

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-533247

(P2014-533247A)

(43) 公表日 平成26年12月11日 (2014. 12. 11)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 T	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006. 01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/02 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 C	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-540048 (P2014-540048)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月31日 (2012. 10. 31)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年7月1日 (2014. 7. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/062861
 (87) 国際公開番号 W02013/067054
 (87) 国際公開日 平成25年5月10日 (2013. 5. 10)
 (31) 優先権主張番号 61/554, 436
 (32) 優先日 平成23年11月1日 (2011. 11. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/554, 440
 (32) 優先日 平成23年11月1日 (2011. 11. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514110761
 バイオノミクス インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 21 サン ディエゴ ソレント バリー
 ロード ナンバー203 11575
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (74) 代理人 100131392
 弁理士 丹羽 武司
 (72) 発明者 レイズ, クリストファー エル.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 30 サン ディエゴ ケイプ ジュエル
 ズ トレイル 5750
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体および癌を治療する方法

(57) 【要約】

G P R 4 9 に対する抗体、およびそのような抗体の使用について本明細書にて記載する。種々の態様は、G P R 4 9 に対するモノクローナル、ヒト化、もしくは完全ヒト抗体、そのような抗体を発現するハイブリドーマもしくはその他の細胞株、そのような抗体をコードする核酸および核酸を含むベクター、ならびにそのような抗体による癌の治療方法に関する。

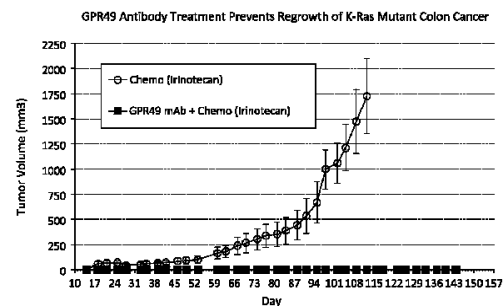


FIG. 23

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類における癌を治療する方法であって、

1.0×10^{-9} M未満の K_d にて G タンパク質共役受容体 49 (G P R 49) ポリペプチドと結合するモノクローナル抗体の治療量を、前記哺乳類へ投与することを含み、

前記 G P R 49 ポリペプチドは配列番号 1 のアミノ酸配列を有し、

前記治療量は前記癌の治療に十分である、方法。

【請求項 2】

前記抗体が 1×10^{-9} M未満の K_d にて G タンパク質共役受容体 49 (G P R 49) ポリペプチドと結合する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記抗体の前記治療量が前記哺乳類中にて腫瘍成長を低減するのに十分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記腫瘍成長の低減が腫瘍体積の減少として測定される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体の前記治療量が、コントロールと比較して、前記哺乳類の生存率を増加させるのに十分である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体が I g G クラス抗体である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記抗体が I g G 1 クラス抗体である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体がヒト抗体である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体がマウス抗体である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体が、78F05、5D6.3、1B3.5、14A8.1、76C12、18G7.1、5B10.1、14F7.1、5F2.5、7C3.4、および8E9.1から成るリストより選択されるモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記抗体またはその断片が、71C10、86C11、66D05、76C12、78F05、および76B04から成る群より選択されるモノクローナル抗体、または

モノクローナル抗体2B5.5、7F8.2、1B3.5、9C6.4、6H5.4、10A6.7、10A9.2、2G8.1、6C10.5、6G10.3、8H8.1、6B10.2、3B8.11、2F12.5、5G2.11、1F10.5、10E1.1、7C3.4、2H9.2、5B12.4、3G8.1、5F2.5、6G10.1、14H9.1、12G5.1、6E10.1、14F7.1、4A10.2、3F11.1、11F6.1、5B10.1、14A8.1、8E9.1、9C7.1、4F6.2、1B8.1、18G7.1、12E3.1、6H5.1、2P69.2、17C9.1、2H5.1、および10A9.2から成る群より選択されるハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体

40

を阻害する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記モノクローナル抗体が、 1×10^{-12} M未満の K_d にて G P R 49 ポリペプチドと結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記抗体がキメラ抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

哺乳類対象中での治療された癌腫瘍の再成長を阻止する方法であって、

50

Gタンパク質共役受容体49 (GPR49) ポリペプチドと結合するモノクローナル抗体の治療量を前記哺乳類対象に投与することを含み、

前記GPR49ポリペプチドは配列番号1のアミノ酸配列を有し、

前記治療量は治療された癌腫瘍の再成長を阻止するのに十分である、方法。

【請求項15】

前記抗体が、78F05、5D6.3、1B3.5、14A8.1、76C12、18G7.1、5B10.1、14F7.1、5F2.5、7C3.4、および8E9.1から成るリストより選択されるモノクローナル抗体である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

哺乳類対象中での治療された癌腫瘍の再成長を遅延する方法であって、

Gタンパク質共役受容体49 (GPR49) ポリペプチドと結合するモノクローナル抗体の治療量を前記哺乳類対象に投与することを含み、

前記GPR49ポリペプチドは配列番号1のアミノ酸配列を有し、

前記治療量は、治療された癌腫瘍の再成長を阻止するのに十分である、方法。

【請求項17】

前記抗体が、78F05、5D6.3、1B3.5、14A8.1、76C12、18G7.1、5B10.1、14F7.1、5F2.5、7C3.4、および8E9.1から成るリストより選択されるモノクローナル抗体である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

10×10^{-9} M未満の K_d にてGタンパク質共役受容体49 (GPR49) ポリペプチドと結合し、前記GPR49ポリペプチドは配列番号1のアミノ酸配列を有する、モノクローナル抗体。

【請求項19】

前記抗体がIgGクラス抗体である、請求項18に記載の抗体。

【請求項20】

前記抗体がIgG1クラス抗体である、請求項19に記載の抗体。

【請求項21】

前記抗体がヒト抗体である、請求項19に記載の抗体。

【請求項22】

前記抗体がマウス抗体である、請求項19に記載の抗体。

【請求項23】

前記抗体が 5×10^{-9} M未満の K_d にてGPR49と結合する、請求項18に記載の抗体。

【請求項24】

前記抗体が 10^{-9} M未満の K_d にてGPR49と結合する、請求項18に記載の抗体。

【請求項25】

前記抗体が 10^{-10} M未満の K_d にてGPR49と結合する、請求項18に記載の抗体。

【請求項26】

前記抗体が 10^{-11} M未満の K_d にてGPR49と結合する、請求項18に記載の抗体。

【請求項27】

前記抗体が 10^{-12} M未満の K_d にてGPR49と結合する、請求項18に記載の抗体。

【請求項28】

前記 K_d が、表面プラズモン共鳴 (SPR)、蛍光励起細胞分離 (FACS)、または酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によって特定される、請求項18に記載の抗体。

【請求項29】

10

20

30

40

50

前記抗体が、モノクローナル抗体 76C12、78F05、2B5.5、7F8.2、1B3.5、9C6.4、6C10.5、10A9.2、2H9-2、6H5.4、6G10.1、8E9.1、11F6.1、12G5.1、5B10.1、6H5.1、14A8.1、9C7.1、4A10.2、14H9.1、14E3.1、14F7.1、4F6.2、6E10.1、2P69.2、3F11.1、7C3.4、18G7.1、1B3.5、または17C9.1である、請求項18に記載の抗体。

【請求項30】

前記抗体またはその断片が、71C10、86C11、66D05、76C12、78F05、および76B04から成る群より選択されるモノクローナル抗体、または

モノクローナル抗体 2B5.5、7F8.2、1B3.5、9C6.4、6H5.4、10A6.7、10A9.2、2G8.1、6C10.5、6G10.3、8H8.1、6B10.2、3B8.11、2F12.5、5G2.11、1F10.5、10E1.1、7C3.4、2H9.2、5B12.4、3G8.1、5F2.5、6G10.1、14H9.1、12G5.1、6E10.1、14F7.1、4A10.2、3F11.1、11F6.1、5B10.1、14A8.1、8E9.1、9C7.1、4F6.2、1B8.1、18G7.1、12E3.1、6H5.1、2P69.2、17C9.1、2H5.1、および10A9.2から成る群より選択されるハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体

を阻害する、請求項18に記載の抗体。

【請求項31】

1×10^{-9} M未満の K_d にて Gタンパク質共役受容体 49 (GPR49) ポリペプチドと結合し、前記 GPR49 ポリペプチドは配列番号1のアミノ酸配列を含む、癌の治療のためのモノクローナル抗体。

【請求項32】

前記抗体が、78F05、5D6.3、1B3.5、14A8.1、76C12、18G7.1、5B10.1、14F7.1、5F2.5、7C3.4、および8E9.1から成るリストより選択されるモノクローナル抗体である、請求項31に記載のモノクローナル抗体。

【請求項33】

前記抗体またはその断片が、71C10、86C11、66D05、76C12、78F05、および76B04から成る群より選択されるモノクローナル抗体、または

モノクローナル抗体 2B5.5、7F8.2、1B3.5、9C6.4、6H5.4、10A6.7、10A9.2、2G8.1、6C10.5、6G10.3、8H8.1、6B10.2、3B8.11、2F12.5、5G2.11、1F10.5、10E1.1、7C3.4、2H9.2、5B12.4、3G8.1、5F2.5、6G10.1、14H9.1、12G5.1、6E10.1、14F7.1、4A10.2、3F11.1、11F6.1、5B10.1、14A8.1、8E9.1、9C7.1、4F6.2、1B8.1、18G7.1、12E3.1、6H5.1、2P69.2、17C9.1、2H5.1、および10A9.2から成る群より選択されるハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体

を阻害する、請求項31に記載のモノクローナル抗体。

【請求項34】

前記モノクローナル抗体が、 1×10^{-12} M未満の K_d にて GPR49 ポリペプチドと結合する、請求項31に記載のモノクローナル抗体。

【請求項35】

1×10^{-9} M未満の K_d にて Gタンパク質共役受容体 49 (GPR49) ポリペプチドと結合し、前記 GPR49 ポリペプチドは配列番号1のアミノ酸配列を含む、腫瘍再成長の阻止のためのモノクローナル抗体。

【請求項36】

前記抗体が、78F05、5D6.3、1B3.5、14A8.1、76C12、18

G 7 . 1、5 B 1 0 . 1、1 4 F 7 . 1、5 F 2 . 5、7 C 3 . 4、および 8 E 9 . 1 から成るリストより選択されるモノクローナル抗体である、請求項 3 5 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3 7】

前記抗体またはその断片が、7 1 C 1 0、8 6 C 1 1、6 6 D 0 5、7 6 C 1 2、7 8 F 0 5、および 7 6 B 0 4 から成る群より選択されるモノクローナル抗体、または

モノクローナル抗体 2 B 5 . 5、7 F 8 . 2、1 B 3 . 5、9 C 6 . 4、6 H 5 . 4、1 0 A 6 . 7、1 0 A 9 . 2、2 G 8 . 1、6 C 1 0 . 5、6 G 1 0 . 3、8 H 8 . 1、6 B 1 0 . 2、3 B 8 . 1 1、2 F 1 2 . 5、5 G 2 . 1 1、1 F 1 0 . 5、1 0 E 1 . 1、7 C 3 . 4、2 H 9 . 2、5 B 1 2 . 4、3 G 8 . 1、5 F 2 . 5、6 G 1 0 . 1、1 4 H 9 . 1、1 2 G 5 . 1、6 E 1 0 . 1、1 4 F 7 . 1、4 A 1 0 . 2、3 F 1 1 . 1、1 1 F 6 . 1、5 B 1 0 . 1、1 4 A 8 . 1、8 E 9 . 1、9 C 7 . 1、4 F 6 . 2、1 B 8 . 1、1 8 G 7 . 1、1 2 E 3 . 1、6 H 5 . 1、2 P 6 9 . 2、1 7 C 9 . 1、2 H 5 . 1、および 1 0 A 9 . 2 から成る群より選択されるハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体

10

を阻害する、請求項 3 5 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3 8】

前記モノクローナル抗体が、 1×10^{-12} M 未満の K_d にて G P R 4 9 ポリペプチドと結合する、請求項 3 5 に記載のモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

配列リストの参照

本出願は、電子フォーマットでの配列リストと共に出願される。この配列リストは、2012年10月26日に作成されたBIONO.002WO_Sequence.txtというファイル名のファイルとして提供され、そのサイズは、およそ31kbである。この電子フォーマットでの配列リストの情報は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年11月1日出願された、発明の名称が、METHODS OF TREATING CANCERである米国特許仮出願第61/554,436号の優先権を主張するものであり、本出願はまた、2011年11月1日出願された、発明の名称が、ANTI-GPR49 ANTIBODIESである米国特許仮出願第61/554,440号の優先権も主張するものであり、これらの全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0003】

本出願は、癌生物学の分野全体に関する。より詳細には、実施形態は、G P R 4 9 に対する抗体、およびそのような抗体の使用に関する。いくつかの実施形態は、G P R 4 9 に対するモノクローナル、ヒト化、もしくは完全ヒト抗体、そのような抗体を発現するハイブリドーマもしくはその他の細胞株、そのような抗体をコードする核酸および核酸を含むベクター、ならびにそのような抗体による癌の治療方法に関する。

40

【背景技術】

【0004】

Gタンパク質共役受容体49(G P R 4 9)は、L G R 5 / H G 3 8 / F E Xとしても知られ、構造的に糖タンパク質ホルモン受容体に類似するロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役受容体(L G R)に属する。L G Rは、以下の3つのサブグループに分類される：(1)甲状腺刺激ホルモン(T S H)受容体、卵胞刺激ホルモン(F S H)受容体、および黄体ホルモン(L H)受容体を含む糖タンパク質ホルモン受容体；(2)リラキシン受容体L G R 7およびL G R 8；ならびに(3)G P R 4 8、G P R 4 9、およびL G R 6。G P R 4 9は、腸、骨格筋、胎盤、脳、および脊髄を含むいくつかの組織中で発現される。しかし、G P R 4 9の機能に関してはほとんど分かっていない。

50

【発明の概要】

【0005】

いくつかの実施形態は、哺乳類における癌を治療する方法に関し、その方法は、 1×10^{-9} M未満の K_d にてGタンパク質共役受容体49 (GPR49) ポリペプチドと結合する、治療量のモノクローナル抗体のをその哺乳類へ投与することを含み、GPR49 ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を有し、治療量は、その癌の治療に十分な量である。1つの態様では、抗体の治療量は、哺乳類における腫瘍成長を低減するのに十分な量である。別の態様では、腫瘍成長の低減は、腫瘍体積の減少として測定される。さらなる態様では、抗体の治療量は、コントロールに対してその哺乳類の生存率を増加させるのに十分な量である。追加の態様では、抗体は、 1×10^{-12} M未満の K_d にてGPR49 ポリペプチドと結合する。

10

【0006】

他の態様では、抗体は、IgGクラス抗体、IgG1クラス抗体、ヒト抗体、またはマウス抗体である。追加の態様では、GPR49 ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列から成る。

【0007】

さらなる態様では、抗体は、モノクローナル抗体78F05、5D6.3、1B3.5、14A8.1、76C12、18G7.1、5B10.1、14F7.1、5F2.5、または7C3.4である。

【0008】

種々の態様では、抗体は、71C10、86C11、66D05、76C12、78F05、および76B04から成る群より選択されるモノクローナル抗体を、またはモノクローナル抗体2B5.5、7F8.2、1B3.5、9C6.4、6H5.4、10A6.7、10A9.2、2G8.1、6C10.5、6G10.3、8H8.1、6B10.2、3B8.11、2F12.5、5G2.11、1F10.5、10E1.1、7C3.4、2H9.2、5B12.4、3G8.1、5F2.5、6G10.1、14H9.1、12G5.1、6E10.1、14F7.1、4A10.2、3F11.1、11F6.1、5B10.1、14A8.1、8E9.1、9C7.1、4F6.2、1B8.1、18G7.1、12E3.1、6H5.1、2P69.2、17C9.1、2H5.1、および10A9.2から成る群より選択される、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体を、競合的に阻害する。

20

30

【0009】

特定の態様は、GPR49と特異的に結合する抗体またはその断片を作製する方法に関し、その方法は、請求項1に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターを有する宿主細胞を培養すること；および前記抗体またはその断片を回収することを含む。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、ELISAによる、抗GPR49 FabのヒトGPR49-Fcとの結合を示す棒グラフである。

40

【図2】図2は、FACSによる、抗GPR49 FabのヒトGPR49-HAトランスフェクトHEK293E細胞との結合を示す棒グラフである。

【図3A】図3は、FACS結合による、CHO-GPR49細胞(図3A)または親CHO細胞(図3B)に対する3つのDyax Fab候補のEC50値を示すグラフである。

【図3B】図3は、FACS結合による、CHO-GPR49細胞(図3A)または親CHO細胞(図3B)に対する3つのDyax Fab候補のEC50値を示すグラフである。

【図4A】図4は、幾何平均(図4A)または陽性細胞パーセント(図4B)によって測定される、GPR49 FabのSW620結腸腫瘍細胞との結合を示す一式の棒グラフ

50

である。

【図 4 B】図 4 は、幾何平均（図 4 A）または陽性細胞パーセント（図 4 B）によって測定される、GPR49 Fab の SW620 結腸腫瘍細胞との結合を示す一式の棒グラフである。

【図 5 A】図 5 A は、FACS 幾何平均によって測定される、GPR49 Fab の SW480 結腸腫瘍細胞との結合を示す棒グラフである。

【図 5 B】図 5 B は、FACS 陽性細胞パーセントによって測定される、GPR49 Fab の SW480 結腸腫瘍細胞との結合を示す棒グラフである。

【図 5 C】図 5 C は、SW480 結腸腫瘍細胞との結合に用いられる 76C12 Fab の種々の濃度に対する一連の FACS ヒストグラムである。

【図 6 A】図 6 A は、FACS 幾何平均によって測定される、GPR49 Fab の HCT116 結腸腫瘍細胞との結合を示す棒グラフである。

【図 6 B】図 6 B は、FACS 陽性細胞パーセントによって測定される、GPR49 Fab の HCT116 結腸腫瘍細胞との結合を示す棒グラフである。

【図 6 C】図 6 C は、HCT116 結腸腫瘍細胞との結合に用いられる 76C12 Fab の種々の濃度に対する一連の FACS ヒストグラムである。

【図 7 A】図 7 A ~ C は、FACS による、マウス GPR49 抗体の CHO GPR49 - Flag - His 発現細胞との結合を示すグラフである。

【図 7 B】図 7 A ~ C は、FACS による、マウス GPR49 抗体の CHO GPR49 - Flag - His 発現細胞との結合を示すグラフである。

【図 7 C】図 7 A ~ C は、FACS による、マウス GPR49 抗体の CHO GPR49 - Flag - His 発現細胞との結合を示すグラフである。

【図 8 A】図 8 A および 8 C は、FACS による、マウス GPR49 抗体の CHO GPR49 - Flag - His 発現細胞との結合を示すグラフである。図 8 B および 8 D は、それぞれ、図 8 A および 8 C の抗体の EC50 を示す表である。

【図 8 B】図 8 A および 8 C は、FACS による、マウス GPR49 抗体の CHO GPR49 - Flag - His 発現細胞との結合を示すグラフである。図 8 B および 8 D は、それぞれ、図 8 A および 8 C の抗体の EC50 を示す表である。

【図 8 C】図 8 A および 8 C は、FACS による、マウス GPR49 抗体の CHO GPR49 - Flag - His 発現細胞との結合を示すグラフである。図 8 B および 8 D は、それぞれ、図 8 A および 8 C の抗体の EC50 を示す表である。

【図 8 D】図 8 A および 8 C は、FACS による、マウス GPR49 抗体の CHO GPR49 - Flag - His 発現細胞との結合を示すグラフである。図 8 B および 8 D は、それぞれ、図 8 A および 8 C の抗体の EC50 を示す表である。

【図 9 A】図 9 A、9 C、9 E、および 9 G は、ダイレクト ELISA による、第二世代マウス抗体の GPR49 との結合を示すグラフである。図 9 B、9 D、9 F、および 9 H は、それぞれ、図 9 A、9 C、9 E、および 9 G の抗体の EC50 を示す表である。

【図 9 B】図 9 A、9 C、9 E、および 9 G は、ダイレクト ELISA による、第二世代マウス抗体の GPR49 との結合を示すグラフである。図 9 B、9 D、9 F、および 9 H は、それぞれ、図 9 A、9 C、9 E、および 9 G の抗体の EC50 を示す表である。

【図 9 C】図 9 A、9 C、9 E、および 9 G は、ダイレクト ELISA による、第二世代マウス抗体の GPR49 との結合を示すグラフである。図 9 B、9 D、9 F、および 9 H は、それぞれ、図 9 A、9 C、9 E、および 9 G の抗体の EC50 を示す表である。

【図 9 D】図 9 A、9 C、9 E、および 9 G は、ダイレクト ELISA による、第二世代マウス抗体の GPR49 との結合を示すグラフである。図 9 B、9 D、9 F、および 9 H は、それぞれ、図 9 A、9 C、9 E、および 9 G の抗体の EC50 を示す表である。

【図 9 E】図 9 A、9 C、9 E、および 9 G は、ダイレクト ELISA による、第二世代マウス抗体の GPR49 との結合を示すグラフである。図 9 B、9 D、9 F、および 9 H は、それぞれ、図 9 A、9 C、9 E、および 9 G の抗体の EC50 を示す表である。

【図 9 F】図 9 A、9 C、9 E、および 9 G は、ダイレクト ELISA による、第二世代

10

20

30

40

50

マウス抗体の G P R 4 9 との結合を示すグラフである。図 9 B、9 D、9 F、および 9 H は、それぞれ、図 9 A、9 C、9 E、および 9 G の抗体の E C 5 0 を示す表である。

【図 9 G】図 9 A、9 C、9 E、および 9 G は、ダイレクト E L I S A による、第二世代マウス抗体の G P R 4 9 との結合を示すグラフである。図 9 B、9 D、9 F、および 9 H は、それぞれ、図 9 A、9 C、9 E、および 9 G の抗体の E C 5 0 を示す表である。

【図 9 H】図 9 A、9 C、9 E、および 9 G は、ダイレクト E L I S A による、第二世代マウス抗体の G P R 4 9 との結合を示すグラフである。図 9 B、9 D、9 F、および 9 H は、それぞれ、図 9 A、9 C、9 E、および 9 G の抗体の E C 5 0 を示す表である。

【図 1 0 A】図 1 0 A は、分離 G P R 4 9 +、分離 G P R 4 9 -、または未分離結腸腫瘍細胞からの腫瘍スフェアの平均数を示す棒グラフである。図 1 0 B は、腫瘍スフェアアッセイにおける G P R 4 9 + および G P R 4 9 - の顕微鏡像である。

10

【図 1 0 B】図 1 0 A は、分離 G P R 4 9 +、分離 G P R 4 9 -、または未分離結腸腫瘍細胞からの腫瘍スフェアの平均数を示す棒グラフである。図 1 0 B は、腫瘍スフェアアッセイにおける G P R 4 9 + および G P R 4 9 - の顕微鏡像である。

【図 1 1 A】図 1 1 は、G P R 4 9 + M o F l o 分離結腸腫瘍細胞を接種したマウスにおける、経時での腫瘍体積（図 1 1 A）および体重（図 1 1 B）を示すグラフである。

【図 1 1 B】図 1 1 は、G P R 4 9 + M o F l o 分離結腸腫瘍細胞を接種したマウスにおける、経時での腫瘍体積（図 1 1 A）および体重（図 1 1 B）を示すグラフである。

【図 1 2 A】図 1 2 A は、マウスにおける G P R 4 9 抗体 7 6 C 1 2 の経時での血清濃度を示すグラフである。図 1 2 B は、マウスにおける、G P R 4 9 抗体 7 6 C 1 2 の週 1 回投与した用量のシミュレーションによる経時での血清濃度を示すグラフである。図 1 2 C は、単一の腹腔内投与後のマウスにおける抗 G P R 4 9 抗体 C 1 2 I g G 1 の薬物動態パラメータを示す表である。

20

【図 1 2 B】図 1 2 A は、マウスにおける G P R 4 9 抗体 7 6 C 1 2 の経時での血清濃度を示すグラフである。図 1 2 B は、マウスにおける、G P R 4 9 抗体 7 6 C 1 2 の週 1 回投与した用量のシミュレーションによる経時での血清濃度を示すグラフである。図 1 2 C は、単一の腹腔内投与後のマウスにおける抗 G P R 4 9 抗体 C 1 2 I g G 1 の薬物動態パラメータを示す表である。

【図 1 2 C】図 1 2 A は、マウスにおける G P R 4 9 抗体 7 6 C 1 2 の経時での血清濃度を示すグラフである。図 1 2 B は、マウスにおける、G P R 4 9 抗体 7 6 C 1 2 の週 1 回投与した用量のシミュレーションによる経時での血清濃度を示すグラフである。図 1 2 C は、単一の腹腔内投与後のマウスにおける抗 G P R 4 9 抗体 C 1 2 I g G 1 の薬物動態パラメータを示す表である。

30

【図 1 3 A】図 1 3 A は、I g G 1 コントロール m A b、抗 G P R 4 9 m A b 7 6 C 1 2 (C 1 2)、またはイリノテカンで処理したマウスにおける、経時での原発性結腸腫瘍体積を示すグラフである。図 1 3 B は、第 6 2 日における T / C 値を示すグラフである。

【図 1 3 B】図 1 3 A は、I g G 1 コントロール m A b、抗 G P R 4 9 m A b 7 6 C 1 2 (C 1 2)、またはイリノテカンで処理したマウスにおける、経時での原発性結腸腫瘍体積を示すグラフである。図 1 3 B は、第 6 2 日における T / C 値を示すグラフである。

40

【図 1 4】図 1 4 は、I D E C 1 5 2 コントロール抗体、7 6 C 1 2 (E T C S C m A b)、化学賦形剤 (chemo vehicle) を有するコントロール m A b、または化学賦形剤を有する E T C S C m A b で処理したマウスにおける、経時での腫瘍体積を示す一式のグラフである。

【図 1 5】図 1 5 は、未処理マウス、またはイリノテカンおよび I g G 1 コントロール、7 6 C 1 2 (E T m A b)、もしくはイリノテカンおよび 7 6 C 1 2 (E T m A b) で処理したマウスの、経時での生存パーセントを示す Kaplan-Meier 曲線である。

【図 1 6 A】図 1 6 A は、I D E C 1 5 2 コントロール抗体、イリノテカンおよび I D E C 1 5 2 コントロール抗体、または 7 6 C 1 2 (C 1 2) 抗体で処理したマウスにおける

50

、経時でのDLD-1結腸異種移植腫瘍成長を示すグラフである。

【図16B】図16Bは、デキストロースコントロール、イリノテカンおよびコントロールIgG1、またはイリノテカンおよび76C12(ET12)抗体で処理したマウスにおける、経時でのDLD-1結腸異種移植腫瘍成長を示すグラフである。

【図17】図17は、K-Ras、PI3K、PTEN、およびp53変異を有する原発性結腸癌モデルにおける腫瘍成長阻害を示すグラフである。

【図18】図18は、腫瘍成長阻害パーセントを示す図である。

【図19】図19は、GPR49 mAb + イリノテカンの組み合わせで処理したK-Ras、PI3K、PTEN、およびp53変異を有するCRC腫瘍の腫瘍阻害パーセントを示す図である。

【図20】図20は、K-Ras、PI3K、PTEN、H-Ras、APC、TP53、FGFR2、VANGL2、STK11、JAK2、およびRB1変異を有する原発性結腸癌モデルにおける腫瘍成長阻害を示すグラフである。

【図21A】図21Aは、抗GPR49抗体が、K-Ras、PI3K、PTEN、およびp53変異を有する結腸癌腫瘍における癌幹細胞の頻度を減少させることを示す図である。

【図21B】図21Bは、抗GPR49抗体による処理により、K-Ras、PI3K、PTEN、およびp53変異を有するCRC腫瘍が第二のレシピエントマウスへ移植された場合に新たな腫瘍を再形成する能力が阻害されることを示すグラフである。

【図22】図22は、GPR49 mAb 18G.7.1による処理によって、K-Ras、PI3K、PTEN、H-Ras、APC、TP53、FGFR2、VANGL2、STK11、JAK2、およびRB1変異を有するCRC腫瘍からの癌幹細胞の数が減少することを示す図である。CSC頻度は、示されるように既に処理された原発性CRC腫瘍細胞を用いた、連続再移植、限界希釈アッセイにて測定した。

【図23】図23は、抗GPR49抗体 + イリノテカンの処理によって、K-Ras、PI3K、PTEN、H-Ras、APC、TP53、FGFR2、VANGL2、STK11、JAK2、およびRB1変異を有するCRC腫瘍の、第二のレシピエントマウスへの再移植後に成長する能力が阻害されることを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本出願のいくつかの実施形態は、GPR49に対する抗体、およびそのような抗体による癌の治療に関する。種々の実施形態は、GPR49に対するヒト化または完全ヒト抗体、そのような抗体を発現するハイブリドーマまたはその他の細胞株、そのような抗体をコードする核酸および核酸を含むベクター、ならびにそのような抗体による癌の治療方法に関する。

【0012】

抗GPR49抗体

いくつかの実施形態は、抗GPR49抗体に関する。本明細書で用いられるGPR49としては、これらに限定されないが、NCBI寄託番号NP_003658.1(配列番号1)のポリペプチドを含むヒトGPR49が挙げられ、これは、NM_003667.2(配列番号2)またはその断片内のコードヌクレオチド配列によってコードされる。NCBI寄託番号NP_003658.1のアミノ酸配列およびNM_003667.2のヌクレオチド配列は、その全体が参照により完全に組み込まれる。本明細書で考慮されるGPR49断片の例としては、GPR49外部ドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞内ドメイン、およびその一部が挙げられる。

【0013】

本明細書で用いられる場合、「抗体」の用語は、これらに限定されないが、合成抗体、モノクローナル抗体、遺伝子組換えによって作製された抗体、細胞内抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、単鎖Fv(scFv)、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド結合Fv(sdFv)(二

10

20

30

40

50

重特異性 s d F v を含む)、および抗イディオタイプ(抗 I d)抗体、ならびに上記のいずれかのエピトープ結合性断片を含む。本明細書で提供されるいくつかの実施形態の抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、またはそれよりも多い多重特異性のものであってよい。多重特異性抗体は、ポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であってよく、またはポリペプチドならびに、異種ポリペプチドまたは固体支持物質などの異種エピトープの両方に対して特異的であってもよい。例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる P C T 公開公報 W O 9 3 / 1 7 7 1 5 ; W O 9 2 / 0 8 8 0 2 ; W O 9 1 / 0 0 3 6 0 ; W O 9 2 / 0 5 7 9 3 ; Tutt, et al., J. Immunol. 147: 60-69 (1991); 米国特許第 4, 4 7 4, 8 9 3 号; 同第 4, 7 1 4, 6 8 1 号; 同第 4, 9 2 5, 6 4 8 号; 同第 5, 5 7 3, 9 2 0 号; 同第 5, 6 0 1, 8 1 9 号; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992) を参照されたい。

【 0 0 1 4 】

考慮されるその他の抗 G P R 4 9 抗体としては、「オリゴクローナル」抗体が挙げられる。本明細書で用いられる場合、「オリゴクローナル」抗体の用語は、別々のモノクローナル抗体の既定の混合物を意味する。オリゴクローナル抗体を作製するための方法は、本技術分野にて公知である。例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる P C T 公開公報 W O 9 5 / 2 0 4 0 1 の「実施例セクション」、実施例 1 ; 米国特許第 5, 7 8 9, 2 0 8 号および同第 6, 3 3 5, 1 6 3 号を参照されたい。特定の実施形態では、オリゴクローナル抗体は、単一細胞中で作り出される 1 つ以上のエピトープに対する抗体の既定の混合物から成る。他の実施形態では、オリゴクローナル抗体は、共通の軽鎖とペア形成して多重特異性を有する抗体を作り出すことができる複数の重鎖を含む(例: その全内容が参照により本明細書に組み込まれる P C T 公開公報 W O 0 4 / 0 0 9 6 1 8)。オリゴクローナル抗体は、単一の標的分子上(例: G P R 4 9)の複数のエピトープを標的とすることが所望される場合に、特に有用である。意図する目的および所望される必要性に対してどのような種類の抗体または抗体の混合物が適用可能であるかについては、当業者であれば公知であるか、または判断することができる。特に、いくつかの実施形態の抗体は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、すなわち、G P R 4 9 抗原と特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子(例: 抗 G P R 4 9 抗体の 1 つ以上の相補性決定領域(C D R))を含む。また、いくつかの実施形態の抗体が、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、すなわち、G P R 4 9 抗原と特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子(例: 抗 G P R 4 9 抗体の 1 つ以上の相補性決定領域(C D R))を含むことも特に考慮される。

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態は、抗体 7 1 C 1 0、8 6 C 1 1、6 6 D 0 5、7 6 C 1 2、7 8 F 0 5、および 7 6 B 0 4 を含む、以下の実施例に記載のようにして作製される抗 G P R 4 9 ヒト F a b に関し、これらは、ヒト G P R 4 9 - F c 外部ドメイン(G P R 4 9 - R F c)(配列番号 3)と結合する。いくつかの実施形態は、実施例に記載のように、これらの F a b の完全長ヒト I g G に関する。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態は、以下の実施例に記載のように、ヒト G P R 4 9 外部ドメイン(G P R 4 9 - H i s)(配列番号 4)に対して産生されるマウスモノクローナル抗体に関し、抗体 2 B 5 . 5、7 F 8 . 2、1 B 3 . 5、9 C 6 . 4、6 H 5 . 4、1 0 A 6 . 7、1 0 A 9 . 2、2 G 8 . 1、6 C 1 0 . 5、6 G 1 0 . 3、8 H 8 . 1、6 B 1 0 . 2、3 B 8 . 1 1、2 F 1 2 . 5、5 G 2 . 1 1、1 F 1 0 . 5、1 0 E 1 . 1、7 C 3 . 4、2 H 9 . 2、5 B 1 2 . 4、3 G 8 . 1、5 F 2 . 5、および 6 G 1 0 . 1 を含む。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態は、以下の実施例に記載のように、完全長ヒト G P R 4 9 に対して産生されるマウスモノクローナル抗体に関し、抗体 1 4 H 9 . 1、1 2 G 5 . 1、6 E 1 0 . 1、1 4 F 7 . 1、4 A 1 0 . 2、3 F 1 1 . 1、1 1 F 6 . 1、5 B 1 0 . 1、1 4 A 8 . 1、8 E 9 . 1、9 C 7 . 1、4 F 6 . 2、1 B 8 . 1、1 8 G 7 . 1、1 2 E

3 . 1、6 H 5 . 1、2 P 6 9 . 2、1 7 C 9 . 1、2 H 5 . 1、および 1 0 A 9 . 2 を含む。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態の抗 G P R 4 9 抗体は、免疫グロブリン分子のいかなるタイプ（例：I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、および I g Y）、クラス（例：I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、および I g A 2）、またはサブクラスであってもよい。免疫グロブリンは、重鎖および軽鎖の両方を有し得る。様々な I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、および I g Y 重鎖が、カップまたはラムダ型の軽鎖とペア形成し得る。

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態は、以下の実施例にて作製され、記載される 2 B 5 . 5、7 F 8 . 2、1 B 3 . 5、9 C 6 . 4、6 H 5 . 4、1 0 A 6 . 7、1 0 A 9 . 2、2 G 8 . 1、6 C 1 0 . 5、6 G 1 0 . 3、8 H 8 . 1、6 B 1 0 . 2、3 B 8 . 1 1、2 F 1 2 . 5、5 G 2 . 1 1、1 F 1 0 . 5、1 0 E 1 . 1、7 C 3 . 4、2 H 9 . 2、5 B 1 2 . 4、3 G 8 . 1、5 F 2 . 5、6 G 1 0 . 1、1 4 H 9 . 1、1 2 G 5 . 1、6 E 1 0 . 1、1 4 F 7 . 1、4 A 1 0 . 2、3 F 1 1 . 1、1 1 F 6 . 1、5 B 1 0 . 1、1 4 A 8 . 1、8 E 9 . 1、9 C 7 . 1、4 F 6 . 2、1 B 8 . 1、1 8 G 7 . 1、1 2 E 3 . 1、6 H 5 . 1、2 P 6 9 . 2、1 7 C 9 . 1、2 H 5 . 1、および 1 0 A 9 . 2 と称する抗 G P R 4 9 抗体のいずれか 1 つを含む抗 G P R 4 9 抗体の軽鎖および / または重鎖を産生するハイブリドーマに関する。1 つの態様では、このハイブリドーマは、ヒト化または完全ヒトモノクローナル抗体の軽鎖および / または重鎖を産生する。

【 0 0 2 0 】

ある実施形態は、以下の実施例にて作製され、記載される 2 B 5 . 5、7 F 8 . 2、1 B 3 . 5、9 C 6 . 4、6 H 5 . 4、1 0 A 6 . 7、1 0 A 9 . 2、2 G 8 . 1、6 C 1 0 . 5、6 G 1 0 . 3、8 H 8 . 1、6 B 1 0 . 2、3 B 8 . 1 1、2 F 1 2 . 5、5 G 2 . 1 1、1 F 1 0 . 5、1 0 E 1 . 1、7 C 3 . 4、2 H 9 . 2、5 B 1 2 . 4、3 G 8 . 1、5 F 2 . 5、6 G 1 0 . 1、1 4 H 9 . 1、1 2 G 5 . 1、6 E 1 0 . 1、1 4 F 7 . 1、4 A 1 0 . 2、3 F 1 1 . 1、1 1 F 6 . 1、5 B 1 0 . 1、1 4 A 8 . 1、8 E 9 . 1、9 C 7 . 1、4 F 6 . 2、1 B 8 . 1、1 8 G 7 . 1、1 2 E 3 . 1、6 H 5 . 1、2 P 6 9 . 2、1 7 C 9 . 1、2 H 5 . 1、および 1 0 A 9 . 2 と称する抗 G P R 4 9 抗体のいずれか 1 つを含む抗 G P R 4 9 抗体の軽鎖または重鎖をコードする核酸分子に関する。1 つの態様では、核酸分子は、ヒト化または完全ヒトモノクローナル抗体の軽鎖または重鎖をコードする。

【 0 0 2 1 】

種々の実施形態は、以下の実施例にて作製され、記載される 2 B 5 . 5、7 F 8 . 2、1 B 3 . 5、9 C 6 . 4、6 H 5 . 4、1 0 A 6 . 7、1 0 A 9 . 2、2 G 8 . 1、6 C 1 0 . 5、6 G 1 0 . 3、8 H 8 . 1、6 B 1 0 . 2、3 B 8 . 1 1、2 F 1 2 . 5、5 G 2 . 1 1、1 F 1 0 . 5、1 0 E 1 . 1、7 C 3 . 4、2 H 9 . 2、5 B 1 2 . 4、3 G 8 . 1、5 F 2 . 5、6 G 1 0 . 1、1 4 H 9 . 1、1 2 G 5 . 1、6 E 1 0 . 1、1 4 F 7 . 1、4 A 1 0 . 2、3 F 1 1 . 1、1 1 F 6 . 1、5 B 1 0 . 1、1 4 A 8 . 1、8 E 9 . 1、9 C 7 . 1、4 F 6 . 2、1 B 8 . 1、1 8 G 7 . 1、1 2 E 3 . 1、6 H 5 . 1、2 P 6 9 . 2、1 7 C 9 . 1、2 H 5 . 1、および 1 0 A 9 . 2 と称する抗 G P R 4 9 抗体のいずれか 1 つを含む抗 G P R 4 9 抗体の軽鎖および / または重鎖をコードする 1 もしくは複数の核酸分子を含むベクターに関する。

【 0 0 2 2 】

他の実施形態は、少なくとも 1 つの宿主細胞を、抗 G P R 4 9 抗体をコードする少なくとも 1 つの核酸分子でトランスフェクトすること、前記宿主細胞中にてこの核酸分子を発現させること、および前記抗体を単離することを含む、抗 G P R 4 9 抗体を作製する方法に関する。いくつかの態様では、そのような抗 G P R 4 9 抗体としては、以下の実施例にて作製され、記載される 2 B 5 . 5、7 F 8 . 2、1 B 3 . 5、9 C 6 . 4、6 H 5 . 4

、10A6.7、10A9.2、2G8.1、6C10.5、6G10.3、8H8.1、6B10.2、3B8.11、2F12.5、5G2.11、1F10.5、10E1.1、7C3.4、2H9.2、5B12.4、3G8.1、5F2.5、6G10.1、14H9.1、12G5.1、6E10.1、14F7.1、4A10.2、3F11.1、11F6.1、5B10.1、14A8.1、8E9.1、9C7.1、4F6.2、1B8.1、18G7.1、12E3.1、6H5.1、2P69.2、17C9.1、2H5.1、および10A9.2と称する抗GPR49抗体のいずれか1つが挙げられる。

【0023】

いくつかの実施形態では、抗体は、 10^{-5} M未満、または 10^{-6} M未満、または 10^{-7} M未満、または 10^{-8} M未満、または 10^{-9} M未満、または 10^{-10} M未満、または 10^{-11} M未満、または 10^{-12} M未満、または 10^{-13} M未満の解離定数または K_d (k_{off} / k_{on}) にてGPR49およびその抗原性断片と特異的に結合することができる。

【0024】

別の実施形態では、抗体は、 1×10^{-3} 秒 $^{-1}$ 未満の K_{off} にてGPR49および/またはその抗原性断片と結合することができる。他の実施形態では、抗体は、 10^{-3} 秒 $^{-1}$ 未満、 5×10^{-3} 秒 $^{-1}$ 未満、 10^{-4} 秒 $^{-1}$ 未満、 5×10^{-4} 秒 $^{-1}$ 未満、 10^{-5} 秒 $^{-1}$ 未満、 5×10^{-5} 秒 $^{-1}$ 未満、 10^{-6} 秒 $^{-1}$ 未満、 5×10^{-6} 秒 $^{-1}$ 未満、 10^{-7} 秒 $^{-1}$ 未満、 5×10^{-7} 秒 $^{-1}$ 未満、 10^{-8} 秒 $^{-1}$ 未満、 5×10^{-8} 秒 $^{-1}$ 未満、 10^{-9} 秒 $^{-1}$ 未満、 5×10^{-9} 秒 $^{-1}$ 未満、または 10^{-10} 秒 $^{-1}$ 未満の K_{off} にてGPR49およびその抗原性断片と結合する。

【0025】

別の実施形態では、抗体は、少なくとも 10^{-5} M・秒 $^{-1}$ 、少なくとも 5×10^{-5} M・秒 $^{-1}$ 、少なくとも 10^{-6} M・秒 $^{-1}$ 、少なくとも 5×10^{-6} M・秒 $^{-1}$ 、少なくとも 10^{-7} M・秒 $^{-1}$ 、少なくとも 5×10^{-7} M・秒 $^{-1}$ 、または少なくとも 10^{-8} M・秒 $^{-1}$ 、または少なくとも 10^{-9} M・秒 $^{-1}$ の会合速度定数または k_{on} 速度にてGPR49および/またはその抗原性断片と結合する。

【0026】

追加の実施形態は、特定の等電点 (pI) または溶融温度 (Tm) などの特定の好ましい生化学的特性を有する抗体を含む。

【0027】

1つの実施形態では、高親和性抗体は、5.5から9.5の範囲のpIを有する。1つの実施形態では、いくつかの実施形態の高親和性抗体は、約65 から約120 の範囲のTmを有する。

【0028】

いくつかの実施形態の抗体はまた、哺乳類 (例: ヒト) 中での半減期 (例: 血清中半減期) が1日超、2日超、3日超、4日超、5日超、6日超、7日超、8日超、9日超、10日超、15日超、20日超、25日超、30日超、35日超、40日超、45日超、2ヶ月超、3ヶ月超、4ヶ月超、または5ヶ月超である抗体も包含する。哺乳類 (例: ヒト) 中での抗体の半減期が延長されることにより、哺乳類中での前記抗体または抗体断片の血清力価が高められる結果となり、従って、前記抗体もしくは抗体断片の投与の頻度が減少し、および/または投与されることになる前記抗体もしくは抗体断片の濃度が低下する。生体内半減期が延長された抗体は、当業者に公知の技術によって作製することができる。例えば、生体内半減期が延長された抗体は、FcドメインとFcRn受容体との間の相互作用に参与していることが識別されているアミノ酸残基の修飾 (例: 置換、欠失、または付加) によって作製することができる (例えば、国際公開WO97/34631; WO04/029207; 米国特許第6,737,056号および米国特許出願公開第2003/019031号を参照されたく、以下でより詳細に考察する); これらの各々について、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0029】

いくつかの実施形態において、抗体は、例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれるGhetie et al., 1997, Nat. Biotech. 15:637-40; Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol. 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci USA 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490); 米国特許第5, 624, 821号; 同第5, 885, 573号; 同第5, 677, 425号; 同第6, 165, 745号; 同第6, 277, 375号; 同第5, 869, 046号; 同第6, 121, 022号; 同第5, 624, 821号; 同第5, 648, 260号; 同第6, 194, 551号; 同第6, 737, 056号; 同第6, 821, 505号; 同第6, 277, 375; 米国特許出願公開第10/370, 749、およびPCT公開公報WO94/2935; WO99/58572; WO00/42072; WO02/060919、WO04/029207に開示されるものなど、そのFcドメイン内における修飾/置換および/または新規アミノ酸を含んでよい。Fcドメインのその他の修飾/置換は、当業者にとって容易に明らかである。

【0030】

抗体は、当業者に公知の数多くの方法によって作製可能であるそのFc領域中の修飾/置換および/または新規アミノ酸残基を含むことができる。限定されない例は、抗体コード領域の単離(例:ハイブリドーマから)、および単離された抗体コード領域のFc領域における1つ以上の所望される置換の作製を含む。別の選択肢として、抗体の可変領域を、1もしくは修飾/置換(one or modifications/substitutions)および/または新規アミノ酸残基を含むFc領域をコードするベクター中へサブクローン化してもよい。

【0031】

いくつかの実施形態の抗体はまた、やはり抗体の1つ以上の機能特性を改変する目的で、グリコシル化を改変するために修飾されてもよい。

【0032】

種々の実施形態において、抗体のグリコシル化が修飾されてよい。例えば、アグリコシル化抗体が作製されてよい(すなわち、グリコシル化のない抗体)。グリコシル化を改変して、例えば、標的抗原に対する抗体の親和性を高めることができる。そのような糖鎖修飾は、例えば、抗体配列内の1つ以上のグリコシル化部位の改変によって達成することができる。例えば、1つ以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除去をもたらす1つ以上のアミノ酸置換を行い、それによってその部位でのグリコシル化を排除することができる。そのようなアグリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高め得るものである。そのような手法は、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5, 714, 350号および同第6, 350, 861号においてより詳細に記載されている。

【0033】

加えて、または別の選択肢として、いくつかの実施形態の抗体は、フコシル残基の量が低減された低フコシル化抗体またはバイセクティング(bisecting) GlcNAc構造が増加された抗体など、改変されたグリコシル化のタイプを有するように作製されてよい。そのような改変グリコシル化パターンは、抗体のADCC能を増加させることが実証されている。そのような糖鎖修飾は、例えば、改変されたグリコシル化機構を有する宿主細胞中で抗体を発現させることによって達成することができる。改変されたグリコシル化機構を

有する細胞は、本技術分野にて報告されており、遺伝子組換え抗体を発現させることによってグリコシル化が改変された抗体を作製するための宿主細胞として用いることができる。例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれるShields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1、さらには欧州特許 E P 1, 176, 195; P C T 公開公報 W O 03 / 035835; W O 99 / 54342 を参照されたい。

【0034】

いくつかの実施形態の抗体は、単独で、またはその他の組成物と組み合わせて用いられたい。抗体は、さらに、NもしくはC末端にて異種ポリペプチドへ遺伝子組換えによって融合されてよく、またはポリペプチドもしくはその他の組成物へ化学的に結合されてもよい(共有および非共有結合を含む)。例えば、抗体は、異種ポリペプチド、薬物、放射性核種、またはトキシンなど、検出アッセイにおける標識として有用である分子およびエフェクター分子と、遺伝子組換えによって融合されても、または結合されてもよい。例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる P C T 公開公報 W O 92 / 08495; W O 91 / 14438; W O 89 / 12624; 米国特許第 5, 314, 995 号; および E P 396, 387 を参照されたい。

【0035】

本明細書にて提供される抗体は、修飾された誘導体、すなわち、抗体による G P R 49 ポリペプチドもしくはその断片との結合、および/または所望される応答の発生を共有結合が阻止しないような形で、いずれかのタイプの分子を抗体へ共有結合させることによって修飾された誘導体を含んでよい。例えば、これらに限定されないが、抗体誘導体としては、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護/封止基による誘導体化、タンパク質分解開裂、細胞リガンドもしくはその他のタンパク質との連結などによって修飾された抗体が挙げられる。数多くの化学修飾のいずれも、公知の技術によって実施されてよく、これらに限定されないが、特異的開裂、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などが挙げられる。加えて、誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含有していてもよい。

【0036】

いくつかの実施形態において、抗体は、N C B I 寄託番号 N P __ 003658.1 (配列番号 1) のヒト G P R 49 ポリペプチドまたはその断片に対して少なくとも 60% の同一性、または少なくとも 70% の同一性、または少なくとも 80% の同一性、少なくとも 85% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 95% の同一性、または少なくとも 97% の同一性、または少なくとも 99% の同一性、または 100% の同一性を有する G P R 49 ポリペプチドを含むか、またはそれから成るポリペプチドと特異的に結合する。そのような断片は、例えば、配列番号 1 の少なくとも約 5、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、もしくは 900 の隣接または非隣接アミノ酸、または上述の長さのいずれかの間のいずれかの数の隣接または非隣接アミノ酸であってよい。

【0037】

2つのアミノ酸配列(または2つの核酸配列)の同一性パーセントは、例えば、最適比較の目的でこれらの配列を整列(alignment)させることによって決定することができる(例: 第一の配列の配列中にギャップが導入されてよい)。次に、対応する位置のアミノ酸またはヌクレオチドを比較し、2つの配列間の同一性パーセントは、これらの配列によって共有される同一の位置の数の関数である(すなわち、同一性% = 同一の位置の数 / 位置の総数 × 100)。2つの配列の実際の比較は、数学的アルゴリズムの使用を例とする公知の方法によって達成することができる。そのような数学的アルゴリズムの具体的な限定されない例は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993) に記載されている。そのようなアルゴリズムは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる Schaffer et al., Nucleic Acids Res

10

20

30

40

50

., 29:2994-3005 (2001)に記載のように、BLASTNおよびBLASTXプログラム(バージョン2.2)に組み込まれている。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、対応するプログラム(例:BLASTN)のデフォルトパラメータが用いられてよい。2002年4月10日から利用可能である<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。1つの実施形態では、検索されるデータベースは、非重複(NR)データベースであり、配列比較のパラメータは:フィルターなし;Expect value 10;Word Size 3;MatrixはBLOSUM62;Gap CostはExistence 11およびExtension 1を有する、として設定されてよい。

【0038】

10

いくつかの実施形態はまた、上述の抗体の変異体も包含し、可変軽鎖(V_L)ドメインおよび/または可変重鎖(V_H)ドメインに1つ以上のアミノ酸残基置換を有する、以下の実施例にて作製され、記載される2B5.5、7F8.2、1B3.5、9C6.4、6H5.4、10A6.7、10A9.2、2G8.1、6C10.5、6G10.3、8H8.1、6B10.2、3B8.11、2F12.5、5G2.11、1F10.5、10E1.1、7C3.4、2H9.2、5B12.4、3G8.1、5F2.5、6G10.1、14H9.1、12G5.1、6E10.1、14F7.1、4A10.2、3F11.1、11F6.1、5B10.1、14A8.1、8E9.1、9C7.1、4F6.2、1B8.1、18G7.1、12E3.1、6H5.1、2P69.2、17C9.1、2H5.1、および10A9.2と称する抗GPR49抗体のいずれか1つが挙げられる。いくつかはまた、1つ以上のV_LCDRおよび/または1つ以上のV_HCDRに1つ以上の追加のアミノ酸残基置換を有する上述の抗体の変異体も包含する。上述の抗体のV_Hドメイン、V_HCDR、V_Lドメイン、および/またはV_LCDRに置換を導入することによって作製される抗体は、例えばGPR49と結合するその能力について、生体外および生体内にて試験されてよい(例えば、これらに限定されないが、ELISAおよびBIACoreを含むイムノアッセイによる)。

20

【0039】

他の実施形態において、抗体は、以下の実施例にて作製され、記載される2B5.5、7F8.2、1B3.5、9C6.4、6H5.4、10A6.7、10A9.2、2G8.1、6C10.5、6G10.3、8H8.1、6B10.2、3B8.11、2F12.5、5G2.11、1F10.5、10E1.1、7C3.4、2H9.2、5B12.4、3G8.1、5F2.5、6G10.1、14H9.1、12G5.1、6E10.1、14F7.1、4A10.2、3F11.1、11F6.1、5B10.1、14A8.1、8E9.1、9C7.1、4F6.2、1B8.1、18G7.1、12E3.1、6H5.1、2P69.2、17C9.1、2H5.1、および10A9.2と称する抗GPR49抗体のいずれか1つを含む上述の抗体のCDRの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または少なくとも6つを有してよい。

30

【0040】

種々の実施形態は、以下の実施例にて作製され、記載される2B5.5、7F8.2、1B3.5、9C6.4、6H5.4、10A6.7、10A9.2、2G8.1、6C10.5、6G10.3、8H8.1、6B10.2、3B8.11、2F12.5、5G2.11、1F10.5、10E1.1、7C3.4、2H9.2、5B12.4、3G8.1、5F2.5、6G10.1、14H9.1、12G5.1、6E10.1、14F7.1、4A10.2、3F11.1、11F6.1、5B10.1、14A8.1、8E9.1、9C7.1、4F6.2、1B8.1、18G7.1、12E3.1、6H5.1、2P69.2、17C9.1、2H5.1、および10A9.2と称する抗GPR49抗体のいずれか1つなど、GPR49と特異的に結合する抗GPR49抗体のV_Hドメイン、V_HCDR、V_Lドメイン、またはV_LCDRの誘導体を含む、GPR49と特異的に結合する抗体を含む。当業者に公知の標準的な技術を用いて、抗体をコードす

40

50

るヌクレオチド配列中に変異（例：付加、欠失、および／または置換）を導入することができ、例えば、部位特異的変異誘発およびPCR変異誘発が挙げられ、これらは、アミノ酸置換の作製に慣行的に用いられる。1つの実施形態では、V_Hおよび／またはV_LCDR誘導体は、元のV_Hおよび／またはV_LCDRに対して、25アミノ酸未満の置換、20アミノ酸未満の置換、15アミノ酸未満の置換、10アミノ酸未満の置換、5アミノ酸未満の置換、4アミノ酸未満の置換、3アミノ酸未満の置換、または2アミノ酸未満の置換を含む。別の実施形態では、V_Hおよび／またはV_LCDR誘導体は、1つ以上の推定非必須アミノ酸残基（すなわち、抗体のGPR49との特異的結合に不可欠なものではないアミノ酸残基）にて作製された保存的アミノ酸置換（例：上記）を有する。別の選択肢として、変異は、飽和変異誘発などにより、V_Hおよび／またはV_LCDRコード配列のすべて、または一部に沿ってランダムに導入されてもよく、得られた変異体は、生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を保持する変異体が識別されてよい。変異誘発に続いて、コードされた抗体が発現されてよく、その抗体の活性が特定されてよい。

10

20

30

40

50

【0041】

いくつかの実施形態はまた、GPR49またはその断片と特異的に結合する抗体も包含し、前記抗体は、以下の実施例にて作製され、記載される2B5．5、7F8．2、1B3．5、9C6．4、6H5．4、10A6．7、10A9．2、2G8．1、6C10．5、6G10．3、8H8．1、6B10．2、3B8．11、2F12．5、5G2．11、1F10．5、10E1．1、7C3．4、2H9．2、5B12．4、3G8．1、5F2．5、6G10．1、14H9．1、12G5．1、6E10．1、14F7．1、4A10．2、3F11．1、11F6．1、5B10．1、14A8．1、8E9．1、9C7．1、4F6．2、1B8．1、18G7．1、12E3．1、6H5．1、2P69．2、17C9．1、2H5．1、および10A9．2と称する抗GPR49抗体のいずれか1つを含む本明細書で述べる抗体のいずれかの可変重鎖および／または軽鎖のアミノ酸配列に対して、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の同一性を有する可変重鎖および／または軽鎖のアミノ酸配列を含む。

【0042】

種々の実施形態はさらに、GPR49またはその断片と特異的に結合する抗体も包含し、前記抗体または抗体断片は、以下の実施例にて作製され、記載される2B5．5、7F8．2、1B3．5、9C6．4、6H5．4、10A6．7、10A9．2、2G8．1、6C10．5、6G10．3、8H8．1、6B10．2、3B8．11、2F12．5、5G2．11、1F10．5、10E1．1、7C3．4、2H9．2、5B12．4、3G8．1、5F2．5、6G10．1、14H9．1、12G5．1、6E10．1、14F7．1、4A10．2、3F11．1、11F6．1、5B10．1、14A8．1、8E9．1、9C7．1、4F6．2、1B8．1、18G7．1、12E3．1、6H5．1、2P69．2、17C9．1、2H5．1、および10A9．2と称する抗GPR49抗体のいずれか1つを含む本明細書で述べる抗体の1つ以上のCDRのアミノ酸配列に対して、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の同一性を有する1つ以上のCDRのアミノ酸配列を含む。2つのアミノ酸配列の同一性パーセントの決定は、BLASTタンパク質検索を含む当業者に公知のいずれの方法によって決定されてもよい。

【0043】

別の実施形態は、以下の実施例にて作製され、記載される2B5．5、7F8．2、1B3．5、9C6．4、6H5．4、10A6．7、10A9．2、2G8．1、6C10．5、6G10．3、8H8．1、6B10．2、3B8．11、2F12．5、5G2．11、1F10．5、10E1．1、7C3．4、2H9．2、5B12．4、3G

8 . 1、5 F 2 . 5、6 G 1 0 . 1、1 4 H 9 . 1、1 2 G 5 . 1、6 E 1 0 . 1、1 4 F 7 . 1、4 A 1 0 . 2、3 F 1 1 . 1、1 1 F 6 . 1、5 B 1 0 . 1、1 4 A 8 . 1、8 E 9 . 1、9 C 7 . 1、4 F 6 . 2、1 B 8 . 1、1 8 G 7 . 1、1 2 E 3 . 1、6 H 5 . 1、2 P 6 9 . 2、1 7 C 9 . 1、2 H 5 . 1、および 1 0 A 9 . 2 と称する抗 G P R 4 9 抗体のいずれか 1 つなど、抗 G P R 4 9 抗体のいずれかの部分における保存的アミノ酸置換の導入を含む。「保存的アミノ酸置換」は、機能的に同等であるアミノ酸を置換するアミノ酸置換を意味することは本技術分野にて公知である。保存的アミノ酸変化は、得られるペプチドのアミノ酸配列にサイレントな変化をもたらす。例えば、類似の極性を有する 1 つ以上のアミノ酸は、機能的に同等に作用し、そのペプチドのアミノ酸配列内にサイレントな改変をもたらす。電氣的に中性であり、残基をより小さい残基で置き換える置換も、たとえそれらの残基が異なる群であったとしても（例：フェニルアラニンをより小さいイソロイシンで置換）、「保存的置換」と見なされ得る。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、本技術分野にて識別されている。保存的アミノ酸置換のいくつかのファミリーを表 1 に示す。

【 0 0 4 4 】

【表 1】

表 1

保存的アミノ酸置換のファミリー

ファミリー	アミノ酸
非極性	Trp、Phe、Met、Leu、Ile、Val、Ala、Pro
非電荷極性	Gly、Ser、Thr、Asn、Gln、Tyr、Cys
酸性／負電荷	Asp、Glu
塩基性／正電荷	Arg、Lys、His
ベーター分岐	Thr、Val、Ile
鎖配向に影響する残基	Gly、Pro
芳香族	Trp、Tyr、Phe、His

【 0 0 4 5 】

「保存的アミノ酸置換」の用語はまた、アミノ酸類似体または変異体の使用も意味する。

【 0 0 4 6 】

抗体を作製する方法

G P R 4 9 ポリペプチドと特異的に結合する抗体は、例えば、イムノアッセイ、B I A c o r e、または当業者に公知のその他の技術によって識別することができる。

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態の抗体は、本技術分野にて公知の適切ないかなる方法で作製されてもよい。目的の抗原に対するポリクローナル抗体は、本技術分野にて公知の様々な手順によって作製することができる。例えば、G P R 4 9 ポリペプチドを、ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない種々の宿主動物へ投与して、抗原に対して特異的であるポリクローナル抗体を含有する血清の産生を誘発することができる。宿主種に応じて、免疫学的応答を高めるために種々のアジュバントが用いられてよく、これらに限定されないが、フロイントアジュバント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの界面活性剤、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノー

ル、ならびに B C G (カルメット・ゲラン桿菌) および コリネバクテリウム・パルバム (Corynebacterium parvum) などの潜在的に有用であるヒトアジュバントが挙げられる。このようなアジュバントも、本技術分野にて公知である。

【0048】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、遺伝子組換え、およびファージディスプレイ技術の使用、またはこれらの組み合わせを含む本技術分野にて公知である広範囲の様々な技術を用いて作製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を用いて作製することができ、本技術分野で公知であり、例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) に教示されるものが挙げられる。本明細書で用いられる場合、「モノクローナル抗体」(「mAb」と略される)の用語は、ハイブリドーマ技術によって作製される抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」の用語は、いずれの真核、原核、またはファージクローンをも含む単クローンから誘導される抗体を意味し、それが作製される方法を意味するものではない。「モノクローナル抗体」は、2つのタンパク質、すなわち重鎖および軽鎖を含んでよく、または別の選択肢として、それらから成っていてよい。

【0049】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を作製およびスクリーニングするための方法は、慣行的な手順であり、本技術分野にて公知である。限定されない例として、マウスが、GPR49ポリペプチド、またはそのようなペプチドを発現する細胞によって免疫化されてよい。抗原に対して特異的である抗体がマウス血清中にて検出されることを例とする免疫応答の検出が得られた後、マウスの脾臓が取り出され、脾細胞が単離される。次に、脾細胞は、公知の技術によって、ATCCから入手可能である細胞株SP20からの細胞を例とするいずれかの適切な骨髓腫細胞と融合される。限界希釈法により、ハイブリドーマが選択され、クローン化される。このハイブリドーマクローンは、次に、GPR49ポリペプチドと結合する能力を有する抗体を分泌する細胞について、本技術分野で公知の方法によって分析される。陽性ハイブリドーマクローンでマウスを免疫化することにより、一般的に高レベルの抗体を含有するものである腹水を作り出すことができる。

【0050】

従って、いくつかの実施形態は、モノクローナル抗体を作製する方法、ならびにその方法で作製された抗体を提供し、その方法は、抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養することを含み、ハイブリドーマは、GPR49抗原で免疫化されたマウスから単離された脾細胞を骨髓腫細胞と融合し、次にGPR49ポリペプチドと結合することができる抗体を分泌するハイブリドーマクローンについて、その融合から得られたハイブリドーマをスクリーニングすることによって作製される。

【0051】

特定のエピトープを認識する抗体断片は、公知の技術によって作製することができる。例えば、いくつかの実施形態のFabおよびF(ab')₂断片は、パパイン(Fab断片の作製)またはペプシン(F(ab')₂断片の作製)などの酵素を用いた免疫グロブリン分子のタンパク質分解開裂によって作製することができる。F(ab')₂断片は、可変領域、軽鎖定常領域、および重鎖のCH1ドメインを含有する。

【0052】

種々の実施形態の抗体はまた、本技術分野で公知の様々なファージディスプレイ法を用いて作製することもできる。ファージディスプレイ法では、機能性抗体ドメインが、それをコードするポリペプチド配列を有するファージ粒子の表面上に提示される。特定の実施形態では、そのようなファージを用いて、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー(例: ヒトまたはマウス)から発現される抗原結合ドメインを提示することができる。目的の抗原と結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、例えば標識抗原、または固体表面もしくはビーズ上に結合または捕捉された抗原を用いることで、抗原によ

って選択または識別を行うことができる。これらの方法で用いられるファージは、通常、F a b、F v、またはジスルフィド安定化F v抗体ドメインがファージのg e n e I I Iまたはg e n e V I I Iタンパク質と遺伝子組換えによって融合されてファージから発現されるf dおよびM 1 3結合ドメインを含む繊維状ファージである。いくつかの実施形態の抗体の作製に用いることができるファージディスプレイ法の例としては、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれるP C T出願公開番号P C T / G B 9 1 / 0 1 1 3 4 ; P C T公開公報W O 9 0 / 0 2 8 0 9 ; W O 9 1 / 1 0 7 3 7 ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 ; W O 9 2 / 1 8 6 1 9 ; W O 9 3 / 1 1 2 3 6 ; W O 9 5 / 1 5 9 8 2 ; W O 9 5 / 2 0 4 0 1 ; ならびに米国特許第5, 6 9 8, 4 2 6号; 同第5, 2 2 3, 4 0 9号; 同第5, 4 0 3, 4 8 4号; 同第5, 5 8 0, 7 1 7号; 同第5, 4 2 7, 9 0 8号; 同第5, 7 5 0, 7 5 3号; 同第5, 8 2 1, 0 4 7号; 同第5, 5 7 1, 6 9 8号; 同第5, 4 2 7, 9 0 8号; 同第5, 5 1 6, 6 3 7号; 同第5, 7 8 0, 2 2 5号; 同第5, 6 5 8, 7 2 7号; 同第5, 7 3 3, 7 4 3号、および同第5, 9 6 9, 1 0 8号に開示されるものが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0053】

上記参考文献に記載のように、ファージによる選択の後、ファージからの抗体コード領域を単離し、これを用いてヒト抗体を含む全抗体またはその他のいずれかの所望される抗原結合断片を作製することができ、ならびに、例えば以下で詳細に述べるように、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む所望されるいずれの宿主中にも発現させることができる。例えば、F a b、F a b'、およびF (a b') 2断片を遺伝子組換えによって作製する技術の利用は、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれるP C T公開公報W O 9 2 / 2 2 3 2 4 ; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); およびSawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); およびBetter et al., Science 240:1041-1043 (1988)に開示されるものなど、本技術分野にて公知の方法を用いて行うこともできる。

【0054】

一本鎖F v sおよび抗体を作製するために用いることができる技術の例としては、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4, 9 4 6, 7 7 8号および同第5, 2 5 8, 4 9 8号; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); およびSkerra et al., Science 240:1038-1040 (1988)に記載のものが挙げられる。

【0055】

ヒト抗体および抗体のヒト化

抗体のヒトにおける生体内使用および生体外検出アッセイを含むいくつかの使用のために、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を用いることが望ましい場合がある。キメラ抗体は、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体など、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。キメラ抗体を作製するための方法は、本技術分野にて公知である。例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれるMorrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; 米国特許第5, 8 0 7, 7 1 5号; 同第4, 8 1 6, 5 6 7号; および同第4, 8 1 6, 3 9 7号を参照されたい。ヒト化抗体は、非ヒト種からの1つ以上の相補性決定領域(C D R)およびヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域を有する、所望される抗原と結合する非ヒト種抗体からの抗体分子である。多くの場合、ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基がC D Rドナー抗体からの対応する残基と置換されて、抗原結合性が改変、好ましくは改善される。これらのフレームワーク置換は、本技術分野にて公知の方法によって識別され、例えば、C D Rとフレームワーク残基との相互作用のモデル化による抗原結合に重要であるフレームワーク残基の識別、ならびに配列比較による特定の位置での異常なフレームワーク残基の識別による(例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれるQueen et al., 米国特許第5, 5 8 5, 0 8 9号; Riechman

n et al., Nature 332:323 (1988)を参照されたい)。

【0056】

ヒト抗体では、マウスもしくはラットの可変および/または定常領域を持つ抗体に付随する問題のいくつかが回避される。そのようなマウスまたはラット由来タンパク質の存在は、抗体の急速なクリアランスに繋がる場合があり、または患者による抗体に対する免疫応答の発生に繋がる場合もある。マウスまたはラット由来抗体の利用を回避するために、本技術分野にて公知である種々の技術を用いて抗体がヒト化されてよく、例えば、CDRグラフティング(EP 239,400;PCT公開公報WO 91/09967;米国特許第5,225,539号;同第5,530,101号;および同第5,585,089号;これらの各々は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる)、ベニアリング(veneering)またはリサーフェイシング(resurfacing)(EP 592,106;EP 519,596;Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991);Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994);Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994))、脱免疫化(de-immunization)(米国特許出願公開第20030153043号)、およびチェーンシャフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)が挙げられ、これらの各々は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0057】

完全ヒト抗体は、ヒト患者の治療的措置に用いることができる。ヒト抗体は、本技術分野にて公知の種々の方法によって作製することができ、ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体ライブラリーを用いた上述のファージディスプレイ法が挙げられる。各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,444,887号および同第4,716,111号;ならびにPCT公開公報WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、およびWO 91/10741も参照されたい。

20

【0058】

ヒト抗体はまた、機能的内在性免疫グロブリンを発現することはできないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて作製することもできる。例えば、ヒト重および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体が、ランダムに、または相同遺伝子組換えによってマウス胚性幹細胞中へ導入されてよい。別の選択肢として、ヒト可変領域、定常領域、および多様性領域(diversity region)が、ヒト重および軽鎖遺伝子に加えて、マウス胚性幹細胞中へ導入されてもよい。マウス重および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同遺伝子組換えによるヒト免疫グロブリン座位の導入と別個に、または同時に、非機能性とされてよい。特に、JH領域のホモ接合型欠失は、内在性抗体産生を阻止する。修飾された胚性幹細胞は、増殖され、胚盤胞中へ微量注入され、キメラマウスが作出される。次に、キメラマウスが飼育されて、ヒト抗体を発現するホモ接合体子孫が作出される。トランスジェニックマウスは、GPR49ポリペプチドのすべてまたは一部を例とする選択された抗原により、通常の方法で免疫化される。その抗原に対するモノクローナル抗体を、従来のハイブリドーマ技術を用いて、免疫化トランスジェニックマウスから得ることができる。このトランスジェニックマウスが持つヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の過程で再構成し、続いて、クラススイッチおよび体細胞変異を起こす。従って、そのような技術を用いることにより、治療的に有用であるIgG、IgA、IgM、およびIgE抗体を作製することが可能である。ヒト抗体を作製するためのこの技術の概要は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれるLonberg and Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を作製するためのこの技術、ならびにそのような抗体を作製するためのプロトコルについての詳細な考察は、例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開公報WO 98/24893;WO 92/01047;WO 96/34096;WO 96/33735;欧州特許第0598877号;米国特許第5,413,923号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,569,825号;同第5,661,016号;同第5,545,806号;同第5,814

30

40

50

、318号；同第5,885,793号；同第5,916,771号；および同第5,939,598号を参照されたい。加えて、アブジェニックス社（Abgenix, Inc.）（フリーモント，カリフォルニア州）およびジェンファーム（Genpharm）（サンホゼ，カリフォルニア州）などの企業が、上述のものに類似の技術を用いることによる、選択された抗原に対するヒト抗体の提供に関与し得る。アブジェニックス社（フリーモント，カリフォルニア州）は、1000 kb未満のサイズであるヒト重鎖遺伝子座およびカッパ軽鎖遺伝子座の生殖系列構造断片（germline configured fragments）を含有するように遺伝子操作された、Xenomouse（登録商標）というマウスの系統を提供する。Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156 (1997) and Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998)を参照されたい。

10

【0059】

別の選択肢としての手法では、ジェンファームインターナショナル社を含む他の企業が、「ミニ遺伝子座（minilocus）」の手法を用いている。ミニ遺伝子座の手法では、Ig遺伝子座からの部分（pieces）（個々の遺伝子）を含めることによって外来性Ig遺伝子座が模倣される。従って、1つ以上のV_H遺伝子、1つ以上のD_H遺伝子、1つ以上のJ_H遺伝子、ミュー（mu）定常領域、および通常は第二の定常領域（好ましくは、ガンマ定常領域）が、動物への挿入のためのコンストラクトとして形成される。この手法は、その開示事項が参照により本明細書に組み込まれるSurani et al.への米国特許第5,545,807号、各々Lonberg and Kayへの米国特許第5,545,806号、同第5,625,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016号、同第5,770,429号、同第5,789,650号、同第5,814,318号、同第5,877,397号、同第5,874,299号、および同第6,255,458号、Krimpenfort and Bernsへの米国特許第5,591,669号および同第6,023,010号、Berns et al.への米国特許第5,612,205号、同第5,721,367号、および同第5,789,215号、ならびにChoi and Dunnへの米国特許第5,643,763号、ならびに、ジェンファームインターナショナル社の米国特許出願第07/574,748号、1990年8月29日出願、同第07/575,962号、1990年8月31日出願、同第07/810,279号、1991年12月17日出願、同第07/853,408号、1992年3月18日出願、同第07/904,068号、1992年6月23日出願、同第07/990,860号、1992年12月16日出願、同第08/053,131号、1993年4月26日出願、同第08/096,762号、1993年7月22日出願、同第08/155,301号、1993年11月18日出願、同第08/161,739号、1993年12月3日出願、同第08/165,699号、1993年12月10日出願、同第08/209,741号、1994年3月9日出願に記載されている。その開示事項がすべてにわたって参照により本明細書に組み込まれる欧州特許第0 546 073 B1号、国際特許出願番号WO92/03918、WO92/22645、WO92/22647、WO92/22670、WO93/12227、WO94/00569、WO94/25585、WO96/14436、WO97/13852、およびWO98/24884、ならびに米国特許第5,981,175号も参照されたい。さらに、その開示事項がすべてにわたって参照により本明細書に組み込まれるTaylor et al., 1992、Chen et al., 1993、Tuailon et al., 1993、Choi et al., 1993、Lonberg et al., (1994)、Taylor et al., (1994)、およびTuailon et al., (1995)、Fishwild et al., (1996)も参照されたい。

20

30

40

【0060】

ヒト抗体は、微小核細胞融合によって染色体の大きな部分または染色体全体が導入されたトランスジェニックマウスから作製することができる。その開示事項が参照により本明細書に組み込まれる欧州特許出願第773 288号および同第843 961号を参照されたい。加えて、Tcマウスとメダレックス（Medarex）のミニ遺伝子座（Humab）マウスとの交雑育種の結果であるKM（商標）-マウスが作出されている。これらのマウスは、キリンのマウスのヒトIgH導入染色体およびジェンファームのマウスのカッパ

50

鎖導入遺伝子を有している (Ishida et al., Cloning Stem Cells, (2002) 4:91-102)。

【 0 0 6 1 】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択 (guided selection)」と称される技術を用いて作製することができる。この手法では、マウス抗体を例とする選択された非ヒトモノクローナル抗体を用いて、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択が誘導される (その全内容が参照により本明細書に組み込まれる Jespers et al., Bio/technology 12:899-903 (1988))。

【 0 0 6 2 】

さらに、今度は G P R 4 9 ポリペプチドに対する抗体を用いて、G P R 4 9 ポリペプチドを「模倣」する抗イディオタイプ抗体を、当業者に公知の技術を用いることで作製することができる (例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる Greenspan & Bona, FASEB J. 7(5):437-444; (1989) および Nissinoff, J. Immunol. 147(8):2429-2438 (1991) を参照されたい)。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、生体内にて治療的に用いることができる。従って、抗体は、個体中でのその免疫原性が低減するように修飾されてよい。例えば、個体がヒトである場合、抗体は、「ヒト化」されてよく、この場合、抗体の (1 もしくは複数の) 相補性決定領域が、ヒト抗体へ移植されるものであり (例えば、Jones et al., Nature 321:522-525, 1986; および Tempest et al., Biotechnology 9:266-273, 1991 に記載のように)、これはその全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 4 】

ファージディスプレイ技術も、抗 G P R 4 9 抗体の保持についてスクリーニングされたヒトからのリンパ球の P C R 増幅 v 遺伝子のレポーターからの、またはナイーブライブラリーからの、ポリペプチドに対する結合活性を有する抗体遺伝子の選択に用いることができる (その全内容が参照により本明細書に組み込まれる McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990; および Marks, et al., Biotechnology 10:779-783, 1992)。これらの抗体の親和性を、チェーンシャフリングによって改善することもできる (その全内容が参照により本明細書に組み込まれる Clackson et al., Nature 352: 624-628, 1991)。

【 0 0 6 5 】

抗体を作製する方法

いくつかの実施形態の抗体は、抗体の合成のための本技術分野にて公知であるいかなる方法によって作製されてもよく、特に、化学合成、または、好ましくは遺伝子組換え発現技術による。

【 0 0 6 6 】

抗体、またはその断片、誘導体、もしくは類似体 (例: 抗体の重もしくは軽鎖、または一本鎖抗体) の遺伝子組換え発現には、抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築が必要である。抗体分子、または抗体の重もしくは軽鎖、またはその一部 (好ましくは、重または軽鎖可変ドメインを含有する) をコードするポリヌクレオチドが得られた後、抗体分子を作製するためのベクターは、本技術分野にて公知の技術を用いて、遺伝子組換え D N A 技術によって作製することができる。従って、抗体コードヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を作製するための方法が、本明細書にて記載される。当業者に公知である方法を用いて、抗体コード配列、ならびに適切な転写および翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。このような方法としては、例えば、生体外遺伝子組換え D N A 技術、合成技術、および生体内遺伝子組換えが挙げられる。従って、種々の実施形態は、抗体分子、またはその重もしくは軽鎖、または重もしくは軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を、プロモーターと操作可能に連結された形で含む複製型ベクター (replicable vectors) を提供する。そのようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでよく (例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる P C T 公開公報 W O 8 6 / 0 5 8 0 7 ; P C T 公開公報 W O 8 9 / 0 1 0 3 6 ; および米国特許

10

20

30

40

50

第 5 , 1 2 2 , 4 6 4 号を参照されたい)、抗体の可変ドメインが、重または軽鎖全体の発現のために、そのようなベクター中へクローン化されてよい。

【 0 0 6 7 】

発現ベクターは、従来の技術によって宿主細胞へ移植され、次に、このトランスフェクトされた細胞が従来の技術によって培養され、抗体が産生される。従って、いくつかの実施形態は、抗体分子、またはその重もしくは軽鎖、または一本鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを、異種プロモーターと操作可能に連結された形で含有する宿主細胞を含む。以下で詳述されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のために、重および軽鎖の両方をコードするベクターが宿主細胞中にて共発現されてよい。

【 0 0 6 8 】

本明細書で述べる抗体分子の発現には、種々の宿主 - 発現ベクター系を用いることができる。そのような宿主 - 発現系は、目的のコード配列の産生、および続いての精製が可能である媒体を表すが、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされた場合に、*in situ*にて抗体分子を発現することができる細胞も表す。これらとしては、限定されないが、抗体コード配列を含有する、遺伝子組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA、もしくはコスミド DNA 発現ベクターで形質転換された細菌（例：大腸菌、枯草菌）；抗体コード配列を含有する遺伝子組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例：サッカロミセス (*Saccharomyces*)、ピキア (*Pichia*)）；抗体コード配列を含有する遺伝子組換えウイルス発現ベクター（例：バキュロウイルス）で感染された昆虫細胞系；抗体コード配列を含有する、遺伝子組換えウイルス発現ベクター（例：カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）による感染、または遺伝子組換えプラスミド発現ベクター（例：Ti プラスミド）による形質転換が行われた植物細胞系；または、哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター（例：メタロチオネインプロモーター）もしくは哺乳類ウイルス由来のプロモーター（例：アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス 7 . 5 K プロモーター）を含有する遺伝子組換え発現コンストラクトを持つ哺乳類細胞系（例：COS、CHO、BHK、293、NS0、3T3、PerC6 細胞）が挙げられる。大腸菌などの細菌細胞および真核細胞を、遺伝子組換え抗体分子の発現に用いることができる。例えば、ヒトサイトメガロウイルスからの主要中間初期遺伝子プロモーターエレメント (major intermediate early gene promoter element) などのベクターと組み合わせられたチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) などの哺乳類細胞は、抗体用の効果的な発現系である (Foecking et al., *Gene* 45:101 (1986) ; Cockett et al., *Bio/Technology* 8:2 (1990))。また、例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 5 , 8 2 7 , 7 3 9 号、同第 5 , 8 7 9 , 9 3 6 号、同第 5 , 9 8 1 , 2 1 6 号、および同第 5 , 6 5 8 , 7 5 9 号も参照されたい。

【 0 0 6 9 】

細菌系では、発現される抗体分子の意図する用途に応じて、数多くの発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、抗体分子の医薬組成物の作製のために、そのようなタンパク質が大量に作製されることになる場合、容易に精製される融合タンパク質産物の高いレベルの発現を指向するベクターが望ましいものであり得る。そのようなベクターとしては、これらに限定されないが、融合タンパク質が産生されるように、抗体コード配列が lacZ コード領域とインフレームでベクター中に個々に結合され得る大腸菌発現ベクター pUR278 (Ruther et al., *EMBO J.* 2:1791 (1983))、これはその全内容が参照により本明細書に組み込まれる；pINベクター (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985) ; Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989))、これらの各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる；などが挙げられる。pGEXベクターも、グルタチオン S - トランスフェラーゼ (GST) を有する融合タンパク質として外来性ポリペプチドを発現させるために用いることができる。一般的に、そのような融合タンパク質は、可溶性であり、マトリックスグルタチオン - アガロースビーズへの吸着および結合、ならびに続いての遊離グルタチオンの存在下での溶出に

10

20

30

40

50

より、溶解された細胞から容易に精製することができる。p G E Xベクターは、クローン化された標的遺伝子産物をG S T部分から遊離させることができるように、トロンピンまたは第X a因子プロテアーゼ開裂部位を含むように設計される。

【0070】

昆虫系では、オートグラファカリフォルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (*AcNPV*) が、外来性遺伝子を発現するためのベクターとして用いられる。このウイルスは、スポドプテラフルギベルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞中で成長する。抗体コード配列は、このウイルスの非必須領域 (例えば、ポリヘドリン遺伝子) 中に個々にクローン化され、*AcNPV*プロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の制御下に置かれ得る。

10

【0071】

哺乳類宿主細胞では、数多くのウイルス発現系が用いられ得る。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、目的の抗体コード配列は、後期プロモーターおよび三連リーダー配列を例とするアデノウイルス転写/翻訳制御複合体と結合され得る。このキメラ遺伝子は、次に、生体外または生体内遺伝子組換えにより、アデノウイルスゲノム中へ挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域 (例: 領域E 1またはE 3) への挿入の結果として、感染宿主中にて生存可能であり、抗体分子を発現することができる遺伝子組換えウイルスが得られる (例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれるLogan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)を参照されたい)。挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳のために、特定の開始シグナルも必要であり得る。これらのシグナルは、A T G開始コドンおよび隣接する配列を含む。さらに、開始コドンは、インサート全体の翻訳を確実にするために、所望されるコード配列のリーディングフレームと同相 (in phase) である必要がある。このような外来性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方の様々な起源のものであってよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含めることによって向上され得る (その全内容が参照により本明細書に組み込まれるBittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)を参照)。

20

【0072】

加えて、挿入配列の発現を調節する、または所望される特定の方法で遺伝子産物を修飾およびプロセッシングする宿主細胞株が選択されてよい。タンパク質産物のそのような修飾 (例: グリコシル化) およびプロセッシング (例: 開裂) は、タンパク質の機能にとって重要であり得る。種々の宿主細胞が、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングおよび修飾のための特徴的で特異的な機構を有している。適切な細胞株または宿主系を選択することで、発現された外来性タンパク質の適正な修飾およびプロセッシングを確実に得ることができる。この目的を達成するために、一次転写物の適切なプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞が用いられ得る。そのような哺乳類宿主細胞としては、これらに限定されないが、C H O、V E R Y、B H K、H e l a、C O S、M D C K、2 9 3、3 T 3、W 1 3 8、N S 0、P e r . C 6、特に、例えば、B T 4 8 3、H s 5 7 8 T、H T B 2、B T 2 0、およびT 4 7 Dなどの乳癌細胞株、ならびに例えば、C R L 7 0 3 0およびH s 5 7 8 B s tなどの正常乳腺細胞株が挙げられる。

30

40

【0073】

遺伝子組換えタンパク質の長期的な高収率での作製の場合、安定な発現が用いられてよい。例えば、抗体分子を安定的に発現する細胞株が遺伝子操作されてよい。ウイルス起源の複製を含有する発現ベクターが用いられるのではなく、宿主細胞が、適切な発現制御エレメント (例: プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など) によって制御されたD N Aおよび選択可能マーカーで形質転換されてよい。外来性D N Aの導入に続いて、遺伝子操作された細胞は、集積培地 (enriched medium) にて1 ~ 2日間成長させ、次に、選択培地へ変更する。遺伝子組換えプラスミド中の選択可能マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がその染色体内へプラスミドを安定的

50

に一体化させて、続いてクローン化し、細胞株へと増殖することができる増殖巣を形成することを可能とする。この方法を用いて、有利には、抗体分子を発現する細胞株を遺伝子操作することができる。このような遺伝子操作された細胞株は、抗体分子と直接または間接的に相互作用を起こす化合物のスクリーニングおよび評価に特に有用であり得る。

【0074】

数多くの選択系が用いられてよく、これらに限定されないが、単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ (Wigler et al., Cell 11:223 (1977))、ヒボキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992))、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) が挙げられ、これらの遺伝子を、それぞれ、*t k -*、*h g p r t -*、または *a p r t -* 細胞に用いることができる。また、代謝拮抗剤耐性を、以下の遺伝子の選択の基礎として用いることもできる：*d h f r*、メトトレキサートに対する耐性を付与 (Wigler et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980) ; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)) ; *g p t*、ミコフェノール酸に対する耐性を付与 (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)) ; *n e o*、アミノグリコシド G - 4 1 8 に対する耐性を付与 Clinical Pharmacy 12:488-505 ; Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991) ; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993) ; Mulligan, Science 260:926-932 (1993) ; および Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993) ; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215) ; および *h y g r o*、ハイグロマイシンに対する耐性を付与 (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)、これらの各々は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる)。遺伝子組換え DNA 技術の分野で公知の方法を、所望される遺伝子組換えクローンの選択に慣行的に適用することができ、このような方法は、例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993) ; Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990) ; ならびに、チャプター 1 2 および 1 3、Dracopolis et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994) ; Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981) に記載されている。

【0075】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加させることができる (レビューについては、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987) を参照されたい)。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害剤のレベルの増加により、マーカー遺伝子のコピーの数が増加する。増幅された領域は、抗体遺伝子と関連することから、抗体の産生も増加することになる (その全内容が参照により本明細書に組み込まれる Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983))。

【0076】

宿主細胞は、2つの発現ベクター、重鎖由来ポリペプチドをコードする第一のベクターと軽鎖由来ポリペプチドをコードする第二のベクターとによって共トランスフェクトされてよい。2つのベクターは、重および軽鎖ポリペプチドの同等の発現を可能とする同一の選択可能マーカーを含有してよい。別の選択肢として、重および軽鎖ポリペプチドの両方をコードし、発現することができる単一のベクターが用いられてもよい。そのような状況では、有害な遊離重鎖が過剰となることを避けるために、軽鎖が重鎖の前に配置されるべきである (その全内容が参照により本明細書に組み込まれる Proudfoot, Nature 322:562 (1986) ; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980))。重および軽鎖のコード配列は、cDNA またはゲノムDNAを含んでよい。

【0077】

抗体分子は、動物によって産生されるか、化学合成されるか、または遺伝子組換え発現

された後、免疫グロブリン分子の精製のための技術分野で公知であるいかなる方法で精製されてもよく、例えば、クロマトグラフィ（例：イオン交換、親和性、特にプロテインAに対する特異的抗原の親和性による、およびサイジングカラムクロマトグラフィ）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質精製のためのその他のいずれかの標準的な技術による。加えて、抗体またはその断片は、精製を容易とするために、本明細書で述べる、またはそれ以外では本技術分野で公知である異種ポリペプチド配列と融合されてもよい。

【0078】

さらに、抗体またはその断片は、精製を容易とするために、ペプチドなどのマーカー配列と融合されてもよい。特定の実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、中でもpQEベクター（キアゲン社（QIAGEN, Inc.），9259 イートンアベニュー，キャッツワース，カリフォルニア州，91311）中に提供されるタグなどのヘキサヒスチジンペプチドであり、その多くが市販されている。その全内容が参照により本明細書に組み込まれるGentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989)に記載のように、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の都合の良い精製をもたらす。精製に有用であるその他のペプチドタグとしては、これらに限定されないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質由来エピトープに対応する「HA」タグ（その全内容が参照により本明細書に組み込まれるWilson et al., Cell 37:767 (1984)）および「フラグ（flag）」タグが挙げられる。

【0079】

本明細書で述べる抗体は、修飾された誘導体を含む（例：いずれかの種類の分子の抗体への共有結合による）。例えば、限定するものではないが、抗体誘導体としては、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護/封止基による誘導体化、タンパク質分解開裂、細胞リガンドもしくはその他のタンパク質との連結などによって修飾された抗体が挙げられる。数多くの化学修飾のいずれも、公知の技術によって実施されてよく、これらに限定されないが、特異的化学開裂、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などが挙げられる。加えて、誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含有していてもよい。

【0080】

生体内半減期が延長された抗体またはその断片は、前記抗体または抗体断片に、高分子量ポリエチレングリコール（PEG）などのポリマー分子を結合させることによって作製することができる。PEGの前記抗体または抗体断片への結合は、前記抗体もしくは抗体断片のNもしくはC末端へのPEGの部位特異的結合により、またはリジン残基上に存在するイプシロン-アミノ基を介して、多官能性リンカー有りまたは無しにて行うことができる。生物学的活性の喪失が最小限の結果となる直鎖または分岐鎖ポリマー誘導体化が用いられる。結合の度合いは、SDS-PAGEおよび質量分析によって密接にモニタリングされ、PEG分子の抗体への適切な結合が確実に行われる。未反応のPEGは、例えばサイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィによって、抗体-PEG結合体から分離することができる。

【0081】

さらに、抗体は、抗体もしくは抗体断片を生体内にてより安定とするために、または生体内でのより長い半減期を持たせるために、アルブミンと結合させることができる。この技術は、本技術分野にて公知であり、例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる国際公開番号WO93/15199、WO93/15200、およびWO01/77137；ならびに欧州特許番号EP 413,622を参照されたい。本明細書で提供される実施形態は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、核酸分子、小分子、模倣剤（mimetic agents）、合成薬物、無機分子、および有機分子が挙げられるがこれらに限定されない1つ以上の部分と結合または融合された抗体またはその断片の使用を包含する。

【0082】

種々の実施形態は、異種タンパク質もしくはポリペプチド（またはその断片、特に、

少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、または少なくとも100アミノ酸のポリペプチド)と遺伝子組換えによって融合または化学的に結合(共有および非共有結合を含む)されて融合タンパク質を生成する抗体またはその断片の使用を包含する。ある実施形態では、抗体またはその断片は、異種タンパク質もしくはポリペプチド(またはその断片、特に、少なくとも約10、少なくとも約20、少なくとも約30、少なくとも約40、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約90、または少なくとも約100アミノ酸のポリペプチド)と遺伝子組換えによって融合または化学的に結合(共有および非共有結合を含む)されて融合タンパク質を生成することができる。融合は、必ずしも直接である必要はなく、リンカー配列を通して行われてもよい。例えば、抗体は、その抗体を特定の細胞表面受容体に特異的である抗体と融合または結合することにより、生体外または生体内において、異種ポリペプチドを特定の細胞型へ標的化することに用いることができる。異種ポリペプチドと融合または結合された抗体はまた、本技術分野で公知の方法を用いることによる生体外イムノアッセイおよび精製方法に用いることもできる。例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる国際公開番号WO 93 / 2 1 2 3 2 ; 欧州特許番号EP 4 3 9 , 0 9 5 ; Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99 ; 米国特許第5 , 4 7 4 , 9 8 1 号 ; Gillies et al., 1992, PNAS 89:1428-1432 ; およびFell et al., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452を参照されたい。

10

【0083】

いくつかの実施形態は、抗体断片と融合もしくは結合された異種タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドを含有する製剤を含む。例えば、異種ポリペプチドは、Fab断片、Fd断片、Fv断片、F(ab)2断片、VHドメイン、VLドメイン、VH CDR、VL CDR、またはこれらの断片と融合または結合されてよい。ポリペプチドを抗体部分と融合または結合させるための方法は、本技術分野にて公知である。例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5 , 3 3 6 , 6 0 3 号、同第5 , 6 2 2 , 9 2 9 号、同第5 , 3 5 9 , 0 4 6 号、同第5 , 3 4 9 , 0 5 3 号、同第5 , 4 4 7 , 8 5 1 号、および同第5 , 1 1 2 , 9 4 6 号 ; 欧州特許番号EP 3 0 7 , 4 3 4 およびEP 3 6 7 , 1 6 6 ; 国際公開番号WO 9 6 / 0 4 3 8 8 およびWO 9 1 / 0 6 5 7 0 ; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539 ; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600 ; およびVil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341を参照されたい。

20

30

【0084】

GPR49またはその断片と特異的に結合する抗体のさらなる融合タンパク質は(例: 上述)、ジーンシャフリング、モチーフシャフリング、エクソンシャフリング、および/またはコドンシャフリング(まとめて「DNAシャフリング」と称する)の技術によって作製することができる。DNAシャフリングを用いて、抗体またはその断片の活性を改変することができる(例: より高い親和性とより低い解離速度を有する抗体またはその断片)。一般的には、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5 , 6 0 5 , 7 9 3 号 ; 同第5 , 8 1 1 , 2 3 8 号 ; 同第5 , 8 3 0 , 7 2 1 号 ; 同第5 , 8 3 4 , 2 5 2 号 ; および同第5 , 8 3 7 , 4 5 8 号、ならびにPatten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33 ; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2): 76-82 ; Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76 ; およびLorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2): 308-313を参照されたい。抗体もしくはその断片、またはコードされた抗体もしくはその断片は、遺伝子組換えの前に、エラーブローンPCR、ランダムヌクレオチド挿入、またはその他の方法によるランダム変異誘発が施されることによって改変されてよい。C/C L Pと特異的に結合する部分である抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチドの1つ以上の部分に、1つ以上の異種分子の1つ以上の構成要素、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片などを用いた遺伝子組換えが施されてよい。

40

50

【0085】

さらに、抗体またはその断片は、精製を容易とするために、ペプチドなどのマーカー配列と融合されてもよい。特定の実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、中でも、p Q E ベクター（キアゲン社，9 2 5 9 イートンアベニュー，キャッツワース，カリフォルニア州，9 1 3 1 1）中に提供されるタグなどのヘキサヒスチジンペプチドであり、その多くが市販されている。その全内容が参照により本明細書に組み込まれるGentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824に記載のように、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の都合の良い精製をもたらす。精製に有用であるその他のペプチドタグとしては、これらに限定されないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質由来エピトープに対応するヘマグルチニン「H A」タグ（その全内容が参照により本明細書に組み込まれるWilson et al., 1984, Cell 37:767）および「フラグ（f l a g）」タグが挙げられる。

10

【0086】

種々の実施形態は、さらに、診断または治療剤と結合された抗体またはその断片も包含する。例えば、その抗体は、例えば任意の治療レジメンの効果を判断することを目的として、臨床検査手順の一環として腫瘍の発生または進行のモニタリングのために、診断的に用いることができる。抗体を、検出可能物質とカップリングすることによって、検出を容易とすることができる。検出可能物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々のポジトロン放出断層撮影に用いられるポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。検出可能物質の抗体（もしくはその断片）へのカップリングもしくは結合は、直接行われても、または本技術分野にて公知の技術を用いて、中間体（例えば、本技術分野で公知のリンカーなど）により間接的に行われてもよい。診断剤として用いるために抗体へ結合させることができる金属イオンについては、例えば、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4, 741, 900号を参照されたい。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ；ならびに、適切な放射性物質の例としては、これらに限定されないが、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、または ^{99}Tc が挙げられ、加えて種々のポジトロン放出断層撮影に用いられるポジトロン放出金属、非放射性常磁性金属イオン、および放射標識された、または特定の放射性同位体と結合された分子が、本明細書で述べる抗体と結合されてよい。

20

30

【0087】

さらに、抗体またはその断片は、細胞分裂阻害剤もしくは細胞致死剤（cytotoxic agent）を例とする細胞毒などの治療部分、治療剤、または例えば ^{213}Bi などのアルファ線放射体を例とする放射性金属イオンと結合されてもよい。細胞毒または細胞傷害性剤には、細胞にとって有害であるいかなる剤をも含まれる。例としては、パクリタキソール（paclitaxol）、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド（tenoposide）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン（1-dehydrotestosterone）、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにこれらの類似体または相同体が挙げられる。治療剤としては、これらに限定されないが、代謝拮抗剤（例：メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン（decabazine））、アルキル化剤（例：メクロレタミン、チオエパ（thioepa

40

50

）クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロトスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにシス-ジクロロジアミン白金（E）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例：ダウノルビシン（以前はダウノマイシン）、およびドキソルビシン）、抗生物質（例：ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、ならびに、有糸分裂阻害剤（例：ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられる。治療部分のより広範囲のリストは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開公報WO 03 / 075957に見出すことができる。

【0088】

これらの結合体は、任意の生物学的応答の修飾に用いることができ、この治療剤または薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されるものとして解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望される生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってよい。そのようなタンパク質としては、例えば、アポトーシス剤（apoptotic agent）または血管新生阻害剤が挙げられる。

【0089】

抗体はまた、固体支持体に結合されてもよく、これは、イムノアッセイまたは標的抗原の精製に特に有用である。そのような固体支持体としては、これらに限定されないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが挙げられる。

【0090】

そのような治療部分を抗体と結合させるための技術は公知であり、例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれるAmon et al., *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)の"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy"; Hells trom et al., *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)の"Antibodies For Drug Delivery"; Thorpe, *Monoclonal Antibodies '84*の"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review": *Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)の"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy"、およびThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982)を参照されたい。

【0091】

抗体は、他のポリペプチドと結合されてよい。抗体をポリペプチド部分と融合または結合させるための方法は、本技術分野にて公知である。例えば、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,336,603号；同第5,622,929号；同第5,359,046号；同第5,349,053号；同第5,447,851号、および同第5,112,946号；EP 307,434；EP 367,166；PCT公開公報WO 96 / 04388およびWO 91 / 06570；Ashkenazi et al., 1991, *PNAS USA* 88:10535；Zheng et al., 1995, *J Immunol* 154:5590；およびVil et al., 1992, *PNAS USA* 89:11337を参照されたい。部分への抗体の融合は、必ずしも直接である必要はなく、リンカー配列を介して行われてもよい。そのようなリンカー分子は、本技術分野にて公知であり、Denardo et al., 1998, *Clin Cancer Res* 4:2483；Peterson et al., 1999, *Bioconjug Chem* 10:553；Zimmerman et al., 1999, *Nucl Med Biol* 26:943；Garnett, 2002, *Adv Drug Deliv Rev* 53:171に記載されている。別の選択肢として、各々についてその全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,676,980号にてSegalによって述べられているように、抗体は、第二の抗体と結合されて、抗体ヘテロ結合体（antibody heteroconjugate）が形成されてもよい。

【0092】

抗GPR49抗体による癌の治療方法

いくつかの実施形態は、抗GPR49抗体によって対象の癌を治療することに関する。種々の実施形態は、抗GPR49抗体によって対象の結腸癌を治療することに関する。ある実施形態では、結腸癌などの癌の治療方法は、その癌の治療に十分である抗GPR49抗体の有効量を対象へ投与することを含む。

【0093】

本明細書で用いられる場合、「対象」は、抗GPR49抗体によって治療可能である癌に罹患する可能性のある生物を含み、ヒトおよび非ヒト動物などである。好ましい動物としては、ヒト対象が挙げられる。本発明の「非ヒト動物」の用語は、すべての脊椎動物、哺乳類、げっ歯類（例：マウスおよびラット）、および非ヒト霊長類（例：サルおよびマカク）を含む。「投与」または「投与する」の用語は、その意図する機能を起こすために、対象へ抗GPR49抗体を導入する経路を含む。

【0094】

癌の治療に関して用いられる場合、「有効量」の用語は、癌を治療するのに十分である抗GPR49抗体の量を意味し、それは、いくつかの様々なパラメータによって測定することができ、これらに限定されないが、癌を有する対象における腫瘍サイズの減少、癌を有する対象における腫瘍の成長速度もしくは増殖速度の低下、転移の阻止もしくは転移の度合いの低減、またはコントロールと比較した場合の癌を有する対象の生存の延長が挙げられる。いくつかの実施形態では、抗GPR49抗体の有効量は、約5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは100%、または前述のパーセントの間のいずれかの数値での腫瘍サイズの減少によって測定される、対象における癌の治療に十分なものである。ある態様では、抗GPR49抗体は、以下の実施例にて作製され、記載される2B5.5、7F8.2、1B3.5、9C6.4、6H5.4、10A6.7、10A9.2、2G8.1、6C10.5、6G10.3、8H8.1、6B10.2、3B8.11、2F12.5、5G2.11、1F10.5、10E1.1、7C3.4、2H9.2、5B12.4、3G8.1、5F2.5、6G10.1、14H9.1、12G5.1、6E10.1、14F7.1、4A10.2、3F11.1、11F6.1、5B10.1、14A8.1、8E9.1、9C7.1、4F6.2、1B8.1、18G7.1、12E3.1、6H5.1、2P69.2、17C9.1、2H5.1、および10A9.2と称する抗GPR49抗体のいずれか1つまたは組み合わせである。

【0095】

いくつかの実施形態では、対象における癌の治療に十分である抗GPR49抗体の有効量が、約1 μ g/kg、50 μ g/kg、100 μ g/kg、150 μ g/kg、200 μ g/kg、250 μ g/kg、300 μ g/kg、350 μ g/kg、400 μ g/kg、500 μ g/kg、550 μ g/kg、600 μ g/kg、700 μ g/kg、800 μ g/kg、900 μ g/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg、125mg/kg、150mg/kg、175mg/kg、200mg/kg、225mg/kg、250mg/kg、275mg/kg、300mg/kg、325mg/kg、350mg/kg、375mg/kg、400mg/kg、425mg/kg、450mg/kg、475mg/kg、500mg/kg、750mg/kg、1000mg/kg、または前述の用量のいずれか2つの間のいずれかの数値での用量（抗体の質量/対象質量）で投与されてよい。ある態様では、抗GPR49抗体は、以下の実施例にて作製され、記載される2B5.5、7F8.2、1B3.5、9C6.4、6H5.4、10A6.7、10A9.2、2G8.1、6C10.5、6G10.3、8H8.1、6B10.2、3B8.11、2F12.5、5G2

. 1 1、1 F 1 0 . 5、1 0 E 1 . 1、7 C 3 . 4、2 H 9 . 2、5 B 1 2 . 4、3 G 8 . 1、5 F 2 . 5、6 G 1 0 . 1、1 4 H 9 . 1、1 2 G 5 . 1、6 E 1 0 . 1、1 4 F 7 . 1、4 A 1 0 . 2、3 F 1 1 . 1、1 1 F 6 . 1、5 B 1 0 . 1、1 4 A 8 . 1、8 E 9 . 1、9 C 7 . 1、4 F 6 . 2、1 B 8 . 1、1 8 G 7 . 1、1 2 E 3 . 1、6 H 5 . 1、2 P 6 9 . 2、1 7 C 9 . 1、2 H 5 . 1、および 1 0 A 9 . 2 と称する抗 G P R 4 9 抗体のいずれか 1 つまたは組み合わせである。

【 0 0 9 6 】

ある実施形態では、癌の治療に十分である抗 G P R 4 9 抗体の有効量は、約 1 n M、5 0 n M、7 5 n M、1 0 0 n M、1 5 0 n M、2 0 0 n M、2 5 0 n M、3 0 0 n M、3 5 0 n M、4 0 0 n M、5 0 0 n M、5 5 0 n M、6 0 0 n M、7 0 0 n M、8 0 0 n M、9 0 0 n M、1 μ M、5 μ M、1 0 μ M、1 5 μ M、2 0 μ M、2 5 μ M、3 0 μ M、3 5 μ M、4 0 μ M、4 5 μ M、5 0 μ M、5 5 μ M、6 0 μ M、6 5 μ M、7 0 μ M、7 5 μ M、8 0 μ M、8 5 μ M、9 0 μ M、9 5 μ M、1 0 0 μ M、1 5 0 μ M、2 0 0 μ M、2 5 0 μ M、3 0 0 μ M、3 5 0 μ M、4 0 0 μ M、5 0 0 μ M、5 5 0 μ M、6 0 0 μ M、7 0 0 μ M、8 0 0 μ M、9 0 0 μ M、1 m M、または前述の濃度のいずれか 2 つの間のいずれかの数値での対象中の血中または血清中濃度である。ある態様では、抗 G P R 4 9 抗体は、以下の実施例にて作製され、記載される 2 B 5 . 5、7 F 8 . 2、1 B 3 . 5、9 C 6 . 4、6 H 5 . 4、1 0 A 6 . 7、1 0 A 9 . 2、2 G 8 . 1、6 C 1 0 . 5、6 G 1 0 . 3、8 H 8 . 1、6 B 1 0 . 2、3 B 8 . 1 1、2 F 1 2 . 5、5 G 2 . 1 1、1 F 1 0 . 5、1 0 E 1 . 1、7 C 3 . 4、2 H 9 . 2、5 B 1 2 . 4、3 G 8 . 1、5 F 2 . 5、6 G 1 0 . 1、1 4 H 9 . 1、1 2 G 5 . 1、6 E 1 0 . 1、1 4 F 7 . 1、4 A 1 0 . 2、3 F 1 1 . 1、1 1 F 6 . 1、5 B 1 0 . 1、1 4 A 8 . 1、8 E 9 . 1、9 C 7 . 1、4 F 6 . 2、1 B 8 . 1、1 8 G 7 . 1、1 2 E 3 . 1、6 H 5 . 1、2 P 6 9 . 2、1 7 C 9 . 1、2 H 5 . 1、および 1 0 A 9 . 2 と称する抗 G P R 4 9 抗体のいずれか 1 つまたは組み合わせである。

【 0 0 9 7 】

別の実施形態では、抗 G P R 4 9 抗体の有効量は、対象の質量に関係なく、固定された用量で投与されてよい。例えば、対象における癌の治療に十分である抗 G P R 4 9 抗体の有効量は、約 1 μ g、5 0 μ g、7 5 μ g、1 0 0 μ g、1 5 0 μ g、2 0 0 μ g、2 5 0 μ g、3 0 0 μ g、3 5 0 μ g、4 0 0 μ g、5 0 0 μ g、5 5 0 μ g、6 0 0 μ g、7 0 0 μ g、8 0 0 μ g、9 0 0 μ g、1 m g、5 m g、1 0 m g、1 5 m g、2 0 m g、2 5 m g、3 0 m g、3 5 m g、4 0 m g、4 5 m g、5 0 m g、7 5 m g、1 0 0 m g、2 0 0 m g、3 0 0 m g、4 0 0 m g、5 0 0 m g、6 0 0 m g、7 0 0 m g、8 0 0 m g、9 0 0 m g、1 0 0 0 m g、1 2 5 0 m g、1 5 0 0 m g、1 7 5 0 m g、2 0 0 0 m g、2 2 5 0 m g、2 5 0 0 m g、2 7 5 0 m g、3 0 0 0 m g、3 5 0 0 m g、4 0 0 0 m g、4 5 0 0 m g、1 0 0 0 m g、1 5 0 0 m g、2 0 0 0 m g、2 5 0 0 m g、3 0 0 0 m g、3 5 0 0 m g、4 0 0 0 m g、4 5 0 0 m g、5 0 0 0 m g、5 5 0 0 m g、6 0 0 0 m g、6 5 0 0 m g、7 0 0 0 m g、7 5 0 0 m g、8 0 0 0 m g、8 5 0 0 m g、9 0 0 0 m g、9 5 0 0 m g、1 0 , 0 0 0 m g、または前述の固定用量のいずれか 2 つの間のいずれかの数値の固定用量であってよい。ある態様では、抗 G P R 4 9 抗体は、以下の実施例にて作製され、記載される 2 B 5 . 5、7 F 8 . 2、1 B 3 . 5、9 C 6 . 4、6 H 5 . 4、1 0 A 6 . 7、1 0 A 9 . 2、2 G 8 . 1、6 C 1 0 . 5、6 G 1 0 . 3、8 H 8 . 1、6 B 1 0 . 2、3 B 8 . 1 1、2 F 1 2 . 5、5 G 2 . 1 1、1 F 1 0 . 5、1 0 E 1 . 1、7 C 3 . 4、2 H 9 . 2、5 B 1 2 . 4、3 G 8 . 1、5 F 2 . 5、6 G 1 0 . 1、1 4 H 9 . 1、1 2 G 5 . 1、6 E 1 0 . 1、1 4 F 7 . 1、4 A 1 0 . 2、3 F 1 1 . 1、1 1 F 6 . 1、5 B 1 0 . 1、1 4 A 8 . 1、8 E 9 . 1、9 C 7 . 1、4 F 6 . 2、1 B 8 . 1、1 8 G 7 . 1、1 2 E 3 . 1、6 H 5 . 1、2 P 6 9 . 2、1 7 C 9 . 1、2 H 5 . 1、および 1 0 A 9 . 2 と称する抗 G P R 4 9 抗体のいずれか 1 つまたは組み合わせである。

【 0 0 9 8 】

10

20

30

40

50

投与および医薬形態

抗GPR49抗体は、本明細書で提供される実施形態において、癌の治療のために様々な方法および医薬形態で投与されてよい。従って、いくつかの実施形態は、上記および以下の実施例で記載される抗GPR49抗体のいずれか1つまたは組み合わせ、ならびに投与の経路および形態に応じて、薬理的に許容されるキャリアまたは希釈剤を含む医薬組成物に関する。

【0099】

用いられてよい投与経路の例としては、注射（皮下、静脈内、非経口、腹腔内、くも膜下腔内）、または経口経路が挙げられる。医薬製剤は、各投与経路に適する形態で与えられてよい。例えば、これらの製剤は、錠剤もしくはカプセルの形態で、注射により、または経口で投与されてよい。注射は、ボラスであってよく、または連続注入であってもよい。抗GPR49抗体は、単独で投与されてよく、または本技術分野にて公知である癌治療のための別の1もしくは複数の剤と、または薬理的に許容されるキャリアと、またはその両方と組み合わせて投与されてもよい。

10

【0100】

本明細書で用いられる場合、「キャリア」は、用いられる用量および濃度でそれに暴露される対象にとって無毒性である薬理的に許容されるキャリア、賦形剤、または安定化剤を含む。多くの場合、生理学的に許容されるキャリアは、pH緩衝水溶液である。生理学的に許容されるキャリアの例としては、リン酸、クエン酸、およびその他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む単糖、二糖、およびその他の糖類；EDTAなどのキレート化剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；ならびに/またはTWEEN、ポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

20

【0101】

経口投与のための固体剤形としては、カプセル、錠剤、丸剤、粉末、および顆粒が挙げられる。そのような固体剤形では、抗体は、スクロース、ラクトース、またはデンプンなどの少なくとも1つの薬理的に許容される不活性キャリアと混合されてよい。そのような剤形は、通常の慣行として、不活性希釈剤以外の追加の物質も含んでよく、例えば、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤である。カプセル、錠剤、および丸剤の場合、剤形は、緩衝剤も含んでよい。錠剤および丸剤は、さらに、本技術分野で公知の腸溶コーティングと共に作製されてよい。

30

【0102】

経口投与のための液体剤形としては、水などの本技術分野にて一般的に用いられる不活性希釈剤を含有するエリキシルを有する、薬理的に許容されるエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップが挙げられる。そのような不活性希釈剤に加えて、組成物はまた、湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、ならびに甘味剤、香味剤、および香料などの賦形剤も含んでよい。

40

【0103】

抗GPR49抗体はまた、非経口投与されてもよい。「非経口投与」および「非経口投与される」の語句は、本明細書で用いられる場合、例えば、腸内および局所投与以外の、通常は注射による投与のモードを含み、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、および胸骨内注射ならびに注入が挙げられる。非経口投与は、滅菌水性もしくは非水性溶液、懸濁液、またはエマルジョンが挙げられ得る。非水性溶媒または媒体の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油およびコーン油などの植物油、ゼラチン、ならびにオレイン酸エチルなどの注射可能有機エステルである。そのような剤形はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などの賦形剤も含

50

有してよい。それらの滅菌は、例えば、細菌保持フィルター (bacteria retaining filter) を通してのろ過によって、滅菌剤を組成物中に混合することによって、組成物を照射処理することによって、または組成物を加熱することによって行われてよい。それらはまた、使用の直前に、滅菌水、または何らかのその他の滅菌注射用媒体を用いて作製されてもよい。

【0104】

非経口投与の場合、抗体は、例えば、溶液、懸濁液、エマルジョン、または薬理的に許容される非経口媒体と合わせての凍結乾燥粉末として製剤されてよい。そのような媒体の例は、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンである。リポソームおよび固定油などの非水性媒体も用いられてよい。媒体または凍結乾燥粉末は、等張性 (例えば、塩化ナトリウム、マンニトール) および化学的安定性 (例えば、バッファーおよび保存剤) を維持する添加剤を含有してよい。製剤は、一般的に用いられる技術によって滅菌される。例えば、注射による投与に適する非経口組成物は、1.5重量%の活性成分を0.9%の塩化ナトリウム溶液中に溶解することによって作製される。

10

【0105】

本明細書で述べる医薬組成物は、単一用量または複数用量として投与されてよく；個別の治療剤としてまたはその他の治療剤と組み合わせて投与されてよく；ならびに、従来の治療法と組み合わされて、それらが順次にまたは同時に実施されてよい。

20

【0106】

併用療法

上述の抗GPR49抗体のいずれも、互いに、および/または癌の治療に有用であることが公知であるいずれかの治療剤と組み合わされて投与されてよい。上述の抗GPR49抗体と組み合わされてよい治療剤の限定されないクラスとしては、これらに限定されないが、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、植物由来抗腫瘍剤、カンプトテシン誘導体、トポイソメラーゼ阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、抗体、およびインターフェロンが挙げられる。

【0107】

アルキル化剤としては、これらに限定されないが、ナイトロジェンマスタード N - オキシド、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、ブスルファン、ミトブロニトール、カルボコン、チオテパ、ラニムスチン、ニムスチン、テモゾロミド、AMD - 473、アルトレタミン、AP - 5280、アパジコン、プロスタリシン、ペンダムスチン、カルムスチン、エストラムスチン、ホテムスチン、グルホスファミド、イホスファミド、KW - 2170、マホスファミド、およびミトラクトールが挙げられ；白金配位アルキル化化合物としては、これらに限定されないが、シスプラチン、カルボプラチン、エタプラチン、ロバプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、またはサトルプラチン (satraplatin) が挙げられる。

30

【0108】

代謝拮抗剤としては、これらに限定されないが、メトトレキサート、6 - メルカプトプリン リボシド、メルカプトプリン、5 - フルオロウラシル (5 - FU) 単独またはロイコボリンとの組み合わせ、テガフル、UFT、ドキシフルリジン、カルモフル、シタラビン、シタラビンオクホスフェート、エノシタビン、S - 1、ゲムシタビン、フルダラビン、5 - アザシチジン、カペシタビン、クラドリビン、クロファラビン、デシタビン、エフロールニチン、エチニルシチジン、シトシンアラビノシド、ヒドロキシ尿素、TS - 1、メルファラン、ネララビン、ノラトレキセド、オクホスフェート、プレメトレキセドジナトリウム、ペントスタチン、ペリトレキソール、ラルチトレキセド、トリアピン、トリメトレキサート、ピダラビン、ピンクリスチン、またはビノレルビンが挙げられる。

40

【0109】

抗生物質としては、これらに限定されないが：アクラルピシン、アクチノマイシンD、アムルピシン、アナマイシン、プレオマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、エル

50

サミトルシン、エピルピシン、ガラルピシン、イダルピシン、マイトマイシンC、メモルピシン (memorubicin)、ネオカルチノスタチン、ペプロマイシン、ピラルピシン、レベッカマイシン、スチマラマー、スルテプトゾシン (srteptozocin)、バルルピシン、またはジノスタチンが挙げられる。

【0110】

ホルモン療法剤としては、エキセメスタン、アナストロゾール、ドキセルカルシフェロール、ファドロゾール、ホルメスタン、タモキシフェンクエン酸塩およびフルベストラントなどの抗エストロゲン剤、トレミフェン、ラロキシフェン、ラソフォキシフェン、レトロゾール、またはピカルタミド、フルタミド、ミフェプリストン、ニルタミド、および4'-シアノ-3-(4-フルオロフェニルスルホニル)-2-ヒドロキシ-2-メチル-3-(トリフルオロメチル)プロピオンアニリド)などの抗アンドロゲン剤が挙げられる。

10

【0111】

植物由来抗腫瘍物質としては、例えば、ニトティック阻害剤 (nitotic inhibitor)、例えば、ビンブラスチン、ドセタキセル、およびパクリタキセルから選択されるものが挙げられる。

【0112】

細胞傷害性トポイソメラーゼ阻害剤としては、アクラルピシン、アモナフィド、ペロテカン、カンプトテシン、10-ヒドロキシカンプトテシン、9-アミノカンプトテシン、ジフロモテカン、イリノテカン、エドテカリン、エピルピシン、エトボシド、エキサテカン、ギマテカン、ルロテカン、ミトキサントロン、ピラルピシン、ピクサントロン、ルビテカン、ソブゾキサン、SN-38、タフルボシド、およびトボテカン、ならびにこれらの組み合わせから成る群より選択される1つ以上の剤が挙げられる。

20

【0113】

免疫剤 (immunologicals) としては、インターフェロンおよびその他の数多くの免疫増強剤が挙げられる。インターフェロンとしては、インターフェロンアルファ、インターフェロンアルファ-2a、インターフェロン、アルファ-2b、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ-1a、またはインターフェロンガンマ-n1が挙げられる。

【0114】

その他の抗癌剤としては、PF3512676、フィルグラスチム、レンチナン、シゾフィラン (sizofilan)、ウベニメクス、WF-10、アルデスロイキン、アレムフズマブ (alemfuzumab)、BAM-002、ダカルバジン、ダクリズマブ、デニロイキン、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、イブリツモマブ、イミキモド、レノグラスチム、レンチナン、メルグラモスチヌム (melgramostinm)、サルグラモスチム、タソネルミン、テクロイキン (tecleukin)、チマラシン (thymalasin)、トシツモマブ、Virulizin、Z-100、エピラツズマブ、ミツモマブ (mitumomab)、オレゴボマブ、ペムツモマブ、アリトレチノイン、アンプリゲン、アトラセンタン、ベキサロテン、ボルテゾミブ、カルシトロール (calcitrol)、エクシスリンド、フィナステリド、ホテムスチン、イバンドロン酸、ミルテホシン、ミトキサントロン、1-アスパラギナーゼ、プロカルバジン、ダカルバジン、ヒドロキシカルバミド、ペガスバルガーゼ、ペントスタチン、タザロツネ (tazarotne)、TLK-286、またはトレチノインが挙げられる。

30

40

【0115】

抗血管新生化合物としては、アシトレチン、フェンレチニド、サリドマイド、ゾレドロ酸、アンジオスタチン、アブリジン、シレングチド (cilengtide)、コンプレタスタチン、A-4、エンドスタチン、ハロフジノン、レビマスタット、レモバブ、スクアラミン、およびウクラインが挙げられる。

【0116】

抗GPR49抗体と組み合わせて用いることができる治療剤のより広範囲のリストは、その全内容が参照により本明細書に組み込まれるPCT公開公報WO03/075957に見出すことができる。

50

【 0 1 1 7 】

本発明の実施形態を、明確化および理解の目的である程度詳細に記載してきたが、当業者であれば、本発明の真の範囲から逸脱することなく、形態および詳細事項に種々の変更を行ってよいことは理解される。

【 実施例 】

【 0 1 1 8 】

G P R 4 9 に対する抗体、そのような抗体を発現するハイブリドーマもしくはその他の細胞株、そのような抗体をコードする核酸および核酸を含むベクター、ならびにそのような抗体による癌の治療方法に関する実施形態を全般的に述べてきたが、単に例証の目的で提供され、限定することを意図するものではない特定の具体的な実施例を参照することにより、さらなる理解を得ることができる。

10

【 0 1 1 9 】

実施例 1

ファージディスプレイライブラリーからのヒト G P R 4 9 に特異的であるヒト F a b の選択

ヒト G P R 4 9 受容体の細胞外ドメインを特異的に認識するヒト抗体を、ファージディスプレイ技術を用いて単離した。

【 0 1 2 0 】

パート I : ファージディスプレイパニング

方法：遺伝子組換えヒト G P R 4 9 - F c 外部ドメイン (G P R 4 9 - F c) (配列番号 3) を用いて、 3.5×10^{10} のユニーククローンを含有するヒトナープファージミド F a b ライブラリーのスクリーニングを行った (Hoet, R. M., et al. NatBiotechnol. 23(3): 344-8 (2005))。ファージライブラリーによるインキュベーションの前に、ビオチン化抗 F c 抗体を磁気ビーズ上に捕捉し、続いて、G P R 4 9 - F c 融合タンパク質を捕捉した。Hoet et al. の記載に従って選択を実施した。3 ラウンドのパニングの後、4 7 9 b p の g e n e I I I スタンプ部を M l u I 消化によって除去し、ベクターを、T G I 細胞中での可溶性 F a b 発現に任せた。

20

【 0 1 2 1 】

結果：このパニングにより、6 1 のユニーククローンを単離した。続いて、ユニーククローンを精製し、結合を再確認した。

30

【 0 1 2 2 】

パート II : E L I S A

遺伝子組換えヒト G P R 4 9 - F c 外部ドメインへの F a b の結合を、E L I S A によって実証した。方法：簡潔に述べると、p H 9 . 6、0 . 0 2 5 M 炭酸塩バッファー中の 2 . 5 u g / m L の可溶性 G P R 4 9 - F c 融合タンパク質を、9 6 ウェルプレート (I M M U L O N 2 H B、ダイネックステクノロジーズ社 (Dyex Technologies, Inc.)、カタログ番号 3 4 5 5) に 5 0 u L / ウェルにてコーティングし、4 にて一晚インキュベートした。プレートを、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S、アーバインサイエンティフィック (Irvine Scientific)、カタログ番号 9 2 4 0)、p H 7 . 4、プラス 0 . 0 2 5 % T w e e n 2 0 により、S k a n W a s h e r 3 0 0 (スカトロンインスツルメンツ (Skatron Instruments)) で洗浄し、1 % 脱脂乳、0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を P B S 中に含有する p H 7 . 4 のバッファーでブロッキングし、次に、室温にて 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを、P B S に 0 . 0 2 5 % T w e e n 2 0 を添加したものにより、S k a n W a s h e r 3 0 0 で洗浄した。アッセイのために、G P R 4 9 コーティングプレートを、次に、コントロール、および P B S 中の 1 % 脱脂乳、0 . 0 5 % T w e e n 2 0 にて 5 0 u L / ウェルで希釈した種々の濃度の試験抗体と共にインキュベートした。室温での 1 時間のインキュベーション後、プレートを、P B S に 0 . 0 2 5 % T w e e n 2 0 を添加したものにより、S k a n W a s h e r 3 0 0 で洗浄した。P B S 中の 1 % 脱脂乳、0 . 0 5 % T w e e n 2 0 にて 2 0 0 0 倍に希釈したヤギ抗ヒトカップ - H R P (サザンバイオテック (Southern B

40

50

iotech)、カタログ番号2060-05)を、50 uL/ウェルで添加して、結合したFabを検出した。プレートを、室温にて1時間インキュベートし、PBSに0.025% Tween 20を添加したものにより、Skán Washer 300で洗浄した。TMB溶液(キルケガード&ペリーラブズ社(KIRKEGAARD & PERRY LABS, INC.)、カタログ番号50-76-00)を100 uL/ウェルで添加し、2分後、50 uL/ウェルの4N H₂SO₄(ラブケム(LabChem)、カタログ番号LC25830-1)で反応を停止した。TMBの吸光度を、450 nm、バックグラウンド540 nmにて、モレキュラーデバイス(Molecular Devices)のプレートリーダーを用いて測定した。データの解析は、SOFITMAX PROソフトウェアパッケージ バージョン4.3 LS(モレキュラーデバイス社)を用いて行った(図1)。

10

【0123】

結果：この結果、以下の6つのFabが滴定可能な結合を有していた：71C10、86C11、66D05、76C12、78F05、および76B04。

【0124】

パートIII：FACS分析

方法：6つのGPR49 Fabを、1:20、1:40、および1:80に希釈し、HA-GPR49でトランスフェクトされたHEK293Eとの結合について、FACSによって試験した。トランスフェクション後24時間から48時間にて細胞を懸濁液として回収し、抗GPR49抗体またはコントロールIgGと共に、氷上にてインキュベートする。細胞を洗浄し、蛍光発色団と結合された抗マウス二次抗体により、一次抗体を検出した。次に、標識細胞をFACSで分離し、未変性の細胞表面GPR49タンパク質の発現を特異的に認識する抗GPR49抗体を識別した。

20

【0125】

結果：6つの有望なFACS陽性GPR49 Fabのすべてが、Fab希釈率の増加に従ってHA-GPR49-HEK293Eとの結合の減少を示し、いずれもHEK293Eとの結合を示さなかった(図2)。幾何平均が低いのは、Fabエピトープへの接近のし易さがそれほど高くないこと、細胞表面でのGPR49の発現が低いこと、またはFabが低親和性であり得ることに起因している可能性がある。CHO親株と比較したCHO-GPR49(50 nM MTX)に対するGPR49 Fab(400 nMからゼロまでの2倍希釈)のFACSによる追加の試験により、以下の3つのFabが、およそEC₅₀<10 nMを有することが明らかとなった：76C12、76B04、および78F05(図3Aおよび3B)。腫瘍細胞株(SW480、SW620、およびHCT116)に対するFabの試験からは、76C12のFabのみが結合能力を有することがFACSによって明らかとなった(図4A、4B、5A~C、および6A~C)。

30

【0126】

パートIV：Biacore分析

方法：3つの特定のFab(76C12、78F05、および76B04)は、FACSにより、10 nM未満の親和性にてヒトGPR49受容体と特異的に結合することが識別された。結合動態学の分析のために、ビオチン化抗ヒトIgG Fc抗体を、Biacore SAチップ上に、2950 RUのレベルまで固定した。次に、GPR49-Fcを、フローセル2に約400 RUの密度まで捕捉し、フローセル1はレファレンスとして用いた。精製Fab(HSP-EP中100、50、25 nM)を、30 μL/分にて7分間注入し、解離のために20分間置いた。データの解析は、BIAevaluationソフトウェア(v4.1)により、1:1モデルを仮定して行った。次に、FabのFcドメインとの交差反応性を試験するために、IgG1 Fcを、フローセル2に約250 RUの密度まで捕捉し、フローセル1はレファレンスとして用いた。次に、すべてのFabを、上記と同じ条件下にて試験した。biacore実験はすべて、BIAcore 3000の装置上、25 °Cにて行った。

40

【0127】

結果：76C12および78F05のFabは、それぞれ3.4 nMおよび1.7 nM

50

のK_Dにて結合した。76B04のFabは、弱い結合を示した。

【0128】

実施例2

完全長抗GPR49 IgGの構築

方法：3つのFabをヒトIgG1に変換し、CHO細胞中にて発現させた。3つの別々の抗GPR49 Fabである、76C12、78F05、および76B04をコードするDNA配列を、遺伝子組換えヒトGPR49外部ドメイン-Fc融合タンパク質に対するバイオパニングにより、ヒト抗体ファージライブラリー（ダイアックス社（Dyax Corp））から選択した。これらのFab遺伝子配列を用い、哺乳類細胞中での抗体産生のためのpV90AS発現ベクター系を用いることにより、完全長抗体をコードする発現プラスミドを構築した。pV90ASは、一次転写物の選択的スプライシングによって単一のプロモーターから2つの転写物が生成されるように設計された修飾pV90発現ベクターである（参考文献：米国特許商標庁出願 WO2005/089285）。天然CMVスプライスドナーをスプライスして、抗体軽鎖コード転写物を生成させるための部分損傷スプライスアクセプター、または抗体重鎖コード転写物を生成させるための天然CMVスプライスアクセプターとする。部分損傷スプライスアクセプターは、重および軽鎖転写物の両方が類似量で得られるように操作されたものである。軽鎖可変（VL）および定常（CL）領域を、PCRで増幅した。5'軽鎖PCRプライマーには、その全内容が参照により本明細書に組み込まれるNakamura T, et al., Int J Immunopharmacol. 22:131-41 (2000)に記載の方法に従って、Sfi I制限エンドヌクレアーゼ部位、および続いて免疫グロブリン軽鎖シグナルペプチドをコードする配列MDMRVPAQLGLLLWLPGARC（配列番号5）を、VL領域のアミノ末端に対応する配列に対してインフレームで含有させた。PCR産物は、アガロースゲル電気泳動、およびQIAquick Gel Extractionキットプロトコル（キアゲン カリフォルニア州）を用いた抽出によって精製し、制限エンドヌクレアーゼSfi IおよびAsc Iで消化し、Sfi I / Asc I消化pHLP025ベクター（ホリーブレンティス（Holly Prentice））と連結した。pHLP025ベクターは、天然のCMVスプライスドナー部位配列に加えて、Sfi I / Asc I消化PCR断片として抗体軽鎖（シグナルペプチド-VL-CL）を受け取るためのSfi I / Asc I制限エンドヌクレアーゼ部位、部分損傷スプライスアクセプター部位配列、およびポリAシグナル配列を含有している（参考文献：米国特許商標庁出願 WO2005/089285）。

【0129】

各抗GPR49 Fab（76C12、78F05、76B04）の重鎖可変（VH）領域を、PCRで増幅した。5'重鎖VH PCRには、上述のように、Nco I制限エンドヌクレアーゼ部位、および続いて合成重鎖シグナルペプチドをコードする配列MGWSLI LFLVA V ATRVLS（配列番号6）を、VH領域のアミノ末端に対応する配列に対してインフレームで含有させた。3'重鎖VH PCRプライマーには、VH領域のカルボキシル末端に対応する配列およびSfi I部位を含有させた。PCR産物は、アガロースゲル電気泳動、およびQIAquick Gel Extractionキットプロトコル（キアゲン、カリフォルニア州）を用いた抽出によって精製し、制限エンドヌクレアーゼNco IおよびSfi Iで消化し、Nco I / Sfi I消化pHLP029ベクター（ホリーブレンティス）と連結した。pHLP029ベクターは、上流のポリAシグナル配列、天然のCMVスプライスアクセプター部位配列、および下流のポリAシグナル配列に加えて、Nco I / Sfi I消化PCR断片として抗体シグナルペプチド-VH配列を受け取るためのNco I / Sfi I部位を含有している（参考文献：米国特許商標庁出願 WO2005/089285）。

【0130】

pHLP025中の（Sfi I部位-軽鎖シグナルペプチド-抗GPR49 VLおよびCL）、およびpHLP029中の（重鎖シグナルペプチド-抗GPR49 VH-Sfi I部位）をコードする遺伝子配列を、上述の5'軽鎖および3'重鎖VH PC

10

20

30

40

50

Rプライマーを用い、両ベクターに共通して存在するオーバーラップ配列を通して、PCR増幅により集合させて、単一のDNA断片を構築した。得られたPCR産物は、アガロースゲル電気泳動、およびQIAquick Gel Extractionキットプロトコル（キアゲン，カリフォルニア州）を用いた抽出によって精製し、制限エンドヌクレアーゼSfi Iで消化し、Dra III消化Igg1親ベクターと連結した。

【0131】

結果：得られたプラスミドは、選択的スプライシング後に翻訳的に活性である抗体重鎖および軽鎖mRNAがおよそ化学量論的量で得られる、バイシストロン性前駆体転写物を生成する。DNA配列分析によって正しい配列を確認した。哺乳類細胞中での完全長の発現により、安定なヒトIgg1抗体の産生が得られた。

10

【0132】

実施例3

哺乳類細胞中での改善された発現のための完全長抗GPR49 IgGの構築

抗体発現の収率および産物の質を改善するために、抗GPR49 Fab、76C12、78F05、76B04、からの元のVH遺伝子配列の修飾を行った。

【0133】

方法：第一に、抗GPR49 VH配列を、公開配列認識プログラム（www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html）（ゲノム科学研究所（The Institute for Genomic Research），9712 メディカルセンタードライブ，ロックビル，メリーランド州 20850）、www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html）。（Martin G. Reese and Frank H. Eeckman，ローレンス・バークレー国立研究所（Lawrence Berkeley National Laboratory），ゲノムインフォマティクスグループ（Genome Informatics Group），1 サイクロトロノロード，バークレー，カリフォルニア州 94720；Reese MG, Eeckman, FH, Kulp, D, Haussler, D, 1997. "Improved Splice Site Detection in Genie". J Comp Biol 4(3), 311-23、も参照されたい。）を用いて、推定スプライス部位を含有する配列について分析した。第二に、抗GPR49 Fabの重鎖可変領域中のコドン、元の抗GPR49 VHポリペプチド配列中における変化にまったく遭遇することなくCHO細胞中で良好に発現された抗体からの同一のKabab位置に対応するコドンで置き換えた。この第二の工程は、推定スプライス部位をほとんど除去するが、追加のスプライス部位分析、およびこれに続く同義コドン交換を実施して、推定スプライス部位が存在する予測される可能性を低減した。

20

30

【0134】

抗GPR49 Fabの配列が最適化されたVH配列とインフレームである合成重鎖リーダーをコードするDNA断片を、化学合成された二本鎖DNA配列として市販業者から入手した（ブルーヘロンバイオテクノロジー社（Blue Heron Biotechnology, Inc.），ボセル，ワシントン州）。この合成断片中には、Nco IおよびSfi I制限エンドヌクレアーゼ部位が5'および3'に含まれていた。リーダーおよび抗GPR49配列最適化VH領域断片を、上記実施例2に記載のように、Nco I/Sfi I消化pHLP029ベクター中にクローン化した。pHLP025中の適切な対応する軽鎖による遺伝子組換えおよびこれに続く単一断片のクローン化は、上記実施例2に記載の通りである。DNA配列分析によって正しい配列を確認した。

40

【0135】

結果：哺乳類細胞中でのこのプラスミドシリーズからの完全長抗体の発現は、安定なヒトIgg1抗体の産生を増加させる結果となった。

【0136】

実施例4

GPR49抗体の一過性発現および特徴づけ

方法：プラスミドDNAを用いて、抗体タンパク質の一過性産生のために、CHO DG44細胞を形質転換した。20ugのプラスミドDNAを、体積0.4mLの1xPBS中にて4x10⁶細胞と混合した。この混合物を、0.4cmキュベット（バイオラッ

50

ド (BioRad)) に添加し、氷上に 15 分間配置した。細胞を、Gene Pulser 電気穿孔器 (バイオラッド) により、600 μ F および 350 ボルトにて電気穿孔した。細胞を、CHO - SSFM II 培地に、100 μ M ヒボキサンチンを添加したもの、および 16 μ M チミジンを入れた T - 25 フラスコ中に配置し、37 ° にて 4 日間インキュベートした。さらに、プラスミド DNA を用いて、抗体タンパク質の一過性発現のために、293E 細胞をトランスフェクトした。1.2 μ g の各 (重および軽) プラスミド DNA を、Qiagen's Effectene トランスフェクション プロトコル (キアゲン, カリフォルニア州) を用いて、 2×10^6 細胞中へトランスフェクトした。細胞を 37 ° にて 3 日間インキュベートした。

【0137】

結果：上清を回収し、ウェスタンブロットおよび ELISA 法の両方によって完全長抗体を確認した。完全 IgG1 の GPR49 と結合する能力は、ELISA によって確認した。

【0138】

実施例 5

抗 GPR49 抗体産生 CHO 細胞株の樹立

本実施例は、完全長 IgG1 として、Fab 76C12 の結合ドメインを含む抗 GPR49 抗体の発現についての詳細な記述を与えるものである。本明細書で述べるその他の Fab、すなわち、実施例 1 に挙げるものについては、類似の方法で発現した。

【0139】

方法：76C12 の可変および定常領域は、ヒト配列由来である。軽鎖および重鎖可変領域全体は、DYAX フェージディスプレイ技術によってヒト GPR49 に対して作製された Fab 由来のものである。可変、ならびに軽鎖定常領域を、選択的スプライシング発現ベクター (alternate splice expression vector) 中へサブクローン化した。選択的スプライシングの構成により、単一のスプライスドナーを 2 つのスプライスアクセプターと共に用いることで、軽および重鎖が連結され、各スプライスアクセプターは、2 つの鎖の一方をコードする転写物を生成する。免疫グロブリン遺伝子をコードする発現ベクター DNA を、インスリン非依存性チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO DG44i) へ電気穿孔した。CHO トランスフェクトマを産生目的のために選択した。

【0140】

76C12 の軽鎖遺伝子の対応する可変 (VL) および定常 (CL) ドメインおよび 76C12 の重鎖遺伝子の可変 (VH) ドメインからの相補 DNA を、発現ベクター中にクローン化した。このベクターは、ヒト重鎖定常領域のすぐ上流側に全軽鎖および可変重鎖 cDNA を挿入するためのクローン化部位を含有する。Ig 遺伝子に加えて、この発現ベクターは、哺乳類細胞中での選択に用いることができるジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子を含有する。次に、得られた発現ベクターを CHO 細胞中へトランスフェクトして、抗 GPR49 分泌 CHO 細胞株の作製を開始した。

【0141】

この発現ベクターを、CHO 細胞中へ電気穿孔した。免疫グロブリン軽鎖特異的 PCR プライマーを用いて、Fab 軽鎖 cDNA の PCR 増幅を行った。5' 特異的オリゴ配列は、バイオジェンアイデック (Biogen Idec) の抗 CD23 分子の軽鎖からの天然シグナルペプチドを含んでいた。5' および 3' オリゴ配列は、中間体ベクター中へサブクローン化するために、それぞれ、Sfi I および Asc I 制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含有している。VH cDNA は、合成重鎖シグナルペプチドを含む 5' オリゴ配列を用いて PCR 増幅した。5' および 3' オリゴ配列は、中間体ベクター中へサブクローン化するために、それぞれ、Nco I および Sfi I 制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含有している。

【0142】

軽鎖 5' および VH 3' オリゴ配列をテンプレートとして用いたオーバ - ラッピング PCR を利用して、軽鎖および VH 領域を 1 つの cDNA セグメントに組み合わせた。得ら

10

20

30

40

50

れた産物を、D r a I I I 部位にサブクローン化し、こうして、最終の選択的スプライシング発現ベクターを作り出した。選択的スプライシングの構成により、一次転写物の選択的スプライシングを通して、単一プロモーターから2つの転写物が作製される。天然C M V スプライスドナーは、準最適スプライスアクセプターへスプライスされて軽鎖コード転写物が作製されるか、または天然C M V スプライスアクセプターへスプライスされて重鎖コード転写物が作製される。準最適スプライスアクセプターは、類似量の両転写物を作製するように設計された。

【0143】

最終のDNAベクターは、H E B S バッファー中、700 ng / u L の濃度で作製し、その後、C H O 細胞中へ電気穿孔した。種々の濃度のDNAを用いて(15、20、30、40、および45 ug) 5回の電気穿孔を行った。各電気穿孔は、0.7 mL の滅菌H E B S バッファー中の 4×10^6 の対数期C H O 細胞および0.1 mL のH E B S 中のDNA(合計体積0.8 mL)を入れた使い捨て0.4 cm キュベット(インビトロジェン(Invitrogen))中に行った。パイオ-ラッド ジーンパルサー Xセル(Bio-Rad Gene Pulse Xcell)を用い、290ボルト、950マイクロファラデーに設定して、細胞にショックを与えた。ショックを与えられた細胞を、次に、室温にて10分間静置し、続いて、室温のインスリンフリーC H O M 16培地10 mLと混合し、遠心分離にかけ(3' @ 1000 rpm)、吸引した。次に、細胞を、12 mL のインスリンフリーC H O M 16培地(室温)に再懸濁し、T-75組織培養フラスコへ移した。

【0144】

細胞および培地：電気穿孔の前に、C H O 細胞を、1 xヌクレオシドを添加した血清フリー培地(C H O M 24)中にて成長させた。C H O M 24は、動物成分をまったく含有しない化学的に明らかである自家培地製剤である。メトトレキサート選択を、ヌクレオシドフリーであるC H O M 16およびC H O M 24の化学的に明らかである培地中に行った。

【0145】

電気穿孔の後、 4×10^6 のC H O 細胞をT-75フラスコ中にブールした。細胞をヌクレオシドフリー培地に播種し、すぐにD H F R 発現についての選択を開始した。細胞は、最終的に、C H O M 24中、125 mL のシェイクフラスコへ拡張した(約3週間)。クローン細胞株を単離するために、トランスフェクトされた安定なブールを希釈し、4つの96ウェルプレート上に、200 u L のC H O M 16において1細胞/ウェルで播種した。プレートを、抗体力価についてのスクリーニングを行うまで、37 に維持した。

【0146】

C H O コロニーを、ヒトカップパ鎖に対して特異的であるE L I S Aを用いて細胞上清を分析することにより、免疫グロブリン産生についてスクリーニングした(播種後第21日から28日)。E L I S Aで用いた捕捉抗体は、ポリクローナルヤギ抗ヒトIg G(ササンバイオテック)であり、検出抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合したポリクローナルヤギ抗ヒトカップパ(ササンバイオテック)であった。免疫グロブリンの分泌量が最も多いコロニーを増大させた。

【0147】

結果：スケールアップおよび製造に適する期待される生化学的および生物物理学的特性を有する抗G P R 49 m A b が得られる高発現C H O 細胞株を樹立した。

【0148】

実施例6

完全ヒト抗G P R 49 I g G 1抗体の精製および特徴づけ

C H O 細胞中で産生された抗体を、以下で述べる方法によって精製および特徴づけした。

【0149】

方法：プロテインA捕捉：プロテインAカラムを、1 x P B S (平衡バッファー)により、100~150 cm / 時間にて、3カラム分の体積で予備平衡化した。上清を、最大

で樹脂 1 ミリリットルあたり 10 mg の G P R 4 9 m A b により、150 cm / 時間にて充填した。充填後、カラムを 5 カラム分の体積の平衡バッファーで洗浄した。次に、カラムを、pH 3.0 の 100 mM グリシンにより、上向流方向で段階溶出した。所望される画分を回収し、2 M トリス塩基にて中性 pH まで滴定した。回収した画分を、1 × P B S に対して透析し、濃縮物をサイズ排除工程のために調製した。サイズ排除凝集物除去工程に含まれるのは、S U P E R D E X 2 0 0 を、1.5 カラム分の体積の 1 × P B S により、36 cm / 時間の流速で平衡化し、続いてタンパク質を充填し、所望される画分を回収することであった。

【0150】

同一性試験を以下のようにして行った：

10

【0151】

1) 分子質量測定をエレクトロスプレー質量分析器 (E S I - M S D) で行う質量分析によるインタクト質量分析 (intact mass analysis)。分析の前に、サンプルを還元してジスルフィド結合を除去した。デコンボリューションされた (deconvoluted) 質量スペクトルは、重および軽鎖の質量を表している。

【0152】

2) N 末端配列分析を、オンライン P T H アナライザーを搭載した A B I タンパク質シーケンサーを用い、エドマン分解によって行った。軽鎖および重鎖の最初のアミノ酸の配列を識別した。

20

【0153】

3) 質量分析によるペプチドマッピング：トリプシンまたはノおよび E n d o L y s C ペプチドマッピングを行って、各ペプチドから得られた L C / M S データの解析から、完全な配列カバレッジを得た。加えて、酸化および脱アミド化の部位および量を検出して特定した。

【0154】

精製試験を以下によって行った；1) S D S - P a g e または C E - S D S：還元および非還元サンプル、この技術は、抗体の断片化、凝集、および不純物の測定に用いる。2) L S および R I 技術による S E C - H P L C を用いて、凝集および断片化を測定し、光散乱により、サンプル成分のモル質量が特定される。3) S D S ゲルまたはキャピラリー I E F 法を用いて、C および N 末端不均一性およびノまたは脱アミド化に起因し得る荷電アイソフォームの等電点電気泳動パターンおよび p i 分布を特定した。最後に、エンドトキシン濃度を、リムルスアメボサイトライゼート (L A L) カイネティック比濁法によって測定した。

30

【0155】

結果：抗 G P R 4 9 m A b の精製により、スケールアップおよび製造に適する特性を有する 99 % 超の単量体エンドトキシンプリー m A b がグラム単位の量で得られた。

【0156】

実施例 7

ヒト G P R 4 9 外部ドメインに対するマウス抗体の作製

パート I：ハイブリドーマ選択

40

方法：G P R 4 9 の外部ドメインに対する抗体を作製するために、マウスを、精製されたエンドトキシンプリー G P R 4 9 - H i s (配列番号 2) により、標準的な技術を用いて 3 回免疫化した。個々のマウスからの血液を、E L I S A および F A C S 分析を用いて、抗原認識についてスクリーニングした。次に、最も高い抗体力価を有する動物を、最終的な抗原ブーストのために選択し、その後、脾臓細胞をハイブリドーマ産生のために単離した。およそ 1000 のクローンを、4 × 24 ウェル融合プレートから 10 × 96 ウェル培養プレートに移した。199 の陽性クローンを、G P R 4 9 - F c 捕捉 E L I S A によって選択し、48 ウェルプレートに移した。これらのうち、F A C S により、G P R 4 9 - C H O 陰性を示したか、または親株 C H O との結合に陽性を示したことから、100 の陽性クローンは選択しなかった。そして、99 陽性クローンのうちの 50 を、アイソタイ

50

ブに応じて選択した。

【 0 1 5 7 】

結果：36のクローンをサブクローン化した（単一または混合 I g G バンド、I g G 1 / k、I g G 2 a / G、および I g G 1 / 2 b / k など）。親からサブクローンまでに、8のクローンが発現を喪失した。24の選択されたサブクローンからのモノクローナル抗体（m A b）を、プロテイン A またはプロテイン G アガロースクロマトグラフィを用いてハイブリドーマ上清から精製し、抗体を、以下で述べるように、F A C S によって試験した。

【 0 1 5 8 】

パート I I : F A C S 分析

方法：24のマウス G P R 4 9 m A b を段階希釈し、G P R 4 9 - F l a g - H i s でトランスフェクトされた C H O および親株 C H O との結合について、F A C S によって試験した（標準的な方法）。

【 0 1 5 9 】

結果：結果を表 2 にまとめる（図 7 A ~ C に示すデータ）。

【 0 1 6 0 】

【表 2 - 1】

表 2

G P R 4 9 m s m A b	F A C s E C 5 0 (nM)
2 B 5 . 5	~ 0 . 2
7 F 8 . 2	~ 0 . 2
1 B 3 . 5	0 . 8 1 2 9
9 C 6 . 4	0 . 8 2 9 7
6 H 5 . 4	~ 1
1 0 A 6 . 7	1 . 4 2 8
1 0 A 9 . 2	4 . 5 2 2
2 G 8 . 1	9 . 7 6 6
6 C 1 0 . 5	9 . 9 7 8
6 G 1 0 . 3	~ 1 0
8 H 8 . 1	1 1 . 1 9

【 0 1 6 1 】

【表 2 - 2】

GPR49 mAb	FACS EC50 (nM)
6B10.2	11.2
3B8.11	12.14
2F12.5	14.64
5G2.11	20.94
1F10.5	24.54
10E1.1	29.49
7C3.4	34.51
2H9.2	43.27
5B12.4	43.56
3G8.1	63.83
5F2.5	530.5
6G10.1	2658

10

20

【0162】

パートIII：Biacore分析

マウスmAbの結合反応速度論を、Biacoreによって分析した。

30

【0163】

方法：ビオチン化抗ヒトIgG Fc抗体を、Biacore SAチップ上に、2950RUのレベルまで固定した。次に、GPR49-Fcを、フローセル2に約400RUの密度まで捕捉し、フローセル1はレファレンスとして用いた。精製マウスmAb (HSP-EP中100、50、25nM)を、30μL/分にて7分間注入し、解離のために20分間置いた。データの解析は、BIAevaluationソフトウェア(v4.1)により、1:1モデルを仮定して行った。biacore実験はすべて、BIAcore 3000の装置上、25℃にて行った。

【0164】

結果：マウスmAbは、64nMから1nM未満の親和性(K_D)にて、GPR49-Fcと結合した。データを表3に示す。

40

【0165】

【表 3 - 1】

表 3

	B I A c o r e
m A b	K _D nM
1 B 3 - 5	1. 1 1
5 B 1 2. 4	7. 5 2
6 C 1 0. 5	0. 6 8
9 C 6. 4	1. 4 4
5 G 2. 1 1	1. 5 9
6 G 1 0__3	2. 7 2
1 0 E 1__1	3. 9 8
7 F 8. 2	0. 9 1
1 0 A 9. 2	< 1 0 0 pM
6 B 1 0__2	3. 0 5
2 H 9 - 2	0. 7 1

10

20

30

【 0 1 6 6 】

【表 3 - 2】

	B I A c o r e
m A b	K D n M
2 G 8 . 1	N / A
6 H 5 . 4	0 . 1 7
1 0 A 6 _ 7	< 1 0 0 p M
3 B 8 - 1 1	3 . 9 2 u M
3 G 8 . 1	0 . 9 9
7 C 3 _ 4	6 . 3 2
2 B 5 - 5	1 . 6 7
8 H 8 _ 1	1 . 5 4
2 F 1 2 . 5	1 . 2 9
1 F 1 0 . 5	6 4 . 0
5 F 2 _ 5	5 . 5 2
6 G 1 0 . 1	0 . 1 4

10

20

30

40

50

【 0 1 6 7 】

実施例 8

完全長ヒト G P R 4 9 に対するマウス抗体の作製

パート I : ハイブリドーマ選択

方法：完全長受容体に対する抗体を作製するために、マウスを、G P R 4 9 遺伝子の完全長 c D N A クローンをコードする D N A ベクターを金粒子と混合したものの 1 0 u g / マウスにて、3 回免疫化した。最初の免疫化のおよそ 7 5 日後に、個々のマウスの血液を、E L I S A および F A C S 分析により、抗原認識についてスクリーニングした。次に、最も高い抗体価を有する動物を、最終的な抗原ブースト (2 5 u g G P R 4 9 - F c 、 1 0 u g G P R 4 9 - D N A / 金粒子、および 5×10^6 G P R 4 9 - C H O 細胞) のために選択し、その後、脾臓細胞をハイブリドーマ作製のために単離した。およそ 1 0 , 0 0 0 のクローンを作製し、およそ 2 0 0 の陽性クローンを、G P R 4 9 - C H O 捕捉 E L I S A によって選択した。

【 0 1 6 8 】

結果：6 7 のクローンを、E L I S A および G P R 4 9 - C H O F A C S によって確認した。次に、2 2 の陽性クローンをサブクローン化した (単一または混合 I g G バンド、I g G 1 / k 、 I g G 2 a / G 、および I g G 1 / 2 b / k など) 。 1 9 の選択されたサブクローンからのモノクローナル抗体 (m A b) を、プロテイン A またはプロテイン G アガロースクロマトグラフィを用いてハイブリドーマ上清から精製し、抗体を、以下で述べるように、F A C S によって試験した。

【 0 1 6 9 】

パートII：FACS分析

方法：19のマウスGPR49 mAbを段階希釈し、GPR49-Flag-HisでトランスフェクトされたCHOおよび親株CHOとの結合について、FACSによって試験した（標準的な方法）。

【0170】

結果：マウスmAbは、17nMから1nM未満（EC50）にて、GPR49と結合した。結果を表4にまとめる（図8A～Dに示すデータ）。抗体10A9.1は、コントロールとして用いた。

【0171】

【表4 - 1】

10

表4

mAb	EC50 (nM, CHO-GPR49)
14H9.1	0.9
12G5.1	1.2
6E10.1	1.3
14F7.1	1.5
4A10.2	1.7
3F11.1	1.8
11F6.1	1.9
5B10.1	1.9
14A8.1	2.1
8E9.1	2.2

20

30

【0172】

【表 4 - 2】

mA b	EC 50 (nM, CHO-GPR49)
9C7. 1	2. 2
4F6. 2	2. 2
1B8. 1	2. 2
18G7. 1	2. 5
12E3. 1	2. 6
6H5. 1	3. 0
2P69. 2	5. 1
17C9. 1	12. 5
2H5. 1	17. 5
10A9. 2	(第一世代mA b) 6. 2

10

20

【0173】

パートIII：GPR49ダイレクト結合ELISA

マウス抗体のGPR49との結合の特徴づけを行うために、ダイレクト結合ELISA

30

アッセイを実施した。

【0174】

方法：pH9.6の0.025M炭酸バッファー中2.5ug/mLの可溶性GPR49-Fc融合タンパク質を、50uL/ウェルにて96ウェルプレート(IMMULON2 HB、ダイネックステクノロジーズ社、カタログ番号3455)にコーティングし、4に overnight インキュベートした。プレートを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS、アーバインサイエンティフィック、カタログ番号9240)、pH7.4に0.025% Tween20を添加したものにより、Skán Washer 300(スカトロンインスツルメンツ)で洗浄し、1% 脱脂乳、0.05% Tween20をPBS中に含有するpH7.4のバッファーでブロッキングし、次に、室温にて1時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを、PBSに0.025% Tween20を添加したものにより、Skán Washer 300で洗浄した。アッセイのために、GPR49コーティングプレートを、次に、コントロール、およびPBS中の1% 脱脂乳、0.05% Tween20にて50uL/ウェルで希釈した種々の濃度の試験抗体と共にインキュベートした。室温での1時間のインキュベーション後、プレートを、PBSに0.025% Tween20を添加したものにより、Skán Washer 300で洗浄した。PBS中の1% 脱脂乳、0.05% Tween20にて2000倍に希釈したヤギ抗マウス-Fc-HRP(サザンバイオテック、カタログ番号2060-05)を、50uL/ウェルで添加して、結合したFabを検出した。プレートを、室温にて1時間インキュベートし、PBSに0.025% Tween20を添加したものにより

40

50

、Skan Washer 300で洗浄した。TMB溶液（キルケガード&ペリーラブズ社、カタログ：50-76-00）を100 uL / ウェルで添加し、2分後、50 uL / ウェルの4N H₂SO₄（ラブケム、カタログ番号LC25830-1）で反応を停止した。TMBの吸光度を、450 nm、バックグラウンド540 nmにて、モレキュラーデバイスのプレートリーダーを用いて測定した。データの解析は、SOFITMAX PROソフトウェアパッケージ バージョン4.3 LS（モレキュラーデバイス社）を用いて行った。結果として、EC50値を得た。

【0175】

結果：マウスmAbは、224 nMから1 nM未満の範囲のEC50にて、GPR49-Fcと結合した（表5；図9A～D）。

10

【0176】

【表5-1】

表5

EC50 (ELISA) [nM]	ハイブリドーマ
0.2	8E9.1
0.24	11F6.1
0.25	12G5.1
0.27	5B10.1
0.28	6H5.1
0.38	14A8.1
0.5	9C7.1
0.53	4A10.2
0.55	14H9.1
0.55	14E3.1

20

30

40

【0177】

【表 5 - 2】

EC50 (ELISA) [nM]	ハイブリドーマ
0.57	14F7.1
0.65	4F6.2
0.657	6E10.1
0.67	2P69.2
0.88	3F11.1
0.95	17C9.1
1.34	1B8.1
1.35	18G7.1
2.86	2H5.1
225.4	18D9.1

10

20

30

【0178】

実施例 9

癌腫瘍は抗 GPR49 抗体で標識可能

方法：結腸およびその他の腫瘍細胞中における GPR49 の発現を、抗 GPR49 mAb、76C12 および 78F05 を用い、フローサイトメトリー (FACS) によって測定した。

【0179】

結果：GPR49 は、複数の結腸腫瘍 (CT1、CT3、LS174T、Sw480、HCT116、SW620、DLD-1、Lovo)、胃腫瘍 N87、肺腫瘍 A549、および陽性コントロール GPR49-CHO 安定化トランスフェクタント中にて発現されることが分かった。加えて、GPR49 への抗 GPR49 mAb の結合の特異性が、LS174T 細胞中の GPR49 の RNAi ノックダウンによって確認され、それは、LS174T 細胞と結合する GPR49 mAb、76C12、76B04、および 78F05 の結合を大きく阻害した。

40

【0180】

実施例 10

結腸癌幹細胞 (CSC) のマーカーとしての GPR49 の検証

パート I :

方法：癌幹細胞腫瘍スフェア状態に維持された CT1 原発性結腸腫瘍細胞を、GPR49 mAb、76C12 を用いた FACS によって分離した。GPR49 陽性 (GPR4

50

9 +)、G P R 4 9 陰性 (G P R 4 9 -)、および未分離の生 P I (ヨウ化プロピジウム) 陰性細胞を、9 6 ウェルプレートに1 ウェルあたり1 細胞で播種し、3 週間後に、スフェア形成能 (すなわち、癌幹細胞の数) について分析した。

【 0 1 8 1 】

結果：分離した G P R 4 9 陽性 (G P R 4 9 +) 結腸腫瘍細胞は、G P R 4 9 陰性および未分離細胞と比較して、癌幹細胞活性が非常に高められていた (図 1 0 A および 1 0 B)。G P R 4 9 で分離した L S 1 7 4 T 結腸腫瘍細胞は、2 つの別個に独立した実験において、癌幹細胞が同様に非常に高濃度となっていた。

【 0 1 8 2 】

パート I I :

方法：これらの結果をさらに確認するために、結腸癌幹細胞腫瘍スフェアを G P R 4 9 またはコントロール R N A i - 1 で処理し、次にウェルあたり 2 5 0 細胞で 9 6 ウェルプレートに播種するという追加の実験を行った。

【 0 1 8 3 】

結果：コントロール R N A i - 1 ではなく、G P R 4 9 R N A i - 1 での処理により、処理の 1 4 日後に測定した結腸癌幹細胞の数が大きく減少した。

【 0 1 8 4 】

実施例 1 1

G P R 4 9 陽性結腸腫瘍細胞は生体内にて癌幹細胞特性を有する

方法：単離した G P R 4 9 + 細胞が、癌幹細胞特性を有することを示すために、G P R 4 9 - 細胞に対して G P R 4 9 + の生体内での成長を比較する生体内癌幹細胞アッセイを実施した。原発性結腸腫瘍細胞株 C T 1 からの G P R 4 9 + 細胞を、M o F l o を用いて 7 6 C 1 2 によって分離し、マウスあたり 1 0 0 0 細胞にて移植した。マウスを、その後 5 0 日間にわたって、腫瘍形成および体重減少について分析した。

【 0 1 8 5 】

結果：G P R 4 9 + 原発性結腸腫瘍細胞は、原発性腫瘍異種移植実験において、高悪性度の腫瘍成長 (図 1 1 A) および急速な体重減少 (図 1 1 B) を引き起こしている。対照的に、G P R 4 9 - 細胞は、非常にゆっくり成長し、急速な体重減少を引き起こさなかった。これらの知見から、G P R 4 9 高発現結腸腫瘍細胞は、癌幹細胞の重要な特徴である高い腫瘍原性を有することが実証される。

【 0 1 8 6 】

実施例 1 2

R - スポンジンは高親和性にて G P R 4 9 と結合するが、G P R 4 9 媒介シグナル伝達を活性化しない

パート I : G P R 4 9 は、糖タンパク質ホルモン受容体ファミリー (例 : F S H、T S H、L H に対する受容体) と関連するオーファン G タンパク質共役型受容体 (G P C R) であり、腸の W n t 標的遺伝子をスクリーニングすることによって識別された腸および胃幹細胞マーカーである (Barker et al., Nature, 2007)。G P R 4 9 の天然リガンドを識別するために、結合実験では、公知の W n t 経路修飾因子であるノギン、グレムリン 1、D A N、コーディン様 1 (Chordin-like 1)、セルベルス 1、P R D C、スタニオカルシン - 1、C O C O、コーディン、R - スポンジン 1 ~ 3、B M P 2、および B M P 4 に注目した。

【 0 1 8 7 】

方法：G P R 4 9 - F c に対するリガンド結合活性を、バイオレイヤー干渉法に基づくアッセイ (biolayer interometry-based assay) にて特定した。簡潔に述べると、G P R 4 9 - F c および試験リガンド (すべて R & D システムズ (R&D systems) から購入) を、すべて、O B バッファー (P B S、p H 7 . 4、0 . 0 1 % (重量 / 体積) N a N 3、1 m g / m L B S A、0 . 0 2 % (v / v) T w e e n 2 0) で希釈した。O c t e t R e d S y s t e m (フォルテバイオ社 (ForteBio, Inc.)、メンロパーク、カリフォルニア州) を用いて、G P R 4 9 - F c を、抗ヒト I g G O c t e t チップ (

10

20

30

40

50

フォルテバイオ社，メンロパーク，カリフォルニア州：パーツ番号 18-5001) 上に捕捉した。チップをOBバッファーで洗浄し、OBバッファー中の試験リガンドを含有するウェルへ移した。試験リガンドのGPR49-Fcとの結合を、会合フェーズ(120秒間)および解離フェーズ(120秒間)の間に、バイオ干渉シグナル(biointerferometry signals)として記録した。加えて、リガンドを、マウスGPR49-Fcに対して試験した。

【0188】

結果：R-スポンジン(RSPO)ファミリーメンバーは、ヒトGPR49-Fcと相互作用を起こすが、解釈を困難とする非特異的構成要素を示している。具体的には、観察された2フェーズの会合および解離は、複数の結合イベントを示唆している。RSPOファミリーメンバーは、マウスGPR49-Fc[88%同一性(91%類似)]とは相互作用を起こさない。

10

【0189】

パートII：用いたGPR49-Fcは、溶解したGPR49外部ドメインの二量体(Fc片側部分同士の相互作用による)であるが、GPR49-Fcがチップへの固定化されていること、および試験RSPO分子が単量体状態であることから、2フェーズの結合は、これによって説明することができない。従って、GPR49-FcへのRPOSの結合の2フェーズ性について、溶液親和性表面プラズモン共鳴アッセイ(solution affinity surface plasmon resonance assay)によってさらに調べた。

20

【0190】

方法：RSPOのGPR49との結合を、溶液親和性表面プラズモン共鳴を用いて分析した(Day ES, et al. Biochemistry. 2005 Feb 15;44(6):1919-31)。この方法は、いわゆる「質量輸送律速(mass-transport-limited)」結合の条件を用いるものであり、ここでは、リガンド結合の初期速度(タンパク質のセンサーチップ(senor chip)への結合)が、溶液中のリガンドの濃度に比例する(BIApplications ハンドブック(1994)第6章: Concentration measurement, pp 6-1-6-10, Pharmacia Biosensor AB)。このような条件下では、可溶性分析物(チップ表面上を流れるタンパク質)のチップ上に固定化されたタンパク質への結合は、チップ表面のデキストランマトリックス中への分析物の拡散と比較して速い。従って、分析物の拡散特性およびチップ表面上を流れる溶液中の分析物濃度から、分析物がチップへ結合する速度が決定される。この実験において、溶液中の遊離RSPO-1の濃度は、固定化されたGPR49-Fcを含有するCM5 Biacoreチップへの初期結合速度によって決定される。これらのRSPO-1溶液を、競合GPR49-Fcで滴定した。

30

【0191】

結果：初期結合速度を、センサーグラムの生データから得た。R-スポンジン-1は、2フェーズ結合プロファイルを示し、このことは、GPR49上における、RSPOに対する複数の協同的結合部位の存在を示唆している。

【0192】

パートIII：GPR49シグナル伝達に対するRSPOの影響を試験するために、複数のアッセイを用いた。

40

【0193】

方法：環状AMP、カルシウム流、およびcAMP-アレスチンアッセイを、標準的な方法で行った。加えて、Wnt/ベータ-カテニンシグナル伝達経路を特徴づける転写に基づくレポーターアッセイであるc-Myc/TCFレポーターアッセイ。このc-Myc/TCFレポーターアッセイでは、SAバイオサイエンスのTCF/LEFレポーターまたはネガティブコンストラクトでトランスフェクトした細胞を用いた。24時間のトランスフェクションの後、細胞をカウントし、96ウェルプレートへ分注した(2×10^4 細胞/ウェル)。次に、細胞を、Opti-MEM + 0.5% FBS + 0.1mM NEAA + 1mM ピルビン酸ナトリウム + 1x 抗生物質培地にて6時間飢餓状態とした。次に、細胞を滴定量のRSPOおよびmWnt3a(200 ng/mL)により、抗体有り

50

または無しにて18時間処理した。プロメガ (Promega) のデュアルルシフェラーゼキットを用いて、デュアルルシフェラーゼ活性を発生させる。加えて、GPR49 RNAiを用いて、RSP O依存性 - カテニン / TCFレポーター活性へのGPR49の特異的な寄与について調べた。

【0194】

結果：cAMP、カルシウム流、または - アレスチン活性アッセイにおいて、RSP Oに対する測定可能な活性は観察されなかった。しかし、RSP Oは、GPR49 RNAiでノックダウンされた - カテニン / TCFレポーター活性を、用量依存的様式で作用させた。

【0195】

実施例13

GPR49-3T3細胞のR-スポンジン-1による刺激

方法：GPR49過剰発現細胞に対するR-スポンジンの影響を調べるために、GPR49で安定的にトランスフェクトされた2500のNIH 3T3線維芽細胞 (GPR49-3T3クローン50) を、R-スポンジン-1と共に2日間インキュベートし、Cell Titer Glo ATPアッセイを用いて、細胞増殖を評価した。GPR49-3T3クローン50は、これまでに、抗GPR49 mAb、76C12でのFACSにより、細胞表面GPR49を高レベルで発現することが示されていた。

【0196】

結果：R-スポンジン1による刺激は、無血清条件において、スタニオカルシンによるコントロール刺激と比較して、GPR49-3T3細胞の細胞増殖を25~40%増加させた。この結果は、異なるクローン、GPR49-3T3クローン28を用いた第二の独立した実験でも確認され、ここでは、GPR49スタニオカルシンコントロール刺激細胞と比較して、R-スポンジン1に応答して示した増殖増加は4倍であった。

【0197】

実施例14

GPR49 mAbによるR-スポンジン結合の阻害

本発明にて詳細に述べた抗GPR49 mAbがRSP Oの可溶性GPR49-Fcへの結合をブロックする能力の特定を行った。

【0198】

方法：抗GPR49抗体のリガンドブロック能を、液相競合表面プラズモン共鳴アッセイ (solution phase competition surface plasmon resonance assay) によって特定した。簡潔に述べると、抗体 (1 uM) を、200 nM RSP Oと共に、氷上にて45分間共インキュベートした。次に、RSP O単独 (200 nM) またはインキュベートした抗体と組み合わせて、GPR49-Fcを固定したCM5 Biacoreチップ上を流動させた (実施例1にて詳述の通り)。60秒間の会合フェーズの最後の結合シグナル (Rmax) であるRmaxを、定常状態 / 平衡にて結合した断片の測定値として用いた。

【0199】

結果：抗GPR49抗体、3B8.11、10A6.7、2B5.5、6C10.5のすべてが、Rmaxを20%を超えて減少させた。3G8.1、6H5.4、および7F8.2はいずれも、Rmaxを20%未満減少させた。

【0200】

実施例15

関連するファミリーメンバーであるGPR48 (LGR4) およびLGR6に対するGPR49 mAbの交差反応性および特異性

方法：本発明で詳細に述べた抗GPR49抗体の関連するファミリーメンバー、GPR48 (LGR4) およびLGR6に対する特異性を特定するために、遺伝子組み換えGPR48、GPR49、およびLGR6を、哺乳類細胞 (HEK293T) 中にて独立して発現させた。これらの受容体を過剰発現する細胞への抗体の結合を、FACS (標準的方法) によって評価し、コントロールベクター (pV100) でトランスフェクトした細胞

10

20

30

40

50

と比較した。

【 0 2 0 1 】

結果：76C12抗体は、哺乳類細胞にて発現されたGPR48とは結合するが、LGR6とは結合しない。試験したその他の抗体のいずれも、GPR48またはLGR6と結合しない（表6）。

【 0 2 0 2 】

【表6】

表6

	ヒトGPR48 (LGR4)	ヒトLGR6
76C12	結合有り	結合無し
78F05	結合無し	結合無し
1B8.1	結合無し	結合無し
14E3.1	結合無し	結合無し
14A8.1	結合無し	結合無し
14F7.1	結合無し	結合無し
18G7.1	結合無し	結合無し
6H5.4	結合無し	結合無し
7C3.4	結合無し	結合無し
7F8.2	結合無し	結合無し
14H9.1	結合無し	結合無し
9C7.3	結合無し	結合無し
1B3.5	結合無し	結合無し

10

20

30

40

【 0 2 0 3 】

実施例16

完全ヒト抗GPR49抗体によるGPR49の内在化

方法；染色手順の48時間前に、Lovo結腸腫瘍細胞を、8ウェルチャンバースライド（ベクトンディキンソン（Becton Dickinson）1型コラーゲンコーティング培養スライド、BD BioCoat（商標）番号354630）へ、ウェルあたり50,000細胞にて播種した。細胞を、通常通りに20継代未満に維持した。染色処置の日に、培地を各ウェルから廃棄し、500uLの冷インキュベーションバッファー（MEMイーグルATCC番号30-2003+1%BSA）で置換した。細胞を、このバッファーにより、2回、各3分間洗浄した。次に、試験されるべき各mAb（76C12、78F05

50

、およびマウス 10A9 . 2) の 250 uL を、10 u g / m L の濃度にて適切なウェルに添加し、インキュベーション培地で希釈し、氷上にて 1 時間インキュベートした。ヒト抗ヒト I G F - 1 R 抗体をポジティブコントロールとして用いて、内在化の度合いを比較した。抗体 5 A 7 (抗 I d m A b) 、 I D E C 1 5 2 (抗 C D 2 3 I g G 1 m A b) 、および抗体無しをネガティブコントロールとして用いた。氷上での 4 5 分間のインキュベーションの後、時間ゼロ (t = 0 ') のスライドを、500 u L の冷洗浄バッファー (P B S + 1 % B S A + 2 % ヤギ血清) により、3 回、各 3 分間洗浄した (スライドは常に氷上に保持) 。次に、t = 0 スライドを、500 u L の 1 4 % パラホルムアルデヒド (1 6 % ストックから P B S で希釈 ; E M S 番号 1 5 7 1 0) により、室温にて 1 5 分間固定した。次に、t = 0 スライドを、再度、冷洗浄バッファーにより、3 回、各 3 分間洗浄し、続いて氷上に静置した。一方、残りのスライドについては、指定の時間点 (1 5 および 6 0 分) にて、37 のインキュベーターに入れた。そのインキュベーション時間の終了後、各スライドは、上記と同じ手順、洗浄および固定に従い、氷上に配置した。次に、すべてのスライドを、200 u L の冷透過バッファー (洗浄バッファー + 0 . 5 % T r i t o n - X) により、氷上にて 1 0 分間透過処理した。続いて、すべてのスライドを、500 m L の冷洗浄バッファーにより、3 回、各 3 分間洗浄した。ストックバイアルを 4 、 1 0 , 0 0 0 r p m にて 1 0 分間最初に回転させた後、二次抗体を、洗浄バッファー中にて 1 : 1 0 0 0 の希釈率で調製した (m A b に対しては、A l e x a F l u o r 4 8 8 ヤギ - 抗マウス I g G (H + L) 、モレキュラープローブ (Molecular Prob es) 番号 A 1 1 0 2 9 、および G 4 抗体に対しては、A l e x a F l u o r 4 8 8 ヤギ - 抗ヒト I g G (H + L) 、モレキュラープローブ 番号 A 1 1 0 1 3) 。希釈した二次抗体の 250 u L を各ウェルに添加し、室温、暗所 (覆うことによる) にて 4 0 分間インキュベートした。スライドを、再度 500 m L の冷洗浄バッファーにより、3 回洗浄した。最終洗浄時にバッファーを廃棄し、すべてのウェルを空にした。次に、提供された分解ツールを用いてスライドからチャンバーを分解し、D A P I 含有 V e c t a s h i e l d 封入剤 (mounting medium) (ベクター (Vector) 番号 H - 1 5 0 0 、H a r d S e t (商標)) を用いてカバースリップをのせた。スライドを、暗所、4 にて一晩保存して、封入剤を乾燥させた。L a s e r S h a r p 2 0 0 0 プログラム (バイオラッド v 5 . 2) を用いた共焦点顕微鏡によりスライドの写真を撮影し、それを、K a l m a n 1 0 の平均処理からの青色および緑色成分の合成像として表した。

10

20

30

【0204】

結果：76C12、78F05、および10A9 . 2 はすべて、60分以内という迅速なGPR49の内在化を示した。予想された通り、陽性コントロール、IGF1R C06は、IGF1R受容体の内在化を示したが、一方、アイソタイプマッチ陰性コントロール (マウス5A7、IDEC152 (霊長類化抗CD23抗体)) は、結合も内在化も起こさなかった。

【0205】

実施例 17

GPR49抗体はマウスGPR49と結合する

方法：本明細書で述べる抗GPR49抗体の特異性を特定するために、遺伝子組換えマウスGPR49を、哺乳類細胞 (H E K 2 9 3 T) 中で発現させた。受容体を過剰発現する細胞への抗体の結合を、FACS (標準的方法) で評価し、コントロールベクター (p V 1 0 0) でトランスフェクトした細胞と比較した。

40

【0206】

結果：76C12は、哺乳類細胞中で発現されたマウスGPR49と、高い親和性で結合する。複数のさらなるGPR49 mAbも、マウスGPR49と結合する (表7) 。

【0207】

【表 7】

表 7

	マウスGPR49 (Lgr5)
76C12	高
78F05	低
1B8.1	中
14E3.1	中
14A8.1	中
14F7.1	中
18G7.1	低
6H5.4	低
7C3.4	低
7F8.2	低
14H9.1	低
9C7.3	+／－
1B3.5	+／－

10

20

30

【0208】

実施例 18

抗GPR49 mAbのエピトープ分類

平衡結合アッセイを開発し、これを用いて、本発明で詳細に述べる一連のGPR49抗体における共通のエピトープ結合グループを特定した。GPR49への結合の交差ブロッキングを用いて、GPR49の特有の結合エピトープと結合する抗体のグループを明らかにした。

40

【0209】

方法：試験抗GPR49 mAbに対するGPR49-Fc結合活性を、バイオレイヤー干渉法に基づくアッセイにて、二次試験mAb（それ自体、または異なるmAb）と共にプレインキュベートしたGPR49-Fcのものと比較した。一次抗GPR49試験mAb（一次mAb）を、Thermo Scientific EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin（サーモサイティフィック（Thermo Scientific）、番号21425）により、製造元のプロトコルに従ってビオチン化した。ビオチン化一次mAb、GPR49-Fc、およびGPR49-Fcに二次試験抗GPR49 mAb（二

50

次 m A b) を添加したものはすべて、O B バッファー (P B S、p H 7.4、0.01 % (重量 / 体積) N a N 3、1 m g / m L B S A、0.02 % (v / v) T w e e n 20) で希釈した。O c t e t R e d S y s t e m (フォルテバイオ社、メンロパーク、カリフォルニア州) を用いて、ビオチン化一次 m A b を、ストレプトアビジン O c t e t チップ (フォルテバイオ社、メンロパーク、カリフォルニア州 : パーツ番号 18 - 5001) 上に捕捉した。チップを O B バッファーで洗浄し、O B バッファー中の G P R 49 - F c を含有するウェルへ移した。チップ上での G P R 49 - F c の一次 m A b への結合を、会合フェーズ (120 秒間) の間に、バイオ干渉シグナルとして飽和まで記録し、会合フェーズの最後の結合シグナル (R m a x) を、定常状態 / 平衡にて結合した断片の測定値として用いた。解離フェーズ (120 秒間) の間の結合も記録した。種々の m A b の互いに対する交差ブロッキング能を測定するために、第二の結合実験を実施し、ここでは、上記で概説した G P R 49 - F c を、5 倍モル過剰の二次試験 m A b (非ビオチン化) と共にプレインキュベートした。次に、ビオチン化一次 m A b でプレロードしたチップへこれを結合させて、R m a x ' を特定した。次に、R m a x ' プライムを R m a x と比較し、R m a x ' / R m a x のパーセントを算出して、チップ上に予め結合させた一次 m A b と結合する G P R 49 - F c の能力に対して二次 m A b が有するブロッキングの量を特定した。一次 m A b に対する二次の交差ブロッキング (R m a x ' / R m a x × 100) を、以下のように記録した : 0 ~ 25 % 完全交差ブロッキング、25 ~ 50 % 部分交差ブロッキング、50 ~ 75 % 低交差ブロッキング、75 ~ 100 % 交差ブロッキング無し。m A b はすべてそれ自体に対して試験し (一次および二次 m A b が同じ試験 m A b)、適正な分析を確保した。

10

20

【 0 2 1 0 】

結果 : 試験した抗 G P R 49 m A b において、6 つの別個のエピトープ結合グループが観察された。そのグループは : グループ 1 (76 C 12、1 B 3.5、6 B 10.2、4 F 6.2)、グループ 2 (18 G 7.1、14 A 8.1、5 B 10.1、14 F 7.1、11 F 6.1、14 E 3.1、1 B 8.1)、グループ 3 (5 F 2.5、6 B 10.2)、グループ 4 (3 F 11.1)、グループ 5 (10 A.2)、およびグループ 6 (6 E 10.1) である。m A b 自体による交差ブロッキングを表 8 および 9 に示す。

【 0 2 1 1 】

【表 8】

表 8

	18G7. 1	1B3. 5	76C12	14A8. 1	5B10. 1	14F7. 1	5D6. 3	5F2. 5
18G7. 1	11%	100%	100%	20%	28%	14%	62%	100%
1B3. 5	100%	4%	7%	100%	100%	100%	47%	100%
76C12	100%	4%	5%	100%	100%	100%	25%	100%
14A8. 1	5%	100%	100%	6%	9%	4%	99%	100%
5B10. 1	13%	100%	100%	16%	11%	14%	76%	100%
14F7. 1	7%	100%	100%	7%	11%	5%	100%	100%
5D6. 3	100%	96%	81%	100%	100%	100%	66%	97%
5F2. 5	100%	100%	100%	100%	100%	100%	79%	13%
11F6. 1	9%	100%	100%					93%
3F11. 1	78%	68%	100%					100%
14E3. 1	5%	88%	95%					83%
1B8. 1	6%	85%	96%					85%

10

20

【 0 2 1 2 】

30

【表 9】

表 9

	11F6.1	3F11.1	14E3.1	1B8.1	10A9.2	6B10.2	4F6.2	6E10.1
18G7.1								
1B3.5								
76C12					100%	4%	6%	100%
14A8.1								
5B10.1								
14F7.1								
5D6.3								
5F2.5					100%	8%	100%	100%
11F6.1	4%	99%	0%	1%	100%	100%	100%	100%
3F11.1	100%	5%	86%	75%	100%	100%	100%	100%
14E3.1	4%	87%	2%	0%				
1B8.1	5%	86%	2%	3%				

10

20

【0213】

30

実施例 19

GPR49 mAb、76C12の薬物動態特性

方法：GPR49抗体、76C12のマウスにおける薬物動態特性、およびCT1モデルでの76C12による次に行う予定である実験のための適切な投与スケジュールを特定するために、15または30mg/kgによる76C12の単一用量を、I.P.にてCRL SCIDベージュマウスに投与した。採血を、15分、30分、60分、2、6、24、および48時間、ならびに4、7、9、11、および14日後に行った。血清濃度をELISAで特定した。

【0214】

結果：76C12は、およそ4日間の半減期を示す(図12A~C)。

40

【0215】

実施例 20

原発性結腸癌モデルにおける原発性腫瘍成長の生体内阻害

方法：76C12 IgG1抗体の単一剤での生体内効力を、CT1(原発性結腸癌)細胞を用いた原発性結腸腫瘍異種移植モデル系で評価した。CT1は、結腸腫瘍患者サンプル由来の結腸腫瘍細胞株であり、これを用いて結腸癌幹細胞(腫瘍スフェア)株を樹立した。これは、患者原発性サンプルから最近得られた低継代(<10継代)であることから、「原発性」細胞株と見なされる。これは、確立された癌幹細胞条件下(血清フリー培地)、低結合プレート(low-attachment plates)(細胞は懸濁状態で成長)にて成長されることから、癌幹細胞株であると見なされる。雌のCRL SCIDベージュマウスに

50

、1000細胞を接種し、腫瘍成長のモニタリングを行った。治療開始時の平均腫瘍体積は、およそ130mm³であった。76C12 mAbを、30および15mg/kgにて、4週間にわたって週1回腹腔内(i.p.)投与した。76C12 mAbはまた、15および7.5mg/kgでの4週間にわたる週2回投与でも試験した。ネガティブコントロールとして、アイソタイプマッチ抗体、CE9.1(IgG1)を、15mg/kgにて、4週間にわたって週1回投与し、一方、イリノテカンを、15mpkにて、4週間にわたって週1回投与した。接種後の示したインターバルで腫瘍を摘出し、全腫瘍体積を測定した。

【0216】

結果：完全ヒト76C12抗体は、用量依存的様式にて腫瘍成長を阻害した(図13Aおよび13B)。抗体は、30mg/kgでの4週間にわたる週1回の投与にて、統計的に有意である単一剤効力を示した。

【0217】

実施例21

併用療法を用いた原発性腫瘍成長の生体内阻害

方法：76C12 IgG1抗体の単一剤での生体内効力を、CT1(原発性結腸癌)細胞を用いた原発性結腸腫瘍異種移植モデル系で評価した。雌のCRL SCIDページマウスに、1000細胞を接種し、腫瘍成長のモニタリングを行った。治療開始時の平均腫瘍体積は、およそ130mm³であった。76C12 mAbを、30および15mg/kgにて、4週間にわたって週2回、単一剤として、および治療の現行標準に従うイリノテカンの投与(すなわち、4週間にわたって7日間ごとに125mg/m²)と組み合わせて、腹腔内(i.p.)投与した。ネガティブコントロールとして、未処理、アイソタイプマッチ抗体 IDEC152(IgG1)、化学賦形剤コントロール、およびIDEC152プラスイリノテカン(組み合わせのコントロール)を、15mg/kgにて、4週間にわたって週1回投与し、一方、イリノテカンを、15mpkにて、4週間にわたって週1回投与した。接種後の示したインターバルで腫瘍を摘出し、全腫瘍体積を測定した。

【0218】

結果：抗GPR49 mAb、76C12抗体およびイリノテカンは、単一剤として(すなわち、単独で投与)、類似の効力を示した。イリノテカンと組み合わせると、30mg/kg(図14)および15mg/kgでの週2回スケジュールの76C12抗体は、単一剤処理と比較して、相加効力を示した。加えて、15mg/kgでの組み合わせも、相加効力を示した。

【0219】

実施例22

併用療法を用いた原発性腫瘍成長の生体内阻害

方法：実施例21からの方法。

【0220】

結果：GPR49抗体の処理の相加的有益性が、マウスの全生存について観察された(実施例21で述べる実験から)。GPR49抗体、76C12での処理により、体重減少が著しく低減され、悪液質性CT1モデルにて、動物生存率が50%増加した(図15)。加えて、抗GPR49 mAbによる処理が無毒性であることも観察されており(実施例16および18から、76C12は内在性マウスGPR49と交差反応し、結合する)；この知見およびGPR49 mAb処理マウスの生存率の増加は、癌をGPR49抗体で遮断することの高い可能性および安全性の両方を支持するものである。

【0221】

実施例23

併用療法を用いた腫瘍細胞株DL D-1の成長の生体内阻害

方法：76C12 IgG1抗体の単一剤での生体内効力を、結腸腫瘍異種移植モデルDL D-1で評価した。雌のCRL SCIDページマウスに、1000細胞を接種し

10

20

30

40

50

、腫瘍成長のモニタリングを行った。治療開始時の平均腫瘍体積は、およそ 130 mm^3 であった。76C12 mAb を、 15 mg/kg にて、4 週間にわたって週 2 回、単一剤として、および治療の現行標準に従うイリノテカンの投与と組み合わせて、腹腔内 (i.p.) 投与した。ネガティブコントロールとして、化学賦形剤コントロールおよび IDEC152 プラスイリノテカン (組み合わせのコントロール) を、 15 mg/kg にて、4 週間にわたって週 1 回投与した。接種後の示したインターバルで腫瘍を摘出し、全腫瘍体積を測定した。

【0222】

結果：76C12 抗体は、腫瘍成長の阻害を示した。イリノテカンとの組み合わせにより、効力の向上が観察された。(図 16A および 16B)

10

【0223】

実施例 24

抗 GPR49 抗体を用いたヒト癌の治療

この例は、GPR49 に対する抗体を用いて、GPR49 の発現が検出された癌幹細胞または腫瘍開始細胞を例とする悪性細胞を標的とすることにより、癌を治療するための方法について述べる。

【0224】

特定の実施形態では、本発明の抗 GPR49 抗体は、精製され、注射用の適切な医薬媒体と共に製剤される。過剰増殖性障害のヒト患者は、本発明の実施形態の完全ヒトまたはヒト化抗 GPR49 抗体の複数用量を、約 1 mg/kg 体重から約 100 mg/kg 体重にて、例えば、2 週間ごとに 1 回、または月 1 回、少なくとも 6 か月間にわたって、静脈内注入によって投与される。インターバルは、患者における予後指標を測定することによる指示に従って、不規則であってもよい。

20

【0225】

抗体は、標準的な放射線療法レジメンの前に、それと同時に、またはその後に投与される。患者のモニタリングを行い、治療の結果として、例えば腫瘍縮小、新たな腫瘍の発生率の低減、腫瘍抗原発現の低下、無予後生存率 (prognosis free survival) の改善、もしくは全生存期間の延長、または疾患予後を評価するその他の手段に基づく抗腫瘍応答が得られるかどうかを判断する。

【0226】

実施例 25

GPR49 抗体を用いた K-Ras、PI3K、PTEN、および p53 変異を有する原発性結腸癌腫瘍の生体内阻害

発明者らは、GPR49 抗体が、公知の癌治療法に対する耐性に繋がり得る特定の変異を有する結腸癌の阻害に生体内にて効果的であるかどうかを判断するための実験を行った。例えば、KRAS 変異を有する患者は、結腸直腸癌のパニツムマブ (Vectibix (登録商標)) およびセツキシマブ (Erbix (登録商標)) による治療法に対する応答が不良であり得る。従って、発明者らは、GPR49 抗体が、これらの公知の治療耐性マーカーを有する結腸癌に有用な治療を提供することができるかどうかを特定したいと考えた。

30

40

【0227】

方法：マウス抗体 14F7.1、18G7.1、5B10.1、14A8.1、1B3.5 の単一剤での生体内効力を、CT1 原発性異種移植細胞を用いた原発性結腸腫瘍異種移植モデル系で評価した。CT1 は、新しいCRC 患者腫瘍サンプルから樹立した原発性結腸直腸癌 (CRC) 生体内異種移植腫瘍である。腫瘍細胞の変異状態は、癌遺伝子変異を識別するための Ion Torrent (登録商標) (ライフテクノロジーズ (Life Technologies), カールスバッド, カリフォルニア州) ディープシーケンシングによって特定した。CT1 腫瘍のおよそ 5 ~ 15 % が GPR49 を発現する。雌の SCID ベージュマウスに、CT1 腫瘍細胞を接種し、腫瘍成長のモニタリングを行った。平均腫瘍体積が 175 mm^3 に達した時点で、マウスをランダムに 10 体のグループに分けた。抗体を

50

、15 mg / kg にて、4 週間にわたって週 2 回、腹腔内 (i . p .) 投与した。ネガティブコントロールとして、アイソタイプマッチ抗体 I g G 1 を、15 mg / kg にて、4 週間にわたって週 2 回投与した。腫瘍体積および体重を週 2 回測定した。

【0228】

結果：抗体は、コントロールと比較して、腫瘍成長を最大 40 % 阻害した (図 17 および 18)。抗体 14 F 7 および 18 G 7 は、最も高い腫瘍成長阻害を示した (それぞれ、40 % および 34 % の腫瘍阻害)。抗体による 34 % および 40 % の腫瘍成長阻害は、G P R 4 9 が腫瘍細胞のおよそ 5 ~ 15 % にしか発現されないことから、「特別に大きい」効果である。この特別に大きい効果は、G P R 4 9 陽性癌幹細胞の抗体による阻害が、生体内にて、増殖性腫瘍細胞の発生源を標的としていることを示唆している。

10

【0229】

実施例 26

化学療法剤イリノテカンと組み合わせた G P R 4 9 抗体による K - R a s、P I 3 K、P T E N、および p 5 3 変異を有する原発性結腸腫瘍の生体内阻害

発明者らはまた、公知の癌治療剤と組み合わせた G P R 4 9 抗体が、公知の癌治療法に対する耐性に繋がり得る特定の変異を有する結腸癌の阻害に生体内にて効果的であるかどうかを判断するための実験も行った。

【0230】

方法：マウス抗体 14 F 7 . 1、18 G 7 . 1、5 B 10 . 1、14 A 8 . 1、1 B 3 . 5 の単一剤での生体内効力を、C T 1 原発性異種移植細胞を用いた原発性結腸腫瘍異種移植モデル系で評価した。C T 1 は、新しい C R C 患者腫瘍サンプルから樹立した原発性結腸直腸癌 (C R C) 生体内異種移植腫瘍である。変異状態は、癌遺伝子変異を識別するためのイオントレントディーブシーケンシングによって特定した。C T 1 腫瘍のおよそ 5 ~ 15 % が G P R 4 9 を発現する。雌の S C I D ベージュマウスに、C T 1 腫瘍細胞を接種し、腫瘍成長のモニタリングを行った。平均腫瘍体積が 175 mm³ に達した時点の第 0 日に、マウスをランダムに 10 体のグループに分けた。化学療法剤イリノテカン、10 mg / kg にて、最初の 5 日間に 1 日 1 回 I P 投与した。抗体は、15 mg / kg にて、4 週間にわたって週 2 回、腹腔内 (i . p .) 投与した。接種後の示したインターバルで、全腫瘍体積について腫瘍を測定した。

20

【0231】

結果：イリノテカンと組み合わせた抗 G P R 4 9 抗体は、イリノテカン単独による 45 % の腫瘍阻害と比較して、57 % から 65 % にて腫瘍成長を阻害した (図 17、図 19)。G P R 4 9 抗体は、従って、特定の利用可能な治療法に対して耐性を有することが知られている結腸癌において、イリノテカンの抗腫瘍活性を 27 % から 44 % 向上させた。

30

【0232】

実施例 27

K - R a s、P I 3 K、P T E N、H - R a s、A P C、T P 5 3、F G F R 2、V A N G L 2、S T K 1 1、J A K 2、および R B 1 変異を有する原発性結腸癌腫瘍の生体内阻害

発明者らは、公知の癌治療法に対する耐性に繋がり得る特定の変異を有する結腸癌腫瘍の単一剤阻害剤として G P R 4 9 抗体が効果的であるかどうかを判断するための実験を行った。上記にて、発明者らは、公知の癌治療剤と組み合わせた G P R 4 9 抗体が効果的であることを特定した。本実験では、発明者らは、無治療コントロールと比較した、G P R 4 9 抗体による治療時の腫瘍成長の相対的阻害を特定した。

40

【0233】

方法：マウス抗体 18 G 7 . 1 および 7 C 3 . 4 の単一剤での生体内効力を、C T 3 (原発性結腸癌) 細胞を用いた原発性結腸腫瘍異種移植モデル系で評価した。C T 3 は、新しい C R C 患者腫瘍サンプルから得た原発性結腸腫瘍異種移植片であり、生体内にて低継代数 (p < 4) で維持される。変異状態は、癌遺伝子変異を識別するための I o n T o r r e n t ディープシーケンシングによって特定した。C T 3 腫瘍のおよそ 15 ~ 20 %

50

が G P R 4 9 を発現する。雌の C B 1 7 - S c i d マウスに、C T 3 細胞を接種し、腫瘍成長のモニタリングを行った。平均腫瘍体積が 130 mm^3 に達した時点にて（第 0 日）、マウスをランダムに 10 体のグループに分けた。次に、抗体を、 15 mg/kg にて、4 週間にわたって週 2 回、腹腔内（i.p.）投与した。ネガティブコントロールとして、アイソタイプマッチ抗体 I g G 1 を、 15 mg/kg にて、4 週間にわたって週 2 回投与した。腫瘍体積および体重を、実験完了まで週 2 回測定した。

【0234】

結果：抗体は、コントロール処理と比較して、腫瘍成長を最大 43% 阻害した（図 20）。この > 40% の腫瘍成長阻害は、G P R 4 9 抗体が C T 3 腫瘍細胞の 15 ~ 20% のサブ集団にしか結合しないことを考えると、「特別に大きい」効果である。この特別に大きい効果は、G P R 4 9 陽性癌幹細胞の抗体阻害が、生体内にて、増殖性腫瘍細胞の発生源を標的としていることを示唆している。

10

【0235】

実施例 28

G P R 4 9 m A b による処理は、K - R a s、P I 3 K、P T E N、および p 5 3 変異を有する原発性結腸腫瘍における生体内での癌幹細胞頻度を低減する

発明者らは、公知の癌治療法に対する耐性に繋がり得る特定の変異を有する結腸癌腫瘍由来の細胞において、G P R 4 9 抗体が癌幹細胞頻度に与える影響について分析する実験を行った。発明者らの観察によると、G P R 4 9 抗体 G P R 4 9 抗体は、結合する腫瘍細胞の比率と比較して「特別に大きい」ものである腫瘍成長に対する相対的な影響を示した。この実験は、特にこれらの抗体による癌幹細胞頻度に対する効果を特定するためのものであった。

20

【0236】

方法：実施例 1 および 2 で概説した生体内実験からの、コントロール、G P R 4 9 m A b、イリノテカン、およびイリノテカンと組み合わせた G P R 4 9 m A b による処理、ならびにコントロールのグループから単離した C T 1 腫瘍細胞を回収し、プールし、分離し、限界希釈二次移植アッセイ（limiting dilution secondary transplant assay）にて再移植し、癌幹細胞頻度を測定した。各処理グループについて、8 体のマウスに、30、100、および 300 細胞を移植した。腫瘍形成（すなわち、腫瘍生着）および成長率を、8 週間にわたり週 2 回のペースでモニタリングした。癌幹細胞の頻度を各処理グループで算出するために、P r i s m G r a p h P a d（商標）を用いた直線回帰解析を行い、各処理グループにおける癌幹細胞の頻度を算出した。このアッセイは、二次宿主中に新たな腫瘍を誘発し得る任意のいずれの腫瘍中における C S C クローンについても、その頻度を測定するものである機能的 C S C アッセイであることから、C S C を測定するための至適基準であると見なされる。このアッセイでは、測定されるべき C S C を含有する腫瘍を、限界希釈アッセイにて二次レシピエントへ連続的に移植した。従って、このアッセイは、いずれの幹細胞についても重要な構成要素である自己複製能力の機能的生体内測定である。これは、C S C の生体外測定に多くの場合用いられる依然として理解および特徴づけが不完全である細胞表面マーカー、または酵素アッセイには依存していない。

30

【0237】

結果：G P R 4 9 m A b およびイリノテカンと組み合わせた G P R 4 9 m A b で前処理した腫瘍からの腫瘍の再成長は、著しく阻害された（図 21）。G P R 4 9 m A b または G P R 4 9 m A b + イリノテカン前処理腫瘍を移植したマウスの 62% 超（5 / 8）は、移植後の 8 週間に腫瘍形成を示さなかった（すなわち、無腫瘍であった）。対照的に、コントロール処理腫瘍を移植したマウスのうち、移植後 8 週間で無腫瘍のままであったのは、僅かに 1 / 8（13%）であった。直線回帰解析により、G P R 4 9 抗体処理後の C S C の数は、コントロールと比較して、3 倍の減少が示された（図 21）。

40

【0238】

実施例 29

G P R 4 9 m A b による処理は、K - R a s、P I 3 K、P T E N、H - R a s、A P

50

C、TP53、FGFR2、VANG L2、STK11、JAK2、およびRB1変異を有する原発性結腸腫瘍における生体内での癌幹細胞頻度を低減する

発明者らは、公知の癌治療法に対する耐性に繋がるより多くの様々な変異を持つ癌細胞に対して、GPR49抗体が類似の影響を与えるかどうかを特定する実験を行った。上記の結果をさらに展開して、発明者らは、より数多くの変異を持つ癌細胞株における癌幹細胞頻度に対するこれらの抗体の効果を特定した。

【0239】

方法：実施例3で概説した生体内実験における処理およびコントロールグループからの、コントロール、GPR49 mAb、イリノテカン、およびGPR49 mAb + イリノテカンによる処理腫瘍から単離したCT3原発性腫瘍細胞を回収し、プールし、分離し、限界希釈二次移植アッセイにて再移植し、癌幹細胞頻度を測定した。各処理グループについて、8体のマウスに、10、30、および100細胞を移植した。腫瘍形成および成長率を、12週間にわたり週2回のペースでモニタリングした。癌幹細胞の頻度を各処理グループで算出するために、Prism Graph Padを用いた直線回帰解析を行い、各処理グループにおける癌幹細胞の頻度を算出した。このアッセイは、二次宿主中に新たな腫瘍を誘発し得る任意のいずれの腫瘍中におけるCSCクローンについても、その頻度を測定するものである機能的CSCアッセイであることから、CSCを測定するための至適基準であると見なされる。このアッセイでは、測定されるべきCSCを含有する腫瘍を、限界希釈アッセイにて二次レシピエントへ段階的に移植した。従って、このアッセイは、いずれの幹細胞についても重要な構成要素である自己複製能力の機能的生体内測定である。これは、CSCの生体外測定に多くの場合用いられる依然として理解および特徴づけが不完全である細胞表面マーカー、または酵素アッセイには依存していない。

【0240】

結果：GPR49 mAbでの処理により、CSCの頻度は、コントロールと比較して、5倍減少した(図22)。

【0241】

実施例30

化学療法剤イリノテカンと組み合わせたGPR49 mAbによる処理は、結腸腫瘍細胞が二次レシピエント中にて新たな腫瘍を形成することを阻止する

発明者らは、イリノテカンと組み合わせたGPR49 mAbによる結腸腫瘍異種移植の生体内処理により、結腸腫瘍細胞が二次レシピエント中にて新たな腫瘍を形成することが阻止されるかどうかを特定するための実験を行った。処理済み腫瘍細胞を移植した対象における新たな二次腫瘍の形成は、癌細胞集団における腫瘍幹細胞の頻度の測定の代わりとなるものである。発明者らは、GPR49抗体およびイリノテカンの組み合わせによる二次腫瘍形成に対する効果を、処理済み結腸腫瘍細胞を受けた対象において特定したいと考えた。

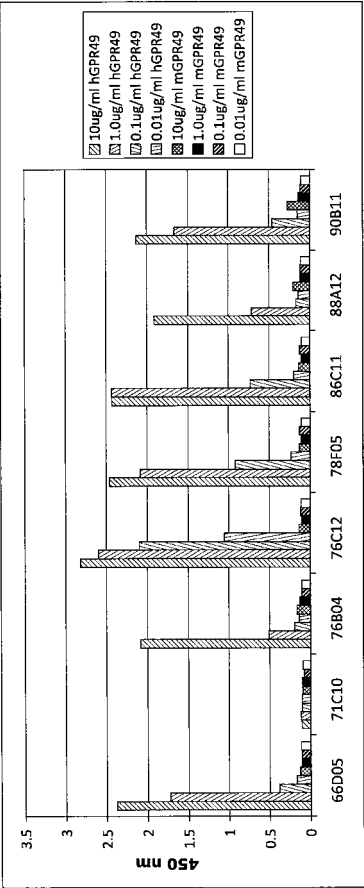
【0242】

方法：実施例3で概説した生体内実験からの、コントロールまたはGPR49 mAb + イリノテカン処理腫瘍から単離した腫瘍細胞を回収し、プールし、分離し、限界希釈二次移植アッセイにて再移植し、癌幹細胞頻度を分析した。各処理グループについて、8体のマウスに、10、30、100細胞を移植した。腫瘍形成を、12週間にわたり週2回のペースでモニタリングした。

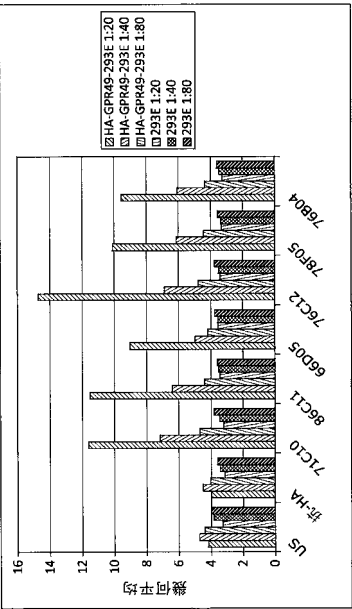
【0243】

結果：140日間の追跡の後、GPR49 mAb + イリノテカングループから腫瘍成長は観察されなかった(腫瘍を有するマウス 0/8)。対照的に、コントロールのイリノテカン処理を移植したマウスでは、5/8の動物が、平均サイズ1729 mm³の腫瘍を形成した(図23)。これは、GPR49抗体による処理が、腫瘍を根絶し(destemmed)、GPR49抗体での処理を停止した後でも、癌幹細胞が増殖を続ける能力を大きく低減したことを示すものであった。

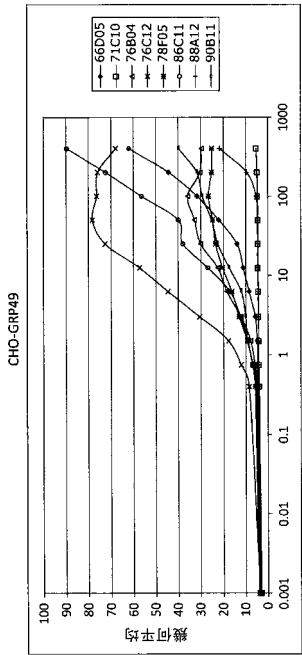
【図 1】



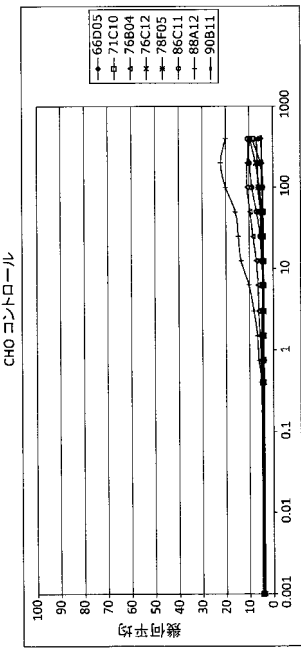
【図 2】



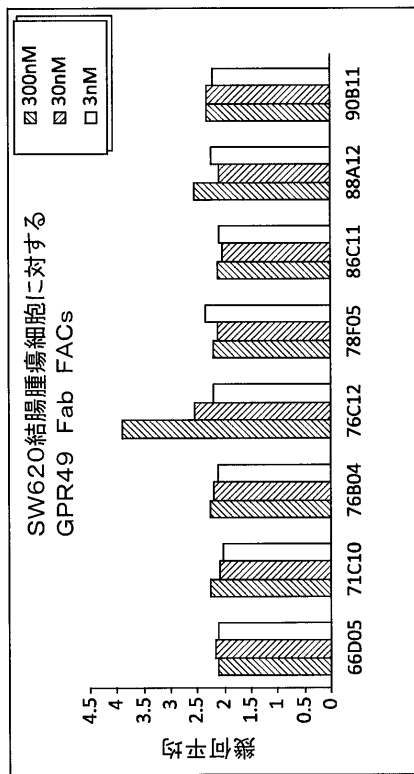
【図 3 A】



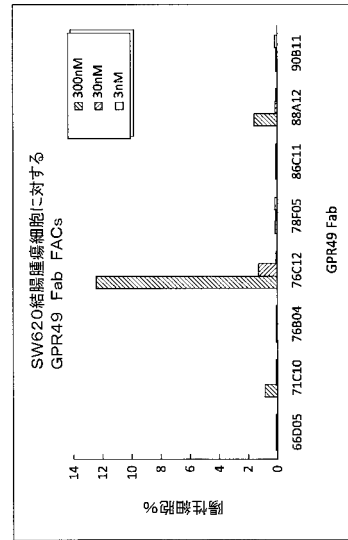
【図 3 B】



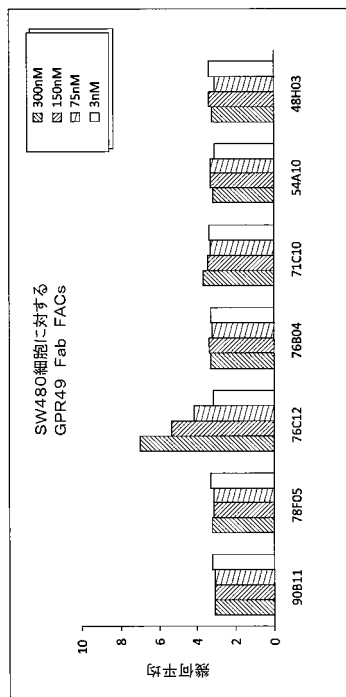
【図 4 A】



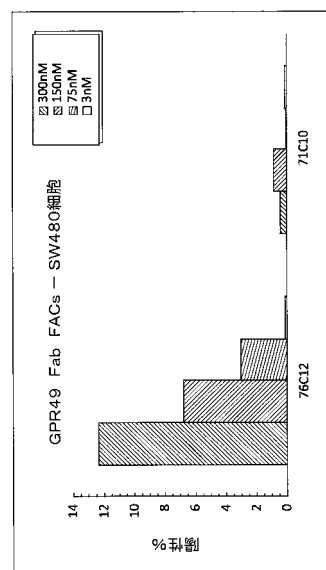
【図 4 B】



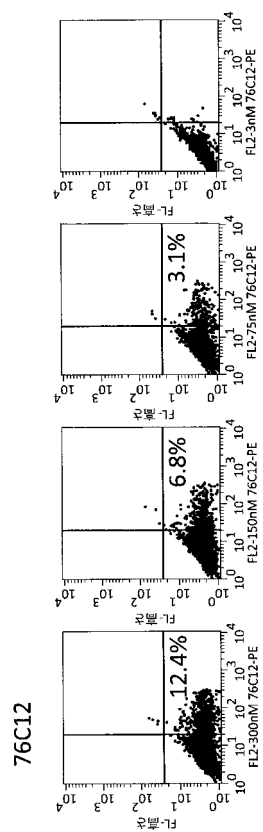
【図 5 A】



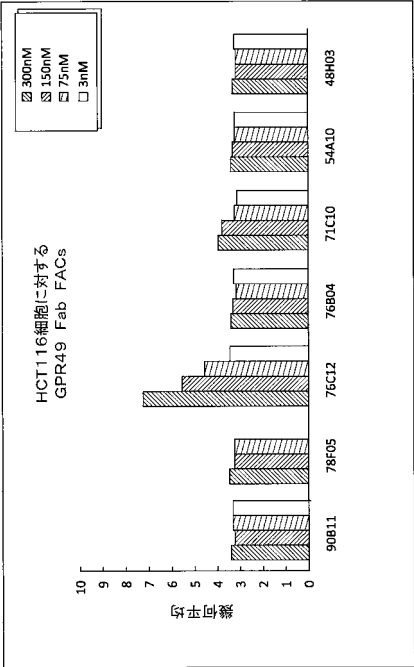
【図 5 B】



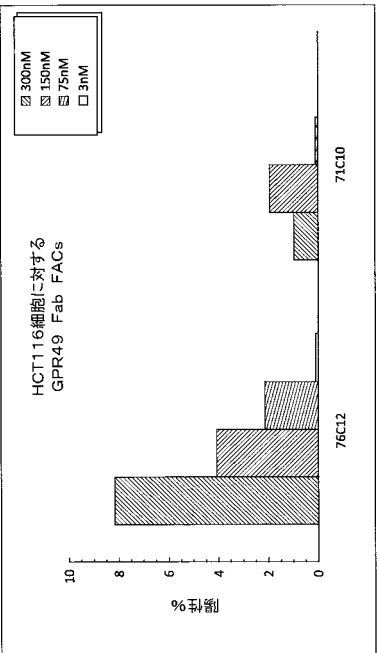
【図 5 C】



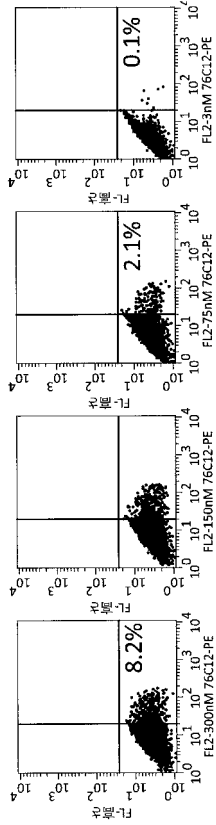
【図 6 A】



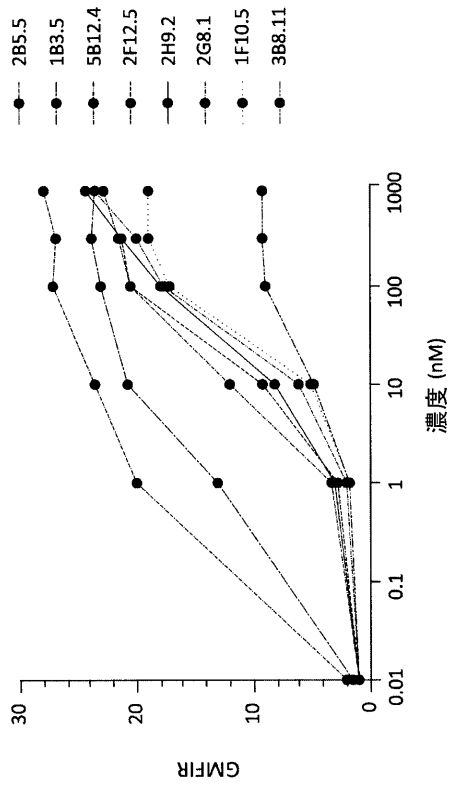
【図 6 B】



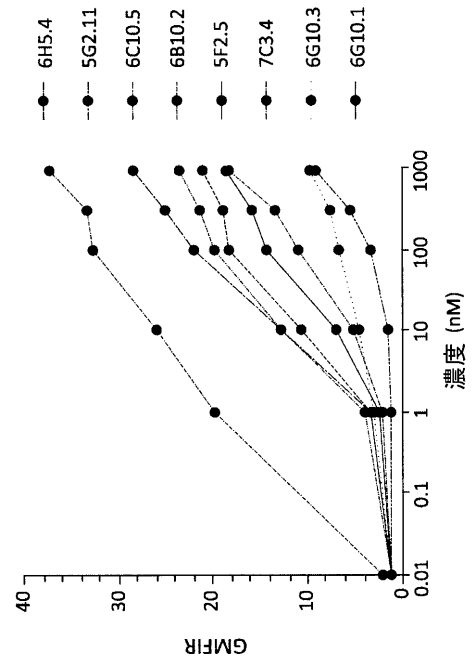
【図 6 C】



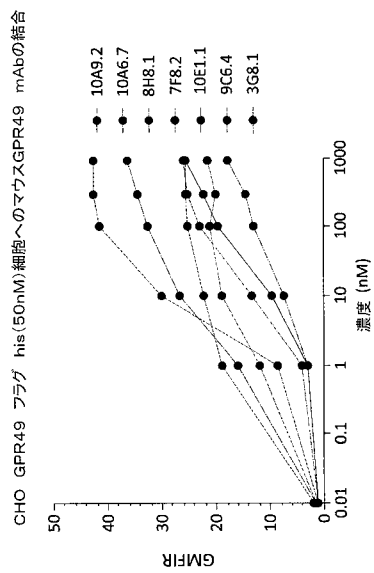
【図 7 A】



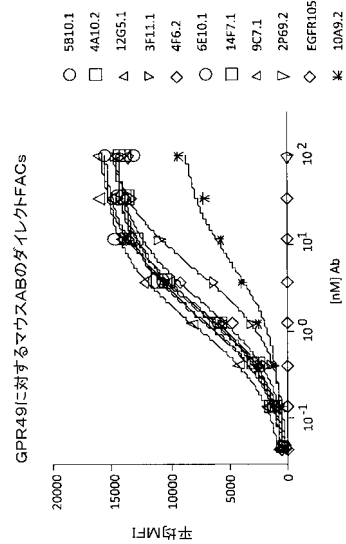
【図 7 B】



【図 7 C】



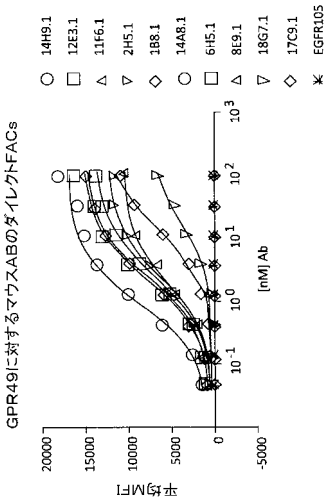
【図 8 A】



【 8 B 】

	5B10.1	4A10.2	12G5.1	3F11.1	4F6.2	6E10.1	14F7.1	9C7.1	2P69.2	EGFR105	10A9.2
EG50	1.941	1.716	1.210	1.750	2.206	1.322	1.476	2.205	5.116	0.2681	6.218

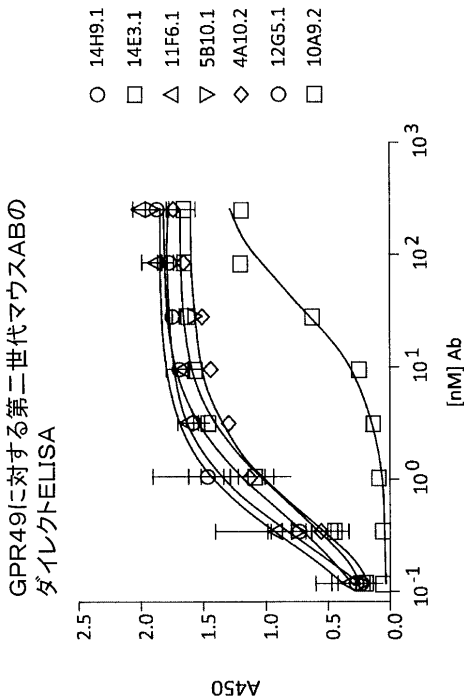
【 8 C 】



【 8 D 】

	14H9.1	12E3.1	11F6.1	2H5.1	188.1	14A8.1	6H5.1	8I9.1	18G7.1	17C9.1
EG50	0.9161	2.632	1.853	1.748	2.239	2.143	2.991	2.170	2.460	12.46

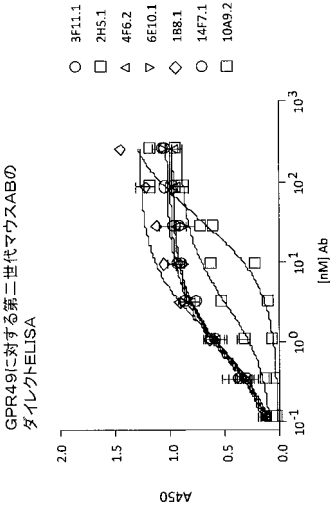
【 9 A 】



【 図 9 B 】

	14H9.1	14E3.1	11F6.1	5B10.1	4A10.2	12G5.1	10A9.2
EC50	0.5523	0.5587	0.2429	0.2737	0.5311	0.2565	35.22

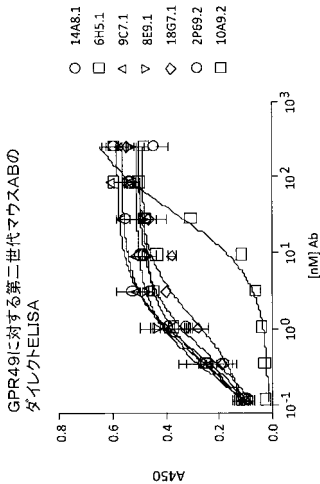
【 図 9 C 】



【 図 9 D 】

	3F11.1	2H5.1	4F6.2	6E10.1	188.1	14F7.1	10A9.2
EC50	0.8837	2.866	0.6506	0.6577	1.335	0.5695	35.22

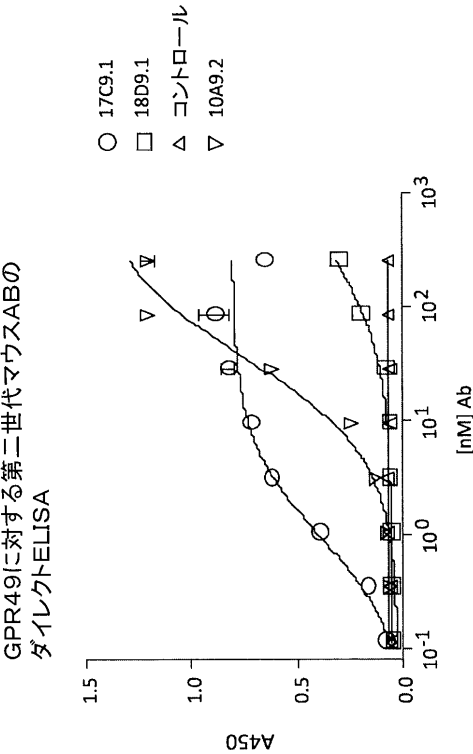
【 図 9 E 】



【 図 9 F 】

	14A8.1	6H5.1	9C7.1	8E9.1	18G7.1	2P69.2	10A9.2
EC50	0.3792	0.2844	0.4986	0.2036	1.352	0.4662	35.22

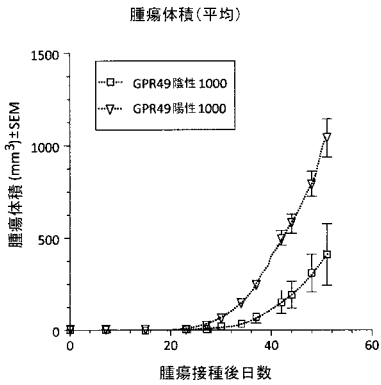
【 図 9 G 】



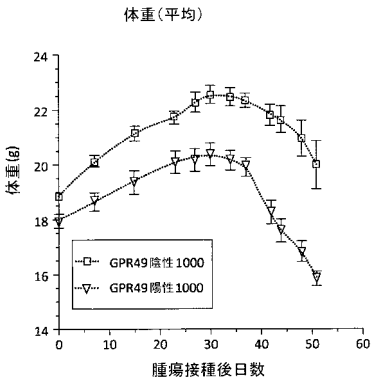
【 図 6 H 】

	17C9.1	18D9.1	Ctrl	10A9.2
EC50	0.9520	225.4	1579	35.22

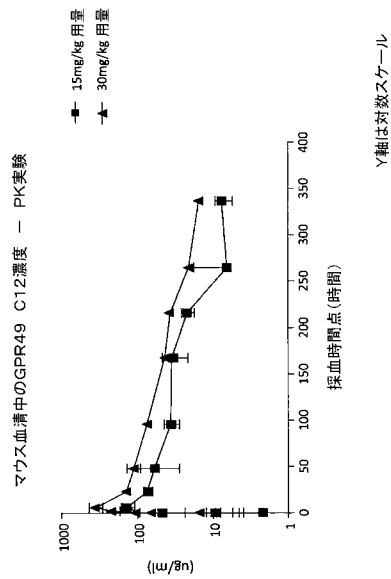
【 図 1 1 A 】



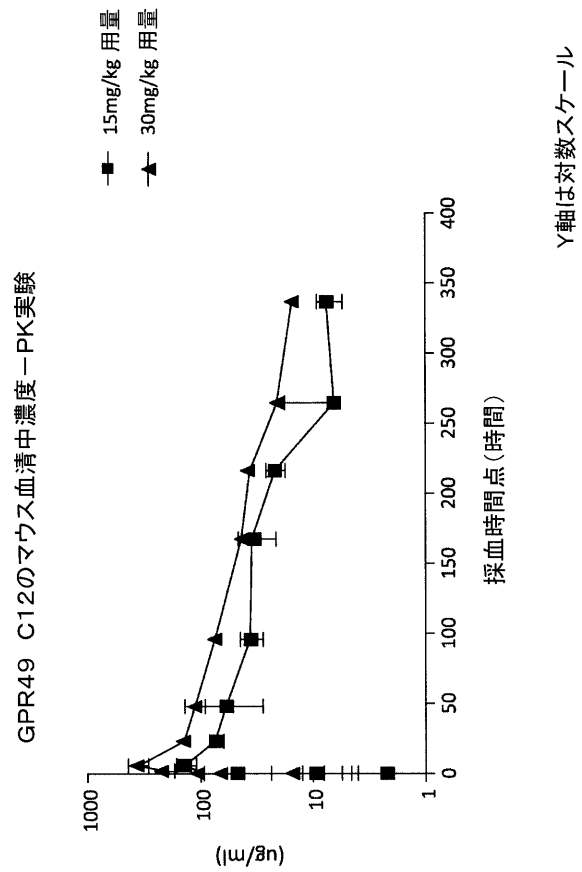
【 図 1 1 B 】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】

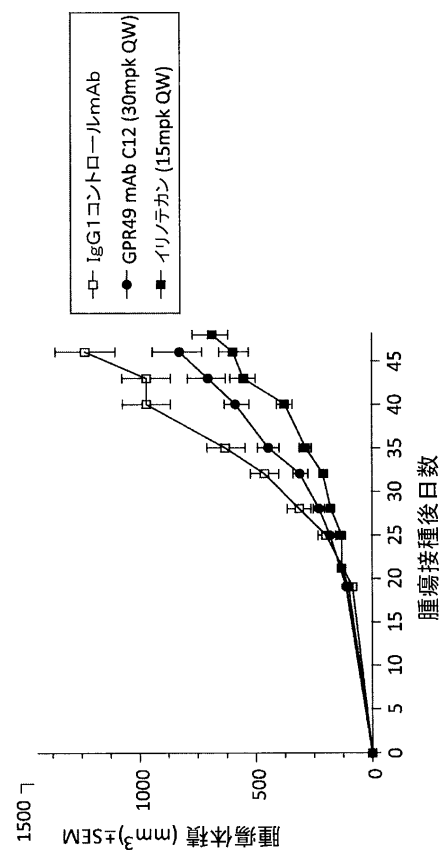


【図 1 2 C】

15または30mg/kgの単一IP投与後のSCIDヘージマウスにおける
GPR49(C12、IgG1)の薬物動態パラメータ

用量	T_{max} 時間	C_{max} -g/mL	$t_{1/2}$ 時間	AUC_{0-36hr} 時間*mg/L	AUC_{0-INF} 時間*mg/L	$AUC_{外推\%}$ %	CL/F mL/hr/kg	Vz/F mL/kg
15	6	135	90	11,310	12,276	8	1.24	162
30	6	359	104	21,853	24,162	10	1.25	187

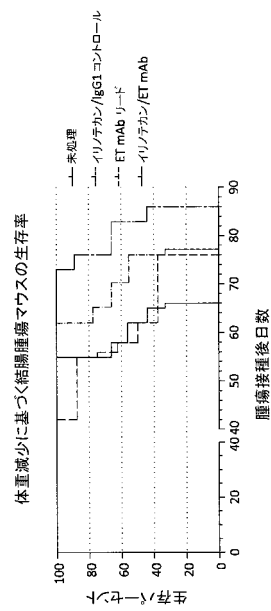
【図 1 3 A】



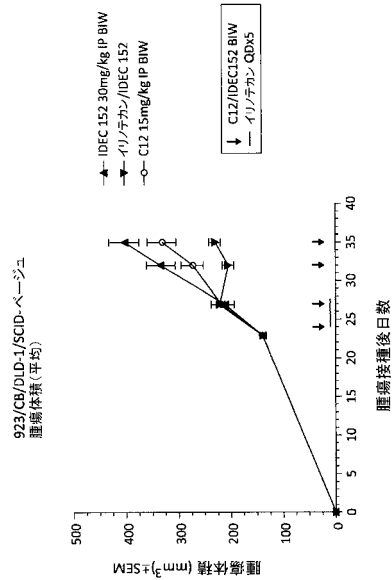
【 図 1 3 B 】

第62日におけるT／C値		
処理	p値	%T/C第62日
ET12 7.5mpk BIW	0.025	67
ET12 15mpk QW	0.188	81
ET12 15mpk BIW	0.008	61
ET12 30mpk QW	0.005	59

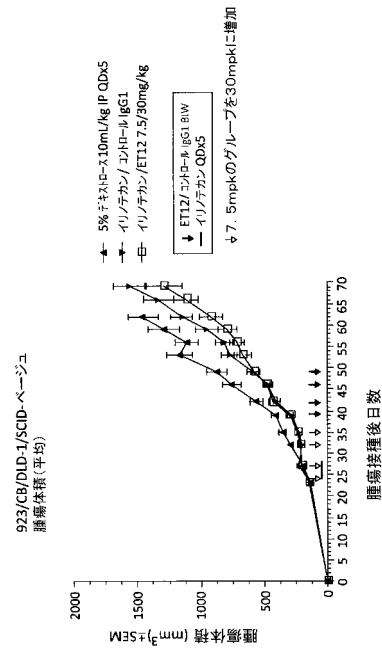
【 図 1 5 】



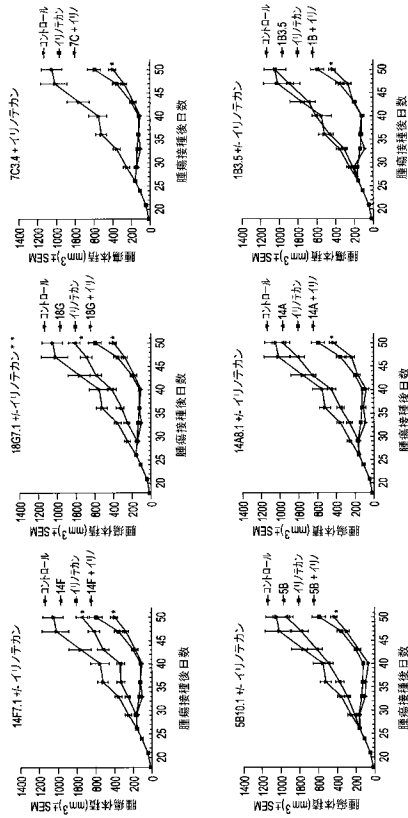
【 図 1 6 A 】



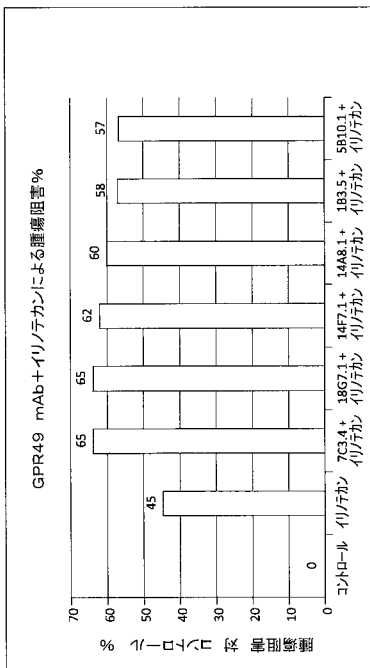
【 図 1 6 B 】



【図 17】

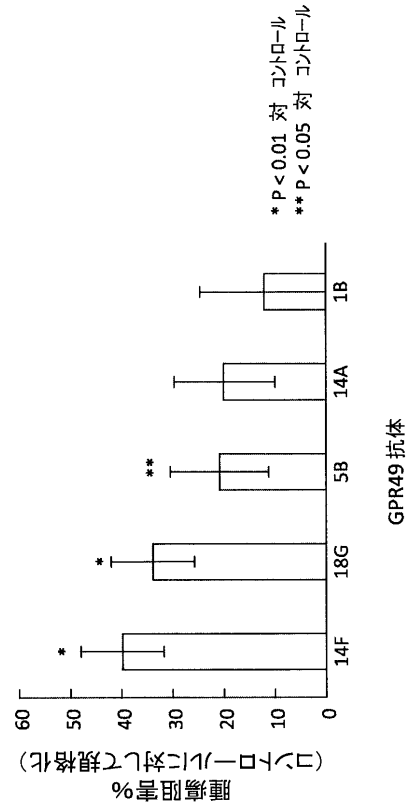


【図 19】

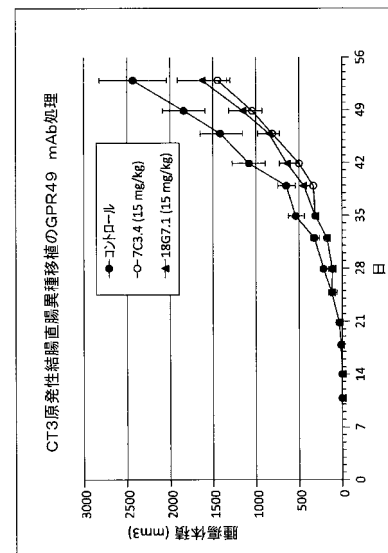


【図 18】

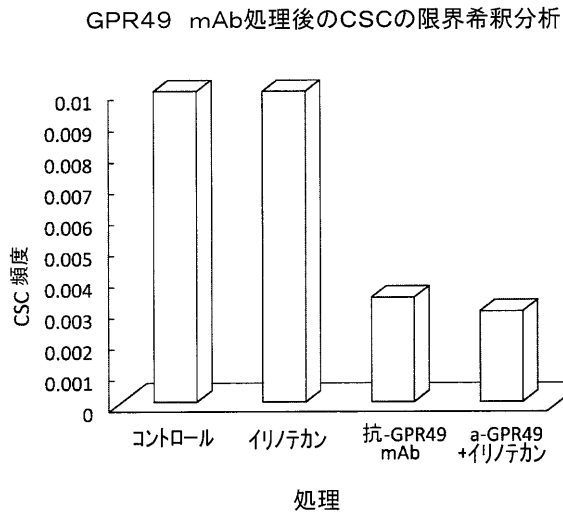
コントロール処理に対して標準化した腫瘍阻害%



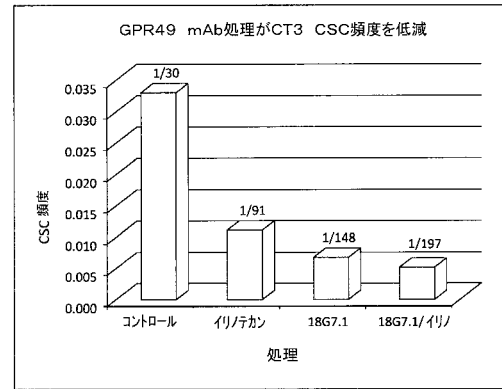
【図 20】



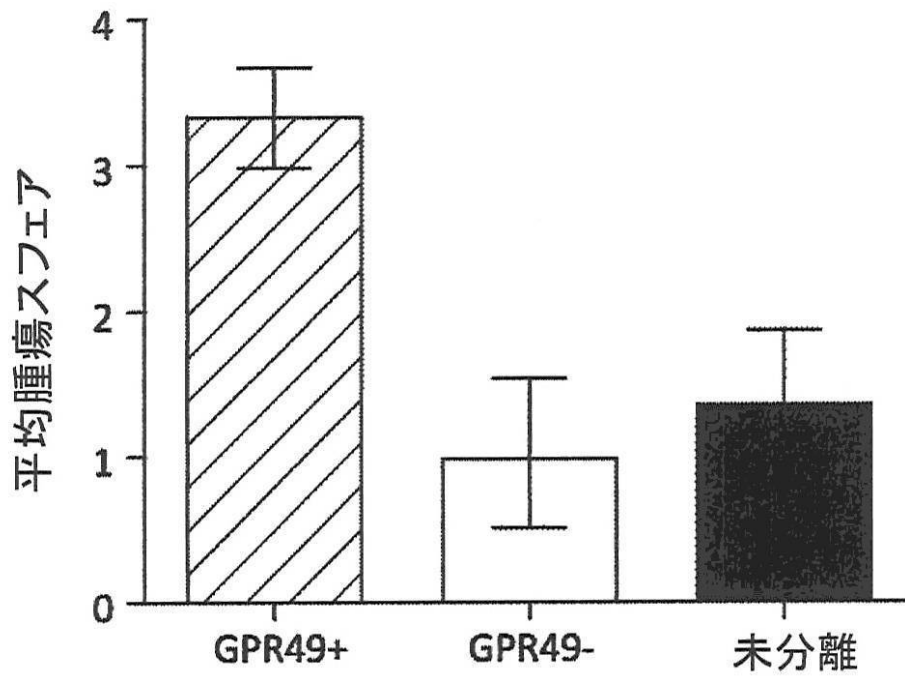
【図 2 1 A】



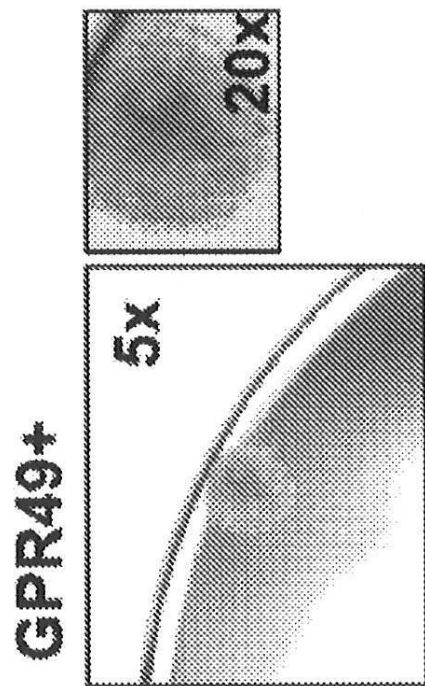
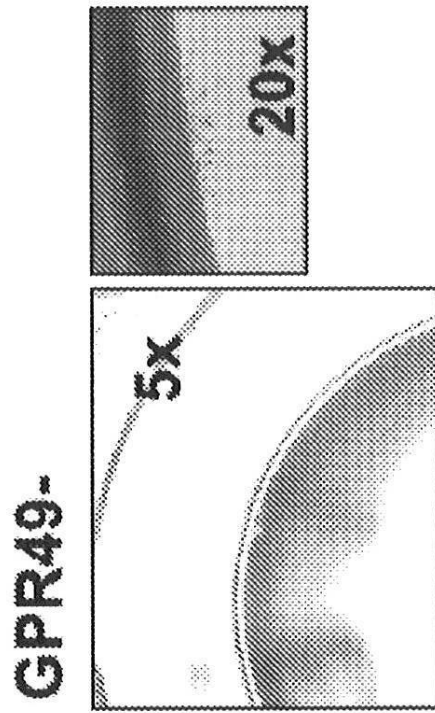
【図 2 2】



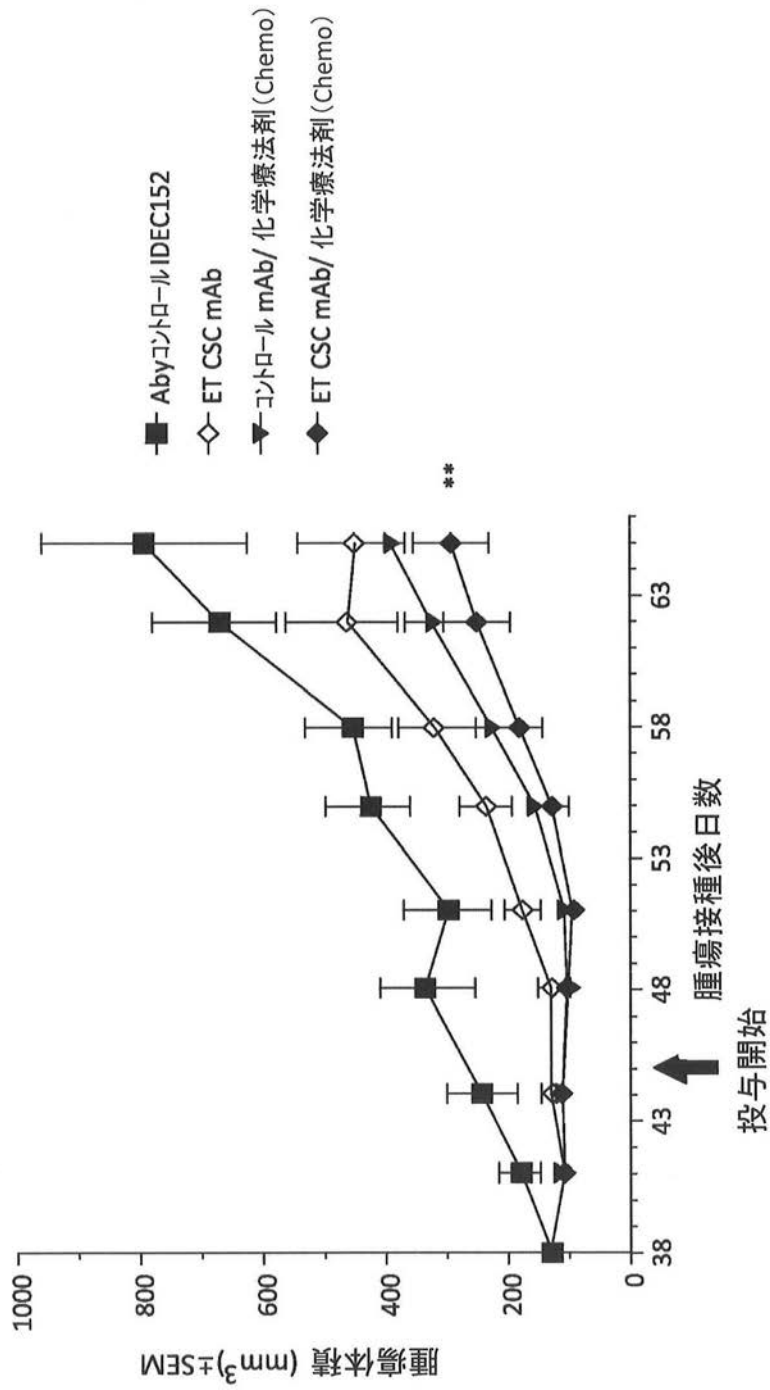
【図 1 0 A】



【図 10B】

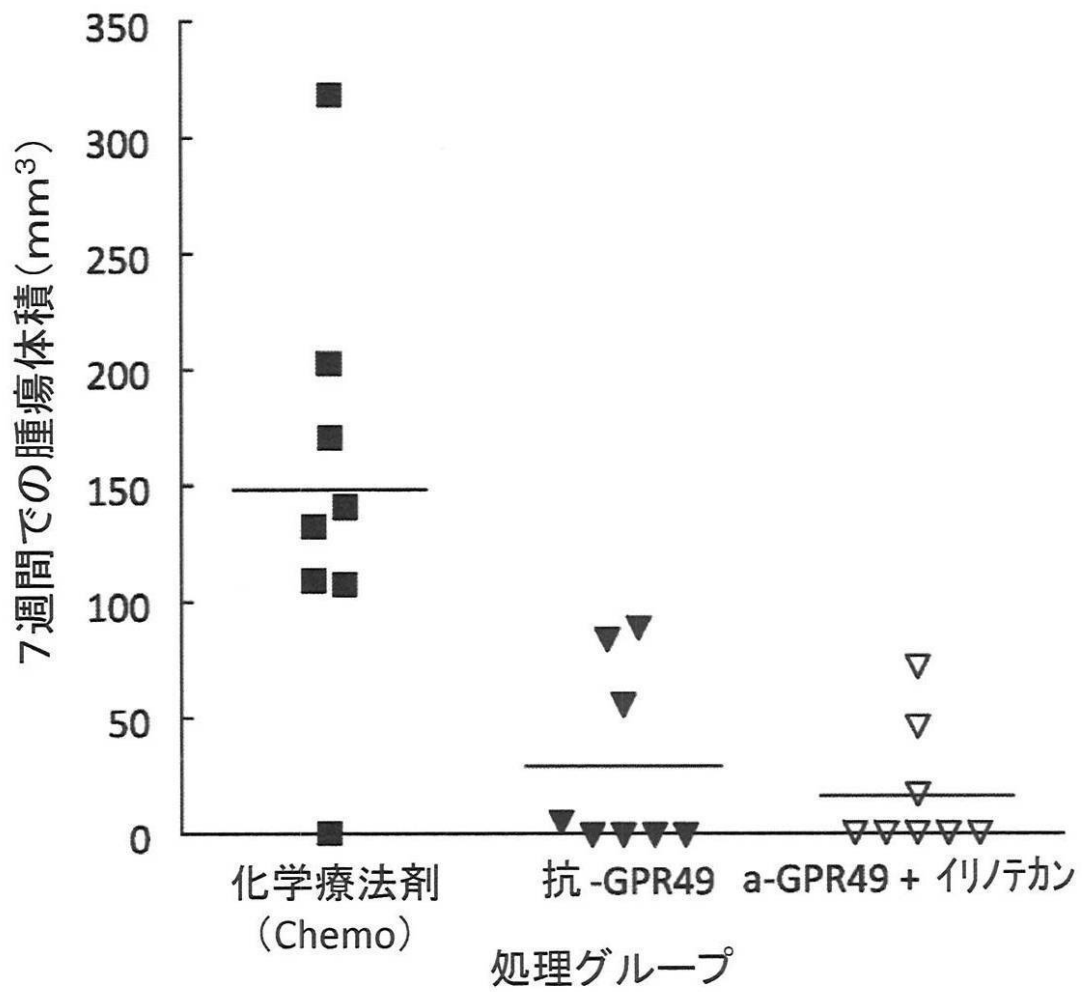


【図 14】



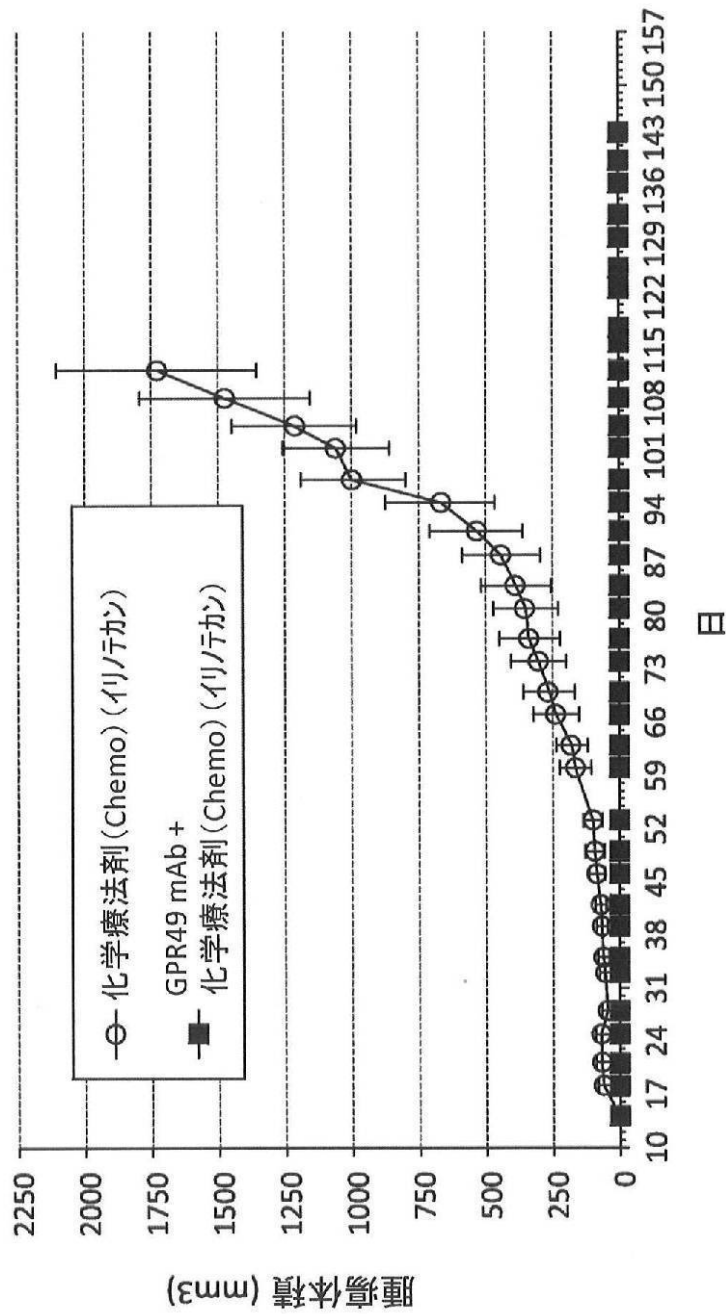
【図 2 1 B】

処理済腫瘍を移植された動物における結腸腫瘍形成



【図 23】

GPR49抗体処理がK-Ras変異結腸癌の再成長を阻止



【配列表】

2014533247000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/062861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 A61K39/395
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SASAKI Y ET AL: "Establishment of a novel monoclonal antibody against LGR5", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 394, no. 3, 9 April 2010 (2010-04-09), pages 498-502, XP002685669, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2010.02.166 [retrieved on 2010-03-01] the whole document ----- -/-	1-34, 36-38

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 2013

Date of mailing of the international search report

15/02/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bernhardt, Wiebke

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/062861

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/016766 A2 (KONINK NL AKADEMIE VAN WETENSC [NL]; KONINK NL AKADEMIE VAN WETENSC [N] 11 February 2010 (2010-02-11) the whole document in particular pages 4, 15, 20-21 examples, claims -----	1-38
A	WO 2009/005809 A2 (ONCOMED PHARM INC [US]; GURNEY AUSTIN [US]) 8 January 2009 (2009-01-08) the whole document -----	1-38
A	EP 2 216 344 A1 (FORERUNNER PHARMA RES CO LTD [JP]) 11 August 2010 (2010-08-11) the whole document -----	1-38
A	BARKER N ET AL: "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5", NATURE: INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 449, 25 October 2007 (2007-10-25), pages 1003-1008, XP002457164, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE06196 the whole document -----	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/062861

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010016766	A2	11-02-2010	NONE
WO 2009005809	A2	08-01-2009	AU 2008270972 A1 08-01-2009
		CA 2691378 A1 08-01-2009	
		EP 2173379 A2 14-04-2010	
		JP 2010532169 A 07-10-2010	
		US 2009074782 A1 19-03-2009	
		US 2009191205 A1 30-07-2009	
		WO 2009005809 A2 08-01-2009	
EP 2216344	A1	11-08-2010	AU 2008321840 A1 22-05-2009
		CA 2705509 A1 22-05-2009	
		CN 102112492 A 29-06-2011	
		EP 2216344 A1 11-08-2010	
		US 2011176995 A1 21-07-2011	
		WO 2009063970 A1 22-05-2009	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/062861

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☒ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 チュウ, ピーター
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 0 サン ディエゴ フォックスボロー ポイント
5 2 8 2

(72)発明者 タン, シャンヤン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 7 6 トウックスベリー カタマウント ロード 1
6 7

(72)発明者 ヤン, ウェイシェン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 6 5 ニュートン プレザント ストリート 5 7

(72)発明者 グラフ, クリスティリン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9 ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー
ナンバー 6 1 4 6 3 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA44 BA53 CA02 DA02 DA03 EA04 GA05 GA13
GA14 HA15
4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 CE12 DA05 DA14
4C085 AA14 BB01 BB31 BB36 CC23 EE01 GG01 GG08
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 EA28 EA51 FA72 FA74
GA26