

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-506248

(P2025-506248A)

(43)公表日 令和7年3月7日(2025.3.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 7 6
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全87頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-548730(P2024-548730)	(71)出願人	524069695
(86)(22)出願日	令和5年2月21日(2023.2.21)		コンセプト トゥー メディシン バイオ
(85)翻訳文提出日	令和6年10月16日(2024.10.16)		テック カンパニー, リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/077493		中華人民共和国 2 0 1 1 1 2 シャンハ
(87)国際公開番号	WO2023/155925		イ, ミンハン ディストリクト, プジ
(87)国際公開日	令和5年8月24日(2023.8.24)		ャン, リアンヘン ロード ナンバー 6
(31)優先権主張番号	PCT/CN2022/077113		5 1, ビルディング 4, フロア 3
(32)優先日	令和4年2月21日(2022.2.21)	(71)出願人	524068414
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		レブ バイオファーマ カンパニー, リ
			ミテッド
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)	(71)出願人	中華人民共和国 2 0 1 1 0 0 シャンハ
	最終頁に続く		イ, ミンハン ディストリクト, リア
		(74)代理人	ンヘン ロード ナンバー 6 5 1, ビル
			ディング 4, 2 エヌディー フロア
			100078282
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗 5 T 4 抗体およびその使用

(57)【要約】

本開示は、抗 5 T 4 抗体、そのバリエーションおよびヒト化バージョンを提供する。新たに開示される抗体は、5 T 4 タンパク質に対して高い親和性を示したものであり、がんを処置するために使用され得る。本開示は、様々な実施形態で、ヒト 5 T 4 タンパク質に特異的な抗体および抗原結合断片を提供する。実験的試験は、これらの新たに同定された抗体がヒト 5 T 4 タンパク質に強力にかつ特異的に結合することができることを示す。5 T 4 を標的とする F a b 断片を含有する融合タンパク質であり、臨床試験において評価された、ナプツモマブとは異なり、これらの新たに同定された抗体は、カニクイザル 5 T 4 タンパク質にも同等の作用強度で結合することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト 5 T 4 癌胎児性栄養膜糖タンパク質 (5 T 4) タンパク質に対する特異性を有し、V H C D R 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 を含む重鎖可変領域 (V H)、および V L C D R 1、V L C D R 2、および V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域 (V L) を含む抗体またはその抗原結合断片であって、前記 V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 4 1、4 2 (または 4 7 ~ 5 3 のいずれか 1 つ)、4 3、4 4、4 5 および 4 6 (または 2 6 4 もしくは 2 6 5) ;

配列番号 5 4、5 5 (または 6 0 ~ 6 3、もしくは 2 6 6 もしくは 2 6 7 のいずれか 1 つ)、5 6、5 7、5 8 および 5 9 ;

配列番号 6 4 ~ 6 9 ;

配列番号 7 0、7 1 (または 7 6)、7 2、7 3、7 4 および 7 5 ;

配列番号 7 7 ~ 8 2 ;

配列番号 8 3 ~ 8 8 ;

配列番号 8 9 ~ 9 4 ;

配列番号 9 5、9 6 (または 1 0 1 ~ 1 0 4 のいずれか 1 つ)、9 7、9 8、9 9 および 1 0 0 ;

配列番号 1 0 5 ~ 1 1 0 ;

配列番号 1 1 1 ~ 1 1 6 ;

配列番号 1 1 7 ~ 1 2 2 ;

配列番号 1 2 3、1 2 4 または 1 2 9、1 2 5、1 2 6、1 2 7 および 1 2 8 ;

配列番号 1 3 0 ~ 1 3 5 ;

配列番号 1 3 6 ~ 1 4 1 ;

配列番号 1 4 2 ~ 1 4 7 ;

配列番号 1 4 8 ~ 1 5 3 ;

配列番号 1 5 4 ~ 1 5 9 ;

配列番号 1 6 0、1 6 1 または 1 6 6、1 6 2、1 6 3、1 6 4 および 1 6 5 ;

配列番号 1 6 7、1 6 8 または 1 7 3、1 6 9、1 7 0、1 7 1 および 1 7 2 ; あるいは

配列番号 1 7 4、1 7 5 または 1 8 0、1 7 6、1 7 7、1 7 8 および 1 7 9 のアミノ酸配列を含む、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

前記 V H C D R 1 が、配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含み ;

前記 V H C D R 2 が、配列番号 5 5、6 0 ~ 6 3 および 2 6 6 ~ 2 6 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み ;

前記 V H C D R 3 が、配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含み ;

前記 V L C D R 1 が、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含み ;

前記 V L C D R 2 が、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含み ;

前記 V L C D R 3 が、配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記 V H が、配列番号 3、2 1 5 ~ 2 2 1 および 2 4 8 ~ 2 5 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 4 および 2 2 2 ~ 2 2 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

前記 V H C D R 1 が、配列番号 1 2 3 のアミノ酸配列を含み ;

前記 V H C D R 2 が、配列番号 1 2 4 および 1 2 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み ;

前記 V H C D R 3 が、配列番号 1 2 5 のアミノ酸配列を含み ;

前記 V L C D R 1 が、配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 2 が、配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 3 が、配列番号 1 2 8 のアミノ酸配列を含む、
 請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

前記 V H が、配列番号 2 3、2 3 6 ~ 2 4 1 および 2 5 9 ~ 2 6 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 2 4 および 2 4 2 ~ 2 4 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

前記 V H C D R 1 が、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 2 が、配列番号 4 2 および 4 7 ~ 5 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 3 が、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 1 が、配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 2 が、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 3 が、配列番号 4 6、2 6 4 または 2 6 5 のアミノ酸配列を含む、
 請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 7】

前記 V H C D R 1 が、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 2 が、配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 3 が、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 1 が、配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 2 が、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 3 が、配列番号 2 6 4 または 2 6 5 のアミノ酸配列を含む、
 請求項 6 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 8】

前記 V H が、配列番号 1、1 8 1 ~ 1 8 4、1 8 9 ~ 1 9 2、および 1 9 5 ~ 2 0 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 2、1 8 5 ~ 1 8 8、1 9 3 ~ 1 9 4、2 0 5 ~ 2 1 4 および 2 6 2 ~ 2 6 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 9】

前記 V H が、配列番号 1 9 7 のアミノ酸配列を含み、および前記 V L が、配列番号 2 6 2 または 2 6 3 のアミノ酸配列を含み、請求項 7 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 10】

前記 V H C D R 1 が、配列番号 7 0 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 2 が、配列番号 7 1 および 7 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 3 が、配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 1 が、配列番号 7 3 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 2 が、配列番号 7 4 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 3 が、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含む、
 請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

40

【請求項 11】

前記 V H が、配列番号 7、2 2 7 ~ 2 2 9、および 2 5 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 8、2 3 0 ~ 2 3 5 および 2 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 12】

前記 V H C D R 1 が、配列番号 9 5 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 2 が、配列番号 9 6 および 1 0 1 ~ 1 0 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；

50

前記 V H C D R 3 が、配列番号 97 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 1 が、配列番号 98 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 2 が、配列番号 99 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 3 が、配列番号 100 のアミノ酸配列を含む、
 請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 13】

前記 V H が、配列番号 15 のアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 14】

前記 V H C D R 1 が、配列番号 117 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 2 が、配列番号 118 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 3 が、配列番号 119 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 1 が、配列番号 120 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 2 が、配列番号 121 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 3 が、配列番号 122 のアミノ酸配列を含む、
 請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 15】

前記 V H が、配列番号 21 のアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 16】

前記 V H C D R 1 が、配列番号 154 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 2 が、配列番号 155 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 3 が、配列番号 156 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 1 が、配列番号 157 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 2 が、配列番号 158 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 3 が、配列番号 159 のアミノ酸配列を含む、
 請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 17】

前記 V H が、配列番号 33 のアミノ酸配列を含み、前記 V L が、配列番号 34 のアミノ酸配列を含む、請求項 16 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 18】

二価 F a b 抗体であるか、または F (a b ') 2、F (a b) 2、F a b '、F a b、F v および s c F v からなる群から選択される断片である、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 19】

薬物部分にコンジュゲートされた請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片を含む、抗体 - 薬物コンジュゲート。

【請求項 20】

前記薬物部分が、細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤である、請求項 19 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

40

【請求項 21】

前記薬物部分が、メイタンシノイド、アウリスタチン、または大環状ケトン類似体である、請求項 20 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

【請求項 22】

前記薬物部分が、モノメチルアウリスタチン E (M M A E) またはモノメチルアウリスタチン F (M M A F) を含む、請求項 21 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

【請求項 23】

前記薬物部分が、酸性条件下で加水分解可能であるリンカーを介して前記抗体またはその断片に結合されている、請求項 19 から 23 のいずれか一項に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

50

【請求項 24】

前記 V H C D R 1 が、配列番号 41 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 2 が、配列番号 42 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V H C D R 3 が、配列番号 43 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 1 が、配列番号 44 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 2 が、配列番号 45 のアミノ酸配列を含み；
 前記 V L C D R 3 が、配列番号 264 または 265 のアミノ酸配列を含む、
 請求項 19 から 23 のいずれか一項に記載の抗体～薬物コンジュゲート。

【請求項 25】

請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の抗原結合断片と、5T4 ではない標的抗原に
 対して結合特異性を有する 1 つまたは複数の抗体または抗原結合断片とを含む、多重特異
 性抗体。 10

【請求項 26】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗原結合断片と、膜貫通ドメインと、共刺激ド
 メインと、C D 3 細胞内ドメインとを含む、キメラ抗原受容体 (C A R)。

【請求項 27】

請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片または請求項
 26 に記載の C A R をコードする、1 つまたは複数のポリヌクレオチド。

【請求項 28】

1 つまたは複数の m R N A である、請求項 27 に記載のポリヌクレオチド。 20

【請求項 29】

前記 m R N A が、化学的に改変されている、請求項 28 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 30】

請求項 27 から 29 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞。

【請求項 31】

請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片、請求項 19 から
 24 のいずれか一項に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート、請求項 25 に記載の多重特異
 性抗体、請求項 26 に記載の C A R、請求項 27 から 29 のいずれか一項に記載のポリヌ
 クレオチド、または請求項 30 に記載の細胞と、薬学的に許容される担体とを含む、組成
 物。 30

【請求項 32】

がんを処置することを必要とする患者におけるがんを処置する方法であって、請求項 1
 から 18 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片、請求項 19 から 24 のい
 ずれか一項に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート、請求項 25 に記載の多重特異性抗体、請
 求項 26 に記載の C A R、請求項 27 から 29 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド
 または請求項 30 に記載の細胞の有効量を前記患者に投与することを含む、方法。

【請求項 33】

がんを処置するための医薬を調製するための、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載
 の抗体またはその抗原結合断片、請求項 19 から 24 のいずれか一項に記載の抗体 - 薬物
 コンジュゲート、請求項 25 に記載の多重特異性抗体、請求項 26 に記載の C A R、請求
 項 27 から 29 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 30 に記載の細胞
 の、使用。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

5 T 4 (栄養膜糖タンパク質、T P B G ; 5 T 4 癌胎児性栄養膜糖タンパク質 ; および
 W n t 活性化阻害因子 1、W A I F 1、としても公知) は、ヒト胎盤組織において最初に
 同定された脊椎動物特異的な 1 回膜貫通タンパク質である。5 T 4 は、細胞外ドメイン、
 膜貫通ヘリックスおよび細胞質領域に 8 つのロイシンリッチリピート (L R R) を含む、 50

高度にグリコシル化された堅いコアを含有する。5 T 4 の細胞質 P D Z 結合モチーフ S e r - A s p - V a l は、細胞膜付近に位置する小胞と会合する細胞質タンパク質である T I P - 2 / G I P C の P D Z ドメインと相互作用すると報告されている。シグナル伝達のさらに下流のメカニズムは、依然として不明である。5 T 4 は、胚の発達に重要な経路でありかつ抗がん治療薬の主な標的である、W n t / - カテニンシグナル伝達経路を阻害することも判明している。

【背景技術】

【0002】

5 T 4 は、正常な成体組織にはほとんど発現されないが、胎盤に、ならびに最も一般的な腫瘍、典型的には腎臓、乳房、結腸、前立腺および卵巣の癌の 80% より多くに、高レ 10
ベルで存在する。したがって、5 T 4 には癌胎児性抗原の特徴があり、この特徴が、5 T 4 をがん処置のための診断マーカーまたは標的としての使用が見込まれる候補として際立たせる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

要旨

本開示は、様々な実施形態で、ヒト 5 T 4 タンパク質に特異的な抗体および抗原結合断片を提供する。実験的試験は、これらの新たに同定された抗体がヒト 5 T 4 タンパク質に 20
強力にかつ特異的に結合することができることを示す。5 T 4 を標的とする F a b 断片を含有する融合タンパク質であり、臨床試験において評価された、ナプツモマブとは異なり、これらの新たに同定された抗体 (n e w l y i d e n t i f i e s a n t i b o d i e s) は、カニクイザル 5 T 4 タンパク質にも同等の作用強度 (p o t e n c y) で結合することができる。

【0004】

本開示の一実施形態によれば、ヒト 5 T 4 癌胎児性栄養膜糖タンパク質 (5 T 4) タン 30
パク質に対して特異性を有する抗体またはその抗原結合断片であって、V H C D R 1 と V H C D R 2 と V H C D R 3 とを含む重鎖可変領域 (V H)、および V L C D R 1 と V L C D R 2 と V L C D R 3 とを含む軽鎖可変領域 (V L) を含む、抗体またはその抗原結合断片が提供される。

【0005】

一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 4 1、4 2 (もしくは 4 7 ~ 5 3 のいずれか 1 つ)、4 3、4 4、4 5 および 4 6 (または 2 6 4 または 2 6 5) のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1 は、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含み；V H C D R 2 は、配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含み；V H C D R 3 は、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 1 は、配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 2 は、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 3 は、配列番号 2 6 4 または 2 6 5 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H は、配列番号 1 9 7 のアミノ酸配列を含み、V L は、配列番号 2 6 2 または 2 6 3 のアミノ酸 40
配列を含む。

【0006】

一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 5 4、5 5 (もしくは 6 0 ~ 6 3、または 2 6 6 または 2 6 7 のいずれか 1 つ)、5 6、5 7、5 8 および 5 9 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 6 4 ~ 6 9 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 7 0、7 1 または 7 6、7 2、7 3、7 4 または 7 5 のアミノ酸配列を含 50

む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号77～82のアミノ酸配列を含む。

【0007】

一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号83～88のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号89～94のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号95、96（もしくは101～104のいずれか1つ）、97、98、99および100のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号105～110のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号111～116のアミノ酸配列を含む。

10

【0008】

一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号117～122のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号123、124または129、125、126、127および128のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号130～135のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号136～141のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号142～147のアミノ酸配列を含む。

20

【0009】

一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号148～153のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号154～159のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号160、161または166、162、163、164および165のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号167、168または173、169、170、171および172のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 1、VH CDR 2、VH CDR 3、VL CDR 1、VL CDR 2およびVL CDR 3は、それぞれ、配列番号174、175または180、176、177、178および179のアミノ酸配列を含む。

30

40

【0010】

薬物部分にコンジュゲートされた本開示の抗体またはその断片を含む、抗体-薬物コンジュゲートも、提供される。一部の実施形態では、薬物部分は、細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤である。一部の実施形態では、薬物部分は、メイタンシノイド、アウリスタチン、または大環状ケトン類似体である。一部の実施形態では、薬物部分は、モノメチルアウリスタチンE (MMAE) またはモノメチルアウリスタチンF (MMAF) を含む。一部の実施形態では、薬物部分は、酸性条件下で加水分解可能であるリンカーを介して抗体ま

50

たはその断片に結合されている。

【0011】

一部の実施形態では、VH CDR 1は、配列番号41のアミノ酸配列を含み；VH CDR 2は、配列番号42のアミノ酸配列を含み；VH CDR 3は、配列番号43のアミノ酸配列を含み；VL CDR 1は、配列番号44のアミノ酸配列を含み；VL CDR 2は、配列番号45のアミノ酸配列を含み；VL CDR 3は、配列番号264または265のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VHは、配列番号197のアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号262または263のアミノ酸配列を含む。

【0012】

本開示の抗原結合断片と、5T4ではない標的抗原に対して結合特異性を有する1つまたは複数の抗体または抗原結合断片とを含む、多重特異性抗体も提供される。 10

【0013】

別の実施形態では、本開示の抗原結合断片と、膜貫通ドメインと、共刺激ドメインと、CD3 細胞内ドメインとを含む、キメラ抗原受容体(CAR)も提供される。

【0014】

本開示の抗体もしくはその抗原結合断片またはCARをコードするポリヌクレオチドも提供される。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、必要に応じて化学的に改変されている、mRNAである。

【0015】

本開示の抗体またはその抗原結合断片を用いる、がんおよび炎症状態を処置するための方法および使用も提供される。 20

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、ヒト5T4タンパク質に対する試験した抗5T4キメラ単一特異性抗体のELISA結合活性を示す。

【0017】

【図2】図2は、カニクイザル5T4タンパク質に対する試験した抗5T4キメラ単一特異性抗体のELISA結合活性を示す。

【0018】

【図3】図3～8は、競合ELISAアッセイによる試験した抗5T4キメラ単一特異性抗体のエピトープ結合を示す。 30

【図4】図3～8は、競合ELISAアッセイによる試験した抗5T4キメラ単一特異性抗体のエピトープ結合を示す。

【図5】図3～8は、競合ELISAアッセイによる試験した抗5T4キメラ単一特異性抗体のエピトープ結合を示す。

【図6】図3～8は、競合ELISAアッセイによる試験した抗5T4キメラ単一特異性抗体のエピトープ結合を示す。

【図7】図3～8は、競合ELISAアッセイによる試験した抗5T4キメラ単一特異性抗体のエピトープ結合を示す。

【図8】図3～8は、競合ELISAアッセイによる試験した抗5T4キメラ単一特異性抗体のエピトープ結合を示す。 40

【0019】

【図9-1】図9は、CHO-K1の表面に発現されたヒト5T4に対する試験した抗5T4キメラmAbの結合活性を示す (shows that the binding activity)。

【図9-2】図9は、CHO-K1の表面に発現されたヒト5T4に対する試験した抗5T4キメラmAbの結合活性を示す (shows that the binding activity)。

【0020】

【図10】図10は、ヒト化14G12抗体の大部分が、キメラ14G12 mAbと比 50

較して、ヒト 5 T 4 抗原に対する同様の結合活性を有することを示す。

【 0 0 2 1 】

【 図 1 1 - 1 】 図 1 1 は、試験したヒト化 1 4 G 1 2 抗体の大部分が、キメラ 1 4 G 1 2 抗体と比較して、ヒト 5 T 4 を過剰発現する C H O K 1 に対して同様の結合活性を有することを示す。

【 図 1 1 - 2 】 図 1 1 は、試験したヒト化 1 4 G 1 2 抗体の大部分が、キメラ 1 4 G 1 2 抗体と比較して、ヒト 5 T 4 を過剰発現する C H O K 1 に対して同様の結合活性を有することを示す。

【 0 0 2 2 】

【 図 1 2 】 図 1 2 は、試験したヒト化 3 9 3 E 9 抗体およびそれらのキメラ m A b が、ヒト 5 T 4 抗原に対して同等の結合活性を有することを示す。 10

【 0 0 2 3 】

【 図 1 3 】 図 1 3 は、試験したヒト化 3 9 3 E 9 抗体の一部が、C H O K 1 - h u 5 T 4 細胞に対してキメラ抗体と同様のまたはさらにはそれより強い結合活性を有することを示す。

【 0 0 2 4 】

【 図 1 4 】 図 1 4 は、試験したヒト化 1 5 9 D 5 抗体およびそれらのキメラ m A b が、ヒト 5 T 4 抗原に対して同等の結合活性を有することを示す。

【 0 0 2 5 】

【 図 1 5 】 図 1 5 は、試験したヒト化 1 5 9 D 5 抗体およびそれらのキメラ抗体が、ヒト 5 T 4 を過剰発現する C H O K 1 に対して同等の結合活性を有することを示す。 20

【 0 0 2 6 】

【 図 1 6 】 図 1 6 は、試験したヒト化 2 8 6 B 4 抗体の一部が、キメラ抗体と比較して、ヒト 5 T 4 抗原に対する同様の結合活性を有することを示す。

【 0 0 2 7 】

【 図 1 7 】 図 1 7 は、試験したヒト化 2 8 6 B 4 抗体の一部が、C H O K 1 - h u 5 T 4 細胞または M C F - 7 細胞に対してそれらのキメラ抗体と同様のまたはさらにはそれより強い結合活性を有することを示す。

【 0 0 2 8 】

【 図 1 8 】 図 1 8 は、P T M 除去抗体が、5 T 4 発現細胞に対してそれらのキメラ抗体より増強された結合能を有することを示す。 30

【 0 0 2 9 】

【 図 1 9 】 図 1 9 は、親和性成熟抗体が、ヒト 5 T 4 抗原に対してそれらの親 H u 1 4 G 1 2 - 2 8 抗体より強い結合活性を有することを示す。

【 0 0 3 0 】

【 図 2 0 】 図 2 0 は、親和性成熟抗体が、5 T 4 発現細胞に対してそれらの親 H u 1 4 G 1 2 - 2 8 抗体より増強された結合能を有することを示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 1 】

詳細な説明

40

定義

用語「1つの(a)」または「1つの(an)」実体は、その実体の1つまたは複数を指し、例えば、「1つの抗体(an antibody)」は、1つまたは複数の抗体を表すと理解されることに留意されたい。したがって、用語「1つの(a)」(または「1つの(an)」)、「1つまたは複数(one or more)」および「少なくとも1つ(at least one)」は、本明細書では同義で使用され得る。

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用される場合、「抗体」または「抗原結合断片」は、抗原を特異的に認識し、それに結合する、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体を指す。抗体は、全抗体およびその任意の抗原結合断片または一本鎖であり得る。したがって、用語「抗体」は、抗 50

原に結合する生物活性を有する免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含む分子を含む、任意のタンパク質またはペプチドを含む。そのようなものの例としては、重鎖もしくは軽鎖またはそのリガンド結合部分の相補性決定領域（CDR）、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク（FR）領域、あるいはその任意の部分、あるいは結合タンパク質の少なくとも一部分が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

用語「抗体断片」または「抗原結合断片」は、本明細書で使用される場合、抗体の一部、例えば、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 $scFv$ などである。構造に関係なく、抗体断片は、無傷抗体により認識される同じ抗原と結合する。用語「抗体断片」は、アダプター、スピーゲルアイゼン、およびダイアボディを含む。用語「抗体断片」は、特定の抗原に結合して複合体を形成することにより抗体のように動作する、任意の合成のまたは遺伝子操作されたタンパク質も含む。

10

【0034】

抗体という用語は、生化学的に区別され得るポリペプチドの様々な広範なクラスを包含する。重鎖が、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはイプシロン（ γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ ）として、一部はこれらの中のサブクラス（例えば、 $\gamma 1 \sim \gamma 4$ ）として、分類されることは、当業者には理解されるであろう。それは、それぞれIgG、IgM、IgA、IgGまたはIgEのような抗体の「クラス」を決定するこの鎖の性質である。

【0035】

免疫グロブリンサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5などは、十分に特徴付けられており、機能の特化をもたらすことが公知である。これらのクラスおよびアイソタイプの各々についての改変バージョンは、本開示に鑑みて当業者には容易に識別可能であり、したがって、本開示の範囲内である。全ての免疫グロブリンクラスは、明らかに本開示の範囲内であり、以下の論述は、一般に、免疫グロブリン分子のIgGクラスに関することになる。IgGに関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量おおよそ23,000ダルトンの2つの同一の軽鎖ポリペプチド、および分子量53,000~70,000ダルトンの2つの同一の重鎖ポリペプチドを含む。4本の鎖は、典型的に、ジスルフィド結合により「Y」形状に連結されており、軽鎖が、「Y」の口で始まって可変領域まで続いて重鎖を両側から挟んでいる。

20

【0036】

本開示の抗体、その抗原結合ポリペプチド、バリエーションまたは誘導体は、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性、ヒト、ヒト化、霊長類化またはキメラ抗体、一本鎖抗体、エピトープ結合性断片、例えば、 Fab 、 Fab' および $F(ab')_2$ 、 Fd 、 Fv 、一本鎖 $Fv(scFv)$ 、一本鎖抗体、ジスルフィド連結 $Fv(sdFv)$ 、 VK または VH ドメインを含む断片、 Fab 発現ライブラリーにより生成される断片、ならびに抗イデオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本明細書で開示される抗体に対する抗Id抗体を含む）を含むが、これらに限定されない。本開示の免疫グロブリンまたは抗体分子は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスのものであり得る。

30

40

【0037】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗体」は、免疫反応性領域または部位が第1の種から得られまたはそれに由来し、定常領域（本開示によれば、無傷であることがあり、部分的であることがあり、または改変されていることがある）が第2の種から得られる、任意の抗体を意味すると考えられたい。ある特定の形態では、標的結合領域または部位は、非ヒト源（例えば、マウスまたは霊長類）からのものとなり、定常領域は、ヒトのものである。

【0038】

本明細書で開示される抗体は、鳥類および哺乳動物を含む任意の動物起源のものであり得る。好ましくは、抗体は、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、

50

ラマ、ウマ、またはニワトリ抗体である。一部の実施形態では、可変領域は、起源が軟骨魚網様のもの（例えば、サメからのもの）であり得る。

【0039】

本明細書で使用される場合、用語「組換え(の)」は、それがポリペプチドまたはポリヌクレオチドに付随する場合、天然に存在しないポリペプチドまたはポリヌクレオチドの形態を意図しており、その非限定的な例は、通常は一緒に存在しないポリヌクレオチドを組み合わせるにより作出され得る。

【0040】

ハイブリドーマ技術は、異なる「ストリンジェンシー」の条件下で行われ得る。一般に、低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション反応は、約 $10 \times SSC$ 、または等価のイオン強度/温度の溶液中、約 $40^\circ C$ で実行される。中ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、典型的に、約 $6 \times SSC$ 中、約 $50^\circ C$ で行われ、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション反応は、一般に、約 $1 \times SSC$ 中、約 $60^\circ C$ で行われる。ハイブリダイゼーション反応はまた、当業者には周知である「生理条件」下で行われ得る。生理条件の非限定的な例は、細胞に通常見られる温度、イオン強度、pHおよび Mg^{2+} 濃度である。

抗5T4抗体

【0041】

別記実験例で実証されるように、本発明者らは、抗5T4抗体14G12、393E9、113H5、159D5、24F10、493E10、257F1、353H11、367B8、389G2、109H7、286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10および95F10（表1）を生成することができた。また重要なこととして、これらの抗体の多くは、5T4に対するFab部分を含有するベンチマーク融合タンパク質であるナプツモマブ(NeoTX)より大きい生物活性を示した。さらに、これらの抗体は、カニクイザル5T4に対して交差反応性を示しており、このことによって前臨床評価を前進させることが可能になる。

【0042】

競合結合実験は、ナプツモマブとともに、これらの新たに同定された抗体を、それらが5T4抗原に結合する場所に基づいて4つの異なるピンに分類することができることを示した。興味深いことに、14G12、393E9および113H5のみが、5T4への結合においてナプツモマブと競合する（「ピンA」と呼ばれる、表4）。ピンBは、159D5、24F10および493E10を含み、ピンCは、257F1、353H11、367B8、389G2および109H7を含み、ピンDは、286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10および95F10を含む。配列検査は、これらのピンの各々における抗体のある特定のCDRが高度に相同であり、それ故、交換可能であると想定されることを示す。

【0043】

本開示の一実施形態によれば、抗体またはその抗原結合断片が提供される。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、ヒト5T4タンパク質に対して結合特性を有する。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、VH CDR1と、VH CDR2と、VH CDR3とを含む重鎖可変領域(VH)、およびVL CDR1と、VL CDR2と、VL CDR3とを含む軽鎖可変領域(VL)を含む。

【0044】

配列解析によって、CDRのいくつかは、潜在的に、翻訳後に改変され得る残基を含むことが明らかになった。翻訳後改変(PTM)リスクを回避するために、ひいては製造を単純にするために、本開示は、CDRのある特定のリスク回避バージョン(derisked version)を設計し、試験した。

【0045】

一部の実施形態では、抗体393E9から誘導される抗体またはその抗原結合断片が提供される。一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号54のアミノ酸配列を含み；

VH CDR 2は配列番号55のアミノ酸配列を含み；VH CDR 3は配列番号56のアミノ酸配列を含み；VL CDR 1は配列番号57のアミノ酸配列を含み；VL CDR 2は配列番号58のアミノ酸配列を含み；VL CDR 3は、それぞれ、配列番号59からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0046】

一部の実施形態では、VH CDR 2は、PTMリスク回避されている。一部の実施形態では、VH CDR 1は配列番号54のアミノ酸配列を含み；VH CDR 2は、配列番号配列番号55、または配列番号60～63または266～267のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；VH CDR 3は配列番号56のアミノ酸配列を含み；VL CDR 1は配列番号57のアミノ酸配列を含み；VL CDR 2は配列番号58のアミノ酸配列

10

【0047】

一部の実施形態では、VH CDR 2は、PTMリスク回避されている。一部の実施形態では、VH CDR 1は配列番号54のアミノ酸配列を含み；VH CDR 2は配列番号266のアミノ酸配列を含み；VH CDR 3は配列番号56のアミノ酸配列を含み；VL CDR 1は配列番号57のアミノ酸配列を含み；VL CDR 2は配列番号58のアミノ酸配列を含み；VL CDR 3は、それぞれ、配列番号59からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR 2は、PTMリスク回避されている。一部の実施形態では、VH CDR 1は配列番号54のアミノ酸配列を含み；VH CDR 2は配列番号267のアミノ酸配列を含み；VH CDR 3は配列番号56のアミノ酸配列を含み；VL CDR 1は配列番号57のアミノ酸配列を含み；VL CDR 2は配列番号58のアミノ酸配列を含み；VL CDR 3は、それぞれ、配列番号59からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。興味深いことに、実施例12に示されるように、PTMリスク回避バージョン、特に、Hu393E9-45-P2およびHu393E9-62-P2（両方とも、配列番号267をVH CDR 2として含む）は、キメラバージョンと比較して増強された親和性を有した。

20

【0048】

例のVH配列は、配列番号3、215～221および248～256からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号4および222～226からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【0049】

一部の実施形態では、VHは、配列番号3、215～221および248～256のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するVH CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号3、215～221および248～256のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号4および222～226のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するVL CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号4および222～226のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

40

【0050】

一部の実施形態では、5T4上の393E9と同じエピトープに結合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。一部の実施形態では、5T4への結合において393E9と競合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。

【0051】

一部の実施形態では、抗体286B4から誘導される抗体またはその抗原結合断片が提供される。一部の実施形態では、VH CDR 1は配列番号123のアミノ酸配列を含み；VH CDR 2は配列番号124のアミノ酸配列を含み；VH CDR 3は配列番号125のアミノ酸配列を含み；VL CDR 1は配列番号126のアミノ酸配列を含み；V

50

L CDR 2は配列番号127のアミノ酸配列を含み；V L CDR 3は、それぞれ、配列番号128からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0052】

一部の実施形態では、V H CDR 2は、PTMリスク回避されている。一部の実施形態では、V H CDR 1は配列番号123のアミノ酸配列を含み；V H CDR 2は、配列番号配列番号124、または配列番号129のアミノ酸配列を含み；V H CDR 3は配列番号125のアミノ酸配列を含み；V L CDR 1は配列番号126のアミノ酸配列を含み；V L CDR 2は配列番号127のアミノ酸配列を含み；V L CDR 3は、それぞれ、配列番号128からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。興味深いことに、実施例12に示されるように、PTMリスク回避バージョンは、キメラバージョンと比較して増強された親和性を有した。 10

【0053】

例のV H配列は、配列番号23、236～241および259～261からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のV L配列は、配列番号24および242～247からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0054】

一部の実施形態では、V Hは、配列番号23、236～241および259～261のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するV H CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号23、236～241および259～261のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V Lは、配列番号24および242～247のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するV L CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号24および242～247のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。 20

【0055】

一部の実施形態では、5 T 4上の286 B 4と同じエピトープに結合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。一部の実施形態では、5 T 4への結合において286 B 4と競合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。

【0056】

一部の実施形態では、抗体14 G 1 2から誘導される抗体またはその抗原結合断片が提供される。一部の実施形態では、V H CDR 1は配列番号41のアミノ酸配列を含み；V H CDR 2は配列番号42のアミノ酸配列を含み；V H CDR 3は配列番号43のアミノ酸配列を含み；V L CDR 1は配列番号44のアミノ酸配列を含み；V L CDR 2は配列番号45のアミノ酸配列を含み；V L CDR 3は、それぞれ、配列番号46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。 30

【0057】

一部の実施形態では、V H CDR 2は、PTMリスク回避されている。一部の実施形態では、V H CDR 1は配列番号41のアミノ酸配列を含み；V H CDR 2は、配列番号配列番号42、または配列番号47～53のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；V H CDR 3は配列番号43のアミノ酸配列を含み；V L CDR 1は配列番号44のアミノ酸配列を含み；V L CDR 2は配列番号45のアミノ酸配列を含み；V L CDR 3は、それぞれ、配列番号46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。 40

【0058】

一部の実施形態では、V L CDR 3は親和性成熟している。実施例20、に示されるように、親和性成熟抗体Hu 14 G 1 2 - 28 - 88 #およびHu 14 G 1 2 - 28 - 108 #は、親14 G 1 2 - 28抗体と比較して、それぞれ、9.45倍および7.41倍だけヒト5 T 4タンパク質に対する結合親和性を顕著に増大させた。

【0059】

一部の実施形態では、V H CDR 1は配列番号41のアミノ酸配列を含み；V H C 50

D R 2 は配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含み；V H C D R 3 は配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 1 は配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 2 は配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 2 6 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 2 は、P T M リスク回避されている。一部の実施形態では、V H C D R 1 は配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含み；V H C D R 2 は配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含み；V H C D R 3 は配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 1 は配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 2 は配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 2 6 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0060】

10

一部の実施形態では、V H C D R 1 は配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含み；V H C D R 2 は、配列番号配列番号 4 2、または配列番号 4 7 ~ 5 3 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み；V H C D R 3 は配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 1 は配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 2 は配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含み；V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 4 6、2 6 4 および 2 6 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0061】

例の V H 配列は、配列番号 1、1 8 1 ~ 1 8 4、1 8 9 ~ 1 9 2、および 1 9 5 ~ 2 0 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例の V L 配列は、配列番号 2、1 8 5 ~ 1 8 8、1 9 3 ~ 1 9 4、2 0 5 ~ 2 1 4 および 2 6 2 ~ 2 6 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。別の例の V H 配列は、配列番号 1、1 8 1 ~ 1 8 4、1 8 9 ~ 1 9 2、および 1 9 5 ~ 2 0 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例の V L 配列は、配列番号 2 6 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。別の例の V H 配列は、配列番号 1、1 8 1 ~ 1 8 4、1 8 9 ~ 1 9 2、および 1 9 5 ~ 2 0 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例の V L 配列は、配列番号 2 6 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。さらに別の例の V H 配列は、配列番号 1 9 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例の V L 配列は、配列番号 2 6 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。さらに別の例の V H 配列は、配列番号 1 9 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例の V L 配列は、配列番号 2 6 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

30

【0062】

一部の実施形態では、V H は、配列番号 1、1 8 1 ~ 1 8 4、1 8 9 ~ 1 9 2、および 1 9 5 ~ 2 0 4 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、あるいは対応する V H C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 1、1 8 1 ~ 1 8 4、1 8 9 ~ 1 9 2、および 1 9 5 ~ 2 0 4 のいずれか 1 つに対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V L は、配列番号 2、1 8 5 ~ 1 8 8、1 9 3 ~ 1 9 4、2 0 5 ~ 2 1 4 および 2 6 2 ~ 2 6 3 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、あるいは対応する V L C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 2、1 8 5 ~ 1 8 8、1 9 3 ~ 1 9 4、2 0 5 ~ 2 1 4 および 2 6 2 ~ 2 6 3 のいずれか 1 つに対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V H は、配列番号 1 9 7 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、あるいは対応する V H C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 1 9 7 のいずれか 1 つに対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V L は、配列番号 2 6 2 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、あるいは対応する V L C D R またはその親和性成熟バージョンを保持しながら配列番号 2 6 2 のいずれか 1 つに対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V L は、配列番号 2 6 3 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、あるいは対応する V L C D R またはその親和性成熟バージョンを保持しながら配列番号 2 6 3 に対する少なくとも

40

50

75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

【0063】

一部の実施形態では、5T4上の14G12と同じエピトープに結合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。一部の実施形態では、5T4への結合において14G12と競合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。

【0064】

一部の実施形態では、抗体159D5から誘導される抗体またはその抗原結合断片が提供される。一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号70のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は配列番号71のアミノ酸配列を含み；VH CDR3は配列番号72のアミノ酸配列を含み；VL CDR1は配列番号73のアミノ酸配列を含み；VL CDR2は配列番号74のアミノ酸配列を含み；VL CDR3は、それぞれ、配列番号75からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0065】

一部の実施形態では、VH CDR2は、PTMリスク回避されている。一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号70のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は、配列番号71、または配列番号76のアミノ酸配列を含み；VH CDR3は配列番号72のアミノ酸配列を含み；VL CDR1は配列番号73のアミノ酸配列を含み；VL CDR2は配列番号74のアミノ酸配列を含み；VL CDR3は、それぞれ、配列番号75からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。実施例12に示されるように、PTMリスク回避バージョン(159D50-P1)は、キメラ抗体と同様の性能を有した。

20

【0066】

例のVH配列は、配列番号7、227~229、および257からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号8、230~235および258からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0067】

一部の実施形態では、VHは、配列番号7、227~229、および257のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するVH CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号7、227~229、および257のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号8、230~235および258のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するVL CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号8、230~235および258のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0068】

一部の実施形態では、5T4上の159D5と同じエピトープに結合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。一部の実施形態では、5T4への結合において159D5と競合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。

40

【0069】

一部の実施形態では、抗体353H11から誘導される抗体またはその抗原結合断片が提供される。一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号95のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は配列番号96のアミノ酸配列を含み；VH CDR3は配列番号97のアミノ酸配列を含み；VL CDR1は配列番号98のアミノ酸配列を含み；VL CDR2は配列番号99のアミノ酸配列を含み；VL CDR3は、それぞれ、配列番号100からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0070】

一部の実施形態では、VH CDR2は、PTMリスク回避されている。一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号95のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は、配列

50

番号 96、または配列番号 101 ~ 104 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み；VH CDR3 は配列番号 97 のアミノ酸配列を含み；VL CDR1 は配列番号 98 のアミノ酸配列を含み；VL CDR2 は配列番号 99 のアミノ酸配列を含み；VL CDR3 は、それぞれ、配列番号 100 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0071】

例の VH 配列は、配列番号 15 のアミノ酸配列を含み、例の VL 配列は、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH は、配列番号 15 のアミノ酸配列、あるいは対応する VH CDR またはその PTM リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 15 に対する少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% もしくは 99% の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VL は、配列番号 16 のアミノ酸配列、あるいは対応する VL CDR またはその PTM リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 16 に対する少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% もしくは 99% の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0072】

一部の実施形態では、5T4 上の 353H11 と同じエピトープに結合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。一部の実施形態では、5T4 への結合において 353H11 と競合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。

【0073】

一部の実施形態では、抗体 109H7 から誘導される抗体またはその抗原結合断片が提供される。一部の実施形態では、VH CDR1 は配列番号 117 のアミノ酸配列を含み；VH CDR2 は配列番号 118 のアミノ酸配列を含み；VH CDR3 は配列番号 119 のアミノ酸配列を含み；VL CDR1 は配列番号 120 のアミノ酸配列を含み；VL CDR2 は配列番号 121 のアミノ酸配列を含み；VL CDR3 は、それぞれ、配列番号 122 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0074】

例の VH 配列は、配列番号 21 のアミノ酸配列を含み、例の VL 配列は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH は、配列番号 21 のアミノ酸配列、あるいは対応する VH CDR またはその PTM リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 21 に対する少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% もしくは 99% の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VL は、配列番号 22 のアミノ酸配列、あるいは対応する VL CDR またはその PTM リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 22 に対する少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% もしくは 99% の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0075】

一部の実施形態では、5T4 上の 109H7 と同じエピトープに結合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。一部の実施形態では、5T4 への結合において 109H7 と競合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。

【0076】

一部の実施形態では、抗体 49C5 から誘導される抗体またはその抗原結合断片が提供される。一部の実施形態では、VH CDR1 は配列番号 154 のアミノ酸配列を含み；VH CDR2 は配列番号 155 のアミノ酸配列を含み；VH CDR3 は配列番号 156 のアミノ酸配列を含み；VL CDR1 は配列番号 157 のアミノ酸配列を含み；VL CDR2 は配列番号 158 のアミノ酸配列を含み；VL CDR3 は、それぞれ、配列番号 159 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

40

【0077】

例の VH 配列は、配列番号 33 のアミノ酸配列を含み、例の VL 配列は、配列番号 34 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH は、配列番号 33 のアミノ酸配列、あるいは対応する VH CDR またはその PTM リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 33 に対する少なくとも 75%、80%、85%、90%、95% もしくは 99% の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VL は、配列番号 34 のアミノ酸

50

配列、あるいは対応する V L C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 3 4 に対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 0 7 8 】

一部の実施形態では、5 T 4 上の 4 9 C 5 と同じエピトープに結合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。一部の実施形態では、5 T 4 への結合において 4 9 C 5 と競合する抗体およびその抗原結合断片がまた提供される。

【 0 0 7 9 】

本明細書に開示される抗体、例えば、1 4 G 1 2、3 9 3 E 9、1 1 3 H 5、1 5 9 D 5、2 4 F 1 0、4 9 3 E 1 0、2 5 7 F 1、3 5 3 H 1 1、3 6 7 B 8、3 8 9 G 2、1 0 9 H 7、2 8 6 B 4、3 7 G 6、2 6 7 B 5、4 2 5 G 1、4 4 9 H 9、4 9 C 5、1 1 9 G 5、8 5 B 1 0 および 9 5 F 1 0 (表 1) に開示される抗体のいずれかの C D R のセット (V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3)、あるいはその P T M リスク回避バージョンを含む抗体がまた提供される。C D R 配列は、表 1 - 1 ~ 1 - 4 1 に記載される。

【 0 0 8 0 】

一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 4 1、4 2 (もしくは 4 7 ~ 5 3 のいずれか 1 つ)、4 3、4 4、4 5 および 4 6 (または 2 6 4 または 2 6 5) のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 5 4、5 5 (もしくは 6 0 ~ 6 3、または 2 6 6 または 2 6 7 のいずれか 1 つ)、5 6、5 7、5 8 および 5 9 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 6 4 ~ 6 9 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 7 0、7 1 または 7 6、7 2、7 3、7 4 または 7 5 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 7 7 ~ 8 2 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 8 1 】

一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 8 3 ~ 8 8 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 8 9 ~ 9 4 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 9 5、9 6 (もしくは 1 0 1 ~ 1 0 4 のいずれか 1 つ)、9 7、9 8、9 9 および 1 0 0 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 0 5 ~ 1 1 0 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 1 1 ~ 1 1 6 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 8 2 】

一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 1 7 ~ 1 2 2 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 2 3、1 2 4 または 1 2 9、1 2 5、1 2 6、1 2 7 および 1 2 8 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D

10

20

30

40

50

R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 3 0 ~ 1 3 5 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 3 6 ~ 1 4 1 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 4 2 ~ 1 4 7 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 8 3 】

一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 4 8 ~ 1 5 3 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 5 4 ~ 1 5 9 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 6 0、1 6 1 または 1 6 6、1 6 2、1 6 3、1 6 4 および 1 6 5 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 6 7、1 6 8 または 1 7 3、1 6 9、1 7 0、1 7 1 および 1 7 2 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 は、それぞれ、配列番号 1 7 4、1 7 5 または 1 8 0、1 7 6、1 7 7、1 7 8 および 1 7 9 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 8 4 】

一部の実施形態では、V H は、配列番号 5 のアミノ酸配列、あるいは対応する V H C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 5 に対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V L は、配列番号 6 のアミノ酸配列、あるいは対応する V L C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 6 に対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 0 8 5 】

一部の実施形態では、V H は、配列番号 9 のアミノ酸配列、あるいは対応する V H C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 9 に対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V L は、配列番号 1 0 のアミノ酸配列、あるいは対応する V L C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 1 0 に対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 0 8 6 】

一部の実施形態では、V H は、配列番号 1 1 のアミノ酸配列、あるいは対応する V H C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 1 1 に対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V L は、配列番号 1 2 のアミノ酸配列、あるいは対応する V L C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 1 2 に対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 0 8 7 】

一部の実施形態では、V H は、配列番号 1 3 のアミノ酸配列、あるいは対応する V H C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 1 3 に対する少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V L は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列、あるいは対応する V L C D R またはその P T M リスク回避バージョンを保持しながら配列番号 1 4 に対

する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

【0088】

一部の実施形態では、VHは、配列番号17のアミノ酸配列、あるいは対応するVH CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号17に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号18のアミノ酸配列、あるいは対応するVL CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号18に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0089】

一部の実施形態では、VHは、配列番号19のアミノ酸配列、あるいは対応するVH CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号19に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号20のアミノ酸配列、あるいは対応するVL CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号20に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

【0090】

一部の実施形態では、VHは、配列番号25のアミノ酸配列、あるいは対応するVH CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号25に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号26のアミノ酸配列、あるいは対応するVL CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号26に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0091】

一部の実施形態では、VHは、配列番号27のアミノ酸配列、あるいは対応するVH CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号27に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号28のアミノ酸配列、あるいは対応するVL CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号28に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

30

【0092】

一部の実施形態では、VHは、配列番号29のアミノ酸配列、あるいは対応するVH CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号29に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号30のアミノ酸配列、あるいは対応するVL CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号30に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

40

【0093】

一部の実施形態では、VHは、配列番号31のアミノ酸配列、あるいは対応するVH CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号31に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号32のアミノ酸配列、あるいは対応するVL CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号32に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

50

【 0 0 9 4 】

一部の実施形態では、V Hは、配列番号35のアミノ酸配列、あるいは対応するV H C D RまたはそのP T Mリスク回避バージョンを保持しながら配列番号35に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V Lは、配列番号36のアミノ酸配列、あるいは対応するV L C D RまたはそのP T Mリスク回避バージョンを保持しながら配列番号36に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 0 9 5 】

一部の実施形態では、V Hは、配列番号37のアミノ酸配列、あるいは対応するV H C D RまたはそのP T Mリスク回避バージョンを保持しながら配列番号37に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V Lは、配列番号38のアミノ酸配列、あるいは対応するV L C D RまたはそのP T Mリスク回避バージョンを保持しながら配列番号38に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

10

【 0 0 9 6 】

一部の実施形態では、V Hは、配列番号39のアミノ酸配列、あるいは対応するV H C D RまたはそのP T Mリスク回避バージョンを保持しながら配列番号39に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V Lは、配列番号40のアミノ酸配列、あるいは対応するV L C D RまたはそのP T Mリスク回避バージョンを保持しながら配列番号40に対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

20

【 0 0 9 7 】

一部の実施形態では、1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換、欠失および/または付加を有する、本開示のC D R配列に由来するC D R配列を含む、抗体および抗原結合断片も提供される。

抗体 - 薬物コンジュゲート

【 0 0 9 8 】

一部の実施形態では、抗体または断片は、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物学的応答改変物質、医薬品、またはP E Gにコンジュゲートされ得る。

30

【 0 0 9 9 】

一実施形態では、本開示の抗体または断片は、薬物部分に共有結合で付着している。薬物部分は、抗体上にコンジュゲーション点を有する反応性の基であることがあり、またはその基を含むように改変されていることがある。例えば、薬物部分は、アルキル化（例えば、抗体のイプシロン - アミノ基リシンまたはN末端において）、酸化された炭水化物の還元アミノ化、ヒドロキシル基とカルボキシル基とのエステル交換、アミノ基またはカルボキシル基のアミド化、およびチオールへのコンジュゲーションにより、結合され得る。

40

【 0 1 0 0 】

一部の実施形態では、抗体分子当たりのコンジュゲートされた薬物部分の数、pは、平均1~8、1~7、1~6、1~5、1~4、1~3、または1~2の範囲である。一部の実施形態では、pは、平均2~8、2~7、2~6、2~5、2~4、または2~3の範囲である。他の実施形態では、pは、平均1、2、3、4、5、6、7または8である。一部の実施形態では、pは、平均約1~約20、約1~約10、約2~約10、約2~約9、約1~約8、約1~約7、約1~約6、約1~約5、約1~約4、約1~約3、または約1~約2の範囲である。一部の実施形態では、pは、約2~約8、約2~約7、約2~約6、約2~約5、約2~約4、または約2~約3の範囲である。

【 0 1 0 1 】

50

例えば、タンパク質の化学的活性化が遊離チオール基の形成をもたらす場合、タンパク質は、スルフヒドリル反応剤とコンジュゲートされ得る。一態様では、前記剤は、遊離チオール基に対して実質的に特異的であるものである。そのような剤としては、例えば、マレイミド (maleimide)、ハロアセトアミド (例えば、ヨード、プロモまたはクロロ)、ハロエステル (例えば、ヨード、プロモまたはクロロ)、ハロメチルケトン (例えば、ヨード、プロモまたはクロロ)、ハロゲン化ベンジル (例えば、ヨウ化物、臭化物または塩化物)、ビニルスルホンおよびピリジルチオが挙げられる。

【0102】

薬物は、リンカーにより抗体または断片に連結され得る。好適なリンカーとしては、例えば、切断性および非切断性リンカーが挙げられる。切断性リンカーは、典型的に、細胞内条件下で切断されやすい。好適な切断性リンカーとしては、例えば、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼなどの細胞内プロテアーゼにより切断可能なペプチドリンカーが挙げられる。例示的な実施形態では、リンカーは、ジペプチドリンカー、例えば、バリン-シトルリン (val-cit)、フェニルアラニン-リシン (phenyllys) リンカー、またはマレイミドカプロン酸 (maleimidocaproic) - バリン-シトルリン (citru-line) - p-アミノベンジルオキシカルボニル (mc-Val-Cit-PABA) リンカーであり得る。別のリンカーは、スルホスクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート (smcc) である。スルホ-smccコンジュゲーションは、マレイミド基を介して起こり、マレイミド基は、スルフヒドリル (チオール、-SH) と反応するが、そのスルホ-NHSエステルは、第一級アミン (リシンおよびタンパク質またはペプチドN末端に見出されるような) に対して反応性である。さらに別のリンカーは、マレイミドカプロイル (mc) である。他の好適なリンカーとしては、特定のpHまたはpH範囲で加水分解可能なリンカー、例えば、ヒドラゾンリンカーが挙げられる。追加の好適な切断性リンカーとしては、ジスルフィドリンカーが挙げられる。薬物を放出するために抗体が細胞内で分解されなければならないような程度まで、リンカー、例えば、mcリンカーなどを抗体に共有結合させることができる。

【0103】

リンカーは、抗体への連結のための基を含み得る。例えば、リンカーは、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシルまたはスルフヒドリル反応性基 (例えば、マレイミド、ハロアセトアミド (例えば、ヨード、プロモまたはクロロ)、ハロエステル (例えば、ヨード、プロモまたはクロロ)、ハロメチルケトン (例えば、ヨード、プロモまたはクロロ)、ハロゲン化ベンジル (例えば、ヨウ化物、臭化物または塩化物)、ビニルスルホンおよびピリジルチオ) を含み得る。

【0104】

一部の実施形態では、薬物部分は、細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤、免疫抑制剤、放射性同位体、毒素などである。コンジュゲートを、腫瘍細胞もしくはがん細胞の増殖 (multiplication) を阻害するために、腫瘍もしくはがん細胞においてアポトーシスを引き起こすために、または患者におけるがんを処置するために、使用することができる。したがって、コンジュゲートを動物のがんの処置のための様々な状況で使用することができる。コンジュゲートを使用して、薬物を腫瘍細胞またはがん細胞に送達することができる。理論により拘束されるものではないが、一部の実施形態では、コンジュゲートは、CLDN6を発現するがん細胞に結合し、またはそれと会合し、コンジュゲートおよび/または薬物は、受容体媒介エンドサイトーシスによって腫瘍細胞またはがん細胞内に取り込まれ得る。

【0105】

一部の実施形態では、薬物部分は、メイタンシノイドまたはアウリスタチンである。一部の実施形態では、薬物部分は、大環状ケトン類似体、例えば、エリブリンである。一部の実施形態では、薬物部分は、トポイソメラーゼ阻害剤、例えば、エキサテカンおよびエキサテカン誘導体である。

10

20

30

40

50

【0106】

細胞の中に入ると、コンジュゲート内（例えば、リンカーの中）の1つまたは複数の特定のペプチド配列は、1つまたは複数の腫瘍細胞またはがん細胞に付随するプロテアーゼによる加水分解で切断され、その結果、薬物の放出がもたらされる。その結果、放出された薬物は遊離して細胞内に移動し、細胞傷害活性または細胞増殖抑制活性または他の活性を誘導する。一部の実施形態では、薬物は、腫瘍細胞もしくはがん細胞外で抗体から切断され、その後、薬物は、細胞に浸透するか、または細胞表面で作用する。

【0107】

薬物部分またはペイロードの例は、エリブリン（2 - (3 - アミノ - 2 - ヒドロキシプロピル)ヘキサコサヒドロ - 3 - メトキシ - 26 - メチル - 20, 27 - ビス(メチレン)11, 15 - 18, 21 - 24, 28 - トリエポキシ - 7, 9 - エタノ - 12, 15 - メタノ - 9H, 15H - フロ(3, 2 - i)フロ(2', 3' - 5, 6)ピラノ(4, 3 - b)(1, 4)ジオキサシクロペンタコシン - 5 - (4H) - オン)、DM1(メイトンシン, N2' - デアセチル - N2' - (3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル) - または N2' - デアセチル - N2' - (3 - メルカプト - 1 - オキソプロピル) - メイトンシン)、mc - MMAD(6 - マレイミドカプロイル - モノメチルアウリスタチン - DまたはN - メチル - L - バリル - N - [(1S, 2R) - 2 - メトキシ - 4 - [(2S) - 2 - [(1R, 2R) - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソ - 3 - [[(1S) - 2 - フェニル - 1 - (2 - チアゾリル)エチル]アミノ]プロピル] - 1 - ピロリジニル] - 1 - [(1S) - 1 - メチルプロピル] - 4 - オキソブチル] - N - メチル - (9Cl) - L - バリンアミド)、mc - MMAF(マレイミドカプロイル - モノメチルアウリスタチンFまたはN - [6 - (2, 5 - ジヒドロ - 2, 5 - ジオキソ - 1H - ピロール - 1 - イル) - 1 - オキソヘキシル] - N - メチル - L - バリル - L - バリル - (3R, 4S, 5S) - 3 - メトキシ - 5 - メチル - 4 - (メチルアミノ)ヘプタノイル - (R, R, 2S) - - メトキシ - - メチル - 2 - ピロリジンプロパノイル - L - フェニルアラニン)およびmc - Val - Cit - PABA - MMAE(6 - マレイミドカプロイル - Val - Cit - (p - アミノベンジルオキシカルボニル) - モノメチルアウリスタチンEまたはN - [[4 - [N - [6 - (2, 5 - ジヒドロ - 2, 5 - ジオキソ - 1H - ピロール - 1 - イル) - 1 - オキソヘキシル] - L - バリル - N5 - (アミノカルボニル) - L - オルニチル]アミノ]フェニル]メトキシ]カルボニル] - N - メチル - L - バリル - N - [(1S, 2R) - 4 - [(2S) - 2 - [(1R, 2R) - 3 - [[(1R, 2S) - 2 - ヒドロキシ - 1 - メチル - 2 - フェニルエチル]アミノ] - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソプロピル] - 1 - ピロリジニル] - 2 - メトキシ - 1 - [(1S) - 1 - メチルプロピル] - 4 - オキソブチル] - N - メチル - L - バリンアミド)からなる群から選択される。DM1は、チューブリン阻害剤メイトンシンの誘導體であり、その一方で、MMAD、MMAEおよびMMAFは、アウリスタチンの誘導體である。一部の実施形態では、薬物部分は、mc - MMAFおよびmc - Val - Cit - PABA - MMAEからなる群から選択される。

【0108】

抗体または断片は、検出可能な標識、例えば放射性標識、免疫調節剤、ホルモン、酵素、オリゴヌクレオチド、光活性治療剤または診断剤、薬物または毒素であり得る細胞傷害剤、超音波強化剤、非放射性標識、これらの組合せ、および当技術分野において公知の他のそのような薬剤を含み得る、治療剤にコンジュゲートまたは融合され得る。

【0109】

抗体を、化学発光化合物とカップリングさせることにより、検出可能に標識することができる。その結果、化学発光タグ付き抗原結合ポリペプチドの存在は、化学反応の過程において生ずる発光の存在を検出することにより決定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマティックアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。

【0110】

10

20

30

40

50

蛍光を発する金属、例えば、 ^{152}Eu 、またはランタニド系列の他のものを使用して、抗体を検出可能に標識することもできる。ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) のような金属キレート基を使用して、これらの金属を抗体に結合させることができる。様々な部分を抗体にコンジュゲートするための技法は、周知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al., (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985)、および Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)) を参照されたい。

【0111】

本開示の任意の抗体または抗原結合断片が、現在開示されているような抗体-薬物コンジュゲート (ADC) に含めるのに好適であることは、理解される。一実施形態では、抗体または断片は、抗体 14G12、393E9、113H5、159D5、24F10、493E10、257F1、353H11、367B8、389G2、109H7、286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10 もしくは 95F10 のうちのいずれかの VH CDR および VL CDR、またはそれらの PTM リスク回避バージョン もしくは 親和性成熟バージョン を含む。

【0112】

一部の実施形態では、抗体または断片は、ピン A (14G12、393E9、および 113H5) の抗体のいずれかの VH および VL CDR を含む。一部の実施形態では、抗体または断片は、ピン B (159D5、24F10、および 493E10) の抗体のいずれかの VH および VL CDR を含む。一部の実施形態では、抗体または断片は、ピン C (257F1、353H11、367B8、389G2、および 109H7) の抗体のいずれかの VH および VL CDR を含む。一部の実施形態では、抗体または断片は、ピン D (286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10 および 95F10) の抗体のいずれかの VH および VL CDR を含む。

【0113】

一部の実施形態では、ADC の抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む VH CDR 1 ; 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む VH CDR 2 ; 配列番号 43 のアミノ酸配列を含む VH CDR 3 ; 配列番号 44 のアミノ酸配列を含む VL CDR 1 ; 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む VL CDR 2 ; および配列番号 46 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む VL CDR 3 を含む。

【0114】

一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号41のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は、配列番号配列番号42、または配列番号47～53のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；VH CDR3は配列番号43のアミノ酸配列を含み；VL CDR1は配列番号44のアミノ酸配列を含み；VL CDR2は配列番号45のアミノ酸配列を含み；VL CDR3は、それぞれ、配列番号46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0115】

一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号41のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は配列番号42のアミノ酸配列を含み；VH CDR3は配列番号43のアミノ酸配列を含み；VL CDR1は配列番号44のアミノ酸配列を含み；VL CDR2は配列番号45のアミノ酸配列を含み；VL CDR3は、それぞれ、配列番号264からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR2は、PTMリスク回避されている。一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号41のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は配列番号42のアミノ酸配列を含み；VH CDR3は配列番号43のアミノ酸配列を含み；VL CDR1は配列番号44のアミノ酸配列を含み；VL CDR2は配列番号45のアミノ酸配列を含み；VL CDR3は、それぞれ、配列番号265からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0116】

一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号41のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は、配列番号配列番号42、または配列番号47～53のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；VH CDR3は配列番号43のアミノ酸配列を含み；VL CDR1は配列番号44のアミノ酸配列を含み；VL CDR2は配列番号45のアミノ酸配列を含み；VL CDR3は、それぞれ、配列番号46、264および265からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0117】

例のVH配列は、配列番号1、181～184、189～192、および195～204からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号2、185～188、193～194、205～214および262～263からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。別の例のVH配列は、配列番号1、181～184、189～192、および195～204からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号262からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。別の例のVH配列は、配列番号1、181～184、189～192、および195～204からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号263からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。さらに別の例のVH配列は、配列番号197からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号262からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。さらに別の例のVH配列は、配列番号197からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号263からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0118】

一部の実施形態では、VHは、配列番号1、181～184、189～192、および195～204のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するVH CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号1、181～184、189～192、および195～204のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号2、185～188、193～194、205～214および262～263のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するVL CDRまたはそのPTMリスク回避もしくは親和性成熟バージョンを保持しながら配列番号2、185～188、193～194、205～214および262～263のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列

10

20

30

40

50

を含む。一部の実施形態では、VHは、配列番号197のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するVH CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号197のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号262のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するVL CDRまたはその親和性成熟バージョンを保持しながら配列番号262のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、VLは、配列番号263のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するVL CDRまたはその親和性成熟バージョンを保持しながら配列番号263のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

10

多機能性分子

【0119】

5T4に特異的な抗体または抗原結合断片、例えば、本明細書で開示されるものと、第2の抗原に対して特異性を有する1つまたは複数の抗体または抗原結合断片とを含む、多機能性分子。

【0120】

一部の実施形態では、第2の抗原は、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、食細胞、ナチュラルキラー細胞、好酸球、好塩基球およびマスト細胞などの、免疫細胞上に発現されるタンパク質である。

20

【0121】

一部の実施形態では、第2の抗原は、CD3、CD47、PD1、PD-L1、LAG3、TIM3、CTLA4、VISTA、CSFR1、A2AR、CD73、CD39、CD40、CEA、HER2、CMET、4-1BB、OX40、SIRPA、CD16、CD28、ICOS、CTLA4、BTLA、TIGIT、HVEM、CD27、VEGFR、またはVEGFに対するものである。

【0122】

異なる形式の二重特異性抗体も提供される。一部の実施形態では、抗5T4断片および第2の断片の各々は、各々独立して、Fab断片、一本鎖可変断片(scFv)、または単ドメイン抗体から選択される。一部の実施形態では、二重特異性抗体は、Fc断片をさらに含む。

30

【0123】

単に抗体を含むものでも抗原結合断片を含むものでもない、二機能性分子も提供される。腫瘍抗原標的化分子として、5T4に特異的な抗体または抗原結合断片、例えば、本明細書に記載されるものなどを、免疫サイトカインまたはリガンドと、必要に応じてペプチドリンカーを介して、化合させることができる。連結される免疫サイトカインまたはリガンドとしては、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、GM-CSF、TNF- α 、CD40L、OX40L、CD27L、CD30L、4-1BBL、LIGHTおよびGITRLが挙げられるが、これらに限定されない。そのような二機能性分子は、免疫チェックポイント遮断効果と腫瘍部位局所免疫調節を併せ持つことができる。

40

【0124】

一部の実施形態では、抗5T4断片は、ピンA(14G12、393E9、および113H5)の抗体のいずれかのVHおよびVL CDRを含む。一部の実施形態では、抗5T4断片は、ピンB(159D5、24F10、および493E10)の抗体のいずれかのVHおよびVL CDRを含む。一部の実施形態では、抗5T4断片は、ピンC(257F1、353H11、367B8、389G2、および109H7)の抗体のいずれかのVHおよびVL CDRを含む。一部の実施形態では、抗5T4断片は、ピンD(286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10および95F10)の抗体のいずれかのVHおよびVL CDRを含む。

50

【0125】

一部の実施形態では、抗5T4断片は、配列番号41のアミノ酸配列を含むVH CDR1；配列番号42のアミノ酸配列を含むVH CDR2；配列番号43のアミノ酸配列を含むVH CDR3；配列番号44のアミノ酸配列を含むVL CDR1；配列番号45のアミノ酸配列を含むVL CDR2；および配列番号46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むVL CDR3を含む。

【0126】

一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号41のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は、配列番号配列番号42、または配列番号47～53のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；VH CDR3は配列番号43のアミノ酸配列を含み；VL CDR1は配列番号44のアミノ酸配列を含み；VL CDR2は配列番号45のアミノ酸配列を含み；VL CDR3は、それぞれ、配列番号46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0127】

一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号41のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は配列番号42のアミノ酸配列を含み；VH CDR3は配列番号43のアミノ酸配列を含み；VL CDR1は配列番号44のアミノ酸配列を含み；VL CDR2は配列番号45のアミノ酸配列を含み；VL CDR3は、それぞれ、配列番号264からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、VH CDR2は、PTMリスク回避されている。一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号41のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は配列番号42のアミノ酸配列を含み；VH CDR3は配列番号43のアミノ酸配列を含み；VL CDR1は配列番号44のアミノ酸配列を含み；VL CDR2は配列番号45のアミノ酸配列を含み；VL CDR3は、それぞれ、配列番号265からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0128】

一部の実施形態では、VH CDR1は配列番号41のアミノ酸配列を含み；VH CDR2は、配列番号配列番号42、または配列番号47～53のいずれか1つのアミノ酸配列を含み；VH CDR3は配列番号43のアミノ酸配列を含み；VL CDR1は配列番号44のアミノ酸配列を含み；VL CDR2は配列番号45のアミノ酸配列を含み；VL CDR3は、それぞれ、配列番号46、264および265からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【0129】

例のVH配列は、配列番号1、181～184、189～192、および195～204からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号2、185～188、193～194、205～214および262～263からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。別の例のVH配列は、配列番号1、181～184、189～192、および195～204からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号262からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。別の例のVH配列は、配列番号1、181～184、189～192、および195～204からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号263からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。さらに別の例のVH配列は、配列番号197からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号262からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。さらに別の例のVH配列は、配列番号197からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例のVL配列は、配列番号263からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

40

【0130】

一部の実施形態では、VHは、配列番号1、181～184、189～192、および195～204のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するVH CDRまたはそのPTMリスク回避バージョンを保持しながら配列番号1、181～184、189～192、および195～204のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%

50

、 90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V Lは、配列番号2、185~188、193~194、205~214および262~263のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するV L C D RまたはそのP T Mリスク回避バージョンもしくは親和性成熟バージョンを保持しながら配列番号2、185~188、193~194、205~214および262~263のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V Hは、配列番号197のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するV H C D RまたはそのP T Mリスク回避バージョンを保持しながら配列番号197のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V Lは、配列番号262のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するV L C D Rまたはその親和性成熟バージョンを保持しながら配列番号262のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、V Lは、配列番号263のいずれか1つのアミノ酸配列、あるいは対応するV L C D Rまたはその親和性成熟バージョンを保持しながら配列番号263のいずれか1つに対する少なくとも75%、80%、85%、90%、95%もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。

10

キメラ抗原受容体

【0131】

一実施形態では、本開示の抗体またはその断片を標的化ユニットとして含む、キメラ抗原受容体(C A R)も提供される。一部の実施形態では、C A Rは、本開示の抗体またはその断片と、膜貫通ドメインと、共刺激ドメインと、C D 3細胞内ドメインとを含む。

20

【0132】

膜貫通ドメインは、抗体または断片を含む細胞外ドメインに、必要に応じてヒンジドメインを介して、融合されるように設計され得る。それは、同様に、共刺激ドメインなどの細胞内ドメインに融合され得る。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、共刺激ドメインの天然の膜貫通領域(例えば、共刺激ドメインとして利用されるC D 2 8 Tもしくは4-I B BのT M領域)またはヒンジ領域の天然の膜貫通ドメイン(例えば、ヒンジドメインとして利用されるC D 8アルファまたはC D 2 8 TのT M領域)を含み得る。

【0133】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、細胞膜を貫通する、しかし細胞の細胞質へとおよび/または細胞外空間へと伸びる、配列を含み得る。例えば、膜貫通のものは、細胞の細胞質および/または細胞外空間へ伸びる1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多くのアミノ酸をそれ自体がさらに含み得る、膜を貫通する配列を含み得る。したがって、膜貫通ドメインは、膜を貫通する領域を含み、その上、膜自体の内または外面を超えて伸びるアミノ酸をさらに含むことができ、それでもやはり、このような配列は、「膜貫通ドメイン」であると見なされ得る。

30

【0134】

一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、短いリンカーを介して細胞質ドメインに融合している。必要に応じて、短いペプチドまたはポリペプチドリンカー、好ましくは、長さ2アミノ酸~10アミノ酸の間のもは、膜貫通ドメインとキメラ受容体の近位細胞質シグナル伝達ドメインとの連結を形成し得る。グリシン-セリンダブレット(G S)、グリシン-セリン-グリシントリプレット(G S G)、またはアラニン-アラニン-アラニントリプレット(A A A)は、好適なリンカーになる。

40

【0135】

一部の実施形態では、C A Rは、さらに、共刺激ドメインを含む。一部の実施形態では、共刺激ドメインは、膜貫通ドメインと活性化ドメインの間に位置する。共刺激ドメインの例としては、C D 2、C D 3デルタ、C D 3イプシロン、C D 3ガンマ、C D 4、C D 7、C D 8 a、C D 8、C D 1 1 a (I T G A L)、C D 1 1 b (I T G A M)、C D 1 1 c (I T G A X)、C D 1 1 d (I T G A D)、C D 1 8 (I T G B 2)、C D 1 9 (

50

B4)、CD27(TFRSF7)、CD28、CD28T、CD29(ITGB1)、CD30(TNFRSF8)、CD40(TNFRSF5)、CD48(SLAMF2)、CD49a(ITGA1)、CD49d(ITGA4)、CD49f(ITGA6)、CD66a(CEACAM1)、CD66b(CEACAM8)、CD66c(CEACAM6)、CD66d(CEACAM3)、CD66e(CEACAM5)、CD69(CLEC2)、CD79A(B細胞抗原受容体複合体関連アルファ鎖)、CD79B(B細胞抗原受容体複合体関連ベータ鎖)、CD84(SLAMF5)、CD96(Tactile)、CD100(SEMA4D)、CD103(ITGAE)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD158A(KIR2DL1)、CD158B1(KIR2DL2)、CD158B2(KIR2DL3)、CD158C(KIR3DP1)、CD158D(KIRDL4)、CD158F1(KIR2DL5A)、CD158F2(KIR2DL5B)、CD158K(KTR3DL2)、CD160(BY55)、CD162(SELPLG)、CD226(DNAM1)、CD229(SLAMF3)、CD244(SLAMF4)、CD247(CD3-ゼータ)、CD258(LIGHT)、CD268(BAFFR)、CD270(TFSF14)、CD272(BTLA)、CD276(B7-H3)、CD279(PD-1)、CD314(KG2D)、CD319(SLAMF7)、CD335(K-p46)、CD336(K-p44)、CD337(K-p30)、CD352(SLAMF6)、CD353(SLAMF8)、CD355(CRTAM)、CD357(TNFRSF18)、誘導性T細胞共刺激因子(ICOS)、LFA-1(CD11a/CD18)、KG2C、DAP-10、ICAM-1、Kp80(KLRF1)、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、LFA-1、SLAMF9、LAT、GADS(GrpL)、SLP-76(LCP2)、PAG1/CBP、CD83リガンド、Fcガンマ受容体、MHCクラス1分子、MHCクラス2分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、活性化NK細胞受容体、Tollリガンド受容体、およびこれらの断片または組合せが挙げられるが、それらに限定されない。

【0136】

一部の実施形態では、CARの細胞質部分は、シグナル伝達/活性化ドメインも含む。一実施形態では、シグナル伝達/活性化ドメインは、CD3ドメインであるか、またはCD3ドメインに対して少なくとも約80%、85%、90%、95%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列である。ポリヌクレオチド、mRNA、および抗体を発現させるまたは調製する方法

【0137】

本開示は、本開示の抗体、そのバリエーションもしくは誘導体、またはCARをコードする、ポリヌクレオチドまたは核酸分子も提供する。本開示のポリヌクレオチドは、抗原結合ポリペプチド、そのバリエーションまたは誘導体の重鎖および軽鎖可変領域全体を同じポリヌクレオチド分子上にまたは別々のポリヌクレオチド分子上にコードし得る。加えて、本開示のポリヌクレオチドは、抗原結合ポリペプチド、そのバリエーションまたは誘導体の重鎖および軽鎖可変領域の部分を同じポリヌクレオチド分子上にまたは別々のポリヌクレオチド分子上にコードし得る。

【0138】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、mRNA分子である。一部の実施形態では、mRNAを、抗体またはその断片を発現させるための標的細胞に導入することができる。

【0139】

mRNAを様々な公知の方法のいずれに従って合成してもよい。例えば、mRNAをin vitro転写(IVT)によって合成することができる。手短に述べると、典型的にはIVTは、プロモーター、リボヌクレオチド三リン酸のプール、DTTとマグネシウムイオンとを含み得るバッファー系、および適切なRNAポリメラーゼ(例えば、T3、

T7またはSP6 RNAポリメラーゼ)、DNAse I、ピロホスファターゼ、および/またはRNAse阻害剤を含有する、直鎖状または環状の鋳型DNAを用いて行われる。厳密な条件は、具体的な応用に応じて変わる。

【0140】

一部の実施形態では、抗体をコードするmRNAの調製のために、鋳型DNAは、*in vitro*で転写される。好適な鋳型DNAは、典型的には、*in vitro*転写のためのプロモーター、例えば、T3、T7またはSP6プロモーター、続いて、所望の抗体をコードする(例えば、重鎖または軽鎖をコードする)mRNAについての所望のヌクレオチド配列、および終結シグナルを有する。

【0141】

標準的な方法を使用して、所望の抗体をコードする(例えば、重鎖または軽鎖をコードする)mRNA配列を決定し、鋳型DNAに組み込むことができる。例えば、所望のアミノ酸配列(例えば、所望の重鎖または軽鎖配列)から出発して、仮想逆翻訳が縮重遺伝子コードに基づいて行われる。次いで、最適化アルゴリズムを好適なコドンの選択に使用することができる。典型的には、G/C含有量を、一方ではできる限り高いG/C含有量を達成するように、他方ではコドン使用頻度に従ってtRNAの頻度をできる限りよく考慮して、最適化することができる。最適化されたRNA配列を確立し、例えば適切な表示デバイスを活用して、表示し、元の(野生型)配列と比較することができる。二次構造を解析して、安定化および不安定化特性または、それぞれ、RNAの領域を算出することもできる。

【0142】

mRNAを未改変または改変mRNAとして合成することができる。典型的には、mRNAは、安定性を向上させるように改変される。mRNAの改変は、例えば、RNAのヌクレオチドの改変を含み得る。したがって、改変mRNAは、例えば、骨格改変、糖改変または塩基改変を含み得る。一部の実施形態では、抗体をコードするmRNA(例えば、重鎖および軽鎖をコードするmRNA)を天然に存在するヌクレオチドおよび/またはヌクレオチド類似体(改変ヌクレオチド)から合成することができ、天然に存在するヌクレオチドおよび/またはヌクレオチド類似体(改変ヌクレオチド)には、プリン(アデニン(A)、グアニン(G))またはピリミジン(チミン(T)、シトシン(C)、ウラシル))、ならびに改変ヌクレオチドとして、プリンおよびピリミジンの類似体または誘導体、例えば、1-メチル-アデニン、2-メチル-アデニン、2-メチルチオ-N-6-イソペンテニル-アデニン、N6-メチル-アデニン、N6-イソペンテニル-アデニン、2-チオ-シトシン、3-メチル-シトシン、4-アセチル-シトシン、5-メチル-シトシン、2,6-ジアミノプリン、1-メチル-グアニン、2-メチル-グアニン、2,2-ジメチル-グアニン、7-メチル-グアニン、イノシン、1-メチル-イノシン、シュードウラシル(5-ウラシル)、ジヒドロ-ウラシル、2-チオ-ウラシル、4-チオ-ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオ-ウラシル、5-(カルボキシヒドロキシメチル)-ウラシル、5-フルオロ-ウラシル、5-プロモ-ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-ウラシル、5-メチル-2-チオ-ウラシル、5-メチル-ウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、5-メチルアミノメチル-ウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオ-ウラシル、5'-メトキシカルボニルメチル-ウラシル、5-メトキシ-ウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、1-メチル-シュードウラシル、キューオシン(queosine)、13-D-マンノシル-キューオシン、ワイプトキソシン、ならびにホスホロアミデート、ホスホロチオエート、ペプチドヌクレオチド、メチルホスホネート、7-デアザグアノシン、5-メチルシトシンおよびイノシンなどが含まれるが、これらに限定されない。このような類似体の調製は、当業者には、例えば、米国特許第4,373,071号、同第4,401,796号、同第4,415,732号、同第4,458,066号、同第4,500,707号、同第4,668,777号、同第4,973,679号、同第5,047,524号、同第5,132,418号、同第5,153

10

20

30

40

50

、319号、同第5,262,530号および同第5,700,642号から公知であり、これらの開示は、その全範囲が参照によりここに含まれる。

【0143】

一部の実施形態では、mRNA（例えば、重鎖および軽鎖をコードするmRNA）は、RNA骨格改変を含有し得る。典型的には、骨格改変は、RNAに含有されるヌクレオチドの骨格のリン酸が化学的に改変される、改変である。例示的な骨格改変は、典型的には、メチルホスホン酸基、メチルホスホロアミド酸基、ホスホロアミド酸基、ホスホロチオ酸（例えば、シチジン5'-O-(1-チオリン酸)）基、ボラノリン酸基、正荷電グアニジニウム基などからなる群からの改変を含むがこれらに限定されず、これは、ホスホジエステル結合が他のアニオン性基、カチオン性基または中性基により置き換えられることを意味する。 10

【0144】

一部の実施形態では、mRNA（例えば、重鎖および軽鎖をコードするmRNA）は、糖改変を含有し得る。典型的な糖改変は、それが含有するヌクレオチドの糖の化学的改変であり、2'-デオキシ-2'-フルオロ-オリゴリボヌクレオチド（2'-フルオロ-2'-デオキシシチジン5'-三リン酸、2'-フルオロ-2'-デオキシウリジン5'-三リン酸）、2'-デオキシ-2'-デアミン-オリゴリボヌクレオチド（2'-アミノ-2'-デオキシシチジン5'-三リン酸、2'-アミノ-2'-デオキシウリジン5'-三リン酸）、2'-O-アルキルオリゴリボヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-C-アルキルオリゴリボヌクレオチド（2'-O-メチルシチジン5'-三リン酸、2'-メチルウリジン5'-20三リン酸）、2'-C-アルキルオリゴリボヌクレオチド、およびこれらの異性体（2'-アラシチジン5'-三リン酸、2'-アラウリジン5'-三リン酸）、またはアジド三リン酸（2'-アジド-2'-デオキシシチジン5'-三リン酸、2'-アジド-2'-デオキシウリジン5'-三リン酸）からなる群から選択される糖改変を含むが、これらに限定されない。

【0145】

一部の実施形態では、mRNA（例えば、重鎖および軽鎖をコードするmRNA）は、ヌクレオチドの塩基の改変（塩基改変）を含有し得る。塩基改変を含有する改変ヌクレオチドは、塩基改変ヌクレオチドとも呼ばれる。そのような塩基改変ヌクレオチドの例としては、2-アミノ-6-クロロプリンリボシド5'-三リン酸、2-アミノアデノシン5'-30三リン酸、2-チオシチジン5'-三リン酸、2-チオウリジン5'-三リン酸、4-チオウリジン5'-三リン酸、5-アミノアシルシチジン5'-三リン酸、5-アミノアシルウリジン5'-三リン酸、5-プロモシチジン5'-三リン酸、5-プロモウリジン5'-三リン酸、5-ヨードシチジン5'-三リン酸、5-ヨードウリジン5'-三リン酸、5-メチルシチジン5'-三リン酸、5-メチルウリジン5'-三リン酸、6-アザシチジン5'-三リン酸、6-アザウリジン5'-三リン酸、6-クロロプリンリボシド5'-三リン酸、7-デアザアデノシン5'-三リン酸、7-デアザグアノシン5'-三リン酸、8-アザアデノシン5'-三リン酸、8-アジドアデノシン5'-三リン酸、ベンゾイミダゾールリボシド5'-三リン酸、N1-メチルアデノシン5'-三リン酸、N1-メチルグアノシン5'-40三リン酸、シュードウリジン5'-三リン酸、ピューロマイシン5'-三リン酸またはキサントシン5'-三リン酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0146】

典型的には、mRNA合成は、N末端（5'）側終端への「キャップ」、およびC末端（3'）側終端への「尾部」の付加を含む。キャップの存在は、大部分の真核細胞に見られるヌクレアーゼに対する耐性を持たせる上で重要である。「尾部」の存在は、mRNAをエキソヌクレアーゼ分解から保護するのに役立つ。

【0147】

それ故、一部の実施形態では、mRNA（例えば、重鎖および軽鎖をコードするmRNA）は、5'キャップ構造を含む。5'キャップは、典型的には次のように付加される：先 50

ず、RNA末端ホスファターゼが、5'ヌクレオチドから末端リン酸基の1つを除去し、2つの末端リン酸を残す；次いで、グアノシン三リン酸（GTP）がグアニリルトランスフェラーゼによって末端リン酸に付加され、その結果、5'5'5三リン酸結合が生じる；次いで、グアニンの7-窒素が、メチルトランスフェラーゼによってメチル化される。キャップ構造の例としては、m7G(5')ppp(5'(A,G(5')ppp(5)AおよびG(5')ppp(5')Gが挙げられるが、これらに限定されない。

【0148】

一部の実施形態では、mRNA（例えば、重鎖および軽鎖をコードするmRNA）は、3'ポリ（A）尾部構造を含む。mRNAの3'末端のポリA尾部は、典型的には、約10～300アデノシンヌクレオチド（例えば、約10～200アデノシンヌクレオチド、約10～175アデノシンヌクレオチド、約10～150アデノシンヌクレオチド、約10～125アデノシンヌクレオチド、10～100アデノシンヌクレオチド、約10～75アデノシンヌクレオチド、約20～70アデノシンヌクレオチド、または約20～60アデノシンヌクレオチド）を含む。一部の実施形態では、抗体をコードするmRNA（例えば、重鎖および軽鎖をコードするmRNA）は、3'ポリ（C）尾部構造を含む。mRNAの3'末端の好適なポリC尾部は、典型的には、約10～200シトシンヌクレオチド（例えば、約10～150シトシンヌクレオチド、約10～100シトシンヌクレオチド、約20～70シトシンヌクレオチド、約20～60シトシンヌクレオチド、または約10～40シトシンヌクレオチド）を含む。ポリC尾部は、ポリA尾部に付加され得るか、またはポリA尾部を置換し得る。

【0149】

一部の実施形態では、mRNA（例えば、重鎖および軽鎖をコードするmRNA）は、5'および/または3'非翻訳領域を含む。一部の実施形態では、5'非翻訳領域は、mRNAの安定性または翻訳に影響を与える1つまたは複数のエレメント、例えば、鉄応答エレメントを含む。一部の実施形態では、5'非翻訳領域は、長さ約50ヌクレオチド～500ヌクレオチドの間（例えば、長さ約50ヌクレオチド～400ヌクレオチドの間、長さ約50ヌクレオチド～300ヌクレオチドの間、長さ約50ヌクレオチド～200ヌクレオチドの間、または長さ約50ヌクレオチド～100ヌクレオチドの間）であり得る。

【0150】

一部の実施形態では、mRNA（例えば、重鎖および軽鎖をコードするmRNA）の5'領域は、本明細書に記載されるものなどの、シグナルペプチドをコードする配列を含む。特定の実施形態では、ヒト成長ホルモン（hGH）に由来するシグナルペプチドが5'領域に組み込まれる。典型的には、シグナルペプチドをコードする配列は、N末端の重鎖または軽鎖をコードする配列に直接または間接的に連結される。

【0151】

本技術を使用して、当技術分野で公知の任意の抗体、および標準的な方法を使用して所望の抗原に対して産生され得る抗体を、送達することができる。本発明を使用して、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体混合物もしくはカクテル、ヒトもしくはヒト化抗体、キメラ抗体、または二重特異性抗体を送達することができる。

【0152】

抗体を作製する方法は、当技術分野において周知であり、本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、本開示の抗原結合ポリペプチドの可変領域と定常領域の両方が、完全にヒトのものである。完全ヒト抗体は、当技術分野において記載されている技法を使用して、および本明細書に記載されているように作製することができる。例えば、特定の抗原に対する完全ヒト抗体を、抗原投与に应答してそのような抗体を産生するように改変されているが内在性遺伝子座が無効にされているトランスジェニック動物に抗原を投与することによって、調製することができる。そのような抗体を作製するために使用され得る例示的な技法は、米国特許第6,150,584号、同第6,458,592号、同第6,420,140号に記載されており、これらの参考特許文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

処置および使用

【0153】

本明細書に記載されるように、本開示の抗体、バリエーション、または誘導体を、ある特定の処置および診断方法において使用することができる。

【0154】

本開示は、本開示の抗体、または断片を、本明細書に記載される障害または状態の1つまたは複数処置するために患者、例えば、動物、哺乳動物およびヒトに投与することを含む、抗体に基づく治療に、さらに関与する。本開示の治療化合物は、本開示の抗体（本明細書に記載のそのバリエーションおよび誘導体を含む）、および本開示の抗体（本明細書に記載のそのバリエーションおよび誘導体を含む）をコードする核酸またはポリヌクレオチドを含むが、これらに限定されない。

10

【0155】

本開示の抗体を使用してがんを処置または阻害することもできる。上記のとおり、5T4は、正常な成体組織にはほとんど発現されないが、胎盤に、ならびに最も一般的な腫瘍、典型的には腎臓、乳房、結腸、前立腺および卵巣の癌の80%より多くに、高レベルで存在する。

【0156】

したがって、一部の実施形態では、それを必要とする患者におけるがんを処置するための方法が提供される。方法は、一実施形態では、本開示の抗体、または断片、または抗体-薬物コンジュゲートの有効量を患者に投与するステップを必然的に伴う。一部の

20

【0157】

実施形態では、患者におけるがん細胞（例えば、間質細胞）の少なくとも1つは、5T4を過剰発現する。細胞療法、例えば、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法も、本開示で提供される。本開示の抗5T4抗体を含む（または代替的に、本開示の抗5T4抗体を発現するように操作された）CARをコードするまたはそれと接触させるベクターによって形質導入される、好適な細胞を使用することができる。したがって、そのような接触または操作によって、細胞を、処置を必要とするがん患者に導入することができる。がん患者は、本明細書で開示されるようなタイプのいずれかのがんを有し得る。細胞（例えば、T細胞）は、例えば、腫瘍浸潤Tリンパ球、CD4+T細胞、CD8+T細胞、またはこれらの組合せで

30

【0158】

あり得るが、これらに限定されない。一部の実施形態では、細胞は、がん患者彼または彼女自身から単離された。一部の実施形態では、細胞は、ドナーによりまたは細胞バンクから提供された。細胞が、がん患者から単離された場合、望ましくない免疫反応を最小限に抑えることができる。

【0159】

がんの非限定的な例としては、膀胱がん、乳がん、大腸がん、子宮内膜がん、食道がん、頭頸部がん、腎臓がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、膵臓がん、前立腺がん、および甲状腺がんが挙げられる。一部の実施形態では、がんは、胃がん、膵臓がん、食道がん、卵巣がんおよび肺がんのうちの1つまたは複数である。

40

【0160】

本開示の抗体もしくはバリエーション、またはそれらの誘導体によって処置、予防、診断および/または予後判定され得る、細胞生存期間の増加に関連するさらなる疾患または状態としては、悪性病変および関連障害、例えば、白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、および赤白血病を含む））および慢性白血病（例えば、慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ球性白血病）を含む）、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、重鎖病、および固形腫瘍の、進行および/または転移が挙げられるがこれらに限定されず、固形腫瘍には、肉腫および癌腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨

50

原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫 (menangioma)、黒色腫、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫が含まれるが、これらに限定されない。

【0161】

いずれの特定の患者についても具体的な投薬量および処置レジメンは、使用される特定の抗体、そのバリエーションまたは誘導体、患者の年齢、体重、総体的な健康、性別および食事、ならびに投与の回数、排泄率、薬物の組合せ、ならびに処置される特定の疾患の重症度をはじめとする、様々な因子に依存することになる。医療介護者によるそのような因子の判断は、当技術分野における通常技能の範囲内である。量は、処置すべき個々の患者、投与経路、製剤のタイプ、使用される化合物の特徴、疾患の重症度、および所望される効果にも依存することになる。使用される量を当技術分野において周知の薬理学および薬物動態の原則によって決定することができる。

10

【0162】

抗体または断片の投与方法は、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外および経口経路を含むが、これらに限定されない。抗原結合ポリペプチドまたは組成物を、任意の適便な経路により、例えば、注入またはポラス注射により、上皮または粘膜皮膚内層（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜など）からの吸収により、投与ことができ、他の生物活性薬剤とともに投与することができる。したがって、本開示の抗原結合ポリペプチドを含有する医薬組成物を、経口投与、直腸投与、非経口投与、大槽内 (intracistemally) 投与、腔内投与、腹腔内投与、局所的に（粉末、軟膏、滴剤もしくは経皮パッチとして）投与、頬側投与、または口腔噴霧剤もしくは点鼻薬として投与することができる。

20

【0163】

用語「非経口」は、本明細書で使用される場合、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内注射および注入を含む、投与方法を指す。

30

【0164】

投与は、全身または局所のものであり得る。加えて、本開示の抗体を、脳室内および髄腔内注射を含む任意の好適な経路により、中枢神経系に導入することが望ましいことがあり、脳室内注射を、例えば、オマヤ貯留槽などの貯留槽に取り付けられた、脳室内カテーテルによって容易にすることができる。経肺投与も、例えば、吸入器またはネブライザー、およびエアロゾル化剤を含有する製剤を使用することにより、利用することができる。

【0165】

本開示の抗原結合ポリペプチドまたは組成物を、処置を必要とするエリアに局所投与することが望ましいことがあり、これは、例として、限定としてではなく、外科手術中の局所注入、外科手術後の創傷包帯法の、例えばそれと併せての、局所的適用により、注射により、カテーテルによって、坐薬によって、または留置剤によって達成することができ、前記留置剤は、膜、例えばシラスティック (sialastic) 膜、または繊維を含む、多孔質、無孔質またはゼラチン質材料のものである。好ましくは、本開示の、抗体を含む、タンパク質を投与する場合、タンパク質が吸収されない材料を使用するように心掛ければならない。

40

【0166】

炎症性、免疫または悪性疾患、障害または状態の処置、阻害および予防において有効であろう、本開示の抗体または断片の量を、標準的な臨床技法により決定することができる。加えて、in vitro アッセイを、最適な投薬量範囲の同定を助けるために、必要に応じて利用することができる。製剤に利用されることになる正確な用量は、投与経路、

50

および疾患、障害または状態の重篤性にも依存することになり、実施者の判断および各患者の状況に応じて決定されるべきである。有効用量を *in vitro* または動物モデル試験系から導出された用量応答曲線から外挿することができる。

【0167】

一般的な提案として、本開示の抗体または断片の患者に投与される投薬量は、典型的に、患者の体重の kg 当たり $0.001\text{mg} \sim 100\text{mg}$ 、患者の体重の kg 当たり $0.01\text{mg} \sim 20\text{mg}$ の間、または患者の体重の kg 当たり $0.5\text{mg} \sim 10\text{mg}$ である。一般に、ヒト抗体は、外来ポリペプチドへの免疫応答に起因してヒトの体内で他の動物種からの抗体より長い半減期を有する。したがって、ヒト抗体のより少ない投薬量、およびより低頻度の投与が、多くの場合、可能である。さらに、本開示の抗体の投薬量および投薬頻度を、例えば脂質化などの改変により抗体の取込みおよび組織透過性（例えば、脳への）を増強することによって、低減させることができる。

10

【0168】

追加の実施形態では、本開示の組成物は、サイトカインと組み合わせて投与される。本開示の組成物とともに投与され得るサイトカインとしては、 IL-2 、 IL-3 、 IL-4 、 IL-5 、 IL-6 、 IL-7 、 IL-10 、 IL-12 、 IL-13 、 IL-15 、 抗CD40 、 CD40L 、および TNF- が挙げられるが、これらに限定されない。

【0169】

追加の実施形態では、本開示の組成物は、例えば放射線療法などの、他の治療または予防レジメンと組み合わせて投与される。

20

組成物

【0170】

本開示は、医薬組成物も提供する。そのような組成物は、抗体、または断片、または抗体-薬物コンジュゲートの有効量と、許容される担体とを含む。一部の実施形態では、組成物は、第2の抗がん剤（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）をさらに含む。

【0171】

具体的な実施形態では、用語「薬学的に許容される」とは、動物における、さらに特にヒトにおける使用について、連邦もしくは州政府の監督機関により承認された、または米国薬局方もしくは他の一般に認知されている薬局方に収載されている、という意味である。さらに、「薬学的に許容される担体」は、一般に、任意のタイプの、非毒性固体、半固体もしくは液体フィラー、希釈剤、カプセル化材または製剤助剤であろう。

30

【0172】

用語「担体」は、それを用いて治療薬が投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような医薬担体は、滅菌液、例えば、水および油であり得、この油には、石油、動物、植物または合成起源のもの、例えば、落花生油、大豆油、鉱物油、ゴマ油などが含まれる。水は、医薬組成物が静脈内投与されるときに好ましい担体である。生理食塩水、ならびにデキストロスおよびグリセロール水溶液も、液体担体として、特に、注射可能溶液に、利用することができる。好適な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物は、所望される場合には、少量の湿潤もしくは乳化剤、または pH 緩衝剤、例えば、酢酸塩、クエン酸塩もしくはリン酸塩も含有し得る。抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸；および浸透張力の調整のための薬剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロスも、想定される。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル、粉末、徐放性製剤などの形態をとり得る。旧来の結合剤および担体、例えば、トリグリセリドを用いて、組成物を坐薬として製剤化することができる。経口製剤は、標準的な担体、例えば、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナト

40

50

リウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含み得る。好適な医薬品担体の例は、参照により本明細書に組み込まれる、E. W. MartinによるRemington's Pharmaceutical Sciencesに記載されている。そのような組成物は、好ましくは精製された形態での、抗原結合ポリペプチドの治療有効量を、患者への適正投与のための形態を提供するために好適な量の担体とともに、含有することになる。製剤は、投与方法に適していなければならない。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器または複数回投与用バイアルに封入され得る。

【0173】

ある実施形態では、組成物は、人間への静脈内投与に適応する医薬組成物として常套的手順に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与用の組成物は、滅菌等張性水性緩衝液中の溶液である。必要に応じ、組成物は、可溶化剤、および注射部位の痛みを和らげるためのリグノカインなどの局所麻酔薬も含み得る。一般に、これらの成分は、別々にまたは混合されて単位剤形で、のどちらかで、例えば、活性薬剤の量を示すアンプルまたはサッシュなどの密閉シールされている容器の中の乾いた凍結粉末または無水濃縮物として供給される。組成物を注入により投与すべき場合、それは、医薬品グレードの滅菌水または食塩水が入っている注入ボトルを用いて分注され得る。組成物が注射により投与される場合、投与の前に成分を混合することができるように、注射用滅菌水または食塩水のアンプルが提供され得る。

10

【0174】

本開示の化合物を中性または塩形態として製剤化することができる。薬学的に許容される塩は、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するものなどのアニオンとで形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなどのカチオンとで形成されるものを含む。

20

【実施例】

【0175】

(実施例1)

ヒト5T4に対するマウスモノクローナル抗体の生成

この実施例は、ハイブリドーマ技術を使用する抗ヒト5T4マウスモノクローナル抗体の生成を説明する。

30

【0176】

抗原：ヒト5T4-Hisタンパク質およびCHO-K1発現ヒト5T4。

【0177】

免疫化：ヒト5T4を標的とするマウスモノクローナル抗体を生成するために、SJLマウス、Balb/cマウスおよびC57BL/6マウスを、先ず、5T4-Hisタンパク質によって免疫した。その後、免疫化マウスに5T4-Hisタンパク質またはCHO-K1発現ヒト5T4によって追加免疫した。5T4タンパク質に結合した抗体を産生するマウスを選択するために、免疫化マウスの血清をELISAおよびFACSによる抗体力価評価に付した。手短に述べると、マイクロタイタープレートを用いて、ELISAコーティング用緩衝液中の0.5または1μg/mLのヒト5T4タンパク質またはcyno 5T4タンパク質、100μL/ウェルで、4で一晚、コーティングし、次いで、150μL/ウェルの1%BSAでブロックした。免疫化マウスからの血清の希釈物を各ウェルに添加し、1時間、37でインキュベートした。プレートをPBS/Tween(登録商標)で洗浄し、次いで、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)とコンジュゲートされた抗マウスIgG抗体とともに、30分間、37でインキュベートした。洗浄後、プレートをTMB基質で現像し、分光光度計によりOD_{450nm}で解析した。免疫応答も、CHO-K1-hu5T4細胞系に対する血清FACSにより試験し、CHO-K1親細胞系が陰性対照としての役割を果たした。得られたマウスを、融合に使用した。ハイブリドーマ上清をELISAによりスクリーニングした。

40

【0178】

50

細胞融合：融合を電機融合により行った。融合細胞を、融合ごとに50の96ウェルプレートに蒔いた。

【0179】

スクリーニング：ハイブリドーマ上清を、組換えヒト(rh)5T4-Hisタンパク質および組換えcyno 5T4-Hisタンパク質に対してELISAによりスクリーニングした。次いで、一次スクリーニングからの陽性上清に、CHOK1-hu5T4細胞系に対するFACS結合およびELISAによるタンパク質結合による確認スクリーニングを行った。

【0180】

サブクロニングおよびスクリーニング：各融合からの陽性初代クローンを、サブクローンが単一の親細胞に確実に由来するように限界希釈によってサブクロニングした。サブクロニングを初代クローンと同じアプローチでスクリーニングし、陽性クローンの培養上清に、親和性ランク付けによる追加の確認スクリーニングを行った。

10

【0181】

ハイブリドーマクローン14G12、393E9、113H5、159D5、24F10、493E10、257F1、353H11、367B8、389G2、109H7、286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10および95F10をさらなる解析に選択した。これらのクローンの可変領域のアミノ酸配列を下の表1に列挙する。表1-1~1-20には、このマウス抗体からの元のCDR配列に加えて、潜在的翻訳後改変(PTM)が除去されているまたは親和性成熟しているバージョンも含まれる。

20

30

40

50

【表 1】

表1. 選択されたクローンの可変領域の配列

名称	配列	配列番号
14G12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGLE WIG RIYREDGHTNYNGKFKG KATLTADKSSTTAYMQLTSLTSEDSAV YFCANG GGAMDY WGQGTSVTVSS	1
14G12 VL	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTIS CRASQDISNYLNWY QKPDGTVKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQODNTLPWTF GGGTKLEIK	2
393E9 VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFT DYYSW VRQPQPKALEW LG FIRNKGNGYTTENSASVKGR FRTISRDNQSILYLQMNALRAEDSAT YYCARY RGNPHYAMDY WGQGTSVTVSS	3
393E9 VL	DIVLTQFPASLAVSLGQRATIS CRASESVEFYGTSFLOWY QKPGQPP KLLIY GASNVESG VPARFSGSGSGTDFLSLHPVEEDDIAMYFC QOSRK VPST FGGGTKLEIK	4
113H5 VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT SGYYWN WIRQFPGNKLEW MGY INSDGSNNYNPSLKN RISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYC AR EEYDYWFAY WGQGLTVSA	5
113H5 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVT CKASONVGTNVA WYQKPGQSPKA LIY SASNRYSG VPDRFTGSGFGTDFLTISNVQSEDLTEYFC QOYNSYP YTF GGGTNLEIK	6
159D5 VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCTASGFTFS NFGMH WVRQAPETGLE WVA YISSGSSTFYADSVKGR FRTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDATAMY FCAR SPAYRYGLDY WGQGTTLTVSS	7
159D5 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS CRASQSVSSSTFSYMH WYQKPGQPP KLLIK SSSNLES GVPARFSGSGSGTDFLNIHPVEEEDTATYYC QHSWE IPYT FGGGTKLEIK	8
24F10 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFS DYGMH WVRQAPEKGLE WVA YISSGTSTIYYTDTVKGR FRTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDATAMY YCARG GGDGYRSTMDY WGQGISVTVSS	9
24F10 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS CRASQSVSSSSYSYMH WYQKPGQPP KLLIK SASNLASG VPARFSGSGSGTDFLNIHPVEEEDSATYYC QHSWE VPRT FGGGTKLEIK	10
493E10 VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFS SFGMH WVRQAPEKGLE WVA YISSGSSTIYYADTVKGR FRTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDATAMY YCARN RAYHREAMDY WGQGTSVTVSS	11
493E10 VL	DIVLTQSPASLTVSLGQRATIS CRASQSVSSSSYNMH WYQKPGQPP KLLIK SASNLES GVPARFSGSGSGTDFLNIHPVEEEDTATYYC QHSWE IPYT FGGGTKLEIK	12
257F1 VH	QVLLQQSGAEVARPGASVKLSCKASGYTFT SYGLN WLRQRTGQGLE WIG EYPRSENTHYNEKFKG KATLTADKSSTAYMELRSLTSEDSAV YFCAR GDWDFDH WGQGTTLTVSS	13

10

20

30

40

50

【表 1 A】

257F1 VL	EILLTQSPAIPASPGKEVTITC <u>SASSSVSYM</u> NWYQKPGSSPKIWIY <u>GISNLAS</u> GVPARFSGSGSGTFFSFTINSMEAEDVATYYC <u>QORSSYPRT</u> FGG GTKLEIK	14
353H11 VH	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASDYTFT <u>SYWMH</u> WVKQRPEQGLE WIGNINPSNGNTNYNEKFKNKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTFEDSAV YYCAR <u>GGWDFDY</u> WGQGTTLTVSS	15
353H11 VL	QVVLTSQSPAIMSASPGKEVTMTCS <u>SASSSVRYMH</u> WYQQRSGTSPKRWI Y <u>DTSKLT</u> SGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC <u>QLWTSKPP</u> <u>WTFGGG</u> TKLEIR	16
367B8 VH	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFT <u>SYWMH</u> WVKQRPEQGLE WIGNINPSNGNTNYNENFKSQATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCAR <u>GGWDFDY</u> WGQGTTLTVSS	17
367B8 VL	QVVLTSQSPAIMSASPGKEVTMTCS <u>SASSSVRYIH</u> WYQQRSGTSPKRWIY <u>DTSKLT</u> SGVPRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC <u>QOWTSKPP</u> <u>WTFGGG</u> TKLEIR	18
389G2 VH	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFT <u>SYWMH</u> WVKQRPEQGLE WIGNINPSNGNTNYNERFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSTVY YCAR <u>GGWDFDY</u> WGQGTTLTVSS	19
389G2 VL	QVVLTSQSPAIMSASPGKEVTMTCS <u>SASSSVRYIH</u> WYQQRSGTSPKRWIY <u>DTSKLT</u> SGVPRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC <u>QOWTSKPP</u> <u>WTFGGG</u> TKLEIK	20
109H7 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFT <u>GYWIE</u> WVKQRPGQGLE WIGETLPGRGSTNYNEKFKGKATFTADTSSNIVYMQLSSLTIEDSAIY YCAR <u>GRRDFDY</u> WGQGTTLTVSS	21
109H7 VL	DIQMTQTSSLSASLGDDEVITISC <u>SASOGINNYLN</u> NWYQKPDGTVKLLI Y <u>YTSLSLHSG</u> VPSRFSGSGSGTDYSLTIINLEPEDIATYYC <u>QQFSKLPFT</u> GSGTKLEIR	22
286B4 VH	DVQLHESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT <u>NYYWN</u> WIRQFPGNNLEW MGYITYDGSNNYNPSLKNRISVTRDTSKNQFFLKLSSVTTEDATYYC TR <u>GGGQLRFDY</u> WGQGTTLTVSS	23
286B4 VL	SIVMTQTPKFLIVSAGDRVITITC <u>KASQSVSNEVT</u> WYQKPGQSPKMLI Y <u>YASNRYT</u> GVDPDRFTGSGYGTDFTFITINTVQAEDLAIYFC <u>QODYSSPW</u> <u>T</u> FGGGTKLEIK	24
37G6 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT <u>SYWIT</u> WVKQRPGQGLE RIGDIYPCSGTINYNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYC CAR <u>SDGNYYFDY</u> WGQGTTLKVVSS	25
37G6 VL	QIVLSQSPAILSASPGKEVTMTC <u>RASSSVNYMH</u> WYQKPGSSPKPWY <u>ATSNLAS</u> GVPPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC <u>QOWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK	26
267B5 VH	DVQFQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT <u>SSYYWN</u> WIRQFPGDKLEW MGYISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKKQFFLKLNSVTTEDATYYC ARS <u>WDGGYAMD</u> NWGQGTSTVTVSS	27
267B5 VL	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVITITC <u>KASQSVSNDVA</u> WYQKPGQSPKLLI Y <u>FASNRYT</u> GVDPDRFTGSGYGTVFFTISTVQADDLAVYFC <u>QODYTSP</u> <u>WTFGGG</u> TRLEIK	28
425G1 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DTYMH</u> WVKQRPEQGLE WIGRIDPANGHTIFASKFOGKATITADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVY YCGLF <u>TMVVVPWYFDV</u> WGTGTTVTVSS	29
425G1 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC <u>KASQDVSTAVA</u> WYQKPGQSPKLLI Y <u>WASTRHT</u> GVDPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYYC <u>QOHYSSP</u> <u>L</u> TFGAGTKLEIK	30

10

20

30

40

50

【表 1 B】

449H9 VH	QVQLQQSGAELVRPGSSVRISCKASGYAFS <u>NYWMN</u> WVKQRPQGGL WIG <u>QIYPGDGDTN</u> YNGKFKGKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YFCAR <u>HYDYPYYYAMDY</u> WGQGTSVTVSS	31
449H9 VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC <u>RASQDIGIALT</u> WLQQEPDGTIKRLIY <u>ATSSLDS</u> GVPKRFSGRSGSDYTLTSSLESEDFVDY <u>YCLQYIISPYTFG</u> GGTKLEIK	32
49C5 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT <u>DYYMN</u> WVKQSHGKSLEW IG <u>DINPYSGGATNNQKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYIELRSLTSEDSAVYF CARG <u>SIYYDSTANYFDY</u> WGQGTTLTVSS	33
49C5 VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC <u>RASENIYSYLA</u> WYQQKQKSPQLLV Y <u>NAKSLTE</u> GVPSRFSGRSGTQFSLKINSLQPEDFGSY <u>YCOHHYVTPW</u> TFGGG <u>TKLEIK</u>	34
119G5 VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT <u>DYYMN</u> WVKQSRGKSLE WIG <u>DINPNNGGTN</u> YNGKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAV YYCA <u>KEGPPGAMDY</u> WGQGTSVTVSS	35
119G5 VL	NIVMTQTPKFLVSAAGDRVTITC <u>KASQSVSNHVA</u> WYQQKPGQSPKLLI Y <u>YVSNRSIG</u> VDPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFC <u>QOQVYSSPFT</u> FGG <u>TRLEMK</u>	36
85B10 VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT <u>AYYVN</u> WVKQSHGKSLEW IG <u>DINPNNGGTN</u> YNGKFKGKATLTVDMSSSTAYMELRSLTSEDSAVY YCA <u>KEGPPGAMDY</u> WGQGTSVTVSS	37
85B10 VL	SIVLTQTPKFLVSAAGDRVPITC <u>KASQSVSNVA</u> WYQQKPGQSPKLLIY Y <u>ASNPT</u> YGVDPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFC <u>QOQVYSSPFT</u> FGG <u>TKLEMK</u>	38
95F10 VH	QVQLQQSGPELVNPGASVKISCKASGYTFT <u>DYYMN</u> WVKQSRGKSLE WIG <u>DINPNNGGTN</u> YNGKFKDKATLTVDKSSNTAYMELRSLTSENSAV YYCA <u>KEGPPGAMDY</u> WGQGTSVTVSS	39
95F10 VL	NIVMTQTPKFLVSAAGDRVTITC <u>KASQSVSNHVA</u> WYQQKPGQSPKLLI Y <u>YVSNRYI</u> GVDPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFC <u>QOQVYSSPF</u> <u>T</u> FGG <u>TRLEMK</u>	40

10

20

30

【表 1 - 1】

表 1-1. 14G12 のCDR配列

14G12	配列	配列番号
CDRH1	SSWMN	41
CDRH2	RIYREDGHTN <u>Y</u> NGKFKG	42
	RIYRED <u>A</u> HTN <u>Y</u> NGKFKG	47
	RIYREDGHTN <u>N</u> <u>A</u> KFKG	48
	RIYREDGHTN <u>Y</u> <u>Q</u> KFKG	49
	RIYRE <u>E</u> GH <u>T</u> N <u>Y</u> <u>Q</u> KFKG	50
	RIYRE <u>E</u> GH <u>T</u> N <u>Y</u> <u>N</u> <u>E</u> KFKG	51
	RIYRE <u>S</u> GH <u>T</u> N <u>Y</u> <u>Q</u> KFKG	52
	RIYRE <u>S</u> GH <u>T</u> N <u>Y</u> <u>N</u> <u>E</u> KFKG	53
CDRH3	GGAMDY	43
CDRL1	RASQDISNYLN	44
CDRL2	YTSRLHS	45
CDRL3	QQDNTLPWT	46
	<u>G</u> N <u>D</u> N <u>T</u> L <u>P</u> W <u>T</u>	264
	<u>A</u> N <u>D</u> N <u>T</u> L <u>P</u> W <u>T</u>	265

40

50

【表 1 - 2】

表 1-2. 393E9 のCDR配列

393E9	配列	配列番号
CDRH1	DYYMS	54
CDRH2	FIRNKGNGYTTENSASVKG	55
	FIRNKGNA ^Y YTTE ^Y SASVKG	60
	FIRNKGNT ^T YTTE ^Y SASVKG	61
	FIRNKGNA ^Y TTEN ^A ASVK	62
	G	63
	FIRNKGNT ^T TTEN ^A ASVKG	266
	FIRNKGNA ^Y TTENSASVKG	267
FIRNKGNGYTTET ^Y SASVKG		
CDRH3	YRGNPYAMDY	56
CDRL1	RASESVEFYGTSFLQ	57
CDRL2	GASNVES	58
CDRL3	QQRKVPST	59

10

【表 1 - 3】

表 1-3. 113H5 のCDR配列

113H5	配列	配列番号
CDRH1	SGYYWN	64
CDRH2	YINSDGSNNYNPSLKN	65
CDRH3	EEYDYWFAY	66
CDRL1	KASQNVGTNVA	67
CDRL2	SASNRYS	68
CDRL3	QQYNSYPYT	69

20

【表 1 - 4】

表 1-4. 159D5 のCDR配列

159D5	配列	配列番号
CDRH1	NFGMH	70
CDRH2	YISSGSSTFYADSVKG	71
	YISSGSSTFYAD ^A VKKG	76
CDRH3	SPAYRYGLDY	72
CDRL1	RASQSVSSSTFSYMH	73
CDRL2	SSSNLES	74
CDRL3	QHSWEIPYT	75

40

50

【表 1 - 5】

表 1-5. 24F10 のCDR配列

24F10	配列	配列番号
CDRH1	DYGMH	77
CDRH2	YISSGTSTIYYTDTVKG	78
CDRH3	GGDGYRSTMDY	79
CDRL1	RASQSVSSSSYSYMH	80
CDRL2	SASNLAS	81
CDRL3	QHSWEVPRT	82

10

【表 1 - 6】

表 1-6. 493E10 のCDR配列

493E10	配列	配列番号
CDRH1	SFGMH	83
CDRH2	YISSGSSTIYYADTVKG	84
CDRH3	NRAYHREAMDY	85
CDRL1	RASQSVSSSSYNYMH	86
CDRL2	SASNLES	87
CDRL3	QHSWEIPYT	88

20

【表 1 - 7】

表 1-7. 257F1 のCDR配列

257F1	配列	配列番号
CDRH1	SYGLN	89
CDRH2	EIYPRSENTHYNEKFKG	90
CDRH3	GDWDFDH	91
CDRL1	SASSSVSYMN	92
CDRL2	GISNLAS	93
CDRL3	QQRSSYPRT	94

30

【表 1 - 8】

表 1-8. 353H11 のCDR配列

353H11	配列	配列番号
CDRH1	SYWMH	95
CDRH2	NINPSNGNTNYNEKFKN	96
	NINPSN ^A NTNYNEKFKN	101
	NINPSN ^Q NTNYNEKFKN	102
	NINPSN ^E NTNYNEKFKN	103
	NINPS ^Q GNTNYNEKFKN	104
CDRH3	GGWDFDY	97
CDRL1	SASSSVRYMH	98
CDRL2	DTSKLT	99
CDRL3	QLWTSKPPWT	100

40

50

【表 1 - 9】

表 1-9. 367B8 のCDR配列

367B8	配列	配列番号
CDRH1	SYWMH	105
CDRH2	NINPSNGNTNYNENFKS	106
CDRH3	GGWDFDY	107
CDRL1	SASSSVRYIH	108
CDRL2	DTSKLTS	109
CDRL3	QQWTSKPPWT	110

10

【表 1 - 10】

表 1-10. 389G2 のCDR配列

389G2	配列	配列番号
CDRH1	SYWMH	111
CDRH2	NINPSNGNTNYNERFKS	112
CDRH3	GGWDFDY	113
CDRL1	SASSSVRYIH	114
CDRL2	DTSKLTS	115
CDRL3	QQWTSKPPWT	116

20

【表 1 - 11】

表 1-11. 109H7 のCDR配列

109H7	配列	配列番号
CDRH1	GYWIE	117
CDRH2	ETLPGRGSTNYNEKFKG	118
CDRH3	GRRDFDY	119
CDRL1	SASQGINNYLN	120
CDRL2	YTSSLHS	121
CDRL3	QQFSKLPFT	122

30

【表 1 - 12】

表 1-12. 286B4 のCDR配列

286B4	配列	配列番号
CDRH1	NNYYWN	123
CDRH2	YITYDGSNNYNPSLKN	124
	YITYD[A]SNNYNPSLKN	129
CDRH3	GGGQLRFDY	125
CDRL1	KASQSVSNEVT	126
CDRL2	YASNRYT	127
CDRL3	QQDYSSPWT	128

40

50

【表 1 - 1 3】

表 1-13. 37G6 のCDR配列

37G6	配列	配列番号
CDRH1	SYWIT	130
CDRH2	DIYPGSGTINYNEKFKS	131
CDRH3	SDGNYYFDY	132
CDRL1	RASSVNYMH	133
CDRL2	ATSNLAS	134
CDRL3	QQWSSNPPT	135

10

【表 1 - 1 4】

表 1-14. 267B5 のCDR配列

267B5	配列	配列番号
CDRH1	SSYYWN	136
CDRH2	YISYDGSNNYNPSLKN	137
CDRH3	SWDGGYAMDN	138
CDRL1	KASQSVSNDVA	139
CDRL2	FASNRYT	140
CDRL3	QQDYTSPWT	141

20

【表 1 - 1 5】

表 1-15. 425G1 のCDR配列

425G1	配列	配列番号
CDRH1	DTYMH	142
CDRH2	RIDPANGHTIFASKFQG	143
CDRH3	FTMVVVPWYFDV	144
CDRL1	KASQDVSTAVA	145
CDRL2	WASTRHT	146
CDRL3	QQHYSSPLT	147

30

【表 1 - 1 6】

表 1-16. 449H9 のCDR配列

449H9	配列	配列番号
CDRH1	NYWMN	148
CDRH2	QIYPGDGDTNYNGKFKN	149
CDRH3	HYDYPYYYAMDY	150
CDRL1	RASQDIGIALT	151
CDRL2	ATSSLDS	152
CDRL3	LQYIISPYT	153

40

50

【表 1 - 1 7】

表 1-17. 49C5 のCDR配列

49C5	配列	配列番号
CDRH1	DYYMN	154
CDRH2	DINPYSGGATNNQKFKG	155
CDRH3	GSIYYDSTANYFD Y	156
CDRL1	RASENIYSYLA	157
CDRL2	NAKSLTE	158
CDRL3	QHHYVTPWT	159

10

【表 1 - 1 8】

表 1-18. 119G5 のCDR配列

119G5	配列	配列番号
CDRH1	DYYMN	160
CDRH2	DINPNNGGTNYNQKFKG DINPNQGGTNYNQKFKG	161 166
CDRH3	EGPPGAMDY	162
CDRL1	KASQSVSNHVA	163
CDRL2	YVSNRSI	164
CDRL3	QQVYSSPFT	165

20

【表 1 - 1 9】

表 1-19. 85B10 のCDR配列

85B10	配列	配列番号
CDRH1	AYYVN	167
CDRH2	DINPNNGGTNYNQKFKG DINPNQGGTNYNQKFKG	168 173
CDRH3	EGPPGAMDY	169
CDRL1	KASQSVSNNVA	170
CDRL2	YASNPYT	171
CDRL3	QQVYSSPFT	172

30

【表 1 - 2 0】

表 1-20. 95F10 のCDR配列

95F10	配列	配列番号
CDRH1	DYYMN	174
CDRH2	DINPNNGGTNYNQKFKD DINPNQGGTNYNQKFKD	175 180
CDRH3	EGPPGAMDY	176
CDRL1	KASQSVSNHVA	177
CDRL2	YVSNRYI	178
CDRL3	QQVYSSPFT	179

40

【 0 1 8 2】

(実施例 2)

50

m A b の結合親和性

組換え 5 T 4 タンパク質 (ヒト 5 T 4 - h i s タグ) に対するこれらのクローンからのキメラ m A b の結合を、捕捉法を使用して B i a c o r e で試験した。m A b を、プロテイン A チップを使用して捕捉した。ヒト 5 T 4 - h i s タグタンパク質の段階希釈物を、捕捉された抗体上に 2 ~ 3 分間、3 0 μ l / 分の流速で注入した。抗原を、3 6 0 ~ 1 0 0 0 秒間、解離させた。全ての実験を B i a c o r e T 2 0 0 で行った。データ解析は、B i a c o r e T 2 0 0 評価ソフトウェアを使用して行った。

【 0 1 8 3 】

下の表 2 の結果で示されるとおり、試験した抗体の大部分は、組換えヒト 5 T 4 タンパク質に対してナノモル濃度またはナノモル濃度未満の結合親和性を示した。

【表 2】

表2. Biacoreにより測定した親和性

Abs	5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
14G12	5.38×10^5	2.22×10^{-4}	4.13×10^{-10}
393E9	3.24×10^6	1.83×10^{-4}	5.65×10^{-11}
113H5	3.48×10^5	1.92×10^{-4}	5.52×10^{-10}
159D5	1.16×10^6	2.40×10^{-4}	2.06×10^{-10}
24F10	4.18×10^5	1.26×10^{-4}	3.02×10^{-10}
493E10	6.42×10^5	4.02×10^{-4}	6.26×10^{-10}
257F1	1.86×10^5	2.75×10^{-4}	1.48×10^{-9}
353H11	4.01×10^5	9.63×10^{-5}	2.40×10^{-10}
367B8	5.88×10^5	1.67×10^{-4}	2.85×10^{-10}
389G2	2.82×10^5	1.38×10^{-4}	4.90×10^{-10}
109H7	6.45×10^5	3.91×10^{-4}	6.06×10^{-10}
286B4	7.28×10^4	6.99×10^{-5}	9.60×10^{-10}
37G6	8.23×10^5	4.86×10^{-4}	5.90×10^{-10}
267B5	1.58×10^5	2.55×10^{-4}	1.62×10^{-9}
425G1	1.31×10^5	2.15×10^{-4}	1.64×10^{-9}
449H9	3.01×10^5	1.15×10^{-4}	3.81×10^{-10}
49C5	5.44×10^5	3.37×10^{-4}	6.20×10^{-10}
119G5	1.30×10^5	1.59×10^{-4}	1.22×10^{-9}
85B10	1.58×10^5	1.25×10^{-4}	7.92×10^{-10}
95F10	3.55×10^5	1.20×10^{-4}	3.37×10^{-10}

【 0 1 8 4 】

E L I S A 試験を行って、ヒトおよびカニクイザルへのキメラ抗体の結合をそれぞれ評価した。5 T 4 を標的とするナブツモマブ (N e o T X) の抗体部分 (本開示ではナブツモマブと略す) を生成し、ベンチマークとして使用した。

【 0 1 8 5 】

手短に述べると、マイクロタイタープレートを、P B S 中の 1 μ g / m l のヒトおよびカニクイザル 5 T 4 タンパク質、1 0 0 μ l / ウェルで、4 で一晩、コーティングし、次いで、1 5 0 μ l / ウェルの 1 % B S A でブロッキングした。キメラ抗体の段階希釈物を各ウェルに添加し、1 時間、R T でインキュベートした。プレートを P B S / T w e e n (登録商標) で洗浄し、次いで、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) とコンジュゲートされたマウス抗ヒト I g G F c 抗体とともに、3 0 分間、R T でインキュベートした。洗浄後、プレートを T M B 基質で発色させ、分光光度計により O D 4 5 0 n m で解析した。全ての 5 T 4 キメラ m A b がヒトおよびカニクイザル 5 T 4 に結合した (図 1 ~ 2 および表 3) 。ナブツモマブは、カニクイザル 5 T 4 に対して非常に弱い交差活性を示した。

(実施例 3)

5 T 4 抗原に対する結合活性

3.1 異種間活性

【表3】

表3. ELISAにより評価したクローンの異種間活性

クローン/ EC ₅₀ (nM)	ヒト5T4	カニクイザル5T4
ナプツモマブ	0.15	2.02
159D5	0.20	0.19
14G12	0.19	0.17
24F10	0.18	0.21
37G6	0.13	0.28

クローン/ EC ₅₀ (nM)	ヒト5T4	カニクイザル5T4
159D5	0.39	0.20
109H7	0.31	0.19
113H5	0.52	0.82
119G5	0.32	0.20
85B10	0.34	0.17
95F10	0.24	0.17
49C5	0.60	0.18

クローン/ EC ₅₀ (nM)	ヒト5T4	カニクイザル5T4
ナプツモマブ	0.48	0.16
286B4	0.35	0.22
257F1	0.56	-
267B5	0.31	0.17

クローン/ EC ₅₀ (nM)	ヒト5T4	カニクイザル5T4
ナプツモマブ	0.52	-
159D5	-	0.11
257F1	-	0.11
353H11	0.73	0.13
367B8	0.86	0.13
393E9	0.37	0.14
425G1	0.29	0.23
449H9	0.37	0.10

クローン/ EC ₅₀ (nM)	ヒト5T4	カニクイザル5T4
ナプツモマブ	0.11	0.17
389G2	0.23	0.19

クローン/ EC ₅₀ (nM)	ヒト5T4	カニクイザル5T4
159D5	0.24	0.18
493E10	0.28	0.25

3.2 競合ELISAによるエピトープマッピング

【0186】

競合ELISAを行って、ヒト5T4に対する結合エピトープに基づいて試験5T4 mAbを分類した。

【0187】

手短に述べると、マイクロタイタープレートを、PBS中の0.5 µg/mlのヒト5T4タンパク質、100 µl/ウェルで、4で一晚、コーティングし、次いで、150 µl/ウェルの1%BSAでブロッキングした。キメラ抗体の段階希釈物および0.2 µg/mlのビオチンコンジュゲート参照mAbを、各ウェルに添加し、1時間、RTでインキュベートした。プレートをPBS/Tween(登録商標)で洗浄し、次いで、ストレプトアビジン-HRPとともに15分間、RTでインキュベートした。洗浄後、プレートをTMB基質で発色させ、分光光度計によりOD 450 nmで解析した。参照mAbとの競合性能に従って、5T4 mAbを図3~8および表4に示すような4つのピン(

10

20

30

40

50

ピン A ~ D) に分けた。

【表 4】

表4. エピトープカテゴリー

カテゴリー	クローンの例
ピンA	ナブツモマブ , 14G12, 393E9, 113H5
ピンB	159D5, 24F10, 493E10
ピンC	257F1, 353H11, 367B8, 389G2, 109H7
ピンD	286B4, 37G6, 267B5, 425G1, 449H9, 49C5, 119G5, 85B10, 95F10

10

3.3 FACS 試験

【0188】

細胞ベースの結合：FACSを使用して、CHO-K1発現ヒト5T4 (CHOK1-hu5T4) に対する全ての試験したキメラmAbの結合活性を評価した。

【0189】

手短に述べると、CHOK1-hu5T4細胞をFACS緩衝液により洗浄し、段階希釈した5T4キメラmAbを有する各ウェルに、4で30分にわたって分配した。FACS緩衝液により洗浄した後、PEヤギ抗ヒトIgG Fc二次抗体 (eBioscience (商標)、Invitrogen) を各ウェルに添加し、4で30分間インキュベートした。試料をFACS緩衝液で2回洗浄した。PEの平均蛍光強度 (MFI) をMACSQuant Analyzer 16により評価した。図9に示すように、全ての試験した5T4キメラmAbはCHOK1-hu5T4細胞に結合し、異なるピンにおける抗体は、異なる結合活性を示した。

20

【0190】

(実施例4)

14G12のヒト化

14G12可変領域遺伝子を利用して、ヒト化mAbを作出した。このプロセスの第1ステップでは、14G12のVHおよびVKのアミノ酸配列を、ヒトIg遺伝子配列の利用可能なデータベースと比較して、全体として最もよくマッチするヒト生殖細胞系列Ig遺伝子配列を見つけた。

30

【0191】

CDRグラフト化に使用したヒト生殖細胞系列の配列、および得られたヒト化配列を、表5に収載する。

40

50

【表 5 - 1】

表 5-1. 14G12 のヒト化- 1回目の実行

名称	配列	配列番号
14G12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGKLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGKATLTADKSSTTAYMQLTSLTSEDSAV YFCANGGAMDYWGQGTSVTVSS	1
14G12 VH.V1 (グラフト化)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYAFSSSWMNWVQQAPGKGLE WMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDTA VYYCATGGAMDYWGQGLTVTVSS	181
14G12 VH.V2	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYAFSSSWMNWVQQAPGKGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDTAV YFCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	182
14G12 VH.V3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYAFSSSWMNWVKQAPGKGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDTAV YFCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	183
14G12 VH.V4	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQAPGKGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADTSTDYAYMELSSLRSEDSAV YFCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	184
14G12 VL	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQDNTLPWT FGGGTKLEIK	2
14G12 VL.V1 (グラフト化)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYFCQQDNTLPWT FGGGTKLEIK	185
14G12 VL.V2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATYFCQQDNTLPWT FGGGTKLEIK	186
14G12 VL.V3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYFCQQDNTLPWT FGGGTKLEIK	187
14G12 VL.V4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATYFCQQDNTLPWT FGGGTKLEIK	188

10

20

30

【表 5 - 2】

表 5-2. 14G12由来のヒト化抗体- 1回目の実行

VL	14G12-VL.V1	14G12-VL.V2	14G12-VL.V3	14G12-VL.V4	14G12-VL
VH					
14G12-VH.V1	Hu14G12-1	Hu14G12-2	Hu14G12-3	Hu14G12-4	
14G12-VH.V2	Hu14G12-5	Hu14G12-6	Hu14G12-7	Hu14G12-8	
14G12-VH.V3	Hu14G12-9	Hu14G12-10	Hu14G12-11	Hu14G12-12	
14G12-VH.V4	Hu14G12-13	Hu14G12-14	Hu14G12-15	Hu14G12-16	
14G12-VH					14G12-C

40

50

【表 5 - 3】

表 5-3. 14G12 のヒト化- 2回目の実行

名称	配列	配列番号
14G12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGKATLTADKSSTTAYMQLTSLTSEDSAV YFCANGGAMDYWGQGTSTVTVSS	1
14G12 VH0 (グラフト化)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSWMNWVRQAPGQGLE WMGRIYREDGHTNYNGKFKGRATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCARGGAMDYWGQGTSTVTVSS	189
14G12 VH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSWMNWVKQAPGQGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGKATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAV YFCANGGAMDYWGQGTSTVTVSS	190
14G12 VH2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSWMNWVKQAPGQGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAV YFCANGGAMDYWGQGTSTVTVSS	191
14G12 VH3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSWMNWVKQAPGQGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGRATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAV FCANGGAMDYWGQGTSTVTVSS	192
14G12 VL	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFCQQDNTLPWTFG GGTKLEIK	2
14G12 VL1 (グラフト化)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKVPKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDVATYYCQQDNTLPWTF GGGTKLEIK	193
14G12 VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKVPKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSDYTLTISLQPEDVATYFCQQDNTLPWTF GGGTKLEIK	194

10

20

【表 5 - 4】

表 5-4. 14G12由来のヒト化抗体- 2回目の実行

VL VH	14G12-VL1	14G12-VL2	14G12-VL
14G12-VH1	Hu14G12-17	Hu14G12-18	
14G12-VH2	Hu14G12-19	Hu14G12-20	
14G12-VH3	Hu14G12-21	Hu14G12-22	
14G12-VH			14G12-C

30

40

50

【表 5 - 5】

表 5-5. 14G12のヒト化- 3回目の実行

名称	配列	配列番号
14G12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGL EWIGRIYREDGHTNYNGKFKGKATLTADKSSTTAYMQLTSLTSEDS AVYFCANGGAMDYWGQTSVTVSS	1
14G12 hVH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADKSTTAYMELSSLRSED TAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	195
hVH1 グラフト化	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGTFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADKSTTAYMELSSLRSED TAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	196
14G12 hVH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSITAYMELSSLRSD DTAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	197
hVH2 グラフト化	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSITAYMELSSLRSD DTAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	198
14G12 hVH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSTTAYMELSSLRSE DTAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	199
hVH3 グラフト化	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSTTGYMELSSLRSE DTAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	200
14G12 hVH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFSSSWMNWVRQAPGQR LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADKSATTAYMELSSLRSED TAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	201
hVH4 グラフト化	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFSSSWMNWVRQAPGQR LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADKSATTAYMELSSLRSED TAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	202
14G12 hVH5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSTTAYMELSSLRSD DTAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	203
hVH5 グラフト化	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSTTAYMELSSLRSD DTAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	204
14G12 VL	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQKPKDGTVKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDIATYFCQQDNTL PWTFGGGTKLEIK	2
14G12 hVL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDYFTISSLPEDIATYFCQQDNTL PWTFGGGTKVEIK	205
hVL1 グラフト化	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDYFTISSLPEDIATYFCQQDNTL PWTFGGGTKVEIK	206
14G12 hVL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDYTLTISLPEDIATYFCQQDNTL PWTFGGGTKVEIK	207
hVL2 グラフト化	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQKPKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSDYTLTISLPEDFATYFCQQDNTL PWTFGGGTKVEIK	208

10

20

30

40

【表 5 - 5 A】

14G12 hVL3	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPRLL IYY <u>TSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDIAVYFCQQDNTLP</u> WTFGGG TKVEIK	209
hVL3 グラフト化	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPRLL IYY <u>TSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQDNTLP</u> WTFGGG TKVEIK	210
14G12 hVL4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQDISNYLNWYQQKPGQP PKL LIYY <u>TSRLHSGVPDRFSGSGSGTDYTLTISSLQAEDIAVYFCQQDNTL</u> PWTFGGG TKVEIK	211
hVL4 グラフト化	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQDISNYLNWYQQKPGQP PKL LIYY <u>TSRLHSGVPDRFSGSGSGTDYTLTISSLQAEDIAVYYCQQDNT</u> LPWTFGGG TKVEIK	212
14G12 hVL5	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAP KL LIYY <u>TSRLHSGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDIATYFCQQDNTL</u> PWTFGGG TKVEIK	213
hVL5 グラフト化	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAP KL LIYY <u>TSRLHSGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYFCQQDNTL</u> PWTFGGG TKVEIK	214

10

【表 5 - 6】

表 5-6. 14G12由来のヒト化抗体- 3回目の実行

20

VL VH	14G12-hVL1	14G12- hVL2	14G12- hVL3	14G12- hVL4	14G12-hVL5	14G12-VL
14G12- hVH1	Hu14G12-23	Hu14G12- 24	Hu14G12- 25	Hu14G12- 26	Hu14G12-27	
14G12- hVH2	Hu14G12-28	Hu14G12- 29	Hu14G12- 30	Hu14G12- 31	Hu14G12-32	
14G12- hVH3	Hu14G12-33	Hu14G12- 34	Hu14G12- 35	Hu14G12- 36	Hu14G12-37	
14G12- hVH4	Hu14G12-38	Hu14G12- 39	Hu14G12- 40	Hu14G12- 41	Hu14G12-42	
14G12- hVH5	Hu14G12-43	Hu14G12- 44	Hu14G12- 45	Hu14G12- 46	Hu14G12-47	
14G12-VH						14G12-C

30

【0192】

(実施例5)

ヒト5T4抗原に対する14G12ヒト化抗体の結合活性

この実施例は、ヒト5T4タンパク質に対する14G12ヒト化抗体の結合活性を試験した。

40

5.1 5T4への14G12ヒト化抗体のELISA結合

【0193】

ヒト5T4に対する14G12ヒト化抗体の結合活性を評価するために、14G12キメラ抗体を14G12ヒト化mAbとともにELISA試験に付した。

【0194】

手短に述べると、マイクロタイタープレートを、PBS中の1µg/mlのヒト5T4-Hisタンパク質、100µl/ウェルで、4℃で一晩、コーティングし、次いで、150µl/ウェルの1%BSAでブロッキングした。抗体の段階希釈物を各ウェルに添加し、1時間、37℃でインキュベートした。プレートをPBS/Tween(登録商標)

50

で洗浄し、次いで、ヤギ抗ヒトIgG-HRPとともに30分間、37℃でインキュベートした。洗浄後、プレートをTMB基質で発色させ、分光光度計によりOD 450nmで解析した。図10および表6に示すように、ヒト化抗体の大部分は、ヒト5T4に高い活性で結合した。

【表6-1】

表6. ヒト5T4に対するヒト化14G12抗体の結合活性

Abs	EC50 (μg/ml)
14G12-C	0.0084
Hu14G12-1	0.021
Hu14G12-2	0.021
Hu14G12-3	0.026
Hu14G12-4	0.019
Hu14G12-5	0.014

10

Abs	EC50 (μg/ml)
Hu14G12-6	0.010
Hu14G12-7	0.015
Hu14G12-8	0.015
Hu14G12-9	0.012
Hu14G12-10	0.015
Hu14G12-11	0.015

20

Abs	EC50 (μg/ml)
Hu14G12-12	0.019
Hu14G12-13	0.018
Hu14G12-14	0.014
Hu14G12-15	0.014
Hu14G12-16	0.017

Abs	EC50 (nM)
14G12-C	0.40
Hu14G12-17	0.52
Hu14G12-18	0.31
Hu14G12-19	0.40
Hu14G12-20	0.32
Hu14G12-21	0.40
Hu14G12-22	0.45

30

Abs	EC50 (μg/ml)
14G12-C	0.0076
Hu14G12-33	0.011
Hu14G12-35	0.013
Hu14G12-36	0.0068
Hu14G12-37	0.011
Hu14G12-38	0.0064
Hu14G12-39	0.0069
Hu14G12-40	0.028

40

50

【表 6 - 2】

Hu14G12-41	0.0047
Hu14G12-42	0.0078
Hu14G12-43	0.0064

Abs	EC50 (μg/ml)
14G12-C	0.0082
Hu14G12-44	0.0075
Hu14G12-45	0.0082
Hu14G12-46	0.023
Hu14G12-47	0.014

10

Abs	EC50 (μg/ml)
14G12-C	0.0057
Hu14G12-23	0.0071
Hu14G12-24	0.0049
Hu14G12-25	0.0060
Hu14G12-26	0.0069
Hu14G12-27	0.0078
Hu14G12-28	0.010

20

Abs	EC50 (μg/ml)
14G12-C	0.010
Hu14G12-29	0.0067
Hu14G12-30	0.010
Hu14G12-31	0.0084
Hu14G12-32	0.0093
Hu14G12-34	0.0087

5.2 5T4への14G12ヒト化抗体の細胞ベースの結合

30

【0195】

ヒト5T4に対する14G12ヒト化抗体の細胞ベースの結合特性を評価するために、試験した抗体をCHOK1-hu5T4細胞においてFACSにより解析した。各ウェルにおいて総数 1×10^5 のCHOK1-hu5T4細胞を、FACS緩衝液中、段階希釈した抗体とともに30分間、4℃でインキュベートした。FACS緩衝液による洗浄後、PEコンジュゲート抗ヒトIgG抗体を各ウェルに添加し、4℃で30分間、インキュベートした。洗浄後、PEのMFIをMACSQuant Analyzer 16により評価した。図11に示すように、列挙されている14G12ヒト化抗体の一部は、14G12キメラ抗体と同等の結合能を示した。

5.3 5T4に対する14G12ヒト化抗体のタンパク質親和性ランク付け

40

【0196】

組換え5T4タンパク質(ヒト5T4-hisタグ)への14G12ヒト化抗体の結合を、捕捉法を使用してBiacoreで試験した。mAbを、プロテインAチップを使用して捕捉した。ヒト5T4-hisタグタンパク質の段階希釈物を、捕捉された抗体上に120~180秒間、30μl/分の流速で注入した。抗原を、360~1000秒間、解離させた。全ての実験をBiacore T200で行った。データ解析は、Biacore T200評価ソフトウェアを使用して行った。結果を下の表7に示す。

50

【表 7】

表 7. Biacoreにより測定した親和性ランク付け

Abs	ヒト 5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
14G12-C	4.01×10^5	3.36×10^{-4}	8.39×10^{-10}
Hu14G12-1	2.83×10^5	1.21×10^{-2}	4.27×10^{-8}
Hu14G12-2	2.03×10^5	4.36×10^{-3}	2.15×10^{-8}
Hu14G12-3	2.00×10^5	5.50×10^{-3}	2.75×10^{-8}
Hu14G12-4	2.14×10^5	2.67×10^{-3}	1.25×10^{-8}
Hu14G12-5	2.48×10^5	1.46×10^{-3}	5.88×10^{-9}
Hu14G12-6	2.88×10^5	7.70×10^{-4}	2.68×10^{-9}
Hu14G12-7	3.36×10^5	8.46×10^{-4}	2.52×10^{-9}
Hu14G12-8	3.40×10^5	4.64×10^{-4}	1.36×10^{-9}
Hu14G12-9	2.02×10^5	1.07×10^{-3}	5.31×10^{-9}
Hu14G12-10	2.12×10^5	5.12×10^{-4}	2.42×10^{-9}
Hu14G12-11	2.41×10^5	5.23×10^{-4}	2.17×10^{-9}
Hu14G12-12	2.74×10^5	6.55×10^{-4}	2.39×10^{-9}
Hu14G12-13	1.98×10^5	1.21×10^{-3}	6.12×10^{-9}
Hu14G12-14	2.07×10^5	7.01×10^{-4}	3.39×10^{-9}
Hu14G12-15	2.62×10^5	8.37×10^{-4}	3.19×10^{-9}
Hu14G12-16	2.69×10^5	4.99×10^{-4}	1.85×10^{-9}

10

20

Abs	ヒト 5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
14G12-C	6.15×10^5	3.30×10^{-4}	5.37×10^{-10}
Hu14G12-18	3.92×10^5	1.78×10^{-3}	4.55×10^{-9}
Hu14G12-23	3.52×10^5	9.08×10^{-4}	2.58×10^{-9}
Hu14G12-28	2.95×10^5	7.14×10^{-4}	2.42×10^{-9}
Hu14G12-29	5.14×10^5	1.10×10^{-3}	2.14×10^{-9}
Hu14G12-32	3.55×10^5	9.79×10^{-4}	2.76×10^{-9}
Hu14G12-37	1.34×10^6	1.42×10^{-3}	1.05×10^{-9}
Hu14G12-43	1.89×10^6	1.60×10^{-3}	8.44×10^{-10}
Hu14G12-44	1.40×10^6	1.97×10^{-3}	1.41×10^{-9}
Hu14G12-47	4.38×10^5	9.21×10^{-4}	2.10×10^{-9}

30

【0197】

(実施例6)

393E9抗体のヒト化

393E9可変領域遺伝子を利用して、ヒト化mAbを作出した。このプロセスの第1ステップでは、393E9のVHおよびVKのアミノ酸配列を、ヒトIg遺伝子配列の利用可能なデータベースと比較して、全体として最もよくマッチするヒト生殖細胞系列Ig遺伝子配列を見つけた。

40

【0198】

CDRグラフト化に使用したヒト生殖細胞系列の配列、および得られたヒト化配列を、表8に収載する。

50

【表 8 - 1】

表 8. 393E9 のヒト化

名称	配列	配列番号
393E9_VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQPPGKAL EWLGFIRNKNGYTTENSASVKGRFTISRDNQSILYLQMNALRAE DSATYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSTVTVSS	3
393E9 VH- G57A (CDR2 変異)	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQPPGKAL EWLGFIRNKGNAYTTENSASVKGRFTISRDNQSILYLQMNALRAE DSATYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSTVTVSS	215
393E9 VH.V1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGL LEWVGFIRNKNGYTTENSASVKGRFTISRDNQSKSTLYLQMNLSLR AEDTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSTVTVSS	216
393E9 VH.V2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQPPGKGL EWVGFIRNKNGYTTENSASVKGRFTISRDNQSKSTLYLQMNLSLR EDTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSTVTVSS	217
393E9 VH.V3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGL LEWVGFIRNKNGYTTENSASVKGRFTISRDNQSKSTLYLQMNLSLR AEDTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSTVTVSS	218
393E9 VH.V4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGL LEWVGFIRNKNGYTTENSASVKGRFTISRDNQSKSTLYLQMNLSLR TEDTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSTVTVSS	219
393E9 VH.V5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGL EWVGFIRNKNGYTTENSASVKGRFTISRDNQSKSTLYLQMNLSLR DTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSTVTVSS	220
393E9 VH.V6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGL LEWVGFIRNKNGYTTENSASVKGRFTISRDNQSKSTLYLQMNLSLR AEDTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSTVTVSS	221
393E9 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGQP PKLLIYGASNVEGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDIAVYFCQ QSRKVPSTFGGGTKLEIK	4
393E9 VL.V1	DIVLTQSPDLSLAVSLGERATINCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGQ PKLLIYGASNVEGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDIAVYFCQ QSRKVPSTFGGGTKVEIK	222
393E9 VL.V2	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGQ APRLLIYGASNVEGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDIIVYFCQQ SRKVPSTFGGGTKVEIK	223
393E9 VL.V3	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGK APKLLIYGASNVEGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIIVYFCQ QSRKVPSTFGGGTKVEIK	224
393E9 VL.V4	DIVLTQSPPLSLPVTPEPASPISCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGQS PQLLIYGASNVEGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDIIVYFCQ QSRKVPSTFGGGTKVEIK	225
393E9 VL.V5	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGQ APRLLIYGASNVEGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSRLEPEDIIVYFCQQ SRKVPSTFGGGTKVEIK	226

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

表 8-2. 393E9 由来のヒト化抗体

	393E9 VH.V1	393E9 VH.V2	393E9 VH.V3	393E9 VH.V4	393E9 VH.V5	393E9 VH.V6
393E9 VL.V1	393E9_hVH1 _hVL1	393E9_hVH 2_hVL1	393E9_hVH3 _hVL1	393E9_hVH 4_hVL1	393E9_hVH 5_hVL1	393E9_hVH6 _hVL1
393E9 VL.V2	393E9_hVH1 _hVL2	393E9_hVH 2_hVL2	393E9_hVH3 _hVL2	393E9_hVH 4_hVL2	393E9_hVH 5_hVL2	393E9_hVH6 _hVL2
393E9 VL.V3	393E9_hVH1 _hVL3	393E9_hVH 2_hVL3	393E9_hVH3 _hVL3	393E9_hVH 4_hVL3	393E9_hVH 5_hVL3	393E9_hVH6 _hVL3
393E9 VL.V4	393E9_hVH1 _hVL4	393E9_hVH 2_hVL4	393E9_hVH3 _hVL4	393E9_hVH 4_hVL4	393E9_hVH 5_hVL4	393E9_hVH6 _hVL4
393E9 VL.V5	393E9_hVH1 _hVL5	393E9_hVH 2_hVL5	393E9_hVH3 _hVL5	393E9_hVH 4_hVL5	393E9_hVH 5_hVL5	393E9_hVH6 _hVL5

10

【 0 1 9 9 】

(実施例 7)

ヒト 5 T 4 抗原に対する 3 9 3 E 9 ヒト化抗体の結合活性

この実施例は、ヒト 5 T 4 タンパク質に対する 3 9 3 E 9 ヒト化抗体の結合活性を試験した。

20

7 . 1 5 T 4 への 3 9 3 E 9 ヒト化抗体の E L I S A 結合

【 0 2 0 0 】

ヒト 5 T 4 に対する 3 9 3 E 9 ヒト化抗体の結合活性を評価するために、3 9 3 E 9 キメラ抗体 (3 9 3 E 9 - C) を 3 9 3 E 9 ヒト化 m A b とともに E L I S A 試験に付した。

【 0 2 0 1 】

手短に述べると、マイクロタイタープレートを、PBS 中の 1 μ g / m l のヒト 5 T 4 - H i s タンパク質、1 0 0 μ l / ウェルで、4 で一晚、コーティングし、次いで、1 5 0 μ l / ウェルの 1 % B S A でブロックした。2 0 n M から出発する抗体の 4 倍希釈物を各ウェルに添加し、1 時間、3 7 でインキュベートした。プレートを P B S / T w e e n (登録商標) で洗浄し、次いで、ヤギ抗ヒト I g G - H R P とともに 3 0 分間、3 7 でインキュベートした。洗浄後、プレートを T M B 基質で発色させ、分光光度計により O D 4 5 0 n m で解析した。図 1 2 および表 9 に示すように、ヒト化抗体の大部分は、ヒト 5 T 4 に高い活性で結合した。

30

【表 9 - 1】

表 9. ヒト 5 T 4 に対するヒト化 393E9 抗体の結合活性

Abs	EC50 (nM)
393E9-C	0.27
393E9_hVH1_hVL1	0.18
393E9_hVH1_hVL2	0.16
393E9_hVH1_hVL3	0.085
393E9_hVH1_hVL4	0.13
393E9_hVH1_hVL5	0.13
393E9_hVH2_hVL1	0.17
393E9_hVH2_hVL2	0.12

40

【表 9 - 2】

393E9_hVH2_hVL3	0.11
393E9_hVH2_hVL4	0.12
393E9_hVH2_hVL5	0.11
393E9_hVH3_hVL1	0.16

Abs	EC50 (nM)
393E9-C	0.13
393E9_hVH3_hVL2	0.20
393E9_hVH3_hVL3	0.14
393E9_hVH3_hVL4	0.095
393E9_hVH3_hVL5	0.12
393E9_hVH4_hVL1	0.13
393E9_hVH4_hVL2	0.12
393E9_hVH4_hVL3	0.13
393E9_hVH4_hVL4	0.16
393E9_hVH4_hVL5	0.22
393E9_hVH5_hVL1	0.16
393E9_hVH5_hVL2	0.27

10

20

Abs	EC50 (nM)
393E9-C	0.23
393E9_hVH5_hVL3	0.12
393E9_hVH5_hVL4	0.17
393E9_hVH5_hVL5	0.11
393E9_hVH6_hVL1	0.11
393E9_hVH6_hVL2	0.11
393E9_hVH6_hVL3	0.052
393E9_hVH6_hVL4	0.14
393E9_hVH6_hVL5	0.19

30

7.2 5T4への393E9ヒト化抗体の細胞ベースの結合

【0202】

ヒト5T4に対する393E9ヒト化抗体の細胞ベースの結合特性を評価するために、試験した抗体をCHO K1-hu5T4細胞においてFACSにより解析した。各ウェルにおいて総数 1×10^5 のCHO K1-hu5T4細胞を、FACS緩衝液中、50nMから出発して3倍段階希釈した抗体とともに30分間、4℃でインキュベートした。FACS緩衝液による洗浄後、PEコンジュゲート抗ヒトIgG抗体を各ウェルに添加し、4℃で30分間、インキュベートした。洗浄後、PEのMFIをMACSQuant Analyzer 16により評価した。図13に示すように、列挙されている393E9ヒト化抗体の一部は、393E9キメラ抗体と同等の結合能を示した。

40

7.3 5T4に対する393E9ヒト化抗体のタンパク質親和性ランク付け

【0203】

組換え5T4タンパク質(ヒト5T4-hisタグ)への393E9ヒト化抗体の結合を、捕捉法を使用してBiacoreで試験した。mAbを、プロテインAチップを使用して捕捉した。ヒト5T4-hisタグタンパク質の段階希釈物を、捕捉された抗体上に3分間、30 μ l/分の流速で注入した。抗原を、280~800秒間、解離させた。全ての実験をBiacore T200で行った。データ解析は、Biacore T200評価ソフトウェアを使用して行った。結果を下の表10に示す。

50

【表 10】

表10. Biacoreにより測定した親和性ランク付け

Abs	ヒト5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
393E9-C	2.31×10^5	1.07×10^{-4}	4.63×10^{-10}
393E9_hVH1_hVL4	1.99×10^5	1.19×10^{-4}	5.99×10^{-10}
393E9_hVH1_hVL5	2.17×10^5	1.12×10^{-4}	5.15×10^{-10}
393E9_hVH2_hVL1	1.90×10^5	1.04×10^{-4}	5.47×10^{-10}
393E9_hVH2_hVL2	2.01×10^5	1.20×10^{-4}	5.94×10^{-10}
393E9_hVH2_hVL3	1.74×10^5	1.20×10^{-4}	6.84×10^{-10}
393E9_hVH2_hVL4	1.95×10^5	1.27×10^{-4}	6.50×10^{-10}
393E9_hVH2_hVL5	2.17×10^5	1.22×10^{-4}	5.60×10^{-10}
393E9_hVH3_hVL1	2.13×10^5	1.08×10^{-4}	5.06×10^{-10}
393E9_hVH3_hVL3	1.93×10^5	1.11×10^{-4}	5.74×10^{-10}
393E9_hVH3_hVL4	2.15×10^5	1.23×10^{-4}	5.73×10^{-10}
393E9_hVH3_hVL5	2.38×10^5	1.20×10^{-4}	5.02×10^{-10}
393E9_hVH4_hVL2	2.04×10^5	1.23×10^{-4}	6.03×10^{-10}
393E9_hVH4_hVL3	1.81×10^5	1.28×10^{-4}	7.06×10^{-10}
393E9_hVH4_hVL5	2.17×10^5	1.29×10^{-4}	5.95×10^{-10}
393E9_hVH5_hVL3	1.70×10^5	1.19×10^{-4}	7.00×10^{-10}
393E9_hVH5_hVL4	1.84×10^5	1.25×10^{-4}	6.79×10^{-10}
393E9_hVH5_hVL5	2.02×10^5	1.21×10^{-4}	5.98×10^{-10}
393E9_hVH6_hVL2	1.99×10^5	1.37×10^{-4}	6.87×10^{-10}
393E9_hVH6_hVL3	1.79×10^5	1.24×10^{-4}	6.91×10^{-10}
393E9_hVH6_hVL5	2.12×10^5	1.22×10^{-4}	5.74×10^{-10}

10

20

【0204】

(実施例8)

30

159D5抗体のヒト化

159D5可変領域遺伝子を利用して、ヒト化mAbを作出した。このプロセスの第1ステップでは、159D5のVHおよびVKのアミノ酸配列を、ヒトIg遺伝子配列の利用可能なデータベースと比較して、全体として最もよくマッチするヒト生殖細胞系列Ig遺伝子配列を見つけた。

【0205】

CDRグラフト化に使用したヒト生殖細胞系列の配列、および得られたヒト化配列を、表11に収載する。

40

50

【表 1 1 - 1】

表 11-1. 159D5 のヒト化

名称	配列	配列番号
159D5 VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCTASGFTFSNFGMHWVRQAPETGL EWVAYISSGSSTFYADSVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTA MYFCARSPAYRYGLDYWGQGTTLTVSS	7
159D5 mVH-S62A (CDR2 変異)	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCTASGFTFSNFGMHWVRQAPETGL EWVAYISSGSSTFYADAVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTA MYFCARSPAYRYGLDYWGQGTTLTVSS	227
159D5 VH.V0 (グラフト化)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGL EWVAYISSGSSTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARSPAYRYGLDYWGQGTTLTVSS	228
159D5 VH.V1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGL EWVAYISSGSSTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYFCARSPAYRYGLDYWGQGTTLTVSS	229
159D5 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSSSTFSYMHWYQQKPGQP PKLLIKSSSNLESGVPRFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYCQHS WEIPYTFGGGTKLEIK	8
159D5 VL.V0 (グラフト化)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQSVSSSTFSYMHWYQQKPGQP PQLLIYSSSNLESGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQH SWEIPYTFGGGTKVEIK	230
159D5 VL.V1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQSVSSSTFSYMHWYQQKPGQP PQLLIKSSSNLESGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQH SWEIPYTFGGGTKVEIK	231
159D5 VL.V2	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQSVSSSTFSYMHWYQQKPGQP PQLLIKSSSNLESGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQH SWEIPYTFGGGTKVEIK	232
159D5 VL.V3 (グラフト化)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSSSTFSYMHWYQQKPGQ PKLLIYSSSNLESGVPRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQH SWEIPYTFGGGTKVEIK	233
159D5 VL.V4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSSSTFSYMHWYQQKPGQ PKLLIKSSSNLESGVPRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQH SWEIPYTFGGGTKVEIK	234
159D5 VL.V5	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSSSTFSYMHWYQQKPGQP PKLLIKSSSNLESGVPRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHS WEIPYTFGGGTKVEIK	235

10

20

30

【表 1 1 - 2】

表 11-2. 159D5 由来のヒト化抗体

VL VH	159D5V L.V0	159D5V L.V1	159D5V L.V2	159D5V L.V3	159D5V L.V4	159D5V L.V5	159D5 VL
159D5-VH.V0	Hu159D 5-1	Hu159D 5-2	Hu159D 5-3	Hu159D 5-4	Hu159D 5-5	Hu159D 5-6	
159D5-VH.V1	Hu159D 5-7	Hu159D 5-8	Hu159D 5-9	Hu159D 5-10	Hu159D 5-11	Hu159D 5-12	
159D5-VH.S62A							159D5-P1
159D5-VH							159D5-C

40

50

【0206】

(実施例9)

ヒト5T4抗原に対する159D5ヒト化抗体の結合活性

この実施例は、ヒト5T4タンパク質に対する159D5ヒト化抗体の結合活性を試験した。

9.1 5T4への159D5ヒト化抗体のELISA結合

【0207】

ヒト5T4に対する159D5ヒト化抗体の結合活性を評価するために、159D5キメラ抗体を159D5ヒト化mAbとともにELISA試験に付した。

【0208】

手短に述べると、マイクロタイタープレートを、PBS中の1 μ g/mlのヒト5T4-Hisタンパク質、100 μ l/ウェルで、4 $^{\circ}$ Cで一晩、コーティングし、次いで、150 μ l/ウェルの1%BSAでブロッキングした。抗体の段階希釈物を各ウェルに添加し、1時間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。プレートをPBS/Tween(登録商標)で洗浄し、次いで、ヤギ抗ヒトIgG-HRPとともに30分間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。洗浄後、プレートをTMB基質で発色させ、分光光度計によりOD_{450nm}で解析した。図14および表12に示すように、ヒト化抗体の大部分は、ヒト5T4に高い活性で結合した。

【表12】

表12. ヒト5T4に対するヒト化159D5抗体の結合活性

Abs	EC50 (nM)
Hu159D5-1	0.088
Hu159D5-2	0.12
Hu159D5-3	0.12
Hu159D5-4	0.094
Hu159D5-5	0.099
Hu159D5-6	0.10

Abs	EC50 (nM)
Hu159D5-7	0.097
Hu159D5-8	0.15
Hu159D5-9	0.14
Hu159D5-10	0.094
Hu159D5-11	0.12
Hu159D5-12	0.12
159D5-P1	0.13
159D5-C	0.13

9.2 5T4への159D5ヒト化抗体の細胞ベースの結合

【0209】

ヒト5T4に対する159D5ヒト化抗体の細胞ベースの結合特性を評価するために、試験した抗体をCHOK1-hu5T4細胞においてFACSにより解析した。各ウェルにおいて総数 1×10^5 のCHOK1-hu5T4細胞を、FACS緩衝液中、段階希釈した抗体とともに30分間、4 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。FACS緩衝液による洗浄後、PEコンジュゲート抗ヒトIgG抗体を各ウェルに添加し、4 $^{\circ}$ Cで30分間、インキュベートした。洗浄後、PEのMFIをMACSQuant Analyzer 16により評価した。図15に示すように、列挙されている159D5ヒト化抗体の大部分は、159D5キメラ抗体と同等の結合能を示した。

9.3 5T4に対する159D5ヒト化抗体のタンパク質親和性ランク付け

【0210】

組換え 5 T 4 タンパク質 (ヒト 5 T 4 - h i s タグ) への 1 5 9 D 5 ヒト化抗体の結合を、捕捉法を使用して B i a c o r e で試験した。m A b を、プロテイン A チップを使用して捕捉した。ヒト 5 T 4 - h i s タグタンパク質の 5 0 n M を、捕捉された抗体上に 3 分間、3 0 μ l / 分の流速で注入した。抗原を、6 0 0 秒間、解離させた。全ての実験を B i a c o r e T 2 0 0 で行った。データ解析は、B i a c o r e T 2 0 0 評価ソフトウェアを使用して行った。結果を下の表 1 3 に示す。

【表 1 3】

表 1 3. Biacoreにより測定した親和性ランク付け

Abs	5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
159D5-C	3.30×10^5	2.04×10^{-4}	6.18×10^{-10}
Hu159D5-1	7.37×10^4	2.94×10^{-4}	3.99×10^{-9}
Hu159D5-2	2.87×10^5	2.27×10^{-4}	7.89×10^{-10}
Hu159D5-3	2.35×10^5	2.40×10^{-4}	1.02×10^{-9}
Hu159D5-4	6.02×10^4	4.26×10^{-4}	7.07×10^{-9}
Hu159D5-5	5.56×10^4	5.61×10^{-4}	1.01×10^{-8}
Hu159D5-6	2.52×10^5	1.79×10^{-4}	7.10×10^{-10}
Hu159D5-7	2.21×10^5	2.53×10^{-4}	1.14×10^{-9}
Hu159D5-8	8.40×10^4	3.52×10^{-4}	4.19×10^{-9}
Hu159D5-9	2.95×10^5	2.21×10^{-4}	7.47×10^{-10}
Hu159D5-10	5.24×10^4	4.88×10^{-4}	9.31×10^{-9}
Hu159D5-11	2.57×10^5	2.73×10^{-4}	1.06×10^{-9}
Hu159D5-12	2.22×10^5	2.67×10^{-4}	1.21×10^{-9}
159D5-P1	3.34×10^5	1.63×10^{-4}	4.89×10^{-10}

10

20

【0 2 1 1】

(実施例 1 0)

2 8 6 B 4 抗体のヒト化

2 8 6 B 4 可変領域遺伝子を利用して、ヒト化 m A b を作出した。このプロセスの第 1 ステップでは、2 8 6 B 4 の V H および V K のアミノ酸配列を、ヒト I g 遺伝子配列の利用可能なデータベースと比較して、全体として最もよくマッチするヒト生殖細胞系列 I g 遺伝子配列を見つけた。

30

【0 2 1 2】

2 8 6 B 4 の重鎖については、V H 4 - 2 8 / J H 6 をヒト化骨格として選択した。2 8 6 B 4 の軽鎖については V L - O 1 8 / J K 4 が最良適合生殖細胞系列である。次いで、ヒト化 2 8 6 B 4 C D R グラフト抗体を設計し、C D R L 1、L 2 および L 3 を V L - O 1 8 - J K 4 のフレームワーク配列にグラフトし、C D R H 1、H 2 および H 3 を V H 4 - 2 8 - J H 6 のフレームワーク配列にグラフトした。次いで、3 D モデルを生成して、抗体結合および立体構造に不可欠である、元のマウス F R 領域配列内のアミノ酸を決定した。2 8 6 B 4 C D R グラフト抗体配列に基づいて、4 本の追加のヒト化重鎖および 5 本の追加の軽鎖を作出した。

40

【0 2 1 3】

C D R グラフト化に使用したヒト生殖細胞系列の配列、および得られたヒト化配列を、表 1 4 に収載する。

50

【表 1 4 - 1】

表14-1. 286B4 のヒト化

名称	配列	配列番号
286B4 VH	DVQLHESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITN N YYWNWIRQFPGNLEW MGYITYDGSNNYNPSLKNRISVTRDTSKNQFFLKLSSVTEDTATYYCT RGGGQLRFDYWGQGTTTVSS	23
286B4 VH- G55A (CDR2 変異)	DVQLHESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITN N YYWNWIRQFPGNLEW MGYITYD A SNNYNPSLKNRISVTRDTSKNQFFLKLSSVTEDTATYYCT RGGGQLRFDYWGQGTTTVSS	236
286B4 VH.V0 (グラフト化)	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISN N YYWNWIRQPPGKGLEWI GYITYDGSNNYNPSLKNRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCA RGGGQLRFDYWGQGTTTVSS	237
286B4 VH.V1	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISN N YYWNWIRQPPGKGLEWI GYITYDGSNNYNPSLKNRVTMS R DTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCA RGGGQLRFDYWGQGTTTVSS	238
286B4 VH.V2	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISN N YYWNWIRQPPGKGLEWI GYITYDGSNNYNPSLKNRVTMS R DTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCA RGGGQLRFDYWGQGTTTVSS	239
286B4 VH.V3	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISN N YYWNWIRQPPGKGLEW MGYITYDGSNNYNPSLKNRITV S RDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYC ARGGGQLRFDYWGQGTTTVSS	240
286B4 VH.V4	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSIT N YYWNWIRQPPGKGLEW MGYITYDGSNNYNPSLKNRITV S RDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCT RGGGQLRFDYWGQGTTTVSS	241
286B4 VL	SIVMTQTPKFLIVSAGDRVITITCKASQSVSNEVTWYQQKPGQSPKMLIY YASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITINTVQAEDLAIYFCQODYSSPWF GGGKLEIK	24
286B4 VL.V0 (グラフト化)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKAPKLLI YYASNRYTGVPDRFSGSGGTDFTFITISLQPEDATYYCQODYSSPWF GGGKVEIK	242
286B4 VL.V1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKAPKLLI YYASNRYTGVPDRFSGSGGTDFTFITISLQPEDATYYCQODYSSPWT FGGGTKVEIK	243
286B4 VL.V2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKAPKMLI YYASNRYTGVPDRFSGSGGTDFTFITISLQPEDATYYCQODYSSPWT FGGGTKVEIK	244
286B4 VL.V3	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKAPKMLI YYASNRYTGVPDRFSGSGYGTDFTFITISLQPEDATYYCQODYSSPWT FGGGTKVEIK	245
286B4 VL.V4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKSPKMLI YYASNRYTGVPDRFSGSGYGTDFTFITISLQPEDATYFCQODYSSPWT FGGGTKVEIK	246
286B4 VL.V5	SIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKSPKMLIY YASNRYTGVPDRFSGSGYGTDFTFITISLQPEDATYFCQODYSSPWF GGGKVEIK	247

10

20

30

40

50

【表 14 - 2】

表 14-2. 286B4 由来のヒト化抗体

VL VH	286B4VL.V1	286B4VL.V2	286B4VL.V3	286B4VL.V4	286B4VL.V5	286B4 VL
286B4-VH.V1	Hu286B4-1	Hu286B4-2	Hu286B4-3	Hu286B4-4	Hu286B4-5	
286B4-VH.V2	Hu286B4-6	Hu286B4-7	Hu286B4-8	Hu286B4-9	Hu286B4-10	
286B4-VH.V3	Hu286B4-11	Hu286B4-12	Hu286B4-13	Hu286B4-14	Hu286B4-15	
286B4-VH.V4	Hu286B4-16	Hu286B4-17	Hu286B4-18	Hu286B4-19	Hu286B4-20	
286B4- VH.G55A						286B4-P1
286B4-VH						286B4-C

10

【0214】

(実施例 11)

ヒト 5 T 4 抗原に対する 2 8 6 B 4 ヒト化抗体の結合活性

この実施例は、ヒト 5 T 4 タンパク質に対する 2 8 6 B 4 ヒト化抗体の結合活性を試験した。

1 1 . 1 5 T 4 への E L I S A 結合

20

【0215】

クローンの結合活性を評価するために、2 8 6 B 4 キメラ抗体を 2 8 6 B 4 ヒト化 m A b とともに E L I S A 試験に付した。

【0216】

手短に述べると、マイクロタイタープレートを、P B S 中の $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヒト 5 T 4 - H i s タンパク質、 $100 \mu\text{l}$ / ウェルで、4 で一晩、コーティングし、次いで、 $150 \mu\text{l}$ / ウェルの 1 % B S A でブロッキングした。2 0 n M から出発する試験抗体の 4 倍希釈物を各ウェルに添加し、1 時間、3 7 でインキュベートした。プレートを P B S / T w e e n (登録商標) で洗浄し、次いで、ヤギ抗ヒト I g G - H R P とともに 3 0 分間、3 7 でインキュベートした。洗浄後、プレートを T M B 基質で発色させ、分光光度計により O D 450 nm で解析した。図 1 6 および表 1 5 に示すように、ヒト化クローンの大部分は、ヒト 5 T 4 に高い効力で結合した。

30

【表 15 - 1】

表 15. ヒト 5 T 4 に対するヒト化 286B4 抗体の結合活性

Abs	EC50 (nM)
284B4-C	0.32
Hu286B4-1	3.81

40

50

【表 1 5 - 2】

Hu286B4-2	1.35
Hu286B4-3	0.51
Hu286B4-4	0.46
Hu286B4-5	0.28
Hu286B4-6	2.64
Hu286B4-7	1.76
Hu286B4-8	0.68
Hu286B4-9	0.33
Hu286B4-10	2.61

10

Abs	EC50 (nM)
284B4-C	0.32
Hu286B4-11	1.42
Hu286B4-12	0.89
Hu286B4-13	0.57
Hu286B4-14	0.30
Hu286B4-15	0.25
Hu286B4-16	4.03
Hu286B4-17	0.71
Hu286B4-18	0.42
Hu286B4-19	0.27
Hu286B4-20	0.42

20

1 1 . 2 5 T 4 への細胞ベースの結合

【 0 2 1 7 】

ヒト5T4に対する286B4ヒト化抗体の細胞ベースの結合特性を評価するために、試験した抗体をCHOK1-hu5T4（ヒト5T4高発現細胞系）またはMCF-7細胞（ヒト5T4低発現細胞系）へのそれらの結合についてFACSにより解析した。各ウェルにおいて総数 1×10^5 のCHOK1-hu5T4またはMCF7細胞を、FACS緩衝液中、50nMから出発して4倍または3倍段階希釈した抗体とともに30分間、4でインキュベートした。FACS緩衝液による洗浄後、PEコンジュゲート抗ヒトIgG抗体を各ウェルに添加し、4で30分間、インキュベートした。洗浄後、PEのMFIをMACSQuant Analyzer 16により評価した。図17A（CHO-hu5T4細胞）および図17B（MCF-7細胞）に示すように、列挙されている286B4-3/8/13/18/5/10/15ヒト化抗体の一部は、286B4キメラ抗体と同等の結合能を示した。

30

1 1 . 3 ヒト5T4に対するタンパク質親和性ランク付け

【 0 2 1 8 】

組換え5T4タンパク質（ヒト5T4-hisタグ）への286B4ヒト化抗体の結合を、捕捉法を使用してBiacoreで試験した。mAbを、プロテインAチップを使用して捕捉した。ヒト5T4-hisタグタンパク質の段階希釈物を、捕捉された抗体上に3分間、 $30 \mu\text{l}$ /分の流速で注入した。抗原を、280~800秒間、解離させた。全ての実験をBiacore T200で行った。データ解析は、Biacore T200評価ソフトウェアを使用して行った。結果を下の表16に示す。

40

50

【表 16】

表 16. Biacoreにより測定した親和性ランク付け

Abs	ヒト 5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
286-C	9.09×10^4	1.13×10^{-4}	1.25×10^{-9}
Hu286B4-3	9.34×10^4	1.07×10^{-4}	1.14×10^{-9}
Hu286B4-5	1.06×10^5	1.28×10^{-4}	1.20×10^{-9}
Hu286B4-8	9.46×10^4	1.03×10^{-4}	1.08×10^{-9}
Hu286B4-10	1.06×10^5	2.04×10^{-4}	1.93×10^{-9}
Hu286B4-13	9.55×10^4	1.07×10^{-4}	1.12×10^{-9}
Hu286B4-15	1.10×10^5	1.14×10^{-4}	1.04×10^{-9}
Hu286B4-18	1.13×10^5	1.33×10^{-4}	1.18×10^{-9}

10

【 0 2 1 9 】

(実施例 1 2)

3 9 3 E 9、1 5 9 D 5 および 2 8 6 B 4 の P T M 除去の確認

1 2 . 1 3 9 3 E 9 の P T M 除去の確認

3 9 3 E 9 V H C D R 2 は、N G および N S 残基 (K a b a t 番号付け) を含み、これらの残基は、翻訳後改変 (P T M) のリスクがあり、将来の製造にとって課題となる。それ故、この実施例は、P T M を防止するために V H 上の N G を N A におよび N S を Y S に変異させた。潜在的な P T M 除去部位の配列を表 1 7 に列挙する。

20

30

40

50

【表 17 - 1】

表 17-1: 潜在的なPTM部位が除去された 393E9 のヒト化

名称	配列	配列番号
393E9 VH.V4 NG-NA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF7DYYSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNAYTTENSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLKTEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTLVTVSS	248
393E9 VH.V4 NS-YS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF7DYYSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNGYTTEYSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLKTEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTLVTVSS	249
393E9 VH.V4 NG-NA NS-YS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF7DYYSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNAYTTEYSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLKTEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTLVTVSS	250
393E9 VH.V5 NG-NA	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTF7DYYSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNAYTTENSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLKTEDTA VYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTLVTVSS	251
393E9 VH.V5 NS-YS	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTF7DYYSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNGYTTEYSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLKTEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTLVTVSS	252
393E9 VH.V5 NG-NA NS-YS	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTF7DYYSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNAYTTEYSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLKTEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTLVTVSS	253
393E9 VH.V6 NG-NA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF7DYYSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNAYTTENSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTLVTVSS	254
393E9 VH.V6 NS-YS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF7DYYSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNGYTTEYSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTLVTVSS	255
393E9 VH.V6 NG-NA NS-YS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF7DYYSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNAYTTEYSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTLVTVSS	256

10

20

30

40

50

【表 17 - 2】

表 17-2. 潜在的なPTM部位が除去された393E9 ヒト化抗体

VL VH	393E9 hVL2	393E9 hVL3	393E9 hVL5
393E9 VH.V4			Hu393E9-45
393E9 VH.V4 (NG-NA)			Hu393E9-45-P1
393E9 VH.V4 (NS-YS)			Hu393E9-45-P2
393E9 VH.V4(NG-NA/ NS-YS)			Hu393E9-45-P3
393E9 VH.V5		Hu393E9-53	
393E9 VH.V5(NG-NA)		Hu393E9-53-P1	
393E9 VH.V5(NS-YS)		Hu393E9-53-P2	
393E9 VH.V5(NG-NA/ NS-YS)		Hu393E9-53-P3	
393E9 VH.V6	Hu393E9-62		
393E9 VH.V6(NG-NA)	Hu393E9-62-P1		
393E9 VH.V6(NS-YS)	Hu393E9-62-P2		
393E9 VH.V6(NG-NA/ NS-YS)	Hu393E9-62-P3		

10

20

【0220】

表面5T4に対するPTM除去抗体の結合特性を評価するために、Hu393E9-45-P2、Hu393E9-53-P2、Hu393E9-62-P2またはキメラ393E9の抗5T4部分を有する三重特異性抗体を、CHOK1-hu5T4細胞へのそれらの結合についてFACSにより解析した。各ウェルにおいて総数 1×10^5 の細胞を、100nMから出発して4倍段階希釈した抗体とともに30分間、4℃でインキュベートした。FACS緩衝液による洗浄後、PEコンジュゲート抗ヒトIgG抗体を各ウェルに

30

添加し、4℃で30分間、インキュベートした。PEのMFIをMACSQuant Analyzer 16により評価した。図18Aに示すように、Hu393E9-45-P2またはHu393E9-62-P2の抗5T4部分を有する三重特異性抗体は、5T4発現細胞に対してキメラ393E9を有するものより増強された結合能を示した。試験した三重特異性抗体間の唯一の違いは、抗5T4部分であった。

30

40

12.2 159D5のPTM除去の確認

【0221】

159D5 VH CDR2は、DS残基(Kabat番号付け)を含み、この残基は、翻訳後改変(PTM)のリスクがあり、将来の製造にとって課題となる。それ故、この実施例は、PTMを防止するためにVH上のDSをDAに変異させた。潜在的なPTM除去部位の配列を表18に列挙する。図14B、図15および表13に示すように、159D5-P1のPTM除去抗体は、159D5-Cの159D5キメラ抗体と同等の結合能力を示した。

【表 18 - 1】

表 18-1. 159D5 CDRH2のPTM除去

VL	VH	159D5-VH DS-DA	159D5-VH
159D5-VL		159D5-P1	159D5-C

50

【表 18 - 2】

表 18-2. 潜在的なPTM部位が除去された 159D5 のヒト化

名称	配列	配列番号
159D5 VH.V0 (グラフト化) DS-DA	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEW VAYISSGSSTFYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARSPAYRYGLDYWGQGTITVTVSS	257
159D5 VL.V1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQSVSSSTFSYMHWYQQKPGPPQ LLIKSSSNLESQVDFRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDVGVYYCQHSWEIP YTFGGGTKVEIK	258

10

【表 18 - 3】

表 18-3. 潜在的なPTM部位が除去された 159D5 ヒト化抗体

VH	159D5 VH.V0
VL	DS-DA
159D5 VL.V1	Hu159D5-2-P1

1 2 . 3 2 8 6 B 4 の P T M 除去の確認

20

【0 2 2 2】

2 8 6 B 4 V H C D R 2 は、D G 残基 (K a b a t 番号付け) を含み、この残基は、翻訳後改変 (P T M) のリスクがあり、将来の製造にとって課題となる。それ故、この実施例は、P T M を防止するために V H 上の D G を D A に変異させた。潜在的な P T M 除去部位の配列を表 1 9 に列挙する。

【表 19 - 1】

表 19-1. 潜在的なPTM部位が除去された 286B4 のヒト化

名称	配列	配列番号
286B4 VH.V1 DG-DA	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISN N YYWNWIRQPPGKGLEWIG YITYDASNNYNPSLKNRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCARG GGQLRFDYWGQGTITVTVSS	259
286B4 VH.V2 DG-DA	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISN N YYWNWIRQPPGKGLEWIG YITYDASNNYNPSLKNRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCARG GGQLRFDYWGQGTITVTVSS	260
286B4 VH.V3 DG-DA	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISN N YYWNWIRQPPGKGLEW GYITYDASNNYNPSLKNRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCARG GGQLRFDYWGQGTITVTVSS	261

30

40

50

【表 19 - 2】

表 19-2: 潜在的なPTM部位が除去された 286B4 ヒト化抗体

VH	VL	286B4 hVL3	286B4 hVL5
286B4 VH.V1		Hu286B4-3	Hu286B4-5
286B4 VH.V1 DG-DA		Hu286B4-3-P1	Hu286B4-5-P1
286B4 VH.V2		Hu286B4-8	
286B4 VH.V2 DG-DA		Hu286B4-8-P1	
286B4 VH.V3			Hu286B4-15
286B4 VH.V3 DG-DA			Hu286B4-15-P1

10

【0223】

表面 5 T 4 に対する P T M 除去抗体の結合特性を評価するために、H u 2 8 6 B 4 - 3 - P 1、H u 2 8 6 B 4 - 5 - P 1、H u 2 8 6 B 4 - 8 - P 1、H u 2 8 6 B 4 - 1 5 - P 1 またはキメラ 2 8 6 B 4 の抗 5 T 4 部分を有する三重特異性抗体を、C H O K 1 - h u 5 T 4 細胞へのそれらの結合について F A C S により解析した。各ウェルにおいて総数 1×10^5 の細胞を、100 nM から出発して 4 倍段階希釈した抗体とともに 30 分間、4 でインキュベートした。F A C S 緩衝液による洗浄後、P E コンジュゲート抗ヒト I g G 抗体を各ウェルに添加し、4 で 30 分間、インキュベートした。P E の M F I を M A C S Q u a n t A n a l y z e r 1 6 により評価した。図 1 8 B に示すように、P T M 除去 2 8 6 B 4 断片を有する三重特異性抗体は、5 T 4 発現細胞に対してキメラ 2 8 6 B 4 断片を有するものより増強された結合能を示した。試験した三重特異性抗体間の唯一の違いは、抗 5 T 4 部分であった。

20

【0224】

(実施例 13)

ヒト化抗体 H u 1 4 G 1 2 - 2 8 の親和性成熟

H u 1 4 G 1 2 - 2 8 のヒト化抗体の親和性を増強するために、親和性成熟を行った。手短に述べると、H u 1 4 G 1 2 - 2 8 の C D R 領域に単点または 2 点飽和変異を含有する 4 つのファージライブラリーを構築した。C D R に特有の変異を有する 2 つの候補を、固体または液体パニングを用いる 1 ラウンドのスクリーニングにより得た。これらの候補の C D R を H u 1 4 G 1 2 - 2 8 フレームワークに移植して、さらなる結合および親和性検証のための抗体を生成した。

30

【0225】

フレームワークに移植された親和性成熟候補の可変領域のアミノ酸配列を下の表 2 0 に列挙する。

40

50

【表 20 - 1】

表 20-1. 親和性成熟抗体の変換領域の配列

名称	配列	配列番号
14G12 hVH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSITTAYMELSRLRSD DTAVYYCANGGAMDYWGQGTLVTVSS	197
14G12 hVL1-88#	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDATYFCGNNDNTL PWTFGGGKVEIK	262
14G12 hVH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSITTAYMELSRLRSD DTAVYYCANGGAMDYWGQGTLVTVSS	197
14G12 hVL1-108#	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDATYFCANDNTL PWTFGGGKVEIK	263

10

【表 20 - 2】

表 20-2. Hu14G12-28由来の親和性成熟抗体

VH	VL	14G12-hVL1-88#	14G12-hVL1-108#
14G12-hVH2		Hu14G12-28-88#	Hu14G12-28-108#

20

【表 20 - 3】

表 20-3. Hu14G12-28-88#のCDR配列

Hu14G12-28-88#	配列	配列番号
CDRH1	SSWMN	41
CDRH2	RIYREDGHTNYNGKFK G	42
CDRH3	GGAMDY	43
CDRL1	RASQDISNYLN	44
CDRL2	YTSRLHS	45
CDRL3	GNNDNTLPWT	264

30

【表 20 - 4】

表 20-4. Hu14G12-28-108#のCDR配列

Hu14G12-28-108#	配列	配列番号
CDRH1	SSWMN	41
CDRH2	RIYREDGHTNYNGKFK G	42
CDRH3	GGAMDY	43
CDRL1	RASQDISNYLN	44
CDRL2	YTSRLHS	45
CDRL3	ANDNTLPWT	265

40

50

13.1 5T4へのELISA結合

【0226】

ヒト5T4に対する親和性成熟抗体の結合活性を評価するために、Hu14G12-28をHu14G12-28-88#およびHu14G12-28-108#とともにELISA試験に付した。

【0227】

手短に述べると、マイクロタイタープレートを、PBS中の2µg/mlのヒト5T4-Hisタンパク質、30µl/ウェルで、4で一晚、コーティングし、次いで、5%PBS/ミルクでブロッキングした。抗体の段階希釈物を各ウェルに添加し、1時間、室温でインキュベートした。プレートをPBS/Tween(登録商標)で洗浄し、次いで、ヤギ抗ヒトIgG-HRPとともに50分間、室温でインキュベートした。洗浄後、プレートをTMB基質で発色させ、分光光度計によりOD 450nmで解析した。図19に示すように、親和性成熟抗体は、親Hu14G12-28抗体より高い作用強度でヒト5T4に結合した。

10

13.2 5T4への細胞ベースの結合

[0001] 表面5T4に対する親和性成熟抗体の結合特性を評価するために、試験した抗体をCHOK1-hu5T4、HEK293-hu5T4またはMCF-7細胞へのそれらの結合についてFACSにより解析した。各ウェルにおいて総数1x10⁵の細胞を、133nMまたは100nMから出発して4倍または5倍段階希釈した抗体とともに60分間、4でインキュベートした。FACS緩衝液による洗浄後、PEコンジュゲート抗ヒトIgG抗体を各ウェルに添加し、4で30分間、インキュベートした。PEのMFIをMACSQuant Analyzer 16により評価した。図20A~B(CHOK1-hu5T4細胞)、図20C~D(HEK293-hu5T4細胞)および図20E(MCF-7細胞)に示すように、親和性成熟抗体は、5T4発現細胞に対して親Hu14G12-28抗体より増強された結合能を示した。

20

13.3 5T4に対する結合親和性

【0228】

組換え5T4タンパク質(ヒト5T4-hisタグ)に対する試験した抗体の結合親和性を、捕捉法を使用してBiacoreで試験した。抗体を、プロテインAチップを使用して捕捉した。ヒト5T4-hisタグタンパク質の段階希釈物を、捕捉された抗体上に3分間、30µl/分の流速で注入した。抗原を、300秒間、解離させた。全ての実験をBiacore T200で行った。データ解析は、Biacore T200評価ソフトウェアを使用して行った。

30

【0229】

下の表21の結果で示されるとおり、親和性成熟抗体Hu14G12-28-88#およびHu14G12-28-108#は、親Hu14G12-28抗体と比較してヒト5T4タンパク質に対する結合親和性をそれぞれ9.45倍および7.41倍、有意に増加させた。このことから、これらの親和性成熟抗体は、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)にとっておよび二重特異性抗体にとって理想的な抗5T4抗体となる。

【表21】

40

表 21. Biacoreにより測定した親和性

Abs	ヒト5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Hu14G12-28	1.80 x 10 ⁵	7.38 x 10 ⁻⁴	4.09 x 10 ⁻⁹
Hu14G12-28-88#	1.91 x 10 ⁵	8.28 x 10 ⁻⁵	4.33 x 10 ⁻¹⁰
Hu14G12-28-108#	1.83 x 10 ⁵	1.01 x 10 ⁻⁴	5.52 x 10 ⁻¹⁰

* * *

【0230】

本開示は、記載した特定の実施形態によって範囲が限定されることはなく、これらの実

50

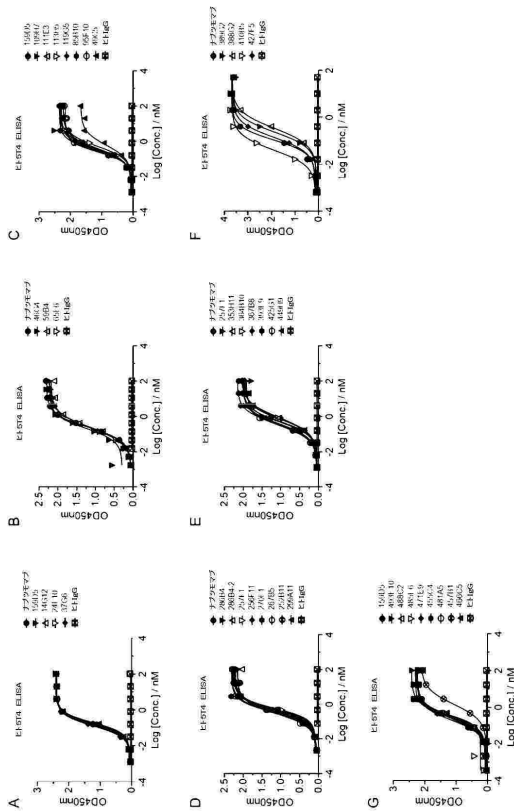
施形態は、本開示の個々の態様の単一の実例として意図したものであり、機能的に等価であるあらゆる組成物または方法が本開示の範囲内である。本開示の主旨および範囲を逸脱することなく、本開示の方法および組成物に様々な改変および変形を加えることができることは、当業者には明らかであろう。したがって、本開示は、本開示の改変形態および変形形態を、それらが添付の請求項およびそれらの均等物の範囲内に入ることを条件に、包含する。

【 0 2 3 1 】

本明細書で言及した全ての公表文献および特許出願は、個々の公表文献または特許出願各々が参照により組み込まれると具体的かつ個別に示された場合と同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【 図面 】

【 図 1 】



【 図 3 】

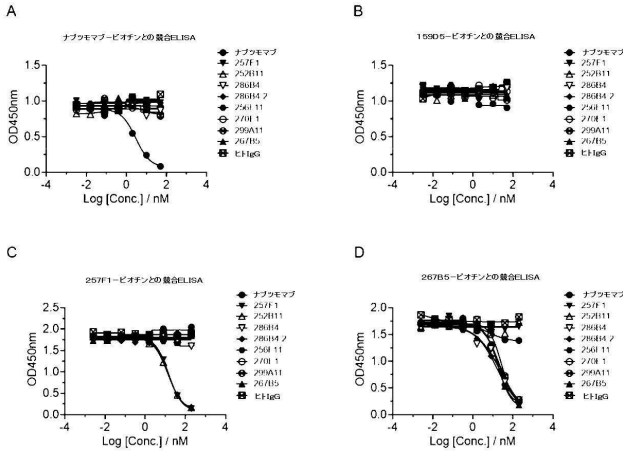


FIG. 3

【 図 4 】

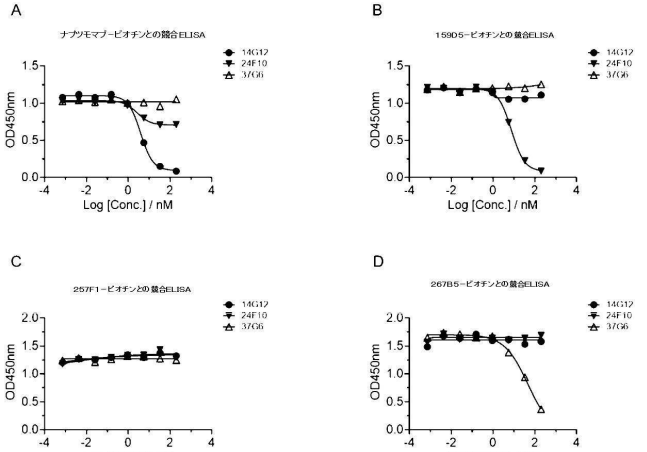


FIG. 4

10

【 図 5 】

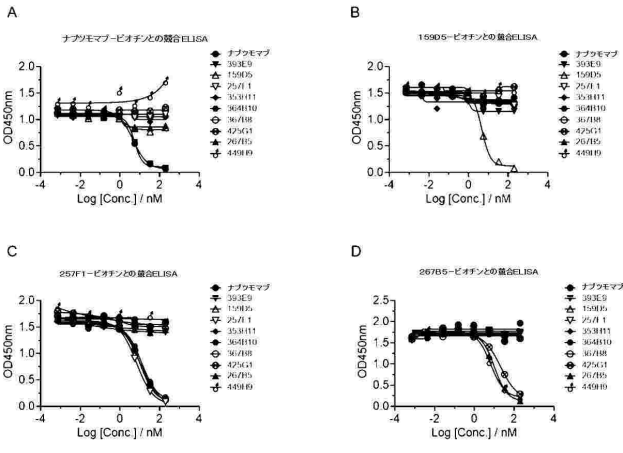


FIG. 5

【 図 6 】

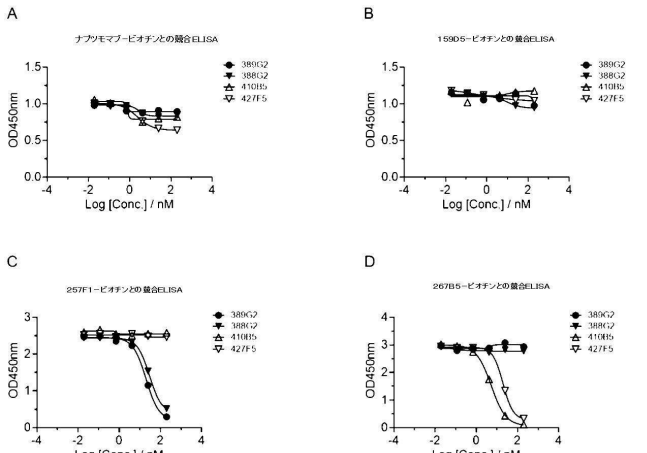


FIG. 6

20

30

40

50

【 図 7 】

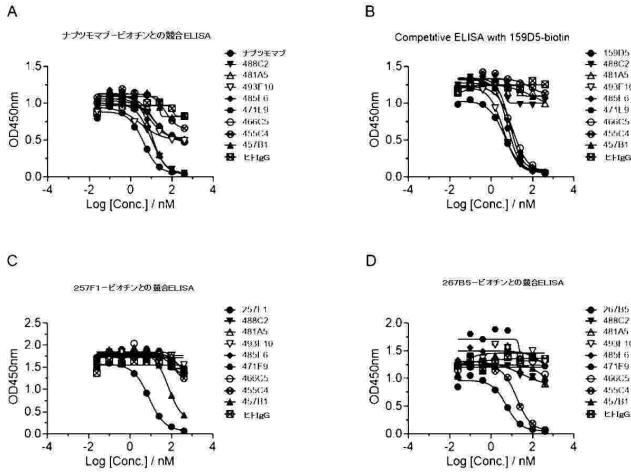


FIG. 7

【 図 8 】

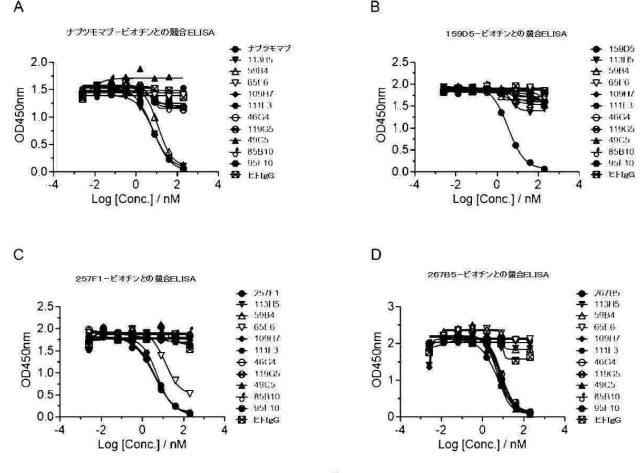


FIG. 8

10

20

30

40

50

【 図 9 - 1 】

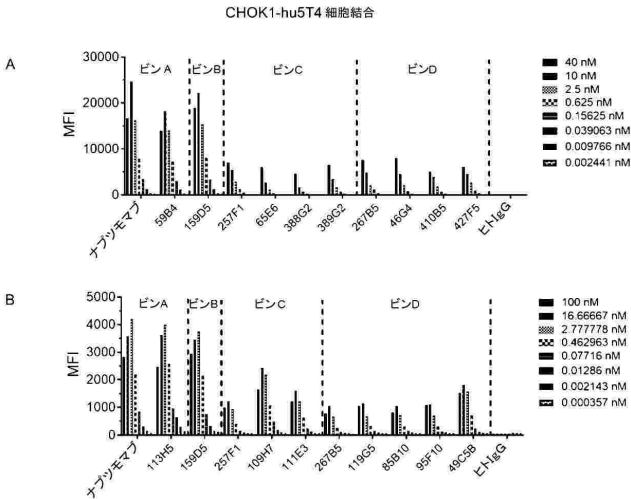


FIG. 9

【 図 9 - 2 】

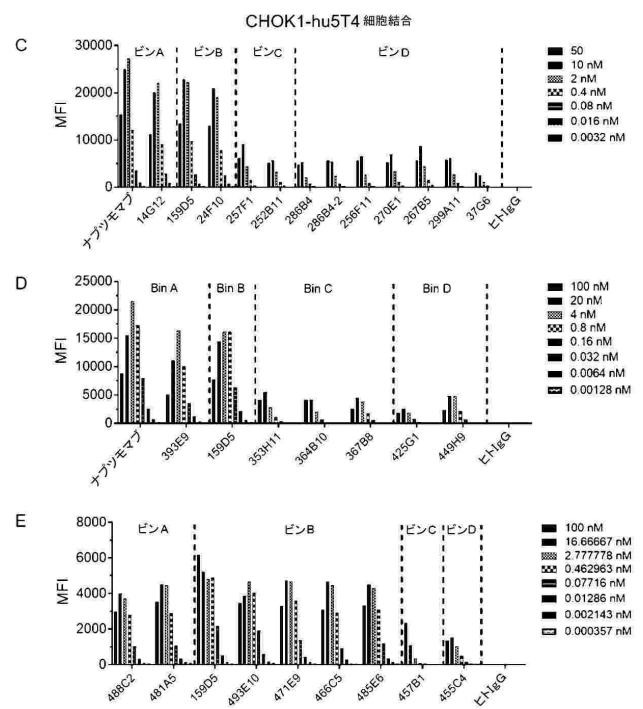


FIG. 9 (続き)

50

【 図 1 0 】

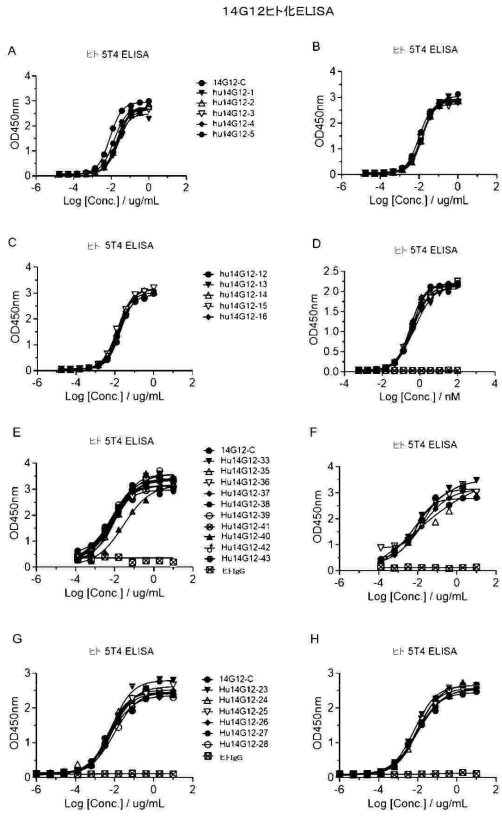


FIG. 10

【 図 1 1 - 1 】

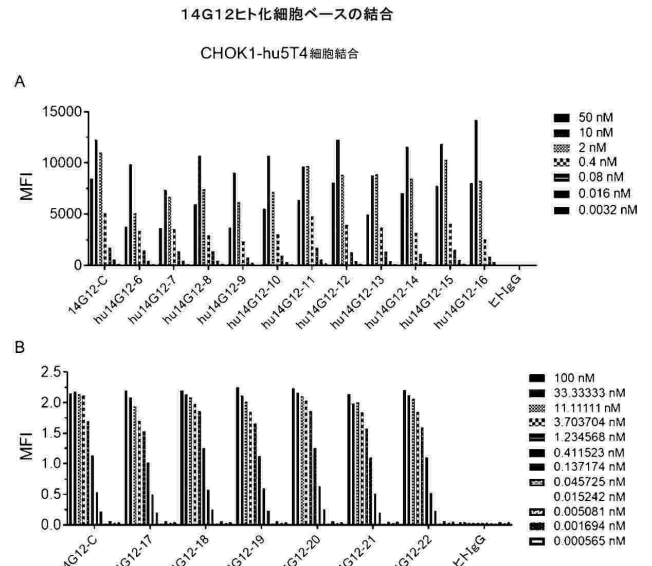


FIG. 11

10

20

【 図 1 1 - 2 】

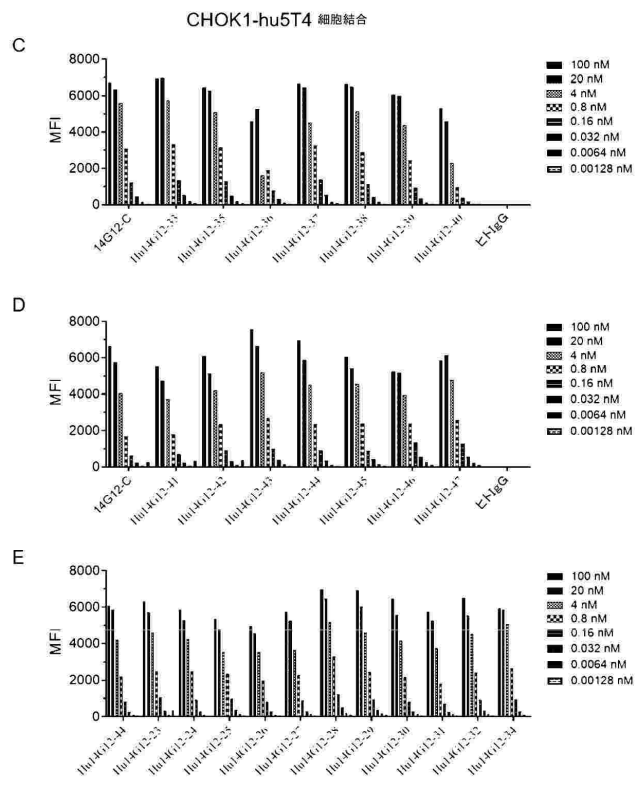


FIG. 11 (続き)

【 図 1 2 】

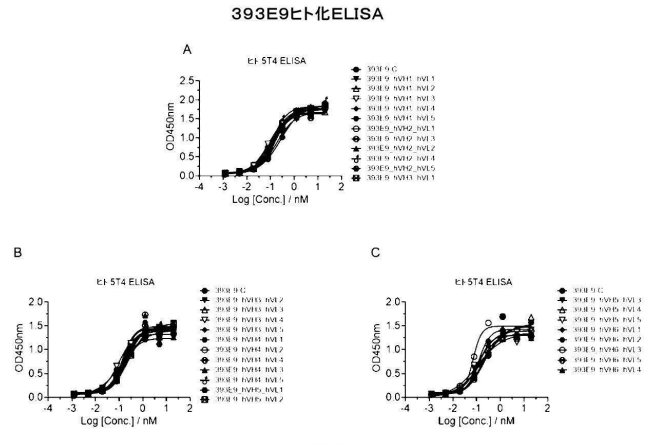


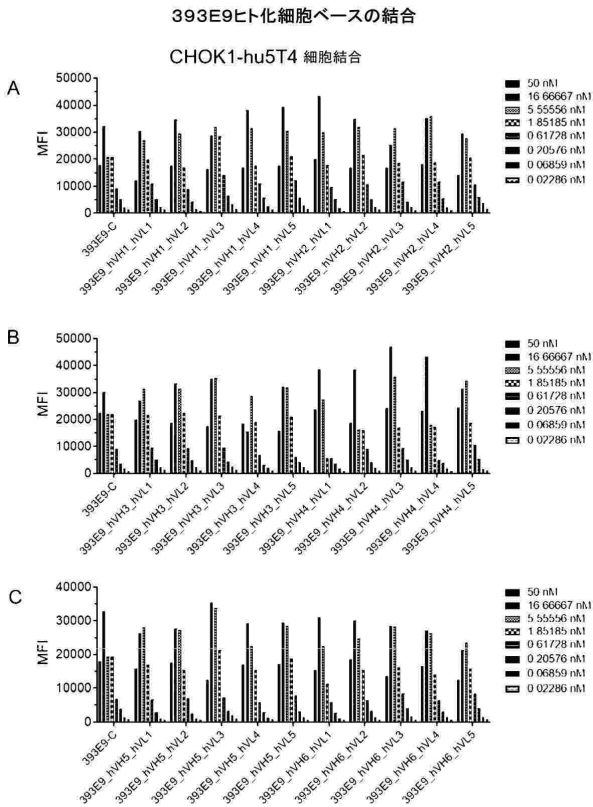
FIG. 12

30

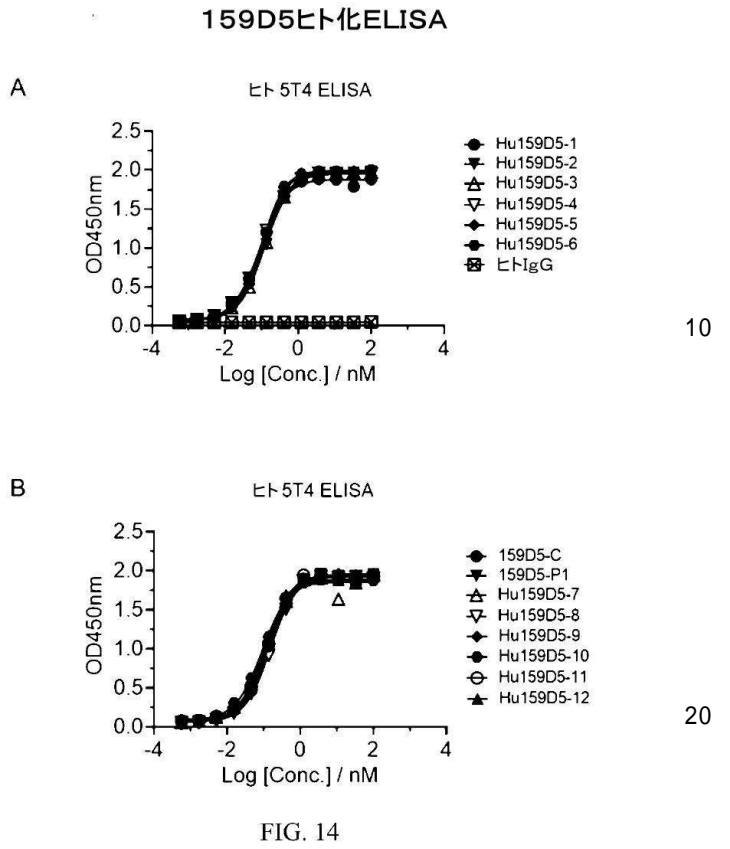
40

50

【 図 1 3 】



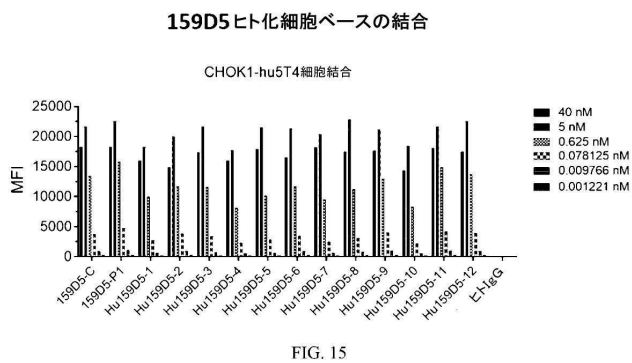
【 図 1 4 】



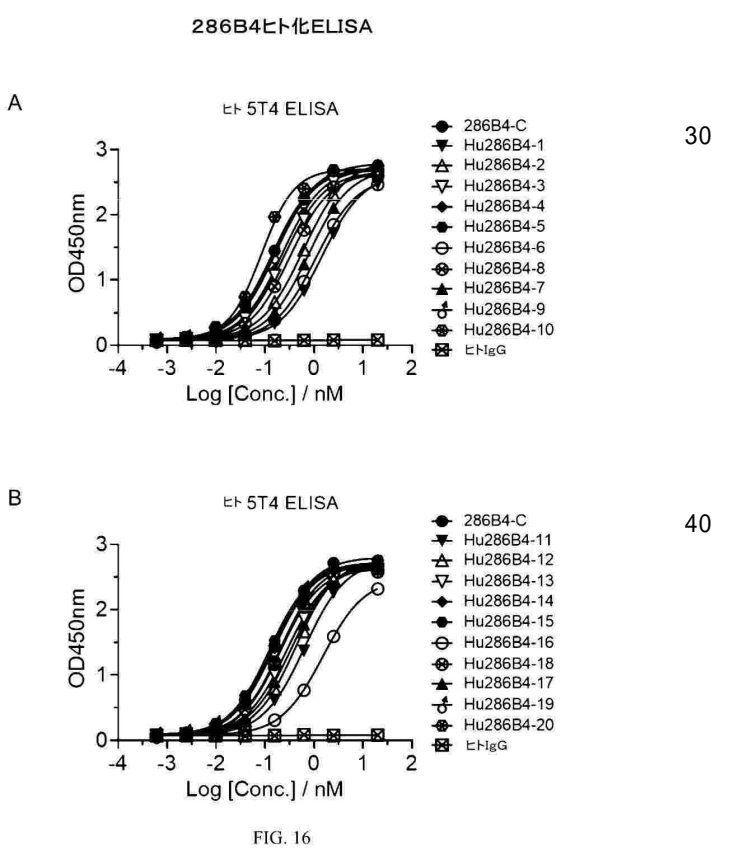
10

20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



30

40

50

【 図 17 】

286B4ヒト化細胞ベースの結合

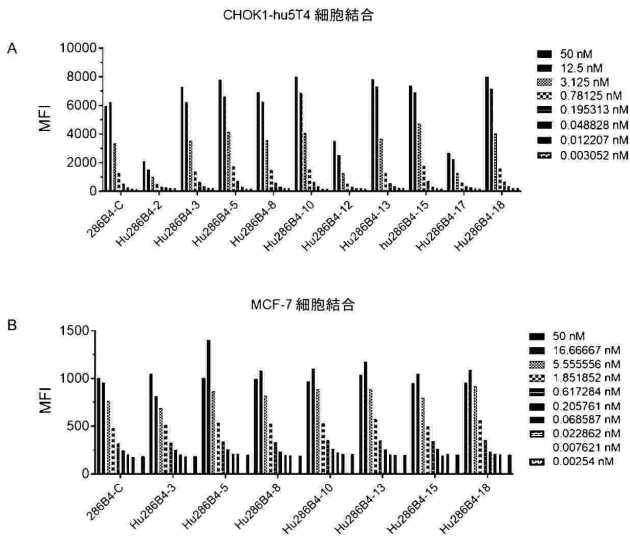


FIG. 17

【 図 18 】

PTM除去細胞ベースの結合

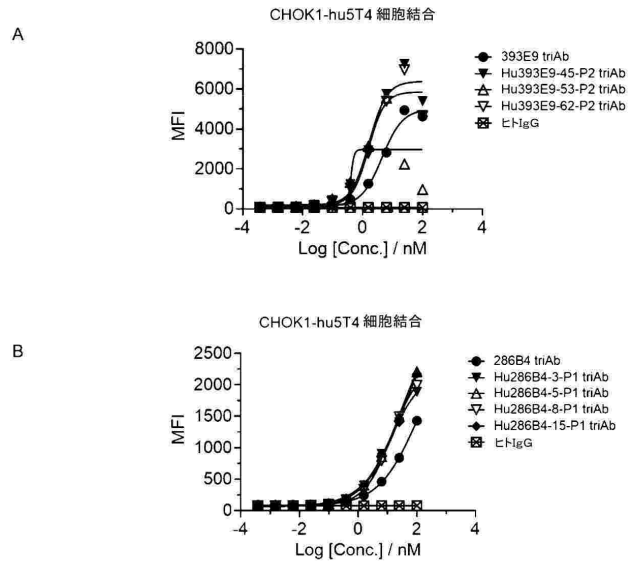


FIG. 18

10

20

【 図 19 】

ヒト5T4 ELISA

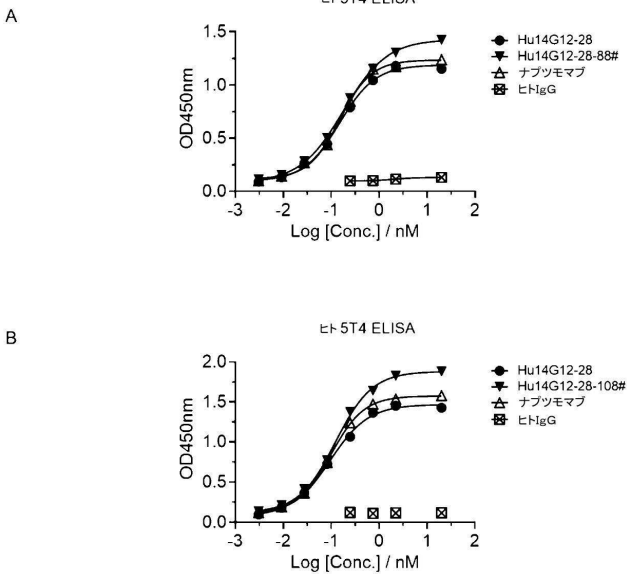


FIG. 19

【 図 20 】

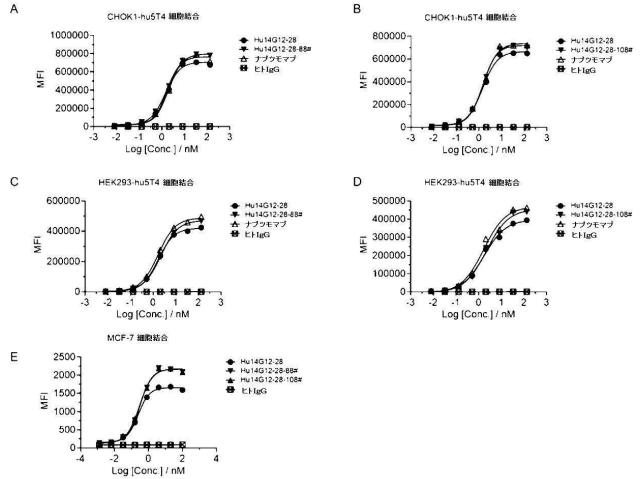


FIG. 20

30

40

【 配列表 】

2025506248000001.xml

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/077493
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K16/32(2006.01);C07K16/30(2006.01);C07K16/46(2006.01);C07K19/00(2006.01);C12N15/02(2006.01);C12N15/02(2006.01);A61K39/395(2006.01);A61P35/00(2006.01)		
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) IPC: C07K C12N A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNKI, CNTXT, DWPL, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, ISI web of Knowledge, PubMed, Genbank, EMBL, Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent and searched items: 5T4, rophoblast glycoprotein, TPBG, WAIF1, antibody, SEQ ID NOs: 1, 2, 41-53, 181-214, 262-265		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006088522 A1 (WYETH CORP) 27 April 2006 (2006-04-27) see claims and examples	1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 6-9 and 24
A	US 2014081005 A1 (WYETH LLC) 20 March 2014 (2014-03-20) see claims and examples	1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 6-9 and 24
A	US 2014308302 A1 (WYETH LLC) 16 October 2014 (2014-10-16) see claims and examples	1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 6-9 and 24
A	US 2019194346 A1 (SYNTHON BIOPHARMACEUTICALS BV) 27 June 2019 (2019-06-27) see claims and examples	1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 6-9 and 24
A	US 2019374651 A1 (ZHEJIANG ZOVA BIOTHERAPEUTICS INC) 12 December 2019 (2019-12-12) see claims and examples	1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 6-9 and 24
A	WO 2014137931 A1 (IMAGINAB INC) 12 September 2014 (2014-09-12) see claims and examples	1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 6-9 and 24
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "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 24 April 2023		Date of mailing of the international search report 28 May 2023
Name and mailing address of the ISA/CN CHINA NATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY ADMINISTRATION 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China		Authorized officer WANG,XiangYu Telephone No. (+86) 010-62089318

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/077493

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.
- b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

10

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/077493

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 32
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(iv) PCT- Method for treatment of the human or animal body.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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:

Invention 1: claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 6-9 and 24

An antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to 5T4, comprising SEQ ID NOs: 1, 181-184, 189-192, 195-204, 197 (VH), 2, 185-188, 193-194, 205-214, 262-263 (VL), 41-53, 264, 265 (CDRs), and corresponding antibody-drugs, multispecific antibody, CARs, polynucleotides, cells, compositions and use for treating cancer.

Inventions 2-20 are equivalent to invention 1 insofar as the antibody amino acids comprising:

SEQ ID NOs: 3, 215-221, 248-256 (VH), 4, 222-226 (VL), 54-63, 266, 267 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 2 and 3)

SEQ ID NOs: 5 (VH), 6 (VL), 64-69 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

SEQ ID NOs: 7, 227-229, 257 (VH), 8, 230-235, 258 (VL), 70-76 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 10 and 11)

SEQ ID NOs: 9 (VH), 10 (VL), 77-82 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

SEQ ID NOs: 11 (VH), 12 (VL), 83-88 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

SEQ ID NOs: 13 (VH), 14 (VL), 89-94 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

SEQ ID NOs: 15 (VH), 16 (VL), 95-104 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 12 and 13)

SEQ ID NOs: 17 (VH), 18 (VL), 105-110 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

SEQ ID NOs: 19 (VH), 20 (VL), 111-116 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

SEQ ID NOs: 21 (VH), 22 (VL), 117-122 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 14 and 15)

SEQ ID NOs: 23, 236-241, 259-261 (VH), 24, 242-247 (VL), 123-128 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 4 and 5)

SEQ ID NOs: 25 (VH), 26 (VL), 130-135 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

SEQ ID NOs: 27 (VH), 28 (VL), 136-141 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

SEQ ID NOs: 29 (VH), 30 (VL), 142-147 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

SEQ ID NOs: 31 (VH), 32 (VL), 148-153 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

SEQ ID NOs: 33 (VH), 34 (VL), 154-159 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 16 and 17)

SEQ ID NOs: 35 (VH), 36 (VL), 160-166 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/077493

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

SEQ ID NOs: 37 (VH), 38 (VL), 167-173 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

SEQ ID NOs: 39 (VH), 40 (VL), 174-179 (CDRs) (claims 1, 18-23, 25-31, 33 (partially))

The common or corresponding technical feature among the 20 inventions lies in that the antibodies bind to human and monkey 5T4. However, the technical feature has been disclosed by the prior art, such as WO2014137931A1 20140912 (see claim 1), US2014308302A1 20141016 (see claims 1-25). Therefore, the same or corresponding technical feature of claims 1-31 and 33 does not make a contribution over the prior art and can not be considered as a special technical feature within the meaning of Rule 13.2 PCT. The application, hence does not meet the requirements of unity of invention as defined in Rule 13.1 PCT.

10

- 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.: **1, 18-23, 25-31, 33 (partially), 6-9 and 24 (SEQ ID NOs: 1, 2, 41-53, 181-214, 262-265)**

20

- 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.

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/077493

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)	
US	2006088522	A1	27 April 2006	RU	2007108716	A	20 October 2008	
				ECSP	077310	A	26 April 2007	
				US	2010021483	A1	28 January 2010	10
				NO	20071436	L	08 June 2007	
				GT	200500255	A	10 April 2006	
				ZA	200702793	B	29 September 2010	
				AU	2005285152	A1	23 March 2006	
				TW	200616662	A	01 June 2006	
				BRPI	0515113	A	01 July 2008	
				WO	2006031653	A2	23 March 2006	
				WO	2006031653	A3	04 May 2006	
				US	2010173382	A1	08 July 2010	
				AR	050642	A1	08 November 2006	
				PE	20100251	A1	10 April 2010	
				IL	181625	A0	04 July 2007	
				PE	20060817	A1	10 October 2006	20
				MX	2007002826	A	27 April 2007	
				JP	2008512485	A	24 April 2008	
				CR	8958	A	04 October 2007	
				PA	8645301	A1	03 July 2006	
SV	2007002227	A	20 March 2007					
CA	2578131	A1	23 March 2006					
EP	1786469	A2	23 May 2007					
KR	20070050956	A	16 May 2007					
US	2014081005	A1	20 March 2014	AU	2016203839	A1	23 June 2016	
				NZ	615308	A	30 October 2015	
				SG	193324	A1	30 October 2013	
				ES	2596194	T3	05 January 2017	
				JP	2014516508	A	17 July 2014	30
				JP	5925875	B2	25 May 2016	
				EP	2694111	A1	12 February 2014	
				EP	2694111	B1	10 August 2016	
				MY	170719	A	27 August 2019	
				HK	1193052	A1	12 September 2014	
				US	2013011418	A1	10 January 2013	
				US	8586049	B2	19 November 2013	
				CO	6771458	A2	15 October 2013	
				PT	2694111	T	20 October 2016	
				SG	10201605401	WA	30 August 2016	
				SI	2694111	T1	28 October 2016	
				MX	2013011353	A	16 December 2013	
				MX	342860	B	14 October 2016	40
				KR	20130125833	A	19 November 2013	
				KR	101529810	B1	26 June 2015	
US	2012251558	A1	04 October 2012					
US	8309094	B2	13 November 2012					
RU	2013142004	A	10 May 2015					
RU	2624141	C2	30 June 2017					
SA	3948	B1	18 March 2015					
JP	2016172747	A	29 September 2016					

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/077493

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 6333882 B2	30 May 2018
		US 2017319711 A1	09 November 2017
		BR 112013025186 A2	11 September 2018
		HK 1221153 A1	26 May 2017
		TW 201534624 A	16 September 2015
		TWI 549968 B	21 September 2016
		TW 201302795 A	16 January 2013
		TWI 471334 B	01 February 2015
		AU 2012235817 A1	10 October 2013
		AU 2012235817 B2	10 March 2016
		CA 2830338 A1	04 October 2012
		CA 2830338 C	15 November 2016
		KR 20150018903 A	24 February 2015
		KR 101783529 B1	29 September 2017
		AU 2017272321 A1	04 January 2018
		WO 2012131527 A1	04 October 2012
		JP 2018140997 A	13 September 2018
		PL 2694111 T3	31 January 2017
		DK 2694111 T3	10 October 2016
		AR 085747 A1	23 October 2013
		PE 20140573 A1	14 May 2014
		EP 3130356 A1	15 February 2017
		HUE 031017 T2	28 June 2017
		IL 228404 A0	31 December 2013
US 2014308302 A1	16 October 2014	RU 2008137074 A	20 April 2010
		SG 170091 A1	29 April 2011
		GT 200800181 A	25 May 2010
		US 2012064600 A1	15 March 2012
		US 8759495 B2	24 June 2014
		NO 20083891 L	03 December 2008
		SA 2759 B1	03 October 2011
		TW 200804424 A	16 January 2008
		TWI 409277 B	21 September 2013
		MX 2008011492 A	22 September 2008
		EP 1994055 A2	26 November 2008
		EP 1994055 B1	02 July 2014
		ES 2498517 T3	24 September 2014
		MY 148763 A	31 May 2013
		US 2016185859 A1	30 June 2016
		US 9902771 B2	27 February 2018
		NZ 596295 A	25 January 2013
		AU 2007226696 A1	20 September 2007
		AU 2007226696 B2	29 August 2013
		AU 2007226696 C1	04 February 2016
		WO 2007106744 A2	20 September 2007
		WO 2007106744 A3	29 November 2007
		WO 2007106744 A8	02 October 2008
		BRPI 0708771 A2	14 June 2011
		BRPI 0708771 B1	22 October 2019
		BRPI 0708771 B8	25 May 2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/077493

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 2018162937 A1	14 June 2018
		PE 20080119 A1	04 March 2008
		DK 2368914 T3	04 March 2019
		AR 059809 A1	30 April 2008
		ZA 200808075 B	28 March 2012
		EP 3539989 A1	18 September 2019
		JP 2009529578 A	20 August 2009
		JP 5523824 B2	18 June 2014
		PT 1994055 E	15 September 2014
		ECSP 088733 A	31 October 2008
		CA 2645097 A1	20 September 2007
		CA 2645097 C	17 September 2019
		CR 10273 A	26 November 2008
		SI 1994055 T1	29 August 2014
		PA 8718601 A1	15 May 2009
		US 2007231333 A1	04 October 2007
		US 8044178 B2	25 October 2011
		EP 2368914 A1	28 September 2011
		EP 2368914 B1	02 January 2019
		IL 193986 A0	01 August 2011
		IL 193986 A	31 August 2015
		KR 20080106345 A	04 December 2008
		KR 101264216 B1	31 May 2013
		ES 2712942 T3	16 May 2019
		NZ 571208 A	22 December 2011
		HK 1121473 A1	24 April 2009
		TW 201335189 A	01 September 2013
		TWI 421257 B	01 January 2014
		DK 1994055 T3	25 August 2014
		PL 1994055 T3	27 February 2015
		KR 20130018980 A	25 February 2013
		KR 101443752 B1	26 September 2014
		IL 240245 A0	24 September 2015
		IL 240245 A	29 May 2017
US	2019194346 A1	27 June 2019	
		BR 112018010394 A2	21 November 2018
		BR 112018010394 A8	26 February 2019
		CL 2018001334 A1	21 December 2018
		ZA 201802584 B	21 December 2022
		HUE 055482 T2	29 November 2021
		LT 3380122 T	11 October 2021
		CA 3005294 A1	01 June 2017
		ES 2889398 T3	12 January 2022
		KR 20180083425 A	20 July 2018
		HRP 20211280 T1	12 November 2021
		EP 3380122 A1	03 October 2018
		EP 3380122 B1	02 June 2021
		SG 11201803692 PA	28 June 2018
		RU 2018122629 A	26 December 2019
		RU 2018122629 A3	27 April 2020
		RU 2736720 C2	19 November 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/077493

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)	
					US	11008400	B2	18 May 2021	
					TW	201731879	A	16 September 2017	
					TWI	744261	B	01 November 2021	10
					AU	2016358854	A1	10 May 2018	
					AU	2016358854	B2	02 February 2023	
					PL	3380122	T3	13 December 2021	
					MY	187325	A	22 September 2021	
					DK	3380122	T3	05 July 2021	
					US	2021317231	A1	14 October 2021	
					US	11584801	B2	21 February 2023	
					WO	2017089447	A1	01 June 2017	
					JP	2018538368	A	27 December 2018	
					JP	6914956	B2	04 August 2021	
					MX	2018006372	A	05 September 2018	
US	2019374651	A1	12 December 2019		EP	3599249	A1	29 January 2020	
					EP	3599249	A4	21 April 2021	20
					JP	2020514302	A	21 May 2020	
					JP	6944526	B2	06 October 2021	
					WO	2018127175	A1	12 July 2018	
WO	2014137931	A1	12 September 2014		None				

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 K 47/68	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,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,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

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 リウ, ファン

中華人民共和国 2 0 1 1 1 2 シャンハイ, ミンハン ディストリクト, プジャン, リアンヘン
ロード ナンバー 6 5 1, ビルディング 4, フロア 3

(72)発明者 ゴン, ウェンツー

中華人民共和国 2 0 1 1 1 2 シャンハイ, ミンハン ディストリクト, プジャン, リアンヘン
ロード ナンバー 6 5 1, ビルディング 4, フロア 3

(72)発明者 ツァイ, ジジャン

中華人民共和国 2 0 1 1 1 2 シャンハイ, ミンハン ディストリクト, プジャン, リアンヘン
ロード ナンバー 6 5 1, ビルディング 4, フロア 3

(72)発明者 ヤン, リウ

中華人民共和国 2 0 1 1 1 2 シャンハイ, ミンハン ディストリクト, プジャン, リアンヘン
ロード ナンバー 6 5 1, ビルディング 4, フロア 3

(72)発明者 ガオ, シャン

中華人民共和国 2 0 1 1 1 2 シャンハイ, ミンハン ディストリクト, プジャン, リアンヘン
ロード ナンバー 6 5 1, ビルディング 4, フロア 3

(72)発明者 ジアン, ウェンチン

中華人民共和国 2 0 1 1 1 2 シャンハイ, ミンハン ディストリクト, プジャン, リアンヘン
ロード ナンバー 6 5 1, ビルディング 4, フロア 3

(72)発明者 ファン, レイ

中華人民共和国 2 0 1 1 1 2 シャンハイ, ミンハン ディストリクト, プジャン, リアンヘン
ロード ナンバー 6 5 1, ビルディング 4, フロア 3

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC15 CC24 DA01

4B065 AA91X AA91Y AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08 BA21 CA24
CA25 CA44

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC27 EE41 EE59
 4C085 AA14 AA26 BB01 BB41 BB43 BB50 CC02 CC31 DD62 EE01
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA72 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74