(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7678769号
(P7678769)

(45)発行日　令和7年5月16日(2025.5.16)

(24)登録日　令和7年5月8日(2025.5.8)

(51)国際特許分類		FI		
C07K 16/28 (2006.01)		C07K	16/28	ZNA
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	N
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00	
A61P 13/08 (2006.01)		A61P	13/08	
A61K 47/68 (2017.01)		A61K	47/68	

請求項の数　20　（全68頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-578269(P2021-578269)
(86)(22)出願日　令和2年7月2日(2020.7.2)
(65)公表番号　特表2022-540385(P2022-540385A)
(43)公表日　令和4年9月15日(2022.9.15)
(86)国際出願番号　PCT/AU2020/050690
(87)国際公開番号　WO2021/000018
(87)国際公開日　令和3年1月7日(2021.1.7)
審査請求日　令和5年6月30日(2023.6.30)
(31)優先権主張番号　2019902344
(32)優先日　令和1年7月2日(2019.7.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
オーストラリア(AU)
前置審査

(73)特許権者　522003486
テリックス ファーマシューティカルズ（イノベーションズ） ピーティーワイ リミテッド
オーストラリア国 ３０５１ ヴィクトリア州 ノース メルボルン、フレミントン ロード ５５、レベル ４
(74)代理人　100136629
弁理士　鎌田 光宜
(74)代理人　100080791
弁理士　高島 一
(74)代理人　100125070
弁理士　土井 京子
(74)代理人　100121212
弁理士　田村 弥栄子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　新生児ＦＣ受容体に対する低下した親和性を有する、ＰＳＭＡに結合するための抗体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
クラスＩｇＧの野生型抗体と比較して低下したＦｃＲｎ結合親和性を有する抗体であって、
ＥＵ番号付けによるＨｉｓ３１０Ａｌａ及びＨｉｓ４３５Ｇｌｎのアミノ酸置換を含む、重鎖定常領域
を含み、
前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）に特異的に結合し、
抗原結合ドメインが、
（ｉ）配列番号１に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号２に示される配列を含むＣＤＲ２、配列番号３又は１９に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ；及び
（ｉｉ）配列番号３３に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号３４に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３５に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＬ；を含む、抗体。
【請求項２】
前記抗原結合ドメインが、さらに少なくとも下記の一つを含む、請求項１に記載の抗体、
（ｉ）配列番号２５に示される配列と少なくとも８０％同一の配列を含むフレームワーク領域（ＦＲ）１、配列番号２６に示される配列と少なくとも８０％同一の配列を含むＦＲ２、配列番号２７に示される配列と少なくとも８０％同一の配列を含むＦＲ３及び配列番号２８に示される配列と少なくとも８０％同一の配列を含むＦＲ４を含むＶＨ；
（ｉｉ）配列番号４１に示される配列と少なくとも８０％同一の配列を含むＦＲ１、配

列番号４２に示される配列と少なくとも８０％同一の配列を含むＦＲ２、及び配列番号４３に示される配列と少なくとも８０％同一の配列を含むＦＲ３及び配列番号４４に示される配列と少なくとも８０％同一の配列を含むＦＲ４を含むＶＬ；
（ｉｉｉ）配列番号２５に示される配列を含むＦＲ１、配列番号２６に示される配列を含むＦＲ２、配列番号２７に示される配列を含むＦＲ３及び配列番号２８に示される配列を含むＦＲ４を含むＶＨ；
（ｉｖ）配列番号４１に示される配列を含むＦＲ１、配列番号４２に示される配列を含むＦＲ２、配列番号４３に示される配列を含むＦＲ３及び配列番号４４に示される配列を含むＦＲ４を含むＶＬ；又は
（ｖ）配列番号２５に示される配列を含むＦＲ１、配列番号２６に示される配列を含むＦＲ２、配列番号２７に示される配列を含むＦＲ３及び配列番号２８に示される配列を含むＦＲ４を含むＶＨ及び、配列番号４１に示される配列を含むＦＲ１、配列番号４２に示される配列を含むＦＲ２、及び配列番号４３に示される配列を含むＦＲ３及び配列番号４４に示される配列を含むＦＲ４を含むＶＬ。

【請求項３】
配列番号４又は２０に示される配列を含むＶＨ及び配列番号３６に示される配列を含むＶＬを含む、抗原結合ドメインを含む、請求項１又は２に記載の抗体。

【請求項４】
前記抗体が、１つ以上のＦｃガンマ受容体に対する前記抗体の親和性を、クラスＩｇＧの野生型抗体と比較して低減させる１つ以上のアミノ酸置換
を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項５】
前記抗体が、前記抗体におけるＣＨ１－ＣＨ２ヒンジ領域の安定性を、クラスＩｇＧの野生型抗体と比較して増加させる１つ以上のアミノ酸置換
を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項６】
抗体の重鎖定常領域が、ＥＵ番号付けによるＳｅｒ２２８Ｐｒｏ及びＬｅｕ２３５Ｇｌｕのアミノ酸置換を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項７】
抗体の重鎖定常領域が配列番号５０又は配列番号５１に示されるアミノ酸配列を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項８】
前記抗体が、
（ｉ）配列番号５３及び配列番号５７、
（ｉｉ）配列番号５４及び配列番号５７、
（ｉｉｉ）配列番号５５及び配列番号５７、又は
（ｉｖ）配列番号５６及び配列番号５７
で表されるアミノ酸配列を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項９】
前記抗体に結合した非タンパク質剤をさらに含み、前記非タンパク質剤は治療剤又は診断剤を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項１０】
治療剤が細胞毒である、請求項９に記載の抗体。

【請求項１１】
治療剤又は診断剤が、放射性元素である、請求項９に記載の抗体。

【請求項１２】
前記非タンパク質剤が、放射性同位元素である、請求項１０に記載の抗体。

【請求項１３】
前記放射性同位元素が、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、ビスマス－２１２及びビスマス－２１３（^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ）、銅－６

４及び銅－６７（^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ）、ガリウム－６７及びガリウム－６８（^{67}Ｇａ及び^{68}Ｇａ）、インジウム－１１１（^{111}Ｉｎ）、ヨウ素－１２３、－１２４、－１２５又は－１３１（^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ）、ルテチウム－１７７（^{177}Ｌｕ）、ラジウム－２２３（^{223}Ｒａ）、サマリウム－１５３（^{153}Ｓｍ）、スカンジウム－４４及びスカンジウム－４７（^{44}Ｓｃ、^{47}Ｓｃ）、ストロンチウム－９０（^{90}Ｓｒ）、テクネチウム－９９（^{99m}Ｔｃ）、イットリウム－８６及びイットリウム－９０（^{86}Ｙ、^{90}Ｙ）並びにジルコニウム－８９（^{89}Ｚｒ）からなる群から選択される放射性同位元素である、請求項１２に記載の抗体。

【請求項１４】

前記放射性同位元素は、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、ルテチウム－１７７（^{177}Ｌｕ）及びジルコニウム－８９（^{89}Ｚｒ）から選択される、請求項１３に記載の抗体。

【請求項１５】

請求項１～１４のいずれか一項に記載の抗体と薬学的に許容され得る賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項１６】

請求項１～１４のいずれか一項に記載の抗体を含む、それを必要とする対象における前立腺癌の治療における使用のための医薬組成物。

【請求項１７】

請求項１～１４のいずれか一項に記載の抗体を含む、対象における疾患、障害又は感染症の診断、監視又は予測における使用のための医薬組成物。

【請求項１８】

放射標識にコンジュゲートされた、請求項１７に記載の医薬組成物。

【請求項１９】

前記放射標識は、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、ビスマス－２１２及びビスマス－２１３（^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ）、銅－６４及び銅－６７（^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ）、ガリウム－６７及びガリウム－６８（^{67}Ｇａ及び^{68}Ｇａ）、インジウム－１１１（^{111}Ｉｎ）、ヨウ素－１２３、－１２４、－１２５又は－１３１（^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ）、ルテチウム－１７７（^{177}Ｌｕ）、ラジウム－２２３（^{223}Ｒａ）、サマリウム－１５３（^{153}Ｓｍ）、スカンジウム－４４及びスカンジウム－４７（^{44}Ｓｃ、^{47}Ｓｃ）、ストロンチウム－９０（^{90}Ｓｒ）、テクネチウム－９９（^{99m}Ｔｃ）、イットリウム－８６及びイットリウム－９０（^{86}Ｙ、^{90}Ｙ）並びにジルコニウム－８９（^{89}Ｚｒ）からなる群から選択される、請求項１８に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項２０】

前記放射標識は、ガリウム－６７及びガリウム－６８（^{67}Ｇａ及び^{68}Ｇａ）、ヨウ素－１２４（^{124}Ｉ）並びにジルコニウム－８９（^{89}Ｚｒ）から選択される、請求項１９に記載の使用のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、放射免疫療法において使用するための、低下した血清半減期を有する抗体、組成物及び抗体、特に放射性同位元素にコンジュゲートされた抗体を生成するための方法に関する。

【０００２】

関連出願

本出願は、オーストラリア仮特許出願オーストラリア特許出願公開第２０１９９０２３４４号明細書からの優先権を主張し、この出願の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００３】
放射線療法は、腫瘍療法の重要な形態である。腫瘍を処置するための放射線療法の様々な方法が開発されている。とりわけ、放射免疫療法（ＲＡＩＴ）は、放射線療法の提供に対する１つの新たなアプローチである。これは、抗体又は抗体断片を使用して放射性同位元素を特定の組織及び細胞に指向させ、それにより腫瘍処置の特異性を向上させ、毒性を低下させる。ＲＡＩＴは、低線量率放射線を使用することにより、その副作用を更に低下させる。
【０００４】
健康な組織及び器官に対する放射線損傷は、放射線療法に関連した主要な問題である。このような損傷は、放射線発生活性酸素種に主に起因し、この活性酸素種は、核酸、炭水化物、脂質及びリポタンパク質などの機能的に重要な生物学的分子を酸化し、組織及び細胞を損傷する。活性酸素種は、多様な生物学的プロセス、例えば抗菌防御、炎症、発癌及び老化に関与する。体重減少に反映されるように、白血球（ＷＢＣ）及び血小板数の減少並びに造血毒性などの骨髄抑制及び血球減少は、放射線障害の最も注目すべき結果である。この毒性は、ＲＡＩＴの放射線量を厳しく制限し、腫瘍処置の有効性を低下させる。
【０００５】
放射線の造血毒性を軽減しようとする多くの方法が開発されている。幹細胞移植（ＳＣＴ）及び骨髄移植（ＢＭＴ）は、最も頻繁に用いられる方法である。しかしながら、これらのアプローチは、侵襲的で高価であり、処置を受けている個体のより長期の入院に寄与する可能性がある。
【０００６】
他の方法には、免疫系を刺激するためのサイトカイン及び放射線曝露期間中に造血をオフにするためのＨＰ５ｂのような血液調節タンパク質を使用することが含まれる。これらの方法は、小規模な研究において造血毒性に対処することにおいて様々な程度の成功を達成したが、ここでもまた、患者を更なる投薬及び処置に曝すことを必要とし、従って大部分が未使用のままである。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
放射線免疫療法に関連する毒性を軽減するための新しい方法が依然として必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
本明細書におけるいかなる先行技術への言及も、この先行技術が任意の管轄区域における共通の一般的知識の一部を形成すること、又はこの先行技術が、当業者により、他の先行技術と理解され、関連すると見なされ、且つ／若しくは組み合わされることが合理的に期待され得ることの承認又は示唆ではない。
【０００９】
本発明は、放射免疫療法において使用するためのクラスＩｇＧの改変抗体を提供し、抗体は、クラスＩｇＧの野生型抗体と比較して１つ以上のアミノ酸置換を有する重鎖定常領域を含み、１つ以上のアミノ酸置換は、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に対する抗体の親和性を低下させ、それによりクラスＩｇＧの野生型抗体と比較して改変抗体の血清半減期を低下させる。
【００１０】
一実施形態では、１つ以上のアミノ酸置換は、ＩｇＧ分子の重鎖定常領域２（ＣＨ２）における置換から選択され、ＦｃＲｎに対するＩｇＧ分子の親和性を低下させる。代替的に、１つ以上のアミノ酸置換は、ＩｇＧ分子の重鎖定常領域３（ＣＨ３）に存在し得、それによりＦｃＲｎに対するＩｇＧ分子の親和性を低下させる。また更に、アミノ酸置換は、ＩｇＧ分子のＣＨ２領域における少なくとも１つの置換と、ＣＨ３領域における少なくとも１つの置換とを含み得、それにより、置換は、ＦｃＲｎに対するＩｇＧの親和性を低

下させる。

【００１１】

特定の好ましい実施形態では、１つ以上のアミノ酸置換は、ＩｇＧの残基Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３３、Ｈｉｓ４３５、Ｈｉｓ４３６又はＩｌｅ２５３の１つ以上に存在し得る。好ましくは、アミノ酸置換は、重鎖定常領域における位置Ｈｉｓ３１０又はＨｉｓ４３５での置換を含む。より好ましくは、ＦｃＲｎに対する抗体の親和性を低下させるアミノ酸置換は、Ｈｉｓ３１０及びＨｉｓ４３５の両方におけるものである。

【００１２】

特定の実施形態では、改変抗体は、１つ以上のＦｃ－ガンマ受容体に結合する能力を保持し、従って、特定の実施形態では、改変抗体は、エフェクター応答（ＡＤＣＣを含む）を刺激する能力を保持する。

【００１３】

代替的な実施形態では、ＦｃＲｎ受容体に対する親和性を低下させる１つ以上のアミノ酸改変は、Ｆｃガンマ受容体に対する親和性も低下させる。改変抗体は、クラスＩｇＧの野生型抗体と比較して１つ以上のアミノ酸置換を更に含み得、ここで、アミノ酸置換は、１つ以上のＦｃガンマ受容体に対する抗体の親和性を更に低下させる。

【００１４】

更なる実施形態では、改変抗体は、クラスＩｇＧの野生型抗体と比較して１つ以上のアミノ酸置換を更に含み、ここで、アミノ酸置換は、クラスＩｇＧの野生型抗体と比較して、改変抗体におけるＣＨ１－ＣＨ２ヒンジ領域の安定性を増加させる。

【００１５】

一実施形態では、改変抗体は、診断又は治療剤にコンジュゲートされる。診断又は治療剤は、例えば、アミノ酸残基のハロゲン化により、抗体に直接又は間接的にコンジュゲートされ得る。好ましくは、診断又は治療剤は、リンカー又はキレーター部分によって抗体に間接的にコンジュゲートされる。一例では、改変抗体は、以下からなる群から選択されるキレート化部分にコンジュゲートされる：ＴＭＴ（６，６’’－ビス［Ｎ，Ｎ’’，Ｎ’’’－テトラ（カルボキシメチル）アミノメチル）－４’－（３－アミノ－４－メトキシフェニル）－２，２’：６’，２’’－ターピリジン）、ＤＯＴＡ（１、４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－ＮＮ’，Ｎ’’（Ｎ’’’－四酢酸）、ＴＣＭＣ、ＤＯ３Ａ、ＣＢ－ＤＯ２Ａ、ＮＯＴＡ、Ｄｉａｍｓａｒ、ＤＴＰＡ、ＣＨＸ－Ａ’’－ＤＴＰＡ、ＴＥＴＥ、Ｔｅ２Ａ、ＨＢＥＤ、ＤＦＯ、ＤＦＯｓｑ及びＨＯＰＯ又は本明細書に記載される他のキレート化剤。

【００１６】

別の例では、改変抗体は、二官能性リンカー、例えばブロモアセチル、チオール、スクシンイミドエステル、ＴＦＰエステル、マレイミドにコンジュゲートされるか、又は当技術分野で公知の任意のアミン若しくはチオール－改変化学を使用してコンジュゲートされる。

【００１７】

好ましくは、診断又は治療剤は、放射性同位元素である。適切な同位元素の例としては、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、ビスマス－２１２及びビスマス－２１３（^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ）、銅－６４及び銅－６７（^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ）、ガリウム－６７及びガリウム－６８（^{67}Ｇａ及び^{68}Ｇａ）、インジウム－１１１（^{111}Ｉｎ）、ヨウ素－１２３、－１２４、－１２５又は－１３１（^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）（^{123}Ｉ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ）、ルテチウム－１７７（^{177}Ｌｕ）、ラジウム－２２３（^{223}Ｒａ）、サマリウム－１５３（^{153}Ｓｍ）、スカンジウム－４４及びスカンジウム－４７（^{44}Ｓｃ、^{47}Ｓｃ）、ストロンチウム－９０（^{90}Ｓｒ）、テクネチウム－９９（^{99m}Ｔｃ）、イットリウム－８６及びイットリウム－９０（^{86}Ｙ、^{90}Ｙ）、ジルコニウム－８９（^{89}Ｚｒ）が挙げられる。

【００１８】

クラスＩｇＧの非改変抗体と比較して低下したＦｃＲｎ結合親和性を有するクラスＩｇＧ改変抗体は、診断又は治療剤を生物学的部位に標的化するのに有用な任意の抗体であり

得る。抗体は、ＩｇＧ１（ヒト又はネズミ）、ＩｇＧ２、ＩｇＧ４、ネズミＩｇＧ２ａを含む任意のＩｇＧクラスであり得る。好ましい例では、抗体は、診断又は治療剤を癌細胞に標的化又は送達するのに有用な任意の抗体である。適切な抗体の例としては、ＩｇＧ１抗体トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））、ジヌツキシマブ（Ｕｎｉｔｕｘｉｎ（登録商標））、ＩｇＧ２抗体パニツムマブ（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（登録商標））、ＩｇＧ４抗体、ペムブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））、ニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））、ネズミＩｇＧ２ａ抗体トシツモマブ（Ｂｅｘｘａｒ（登録商標））及びネズミＩｇＧ１抗体イブリツモマブ（Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標））が挙げられる。他の例としては、ゲムツズマブ（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（登録商標））、ブレンツキシマブ（Ａｄｃｅｔｒｉｓ（登録商標））、イノツズマブ（Ｂｅｓｐｏｎｓａ（登録商標））、グレンバツムマブ（ＣＤＸ－０１１）、アネツマブ（ＢＡＹ　９４－９３４３）、ミルベツキシマブ（ＩＭＧＮ８５３）、デパツキシズマブ（ＡＢＴ－４１４）、ロバルピツズマブ（Ｒｏｖａ－Ｔ）及びロバルピツズマブタリリン（ＳＧＮ－ＣＤ３３Ａ）が挙げられる。

【００１９】

本発明は、クラスＩｇＧの非改変抗体と比較して又はクラスＩｇＧの野生型抗体と比較して低下したＦｃＲｎ結合親和性を有するクラスＩｇＧの改変抗体も提供し、抗体は、

－　クラスＩｇＧの野生型抗体と比較して１つ以上のアミノ酸置換を有する重鎖定常領域であって、１つ以上のアミノ酸置換は、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に対する抗体の親和性を低下させ、それによりクラスＩｇＧの野生型抗体と比較して改変抗体の血清半減期を低下させる、重鎖定常領域

を含み、

前記抗体は、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）に特異的に結合し、前記抗体は、

ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４－リンカー－ＦＲ１ａ－ＣＤＲ１ａ－ＦＲ２ａ－ＣＤＲ２ａ－ＦＲ３ａ－ＣＤＲ３ａ－ＦＲ４ａ

を含み、ここで、

ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４は、それぞれフレームワーク領域であり；

ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３は、それぞれ相補性決定領域であり；

ＦＲ１ａ、ＦＲ２ａ、ＦＲ３ａ及びＦＲ４ａは、それぞれフレームワーク領域であり；

ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａは、それぞれ相補性決定領域であり；

相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表１に記載のアミノ酸配列を有する。好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表１に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３がＶＨからの配列であり、ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａがＶＬからの配列であるか、又はＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３がＶＬからの配列であり、ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａがＶＨからの配列であるものも含む。

【００２０】

より詳細には、本発明は、クラスＩｇＧの非改変抗体と比較して又はクラスＩｇＧの野生型抗体と比較して低下したＦｃＲｎ結合親和性を有するクラスＩｇＧの改変抗体を提供し、抗体は、

－　重鎖定常領域であって、位置Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３３、Ｈｉｓ４３５、Ｈｉｓ４３６、Ｉｌｅ２５３における１つ以上のアミノ酸残基は、非改変抗体又はクラスＩｇＧの野生型抗体に存在する残基と異なる、重鎖定常領域

を含み、

前記抗体は、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）に特異的に結合し、前記抗体は、

ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４－リンカー－ＦＲ１ａ－ＣＤＲ１ａ－ＦＲ２ａ－ＣＤＲ２ａ－ＦＲ３ａ－ＣＤＲ３ａ－ＦＲ４ａ

を含み、ここで、

ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４は、それぞれフレームワーク領域であり；
ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３は、それぞれ相補性決定領域であり；
ＦＲ１ａ、ＦＲ２ａ、ＦＲ３ａ及びＦＲ４ａは、それぞれフレームワーク領域であり；
ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａは、それぞれ相補性決定領域であり；
相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表１に記載のアミノ酸配列を有する。好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表１に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３がＶＨからの配列であり、ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａがＶＬからの配列であるか、又はＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３がＶＬからの配列であり、ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａがＶＨからの配列であるものも含む。

【００２１】

一実施形態では、ＰＳＭＡに特異的に結合する抗体は、（ＮからＣ末端又はＣからＮ末端の順に）配列番号４又は２０のアミノ酸から本質的になるか又はそれからなる抗原結合部位を含む。

【００２２】

更なる実施形態では、ＰＳＭＡに特異的に結合する抗体は、以下の少なくとも１つを含む：

（ｉ）配列番号１又は１７に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含む相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号２又は１８に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３又は１９に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ；

（ｉｉ）配列番号４又は２０に示される配列に対して少なくとも約９５％、又は９６％、又は９７％、又は９８％、又は９９％同一の配列を含むＶＨ；

（ｉｉｉ）配列番号３３に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ１、配列番号３４に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３５に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ３を含むＶＬ；

（ｉｖ）配列番号３６に示される配列に対して少なくとも約９５％同一の配列を含むＶＬ；

（ｖ）配列番号１又は１７に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号２又は１８間に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３又は１９に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ；

（ｖｉ）配列番号４又は２０に示される配列を含むＶＨ；

（ｖｉｉ）配列番号３３に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号３４に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号４５に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＬ；

（ｖｉｉｉ）配列番号３６に示される配列を含むＶＬ；

（ｉｘ）配列番号１又は１７に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号２又は１８間に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３又は１９に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ；並びに配列番号３３に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号３４に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３５に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＬ；又は

（ｘ）配列番号４又は２０に示される配列を含むＶＨ及び配列番号３６に示される配列

を含むＶＬ。
【００２３】
好ましくは、重鎖定常領域は、Ｈｉｓ３１０及びＨｉｓ４３５の両方におけるアミノ酸置換を含む。抗体は、定常重鎖領域のＳｅｒ２２８及びＬｅｕ２３５と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。
【００２４】
任意の実施形態では、抗体は、配列番号４９～５１の任意の１つに示されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含み、好ましくは、重鎖定常領域は、配列番号５０に示される配列を含む。
【００２５】
なお更なる実施形態では、抗体の重鎖は、配列番号４９～５６の任意の１つに示される、好ましくは配列番号５３に示される配列を含む。
【００２６】
また更に、好ましい実施形態では、抗体の軽鎖定常領域は、配列番号５２に示される配列を含む。より好ましくは、抗体は、配列番号５７に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。
【００２７】
特に好ましい実施形態では、抗体は、配列番号５３に示されるアミノ酸配列及び配列番号５７に示される配列を含む。
【００２８】
本発明は、免疫グロブリン部分及びそれにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子も提供し、
免疫グロブリン部分は、腫瘍関連抗原に特異的に結合し、
免疫グロブリン部分は、野生型免疫グロブリンと比較して、ＦｃＲｎ受容体に対する低下又は消失した親和性を有し；
非タンパク質剤は、細胞毒又は放射性元素などの治療的部分を含む。
【００２９】
免疫グロブリン部分は、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））、ジヌツキシマブ（Ｕｎｉｔｕｘｉｎ（登録商標））、パニツムマブ（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（登録商標））、ペムブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））、ニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））、トシツモマブ（Ｂｅｘｘａｒ（登録商標））、イブリツモマブ（Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標））、ゲムツズマブ（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（登録商標））、ブレンツキシマブ（Ａｄｃｅｔｒｉｓ（登録商標））、イノツズマブ（Ｂｅｓｐｏｎｓａ（登録商標））、グレンバツムマブ（ＣＤＸ－０１１）、アネツマブ（ＢＡＹ　９４－９３４３）、ミルベツキシマブ（ＩＭＧＮ８５３）、デパツキシズマブ（ＡＢＴ－４１４）、ロバルピツズマブ（Ｒｏｖａ－Ｔ）及びロバルピツズマブタリリン（ＳＧＮ－ＣＤ３３Ａ）又は本明細書に記載される任意の他の抗体を含むが、これらに限定されない、腫瘍関連抗原への結合に有用な任意の抗体を含み得る。
【００３０】
本発明は、免疫グロブリン部分及びそれにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子を提供し、
免疫グロブリン部分は、ＰＳＭＡに特異的に結合し、且つ
ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４－リンカー－ＦＲ１ａ－ＣＤＲ１ａ－ＦＲ２ａ－ＣＤＲ２ａ－ＦＲ３ａ－ＣＤＲ３ａ－ＦＲ４ａ
を含む抗原結合部位を含み、ここで、
ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４は、それぞれフレームワーク領域であり；
ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３は、それぞれ相補性決定領域であり；
ＦＲ１ａ、ＦＲ２ａ、ＦＲ３ａ及びＦＲ４ａは、それぞれフレームワーク領域であり；
ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａは、それぞれ相補性決定領域であり；

相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表１に記載のアミノ酸配列を有し、
免疫グロブリン部分は、野生型免疫グロブリンと比較して、ＦｃＲｎ受容体に対する低下又は消失した親和性を有し；
非タンパク質剤は、細胞毒又は放射性元素などの治療的部分を含む。
【００３１】
好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表１に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３がＶＨからの配列であり、ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａがＶＬからの配列であるか、又はＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３がＶＬからの配列であり、ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａがＶＨからの配列であるものも含む。好ましくは、免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域におけるＨｉｓ３１０及び／又はＨｉｓ４３５と均等な残基におけるアミノ酸置換を有する。免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域のＳｅｒ２２８及びＬｅｕ２３５と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。
【００３２】
好ましくは、非タンパク質剤は、放射性元素を含む。
【００３３】
本発明は、免疫グロブリン部分及びそれにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子も提供し、
免疫グロブリン部分は、ＰＳＭＡに特異的に結合し、且つ（ＮからＣ末端又はＣからＮ末端の順に）配列番号４又は２０のアミノ酸から本質的になるか又はそれからなる抗原結合部位を含み；
免疫グロブリン部分は、野生型免疫グロブリンと比較して、ＦｃＲｎ受容体に対する低下又は消失した親和性を有し；
非タンパク質剤は、細胞毒又は放射性元素などの治療的部分を含む。
【００３４】
好ましくは、免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域におけるＨｉｓ３１０及び／又はＨｉｓ４３５と均等な残基におけるアミノ酸置換を有する。免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域のＳｅｒ２２８及びＬｅｕ２３５と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。
【００３５】
本発明は、免疫グロブリン部分及びそれにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子も提供し、
免疫グロブリン部分は、野生型免疫グロブリンと比較して、ＦｃＲｎ受容体に対する低下又は消失した親和性を有し、免疫グロブリン部分は、ＰＳＭＡに特異的に結合し、且つ以下の少なくとも１つを含む：
（ｉ）配列番号１又は１７に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含む相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号２又は１８に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３又は１９に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ；
（ｉｉ）配列番号４又は２０に示される配列に対して少なくとも約９５％、又は９６％、又は９７％、又は９８％、又は９９％同一の配列を含むＶＨ；
（ｉｉｉ）配列番号３３に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ１、配列番号３４に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３５に示される配列に

対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ３を含むＶＬ；

（ｉｖ）配列番号３６に示される配列に対して少なくとも約９５％同一の配列を含むＶＬ；

（ｖ）配列番号１又は１７に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号２又は１８間に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３又は１９に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ；

（ｖｉ）配列番号４又は２０に示される配列を含むＶＨ；

（ｖｉｉ）配列番号３３に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号３４に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号４５に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＬ；

（ｖｉｉｉ）配列番号３６に示される配列を含むＶＬ；

（ｉｘ）配列番号１又は１７に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号２又は１８間に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３又は１９に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ；並びに配列番号３３に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号３４に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３５に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＬ；又は

（ｘ）配列番号４又は２０に示される配列を含むＶＨ及び配列番号３６に示される配列を含むＶＬ。

【００３６】

好ましくは、免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域におけるＨｉｓ３１０及び／又はＨｉｓ４３５と均等な残基におけるアミノ酸置換を有する。免疫グロブリン部分は、定常重鎖領域のＳｅｒ２２８及びＬｅｕ２３５と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み得る。好ましくは、非タンパク質剤は、放射性元素を含む。

【００３７】

任意の実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号４９～５１の任意の１つに示されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含み、好ましくは、重鎖定常領域は、配列番号５０に示される配列を含む。

【００３８】

なお更なる実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号５３～５６の任意の１つ、好ましくは５３に示される配列を含む。

【００３９】

任意の実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号５２の配列を含む軽鎖定常領域を含む。一実施形態において、免疫グロブリンは、配列番号５７に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。

【００４０】

特に好ましい実施形態では、免疫グロブリンは、配列番号５３及び５７に示される配列を含む。

【００４１】

本発明は、個体における癌を処置する方法も提供し、方法は、それを必要とする個体に、免疫グロブリン部分及び前述のようにコンジュゲートされた非タンパク質剤を含む分子を投与することを含む。

【００４２】

本発明は、放射免疫療法における使用に適した抗体を生成する方法も提供し、方法は、

－　放射免疫療法を必要とする細胞又は組織上に存在するエピトープに特異的に結合する抗原結合部位を有する抗体を提供すること；

－　抗体の重鎖定常領域に少なくとも１つのアミノ酸置換を導入して、改変抗体を生成することであって、少なくとも１つのアミノ酸置換は、残基Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３５及びＩｌｅ２５３におけるアミノ酸置換からなる群から選択され、それにより前記抗体のＦｃＲｎに対する結合親和性及び／又は血清半減期の変化を引き起こす、生成すること；

－　改変抗体を放射性元素とコンジュゲートすること

を含み、それにより放射免疫療法における使用に適した抗体を生成する。
【００４３】
特定の実施形態では、抗体は、下記の表１に記載の相補性決定領域、フレームワーク領域、可変軽鎖又は可変重鎖領域のいずれかを有する抗体を含む、本明細書に記載される抗体である。好ましくは、改変抗体は、定常重鎖領域のＳｅｒ２２８及びＬｅｕ２３５と均等な残基におけるアミノ酸置換も含む。好ましくは、放射性元素は、キレート化剤、例えばＤＯＴＡを使用して改変抗体にコンジュゲートされる。
【００４４】
本発明は、疾患の処置において使用するための抗体－放射性同位元素イムノコンジュゲートを生成する方法も提供し、方法は、
－　放射免疫療法を必要とする細胞又は組織上に存在するエピトープに特異的に結合する抗原結合部位を有する抗体を提供すること；
－　抗体の重鎖定常領域に少なくとも１つのアミノ酸置換を導入して、改変抗体を生成することであって、少なくとも１つのアミノ酸置換は、アミノ酸残基Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３５及びＩｌｅ２５３における置換からなる群から選択され、それにより前記抗体のＦｃＲｎに対する結合親和性及び／又は血清半減期の変化を引き起こす、生成すること；
－　改変抗体を放射性元素とコンジュゲートすること
を含み、それにより疾患の処置において使用するための抗体－放射性同位元素イムノコンジュゲートを生成する。
【００４５】
好ましくは、抗体は、下記の表１に記載の相補性決定領域、フレームワーク領域、可変軽鎖又は可変重鎖領域のいずれかを有する抗体を含む、本明細書に記載される抗体である。好ましくは、改変抗体は、定常重鎖領域のＳｅｒ２２８及びＬｅｕ２３５と均等な残基におけるアミノ酸置換も含み、好ましくは、放射性元素は、キレート化剤、例えばＤＯＴＡを使用して改変抗体にコンジュゲートされる。より好ましくは、改変抗体は、アミノ酸置換Ｈｉｓ３１０Ａｌａ及びＨｉｓ４３５Ｇｌｎを含む。
【００４６】
好ましくは、疾患は、前立腺癌又は腎細胞癌を含む癌である。
【００４７】
本発明は、改変抗体であって、非改変形態の抗体と比較して、ＦｃＲｎに対する変化した結合親和性及び／又は変化した血清半減期を有する改変抗体を生成する方法を更に提供し、前記方法は、
（ａ）免疫グロブリン重鎖の少なくとも定常領域をコードする核酸分子に作動可能に連結された適切なプロモーターを含む発現ベクター（好ましくは複製可能な発現ベクター）を提供することであって、アミノ酸残基Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３５及びＩｌｅ２５３からなる群から選択される、重鎖定常領域からの少なくとも１つのアミノ酸は、非改変抗体に存在するものと異なるアミノ酸で置換され、それによりＦｃＲｎ結合親和性及び／又は血清半減期の変化を引き起こす、提供することと；
（ｂ）宿主細胞を前記ベクターで形質転換することと；
（ｃ）前記形質転換された宿主細胞を培養して、前記改変抗体を生成することと
を含む。
【００４８】
任意選択的に、このような方法は、相補的な免疫グロブリン軽鎖をコードするＤＮＡに作動可能に連結されたプロモーターを含む第２の発現ベクター（好ましくは複製可能な発現ベクター）を調製し、且つ前記細胞株を前記第２のベクターで更に形質転換することを更に含む。
【００４９】
放射免疫療法において使用するための抗体の血清半減期を変更するための方法であって、
－　放射免疫療法を必要とする細胞又は組織上に存在するエピトープに特異的に結合する抗原結合部位を有する抗体を提供すること；

－　抗体の重鎖定常領域に少なくとも１つのアミノ酸置換を導入して、改変抗体を生成することであって、少なくとも１つのアミノ酸置換は、アミノ酸残基Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３５及びＩｌｅ２５３における置換からなる群から選択され、それにより前記抗体のＦｃＲｎに対する結合親和性及び血清半減期の変化を引き起こす、生成すること
を含む方法である。

【００５０】

好ましくは、本方法は、改変抗体を放射性元素とコンジュゲートすることを更に含む。好ましくは、抗体は、下記の表１に記載の相補性決定領域、フレームワーク領域、可変軽鎖又は可変重鎖領域のいずれかを有する抗体を含む、ＰＳＭＡへの結合のための、本明細書に記載される抗体である。好ましくは、改変抗体は、Ｓｅｒ２２８Ｐｒｏ及び／又はＬｅｕ２３５Ｇｌｕを含む、定常重鎖領域のＳｅｒ２２８及びＬｅｕ２３５と均等な残基におけるアミノ酸置換も含む。より好ましくは、改変抗体は、アミノ酸置換Ｈｉｓ３１０Ａｌａ及びＨｉｓ４３５Ｇｌｎを含む。

【００５１】

放射免疫療法において使用するための抗体の毒性を低下させるための方法であって、

－　放射免疫療法を必要とする細胞又は組織上に存在するエピトープに特異的に結合する抗原結合部位を有する抗体を提供すること；

－　抗体の重鎖定常領域に少なくとも１つのアミノ酸置換を導入して、改変抗体を生成することであって、少なくとも１つのアミノ酸置換は、アミノ酸残基Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３５及びＩｌｅ２５３における置換からなる群から選択され、アミノ酸置換は、改変抗体の血清半減期を低下させ、且つ／又は循環からの改変抗体のクリアランスを増加させる、生成すること
を含み、それにより、抗体が放射免疫療法において使用するために放射性元素とコンジュゲートされるとき、抗体の毒性を低下させる、方法である。

【００５２】

任意の実施形態では、抗体の毒性を低下させることは、さもなければ循環中での放射性同位元素のより長期の滞留から生じるであろう多くの毒性効果（血液学的毒性、骨中への吸収及び骨髄照射を含む）を低下させることを含む。

【００５３】

任意の実施形態では、本明細書に記載される放射標識抗体又は放射性免疫複合体の毒性は、個体への投与後、抗体又はイムノコンジュゲートの腫瘍：血液比を決定することによって評価される。

【００５４】

本発明の任意の実施形態では、本発明の改変抗体の腫瘍：血液比は、抗体の投与から少なくとも８時間後に比を決定した場合、本明細書に記載される重鎖定常領域に対する改変を有さない非改変抗体の少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも６倍、少なくとも８倍若しくは少なくとも１０大きいか又はそれを超える。代替的に、比は、個体への抗体の投与から少なくとも２４、４８、７２又は１２０時間後に決定される。特定の実施形態では、本発明の改変抗体の腫瘍：血液比は、抗体の投与から少なくとも１２０時間後に比を決定した場合、本明細書に記載される重鎖定常領域に対する改変を有さない非改変抗体の少なくとも５０倍、少なくとも１００倍、少なくとも２００倍又は少なくとも３００倍大きい。

【００５５】

本発明の任意の実施形態では、非改変抗体と比較して低下又は変化した血清半減期を有する、本明細書に記載される改変抗体は、非改変抗体の少なくとも２倍、少なくとも３倍速いか又はそれを超える血清クリアランス速度を有する。

【００５６】

本発明の特に好ましい実施形態では、本明細書に記載される抗体は、セラノスティック対における使用に適しており、ここで、セラノスティック対は、１）造影剤に結合した抗体、及び２）治療用の薬剤に結合した抗体を含む。例えば、抗体は、第１に、放射線画像

化における使用に適した放射性同位元素に結合されるときに診断薬として使用され得、第２に、抗体は、治療での使用に適した放射性同位元素又は細胞毒性剤に結合されるときに治療薬として使用され得る。

【００５７】

本発明は、対象における疾患、障害又は感染症を診断、監視又は予測するインビボでの方法も提供し、方法は、

（ａ）有効量の、本明細書に記載される改変抗体を対象に投与することであって、前記改変抗体は、疾患、障害又は感染症に関連する抗原に特異的に結合する、投与することと；

（ｂ）前記抗原が見出される前記対象における部位において、改変抗体を濃縮させることと；

（ｃ）前記改変抗体を検出することと

を含み、それにより、前記改変抗体のバックグラウンド又は標準レベルを超える検出は、対象が前記疾患、障害又は感染症を有することを示す。

【００５８】

本発明は、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）に結合するか又は特異的に結合する抗原結合部位を提供する。好ましくは、本発明の抗原結合部位は、ヒトＰＳＭＡに結合するか又は特異的に結合する。

【００５９】

本発明は、ＰＳＭＡへの結合のための抗原結合部位を提供し、抗原結合部位は、

ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４－リンカー－ＦＲ１ａ－ＣＤＲ１ａ－ＦＲ２ａ－ＣＤＲ２ａ－ＦＲ３ａ－ＣＤＲ３ａ－ＦＲ４ａ

を含み、ここで、

ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４は、それぞれフレームワーク領域であり；

ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３は、それぞれ相補性決定領域であり；

ＦＲ１ａ、ＦＲ２ａ、ＦＲ３ａ及びＦＲ４ａは、それぞれフレームワーク領域であり；

ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａは、それぞれ相補性決定領域であり；

フレームワーク領域又は相補性決定領域のいずれかの配列は、本明細書に記載されている。

【００６０】

本発明は、ＰＳＭＡへの結合のための抗原結合部位を提供し、抗原結合部位は、

ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４－リンカー－ＦＲ１ａ－ＣＤＲ１ａ－ＦＲ２ａ－ＣＤＲ２ａ－ＦＲ３ａ－ＣＤＲ３ａ－ＦＲ４ａ

を含み、ここで、

ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４は、それぞれフレームワーク領域であり；

ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３は、それぞれ相補性決定領域であり；

ＦＲ１ａ、ＦＲ２ａ、ＦＲ３ａ及びＦＲ４ａは、それぞれフレームワーク領域であり；

ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａは、それぞれ相補性決定領域であり；

相補性決定領域のいずれかの配列は、下記の表１に記載のアミノ酸配列を有する。好ましくは、フレームワーク領域は、各抗体由来の様々なフレームワーク領域を整列させることによって決定され得る特定の残基におけるアミノ酸改変を含む、同様に下記の表１に記載されるアミノ酸配列を有する。本発明は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３がＶＨからの配列であり、ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａがＶＬからの配列であるか、又はＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３がＶＬからの配列であり、ＣＤＲ１ａ、ＣＤＲ２ａ及びＣＤＲ３ａがＶＨからの配列であるものも含む。

【００６１】

本発明は、（ＮからＣ末端又はＣからＮ末端の順に）配列番号４又は２０のアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか又はそれからなる抗原結合部位を提供する。

【００６２】

本発明は、抗体の抗原結合ドメインを含む抗原結合部位も提供し、抗原結合ドメインは、ＰＳＭＡに結合するか又は特異的に結合し、抗原結合ドメインは、以下の少なくとも１

つを含む：
（ｉ）配列番号１又は１７に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含む相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号２又は１８に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３又は１９に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ；
（ｉｉ）配列番号４又は２０に示される配列に対して少なくとも約９５％、又は９６％、又は９７％、又は９８％、又は９９％同一の配列を含むＶＨ；
（ｉｉｉ）配列番号３３に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ１、配列番号３４に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３５に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＣＤＲ３を含むＶＬ；
（ｉｖ）配列番号３６に示される配列に対して少なくとも約９５％同一の配列を含むＶＬ；
（ｖ）配列番号１又は１７に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号２又は１８間に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３又は１９に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ；
（ｖｉ）配列番号４又は２０に示される配列を含むＶＨ；
（ｖｉｉ）配列番号３３に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号３４に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号４５に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＬ；
（ｖｉｉｉ）配列番号３６に示される配列を含むＶＬ；
（ｉｘ）配列番号１又は１７に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号２又は１８間に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３又は１９に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ；並びに配列番号３３に示される配列を含むＣＤＲ１、配列番号３４に示される配列を含むＣＤＲ２及び配列番号３５に示される配列を含むＣＤＲ３を含むＶＬ；又は
（ｘ）配列番号４又は２０に示される配列を含むＶＨ及び配列番号３６に示される配列を含むＶＬ。
【００６３】
本発明の任意の態様では、抗原結合ドメインは、以下の少なくとも１つを更に含む：
（ｉ）配列番号９又は２５に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むフレームワーク領域（ＦＲ）１、配列番号１０又は２６に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＦＲ２、配列番号１１又は２７に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＦＲ３及び配列番号１２又は２８に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＦＲ４を含むＶＨ；
（ｉｉ）配列番号４１に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＦＲ１、配列番号４２に示される配列に対して少なくとも約

８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＦＲ２、配列番号４３に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＦＲ３及び配列番号４４に示される配列に対して少なくとも約８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９９％同一の配列を含むＦＲ４を含むＶＬ；

（ｉｉｉ）配列番号９又は２５に示される配列を含むＦＲ１、配列番号１０又は２６間に示される配列を含むＦＲ２、配列番号１１又は２７に示される配列を含むＦＲ３及び配列番号１２又は２８に示される配列を含むＦＲ４を含むＶＨ；

（ｉｖ）配列番号４１に示される配列を含むＦＲ１、配列番号４２間に示される配列を含むＦＲ２、配列番号４３に示される配列を含むＦＲ３及び配列番号４４に示される配列を含むＦＲ４を含むＶＬ；又は

（ｖ）配列番号９又は２５に示される配列を含むＦＲ１、配列番号１０又は２６間に示される配列を含むＦＲ２、配列番号１１又は２７に示される配列を含むＦＲ３及び配列番号１２又は２８に示される配列を含むＦＲ４を含むＶＨ；並びに配列番号４１に示される配列を含むＦＲ１、配列番号４２間に示される配列を含むＦＲ２、配列番号４３に示される配列を含むＦＲ３及び配列番号４４に示される配列を含むＦＲ４を含むＶＬ。

【００６４】

任意の実施形態では、抗原結合部位は、配列番号４９～５１の任意の１つに示されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含み、好ましくは、重鎖定常領域は、配列番号５０に示される配列を含む。

【００６５】

なお更なる実施形態では、抗原結合部位は、配列番号５３～５６の任意の１つ、好ましくは５３に示される配列を含む。

【００６６】

任意の実施形態では、抗原結合部位は、配列番号５２の配列を含む軽鎖定常領域を含む。一実施形態では、抗原結合部位の軽鎖は、配列番号５７の配列を含む。

【００６７】

特に好ましい実施形態では、抗原結合部位は、配列番号５３及び５７に示される配列を含む。

【００６８】

前述の抗原結合部位は、抗体の抗原結合ドメインと呼ぶこともできる。

【００６９】

好ましくは、本明細書に記載される抗原結合部位は、抗体又はその抗原結合断片である。典型的には、抗原結合部位は、抗体、例えばモノクローナル抗体である。

【００７０】

本明細書に記載されるように、抗原結合部位は、以下の形態のものであり得る：

（ｉ）単鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）；

（ｉｉ）二量体ｓｃＦｖ（ジ－ｓｃＦｖ）；

（ｉｉｉ）抗体の定常領域、Ｆｃ又は重鎖定常ドメイン（ＣＨ）２及び／若しくはＣＨ３に結合した（ｉ）又は（ｉｉ）の１つ；又は

（ｉｖ）免疫エフェクター細胞に結合するタンパク質に結合した（ｉ）又は（ｉｉ）の１つ。

【００７１】

更に、本明細書に記載されるように、抗原結合部位は、以下の形態のものであり得る：

（ｉ）ダイアボディ；

（ｉｉ）トリアボディ；

（ｉｉｉ）テトラボディ；

（ｉｖ）Ｆａｂ；

（ｖ）Ｆ（ａｂ’）２；
（ｖｉ）Ｆｖ；
（ｖｉｉ）抗体の定常領域、Ｆｃ又は重鎖定常ドメイン（ＣＨ）２及び／若しくはＣＨ３に結合した（ｉ）～（ｖｉ）の１つ；又は
（ｖｉｉｉ）免疫エフェクター細胞に結合するタンパク質に結合した（ｉ）～（ｖｉ）の１つ。

【００７２】
任意の態様又は実施形態において、抗体は、裸の抗体である。詳細には、抗体は、非コンジュゲート形態であり、コンジュゲートを形成するように適合されていない。

【００７３】
本発明は、本明細書に記載される抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、ｄａｂ（単一ドメイン抗体）、ジ－ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子又は多特異的抗体を含む融合タンパク質も提供する。

【００７４】
本発明は、標識又は細胞毒性剤にコンジュゲートされた、本明細書に記載される抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、ｄａｂ、ジ－ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体又は融合タンパク質の形態のコンジュゲートも提供する。

【００７５】
本発明は、本明細書に記載される抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、ｄａｂ、ジ－ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体、融合タンパク質又はコンジュゲートへの結合のための抗体も提供する。

【００７６】
好ましい実施形態では、抗原結合部位は、野生型抗体Ｆｃ領域に対して、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に対する抗体の結合を改変する、抗体定常ドメイン、ＣＨ２－ＣＨ３領域における１つ以上のアミノ酸置換を含むＩｇＧ免疫グロブリンである。１つ以上のアミノ酸改変は、ＦｃＲｎに対する抗体定常ドメイン、Ｆｃ領域又はそのＦｃＲｎ結合断片の親和性を変え、それにより抗原結合部位の血清半減期を変化させる。

【００７７】
好ましくは、置換は、非改変野生型抗体に対して、ＦｃＲｎに対する結合親和性及び／又は前記改変抗体の血清半減期を変化させる。本発明は、非改変抗体と比較して低下したＦｃＲｎに対する結合親和性及び／又は低下した血清半減期を有する改変抗体を更に提供し、ここで、ＣＨ２ドメインからの位置Ｉｌｅ２５３若しくはＨｉｓ３１０及び／又はＣＨ３ドメインからの残基Ｈｉｓ４３５における任意の１つ以上のアミノ酸残基は、非改変抗体に存在するものと異なるか又は非改変ＩｇＧと異なる別のアミノ酸で置換されている。

【００７８】
一例では、１つ以上のアミノ酸改変は、Ｈ３１０及びＨ４３５と均等な残基におけるアミノ酸置換から選択される。更なる例では、抗体は、Ｈｉｓ３１０及びＨｉｓ４３５残基の両方におけるアミノ酸置換を含む。

【００７９】
アミノ酸置換は、ヒスチジン残基からアラニン、グルタミン、グルタミン酸又はアスパラギン酸への置換を含み得る。好ましくは、Ｈｉｓ３１０におけるアミノ酸置換は、アラニンへのものである。好ましくは、Ｈｉｓ４３５におけるアミノ酸置換は、グルタミンへのものである。好ましくは、Ｉｌｅ２５３におけるアミノ酸置換は、アラニンである。

【００８０】
更なる実施形態では、抗原結合部位は、抗体の結合を改変してＦｃガンマ受容体を活性化する１つ以上のアミノ酸置換を含む抗体である。１つ以上のアミノ酸改変は、任意の１

つ以上のＦｃガンマ受容体に対する抗体定常ドメイン、Ｆｃ領域又はＦｃガンマ受容体結合断片の親和性を変える。好ましくは、アミノ酸改変は、Ｌｅｕ２３５と均等な残基におけるものである。より好ましくは、アミノ酸改変は、Ｌｅｕ２３５からグルタミン酸へのものである。

【００８１】

一実施形態では、アミノ酸改変は、Ｓｅｒ２２８におけるヒンジ安定化変異である。好ましくは、Ｓｅｒ２２８におけるアミノ酸改変は、プロリンへのものである。

【００８２】

本発明の一実施形態では、抗体は、Ｓｅｒ２２８、Ｌｅｕ２３５、Ｈｉｓ３１０及びＨｉｓ４３５における変異を含む。好ましくは、アミノ酸改変は、Ｓｅｒ２２８Ｐｒｏ、Ｌｅｕ２３５Ｇｌｕ、Ｈｉｓ３１０Ａｌａ及びＨｉｓ４３５Ｇｌｎである。

【００８３】

アミノ酸改変は、好ましくは、ＩｇＧ１アイソタイプを有する抗体又はＩｇＧ４アイソタイプに対して行われる。

【００８４】

好ましい実施形態では、抗体は、配列番号２３５～２３８の任意の１つに示される重鎖定常領域を含む。

【００８５】

本発明は、本明細書に記載される抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、ｄａｂ、ジ－ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体、融合タンパク質又はコンジュゲートをコードする核酸も提供する。

【００８６】

一例では、そのような核酸は、核酸がプロモーターに作動可能に連結される発現コンストラクトに含まれる。そのような発現コンストラクトは、ベクター、例えばプラスミドにあり得る。

【００８７】

単一ポリペプチド鎖抗原結合部位に関する本発明の例において、発現コンストラクトは、ポリペプチド鎖をコードする核酸に連結されたプロモーターを含み得る。

【００８８】

抗原結合部位を形成する多数のポリペプチド鎖に関する例において、発現コンストラクトは、例えば、プロモーターに作動可能に連結されたＶＨを含むポリペプチドをコードする核酸及び例えばプロモーターに作動可能に連結されたＶＬを含むポリペプチドをコードする核酸を含む。

【００８９】

別の例では、発現コンストラクトは、例えば、作動可能に連結された以下の構成要素を５’から３’の順で含むバイシストロニックな発現コンストラクトである：

（ｉ）プロモーター

（ｉｉ）第１のポリペプチドをコードする核酸；

（ｉｉｉ）内部リボソーム進入部位；及び

（ｉｖ）第２のポリペプチドをコードする核酸、

ここで、第１のポリペプチドは、ＶＨを含み、第２のポリペプチドは、ＶＬを含むか又は逆も可能である。

【００９０】

本発明は、別個の発現コンストラクトも意図し、その一方は、ＶＨを含む第１のポリペプチドをコードし、他方は、ＶＬを含む第２のポリペプチドをコードする。例えば、本発明は、以下を含む組成物も提供する：

（ｉ）プロモーターに作動可能に連結されたＶＨを含むポリペプチドをコードする核酸を含む第１の発現コンストラクト；及び

（ｉｉ）プロモーターに作動可能に連結されたＶＬを含むポリペプチドをコードする核

酸を含む第２の発現コンストラクト。
【００９１】
本発明は、本明細書に記載されるベクター又は核酸を含む細胞を提供する。好ましくは、細胞は、単離されるか、実質的に精製されるか、又は組換え体である。一例では、細胞は、本発明の発現コンストラクト又は：
（ｉ）プロモーターに作動可能に連結されたＶＨを含むポリペプチドをコードする核酸を含む第１の発現コンストラクト；及び
（ｉｉ）プロモーターに作動可能に連結されたＶＬを含むポリペプチドをコードする核酸を含む第２の発現コンストラクト
を含み、ここで、第１及び第２のポリペプチドは、結合して、本発明の抗原結合部位を形成する。
【００９２】
本発明の細胞の例には、菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞が含まれる。
【００９３】
本発明は、抗原結合部位を含むか、又は本明細書に記載されるＣＤＲ及び／若しくはＦＲ配列又は本明細書に記載される免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、ｄａｂ（単一ドメイン抗体）、ジ－ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体、融合タンパク質又はコンジュゲート及び薬学的に許容され得る担体、希釈剤又は賦形剤を含む医薬組成物も提供する。
【００９４】
本発明は、抗原結合部位を含むか、又は本明細書に記載されるＣＤＲ及び／若しくはＦＲ配列又は本明細書に記載される抗原結合部位、免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、ｄａｂ、ジ－ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体、融合タンパク質又はコンジュゲート、希釈剤及び任意選択的に標識を含む診断組成物も提供する。好ましくは、抗原結合部位は、放射性同位元素にコンジュゲートされたモノクローナル抗体である。
【００９５】
本発明は、抗原結合部位を含むか、又は本明細書に記載されるＣＤＲ及び／若しくはＦＲ配列又は本明細書に記載される免疫グロブリン可変ドメイン、抗体、ｄａｂ、ジ－ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単鎖抗体分子若しくは多特異的抗体、融合タンパク質又はコンジュゲートを含むキット又は製品も提供する。
【００９６】
好ましくは、抗原結合部位は、放射性同位元素にコンジュゲートされたモノクローナル抗体である。
【００９７】
本明細書に記載される抗原結合部位、タンパク質又は抗体は、ヒト定常領域、例えばＩｇＧ定常領域、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４定常領域又はそれらの混合物を含み得る。抗体又はタンパク質がＶＨ及びＶＬを含む場合、ＶＨは、重鎖定常領域に結合し得、ＶＬは、軽鎖定常領域に結合し得る。
【００９８】
一例では、本明細書に記載されるタンパク質若しくは抗体又は本明細書に記載されるタンパク質若しくは抗体の組成物は、Ｃ末端リシン残基を完全に又は部分的に有する又は有さない配列の混合物を含む、安定化重鎖定常領域を含む重鎖定常領域を含む。
【００９９】
一例では、本発明の抗体は、ＩｇＧ４定常領域又は安定化ＩｇＧ４定常領域（例えば、上述したような）に結合又は融合した、本明細書に開示されるＶＨを含み、ＶＬは、カッパ軽鎖定常領域に結合又は融合されている。

【０１００】
本発明の抗原結合部位の機能的特性は、必要な変更を加えて本発明の抗体に適用されると解釈されるであろう。
【０１０１】
本明細書に記載される抗原結合部位は、精製され、実質的に精製され、単離され、且つ／又は組換え体であり得る。
【０１０２】
本発明は、対象における癌を処置又は予防する方法も提供し、方法は、本発明の抗原結合部位を対象に投与することを含む。この点について、抗原結合部位は、状態の再発を予防するために使用することができ、これは、状態の予防と見なされる。
【０１０３】
例示的な癌としては、前立腺癌が挙げられる。ＰＳＭＡに対する親和性を有する抗体がこの目的に有用であることが理解されるであろう。
【０１０４】
本発明は、対象における疾患、障害又は感染症を診断、監視又は予測するインビボでの方法も提供し、方法は、
（ａ）有効量の本明細書に記載される抗体を対象に投与することであって、前記抗体は、疾患、障害又は感染症に関連する抗原に特異的に結合する、投与することと；
（ｂ）前記抗原が見出される前記対象における部位において、抗体を濃縮させることと；
（ｃ）前記抗体を検出することと
を含み、それにより、前記抗体のバックグラウンド又は標準レベルを超える検出は、対象が前記疾患、障害又は感染症を有することを示す。
【０１０５】
本明細書で使用される場合、文脈が特に必要としない限り、用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」及び用語の変形、例えば「含むこと」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」及び「含まれる」は、更なる付加物、構成要素、整数又は工程を排除することを意図するものではない。
【０１０６】
本発明の更なる態様及び先行する段落に記載された態様の更なる実施形態は、実施例により与えられる以下の説明から、付随する図面を参照して明らかになるであろう。
【図面の簡単な説明】
【０１０７】
【図１】本発明の抗体の平均半減期及び半減期のテューキーの多重比較。エラーバーは、平均の標準誤差を表す。Ｊ５９１　ＩｇＧ＝ＰＳＭＡの結合についての対照ＨｕＪ５９１抗体。ＡＮＴ４０４４－Ｋ－ＤＯＴＡ＝ＤＯＴＡにコンジュゲートされた抗体ＡＮＴ４０４４リシン。ＡＮＴ４０４４－Ａ２－Ｋ－ＤＯＴＡ－ＤＯＴＡにコンジュゲートされた抗体ＡＮＴ４０４４－Ａ２リシン。ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ－Ｋ－ＤＯＴＡ＝ＦｃＲｎ結合領域にアミノ酸置換を有する抗体ＡＮＴ４０４４、ＤＯＴＡにコンジュゲートされたリシン。ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｇ－Ｋ－ＤＯＴＡ＝ＦｃＲｎ及びＦｃガンマ受容体結合領域にアミノ酸置換を有する抗体ＡＮＴ４０４４、ＤＯＴＡにコンジュゲートされたリシン。
【図２】本発明の選択抗体についての平均曲線下面積（ＡＵＣ）及びクリアランス（ＣＬ）。Ｊ５９１　ＩｇＧ＝ＰＳＭＡの結合についての対照ＨｕＪ５９１抗体。ＡＮＴ４０４４－Ｋ－ＤＯＴＡ＝ＤＯＴＡにコンジュゲートされた抗体ＡＮＴ４０４４リシン。ＡＮＴ４０４４－Ａ２－Ｋ－ＤＯＴＡ－ＤＯＴＡにコンジュゲートされた抗体ＡＮＴ４０４４－Ａ２リシン。ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ－Ｋ－ＤＯＴＡ＝ＦｃＲｎ結合領域にアミノ酸置換を有する抗体ＡＮＴ４０４４、ＤＯＴＡにコンジュゲートされたリシン。ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｇ－Ｋ－ＤＯＴＡ＝ＦｃＲｎ及びＦｃガンマ受容体結合領域にアミノ酸置換を有する抗体ＡＮＴ４０４４、ＤＯＴＡにコンジュゲートされたリシン。
【図３】ＰＥＴ画像のＲＯＩ分析により決定された８時間における抗体の体内分布。
【図４】ＰＥＴ画像のＲＯＩ分析により決定された２４時間における抗体の体内分布。

【図５】エクスビボガンマ計数により決定された４８時間における全抗体の体内分布。
【図６】ＰＥＴ画像のＲＯＩ分析により決定された４８時間における抗体の体内分布。
【図７】注射後５日までの抗体の血中濃度。
【図８】画像化により決定された抗体の腫瘍蓄積（８時間、２４時間、４８時間）。
【図９】腫瘍中の抗体の血液に対する比。抗体のそれぞれについての腫瘍：血液比（インビボでの腫瘍：尾の血液）を８時間、２４時間及び４８時間の時点について決定した。抗体ＪＮ００５及びｈＪ５９１と比較して、ＪＮ００６及びＪＮ００７の比は、全時点で有意に高い。
【図１０】腫瘍中の抗体の血液に対する比。抗体のそれぞれについての腫瘍：血液比（エクスビボ：エクスビボ）を４８時間及び１２０時間の時点について決定した。抗体ＪＮ００５及びｈＪ５９１と比較して、ＪＮ００６及びＪＮ００７の比は、全時点で有意に高い。
【図１１】本発明の例示的な抗体のインビボ画像化及びインビボ分布。本発明の抗－ＰＳＭＡ、ＦｃＲｎ－Ｋ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ－改変抗体を受容したＬＮＣａｐ異種移植マウスのＳＰＥＣＴ画像化。
【図１２】本発明の例示的な抗体の血液薬物動態。本発明の抗－ＰＳＭＡ、ＦｃＲｎ－Ｋ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ－改変抗体の投与後のマウスの血中で測定した放射能のレベル。
【図１３】本発明の例示的な抗体で処置したＬＮＣａｐ保持異種移植マウスにおける有効性試験。本発明の抗ＰＳＭＡ、Ｋ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ　ＦｃＲｎ－改変抗体による処置は、０日目と比較して１４日目に腫瘍体積の変化がないことから明らかなように、腫瘍増殖を有意に抑制した。対照（ＰＢＳ）グループでは、腫瘍体積の全体的な増加があり、ＦｃＲｎ－Ｋ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ処置グループの対応する時間と比較した場合、腫瘍は、９、１２及び１４日において有意に大きくなった。
【図１４】本発明の例示的な抗体の投与後の、ＬＮＣａｐ保持異種移植マウスにおける腫瘍：血液比。ＦｃＲｎ結合を低下させるように改変された本発明の抗ＰＳＭＡ、Ｋ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ抗体（ＨｕＸ５９２Ｒ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ１７７）の処置を受けたマウスについての腫瘍：血液比を示す。対照マウスに抗ＰＳＭＡ、Ｋ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ抗体（ＨｕＪ５９１－ＤＯＴＡ－Ｌｕ１７７）を投与した。非改変抗体を受けたマウスと比較して、特に２４時間及び４８時間の時点で、ＦｃＲｎ改変抗体を受けたマウスでは比がより大きい。
【図１５】エクスビボガンマ計数により測定した、健康なオスＢａｌｂ／ｃヌードマウスにおける^{177}Ｌｕ－標識ＨｕＸ５９２Ｒ及びＨｕＪ５９１体内分布。Ａは、投与後２４、４８及び７２時間で評価したＨｕＸ５９２Ｒ体内分布を示す一方、Ｂは、投与後７２時間のＨｕＸ５９２Ｒの体内分布をＨｕＪ５９１と比較する。
【図１６】ＨｕＸ５９２Ｒ（ＦｃＲｎ－Ｋ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ）の投与後の各治療コホート又は非処置対照におけるＬＮＣａＰ異種移植腫瘍の退縮。
【図１７】ＴＬＸ５９２（ＦｃＲｎ－Ｋ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ）、ＴＬＸ５９１（Ｋ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ抗体、本明細書でＨｕＪ５９１－ＤＯＴＡ－Ｌｕ１７７とも呼ばれる）の投与後又は非処置対照の試験期間中のコホート生存のプロット。
【発明を実施するための形態】
【０１０８】
本明細書に開示及び定義される本発明は、言及されるか又は文章若しくは図面から明らかな個々の特徴の２つ以上の代替的組み合わせの全てに拡張されることが理解されるであろう。これらの異なる組み合わせの全ては、本発明の様々な代替的態様を構成する。
【０１０９】
本発明の更なる態様及び先行する段落に記載された態様の更なる実施形態は、実施例により与えられる以下の説明から、付随する図面を参照して明らかとなるであろう。
【０１１０】
ここで、本発明の特定の実施形態を詳細に参照する。本発明は、実施形態と共に記載されるが、本発明をそれらの実施形態に限定しないことを意図することが理解されるであろう。むしろ、本発明は、特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内に含まれ得る全ての代替形態、修正形態及び均等物を包含することが意図される。

【０１１１】
本発明は、部分的には、放射免疫療法において使用するための放射性免疫複合体の毒性を低下させるための新たなアプローチの特定に関する。特に、本発明の方法は、放射性免疫複合体の治療可能性に有意に影響を及ぼすことなく毒性を低下させる。
【０１１２】
上記に概述したように、健康な組織及び細胞に対する放射線損傷は、放射免疫療法に関連した主要な問題である。この毒性は、ＲＡＩＴの放射線量を厳しく制限し、腫瘍処置の有効性を低下させる。
【０１１３】
しかしながら、本発明者らは、抗体の定常重鎖に対する改変により、新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）に対する抗体の親和性を低下させることにより、野生型抗体と比較して低下した血清半減期を有する、放射免疫療法において使用するための抗体を開発した。従って、本発明者らによって開発された抗体は、様々な免疫療法において使用するための有意な利点を有する。
【０１１４】
治療抗体のＦｃＲｎ結合ドメインの改変は以前に報告されているが、そのような改変は、ＦｃＲｎ親和性の増加、例えば治療抗体の血清半減期の増加及び循環中での治療抗体の滞留の延長を目的として開発されている。先行技術のアプローチとは対照的に、本発明は、治療剤の血清半減期を低下させることを目的としている。
【０１１５】
驚くべきことに、本発明者らは、血清半減期の低下（及び投与後の体循環からのクリアランス率の増加）にもかかわらず、本発明の抗体が、腫瘍部位に送達され、且つその部位で蓄積されるための、非改変抗体と同様の能力を有することを見出した。これらの結果は、それが改変抗体と非改変抗体の腫瘍負荷が統計的に異ならないことを示す点で驚くべきことであり、本発明者らにより採用されたアプローチが、血清半減期を有意に低下させ、それにより毒性を有意に低下させる一方、抗体がそれらの標的エピトープに結合する能力にも、標的部位に送達される抗体の能力にも負の影響を与えないことを示す。
【０１１６】
より重要なことに、本発明者らは、本発明の改変抗体が、増加したクリアランスにもかかわらず、腫瘍部位に滞留し続けることを示した。従って、本発明者らの研究は、放射性標識抗体のＦｃＲｎ又はＦｃＲｎ及びＦｃガンマ受容体結合ドメインの改変が腫瘍中に蓄積するその能力に関して抗体の治療可能性に影響を及ぼすことなく、循環中の放射性同位元素の量を減少させるのに有意な有用性を有することを示す。これは、さもなければ循環中の放射性同位元素のより長期の滞留から生じるであろう多くの毒性効果（骨髄照射及び骨への吸収の結果としての血液毒性を含む）を減少させることを含む、多くの利点を有する。更に、これまでの多くのＲＡＩＴ療法の用量制限毒性がこの延長された血液循環及び骨髄の照射の直接の結果としての血液毒性であることを考慮すると、本発明は、より高いレベルでの許容可能な投与の可能性を与え；従ってより効果的な治療をもたらす。骨への吸収及び骨髄照射）。
【０１１７】
予想外に、本発明者らは、定常重鎖に対するアミノ酸改変が、ＦｃＲｎ結合を妨げる一方、抗体がタンパク質Ｇ及びいくつかのタンパク質Ａ精製樹脂に結合する能力に影響を及ぼさないことも見出した。従って、他の免疫治療薬と比較して低下した血清半減期を有する本発明の抗体は、通常の抗体のために開発された同じ既存の／標準化された生成プラットフォームを使用して生成され得る。これは多くの他の操作された抗体形式、例えばミニボディ、ダイアボディなど（これらは、生成が煩わしく、ＩｇＧ分子よりも安定性が低い）のいくつかを上回る重要な利点である。また、身体に対して「天然」である分子形式として、全長抗体は、操作された抗体又は抗体断片よりも免疫原性応答の可能性が減少する傾向もある。
【０１１８】

本発明の抗体の更なる利点は、セラノスティクスの分野における適用のためのそれらの特定の適合性である。より詳細には、上述のように、抗体が適切な量の放射性物質を腫瘍に送達することができる一方、循環から迅速に排除されるため、抗体の低下した血清半減期は、放射性同位元素に結合される場合、抗体を治療に特に有用にする。加えて、抗体の低下した血清半減期は、抗体に結合され、画像化のために選択された放射性同位元素の迅速な排除が望ましい診断方法における使用に、抗体を特に適したものとする。診断としての最初の例における抗体の使用は、それにより抗体の治療形態の使用及び投与を知らせる（即ち抗体が治療に適した放射性同位元素に結合される場合）。従って、本発明の抗体は、異なる放射性同位元素に結合され、続いて「セラノスティック対」として使用される場合、有用性を見出す。

【０１１９】

一般事項

本明細書を通して、特に明記しない限り又は文脈が特に要求しない限り、単一の工程、物質の組成物、工程の群又は物質の組成物の群は、それらの工程、物質の組成物、工程の群又は物質の組成物の群の１つ及び複数（即ち１つ以上）を包含するものとする。従って、本明細書で使用される場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」及び「その」は、文脈が明確に特に指示しない限り、複数の態様を含み、逆も同様である。例えば、「１つの（ａ）」に対する参照は、単一及び２つ以上を含み；「１つの（ａｎ）」に対する参照は、単一及び２つ以上を含み；「その」に対する参照は、単一及び２つ以上を含む、などである。

【０１２０】

当業者は、本発明が、詳細に記載されたもの以外の変更及び修正を受け入れる余地があることを認識するであろう。本発明はそのような変更及び修正の全てを含むことを理解するべきである。本発明は、本明細書で参照又は示された工程、特徴、組成物及び化合物の全て並びに前記工程若しくは特徴の任意の及び全ての組み合わせ又は前記工程若しくは特徴の任意の２つ以上の組み合わせを個々に又は集合的にも含む。

【０１２１】

当業者は、本発明の実践に使用できる、本明細書に記載されるものと類似の又は均等な多くの方法及び材料を認めるであろう。本発明は、記載された方法及び材料に決して限定されない。

【０１２２】

本明細書で参照される特許及び公開の全ては、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１２３】

本発明は、例示の目的のみが意図される、本明細書に記載される特定の例によってその範囲が限定されない。機能的に均等な生成物、組成物及び方法は、本発明の範囲内に明確に含まれる。

【０１２４】

本明細書の本発明の任意の例又は実施形態は、特に詳細に明記しない限り、必要な変更を加えて、本発明の任意の他の例又は実施形態に適用されると解釈するものとする。

【０１２５】

特に詳細に定義しない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、当業者（例えば、細胞培養、分子遺伝学、免疫学、免疫組織化学、タンパク質化学及び生化学における）により通常理解されるものと同じ意味を有すると解釈するものとする。

【０１２６】

特に示さない限り、本開示で使用される組換えタンパク質、細胞培養及び免疫学的技術は、当業者に周知の標準的な手順である。そのような技術は、Ｊ．Ｐｅｒｂａｌ，Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ（１９８４）、Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓ

pring Harbour Laboratory Press（１９８９）、Ｔ．Ａ．Ｂｒｏｗｎ（編集者），Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅｓ １ ａｎｄ ２，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９１）、Ｄ．Ｍ．Ｇｌｏｖｅｒ ａｎｄ Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ（編集者），ＤＮＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｖｏｌｕｍｅｓ １－４，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９９５ ａｎｄ １９９６）及びＦ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（編集者），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８、現在までの全ての更新を含む）、Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ（編集者）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｕｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，（１９８８）及びＪ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．（編集者）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ（現在までの全ての更新を含む）などの情報源の文献全体に記載及び説明されている。

【０１２７】

本明細書の可変領域及びその一部、免疫グロブリン、抗体及びその断片の記載及び定義は、Ｋａｂａｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．，１９８７ ａｎｄ １９９１、Ｂｏｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４２，３０９－３２０，１９９４、Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ Ｊ．Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７，１９８７、Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ３４２，８７７－８８３，１９８９及び／又はＡｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２７３，９２７－９４８，１９９７における考察において更に明確化され得る。

【０１２８】

用語「及び／又は」、例えば「Ｘ及び／又はＹ」は、「Ｘ及びＹ」又は「Ｘ又はＹ」のいずれかを意味すると理解されるものとし、両方の意味又はいずれかの意味の明示的な支持を提供すると解釈されるものとする。

【０１２９】

本明細書で使用される場合、用語「に由来する」は、特定の整数が、特定の供給源から、必ずしもその供給源から直接ではないが、得ることができることを示すと解釈されるものとする。

【０１３０】

選択された定義

本明細書で使用される場合、腫瘍：血液比は、個体の血液中の抗体の量に対する同じ抗体（又は放射標識抗体）の量の比を指す。当業者は、腫瘍：血液比を計算するための標準的な技術に精通しているであろう。例えば、放射性同位元素（又は標識抗体）のエクスビボ活性濃度を測定し、組織（又は血液）１グラム当たりの減衰補正注入活性のパーセントとして表し、注入線量／ｇ（％ＩＤ／ｇ）の百分率として近似する。次いで、腫瘍対血液比を、血液中で検出された活性に対する腫瘍中で検出された活性として計算する。

【０１３１】

本明細書で使用される場合、用語「セラノスティック」は、診断及び治療のために使用される化合物／材料の能力を指す。用語「セラノスティック試薬」は、患者の疾患又は状態の検出、診断及び／又は処置の両方に適した任意の試薬に関する。セラノスティック化合物／材料の目的は、異なる診断剤と治療剤との間に存在し得る、体内分布及び選択性における望ましくない差異を克服することである。セラノスティック対を用いて、画像化放射性核種を含むセラノスティック化合物はまず、疾患を同定するか、又は身体中の罹患領域の位置を特定するために患者に投与される。同定／位置決定されると、疾患は、画像化放射性核種及び治療放射性核種の体内分布が同じであるため、標的特異的な様式で治療放射性核種を含むセラノスティック化合物を投与することによって処置され得る。

【０１３２】
本発明に関連して、本発明の抗体は、例えば、抗体が画像化又は診断目的のために放射性同位元素にコンジュゲートされ、同じ抗体が、治療に適した異なる放射性同位元素又は細胞毒性剤とコンジュゲートされる、セラノスティック対における包接に特に有用である。抗体の抗原結合部位は、診断（腫瘍分布、腫瘍サイズ、腫瘍密度を含む）を容易にするために、診断用放射性同位元素を腫瘍の部位に向けるか又はその部位を標的とする一方、抗体の同じ抗原結合部位は、治療のために放射性同位元素を腫瘍に向ける。
【０１３３】
本明細書で使用される用語「Ｆｃ領域」は、ときに「Ｆｃ」又は「Ｆｃドメイン」と呼ばれ、ＩｇＧ分子のパパイン消化によって得られる結晶性断片と相関するＩｇＧ分子の部分を指す。Ｆｃ領域は、ジスルフィド結合によって連結されたＩｇＧ分子の２つの重鎖のＣ末端半分からなる。それは抗原結合活性を有さないが、炭水化物部分並びに補体及びＦｃＲｎ受容体を含むＦｃ受容体のための結合部位を含む。Ｆｃ領域は、第２の定常ドメインＣＨ２全体（ＥＵインデックス番号付けシステムによれば、Ｋａｂａｔシステムにおける残基２４４～３６０としても定義される、ヒトＩｇＧ１の残基２３１～３４０）及び第３の定常ドメインＣＨ３（残基３４１～４４７　ＥＵインデックス／３６１～４７８　Ｋａｂａｔ）を含む（例えば、ＣＨ２の配列については国際公開第２０１５１７５８７４号パンフレットの配列番号１又は図１Ｃ及びＣＨ３の配列については配列番号２；図１Ｄ（参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたく；また、免疫グロブリンのＦｃ領域における様々な残基に使用される番号付け慣例の対比については、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃＣｈａｒｔ／Ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ／Ｈｕ＿ＩＧＨＧｎｂｅｒ．ｈｔｍｌ＃ｒｅｆｓを参照されたい）。
【０１３４】
本明細書で使用される場合、「ＥＵインデックス」又は「ＥＵ番号付けスキーム」は、ＥＵ抗体の番号付けを指す（Ｅｄｅｌｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９６９，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　６３：７８－８５、全体が参照により本明細書に組み込まれる）。本明細書で使用される場合、「Ｋａｂａｔシステム」は、Ｋａｂａｔ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．，１９８７　ａｎｄ　１９９１を指す。当業者は、所与のアミノ酸配列がＥＵ又はＫａｂａｔシステムのいずれに従って番号付けされるかを容易に決定することができるであろう。
【０１３５】
用語「単離されたタンパク質」又は「単離されたポリペプチド」は、その起源又は誘導源により、天然の状態でそれに付随する天然に結合した成分と結合していない；同じ供給源からの他のタンパク質を実質的に含まないタンパク質又はポリペプチドである。タンパク質は、当技術分野で公知のタンパク質精製技術を使用して、単離により、天然に結合する成分を実質的に含まないようにするか、又は実質的に精製することができる。「実質的に精製された」は、タンパク質が汚染物質を実質的に含まない、例えば汚染物質を少なくとも約７０％、又は７５％、又は８０％、又は８５％、又は９０％、又は９５％、又は９６％、又は９７％、又は９８％、又は９９％含まないことを意味する。
【０１３６】
用語「組換え体」は、人工遺伝子組換えの産物を意味すると理解されるものとする。従って、抗体抗原結合ドメインを含む組換えタンパク質に関連して、この用語は、Ｂ細胞成熟中に生じる天然の組換えの産物である対象の体内に天然に存在する抗体を包含しない。しかしながら、このような抗体が単離される場合、それは、抗体抗原結合ドメインを含む単離されたタンパク質と見なされるべきである。同様に、タンパク質をコードする核酸が組換え手段を用いて単離及び発現する場合、得られるタンパク質は、抗体抗原結合ドメインを含む組換えタンパク質である。組換えタンパク質は、例えば、それが発現する細胞、組織又は対象内にある場合、人工組換え手段によって発現したタンパク質も包含する。

【０１３７】
用語「タンパク質」は、単一のポリペプチド鎖、即ちペプチド結合によって連結された一連の連続するアミノ酸又は互いに共有結合若しくは非共有結合で連結された一連のポリペプチド鎖（即ちポリペプチド複合体）を含むと解釈されるものとする。例えば、一連のポリペプチド鎖は、適切な化学結合又はジスルフィド結合を用いて共有結合され得る。非共有結合の例には、水素結合、イオン結合、ファンデルワールス力及び疎水性相互作用が含まれる。
【０１３８】
用語「ポリペプチド」又は「ポリペプチド鎖」は、ペプチド結合によって連結された一連の連続アミノ酸を意味することが前記の段落から理解されるであろう。
【０１３９】
本明細書で使用される場合、用語「抗原結合部位」は、「抗原結合ドメイン」と互換的に使用され、抗原に特異的に結合することができる抗体の領域、即ちＶＨ若しくはＶＬ又はＶＨ及びＶＬの両方を含むＦｖを意味すると解釈されるものとする。抗原結合ドメインは、抗体全体に関連するものである必要はなく、例えば単離されている（例えば、ドメイン抗体）か、又は例えばｓｃＦｖなどの本明細書に記載されるような別の形態であり得る。
【０１４０】
本開示の目的のために、用語「抗体」は、Ｆｖに含まれる抗原結合ドメインにより、１つ又は数個の密接に関連した抗原に特異的に結合することができるタンパク質を含む。この用語は、４鎖抗体（例えば、２つの軽鎖及び２つの重鎖）、組換え又は改変抗体（例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ＣＤＲグラフト抗体、霊長類抗体、脱免疫抗体、合成ヒト化抗体、半抗体、二重特異性抗体）を含む。抗体は、一般には、定常領域又は定常断片又は結晶化可能な断片（Ｆｃ）に配置することができる定常ドメインを含む。抗体の例示的な形態は、それらの基本単位として４鎖構造を含む。全長抗体は、共有結合した２つの重鎖（約５０～７０ｋＤ）と、２つの軽鎖（それぞれ約２３ｋＤａ）とを含む。軽鎖は、一般には、可変領域（存在する場合）及び定常ドメインを含み、哺乳動物では、κ軽鎖又はλ軽鎖のいずれかである。重鎖は、一般に、可変領域及びヒンジ領域によって更なる定常ドメインに結合された１又は２つの定常ドメインを含む。哺乳動物の重鎖は、α、δ、ε、γ又はμのタイプの１つのものである。各軽鎖は、重鎖の１つにも共有結合している。例えば、２つの重鎖及び重鎖と軽鎖は、鎖間ジスルフィド結合と、非共有結合相互作用とによって一緒に保持されている。鎖間ジスルフィド結合の数は、異なるタイプの抗体間で変動し得る。各鎖は、Ｎ末端可変領域（ＶＨ又はＶＬ、それぞれは、約１１０アミノ酸長である）及びＣ末端における１つ以上の定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメイン（約１１０アミノ酸長のＣＬ）は、重鎖の第１の定常ドメイン（３３０～４４０アミノ酸長のＣＨ１）と整列し、ジスルフィド結合されている。軽鎖可変領域は、重鎖の可変領域と整合されている。抗体重鎖は、２つ以上の更なるＣＨドメイン（例えば、ＣＨ２、ＣＨ３など）を含み得、ＣＨ１及びＣＨ２定常ドメイン間にヒンジ領域を含み得る。抗体は、任意のタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１及びＩｇＡ２）又はサブクラスのものであり得る。一例では、抗体は、ネズミ（マウス又はラット）抗体又は霊長類（ヒトなど）抗体である。一例では、抗体重鎖は、Ｃ末端リシン残基を欠いている。一例では、抗体はヒト化、合成ヒト化、キメラ、ＣＤＲ移植又は脱免疫化される。
【０１４１】
用語「全長抗体」、「無傷抗体」又は「全抗体」は、抗体の抗原結合断片とは対照的に、実質的に無傷の形態の抗体を指すために互換的に使用される。詳細には、全抗体は、Ｆｃ領域を含む重鎖及び軽鎖を有するものを含む。定常ドメインは、野生型配列定常ドメイン（例えば、ヒト野生型配列定常ドメイン）又はそのアミノ酸配列変異体であり得る。
【０１４２】
本明細書で使用される場合、「可変領域」は、抗原に特異的に結合し得る、本明細書で定義されるような抗体の軽鎖及び／又は重鎖の部分を指し、相補性決定領域（ＣＤＲ）；

即ちＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３並びにフレームワーク領域（ＦＲ）のアミノ酸配列を含む。例えば、可変領域は、３つのＣＤＲと共に３又は４つのＦＲ（例えば、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及び任意選択的にＦＲ４）を含む。ＶＨは、重鎖の可変領域を指す。ＶＬは、軽鎖の可変領域を指す。

【０１４３】

本明細書で使用される場合、用語「相補性決定領域」（同義語ＣＤＲ；即ちＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）は、抗体可変領域のアミノ酸残基を指し、その存在は、特異的抗原結合に対する主要な寄与因子である。各可変領域ドメイン（ＶＨ又はＶＬ）は、典型的にはＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３と識別される３つのＣＤＲを有する。ＶＨのＣＤＲは、本明細書ではそれぞれＣＤＲ　Ｈ１、ＣＤＲ　Ｈ２及びＣＤＲ　Ｈ３とも呼ばれ、ここで、ＣＤＲ　Ｈ１はＶＨのＣＤＲ１に対応し、ＣＤＲ　Ｈ２はＶＨのＣＤＲ２に対応し、ＣＤＲ　Ｈ３はＶＨのＣＤＲ３に対応する。同様に、ＶＬのＣＤＲは、本明細書ではそれぞれＣＤＲ　Ｌ１、ＣＤＲ　Ｌ２及びＣＤＲ　Ｌ３とも呼ばれ、ここで、ＣＤＲ　Ｌ１はＶＬのＣＤＲ１に対応し、ＣＤＲ　Ｌ２はＶＬのＣＤＲ２に対応し、ＣＤＲ　Ｌ３はＶＬのＣＤＲ３に対応する。一例では、ＣＤＲ及びＦＲに割り当てられるアミノ酸位置は、Ｋａｂａｔ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．，１９８７　ａｎｄ　１９９１（本明細書では「Ｋａｂａｔ番号付けシステム」とも呼ばれる）に従って定義される。別の例では、ＣＤＲ及びＦＲに割り当てられるアミノ酸位置は、拡張Ｃｈｏｔｈｉａ番号付けスキーム（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｉｏｉｎｆｏ．ｏｒｇ．ｕｋ／ｍｄｅｘ．ｈｔｍｌ）に従って定義される。本発明は、Ｋａｂａｔ番号付けシステムによって定義されるＦＲ及びＣＤＲに限定されず、標準の番号付けシステム又はＣｈｏｔｈｉａ　ａｎｄ　Ｌｅｓｋ　Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７，１９８７；Ｃｈｏｔｈｉａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３４２：８７７－８８３，１９８９；及び／若しくはＡｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７３：９２７－９４８，１９９７の番号付けシステム；Ｈｏｎｎｅｇｈｅｒ　ａｎｄ　Ｐｌｕｅｋｔｈｕｎ　Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０９：６５７－６７０，２００１の番号付けシステム；又はＧｉｕｄｉｃｅｌｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２５：２０６－２１１　１９９７に論じられるＩＭＧＴシステムを含む全ての番号付けシステムを含む。一例では、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ番号付けシステムに従って定義される。任意選択的に、Ｋａｂａｔ番号付けシステムによる重鎖ＣＤＲ２は、本明細書に列挙される５つのＣ末端アミノ酸を含まないか、又はそれらのアミノ酸の任意の１つ以上は、別の天然に存在するアミノ酸で置換されている。この点に関して、Ｐａｄｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＦＡＳＥＢ　Ｊ．，９：１３３－１３９，１９９５は、重鎖ＣＤＲ２の５つのＣ末端アミノ酸が一般に抗原結合に関与しないことを確立した。

【０１４４】

「フレームワーク領域」（ＦＲ）は、ＣＤＲ残基以外の可変領域残基である。ＶＨのＦＲは、本明細書ではそれぞれＦＲ　Ｈ１、ＦＲ　Ｈ２、ＦＲ　Ｈ３及びＦＲ　Ｈ４とも呼ばれ、ここで、ＦＲ　Ｈ１はＶＨのＦＲ　１に対応し、ＦＲ　Ｈ２はＶＨのＦＲ　２に対応し、ＦＲ　Ｈ３はＶＨのＦＲ　３に対応し、ＦＲ　Ｈ４はＶＨのＦＲ　４に対応する。同様に、ＶＬのＦＲは、本明細書ではそれぞれＦＲ　Ｌ１、ＦＲ　Ｌ２、ＦＲ　Ｌ３及びＦＲ　Ｌ４と呼ばれ、ここで、ＦＲ　Ｌ１はＶＬのＦＲ　１に対応し、ＦＲ　Ｌ２はＶＬのＦＲ　２に対応し、ＦＲ　Ｌ３はＶＬのＦＲ　３に対応し、ＦＲ　Ｌ４はＶＬのＦＲ　４に対応する。

【０１４５】

本明細書で使用される場合、用語「Ｆｖ」は、ＶＬ及びＶＨが結合して、抗原結合ドメインを有する複合体を形成する、即ち抗原に特異的に結合することができる、多数のポリペプチド又は単一のポリペプチドから構成されているかにかかわらず、任意のタンパク質を意味すると解釈されるものとする。抗原結合ドメインを形成するＶＨ及びＶＬは、単一のポリペプチド鎖又は異なるポリペプチド鎖であり得る。更に、本発明のＦｖ（及び本発明の任意のタンパク質）は、同じ抗原に結合し得るか又は結合し得ない多数の抗原結合ド

メインを有し得る。この用語は、組換え手段を用いて生成された抗体に直接由来する断片、そのような断片に対応するタンパク質を包含すると理解されるものとする。いくつかの例では、ＶＨは重鎖定常ドメイン（ＣＨ）１に連結されず、且つ／又はＶＬは軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）に連結されない。ポリペプチド又はタンパク質を含む例示的なＦｖとしては、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）断片、ｓｃＦｖ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ若しくはより高次の複合体又はその定常領域若しくはドメイン、例えばＣＨ２若しくはＣＨ３ドメイン、例えばミニボディに連結した前述のいずれかが挙げられる。「Ｆａｂ断片」は、免疫グロブリンの一価抗原結合断片からなり、全抗体を酵素パパインで消化して、無傷軽鎖と重鎖の一部とからなる断片を得ることにより生成することができるか、又は組換え手段を用いて生成することができる。抗体の「Ｆａｂ’断片」は、全抗体をペプシンで処理した後、還元して、無傷軽鎖とＶＨ及び単一定常ドメインを含む重鎖の一部とからなる分子を得ることによって得ることができる。２つのＦａｂ’断片は、この方法で処理した抗体毎に得られる。Ｆａｂ’断片は、組換え手段によっても生成され得る。抗体の「Ｆ（ａｂ’）２断片」は、２つのジスルフィド結合によって一緒に保持された２つのＦａｂ’断片の二量体からなり、抗体分子全体を酵素ペプシンで処理することにより、その後の還元なしに得られる。「Ｆａｂ２」断片は、例えば、ロイシンジッパー又はＣＨ３ドメインを使用して連結された２つのＦａｂ断片を含む組換え断片である。「単鎖Ｆｖ」又は「ｓｃＦｖ」は、軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域が適切な柔軟なポリペプチドリンカーによって共有結合されている抗体の可変領域断片（Ｆｖ）を含む組換え分子である。

【０１４６】

本明細書で使用される場合、抗原結合部位又はその抗原結合ドメインと抗原との相互作用に関する用語「結合する」は、相互作用が抗原上の特定の構造（例えば、抗原決定基又はエピトープ）の存在に依存することを意味する。例えば、抗体は、一般にタンパク質ではなく、特定のタンパク質構造を認識し、それに結合する。抗体がエピトープ「Ａ」に結合する場合、標識「Ａ」及びタンパク質を含む反応において、エピトープ「Ａ」を含む分子（又は遊離の非標識「Ａ」）の存在は、抗体に結合した標識「Ａ」の量を低下させるであろう。

【０１４７】

本明細書で使用される場合、用語「～に特異的に結合する」又は「特異的に～に結合する」は、本発明の抗原結合部位が、代替的抗原又は細胞と比較して、より頻繁に、より迅速に、より長い持続時間及び／又はより高い親和性で、特定の抗原又はそれを発現している細胞と反応又は結合すること意味すると解釈されるものとする。例えば、抗原結合部位は、他の抗原に対するものよりも実質的高い親和性（例えば、１．５倍又は２倍又は５倍又は１０倍又は２０倍又は４０倍又は６０倍又は８０倍～１００倍又は１５０倍又は２００倍）で、ＰＳＭＡに結合する。

【０１４８】

本明細書で使用される場合、用語「エピトープ」（同義語「抗原決定基」）は、抗体の抗原結合ドメインを含む抗原結合部位が結合する、細胞表面タンパク質（ＰＳＭＡなど）の領域を意味すると理解されるものとする。

【０１４９】

本明細書で使用される場合、用語「状態」は、正常な機能の破壊又は妨害を指し、任意の特定の状態に限定されるべきではなく、疾患又は障害を含む。

【０１５０】

本明細書で使用される場合、「予防すること」、「予防する」又は「予防」は、本発明の抗原結合部位を投与することにより、状態の少なくとも１つの症状の発現を停止又は妨げることを含む。この用語は、再発を予防又は妨げるための寛解期の対象の処置も包含する。

【０１５１】

本明細書で使用される場合、用語「処置すること」、「処置する」又は「処置」は、本

明細書に記載される抗原結合部位を投与することにより、特定の疾患又は状態の少なくとも１つの症状を低下させ又は排除することを含む。

【０１５２】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、ヒト、例えば哺乳動物を含む任意の動物を意味すると解釈されるものとする。例示的な対象としては、ヒト及び非ヒト霊長類が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、対象は、ヒトである。

【０１５３】

改変抗体

本発明は、部分的にはＩｇＧ抗体に対する改変に関し、これは、ＦｃＲｎに対する抗体の親和性を低下又は消失させ、それにより抗体の血清半減期を低下させる、抗体の領域に対する１つ以上のアミノ酸置換を含む。

【０１５４】

本発明によれば、血清半減期の低下が所望される任意の抗体が、本明細書に記載される方法に従って改変され得ることが理解されるであろう。更に、好ましい実施形態では、血清半減期が低下するように改変された抗体は、診断又は治療用途、より詳細にはセラノスティック用途に有用な抗体であることが理解されるであろう。

【０１５５】

本発明の方法による使用に適した抗体の例としては、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（登録商標））、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ（登録商標））、ジヌツキシマブ（Ｕｎｉｔｕｘｉｎ（登録商標））、パニツムマブ（Ｖｅｃｔｉｂｉｘ（登録商標））、ペムブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ（登録商標））、ニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ（登録商標））、トシツモマブ（Ｂｅｘｘａｒ（登録商標））、イブリツモマブ（Ｚｅｖａｌｉｎ（登録商標））が挙げられる。しかしながら、本発明は、抗体がさもなければＦｃＲｎによる結合を受けやすいことを条件として、特定の抗体に限定されるものではないことも理解されるであろう。

【０１５６】

本発明は、腫瘍抗原を標的とする抗体薬物コンジュゲートの使用も意図し、ここで、コンジュゲートは、細胞毒性ペイロードを含む。そのような抗体の例としては、ゲムツズマブ（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（登録商標））、ブレンツキシマブ（Ａｄｃｅｔｒｉｓ（登録商標））、イノツズマブ（Ｂｅｓｐｏｎｓａ（登録商標））、グレンバツムマブ（ＣＤＸ－０１１）、アネツマブ（ＢＡＹ　９４－９３４３）、ミルベツキシマブ（ＩＭＧＮ８５３）、デパツキシズマブ（ＡＢＴ－４１４）、ロバルピツズマブ（Ｒｏｖａ－Ｔ）及びロバルピツズマブタリリン（ＳＧＮ－ＣＤ３３Ａ）が挙げられる。更なる例は、Ｌａｍｂｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．，２０１７，Ａｄｖ　Ｔｈｅｒ（２０１７）３４：１０１５－１０３５（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１５７】

特定の実施形態では、ＦｃＲｎに対する親和性を低下させる本発明による改変に適している抗体は、表１に示される配列の１つ以上を有する抗体である。

【０１５８】

本発明は、本明細書に開示される配列に対して少なくとも８０％の同一性を有する、それをコードする抗原結合部位又は核酸も提供する。一例では、本発明の抗原結合部位又は核酸は、本明細書に開示される配列に対して少なくとも約８５％、又は９０％、又は９５％、又は９７％、又は９８％、又は９９％同一の配列を含む。

【０１５９】

代替的又は追加的に、抗原結合部位は、任意の例に従って本明細書に記載されるV_H又はV_LのＣＤＲに対して少なくとも約８０％、又は８５％、又は９０％、又は９５％、又は９７％、又は９８％、又は９９％同一のＣＤＲ（例えば、３つのＣＤＲ）を含む。

【０１６０】

別の例では、本発明の核酸は、任意の例に従って本明細書に記載される機能を有する抗原結合部位をコードする配列に対して少なくとも約８０％、又は８５％、又は９０％、又

は９５％、又は９７％、又は９８％、又は９９％同一の配列を含む。本発明は、遺伝暗号の縮重の結果、本明細書に例示される配列と異なる、本発明の抗原結合部位をコードする核酸も包含する。

【０１６１】

核酸又はポリペプチドの％同一性は、ＧＡＰ（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８，４４３－４５３，１９７０）分析（ＧＣＧプログラム）により、ギャップ形成ペナルティ＝５及びギャップ伸長ペナルティ＝０．３を用いて決定される。クエリ配列は、少なくとも５０残基長であり、ＧＡＰ分析は、２つの配列を少なくとも５０残基の領域にわたって整合する。例えば、クエリ配列は、少なくとも１００残基長であり、ＧＡＰ分析は、２つの配列を少なくとも１００残基の領域にわたって整合する。例えば、２つの配列は、それらの全長にわたって整合される。

【０１６２】

本発明は、本明細書に記載される抗原結合部位をコードする核酸に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸も意図する。「中程度のストリンジェンシー」は、本明細書では、２ｘＳＳＣ緩衝液、０．１％（ｗ／ｖ）ＳＤＳ中、４５℃～６５℃の範囲の温度で又は均等な条件で行われるハイブリダイゼーション及び／又は洗浄と定義される。「高ストリンジェンシー」は、本明細書では、０．１ｘＳＳＣ緩衝液、０．１％（ｗ／ｖ）ＳＤＳ又はより低い塩濃度中、少なくとも６５℃の温度で又は均等な条件で行われるハイブリダイゼーション及び／又は洗浄と定義される。本明細書における特定のレベルのストリンジェンシーへの言及は、当業者に公知のＳＳＣ以外の洗浄／ハイブリダイゼーション溶液を使用する均等な条件を包含する。例えば、二本鎖核酸の鎖が解離する温度（融解温度又はＴｍとしても知られる）を計算するための方法は、当技術分野で公知である。核酸のＴｍに類似する（例えば、５℃以内又は１０℃以内）又は等しい温度は、高ストリンジェンシーと見なされる。中間のストリンジェンシーは、核酸の計算Ｔｍの１０℃～２０℃又は１０℃～１５℃以内であると見なされる。

【０１６３】

本発明は、本明細書に示される配列と比較して１つ以上の保存的アミノ酸置換を含む、本発明の抗原結合部位の突然変異体形態も意図する。いくつかの例では、抗原結合部位は、１０以下、例えば９又は８又は７又は６又は５又は４又は３又は２又は１つの保存的アミノ酸置換を含む。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖及び／又はハイドロパシー及び／又は親水性を有するアミノ酸残基で置き換えられたものである。

【０１６４】

類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されており、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β－分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。ハイドロパシー指数は、例えば、Ｋｙｔｅ ａｎｄ Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１５７：１０５－１３２，１９８２に記載されており、親水性指数は、例えば、米国特許第４５５４１０１号明細書に記載されている。

【０１６５】

本発明は、非保存的アミノ酸変化も意図する。例えば、荷電アミノ酸の、別の荷電アミノ酸及び中性又は正に荷電したアミノ酸との置換は、特に興味深い。いくつかの例では、抗原結合部位は、１０以下、例えば９又は８又は７又は６又は５又は４又は３又は２又は１つの非保存的アミノ酸置換を含む。

【０１６６】

一例では、変異は、本発明の抗原結合部位の抗原結合ドメインのＦＲ内に生じる。別の例では、変異は、本発明の抗原結合部位のＣＤＲ内に生じる。

【０１６７】
抗原結合部位の突然変異体形態を生成する例示的な方法には、
・ＤＮＡ（Ｔｈｉｅ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．５２５：３０９－３２２，２００９）又はＲＮＡ（Ｋｏｐｓｉｄａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．１０７：１６３－１６８，２００６；Ｋｏｐｓｉｄａｓ ｅｔ ａｌ．ＢＭＣ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，７：１８，２００７；及び国際公開第１９９９／０５８６６１号パンフレット）の変異誘発；
・ポリペプチドをコードする核酸を変異誘発物細胞、例えばＸＬ－１Ｒｅｄ、ＸＬ－ｍｕｔＳ及びＸＬ－ｍｕｔＳ－Ｋａｎｒ細菌細胞に導入すること（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）；
・例えば、Ｓｔｅｍｍｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ ３７０：３８９－９１，１９９４に開示されているＤＮＡシャッフリング；並びに
・例えば、Ｄｉｅｆｆｅｎｂａｃｈ（ｅｄ）ａｎｄ Ｄｖｅｋｓｌｅｒ（ｅｄ）（ＰＣＲ Ｐｒｉｍｅｒ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，ＮＹ，１９９５において）に記載されている部位特異的変異誘発が含まれる。

【０１６８】
本発明の突然変異体抗原結合部位の生物学的活性（例えば、抗原結合）を決定する例示的な方法は、当業者に明らかであり、且つ／又は本明細書に記載されている。例えば、抗原結合、結合の競合阻害、親和性、結合、解離及び治療有効性を決定する方法は、本明細書に記載されている。

【０１６９】
定常領域
本発明は、抗体の定常領域を含む、本明細書に記載される抗原結合部位及び／又は抗体を包含する。これには、Ｆｃに融合された抗体の抗原結合断片が含まれる。

【０１７０】
本発明のタンパク質を生成するのに有用な定常領域の配列は、多数の異なる供給源から得ることができる。いくつかの例では、タンパク質の定常領域又はその部分は、ヒト抗体に由来する。定常領域又はその部分は、ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡ及びＩｇＥを含む任意の抗体クラス並びにＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３及びＩｇＧ４を含む任意の抗体アイソタイプに由来し得る。一例では、定常領域は、ヒトアイソタイプＩｇＧ４又は安定化ＩｇＧ４定常領域である。

【０１７１】
好ましい改変
本発明は、Ｆｃ領域又は定常領域を含む抗体又は抗原結合部位に対する改変を特に意図する。

【０１７２】
新生児Ｆｃ－受容体（ＦｃＲｎ）は、ＩｇＧクラスの抗体のインビボでの代謝運命に重要である。ＦｃＲｎはリソソーム分解経路からＩｇＧを救うように機能し、低下したクリアランス及び増加した半減期をもたらす。２つのポリペプチド：５０ｋＤａクラスＩ主要組織適合性複合体様タンパク質（ａ－ＦｃＲｎ）及び１５ｋＤａ ｐ２－ミクログロブリン（β２ηι）からなるヘテロ二量体タンパク質である。ＦｃＲｎは、クラスＩｇＧの抗体のＦｃ－領域のＣＨ２－ＣＨ３部分に高い親和性で結合する。クラスＩｇＧの抗体とＦｃＲｎとの間の相互作用は、ｐＨ依存性であり、１：２化学量論で起こり、即ち、１つのＩｇＧ抗体分子は、その２つの重鎖Ｆｃ－領域ポリペプチドを介して２つのＦｃＲｎ分子と相互作用し得る（例えば、Ｈｕｂｅｒ，Ａ．Ｈ．，ｅｔ ａｌ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２３０（１９９３）１０７７－１０８３を参照されたい）。

【０１７３】
従って、ＩｇＧのインビトロでのＦｃＲｎ結合特性／特徴は、その血液循環中でのインビボ薬物動態特性を示すものである。ＦｃＲｎとＩｇＧクラスの抗体のＦｃ－領域との間の相互作用には、重鎖ＣＨ２－及びＣＨ３－ドメインの異なるアミノ酸残基が関与する。

【０１７４】
ＦｃＲｎ結合に影響を及ぼし、それによって血液循環中の半減期に影響を及ぼす様々な変異は公知である。マウスＦｃ－領域－マウスＦｃＲｎ相互作用に重要なＦｃ－領域残基は、部位特異的変異誘発（例えば、Ｄａｌｌ’Ａｃｑｕａ，Ｗ．Ｆ．，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ　１６９（２００２）５１７１－５１８０を参照されたい）によって同定されている。残基Ｉｌｅ２５３、Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３３、Ａｓｎ４３４及びＨｉｓ４３５（ＥＵインデックス番号付けシステムによる番号付け）は、相互作用に関与する（Ｍｅｄｅｓａｎ，Ｃ，ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２６（１９９６）２５３３－２５３６；Ｆｉｒａｎ，Ｍ．，ｅｔ　ａｌ，Ｉｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３（２００１）９９３－１００２；Ｋｉｍ，Ｊ．Ｋ．，ｅｔ　ａｌ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４（１９９４）５４２－５４８）。（Ｋａｂａｔシステムを使用すると、関連残基は、Ｉｌｅ２６６、Ｈｉｓ３２９、Ｈｉｓ４６４、Ａｓｎ４６５及びＨｉｓ４６６である）。残基Ｉｌｅ２５３、Ｈｉｓ３１０及びＨｉｓ４３５は、ヒトＦｃ－領域とネズミＦｃＲｎとの相互作用に重要であることが見出された（Ｋｉｍ，Ｊ．Ｋ．，ｅｔ　ａｌ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９（１９９９）２８１９－２８８５）。
【０１７５】
より詳細には、抗体は、タンパク質の半減期を低下させる１つ以上のアミノ酸置換を含み得る。例えば、抗体は、新生児Ｆｃ領域（ＦｃＲｎ）に対するＦｃ領域の親和性を低下させる１つ以上のアミノ酸置換を含むＦｃ領域を含む。
【０１７６】
本発明は、天然に存在するクラスＩｇＧ抗体定常領域と実質的に同一の定常領域を有する抗体も提供し、ここで、残基Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３５及びＩｌｅ２５３からなる群から選択される少なくとも１つのアミノ酸残基は、天然に存在するクラスＩｇＧ抗体に存在するものと異なり、それにより前記抗体のＦｃＲｎ結合親和性及び／又は血清半減期を、天然に存在する抗体に対して変化させる。好ましい実施形態では、天然に存在するクラスＩｇＧ抗体は、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ２Ｍ３、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４分子の重鎖定常領域を含む。
【０１７７】
また好ましい実施形態では、天然に存在するクラスＩｇＧ抗体と実質的に同一の定常領域を有する抗体の重鎖定常領域からのアミノ酸残基３１０又は残基４３５は、ヒスチジンではない任意のアミノ酸であり、ＦｃＲｎに対する定常領域の親和性を低下させる。例えば、残基３１０又は４３５におけるアミノ酸は、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ロイシン、イソロイシン、アルギニン、プロリン、グルタミン、メチオニン、セリン、スレオニン、リシン、アスパラギン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、バリン又はグリシンであり得る。
【０１７８】
好ましくは、位置３１０における残基は、アラニン又はグルタミン酸若しくはグルタミンから選択され；又は重鎖定常領域からのアミノ酸残基４３５は、アルギニン、グルタミン若しくはアラニンから選択される。他の好ましい実施形態では、天然に存在するクラスＩｇＧ抗体と実質的に同一の定常領域を有する抗体は、位置３１０におけるアラニン残基及び位置４３５におけるグルタミン残基を有する。
【０１７９】
本発明の好ましい実施形態では、改変抗体のＦｃＲｎに対する結合親和性及び／又は血清半減期は、少なくとも約３０％、５０％、８０％、２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍又は１００倍低下する。本発明の好ましい実施形態では、前記改変抗体のＦｃＲｎに対する結合親和性及び／又は血清半減期は、少なくとも約２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％又は９９％低下する。
【０１８０】
加えて、本発明の抗体は、任意の１つ以上のＦｃガンマ受容体に対する抗体の親和性を

改変する１つ以上の変異を含み得る。

【０１８１】

本発明の好ましい実施形態では、定常領域のＦｃ領域は、エフェクター機能を誘導する能力を保持する。一例では、定常領域のＦｃ領域は、野生型ＩｇＧと比較してエフェクター機能を増加させることを含む、エフェクター機能を調節する１つ以上のアミノ酸置換を含む。

【０１８２】

一例では、定常領域のＦｃ領域は、エフェクター機能を誘導する能力が、例えば、天然又は野生型ヒトＩｇＧ１又はＩｇＧ３　Ｆｃ領域と比較して低下している。一例では、エフェクター機能は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）及び／又は抗体依存性細胞媒介性食作用（ＡＤＣＰ）及び／又は補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）である。タンパク質を含むＦｃ領域のエフェクター機能のレベルを評価する方法は、当技術分野で公知であり、且つ／又は本明細書に記載されている。

【０１８３】

一例では、抗体がエフェクター機能を誘導する能力を改変するアミノ酸置換は、重鎖定常領域からの残基Ｉｌｅ２５３におけるアミノ酸置換である。一例では、置換は、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ロイシン、イソロイシン、アルギニン、プロリン、グルタミン、メチオニン、セリン、スレオニン、リシン、アスパラギン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、バリン又はグリシンから選択される任意のアミノ酸へのものであり、この置換は、抗体がエフェクター機能を誘導する能力を低下させる。好ましい実施形態では、残基２５３におけるＩｌｅからの置換は、アルギニン、プロリン又はアスパラギン酸塩、より好ましくはアラニンへのものである。

【０１８４】

一例では、Ｆｃ領域は、ＩｇＧ４　Ｆｃ領域（即ちＩｇＧ４定常領域から）、例えばヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域である。適切なＩｇＧ４　Ｆｃ領域の配列は、当業者に明らかであり、且つ／又は公に入手可能なデータベースで入手可能（例えば、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎから入手可能）である。

【０１８５】

一例では、定常領域は、安定化ＩｇＧ４定常領域である。用語「安定化ＩｇＧ４定常領域」は、Ｆａｂアーム交換若しくはＦａｂアーム交換を受ける傾向又は半抗体の形成若しくは半抗体の形成の傾向が低下するように改変されたＩｇＧ４定常領域を意味すると理解される。「Ｆａｂアーム交換」は、ＩｇＧ４重鎖及び結合した軽鎖（半分子）が別のＩｇＧ４分子からの重鎖－軽鎖対と交換される、ヒトＩｇＧ４についてのタンパク質改変のタイプを指す。従って、ＩｇＧ４分子は、２つの異なる抗原を認識する２つの異なるＦａｂアームを獲得し得る（二重特異性分子をもたらす）。Ｆａｂアーム交換は、インビボで自然に起こり、また、精製血液細胞又は還元グルタチオンなどの還元剤によってインビトロで誘導され得る。「半抗体」は、ＩｇＧ４抗体が解離して、それぞれが単一重鎖及び単一軽鎖を含む２つの分子を形成する際に形成される。

【０１８６】

一例では、安定化ＩｇＧ４定常領域は、Ｋａｂａｔのシステムによるヒンジ領域の位置２４１にプロリンを含む（Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ　Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　ＤＣ　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ　ａｎｄ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，１９８７　ａｎｄ／ｏｒ　１９９１）。この位置は、ＥＵ番号付けシステムによるヒンジ領域の位置２２８に対応する。ヒトＩｇＧ４では、この残基は、一般にセリンである。プロリンをセリンに置換した後、ＩｇＧ４ヒンジ領域は、配列ＣＰＰＣを含む。この点において、当業者は「ヒンジ領域」が、抗体の２つのＦａｂアームに可動性を付与するＦｃ及びＦａｂ領域を連結する抗体重鎖定常領域のプロリンリッチ部分であることを認識するであろう。ヒンジ領域は、重鎖間ジスルフィド結合に関

与するシステイン残基を含む。これは、一般に、Ｋａｂａｔの番号付けシステムによるヒトＩｇＧ１のＧｌｕ２２６からＰｒｏ２４３（又はＥＵインデックスを用いてＧｌｕ２１６からＰｒｏ２３０）への伸長として規定される。他のＩｇＧアイソタイプのヒンジ領域は、最初及び最後のシステイン残基を配置して、同じ位置で重鎖間ジスルフィド（Ｓ－Ｓ）結合を形成することにより、ＩｇＧ１配列と整列され得る（例えば、国際公開第２０１０／０８０５３８号パンフレットを参照されたい）。

【０１８７】

安定化ＩｇＧ４抗体の更なる例は、ヒトＩｇＧ４の重鎖定常領域の位置４０９（ＥＵ番号付けシステムによる）におけるアルギニンが、リシン、スレオニン、メチオニン又はロイシンで置換されている抗体である（例えば、国際公開第２００６／０３３３８６号パンフレットに記載されているように）。定常領域のＦｃ領域は、追加的又は代替的に：４０５（ＥＵ番号付けシステムによる）に対応する位置におけるアラニン、バリン、グリシン、イソロイシン及びロイシンからなる群から選択される残基を含み得る。任意選択的に、ヒンジ領域は、位置２４１にプロリンを含む（即ちＣＰＰＣ配列）（上述のように）。

【０１８８】

別の例では、Ｆｃ領域は、低下したエフェクター機能を有するように改変された領域、即ち「非免疫賦活性Ｆｃ領域」である。例えば、Ｆｃ領域は、２６８、３０９、３３０及び３３１からなる群から選択される１つ以上の位置における置換を含むＩｇＧ１　Ｆｃ領域である。別の例では、Ｆｃ領域は、以下の変化Ｅ２３３Ｐ、Ｌ２３４Ｖ、Ｌ２３５Ａ及びＧ２３６の削除の１つ以上並びに／又は以下の変化Ａ３２７Ｇ、Ａ３３０Ｓ及びＰ３３１Ｓの１つ以上を含むＩｇＧ１　Ｆｃ領域である（Ａｒｍｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒ Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９：２６１３－２６２４，１９９９；Ｓｈｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．２７６（９）：６５９１－６０４，２００１）。非免疫賦活性Ｆｃ領域の更なる例は、例えば、Ｄａｌｌ’Ａｃｑｕａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７７：１１２９－１１３８　２００６；及び／又はＨｅｚａｒｅｈ　Ｊ　Ｖｉｒｏｌ；７５：１２１６１－１２１６８，２００１）に記載されている。

【０１８９】

別の例では、Ｆｃ領域は、例えば、ＩｇＧ４抗体からの少なくとも１つのC_H2ドメインと、ＩｇＧ１抗体からの少なくとも１つのC_H3ドメインとを含むキメラＦｃ領域であり、ここで、Ｆｃ領域は、２４０、２６２、２６４、２６６、２９７、２９９、３０７、３０９、３２３、３９９、４０９及び４２７（ＥＵ番号付け）からなる群から選択される１つ以上のアミノ酸位置における置換を含む（例えば、国際公開第２０１０／０８５６８２号パンフレットに記載されているように）。例示的な置換には、２４０Ｆ、２６２Ｌ、２６４Ｔ、２６６Ｆ、２９７Ｑ、２９９Ａ、２９９Ｋ、３０７Ｐ、３０９Ｋ、３０９Ｍ、３０９Ｐ、３２３Ｆ、３９９Ｓ及び４２７Ｆが含まれる。

【０１９０】

抗体生成

好ましくは、任意の例による、本明細書に記載される抗原結合部位は、組換え体である。

【０１９１】

組換えタンパク質の場合、これをコードする核酸を、発現コンストラクト又はベクターにクローニングすることができ、次いでこれを宿主細胞、例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、酵母細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞、例えばサルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ヒト胚腎臓（ＨＥＫ）細胞又は骨髄腫細胞（さもなければタンパク質を生成しない）にトランスフェクトする。タンパク質の発現のために使用される例示的な細胞は、ＣＨＯ細胞、骨髄腫細胞又はＨＥＫ細胞である。これらの目的を達成するための分子クローニング技術は、当技術分野で公知であり、例えばＡｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，（編集者），Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ　Ｐｕｂ．Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　ａｎｄ　Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ（１９８８、現在までの全ての更新を含む）又はＳａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍ

ａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）に記載されている。非常に様々なクローニング及びインビトロ増幅方法が、組換え核酸の構成に適している。組換え抗体の生成方法は、当技術分野でも公知であり、例えば米国特許第４８１６５６７号明細書又は米国特許第５５３０１０１号明細書を参照されたい。

【０１９２】

単離後、核酸は、更なるクローニング（ＤＮＡの増幅）のために又は無細胞システム中若しくは細胞中での発現のために、発現コンストラクト又は発現ベクター中のプロモーターに作動可能に連結するように挿入される。

【０１９３】

本明細書で使用される場合、用語「プロモーター」は、その最も広い文脈で解釈されるべきであり、例えば発生及び／若しくは外部刺激に応答して又は組織特異的な様式で核酸の発現を変化させる更なる調節エレメント（例えば、上流活性化配列、転写因子結合部位、エンハンサー及びサイレンサー）を有する又は有さない、正確な転写開始に必要なＴＡＴＡボックス又はイニシエーターエレメントを含むゲノム遺伝子の転写調節配列を含む。本発明の文脈では、用語「プロモーター」は、プロモーターが作動可能に連結された核酸の発現を付与、活性化又は増強する、組換え、合成若しくは融合核酸又は誘導体を記載するのにも使用される。例示的なプロモーターは、１つ以上の特定の調節エレメントの更なるコピーを含んで、発現を更に増強し、且つ／又は前記核酸の空間的発現及び／若しくは時間的発現を変化させ得る。

【０１９４】

本明細書で使用される場合、用語「作動可能に連結された」は、核酸の発現がプロモーターによって制御されるような、核酸に対するプロモーターの位置付けを意味する。

【０１９５】

細胞中での発現のための多数のベクターが入手可能である。ベクター成分は、一般に、以下の１つ以上を含むが、これらに限定されない：シグナル配列、タンパク質をコードする配列（例えば、本明細書に提供される情報に由来する）、エンハンサーエレメント、プロモーター及び転写終結配列。当業者は、タンパク質の発現に適した配列を認識するであろう。例示的なシグナル配列としては、原核生物分泌シグナル（例えば、ｐｅｌＢ、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、ＩｐｐまたはII熱安定性エンテロトキシンＩＩ）、酵母分泌シグナル（例えば、インベルターゼリーダー、α因子リーダー又は酸性ホスファターゼリーダー）又は哺乳動物分泌シグナル（例えば、単純ヘルペスｇＤシグナル）が挙げられる。

【０１９６】

哺乳動物細胞中で活性な例示的なプロモーターには、サイトメガロウイルス即時初期プロモーター（ＣＭＶ－ＩＥ）、ヒト伸長因子１－αプロモーター（ＥＦ１）、核内低分子ＲＮＡプロモーター（Ｕ１ａ及びＵ１ｂ）、α－ミオシン重鎖プロモーター、サルウイルス４０プロモーター（ＳＶ４０）、ラウス肉腫ウイルスプロモーター（ＲＳＶ）、アデノウイルス主要後期プロモーター、β－アクチンプロモーター；ＣＭＶエンハンサー／β－アクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター又はその活性な断片を含むハイブリッド調節エレメントが含まれる。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、ＳＶ４０によって形質転換された猿腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）；ヒト胚腎臓株（懸濁液培養物中での増殖のためにサブクローニングされた２９３又は２９３細胞；ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１０）；又はチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）である。

【０１９７】

例えば、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）、サッカロマイセス・セレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）及びＳ．ポンベ（Ｓ．ｐｏｍｂｅ）を含む群から選択される酵母細胞などの酵母細胞内での発現に適した典型的なプロモーターとしては、ＡＤＨ１プロモーター、ＧＡＬ１プロモーター、ＧＡＬ

４プロモーター、ＣＵＰ１プロモーター、ＰＨＯ５プロモーター、ｎｍｔプロモーター、ＲＰＲ１プロモーター又はＴＥＦ１プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１９８】

発現のために、それを含む単離された核酸又は発現コンストラクトを細胞に導入する手段は、当業者に公知である。所与の細胞に使用される技術は、公知の成功した技術に依存する。組換えＤＮＡを細胞に導入するための手段には、マイクロインジェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、例えばリポフェクタミン（Ｇｉｂｃｏ、ＭＤ、ＵＳＡ）及び／又はセルフェクチン（Ｇｉｂｃｏ、ＭＤ、ＵＳＡ）を使用することによるリポソーム媒介トランスフェクション、ＰＥＧ媒介性ＤＮＡ取込み、電気穿孔及び例えばとりわけＤＮＡ被覆タングステン又は金粒子（Ａｇｒａｃｅｔｕｓ　Ｉｎｃ．、ＷＩ、ＵＳＡ）を使用することによる微粒子銃法が含まれる。

【０１９９】

タンパク質の生成に使用される宿主細胞は、使用される細胞タイプに応じて、多様な培地中で培養され得る。Ｈａｍ’ｓ　Ｆｌ０（Ｓｉｇｍａ）、Ｍｉｎｉｍａｌ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ（（ＭＥＭ）、（Ｓｉｇｍａ）、ＲＰＭｌ－１６４０（Ｓｉｇｍａ）及びＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｅａｇｌｅ’ｓ　Ｍｅｄｉｕｍ（（ＤＭＥＭ）、Ｓｉｇｍａ）などの市販の培地は、哺乳動物細胞を培養するのに適している。本明細書で論じられる他の細胞タイプの培養のための培地は、当技術分野で公知である。

【０２００】

タンパク質の単離

タンパク質の単離方法は、当技術分野で公知であり、且つ／又は本明細書に記載されている。

【０２０１】

抗原結合部位が培養培地に分泌される場合、そのような発現システムからの上清は、最初に、市販のタンパク質濃度フィルター、例えばＡｍｉｃｏｎ又はＭｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｐｅｌｌｉｃｏｎ限外濾過ユニットを使用して濃縮され得る。タンパク質分解を阻害するためにＰＭＳＦなどのプロテアーゼ阻害剤が前述の工程のいずれかに含まれ得、付随的な汚染物質の増殖を防止するために抗生物質が含まれ得る。代替的又は追加的に、上清は、濾過され、且つ／又は例えば連続遠心分離を用いて、タンパク質を発現している細胞から分離され得る。

【０２０２】

細胞から調製された抗原結合部位は、例えば、イオン交換、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、親和性クロマトグラフィー（例えば、タンパク質Ａ親和性クロマトグラフィー又はタンパク質Ｇクロマトグラフィー）又は前述の任意の組み合わせを用いて精製され得る。これらの方法は、当技術分野で公知であり、例えば国際公開第９９／５７１３４号パンフレット又はＥｄ　Ｈａｒｌｏｗ　ａｎｄ　Ｄａｖｉｄ　Ｌａｎｅ（編集者）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，（１９８８）に記載されている。

【０２０３】

当業者は、タンパク質が精製又は検出を容易にするためにタグ、例えばポリ－ヒスチジンタグ、例えばヘキサ－ヒスチジンタグ、又はインフルエンザウイルスヘマグルチニン（ＨＡ）タグ、又はサルウイルス５（Ｖ５）タグ、又はＦＬＡＧタグ、又はグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）タグを含むように改変され得ることも認識するであろう。次いで、得られたタンパク質を親和性精製などの当技術分野で公知の方法を用いて精製する。例えば、ヘキサ－ヒスタグを含むタンパク質は、タンパク質を含むサンプルを、固体又は半固体担体上に固定されたヘキサ－ヒスタグに特異的に結合するニッケル－ニトリロ三酢酸（Ｎｉ－ＮＴＡ）と接触させ、サンプルを洗浄して非結合タンパク質を除去し、続いて結合タンパク質を溶出することによって精製される。代替的に又は加えて、タグに結合するリガンド又は抗体を親和性精製方法において使用する。

【０２０４】
抗体への放射性同位元素の結合
本発明の任意の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、診断又は治療剤に直接又は間接的に結合され得、好ましくは、診断又は治療剤は、放射性同位元素である。
【０２０５】
適切な同位元素の例としては、アクチニウム－２２５（^{225}Ａｃ）、アスタチン－２１１（^{211}Ａｔ）、ビスマス－２１２及びビスマス－２１３（^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ）、銅－６４及び銅－６７（^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ）、ガリウム－６７及びガリウム－６８（^{67}Ｇａ及び^{68}Ｇａ）、インジウム－１１１（^{111}Ｉｎ）、ヨウ素－１２３、－１２４、－１２５又は－１３１（^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）（^{123}Ｉ）、鉛－２１２（^{212}Ｐｂ）、ルテチウム－１７７（^{177}Ｌｕ）、ラジウム－２２３（^{223}Ｒａ）、サマリウム－１５３（^{153}Ｓｍ）、スカンジウム－４４及びスカンジウム－４７（^{44}Ｓｃ、^{47}Ｓｃ）、ストロンチウム－９０（^{90}Ｓｒ）、テクネチウム－９９（^{99m}Ｔｃ）、イットリウム－８６及びイットリウム－９０（^{86}Ｙ、^{90}Ｙ）、ジルコニウム－８９（^{89}Ｚｒ）が挙げられる。当業者は、いずれの放射性同位元素が診断剤としての使用に好ましいか及び治療剤としての使用に好ましいかを知っているであろう。
【０２０６】
放射性同位元素は、本発明の抗体に直接（キレート化剤又は補欠分子族又はリンカーを介して）又は抗体中の単一若しくは多数のアミノ酸残基への結合（例えば、チロシン残基のハロゲン化）を介して間接的に、コンジュゲートし得ることが理解されるであろう。
【０２０７】
代替的な実施形態では、放射性同位元素を抗体にコンジュゲートするためにキレート化剤又はリンカーが使用され得る。一例では、抗体は、以下からなる群から選択されるキレート化部分にコンジュゲートされ得る：ＴＭＴ（６，６’’－ビス［Ｎ，Ｎ’’，Ｎ’’’－テトラ（カルボキシメチル）アミノメチル）－４’－（３－アミノ－４－メトキシフェニル）－２，２’：６’，２’’－ターピリジン）、ＤＯＴＡ（１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－ＮＮ’，Ｎ’’（Ｎ’’’－四酢酸、テトラキセタンとしても既知）、ＴＣＭＣ（ＤＯＴＡのテトラ－１級アミド）、ＤＯ３Ａ（１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７－トリス（酢酸）－１０－（２－チオエチル）アセトアミド）、ＣＢ－ＤＯ２Ａ（４，１０－ビス（カルボキシメチル）－１，４，７，１０－テトラアザビシクロ［５．５．２］テトラデカン）、ＮＯＴＡ（１，４，７－トリアザシクロノナン－三酢酸）、Ｄｉａｍｓａｒ（３，６，１０，１３，１６，１９－ヘキサアザビシクロ［６．６．６］エイコサン－１，８－ジアミン）、ＤＴＰＡ（ペンテト酸又はジエチレントリアミン五酢酸）、ＣＨＸ－Ａ’’－ＤＴＰＡ（［（Ｒ）－２－アミノ－３－（４－イソチオシアナトフェニル）プロピル］－ｔｒａｎｓ－（Ｓ，Ｓ）－シクロヘキサン－１，２－ジアミン－五酢酸）、ＴＥＴＡ（１，４，８，１１－テトラアザシクロテトラデカン－１，４，８）、１１－四酢酸、Ｔｅ２Ａ（４，１１－ビス（カルボキシメチル）－１，４，８，１１－テトラアザビシクロ［６．６．２］ヘキサデカン）、ＨＢＥＤ、ＤＦＯ（デフェロキサミン）、ＤＦＯｓｑ（ＤＦＯ－スクアラミド）及びＨＯＰＯ（３，４，３－（ＬＩ－１，２－ＨＯＰＯ）又は本明細書に記載される他のキレート化剤。
【０２０８】
放射性金属及び他のハロゲン化放射性同位元素を有するキレーターは、１つ以上のリシン残基、チロシン残基又はチオール部分を含むが、これらに限定されない、抗体における１つ以上のアミノ酸残基又は反応性部分を介して、本発明の抗体に結合され得る。
【０２０９】
別の例では、改変抗体は、二官能性リンカー、例えばブロモアセチル、チオール、スクシンイミドエステル、ＴＦＰエステル、マレイミドにコンジュゲートされるか、又は当技術分野で公知の任意のアミン若しくはチオール改変化学を使用してコンジュゲートされる。
【０２１０】
当業者は、キレート化剤を抗体及びその誘導体又は断片にコンジュゲートするための標

準的な方法に精通しているであろう。加えて、当業者は、例えば、Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｒｅｖ．，２０１４，４３，２６０（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、放射性金属と対をなす関連キレート化剤を選択するためのアプローチに精通しているであろう。

【０２１１】

抗原結合部位の活性のアッセイ

ＰＳＭＡへの結合

本明細書の開示から、当業者は、本発明の好ましい抗原結合部位がＰＳＭＡに結合することが明らかであろう。タンパク質の結合を評価する方法は当技術分野で公知であり、例えばＳｃｏｐｅｓ（Ｐｒｏｔｅｉｎ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，１９９４において）に記載されている通りである。そのような方法は、一般に、抗原結合部位を固定し、それを標識抗原と接触させることを含む。洗浄して非特異性結合タンパク質を除去した後、標識及びその結果として結合抗体の量が検出される。当然のことながら、抗原結合部位を標識し、抗原を固定し得る。パニングタイプのアッセイも用いることができる。代替的又は追加的に、表面プラズモン共鳴アッセイを用いることができる。

【０２１２】

治療、診断及びセラノスティック方法

本発明の抗体は、放射免疫療法による処置を必要とする多数の状態の処置に有用である。典型的には、そのような状態は、癌を含む。

【０２１３】

例示的な癌は、肛門組織、胆管、膀胱、血液細胞、腸、脳、乳房、カルチノイド、子宮頸部、眼、食道、頭部及び頸部、腎臓、喉頭、白血病、肝臓、肺、リンパ節、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、骨髄腫、卵巣、膵臓、陰茎、前立腺、皮膚（例えば、扁平上皮癌）、肉腫、胃、精巣、甲状腺、膣、外陰における腫瘍を含む、嚢胞性及び固形腫瘍、骨及び軟組織腫瘍を含む。軟組織腫瘍は、良性神経鞘腫モノソミー、デスモイド腫瘍、脂肪芽細胞腫、脂肪腫、子宮筋腫、淡明細胞肉腫、皮膚線維肉腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液型軟骨肉腫、脂肪肉腫粘液型、胞巣状横紋筋肉腫及び滑膜肉腫を含む。特定の骨腫瘍は、非骨化性線維腫、単発性骨嚢腫、内軟骨腫、動脈瘤様骨嚢胞、骨芽細胞腫、軟骨芽細胞腫、軟骨粘液線維腫、骨形成性線維腫及びアダマンチノーマ、巨細胞腫、線維性骨異形成症、ユーイング肉腫、好酸球性肉芽腫、骨肉腫、軟骨腫、軟骨肉腫、悪性線維性組織球腫及び転移性癌を含む。白血病は、急性リンパ性、急性骨髄芽球性、慢性リンパ性及び慢性骨髄性を含む。

【０２１４】

他の例は、乳房腫瘍、結腸直腸腫瘍、腺癌、中皮腫、膀胱腫瘍、前立腺腫瘍、胚細胞腫瘍、肝細胞腫／胆管、癌腫、神経内分泌腫瘍、下垂体腫瘍、小円形細胞腫瘍、扁平上皮癌、黒色腫、異型線維黄色腫、精上皮腫、非精巣上皮腫、間質ライディッヒ細胞腫瘍、セルトリ細胞腫瘍、皮膚腫瘍、腎臓腫瘍、精巣腫瘍、脳腫瘍、卵巣腫瘍、胃腫瘍、口腔腫瘍、膀胱腫瘍、骨腫瘍、頸部腫瘍、食道腫瘍、喉頭腫瘍、肝臓腫瘍、肺腫瘍、経膣腫瘍及びウィルムス腫瘍を含む。

【０２１５】

好ましくは、本発明の抗原結合部位は、ＰＳＭＡの存在により特徴付けられる癌の処置に有用である。例えば、ＰＳＭＡに結合する抗体は、前立腺癌を含む、ＰＳＭＡの発現の増加により特徴付けられる癌の処置に有用である。

【０２１６】

当業者は、本明細書に開示される状態を診断するラジオイメージングに使用される放射性同位元素を含む、本発明の抗体と共に使用される適切な診断剤を選択する方法に精通しているであろう。更に、当業者は、本明細書に記載される診断試薬と共に使用される画像化技術に精通しているであろう。

【０２１７】

本明細書で使用される場合、セラノスティック方法は、腫瘍細胞及び／又は転移のインビトロ及び／又はインビボでの可視化、同定及び／又は検出の方法並びに癌を処置する方法である。

【０２１８】

一実施形態では、本発明は、

（１）診断的に有効な量の本発明の抗体を患者又は対象に投与することであって、抗体は、少なくとも１つの診断的に有用な標識を含む、投与することと、

（２）治療的有効量の本発明の抗体を、それを必要とする患者又は対象に投与することであって、抗体は、腫瘍治療薬（例えば、放射性同位元素、毒素、薬物）を含む、投与することと

を含むセラノスティック方法を含む。

【０２１９】

好ましくは、工程１及び工程２は、連続して行われ、工程１及び工程２の抗体は同じである。

【０２２０】

タンパク質を含む抗体結合ドメイン

単一ドメイン抗体

いくつかの例では、本発明の抗原結合部位又はタンパク質は、単一ドメイン抗体（これは、用語「ドメイン抗体」又は「ｄＡｂ」と互換的に使用される）であるか又はそれを含む。単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変領域の全部又は一部分を含む単一ポリペプチド鎖である。特定の例では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である（Ｄｏｍａｎｔｉｓ，Ｉｎｃ．、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ；例えば米国特許第６２４８５１６号明細書を参照されたい）。

【０２２１】

ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ

いくつかの例では、本発明のタンパク質は、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ又は例えば国際公開第９８／０４４００１号パンフレット及び／若しくは国際公開第９４／００７９２１号パンフレットに記載されているものなどのより高次のタンパク質複合体であるか又はそれを含む。

【０２２２】

例えば、ダイアボディは、２つの結合ポリペプチド鎖を含むタンパク質であり、各ポリペプチド鎖は、構造V_L-X-V_H又はV_H-X-V_Lを含み、V_Lは抗体軽鎖可変領域であり、V_Hは抗体重鎖可変領域であり、Ｘは、単一ポリペプチド鎖におけるV_H及びV_Lが結合する（又はＦｖを形成する）ことを可能にするように不十分な残基を含むリンカーであるか又は存在せず、一方のポリペプチド鎖のV_Hは、他方のポリペプチド鎖のV_Lに結合して、抗原結合ドメインを形成し、即ち１つ以上の抗原に特異的に結合することができるＦｖ分子を形成する。V_L及びV_Hは、各ポリペプチド鎖中で同じであり得るか、又はV_L及びV_Hは、二重特異性ダイアボディを形成するように各ポリペプチド鎖中で異なり得る（即ち異なる特異性を有する２つのＦｖを含む）。

【０２２３】

単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）

当業者は、ｓｃＦｖが単一ポリペプチド鎖中のV_H及びV_L領域を含み、V_H及びV_L間にポリペプチドリンカーを含み、これはｓｃＦｖが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする（即ち単一ポリペプチド鎖のV_H及びV_Lが互いに結合してＦｖを形成する）ことを認識するであろう。例えば、リンカーは、１２を超えるアミノ酸残基を含み、$(Gly_4Ser)_3$は、ｓｃＦｖのためのより好ましいリンカーの１つである。

【０２２４】

本発明は、ジスルフィド安定化Ｆｖ（即ちｄｉＦｖ又はｄｓＦｖ）も意図し、ここで、単一システイン残基がV_HのＦＲ及びV_LのＦＲに導入され、システイン残基がジスルフィド結合により連結されて安定なＦｖを提供する。

【０２２５】
代替的に又は加えて、本発明は、二量体ｓｃＦｖを包含し、即ち、２つのｓｃＦｖ分子を含むタンパク質は、例えば、ロイシンジッパードメイン（例えば、Ｆｏｓ又はＪｕｎに由来する）により、非共有又は共有結合により連結される。代替的に、２つのｓｃＦｖは、例えば、米国特許出願公開第２００６０２６３３６７号明細書に記載されているように、十分な長さのペプチドリンカーによって連結されて、ｓｃＦｖの形成と、抗原への結合の両方を可能にする。
【０２２６】
重鎖抗体
重鎖抗体は、それらが重鎖を含むが軽鎖を含まないという点で、抗体の多くの他の形態とは構造的に異なる。従って、これらの抗体は「重鎖のみの抗体」とも呼ばれる。重鎖抗体は、例えば、ラクダ類及び軟骨魚（ＩｇＮＡＲとも呼ばれる）に見出される。
【０２２７】
天然に存在する重鎖抗体中に存在する可変領域は、一般に、従来の４－鎖抗体中に存在する重鎖可変領域（「V_Hドメイン」と呼ばれる）及び従来の４－鎖抗体中に存在する軽鎖可変領域（「V_Lドメイン」と呼ばれる）と区別するために、ラクダ類抗体において「V_{HH}ドメイン」及びＩｇＮＡＲにおいてＶ－ＮＡＲと呼ばれる。
【０２２８】
ラクダ類からの重鎖抗体及びその可変領域並びにそれらの生成及び／又は単離及び／又は使用の方法の一般的記載は、とりわけ、以下の参考文献、国際公開第９４／０４６７８号パンフレット、国際公開第９７／４９８０５号パンフレット及び国際公開第９７／４９８０５号パンフレットに見出される。
【０２２９】
軟骨魚からの重鎖抗体及びその可変領域並びにそれらの生成及び／又は単離及び／又は使用の方法の一般的記載は、とりわけ、国際公開第２００５／１１８６２９号パンフレットに見出される。
【０２３０】
他の抗体及びその抗原結合ドメインを含むタンパク質
本発明は、以下の他の抗体及びその抗原結合ドメインを含むタンパク質を意図する。
（ｉ）米国特許第５７３１１６８号明細書に記載されているような「キー・アンド・ホール」二重特異性タンパク質；
（ｉｉ）例えば、米国特許第４６７６９８０号明細書に記載されているようなヘテロコンジュゲートタンパク質；
（ｉｉｉ）例えば、米国特許第４６７６９８０号明細書に記載されているような化学クロスリンカーを使用して生成されたヘテロコンジュゲートタンパク質；及び
（ｉｖ）Fab_3（例えば、欧州特許第１９９３０３０２８９４号明細書に記載されているような）。
【０２３１】
組成物
いくつかの例では、本明細書に記載される抗原結合部位は、従来の無毒の薬学的に許容され得る担体を含む投与製剤中で、経口的に、非経口的に、吸入噴霧、吸着、吸収により、局所的に、直腸内、鼻腔内、頬内、膣内、脳室内、移植リザーバーを介して又は任意の他の都合のよい剤形により投与することができる。用語「非経口的に」は、本明細書で使用される場合、皮下、静脈内、筋内、腹腔内、くも膜下腔内、脳室内、胸骨内及び頭蓋内注射又は注入技術を含む。
【０２３２】
抗原結合部位を対象への投与に適した形態（例えば、医薬組成物）に調製する方法は、当技術分野で公知であり、例えばＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１８ｔｈ ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９９０）及びＵ．Ｓ．Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａ：Ｎａｔｉｏｎａｌ

Ｆｏｒｍｕｌａｒｙ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９８４）に記載されている方法を含む。

【０２３３】

本発明の医薬組成物は、非経口投与、例えば静脈内投与又は体腔若しくは器官の管腔若しくは関節への投与に特に有用である。投与用の組成物は、薬学的に許容され得る担体、例えば水性担体に溶解された抗原結合部位の溶液を通常含むであろう。多様な水性担体、例えば生理食塩水などを使用することができる。組成物は、ｐＨ調整及び緩衝剤、毒性調整剤など、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどの生理学的状態の近似に必要な薬学的に許容され得る補助物質を含み得る。これらの製剤中の本発明の抗原結合部位の濃度は、広く変動し得、選択される特定の投与モード及び患者の必要性に従い、主に流体体積、粘度、体重などに基づいて選択されるであろう。例示的な担体としては、水、生理食塩水、リンゲル液、右旋糖溶液及び５％ヒト血清アルブミンが挙げられる。混合油及びオレインエチルなどの非水性ビヒクルも使用することができる。リポソームも担体として使用することができる。ビヒクルは、等張性及び化学的安定性を向上させる少量の添加剤、例えば緩衝液及び保存剤を含み得る。

【０２３４】

投与量及び投与のタイミング

本発明の抗原結合部位の適切な投与量は、抗原結合部位の特異性、処置される状態及び／又は処置される対象に応じて変動するであろう。例えば、準最適投与量から開始し、投与量を増分的に変更して最適な又は有用な投与量を決定することによって適切な投与量を決定することは、熟練した医師の能力の範囲内である。代替的に、処置／予防のための適切な投与量を決定するために、細胞培養アッセイ又は動物試験からのデータを使用し、ここで、適切な用量は、毒性が殆ど又は全くない活性化合物のＥＤ$_{50}$を含む循環濃度の範囲内である。投与量は、使用される剤形及び投与経路に応じて、この範囲内で変動し得る。治療的／予防的有効用量は、当初は細胞培養アッセイによって見積もることができる。用量は、細胞培養において決定されたＩＣ$_{50}$（即ち症状の半最大阻害を達成する化合物の濃度又は量）を含む、循環血漿濃度範囲を達成するように、動物モデルにおいて処方され得る。このような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するのに使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。

【０２３５】

いくつかの例では、本発明の方法は、予防的又は治療的有効量の本明細書に記載されるタンパク質を投与することを含む。

【０２３６】

用語「治療的有効量」は、処置が必要な対象に投与されると、対象の予後及び／若しくは状態を改善し、且つ／又は本明細書に記載される臨床状態の１つ以上の症状を、その状態の臨床的診断若しくは臨床的特徴として観察及び許容されるものを下回るレベルに低下させる、量である。対象に投与される量は、処置される状態の特定の特徴、処置される状態のタイプ及び段階、投与モード並びに対象の特徴、例えば一般的健康、他の疾患、年齢、性別、遺伝子型及び体重に依存するであろう。当業者は、これら及び他の因子に応じて、適切な投与量を決定することができるであろう。従って、この用語は、本発明を特定の量に、例えばタンパク質の重量又は量を限定するよう解釈されるべきではなく、本発明は、対象において明記された結果を達成するのに十分な任意の量の抗原結合部位を包含する。

【０２３７】

本明細書で使用される場合、用語「予防的有効量」は、臨床状態の１つ以上の検出可能な症状を予防若しくは阻害するか又はその開始を遅延させるのに十分なタンパク質の量を意味すると解釈されるものとする。当業者は、そのような量が、例えば、投与される特定の抗原結合部位及び／又は特定の対象及び／又は状態のタイプ若しくは重篤さ若しくはレベル及び／又は状態に対する素因（遺伝的又はそれ以外）に応じて変動することを認識するであろう。従って、この用語は、本発明を特定の量に、例えば抗原結合部位の重量又は量を限定するよう解釈されるべきではなく、本発明は、対象において明記された結果を達

成するのに十分な任意の量の抗原結合部位を包含する。
【０２３８】
キット
本発明は加えて、以下の１つ以上を含むキットを含む：
（ｉ）本発明の抗体又はそれをコードする発現コンストラクト；
（ｉｉ）本発明の分子；
（ｉｉｉ）本発明の複合体；又は
（ｉｉｉ）本発明の医薬組成物。
【０２３９】
癌の検出のためのキットの場合、キットは、例えば、本発明の抗原結合部位に結合した、検出手段を更に含み得る。
【０２４０】
治療的／予防的使用のためのキットの場合、キットは、薬学的に許容され得る担体を更に含み得る。
【０２４１】
任意選択的に、本発明のキットは、任意の例による本明細書に記載される方法における使用のための説明書と共に包装される。
【０２４２】

【表１】

表 1:本発明の PSMA 結合抗体についてのアミノ酸及びヌクレオチド配列の概略

抗体 ID	領域	配列番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
ANT4044 可変重鎖	HCDR1 (タンパク質)	1	EYTIH
	HCDR2 (タンパク質)	2	NINPNNGGTTYNQKFED
	HCDR3 (タンパク質)	3	GWNFDY
	VH (タンパク質)	4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAP GKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSS
	HCDR1 (DNA)	5	GAATACACCATCCAC
	HCDR2 (DNA)	6	AACATTAATCCTAACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAA GTTCGAGGAC
	HCDR3 (DNA)	7	GGTTGGAACTTTGACTAC
	VH (DNA)	8	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAT ACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGGTGAGGCAGGC CCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCT AACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACA GAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCTA CATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCAGTC TATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACTTTGACTACTGGGGCCA AGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	HFR1 (タンパク質)	9	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
	HFR2 (タンパク質)	10	WVRQAPGKGLEWIG
	HFR3 (タンパク質)	11	RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA
	HFR4 (タンパク質)	12	WGQGTTVTVSS
	HFR1 (DNA)	12	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAT ACACATTCACT
	HFR2 (DNA)	14	TGGGTGAGGCAGGCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATT GGA

【０２４３】

【表２】

抗体 ID	領域	配列番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	HFR3 (DNA)	15	AGAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCT ACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCAGT CTATTACTGTGCAGCT
	HFR4 (DNA)	16	TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
ANT4044-A2 可変重鎖	HCDR1 (タンパク質)	17	EYTIH
	HCDR2 (タンパク質)	18	NINPNNGGTTYNQKFED
	HCDR3 (タンパク質)	19	YWLFDY
	VH (タンパク質)	20	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAP GKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCAAYWLFDYWGQGTTVTVSS
	HCDR1 (DNA)	21	GAATACACCATCCAC
	HCDR2 (DNA)	22	AACATTAATCCTAACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAA GTTCGAGGAC
	HCDR3 (DNA)	23	TACTGGCTGTTCGACTAC
	VH (DNA)	24	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAT ACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGGTGAGGCAGGC CCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCT AACAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACA GAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCTA CATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCAGTC TATTACTGTGCAGCTTACTGGCTGTTCGACTACTGGGGCCA AGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	HFR1 (タンパク質)	25	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
	HFR2 (タンパク質)	26	WVRQAPGKGLEWIG
	HFR3 (タンパク質)	27	RVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA
	HFR4 (タンパク質)	28	WGQGTTVTVSS

【０２４４】

【表３】

抗体 ID	領域	配列番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	HFR1 (DNA)	29	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAG CCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAT ACACATTCACT
	HFR2 (DNA)	30	TGGGTGAGGCAGGCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATT GGA
	HFR3 (DNA)	31	AGAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACCAGCACAGCCT ACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATACTGCAGT CTATTACTGTGCAGCT
	HFR4 (DNA)	32	TGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCA
ANT4044/ ANT4044-A2 可変軽鎖	LCDR1 (タンパク質)	33	KASQDVGTAVD
	LCDR2 (タンパク質)	34	WASTRHT
	LCDR3 (タンパク質)	35	QQYNSYPLT
	VL (タンパク質)	36	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPG QAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFA VYYCQQYNSYPLTFGQGTKVDIK
	LCDR1 (DNA)	37	AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGAC
	LCDR2 (DNA)	38	TGGGCATCCACCCGGCACACT
	LCDR3 (DNA)	39	CAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACG
	VL (DNA)	40	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCTGTCCGCATC AGTAGGAGACAGGGTCACCATCACTTGCAAGGCCAGTCA GGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCAACAGAAACCA GGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCG GCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGCAGCCTG AAGACTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAACAGCTAT CCTCTCACGTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA

【０２４５】

【表４】

抗体 ID	領域	配列番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
	LFR1 (タンパク質)	41	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC
	LFR2 (タンパク質)	42	WYQQKPGQAPKLLIY
	LFR3 (タンパク質)	43	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYC
	LFR4 (タンパク質)	44	FGQGTKVDIK
	LFR1 (DNA)	45	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCTGTCCGCATC AGTAGGAGACAGGGTCACCATCACTTGC
	LFR2(DNA)	46	TGGTATCAACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGA TTTAC
	LFR3 (DNA)	47	GGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTT GCAGTTTATTACTGT
	LFR4 (DNA)	48	TTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA
ANT4044/ANT4044-A2_非改変ヒトIgG1 重鎖定常領域	IgG1 HC (タンパク質)	49	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ANT4044/ANT4044-A2改変ヒトIgG1 重鎖定常領域	IgG1 H310A H435Q HC (タンパク質)	50	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL**A**QDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**Q**YTQKSLSLSPGK

【０２４６】

【表５】

抗体 ID	領域	配列番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
ANT4044/ANT4044-A2_改変ヒトIgG4 定常鎖領域	IgG4 S228P L235E H310A H435Q HC (タンパク質)	51	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNQYTQKSLSLSLGK
ANT4044/ANT4044-A2 カッパ 軽鎖定常領域	ヒト κ LC 定常領域	52	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ANT4044 RADmAb IgG1 重鎖 (HuX592r)	FcRn-ヌル，IgG1 アロタイプ G1m(3) H310A H435Q	53	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL**A**QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**Q**YTQKSLSLSPGK
ANT4044 RADmAb IgG4 重鎖	FcRn+FcRγ-ヌル，IgG4 S228P L235E H310A H435Q	54	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL**A**QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN**Q**YTQKSLSLSLGK

【０２４７】

【表６】

抗体 ID	領域	配列番号	アミノ酸又はヌクレオチド配列
ANT4044-A2 RADmAb IgG1 重鎖	FcRn-ヌル，IgG1 H310A H435Q	55	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAP GKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCAAYWLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNQYTQKSLSLSPGK
ANT4044-A2 RADmAb IgG4 重鎖	FcRn+FcRγ- ヌル IgG4 S228P L235E H310A H435Q	56	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAP GKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCAAYWLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNQYTQKSLSLSLGK
ANT4044-A NT4044-A2 Vk 軽鎖	Vk 軽鎖	57	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPG QAPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFA VYYCQQYNSYPLTFGQGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

【実施例】

【０２４８】

実施例１：ＰＳＭＡへの結合のための抗体

概要

２つの抗体、ＡＮＴ４０４４及びＡＮＴ４０４４－Ａ２の抗体ＶＨ遺伝子配列を、非改変ＩｇＧ１、変異Ｈ３１０Ａ及びＨ４３５Ｑ（ＦｃＲｎ結合及びタンパク質Ａ結合を消失させる（Ａｎｄｅｒｓｅｎ、ｅｔ　ａｌ．、２０１２））を有するＩｇＧ１（ＩｇＧ１（Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）と呼ばれる）及び上記と同じＦｃＲｎ消失変異を有する改変ＩｇＧ４を、ヒンジ安定化Ｓ２２８Ｐ変異（Ａｎｇａｌ、ｅｔ　ａｌ．、１９９３）及びＦｃサイレンシング　Ｌ２３５Ｅ変異（Ｒｅｄｄｙ、ｅｔ　ａｌ．、２０００）（ＩｇＧ４（Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）と呼ばれる）と共にコードする３つの異なるヒトＩｇＧ二重発現ベクターにクローニングした。各二重発現ベクターは、ＡＮＴ４０４４及びＡＮＴ４０４４－Ａ２の両方に共通の抗体Ｖκ遺伝子配列も含んでいた。

【０２４９】

合計５つの抗体を一過性にトランスフェクトし、ＣＨＯ細胞中で発現させ、タンパク質Ａ（ＡＮＴ４０４４－Ａ２　ＩｇＧ１）又はタンパク質Ｇ（ＩｇＧ１（Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）及びＩｇＧ４（Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）の両方としてＡＮＴ４０４４及びＡＮＴ４０４４－Ａ２の両方）のいずれかを用いて精製した。親和性クロマトグラフィーに続いて、分取サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を行った。

【０２５０】

抗体の完全性をＳＤＳ－ＰＡＧＥ、分析ＳＥＣ、熱安定性及びＢｉａｃｏｒｅによるＰＳＭＡへの抗原結合によって評価した。更なる試験を、Ｂｉａｃｏｒｅ単一サイクル分析を用いて、ヒトＦｃガンマ受容体のパネル（ＦｃγＲｌｌｌＡ１７６Ｆ、ＦｃγＲｌｌｌＡ１７６Ｖ、ＦｃγＲｌｌｌＢ、ＦｃγＲｌＩＡ１６７Ｒ、ＦｃγＲｌｌＡ１６７Ｈ、ＦｃγＲｌｌＢ、ＦｃｇＲｌ）及び新生児受容体、ＦｃＲｎに対して行った。

【０２５１】

方法及び結果

抗体－発現プラスミドの構築

ヒト化抗体ＡＮＴ４０４４及び親和性成熟したヒト化抗体ＡＮＴ４０４４－Ａ２のＶＨ及びＶκ配列を使用して、ＩｇＧ１（ｐＡＮＴ１８）、ＩｇＧ１（Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）（ｐＡＮＴ７１）及びＩｇＧ４（Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）（ｐＡＮＴ７３）のｐＡＮＴ二重発現ベクターへのクローニングのための隣接制限酵素部位を有するＤＮＡ断片を生成した。ＶＨ領域を、各アイソタイプベクター内のＭｌｕＩ制限部位とＨｉｎｄ　ＩＩＩ制限部位との間にクローニングし、Ｖκ領域をＢｓｓＨ　ＩＩ制限部位とＢａｍＨ　Ｉ制限部位との間にクローニングした。５つの全てのコンストラクトをＤＮＡ配列決定によって確認した。

【０２５２】

抗体の一過性言発現

５つの抗体コンストラクトに対応する無エンドドキシンＤＮＡを調製し、ＭａｘＣｙｔｅ　ＳＴＸ（登録商標）エレクトロポレーションシステム（ＭａｘＣｙｔｅ　Ｉｎｃ．、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＵＳＡ）を使用してＣＨＯ－Ｓ細胞（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｌｏｕｇｈｂｏｒｏｕｇｈ、ＵＫ）に一過性にトランスフェクトした。回収に続いて、８ｍＭ　Ｌ－グルタミン（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｌｏｕｇｈｂｏｒｏｕｇｈ、ＵＫ）及び１ｘヒポキサンチン－チミジン（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｌｏｕｇｈｂｏｒｏｕｇｈ、ＵＫ）を含むＣＤ　ＯｐｔｉＣＨＯ培地（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｌｏｕｇｈｂｏｒｏｕｇｈ、ＵＫ）中で細胞を３ｘ１０^{6}細胞／ｍｌに希釈した。トランスフェクションの２４時間後、培養温度を３２℃に下げ、１ｍＭ酪酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ、Ｄｏｒｓｅｔ、ＵＫ）を加えた。

【０２５３】

培養物には、３．６％（出発体積の）供給物（２．５％　ＣＨＯ　ＣＤ　Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　Ｆｅｅｄ　Ａ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｌｏｕｇｈｂｏｒｏｕｇｈ、ＵＫ）、０．５％　Ｙｅａｓｔｏｌａｔｅ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、ＵＫ）、０．２５ｍＭ　Ｇｌｕｔａｍａｘ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｌｏｕｇｈｂｏｒｏｕｇｈ、ＵＫ）及び２ｇ／Ｌブドウ糖（Ｓｉｇｍａ、Ｄｏｒｓｅｔ、ＵＫ））の添加により毎日供給した。ＩｇＧ上清力価をＩｇＧ　ＥＬＩＳＡによって監視し、トランスフェクトした細胞を、上清を回収する前に１４日間まで培養した。

【０２５４】

抗体精製

細胞培養上清を、タンパク質Ａ（ＡＮＴ４０４４－Ａ２　ＩｇＧ１）又はタンパク質Ｇ（ＩｇＧ１（Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）及びＩｇＧ４（Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）の両方としてＡＮＴ４０４４及びＡＮＴ４０４４－Ａ２の両方）Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｌｉｔｔｌｅ　Ｃｈａｌｆｏｎｔ、ＵＫ）のいずれかに通した。全抗体を１ｘＰＢＳ、ｐＨ７．２に緩衝液交換した。タンパク質Ａ又はタンパク質Ｇ精製材料を、移動相として１ｘＰＢＳを使用して、ＨｉＬｏａｄ

（商標）２６／６００　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（商標）２００ｐｇ分取ＳＥＣカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｌｉｔｔｌｅ　Ｃｈａｌｆｏｎｔ、ＵＫ）上で流し、その間、モノマー画分を収集し、プールし、濾過滅菌した。ＳＥＣプロファイルは、抗体、特にＡＮＴ４０４４－Ａ２が、ＩｇＧ４（Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）として発現する場合、他のＩｇＧアイソタイプとして発現する抗体と比較して、凝集のより高いレベル（２２％まで）を示すことを明らかにした。

【０２５５】

抗体は、ＯＤ２８０ｎｍを測定し、それらの予測アミノ酸配列に基づいて吸光係数（Ｅｃ（０．１％））を使用することによって定量した。

【０２５６】

分析ＳＥＣ及びＳＤＳ－ＰＡＧＥ

ストックＡＮＴ４０４４　ＩｇＧ１及びタンパク質Ａ又はタンパク質Ｇ、続いて分取ＳＥＣ精製材料を、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（商標）２００　Ｉｎｃｒｅａｓｅ　１０／３００　ＧＬ分析カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｌｉｔｔｌｅ　Ｃｈａｌｆｏｎｔ、ＵＫ）及び移動相として１ｘＰＢＳを使用して、分析ＳＥＣにより分析した。溶出プロファイルは、ＩｇＧの正しく折り畳まれたモノマー種に典型的であった。抗体は、非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥによっても分析した。ＶＨ及びＶκ鎖の予測サイズに対応するバンドが観察された。

【０２５７】

熱安定性分析

ストックからの５つの精製抗体及びＡＮＴ４０４４　ＩｇＧ１の熱安定性を評価するために、蛍光ベースの熱シフトアッセイを用いて融解温度（タンパク質ドメインの５０％が展開される温度）を決定した。全ての抗体を、ＳＹＰＲＯ（登録商標）Ｏｒａｎｇｅ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｌｏｕｇｈｂｏｒｏｕｇｈ、ＵＫ）を含む１×ＰＢＳ中で１００μｇ／ｍｌの作業濃度に希釈し、ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓリアルタイムＰＣＲシステム（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｌｏｕｇｈｂｏｒｏｕｇｈ、ＵＫ）上で２５℃から９９℃の温度勾配に５６分間かけて供した。融解曲線を、タンパク質熱安定性ソフトウエア（バージョン１．２）を使用して分析し、Ｔｍを一次導関数データに基づいて計算した。

【０２５８】

ＡＮＴ４０４４及びＡＮＴ４０４４－Ａ２の両方について、ＩｇＧ１バックボーンは最も熱的に安定であるように見え、両方についての最低融解温度は６９．３℃であった。異なるＩｇＧバックボーンを比較すると、ＡＮＴ４０４４は、ＡＮＴ４０４４－Ａ２と比較してより大きい熱安定性を示した。

【０２５９】

ＰＳＭＡへの結合の評価

前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）への結合を評価するために、精製した抗体のそれぞれについて多サイクル動態分析を行った。分析は、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００評価ソフトウエアＶ３．０．１（Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）を実行するＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００（シリアル番号１９０９９１３）装置を用いて行った。直接比較のために、全ての抗体をタンパク質Ｇチップ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）上に捕捉した。

【０２６０】

精製した抗体をＨＢＳ－ＥＰ＋中で１μｇ／ｍｌの濃度に希釈した。各サイクルの開始時に、各抗体をタンパク質Ｇ表面上に捕捉して、約５０ＲＵのＲＬを得た。捕捉後、表面を安定化させた。任意の潜在的な物質移動効果を最小限にするために、３５μｌ／分の流速を使用して動態データを得た。動態分析のために、ＰＳＭＡ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、Ｕ．Ｓ．Ａ）を使用した。ブランクの複数の反復（ＰＳＭＡ）及び分析物の単一濃度の反復を動態ランにプログラムして、動態サイクルにわたる表面及び分析物の両方の安定性をチェックした。動態分析のために、２倍希釈範囲を２５ｎＭ～１．５６２５ｎＭ　ＰＳＭＡから選択した。ＰＳＭＡの結合相を６００秒間監視し、解

離相を２４００秒間監視した。タンパク質Ｇ表面の再生は、各サイクルの終わりに、０．５％　Ｐ２０を含む１０ｍＭグリシン－ＨＣＬ（ｐＨ１．５）の２回の注入を用いて行った。

【０２６１】

参照チャネルＦｃ１からのシグナルをＦｃ２、Ｆｃ３及びＦｃ４のシグナルから差し引いて、参照表面への非特異的結合の差を補正し、全体的なＲｍａｘパラメーターを１対１結合モデルにおいて使用した。相対ＫＤは、各抗体のＫＤを同じチップ上のＡＮＴ４０４４　ＩｇＧ１のＫＤで割ることによって計算した。

【０２６２】

ヒトＦｃＲｎへの結合の評価

精製された抗体のＦｃＲｎへの結合を、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００評価ソフトウエアＶ３．０．１（Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）を実行するＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００（シリアル番号１９０９９１３）装置を用いて、定常状態親和性分析によって評価した。ＦｃＲｎ（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ、Ｂｅｉｊｉｎｇ、Ｃｈｉｎａ）を、３００ＲＵへの標準アミンカップリングを使用して、酢酸ナトリウム（ｐＨ５．５）中１０μｇ／ｍＬでＣＭ５チップ上にコーティングした。

【０２６３】

精製した抗体を、ｐＨ６．０又はｐＨ７．４のいずれかで０．０５％　Ｐ２０を含むＰＢＳ中３７ｎＭ～３０００ｎＭの５点希釈で滴定した。抗体を、３０μｌ／分の流速及び２５℃において漸増濃度でチップ上を通過させた。注入時間は３０秒、解離時間は１００秒であった。単一の解離に続いて、チップを０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０で再生した。

【０２６４】

予想通り、Ｈ３１０Ａ　Ｈ４３５Ｑ変異は、ｐＨ６．０でＦｃＲｎへの抗体結合を有意に低下させた。非改変ＩｇＧ１として試験したＡＮＴ４０４４及びＡＮＴ４０４４－Ａ２抗体の両方は、ｐＨ６．０でＦｃＲｎに対して類似の親和性を示した。抗体のいずれについても、結合はｐＨ７．４で殆ど観察されなかった。

【０２６５】

ヒトＦｃガンマ受容体への結合の評価

高及び低親和性Ｆｃガンマ受容体への精製抗体の結合を、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００評価ソフトウエアＶ３．０．１（Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）を実行するＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００（ｓｅｒｉａｌ　ｎｏ．１９０９９１３）装置を使用する単一サイクル分析により、流速３０μｌ／分で作動させて評価した。ヒトＦｃ受容体、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ（１６７Ｒ及び１６７Ｈ多型の両方）、ＦｃγＲＩＩｂ、ＦｃγＲＩＩＩａ（１７６Ｆ及び１７６Ｖ多型の両方）及びＦｃγＲＩＩＩｂをＳｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ（Ｂｅｉｊｉｎｇ、Ｃｈｉｎａ）から得た。ＦｃγＲをＨｉｓｃａｐｔｕｒｅ　キット（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｌｉｔｔｌｅ　Ｃｈａｌｆｏｎｔ、ＵＫ）を使用して、標準的なアミン化学を用いて予め結合させたＣＭ５センサチップ上に補足した。

【０２６６】

各サイクルの開始時に、ＨＢＳ－Ｐ＋で希釈したＨｉｓタグ化Ｆｃγ受容体を、特定のＲＵレベルまで負荷した。各濃度間で再生しない抗体の５点、３倍希釈範囲を各受容体について使用した。全ての場合において、解離後、チップをグリシン（ｐＨ１．５）の２回の注入で再生した。参照チャネルＦｃ１（ブランク）からのシグナルを、受容体を負荷したＦｃのシグナルから差し引いて、参照表面への非特異的結合の差を補正した。

【０２６７】

センサグラムを、高親和性Ｆｃガンマ受容体ＦｃγＲＩについての１：１動態について且つ低親和性Ｆｃガンマ受容体についての定常状態結合によって分析した。

【０２６８】

代表的なセンサグラム

非改変ＩｇＧ１として発現したＡＮＴ４０４４及びＡＮＴ４０４４－Ａ２は、全ての高親和性及び低親和性ヒト活性化Ｆｃγ受容体に結合した。ＩｇＧ１におけるＨ３１０Ａ及

びＨ４３５Ｑの変異の導入は、この結合に影響を与えなかったが、低親和性ヒトＦｃγ受容体へのわずかな結合低下傾向が観察された。予想通り、ＩｇＧ４（Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）抗体は、全ての活性化Ｆｃγ受容体への顕著に低下した結合を示した。試験した全ての抗体は、阻害性受容体ＦｃγＲＩＩＢへの低い親和性結合を示した。従って、ＩｇＧ１及びＩｇＧ１（Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）の両方はエフェクター機能を刺激できる可能性があるが、ＩｇＧ４（Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）は、エフェクター機能を刺激する可能性が低い。

【０２６９】

結論

ヒト化抗ＰＳＭＡ抗体ＡＮＴ４０４４及びその親和性成熟変異体ＡＮＴ４０４４－Ａ２に対応する可変重鎖及び軽鎖配列を、非改変ヒトＩｇＧ１、変異Ｈ３１０Ａ及びＨ４３５Ｑ（ＦｃＲｎ結合を消失させる）又はヒトＩｇＧ４（Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）を有するヒトＩｇＧ１のいずれかをコードする二重発現ベクターにクローニングした。ＣＨＯ細胞を一過性にトランスフェクトし、５つの抗体をタンパク質Ａ又はタンパク質Ｇ親和性クロマトグラフィー及び分取ＳＥＣにより精製した。分析ＳＥＣは、モノマーＩｇＧと一致するプロファイルを明らかにし、凝集の証拠は殆どなかった。ＡＮＴ４０４４　ＩｇＧ１（ストックから）を含む全ての抗体は、それらの熱安定性と、ＰＳＭＡ、ヒトＦｃＲｎ及びヒトＦｃγ受容体への結合の点で特徴付けられた。

【０２７０】

ＡＮＴ４０４４及びＡＮＴ４０４４－Ａ２の両方について、ＩｇＧ１バックボーンは最も熱的に安定であるように見えたが、ＡＮＴ４０４４抗体はＡＮＴ４０４４－Ａ２抗体と比較してより大きい熱安定性を示した。ＩｇＧ１（Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）及びＩｇＧ４（Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）形式の両方における全ての抗体は、非改変ＩｇＧ１として発現するそれらの対応物と同様のＰＳＭＡへの結合を示した。親和性成熟ＡＮＴ４０４４－Ａ２抗体は、ＡＮＴ４０４４と比較してＰＳＭＡに対して２～３倍大きい親和性を示した。

【０２７１】

ｐＨ６．０でのＦｃＲｎへの結合は、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ変異の導入によって有意に低下したが、ｐＨ７．４でのＦｃＲｎへの結合は、抗体のいずれについても殆ど観察されなかった。

【０２７２】

ヒトＦｃγ受容体への抗体結合の分析から、ＩｇＧ４として発現する抗体におけるＬ２３５Ｅ変異（Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３５Ｅ、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）によって結合が消失することが確認された。変異Ｈ３１０Ａ及びＨ４３５Ｑは、ヒトＦｃγ受容体への抗体結合に有意な影響を及ぼさず、従って、ＩｇＧ１及びＩｇＧ１（Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３５Ｑ）の両方は、同様のエフェクター機能特性を示すと予想される。

【０２７３】

実施例２：抗体のコンジュゲーション

抗体ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ１、ＡＮＴ４０４４－Ａ２－ＩｇＧ１、ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ１　Ｈ３１０Ａ　Ｈ４３５Ｑ（別名ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ１－２Ｍ）及びＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ４　Ｓ２２８Ｐ　Ｌ２３５Ｅ　Ｈ３１０Ａ　Ｈ４３５Ｑ（別名ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ４－４Ｍ）を、ＴｈｉｏＢｒｉｄｇｅ（商標）－ＰＥＧ（６ｕ）－ＤＯＴＡ試薬又はＮＨＳ－ＤＯＴＡ試薬のいずれかにコンジュゲートした。

【０２７４】

ＴｈｉｏＢｒｉｄｇｅ（商標）は、ＰｏｌｙＴｈｅｒｉｃｓの独自のジスルフィドコンジュゲーションリンカーであり、記載されている。

【０２７５】

ＤＯＴＡは、キレーターペイロード、１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸モノアミドである。

【０２７６】

ＴｈｉｏＢｒｉｄｇｅ（商標）ＤＯＴＡコンジュゲーション評価：ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ１を、反応緩衝液（２０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ））中の６～１０ｍｇ／ｍＬ溶液として調製した。反応緩衝液（６～１０ｍｇ／ｍＬ、４０℃）中のＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ１に、抗体又はＤＴＴ　１０ｍＭ当たり６～１０当量のトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）を添加した。反応緩衝液で希釈することにより、抗体濃度を５ｍｇ／ｍＬに調整した。還元混合物を３７～４０℃で１時間インキュベートした。還元混合物を２２℃に冷却した後、試薬を添加した。アセトニトリル中の５．６～８当量のＴｈｉｏＢｒｉｄｇｅ（商標）－ＰＥＧ（６ｕ）－ＤＯＴＡを混合物に添加し、これを更に反応緩衝液で４ｍｇ／ｍＬに希釈した。混合物中のアセトニトリルの百分率は、５％であった。反応混合物を２２℃で２２時間までインキュベートした。緩衝液交換及び過剰な試薬の除去を、Ｖｉｖａｓｐｉｎ　２０フィルター（３０ｋＤａ　ＭＷＣＯ、ＰＥＳ膜、Ｇｅｎｅｒｏｎ）を用いて１４，０００ｒｃｆでの超遠心分離により行った。サンプルをＶｉｖａｓｐｉｎ　２０フィルター（３０ｋＤａ　ＭＷＣＯ、ＰＥＳ膜、Ｇｅｎｅｒｏｎ）を用いてＤｕｌｂｅｃｃｏのＰＢＳ　ｐＨ７．２～７．５中に７～９回交換した。抗体－ＴｈｉｏＢｒｉｄｇｅ（商標）ＤＯＴＡコンジュゲート濃度をＵＶ－ｖｉｓにより測定し、ＤｕｌｂｅｃｃｏのＰＢＳ　ｐＨ７．２～７．５を用いて４．０ｍｇ／ｍＬに補正し、滅菌濾過し（０．２２μｍ酢酸セルロースフィルター）、－８０℃で保存した。

【０２７７】

リシン－ＤＯＴＡコンジュゲーション評価：ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ１を、０．１Ｍ　$NaHCO_3$及び２０ｍＭエチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）、ｐＨ８～９（反応緩衝液）中の６ｍｇ／ｍＬ溶液として調製した。次に、ＤｕｌｂｅｃｃｏのＰＢＳ　ｐＨ７．２～７．５中の１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸モノ－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステルヘキサフルオロホスフェートトリフルオロ酢酸塩（ＮＨＳ－ＤＯＴＡ試薬）を５．０ｍｇ／ｍＬで調製した。１０～２５当量のＮＨＳ－ＤＯＴＡ試薬溶液を加え、反応緩衝液を加えて抗体濃度を４．０ｍｇ／ｍＬに補正した。２２℃で２～３時間インキュベートした。次に、０．２Ｍ酢酸ナトリウム、ｐＨ５．５（４：１ｖ／ｖ）を加えてクエンチし、Ｖｉｖａｓｐｉｎ　２０フィルター（３０ｋＤａ　ＭＷＣＯ、ＰＥＳ膜、Ｇｅｎｅｒｏｎ）を用いて１４，０００ｒｃｆで超遠心分離した。希釈及び超遠心分離を更に２回繰り返した。次いで、緩衝液をＶｉｖａｓｐｉｎ　２０フィルター（３０ｋＤａ　ＭＷＣＯ、ＰＥＳ膜、Ｇｅｎｅｒｏｎ）を用いてＤｕｌｂｅｃｃｏのＰＢＳ　ｐＨ７．２～７．５中に４回交換した。抗体－ＤＯＴＡコンジュゲート濃度をＵＶ－ｖｉｓにより測定し、ＤｕｌｂｅｃｃｏのＰＢＳ　ｐＨ７．２～７．５を用いて４．０ｍｇ／ｍＬに修正し、滅菌濾過し（０．２２μｍ酢酸セルロースフィルター）、－８０℃で保存した。小規模反応及び精製を最初に行って、適切なコンジュゲーション条件を同定した。コンジュゲーションの程度、純度及び存在する残留試薬を確認するために、分析ＳＥＣ及び分析ＬＣ－ＭＳ方法を開発した。コンジュゲーションは両方の試薬について有効であることが見出された。いずれの試薬も、コンジュゲーション中又はコンジュゲーション後に凝集をもたらさなかった。リシンコンジュゲートは、より広い範囲の様々なＤＯＴＡ負荷種を示し、ＬＣ－ＭＳ分析のためにＴｈｉｏＢｒｉｄｇｅ（商標）コンジュゲートよりも多い量を必要とした。試験した全てのサンプルは、ＬＣ－ＭＳにより、４．０～４．２の平均ＤＡＲ（ＴｈｉｏＢｒｉｄｇｅ（商標）コンジュゲート）及び３．８～４．９の平均ＤＡＲ（リシンコンジュゲート）を有することが示された。

【０２７８】

実施例３：ＰＳＭＡに結合する抗体の薬物動態分析

実施例１に記載したものと類似の方法論を用いて、以下の抗体の血清半減期を評価した：Ｊ５９１　ＩｇＧリシンＤＯＴＡコンジュゲート（ＰＳＭＡへの結合についての対照抗体）、ＡＮＴ４０４４リシンＤＯＴＡコンジュゲート（ＡＮＴ４０４４－Ｋ－ＤＯＴＡ）、ＡＮＴ４０４４－Ａ２リシンＤＯＴＡコンジュゲート（ＡＮＴ４０４４－Ａ２－Ｋ－ＤＯＴＡ）、ＦｃＲｎ結合領域にアミノ酸置換を有するＡＮＴ４０４４、リシンＤＯＴＡコ

ンジュゲート（ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ－Ｋ－ＤＯＴＡ）並びにＦｃＲｎ及びＦｃガンマ受容体結合領域にアミノ酸置換を有するＡＮＴ４０４４、リシンＤＯＴＡコンジュゲート（ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｇ－Ｋ－ＤＯＴＡ）。結果を図１に示す。

【０２７９】

図２は、各試験抗体についての平均曲線下面積（ＡＵＣ、上）及びクリアランス（ＣＬ、下）を示す。エラーバーは、平均の標準誤差を表す。

【０２８０】

実施例４：体内分布及び腫瘍蓄積試験

マウスモデルにおけるＬＮＣａＰ細胞への本発明の異なる抗体の比較標的化の定量分析を評価した。

【０２８１】

抗体の放射標識及びＴＬＣ分析。

試験抗体は、

１．ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ１＋ＤＯＴＡ（「ＪＮ００５」）

２．ＡＮＴ４０４４－Ａ２－ＩｇＧ１＋ＤＯＴＡ（「ＪＮ００８」）

３．ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ１（ＦｃＲｎ）＋ＤＯＴＡ（「ＪＮ００７」）

４．ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ４（ＦｃＲｎ／ＦｃＲガンマ）＋ＤＯＴＡ（「ＪＮ００６」）

５．ＨｕＪ５９１　ＩｇＧ１＋ＤＯＴＡ（ＰＳＭＡへの結合についての対照）であった。

【０２８２】

全ての抗体を０．１Ｍ　ｐＨ５．５酢酸アンモニウム緩衝液中で、生体分子の２００倍過剰で^{64}Ｃｕと共に室温で４５分間インキュベートした。各溶液のサンプルを採取し、５０ｍＭ　ＥＤＴＡと１：１で混合した。５μＬの各溶液をＴＬＣ紙（シリカゲルを含浸させたＡｇｉｌｅｎｔ　ｉＴＬＣ－ＳＧ　Ｇｌａｓｓマイクロファイバークロマトグラフィー紙）上にスポットし、５０：５０　H_2O：エタノールで流した。次いで、プレートをＣａｒｅｓｔｒｅａｍ　ＭＳＦＸ画像化システム上で、放射性同位元素リン光スクリーンを用いて画像化した。必要な場合、非結合銅を７　Ｋ　ＭＷＣＯ　Ｚｅｂａ　Ｓｐｉｎカラム（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、製造業者のプロトコルに従って除去した。全てのサンプルは、＞９５％標識を示した。

【０２８３】

対照実験を行って、遊離Ｃｕ－６４及びＥＤＴＡに結合したＣｕ－６４の溶出挙動を品質管理のために監視した。

【０２８４】

腫瘍開始及び増殖

８週齢のオスＢａｌｂ／ＣヌードマウスにＬＮＣａＰ細胞を各マウスの右脇腹にて皮下注射した（２７Ｇ針）。

【０２８５】

抗体溶液を、尾静脈（２９Ｇ）を介して注射し、次いでマウスをＳｉｅｍｅｎｓ　Ｉｎｖｅｏｎ　ＰＥＴ－ＣＴ　装置を使用して画像化するか、又は尾切断により血液を収集し、示された時点での血液濃度分析のためにガンマカウンターにより活性を測定した。

【０２８６】

画像化プロトコル

マウスに、イソフルラン（ＩｓｏＦｌｏ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）で、閉鎖した麻酔誘導チャンバ内において用量２％で麻酔をかけた。マウスを眼球及び足反射を用いて監視して、深い麻酔を確認した。マウスに深い麻酔をかけた後、マウスを適切な動物ベッド上に置き、ここで、麻酔空気混合物（１％）を、鼻円錐部を通して鼻及び口腔に送達した。生理学的監視（センサプローブを使用した呼吸）を、動物監視システム（ＢｉｏＶｅｔＴＭシステム、ｍ２ｍ　Ｉｍａｇｉｎｇ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を使用して、全実験を通して達成した。画像は、抗体の尾静脈内注射後、Ｓｉｅｍｅｎｓ　Ｉｎｖｅｏｎ　ＰＥＴ－ＣＴスキャナーを使用して獲得した。

【０２８７】
注射器を放射性同位元素溶液（約１５０μＬ）で満たし、注射器内の活性を、較正係数３５を有する線量キャリブレーター（Ｃａｐｉｎｔｅｃ　ＣＲＣ－２５）を使用して測定した。尾静脈注射後の注射器内に残留した活性を、同じ線量キャリブレーター使用して測定し、各マウスに注射した総体積を計算した。
【０２８８】
ＰＥＴ／ＣＴスキャナーの較正は、放射線源としてＣｕ－６４溶液の線量を含む自社製ファントムを用いて行った。
【０２８９】
マウスをスキャナーベッド上に位置付け（社内で開発したベッドを使用して１スキャン当たりｎ＝４）、解剖学的同時登録用のマイクロ－ＣＴスキャンを獲得した。マウスのＣＴ画像を、電圧を８０ｋＶに設定し、電流を５００μＡに設定して、Ｘ線源を介して獲得した。スキャンは１２０の回転ステップを有する３６０°回転を用いて、低拡大率及びビニング係数４で行った。曝露時間は２３０ｍｓであり、有効ピクセルサイズは１０６μｍであった。Ｆｅｌｄｋａｍｐ再構成ソフトウエア（Ｓｉｅｍｅｎｓ）を使用してＣＴ画像を再構成した。ＣＴ画像化後、放射性トレーサーの注射から８時間、２４時間及び４８時間後、３０～６０分の静的取得を用いてＰＥＴスキャンを獲得した。ＰＥＴ画像を、サブセット化による期待値最大化法（ｏｒｄｅｒｅｄ－ｓｕｂｓｅｔ　ｅｘｐｅｃｔａｔｉｏｎ　ｍａｘｉｍｉｓａｔｉｏｎ）（ＯＳＥＭ２Ｄ）アルゴリズムを用いて再構成し、ＣＴ及びＰＥＴ画像の融合と目的の領域（ＲＯＩ）の画定を可能にするＩｎｖｅｏｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｗｏｒｋｐｌａｃｅソフトウエア（ＩＲＷ　４．１）（Ｓｉｅｍｅｎｓ）を使用して分析した。個々の各動物のＣＴ及びＰＥＴデータセットを、ＩＲＷソフトウエア（Ｓｉｅｍｅｎｓ）を使用して整合して、目的の器官の良好な重ね合わせを確実にした。３つの三次元ＲＯＩを、形態的ＣＴ情報を使用して、全身並びに心臓、腎臓、肺、膀胱、肝臓、脾臓、腸及び腫瘍などの目的の全器官内に配置して器官を描写した。１ボクセル当たりの活性を、既知の活性のＣｕ－６４で満たした円筒形ファントムをスキャンすることにより得られた変換係数を使用してｎｃｉ／ｃｃに変換して、ＰＥＴスキャナー効率を明らかにした。次いで、活性濃度を、組織１ｃｍ^{3}当たりの減衰補正注入活性のパーセントとして表した。これは注入線量／ｇ（％ＩＤ／ｇ）の百分率として近似され得る。
【０２９０】
次いで、腫瘍対血液比を、血液中で検出された活性に対する腫瘍中で検出された活性として計算した。
【０２９１】
結果
マウスを注射後８、２４及び４８時間で画像化した。４８時間の時点後、器官をガンマ計数及び器官分布の定量のために回収した。
【０２９２】
目的の領域を腫瘍縁（ＣＴスキャンにより描写された）の周りで描き、抗体の濃度を画像検査において（％注入線量に基づいて）各マウスについて計算した。図３～６及び８は、インビボ及びエクスビボで（ガンマカウンターにより）測定した器官蓄積を示す。インビボとエクスビボとの間の量の変動は、インビボプロットのためのＲＯＩ及びバックグラウンドシグナルに起因して生じる。ｎｓ　Ｐ＞０．０５、＊Ｐ≦０．０５、＊＊Ｐ≦０．０１、＊＊＊Ｐ≦０．００１、＊＊＊＊Ｐ≦０．０００１
【０２９３】
図７は、注射後５日までの抗体の血中濃度を示す。
【０２９４】
インビボ画像化は、全抗体について腫瘍蓄積及び長期局在化（２日を超える）を示した。異なる抗体間で統計的有意差はなく、腫瘍中の量は、４８時間後に約５％　ＩＤ／ｇであった。
【０２９５】

エクスビボ分析は、全抗体について４８時間の体内分布を示した。この時点で、腫瘍蓄積は抗体の最高濃度を有し、肝臓、脾臓及び肺が続いた。

【０２９６】

ＪＮ００５は、他の変異体（Ｊ５９１を除いて）よりも低い肝臓及び脾臓蓄積を示す。これは、遥かに長い循環時間においても明らかである（１２０時間において約１０％　ＩＤ／ｇのＪＮ００５がなお循環している）。

【０２９７】

１２０時間後に血液サンプルを採取することによって薬物動態評価を行った。最も注目すべき観察事項は、他の抗体と比較して速いＪＮ００７のクリアランスであった。

【０２９８】

血液サンプルは、抗体の腫瘍：血液比の計算のためにも使用した。抗体のそれぞれについての腫瘍：血液比（インビボ：テールブリード（ｔａｉｌ　ｂｌｅｅｄ））を、８時間、２４時間及び４８時間の時点について決定した。結果を図９に示す。図１０は、４８時間及び１２０時間での腫瘍：血液比（エクスビボ：エクスビボ）を示す。

【０２９９】

腫瘍：血液比は、抗体ＪＮ００５（ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ１＋ＤＯＴＡ）及びＪ５９１と比較して、抗体ＪＮ００６（ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ４（ＦｃＲｎ／ＦｃＲガンマ）＋ＤＯＴＡ）及びＪＮ００７（ＡＮＴ４０４４－ＩｇＧ１（ＦｃＲｎ）＋ＤＯＴＡ）が全ての時点で有意に高い。１２０時間での比が特に著しく、ＦｃＲｎ結合改変及びＦｃＲｎ／Ｒｆガンマ受容体結合改変抗体についての腫瘍：血液比が非改変抗体の比の約２００倍であった。

【０３００】

考察

試験抗体のいくつかは、有意に低下した血清半減期（及び増加したクリアランス）を有するにもかかわらず、腫瘍に蓄積する全抗体の量は統計的に異ならなかった。これらの結果は、それが抗体のそれぞれの腫瘍負荷が同じであり、ＦｃＲｎ及びＦｃガンマ受容体改変がＪＮ００７及びＪＮ００６抗体のクリアランスを有意に増加させ、血清半減期を低下させたにもかかわらず、全ての抗体がそれらの標的エピトープに対して同様の結合親和性を有し、また全ての抗体が標的部位に送達される同様の能力を有したことを示す点で、驚くべきことである。

【０３０１】

この結果は、放射性標識抗体のＦｃＲｎ又はＦｃＲｎ及びＦｃガンマ受容体結合ドメインの改変が腫瘍中に蓄積するその能力に関して抗体の治療可能性に影響を及ぼすことなく、循環中の放射性同位元素の量を減少させるのに有意な有用性を有することを示す。これは、さもなければ循環中の放射性同位元素のより長期の滞留から生じるであろう多くの毒性効果（血液毒性、骨への吸収及び骨髄照射を含む）を減少させることを含む、多くの利点を有する。

【０３０２】

実施例５：本発明の例示的な抗体の^{177}Ｌｕ画像化及び放射線療法有効性試験

試験物品

１．ＴＸＰ０２－ＪＮ００７（ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ－Ｋ－ＤＯＴＡ）

２．ＴＸＰ０２－ＪＮ００５（ＡＮＴ４０４４－Ｋ－ＤＯＴＡ）

３．ＰＳＭＡ－６１７（ＰＳＭＡ結合ペプチド）

第１相化学：画像化試験

標識の概要：ＪＮ００７、ＪＮ００５。

【０３０３】

ＡＮＴ４０４４は、本明細書に記載されている抗ＰＳＭＡ抗体である。ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲＮは、重鎖定常鎖のＦｃＲｎ結合領域が、血清半減期を低下させるように改変されている、抗体の改変形態である。ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ－Ｋ－ＤＯＴＡは、リシン残基を介してキレーターＤＯＴＡにコンジュゲートされたＡＮＴ４０４４－ＦｃＲＮであ

る。
【０３０４】
１５０μｇのＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎを５００ＭＢｑのＬｕ－１７７で、３７℃での２時間のインキュベーションで標識した。標識効率は、８１％であった。反応混合物をＮＡＰ－５カラム上でＰＢＳ中に精製し、その後の標識効率は９８％であった。標識抗体を含む画分を収集した。２０ＭＢｑのＬｕ－１７７で標識されたそれぞれ１０μｇ、１００μｇ及び３７０μｇを含む用量を、適切な量の非標識ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ抗体及びＰＢＳを加えることにより調製した。
【０３０５】
５００μｇのＡＮＴ４０４４抗体を１００ＭＢｑのＬｕ－１７７で、３７℃での２時間のインキュベーションで標識した。標識効率は９８．２％であった。製剤をＰＢＳ中に希釈し、更に精製することなく使用した。
【０３０６】
第２相化学：有効性試験
標識の概要：ＰＳＭＡ－６１７、ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ。
６μｇ（４ｎｍｏｌ）のＰＳＭＡ－６１７（６μｌの水中１ｍｇ／ｍｌ溶液）を０．１Ｍ酢酸アンモニウム緩衝液（ｐＨ５．５）中で２００ＭＢｑ　Ｌｕ－１７７で標識し、９５℃まで１０分間加熱した。標識効率は９７．６％であった。製剤をＰＢＳ中に希釈し、更に精製することなく使用した。
【０３０７】
３００μｇ　ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎを１２０ＭＢｑ　Ｌｕ－１７７で標識した。３７℃で２時間のインキュベーション後の標識効率は、９６．５％であった。製剤を５μｌ０．１Ｍ　ＥＤＴＡを加えることによりクエンチし、ＰＢＳ中に希釈し、更に精製することなく使用した。
【０３０８】
第１相　－　画像化試験設計
１．第１相試験のために、適切な腫瘍サイズ（１５０～３００ｍｍ^3）を有する動物を、試験中、以下の投与量を有するｎ＝３の４グループに配置した。
ａ．グループ１：２００μｌの１０μｇ［^{177}Ｌｕ］ＴＸＰ０２－ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ、外側尾静脈中への静脈内（ｉｖ）注射。
ｂ．グループ２：２００μｌの１００μｇ［^{177}Ｌｕ］ＴＸＰ０２－ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ、外側尾静脈中へのＩＶ注射。
ｃ．グループ３：２００μｌの３７０μｇ［^{177}Ｌｕ］ＴＸＰ０２－ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ、外側尾静脈中へのＩＶ注射。
ｄ．グループ４：２００μｌの１００μｇ［^{177}Ｌｕ］ＴＸＰ０２－ＡＮＴ４０４４、外側尾静脈中へのＩＶ注射。
２．抗体体内分布を、ＳＰＥＣＴ／ＣＴ画像化を介して抗体注射後４、２４及び４８時間で評価した。
ａ．全身静的ＳＰＥＣＴ画像を獲得した後、解剖学的参照に関する全身ＣＴを獲得した。
ｂ．ＳＰＥＣＴスキャン時間は、１スキャン当たり４０分であり、ＣＴスキャン時間は１２分であった。
ｃ．動物を多マウスホテル内で、１度に３匹画像化した。
３．腫瘍体積を週に３回、キャリパー測定により評価した。動物を任意の悪影響について検査し、規則的に秤量した。
４．動物を選択するために、組織を更なるエクスビボ分析のために収集した。
５．残りの動物を殺し、死体を廃棄した。
【０３０９】
第２相　－　有効性試験設計
１．有効性試験のために、適切な腫瘍サイズ（１５０～３００ｍｍ^3）を有する動物を、試験中、以下の投与量を有するｎ＝６の３グループに配置した。

ａ．グループ１：２００μｌの５０μｇ［^{177}Ｌｕ］ＴＸＰ０２－ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ、ＩＶ
ｂ．グループ２：２００μｌの６００　ｎｇ［^{177}Ｌｕ］ＰＳＭＡ－６１７、ＩＶ
ｃ．グループ３：２００μｌ　ＰＢＳ、ＩＶ
２．試験薬剤注射後、腫瘍サイズをキャリパー測定により週に３回、３週間評価した。
３．動物を任意の悪影響について検査し、規則的に秤量した。
４．血液サンプルを尾穿刺方法によりグループ１及び２の動物から０．５、４、８、２４、４８、７２、９６、１２０時間に採取し、ガンマ計数により評価した。
５．全血サンプルを秤量した後、参照基準を有するガンマカウンターで計数した。
６．初期の試験では、目的は処置後５週間の腫瘍増殖を監視することであった。この時間枠は、［^{177}Ｌｕ］ＴＸＰ０２－ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎマウスの数匹に観察された放射線障害のために減少させた。
７．動物を選択するために、組織を更なるエクスビボ分析のために収集した。
８．残りの動物を殺し、死体を廃棄した。

【０３１０】

結果及び考察

図１１は、異種移植マウスにおける［^{177}Ｌｕ］ＴＸＰ０２－ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ分布の例示的な画像である。

【０３１１】

図１２は、マウスからの血液中で測定した［^{177}Ｌｕ］ＴＸＰ０２－ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ放射能レベルのプロットである。

【０３１２】

図１３は、本試験で決定された腫瘍増殖のプロットである。ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ処置は、０日目と比較して１４日目に腫瘍体積の変化がないことから明らかなように、腫瘍増殖を有意に抑制した。対照（ＰＢＳ）グループでは、腫瘍体積の全体的な増加があり、ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲｎ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ処置グループの対応する時間と比較した場合、腫瘍は、９、１２及び１４日において有意に大きくなった。

【０３１３】

試験（ＪＮ００７）及び比較（ｃｏｍｐａｒａｔｏｒ）（ＪＮ００５）抗体の両方の標識は成功であり（＞９６％　標識効率）、２ＭＢｑ／μｇの最大特異的活性が達成された。

【０３１４】

画像化試験は、試験及び比較抗体の両方の、ＬＮＣａＰ腫瘍異種移植片への取込みを示した（表２を参照されたい）。

【０３１５】

心臓の左心室内に描かれた小さいＲＯＩにより推測されるように、血液クリアランスは、注射後４８時間で、ＪＮ００５抗体の同じ時点と比較して、全グループについてＪＮ００７抗体がより速かった（表３を参照されたい）。

【０３１６】

【表７】

表 2:　4、24 及び 48 時間における[^{177}Lu]TXP02-JN007 及び[^{177}Lu]TXP02-JN005 腫瘍取込み

グループ	質量用量 (μg/動物)	画像化トレーサー	線量放射能 (Mbq/動物, 平均± SD)	4 時間: 腫瘍 %ID/g (平均± SD)	24 時間: 腫瘍 %ID/g (平均± SD)	48 時間: 腫瘍 %ID/g (平均± SD)
1	100	[^{177}Lu] TXP02-JN007	19.4 ±0.6	3.2 ± 0.4	6.9 ± 1.2	8.3 ± 1.7
2	100	[^{177}Lu] TXP02-JN005	19.7 ± 0.7	4.5 ± 0.2	16.8 ± 1.2	23.7 ± 0.8

【０３１７】
【表８】

表 3:　4、24 及び 48 時間における[^{177}Lu]TXP02-JN007 及び[^{177}Lu]TXP02-JN005 心臓(血液)取込み

グループ	質量用量 (μg/動物)	画像化 トレーサー	線量放射能 (Mbq/動物, 平均± SD)	4 時間: 血液 %ID/g (平均± SD)	24 時間: 血液 %ID/g (平均± SD)	48 時間: 血液 %ID/g (平均± SD)
1	100	[^{177}Lu] TXP02-JN007	19.4 ±0.6	11.7 ± 1.7	3.0 ± 0.2	1.7 ± 0.1
2	100	[^{177}Lu] TXP02-JN005	19.7 ± 0.7	16.5 ± 1.1	10.0 ± 0.6	7.8 ± 0.9

【０３１８】
図１４は、ＪＮ００７抗体（ＦｃＲｎ結合を低下させるように改変した本発明の抗ＰＳＭＡ、Ｋ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ抗体－ＨｕＸ５９２Ｒ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ１７７とも呼ばれる）の投与後のマウスにおける腫瘍：血液比のプロットである。
【０３１９】
対照マウス（ＪＮ００５、即ちＦｃＲｎ結合領域に改変を有さない抗ＰＳＭＡ、Ｋ－ＤＯＴＡ－Ｌｕ抗体ＨｕＪ５９１－ＤＯＴＡ－Ｌｕ１７７を受けた）と比較して、ＦｃＲｎ改変抗体を受けたマウスは、血液と比較して腫瘍中の抗体の比が高かった。
【０３２０】
実施例６
試験抗体
１．ＨｕＸ５９２Ｒ（ＡＮＴ４０４４－ＦｃＲＮ）。
２．ＨｕＪ５９１（ＡＮＴ４０４４）。
【０３２１】
抗体の放射標識及びＴＬＣ分析
全ての抗体を０．１Ｍ　ｐＨ５．５酢酸アンモニウム緩衝液中で、ＨｕＸ５９２Ｒ及びＨｕＪ５９１について各生体分子の５０倍又は１００倍過剰で^{177}Ｌｕと共に室温で４５分間インキュベートした。各溶液のサンプルを採取し、５０ｍＭ　ＤＴＰＡと１：１で混合した。５μＬの各ＤＴＰＡインキュベートサンプル又はニート溶液をＴＬＣ紙（シリカ

ゲルを含浸させたＡｇｉｌｅｎｔ　ｉＴＬＣ－ＳＧ　Ｇｌａｓｓマイクロファイバークロマトグラフィー紙）上にスポットし、５０：５０　H_2O：エタノールで流した。次いで、Ｅｃｋｅｒｔ及びＺｉｅｇｌｅｒ　Ｍｉｎｉ－Ｓｃａｎ及びＦｌｏｗ－Ｃｏｕｎｔシステムを使用して放射標識種移動の検出を達成した。全てのサンプルは、＞９０％標識を示した。対照実験を行って、遊離^{177}Ｌｕ及びＤＴＰＡに結合した^{177}Ｌｕの溶出挙動を品質管理のために監視した。

【０３２２】

細胞結合

Ｌｕ－標識コンストラクトＨｕＸ５９２Ｒ及びＨｕＪ５９１を細胞結合について評価した。

【０３２３】

要約すれば、０．１００ｍＬ　ＰＢＳ中の１．２５ｘ１０^{5}　ＰＣ－３腫瘍細胞（陰性対照）又は１．２５ｘ１０^{5}　ＬＮＣａＰ腫瘍細胞を含むエッペンドルフチューブを、５μＬ（０．０３０ＭＢｑ）の標識抗体と共に３７℃でインキュベートする。インキュベーションは、分析のために以下の時点で停止した：１時間、２時間、４時間及び２４時間。

【０３２４】

非結合分率の決定。

各インキュベーション期間の終わりに、エッペンドルフチューブを５００ｇで５分間遠心分離する。遊離Ｌｕ－１７７抗体を含む上清を別個のチューブに回収し、ガンマ分析を用いて計数した。Ｌｕ－１７７　標識抗体と結合した細胞を含むペレットを、０．２００ｍＬのＰＢＳ溶液で洗浄し、５００ｇで５分間、３回繰り返して遠心分離した。各洗浄の上清を収集及び計数し、値を回収したインキュベーション上清と組み合わせて、遊離非結合抗体の合計を得た。

【０３２５】

表面結合分率の決定。

ペレットを、ｐＨ４．０の０．１ｍＬ　ＰＢＳ中に２０分間、氷冷温度で再懸濁した。次いで、エッペンドルフチューブを４℃において５００ｇで５分間遠心分離し、上清を計数のために収集した。氷冷ＰＢＳ　ｐＨ４．０で更に３回洗浄した後、上清をガンマ計数のために収集した。

【０３２６】

内部化分率の決定。

洗浄及び遠心分離後、細胞ペレットを内部化分率として計数した。

【０３２７】

タンパク質濃度

細胞を１Ｍ　ＮａＯＨで可溶化し、タンパク質濃度を決定した。

【０３２８】

計算

腫瘍細胞へのＬｕ－１７７抗体の結合（表面結合及び内部化分率）及び非結合抗体を計算し、タンパク質の１ｍｇ当たりインキュベートした総放射能の百分率として報告した。

【０３２９】

動物

６週齢の健康なオスＢａｌｂ／ＣヌードマウスＡＲＣ（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ）から獲得し、この試験に使用した。細胞の注射前に環境に順化させるために、マウスを試験前に１週間監視した。全動物に、実験前及び実験中、食物及び水への自由なアクセスを提供した。

【０３３０】

投与

注射器を放射標識抗体溶液（約１００μＬ）で満たし、注射器内の活性を、較正係数３５を有する線量キャリブレーター（Ｃａｐｉｎｔｅｃ　ＣＲＣ－２５）を使用して測定した。尾静脈注射後の注射器内に残留した活性を、同じ線量キャリブレーター使用して測定

し、各マウスに注射した総体積を計算した。

【０３３１】

耐容性

健康なオスＢａｌｂ／Ｃヌードマウス（１投与コホート当たりｎ＝３）に、^{177}Ｌｕ－標識ＨｕＸ５９２Ｒを合計３回、７日間隔で注射（２９Ｇ、約１００μＬ生理食塩水中での尾静脈注射）して、１マウス当たり約１００μｇの大量投与で６、９又は１２ＭＢｑの注入線量を与えた。次いで、注射後にマウスの健康を監視し、最初の注射の２８日後に全マウスを殺し、器官をＰＦＡ中に固定し、３０％ショ糖に移動し、必要であれば、将来の分析のために凍結保存する前に崩壊させた。

【０３３２】

体内分布

健康なオスＢａｌｂ／Ｃヌードマウス（１コホート当たりｎ＝３）に、^{177}Ｌｕ－標識コンストラクトを注射（２９Ｇ、尾静脈注射生理食塩水）して、１マウス当たり１００（ＨｕＸ５９２Ｒ）又は１４０（ＨｕＪ５９１）μｇの大量投与で６ＭＢｑの注入線量を与えた。次いで、動物を注射後２４、４８及び７２時間（ＨｕＸ５９２Ｒの場合）及び７２時間（ＨｕＪ５９１の場合）で犠牲にした。血液をサンプリングし、組織を収集し、過剰な血液を洗浄し、エクスビボ分析のために秤量した。Ｐｅｒｋｉｎ　ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ　２４８０　Ａｕｔｏｍａｔｉｃガンマカウンターを使用して組織中の放射能を測定した。ガンマカウンターを^{177}Ｌｕの既知のサンプルを使用して較正し、測定した活性を注射活性に基づく組織重量の％ＩＤ／ｇとして表した。

【０３３３】

腫瘍開始及び増殖

オートラジオグラフィー及び治療試験のために、８～１２週齢のオスＢａｌｂ／Ｃヌードマウスに、５０μＬ　５０：５０リン酸緩衝生理食塩水中の４ｘ１０^{6}　ＬＮＣａＰ細胞を各マウスの右脇腹にて皮下注射した（２７Ｇ針）。細胞注射時に潰瘍の証拠は存在せず；動物を綿密に監視し、腫瘍をキャリパーで測定し、固形腫瘍の増殖とは別に良好な状態を維持した。腫瘍増殖はＬＮＣａＰ腫瘍に度々観察されるように散発的であり、腫瘍が１００～２００mm^{3}に達したらマウスを適切な試験アームに登録した。

【０３３４】

オートラジオグラフィー

腫瘍保持オスＢａｌｂ／Ｃヌードマウス（１コホート当たりｎ＝２）に、^{177}Ｌｕ－標識コンストラクトを注射（２９Ｇ、約１００μＬ生理食塩水中での尾静脈注射）して、１マウス当たり１００（ＨｕＸ５９２Ｒ）又は１４０（ＨｕＪ５９１）μｇの大量投与で６ＭＢｑの注入線量を与えた。次いで、動物を注射の７日後に犠牲にし、腫瘍サンプルをイソペンタン－ドライアイススラリー中でスナップ凍結した後、切片化のためにＯＣＴ化合物中に包埋した。２０μｍ切片をスライド上に収集し、風乾した後、密閉カセット中の蛍光スクリーン上で約３．５時間露光した。次いで、Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｔｙｐｈｏｏｎ　Ｐｈｏｓｐｈｏｒｉｍａｇｅを使用して、感度設定１０００で^{177}Ｌｕに対して最適化して、５０ｇｍのピクセルサイズ（スキャン時間２０～３０分）を使用して画像を得た。ＩｍａｇｅＱｕａｎｔ　ＴＬソフトウエアを使用して、画像を分析した。

【０３３５】

治療試験

腫瘍保持オスＢａｌｂ／Ｃヌードマウス（１コホート当たりｎ＝６）に、^{177}Ｌｕ－標識コンストラクトを注射（２９Ｇ、約１００μＬ生理食塩水中での尾静脈注射）して、１マウス当たり１００μｇのＨｕＸ５９２Ｒ又は１４０μｇのＨｕＪ５９１の大量投与で６若しくは８ＭＢｑのＨｕＸ５９２Ｒ又は６ＭＢｑのＨｕＪ５９１の注入線量を与えた。治療に応答する腫瘍増殖を、ビヒクルのみの対照と比較して、９０日間にわたって監視した。

【０３３６】

結果

ＨｕＸ５９２Ｒ及びＨｕＪ５９１の両方が、^{177}Ｌｕ標識の成功を示した。これらの^{1}

^{177}Ｌｕ標識コンストラクトを、細胞結合、耐容性、体内分布及び治療有効性試験に直接使用した。

【０３３７】

細胞結合

^{177}Ｌｕ－標識ＨｕＸ５９２Ｒ及びＨｕＪ５９１の結合を、ＬＮＣａＰ（ＰＳＭＡ＋）及びＰＣ３（ＰＳＭＡ－）細胞株に対して評価した。非結合、表面結合及び細胞ペレット結合分率を、細胞にコンストラクトを加えた１、２及び４時間後に評価した。細胞アッセイは、ＨｕＪ５９１及びＨｕＸ５９２Ｒの両方が、ＰＳＭＡ発現細胞株において向上した蓄積を示し、細胞ペレットにおいて観察された最高濃度は、アッセイ期間中（全ての時点で）の内部化の成功を示した。最小限の結合／内部化が一般にＰＳＭＡ陰線細胞株（ＰＣ３）において観察され、結合は受容体依存性であり、標識は受容体への抗体結合を有意に妨害しないことが示された。

【０３３８】

耐容性

健康なオスＢａｌｂ／ｃヌードマウス（１コホート当たりｎ＝３）における^{177}Ｌｕ－標識ＨｕＸ５９２Ｒの耐容性を、１週間隔で３回投与した３用量レベル、１２、９及び６ＭＢｑで評価した。動物の健康を、動物の体重及び動物スコアシートにより、治療的投与の３週間を含む４週間評価した。この試験では、１２ＭＢｑの線量は高すぎることが見出され、それにより全試験は６ＭＢｑ及び８ＭＢｑの線量を用いて行った。

【０３３９】

体内分布

健康なオスＢａｌｂ／ｃヌードマウス（１コホート当たりｎ＝３）における^{177}Ｌｕ－標識コンストラクトの体内分布を、ＨｕＸ５９２Ｒでは投与の２４、４８及び７２時間後に（図１５Ａ）、ＨｕＪ５９１では投与の７２時間後のみに（図１５Ｂ）評価した。結果は、ＨｕＸ５９２Ｒと比較してＨｕＪ５９１の循環時間が有意に高いことを示し、肝臓及び脾臓などのクリアランス器官における蓄積は同等に低いレベルであり、系によるより急速なクリアランスを示唆した。

【０３４０】

オートラジオグラフィー

^{177}Ｌｕ－標識コンストラクトを腫瘍保持オスＢａｌｂ／Ｃヌードマウスに投与した。動物を注射から１週間後に犠牲にし、腫瘍をＯＣＴ中で凍結し、切片化し、オートラジオグラフィー画像を獲得した。全体的な結果は、両コンストラクトによる腫瘍蓄積及び浸透と一致し、この時点でＨｕＸ５９２Ｒと比較してＨｕＪ５９１の蓄積が高かった。更に、放射線治療薬（ｒａｄｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ）の分布は、両抗体について腫瘍全体に十分に分散しているように見えた。

【０３４１】

治療試験

側腹部ＬＮＣａＰ異種移植腫瘍を有するオスＢａｌｂ／Ｃヌードマウスを治療コホートに割り付け、以下のいずれかの３線量を１週間隔で投与した；

１．ビヒクル対照

２．６ＭＢｑ［^{177}Ｌｕ］－ＨｕＸ５９２Ｒ

３．８ＭＢｑ［^{177}Ｌｕ］－ＨｕＸ５９２Ｒ

４．６ＭＢｑ［^{177}Ｌｕ］－ＨｕＪ５９１

【０３４２】

腫瘍退縮（図１７）及び動物の体重により評価した動物の健康を１００日間監視した。結果は、ＨｕＸ５９２Ｒ　８ＭＢｑにおいて２マウスで両方のＨｕＸ５９２Ｒ（図１６）の有意な腫瘍増殖阻害を示し、ＨｕＪ５９１コホート（図示せず）の４マウスは完全な腫瘍退縮を示し、ここで、腫瘍負荷は、キャリパーによって測定できなかった。治療を開始した３７日後（全てのコホートがｎ＝６で統計的比較が可能な最後のデータポイント）、６ＭＢｑのＨｕＸ５９２Ｒ（ｐ　０．０１０５）、８ＭＢｑのＨｕＸ５９２Ｒ（ｐ　０．０

０８６）及び６ＭＢｑのＨｕＪ５９１（ｐ　０．００５６）の３つの処置の全ては、２元配置分散分析により決定して、対照コホートと比較して腫瘍増殖に有意な低下を生じた。

【０３４３】

投与グループのいずれも、体重の変化により評価して、有意な健康障害を示さない。

【０３４４】

マウス生存期間（図１７）は、対照コホート（中央値生存期間８３．５日）と比較して、３処置コホートの全てで統計的により長い（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ検定によりｐ＜０．０５）（中央値生存期間＞試験期間）。上向きのチェックマークは、非腫瘍／健康関連問題のために安楽死させた動物を示す。

【０３４５】

製剤（６ＭＢｑのＨｕＪ５９１）及びＨｕＸ５９２Ｒ（６ＭＢｑ及び８ＭＢｑの両方の）の両方は、ＰＳＭＡ発現腫瘍に対する有効性を示した。ＨｕＪ５９１（６ＭＢｑの）及びＨｕＸ５９２Ｒ（８ＭＢｑの）の両方は、試験の１００日間中、処置／腫瘍関連死を有さず、ＨｕＸ５９２Ｒ　８ＭＢｑの２マウス及びＨｕＪ５９１　グループの４マウスが腫瘍の完全な退縮（キャリパーにより測定不可能）を示した。生存プロットに関しては、抗体を用いた全処置グループが対照グループよりも統計的に良好であった。

【０３４６】

本明細書に開示及び定義される本発明は、言及されるか又は文章若しくは図面から明らかな個々の特徴の２つ以上の代替的組み合わせの全てに拡張されることが理解されるであろう。これらの異なる組み合わせの全ては、本発明の様々な代替的態様を構成する。

【図面】

【図１】

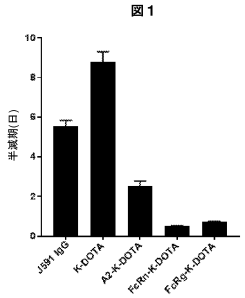


図1
半減期(日)
J591 IgG
K-DOTA
A2-K-DOTA
FcRn-K-DOTA
FcRg-K-DOTA

【図２】

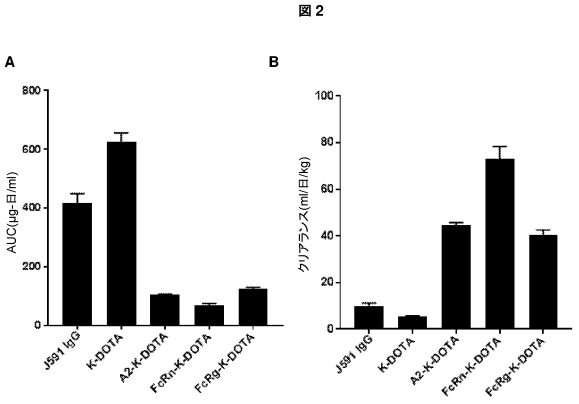


図2
A
AUC(μg-日/ml)
B
クリアランス(ml/日/kg)
J591 IgG
K-DOTA
A2-K-DOTA
FcRn-K-DOTA
FcRg-K-DOTA

【図３】

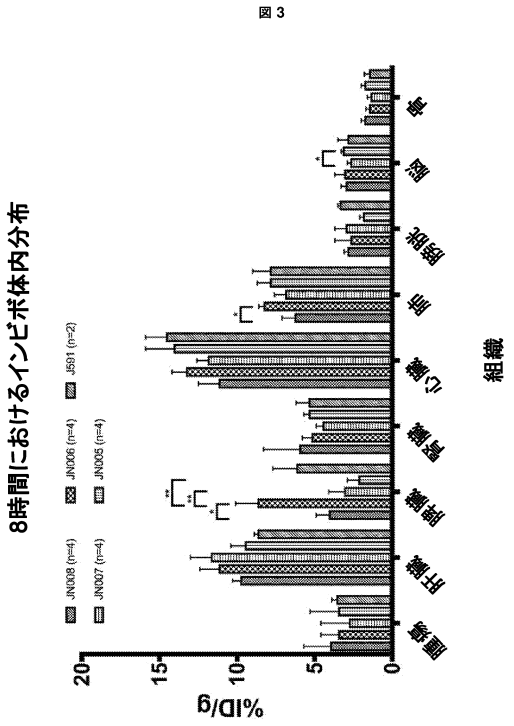


図3
8時間におけるインビボ体内分布
%ID/g
組織
JN008 (n=4)
JN006 (n=4)
JN005 (n=4)
JN007 (n=4)
J591 (n=2)

【図４】

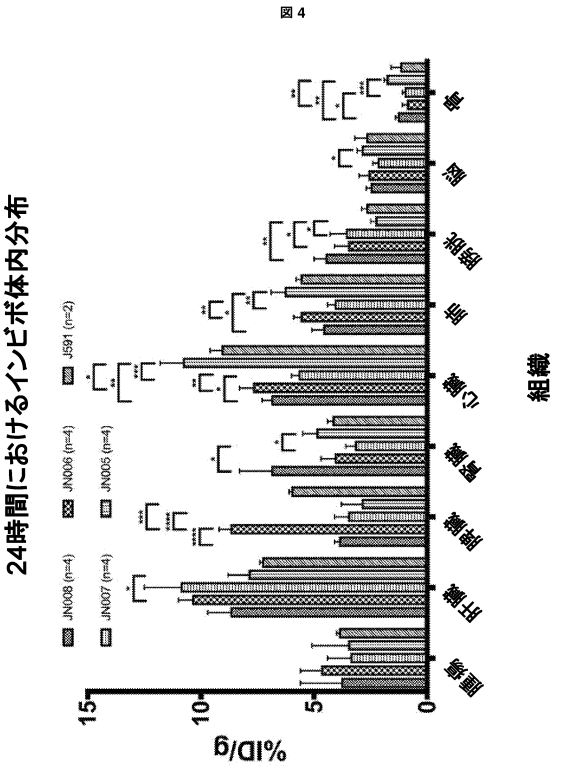


図4
24時間におけるインビボ体内分布
%ID/g
組織
JN008 (n=4)
JN006 (n=4)
JN005 (n=4)
JN007 (n=4)
J591 (n=2)

【図５】

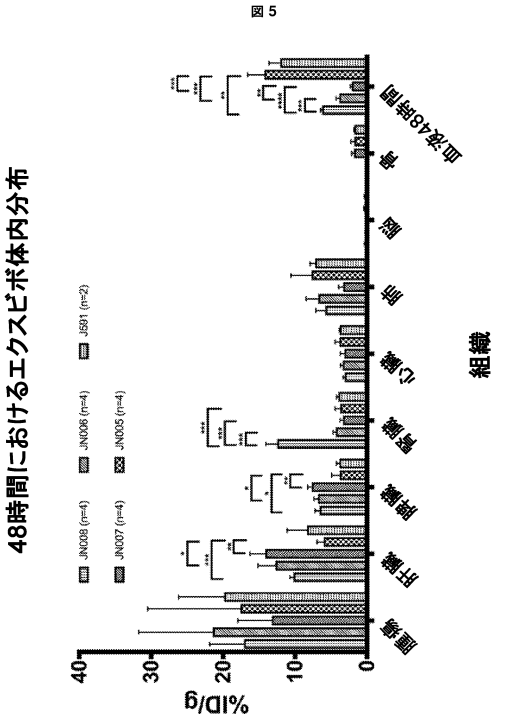


図５
48時間におけるエクスビボ体内分布
%ID/g
組織
腫瘍
肝臓
脾臓
腎臓
心臓
肺
脳
骨
血液48時間
JN008 (n=4)
JN006 (n=4)
J591 (n=2)
JN007 (n=4)
JN005 (n=4)

【図６】

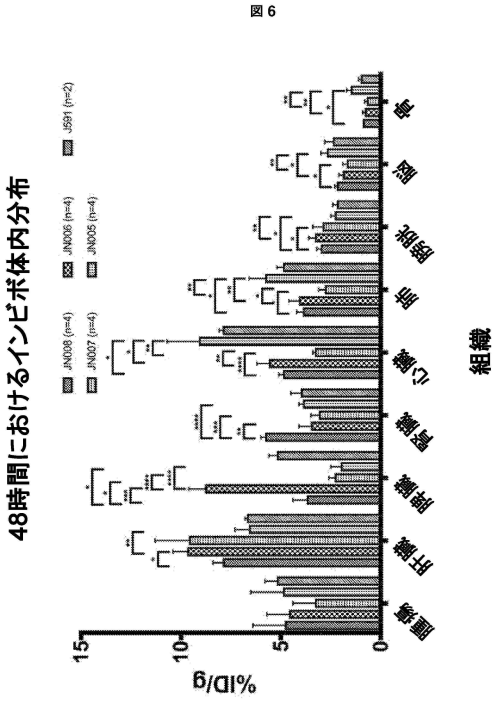


図６
48時間におけるインビボ体内分布
%ID/g
組織
腫瘍
肝臓
脾臓
腎臓
心臓
肺
脳
骨
JN008 (n=4)
JN006 (n=4)
J591 (n=2)
JN007 (n=4)
JN005 (n=4)

【図７】

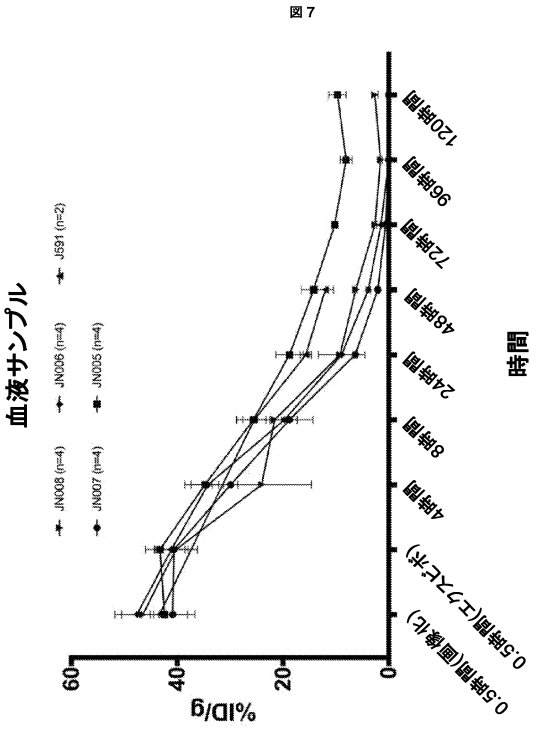


図７
血液サンプル
%ID/g
時間
0.5時間(腫瘍化)
0.5時間(エクスビボ)
4時間
8時間
24時間
48時間
72時間
96時間
120時間
JN008 (n=4)
JN006 (n=4)
J591 (n=2)
JN007 (n=4)
JN005 (n=4)

【図８】

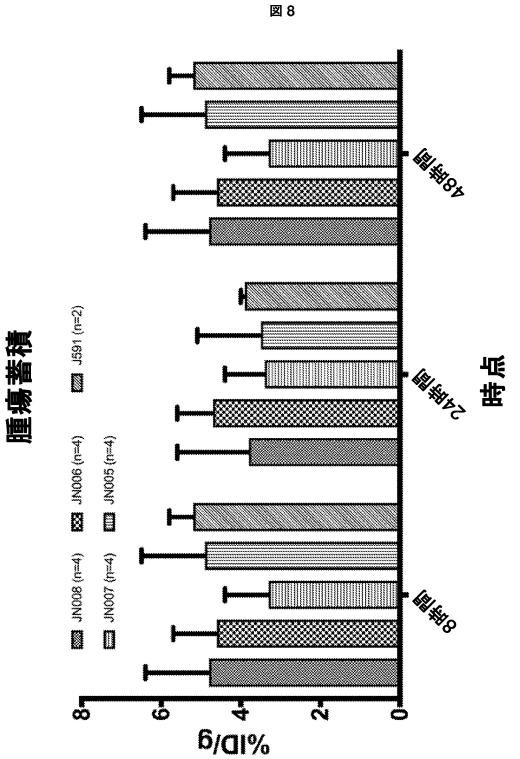
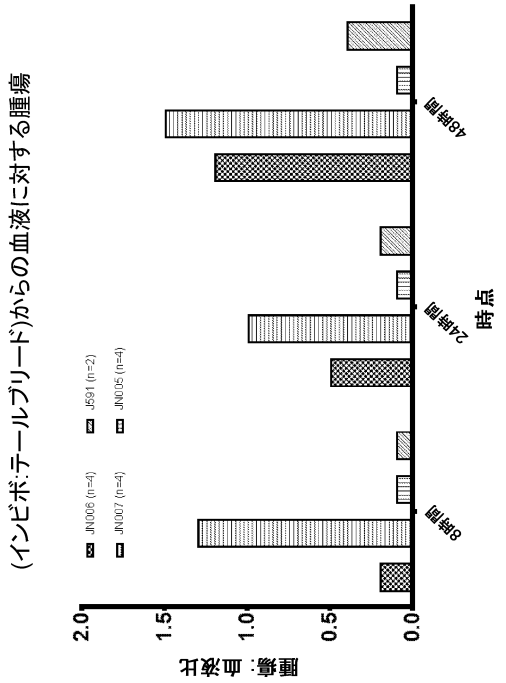


図８
腫瘍蓄積
%ID/g
時点
8時間
24時間
48時間
JN008 (n=4)
JN006 (n=4)
J591 (n=2)
JN007 (n=4)
JN005 (n=4)

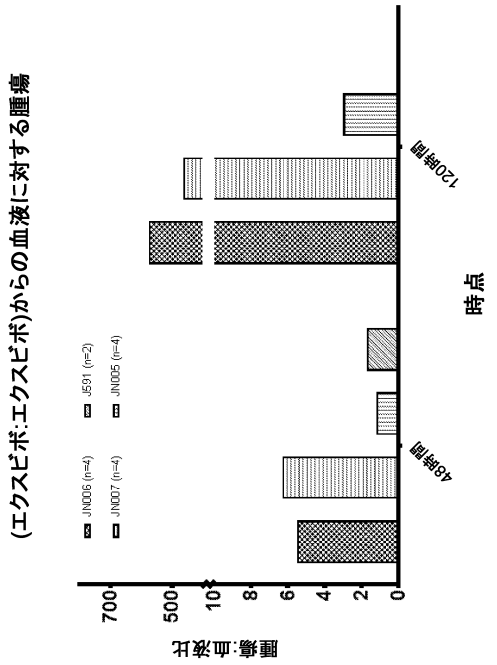
【図９】

図9



【図１０】

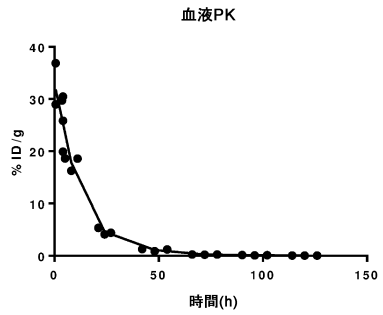
図10



【図１１】

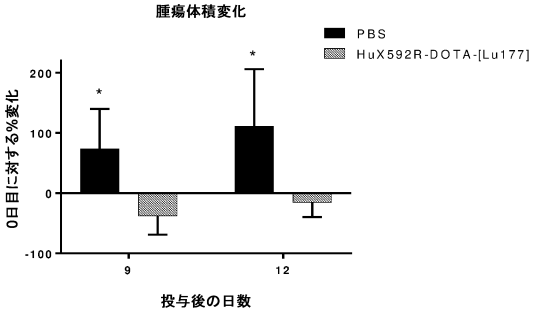
【図１２】

図12



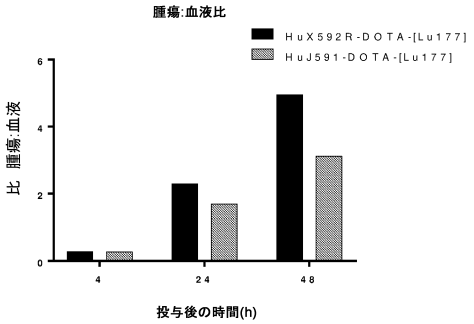
【図１３】

図13



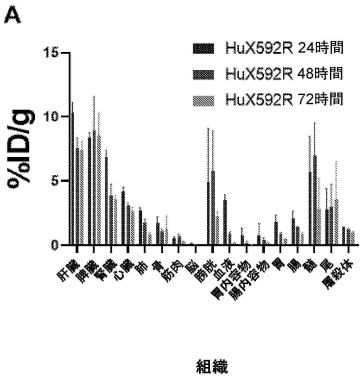
【図１４】

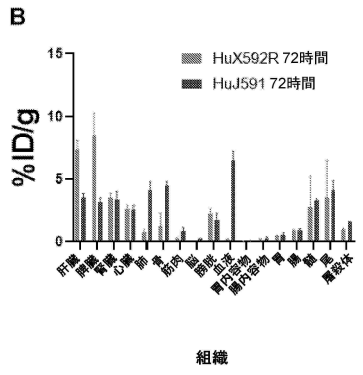
図14



【図１５】

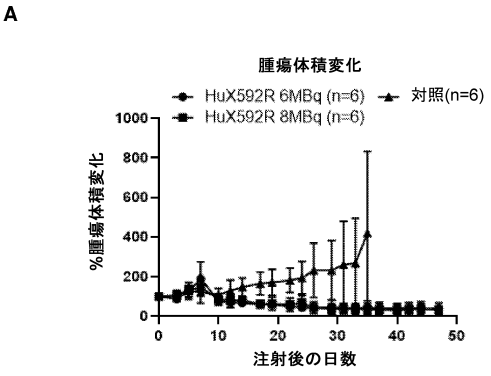
図15

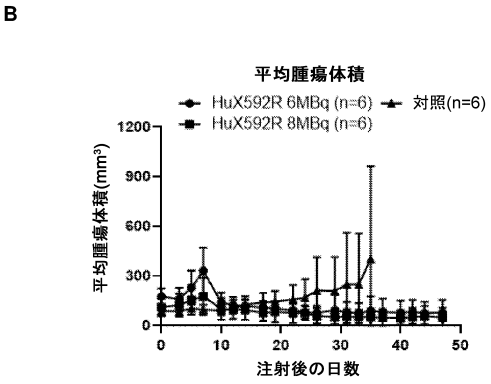




【図１６】

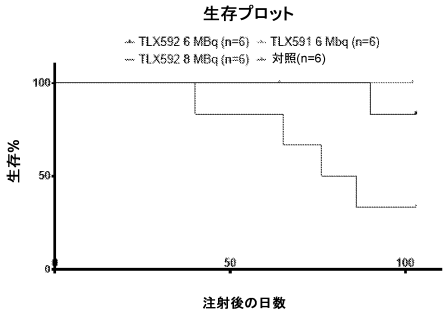
図16





【図１７】

図17



【配列表】

0007678769000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類
Ａ６１Ｋ　51/10　(2006.01)

ＦＩ
Ａ６１Ｋ　51/10　１００
Ａ６１Ｋ　51/10　２００

(74)代理人　100174296
弁理士　當麻 博文
(74)代理人　100137729
弁理士　赤井 厚子
(74)代理人　100152308
弁理士　中 正道
(74)代理人　100201558
弁理士　亀井 恵二郎
(72)発明者　ウィートクロフト、マイケル ポール
オーストラリア国、３０５１ ヴィクトリア州、ノース メルボルン、フレミントン ロード ５５、スイート ２２６ 気付
(72)発明者　ベーレンブルッフ、クリスチャン ピーター
オーストラリア国、３０５１ ヴィクトリア州、ノース メルボルン、フレミントン ロード ５５、スイート ２２６ 気付

審査官　坂井田 京

(56)参考文献　国際公開第２０１７／２１２２５０（WO，Ａ１）
特表２０１６－５２８１６８（ＪＰ，Ａ）
特表２０１１－５０２１２６（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００ － １５／９０
Ｃ０７Ｋ　１／００ － １９／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）