(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年4月20日(20.04.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/063026 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/40 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/034801

(22) 国際出願日： 2022年9月16日(16.09.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-169289 2021年10月15日(15.10.2021) JP

(71) 出願人: 株式会社カイオム・バイオサイエンス (CHIOME BIOSCIENCE INC.) [JP/JP]; 〒1510071 東京都渋谷区本町三丁目１２番１号 Tokyo (JP).

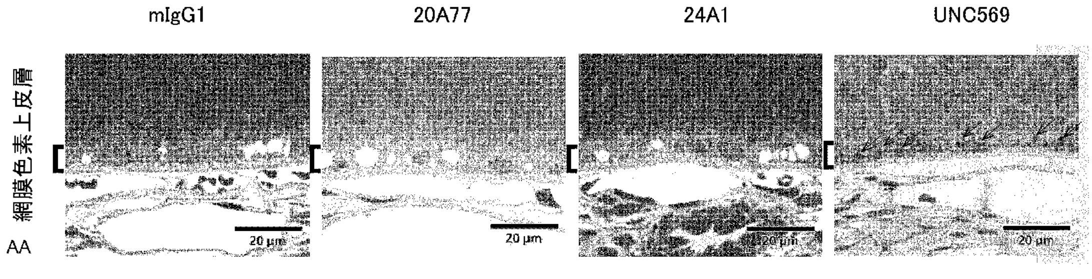
(72) 発明者: 豊浦 雅義 (TOYOURA Masayoshi); 〒1510071 東京都渋谷区本町三丁目１２番１号 株式会社カイオム・バイオサイエンス内 Tokyo (JP). 上林 博明(KAMBAYASHI Hiroaki); 〒1510071 東京都渋谷区本町三丁目１２番１号 株式会社カイオム・バイオサイエンス内 Tokyo (JP). 澤田 篤志(SAWADA Atsushi); 〒1510071 東京都渋谷区本町三丁目１２番１号 株式会社カイオム・バイオサイエンス内 Tokyo (JP). 武居 亜希(TAKESUE Aki); 〒1510071 東京都渋谷区本町三丁目１２番１号 株式会社カイオム・バイオサイエンス内 Tokyo (JP). 井上 俊和(INOUE Toshikazu); 〒1510071 東京都渋谷区本町三丁目１２番１号 株式会社カイオム・バイオサイエンス内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 正林 真之 (SHOBAYASHI Masayuki); 〒1000005 東京都千代田区丸の内１－７－１２ サピアタワー Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

(54) **Title:** ANTIBODY OR FRAGMENT THEREOF BINDING SPECIFICALLY TO MERTK, AND ANTI-TUMOR AGENT

(54) 発明の名称： ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片、及び抗腫瘍剤



AA Retinal pigment epithelial layer

(57) **Abstract:** A problem addressed by the present invention is to provide an anti-MerTK antibody that has a tumor-suppressing effect and does not tend to cause ocular toxicity. The present invention provides an antibody or a fragment thereof that binds specifically to MerTK, in which the amino acid sequences of heavy chain and light chain CDRs 1 to 3 satisfy predetermined requirements.

(57) 要約：本発明の課題は、腫瘍抑制効果を有し、かつ、眼毒性を生じにくい抗ＭｅｒＴＫ抗体を提供することである。本発明は、重鎖及び軽鎖のＣＤＲ１乃至３のアミノ酸配列が、所定の要件を満たす、ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片を提供する。

WO 2023/063026 A1

［続葉有］

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ：

ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片、及び抗腫瘍剤

技術分野

[0001]　本発明は、ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片、及び抗腫瘍剤に関する。

背景技術

[0002]　「Ｍｙｅｌｏｉｄ－Ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ－Ｒｅｐｒｏｄｕｃｔｉｖｅ Ｔｙｒｏｓｉｎｅ Ｋｉｎａｓｅ」（以下、「ＭｅｒＴＫ」ともいう。）は、ＴＡＭ（Ｔｙｒｏ３、ＡＸＬ、及びＭｅｒＴＫ）受容体チロシンキナーゼファミリーのメンバーの１つとして知られる。ＭｅｒＴＫは、２つのイムノグロブリン様ドメイン、２つのフィブロネクチンＩＩＩ型ドメイン、及び１つのチロシンキナーゼドメインを有する膜貫通型タンパク質である。

[0003]　ＭｅｒＴＫには、種々の機能が知られている。

例えば、がん細胞に発現するＭｅｒＴＫの活性化ががん細胞の増殖や遊走を誘導することや、腫瘍微小環境におけるＭｅｒＴＫが免疫抑制に寄与すること等が報告されている（例えば、非特許文献１、非特許文献２等）。

そのため、ＭｅｒＴＫは、癌免疫分野における新たな標的分子として注目されている。

[0004]　例えば、特許文献１には、ＭｅｒＴＫと、ＭｅｒＴＫのリガンドである「Ｇｒｏｗｔｈ ａｒｒｅｓｔ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｐｒｏｔｅｉｎ ６」（以下、「Ｇａｓ６」ともいう。）との結合を阻害する抗ＭｅｒＴＫ抗体が、癌の治療に有効であることが開示されている。

[0005]　他方で、ＭｅｒＴＫとそのリガンドとの阻害は、副作用を生じる可能性がある。

例えば、非特許文献３には、マウスへのＭｅｒＴＫ低分子阻害剤（ＵＮＣ５６９）の投与により、視細胞層においてトルイジンブルー陽性顆粒や空砲

の増加が認められ、眼毒性が生じたことが報告されている。

非特許文献４には、エフェロサイトーシス阻害能や抗腫瘍効果を有する抗ＭｅｒＴＫ抗体が、カニクイザルに眼毒性をもたらしたことが報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第２０２０／０７６７９９号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｐｈａｒｍａｃｏｌ　Ｔｈｅｒ．　２０２１　Ｓｅｐ；２２５：１０７８２２．　ｄｏｉ：　１０．１０１６／ｊ．ｐｈａｒｍｔｈｅｒａ．２０２１．１０７８２２．　Ｅｐｕｂ　２０２１　Ｍａｒ　１０

非特許文献2：Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．　２０２０　Ｆｅｂ　１８；５２（２）：３５７－３７３．ｅ９．　ｄｏｉ：　１０．１０１６／ｊ．ｉｍｍｕｎｉ．２０２０．０１．０１４．　Ｅｐｕｂ　２０２０　Ｆｅｂ　１１

非特許文献3：Ｔｏｘｉｃｏｌ　Ｐａｔｈｏｌ．　２０１８　Ｆｅｂ；４６（２）：１９３－２０１．　ｄｏｉ：１０．１１７７／０１９２６２３３１７７４９４６９．　Ｅｐｕｂ　２０１８　Ｊａｎ　８

非特許文献4：ｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｓｕｒｆａｃｅｏｎｃｏｌｏｇｙ．ｃｏｍ／ｗｐ－ｃｏｎｔｅｎｔ／ｕｐｌｏａｄｓ／Ｓｕｒｆａｃｅ＿ＡＡＣＲ１９＿１９０３０７ｃ．ｐｄｆ

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかし、現在まで、腫瘍抑制効果を有し、かつ、眼毒性を生じにくい抗ＭｅｒＴＫ抗体に関する報告は確認されていない。

[0009] 本発明は以上の実情に鑑みてなされたものであり、腫瘍抑制効果を有し、かつ、眼毒性を生じにくい抗ＭｅｒＴＫ抗体の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0010]　本発明者らが検討した結果、所定の配列から構成される抗体又はその断片によれば上記課題を解決できることを新規に見出し、本発明を完成するに至った。より具体的には、本発明は以下を提供する。

[0011]　（１）　重鎖及び軽鎖のＣＤＲ１乃至３のアミノ酸配列が、下記［要件Ａ］を全て満たす、ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片。

［要件Ａ］

重鎖ＣＤＲ１が、配列番号２で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ２が、配列番号３で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ３が、配列番号４で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ１が、配列番号６で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ２が、配列番号７で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ３が、配列番号８で表されるアミノ酸配列である。

[0012]　（２）　さらに、下記［要件Ｂ］を全て満たす、（１）に記載の抗体又はその断片。

［要件Ｂ］

重鎖可変領域が、配列番号１で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号５で表されるアミノ酸配列である。

[0013]　（３）　重鎖及び軽鎖のＣＤＲ１乃至３のアミノ酸配列が、下記［要件Ｃ］を全て満たす、ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片。

［要件Ｃ］

重鎖ＣＤＲ１が、配列番号１０で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ２が、配列番号１１で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ３が、配列番号１２で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ１が、配列番号１４で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ２が、配列番号１５で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ３が、配列番号１６で表されるアミノ酸配列である。

[0014]　（４）　さらに、下記［要件Ｄ］又は［要件Ｅ］のいずれかを全て満たす、（３）に記載の抗体又はその断片。

［要件Ｄ］

重鎖可変領域が、配列番号９で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号１３で表されるアミノ酸配列である。

［要件Ｅ］

重鎖可変領域が、配列番号２３で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号２４で表されるアミノ酸配列である。

[0015]　（５）　重鎖及び軽鎖のＣＤＲ１乃至３のアミノ酸配列が、下記［要件Ｆ］を全て満たす、ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片。

［要件Ｆ］

重鎖ＣＤＲ１が、配列番号２で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ２が、配列番号１８で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ３が、配列番号４で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ１が、配列番号６で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ２が、配列番号２０で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ３が、配列番号８で表されるアミノ酸配列である。

[0016]　（６）　さらに、下記［要件Ｇ］又は［要件Ｈ］のいずれかを全て満たす、（５）に記載の抗体又はその断片。

［要件Ｇ］

重鎖可変領域が、配列番号１７で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号１９で表されるアミノ酸配列である。

［要件Ｈ］

重鎖可変領域が、配列番号２１で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号２２で表されるアミノ酸配列である。

[0017]　（７）　（１）から（６）のいずれか１項に記載の抗体又はその断片を含む、抗腫瘍剤。

[0018]　（８）　さらに、免疫チェックポイント阻害剤を含む（７）に記載の抗腫瘍剤。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、腫瘍抑制効果を有し、かつ、眼毒性を生じにくい抗ＭｅｒＴＫ抗体が提供される。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]実施例におけるリン酸化阻害試験の結果を示す図である。

[図2]実施例で作製した抗体のＨ鎖可変領域及びＬ鎖可変領域のアミノ酸配列、及び該配列へのＣＤＲ変異導入箇所を示す図である。

[図3]各種動物に由来するＭｅｒＴＫに対する、実施例で作製した抗体のＥＬＩＳＡにおける反応性を示す図である。

[図4]実施例で作製した抗体による腫瘍抑制効果を示す図である。

[図5]実施例で作製した抗体による腫瘍抑制効果を示す図である。

[図6]実施例でのＴＩＬ解析におけるＭ１／Ｍ２比を示す図である。

[図7]実施例で作製した抗体による腫瘍抑制効果を示す図である。

[図8]実施例で作製した抗体による腫瘍抑制効果を示す図である。

[図9]実施例で作製した抗体による腫瘍抑制効果を示す図である。

[図10]実施例で作製した抗体による腫瘍抑制効果を示す図である。

[図11]実施例で作製した抗体による腫瘍抑制効果を示す図である。

[図12]実施例で作製した抗体による腫瘍抑制効果を示す図である。

[図13]各種抗ＭｅｒＴＫ抗体による、ＭｅｒＴＫとＧａｓ６との結合阻害能を示す図である。

[図14]各種抗ＭｅｒＴＫ抗体による、ＭｅｒＴＫとＴＵＬＰ１との結合阻害能を示す図である。

[図15]各種抗ＭｅｒＴＫ抗体による、ＭｅｒＴＫとＧａｓ６との結合阻害能を示す図である。

[図16]各種抗ＭｅｒＴＫ抗体による、ＭｅｒＴＫとＴＵＬＰ１との結合阻害能を示す図である。

[図17]各種薬剤投与後の網膜色素上皮層のＴＢ染色結果を示す図である。

[図18]各種薬剤投与後の外顆粒層のＴＢ染色結果を示す図である。

[図19]各種薬剤投与後の網膜色素上皮層のＴＢ染色結果を示す図である。

[図20]各種薬剤投与後の外顆粒層のＴＢ染色結果を示す図である。

[図21]抗ＭｅｒＴＫ抗体のヒトキメラ抗体及びヒト化抗体のＥＬＩＳＡにおける反応性を示す図である。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、本発明の実施形態について説明するが、本発明はこれに限定されない。

[0022] ＜ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片＞

本発明に係るＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片（以下、「本発明の抗体又はその断片」ともいう。）は、後述のとおり３つの態様を包含する。

[0023] 本発明の抗体又はその断片は、抗ＭｅｒＴＫ抗体又はその断片である。

従来、抗ＭｅｒＴＫ抗体は、ＭｅｒＴＫと、ＭｅｒＴＫのリガンドとの結合阻害により抗腫瘍効果を奏することが知られていた。

抗ＭｅｒＴＫ抗体は、例えば、ＭｅｒＴＫと、ＭｅｒＴＫのリガンドのうちＧａｓ６との結合を阻害する結果、腫瘍微小環境を変化させ、抗腫瘍効果を奏する。

[0024] ここで、ＭｅｒＴＫのリガンドのうち「Ｔｕｂｂｙ－ｒｅｌａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ １」（以下、「ＴＵＬＰ１」ともいう。）遺伝子は、眼疾患である網膜色素変性症の原因である。さらに、ＴＵＬＰ１をノックアウトすると、光受容体変性が引き起こされることが知られている（Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｖｅ Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌｏｇｙ ＆ Ｖｉｓｕａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ， Ａｕｇｕｓｔ ２００１，Ｖｏｌ．４２，Ｎｏ．９）。また、ＭｅｒＴＫをノックアウトすると、眼の視力低下と相関が認められている異常所見の一つである外顆粒層の萎縮がみられることが知られている（Ｎｅｕｒｏｎ．２０１２ Ｄｅｃ ２０；７６（６）：１１２３－３２．）。したがって、抗腫瘍効果を奏する抗ＭｅｒＴＫ抗体であっても、ＭｅｒＴＫとＴＵＬＰ１との結合を阻害する抗体であれば、眼毒性を生じる懸念がある。

[0025] そこで、本発明者らがさらなる検討を行った結果、本発明の抗体又はその

断片の創出に成功し、該抗体等によれば、ＭｅｒＴＫとＧａｓ６との結合は阻害するものの、ＭｅｒＴＫとＴＵＬＰ１との結合は阻害せず、腫瘍抑制効果を有し、かつ、眼毒性を生じにくいことを確かめた。

[0026] 本発明において、「ＭｅｒＴＫに特異的に結合する」とは、本発明の抗体又はその断片が、ＭｅｒＴＫタンパク質と特異的に結合し、その他のタンパク質とは、ほぼ又は全く結合しないことを意味する。

抗体又はその断片がＭｅｒＴＫに特異的に結合するかどうかは、Ｅｎｚｙｍｅ－Ｌｉｎｋｅｄ Ｉｍｍｕｎｏ Ｓｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ（ＥＬＩＳＡ法）により特定する。

[0027] 本発明において「抗体」とは、免疫グロブリン等とも称されるＹ字型の４本鎖構造のタンパク質を意味する。

[0028] 本発明において「抗体の断片」とは、本発明の抗体の構造のうち、抗体の相補性決定領域（以下、「ＣＤＲ」ともいう。）又は可変領域の構造を有するタンパク質を意味する。ただし、本発明の抗体の断片は、ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗原結合断片であり、少なくとも、後述する要件Ａ乃至Ｃのうちのいずれかを全て満たす。

[0029] （第１の態様に係る抗体又はその断片）

本発明の抗体又はその断片のうち、第１の態様に係る抗体又はその断片は、重鎖及び軽鎖のＣＤＲ１乃至３のアミノ酸配列が、下記［要件Ａ］を全て満たす。

［要件Ａ］

重鎖ＣＤＲ１が、配列番号２で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ２が、配列番号３で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ３が、配列番号４で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ１が、配列番号６で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ２が、配列番号７で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ３が、配列番号８で表されるアミノ酸配列である。

[0030]

[表1]

配列番号	アミノ酸配列
2	SYWMH
3	NINPSNGGTNYNEKFKS
4	LNYYGFDGFAF
6	KASQDINSYLS
7	RANRLVD
8	LQYDEFPFT

[0031] 第１の態様に係る抗体又はその断片は、本発明の効果をより奏しやすいという観点から、好ましくは、下記［要件Ｂ］を全て満たす。

［要件Ｂ］

重鎖可変領域が、配列番号１で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号５で表されるアミノ酸配列である。

[0032] [表2]

配列番号	アミノ酸配列
1	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCRASGNTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNINPSNGGTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLNYYGFDGFAFWGQGTLVTVSA
5	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPFTFGSGTKLEIK

[0033] 第１の態様に係る抗体又はその断片は、実施例において、「２０Ａ７７」、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ２ａ」と称される各抗体を包含する。

[0034] （第２の態様に係る抗体又はその断片）

本発明の抗体又はその断片のうち、第２の態様に係る抗体又はその断片は、重鎖及び軽鎖のＣＤＲ１乃至３のアミノ酸配列が、下記［要件Ｃ］を全て満たす。

［要件Ｃ］

重鎖ＣＤＲ１が、配列番号１０で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ２が、配列番号１１で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ３が、配列番号１２で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ１が、配列番号１４で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ２が、配列番号１５で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ３が、配列番号１６で表されるアミノ酸配列である。

[0035] [表3]

配列番号	アミノ酸配列
10	VYDMH
11	RIRSKSSNYATNYADSVKD
12	DGSHYYYALDY
14	RASQDINNYLN
15	YSSRLHS
16	QQGKMFPWT

[0036] 第２の態様に係る抗体又はその断片は、本発明の効果をより奏しやすいという観点から、好ましくは、下記［要件Ｄ］又は［要件Ｅ］のいずれかを全て満たす。

［要件Ｄ］

重鎖可変領域が、配列番号９で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号１３で表されるアミノ酸配列である。

［要件Ｅ］

重鎖可変領域が、配列番号２３で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号２４で表されるアミノ酸配列である。

[0037] [表4]

配列番号	アミノ酸配列
9	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNVYDMHWVRQAPGEGLEWVARIRSKSSNYATNYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLQTEDTAIYYCVRDGSHYYYALDYWGQGTSVTVSS
13	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKLDGTVKLLIYYSSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKMFPWTFGGGTKLEIK
23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNVYDMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSSNYATNYADSVKDRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRDGSHYYYALDYWGQGTTVTVSS
24	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYSSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGKMFPWTFGGGTKVEIK

[0038] 第２の態様に係る抗体又はその断片は、実施例において、「２４Ａ１」、

「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」、「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ２ａ」、「２４Ａ１＿ｈＩｇＧ１ＬＡＬＡ」、「ｈｚ２４Ａ１」、「ｈｚ２４Ａ１＿ｈＩｇＧ１ＬＡＬＡ」と称される各抗体を包含する。

なお、「ｈｚ２４Ａ１」、「ｈｚ２４Ａ１＿ｈＩｇＧ１ＬＡＬＡ」は、いずれも、「２４Ａ１」をヒト化した抗体である。

[0039] （第３の態様に係る抗体又はその断片）

本発明の抗体又はその断片のうち、第３の態様に係る抗体又はその断片は、重鎖及び軽鎖のＣＤＲ１乃至３のアミノ酸配列が、下記［要件Ｆ］を全て満たす。

［要件Ｆ］

重鎖ＣＤＲ１が、配列番号２で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ２が、配列番号１８で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ３が、配列番号４で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ１が、配列番号６で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ２が、配列番号２０で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ３が、配列番号８で表されるアミノ酸配列である。

[0040] [表5]

配列番号	アミノ酸配列
2	SYWMH
18	NINPSSGGTNYNEKFKS
4	LNYYGFDGFAF
6	KASQDINSYLS
20	RANRLVS
8	LQYDEFPFT

[0041] 第３の態様に係る抗体又はその断片は、本発明の効果をより奏しやすいという観点から、好ましくは、下記［要件Ｇ］又は［要件Ｈ］のいずれかを全て満たす。

［要件Ｇ］

重鎖可変領域が、配列番号１７で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号１９で表されるアミノ酸配列である。

［要件Ｈ］

重鎖可変領域が、配列番号２１で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号２２で表されるアミノ酸配列である。

[0042] [表6]

配列番号	アミノ酸配列
17	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCRASGNTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNINPSSGGTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLNYYGFDGFAFWGQGTLVTVSA
19	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPFTFGSGTKLEIK
21	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGNTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGNINPSSGGTNYNEKFKSRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLNYYGFDGFAFWGQGTLVTVSS
22	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPFTFGGGTKVEIK

[0043] 第３の態様に係る抗体又はその断片は、実施例において、「ｍ２０Ａ７７」、「ｍ２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」、「ｍ２０Ａ７７＿ｈＩｇＧ１ＬＡＬＡ」、「ｈｚ２０Ａ７７」、「ｈｚ２０Ａ７７＿ｈＩｇＧ１ＬＡＬＡ」と称される各抗体を包含する。

なお、「ｈｚ２０Ａ７７」、「ｈｚ２０Ａ７７＿ｈＩｇＧ１ＬＡＬＡ」は、いずれも、「ｍ２０Ａ７７」をヒト化した抗体である。

[0044] <本発明の抗体又はその断片の製造方法>

本発明の抗体又はその断片の製造方法は特に限定されないが、各種抗体（モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体等）や、各種ポリペプチドの製造方法として従来知られる方法を採用できる。

[0045] 本発明の抗体は、好ましくはモノクローナル抗体として製造することが好ましい。

[0046] 本発明の抗体又はその断片は、必要に応じて精製等を行ってもよい。

[0047] 抗体又はその断片が、本発明の抗体又はその断片であるかどうかは、アミノ酸配列を特定するための任意の方法（Ｎ末端アミノ酸配列解析等）によって特定できる。

[0048] 本発明は、本発明の抗体又はその断片をコードする遺伝子、該遺伝子を含

む発現ベクター等を包含する。

これらの遺伝子、発現ベクターは、従来知られる方法によって作製できる。

[0049] <本発明の抗腫瘍剤>

本発明の抗体又はその断片は、良好な抗腫瘍効果を奏するため、抗腫瘍剤として好ましく使用できる。

[0050] 本発明の抗腫瘍剤は、例えば、癌（肺癌、乳癌、大腸癌、急性リンパ性白血病等）等の治療に有効であり得る。

[0051] 本発明の抗腫瘍剤は、従来知られる抗体薬と同様の方法により投与できる。例えば、本発明の抗腫瘍剤は、経口投与、静脈内投与、皮下投与等によって投与し得る。

[0052] 本発明の抗腫瘍剤中の本発明の抗体又はその断片の配合量は特に限定されず、投与対象の状態や、得ようとする効果等に応じて適宜設定できる。

[0053] 本発明の抗腫瘍剤の投与対象は特に限定されず、哺乳類（ヒト、非ヒト動物）等が挙げられる。非ヒト動物としては、サル等が挙げられる。

[0054] 本発明の抗腫瘍剤には、本発明の効果を阻害しない範囲で、本発明の抗体又はその断片以外の、医薬品への配合成分として知られる任意の成分が配合されていてもよい。このような成分の量や種類は、得ようとする効果等に応じて適宜設定できる。

[0055] 本発明の抗腫瘍剤には、本発明の抗体又はその断片以外の薬効成分が含まれていてもよく、含まれていなくてもよい。

本発明の抗腫瘍剤は、本発明の抗体又はその断片以外の薬効成分と併用して用いてもよい。このような薬効成分は、本発明の抗体又はその断片以外とともに配合された単一の剤として投与してもよいし、本発明の抗体又はその断片以外とは別の剤として調製し、本発明の抗腫瘍剤と併用投与してもよい。

[0056] 本発明の抗体又はその断片と併用され得る好ましい薬効成分としては、免疫チェックポイント阻害剤が挙げられる。

免疫チェックポイント阻害剤としては、抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＴＬＡ４抗体等が挙げられる。

[0057] 本発明は、本発明の抗腫瘍剤を用いた癌の治療方法を包含する。

実施例

[0058] 以下に、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0059] ＜試験１：ＭｅｒＴＫに対するモノクローナル抗体の樹立＞

以下の方法に基づき、ＭｅｒＴＫに対するモノクローナル抗体を取得した。

[0060] （１－１）ヒトＭｅｒＴＫ発現ベクターの構築

ヒトＭｅｒＴＫタンパク質のアミノ酸配列（ＵｎｉＰｒｏｔ番号：Ｑ１２８６６）に基づき、５’末端にＫｏｚａｋ翻訳開始配列、３’側に翻訳終止コドンを挿入したＤＮＡを遺伝子合成した（ＧＥＮＥＷＩＺ社のサービスを利用）。

「Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ」（タカラバイオ）を用いて、合成したＤＮＡを「ｐｃＤＮＡ３．４」（サーモフィッシャーサイエンティフィック）のクローニングサイトに挿入し、ヒトＭｅｒＴＫ発現ベクターを得た。

[0061] （１－２）マウスＭｅｒＴＫ発現ベクターの構築

マウスＭｅｒＴＫタンパク質のアミノ酸配列（ＵｎｉＰｒｏｔ番号：Ｑ６０８０５）に基づき、上記ヒトＭｅｒＴＫ発現ベクターと同様の方法によって、マウスＭｅｒＴＫ発現ベクターを得た。

[0062] （２－１）ヒトＭｅｒＴＫマウスＦｃ融合タンパク質の発現と精製

ヒトＭｅｒＴＫマウスＦｃ融合タンパク質（以下、「ｈＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｍＦｃ」ともいう。）として、ヒトＭｅｒＴＫタンパク質（ＵｎｉＰｒｏｔ番号Ｑ１２８６６）の１番目から５０５番目のアミノ酸と、マウスＩｇＧ２ａ重鎖（ＵｎｉＰｒｏｔ番号Ｐ０１８６３）の１１４番目から３３０番目のアミノ酸と、を融合させたタンパク質を設計した。このアミノ酸配列を元

に発現ベクターを構築し、ｈＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｍＦｃ発現ベクターを得た。

次いで、ｈＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｍＦｃ発現ベクターを導入プラスミドとして、「Ｅｘｐｉ２９３　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ」（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて一過性発現を行った。

一過性発現後、培養上清を回収し、「ＨｉＴｒａｐ　ＰｒｏｔｅｉｎＧ　ＨＰカラム」（サイティバ）を用いたアフィニティ精製を行った。

アフィニティ精製した溶出液を濃縮し、「Ｓｅｐｈａｄｅｘ　２００ｐｇ　１６／６０」（サイティバ）を用いたゲルろ過精製を行った。

ゲルろ過精製の溶出画分を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ法にてバンドを確認し、バンドが確認できたフラクションを回収し、ｈＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｍＦｃとして使用した。

[0063]（２－２）マウスＭｅｒＴＫマウスＦｃ融合タンパク質の発現と精製

マウスＭｅｒＴＫマウスＦｃ融合タンパク質（以下、「ｍＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｍＦｃ」ともいう。）として、マウスＭｅｒＴＫタンパク質（ＵｎｉＰｒｏｔ番号Ｑ６０８０５）の１番目から４９７番目のアミノ酸と、マウスＩｇＧ２ａ重鎖（ＵｎｉＰｒｏｔ番号Ｐ０１８６３）の１１４番目から３３０番目のアミノ酸と、を融合させたタンパク質を設計した。このアミノ酸配列を元に、上記のｈＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｍＦｃ調製方法と同様の方法でタンパク質の発現及び精製を行い、ｍＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｍＦｃを得た。

[0064]（３－１）ヒトＭｅｒＴＫ安定発現ＥＬ４細胞の構築

ヒトＭｅｒＴＫ発現ベクターを導入プラスミドとして、「Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ」（Ｌｏｎｚａ）を用いて、マウスリンパ腫細胞株ＥＬ４に遺伝子導入を行った。

遺伝子導入後、培地に「Ｇ４１８」（ナカライテスク）を添加し、細胞を９６ウェルプレートに播種し培養を行った。

培養後、Ｇ４１８耐性的な増殖が見られた細胞について、抗ヒトＭｅｒＴＫ抗体（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ，　ＭＡＢ８９１２）を用いたフローサイ

トメトリーにより、ヒトＭｅｒＴＫの発現を確認した。最終的に単クローン由来の細胞株を選択し、これをヒトＭｅｒＴＫ安定発現ＥＬ４細胞（以下、「ｈＭｅｒＴＫ－ＥＬ４」ともいう。）として以下の試験に使用した。

[0065] （３－２）マウスＭｅｒＴＫ安定発現ＢａＦ／３細胞の構築

マウスＭｅｒＴＫ発現ベクターを導入プラスミドとして、「Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ」（Ｌｏｎｚａ）を用いて、マウスｐｒｏ－Ｂ細胞株Ｂａ／Ｆ３に遺伝子導入を行った。

遺伝子導入後、培地に「Ｇ４１８」（ナカライテスク）を添加し、細胞を９６ウェルプレートに播種し培養を行った。

培養後、Ｇ４１８耐性的な増殖が見られた細胞について、抗マウスＭｅｒＴＫ抗体（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ，　ＡＦ５９１）を用いたフローサイトメトリーにより、マウスＭｅｒＴＫの発現を確認した。最終的に単クローン由来の細胞株を選択し、これをマウスＭｅｒＴＫ安定発現ＢａＦ／３細胞（以下、「ｍＭｅｒＴＫ－Ｂａ／Ｆ３」ともいう。）として、以下の試験に使用した。

[0066] （４）ＭｅｒＴＫに対するモノクローナル抗体の作製

以下の２通りの方法に基づき、ＭｅｒＴＫ精製タンパク質、又はＭｅｒＴＫ安定発現細胞をＭｅｒＴＫ遺伝子欠損マウス（Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，　Ｂ６；１２９－ＭｅｒＴＫ＜ｔｍ１Ｇ４ｌ＞／Ｊ）に免疫した。

免疫後、単離したリンパ節細胞を用いてＭｅｒＴＫに対するモノクローナル抗体を作製した。

[0067] （免疫方法－１）

抗原として、ｈＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｍＦｃ、及びｍＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｍＦｃ（いずれもＭｅｒＴＫ精製タンパク質）を用いた。

各抗原を、アジュバント「ＴｉｔｅｒＭａｘＧｏｌｄ」（ＴｉｔｅｒＭａｘ）と混合し、マウス１匹あたりの抗原投与量が１００μｇとなるように足底静脈投与を行った。投与後、７日後及び１０日後に、マウス１匹あたりの

抗原投与量を１０μｇに設定した点以外は上記同様に追加免疫を行った。

免疫終了後、マウスから膝窩リンパ節を採取して細胞懸濁液を調製したのち、これをＳＰ２／０－Ａｇ１４ミエローマ細胞と混合し、電気式細胞融合装置（「ＥＣＦＧ２１」、ネッパジーン）による電気式細胞融合を行った。

融合後の細胞を、「ＣｌｏｎａＣｅｌｌＴＭ－ＨＹ　Ｍｅｄｉｕｍ　Ｄ」（「ＳＴ－０３８０４」、ＳＴＥＭＣＥＬＬ）に懸濁し、プラスチックシャーレに播種した。

播種後、８～１０日後に形成されたコロニーを、ハイブリドーマ用培地を分注した９６ウェルプラスチックプレート中に単離し、その培養上清を下記評価に用いた。

なお、ハイブリドーマ用培地としては、ＲＰＭＩ１６４０（「Ａ１０４９１０１」、サーモフィッシャーサイエンティフィック）に対し、１／５０量の「Ｎｕｔｒｉｄｏｍ－ＣＳ」（「１１３６３７４３００１」、メルク）、及び、１／５０量の「ＨＡＴ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ」（「２１０６００１７」、サーモフィッシャーサイエンティフィック）を添加したものを用いた。

[0068] （免疫方法－２）

抗原として、ｈＭｅｒＴＫ－ＥＬ４、及びmＭｅｒＴＫ－Ｂａ／Ｆ３（いずれもＭｅｒＴＫ安定発現細胞）を用いた。これらの細胞はＰＢＳの懸濁溶液として調製した。

各抗原を、アジュバント「ＴｉｔｅｒＭａｘＧｏｌｄ」（ＴｉｔｅｒＭａｘ）と混合し、マウス１匹あたりの抗原投与量が１×１０^{7}個（細胞数）となるように足底静脈投与を行った。投与後、７日後及び１０日後に、マウス１匹あたりの抗原投与量を１×１０^{5}個に設定し、腹腔内投与した点以外は上記同様に追加免疫を行った。

免疫終了後、上記（免疫方法－１）と同様の方法で培養上清を得て、下記評価に用いた。

[0069] （５）抗体のスクリーニング

上記で得られた各培養上清を用いて、ヒト及びマウスのＭｅｒＴＫに結合能を持つハイブリドーマクローンをスクリーニングした。

具体的には、ヒトＭｅｒＴＫを内在的に発現するヒトメラノーマ株Ｇ３６１、及びｍＭｅｒＴＫ－Ｂａ／Ｆ３を用いて、フローサイトメトリーによる抗体結合性の評価を行った。

約１５，０００クローンをスクリーニングした結果、ヒト及びマウスＭｅｒＴＫに対する結合能を有するハイブリドーマクローンが７６クローン得られた。

[0070] ＜試験２：抗体の評価＞

上記で得られたハイブリドーマクローンを以下の各評価に供し、ＭｅｒＴＫに対するモノクローナル抗体としての機能を確認した。

[0071] （１）リン酸化阻害活性

以下の方法に基づき、各クローンについて、ＭｅｒＴＫリン酸化阻害活性を評価した。該活性が高いほど、ＭｅｒＴＫへの結合能が高いことを意味する。

[0072] （方法）

ヒトＭｅｒＴＫ安定発現細胞（ｈＭｅｒＴＫ－ＥＬ４）を１０％ＦＢＳを含む「ＤＭＥＭ ｈｉｇｈ ｇｌｕｃｏｓｅ培地」（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で培養した。

培養後、細胞をＰＢＳで洗浄し、無血清培地に懸濁して、$１×１０^{6}$ ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるように９６ウェルに播種し、３７℃に３時間インキュベートした。

インキュベート後、各クローンを添加し、１時間反応させ、２００ｎＭヒトＧａｓ６（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ）で１０分間刺激し、ｈＭｅｒＴＫ－ＥＬ４を遠心分離し回収した。

回収したｈＭｅｒＴＫ－ＥＬ４を細胞溶解液に溶解し、得られた溶解液中のリン酸化ＭｅｒＴＫタンパク質の量を、「Ｈｕｍａｎ Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｍｅｒ ＤｕｏＳｅｔ ＩＣ ＥＬＩＳＡ」（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ）を

用いて測定した。

なお、細胞溶解液としては、ミリＱ水に、１％の「ＩＧＥＰＡＬ　ＣＡ－６３０」（ＳＩＧＭＡ）、１ｘ濃度分の「Ｈａｌｔ　Ｐｒｏｔｅａｓｅ　ａｎｄ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ　Ｓｉｎｇｌｅ－Ｕｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ　Ｃｏｃｋｔａｉｌ」（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を添加したものを用いた。

[0073] （結果）

７６クローンのうち、１４クローンにおいてリン酸化阻害活性が見られた。

該１４クローンのうち、特に高い阻害活性を示したクローンとして「２０Ａ７７」及び「２４Ａ１」を選抜し、以下の試験に供した。

これらのクローンのリン酸化阻害活性を図１に示す。図１に示されるとおり、「２０Ａ７７」及び「２４Ａ１」は、それぞれ濃度依存的に、Ｇａｓ６とＭｅｒＴＫとの結合、及びＭｅｒＴＫのリン酸化を阻害し、ＭｅｒＴＫへの結合能が高いことがわかった。

[0074] （２）抗体配列解析

以下の方法に基づき、「２０Ａ７７」及び「２４Ａ１」のそれぞれについて、その免疫グロブリン遺伝子可変領域の配列の解析を行った。

ハイブリドーマ細胞を拡大培養し、「ＲＮｅａｓｙ　ｍｉｎｉ　ｋｉｔ」（Ｑｉａｇｅｎ）によりＲＮＡを抽出し、「ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｓｕｐｅｒ　ｍｉｘ」（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によるｃＤＮＡ合成を行った。

合成したｃＤＮＡをテンプレートに用い、ＰＣＲ法により抗体可変領域配列を増幅した。なお、重鎖、及び軽鎖ともに可変領域上流、及び定常領域下流を認識するプライマーを使用し増幅した。

得られたＤＮＡ断片を、「Ｚｅｒｏｂｌｕｎｔ　ＴＯＰＯ　ＴＡ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　ａｎｄ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ｋｉｔ」（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）のキットに添付のベクターにクローニング

を行い、ＤＮＡ配列解析を行った。

得られた抗体配列について、Ｋａｂａｔらの方法（Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔｓ, Ｆｉｆｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ, ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ. ９１－３２４２, Ｕ. Ｓ. Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ, １９９１）に従ってＣＤＲ領域を決定した。

[0075] 解析された抗体配列、及びそのＣＤＲ領域配列の概要を、以下の表７に示す。

なお、以下、表中の略号は以下の意味を有する。

ＶＨ：　重鎖可変領域

ＣＤＲＨ：　重鎖ＣＤＲ

ＶＬ：　軽鎖可変領域

ＣＤＲＬ：　軽鎖ＣＤＲ

[0076] [表7]

	ＶＨ	ＣＤＲＨ１	ＣＤＲＨ２	ＣＤＲＨ３	ＶＬ	ＣＤＲＬ１	ＣＤＲＬ２	ＣＤＲＬ３
２０Ａ７７	配列番号１	配列番号２	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	配列番号８
２４Ａ１	配列番号９	配列番号１０	配列番号１１	配列番号１２	配列番号１３	配列番号１４	配列番号１５	配列番号１６

[0077] （３）組換えマウス抗体の作製及び抗体配列改変

表７に示された各抗体配列と、マウスＩｇＧ１重鎖及びκ軽鎖又はマウスＩｇＧ２ａ重鎖及びκ軽鎖と、を連結し、マウスＩｇＧ１、及びマウスＩｇＧ２ａ抗体遺伝子配列を設計した。設計した抗体配列を元に、発現ベクターを構築し、抗体発現ベクターを得た。

抗体発現ベクターを導入プラスミドとして、「Ｅｘｐｉ２９３ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ」（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて一過性発現を行った。

一過性発現を行った培養上清を回収し、「Ａｂ－Ｃａｐｃｈｅｒ ＥｘＴ

ｒａカラム」（プロテノバ）を用いたアフィニティ精製を行った。

アフィニティ精製した溶出液を濃縮し、ヒスチジンバッファー（１％　Ｈｉｓｔｉｄｉｎｅ、ｐＨ６．０）を緩衝液に使用し、「Ｓｅｐｈａｄｅｘ　２００ｐｇ　１６／６０」（サイティバ）を用いたゲルろ過精製を行った。

ゲルろ過精製の溶出画分について、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ法によってバンドを確認した。バンドが確認できたフラクションを回収し、「２０Ａ７７」及び「２４Ａ１」のマウスＩｇＧ１型抗体及びマウスＩｇＧ２ａ型抗体を得た（それぞれ、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ２ａ」、「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」、「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ２ａ」ともいう。）。

[0078]　さらに、ＣＤＲ領域のアミノ酸改変を試みた。配列改変の導入箇所は図２に示すとおりであり、ＣＤＲ領域中に存在する切断反応及び脱アミノ化反応を受ける可能性の高い配列について実施した。ＣＤＲの配列改変を施した抗体を、「ｍ２０Ａ７７」ともいう。その配列情報を以下の表８に示す。

また、「ｍ２０Ａ７７」についても上記同様の方法により、マウスＩｇＧ１型抗体（「ｍ２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」ともいう。）を得た。

[0079] [表8]

	ＶＨ	ＣＤＲＨ１	ＣＤＲＨ２	ＣＤＲＨ３	ＶＬ	ＣＤＲＬ１	ＣＤＲＬ２	ＣＤＲＬ３
ｍ２０Ａ７７	配列番号１７	配列番号２	配列番号１８	配列番号４	配列番号１９	配列番号６	配列番号２０	配列番号８

[0080]　（４）各種動物由来のＭｅｒＴＫに対する交差反応性

各種動物（ヒト、マウス、カニクイザル、ラット）に由来するＭｅｒＴＫに対する、上記で得られた抗体クローンの交差反応性を、ＥＬＩＳＡ法によって確認した。

ＥＬＩＳＡ法においては、各種動物（ヒト、マウス、カニクイザル、ラット）に由来するＭｅｒＴＫのヒトＦｃ融合タンパク質を抗原として用いた。具体的には、ヒト、マウスＭｅｒＴＫ抗原としては、「Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｈｕｍａｎ　Ｍｅｒ　Ｆｃ　Ｃｈｉｍｅｒａ　Ｐｒｏｔｅｉｎ」（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）、及び「Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｍｏｕｓｅ　Ｍ

ｅｒ　Ｆｃ　Ｃｈｉｍｅｒａ　Ｐｒｏｔｅｉｎ」（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）を用いた。カニクイザルＭｅｒＴＫ、及びラットＭｅｒＴＫ抗原としては、ｈＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｍＦｃやｍＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｍＦｃと同様の手法で調製した、カニクイザルＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｈＦｃ（以下、「ｃｙｎｏＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｈＦｃ」ともいう。）、ラットＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｈＦｃ（以下、「ｒａｔＭｅｒＴＫＥＣＤ－ｈＦｃ」ともいう。）を用いた。

[0081]　ＥＬＩＳＡ法は、以下の方法で実施した。

まず、各抗原をそれぞれＥＬＩＳＡプレート（Ｎｕｎｃ）に５μｇ／ｍｌの濃度で添加し、室温で一晩固相した。

固相液を除去後、ブロッキング反応として１％　ＢＳＡ／ＰＢＳを添加し、室温で１時間静置した。

ブロッキング後、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０／ＰＢＳ液で洗浄し、一次反応として抗体液を室温で１時間反応させた。

洗浄後、二次反応としてＨＲＰ標識抗体（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を１時間反応させた。洗浄後、発色基質液としてＴＭＢ（Ｄａｋｏ）を加え発色させ、１０分後、１Ｎ硫酸を加え反応を停止し、４５０ｎｍの吸光度を測定した。

[0082]　図３に、各種動物に由来するＭｅｒＴＫに対する、「ｍ２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」及び「ｍ２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」のＥＬＩＳＡにおける反応性を示す。

図３に示すように、「２０Ａ７７」及び「２４Ａ１」のいずれも、ヒト、マウス、カニクイザル、及びラットの抗原にほぼ同様の反応性を示した。これらの結果から、「２０Ａ７７」及び「２４Ａ１」のいずれも、高い種交差反応性を有することがわかった。

[0083]　＜試験３：本発明の抗体の抗腫瘍効果＞

以下の方法に基づき、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ２ａ」の抗腫瘍効果を評価した。評価の際には、マウス大腸がん細胞株ＣＴ２６（ＡＴＣＣ）を用いた同系腫瘍モデルを使用した。

[0084] マウス（Ｂａｌｂ／ｃ）に対し、１匹あたり５×１０^{6}細胞のＣＴ２６を、マウス右脇腹皮下に移植した。

腫瘍移植後５日目に群分けし、アイソタイプコントロール抗体であるｍＩｇＧ２ａ、及び「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ２ａ」を、腹腔内に１０ｍｇ／ｋｇの容量で１週間に２回の頻度で投与した。

投与後、腫瘍サイズを週に２回の頻度で計測を開始し、腫瘍移植後１９日目に終了した。なお、腫瘍サイズは、ノギスを用いて腫瘍の短径と長径をそれぞれ計測し、以下の式から算出した。

腫瘍サイズ＝（短径（ｍｍ））^{2}×（長径（ｍｍ））×３．１４／６

[0085] 図４及び５に、評価結果を示す。これらの結果に示されるとおり、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ２ａ」は、ｍＩｇＧ２ａ投与群に比較して、有意に腫瘍を抑制した。

[0086] さらに、腫瘍移植後１９日目に腫瘍を採取し、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）解析を行った。

ＴＩＬ解析に際しては、まず、腫瘍採取後、「Ｔｕｍｏｒ　Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　ｋｉｔ，ｍｏｕｓｅ」（ミルテニーバイオテク）由来の酵素液とともに、「ｇｅｎｔｌｅＭＡＣＳ　Ｃ　Ｔｕｂｅｓ」（ミルテニーバイオテク）に腫瘍塊を加え、「ｇｅｎｔｌｅＭＡＣＳ　Ｏｃｔｏ　Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｏｒ」（ミルテニーバイオテク）を用いて、腫瘍分散を行った。

腫瘍分散後、１％　ＦＢＳ／ＰＢＳで洗浄後、表９記載のフローサイトメトリー（ＦＣＭ）解析用抗体を用いて染色を行った。染色後、ＦＡＣＳ　ｃａｌｉｂｕｒ（ＢＤ）を用いてＦＣＭ解析を行った。

図６に、「Ｍ１／Ｍ２比」を示す。Ｍ１は炎症性マクロファージを示し、Ｍ２は免疫抑制性のマクロファージを示す。Ｍ１／Ｍ２比は、ＭｅｒＴＫ阻害による腫瘍微小環境の特徴的な変化を示す指標である。図６に示されるとおり、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ２ａ」の投与によって、Ｍ１／Ｍ２比が増加し、腫瘍微小環境が抗腫瘍の環境に変化していることが示された。

[0087]

[表9]

抗体名	メーカー	カタログ番号
FITC anti-mouse CD45 Antibody	Biolegend	103108
APC anti-mouse F4/80 Antibody	Biolegend	123115
FITC anti-mouse CD86 Antibody	Biolegend	105005
PE anti-mouse CD206 (MMR) Antibody	Biolegend	141705

[0088] ＜試験４：本発明の抗体の薬効用量＞

以下の方法に基づき、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」及び「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」の投与量に応じた抗腫瘍効果を評価した。評価の際には、上記「試験３」同様に、マウス大腸がん細胞株ＣＴ２６（ＡＴＣＣ）を用いた同系腫瘍モデルを使用した。

[0089] 「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」投与群では、溶媒（1％　Ｈｉｓｔｉｄｉｎｅ　ｂｕｆｆｅｒ、ｐＨ６．０）及び「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」を、腹腔内に３、１０、又は３０ｍｇ／ｋｇの容量で１週間に２回の頻度で投与した。

「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」投与群では、溶媒（1％　Ｈｉｓｔｉｄｉｎｅ　ｂｕｆｆｅｒ、ｐＨ６．０）及び「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」を、腹腔内に３、５、又は３０ｍｇ／ｋｇの容量で１週間に２回の頻度で投与した。

腫瘍サイズは週に２回の頻度で計測し、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」投与群では腫瘍移植後１９日目に、「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」投与群では腫瘍移植後２２日目に終了した。

[0090] 図７乃至１０に、評価結果を示す。

図７及び８に示されるとおり、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」投与群では、いずれの濃度においても、溶媒対照群に比較して腫瘍増殖の抑制効果が認められた。

特に、３ｍｇ／ｋｇ、及び３０ｍｇ／ｋｇ投与群において有意な抑制効果

が認められた。

図９及び１０に示されるとおり、「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」投与群では、溶媒対照群に比較して、特に、５ｍｇ／ｋｇ、及び３０ｍｇ／ｋｇ投与群において有意に腫瘍増殖を抑制した。

[0091] ＜試験５：本発明の抗体及び抗ＰＤ－１抗体の併用投与による抗腫瘍効果＞

以下の方法に基づき、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」及び「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」と、抗ＰＤ－１抗体との併用による抗腫瘍効果を評価した。評価の際には、上記「試験３」同様に、マウス大腸がん細胞株ＣＴ２６（ＡＴＣＣ）を用いた同系腫瘍モデルを使用した。

抗ＰＤ－１抗体は、抗腫瘍効果を有することが知られる。

[0092] 各投与群には、以下の抗体を１週間に２回の頻度で投与した。投与は、腫瘍移植後１９日目まで行った。

「ｍＩｇＧ１」：「ｍＩｇＧ１」を５ｍｇ／ｋｇ

「ｍ２０Ａ７７」：「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」を３ｍｇ／ｋｇ

「２４Ａ１」：「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」を５ｍｇ／ｋｇ

「αＰＤ－１」：抗マウスＰＤ－１抗体（「２９Ｆ．１Ａ１２」、ＢｉｏＸｃｅｌｌ）を０．３ｍｇ／ｋｇ

「ｍ２０Ａ７７＋αＰＤ－１」：「ｍ２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」と抗マウスＰＤ－１抗体とをそれぞれ３ｍｇ／ｋｇ、０．３ｍｇ／ｋｇ

「２４Ａ１＋αＰＤ－１」：「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」と抗マウスＰＤ－１抗体とをそれぞれ５ｍｇ／ｋｇ、０．３ｍｇ／ｋｇ

[0093] 図１１及び１２に、評価結果を示す。

これらの図に示されるとおり、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」は、ＰＤ－１抗体との併用によって抗腫瘍効果が増強される傾向にあった。

また、「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」は、ＰＤ－１抗体との併用によって抗腫瘍効果が増強された。

以上から、本発明の抗体は、抗ＰＤ－１抗体と併用することで、抗腫瘍効果が増強することがわかった。

[0094] ＜試験６：各種リガンド結合阻害能の評価＞

「２０Ａ７７」及び「２４Ａ１」を用いて、ＭｅｒＴＫの各種リガンド結合阻害能を評価した。

ＭｅｒＴＫのリガンドとしては、ヒトＧａｓ６（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）及びヒトＴＵＬＰ１（ａｂｃａｍ）を用い、それぞれ「Ｂｉｏｔｉｎ　Ｌａｂｅｌｉｎｇ　Ｋｉｔ－ＮＨ」（Ｄｏｊｉｎｄｏ）を用いてビオチン標識を行った。

Ｇａｓ６は抗腫瘍効果に関係するリガンドであり、ＭｅｒＴＫとＧａｓ６との結合阻害活性を有する抗体は抗腫瘍効果を奏し得る。

ＴＵＬＰ１は、眼毒性に関係するリガンドであり、ＭｅｒＴＫとＴＵＬＰ１との結合阻害活性を有する抗体は眼毒性を有し得る。

したがって、Ｇａｓ６との結合阻害活性が高く、かつ、ＴＵＬＰ１との結合阻害活性が低い抗体は、眼毒性の低い抗腫瘍剤として有効であり得る。

[0095] リガンド結合阻害試験は、以下のように行った。

まず、ＥＬＩＳＡ用プレート（Ｎｕｎｃ）に、ヒトＭｅｒＴＫ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）を５μｇ／ｍｌの濃度で添加し、室温で一晩固相した。固相液を除去後、ブロッキング反応として１％　ＢＳＡ／ＰＢＳを添加し、室温で１時間静置した。

ブロッキング後、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０／ＰＢＳ液で洗浄し、一次反応として抗体液を室温で１時間反応させた。

洗浄後、二次反応として、ビオチン化Ｇａｓ６又はビオチン化ＴＵＬＰ１を、それぞれ１０ｎＭ又は４０ｎＭの濃度で添加し、室温で１時間反応させた。

洗浄後、三次反応としてＨＲＰ標識ストレプトアビジン（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を３０分間反応させた。

洗浄後、発色基質液としてＴＭＢ（Ｄａｋｏ）を加え発色させ、２０分後、１Ｎ硫酸を加え反応を停止し、４５０ｎｍの吸光度を測定した。

[0096] 図１３及び１４に、評価結果を示す。

これらの図に示されるとおり、陽性対照（抗ヤギＭｅｒＴＫポリクローナル抗体）は、Ｇａｓ６及びＴＵＬＰ１のいずれについても、ＭｅｒＴＫとの結合を阻害した。

これに対し、「２０Ａ７７」及び「２４Ａ１」は、Ｇａｓ６とＭｅｒＴＫとの結合は阻害したものの、ＴＵＬＰ１とＭｅｒＴＫとの結合は阻害しなかった。

以上から、本発明の抗体は、良好な抗腫瘍効果を有しつつ、眼毒性が低い抗体であり得ることがわかった。

[0097] なお、多数の抗ＭｅｒＴＫ抗体について、上記同様にリガンド結合阻害能を評価した。その結果の一部を図１５及び１６に示す。

しかし、ほぼ全ての抗体が、Ｇａｓ６とＭｅｒＴＫとの結合、及びＴＵＬＰ１とＭｅｒＴＫとの結合の両方を阻害した。

Ｇａｓ６とＭｅｒＴＫとの結合を強く阻害し、かつ、ＴＵＬＰ１とＭｅｒＴＫとの結合を阻害しない抗体は、「２０Ａ７７」及び「２４Ａ１」のみだった。

[0098] ＜試験７：ｉｎ　ｖｉｖｏ眼毒性試験による眼毒性の検証＞

上記「試験６」で確認された結果を踏まえ、以下の方法に基づき、本発明の抗体によるｉｎ　ｖｉｖｏでの眼毒性について検証した。

[0099] 眼毒性試験は、マウス（Ｂａｌｂ／ｃ）を用いて行った。

各マウスに、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」、「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」、又はアイソタイプコントロール抗体（ｍＩｇＧ１）を、１０ｍｇ／ｋｇの容量で、１週間に２回の頻度で静脈内投与した。

眼毒性の陽性対照として、ＭｅｒＴＫ低分子阻害剤であるＵＮＣ５６９を１５０ｍｇ／ｋｇの容量で１０日間経口投与した。

初回投与後２９日目に眼を摘出し、カルノフスキー固定を行い、アプライドメディカルリサーチに委託し、樹脂包埋及び切片作製、トルイジンブルー染色（以下、「ＴＢ染色」ともいう。）を行った。ＴＢ陽性顆粒の増加は、目の異常所見が進行していることを意味する。

[0100] ＴＢ染色後の切片写真を図１７及び１８に示す。

図１７のとおり、ＵＮＣ５６９投与群では、網膜色素上皮層にＴＢ陽性顆粒の増加が認められた（矢印部位）。

これに対し、「２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」又は「２４Ａ１＿ｍＩｇＧ１」を投与した群では、ＴＢ陽性顆粒の増加は認められなかった。

[0101] なお、図１８のとおり、いずれの投与群においても、外顆粒層の萎縮（眼の視力低下と相関が認められている異常所見）は認められなかった。

以上から、本発明の抗体は、抗腫瘍効果を奏する一方で眼毒性への懸念が少ない抗体であることが示唆された。

[0102] ＜試験８：ｉｎ　ｖｉｖｏ眼毒性試験による毒性容量の検証＞

上記「試験７」で確認された結果を踏まえ、以下の方法に基づき、本発明の抗体の毒性容量について検証した。

[0103] 眼毒性試験は、マウス（Ｂａｌｂ／ｃ）を用いて行った。

各マウスに、溶媒、又は「ｍ２０Ａ７７＿ｍＩｇＧ１」を３、又は１０ｍｇ／ｋｇの容量で、１週間に２回の頻度で静脈内投与した。

初回投与後３０日目に眼を摘出し、カルノフスキー固定を行い、アプライドメディカルリサーチに委託し、樹脂包埋及び切片作製、ＴＢ染色を行った。

[0104] ＴＢ染色後の切片写真を図１９及び２０に示す。

図１９のとおり、いずれの投与群においても、ＴＢ陽性顆粒の増加は認められなかった。一方で、図２０のとおり、溶媒対照群、３ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇいずれの投与群においても、異常所見である外顆粒層の萎縮は認められなかった。

[0105] ＜試験９：ヒト化抗体の作製＞

「ｍ２０Ａ７７」及び「２４Ａ１」について、マウス重鎖及び軽鎖可変領域と、ヒトＩｇＧ１重鎖及びκ軽鎖定常領域のキメラ抗体（以下、「ヒトキメラ抗体」ともいう。）を作製した。ヒトキメラ抗体は、上記「（３）組換えマウス抗体の作製及び抗体配列改変」と同様の方法で作製した。

[0106] 得られたヒトキメラ抗体について、以下の方法に基づき、抗体配列のヒト化を行った。

まず、各抗体可変領域の配列について、ＣＤＲ移植法によるヒト化を行った。ヒト化配列の設計は、Ｔｓｕｒｕｓｈｉｔａら（２００５．Ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ｈｕｍａｎｉｚｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｆｒｏｍ ａｎｔｉ－Ｔａｃ ｔｏ Ｚｅｎａｐａｘ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ３６：６９－８３．）の方法を参考に実施した。

次いで、マウス抗体の３次元分子モデルを定法により作成した。この分子モデルを元に、フレームワーク領域のアミノ酸配列の中で、ＣＤＲの構造形成に重要と考えられる残基、また抗原との反応に必須であると考えられた残基を推定した。

この作業と並行して、ヒト抗体重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のｃＤＮＡ配列データベースの中から、各抗体の重鎖可変領域、軽鎖可変領域に相同性の高い配列を検索した。

検索したヒト抗体配列のフレームワーク部分の配列と、各抗体のＣＤＲ配列と、を連結した配列を設計し、そこへ、ＣＤＲ構造形成又は抗原との反応に必須であると考えられた残基の配列をさらに移植して、表１０に示すヒト化抗体配列「ｈｚ２０Ａ７７」及び「ｈｚ２４Ａ１」を設計した。

なお、ヒト化抗体配列の持つＣＤＲ配列は元となったマウス抗体のものと同一である。

[0107] [表10]

	ＶＨ	ＣＤＲＨ１	ＣＤＲＨ２	ＣＤＲＨ３	ＶＬ	ＣＤＲＬ１	ＣＤＲＬ２	ＣＤＲＬ３
ｈｚ２０Ａ７７	配列番号２１	配列番号２	配列番号１８	配列番号４	配列番号２２	配列番号６	配列番号２０	配列番号８
ｈｚ２４Ａ１	配列番号２３	配列番号１０	配列番号１１	配列番号１２	配列番号２４	配列番号１４	配列番号１５	配列番号１６

[0108] 設計された抗体は以下のように作製した。

重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列は、α－ラクトアルブミンシグナルペプチドを接続したうえで、ＬＡＬＡ配列を導入したヒトＩ

ｇＧ１定常領域（以下、「ｈＩｇＧ１ＬＡＬＡ」ともいう。）とともに、ｐｃＤＮＡ３．４ベクターに、「Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ」（タカラバイオ）を用いてクローニングした。

軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列は、重鎖可変領域と同様にα－ラクトアルブミンシグナルペプチドを接続したうえで、ヒトＩｇκ定常領域とともにｐｃＤＮＡ３．４ベクターに、「Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ」（タカラバイオ）を用いてクローニングした。

次いで、抗体を上記「（３）組換えマウス抗体の作製及び抗体配列改変」と同様の方法で作製した。

[0109] 作製した抗体について、ＥＬＩＳＡ法により、抗原結合活性を確認した。その結果を図２１に示す。

図２１に示されるとおり、得られたヒト化抗体（「ｈｚ２０Ａ７７＿ｈＩｇＧ１ＬＡＬＡ」、及び「ｈｚ２４Ａ１＿ｈＩｇＧ１ＬＡＬＡ」）は、いずれも、元となったヒトキメラ抗体（「ｍ２０Ａ７７＿ｈＩｇＧ１ＬＡＬＡ」、及び「２４Ａ１＿ｈＩｇＧ１ＬＡＬＡ」）と同程度又はそれ以上の反応性を示した。

この結果から、作製されたヒト化抗体群は、ヒトＭｅｒＴＫに対する反応性を十分に有することが示された。

請求の範囲

[請求項1]　重鎖及び軽鎖のＣＤＲ１乃至３のアミノ酸配列が、下記［要件Ａ］を全て満たす、ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片。

［要件Ａ］

重鎖ＣＤＲ１が、配列番号２で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ２が、配列番号３で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ３が、配列番号４で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ１が、配列番号６で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ２が、配列番号７で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ３が、配列番号８で表されるアミノ酸配列である。

[請求項2]　さらに、下記［要件Ｂ］を全て満たす、請求項１に記載の抗体又はその断片。

［要件Ｂ］

重鎖可変領域が、配列番号１で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号５で表されるアミノ酸配列である。

[請求項3]　重鎖及び軽鎖のＣＤＲ１乃至３のアミノ酸配列が、下記［要件Ｃ］を全て満たす、ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片。

［要件Ｃ］

重鎖ＣＤＲ１が、配列番号１０で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ２が、配列番号１１で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ３が、配列番号１２で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ１が、配列番号１４で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ２が、配列番号１５で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ３が、配列番号１６で表されるアミノ酸配列である。

[請求項4]　さらに、下記［要件Ｄ］又は［要件Ｅ］のいずれかを全て満たす、請求項３に記載の抗体又はその断片。

［要件Ｄ］

重鎖可変領域が、配列番号９で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号１３で表されるアミノ酸配列である。

［要件Ｅ］

重鎖可変領域が、配列番号２３で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号２４で表されるアミノ酸配列である。

[請求項5] 重鎖及び軽鎖のＣＤＲ１乃至３のアミノ酸配列が、下記［要件Ｆ］を全て満たす、ＭｅｒＴＫに特異的に結合する抗体又はその断片。

［要件Ｆ］

重鎖ＣＤＲ１が、配列番号２で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ２が、配列番号１８で表されるアミノ酸配列である。

重鎖ＣＤＲ３が、配列番号４で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ１が、配列番号６で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ２が、配列番号２０で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖ＣＤＲ３が、配列番号８で表されるアミノ酸配列である。

[請求項6] さらに、下記［要件Ｇ］又は［要件Ｈ］のいずれかを全て満たす、請求項５に記載の抗体又はその断片。

［要件Ｇ］

重鎖可変領域が、配列番号１７で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号１９で表されるアミノ酸配列である。

［要件Ｈ］

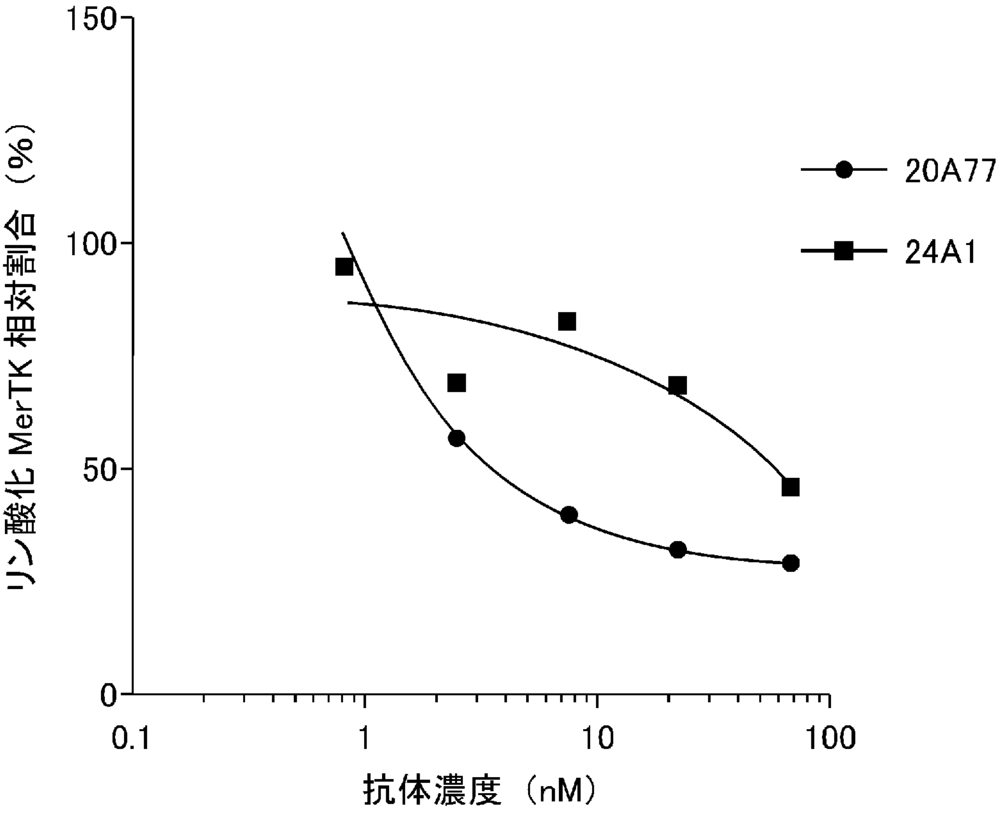
重鎖可変領域が、配列番号２１で表されるアミノ酸配列である。

軽鎖可変領域が、配列番号２２で表されるアミノ酸配列である。

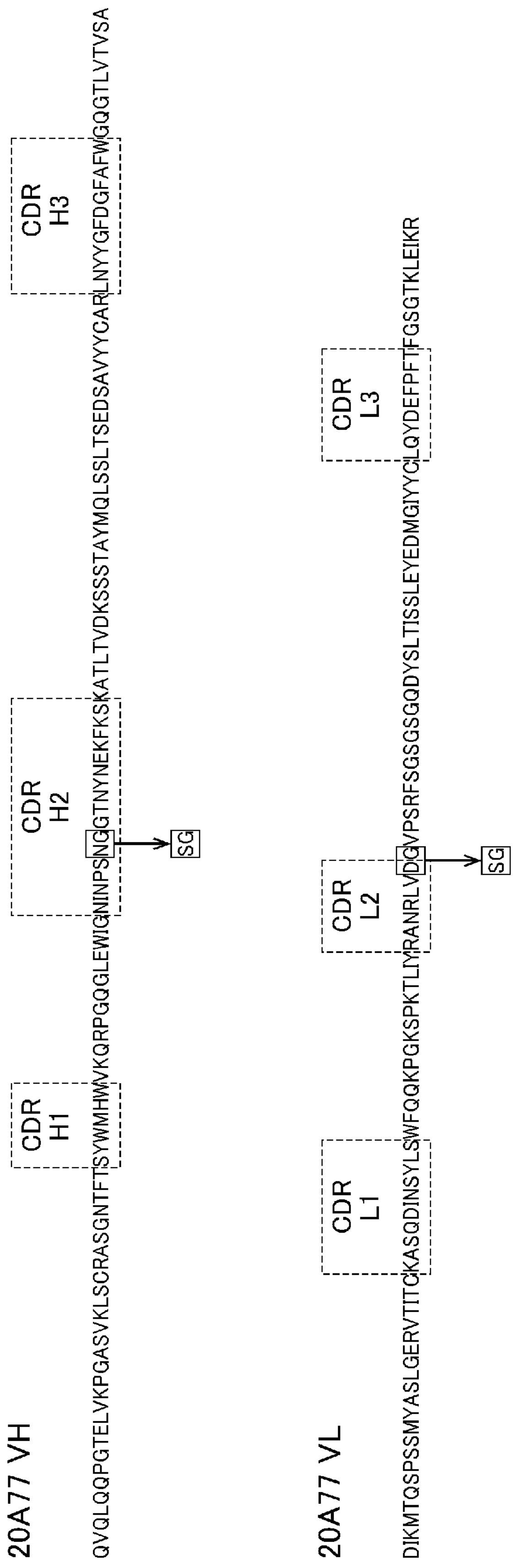
[請求項7] 請求項１から６のいずれか１項に記載の抗体又はその断片を含む、抗腫瘍剤。

[請求項8] さらに、免疫チェックポイント阻害剤を含む請求項７に記載の抗腫瘍剤。

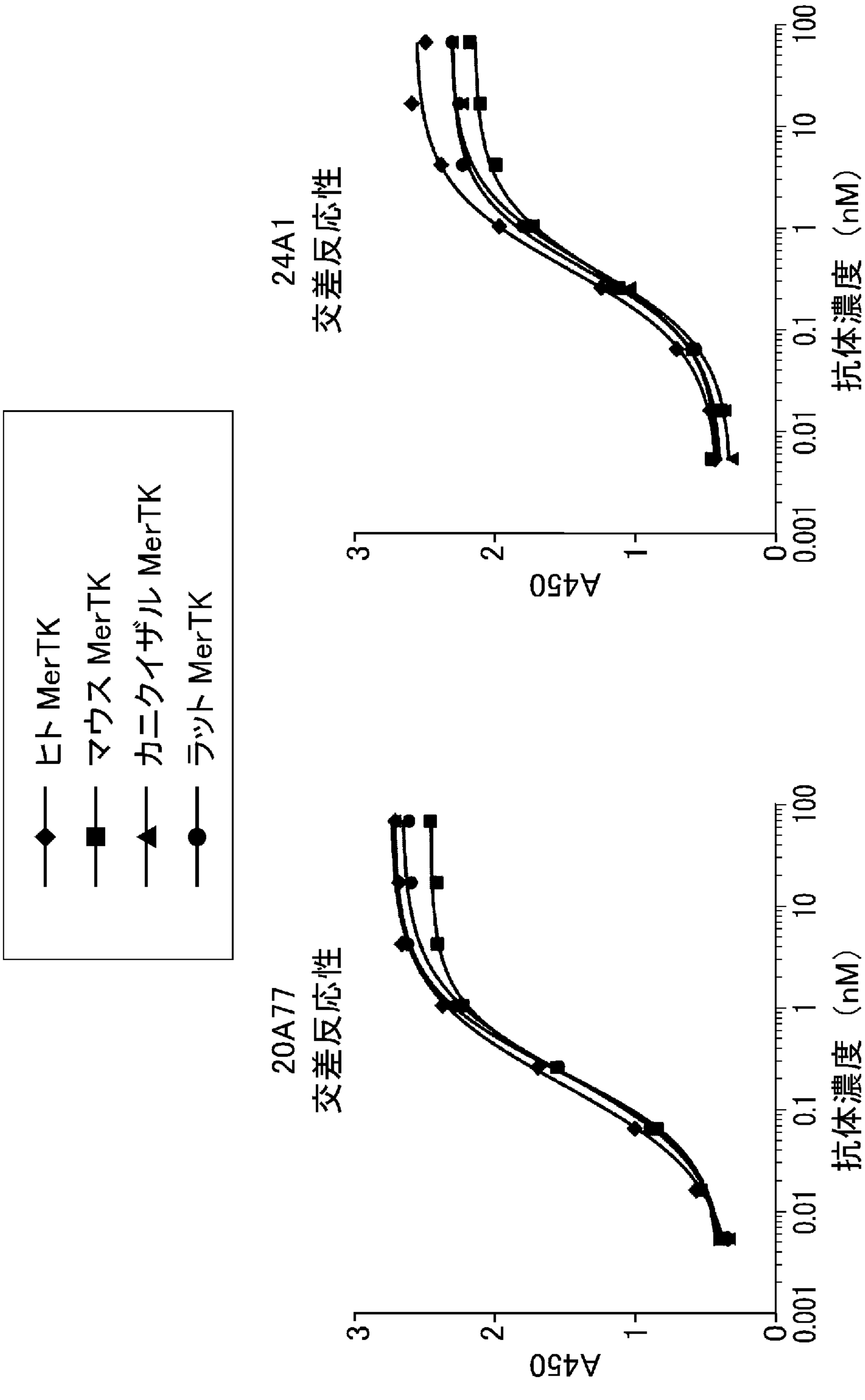
[図1]



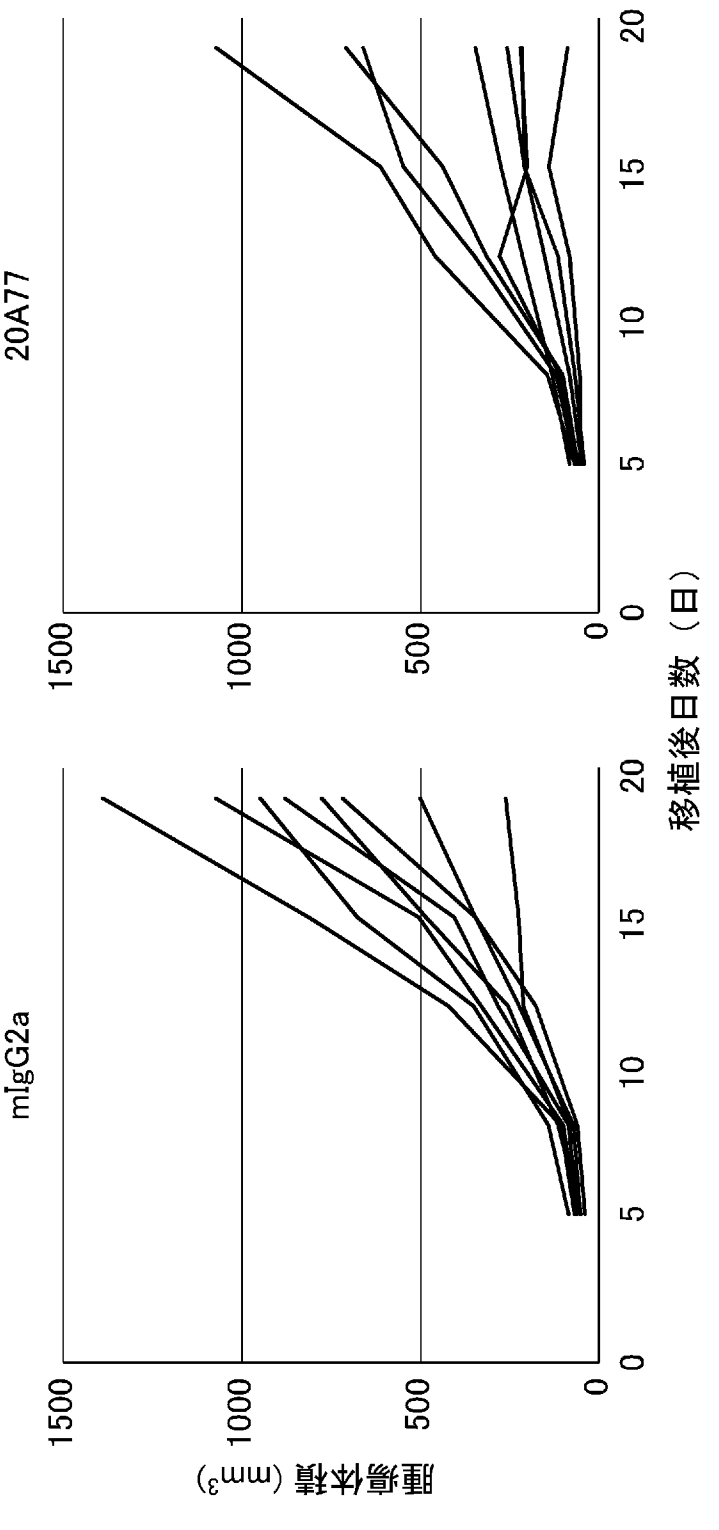
[図2]


20A77 VH
CDR H1
CDR H2
CDR H3
QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCRASGNTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNINPSNGGTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLNYYGFDGFAFWGQGTLVTVSA
SG
20A77 VL
CDR L1
CDR L2
CDR L3
DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPFTFGSGTKLEIKR
SG

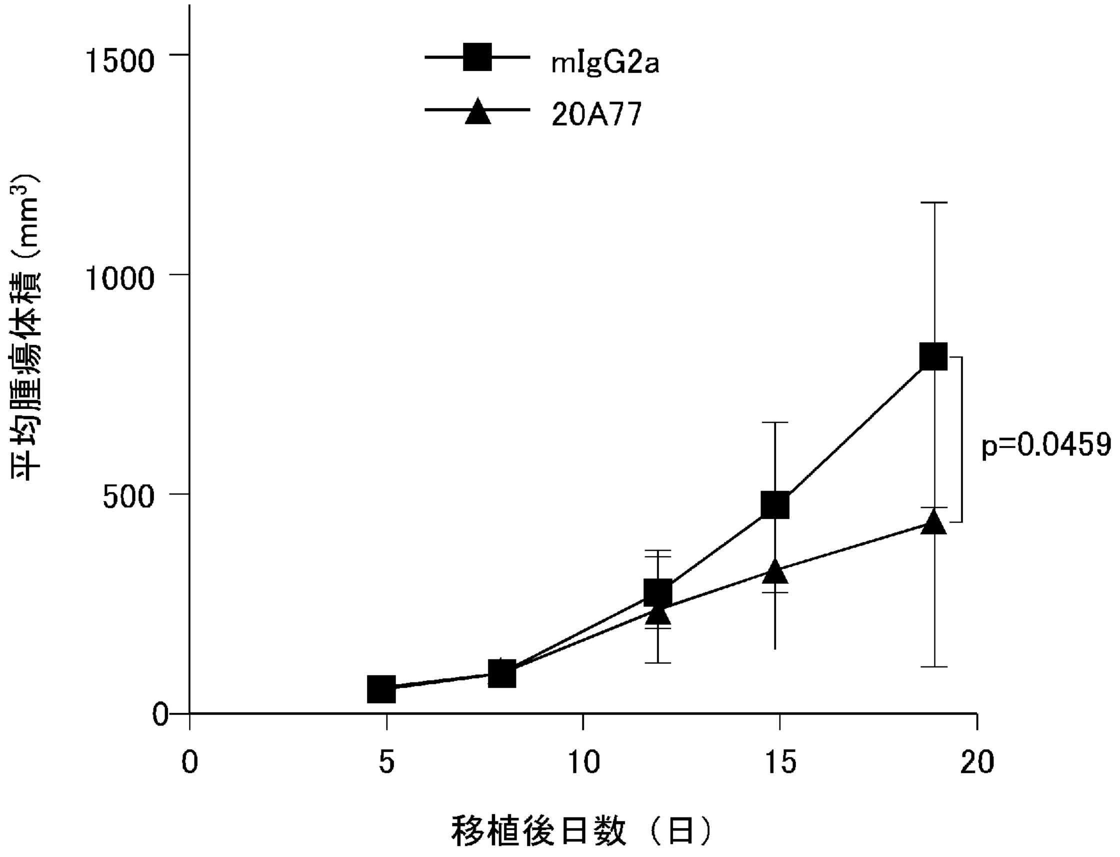
[図3]


ヒト MerTK
マウス MerTK
カニクイザル MerTK
ラット MerTK
20A77
交差反応性
24A1
交差反応性
A450
抗体濃度（nM）
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1
10
100

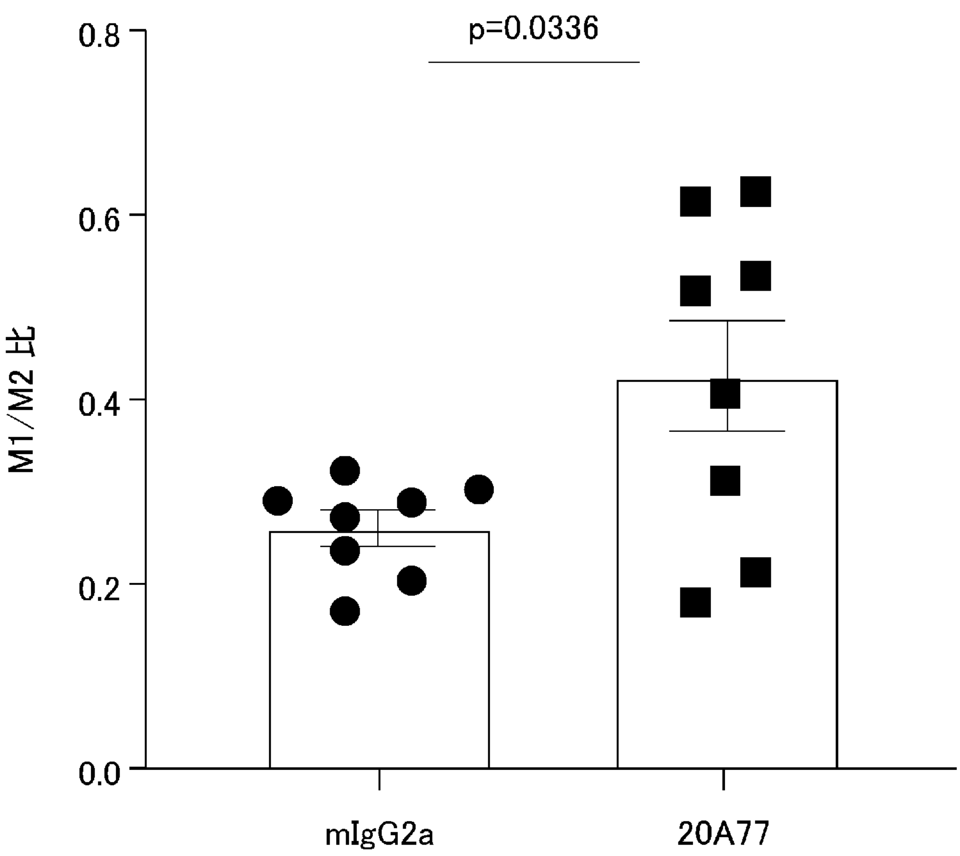
[図4]



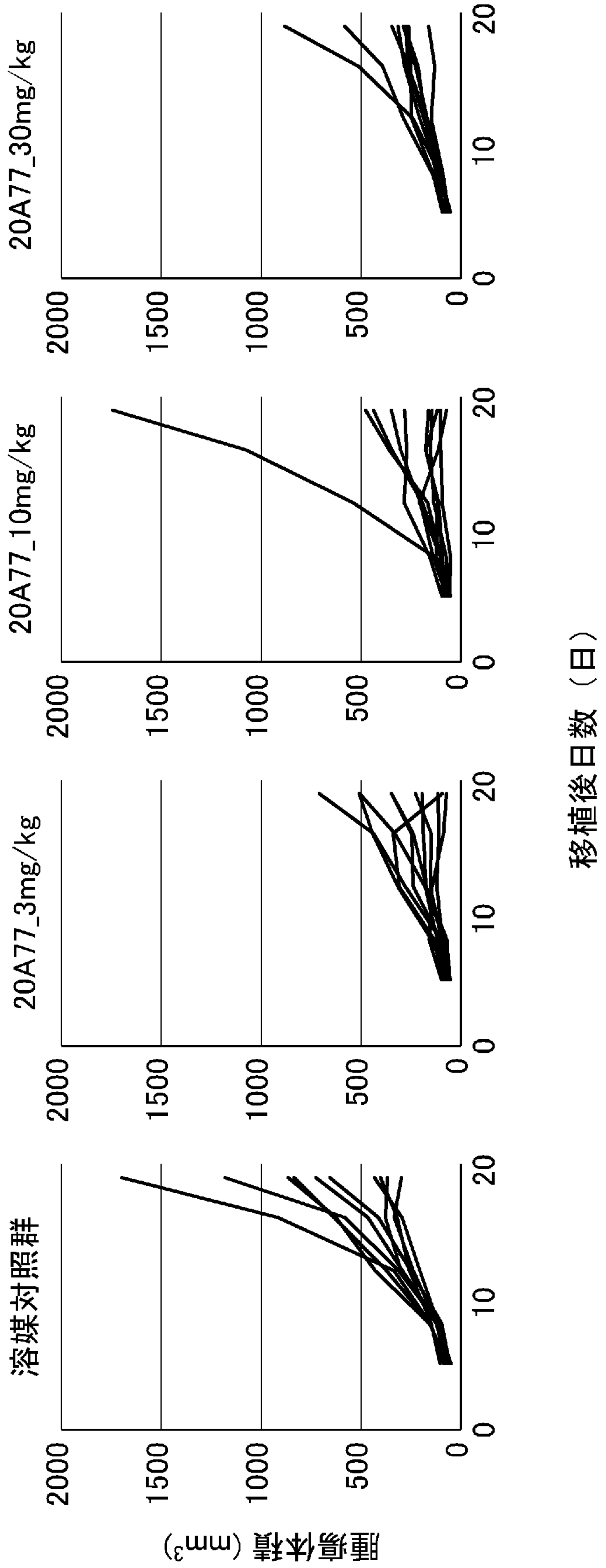
[図5]


mIgG2a
20A77
1500
1000
500
0
平均腫瘍体積（mm3）
p=0.0459
0
5
10
15
20
移植後日数（日）

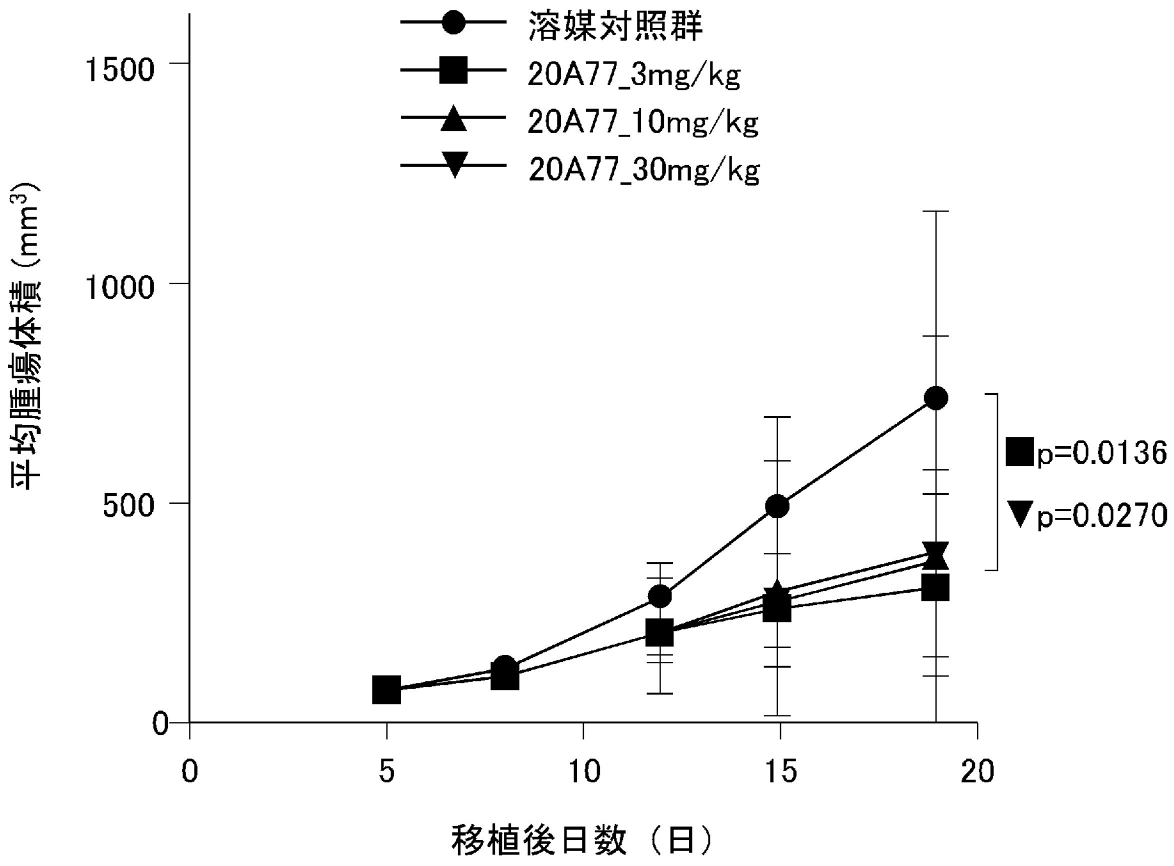
[図6]



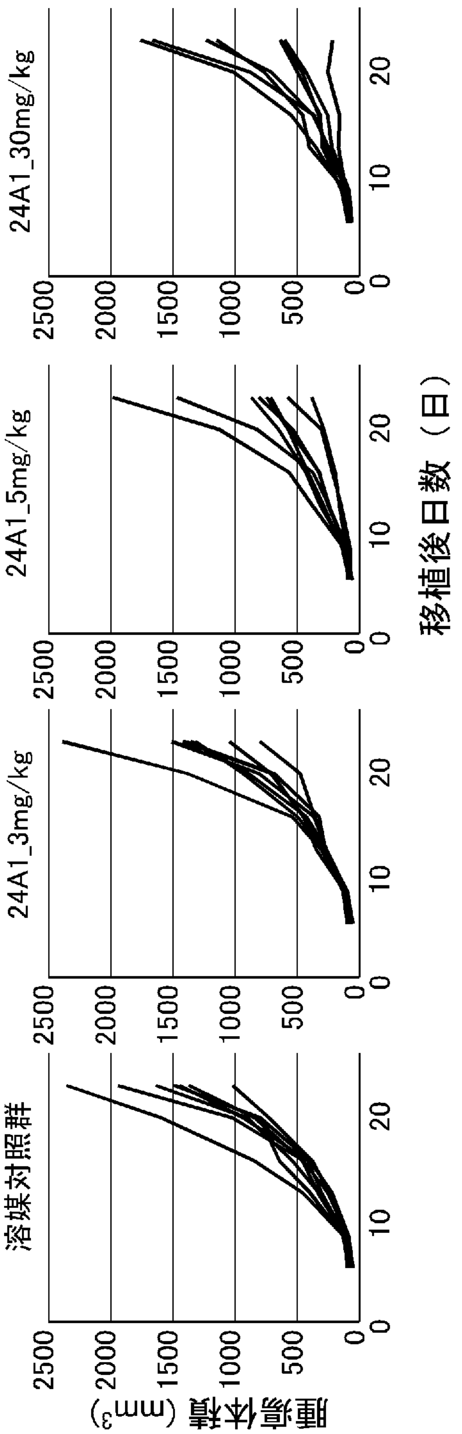
[図7]


溶媒対照群
20A77_3mg/kg
20A77_10mg/kg
20A77_30mg/kg
腫瘍体積（mm3）
移植後日数（日）
2000
1500
1000
500
0
0
10
20

[図8]

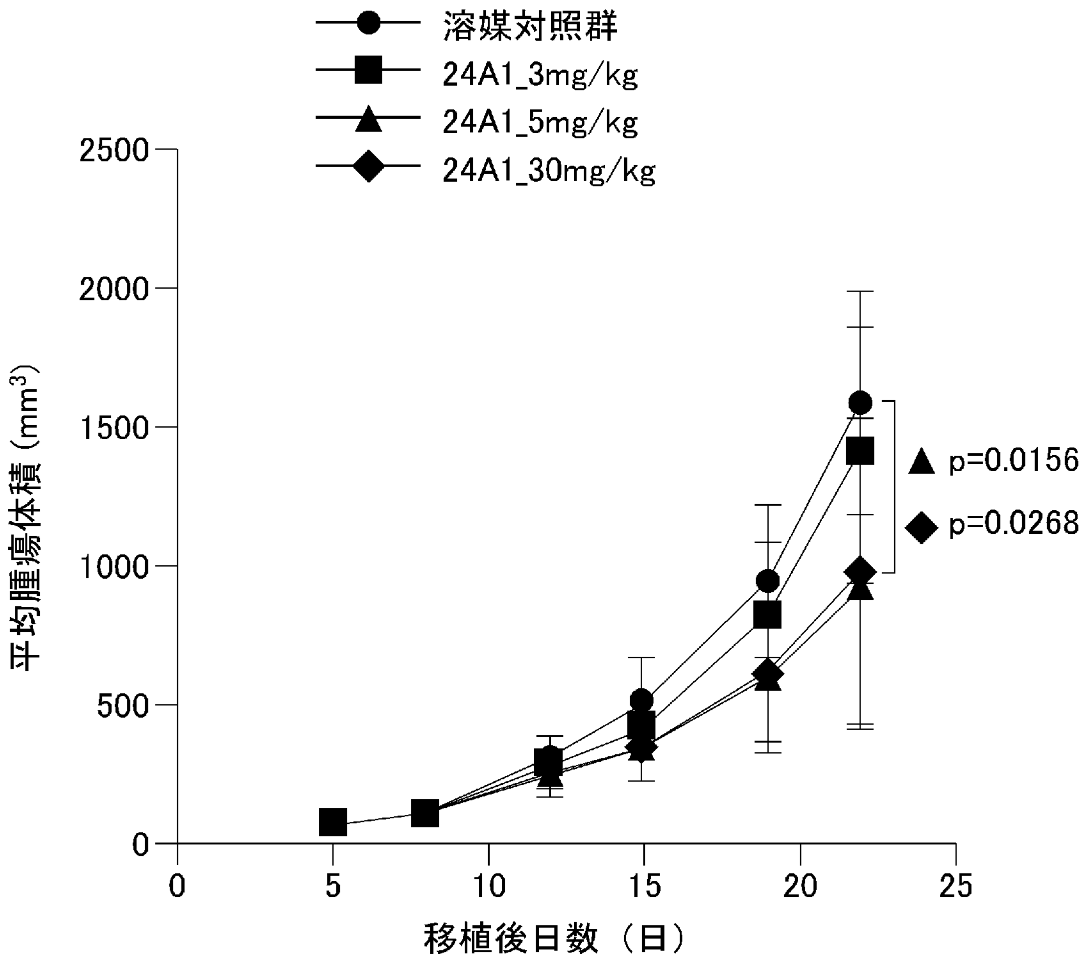

溶媒対照群
20A77_3mg/kg
20A77_10mg/kg
20A77_30mg/kg
平均腫瘍体積 (mm3)
1500
1000
500
0
5
10
15
20
移植後日数（日）
p=0.0136
p=0.0270

[図9]



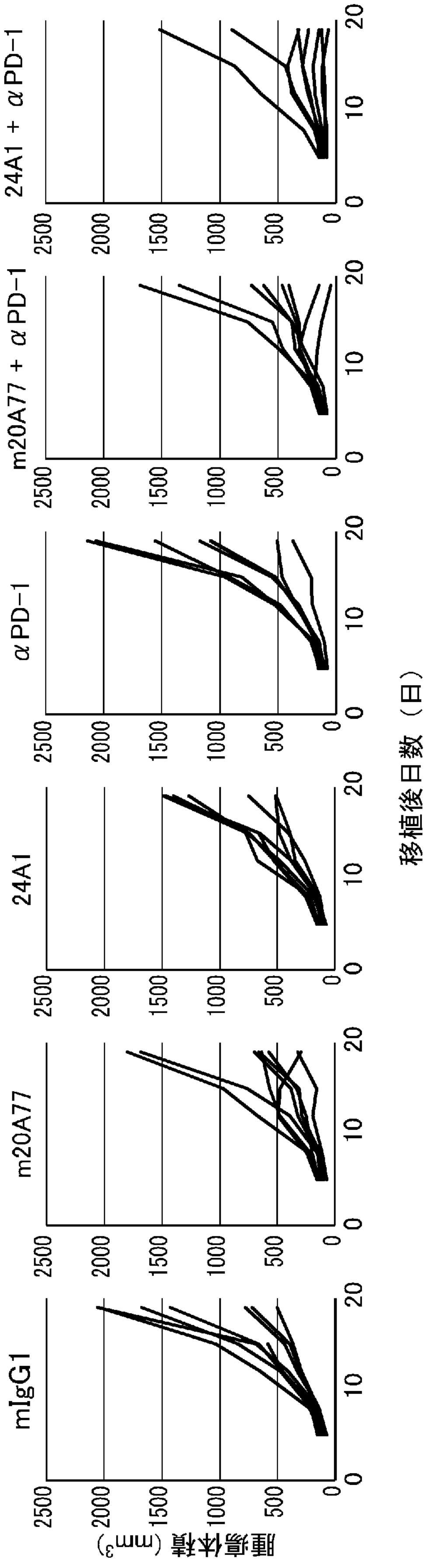
溶媒対照群
24A1_3mg/kg
24A1_5mg/kg
24A1_30mg/kg
腫瘍体積（mm3）
移植後日数（日）
0
500
1000
1500
2000
2500
0
10
20

[図10]

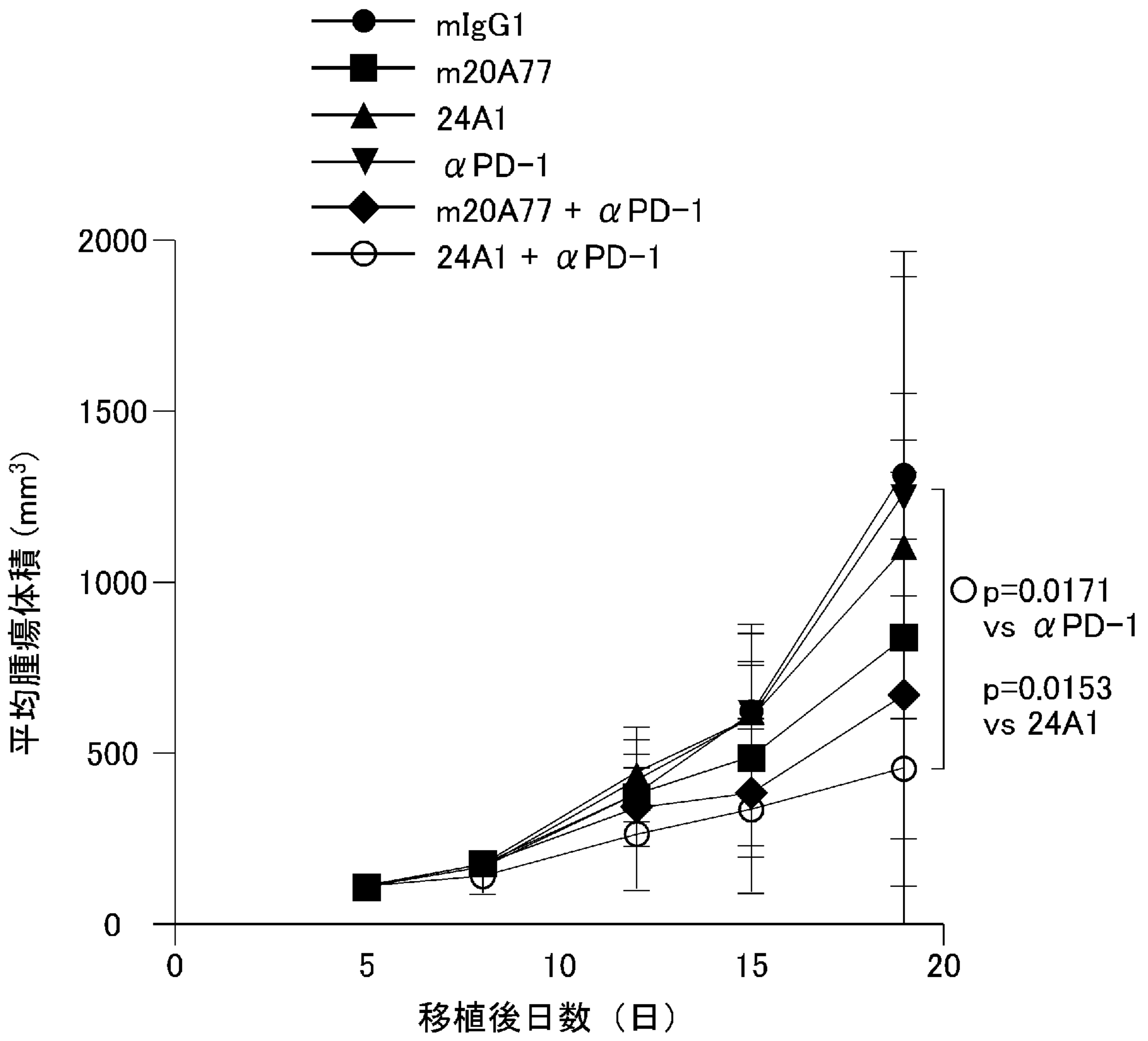


溶媒対照群
24A1_3mg/kg
24A1_5mg/kg
24A1_30mg/kg
平均腫瘍体積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
▲ p=0.0156
◆ p=0.0268
0
5
10
15
20
25
移植後日数（日）

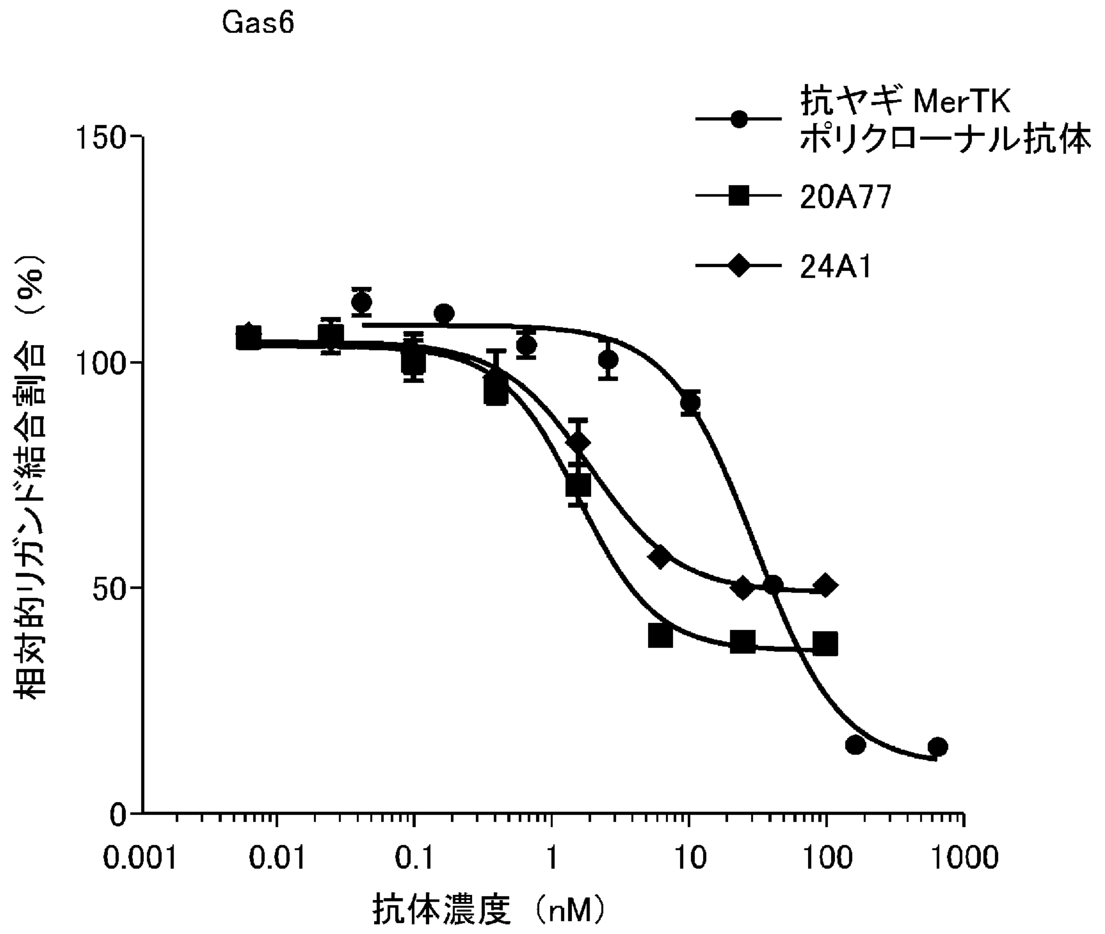
[図11]


mIgG1
m20A77
24A1
αPD-1
m20A77 + αPD-1
24A1 + αPD-1
腫瘍体積（mm3）
移植後日数（日）
0
500
1000
1500
2000
2500
0
10
20

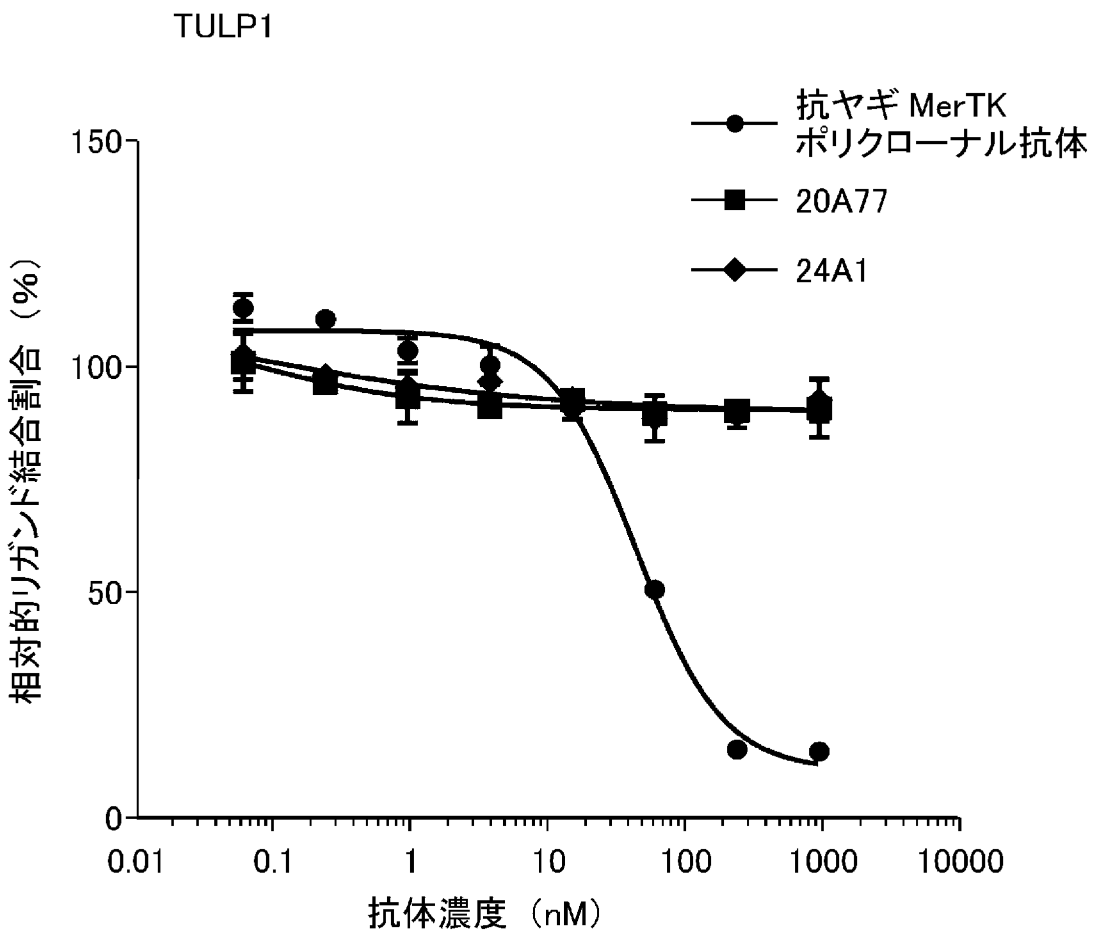
[図12]


mIgG1
m20A77
24A1
αPD-1
m20A77 + αPD-1
24A1 + αPD-1
2000
1500
1000
500
0
平均腫瘍体積 (mm3)
0
5
10
15
20
移植後日数（日）
○p=0.0171
vs αPD-1
p=0.0153
vs 24A1

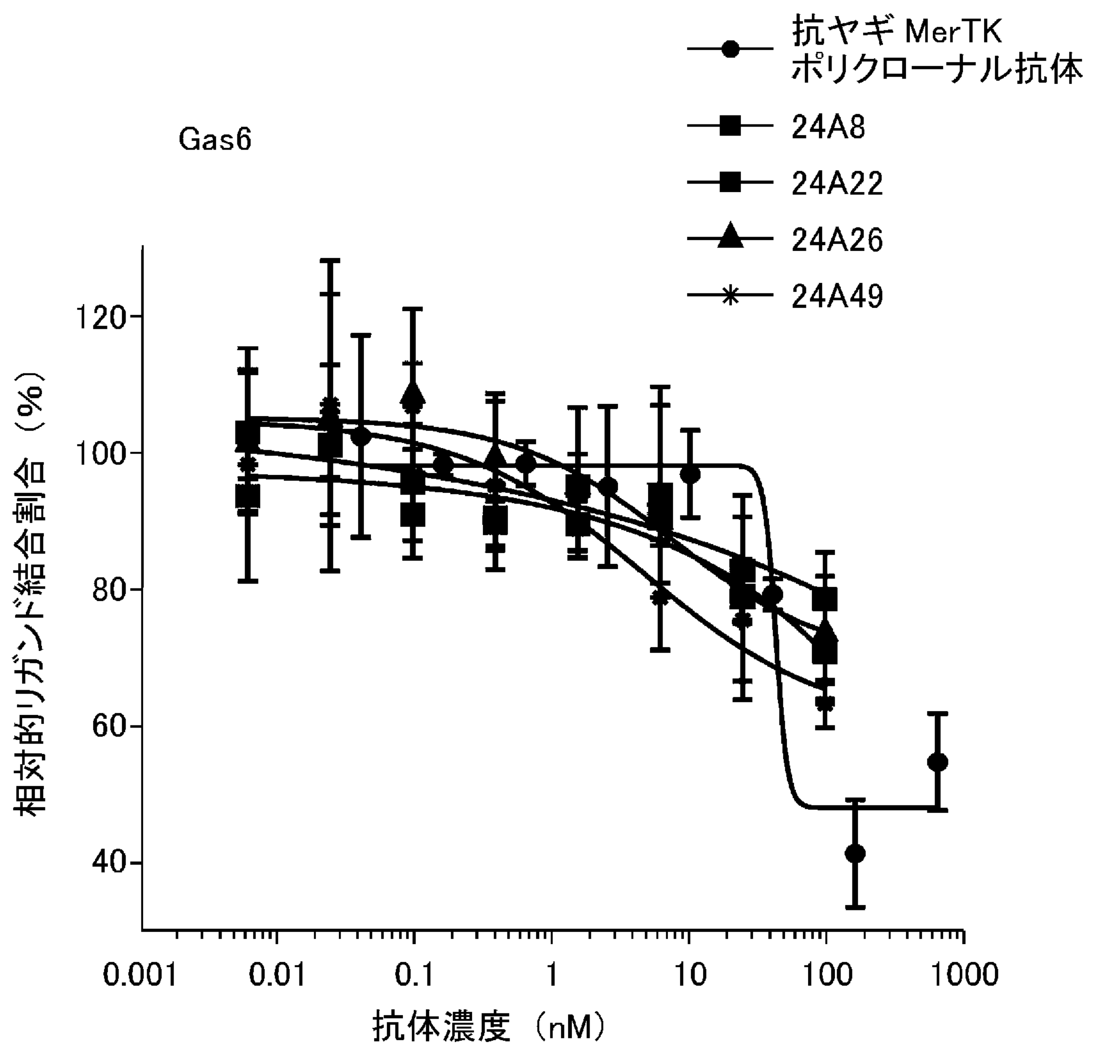
[図13]


Gas6
抗ヤギ MerTK
ポリクローナル抗体
20A77
24A1
150
100
50
0
相対的リガンド結合割合（%）
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体濃度（nM）

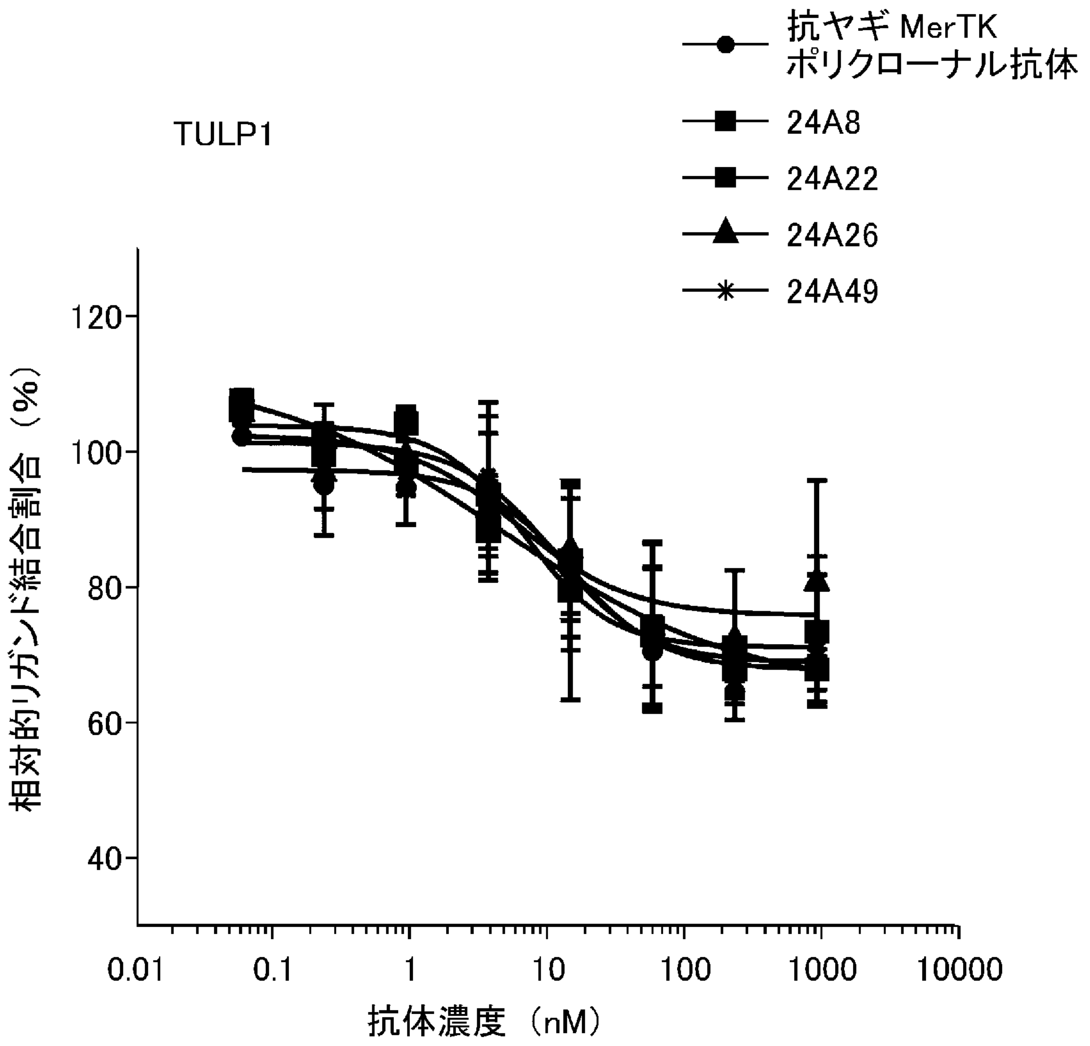
[図14]


TULP1
抗ヤギ MerTK
ポリクローナル抗体
20A77
24A1
150
100
50
0
相対的リガンド結合割合（%）
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体濃度（nM）

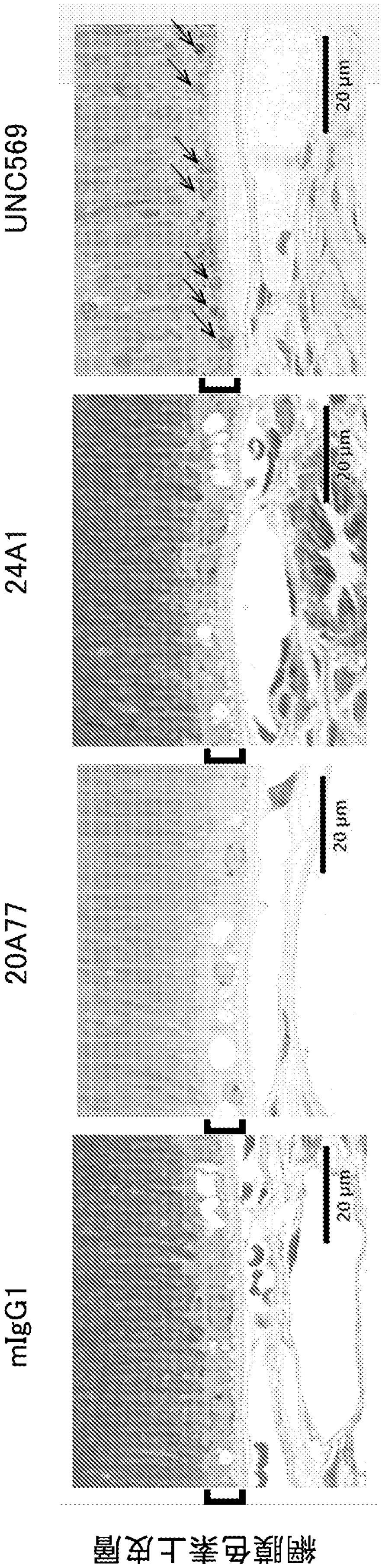
[図15]


Gas6
抗ヤギ MerTK
ポリクローナル抗体
24A8
24A22
24A26
24A49
相対的リガンド結合割合（%）
120
100
80
60
40
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体濃度（nM）

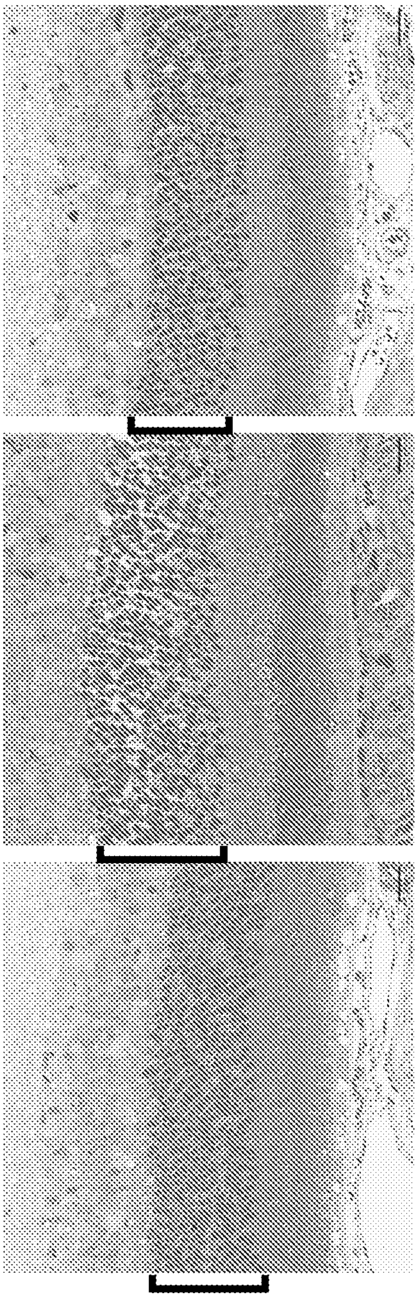
[図16]


抗ヤギ MerTK
ポリクローナル抗体
24A8
24A22
24A26
24A49
TULP1
相対的リガンド結合割合（%）
120
100
80
60
40
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体濃度（nM）

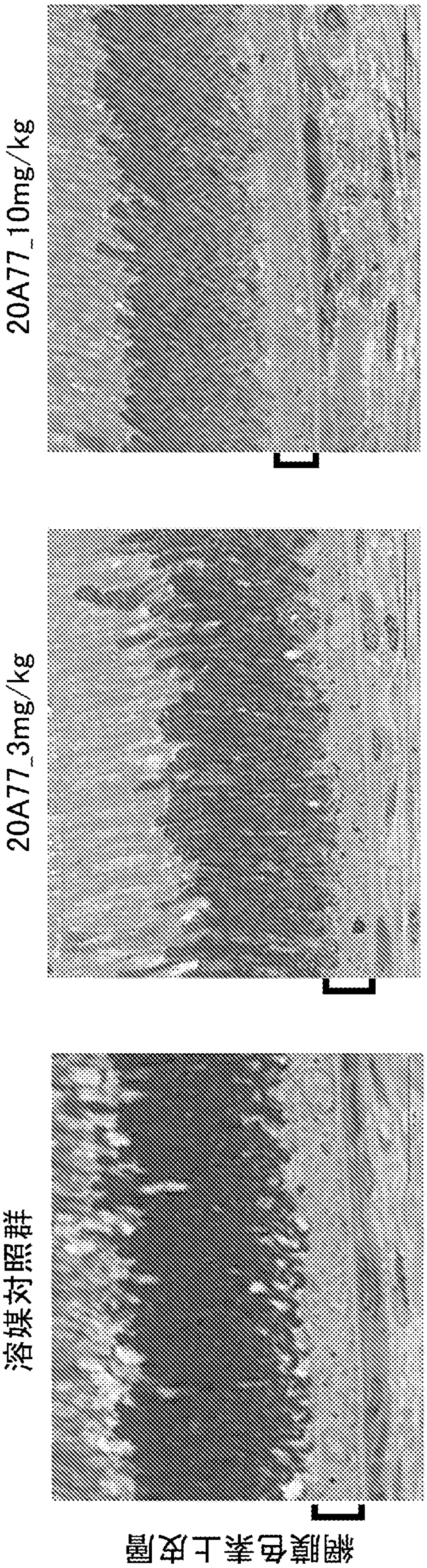
[図17]



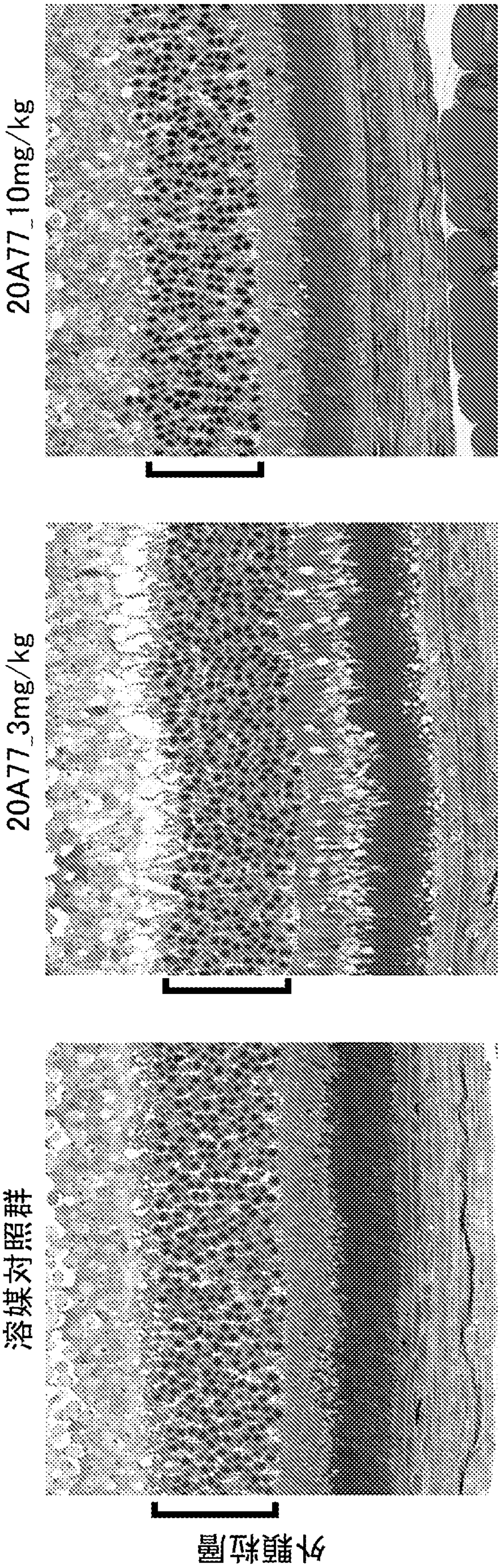
[図18]



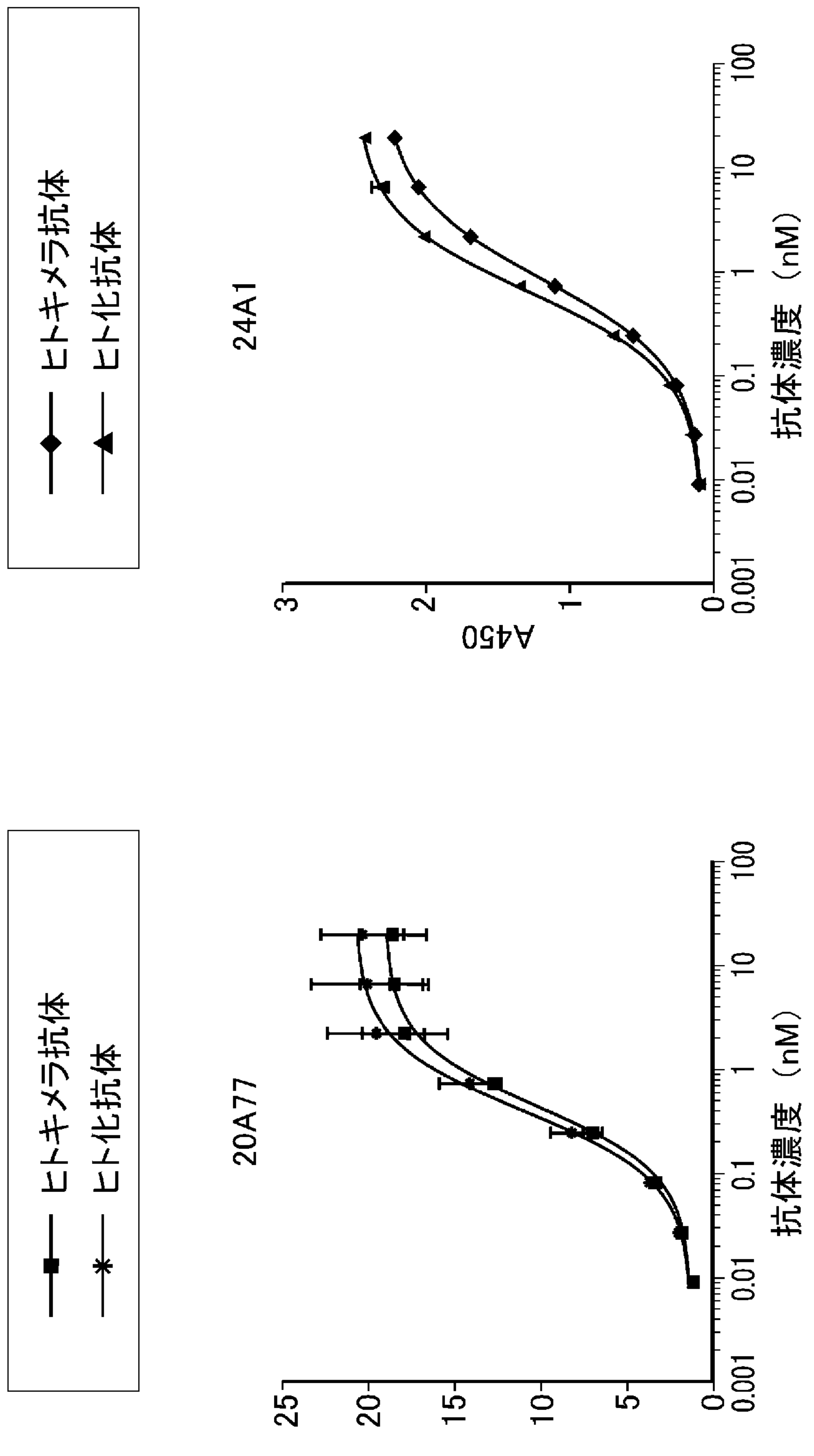
[図19]



[図20]



[図21]


ヒトキメラ抗体
ヒト化抗体
24A1
A450
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体濃度（nM）
ヒトキメラ抗体
ヒト化抗体
20A77
A450
0
5
10
15
20
25
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体濃度（nM）

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/034801

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/40(2006.01)i; ***A61K 39/395***(2006.01)i; ***A61K 45/00***(2006.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i; ***A61P 43/00***(2006.01)i; ***C12N 15/13***(2006.01)i
FI: C07K16/40 ZNA; A61P35/00; A61P43/00 121; A61K39/395 N; A61K39/395 T; A61K45/00; C12N15/13

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/00-16/46; A61K39/00-39/44; A61K45/00-45/08; A61P1/00-43/00; C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021/119508 A1 (ALECTOR LLC) 17 June 2021 (2021-06-17) claims, table 26	1-8
A	WO 2020/076799 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 16 April 2020 (2020-04-16) claims, p. 13, lines 14-29	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.   ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 October 2022	**08 November 2022**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	 Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      - ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      - ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

   The “form of an Annex C/ST.25 text file” is replaced with the “form of ST.26.”

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims are classified into the following three inventions.

(Invention 1) Claims 1-2 and 5-6, and claims 7-8 referring to any of claims 1-2 and 5-6

Claim 1 has the special technical feature of "having CDR, an amino acid sequence, represented by SEQ ID Nos: 2-8," and is thus classified as invention 1.

Also, the invention in claim 5 shares, with the invention in claim 1, the common special technical feature of "having CDR, an amino acid sequence, represented by SEQ ID Nos: 2, 4, 6, and 8," and is thus classified as invention 1.

The invention in claims 2 and 6-8 referring to any of claims 1 and 5 is dependent on claim 1 or 5, and is inventively associated with claims 1 and 5, and is thus classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 3-4 and claims 7-8 referring to any of claims 3-4

Claim 3 cannot be said to have a same or corresponding special technical feature with the invention classified as invention 1.

Claim 3 is not dependent on claim 1, and is not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

In addition, claim 3 has the special technical feature of "having CDR, an amino acid sequence, represented by SEQ ID Nos: 10-16," and is thus classified as invention 2.

Also, the invention in claims 4 and 7-8 referring to claim 3 is dependent on claim 3, and is inventively associated with claim 3, and is thus classified as invention 2.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☑ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/034801

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2021/119508 A1	17 June 2021	(Family: none)	
WO 2020/076799 A1	16 April 2020	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/034801

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 16/40(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i;
A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i
FI: C07K16/40 ZNA; A61P35/00; A61P43/00 121; A61K39/395 N; A61K39/395 T; A61K45/00; C12N15/13

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K16/00-16/46; A61K39/00-39/44; A61K45/00-45/08; A61P1/00-43/00; C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	WO 2021/119508 A1 (ALECTOR LLC) 17.06.2021 (2021－06－17) Claims, Table26	1-8
A	WO 2020/076799 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 16.04.2020 (2020－04－16) Claims, 第１３頁第１４行－第２９行	1-8

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
05.10.2022	08.11.2022

名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）
日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	松本 淳 4B 4675 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

国際出願番号
PCT/JP2022/034801

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:
上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲は、以下の３つの発明に区分される。

（発明１）請求項１－２、５－６、請求項１－２、５－６を引用する請求項７－８
　請求項１は「配列番号２－８で表されるアミノ酸配列であるCDRを有する」という特別な技術的特徴を有しているので、発明１に区分する。
　また、請求項５に係る発明は請求項１に係る発明と、「配列番号２、４、６、８で表されるアミノ酸配列であるCDRを有する」という共通の特別な技術的特徴を有しているため発明１に区分する。
　請求項１、５を引用する請求項２、６－８に係る発明は請求項１、５の従属請求項であり、請求項１、５に対して発明の連関を有しているので、発明１に区分する。

（発明２）請求項３－４、請求項３－４を引用する請求項７－８
　請求項３は発明１に区分された発明と同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。
　請求項３は請求項１の従属請求項ではなく、発明１に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。
　そして、請求項３は「配列番号１０－１６」で表されるアミノ酸配列であるCDRを有する」という特別な技術的特徴を有しているので、発明２に区分する。
　また、請求項３を引用する請求項４、７－８に係る発明は請求項３の従属請求項であり、請求項３に対して発明の連関を有しているので、発明２に区分する。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2. ☑ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/034801

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2021/119508 A1	17.06.2021	(ファミリーなし)	
WO 2020/076799 A1	16.04.2020	(ファミリーなし)	