

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6148984号
(P6148984)

(45) 発行日 平成29年6月14日(2017.6.14)

(24) 登録日 平成29年5月26日(2017.5.26)

| | | | | |
|--------------|--------|-----------|---------|---------|
| (51) Int.Cl. | F 1 | C 1 2 N | 15/00 | Z N A A |
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) | C O 7 K | 16/28 |
| C O 7 K | 16/28 | (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 |
| A 6 1 K | 39/395 | (2006.01) | A 6 1 K | 31/40 |
| A 6 1 K | 31/40 | (2006.01) | A 6 1 K | 31/357 |
| A 6 1 K | 31/357 | (2006.01) | | |

請求項の数 11 (全 67 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2013-547713 (P2013-547713) | (73) 特許権者 | 000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 |
| (86) (22) 出願日 | 平成23年12月30日(2011.12.30) | (74) 代理人 | 100080791 弁理士 高島 一 |
| (65) 公表番号 | 特表2014-509187 (P2014-509187A) | (74) 代理人 | 100125070 弁理士 土井 京子 |
| (43) 公表日 | 平成26年4月17日(2014.4.17) | (74) 代理人 | 100136629 弁理士 鎌田 光宣 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2011/068244 | (74) 代理人 | 100121212 弁理士 田村 弥栄子 |
| (87) 国際公開番号 | W02012/092616 | (74) 代理人 | 100122688 弁理士 山本 健二 |
| (87) 国際公開日 | 平成24年7月5日(2012.7.5) | (74) 代理人 | 100117743 弁理士 村田 美由紀 |
| 審査請求日 | 平成26年12月25日(2014.12.25) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 61/470,382 | | |
| (32) 優先日 | 平成23年3月31日(2011.3.31) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 61/428,699 | | |
| (32) 優先日 | 平成22年12月30日(2010.12.30) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】結合抗CD38抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトCD38(配列番号1)及びカニクイザルCD38(配列番号2)に特異的に結合する単離された抗体であって、

a) 以下を含む重鎖可変領域：

- i) 配列番号3を含む第1のCDR；
- ii) 配列番号4を含む第2のCDR；
- iii) 配列番号5を含む第3のCDR；及び

b) 以下を含む軽鎖可変領域：

- i) 配列番号6を含む第1のCDR；
- ii) 配列番号7を含む第2のCDR；
- iii) 配列番号8を含む第3のCDR；及び

c) 共有結合された薬物部分、

を含み、前記重鎖可変領域が配列番号9を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号10を含む抗体。

【請求項2】

重鎖が配列番号21を含み、軽鎖が配列番号22を含む、請求項1記載の単離された抗体。

【請求項3】

ヒトCD38(配列番号1)及びカニクイザルCD38(配列番号2)に特異的に結合

10

20

する単離された抗体であって、

a) 以下を含む重鎖可変領域：

- i) 配列番号 1 3 を含む第 1 の C D R ；
- i i) 配列番号 1 4 を含む第 2 の C D R ；
- i i i) 配列番号 1 5 を含む第 3 の C D R ；及び

b) 以下を含む軽鎖可変領域：

- i) 配列番号 1 6 を含む第 1 の C D R ；
- i i) 配列番号 1 7 を含む第 2 の C D R ；
- i i i) 配列番号 1 8 を含む第 3 の C D R ；及び

c) 共有結合された薬物部分、

を含み、重鎖可変領域が配列番号1 1を含み、軽鎖可変領域が配列番号1 2を含む、抗体。

【請求項 4】

ヒト C D 3 8 (配列番号 1) 及びカニクイザル C D 3 8 (配列番号 2) に特異的に結合する単離された抗体であって、

a) 配列番号 1 9 を含む重鎖；及び

b) 以下を含む軽鎖可変領域：

- i) 配列番号 1 6 を含む第 1 の C D R ；
- i i) 配列番号 1 7 を含む第 2 の C D R ；
- i i i) 配列番号 1 8 を含む第 3 の C D R ；及び

c) 共有結合された薬物部分、

を含み、軽鎖が配列番号2 0を含む、抗体。

【請求項 5】

さらに F c ドメインを含む、請求項 1 記載の単離された抗体。

【請求項 6】

前記 F c ドメインがヒト F c ドメインである、請求項 5 記載の単離された抗体。

【請求項 7】

前記 F c ドメインが変異 F c ドメインである、請求項 5 記載の単離された抗体。

【請求項 8】

前記薬物部分が、リンカーを用いて前記抗体に結合される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の単離された抗体。

【請求項 9】

前記薬物部分が、アウリストチン、メイタンシノイド、及びカリケアマイシン、ドラステチン、及びトリコテセンからなる群から選択される、請求項 8 記載の単離された抗体。

【請求項 10】

以下をコードする単離された核酸を含む、宿主細胞：

(A) 配列番号 9 の配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 0 の配列を含む軽鎖可変領域；

(B) 配列番号 2 1 の配列を含む重鎖及び配列番号 2 2 の配列を含む軽鎖；

(C) 配列番号 1 9 の配列を含む重鎖及び配列番号 2 0 の配列を含む軽鎖；又は

(D) 配列番号 1 1 の配列を含む重鎖及び配列番号 1 2 の配列を含む軽鎖。

【請求項 11】

ヒト C D 3 8 (配列番号 1) 及びカニクイザル C D 3 8 (配列番号 2) に特異的に結合する単離された抗体であって、

a) 以下を含む重鎖可変領域：

- i) 配列番号 3 を含む第 1 の C D R ；
- i i) 配列番号 4 を含む第 2 の C D R ；
- i i i) 配列番号 5 を含む第 3 の C D R ；及び

b) 以下を含む軽鎖可変領域：

- i) 配列番号 6 を含む第 1 の C D R ；

10

20

30

40

50

i i) 配列番号 7 を含む第 2 の C D R ;
i i i) 配列番号 8 を含む第 3 の C D R ; 及び
c) 共有結合された薬物部分、

を含む抗体を含み、前記重鎖可変領域が配列番号 9 を含み、前記軽鎖可変領域が配列番号 10 を含む、ガンの治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(背景)

本願は、2010年12月30に出願されたUSSN 61/428,699；2011年3月31に出願されたUSSN 61/470,382；2011年3月31日に出願されたUSSN 61/470,406；及び2011年5月11日に出願されたUSSN 61/485,104の35U.S.C. § 119(e)下での利益を主張し、これらの出願は全て、その全体が参考によって本明細書に援用される。 10

【背景技術】

【0 0 0 2】

C D 3 8 は、サイクリック A D P リボースヒドロラーゼとしても知られ、長い C 末端細胞外ドメインと、短い N 末端細胞質ドメインとを有する I I 型膜貫通糖タンパク質である。 C D 3 8 は、 C D 1 5 7 及び A p l y s i a A D P R を含む、関連する膜結合酵素又は可溶性酵素のグループのメンバーである。この酵素ファミリーは、 N A D をサイクリック A D P リボース又はニコチン酸(n i c t o t i n i c a c i d) - アデニンジヌクレオチドホスフェートに変換する独特の能力を有する。 20

【0 0 0 3】

さらに、 C D 3 8 は、 C a ^{2 +} 動員に関与すること、及び多数のシグナル伝達分子(ホスホリパーゼ C 、 Z A P - 7 0 、 s y k 及び c - c b 1 を含む)のチロシンリン酸化を介したシグナル伝達に関与することが報告されている。これらの観察結果に基づいて、 C D 3 8 は、リンパ系細胞の正常な発達の間、その成熟及び活性化において重要なシグナル伝達分子であることが提案された。 30

【0 0 0 4】

造血細胞の間での様々な機能的效果は、 C D 3 8 媒介性のシグナル伝達に起因しており、これには、リンパ球増殖、サイトカイン放出、 B 細胞及び骨髓性細胞の発達及び生存の制御、並びに樹状細胞の成熟誘導が含まれる。 30

【0 0 0 5】

それにも関わらず、シグナル伝達及び造血における C D 3 8 の正確な役割は不明確なままである。なぜなら、シグナル伝達研究の大半は、 C D 3 8 を異所的に過剰発現する細胞株及び抗 C D 3 8 モノクローナル抗体(非生理的リガンドである)を使用しているからである。

【0 0 0 6】

C D 3 8 の予測される天然リガンドは、 C D 3 1 (P E C A M - 1 ； 血小板内皮細胞接着分子 - 1) である。 C D 3 1 は、 1 3 0 k D の免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーであり、循環血小板、好中球、単球及びナイーブ B リンパ球の表面に発現している。機能的には、 C D 3 1 は接着分子として作用すると考えられる。 C D 3 8 と C D 3 1 の相互作用が、白血病細胞の生存の促進に作用し得ることが示唆されている。 40

【0 0 0 7】

单一分子を欠損した動物モデルは、多くの例において、その動物における分子の生物学的役割を理解する基本的ツールである。その根底にある前提是、タンパク質が必須の機能を発揮しているなら、その完全な喪失により、当該機能の完全な喪失がもたらされるというものである。

【0 0 0 8】

C D 3 8 ノックアウトマウスが作出されている。これらの動物は、組織関連 N A D a s 50

e活性のほぼ完全な喪失を示す。それにも関わらず、これらの動物は生存可能であり、これにより、CD38及びその活性は生存に必要ではないとの結論が導かれる。しかしながら、これらのマウスは、先天性免疫の欠損及びT細胞依存性液性免疫応答の低下を示す。

【0009】

マウスでの結果とは対照的に、ヒトにおいては、CD38の欠如と生存とは相容れないとの強力な状況証拠が存在する。新生児由来の5,000超の血液サンプルを分析しても、CD38⁻個体を一つも同定できなかった；これは、マウスとは異なって、CD38が生存に必要であることを示唆する。従って、CD38機能についてマウスで観察された結果をヒトに外挿できるかは不明である。

【0010】

CD38は、多くの造血器悪性腫瘍、及び様々な造血器悪性腫瘍に由来する細胞株で上方制御されており、当該悪性腫瘍としては、非ホジキンリンパ腫（NHL）、バーキットリンパ腫（BL）、多発性骨髓腫（MM）、B細胞慢性リンパ性白血病（B-CLL）、B細胞及びT細胞急性リンパ性白血病（ALL）、T細胞リンパ腫（TCL）、急性骨髓性白血病（AML）、有毛細胞白血病（HCL）、ホジキンリンパ腫（HL）及び慢性骨髓性白血病（CML）が挙げられる。一方、造血系の最も未発達な多能性幹細胞はCD38⁻である（図1）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

抗ガン剤の発見及び開発における最近の進歩にも関わらず、CD38発現腫瘍を伴う多くの種類のガンは、依然として予後が不良である。従って、このような種類のガンを治療するための方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

（本発明の要旨）

本明細書では、CD38に結合するための試薬及び方法、並びにCD38特異的抗体を含むCD38特異的結合剤を用いた、CD38関連疾患の治療方法及びCD38の検出方法を提供する。治療目的のために、本発明の抗体は、以下に記載のように、結合された薬物部分（conjugated drug moiety）を含む。診断目的のために、本発明の抗体は、検出可能な標識を任意選択で含んでよい。

【0013】

従って、いくつかの実施態様において、ヒトCD38（配列番号1）及びカニクイザルCD38（配列番号2）に特異的な単離された抗体を記載する。この抗体は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域から構成されており、ここで重鎖可変領域は、3つの相補性決定領域（CDRs）であるHCDR1、HCDR2及びHCDR3から構成され、軽鎖可変領域も3つのCDRであるLCDR1、LCDR2及びLCDR3から構成される。CDRの配列は、HCDR1（配列番号3）、HCDR2（配列番号4）、HCDR3（配列番号5）、LCDR1（配列番号6）、LCDR2（配列番号7）及びLCDR3（配列番号8）により表される。いくつかの実施態様において、抗体はさらに、結合された薬物部分を含む。

【0014】

他の実施態様において、単離された抗体は重鎖可変領域から構成されており、ここで重鎖可変領域の配列は配列番号9により包含される。他の実施態様において、単離された抗体は軽鎖可変領域から構成されており、ここで軽鎖可変領域の配列は配列番号10により包含される。いくつかの実施態様において、抗体はさらに、結合された薬物部分を含む。

【0015】

いくつかの実施態様において、単離された抗体は重鎖可変領域から構成されており、ここで重鎖可変領域の配列は配列番号9により包含される。他の実施態様において、単離された抗体は軽鎖可変領域から構成されており、ここで軽鎖可変領域の配列は配列番号10

10

20

30

40

50

により包含される。重鎖可変領域と軽鎖可変領域のこの組合せは、A b 7 9と称される。いくつかの実施態様において、抗体はさらに、結合された薬物部分を含む。

【0016】

いくつかの実施態様において、単離された抗体は、重鎖及び軽鎖から構成されており、ここで重鎖の配列は配列番号11により包含され、軽鎖は配列番号12により包含される。いくつかの実施態様において、抗体はさらに、結合された薬物部分を含む。

【0017】

いくつかの実施態様において、単離された抗体はFcドメインを含む。他の実施態様において、FcドメインはヒトFcドメインである。さらに他の実施態様において、Fcドメインは変異型Fcドメインである。

10

【0018】

いくつかの実施態様において、配列番号11の重鎖をコードする単離された核酸を提供する。他の実施態様において、配列番号12の軽鎖をコードする単離された核酸を提供する。

【0019】

いくつかの実施態様において、配列番号11の重鎖をコードする単離された核酸と、配列番号12の軽鎖をコードする単離された核酸とを含む、宿主細胞を提供する。

【0020】

いくつかの実施態様において、本発明の抗体の製造方法を提供する。当該方法は、配列番号11の重鎖をコードする単離された核酸と、配列番号12の軽鎖をコードする単離された核酸とを含む宿主細胞を、前記単離された核酸が発現し、抗体が製造される条件下で培養する工程を包含する。次いで、当該分野で標準的な化学を用いて、薬物部分を抗体に結合する。

20

【0021】

いくつかの実施態様において、ヒトCD38(配列番号1)及びカニクイザルCD38(配列番号2)に特異的な単離された抗体を記載する。この抗体は、6つのCDRから構成されており、ここで、この抗体の各CDRは、0個、1個又は2個のアミノ酸置換により、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8とは異なり得る。いくつかの実施態様において、抗体はさらに、結合された薬物部分を含む。

【0022】

30

他の実施態様において、ヒトCD38(配列番号1)及びカニクイザルCD38(配列番号2)に特異的な単離された抗体を記載する。この抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域から構成されており、ここで重鎖可変領域は、3つの相補性決定領域(CDRs)であるHCDR1、HCDR2及びHCDR3から構成されており、軽鎖可変領域も3つのCDRであるLCDR1、LCDR2及びLCDR3から構成されている。CDRの配列は、HCDR1(配列番号13)、HCDR2(配列番号14)、HCDR3(配列番号15)、LCDR1(配列番号16)、LCDR2(配列番号17)及びLCDR3(配列番号18)により表される。いくつかの実施態様において、抗体はさらに、結合された薬物部分を含む。

【0023】

40

他の実施態様において、単離された抗体は重鎖可変領域から構成されており、ここで重鎖可変領域の配列は配列番号19により包含される。他の実施態様において、単離された抗体は軽鎖可変領域から構成されており、ここで軽鎖可変領域の配列は配列番号20により包含される。いくつかの実施態様において、抗体はさらに、結合された薬物部分を含む。

【0024】

いくつかの実施態様において、単離された抗体は重鎖可変領域から構成されており、ここで重鎖可変領域の配列は配列番号19により包含される。他の実施態様において、単離された抗体は軽鎖可変領域から構成されており、ここで軽鎖可変領域の配列は配列番号20により包含される。重鎖可変領域と軽鎖可変領域のこの組合せはA b 1 9と称される。

50

いくつかの実施態様において、抗体はさらに、結合された薬物部分を含む。いくつかの実施態様において、抗体はさらに、別法として、診断を容易にするために検出可能な標識を含む。

【0025】

いくつかの実施態様において、単離された抗体は、重鎖及び軽鎖から構成されており、ここで重鎖の配列は配列番号21により包含され、軽鎖は配列番号22により包含される。いくつかの実施態様において、抗体はさらに、結合された薬物部分を含む。

【0026】

いくつかの実施態様において、配列番号21の重鎖をコードする単離された核酸を提供する。他の実施態様において、配列番号22の軽鎖をコードする単離された核酸を提供する。
10

【0027】

いくつかの実施態様において、配列番号21の重鎖をコードする単離された核酸と、配列番号22の軽鎖をコードする単離された核酸とを含む、宿主細胞を提供する。

【0028】

いくつかの実施態様において、本発明の抗体の製造方法を提供する。当該方法は、配列番号21の重鎖をコードする単離された核酸と、配列番号22の軽鎖をコードする単離された核酸とを含む宿主細胞を、前記単離された核酸が発現し、抗体が製造される条件下で培養する工程を包含する。次いで、当該分野で標準的な化学を用いて、薬物部分を抗体に結合する。
20

【0029】

他の実施態様において、ヒトCD38（配列番号1）及びカニクイザルCD38（配列番号2）に特異的な単離された抗体を記載する。この抗体は、6つのCDRから構成されており、ここで、この抗体の各CDRは、0個、1個又は2個のアミノ酸置換により、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17及び配列番号18とは異なり得る。

【0030】

いくつかの実施態様において、ヒトCD38（配列番号1）及びカニクイザルCD38（配列番号2）に特異的に結合する単離された抗CD38抗体を提供し、ここで該抗体は、約 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 以上のKDでヒトCD38に結合し、約 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 以上のKDでカニクイザルCD38と結合する。
30

【0031】

いくつかの実施態様において、ヒトCD38及び/又はカニクイザルCD38との結合についてAb79及び/又はAb19と競合する抗体を提供する。

【0032】

これらの及び他の実施態様、特徴及び潜在的利点は、以下の記載及び図面を参照することにより明らかとなるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1は、リンパ系細胞のCD38発現プロファイルを示す。CD38発現は、ブローバ細胞（CD34⁺CD19⁺CD20⁻）、活性化B細胞（CD19⁺CD20⁺）、形質細胞（CD138⁺CD19⁻CD20⁻）、活性化CD4⁺及びCD8⁺T細胞、NK細胞（CD3⁺CD56⁺）及びNK細胞（CD56⁺CD16⁺）において同定された。さらに、CD38発現は、リンパ球前駆細胞（CD34⁺CD45RA⁺CD10⁺CD19⁻）でも見られるが、リンパ系幹細胞では見られない。
40

【図2】図2はAb79及びAb19の重鎖及び軽鎖の配列を示す。

【図3】図3は、ヒト及びカニクイザルCD38の配列を表す。

【図4】図4は、免疫蛍光法による、正常組織結合Ab79の検出を示す。（A）Ab79で染色された正常ヒト結腸。（B）無関係なコントロール抗体であるパリビズマブで染色された正常ヒト結腸。（C）ヘマトキシリンで対比染色された正常ヒト結腸の光学顕微
50

鏡像。(D) Ab79で染色された正常ヒト前立腺。(E)無関係なコントロール抗体であるパリビズマブで染色された正常ヒト前立腺。(F)ヘマトキシリンで対比染色された正常ヒト前立腺の光学顕微鏡像。(G)Ab79で染色された正常ヒトリンパ節。(I)ヘマトキシリンで対比染色された正常ヒトリンパ節の光学顕微鏡像。

【図5】図5は、多発性骨髄腫(MM)患者由来の骨髄サンプルへのAb79結合の検出を示す。(A)正常骨髄の免疫蛍光Ab79染色。(B)MM患者由来の骨髄の代表的な免疫蛍光Ab79染色。Ab79により認識されるエピトープは、検査した全ての多発性骨髄腫サンプルにおいて、およそ50%以上の細胞で強く発現したが、正常骨髄においてはおよそ10%以下の細胞でしか発現しなかった。

【図6】図6は、免疫蛍光法により検出される、様々な細胞株へのAb79の結合を示す。10(A)MOLP-8、(B)Daaudi、(C)RPMI、(D)MCF7。

【図7】図7は、(A)多発性骨髄腫患者由来の骨髄に由来する細胞、及び(B)慢性リンパ性白血病患者由来のPBMC(CD5⁺細胞でゲーティング)に対する、Ab79発現のFACS解析を示す。

【図8】図8は、Ab19、Ab79並びにベンチマーク抗体BM1及びBM2を比較する、in vivo用量反応研究を示す。

【図9】図9は、Ab19、Ab79並びにベンチマーク抗体BM1及びBM2で処置したマウスにおける、可視化したリンパ腫の拡散を示す。

【図10】図10は、X線結晶学データに基づく、CD38へのAb79結合を示す。

【図11】図11は、多数の異なるADC態様を示す。本明細書で示すように、リンカー部分は変化してよく、アミノ酸組成、自壊的リンカー(self-immolative linker)などを含む。20

【図11A】図11は、多数の異なるADC態様を示す。本明細書で示すように、リンカー部分は変化してよく、アミノ酸組成、自壊的リンカー(self-immolative linker)などを含む。

【図11B】図11は、多数の異なるADC態様を示す。本明細書で示すように、リンカー部分は変化してよく、アミノ酸組成、自壊的リンカー(self-immolative linker)などを含む。

【図11C】図11は、多数の異なるADC態様を示す。本明細書で示すように、リンカー部分は変化してよく、アミノ酸組成、自壊的リンカー(self-immolative linker)などを含む。30

【図11D】図11は、多数の異なるADC態様を示す。本明細書で示すように、リンカー部分は変化してよく、アミノ酸組成、自壊的リンカー(self-immolative linker)などを含む。

【図11E】図11は、多数の異なるADC態様を示す。本明細書で示すように、リンカー部分は変化してよく、アミノ酸組成、自壊的リンカー(self-immolative linker)などを含む。

【図12】図12は、ベンチマーク1及び2、Ab19並びにAb79の各抗体に結合するヒトCD38エピトープを示す。

【図13】図13は、好ましいリンカーノード物組合せの構造を示す。当業者に理解されるように、ここで示すTSF79(例えば、Ab79)抗体は、Ab19抗体に変更できる。同様に、本明細書で論じるように、本明細書に示すアウリストチン(auristatin)Eに加えて、任意の数の追加の薬物/リンカーノード物組合せを用いることができる。40

【図14】図15は、投与24時間後のカニクイザルにおける細胞数の変化の割合を示す。

【図15】図15は、Ab79の単回投与後の枯渇の回復を示す。

【0034】

(本発明の詳細な説明)

概説

CD38の細胞外ドメインは、ADPリボシリルシクラーゼ活性とADPリボシリルドロ

50

ラーゼ活性の両方を有する、二機能 (bi functional) 酵素活性を有することが示されている。従って、CD38は、NAD⁺のcADPRへの変換を触媒でき（シクラーゼ）、さらにそれをADPリボースに加水分解できる（ヒドロラーゼ）。cADPRは、細胞増殖、分化及びアポトーシスに重要なセカンドメッセンジャーAktiviteiであるカルシウムの細胞内ストアからの動員に機能する。

【0035】

CD38の発現の増加は、造血起源の様々な疾患で報告されており、慢性リンパ芽球性白血病におけるネガティブな予後マーカーとして記載されている。このような疾患としては、多発性骨髄腫（Jackson et al. (1988)）、慢性リンパ芽球性白血病（Moribito et al. (2001)、Jelinek et al. (2001)、Chevalier et al. (2002)、Durig et al. (2002)）、B細胞慢性リンパ性白血病、B細胞急性リンパ性白血病を含む急性リンパ芽球性白血病（Keyhani et al. (2000)）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、原発性全身性アミロイドーシス、マントル細胞リンパ腫、前リンパ球性 / 骨髄性白血病、急性骨髓性白血病（Keyhani et al. (1993)）、慢性骨髓性白血病（Marinov et al. (1993)）、濾胞性リンパ腫、NK細胞白血病及び形質細胞白血病が挙げられるが、これらに限定されない。このように、CD38は、造血系疾患の治療において有用な標的を提供する。

【0036】

複数の抗CD38抗体が、CD38関連ガンの治療について臨床試験されている（本明細書において、「ベンチマーク1及びベンチマーク2」と称する）。従って、治療効果及び / 又は診断的適用を有するCD38に対する抗体が有用である。本発明は、異なるCD38エピトープに結合する、2つの異なる抗CD38のCDRセットであって、CD38のヒト及びカクニイザイル形態の両方に結合するもの、並びにこれらのCDRを含む抗体を提供する。抗体はさらに、本明細書に記載するように、薬物 / リンカー結合体を含む。

【0037】

臨床試験におけるいくつかの抗CD38抗体では見られない利点の一つは、カニクイザルCD38に結合できることである。なぜなら、これらの靈長類は前臨床試験での利用が見出されており、従って、投与、毒性、有効性などの初期の評価につながり得るからである。

【0038】

CD38タンパク質

従って、本発明は、ヒトCD38タンパク質に特異的に結合する（及び、以下に記載のとおり、追加として、好ましくは、靈長類CD38タンパク質に特異的に結合する）単離された抗CD38抗体を提供する。当分野で既知のとおり、CD38タンパク質は多数の種で見られる。本発明で特に有用なものは、ヒトCD38タンパク質と靈長類CD38タンパク質、特に、臨床試験で使用される靈長類、例えば、カニクイザル（マカカ・ファシキュラリス（Macaca fascicularis）、カニクイザル（Crab eating macaque）、本明細書では「サイノ」（cyno）と称する場合もある）などのCD38タンパク質の両方に結合する抗体である。「ヒトCD38」又は「ヒトCD38抗原」とは、配列番号1、又はエピトープなどの機能性断片（本明細書で定義するとおり）のタンパク質を意味する。一般に、CD38は、短い細胞質内テイル、膜貫通ドメイン及び細胞外ドメインを有し、特定の実施態様において、本発明の抗体は、CD38タンパク質の細胞外部分と結合する。本明細書において「カニクイザルCD38」とは、ヒトCD38と92%同一である配列番号2を意味する。

【0039】

CD38の同義語には、ADPリボシリルシクラーゼ1、cADPrヒドロラーゼ1、CD38-rs1、サイクリックADP-リボースヒドロラーゼ1、I-19及びNIM-R5抗原が含まれる。

【0040】

10

20

30

40

50

いくつかの実施態様において、本発明の抗 C D 3 8 A b 7 9 抗体は、多数のアミノ酸残基において C D 3 8 と相互作用し、該アミノ酸残基としては、K 1 2 1、F 1 3 5、Q 1 3 9、D 1 4 1、M 1 4 2、D 2 0 2、V 2 0 3、H 2 0 5、Q 2 3 6、E 2 3 9、W 2 4 1、S 2 7 4、C 2 7 5、K 2 7 6、F 2 8 4、C 2 8 7、V 2 8 8、K 2 8 9、N 2 9 0、P 2 9 1、E 2 9 2、D 2 9 3 が挙げられる。本明細書で概説するように、これらの残基と相互作用する他の抗体も、治療及び診断的適用における使用が見出される。

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施態様において、本発明の抗 C D 3 8 抗体は、任意選択で（いくつかの場合においては好ましくは）、C D 1 5 7 などの C D 3 8 ファミリーの他のメンバーと結合しない。例えば、本明細書における好ましい実施態様は、配列番号 2 3 (G e n b a n k 10 アクセッション番号 N P _ 0 0 4 3 2 5) のヒト C D 1 5 7 と結合しない。

【 0 0 4 2 】

抗体

本発明は、抗 C D 3 8 抗体、通常は本明細書に記載のとおり、治療及び／又は診断抗体を提供する。本発明での使用が発見される抗体は、本明細書に記載のとおり、多数のフォーマットをとることができ、これには、従来の抗体、並びに抗体誘導体、断片及び模倣物 (m i m e t i c s) (以下に記載) が挙げられる。原則として、本発明は、本明細書で定義するとおり 6 個の C D R のセット (以下に記載のとおり、少数のアミノ酸の変化を含む) を含む抗体構造を提供する。

【 0 0 4 3 】

従来の抗体構造ユニットは、典型的には 4 量体を含む。各 4 量体は、典型的には、2 つの同一のポリペプチド鎖対からなり、各対は、1 つの「軽」鎖 (典型的には約 2 5 k D a の分子量を有する) と 1 つの「重」鎖 (典型的には、約 5 0 ~ 7 0 k D a の分子量を有する) を有する。ヒト軽鎖は、 軽鎖と 軽鎖に分類される。重鎖は、 μ 、 γ 、 δ 、 ϵ 又は α に分類され、それぞれ、I g M、I g D、I g G、I g A 及び I g E として抗体アイソタイプを定義する。I g G は複数のサブクラスを有し、サブクラスとしては、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4 が挙げられるがこれらに限定されない。I g M は、I g M 1 及び I g M 2 を含むサブクラスを有するが、これらに限定されない。従って、本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」は、その定常領域の化学的及び抗原的特徴により定義される免疫グロブリンの任意のサブクラスを意味する。既知のヒト免疫グロブリンアイソタイプは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g M 1、I g M 2、I g D 及び I g E である。治療用抗体には、アイソタイプ及び／又はサブクラスのハイブリッドも含まれ得ることが理解されるべきである。

【 0 0 4 4 】

各鎖のアミノ末端部分には、抗原認識に主に関与する約 1 0 0 ~ 1 1 0 以上のアミノ酸の可変領域が含まれる。可変領域では 3 つのループが重鎖及び軽鎖の各 V ドメインについて集合しており、抗原結合部位を形成する。各ループは、相補性決定領域とも称され（以下、「 C D R 」とも称する）、この部分におけるアミノ酸配列の変異 (v a r i a t i o n) が最も顕著である。「可変」とは、可変領域の特定のセグメントが、抗体の配列において広範囲に異なるという事実を意味する。可変領域内の可変性は、均一に分布していない。代わりに、V 領域は、それぞれ 9 ~ 1 5 アミノ酸長以上の「超可変領域」と称される極度に可変性の短い領域により分離される 1 5 ~ 3 0 アミノ酸のフレームワーク領域 (F R) と称される比較的不变のストレッチからなる。

【 0 0 4 5 】

各 V H 及び V L は、3 つの超可変領域（「相補性決定領域」、「 C D R 」）と 4 つの F R からなり、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端へ配置される：F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 。

【 0 0 4 6 】

超可変領域は、一般に、軽鎖可変領域における、アミノ酸残基約 2 4 ~ 3 4 (L C D R 1 ; 「 L 」は軽鎖を意味する) 、5 0 ~ 5 6 (L C D R 2) 及び 8 9 ~ 9 7 (L C D R 3 50

)と重鎖可変領域における、約 31～35B (H C D R 1 ; 「H」は重鎖を意味する)、50～65 (H C D R 2) 及び 95～102 (H C D R 3) のアミノ酸残基; Kabat et al . , SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST , 5th Ed . Public Health Service , National Institutes of Health , Bethesda , Md . (1991) 、及び / 又は超可変性ループを形成するそれらの残基 (例えば、軽鎖可変領域における残基 26～32 (L C D R 1) 、 50～52 (L C D R 2) 及び 91～96 (L C D R 3) と、重鎖可変領域における 26～32 (H C D R 1) 、 53～55 (H C D R 2) 及び 96～101 (H C D R 3) ; Chothia and Lessk (1987) J . Mol . Biol . 196 : 901 - 917 を包含する。本発明の具体的な C D R は以下に記載する。

【0047】

本明細書にわたり、可変ドメインの残基 (およそ、軽鎖可変領域の残基 1～107 及び重鎖可変領域の残基 1～113) について言及する場合には、Fc 領域で使用される EU ナンバーシステムとともに、Kabat ナンバリングシステムを通常用いる (例えば、Kabat et al . , 上記 (1991)) 。

【0048】

C D R は、抗原結合の形成に寄与し、より詳細には、抗体のエピトープ結合部位の形成に寄与する。「エピトープ」とは、パラトープとして知られる、抗体分子の可変領域における特異的な抗原結合部位と相互作用する決定基を意味する。エピトープは、アミノ酸や糖側鎖などの分子にグループ分けされ、通常、特異的な構造特性及び特異的な電荷特性を有する。単一の抗原が、2 以上のエピトープを有してもよい。例えば、本明細書で示すとおり、「Ab19」及び「Ab79」と本明細書で称する 2 つの異なる抗体は、CD38 分子上の異なるエピトープに結合する。

【0049】

エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基 (エピトープの免疫優性コンポーネント (immunodominant component) とも称される) 、及び結合に直接関与しない他のアミノ酸残基 (特異的な抗原結合ペプチドにより有効に阻害されるアミノ酸残基など) (換言すれば、当該アミノ酸残基は、特異的な抗原結合ペプチドのフットプリント (footprint) 内である) を含んでよい。

【0050】

エピトープは、立体構造であるか、直線状であるかのいずれかであってよい。立体構造エピトープは、直線状のポリペプチド鎖の異なるセグメントから空間的に並置されたアミノ酸により製造される。直線状エピトープは、ポリペプチド鎖の隣接アミノ酸残基により作製されたものである。立体構造及び非立体構造エピトープは、変性溶媒の存在下、後者ではなく前者との結合が失われることで区別され得る。

【0051】

エピトープは、典型的には、特有の空間配置において、少なくとも 3 つ、通常は、少なくとも 5 又は 8～10 アミノ酸を含む。同一のエピトープを認識する抗体は、1 つの抗体が、標的抗原ともう一つの抗体との結合をブロックする能力を示す単純な免疫アッセイで検証することができ、これは、例えば、実施例で概説するような、「ビニング (binning)」などである。実施例に示すような X 線結晶学研究により、図 12 に示すとおり、本発明の抗体 (Ab19 及び Ab79 を含む) と従来技術の抗体 (ベンチマーク 1 及びベンチマーク 2) の両方に結合するアミノ酸残基が同定される。

【0052】

本発明において、実施例で概説するとおり Ab79 は、CD38 の多数のアミノ酸残基と相互作用し、該アミノ酸残基としては、K121、F135、Q139、D141、M142、E239、W241、S274、C275、K276、F284、V288、K289、N290、P291、E292 及び D293 が挙げられる。これらの残基は、S274 がシアン (cyan) で実際には F274 である以外は、ヒト及びカニケイザル (50

cyan monkeys) の両方で同一であることに留意すべきである。これらの残基は、免疫優性エピトープ及び / 又は特異的抗原結合ペプチドのフットプリント内の残基を表してよい。

【0053】

本発明において、Ab19は、異なるエピトープと結合し、これには、G91、E103、E1034、D105、Q107、M110、K111、T114、Q115、T148、V192、R194、R195、F196、A199、H228、N229、Q231、E233及びK234が挙げられる。これらの残基は、M110がシアン(cyan)ではV110であり、A199がシアン(cyan)ではT199であることを除いて、ヒトとカニクイザル(cyan monkeys)の両方で同一であることに留意すべきである。10

【0054】

従って、いくつかの実施態様において、これらのエピトープのいずれかでの結合により Ab79 及び Ab19 と競合する抗体も自己免疫疾患を治療するために使用され得る。Ab79 と BM1 は、いくらか重複しており、従って、Ab79 と競合するが BM1 とは競合しない抗体の本発明での使用も見出される点に留意すべきである。

【0055】

従って、本発明は、ヒト及びシアン(cyan)CD38の両方に結合し、これらの残基の少なくとも 80%、90%、95% 又は 98% と相互作用する抗体を提供する。言い換れば、相互作用ゾーンの表面領域は、これらの残基の領域に過ぎない。20

【0056】

各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能に主に関与する定常領域を定義する。Kabat らは、重鎖及び軽鎖可変領域の多数の一次配列を集めた。配列の保存の程度に基づいて、彼らは、個々の一次配列を CDR とフレームワークとに分類し、そのリストを作成した(SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A.Kabat et al. を参照されたい。参照によりその全体が本明細書に援用される)。

【0057】

免疫グロブリンの IgG サブクラスでは、重鎖に複数の免疫グロブリンドメインが存在する。本明細書において「免疫グロブリン(Ig)ドメイン」とは、異なる三次構造を有する免疫グロブリンの領域を意味する。本発明で関心のあるものは、重鎖定常(CH)ドメインとヒンジドメインを含む、重鎖ドメインである。IgG 抗体との関連において、IgG アイソタイプはそれぞれ 3 つの CH 領域を有する。従って、IgG との関連において「CH」ドメインは以下のとおりである: 「CH1」とは、Kabat に示す EU インデックスに従って、118 ~ 220 位を意味する。「CH2」とは、Kabat に示す EU インデックスに従って、237 ~ 340 位を意味し、「CH3」とは、Kabat に示す EU インデックスに従って、341 ~ 447 位を意味する。30

【0058】

重鎖の別のタイプの Ig ドメインはヒンジ領域である。本明細書において「ヒンジ」又は「ヒンジ領域」又は「抗体ヒンジ領域」又は「免疫グロブリンヒンジ領域」とは、抗体の第一と第二の定常領域の間のアミノ酸を含むフレキシブルなポリペプチドを意味する。構造的には、IgG CH1 ドメインは、EU220 位で終了し、IgG CH2 ドメインは、EU237 位の残基で開始する。従って、IgG についての抗体ヒンジは、本明細書では、221 位(IgG1 の D221)から 236 位(IgG1 では G236)を含むと定義され、ここで、番号付けは Kabat に示す EU インデックスに従うものである。いくつかの実施態様において、例えば Fc 領域との関連で、下方(lower)のヒンジが含まれ、「下方のヒンジ」とは一般に 226 位又は 230 位を意味する。40

【0059】

本発明で特に関心があるのは Fc 領域である。本明細書で使用する場合、「Fc」又は

10

20

30

40

50

「Fc領域」又は「Fcドメイン」とは、第一の定常領域免疫グロブリンドメインを除く抗体定常領域を含むポリペプチドを意味し、いくつかの場合においては、ヒンジの一部も含まれる。従って、Fcとは、IgA、IgD及びIgGの最後の2つの定常領域免疫グロブリンドメイン、IgE及びIgMの最後の3つの定常領域免疫グロブリンドメイン、並びにこれらのドメインのN末端のフレキシブルなヒンジを意味する。IgAとIgMについては、FcにJ鎖が含まれてもよい。IgGについては、Fcドメインは、免疫グロブリンドメインC₂及びC₃(C₂及びC₃)、並びにC₁(C₁)とC₂(C₂)の間の下方のヒンジを含む。Fc領域の境界は変化し得るとはいえ、ヒトIgG重鎖Fc領域は通常、そのカルボキシ末端にC₂C₆又はP₂C₀残基を含ものと定義され、ここで番号付けはKabatに示すEUインデックスに従う。いくつかの実施態様において、以下に詳述するとおり、アミノ酸修飾がFc領域でなされて、例えば、1つ以上のFc-Rレセプター、又はFcRnレセプターとの結合が変更される。10

【0060】

いくつかの実施態様において、抗体は完全長である。本明細書において「完全長抗体」とは、抗体の天然の生物学的形態を構成する構造を意味し、これは、可変及び定常領域を含み、本明細書で概説するとおり1つ以上の修飾を含む。

【0061】

あるいは、抗体は、様々な構造、例えば、抗体断片、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体(本明細書では「抗体模倣物」と称する場合もある)、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗体融合物(「抗体結合体(conjugate)」とも称される場合がある)、及びそれぞれの断片などであってよいが、これらに限定されない。構造は依然として依存する。20

【0062】

一実施態様において、抗体は抗体断片である。具体的な抗体断片としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：(i) VL、VH、CL及びCH1ドメインからなるFab断片；(ii)VH及びCH1ドメインからなるFd断片；(iii)単一抗体のVL及びVHドメインからなるFv断片；(iv)単一の可変領域からなるdAb断片(Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546、参照により全体を援用する)；(v)単離されたCDR領域；(vi)2つの結合したFab断片を含む二価の断片であるF(ab')2断片；(vii)単鎖Fv分子(scFv)であって、VHドメイン及びVLドメインが、2つのドメインが会合して抗原結合部位を形成することができるペプチドリンクアーカーにより結合されているもの(Bird et al., 1988, Science 242: 423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883、参照によりその全体が援用される)；(viii)二重特異性单鎖Fv(WO03/11161、参照により本明細書に援用される)；及び(ix)遺伝子融合により構築された多価又は多重特異性(multispecific)断片である「ダイアボディ」又は「トリアボディ」(Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326: 461-479; WO94/13804; Hollinger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-6448、参照により全て、その全体が援用される)。3040

【0063】

キメラ及びヒト化抗体

いくつかの実施態様において、抗体は異なる種由来の混合物であってよく、例えば、キメラ抗体及び/又はヒト化抗体などであってよい。すなわち、本発明において、CDRセットは、本明細書において配列により具体的に記載されるもの以外のフレームワーク及び定常領域とともに使用されてよい。

【0064】

一般に、「キメラ抗体」及び「ヒト化抗体」はともに、2以上の種由来の領域を組み合わせた抗体を意味する。例えば、「キメラ抗体」は、従来、マウス(又はいくつかの場合50

ではラット)由来の可変領域(1つ以上)とヒト由来の定常領域(1つ以上)とを含む。「ヒト化抗体」は、通常、ヒト抗体で見られる配列と交換された可変ドメインフレームワーク領域を有している非ヒト抗体を意味する。一般に、ヒト化抗体においては、CDRを除く抗体全体は、ヒト起源のポリヌクレオチドによりコードされるか、又はそのCDR内を除いてそのような抗体と同一である。CDRは、そのいくつか又は全てが非ヒト生物由来の核酸によりコードされ、ヒト抗体可変領域のシートフレームワークへとグラフトされて抗体を作り、その特異性はグラフトされたCDRにより決定される。このような抗体の作製は、例えば、WO 92/11018、Jones, 1986, Nature 321:522-525、Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536などに記載されており、これらは全て、参考によりその全体が本明細書に援用される。選択されたアクセプターフレームワーク残基の対応するドナー残基への「復帰突然変異(Backmutation)」は、多くの場合、最初のグラフト構築物で失われた親和性を取り戻すために必要である(US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213、これらは全て、参考によりその全体が援用される)。ヒト化抗体は、最も有利には、少なくとも免疫グロブリン定常領域の一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものを含み、従って、典型的にはヒトFc領域を含む。ヒト化抗体は、遺伝子組換えされた免疫系を有するマウスを用いて作製されてもよい。Roque et al., 2004, Biotech hnol. Prog. 20:639-654、参考によりその全体が援用される。非ヒト抗体をヒト化及び再形成のための様々な技術及び方法が当分野で公知である(Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science(USA)及びそこで引用される参考文献を参照されたい。これらは全て、参考によりその全体が援用される)。ヒト化方法としては、以下に記載の方法が挙げられるが、これらに限定されない: Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160:1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng. 11:321-8、これら全て、参考によりその全体が援用される。ヒト化、又は非ヒト抗体可変領域の免疫原性を低下させる他の方法には、例えば、Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973(参考によりその全体が援用される)などに記載されるような表面再形成(resurfacing)方法が含まれてよい。一実施態様において、親抗体は、当分野で既知であるとおり、親和性成熟されている。構造に基づく方法は、ヒト化及び親和性成熟について実施されてよく、例えばUS SN 11/004, 590に記載される方法などである。選択に基づく方法は、抗体可変領域をヒト化及び/又は親和性成熟するために実施されてよく、この方法としては、以下に記載の方法が挙げられるが、これらに限定されない: Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37):22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8910-8915; Krauss et al., 2003 10 20 30 40 50

, Protein Engineering 16(10):753-759 (これらは全て、参照によりその全体が援用される)。他のヒト化方法は、CDRの一部のみのグラフトを伴ってよく、これには、以下に記載の方法が挙げられるが、これらに限定されない: USSN09/810, 510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084 (これらは全て、参照によりその全体が援用される)。

【0065】

一実施態様において、本発明の抗体は、多重特異性抗体、とりわけ二重特異性抗体であつてよく、二重特異性抗体は、「ダイアボディ」と称される場合もある。これらは、2つ(以上)の異なる抗原、又は同一抗原上の異なるエピトープに結合する抗体である。ダイアボディは、当分野で既知の様々な方法で作製され得(Holliger and Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449、参照によりその全体が援用される)、例えば、化学的に又はハイブリッドハイブリドーマ(hybrid hybridoma)から調製され得る。

【0066】

一実施態様において、抗体はミニボディである。ミニボディは、CH3ドメインと連結されたscFvを含む最小化抗体様タンパク質である。Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061、参照によりその全体が援用される。いくつかの場合において、scFvはFc領域と連結され得、ヒンジ領域のいくつか又は全体を含んでよい。

【0067】

本発明の抗体は、通常、単離されるか、又は組換えられる。「単離される」とは、本明細書で開示する様々なポリペプチドを記載するために使用する場合、ポリペプチドが発現される細胞又は細胞培養物から同定され且つ分離され、且つ/又は回収されたポリペプチドを意味する。通常、単離されたポリペプチドは、少なくとも1つの精製工程により調製される。「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を意味する。例えば、CD38と特異的に結合する単離された抗体は、CD38以外の抗原と特異的に結合する抗体を実質的に含まない。

【0068】

しかしながら、ヒトCD38又はカニクイザルCD38のエピトープ、アイソフォーム又は変異体と特異的に結合する単離された抗体は、例えば、CD38種ホモログ(species homolog)などの他の種由来の他の関連抗原と交差反応性を有してよい。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質及び/又は化学物質を実質的に含まないものであってよい。

【0069】

異なる特異性を有する単離されたモノクローナル抗体は、良く定義された組成物中で組み合わされ得る。従って、例えば、Ab79及びAb19は、所望する場合、单一の製剤で組み合わされ得る。

【0070】

本発明の抗CD38抗体は、CD38リガンド(例えば、配列番号1及び2のヒト及びカニクイザルCD38タンパク質など)と特異的に結合する。「特異的結合」又は「特異的に結合する」、又は特定の抗原若しくはエピトープに「特異的」であるとは、非特異的相互作用と測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、コントロール分子の結合と比較して、分子の結合を決定することにより測定でき、コントロール分子は、通常、結合活性を有さない類似構造の分子である。例えば、特異的結合は、標的と類似するコントロール分子との競合により決定され得る。

【0071】

特定の抗原又はエピトープに対する特異的結合は、例えば、少なくとも約 10^{-4} M、少なくとも約 10^{-5} M、少なくとも約 10^{-6} M、少なくとも約 10^{-7} M、少なくと

10

20

30

40

50

も約 10^{-8} M、少なくとも約 10^{-9} M、或いは少なくとも約 10^{-10} M、少なくとも約 10^{-11} M、少なくとも約 10^{-12} M以上の抗原又はエピトープに対するKDを有する抗体により示され得、ここで、KDとは、特定の抗体・抗原相互作用の解離速度を意味する。典型的には、抗原に特異的に結合する抗体は、抗原又はエピトープに対するコントロール分子について20~、50~、100~、500~、1000~、5,000~、10,000~倍以上のKDを有する。

【0072】

さらに、特定の抗原又はエピトープに対する特異的結合は、例えば、コントロールに対するエピトープについて少なくとも20~、50~、100~、500~、1000~、5,000~、10,000~倍以上の抗原又はエピトープに対するKA又はKaを有する抗体により示され得、ここで、KA又はKaは、特定の抗体・抗原相互作用の結合(association)速度を意味する。

【0073】

抗体修飾

本発明は、さらに変異抗体も提供する。すなわち、本発明の抗体は多数の修飾がなされてよく、これには、CDRにおけるアミノ酸修飾(親和性成熟)、Fc領域におけるアミノ酸修飾、グリコシル化変異体、他のタイプの共有結合修飾などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0074】

本明細書において「変異体(variant)」とは、少なくとも1つのアミノ酸修飾によって親ポリペプチドのものと異なるポリペプチド配列を意味する。アミノ酸修飾には、置換、挿入、及び欠失が含まれてよく、多くの場合、前者が好ましい。

【0075】

一般に、本明細書に記載するとおり、タンパク質の機能が依然として存在する限り、変異体には任意数の修飾が含まれてよい。すなわち、Ab79又はAb19のいずれかのCDRで作製されたアミノ酸変異体の場合、例えば、抗体は、ヒト及びカニクイザルCD38の両方に依然として、特異的に結合すべきである。同様に、アミノ酸変異体が、Fc領域で作製された場合、例えば、変異抗体は、抗体の特定の適用又は適応のため、必要なレセプター結合機能を保持すべきである。

【0076】

しかしながら、一般に、多くの場合、そのゴールは最小数の修飾で機能を変更することであるので、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸置換が通常利用される。いくつかの場合において、1~5個修飾が存在し、多くの実施態様においては、1~2、1~3、及び1~4個の修飾の使用も認められる。

【0077】

アミノ酸修飾の数は、機能的ドメインの範囲内であってよいことに留意すべきである：例えば、野生型又は改変タンパク質のFc領域では1~5個の修飾、例えばFv領域では1~5個の修飾を有することが望ましい場合がある。変異ポリペプチド配列は、親配列(例えば、Ab79及び/又はAb19の可変領域、定常領域、並びに/又は重鎖及び軽鎖配列など)と少なくとも約80%、85%、90%、95%又は最大で98若しくは99%の同一性を有することが好ましい。配列サイズにもよるが、同一性の割合は、アミノ酸の数によって決まるに留意すべきである。

【0078】

本明細書において「アミノ酸置換」又は「置換」とは、親ポリペプチド配列の特定の位置のアミノ酸を別のアミノ酸と交換することを意味する。例えば、置換S100Aとは、100位のセリンをアラニンと交換した変異ポリペプチドをいう。本明細書で使用する場合、「アミノ酸挿入」又は「挿入」とは、親ポリペプチド配列の特定の位置のアミノ酸の追加を意味する。本明細書で使用する場合に、「アミノ酸欠失」又は「欠失」とは、親ポリペプチド配列における特定の位置のアミノ酸の除去を意味する。

【0079】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する場合、「親ポリペプチド」、「親タンパク質」、「前駆体ポリペプチド」又は「前駆体タンパク質」とは、変異体を作製するためにその後修飾される、非修飾のポリペプチドを意味する。通常、本明細書における親ポリペプチドはA b 7 9 及びA b 1 9である。親ポリペプチドは、ポリペプチド自体、親ポリペプチドを含む組成物、又はそれをコードするアミノ酸配列をいうこともある。従って、本明細書で使用する場合、「親F c ポリペプチド」とは、変異体を作製するために修飾されるF c ポリペプチドを意味し、本明細書で使用する場合、「親抗体」とは、変異抗体を作製するために修飾される抗体を意味する。

【0080】

本明細書において「野生型」又は「WT」又は「天然」とは、アレル変異を含む、天然で発見されるアミノ酸配列又はヌクレオチド配列を意味する。WTタンパク質、ポリペプチド、抗体、免疫グロブリン、IgGなどは、意図的に修飾されていないアミノ酸配列又はヌクレオチド配列を有する。

【0081】

本明細書において「変異F c 領域」とは、少なくとも1つのアミノ酸修飾によって、野生型F c 配列のものとは異なるF c 配列を意味する。F c 変異体は、F c ポリペプチド自体、F c 変異体ポリペプチドを含む組成物、又はアミノ酸配列をいうこともある。

【0082】

いくつかの実施態様において、1つ以上のアミノ酸修飾が、抗体(A b 7 9 又はA b 1 9のいずれか)の1つ以上のCDRにおいてなされる。一般に、1又は2又は3個のアミノ酸のみが、いずれかの単一のCDRにおいて置換され、通常は4から、5、6、7、8、9又は10個以上の変化はCDRのセット内ではなされない。しかしながら、任意のCDRにおいて、置換されないか、1個、2個又は3個の置換のいずれかの組合せが、任意の他の置換と、独立して任意選択で組み合わされ得る。

【0083】

いくつかの場合において、CDRにおけるアミノ酸修飾は、「親和性成熟」と称される。「親和性成熟された」抗体は、1つ以上のCDRにおいて1つ以上の変更を有するものであり、その結果、これらの変更を有さない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性が改善される。いくつかの場合において、稀ではあるが、その抗原に対する抗体の親和性を低下させることが望ましい場合があるが、通常、これは好ましくない。

【0084】

親和性成熟は、「親」抗体と比較して、少なくとも約10%～50～100～150%以上、又は1～5倍、抗原に対する抗体の結合親和性を増加させるためになされ得る。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル、又はさらにはピコモル親和性を有する。親和性成熟抗体は、既知の手順により製造される。例えば、重鎖可変(VH)ドメイン及び軽鎖可変(VL)ドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載したMarks et al., 1992, Biotechnology 10: 779-783を参照されたい。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダム変異導入法は、以下に記載される: 例えば、Barbas, et al. 1994, Proc. Nat. Acad. Sci., USA 91: 3809-3813; Shier et al., 1995, Gene 169: 147-155; Yelton et al., 1995, J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154(7): 3310-9; 及びHawkins et al., 1992, J. Mol. Biol. 226: 889-896など。

【0085】

あるいは、アミノ酸修飾は、「サイレント」である、例えば、抗原に対する抗体の親和性を有意に変更しない、本発明の抗体の1つ以上のCDRでなされ得る。これらは、発現を最適化する(本発明の抗体をコードする核酸についてなし得る)ことを含む様々な理由でなされ得る。

【0086】

10

20

30

40

50

従つて、変異 C D R 及び抗体は、本発明の C D R 及び抗体の定義内に含まれる；すなわち、本発明の抗体は、A b 7 9 及び A b 1 9 の 1 つ以上の C D R において、アミノ酸修飾を含み得る。さらに、以下で概説するとおり、アミノ酸修飾は、C D R 外の任意の領域（フレームワーク及び定常領域を含む）において、独立して任意選択でなされ得る。

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施態様において、ヒト C D 3 8（配列番号 1）及びカニクイザル C D 3 8（配列番号 2）に対して特異的な、A b 7 9 及び A b 1 9 変異抗体を記載する。この抗体は 6 つの C D R からなり、ここで、この抗体の各 C D R は、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 及び配列番号 8 と 0、1 又は 2 個のアミノ酸置換により異なり得る。他の実施態様において、変異抗 C D 3 8 抗体は、6 つの C D R からなり、ここで、この抗体の各 C D R は、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7 及び配列番号 1 8 と 0、1 又は 2 個のアミノ酸置換により異なり得る。
10

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施態様において、本発明の抗 C D 3 8 抗体は、変異 F c ドメインからなる。当分野で既知のとおり、抗体の F c 領域は、多数の F c レセプター及びリガンドと相互作用し、エフェクター機能と称される重要な機能的能力の数々を与える。これらの F c レセプターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：（ヒトにおける）アイソフォーム F c R I a、F c R I b 及び F c R I c を含む F c R I（C D 6 4）；アイソフォーム F c R I I a（アロタイプ H 1 3 1 及び R 1 3 1 を含む）、F c R I I b（F c R I I b - 1 及び F c R I I b - 2 を含む）及び F c R I I c を含む F c R I I（C D 3 2）；並びにアイソフォーム F c R I I I a（アロタイプ V 1 5 8 及び F 1 5 8 を含み、抗体依存性細胞傷害（A D C C）と関連する））及び F c R I I I b（アロタイプ F c R I I I b - N A 1 及び F c R I I I b - N A 2 を含む）を含む F c R I I I（C D 1 6）；F c R n（新生児型レセプター）、C 1 q（補体依存性細胞傷害（C D C）に関与する補体タンパク質）並びに F c R n（血清半減期に関与する新生児型レセプター）。適した修飾は、以下で一般に概説されるように、1 つ以上の位置でなされ得る：例えば、U S 特許出願 1 1 / 8 4 1, 6 5 4 及びそこで引用される参考文献、U S 2 0 0 4 / 0 1 3 2 1 0、U S 2 0 0 5 / 0 0 5 4 8 3 2、U S 2 0 0 6 / 0 0 2 4 2 9 8、U S 2 0 0 6 / 0 1 2 1 0 3 2、U S 2 0 0 6 / 0 2 3 5 2 0 8、U S 2 0 0 7 / 0 1 4 8 1 7 0、U S S N 1 2 / 3 4 1, 7 6 9、U S 特許 N o . 6, 7 3 7, 0 5 6、U S 特許 N o . 7, 6 7 0, 6 0 0、U S 特許 N o . 6, 0 8 6, 8 7 5（これらは全て、参照によりその全体が明確に援用される）（特に、F c レセプターとの結合を増加させる特定のアミノ酸置換について）。

【 0 0 8 9 】

上記で概説する修飾に加えて、他の修飾がなされ得る。例えば、分子は、V H ドメインと V L ドメインを連結するジスルフィド架橋の組込みにより安定化され得る（Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14: 1239 - 1245、参照によりその全体が援用される）。さらに、以下で概説するようになされ得る抗体の様々な共有結合修飾が存在する。
30

【 0 0 9 0 】

抗体の共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれ、常にではないが通常は、翻訳後に行われる。例えば、選択された側鎖又は N 末端若しくは C 末端残基と反応可能な有機誘導体化剤を抗体の特定のアミノ酸残基と反応させることにより、複数のタイプの抗体共有結合修飾が分子に導入される。
40

【 0 0 9 1 】

最も一般的には、システイニル残基が、クロロ酢酸又はクロロアセトアミドなどの - ハロアセテート（及び対応するアミン）と反応して、カルボキシメチル又はカルボキシアミドメチル誘導体を生成する。システイニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、- プロモ - - (5 - イミドゾイル) プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N
50

- アルキルマレイミド、3 - ニトロ - 2 - ピリジルジスルフィド、メチル 2 - ピリジルジスルフィド、p - クロロメルクリベンゾアート、2 - クロロメルクリ - 4 - ニトロフェノール、又はクロロ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾールなどとの反応により、誘導体化されてよい。

【0092】

さらに、抗体 - 薬物結合体 (ADC) 適用においては、システインでの修飾が特に有用である（さらに以下に記載する）。いくつかの実施態様において、抗体の定常領域は、薬物部分のより特異的かつ制御された配置を可能にするために、特に「チオール反応性」である1つ以上のシステインを含むよう改変され得る。例えば、U.S.特許No. 7,521,541（参照によりその全体が本明細書に援用される）を参照されたい。

10

【0093】

ヒスチジル残基は、ジエチルピロカーボネートとpH 5.5 ~ 7.0で反応させることにより誘導体化される。なぜなら、この薬剤は、ヒスチジル側鎖に対して比較的特異的だからである。パラ - プロモフェナシルプロミドも有用である；反応は、pH 6.0で0.1Mカコジル酸ナトリウム中で実施されることが好ましい。

【0094】

リジニル (lysiny1) 及びアミノ末端残基は、コハク酸又は他のカルボン酸無水物と反応する。この薬剤を用いた誘導体化は、リジニル残基の電荷を逆転させる効果を有する。-アミノ含有残基を誘導体化するために適した他の薬剤は、メチルピコリンイミデートなどのイミドエステル；ピリドキサールホスフェート；ピリドキサール；クロロボロヒドリド；トリニトロベンゼンスルホン酸；O - メチルイソウレア；2 , 4 - ペンタジオン；及びグリオキシリ酸とのアミノ基転移酵素触媒反応が挙げられる。

20

【0095】

アルギニル残基は、1つ又は複数の従来の試薬との反応により修飾され、これらの中には、フェニルグリオキサール、2 , 3 - ブタンジオン、1 , 2 - シクロヘキサンジオン、及びニンヒドリンがある。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高いpKaにより、反応がアルカリ条件で実施されることを必要とする。さらに、これらの試薬は、リジンの基、及びアルギニンイプシロンアミノ基と反応してよい。

【0096】

チロシル残基の特定の修飾は、チロシル残基にスペクトル標識を導入することに特に関心がある場合には、芳香族ジオゾニウム化合物又はテトラニトロメタンと反応させることによりなされてよい。最も一般的には、N - アセチルイミドゾール及びテトラニトロメタンを用いて、それぞれ、O - アセチルチロシル種及び3 - ニトロ誘導体を形成する。チロシル残基は、125I又は131Iを用いてヨウ素化して、ラジオイムノアッセイ、クロラミンT法（適しているとして上記に記載したもの）で使用するための標識されたタンパク質を調製する。

30

【0097】

カルボキシリ側鎖基（アスパルチル又はグルタミル）は、カルボジイミド (R' - N = C = N - R') [式中、R及びR'は、任意選択で異なるアルキル基である]との反応により選択的に修飾され、例えば、1 - シクロヘキシリ - 3 - (2 - モルホリニル - 4 - エチル)カルボジイミド、1 - エチル - 3 - (4 - アゾニア - 4 , 4 - ジメチルペンチル)カルボジイミドなどである。さらに、アスパルチル及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によりアスパラギニル及びグルタミニル残基に変換される。

40

【0098】

二官能性剤を用いた誘導体化は、以下に記載の方法に加えて様々な方法で使用するため、水不溶性のサポートマトリックス又は表面への抗体の架橋に有用である。一般的に使用される架橋剤としては、例えば、1 , 1 - ビス (ジアゾアセチル) - 2 - フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4 - アジドサリチル酸とのエステル、ホモ二官能性イミドエステル (3 , 3' - ジチオビス (スクシンイミジルプロピオネート)などのジスクシンイミジルエステルを含む) 及び二官能性マレ

50

イミド(ビス-N-マレイミド-1,8-オクタンなど)が挙げられる。メチル-3-[
(p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデートなどの誘導体化剤は、光の存在下で
架橋を形成できる光活性化可能(photoactivatable)な中間体を生成する。あるいは、サイノモルガソジェン(cynomolgusogen)プロミド活性化
炭水化物などの反応性水不溶性マトリックス及び反応性基質(U.S.特許No.3,9
69,287;3,691,016;4,195,128;4,247,642;4,2
29,537;及び4,330,440(全て参照により援用される)に記載のもの)が
タンパク質固定化に用いられる。

【0099】

グルタミニル及びアスパラギニル残基は、それぞれ、対応するグルタミル及びアスパル
チル残基に頻繁に脱アミノ化される。あるいは、これらの残基は、中程度の酸性条件下で
脱アミド化される。これらの残基のいずれの形態も、本発明の範囲内に含まれる。
10

【0100】

他の修飾として、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリル又はスレオニル残基の
ヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン及びヒスチジン側鎖の-アミノ基のメ
チル化(T.E.Creighton, Proteins: Structure and
Molecular Properties, W.H.Freeman & Co., San
Francisco, pp.79-86[1983]、参照によりその全体が援用さ
れる)、N-末端アミンのアセチル化、及びC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられ
る。
20

【0101】

さらに、当業者に理解されるように、標識(蛍光、酵素、磁気、放射性などを含む)は
全て抗体(及び本発明の他の組成物)に追加され得る。

【0102】

グリコシル化

別のタイプの共有結合修飾は、グリコシル化での変更である。別の実施態様において、
本明細書で開示する抗体は、1つ以上の改変糖型(engineered glycoform)を含むよう修飾され得る。本明細書で使用される場合、「改変糖型」とは抗体と
共有結合した炭水化物組成物を意味し、ここで、前記炭水化物組成物は、化学的に親抗体
のものとは異なる。改変糖型は、エフェクター機能の増強又は低下を含む(これらに限定
されない)種々の目的のために有用であり得る。改変糖型の好ましい形態は、アフコシル化
(afucosylation)であり、これは、おそらくFc RIIIaレセプターへの強固(tighter)な結合を介して、ADCC機能の増加と関連することを示
している。これに関連して、「アフコシル化」とは、宿主細胞で製造される抗体の大多数
が、実質的にフコースを欠いていることを意味し、例えば、作製された抗体の90~95
~98%が、抗体の炭水化物部分(通常、Fc領域のN297で結合される)の成分として相当量(appreciable)のフコースを有さないことを意味する。機能的に定
義すると、アフコシル化抗体は、通常、Fc RIIIaレセプターに対して、少なくとも50%以上の親和性を示す。
30

【0103】

改変糖型は、当分野で既知の様々な方法で作製されてよい(Umana et al.
, 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294;
Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:2673
3-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem
278:3466-3473; US6,602,684; USSN10/277,37
0; USSN10/113,929; PCT WO00/61739A1; PCT WO
01/29246A1; PCT WO02/31140A1; PCT WO02/309
54A1(全て参照によりその全体が援用される);(Potelligent(登録商
標)技術[Biowa, Inc., Princeton, NJ]; GlycoMAB(登
50

録商標)グリコシル化改変技術 [Glycart Biotechnology AG , Zurich , Switzerland])。これらの技術の多くが、Fc領域に共有結合するフコシル化及び/又は二分化 (bisection) オリゴ糖のレベルを制御することに基づき、例えば、種々の生物又は細胞株(改変されたか、そうではないもの)、例えば、Lec-13 CHO細胞又はラットハイブリドーマYB2/0細胞などでIgGを発現させること、グリコシル化経路に関与する酵素(例えば、FUT8 [1,6 - フコシルトランスフェラーゼ (1,6 - fucosyl transferase)] 及び/又は 1 - 4 - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII [GntIII])を制御すること、又はIgGを発現させた後に1つ以上の炭水化物を修飾することなどによる。例えば、「糖改変抗体 (sugar engineered antibody)」又はSeattle Geneticsの「SEA技術」は、製造の間にフコシル化を阻害する修飾されたサッカリドを添加することにより機能する; 例えば、20090317869を参照されたい(参照によりその全体が援用される)。改変糖型は、典型的には、異なる炭水化物又はオリゴ糖を意味し、従って、抗体は、改変糖型を含み得る。
10

【0104】

あるいは、改変糖型は、異なる炭水化物又はオリゴ糖を含むIgG変異体を意味してもよい。当分野で既知のとおり、グリコシル化パターンは、タンパク質の配列(例えば、以下に記載する特定のグリコシル化アミノ酸残基の有無)、又はタンパク質が製造される宿主細胞若しくは生物の両方によって決まり得る。特定の発現系を以下に記載する。

【0105】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N結合型又はO結合型のいずれかである。N結合型とは、炭水化物部分がアスパラギン残基の側鎖に結合することを意味する。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニンのトリペプチド配列(ここで、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である)は、炭水化物部分のアスパラギン側鎖への酵素結合に対する認識配列である。従って、ポリペプチドにこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在することにより、潜在的グリコシル化部位が形成される。O結合型グリコシル化とは、糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース又はキシロースの1つの、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はトレオニンへの結合を意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンを使用してもよい。

【0106】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、上記トリペプチド配列の1つ以上を含むようにアミノ酸配列を変更(alteration)することにより都合よく達成される(N結合型グリコシル化部位について)。変更は、1つ以上のセリン又はスレオニン残基の出発配列への付加、又はそれによる置換によりなされてもよい(O結合型グリコシル化部位について)。容易にするために、抗体アミノ酸配列は、DNAレベルでの変化を介して好ましくは変更され、特に、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが作製されるように、予め選択した塩基で標的ポリペプチドをコードするDNAを変異させることによる。

【0107】

抗体上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、化学的又は酵素的にグリコシドをタンパク質に結合させることによる。これらの手順は、N結合型及びO結合型グリコシル化に関するグリコシル化能力を有する宿主細胞でのタンパク質製造を必要としないという点において有利である。使用される結合様式によって、1つ以上の糖が以下に結合されてよい:(a)アルギニン及びヒスチジン、(b)遊離カルボキシル基、(c)遊離スルフヒドリル基(システインのものなど)、(d)遊離ヒドロキシル基(セリン、スレオニン、ヒドロキシプロリンのものなど)、(e)芳香族残基(フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンのものなど)、又は(f)グルタミンのアミド基。これらのことによると、WO 87/05330及びApplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259 - 306に記載されており、これらはともに参照によりその全体が援用される。

【0108】

10

20

30

40

50

出発抗体に存在する炭水化物部分の除去（例えば、翻訳後）は、化学的又は酵素的に達成されてよい。化学的な脱グリコシル化は、化合物トリフルオロメタンスルホン酸又は同等の化合物へのタンパク質の暴露を必要とする。この処理により、結合する糖（N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン）を除く、大部分又は全ての糖が切断される一方で、ポリペプチドは無傷のままである。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 及び Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118: 131に記載されており、これらはともに参考によりその全体が援用される。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138: 350（参考によりその全体が援用される）に記載されるとおり、様々なエンド及びエキソ-グリコシダーゼを使用することにより達成できる。潜在的グリコシル化部位でのグリコシル化は、Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 3105（参考によりその全体が援用される）に記載されるとおり、化合物ツニカマイシンの使用により妨げられ得る。ツニカマイシンは、タンパク質-N-グリコシド結合の形成を阻害する。

【0109】

抗体の共有結合修飾の別のタイプは、様々な非タンパク性ポリマーと抗体との結合を含み、当該ポリマーとしては、例えば、Nektar Therapeuticsの2005-2006 PEGカタログ（Nektarウェブサイトから入手可能）、US特許No. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192又は4,179,337（これらは全て参考によりその全体が援用される）に記載されるように、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレンなどの各種ポリオールが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、当分野で既知のとおり、アミノ酸置換は、PEGなどのポリマーの付加を容易にするために、抗体内の様々な位置で行われてよい。例えば、U.S.公報No. 2005/0114037A1（参考によりその全体が援用される）を参照されたい。

【0110】

特定のCDR及び可変領域の実施態様

本発明は、それぞれ特定のCDRセット（上記で概説するように、いくつかのアミノ酸置換を含む）を有する多数の抗体を提供する。上記で概説するように、抗体は、6つのCDRのセット、可変領域、又は全長の重鎖及び軽鎖（定常領域を含む）により定義され得る。さらに、上記で概説するように、アミノ酸置換がなされてもよい。一般に、CDR内の変化との関連で、アミノ酸修飾は、CDRの長さが比較的短いことに起因して、なされ得るアミノ酸修飾の数に関して通常記載される。これは、可変、定常又は全長配列に導入され得るアミノ酸修飾の数の議論にも適用できる一方、変化の数に加えて、「%同一性」に関してこれらの変化を定義することも適切である。従って、本明細書に記載されるように、本発明内に含まれる抗体は、本明細書に列挙した配列番号と80、85、90、95、98又は99%同一である。

【0111】

Ab79抗体の関連で、CDRのセットは以下のとおりである：重鎖の3つのCDRは、HCDR1配列番号3（HCDR1）、配列番号4（HCDR2）及び配列番号5（HCDR3）を含み、かつ軽鎖の3つのCDRは、配列番号6（LCDR1）、配列番号7（LCDR2）及び配列番号8（LCDR3）を含む。

【0112】

Ab19の関連で、CDRのセットは以下のとおりである：HCDR1（配列番号13）、HCDR2（配列番号14）及びHCDR3（配列番号15）、並びにLCDR1（配列番号16）、LCDR2（配列番号17）及びLCDR3（配列番号18）。

【0113】

本発明から特に排除される抗体は、配列番号24及び25（ベンチマーク1の重鎖及び軽鎖）並びに配列番号26及び27（ベンチマーク2の重鎖及び軽鎖）のものである。こ

これらの抗体は、下記のカニクイザルCD38と交差反応しないことに留意すべきである。

【0114】

本発明の抗体は、ヒト及びカニクイザルCD38と交差反応し、従って種交差反応性抗体(species cross-reactive antibody)である。「種交差反応性抗体」とは、第一の哺乳動物種由来の抗原に対する結合親和性とほぼ同一の、第二の哺乳動物種由来のその抗原のホモログに対する結合親和性を有する抗体である。種交差反応性は、例えば、第一の哺乳動物種の抗原に対する抗体のKDを、第二の哺乳動物種のその抗原ホモログに対する同一抗体のKDで割った比率として表すことができ、当該比率は、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、2.5、10、15、最大で20である。あるいは又はさらに、抗体は、第二の種に投与されて治療又は診断効果を示す場合に、「種交差反応性」である。従って、本ケースでは、本発明の抗体は、カクニイザルCD38と交差反応性であり、カニクイザル靈長類に投与されて前臨床効果を示し、従って、交差反応性と考えられる。10

【0115】

いくつかの実施態様において、ヒトCD38及び/又はカニクイザルCD38との結合に対して、本発明の抗体(例えば、Ab79及び/又はAb19)と競合する抗体を提供するが、これには、BM1又はBM2のいずれも含まれない。2つ以上の抗CD38抗体によるCD38又はCD38の一部との結合の競合は、当分野で既知の任意の適した技術により決定されてよい。20

【0116】

本発明の関連で競合とは、試験化合物の存在下、本発明の抗体(例えば、Ab79又はAb19)が、例えばCD38などの特定の結合パートナーと結合する性向を、検出可能に有意に減少させることをいう。典型的には、競合とは、ELISAやBiacore(登録商標)アッセイなどの標準的な技術により測定されるように、競合物質の存在下、本発明の抗体がCD38と結合するのを少なくとも約10~100%減少させることを意味する。従って、例えば、競合についての基準を、少なくとも約10%の相対的阻害が検出される;少なくとも約15%の相対的阻害が検出される;又は、少なくとも約20%の相対的阻害が検出された後、抗体は十分に競合すると考えられる、と設定することが可能である。競合抗体の属するエピトープが抗原中に近接して位置する場合、競合は、CD38結合の約40%超の相対的阻害により特徴付けられてよい(例えば、少なくとも約45%阻害、例えば少なくとも約50%阻害、例えば少なくとも約55%阻害、例えば少なくとも約60%阻害、例えば少なくとも約65%阻害、例えば少なくとも約70%阻害、例えば少なくとも約75%阻害、例えば少なくとも約80%阻害、例えば少なくとも約85%阻害、例えば少なくとも約90%阻害、例えば少なくとも約95%阻害、又はそれより高いレベルの相対的阻害)。30

【0117】

いくつかの場合において、競合的結合アッセイの1つ以上の成分が、診断的適用の関連で、以下に記載するように標識される。

【0118】

競合は、2以上のCD38エピトープについて、及び/又はCD38の一部について、抗CD38抗体間で存在してもよい場合もあり、例えば、CD38の特定の領域の抗体結合特性がその断片中に保持される場合、例えば、様々な試験断片に位置するうまく提示された(well-presented)直線状エピトープ、又は十分に大きなCD38断片及びCD38で提示される立体構造エピトープの場合などである。40

【0119】

競合の評価は、典型的には、本発明の抗体、CD38(ヒト若しくはカニクイザルのいずれか、又は両方)、及び試験分子を用いて、相対的阻害結合を評価することを伴う。試験分子としては任意の分子が挙げられ、他の抗体、低分子、ペプチドなどが挙げられる。化合物は、他に存在する分子に対する、問題となる分子の選択性及び/又は特異性に関する情報が比較により与えられるのに十分な量で混合される。50

【0120】

試験化合物、CD38及び本発明の抗体の量は変更されてよい。例えば、ELISA評価のためには、約5～50μg（例えば、約10～50μg、約20～50μg、約5～20μg、約10～20μgなど）の抗CD38抗体及び/又はCD38標的が、競合が存在するかを評価するために必要である。条件は、結合に適するべきでもある。典型的には、生理学的又はほぼ生理学的条件（例えば、約20～40の温度、pH=約7～8など）が、抗CD38：CD38結合に適する。

【0121】

多くの場合、競合は、ELISA及び/又はFACS分析により決定されるように、約5%よりもかなり高い相対的阻害により特徴づけられる。特定の状況（例えば、CD38に結合する別のペプチド又は分子（例えば、CD38の天然の結合パートナー、例えば、CD31抗原とも称されるCD31、EndoCAM、GPIIA、PECAM-1、血小板/内皮細胞接着分子、天然に存在する抗CD38抗体など）の結合を阻害するという目的の機能を有するよう設計された新規抗体について、競合アッセイを用いて選択又はスクリーニングする場合）では、競合に適したレベルの基準/決定因子として、より高い相対的阻害の閾値を設定することが望ましい場合がある。10

【0122】

いくつかの実施態様において、本発明の抗CD38抗体は、CD38の1つ以上の残基又は領域と特異的に結合するが、CD38と相同性を有する他のタンパク質、例えば、BST-1（骨髓間質細胞抗原-1）、Mo5（CD157とも称される）などと交差反応しないものもある。20

【0123】

典型的には、交差反応性の欠如は、適切なアッセイ条件下、十分量の分子を用いたELISA及び/又はFACS分析により評価される場合、分子間の相対的競合阻害が約5%未満であることを意味する。

【0124】

開示する抗体は、リガンド-レセプター相互作用のプロック、又はレセプターコンポーネント相互作用の阻害での使用が見出され得る。本発明の抗CD38は、「遮断（blocking）」又は「中和」するものであってよい。「中和抗体」は、CD38への結合により、CD38の生物活性、例えば、リガンドと相互作用する能力、酵素活性、及び/又はシグナリング能力を阻害する抗体を意味することが意図される。CD38の生物活性の阻害は、当分野で既知の複数の標準的in vitro又はin vivoアッセイの1つ以上により評価され得る（以下の実施例を参照されたい）。30

【0125】

「結合を阻害する」又は「結合を遮断する」（例えば、CD38結合パートナーとCD38との結合の阻害/遮断について言及する場合）には、部分的及び完全な阻害/遮断の両方が包含される。CD38結合パートナーとCD38との結合の阻害/遮断は、阻害又は遮断されることなくCD38結合パートナーがCD38と結合した場合に生じる細胞シグナリングの正常なレベル又はタイプを低下又は変更してもよい。阻害及び遮断はまた、抗CD38抗体と接触しないリガンドと比較して、抗CD38抗体と接触させた場合のCD38結合パートナーとCD38との結合親和性が、測定可能に減少することを含むことが意図され、例えば、CD38結合パートナーとCD38との結合が、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%又は100%遮断されることなどである。40

【0126】

開示する抗CD38抗体はまた、細胞増殖を阻害してもよい。「増殖を阻害する」とは、抗CD38抗体と接触しない細胞の増殖と比較して、抗CD38抗体と接触した場合の同一の細胞の増殖が、測定可能に減少することを含み、例えば、細胞培養物の増殖が少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%又は100%阻害されることなどである。50

【 0 1 2 7 】**本発明の抗体の製造方法**

本発明は、開示する抗 C D 3 8 抗体の製造方法をさらに提供する。これら的方法は、本発明の抗体をコードする、1つ以上の単離された核酸を含む宿主細胞を培養する工程を含む。当業者に理解されるように、これは、抗体の特性に応じて、様々な方法で実施され得る。いくつかの実施態様において、本発明の抗体が全長の従来の抗体である場合、例えば、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域である場合には、例えば、抗体が製造され、単離可能な条件下で実施される。

【 0 1 2 8 】

一般に、本発明の抗体をコードする核酸を提供する。このようなポリヌクレオチドは、重鎖及び軽鎖それぞれの可変領域及び定常領域の両方をコードするものであるが、本明細書に記載の組成物に従って、他の組合せも本発明により企図される。本発明は、開示するポリヌクレオチド由来のオリゴヌクレオチド断片、及びこれらのポリヌクレオチドと相補的な核酸配列も企図する。

10

【 0 1 2 9 】

ポリヌクレオチドは R N A の形態であっても D N A の形態であってもよい。D N A 、 c D N A 、ゲノム D N A 、核酸アナログ及び合成 D N A の形態であるポリヌクレオチドは、本発明の範囲内である。D N A は二本鎖であっても一本鎖であってもよく、一本鎖の場合には、コーディング(センス)鎖又は非コーディング(アンチセンス)鎖であってよい。ポリペプチドをコードするコーディング配列は、本明細書で提供するコーディング配列と同一であってもよく、又は異なるコーディング配列であって、遺伝コードの冗長性又は縮重の結果として、本明細書で提供する D N A と同一のポリペプチドをコードする配列であってもよい。

20

【 0 1 3 0 】

いくつかの実施態様において、本発明の抗体をコードする1つ以上の核酸は、発現ベクターに組み込まれ、当該発現ベクターは、導入される宿主細胞の染色体外であるか、又はそのゲノム中にインテグレートされるよう設計され得る。発現ベクターは、任意数の適切な制御配列(転写及び翻訳調節配列、プロモーター、リボソーム結合部位、エンハンサー、複製起点などが挙げられるが、これらに限定されない)又は他の要素(選択遺伝子など)を含むことができ、これらは全て、当分野でよく知られるように操作可能に連結される。いくつかの場合、2つの核酸を用いて、それぞれを異なる発現ベクターに入れるか(例えば、第一の発現ベクターに重鎖、第二の発現ベクターに軽鎖)、あるいはそれらを同一の発現ベクターにいれることができる。制御配列の選択を含む、1つ以上の発現ベクターの設計は、宿主細胞の選択、所望するタンパク質の発現レベルなどの因子によって決まり得ることが当業者に理解されるだろう。

30

【 0 1 3 1 】

一般に、選択される宿主細胞に適した任意の方法(例えば、トランスフォーメーション、トランスフェクション、エレクトロポレーション、インフェクションなど)を用いて、1つ以上の核酸が1つ以上の発現調節要素に操作可能に連結されるように(例えば、ベクターにおいて、細胞でのプロセスにより作出される構築物において、宿主細胞のゲノムにインテグレートされて)、核酸及び/又は発現が適した宿主細胞に導入され、組換え宿主細胞が作出される。得られた組換え宿主細胞は、発現に適した条件下(例えば、インデューサーの存在下、適した非ヒト動物中、適した塩、増殖因子、抗生物質、栄養補助剤などを添加した適した培地など)で維持でき、それによりコードされた1つ以上のポリペプチドが製造される。いくつかの場合において、重鎖が1つの細胞で製造され、軽鎖が別の細胞で製造される。

40

【 0 1 3 2 】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は当分野で既知であり、American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VAから入手可能な多くの不死化細胞株が含まれ、これには、チャイニーズハムス

50

ター卵巣(CHO)細胞、HEK 293細胞、NSO細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)、ヒト肝細胞ガン細胞(例えば、Hep G2)、及び多数の他の細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。細菌、酵母、昆虫及び植物を含む(これらに限定されない)非哺乳動物細胞を用いて、組換え抗体を発現させることもできる。いくつかの実施態様において、抗体は、ウシやニワトリなどのトランスジェニック動物において製造することができる。

【0133】

抗体分子生物学、発現、精製及びスクリーニングの一般的な方法は、例えば、Kontermann & Dubelにより編集されたAntibody Engineering, Springer, Heidelberg, 2001 and 2010 Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76; 及びMorrison, S. (1985) Science 229:1202に記載される。
10

【0134】

本明細書に記載の抗体薬物結合体(conjugate)は、当分野で知られるように作製され、これには、以下により利用される技術が含まれる: Seattle Genetics(例えば、U.S.特許No. 8,067,546、8,039,273、7,989,434、7,851,437、7,837,980及び7,829,531を参考されたい。これらは全て参照により明確にその全体が本明細書に援用され、特に薬物、リンカー及び結合方法を参照する)、Syntargia(例えば、7,705,045及び7,223,837を参考されたい。これらは全て参照により明確にその全体が本明細書に援用され、特に薬物、リンカー及び結合方法を参照する)、Medarex(例えば、8,034,959、8,034,787、7,968,586、7,847,105を参考されたい。これらは全て参照により明確にその全体が本明細書に援用され、特に薬物、リンカー及び結合方法を参照する)、及び当分野で周知の他の方法。
20

【0135】

適用及び適応

本発明の抗体が作製された場合には、CD38関連疾患の診断及びその治療を含む様々な適用での使用が見出される。
30

【0136】

CD38関連病態

一つの側面において、本発明は、医薬上有効量の開示抗体を患者に投与する工程を含む、CD38を発現する細胞の増殖と関連する病態の治療法を提供する。ある実施態様において、病態はガンであり、特定の実施態様において、ガンは血液ガンである。他の特定の実施態様において、病態は、多発性骨髄腫、慢性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、形質細胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、B-細胞リンパ腫又はバーキットリンパ腫である。

【0137】

特定の病態は、CD38を発現する細胞と関連し、特定の病態は、細胞表面上のCD38の過剰発現、高密度発現又は上方制御された発現と関連することが当分野で既知である。細胞集団がCD38を発現するかどうかは、当分野で既知の方法、例えば、所与の集団において、CD38と特異的に結合する抗体により標識された細胞の割合をフローサイトメトリーにより決定する方法や、免疫組織化学アッセイなどにより決定でき、これは、診断的適用について以下で一般に記載するとおりである。例えば、CD38の発現が細胞の約10~30%で検出される細胞集団は、CD38に対して弱陽性(weak positivity)を有するとみなすことができ；CD38の発現が細胞の約30%超で検出される細胞集団は、CD38に対して明確に(definite)陽性であるとみなすことができるが(Jackson et al. (1988), Clin. Exp. Immunol. 72:351-356で示すとおり)、とはいえた他の基準を用いて、細胞集団
40
50

がCD38を発現するかを決定できる。細胞表面上の発現密度は、当分野で既知の方法、例えば、CD38と特異的に結合する抗体を用いて蛍光標識されている細胞の平均蛍光密度をフローサイトメトリーにより測定することなどにより、決定できる。

【0138】

いくつかの実施態様において、本発明の組成物及び方法は、「血液ガン」などのガンに適用され、この用語は、血液形成組織の悪性新生物を意味し、白血病、リンパ腫及び多発性骨髄腫を包含する。CD38発現と関連する病態の非限定的な例として、以下を挙げることができるが、これらに限定されない：多発性骨髄腫（Jackson et al. (1988), Clin. Exp. Immunol. 72: 351-356）、B細胞慢性リンパ性白血病（B-CLL）（During et al. (2002), Leukemia 16: 30-5; Morabito et al. (2001), Leukemia Research 25: 927-32; Marinov et al. (1993), Neoplasma 40(6): 355-8；及びJelinek et al. (2001), Br. J. Haematol. 115: 854-61）、急性リンパ芽球性白血病（Keyhani et al. (1999), Leukemia Research 24: 153-9；及びMarinov et al. (1993), Neoplasma 40(6): 355-8）、慢性骨髄性白血病（Marinov et al. (1993), Neoplasma 40(6): 355-8）、急性骨髄性白血病（Keyhani et al. (1999), Leukemia Research 24: 153-9）、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性骨髄性（myelogenousous又はmyeloid）白血病（CML）、急性骨髄性（myelogenousous又はmyeloid）白血病（AML）、急性リンパ性白血病（ALL）、有毛細胞白血病（HCL）、骨髄異形成症候群（MDS）、又は急性期慢性骨髄性白血病（CML-BP）、及びこれらの白血病の全てのサブタイプ（当分野で公知の形態学的、組織化学的及び免疫学的技術により定義されるもの）。

【0139】

「新生物」又は「新生物病態（neoplastic condition）」とは、正常なコントロールを失い、その結果1以上の症状（制御不能の増殖、分化の欠如、局所的な組織浸潤及び転移を含む）を生じることにより特徴づけられる、細胞増殖と関連する病態を意味する。

【0140】

本発明のいくつかの実施態様において、血液ガンは、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性骨髄性白血病（AML）及び急性リンパ性白血病（ALL）からなる群から選択される。

【0141】

さらに、CD38発現が、例えば、B細胞慢性リンパ性白血病（During et al. (2002), Leukemia 16: 30-5；及びMorabito et al. (2001), Leukemia Research 25: 927-32）及び急性骨髄性白血病（Keyhani et al. (1999), Leukemia Research 24: 153-9）などの病態を有する患者に対する予後指標であることが当分野で既知である。

【0142】

CLLは、西側諸国における成人の最も一般的は白血病である。CLLは、リンパ節や他のリンパ系組織に関与する、成熟した外観を有するリンパ球のクローン性増殖であり、骨髄への進行性浸潤を有し、末梢血での存在がみられる。B細胞型（B-CLL）が、大部分のケースの代表である。

【0143】

B-CLL

B-CLLは、長年にわたり、持続的な形で骨髄及び末梢血に蓄積する反応不顯性の單クローン性B系細胞の進行性の増加により特徴付けられる難病である。CD38の発現は

10

20

30

40

50

、B - C L Lに対する独立した予後不良因子と考えられる。Hamblin et al ., Blood 99: 1023 - 9 (2002)。

【0144】

B - C L Lの現在の標準的治療法は、一時的な緩和であり、細胞増殖抑制剤であるクロラムブシリ又はフルダラビンを用いて主に実施される。再発した場合には、リツキシマブ（CD20に対するモノクローナル抗体）又はキャンパス（CD52に対するモノクローナル抗体）と組み合わせてフルダラビン、シクロホスファミドを用いる併用療法が多くの場合開始される。従って、B - C L Lの治療に対して、未だ満たされていない重大な医学的ニーズが存在する。いくつかの実施態様において、開示する抗CD38抗体を用いたB - C L Lの治疗方法を提供する（かつ、以下で概説するように、これは、任意選択且つ独立して、上記薬物のいずれかを含む併用療法を用いて実施されてよい）。 10

【0145】

B - C L Lは、緩慢性と進行性の2つのサブタイプにより特徴付けられる。これらの臨床表現型は、免疫グロブリン重鎖可変領域（IgVH）遺伝子における体細胞突然変異の有無と相關する。本明細書で使用する場合、緩慢性B - C L Lとは、変異したIgVH遺伝子を有し、且つ／又は緩慢性B - C L Lと関連する1つ以上の臨床表現型を示す対象における障害を意味する。本明細書で使用する場合、進行性B - C L Lとは、変異していないIgVH遺伝子を有し、且つ／又は進行性B - C L Lと関連する1つ以上の臨床表現型を示す対象における障害を意味する。 20

【0146】

多発性骨髄腫

多発性骨髄腫は、骨髄における形質細胞の新生増殖により特徴付けられるB細胞系の悪性障害である。現在治療レジメンは、中等度の奏効率を示す。しかし、全体の生存率は横ばいでしかなく、平均生存期間はおよそ3年である。従って、多発性骨髄腫の治療に対して、未だ満たされていない重大な医学的ニーズが存在する。いくつかの実施態様において、開示する抗CD38抗体を用いた多発性骨髄腫の治疗方法を提供する。 30

【0147】

CD38は、最終的にB細胞に分化する形質細胞に高度に発現する。

【0148】

骨髄腫細胞の増殖は、様々な作用を引き起こし、これには、骨における溶解性病変（穴）、赤血球数の減少、異常タンパク質の產生（腎臓、神経及び他の臓器へのダメージを伴う）、免疫系機能の低下及び血中カルシムレベルの上昇（高カルシウム血症）が挙げられる。 30

【0149】

現在の治療オプションには、化学療法、好ましくは、可能であれば自家幹細胞移植（ASCT）と関連する化学療法が含まれる。

【0150】

意義不明の単クローニ性免疫グロブリン血症及びくすぶり型多発性骨髄腫

いくつかの実施態様において、開示抗体を用いた単クローニ性免疫グロブリン血症の治疗方法を提供する。他の実施態様において、開示抗体を用いたくすぶり型多発性骨髄腫の治疗方法を提供する。 40

【0151】

意義不明の単クローニ性免疫グロブリン血症（MGUS）及びくすぶり型多発性骨髄腫（SMM）は、骨髄における単クローニ性形質細胞増殖と、末端器官障害の欠如により特徴付けられる無症候性の前腫瘍性障害である。

【0152】

くすぶり型多発性骨髄腫（SMM）は、症候性又は活動型多発性骨髄腫への高い進行リスクを有する、形質細胞の無症候性増殖障害である（N. Engl. J. Med. 356 (25) : 2582 - 2590 (2007)）。

【0153】

10

20

30

40

50

SMMを定義する国際コンセンサス基準が2003年に採択され、当該基準は、患者が、>30g/LのMタンパク質レベル、及び/又は>10%の骨髄クローン性形質細胞を有することを必要とする(Br. J. Haematol. 121: 749-57(2003))。患者は、骨病変又は症状を含む臓器又は関連組織の損傷を有してはならない(Br. J. Haematol. 121: 749-57(2003))。

【0154】

最近の研究により、2つのSMMサブセットが同定されている：i)進行性疾患を有する患者及びii)非進行性疾患を有する患者(Br. J. Haematol. 121: 631-636(2003))。MGUSを定義する国際コンセンサス基準は、患者が、<30g/LのMタンパク質レベル、<10%の骨髄形質細胞、及び骨病変又は症状を含む臓器又は関連組織の損傷を有さないことを必要とする(Br. J. Haematol. 121: 749-57(2003))。

【0155】

SMMは、末端器官障害が存在しないことから、意義不明の単クローニング免疫グロブリン血症(MGUS)と類似する(N. Engl. J. Med. 356(25): 2582-2590(2007))。しかしながら、臨床的には、SMMは、20年で活動型多発性骨髄腫又はアミロイドーシスに進行する可能性が遙かに高い(SMMでは78%の確率であるのに対し、MGUSでは21%)(N. Engl. J. Med. 356(25): 2582-2590(2007))。

【0156】

図11は多数の異なるADCの態様を示す。本明細書に記載するように、リンカー部分は変化してよく、これには、アミノ酸組成、自壊的(self-immolative)リンカーなどが含まれる。

【0157】

抗体薬物結合体

いくつかの実施態様において、本発明の抗CD38抗体は、薬物と結合して抗体-薬物結合体(conjugate)(ADC)を形成する。一般に、ADCはガン適用(oncology application)に使用され、その場合には、細胞傷害性剤(cytotoxic agent)又は細胞増殖抑制剤の局所デリバリーのための抗体-薬物結合体の使用は、薬物部分の腫瘍への標的デリバリーを可能にし、これにより、より高い有効性、より低い毒性などを可能となり得る。この技術の概説は、Ducry et al., Bioconjugate Chem., 21: 5-13(2010)、Carter et al., Cancer J. 14(3): 154(2008)及びSenter, Current Opin. Chem. Biol. 13: 235-244(2009)(これらは全て、参照によりその全体が援用される)により提供される。

【0158】

従って、本発明は、薬物と結合した抗CD38抗体を提供する。一般に、結合は、以下でさらに記載するように、抗体への共有結合により実施され、通常は、リンカー、多くの場合はペプチド結合(以下に記載するように、標的部位であるかを問わず、プロテアーゼによる切断に反応しやすいよう設計されてよい)に依拠する。さらに、上述のとおり、リンカー-薬物ユニット(LU-D)の結合は、抗体内のシステインへの結合によりなされ得る。当業者に理解されるように、抗体当たりの薬物部分の数は、反応条件によって変更でき、薬物:抗体は1:1~10:1に変更できる。当業者に理解されるように、実際の数は平均である。

【0159】

従って、本発明は、薬物と結合した抗CD38抗体を提供する。上述のとおり、ADCの薬物は任意数の薬剤(agent)であってよく、細胞傷害性剤、例えば、化学療法剤、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、又はそのフラグメント)、又は放射性同位体(すなわち、ラジオコンジュゲート(radioconjugate))が提供されるが、これらに限定されない。他の実施態様におい

10

20

30

40

50

て、本発明はさらに、ADCを用いる方法を提供する。

【0160】

本発明での使用のための薬物には、細胞傷害性薬、特に癌治療のために使用されるものが挙げられる。このような薬物としては、一般に、DNA損傷剤、代謝拮抗薬、天然生成物及びそれらのアナログが挙げられる。例示的なクラスの細胞傷害性剤としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼインヒビター及びチミジル酸シントーゼインヒビターなどの酵素阻害剤、DNAインターラート剤、DNA切断剤、トポイソメラーゼインヒビター、アントラサイクリンファミリーの薬物、ビンカ薬物、マイトイシン、ブレオマイシン、細胞傷害性ヌクレオシド、ブテリジンファミリーの薬物、ジイネン、ポドフィロトキシン、ドラスタチン、メイタンシノイド、分化誘導剤及びタキソールが挙げられる。

10

【0161】

これらのクラスのメンバーとしては、例えば、メトトレキサート、メトプテリン、ジクロロメトトレキサート、5-フルオロウラシル、6-メルカブトプリン、シトシンアラビノシド、メルファラン、ロイロシン、ロイロシデイン、アクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、マイトイシンC、マイトイシンA、カルミノマイシン(camino mycin)、アミノプテリン、タリソマイシン、ポドフィロトキシン及びポドフィロトキシン誘導体(エトポシド又はリン酸エトポシドなど)、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、タキサン類、例えばタキソール、タキソテール、レチノイン酸、酪酸、N8-アセチルスペルミジン、カンプトテシン、カリケアマイシン、エスペラマイシン、エン-ジイン、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、カリケアマイシン、カンプトテシン、メイタンシノイド(DM1を含む)、モノメチルauristatinE(MMAE)、モノメチルauristatinF(MMAF)、及びメイタンシノイド(DM4)、並びにそれらのアナログが挙げられる。

20

【0162】

毒素は、抗体-毒素結合体として使用されてよく、細菌毒素、例えばジフテリア毒素、植物毒素、例えばリシン(ricin)、低分子毒素、例えば、ゲルダナマイシン(Mandler et al(2000)J.Nat.Cancer Inst.92(19):1573-1581;Mandler et al(2000)Bioorganic & Med.Chem.Letters 10:1025-1028;Mandler et al(2002)Bioconjugate Chem.13:786-791)、メイタンシノイド(EP1391213;Liu et al.,(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93:8618-8623)及びカリケアマイシン(Lode et al(1998)Cancer Res.58:2928;Hinman et al(1993)Cancer Res.53:3336-3342)などが挙げられる。毒素は、チューブリン結合、DNA結合又はトポイソメラーゼ阻害を含むメカニズムにより、細胞傷害性及び細胞増殖抑制効果を発揮してよい。

30

【0163】

抗CD38抗体と1つ以上の低分子毒素、例えば、メイタインシノイド、ドラスタチン、アウリストチン(auristatin)、トリコテセン、カリケアマイシン及びCC1065、並びに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体との結合体が企図される。

40

【0164】

メイタンシノイド

メイタンシノイド薬物部分として使用するのに適したメイタンシン化合物が当分野で公知であり、これは、既知の方法で天然源から単離されるか、遺伝子工学技術を用いて製造されるか(Yu et al(2002)PNAS 99:7968-7973を参照されたい)、又は既知の方法に従って合成により調製されるメイタンシノール若しくはメイタンシノールアナログであってよい。以下に記載するように、薬物は、抗体との結合のために、チオールやアミン基などの官能性活性基(functionally active group)の組込みにより修飾されてよい。

【0165】

50

例となるメイタンシノイド薬物部分としては、修飾された芳香族環を有するもの、例えば：C - 19 - デクロロ（U . S . 特許No . 4 , 256 , 746）（アンサマイトシンP2のリチウムアルミニウムヒドリド還元により調製）；C - 20 - ヒドロキシ（又はC - 20 - デメチル）+/- C - 19 - デクロロ（U . S . 特許No . 4 , 361 , 650及び4 , 307 , 016）（ストレプトマイセス又はアクチノミセスの脱メチル化、又はLAHを用いた脱塩素化により調製）；及びC - 20 - デメトキシ、C - 20 - アシリルオキシ（-OCOR）、+/- デクロロ（U . S . 特許No . 4 , 294 , 757）（塩化アシリルを用いるアシリル化により調製）など、並びに他の位置での修飾を有するものが挙げられる。

【0166】

10

例となるメイタンシノイド薬物部分としては、さらに以下の修飾を有するもの、例えば：C - 9 - SH（U . S . 特許No . 4 , 424 , 219）（メイタンシノールのH2S又はP2S5との反応により調製）；C - 14 - アルコキシメチル（デメトキシ / CH2OR）（U . S . 特許No . 4 , 331 , 598）；C - 14 - ヒドロキシメチル又はアシリルオキシメチル（CH2OH又はCH2OAc）（U . S . 特許No . 4 , 450 , 254）（ノカルジア（Nocardia）から調製）；C - 15 - ヒドロキシ / アシリルオキシ（U . S . 特許No . 4 , 364 , 866）（ストレプトマイセスによるメイタンシノールの転化により調製）；C - 15 - メトキシ（U . S . 特許No . 4 , 313 , 946及び4 , 315 , 929）（トレウィアヌドロフローラ（Trewia nudiflora）より単離）；C - 18 - N - デメチル（U . S . 特許No . 4 , 362 , 663及び4 , 322 , 348）（ストレプトマイセスによるメイタンシノールの脱メチル化により調製）；及び、4 , 5 - デオキシ（U . S . 特許No . 4 , 371 , 533）（メイタンシノールの三塩化チタン / LAH還元により調製）などが挙げられる。

【0167】

20

特に使用されるのは、DM1（参照により援用されるUS特許No . 5 , 208 , 020に開示）及びDM4（参照により援用されるUS特許No . 7 , 276 , 497に開示）である。5 , 416 , 064、WO / 01 / 24763、7 , 303 , 749、7 , 601 , 354、USSN 12 / 631 , 508、WO 02 / 098883、6 , 441 , 163、7 , 368 , 565、WO 02 / 16368及びWO 04 / 1033272（これらは全て、その全体が参照により明確に援用される）に記載の多数の追加のメイタンシノイド誘導体及び方法も参照されたい。

30

【0168】

メイタンシノイドを含むADC、その作製方法及びその治療的使用は、例えば、U . S . 特許No . 5 , 208 , 020 ; 5 , 416 , 064 ; 6 , 441 , 163 及び欧洲特許EP 0425235B1に開示されており、この開示は参照により明確に援用される。Liu et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . USA 93 : 8618 - 8623 (1996)では、ヒト結腸直腸ガンに対して指向された、モノクローナル抗体C242に結合されたDM1として示されるメイタンシノイドを含むADCが記載された。当該結合体は、培養結腸ガン細胞に向けて高い細胞傷害性であることが見られ、in vivo腫瘍増殖アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。

40

【0169】

Charri et al . , Cancer Research 52 : 127 - 131 (1992)では、メイタンシノイドを、ジスルフィドリンカーを介して、ヒト結腸ガン細胞株における抗原に結合するマウス抗体A7と結合させるか、又はHER-2/neu癌原遺伝子に結合する別のマウスモノクローナル抗体TA . 1と結合させたADCが記載される。TA . 1 - メイタンシノイド結合体の細胞傷害性は、ヒト乳癌細胞株SK-BR-3（細胞当たり、3 × 10⁵ HER-2表面抗原を発現する）に対してin vitroで試験された。薬物結合体は、遊離メイタンシノイド薬物と同様のある程度の細胞傷害性を達成し、これは、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子数を増加させることにより増加した。A7 - メイタンシノイド結合体は、マウスにおいて低い全身細胞傷害性（sy

50

systemic cytotoxicity)を示した。

【0170】

アウリスタチン及びドラスタチン

いくつかの実施態様において、ADCは、ドラスタチン又はドラスタチンペプチドのアナログ及び誘導体、アウリスタチンに結合させた抗CD38抗体を含む(U.S.特許No.5,635,483、5,780,588)。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解、並びに核及び細胞の分裂に干渉し(Woyke et al(2001)Antimicrob Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)、抗癌活性(U.S.特許No.5663149)及び抗真菌活性(Pettit et al(1998)Antimicrob Agents Chemother. 42:2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン薬物部分又はアウリスタチン薬物部分は、ペプチド薬物部分のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端を介して抗体に結合させてよい(WO02/088172)。

【0171】

例示的なアウリスタチンの実施態様は、Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented Mar. 28, 2004及び米国特許公報No.2005/0238648(これらの開示は、参照によりその全体が明確に援用される)に開示されるように、N末端結合モノメチルアウリスタチン薬物部分であるDEとDFを含む。

【0172】

例示的なアウリスタチンの実施態様は、MMAEである(図10に示す。図10では、波線は抗体薬物結合体のリンカー(L)への共有結合を示す: 参照によりその全体が明確に援用されるUS特許No.6,884,869を参照されたい)。

【0173】

別の例示的なアウリスタチンの実施態様は、MMAFである(図10に示す。図10では、波線は抗体薬物結合体のリンカー(L)への共有結合を示す: 参照によりその全体が明確に援用されるUS2005/0238649、5,767,237及び6,124,431を参照されたい)。

【0174】

MMAE又はMMAFと様々なリンカー要素(本明細書にさらに記載)を含むさらなる例示的な実施態様は、以下の構造及び略語を有する(ここで、Abは抗体を意味し、pは1~約8である):

【0175】

典型的には、ペプチドベースの薬物部分は、2つ以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片の間にペプチド結合を形成することにより調製することができる。そのようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で周知である液相合成法に従って調製することができる(E. Schroeder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照されたい)。アウリスタチン/ドラスタチン薬物部分は、U.S.特許No.5,635,483; U.S.特許No.5,780,588; Pettit et al(1989)J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al(1998)Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al(1996)J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; 及びDoronina(2003)Nat Biotechnol 21(7):778-784の方法に従って調製してよい。

【0176】

カリケアマイシン

10

20

30

40

50

別の実施態様において、ADCは、1つ以上のカリケアマイシン分子と結合させた本発明の抗体を含む。例えば、マイロターゲ(Mylotarg)は、最初に市販されたADC薬物であり、ペイロード(payload)としてカリケアマイシン1を利用する(参照によりその全体が援用される、US特許No.4,970,198を参照されたい)。さらなるカリケアマイシン誘導体は、US特許No.5,264,586、5,384,412、5,550,246、5,739,116、5,773,001、5,767,285及び5,877,296(全て参照により明確に援用される)に記載される。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で二本鎖DNA切断物を產生することができる。カリケアマイシンファミリーの結合体の調製に関しては、U.S.特許No.5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001、5,877,296(すべてAmerican Cyanamid Company)を参照されたい。使用してよいカリケアマイシンの構造的アナログとして、1I、2I、2I、N-アセチル-1I、PSAG及びI1が挙げられるが、これらに限定されない(Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342(1993)、Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928(1998)及びAmerican Cyanamidの上記米国特許)。抗体を結合体化させることのできる別の抗腫瘍薬物は、葉酸代括抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAの両方は、細胞内作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。従って、抗体媒介インターナリゼーションを介したこれらの薬剤の細胞取り込みは、それらの細胞傷害性効果を大きく増強する。

【0177】

デュオカルマイシン

CC-1065(参照により援用される4,169,888を参照されたい)及びデュオカルマイシンは、ADCで利用される抗腫瘍抗生物質ファミリーのメンバーである。これらの抗生物質は、副溝において、アデニンのN3での配列選択的DNAアルキル化を介した作用するようであり、これにより、一連の事象が開始され、結果としてアポトーシスとなる。

【0178】

デュオカルマイシンの重要なメンバーとして、デュオカルマイシンA(参照により援用される、US特許No.4,923,990)及びデュオカルマイシンSA(参照により援用される、U.S.特許No.5,101,038)、並びに以下に記載される多数のアナログが挙げられる:US特許No.7,517,903、7,691,962、5,101,038;5,641,780;5,187,186;5,070,092;5,070,092;5,641,780;5,101,038;5,084,468、5,475,092、5,585,499、5,846,545、WO2007/089149、WO2009/017394A1、5,703,080、6,989,452、7,087,600、7,129,261、7,498,302及び7,507,420(これらは全て、参照により明確に援用される)。

【0179】

他の細胞傷害性剤

本発明の抗体に結合できる他の抗腫瘍剤としては、BCNU、ストレプトゾイシン(streptozocin)、ビンクリスチン及び5-フルオロウラシル、U.S.特許No.5,053,394及び5,770,710に記載のLL-E33288複合体としてまとめて知られる薬剤のファミリー、並びにエスペラミシン(U.S.特許No.5,877,296)が挙げられる。

【0180】

使用することのできる酵素的に活性な毒素及びそのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖(シードモナス・エルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa)由来)、リシンA鎖、アブリ

10

20

30

40

50

ン A 鎖、モデッシン A 鎖、 - サルシン、アレウリテス・フォルディ (A le u r i t e s f o r d i i) タンパク質、ジアンチンタンパク質、フィトラカ・アメリカーナ (P hyt o l a c a a m e r i c a n a) タンパク質 (P A P I、P A P I I 及びP A P - S)、モモルディカ・カラントニア (m o m o r d i c a c h a r a n t i a) インヒビター、クルシン、クロチン、サポナリア・オフィシナリス (s a p a o n a r i a o f f i c n a l i s) インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンが挙げられる。例えば、1993年10月28日公開のWO93/21232号を参照されたい。

【0181】

本発明は、抗体と、核酸分解活性を有する化合物（例えば、リボヌクレアーゼ、又はデオキシリボヌクレアーゼ (D N a s e) などのDNAエンドヌクレアーゼ）との間に形成されるADCをさらに意図する。

【0182】

腫瘍の選択的破壊のために、抗体は高放射性原子を含んでよい。多様な放射性同位体が、放射性結合 (radioconjugated) 抗体の产生に利用することができる。例としては、At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212、及びLuの放射性同位体が挙げられる。

【0183】

放射標識又は他の標識は、既知の方法により結合体に組み込まれてよい。例えば、ペプチドを合成してもよいし、水素の代わりに例えばフッ素-19を含む適当なアミノ酸前駆体を用いる化学的アミノ酸合成により合成してよい。Tc99m又はI123、Re186、Re188及びIn111などの標識は、システイン残基を経てペプチドに結合させることができる。イットリウム-90は、リジン残基を経て結合させることができる。IODOGEN法 (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) を用いてヨウ素-123を取り込むことができる。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy” (Chatal, CRC Press 1989) は、他の方法を詳細に説明する。

【0184】

複数の抗体を含む組成物について、薬物負荷は、抗体当たりの薬物分子の平均数であるpにより表される。薬物負荷は、抗体当たり1~20薬物 (D) の範囲であってよい。結合体化反応の調製における抗体当たりの薬物の平均数は、質量分析、ELISAアッセイ及びHPLCなどの慣用的な手段によって特徴付けることができる。pの換算で抗体-薬物-結合体の定量的分布も決定することができる。

【0185】

いくつかの例において、pが他の薬物負荷を有する抗体-薬物-結合体からの特定の値である、均一な抗体-薬物-結合体の分離、精製及び特徴付けは、逆相HPLC又は電気泳動などの手段によって達成することができる。例示的な実施態様において、pは2、3、4、5、6、7若しくは8であるか、又はその分数 (fraction) である。

【0186】

抗体薬物結合体の生成は、当業者に公知の任意の技術によって達成され得る。簡潔には、抗体薬物結合体は、抗体ユニットとしての抗CD38抗体、薬物、及び任意選択で薬物と結合剤とを連結するリンカーを含み得る。

【0187】

多くの様々な反応が、結合剤への薬物及び/又はリンカーの共有結合に利用可能である。これは、結合剤（例えば、抗体分子）のアミノ酸残基（リジンのアミン基、グルタミン酸及びアスパラギン酸の遊離カルボン酸基、システインのスルフヒドリル基、及び芳香族アミノ酸の種々の部分を含む）の反応によって達成される。共有結合の最も一般に使用される非特異的方法のうちの1つは、化合物のカルボキシ（又はアミノ）基を、抗体のアミノ（又はカルボキシ）基に連結するためのカルボジイミド反応である。さらに、二官能性

10

20

30

40

50

剤（例えば、ジアルデヒド又はイミドエステル）は、化合物のアミノ基を、抗体分子のアミノ基に連結するために使用してきた。

【0188】

シップ塩基反応は、結合剤への薬物の結合にも利用可能である。この方法は、グリコール又はヒドロキシリル基を含む薬物の過ヨウ素酸酸化、従って、アルデヒドの形成を含み、アルデヒドは、次いで、結合剤と反応させられる。結合は、結合剤のアミノ基とのシップ塩基の形成を介して起こる。イソチオシアネートはまた、結合剤に薬物を共有結合させるためのカップリング剤として使用され得る。他の技術は、当業者に公知であり、本発明の範囲内である。

【0189】

いくつかの実施態様において、中間体（リンカーの前駆物質である）を、適切な条件下で薬物と反応させる。他の実施態様において、反応性の基は、薬物及び／又は中間体に対して使用される。薬物と中間体との間の反応の生成物、又は誘導体化薬物を、その後、適切な条件下で、本発明の抗CD38抗体と反応させる。

【0190】

本発明の結合体を調製する目的で、より簡便に化合物の反応を行うため、所望の化合物に修飾を行ってよいことが理解されるだろう。例えば、アミン、ヒドロキシリル、又はスルフヒドリルなどの官能基を、薬物の活性又は他の特性に対して最小限又は許容可能な効果を有する位置で、薬物に付加してよい。

【0191】

リンカーエニット

典型的には、抗体薬物結合体は、薬物ユニットと抗体ユニットとの間にリンカーエニットを含む。いくつかの実施態様において、リンカーは、リンカーの切断により、適切な環境において抗体から薬物ユニットを放出するように、細胞内又は細胞外条件下で切断可能である。例えば、特定のプロテアーゼを分泌する固形腫瘍は、切断可能なリンカーの標的として機能してよく；他の実施態様では、利用されるのは細胞内プロテアーゼである。さらに他の実施態様において、リンカーエニットは、切断可能でなく、薬物は、例えば、リソソームでの抗体分解によって放出される。

【0192】

いくつかの実施態様において、リンカーは、細胞内環境中に（例えば、リソソーム又はエンドソーム又はまたはカベオラ（caveolea）内）に存在する切断剤によって切断可能である。リンカーは、例えば、細胞内ペプチダーゼ又はプロテアーゼ酵素（リソソームプロテアーゼ又はエンドソームプロテアーゼが挙げられるが、これらに限定されない）によって切断されるペプチジルリンカーであり得る。いくつかの実施態様において、ペプチジルリンカーは、少なくとも2アミノ酸長又は少なくとも3アミノ酸長である。

【0193】

切断剤としては、限定されないが、カテプシンB及びカテプシンD並びにプラスミンが挙げられ得、これらは全て、標的細胞内の活性薬物の放出を生じるジペプチド薬物誘導体を加水分解することが知られている（例えば、Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123を参照されたい）。CD38発現細胞に存在する酵素によって切断可能なペプチジルリンカーがある。例えば、チオール依存性プロテアーゼであり、ガン組織において高度に発現されるカテプシン-Bによって切断可能であるペプチジルリンカーが、使用され得る（例えば、Ph e - L e u又はG l y - P h e - L e u - G l y リンカー（配列番号X）など）。このようなリンカーの他の例は、例えば、U.S.特許No. 6,214,345（その全体が、全ての目的のために、本明細書に参照により援用される）に記載される。

【0194】

いくつかの実施態様において、細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチジルリンカーは、V a l - C i t リンカー又はP h e - L y s リンカー（例えば、U.S.特許No. 6,214,345（これは、v a l - c i t リンカーでのドキソルビシンの合成を

10

20

30

40

50

記載する)を参照されたい)である。

【0195】

他の実施態様において、切断可能なリンカーは、pH感受性(すなわち、特定のpH値での加水分解に感受性)である。典型的には、pH感受性リンカーは、酸性条件下で加水分解可能である。例えば、リソソームにおいて加水分解可能である酸不安定性リンカー(例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、c i s - アコニットアミド、オルトエステル、アセタール、及びケタールなど)が使用され得る(例えば、U.S.特許No. 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubow chik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264: 14653-14661を参照されたい)。このようなリンカーは、中性pH条件(例えば、血液中の条件)下で比較的安定であるが、pH 5.5又は5.0未満(リソソームのpHに近い)では不安定である。特定の実施態様において、加水分解可能なリンカーは、チオエーテルリンカー(例えば、アシルヒドラゾン結合を介して治療剤に結合したチオエーテル)である(例えば、U.S.特許No. 5,622,929を参照されたい)。

【0196】

さらに他の実施態様において、リンカーは、還元条件下で切断可能である(例えば、ジスルフィドリンカー)。種々のジスルフィドリンカーが当該分野で既知であり、これらとしては例えば、S A T A (N-スクシンイミジル-5-アセチルチオアセテート)、S P D P (N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート)、S P D B (N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート)及びS M P T (N-スクシンイミジル-オキシカルボニル--メチル--(2-ピリジル-ジチオ)トルエン) - 、S P D B 及びS M P T を使用して形成され得るもののが挙げられる(例えば、Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47: 5924-5931; Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C.W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987を参照されたい。U.S.特許No. 4,880,935も参考されたい)。

【0197】

さらに他の特定の実施態様において、リンカーは、マロネートリンカー(Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15: 1387-93)、マレイミドベンゾイルリンカー(Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10): 1299-1304)、又は3'-N-アミドアナログ(Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10): 1305-12)である。

【0198】

さらに他の実施態様において、リンカーユニットは、切断可能ではなく、薬物は抗体分解によって放出される(例えば、U.S.公開広報No. 2005/0238649(その全体が、全ての目的のために本明細書に参照により援用される)を参照されたい)。

【0199】

多くの実施態様において、リンカーは自壊的(self-immolative)である。本明細書で使用する場合、「自壊的スペーサー(self-immolative Spacer)」という用語は、2個の間隔の空いた化学部分を安定な3つの部分からなる分子へと一緒に共有結合し得る二官能性化学部分をいう。それは、第1の部分への結合が切断される場合、第2の化学部分から自発的に分離する。例えば、WO 2007059404A2、WO 06110476A2、WO 05112919A2、WO 2010/062171、WO 09/017394、WO 07/089149、WO 07/018431、WO 04/043493及びWO 02/083180(これらは、薬物-切断可能な

10

20

30

40

50

基質結合体を対象としており、薬物及び切断可能な基質は、任意選択で、自壊的リンカーを介して結合されている。これらは全て参照により明確に援用される)を参照されたい。

【0200】

多くの場合、リンカーは、細胞外環境に対して実質的に感受性ではない。本明細書で使用する場合、リンカーの文脈において「細胞外環境に対して実質的に感受性ではない」とは、抗体薬物結合体化合物のサンプルにおいて、リンカーのうちの約20%以下、約15%以下、約10%以下、約5%以下、約3%以下又は約1%以下が、抗体薬物結合体化合物が細胞外環境に(例えば、血漿中に)存在する場合に切断されることを意味する。

【0201】

リンカーが細胞外環境に対して実質的に感受性でないかは、例えば、血漿とともに、抗体薬物結合体化合物を所定の期間(例えば、2時間、4時間、8時間、16時間又は24時間)にわたってインキュベートし、次いで、上記血漿中に存在する遊離薬物の量を定量することによって、決定され得る。

【0202】

他の相互に排他的ではない実施態様において、リンカーは、細胞インターナリゼーションを促進する。特定の実施態様において、リンカーは、治療剤に結合された場合に(すなわち、本明細書に記載されるように、抗体薬物結合体化合物のリンカー-治療剤部分の環境において)細胞インターナリゼーションを促進する。さらに他の実施態様において、リンカーは、アウリスタチン化合物及び本発明の抗CD38抗体の両方に結合体化された場合に、細胞インターナリゼーションを促進する。

【0203】

本発明の組成物及び方法とともに使用され得る種々の例示的リンカーは、WO 2004-010957、U.S.公開公報No. 2006/0074008、U.S.公開公報No. 20050238649及びU.S.公開公報No. 2006/0024317(これらの各々は、その全体が、全ての目的のために本明細書に参照により援用される)に記載される。

【0204】

薬物負荷

薬物負荷は p により表され、 p は、分子における抗体当たりの薬物部分の平均数である。薬物負荷(「 p 」)は、抗体当たり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20以上の部分(D)であってよいが、とはいえる、多くの場合、平均数は分数又は小数(a fraction or a decimal)である。通常は、1~4の薬物負荷が多くの場合有用であり、1~2も有用である。本発明のADCは、1~20の範囲の薬物部分が結合された抗体の集まりが含まれる。結合体化反応からADCを調製する場合の抗体当たりの薬物部分の平均数は、質量分析やELISAアッセイなどの従来の手段によって特徴付けられ得る。

【0205】

p に関してADCの量的分布も決定され得る。いくつかの場合において、 p が他の薬物負荷を有するADCからの特定の値である、均一なADCの分離、精製及び特徴付けは、電気泳動などの手段によって達成され得る。

【0206】

いくつかの抗体-薬物結合体について、 p は抗体への結合部位の数によって制限され得る。例えば、上記の例示的実施形態にあるとおり、結合がシステインチオールである場合、抗体はシステインチオール基を1個のみ若しくは数個有し得るか、又はそれを介してリンカーが結合し得る十分な反応性を有するチオール基を1個のみ若しくは数個有し得る。特定の実施態様では、より高い薬物負荷、例えば $p > 5$ は、特定の抗体-薬物結合体の凝集、不溶解、毒性、又は細胞透過性の喪失を起こし得る。特定の実施態様形態において、本発明のADCの薬物負荷は、1~約8; 約2~約6; 約3~約5; 約3~約4; 約3.1~約3.9; 約3.2~約3.8; 約3.2~約3.7; 約3.2~約3.6; 約3.3~約3.8; 又は約3.3~約3.7の範囲である。実際、特定のADCについて、抗

10

20

30

40

50

体当たりの薬物部分の最適な比は8未満であってよく、約2～約5であってよいことが示されている。U S 2 0 0 5 - 0 2 3 8 6 4 9 A 1 (その全体が参照により援用される)を参照されたい。

【0207】

特定の実施態様では、結合体化反応の間、理論上の最大薬物部分より少ない数が抗体に結合する。抗体は、以下で考察するように、例えば、薬物-リンカー中間体又はリンカー試薬と反応しないリジン残基を含み得る。概して、抗体は、薬物部分と結合し得る反応性の遊離システインチオール基を多くは含まない。実際には、抗体中のほとんどのシステインチオール残基がジスルフィド架橋として存在する。特定の実施態様では、抗体を部分的又は完全な還元条件下でジチオスレイトール(DTT)又はトリカルボニルエチルホスフイン(TCEP)などの還元剤によって還元して、反応性システインチオール基を生成してもよい。特定の実施態様では、抗体を変性条件に供してリジン又はシステインなどの反応性の求核基を露出させる。

【0208】

A D C の負荷(薬物/抗体比)は様々な方法で、例えば、以下によって調節することができる:(i)抗体との反応性を有するモル過剰の薬物-リンカー中間体又はリンカー試薬を制限すること、(ii)結合体化反応時間又は温度を制限すること、(iii)システインチオール改変のための還元条件を部分的又は制限的なものとすること、(iv)リンカー-薬物結合の数及び/又は位置が調節されるようにシステイン残基の数及び位置を改変するため、組換え技術により抗体のアミノ酸配列を遺伝子操作すること(本明細書及びWO 2 0 0 6 / 0 3 4 4 8 8 (その全体が参照により援用される)に開示されるように調製されるチオMab又はチオFabなど)。

【0209】

2個以上の求核基が、薬物-リンカー中間体又はリンカー試薬と反応し、続いて薬物部分試薬と反応する場合、得られる生成物は、抗体に結合した1つ以上の薬物部分の分布を有するA D C 化合物の混合物であることが理解されるべきである。抗体当たりの平均薬物数は、抗体に特異的で且つ薬物に特異的な二重ELISA抗体アッセイ法により混合物から計算されてもよい。個々のA D C 分子は混合物において質量分析で同定し、HPLC、例えば疎水性相互作用クロマトグラフィーなどにより分離し得る。

【0210】

いくつかの実施態様では、単一の負荷値を有する同種A D C が、結合体混合物から電気泳動法又はクロマトグラフィーにより分離され得る。

【0211】

A D C の細胞傷害性効果の判定方法

薬物又は抗体-薬物結合体が細胞に対して細胞増殖抑制効果及び/又は細胞傷害性効果を及ぼすかどうかを判定する方法は公知である。一般に、抗体薬物結合体の細胞傷害性活性又は細胞増殖抑制活性は、以下により計測され得る:細胞培養培地において抗体薬物結合体の標的タンパク質を発現する哺乳動物細胞を曝露し;細胞を約6時間～約5日間にわたり培養し;且つ細胞生存率を計測する。細胞ベースのin vitroアッセイを使用して抗体薬物結合体の生存率(増殖)、細胞傷害性、及びアポトーシス誘導(カスパー化活性化)を計測することができる。

【0212】

抗体薬物結合体が細胞増殖抑制効果を及ぼすかどうかの判定には、チミジン取込みアッセイ法を用いてもよい。例えば、標的抗原を発現する癌細胞を5,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種し、72時間の期間にわたり培養し、その72時間の期間のうちの最後の8時間の間に0.5 μ Ciの³H-チミジンに曝露することができる。抗体薬物結合体の存在下及び非存在下における培養物の細胞への³H-チミジンの取込みが計測される。

【0213】

細胞傷害性(cytotoxicity)を判定するには、壞死又はアポトーシス(

10

20

30

40

50

ログラム細胞死)を計測することができる。壊死は典型的には、細胞膜透過性の増加;細胞の膨潤、及び細胞膜の断裂を伴う。アポトーシスは典型的には、膜の小胞形成、細胞質の凝集、及び内因性エンドヌクレアーゼの活性化により特徴付けられる。ガン細胞に対するこれらの作用のいずれかを測定することにより、抗体薬物結合体がガン治療に有用であることが示される。

【0214】

細胞生存率は、ニュートラルレッド、トリパンブルー、又はALAMAR(商標)ブルーなどの色素の細胞中における取込みを測定することにより計測することができる(例えば、Page et al., 1993, Int'l. J. Oncology 3:473-476を参照されたい)。かかるアッセイ法では、色素を含む培地中で細胞をインキュベートし、細胞を洗浄し、色素の細胞取込みを反映する残留色素を分光光度法で計測する。細胞傷害性の計測のためには、タンパク質結合色素のスルホローダミンB(SRB)もまた使用することができる(Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12)。

【0215】

或いは、死細胞ではなく生細胞を検出することによる、哺乳動物細胞の生存及び増殖についての定量的比色アッセイ法において、MTTなどのテトラゾリウム塩が用いられる(例えば、Mosmann 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63を参照されたい)。

【0216】

アポトーシスは、例えばDNA断片化を計測することによって定量することができる。DNA断片化をin vitroで定量的に測定する市販の測光法が利用可能である。かかるアッセイ法の例としては、TUNEL(断片化したDNAにおける標識ヌクレオチドの取込みを検出する)及びELISAベースのアッセイ法が挙げられ、Biochemicals, 1999, No. 2, pp. 34-37(Roche Molecular Biochemicals)に記載されている。

【0217】

アポトーシスはまた、細胞における形態学的な変化の計測によっても判定することができる。例えば、壊死と同様に、特定の色素(例えば、蛍光色素、例えばアクリジンオレンジ又は臭化工チジウムなど)の取込みを計測することにより、細胞膜の完全性の喪失を判定することができる。アポトーシス細胞数の計測方法については、Duke and Cohen, Current Protocols in Immunology(Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16)により記載されている。細胞はまた、DNA色素(例えば、アクリジンオレンジ、臭化工チジウム、又はヨウ化プロビジウム)で標識し、それらの細胞を、核の内膜に沿ったクロマチンの凝縮及び辺縁趨向について観察することができる。アポトーシスを判定するために計測することができる他の形態学的な変化としては、例えば、細胞質凝集、膜の小胞形成の増加、及び細胞収縮が挙げられる。

【0218】

アポトーシス細胞の存在は、培養物の付着した区画と「浮遊した」区画の双方で計測することができる。例えば、双方の区画とも上清を除去して回収し、付着した細胞をトリプシン処理し、遠心分離洗浄ステップ(例えば、2000 rpmで10分間)の後に調製物を合わせて1つにし、アポトーシスを(例えば、DNA断片化の計測により)検出することができる。(例えば、Piazza et al., 1995, Cancer Research 55:3110-16を参照されたい)。

【0219】

In vivoでは、本発明の抗CD38抗体の治療組成物の効果を好適な動物モデルで評価することができる。例えば異種ガンモデルを使用することができ、このモデルでは、ガンの外植片又は継代されたゼノグラフト組織がヌードマウス又はSCIDマウスなどの免疫不全動物に導入される(Klein et al., 1997, Nature Medicine 5:3110-16を参照されたい)。

edicine 3 : 402 - 408)。腫瘍形成の阻害、腫瘍退縮又は転移などを計測するアッセイ法を用いて有効性を予測することができる。

【0220】

前述の方法の実施において使用される治療組成物は、所望のデリバリー方法に好適な担体を含む医薬組成物に製剤化することができる。好適な担体は、治療組成物と組み合わせた場合に治療組成物の抗腫瘍機能を維持し、通常は患者の免疫系との反応性を有しない任意の材料を含む。例としては、滅菌リン酸緩衝生理食塩水溶液、静菌水などの、数多くの標準的な医薬担体のいずれかも挙げられるが、これらに限定されない(概して、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osol., Ed., 1980を参照されたい)。

10

【0221】

In Vivo 投与のための抗体組成物

本発明に従って使用される抗体の製剤は、任意選択で医薬上許容される担体、賦形剤又は安定化剤とともに、所望の純度を有する抗体を混合することにより保存のために凍結乾燥製剤又は水溶性の形態で調製される(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980])。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、実施される用量及び濃度において、レシピエントに対して非毒性であり、リン酸、クエン酸及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存料(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパベン(メチル又はプロピルパラベンなど)；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサンノール；3-ペントノール；及びm-クレゾールなど)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；タンパク質(血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリンなど)；親水性ポリマー(ポリビニルピロリドンなど)；アミノ酸(グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジンなど)；単糖、二糖及び他の炭水化物(グルコース、マンノース又はデキストリンを含む)；キレート化剤(EDTAなど)；糖類(スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなど)；塩形成カウンターイオン(ナトリウムなど)；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)；及び/又は非イオン性界面活性剤(TWEEN(商標)、PLURONICS(商標)又はポリエチレングリコール(PEG)など)が挙げられる。

20

【0222】

本明細書における製剤は、治療されるべき特定の適応のために、必要に応じて2以上の活性化合物を含んでよく、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものである。例えば、他の特異性を有する抗体を提供することが望ましいことがある。あるいは、又はさらに、組成物は、細胞傷害性剤、サイトカイン、増殖阻害剤及び/又は低分子アンタゴニストを含んでよい。このような分子は、意図される目的のために有効な量で組み合わせて適切に存在する。

30

【0223】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合により、調製されたマイクロカプセル中に封入されてよく、例えば、コロイド状ドラッグデリバリーシステム(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルションにおける、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルなどである。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に記載されている。

40

【0224】

In vivo 投与のために使用されるべき製剤は、無菌であるか、ほぼ無菌に近いものであるべきである。これは、滅菌ろ過膜を介したろ過により容易に達成される。

50

【0225】

徐放性調製物を調製してよい。徐放性調製物の適した例としては、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、例えば、フィルム又はマイクロカプセルなどの成形品の形態である。徐放性調製物の例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）又はポリ（ビニルアルコール）、ポリラクチド（U.S.特許No.3,773,919）、L-グルタミン酸とガムマエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-ビニルアセテート、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーとロイプロリドアセテートからなる注入可能なマイクロスフェア）、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-ビニルアセテート及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは、100日間にわたって分子を放出することができるが、ある種のヒドロゲルは、より短い期間、タンパク質を放出する。

【0226】

カプセル化された抗体が、長期間体内で保持される場合、37での湿気の暴露の結果、それらは変性又は凝集し得、結果として生物学的活性を喪失し、免疫原性の潜在的变化を引き起こす。合理的戦略として、関与するメカニズムに応じた安定化が考案され得る。例えば、凝集メカニズムが、チオ-ジスルフィド交換を介した分子内S-S結合形成であることを発見した場合には、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、含水量を調節し、適切な添加物を使用し、特定のポリマー-マトリックス組成物を開発することにより、安定化が達成され得る。

【0227】

投与様式

本発明の抗体及び化学療法剤は、既知の方法に従って対象に投与され、例えば、ボーラスとして又は一定期間にわたる持続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳髄腔内（intracerebrospinal）、皮下、関節内、滑液内、クモ膜下腔内、経口、局所又は吸入による経路により患者に投与される。抗体の静脈内又は皮下投与が好ましい。

【0228】

治療様式

本発明の方法において、治療は、疾患又は病態に対する正の治療応答（positive therapeutic response）を提供するために使用される。「正の治療応答」とは、疾患若しくは病態の改善、及び/又は疾患若しくは病態と関連する症状の改善を意図する。例えば、正の治療応答は、疾患における以下の改善の1つ以上を意味し得る：（1）新生細胞数の減少；（2）新生細胞死の増加；（3）新生細胞生存の阻害；（5）腫瘍増殖の阻害（すなわち、ある程度遅らせる、好ましくは停止）；（6）患者生存率の増加；及び（7）疾患又は病態と関連する1つ以上の症状のある程度の緩和。

【0229】

任意の所与の疾患又は病態に対する正の治療応答は、その疾患又は病態に特異的な標準化された応答基準により決定され得る。腫瘍応答は、スクリーニング技術、例えば、磁気共鳴画像（MRI）スキャン、X-放射線イメージング、コンピューター断層撮影（CT）スキャン、骨スキャンイメージング、内視鏡検査及び腫瘍生検サンプリング（骨髄穿刺（BMA）を含む）及び循環腫瘍細胞の計測などを用いて、腫瘍形態の変化（すなわち、全腫瘍組織量、腫瘍サイズなど）について評価できる。

【0230】

これらの正の治療応答に加えて、治療を受ける対象は、疾患と関連する症状において、改善の有益な効果を受け得る。

【0231】

従って、B細胞腫瘍について、対象は、いわゆるB症状、すなわち、盗汗、発熱、体重減少及び/又は蕁麻疹の低下を受け得る。前ガン状態について、抗CD38療法での治療

10

20

30

40

50

は、例えば、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症（M G U S）に罹患した対象における多発性骨髄腫の発症などの、関連する悪性疾患の発症までの期間を遮断及び／又は引き延ばし得る。

【0232】

疾患の改善は、完全寛解として特徴付けられてよい。「完全寛解」とは、骨髄腫の場合には、なんらかの以前は異常であった放射線学的検査、骨髄、及び脳脊髄液（C S F）又は異常な単クローン性タンパク質の正常化とともに、臨床的に検出可能な疾患がなくなることを意図する。

【0233】

このような応答は、本発明の方法による治療後、少なくとも4～8週間、場合によっては6～8週間持続してよい。あるいは、疾患における改善は、部分寛解として分類されてよい。「部分寛解」とは、新たな病変の不在下で、全ての測定可能な腫瘍組織量（すなわち、対象に存在する悪性細胞数、又は測定される腫瘍塊の大部分又は異常な単クローン性タンパク質の量）が少なくとも約50%減少し、それが4～8週間又は6～8週間持続し得ることを意図する。

【0234】

本発明の治療は、「治療上有効量」の使用される医薬を含む。「治療上有効量」とは、必要な用量及び期間で、所望の治療結果を達成するのに有効な量をいう。

【0235】

治療上有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別及び体重や、個体において所望の反応を導く医薬の能力などの要因によって変動し得る。治療上有効量はまた、抗体又は抗体部分の毒性又は有害作用のいずれかより治療上有益な効果が上回るものもある。

【0236】

腫瘍療法における「治療上有効量」は、疾患の進行を一定に保つ能力により測定されてよい。ガンを阻害する化合物の能力は、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系で評価されてよい。

【0237】

あるいは、組成物のこの特性は、当業者に既知の*in vitro* アッセイにより、化合物が細胞増殖を阻害する能力又はアポトーシスを誘導する能力を調べることにより評価されてよい。治療化合物の治療上有効量は、腫瘍サイズを減少させるか、あるいは対象における症状を改善し得る。当業者であれば、対象のサイズ、対象の症状の重篤度、及び特定の組成物又は選択される投与経路などの因子に基づいて、このような量を決定できるだろう。

【0238】

用量レジメンは、最適な所望の反応（例えば、治療応答）を提供するために調整される。例えば、単回ボーラスを投与してよく、複数の分割量を時間をかけて投与してよく、又は用量を比例的に減少又は増加（危急的治療状況により示されるとおり）させてもよい。非経口組成物は、投与を容易にするために、また投薬量を一様にするために、投薬単位形態に製剤化してもよい。本明細書で使用する場合、投薬単位形態（d o s a g e u n i t f o r m）とは、治療されるべき対象のために単一用量として適切な、物理的に別個の単位を意味し、各単位は、必要な医薬担体と関連して所望の治療効果を生じるよう計算された、予め決められた量の活性化合物を含む。

【0239】

本発明の投薬単位形態についての規格は、(a)活性化合物に特有の特性及び達成されるべき特定の治療効果、並びに(b)個体における治療感受性(treatment of sensitivity)のために、そのような活性化合物を配合する当分野に固有の限界、により決定され、それらに直接依存する。

【0240】

本発明で使用される抗CD38抗体についての有効量及び投薬レジメンは、治療されるべき疾患又は病態によって決まり、当業者により決定され得る。

10

20

30

40

50

【0241】

本発明で使用される抗CD38抗体の治療上有効量についての非限定的な例示範囲は、約0.1～100mg/kg、例えば約0.1～50mg/kgなど、例えば約0.1～20mg/kg、例えば約0.1～10mg/kg、例えば約0.5、例えば約0.3、約1、又は約3mg/kgなどである。別の実施態様において、抗体は、1mg/kg以上の用量、例えば1～20mg/kgの用量、例えば5～20mg/kgの用量、例えば8mg/kgの用量で投与される。

【0242】

当分野の通常の技術を有する医師であれば、必要な医薬組成物の有効量を容易に決定し、処方し得る。例えば、医師又は獣医は、所望の治療効果を達成するのに必要な量よりも低いレベルで、医薬組成物に用いられる医薬の用量をスタートし、所望の効果が達成されるまで徐々に用量を増加させることができる。10

【0243】

一実施態様において、抗CD38抗体は、1週間の投与量が10～500mg/kg、例えば200～400mg/kgで注入により投与される。このような投与は、例えば、1～8回(3～5回など)、反復してよい。投与は、2～24時間、例えば2～12時間の期間に亘って持続注入により実施されてよい。

【0244】

一実施態様において、毒性を含む副作用を低下させることが必要な場合には、抗CD38抗体は、24時間超などの長期間に亘ったゆっくりした持続注入により投与される。20

【0245】

一実施態様において、抗CD38抗体は、1週間の投与量が250mg～2000mg、例えば300mg、500mg、700mg、1000mg、1500mg又は2000mgなどで、最大8回、例えば4～6回など投与される。投与は、2～24時間、例えば2～12時間などに亘る持続注入により実施されてよい。このようなレジメンは、例えば6ヶ月又は12ヶ月後に、必要に応じて1回以上反復されてよい。用量は、例えば、生物学的サンプルを取り出し、抗CD38抗体の抗原結合領域を標的とする抗イディオタイプ抗体を用いることにより、投与時の血中の本発明の化合物量を測定することにより決定されるか、又は調整されてよい。

【0246】

さらなる実施態様において、抗CD38抗体は、2～12週間、例えば3～10週間、例えば4～8週間、週に一回投与される。30

【0247】

一実施態様において、抗CD38抗体は、維持療法により投与され、これは、例えば、6ヶ月以上の期間、週に一回投与される。

【0248】

一実施態様において、抗CD38抗体は、抗CD38抗体の一回の注入とそれに続く放射性同位体結合抗CD38抗体の注入を含むレジメンにより投与される。レジメンは、例えば7～9日後などに反復されてよい。

【0249】

本発明に従った治療は、非限定例として、単回又は分割量を24、12、8、6、4若しくは2時間ごとに又は任意の組合せで使用して、治療の開始後、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39又は40日目に少なくとも1回、あるいはまた1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20週目に少なくとも1回、又はその任意の組合せで、一日当たり、約0.1～100mg/kg、例えば0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、4050

50、60、70、80、90又は100mg/kgの抗体量を一日当たりの用量として提供してよい。

【0250】

いくつかの実施態様において、その抗CD38抗体分子は、1つ以上の追加の治療剤、例えば化学療法剤と組み合わせて使用する。DNA損傷化学療法剤の非限定例として、トポイソメラーゼI阻害剤（例えば、イリノテカン、トポテカン、カムトテシン及びそのアナログ又は代謝物、ドキソルビシンなど）；トポイソメラーゼII阻害剤（例えば、エトポシド、テニポシド、ダウノルビシンなど）；アルキル化剤（例えば、メルファラン、クロラムブシリ、ブルファン、チオテパ、イフオスファミド、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、デカルバジン、メトトレキサート、マイトイシンC、シクロホスファミドなど）；DNAインターラーカー（例えば、シスプラチニン、オキサリプラチニン、カルボプラチニンなど）；DNAインターラーカー及びフリーラジカルジェネレーター（ブレオマイシンなど）；及びスクレオシド模倣物（例えば、5-フルオロウラシル、カベシチビン、ゲムシタビン、フルダラビン、シタラビン、メルカブトプリン、チオグアニン、ペントスタチン、ヒドロキシウレアなど）が挙げられる。
10

【0251】

細胞複製を妨げる化学療法剤として、以下が挙げられる：パクリタキセル、ドセタキセル及び関連アナログ；ピンクリスチン、ピンプラスチン及び関連アナログ；サリドマイド、レナリドミド及び関連アナログ（例えば、CC-5013、CC-4047など）；タンパク質チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、イマチニブメシレート及びゲフィチニブ）；
20 プロテアソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブ）；NF-B阻害剤（I-Bキナーゼの阻害剤を含む）；ガンで過剰発現するタンパク質と結合し、それにより細胞複製を下方制御する抗体（例えば、トラスツズマブ、リツキシマブ、セツキシマブ、ベバシズマブなど）；及びガンで上方制御、過剰発現又は活性化されることが既知のタンパク質又は酵素の他の阻害剤であって、その阻害が細胞複製を下方制御するもの。

【0252】

いくつかの実施態様において、本発明の抗体は、ベルケイド（登録商標）（ボルテゾミブ）での治療前、同時、又は後に使用できる。

【0253】

診断用途
30 提供する抗CD38抗体は、CD38と関連する腫瘍又は他の疾患状態のin vitro又はin vivoイメージングでの使用も見出される。いくつかの実施態様において、本明細書の記載の抗体は、診断及び治療のために使用され、又は診断のみに使用される。抗CD38抗体を診断と治療の両方に使用する場合には、いくつかの実施態様は、診断抗体が治療抗体との結合に競合しないように、2つの異なるエピトープに対する2つの異なる抗CD38抗体に依拠するが、とはいえ、いくつかの場合では同一の抗体を両方の目的のために使用できる。例えば、いくつかの例において、Ab19抗体を診断的（通常、以下に記載のように標識される）に使用し、一方でAb79を治療的に使用するか、逆もまた同様である。従って、本発明に含まれる組成物は、診断抗体と治療抗体を含むものであり、いくつかの実施態様においては、診断抗体は本明細書に記載のように標識される。さらに、治療抗体と診断抗体の組成物は、本明細書で概説するように、他の薬物と同時に投与されてもよい。
40

【0254】

多くの実施態様において、診断抗体は標識される。本明細書において「標識される」とは、本明細書に開示する抗体が、スクリーニング又は診断手順で検出できるよう結合される1つ以上の要素、アイソトープ又は化合物を有することを意味する。一般に、標識は複数のクラスに分類される：a)免疫標識（抗体により認識される融合パートナーとして組み込まれるエピトープであってよい）、b)同位体標識（放射性同位体又は重同位体であってよい）、c)低分子標識（蛍光及び比色（colorimetric）色素、又は他の標識方法を可能にするビオチンなどの分子を含んでよい）、及びd)粒子などの標識（
50

超音波標識のためのバブルを含む)又は体内イメージングを可能にする常磁性標識。当分野で既知であるように、標識は任意の位置で抗体に組み込まれてよく、タンパク質発現の間に *in vitro* 又は *in vivo* で組み込まれてよい。

【0255】

診断は、下記に記載するように体全体のイメージングを可能にする診断抗体の投与により *in vivo* で実施されることもでき、又は患者から取り出したサンプル上で *in vitro* で実施することもできる。この関連において、「サンプル」には、体液(血液、尿、血清、リンパ液、唾液、肛門及び膣分泌物、汗及び精液を含むがこれらに限定されない)、及び関連組織の生検から得られるものなどの組織サンプルを含む(これらに限定されない)、任意数の物を含む。

10

【0256】

いくつかの実施態様において、*in vivo* イメージングは、例えば、超音波、CTスキャン、X線、MRI及びPETスキャン、並びに光学技術(体の表面に近い腫瘍について光学標識(optical label)を用いるものなど)を含む(これらに限定されない)ものにより実施される。

【0257】

CD38と関連する疾患の *in vivo* イメージングは、任意の適した技術により実施されてよい。例えば、⁹⁹Tc-標識、又は別の線放射同位体での標識を用いて、抗CD38抗体を標識してよい。この技術の変形例として、ガンマカメラ技術よりも画像を改善するために磁気共鳴映像法(MRI)の使用が挙げられてよい。同様の免疫シンチグラフィー法及び原理は、例えば、Srivastava(ed.), Radiolabelled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy(Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes", in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Gennaro et al., (eds.), pp. 624-652(Mack Publishing Co., 1990)、及びBrown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies", in Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto et al., (eds.) (Chapman & Hall 1993)などに記載されている。

20

【0258】

一実施態様において、本発明は、抗CD38抗体が検出促進剤に結合され、結合抗体を血流に注入することなどにより宿主に投与して、宿主における標識抗体の存在及び位置を分析する、*in vivo* イメージング方法を提供する。この技術、及び本明細書で提供する任意の他の診断方法を介して、本発明は、ヒト患者、又はヒト患者から得られた生物学的サンプルにおける、疾患関連細胞の存在をスクリーニングする方法を提供する。

【0259】

診断イメージングについては、放射性同位体を抗CD38抗体に直接結合させるか、又は媒介となる(intermediary)官能基を用いることにより間接的に結合させるかのいずれかであってよい。有用な媒介となる官能基としては、エチレンジアミンテトラ酢酸、ジエチレントリアミンペニタ酢酸などのキレーターが挙げられる(例えば、U.S.特許No.5,057,313を参照されたい)。放射性同位体に結合させた抗CD38抗体を伴うこのような診断アッセイにおいて、患者にデリバリーされる結合抗CD38抗体の用量は、典型的には、検出及び正確な測定を可能にする、最小限の半減期、最小限の体内保持及び最小限の同位体量の最もよい組み合わせについて同位体を選択することを通じて、可能な限り低いレベルで維持される。

40

【0260】

放射性同位体及び放射線不透過性剤に加えて、診断方法は、色素(例えば、ビオチン-ストレプトアジビン複合体など)、造影剤、蛍光化合物又は分子、及び増強剤(例えば、

50

常磁性イオン) (磁気共鳴イメージング(MRI)(例えば、MRI技術、及びMRI増強剤に結合する抗体の調製を記載したU.S.特許No.6,331,175などを参照されたい)について)に結合させた抗CD38抗体を用いて実施してよい。このような診断/検出剤は、磁気共鳴イメージングで使用するための剤、及び蛍光化合物から選択されてよい。

【0261】

抗CD38抗体に放射性金属又は常磁性イオンを負荷するために、イオンを結合するための多様なキレート基が結合されたロングテールを有する試薬と、抗体とを反応させる必要があり得る。このようなテールは、ポリリジンや多糖などのポリマー、又はキレート基との結合が可能なペンドント基を有する他の誘導体化若しくは誘導可能な鎖、例えば、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビスチオセミカルバゾン、ポリオキシム、及びこの目的のために有用であることが既知の基などであってよい。10

【0262】

キレートは、標準化学を用いて抗CD38抗体に結合されてよい。キレートは、免疫反応性の最小限の喪失、及び最小限の凝集及び/又は内部交差反応性を有する分子への結合形成を可能にする基により抗CD3抗体に通常は結合される。

【0263】

潜在的に有用な金属キレート組み合わせの例として、2-ベンジル-DTPA及びそのモノメチル及びシクロヘキシリソロゲが挙げられ、通常のエネルギー範囲である60~4,000keVの診断同位体、例えば、¹²⁵I、¹²³I、¹²⁴I、⁶²Cu、⁶⁴Cu、¹⁸F、¹¹¹In、⁶⁷Ga、⁹⁹Tc、⁹⁴Tc、¹¹C、¹³N、⁵O、⁷⁶Brなど(ラジオイメージングについて)とともに使用される。20

【0264】

標識として、放射性核種、放射性物質造影剤、常磁性イオン、金属、蛍光標識、化学発行標識、超音波造影剤、光活性剤が挙げられる。このような診断剤は公知であり、このような公知の診断剤のいずれも使用してよい。診断剤の非限定的な例として、放射性核種、例えば、¹¹⁰In、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁸F、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、⁹⁴mTc、⁹⁴Tc、⁹⁹mTc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴-¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、⁵²mMn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、⁸²mRb、⁸³Sr、又は他の-、-若しくは陽電子放射体などが挙げられてよい。30

【0265】

使用される常磁性イオンとして、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)又はエルビウム(III)を挙げてよい。金属造影剤として、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)又はビスマス(III)を挙げてよい。40

【0266】

超音波造影剤は、リポソーム、例えばガス封入(filled)リポソームを含んでよい。放射線不透過性診断剤は、化合物、バリウム化合物、ガリリウム化合物及びタリウム化合物から選択されてよい。

【0267】

これらの及び同様のキレートは、マンガン、鉄、カドリニウムなどの非放射線金属と複合化する場合に、抗CD38抗体と関連して、MRI診断方法に有用であり得る。NOTA、DOTA、TETAなどの大環状キレートは、様々な金属及び放射性金属で有用であり、とりわけ、それぞれ、ガリウム、イッテリウム及び銅の放射性核種で有用である。このような金属キレート複合体は、対象となる金属に対する環のサイズを調節することにより非常に安定化させ得る。²²³Raなどの核種との安定した結合について関心対象で50

ある大環状ポリエーテルなどの他の環系キレートも診断方法に適切であり得る。

【0268】

従って、本発明は、診断抗CD38抗体結合体であって、抗CD38抗体結合体が造影剤（例えば、磁気共鳴イメージング、コンピューター断層撮影法、超音波造影増強剤などのため）又は例えば、-、-、-、オージェ電子-、又は陽電子放出同位体などであってよい放射性核種に結合されている、結合体を提供する。

【0269】

抗CD38抗体はまた、例えば、特定の細胞、組織又は血清における対象抗原の発現を検出するのに有用であり得る。診断的適用のために、抗体は典型的には、in vitroのアッセイで検出可能な部分で標識される。当業者に理解されるように、in vitro試験での使用に適した標識は広範囲にわたって存在する。本発明のこの側面での使用に適した色素（dye）としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：蛍光ランタニド複合体（ヨーロピウム及びテルビウムを含む）、フルオレセイン、ローダミン、テトラムエチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチル-クマリン、量子ドット（「ナノクリスタル」とも称される；U.S. Ser. No. 09/315,584を参照されたい（参照により援用される））、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファー-イエロー、カスケードブルー（商標）、テキサスレッド、Cy色素（Cy3、Cy5など）、アレクサを含むアレクサ色素、フィコエリトリン、ボディピー及びMolecular Probes Handbook by Richard P. Hauglandの第6版に記載の他のもの（参照により本明細書に援用される）。

【0270】

次いで、染色された組織は、腫瘍におけるCD38関連ペプチド量のインディケーターとして放射活性を計測するために評価され得る。例えば、浸潤性ガン細胞の存在に対するバイオマーカーとしてCD38を使用する場合においては、このような技術の使用により得られた画像を用いて、患者、哺乳動物又は組織における生体分布を評価してよい。

【0271】

製品

他の実施態様において、上述の障害の治療に有用な物質を含む製品を提供する。当該製品は、容器とラベルを含む。適した容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリング及び試験管などが挙げられる。容器は、ガラスやプラスチックなど様々な物質から成型されてよい。容器は、病態の治療に有効な組成物を保持し、滅菌アクセスポート（例えば、容器は、皮下注射針による穿刺可能なストッパーを有する注入可能な溶液バッグ又はバイアルであってよい）を有してよい。組成物中の活性剤は抗体である。容器上に又は容器に付随するラベルは、組成物が、選択する病態の治療に使用されることを示す。製品はさらに、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液などの医薬上許容されるバッファーを含む第二の容器を含んでよい。製品は、商業上及びユーザーの点から見て好みい他の物質をさらに含んでよく、これには、他のバッファー、希釈剤、フィルター、ニードル、シリング及び使用方法を記載した添付文書が挙げられる。

【実施例】

【0272】

以下の実施例は、本発明を例証するために提供するものであり、本発明を何ら限定するものではない。

【0273】

実施例1：ヒト、カニクイザル及びマウスCD38をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター構築物

ヒトCD38（huCD38）を発現するベクターを構築するために、huCD38をコードするポリヌクレオチドをOrigene Technologies Trueclone（登録商標）humanから得たcDNAから単離した。G418（Geneticin）耐性トランスクレオチドの選択を可能にするネオマイシン耐性（neo^R）遺伝子を含む安定な発現ベクター（XOMA, Inc.）に単離したhuCD38をクロ

10

20

30

40

50

ーニングした。選択されたトランスフェクタントに存在する huCD38 遺伝子をシーケンシングして、任意の配列エラーを同定した。Genbank アクセッション NM_001775 から外れた配列エラーを PCR 部位特異的変異導入により訂正した。最終的なベクター-DNA を 5' シーケンシングにより確認した。

【0274】

カニクイザル CD38 (cyCD38) を発現するベクターを構築するために、Bio chain Institute's cDNA-monkey (カニクイザル) - 正常脾臓組織から得たDNAから cyCD38 をコードするポリヌクレオチドを単離した。G418 (Geneticin) 耐性トランスフェクタントの選択を可能にするneo^R 遺伝子を含む安定な発現ベクター (XOMA, Inc.) に単離した cyCD38 をクローニングした。選択されたトランスフェクタントに存在する cyCD38 遺伝子をシーケンシングして、任意の配列エラーを同定した。Genbank アクセッション AY555148 から外れた配列エラーを PCR 部位特異的変異導入により訂正した。最終的なベクター-DNA をシーケンシングにより確認した。

【0275】

マウス CD38 (mocD38) を発現するベクターを構築するために Origene's TrueORFコレクションから得たDNAから mocD38 をコードするポリヌクレオチドを単離した。G418 (Geneticin) 耐性トランスフェクタントの選択を可能にするneo^R 遺伝子を含む安定な発現ベクター (XOMA, Inc.) に単離した mocD38 をクローニングした。選択されたトランスフェクタントに存在する mocD38 遺伝子をシーケンシングして、任意の配列エラーを同定した。Genbank アクセッション NM_007646 から外れた配列エラーを PCR 部位特異的変異導入により訂正した。最終的なベクター-DNA をシーケンシングにより確認した。

【0276】

実施例2：CD38 を発現するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞の開発

huCD38、muCD38 及び cyCD38 を発現する CHO 細胞を開発するために、CHO 細胞を直鎖化DNAでトランスフェクトした。選択下で一週間置いた後、フローサイトメトリーにより細胞をソーティングし、最も高い huCD38、muCD38 又は cyCD38 発現細胞 (最大 15%) を 96 ウェルプレートに播種して、單一コロニーを生じさせた。残りの細胞も選択下で播種し、バックアップコロニーを生じさせた。播種してからおよそ 12 ~ 14 日後に單一コロニーを同定し、96 ディープウェルプレートに移した。第二継代後、FACS 分析によりクローンをスクリーニングした。トップの産生クローンを継代し、振とうフラスコに広げた。マイクロラズマ AVA 試験及びスケールアップのために、トップの 2 クローンを凍結及び / 又は培養した。

【0277】

播種性 (disseminated) ゼノグラフトモデルのためのルシフェラーゼレポーターを構築するために、CMV プロモーター / ルシフェラーゼ遺伝子 / ネオマイシン選択可能なマークターを含む市販のベクター (Promega, Madison, WI) を用いて、Dauidi バーキットリンパ腫細胞の安定発現株を作製した。

【0278】

実施例3：ファージディスプレイライブラリー及び CD38 と結合する薬剤のスクリーニング

標的特異抗体のファージディスプレイライブラリーからの選択は、Marksらにより記載される方法 (2004, Methods Mol. Biol. 248: 161 - 76) に従って実施した。簡単に述べると、ファージディスプレイライブラリーを室温で 1 時間、100 pmol のビオチン化 CD38 とともにインキュベートし、次いで 100 μL のストレプトアジビンビーズ懸濁液 (DYNABEADS (登録商標) M-280 Streptavidin, Invitrogen) を用いて、形成した複合体を捕捉した。洗浄バッファー (PBS 中 5% ミルク) でビーズを洗浄することにより非特異的なファージを除去した。結合したファージを 0.5 mL の 100 nM トリエチルアミン (TEA) 10 50

で溶出し、等量の 1 M TRIS - CI (pH 7.4) を添加することによりすぐに中和した。溶出したファージプールを用いて、対数増殖期の TG1 E. coli に感染させ、Marks らの上記文献に記載のように、ファージミドをレスキューした。選択を計 3 ラウンド繰り返した。

【0279】

あるいは、固定化した CD38 (R & D systems) に対してファージディスプレイライブラリーをパンニングして、CD38との結合能力を有する抗体断片パネルを同定した。パンニングは、標準的なプロトコルを用いて実施した（例えば、Methods in Molecular Biology, vol. 178 : Antibody Phage Display : Methods and Protocols Edited by : P. M. O'Brien and R. Aitken, Humana Press ; "Panning of Antibody Phage-Display Libraries", Coomber, D. W. J., pp. 133 - 145、及び "Selection of Antibodies Against Biotinylated Antigens", Chames et al., pp. 147 - 157 を参照されたい）。簡単に述べると、NUNC (登録商標) MAXISORP プレートの 3 つのウェルに、PBS 中、10 µg / mL の濃度の組換え CD38 (R & D Systems) 50 µL をコーティングした。4 ℃ で一晩インキュベートした後、PBS 中 5 % ミルクを用いて、結合していない結合部位を 1 時間、室温でプロッキングした。次いで、5 % ミルク / PBS 中、およそ 200 µL のファージライブラリーをプロッキングしたウェルに添加し、室温でおよそ 1 ~ 2 時間インキュベートした。ウェルを洗浄し、結合したファージを標準的な方法を用いて溶出した（例えば、Sambrook and Russell, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 を参照されたい）。溶出したファージは、対数増殖期にある E. coli TG1 宿主細胞への感染を介して増幅させた。2,500 RPM で 5 分間遠心分離することにより感染 TG1 細胞を回収し、15 cm の 2 YT - アンピシリン - 2 % グルコース寒天プレート上に播種し、30 ℃ で一晩インキュベートした。ついで、増幅させたファージを用いてパンニング工程を繰り返した。パンニング、溶出及び増幅のサイクルを 3 ラウンド繰り返した。

【0280】

パンニングが完了した後、播種した TG1 細胞由来の單一コロニーを用いて、96 ウェルプレート中、培地に接種した。ミクロ培養を OD 600 = 0.6 まで増殖させ、その時点で、1 mM の IPTG を添加することにより可溶性 scFv の発現を誘導し、シェーカー中、30 ℃ で一晩インキュベートした。遠心分離により細菌をペレット化し、標準的な ELISA アッセイ及び FACS 結合アッセイにより固定化 CD38 に結合する scFv を試験するために、ペリプラズム抽出物を用いた。

【0281】

FACS 結合スクリーニングのために、CD38 を安定発現する CHO 細胞を用いて、天然の膜結合 CD38 に結合する能力についてペリプラズム抽出物 (PPE) 中の scFv をスクリーニングした。親及び CHO トランスフェクタント (ヒト CD38 又はカニクイザル CD38 又はマウス CD38 発現細胞株) を、PBS (Life Technology) 、0.5 % BSA (Sigma-Aldrich) 及び 0.1 % NaN3 (Sigma-Aldrich) (FACS バッファー) 中、別々に、 2×10^6 細胞 / mL で再懸濁した。CD38 を発現しない親 CHO 細胞をネガティブコントロールとして使用した。25 µL の細胞アリコートを V 底 96 ウェルプレート (Costar Cat # 3897) に播種し、myc タグ scFv 抗体断片を含むペリプラズム抽出物 25 µL を細胞に添加し、次いで混合物を 4 ℃ で 30 分間インキュベートした。次いで、細胞を 2 回洗浄し、その後、ペレットを 25 µL のマウス抗 c-myc (FACS バッファー 中、1 / 1000) (Roche) に再懸濁し、再度 4 ℃ で 30 分間インキュベートした。次い

10

20

30

40

50

で、細胞を2回洗浄し、FACSバッファー(Jackson labs)中、1/200希釈した抗マウスIgG-P E 25 μL中に再懸濁し、再度、4で30分間インキュベートした。次いで、細胞を2回洗浄して、過剰な非結合抗体を除去し、70 μLのFACSバッファーに再懸濁し、BD FACS can(登録商標)で分析した。得られたデータをFlowJo software(TreeStar, Inc.)を用いて評価した。陽性サンプルは、親CHO細胞株(CD38⁻)の平均蛍光強度に対する、CD38トランスフェクトCHO細胞の平均蛍光強度を比較することにより同定した。

【0282】

ヒトCD38に結合した抗体クローンをシーケンシングして、独特のクローンを同定した。次いで、独特のscFvクローンを、Biacore(登録商標)分析により決定されたオフレートに基づき、ランク付けした。標準的なアミンカップリングケミストリーにより(Biacore(登録商標))、200RU~500RUのヒト組換えCD38(R&D Systems' cat # 2404-AC又は同等物)をCM5又は同等のチップに固定した。リファレンススポットも調製し、これを活性化し、次いでタンパク質を固定化することなくブロッキングした。これは、アセテートバッファー(pH 5.0)中、1~3 μg/mLに抗原を希釈し、必要なレベルが固定化されるまで(3~5)分間、活性化表面に注入することにより実施した。次いで、表面をエタノールアミンでブロッキングした。ペリプラズム抽出物を、2mg/mL BSA(ウシ血清アルブミン)を有する、アッセイランニングバッファー10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA(エチレンジアミンテトラ酢酸)及び0.05%ポリソルベート20(pH 7.4)で1:1に希釈した。希釈したペリプラズム抽出物を表面プラズモン共鳴(SPR)表面に、30分で、300秒間と追加の900秒間(モニタリングされる解離時間)で注入した。100mM HC1を8秒間、1回注入して再生(regeneration)させた。リファレンススポットから得られたデータを、活性表面から得られたデータから減算し、次いでBiacore(登録商標)T100ソフトウェアにおいて1:1解離モデルを用いて、解離曲線をフィッティングした。

【0283】

トップランクのscFvクローンをIgG1抗体に変換した。保持された結合特性を保証し、種間交差反応性を評価するため、親CHO細胞、並びにヒト、マウス及びカニクイザルCD38を発現するCHO細胞を用いて、IgG1再フォーマット(reformatted)クローンに対しFACS結合スクリーニングを繰り返した。IgG再フォーマットクローンのFACS特徴付けを上述のとおり実施したが、抗c-myc抗体及び抗マウスIgG-P Eの添加からなる工程は、全長ヒトIgGの結合が、フィコエリトリン結合抗ヒトIgG(Jackson Labs)の添加により検出される1回の工程に置き換えた。

【0284】

実施例4:IgG再フォーマットクローンのin vitro細胞系アッセイ

約150のクローンをヒトIgG1抗体として再フォーマットし、以下に記載するとおり、アッセイのパネルを用いて、5つ(Ab19、Ab43、Ab72、Ab79及びAb110)を十分に評価した。In vitro及びin vivoアッセイの両方におけるIgG再フォーマットクローンのパフォーマンスを2つの抗体、BMTK4-1(ベンチマーク1、BM-1又はBMTK-1とも称する)(配列番号24及び25;重鎖及び軽鎖可変領域)及びBMTK4-2(ベンチマーク2、BM-2又はBMTK-2とも称する)(配列番号26及び27;重鎖及び軽鎖可変領域)と比較した。これらのアミノ酸配列は、それぞれ、既知の抗CD38抗体ダラツムマブ(HuMax-CD38とも称され、国際公開No.06/099875に開示される)及びSAR650984(国際公開No.08/047242に開示される)に由來した。呼吸系発疹ウイルスを認識する臨床的に認可された抗体であるパリビズマブ(SYNAGIS(登録商標))(Medimmune)をCD38結合に対するネガティブコントロールとした。

【0285】

10

20

30

40

50

実施例 5：免疫蛍光法による A b 7 9 結合の検出

Alexa Fluor (登録商標) 488 色素で標識された A b 7 9 を正常ヒト結腸直腸組織、前立腺及びリンパ凍結切片に適用した。Alexa Fluor (登録商標) 488 色素で標識されたパリビズマブ (Synagis (登録商標)) をネガティブ染色コントロールとした。得られた免疫蛍光像を図 4 に示す。正常ヒト結腸直腸組織、前立腺及びリンパ節において、A b 7 9 について観察された染色パターンは、市販のポリクローナル抗 CD38 抗体で見られたものと同一であった (データ示さず)。

【0286】

Alexa Fluor (登録商標) 488 色素標識された A b 7 9 を正常及び多発性骨髄腫の骨髄試料にも適用した (図 5)。A b 7 9 は正常骨髄細胞の ~ 10 % と結合したのに対し、多発性骨髄腫の骨髄細胞は > 90 % が A b 7 9 結合を示した (4 つの試験サンプルのうち 4 つにおいて)。

【0287】

A b 7 9 が多数の細胞株 (MOLP-8、DAUDI、RPMI 及び MCF7) と結合する能力についても検証した。MOLP-8 (ヒト多発性骨髄腫)、DAUDI (バーキットリンパ腫罹患者由来のリンパ芽球) 及び RPMI (慢性骨髄性白血病罹患者から樹立された細胞株) 細胞はすべて、A b 7 9 による結合を示した。乳癌株である MCF7 は、A b 7 9 結合に対して、概してネガティブであるようだった (図 6)。

【0288】

Alexa Fluor (登録商標) 488 結合抗体を 8 μm のクリオスタット凍結切片上で染色し、エタノール / アセトン混合物で 5 分間固定し、その後、湿度制御チャンバー中、室温で 1 時間、抗体とともにインキュベートした。次いで、切片を洗浄し、DAP-I 含有包埋剤 (Vector Laboratories, cat # H1500) を添加し、カバーガラスをのせた。

【0289】

実施例 6：多発性骨髄腫 (MM) 及び慢性リンパ性白血病 (CLL) に対する A b 7 9 発現の評価

多発性骨髄腫患者由来の骨髄サンプルに対する A b 7 9 結合は、CD138⁺ 細胞の濃縮 (enrichment) 後か、或いは CD138⁺ CD45^{-/-1°} 細胞のゲーティングによるかのいずれかによりフローサイトメトリーにより分析した (図 7A)。A b 7 9 は、6 つの多発性骨髄腫サンプルのうち 4 つにおいて、> 95 % の細胞で発現が見られた。A b 7 9 の結合パターンは、臨床検査室で使用された抗 CD38 抗体のものと、概して類似しているようであった。さらに、A b 7 9 は、慢性リンパ性白血病罹患者由来の細胞と結合した (図 7B)。

【0290】

MM 及び CLL と結合する A b 7 9 を FACS により測定するために、患者サンプルを 24 時間以内に処理した。製造者の指示書に従って、Ficoll-Paque (商標) (GE Healthcare) により末梢血単核細胞を単離した。括弧内のクローニング以下の抗体パネルを用いて、発現分析を実施した。MM パネル : A b 7 9 - Alexa Fluor (登録商標) 488、CD45 - PerCP (2D1)、CD138 - APC (MI15)。CLL パネル : A b 7 9 - Alexa Fluor (登録商標) 488；CD5 - PE (UCHT2)、CD45 - PerCP (2D1)、CD19 - APC (SJ25C1)。5 μL の PE、PerCP 若しくは APC 標識抗体、又は 10 μL の Alexa Fluor (登録商標) 488 標識抗体又はアイソタイプコントロールを、100 μL の 0.2 × 10⁶ PBMC 又は CD138 濃縮細胞 (骨髄穿刺液由来) のいずれかを含む各ウェル又はチューブに添加した。サンプルを室温で 30 分間インキュベートし、その後、製造者の指示書に従って、赤血球細胞を BD Pharmlyse を用いて溶解した。全てのサンプルを FACS バッファーで 3 回洗浄した。1 % パラホルムアルデヒドでサンプルを固定し、BD FACS Canto (商標) II 又は BD FACS Caliber (商標) で分析した。

10

20

30

40

50

【0291】

実施例7：抗CD38誘導CDCアッセイ

カニクイザル交差反応性クローンを、補体依存性細胞傷害(CDC)を誘導する能力について試験した。MOLP-8細胞を、50 μLの完全培地(10%胎児ウシ血清を添加した RPMI)中、黒色の96ウェル平底組織培養プレートにウェル当たり10,000細胞の密度で播種した。50 μLの2×抗CD38抗体、コントロールIgG抗体又は培地のみのものを各ウェルに添加し、室温で10分間インキュベートしておいた。細胞株に応じて量を変更した(2~15 μL)精製ウサギ補体(cat# CL3441 Cedarlane Laboratories, Canada)を、コントロールウェル以外の各ウェルに添加した。37で1時間インキュベートした後、プレートを室温にし、ウェル当たり100 μLのセルタイターキット(Cytotoxicity Glo)(商標)試薬(Promega G7571/G7573)を添加し、プレートを5~7分間振とうさせ、発光をEnVision(登録商標)(Perkin Elmer)発光プレートリーダーで読み取った。試験条件：細胞のみ；細胞+補体；細胞+IgGコントロール+補体；細胞+抗体+補体。CDC%は、下記式を用いて計算した：

$$100 - (RLU_T / RLU_C) \times 100$$

[式中、RLU_Tは、試験サンプルの相対発光単位(relative luminescence unit)であり、RLU_Cは、補体のみのサンプルの相対発光単位である]。統計分析はPRISMソフトウェアを用いて実施した。抗体濃度に対するCDC%をプロットすることにより決定されたEC₅₀値を表1に示す。

10

20

【0292】

実施例8：抗CD38誘導ADCCアッセイ

抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)は、標的細胞としてDaudi、MOLP-8及びRPMI-8226細胞株を用いて評価した。Stanford Blood Center(Palo Alto, CA)から得られた軟膜又はLRSから、Ficoll-Plaque(商標)分離によりエフェクター細胞としてPBMCを単離した。PBS中2%FBSを用いて試料を1:3希釈した。35 mLの希釈試料の下に15 mLのFicoll-Plaque(商標)(GE Healthcare)を徐々に層状にし、1800 rpm(ブレーキオフ)で25分間遠心分離した。PBMCを含む濁った中間層を集め、PBS中2%FBSで3回洗浄し、10%DMSO/FBS中、アリコート当たり50 × 10⁶細胞/mLのアリコートを凍結した。必要な場合には、凍結したPBMCアリコートを融解し、2 × 10⁶/mLで、10%FBS/RMP1+5 ng/mL組換えヒトIL2(R&D systems #202-IL)中、一晩培養した。

30

【0293】

ADCCアッセイのために、すべての工程は完全培地中で実施した。ウェル当たり5000の標的細胞を、50 μLの3×抗CD38、コントロールIgG又は培地のみが添加された96ウェルプレートに播種し、その後、50 μLのヒトエフェクターPBMCを、標的：エフェクター(T:E)細胞が1:25~1:50となる比率で添加した。~30秒間、800 rpmでプレートを簡単に遠心分離して、全ての細胞を近づけた。37で4時間後、プレートを1100 rpmで5分間遠心分離し、100 μLの上清を白色プレートに移した。100 μLのCytotoxicity Glo(商標)試薬(Promega cat# G9292)を上清に添加し、プレートを20~30分間、RTで振とうさせた。発光をEnVision(登録商標)(Perkin Elmer)発光プレートリーダーで読み取り、特異的溶解の割合を下記式を用いて測定した：

$$(RLU_T / RLU_{E/T}) / (RLU_L / RLU_{E/T}) \times 100$$

[式中、RLU_Tは、試験サンプルの相対発光単位であり、RLU_{E/T}は、標的細胞及びエフェクター細胞のみを含むサンプルの相対発光単位であり、RLU_Lは、Triton X-100で溶解した細胞についての相対発光単位である。]統計分析は、PRISMソフトウェアを用いて実施した。抗体濃度に対する特異的溶解%をプロットすることにより決定されたEC₅₀値を表1に示す。

40

50

【表1】

表1：IgG再フォーマット抗体のCDC、ADCC及びアゴニスト活性

| 抗体 | CDC EC50 nM (MOLP-8) | ADCC EC50 nM (DAUDI) | ADCC EC50 nM (MOLP-8) | ADCC EC50 nM (RPMI-8226) | アボトシス EC50 nM (DAUDI) |
|-------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| BM-1 | 0.48±0.16 | 0.03±0.02 | 0.036±0.013 | 0.13±0.03 | 0.057 |
| BM-2 | 0.65±0.18 | 0.04±0.02 | 0.024±0.005 | 0.15±0.04 | 0.062 |
| Ab19 | 0.98±0.26 | 0.08±0.03 | 0.038±0.008 | 0.46±0.15 | 0.032 |
| Ab43 | 2.2 | 0.12±0.09 | 0.027±0.018 | 3.84 ±1.34 | 1.56 |
| Ab72 | 0.66±0.49 | 0.14±0.12 | 0.193±0.037 | 2.35±0.99 | 0.35 |
| Ab79 | 1.1±0.39 | 0.03±0.02 | 0.047±0.012 | 0.46±0.19 | 0.048 |
| Ab110 | 1.99±0.71 | 0.24±0.17 | 0.874±0.804 | 2.98±0.91 | 0.40 |
| Ab164 | 2.00±0.83 | ND | 0.165±0.154 | 1.2±0.24 | 0.31 |

【0294】

実施例9：FACSによる親和性決定

CD38を発現するMOLP-8細胞は、およそ200万細胞/mLの生存細胞濃度で、1%PBSバッファーに懸濁した。試験すべきmAbは、1×PBS中、2つの96ウェルプレート上、ウェルにわたって段階希釈（2倍）した。各滴定（titration）の最後のウェルは、バッファーのみを含んだ。最終体積が300~L/ウェルとなり、各ウェルがおよそ100,000細胞含むように各ウェルに追加のPBS及び細胞懸濁液を追加した。mAbを下記に列挙し、滴定で使用した、対応する最終的なmAb結合部位濃度（2×分子濃度）範囲も示す：

ベンチマーク1、[mAb]結合部位 = 50.8 nM ~ 49.7 pM

ベンチマーク2、[mAb]結合部位 = 49.5 nM ~ 48.3 pM

Ab43、[mAb]結合部位 = 49.3 nM ~ 48.2 pM

Ab110、[mAb]結合部位 = 204 nM ~ 49.9 pM

Ab79、[mAb]結合部位 = 103 nM ~ 25.3 pM

Ab72、[mAb]結合部位 = 103 nM ~ 25.2 pM

Ab19、[mAb]結合部位 = 100 nM ~ 12.2 pM

プレートをプレートシェーカーに4で5時間置き、その後、プレートを1×PBSで4、3回洗浄した。次いで、200 μLの99 nM Cy5ヤギ抗ヒトIgG Fc特異ポリクローナル抗体（Jackson Immuno Research Laboratories, #109-175-008）を各ウェルに添加し、プレートを4で30分間振とうさせた。プレートを再度1×PBSで4、2回洗浄し、次いで、FACSCanto（商標）II HTSフローサイトメーターを用いて、独特のmAb結合部位濃度を含む各ウェルについて、5000イベントの平均蛍光強度（MFI）を記録した。抗体結合部位濃度の関数としての平均蛍光強度のプロットは、KDを見積もるための下記式を用いて、Scientist 3.0ソフトウェアで非線形フィッティングした：

$$F = p [(KD + LT + n(M)) - \{ (KD + LT + n(M))^{2/4} n(M) (LT) \}^{1/2}] / 2 + B$$

[式中、F（平均蛍光強度）、LT（トータルのmAb結合部位濃度）、p（mAbに結合する任意の蛍光単位に関する比例定数）、M（細胞内モル濃度；300 μL中、100,000細胞に基づいて0.553 fM）、n（細胞当たりのレセプター数）、B（バックグラウンドシグナル）、及びKD=平衡解離定数。]。

【0295】

各抗体の滴定曲線について、KDの見積もりはPとして得、n、B及びLDは、非線形

10

20

30

40

50

分析において自由にフロート(floated freely)させた。上記方程式の詳細な導出については、Drake and Klakamp(2007)，“A rigorous multiple independent binding site model for determining cell-based equilibrium dissociation constants”，J. Immunol. Methods 318:157 - 62(参照により本明細書に援用される)を参照されたい。全ての抗体について得られたKDのものを、括弧内において各フィットの95%信頼区間とともに親和性が減少した順に表3に列記する。抗体結合部位濃度(2×分子濃度)を非線形曲線フィッティングのために使用した。

【0296】

10

実施例10：Biacore(登録商標)による親和性決定

可溶性CD38エクトドメイン(ECД)に対するIgG抗体の親和性は、22、Biacore(商標)A100上で、表面プラズモン共鳴(SPR)分析により決定した。ヤギ抗ヒトIgGポリクローナル抗体(Caltag H10500)を、チップの4つ全てのフローセル内のスポット1、2、4及び5への標準的なアミンカップリングを用いて、CM5バイオセンサーチップに固定化した。各スポット上の固定化レベルは、5865RU~6899RUの範囲であった。ヒトCD38はR&D Systems(Cat#2404-AC, Lot#PEH020812A)から得た。CD38のストック濃度は、Paceら((1995)“How to measure and predict molar absorption coefficient of a protein” Protein Science 4(11):2411-23 and Pace and Grimsley(2004)“Spectrophotometric determination of protein concentration”, in Current Protocols in Protein Science, Chapter 3: Unit 3.1)に詳述される方法を用いて決定した(各参考文献の教示は参照により本明細書に援用される)。

20

【0297】

HEPES緩衝生理食塩水、0.005%ポリソルベート20を脱ガスし、濾過したBSAを最終濃度100μg/mLで添加することによりランニングバッファーを調製した。8つの精製mAb全てをランニングバッファーでおよそ2μg/mLに希釈した。予備実験により、~100RUと同じくらいの表面容量(R_{max})を維持するために捕捉されるべき捕捉されるべき各mAbの量を見積もった。各mAb捕捉/抗原注入サイクルについて、mAbは、それぞれのリファレンス表面として働くスポット2と4に近接する、各フローセル内のスポット1及び5で捕捉された。各希釈mAbは、10μL/分の流速で1分間捕捉され、その後、表面を安定化するため、ランニングバッファーを3分間流した。HuCD38は、全ての4つのフローセルに120秒間、30μL/分、193.7nM~3.0nM(2×段階希釈)の濃度範囲にわたって注入し、その後、15分間解離段階とした。サンプルは全てランニングバッファー中で調製し、二重参照(double referencing)のために散在(interspersed)された7つのバッファー注入物を用いてランダムに3連で注入した。10mMのグリシン(pH1.7)での20秒間のパルスを2回行い、表面を再生した。

30

【0298】

40

全てのセンサーグラムデータをscrubber 2.0cソフトウェアで処理し、scrubber 2.0cの1:1相互作用モデルにグローバルにフィッティングさせた。得られた結合定数を表2に示す。

【0299】

【表2】

| 抗体 | FACS KD (nM) MOLP-8 | FACS KD (pM) RPMI-8226 | Biacore Ka (M-1s-1) | Biacore Kd (s-1) | Biacore KD (nM) |
|-------|---------------------------|------------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------|
| BM-1 | 1.1 (0.9) | 802 | 4.49 × 10 ⁴ | 2.46 × 10 ⁻³ | 54.8 |
| BM-2 | 1.6 (0.6) | 428 | 4.24 × 10 ⁵ | 2.27 × 10 ⁻³ | 5.4 |
| Ab19 | 0.4 (0.3) | - | 1.54 × 10 ⁵ | 8.10 × 10 ⁻⁴ | 5.3 |
| Ab79 | 1.2 (1.1) | 508 | 1.22 × 10 ⁵ | 6.75 × 10 ⁻⁴ | 5.5 |
| Ab72 | 0.6 (0.4) | - | 1.44 × 10 ⁴ | 1.82 × 10 ⁻³ | 126 |
| Ab110 | 1.0 (0.1) | - | 1.22 × 10 ⁵ | 1.71 × 10 ⁻¹ | 1400 |
| Ab43 | 1.1 (0.3) | - | 2.72 × 10 ⁵ | 1.46 × 10 ⁻¹ | 537 |
| Ab164 | 1.4 (0.7) | - | 1.99 × 10 ⁵ | 7.15 × 10 ⁻² | 359 |

【0300】

実施例11：免疫蛍光内在化アッセイ

免疫蛍光技術を用いて、抗CD38抗体のMOLP-8細胞への内在化を評価した。MOLP-8細胞を集め、Alexa Fluor（登録商標）488に直接結合させた各抗CD38抗体1μgを用いて、RPMI-1640中、5×10⁶細胞を4、10分間染色した。1%BSA含有PBSで細胞を洗浄し、1×10⁶細胞を4又は37で3時間又は6時間インキュベートした。2μgのウサギ抗Alexa Fluor（登録商標）488抗体（Invitrogen）を用いて、4、30分間、表面染色をクエンチした。細胞を洗浄し、1%PFAを含むPBSで固定し、Microtest 96ウェルプレート（BD Biosciences）に移し、FACSCanto（商標）II（BD Biosciences）フローサイトメーターを用いたフローサイトメトリーにより評価するか、ImageXpress（登録商標）Micro（Molecular Devices）を20倍の倍率で用いて画像化するかのいずれか行った。

【0301】

実施例12：Biacore（登録商標）によるエピトープビニング

Biacore（登録商標）A100機器を用いて、2つのベンチマーク抗体とAb19及びAb79をビニング（bi～）した。最初に、NHS/EDCカップリング化学を用いて、CM5チップ上に高密度及び低密度で抗体を固定化した。エピトープビニング実験の各サイクルについて、CD38をこれらの表面上に最初に注入した。次いで、ELISAフォーマットにおけるサンドイッチアッセイと同様に、独特的の抗体（固定化抗体のセットから得られたもの）をCD38/抗体複合体を含む表面上に注入した。各サイクルの最後にリン酸パルスを用いて表面を再生した。BSA添加HBS-P（10mM 10HEPES pH7.4、150mM NaCl、0.005%）P-20）を用いて、22でデータを集めた。得られたセンサーグラムをBiacore（登録商標）A100 Evaluationソフトウェアパッケージの「Epitope Mapping」モジュールとScrubber for A100データセットのトライアルバージョン（trial version of Scrubber for A100 data set）を用いて処理した。再現データを使用して、表3に示すとおり、2つの別々の実験から上記4つのmAbに対するバイナリーアソシエーションマトリックスを作製した。

【0302】

10

20

30

40

【表3】

| | Ab79 | BM1 | Ab19 | BM2 |
|------|------|-----|------|-----|
| Ab79 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| BM1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Ab19 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| BM2 | 1 | 0 | 0 | 0 |

【0303】

実施例13：in vivo分析

ヒトリンパ腫の播種性Daaudi-Lucシフェラーゼモデルについて、Ab19及びAb79のin vivo有効性を試験した。Taconic Laboratoriesから得た6～8週齢のメスCB.17 SCIDマウスに 1×10^6 個のDaaudi-Luc腫瘍細胞を静脈注射した。研究7日目に、パリビズマブ、Ab79、Ab19、ベンチマーク1及びベンチマーク2をマウス腹腔内に注射した。IVIS Xenogen system(Caliper Life Sciences)を用いて、21日目から毎週、生物発光イメージングを実施し、全身腫瘍組織量をモニタリングした。イメージングのために、イメージジングの10分前にルシフェラーゼ基質(150mg/kg)を動物にIP注射し、次いでイソフルラン下で動物を麻酔し、イメージングした。結果を図8及び9に示す。

【0304】

(配列表)

配列番号1(CD38ホモ・サピエンス；NP_001766.2)

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

【0305】

配列番号2(CD38マカカ・ファシキュラリス(Macaca fascicularis)；AAT36330.1)

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

【0306】

配列番号3(HCDR1 Ab79)

G F T F D D Y G

【0307】

配列番号4 (H C D R 2 A b 7 9)

I S W N G G K T

【0308】

配列番号5 (H C D R 3 A b 7 9)

A R G S L F H D S S G F Y F G H

【0309】

配列番号6 (L C D R 1 A b 7 9)

S S N I G D N Y

【0310】

配列番号7 (L C D R 2 A b 7 9)

R D S

【0311】

配列番号8 (L C D R 3 A b 7 9)

Q S Y D S S L S G S

【0312】

配列番号9 (重鎖 A b 7 9)

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

【0313】

配列番号10 (軽鎖 A b 7 9)

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

【0314】

配列番号11 (重鎖 A b 1 9)

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

【0315】

配列番号12 (軽鎖 A b 1 9)

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

【0316】

配列番号13 (H C D R 1 A b 1 9)

G F T F N N Y D

【0317】

配列番号14 (H C D R 2 A b 1 9)

I S Y D G S D K

【0318】

配列番号15 (H C D R 3 A b 1 9)

A R V Y Y Y G F S G P S M D V

【0319】

配列番号16 (L C D R 1 A b 1 9)

N S N I G S N T

10

20

30

40

50

【0320】

配列番号17 (LCDR2 Ab19)

SDS

【0321】

配列番号18 (LCDR3 Ab79)

QSYDSSLSGSR

【0322】

配列番号19 (重鎖 Ab19) w / 定常 (constant)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQA
 PGKGLEWVAVISYDGSDKDYADSVKGRTTISRDN SKNTLY 10
 LQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYYGFSGPSMDVWGQGT LVT
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
 VSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGT
 QTYICNVN HKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTC PPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDI AVEWE SNGQ PENNYKTTP
 PVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFS CSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK 20

【0323】

配列番号20 (軽鎖 Ab19) w / 定常

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQL
 PG TAPKLLIYSDSNRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLR
 SEDEADYYCQSYDSSL SGSRVFGGGT KLT VLGQPKANPTV
 TL FPPSSEELQANKATLVCL I SDFYPGAVTVAWKADGSPV
 KAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV
 THEGSTVEKTVAPTECS

【0324】

配列番号21 (重鎖 Ab79)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGM SWVRQA
 PGKGLEWVSDISWNNGKTHYVDSVKGQFTTISRDN SKNTLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCAR GS LFHDSSGFYFGHWGQGT LVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
 TVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLG
 TQTYICNVN HKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTC PPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDI AVEWE SNGQ PENNYKTTP
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFS CSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK 40

【0325】

配列番号22 (軽鎖 Ab79)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQL
 PG TAPKLLIYRDSQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLR
 SEDEADYYCQSYDSSL SGSVFGGGT KLT VLGQPKANPTV
 LFPPSSEELQANKATLVCL I SDFYPGAVTVAWKADGSPV
 AGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV
 HEGSTVEKTVAPTECS 50

【0326】

配列番号23(CD157ホモ・サピエンス; NP_004325)

MAA QGCAASRLLQLLQLLLLAAAGGARARWRGEGETS
 AHL RDI F LGRCAEYRALLSPEQRNKNCTAIWEAFKVALDK
 DPC SVLP SDYDLFINLSRHSPRDKSLFWENSHLLVNSFA
 DNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDSGLDYQSCP
 EDCENNPVDSFWKRASIQYSKDSSGVIHVMLNGSEPTGA
 YPIKGFFADYEIPNLQKEKITRIEIWVMHEIGGPNVESCG
 EGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPD
 CALKSAAAATQRKAPS LYTEQRAGLIIPPLFLVLASRTQL 10

【0327】

配列番号24(ベンチマーク1;重鎖可変領域)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMS WVRQA
 PGKGLEWVSAISGSGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
 LQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTLVTV
 SS

【0328】

配列番号25(ベンチマーク1;軽鎖可変領域)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKP
 GQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELP 20
 EDFAVYYCQQRSNW PPTFGQGTKVEIKR

【0329】

配列番号26(ベンチマーク2;重鎖可変領域)

QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCCKASGYTFDYWMQWVKQR
 PGQGLEWIGTIYPGDGDTGYAQKFKQGKATLTADKSSKTVY
 MHLSSLASEDSA VYYCAR GDYYGSNSLDYWGQGT S VTVSS

【0330】

配列番号27(ベンチマーク2;軽鎖可変領域)

DIVMTQSHLSMSTS LGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKP
 GQSPRRLIYSASYRYIGVPDRFTGSGAGTDFTFTISSVQA 30
 EDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGT KLEIKR

【0331】

配列番号28(重鎖 Ab43)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSYGMHWVRQA
 PGKGLEWVSRINSDGSSTS YADSMKGQFTISRDN SKNTLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCAR GGGYYYYAMD VWGQGT LVT VSSA
 STKGPSVFP LAPSSKSTS GGTAALGCLVKD YFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
 ICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH T CPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY 40
 VDGVEVHN A KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLP PSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESEN GQPENNYKTTPPVL
 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

【0332】

配列番号29(軽鎖 Ab43)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGYKTVNWYQQL
 PGTAPKLLIYDNNKRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR 50
 SEDead YYCAAWDDSLNGLVFGGGT KLT VLGQPKANPTVT

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

【0333】

配列番号30(重鎖 Ab72)

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

【0334】

配列番号31(軽鎖 Ab72)

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

【0335】

配列番号32(重鎖 Ab110)

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

【0336】

配列番号33(軽鎖 Ab110)

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

【0337】

配列番号34(重鎖 Ab19) w / 定常

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F N N Y D M T W V R Q A 50

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

【0338】

配列番号35(軽鎖 Ab19)w/定常

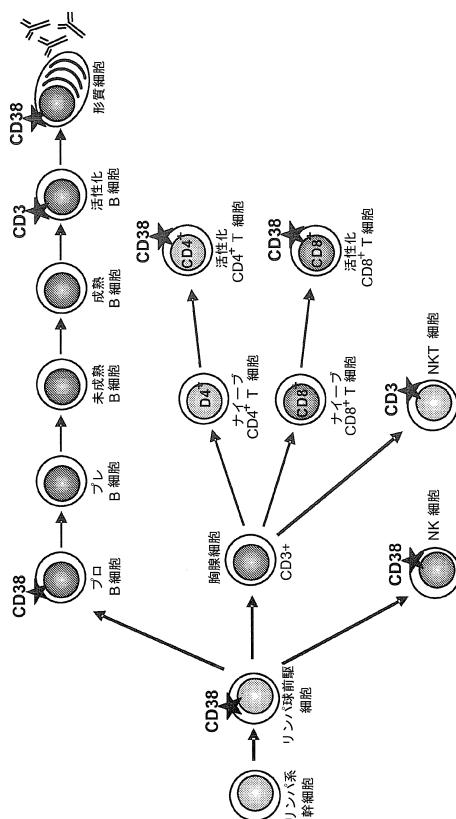
Q S V L T Q P P S A S G T P G Q R V T I S C S G S N S N I G S N T V N W Y Q Q L
 P G T A P K L L I Y S D S N R P S G V P D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R
 S E D E A D Y Y C Q S Y D S S L S G S R V F G G G T K L T V L G Q P K A N P T V
 T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V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

【0339】

20

本発明の実施態様を明確にするために、詳細に参照により本発明を説明するが、添付の特許請求の範囲に定義される発明の範囲から逸脱することなく、改作及び改変が可能であることは明らかである。より詳細には、特に有利な例として、本明細書において本発明のいくつかの側面を特定するが、本発明は、これらの特定の本発明の側面により限定される必要はないことが企図される。

【図1】



【図2】

Ab79 重鎖 (SEQ ID NO:21)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMWSVRQAPGKGLEWVSDIS
 WNGGKTHYVDSVKGQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFH
 DSSGFYFGHWGQGTIVTVA SASTKGPSVFLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYE
 PEPVTWSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDRV EPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAGQPREPVYTLPPSREEMTK
 NQVS LTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ab79 軽鎖 (SEQ ID NO:22)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSNIGDNVWSYQQLPGTAPKLLIYRDSQ
 RPSGVDPDRSGSKSGTSASLAI SGLRSEADYYCQSYDSSLGSVFGGGTKL
 TVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA/TVAWKADGSPVK
 AGVETTKPSKQSNNKYAAASSYLSLTPEQWKS HRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAP
 TECS

Ab19 重鎖 (SEQ ID NO:11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWV RQAPGKGLEWVAVI
 SYDGSDKD YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYY
 GFSGPSMDVWGGQTLTVTVA SASTKGPSVFLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYE
 FPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYLSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDRV EPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAGQPREPVYTLPPSREEMTK
 NQVS LTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
 KSRWQQGVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ab19 軽鎖 (SEQ ID NO:12)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSNIGNSNTV NWYQQLPGTAPKLLIYSDSN
 RPSGVDPDRSGSKSGTSASLAI SGLRSEADYYCQSYDSSLGSVFGGGTKL
 TVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA/TVAWKADGSPVK
 AGVETTKPSKQSNNKYAAASSYLSLTPEQWKS HRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAP
 PTECS

【図3】

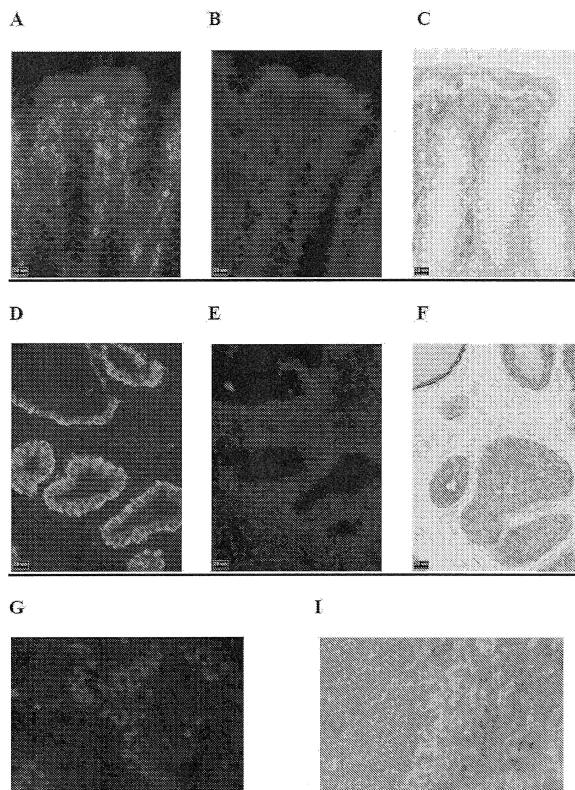
CD38 ホモ・サピエンス (Accession NP_001766.2; SEQ ID NO:1)

MANCEFSPVSGDKPCCLRSRAQLCLGVSIVLILVVVLAVVVPRWRQQWSPGPGTTKR
FPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDASFKAIFSKHPCNITEEEDYQPLMKLGTQT
VPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLTWCGEFTNSKINYQSCP
DWRKDCSNNPVSFWKTVSRFAEAACDVVHVMLNGRSKIFDKNSTFGSVEVHNQ
PEKVOTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIFRPFKNIYRPDKFLQCVKNPE
DSCTSEI

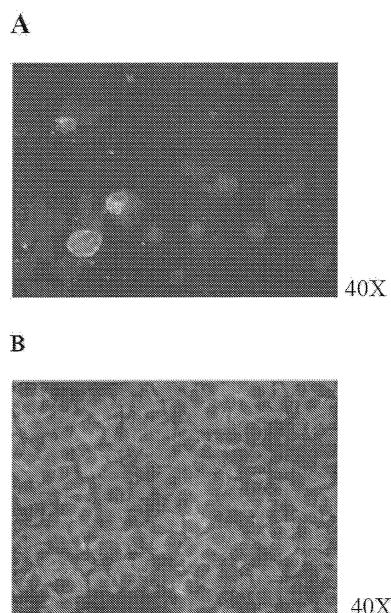
CD38 マカカ・ファシキュラリス/カニクイザル/Crab eating macaque (Accession AAT36330.1;
SEQ ID NO:2)

MANCEFSPVSGDKPCCLRSRAQVCLGVCLLVLLILVVVVAVVLPWRQQWSPGSGTTTS
RFPETVLARCVKYTEHVPEMRHVDCQSVWDASFKAIFSKYPCNITEEEDYQPLVKLGTQ
TVPCKTLLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLTWCGEFTNTFEINYQSC
PDWRKDCCSNPVSFWKTVSRFAETACGVVHVMLNGRSKIFDKNSTFGSVEVHN
QPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIFRPFKNIYRPDKFLQCVKN
PEDSSCLSGI

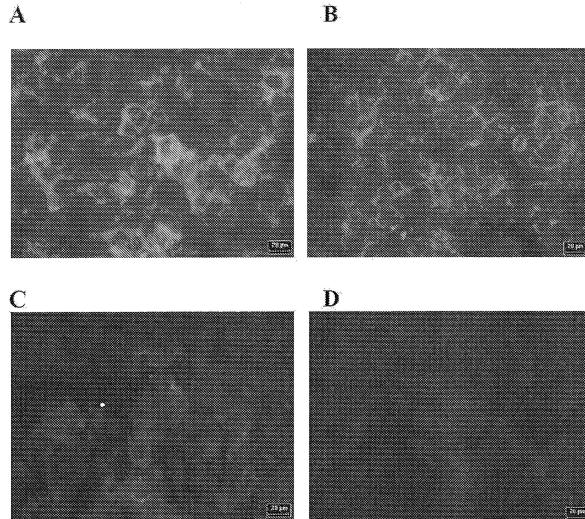
【図4】



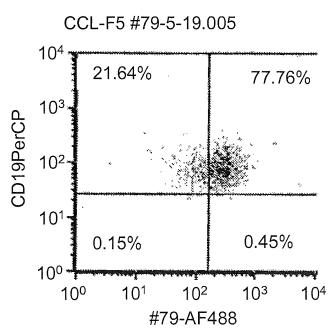
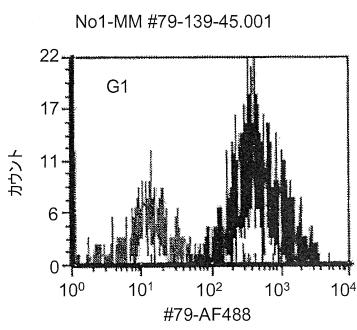
【図5】



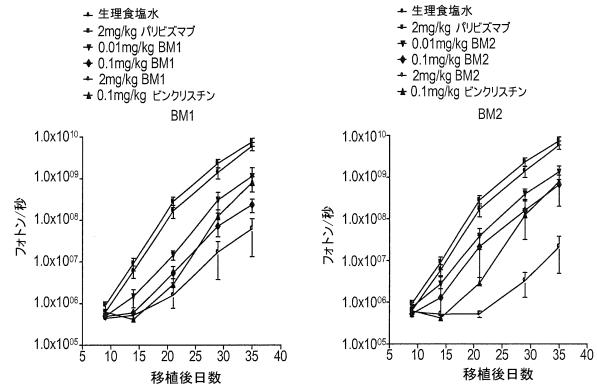
【図6】



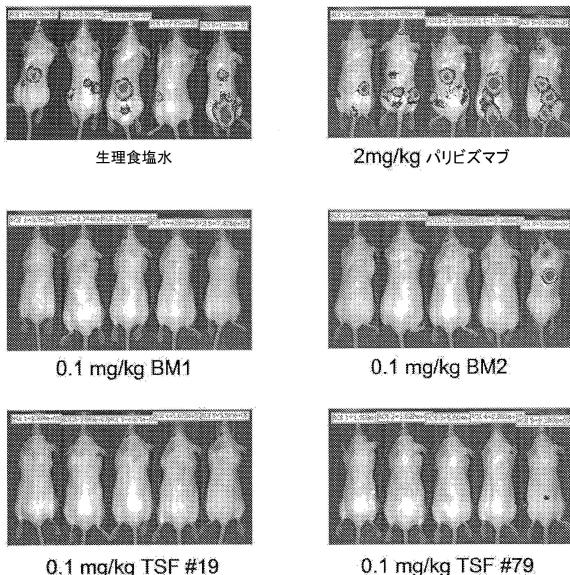
【図7】



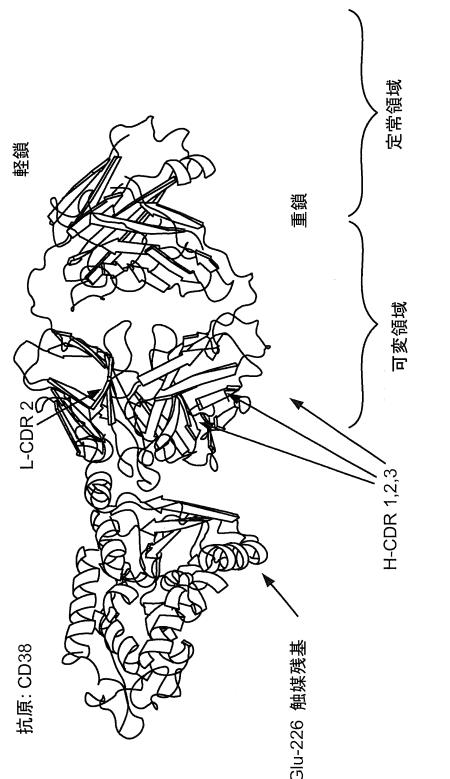
【図8】



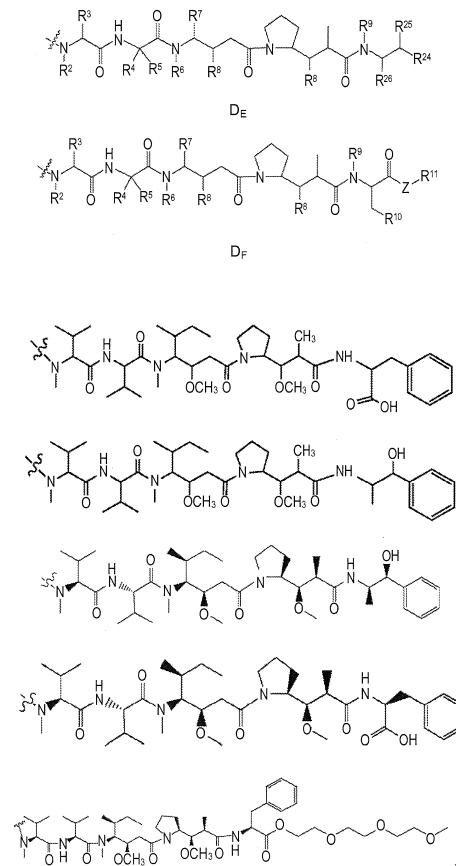
【図9】



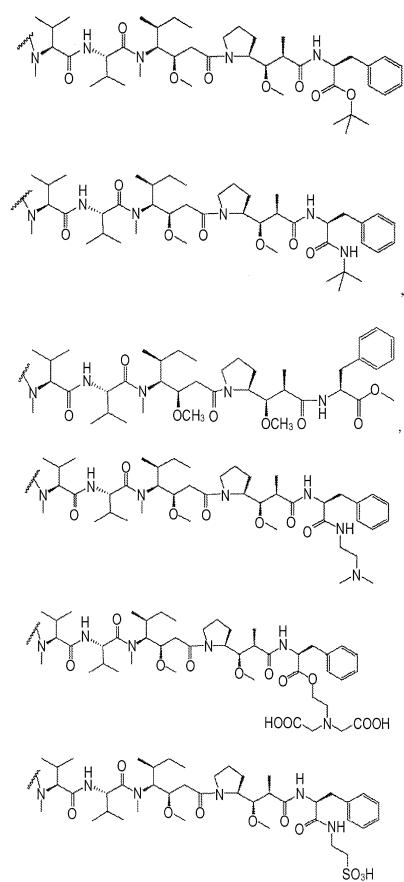
【図10】



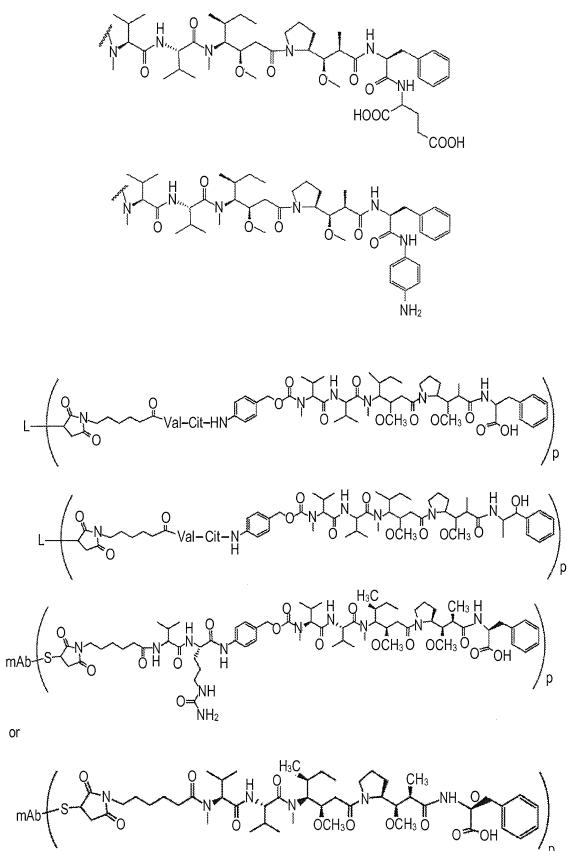
【図 1 1】



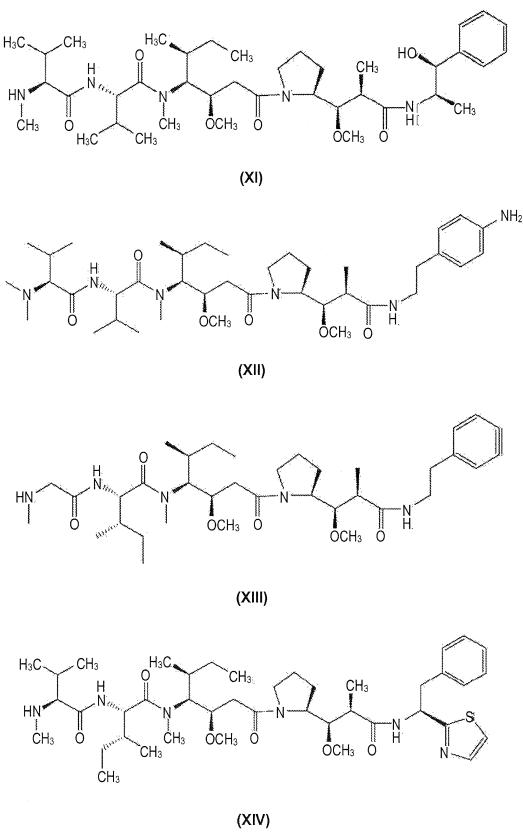
【図 1 1 A】



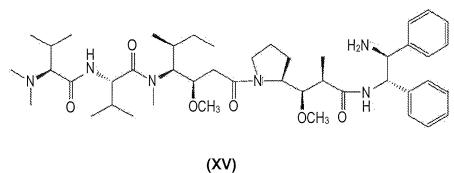
【図 1 1 B】



【図 1 1 C】

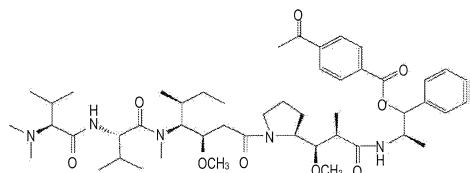


【 义 1 1 D 】



(XIX)

(义 1 1 E)



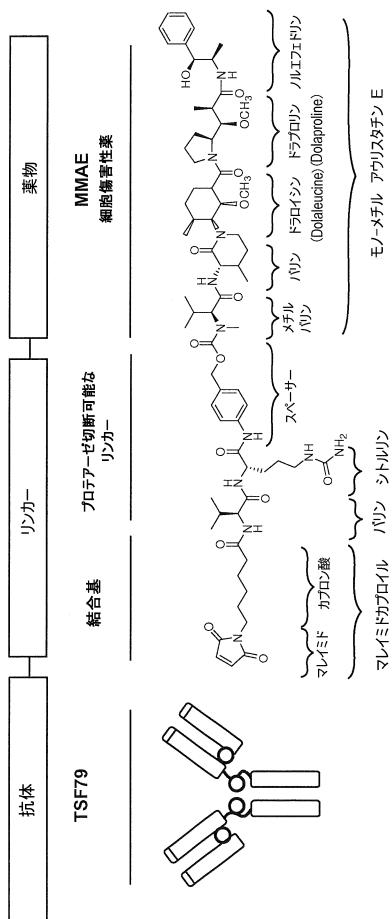
(XX)

(XXI)

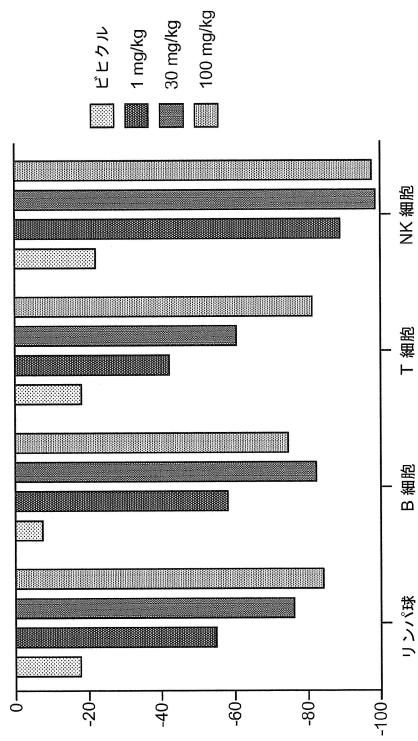
【 図 1 2 】

| BM2 | | BM1 | | TSF19 | | TSF79 | |
|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-------|-----|
| E | 76 | N | 120 | G | 91 | K | 121 |
| H | 79 | K | 121 | E | 103 | F | 135 |
| E | 104 | F | 135 | E | 104 | Q | 139 |
| Q | 107 | Q | 139 | D | 105 | D | 141 |
| M | 110 | D | 141 | Q | 107 | M | 142 |
| K | 111 | D | 202 | M | 110 | E | 239 |
| L | 112 | V | 203 | K | 111 | W | 241 |
| G | 113 | H | 205 | T | 114 | S | 274 |
| T | 114 | Q | 236 | Q | 115 | C | 275 |
| Q | 115 | T | 237 | T | 148 | K | 276 |
| T | 116 | E | 239 | V | 192 | F | 284 |
| V | 117 | W | 241 | R | 194 | V | 288 |
| C | 119 | Q | 272 | R | 195 | K | 289 |
| T | 148 | F | 273 | F | 196 | N | 290 |
| L | 150 | S | 274 | E | 198 | P | 291 |
| T | 191 | C | 275 | A | 199 | E | 292 |
| V | 192 | K | 276 | H | 228 | D | 293 |
| R | 194 | F | 284 | N | 229 | S | 294 |
| R | 195 | P | 291 | Q | 231 | | |
| F | 196 | E | 292 | E | 233 | | |
| E | 198 | T | 297 | K | 234 | | |
| A | 199 | S | 298 | | | | |
| Q | 231 | | | | | | |
| E | 233 | | | | | | |
| K | 234 | | | | | | |

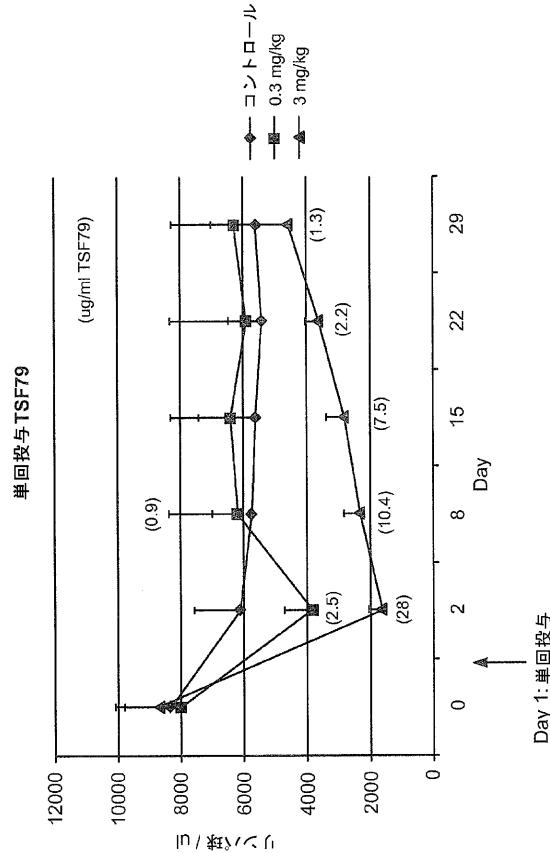
【図 1 3】



【図14】



【図15】



【配列表】

0006148984000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I |
|-------------|--------|--------------------------|
| A 6 1 K | 31/702 | (2006.01) A 6 1 K 31/702 |
| A 6 1 K | 31/353 | (2006.01) A 6 1 K 31/353 |
| A 6 1 P | 35/00 | (2006.01) A 6 1 P 35/00 |
| C 1 2 N | 1/15 | (2006.01) C 1 2 N 1/15 |
| C 1 2 N | 1/19 | (2006.01) C 1 2 N 1/19 |
| C 1 2 N | 1/21 | (2006.01) C 1 2 N 1/21 |
| C 1 2 N | 5/10 | (2006.01) C 1 2 N 5/10 |
| C 1 2 P | 21/08 | (2006.01) C 1 2 P 21/08 |

(31)優先権主張番号 61/470,406

(32)優先日 平成23年3月31日(2011.3.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/485,104

(32)優先日 平成23年5月11日(2011.5.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 イライアス、キャスリーン、アン

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94080、サウス サン フランシスコ、イースト グランド アヴェニュー 285、タケダ サン フランシスコ インコーポレーテッド内

(72)発明者 ランデス、グレゴリー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94080、サウス サン フランシスコ、イースト グランド アヴェニュー 285、タケダ サン フランシスコ インコーポレーテッド内

(72)発明者 シン、シェエーター

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94080、サウス サン フランシスコ、イースト グランド アヴェニュー 285、タケダ サン フランシスコ インコーポレーテッド内

(72)発明者 コーヴァー、ウーター

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94080、サウス サン フランシスコ、イースト グランド アヴェニュー 285、タケダ サン フランシスコ インコーポレーテッド内

(72)発明者 ドレイク、アンドリュー、ウォーリング

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94080、サウス サン フランシスコ、イースト グランド アヴェニュー 285、タケダ サン フランシスコ インコーポレーテッド内

(72)発明者 ハーク - フレンショー、マリー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94080、サウス サン フランシスコ、イースト グランド アヴェニュー 285、タケダ サン フランシスコ インコーポレーテッド内

(72)発明者 スネル、ジェルジュ、パル

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94080、サウス サン フランシスコ、イースト グランド アヴェニュー 285、タケダ サン フランシスコ インコーポレーテッド内

(72)発明者 ブハスカー、ヴィナイ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94080、サウス サン フランシスコ、イースト グランド アヴェニュー 285、タケダ サン フランシスコ インコーポレーテッド内

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 特開2016-121139(JP,A)
国際公開第2012/092612(WO,A1)
国際公開第2010/021874(WO,A1)
国際公開第2009/077993(WO,A1)
特表2001-509817(JP,A)
特表2010-504363(JP,A)
国際公開第2006/125640(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
C07K 16/00 - 16/46
CAplus / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)
UniProt / GeneSeq
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)