

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-509931

(P2010-509931A)

(43) 公表日 平成22年4月2日(2010.4.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C O 7 K 16/30 (2006.01)	C O 7 K 16/30 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 C O 7 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 67 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-537651 (P2009-537651)	(71) 出願人	500033483
(86) (22) 出願日	平成19年11月23日 (2007.11.23)		ビエール、ファール、メディカマン
(85) 翻訳文提出日	平成21年6月16日 (2009.6.16)		フランス国ブローニュ、ビヤンクール、ブ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/062760		ラス、アベル、ガンズ、4 5
(87) 国際公開番号	W02008/062063	(74) 代理人	100075812
(87) 国際公開日	平成20年5月29日 (2008.5.29)		弁理士 吉武 賢次
(31) 優先権主張番号	06/10329	(74) 代理人	100091487
(32) 優先日	平成18年11月24日 (2006.11.24)		弁理士 中村 行孝
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100094640
			弁理士 紺野 昭男
		(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝
		(74) 代理人	100137497
			弁理士 大森 未知子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規抗増殖性化合物

(57) 【要約】

本発明は、イン・ビトロおよび/またはイン・ビボにおいて腫瘍細胞の増殖を阻害可能な新規な単離された抗体（この抗体は機能的スクリーニングによって得られたものである）、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。より詳しくは、本発明は、J A M - A タンパク質に特異的な6 F 4 抗体、ならびに癌処置のためのその使用に関する。このような抗体からなる医薬組成物も含まれる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも配列番号 1、2、3、4、5 もしくは 6 を含んでなる配列の C D R、またはその配列が最適なアライメントの後に配列番号 1、2、3、4、5 もしくは 6 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する少なくとも 1 つの C D R の中から選択される少なくとも 1 つの C D R を含んでなる、イン・ビトロおよび / またはイン・ビボにおいて腫瘍細胞の増殖を阻害可能な単離された抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 2】

モノクローナル抗体からなる、請求項 1 に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

10

【請求項 3】

配列番号 2、4 および 6 の配列の 3 つの C D R のうち少なくとも 1 つ、または最適なアライメントの後に配列番号 2、4 もしくは 6 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する少なくとも 1 つの配列を含んでなる重鎖を含んでなる、請求項 1 または請求項 2 に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 4】

それぞれ C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 である下記の 3 つの C D R :

C D R - H 1 は、配列番号 2、7 もしくは 9 の配列、または最適なアライメントの後に配列番号 2、7 もしくは 9 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなり、

20

C D R - H 2 は、配列番号 4 もしくは 11 の配列、または最適なアライメントの後に配列番号 4 もしくは 11 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなり；かつ

C D R - H 3 は、配列番号 6 もしくは 12 の配列、または最適なアライメントの後に配列番号 6 もしくは 12 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなる重鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 5】

配列番号 7 の配列の C D R - H 1、配列番号 4 の配列の C D R - H 2 および配列番号 12 の配列の C D R - H 3 を含んでなる重鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

30

【請求項 6】

配列番号 9 の配列の C D R - H 1、配列番号 11 の配列の C D R - H 2 および配列番号 6 の配列の C D R - H 3 を含んでなる重鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 7】

配列番号 1、3 および 5 の配列の 3 つの C D R のうち少なくとも 1 つ、または最適なアライメントの後に配列番号 1、3 および 5 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する少なくとも 1 つの配列を含んでなる軽鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

40

【請求項 8】

それぞれ C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 である下記の 3 つの C D R :

C D R - L 1 は、配列番号 1 もしくは 8 の配列、または最適なアライメントの後に配列番号 1 もしくは 8 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなり、

C D R - L 2 は、配列番号 3 もしくは 10 の配列、または最適なアライメントの後に配列番号 3 もしくは 10 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなり；かつ

C D R - L 3 は、配列番号 5 の配列、または最適なアライメントの後に配列番号 5 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなる軽鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体、またはその

50

誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 9】

配列番号 1 の配列の C D R - L 1、配列番号 3 の配列の C D R - L 2 および配列番号 5 の配列の C D R - L 3 を含んでなる軽鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 10】

配列番号 8 の配列の C D R - L 1、配列番号 10 の配列の C D R - L 2 および配列番号 5 の配列の C D R - L 3 を含んでなる軽鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 11】

下記の 3 つの C D R :

配列番号 1 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 1 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - L 1 ;

配列番号 3 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 3 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - L 2 ; および

配列番号 5 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 5 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - L 3

を含んでなる軽鎖と、

下記の 3 つの C D R :

配列番号 7 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 7 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - H 1 ;

配列番号 4 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 4 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - H 2 ; および

配列番号 12 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 12 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - H 3

を含んでなる重鎖と

を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 12】

下記の 3 つの C D R :

配列番号 8 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 8 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - L 1 ;

配列番号 10 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 10 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - L 2 ; および

配列番号 5 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 5 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - L 3

を含んでなる軽鎖と、

下記の 3 つの C D R :

配列番号 9 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 9 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - H 1 ;

配列番号 11 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 11 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - H 2 ; および

配列番号 6 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 6 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - H 3

を含んでなる重鎖と

を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 13】

配列番号 13 のアミノ酸配列または最適なアライメントの後に配列番号 13 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなる軽鎖配列を含んでなり、かつ、配列番

10

20

30

40

50

号 14 のアミノ酸配列または最適なアライメントの後に配列番号 14 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなる重鎖配列を含んでなる、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 14】

配列番号 17 のアミノ酸配列または最適なアライメントの後に配列番号 17 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなる軽鎖配列を含んでなり、かつ、配列番号 18 もしくは 19 のアミノ酸配列または最適なアライメントの後に配列番号 18 もしくは 19 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなる重鎖配列を含んでなる、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

10

【請求項 15】

誘導化合物が、初期抗体のパラトピック認識特性の総てまたは一部を保存するように少なくとも 1 つの CDR がグラフトされているペプチドスキャフォールドを含んでなる結合タンパク質からなる、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 16】

ペプチドスキャフォールドが、a) 系統発生的によく保存されており、b) 強固な構造であり、c) 周知の三次元分子構成を有し、d) サイズが小さく、および / または e) 安定性を改変することなく欠失および / または挿入により改変可能な領域を含んでなるタンパク質の中から選択される、請求項 15 に記載の抗体またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

20

【請求項 17】

前記ペプチドスキャフォールドが、i) フィブロネクチン、優先的にはフィブロネクチン 3 型ドメイン 10 に由来するスキャフォールド、リボカリン、アンチカリン、黄色ブドウ球菌の A タンパク質のドメイン B に由来する Z タンパク質、チオレドキシン A、もしくは「アンキリンリピート」、「アルマジロリピート」、「ロイシンリッチリピート」および「テトラトリコペプチドリピート」などの繰り返しモチーフを有するタンパク質、または ii) ニューロン NO シンターゼのタンパク質阻害剤 (PIN) のの中から選択される、請求項 15 または請求項 16 に記載の抗体またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

30

【請求項 18】

前記機能的フラグメントが、フラグメント Fv、Fab、(Fab')₂、Fab'、scFv、scFv-Fc およびダイアボディー、または PEG 化フラグメントなどの半減期が延長されているいずれかのフラグメントの中から選択される、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 19】

前記抗体がネズミ抗体であり、および配列番号 15 のアミノ酸配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 15 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の軽鎖と、配列番号 16 のアミノ酸配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 16 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の重鎖とを含んでなる、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

40

【請求項 20】

前記抗体が、マウスとは異種の抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域も含んでなるキメラ抗体である、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 21】

前記の異種がヒトである、請求項 20 に記載のキメラ抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 22】

ヒト抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域がそれぞれ または 領域および - 1

50

、 - 2 または - 4 領域である、請求項 2 1 に記載のヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント

【請求項 2 3】

2 0 0 6 年 7 月 6 日に I - 3 6 4 6 番として the CNCM, Pasteur Institute, Paris に提出されたネズミハイブリドーマ。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載のハイブリドーマにより分泌される抗体。

【請求項 2 5】

J A M - A (結合部接着分子 - A) タンパク質と特異的に結合できる、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

10

【請求項 2 6】

J A M - A タンパク質に対する K d がおよそ 1 n M ~ 1 p M の間、より優先的には 1 0 p M ~ 4 0 p M の間である、請求項 2 5 に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 2 7】

下記の核酸：

a) 請求項 1 ~ 2 2 および 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントをコードする核酸、D N A または R N A ；

b) a) で定義された核酸と相補的な核酸；

c) 高ストリンジェント条件下で配列番号 2 0 ~ 3 1 の核酸配列の C D R の少なくとも 1 つとハイブリダイズし得る少なくとも 1 8 ヌクレオチドの核酸；および

20

d) 高ストリンジェント条件下で少なくとも配列番号 3 2 もしくは 3 6 の核酸配列の軽鎖および / または配列番号 3 3 、 3 7 もしくは 3 8 の核酸配列の重鎖とハイブリダイズし得る少なくとも 1 8 ヌクレオチドの核酸

の中から選択される単離された核酸。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の核酸からなるベクター。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 3 0】

請求項 2 9 に記載のベクターにより形質転換された細胞を含んでなる、ヒト以外のトランスジェニック動物。

30

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 2 2 および 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントを製造する方法であって、下記の工程：

a) 請求項 2 9 に記載の宿主細胞の培地で、請求項 2 9 に記載の宿主細胞に好適な培養条件にて培養すること；および

b) このようにして培養培地から、または培養細胞から生産された抗体またはその機能的フラグメントの 1 つを回収すること

を含む、方法。

40

【請求項 3 2】

二重特異性抗体からなり、受容体 V E G F R 、 V E G F 、 E G F R 、 I G F - 1 R 、 H E R 2 n e u 、 H G F 、 c M E T 、 F G F 、 C X C R 4 および C X C R 2 の中から選択される、腫瘍発達に関連する受容体と相互作用し得る第二のモチーフを含んでなる、請求項 1 ~ 2 2 および 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 3 3】

薬剤として用いるための、請求項 1 ~ 2 2 、 2 4 ~ 2 6 および 3 2 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 3 4】

50

請求項 1 ~ 2 2、2 4 ~ 2 6、3 2 および 3 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントからなる化合物を有効成分として含んでなる、組成物。

【請求項 3 5】

同時、個別または継続形式で用いるための組合せ製品として、J A M - A タンパク質に対する抗体以外の抗腫瘍抗体をさらに含んでなる、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

同時、個別または継続形式で用いるための組合せ製品として、細胞傷害性 / 細胞増殖抑制剤をさらに含んでなる、請求項 3 4 または請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記細胞傷害性 / 細胞増殖抑制剤が同時使用のための前記組成物の少なくとも 1 つの要素と化学的に結合されている、請求項 3 6 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

少なくとも 1 つの前記抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントが、細胞毒および / または放射性同位元素にコンジュゲートされている、請求項 3 4 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 9】

薬剤として用いるための、請求項 3 4 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 0】

腫瘍細胞の増殖に関連する疾病の予防または治療のための薬剤の製造のための、請求項 1 ~ 2 2、2 4 ~ 2 6、3 2 および 3 4 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント、および / または請求項 3 3 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 4 1】

癌の予防または治療のための薬剤の製造のための、請求項 4 0 に記載の使用。

【請求項 4 2】

前記癌が前立腺癌、骨肉腫、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、多発性骨髄腫、卵巣癌、膵臓癌および結腸癌の中から選択される癌である、請求項 4 1 に記載の使用。

【請求項 4 3】

前記癌がエストロゲン関連乳癌、非小細胞肺癌、結腸癌および膵臓癌の中から選択される癌である、請求項 4 2 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、腫瘍増殖を阻害可能な新規抗体、特にネズミモノクローナル抗体、キメラおよびヒト化抗体、ならびにこのような抗体をコードするアミノ酸配列および核酸配列に関する。一態様から、本発明は、腫瘍細胞の増殖を阻害可能な新規抗体、誘導化合物または機能的フラグメントに関する。本発明はまた、癌の予防的および / または治療的処置のための、ならびに癌診断に関連する手法またはキットにおける薬剤としてのこのような抗体の使用を含む。最後に、本発明はこのような抗体を他の抗体などの抗癌化合物と組み合わせて含む、または毒素とコンジュゲートされた組成物、特定の癌の予防および / または治療のためのその使用を含む。

【0002】

一般に、モノクローナル抗体の製造のために選択される基準は、可能性のある治療標的として特定された免疫原の認識である。実際には、マウスを免疫原に相当する組換えタンパク質で免疫し、マウスによって産生されたモノクローナル抗体を回収した後、それらをまず、免疫原を特異的に認識するそれらの能力に関してスクリーニングする。第二の工程で、このようにして選択された抗体を、それらの活性ならびにそれらの特性および / または作用機序を決定するためにイン・ビボおよびイン・ビトロで試験する。

【0003】

10

20

30

40

50

この「伝統的な」アプローチは、最初から機能する標的を知ることができるとしても、多くの場合、所与の標識を確かに特異的に認識し得るが、イン・ビボにおいて有意な生物活性を示さない多数の抗体を生じる。癌の分野では、抗体がイン・ビトロで良い結果を生じるとしても、このような抗体はその後、イン・ビボで本当の抗体活性を示すことを必ずしも意味するのではないということが実際に知られている。

【0004】

本発明は「機能的」アプローチ、より詳しくは認識される抗原ではなく、抗体に求められる機能に基づく一次スクリーニングを基にしていることから、先行するこのようなものとは異なり、上述に背反さえる。

【0005】

より詳しくは、本発明者らは、抗体選択パラメーターとして、ある機能、すなわち、細胞の基本増殖（誘導型のものではない）の阻害を選択した。

【0006】

用いる生産法は以下の実施例でさらに詳しく記載する。

【0007】

驚くべきことに、この機能的アプローチにより、発明者らはイン・ビトロおよび/またはイン・ビボにおいて腫瘍細胞の増殖を有意に阻害可能な抗体を作製および選択した。

【0008】

第一の態様によれば、本発明はイン・ビトロおよび/またはイン・ビボにおいて腫瘍細胞の増殖を阻害可能な単離された抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関し、該抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号1、2、3、4、5もしくは6の配列の相補性決定領域（CDR）の中から選択される少なくとも1つのCDR、またはその配列が最適なアライメントの後に配列番号1、2、3、4、5もしくは6の配列と少なくとも80%、好ましくは、85%、90%、95%および98%の同一性を有する少なくとも1つのCDRを含む。

【0009】

抗体の「機能的フラグメント」とは、特に、フラグメントFv、scFv（sc＝単鎖）、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fcもしくはダイアボディー、またはその半減期が延長されているいずれかのフラグメントなどの抗体フラグメントを意味する。このような機能的フラグメントは本明細書の後段で詳細に記載される。

【0010】

抗体の「誘導化合物」はペプチドスキャフォールド（scaffold）と、その被認識力を保存するために元の抗体の少なくとも1つのCDRとからなる結合タンパク質を意味する。当業者に公知のこのような誘導化合物は本明細書の後段で詳細に記載される。

【0011】

より好ましくは、本発明は、本発明の抗体、それらの誘導化合物またはそれらの機能的フラグメント、特に、遺伝子組換えまたは化学合成によって得られたキメラまたはヒト化抗体を含む。

【0012】

好ましい実施形態によれば、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントはモノクローナル抗体からなることを特徴とする。

【0013】

「モノクローナル抗体」は、ほぼ均質な抗体集団から得られる抗体を意味するものと理解される。より詳しくは、集団の個々の抗体は、最小の比率で見られる可能性のある少数の天然突然変異以外は同一である。言い換えれば、モノクローナル抗体は単細胞クローン（例えば、ハイブリドーマ、均質な抗体をコードするDNA分子でトランスフェクトされた真核生物宿主細胞、均質な抗体をコードするDNA分子でトランスフェクトされた原核生物宿主細胞など）の増殖から生じる均質な抗体からなり、一般に、1つ、および1つのクラス、またサブクラスのための重鎖と一種のための軽鎖を特徴とする。モノクローナル抗体は極めて特異的であり、単一の抗原に向けられる。さらに、一般に、種々の決定基または

10

20

30

40

50

エピトープに対する種々の抗体を含むポリクローナル抗体の調製とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原の単一のエピトープに向けられる。

【 0 0 1 4 】

ここで、本発明は天然型の抗体に関するのではなく、すなわち、それらは天然環境から採取されたものではないが、天然源からの精製により単離または取得されたか、あるいは遺伝子組み換えまたは化学合成によって取得され、従って、それらは後述されるように非天然アミノ酸を有し得ると理解すべきである。

【 0 0 1 5 】

より詳しくは、本発明の好ましい実施形態によれば、該抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 1、3 もしくは 5 のアミノ酸配列の C D R の中から選択される少なくとも 1 つの C D R、またはその配列が最適なアライメントの後に配列番号 1、3 もしくは 5 の配列と少なくとも 8 0 %、好ましくは 8 5 %、9 0 %、9 5 % および 9 8 % の同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を含んでなる軽鎖を含むか、あるいは配列番号 2、4 もしくは 6 のアミノ酸配列の C D R の中から選択される少なくとも 1 つの C D R、またはその配列が最適なアライメントの後に配列番号 2、4 もしくは 6 の配列と少なくとも 8 0 %、好ましくは 8 5 %、9 0 %、9 5 % および 9 8 % の同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 1 6 】

より詳しくは、本発明の抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの 1 つは、配列番号 2、4 および 6 の配列の 3 つの C D R のうち少なくとも 1 つ、または最適なアライメントの後に配列番号 2、4 もしくは 6 の配列と少なくとも 8 0 %、好ましくは 8 5 %、9 0 %、9 5 % および 9 8 % の同一性を有する少なくとも 1 つの配列を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 1 7 】

さらにより好ましくは、本発明の抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの 1 つは、それぞれ C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 の下記の 3 つの C D R :

C D R - H 1 は、配列番号 2、7 もしくは 9 の配列、または最適なアライメントの後に配列番号 2、7 もしくは 9 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなり、

C D R - H 2 は、配列番号 4 もしくは 1 1 の配列、または最適なアライメントの後に配列番号 4 もしくは 1 1 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなり；かつ

C D R - H 3 は、配列番号 6 もしくは 1 2 の配列、または最適なアライメントの後に配列番号 6 もしくは 1 2 の配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 1 8 】

特定の実施形態によれば、抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの 1 つは、配列番号 7 の配列の C D R - H 1、配列番号 4 の配列の C D R - H 2 および配列番号 1 2 の配列の C D R - H 3 を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 1 9 】

別の特定の実施形態によれば、抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの 1 つは、配列番号 9 の配列の C D R - H 1、配列番号 1 1 の配列の C D R - H 2 および配列番号 6 の配列の C D R - H 3 を含んでなる重鎖を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 2 0 】

別の実施形態によれば、本発明の抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの 1 つは、配列番号 1、3 および 5 の 3 つの C D R のうち少なくとも 1 つ、または最適なアライメントの後に配列番号 1、3 もしくは 5 の配列と少なくとも 8 0 %、好ましくは 8 5 %、9 0 %、9 5 % および 9 8 % の同一性を有する少なくとも 1 つの配列を含

10

20

30

40

50

んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とする。

【0021】

好ましい様式では、本発明の抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの1つは、それぞれCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3の下記の3つのCDR：

CDR-L1は、配列番号1もしくは8の配列、または最適なアライメントの後に配列番号1もしくは8の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含んでなり；

CDR-L2は、配列番号3もしくは10の配列、または最適なアライメントの後に配列番号3もしくは10の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含んでなり；かつ

CDR-L3は、配列番号5の配列、または最適なアライメントの後に配列番号5の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含んでなる
を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とする。

【0022】

特定の実施形態によれば、抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの1つは、配列番号1の配列のCDR-L1、配列番号3の配列のCDR-L2および配列番号5の配列のCDR-L3を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とする。

【0023】

別の特定の実施形態によれば、抗体、またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの1つは、配列番号8の配列のCDR-L1、配列番号10の配列のCDR-L2および配列番号5の配列のCDR-L3を含んでなる軽鎖を含んでなることを特徴とする。

【0024】

本明細書において「ポリペプチド」、「ポリペプチド配列」、「ペプチド」および「抗体化合物またはそれらの配列と結合しているタンパク質」は互換的なものである。

【0025】

ここで、本発明は天然型の抗体に関するのではなく、すなわち、それらは天然環境から採取されたものではないが、天然源からの精製により単離または取得されたか、あるいは遺伝子組み換えまたは化学合成によって取得され、従って、それらは後述されるように非天然アミノ酸を有し得ると理解すべきである。

【0026】

第一の実施形態において、相補性決定領域、またはCDRは、Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991およびその後続版)により定義されているような免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域を意味する。3つの重鎖CDRと3つの軽鎖CDRがある。ここで、「CDR」とは、抗原または抗体が認識するエピトープに対する抗体の結合親和性を担うアミノ酸残基の大部分を含む領域の、場合によって1以上またはさらには総てを示すために用いる。

【0027】

第二の実施形態において、CDR領域またはCDRとは、IMGTによって定義されているような免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域を示すものとする。

【0028】

IMGTユニークナンバリングは、抗原受容体、鎖のタイプまたは種が何であれ、可変ドメインに匹敵すると定義されている[Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V.およびLefranc, Dev. Comp. Immunol, 27, 55-77 (2003)]。IMGTユニークナンバリングでは、例えば、システイン23(1st-CYS)、トリプトファン41(CONSERVED-TRP)、疎水性アミノ酸89、システイン104(2nd-CYS)、フェニルアラニンまたはトリプトファン118(J-PHEまたはJ-TRP)など、保存され

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

最後に、CDR-H3は、共通ナンバリングシステムとk a b a tナンバリングシステムでは配列番号6 (Q T D Y F D Y)であり、I M G Tナンバリングシステムでは配列番号12 (A R Q T D Y F D Y)である。

【 0 0 3 8 】

本発明の意味において、2配列の核酸またはアミノ酸間の「同一性%」は、最適なアライメントの後に得られる、比較する2配列間で同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージを意味し、このパーセンテージは単に統計的なものであり、2配列間の違いはそれらの長さに添ってランダムに分布している。2つの核酸またはアミノ酸配列の比較は従来、それらを最適にアラインした後にそれらの配列を比較することにより行われ、この比較はセグメントで行うこともできるし、あるいは「アライメントウインドウ」を用いて行うこともできる。比較のための配列の最適なアライメントは、手による比較の他、Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482]のローカルホモロジーアルゴリズムの手段、Neddleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443]のローカルホモロジーアルゴリズムの手段、Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]の類似性検索法の手段、またはこれらのアルゴリズムを用いたコンピューターソフトウェア (the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) の G A P、B E S T F I T、F A S T A および T F A S T A または匹敵するソフトウェア B L A S T N R もしくは B L A S T P による) の手段によって行うことができる。

10

【 0 0 3 9 】

2つの核酸またはアミノ酸配列間の同一性%は2つの最適にアラインされた配列を比較することによって求められ、比較する核酸またはアミノ酸配列はその2配列間の最適なアライメントのための参照配列と比較して付加または欠失を有する可能性がある。同一性%は、その2配列間でアミノ酸、ヌクレオチドまたは残基が同じである位置の数を求め、そのアライメントウインドウにおいて、同一の位置の数を位置の総数で割り、その結果に100を掛けて2配列間の同一性%を得ることで算出される。

20

【 0 0 4 0 】

例えば、サイト <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html> で入手可能な B L A S T プログラム「BLAST 2 sequences」(Tatusova et al, "Blast 2 sequences- a new tool for comparing protein and nuclotide sequences", FEMS Microbiol, 1999, Lett. 174:247-250) を、デフォルトパラメーター (特にパラメーターとしては、「オープンギャップペナルティー」: 5 および「エクステンションギャップペナルティー」: 2 ; 選択マトリックスは、例えばプログラムにより提案された「B L O S U M 6 2」マトリックスである) とともに用いることができ、比較する2配列間の同一性%はそのプログラムによって直接算出される。

30

【 0 0 4 1 】

参照アミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を示すアミノ酸配列では、好ましい例は、参照配列、特定の修飾、特に、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、付加または置換、末端切断または延長を含むものが挙げられる。1以上の保存的または非保存的アミノ酸の置換の場合、置換は置換されるアミノ酸が「等価な」アミノ酸に置き換えられることが好ましい。ここで、「等価なアミノ酸」とは、対応する抗体の生物活性を改変することなく構造アミノ酸の、また、以下に定義される特定の例の1つに置換され得るいずれのアミノ酸も示すものとする。

40

【 0 0 4 2 】

等価なアミノ酸は、それらが置換されるアミノ酸との構造的相同性か、または生成され得る種々の抗体間の生物活性の比較試験の結果のいずれかに基づいて決定することができる。

【 0 0 4 3 】

限定されない例としては、下表1は、対応する修飾抗体の生物活性の有意な改変をもたらさずに実施可能な可能性のある置換をまとめたものであり、逆の置換も同じ条件で本来可能である。

【表 1】

表 1

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

【0044】

当業者ならば、当技術分野の現状で、6つのCDR間で最も大きな変動（長さおよび組成）は3つの重鎖CDR、より詳しくは、この重鎖のCDR-H3に見られることが分かるであろう。結果として、本発明の抗体またはそれらの誘導化合物もしくは機能的フラグメントの1つの、好ましい特徴的なCDRは重鎖の3つのCDR、すなわち、それぞれ配列番号2、4および6の配列によりコードされているCDR、さらにより優先的には、配列番号6の配列によりコードされているCDR-H3に相当するCDRである。

【0045】

特定の実施形態において、本発明は、ネズミ抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0046】

本発明の別の実施形態は、下記の3つのCDR：

配列番号1の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号1の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L1；

配列番号3の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号3の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L2；および

配列番号5の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号5の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-L3

を含んでなる軽鎖と、下記の3つのCDR：

配列番号7の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号7の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR-H1；

10

20

30

40

50

配列番号 4 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 4 の配列と少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を有する配列の C D R - H 2 ; および

配列番号 1 2 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 1 2 の配列と少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を有する配列の C D R - H 3

を含んでなる重鎖とを含んでなる、抗体またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントを開示する。

【 0 0 4 7 】

本発明のさらに別の実施形態は、下記の 3 つの C D R :

10

配列番号 8 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 8 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - L 1 ;

配列番号 1 0 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 1 0 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - L 2 ; および

配列番号 5 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 5 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - L 3

を含んでなる軽鎖と、下記の 3 つの C D R :

配列番号 9 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 9 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - H 1 ;

配列番号 1 1 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 1 1 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - H 2 ; および

20

配列番号 6 の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号 6 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R - H 3

を含んでなる重鎖とを含んでなる、抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントを開示する。

【 0 0 4 8 】

さらに別の実施形態によれば、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、配列番号 1 3 のアミノ酸配列、または最適なアライメントの後に配列番号 1 3 の配列と少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を有する配列を含んでなる軽鎖配列を含んでなること ; かつ、配列番号 1 4 の配列、または最適なアライメントの後に配列番号 1 4 のアミノ酸配列と少なくとも 80 %、好ましくは 85 %、90 %、95 % および 98 % の同一性を有する配列を含んでなる重鎖配列を含んでなることを特徴とする。

30

【 0 0 4 9 】

また、配列番号 1 7 のアミノ酸配列、または最適なアライメントの後に配列番号 1 7 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなる軽鎖配列を含んでなり、かつ、配列番号 1 8 もしくは 1 9 のアミノ酸配列、または最適なアライメントの後に配列番号 1 8 もしくは 1 9 の配列と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含んでなる重鎖配列を含んでなることを特徴とする、ヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントも開示される。

40

【 0 0 5 0 】

すぐ上に示したように、本発明はまた、本発明に記載されるような抗体から誘導された化合物に関する。より詳しくは、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、該誘導化合物が初期抗体のパラトープ認識特性の総てまたは一部が保存されるように少なくとも 1 つの C D R がグラフトされたペプチドスキャフォールドを含んでなる結合タンパク質であることを特徴とする。

【 0 0 5 1 】

本明細書に記載されている 6 つの C D R 配列のうち 1 以上の配列は、種々の免疫グロブリンタンパク質スキャフォールド上にも存在し得る。この場合、このタンパク質配列はグラフトされる C D R の折りたたみに都合のよいペプチド骨格を再生することができ、それ

50

らのパラトープ抗原認識特性を保存することが可能である。

【 0 0 5 2 】

一般に、当業者ならば、元の抗体に由来する少なくとも1つのCDRをグラフトするためのタンパク質スキファールドの種類をどのようにして決定すればよいかを知っている。

【 0 0 5 3 】

より詳しくは、このようなスキファールドを選択するには、次のような判定基準の最大数を見たさなければならぬことが知られている(Skerra A., J. Mol. Recogn., 2000, 13:167-187)。

- ・ 系統発生的保存が良好なこと
- ・ 三次元構造が既知であること (例えば、結晶学、NMR分光法または当業者に公知の他のいずれかの技術による)
- ・ サイズが小さいこと
- ・ 転写後修飾が少ないか無いこと、および/または
- ・ 産生、発現および精製が容易なこと

【 0 0 5 4 】

このようなタンパク質スキファールドの起源は、限定されるものではないが、フィブロネクチンおよび優先的にはフィブロネクチンIII型ドメイン10、リポカリン、アンチカリン(Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のAタンパク質のドメインBに由来するZタンパク質、チオレドキシンA、または「アンキリンリピート」(Kohl et al, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、「アルマジロリピート」、「ロイシンリッチリピート」および「テトラトリコペプチドリピート」などの繰り返しモチーフを有するタンパク質の中から選択される構造であり得る。

【 0 0 5 5 】

例えば、サソリ、昆虫、植物、軟体動物などに由来する毒素のような毒素に由来するスキファールド、およびニューロンノシンターゼのタンパク質阻害剤(PIN)も挙げべきである。

【 0 0 5 6 】

限定されるものではないが、このようなハイブリッド構築の例としては、PINのループの1つにおける抗CD4抗体、すなわち、13B8.2のCDR-H1(重鎖)の挿入があり、このようにして得られた新たな結合タンパク質は元の抗体と同じ結合特性を保存している(Bes et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344)。単に例として、ネオカルジノスタチンのループの1つに抗リゾチームVHH抗体のCDR-H3(重鎖)をグラフトすることも挙げられる(Nicaise et al, Protein Science, 2004, 13(7):1882-1891)。

【 0 0 5 7 】

最後に、上記のように、このようなペプチドスキファールドは元の抗体に由来する1~6つのCDRを含み得る。好ましくは、必ずしも必要ではないが、当業者は重鎖由来の少なくとも1つのCDRを選択し、それは抗体の特異性を主として担うことが知られている。1以上の適切なCDRの選択は当業者には自明であり、次に、好適な既知の技術を選択することができる(Bes et al, FEBS letters 508, 2001, 67-74)。

【 0 0 5 8 】

本発明の特定の態様は、本発明の抗体から誘導された化合物を選択するための方法に関し、該誘導化合物はイン・ビトロおよび/またはイン・ビボで腫瘍細胞の増殖を阻害することができ、また、該誘導化合物は、少なくとも1つの抗体CDRがグラフトされるペプチドスキファールドを含んでなり、その方法は下記の工程：

a) イン・ビトロにおいて、少なくとも1つの抗体CDRがグラフトされたペプチドスキファールドからなる化合物を、増殖可能な腫瘍細胞を含む生体サンプルと接触させて、これらの細胞が増殖可能な条件下に置くこと；および

b) その化合物がこれらの腫瘍細胞の増殖を阻害することができれば、その化合物を選択することを特徴とし、また、該少なくとも1つのグラフトされたCDRが下記のCDR:

配列番号1、8の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号1、8の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR;

配列番号3、10の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号3、10の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR;

配列番号5の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号5の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR;

配列番号2、7、9の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号2、7、9の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR;

配列番号4、11の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号4、11の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR; および

配列番号6、12の配列の、または最適なアライメントの後に配列番号6、12の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列のCDR
の中から選択されることを特徴とする。

【0059】

好ましい様式によれば、その方法は、工程a)において、イン・ビトロにおいて少なくとも2つまたは3つの抗体CDRがグラフトされているペプチドスキャフォールドを含んでなる化合物を接触させることを含み得る。

【0060】

この方法のさらにより好ましい様式によれば、ペプチドスキャフォールドは、その構造が上述されたスキャフォールドまたは結合タンパク質の中から選択される。

【0061】

明らかにこれらの例は何ら限定されるものではなく、当業者に既知または自明の他のいずれの構造も本特許出願により付与される保護に包含されるものとみなされるべきである。

【0062】

よって、本発明は、ペプチドスキャフォールドが、a) 系統発生的によく保存されており、b) 強固な構造であり、c) 周知の三次元分子構成を有し、d) サイズが小さく、および/またはe) 安定性を改変することなく欠失および/または挿入により改変可能な領域を含んでなるタンパク質の中から選択されることを特徴とする抗体またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0063】

好ましい実施形態によれば、本発明の抗体またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、該ペプチドスキャフォールドが、i) フィブロネクチン、優先的にはフィブロネクチン3型ドメイン10、リボカリン、アンチカリン、黄色ブドウ球菌のAタンパク質のドメインBに由来すZタンパク質、チオレドキシンA、または「アンキリンリピート」(Kohl et al, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705)、「アルマジロリピート」、「ロイシンリッチリピート」および「テトラトリコペプチドリピート」などの繰り返しモチーフを有するタンパク質、またはii) ニューロンNOSインターゼのタンパク質阻害剤(PIN)の中から選択されることを特徴とする。

【0064】

本発明の別の態様は上記の抗体の機能的フラグメントに関する。

【 0 0 6 5 】

より詳しくは、本発明は、該機能的フラグメントがフラグメントF_v、F_ab、(F_ab')₂、F_ab'、s c F_v、s c F_v-F_cおよびダイアボディー、またはPEG化フラグメントなどの半減期が延長されているいずれかのフラグメントの中から選択されることを特徴とする抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントを対象とする。

【 0 0 6 6 】

本発明の抗体のこのような機能的フラグメントは、例えば、フラグメントF_v、s c F_v(s c = 単鎖)、F_ab、F(a b')₂、F_ab'、s c F_v-F_cもしくはダイアボディー、またはポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコールの付加(ペグ化)(PEG化フラグメントはF_v-PEG、s c F_v-PEG、F_ab-PEG、F(a b')₂-PEGおよびF_ab'-PEGと呼ばれる)などの化学修飾により、あるいはリポソーム、マイクロスフェアまたはPLGAの組み込みによりその半減期が延長されているいずれかフラグメントであり、該フラグメントは、一般的な様式で、それが由来する抗体の活性(部分的なものであっても)を著しく示し得る本発明の特徴的なCDRの少なくとも1つを有する。

10

【 0 0 6 7 】

好ましくは、該機能的フラグメントは、それらが由来する抗体の可変重鎖または軽鎖の部分配列を含んでなる、または含み、該部分配列は、それが由来する抗体と同じ結合特異性、および十分な親和性、好ましくは、それが由来する抗体の親和性の少なくとも1/100相当、より好ましくは少なくとも1/10を保持するに十分なものである。

20

【 0 0 6 8 】

このような機能的フラグメントは、それが由来する抗体の配列の少なくとも5つのアミノ酸、好ましくは6、7、8、10、15、25、50または100の連続するアミノ酸を含む。

【 0 0 6 9 】

好ましくは、これらの機能的フラグメントは、F_v、s c F_v、F_ab、F(a b')₂、F(a b')、s c F_v-F_cまたはダイアボディータイプのものであり、これらは一般に、それらが由来する抗体と同じ結合親和性を有する。本発明によれば、本発明の抗体のフラグメントは上記の抗体から、ペプシンまたはパパンを含む酵素消化などの方法により、および/または化学的還元によるジスルフィド橋の切断により得ることができる。これらの抗体フラグメントはまた、これもまた当業者に公知の組換え遺伝学技術により、または例えばApplied BioSystemsなどによって販売されているものなどの自動ペプチド合成装置の手段によるペプチド合成によって得ることもできる。

30

【 0 0 7 0 】

本発明はまた、該抗体がネズミ抗体であること、および配列番号15のアミノ酸配列の、または最適なアライメントの後に配列番号15の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列の軽鎖と、配列番号16のアミノ酸配列の、または最適なアライメントの後に配列番号16の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列の重鎖とを含んでなることを特徴とする、始原ネズミ抗体、すなわち、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントを対象とする。

40

【 0 0 7 1 】

より明確にするため、下表2は本発明の抗体に相当する種々のアミノ酸配列をまとめたものである。

【表 2】

表 2 (Mu. =ネズミ、Hu. =ヒト化)

抗体	CDR ナンバリング	重鎖	軽鎖	配列番号
6F4	一般		CDR-L1	1
			CDR-L2	3
			CDR-L3	5
		CDR-H1		2
		CDR-H2		4
		CDR-H3		6
	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	3
			CDR-L3	5
		CDR-H1		7
		CDR-H2		4
		CDR-H3		12
	Kabat		CDR-L1	8
			CDR-L2	10
			CDR-L3	5
		CDR-H1		9
		CDR-H2		11
		CDR-H3		6
			Mu.可変ドメイン	13
		Mu.可変ドメイン		14
			Mu.全体	15
		Mu.全体		16
			Hu.可変ドメイン	17
		Hu.可変ドメイン(V1)		18
		Hu.可変ドメイン(V2)		19

【0072】

本発明の別の特定の態様は、抗体がまた、マウスとは異種、すなわちヒトの抗体に由来する軽鎖および重鎖定常領域も含むことを特徴とする、キメラ抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0073】

本発明のさらに別の特定の態様は、ヒト抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域がそれぞれ または 領域および - 1、 - 2 または - 4 領域であることを特徴とする、ヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0074】

別の態様によれば、本発明は、本発明のモノクローナル抗体を分泌し得るネズミハイブリドーマ、特に、2006年7月6日にI-3646番としてフランスの微生物培養に関するセンター(CNCM, Pasteur Institute, Paris)に提出されたネズミ起源のハイブリドーマに関する。該ハイブリドーマはBalb/C免疫マウス脾細胞と骨髓腫Sp2/O-Ag14系統の細胞との融合によって得られたものである。

【0075】

抗体が2006年7月4日にI-3646番としてCNCMに提出されたハイブリドーマにより分泌されることを特徴とするモノクローナル抗体(ここでは6F4と呼ぶ)、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは明らかに本発明の一部をなす。

【0076】

本発明の抗体はまた、キメラまたはヒト化抗体も含む。

【 0 0 7 7 】

キメラ抗体は、ある種の抗体に由来する天然可変領域（軽鎖および重鎖）をその種とは異種の抗体の軽鎖および重鎖の定常領域と組み合わせて含むものである。

【 0 0 7 8 】

抗体またはそのキメラフラグメントは組換え遺伝学の技術を用いて作製することができる。例えば、キメラ抗体は、プロモーターと、本発明の非ヒト、特にネズミのモノクローナル抗体の可変領域をコードする配列とヒト抗体定常領域をコードする配列を含む組換えDNAをクローニングすることにより作製することができた。このようなある組換え遺伝子によりコードされている本発明のキメラ抗体は例えばマウス・ヒトキメラであってよく、この抗体の特異性はネズミDNAに由来する可変領域により決定され、そのイソ型はヒトDNAに由来する定常領域により決定される。キメラ抗体の作製方法については、Verhoeven et al. (BioEssays, 8:74, 1988)を参照。

10

【 0 0 7 9 】

「ヒト化抗体」とは、非ヒト起源の抗体に由来するCDR領域を含むが、その抗体分子の他の部分は1つの（またはいくつかの）ヒト抗体に由来している抗体を意味する。さらに、その骨格セグメント残基（FRと呼ばれる）のいくつかは結合親和性を保持するために改変可能である(Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988)。

【 0 0 8 0 】

本発明のヒト化抗体またはそのフラグメントは、当業者に公知の技術によって作製することができる（例えば、文献Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992;およびBebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992に記載されているものなど）。このようなヒト化抗体はin vitroにおける診断またはin vivoにおける予防処置および/もしくは治療処置を含む方法におけるそれらの使用に好ましい。例えば、PDLにより特許EP 0 4 5 1 2 6 1、EP 0 6 8 2 0 4 0、EP 0 9 3 9 1 2 7、EP 0 5 6 6 6 4 7またはUS 5, 530, 101、US 6, 180, 370、US 5, 585, 089およびUS 5, 693, 761に記載されている「CDRグラフト」技術などの他のヒト化技術も当業者に知られている。米国特許第5, 639, 641号または同第6, 054, 297号、同第5, 886, 152号および同第5, 877, 293号も挙げられる。

20

30

【 0 0 8 1 】

さらに、本発明はまた、上記のネズミ抗体に由来するヒト化抗体に関する。

【 0 0 8 2 】

より詳しくは、6F4抗体のためのヒト化法は、軽鎖および重鎖に関してそれぞれ実施例2および3に詳細に記載されている。

【 0 0 8 3 】

好ましい様式では、ヒト抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域はそれぞれ またはおよび - 1、 - 2または - 4領域である。

【 0 0 8 4 】

IgG1イソ型IgG1に相当する実施形態では、その抗体のさらなる特徴は、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)などのエフェクター機能を示すことである。

40

【 0 0 8 5 】

本発明の別の態様では、出願者らはまた、本発明の抗体によって認識される抗原を同定した。

【 0 0 8 6 】

これを果たすために用いられる方法は下表4に詳細に記載されている。

【 0 0 8 7 】

JAM-Aは免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)に属す膜タンパク質であり、それは結合部接着分子(JAM)ファミリーに属する。ヒトでは、このJAMファミ

50

リーは、J A M - A、J A M - B、J A M - C、A 3 3 および A 3 4 タンパク質をはじめとするいくつかのメンバーを含んでなる。J A Mファミリーのメンバーのうち、J A M - AはJ A M - BおよびJ A M - Cと最も高い相同性を有し、アミノ酸ではおよそ35%の配列同一性、そしてこれら2つのタンパク質と45%の類似性を有する。J A M - Aタンパク質はまた、J A M A、F 1 1 R、F 1 1 受容体、J A M - 1、J A M 1、P A M - 1またはC D 3 2 1とも呼ばれる。

【0088】

細胞外領域の長さで異なるJ A M - A前駆体の2つのイソ型は、

イソ型 a : 2 9 9 アミノ酸 (配列番号 6 1)

イソ型 b : 2 5 9 アミノ酸 (配列番号 6 3)

と確認されている。

10

【0089】

これら2つのイソ型のヌクレオチド配列は、イソ型 a については配列番号 6 2 で、イソ型 b については配列番号 6 4 で表される。

【0090】

ヒト細胞の表面で発現されるタンパク質は、細胞内C末端ドメイン、1回膜貫通ドメイン(21アミノ酸)および2つの「I g 様」ドメインを含むN末端細胞外領域を有する単一のポリペプチド鎖を有する。

【0091】

J A M - Aは、N - グリコシル化部位、イソ型 a では185番に、そしてイソ型 b では145番にA s n 残基、および1つはI g N末端ドメインの50番と109番のC y s 残基の間、もう1つは第二のI g ドメインの153番と212番のC y s 残基の間に2つのジスルフィド橋を有する。

20

【0092】

2つの細胞外I g 様ドメインの存在は結晶学によって確認された(Kostrewa et al, 2001, EMBO J. 16:4391-4398; Prota et al, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:5366-5371)。これら2つのドメインはトリペプチドリッカー(配列V L V [1 2 7 ~ 1 2 9]、イソ型 A)により接続されている。これらの構造研究ではまた、細胞外領域を含む細胞表面上での同種親和性相互作用におけるJ A M - Aの関連が確認され、組換え型において産生され、溶液中でホモ二量体を形成し得る(Bazzoni et al, 2000, J. Biol. Chem. 275:30970-30976)この領域も、これらの相互作用に関与するアミノ酸: A r g 5 9、G l u 6 1、L y s 6 3、L e u 7 2、T y r 7 5、M e t 1 1 0、G l u 1 1 4、T y r 1 1 9 および G l u 1 2 1 の同定を可能とする。トリペプチドR V E [5 9 ~ 6 1] はJ A Mファミリー内で比較的保存されており(J A M - BではR L E、J A M - CではR I E)、ホモ二量体形成の最小モチーフとなる(Kostrewa et al, 2001, EMBO J. 16:4391-4398)。

30

【0093】

上皮細胞および内皮細胞では、J A M - Aは主として密着結合部で見られる(Liu et al, 2000, J. Cell Sci., 113:2363-2374)。この細胞質領域はC末端位にI I 型P D Zドメイン(配列F L V [2 9 8 ~ 3 0 0]、イソ型 a、J A M - Aと、密着結合に関連する種々のサイトゾルタンパク質との相互作用を担う)を含み、また、Z O - 1、A F - 6、M U P P - 1 および P A R - 3 などのP D Zドメインも含む(Ebnet et al, 2000, J. Biol. Chem., 275:27979-27988; Itoh et al, 2001, J. Cell Biol, 154:491-498; Hamazaki et al, 2002, J. Biol. Chem., 277:455-461)。二量体形成に関与する領域[1 1 1 ~ 1 2 3] に対するネズミ抗体、いわゆるJ 3 F . 1 およびJ 1 0 . 4 抗体はイン・ビトロにおいてJ A M - Aのホモ二量体形成および上皮バリアの再構築を阻害し得る(Mandell et al, 2004, J. Biol. Chem., 279:16254-16262)。

40

【0094】

J A M - Aはインテグリン_{v₃}と相互作用し、インテグリン_{v₃}のリガンドであるビトロネクチンへの内皮細胞の移動に関与する(Naik and Naik, 2005, J. Cell Sci.

50

119:490-499)。抗 J A M - A 抗体 J 3 F . 1 は、抗 $\alpha_v \beta_3$ 抗体と同様に、in vitroにおいて内皮細胞の移動および b F G F により誘発される脈管形成を阻害する(Naik et al., 2003, Blood, 102:2108-2114)。内皮細胞において、種々のシグナル伝達経路が証明されている：M A P キナーゼ、P I 3 - キナーゼおよび P K C (Naik et al., 2005, J. Cell Sci., 119:490-499; Naik et al., 2003, Blood, 102:2108-2114; Naik et al., 2003, Artheroscler. Thromb. Vase. Biol, 23:2165-2171)。

【 0 0 9 5 】

J A M - A はまた、単球、リンパ球、好中球および血小板でも発現される(Williams et al., 1999, Mol. Immunol, 36:1175-1188)。しかしながら、J A M - A タンパク質は、当初は、血小板を活性化することができ、それらの凝集を誘発することができる抗体である F 1 1 抗体の受容体として同定されていた(Naik et al., 1995, Biochem. J., 310:155-162; Sobocka et al., 2000, Blood, 95:2600-2609)。ペプチド [2 8 ~ 6 0] および [9 7 ~ 1 0 9] は F 1 1 抗体エピトープに属し、血小板の活性化と凝集現象ならびにホモ二量体形成に関与している(Babinska et al., 2002, Thromb. Haemost., 87:712-721)。

【 0 0 9 6 】

ネズミ型の J A M - A に対するラット抗体 B V 1 1 は、in vitroおよびin vivoで単球の経内皮移動を阻害する(Del Maschio et al., 1999, J. Exp. Med., 190:1351-1356)。Ostermannおよび共同研究者(2002, Nature Immunol., 3:151-158)は、J A M - A が、炎症性応答の発達中にある種のケモカインに応答して過剰発現され、白血球の血管外遊出または炎症部位への移動に必要とされる $\alpha_L \beta_2$ または L F A - 1 (リンパ球機能関連抗原 1) インテグリンのリガンドであることを示した。J A M - A は、第二の I g 様ドメインを介して T リンパ球および好中球の接着および経内皮移動に寄与し(Ostermann et al., 2002, Nature Immunol, 3:151-158)、従って、炎症部位への白血球の補充に重要な役割を果たす。

【 0 0 9 7 】

J A M - A タンパク質はまた、ウイルス感染現象にも関連付けられる。J A M - A はまさに、付着タンパク質 1 と相互作用する手段によってある種の脳炎を担うウイルス、レオウイルスの受容体である(Barton et al., 2001, Cell 104:441-451)。抗 J A M - A 抗体 J 1 0 . 4 は、レオウイルスの J A M - A との結合を阻害する(Forrest et al, 2003, J. Biol. Chem., 278:48434-48444)。

【 0 0 9 8 】

これまでに、ヒト型の J A M - A に対する上記の抗体でイン・ビボ活性を示したものはなく、抗腫瘍活性はずっと低い。このような抗体は研究手段としてのみ用いられている。よって、前者の技術分野では、イン・ビトロおよびイン・ビボで活性のある抗腫瘍抗体は本当に無いのである。

【 0 0 9 9 】

特定の態様によれば、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、J A M - A タンパク質と特異的に結合できることを特徴とする(英名では「結合部接着分子」)。

【 0 1 0 0 】

さらに別の態様によれば、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、J A M - A に対しておおよそ 1 n M ~ おおよそ 1 p M の間の K_D を示すことを特徴とする。より好ましくは、この J A M - A に対する K_D はおおよそ 1 0 p M ~ おおよそ 4 0 p M の間である。

【 0 1 0 1 】

「 K_D 」とは、ある抗体 - 抗原複合体の解離定数を示す。 $K_D = K_{off} / K_{on}$ (K_{off} は抗体 - 抗原複合体からの抗体が解離する「解離速度」定数であり、 K_{on} は抗体が抗原と結合するレベルである)(Chen Y. et al, 1999, J.Mol.Biol, 293:865-881)。

【 0 1 0 2 】

本発明の新規な態様は、下記の核酸(いずれの縮重遺伝コードも含む)：

10

20

30

40

50

a) 本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントの1つをコードする核酸、DNAまたはRNA；

b) a) で定義された核酸と相補的な核酸；

c) 高ストリンジェント条件下で配列番号20～31の核酸配列のCDRの少なくとも1つと、または最適なアライメントの後に配列番号20～31の配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を有する配列とハイブリダイズし得る少なくとも18ヌクレオチドの核酸；および

d) 高ストリンジェント条件下で少なくとも配列番号32もしくは36の核酸配列の軽鎖および/または配列番号33、37もしくは38の核酸配列の重鎖と、あるいは最適なアライメントの後に配列番号32もしくは36および/または33、37もしくは38の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列とハイブリダイズし得る少なくとも18ヌクレオチドの核酸

の中から選択されることを特徴とする単離された核酸に関する。

【0103】

下表3は本発明の抗体に関する種々のヌクレオチド配列をまとめたものである。

【表3】

表 3

抗体	CDR ナンバリング	重鎖	軽鎖	配列番号
6F4	一般		CDR-L1	20
			CDR-L2	22
			CDR-L3	24
		CDR-H1		21
		CDR-H2		23
		CDR-H3		25
	IMGT		CDR-L1	20
			CDR-L2	22
			CDR-L3	24
		CDR-H1		26
		CDR-H2		23
		CDR-H3		27
	Kabat		CDR-L1	28
			CDR-L2	29
			CDR-L3	24
		CDR-H1		30
		CDR-H2		31
		CDR-H3		25
			Mu.可変ドメイン	32
		Mu.可変ドメイン		33
			Mu.全体	34
		Mu.全体		35
			Hu.可変ドメイン	36
		Hu.可変ドメイン(V1)		37
		Hu.可変ドメイン(V2)		38

【0104】

本明細書で互換的に用いられる「核酸」、「核配列」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」とは、改変型であれ非改変型であれ、核酸のあるフラグメントまたは領域を定義し、非天然ヌクレオチドを含むまたは含まない、二本鎖DNA、一本鎖DNAまたは該DNAの

転写産物のいずれかである厳密なヌクレオチド配列を意味する。

【0105】

ここで、本発明はそれらの天然染色体環境、すなわち天然状態のヌクレオチド配列に関するものではないことにも触れておかなければならない。本発明の配列は単離および／または精製されたものであり、すなわち、それらは例えば複製により直接的または間接的にサンプリングされ、それらの環境は少なくとも部分的に改変されている。組換え遺伝学により、例えば宿主細胞の手段により得られた、または化学合成により得られた単離された核酸もここに挙げておくべきであろう。

【0106】

「最適なアライメントの後に好ましい配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性%を示す核配列」とは、参照核配列に対して、特に、欠失、末端切断、延長、キメラ融合および／または置換（特に、点によるもの）などのある種の改変を示す核配列を意味する。好ましくは、これらは参照配列と同じアミノ酸配列をコードする配列であり、これは遺伝コードの縮重、または参照配列と、好ましくは高ストリンジェント条件下（特に、以下に定義されるもの）で特異的にハイブリダイズし得る相補的配列に関連する。

【0107】

高ストリンジェント条件下でのハイブリダイゼーションとは、温度およびイオン強度に関する条件が、2つの相補的DNAフラグメントの間でハイブリダイゼーションを維持させるように選択されることを意味する。単に例として、上記のポリヌクレオチドフラグメントを定義する目的でのハイブリダイゼーション工程の高ストリンジェント条件は有利には次の通りである。

【0108】

DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションは、2段階で行う：（1）42℃で3時間、5X SSC（1X SSCは0.15M NaCl + 0.015M クエン酸ナトリウムの溶液に相当する）、50%ホルムアミド、7%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、10Xデンハート溶液、5%デキストラン硫酸および1%サケ精子DNAを含有するリン酸バッファー（20mM、pH7.5）中でのプレハイブリダイゼーション；（2）プローブの長さに応じた温度（すなわち、プローブ>100ヌクレオチド長の場合は42℃）で20時間の予備ハイブリダイゼーションの後、20℃で20分、2X SSC + 2% SDS中での洗浄2回、20℃で20分、0.1X SSC + 0.1% SDS中での洗浄1回。最後の洗浄は、0.1X SSC + 0.1% SDS中、プローブ>100ヌクレオチド長の場合は60℃で30分行う。定義された大きさのポリヌクレオチドに対する上記の高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、当業者ならば、Sambrook, et al. (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001)に記載の手順に従って、より長いまたはより短いオリゴヌクレオチドのために適合させることができる。

【0109】

本発明はまた、本発明に記載されているような核酸を含んでなるベクターに関する。

【0110】

本発明は特に、このようなヌクレオチド配列を含むクローニングベクターおよび／または発現ベクターを対象とする。

【0111】

本発明のベクターは、好ましくは、ある宿主細胞においてヌクレオチド配列の発現および／または分泌を可能とするエレメントを含む。このように、ベクターはプロモーター、翻訳開始および終結シグナル、ならびに好適な転写調節領域を含まなければならない。それは宿主細胞において安定に維持され得るものでなければならず、所望により、翻訳されたタンパク質の分泌を指定する特異的シグナルを有してもよい。これら種々のエレメントは、当業者により、用いる宿主細胞に応じて選択および至適化される。この目的で、これらのヌクレオチド配列は選択された宿主内に自己複製ベクターにて挿入することもできる

し、あるいは選択された宿主の組込型ベクターであってもよい。

【0112】

このようなベクターは、当業者により一般に用いられている方法によって作製され、得られたクローンは、リポフェクション、エレクトロポレーション、熱ショックまたは化学法などの標準的な方法によって好適な宿主へ導入することができる。

【0113】

これらのベクターは例えばプラスミドまたはウイルス起源のベクターである。それらは本発明のヌクレオチド配列をクローニングまたは発現させるために宿主細胞を形質転換するのに用いられる。

【0114】

本発明はまた、本発明に記載されているようなベクターにより形質転換された、または本発明に記載されているようなベクターを含んでなる宿主細胞を含む。

【0115】

宿主細胞は細菌細胞、例えば、限定されるものではないが酵母作用、または動物細胞、特に哺乳類細胞などの原核生物系または真核生物系の中から選択することができる。また、昆虫細胞または植物細胞も使用可能である。

【0116】

本発明はまた、本発明の形質転換細胞を有するヒト以外の動物に関する。

【0117】

本発明の別の態様は、本発明の抗体またはその機能的フラグメントの1つの製造方法に関し、その方法は下記の工程：

a) 本発明の宿主細胞の培地で、本発明の宿主細胞に好適な培養条件にて培養すること；および

b) このようにして培養培地から、または培養細胞から生産された抗体またはその機能的フラグメントの1つを回収することを含むことを特徴とする。

【0118】

本発明の形質転換細胞は本発明の組換えポリペプチドの製造方法に用いられるものである。本発明のベクターおよび/またはベクターにより形質転換された細胞を用いることを特徴とする、本発明のポリペプチドを組換え型で製造する方法もまた本発明に含まれる。好ましくは、本発明のベクターにより形質転換された細胞は、前記ポリペプチドの発現および前記組換えペプチドの回収を可能とする条件下で培養される。

【0119】

すでに述べたように、宿主細胞は原核生物系または真核生物系の中から選択することができる。このような原核生物系または真核生物系において分泌を促進する本発明のヌクレオチド配列を同定することができる。従って、このような配列を有する本発明のベクターは分泌させる組換えタンパク質の産生に有利に使用することができる。実際、着目するこれらの組換えタンパク質の精製は、宿主細胞内よりもむしろ細胞培養の上清中に存在するという点で容易となる。

【0120】

本発明のポリペプチドはまた、化学合成によっても製造することができる。このような製造方法の1つも本発明の目的である。当業者ならば、固相技術（特に、Steward et al., 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed. 参照）または溶液中でのフラグメントの縮合もしくは慣例の合成による部分的固相技術などの化学合成法を知っている。化学合成法によって得られ、対応する非天然アミノ酸を含み得るポリペプチドも本発明に含まれる。

【0121】

本発明の方法によって取得され得る抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントも本発明に含まれる。

【0122】

さらに別の態様によれば、本発明は、さらにヒトチロシンキナーゼファミリー受容体と特異的に結合することができ、かつ/またはこのような受容体のチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害することができることを、上記のような抗体に関する。

【0123】

新規な実施形態によれば、本発明は、例えば、VEGFR、VEGF、EGFR、IGF-1R、HER2neu、HGF、cMET、FGF、テトラスパニン、インテグリン、CXCR4またはCXCR2など、腫瘍の発達に関連づけられている受容と相互作用し得る第二のモチーフを含むという意味で特異的である抗体からなる、抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0124】

第一の実施形態によれば、このようなある抗体は二重特異性抗体からなり、EGFとヒト上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)との結合を特異的に阻害し、かつ/または該EGFRのチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害する第二のモチーフを含む。本発明のさらにより好ましい態様によれば、該第二の抗EGFRモチーフはモノクローナル抗体セツキシマブ(cetuximab)(C225またはエルビタックス(erbitux))、マツズマブ(matuzumab)、huR3、HuMax-EGFRまたはパニツマブ(panitumab)に由来する。

【0125】

第二の実施形態によれば、本発明の抗体は二重特異性抗体からなり、HER2/neu受容体により調節される活性を特異的に阻害し、かつ/または該ER2/neu受容体のチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害する第二のモチーフを含む。より詳しくは、該第二の抗HER2/neuモチーフは、マウスモノクローナル抗体4D5もしくは2C4またはヒト化抗体トラスツズマブ(trastuzumab)もしくはペルツズマブ(pertuzumab)に由来する。

【0126】

第三の実施形態によれば、本発明の抗体は二重特異性抗体からなり、肝細胞増殖因子(HGF)とcMET受容体との結合を特異的に阻害し、かつ/または該cMET受容体のチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害する第二のモチーフを含む。

【0127】

第四の実施形態によれば、本発明の抗体は二重特異性抗体からなり、IGF-1R受容体により調節される活性を特異的に阻害し、かつ/または該IGF-1R受容体のチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害する第二のモチーフを含む。より詳しくは、該第二の抗IGF-1Rモチーフはマウスモノクローナル抗体7C10、対応するヒト化抗体h7C10(Goetsch et al, 国際特許出願WO 03/059951)、hEM164抗体(Maloney et al, Cancer Res., 2003, 63(16):5073-5083)、Abgenixにより開発された抗IGF-1R抗体(米国特許出願第2005/281812号参照)またはMab39、1H7(Li et al, Cancer Immunol. Immunother., 2000, 49(4-5):243-252)または4G11(Jackson-Booth et al, Horm. Metab. Res., 2003, 35(11-12):850-856)に由来する。

【0128】

最後に、第五の実施形態によれば、本発明の抗体は二重特異性抗体からなり、限定されない例として、VEGFR、VEGF、FGF(繊維芽細胞増殖因子)などの腫瘍発達に関連づけられているいずれかの受容体種、あるいはCXCR2またはCXCR4などのCXCR(ケモカイン受容体)ファミリーのいずれかのメンバーと相互作用し得る第二のモチーフを含む。

【0129】

また、リツキシマブ、イブリツモマブ(ibritumomab)またはトシツモマブ(tositumomab)などの抗CD20抗体;ゲムツズマブ(gemtuzumab)またはリンツズマブ(lintuzumab)などの抗CD33抗体;エブラツズマブ(epratuzumab)などの抗CD22抗体;アレムスズマブ(alemtuzumab)などの抗CD52抗体;エドレコロマブ(edrecolomav)、Ch17-1AまたはIGN-101などの抗EpCAM抗体;キサクチン(Xactin)などの抗CTP2

10

20

30

40

50

1 または 16 抗体；^{1 3 1} I - C o t a r a T N T - 1 などの抗 D N A - A g 抗体；ペムツモマブ(pemtumomab)または R 1 1 5 0 などの抗 M U C 1 抗体；A B X - M A 1 などの抗 M U C 1 8 抗体；ミツモマブ(mitumomab)などの抗 G D 3 抗体；C e a V a c またはラベツズマブ(labetuzumab)などの抗 E C A 抗体；O v a R e x などの抗 C A 1 2 5 抗体；アポリズマブ(apolizumab)などの抗 H L A - D R 抗体；M D X - 0 1 0 などの抗 C T L A 4 抗体；M D X - 0 7 0、^{1 1 1} I n & ^{9 0} Y - J 5 9 1、^{1 7 7} L u J 5 9 1、J 5 9 1 - D M 1 などの抗 P S M A 抗体；I G N 3 1 1 などの抗 L e w i s Y 抗体；A S 1 4 0 5 および 9 0 Y m u B C 1 などの抗脈管形成抗体；T R A I L R 1 m A b または T R A I L R 2 m A b などの抗 T r a i l - R 1 抗体なども挙げるのに適している。

【0130】

二重特異性または二機能性抗体は、2つの異なる可変領域が同じ分子内で組み合わされている第二世代のモノクローナル抗体である(Hollinger and Bohlen, 1999, Cancer and metastasis, rev. 18:411-419)。それらの有用性は診断および治療の両領域で、新たなエフェクター機能を動員する、または腫瘍細胞の表面にいくつかの分子を標的化するそれらの能力に関して実証されており、このような抗体は化学的手法(Glennie MJ et al, 1987, J. Immunol. 139, 2367-2375; Repp R. et al, 1995, J. Hemat., 377-382)または体細胞法(Staerz U.D. and Bevan M.J., 1986, PNAS 83, 1453-1457; Suresh M.R. et al, 1986, Method Enzymol, 121:210-228)だけでなく、優先的には、ヘテロ二量体形成を促し、従って、求める抗体の精製を容易にすることができる遺伝子工学技術によっても得ることができる(Merchand et al., 1998, Nature Biotech., 16:677-681)。

【0131】

これらの二重特異性抗体は、完全な I g G、二重特異性 F a b ' 2、F a b ' P E G、ダイアポディーまたは二重特異性 s c F v としてだけではなく、標的化される各抗原に対して2つの結合部位が存在する四価二重特異性抗体(Park et al, 2000, Mol. Immunol, 37(18):1123-30)または上記のようにそのフラグメントとしても構築することができる。

【0132】

二重特異性抗体の生産および投与が2つの特異性抗体を生産するよりも安価であるという経済的利点に加え、このような二重特異性抗体の使用は処置の毒性を軽減するという利点も有する。実際、二重特異性抗体を用いると、循環抗体の全体量を低くし、結果的に潜在的毒性を小さくすることができる。

【0133】

本発明の好ましい実施形態では、二重特異性抗体は二価または四価の抗体である。

【0134】

最後に、本発明は、薬剤として用いるための上記の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントに関する。

【0135】

本発明はまた、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントの1つからなる化合物を有効成分として含んでなる医薬組成物に関する。好ましくは、該抗体には賦形剤および/または薬学上許容される担体が添加される。

【0136】

さらに別の実施形態によれば、本発明はまた、I G F - 1 R、E G F R、H E R 2 / n e u、c M E T、V E G F R もしくは V E G F などの受容体のチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害することができる化合物、または当業者に公知の他のいずれかの抗腫瘍化合物の中から選択される第二の抗腫瘍化合物を少なくとも含んでなる上記のような医薬組成物に関する。本発明の第二の好ましい態様では、該第二の化合物は、または該受容体によって誘導される増殖活性および/または抗アポトーシ活性および/または脈管形成活性および/または内転移誘発活性を阻害し得る、単離された抗 E G F R、抗 I G F - 1 R、抗 H E R 2 / n e u、抗 c M E T、V E G F R、V E G F などの抗体、またはそれらの機能的フラグメントおよび誘導化合物の中から選択することができる。

【0137】

本発明のさらに別の実施形態によれば、該組成物はさらに、同時、個別または延長形式で用いるための組合せ製品として、I G F - 1 R、E G F R、H E R 2 / n e u、c M E TおよびV E G F Rなどの受容体のチロシンキナーゼ活性の少なくとも1つの阻害剤を含んでなる。

【0138】

別の好ましい実施形態では、これらの受容体のチロシンキナーゼ活性の阻害剤は、誘導型天然因子、ジアニリノフタルイミド、ピラゾロ - もしくはピロール - ピリドピリミジンまたはキナゾリンを含む群から選択される。このような阻害剤は当業者によく知られ、文献に記載されている(Ciardello F., Drugs 2000, Suppl. 1, 25-32)。

【0139】

本発明を補足する別の実施形態は、同時、個別または継続使用のための組合せ製品としてさらに細胞傷害性/細胞増殖抑制剤を含んでなる上記の組成物からなる。

【0140】

「同時使用」とは、単一の投与形に含まれる組成物の両化合物の投与を意味する。

【0141】

「個別使用」とは、異なる投与形に含まれる組成物の両化合物の同時投与を意味する。

【0142】

「継続使用」とは、異なる投与形に各々含まれる組成物の両化合物の逐次投与を意味する。

【0143】

一般に、本発明の組成物は癌処置の有効性を著しく高める。言い換えれば、本発明の抗体の治療効果は細胞傷害性薬剤の投与によって、予期されないように増強される。本発明の組成物によってもたらされる別の主要な次の利点は、有効成分のより低い有効用量を使用できる可能性に関し、従って、副作用、特に細胞傷害性薬剤の作用の出現のリスクを回避または軽減することを可能とする。さらに、この組成物は期待される治療効果をより早急に達成することを可能とする。

【0144】

「治療的抗癌薬」または「細胞傷害性薬剤」とは、患者に投与した際に、患者の癌の発達を治療または予防する物質を意味する。このような薬剤の限定されない例としては、「アルキル化」剤、代謝拮抗物質、抗腫瘍抗生物質、有糸分裂阻害剤、クロマチン機能阻害剤、抗脈管形成薬、抗エストロゲン作用薬、抗アンドロゲン作用薬および免疫調節剤が挙げられる。

【0145】

このような薬剤は、例えば、V I D A Lの、標題「細胞傷害性」として腫瘍学および血液学に関する化合物に当てられた頁に引用され、この文献に引用されている細胞傷害性化合物は本明細書において好ましい細胞傷害性薬剤として引用される。

【0146】

「アルキル化剤」とは、細胞内で任意の分子、優先的には核酸(例えばDNA)と共有結合することができる、またはアルキル化することができる任意の物質を指す。このようなアルキル化剤の例としては、メクロレタミン、クロラムブシル、メルファラン、クロルヒドレート、ピボプロマン、プレドニムスチン、リン酸二ナトリウムもしくはエストラムスチンなどのナイトロジェンマスタード;シクロホスファミド、アルトレタミン、トロフォスファミド、スルホホスファミドもしくはイフォスファミドなどのオキサザホスホリン;チオテパ、トリエチレンアミンもしくはアルテトラミンなどのアジリジンもしくはエチレン - イミン;カルムスチン、ストレプトゾシン、フォテムスチンもしくはロムスチンなどのニトロソ尿素;ブスルファン、トレオスルファンもしくはインプロスルファンなどのスルホン酸アルキル;ダカルバジンなどのトリアゼン;またはシスプラチン、オキサリプラチンもしくはカルボプラチンなどの白金複合体が挙げられる。

【0147】

「代謝拮抗物質」とは、ある種の活性、一般にはDNA合成を妨げることによって増殖

10

20

30

40

50

および/または細胞代謝を遮断する物質を指す。代謝拮抗物質の例としては、メトトレキサート、5 - フルオロウラシル、フロクスウリジン、5 - フルオロデオキシウリジン、カペシタビン、シタラビン、フルダラビン、シトシンアラビノシド、6 - メルカプトプリン (6 - M P)、6 - チオグアニン (6 - T G)、クロロデスオキシアデノシン、5 - アザシチジン、ゲムシタビン、クラドリビン、デオキシコフォルミシンおよびペントスタチンが挙げられる。

【0148】

「抗腫瘍抗生物質」とは、DNA、RNAおよび/またはタンパク質の合成を妨害または阻害し得る化合物を指す。このような抗腫瘍抗生物質の例としては、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、バルルビシン、ミトキサントロン、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、プリカマイシン、マイトマイシンC、ブレオマイシンおよびプロカルバジンが挙げられる。

10

【0149】

「有糸分裂阻害剤」は、細胞周期および有糸分裂の正常な進行を妨害する。一般に、バクリタキセルおよびドセタキセルなどの微小管阻害剤または「タキソイド」は有糸分裂を阻害し得る。ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンおよびビノレルビンなどのビンカルカロイドも有糸分裂を阻害し得る。

【0150】

「クロマチン阻害剤」または「トポイソメラーゼ阻害剤」は、トポイソメラーゼIおよびIIなどの、クロマチンを形成するタンパク質の正常な機能を阻害する物質である。このような阻害剤の例としては、トポイソメラーゼIとしては、カンプトテシンおよびその誘導体 (イリノテカンまたはトポテカンなど) ; トポイソメラーゼIIとしては、エトポシド、リン酸エチポシドおよびテニポシドが挙げられる。

20

【0151】

「抗脈管形成薬」は、血管の成長を阻害する薬剤、化合物、物質または因子である。抗脈管形成薬の例としては、限定されるものではないが、ラゾキシシン、マリマスタット、バチマスタット、プリノマスタット、タノマスタット、イロマスタット、CGS - 27023A、ハロフギロン、COL - 3、ネオバスタット、BMS - 275291、サリドマイド、CDC 501、DMXAA、L - 651582、スクアラミン、エンドスタチン、SU5416、SU6668、インターフェロン - 、EMD121974、インターロイキン - 12、IM862、アンギオスタチンおよびビタキシシンが挙げられる。

30

【0152】

「抗エストロゲン作用薬」または「エストロゲン拮抗薬」とは、エストロゲン作用を低下、拮抗または阻害する物質を指す。このような薬剤の例としては、タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ヨードキシフェン、アナストロゾール、レトロゾールおよびエキセメスタンが挙げられる。

【0153】

「抗アンドロゲン作用薬」または「アンドロゲン拮抗薬」とは、アンドロゲン作用を低下、拮抗または阻害する物質を指す。抗アンドロゲン作用薬の例としては、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、スピロノラクトン、酢酸シプロテロン、フィナステリドおよびシミチジンが挙げられる。

40

【0154】

免疫調節剤は、免疫系を刺激する物質である。免疫調節剤の例としては、インターフェロン、インターロイキン (アルデスロイキン、OCT - 43、デニロイキンディフチトクスもしくはインターロイキン - 2 など)、腫瘍壊死因子 (タソネルミンなど)、またはレンチナン、シゾフィラン、ロキニメックス、ピドチモド、ペガデマゼ、チモフェチン、ポリI : Cまたはレバミゾールと5 - フルオロウラシルの組合せなどの他種の免疫調節剤が挙げられる。

【0155】

さらに詳細なことについては、当業者ならば、「Therapeutic chemistry, vol. 6, Ant

50

itumor drugs and perspectives in the treatment of cancer, TEC and DOC edition, 2003 [仏語]と題されたthe French Association of Therapeutic Chemistry Teachersが刊行しているマニュアルを参照することができる。

【0156】

特に好ましい実施形態では、組合せ製品としての本発明の組成物は、同時使用のために前記細胞傷害性薬剤が前記抗体と化学的に結合されることを特徴とする。

【0157】

特に好ましい実施形態では、前記組成物は、前記細胞傷害性/細胞増殖抑制剤が紡錘体阻害剤または安定剤、好ましくは、ビノレルビンおよび/またはビンフルニンおよび/またはビンクリスチンの中から選択されることを特徴とする。

10

【0158】

該細胞傷害性薬剤と本発明の抗体の間の結合を容易にするために、結合される2つの化合物の間に、ポリ(アルキレン)グリコール、ポリエチレングリコールまたはアミノ酸などのスペーサー分子を導入することもできるし、あるいは別の実施形態では、その抗体と反応し得る官能基が導入された該細胞傷害性薬剤の活性な誘導体を使用することもできる。これらの結合技術は当業者によく知られ、本明細書ではこれ以上詳しく述べない。

【0159】

他のEGFR阻害剤としては、限定されるものではないが、モノクローナル抗体C225および抗EGFR 22 Mab (ImClone Systems Incorporated)、ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys)、EMD-7200 (Merck KgaA)または化合物ZD-1834、ZD-1838およびZD-1839 (AstraZeneca)、PKI-166 (Novartis)、PKI-166 / CGP-75166 (Novartis)、PTK 787 (Novartis)、CP 701 (Cephalon)、フルノミド (Pharmacia/Sugen)、CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis)、CI-1033 / PD 183、805 (Warner Lambert Parke Davis)、CL-387、785 (Wyeth-Ayerst)、BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche)、NaアミジンA (Bristol-board Myers Squibb)、RC-3940-II (Pharmacia)、BI BX-1382 (Boehringer Ingelheim)、OLX-103 (Merck & Co)、VRC TC-310 (Ventech Research)、EGF融合毒素 (Seragen Inc.)、DAB-389 (Seragen/Lilgand)、ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund)、RG-50864 (INSERM)、LFM-A12 (Parker Hughes Center Cancer)、WHI-P97 (Parker Hughes Center Cancer)、GW-282974 (Glaxo)、KT-8391 (Kyowa Hakko)または「EGFRワクチン」(York Medical/Centro of Immunologia Molecular)が挙げられる。

20

30

【0160】

本発明の別の態様は、前記抗体またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントの少なくとも1つが細胞毒素および/または放射性同位元素とコンジュゲートされていることを特徴とする組成物に関する。

【0161】

好ましくは、前記毒素または前記放射性同位元素は、腫瘍細胞の成長または増殖を妨害し得る、特に腫瘍細胞を完全に不活性化し得る。

【0162】

また好ましくは、前記毒素は細菌内毒素、特に、シュードモナス外毒素Aである。

40

【0163】

優先的に治療抗体と組み合わせられる放射性同位元素は、 α 線を放出する放射性同位元素であり、優先的には、ヨウ素¹³¹、イットリウム⁹⁰、金¹⁹⁹、パラジウム¹⁰⁰、銅⁶⁷、ビスマス²¹³およびアンチモン²¹¹である。 β 線および γ 線を放出する放射性同位元素も治療に使用可能である。「本発明の抗体またはその機能的フラグメントの少なくとも1つと組み合わせられた毒素または放射性同位元素」とは、特に、結合分子を導入して、または導入せずに、2つの化合物間を共有結合させることにより、該毒素または放射性同位元素を少なくとも1つの抗体と結合可能にするいずれの手段も指す。

【0164】

50

コンジュゲートの要素の総てまたは一部の化学結合（共有結合）、静電氣的結合、または非共有結合を可能にする薬剤の例としては、特に、ベンゾキノン、カルボジイミド、より詳しくは、EDC（１－エチル－３－〔３－ジメチル－アミノプロピル〕－カルボジイミド－ヒドロクロリド）、ジマレイミド、ジチオビス－ニトロ安息香酸（DTNB）、N－スクシンイミジルS－アセチルチオアセテート（SATA）、紫外線と反応する１以上のフェニルアシ(phenylaside)基を有する１以上基を有する架橋剤、最も優先的には、N－〔４－（アジドサリチルアミノ）ブチル〕－３’－（２’－ピリジルジチオ）－プロピオンアミド（APDP）、N－スクシンイミド－イル３（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）および６－ヒドラジノ－ニコチンアミド（HYNIC）が挙げられる。

10

【０１６５】

特に放射性同位元素に対する結合の別の形態は、二官能性イオンキレート剤の使用からなり得る。

【０１６６】

このようなキレート剤の例としては、金属、特に放射性金属と免疫グロブリンの結合を生じさせるEDTA（エチレンジアミ四酢酸）またはDTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）由来のキレート剤が挙げられる。よって、DTPAおよびその誘導体は炭素鎖において種々の基で置換可能であり、このようにして配位子－金属錯体の安定性および堅牢性を高めることができる(Krejcarek et al., 1977; Brechbiel et al., 1991; Gansow, 1991; 米国特許第4,831,175号)。

20

【０１６７】

例えば、遊離形態または金属イオンとの錯体として薬剤および生物学で広く使用されて久しいDTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）およびその誘導体は、癌治療の放射能－免疫コンジュゲートの開発のため、抗体などの治療的または診断的の着目されるタンパク質と結合することができる金属イオンと安定なキレートを形成する著しい特徴を示す(Meases et al., 1984; Gansow et al., 1990)。

【０１６８】

また、好ましくは、該コンジュゲートを形成する本発明の少なくとも１つの抗体は、その機能的フラグメント、特に、scFvフラグメントなど、それらのFc成分を失ったフラグメントの中から選択される。

30

【０１６９】

本発明はまた、癌の予防または治療を意図した薬剤の製造のための該組成物の使用も含む。

【０１７０】

本発明はまた、腫瘍細胞の増殖を阻害することを目的とする薬剤の製造のための本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント、好ましくは、ヒト化抗体、および／または組成物の使用に関する。一般に、本発明は、癌の予防または治療を目的とする薬剤の製造のための本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント、好ましくは、ヒト化抗体、および／または組成物の使用に関する。

40

【０１７１】

予防および／または治療可能な好ましい癌としては、前立腺癌、骨肉腫、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、結腸癌、多発性骨髄腫、卵巣癌、膵臓癌または他のいずれかの癌が挙げられる。

【０１７２】

好ましい様式では、前記癌はエストロゲン関連乳癌、非小細胞肺癌、結腸癌および／または膵臓癌の中から選択される癌である。

【０１７３】

本発明の別の態様は、JAM-A発現レベルに関連する疾病の、好ましくはイン・ビトロにおける診断方法に記載されているような抗体の使用に関する。好ましくは、該診断方法における該JAM-Aタンパク質関連疾患は癌である。

50

【 0 1 7 4 】

よって、本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントは、特に、癌など、このタンパク質による異常な発現に関連する疾病の診断のための、イン・ビトロにおける生体サンプル中の J A M - A タンパク質の検出および / または定量のための方法に使用可能であり、その方法は下記の工程：

a) 生体サンプルを本発明の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントと接触させること；

b) 形成され得る抗原 - 抗体複合体を実証することを含む。

【 0 1 7 5 】

よって、本発明はまた、記載のような (レジオネラ・ニューモフィラ・パリス (Legionella pneumophila Paris) 菌もしくは関連微生物由来の遺伝子の発現を検出するため、またはレジオネラ・ニューモフィラ・パリス菌もしくは関連微生物を検出および / または同定するための) 方法の実行のための、下記の要素：

a) 本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体；

b) 所望により、免疫反応に好適な媒体を構成するための試薬；

c) 所望により、免疫反応によって産生される抗原 - 抗体複合体試薬を解明するための試薬を含んでなるキットまたは補助品を含む。

【 0 1 7 6 】

有利には、これらの抗体またはその機能的フラグメントは支持体、特にタンパク質チップに固定することができる。このようなタンパク質チップの 1 つは、本発明の目的である。

【 0 1 7 7 】

有利には、これらのタンパク質チップは、生体サンプル中で J A M - A タンパク質を検出および / または定量するのに必要なキットまたは補助品に使用可能である。

【 0 1 7 8 】

本明細書において「生体サンプル」とは、生きている生物体から採取されたサンプル (哺乳類、特にヒトから採取された、特に、血液、組織、器官またはその他のサンプル) またはこのようなある J A M - A タンパク質を含む可能性のあるいずれかのサンプル (必要に応じて形質転換された細胞のサンプルなど) に関するということを述べておくべきであろう。

【 0 1 7 9 】

該抗体またはその機能的フラグメントは、検出可能かつ / または定量可能なシグナルを得るために免疫複合体または標識抗体の形態であり得る。

【 0 1 8 0 】

本発明の標識抗体またはその機能的もしくはフラグメントとしては、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 - D - ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースアミラーゼ、炭酸脱水酵素、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼもしくはグルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼなどの酵素、またはビオチン、ジゴキシゲニンもしくは 5 - プロモ - デスオキシウリジンなどの分子と組み合わせることができる抗体コンジュゲート (免疫複合体) が挙げられる。特にフルオレセインおよびその誘導体、フルオロクロム、ローダミンおよびその誘導体、緑色蛍光タンパク質 (G F P)、ダンシル、ウンベリフェロンなどをはじめとする蛍光標識もまた、本発明の抗体またはその機能的フラグメントと組み合わせることができる。このようなコンジュゲートでは、本発明の抗体またはその機能的フラグメントは当業者に公知の方法によって作製することができる。それらは、酵素もしくは蛍光標識と直接；あるいはスパーサー基または架橋基 (ポリアルデヒド、グルタルアルデヒド、エチレンジアミン四酢酸 (E D T A) またはジエチレントリアミン五酢酸 (D P T A) など) を介して；あるいは治療コンジュゲートに関して上記したものなどの結合剤の存在下で結合させることができる

10

20

30

40

50

。フルオレセイン標識を有するコンジュゲートはイソチオシアネートとの反応によって作製することができる。

【0181】

他のコンジュゲートはまた、ルミノールおよびジオキセタンなどの化学発光標識、ルシフェラーゼおよびルシフェリンなどの生物発光標識、またはヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹²⁶、ヨウ素¹³³、臭素⁷⁷、テクネチウム^{99m}、インジウム¹¹¹、インジウム^{113m}、ガリウム⁶⁷、ガリウム⁶⁸、ルテニウム⁹⁵、ルテニウム⁹⁷、ルテニウム¹⁰³、ルテニウム¹⁰⁵、水銀¹⁰⁷、水銀²⁰³、レニウム^{99m}、レニウム¹⁰¹、レニウム¹⁰⁵、スカンジウム⁴⁷、テルル^{121m}、テルル^{122m}、テルル^{125m}、トリウム¹⁶⁵、トリウム¹⁶⁷、トリウム¹⁶⁸、フッ素¹⁸、イットリウム¹⁹⁹およびヨウ素¹³¹放射性標識を含み得る。放射性同位元素と抗体を直接または上記のEDTAもしくはDTPAなどのキレート剤を介して結合させるための当業者に公知の既存の方法は診断用放射性同位元素についても使用可能である。よって、クロラミン-T技術による[¹²⁵I]Naでの標識[Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495]; Crockford et al. (米国特許第4,424,200号)が記載しているようなテクネチウム^{99m}での標識またはHnatowich (米国特許第4,479,930号)が記載しているようなDTPAを介した結合を挙げるべきであろう。

10

【0182】

本発明はまた、JAM-Aタンパク質を発現または過剰発現する細胞に対して生物学的に活性な化合物の特異的標的化のための薬剤の製造を目的とした本発明の抗体の使用に関する。

20

【0183】

本明細書の意味において、「生物学的に活性な化合物」とは、細胞の活性、特に成長、増殖、転写および遺伝子翻訳を調節、特に阻害し得る化合物である。

【0184】

本発明はまた、好ましくは標識された、特に放射性標識された本発明の抗体またはその機能的フラグメントからなるイン・ビボ診断試薬およびJAM-Aタンパク質の細胞内発現または過剰発現に関連する癌の医学的画像化、特に検出におけるその使用に関する。

【0185】

本発明はまた、薬剤として用いる本発明の組合せ製品としての組成物、または抗JAM-A/毒素コンジュゲートまたは放射性同位元素に関する。

30

【0186】

好ましくは、前記の組合せ製品としての組成物またはコンジュゲートには、賦形剤および/または医薬ビヒクルが添加される。

【0187】

本明細書において「医薬ビヒクル」とは、二次反応を引き起こさず、例えば、有効化合物の投与を容易にするか、生物体内でのその寿命および/または有効性を増強するか、その溶液中での溶解度を高めるか、またはその保存性を改良する医薬組成物に入っている化合物、または化合物の組合せを意味する。このような医薬担体は周知のものであり、選択される有効化合物の性質および投与経路によって当業者によって適合される。

40

【0188】

好ましくは、このような化合物は全身経路、特に、静脈経路、筋肉経路、皮内経路、腹腔内経路、皮下経路または経口経路によって投与される。より好ましくは、本発明の抗体からなる組成物は経時的に等間隔の数回に分けて投与される。

【0189】

それらの投与経路、投与計画および最適な剤形は、例えば、患者の年齢または体重、患者の健康状態の重篤度、処置に対する患者の耐性、および受ける副作用など、患者に適した処置を確立する際に一般に考慮される基準に従って決定することができる。

【0190】

よって、本発明は、JAM-Aを発現または過剰発現する細胞に対して生物学的に活性

50

な化合物の特異的標的化のための薬剤の製造を目的とした抗体またはその機能的フラグメントの1つの使用に関する。

【0191】

本発明の他の特徴および利点は本明細書の実施例および図面（範例を以下に示す）でさらに明らかになる。

【実施例】

【0192】

実施例1：6F4抗体の作製

ネズミモノクローナル抗体（M a b）を作製するために、B A L B / CマウスをA T C CからのM C F - 7細胞 5×10^6 個を用いて免疫した。10⁷個のM C F - 7細胞の最終追加免疫注射後、マウスのリンパ節（lymph nodes）由来の細胞を、Kohler and Milsteinによって記載されている古典的な技術を用いてS p 2 / O - A g 1 4 骨髓腫細胞と融合する。次に、融合から生じるハイブリドーマの上清を機能活性、すなわちイン・ビトロでのM C F - 7細胞の増殖阻害についてスクリーニングした。

【0193】

このスクリーニングでは、M C F - 7細胞を96ウェル培養皿において100 μ lのウシ胎児血清不含ハイブリドーマ培地中 5×10^3 細胞/ウェルで培養する。これらのプレートを5%CO₂雰囲気下、37℃で24時間インキュベートする。24時間後、スクリーニングするハイブリドーマの上清50 μ lを各ウェルに入れる。プレートの最下段は対照用に確保する：

3つのウェルには、目的の活性に関して無関係であり、かつ融合細胞に用いた同じ培養培地中で培養されるハイブリドーマ上清50 μ lを添加する。これらのウェルは、不活性上清のトリチウム化チミジン取り込みに対する影響を較正するために用いられる；

3つのウェルにはハイブリドーマ培養培地50 μ lを入れる。

【0194】

培養からおおよそ52時間後、各ウェルに0.25 μ Ciの[³H]チミジンを添加し、再度37℃で20時間インキュベートする。DNA中への[³H]チミジンの取り込み（細胞増殖を示す）は、液体シンチレーションを測定することによって定量される。各プレートについてバックグラウンドノイズおよび閾値は、培地だけを入れた対照ウェルおよび無関係なハイブリドーマ上清の関数として測定される。

【0195】

この方法によって、第一回目のスクリーニング後にM C F - 7細胞の増殖を阻害する抗体を分泌する43のハイブリドーマが選択された。これらの43ハイブリドーマのうち11ハイブリドーマは増殖が弱いまたは存在せず、廃棄した。ハイブリドーマの増加およびクローニング後に実施した増殖試験中に、その上清がM C F - 7細胞の増殖に対して20%の阻害活性を有していたハイブリドーマだけを選択した。クローニング/選択プロセスの終わりに、1つのクローンだけが必要な特性を有することが分かった、6F4クローン。

【0196】

実施例2：6F4抗体軽鎖可変領域（6F4 VL）のCDRグラフトによるヒト化プロセス

a) 6F4 VLヌクレオチド配列と総ての既知ネズミ細胞系統配列との比較

CDRグラフトによるヒト化における予備段階として、初めに、6F4 VLヌクレオチド配列をIMGTデータバンク（インターネットアドレス：<http://imgt.cines.fr>）に存在する総てのネズミ細胞系統配列と比較した。

【0197】

V領域については98.56%の配列同一性を有するマウス細胞系統領域V、そしてJ領域については100%の配列同一性を有するマウス細胞系統領域Jそれぞれ、IGK V 19 - 93 * 01（配列番号39、EMBL命名法：AJ235935）およびIGK J 1 * 01（配列番号40、EMBL命名法：V00777）を同定した。

【 0 1 9 8 】

これらの同一性を踏まえて、6 F 4 V L 配列をそのまま用いることにした。

【 0 1 9 9 】

これらのアライメントは V 領域については図 2 A に、そして J 領域については図 2 B に示している。

【 0 2 0 0 】

b) 6 F 4 V L ヌクレオチド配列と総ての既知ヒト細胞系統配列との比較

C D R グラフトに最良のヒト候補を同定するために、6 F 4 V L と最大限の同一性を有するヒト由来生殖細胞系を探した。このために、マウス 6 F 4 V L ヌクレオチド配列を I M G T データベースに存在する総てのヒト細胞系統配列と比較した。

10

【 0 2 0 1 】

V 領域については 8 1 . 3 6 % の配列同一性を有するヒト由来細胞系統領域 V、すなわち I G K V 1 - 3 3 * 0 1 (配列番号 4 1、E M B L 命名法: M 6 4 8 5 6) を、そして J 領域については 8 6 . 8 4 % の配列同一性を有するヒト由来細胞系統領域 J、すなわち I G K J 1 * 0 1 (配列番号 4 2、E M B L 命名法: J 0 0 2 4 2) を同定した。

【 0 2 0 2 】

このようにして、マウス 6 F 4 V L C D R のヒト受容体配列として V 領域については細胞系統 I G K V 1 - 3 3 * 0 1、そして J 領域については I G K J 1 * 0 1 を選択した。

【 0 2 0 3 】

これらのアライメントは V 領域については図 3 A に、そして J 領域については図 3 B に示している。

20

【 0 2 0 4 】

c) ヒト化型 6 F 4 V L

ヒト化プロセスにおける下記の工程は、I G K V 1 - 3 3 * 0 1 細胞系統配列と I G K J 1 * 0 1 細胞系統配列を結合すること、その後これらの同じ生殖細胞系のスキャフォールド領域にマウス 6 F 4 V L C D R を結合することからなる。

【 0 2 0 5 】

該プロセスのこの段階のマウス 6 F 4 F v 領域分子モデルは、分子の三次元構造 (C D R のカノニカル構造、V H / V L 界面など) の維持または抗原の結合のいずれかに関与し得ることから、保存するマウス残基の選択において特に有用となるであろう。スキャフォールド領域において、マウス (6 F 4 V L) ヌクレオチドとヒト (I G K V 1 - 3 3 * 0 1 / I G K J 1 * 0 1) ヌクレオチドとの間でのそれぞれの相違を非常に慎重に検討する。

30

【 0 2 0 6 】

以下のことをより明確にするために、図 4 では、K A B A T 分類および I M G T 分類に準拠して 6 F 4 V L 配列を示している。保存されるはずの 3 つのネズミ残基を同定した。

【 0 2 0 7 】

残基 3 3 (I l e) は、I M G T によれば C D R 1 アンカリングに関与し、K a b a t によれば C D R 1 の一部である。

40

【 0 2 0 8 】

残基 4 9 (H i s) は、I M G T によれば C D R 2 アンカリングに関与し、V H / V L 界面に関与し、バーニアゾーンに属する。

【 0 2 0 9 】

残基 5 3 (T h r) は、I M G T によれば C D R 2 アンカリングに関与し、K a b a t によれば C D R 2 の一部である。

【 0 2 1 0 】

最初に、I G K V 1 - 3 3 * 0 1 および I G K J 1 * 0 1 のスキャフォールド領域における 3 つの変化を研究する。これらの変化は残基 2 4、6 9 および 7 1 (I M G T 命名法

50

）に関係する。当然のことながら、これらの３つの変化は互いに独立に検討され、さらに様々な組合せにおいても検討されると理解すべきである。考えられるあらゆる変異株を用意して、それらを試験し、かつ最良の結合特性を保存した変異株を選択することがこの目的である。例えば各変異株に対して E L I S A / B i a c o r e 結合試験を実施する。

【 0 2 1 1 】

残基 2 4 (L y s / G l n) は、C D R 1 付近に存在し、結果として、正確な C D R 1 提示を可能にするコンフォーメーションの維持に重要である可能性が考えられる。より詳しくは、この残基はバーニアゾーン内の残基 6 9 - 7 0 と相互作用する可能性がある。L y s はヒト V L においてわずかしが表示されないが、K a b a t によれば C D R 1 の一部である。

10

【 0 2 1 2 】

残基 6 9 (A r g / T h r) は、バーニアゾーンに存在するため C D R 1 のカノニカル構造に直接関与するが、この残基はヒト V L において常に T h r である。

【 0 2 1 3 】

残基 7 1 (T y r / P h e) は、C D R 1 のカノニカル構造に直接関与するが、ヒト V L において規則的に P h e である。

【 0 2 1 4 】

次に、残基 5 6 (A l a) の T h r への改変を考えることができる。この残基は、I M G T によれば C D R 外にあるが、K a b a t によれば C D R 2 に属する。

20

【 0 2 1 5 】

第三そして最後に、２つのさらなる変化が残基 3 4 および 5 5 (I M G T 命名法) においてもたらされる可能性が考えられる。I M G T によって定義された C D R の外にあるこれらの２つの残基は、K a b a t によって定義された C D R 中に含まれる。

【 0 2 1 6 】

残基 3 4 (A l a / A s n) は、K a b a t によれば C D R 1 に属し、V H / V L 界面に参加する。ヒトにおいて A l a が強く表示されるにもかかわらず、このような突然変異は関連性を保ち続ける。

【 0 2 1 7 】

残基 5 5 (G l n / G l u) は、K a b a t によれば C D R 2 の一部であり、V H / V L 界面にも参加する。ヒトにおいて G l n が強く表示されるにもかかわらず、このような突然変異もまた関連性を保ち続ける。

30

【 0 2 1 8 】

上記したように、これらの３つの突然変異は独立に試験することができ、または様々な組合せにおいて試験することができた。

【 0 2 1 9 】

実施例 3 : 6 F 4 抗体重鎖可変領域 (6 F 4 V H) の C D R グラフティングによるヒト化プロセス

a) 6 F 4 V H ヌクレオチド配列と総ての既知ネズミ細胞系統配列との比較

C D R グラフトによるヒト化における予備段階として、初めに、6 F 4 V H ヌクレオチド配列を I M G T データバンク (インターネットアドレス : <http://imgt.cines.fr>) に存在する総てのネズミ細胞系統配列と比較した。

40

【 0 2 2 0 】

V 領域については 9 9 . 3 0 % の配列同一性を有するネズミ細胞系統領域 V (I G H V 1 S 1 3 5 * 0 1 ; 配列番号 4 3 ; E M B L 命名法 : A F 3 0 4 5 5 6) 、D 領域については 8 0 % の配列同一性を有するネズミ細胞系統領域 D (I g H D - S T 4 * 0 1 ; 配列番号 4 4 ; E M B L 命名法 : M 2 3 2 4 3) 、そして J 領域については 1 0 0 % の配列同一性を有するネズミ細胞系統領域 J (I g H J 2 * 0 1 ; 配列番号 4 5 ; E M B L 命名法 : V 0 0 7 7 0) 。

【 0 2 2 1 】

これらのアライメントは V 領域については図 5 A に、D 領域については図 5 B に、そし

50

て J 領域については図 5 C に示している。

【 0 2 2 2 】

これらの同一性を踏まえて、6 F 4 V L の場合と同様に、6 F 4 V H 配列をそのまま用いることにした。

【 0 2 2 3 】

b) 6 F 4 V H ヌクレオチド配列と総ての既知ヒト細胞系統配列との比較

C D R グラフトに最良のヒト候補を同定するために、6 F 4 V H の 3 つの領域 V、D および J それぞれと最大限の同一性を有するヒト由来生殖細胞系を探した。このために、マウス 6 F 4 V H ヌクレオチド配列を I M G T データベースに存在する総てのヒト細胞系統配列と比較した。

10

【 0 2 2 4 】

V 領域については 7 5 . 3 4 % の配列同一性を有するヒト由来生殖細胞系 (I G H V 1 - f * 0 1 ; 配列番号 4 6 ; E M B L 命名法 : Z 1 2 3 0 5) を、D 領域については 7 1 . 4 2 % の配列同一性を有するヒト由来生殖細胞系 (I G H D 1 - 1 * 0 1 ; 配列番号 4 7 ; E M B L 命名法 : X 9 7 0 5 1) を、そして J 領域については 8 7 . 5 1 % の配列同一性を有するヒト由来生殖細胞系 (I G H J 4 * 0 1 ; 配列番号 4 8 、 E M B L 命名法 : J 0 0 2 5 6) を同定した。

【 0 2 2 5 】

領域 V、D および J それぞれに対して、上記生殖系統を選択し、それらで再配列した。

【 0 2 2 6 】

これらのアライメントは V 領域については図 6 A に、D 領域については図 6 B に、そして J 領域については図 6 C に示している。

20

【 0 2 2 7 】

c) ヒト化型 6 F 4 V H

ヒト化プロセスにおける下記の工程は、I G H V 1 - f * 0 1 細胞系統配列、I G H D 1 - 1 * 0 1 細胞系統配列および I G H J 4 * 0 1 細胞系統配列を結合すること、その後これらの同じ生殖細胞系のスキャフォールド領域にマウス 6 F 4 V H C D R を結合することからなる。

【 0 2 2 8 】

該プロセスのこの段階のマウス 6 F 4 F v 領域分子モデルは、分子の三次元構造 (C D R のカノニカル構造、V H / V L 界面など) の維持または抗原の結合のいずれかに関与し得ることから、保存するマウス残基の選択において特に有用となるであろう。スキャフォールド領域において、マウス (6 F 4 V H) ヌクレオチドとヒト (I G H V 1 - f * 0 1 、 I G H D 1 - 1 * 0 1 および I G H J 4 * 0 1) ヌクレオチドとの間でのそれぞれの相違を非常に慎重に検討する。

30

【 0 2 2 9 】

以下のことをより明確にするために、図 7 では、K A B A T 分類および I M G T 分類に準拠して 6 F 4 V H 配列を示している。

【 0 2 3 0 】

軽鎖の場合と同様に、変化しないはずの 4 つの残基を同定した。

40

【 0 2 3 1 】

残基 2 (I l e) は、パーニアゾーンの一部であり、および C D R 3 構造化に関与する。

【 0 2 3 2 】

残基 3 5 (T y r) は、I M G T によれば C D R 1 アンカリングに関与し、K a b a t によれば C D R 1 の一部であり、V H / V L 界面にも参加し、C D R 3 と相互作用する。

【 0 2 3 3 】

残基 5 0 (T y r) は、I M G T によれば C D R 2 アンカリングに関与し、K a b a t によれば C D R 2 の一部であり、パーニアゾーンの一部でもあり、V H / V L 界面にも参加する。

50

【 0 2 3 4 】

残基 5 9 (A r g) は、 I M G T によれば C D R 2 アンカリングに関与し、 K a b a t によれば C D R 2 の一部であり、 V H / V L 界面に参加する。

【 0 2 3 5 】

第一のヒト化型には、残基 6 1、6 2 および 6 5 それぞれに 3 つの突然変異を含めることができるであろう (I M G T 分類)。

【 0 2 3 6 】

これらの 3 つの残基は、 K a b a t によれば C D R 2 中に存在し、 V H / V L 界面に参加する。

【 0 2 3 7 】

残基 6 1 (A s n / A l a) は抗原認識に直接関係しない。そのため、その突然変異を考えることができる。

【 0 2 3 8 】

残基 6 2 (G l n / G l u) および残基 6 5 (L y s / G l n)。

【 0 2 3 9 】

次に、2 つのさらなる変化を評価する。これらの 2 つの変化は残基 4 8 および 7 4 (I M G T 命名法) に関係する。

【 0 2 4 0 】

スキャフォールド領域に属する残基 4 8 (I l e / M e t) は、 V H / V L 界面に参加する。

【 0 2 4 1 】

残基 7 4 (L y s / T h r) は、バーニアゾーンの一部であり、 C D R 2 構造化に関係している可能性がある。

【 0 2 4 2 】

第三そして最後に、第三の突然変異系列すなわち残基 9 (P r o / A l a) および 4 1 (H i s / P r o) の変化を考えることができた。こうして、 6 F 4 V L に対して計画した突然変異と同じ方法で、 C D R アンカリングを改変することなく可能な限り厳密にヒト生殖細胞系に近づけることがこの目的である。

【 0 2 4 3 】

要約する目的でのみ、以下の表 4 および 5 に、用いた細胞系統と、それぞれの、それらのアミノ酸およびヌクレオチド配列番号を記載している。

表 4

【表 4】

表 4

生殖細胞系 (E M B L 参照)	配列番号
IGKV19-93*01 (AJ235935)	39
IGKJ1*01 (V00777)	40
IGKV1-33*01 (M64856)	41
IGKJ1*01 (J00242)	42
IGHV1S135*01 (AF304556)	43
IGHD-ST4*01 (M23243)	44
IGHJ2*01 (V00770)	45
IGHV1-f*01 (Z12305)	46
IGHD1-1*01 (X97051)	47
IGHJ4*01 (J00256)	48
IGHV1-03*01 (X62109)	49

表 5

【表 5】

表 5

生殖細胞系 (E M B L 参照)	配列番号
IGKV19-93*01 (AJ235935)	50
IGKJ1*01 (V00777)	51
IGKV1-33*01 (M64856)	52
IGKJ1*01 (J00242)	53
IGHV1S135*01 (AF304556)	54
IGHD-ST4*01 (M23243)	55
IGHJ2*01 (V00770)	56
IGHV1-f*01 (Z12305)	57
IGHD1-1*01 (X97051)	58
IGHJ4*01 (J00256)	59
IGHV1-03*01 (X62109)	60

10

【 0 2 4 4 】

実施例 4 : 6 F 4 抗体の抗原標的の精製および同定

免疫親和性による精製

6 F 4 抗体の抗原標的を H T - 2 9 細胞高密度膜画分から精製する。150 mM NaCl、Triton X - 100 および I G E P A L を含有する 50 mM Tris / HCl バッファー、pH 7.4 に可溶化した後、膜タンパク質を、セファロースビーズ上に固定化されている 6 F 4 抗体の存在下、+ 4 でゆっくりと混合しながら一晚インキュベートする。次に、非特異的に吸着したタンパク質を除去するために、ビーズ上に形成された 6 F 4 - A g 複合体を様々な洗浄剤含有溶液で洗浄する。0.1 M Gly / HCl バッファー、pH 2.7 を用いて 6 F 4 - セファロース支持体から 6 F 4 抗原標的を溶出する。目的の抗原の高密度画分を選択するために、集めた画分を SDS - PAGE 電気泳動 (10%ゲル、非還元性条件) およびニトロセルロース膜への転写後のウエスタンブロット (一次 6 F 4 抗体を 0.5 μg / ml で使用、化学発光により検出) により解析する (図 8 A および 8 B)。ウエスタンブロットによる解析により、非選択画分および洗液中に目的のタンパク質が存在しないこと、そして酸性 pH において後者が特異的に溶出されることが確認される。

20

30

【 0 2 4 5 】

次に、2 回の精製から生じる高密度画分を、上記の条件下で SDS - PAGE 電気泳動 (10%ゲル) およびウエスタンブロットにより解析した。ウエスタンブロットにおいて 6 F 4 抗体によって認識された抗原は、還元性条件での解析後の見かけの分子量は 35 kDa であった (図 9 A および 9 B)。電気泳動を非還元性条件で実施したときに見かけの分子量が異なることが分かる: これらの条件下では、見かけの分子量は還元性条件で認められるものより実際には少し低い。

40

【 0 2 4 6 】

抗原標的の同定

SDS - PAGE 電気泳動 (10%ゲル) 後、質量分析による解析と適合する方法を用いて目的タンパク質をコロイダルブルーで染色する (図 10)。ウエスタンブロットによって検出された目的タンパク質に対応する特定のバンドを、外科用メスを用いて切り取り、その後 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液中でのインキュベーションにより脱染する。還元 (DTT) / アルキル化 (ヨードアセトアミド) およびトリプシン (Promega) (リジン およびアルギニン残基でタンパク質を加水分解し、その結果、C 末端位置にリジンまたはアルギニン残基を有するペプチドを放出するタンパク質分解酵素) による目的タンパク質の「ゲル内」加水分解 (37 で一晚) 後、生成したペプチドをギ酸の存在下でアセトニトリル / 水混合物 (70 / 30、v / v) を用いて抽出する。次いで、これらを、マトリ

50

ックス (- シアノ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸, Bruker Daltonics) との混合物として A T F A の存在下で M A L D I ターゲット上に付着させた後、M A L D I - T O F 質量分析 (A uto flex, Bruker Daltonics) により解析する。得られた質量スペクトルを図 1 0 に示す。この解析から推定されるペプチドのリストを用いて、Mascot search engine (Matrix Sc iences) を用いたデータベース検索により目的タンパク質を同定する。

【 0 2 4 7 】

N C B I n r データバンク検索結果から、ヒト由来タンパク質に限り、3 つのタンパク質が大きなスコア (スコア > 6 4) をとることが分かる：

- 1 . ヒト結合部接着分子タイプ 1 の結晶構造

スコア = 1 1 6

10

このタンパク質は構造研究に用いた F 1 1 R / J A M - A タンパク質の細胞外ドメインに相当する。

- 2 . F 1 1 受容体 (ホモ・サピエンス (Homo sapiens))

スコア = 1 1 6

このタンパク質は、タンパク質 F 1 1 R / イソ型 a の前駆体に相当する。

- 3 . F 1 1 受容体イソ型 b (ホモ・サピエンス)

スコア = 6 5

【 0 2 4 8 】

これはタンパク質 F 1 1 R イソ型 b の前駆体であり、イソ型 a に対して 2 0 アミノ酸の 2 欠失が存在する。

20

【 0 2 4 9 】

よって、このアプローチにより同定されたタンパク質は、F 1 1 R または F 1 1 受容体と呼ばれる。これは実際に、該タンパク質がいわゆる F 1 1 抗体の受容体として最初に記載されたときに採用された該タンパク質の正式呼称である (Naik et al., 1995, Biochem. J., 310, 155-162)。このタンパク質は今日 J A M - A または「結合部接着分子 A」という名前でよく知られており、J A M 1、P A M - 1、C D 3 2 1 または抗原 1 0 6 と呼ばれる。

【 0 2 5 0 】

トリプシン加水分解によって放出され、質量分析によって解析したペプチドのうち 9 つのペプチドは、ヒト型 J A M - A / イソ型 a の理論加水分解から生じるペプチドのものに相当する、0 . 1 D a を超えない実験分子量を有する。これらの 9 つのペプチドは該タンパク質の一次配列の 3 7 % に及ぶ。さらに、J A M - A 前駆体の理論分子量 (~ 3 2 . 9 k D a) は、S D S - P A G E によって実験的に決定された見かけの分子量と一致する。

30

【 0 2 5 1 】

ウエスタンブロットによって同定された標的の確認

次に、プロテオミクス手法による J A M - A の同定をウエスタンブロット (非還元性条件で 1 0 % S D S - P A G E ゲル、6 F 4 抗体を 0 . 5 μ g / m l で使用、化学発光により検出) により確認した。

【 0 2 5 2 】

図 1 1 A に示されるように、6 F 4 抗体は、H T - 2 9 膜抽出物中および免疫精製によって濃縮された画分中の天然 J A M - A タンパク質 (見かけの M W = 3 5 k D a) だけでなく、二量体組換えタンパク質 J A M - A / F c (R&D Systems r e f . 1 1 0 3 - J M、見かけの M W ~ 1 2 0 k D a) も認識する。この認識は 1 / 1 0 0 0 に希釈した市販の抗ヒト J A M - A ヤギポリクローナル抗体 (R&D Systems、r e f . A F 1 1 0 3) のものに等しい (図 1 1 B)。

40

【 0 2 5 3 】

実施例 5 : ヒト J A M - A に対する 6 F 4 抗体の特異性

6 F 4 抗体の特異性を上記の条件下でウエスタンブロットにより確認した。

図 1 2 では、6 F 4 抗体が組換えタンパク質 h J A M - A / F c (R&D Systems r e f . 1 1 0 3 - J M) を認識するが、ヒト型 J A M - B および J A M - C (組換えタンバ

50

ク質 h J A M - B / F c および h J A M - C / F c、R&D Systems ref. 1074 - V J および 1189 - J3) もネズミ型 J A M - A (組換えタンパク質 m J A M - A / F c、R&D Systems ref. 1077 - J M) も認識しないことから、6 F 4 抗体がヒト型 J A M - A に対して特異的であることが分かる。

【0254】

実施例 6 : B I A c o r e (表面プラズモン共鳴) による 6 F 4 抗体の親和性の測定

原理

B I A c o r e を用い、可溶性タンパク質 J A M - 1 - F c (抗体の F c フラグメントと融合され、N S 0 細胞内で組換え型として産生される細胞外ドメイン) に対する 6 F 4 抗体の親和性定数 K_D (M) は、結合速度 (k_a) ($1/m \cdot s$) および解離速度 (k_d) ($1/s$) の決定から、式 $K_D = k_d / k_a$ (Rich and Myszk, J. Mol. Recog., 2005, 18, 431) に従って算出することができる。

【0255】

材料および方法

使用機器 : B I A c o r e X および B I A evaluation 3.1 X ソフトウェア (Uppsala、SW)

試薬 :

ネズミモノクローナル 6 F 4 抗体 : 1.3 mg/ml

ヒト J A M - 1 - F c (ref. 1103 - J M R&D Systems) : $50 \mu\text{g}$ 担体不

含

マウス J A M - 1 - F c (ref. 1077 - J M R&D Systems) : $50 \mu\text{g}$ 担体

不含

ランニングバッファー : H B S - E P (BIAcore)

結合キット : 「アミン」 (BIAcore)

結合バッファー : 酢酸 pH 5.0 (BIAcore)

補足抗体 : ヤギ I g G F c 抗ヒト (= G A H、ヤギ抗ヒト) (Bioscience)

再生バッファー : グリシン、H C l pH 1.5 30 秒 (BIAcore)

【0256】

考察および結論

図 13 のデータは、ネズミ 6 F 4 抗体がヒト J A M - 1 タンパク質の細胞外部分と結合するが、ネズミ J A M - 1 タンパク質の細胞外部分とは結合しないことを示す。

【0257】

図 14 のデータにより、これらの実験条件下でヒト J A M - 1 タンパク質に対する 6 F 4 抗体の K_D は 22 pM と算出できる。解離速度が遅いことは、この抗原に対する抗体アビジティの現象の関与を示す (二価分析モデル)。

【0258】

実施例 7 : M C F - 7 異種移植モデルにおける 6 F 4 抗体のイン・ビボ活性

未精製の、 $250 \mu\text{g}$ / マウスの用量で I P 経路により注射された 6 F 4 抗体の試験は、この抗体が、P B S を注射したマウスの 56% に達する阻害率% でイン・ビボにおいて M C F - 7 細胞の増殖を有意に阻害することを示す (図 15)。I g G 1 対照イソ型として無関連の 9 G 4 抗体は予測されたように抗腫瘍活性を持たない。

【0259】

実施例 8 : 腫瘍細胞パネルに対して 6 F 4 により認識される抗原の分布の検討

6 F 4 抗体に対する可能性のある適応を決定するため、4 種類の腫瘍を膜発現特性に関してフローサイトメトリーで検討した。選択した細胞系統は M C F - 7 (エストロゲン関連乳癌)、A 5 4 9 (非小細胞肺癌)、H T 2 9 および C o l o 2 0 5 (結腸癌) および B x P C 3 (膵臓癌) である。細胞の標識については、一定範囲の用量 ($10 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.25 \mu\text{g/ml}$ および $0.125 \mu\text{g/ml}$) を試験した。

【0260】

10

20

30

40

50

図 16 に示される結果は、6 F 4 抗体が試験した総ての細胞の表面で有意に発現される抗原を認識することを示す。得られた標識は可飽和であり、その特異性を証明する。この部位の飽和は抗体濃度 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ から得られ、これは J A M - A 抗原に対する 6 F 4 抗体の親和性が高いという証拠である。

【 0 2 6 1 】

実施例 9 : 6 F 4 抗体の軽鎖可変領域 (6 F 4 V L) の C D R グラフトによるヒト化免疫分析の概要

【 表 6 】

結果の概要:	生産的 I G K 再配列配列 (停止コドンでなく、インフレーム結合部)		
V 遺伝子および対立遺伝子	IGKV1-33*01	スコア=922	同一性=81.36% (227/279nt)
J 遺伝子および対立遺伝子	IGKJ1*01	スコア=140	同一性=86.49% (32/37nt)
CDR-IMGT 長および AA 結合部	[6, 3, 8]	CLQYDNLWTF	

10

【 0 2 6 2 】

最も近いヒト V 遺伝子の同定に関する詳細なデータ

最も近い V 領域 (V 領域の最初のヌクレオチドから 2 番目の C Y S コドンおよび 15 n t の C D R 3 - I M G T までを評価)

	スコア	同一性
M64856 IGKV1-33*01	922	81.36% (227/279nt)
M64855 IGKV1D-33*01	922	81.36% (227/279nt)
X63398 IGKV1-27*01	868	79.21% (221/279nt)
Y14865 IGKV1-NL1*01	841	78.14% (218/279nt)
X72817 IGKV1D-43*01	841	78.14% (218/279nt)

20

【 0 2 6 3 】

最も近いヒト J 遺伝子の同定に関する詳細なデータ

最も近い J 領域:

	スコア	同一性
J00242 IGKJ1*01	140	86.49% (32/37nt)
AF103571 IGKJ4*02	122	81.08% (30/37nt)
J00242 IGKJ4*01	113	78.38% (29/37nt)
Z70260 IGKJ2*02	104	75.68% (28/37nt)
Z46620 IGKJ2*04	95	72.97% (27/37nt)

30

【 0 2 6 4 】

重要残基の同定

いくつかの基準は C D R の外側の重要残基の定義およびランク付けに関与したものである。これらには少なくとも、V H / V L 境界、抗原結合または C D R 構造における残基の既知の関与、ネズミ残基とヒト残基の間のアミノ酸クラスの変化、可変ドメインの三次元構造における残基の局在が含まれる。

40

【 0 2 6 5 】

6 F 4 V L ドメインと最も近い I G K V 1 - 33 * 01 ヒト生殖細胞系 V 遺伝子の間では 21 アミノ酸の違いが見られ、それらの総てが C D R 残基の外側にある。上記で挙げたパラメーターを分析すると、これら 21 の残基のうち、9 つの最も寄与する可能性の高い残基が同定される。これらのネズミ残基は K 24、I 39、A 40、H 55、T 66、Q 68、A 69、R 85 および Y 87 である。これら 9 つの残基のうち、3 つがより重要

50

であると予想され、従って、それらはそれらのネズミ起源をヒト化型に保つ。これらはそれぞれ C D R 1 および C D R 2 アンカーに位置する残基 I 3 9 および H 5 5 および T 6 6 である。最後に、それらがヒト化可能かどうか、またはそれらがそれらのネズミ起源を維持しなければならないかどうかを調べるため、6つのアミノ酸は個々に、かつ/または組み合わせて分析する。抗原結合および V 領域の構造に J 領域が無関連であることに着目し、天然ヒト I G K J 1 * 0 1 生殖細胞系遺伝子を用いることにした。

【 0 2 6 6 】

図 1 7 に示されるヒト化 6 F 4 V L ドメインのデザインされた配列において、

* は、事実上それらのヒトカウンターパートへ変化したアミノ酸に相当し、

1 は、それらのヒト化能に関して分析されたアミノ酸に相当し（そのヒト残基はサインの下に示されている）、

2 は、ヒト化 6 F 4 V H ドメイン中にネズミが残るアミノ酸に相当する。

【 0 2 6 7 】

実施例 1 0 : 6 F 4 抗体の重鎖の可変領域 (6 F 4 V H) の C D R グラフトによるヒト化の第一の形式

免疫分析の概要

【 表 7 】

結果の概要：	生産的 I G H 再配列配列 (停止コドンでなく、インフレーム結合部)		
V 遺伝子および対立遺伝子	IGHV1-f*01	スコア=796	同一性=75.35% (217/288nt)
J 遺伝子および対立遺伝子	IGHJ4*01	スコア=181	同一性=87.23% (41/47nt)
CDR-IMGT長およびAA結合部	[8, 8, 9]	CARQTDYFDYW	

【 0 2 6 8 】

D 遺伝子は V H ドメイン内の C D R 3 領域に厳密に属している。このヒト化プロセスは「C D R グラフト」アプローチに基づく。この戦略において最も近いヒト D 遺伝子の分析は有用ではない。

【 0 2 6 9 】

最も近いヒト V 遺伝子の同定に関する詳細なデータ

最も近い V 領域 (V 領域の最初のヌクレオチドから 2 番目の C Y S コドンまでを評価)

	スコア	同一性
Z12305 IGHV1-f*01	796	75.35% (217/288nt)
X62106 IGHV1-2*02	787	75.00% (216/288nt)
X92208 IGHV1-2*03	782	74.65% (215/288nt)
Z12310 IGHV1-2*04	778	74.65% (215/288nt)
M99642 IGHV1-24*01	760	73.96% (213/288 nt)

【 0 2 7 0 】

最も近いヒト J 遺伝子の同定に関する詳細なデータ

最も近い J 領域：

	スコア	同一性
J00256 IGHJ4*01	181	87.23% (41/47nt)
X86355 IGHJ4*02	172	85.11% (40/47nt)
M25625 IGHJ4*03	172	85.11% (40/47nt)
J00256 IGHJ1*01	138	74.51% (38/51nt)
J00256 IGHJ5*01	133	74.00% (37/50nt)

【 0 2 7 1 】

重要残基の同定

いくつかの基準は C D R の外側の重要残基の定義およびランク付けに関与したものである。これらには少なくとも、V H / V L 境界、抗原結合または C D R 構造における残基の既知の関与、ネズミ残基とヒト残基の間のアミノ酸クラスの変化、可変ドメインの三次元構造における残基の局在が含まれる。

【 0 2 7 2 】

6 F 4 V H ドメインと最も近い I G K H 1 - f * 0 1 ヒト生殖細胞系 V 遺伝子の間では 3 1 アミノ酸の違いが見られ、それらの総てが C D R 残基の外側にある。上記で挙げたパラメーターを分析すると、これら 3 1 の残基のうち、9 つの最も寄与する可能性の高い残基が同定される。これらのネズミ残基は I 2、Y 4 0、I 5 3、Y 5 5、R 6 6、N 6 8、Q 6 9、K 7 2 および K 8 2 である。これら 9 つの残基のうち、2 つがより重要であると予想され、従って、それらはそれらのネズミ起源をヒト化型に保つ。これらは C D R 2 アンカーに位置する残基 Y 5 5 および R 6 6 である。最後に、それらがヒト化可能かどうか、またはそれらがそれらのネズミ起源を維持しなければならないかどうかを調べるため、7 つのアミノ酸は個々に、かつ / または組み合わせて分析する。抗原結合および V 領域の構造に J 領域が関与しないことに着目し、天然ヒト I G K J 4 * 0 1 生殖細胞系遺伝子を用いることに決めた。

10

【 0 2 7 3 】

図 1 8 に示されるヒト化 6 F 4 V H ドメインのデザインされた配列において、
* は、事実上それらのヒトカウンターパートへ変化したアミノ酸に相当し、
1 は、それらのヒト化能に関して分析されたアミノ酸に相当し（そのヒト残基はサインの下に示されている）、
2 は、ヒト化 6 F 4 V H ドメイン中にネズミが残るアミノ酸に相当する。

20

【 0 2 7 4 】

実施例 1 1 : 6 F 4 抗体 (6 F 4 V H) の重鎖可変領域の C D R グラフトによるヒト化の第二の形式

C D R グラフトのヒト V 遺伝子候補を同定するための他の方法は、I M G T / D o m a i n G a p A l i g n ツールを用いて、アミノ酸レベルでヒトホモロジーを探すことである。

30

I M G T / D o m a i n G a p A l i g n 免疫分析の結果を以下にまとめる。

対立遺伝子	IGHV-3*01
種	ホモ・サピエンス
ドメイン	1
Smith-Waterman スコア	451
同一性 %	64.3
重複	98

【 0 2 7 5 】

I G H V 1 - 0 3 * 0 1 生殖細胞系遺伝子 (配列番号 4 9、E M B L 命名法 : X 6 2 1 0 9) における重要残基の同定

40

6 F 4 V H ドメインおよび I G H V 1 - 3 * 0 1 タンパク質配列のアライメントを図 3 1 に示す。

【 0 2 7 6 】

それらの残基の選択およびランク付けは、それらの構造的関連性、それらの既知の構造 - 機能関係、それが起こり、また、第一のヒト化プロセスの際に得られた結果を利用するならば、アミノ酸クラスの変異の関連性に従った単一の各位置の相対的重要性に基づいた示差的基準に基づく。

【 0 2 7 7 】

最初の意図では、残基 Y 5 5 および R 6 6 (双方とも C D R 2 アンカーに割り付けられた残基として結合に関与することが強く推測される) 以外、種々の「C D R の外側」の総

50

てのアミノ酸がそれらのヒト相対物に対して変異を持っていた。後に記載される他の総ての分析が行われる場合には、プロセスの終了時にこれらの2つの残基のヒト化能が検索される。実際、親抗体である6F4 H₂2再ヒト化VHドメインの完全な活性の再生は、次のように改良しなければならない：「脱ヒト化」プロセスは、必要に応じて、それらのネズミ相対物におけるこれらのアミノ酸を戻し突然変異することである。

【0278】

第一群の残基、すなわち、E1Q、K43RおよびK75Rは、基準の強い組合せを示し、利益を探す場合に「脱ヒト化」が評価される最初の位置に相当する。

【0279】

次に、第二群の残基、すなわち、K48Q、S49R、F88YおよびH90Rは化学的に関連のある突然変異であるが、構造的には重要な残基とは思われず、2回目の実験で試験される。

【0280】

第三群の6つの残基はおそらく全体的および/または核配向(core-oriented)の残基に關与する可能性が高いので、結合に關与している可能性は低く、必要であれば3回目の改良で検討される。

【0281】

第四群の残基は構造的および/またはアミノ酸クラスの変異に關連するとは思えず、その「脱ヒト化」は後に検討される。

【0282】

最後に、次の6つの残基I2V、Y40H、I53M、N68S、K72QおよびK82Tは、ヒト化が最初にヒト化されるVHドメインの結合活性を、少なくともこの最初の組合せでは変化させなかったアミノ酸に相当する。これらの残基の「脱ヒト化」は最後の改良として行われる。

【0283】

D遺伝子は、VHドメイン内のCDR3領域に厳密に属している。このヒト化プロセスは「CDRグラフト」アプローチに基づく。この戦略において最も近いヒトD遺伝子の分析は有用ではない。

【0284】

J領域はV領域の抗原結合および構造に無関連であることに着目し、天然ヒトIGHJ4*01生殖細胞系遺伝子を用いることにした。

【0285】

再ヒト化6F4抗体に関して得られた実験データ

以下の実験では、再ヒト化は、重鎖、実施例9に例示されたようなQTY/AETヒト化6F4 VLドメインに常に相当する軽鎖のみに關し、この最後に選択されたヒト化VLドメインは組換えキメラ6F4抗体と同様の抗JAM-a結合活性を示す。同様に、再ヒト化形式の改良アッセイを、ELISAアッセイによって定義されたような組換えキメラ6F4抗体抗JAM-結合活性を参照して行った(データは示されていない)。

【0286】

実施例12：6F4 MA bによるJAM-A発現のイン・ビトロダウンレギュレーション

JAM A発現に対する6F4 MA bの効果を調べるため、MCF-7、HT29およびA549細胞系統を選択した。要約すると、細胞を75 cm² フラスコに入れ、37の5% CO₂ 雰囲気下、24時間、10%ウシ胎児血清(FCS)を添加した培地中でインキュベートした。その後、細胞をPBSで3回洗浄し、血清不含培地でさらに1日インキュベートした。この第二のインキュベーションの後、血清不含培地を除去し、新しい血清不含培地単独、または6F4、もしくは9G4と記載されるIgG1イソ型対照のいずれかを含有する新しい血清不含培地に置き換えた。インキュベーション5時間または16時間後、冷溶解バッファー(10 mM Tris HCl バッファー、pH 7.5、15% NaCl 1 M (Sigma Chemical Co.)、10%洗剤混合物(10 mM Tris-H

10

20

30

40

50

C l、10% I g e p a l 溶解バッファー) (Sigma Chemical Co.)、5%デオキシコール酸ナトリウム(Sigma Chemical Co.)、1プロテアーゼ阻害剤カクテル完全T M 錠剤(Roc he)および1%ホスファターゼ阻害剤カクテルセットI I (Calbiochem)、p H 7 . 5) を加え、細胞を氷上で掻き取った。これらの溶解液を4 での遠心分離によって明澄化した。タンパク質をB C A タンパク質アッセイによって定量し、25 μ g のタンパク質をB i o r a d 4 ~ 12% B i s - T r i s ゲルの各レーンにのせた。サンプルは100 5分間加熱し、-20 で維持するか、またはそのまま4 ~ 12% S D S - P A G E ゲルにのせ、ニトロセルロース膜に移した。プロットをまず、総ての抗体に関して5% B S A でブロッキングした。特異的抗J A M A 一次抗体のインキュベーションを室温で2時間行った。フィルターをT B S T で洗浄し、適当なH R P 結合二次抗体とともに室温で1時間インキュベートした。膜をT B S T で洗浄した後、タンパク質をE C L (Amersham) で可視化した。

10

【0287】

図19に示されるように、6 F 4 M A b で処理した3つの細胞系統で、有意なJ A M - A のダウンレギュレーションが見られた。M C F - 7 が最も感受性が高いと思われ、6 F 4 インキュベーション5時間後という早期に完全かつ安定なダウンレギュレーションが見られた。H T 29細胞でも、部分的ではあるが、持続性のJ A M - A ダウンレギュレーションが見られた。6 F 4 M A b ではインキュベーション16時間後に完全な阻害が見られたのに対し、A 549細胞では、インキュベーション初期では有意な効果が見られなかった。ダウンレギュレーションの速度論は異なっていた。予測されたように、非処理細胞と9 G 4 イソ型対照とともにインキュベートした細胞の間には有意な差は見られなかった。

20

【0288】

実施例13：イン・ビボ腫瘍増殖に対する6 F 4 の単回注射の効果

6 F 4 M A b のイン・ビボ作用機序を調べるため、7週齢のエストロゲンペレット担持雌マウスにM C F - 7細胞を注射した。腫瘍体積が80 ~ 100 mm³に達した際に、匹敵する腫瘍を有するマウス3群を構成した。非処理の腫瘍内の腫瘍細胞の基本増殖を確認するため、注射前にこれらの群のうちの1つから腫瘍を取り出した。他の2群のマウスに1 mg の6 F 4 または同用量のI g G 1 イソ型対照(9 G 4 と表記)のいずれかを注射した。

30

【0289】

注射6時間後に腫瘍を取り出し、ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、5 μ m 切片とし、抗K i 67抗体で染色し、処理腫瘍と対照腫瘍の増殖レベルを調べた。

【0290】

図20に示されるように、注射前に取り出した腫瘍(0時点としてT 0で表す)とイソ型対照9 G 4 で処理した腫瘍の間に差は見られなかった。他方、6 F 4 を1回注射した後では腫瘍細胞増殖の有意な阻害が見られた。

【0291】

実施例14：イン・ビボJ A M - A 発現に対する6 F 4 の単回注射の効果

この研究でのイン・ビボプロトコールは、ウエスタンブロット解析のために、取り出した腫瘍を液体窒素中で急速冷凍したこと以外はイン・ビボ増殖実験で記載したものと同様である。ウエスタンブロットは上記実施例13に記載されているように行った。

40

【0292】

図21は、非処理マウス(0時点としてT 0で表す)と9 G 4 イソ型対照を1回注射したマウスの間でJ A M - A 発現に差は見られなかった。マウスを6 F 4 M A b で処理した場合には有意なダウンレギュレーションが見られ、この抗体のイン・ビボ抗腫瘍活性に關与する潜在的な作用機序が受容体のダウンレギュレーションであり得ることが示唆される。これらの結果はイン・ビトロで見られ、実施例13に示されているものと一致していた。

【0293】

50

実施例 15 : 6 F 4 およびその F (a b ')₂ フラグメントの抗腫瘍活性の比較

J A M - A は M C F - 7 細胞によって高く発現され、6 F 4 は I g G 1 (マウスでのエフェクター機能にあまり関与しないことが知られているイソ型) であるということにもかかわらず、イン・ビボ活性におけるエフェクター機能の関与の可能性を調べるため、6 F 4 とその F (a b ')₂ フラグメントの間のイン・ビボ比較を M C F - 7 モデルで設定した。

【 0 2 9 4 】

この目的で、500万個の M C F 7 細胞を、エストロゲンペレットを担持する7週齢の雌マウスに移植した。細胞を移植して5日後、マウスを300 μ g の6 F 4 または200 μ g の6 F 4 F (a b ')₂ のいずれかで週に3回処理した。最初の注射では、600 μ g の抗体および400 μ g の6 F 4 F (a b ')₂ を注射した。腫瘍体積を4週間、週に2回測定した。

【 0 2 9 5 】

図 2 2 は、6 F 4 および6 F 4 F (a b ')₂ で処理したマウスの腫瘍増殖は、D 3 ~ D 2 7 からの対照マウスの腫瘍増殖とは有意に異なっていた (6 F 4 では p = 0 . 0 3 、6 F 4 F (a b ')₂ では p = 0 . 0 1 5) 。6 F 4 および6 F 4 F (a b ')₂ マウス群の間では差は見られず、エフェクター機能は6 F 4 活性に関与しないことを示す。

【 0 2 9 6 】実施例 1 6 : ヒト組織での J A M - A 発現の評価

J A M A を過剰発現する腫瘍種を選択するため、腫瘍組織と正常患者組織で J A M - A 発現の比較を行った。この検討のため、同じ患者から正常組織と腫瘍組織の対を選択した。これらの患者では、正常組織は腫瘍近傍から採取した。J A M - A 発現は、Superships 製の組織アレイを用い、免疫組織化学 (I H C) によって判定した。要約すると、スライドを脱脂し、D a k o c y t o m a t i o n 溶液 S 1 6 9 9 を用い、9 8 ° C で 2 0 分間抗原賦活を行った。内在ペルオキシダーゼをクエンチ (0 . 3 % H₂O₂ 溶液、5 分間) し、非特異的部位をブロッキング (Ultra - V - Block ; Labvision, ref, TA - 125 - UB) した後、一次抗体 (R & D system からの抗 - h J A M - A 、 A F 1 1 0 3 または Zymed からのヤギ I g G イソ型対照) を室温で 1 時間インキュベートした。T B S - t w e e n 中で洗浄した後、dakocytomation からの L S A B + キットを用い、抗 - h J A M - A の結合を現像した。一次抗体と L S A B + の複合体の可視化は、発色反応 H R P - D A B によって行った。その後、スライドをヘマトキシリンで対比染色を行った。

【 0 2 9 7 】

甲状腺、肺および乳癌のサンプルを分析した。甲状腺サンプル (図 2 3) については、正常甲状腺組織では発現は見られなかったが、J A M - A では、同じ患者からの腫瘍切片 (膜染色) で強く発現されたことが明らかであった。肺正常組織では、J A M - A は胚細胞によって発現された。しかしながら、総ての腫瘍サンプルで強い膜発現が見られた (図 2 4) 。乳癌では、正常乳房組織で小葉乳癌に位置する弱い J A M - A 発現が見られた。癌切片では、図 2 5 に示される 3 例の癌腫 (浸潤性乳管、非定型髄質および浸潤性乳頭状) は、J A M - A が乳癌組織で過剰発現することを示す。

【 0 2 9 8 】

これらのデータは、甲状腺癌、乳癌および肺癌が J A M A 療法の良好な標的となり得ることを示唆した。

【 0 2 9 9 】実施例 1 7 : ヌードマウスにおける A 4 3 1 類表皮癌異種移植片における 6 F 4 のイン・ビボ活性

A - 4 3 1 細胞を、10% 熱不活化ウシ胎児血清 (Sigma) を添加した D M E M (Lonza) で通常に培養した。植え継ぎ 2 日前に細胞を二分したところ、それらは指数増殖期となった。1000万個の A - 4 3 1 細胞を7週齢の無胸腺ヌードマウスに移植した。移植 5 日後 (D 5) 、マウスを無作為化し、以下のスキームで i . p . (腹腔) 処置した : 対照群に

10

20

30

40

50

は週に2回PBS注射を施し、6F4処理群には負荷量2mg、次いで週に2回1mg用量の抗体をi.p(腹腔)注射した。週に2回腫瘍を測定し、腫瘍体積を式： $\frac{1}{6}$ 長さ、幅、高さを用いて算出した。各時点でマン・ホイットニー検定およびSigmaStatソフトウェアを用いて統計分析を行った。図26は、6F4MAbがA431細胞系のイン・ビボ増殖を有意に阻害し得ることを示した(38日目から56日目までで $p < 0.009$)。

【0300】

実施例18：抗原提示細胞(APC)による抗原提示に対する6F4活性の評価

JAMタンパク質はヒト身体中の種々の組織ならびに血小板、白血球および赤血球の表面で発現される[Naik 1995; Malergue 1998; Korneki 1990; Williams 1999; Gupta 2000]。JAM-Aは血小板、好中球、単球、リンパ球および赤血球[総説としては、Mandell 2005参照]。

【0301】

6F4による処理が患者の抗原提示を損なう可能性があるかどうかを調べるため、マクロファージおよび樹状細胞を含む抗原提示細胞(APC)の妨害の可能性の評価を行った。提示過程で、APCは抗原をインターナライズし、それらを消化して、細胞質内でCMHクラスII分子と結合されるペプチドを生じる。次に、この複合体がAPC膜上で発現され、増殖による刺激に応答する特異的なTリンパ球に提示される。

【0302】

以下に示す研究では、ヒトPBMCによる破傷風毒提示に対する6F4の潜在的効果を評価した。この目的で、血液からフィコール勾配遠心分離によりPBMCを単離した。細胞をPBSで洗浄し、計数し、10%熱不活化ウシ胎児血清(FCS)、グルタミンおよび抗生物質を添加したRPMI 1640培地に 0.25×10^6 細胞/mlの濃度で懸濁させた。予め抗原および供試抗体(終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$)を満たした96ウェルプレートの各ウェルに $100 \mu\text{l}$ のPBMCを播種した。IgG1イソ型対照として9G4MAbを用い、陽性対照としてリンパ球のポリクローナルアクチベーターであるフィトヘマグルチニンPHA(終濃度 $2.5 \mu\text{g/ml}$)を導入した。

【0303】

特異的な抗原アクチベーター破傷風毒(TT)を選択し、終濃度 $100 \mu\text{g/ml}$ でPBMCに加えた。次に、プレートを37℃、5%CO₂を含む大気中で96時間インキュベートした。その後、 $0.25 \mu\text{Ci}$ の[³H]-チミジンをウェルに加え、24時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を採取し、フィルター膜を乾燥させ、放射活性量をシンチレーションカウンターで計数した。

【0304】

2回の独立した実験の値を示す図27Aおよび28Aに関して、PBMC提示の陽性対照として用いたポリクローナルアクチベーターPHAは、リンパ球増殖の有効なインデューサーであり、指数はドナーおよび実験によって30~70の範囲である。これらの条件で、リンパ球増殖指数は抗体がインキュベートされた際は常に変化するとは限らず、6F4は有意なアゴニストまたはアンタゴニスト活性を示さなかった。2回の独立した実験の値を示す図27Bおよび28Bは、リンパ球増殖のTT活性化に対してドナー間で有意な変動が生じ得ることを示した。これらの実験では、指数はドナーおよび実験によって2~5の範囲であった。しかしながら、6F4が存在する場合には、抗原提示の妨げは見られなかった。

【0305】

結論として、APCおよびリンパ球上でのJAM-Aの有意な発現にもかかわらず、この標的に対する抗体を使用しても、リンパ球の非特異的増殖も抗原提示プロセスも損なわれない。

【0306】

実施例19：6F4インキュベーション後の血小板凝集および活性化の評価

ヒト血小板と結合する6F4が生物学的機能を持ち得るかどうかを検討するため、血小

10

20

30

40

50

板凝集とセロトニン放出の2つのパラメーターを測定した。

【0307】

この目的で、10人の正常なドナーからのヒト血小板を数種の供試抗体5 μ g/mlとともにインキュベートした。

【0308】

PM6/248(抗 I I b 3)は血小板凝集を誘発することが報告されている。陰性イソ型対照として9G4を用いた。

【0309】

予測されたように、ヒト血小板を用いて試験すると、トロンビンおよびADPは凝集を誘発した。PM6/248も血小板凝集を誘発した。

【0310】

6F4とともにインキュベートした後では、血小板凝集は測定されなかった。この作用は、陽性対照として用いた9G4の場合に見られたものに匹敵していた(図29)。

【0311】

同様に、6F4はセロトニンの放出を誘発できなかったが(図30)、トロンビンは予測されたように5-HTの放出を誘発した。

【0312】

これらの結果は、総てを考え合わせると、6F4活性化後では、JAM-Aは発現されるが、ヒト血小板において生物学的機能は誘発されないことを示す。

【図面の簡単な説明】

【0313】

【図1】ネズミ6F4抗体の重鎖および軽鎖の各配列を示す。CDRは下線と太字で示されている(Kabatナンバリングによる)。

【図2A】ネズミ6F4抗体と選択されたネズミ細胞系統(すなわち、V領域に関してはIGKV19-93*01(配列番号39)およびJ領域に関してはIGKJ1*01(配列番号40))のV領域(図2A)およびJ領域(図2B)の各アライメントを示す。

【図2B】ネズミ6F4抗体と選択されたネズミ細胞系統(すなわち、V領域に関してはIGKV19-93*01(配列番号39)およびJ領域に関してはIGKJ1*01(配列番号40))のV領域(図2A)およびJ領域(図2B)の各アライメントを示す。

【図3A】ネズミ6F4抗体と選択されたヒト細胞系統(すなわち、V領域に関してはIGKV1-33*01(配列番号41)およびJ領域に関してはIGKJ1*01(配列番号42))のV領域(図3A)およびJ領域(図3B)の各アライメントを示す。

【図3B】ネズミ6F4抗体と選択されたヒト細胞系統(すなわち、V領域に関してはIGKV1-33*01(配列番号41)およびJ領域に関してはIGKJ1*01(配列番号42))のV領域(図3A)およびJ領域(図3B)の各アライメントを示す。

【図4】KABATナンバリングシステムおよびIMGTナンバリングシステムそれぞれに関する6F4抗体の軽鎖のタンパク質配列を示す。

【図5A】ネズミ6F4抗体と選択されたネズミ細胞系統(すなわち、V領域に関してはIGHV1S135*01(配列番号43)、D領域に関してはIGHD-ST4*01(配列番号44)およびJ領域に関してはIGHJ2*01(配列番号45))のV領域(図5A)、D領域(図5B)およびJ領域(図5C)の各アライメントを示す。

【図5B】ネズミ6F4抗体と選択されたネズミ細胞系統(すなわち、V領域に関してはIGHV1S135*01(配列番号43)、D領域に関してはIGHD-ST4*01(配列番号44)およびJ領域に関してはIGHJ2*01(配列番号45))のV領域(図5A)、D領域(図5B)およびJ領域(図5C)の各アライメントを示す。

【図5C】ネズミ6F4抗体と選択されたネズミ細胞系統(すなわち、V領域に関してはIGHV1S135*01(配列番号43)、D領域に関してはIGHD-ST4*01(配列番号44)およびJ領域に関してはIGHJ2*01(配列番号45))のV領域(図5A)、D領域(図5B)およびJ領域(図5C)の各アライメントを示す。

【図6A】ネズミ6F4抗体と選択されたヒト細胞系統(すなわち、V領域に関してはI

10

20

30

40

50

G H V 1 - f * 0 1 (配列番号 4 6)、D 領域に関しては I G H D 1 - 1 * 0 1 (配列番号 4 7) および J 領域に関しては I G H J 4 * 0 1 (配列番号 4 8) の V 領域 (図 6 A)、D 領域 (図 6 B) および J 領域 (図 6 C) の各アライメントを示す。

【図 6 B】ネズミ 6 F 4 抗体と選択されたヒト細胞系統 (すなわち、V 領域に関しては I G H V 1 - f * 0 1 (配列番号 4 6)、D 領域に関しては I G H D 1 - 1 * 0 1 (配列番号 4 7) および J 領域に関しては I G H J 4 * 0 1 (配列番号 4 8)) の V 領域 (図 6 A)、D 領域 (図 6 B) および J 領域 (図 6 C) の各アライメントを示す。

【図 6 C】ネズミ 6 F 4 抗体と選択されたヒト細胞系統 (すなわち、V 領域に関しては I G H V 1 - f * 0 1 (配列番号 4 6)、D 領域に関しては I G H D 1 - 1 * 0 1 (配列番号 4 7) および J 領域に関しては I G H J 4 * 0 1 (配列番号 4 8)) の V 領域 (図 6 A)、D 領域 (図 6 B) および J 領域 (図 6 C) の各アライメントを示す。

【図 7】K A B A T ナンバリングシステムおよび I M G T ナンバリングシステムそれぞれに関する 6 F 4 抗体の重鎖のタンパク質配列を示す。

【図 8 A】H T - 2 9 細胞膜からの 6 F 4 抗原の 6 F 4 - セファロース免疫精製を示す。回収された画分の、S D S - P A G E 電気泳動 (図 8 A) およびウエスタンブロット (図 8 B) による分析を同様に示す。

【図 8 B】H T - 2 9 細胞膜からの 6 F 4 抗原の 6 F 4 - セファロース免疫精製を示す。回収された画分の、S D S - P A G E 電気泳動 (図 8 A) およびウエスタンブロット (図 8 B) による分析を同様に示す。

【図 9 A】免疫精製タンパク質の S D S - P A G E 電気泳動 (図 9 A) およびウエスタンブロット (図 9 B) による分析を示す。2 回の精製 (# 1 および # 2) を行い、還元条件および非還元条件下で分析した。

【図 9 B】免疫精製タンパク質の S D S - P A G E 電気泳動 (図 9 A) およびウエスタンブロット (図 9 B) による分析を示す。2 回の精製 (# 1 および # 2) を行い、還元条件および非還元条件下で分析した。

【図 1 0】トリプシン加水分解後に抽出されたペプチド混合物の、M A L D I - T O F 質量分析による分析を示す。

【図 1 1 A】ウエスタンブロット (非還元条件) により同定されたタンパク質の確定を示す (6 F 4 抗体 (図 1 1 A) および抗ヒト J A M - A ポリクローナル抗体 (図 1 1 B) を用いて現像) 。

【図 1 1 B】ウエスタンブロット (非還元条件) により同定されたタンパク質の確定を示す (6 F 4 抗体 (図 1 1 A) および抗ヒト J A M - A ポリクローナル抗体 (図 1 1 B) を用いて現像) 。

【図 1 2】ヒト J A M - A タンパク質に対する 6 F 4 抗体の特異性を示す。各タンパク質の付着量は 2 5 0 n g、2 5 n g および 1 0 n g である。

【図 1 3】ネズミ J A M 1 F c タンパク質 (フローセル # 1、下のグラフ) およびネズミ J A M 1 F c タンパク質 (フローセル # 2、上のグラフ) に対して、2 0 で解離時間 5 分および流速 3 0 μ l / 分で、H B S - E P バッファー中 1 0 0 n m の 6 F 4 抗体を 2 分注射 (両矢印) した後に得られたセンサーグラムを示す (C M 4 : m - J A M 1 - F c 5 0 1 . 6 R U (F c 1) および 5 1 1 . 5 R U (F c 2)) 。

【図 1 4】二重参照 (F c 2 - F c 1) 6 F 4 (F c 2 - F c 1) H B S - E P で得られたセンサーグラムを示す。L a n g m u i r A + B 結合モデルを用いてこの曲線の当てはめを行う。算出された動態パラメーター (黒い曲線) は次の通り : $k_a = (1 . 3 8 \pm 0 . 0 0 1) * 1 0^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_d = (0 . 2 5 \pm 1 . 5 8) * 1 0^6 \text{ s}^{-1}$; $R_{max} \text{ (グローバルフィッティング)} = 3 7 1 \text{ R U}$; $K^2 = 0 . 8 5 3$ 。

【図 1 5】スイスヌードマウスにおける M C F - 7 細胞の異種移植モデルにおける 6 F 4 抗体の抗腫瘍活性を示す。6 F 4 抗体は、1 週間に 2 回、理論用量 2 5 0 μ g / マウスで、未精製形態 (腹腔液) にて I P 経路により試験した。9 G 4 抗体は、測定する活性に関して無関連の、同じイソ型 (I g G 1) の抗体である。

【図 1 6】種々の腫瘍系統の表面での、M a b 6 F 4 により認識される J A M - A タン

10

20

30

40

50

パク質発現を示す。

【図 17】* が事実上それらのヒトカウンターパートへ変化したアミノ酸に相当する、1 がそれらのヒト化能に関して分析されたアミノ酸に相当する（そのヒト残基はサインの下に示されている）、および 2 がヒト化 6 F 4 V L ドメイン中にネズミが残るアミノ酸に相当する、ヒト化 6 F 4 V L ドメインの配列を示す。

【図 18】* が事実上それらのヒトカウンターパートへ変化したアミノ酸に相当し、1 がそれらのヒト化能に関して分析されたアミノ酸に相当し（そのヒト残基はサインの下に示されている）、および 2 がヒト化 6 F 4 V H ドメイン中にネズミが残るアミノ酸に相当する、ヒト化 6 F 4 V H ドメインの配列を示す。

【図 19】6 F 4 M A b によって誘発されたイン・ビトロ J A M - A ダウンレギュレーションを示す。

【図 20】6 F 4 M A b によって誘発された腫瘍細胞増殖のイン・ビボ阻害を示す。

【図 21】6 F 4 M a b によって J A M - A のイン・ビボダウンレギュレーションを示す。

【図 22】M C F - 7 イン・ビボモデルに対する 6 F 4 およびその F (a b ')₂ フラグメントの比較を示す。

【図 23】甲状腺組織での J A M - A の正常発現と腫瘍性発現の比較を示す。

【図 24】肺組織での J A M - A の正常発現と腫瘍性発現の比較を示す。

【図 25】乳房組織での J A M - A の正常発現と腫瘍性発現の比較を示す。

【図 26】ヌードマウスにおける A 4 3 1 類表皮癌異種移植片での 6 F 4 のイン・ビボ活性を示す曲線を示す。

【図 27】A . P H A により誘発される非特異的リンパ球増殖 (lymphoproliferation)、および B . 抗原提示プロセスに対する 6 F 4 抗体の効果を示す。2 つの独立したドナーを用いた第一の実験。

【図 28】A . P H A により誘発される非特異的リンパ球増殖 (lymphoproliferation)、および B . 抗原提示プロセスに対する 6 F 4 抗体の効果を示す。2 つの独立したドナーを用いた第二の実験。

【図 29】10 人のヒト正常ドナーでの血小板凝集を示す。結果は平均値 + / - 標準誤差として表す。

【図 30】10 人のヒト正常ドナーでのセロトニン放出を示す。結果は平均値 + / - 標準誤差として表す。

【図 31】6 F 4 V H ドメインおよび I G H V 1 - 0 3 * 0 1 生殖細胞系遺伝子（配列番号 49）のアライメントを示す。

10

20

30

【 図 1 】

6 F 4 抗体

重鎖（可変ドメイン）：

ヌクレオチド配列：

GAGATTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGASCTGGTGAAGCCTTGGGGCTTCAGTGAAGGTATC
CTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCATACAGCATGTACCTGGTGAAGCAGAGCCATG
GAAAGAGCCCTTGAGTGGATTGGATATATATCTACCTTACAGTGGTCTACTAGGTACAACCG
AGTCTCAGGGCCAGGCCACATGACTGTTGTCAGACCTCTTCAGCAGACAGCTTCATGATCT
CAACAGCTGCATCTTGAGGACTCTGCAGCTCTATTACTGTGCAAGCAGACCGCTACTCTTG
ACTACTGGGGGCCAAGGCACCACTCTCAGTCTCCTCA

タンパク質配列：（１文字コード）

EILQQQSGPELVKPGASVKVKSCKASGYSFTDYSMYWVKQSHGKSLEWIGYIDFYNGGTRYNQ
CDR 1 CDR 2
KFKGKATLTVDKSSSTAFMHLNSLTSEDSAVYYCARGTDYFDYWGQTTLTVSS
CDR 3

輕鎖 (可變ドメイン) :

ヌクレオチド配列：

GACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCCTACTGTTGCACTCTCGGGAGGGCAAAAGTACCAAT
 CACTTGCAAAGGCAAGSCCAAGACATTAACAATTATATAGCTTGGTACCAACAACAAGCCTGGAA
 AAGGTCTTAGGCTGCTCATACATTACATCATCATTAACAAGCGGCATCCCATCAAGGTTC
 AGTGAAGTGGGTCTGGGAGAGATTATTCCTCAGCATCAGCAACCTGGAGCCTGAAGATAT
 TGAACCTATTATTGTTACAGTATTAATCTGTGGACCTCGGTGGAGGACCAAGCTGG
 AATCAAA
 CDR 1
 CDR 2
 CDR 3

タンパク質配列：（１文字コード）

DIQMTQSPSSLSASLGKVTITTCASODINNYIAWYQHKGPKGPRLLIHYSITSLQAGPSRF
 CDR 1 CDR 2
 SGSGSGRDYSFSSINLEPEDIGTYYICLDYDNLWTFGGGKLEIK
 CDR 3

【 図 3 A 】

IGKV1-33*01 (IMGT 命名法) : 81.36%(227/279nt)

```

<----- FR1 - IMGT ----->
1 5 10 15
gac atc cag atg sca cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct ctg
D I Q M T Q S F S L S A S
M64856 IGKV1-33*01
-----
g-a
v

6F4 VL ドメイン
----->
20 25 30
gga ggc aaa gtc acc atc act tgc aag gca agc gaa gac att aac
G G K V T I T C K A S Q Q D I A
M64856 IGKV1-33*01
-----
-a-g- -c- -g- -t- -g- -t-
D M Q S

<----- CDRI1 - IMGT ----->
35 40 45
aat tat ..... atc gct tgg ttc caa cac acc
M Y ..... I A W Y Q H K
-c- -c- -t- t- aa- -g- -g- -a-
M L N Q

FR2 - IMGT ----->
50 55 60 65 70 75
cct gga aaa ggt act agc ctg ctg ata cat tat aca tct .....
G A K G F R L L I H Y T S
-a- -c- -cc A K -c- -g- -t- ct- g- -c-
A K Y D A

<----- - IMGT ----->
65 70 75
... tca tca gca ggc atc cca ... tca agg
... t- l- q- a- g- i- f- s- r-
... M L K T V

FR3 - IMGT ----->
80 85 90
ttc agt gga aat ggg ..... tct ggg aga gat tat tcc ttc agc
F S G S G F S D T Y S C
-a- -a- -a- -a- -t- -t- -t-
T F T T

<----- - IMGT ----->
95 100 104
atc agc aac ctg gag cct gaa gat att gga act tat tat tct cts
I S W L F P D D T Y S C
-c- -g- -c- -a- -c- -a- -a-
S Q A A Q

<----- CDRI3 - IMGT ----->
105 110 115
cag tat gat aat ctg tgg agc ttc ggt gga ggc acc agc ctg gaa
Q Y D S L F T F G G C T K L R
-a- -c- -c- -c- -c- -c-
M S S S S S

```

【 ㄟ 3 B 】

IGKJ1*01 (IMGT 命名法) : 86.84%(33/38nt)

CDR3 - IMGT <----- FR4-IMGT ----->
6F4 VL ドメイン G TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA
W T F G G T K L R I K
J00242 IGK^C1*01 - - - C CA - G - G - - -
 α μ

【 図 2 A 】

IGKV19-93*01 (IMGT 命名法) : 98.56%(275/279nt)

```

5F4 VL ドメイン (AA)          <-----FR1-IMG1----->
5F4 VL ドメイン                D I G M T Q S P S S L S A S L G G R V T
A1235935 IGKV19-93*01      cgcaccatcagcagcaagtcacctctcactctctgctatctctggggccaagcacc
----->-----
5F4 VL ドメイン (AA)          <-----CDR1-IMG1----->
5F4 VL ドメイン                I T C K A S O D I N N Y      1 A
A1235935 IGKV19-93*01      atcatttcgaaagcagccaaagcattcaacattat.....atagct
----->-----
5F4 VL ドメイン (AA)          <-----FR2-IMG1----->
5F4 VL ドメイン                W Y Q . H R P K G K G D L L I H Y T S      CDR
A1235935 IGKV19-93*01      tggtaacacacaaagcctggaaaggctctcagctggctcattatcaaacatt.....
----->-----
5F4 VL ドメイン (AA)          <-----2-IMG1----->
5F4 VL ドメイン                T L Q A S I E      S R P S G G G
A1235935 IGKV19-93*01      ..acatcaagacagcagcattccca...tcagagctcaatgggaagtggg
----->-----
5F4 VL ドメイン (AA)          <-----FR3-IMG1----->
5F4 VL ドメイン                S G R D Y S F S I S L I H Y P E D I G
A1235935 IGKV19-93*01      ctctggggagcttattcttcacgactcagcgaactgggggctcagaagatttggg
----->-----
5F4 VL ドメイン (AA)          <-----CDR3-IMG1----->
5F4 VL ドメイン                T Y I C L Q Y D N L H T F P G G U T K L E
A1235935 IGKV19-93*01      acattattatctctcagcagctctcagctctctgctctgggggacacagctcgga
----->-----
5F4 VL ドメイン (AA)          <----->
5F4 VL ドメイン                I K
                                tcaaac

```

【 圖 2 B 】

IGKJ1*01 (IMGT 命名法) : 100.0%(38/38nt)

COR3-IMGT <-----> PR4-IMGT ----->
 6F4 VL ドメイン (AA) N T F G G G T K L E I K
 6F4 VL ドメイン gtggacgttcctcggtggaggcacaagctgggaatcaaac
 V00777 IGK.L*01

【 図 4 】

通し番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
MAGT 通し番号 (1)	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
KabelTV 通し番号 (2)	1	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
本方式 6F4VLC	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	L	G	G	K	V	T	I	T	

通し番号	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
MAGT 通し番号 (1)	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
KabelTV 通し番号 (2)	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
本方式 6F4VLC	C	K	A	S	D	G	P	D	I	N	H	N	-	-	-	-	-	-	A	N	G	T

通し番号	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
MAGT 通し番号 (1)	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
KabelTV 通し番号 (2)	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
本方式 6F4VLC	H	K	P	Q	G	K	G	P	R	L	H	V	T	S	-	-	-	-	-	-	-

通し番号	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	
MAGT 通し番号 (1)	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	
KabelTV 通し番号 (2)	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	
本方式 6F4VLC	T	L	Q	A	G	I	P	-	S	R	F	S	G	S	G	-	-	-	S	G	R	D

通し番号	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
MAGT 通し番号 (1)	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
KabelTV 通し番号 (2)	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
本方式 6F4VLC	S	F	S	I	S	N	L	E	P	E	D	I	G	T	Y	C	L	Q	Y	D	-

通し番号	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
MAGT 通し番号 (1)	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
KabelTV 通し番号 (2)	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
本方式 6F4VLC	-	-	-	-	-	N	L	W	T	F	D	I	G	T	K	L	E	K	-	-	-

【 図 5 A 】

```

5'          <-----FR1-1MST----->
5'          E I Q L Q Q S G S F E L V R P G S A V K
5'          g g a t c c a a g c t g c a g g a t c t g g a c t c c a g c t g g t g a g c c t g g g g c t c a t g c a a g
AF304556 IGR.V1S135*01

5'          <-----CR1-1MST----->
5'          V S C K A S A S Y S F T E Y S          n t y t c
5'          g t a t c c t c a a g c c t t c g t t a c t c a t c t g a c t a c a g g          a t g t a c
AF304556 IGR.V1S135*01

-----FR2-1MST----->
5'          W V K Q S R G R S L B W I G T I D P Y K C D R
5'          c a a g c a a g c a a g c c t g a a a g c c t c a g t g a t t c a t t a t g a t c t t a c c a
AF304556 IGR.V1S135*01

2-1MST <-----
5'          G G T          R Y N Q K P K G K A T L T V
5'          g y t g t a c t          a g t c a a c a a g c a a g c t c a a g g a a g c a a c a t a c c t g t
AF304556 IGR.V1S135*01

5'          <-----FR3-1MST----->
5'          T R E S S A F M H L T S S D S D S
5'          g a c a t g c t c a a c a g c c t c a t g a t c t a c a a g c c t g a c a c t g a g g a c t g c a
AF304556 IGR.V1S135*01

----->
5'          <-----CDR3-1MST----->
5'          V Y Y C A A R Q T D Y F E Y W G G G T T V
5'          g t c t t c a t c t g c t g c a a g g a c t c t t g t g a c t a c t g g g g c a a g g a c c a c t c t c
AF304556 IGR.V1S135*01

T V S S
a c a g t c t c t c a a g

5'          <-----
5'          T V S S
5'          a c a g t c t c t c a a g

```

【 図 6 A 】

IGHV1-**01* (IMGT 命名法) : 75.34%(217/288nt)

[illegible]

【 図 5 C 】

IGHJ2*01 (IMGT 命名法) : 100.00%(48/48nt)

6F4 VL ドメイン (AA) CDR3-IMGF FR4
Q T D Y F D Y W G Q G T T L T V S S
6F4 VH ドメイン
cagacggactacttctgactactggggccaaggccacctctcacagtctctca
V00770 IGHG2*01

【 図 6 B 】

IGHD1-1*01 (IMGT 命名法) : 71.42%(5/7nt)

GP4 VH ドメイン

X97051 IGHD1-1*01

CDR3 - IMGT

caq acg gac tac ttt

Q T D Y F

- -ac -

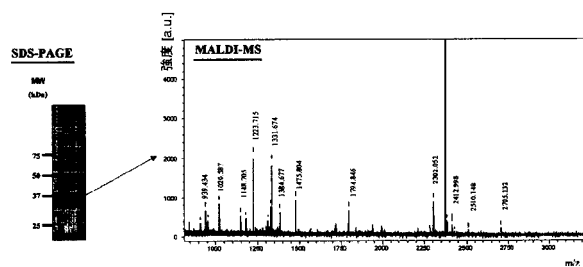
W

【 図 6 C 】

IGHJ4*01 (IMGT 命名法) : 87.50%(42/48nt)

[illegible]

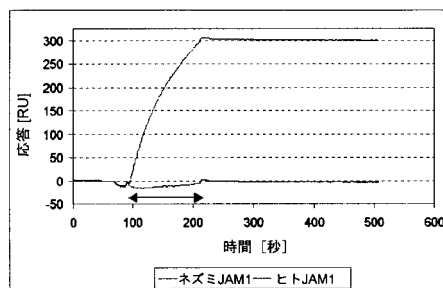
【 図 1 0 】



【 図 7 】

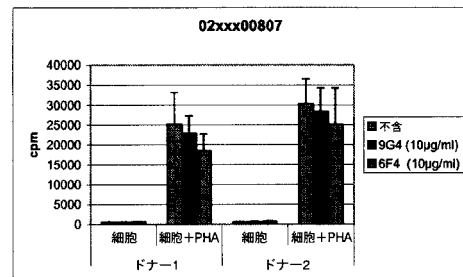
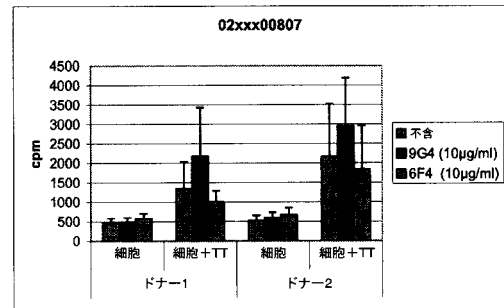
通し番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
BMGT 国庫番号 (1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
KabaviL 国庫番号 (2)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
ネズミ 6F4VH	E	I	Q	L	G	O	S	G	P	-	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	Y	S
通し番号	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
BMGT 国庫番号 (1)	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
KabaviL 国庫番号 (2)	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
ネズミ 6F4VH	C	K	A	S	U	S	F	T	D	Y	S	-	-	-	M	Y	-	W	K	-	-	-
通し番号	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
BMGT 国庫番号 (1)	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
KabaviL 国庫番号 (2)	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
ネズミ 6F4VH	Q	S	H	G	K	S	L	E	W	I	D	Y	I	D	P	Y	N	G	K	G	T	-
通し番号	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
BMGT 国庫番号 (1)	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
KabaviL 国庫番号 (2)	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
ネズミ 6F4VH	A	-	R	Y	N	G	K	F	K	G	K	A	T	L	F	V	D	K	S	T	-	-
通し番号	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
BMGT 国庫番号 (1)	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
KabaviL 国庫番号 (2)	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109
ネズミ 6F4VH	T	F	A	M	H	L	N	S	L	T	S	E	D	S	A	Y	V	C	A	R	G	T
通し番号	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122
BMGT 国庫番号 (1)	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122
KabaviL 国庫番号 (2)	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122
ネズミ 6F4VH	D	-	-	-	-	Y	F	D	V	Y	G	Q	G	T	F	L	T	V	S	-	-	-

【 図 1 3 】

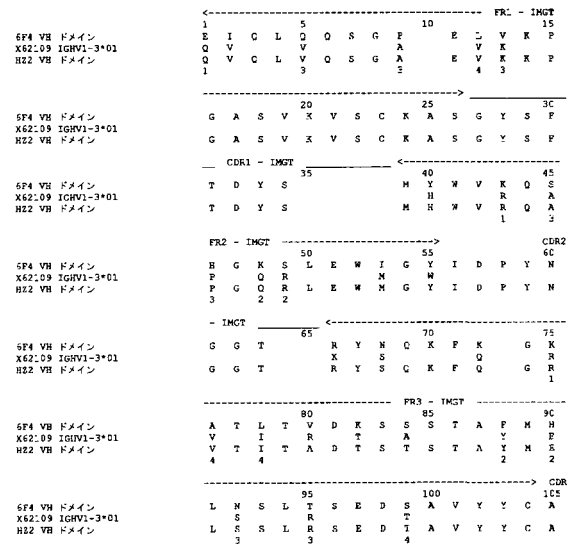


【 図 2 8 】

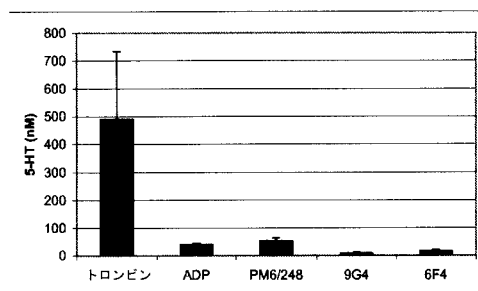
A

**B**

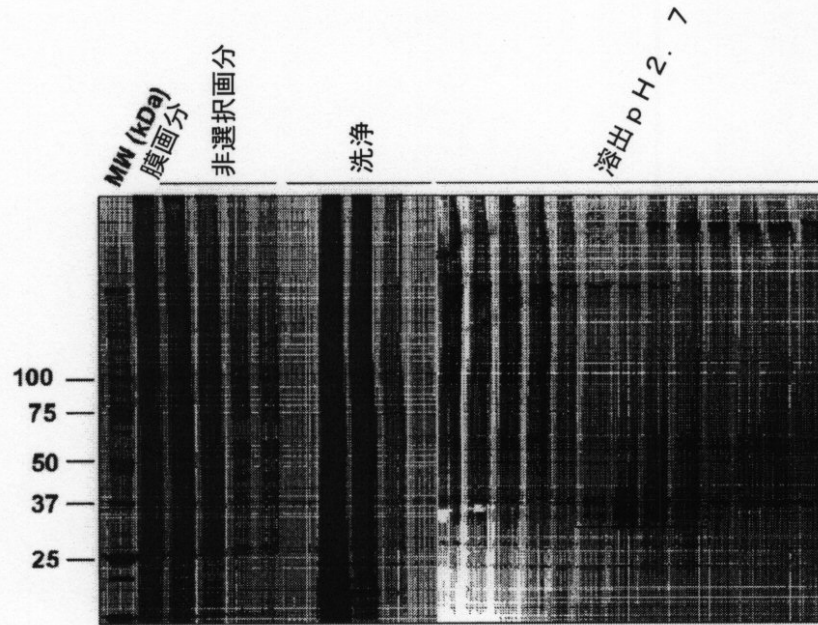
【 図 3 1 】



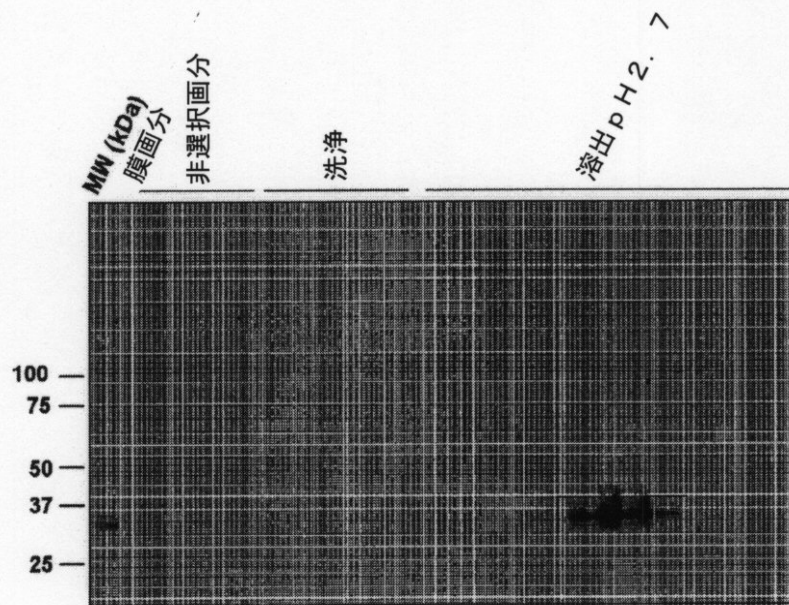
6F4 VH ドメイン
X62L09 IGHV1-3*01
H22 VH ドメイン



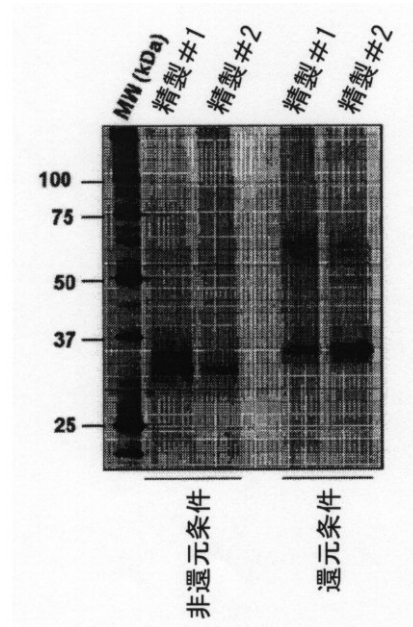
【 図 8 A 】



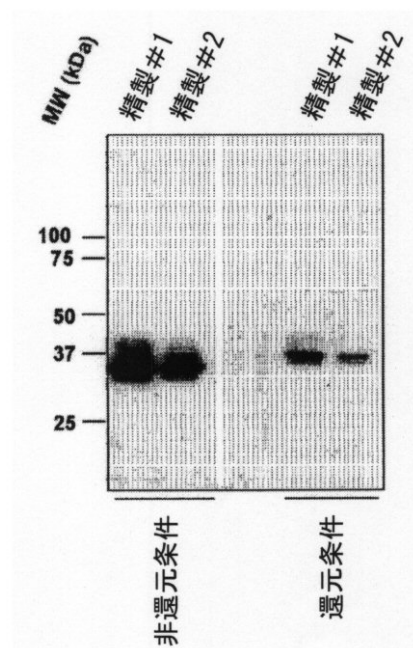
【 図 8 B 】



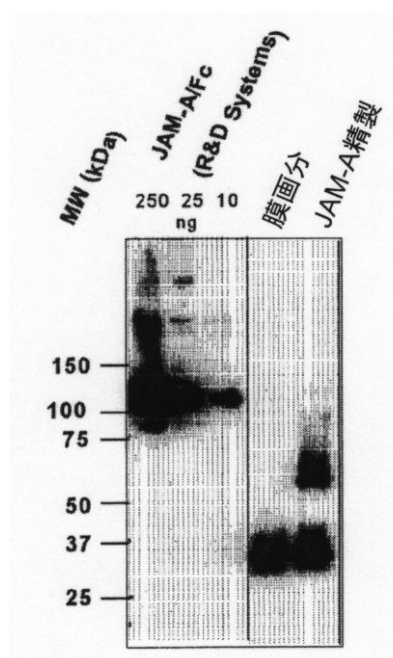
【 図 9 A 】



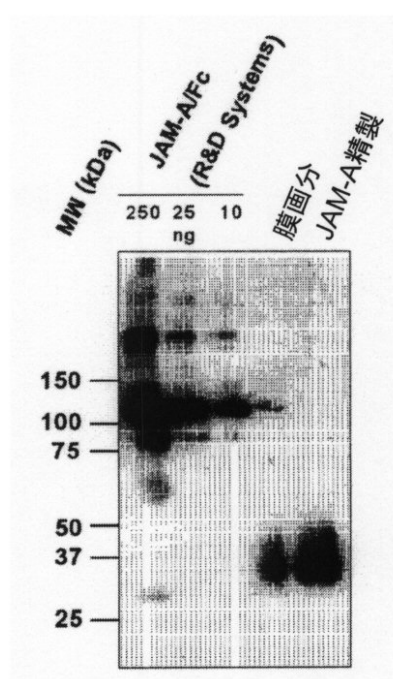
【 図 9 B 】



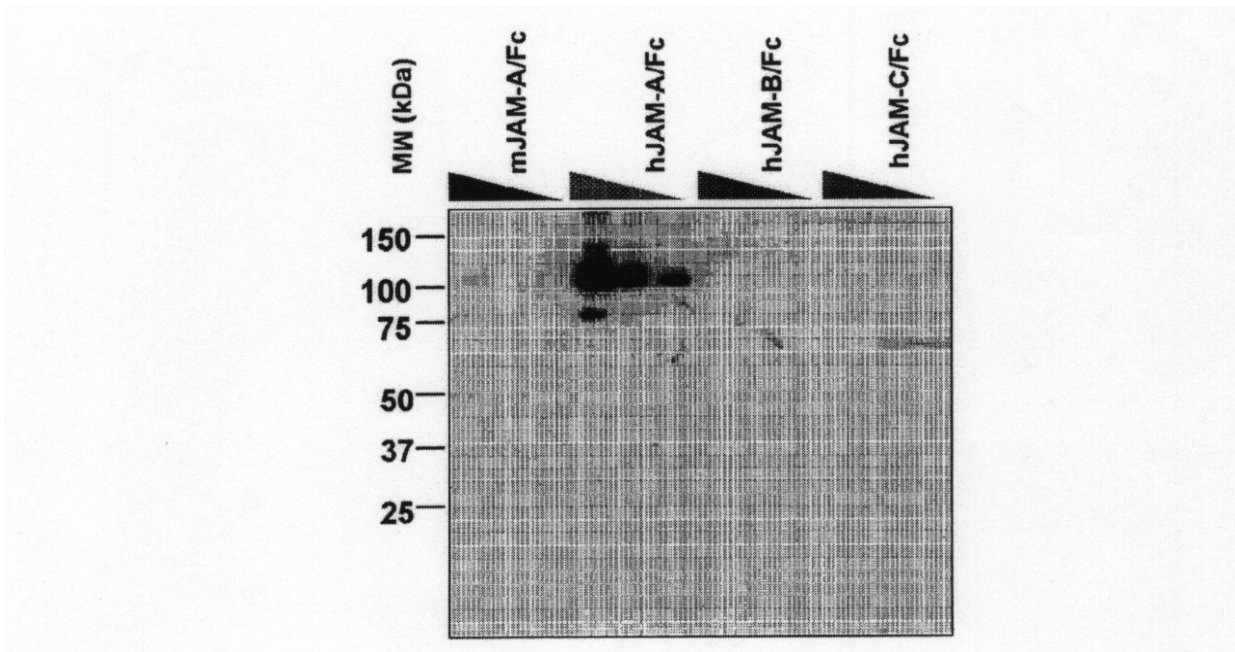
【 図 1 1 A 】



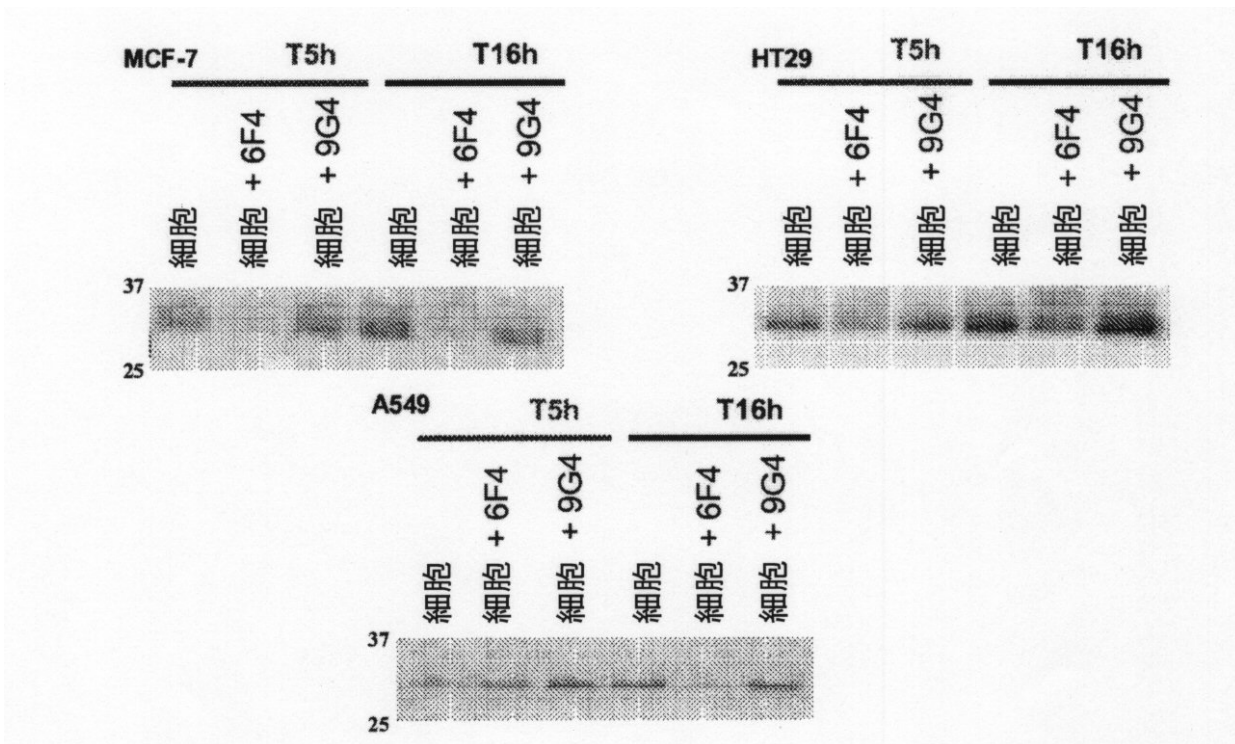
【 図 1 1 B 】



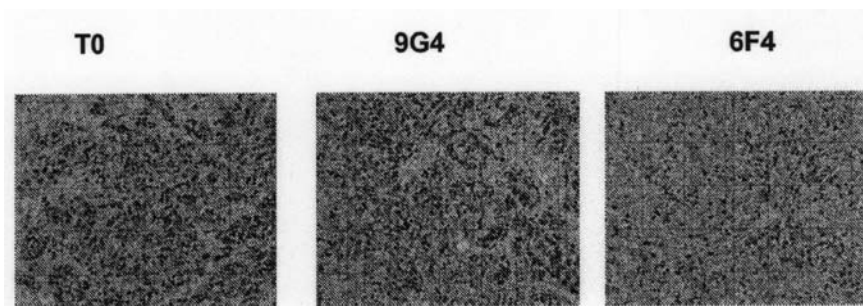
【 図 1 2 】



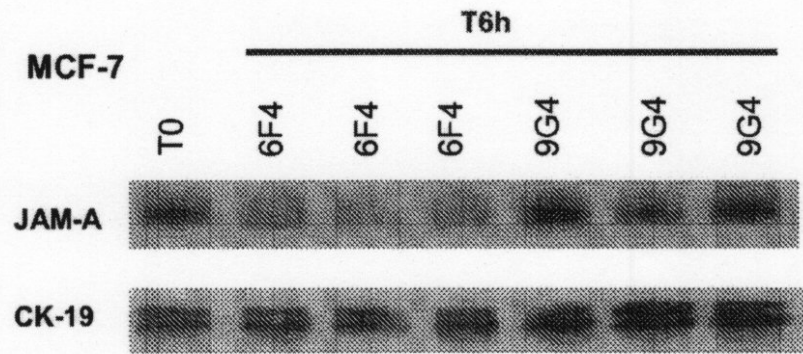
【 図 1 9 】



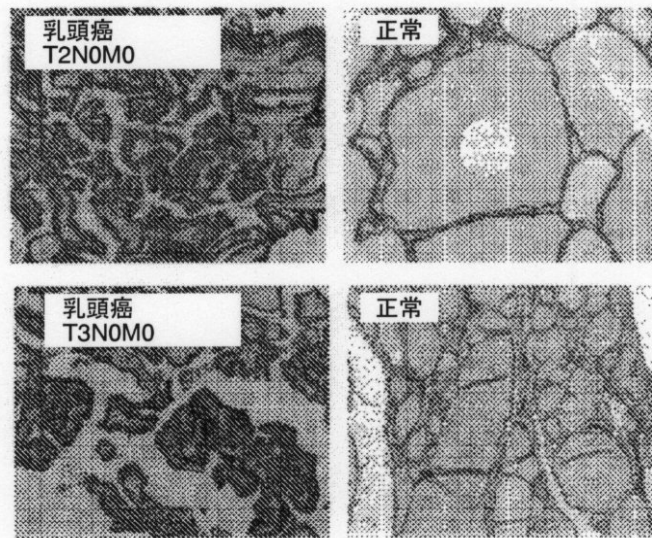
【 図 2 0 】



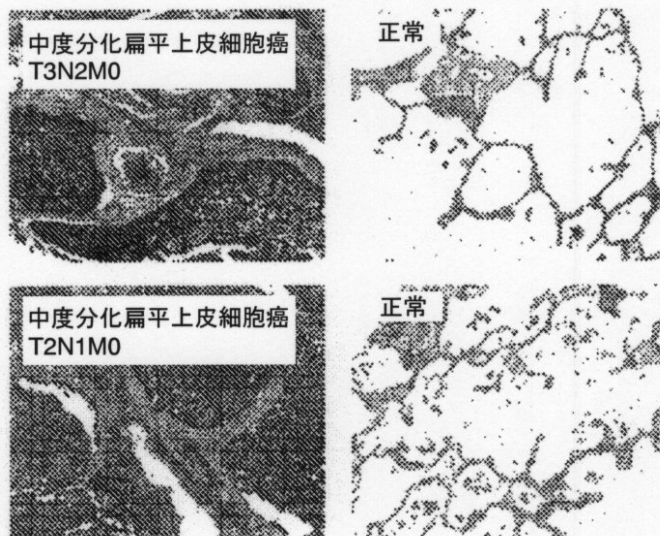
【図 2 1】



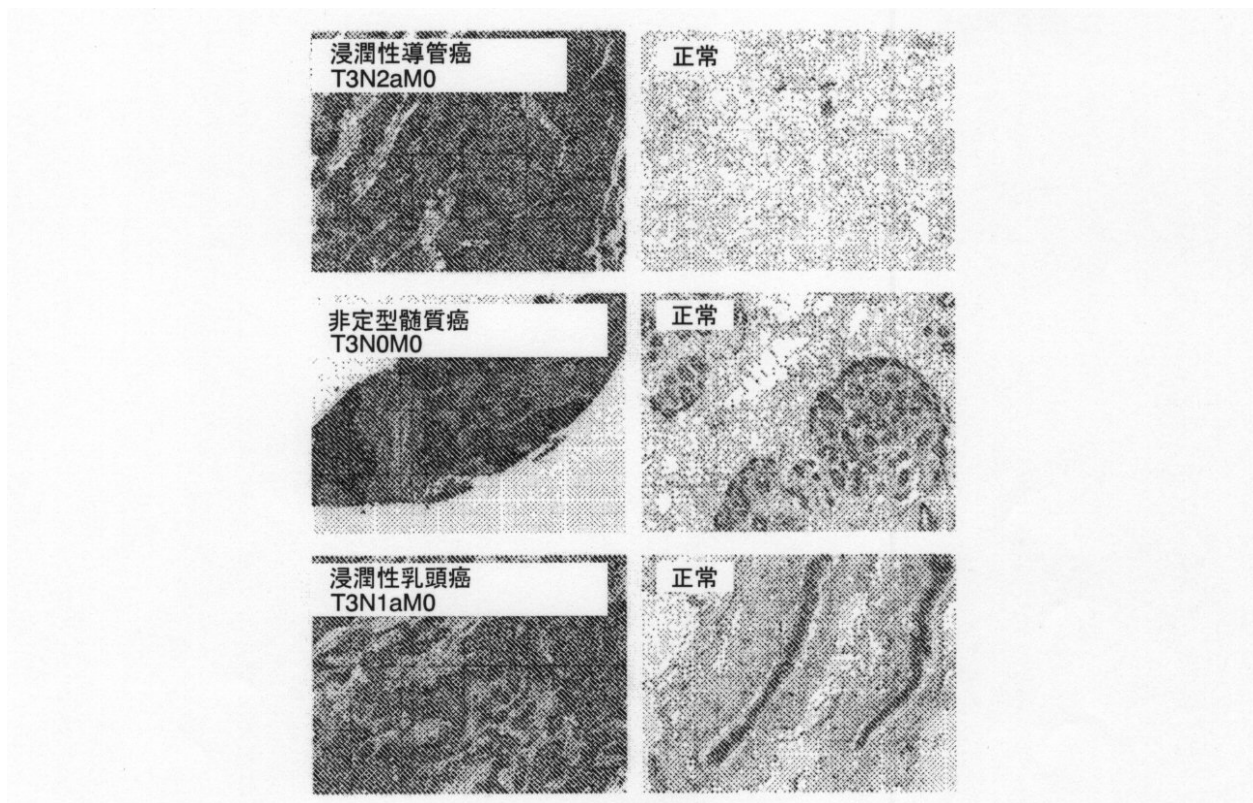
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



【配列表】

2010509931000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成21年3月5日(2009.3.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも配列番号1、2、3、4、5もしくは6を含んでなる配列のCDRの中から選択される少なくとも1つのCDRを含んでなる、イン・ビトロおよび/またはイン・ビボにおいて腫瘍細胞の増殖を阻害可能な単離された抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項2】

モノクローナル抗体からなる、請求項1に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項3】

配列番号2、4および6の配列の3つのCDRのうち少なくとも1つを含んでなる重鎖を含んでなる、請求項1または請求項2に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項4】

それぞれCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3である下記の3つのCDR：
 CDR-H1は、配列番号2、7もしくは9の配列を含んでなり、
 CDR-H2は、配列番号4もしくは11の配列を含んでなり；かつ
 CDR-H3は、配列番号6もしくは12の配列を含んでなる
 を含んでなる重鎖を含んでなる、請求項1～3のいずれか一項に記載の抗体、またはその

誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 5】

配列番号 7 の配列の C D R - H 1、配列番号 4 の配列の C D R - H 2 および配列番号 12 の配列の C D R - H 3 を含んでなる重鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 6】

配列番号 9 の配列の C D R - H 1、配列番号 11 の配列の C D R - H 2 および配列番号 6 の配列の C D R - H 3 を含んでなる重鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 7】

配列番号 1、3 および 5 の配列の 3 つの C D R のうち少なくとも 1 つを含んでなる軽鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 8】

それぞれ C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 である下記の 3 つの C D R :

C D R - L 1 は、配列番号 1 もしくは 8 の配列を含んでなり、

C D R - L 2 は、配列番号 3 もしくは 10 の配列を含んでなり；かつ

C D R - L 3 は、配列番号 5 の配列を含んでなる

を含んでなる軽鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 9】

配列番号 1 の配列の C D R - L 1、配列番号 3 の配列の C D R - L 2 および配列番号 5 の配列の C D R - L 3 を含んでなる軽鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 10】

配列番号 8 の配列の C D R - L 1、配列番号 10 の配列の C D R - L 2 および配列番号 5 の配列の C D R - L 3 を含んでなる軽鎖を含んでなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 11】

下記の 3 つの C D R :

配列番号 1 の配列の C D R - L 1 ;

配列番号 3 の配列の C D R - L 2 ; および

配列番号 5 の配列 C D R - L 3

を含んでなる軽鎖と、

下記の 3 つの C D R :

配列番号 7 の配列の C D R - H 1 ;

配列番号 4 の配列の C D R - H 2 ; および

配列番号 12 の配列の C D R - H 3

を含んでなる重鎖と

を含んでなる、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 12】

下記の 3 つの C D R :

配列番号 8 の配列の C D R - L 1 ;

配列番号 10 の配列の C D R - L 2 ; および

配列番号 5 の配列の C D R - L 3

を含んでなる軽鎖と、

下記の 3 つの C D R :

配列番号 9 の配列の C D R - H 1 ;

配列番号 11 の配列の C D R - H 2 ; および

配列番号 6 の配列の C D R - H 3
を含んでなる重鎖と

を含んでなる、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 1 3】

配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖配列を含んでなり、かつ、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖配列を含んでなる、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 1 4】

配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖配列を含んでなり、かつ、配列番号 1 8 または 1 9 のアミノ酸配列を含んでなる重鎖配列を含んでなる、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 1 5】

誘導化合物が、初期抗体のパラトピック認識特性の総てまたは一部を保存するように少なくとも 1 つの C D R がグラフトされているペプチドスキャフォールドを含んでなる結合タンパク質からなる、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 1 6】

ペプチドスキャフォールドが、a) 系統発生的によく保存されており、b) 強固な構造であり、c) 周知の三次元分子構成を有し、d) サイズが小さく、および/または e) 安定性を改変することなく欠失および/または挿入により改変可能な領域を含んでなるタンパク質の中から選択される、請求項 1 5 に記載の抗体またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 1 7】

前記ペプチドスキャフォールドが、i) フィブロネクチン、優先的にはフィブロネクチン 3 型ドメイン 1 0 に由来するスキャフォールド、リボカリン、アンチカリン、黄色ブドウ球菌の A タンパク質のドメイン B に由来する Z タンパク質、チオレドキシン A、または「アンキリンリピート」、「アルマジロリピート」、「ロイシンリッチリピート」および「テトラトリコペプチドリピート」などの繰り返しモチーフを有するタンパク質、または i i i) ニューロン NO シンターゼのタンパク質阻害剤 (P I N) のの中から選択される、請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の抗体またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 1 8】

前記機能的フラグメントが、フラグメント F v、F a b、(F a b')₂、F a b'、s c F v、s c F v - F c およびダイアボディー、または P E G 化フラグメントなどの半減期が延長されているいずれかのフラグメントの中から選択される、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 1 9】

前記抗体がネズミ抗体であり、および配列番号 1 5 のアミノ酸配列の軽鎖と、配列番号 1 6 のアミノ酸配列の重鎖とを含んでなる、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 2 0】

前記抗体がマウスとは異種の抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域も含んでなるキメラ抗体である、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 2 1】

前記の異種がヒトである、請求項 2 0 に記載のキメラ抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 2 2】

ヒト抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域が、それぞれ 領域および -

1、 - 2 または - 4 領域である、請求項 2 1 に記載のヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント

【請求項 2 3】

2 0 0 6 年 7 月 6 日に I - 3 6 4 6 番として the CNCM, Pasteur Institute, Paris に提出されたネズミハイブリドーマ。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載のハイブリドーマにより分泌される抗体。

【請求項 2 5】

J A M - A (結合部接着分子 - A) タンパク質と特異的に結合できる、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 2 6】

J A M - A タンパク質に対する K d がおよそ 1 n M ~ 1 p M の間、より優先的には 1 0 p M ~ 4 0 p M の間である、請求項 2 5 に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 2 7】

下記の核酸：

a) 請求項 1 ~ 2 2 および 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントをコードする核酸、D N A または R N A ；

b) a) で定義された核酸と相補的な核酸；

c) 高ストリンジェント条件下で配列番号 2 0 ~ 3 1 の核酸配列の C D R の少なくとも 1 つとハイブリダイズし得る少なくとも 1 8 ヌクレオチドの核酸；および

d) 高ストリンジェント条件下で少なくとも配列番号 3 2 もしくは 3 6 の核酸配列の軽鎖および / または配列番号 3 3 、 3 7 もしくは 3 8 の核酸配列の重鎖とハイブリダイズし得る少なくとも 1 8 ヌクレオチドの核酸

の中から選択される単離された核酸。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 に記載の核酸からなるベクター。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 3 0】

請求項 2 9 に記載のベクターにより形質転換された細胞を含んでなる、ヒト以外のトランスジェニック動物。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 2 2 および 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントを製造する方法であって、下記の工程：

a) 請求項 2 9 に記載の宿主細胞の培地で、請求項 2 9 に記載の宿主細胞に好適な培養条件にて培養すること；および

b) このようにして培養培地から、または培養細胞から生産された抗体またはその機能的フラグメントの 1 つを回収すること

を含む、方法。

【請求項 3 2】

二重特異性抗体からなり、受容体 V E G F R 、 V E G F 、 E G F R 、 I G F - 1 R 、 H E R 2 n e u 、 H G F 、 c M E T 、 F G F 、 C X C R 4 および C X C R 2 の中から選択される、腫瘍発達に関連する受容体と相互作用し得る第二のモチーフを含んでなる、請求項 1 ~ 2 2 および 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 3 3】

薬剤として用いるための、請求項 1 ~ 2 2 、 2 4 ~ 2 6 および 3 2 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント。

【請求項 3 4】

請求項 1 ~ 2 2、2 4 ~ 2 6、3 2 および 3 3 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントからなる化合物を有効成分として含んでなる、組成物。

【請求項 3 5】

同時、個別または継続形式で用いるための組合せ製品として、J A M - A タンパク質に対する抗体以外の抗腫瘍抗体をさらに含んでなる、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

同時、個別または継続形式で用いるための組合せ製品として、細胞傷害性 / 細胞増殖抑制剤をさらに含んでなる、請求項 3 4 または請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記細胞傷害性 / 細胞増殖抑制剤が、同時使用のための前記組成物の少なくとも 1 つの要素と化学的に結合されている、請求項 3 6 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

少なくとも 1 つの前記抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメントが、細胞毒および / または放射性同位元素にコンジュゲートされている、請求項 3 4 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 9】

薬剤として用いるための、請求項 3 4 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 0】

腫瘍細胞の増殖に関連する疾病の予防または治療のための薬剤の製造のための、請求項 1 ~ 2 2、2 4 ~ 2 6、3 2 および 3 4 のいずれか一項に記載の抗体、またはその誘導化合物もしくは機能的フラグメント、および / または請求項 3 3 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

【請求項 4 1】

癌の予防または治療のための薬剤の製造のための、請求項 4 0 に記載の使用。

【請求項 4 2】

前記癌が前立腺癌、骨肉腫、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、多発性骨髄腫、卵巣癌、膵臓癌および結腸癌の中から選択される癌である、請求項 4 1 に記載の使用。

【請求項 4 3】

前記癌がエストロゲン関連乳癌、非小細胞肺癌、結腸癌および膵臓癌の中から選択される癌である、請求項 4 2 に記載の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/062760

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 C12N5/12 C12N5/20 C12P21/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/060457 A (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; BALASA BALAJI [US]; TSURUSHITA NAOYA [US] 7 July 2005 (2005-07-07) page 11; sequences 75,76,77	1,2,8,9, 20-22, 27-39
X	WO 2006/008076 A2 (UNIV DEGLI STUDI MILANO [IT]; MANTOVANI ALBERTO [IT]; DEJANA ELISABETT) 26 January 2006 (2006-01-26) claims ----- -/-	25-39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 March 2008		25/03/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Didelon, Frédéric

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/062760

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CORVAIA NATHALIE ET AL: "BLOCKADE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR PRODUCTION BY A2CHM, A RECOMBINANT HUMANIZED ANTI-INSULIN LIKE GROWTH FACTOR RECEPTOR I ANTIBODY" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 47, April 2006 (2006-04), page 280, XP001245692 ISSN: 0197-016X abstract</p>	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/062760

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005060457	A	07-07-2005	NONE
WO 2006008076	A2	26-01-2006	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	M
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
	A 6 1 K 43/00	
	A 6 1 K 39/395	L
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 リリアン、ゲシュ

フランス国アイゼ、ルート、ド、クルゼ、 1 5

(72)発明者 ナタリー、コルベア

フランス国コロンジユ、スウ、サルプ、ルート、ド、ボブレ、レジダンス、アルク、アン、シエル、ル、クワン、 2 0

(72)発明者 ジャン フランソワ、アウー

フランス国ボーモン、ドメヌ、デュ、サレブ、ルート、デュ、サレブ

(72)発明者 セドリック、ベス

フランス国ビルビーユ、ブルバル、デ、アカンテ、 1 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA02

4B064 AG27 CA20 CC24 DA01

4B065 AA91X AA92X AB05 BA08 CA25 CA44

4C076 CC27 EE23 FF31

4C084 AA22 MA02 NA12 NA13 NA14 ZB262

4C085 AA14 BB01 CC23 DD63 EE03

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA57 DA76 EA28 EA51 FA74