

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6273214号
(P6273214)

(45) 発行日 平成30年1月31日(2018.1.31)

(24) 登録日 平成30年1月12日(2018.1.12)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00
C 07 K 16/18	(2006.01)	C 07 K	16/18
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K	39/395
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P	35/00

請求項の数 30 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願2014-557760 (P2014-557760)	(73) 特許権者	505314468 シアトル ジェネティックス, インコ- ポレイテッド アメリカ合衆国 ワシントン 98021 , ボセル, エス. イー., 30ティ ーエイチ ドライブ - 21823
(86) (22) 出願日	平成25年2月14日 (2013.2.14)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(65) 公表番号	特表2015-509938 (P2015-509938A)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(43) 公表日	平成27年4月2日 (2015.4.2)	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/026087	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 國際公開番号	W02013/123152		
(87) 國際公開日	平成25年8月22日 (2013.8.22)		
審査請求日	平成27年12月4日 (2015.12.4)		
(31) 優先権主張番号	61/600,499		
(32) 優先日	平成24年2月17日 (2012.2.17)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/602,511		
(32) 優先日	平成24年2月23日 (2012.2.23)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】がんを処置するためのインテグリン α v β 6 に対する抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1に示される配列を含む重鎖可変領域および配列番号2に示される配列を含む軽鎖可変領域を含む、インテグリン α v β 6 に特異的に結合する単離されたマウスモノクローナル抗体、またはそのキメラ形態もしくはヒト化形態。

【請求項 2】

配列番号3(C D R 1)、配列番号4(C D R 2)、および配列番号5(C D R 3)に示される重鎖相補性決定領域(C D R)配列、ならびに配列番号6(C D R 1)、配列番号7(C D R 2)、および配列番号8(C D R 3)に示される軽鎖C D R配列を含む、インテグリン α v β 6 に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 3】

配列番号3(C D R 1)、配列番号4(C D R 2)、および配列番号5(C D R 3)に示される重鎖相補性決定領域(C D R)配列、ならびに配列番号6(C D R 1)、配列番号7(C D R 2)、および配列番号8(C D R 3)に示される軽鎖相補性決定領域(C D R)配列を含む、インテグリン α v β 6 に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体であって、重鎖可変領域がH A(配列番号9)と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域がL A(配列番号10)と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有し、ただし、配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号2のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むマウス抗体に対して少なくとも1つの復帰変異があり、該復帰変異は重鎖可変フレームワーク領域内にある、ヒト化モノクローナル抗体。

10

20

【請求項4】

H A (配列番号9)と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域であって、ただし、配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号2のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むマウス抗体に対して少なくとも1つの復帰変異があり、該復帰変異は重鎖可変フレームワーク領域内にあり、かつ前記抗体が配列番号3(C D R 1)、配列番号4(C D R 2)、および配列番号5(C D R 3)に示される重鎖相補性決定領域(C D R)配列を含むことを条件とする、重鎖可変領域を含み、かつ、

L A (配列番号10)と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域であって、ただし、前記抗体が配列番号6(C D R 1)、配列番号7(C D R 2)、および配列番号8(C D R 3)に示される軽鎖相補性決定領域(C D R)配列を含むことを条件とする、軽鎖可変領域を含む、請求項2に記載の抗体。 10

【請求項5】

前記抗体がヒト化抗体であり、かつ配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号2のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むマウス抗体に対して少なくとも1つの復帰変異があり、該復帰変異は前記重鎖可変フレームワーク領域内にある、請求項4に記載の抗体。

【請求項6】

配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号2のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むマウス抗体に対して少なくとも2つの復帰変異があり、該復帰変異は前記重鎖可変フレームワーク領域内にある、請求項5に記載のヒト化抗体。 20

【請求項7】

H A の位置H 2 8 およびH 3 0 のうち少なくとも1つがSで占有され、ここで番号付けがK a b a t 番号付与法に従っている、請求項5に記載のヒト化抗体。

【請求項8】

位置H 2 8 とH 3 0 の両方ともSで占有されている、請求項7に記載のヒト化抗体。

【請求項9】

位置H 7 2 が、DまたはQで占有され、位置H 7 3 がTまたはKで占有され、位置H 7 5 がTまたはSで占有され、位置H 7 8 がVまたはAで占有され、位置H 9 3 がAまたはVで占有されている、請求項8に記載のヒト化抗体。

【請求項10】

位置L 4 が、MまたはLで占有され、位置L 2 1 がIまたはLで占有され、位置L 2 2 がSまたはFで占有され、位置L 3 6 がFまたはLで占有され、位置L 3 7 がQまたはFで占有され、位置L 4 5 がRまたはKで占有され、位置L 6 3 がSまたはTで占有されていていることを除いて、前記抗体がL A (配列番号10)に示される配列を含む軽鎖可変領域を含み、番号付けがK a b a t 番号付与法に従っている、請求項1~9のいずれか1項に記載の抗体。 30

【請求項11】

前記抗体がヒト化抗体であり、かつ前記重鎖可変領域が、H B (配列番号11)、H T (配列番号22)、H L (配列番号15)、H U (配列番号23)、H M (配列番号16)またはH N (配列番号17)に示されるアミノ酸配列を有する、請求項1~10のいずれか1項に記載の抗体。 40

【請求項12】

前記軽鎖可変領域が、L A (配列番号10)、L B (配列番号24)、L C (配列番号25)、L D (配列番号26)、L E (配列番号27)、L F (配列番号28)またはL G (配列番号29)に示されるアミノ酸配列を有する、請求項1~11のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項13】

H B (配列番号11)に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域およびL A (配列番号10)、L B (配列番号24)、L C (配列番号25)、L D (配列番号26)、L E (配列番号27)、L F (配列番号28)もしくはL G (配列番号29)に示され 50

るアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するか；H T (配列番号 22) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するか；H L (配列番号 15) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するか；H U (配列番号 23) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するか；H N (配列番号 17) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するか、または H M (配列番号 16) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する、請求項 9 に記載のヒト化抗体。

【請求項 14】

抗原結合断片である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 15】

前記重鎖可変領域がヒト重鎖定常領域に融合され、かつ前記軽鎖可変領域がヒト軽鎖定常領域に融合されている、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 16】

前記重鎖定常領域が、F c ガンマ受容体に対する結合が天然のヒト定常領域と比較して減少した天然のヒト定常領域の変異体形態である、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 17】

前記重鎖定常領域が、Ig G 1 アイソタイプのものである、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 18】

細胞毒性薬剤に結合体化されている、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 19】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むマウス抗体と比較して、 v_6 に対して 5 倍以内の親和性を有する、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 20】

配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むマウス抗体と比較して、 v_6 に対して 2 倍以内の親和性を有する、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 21】

v_6 に対して 0.1 nM ~ 5 nM の範囲内の見かけの解離定数 (k d) を有する、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 22】

v_6 に対して 0.1 nM ~ 2 nM の範囲内の見かけの解離定数 (k d) を有する、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 23】

v_6 に対して 0.5 nM ~ 1.5 nM の範囲内の見かけの解離定数 (k d) を有する、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 24】

前記抗体が、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 2 のアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を含む軽鎖可変領域を含むマウス抗体のキメラ形態であり、かつ前記抗体は、ヒト重鎖定常領域に融合している配列番号1に示される配列を含む前記重鎖可変領域、およびヒト軽鎖定常領域に融合している配列番号2に示される配列を含む前記軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項25】

精製されたものである、請求項1～24のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項26】

請求項1～25のいずれか1項によって定義される、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域をコードする単離された核酸。

【請求項27】

がんを有する患者を処置するための組成物であって、前記組成物は、請求項1～25のいずれか1項に記載の抗体を含み、前記抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体である、組成物。

【請求項28】

前記がんが、膀胱がん、頭頸部がん、皮膚がん、肺がん、膵臓がん、子宮がん、乳がん、結腸がん、前立腺がん、卵巣がん、ならびに胃がんである、請求項27に記載の組成物。

【請求項29】

前記がんが、扁平上皮癌または腺癌である、請求項27に記載の組成物。

【請求項30】

請求項1～25のいずれか1項に記載の抗体を含む医薬組成物であって、前記抗体が、キメラ抗体またはヒト化抗体である、医薬組成物。

10

20

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2012年2月17日に出願された米国仮出願第61/600,499号、および2012年2月23日に出願された米国仮出願第61/602,511号（これらの各々が、全ての目的のためにその全体が参考として援用される）の利益を主張する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0002】

本明細書において、インテグリン ν 6に特異的に結合するモノクローナル抗体およびこれを用いてがんを処置する方法が提供される。本明細書に記載される抗体は、15H3抗体を含む。15H3抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号2のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むマウスモノクローナル抗体である。15H3マウス抗体のキメラ形態およびヒト化形態、ならびにそのヒト形態は、本発明に包含される。15H3抗体のキメラ形態、ヒト化形態、およびヒト形態は、マウス15H3抗体と実質的に同じ相補性決定領域(CDR)を含み、インテグリン ν 6に特異的に結合する。マウス15H3抗体の重鎖CDRの3つは、配列番号3(H-CDR1)、配列番号4(H-CDR2)、および配列番号5(H-CDR3)に提供される配列を有する。マウス15H3抗体の軽鎖CDRの3つは、配列番号6(L-CDR1)、配列番号7(L-CDR2)、および配列番号8(L-CDR3)に提供される配列を有する。任意選択で、 ν 6に特異的に結合するマウス15H3抗体と実質的に同じ相補性決定領域(CDR)を含むヒト化抗体において、重鎖可変領域の位置H28、H30、H72、H73、H75、H78、またはH93のうち少なくとも1つは、マウス15H3抗体の対応する位置のアミノ酸残基に占有されている。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28、H30、H72、H73、H75、H78、またはH93のうち少なくとも2つは、マウス15H3抗体の対応する位置のアミノ酸残基で占有

40

50

される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28、H30、H72、H73、H75、H78、またはH93のうち少なくとも4つは、マウス15H3抗体の対応する位置のアミノ酸残基で占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28およびH30のうち少なくとも1つは、Sで占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28およびH30は、Sで占有され、位置H72は、DまたはQで占有され、位置H73は、TまたはKで占有され、位置H75は、TまたはSで占有され、位置H78は、VまたはAで占有され、93位は、AまたはVで占有される。任意選択でこれらの実施形態のいずれかでは、重鎖フレームワーク領域中のアミノ酸残基の多くとも10個、多くとも9個、多くとも8個、多くとも7個、多くとも6個、または多くとも5個は、マウス15H3抗体の対応する位置のアミノ酸残基で占有される。任意選択で、これらの実施形態のいずれかでは、重鎖可変領域のCDRは配列番号1のものであり、軽鎖可変領域のCDRは配列番号2のものである。任意選択で、これらの実施形態のいずれかでは、重鎖可変領域のCDRは実質的に配列番号1のものであり、軽鎖可変領域のCDRは実質的に配列番号2のものである。任意選択で、これらの実施形態のいずれかでは、重鎖可変領域のCDRは、配列番号1のものであり、軽鎖可変領域のCDRは配列番号2のものであり、各CDRに0、1、2または3個の保存的アミノ酸置換を有する。一態様では、配列番号3(CDR1)、配列番号4(CDR2)、および配列番号5(CDR3)に示される重鎖相補性決定領域(CDR)配列、ならびに配列番号6(CDR4)、配列番号7(CDR5)、および配列番号8(CDR6)に示される軽鎖CDR配列を含み、各CDRに0、1、2または3個の保存的アミノ酸置換を有する、インテグリンv6に特異的に結合するキメラまたはヒト化抗体が、本明細書において提供される。ここで、この出願の他の場所にある通り、Kabat番号付けを使用して、重鎖および軽鎖可変領域中の位置を記載する。

【0003】

本発明は、HA(配列番号9)と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含み、LA(配列番号10)と少なくとも90%同一の軽鎖可変領域を有する抗体(例えば、ヒト化抗体)も提供する。いくつかの態様では、本発明は、重鎖フレームワーク領域に少なくとも1つのマウス15H3復帰変異を有するHA(配列番号9)と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、およびLA(配列番号10)と少なくとも90%同一の軽鎖可変領域を含む抗体を提供する。「可変鎖フレームワーク領域に少なくとも1つのマウス15H3復帰変異を有する」という語句によって、アクセプタ可変鎖フレームワーク領域中にあるアミノ酸残基の少なくとも1つが、ドナーマウス15H3抗体の対応する位置に存在するアミノ酸残基に変化することが意味される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28、H30、H72、H73、H75、H78、またはH93のうち少なくとも1つは、マウス15H3抗体の対応する位置のアミノ酸残基で占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28、H30、H72、H73、H75、H78、またはH93のうち少なくとも2つは、マウス15H3抗体の対応する位置のアミノ酸残基で占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28、H30、H72、H73、H75、H78、またはH93のうち少なくとも4つは、マウス15H3抗体の対応する位置のアミノ酸残基で占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28の少なくとも1つは、Sで占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28およびH30は、Sで占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28およびH30は、Sで占有され、位置H72は、DまたはQで占有され、位置H73は、TまたはKで占有され、位置H75は、TまたはSで占有され、位置H78は、VまたはAで占有され、93位は、AまたはVで占有される。任意選択でこれらの実施形態のいずれかでは、重鎖フレームワーク領域

10

20

30

40

50

中のアミノ酸残基の多くとも 10 個、多くとも 9 個、多くとも 8 個、多くとも 7 個、多くとも 6 個、または多くとも 5 個は、マウス 15H3 抗体の対応する位置のアミノ酸残基で占有される。任意選択で、これらの実施形態のいずれかで、重鎖可変領域の CDR は配列番号 1 のものであり、軽鎖可変領域の CDR は配列番号 2 のものである。任意選択で、これらの実施形態のいずれかでは、重鎖可変領域の CDR は実質的に配列番号 1 のものであり、軽鎖可変領域の CDR は実質的に配列番号 2 のものである。任意選択で、これらの実施形態のいずれかでは、重鎖可変領域の CDR は、配列番号 1 のものであり、軽鎖可変領域の CDR は配列番号 2 のものであり、各 CDR に 0、1、2 または 3 個の保存的アミノ酸置換を有する。

【0004】

10

本発明は、HB (配列番号 11)、HF (配列番号 12)、HG (配列番号 13)、HK (配列番号 14)、HL (配列番号 15)、HM (配列番号 16)、HN (配列番号 17)、HO (配列番号 18)、HQ (配列番号 19)、HR (配列番号 20)、HS (配列番号 21)、HT (配列番号 22)、または、HU (配列番号 23) と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および LA (配列番号 10)、LB (配列番号 24)、LC (配列番号 25)、LD (配列番号: 26)、LE (配列番号 27)、LF (配列番号 28) または LG (配列番号 29) と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変領域を含む抗体 (例えば、ヒト化抗体)、ならびにその任意の組合せ (すなわち、抗体は、重鎖可変領域の任意の 1 つと対をなす重鎖可変領域の任意の 1 つを含むことができる) を提供する。任意選択で、抗体は、HA、HB、HF、HG、HK、HL、HM、HN、HO、HQ、HR、HS、HT、HU と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および LA、LB、LC、LD、LE、LF または LG と少なくとも 95 % 同一の軽鎖可変領域、ならびにその任意の組合せ (すなわち、抗体は、軽鎖可変領域の任意の 1 つと対をなす重鎖可変領域の任意の 1 つを含むことができる) を含む。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置 H28、H30、H72、H73、H75、H78、または H93 のうち少なくとも 1 つは、マウス 15H3 抗体の対応する位置のアミノ酸残基で占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置 H28、H30、H72、H73、H75、H78、または H93 のうち少なくとも 2 つは、マウス 15H3 抗体の対応する位置のアミノ酸残基で占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置 H28 および H30 の少なくとも 1 つは、S で占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置 H28 および H30 は、S で占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置 H28 および H30 は、S で占有され、位置 H72 は、D または Q で占有され、位置 H73 は、T または K で占有され、位置 H75 は、T または S で占有され、位置 H78 は、V または A で占有され、93 位は、A または V で占有される。任意選択でこれらの実施形態のいずれかでは、重鎖フレームワーク領域中のアミノ酸残基の多くとも 10 個、多くとも 9 個、多くとも 8 個、多くとも 7 個、多くとも 6 個、または多くとも 5 個は、マウス 15H3 抗体の対応する位置のアミノ酸残基で占有される。任意選択で、これらの実施形態のいずれかでは、重鎖可変領域の CDR は配列番号 1 のものであり、軽鎖可変領域の CDR は配列番号 2 のものである。任意選択で、これらの実施形態のいずれかでは、重鎖可変領域の CDR は実質的に配列番号 1 のものであり、軽鎖可変領域の CDR は実質的に配列番号 2 のものである。任意選択で、これらの実施形態のいずれかでは、重鎖可変領域の CDR は、配列番号 1 のものであり、軽鎖可変領域の CDR は配列番号 2 のものであり、各 CDR に 0、1、2 または 3 個の保存的アミノ酸置換を有する。本明細書に記載される抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、任意選択で、シグナルペプチドに融合されている。典型的な重鎖マウスシグナルペプチドは、配列番号 33 に示され、典型的な重鎖ヒトシグナルペプチドは、配列番号 34 に示され、典型的な軽鎖マウスシグナルペプチドは、配列番号 35 に示され、典型的な軽鎖ヒトシグナルペプチドは、配列番号 36 に示される。

【0005】

20

30

40

本明細書に記載される抗体の重鎖可変領域は、重鎖定常領域と任意選択で融合され、軽

50

鎖可変領域は、軽鎖定常領域と任意選択で融合されている。重鎖定常領域は、天然のヒト定常領域であることができ、または天然のヒト定常領域の変異体形態、例えば、Fc ガンマ受容体に対する結合が天然のヒト定常領域と比較して減少したものであることができる。任意選択で、重鎖定常領域は、IgG1 アイソタイプである。任意選択で、重鎖定常領域は、配列番号 30 を含むアミノ酸配列を有し、軽鎖定常領域は、配列番号 31 を含むアミノ酸配列を有する。任意選択で、重鎖定常領域は、配列番号 32 を含むアミノ酸配列を有し、軽鎖定常領域は、配列番号 31 を含むアミノ酸配列を有する。任意選択で、抗体は、細胞毒性薬剤に結合体化されている（すなわち、抗体 - 薬物結合体）。本発明の特定の抗体は、ヒト ν 6 に対して 15H3 抗体のマウスバージョンより大きい親和性を有する。競合結合アッセイまたは飽和結合アッセイ（実施例に記載のものなど）で決定された通り、いくつかの他の抗体は、ヒト ν 6 に対して 15H3 抗体のマウスバージョンより多くて 10 倍低い、好ましくは多くて 6 倍低い、より好ましくはわずかに 5 倍低い、さらに好ましくはわずかに 2 倍低い親和性を有する。いくつかの態様では、本明細書に記載されるヒト化抗体は、ヒト ν 6 に対するマウス 15H3 抗体の親和性の約 10 倍以内、好ましくは約 5 倍以内、より好ましくは約 2 倍以内でヒト ν 6 に対する親和性を有する。いくつかの態様では、本明細書に記載されるヒト化抗体は、ヒト ν 6 に対して 0.1 nM ~ 10 nM、好ましくは 0.1 nM ~ 5 nM、より好ましくは 0.1 nM ~ 2 nM、0.5 nM ~ 2 nM または 0.5 nM ~ 1.5 nM の範囲内の見かけの解離定数（ k_d ）を有する。

【0006】

本明細書に記載されるアミノ酸配列を含む二重特異性モノクローナル抗体も提供される。

【0007】

本発明は、上記の抗体のいずれかの重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域をコードする核酸をさらに提供する。

【0008】

本発明は、患者に上記の通りの抗体の有効なレジメンを施すことを含む、がんの患者を処置する方法をさらに提供する。好ましくは、抗体は、細胞毒性薬剤に結合体化されている。がんは、 ν 6 抗原を発現するものである。任意選択で、がんは、膀胱がん、頭頸部がん（口唇、口腔、鼻腔、副鼻腔、咽頭および喉頭のがんを含む）、皮膚がん、肺がん、脾臓がん、子宮がん、乳がん（トリプルネガティブ乳がんを含む）、子宮頸がん、結腸がん、前立腺がん、卵巣がん（ovarian cancer）、胃がん、または肝がんである。任意選択で、がんは、扁平上皮癌または腺癌である。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

配列番号 1 に示される配列を含む重鎖可変領域および配列番号 2 に示される配列を含む軽鎖可変領域を含む、インテグリン ν 6 に特異的に結合する単離されたマウス 15H3 モノクローナル抗体、ならびにそのキメラ形態またはヒト化形態。

(項目 2)

配列番号 3 (CDR1)、配列番号 4 (CDR2)、および配列番号 5 (CDR3) に示される重鎖相補性決定領域 (CDR) 配列、ならびに配列番号 6 (CDR4)、配列番号 7 (CDR5)、および配列番号 8 (CDR6) に示される軽鎖 CDR 配列を含み、かつ各 CDR に 0、1、2 または 3 個の保存的アミノ酸置換を有する、インテグリン ν 6 に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

(項目 3)

インテグリン ν 6 に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体であって、前記抗体は、

HA (配列番号 9) と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域であって、ただし、重鎖可変フレームワーク領域に少なくとも 1 つのマウス 15H3 復帰変異があり、かつ前記抗体が配列番号 3 (CDR1)、配列番号 4 (CDR2)、および配列

10

20

30

40

50

番号 5 (C D R 3) に示される重鎖相補性決定領域 (C D R) 配列を含み、かつ各 C D R に 0 、 1 、 2 もしくは 3 個の保存的アミノ酸置換を有することを条件とする、重鎖可変領域を含むか、または

L A (配列番号 1 0) と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域であって、ただし、前記抗体が配列番号 6 (C D R 1) 、配列番号 7 (C D R 2) 、および配列番号 8 (C D R 3) に示される軽鎖相補性決定領域 (C D R) 配列を含み、かつ各 C D R に 0 、 1 、 2 もしくは 3 個の保存的アミノ酸置換を有することを条件とする、軽鎖可変領域を含む、

ヒト化モノクローナル抗体。

(項目 4)

10

配列番号 3 (C D R 1) 、配列番号 4 (C D R 2) 、および配列番号 5 (C D R 3) に示される重鎖相補性決定領域 (C D R) 配列、ならびに配列番号 6 (C D R 4) 、配列番号 7 (C D R 5) 、および配列番号 8 (C D R 6) に示される軽鎖 C D R 配列を含む、項目 2 または 3 に記載の抗体。

(項目 5)

20

H A (配列番号 9) と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域であって、ただし、重鎖可変フレームワーク領域に少なくとも 1 つのマウス 1 5 H 3 復帰変異があり、かつ前記抗体が配列番号 3 (C D R 1) 、配列番号 4 (C D R 2) 、および配列番号 5 (C D R 3) に示される重鎖相補性決定領域 (C D R) 配列を含み、かつ各 C D R に 0 、 1 、 2 または 3 個の保存的アミノ酸置換を有することを条件とする、重鎖可変領域を含み、かつ必要に応じて、

L A (配列番号 1 0) と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域であって、ただし、前記抗体が配列番号 6 (C D R 1) 、配列番号 7 (C D R 2) 、および配列番号 8 (C D R 3) に示される軽鎖相補性決定領域 (C D R) 配列を含み、かつ各 C D R に 0 、 1 、 2 または 3 個の保存的アミノ酸置換を有することを条件とする、軽鎖可変領域を含む、項目 2 に記載の抗体。

(項目 6)

30

配列番号 5 に示される重鎖 C D R 3 、配列番号 8 に示される軽鎖 C D R 3 を有し、かつ残りの C D R に 0 、 1 、 2 または 3 個の保存的アミノ酸置換を有する、項目 2 、 3 または 5 に記載の抗体。

(項目 7)

前記抗体がヒト化抗体であり、かつ前記重鎖可変フレームワーク領域に少なくとも 1 つのマウス 1 5 H 3 復帰変異がある、項目 5 または 6 に記載の抗体。

(項目 8)

前記重鎖可変フレームワーク領域に少なくとも 2 つのマウス 1 5 H 3 復帰変異がある、項目 7 に記載のヒト化抗体。

(項目 9)

H A の位置 H 2 8 および H 3 0 のうち少なくとも 1 つが S で占有され、ここで番号付けが K a b a t 番号付与法に従っている、項目 7 に記載のヒト化抗体。

(項目 1 0)

40

位置 H 2 8 と H 3 0 の両方とも S で占有されている、項目 9 に記載のヒト化抗体。

(項目 1 1)

位置 H 7 2 が、 D または Q で占有され、位置 H 7 3 が T または K で占有され、位置 H 7 5 が T または S で占有され、位置 H 7 8 が V または A で占有され、 9 3 位が A または V で占有されている、項目 1 0 に記載のヒト化抗体。

(項目 1 2)

位置 L 4 が、 M または L で占有され、位置 L 2 1 が I または L で占有され、位置 L 2 2 が S または F で占有され、位置 L 3 6 が F または L で占有され、位置 L 3 7 が Q または F で占有され、位置 L 4 5 が R または K で占有され、位置 L 6 3 が S または T で占有されていることを除いて、前記抗体が L A (配列番号) に示される配列を含む軽鎖可変領域を含

50

み、番号付けが K a b a t 番号付与法に従っている、上述の項目のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 13)

前記抗体がヒト化抗体であり、かつ前記重鎖可変領域が、H B (配列番号 11)、H T (配列番号 22)、H L (配列番号 15)、H U (配列番号 23)、H M (配列番号 16) または H N (配列番号 17) に示されるアミノ酸配列を有する、上述の項目のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 14)

前記軽鎖可変領域が、L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) または L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する、上述の項目のいずれかに記載の抗体。

10

(項目 15)

H B (配列番号 11) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するか；H T (配列番号 22) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するか；H L (配列番号 15) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するか；H U (配列番号 23) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するか；H N (配列番号 17) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するか、または H M (配列番号 16) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有するか、または H M (配列番号 16) に示されるアミノ酸配列を有する前記重鎖可変領域および L A (配列番号 10)、L B (配列番号 24)、L C (配列番号 25)、L D (配列番号 26)、L E (配列番号 27)、L F (配列番号 28) もしくは L G (配列番号 29) に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する、項目 11 に記載のヒト化抗体。

20

(項目 16)

抗原結合断片である、上述の項目のいずれかに記載の抗体。

(項目 17)

前記重鎖可変領域がヒト重鎖定常領域に融合され、かつ前記軽鎖可変領域がヒト軽鎖定常領域に融合されている、上述の項目のいずれか 1 項に記載の抗体。

30

(項目 18)

前記重鎖定常領域が、F c ガンマ受容体に対する結合が天然のヒト定常領域と比較して減少した天然のヒト定常領域の変異体形態である、項目 17 に記載の抗体。

(項目 19)

前記重鎖定常領域が、I g G 1 アイソタイプのものである、項目 17 に記載の抗体。

(項目 20)

細胞毒性薬剤に結合体化されている、上述の項目のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 21)

マウス 15 H 3 抗体と比較して、v 6 に対して 5 倍以内の親和性を有する、上述の項目のいずれかに記載の抗体。

50

(項目 2 2)

マウス 1 5 H 3 抗体と比較して、 ν 6 に対して 2 倍以内の親和性を有する、上述の項目のいずれかに記載の抗体。

(項目 2 3)

ν 6 に対して 0 . 1 nM ~ 5 nM の範囲内の見かけの解離定数 (k_d) を有する、上述の項目のいずれかに記載の抗体。

(項目 2 4)

ν 6 に対して 0 . 1 nM ~ 2 nM の範囲内の見かけの解離定数 (k_d) を有する、上述の項目のいずれかに記載の抗体。

(項目 2 5)

ν 6 に対して 0 . 5 nM ~ 1 . 5 nM の範囲内の見かけの解離定数 (k_d) を有する、上述の項目のいずれかに記載の抗体。

10

(項目 2 6)

前記抗体が、マウス 1 5 H 3 抗体のキメラ形態であり、かつヒト重鎖定常領域に融合している配列番号 1 に示される配列を含む前記重鎖可変領域、およびヒト軽鎖定常領域に融合している配列番号 2 に示される配列を含む前記軽鎖可変領域を含む、項目 1 に記載の抗体。

(項目 2 7)

精製されたものである、上述の項目のいずれかに記載の抗体。

(項目 2 8)

上述の項目のいずれかによって定義される、重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域をコードする単離された核酸。

20

(項目 2 9)

がんを有する患者を処置する方法であって、前記患者に、上述の項目のいずれか 1 項に記載の抗体の有効なレジメンを施すことを含み、前記抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体またはヒト化抗体である、方法。

(項目 3 0)

前記がんが、膀胱がん、頭頸部がん、皮膚がん、肺がん、膵臓がん、子宮がん、乳がん、結腸がん、前立腺がん、卵巣がん、ならびに胃がんである、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

30

前記がんが、扁平上皮癌または腺癌である、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 2)

上述の項目のいずれかに記載の抗体を含む医薬組成物であって、前記抗体が、キメラ抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体である、医薬組成物。

【図面の簡単な説明】

【0 0 0 9】

【図 1】図 1 は、マウス親 m A b (1 5 H 3 と称する) のアミノ酸配列と、選択されたヒト化 1 5 H 3 重鎖可変 (上 2 段のパネル) および軽鎖可変 (下 2 段のパネル) 領域との整列を示す図である。

【図 2】図 2 は、ヒト ν 6 を発現している 2 9 3 F 細胞における、HB 重鎖を有する抗体とマウス親抗体 (m 1 5 H 3 と称する) との競合結合研究の結果を示す図である。

40

【図 3】図 3 A ~ C は、 ν 6 を発現している 2 9 3 F 細胞および F D C - P 1 細胞に対する抗体 H B L C および H T L C の飽和結合研究の結果を示す図である。

【図 4】図 4 は、 ν 6 を発現している 2 9 3 F 細胞における、HB、HL および HN 重鎖を有する抗体とマウス親抗体 (m 1 5 H 3 と称する) との競合結合研究の結果を示す図である。

【図 5】図 5 は、 ν 6 を発現している 2 9 3 F 細胞における、HB、HQ および HR 重鎖を有する抗体とマウス親抗体 (m 1 5 H 3 と称する) との競合結合研究の結果を示す図である。

【図 6】図 6 は、 ν 6 を発現している 2 9 3 F 紹胞における、HM 重鎖を有する抗体

50

とマウス親抗体 (m15H3と称する)との競合結合研究の結果を示す図である。

【図7】図7は、v6を発現している293F細胞における、HB、HL、HS、HTおよびHU重鎖を有する抗体とマウス親抗体 (m15H3と称する)との競合結合研究の結果を示す図である。

【図8】図8は、Tumor Micro Arrayの膀胱がん試料に対するIHCによるv6タンパク質発現の分析を示す図である。

【図9-1】図9A～9Fは、細胞毒性アッセイにおいて親マウスと同様に作用するヒト化15H3抗v6ADCを示す図である。

【図9-2】図9A～9Fは、細胞毒性アッセイにおいて親マウスと同様に作用するヒト化15H3抗v6ADCを示す図である。

【図9-3】図9A～9Fは、細胞毒性アッセイにおいて親マウスと同様に作用するヒト化15H3抗v6ADCを示す図である。

【図10】図10は、ヌードマウスにおけるDetroit562頭頸部がん細胞系の異種移植研究の結果を示す図である。用量は、図に示される。最初の投与は、腫瘍がおよそ100mm³に達したときであった。

【図11】図11は、ヌードマウスにおけるHPAFII脾臓がん細胞系の異種移植研究の結果を示す図である。投与の用量および時間は、図に示される。

【図12】図12は、ヌードマウスにおけるBxPC-3脾臓がん細胞系の異種移植研究の結果を示す図である。投与の用量および時間は、図に示される。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、とりわけ、v6に特異的に結合するモノクローナル抗体およびその結合体を提供する。本抗体は、v6発現に付随する状態(様々ながんを含む)の処置および診断、ならびにv6の検出に有用である。v6に特異的に結合する抗体は、6インテグリンサブユニット単体および/またはv6インテグリン複合体に特異的に結合するが、vサブユニット単体には結合しない。

【0011】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定、分離および/もしくは回収された抗体ならびに/または組換え的に生成される抗体のことを指す。「精製された抗体」とは、通常、その產生または精製により生じる干渉タンパク質および他の夾雑物から少なくとも50%w/w高純度である抗体のことであるが、その抗体が、その使用を容易にする目的で、過剰の薬学的に許容される担体(複数可)または他の媒体と組み合わされる可能性を除外しない。干渉タンパク質および他の夾雑物には、例えば、抗体が単離または組換え的に生成される細胞の細胞成分が含まれ得る。時には、抗体は、產生または精製由來の干渉タンパク質および夾雑物から少なくとも60%、70%、80%、90%、95または99%w/w高純度である。本明細書に記載される抗体は、マウス、キメラ、ヒト化、およびヒト抗体を含めて、単離および/または精製された形態で提供することができる。

【0012】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体のことを指し、すなわち、少量存在する可能性がある、考え得る天然に存在する変異を除いて、その集団を含む個々の抗体は同一である。修飾語句「モノクローナル」とは、実質的に均質な抗体の集団から得られるままの抗体の性質を示し、何かしら特定の方法による抗体の產生を必要とするものと解釈されるべきでない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら(1975年)Nature 256巻:495頁によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製されても、または組換えDNA法(例えば、米国特許第4816567号を参照のこと)によって作製されてもよい。「モノクローナル抗体」は、例えば、Clacksonら(1991年)Nature、352巻:624～628頁およびMarksら(1991年)J. Mol. Biol.、222巻:581～597頁に記載される技術を使用するフー

10

20

30

40

50

ジ抗体ライブラリから単離されてもよく、または他の方法によって作製されてもよい。本明細書に記載される抗体は、モノクローナル抗体である。

【0013】

その標的抗原に対するモノクローナル抗体の特異的結合は、少なくとも 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、または $10^{10} M^{-1}$ の親和性を意味し、大きさは検出可能なほど高く、少なくとも1つの無関係な標的に対して起こる非特異的結合と区別できる。非特異的な結合が通常ファンデルワールス力の結果であるのに対して、特異的結合は特定の官能基間のまたは特定の空間嵌合（例えば、鍵と鍵穴タイプ）の結合の形成の結果であり得る。抗体は、例えば、ウェスタンプロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、または免疫沈降アッセイなどの技術を使用する競合および非競合イムノアッセイ系など公知の方法によって、 v_6 に対する特異的結合をアッセイすることができる。10

【0014】

完全な抗体の基本的な抗体構造単位は、サブユニットの四量体である。各四量体は、ボリペプチド鎖の同一の対を2つ含み、各対は1本の「軽」鎖（約25kDa）と1本の「重」鎖（約50～70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識を担う約100～110個以上のアミノ酸の可変領域を含む。この可変領域は、最初に、切断可能なシグナルペプチドに連結されて発現される。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定する。20

【0015】

軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロンに分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEと規定する。軽鎖および重鎖において、可変および定常領域は約12個以上のアミノ酸の「J」領域により接合され、重鎖は約10個以上のアミノ酸の「D」領域も含む（一般に、Fundamental Immunology（Paul, W.編、第2版、第7章 Raven Press, N.Y.、1989年を参照のこと、全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれる）。

【0016】

各軽鎖／重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。したがって、完全な抗体は、2つの結合部位を有する。二官能性、二重特異性抗体を除いて、2つの結合部位は同じである。鎖は全て、3つの超可変領域、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる、によって接合される比較的保存されているフレームワーク領域（FR）の同じ全体構造を呈する。各対の2本の鎖からなるCDRは、フレームワーク領域によって整列され、特異的エピトープに結合可能になる。N末端からC末端へと、軽鎖と重鎖の両方が、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。各ドメインに対するアミノ酸の割当ては、Kabatの定義、Sequences of Proteins of Immunological Interest（National Institutes of Health, Bethesda, MD、1987年および1991年）、またはChothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196卷：901～917頁（1987年）；Chothiaら、Nature 342卷：878～883頁（1989年）に従う。Kabatは、広く使用されている番号付与法（Kabat番号付け）も提供し、この方法において異なる重鎖の間または異なる軽鎖の間で対応する残基には同じ番号が割り当てられる。3040

【0017】

用語「抗体」とは、完全な抗体およびその抗原結合性断片を含む。通常、抗体断片は、完全抗体と競合し、それら断片は、標的に対して特異的に結合するように完全抗体から得られ、別々の重鎖、軽鎖、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)c、ダイアボディ、Dab、ナノボディ、およびFvを含む。断片は、組換えDNA技術によって、または完全な免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的分離によって生成することができる。用語「抗体」とは、ダイアボディ（ホモ二量体Fv断片）またはミニボディ（V_L-V_H50

- C_H3)、二重特異性抗体なども含む。二重特異性または二官能性抗体は人工的な雑種抗体であり、2つの異なる重鎖/軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する(例えば、Song s i v i l a i および L a c h m a n n 、 C l i n . E x p . I m m u n o l . 7 9 卷 : 3 1 5 ~ 3 2 1 頁 (1 9 9 0 年) ; K o s t e l n y ら、 J . I m m u n o l . 1 4 8 卷 : 1 5 4 7 ~ 5 3 頁 (1 9 9 2 年) を参照のこと)。用語「抗体」とは、抗体自体(裸の抗体)または細胞毒性薬剤に結合体化されている抗体を含む。

【 0 0 1 8 】

用語「エピトープ」とは、抗体が結合する抗原上の部位のことを指す。エピトープは、連続するアミノ酸または1つもしくは複数のタンパク質の三次折りたたみによって近くに置かれる不連続なアミノ酸から形成され得る。三次折りたたみによって形成されるエピトープが変性溶剤を用いる処理で通常失われるのに対して、連続するアミノ酸から形成されるエピトープは変性溶剤への曝露に対して通常保持される。エピトープは、通常、少なくとも3個、より通常には、少なくとも5個または8~10個のアミノ酸を固有の空間配置に含む。エピトープの空間配置を決定する方法には、例えば、X線結晶学および二次元核磁気共鳴がある。例えば、Methods in Molecular Biology、第66巻、Glenn E. Morris編(1996年)のEpitope Mapping Protocolsを参照のこと。

【 0 0 1 9 】

同じまたは重なり合うエピトープを認識する抗体は、標的抗原に対して1つの抗体が別の抗体の結合と競合する能力を示す簡単なイムノアッセイで同定できる。その抗原に結合している抗体のX線結晶学によって抗体のエピトープを定義して、接触残基を同定することもできる。別法として、一方の抗体の結合を減少または消失させる抗原中のアミノ酸変異の全てが他方の結合を減少または消失させる場合、2つの抗体は同じエピトープを有する。一方の抗体の結合を減少または消失させるアミノ酸変異のいくつかが他方の結合を減少または消失させる場合、2つの抗体は重なり合うエピトープを有する。

【 0 0 2 0 】

抗体間の競合は、被験抗体が、共通の抗原に対する参照抗体の特異的結合を阻害するアッセイによって決定される(例えば、Jung h a n s ら、Cancer Res. 50巻: 1 4 9 5 頁、1 9 9 0 年 を参考のこと)。過剰の試験抗体(例えば、少なくとも2×、5×、10×、20×または100×)が、競合結合アッセイにおいて測定される通り少なくとも50%、しかし好ましくは75%、90%または99%まで参照抗体の結合を阻害する場合、試験抗体は参照抗体と競合している。競合アッセイによって同定される抗体(競合抗体)は、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体、および参照抗体が結合しているエピトープと十分に近い隣接するエピトープに結合して立体障害を起こす抗体を含む。

【 0 0 2 1 】

用語「患者」は、いずれかの治療的処置を受けるヒトおよび他の哺乳動物対象を含む。

【 0 0 2 2 】

用語「処置」または「処置する」とは、任意の臨床段階で、v 6を発現しているがんの臨床または診断症状が発症した後に、対象に抗 v 6抗体または抗体-薬物結合体を投与することにより、疾患の臨床または診断症状を低減または消失させることによって証明されるように、患者において v 6を発現しているがんの進行を減速、停止、または退行させることを指す。処置は、例えば、症状の重症度、症状の数、または再発の頻度の低減を含み得る。

【 0 0 2 3 】

アミノ酸置換を保存的または非保存的に分類するために、以下のアミノ酸置換を保存的置換とみなす:トレオニン、アラニン、またはアスパラギンによって置換されるセリン;プロリンまたはセリンによって置換されるトレオニン;アスパラギン酸、ヒスチジン、またはセリンによって置換されるアスパラギン;グルタミン酸またはアスパラギンによって置換されるアスパラギン酸;グルタミン、リシン、またはアスパラギン酸によって置換さ

10

20

30

40

50

れるグルタミン酸；アルギニン、リシン、またはグルタミン酸によって置換されるグルタミン；チロシンまたはアスパラギンによって置換されるヒスチジン；リシンまたはグルタミンによって置換されるアルギニン；イソロイシン、ロイシンまたはバリンによって置換されるメチオニン；ロイシン、バリン、またはメチオニンによって置換されるイソロイシン；バリン、イソロイシン、またはメチオニンによって置換されるロイシン；チロシンまたはトリプトファンによって置換されるフェニルアラニン；トリプトファン、ヒスチジン、またはフェニルアラニンによって置換されるチロシン；トレオニンによって置換されるプロリン；セリンによって置換されるアラニン；グルタミン酸、グルタミン、またはアルギニンによって置換されるリシン；メチオニン、イソロイシン、またはロイシンによって置換されるバリン；およびフェニルアラニンまたはチロシンによって置換されるトリプトファン。

【0024】

パーセンテージ配列同一性は、Kabat番号付与法によって最大限に整列される抗体配列を用いて決定される。整列させた後、対象の抗体領域（例えば、重鎖または軽鎖の可変領域全体）が参照抗体の同じ領域と比較される場合、対象と参照抗体領域とのパーセンテージ配列同一性は、対象と参照抗体領域の両方において同じアミノ酸で占有されている位置の数を、ギャップを算入しない2つの領域の整列された位置の合計数で割り、100を掛けてパーセンテージに変換したものである。

【0025】

値の範囲の指定は、範囲内のまたは範囲を定義する全ての整数を含む。

【0026】

抗体エフェクター機能とは、IgのFcドメイン（複数可）によって付与される機能のことを指す。そのような機能は、例えば、抗体依存性細胞性細胞毒性、抗体依存性細胞食作用または補体依存性細胞傷害であり得る。そのような機能は、例えば、食作用もしくは溶解活性を持つ免疫細胞上のFc受容体に対するFcエフェクタードメイン（複数可）の結合によって、または補体系成分に対するFcエフェクタードメイン（複数可）の結合によって遂行され得る。通常、Fc-結合細胞または補体成分によって媒介される効果（複数可）は、v6標的細胞の阻害および/または枯渇をもたらす。抗体のFc領域は、Fc受容体（FcR）を発現している細胞を集めることができ、抗体被覆標的細胞を近くに置くことができる。Fc R III (CD16)、Fc R II (CD32)およびFc RI (CD64)を含めて、IgGに対する表面FcRを発現している細胞はエフェクター細胞として作用して、IgG被覆細胞を破壊することができる。そのようなエフェクター細胞は、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球および好酸球を含む。IgGによるFc Rの係合は、抗体依存性細胞性細胞毒性（ADCC）または抗体依存性細胞食作用（ADCP）を活性化する。ADCCは、膜細孔形成タンパク質およびプロテアーゼの分泌によりCD16⁺エフェクター細胞に媒介され、一方で、食作用は、CD32⁺およびCD64⁺エフェクター細胞に媒介される（Fundamental Immunology、第4版、Paul編、Lippincott-Raven、N.Y.、1997年、第3章、17頁および30頁；Uchidaら、2004年、J. Exp. Med. 199卷：1659～69頁；Akewanlopら、2001年、Cancer Res. 61卷：4061～65頁；Watanabeら、1999年、Breast Cancer Res. Treat. 53卷：199～207頁を参照のこと）。ADCCおよびADCPに加えて、細胞結合抗体のFc領域は補体古典経路を活性化して、補体依存性細胞傷害（CDC）を誘発することもできる。抗体のFc領域が抗原と複合体形成するとき、補体系のC1qがその領域に結合する。細胞結合抗体に対するC1qの結合は、C4およびC2のタンパク質分解活性化に関わる事象のカスケードを開始して、C3転換酵素を生成することができる。C3転換酵素によるC3のC3bへの切断により、C5b、C6、C7、C8およびC9を含めた終末補体成分の活性化が可能になる。併せて、これらのタンパク質は抗体被覆細胞上に膜侵襲複合体細孔を形成する。これらの細孔は、細胞膜の健全性を損ない、標的細胞を殺す（Immun

10

20

30

40

50

obiology、第6版、Janewayら、Garland Science、N.Y.、2005年、第2章を参照のこと)。

【0027】

用語「抗体依存性細胞性細胞毒性」またはADCとは、溶解活性を持っている免疫細胞(エフェクター細胞とも称する)と抗体被覆標的細胞との相互作用に依存する細胞死を誘導する機序のことである。そのようなエフェクター細胞は、ナチュラルキラー細胞、単球/マクロファージおよび好中球を含む。エフェクター細胞は、それらの抗原結合部位を介して標的細胞に結合しているIgのFcエフェクタードメイン(複数可)に付着する。抗体被覆標的細胞の死は、エフェクター細胞活性の結果として起こる。

【0028】

用語「抗体依存性細胞貪食作用」またはADCPとは、IgのFcエフェクタードメイン(複数可)に結合する食細胞性免疫細胞(例えば、マクロファージ、好中球および樹状細胞)によって、抗体被覆細胞が、全部または一部、内部移行される過程のことを指す。

【0029】

用語「補体依存性細胞傷害」またはCDCとは、細胞死を誘導する機序のことを指し、この機序において、標的に結合している抗体のFcエフェクタードメイン(複数可)は、標的細胞膜における穴の形成に至る一連の酵素反応を活性化する。通常、抗体被覆標的細胞などにある抗原抗体複合体は、補体成分C1qに結合し、活性化し、次に補体カスケードを活性化して標的細胞死をもたらす。補体の活性化により、白血球上の補体受容体(例えば、CR3)に結合することによりADCが助長される、標的細胞表面への補体成分の堆積が起こる場合もある。

【0030】

「細胞障害性効果」とは、標的細胞の枯渇、消失および/または致死のことを指す。「細胞増殖抑制効果」とは、細胞増殖の阻害のことを指す。本明細書で使用される「細胞毒性薬剤」とは、細胞に対して細胞障害性および/または細胞増殖抑制効果を有する薬剤のことを指す。細胞毒性薬剤は、抗体に結合体化することも抗体と組み合わせて投与することもできる。

【0031】

用語「薬学的に許容される」とは、動物、より具体的にはヒトでの使用について、連邦もしくは州政府の監督官庁によって承認されているもしくは承認できる、または米国薬局方もしくは他の一般に認識されている薬局方に列挙されていることを意味する。用語「薬学的に適合する原料」とは、薬学的に許容される希釈剤、アジュバント、賦形剤、または抗v6抗体を送達する媒体のことを指す。

【0032】

語句「薬学的に許容される塩」とは、抗v6抗体もしくはその結合体または抗v6抗体と一緒に投与される薬剤の、薬学的に許容される有機または無機塩のことを指す。典型的な塩には、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物塩、臭化物塩、ヨウ化物塩、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、過リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチジン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、糖酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、pトルエンスルホン酸塩、およびバモン酸塩(すなわち、1,1'メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ3ナフト酸)塩)がある。薬学的に許容される塩は、酢酸イオン、コハク酸イオンまたは他の対イオンなど別の分子の包含に関わってもよい。対イオンは、親化合物の電荷を安定化する任意の有機または無機部分でもよい。さらに、薬学的に許容される塩は、その構造内に1つ以上の荷電原子を有してもよい。複数の荷電原子が薬学的に許容される塩の一部である実例は、複数の対イオンを有することができる。したがって、薬学的に許容される塩は、1つもしくは複数の荷電原子および/または1つもしくは複数の対イオンを有することができる。

10

20

30

40

50

【0033】

文脈から特に明らかでない限り、用語「約」は、表示値の標準偏差の範囲内にある値を包含する。

【0034】

I. 標的分子

特に明記しない限り、 v_6 は、ヒト v_6 を意味する。典型的な v_6 ヒト配列は、GenBank受託番号AAA36122に指定される。典型的な v ヒト配列は、NCBI NP_002201.1に指定される。

【0035】

II. 本発明の抗体

10

A. 結合特異性および機能特性

本発明は、マウス15H3抗体ならびにキメラ、ヒト化、およびヒト15H3抗体を提供する。

【0036】

ヒト v_6 に対する本発明の抗体（例えば、マウス15H3抗体のキメラ形態、ヒト化形態およびヒト形態）の親和性は、好ましくはヒト v_6 に対するマウス15H3抗体の親和性と同等かヒト v_6 に対するマウス15H3抗体の親和性より大きい、またはヒト v_6 に対するマウス抗体15H3の親和性に対して倍率10以内、倍率5以内、倍率2以内で弱くなっている、例えば、ヒト v_6 に対するマウス15H3抗体の親和性より好ましくは10分の1以上弱い、より好ましくは5分の1以上弱い、さらにより好ましくは2分の1以上弱い。標的抗原に対する抗体の親和性を測定する一方は、抗体の見かけの解離定数を決定することによる。本発明は、ヒト v_6 に対して、マウス15H3と基本的に同じ（すなわち、実験誤差範囲内）見かけの解離定数を有する抗体（例えば、マウス15H3抗体のキメラ形態、ヒト化形態およびヒト形態）およびマウス抗体15H3より低いまたは高い解離定数を有する抗体を包含する。いくつかの実施形態では、本発明の抗体（例えば、マウス15H3抗体のキメラ形態、ヒト化形態およびヒト形態）は、ヒト v_6 に対するマウス15H3抗体の見かけの解離定数の0.1~10倍の範囲、好ましくは0.1~5倍、0.1~2倍、またはさらに0.5~2倍の範囲内のある見かけの解離定数を有する。いくつかの態様では、ヒト v_6 に対する抗体の見かけの解離定数（ k_d ）は、好ましくは0.1nM~5nMの範囲、さらにより好ましくは0.1nM~5nMの範囲、さらに好ましくは0.1nM~2nMまたは0.5nM~1.5nMの範囲内にある。マウス15H3抗体がそうであるように、キメラ、ヒト化およびヒト15H3抗体は、天然形態および/またはCHO細胞から組換え的に発現されたヒト v_6 に特異的に結合する。通常、キメラ、ヒト化およびヒト15H3抗 v_6 抗体は、ヒト v_6 に対する結合についてマウス15H3と競合する。

20

【0037】

動物モデルまたは臨床試験において、好ましい抗体は、培養増殖しているがん性細胞で示される様にがん（例えば、細胞の増殖、転移および/または生物に対する致死性）を単独で（すなわち、裸の抗体として）または細胞毒性薬剤に結合体化されて、阻害する。動物モデルは、適当な免疫不全げっ歯類株、例えば、無胸腺ヌードマウスまたはSCIDマウスに v_6 を発現しているヒト腫瘍細胞系を移植することによって形成することができる。これらの腫瘍細胞系は、皮下注射による固形腫瘍または静脈内注射による播種性腫瘍のいずれかとして免疫不全げっ歯類宿主において樹立できる。一旦宿主内に樹立されたら、実施例に記載の通りこれらの腫瘍モデルを適用して、抗 v_6 抗体またはその結合体化形態の治療効果を評価できる。

30

【0038】

B. 抗体

40

ヒト化抗体は、非ヒト「ドナー」抗体由来CDRがヒト「アクセプタ」抗体配列に移植されている遺伝子工学によって作られた抗体である（例えば、Queen、USS5, 530, 101および5, 585, 089；Winter、USS5, 225, 539；Car

50

ter、U S 6, 4 0 7, 2 1 3; Adair、U S 5, 8 5 9, 2 0 5; ならびに F o o t e、U S 6, 8 8 1, 5 5 7 を参照のこと)。アクセプタ抗体配列は、例えば、ヒト抗体配列、そのような配列の複合物、ヒト抗体配列の共通配列、または生殖細胞系領域配列であり得る。重鎖に好ましいアクセプタ配列は、生殖細胞系 V_H エクソン V_H 1 - 4 6 および、 J エクソン (J_H) には、エクソン J_H - 4 である。軽鎖の場合、好ましいアクセプタ配列は、エクソン V_K 2 - 3 0 (文献において K_V 2 - 3 0 とも記載される)、および J エクソンには J - 2 である。重鎖に好ましい代わりのアクセプタ配列には、 J エクソン (J_H)、 J_H - 1、 J_H - 2、 J_H - 3、 J_H - 4、または J_H - 5 を伴う生殖細胞系 V_H エクソン V_H 1 - 8 または V_H 1 - 3 がある。軽鎖に好ましい代わりのアクセプタ配列には、 J エクソン J - 1、 J - 2、 J - 3、 J - 4、または J - 5 を伴うエクソン V_K 2 - 2 9 (文献において K_V 2 - 3 0 とも記載される) がある。したがって、ヒト化抗体は、完全にまたは実質的に非ヒトドナー抗体および可変領域フレームワーク配列に由来するいくつかのまたは全ての C D R、ならびに存在する場合には、完全にまたは実質的にヒト抗体配列に由来する定常領域を有する抗体である。同様に、ヒト化重鎖は、完全にまたは実質的にドナー抗体重鎖、および重鎖可変領域フレームワーク配列に由来する少なくとも 1 つ、2 つ、通常は 3 つ全ての C D R、ならびに存在する場合には、実質的にヒト重鎖可変領域フレームワークおよび定常領域配列に由来する重鎖定常領域を有する。同様に、ヒト化軽鎖は、完全にまたは実質的にドナー抗体軽鎖、および軽鎖可変領域フレームワーク配列に由来する少なくとも 1 つ、2 つ、通常は 3 つ全ての C D R、ならびに存在する場合には、実質的にヒト軽鎖可変領域フレームワークおよび定常領域配列に由来する軽鎖定常領域を有する。いくつかの態様では、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖とヒト化軽鎖を含む。それぞれの C D R の間で対応する残基の少なくとも 6 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % または 1 0 0 % (K a b a t で定義される) が同一である場合、ヒト化またはヒト抗体の C D R は、非ヒト抗体の対応する C D R に実質的に由来するまたは実質的に同一である。いくつかの実施形態では、各 C D R にある保存的アミノ酸置換が 3 個以下である場合、ヒト化抗体またはヒト抗体の C D R は、非ヒト抗体の対応する C D R に実質的に由来するまたは実質的に同一である。K a b a t で定義される対応する残基の少なくとも 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % または 1 0 0 % が同一である場合、抗体鎖の可変領域フレームワーク配列または抗体鎖の定常領域は、それぞれヒト可変領域フレームワーク配列またはヒト定常領域に実質的に由来する。本発明のいくつかのヒト化抗体において、抗体の重鎖可変フレームワーク領域に少なくとも 1 つのマウス 1 5 H 3 復帰変異がある。
10
20
30
30

【0039】

ヒト化抗体は、マウス抗体由来の 6 つの C D R (好ましくは K a b a t で定義される) 全てをしばしば組み込むが、マウス抗体由来 C D R の全てではない C D R (例えば、少なくとも 3、4 または 5 つ) で作製することもできる (例えば、P a s c a l i s ら、J. Immunol. 169巻: 3076 頁、2002 年; V a j d o s ら、Journal of Molecular Biology, 320巻: 415 ~ 428 頁、2002 年; I w a h a s h i ら、Mol. Immunol. 36巻: 1079 ~ 1091 頁、1999 年; T a m u r a ら、Journal of Immunology, 164巻: 1432 ~ 1441 頁、2000 年)。
40

【0040】

C D R 配置および / または抗原への結合に対するそれらの考え得る影響に基づいて、ヒト可変領域フレームワーク残基の特定のアミノ酸を置換に選ぶことができる。そのような考え得る影響についての調査は、モデリング、特定の場所でのアミノ酸の特性の検討、または特定のアミノ酸の置換もしくは変異誘発の効果の経験的な観察によるものである。

【0041】

例えば、マウス可変領域フレームワーク残基と選択されたヒト可変領域フレームワーク残基の間でアミノ酸が異なる場合、そのアミノ酸が

(1) 非共有結合的に抗原に直接結合する、

(2) CDR領域に隣接している、

(3) さもなければCDR領域と相互作用する(例えば、CDR領域から約6以内である)、または

(4) 重鎖と軽鎖との相互作用を媒介する

ことが合理的に期待されれば、ヒトフレームワークアミノ酸をマウス抗体由来の同等のフレームワークアミノ酸で置換することができる。

【0042】

15H3抗体はマウス抗体として同定されたが、本出願は、ヒト15H3抗体も包含する。用語「ヒト15H3抗体」は、ヒト免疫グロブリン遺伝子配列から得られ、マウス15H3抗体と実質的に同一のCDRを有し、類似の性質、すなわち、v6に対する結合特異性を示す抗体を意味する。いくつかの態様では、ヒト15H3抗体は、本明細書に記載される重鎖可変領域と実質的に同一である重鎖可変領域および/または本明細書に記載される軽鎖可変領域と実質的に同一である軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、本発明の15H3抗体はヒト抗体ではない、例えば、本発明の15H3抗体はマウス、キメラ、またはヒト化抗体である。

【0043】

本発明は、重鎖可変領域がHA(配列番号9)と少なくとも90%の同一性を示し、軽鎖可変領域がLA(配列番号10)と少なくとも90%同一性を示す15H3抗体を提供する。いくつかの態様では、抗体はヒト化抗体であり、重鎖可変フレームワーク領域に少なくとも1つのマウス15H3復帰変異がある。加えて、本発明は、ヒト化重鎖可変領域が配列番号11~23と少なくとも90%、95%または99%の配列同一性を示し、ヒト化軽鎖可変領域が配列番号10および24~29と少なくとも90%、95%または99%の配列同一性を示す15H3抗体(およびその任意の組合せ)を提供する。本発明は、重鎖可変領域が配列番号11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示し、ヒト化軽鎖可変領域が配列番号10と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示す抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、重鎖可変領域が配列番号11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示し、軽鎖可変領域が配列番号24と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示す抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、重鎖可変領域が配列番号11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示し、軽鎖可変領域が配列番号25と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示す抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、重鎖可変領域が配列番号11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示し、軽鎖可変領域が配列番号26と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示す抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、重鎖可変領域が配列番号11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示し、軽鎖可変領域が配列番号27と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示す抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、重鎖可変領域が配列番号11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示し、軽鎖可変領域が配列番号28と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示す抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、重鎖可変領域が配列番号11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示し、軽鎖可変領域が配列番号29と少なくとも90%、95%もしくは99%または100%の配列同一性を示す抗体を提供する。

しくは99%または100%の配列同一性を示す抗体を提供する。いくつかの態様では、これらの抗体はヒト化抗体であり、それぞれの抗体中の復帰変異のいくつかまたは全てが保持されている。換言すれば、そのような抗体において、好ましくは、位置H28、H30、H72、H73、H75、H78、またはH93の少なくとも1つは、マウス15H3抗体の対応する位置のアミノ酸で占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28およびH30の少なくとも1つは、Sで占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28およびH30は、Sで占有される。任意選択で、そのような抗体のいずれかにおいて、位置H28およびH30は、Sで占有され、位置H72は、DまたはQで占有され、位置H73は、TまたはKで占有され、位置H75は、TまたはSで占有され、位置H78は、VまたはAで占有され、93位は、AまたはVで占有される。好ましくは、例えば、重鎖可変領域が配列番号11～23と少なくとも90%、95%または99%の配列同一性を示し、軽鎖可変領域が配列番号10および24～29と少なくとも90%、95%または99%の配列同一性を示す15H3ヒト化抗体について記載される抗体のいずれかにおいて、そのCDR領域は、マウスドナー抗体、すなわち、マウス15H3抗体（配列番号3～8）のCDR領域と同一である、または実質的に同一である。CDR領域は、Kabatで定義される。本発明の抗体には、抗体HBLA、HBLB、HBLC、HBLD、HBLE、HBLF、HBLG、HLLA、HLLB、HLLC、HLLD、HLLE、HLLF、HLLG、HMLA、HMLB、HMLC、HMLD、HMLE、HMLF、HMLG、HNLA、HNLB、HNLC、HNLD、HNLE、HNLF、HNLG、HRLA、HRLB、HRLC、HRLD、HRLE、HRLF、HRLG、HSLA、HSLB、HSLC、HSLD、HSEL、HSLF、HSLG、HTLA、HTLB、HTLC、HTLD、HTLE、HTLF、HTLG、HULA、HULB、HULC、HULD、HULE、HULF、およびHULGがある。

【0044】

別の考え得る変形は、CDR中の特定の残基をヒトCDR配列、通常は実証されたヒト化抗体の設計に使用されるヒトアクセプタ配列のCDR、の対応する残基と置換することである。いくつかの抗体において、CDRの一部、すなわち結合に必要とされるCDR残基のサブセット、SDRと称する、だけがヒト化抗体において結合を保持するのに必要である。抗原と接触しておらずSDRの中にはないCDR残基は、過去の研究（例えばCDR

H2の残基H60～H65は、しばしば必要とされない）に基づいて、Chothia超可変ループ（Chothia、J. Mol. Biol. 196卷：901頁、1987年）の外側にあるKabat CDRの領域から、分子モデリングおよび/もしくは経験によって、またはGonzalesら、Mol. Immunol. 41卷：863頁（2004年）に記載の通りに同定することができる。そのようなヒト化抗体の1つもしくは複数のドナーCDR残基が存在していないかまたはドナーCDR全体が除外されている位置において、その位置を占有しているアミノ酸は、アクセプタ抗体配列または保存的置換において対応する位置（Kabat番号付けによる）を占有しているアミノ酸であることができる。含められる、CDR中のドナーアミノ酸に対するアクセプタのそのような置換の数は、競合要件のバランスを反映している。そのような置換は、ヒト化抗体におけるマウスアミノ酸の数を低減し、結果的に潜在的免疫原性を低減させる際に潜在的に有利である。

【0045】

本明細書の好ましい実施形態では、ヒト化およびヒト15H3抗体のCDR領域は、マウス15H3抗体（配列番号3～8）のCDR領域と同一である、または実質的に同一である。本明細書に記載される抗体のいずれかにおいて、CDR領域は、0、1、2または3個の保存的アミノ酸置換を有するマウス15H3抗体（すなわち、配列番号3～8）のものであり得る。本明細書に記載される抗体のいずれかにおいて、CDR領域は、各CDRに0、1、2または3個の保存的アミノ酸置換を有するマウス15H3抗体（すなわち、配列番号3～8）のものであり得る。本明細書に記載される抗体のいずれかにおいて、

CDR領域は、重鎖のCDR1およびCDR2ならびに軽鎖のCDR1、CDR2および任意選択でCDR3に0、1、2または3個の保存的アミノ酸置換を有するマウス15H3抗体（すなわち、配列番号3～8）のものであり得る。分子モデリングおよび経験的推論により、本明細書に記載される抗体のいずれかにおいて、保存的アミノ酸置換は、例えば、軽鎖のCDR1の24、25、32、33、および／もしくは34位、軽鎖のCDR2の53～56位、重鎖のCDR1の31および／もしくは32位、ならびに／または重鎖のCDR2の61～65位であり得ることが決定された。加えて、本明細書に記載される抗体のいずれかにおいて、以下の3つの位置は対応するヒトアミノ酸で置き換える：重鎖CDR2の64位リシンは、グルタミンで置き換えることができ、軽鎖CDR1の24位リシンは、アルギニンで置き換えることができ、軽鎖CDR2の54位ロイシンは、アルギニンで置き換えることができる。10

【0046】

C. 定常領域の選択

本明細書に記載される抗体の重鎖および軽鎖可変領域は、ヒト定常領域の少なくとも一部に連結できる。定常領域の選択は、一部において、抗体依存性細胞媒介細胞毒性、抗体依存性細胞食作用および／または補体依存性細胞傷害が望ましいかどうかによって決まる。例えば、ヒト同位体IgG1とIgG3は強力な補体依存性細胞傷害を、ヒトイソタイプIgG2は弱い補体依存性細胞傷害を有し、ヒトIgG4は補体依存性細胞傷害がない。ヒトIgG1およびIgG3は、ヒトIgG2およびIgG4より強力な細胞媒介エフェクター機能も誘導する。軽鎖定常領域は、ラムダまたはカッパであり得る。抗体は、2本の軽鎖および2本の重鎖を含有する四量体として、別々の重鎖、軽鎖として、Fab、Fab'、F(ab')2およびFvとして、または重鎖と軽鎖可変ドメインがスペーサによって連結されている一本鎖抗体として発現させることができる。20

【0047】

ヒト定常領域は、異なる個体間でアロタイプ変形およびイソアロタイプ変形を示し、すなわち、1つまたは複数の多形位置において、定常領域は異なる個体では異なることができる。イソアロタイプを認識する血清が1つまたは複数の他のアイソタイプの非多形領域に結合するという点で、イソアロタイプはアロタイプと異なる。

【0048】

重鎖のC末端リシンなど、軽鎖および／または重鎖のアミノまたはカルボキシ末端の1つまたはいくつかのアミノ酸は、その分子の一部または全てにおいて、存在していなくても誘導体化されていてもよい。定常領域に置換を作製して、補体媒介細胞傷害もしくはADC Cなどのエフェクター機能を増減させる（例えば、Winterら、米国特許第5,624,821号；Tsoら、米国特許第5,834,597号；およびLazarら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103巻：4005頁、2006年を参照のこと）またはヒトにおける半減期を延長する（例えば、Hintonら、J. Biol. Chem. 279巻：6213頁、2004年を参照のこと）ことができる。30

【0049】

典型的な置換には、アミノ酸234、235、237、239、267、298、299、326、330、または332位の天然アミノ酸のシステイン残基へのアミノ酸置換、好ましくはヒトIgG1アイソタイプにおけるS239C変異（定常領域の置換は、EUIインデックスに従う）がある（U.S.20100158909）。追加のシステイン残基の存在により、鎖間ジスルフィド結合形成が可能になる。そのような鎖間ジスルフィド結合形成により立体障害が起こり、それによってFc領域-Fc-R結合相互作用の親和性が減少することがあり得る。IgG定常領域のFc領域にまたはその近傍に導入されるシステイン残基（複数可）は、治療剤と結合体化させるための部位として役立つこともある（例えば、薬物のマレイミド誘導体などチオール特異的試薬を使用して細胞障害性薬物をカップリングさせる）。治療剤の存在により立体障害が起こり、それによってFc領域-Fc-R結合相互作用の親和性がさらに減少する。40 234、235、236および／また50

は237位のいずれかにおける他の置換は、Fc受容体、特にFcRI受容体に対する親和性を減少させる（例えば、US6,624,821、US5,624,821を参照のこと）。

【0050】

*in vivo*における抗体の半減期も、そのエフェクター機能に影響を与える場合がある。抗体の半減期を増減させて、その治療活性を修飾することができる。FcRnは、

2-ミクログロブリンと非共有結合的に会合するMHCクラスI抗原と構造的に類似している受容体である。FcRnは、IgGの異化および組織間のそれらのトランスサイトーシスを調節する（GhetieおよびWard、2000年、Annu. Rev. Immunol. 18巻：739～766頁；GhetieおよびWard、2002年、Immunol. Res. 25巻：97～113頁）。IgG-FcRn相互作用は、pH6.0（細胞内小胞のpH）で起こるがpH7.4（血液のpH）では起こらず、この相互作用により、IgGの血液循環への再循環が可能になる（GhetieおよびWard、2000年、Annu. Rev. Immunol. 18巻：739～766頁；GhetieおよびWard、2002年、Immunol. Res. 25巻：97～113頁）。FcRn結合に関わるヒトIgG₁の領域がマップされた（Shieldら、2001年、J. Biol. Chem. 276巻：6591～604頁）。ヒトIgG₁の位置Pro238、Thr256、Thr307、Gln311、Asp312、Glu380、Glu382、またはAsn434におけるアラニン置換は、FcRn結合を増強する（Shieldら、2001年、J. Biol. Chem. 276巻：6591～604頁）。これらの置換を有するIgG₁分子の血清半減期は長い。その結果、これらの修飾したIgG₁分子はそれらのエフェクター機能を遂行し、したがって無修飾のIgG₁と比較して、より長期間にわたってそれらの治療効果を発揮できる可能性がある。FcRnに対する結合を増加させる他の典型的な置換には、250位のGlnおよび/または428位のLeuがある。定常領域における全ての位置に対してEU番号付けを使用している。

【0051】

保存されているAsn297に共有結合的に付着しているオリゴ糖は、IgGのFc領域の、FcRに結合する能力に関わる（Lundら、1996年、J. Immunol. 157巻：4963～69頁；WrightおよびMorrison、1997年、Trends Biotechnol. 15巻：26～31頁）。IgGに対するこのグリコフォームの操作は、IgG媒介ADCCを著しく改善することができる。このグリコフォームへのバイセクト（bisection）N-アセチルグルコサミン修飾の付加（Umanalら、1999年、Nat. Biotechnol. 17巻：176～180頁；Daviesら、2001年、Biotech. Bioeng. 74巻：288～94頁）またはこのグリコフォームからのフコースの除去（Shieldら、2002年、J. Biol. Chem. 277巻：26733～40頁；Shinkawaら、2003年、J. Biol. Chem. 278巻：6591～604頁；Niwaら、2004年、Cancer Res. 64巻：2127～33頁）は、IgG-FcとFcRとの結合を改善し、それによってIgG媒介ADCC活性を増強するIgG-Fc操作の2つの例である。

【0052】

ヒトIgG1-Fc領域の溶剤曝露されたアミノ酸の全体的な置換により、FcR結合親和性が改変されたIgGバリアントが生成した（Shieldら、2001年、J. Biol. Chem. 276巻：6591～604頁）。親IgG1と比較したとき、Thr256/Ser298、Ser298/Glu333、Ser298/Lys334、またはSer298/Glu333/Lys334のAlaへの置換に関わるこれらバリアントのサブセットは、FcRに対する結合親和性とADCC活性の両方の増加を実証する（Shieldら、2001年、J. Biol. Chem. 276巻：6591～604頁；Okazakiら、2004年、J. Mol. Biol. 350

36巻：1239～49頁)。

【0053】

抗体の補体結合活性(C1q結合とCDC活性の両方)は、Lys326およびGlu333での置換によって改善できる(Idusogieら、2001年、J. Immunol. 166巻：2571～2575頁)。ヒトIgG2主鎖に対する同じ置換により、C1qに十分結合せず補体活性化活性が激しく欠損している抗体アイソタイプを、C1qに結合し、かつCDCを媒介できる抗体に変換することができる(Idusogieら、2001年、J. Immunol. 166巻：2571～75頁)。他のいくつかの方法を適用して、抗体の補体結合活性も改善した。例えば、IgGのカルボキシル末端にIgMの18アミノ酸カルボキシル末端尾部断片を移植することにより、CDC活性が大きく増強される。これは、通常なら検出可能なCDC活性がないIgG4でも観察される(Smithら、1995年、J. Immunol. 154巻：2226～36頁)。また、IgG1重鎖のカルボキシ末端の近くに位置するSer444のCysでの置換は、IgG1の尾部-尾部二量体化を誘導し、単量体IgG1に比べてCDC活性を200倍増加させた(Shopesら、1992年、J. Immunol. 148巻：2918～22頁)。加えて、C1qに対する特異性を備えた二重特異性ダイアボディ構築物も、CDC活性を与える(Kontermannら、1997年、Nat. Biotech. 15巻：629～31頁)。

【0054】

重鎖のアミノ酸残基318、320、および322の少なくとも1つをAlaなど異なる側鎖を有する残基に変異させることによって、補体活性を減少させることができる。3つの残基のうちいずれか1つの代わりに、他のアルキル置換された非イオン性残基、Gly、Ile、Leu、もしくはValなど、または芳香族無極性残基、Phe、Tyr、TrpおよびProなども、C1q結合を減少させるかまたは無効にする。Ser、Thr、CysおよびMetを残基318でなく、320および322で使用して、C1q結合活性を減少させるかまたは無効にすることができる。極性残基による318(Glu)残基の置き換えは、C1q結合活性を修飾する可能性があるが無効にする可能性はない。残基297(Asn)をAlaと置き換えることにより、溶解活性が除去されるが、C1qに対する親和性は少ししか減少しない(約3分の1)。この変更は、グリコシル化部位および補体活性化に必要な炭水化物の存在を無効化する。この部位における任意の他の置換も、グリコシル化部位を無効化する。以下の変異およびその任意の組合せも、C1q結合を減少させる：D270A、K322A、P329A、およびP311S(WO06/036291を参照のこと)。

【0055】

ヒト定常領域に対する参照は、任意の天然のアロタイプまたは天然のアロタイプにおいて多形位置を占有している残基の任意の交換を含む定常領域を含む。また、Fcガンマ受容体結合を減少させるかまたはFcRNに対する結合を増加させるために上に示した変異など、天然のヒト定常領域と比較して1、2、5、または10までの変異は存在してもよい。

【0056】

D. 抗体の発現

キメラまたはヒト化抗体は、通常は組換え発現によって生成される。通常、組換えポリヌクレオチド構築物は、天然に付随のまたは異種のプロモータ領域を含めた、抗体鎖のコード配列に作動可能に連結された発現制御配列を含む。好ましくは、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはそれにトランスフェクトできるベクター内にある真核生物プロモータ系である。ベクターを適当な宿主に一旦組み込んだら、宿主は、ヌクレオチド配列の高レベル発現、ならびに交差反応抗体の採集および精製に適切な条件で維持される。

【0057】

哺乳動物細胞は、免疫グロブリンまたはその断片をコードするヌクレオチド部分を発現

10

20

30

40

50

させるのに好ましい宿主である。Winnacker、From Genes to C1ones、(VCH Publishers、NY、1987年)を参照のこと。完全な異種タンパク質を分泌することができるいくつかの適切な宿主細胞系が当業者によって開発され、CHO細胞系(例えば、DG44)、様々なCOS細胞系、HeLa細胞、HEK293細胞、L細胞、ならびにSp2/0およびNS0を含めた抗体非生成骨髄腫が含まれる。好ましくは、細胞は、非ヒトである。これらの細胞用の発現ベクターは、複製起点、プロモータ、エンハンサなどの発現制御配列(Queenら、Immunol. Rev. 89巻:49頁(1986年))、ならびにリボゾーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、および転写終了配列など必要なプロセシング情報部位を含むことができる。好ましい発現制御配列は、内在性遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、牛パピロマウィルスなどから得られるプロモータである。Cоля、J. Immunol. 148巻:1149頁(1992年)を参照のこと。
10

【0058】

v 6に対するヒト抗体は、下に記載した様々な技術によって得られる。ヒト抗体を生成する方法には、Oestbergら、Hybridoma 2巻:361~367頁(1983年); Oestberg、米国特許第4,634,664号; およびEngлеманら、米国特許第4,634,666号のトリオーマ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックマウスの使用(例えば、Lonbergら、WO93/12227(1993年); USS5,877,397、USS5,874,299、USS5,814,318、USS5,789,650、USS5,770,429、USS5,661,016、USS5,633,425、USS5,625,126、USS5,569,825、USS5,545,806、Nature 148巻、1547~1553頁(1994年)、Nature Biotechnology 14巻、826頁(1996年)、Kucherlapati、WO91/10741(1991年)を参照のこと)、ならびにファージディスプレイ法(例えば、Dowerら、WO91/17271およびMcCaaffertyら、WO92/01047、USS5,877,218、USS5,871,907、USS5,858,657、USS5,837,242、USS5,733,743およびUSS5,565,332を参照のこと)がある。
20

【0059】

一旦発現させたら、抗体は、HPLC精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含めた当技術分野の標準的な手順に従って精製することができる(一般に、Scopes、Protein Purification (Springer-Verlag、NY、1982年)を参照のこと)。
30

【0060】

I I I . 核酸

本発明は、上記の重鎖および軽鎖のいずれかをコードする核酸をさらに提供する。通常、核酸は、重鎖および軽鎖に融合されたシグナルペプチドもコードする。核酸のコード配列は、例えばプロモータ、エンハンサ、リボゾーム結合部位、転写終了シグナルなどの調節配列と作動可能に連結されて、コード配列の発現を確実にすることができる。重鎖および軽鎖をコードする核酸は、単離された形態で存在することができ、または1つもしくは複数のベクターにクローニングすることができる。核酸は、例えば、固体の状態の合成または重なり合うオリゴヌクレオチドのPCRによって合成することができる。重鎖および軽鎖をコードする核酸は1つの連続する核酸として、例えば、発現ベクター内に接合することができ、または別個である、例えば、各々の発現ベクターにクローニングすることができる。典型的な核酸は、配列番号37(マウス重鎖)、配列番号38(マウス軽鎖)、配列番号39(HA)、配列番号40(HB)、配列番号41(HL)、配列番号42(HT)、配列番号43(HN)、配列番号44(HU)、配列番号45(LA)、配列番号46(LC)、配列番号47(LF)、配列番号48(LG)、配列番号49(マウス重鎖シグナルペプチド)、配列番号50(ヒト重鎖シグナルペプチド)、配列番号51(マウス軽鎖シグナルペプチド)、および配列番号52(ヒト軽鎖シグナルペプチド)に
40

示される。核酸は、単離された形態で提供され得る。単離された核酸分子は、その自然環境の成分から同定、分離および／もしくは回収されたものまたは天然に存在しないものである。

【0061】

I V . 抗体薬物結合体

抗 v_6 抗体を、細胞障害性部分（薬学的に適合するその塩を含める）に結合体化して、抗体薬物結合体（ADC）を形成することができる。抗体に結合体化するのに特に適切な部分は、細胞毒性薬剤（例えば、化学療法剤）、プロドラッグ変換酵素、放射性同位体もしくは化合物、または毒素である（これらの部分は併せて治療剤と称される）。例えば、抗 v_6 抗体は、化学療法剤または毒素（例えば、細胞増殖抑制剤または細胞破壊剤、例えばアブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素）などの細胞毒性薬剤に結合体化することができる。細胞毒性薬剤の有用な種類の例には、例えば、DNA副溝結合剤、DNAアルキル化剤、およびチューブリン阻害剤がある。典型的な細胞毒性薬剤には、例えば、オーリスタチン、カンプトセシン、デュオカルマイシン、エトポシド、マイタンシノイド（例えば、DM1、DM2、DM3、DM4）、タキサン、ベンゾジアゼピン含有化合物（例えば、ピロロ[1,4]ベンゾジアゼピン、インドリノベンゾジアゼピン、およびオキサゾリジノベンゾジアゼピン）を含めたベンゾジアゼピンならびにピンカアルカロイドがある。タンパク質、特に抗体に治療剤を結合体化する技術は周知である。（例えば、Allleyら、Current Opinion in Chemical Biology 2010年14巻：1～9頁；Senter、Cancer J.、2008年、14巻（3号）：154～169頁を参照のこと）。

【0062】

治療剤（例えば、細胞毒性薬剤）は、（例えば、加水分解によって、抗体分解によってまたは切断剤によって）抗体から切り出されない限りその活性が減少する様式で結合体化できる。結合体が、 v_6 を発現しているがん細胞に内部移行されたときに抗体から切断されるように（例えば、エンドソーム的に、または例えばpH感受性もしくはプロテアーゼ感受性によって、リソソーム環境で、またはカベオラ環境で）、 v_6 を発現しているがん細胞の細胞内環境において切断に感受性であるが細胞外環境に対して実質的に感受性でない切断可能なリンカーを用いて、そのような治療剤を抗体に付着させることができる。そのような治療剤を切断不可能なリンカーで抗体に付着させることもできる。

【0063】

通常、ADCは、治療剤と抗 v_6 抗体の間にリンカー領域を含む。上述の通り、リンカーの切断により細胞内環境（例えば、リソソームもしくはエンドソームまたはカベオラ内）にある抗体から治療剤が遊離されるように、リンカーを細胞内条件で切断可能にすることができる。リンカーは、例えば、リソソームまたはエンドソームのプロテアーゼを含めた、細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断されるペプチジルリンカーであり得る。いくつかの態様では、ペプチジルリンカーは、少なくとも長さ2アミノ酸または少なくとも長さ3アミノ酸である。切断剤には、カテーテンBおよびDならびにプラスミンがあり得る（例えば、DubowchikおよびWalker、1999年、Pharm. Therapeutics 83巻：67～123頁を参照のこと）。最も典型的なものは、 v_6 を発現している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である。例えば、がん性組織において高発現している、チオール依存的プロテアーゼ、カテーテン-Bによって切断可能なペプチジルリンカー（例えば、PhelieuまたはVal-Citペプチドを含むリンカー）を使用することができる。リンカーは、例えば、治療剤（例えば、薬物）に直接付着しており、抗体の分解によって遊離されるマレイミド-アルキレン-またはマレイミド-アリールリンカーなどの切断不可能なリンカーであることもできる。

【0064】

ADCが細胞外環境（例えば、血漿中）に存在するとき、通常、リンカーが細胞外環境に対して実質的に感受性でないとは、ADCの試料中にあるリンカーの約20%以下、通

10

20

30

40

50

常は約 15 %以下、より通常には約 10 %以下、およびさらにより通常には約 5 %以下、約 3 %以下または約 1 %以下が切断されることを意味している。例えば、(a) ADC(「ADC 試料」)と(b)等モル量の結合体化していない抗体または治療剤(「対照試料」)の両方を独立に血漿と一緒に予め定めた時間(例えば、2、4、8、16、または24時間)インキュベートし、次いで例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定した ADC 試料中に存在する結合体化していない抗体または治療剤の量を対照試料中に存在する量と比較することによって、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どうか決定することができる。

【0065】

リンカーは、細胞内移行を促進することもできる。リンカーは、治療剤に結合体化されている場合(すなわち、本明細書に記載される ADC のリンカー - 治療剤部分の環境において)、細胞内移行を促進することができる。別法として、リンカーは、治療剤と抗 v 6 抗体の両方に結合体化されている場合(すなわち、本明細書に記載される ADC の環境において)、細胞内移行を促進することができる。

【0066】

典型的な抗体 - 薬物結合体には、薬物成分がオーリスタチン薬物であることを意味するオーリスタチン系抗体 - 薬物結合体がある。オーリスタチンはチューブリンに結合し、微小管動態ならびに核および細胞分裂に干渉し、抗がん活性を有することが示された。通常、オーリスタチン系抗体 - 薬物結合体は、オーリスタチン薬物と抗 v 6 抗体の間にリンカーを含む。リンカーは、例えば、切断可能なリンカー(例えば、ペプチジルリンカー)または切断不可能なリンカー(例えば、抗体の分解によって遊離されるリンカー)であり得る。オーリスタチンは、オーリスタチン E またはその誘導体であり得る。オーリスタチンは、例えば、オーリスタチン E とケト酸の間で形成されるエステルであり得る。例えば、オーリスタチン E は、パラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応して、それぞれ、AEB および AEV B を生成することができる。他のオーリスタチンには、MMA F および MMA E がある。典型的なオーリスタチンの合成および構造は、米国特許出願公開第 7,659,241 号、第 7,498,298 号、第 2009-0111756 号、第 2009-0018086 号および第 7,968,687 号に記載されており、その各々は、全ての目的のためにその全体が参考により本明細書に組み込まれる。

【0067】

典型的なオーリスタチン系抗体薬物結合体には、以下に示すように v c MMA E、v c MMA F および m c MMA F 抗体薬物結合体：

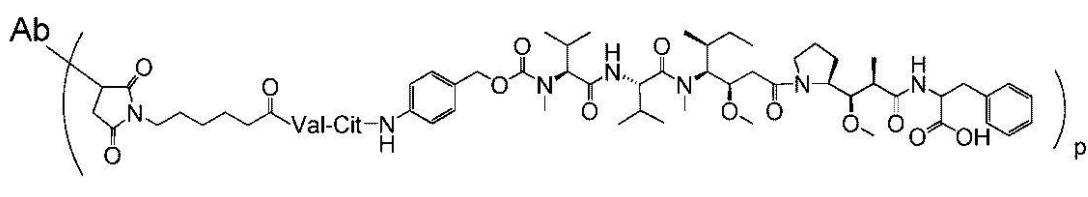
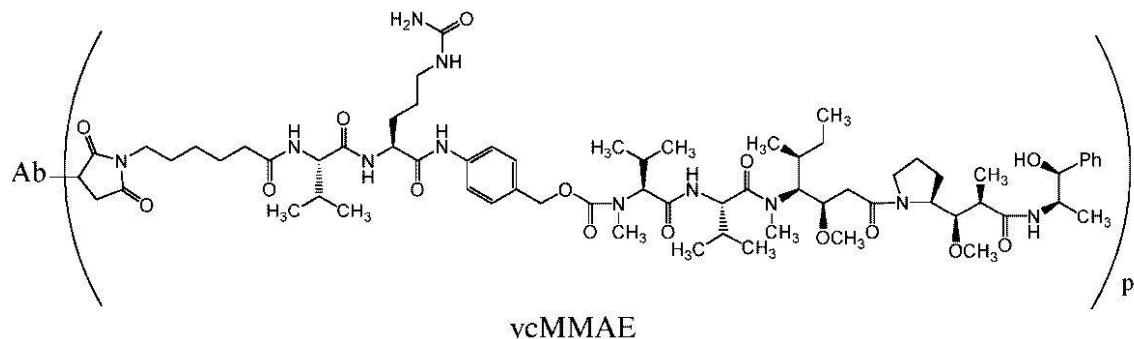
【0068】

10

20

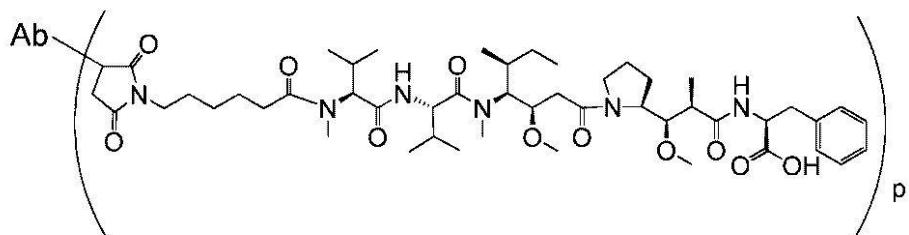
30

【化1】



vcMMAF

20



mcMMAF

または薬学的に許容されるその塩があり、Abは本明細書に記載の抗体であり、Val-citはバリン-シトルリンジペプチドを表す。薬物負荷は、p、抗体当たりの薬物-リンカー分子数、によって表される。文脈に応じて、pは、抗体当たりの薬物-リンカー分子の平均数を表すことができ、平均薬物負荷も意味した。pは、1～20の範囲内にあり、好ましくは1～8である。いくつかの好ましい実施形態では、pが平均薬物負荷を表すとき、pは約2～約5の範囲内にある。いくつかの実施形態では、pは、約2、約3、約4または約5である。製剤中の抗体当たりの薬物の平均数は、質量分析、HIC、ELISAアッセイ、およびHPLCなど従来の手段によって特徴付けられてもよい。いくつかの態様では、抗v6抗体は、抗体のシステイン残基を介して薬物-リンカーに付着している。いくつかの態様では、システイン残基は、抗体に操作されているものである。他の態様では、システイン残基は、鎖間ジスルフィドシステイン残基である。

30

【0069】

V.v6に対する他の抗体

マウス15H3抗体および15H3抗体のキメラ形態、ヒト化形態、またはヒト形態と同様に、v6の細胞外ドメインに結合する他の抗体は、本発明のいくつかの方法、特に膀胱がんの処置法に使用することができる。好ましくは、そのような実施形態では、抗体は細胞毒性薬剤に結合体化されている。抗v6抗体の一群は公知であり、例えば、米国特許出願公開第20100330103号および第20110294982号ならびに米国特許第7,465,449号、第7,943,742号および第6,692,741号を参照のこと、その各々は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

50

【0070】

v 6または1つもしくは複数のその細胞外ドメインを免疫することによって、v 6に対する他の抗体を新たに作製することができる。免疫原に対する他の非ヒト、例えば、マウス、モルモット、靈長類、ウサギまたはラットモノクローナル抗体の產生は、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSH P NY (1988年)) (全ての目的のために参照により組み込まれる)に記載された通り実施することができる。そのような免疫原は、ペプチド合成によってまたは組換え発現によって、天然の供給源から得ることができる。

【0071】

非ヒト抗体のヒト化、キメラまたはベニヤ形態 (veneered) を作製することができる。ヒト化抗体を生成するための一般的な方法論は、Queen, US5,530,101およびUS5,585,089; Winter, US5,225,539; Carter, US6,407,213; Adair, US5,859,205; ならびにFote, US6,881,557に記載されている。キメラ抗体とは、非ヒト抗体 (例えば、マウス) の軽鎖および重鎖の可変領域が、ヒト軽鎖および重鎖の定常領域と組み合わせられる抗体である。そのような抗体は、実質的または完全にマウス抗体の結合特異性を保持しており、約2/3がヒト配列である。ベニヤ抗体とは、非ヒト抗体のCDRのいくつかおよび通常は全てならびに非ヒト可変領域フレームワーク残基のいくつかを保持しているが、B細胞またはT細胞エピトープに寄与し得る他の可変領域フレームワーク残基、例えば露出している残基 (Padlan, Mol. Immunol. 28巻: 489頁、1991年) をヒト抗体配列の対応する位置の残基で置き換えて、ヒト化抗体の形態である。その結果、CDRが完全にまたは実質的に非ヒト抗体由来であり、置換によって非ヒト抗体の可変領域フレームワークがさらにヒト様になるように作製された抗体になる。

10

【0072】

v 6に対するヒト抗体は、上記の通り様々な技術によって得ることができる。

【0073】

必要に応じて、15H3抗体など典型的な抗体と同じまたは重なり合うエピトープ特異性を得るために、競合結合アッセイまたは別の方法によっていずれかの抗体を選択することができる。

30

【0074】

VI. 治療用途

本発明の抗体を、単独または抗v 6抗体薬物結合体として使用して、がんを処置することができる。そのようながんのいくつかは、タンパク質 (例えば、実証された抗体の1つを使用するイムノアッセイによる) またはmRNAレベルのいずれかで測定される検出可能なレベルのv 6を示す。そのようながんのいくつかは、同じ型の、好ましくは同じ患者の非がん性組織と比較して、v 6レベルの上昇を示す。より高いまたはより低いレベルを処置することもできるが、処置可能ながん細胞におけるv 6の典型的なレベルは、細胞当たり1000~200,000個のv 6分子である。一般に、固体腫瘍の処置には、より高いコピー数、例えば、細胞当たり少なくとも約15,000個のv 6分子が好ましい。任意選択で、処置を実施する前にがんのv 6レベルが測定される。

40

【0075】

v 6発現に付随する、処置可能ながんの例には、例えば、膀胱がん、頭頸部がん (例えば、口唇、口腔、鼻腔、副鼻腔、咽頭、および喉頭のがんを含む)、皮膚がん、肺がん、膵臓がん、子宮がん、乳がん (トリプルネガティブ乳がんを含む)、結腸がん、前立腺がん、卵巣がん、胃がん、ならびに肝がんがある。一態様では、扁平上皮癌および腺癌はv 6発現に付随し、処置可能ながんの例である。本処置は、これらの種類の原発性または転移性腫瘍の患者に適用することができる。本処置は、処置を受けていない、従来の処置 (例えば、ホルモン、タモキシフェン、ハーセプチニ) に抵抗性がある、またはそ

50

のような処置に対する応答の後に再発した患者に適用することもできる。抗 v_6 抗体およびその結合体を使用して、 v_6 を発現するがんを処置することができる。一実施形態では、ヒト、ヒト化もしくはキメラ抗 v_6 抗体またはその結合体を使用して、 v_6 を発現している膀胱がん、頭頸部がん（例えば、口唇、口腔、鼻腔、副鼻腔、咽頭、および喉頭がんを含む）、皮膚がん、肺がん、膵臓がん、子宮がん、乳がん（トリプルネガティブ乳がんを含む）、結腸がん、前立腺がん、卵巣がん、胃がん、または肝がんの対象を処置する。一実施形態では、ヒト、ヒト化もしくはキメラ抗 v_6 抗体またはその結合体を使用して、 v_6 を発現している扁平上皮癌または腺癌の対象を処置する。

【0076】

本出願は、膀胱がん細胞の表面に v_6 タンパク質を発現させる最初の信頼性のある開示であると考えられる。したがって、 v_6 指向性療法を使用して、 v_6 を発現している膀胱がんに罹患している患者を処置することができる（例えば、抗 v_6 抗体、ペプチドまたはその結合体）。膀胱がんを処置するための v_6 指向性療法には、本明細書に開示する抗体および結合体、例えば、キメラ、ヒト、およびヒト化 15H3 抗体ならびにその結合体があるが、そのような抗体または療法に限定されない。

【0077】

ヒト、ヒト化またはキメラ抗体は、単独でまたはその結合体として、発症を遅延させ、重症度を減少させ、さらなる悪化を阻害し、および/または少なくとも 1 つのがんの兆候もしくは症状を改善する、投与量、投与経路および投与の頻度を意図する有効なレジメンで施される。レジメンは、治療上有効なレジメンと称することができる。いくつかの実例では、治療効果は、同じ患者における病歴対照または過去の経験と比較して個々の患者において観察できる。他の実例では、治療効果は、未処置患者の対照集団と比較した処置済み患者集団における臨床前または臨床試験で実証できる。

【0078】

モノクローナル抗体の典型的な投与量は、例えば、患者体重の 0.1 mg / kg ~ 50 mg / kg、より通常には 1 mg / kg ~ 30 mg / kg、1 mg / kg ~ 20 mg / kg、1 mg / kg ~ 15 mg / kg、1 mg / kg ~ 12 mg / kg、もしくは 1 mg / kg ~ 10 mg / kg、または 2 mg / kg ~ 30 mg / kg、2 mg / kg ~ 20 mg / kg、2 mg / kg ~ 15 mg / kg、2 mg / kg ~ 12 mg / kg、もしくは 2 mg / kg ~ 10 mg / kg、または 3 mg / kg ~ 30 mg / kg、3 mg / kg ~ 20 mg / kg、3 mg / kg ~ 15 mg / kg、3 mg / kg ~ 12 mg / kg、もしくは 3 mg / kg ~ 10 mg / kg である。抗体薬物結合体の典型的な投与量は、例えば、対象の体重の 0.01 mg / kg ~ 10 mg / kg、0.1 mg / kg ~ 10 mg / kg、0.3 mg / kg ~ 3 mg / kg、0.5 mg / kg ~ 3 mg / kg、1 mg / kg ~ 7.5 mg / kg、もしくは 2 mg / kg ~ 7.5 mg / kg もしくは 3 mg / kg ~ 7.5 mg / kg、または 0.1 ~ 2.0 もしくは 0.5 ~ 5 mg / kg 体重（例えば、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 mg / kg）あるいは固定用量として 10 ~ 1500 もしくは 200 ~ 1500 mg である。いくつかの方法において、患者は少なくとも 1.5 mg / kg、少なくとも 2 mg / kg または少なくとも 3 mg / kg の用量を投与され、3 週間毎に 1 回以上投与される。投与量は、障害が急性か慢性かにかかわらず、その他の因子の中で、細胞障害性薬物の同一性、投与の頻度、患者の状態および、もしあれば、従前の処置に対する応答に応じて決まる。

【0079】

投与は、必要でなくても通常は非経口である。投与は、腫瘍に直接局在化させることもできる。静脈内または皮下投与による体循環への投与が好ましい。静脈内投与は、例えば、30 ~ 90 分間などにわたる点滴または単回のボーラス注射によることができる。

【0080】

投与の頻度は、他の因子中でも循環中の抗体または結合体の半減期、患者の状態および投与経路に応じて決まる。頻度は、患者の状態の変化または処置するがんの進行に呼応して、例えば、毎日、毎週、毎月、年 4 回、または不規則間隔であることができる。継続的

10

20

30

40

50

な処置過程において、より多いまたは少ない頻度の投薬も可能であるが、静脈内投与の典型的な頻度は1週間に2回～年4回の間である。継続的な処置過程において、より多いまたは少ない頻度の投薬も可能であるが、静脈内投与の他の典型的な頻度は毎週、4週間のうち3回、または3週間毎である。皮下投与の場合、より多いまたは少ない頻度の投薬も可能であるが、典型的な投薬頻度は毎日～毎月である。

【0081】

投与される投薬の回数は、がんの性質（例えば、急性または慢性症状を示すかどうか）および処置に対する障害の応答に応じて決まる。いくつかの態様では、急性障害または慢性障害の急性憎悪の場合、1～10の間の投与がしばしば十分である。時には、単回ボーラス投与、任意選択で分割形態が、急性障害または慢性障害の急性増悪に十分である。急性障害または急性憎悪の再発に対して、処置を繰り返すことができる。慢性障害の場合、少なくとも1、5もしくは10年間または患者の生涯にわたってずっと、一定の間隔、例えば、毎週、2週間に1回、毎月、年4回、6カ月毎に抗体を投与することができる。

10

【0082】

非経口投与用の医薬組成物は、好ましくは無菌であり、実質的に等張であり、GMP条件で製造される。医薬組成物は、単回投与の投与量で提供することができる。医薬組成物は、1つまたは複数の生理的に許容される担体、希釈剤、賦形剤または佐剤を使用して処方することができる。処方は、選択される投与経路に応じて決まる。注射の場合、抗体は、水溶液、好ましくは（注射部位における不快感を減少させるために）Hank溶液、リンゲル溶液、または生理食塩水もしくは酢酸緩衝液など生理的に適合する緩衝液に処方することができる。溶液は、懸濁剤、安定化剤および/または分散剤などの製剤化剤を含有することができる。別法として、抗体は、使用前に適切な媒体、例えば、無菌の発熱物質を含まない水、で構成する凍結乾燥形態であることもできる。液体処方中の抗体の濃度は、例えば、1～100mg/mLであることができる。

20

【0083】

本発明の抗体および抗体薬物結合体を用いる処置は、化学療法、放射線、幹細胞処置、外科手術、処置される障害に対して有効な他の処置と組み合わせることができる。いくつかの態様では、本明細書に記載される抗体および抗体薬物結合体は、処置しようとする特定の疾患に対する標準的な治療である他の療法（例えば、第一選択の標準的な治療または第二もしくは第三選択の処置またはさらにサルベージ療法）と一緒に投与されることになる。v6に対する抗体および抗体薬物結合体と一緒に投与できる他の薬剤の有用な種類には、例えば、他の標的化療法および/または非標的化療法の両方がある。例には、がん性細胞で発現する他の受容体に対する抗体または抗体薬物結合体、v6を標的にしたペプチドまたはその結合体、抗チューブリン剤（例えば、オーリスタチン）、DNA副溝結合剤、DNA複製阻害剤、アルキル化剤（例えば、シスプラチニン、モノ（プラチナ）、ビス（プラチナ）および3核プラチナ錯体ならびにカルボプラチニンなどのプラチナ錯体）、アントラサイクリン、抗生物質、葉酸代謝拮抗薬、代謝拮抗物質、化学療法増感剤、デュオカルマイシン、エトポシド、フッ化ビリミジン、イオノフォア、レキシトロプシン（lexitropsin）、ニトロソ尿素、プラチノール、予形成化合物、プリン代謝拮抗薬、ピューロマイシン、放射線増感剤、ステロイド、タキサン、トボイソメラーゼ阻害剤、ピンカアルカロイドなどがある。

30

【0084】

VII. 他の用途

抗v6抗体を使用して、臨床診断もしくは処置に関連してまたは研究においてv6を検出することができる。がんにおけるv6の発現は、がんが本発明の抗体を用いて処置可能であることの指標を与える。抗体は、v6を持つ細胞および様々な刺激に対するその応答を検出する実験室研究用の研究試薬として販売することもできる。そのような使用において、モノクローナル抗体は、蛍光分子、スピニン標識分子、酵素またはラジオアイソタイプで標識することができ、v6のアッセイを実施するのに必要な試薬全てを含むキットの形態で提供することができる。本明細書に記載される抗体を使用して

40

50

、 ν 6 タンパク質の発現を検出し、がんが抗 ν 6 ADC で処置可能かどうか決定することができる。抗体を使用して、例えば、親和性クロマトグラフィーによって、 ν 6 を精製することもできる。

【0085】

上または下で引用される全ての特許出願、ウェブサイト、他の刊行物、受託番号などは、こうして参照により組み込まれるものとして個々の項目が具体的および個別に示される場合と同程度に、全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。配列の異なるバージョンが異なる時点での受託番号と関連付けられる場合、この出願の有効な出願日での受託番号と関連付けられるバージョンを意味する。有効な出願日とは、実際の出願より前の日、または適用可能であれば、受託番号を記載する優先権主張の出願日を意味する。特段の具体的な指示がない限り、本発明の任意の特徴、ステップ、要素、実施形態、または態様は、任意の他のものと組み合わせて使用できる。本発明は、明確さと理解を目的として例示および例により一部詳細に記載されているが、添付の特許請求の範囲内で特定の変更および修正が実施されてもよいことは、明らかになろう。

10

【実施例】

【0086】

材料

以下の実施例において記載される細胞系は、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC)、国立がん研究所 (NCI) または Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH、Braunschweig、ドイツ (DMSZ) に指定された条件に従って培養で維持された。Detroit 562 細胞系、HPAF II 細胞系、および BXP C 3 細胞系は、ATCC から入手した。FreeStyle (商標) 293-F (Invitrogen Corp.) ヒト上皮腎臓細胞および対応するトランスフェクタントは、製造者によって記載の通り維持された。細胞培養試薬は、Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA.)、Molecular Devices (Sunnydale, CA) および他の供給元から入手した。二次抗体試薬は、Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA) から購入した。組換えヒト ν 6 は社内で調製した。組換え ν 3 および ν 8 は、R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。FreeStyle (商標) 293-F 細胞は、内在性インテグリン ν を発現し、その細胞にヒト、カニクイザルまたはマウスインテグリン 6 をコードする完全長 cDNA を安定にトランスフェクトして、それぞれ、HEK 293 F : hu 6、HEK 293 F : cyno 6 および HEK 293 F : mu 6 細胞系を生成した。空のベクター (HEK 293 F : ベクター) をトランスフェクトした HEK 293 F 細胞を陰性対照として使用した。内在性マウスインテグリン ν を発現するマウス 3T3 および FDC-P1 細胞にヒトおよびマウスインテグリン 6 の完全長 cDNA クローンをトランスフェクトして、それぞれ、3T3 : hu 6 および FDC-P1 : mu 6 を生成した。

20

【0087】

方法論：

30

飽和結合アッセイ

以下の抗原を発現している細胞系を使用して飽和結合研究を行った：293 F : hu 6 ; 293 F : cyno 6 ; FDC-P1 : mu 6 およびラット NBT-II。抗原を発現している細胞 0.25 ~ 0.5 × 10⁶ 個を、96 ウェル ν 底プレートに、1 ウェル 每に分注した。m15H3、h15H3 (HBL) および h15H3 (HTL) を、同等のレベルのビオチンで直接標識し、0.1 pM ~ 150 nM の範囲の濃度で、細胞に添加した。細胞を、氷上で 30 分間インキュベートし、FACS 緩衝液 (PBS、2% ウシ胎仔血清、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、0.02% Na₃) で 3 回洗浄し、FACS 緩衝液中で PE 結合体化ストレプトアビシン (0.5 μg / mL) と共に氷上で 45 分間インキュベートし、3 回洗浄し、FACS 緩衝液に再懸濁した。結合は、

40

50

Becton Dickinson Biosciences FACSCalibur (San Jose, CA) を使用して検出した。GraphPad Software (LaJolla, CA) を使用して、見かけの K_d を算出した。

【0088】

ELISA

96 ウェル Maxisorb プレート (Nunc) を、PBS に希釈した $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 組換えヒト v6、v3 および v8 で 4 で終夜コーティングした。0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) でプレートを洗浄した。洗浄緩衝液を取り除き、プレートを TBS ブロッキング緩衝液 (1 mM MnCl₂、0.05% Tween 20、1% BSA を加えた TBS) 中で、室温で 30 分間ブロッキングした。プレートを洗浄し、次いで $4.6 \text{ ng}/\text{mL}$ ~ $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲の濃度で TBS ブロッキング緩衝液に希釈したビオチン化抗体 (m15H3 または h15H3) と共に 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ HRP-ストレプトアビシンと共に 1 時間インキュベートし、洗浄し、次いで TMB 基質と共に 10 分間インキュベートした。1 M H₂S₀4 で反応を停止させた。450 nm での吸光度を、Fusion HT プレートリーダー (Perkin Elmer, Waltham, MA) を使用して読み取った。

【0089】

競合結合アッセイ

293F:hu および HEK293F:cyno 6 細胞系を使用して競合結合アッセイを行った。抗原を発現している細胞 1×10^5 個を、氷上で 96 ウェル v 底プレートの各ウェルに分注した。細胞を、2 nM Alexa Fluor-647 標識マウス 15H3 および濃度を増加させた (0.024 nM ~ 100 nM) 未標識のヒト化 15H3 構築物と共に 1 時間インキュベートした。細胞をペレット化し、PBS で 3 回洗浄した。細胞をペレット化し、PBS/BSA 125 μL に再懸濁した。蛍光をフローサイトメトリによって分析し、飽和蛍光シグナルのパーセントを使用して、結合している標識マウス 15H3 のパーセントを決定し、続いて様々な傾きを有するシグモイド用量反応曲線にデータをフィッティングすることによって EC50 を推定した。

【0090】

定量的フローサイトメトリ分析

一次抗体としてマウス v6 mAb、および製造業者 (DAKO A/S, Glostrup, デンマーク) によって記載の通り DAKO QiFiKit フローサイトメトリ間接アッセイを使用して、細胞表面の v6 コピー数の定量化を決定し、Becton Dickinson FACSscan フローサイトメーターを用いて評価した。

【0091】

細胞毒性アッセイ

腫瘍細胞を、抗 v6 抗体薬物結合体と共に 37 で 96 時間インキュベートした。結合しない (h00) ADC を、陰性対照として使用した。CellTiter-Glo (登録商標) 発光アッセイ (Promega Corporation, Madison, WI) を使用して細胞生存率を決定し、Fusion HT プレートリーダー (Perkin Elmer, Waltham, MA) で結果を測定した。媒体処理した細胞 (対照 = 100%) と比較して生存率を 50% 低下させるのに必要な化合物の濃度である IC₅₀ として、結果を記録する。

【0092】

抗体薬物結合体の產生

抗 v6 抗体の抗体薬物結合体は、US20050238649 に記載の通り調製した。薬物リンカー vCMMAE と mCMMAF の両方については、US20050238649 に記載されており、全ての目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0093】

in vivo 活性研究

20

30

40

50

ヌード(nu / nu)マウス(動物7~10匹/群)に培養で増殖させた腫瘍細胞を移植した。25%マトリゲル中の 5×10^5 個の細胞を使用してDetroit 562 (ATCC)を移植し、25%マトリゲル中の 1×10^6 個を使用してHPAF II (ATCC)を移植した。腫瘍が 100 mm^3 に達したら(q 4 d × 4回の腹腔内注射)、ヒト化

v 6 ADCまたは結合しない対照ADCを用いる投薬を開始した。ノギスを使用して腫瘍体積をモニタリングし、腫瘍体積がおよそ 800 mm^3 に達したら、動物を安楽死させた。1匹または複数の動物を安楽死させるまで、腫瘍体積中央値プロットを各群に対して続けた。動物の手順の全ては、実験動物ケア評価認証協会によって公認された施設において動物飼育使用委員会によって承認されたプロトコルの下で実施した。

【0094】

10

免疫組織化学的(IHC)染色方法

Multi-Tumor Microarrays (TMA) (cat # MC5001)は、US Biomax Inc. から購入した。全ての試料をBond-Max(商標)自動染色機(Leica)で処理した。

【0095】

20

FFPE組織のIHC染色:

Bond(商標)Dewax溶液(Leica、cat # AR9222)を72で使用して、マルチ腫瘍アレイブロックMC5001のパラフィン切片を保持するスライドを脱パラフィンし、再水和した。EDTAに基づくBond(商標)Epitope Retrieval Solution 2(Leica、cat # AR9640)を使用して、抗原回復を95~100で20分間実施した。スライドは、protein block(DAKO cat # X0909)で30分間処理した後、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 一次抗体マウス抗インテグリン6クローン437216(RnD MAB # 41551)と共に25で45分間インキュベートした。バックグラウンド染色の陰性対照として、アイソタイプ適合性マウスIgG2b(Zymed # 02-6300)を $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ で使用した。自動化IHC染色のために、アルカリホスファターゼ-Fast Redに基づく検出キット(Bond(商標)Polymer AP Red検出キット; Leica、cat # DS9305)を使用した。発色現像の後、切片をヘマトキシリンで対比染色し、カバーガラスを被せた。病理学者によってスライドを評価およびスコア付けし、Olympus BX41顕微鏡を使用して画像を撮像した。

30

【0096】

40

凍結組織のIHC:

凍結切片を保持するスライドを、アセトン中で、-20で10分間インキュベートして、組織を固定した。Perox Abolish(Biocare cat # PXA96)過酸化物ブロッキング試薬を25で15分間適用して、内在性ペルオキシダーゼを消失させた。スライドを、アビジンブロック(Vector cat # SP-2001)で、続けてビオチンブロック(Vector cat # SP-2001)で、25で各15分間順次インキュベートした。スライドを、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ヒト化抗インテグリン6クローン15H3一次抗体と共に60分間インキュベートした。 50 mM MnCl₂を含有するBond(商標)Primary Antibody Diluent(Leica cat # AR9352)に一次および二次抗体を調製した。バックグラウンド染色の陰性対照として、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ヒトIgG(Ancell cat # 295-010)を使用した。一次抗体インキュベーションの後に、ビオチン化ヤギ抗ヒト二次抗体(Jackson cat # 109-066-098)を $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ で使用し、25で30分間インキュベートした。ビオチン化二次抗体の検出のために、VECTASTAIN Elite ABC試薬(Vector cat # PK-7100)を25で30分間適用した。Bond(商標)Polymer Refine検出キット(Leica cat # DS9800)を使用して、DAB発色現像した。切片をヘマトキシリンで対比染色し、カバーガラスを被せた。病理学者によってスライドを評価およびスコア付けし、Olympus BX41顕微鏡を使用して画像を撮像した。

50

【0097】

結果

1. マウス抗体の結合

マウス ν 6 モノクローナル抗体 15H3 抗体および選択されたそのヒト化バージョンの K_D を、ヒト、カニクイザル、ラットおよびマウスに対して決定した。ラットを除外して、遺伝子工学によって作られた細胞系 (293F : hu 6, 293F : cyno 6 または FDC-P1 : mu 6) を使用して、インテグリン 6 オルトログに対する競合および飽和結合研究を行った。遺伝子工学によって作られた細胞系は内在性 ν を発現し、この ν は組換え 6 鎮と一組になって、内在性 ν と組換え 6 からなるヘテロ二量体受容体が生成される。ラット ν 6 に対する親和性は、ラット NBT-II 膀胱癌細胞を使用して決定され、この細胞は内在性 ν 6 を発現する。

【0098】

【表1】

表1

種	h15H3 (HTLC) (nM)	h15H3 (HBLC) (nM)	m15H3 (nM)
ヒト	1.2	1.4	0.8
カニクイザル	1.5	1.6	1.0
ラット	0.4	データなし	0.2
マウス	0.3	0.6	0.2

15H3 抗体の生成

およそ 5×10^6 個の 3T3 : hu 6 トランスフェクタントの腹腔内注射により BALB/c マウスを 3 回免疫した。融合の 3 日前に、マウスは、静脈内 (6 μ g) および腹膜内 (30 μ g) に投与される精製組換えヒト ν 6 の最後の注射を受けた。ポリエチレングリコールを使用して、P3X63Ag8.653 骨髄腫細胞に脾臓およびリンパ節から採取したリンパ球を融合した。融合した細胞を、ハイブリドーマ増殖培地 (4 mM グルタミン、10% Fetal Clone I、10% Cloning Factor およびペニシリン / ストレプトマイシンを含有する IMDM) 中で終夜回復させた。回復の後に、細胞を遠沈し、次いで、半固体培地に播いた。半固体培地は、ハイブリドーマ選択用の HAT および IgG 產生用の Clone Detect をプラスしたハイブリドーマ増殖培地で補充された Clone Matrix 培地からなった。ハイブリドーマを、37

で 10 日間インキュベートした。10 日目に、Clone Pix FL (Molecular Devices) を使用して IgG を生成しているハイブリドーマクローンを採集し、HT をプラスした IgG を枯渇させたハイブリドーマ増殖培地を含有する 96 ウェルプレートに移した。ハイブリドーマ培養上清を 293F : hu 6 トランスフェクタントに対してスクリーニングし、検出に Alexis Fluor-647 標識二次抗体を使用して陽性クローンを同定した。プレートを、FMAT8200 (Applied Biosystems) で読み取った。293F : hu 6 および 293F : cyno 6 に結合したが 293F : ベクターには結合しなかったハイブリドーマを直接コンジュゲーション用として展開した。直接結合体化した抗体パネルを、結合および細胞毒性アッセイで試験した。m15H3 は、複数の ν 6 陽性腫瘍細胞系に対して ADC として細胞毒性活性を示し、ヒトおよびカニクイザル形態抗原に対して同等の親和性を有していたので、リード抗体として選択した。抗体が 293F : hu 6 トランスフェクタントに結合するが ν 5 陽性親系統 (293F : ベクター) に結合しないことが示された FMAT および FACS 結合研究において、マウス 15H3 およびヒト化 15H3 の特異性を確認した。抗体が組換えヒト ν 6 には結合するが ν 3 または ν 8 には結合しなかった ELLISA により、m15H3 および h15H3 の結合特異性も確認した。

【0099】

10

20

30

40

50

ヒト化抗体の設計および試験

この実施例において、ヒト化の出発点またはドナー抗体は、マウス 15H3 抗体である。重鎖に対する VH1-46 および JH4 ならびに軽鎖に対する VK2-30 および JK2 によって提供されるゲノム配列を使用した。

【0100】

1 巡目のヒト化において、ヒトアクセプタ配列がドナー配列と異なっている位置において 13 の位置が重鎖の中に同定され (H28、H30、H38、H40、H41、H48、H66、H67、H69、H71、H72、H93、H108)、6 つの位置が軽鎖の中に同定され (L21、L22、L36、L37、L45 および L63)、これらの位置は、抗原が直接に接触する、CDR のコンフォメーションに影響を及ぼす、または重鎖と軽鎖の間の充填に影響を及ぼすことにより抗体結合に影響を及ぼす可能性がある。これら位置の異なる入れ替えで復帰変異を組み込んで、ヒト化重鎖を 8 種類およびヒト化軽鎖を 5 種類作製した。復帰変異には、下線を引き、太字にしてある。(表 2 および 3)。残りの位置は、ヒトアクセプタ配列由来残基で占有されている。

【0101】

【表 2】

表2:重鎖復帰変異

Ab	H28	H30	H38	H40	H41	H48	H66	H67	H69	H71	H72	H93	H108	復帰 変異数
HA	T	T	R	A	P	M	R	V	M	R	D	A	L	0
HB	<u>S</u>	<u>S</u>	R	A	P	M	R	V	M	R	D	A	L	2
HC	T	T	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	M	R	V	M	R	D	A	L	3
HD	T	T	R	A	P	<u>I</u>	R	V	M	R	D	A	L	1
HE	T	T	R	A	P	M	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	D	A	L	4
HF	T	T	R	A	P	M	R	V	M	R	D	<u>V</u>	L	1
HG	T	T	R	A	P	M	R	V	M	R	<u>Q</u>	A	L	1
HH	T	T	R	A	P	M	R	V	M	R	D	A	<u>P</u>	1
HI	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	13

10

20

30

【0102】

【表 3】

表3 軽鎖復帰変異

抗体	L21	L22	L36	L37	L45	L63	復帰 変異数
LA	I	S	F	Q	R	S	0
LB	<u>L</u>	<u>F</u>	F	Q	R	S	2
LC	I	S	<u>L</u>	<u>F</u>	R	S	2
LD	I	S	F	Q	<u>K</u>	S	1
LE	I	S	F	Q	R	<u>T</u>	1
LF	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	6

40

次いでヒト化抗体を発現させ、ヒト化重鎖および軽鎖のこれらの鎖の入れ替えを表した。重鎖の全てを発現させたが、HB 重鎖だけが評価可能な結合を実証した(図 2)。軽鎖の全てが、HB 重鎖との組合せで結合を示した。

50

【0103】

1巡目のヒト化の結合データに基づいて、2巡目のヒト化を実施した。H28、H30、H72、およびH93に加えて、ヒトアクセプタ配列がドナー配列と異なっている3つの位置、H73、H75、H78が重鎖の中に同定され、これらの位置は、抗原が直接に接触する、CDRのコンフォメーションに影響を及ぼす、または重鎖と軽鎖の間の充填に影響を及ぼすことにより抗体結合に影響を及ぼす可能性がある。L21、L22、L36、L37、L45、およびL63に加えて、1つの位置、L4が軽鎖の中に同定された。これら位置の異なる入れ替えで復帰変異を組み込んで、追加のヒト化重鎖を10種類および追加のヒト化軽鎖を1種類作製した。復帰変異には、下線を引き、太字にしてある。（表4および5）。残りの位置は、ヒトアクセプタ配列由来残基で占有されている。

10

【0104】

【表4】

表4:重鎖復帰変異

抗体	H28	H30	H72	H73	H75	H78	H93	復帰 変異数
HA	T	T	D	T	T	V	A	0
HB	<u>S</u>	<u>S</u>	D	T	T	V	A	2
HF	T	T	D	T	T	V	<u>V</u>	1
HG	T	T	Q	T	T	V	A	1
HK	T	T	D	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	A	3
HL	<u>S</u>	<u>S</u>	D	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	A	5
HM	<u>S</u>	<u>S</u>	Q	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	A	6
HN	<u>S</u>	<u>S</u>	Q	T	T	V	A	3
HO	<u>S</u>	<u>S</u>	Q	<u>K</u>	T	V	A	4
HQ	T	T	D	T	<u>S</u>	<u>A</u>	A	2
HR	<u>S</u>	<u>S</u>	D	T	<u>S</u>	<u>A</u>	A	4
HS	<u>S</u>	<u>S</u>	Q	T	<u>S</u>	<u>A</u>	A	5
HT	<u>S</u>	<u>S</u>	Q	T	T	V	<u>V</u>	4
HU	<u>S</u>	<u>S</u>	Q	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	7

20

30

【0105】

【表5】

表5 軽鎖復帰変異

抗体	L4	L21	L22	L36	L37	L45	L63	復帰 変異数
LA	M	I	S	F	Q	R	S	0
LB	M	<u>L</u>	<u>F</u>	F	Q	R	S	2
LC	M	I	S	<u>L</u>	<u>F</u>	R	S	2
LD	M	I	S	F	Q	<u>K</u>	S	1
LE	M	I	S	F	Q	R	<u>T</u>	1
LF	M	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	6
LG	<u>L</u>	I	S	<u>L</u>	<u>F</u>	R	S	3

重鎖の全て (H O および H K を除く) を発現させた。結合曲線を、図 4 ~ 7 に示す。

【0106】

EC₅₀ を、下の表 6 に要約する。

【0107】

【表6】

表6:選択されたヒト化抗 α v β 6抗体に対するEC₅₀

Ab	EC50 (nM)
HBLC	8.14
HLLC	0.74
HLLG	0.97
HMLC	0.49
HMLG	1.07
HNLC	11.14
HNLG	3.16
HRLC	26.7
HRLG	23.9
HSLC	32.5
HTLC	3.7
HULC	0.93

発現データ

ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE) を使用する様々な腫瘍型の免疫組織化学生的分析に、抗 B 6 クローン 437216 (R & D systems) を使用した。

【0108】

10

20

30

40

【表7】

マルチ腫瘍アレイにおける $\alpha v\beta 6$ の発現データの要約

腫瘍起源	$\alpha v\beta 6+$ 発現 (%)
膀胱	65
頭頸部	50
皮膚	33
肺	30
膵臓	30
子宮	30
乳房	26
結腸	20
前立腺	15
卵巣	14
胃	5

10

凍結組織を使用する様々な腫瘍型の免疫組織化学的分析に、抗B6クローン437216(R&D systems)を使用した。

【0109】

【表8】

20

凍結組織試料における $\alpha v\beta 6$ の発現データの要約

腫瘍起源	$\alpha v\beta 6+$	症例数	%
膵臓	10	9	100%
頭頸部	10	10	100%

ホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)および凍結組織を使用する様々な正常な組織型の免疫組織化学的分析にも、抗B6クローン437216(R&D systems)を使用した。正常な乳房、膵臓、食道、喉頭、肺、皮膚、子宮、乳房、結腸、前立腺、胃および卵巣の全てで、B6発現が全くなかった。

【0110】

30

15H3抗体を使用して、凍結腫瘍および正常組織試料も染色した。正常組織試料は、B6発現について陰性だった。トリプルネガティブ乳がん組織の23%(3/13)は、穏やか~強力なB6発現を示した。膵臓がん試料(5/5試料)肺がん試料(10/10)および胃がん試料(10/10)の100%が、強力なB6発現を示した。

【0111】

マウス15H3

ADCのin vitro抗腫瘍活性

細胞毒性アッセイを使用して、抗 $v6$ ADCのin vitro抗腫瘍活性を測定した。定量的FACS分析により、様々な細胞系において $v6$ 発現の調査を実施した。下の表を参照すると、マウス15H3 ADC(vcMMAEまたはmcMMAF(US20050238649に記載される小分子および/またはリンカーの両方)と結合体化されているマウス15H3抗体)は、 $v6$ 細胞を殺すのに有効であった。

40

【0112】

【表9】

がん細胞系	コピ一/細胞($\times 10^3$)	M15H3-vc-MMAE IC ₅₀ (ng/ml)	M15H3-mc-MMAF IC ₅₀ (ng/ml)
HupT4	184	35	16
BxPC3	37	34	7
HPAFII	22	76	>2000
Panc08.13	137	93	1400
Capan-1	19	365	1508
SU8686	33	効果なし	効果なし
5637	36	>1000	>1000
SW780	80	614	86
RT4	42	>1000	>1000

図9は、細胞毒性アッセイにおいてヒト化15H3抗v6ADCが親マウスと同様に作用したことを示す。 20

【0113】

ヒト化抗v6ADCのin vivo抗腫瘍活性

臍臓がん(HPAFII、BxPC-3)ならびに頭頸部がん(Detroit562)モデルを使用して、選択したヒト化v6ADC(抗体当たり平均4薬物)の抗腫瘍活性をin vivoで(図10~12)実証した。vcMMAEに結合体化されているv6ADCは、未処置および対照ADCと比較して有意な腫瘍遅延または腫瘍寛解を示した。h15H3-vcMMAE(4)とは、抗体当たり平均4個のvcMMAE薬物リンカー分子を有するマウス親抗体のヒト化形態の抗体薬物結合体のことを指す。h00-vcMMAE(4)とは、抗体当たり平均4個のvcMMAE薬物リンカー分子を有する、結合しない対照抗体の抗体薬物結合体のことを指す。h15H3-1はHBL構築物であり、h15H3-2はHLLC構築物であり、h15H3-3はHTLC構築物である。 30

【0114】

【化2】

配列

配列番号 1 - マウス重鎖可変領域一タンパク質

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFGYFMNWKQSHGQSLEWIGLINPYNGDSFYNQKFKGKATLT
VQKSSSTAHMELQSLTSEDAVFYCVRGLRRDFDYWGQGTPLTVSS

配列番号 2 - マウス軽鎖可変領域一タンパク質

DVVLTQIPLTLSVTIGQPASLFCKSSQSLLDSDGKTYLNWLFQQRPGQSPKRЛИLVSELDGVPDRFTGSG
SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKEIKR

10

配列番号 3 - マウス重鎖CDR1一タンパク質

GYFMN

配列番号 4 - マウス重鎖CDR2一タンパク質

LINPYNGDSFYNQKFKG

配列番号 5 - マウス重鎖CDR3一タンパク質

GLRRDFDY

20

配列番号 6 - マウス軽鎖CDR1一タンパク質

KSSQSLDSDGKTYLN

配列番号 7 - マウス軽鎖CDR2一タンパク質

LVSELDs

配列番号 8 - マウス軽鎖CDR3一タンパク質

WQGTHFPRt

30

配列番号 9 - HA重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRDTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLRRDFDYWGQGTPLTVSS

配列番号 10 - LA軽鎖可変領域一タンパク質

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSELD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKEIKR

40

配列番号 11 - HB重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYFSGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY

【0115】

【化3】

NQKFKGRVTMTRDTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGLRRDFDYWGQGTLTVSS

配列番号 12 - HF 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRDTSTVYMESSLRSEDTAVYYCVRGLRRDFDYWGQGTLTVSS

配列番号 13 - HG 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRDTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGLRRDFDYWGQGTLTVSS

10

配列番号 14 - HK 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRDKSSSTAYMESSLRSEDTAVYYCARGLRRDFDYWGQGTLTVSS

配列番号 15 - HL 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRDKSSSTAYMESSLRSEDTAVYYCARGLRRDFDYWGQGTLTVSS

20

配列番号 16 - HM 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRQKSSSTAYMESSLRSEDTAVYYCARGLRRDFDYWGQGTLTVSS

配列番号 17 - HN 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRQKSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGLRRDFDYWGQGTLTVSS

30

配列番号 18 - HO 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRQKSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARGLRRDFDYWGQGTLTVSS

配列番号 19 - HQ 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRDTSSSTAYMESSLRSEDTAVYYCARGLRRDFDYWGQGTLTVSS

配列番号 20 - HR 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRDTSSSTAYMESSLRSEDTAVYYCARGLRRDFDYWGQGTLTVSS

40

配列番号 21 - HS 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYFMNWRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRQTSSSTAYMESSLRSEDTAVYYCARGLRRDFDYWGQGTLTVSS

【0116】

【化4】

配列番号 22 - HT 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSGYFNMWVRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRQTSTSTVYMELESSLRSEDTAVYYCVRGLRRDFDYWGQGTIVTVSS

配列番号 23 - HU 重鎖可変領域一タンパク質

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSGYFNMWVRQAPGQGLEWMGLINPYNGDSFY
NQKFKGRVTMTRQKSSTAYMELESSLRSEDTAVYYCVRGLRRDFDYWGQGTIVTVSS

10

配列番号 24 - LB 軽鎖可変領域一タンパク質

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASLFCCKSSQSLLSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSELD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKEIKR

配列番号 25 - LC 軽鎖可変領域一タンパク質

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSELD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKEIKR

20

配列番号 26 - LD 軽鎖可変領域一タンパク質

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLSDGKTYLNWFQQRPGQSPKRRLIYLVSELD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKEIKR

配列番号 27 - LE 軽鎖可変領域一タンパク質

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSELD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKEIKR

30

配列番号 28 - LF 軽鎖可変領域一タンパク質

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASLFCCKSSQSLLSDGKTYLNWFQQRPGQSPKRRLIYLVSELD
SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKEIKR

配列番号 29 - LG 軽鎖可変領域一タンパク質

DVVLTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSELD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKEIKR

40

配列番号 30 - ヒトIgG1重鎖定常領域一タンパク質

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSS
GLYSLSVVTVPSLGTQTYICNVNPKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVIIAKTPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLISPGK

配列番号 31 - ヒトカッパ軽鎖定常ドメイン一タンパク質

【0117】

【化5】

TVAAPSVIIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 32 - ヒトIgG1重鎖定常領域S239C変異体ータンパク質

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSS
GLYSLSVVTVPSLGTQTYICNVNIKPSNTKVDKKVEPKSCDKTIITCPPCPAPELLGG
PCVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号 33 - マウス重鎖可変領域シグナルペプチドータンパク質

MGWSCIIFLFLLSVTVGVFS

配列番号 34 - ヒト重鎖可変領域シグナルペプチドータンパク質

MAWWTLLFLMAAAQSAQA

20

配列番号 35 - マウス軽鎖可変領域シグナルペプチドータンパク質

MSPAQFLFLLVWLWIRETNG

配列番号 36 - ヒト軽鎖可変領域シグナルペプチドータンパク質
protein

MKLPVRLVLMFWIPASSS

配列番号 37 - マウス重鎖可変領域-核酸

30

gaggttcagctgcagcagtctgacacttgagttggtaaaacctggggcttcagtgaagatatacctgcaaggc
ttctggatttattcatttagtggctactttatgaactgggtgaaacagagccatggacagagcccttgagtgg
ttggacttattaaatccttacaatggagactcttttacaatcagaagttcaagggcaaggccacattgact
gtacagaagtctcttagtacagccccacatggaaactccagagcctgacatctgaagactctgcagtttt
ttgtgttagagggttacgacggactttgactattggggccaaggcaccctctcacagtctcctca

配列番号 38 - マウス軽鎖可変領域-核酸

Gatgttgttgaccagattccactcaactttgtcggttaccattggacaaccagcctcccttttgtaa
gtcaagtcaagacgcctttagatagtgtatggaaagacatatttgaattggattttcagaggccaggccagt
ctccaaagcgccttatttatctgggtctgaactggactctggagttccctgacaggttcaactggcagtgg
tcagggacagattcacactgaaaatcagcagagtgaggctgaggattggagttatttgcggca
aggtacacatttcctcgacgttccggtgaggcaccaagctggaaatcaaacgg

40

配列番号 39 - HA重鎖可変領域-核酸

【0118】

【化6】

Caggtgcagctgggcgcgtctggagctgaggtaagaaggcctggagcctctgtgaagggtgtcctgttaaggc
ctctggctacacccctcacaggctacttcatgaactgggtgaggcaggccctggccagggcctggagtgga
tgggcctgatcaacccttacaatggagactccttctacaaccagaagttcaagggcagggtgaccatgacc
agggacacccacatggagactgttcatggagctgtcctccctgaggctgaggacacagctgtgtacta
ctgtgccagggcctgaggagggactttgactactggggccagggcaccctggtaacgtgtcctcc

配列番号 40 - HB 重鎖可変領域-核酸

Caggtgcagctgggcgcgtctggagctgaggtaagaaggcctggagcctctgtgaagggtgtcctgttaaggc
ctctggctacagcttctctggctacttcatgaactgggtgaggcaggccctggccagggcctggagtgga
tgggcctgatcaacccttacaatggagactccttctacaaccagaagttcaagggcagggtgaccatgacc
agggacacccacatggagactgttcatggagctgtcctccctgaggctgaggacacagctgtgtacta
ctgtgccagggcctgaggagggactttgactactggggccagggcaccctggtaacgtgtcctcc

10

配列番号 41 - HL 重鎖可変領域-核酸

Caggtgcagctgggcgcgtctggagctgaggtaagaaggcctggagcctctgtgaagggtgtcctgttaaggc
ctctggctacagcttctctggctacttcatgaactgggtgaggcaggccctggccagggcctggagtgga
tgggcctgatcaacccttacaatggagactccttctacaaccagaagttcaagggcagggtgaccatgacc
agggacaagtccctccacagttacatggagctgtcctccctgaggctgaggacacagctgtgtacta
ctgtgccagggcctgaggagggactttgactactggggccagggcaccctggtaacgtgtcctcc

20

配列番号 42 - HT 重鎖可変領域-核酸

Caggtgcagctgggcgcgtctggagctgaggtaagaaggcctggagcctctgtgaagggtgtcctgttaaggc
ctctggctacagcttctctggctacttcatgaactgggtgaggcaggccctggccagggcctggagtgga
tgggcctgatcaacccttacaatggagactccttctacaaccagaagttcaagggcagggtgaccatgacc
aggcagacccacatggagactgttcatggagctgtcctccctgaggctgaggacacagctgtgtacta
ctgtgtcagggcctgaggagggactttgactactggggccagggcaccctggtaacgtgtcctcc

配列番号 43 - HN 重鎖可変領域-核酸

Caggtgcagctgggcgcgtctggagctgaggtaagaaggcctggagcctctgtgaagggtgtcctgttaaggc
ctctggctacagcttctctggctacttcatgaactgggtgaggcaggccctggccagggcctggagtgga
tgggcctgatcaacccttacaatggagactccttctacaaccagaagttcaagggcagggtgaccatgacc
aggcagacccacatggagactgttcatggagctgtcctccctgaggctgaggacacagctgtgtacta
ctgtgccagggcctgaggagggactttgactactggggccagggcaccctggtaacgtgtcctcc

30

配列番号 44 - HU 重鎖可変領域-核酸

Caggtgcagctgggcgcgtctggagctgaggtaagaaggcctggagcctctgtgaagggtgtcctgttaaggc
ctctggctacagcttctctggctacttcatgaactgggtgaggcaggccctggccagggcctggagtgga
tgggcctgatcaacccttacaatggagactccttctacaaccagaagttcaagggcagggtgaccatgacc
aggcagaagtccctccacagttacatggagctgtcctccctgaggctgaggacacagctgtgtacta
ctgtgtcagggcctgaggagggactttgactactggggccagggcaccctggtaacgtgtcctcc

40

配列番号 45 - LA軽鎖可変領域-核酸

gatgtgggtatgaccaggctccctctgtccctgcctgtgaccctggggccagcctgcctccatctcctgtaa
gtcctccctggactctgtatggcaagacactacactgaactgggtccagcaggcctggccagt
ccccttaggaggctgatctacccctggactctggactctggactctggactgtcctgacaggttctctggctctggc
tctggcacagacttccaccctgaagatctccagggtggaggctgaggatgtggagtgactactgttggca
gggcacccacttcccttaggaccccttggaggtggaaaccaagctggagatcaagcgt

【0119】

【化7】

配列番号 46 - LC 軽鎖可変領域-核酸

gatgtggatgaccagtcctgtccctgcctgtgaccctggccagccctgcctccatctcctgtaa
gtcctccctgcctgtggactctgtatgcacactacctgaactggctgttccagaggcctggccagt
cccctaggaggctgatctacctgtgtctgagctggactctggagtgccgtacaggttctggctctggc
tctggcacagacttcaccctgaagatctccagggtgaggctgaggatgtggagtgactactgtggca
gggcacccacttccttaggaccttggaggtggaaccaagctggagatcaagcgt

配列番号 47 - LF 軽鎖可変領域-核酸

Gatgtggatgaccagtcctgtccctgcctgtgaccctggccagccctgcctccctgttctgtaa
gtcctccctgcctgtggactctgtatgcacactacctgaactggctgttccagaggcctggccagt
cccctaggaggctgatctacctgtgtctgagctggactctggagtgccgtacaggttctggctctggc
tctggcacagacttcaccctgaagatctccagggtgaggctgaggatgtggagtgactactgtggca
gggcacccacttccttaggaccttggaggtggaaccaagctggagatcaagcgt

10

配列番号 48 - LG 軽鎖可変領域-核酸

gatgtggatgaccagtcctgtccctgcctgtgaccctggccagccctgcctccatctcctgtaa
gtcctccctgcctgtggactctgtatgcacactacctgaactggctgttccagaggcctggccagt
cccctaggaggctgatctacctgtgtctgagctggactctggagtgccgtacaggttctggctctggc
tctggcacagacttcaccctgaagatctccagggtgaggctgaggatgtggagtgactactgtggca
gggcacccacttccttaggaccttggaggtggaaccaagctggagatcaagcgt

20

配列番号 49 - マウス重鎖可変領域シグナルペプチド-核酸

Atggatggagctgtatcttcctttcttcctgtcagtaactgttagtgtgtttct

配列番号 50 - ヒト重鎖可変領域シグナルペプチド-核酸

Atggcttgggtgtggaccttgcattcctgtatggcagctgccccaaagtgcggcaagca

30

配列番号 51 - マウス軽鎖可変領域シグナルペプチド-核酸

atgagtcctgcccagttcctgtttctgttagtgcctggattcggaaaccaacgg

配列番号 52 - ヒト軽鎖可変領域シグナルペプチド-核酸

Atgaagttgcctgtttaggctgtggctgatgttctggattcctgcttcagcagt

配列番号 53 - ヒトIgG1重鎖定常領域-核酸

40

cttagcaccaaggcccateggttccccctggcacccctcccaagagcacccctggggcacageggccctggctgcctggtaaggactactcc
ccgaaccggtaeggtgtcgactcagggccctgaccagcggcgtgcacacccctccggctgtctacagactactccctcagcag
cgtggtgaccgtgeccctccagcagctggcacccagacatctgcacagtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaagttgagcc

【0120】

【化8】

caaatcttgtgacaaaactcacacatgcccacgtgcccagcacctgaactctgggggacggcagtttcctttccccaaaacccaaggacaccc
tcatgatctccggacccctgaggtecatgctgtgggtgacgtgagccacgaagaccctgaggtaactgttaactgtggacggcgtggaggt
gcataatgccaacaagccggggaggaggcgtacaacagcacgtaccgtgtggcagggcctaccgtcaccaggactggctgaatggca
aggagtacaagtgeaggttccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaagggcagccccgagaaccacaggttac
accctgccccatccggatgagctgaccaagaaccaggcgttccatcgactgtggtaaaaggcttateccagcgaatcgccgtggagtg
agcaatgggeacccggagaacaactacaagaccacgttccatcgactgtggacttcttctatcagcaagtcacccgtggacaagagc
aggggcagcagggaaacgttctatgtcatcgatgaggctctgacaaaccactacaacgcaagaagccctccctgtccggtaaa

配列番号 54 - ヒトカッパ軽鎖定常ドメイン-核酸

10

Actgtgggggeccatgttcatcttccgcatctgtatgagcagtgtgaaatctggactgtgtgtgcctgtgaataacttctatcccagag
gccaaggatcagtggaagggtggataacgcctccaatcggttaactcccaggagatgtcagagcaggacagcactacagectc
cagcaccctgacgtgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccatcaggcctgagctgcctgc
caacagggagaggtgt

配列番号 55 - ヒトIgG1重鎖定常領域S239C変異体-核酸

20

Getagcaccaaggcccattgttccctgtgaccccttcaagagcaccttggggcacagetgcctggctggtaaggactacttcc
ctgaaacctgtgacagtgtcctgaaactcaggeccctgacccagcggcgtgacacccttccggctgtccatcagtcacttccctc
gtggtgaccgttccctcagcagetttggccatccagactacatctgcaactgtgaatcacaagccagcaacaccaagggt
aaatctgtgacaaaactcacacatgcccacccgtgcccagcacctgaactctggggacccgtgttcttccccaaaacccaagg
accctatgtccggaccctgtgaggcatactgctgtggggacgtgagccacgaagaccctgaggtaactgttacgtgt
cataatgccaagacaagccggggaggaggcgtacaacacgacgtaccgtgtggcaggttccatcgccatggcgtgaatgg
ggaggtacaatgtcaaggatccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaggccaaaggc
agccccgagaaccacaggcgttccatcgactgtggacttccatcgacccgttccatcgactgtggacaagag
gcaatggcagccggagaacaactacaagaccacgttccatgtggacttccatcgactgtggacaagag
ggtggcagcagggaaacgttctatgtcatcgatgaggctctgacaaaccactacacacaagggc
acttccctgtccggtaaa

【図1】

10 20 30 40 50
h15H3 VH E...P.L.V...I...S.S...K.SH...S.I...
h15H3 HA QVQLTQSGAATVKKPGASVVKVSKQASGVYFTGVYFMMWVRCAPGQQLWNLINPVYQDSDVY
h15H3 HBS.S...
h15H3 HLS.S...
h15H3 HTS.S...
h15H3 HVS.S...

70 80 90 100 110
h15H3 VH K...L.V.Q...S...A.H...Q...T...S...P...V...
h15H3 HA HQKPFGRVYMTDRTISSTVYMEISLRLGEDTAVVYCYARLRLDFDYGQGQCLTVTVSS
h15H3 HBK.S...A...
h15H3 HLQ...
h15H3 HTQ...
h15H3 HVV...

15 20 30 40 50
h15H3 VL L.I...P.S...I...L.P...K...
h15H3 LA PVVVQDPSPLSPVTLQDPAHSCKSQSLDSDQHLYVNFQDQPGQSPRHLVLYVSLD
h15H3 LCL.P...
h15H3 LFL.P...K...
h15H3 LGL...

60 70 80 90 100
h15H3 VLT...
h15H3 LA RGVVPCDFPSGHSQGSDTDFKIKSVNVAJDWGVYVYCNQGTHFPRTFPGSGTQLBIRK
h15H3 LC
h15H3 LFT...
h15H3 LG
.....

Figure 1

【図2】

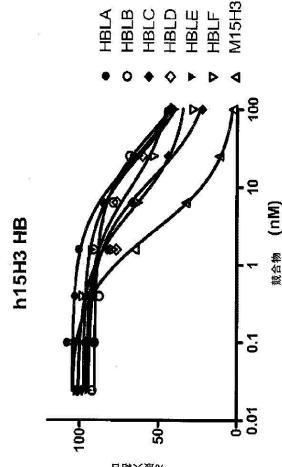
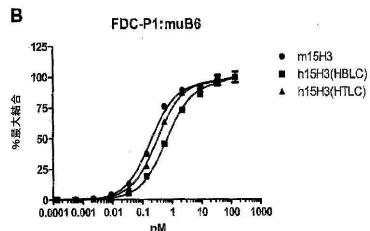


Figure 2

【図3】



C

試験試料	Kd (nM)
m15H3	0.2
h15H3(HBLC)	0.6
h15H3(HTLC)	0.3

Figures 3A-3C

【図4】

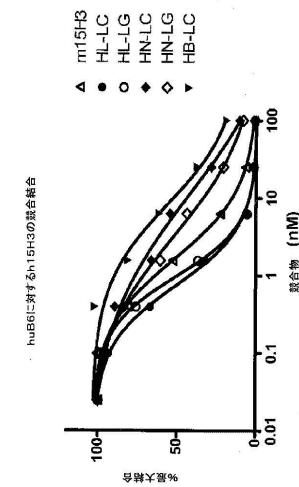


Figure 4

【図5】

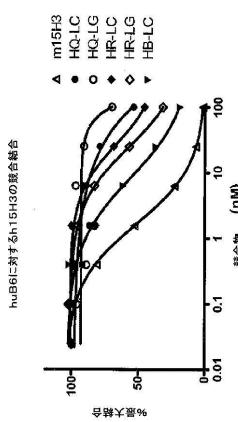


Figure 5

【図6】

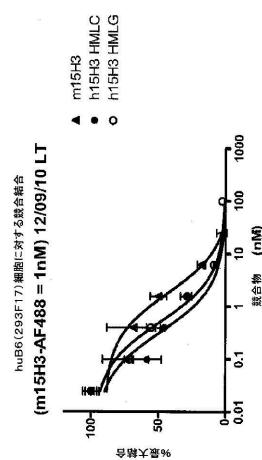


Figure 6

【図7】

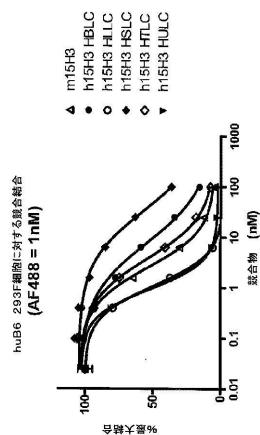


Figure 7

【図8】

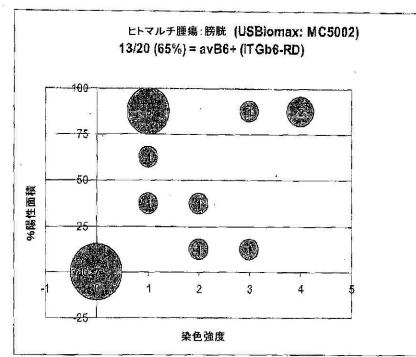


Figure 8

【図9-1】

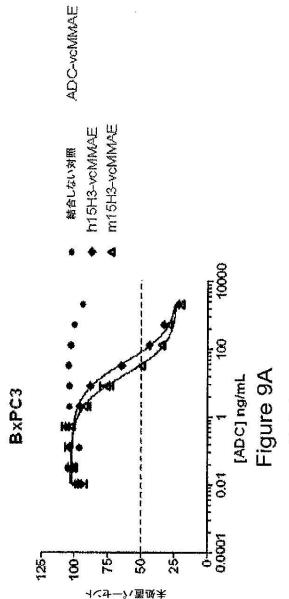


Figure 9A

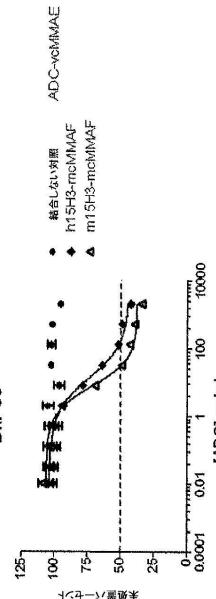


Figure 9B Figures 9A-9B

【図9-2】

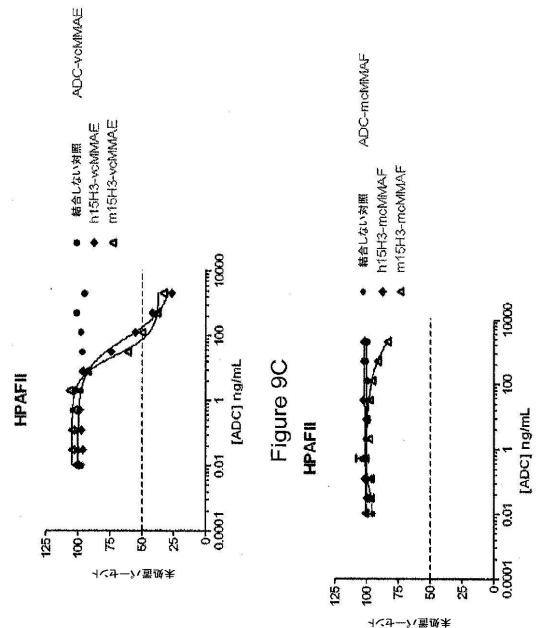
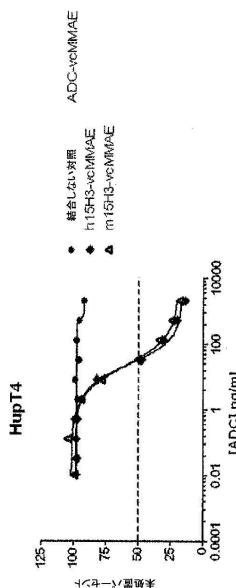
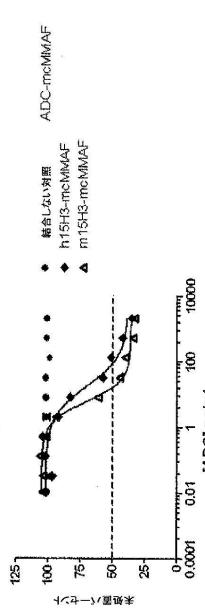


Figure 9C

Figure 9D Figures 9C-9D

Figure 9E

【図 9 - 3】

Figure 9E
HupT4Figure 9F
HupT4

【図 10】

Detroit562頸部癌に対するh15H3-vcMMAE(4)の活性

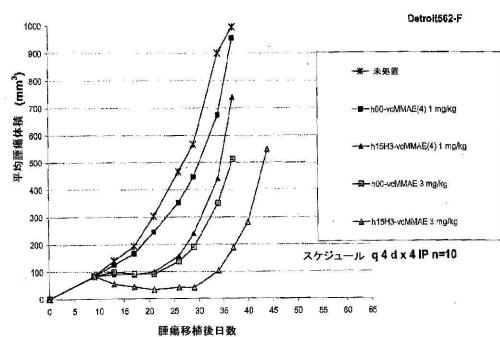


Figure 10

【図 11】

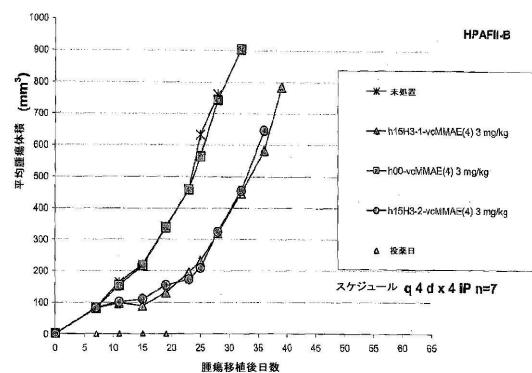
ヌードマウスにおけるHPAFII肺癌異種移植片に対する抗 α v β 6 ADCの活性

Figure 11

【図 12】

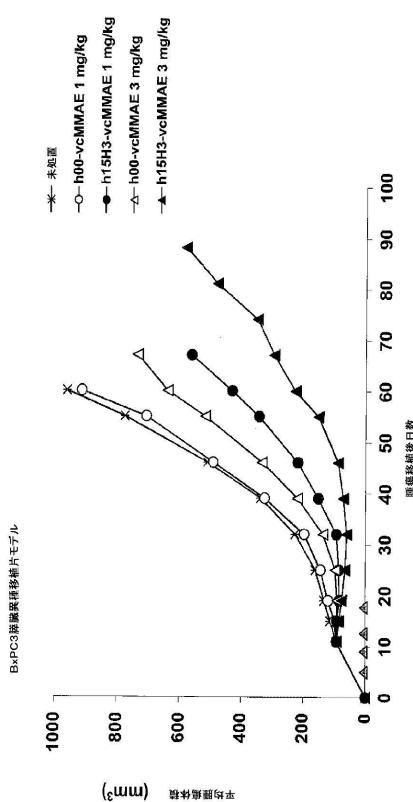


Figure 12

【配列表】

0006273214000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100194618

弁理士 鶴田 聰子

(72)発明者 ライアン, マウリーン

アメリカ合衆国 ワシントン 98021, ボセル, 30ティーエイチ ドライブ サウスイースト 21823, シアトル ジェネティックス, インコーポレイテッド

(72)発明者 サスマン, ジャンゴ

アメリカ合衆国 ワシントン 98021, ボセル, 30ティーエイチ ドライブ サウスイースト 21823, シアトル ジェネティックス, インコーポレイテッド

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表2009-500041(JP, A)

特表2005-528099(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 16/00-16/46

UniProt/GenSeq

Capplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed