

(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 1	テーマコード (参考)
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	T 4 B 02 4
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 06 4
C 07 K 16/28 (2006.01)	C 07 K 16/28	4 C 08 5
C 12 N 15/02 (2006.01)	C 12 N 15/00	C 4 H 04 5
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 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)	(71) 出願人	514110761 バイオノミクス インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成24年10月31日 (2012.10.31)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921 21 サン デイエゴ ソレント バリー ロード ナンバー 203 11575
(85) 翻訳文提出日	平成26年7月1日 (2014.7.1)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/062861	(74) 代理人	100126505 弁理士 佐貫 伸一
(87) 國際公開番号	W02013/067054	(74) 代理人	100131392 弁理士 丹羽 武司
(87) 國際公開日	平成25年5月10日 (2013.5.10)	(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 デイエゴ ケイブ ジュエル ズ トレイル 5750
(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)		

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。

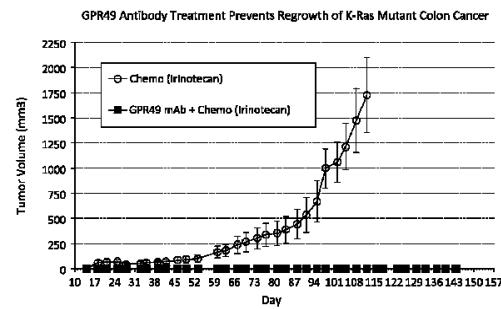


FIG. 23

**【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、

$10 \times 10^{-9}$  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 GPR49 ポリペプチドは配列番号 1 のアミノ酸配列を有し、

前記治療量は前記癌の治療に十分である、方法。

**【請求項 2】**

前記抗体が  $1 \times 10^{-9}$  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、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 IgG 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 IgG1 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、111F6.1、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產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、 $1 \times 10^{-12}$  M未満の  $K_d$  にて GPR49 ポリペプチドと結合する、請求項 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】**

哺乳類対象中の治療された癌腫瘍の再成長を阻止する方法であって、

10

20

30

40

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】**

$10 \times 10^{-9}$ M未満のK<sub>d</sub>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。

30

**【請求項23】**

前記抗体が $5 \times 10^{-9}$ M未満のK<sub>d</sub>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<sub>d</sub>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<sub>d</sub>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<sub>d</sub>にてGPR49と結合する、請求項18に記載の抗体。

40

**【請求項27】**

前記抗体が $10^{-12}$ M未満のK<sub>d</sub>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<sub>d</sub>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】**

50

前記抗体が、モノクローナル抗体 7 6 C 1 2、7 8 F 0 5、2 B 5 . 5、7 F 8 . 2、1 B 3 . 5、9 C 6 . 4、6 C 1 0 . 5、1 0 A 9 . 2、2 H 9 - 2、6 H 5 . 4、6 G 1 0 . 1、8 E 9 . 1、1 1 F 6 . 1、1 2 G 5 . 1、5 B 1 0 . 1、6 H 5 . 1、1 4 A 8 . 1、9 C 7 . 1、4 A 1 0 . 2、1 4 H 9 . 1、1 4 E 3 . 1、1 4 F 7 . 1、4 F 6 . 2、6 E 1 0 . 1、2 P 6 9 . 2、3 F 1 1 . 1、7 C 3 . 4、1 8 G 7 . 1、1 B 3 . 5、または 1 7 C 9 . 1 である、請求項 1 8 に記載の抗体。

**【請求項 3 0】**

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つ  
て產生されるモノクローナル抗体

を阻害する、請求項 1 8 に記載の抗体。

**【請求項 3 1】**

$1 \times 10^{-9}$  M 未満の K<sub>d</sub> にて G タンパク質共役受容体 4 9 ( G P R 4 9 ) ポリペプチ  
ドと結合し、前記 G P R 4 9 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 3 2】**

前記抗体が、7 8 F 0 5、5 D 6 . 3、1 B 3 . 5、1 4 A 8 . 1、7 6 C 1 2、1 8  
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 1 に記載のモノクロー  
ナル抗体。

**【請求項 3 3】**

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つ  
て產生されるモノクローナル抗体

を阻害する、請求項 3 1 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 3 4】**

前記モノクローナル抗体が、 $1 \times 10^{-12}$  M 未満の K<sub>d</sub> にて G P R 4 9 ポリペプチ  
ドと結合する、請求項 3 1 に記載のモノクローナル抗体。

**【請求項 3 5】**

$1 \times 10^{-9}$  M 未満の K<sub>d</sub> にて G タンパク質共役受容体 4 9 ( G P R 4 9 ) ポリペプチ  
ドと結合し、前記 G P R 4 9 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 3 6】**

前記抗体が、7 8 F 0 5、5 D 6 . 3、1 B 3 . 5、1 4 A 8 . 1、7 6 C 1 2、1 8

10

20

30

40

50

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35に記載のモノクローナル抗体。

#### 【請求項37】

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產生されるモノクローナル抗体

を阻害する、請求項35に記載のモノクローナル抗体。

#### 【請求項38】

前記モノクローナル抗体が、 $1 \times 10^{-12}$  M未満のK<sub>d</sub>にてGPR49ポリペプチドと結合する、請求項35に記載のモノクローナル抗体。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【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、その全内容が参考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日に出願された、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日に出願された、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、参考により本明細書に組み込まれる。

##### 【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、GPR49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、GPR49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。

##### 【背景技術】

##### 【0004】

Gタンパク質共役受容体49(GPR49)は、LGR5/HG38/FEX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(LGR)に属する。LGR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(TSH)受容体、卵胞刺激ホルモン(FSH)受容体、および黄体ホルモン(LH)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LGR7およびLGR8；ならびに(3)GPR48、GPR49、およびLGR6。GPR49は、腸、骨格筋、胎盤、脳、および脊髄を含むいくつかの組織中に発現される。しかし、GPR49の機能に関してはほとんど分かっていない。

## 【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、 $1 \times 10^{-9}$  M未満のK<sub>d</sub>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、 $1 \times 10^{-12}$  M未満のK<sub>d</sub>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。

20

## 【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產生されるモノクローナル抗体を、競合的に阻害する。

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GPR49Fab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GPR49Fab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、GPR49Fab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4B】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、GPR49Fab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5A】図5Aは、FACS幾何平均によって測定される、GPR49FabのSW480結腸腫瘍細胞との結合を示す棒グラフである。

【図5B】図5Bは、FACS陽性細胞パーセントによって測定される、GPR49FabのSW480結腸腫瘍細胞との結合を示す棒グラフである。

【図5C】図5Cは、SW480結腸腫瘍細胞との結合に用いられる76C12Fabの種々の濃度に対する一連のFACSヒストグラムである。 10

【図6A】図6Aは、FACS幾何平均によって測定される、GPR49FabのHCT116結腸腫瘍細胞との結合を示す棒グラフである。

【図6B】図6Bは、FACS陽性細胞パーセントによって測定される、GPR49FabのHCT116結腸腫瘍細胞との結合を示す棒グラフである。

【図6C】図6Cは、HCT116結腸腫瘍細胞との結合に用いられる76C12Fabの種々の濃度に対する一連のFACSヒストグラムである。 20

【図7A】図7A～Cは、FACsによる、マウスGPR49抗体のCHO GPR49-F1ag-His発現細胞との結合を示すグラフである。

【図7B】図7A～Cは、FACsによる、マウスGPR49抗体のCHO GPR49-F1ag-His発現細胞との結合を示すグラフである。 20

【図7C】図7A～Cは、FACsによる、マウスGPR49抗体のCHO GPR49-F1ag-His発現細胞との結合を示すグラフである。

【図8A】図8Aおよび8Cは、FACsによる、マウスGPR49抗体のCHO GPR49-F1ag-His発現細胞との結合を示すグラフである。図8Bおよび8Dは、それぞれ、図8Aおよび8Cの抗体のEC50を示す表である。

【図8B】図8Aおよび8Cは、FACsによる、マウスGPR49抗体のCHO GPR49-F1ag-His発現細胞との結合を示すグラフである。図8Bおよび8Dは、それぞれ、図8Aおよび8Cの抗体のEC50を示す表である。

【図8C】図8Aおよび8Cは、FACsによる、マウスGPR49抗体のCHO GPR49-F1ag-His発現細胞との結合を示すグラフである。図8Bおよび8Dは、それぞれ、図8Aおよび8Cの抗体のEC50を示す表である。 30

【図8D】図8Aおよび8Cは、FACsによる、マウスGPR49抗体のCHO GPR49-F1ag-His発現細胞との結合を示すグラフである。図8Bおよび8Dは、それぞれ、図8Aおよび8Cの抗体のEC50を示す表である。

【図9A】図9A、9C、9E、および9G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9B、9D、9F、および9Hは、それぞれ、図9A、9C、9E、および9Gの抗体のEC50を示す表である。

【図9B】図9A、9C、9E、および9G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9B、9D、9F、および9Hは、それぞれ、図9A、9C、9E、および9Gの抗体のEC50を示す表である。 40

【図9C】図9A、9C、9E、および9G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9B、9D、9F、および9Hは、それぞれ、図9A、9C、9E、および9Gの抗体のEC50を示す表である。

【図9D】図9A、9C、9E、および9G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9B、9D、9F、および9Hは、それぞれ、図9A、9C、9E、および9Gの抗体のEC50を示す表である。

【図9E】図9A、9C、9E、および9G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9B、9D、9F、および9Hは、それぞれ、図9A、9C、9E、および9Gの抗体のEC50を示す表である。

【図9F】図9A、9C、9E、および9G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GPR49との結合を示すグラフである。図9B、9D、9F、および9Hは、それぞれ、図9A、9C、9E、および9Gの抗体のEC50を示す表である。

【図9G】図9A、9C、9E、および9G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9B、9D、9F、および9Hは、それぞれ、図9A、9C、9E、および9Gの抗体のEC50を示す表である。

【図9H】図9A、9C、9E、および9G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9B、9D、9F、および9Hは、それぞれ、図9A、9C、9E、および9Gの抗体のEC50を示す表である。

【図10A】図10Aは、分離GPR49+、分離GPR49-、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10Bは、腫瘍スフェアアッセイにおけるGPR49+およびGPR49-の顕微鏡像である。  
10

【図10B】図10Aは、分離GPR49+、分離GPR49-、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10Bは、腫瘍スフェアアッセイにおけるGPR49+およびGPR49-の顕微鏡像である。

【図11A】図11は、GPR49+ MoF10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11A)および体重(図11B)を示すグラフである。

【図11B】図11は、GPR49+ MoF10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11A)および体重(図11B)を示すグラフである。

【図12A】図12Aは、マウスにおけるGPR49抗体76C12の経時での血清濃度を示すグラフである。図12Bは、マウスにおける、GPR49抗体76C12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12Cは、単一の腹腔内投与後のマウスにおける抗GPR49抗体C12 IgG1の薬物動態パラメータを示す表である。  
20

【図12B】図12Aは、マウスにおけるGPR49抗体76C12の経時での血清濃度を示すグラフである。図12Bは、マウスにおける、GPR49抗体76C12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12Cは、単一の腹腔内投与後のマウスにおける抗GPR49抗体C12 IgG1の薬物動態パラメータを示す表である。

【図12C】図12Aは、マウスにおけるGPR49抗体76C12の経時での血清濃度を示すグラフである。図12Bは、マウスにおける、GPR49抗体76C12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12Cは、単一の腹腔内投与後のマウスにおける抗GPR49抗体C12 IgG1の薬物動態パラメータを示す表である。  
30

【図13A】図13Aは、IgG1コントロールmAb、抗GPR49 mAb 76C12(C12)、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13Bは、第62日におけるT/C値を示すグラフである。  
。

【図13B】図13Aは、IgG1コントロールmAb、抗GPR49 mAb 76C12(C12)、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13Bは、第62日におけるT/C値を示すグラフである。  
40

【図14】図14は、IDE-C152コントロール抗体、76C12(ET CSC mAb)、化学賦形剤(chemo vehicle)を有するコントロールmAb、または化学賦形剤を有するET CSC mAb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15】図15は、未処理マウス、またはイリノテカンおよびIgG1コントロール、76C12(ET mAb)、もしくはイリノテカンおよび76C12(ET mAb)で処理したマウスの、経時での生存パーセントを示すカプラン・マイヤー曲線である。

【図16A】図16Aは、IDE-C152コントロール抗体、イリノテカンおよびIDE-C152コントロール抗体、または76C12(C12)抗体で処理したマウスにおける  
50

、経時での D L D - 1 結腸異種移植腫瘍成長を示すグラフである。

【図 16 B】図 16 B 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 Ig G 1 、またはイリノテカンおよび 76 C 12 ( E T 12 ) 抗体で処理したマウスにおける、経時での D L D - 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 - 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、G P R 4 9 m A b + イリノテカンの組み合わせで処理した K - R a s 、 P I 3 K 、 P T E N 、および p 5 3 変異を有する C R C 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 - 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モデルにおける腫瘍成長阻害を示すグラフである。

【図 21 A】図 21 A は、抗 G P R 4 9 抗体が、K - R a s 、 P I 3 K 、 P T E N 、および p 5 3 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 21 B】図 21 B は、抗 G P R 4 9 抗体による処理により、K - R a s 、 P I 3 K 、 P T E N 、および p 5 3 変異を有する C R C 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、G P R 4 9 m A b 18 G . 7 . 1 による処理によって、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 C R C 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。C S C 頻度は、示されるように既に処理された原発性 C R C 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 G P R 4 9 抗体 + イリノテカンの処理によって、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 C R C 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】

##### 【0 0 1 1】

本出願のいくつかの実施形態は、G P R 4 9 に対する抗体、およびそのような抗体による癌の治療に関する。種々の実施形態は、G P R 4 9 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。

##### 【0 0 1 2】

##### 抗 G P R 4 9 抗体

いくつかの実施形態は、抗 G P R 4 9 抗体に関する。本明細書で用いられる G P R 4 9 としては、これらに限定されないが、N C B I 寄託番号 N P \_ 0 0 3 6 5 8 . 1 ( 配列番号 1 ) のポリペプチドを含むヒト G P R 4 9 が挙げられ、これは、N M \_ 0 0 3 6 6 7 . 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。N C B I 寄託番号 N P \_ 0 0 3 6 5 8 . 1 のアミノ酸配列および N M \_ 0 0 3 6 6 7 . 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 G P R 4 9 断片の例としては、G P R 4 9 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。

##### 【0 0 1 3】

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 F v ( s c F v ) 、 F a b 断片、 F ( a b ' ) 断片、ジスルフィド結合 F v ( s d F v ) ( 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; Kostelný et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992) を参考されたい。  
10

#### 【 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 号を参考されたい。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。  
20  
30

#### 【 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 )に対して產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。  
40

#### 【 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 に対して產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  
50

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、カッパ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

10

20

30

40

50

、 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 つが挙げられる。

## 【 0 0 2 3 】

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 $K_d (k_{ff} / k_{on})$ にて G P R 4 9 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。 10

## 【 0 0 2 4 】

別の実施形態では、抗体は、 $1 \times 10^{-3}$  秒 $^{-1}$ 未満の $K_{ff}$ にて G P R 4 9 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、 $5 \times 10^{-3}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $10^{-4}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-4}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $10^{-5}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-5}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $10^{-6}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-6}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $10^{-7}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-7}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $10^{-8}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-8}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $10^{-9}$  秒 $^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-9}$  秒 $^{-1}$ 未満、または $10^{-10}$  秒 $^{-1}$ 未満の $K_{ff}$ にて G P R 4 9 およびその抗原性断片と結合する。 20

## 【 0 0 2 5 】

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 $5 \times 10^{-5}$  M・秒 $^{-1}$ 、少なくとも $10^{-6}$  M・秒 $^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{-6}$  M・秒 $^{-1}$ 、少なくとも $10^{-7}$  M・秒 $^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{-7}$  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 G P R 4 9 および / またはその抗原性断片と結合する。

## 【 0 0 2 6 】

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。 30

## 【 0 0 2 7 】

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。

## 【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態の抗体はまた、哺乳類(例:ヒト)中の半減期(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)中の抗体の半減期が延長されることにより、哺乳類中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関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WO 97/34631; WO 04/029207; 米国特許第6,737,056号および米国特許出願公開第2003/0190311号を参照されたく、以下でより詳細に考察する);これらの各自について、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。 40 50

**【 0 0 2 9 】**

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号；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。  
10  
20

**【 0 0 3 0 】**

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。

**【 0 0 3 1 】**

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。

**【 0 0 3 2 】**

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。  
30  
40

**【 0 0 3 3 】**

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ADC能を増加させることができ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  
50

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考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; PCT公開公報WO 03/035835; WO 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てよい。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考により本明細書に組み込まれるPCT公開公報WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; 米国特許第5,314,995号; およびEP 396,387を参照されたい。

10

#### 【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GPR49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。

20

#### 【0036】

いくつかの実施形態において、抗体は、NCBI寄託番号NP\_003658.1(配列番号1)のヒトGPR49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GPR49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。

30

#### 【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(align)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、その全内容が参考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、その全内容が参考により本明細書に組み込まれるSchaffer et al., Nucleic Acids Res

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 $V_L$ CDRおよび/または1つ以上の $V_H$ CDR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、 $V_H$ CDR、 $V_L$ ドメイン、および/または $V_L$ CDR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】

40

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、 $V_H$ CDR、 $V_L$ ドメイン、または $V_L$ CDR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

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P C R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<sub>H</sub>および／またはV<sub>L</sub> C D R誘導体は、元のV<sub>H</sub>および／またはV<sub>L</sub> C D R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<sub>H</sub>および／またはV<sub>L</sub> C D R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G P R 4 9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<sub>H</sub>および／またはV<sub>L</sub> C D R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

#### 【0041】

いくつかの実施形態はまた、G P R 4 9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。

20

#### 【0042】

種々の実施形態はさらに、G P R 4 9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つを含む本明細書で述べる抗体の1つ以上のC D R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C D R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、B L A S T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。

30

40

#### 【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

50

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変化をもたらす。電気的に中性であり、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	T r p、P h e、M e t、L e u、I l e、V a l、A l a、P r o
非電荷極性	G l y、S e r、T h r、A s n、G l n、T y r、C y s
酸性／負電荷	A s p、G l u
塩基性／正電荷	A r g、L y s、H i s
ベータ一分岐	T h r、V a l、I l e
鎖配向に影響する残基	G l y、P r o
芳香族	T r p、T y r、P h e、H i s

【 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產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、フ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

10

20

30

40

50

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vantが挙げられる。このようなアジュvant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單一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。10

#### 【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髄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。20

#### 【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髄腫細胞と融合し、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。30

#### 【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Fab'2断片は、パパイン(Fab断片の作製)またはペプシン(Fab'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。Fab'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。40

#### 【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50

って選択または識別を行うことができる。これらの方で用いられるファージは、通常、F<sub>a</sub>b、F<sub>v</sub>、またはジスルフィド安定化F<sub>v</sub>抗体ドメインがファージのgene I IIまたはgene V III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纖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PCT出願公開番号PCT/GB91/01134; PCT公開公報WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; WO95/20401; ならびに米国特許第5,698,426号; 同第5,223,409号; 同第5,403,484号; 同第5,580,717号; 同第5,427,908号; 同第5,750,753号; 同第5,821,047号; 同第5,571,698号; 同第5,427,908号; 同第5,516,637号; 同第5,780,225号; 同第5,658,727号; 同第5,733,743号、および同第5,969,108号に開示されるものが挙げられる。

#### 【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<sub>a</sub>b、F<sub>a</sub>b'、およびF(a b')<sub>2</sub>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PCT公開公報WO92/22324; 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ができる。

#### 【0054】

一本鎖F<sub>v</sub>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4,946,778号および同第5,258,498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5,807,715号; 同第4,816,567号; および同第4,816,397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(CDR)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CDRドナー抗体からの対応する残基と置換されて、抗原結合性が変更、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、CDR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5,585,089号; Riechman

10

20

30

30

40

50

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、その全内容が参考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)、およびチェインシャフリング (chain shuffling) (米国特許第5, 565, 332号) が挙げられ、これらの各々は、その全内容が参考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考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も参考されたい。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是、その全内容が参考により本明細書に組み込まれるLonberg and Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)を参考されたい。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考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0 598 877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, 814304050

, 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、1000kb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<sub>H</sub> 遺伝子、1つ以上のD<sub>H</sub> 遺伝子、1つ以上のJ<sub>H</sub> 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1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WO 92/03918、WO 92/22645、WO 92/22647、WO 92/22670、WO 93/12227、WO 94/00569、WO 94/25585、WO 96/14436、WO 97/13852、およびWO 98/24884、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、Tuailion et al., 1993、Choi et al., 1993、Lonberg et al., (1994)、Taylor et al., (1994)、およびTuailion 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 (Humanab) 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 Ig H 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)。

#### 【0061】

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)）。

#### 【0062】

さらに、今度はGPR49ポリペプチドに対する抗体を用いて、GPR49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）。

10

#### 【0063】

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。

20

#### 【0064】

ファージディスプレイ技術も、抗GPR49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PCR増幅v遺伝子のレパートリーからの、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、チェイ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）。

20

#### 【0065】

##### 抗体を作製する方法

30

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、特には、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。

#### 【0066】

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DNA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DNA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PCT公開公報WO86/05807；PCT公開公報WO89/01036；および米国特許

40

50

第5, 122, 464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。

#### 【0067】

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。

#### 【0068】

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產生、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:T1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7.5K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さ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5,827,739号、同第5,879,936号、同第5,981,216号、および同第5,658,759号も参照されたい。

#### 【0069】

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・アガローススピ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。pGEXベクターは、クローン化された標的遺伝子産物をGST部分から遊離させることができるように、トロンビンまたは第Xa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、スピドロテラフルギペルダ (*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E1またはE3）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、その全内容が参考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、ATG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要素、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（その全内容が参考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：グリコシリ化）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リ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、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、NS0、Per.C6、特には、例えば、BT483、HS578T、HTB2、BT20、およびT47Dなどの乳癌細胞株、ならびに例えば、CRL7030およびHS578Bstなどの正常乳腺細胞株が挙げられる。

30

#### 【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DNAおよび選択可能マーカーで形質転換されてよい。外来性DNA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

40

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チミジンキナーゼ (Wigler et al., Cell 11:223 (1977))、ヒポキサンチン - 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 - 418 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、その全内容が参考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考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 12 および 13 、Dracopoli 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、その全内容が参考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、抗体の產生も増加することになる (その全内容が参考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クレプトされてよい。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いてよい。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单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 (その全内容が参考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

10

20

20

30

40

50

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、精製を容易するために、ペプチドなどのマークー配列と融合されてもよい。特定の実施形態では、マークーアミノ酸配列は、中でも p Q E 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「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., 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 glycole (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 WO 93 / 15199、WO 93 / 15200、および WO 01 / 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、特には、

10

20

30

40

50

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、特には、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、リンカーパリエント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 93/21232; 欧州特許番号 E P 439, 095; Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99; 米国特許第 5, 474, 981 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

20

30

40

50

## 【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、F<sub>a</sub>b 断片、F<sub>d</sub> 断片、F<sub>v</sub> 断片、F(a b)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, 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; 欧州特許番号 E P 307, 434 および E P 367, 166; 国際公開番号 WO 96/04388 および WO 91/06570; 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。

30

40

50

## 【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变することができる(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, 605, 793 号; 同第 5, 811, 238 号; 同第 5, 830, 721 号; 同第 5, 834, 252 号; および同第 5, 837, 458 号、ならびに Patten et al., 1997, Curr. Opinion 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、エラープローン 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 / CLP 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。

## 【0085】

さらに、抗体またはその断片は、精製を容易するために、ペプチドなどのマークー配列と融合されてもよい。特定の実施形態では、マークーアミノ酸配列は、中でも、pQEベクター（キアゲン社，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., 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（flag）」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ます。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、ストレプトアビシン／ビオチンおよびアビシン／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ット、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、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>111</sup>In、または<sup>99</sup>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

## 【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<sup>213</sup>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、マイトイシン、エトポシド、テノポシド（tenoposide）、ビンクリスチン、ビンプラスチン、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tron、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（decarbazine））、アルキル化剤（例：メクロレタミン、チオエパ（thioepa30

) クロラムブシリ、メルファラン、カルムスチン( B S N U ) およびロムスチン( C C N U ) 、シクロトスファミド( cyclothosphamide ) 、ブスルファン、ジブロモマンニトル、ストレプトゾトシン、マイトイシンC、ならびにシス - ジクロロジアミン白金( I I ) ( D D P ) 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( A M C ) ) 、ならびに、有糸分裂阻害剤( 例 : ビンクリスチンおよびビンプラスチン ) 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 P C T 公開公報 W O 0 3 / 0 7 5 9 5 7 に見出すことができる。

## 【 0 0 8 8 】

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。

## 【 0 0 8 9 】

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。

## 【 0 0 9 0 】

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" ; Hellstrom 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. 475-50 6 (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。

## 【 0 0 9 1 】

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 , 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； E P 3 0 7 , 4 3 4 ； E P 3 6 7 , 1 6 6 ； P C T 公開公報 W O 9 6 / 0 4 3 8 8 および W O 9 1 / 0 6 5 7 0 ； 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モノマーは、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 , 6 7 6 , 9 8 0 号にて Segall 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。

10

20

30

40

50

## 【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。

10

## 【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。

20

## 【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1μg/kg、50μg/kg、100μg/kg、150μg/kg、200μg/kg、250μg/kg、300μg/kg、350μg/kg、400μg/kg、500μg/kg、550μg/kg、600μg/kg、700μg/kg、800μg/kg、900μg/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、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

30

40

50

. 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 10  
 、 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 20  
 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 30  
 、 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 】

## 投与および医薬形態

抗 G P R 4 9 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 G P R 4 9 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、薬理学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。

### 【 0 0 9 9 】

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、ボーラスであてよく、または連続注入であってもよい。抗 G P R 4 9 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、または薬理学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

### 【 0 1 0 0 】

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学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单糖、二糖、およびその他の糖類；E D T A 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 T W E E N、ポリエチレングリコール（P E G）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

20

### 【 0 1 0 1 】

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 つの薬理学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

### 【 0 1 0 2 】

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ールを有する、薬理学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

### 【 0 1 0 3 】

抗 G P R 4 9 抗体はまた、非経口投与されてもよい。「非経口投与」とおよび「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、囊内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、囊下、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、または薬理学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、リングル液、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。

30

#### 【0107】

アルキル化剤としては、これらに限定されないが、ナイトロジエンマスター 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、ミトプロニトール、カルボコン、チオテバ、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、ベンダムスチン、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、シスプラチニン、カルボプラチニン、エプタプラチニン、ロバプラチニン、ネダプラチニン、オキサリプラチニン、またはサトルプラチニン (satrplatin) 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-メルカプトブリン リボシド、メルカプトブリン、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、エフロールニチニン、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、トリメトレキセート、ビダラビン、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：アクラルビシン、アクチノマイシンD、アムルビシン、アナマイシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エル

50

サミトルシン、エピルビシン、ガラルビシン、イダルビシン、マイトイシンC、メモルビシン (memorubicin)、ネオカルチノスタチン、ペプロマイシン、ピラルビシン、レベッカマイシン、スチマラマー、スルテプトゾシン (srteptozocin)、バルルビシン、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、またはビカルタミド、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)プロピオニアリド)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、ビンプラスチン、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、アクラルビシン、アモナフィド、ベロテカン、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、エピルビシン、エトポシド、エキサテカン、ギマテカン、ルロテカン、ミトキサントロン、ピラルビシン、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、およびトポテカン、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-n 1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 (teclerukin)、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、ペガスパルガーゼ、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

【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、ゾレドロン酸、アンジオスタチン、アブリジン、シレンギチド (cilengtide)、コンブレタスタチン、A-4、エンドスタチン、ハロフジノン、レビマstatt、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。

40

50

## 【0117】

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】

## 【0118】

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

## 【0119】

## 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。

## 【0120】

## 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、 $3.5 \times 10^{10}$  のユニーククローンを含有するヒトナイープファージミド 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. Nat Biotechnol 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、479 bp の gene III スタンプ部を M l u 1 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

## 【0121】

結果：このパニングにより、61 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

## 【0122】

## 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、0.025 M 炭酸塩バッファー中の 2.5 ug / mL の可溶性 G P R 4 9 - F c 融合タンパク質を、96 ウェルプレート (IMMULON 2 HB、ダイネックステクノロジーズ社 (Dynex Technologies, Inc.) 、カタログ番号 3455) に 50 uL / ウェルにてコーティングし、4 にて一晩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 9240) 、p H 7.4、プラス 0.025 % Tween 20 により、Sk an Washer 300 (スカトロンインスツルメンツ (Skatron Instruments) ) で洗浄し、1 % 脱脂乳、0.05 % Tween 20 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 0.025 % Tween 20 を添加したものにより、Sk an Washer 300 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、0.05 % Tween 20 にて 50 uL / 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 0.025 % Tween 20 を添加したものにより、Sk an Washer 300 で洗浄した。P B S 中の 1 % 脱脂乳、0.05 % Tween 20 にて 2000 倍に希釈したヤギ抗ヒトカッパ - H R P (サザンバイオテック (Southern B 40

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、Skan 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 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (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、SOFTMAX 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 I II : 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 EC<sub>50</sub> < 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 I V : 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-EPS 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、BIAevalution 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<sub>D</sub> にて結合した。76B04 の F<sub>ab</sub> は、弱い結合を示した。

### 【0128】

#### 実施例 2

##### 完全長抗 G P R 4 9 I g G の構築

方法：3つの F<sub>ab</sub> をヒト I g G 1 に変換し、C H O 細胞中にて発現させた。3つの別々の抗 G P R 4 9 F<sub>ab</sub> である、76C12、78F05、および76B04 をコードする D N A 配列を、遺伝子組換えヒト G P R 4 9 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 F<sub>ab</sub> 遺伝子配列を用い、哺乳類細胞中での抗体産生のための p V 9 0 A S 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。p V 9 0 A S 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 p V 9 0 発現ベクターである（参考文献：米国特許商標庁出願 WO 2 0 0 5 / 0 8 9 2 8 5）。天然 C M V 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 C M V 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（V L）および定常（C L）領域を、P C R で増幅した。5' 軽鎖 P C R 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、S f i 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 M D M R V P A Q L L G L L L W L P G A R C（配列番号5）を、V L 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。P C R 産物は、アガロースゲル電気泳動、および Q I A q u i c k G e l E x t r a t i o n 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 S f i I および A s c I で消化し、S f i I / A s c I 消化 p H L P 0 2 5 ベクター（ホリープレンティス（Holly Prentice））と連結した。p H L P 0 2 5 ベクターは、天然の C M V スプライスドナー部位配列に加えて、S f i I / A s c I 消化 P C R 断片として抗体軽鎖（シグナルペプチド - V L - C L）を受けるための S f i I / A s c 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 WO 2 0 0 5 / 0 8 9 2 8 5）。

### 【0129】

各抗 G P R 4 9 F<sub>ab</sub> (76C12、78F05、76B04) の重鎖可変（V H）領域を、P C R で増幅した。5' 重鎖 V H P C R には、上述のように、N c o 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 M G W S L I L L F L V A V A T R V L S（配列番号6）を、V H 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 V H P C R プライマーには、V H 領域のカルボキシル末端に対応する配列および S f i I 部位を含有させた。P C R 産物は、アガロースゲル電気泳動、および Q I A q u i c k G e l E x t r a t i o n 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 N c o I および S f i I で消化し、N c o I / S f i I 消化 p H L P 0 2 9 ベクター（ホリープレンティス）と連結した。p H L P 0 2 9 ベクターは、上流のポリ A シグナル配列、天然の C M V 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、N c o I / S f i I 消化 P C R 断片として抗体シグナルペプチド - V H 配列を受けるための N c o I / S f i I 部位を含有している（参考文献：米国特許商標庁出願 WO 2 0 0 5 / 0 8 9 2 8 5）。

### 【0130】

p H L P 0 2 5 中の (S f i I 部位 - 軽鎖シグナルペプチド - 抗 G P R 4 9 V L および C L)、および p H L P 0 2 9 中の (重鎖シグナルペプチド - 抗 G P R 4 9 V H - S f i 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 V H P C

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、P C R増幅により集合させて、単一のD N A断片を構築した。得られたP C R産物は、アガロースゲル電気泳動、およびQ I A q u i c k G e l E x t r a t i o n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S f i Iで消化し、D r a I I I消化I g G 1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m R N A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。D N A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I g G 1抗体の產生が得られた。

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G P R 4 9 I g G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G P R 4 9 F a b、7 6 C 1 2、7 8 F 0 5、7 6 B 0 4、からの元のV H遺伝子配列の修飾を行った。

#### 【0133】

方法：第一に、抗G P R 4 9 V H配列を、公開配列認識プログラム（[www.tigr.org/t\\_db/GeneSplicer/gene\\_spl.html](http://www.tigr.org/t_db/GeneSplicer/gene_spl.html)（ゲノム科学研究所（The Institute for Genomic Research）、9 7 1 2 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 2 0 8 5 0）、[www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://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 サイクロトロンロード、バークレー、カリフォルニア州 9 4 7 2 0；Reese M G, Eeckman, F H, Kul p, 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G P R 4 9 F a bの重鎖可変領域中のコドンを、元の抗G P R 4 9 V H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C H O細胞中で良好に発現された抗体からの同一のK a b a t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

#### 【0134】

抗G P R 4 9 F a bの配列が最適化されたV H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D N A断片を、化学合成された二本鎖D N A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、N c o IおよびS f i 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G P R 4 9配列最適化V H領域断片を、上記実施例2に記載のように、N c o I / S f i I消化p H L P 0 2 9ベクター中にクローン化した。p H L P 0 2 5中の適切な対応する軽鎖による遺伝子組換えおよびそれに続く单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。D N A配列分析によって正しい配列を確認した。

30

#### 【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I g G 1抗体の产生を増加させる結果となった。

#### 【0136】

##### 実施例4

##### G P R 4 9抗体の一過性発現および特徴づけ

方法：プラスミドD N Aを用いて、抗体タンパク質の一過性产生のために、C H O D G 4 4細胞を形質転換した。2 0 u gのプラスミドD N Aを、体積0 . 4 m Lの1 × P B S中にて4 × 1 0 6細胞と混合した。この混合物を、0 . 4 c mキュベット（バイオラッ

40

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 uF 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 uM ヒポキサンチンを添加したもの、および 16 uM 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、293 E 細胞をトランスフェクトした。1.2 ug の各 (重および軽) プラスミド DNA を、Qiagen's Efficientene 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<sup>6</sup> 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】

10

結果：上清を回収し、ウェスタンプロットおよび 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】

20

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 ファ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) 中へサブクローニングした。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 トランスフェクトーマを產生目的のために選択した。

## 【0140】

30

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ニングした。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ニング部位を含有する。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】

40

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ニングするために、それぞれ、Sfi I および Sac 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ニングするために、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】

50

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

れた産物を、D r a I I I 部位にサブクローニング化し、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CMV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CMV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、HEBSバッファー中、700ng/uLの濃度で作製し、その後、CHO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45ug)5回の電気穿孔を行った。各電気穿孔は、0.7mLの滅菌HEBSバッファー中の4×10<sup>6</sup>の対数期CHO細胞および0.1mLのHEBS中のDNA(合計体積0.8mL)を入れた使い捨て0.4cmキュベット(インビトロジエン(Invitrogen))中にて行った。バイオ-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CHOM16培地10mLと混合し、遠心分離にかけ(3'@1000rpm)、吸引した。次に、細胞を、12mLのインスリンフリーCHOM16培地(室温)に再懸濁し、T-75組織培養フラスコへ移した。

10

## 【0144】

細胞および培地：電気穿孔の前に、CHO細胞を、1×ヌクレオシドを添加した血清フリー培地(CHOM24)中にて成長させた。CHOM24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。メトレキサート選択を、ヌクレオシドフリーであるCHOM16およびCHOM24の化学的に明らかである培地中にて行った。

20

## 【0145】

電気穿孔の後、4×10<sup>6</sup>のCHO細胞をT-75フラスコ中にプールした。細胞を又クレオシドフリー培地に播種し、すぐにDHF R発現についての選択を開始した。細胞は、最終的に、CHOM24中、125mL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プールを希釈し、4つの96ウェルプレート上に、200uLのCHOM16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。

30

## 【0146】

CHOコロニーを、ヒトカッパ鎖に対して特異的であるELISA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)。ELISAで用いた捕捉抗体は、ポリクローナルヤギ抗ヒトIgG(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。

40

## 【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GPR49 mAbが得られる高発現CHO細胞株を樹立した。

## 【0148】

## 実施例6

## 完全ヒト抗GPR49 IgG1抗体の精製および特徴づけ

CHO細胞中で產生された抗体を、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×PBS(平衡バッファー)により、100~150cm<sup>2</sup>/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

50

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 × PBS 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 × PBS 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 / および Endo Lys 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 LC / MS 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) SDS - 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) SDS 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 / 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セート (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フリー 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

40

## パート I : ハイブリドーマ選択

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フリー 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、最も高い抗体力値を有する動物を、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。

【0157】

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 IgG バンド、IgG1 / k、IgG2a / G、および IgG1 / 2b / 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（mAb）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、FACSによって試験した。

【0158】

パートII：FACS分析

方法：24のマウスGPR49 mAbを段階希釈し、GPR49-F1ag-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）。

【0159】

結果：結果を表2にまとめる（図7A～Cに示すデータ）。

【0160】

【表2-1】

表2

GPR49 m s mAb	FACs EC50 (nM)
2B5.5	~0.2
7F8.2	~0.2
1B3.5	0.8129
9C6.4	0.8297
6H5.4	~1
10A6.7	1.428
10A9.2	4.522
2G8.1	9.766
6C10.5	9.978
6G10.3	~10
8H8.1	11.19

10

20

30

40

【0161】

【表2-2】

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

10

20

30

## 【0162】

## パートIII：Biacore分析

マウスマAbの結合反応速度論を、Biacoreによって分析した。

## 【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。精製マウスマAb (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、BIA evaluation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：マウスマAb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。

## 【0165】

40

【表 3 - 1】

表3

	B I A c o r e
mAb	K <sub>D</sub> nM
1B3-5	1. 1 1
5B12.4	7. 5 2
6C10.5	0. 6 8
9C6.4	1. 4 4
5G2.11	1. 5 9
6G10_3	2. 7 2
10E1_1	3. 9 8
7F8.2	0. 9 1
10A9.2	< 100 pM
6B10_2	3. 0 5
2H9-2	0. 7 1

10

20

30

【0 1 6 6】

## 【表3-2】

	BIAcore
mAb	KD nM
2G8.1	N/A
6H5.4	0.17
10A6_7	<100 pM
3B8-11	3.92 uM
3G8.1	0.99
7C3_4	6.32
2B5-5	1.67
8H8_1	1.54
2F12.5	1.29
1F10.5	64.0
5F2_5	5.52
6G10.1	0.14

10

20

30

40

## 【0167】

## 実施例8

## 完全長ヒトGPR49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、GPR49遺伝子の完全長cDNAクローニングをコードするDNAベクターを金粒子と混合したものの10u g / マウスにて、3回免疫化した。最初の免疫化のおよそ75日後に、個々のマウスの血液を、ELISAおよびFACS分析により、抗原認識についてスクリーニングした。次に、最も高い抗体力値を有する動物を、最終的な抗原ブースト(25u g GPR49-Fc、10u g GPR49-DNA / 金粒子、および $5 \times 10^6$  GPR49-CHO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10,000のクローニングを作製し、およそ200の陽性クローニングを、GPR49-CHO捕捉ELISAによって選択した。

## 【0168】

結果：67のクローニングを、ELISAおよびGPR49-CHO FACSによって確認した。次に、22の陽性クローニングをサブクローニングした(单一または混合IgGバンド、IgG1/k、IgG2a/G、およびIgG1/2b/kなど)。19の選択されたサブクローニングからのモノクローナル抗体(mAb)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ー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、FACSによって試験した。

## 【0169】

50

## パートⅡ：FACS分析

方法：19のマウスGPR49 mAbを段階希釈し、GPR49-F1ag-Hisでトランسف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】

mAb	EC50 (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mAb) 6.2

10

20

30

40

50

## 【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 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(ImmunoN2 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にて一晩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、Skran 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、Skran 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、Skran 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

、 S k a n W a s h e r 3 0 0 で洗浄した。 T M B 溶液（キルケガード & ペリーラブズ社、カタログ：5 0 - 7 6 - 0 0 ）を 1 0 0 u L / ウェルで添加し、2 分後、5 0 u L / ウェルの 4 N H 2 S O 4 （ラブケム、カタログ番号 L C 2 5 8 3 0 - 1 ）で反応を停止した。 T M B の吸光度を、4 5 0 n m 、バックグラウンド 5 4 0 n m 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、S O F T M A X P R O ソフトウェアパッケージ バージョン 4 . 3 L S （モレキュラーデバイス社）を用いて行った。結果として、E C 5 0 値を得た。

## 【 0 1 7 5 】

結果：マウスマ A b は、2 2 4 n M から 1 n M 未満の範囲の E C 5 0 にて、G P R 4 9 - F c と結合した（表 5 ; 図 9 A ~ D ）。 10

## 【 0 1 7 6 】

## 【 表 5 - 1 】

表 5

E C 5 0 (E L I S A) [n M]	ハイブリドーマ
0 . 2	8 E 9 . 1
0 . 2 4	1 1 F 6 . 1
0 . 2 5	1 2 G 5 . 1
0 . 2 7	5 B 1 0 . 1
0 . 2 8	6 H 5 . 1
0 . 3 8	1 4 A 8 . 1
0 . 5	9 C 7 . 1
0 . 5 3	4 A 1 0 . 2
0 . 5 5	1 4 H 9 . 1
0 . 5 5	1 4 E 3 . 1

## 【 0 1 7 7 】

【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

40

50

## 【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、DL-D-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することが分かった。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。

## 【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

9+）、GPR49陰性（GPR49-）、および未分離の生PI（ヨウ化プロピジウム）陰性細胞を、96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。

#### 【0181】

結果：分離したGPR49陽性（GPR49+）結腸腫瘍細胞は、GPR49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10Aおよび10B）。GPR49で分離したLS174T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。

#### 【0182】

パートII：

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GPR49またはコントロールRNAi-1で処理し、次にウェルあたり250細胞で96ウェルプレートに播種するという追加の実験を行った。

#### 【0183】

結果：コントロールRNAi-1ではなく、GPR49 RNAi-1での処理により、処理の14日後に測定した結腸癌幹細胞の数が大きく減少した。

#### 【0184】

実施例11

GPR49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GPR49+細胞が、癌幹細胞特性を有することを示すために、GPR49-細胞に対してGPR49+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CT1からのGPR49+細胞を、Mof1oを用いて76C12によって分離し、マウスあたり1000細胞にて移植した。マウスを、その後50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。

#### 【0185】

結果：GPR49+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11A）および急速な体重減少（図11B）を引き起こしている。対照的に、GPR49-細胞は、非常にゆっくり成長し、急速な体重減少を引き起さなかつた。これらの知見から、GPR49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。

#### 【0186】

実施例12

R-スponginは高親和性にてGPR49と結合するが、GPR49媒介シグナル伝達を活性化しない

パートI：GPR49は、糖タンパク質ホルモン受容体ファミリー（例：FSH、TSH、LH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（GPCR）であり、腸のWnt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）。GPR49の天然リガンドを識別するために、結合実験では、公知のWnt経路修飾因子であるノギン、グレムリン1、DAN、コーディン様1（Chordin-like 1）、セルベルス1、PRDC、スタニオカルシン-1、COCO、コーディン、R-スpongin 1~3、BMP2、およびBMP4に注目した。

#### 【0187】

方法：GPR49-Fc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、GPR49-Fc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、OBバッファー（PBS、pH 7.4、0.01%（重量/体積）NaN<sub>3</sub>、1mg/mL BSA、0.02%（v/v）Tween20）で希釈した。Octet Red System（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、GPR49-Fcを、抗ヒトIgG Octet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：パート番号 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 G P R 4 9 - F c 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 G P R 4 9 - F c に対して試験した。

#### 【0188】

結果：R - スポンジン(R S P O)ファミリーメンバーは、ヒト G P R 4 9 - F c 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。R S P O ファミリーメンバーは、マウス G P R 4 9 - F c [88%同一性(91%類似)]とは相互作用を起こさない。

#### 【0189】

パートII：用いた G P R 4 9 - F c は、溶解した G P R 4 9 外部ドメインの二量体(F c 片側部分同士の相互作用による)であるが、G P R 4 9 - F c がチップへの固定化されていること、および試験 R S P O 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、G P R 4 9 - F c への R P O S 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。

#### 【0190】

方法：R S P O の G P R 4 9 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(タンパク質のセナーチップ(senor chip)への結合)が、溶液中のリガンドの濃度に比例する(BIA Applications 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 R S P O - 1 の濃度は、固定化された G P R 4 9 - F c 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 R S P O - 1 溶液を、競合 G P R 4 9 - F c で滴定した。

#### 【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、G P R 4 9 上における、R S P O 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. G P R 4 9 シグナル伝達に対する R S P O の影響を試験するために、複数のアッセイを用いた。

#### 【0193】

方法：環状AMP、カルシウム流、および - 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 - カテニン / T C F レポーターアッセイ。この - カテニン / T C F レポーターアッセイでは、SAバイオサイエンスの T C F / L E F 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( $2 \times 10^4$  細胞 / ウェル)。次に、細胞を、Opti-MEM + 0.5% FBS + 0.1 mM NEAA + 1 mM ピルビン酸ナトリウム + 1 × 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 R S P O および mWnt3a (200 ng / mL) により、抗体有り

10

20

30

40

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、G P R 4 9 R N A i を用いて、R S P O 依存性 - カテニン / T C F レポーター活性への G P R 4 9 の特異的な寄与について調べた。

## 【0194】

結果 : c A M P 、カルシウム流、または - アレスチン活性アッセイにおいて、R S P O に対する測定可能な活性は観察されなかった。しかし、R S P O は、G P R 4 9 R N A i でノックダウンされた - カテニン / T C F 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

## G P R 4 9 - 3 T 3 細胞の R - スポンジン - 1 による刺激

方法 : G P R 4 9 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、G P R 4 9 で安定的にトランスクレクトされた 2500 の N I H 3 T 3 線維芽細胞 (G P R 4 9 - 3 T 3 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、C e 1 1 T i t e r G l o A T P アッセイを用いて、細胞増殖を評価した。G P R 4 9 - 3 T 3 クローン 50 は、これまでに、抗 G P R 4 9 m A b 、76 C 1 2 での F A C s により、細胞表面 G P R 4 9 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、G P R 4 9 - 3 T 3 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、G P R 4 9 - 3 T 3 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、G P R 4 9 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

## G P R 4 9 m A b 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 G P R 4 9 m A b が R S P O の可溶性 G P R 4 9 - F c への結合をブロックする能力の特定を行った。

## 【0198】

方法 : 抗 G P R 4 9 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 R S P O と共に、氷上にて 45 分間共インキュベートした。次に、R S P 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、G P R 4 9 - F c を固定した C M 5 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 (R max) である R max 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 G P R 4 9 抗体、3 B 8 . 1 1 、1 0 A 6 . 7 、2 B 5 . 5 、6 C 1 0 . 5 のすべてが、R max を 20 % を超えて減少させた。3 G 8 . 1 、6 H 5 . 4 、および 7 F 8 . 2 はいずれも、R max 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 G P R 4 8 (L G R 4) および L G R 6 に対する G P R 4 9 m A b 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 G P R 4 9 抗体の関連するファミリーメンバー、G P R 4 8 (L G R 4) および L G R 6 に対する特異性を特定するために、遺伝子組み換え G P R 4 8 、G P R 4 9 、および L G R 6 を、哺乳類細胞 (H E K 2 9 3 T) 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、F A C S (標準的方法) によって評価し、コントロールベクター (p V 1 0 0) でトランスクレクトした細胞

10

20

30

40

50

と比較した。

【0201】

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）。

【0202】

【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

【0203】

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 ug / mL 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 IGF-1R 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 5A7 ( 抗 IgG1 mAb ) 、 IDEC152 ( 抗 CD23 IgG1 mAb ) 、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。氷上の 45 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 uL の冷洗浄バッファー ( PBS + 1% BSA + 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 uL の 14% パラホルムアルデヒド ( 16% ストックから PBS で希釈 ; EMS 番号 15710 ) により、室温にて 15 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 ( 15 および 60 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 uL の冷透過バッファー ( 洗浄バッファー + 0.5% Triton-X ) により、氷上にて 10 分間透過処理した。続いて、すべてのスライドを、500 mL 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 、 10,000 rpm にて 10 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 1:1000 の希釈率で調製した ( mAb に対しては、 Alexa Fluor 488 ヤギ - 抗マウス IgG ( H + L ) 、モレキュラープローブ ( Molecular Probes ) 番号 A11029 、および G4 抗体に対しては、 Alexa Fluor 488 ヤギ - 抗ヒト IgG ( H + L ) 、モレキュラープローブ 番号 A11013 ) 。希釈した二次抗体の 250 uL を各ウェルに添加し、室温、暗所 ( 覆うことによる ) にて 40 分間インキュベートした。スライドを、再度 500 mL 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、DAPI 含有 Vectashield 封入剤 ( mounting medium ) ( ベクター ( Vector ) 番号 H-1500 、 Hard Set ( 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。Laser Sharp 2000 プログラム ( バイオラッド v5.2 ) 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、Kalmann 10 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。

#### 【 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 ( 靈長類化抗 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 ( HEK293T ) 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 ( pV100 ) でトランスフェクトした細胞と比較した。

#### 【 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 】

10

20

30

40

## 【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

40

50

## 【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への結合の交差プロックイングを用いて、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。

## 【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）と共にブ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（サーモサイエンティフィック（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

次 mAb を添加したものはすべて、OB バッファー (PBS、pH 7.4、0.01% (重量 / 体積) NaN<sub>3</sub>、1 mg / mL BSA、0.02% (v/v) Tween 20) で希釈した。Octet Red System (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 mAb を、ストレプトアビシン Octet 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 OB バッファーで洗浄し、OB バッファー中の GPR49-Fc を含有するウェルへ移した。チップ上で GPR49-Fc の一次 mAb 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 (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。解離フェーズ (120 秒間) の間の結合も記録した。種々の mAb 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 GPR49-Fc を、5 倍モル過剰の二次試験 mAb (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 mAb でプレロードしたチップへこれを結合させて、Rmax' を特定した。次に、Rmax' プライムを Rmax と比較し、Rmax' / Rmax 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 mAb と結合する GPR49-Fc の能力に対して二次 mAb が有するブロッキングの量を特定した。一次 mAb に対する二次の交差ブロッキング (Rmax' / Rmax × 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。mAb はすべてそれ自体に対して試験し (一次および二次 mAb が同じ試験 mAb) 、適正な分析を確保した。

10

20

## 【0210】

結果: 試験した抗 GPR49 mAb 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 (76C12、1B3.5、6B10.2、4F6.2)、グループ 2 (18G7.1、14A8.1、5B10.1、14F7.1、11F6.1、14E3.1、1B8.1)、グループ 3 (5F2.5、6B10.2)、グループ 4 (3F11.1)、グループ 5 (10A.2)、およびグループ 6 (6E10.1) である。mAb 自体による交差ブロッキングを表 8 および 9 に示す。

## 【0211】

【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%	60%	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

30

【0 2 1 2】

## 【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

30

## 【0213】

## 実施例19

## G P R 4 9 m A b 、 7 6 C 1 2 の薬物動態特性

方法：G P R 4 9 抗体、7 6 C 1 2 のマウスにおける薬物動態特性、およびC T 1 モデルでの7 6 C 1 2 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、1 5 または3 0 m g / k g による7 6 C 1 2 の単一用量を、I . P . にてC R L S C I D ベージュマウスに投与した。採血を、1 5 分、3 0 分、6 0 分、2 、 6 、 2 4 、および4 8 時間、ならびに4 、 7 、 9 、 1 1 、および1 4 日後に行った。血清濃度をE L I S A で特定した。

## 【0214】

結果：7 6 C 1 2 は、およそ4 日間の半減期を示す（図1 2 A ~ 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：7 6 C 1 2 I g G 1 抗体の単一剤での生体内効力を、C T 1 ( 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 1 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 (< 1 0 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C R L S C I D 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 $130\text{ mm}^3$ であった。 $76\text{C}12\text{ mAb}$ を、30および $15\text{ mg/kg}$ にて、4週間にわたって週1回腹腔内(i.p.)投与した。 $76\text{C}12\text{ mAb}$ はまた、 $15$ および $7.5\text{ mg/kg}$ 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、 $15\text{ mg/kg}$ 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、 $15\text{ mg/kg}$ 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。

#### 【0216】

結果：完全ヒト $76\text{C}12$ 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、 $30\text{ mg/kg}$ 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： $76\text{C}12\text{ IgG1}$ 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ベージュマウスに、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 $130\text{ mm}^3$ であった。 $76\text{C}12\text{ mAb}$ を、30および $15\text{ mg/kg}$ 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(すなわち、4週間にわたって7日間ごとに $125\text{ mg/m}^2$ )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、 $15\text{ mg/kg}$ 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、 $15\text{ mg/kg}$ 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。

#### 【0218】

結果：抗GPR49 mAb、 $76\text{C}12$ 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、 $30\text{ mg/kg}$ (図14)および $15\text{ mg/kg}$ での週2回スケジュールの $76\text{C}12$ 抗体は、単一剤処理と比較して、相加効力を示した。加えて、 $15\text{ mg/kg}$ 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、 $76\text{C}12$ 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、 $76\text{C}12$ 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： $76\text{C}12\text{ IgG1}$ 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ベージュマウスに、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 $130\text{ mm}^3$ であった。 $76\text{ C }12\text{ mAb}$ を、 $15\text{ mg/kg}$ 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、 $15\text{ mg/kg}$ 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： $76\text{ C }12$ 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。

20

#### 【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 $1\text{ mg/kg}$ 体重から約 $100\text{ mg/kg}$ 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。

30

#### 【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(Erbritux(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。

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 $175\text{ mm}^3$ 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

、 $15\text{ mg} / \text{kg}$  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 IgG1 を、 $15\text{ mg} / \text{kg}$  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14F7および18G7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、GPR49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、GPR49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GPR49抗体によるK-Ras、PI3K、PTEN、およびp53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も行った。

#### 【0230】

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。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 $175\text{ mm}^3$ 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を、 $10\text{ mg} / \text{kg}$  にて、最初の5日間に1日1回IP投与した。抗体は、 $15\text{ mg} / \text{kg}$  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GPR49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）。GPR49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-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GPR49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GPR49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、GPR49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18G7.1および7C3.4の単一剤での生体内効力を、CT3（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。CT3は、新しいCRC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Ion Torrentディープシーケンシングによって特定した。CT3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 1 3 0 mm<sup>3</sup> に達した時点にて（第 0 日）、マウスをランダムに 1 0 体のグループに分けた。次に、抗体を、1 5 m g / k g 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、1 5 m g / k g 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。

#### 【 0 2 3 4 】

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 4 3 % 阻害した（図 2 0）。この > 4 0 % の腫瘍成長阻害は、G P R 4 9 抗体が C T 3 腫瘍細胞の 1 5 ~ 2 0 % 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

#### 【 0 2 3 5 】

##### 実施例 2 8

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

#### 【 0 2 3 6 】

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、3 0 、1 0 0 、および 3 0 0 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、二次宿主にて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

#### 【 0 2 3 7 】

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 2 1）。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 6 2 % 超（5 / 8）は、移植後の 8 週間にて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 ( 1 3 % ) 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 2 1）。40

#### 【 0 2 3 8 】

##### 実施例 2 9

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

10

20

30

40

50

C、TP53、FGFR2、VANGL2、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、二次宿主中にて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クローニングについても、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。

10

20

30

#### 【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3 0

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。

30

#### 【0242】

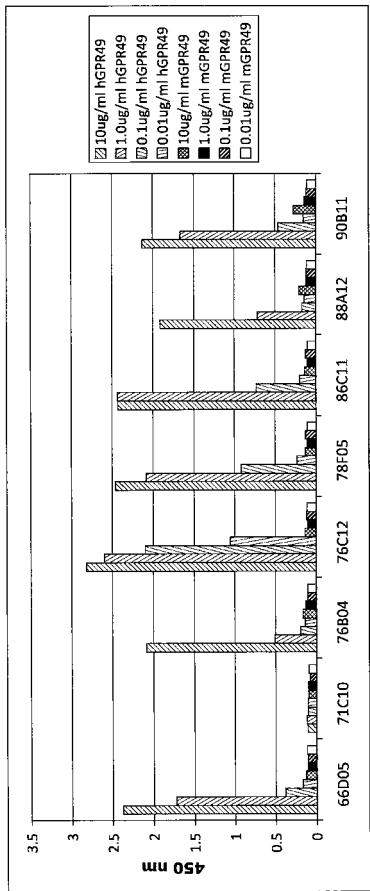
方法：実施例3で概説した生体内実験からの、コントロールまたはGPR49 mAb + イリノテカン処理腫瘍から単離した腫瘍細胞を回収し、プールし、分離し、限界希釈二次移植アッセイにて再移植し、癌幹細胞頻度を分析した。各処理グループについて、8体のマウスに、10、30、100細胞を移植した。腫瘍形成を、12週間にわたり週2回のペースでモニタリングした。

40

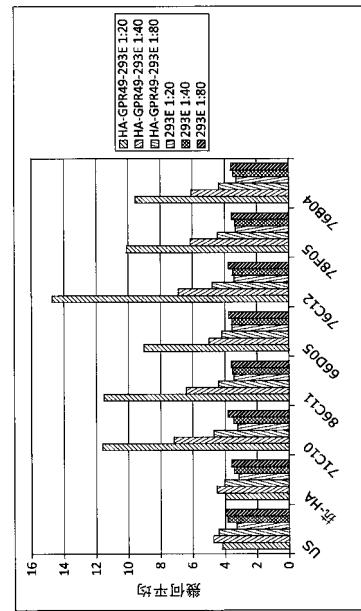
#### 【0243】

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  $1729 \text{ mm}^3$  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。

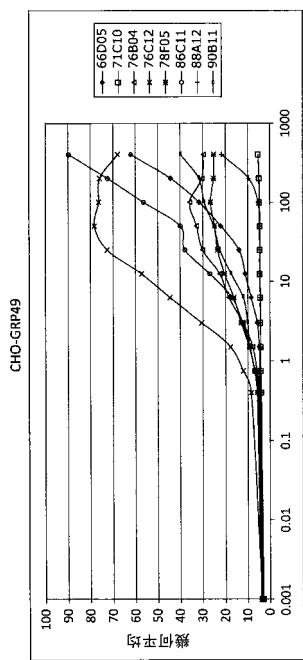
【図1】



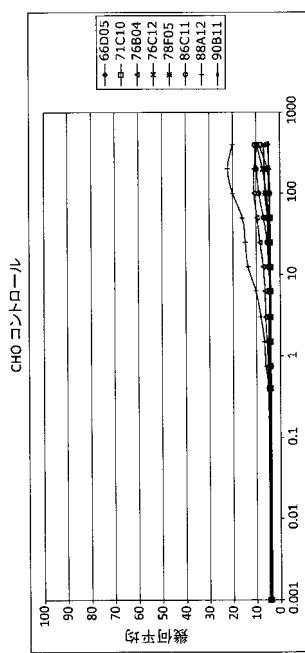
【図2】



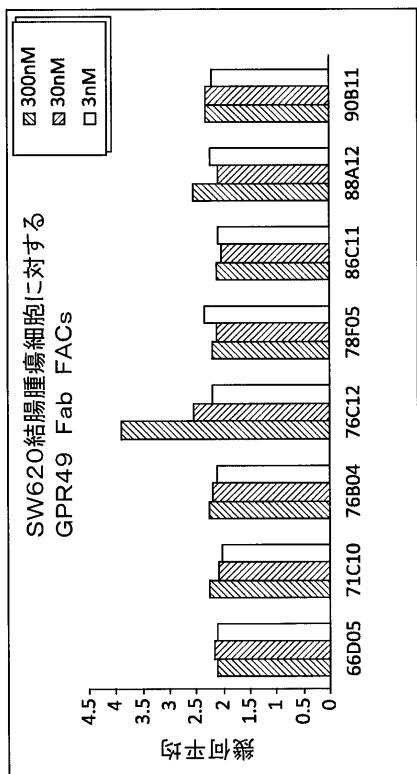
【図3 A】



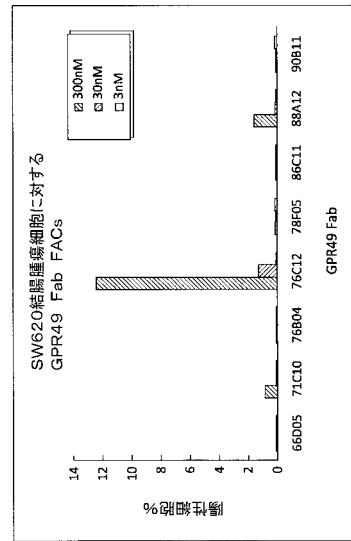
【図3 B】



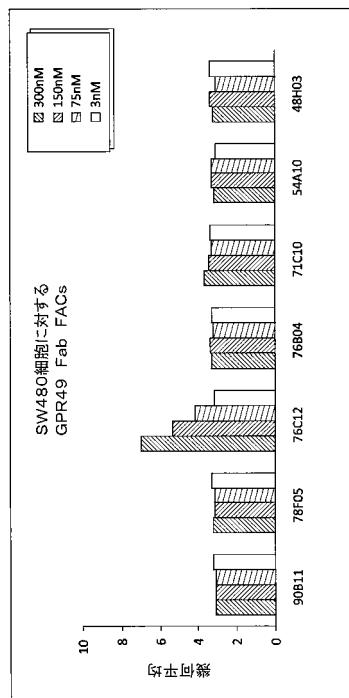
【図 4 A】



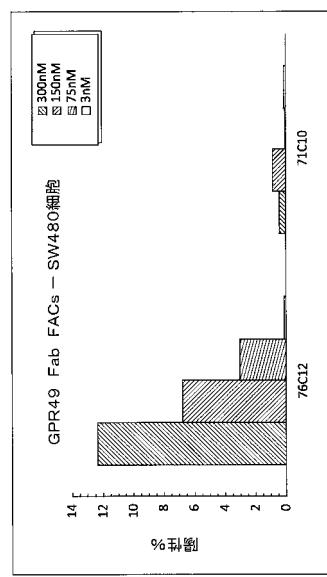
【図 4 B】



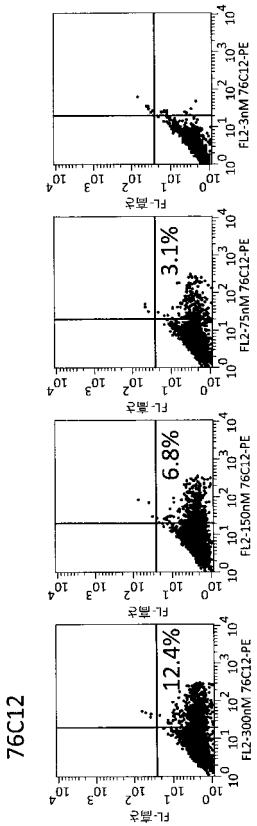
【図 5 A】



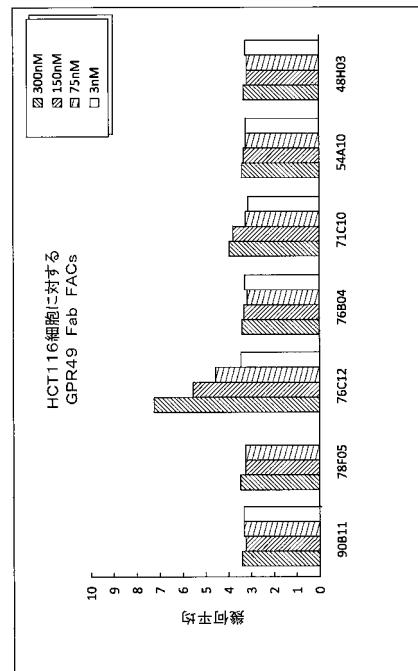
【図 5 B】



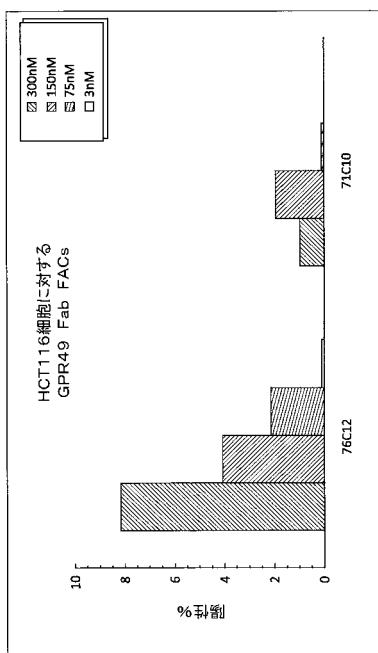
【図 5 C】



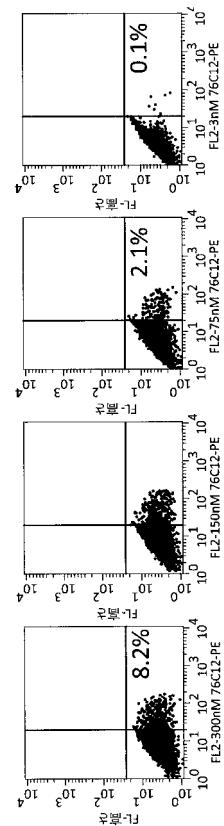
【図 6 A】



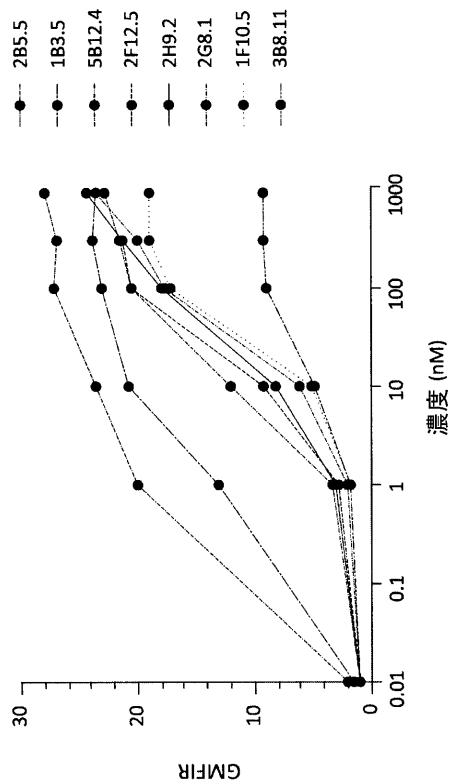
【図 6 B】



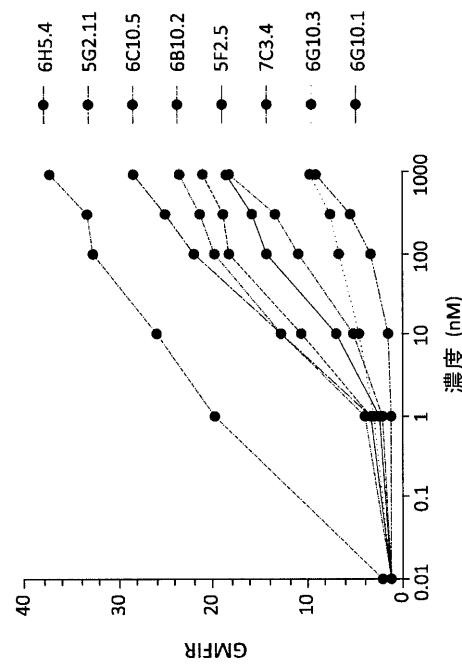
【図 6 C】



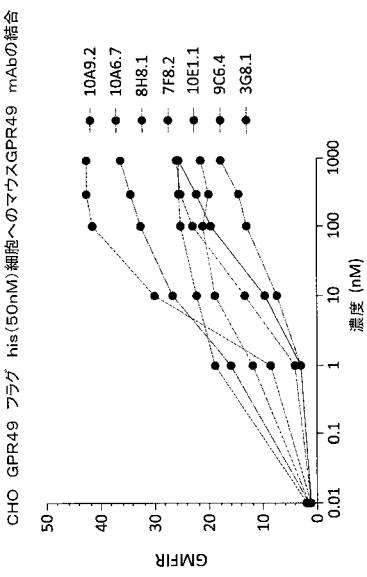
【図 7 A】



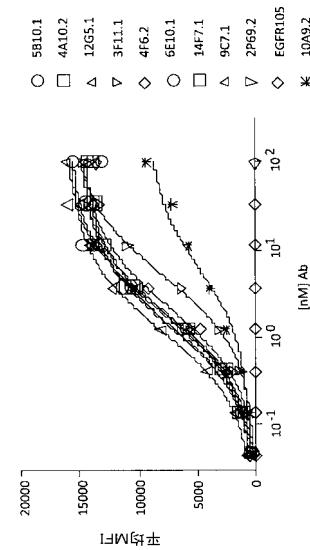
【図 7 B】



【図 7 C】



【図 8 A】

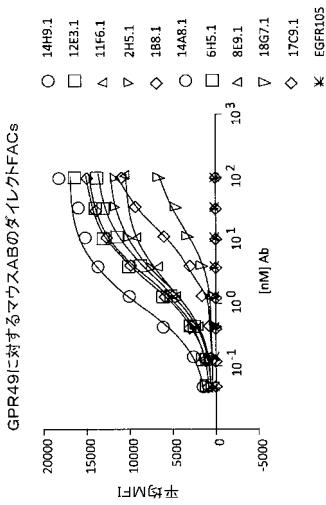


GPR49に対するマウスABのダイレクトFACs

【図 8 B】

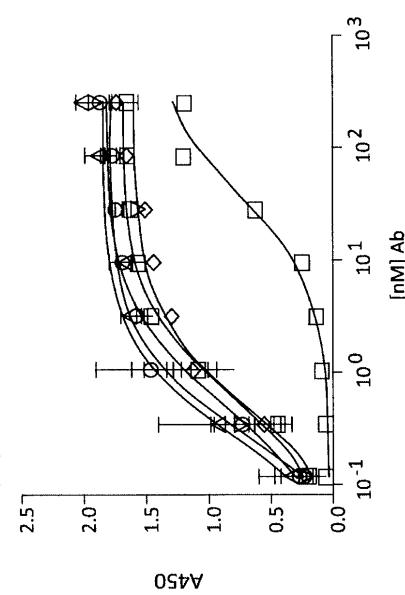
	EC50	14H9.1	12E3.1	11F6.1	2H5.1	13B1	14A6.1	6H5.1	6E9.1	18G7.1	17C9.1
EC50	0.9161	2.632	1.853	1.748	2.239	2.143	2.450	2.170	2.591	2.450	12.46

【図 8 C】



【図 8 D】

	EC50	14H9.1	12E3.1	11F6.1	2H5.1	13B1	14A6.1	6H5.1	6E9.1	18G7.1	17C9.1
EC50	0.9161	2.632	1.853	1.748	2.239	2.143	2.450	2.170	2.591	2.450	12.46

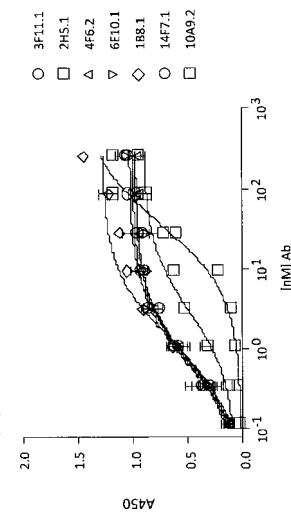
GPR49に対する第二世代マウスAbの  
ダイレクトELISA

【図 9 A】

【図 9 B】

	3F11.1	2H5.1	4F6.2	6F10.1	1B8.1	14F7.1	10A9.2
EC50	0.8837	2.866	0.6506	0.6577	1.335	0.5695	35.22

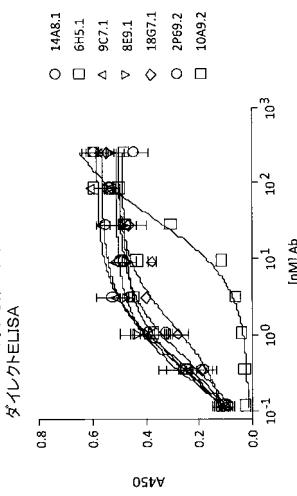
【図 9 C】



【図 9 D】

	3F11.1	2H5.1	4F6.2	6F10.1	1B8.1	14F7.1	10A9.2
EC50	0.8837	2.866	0.6506	0.6577	1.335	0.5695	35.22

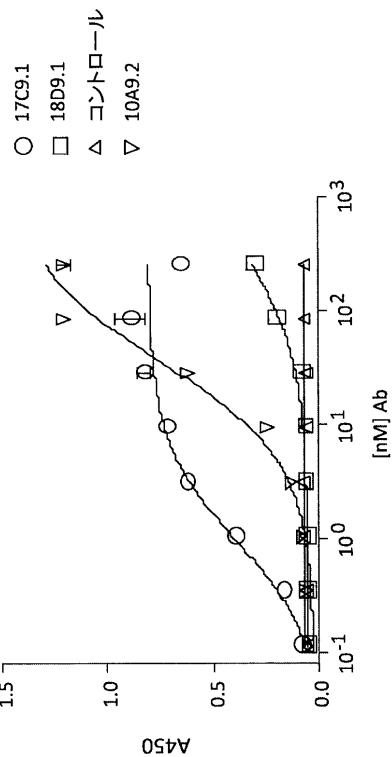
【図 9 E】



【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

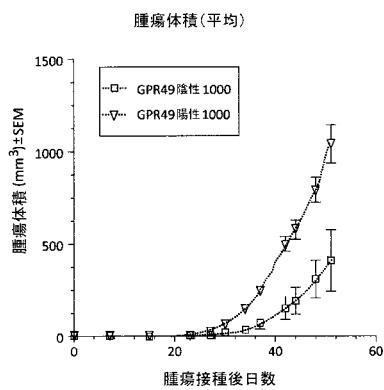
【図 9 G】



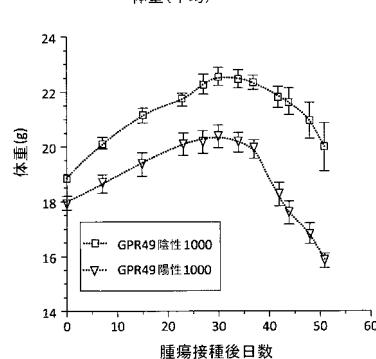
【図 9 H】

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

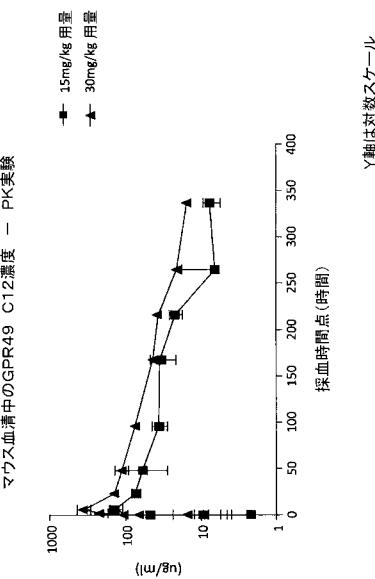
【図 1 1 A】



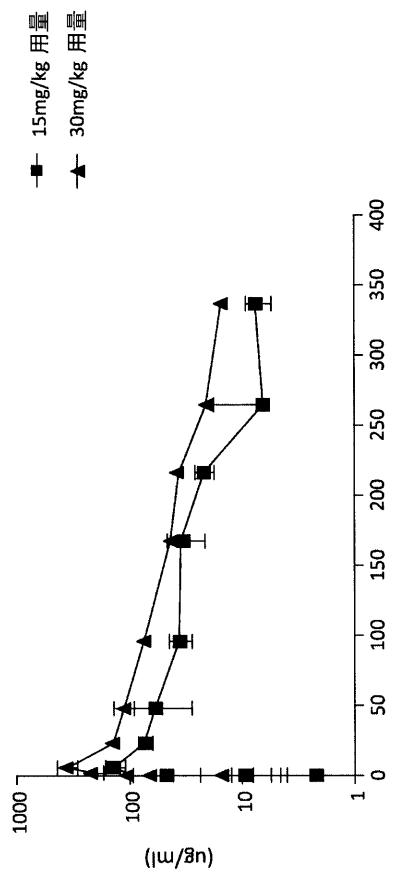
【図 1 1 B】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】

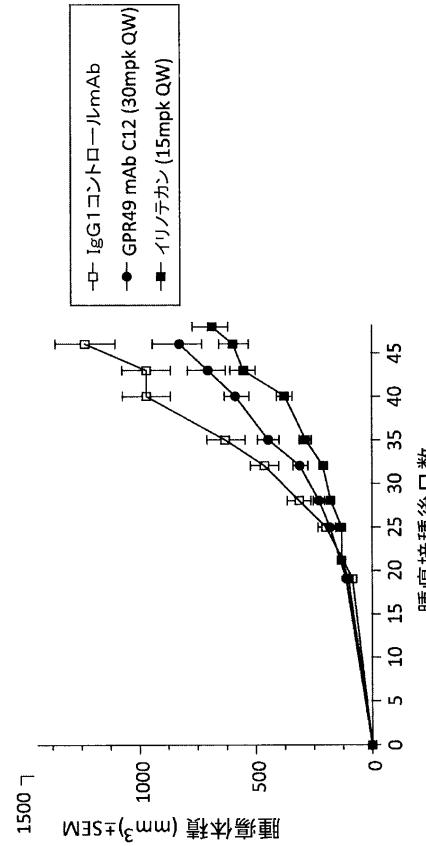


Y軸は対数スケール

【図 1 2 C】

16または30mg/kgの単一IP投与後のSCIDベージュマウスにおける GPR49(C12, IgG1)の薬物動態(ラメータ)						
用量	T <sub>max</sub> 時間	C <sub>max</sub> g/mL	t <sub>1/2</sub> 時間	AUC <sub>0-336h</sub> 時間*mg/L	AUC <sub>0-INF</sub> 時間*mg/L	CL / F ml/h/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】

腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) ± SEM

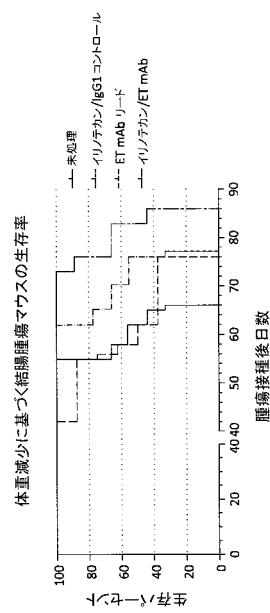
Y軸は対数スケール

【図 1 3 B】

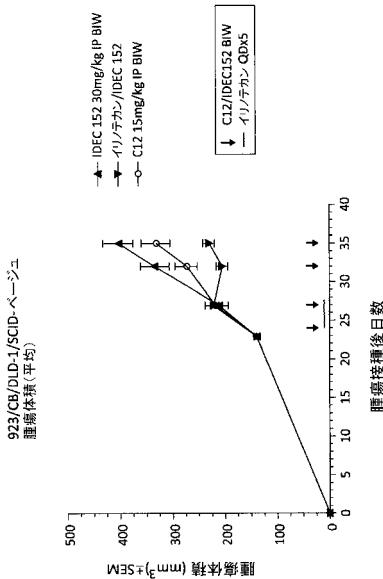
第62日におけるT/C値

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

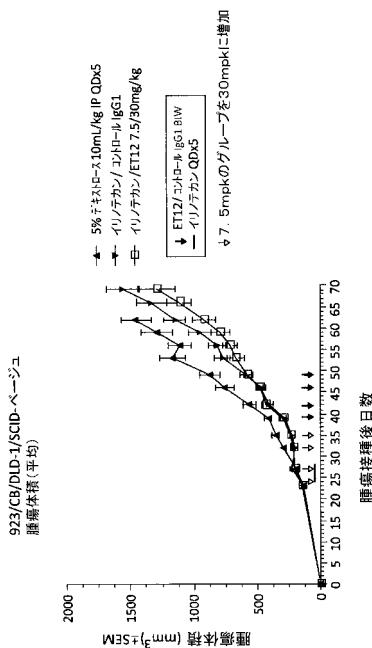
【図 1 5】



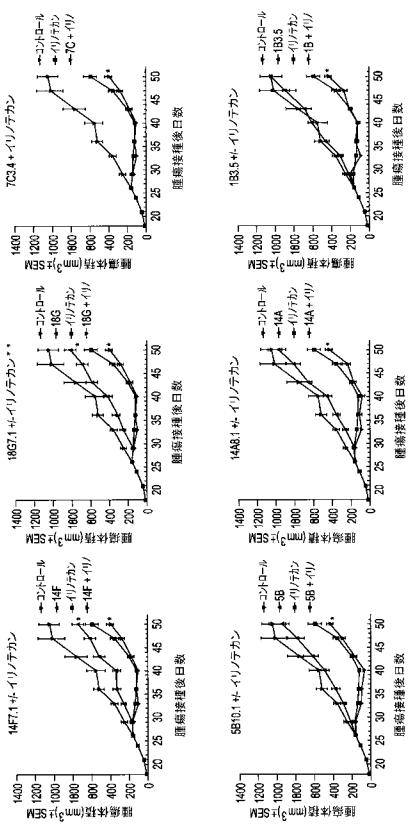
【図 1 6 A】



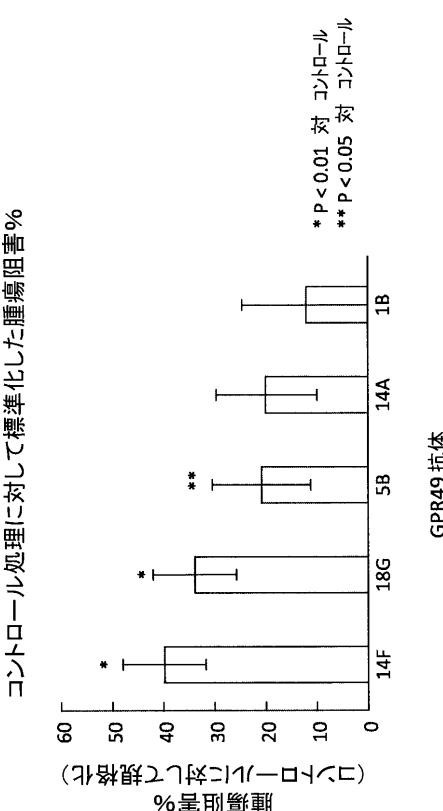
【図 1 6 B】



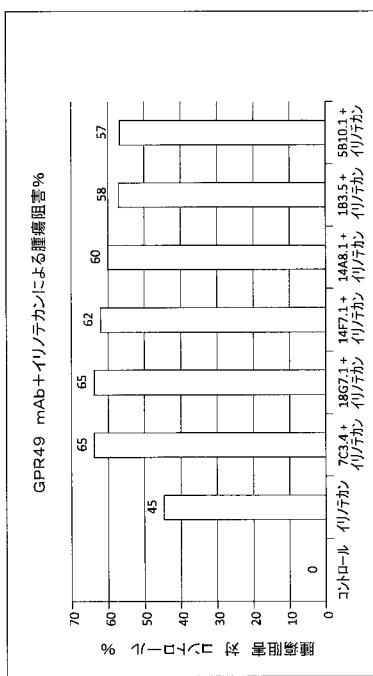
【図 17】



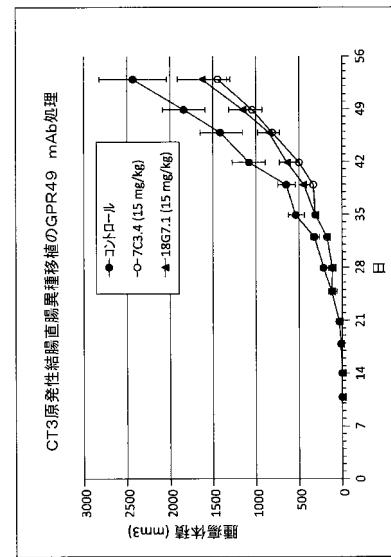
【図 18】



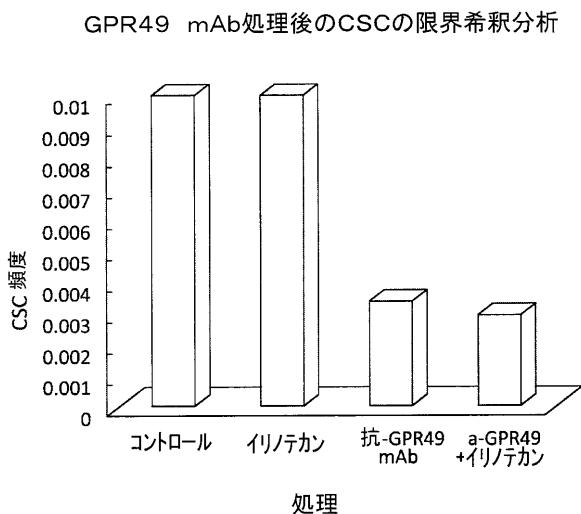
【図 19】



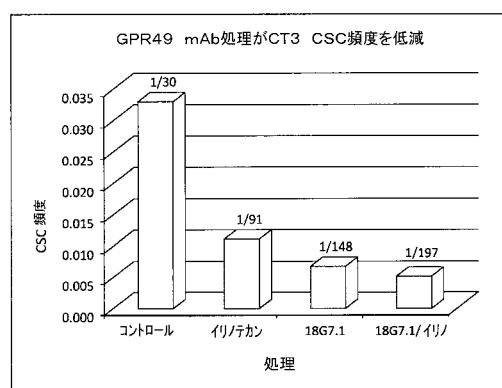
【図 20】



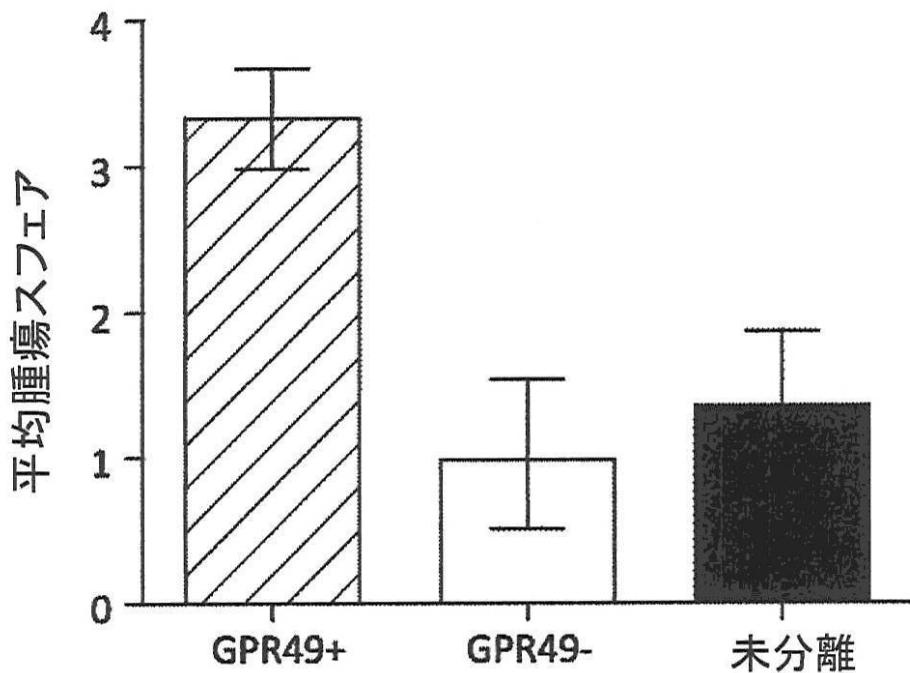
【図 2 1 A】



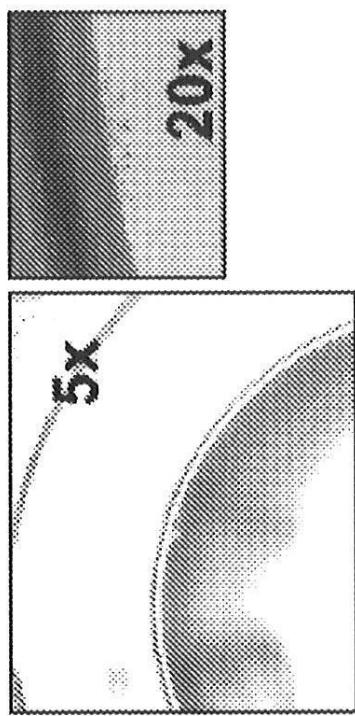
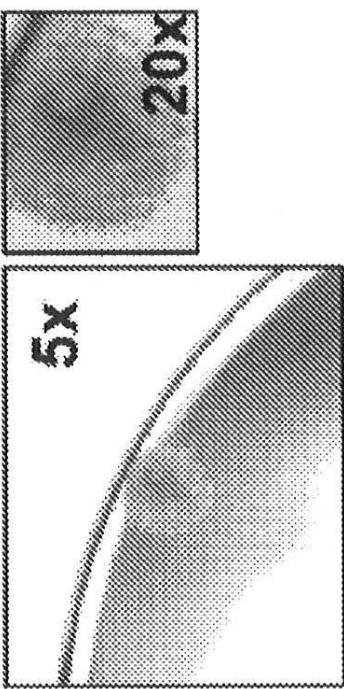
【図 2 2】



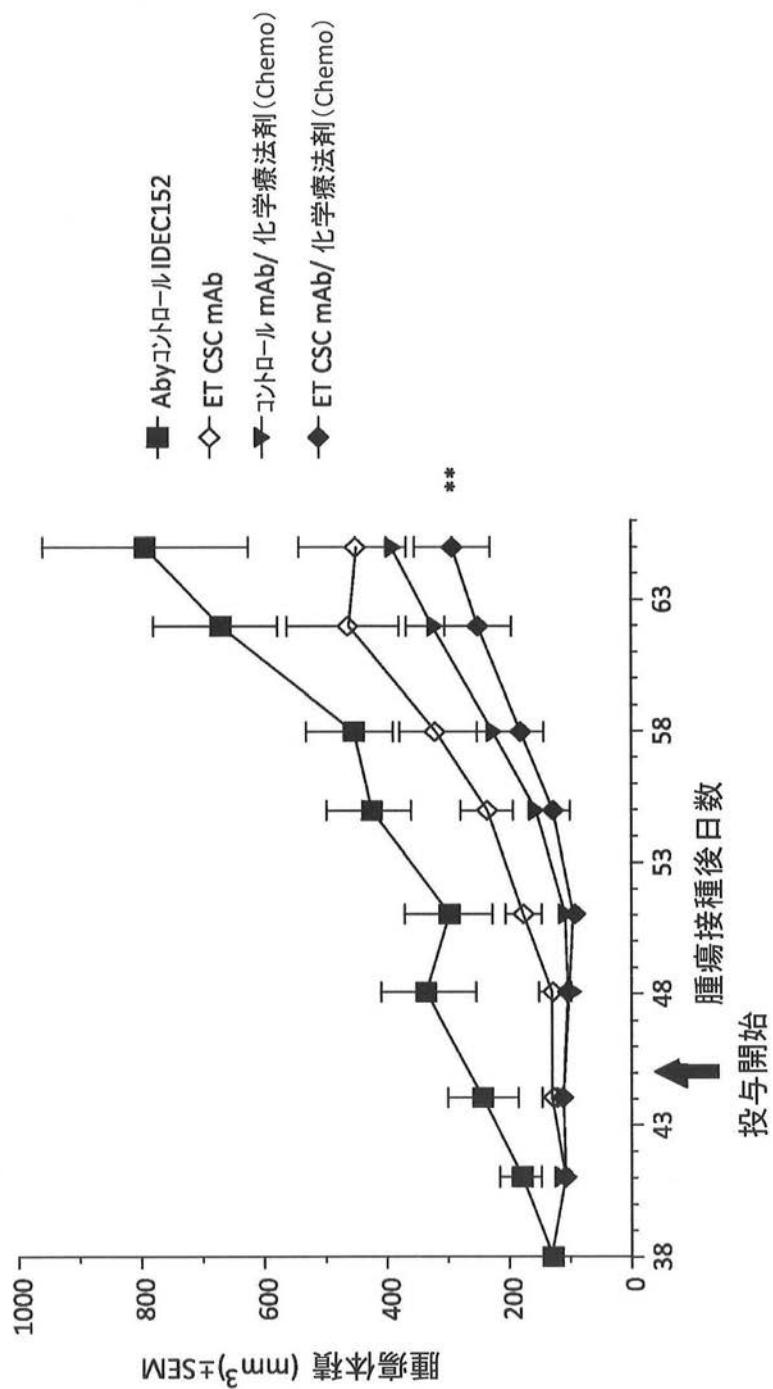
【図 1 0 A】



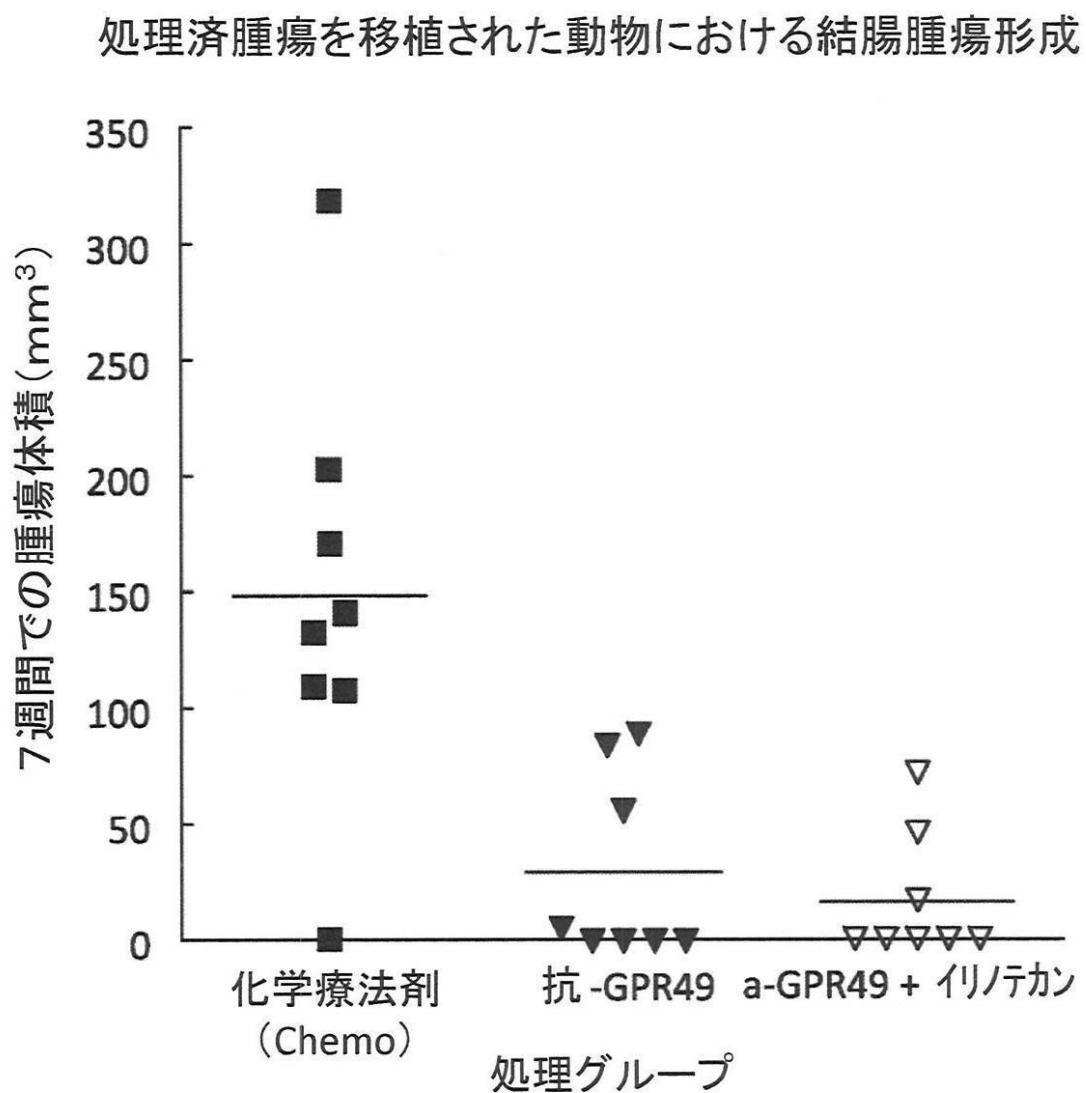
【図 10B】

**GPR49-****GPR49+**

【図14】

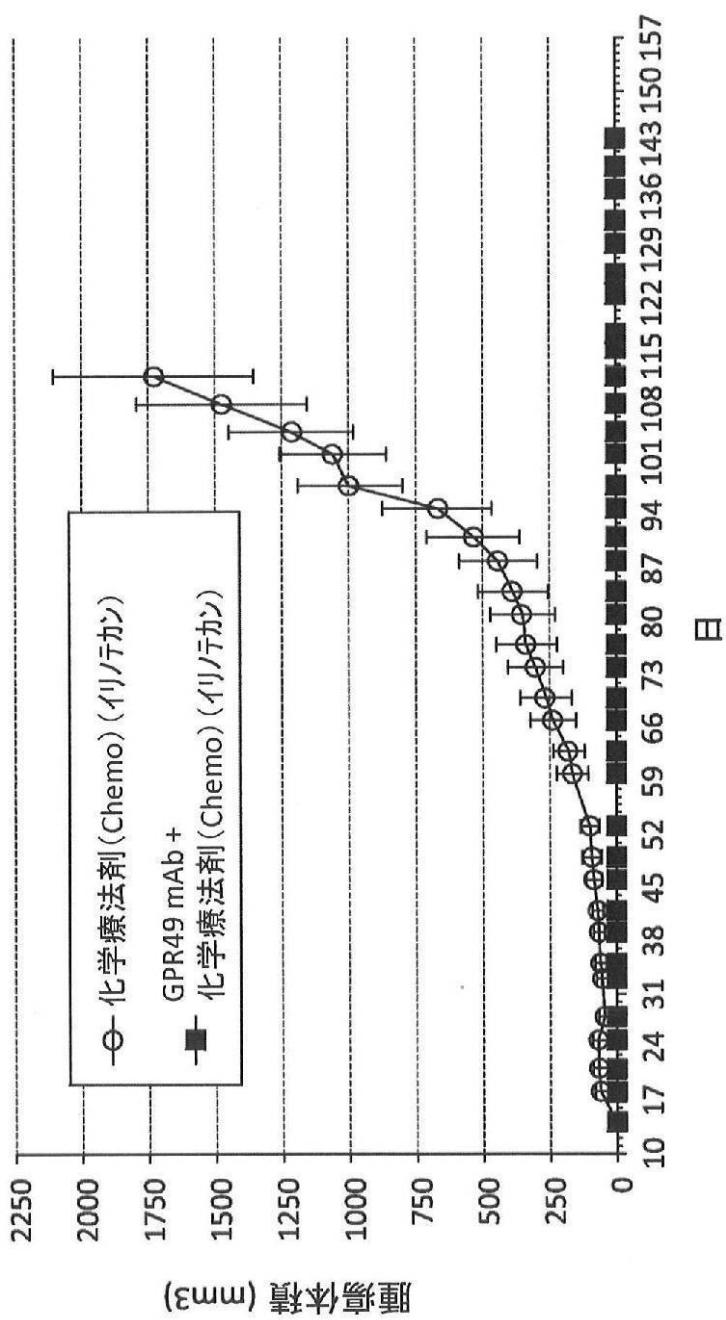


【図 2 1 B】



【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

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
--	--

* Special categories of cited documents :
---

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family
---

Date of the actual completion of the international search
---

Date of mailing of the international search report
--

22 January 2013
-----------------

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,R,S,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,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,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 92130 サンディエゴ フォックスボロー ポイント  
5282

(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 01876 トウックズベリー カタマウント ロード 1  
67

(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 02465 ニュートン プレザント ストリート 57

(72) 発明者 グラフ, クリストイリン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139 ケンブリッジ マサチューセッツ アベニュー  
ナンバー 614 632

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