F R アンタゴニストによる治療を受けている対象をモニタリングし、対象が A × 1 発現、A × 1 活性化突然変異または A × 1 遺伝子増幅を発現しているかどうかを特定することと、(ii) 対象が A × 1 活性化突然変異または A × 1 遺伝子増幅を発現している場合に、E G F R アンタゴニストに加えて、本明細書に記載される抗 A × 1 抗体のいづれかを含むように対象の治療計画を変更することを含む方法を提供する。20

【0242】

一態様では、本発明は、E G F R 活性化突然変異または E G F R 遺伝子増幅と関連する癌に罹患している対象の治療方法であって、(i) E G F R アンタゴニストによる治療を受けている対象をモニタリングし、対象が阻害剤に対する耐性を発現しているかどうかを特定することと、(ii) 対象を検査して、対象が A × 1 発現、A × 1 活性化突然変異または A × 1 遺伝子増幅を有しているかどうかを特定することと、(iii) 対象が A × 1 活性化突然変異または A × 1 遺伝子増幅を有している場合に、E G F R アンタゴニストに加えて、本明細書に記載される抗 A × 1 抗体のいづれかを含むように対象の治療計画を変更することを含む方法を提供する。30

【0243】

一態様では、本発明は、E G F R アンタゴニストの評価方法であって、(i) E G F R アンタゴニストによる治療を受けている集団をモニタリングし、治療薬に対する耐性を発現している対象を同定することと、(ii) 耐性のある対象を検査して、各対象が A × 1 発現、A × 1 活性化突然変異または A × 1 遺伝子増幅を有しているかどうかを特定することと、(iii) 対象が A × 1 発現、A × 1 活性化突然変異または A × 1 遺伝子増幅を有している場合に、E G F R アンタゴニストに加えて、本明細書に記載される抗 A × 1 抗体のいづれかを含むように対象の治療計画を変更することを含む方法を提供する。

【0244】

一態様では、本発明は、癌細胞の E G F R リン酸化を低減する方法であって、前記癌細胞は E G F R アンタゴニストに対する耐性を獲得し、また前記癌細胞は、A × 1 活性化突然変異または A × 1 遺伝子増幅を含んでおり、該方法は、本明細書に記載されるいづれかの抗 A × 1 抗体及び E G F R アンタゴニストと、細胞を接触させる工程を含む方法を提供する。40

【0245】

一態様では、本発明は、癌細胞の P B K 媒介性シグナル伝達を低減する方法であって、前記癌細胞は E G F R アンタゴニストに対する耐性を獲得し、また前記癌細胞は A × 1 発現、A × 1 活性化突然変異または A × 1 遺伝子増幅を含んでおり、該方法は、本明細書に記載されるいづれかの抗 A × 1 抗体及び E G F R アンタゴニストと、細胞を接触させる工50

程を含む方法を提供する。

【0246】

一態様では、本発明は、癌細胞のEGFR媒介性シグナル伝達を低減する方法であって、前記癌細胞はEGFRアンタゴニストに対する耐性を獲得し、また前記癌細胞はA<sub>x</sub>1発現、A<sub>x</sub>1活性化突然変異またはA<sub>x</sub>1遺伝子増幅を含んでおり、該方法が、本明細書に記載されるいづれかの抗A<sub>x</sub>1抗体及びEGFRアンタゴニストと、細胞を接触させることを含む方法を提供する。

【0247】

一態様では、本発明は、EGFRアンタゴニストに対する癌細胞の感受性を回復する方法であって、前記癌細胞はEGFRアンタゴニストに対する耐性を獲得し、また前記癌細胞はA<sub>x</sub>1発現、A<sub>x</sub>1活性化突然変異またはA<sub>x</sub>1遺伝子増幅を含んでおり、該方法は、本明細書に記載されるいづれかの抗A<sub>x</sub>1抗体及びEGFRアンタゴニストと、細胞を接触させることを含む方法を提供する。

【0248】

一態様では、本発明は、癌細胞の成長または増殖を低減する方法であって、前記癌細胞はEGFRアンタゴニストに対する耐性を獲得し、また前記癌細胞はA<sub>x</sub>1発現、A<sub>x</sub>1活性化突然変異またはA<sub>x</sub>1遺伝子増幅を含んでおり、該方法は、本明細書に記載されるいづれかの抗A<sub>x</sub>1抗体及びEGFRアンタゴニストと、細胞を接触させる工程を含む方法を提供する。

【0249】

一態様では、本発明は、癌細胞のアポトーシスを増加させる方法であって、前記癌細胞はEGFRアンタゴニストに対する耐性を獲得し、また前記癌細胞はA<sub>x</sub>1発現、A<sub>x</sub>1活性化突然変異またはA<sub>x</sub>1遺伝子増幅を含んでおり、該方法は、本明細書に記載されるいづれかの抗A<sub>x</sub>1抗体及びEGFRアンタゴニストと、細胞を接触させる工程を含む方法を提供する。

【0250】

一態様では、本発明は、EGFRアンタゴニストに対する癌細胞の耐性を低減する方法であって、前記癌細胞はEGFRアンタゴニストに対する耐性を獲得し、また前記癌細胞はA<sub>x</sub>1活性化突然変異またはA<sub>x</sub>1遺伝子増幅を含んでおり、該方法は、本明細書に記載されるいづれかの抗A<sub>x</sub>1抗体及びEGFRアンタゴニストと、細胞を接触させる工程を含む方法を提供する。

【0251】

一態様では、本発明は、EGFRアンタゴニスト耐性を獲得した癌細胞の治療方法であって、前記癌細胞は、A<sub>x</sub>1活性化突然変異またはA<sub>x</sub>1遺伝子増幅を含んでおり、該方法は、本明細書に記載されるいづれかの抗A<sub>x</sub>1抗体及びEGFRアンタゴニストと、細胞を接触させることを含む方法を提供する。

【0252】

いくつかの実施形態では、癌細胞はEGFR誘導性の癌である。いくつかの実施形態では、癌細胞はEGFR活性化突然変異を含む。いくつかの実施形態では、癌細胞はEGFR遺伝子増幅を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子増幅は少なくとも2倍である。いくつかの実施形態では、A<sub>x</sub>1増幅は少なくとも2倍である。いくつかの実施形態では、癌細胞は、EGFRアンタゴニストに対する耐性の増加と関連するEGFR遺伝子突然変異を含む。いくつかの実施形態では、EGFRアンタゴニストに対する耐性の増加と関連するEGFR遺伝子突然変異は、EGFRのT790M突然変異である。

【0253】

いくつかの実施形態では、EGFRアンタゴニストは、小分子治療薬、核酸治療薬またはタンパク質治療薬である。いくつかの実施形態では、EGFRアンタゴニストは、抗体、アンチセンス分子または小分子キナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、EGFRアンタゴニストは、ゲフィチニブ、エルロチニブ、セツキシマブ、パニツムマブからなる群から選択されるEGFRキナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態では、EGF

10

20

30

40

50

Rアンタゴニストは、セツキシマブ、パニツムマブからなる群から選択される抗EGFR抗体である。いくつかの実施形態では、核酸治療薬は、siRNA分子である。

#### 【0254】

一態様では、本発明は、EGFRアンタゴニスト及び本明細書に記載されるいづれかの抗A<sub>x</sub>1抗体による治療候補である対象を同定する方法であって、前記対象はEGFRアンタゴニストによる治療を受けたことがあり、前記EGFRアンタゴニストに対する耐性を獲得した癌に罹患しており、前記対象由来の癌細胞において、A<sub>x</sub>1発現、A<sub>x</sub>1活性化突然変異またはA<sub>x</sub>1遺伝子増幅を検出することを含む方法を提供する。

#### 【0255】

一態様では、本発明は、EGFRアンタゴニストによる治療を受けており、前記EGFRアンタゴニストに対する耐性を獲得するリスクのある対象を同定する方法であって、前記対象由来の癌細胞において、A<sub>x</sub>1発現、A<sub>x</sub>1活性化突然変異またはA<sub>x</sub>1遺伝子増幅の存在を検出することを含み、前記A<sub>x</sub>1発現、A<sub>x</sub>1活性化突然変異またはA<sub>x</sub>1遺伝子増幅の存在が、前記耐性を獲得するリスクの指標となる方法を提供する。10

#### 【0256】

一態様では、本発明は、EGFRアンタゴニストによる治療に耐性である癌に罹患した対象を治療する方法であって、EGFRアンタゴニスト及び本明細書に記載されるいづれかの抗A<sub>x</sub>1抗体を対象に投与することを含む方法を提供する。

#### 【0257】

一態様では、本発明は、EGFR活性化突然変異またはEGFR遺伝子増幅に関連する癌に罹患している対象の治療方法であって、該対象は、EGFRアンタゴニストによる治療に耐性を発現しており、該方法は、対象がA<sub>x</sub>1発現、例えば、A<sub>x</sub>1のレベルの上昇及び/または活性の上昇を有するかどうかを特定することと、A<sub>x</sub>1発現、例えば、A<sub>x</sub>1活性の上昇を有する対象に、EGFRアンタゴニスト及び本明細書に記載されるいづれかの抗A<sub>x</sub>1抗体を投与することを含む方法を提供する。20

#### 【0258】

一態様では、本発明は、EGFR活性化突然変異またはEGFR遺伝子増幅と関連する癌に罹患している対象の治療方法であって、(i) EGFRアンタゴニストによる治療を受けている対象をモニタリングし、対象がA<sub>x</sub>1発現、例えば、A<sub>x</sub>1レベルの上昇及び/またはA<sub>x</sub>1活性の上昇を示すかどうかを特定することと、(ii) 対象がA<sub>x</sub>1発現、例えば、A<sub>x</sub>1レベルの上昇及び/または活性の上昇を発現している場合に、EGFRアンタゴニストに加えて、本明細書に記載される抗A<sub>x</sub>1抗体のいづれかを含むように対象の治療計画を変更することを含む方法を提供する。30

#### 【0259】

一態様では、本発明は、EGFR活性化突然変異またはEGFR遺伝子増幅と関連する癌に罹患している対象の治療方法であって、(i) EGFRアンタゴニストによる治療を受けている対象をモニタリングし、対象が阻害剤に対する耐性を発現しているかどうかを特定することと、(ii) 対象を検査して、対象がA<sub>x</sub>1発現、例えばA<sub>x</sub>1レベルの上昇及び/または活性の上昇を有しているかどうかを特定することと、(iii) 対象がA<sub>x</sub>1レベルの上昇及び/または活性の上昇を有している場合に、EGFRアンタゴニストに加えて、本明細書に記載される抗A<sub>x</sub>1抗体のいづれかを含むように対象の治療計画を変更することを含む方法を提供する。40

#### 【0260】

別の態様では、本発明は、(i) EGFRアンタゴニストに対する癌細胞の感受性を回復し、(ii) EGFRアンタゴニストに対する癌細胞の耐性を低減し、及び/または(iii) EGFRアンタゴニスト及び本明細書に記載されるいづれかの抗A<sub>x</sub>1抗体と、細胞を接触させることにより、EGFRアンタゴニスト耐性を獲得した癌細胞を治療する方法を提供する。

#### 【0261】

例示した実施形態では、癌細胞は、EGFRアンタゴニストに対する耐性を獲得してお50

り、例えば、 $A \times 1$  遺伝子の突然変異活性、 $A \times 1$  遺伝子増幅、または G a s 6 媒介性  $A \times 1$  活性化に伴う  $A \times 1$  活性及び／または発現レベルの上昇を含む。本明細書に開示される方法は、癌細胞の感受性の回復、耐性の低減、及び／または獲得した耐性の治療に使用することができる。

#### 【0262】

別の態様では、本発明は、E G F R アンタゴニスト及び本明細書に記載されるいずれかの抗  $A \times 1$  抗体と、細胞を接触させることにより、癌細胞の成長及び／または増殖を低減する、または癌細胞のアポトーシスを増加させる方法を提供する。例示した実施形態では、癌細胞は、E G F R アンタゴニストに対する耐性を獲得しており、例えば、 $A \times 1$  遺伝子の突然変異活性、 $A \times 1$  遺伝子増幅、または G a s 6 媒介性  $A \times 1$  活性化に伴う  $A \times 1$  活性及び／または発現の上昇を含む。10

#### 【0263】

##### 医薬組成物

本発明の抗体は通常、抗体に加えて少なくとも 1 つの成分を含み得る医薬組成物の形態で投与される。

#### 【0264】

したがって、本発明による医薬組成物及び本発明に従って使用される医薬組成物は、活性成分に加えて、当業者に周知の薬学的に許容される賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤または他の材料を含んでよい。このような材料は、非毒性でなければならず、活性成分の有効性を妨げてはならない。担体または他の材料の厳密な性質は、投与経路によって異なり、投与経路は経口であっても、注射（例えば静脈内）によるものでもよい。本医薬組成物は、ヒト用医薬品及び動物用医薬品に使用されるヒト用または動物用のものであり得る。20

#### 【0265】

本明細書に記載する種々の異なる形態の医薬組成物に適した、このような賦形剤の例は、"Hand book of Pharmaceutical Excipients", 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and P J Weller にて参照することができる。

#### 【0266】

治療用途に許容される担体または希釈剤は、医薬分野で周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985) に記載されている。好適な担体の例としては、ラクトース、デンプン、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、マンニトール、ソルビトールなどが挙げられる。好適な希釈剤の例としては、エタノール、グリセロール、水及び緩衝生理食塩水が挙げられる。30

#### 【0267】

薬剤担体、賦形剤または希釈剤の選択は、意図された投与経路及び標準的な薬物を考慮して選択することができる。医薬組成物には、担体、賦形剤、または希釈剤として、またはそれに加えて、任意の好適な結合剤（複数可）、滑沢剤（複数可）、懸濁化剤（複数可）、コーティング剤（複数可）、可溶化剤（複数可）、緩衝剤（複数可）、着香剤（複数可）、界面活性剤（複数可）、粘稠剤（複数可）、防腐剤（複数可）（抗酸化剤を含む）など、意図するレシピエントの血液と等張性のある製剤を提供する目的で含まれる物質を含んでよい。40

#### 【0268】

好適な結合剤の例としては、デンプン、ゼラチン、天然糖（例えば、グルコース、無水ラクトース、易流動性ラクトース、ベータ-ラクトース、とうもろこし甘味剤）、天然ガム及び合成ガム（例えば、アカシア、トラガカント、またはアルギン酸ナトリウム）、カルボキシメチルセルロースならびにポリエチレングリコールが挙げられる。

#### 【0269】

好適な滑沢剤の例としては、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどが挙げ50

られる。医薬組成物には、防腐剤、安定剤、色素及び着香剤さえも存在してよい。防腐剤の例としては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸及びpヒドロキシ安息香酸のエステルが挙げられる。抗酸化剤及び沈殿防止剤も使用することができる。

#### 【0270】

医薬組成物には、経口投与、局所（経皮、頸側、舌下）投与、直腸投与または非経口（皮下、皮内、筋肉内、及び静脈内を含む）投与、経鼻投与、経肺投与（例えば、吸入）に適したものが含まれる。製剤は、必要な場合、利便上、個々の用量単位で提供されてもよく、薬学分野で周知の方法のいずれかにより調製することができる。どの方法にも、活性化合物を液体担体もしくは微粉固体担体または両方と結合させた後、生成物を必要に応じて望ましい製剤に成形する工程が含まれる。担体が固体である場合の経口投与に適した医薬組成物は、単位用量製剤、例えば、それぞれ所定量の活性薬剤を含有する大丸薬、カプセル剤または錠剤として提供されることが最も好ましい。錠剤は、場合により1つ以上の補助成分とともに、圧縮または成形することにより作製することができる。圧縮錠剤は、場合により結合剤、滑沢剤、不活性希釈剤、潤滑剤、界面活性剤または分散剤と混合された易流動性形態、例えば粉末または顆粒の活性薬剤を、適した機械で圧縮することにより調製することができる。成形錠剤は、不活性液体希釈剤とともに活性薬剤を成形することにより作製することができる。錠剤は、場合によりコーティングされていてもよく、コーティングしていない場合には、場合により刻み目を付けてもよい。カプセル剤は、活性薬剤を単独で、または1種以上の補助成分との混合物としてカプセルシェルに充填した後、通常の方法で密封することにより調製することができる。カシェ剤はカプセル剤と同様に、活性薬剤が何らかの補助成分（複数可）とともにライスペーパー製の包材中に封入されている。活性薬剤はまた、分散性粒剤として製剤化することもでき、例えば、これは投与前に水中で懸濁化しても、食品にふりかけてもよい。この粒剤を例えばサシェに包装することができる。担体が液体である場合の経口投与に適した製剤は、水性もしくは非水性液体中の溶液もしくは懸濁液、または水中油型液体エマルジョンとして提供されてもよい。

#### 【0271】

経口投与のための製剤には、徐放剤形、例えば、活性薬剤が適切な放出制御マトリックス内に製剤化されているか、または好適な放出制御フィルムでコーティングされている錠剤を含む。このような製剤は特に予防用途に好都合であり得る。

#### 【0272】

担体が固体である場合の直腸投与に適した医薬組成物は、単位用量坐剤として提供されることが最も好ましい。好適な担体には、当技術分野で一般に用いられるカカオバター及びその他の材料を含む。坐剤は、軟化または溶解された担体（複数可）と活性薬剤を混合した後、成形型内で冷却して成形することにより、好都合に形成することができる。

#### 【0273】

非経口投与に適した医薬組成物は、水性または油性ビヒクル中の活性薬剤の無菌溶液または懸濁液を含む。

#### 【0274】

注射用製剤は、ボーラス注射または連続注入に適したものであってよい。このような製剤は、単位用量または複数用量容器で提供し、製剤の投入後、使用時に必要となるまで密封されていると便利である。あるいは、活性薬剤を粉末形態にし、好適なビヒクル、例えば滅菌バイロジエンフリー水を用いて使用前に作製してもよい。

#### 【0275】

活性化合物はまた、長時間作用性のデポー製剤として調製してもよく、これを例えば皮下または筋肉内に、筋肉内注射によってまたは埋め込みによって投与してもよい。デポー調製物は、例えば、好適なポリマー材料もしくは疎水性材料またはイオン交換樹脂を含んでもよい。このような長時間作用性製剤は、特に予防用途に好都合である。

#### 【0276】

口腔経由の肺投与に適した製剤は、活性化合物を含有し、望ましくは直径が0.5～7ミクロンの範囲である粒子状物質をレシピエントの気管支樹に送達するように提供される

10

20

30

40

50

。一つの可能性として、このような製剤は、吸入装置での使用に適した貫通可能なカプセル、例えばゼラチン内での提供、あるいは活性薬剤と、好適な液体またはガス状の噴射剤、ならびに場合により界面活性剤及び／もしくは固体希釈剤などの他の成分を含む、自動噴霧製剤としての提供に好都合である微粉碎粉末の形態である。好適な液体噴射剤としてはプロパン及びクロロフルオロカーボンが挙げられ、好適なガス状噴射剤としては二酸化炭素が挙げられる。また自動噴霧製剤は、活性薬剤を溶液または懸濁液の液滴形態で投薬する場合に用いることができる。

#### 【0277】

このような自動噴霧製剤は、当技術分野で既知のものと同様に、既定の手順によって調製することができる。自動噴霧製剤は、好適には、望ましい噴霧特性を有する手動操作可能な、または自動的に機能するバルブを備えた容器で提示される。また有利には、バルブはその作動ごとに一定の量（例えば、25～100マイクロリットル）を送達する計量型のものである。10

#### 【0278】

更に別の可能性として、活性薬剤は、加速気流または超音波攪拌を用いて吸入用の微細な霧状液滴を発生させるアトマイザーまたはネプライザーで使用するために溶液または懸濁液の形態であってもよい。

#### 【0279】

経鼻投与に適した製剤としては、一般に上記の肺投与用のものと類似した製剤が挙げられる。このような製剤は、投与されるときに鼻腔内に定着できるように、望ましくは10～200ミクロン範囲の粒径を有する必要があり、これは、必要に応じて好適な粒径の粉末を使用するかまたは適切なバルブを選択することによって実現できる。他の好適な製剤としては、鼻の近くに保持した容器から鼻腔への急速吸入により投与するための20～500ミクロンの範囲の粒径を有する粗粉末、及び水性または油性溶液または懸濁液中に0.2～5% w/v の活性薬剤を含む点鼻液が挙げられる。20

#### 【0280】

薬学的に許容される担体は、当業者に周知であり、それらの担体としては、0.1M、好ましくは0.05Mリン酸緩衝液、または0.8%生理食塩水が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、このような薬学的に許容される担体は、水性または非水性の溶液、懸濁液、及びエマルジョンであってもよい。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水性担体としては、生理食塩水及び緩衝化媒体を含めた、水、アルコール／水溶液、エマルジョン、または懸濁液が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リングルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸加リングル、または不揮発性油が挙げられる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなどの防腐剤及びその他の添加剤が存在してもよい。30

#### 【0281】

局所製剤に適した製剤は、例えば、ゲル剤、クリーム剤、または軟膏剤として提供することができる。このような調製物は、例えば、傷もしくは潰瘍の表面に直接広げるか、または治療すべき箇所及び部分一面に適用できる包帯、ガーゼ、メッシュなどの好適な支持体に付けて、傷または潰瘍に塗布することができる。40

#### 【0282】

治療すべき部位、例えば、傷または潰瘍に直接噴霧するかまたはふりかけることができる、液体または粉末製剤も提供することができる。あるいは、包帯、ガーゼ、メッシュなどの担体に、製剤を噴霧またはふりかけた後、治療すべき部位に適用することができる。

#### 【0283】

本発明の更なる態様によれば、上記の医薬組成物または動物用組成物を調製するための方法であって、活性化合物（複数可）を、例えば混合によって、担体と結合させる工程を含む方法が提供される。一般に該製剤は、活性薬剤を、液体担体もしくは微粉固体担体、またはその両方と均一にかつ十分に結合させ、その後、必要な場合には生成物を成形する50

ことによって調製される。本発明は、薬剤を、薬学的または獣医学的に許容される担体またはビヒクルと結合させることを含む、医薬組成物の調製方法にまで及ぶ。

#### 【0284】

##### 投与

本発明の医薬組成物は、経口、経直腸、経鼻、気管支内、局所（頬側、舌下を含む）、膣もしくは非経口（皮下、筋肉内、静脈内、動脈内及び皮内を含む）、腹腔内、または髄腔内投与への適合が可能である。好ましくは、製剤は静脈内または皮下投与される製剤である。

#### 【0285】

製剤は、好都合には、単位剤形で、すなわち、単位用量、または単位用量の複数単位もしくは分割単位を含有する個別部分の形態で提示することができる。例として、製剤は錠剤及び徐放性カプセル剤の形態をとることができ、製薬分野で周知の任意の方法によって調製することができる。

#### 【0286】

本発明における経口投与用製剤は、それぞれ所定の量の活性薬剤を含有するカプセル剤、ゲルーレ（g e l l u l e s）、ドロップ剤、カシェ剤、丸薬もしくは錠剤などの別個の単位として；粉末もしくは顆粒として；水性液体もしくは非水性液体中の活性薬剤の溶液、エマルジョン、もしくは懸濁液として；または水中油型液体エマルジョンもしくは油中水型液体エマルジョンとして；または大丸薬などとして提供することができる。好ましくは、これらの組成物は、1用量当たり1～250mg、より好ましくは10～100mgの活性成分を含有する。

#### 【0287】

経口投与用組成物（例えば、錠剤及びカプセル剤）に関して、用語「許容される担体」は、ビヒクル、例えば一般的な賦形剤、例えば結合剤、例えばシロップ、アカシア、ゼラチン、ソルビトール、トラガカント、ポリビニルピロリドン（ポビドン）、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピル-メチルセルロース、スクロース及びデンブン；充填剤及び担体、例えば、トウモロコシデンブン、ゼラチン、ラクトース、スクロース、微結晶セルロース、カオリン、マンニトール、リン酸二カルシウム、塩化ナトリウム及びアルギン酸；ならびに滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム及び他の金属ステアリン酸塩、ステアリン酸グリセロール、ステアリン酸、シリコーン流体、タルク、蠍、油、及びコロイド状シリカを含む。ペパーミント、冬緑油、サクランボ香料などの着香剤も使用することができる。剤形を容易に識別できるように、着色剤を添加することが望ましい場合もある。錠剤は、当技術分野で周知の方法によってコーティングすることもできる。

#### 【0288】

錠剤は、場合により1種以上の補助成分とともに、圧縮または成形することにより製造することができる。圧縮錠剤は、場合により結合剤、滑沢剤、不活性希釈剤、防腐剤、界面活性剤または分散剤と混合された易流動性形態、例えば粉末または顆粒の活性薬剤を、適した機械で圧縮することにより、調製することができる。成形錠剤は、湿った粉末化合物と不活性液体希釈剤との混合物を好適な機械で成形することにより製造することができる。錠剤は、場合によりコーティングすることも、刻み目をつけることもでき、活性薬剤をゆっくりまたは制御して放出させるように製剤化することもできる。

#### 【0289】

経口投与に適した他の製剤としては、矯味基剤、通常はスクロース及びアカシア、またはトラガカントに活性薬剤を含むトローチ剤；不活性基剤、例えば、ゼラチン及びグリセリンまたはスクロース及びアカシアに活性薬剤を含むパステル剤；好適な液体担体に活性薬剤を含む洗口液が挙げられる。

#### 【0290】

他の投与形態は、静脈内、動脈内、髄腔内、皮下、皮内、腹腔内または筋肉内に注射でき、無菌のまたは滅菌可能な溶液から調製される溶液またはエマルジョンを含む。注射形

10

20

30

40

50

態は通常、1用量当たり10～1000mg、好ましくは10～250mgの活性成分を含有する。

【0291】

本発明の医薬組成物はまた、坐剤、腔坐剤、懸濁液、エマルジョン、ローション剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、噴霧剤、溶液または粉剤の形態であってもよい。

【0292】

経皮投与の代替的な手段は、皮膚パッチの使用によるものである。例えば、ポリエチレングリコールまたは液体パラフィンの水性エマルジョンからなるクリーム剤に活性成分を組み込むことができる。活性成分はまた、必要とされ得る程度の安定剤及び防腐剤を加えた、白蠅または白色軟質パラフィン基剤からなる軟膏に1～10重量%の濃度で組み込むことができる。10

【0293】

別の製剤手法により、経口または坐剤経路に適した製剤を提供することができる。投与経路は、有効性を最大化する、または副作用を最小化するために、治療薬の物理化学的特性によって、疾患ごとに特別に配慮して決定することができる。

【0294】

更に別の投与様式は、留置装置のプレコーティングまたはそれ以外の組み込みを用いるものであり、そのために適切な実験によって抗体の最適量を決定する。

【0295】

本発明のいくつかの好ましい実施形態の抗体分子は、単一遺伝子性断片（例えばFabまたはscFv）である。このような抗体断片は、半減期が比較的短いという特徴を有することができる。20

【0296】

投与量

当業者は、過度の実験をすることなく、対象に投与する、本組成物の適切な用量を容易に決定することができる。通常は、医師が個々の患者に最も適する実際の投与量を決定するものであり、投与量は、用いる特定の薬剤の活性、その薬剤の代謝安定性及び作用の長さ、年齢、体重、全身の健康、性別、食事、投与様式及び投与時間、排泄率、併用薬物、特定の病状の重症度、ならびに個別の実行中の療法を含めた様々な因子に応じて異なると予想される。30

【0297】

本発明に従って、提供される組成物を個々の患者に投与することができる。投与は「治療的有効量」内であることが好ましく、この量は患者に利点をもたらすのに十分な量である。このような利点は、少なくとも1つの症状が少なくとも寛解することであってよい。実際に投与される量、ならびに投与速度及び時間経過は、治療される内容の性質及び重症度に依存する。治療薬の処方（例えば、投与量の決定など）は、一般診療医及び他の医師の担当範囲内である。抗体の適切な用量は当技術分野で周知である（Leidermann J. A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe, K. D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922を参照）。40

【0298】

正確な用量は、抗体が診断用または治療用いずれであるか、治療すべき領域の大きさと位置、抗体（例えば全抗体、抗体断片またはダイアボディ）の明確な性質、及び抗体と結合する検出可能標識または他の分子の性質を含めた多数の因子に応じて異なると予想される。通常の抗体用量を静脈内にボーラス投与することができる。他の投与様式としては、数時間にわたる静脈注入により、同程度の総蓄積用量を達成することが挙げられる。これは成人患者の単独治療での用量であり、幼児及び乳児の場合には、それに比例して調整でき、また他の形態の抗体の場合、分子量に比例して調整することができる。治療は、医師の裁量で毎日、週2回、毎週または毎月の間隔で繰り返すことができる。50

**【 0 2 9 9 】**

本明細書で開示される投与量は、平均的症例の例示である。言うまでもなく、この投与量範囲よりも高いまたは低い方が功を奏する個々の事例もあり得るが、このような量も本発明の範囲内である。

**【 0 3 0 0 】**

本発明に従って、 $A \times 1$  を阻害する有効量の薬剤を投与することができる。言うまでもなく、この投与量は薬剤の投与種類に応じて更に変更される。例えば、緊急治療時に「有効量」を達成するためには、非経口投与が好ましい。 $5\%$  デキストロースの水または正常生理食塩水中の化合物、または好適な賦形剤を含む類似の製剤の静脈内注射が最も効果的であるが、筋肉内ボーラス注射も有用である。通常、非経口用量は  $0.01 \sim \text{約 } 100\text{ mg} / \text{kg}$  であり、好ましくはキナーゼの阻害または標的受容体の飽和に有効な血漿中濃度に薬物濃度を維持するように  $0.1 \sim 20\text{ mg} / \text{kg}$  である。薬剤は、毎日  $1 \sim 4$  回、 $\text{約 } 0.4 \sim \text{約 } 400\text{ mg} / \text{kg}$  / 日の総 1 日用量を達成するレベルで投与することができる。治療的に有効である正確な活性薬剤量、及びこのような薬剤が最適に投与される経路は、薬剤の血中濃度を、治療的効果を得るために必要な濃度と比較することにより、当業者によって容易に決定される。

10

**【 0 3 0 1 】**

本発明の薬剤はまた、薬物濃度が本明細書に開示される治療的指標のうちの 1 つ以上を達成するのに十分であるような方法で患者に経口投与することもできる。通常、薬剤を含有する医薬組成物は、患者の病状と合致するように  $0.1 \sim \text{約 } 50\text{ mg} / \text{kg}$  の経口用量で投与される。好ましくは、経口用量は  $0.5 \sim \text{約 } 20\text{ mg} / \text{kg}$  である。

20

**【 0 3 0 2 】**

本発明の薬剤を数種のバイオアッセイのいずれかで試験して、所与の薬理効果を得るために必要な濃度を決定することができる。

**【 0 3 0 3 】****併用療法**

本発明の抗  $A \times 1$  抗体は単独で投与することも、他の治療薬と組み合わせて、治療すべき病状に応じて同時にまたは逐次的に投与することもできる。例えば、本発明の抗体またはその複合体を、抗癌单剤療法として、または下記のような他の癌治療薬との併用療法に使用することができる。他の治療薬には、好適な用量の鎮痛薬、例えば非ステロイド性抗炎症薬（例えばアスピリン、イブプロフェンまたはケトプロフェン）もしくはオピエート（例えばモルヒネ）、または制吐剤の投与を含むことができる。

30

**【 0 3 0 4 】****併用療法での使用に適した薬剤**

これには、アルキル化剤（例えば、ブスルファンなどのスルホン酸アルキル）；ナイトロジエンマスター（例えばクロラムプシル、シクロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン及びウラムスチン）、エチレンイミン誘導体（例えばチオテパ）；ニトロソウレア（例えばカルムスチン、ロムスチン及びストレプトゾシン）、トリアゼン（例えばダカルバジン）、プロカルバジン及びテモゾールアミド（temozolamide）；白金化合物、例えばシスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン及びピコプラチン、オンナプラチン（onnoplatin）、テトラプラチン、スプリオプラチン（sproplatin）、イプロプラチニ、クロロ（ジエチレンジアミノ）-白金（II）クロリド、ジクロロ（エチレンジアミノ）-白金（II）、ジアミノ（2-エチルマロナト）白金（II）、（1,2-ジアミノシクロヘキサン）マロナト白金（II）、（4-カルボキシフタロ）-（1,2-ジアミノシクロヘキサン）白金（II）、（1,2-ジアミノシクロヘキサン）-cis-（ピルバト）白金（II）；抗葉酸剤（例えばメトトレキサート、ペメトレキセド（permetrexed）、ラルチトレキセド、及びトリメトレキサート）を含む代謝拮抗薬；ピリミジン類似体（例えばアザシチジン、カペシタビン、シタラビン、エダトレキサート、フロクス

40

50

ウリジン、フルオロウラシル、ゲムシタビン及びトロキサシタビン) ; プリン類似体(例えばクラドリビン、クロロデオキシアデノシン、クロファラビン、フルダラビン、メルカブトプリン、ペントスタチン、チオグアニン) ; 抗腫瘍抗生物質(例えばブレオマイシン、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ポルフィロマイシン)、及びアントラサイクリン(例えばダウノルビシン、ドキソルビシン、エビルビシン、イダルビシン及びバルルビシン)を含む天然生成物; 有糸分裂阻害薬(例えばビンカアルカロイド、ビンプラスチン、ビンベシル(vinvesir)、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン) ;

酵素(例えばL-アスパラギナーゼ及びPEG-L-アスパラギナーゼ) ; 微小管ポリマー安定剤(例えばタキサン類のパクリタキセル及びドセタキセル) ; トポイソメラーゼI阻害剤(例えばカンプトテシン、イリノテカン及びトポテカン) ; トポイソメラーゼII阻害剤(例えばポドフィロトキシン、アムサクリン、エトポシド、テニポシド、ロソキサントロン及びアクチノマイシン) ; アンドロゲン(例えばフルオキシメステロン及びテストラクトン)を含むホルモン及びホルモンアンタゴニスト、抗アンドロゲン薬(例えばビカルタミド、シプロテロン、フルタミド及びニルタミド) ; コルチコステロイド(例えばデキサメタゾン及びプレドニゾン) ; アロマターゼ阻害剤(例えばアミノグルテチミド、アナストロゾール、エキセメスタン、ホルメスタン及びレトロゾール) ; エストロゲン(例えばジエチルスチルベストロール) ; 抗エストロゲン薬(例えばフルベストラント、ラロキシフェン、タモキシフェン及びトレミフェン) ; 黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニスト及びアンタゴニスト(例えばアバレリクス、ブセレリン、ゴセレリン、リュープロリド、ヒストレリン、デスロレリン(desorelin)、酢酸ナファレリン及びトリプトレリン) ; プロゲスチン(例えば酢酸メドロキシプロゲステロン及び酢酸メゲストロール)及び甲状腺ホルモン(例えばレボチロキシン及びリオチロニン) ; PKB経路阻害剤(例えばペリホシン、エンザスタウリン塩酸塩及びトリシリビン) ; PI3K阻害剤(例えばセマフォア(semafore)及びSF1126) ; mTOR阻害剤(例えばラパマイシン及び類似体) ; CDK阻害剤(例えばセリシクリブ、アルボシジブ及び7-ヒドロキシスタウロスボリン) ; COX-2阻害剤(例えばセレコキシブ) ; HDAC阻害剤(例えばトリコスタチンA、スペロイルアニリドヒドロキサム酸及びクラミドシン) ; DNAメチラー阻害剤(例えばテモゾロミド) ; ならびにその他の薬剤(例えばアルトレタミン、三酸化ヒ素、サリドマイド、レナリドミド、硝酸ガリウム、レバミゾール、ミトタン、ヒドロキシウレア、オクトレオチド、プロカルバジン、スラミン、光線力学的化合物(例えばメトキサレン及びポルフィマーナトリウム)、及びプロテアソーム阻害剤(例えばボルテゾミブ))が挙げられる。

### 【0305】

分子標的療法剤チロシンキナーゼ阻害剤としては以下が挙げられる: 機能性治療剤(例えば遺伝子療法剤) ; アンチセンス療法剤 ; チロシンキナーゼ阻害剤(例えばエルロチニブ塩酸塩、ゲフィチニブ、メシル酸イマチニブ及びセマクサニブ) ; RAF阻害剤(例えばソラフェニブ) ; レチノイド及びレキシノイドなどの遺伝子発現モジュレーター(例えばアダパレン、ベキサロテン、trans-レチノイン酸、9-cis-レチノイン酸及びN-(4-ヒドロキシフェニル)レチンアミド) ; モノクローナル抗体(例えばアレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、トラスツズマブ)を含む表現型特異的療法剤 ; 免疫毒素(例えばエムタンシン)、放射性免疫複合体(例えばI-トシツモマブ(tositumab))、ならびに癌ワクチン。

### 【0306】

生物学的療法剤としては、インターフェロン(例えばインターフェロン-[アルファ]2a及びインターフェロン-[アルファ]2b)、及びインターロイキン(例えばアルデスロイキン、デニロイキンディフィティトックス及びオブレルベキン)が挙げられる。Ax1阻害剤としては、1-(6,7-ジヒドロ-5H-ベンゾ[6,7]シクロヘプタ[1,2-c]ピリダジン-3-イル)-N3-((7-(S)-ピロリジン-1-イル)-

10

20

30

40

50

6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 5 H - ベンゾ [ 7 ] アヌレン - 2 - イル ) - 1 H - 1 ,  
2 , 4 - トリアゾール - 3 , 5 - ジアミン ( B G B 3 2 4 / R 4 2 8 ) 、 C H 5 4 5 1 0  
9 8 ( Roche ) 、ならびに P C T / U S 0 7 / 0 8 9 1 7 7 、 P C T / U S 2 0 1  
0 / 0 2 1 2 7 5 及び P C T / E P 2 0 1 1 / 0 0 4 4 5 1 に記載の A × 1 阻害剤が挙げ  
られ、各文献は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 3 0 7 】

癌細胞に対して作用することを目的としたこれらの薬剤に加え、抗癌療法には、保護剤または補助剤の使用が含まれ、例えば、細胞保護剤（例えばアミフォスチン及びデクストラゾキサン）；ホスホネート（例えばパミドロネート、ゾレドロン酸）；及び刺激因子（例えばエポエチン、ダルベボエチン（ d a r b e o p e t i n ）、フィルグラスチム、 P E 10 G - フィルグラスチム及びサルグラモスチム）が挙げられる。

#### 【 0 3 0 8 】

例えば、カルボプラチニン / パクリタキセル、カペシタビン / ドセタキセル、フルオロウラシル ( f l u o r a u r a c i l ) / レバミゾール、フルオロウラシル / ロイコボリン、メトトレキサート / ロイコボリン及びトラスツズマブ / パクリタキセル）の組み合わせ単独、またはカルボプラチニンなどとの更なる併用など、多くの併用化学療法計画が当技術分野で既知である。

#### 【 0 3 0 9 】

本明細書に開示された抗 A × 1 抗体と併用される、特に好ましいクラスの薬剤は、免疫チェックポイントモジュレーター ( I C M ) 、例えば免疫チェックポイント阻害剤 ( I C 20 I ) である。

#### 【 0 3 1 0 】

腫瘍は、免疫系の抑制性経路である免疫チェックポイントを悪用して免疫耐性を誘発し得る。したがって、T 細胞刺激性及び抑制性受容体、ならびに樹状細胞刺激性受容体を含む、免疫チェックポイントを遮断または調節し、それによって癌の免疫耐性を低減または克服する抗体の使用は、癌研究の重要な手段である。

#### 【 0 3 1 1 】

免疫チェックポイントを調節する抗体の使用により調節され得る T 細胞刺激性受容体としては、 C D 2 8 、 I C O S 、 4 - 1 B B 、 O X 4 0 、 G I T R 、 C D 2 7 、 T W E A K R 、 H V E M 及び T I M - 1 が挙げられる。免疫チェックポイントを調節する抗体の使用により調節され得る T 細胞抑制性受容体としては、 P D - L 1 、 C T L A - 4 、 P D - 1 、 B T L A 、 T I M - 3 、 V I S T A 、 L A G - 3 及び T I G I T が挙げられる。免疫チェックポイントを調節する抗体の使用により調節され得る樹状細胞刺激性受容体としては、 C D 4 0 及び 4 - 1 B B が挙げられる。

#### 【 0 3 1 2 】

本明細書に開示される抗 A × 1 抗体との併用に適した I C M には、免疫チェックポイントを調節または阻害する抗体を含み、その多くが当技術分野で既知である。特に好適な免疫チェックポイントを調節する抗体としては、以下が挙げられる：

C T L A - 4 標的抗体、例えばイピリムマブ及びトレメリムマブ。

P D - 1 標的抗体、例えばペムブロリズマブ、ミボルマブ ( M i v o l u m a b ) 及び A 40 M P - 5 1 4 / M E D I 0 6 8 0 。

B D - L 1 標的抗体、例えば M P D L 3 2 8 0 A 、 M E D I 4 7 3 6 、 M S B 0 0 1 0 7 1 8 C 及び B M S - 9 3 6 5 5 9 。

4 - 1 B B 標的抗体、例えばウレルマブ及び P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 。

O X - 4 0 標的抗体、例えば M E D I 6 4 6 9 、 M E D I 6 3 8 3 ( r O X 4 0 L ) 及び M O X R 0 9 1 6 。

G I T R 標的抗体、例えば T R X 5 1 8 。

C D 2 7 標的抗体、例えば C D X - 1 1 2 7 。

C D 4 0 標的抗体、例えば C P - 8 7 0 , 8 9 3 。

L A G 3 標的抗体、例えば B M S - 9 8 6 0 1 6 。

**【 0 3 1 3 】**

本発明の抗 A × L 抗体と I C M 抗体を併用する場合、使用する I C M 抗体のすべてが抑制性受容体を標的とすることも、抑制性受容体を標的とする I C M 抗体と刺激性受容体を標的とする I C M 抗体との組み合わせを使用することもできる。

**【 0 3 1 4 】**

したがって本開示は、本明細書に記載するように、治療（例えば癌などの増殖性疾患）に使用される A × 1 結合抗体を提供するものであり、ここでの治療は 1 種以上の免疫チェックポイント調節抗体を更に含む。同様に、増殖性疾患（例えば癌）の治療用医薬品の製造に、本明細書に記載される A × 1 結合抗体を提供するものであり、ここでの治療は 1 種以上の免疫チェックポイント調節抗体を更に含む。抗体は、イピリムマブ、トレメリムマブ、ペムプロリズマブ、ミボルマブ、AMP - 514 / MED 0680、MPDL3280A、MED 4736、MSB0010718C、BMS - 936559、ウレルマブ、PF - 05082566、MED 6469、MED 6383 (rOX40L)、MOXR0916、TRX518、CDX - 1127、CP - 870, 893 及び BMS - 986016 から選択することができる。癌は肺癌、黒色腫、乳癌、卵巣癌または癌腫から選択され得る。10

**【 0 3 1 5 】**

本発明の化合物は、1 種以上の免疫チェックポイント調節抗体の前に、1 種以上の免疫チェックポイント調節抗体と同時に、または 1 種以上の免疫チェックポイント調節抗体の後に投与することができる。20

**【 0 3 1 6 】**

本発明の抗 A × 1 抗体との併用に特に好ましい、別のクラスの薬剤は A × 1 以外の標的に特異的な抗腫瘍抗体である。本発明の抗 A × 1 抗体との併用に適した、このような抗体を以下の表に示す：

抗原の分類	抗原の例	各標的に対して惹起される治療的mAbの例	抗原を発現する腫瘍型
造血性分化	CD2C	リツキシマブ	非ホジキンリンパ腫
抗原		イブリツモマブチウキセタン及びトシツモマブ	リンパ腫
	CD30	ブレンツキシマブベドチン	ホジキンリンパ腫
	CD33	ゲムツズマブ	急性骨髓性白血病
		オゾガマイシン	
	CD52	アレムツズマブ	慢性リンパ性白血病
固形腫瘍によって発現する	EpCAM	IGN101及びアデカツムマブ	上皮性腫瘍(乳房、大腸及び肺)
糖タンパク質	CEA	ラベツズマブ	乳房、大腸及び肺腫瘍
	gpA33	huA33	大腸癌
	ムチン	ペムツモマブ及び	乳房、大腸、肺及び
		オレゴボマブ	卵巣腫瘍
	TAG-72	CC49(ミンレツモマブ)	乳房、大腸及び肺腫瘍
	CAIX	cG250	腎細胞癌
	PSMA	J591	前立腺癌
	葉酸結合タンパク質	MOV18及びMORAb-003(ファルレツズマブ)	卵巣腫瘍

10

20

30

抗原の分類	抗原の例	各標的に対して惹起される治療的mAbの例	抗原を発現する腫瘍型
糖脂質	Ganglioside (例えばGD2、GD3及びGM2)	3F8、ch14.18及びKW-2871	神経外胚葉性腫瘍及び一部の上皮性腫瘍
炭水化物	Le <sup>a</sup>	hu3S193及び1gN311	乳房、大腸、肺及び前立腺腫瘍
抗血管形成mAbの標的	VEGF	ベバシズマブ	腫瘍血管系
	VEGFR	IM-2C6及びCDP791	上皮由来の固形腫瘍
	インテグリンαVβ3	エタラシズマブ	腫瘍血管系
	インテグリンα5β1	ボロシキシマブ	腫瘍血管系
成長及び分化シグナル伝達	EGFR	セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ及び806	神経膠腫、肺、乳房、大腸、及び頭頸部腫瘍
	ERBB2	トラスツズマブ及びペルツズマブ	乳房、大腸、肺、卵巣及び前立腺腫瘍
	ERBB3	MM-121	乳房、大腸、肺、卵巣及び前立腺腫瘍
	MET	AMG 102、MET MAB及びSCH 900105	乳房、大腸及び肺腫瘍
	IGF1R	AVE1642、IMC- A12、MK-0646、R1507及びCP751871	神経膠腫、肺、乳房、頭頸部、前立腺及び甲状腺癌
	EPHA3	KB004及びIIIA4	肺、腎臓及び大腸腫瘍、黒色腫、神経膠腫及び血液悪性腫瘍
	TRAILR1	マパツムマブ (HGS-E TR1)	大腸、肺及び脾臓腫瘍、ならびに血液悪性腫瘍
	TRAILR2	HGS-E TR2及びCS-1008	
	RANKL	デノスマブ	前立腺癌及び骨転移
間質及び細胞外マトリックス抗原	FAR	シプロツズマブ及びF19	大腸、乳房、肺、脾臓及び頭頸部腫瘍
	テネイシン	81C6	神経膠腫、乳房及び前立腺腫瘍

10

20

30

40

本明細書全体にわたって、本明細書に記載される方法は、*in vitro*または*ex vivo*で実施されることが好ましい。方法はまた、*in vivo*で実施することもできる。

#### 【0318】

本発明は、本明細書で提供される抗体をA×1と結合させること、または結合を可能にすること含む方法を提供する。前述のように、このような結合は*in vivo*（例えば抗体の投与後）、または抗体をコードする核酸で行われる場合もあれば、あるいは*in vitro*、例えばELISA法、ウェスタンプロット解析、免疫細胞化学、免疫組織化学、免疫沈降またはアフィニティクロマトグラフィーで行われる場合もある。

#### 【0319】

A×1受容体と結合する抗体の量を測定することができる。診断を目的とする試験用サンプル中の抗原量と関連した定量化が可能である。

#### 【0320】

サンプル中の抗体の反応性は、任意の適切な手段によって特定することができる。実現可能な手段の一つが放射性免疫アッセイ（RIA）である。放射性標識抗原を非標識抗原（試験用サンプル）と混合して、抗体と結合させる。結合した抗原を結合していない抗原から物理的に分離し、抗体と結合した放射性抗原の量を測定する。試験用サンプル中に存在する抗原が増えるほど、抗体と結合する放射性抗原は少なくなる。レポーター分子と結合された抗原または類似体を使用した、非放射性抗原による競合的結合アッセイを用いることもできる。レポーター分子は、分光吸収特性または発光特性を有する蛍光色素、蛍光体またはレーザー色素であってよい。好適な蛍光色素としては、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン及びTexas Redが挙げられる。好適な発色性色素としては、ジアミノベンジンが挙げられる。

#### 【0321】

それ以外のレポーターとして、着色された、磁性または常磁性のラテックスビーズ、及び検出可能なシグナルの視覚的観察、電気的検出もしくはそれ以外の記録を直接的または間接的に可能にする生物学的または化学的に活性のある薬剤などの巨大分子コロイド状粒子または微粒子材料がある。これらの分子は、例えば、発色もしくは変色、または電気的特性の変化を起こす反応を触媒する酵素であってもよい。それらは分子的に励起可能ため、エネルギー状態間の電子遷移により、特有のスペクトル吸収または放射が得られる。レポーター分子には、バイオセンサーとともに用いられる化学物質が含まれていてもよい。ビオチン／アジピンまたはビオチン／ストレプトアビシン及びアルカリホスファターゼ検出系を使用することができる。

#### 【0322】

個々の抗体・レポーター複合体によって生成されるシグナルを利用して、（標準及び試験）サンプル中の関連する抗体結合の定量化可能な絶対的または相対的データを導き出すことができる。

#### 【0323】

本発明はまた、競合アッセイ法での抗原レベルの測定における上記の抗体の使用、すなわち、本発明によって提供される抗体を競合アッセイ法で使用することにより、サンプル中の抗原のレベルを測定する方法も提供する。この方法では、結合抗原を未結合抗原から物理的に分離する必要がない場合がある。結合時に物理的または光学的变化が生じるよう、抗体にレポーター分子を結合することは、実現可能な手段の一つである。このレポーター分子は、検出可能な、また好ましくは測定可能なシグナルを直接的にまたは間接的に生じさせることができる。レポーター分子の結合は、直接的もしくは間接的、共有結合的（例えばペプチド結合による）、または非共有結合的であってよい。ペプチド結合による結合は、抗体及びレポーター分子をコードする融合遺伝子の組み換え発現の結果によるものであり得る。

#### 【0324】

本発明はまた、例えばバイオセンサーシステムにおいて、本発明による抗体を使用する

10

20

30

40

50

ことにより抗原レベルを直接測定することを提供する。

【0325】

結合の測定様式は本発明の特徴ではなく、当業者は自身の選択及び一般知識に従って好適な様式を選択することができる。

【0326】

本発明は更に、抗原と結合し、かつ本明細書に実質的に指定されたアミノ酸を有する C D R を含む抗体可変ドメイン（V H もしくは V L のいずれか、または両方）、または本明細書に実質的に指定されたアミノ酸配列を有する可変ドメインを含むいかなる抗体とも、A × 1 への結合を競合する抗体にまで及ぶ。抗体間の競合は、例えば、一方の結合メンバーに特異的なレポーター分子をタグ付けし、他方のタグ無し結合メンバー（複数可）の存在下で検出できるようにして、同じエピトープもしくは重複するエピトープを結合する抗体の同定を可能にすることによって、in vitro で容易に分析することができる。競合は、例えば、ELISA 法またはフローサイトメトリーを使用して特定することができる。あるいは、競合抗体は、実施例 6 に記載するように、Biacore 装置を使用した表面プラズモン共鳴（SPR）技術によって同定することができる。

【0327】

別の方法では、目的とする抗体が結合する A × 1 上のエピトープと結合する抗体（例えば、10C9 または 10G5 抗体の A × 1 への結合を阻止するもの）をスクリーニングするため、Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Ed Harlow and David Lane (1988) に記載されているような通常のクロスブロッキングアッセイを実施することができる。

【0328】

競合試験には、抗原のペプチド断片、特に目的とするエピトープを含むペプチドを用いることができる。エピトープ配列に加え、1つ以上のアミノ酸をいずれかの末端に有するペプチドを使用することができる。このようなペプチドは、特異的配列から「本質的になる」と称することができる。本発明による抗体は、抗原に対する結合が、所与の配列を有する、またはそれを含むペプチドによって阻害されるようなものでもあってよい。そのための試験に、一方の配列に加え、1つ以上のアミノ酸を有するペプチドを使用することができる。

【0329】

特定のペプチドを結合する抗体を、例えば、ペプチド（複数可）を用いたパニングにより、ファージディスプレイライラリから単離することができる。

【0330】

本発明は更に、本発明の抗体をコードする単離された核酸を提供する。核酸には DNA 及び RNA を含む。好適な態様では、本発明は、上記に定義した本発明の CDR、VH または VL ドメインをコードする核酸を提供する。

【0331】

本発明はまた、上記の少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含むプラスミド、ベクター、転写カセットまたは発現カセットの形態である構築物も提供する。

【0332】

本発明はまた、上記の 1 種以上の構築物を含む、組み換え宿主細胞も提供する。提供される CDR、VH もしくは VL ドメイン、または抗体のいずれをコードする核酸も、コード核酸からの発現方法を含む、コード産物の产生方法と同様に、それ自体で本発明の一態様を形成する。発現は、その核酸を含む組み換え宿主細胞を適切な条件下で培養することにより、利便に実現され得る。発現による产生後、VH もしくは VL ドメイン、または抗体を当技術分野で既知の任意の好適な技術を使用して単離及び / または精製することができる。

【0333】

本発明による抗体、VH 及び / または VL ドメイン、ならびにコード核酸分子及びベク

10

20

30

40

50

ターは、例えば天然の環境から、実質的に純粋もしくは均一な形態で、あるいは核酸の場合には、必要とされる機能を有するポリペプチドをコードする配列以外の核酸も遺伝子源も含まずに、もしくは実質的に含まずに、単離及び／または精製して提供することができる。本発明による核酸は、DNAまたはRNAを含んでよく、また全体的にまたは部分的に合成されてもよい。本明細書に記載するヌクレオチド配列への言及は、指定された配列を有するDNA分子を包含し、かつ文脈において特に指示がない限り、TがUで置換されている指定された配列を有するRNA分子を包含する。

#### 【0334】

種々の異なる宿主細胞においてポリペプチドをクローニング及び発現する系は周知である。好適な宿主細胞としては、細菌、哺乳動物細胞、酵母、バキュロウイルス及び昆虫細胞系が挙げられる。当技術分野で、異種ポリペプチドの発現に利用可能な哺乳動物細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、仔ハムスター腎臓（BHK）細胞、NS0及びSP2/0マウス黒色腫細胞、YB2/0ラット骨髄腫細胞、ヒト細胞株HEK-293及びPER.C6ならびに他多数が挙げられる。一般的な好ましい細菌宿主はE.coliである。10

#### 【0335】

E.coliのような原核細胞における抗体及び抗体断片の発現は、当技術分野において十分に確立されている。概説については、例えばPluckthun, A. Bio/Technology 9:545-551(1991)を参照のこと。培養物中の真核細胞の発現もまた、抗体の作製のための1つの選択肢として当業者は利用可能である。概説については、例えば、Ref., M.E.(1993) Curr. Opinion Biotech. 4:573-576; Trill J.J. et al. (1995) Curr. Opinion Biotech. 6:553-560を参照のこと。20

#### 【0336】

必要に応じて、プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子及び他の配列を含めた、適切な調節配列を含んでいる好適なベクターを選択または構築することができる。ベクターは、必要に応じて、プラスミド、ウイルス、例えば、ファージもしくはファージミドであってよい(Sambrook and Russell, 2001, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992には、例えば、核酸構築物の調製、突然変異誘発、配列決定、細胞中へのDNAの導入及び遺伝子発現における核酸の操作、ならびにタンパク質解析のための既知の技術及びプロトコルが数多く詳細に記載されている。30

#### 【0337】

したがって、本発明の更に別の態様は、本明細書に開示される核酸を含む宿主細胞を提供する。なお更なる態様は、このような核酸の宿主細胞への導入を含む方法を提供する。この導入には、任意の利用可能な技術を使用することができる。真核細胞の場合、好適な技術には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、リポソーム媒介性のトランスフェクション、及びレトロウイルスまたは他のウイルス、例えば、ワクシニア、もしくは昆虫細胞の場合、バキュロウイルスを使用する形質導入が含まれ得る。菌体の場合、好適な技術には、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション及びバクテリオファージを使用したトランスフェクションが含まれ得る。40

#### 【0338】

導入に続いて、例えば、遺伝子発現のための条件下で宿主細胞を培養することにより、核酸からの発現を引き起こすか、または可能にすることができる。

#### 【0339】

50

一実施形態では、本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム（例えば染色体）中に組み込まれる。標準的な技術に従って、このゲノムとの組み換えを促進する配列を含めることによって、組み込みを促進することができる。

【0340】

本発明はまた、上記の抗体またはポリペプチドを発現させるために、発現系で上記構築物を使用することを含む方法も提供する。

【0341】

ここで以下の実験を参照し、本発明の態様及び実施形態を例示目的として説明する。

【0342】

本明細書のあらゆる箇所で引用された文献はすべて、参照により本明細書に組み込まれる。10

【0343】

発明の陳述 - 10C9抗体

以下の段落は、本発明の具体的に想定される多数の実施形態及び組み合わせを記載する。。

【0344】

1. A×1を結合する抗体であって、

10C9のVHドメイン（配列番号3）、及び配列番号7のアミノ酸配列を有するVH  
CDR3と、場合により配列番号6及び配列番号5から選択されるアミノ酸配列を有する  
1つ以上のVH CDRとを含むVHドメインからなる群から選択される抗体VHドメイン；ならびに/または20

10C9のVLドメイン（配列番号4）、及び配列番号8、配列番号9及び配列番号10  
から選択されるアミノ酸配列を有する1つ以上のVL CDRを含むVLドメインからなる  
群から選択される抗体VLドメインを含む抗体。

【0345】

2. 配列番号5、配列番号6及び配列番号7のアミノ酸配列を有するVH CDRを含  
んでいる抗体VHドメインを含む、段落1による抗体であって、10C9のVHドメイン  
(配列番号3)及び10C9のVLドメイン(配列番号4)を含んでいる抗体のA×1結合  
ドメインと、ヒトA×1への結合を競合する抗体。

【0346】

3. 10C9のVHドメイン(配列番号3)を含んでいる段落1または段落2による抗  
体。

【0347】

4. 10C9のVLドメイン(配列番号4)を含んでいる段落3による抗体。

【0348】

5. 段落1～4のいずれか1項による抗体の変異体であって、1つ以上のフレームワー  
ク領域内及び/または1つ以上のCDR内に1つ以上のアミノ酸配列改変を含む変異体。

【0349】

6. 抗体の親和性と抗原結合部位の親和性が同一条件下で特定されるとき、10C9の  
VHドメイン(配列番号3)及び10C9のVLドメイン(配列番号4)によって形成さ  
れるA×1抗原結合部位の親和性と等しいか、またはそれを上回る親和性でA×1を結合  
する段落1～5のいずれか1項による抗体。

【0350】

7. scFv抗体分子を含む、段落1～6のいずれか1項による抗体。

【0351】

8. 抗体の定常領域を含む、段落1～6のいずれか1項による抗体。

【0352】

9. 全抗体を含む、段落8による抗体。

【0353】

10. 抗原結合能に加えて、更に機能的特徴を備えている付加アミノ酸を含む、段落1

50

～9のいずれか1項による抗体。

【0354】

11.  $2 \times 10^{-10}$  M以下の $K_D$ で $A \times 1$ を結合する、段落1～10のいずれか1項による抗体。

【0355】

12.  $1.5 \times 10^6$  M $^{-1}$  s $^{-1}$ 以上の $k_{on}$ で $A \times 1$ を結合する、段落1～11のいずれか1項による抗体。

【0356】

13.  $A \times 1$ がヒト $A \times 1$ である、段落1～12のいずれか1項による抗体。

【0357】

14. 灵長類の $A \times 1$ を特異的に結合する、段階1～13のいずれか1項による抗体。

【0358】

15. (i)  $10^{-3}$  M超の $K_D$ でマウス $A \times 1$ を結合する；  
 (ii)  $10^{-3}$  M超の $K_D$ でヒトMerを結合する；及び／または  
 (iii)  $10^{-3}$  M超の $K_D$ でヒトTyr03を結合する、段階1～14のいずれか1項による抗体。

【0359】

16.  $A \times 1$ のGas6への結合を阻害する、段落1～15のいずれか1項による抗体。  
 。

【0360】

17.  $A \times 1$ 受容体の発現を下方調節する、段落1～16のいずれか1項による抗体。

【0361】

18.  $A \times 1$ 受容体の発現を、抗体と接触させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの50%未満に減少させる、段落17による抗体。

【0362】

19.  $A \times 1$ 受容体発現の下方調節が、サンプルと抗体との接触後12時間以内に観察される、段落17または18のいずれか1項による抗体。

【0363】

20.  $A \times 1$ 受容体発現の下方調節が、サンプルと抗体との接触後、少なくとも24時間持続する、段落17～19のいずれか1項による抗体。

【0364】

21.  $A \times 1$ 受容体の内在化の速度を増加させる、段落1～20のいずれか1項による抗体。

【0365】

22.  $A \times 1$ 活性を阻害する、段落1～21のいずれか1項による抗体。

【0366】

23. 前記抗体が、 $A \times 1$ 受容体の下流シグナル伝達を阻害する、段落22による抗体。  
 。

【0367】

24. 本発明の抗体と接触させたサンプルのSerine 473でのAktのリン酸化を、抗体と接触させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの50%未満に減少させる、段落22または23のいずれか1項による抗体。

【0368】

25. 細胞死率を増加させる、段落1～24のいずれか1項による抗体。

【0369】

26. 肿瘍成長を阻害する、段落1～25のいずれか1項による抗体。

【0370】

27. 検出可能標識、酵素または毒素と、場合によりペプチジル結合またはリンカーを介して複合体化された、段落1～26のいずれか1項による抗体。

【0371】

10

20

30

40

50

28. 前記毒素がMMAE及びMMMFからなる群から選択される、段落27による抗体。

【0372】

29. 前記検出可能標識がFITCである、段落27による抗体。

【0373】

30. ハイブリドーマUT-10C9-B9から得られる10C9抗体が結合するエピトープと結合する、段落1～29のいずれか1項による抗体。

【0374】

31. ハイブリドーマUT-10C9-B9から得られる10C9抗体が結合するエピトープと結合する抗体。 10

【0375】

32. Ax1とそのリガンドGas6との結合を阻害する、段落31による抗体。

【0376】

33. Ax1発現の下方調節、Ax1受容体のシグナル伝達阻害、及び/または腫瘍成長の阻害をもたらす、段落31または32のいずれか1項による抗体。

【0377】

34. ハイブリドーマUT-10C9-B9から得られる10C9抗体。

【0378】

35. 段落1～26のいずれか1項による抗体の、抗体または抗体のVHもしくはVLドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。 20

【0379】

36. 段落35による核酸で形質転換された宿主細胞。

【0380】

37. 抗体または抗体のVHもしくはVLドメインの作製方法であって、前記抗体または抗体のVHもしくはVLドメインの作製条件下で、段落36による宿主細胞を培養することを含む方法。

【0381】

38. 前記抗体または抗体のVHもしくはVL可変ドメインを単離及び/または精製することを更に含む、段落37による方法。

【0382】

39. 前記抗体または抗体のVHもしくはVL可変ドメインを、少なくとも1種の追加成分を含む組成物に製剤化することを更に含む、段落37または段落38による方法。 30

【0383】

40. Ax1を結合する抗体を得る方法であって、

10C9のVHドメインのアミノ酸配列(配列番号3)における1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、置換、または挿入により、それぞれが10C9のVHドメインのアミノ酸配列変異体である1つ以上のVHドメインを提供し、場合により、このようにして提供される1つ以上のVHドメインのアミノ酸配列変異体を1つ以上のVLドメインと組み合わせ、1つ以上のVH/VLの組み合わせを提供することと；及び/または

10C9のVLドメインのアミノ酸配列(配列番号4)における1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、置換、または挿入により、10C9のVLドメインのアミノ酸配列変異体であるVLドメインを提供し、このようにして提供される1つ以上のVLドメインのアミノ酸配列変異体を1つ以上のVHドメインと組み合わせ、1つ以上のVH/VLドメインの組み合わせを提供することと；

ならびにVHドメインのアミノ酸配列変異体またはVH/VLの組み合わせもしくは複数の組み合わせを試験して、Ax1を結合する抗体を同定することと、を含む方法。 40

【0384】

41. Ax1を結合する抗体を得る方法であって、

CDR3が置換されているか、もしくはCDR3コード領域が欠失している1つ以上のVHドメインをコードする出発核酸を提供し、前記出発核酸を、配列番号7であるVH-C 50

D R 3 のアミノ酸配列をコードするドナー核酸と組み合わせることにより、前記ドナー核酸を出発核酸内の C D R 3 領域に挿入し、それによって V H ドメインをコードする核酸産物を提供すること；または

C D R 3 が置換されているか、もしくは C D R 3 コード領域が欠失している 1 つ以上の V L ドメインをコードする出発核酸を提供し、前記出発核酸を、配列番号 10 である V L C D R 3 のアミノ酸配列をコードするドナー核酸と組み合わせることにより、前記ドナー核酸を出発核酸内の C D R 3 領域に挿入し、それによって V L ドメインをコードする核酸産物を提供すること；

V H ドメインをコードする前記核酸産物の核酸を発現させ、場合により、このようにして提供される V H ドメインを 1 つ以上の V L ドメインと組み合わせて V H / V L の組み合わせを提供すること、及び／もしくは V L ドメインをコードする前記核酸産物の核酸を発現させ、このようにして提供される V L ドメインを 1 つ以上の V H ドメインと組み合わせて V H / V L の組み合わせを提供すること；

A × 1 を結合する V H ドメインもしくは V H / V L の組み合わせを含む抗体を選択すること；

ならびに、A × 1 を結合する前記抗体及び／もしくは A × 1 を結合する抗体をコードする核酸を回収することと、を含む方法。

**【 0 3 8 5 】**

4 2 . A × 1 を結合する抗体が V H ドメイン及び V L ドメインを含む抗体断片である、段落 4 1 または段落 4 1 による方法。

**【 0 3 8 6 】**

4 3 . 前記抗体断片が s c F v 抗体分子である、段落 4 2 による方法。

**【 0 3 8 7 】**

4 4 . 前記抗体断片が F a b 抗体分子である、段落 4 2 による方法。

**【 0 3 8 8 】**

4 5 . 全抗体に抗体断片の V H ドメイン及び／または V L ドメインを提供することを更に含む、段落 4 3 または段落 4 4 による方法。

**【 0 3 8 9 】**

4 6 . A × 1 を結合する抗体または A × 1 を結合する抗体の抗体 V H もしくは V L 可変ドメインを、少なくとも 1 種の追加成分を含む組成物に製剤化することを更に含む、段落 3 7 ~ 4 5 のいずれか 1 項による方法。

**【 0 3 9 0 】**

4 7 . A × 1 を結合する抗体を A × 1 または A × 1 の断片に結合することを更に含む、段落 3 7 ~ 4 6 のいずれか 1 項による方法。

**【 0 3 9 1 】**

4 8 . 段落 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項による A × 1 を結合する抗体を A × 1 または A × 1 の断片に結合することを含む方法。

**【 0 3 9 2 】**

4 9 . 前記結合が i n v i t r o で生じる、段落 4 7 または段落 4 8 による方法。

**【 0 3 9 3 】**

5 0 . 抗体が A × 1 または A × 1 の断片に結合する量を特定することを含む、段落 4 7 ~ 4 9 のいずれか 1 項による方法。

**【 0 3 9 4 】**

5 1 . A × 1 の過剰発現を特徴とする疾患または障害を治療する医薬品の製造における、前記抗体の使用を更に含む、段落 3 7 ~ 4 6 のいずれか 1 項による方法。

**【 0 3 9 5 】**

5 2 . 段落 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項による抗体、またはその免疫複合体を、薬学的に許容される賦形剤とともに含む組成物。

**【 0 3 9 6 】**

5 3 . 免疫チェックポイントモジュレーター及び／または A × 1 以外の標的に特異的な

10

20

30

40

50

抗腫瘍抗体を更に含む、段落 5 2 による組成物。

**【 0 3 9 7 】**

5 4 . 前記免疫チェックポイントモジュレーターが、イピリムマブ、トレメリムマブ、ペムプロリズマブ、ミボルマブ、AMP - 514 / MED 0680、MPDL3280A、MED 4736、MSB0010718C、BMS - 936559、ウレルマブ、PF - 05082566、MED 6469、MED 6383 (rOX40L)、MOKR0916、TRX518、CDX - 1127、CP - 870、893またはBMS - 986016などの抗体である、段落 5 3 による組成物。

**【 0 3 9 8 】**

5 5 . Ax 1 以外の標的に特異的な前記抗腫瘍抗体が、リツキシマブ、イブリツモマブチウキセタン、トシツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、アレムツズマブ、IGN101、アデカツムマブ、ラベツズマブ、huA33、ペムツモマブ、オレゴボマブ、CC49 (ミニレツモマブ)、cG250、J591、MOV18、MORAb - 003 (ファルレツズマブ)、3F8、ch14.18、KW - 2871、hu3S193、IgN311、ベバシズマブ、IM - 2C6、CDP791、エタラシズマブ、ボロシキシマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ806、トラスツズマブ、ペルツズマブ、MM - 121、AMG 102、METMAB、SCH 900105、AVE1642、IMC - A12、MK - 0646、R1507、CP 751871、KB004、IIIA4、マバツムマブ (HGS - ETR1)、HGS - ETR2、CS - 1008、デノスマブ、シブロツズマブ、F19、81C6 からなる群から選択される、段落 5 3 による組成物。 10

**【 0 3 9 9 】**

5 6 . 治療方法に使用される、段落 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項による抗体、または段落 5 2 ~ 5 5 のいずれか 1 項による組成物。 20

**【 0 4 0 0 】**

5 7 . 増殖性疾患の治療方法に使用される、段落 5 6 による抗体または組成物。

**【 0 4 0 1 】**

5 8 . 前記増殖性疾患が癌である、段落 5 7 による抗体または組成物。

**【 0 4 0 2 】**

5 9 . 前記癌が転移癌である、段落 5 8 による抗体または組成物。 30

**【 0 4 0 3 】**

6 0 . Ax 1 の過剰発現を特徴とする疾患または障害を治療するための医薬品の製造における、段落 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項による抗体、または段落 5 2 ~ 5 5 のいずれか 1 項による組成物の使用。

**【 0 4 0 4 】**

6 1 . Ax 1 の過剰発現を特徴とする疾患または障害の治療方法であって、段落 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項による抗体、または段落 5 2 ~ 5 5 のいずれか 1 項による組成物を、疾患もしくは障害を有する患者、または疾患もしくは障害を発現するリスクのある患者に投与することを含む方法。

**【 0 4 0 5 】**

6 2 . 段落 5 6 ~ 5 9 のいずれか 1 項による抗体、または請求項 6 1 の方法であって、段落 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項による抗体、または段落 5 2 ~ 5 5 のいずれか 1 項による組成物を、免疫チェックポイントモジュレーター及び / または Ax 1 以外の標的に特異的な抗腫瘍抗体と組み合わせて投与することを含む治療方法。 40

**【 0 4 0 6 】**

6 3 . 前記抗体が転移癌細胞を標的とする医薬組成物の送達を誘導する、段落 6 1 による方法。

**【 0 4 0 7 】**

6 4 . Ax 1 の過剰発現を特徴とする疾患または障害を検出するための診断薬の製造における、段落 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項による抗体、及び前記抗体と転移癌細胞の結合を特 50

定できる1種以上の試薬の使用。

**【0408】**

65. A×1の過剰発現を特徴とする疾患または障害の診断方法であって、段落1～29のいずれか1項による抗体、または段落52～55のいずれか1項による組成物、及び前記抗体と転移癌細胞との結合を特定できる1種以上の試薬を、疾患もしくは障害を有する患者、または疾患もしくは障害を発現するリスクのある患者に投与することを含む方法。

**【0409】**

66. 段落1～29のいずれか1項による抗体、及び前記メンバーと転移癌細胞との結合を特定できる1種以上の試薬を含む診断キット。

10

**【0410】**

67. 段落1～29のいずれか1項による抗体、または段落52～55のいずれか1項による組成物を含むキット。

**【0411】**

68. 薬学的に許容される賦形剤とともに、有効量の段落1～29による抗体を活性成分として含む医薬組成物。

**【0412】**

発明の陳述 - 10G5抗体

以下の段落は、本発明の具体的に想定される多数の実施形態及び組み合わせを記載する。

20

**【0413】**

1a. A×1を結合する抗体であって、  
10G5のVHドメイン（配列番号21）、及び配列番号25のアミノ酸配列を有するVH CDR3と、場合により配列番号24及び配列番号23から選択されるアミノ酸配列を有する1つ以上のVH CDRとを含むVHドメインからなる群から選択される抗体VHドメイン；ならびに／または

10G5のVLドメイン（配列番号22）、及び配列番号26、配列番号27及び配列番号28から選択されるアミノ酸配列を有する1つ以上のVL CDRを含むVLドメインからなる群から選択される抗体VLドメインを含む抗体。

**【0414】**

30

1b. A×1を結合する抗体であって、  
10G5（Q1E）のVHドメイン（配列番号45）、及び配列番号25のアミノ酸配列を有するVH CDR3と、場合により配列番号24及び配列番号23から選択されるアミノ酸配列を有する1つ以上のVH CDRとを含むVHドメインからなる群から選択される抗体VHドメイン；ならびに／または10G5のVLドメイン（配列番号22）、及び配列番号26、配列番号27及び配列番号28から選択されるアミノ酸配列を有する1つ以上のVL CDRを含むVLドメインからなる群から選択される抗体VLドメインを含む抗体。

**【0415】**

2a. 段落1aまたは1bによる抗体であって、配列番号23、配列番号24及び配列番号25のアミノ酸配列を有するVH CDRを含んでいる抗体VHドメインを含み、10G5のVHドメイン（配列番号21）及び10G5のVLドメイン（配列番号22）を含んでいる抗体のA×1結合ドメインと、A×1への結合を競合する抗体。

40

**【0416】**

3a. 10G5のVHドメイン（配列番号21）を含んでいる段落1aまたは段落2aによる抗体。

**【0417】**

3b. 10G5（Q1E）のVHドメイン（配列番号45）を含んでいる段落1bまたは段落2aによる抗体。

**【0418】**

50

4 a . 1 0 G 5 の V L ドメイン（配列番号 2 2）を含んでいる段落 3 a による抗体。

【 0 4 1 9 】

5 a . 段落 1 a ~ 4 a のいずれか 1 項による抗体の変異体であって、1 つ以上のフレームワーク領域内及び / または 1 つ以上の C D R 内に 1 つ以上のアミノ酸配列改変を含む変異体。

【 0 4 2 0 】

6 a . 抗体の親和性と抗原結合部位の親和性が同一条件下で特定されるとき、1 0 G 5 の V H ドメイン（配列番号 2 1）及び 1 0 G 5 の V L ドメイン（配列番号 2 2）によって形成される A × 1 抗原結合部位の親和性と等しいか、またはそれを上回る親和性で A × 1 と結合する段落 1 a ~ 5 a のいずれか 1 項による抗体。 10

【 0 4 2 1 】

7 a . s c F v 抗体分子を含む、段落 1 a ~ 6 a のいずれか 1 項による抗体。

【 0 4 2 2 】

a 8 . 抗体定常領域を含む、段落 1 a ~ 6 a のいずれか 1 項による抗体。

【 0 4 2 3 】

9 a . 全抗体を含む、段落 8 a による抗体。

【 0 4 2 4 】

1 0 a . 抗原結合能に加えて、更に機能的特徴を備えている付加アミノ酸を含む、段落 1 a ~ 9 a のいずれか 1 項による抗体。 20

【 0 4 2 5 】

1 1 a .  $6 \times 10^{-10}$  M 以下の K<sub>D</sub> で A × 1 を結合する、段落 1 a ~ 1 0 a のいずれか 1 項による抗体。

【 0 4 2 6 】

1 2 a .  $8 \times 10^{-5}$  M  $\cdot$   $s^{-1}$  以上の k<sub>on</sub> で A × 1 を結合する、段落 1 a ~ 1 1 a のいずれか 1 項による抗体。

【 0 4 2 7 】

1 3 a . A × 1 がヒト A × 1 である、段落 1 a ~ 1 2 a のいずれか 1 項による抗体。

【 0 4 2 8 】

1 4 a . 犬類の A × 1 を特異的に結合する、段落 1 a ~ 1 3 a のいずれか 1 項による抗体。 30

【 0 4 2 9 】

1 5 a . ( i )  $10^{-3}$  M 超の K<sub>D</sub> でマウス A × 1 を結合する；  
 ( i i )  $10^{-3}$  M 超の K<sub>D</sub> でヒト M e r を結合する；及び / または  
 ( i i i )  $10^{-3}$  M 超の K<sub>D</sub> でヒト T y r o 3 を結合する、段落 1 a ~ 1 4 a のいずれか 1 項による抗体。

【 0 4 3 0 】

1 6 a . A × 1 の G a s 6 への結合を阻害する、段落 1 a ~ 1 5 a のいずれか 1 項による抗体。

【 0 4 3 1 】

1 7 a . A × 1 受容体の発現を下方調節する、段落 1 a ~ 1 6 a のいずれか 1 項による抗体。 40

【 0 4 3 2 】

1 8 a . A × 1 受容体の発現を、抗体と接触させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの 5 0 % 未満に減少させる、段落 1 7 a による抗体。

【 0 4 3 3 】

1 9 a . A × 1 受容体発現の下方調節が、サンプルと抗体との接触後 1 2 時間以内に観察される、段落 1 7 a または 1 8 a のいずれか 1 項による抗体。

【 0 4 3 4 】

2 0 a . A × 1 受容体発現の下方調節が、サンプルと抗体との接触後、少なくとも 2 4 時間持続する、段落 1 7 a ~ 1 9 a のいずれか 1 項による抗体。 50

**【0435】**

21a. A<sub>x</sub>1受容体の内在化の速度を増加させる、段落1a～20aのいずれか1項による抗体。

**【0436】**

22a. A<sub>x</sub>1活性を阻害する、段落1a～21aのいずれか1項による抗体。

**【0437】**

23a. 前記抗体が、A<sub>x</sub>1受容体の下流シグナル伝達を阻害する、段落22aによる抗体。

**【0438】**

24a. 本発明の抗体と接触させたサンプルのSerine 473でのAktのリン酸化を、抗体と接触させないこと以外は同じ処理をしたサンプルで観察されるレベルの50%未満に減少させる、段落22aまたは23aのいずれか1項による抗体。 10

**【0439】**

25a. 細胞死率を増加させる、段落1a～24aのいずれか1項による抗体。

**【0440】**

26a. 腫瘍成長を阻害する、段落1a～25aのいずれか1項による抗体。

**【0441】**

27a. 検出可能標識、酵素または毒素と、場合によりペプチジル結合またはリンカーを介して複合体化された、段落1a～26aのいずれか1項による抗体。 20

**【0442】**

28a. 前記毒素がMMAE及びMMMFからなる群から選択される、段落27aによる抗体。

**【0443】**

29a. 前記検出可能標識がFITCである、段落27aによる抗体。

**【0444】**

30a. ハイブリドーマWR-10G5-E5から得られる10G5抗体が結合するエピトープと結合する、段落1a～29aのいずれか1項による抗体。 30

**【0445】**

31a. ハイブリドーマWR-10G5-E5から得られる10G5抗体が結合するエピトープと結合する抗体。 30

**【0446】**

32a. A<sub>x</sub>1とそのリガンドGas6との結合を阻害する、段落31aによる抗体。

**【0447】**

33a. A<sub>x</sub>1発現の下方調節、A<sub>x</sub>1受容体のシグナル伝達阻害、及び／または腫瘍成長の阻害をもたらす、段落31aまたは32aのいずれか1項による抗体。

**【0448】**

34a. ハイブリドーマWR-10G5-E5から得られる10G5抗体。

**【0449】**

35a. 段落1a～26aのいずれか1項による抗体の、抗体または抗体のVHもしくはVLドメインをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。 40

**【0450】**

36a. 段落35aによる核酸で形質転換された宿主細胞。

**【0451】**

37a. 抗体または抗体のVHもしくはVLドメインの作製方法であって、前記抗体または抗体のVHもしくはVLドメインの作製条件下で、段落36aによる宿主細胞を培養することを含む方法。

**【0452】**

38a. 前記抗体または抗体のVHもしくはVL可変ドメインを単離及び／または精製することを更に含む、段落37aによる方法。

**【0453】**

39a. 前記抗体または抗体のVHもしくはVL可変ドメインを、少なくとも1種の追加成分を含む組成物に製剤化することを更に含む、段落37aまたは段落38aによる方法。

**【0454】**

40a. A×1を結合する抗体を得る方法であって、

10G5のVHドメインのアミノ酸配列(配列番号3)における1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、置換、または挿入により、それぞれが10G5のVHドメインのアミノ酸配列変異体である1つ以上のVHドメインを提供し、場合により、このようにして提供される1つ以上のVHドメインのアミノ酸配列変異体を1つ以上のVLドメインと組み合わせ、1つ以上のVH/VLの組み合わせを提供することと;及び/または

10

10G5のVLドメインのアミノ酸配列(配列番号4)における1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、置換、または挿入により、10G5のVLドメインのアミノ酸配列変異体であるVLドメインを提供し、このようにして提供される1つ以上のVLドメインのアミノ酸配列変異体を1つ以上のVHドメインと組み合わせ、1つ以上のVH/VLドメインの組み合わせを提供することと;ならびに

VHドメインのアミノ酸配列変異体またはVH/VLの組み合わせもしくは複数の組み合わせを試験して、A×1を結合する抗体を同定することと、を含む方法。

**【0455】**

41a. A×1を結合する抗体を得る方法であって、

CDR3が置換されているか、もしくはCDR3コード領域が欠失している1つ以上のVHドメインをコードする出発核酸を提供し、前記出発核酸を、配列番号7であるVH-CDR3のアミノ酸配列をコードするドナー核酸と組み合わせることにより、前記ドナー核酸を出発核酸内のCDR3領域に挿入し、それによってVHドメインをコードする核酸産物を提供すること;または

20

CDR3が置換されているか、もしくはCDR3コード領域が欠失している1つ以上のVLドメインをコードする出発核酸を提供し、前記出発核酸を、配列番号10であるVL-CDR3のアミノ酸配列をコードするドナー核酸と組み合わせることにより、前記ドナー核酸を出発核酸内のCDR3領域に挿入し、それによってVLドメインをコードする核酸産物を提供すること;

VHドメインをコードする前記核酸産物の核酸を発現させ、場合により、このようにして提供されるVHドメインを1つ以上のVLドメインと組み合わせてVH/VLの組み合わせを提供すること、及び/もしくはVLドメインをコードする前記核酸産物の核酸を発現させ、このようにして提供されるVLドメインを1つ以上のVHドメインと組み合わせてVH/VLの組み合わせを提供することと;

30

A×1を結合するVHドメインもしくはVH/VLの組み合わせを含む抗体を選択すること;

ならびに、A×1を結合する前記抗体及び/もしくはA×1を結合する抗体をコードする核酸を回収することと、を含む方法。

**【0456】**

42a. A×1を結合する前記抗体がVHドメイン及びVLドメインを含む抗体断片である、段落41aまたは段落41aによる方法。

40

**【0457】**

43a. 前記抗体断片がscFv抗体分子である、段落42aによる方法。

**【0458】**

44a. 前記抗体断片がFab抗体分子である、段落42aによる方法。

**【0459】**

45a. 全抗体に抗体断片のVHドメイン及び/またはVLドメインを提供することを更に含む、段落43aまたは段落44aによる方法。

**【0460】**

46a. A×1を結合する抗体またはA×1を結合する抗体の抗体VHもしくはVL可

50

変ドメインを、少なくとも 1 種の追加成分を含む組成物に製剤化することを更に含む、段落 37a ~ 45a のいずれか 1 項による方法。

**【0461】**

47a.  $A \times 1$  を結合する抗体を  $A \times 1$  または  $A \times 1$  の断片に結合することを更に含む、段落 37a ~ 46a のいずれか 1 項による方法。

**【0462】**

48a. 段落 1a ~ 29a のいずれか 1 項による  $A \times 1$  を結合する抗体を  $A \times 1$  または  $A \times 1$  の断片に結合することを含む方法。

**【0463】**

49a. 前記結合が *in vitro* で生じる、段落 47a または段落 48a による方法。 10

**【0464】**

50a. 抗体が  $A \times 1$  または  $A \times 1$  の断片に結合する量を特定することを含む、段落 47a ~ 49a のいずれか 1 項による方法。

**【0465】**

51a.  $A \times 1$  の過剰発現を特徴とする疾患または障害を治療する医薬品の製造における、前記抗体の使用を更に含む、段落 37a ~ 46a のいずれか 1 項による方法。

**【0466】**

52a. 段落 1a ~ 26a のいずれか 1 項による抗体、またはその免疫複合体を、薬学的に許容される賦形剤とともに含む組成物。 20

**【0467】**

53a. 免疫チェックポイントモジュレーター及び / または  $A \times 1$  以外の標的に特異的な抗腫瘍抗体を更に含む、段落 52a による組成物。

**【0468】**

54a. 前記免疫チェックポイントモジュレーターが、イピリムマブ、トレメリムマブ、ペムプロリズマブ、ミボルマブ、AMP-514 / MED 0680、MPDL3280A、MED 4736、MSB 0010718C、BMS-936559、ウレルマブ、PF-05082566、MED 6469、MED 6383 (rOX40L)、M OXR 0916、TRX 518、CDX-1127、CP-870、893 または BMS-986016 などの抗体である、段落 53a による組成物。 30

**【0469】**

55a.  $A \times 1$  以外の標的に特異的な前記抗腫瘍抗体が、リツキシマブ、イブリツモマブチウキセタン、トシツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、ゲムツズマブオゾガマイシン、アレムツズマブ、IGN 101、アデカツムマブ、ラベツズマブ、huA33、ペムツモマブ、オレゴボマブ、CC49 (ミンレツモマブ)、cG250、J591、MOV18、MORAb-003 (ファルレツズマブ)、3F8、ch14.18、KW-2871、hu3S193、IgN311、ベバシズマブ、IM-2C6、CDP791、エタラシズマブ、ボロシキシマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ806、トラスツズマブ、ペルツズマブ、MM-121、AMG 102、METMAB、SCH 900105、AVE 1642、IMC-A12、MK-0646、R1507、CP 751871、KB004、IIIA4、マパツムマブ (HGS-ETR1)、HGS-ETR2、CS-1008、デノスマブ、シブロツズマブ、F19、81C6 からなる群から選択される、段落 53a による組成物。 40

**【0470】**

56a. 治療方法に使用される、段落 1a ~ 29a のいずれか 1 項による抗体、または段落 52a ~ 55a のいずれか 1 項による組成物。

**【0471】**

57a. 増殖性疾患の治療方法に使用される、段落 56a による抗体または組成物。

**【0472】**

58a. 前記増殖性疾患が癌である、段落 57a による抗体または組成物。 50

## 【0473】

59a. 前記癌が転移癌である、段落58aによる抗体または組成物。

## 【0474】

60a. A×1の過剰発現を特徴とする疾患または障害を治療するための医薬品の製造における、段落1a～29aのいずれか1項による抗体、または段落52a～55aのいずれか1項による組成物の使用。

## 【0475】

61a. A×1の過剰発現を特徴とする疾患または障害の治療方法であって、段落1a～29aのいずれか1項による抗体、または段落52a～55aのいずれか1項による組成物を、疾患もしくは障害を有する患者、または疾患もしくは障害を発現するリスクのある患者に投与することを含む方法。 10

## 【0476】

62a. 段落56a～59aのいずれか1項による抗体、または請求項61aの方法であって、段落1a～29aのいずれか1項による抗体、または段落52a～55aのいずれか1項による組成物を、免疫チェックポイントモジュレーター及び／またはA×1以外の標的に特異的な抗腫瘍抗体と組み合わせて投与することを含む治療方法。

## 【0477】

63a. 前記抗体が転移癌細胞を標的とする医薬組成物の送達を誘導する、段落61aによる方法。

## 【0478】

64a. A×1の過剰発現を特徴とする疾患または障害を検出するための診断薬の製造における、段落1a～29aのいずれか1項による抗体、及び前記抗体と転移癌細胞の結合を特定できる1種以上の試薬の使用。 20

## 【0479】

65a. A×1の過剰発現を特徴とする疾患または障害の診断方法であって、段落1～29aのいずれか1項による抗体、または段落52a～55aのいずれか1項による組成物、及び前記抗体と転移癌細胞との結合を特定できる1種以上の試薬を、疾患もしくは障害を有する患者、または疾患もしくは障害を発現するリスクのある患者に投与することを含む方法。

## 【0480】

66a. 段落1a～29aのいずれか1項による抗体、及び前記メンバーと転移癌細胞との結合を特定できる1種以上の試薬を含む診断キット。 30

## 【0481】

67a. 段落1a～29aのいずれか1項による抗体、または段落52a～55aのいずれか1項による組成物を含むキット。

## 【0482】

68a. 薬学的に許容される賦形剤とともに、有効量の段落1a～29aによる抗体を活性成分として含む医薬組成物。

## 【実施例】

## 【0483】

実施例1：マウス抗A×1モノクローナル抗体の生成

C末端Mycエピトープと融合させた全長ヒトA×1をコードするプラスミドを用いた、免疫応答性NMR1マウス（チャールズリバー）のDNA免疫法により、ヒトA×1受容体に対するモノクローナル抗体（MAb）を生成した。

## 【0484】

血中にr-hA×1特異的抗体の存在を示すマウス由来の脾臓細胞を、標準的プロトコルによるマウス骨髄腫細胞との融合に使用した。各細胞を、ヒポキサンチン・アミノブテリン・チミジン（HAT）培地を入れたプレート（ウェル当たり10<sup>5</sup>細胞）中で培養し、ハイブリドーマを選抜した。12日間の選抜後、生成された14のハイブリドーマの上清を採取して、酵素結合による免疫吸着アッセイ（ELISA）及びフローサイトメトリー 50

にて A × 1 結合を検出した。限界希釈法による 2 巡目のサブクローニング後に最も高い抗原結合活性を示している、3 つの陽性クローンを拡大培養し、in vitro での大規模な抗体産生を行った。プロテイン G アフィニティクロマトグラフィーによって、M Ab を細胞培養上清から精製した。

#### 【 0 4 8 5 】

フローサイトメトリーで A × 1<sup>+</sup> 細胞に特異的な結合を示している抗体クローン 10C 9 及び 10G 5 を選抜して更に性質決定した。

#### 【 0 4 8 6 】

フローサイトメトリーのため、培養液中の付着細胞を PBS で洗浄し、1 分間のトリプシン (0.25%) 处理により分離し、培養皿を叩いて完全に剥離させた。組織培養用フラスコに完全培地を添加してトリプシンをクエンチした後、細胞を PBS で洗浄した。洗浄工程中に、5 分間 200 g の遠心分離により細胞を収集した。0.02% のウシ血清アルブミン (BSA) を含有する PBS で、抗体の総濃度を希釈した。10

#### 【 0 4 8 7 】

10<sup>5</sup> 個の細胞を含む 200 μL の細胞懸濁液を使用して、室温で 20 分間、細胞染色を実施した。PBS / 0.02% BSA による 2 段階の洗浄後、細胞を 200 μL に再懸濁して、濃度 2 μg / mL の APC 複合体化ロバ抗マウス IgG (H + L) 二次抗体 (Jackson Laboratories、カタログ番号 715-136-150) とともに室温で 20 分間インキュベートした。染色した細胞を PBS / 0.02% BSA で 2 回洗浄し、BD LSR Fortessa 細胞分析器 (BD Biosciences) を使用して分析するまで、氷で保存した。20

#### 【 0 4 8 8 】

実施例 2：マウスモノクローナル抗体 10C 9 及び 10G 5 はヒト TAM 受容体ファミリーの他のメンバーと交差反応しない

結合実験はすべて、Biacore 3000 装置 (GE Healthcare) を使用して 25 で実施した。ヒト TAM 受容体ファミリーのメンバーである、A × 1 (rhA × 1 - Fc キメラ；R & D Systems、カタログ番号 154-AL)、Mer (rhMer - Fc キメラ；R & D Systems、カタログ番号 891-MR) 及び Tyro3 (rhTyro3 / Dtk - Fc キメラ；R & D Systems、カタログ番号 859-DK) の細胞外ドメインに対応する可溶性組み換え抗原を、CM5 センサーチップの表面にアミンカップリングを利用して、それぞれ表面密度 393.0、303.6 及び 364.0 のレゾナンスユニット (RU) で固定化した。Biacore の稼働は、Binding analysis ウィザードを使用した自動モードで実施した。HBS - EP 缓衝液 (GE Healthcare) 中に濃度 10 μg / mL の MAb 10C 9 または MAb 10G 5 を含有しているサンプルを、固定化抗原を有する表面全体に流速 30 μL / 分で 3 分間注入 (会合) した後、5 分間、解離させた。30

#### 【 0 4 8 9 】

図 1 に示した結果は、マウスモノクローナル抗体 10C 9 及び 10G 5 がヒト A × 1 に対して特異的な結合性を示し、組み換えヒト Mer 及び Tyro3 抗原には結合しなかったことを示している。40

#### 【 0 4 9 0 】

実施例 3：マウスモノクローナル抗体 10C 9 及び 10G 5 はマウス A × 1 と交差反応しない

結合実験は、Biacore 3000 装置 (GE Healthcare) を使用して 25 で実施した。ヒト A × 1 (rhA × 1 - Fc キメラ；R & D Systems、カタログ番号 154-AL)、マウス A × 1 (rmA × 1 - Fc キメラ；R & D Systems、カタログ番号 854-A X) 及びヒト Tyro3 (rhTyro3 / Dtk - Fc キメラ；R & D Systems、カタログ番号 859-DK) に対応する可溶性組み換え抗原を、CM5 センサーチップの表面にアミンカップリングを利用して、それぞれ表面密度 1,308.0、2,115.9 及び 1,429.0 50

R Uで固定化した。Biacoreの稼働は、Binding analysis ウィザードを使用した自動モードで実施した。

#### 【0491】

HBS-EP緩衝液(GE Healthcare)中に濃度10 μg/mLでMAb 10C9、MAb 10G5、または組み換えマウス(rm)A<sub>x</sub>1-リガンドGas 6(R&D Systems、カタログ番号986-GS/CF)を含有しているサンプルを、固定化抗原を有する表面全体に流速30 μL/分で3分間注入(会合)した後、5分間、解離させた。

#### 【0492】

図2に示した結果は、MAb 10C9及び10G5がヒトA<sub>x</sub>1と特異的に相互作用し、組み換えマウスA<sub>x</sub>1及びヒトMer抗原には結合しなかったことを示している(それぞれ図2の上段及び中段パネル)。対照的に、対照として使用したマウスGas 6は、ヒト及びマウスA<sub>x</sub>1の両方と強い結合性を示し、ヒトTyro3とはそれより幾分弱い結合性を示した(図2、下段パネル)。

#### 【0493】

実施例4：マウスモノクローナル抗体10C9及び10G5は非ヒト靈長類由来のA<sub>x</sub>1受容体と特異的に結合する

カニクイザル由来のA<sub>x</sub>1受容体の配列(Macaca fascicularis;配列番号43)をWO2009062690A1から取得した。配列に基づいて、cyno-A<sub>x</sub>1の組み換え細胞外ドメインをCHO細胞での一時的発現によってヒトFcとの融合タンパク質として生成した。組み換えcyno-A<sub>x</sub>1-Fcを、プロテインA-セファロース(GE Healthcare)を使用して均一に精製した。結合実験は、Biacore 3000装置(GE Healthcare)を使用して25で実施した。ヒトA<sub>x</sub>1(rhA<sub>x</sub>1-Fcキメラ;R&D Systems、カタログ番号154-AL)及びcyno-A<sub>x</sub>1に対応する可溶性組み換え抗原を、CM5センサーチップの表面にアミンカップリングを利用して、それぞれ表面密度775及び880RUで固定化した。Biacoreの稼働は、Binding analysis ウィザードを使用した自動モードで実施した。

#### 【0494】

HBS-EP緩衝液(GE Healthcare)中に濃度10 μg/mLでMAb 10C9、MAb 10G5、またはヒトA<sub>x</sub>1特異的MAb 5F11(対照)を含有しているサンプルを、固定化抗原を有する表面全体に流速30 μL/分で3分間注入(会合)した後、5分間、解離させた。

#### 【0495】

図3に示した結果は、MAb 10C9及び10G5がヒト及びカニクイザル由来両方のA<sub>x</sub>1抗原と強力かつ特異的に相互作用することを示している。対照的に、対照抗体5F11は、ヒトA<sub>x</sub>1とは強力な結合性を示したが、カニクイザル由来のA<sub>x</sub>1との交差反応性は示さなかった。

#### 【0496】

実施例5：マウスモノクローナル抗体10C9及び10G5の親和性測定  
抗A<sub>x</sub>1抗体10C9及び10G5の親和性測定は、Biacore 3000装置(GE Healthcare)を使用して表面プラズモン共鳴測定により25で実施した。固体の抗原コーティング面として、密度190RUでrhA<sub>x</sub>1-Fcキメラ(R&D Systems、カタログ番号154-AL)を固定化したセンサーチップCM5を使用した。

#### 【0497】

速度論的測定のため、HBS-EP緩衝液(Biacore、カタログ番号BR-1001-88)中の濃度の異なる抗A<sub>x</sub>1抗体(0.3~666.7 nM)を流速30 μL/分、注入時間3分間で注入した後、5分間、解離させた(緩衝液のみ)。各サイクル後、再生溶液(10 mMのHCl、1 MのNaCl)を30秒間、流速50 μL/分で注入

10

20

30

40

50

することにより表面を再生した。

#### 【0498】

物質移動制御実験は、使用したM A b 1 0 C 9 及び1 0 G 5 の両方に有意な物質移動限界が見られないことを示した。付加的な結合反応制御実験では、1 濃度のアナライト(M A b 1 0 C 9 が7 9 0 n M 、1 0 G 5 が1 6 0 n M ) を1 分、3 分または2 0 分間注入した後、解離相が実質的に同一であったため、両方の抗体には結合反応は見られなかった。

#### 【0499】

速度論的会合速度(結合速度、 $k_{on}$ ) 及び速度論的解離速度(解離速度、 $k_{off}$ ) は、B I A e v a l u a t i o n ソフトウェア及び1 : 1 のL a n g m u i r 結合モデルを使用して算出した。平衡解離定数( $K_D$ ) は $k_{off} / k_{on}$  比で算出した。形成された抗体 - 抗原複合体の半減期( $t_{1/2}$ ) は $\ln 2 / k_{off}$  比で算出した。  
10

#### 【0500】

図4に示すように、マウスM A b 1 0 C 9 及び1 0 G 5 は、それぞれ $K_D$  値0 . 1 8 n M 及び0 . 5 3 n M の、ナノモル以下範囲の高親和性を示した。

#### 【0501】

実施例6：マウスモノクローナル抗体1 0 C 9 及び1 0 G 5 はG A S 6 のA X Lへの結合を阻止する

競合結合試験は、B i a c o r e 3 0 0 0 装置(G E H e a l t h c a r e ) 及びB i n d i n g A n a l y s i s ウィザードを使用し、2つのサンプルを数サイクル注入して実施した。第1のサンプルとして、飽和濃度のM A b 1 0 C 9 (7 9 0 n M 、すなわち1 2 0 μ g / m L ) または1 0 G 5 (1 6 0 n M 、すなわち2 4 μ g / m L ) を、r h A x 1 - F c でコーティング(アミンカップリング法を使用)されたC M 5 センサーチップの表面全体に、流速3 0 μ L / 分で、3分間注入し、続いて2 . 5 分間、安定化させた(H B S - E P 緩衝液のみ) 後、第2のサンプルを注入した。第2のサンプルには、組み換えヒト(r h) G a s 6 (R & D S y s t e m s 、カタログ番号8 8 5 - G S ) 、組み換えマウス(r m) G a s 6 (R & D S y s t e m s 、カタログ番号9 8 6 - G S / C F ) ならびに抗A x 1 抗体のパネル、例えばM A B 1 5 4 (R & D S y s t e m s 、カタログ番号M A B 1 5 4 ) 、1 0 C 9 及び1 0 G 5 を使用した。濃度はすべて2 5 μ g / m L である。第2のサンプルを3分間注入し、続いて2 . 5 分間、安定化(緩衝液のみ)させ、更に流速5 0 μ L / 分で再生溶液(1 0 m M のH C l 、1 M のN a C l ) を3 0 秒間注入することにより表面を再生した。  
20

#### 【0502】

図5に示した結果は、M A b 1 0 C 9 及び1 0 G 5 はいずれも、A x 1 の結合を、市販の対照抗体M A B 1 5 4 (R & D S y s t e m s ) と競合しないことを示した。他方で、抗体1 0 C 9 及び1 0 G 5 は互いの結合を阻害し、加えて、ヒト及びマウス起源の両方で、そのリガンドG a s 6 によるA x 1 の結合を阻害した。

#### 【0503】

実施例7：3次元(3 D ) 器官型モデルにおいて、マウスモノクローナル抗体1 0 C 9 及び1 0 G 5 は高悪性度乳癌細胞の成長を阻害する  
40

高悪性度トリプルネガティブヒト乳癌細胞株M D A - M B - 2 3 1 (A T C C (登録商標) H T B - 2 6 (商標)) を、1 0 % のウシ胎児血清(F B S ) 、グルタミンならびにペニシリン及びストレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地/栄養混合物F - 1 2 ハム培地中で、推奨条件に従って培養した。培養した細胞を、細胞表面に抗体の適切な結合が確認されるまで、懸濁液中で少なくとも1 時間、3 7 ℃ で前処理した後、細胞外マトリックスに定置した。細胞培養液は毎日観察し、1 日おきに交換処理を行った。抗体は濃度5 0 ~ 1 0 0 μ g / m L で使用した。位相差及びホフマン光学系両方を利用したN I K O N 光学顕微鏡で、カバーガラス3 D イメージング分析(3 5 m m ディッシュ) を実施した。既に3 日目にして、M A b 1 0 C 9 またはM A b 1 0 G 5 で処理された細胞と、対照の無関係なI g G で処理された細胞との間に成長差が見られた。6 日目で、抗  
50

体 10C9 または 10G5 で処理された細胞は、対照で処理された細胞と比較して、細胞外マトリックスでの成長と腫瘍の発現を有意に阻害したことが明らかになった（図 6）。核染色により、M A b 10G5 で処理された細胞は成長を阻害されたが、まだ生存していることが明らかとなった。類似の効果は抗体 10C9 でも観察された。この実験は、抗 A × 1 抗体 10C9 及び 10G5 のいずれもが、器官型腫瘍の発現を阻害する見込みがあることを実証した。

#### 【0504】

実施例 8：抗体 10C9 及び 10G5 は、*in vitro* の 3D 腫瘍クローンの形態変化を誘発する

M D A - M B - 231 細胞を細胞外マトリックス上で増殖させ、高悪性度の星形形態を形成させる。次に、星形の腫瘍を、実施例 7 に記載されているように、対照 IgG ならびに抗体 10C9 及び 10G5 で処理した。抗体 10C9 及び 10G5 はいずれも、細胞死と DNA 断片化に伴う星形パターンの分解を引き起こした（図 7）。これらの結果は、特異的モノクローナル抗体 10C9 及び 10G5 を使用した A × 1 の阻害が、*in vitro* の 3D モデルで強い抗腫瘍効果を有することを実証した。

#### 【0505】

実施例 9：抗体 10C9 及び 10G5 は A × 1 受容体の内在化を誘発する

異なる抗体で処理された M B A - M D - 231 細胞での A × 1 受容体タンパク質の発現を、ウェスタンプロット解析により検討した。細胞を 1 ウェル当たり  $5 \times 10^5$  細胞の密度で 6 ウェルプレートに播種し、一晩培養した後、処理を開始した。細胞をアイソタイプ対照（マウス IgG2b）、濃度 100 μg/mL の抗 A × 1 抗体（10C9、10G5 及び MAb #3）、または濃度 0.5 μM のマルチキナーゼ阻害剤フォレチニブ（Met、Ron、A × 1、Tie-2 及び VEGFR2 を標的とする）の存在下で 20 時間処理し、続いて 1,200 rpm で 5 分間遠心分離して採取し、滅菌 PBS で洗浄した。遠心分離によって細胞を採取して、NP40 溶解緩衝液で再懸濁した後、30 分間、氷上でインキュベートした。細胞可溶化物を遠心分離（12,000 rpm、4、5 分）によって清澄化し、BCA タンパク質アッセイを利用してタンパク質濃度を測定した。35 μg の総タンパク質を含んでいる細胞可溶化物サンプルを、還元剤（Life Technologies）の存在下で変性させ、NuPAGE 10% Bis-Tris ポリアクリルアミド（PAA）ゲル、1.0 mm x 12 ウェル（Invitrogen）の各ウェルに充填した。Bis-Tris SDS ランニング緩衝液を使用して、推奨条件（Life

Technologies）下で電気泳動を実施し、20% メタノールを用いた転写緩衝液を使用して、XCell II I I (商標) Blot Module (Invitrogen) 用マニュアルの 2 種類のゲルに関する記載のようにタンパク質を PVDF 膜に転写した。5% のスキムミルクを加えた TBS / 0.1% Tween 20 (TBS-T) の 10 mL ブロッキング緩衝液中で、室温にて 1 時間、膜をインキュベートし、続いて抗 A × 1

MAb 154 (R & D Systems) の 1 : 1000 希釀液を含有する 5 mL のインキュベーション緩衝液（3% のスキムミルクを加えた TBS-T）中で、4 度で一晩インキュベートした。膜を 10 mL の TBS-T で 5 分ずつ 3 回洗浄し、続いて 5 mL のインキュベーション緩衝液中のヤギ抗マウス IgG (H + L) HRP 複合体二次抗体（1 : 2000）とともに、室温で静かに転がしながら 1 時間インキュベートした。その後、膜を 10 mL の TBS-T で 5 分間に 3 回、更に 10 mL の TBS 緩衝液で 2 回洗浄した。膜を 1 mL の ECL 基質とともに室温で 1 分間インキュベートした。過剰な基質溶液を吸引し、プロットを ChemiDoc (商標) XRS + 撮像装置（Bio Rad）及び Image Lab ソフトウェアを使用して可視化した。負荷対照として、マウス抗アクチン抗体（1 : 10,000；Sigma）を用いた検出を同条件下で行った。

#### 【0506】

図 8 に示した結果は、無関係な IgG または MAb #3 のいずれかで処理された細胞と比較して、MAb 10C9 及び 10G5 で処理された細胞中の A × 1 タンパク質が有意に低減することを示した。この結果は、MAb 10C9 及び 10G5 が A × 1 受容体の

10

20

30

40

50

内在化及び細胞内分解を誘発することを示している。

#### 【0507】

実施例10：抗体10C9及び10G5は、リガンド誘導性のA×1下流シグナル伝達を阻害する

本実験は、ヒト子宮頸癌由来の細胞株HeLa (ATCC(登録商標) CCL-2(商標))を使用して実施した。T175フラスコにて、10%のFBS、ペニシリン-ストレプトマイシン及びLグルタミンを補充したMEM培地(Sigma)中で集密度80%まで細胞を増殖させた。細胞をPBSで洗浄し、0.25%のトリプシン/EDTA(Sigma)で処理して剥離し、続いて遠心分離して、新鮮な培地(MEM/0.5%FBS)で再懸濁した。10%のFBSを補充したMEM培地を入れたペトリ皿に細胞を播種した(1皿当たり $3 \times 10^6$ 細胞)。37度3時間培養した後、細胞をPBSで洗浄し、飢餓培地(MEM/0.5%FBS)中で一晩保存した。濃度1μg/mLの抗A×1抗体10C9または10G5とともに、細胞を1時間プレインキュベートし、続いて濃度10μg/mLの、A×1リガンドである組み換えマウスGas6(R&D Systems)で20分間刺激した。細胞可溶化物を実施例9に記載されているように調製し、抗ホスホ-Akt(Ser<sup>473</sup>)抗体(Cell Signaling)、続いてヤギ抗ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ(Jackson ImmunoResearch)を使用してウェスタンプロット解析を実施した。抗ホスホ-Aktは、AKT1、AKT2及びAKT3を区別していないため、プロットには「ホスホ-Akt」の総レベルを示す。抗GAPDH抗体(Millipore)による検出を、負荷対照として使用した。

10

#### 【0508】

図9に示した結果は、Ser<sup>473</sup>上のAktの下流リン酸化を読み取り値として使用した場合に、A×1特異的リガンドGas6が、HeLa細胞で強力なA×1シグナル伝達を誘発することを示した。このシグナル伝達を抗体10C9の存在下で有意に低減できた。抗体10G5においても類似した結果が得られた。

20

#### 【0509】

実施例11：マウスモノクローナル抗体10C9及び10G5のシーケンシング

ハイブリドーマ細胞を標準条件下で増殖させた。 $5 \times 10^6$ 個のハイブリドーマ細胞を使用し、標準プロトコルに従ってmRNAの単離及びcDNA合成を行った。重鎖及び軽鎖可変領域(それぞれVH及びVL)をコードする遺伝子のPCR增幅のため、Mouse IgG Library Primer Set(Progen, Heidelberg, Germany、カタログ番号F2010)を使用した。ハイブリドーマ10C9では、異なるプライマーの組み合わせを使用したPCR増幅により、VH遺伝子に対する5種類のプライマーの組み合わせを使用したPCRから9配列を、VL遺伝子に対する2種類のプライマーの組み合わせを使用したPCRから5配列を得た。その後の作業のため、IMGTデータベースとのスクレオチドアラインメントによって決定される、対応する生殖細胞系配列との最大相同意を基準としてクローンVH1(A7-1)及びV2(E2-2)の配列を選抜した。

30

#### 【0510】

ハイブリドーマ10G5では、異なるプライマーの組合せを使用したPCR増幅により、VH遺伝子に対する6種類のプライマーの組み合わせを使用したPCRから12配列を、VL遺伝子に対する2種類のプライマーの組み合わせを使用したPCRから5配列を得た。その後の作業のため、IMGTデータベースとのスクレオチドアラインメントによって決定される、対応する生殖細胞系配列との最大相同意を基準としてクローンVH1(B6-4)及びV1(F1-3)の配列を選抜した。

40

#### 【0511】

抗体10C9及び10G5のVH及びVLドメインの推定アミノ酸配列を図10に示す。配列解析から、重鎖のCDR1に見込まれるN-グリコシル化部位の存在が明らかになった(CDR-H1；図10で「NFT」のグリコシル化部位を太字で示す)。

#### 【0512】

50

VHドメインの1位のグルタミン(Q)がグルタミン酸(E)と置換された場合の10G5のVH変異体の配列も図10に含まれている。この変異体を「10G5[Q1E]」と称する。

#### 【0513】

実施例12：キメラモノクローナル抗体10C9及び10G5の生成及び試験

マウスハイブリドーマ10C9及び10G5から取得したVH及びVL配列を使用して、哺乳動物細胞(GeneArt)の発現にコドンが最適化された合成遺伝子を生成した。これらのマウスVH及びVL遺伝子を、それぞれヒトIgG1重鎖及び軽鎖(C-カッパ)の定常ドメインをコードする遺伝子要素とともに、哺乳動物細胞の抗体産生に適した発現ベクターにインフレームでライゲーションした。キメラ(マウス可変/ヒト定常)IgG1抗体の産生をチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞での一時的発現によって達成した後、プロテインAアフィニティクロマトグラフィーを使用して精製した。  
10

#### 【0514】

フローサイトメトリーで、精製されたキメラ抗体(純度95%超)のAx1陽性乳癌細胞株MDA-MB-231との結合を分析した。比較のため、親マウスのMAb 10C9及び10G5を使用した。フローサイトメトリーに備え、培養液中の付着細胞をPBSで洗浄し、1分間のトリプシン(0.25%)処理により分離し、培養皿を叩いて完全に剥離させた。組織培養用フラスコに完全培地を添加してトリプシンをクエンチした後、細胞をPBSで洗浄した。洗浄工程中に、5分間200gの遠心分離により細胞を収集した。0.02%のウシ血清アルブミン(BSA)を含有するPBSで、抗体の総濃度を希釈した。10<sup>5</sup>個の細胞を含む200μLの細胞懸濁液を使用して、室温で20分間、細胞染色を実施した。APC複合体ロバ抗ヒトまたは抗マウスそれぞれのIgG(H+L)F(ab')<sub>2</sub>断片(Jackson Immunoresearch)を用いて、細胞に結合した抗体を検出した。PBS/0.02%BSAによる2段階の洗浄後、細胞を200μLに再懸濁して、Accuri C6フローサイトメーター(BD Biosciences)で分析するまで氷で保存した。図11に示した結果から、フローサイトメトリーにおいてキメラ抗体はAx1陽性MDA-MB-231細胞との強い結合を示した。  
20

#### 【0515】

加えて、キメラ抗体c10C9及びc10G5のAx1結合特性を、Biacore 3000装置(GE Healthcare)及び表面密度1,308.0RUでヒトAx1(rhAx1-Fcキメラ; R&D Systems、カタログ番号154-AL)をコーティングしたセンサーチップCM5を使用して試験した。Biacoreの稼働は、Binding analysis ウィザードを使用した自動モードで実施した。HBS-EP緩衝液(GE Healthcare)中に濃度10μg/mLのキメラ抗体c10C9及びc10G5またはそれに相当するマウス抗体を含有しているサンプルを、固定化抗原を有する表面全体に流速30μL/分で3分間注入(会合)した後、5分間、解離させた。  
30

#### 【0516】

図12に示す結果は、キメラ抗体c10C9及びc10G5はいずれも、ハイブリドーマ10C9及び10G5に由来するマウス抗体の相当する結合プロファイルと極めて類似したプロファイルで、固定化されたAx1と結合することを示している。  
40

#### 【0517】

実施例13：キメラ抗体10C9及び10G5は親マウス抗体と同じ親和性でAx1を結合する

キメラ抗Ax1抗体c10C9及びc10G5の親和性測定は、Biacore 3000装置(GE Healthcare)を使用して表面プラズモン共鳴測定により25で実施した。固体の抗原コーティング面として、密度190RUでrhAx1-Fcキメラ(R&D Systems、カタログ番号154-AL)を固定化したセンサーチップCM5を使用した。

#### 【0518】

速度論的測定のため、HBS-EP緩衝液(Biacore、カタログ番号BR-1001-88)中の濃度の異なる抗A<sub>x</sub>1抗体(0.3~333.3nM)を流速30μL/分、注入時間3分間で注入した後、5分間、解離させた(緩衝液のみ)。各サイクル後、再生溶液(10mMのHCl、1MのNaCl)を30秒間、流速50μL/分で注入することにより表面を再生した。

#### 【0519】

物質移動制御実験は、キメラMAb c10C9及びc10G5両方に有意な物質移動限界が見られないことを示した。

#### 【0520】

速度論的会合速度(結合速度、 $k_{on}$ )及び速度論的解離速度(解離速度、 $k_{off}$ )は、BIA evaluationソフトウェア及び1:1のLangmuir結合モデルを使用して算出した。平衡解離定数( $K_D$ )は $k_{off}/k_{on}$ 比で算出した。形成された抗体-抗原複合体の半減期( $t_{1/2}$ )は $\ln 2/k_{off}$ 比で算出した。  
10

#### 【0521】

図13に示すように、キメラMAb c10C9及びc10G5はいずれも、親マウス抗体の親和性を若干上回る(実施例5を参照)、 $K_D$ 値0.10nMのナノモル以下範囲の高親和性を示した。

#### 【0522】

実施例14：キメラ抗体10G5は、ヒト非小細胞肺癌のマウスモデルにおいて腫瘍成長を阻害する  
20

抗A<sub>x</sub>1キメラ抗体のin vivoでの抗腫瘍活性を評価するために、本発明者らは、ヒト非小細胞肺癌(NSCLC)のマウス異種移植モデルを使用した。ヒトNSCLCA549細胞(ATCC#CCL-185)A549細胞を、10%のFBS、2mMのL-グルタミン、100U/mlのペニシリン及び100μg/mlのストレプトマイシン、0.01MのHEPES緩衝液、0.45%のD-(+)-グルコース、1mMのピルビン酸ナトリウムを補充したDMEM培地で、単層培養としてin vitroで増殖させた。ヌードマウスの側腹部に、無血清培地/マトリゲル(1:1)で再懸濁した $5 \times 10^6$ のA549細胞を皮下(s.c.)注入した。腫瘍サイズが $100\text{ mm}^3$ に達したら(図14の0日目)、動物をランダム化して、4週間、週2回の腹腔内(i.p.)注入により、20mg/kgのビヒクル(滅菌PBS)または抗A<sub>x</sub>1キメラ抗体10G5のいずれかで処置した。  
30

#### 【0523】

図14に示すように、キメラ抗体10G5は、対照と比較して、A549腫瘍の成長を有意に減衰させた( $P < 0.01$ 、双方向ANOVAにより決定)。4週間の処置後、約40%の阻害が観察された。

#### 【0524】

実施例15：キメラ抗体10G5は、ヒト急性骨髄性白血病のマウス異種移植モデルにおいて腫瘍成長を阻害する

抗A<sub>x</sub>1キメラ抗体の血液癌モデルでの抗腫瘍活性を評価するために、本発明者らは、ヒト急性骨髄性白血病(AML)のマウス異種移植モデルを使用した。ヒトAML-Mv4-11細胞(ATCC#CRL-9591)細胞を、10%のFBS、2mMのL-グルタミン、100U/mlのペニシリン及び100μg/mlのストレプトマイシンを補充したIMDM培地の懸濁液中で増殖させた。ヌードマウスの側腹部に、無血清IMDM培地とマトリゲル(1:1)との混合物で再懸濁した $5 \times 10^6$ のMv4-11細胞をs.c.注入した。腫瘍サイズが $200\text{ mm}^3$ に達したら(図15の0日目)、動物をランダム化して、4週間、週2回のi.p.注入により、30mg/kgのビヒクル(滅菌PBS)または抗A<sub>x</sub>1キメラ抗体10G5のいずれかで処置した。  
40

#### 【0525】

図15に示すように、キメラ抗体10G5は、対照と比較して、Mv4-11腫瘍の成長を極めて有意に減衰させた( $P < 0.0001$ 、双方向ANOVAにより決定)。3週  
50

間の処置後、約 7 5 % の阻害が観察された。

#### 【 0 5 2 6 】

実施例 1 6 : 非フコシル化グリコシル化操作した C 1 0 G 5 ( G L Y M A X ) は、ヒト非小細胞肺癌のマウスモデルにおいて C 1 0 G 5 と比較して増強された抗腫瘍効果を示す

抗 A × 1 裸抗体は、標定受容体に特異的なシグナル伝達経路を阻害すること、ならびに / またはそのエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞障害 ( A D C C ) 、補体依存性細胞傷害 ( C D C ) 及び / もしくは抗体依存性細胞貪食作用 ( A D C P ) による腫瘍細胞の殺傷のいずれによっても腫瘍成長を防止することができる。コアがフコシル化されていない抗体は、抗体依存性の細胞媒介性細胞傷害 ( A D C C ) の有意な増強及び抗腫瘍活性作用の増加を示す。

10

#### 【 0 5 2 7 】

キメラ抗体 c 1 0 G 5 の 2 つの変異体 ( w t 及び非フコシル化 ) の抗腫瘍効果を比較するために、本発明者らは、ヒト非小細胞肺癌 ( N S C L C ) のマウス異種移植モデルを使用した。ヒト N S C L C A 5 4 9 細胞 ( A T C C # C C L - 1 8 5 ) A 5 4 9 細胞を、 1 0 % の F B S 、 2 m M の L - グルタミン、 1 0 0 U / m l のペニシリソニン及び 1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシン、 0 . 0 1 M の H E P E S 緩衝液、 0 . 4 5 % の D - ( + ) - グルコース、 1 m M のピルビン酸ナトリウムを補充した D M E M 培地で、単層培養として in vitro で増殖させた。 S C I D マウスの側腹部に、無血清培地 / マトリゲル ( 1 : 1 ) で再懸濁した 5 × 1 0 <sup>6</sup> の A 5 4 9 細胞を皮下 ( s . c . ) 注入した。腫瘍サイズが 1 3 0 mm <sup>3</sup> に達したら ( 図 1 5 の 0 日目 ) 、動物をランダム化して、 4 週間、週 2 回の腹腔内 ( i . p . ) 注入により、 3 0 m g / k g の抗 A × 1 c 1 0 G 5 または G l y m a x - c 1 0 G 5 のいずれかで処置した。

20

#### 【 0 5 2 8 】

図 1 6 に示すように、抗体 G l y m a x - c 1 0 G 5 は、 c 1 0 G 5 と比較して、 A 5 4 9 腫瘍の成長を有意に減衰させた ( P < 0 . 0 0 0 1 、 双方向 A N O V A により決定 ) 。キメラ 1 0 G 5 の w t 型と非フコシル化型の活性に有意差が見られたことは、腫瘍成長の阻害における抗体依存性細胞傷害 ( A D C C ) の重要性を示す。

20

#### 【 0 5 2 9 】

実施例 1 7 : フレームワーク変異体 1 ( F V 1 ) は、ヒト非小細胞肺癌のマウスモデルにおいて腫瘍成長を阻害する

30

F V 1 は、 C D R を有し、 1 0 G 5 との結合特異性を有するが、 V ドメインのフレームワーク領域に複数の置換を有する抗体である。抗 A × 1 F V 1 の in vivo での抗腫瘍活性を評価するために、本発明者らは、ヒト非小細胞肺癌 ( N S C L C ) のマウス異種移植モデルを使用した。ヒト N S C L C A 5 4 9 細胞 ( A T C C # C C L - 1 8 5 ) A 5 4 9 細胞を、 1 0 % の F B S 、 2 m M の L - グルタミン、 1 0 0 U / m l のペニシリソニン及び 1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシン、 0 . 0 1 M の H E P E S 緩衝液、 0 . 4 5 % の D - ( + ) - グルコース、 1 m M のピルビン酸ナトリウムを補充した D M E M 培地で、単層培養として in vitro で増殖させた。 S C I D マウスの側腹部に、無血清培地 / マトリゲル ( 1 : 1 ) で再懸濁した 5 × 1 0 <sup>6</sup> の A 5 4 9 細胞を皮下 ( s . c . ) 注入した。腫瘍サイズが 1 0 0 mm <sup>3</sup> に達したら ( 図 1 6 の 1 8 日目 ) 、動物をランダム化して、 2 週間、週 2 回の腹腔内 ( i . p . ) 注入により、 3 0 m g / k g のビヒクル ( S Y N A G I S ) または抗 A × 1 F V 1 のいずれかで処置した。図 1 7 に示すように、抗体 F V 1 は、対照と比較して、 A 5 4 9 腫瘍の成長を有意に減衰させた ( P < 0 . 0 5 1 、 双方向 A N O V A により決定 ) 。 2 週間の処置後、約 2 5 % の阻害が観察された。

40

#### 【 0 5 3 0 】

実施例 1 8 : グリコシル化操作された F V 2 ( F V 2 - G L Y M A X X ) は、ヒト非小細胞肺癌のマウスモデルの腫瘍成長に対する抗 E G F R 治療薬の効果を増強する

F V 2 - G L Y M A X X は、 C D R を有し、 1 0 G 5 との結合特異性を有するが、 V ドメインのフレームワーク領域に複数の置換を有する抗体である。抗 F V 2 - G L Y M A X X の in vivo での抗腫瘍活性を評価するために、本発明者らは、ヒト非小細胞肺癌

50

(N S C L C) のマウス異種移植モデルを使用した。ヒト N S C L C A 5 4 9 細胞 (A T C C # C C L - 1 8 5) A 5 4 9 細胞を、10%の F B S 、2 mMのL-グルタミン、100 U / m l のペニシリン及び100 µg / m l のストレプトマイシン、0.01 MのH E P E S 緩衝液、0.45%のD-(+)-グルコース、1 mMのピルビン酸ナトリウムを補充したD M E M 培地中で、単層培養としてin vitroで増殖させた。ヌードマウスの側腹部に、無血清培地 / マトリゲル(1:1)で再懸濁した $5 \times 10^6$ のA 5 4 9 細胞を皮下(s. c.)注入した。腫瘍サイズが100 mm<sup>3</sup>に達したら(図18の0日目)、動物をランダム化して、ビヒクル(S Y N A G I S)、E r b i t u x(20 mg / k g)またはF V 2 - G L Y M A X X(15または30 mg / k g)のいずれかを単独でもしくは組み合わせて処置した。抗体は、3週間、週2回の腹腔内(i. p.)注入により投与した。

## 【0531】

図18に示すように、F V 2 - G L Y M A X Xは、抗E G F R 治療抗体セツキシマブ(E r b i t u x)の抗腫瘍効果と酷似した適度な抗腫瘍活性を示した。しかしながら、いずれの抗体も単剤として使用した場合、アイソタイプ対照抗体(S y n a g i s)で処置したマウスコホートと比較して統計学的に有意な効果は観察されなかった。両方の抗体を併用すると、アイソタイプ対照で処置した動物と比較して、有意な腫瘍成長の遅延が得られた(P < 0.0001; 双方向ANOVAにより決定)。F V 2 - G L Y M A X X 抗体またはE r b i t u xのいずれか単独による処置群と比較した場合にも、効果が有意であった(P < 0.05; 双方向ANOVAにより決定)。

## 【0532】

## 配列

## 配列番号1 [ 1 0 C 9 VH ドメイン( n t ) ]

```
CAGGTCCA ACTG CAGC AGCC TGGACCTGAGCTGGTGAAGC  
CTGGGGCTTCAGTGAAAGATATCCTGCAAGAACCTTGACTA  
CAATTTCACACGCTACTATATACTGGGTGAAGCAGAGG  
CCTGGACAGGGACTTGGAGTGATTGGATGGATTATCCTG  
GAAC TG GT GATTCTAAATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAG  
GCCACACTGACGGCAGACACATCCTCCAGCACTGCCTAC  
ATGCAGCTCAGCTCCC AACATCTGAGGACTCTGGTCT  
ATTTCTGTGCAAGGAATGGTAACTACTGGTACTTCGATGT  
CTGGGGCGCAGGGACC CGCGGT CACCGTCTCCCTCAGCCAAA  
ACGACACCC
```

## 配列番号2 [ 1 0 C 9 VL ドメイン( n t ) ]

```
GATATTGTGATGACGCAGGCTGCACCCCTCTGGACCTGTCA  
CTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAA  
GAGTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAACTCCTGATAT  
ATCGGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTT  
CAGTGGCAGTGGTCAGGAACTGCTTACACTGAGAAC  
AGTAGAGTGGAGGGCTGAGGATGTGGGTATCTATTACTGTA  
TGCAACATCGAGAATATCCTTACGTTCGGAGGGGGAC  
CAAAC TGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA  
TCC
```

## 配列番号3 [ 1 0 C 9 VH ドメイン( a a ) ]

```
QVQLQQPGPELVKPGASVKISCKTS D Y N F T R Y Y I H W V K Q R  
P G Q G L E W I G W I Y P G T G D S K Y N E K F K G R A T L T A D T S S S T A Y  
M Q L S S Q T S E D S A V Y F C A R N G N Y W Y F D V W G A G T A V T V S S
```

## 配列番号4 [ 1 0 C 9 VL ドメイン( a a ) ]

```
D I V M T Q A A P S G P V T P G E S V S I S C R S S K S L L H S N G N T Y L Y W
```

10

20

30

40

50

F L Q R P G Q S P Q L L I Y R M S N L A S G V P D R F S G S G S G T A F T L R I  
S R V E A E D V G I Y Y C M Q H R E Y P F T F G G G T K L E I K

配列番号 5 [ 1 0 C 9 重鎖 C D R 1 ]

D Y N F T R Y Y I H

配列番号 6 [ 1 0 C 9 重鎖 C D R 2 ]

W I Y P G T G D S K Y N E K F K G

配列番号 7 [ 1 0 C 9 重鎖 C D R 3 ]

N G N Y W Y F D V

配列番号 8 [ 1 0 C 9 軽鎖 C D R 1 ]

R S S K S L L H S N G N T Y L Y

配列番号 9 [ 1 0 C 9 軽鎖 C D R 2 ]

R M S N L A S

配列番号 10 [ 1 0 C 9 軽鎖 C D R 3 ]

M Q H R E Y P F T

配列番号 11 [ 1 0 C 9 重鎖 F R 1 ]

Q V Q L Q Q P G P E L V K P G A S V K I S C K T S

配列番号 12 [ 1 0 C 9 重鎖 F R 2 ]

W V K Q R P G Q G L E W I G

配列番号 13 [ 1 0 C 9 重鎖 F R 3 ]

R A T L T A D T S S S T A Y M Q L S S Q T S E D S A V Y F C A R

配列番号 14 [ 1 0 C 9 重鎖 F R 4 ]

W G A G T A V T V S S

配列番号 15 [ 1 0 C 9 軽鎖 F R 1 ]

D I V M T Q A A P S G P V T P G E S V S I S C

配列番号 16 [ 1 0 C 9 軽鎖 F R 2 ]

W F L Q R P G Q S P Q L L I Y

配列番号 17 [ 1 0 C 9 軽鎖 F R 3 ]

G V P D R F S G S G S G T A F T L R I S R V E A E D V G I Y Y C

配列番号 18 [ 1 0 C 9 軽鎖 F R 4 ]

F G G G T K L E I K

配列番号 19 [ 1 0 G 5 V H ドメイン ( n t ) ]

C A G G T C C A G C T G C A G C A G T C T G G G G C T G A G C T G G T G A G G C

C T G G G G C T T C A G T G A A G G C T G T C C T G C A A G G C T T C T G G C T A

C A G T T T C A C T G A C T T C T A T A T A A A C T G G G T G A G G C A G A G G

C C T G G A C A G G G A C T T G A G T G G A T T G C A A G G A T T T T C C T G

G A G G T G A T A A T A C T T A C T A C A A T G A G A A G T T C A A G G G C A A

G G C C A C A C T G A C T G C A G A A G A A T C C T C A G C A C T G C C T A C

A T A C A G C T C A G C A G C C T G A C A T C T G A G G A C T C T G C T G T C T

A T T T C T G T G C A A G A C G G G G A C T T T A C T A T G C T A T G G A C T A

C T G G G G T C A A G G A A T C T C A G T C A C C G T C T C C T C A G C C A A A

A C G A C A C C C

配列番号 20 [ 1 0 G 5 V L ドメイン ( n t ) ]

G A T G T T T G A T G A C C C A A A C T C C A C T C T C C C T G C C T G T C A

G T C T T G G A G A T C A A G C C T C C A T C T C T T G C A G A T C T A G T C A

G A G C C T T G T G C A C A G T A A T G G A A T C C C C T A T T T A C A T T G G

T A C C T G C A G A A G G C C A G G C C A G T C T C C A A A G C T C C T G A T C T

A C A G A G T T T C C A A C C G A T T T C T G G G G T C C C A G A C A G G T T

C A G T G G C A G T G G A T C A G G G A C A G A T T T C A C G C T C A A G A T C

A G C A G A G T G G A G G G C T G A G G A T C T G G G A G T T T A T T T C T G T T

C T C A A G G T A C A C A T G T T C C T C C G A C G T T C G G T G G T G G C A C

10

20

30

40

50

C A A G C T G G A A A T C A A A C G G G C T G A T G C T G C A C C A A C T G T A  
T C C

配列番号 21 [ 10G5 VH ドメイン (aa) ]

Q V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V K L S C K A S G Y S F T D F Y I N W V R Q R  
P G Q G L E W I A R I F P G G D N T Y Y N E K F K G K A T L T A E E S S S T A Y  
I Q L S S L T S E D S A V Y F C A R R G L Y Y A M D Y W G Q G I S V T V S S

配列番号 22 [ 10G5 VL ドメイン (aa) ]

D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V H S N G I P Y L H W  
Y L Q K P G Q S P K L L I Y R V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I  
S R V E A E D L G V Y F C S Q G T H V P P T F G G G T K L E I K

10

配列番号 23 [ 10G5 重鎖 CDR1 ]

G Y S F T D F Y I N

配列番号 24 [ 10G5 重鎖 CDR2 ]

R I F P G G D N T Y Y N E K F K G

配列番号 25 [ 10G5 重鎖 CDR3 ]

R G L Y Y A M D Y

配列番号 26 [ 10G5 軽鎖 CDR1 ]

R S S Q S L V H S N G I P Y L H

配列番号 27 [ 10G5 軽鎖 CDR2 ]

R V S N R F S

20

配列番号 28 [ 10G5 軽鎖 CDR3 ]

S Q G T H V P P T

配列番号 29 [ 10G5 重鎖 FR1 ]

Q V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V K L S C K A S

配列番号 30 [ 10G5 重鎖 FR2 ]

W V R Q R P G Q G L E W I A

配列番号 31 [ 10G5 重鎖 FR3 ]

K A T L T A E E S S S T A Y I Q L S S L T S E D S A V Y F C A R

配列番号 32 [ 10G5 重鎖 FR4 ]

W G Q G I S V T V S S

30

配列番号 33 [ 10G5 軽鎖 FR1 ]

D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C

配列番号 34 [ 10G5 軽鎖 FR2 ]

W Y L Q K P G Q S P K L L I Y

配列番号 35 [ 10G5 軽鎖 FR3 ]

G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C

配列番号 36 [ 10G5 軽鎖 FR4 ]

F G G G T K L E I K

配列番号 37 [ ヒト A x 1 ]

M G I Q A G E P D P P E E P L T S Q A S V P P H Q L R L G S L H P H T P Y H I R  
V A C T S S Q G P S S W T H W L P V E T P E G V P L G P P E N I S A T R N G S Q  
A F V H W Q E P R A P L Q G T L L G Y R L A Y Q G Q D T P E V L M D I G L R Q E  
V T L E L Q G D G S V S N L T V C V A A Y T A A G D G P W S L P V P L E A W R P  
G Q A Q P V H Q L V K E P S T P A F S W P W W Y V L L G A V V A A C V L I L A  
L F L V H R R K K E T R Y G E V F E P T V E R G E L V V R Y R V R K S Y S R R T  
T E A T L N S L G I S E E L K E K L R D V M V D R H K V A L G K T L G E G E F G  
A V M E G Q L N Q D D S I L K V A V K T M K I A I C T R S E L E D F L S E A V C  
M K E F D H P N V M R L I G V C F Q G S E R E S F P A P V V I L P F M K H G D L  
H S F L L Y S R L G D Q P V Y L P T Q M L V K F M A D I A S G M E Y L S T K R F  
I H R D L A A R N C M L N E N M S V C V A D F G L S K K I Y N G D Y Y R Q G R I

50

A K M P V K W I A I E S L A D R V Y T S K S D V W S F G V T M W E I A T R G Q T  
 P Y P G V E N S E I Y D Y L R Q G N R L K Q P A D C L D G L Y A L M S R C W E L  
 N P Q D R P S F T E L R E D L E N T L K A L P P A Q E P D E I I L Y V N M D E G G  
 G Y P E P P G A A G G A D P P T Q P D P K D S C S C L T A A E V H P A G R Y V L  
 C P S T T P S P A Q P A D R G S P A A P G Q E D G A

配列番号38 [マウスAx1]

M G R V P L A W W L A L C C W G C A A H K D T Q T E A G S P F V G N P G N I T G  
 A R G L T G T L R C E L Q V Q G E P P E V V W L R D G Q I L E L A D N T Q T Q V  
 P L G E D W Q D E W K V V S Q L R I S A L Q L S D A G E Y Q C M V H L E G R T F  
 V S Q P G F V G L E G L P Y F L E E P E D K A V P A N T P F N L S C Q A Q G P P 10  
 E P V T L L W L Q D A V P L A P V T G H S S Q H S L Q T P G L N K T S S F S C E  
 A H N A K G V T T S R T A T I T V L P Q R P H H L H V V S R Q P T E L E V A W T  
 P G L S G I Y P L T H C N L Q A V L S D D G V G I W L G K S D P P E D P L T L Q  
 V S V P P H Q L R L E K L L P H T P Y H I R I S C S S S Q G P S P W T H W L P V  
 E T T E G V P L G P P E N V S A M R N G S Q V L V R W Q E P R V P L Q G T L L G  
 Y R L A Y R G Q D T P E V L M D I G L T R E V T L E L R G D R P V A N L T V S V  
 T A Y T S A G D G P W S L P V P L E P W R P V S E P P P R A F S W P W W Y V L L  
 G A L V A A A C V L I L A L F L V H R R K K E T R Y G E V F E P T V E R G E L V  
 V R Y R V R K S Y S R R T T E A T L N S L G I S E E L K E K L R D V M V D R H K  
 V A L G K T L G E G E F G A V M E G Q L N Q D D S I L K V A V K T M K I A I C T 20  
 R S E L E D F L S E A V C M K E F D H P N V M R L I G V C F Q G S D R E G F P E  
 P V V I L P F M K H G D L H S F L L Y S R L G D Q P V F L P T Q M L V K F M A D  
 I A S G M E Y L S T K R F I H R D L A A R N C M L N E N M S V C V A D F G L S K  
 K I Y N G D Y Y R Q G R I A K M P V K W I A I E S L A D R V Y T S K S D V W S F  
 G V T M W E I A T R G Q T P Y P G V E N S E I Y D Y L R Q G N R L K Q P V D C L  
 D G L Y A L M S R C W E L N P R D R P S F A E L R E D L E N T L K A L P P A Q E  
 P D E I I L Y V N M D E G G S H L E P R G A A G G A D P P T Q P D P K D S C S C L  
 T A A D V H S A G R Y V I C P S T A P G P T L S A D R G C P A P P G Q E D G A

配列番号39 [ヒトTyro3]

M A L R R S M G R P G L P P L P P P P R L G L L A A L A S L L L P E S A A 30  
 A G L K L M G A P V K L T V S Q G Q P V K L N C S V E G M E E P D I Q W V K D G  
 A V V Q N L D Q L Y I P V S E Q H W I G F L S L K S V E R S D A G R Y W C Q V E  
 D G G E T E I S Q P V W L T V E G V P F F T V E P K D L A V P P N A P F Q L S C  
 E A V G P P E P V T I V W W R G T T K I G G P A P S P S V L N V T G V T Q S T M  
 F S C E A H N L K G L A S S R T A T V H L Q A L P A A P F N I T V T K L S S S N  
 A S V A W M P G A D G R A L L Q S C T V Q V T Q A P G G W E V L A V V V P V P P  
 F T C L L R D L V P A T N Y S L R V R C A N A L G P S P Y A D W V P F Q T K G L  
 A P A S A P Q N L H A I R T D S G L I L E W E E V I P E A P L E G P L G P Y K L  
 S W V Q D N G T Q D E L T V E G T R A N L T G W D P Q K D L I V R V C V S N A V  
 G C G P W S Q P L V V S S H D R A G Q Q G P P H S R T S W V P V V L G V L T A L 40  
 V T A A A L A L I L L R K R R K E T R F G Q A F D S V M A R G E P A V H F R A A  
 R S F N R E R P E R I E A T L D S L G I S D E L K E K L E D V L I P E Q Q F T L  
 G R M L G K G E F G S V R E A Q L K Q E D G S F V K V A V K M L K A D I I A S S  
 D I E E F L R E A A C M K E F D H P H V A K L V G V S L R S R A K G R L P I P M  
 V I L P F M K H G D L H A F L L A S R I G E N P F N L P L Q T L I R F M V D I A  
 C G M E Y L S S R N F I H R D L A A R N C M L A E D M T V C V A D F G L S R K I  
 Y S G D Y Y R Q G C A S K L P V K W L A L E S L A D N L Y T V Q S D V W A F G V  
 T M W E I M T R G Q T P Y A G I E N A E I Y N Y L I G G N R L K Q P P E C M E D  
 V Y D L M Y Q C W S A D P K Q R P S F T C L R M E L E N I L G Q L S V L S A S Q  
 D P L Y I N I E R A E E P T A G G S L E L P G R D Q P Y S G A G D G S G M G A V 50

GGTPSDCRYILTPGGLAEQPGQAEHQPESPLNETQRLLL  
QQGLLPHSSC

配列番号40 [ヒトMer]

MGPAPLPLLGLFLPALWRRRAITEAREEAKPYPLFPGPFP  
GSLQTDHTPLLSLPHASGYQPALMFSPQTQPGRPHTGNVAI  
PQVTSVESKPLPPLAFKHTVGHIILSEHKGVKFNCISVP  
NIYQDTTISWWKDGFKELLGAHHAITQFYPDDEVTAIIASF  
SITSVQRSDNGSYICKMKINNEEIVSDPIYIEVQGLPHFT  
KQPESMNVTRNTAFNLTCQAVGPPEPVNIFWVQNSSRVNE  
QPEKSPSVLTVPGLTEMAVFSCAEHNDKGLTVSKGVQINI 10  
KAIPSPPTEVSI RNSTAHSILISWVPGFDGYSPFRNC SIQ  
VKEADPLSNGSVMIFNTSALPHLYQIKQLQALANYSIGVS  
CMNEIGWSAVSPWILASTTEGAPS VAPLNVTVFLNESSDN  
VDIRWMKPPTKQ QDGELVGYRISHVWQSAGISKELLEEVG  
QNGSRARISVQVHNATCTVRIAAVTRGGVGPFSDPVKIFI  
PAHGWVDYAPSSTPAPGNADPVLIIIFGCFCGFILIGLILY  
ISLAIRKRVQETKFGNAFTEEDSELV VNYIAKKSFCCRRAI  
ELTLHSLGVSEELQNKLEDVVIDRNLLILGKILGEGEFGS  
VMEGNLKQEDGTSLKVAVKTMKLDNSSQREIEEFLSEAAC  
MKDFSHPNVIRLLGVCIEMSSQGIPKPMVILP FMKYGD LH 20  
TYLLYSRLETGP KHIPLQTLKFMVDIALGMEYL SNRNFL  
HRDLAARN CMLRDDMTVCVADFG LSKKIYSGDYYRQGRIA  
KMPVKWIAIESLADRVYT SKSDVWAFGV TMWEIATRGMT P  
YPGVQNHEMYDYLLHGHLRKQPEDCLDELYEIMYS CWRTD  
PLDRPTFSVLRLQLEKLLES LPDVRNQADV IYVNTQLLES  
SEGLAQGSTLAPLDNIDPDSIIASCTPRAAISVVTAEVH  
DSKPHEGRYILNGGSEEWEDLTSAPS AAVTAEKNSVLPGE  
RLVRNGVSWSHSSMLPLGSSL PDELLFA DDSSEGSEVLM  
配列番号41 [ヒトAkt3]

MSDVTIVKEGWVQKRGEYIKNWRPRYFLLKTDGSFIGYKE 30  
KPQDV DLPYPLNNFSVAKCQLMKTERPKPNTFIIRCLQWT  
TVIERTFHVDTPEERE EEWTEAIQAVADRLQRQEEERMNCS  
PTS QIDNIGEEEMDASTTHHKRKT MND FDYLKLLGKGTF G  
KVILVREKASGKYYAMKILKKEVIIIAKDEVAHTL TESRVL  
KNTRHPFLTSLKYSFQTKDRLCFVMEYVNGGELFFHLSRE  
RVFSEDRTRFYGAEIVSALDYLHSGKIVYRDLKLENLMD  
KG DGH IKITDFGLCKEGITDAATMKTFCGTPEYLAPEVLED  
NDYGRAV DWWGLGVVMYEMMCGR LPFY NQDH EKL FELILM  
EDIKF PRTLSSDAKSLLSGLLIKDPNKRLGGGPDDAKEIM  
RHSFFSGVNWQDVYDKKL VPPFKPQVTSETDTRYFDEEFT 40  
AQTITITTPPEK CQQSDCGMLGNWKK

配列番号42 [ヒトGas6]

MAPSLSPGPAALRRRAPQ L L L LAAECALAALLPAREATQ  
FLRPRQRRAFQVFE EAKQGHLERECVEELCSREEAREVFE  
NDPETDYFYPRYLD CINKYGS PYTKNSGFATCVQNL PDQC  
TPNP CDRKG TQACQDLMGNFFCLCKAGWGGR L C DKDVNEC  
SQENG GCLQIC HNKPGSFHC S CHSGFELSSDGRT C QD IDE  
CADSEACGEARCKNLPGS YSCLCDEGFAYSSQEKA CRD VD  
ECLQGRCEQVCVN SPGS YTC HCDGRGG LKLSQDM DT C EDI  
LPCV PFSVAKSVKSLYLG R MFSGT P V I RLRFKRLQPTRLV 50

A E F D F R T F D P E G I L L F A G G H Q D S T W I V L A L R A G R L E L Q L R  
 Y N G V G R V T S S G P V I N H G M W Q T I S V E E L A R N L V I K V N R D A V  
 M K I A V A G D L F Q P E R G L Y H L N L T V  
 G G I P F H E K D L V Q P I N P R L D G C M R S W N W L N G E D T T I Q E T V K  
 V N T R M Q C F S V T E R G S F Y P G S G F A F Y S L D Y M R T P L D V G T E S  
 T W E V E V V A H I R P A A D T G V L F A L W A P D L R A V P L S V A L V D Y H  
 S T K K L K K Q L V V L A V E H T A L A L M E I K V C D G Q E H V V T V S L R D  
 G E A T L E V D G T R G Q S E V S A A Q L Q E R L A V L E R H L R S P V L T F A  
 G G L P D V P V T S A P V T A F Y R G C M T L E V N R R L L D L D E A A Y K H S  
 D I T A H S C P P V E P A A A

10

配列番号43 [ *Macaca fascicularis* 由来 A × 1 ; 本明細書での別称  
 「*Cyno Ax1*」 ]

M A W R C P R M G R V P L A W C L A L C G W V C M A P R G T Q A E E S P F V G N  
 P G N I T G A R G L T G T L R C Q L Q V Q G E P P E V H W L R D G Q I L E L A D  
 S T Q T Q V P L G E D E Q D D W I V V S Q L R I A S L Q L S D A G Q Y Q C L V F  
 L G H Q N F V S Q P G Y V G L E G L P Y F L E E P E D R T V A A N T P F N L S C  
 Q A Q G P P E P V D L L W L Q D A V P L A T A P G H G P Q R N L H V P G L N K T  
 S S F S C E A H N A K G V T T S R T A T I T V L P Q Q P R N L H L V S R Q P T E  
 L E V A W T P G L S G I Y P L T H C T L Q A V L S D D G M G I Q A G E P D P P E  
 E P L T L Q A S V P P H Q L R L G S L H P H T P Y H I R V A C T S S Q G P S S W  
 T H W L P V E T P E G V P L G P P E N I S A T R N G S Q A F V H W Q E P R A P L  
 Q G T L L G Y R L A Y Q G Q D T P E V L M D I G L R Q E V T L E L Q G D G S V S  
 N L T V C V A A Y T A A G D G P W S L P V P L E A W R P G Q A Q P V H Q L V K E  
 T S A P A F S W P W W Y I L L G A V V A A C V L I L A L F L V H R R K K E T R  
 Y G E V F E P T V E R G E L V V R Y R V R K S Y S R R T T E A T L N S L G I S E  
 E L K E K L R D V M V D R H K V A L G K T L G E G E F G A V M E G Q L N Q D D S  
 I L K V A V K T M K I A I C T R S E L E D F L S E A V C M K E F D H P N V M R L  
 I G V C F Q G S E R E S F P A P V V I L P F M K H G D L H S F L L Y S R L G D Q  
 P V Y L P T Q M L V K F M A D I A S G M E Y L S T K R F I H R D L A A R N C M L  
 N E N M S V C V A D F G L S K K I Y N G D Y Y R Q G R I A K M P V K W I A I E S  
 L A D R V Y T S K S D V W S F G V T M W E I A T R G Q T P Y P G V E N S E I Y D  
 Y L R Q G N R L K Q P A D C L D G L Y A L M S R C W E L N P Q D R P S F T E L R  
 E D L E N T L K A L P P A Q E P D E I L Y V N M D E G G G Y P E P P G A A G G A  
 D P P T Q L D P K D S C S C L T S A E V H P A G R Y V L C P S T A P S P A Q P A  
 D R G S P A A P G Q E D G A

20

配列番号44 [ リンカー ]

G G G S

配列番号45 [ 1 0 G 5 ( Q 1 E ) V H ドメイン ( a a ) ]

Q V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V K L S C K A S G Y S F T D F Y I N W V R Q R  
 P G Q G L E W I A R I F P G G D N T Y Y N E K F K G K A T L T A E E S S S T A Y  
 I Q L S S L T S E D S A V Y F C A R R G L Y Y A M D Y W G Q G I S V T V S S

30

【 0 5 3 3 】

生物寄託

本開示は2種類のハイブリドーマ細胞株に関する。「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約」に従って、2つのハイブリドーマ細胞株を寄託した。詳細を以下に示す。

【 0 5 3 4 】

U T - 1 0 C 9 - B 9

受託機関 European Collection of Cell Culture  
 s ( ECACC )

40

50

P u b l i c   H e a l t h   E n g l a n d  
P o r t o n   D o w n  
S a l i s b u r y  
W i l t s h i r e  
S P 4   O J G  
U n i t e d   K i n g d o m

寄託日 2015年12月16日

アクセッション番号 15121601

特徴 ハイブリドーマ - Bリンパ球；種 - M . m u s c u l u s (マウス)；形態 - リンパ芽球；免疫原 - ヒトA×1細胞外ドメイン；免疫細胞供与体 - N M R I マウス；無限分裂パートナー X 6 3 . A g 8 . 6 5 3 ; 産物の Ig クラス / サブクラス - Ig G 2 b

【0535】

WR - 10G5 - E5

受託機関 European Collection of Cell Culture  
s (E C A C C)

P u b l i c   H e a l t h   E n g l a n d  
P o r t o n   D o w n  
S a l i s b u r y  
W i l t s h i r e  
S P 4   O J G

U n i t e d   K i n g d o m

10

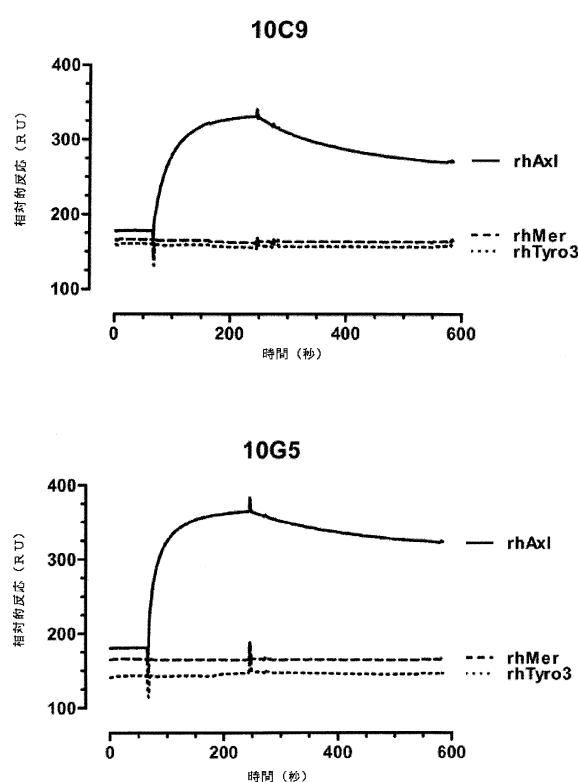
20

寄託日 2015年12月16日

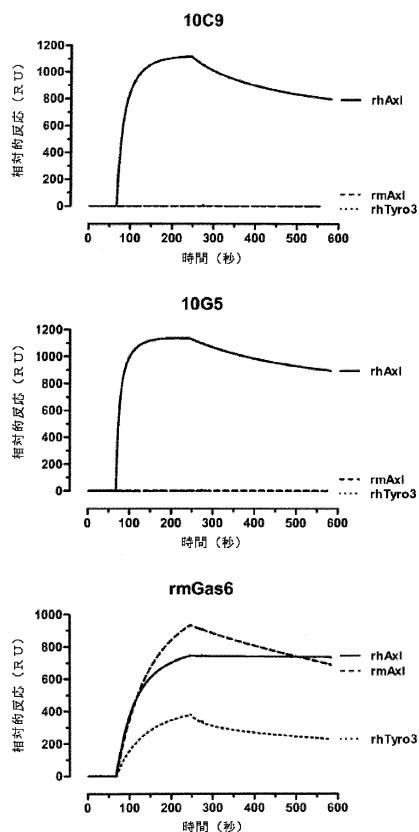
アクセッション番号 15121602

特徴 ハイブリドーマ - Bリンパ球；種 - M . m u s c u l u s (マウス)；形態 - リンパ芽球；免疫原 - ヒトA×1細胞外ドメイン；免疫細胞供与体 - N M R I マウス；無限分裂パートナー X 6 3 . A g 8 . 6 5 3 ; 産物の Ig クラス / サブクラス - Ig G 1

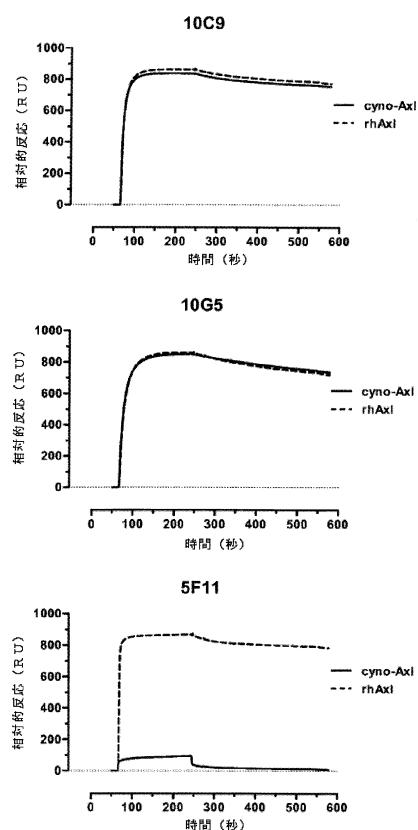
【図1】



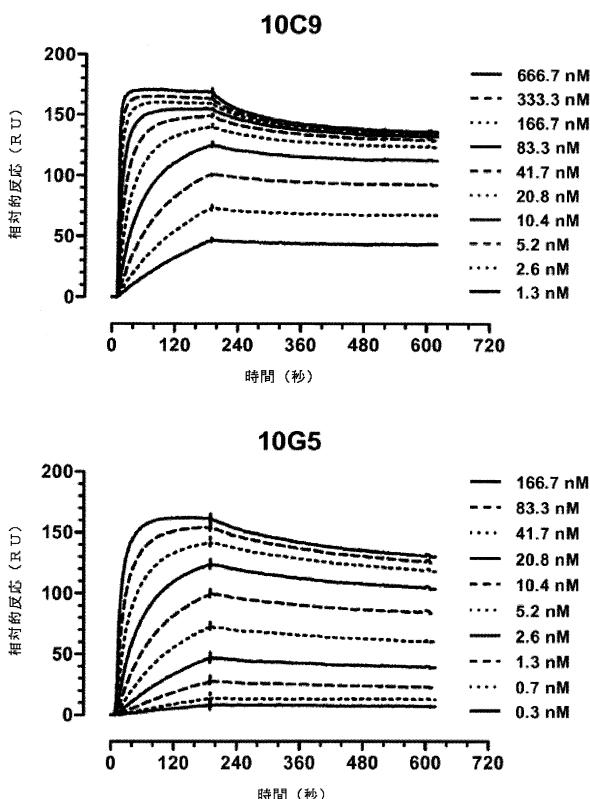
【図2】



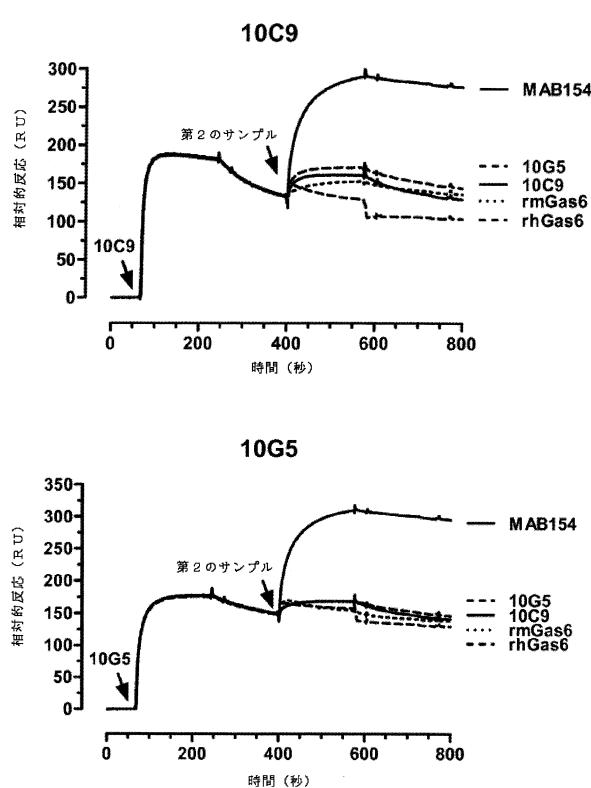
【図3】



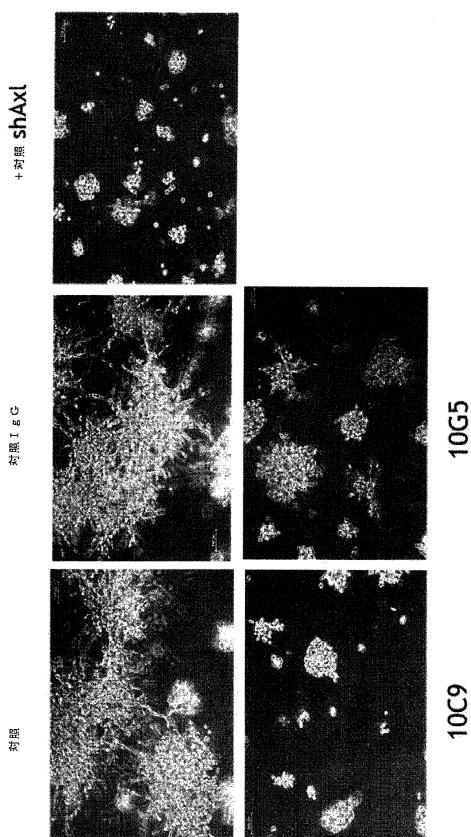
【図4】



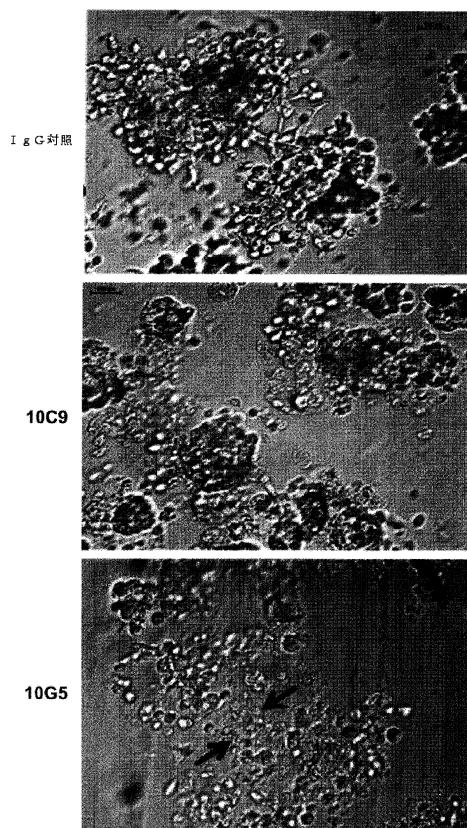
【図5】



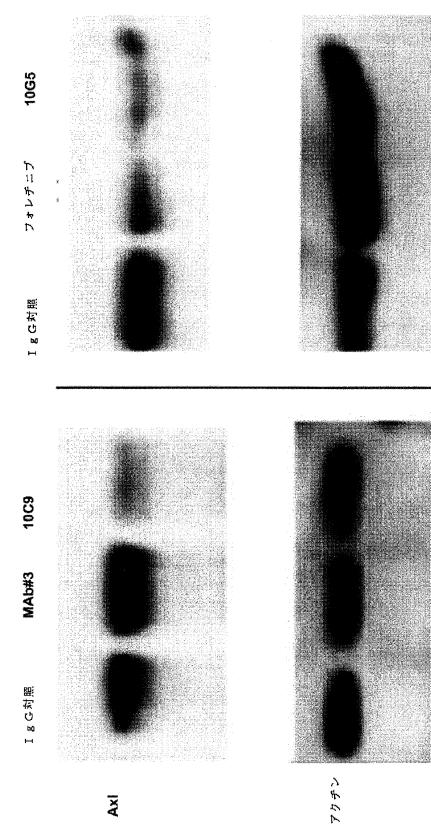
【図6】



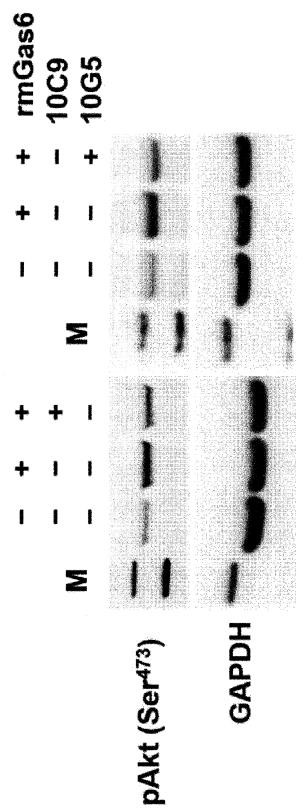
【図7】



【図8】



【図9】



【図10】

抗体 1 O C 9

**VH1 A7-1**  
QVQLQQPGPELVKPGASVKISCKTSDYNFTRYIYHWVKQRPGQGLEWIGWIYPGTGDSKY  
NEKFKGRTATLTD**TSSSTAYMQLSSQTSEDSA**YFCARNGNYWYFDWAGATAVTVSS

**Vk2 E2-2**  
DIVMTQAAPSGPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTLYWFLQRPGQSPQLIYRMSNLAS  
GVPDRESGSGTAFTI RISRVFAEDVGIYCCMOHREYPTETGGGTKI EIK

抗体 10G5

**VH1**  
QVQLQSQGAEVLVRPGASVKLSCKASGYSFTDFYINWVRQRPGQGLEWIARIFFGGDNTYY  
NEKEKGKATLTAFFESSSTAVIOLSSITSEDFASYVECARRGIYYAMDYWGOGISIVTSS

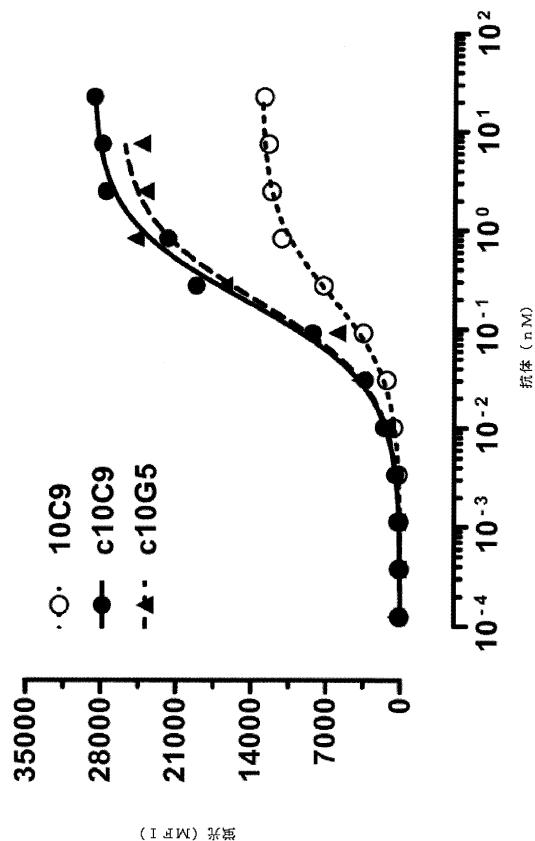
**Vk1 F1-3**  
DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHNSGIPYLHWYLQKPGQSPKLIIYRVSNRFSG  
VRDPRESGCCSCTDETLKISPVAEFLPQVKESCGSOTHVPRTECCGCTLK

抗体 10G5 [Q1E]

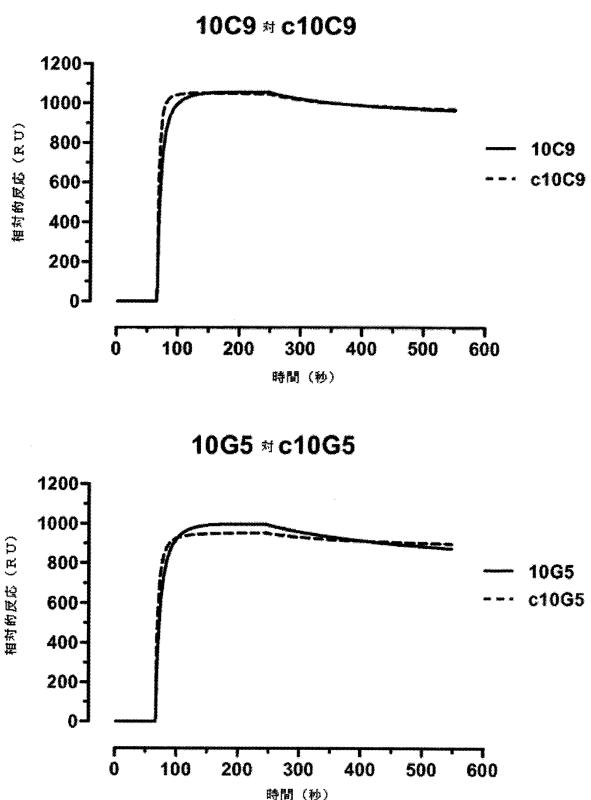
**VH1**  
EVQLQSGAELVPRGASVKLSCKASGYSFDFYIINWVRQRPGQQGLEWIARIFFGGDNTYY  
NEKEKCKATLTAEESSSTAXIQLSSTTSERDSAVLVECARPLVYAMDYWCOCISIVTVSS

Vk1 F1-3  
DVLMTQTPLSLPVSGLGDQASISCRSSQSLVHSNGIPYLHWYLQKPGQSPKLIIYRVSNRFSG  
VDRFEGGCGGCGCTDTLKIOPVAAEPLQWVCGGCGTIVPDTFOGCTKLEIK

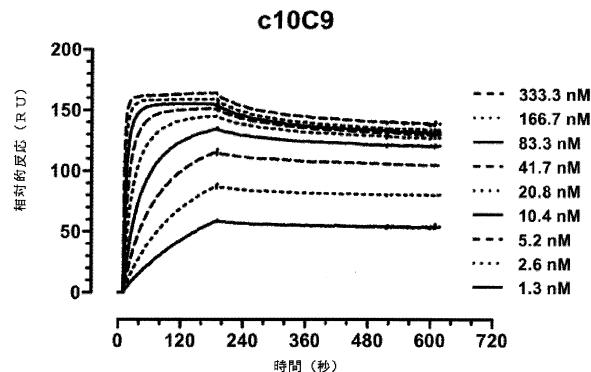
【 図 1 1 】



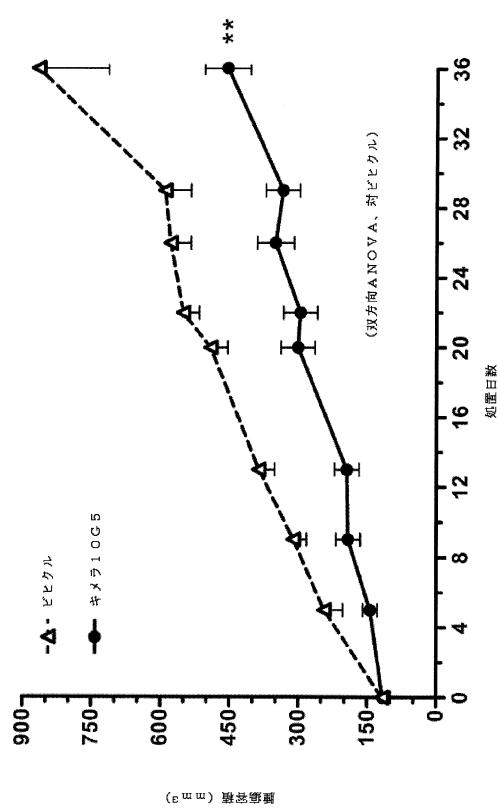
【図12】



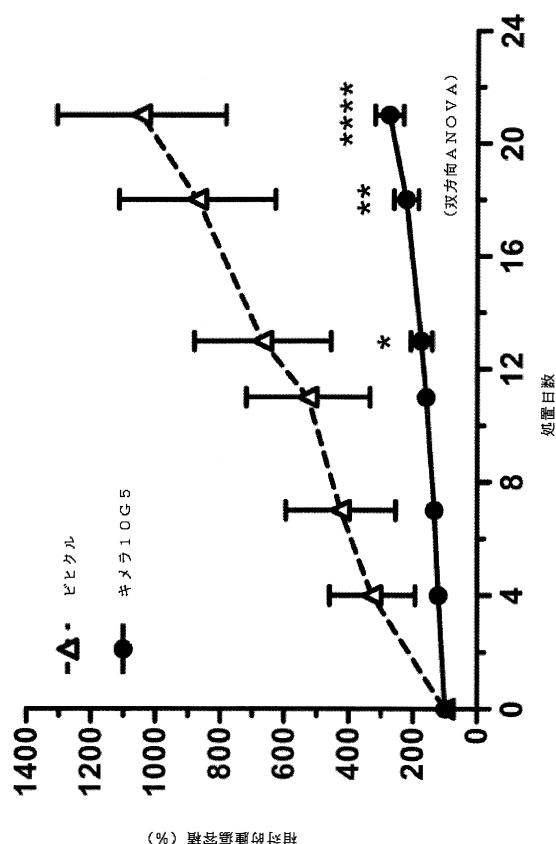
【図13】



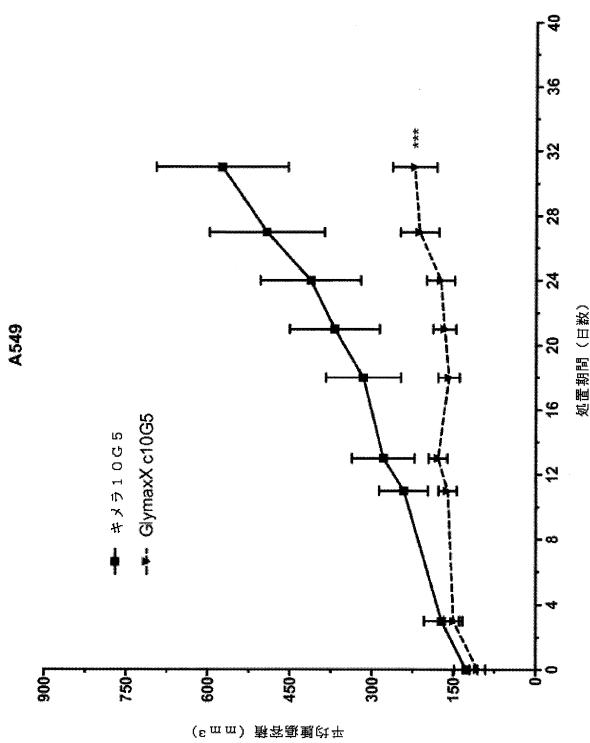
【図14】



【図15】

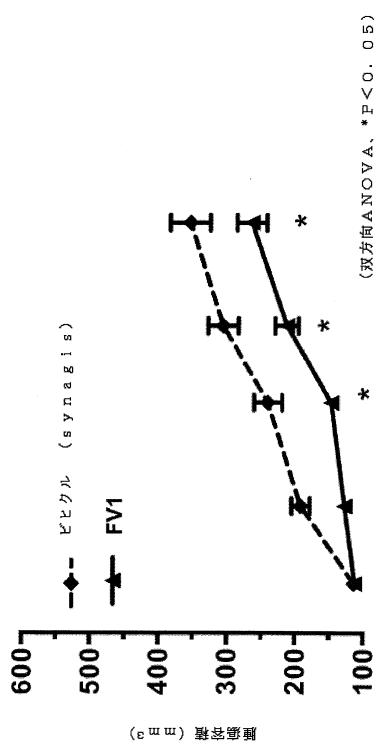


【図16】

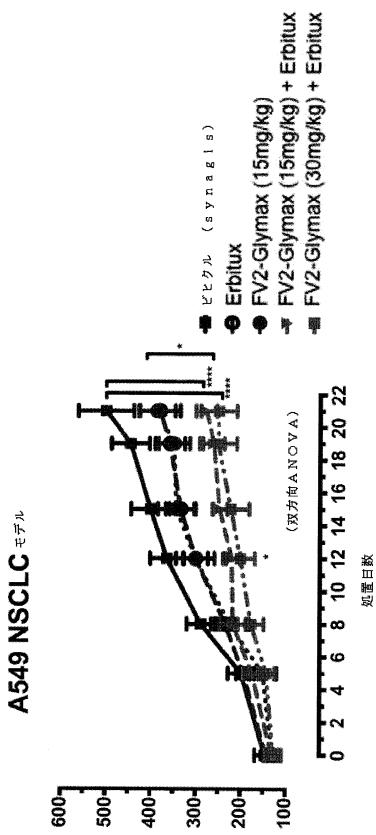


【図17】

A549



【図18】



【配列表】

0006931609000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/06	(2006.01)	C 1 2 N	15/06 1 0 0
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 E
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 C
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	39/395 L
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	A 6 1 K	47/68
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
			G 0 1 N	33/574 D
			C 1 2 N	1/15
			C 1 2 N	1/19
			C 1 2 N	1/21

## 前置審査

- (72)発明者 ミクレム , ダーヴィド ロベルト  
ノルウェー国 , 5 0 3 3 ベルゲン , レプスラゲルガテン 4 ベー
- (72)発明者 クプリヤノフ , セルゲイ  
ノルウェー国 , 0 7 6 8 オスロ , ホヴセテルヴェイエン 9 8
- (72)発明者 ロレンス , ジェームズ ブラッドリー  
ノルウェー国 , 5 1 5 2 ボネス , クラケネスヴェイエン 1 0
- (72)発明者 アハメド , ラヴィーナ  
ノルウェー国 , 5 0 9 6 ベルゲン , ヨハンブリッツ ヴェイ 2 0
- (72)発明者 ニルソン , リン ホーデネランド  
ノルウェー国 , 5 0 6 7 ベルゲン , グランヴェゲン 1 1
- (72)発明者 サンダル , トーン  
ノルウェー国 , 5 0 0 9 ベルゲン , モレンダルスバッケン 1

審査官 上村 直子

- (56)参考文献 特開2 0 1 4 - 2 2 4 1 1 6 ( J P , A )  
特表2 0 1 1 - 5 0 5 1 2 0 ( J P , A )  
特表2 0 1 3 - 5 3 8 5 5 3 ( J P , A )  
特表2 0 1 4 - 5 3 2 6 8 7 ( J P , A )  
特表2 0 1 4 - 5 2 2 6 3 9 ( J P , A )

## (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N  
C 0 7 K  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
U n i P r o t / G e n e S e q