

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-30303

(P2019-30303A)

(43) 公開日 平成31年2月28日(2019.2.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 158 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-171781 (P2018-171781)	(71) 出願人	509012625
(22) 出願日	平成30年9月13日 (2018. 9. 13)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2015-503644 (P2015-503644)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
原出願日	平成25年3月29日 (2013. 3. 29)	(74) 代理人	110002077
(31) 優先権主張番号	61/618, 232		園田・小林特許業務法人
(32) 優先日	平成24年3月30日 (2012. 3. 30)	(72) 発明者	ホンゴ, ジョーアン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
(31) 優先権主張番号	61/683, 048	(72) 発明者	マオ, ウェイコアン
(32) 優先日	平成24年8月14日 (2012. 8. 14)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/778, 710		
(32) 優先日	平成25年3月13日 (2013. 3. 13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 L g R 5 抗体および免疫複合体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗 L g R 5 抗体および免疫複合体ならびにそれらを使用する方法を提供する。

【解決手段】 ロイシンリッチ反復含有 G タンパク質共役型受容体 5 (L g R 5) に結合する単離抗体であって、前記抗体は、ヒト L g R 5 の特定のエピトープに結合し、 L g R 5 に 5 n M 以下の親和性で結合する、抗体および細胞傷害性薬剤を含む、免疫複合体。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

L g R 5 に結合する単離抗体であって、前記抗体は、配列番号 6 7 のアミノ酸 2 2 ~ 3 2 3 内または配列番号 6 7 のアミノ酸 2 2 ~ 1 2 3 内のエピトープに結合し、L g R 5 に 5 n M 以下の親和性で結合する、抗体。

【請求項 2】

モノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

L g R 5 に結合する抗体断片である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

L g R 5 は、配列番号 6 7 のヒト L g R 5 である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体は、

- a) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、および配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、または、
- b) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、および配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体は、

- a) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、または、
- b) 配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体は、配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 および、

- a) 配列番号 4 0 の重鎖フレームワーク F R 3 配列、
- b) 配列番号 4 1 の重鎖フレームワーク F R 3 配列、
- c) 配列番号 4 2 の重鎖フレームワーク F R 3 配列、または、
- d) 配列番号 4 3 の重鎖フレームワーク F R 3 配列、を含む、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

前記抗体は、

- a) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、または、
- b) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、を含む、請求項 7 または請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記抗体は、

- a) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、または、
- b) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

む H V R - L 2、および配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 1 1】

前記抗体は、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含み、配列番号 3 5 の軽鎖フレームワーク F R 3 配列をさらに含む、請求項 9 または請求項 1 0 に記載の抗体。

【請求項 1 2】

前記抗体は、

- a) 配列番号 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、
- b) 配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、
- c) (a) にあるような V H 配列および (b) にあるような V L 配列、
- d) 配列番号 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、
- e) 配列番号 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、
- f) (d) にあるような V H 配列および (e) にあるような V L 配列、
- g) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、
- h) 配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、
- i) (g) にあるような V H 配列および (h) にあるような V L 配列、
- j) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、
- k) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、
- l) (j) にあるような V H 配列および (k) にあるような V L 配列、
- m) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、
- n) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、
- o) (m) にあるような V H 配列および (n) にあるような V L 配列、
- p) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、
- q) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、
- r) (p) にあるような V H 配列および (q) にあるような V L 配列、
- s) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、
- t) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、
- u) (s) にあるような V H 配列および (t) にあるような V L 配列、
- v) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、
- w) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、
- x) (v) にあるような V H 配列および (w) にあるような V L 配列、
- y) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配

10

20

30

40

50

列、

z) 配列番号 25 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する V L 配列、または、

aa) (y) にあるような V H 配列および (z) にあるような V L 配列、を含む、前述の請求項のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 13】

配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、および 26 から選択される V H 配列を含む、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 14】

配列番号 5、7、9、11、13、15、17、19、および 25 から選択される V L 10
配列を含む、請求項 12 または請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 15】

抗体であって、

a) 配列番号 6 の V H 配列および配列番号 5 の V L 配列、

b) 配列番号 8 の V H 配列および配列番号 7 の V L 配列、

c) 配列番号 10 の V H 配列および配列番号 9 の V L 配列、

d) 配列番号 12 の V H 配列および配列番号 11 の V L 配列、

e) 配列番号 14 の V H 配列および配列番号 13 の V L 配列、

f) 配列番号 16 の V H 配列および配列番号 15 の V L 配列、

g) 配列番号 18 の V H 配列および配列番号 17 の V L 配列、 20

h) 配列番号 20 の V H 配列および配列番号 19 の V L 配列、または、

i) 配列番号 26 の V H 配列および配列番号 25 の V L 配列、を含む、抗体。

【請求項 16】

I g G 1、I g G 2 a、または I g G 2 b 抗体である、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードする、単離核酸。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 19】

前記抗体が産生されるように、請求項 18 に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体を産生する方法。 30

【請求項 20】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の抗体および細胞傷害性薬剤を含む、免疫複合体。

【請求項 21】

式 A b - (L - D) p を有し、式中、

(a) A b は、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の抗体であり、

(b) L は、リンカーであり、

(c) D は、メイタンシノイド、オーリスタチン、カリケアミシン、ピロロベンゾジアゼ 40
ピン、およびネモルピシン (n e m o r u b i c i n) 誘導体から選択される薬物であり

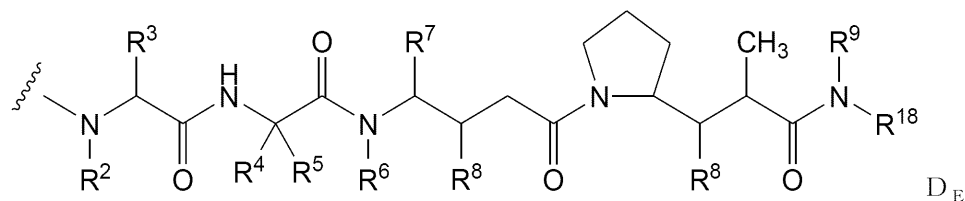
(d) p は、1 ~ 8 の範囲である、請求項 20 に記載の免疫複合体。

【請求項 22】

D は、オーリスタチンである、請求項 21 に記載の免疫複合体。

【請求項 23】

D は、式 D_E



を有し、式中、 R^2 および R^6 は各々、メチルであり、 R^3 および R^4 は各々、イソプロピルであり、 R^5 は、H であり、 R^7 は、sec-ブチルであり、各 R^8 は独立して、 CH_3 、 $O-CH_3$ 、OH、および H から選択され、 R^9 は、H であり、 R^{18} は、 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -アリールである、請求項 22 に記載の免疫複合体。

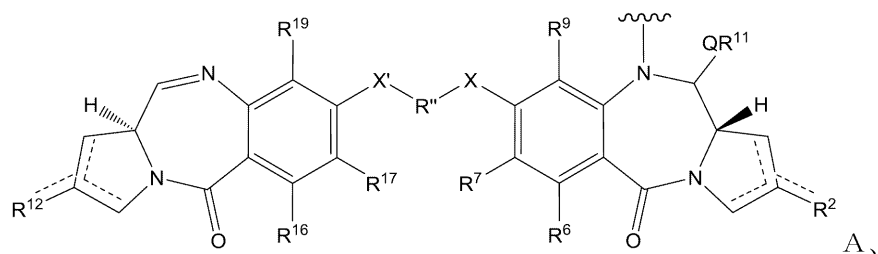
10

【請求項 24】

前記薬物は、MMAE である、請求項 21 に記載の免疫複合体。

【請求項 25】

D は、式 A、



20

のピロロベンゾジアゼピンであり、式中、点線は、C1 と C2 または C2 と C3 との間の二重結合の任意の存在を示し、

R^2 は独立して、H、OH、 $=O$ 、 $=CH_2$ 、CN、R、OR、 $=CH-R^D$ 、 $=C(R^D)_2$ 、 $O-SO_2-R$ 、 CO_2R 、および COR から選択され、任意に、ハロまたはジハロからさらに選択され、 R^D は独立して、R、 CO_2R 、COR、CHO、 CO_2H 、およびハロから選択され、

R^6 および R^9 は独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、 NH_2 、NHR、 NRR' 、 NO_2 、 Me_3Sn 、およびハロから選択され、

30

R^7 は独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、 NH_2 、NHR、 NRR' 、 NO_2 、 Me_3Sn 、およびハロから選択され、

Q は独立して、O、S、および NH から選択され、

R^{11} は、H、もしくは R であるか、または、Q が O である場合、 SO_3M であるか、のいずれかであり、式中、M は、金属陽イオンであり、

R および R' は各々独立して、任意に置換される C_{1-8} アルキル、 C_{3-8} ヘテロシクリル、および C_{5-20} アリール基から選択され、任意に、基 NRR' に関して、R および R' は、それらが結合する前記窒素原子と一緒に、任意に置換される 4、5、6、または 7 員の複素環式環を形成し、

40

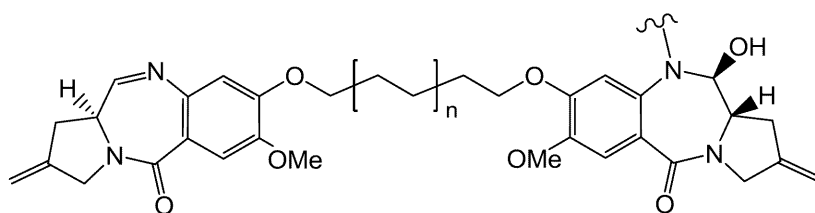
R^{12} 、 R^{16} 、 R^{19} 、および R^{17} は、それぞれ、 R^2 、 R^6 、 R^9 、および R^7 について定義される通りであり、

R'' は、 C_{3-12} アルキレン基であり、その鎖は、任意に置換される 1 個以上のヘテロ原子および / または芳香族環によって分断され得、

X および X' は独立して、O、S、および N(H) から選択される、請求項 21 に記載の免疫複合体。

【請求項 26】

D は、構造、



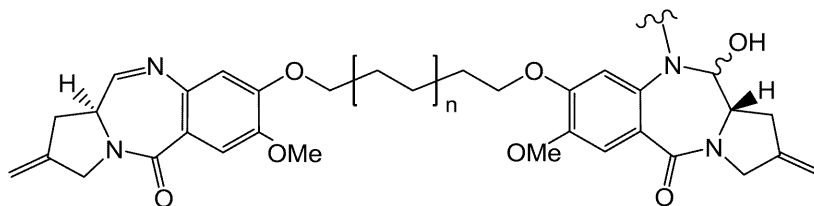
A (II)、

を有し、式中、 n は、0 または 1 である、請求項 25 に記載の免疫複合体。

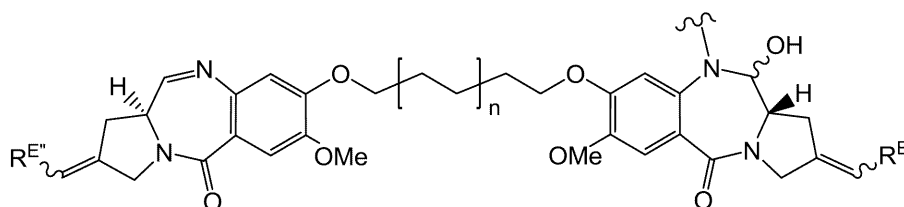
【請求項 27】

D は、

10



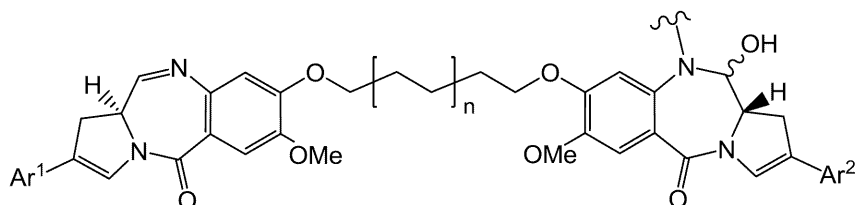
A (I)、



A (III)

I)、

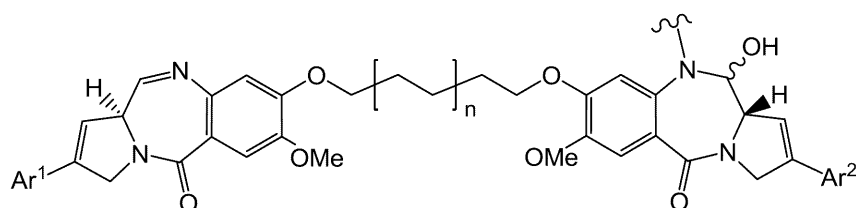
20



A (IV)、

30

および



A (V)、

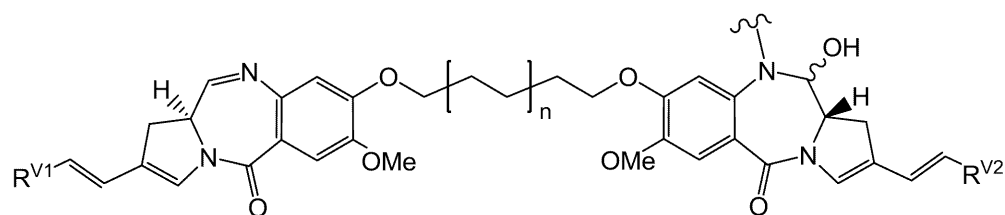
40

から選択される構造を有し、式中、 R^E および $R^{E'}$ は各々独立して、H または R^D から選択され、式中、 R^D は独立して、R、 CO_2R 、COR、CHO、 CO_2H 、およびハロゲンから選択され、

Ar^1 および Ar^2 は各々独立して、任意に置換される $C_5 - C_{20}$ アリールであり、 n は、0 または 1 である、請求項 25 に記載の免疫複合体。

【請求項 28】

D は、式 B、



のピロロベンゾジアゼピンであり、式中、水平の波線は、リンカーへの共有結合（a t t a c h e m e n t）部位を示し、

R^{V1} および R^{V2} は独立して、H、メチル、エチル、フェニル、フルオロ置換フェニル、および C_{5-6} ヘテロシクリルから選択され、

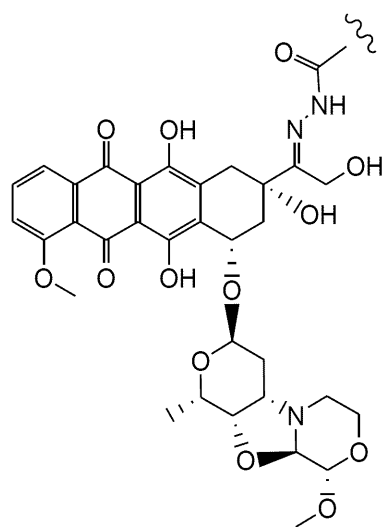
n は、0 または 1 である、請求項 21 に記載の免疫複合体。

【請求項 29】

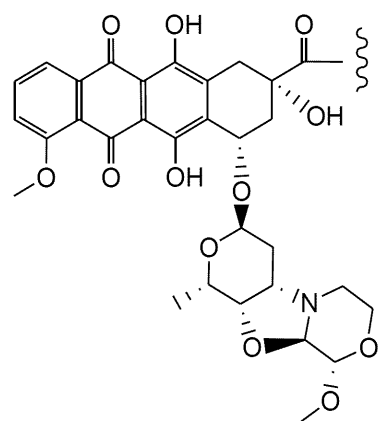
D は、ネモルピシン誘導体である、請求項 21 に記載の免疫複合体。

【請求項 30】

D は、



、および



から選択される構造を有する、請求項 29 に記載の免疫複合体。

【請求項 31】

前記リンカーは、プロテアーゼによって開裂可能である、請求項 21 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

【請求項 32】

前記リンカーは、val - cit ジペプチドまたは Phe - Lys ジペプチドを含む、

請求項 3 1 に記載の免疫複合体。

【請求項 3 3】

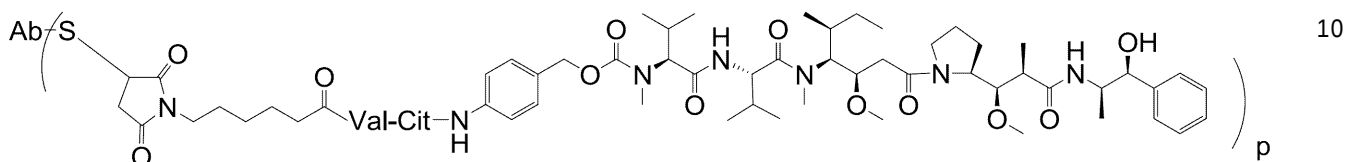
前記リンカーは、酸不安定性である、請求項 2 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

【請求項 3 4】

前記リンカーは、ヒドラゾンを含む、請求項 3 3 に記載の免疫複合体。

【請求項 3 5】

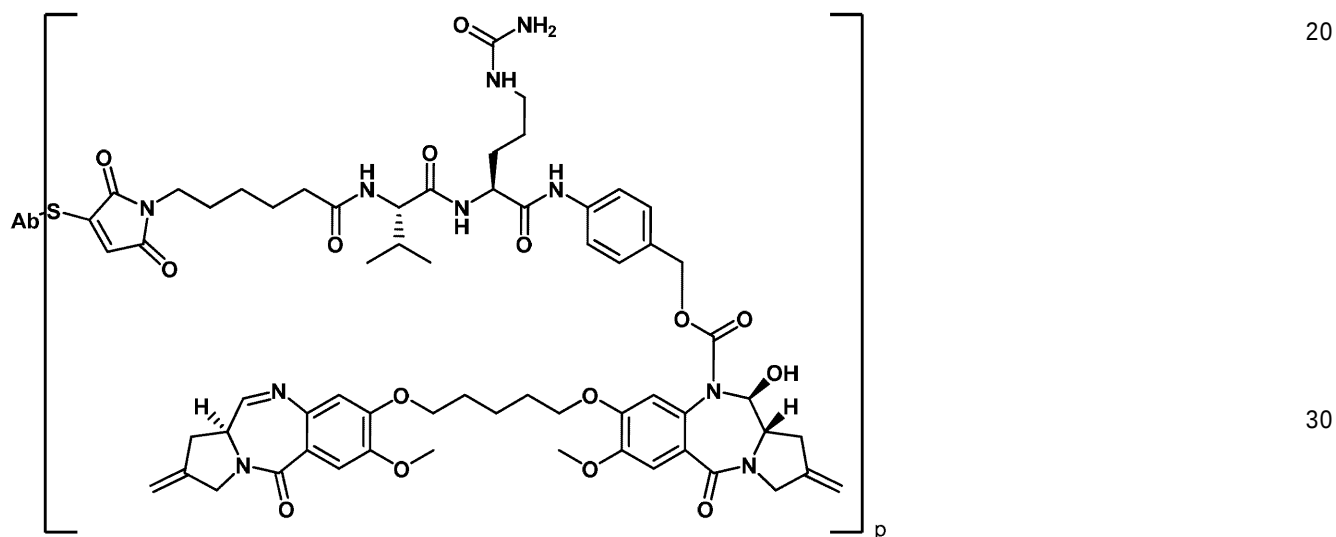
式、



を有し、式中、S は、硫黄原子である、請求項 2 3 に記載の免疫複合体。

【請求項 3 6】

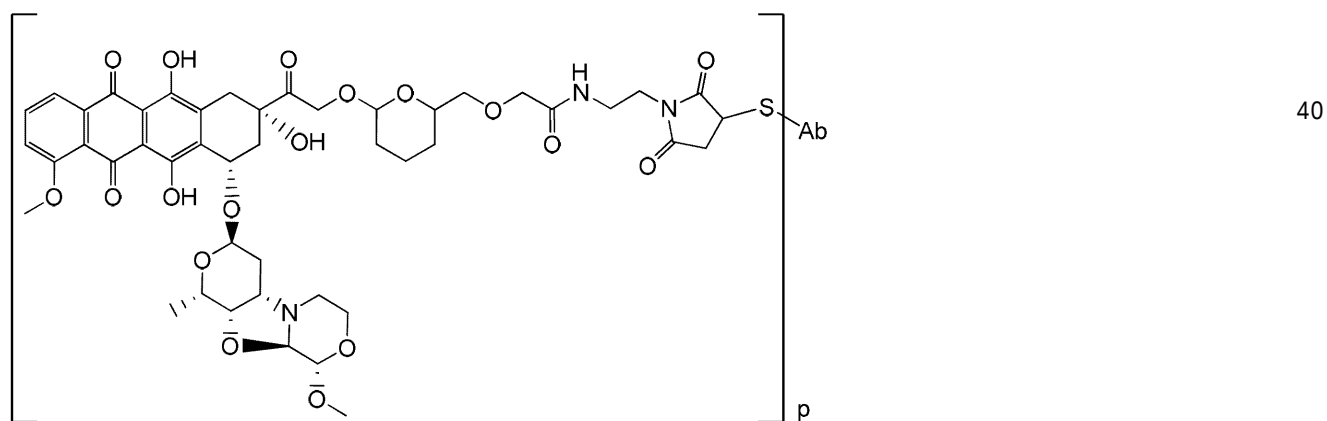
式、

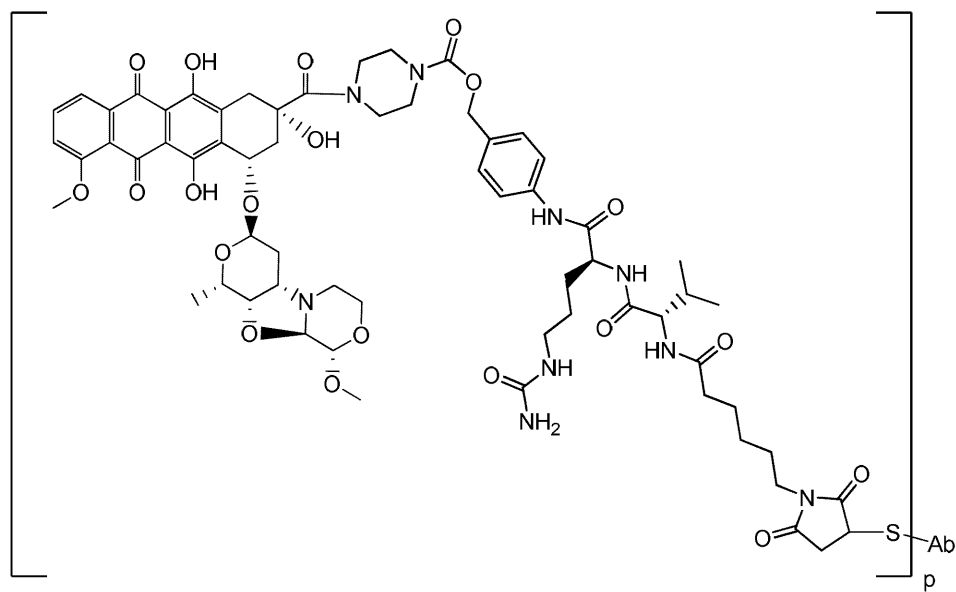


30

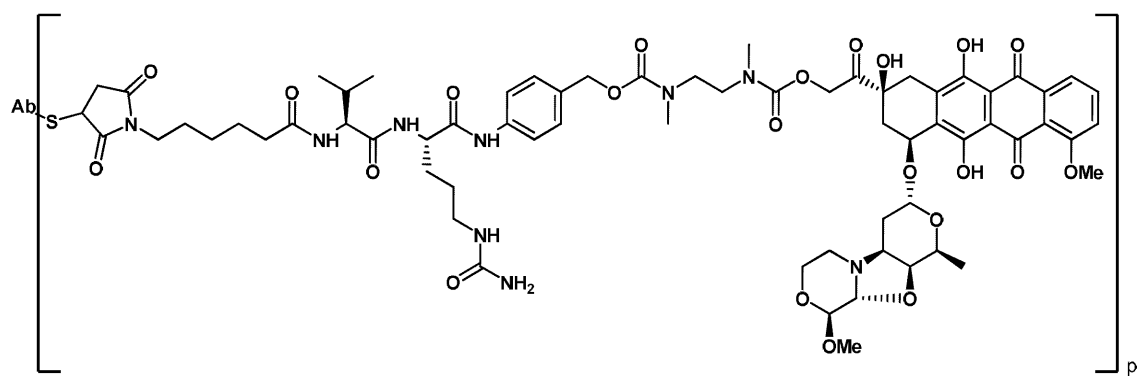
を有する、請求項 2 6 に記載の免疫複合体。

【請求項 3 7】



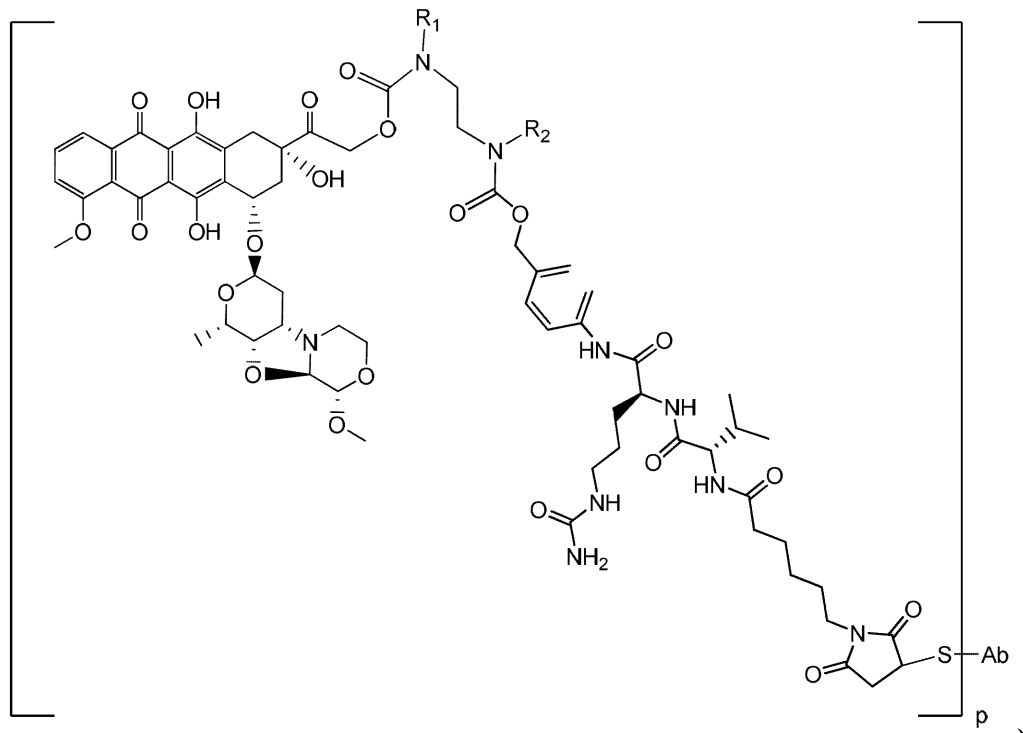


10



20

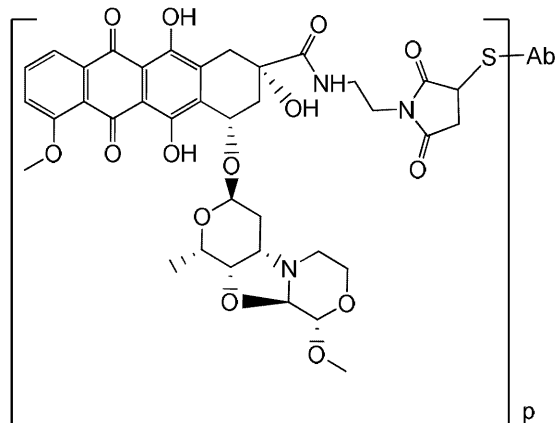
30



10

20

および



30

から選択される式を有する、請求項 30 に記載の免疫複合体。

【請求項 38】

p は、2 ~ 5 の範囲である、請求項 21 ~ 37 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

【請求項 39】

請求項 9 に記載の抗体を含む、請求項 21 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体。

40

【請求項 40】

請求項 15 に記載の抗体を含む、請求項 21 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体

。

【請求項 41】

請求項 21 ~ 40 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体、および薬剂的に許容される担体を含む、医薬製剤。

【請求項 42】

追加の治療剤をさらに含む、請求項 41 に記載の医薬製剤。

【請求項 43】

前記追加の治療剤は、Avastin（登録商標）（ベパシズマブ）である、請求項 4

50

2 に記載の医薬製剤。

【請求項 4 4】

L g R 5 陽性がんを有する個体を治療する方法であって、前記方法は、前記個体に、有効量の、請求項 2 1 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体を投与することを含む、方法。

【請求項 4 5】

前記 L g R 5 陽性がんは、結腸直腸がん、膵臓がん、卵巣がん、および子宮内膜がんから選択される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

追加の治療剤を個体に投与することをさらに含む、請求項 4 5 に記載の方法。

10

【請求項 4 7】

前記追加の治療剤は、A v a s t i n (登録商標) (ペバシズマブ)である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

L g R 5 陽性細胞の増殖を阻害する方法であって、前記方法は、前記細胞を、請求項 2 1 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体に、前記細胞の表面上の L g R 5 への前記免疫複合体の結合を許容する条件下で曝露し、それによって前記細胞の増殖を阻害することを含む、方法。

【請求項 4 9】

前記細胞は、結腸直腸、膵臓、卵巣、または子宮内膜がん細胞である、請求項 4 8 に記載の方法。

20

【請求項 5 0】

標識に複合される、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5 1】

前記標識は、陽電子放出体である、請求項 5 0 に記載の抗体。

【請求項 5 2】

前記陽電子放出体は、 ^{89}Zr である、請求項 5 1 に記載の抗体。

【請求項 5 3】

生体試料中のヒト L g R 5 を検出する方法であって、前記生体試料を、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の抗 L g R 5 抗体と、自然発生ヒト L g R 5 への前記抗 L g R 5 抗体の結合を許容する条件下で接触させることと、複合体が、前記生体試料中で、前記抗 L g R 5 抗体と自然発生ヒト L g R 5 との間で形成されるかどうかを検出することと、を含む、方法。

30

【請求項 5 4】

前記抗 L g R 5 抗体は、請求項 9 または請求項 1 5 にあるような抗体である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記生体試料は、結腸直腸がん試料、膵臓がん試料、卵巣がん試料、または子宮内膜がん試料である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

L g R 5 陽性がんを検出するための方法であって、(i) 標識された抗 L g R 5 抗体を、L g R 5 陽性がんを有するかまたはそれを有することが疑われる対象に投与することであって、前記標識された抗 L g R 5 抗体は、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の前記抗 L g R 5 抗体を含む、投与することと、(i i) 前記対象において前記標識された抗 L g R 5 抗体を検出することであって、前記標識された抗 L g R 5 抗体の検出は、前記対象における L g R 5 陽性がんを示す、検出することと、を含む、方法。

40

【請求項 5 7】

前記標識された抗 L g R 5 抗体は、標識されている、請求項 8 または請求項 1 4 にあるような抗体である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

50

前記標識された抗 L g R 5 抗体は、陽電子放出体に複合された抗 L g R 5 抗体を含む、請求項 5 6 または請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記陽電子放出体は、 ^{89}Zr である、請求項 5 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗 L g R 5 抗体および免疫複合体ならびにそれらを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ロイシンリッチ反復含有 G タンパク質共役型受容体 5 (L g R 5) は、活性に細胞分裂している (c y c l i n g) 腸幹細胞 (I S C) の表面上で見出される、7 回膜貫通タンパク質である。L g R 5 発現 I S C は、W n t 調節に感受性があり、主に、腸上皮の恒常性の再生に参与する。しかしながら、マウスにおける L g R 5 発現細胞の排除は、腸上皮の恒常性に影響せず、これは他の細胞型がこの細胞集団の喪失を補償し得ることを示唆している。T i a n e t a l . , N a t u r e 4 7 8 : 2 5 5 - 2 5 9 (2 0 1 1) 。R - スポンジンは、W N T 3 A による W N T シグナル伝達を増強し、全ての 4 つの R - スポンジン (R S P O 1 、 R S P O 2 、 R S P O 3 、 および R S P O 4) が、L g R 5 に結合可能である。L a u e t a l . , N a t u r e 4 7 6 : 2 9 3 - 2 9 7 (2 0 1 1) 。

10

20

【0003】

ヒト L g R 5 は、907 アミノ酸タンパク質であり、このうち約 540 個のアミノ酸が、アミノ末端シグナル配列の開裂後に細胞外空間にあることが予測される。L g R 5 は、エクトドメインにおける 17 個の不完全なロイシンリッチ反復モチーフ、およびロイシンリッチ反復と第 1 の膜貫通ドメインとの間に位置するシステインリッチ領域を含む。

【0004】

当該技術分野において、がん等の L g R 5 関連常態の診断および治療のために、L g R 5 を標的とする薬剤に対する必要性が存在する。本発明はその必要性を満たし、また他の便益を提供する。

【発明の概要】

30

【0005】

本発明は、抗 L g R 5 抗体および免疫複合体ならびにそれらを使用する方法を提供する。

【0006】

いくつかの実施形態において、L g R 5 に結合する単離抗体が提供される。いくつかの実施形態において、本抗体は、任意の組み合わせで、次の特性のうちの少なくとも 1 つ以上を有する：(a) 配列番号 67 のアミノ酸 22 ~ 555 内のエピトープに結合する、および / または配列番号 67 のアミノ酸 22 ~ 123 内のエピトープに結合する、および / または配列番号 67 のアミノ酸 22 ~ 323 内のエピトープに結合する、および / または配列番号 67 のアミノ酸 22 ~ 424 内のエピトープに結合する、および / または配列番号 67 のアミノ酸 324 ~ 555 内のエピトープに結合する、および / または配列番号 67 のアミノ酸 324 ~ 424 内のエピトープに結合する、(b) L g R 5 に、5 n M 以下、または 4 n M 以下、または 3 n M 以下、または 2 n M 以下、または 1 n M 以下、および任意に、0 . 0001 n M 以上、または 0 . 001 n M 以上、または 0 . 01 n M 以上の親和性で結合する、(c) L g R 5 への R - スポンジン (R S P O) の結合を有意に妨害しない、(d) β - カテニンシグナル伝達を有意に妨害しない、(e) L g R 5 シグナル伝達の R S P O 活性化を有意に妨害しない、(f) カスパーゼ 3 開裂を活性化する、(g) ヒト L g R 5 および齧歯類 L g R 5 の両方を認識する、(h) ヒト L g R 5 を認識するが、齧歯類 L g R 5 を認識しない、(i) その複合されていない形態で腫瘍成長を有意に阻害しない、ならびに (j) 幹細胞分化を誘導しない。

40

50

【0007】

いくつかの実施形態において、単離抗 L g R 5 抗体は、配列番号 67 のアミノ酸 22 ~ 323 内のエピトープに、5 nM 以下、または 4 nM 以下、または 3 nM 以下、または 2 nM 以下、または 1 nM 以下、および任意に、0.0001 nM 以上、または 0.001 nM 以上、または 0.01 nM 以上の親和性で結合する。

【0008】

いくつかの実施形態において、単離抗 L g R 5 抗体は、配列番号 67 のアミノ酸 22 ~ 123 内のエピトープに、5 nM 以下、または 4 nM 以下、または 3 nM 以下、または 2 nM 以下、または 1 nM 以下、および任意に、0.0001 nM 以上、または 0.001 nM 以上、または 0.01 nM 以上の親和性で結合する。

10

【0009】

いくつかの実施形態において、単離抗 L g R 5 抗体は、配列番号 67 のアミノ酸 324 ~ 424 内のエピトープに、5 nM 以下、または 4 nM 以下、または 3 nM 以下、または 2 nM 以下、または 1 nM 以下、および任意に、0.0001 nM 以上、または 0.001 nM 以上、または 0.01 nM 以上の親和性で結合する。

【0010】

単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、L g R 5 への R - スポンジン (R S P O) の結合を有意に妨害しない。単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、w n t / β - カテニンシグナル伝達を有意に妨害しない。単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、L g R 5 シグナル伝達の R S P O 活性化を有意に妨害しない。単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、カスパーゼ 3 開裂を活性化する。単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、ヒト L g R 5 および齧歯類 L g R 5 の両方を認識する。単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、ヒト L g R 5 を認識するが、齧歯類 L g R 5 を認識しない。単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、その複合されていない形態で腫瘍成長を有意に阻害しない。単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、幹細胞分化を誘導しない。

20

30

【0011】

単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、モノクローナル抗体である。単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体である。単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、I g G 1、I g G 2 a、または I g G 2 b 抗体である。単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、L g R 5 に結合する抗体断片である。単離抗 L g R 5 抗体のうちの任意のもののいくつかの実施形態において、L g R 5 は、配列番号 67 のヒト L g R 5 である。

【0012】

いくつかの実施形態において、L g R 5 に結合する抗体は、配列番号 67 のアミノ酸 22 ~ 323 内のエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、本抗体は、L g R 5 に 5 nM 以下の親和性で結合する。いくつかの実施形態において、本抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、本抗体は、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体である。いくつかの実施形態において、本抗体は、I g G 1、I g G 2 a、または I g G 2 b 抗体である。いくつかの実施形態において、本抗体は、L g R 5 に結合する抗体断片である。いくつかの実施形態において、L g R 5 は、配列番号 67 のヒト L g R 5 である。

40

【0013】

いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 32 のアミノ酸配列を含む H

50

V R - H 3、(b) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、および (c) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および (c) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号 4 1 の重鎖フレームワーク F R 3 配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 をさらに含む。いくつかの実施形態において、単離抗体は、(a) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号 3 5 の軽鎖フレームワーク F R 3 配列をさらに含む。

10

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態において、単離抗体は、(a) 配列番号 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、または (b) 配列番号 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、または (c) (a) にあるような V H 配列および (b) にあるような V L 配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号 8 の V H 配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号 7 の V L 配列を含む。いくつかの実施形態において、単離抗体は、配列番号 8 の V H 配列および配列番号 7 の V L 配列を含む。

20

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態において、L g R 5 に結合する抗体は、(a) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(b) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、および (c) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および (c) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 をさらに含む。いくつかの実施形態において、単離抗体は、(a) 配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

30

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態において、単離抗体は、(a) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、または (b) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、または (c) (a) にあるような V H 配列および (b) にあるような V L 配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号 2 4 の V H 配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号 2 3 の V L 配列を含む。いくつかの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 4 の V H 配列および配列番号 2 3 の V L 配列を含む。

40

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態において、L g R 5 に結合する抗体は、(a) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(b) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、および (c) 配列番号 4 9 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および (c) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 4 6 アミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 をさらに含む。いくつかの実施形態において、単離抗体は、(a) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む

50

H V R - L 1、(b) 配列番号 4 6 アミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態において、単離抗体は、(a) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、または (b) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、または (c) (a) にあるような V H 配列および (b) にあるような V L 配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号 2 2 の V H 配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号 2 1 の V L 配列を含む。いくつかの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 2 の V H 配列および配列番号 2 1 の V L 配列を含む。

10

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態において、L g R 5 に結合する抗体は、(a) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(b) 配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、および (c) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および (c) 配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 をさらに含む。いくつかの実施形態において、単離抗体は、(a) 配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

20

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態において、単離抗体は、(a) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列、または (b) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列、または (c) (a) にあるような V H 配列および (b) にあるような V L 配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号 2 6 の V H 配列を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、配列番号 2 5 の V L 配列を含む。いくつかの実施形態において、単離抗体は、配列番号 2 6 の V H 配列および配列番号 2 5 の V L 配列を含む。

30

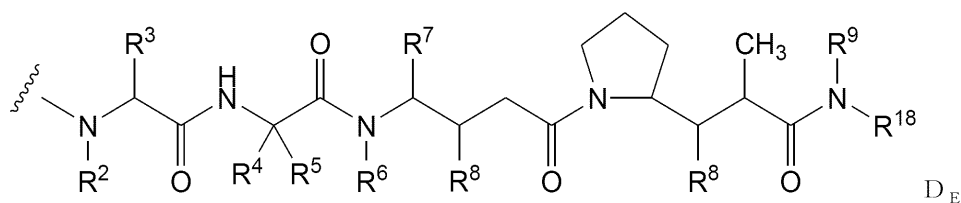
【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体をコードする単離核酸が提供される。いくつかの実施形態において、核酸を含む宿主細胞が提供される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体を産生する方法が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含む。

【 0 0 2 2 】

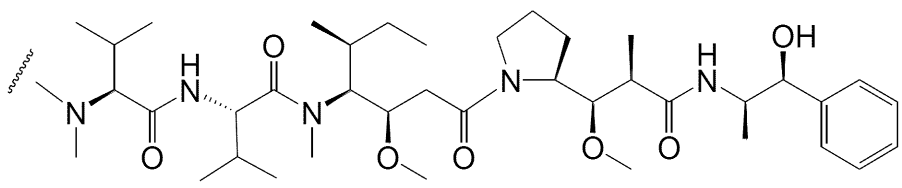
いくつかの実施形態において、免疫複合体が提供される。いくつかの実施形態において、免疫複合体は、抗 L g R 5 抗体および細胞傷害性薬剤を含む。いくつかの実施形態において、免疫複合体は、式 A b - (L - D) p を有し、式中、(a) A b は、本明細書に記載される抗体であり、(b) L は、リンカーであり、(c) D は、メイタンシノイド、オーリスタチン、カリケアミシン、ピロロベンゾジアゼピン、およびネモルピシン (n e m o r u b i c i n) 誘導体から選択される薬物であり、(d) p は、1 ~ 8 の範囲である。いくつかの実施形態において、D は、オーリスタチンである。いくつかのかかる実施形態において、D は、式 D_E

40



を有し、式中、 R^2 および R^6 は各々、メチルであり、 R^3 および R^4 は各々、イソプロピルであり、 R^5 は、H であり、 R^7 は、sec-ブチルであり、各 R^8 は独立して、 CH_3 、 $O-CH_3$ 、OH、および H から選択され、 R^9 は、H であり、 R^{18} は、 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -アリールである。いくつかの実施形態において、D は、次の構造を有する MMAE である：

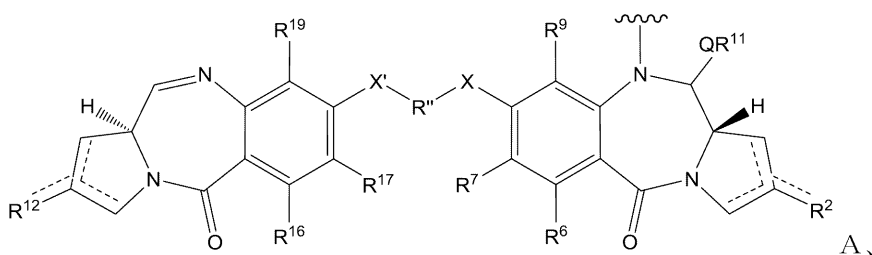
10



【0023】

いくつかの実施形態において、D は、式 A、

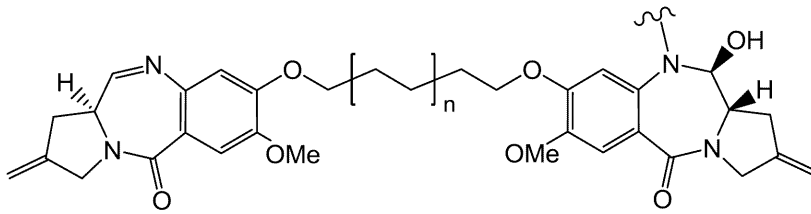
20



のピロロベンゾジアゼピンであり、式中、点線は、C1 と C2 または C2 と C3 との間の二重結合の任意の存在を示し、 R^2 は独立して、H、OH、 $=O$ 、 $=CH_2$ 、CN、R、OR、 $=CH-R^D$ 、 $=C(R^D)_2$ 、 $O-SO_2-R$ 、 CO_2R 、および COR から選択され、任意に、ハロまたはジハロからさらに選択され、式中、 R^D は独立して、R、 CO_2R 、COR、CHO、 CO_2H 、およびハロから選択され、 R^6 および R^9 は独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、 NH_2 、NHR、 NRR' 、 NO_2 、 Me_3Sn 、およびハロから選択され、 R^7 は独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、 NH_2 、NHR、 NRR' 、 NO_2 、 Me_3Sn 、およびハロから選択され、Q は独立して、O、S、および NH から選択され、 R^{11} は、H、もしくは R であるか、または、Q が O である場合、 SO_3M であるか、のいずれかであり、式中、M は、金属陽イオンであり、R および R' は各々独立して、任意に置換される C_{1-8} アルキル、 C_{1-12} アルキル、 C_{3-8} ヘテロシクリル、 C_{3-20} ヘテロシクリル、および C_{5-20} アリール基から選択され、任意に、基 NRR' に関して、R および R' は、それらが結合する窒素原子と一緒に、任意に置換される 4、5、6、または 7 員の複素環式環を形成し、 R^{12} 、 R^{16} 、 R^{19} および R^{17} は、それぞれ、 R^2 、 R^6 、 R^9 および R^7 について定義される通りであり、 R^{20} は、 C_{3-12} アルキレン基であり、その鎖は、任意に置換される 1 個以上のヘテロ原子および / または芳香族環によって分断され得、X および X' は独立して、O、S、および N(H) から選択される。いくつかのかかる実施形態において、D は、

30

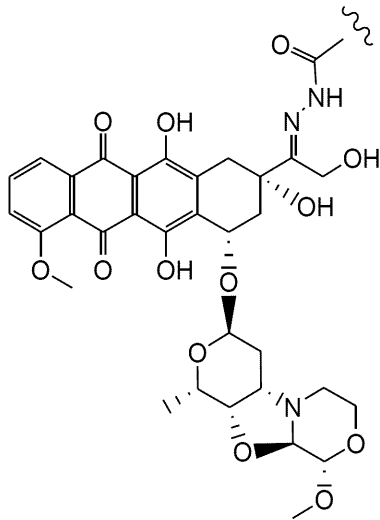
40



であり、式中、 n は、0 または 1 である。

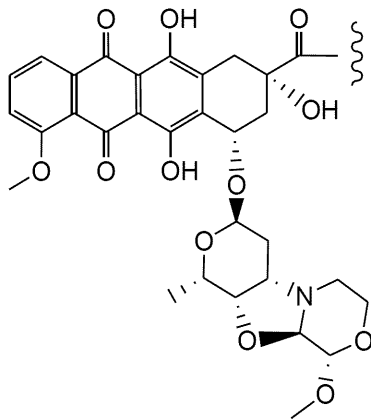
【0024】

いくつかの実施形態において、 D は、ネモルピシン誘導体である。いくつかの実施形態において、 D は、



20

、および



30

から選択される構造を有する。

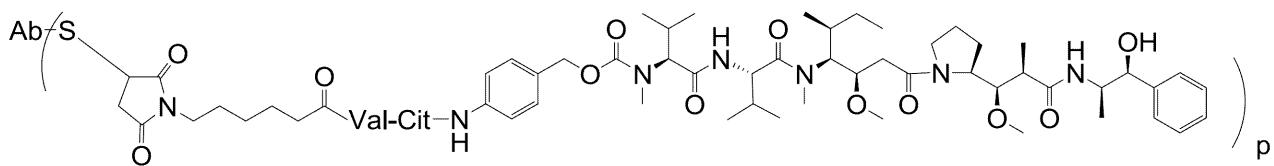
40

【0025】

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、プロテアーゼによって開裂可能であるリンカーを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、 $val-cit$ ジペプチドまたは $Phe-Lys$ ジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、免疫複合体は、酸不安定性であるリンカーを含む。いくつかのかかる実施形態において、リンカーは、ヒドラゾンを含む。

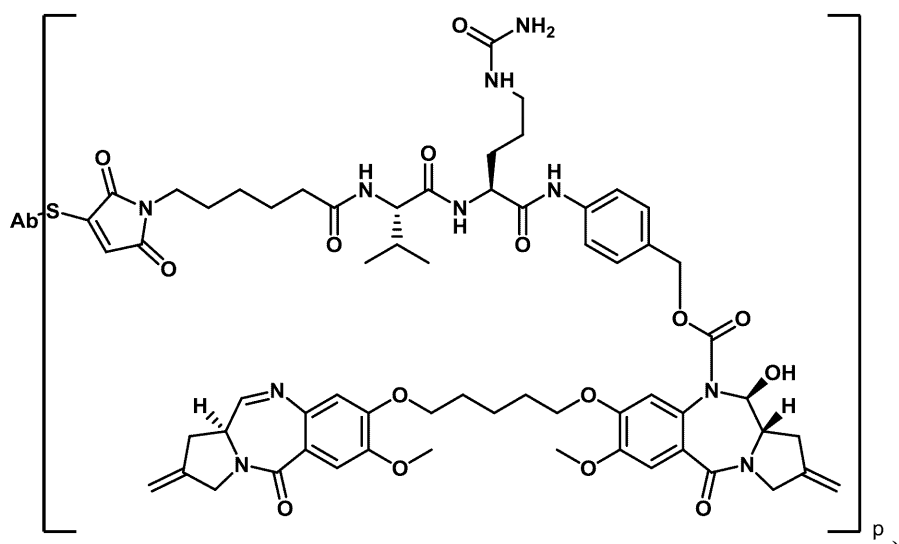
【0026】

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、

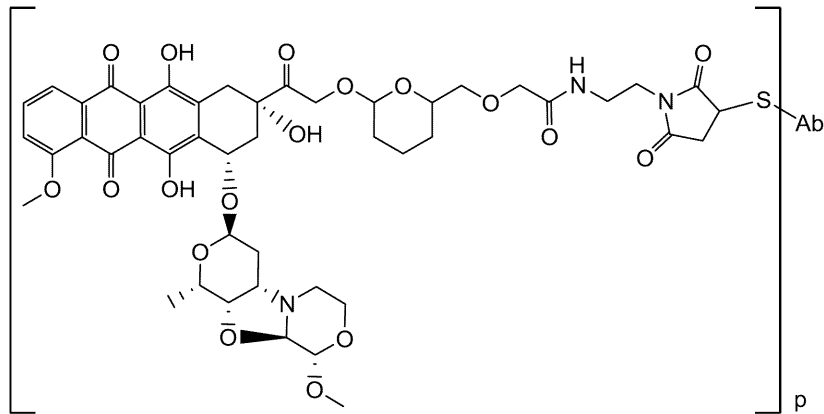


から選択される式を有し、式中、Sは、硫黄原子であり、

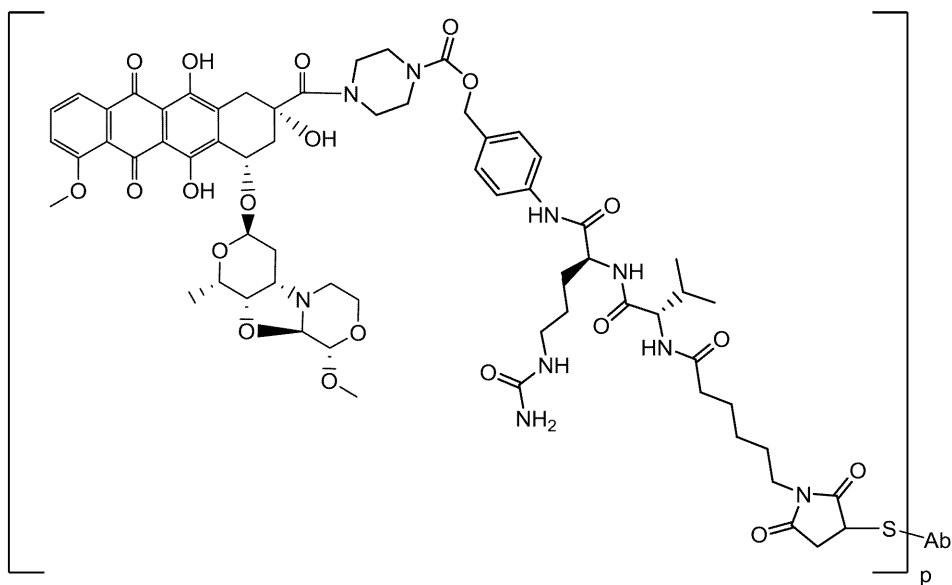
10



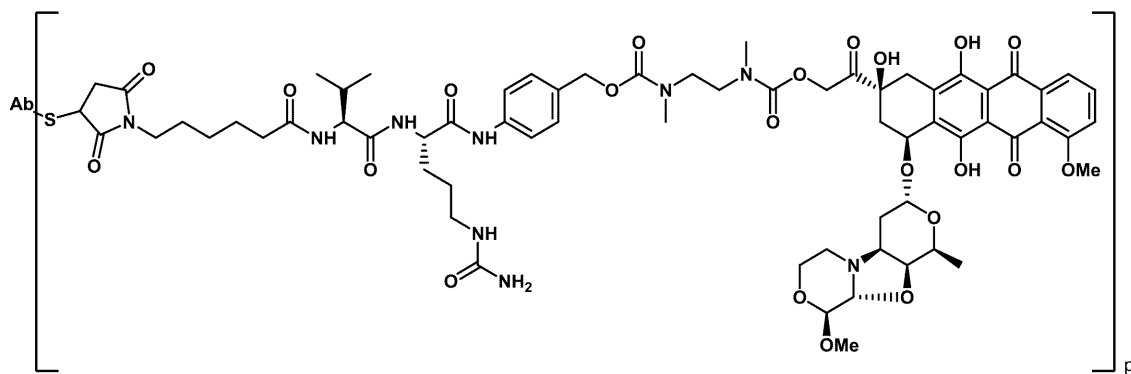
20



30

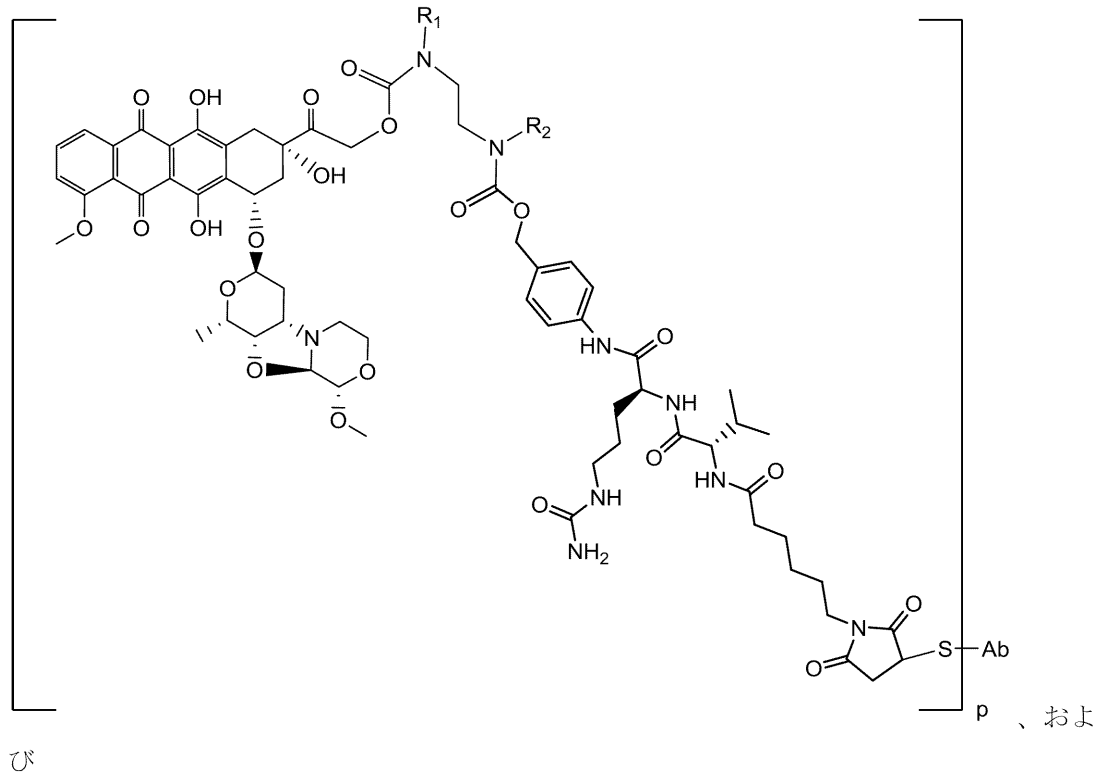


10



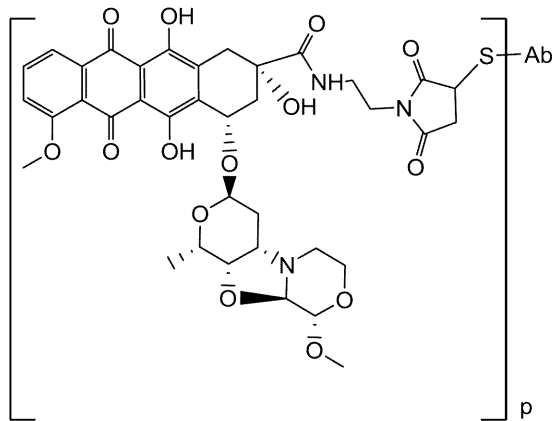
20

30



10

20



30

である。

いくつかの実施形態において、 p は、2 ~ 5 の範囲である。

【0027】

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、(a) 配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) 配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c) 配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d) 配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e) 配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f) 配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、抗体を含む。いくつかの実施形態において、免疫複合体は、配列番号8のVH配列および配列番号7のVL配列を含む、抗体を含む。

40

【0028】

いくつかの実施形態において、医薬製剤が提供される。いくつかのかかる実施形態において、医薬製剤は、例えば、本明細書に記載される、LgR5に結合する抗体を含む、免疫複合体を含む。いくつかの実施形態において、医薬製剤は、追加の治療剤をさらに含む

50

。いくつかの実施形態において、追加の治療剤は、A v a s t i n（登録商標）（ペバシズマブ）である。

【0029】

いくつかの実施形態において、L g R 5 陽性がんを有する個体を治療する方法が提供される。いくつかのかかる実施形態において、本方法は、例えば、本明細書に記載される、L g R 5 に結合する抗体を含む免疫複合体を含む、医薬製剤を投与することを含む。いくつかの実施形態において、L g R 5 陽性がんは、結腸直腸がん、膵臓がん、卵巣がん、および子宮内膜がんから選択される。いくつかの実施形態において、L g R 5 陽性がんは、小腸がんである。いくつかの実施形態において、小腸がんは、十二指腸、空腸、および / または腸骨 (i l i u m) のがんである。いくつかの実施形態において、小腸がんは、空腸および / または腸骨 (i l i u m) のがんである。いくつかの実施形態において、L g R 5 陽性がんは、K r a s 突然変異、A P C 突然変異、または K r a s 突然変異および A P C 突然変異の両方（例えば、がん細胞のうちの少なくとも一部分において）を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、追加の治療剤を個体に投与することを含む。いくつかのかかる実施形態において、追加の治療剤は、A v a s t i n（登録商標）（ペバシズマブ）である。

10

【0030】

いくつかの実施形態において、L g R 5 陽性細胞の増殖を阻害する方法が提供される。いくつかの実施形態において、細胞を、L g R 5 に結合する抗体を含む免疫複合体に、細胞の表面上の L g R 5 への免疫複合体の結合を許容する条件下で曝露することを含む、方法。いくつかの実施形態において、L g R 5 に結合する抗体は、本明細書に記載される抗体である。いくつかの実施形態において、細胞の増殖がそれによって阻害される。いくつかの実施形態において、細胞は、結腸直腸、小腸、膵臓、卵巣、または子宮内膜がん細胞である。

20

【0031】

いくつかの実施形態において、L g R 5 に結合する抗体は、標識に複合される。いくつかの実施形態において、L g R 5 に結合する抗体は、本明細書に記載される抗体である。いくつかの実施形態において、標識は、陽電子放出体である。いくつかの実施形態において、陽電子放出体は、⁸⁹Zr である。

【0032】

いくつかの実施形態において、生体試料中のヒト L g R 5 を検出する方法が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、生体試料を、抗 L g R 5 抗体と、自然発生ヒト L g R 5 への抗 L g R 5 抗体の結合を許容する条件下で接触させることと、複合体が、生体試料中で、抗 L g R 5 抗体と自然発生ヒト L g R 5 との間で形成されるかどうかを検出することとを含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、本明細書に記載される抗体である。いくつかの実施形態において、生体試料は、結腸直腸がん試料、小腸がん試料、膵臓がん試料、卵巣がん試料、または子宮内膜がん試料である。

30

【0033】

いくつかの実施形態において、L g R 5 陽性がんを検出するための方法が提供される。いくつかのかかる実施形態において、本方法は、(i) 標識された抗 L g R 5 抗体を、L g R 5 陽性がんを有するかまたはそれを有することが疑われる対象に投与することと、(i i) 対象において標識された抗 L g R 5 抗体を検出することとを含み、その標識された抗 L g R 5 抗体の検出は、対象における L g R 5 陽性がんを示す。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、本明細書に記載される抗体である。

40

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】実施例 A に記載される、種々の組織におけるヒト L g R 5 遺伝子発現のレベルのグラフ表示を示す。図1における挿入図は、実施例 A に記載される、正常な結腸組織および結腸腫瘍におけるヒト L g R 5 遺伝子発現のレベルのグラフ表示を示す。

【図2】実施例 B に記載される、インサイツハイブリダイゼーションによる結腸腫瘍にお

50

ける L g R 5 の発現を示す。

【図 3】実施例 B に記載される、双方ともインサイツハイブリダイゼーションによって決定される、(A) 結腸腫瘍組織マイクロアレイにおける種々のレベルの L g R 5 発現の有病率、および (B) 各結腸直腸腺がん試料からの 3 つのコアにおける L g R 5 発現の不均一性を示す。

【図 4】実施例 C ~ F に記載されるように発達させられた、ある特定の抗 L g R 5 モノクローナル抗体の特性を示す。

【図 5】マウス抗体 m u 8 E 1 1 およびそのヒト化変異体 (h u 8 E 1 1 . v 1 ~ h u 8 E 1 1 . v 8) の軽鎖可変領域配列のアライメントを示す。3 つの超可変領域 (H V R : H V R 1、H V R 2、H V R 3) は、配列における囲みによって示される。

10

【図 6】マウス抗体 m u 8 E 1 1 およびそのヒト化変異体 (h u 8 E 1 1 . v 1 ~ h u 8 E 1 1 . v 8) の重鎖可変領域配列のアライメントを示す。3 つの超可変領域 (H V R : H V R 1、H V R 2、H V R 3) は、配列における囲みによって示される。

【図 7】マウス抗体 3 G 1 2 および 2 H 6 の軽鎖可変領域配列を示す。3 つの超可変領域 (H V R : H V R 1、H V R 2、H V R 3) は、配列における囲みによって示される。

【図 8】マウス抗体 3 G 1 2 および 2 H 6 の重鎖可変領域配列を示す。3 つの超可変領域 (H V R : H V R 1、H V R 2、H V R 3) は、配列における囲みによって示される。

【図 9】実施例 E に記載される、キメラ抗体 c h 8 E 1 1 および種々のヒト化変異体の親和性測定を示す。

【図 10】ヒト抗体 Y W 3 5 3 の軽鎖可変領域配列を示す。3 つの超可変領域 (H V R : H V R 1、H V R 2、H V R 3) は、配列における囲みによって示される。

20

【図 11】ヒト抗体 Y W 3 5 3 の重鎖可変領域配列を示す。3 つの超可変領域 (H V R : H V R 1、H V R 2、H V R 3) は、配列における囲みによって示される。

【図 12 A】ヒト、カニクイザル、ラット、およびマウス由来の L g R 5 のアライメントを示す。

【図 12 B】ヒト、カニクイザル、ラット、およびマウス由来の L g R 5 のアライメントを示す。

【図 12 C】ヒト、カニクイザル、ラット、およびマウス由来の L g R 5 のアライメントを示す。

【図 13】実施例 L に記載されるように、抗 L g R 5 免疫複合体が、L o V o 結腸がん異種移植片において有効性を実証することを示す。

30

【図 14】実施例 M に記載されるように、抗 L g R 5 免疫複合体が、D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片において有効性を実証することを示す。

【図 15】実施例 M に記載されるように、h u Y W 3 5 3 - v c M M A E 免疫複合体が、D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片において 3、6、および 12 m g / k g で有効性を実証することを示す。

【図 16】実施例 N に記載される、A V および A K V マウスの結腸からの正常な組織およびポリープにおける L g R 5 m R N A 発現を示す。

【図 17】実施例 N に記載されるように、抗 L g R 5 抗体および抗 L g R 5 抗体 - 薬物複合体を投与された A K V マウスの生存期間が、対照 A K V マウスよりも長い生存時間を有することを示す。

40

【図 18】実施例 N に記載される、対照 A D C、抗 L g R 5 A D C、または抗 L g R 5 抗体を投与された A K V マウスにおける、切断型カスパーゼ 3 に対して陽性である、腫瘍面積の割合を示す。

【図 19】実施例 N に記載されるように、抗 L g R 5 抗体 - 薬物複合体を投与された A K V マウスが、無処置の A K V マウスおよび g p 1 2 0 - A D C または抗 L g R 5 を投与された A K V マウスよりも長い生存時間を有することを示す。

【図 20】実施例 N に記載される、A K V L g R 5 ^{D T R} / + マウスの小腸ポリープおよび結腸ポリープにおける L g R 5 + 面積を示す。

【図 21】実施例 N に記載される、(A) 対照 A D C および抗 L g R 5 - A D C 処置 A K

50

V L g R 5^{D T R} / + マウスにおける、1細胞面積当たりのC C 3 + G F P + 面積、ならびに(B)対照A D Cおよび抗L g R 5 - A D C処置A K V L g R 5^{D T R} / + マウスにおける、例となる免疫組織化学染色を示す。

【図22】実施例Nに記載される、対照A D Cおよび抗L g R 5 - A D C治療A K V L g R 5^{D T R} / + マウスにおける、1細胞面積(G F P + 細胞またはG F P - 細胞のいずれか)当たりのK i 6 7 + 面積を示す。

【図23】実施例Nに記載される、A K V L g R 5^{D T R} / + マウスの陰窩および腫瘍におけるG F P強度対G F P + 面積の比率を示す。

【図24】実施例Oに記載されるように、h u Y W 3 5 3 - v c M M A E、h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E、およびc h 8 E 1 1 - v c M M A E免疫複合体が、D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片において有効性を実証することを示す。

【図25】実施例Oに記載されるように、h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E免疫複合体が、D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片において有効性を実証することを示す。

【図26】実施例Pに記載されるように、h u Y W 3 5 3 - v c M M A Eおよびh u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E免疫複合体が、L o V o X 1 . 1 結腸がん異種移植片において有効性を実証することを示す。

【図27】実施例Pに記載されるように、h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E免疫複合体が、L o V o X 1 . 1 結腸がん異種移植片において有効性を実証することを示す。

【図28】実施例Qに記載されるように、h u Y W 3 5 3 - v c M M A E、h u Y W 3 5 3 - アセタール - P N U、およびh u Y W 3 5 3 - v c P N U免疫複合体が、D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片において有効性を実証することを示す。

【図29】実施例Rに記載されるように、h u 8 E 1 1 v 2 - アセタール - P N U、h u 8 E 1 1 v 2 - v c P N U、およびh u 8 E 1 1 v 2 - P N U免疫複合体が、D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片において実証することを示す。

【図30】実施例Sに記載される、L o V o X 1 . 1 結腸がん異種移植片におけるある特定のh u 8 E 1 1 v 2 免疫複合体および対照抗体免疫複体の投与の結果を示す。

【図31】実施例Sに記載されるように、h u 8 E 1 1 v 2 - アセタール - P N U免疫複合体は、過剰の対照抗体を同時投与された(c o a d m i n s t e r e d)マウスにおけるL o V o X 1 . 1 結腸がん異種移植片において有効性を実証する。

【図32】実施例Tに記載されるように、抗L g R 5 h u Y W 3 5 3 P B D免疫複合体が、D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片において有効性を実証することを示す。

【図33】実施例Tに記載されるように、抗L g R 5 h u 8 E 1 1 v 2 P B D免疫複合体が、D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片において有効性を実証することを示す。

【図34】実施例Uに記載されるように、抗L g R 5 h u 8 E 1 1 v 2 P B D免疫複合体が、L o V o X 1 . 1 結腸(c o l o n g)異種移植片において有効性を実証することを示す。

【図35 - 1】(A)抗体 - v c M M A E免疫複合体、(B)抗体 - アセタール - P N U免疫複合体、(C)抗体 - アセタール - P N U免疫複合体、(D)抗体 - P N U免疫複合体、および(E)抗体 - v c P B D免疫複体の構造を示す。

【図35 - 2】(A)抗体 - v c M M A E免疫複合体、(B)抗体 - アセタール - P N U免疫複合体、(C)抗体 - アセタール - P N U免疫複合体、(D)抗体 - P N U免疫複合体、および(E)抗体 - v c P B D免疫複体の構造を示す。

【発明を実施するための形態】

【0035】

I . 定義

本明細書における目的のために、「アクセプターヒトフレームワーク」は、下に記載される、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変ドメイン(V L)フレームワークまたは重鎖可変ドメイン(V H)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワー

10

20

30

40

50

クは、その同じアミノ酸配列を含んでもよく、またはそれは、アミノ酸配列変化を含有し得る。いくつかの実施形態において、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、または2以下である。いくつかの実施形態において、V Lアクセプターヒトフレームワークは、配列において、V Lヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と同一である。

【0036】

「親和性」は、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の、総計の非共有相互作用の強度を指す。別途指定されない限り、本明細書で使用されるとき、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体および抗原）間の1:1の相互作用を反映する、固有結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数（ K_d ）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例示説明および例となる実施形態が、以下に記載される。

10

【0037】

「親和性成熟」抗体は、変化を有しない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域（HVR）において1つ以上の変化を有し、かかる変化が抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす、抗体を指す。

【0038】

「抗LgR5抗体」および「LgR5に結合する抗体」という用語は、抗体が、診断剤および/または治療剤として、LgR5を標的とすることにおいて有用であるように、LgR5に十分な親和性で結合可能である抗体を指す。一実施形態において、無関係の非LgR5タンパク質への抗LgR5抗体の結合の程度は、例えば、放射免疫測定法（RIA）によって測定するとき、LgR5への抗体の結合の約10%未満である。ある特定の実施形態において、LgR5に結合する抗体は、1 μ M以下、100 nM以下、10 nM以下、5 nM以下、4 nM以下、3 nM以下、2 nM以下、1 nM以下、0.1 nM以下、0.01 nM以下、または0.001 nM以下（例えば、 10^{-8} M以下、例えば、 10^{-8} M ~ 10^{-13} M、例えば、 10^{-9} M ~ 10^{-13} M）の解離定数（ K_d ）を有する。ある特定の実施形態において、抗LgR5抗体は、異なる種由来のLgR5の間で保存されるLgR5のエピトープに結合する。

20

30

【0039】

「抗体」という用語は、本明細書で最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を含むが、これらに限定されない、種々の抗体構造を包含する。

【0040】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部を含み、インタクトな抗体が結合する抗原に結合する、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；二重特異性抗体；線状抗体（linear antibodies）；1本鎖抗体分子（例えば、scFv）；および抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0041】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、その抗原への参照抗体の結合を50%以上遮断する抗体、および逆に、競合アッセイにおいて、その抗原への抗体の結合を50%以上遮断する参照抗体を指す。例となる競合アッセイが本明細書に提供される。

【0042】

「がん」および「がん性」という用語は、未制御な細胞成長/増殖によって典型的に特徴付けられる、哺乳動物における生理的状态を指すか、または説明する。がんの例としては、がん腫、リンパ腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫

50

、および白血病が挙げられるが、これらに限定されない。かかるがんのより特定の例としては、扁平上皮細胞がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺がん、肺の扁平上皮がん、腹膜のがん、肝細胞がん、消化器がん、膵臓がん、神経膠腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、肝細胞腫、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、小腸がん、子宮内膜または子宮がん腫、唾液腺がん、腎臓がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰部がん、甲状腺がん、肝細胞がん、白血病および他のリンパ増殖性障害、ならびに種々の種類の頭頸部がん等が挙げられる。

【 0 0 4 3 】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖および / または軽鎖の一部が特定の源または種に由来する一方で、重鎖および / または軽鎖の残りの部分が異なる源または種に由来する、抗体を指す。

10

【 0 0 4 4 】

抗体の「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域の型を指す。5つの主要な抗体クラス I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M が存在し、これらのうちの数個は、サブクラス (アイソタイプ)、例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、および I g A₂ にさらに分割され得る。免役グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γ、および μ と呼ばれる。

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞機能を阻害するもしくは阻止する、および / または細胞死もしくは破壊を引き起こす、物質を指す。細胞傷害性薬剤には、放射性同位体 (例えば、A t²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、R e¹⁸⁶、R e¹⁸⁸、S m¹⁵³、B i²¹²、P³²、P b²¹²、および L u の放射性同位体) ; 化学療法剤もしくは化学療法薬 (例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド (ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド)、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシン C、クロラムブシル、ダウノルビシン、または他のインターカレート剤) ; 成長阻害剤; 核酸分解酵素等の酵素およびそれらの断片; 抗生物質; 細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素活性毒素 (それらの断片および / または変異体を含む) 等の毒素; ならびに下に記載される種々の抗腫瘍または抗がん剤が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【 0 0 4 6 】

「エフェクター機能」は、抗体アイソタイプにより様々である、抗体の F c 領域に起因し得る生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C 1 q 結合および補体依存性細胞傷害作用 (C D C) ; F c 受容体結合; 抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用 (A D C C) ; 食作用; 細胞表面受容体 (例えば、B 細胞受容体) の下方制御; ならびに B 細胞活性化が挙げられる。

【 0 0 4 7 】

薬剤、例えば、医薬製剤の「有効量」は、必要な複数回投薬量で一定期間にわたる、所望の治療的または予防的結果を達成するために有効な量を指す。

【 0 0 4 8 】

「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位を指す。

40

【 0 0 4 9 】

本明細書における「F c 領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含有する、免役グロブリン重鎖の C 末端領域を定義するように使用される。この用語には、天然配列 F c 領域および変異体 F c 領域が含まれる。一実施形態において、ヒト I g G 重鎖 F c 領域は、C y s 2 2 6 から、または P r o 2 3 0 から、重鎖のカルボキシル末端までに及ぶ。しかしながら、F c 領域の C 末端リジン (L y s 4 4 7) は、存在することも、しないこともある。本明細書で別途明記されない限り、F c 領域または定常領域におけるアミノ酸残基の付番は、K a b a t e t a l . , S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 5 t h E d . P u b

50

l i c H e a l t h S e r v i c e , N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a , M D , 1 9 9 1 に記載される、E U インデックスとも呼ばれる、E U 付番方式に従う。

【 0 0 5 0 】

「フレームワーク」または「F R」は、超可変領域（H V R）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのF Rは、一般に、4つのF RドメインF R 1、F R 2、F R 3、およびF R 4からなる。したがって、H V RおよびF R配列は、一般に、V H（またはV L）において次の配列で現れる：F R 1 - H 1（L 1）- F R 2 - H 2（L 2）- F R 3 - H 3（L 3）- F R 4。

【 0 0 5 1 】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、および「全抗体」という用語は、本明細書で、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有する、または本明細書に定義されるF c領域を含有する重鎖を有する、抗体を指すように交換可能に使用される。

【 0 0 5 2 】

「L g R 5のグリコシル化型」という用語は、炭水化物残基の付加によって翻訳後修飾されている、L g R 5の自然発生型を指す。

【 0 0 5 3 】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」という用語は、交換可能に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞には、初代形質転換細胞および継代の数に関わらずそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれる。子孫は、核酸含量において親細胞と完全に同一でない場合があるが、突然変異を含有し得る。元々形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する突然変異体子孫が、本明細書に含まれる。

【 0 0 5 4 】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生された、またはヒト抗体レパートリーを利用する非ヒト源に由来する、抗体のアミノ酸配列、または他のヒト抗体コード配列に対応する、アミノ酸配列を保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特異的に除外する。

【 0 0 5 5 】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンV LまたはV Hフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を代表する、フレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンV LまたはV H配列の選択は、可変ドメイン配列の下位集団から行われる。一般に、配列の下位集団は、K a b a t e t a l . , S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , F i f t h E d i t i o n , N I H P u b l i c a t i o n 9 1 - 3 2 4 2 , B e t h e s d a M D (1 9 9 1) , v o l s . 1 - 3 . にあるような下位集団である。一実施形態において、V Lについて、下位集団は、上記のK a b a tらにあるような下位集団カップIである。一実施形態において、V Hについて、下位集団は、上記のK a b a tらにあるような下位集団I I Iである。

【 0 0 5 6 】

「ヒト化」抗体は、非ヒトH V Rからのアミノ酸残基およびヒトF Rからのアミノ酸残基を含む、キメラ抗体を指す。ある特定の実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの、可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、そのH V R（例えば、C D R）の全てまたは実質的に全てが、非ヒト抗体のそれらに対応し、そのF Rの全てまたは実質的に全てが、ヒト抗体のそれらに対応する。ヒト化抗体は任意に、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでもよい。抗体、例えば非ヒト抗体の、「ヒト化型」は、ヒト化を経た抗体を指す。

【 0 0 5 7 】

本明細書で使用される「超可変領域」または「H V R」という用語は、配列が高度に変

10

20

30

40

50

化する、および／または構造的に規定されたループ（「超可変ループ」）を形成する、抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般に、天然４本鎖抗体は、６つのHVRを含み、このうち３つがVH（H1、H2、H3）にあり、３つがVL（L1、L2、L3）にある。HVRは一般に、超可変ループからのおよび／または「相補性決定領域」（CDR）からのアミノ酸残基を含み、このうち後者が、配列可変性が最も高く、および／または抗原認識に關与する。例となる超可変ループは、アミノ酸残基26～32（L1）、50～52（L2）、91～96（L3）、26～32（H1）、53～55（H2）、および96～101（H3）において生じる。（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917（1987））。例となるCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3）は、アミノ酸残基L1の24～34、L2の50～56、L3の89～97、H1の31～35B、H2の50～65、およびH3の95～102において生じる。（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD（1991））。VHにおけるCDR1を除いて、CDRは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRはまた、抗原に接触する残基である、「特異性決定残基」または「SDR」も含む。SDRは、短縮型（abbreviated）CDR、またはa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含有される。例となるa-CDR（a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、およびa-CDR-H3）は、アミノ酸残基L1の31～34、L2の50～55、L3の89～96、H1の31～35B、H2の50～58、およびH3の95～102において生じる。（Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619-1633（2008）を参照されたい）。別途指定されない限り、可変ドメインにおけるHVR残基および他の残基（例えば、FR残基）は、本明細書において上記のKabatらに従って付番される。

【0058】

「免疫複合体」は、細胞傷害性薬剤を含むが、これらに限定されない１個以上の異種性分子（複数可）に複合される抗体である。

【0059】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物には、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類（例えば、ヒト、およびサル等の非ヒト霊長類）、ウサギ、および齧歯類（例えば、マウスおよびラット）が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、個体または対象は、ヒトである。

【0060】

「単離抗体」は、その天然環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態において、本抗体は、例えば、電気泳動法（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフ法（例えば、イオン交換または逆相HPLC）によって決定するとき、95%超または99%超の純度まで精製される。抗体の純度の評価のための方法の概説については、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848: 79-87（2007）を参照されたい。

【0061】

「単離核酸」は、その天然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離核酸には、核酸分子を通常含有する細胞内に含有される核酸分子が含まれるが、その核酸分子は、染色体外に、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に、存在する。

【0062】

「抗LgR5抗体をコードする単離核酸」は、抗体重鎖および軽鎖（またはそれらの断片）をコードする１個以上の核酸分子を指し、それには単一のベクターまたは別個のベクターにおけるかかる核酸分子（複数可）が含まれ、かかる核酸分子（複数可）は、宿主細胞

胞内の1つ以上の場所に存在する。

【0063】

本明細書で使用される「LgR5」という用語は、細胞内のLgR5前駆体タンパク質のプロセッシングからもたらされる、任意の天然の成熟LgR5を指す。別途指定されない限り、この用語には、霊長類（例えば、ヒトおよびカニクイザル）および齧歯類（例えば、マウスおよびラット）等の哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源由来のLgR5が含まれる。この用語にはまた、LgR5の自然発生変異体、例えば、スプライス変異体または対立遺伝子変異体が含まれる。シグナル配列（アミノ酸1～21）を含む、例となるヒトLgR5前駆体タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号67に示される。例となる成熟ヒトLgR5のアミノ酸配列は、配列番号68に示される。例となるカニクイザルLgR5のアミノ酸33～907についての予測される配列は、配列番号69に示される。例となるラットLgR5前駆体（シグナル配列、アミノ酸1～21を含む）および成熟配列についてのアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号70および71に示される。例となるマウスLgR5前駆体（シグナル配列、アミノ酸1～21を含む）および成熟配列についてのアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号72および73に示される。

10

【0064】

「LgR5陽性がん」という用語は、細胞の表面上でLgR5を発現する細胞を含むがんを指す。細胞が表面上でLgR5を発現するかどうかを決定する目的のために、LgR5 mRNA発現は、細胞表面上のLgR5発現に相関すると見なされる。いくつかの実施形態において、LgR5 mRNAの発現は、インサイツハイブリダイゼーションおよびRT-PCR（定量RT-PCRを含む）から選択される方法によって決定される。代替的に、細胞表面上でのLgR5の発現は、例えば、LgR5に対する抗体を使用して、免疫組織化学、FACS等の方法において、決定することができる。

20

【0065】

「LgR5陽性細胞」という用語は、その表面上でLgR5を発現する細胞を指す。

【0066】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、および/または同じエピトープに結合するが、例えば、自然発生突然変異を含有する、またはモノクローナル抗体製剤の産生中に発生する、可能性のある変異体抗体を除き、かかる変異体は一般に少量で存在する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含む、ポリクローナル抗体製剤とは対照的に、モノクローナル抗体製剤の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対する。故に、「モノクローナル」という修飾語は、抗体の実質的に同種の集団から得られるという抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されないものとする。例えば、本発明による使用対象のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組み換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むが、これらに限定されない、多様な技法によって作製されてもよく、モノクローナル抗体を作製するためのかかる方法および他の例となる方法が、本明細書に記載されている。

30

40

【0067】

「裸の抗体」は、異種性部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識に複合されていない抗体を指す。裸の抗体は、医薬製剤中に存在してもよい。

【0068】

「天然抗体」は、様々な構造を有する、自然発生免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2つの同一の軽鎖および2つの同一の重鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端まで、各重鎖は、可変重ドメイン（variable heavy domain）または重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）、続いて3つの定常ドメイン（CH1、CH2、およびCH3）を有する。同様に、N末端からC末端まで、各軽

50

鎖は、可変軽ドメイン (variable light domain) または軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域 (VL)、続いて定常軽 (CL) ドメインを有する。抗体の軽鎖には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ (κ) およびラムダ (λ) と呼ばれる2つの型うちの1つが割り当てられ得る。

【0069】

「添付文書」という用語は、かかる治療薬の適応症、使用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌症についての情報、および/またはその使用に関する警告を含有する、治療薬の商用のパッケージに通例含まれる指示書を指すように使用される。

【0070】

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」は、配列をアライメントし、必要な場合、ギャップを導入して、配列同一性最大パーセントを得た後に、配列同一性の部分としていかなる保存的置換も考慮に入れずに、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、当該技術分野における技術の範囲内である種々の方式で、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMegalign (DNASTAR) ソフトウェア等の、公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、達成することができる。当業者は、比較されている配列の完全長にわたる最大のアライメントを得るために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列をアライメントするために適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. によって著され、ソースコードは、ユーザ文書と共に米国著作権庁 (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559に提出されており、米国著作権番号TXU 510087の下に登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に利用可能であるか、またはソースコードから編集されてもよい。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムで使用する場合は編集すべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変更はない。

【0071】

アミノ酸配列比較のためにALIGN-2が用いられる場合、所与のアミノ酸配列Bに対する、それとの、またはそれと対比した、所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性% (代替的に、所与のアミノ酸配列Bに対する、それとの、またはそれと対比したある特定のアミノ酸配列同一性%を有する、またはそれを含む、所与のアミノ酸配列Aと表現され得る) は、次のように算出される：

$$100 \times \text{分数} X / Y$$

(式中、Xは、配列アライメントプログラムALIGN-2によって、そのプログラムのAおよびBのアライメントにおいて完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である)。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一性%は、Aに対するBのアミノ酸配列同一性%と等しくはならないことが理解されよう。特に別途定めのない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性%値は、直前の段落に記載されるように、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して得られる。

【0072】

「医薬製剤」という用語は、調製物の中に含有される活性成分の生物活性が有効になるような形態であり、製剤が投与されるであろう対象にとって許容できないほど有毒である追加の構成成分を何ら含有しない、調製物を指す。

【0073】

「薬剤的に許容される担体」は、対象にとって無毒である、活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。薬剤的に許容される担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤、または防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0074】

本明細書で使用されるとき、「治療」（および「治療する」または「治療すること」等のその文法上の変形形態）は、治療されている個体の自然過程を変えることを目的とした臨床介入を指し、予防のために、または臨床病理過程の間に行うことができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患進行速度の低減、疾患状態の寛解または一次緩和、および緩解または予後の改善が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延するために、または疾患の進行を緩徐にするために使用される。

10

【0075】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体を抗原に結合することに関与する、抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、VHおよびVL）は一般に、同様の構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）および3つの超可変領域（HVR）を含む。（例えば、Kindt et al., *Immunology*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照されたい）。抗原結合特異性を付与するためには、単一のVHまたはVLドメインで十分であり得る。さらに、抗原に結合する抗体からのVHまたはVLドメインを使用して、それぞれ、相補的VLまたはVHドメインのライブラリをスクリーニングして、特定の抗原に結合する抗体を単離してもよい。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150: 880 - 887 (1993)、Clarkson et al., *Nature* 352: 624 - 628 (1991)を参照されたい。

20

【0076】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、連結している別の核酸を増殖することが可能な核酸分子を指す。この用語には、自己複製核酸構造としてのベクター、ならびに導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターが含まれる。ある特定のベクターは、作動的に連結された核酸の発現を導くことが可能である。かかるベクターは、本明細書で「発現ベクター」と称される。

30

【0077】

「アルキル」は、直鎖（normal）、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する、 $C_1 \sim C_{18}$ 炭化水素である。例としては、メチル（Me、 $-CH_3$ ）、エチル（Et、 $-CH_2CH_3$ ）、1-プロピル（n-Pr、n-プロピル、 $-CH_2CH_2CH_3$ ）、2-プロピル（i-Pr、i-プロピル、 $-CH(CH_3)_2$ ）、1-ブチル（n-Bu、n-ブチル、 $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ ）、2-メチル-1-プロピル（i-Bu、i-ブチル、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ ）、2-ブチル（s-Bu、s-ブチル、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ ）、2-メチル-2-プロピル（t-Bu、t-ブチル、 $-C(CH_3)_3$ ）、1-ペンチル（n-ペンチル、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ）、2-ペンチル（ $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$ ）、3-ペンチル（ $-CH(CH_2CH_3)_2$ ）、2-メチル-2-ブチル（ $-C(CH_3)_2CH_2CH_3$ ）、3-メチル-2-ブチル（ $-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$ ）、3-メチル-1-ブチル（ $-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$ ）、2-メチル-1-ブチル（ $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$ ）、1-ヘキシル（ $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ）、2-ヘキシル（ $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$ ）、3-ヘキシル（ $-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$ ）、2-メチル-2-ペンチル（ $-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$ ）、3-メチル-2-ペンチル（ $-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$ ）、4-メチル-2-ペンチル（ $-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$ ）、3-メチル-3-ペンチル（ $-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$ ）、2-メチル-3-ペンチル（

40

50

- $\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、2, 3 - ジメチル - 2 - ブチル ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、3, 3 - ジメチル - 2 - ブチル ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$) がある。

【0078】

本明細書で使用される「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル」という用語は、1 ~ 8 個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖の飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル」基には、- メチル、- エチル、- n - プロピル、- n - ブチル、- n - ペンチル、- n - ヘキシル、- n - ヘプチル、- n - オクチル、- n - ノニルおよび - n - デシルが含まれるが、これらに限定されない一方で、分岐鎖 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキルには、- イソプロピル、- sec - ブチル、- イソブチル、- tert - ブチル、- イソペンチル、2 - メチルブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキルには、- ビニル、- アリル、- 1 - ブテニル、- 2 - ブテニル、- イソブチレニル、- 1 - ペンテニル、- 2 - ペンテニル、- 3 - メチル - 1 - ブテニル、- 2 - メチル - 2 - ブテニル、- 2, 3 - ジメチル - 2 - ブテニル、1 - ヘキシル、2 - ヘキシル、3 - ヘキシル、- アセチレニル、- プロピニル、- 1 - ブチニル、- 2 - ブチニル、- 1 - ペンチニル、- 2 - ペンチニル、- 3 - メチル - 1 - ブチニルが含まれるが、これらに限定されない。 $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル基は、置換されていないか、または - $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、- $\text{O} - (\text{C}_1 \sim \text{C}_8 \text{ アルキル})$ 、- アリール、- $\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、- $\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、- $\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、- $\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、- $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、- $\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、- $\text{SO}_3\text{R}'$ 、- $\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、- $\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、- OH 、- ハロゲン、- N_3 、- NH_2 、- $\text{NH}(\text{R}')$ 、- $\text{N}(\text{R}')_2$ 、および - CN を含むが、これらに限定されない 1 個以上の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、 H 、- $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、およびアリールから選択される。

10

20

【0079】

本明細書で使用される「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ アルキル」という用語は、1 ~ 12 個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖の飽和または不飽和炭化水素を指す。 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{12}$ アルキル基は、置換されていないか、または - $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、- $\text{O} - (\text{C}_1 \sim \text{C}_8 \text{ アルキル})$ 、- アリール、- $\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、- $\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、- $\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、- $\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、- $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、- $\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、- $\text{SO}_3\text{R}'$ 、- $\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、- $\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、- OH 、- ハロゲン、- N_3 、- NH_2 、- $\text{NH}(\text{R}')$ 、- $\text{N}(\text{R}')_2$ 、および - CN を含むが、これらに限定されない 1 個以上の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、 H 、- $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル、およびアリールから選択される。

30

【0080】

本明細書で使用される「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル」という用語は、1 ~ 6 個の炭素原子を有する直鎖または分岐鎖の飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル」基には、- メチル、- エチル、- n - プロピル、- n - ブチル、- n - ペンチル、および - n - ヘキシルが含まれるが、これらに限定されない一方で、分岐鎖 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルには、- イソプロピル、- sec - ブチル、- イソブチル、- tert - ブチル、- イソペンチル、および 2 - メチルブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルには、- ビニル、- アリル、- 1 - ブテニル、- 2 - ブテニル、および - イソブチレニル、- 1 - ペンテニル、- 2 - ペンテニル、- 3 - メチル - 1 - ブテニル、- 2 - メチル - 2 - ブテニル、- 2, 3 - ジメチル - 2 - ブテニル、1 - ヘキシル、2 - ヘキシル、および 3 - ヘキシルが含まれるが、これらに限定されない。 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル基は、置換されていないか、または $\text{C}_1 \sim \text{C}_8$ アルキル基について上述される、1 個以上の基で置換されている可能性がある。

40

【0081】

本明細書で使用される「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル」という用語は、1 ~ 4 炭素原子を有する直鎖または分岐鎖の飽和または不飽和炭化水素を指す。代表的な「 $\text{C}_1 \sim \text{C}_4$ アルキル」基には、- メチル、- エチル、- n - プロピル、- n - ブチルが含まれるが、これらに限

50

定されない一方で、分岐鎖 $C_1 \sim C_4$ アルキルには、- イソプロピル、- sec - ブチル、- イソブチル、- tert - ブチルが含まれるが、これらに限定されず、不飽和 $C_1 \sim C_4$ アルキルには、- ビニル、- アリル、- 1 - ブテニル、- 2 - ブテニル、および - イソブチレニルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_1 \sim C_4$ アルキル基は、置換されていないか、または $C_1 \sim C_8$ アルキル基について上述される、1 個以上の基で置換されている可能性がある。

【0082】

「アルコキシ」は、酸素に単結合されたアルキル基である。例となるアルコキシ基には、メトキシ (- OCH_3) およびエトキシ (- OCH_2CH_3) が含まれるが、これらに限定されない。「 $C_1 \sim C_5$ アルコキシ」は、1 ~ 5 個の炭素原子を有するアルコキシ基である。アルコキシ基は、置換されていないか、またはアルキル基について上述される、1 個以上の基で置換されている可能性があり得る。

10

【0083】

「アルケニル」は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素、 sp^2 二重結合を有する直鎖、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する、 $C_2 \sim C_{18}$ 炭化水素である。例としては、エチレンまたはビニル (- $CH=CH_2$)、アリル (- $CH_2CH=CH_2$)、シクロペンテニル (- C_5H_7)、および 5 - ヘキセニル (- $CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$) が挙げられるが、これらに限定されない。「 $C_2 \sim C_8$ アルケニル」は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素、 sp^2 二重結合を有する 2 ~ 8 個の直鎖、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する、炭化水素である。

20

【0084】

「アルキニル」は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素、 sp 三重結合を有する直鎖、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する、 $C_2 \sim C_{18}$ 炭化水素である。例としては、アセチレン系 (- $C \equiv CH$) およびプロパルギル (- $CH_2C \equiv CH$) が挙げられるが、これらに限定されない。「 $C_2 \sim C_8$ アルキニル」は、少なくとも 1 つの不飽和部位、すなわち炭素 - 炭素、 sp 三重結合を有する 2 ~ 8 個の直鎖、第二級、第三級、または環状炭素原子を含有する、炭化水素である。

【0085】

「アルキレン」は、1 ~ 18 個の炭素原子からなり、親アルカンの同じまたは 2 個の異なる炭素原子からの 2 個の水素原子の除去によってもたらされる 2 つの一価ラジカル中心を有する、飽和の分岐鎖または直鎖または環状炭化水素基を指す。典型的なアルキレン基には、メチレン (- CH_2 -)、1, 2 - エチル (- CH_2CH_2 -)、1, 3 - プロピル (- $CH_2CH_2CH_2$ -)、1, 4 - ブチル (- $CH_2CH_2CH_2CH_2$ -) 等が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0086】

「 $C_1 \sim C_{10}$ アルキレン」は、式 - $(CH_2)_{1 \sim 10}$ - の直鎖、飽和炭化水素基である。 $C_1 \sim C_{10}$ アルキレンの例としては、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン (*octylene*)、ノニレン、およびデカレンが挙げられる。

40

【0087】

「アルケニレン」は、2 ~ 18 個の炭素原子からなり、親アルケンの同じまたは 2 個の異なる炭素原子からの 2 個の水素原子の除去によってもたらされる 2 つの一価ラジカル中心を有する、不飽和の分岐鎖または直鎖または環状炭化水素基を指す。典型的なアルケニレン基には、1, 2 - エチレン (- $CH=CH$ -) が含まれるが、これらに限定されない。

【0088】

「アルキニレン」は、2 ~ 18 個の炭素原子からなり、親アルキンの同じまたは 2 個の異なる炭素原子からの 2 個の水素原子の除去によってもたらされる 2 つの一価ラジカル中心を有する、不飽和の分岐鎖または直鎖または環状炭化水素基を指す。典型的なアルキニ

50

レン基には、アセチレン ($-C \equiv C-$)、プロパルギル ($-CH_2C \equiv C-$)、および 4-ペンチニル ($-CH_2CH_2CH_2C \equiv C-$) が含まれるが、これらに限定されない。

【0089】

「アリール」は、炭素環式芳香族基を指す。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、およびアントラセニルが挙げられるが、これらに限定されない。炭素環式芳香族基または複素環式芳香族基は、置換されていないか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{ アルキル})$ 、 $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、および $-CN$ を含むが、これらに限定されない 1 個以上の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、およびアリールから選択される。

10

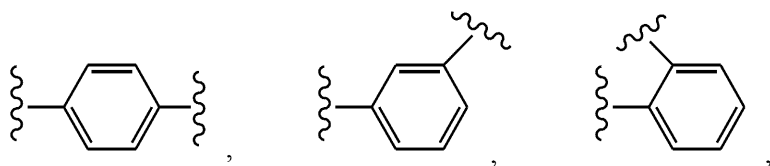
【0090】

「 $C_5 \sim C_{20}$ アリール」は、炭素環式芳香環内に 5 ~ 20 個の炭素原子を有する、アリール基である。 $C_5 \sim C_{20}$ アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、およびアントラセニルが挙げられるが、これらに限定されない。 $C_5 \sim C_{20}$ アリール基は、アリール基について上述されるように、置換されているか、または置換されていない可能性がある。「 $C_5 \sim C_{14}$ アリール」は、炭素環式芳香族内に 5 ~ 14 個の炭素原子を有するアリール基である。 $C_5 \sim C_{14}$ アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、およびアントラセニルが挙げられるが、これらに限定されない。 $C_5 \sim C_{14}$ アリール基は、アリール基について上述されるように、置換されているか、または置換されていない可能性がある。

20

【0091】

「アリーレン」は、2 つの共有結合を有するアリール基であり、次の構造、



30

に示されるオルト、メタ、またはパラ配置にあり得、そのフェニル基は、置換されていないか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8 \text{ アルキル})$ 、 $-アリール$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、および $-CN$ を含むが、これらに限定されない最大 4 個の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、およびアリールから選択される。

【0092】

「アリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端または sp^3 炭素原子に結合した水素原子のうちの 1 個が、アリール基と置き換えられている、非環式アルキル基を指す。典型的なアリールアルキル基には、ベンジル、2-フェニルエタン-1-イル、2-フェニルエテン-1-イル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-ナフチルエテン-1-イル、ナフトベンジル、2-ナフトフェニルエタン-1-イル等が含まれるが、これらに限定されない。アリールアルキル基は、6 ~ 20 個の炭素原子を含み、例えば、アリールアルキル基のアルカニル、アルケニル、またはアルキニル基を含む、アルキル部分は、1 ~ 6 個の炭素原子であり、アリール部分は、5 ~ 14 個の炭素原子である。

40

【0093】

「ヘテロアリールアルキル」は、炭素原子、典型的には末端または sp^3 炭素原子に結合した水素原子のうちの 1 個が、ヘテロアリール基と置き換えられている、非環式アルキル基を指す。典型的なヘテロアリールアルキル基には、2-ベンズイミダゾリルメチル、

50

2 - フリルエチル等が含まれるが、これらに限定されない。ヘテロアリールアルキル基は、6 ~ 20 個の炭素原子を含み、例えば、ヘテロアリールアルキル基のアルカニル、アルケニル、またはアルキニル基を含む、アルキル部分は、1 ~ 6 個の炭素原子であり、ヘテロアリール部分は、5 ~ 14 個の炭素原子ならびに N、O、P、および S から選択される 1 ~ 3 個のヘテロ原子である。ヘテロアリールアルキル基のヘテロアリール部分は、3 ~ 7 個の環員を有する単環 (2 ~ 6 個の炭素原子、または 7 ~ 10 環員を有する二環 (4 ~ 9 個の炭素原子ならびに N、O、P、および S から選択される 1 ~ 3 個のヘテロ原子)、例えば、ビシクロ [4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、または [6, 6] 系であり得る。

【0094】

「置換アルキル」、「置換アリール」、および「置換アリールアルキル」は、1 個以上の水素原子が各々独立して置換基と置き換えられている、それぞれ、アルキル、アリール、およびアリールアルキルを意味する。典型的な置換基には、- X、- R、- O⁻、- OR、- SR、- S⁻、- NR₂、- NR₃、= NR、- CX₃、- CN、- OCN、- SCN、- N=C=O、- NCS、- NO、- NO₂、= N₂、- N₃、NC(=O)R、- C(=O)R、- C(=O)NR₂、- SO₃⁻、- SO₃H、- S(=O)₂R、- OS(=O)₂OR、- S(=O)₂NR、- S(=O)R、- OP(=O)(OR)₂、- P(=O)(OR)₂、- PO₃、PO₃H₂、- C(=O)R、- C(=O)X、- C(=S)R、- CO₂R、- CO₂、- C(=S)OR、- C(=O)SR、- C(=S)SR、- C(=O)NR₂、- C(=S)NR₂、- C(=NR)NR₂ が含まれるが、これらに限定されず、式中、各 X は独立して、ハロゲン、すなわち F、Cl、Br、または I であり、各 R は独立して、- H、C₂ ~ C₁₈ アルキル、C₆ ~ C₂₀ アリール、C₃ ~ C₁₄ 複素環、保護基、またはプロドラッグ部分である。上述のアルキレン、アルケニレン、およびアルキニレン基もまた、同様に置換され得る。

【0095】

「ヘテロアリール」および「複素環」は、1 個以上の環原子がヘテロ原子、例えば、窒素、酸素、および硫黄である、環系を指す。複素環基は、3 ~ 20 個の炭素原子ならびに N、O、P、および S から選択される 1 ~ 3 個のヘテロ原子を含む。複素環は、3 ~ 7 個の環員を有する単環 (2 ~ 6 個の炭素原子ならびに N、O、P、および S から選択される 1 ~ 3 個のヘテロ原子)、または 7 ~ 10 環員を有する二環 (4 ~ 9 個の炭素原子ならびに N、O、P、および S から選択される 1 ~ 3 個のヘテロ原子)、例えば、ビシクロ [4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、または [6, 6] 系であり得る。

【0096】

例となる複素環は、例えば、Paquette, Leo A., "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968) (特に第 1、3、4、6、7、および 9 章)、"The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 ~ 現在) (特に第 13、14、16、19、および 28 巻)、ならびに J. Am. Chem. Soc. (1960) 82: 5566 に記載される。

【0097】

複素環の例としては、限定ではなく例として、ピリジル、ジヒドロイピリジル (dihydroypyridyl)、テトラヒドロピリジル (ピペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、硫黄酸化型テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、4 - ピペリドニル、ピロリジニル、2 - ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス - テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス - テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デ

10

20

30

40

50

カヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾシニル (azociny l)、
 トリアジニル、6 H - 1 , 2 , 5 - チアジアジニル、2 H , 6 H - 1 , 5 , 2 - ジチアジ
 ニル、チエニル、チアントレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサン
 テニル、フェノキサチニル、2 H - ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジ
 ニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3 H - インドリル、1 H - イン
 ダゾリル、プリニル、4 H - キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリ
 ニル、キナゾリニル、シンノリニル、プテリジニル、4 a H - カルバゾリル、カルバゾリ
 ル、 β - カルボリニル、フェナントリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナント
 ロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロ
 マニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニ
 ル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、
 オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベン
 ゾキサゾリニル、およびイサチノイル (isatiny l) が挙げられる。

10

【 0 0 9 8 】

限定ではなく例として、炭素が結合する複素環は、ピリジンの2、3、4、5、もしくは
 6 位、ピリダジンの3、4、5、もしくは6 位、ピリミジンの2、4、5、もしくは6
 位、ピラジンの2、3、5、もしくは6 位、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、
 チオフェン、ピロール、もしくはテトラヒドロピロールの2、3、4、もしくは5 位、オ
 キサゾール、イミダゾール、もしくはチアゾールの2、4、もしくは5 位、イソキサゾ
 ール、ピラゾール、もしくはイソチアゾールの3、4、もしくは5 位、アジリジンの2 もし
 くは3 位、アゼチジンの2、3、もしくは4 位、キノリンの2、3、4、5、6、7、も
 しくは8 位、またはイソキノリンの1、3、4、5、6、7、もしくは8 位において結合
 される。さらにより典型的に、炭素が結合した複素環には、2 - ピリジル、3 - ピリジル
 、4 - ピリジル、5 - ピリジル、6 - ピリジル、3 - ピリダジニル、4 - ピリダジニル、
 5 - ピリダジニル、6 - ピリダジニル、2 - ピリミジニル、4 - ピリミジニル、5 - ピリ
 ミジニル、6 - ピリミジニル、2 - ピラジニル、3 - ピラジニル、5 - ピラジニル、6 -
 ピラジニル、2 - チアゾリル、4 - チアゾリル、または5 - チアゾリルが含まれる。

20

【 0 0 9 9 】

限定ではなく例として、窒素が結合した複素環は、アジリジン、アゼチジン、ピロール
 、ピロリジン、2 - ピロリン、3 - ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2 - イミ
 ダゾリン、3 - イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2 - ピラゾリン、3 - ピラゾリ
 ン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、1 H - インダゾールの1 位、イ
 ソインドール、またはイソインドリンの2 位、モルホリンの4 位、およびカルバゾールま
 たは β - カルボリンの9 位において結合される。さらにより典型的に、窒素が結合した複
 素環には、1 - アジリジル、1 - アゼテジル (a z e t e d y l)、1 - ピロリル、1 -
 イミダゾリル、1 - ピラゾリル、および1 - ピペリジニルが含まれる。

30

【 0 1 0 0 】

「 $C_3 \sim C_8$ 複素環」は、環炭素原子のうちの1 ~ 4 個が独立して、O、S、およびN
 からなる群からのヘテロ原子と置き換えられている、芳香族または非芳香族 $C_3 \sim C_8$ 炭
 素環を指す。 $C_3 \sim C_8$ 複素環の代表的な例としては、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェ
 ン、インドリル、ベンゾピラゾリル、クマリニル、イソキノリニル、ピロリル、チオフェ
 ニル、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、
 ピリミジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、
 イソキサゾリル、およびテトラゾリルが挙げられるが、これらに限定されない。 $C_3 \sim C$
 $_8$ 複素環は、置換されていないか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-$ ($C_1 \sim C_8$ ア
 ルキル)、 $-アリアル$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、および $-CN$ を含むが、これらに限定されない最大7 個の基で置換さ
 れている可能性があり、式中、各 R' は独立して、H、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、およびア

40

50

ルールから選択される。

【0101】

「 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロ」は、複素環基の水素原子のうちの1個が結合と置き換えられている、上に定義される $C_3 \sim C_8$ 複素環基を指す。 $C_3 \sim C_8$ ヘテロシクロは、置換されていないか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、および $-CN$ を含むが、これらに限定されない最大6個の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、およびアリールから選択される。

10

【0102】

「 $C_3 \sim C_{20}$ 複素環」は、環炭素原子のうちの1～4個が独立して、 O 、 S 、および N からなる群からのヘテロ原子と置き換えられている、芳香族または非芳香族 $C_3 \sim C_8$ 炭素環を指す。 $C_3 \sim C_{20}$ 複素環は、置換されていないか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、および $-CN$ を含むが、これらに限定されない最大7個の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、およびアリールから選択される。

20

【0103】

「 $C_3 \sim C_{20}$ ヘテロシクロ」は、複素環基の水素原子のうちの1個が結合と置き換えられている、上に定義される $C_3 \sim C_{20}$ 複素環基を指す。

【0104】

「炭素環」は、単環として3～7個の炭素原子、または二環として7～12個の炭素原子を有する、飽和または不飽和の環を意味する。単環式炭素環は、3～6個の環原子、さらにより典型的には5または6個の環原子を有する。二環式炭素環は、例えば、ビシクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6]、もしくは[6, 6]系として配置される、7～12個の環原子、またはビシクロ[5, 6]もしくは[6, 6]系として配置される、9もしくは10個の環原子を有する。単環式炭素環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペンタ-1-エニル、1-シクロペンタ-2-エニル、1-シクロペンタ-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキサ-1-エニル、1-シクロヘキサ-2-エニル、1-シクロヘキサ-3-エニル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられる。

30

【0105】

「 $C_3 \sim C_8$ 炭素環」は、3、4、5、6、7、または8員の飽和または不飽和の非芳香族炭素環式環である。代表的な $C_3 \sim C_8$ 炭素環には、 $-$ シクロプロピル、 $-$ シクロブチル、 $-$ シクロペンチル、 $-$ シクロペンタジエニル、 $-$ シクロヘキシル、 $-$ シクロヘキセニル、 $-1, 3$ -シクロヘキサジエニル、 $-1, 4$ -シクロヘキサジエニル、 $-$ シクロヘプチル、 $-1, 3$ -シクロヘプタジエニル、 $-1, 3, 5$ -シクロヘプタトリエニル、 $-$ シクロオクチル、および $-$ シクロオクタジエニルが含まれるが、これらに限定されない。 $C_3 \sim C_8$ 炭素環基は、置換されていないか、または $-C_1 \sim C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 \sim C_8$ アルキル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、および $-CN$ を含むが、これらに限定されない1個以上の基で置換されている可能性があり、式中、各 R' は独立して、 H 、 $-C_1 \sim C_8$ アルキル、およびアリールから選択される。

40

【0106】

50

「 $C_3 \sim C_8$ カルボシクロ」は、炭素環基の水素原子のうちの 1 個が結合と置き換えられている、上に定義される $C_3 \sim C_8$ 炭素環基を指す。

【0107】

「リンカー」は、共有結合、または抗体を薬物部分に共有結合する原子の鎖を含む、化学部分を指す。種々の実施形態において、リンカーには、アルキルジイル、アリールジイル、ヘテロアリールジイル等の二価基、 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ 等の部分、アルキルオキシ（例えば、ポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ）およびアルキルアミノ（例えば、ポリエチレンアミノ、Jeffamine（商標））の反復単位、ならびにコハク酸塩、コハク酸アミド、ジグリコール酸塩、マロン酸塩、およびカプロアミドを含む二酸エステルおよびアミドが含まれる。種々の実施形態において、リンカーは、

10

【0108】

「キラル」という用語は、鏡像パートナーの重ね合わせできない (*non-superimposability*) 特性を有する分子を指し、一方で「キラル」という用語は、それらの鏡像パートナーと重ね合わせできる (*superimposability*) 分子を指す。

【0109】

「立体異性体」という用語は、同一の化学構成を有するが、空間内の原子または基の配置に関して異なる、化合物を指す。

20

【0110】

「ジアステレオマー」は、2 つ以上のキラル性の中心を有し、それらの分子が互いの鏡像でない、立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理特性、例えば、融点、沸点、スペクトル特性、および反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動法およびクロマトグラフィー等の高解像度分析手順の下で分離されてもよい。

【0111】

「鏡像異性体」は、互いに重ね合わせできない鏡像である、化合物の 2 つの立体異性体を指す。

【0112】

本明細書で使用される立体化学的な定義および慣例は、一般に、S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York、および Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York に従う。多くの有機化合物は、光学活性型で存在し、すなわち、それらは、平面偏光の平面を回転させる能力を有する。光学活性化合物を説明する際、接頭辞 D および L、または R および S は、そのキラル中心（複数可）の周りの分子の絶対配置を表すように使用される。接頭辞 d および l または (+) および (-) は、化合物による平面偏光の回転の徴候を表記するために用いられ、このうち (-) または l は、化合物が左旋性であることを意味する。(+) または d の接頭辞を有する化合物は、右旋性である。所与の化学構造について、これらの立体異性体は、それらが互いの鏡像であることを除いて同一である。特定の立体異性体はまた、鏡像異性体とも称され得、かかる異性体の混合物は、しばしば鏡像異性体混合物と呼ばれる。鏡像異性体の 50 : 50 混合物は、ラセミ混合物またはラセミ体と称され、それらは化学反応またはプロセスにおいて立体選択または立体特異性が存在していない場合に生じ得る。「ラセミ混合物」および「ラセミ体」という用語は、光学活性を欠く 2 つの鏡像異性体種の等モル混合物を指す。

30

40

【0113】

「脱離基」は、別の官能基によって置換され得る官能基を指す。ある特定の脱離基は、当該技術分野で周知であり、例としては、ハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物、ヨウ

50

化物)、メタンスルホニル(メシル)、p-トルエンスルホニル(トシル)、トリフルオロメチルスルホニル(トリフル酸塩)、およびトリフルオロメチルスルホン酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【0114】

「保護基」という用語は、特定の官能性を、化合物上の他の官能基を反応させながら、ブロックするまたは保護するために一般的に用いられる置換基を指す。例えば、「アミノ保護基」は、化合物中のアミノ官能性をブロックするまたは保護する、アミノ基に結合した置換基である。好適なアミノ保護基には、アセチル、トリフルオロアセチル、t-ブトキシカルボニル(BOC)、ベンジルオキシカルボニル(CBZ)、および9-フルオレニルメチレンオキシカルボニル(fluorenylmethylenoxycarbonyl)(Fmoc)が含まれるが、これらに限定されない。保護基およびそれらの使用の一般的説明については、T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991、またはより新しい版を参照されたい。

【0115】

II. 組成物および方法

一態様において、本発明は、部分的に、LgR5に結合する抗体およびかかる抗体を含む免疫複合体に基づく。本発明の抗体および免疫複合体は、例えば、LgR5陽性がんの診断または治療に有用である。

【0116】

A. 例となる抗LgR5抗体

いくつかの実施形態において、本発明は、LgR5に結合する単離抗体を提供する。LgR5は、例えば、活性に細胞分裂している腸幹細胞の表面上で見出される、7回膜貫通タンパク質である。本明細書で実証されるように、LgR5は、試験された結腸腫瘍切片の約77%において発現される。

【0117】

シグナル配列(アミノ酸1~21)を含む、例となる自然発生ヒトLgR5前駆体タンパク質配列は、配列番号67に提供され、対応する成熟LgR5タンパク質配列は、配列番号68(配列番号67のアミノ酸22~907に対応する)に示される。

【0118】

ある特定の実施形態において、抗LgR5抗体は、任意の組み合わせで、次の特性のうちの少なくとも1つ以上を有する：(a)配列番号67のアミノ酸22~555内のエピトープに結合する、(b)LgR5に、5nM以下、または4nM以下、または3nM以下、または2nM以下、または1nM以下、および任意に、0.0001nM以上、または0.001nM以上、または0.01nM以上の親和性で結合する、(c)LgR5へのR-スポンジン(RSPO)の結合を有意に妨害しない、(d) β -カテニンシグナル伝達を有意に妨害しない、(e)LgR5シグナル伝達のRSPO活性化を有意に妨害しない、(f)カスパーゼ3開裂を活性化する、(g)ヒトLgR5および齧歯類LgR5の両方を認識する、(h)ヒトLgR5を認識するが、齧歯類LgR5を認識しない、(i)その複合されていない形態で腫瘍成長を有意に阻害しない、ならびに(j)幹細胞分化を誘導しない。いくつかの実施形態において、抗LgR5抗体は、8E11、ならびにhu8E11.v2、YW353、2H6、および3G12等のそのヒト化変異体である。いくつかの実施形態において、LgR5は、ヒトLgR5である。いくつかの実施形態において、LgR5は、ヒト、カニクイザル、マウス、およびラットLgR5から選択される。

【0119】

(a)配列番号67のアミノ酸22~555内のエピトープに結合する

抗LgR5抗体がLgR5のエピトープに結合するかどうかを決定する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープ(例えば、配列番号67のアミノ酸22~555内)への抗LgR5抗体の結合は、293細胞内で

N末端およびC末端欠失を伴うLgR5ポリペプチドを発現させること、ならびにFACSによって、実施例Iに記載されるように、切断型ポリペプチドへの抗体の結合を試験することによって、決定されてもよい。いくつかの実施形態において、293細胞内で発現される完全長LgR5への結合と比べた、切断型ポリペプチドへの抗体の結合の実質的な低減(70%以上の低減)または排除は、抗体がその切断型ポリペプチドに結合しないことを示す。いくつかの実施形態において、LgR5は、ヒトLgR5である。いくつかの実施形態において、LgR5は、ヒトLgR5またはカニクイザルLgR5である。

【0120】

いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のロイシン(Lucine)リッチN末端ドメイン(例えば、配列番号67のアミノ酸残基25~66)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5の1つ以上のロイシン(Lucine)リッチ反復(LRR)(例えば、配列番号67のアミノ酸残基67~446、LgR5のLRR1~16)を含む。)。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR1(例えば、配列番号67のアミノ酸残基67~90)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR2(例えば、配列番号67のアミノ酸残基91~112)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR3(例えば、配列番号67のアミノ酸残基115~136)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR4(例えば、配列番号67のアミノ酸残基139~160)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR5(例えば、配列番号67のアミノ酸残基163~184)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR6(例えば、配列番号67のアミノ酸残基187~208)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR7(例えば、配列番号67のアミノ酸残基211~232)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR8(例えば、配列番号67のアミノ酸残基235~256)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR9(例えば、配列番号67のアミノ酸残基258~279)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR10(例えば、配列番号67のアミノ酸残基282~303)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR11(例えば、配列番号67のアミノ酸残基306~328)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR12(例えば、配列番号67のアミノ酸残基329~350)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR13(例えば、配列番号67のアミノ酸残基353~374)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR14(例えば、配列番号67のアミノ酸残基375~396)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR15(例えば、配列番号67のアミノ酸残基399~420)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LgR5のLRR16(例えば、配列番号67のアミノ酸残基423~446)を含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、LRR1~LRR11、LRR2~LRR11、LRR3~LRR11、LLR1~LLR3、LLR2~LLR3、LLR2~LLR8、LLR3~LL7、またはLLR4~LLR6のいずれかを含む。

【0121】

いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、配列番号67のアミノ酸22~555内のエピトープを含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、配列番号67のアミノ酸22~424内のエピトープを含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、配列番号67のアミノ酸22~123内のエピトープを含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、配列番号67のアミノ酸22~323内のエピトープを含む。いくつかの実施形態において、LgR5のエピトープは、配列番号67のアミノ酸324~555内のエピトープを含む。いくつかの実施形

態において、L g R 5 のエピトープは、配列番号 6 7 のアミノ酸 3 2 4 ~ 4 2 4 内のエピトープを含む。

【 0 1 2 2 】

本明細書に記載される態様および実施形態は、「なること (c o n s i s t i n g) 」および / または態様および実施形態「から事実上なること (c o n s i s t i n g e f f e c t i a l l y o f) 」を含むことが理解される。

【 0 1 2 3 】

(b) L g R 5 に、5 n M 以下、または 4 n M 以下、または 3 n M 以下、または 2 n M 以下、または 1 n M 以下、および任意に、0 . 0 0 0 1 n M 以上、または 0 . 0 0 1 n M 以上、または 0 . 0 1 n M 以上の親和性で結合する。

結合親和性を決定する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、結合親和性は、B I A c o r e (登録商標) アッセイに従って、本明細書の実施例 E に記載されるように決定されてもよい。具体的には、いくつかの実施形態において、K d は、B I A C O R E (登録商標) - 3 0 0 0 (B I A c o r e , I n c . , P i s c a t a w a y , N J) を使用した表面プラスモン共鳴アッセイを使用して、測定されてもよい。B I A c o r e (商標) リサーチグレード C M 5 チップを、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (E D C) および N - ヒドロキシコハク酸イミド (N H S) 試薬により、供給業者の指示に従って活性化してもよい。ヤギ抗ヒト F c I g G をチップにカップリングして、各フローセルにおいておよそ 1 0 , 0 0 0 応答単位 (R U) を達成してもよい。未反応のカップリング基を、1 M エタノールアミンによりブロッキングしてもよい。動態測定のために、抗 L G R 5 抗体を捕捉して、およそ 3 0 0 の R U を達成してもよい。ヒト L g R 5 E C D (例えば、バキュロウイルス株において発現された H i s - F c に融合されたアミノ酸 2 2 ~ 5 5 7 (または 2 2 ~ 5 5 5 等の同様の断片) 、または C H O 細胞から発現された F c に融合されたアミノ酸 2 2 ~ 5 5 8 (または 2 2 ~ 5 5 5 等の同様の断片) 、1 2 5 n M ~ 0 . 4 9 n M) の 2 倍段階希釈液を、H B S - P 緩衝液中 (0 . 0 1 M H E P E S (p H 7 . 4) 、0 . 1 5 M N a C l 、0 . 0 0 5 % 界面活性剤 P 2 0) 、2 5 で、3 0 μ L / 分の流速により注射してもよい。会合速度 (k_{on}) および解離速度 (k_{off}) は、1 : 1 L a n g m u i r 結合モデル (B I A c o r e (商標) E v a l u a t i o n S o f t w a r e 第 3 . 2 版) を使用して算出してもよい。平衡解離定数 (K d) は、比率 k_{off} / k_{on} として算出されてもよい。オン速度が、上の表面プラスモン共鳴アッセイによって、 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ を超える場合、オン速度は、攪拌されたキュベットを備えるストップフロー装着分光光度計 (A v i v I n s t r u m e n t s) または 8 0 0 0 - シリーズ S L M - A m i n c o (登録商標) 分光光度計 (T h e r m o S p e c t r o n i c) 等の分光計において測定される、漸増濃度の抗原の存在下で、2 5 で、P B S (p H 7 . 2) 中 2 0 n M 抗 - 抗原抗体 (F a b 型) の蛍光発光強度 (励起 = 2 9 5 n m 、発光 = 3 4 0 n m 、1 6 n m 帯域通過) の増加または減少を測定する、蛍光消光技法を使用することによって、決定されてもよい。

【 0 1 2 4 】

いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、L g R 5 に、約 5 n M 以下、または約 4 n M 以下、または約 3 n M 以下、または約 2 n M 以下、または約 1 n M 以下のいずれかの親和性で結合する。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、L g R 5 に、約 5 以下の親和性で結合する。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、L g R 5 に、約 4 n M 以下の親和性で結合する。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、L g R 5 に、約 3 n M 以下の親和性で結合する。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、L g R 5 に、約 2 n M 以下の親和性で結合する。いくつかの実施形態において、L g R 5 は、ヒト L g R 5 である。いくつかの実施形態において、L g R 5 は、ヒト L g R 5 またはカニクイザル L g R 5 である。

【 0 1 2 5 】

当業者によって理解されるように、「約」値またはパラメータへの言及は、その値また

はパラメータ自体に対する実施形態を含む（および説明する）。例えば、「約 X」に言及する説明は、「X」の説明を含む。

【0126】

(c) LgR5 への R - スポンジン (RSPO) の結合を有意に妨害しない

LgR5 への RSPO の結合を妨害する、抗 LgR5 抗体の能力を決定する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、LgR5 への R - スポンドン (spondon) (RSPO) の結合を有意に妨害する抗 LgR5 抗体の能力は、フローサイトメトリーによって決定されてもよい。いくつかの実施形態において、例えば、LgR5 を発現する 293 細胞は、RSPO1、RSPO2、RSPO3、および / または RSPO4 等の、蛍光標識された RSPO と、抗 LgR5 抗体の存在および非存在下で接

10

触させられてもよい。293 細胞への RSPO の結合は、蛍光標識細胞分取 (FACS) を使用して検出されてもよい。いくつかの実施形態において、対照抗体の存在下での RSPO 結合と比べた、抗 LgR5 抗体の存在下での約 25 % 未満の RSPO 結合の減少は、その抗 LgR5 抗体が LgR5 への RSPO の結合を有意に妨害しないことを示す。

【0127】

いくつかの実施形態において、LgR5 への R - スポンドン (spondon) (RSPO) の結合を有意に妨害する、抗 LgR5 抗体の能力は、BIAcore アッセイによって決定されてもよい。いくつかの実施形態において、例えば、LgR5 細胞外ドメインは、例えば、本明細書に記載されるように、CM5 チップ上に固定化されてもよく、固定化された LgR5 への、RSPO1、RSPO2、RSPO3、および / または RSPO

20

4 等の RSPO の結合は、抗 LgR5 抗体の存在および非存在下で決定されてもよい。いくつかの実施形態において、対照抗体の存在下での RSPO 結合と比べた、抗 LgR5 抗体の存在下での約 25 % 未満の RSPO 結合の減少は、その抗 LgR5 抗体が LgR5 への RSPO の結合を有意に妨害しないことを示す。

【0128】

いくつかの実施形態において、RSPO は、RSPO1、RSPO2、RSPO3、および RSPO4 から選択される。いくつかの実施形態において、本抗体は、結合を、約 25 % 未満、約 20 % 未満、約 15 % 未満、または約 10 % 未満妨害する。いくつかの実施形態において、本抗体は、LgR5 への RSPO の結合を検出可能に妨害しない。いくつかの実施形態において、LgR5 は、ヒト LgR5 である。いくつかの実施形態において

30

、LgR5 は、ヒト LgR5 またはカニクイザル LgR5 である。

【0129】

(d) wnt / β - カテニンシグナル伝達を有意に妨害しない

wnt / β - カテニンシグナル伝達を妨害する、抗 LgR5 抗体の能力を決定する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、wnt / β - カテニンシグナル伝達を有意に妨害する、抗 LgR5 抗体の能力は、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定されてもよい。いくつかの実施形態において、例えば、wnt / β - カテニン反応性プロモーター（例えば、多量体化 TCF / LEF DNA 結合部位を含むプロモーター等）の制御下で、レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子等）を含む、レポーター構築物が、LgR5 を発現する細胞中にトランスフェクトされてもよい。細胞

40

は次いで、Wnt3a 等の Wnt リガンド、ならびに RSPO1、RSPO2、RSPO3、および / または RSPO4 等の RSPO と、抗 LgR5 抗体の存在および非存在下で接触させられ、ルシフェラーゼ発現が測定される。いくつかの実施形態において、対照抗体の存在下でのルシフェラーゼ発現と比べた、抗体の存在下での約 25 % 未満のルシフェラーゼ発現の減少は、その抗 LgR5 抗体が β - カテニンシグナル伝達を有意に妨害しないことを示す。

【0130】

いくつかの実施形態において、本抗体は、 β - カテニンシグナル伝達を、約 25 % 未満、約 20 % 未満、約 15 % 未満、または約 10 % 未満妨害する。いくつかの実施形態において、本抗体は、 β - カテニンシグナル伝達を検出可能に妨害しない。いくつかの実施形

50

態において、L g R 5 は、ヒト L g R 5 である。いくつかの実施形態において、L g R 5 は、ヒト L g R 5 またはカニクイザル L g R 5 である。

【 0 1 3 1 】

(e) L g R 5 シグナル伝達の R S P O 活性化を有意に妨害しない

L g R 5 の R S P O 活性化を妨害する、抗 L g R 5 抗体の能力を決定する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、L g R 5 シグナル伝達の R S P O 活性化を有意に妨害する、抗 L g R 5 抗体の能力は、レポーター遺伝子アッセイを使用して決定されてもよい。いくつかの実施形態において、例えば、 β -カテニン反応性プロモーター（例えば、多量体化 T C F / L E F DNA 結合部位を含むプロモーター等）の制御下で、レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ遺伝子等）を含む、レポーター構

10 築物が、L g R 5 を発現する細胞中にトランスフェクトされてもよい。細胞は次いで、W n t 3 a 等の W n t リガンドと、R S P O 1、R S P O 2、R S P O 3、および / または R S P O 4 等の R S P O の存在および非存在下で接触させられてもよく、L g R 5 シグナル伝達の活性化が、R S P O の存在下でのルシフェラーゼ発現の増加として測定されてもよい。L g R 5 シグナル伝達の活性化はまた、抗 L g R 5 抗体の存在および非存在下で測定されてもよい。いくつかの実施形態において、細胞が対照抗体と対比して抗 L g R 5 抗体と接触させられるときの、R S P O 1、R S P O 2、R S P O 3、および / または R S P O 4 の存在下での約 2 5 % 未満の L g R 5 シグナル伝達の活性化の減少は、その抗 L g R 5 抗体が L g R 5 シグナル伝達の R S P O 活性化を有意に妨害しないことを示す。

【 0 1 3 2 】

いくつかの実施形態において、R S P O は、R S P O 1、R S P O 2、R S P O 3、および R S P O 4 から選択される。いくつかの実施形態において、本抗体は、L g R 5 シグナル伝達の R S P O 活性化を、約 2 5 % 未満、約 2 0 % 未満、約 1 5 % 未満、または約 1 0 % 未満妨害する。いくつかの実施形態において、本抗体は、L g R 5 シグナル伝達の R S P O 活性化を検出可能に妨害しない。いくつかの実施形態において、L g R 5 は、ヒト L g R 5 である。いくつかの実施形態において、L g R 5 は、ヒト L g R 5 またはカニクイザル L g R 5 である。

【 0 1 3 3 】

(f) カスパーゼ 3 開裂を活性化する

カスパーゼ 3 開裂を活性化する、抗 L g R 5 抗体の能力を決定する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、カスパーゼ 3 開裂を活性化する、抗 L g R 5 抗体の能力は、齧歯類異種移植片モデルにおいて、例えば、実施例 N に記載されるように、決定されてもよい。いくつかの実施形態において、切断型カスパーゼ 3 の存在は、例えば、抗 L g R 5 抗体を投与された腸腫瘍発生 (t u m o r o g e n e s i s) モデルマウスから収集された、ホルマリン固定パラフィン包埋 (F F P E) 小腸および結腸組織における、腫瘍面積の関数として測定されてもよい。切断型カスパーゼ 3 の存在は、いくつかの実施形態において、免疫組織化学を使用して決定されてもよい。さらに、いくつかの実施形態において、カスパーゼ 3 開裂は、陽性腫瘍面積パーセントとして、例えば、実施例 N および図 1 8 に示されるように、決定されてもよい。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、カスパーゼ 3 陽性腫瘍面積の割合を、実施例 N に記載されるアッセイに従って、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 2 5 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 3 5 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 4 5 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 1 0 0 %（すなわち、陽性腫瘍面積の割合は倍増する）のいずれかだけ増加させる。

【 0 1 3 5 】

(g) ヒト L g R 5 および齧歯類 L g R 5 の両方を認識する

ヒトおよび齧歯類 L g R 5 に結合する、抗 L g R 5 抗体の能力を決定する方法は、当該

10

20

30

40

50

技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、ヒトおよび齧歯類 L g R 5 ポリペプチドは、293細胞において発現され、L g R 5 発現 (e s p r e s s i n g) 293細胞への抗体の結合が、FACSによって、実施例Gに記載されるように試験される。いくつかの実施形態において、齧歯類 L g R 5 は、マウスまたはラット L g R 5 である。いくつかの実施形態において、齧歯類 L g R 5 は、マウス L g R 5 である。

【0136】

(h) ヒト L g R 5 を認識するが、齧歯類 L g R 5 を認識しない

ヒト L g R 5 に結合するが、齧歯類 L g R 5 には結合しない、抗 L g R 5 抗体の能力を決定する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、ヒトおよび齧歯類 L g R 5 ポリペプチドは、293細胞において発現され、L g R 5 発現 (e s p r e s s i n g) 293細胞への抗体の結合が、FACSによって、実施例Gに記載されるように試験される。いくつかの実施形態において、齧歯類 L g R 5 は、マウスまたはラット L g R 5 である。いくつかの実施形態において、齧歯類 L g R 5 は、マウス L g R 5 である。

10

【0137】

(i) その複合されていない形態で腫瘍成長を有意に阻害しない

その複合されていない形態で腫瘍成長を阻害する、抗 L g R 5 抗体の能力を決定する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、実施例Mに記載されるD5124膵臓がん異種移植片モデル等の齧歯類異種移植片モデルが、使用される。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、例えば、実施例Lに記載されるように、L o V o 結腸がん細胞株異種移植片モデルにおいて、その複合されていない形態で腫瘍成長を有意に阻害しない。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、例えば、実施例Nに記載されるように、マウス腸腫瘍発生モデルにおいて、その複合されていない形態で腫瘍成長を有意に阻害しない。異種移植片モデルまたはマウス腸腫瘍発生モデルにおける腫瘍成長の阻害は、ビヒクル対照または対照抗体と比べて決定される。

20

【0138】

いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、腫瘍成長を、その複合されていない形態で、約25%未満、約20%未満、約15%未満、または約10%未満阻害する。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、その複合されていない形態で腫瘍成長を検出可能に阻害しない。

30

【0139】

(j) 幹細胞分化を誘導しない

幹細胞分化 (d i f f e r e n t i a t i o n) を誘導する、抗 L g R 5 抗体の能力を決定する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、幹細胞分化は、抗 L g R 5 抗体の存在および非存在下で、L g R 5 を発現する、小腸内の迅速に細胞分裂している (f a s t - c y c l i n g) 幹細胞である、陰窩底部円柱細胞 (C B C) の、例えば、腸細胞、杯細胞、および/または腸内分泌細胞へと分化する能力を決定することによってアッセイされてもよい。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、抗 L g R 5 抗体の存在下で、対照抗体もまたC B C の集団の約25%未満において幹細胞分化を誘導する条件下で、C B C の集団の約25%未満、約20%未満、約15%未満、または約10%未満のいずれかが分化する場合、幹細胞分化を誘導しないと見なされる。

40

【0140】

いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体免疫複合体は、幹細胞分化を誘導しないという主要な機構を通じて、腫瘍成長を阻害する。いくつかのかかる実施形態において、抗 L g R 5 抗体免疫複合体は、免疫複合体における抗体に複合された細胞傷害性薬剤を通じて媒介される細胞傷害性活性を通じて、腫瘍成長を阻害する。

【0141】

抗体 8 E 1 1 および他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a) 配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) 配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c) 配列番号3

50

2のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのHVRを含む、抗LgR5抗体を提供する。

【0142】

一態様において、本発明は、(a)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVH HVR配列を含む、抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。別の実施形態において、本抗体は、配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H3および配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L3、および配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、(a)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

10

【0143】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVL HVR配列を含む、抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、(a)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

20

【0144】

別の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(iii)配列番号32から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVH HVR配列を含む、VHドメイン、ならびに(b)(i)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-L2から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVL HVR配列を含む、VLドメイン、ならびに(c)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0145】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号30のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号31のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号32のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、抗体を提供する。

40

【0146】

上の実施形態のいずれにおいても、抗LgR5抗体は、ヒト化されている。一実施形態において、抗LgR5抗体は、上の実施形態のいずれかにあるようなHVRを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒトVLカッパIVコンセンサス(VL_{KIV})フレームワークおよび/またはVHフレームワークVH₁である。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、重鎖フレームワーク領域FR3内にR71S突然変異およびA78V突然変異を含む、ヒトVLカッパIVコンセンサス(VL_{KIV})フレームワークおよび/またはVHフレームワークVH₁である。

50

【 0 1 4 7 】

いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、上の実施形のいずれかにあるような H V R を含み、配列番号 4 0 ~ 4 3 から選択される重鎖フレームワーク F R 3 配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、上の実施形態のいずれかにあるような H V R を含み、配列番号 4 1 の重鎖フレームワーク F R 3 配列をさらに含む。いくつかのかかる実施形態において、重鎖可変ドメインフレームワークは、配列番号 4 0 ~ 4 3 から選択される F R 3 配列を有する、修飾されたヒト V H ₁ フレームワークである。いくつかのかかる実施形態において、重鎖可変ドメインフレームワークは、配列番号 4 1 の F R 3 配列を有する、修飾されたヒト V H ₁ フレームワークである。

【 0 1 4 8 】

いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、上の実施形のいずれかにあるような H V R を含み、配列番号 3 6 の軽鎖フレームワーク F R 3 配列をさらに含む。いくつかのかかる実施形態において、重鎖可変ドメインフレームワークは、配列番号 3 6 の F R 3 配列を有する、修飾された V L カッパ I V コンセンサス (V L _{K I V}) フレームワークである。

【 0 1 4 9 】

別の態様において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、および 20 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (V H) 配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、および 20 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する、V H 配列は、参照配列と比べて、置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗 L g R 5 抗体は、L g R 5 に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、総計 1 ~ 10 個のアミノ酸が、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、および 20 から選択される配列において置換され、挿入され、および / または欠失されている。ある特定の実施形態において、総計 1 ~ 5 個のアミノ酸が、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、および 20 から選択される配列において置換され、挿入され、および / または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、H V R の外側の領域で (すなわち、F R において) 生じる。

【 0 1 5 0 】

いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (V H) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (V H) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 10 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (V H) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 12 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (V H) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 14 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (V H) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 16 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (V H) 配

列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 18 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (VH) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 20 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (VH) 配列を含む。

【0151】

任意に、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、および 20 から選択される VH 配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、VH は、(a) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、および (c) 配列番号 32 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 から選択される、1つ、2つ、または3つの HVR を含む。

10

【0152】

別の態様において、抗 L g R 5 抗体が提供され、その抗体は、配列番号 5、7、9、11、13、15、17、および 19 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン (VL) を含む。ある特定の実施形態において、配列番号 5、7、9、11、13、15、17、および 19 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する、VL 配列は、参照配列と比べて、置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗 L g R 5 抗体は、L g R 5 に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、総計 1 ~ 10 個のアミノ酸が、配列番号 5、7、9、11、13、15、17、および 19 から選択されるアミノ酸配列において置換され、挿入され、および / または欠失されている。ある特定の実施形態において、総計 1 ~ 5 個のアミノ酸が、配列番号 5、7、9、11、13、15、17、および 19 から選択されるアミノ酸配列において置換され、挿入され、および / または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、HVR の外側の領域で (すなわち、FR において) 生じる。

20

【0153】

いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン (VL) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン (VL) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン (VL) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 11 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン (VL) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 13 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン (VL) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 15 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン (VL) 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 17 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %

30

40

50

、 98%、99%、または100%の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン(VL)配列を含む。いくつかの実施形態において、抗LgR5抗体は、配列番号19のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン(VL)配列を含む。

【0154】

任意に、抗LgR5抗体は、配列番号5、7、9、11、13、15、17、および19から選択されるアミノ酸配列のVL配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、VLは、(a)配列番号27のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号28のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)配列番号29のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

10

【0155】

別の態様において、抗LgR5抗体が提供され、その抗体は、上に提供される実施形態のいずれかにあるようなVH、および上に提供される実施形態のいずれかにあるようなVLを含む。一実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号6および配列番号5におけるVHおよびVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。一実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号8および配列番号7におけるVHおよびVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。一実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号10および配列番号9におけるVHおよびVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。一実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号12および配列番号11におけるVHおよびVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。一実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号14および配列番号13におけるVHおよびVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。一実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号16および配列番号15におけるVHおよびVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。一実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号18および配列番号17におけるVHおよびVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。一実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号20および配列番号19におけるVHおよびVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。

20

【0156】

さらなる態様において、本発明は、本明細書に提供される抗LgR5抗体と同じエピトープに結合する、抗体を提供する。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号8のVH配列および配列番号7のVL配列を含む抗LgR5抗体と同じエピトープに結合する、抗体が提供される。ある特定の実施形態において、アミノ酸22~323からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号67のエピトープに結合する、抗体が提供される。いくつかの実施形態において、アミノ酸1~312からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号68のエピトープに結合する、抗体が提供される。

30

【0157】

本発明のさらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗LgR5抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一実施形態において、抗LgR5抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、二重特異性抗体、またはF(ab')₂断片である。別の実施形態において、本抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、本明細書に定義されるIgG1抗体または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

40

【0158】

さらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗LgR5抗体は、下の第1~7節に記載される特長のうちのいずれをも、単独でまたは組み合わせて、組み込んでよい。

【0159】

抗体YW353および他の実施形態

50

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む HVR - H 1、(b) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む HVR - H 2、(c) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H 3、(d) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む HVR - L 1、(e) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む HVR - L 2、および (f) 配列番号 59 のアミノ酸配列を含む HVR - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つの HVR を含む、抗 L g R 5 抗体を提供する。

【0160】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む HVR - H 1、(b) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む HVR - H 2、および (c) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または全ての 3 つの VH HVR 配列を含む、抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H 3 を含む。別の実施形態において、本抗体は、配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H 3、および配列番号 59 のアミノ酸配列を含む HVR - L 3 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H 3、配列番号 59 のアミノ酸配列を含む HVR - L 3、および配列番号 61 のアミノ酸配列を含む HVR - H 2 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む HVR - H 1、(b) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む HVR - H 2、および (c) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H 3 を含む。

10

【0161】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む HVR - L 1、(b) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む HVR - L 2、および (c) 配列番号 59 のアミノ酸配列を含む HVR - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または全ての 3 つの VL HVR 配列を含む、抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む HVR - L 1、(b) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む HVR - L 2、および (c) 配列番号 59 のアミノ酸配列を含む HVR - L 3 を含む。

20

【0162】

別の態様において、本発明の抗体は、(a) (i) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む HVR - H 1、(i i) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む HVR - H 2、および (i i i) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または全ての 3 つの VH HVR 配列を含む、VH ドメイン、ならびに (b) (i) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む HVR - L 1、(i i) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む HVR - L 2 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または全ての 3 つの VL HVR 配列を含む、VL ドメイン、ならびに (c) 配列番号 59 のアミノ酸配列を含む HVR - L 3 を含む。

30

【0163】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む HVR - H 1、(b) 配列番号 61 のアミノ酸配列を含む HVR - H 2、(c) 配列番号 62 のアミノ酸配列を含む HVR - H 3、(d) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む HVR - L 1、(e) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む HVR - L 2、および (f) 配列番号 59 から選択されるアミノ酸配列を含む HVR - L 3 を含む、抗体を提供する。

40

【0164】

上の実施形態のいずれにおいても、抗 L g R 5 抗体は、ヒト抗体である。

【0165】

別の態様において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 26 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン (VH) 配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号 26 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を

50

有する、V H配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗L g R 5抗体は、L g R 5に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、総計1～10個のアミノ酸が、配列番号26において置換され、挿入され、および/または欠失されている。ある特定の実施形態において、総計1～5個のアミノ酸が、配列番号26において置換され、挿入され、および/または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、H V Rの外側の領域で（すなわち、F Rにおいて）生じる。任意に、抗L g R 5抗体は、配列番号26のV H配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、V Hは、（a）配列番号60のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、（b）配列番号61のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、および（c）配列番号62のアミノ酸配列を含むH V R - H 3から選択される、1つ、2つ、または3つのH V Rを含む。

【0166】

別の態様において、抗L g R 5抗体が提供され、その抗体は、配列番号25のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン（V L）を含む。ある特定の実施形態において、配列番号25のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する、V L配列は、参照配列と比べて、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗L g R 5抗体は、L g R 5に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、総計1～5個のアミノ酸が、配列番号25において置換され、挿入され、および/または欠失されている。ある特定の実施形態において、総計1～10個のアミノ酸が、配列番号25において置換され、挿入され、および/または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、H V Rの外側の領域で（すなわち、F Rにおいて）生じる。任意に、抗L g R 5抗体は、配列番号25のV L配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、V Lは、（a）配列番号57のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、（b）配列番号58のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、および（c）配列番号59のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される、1つ、2つ、または3つのH V Rを含む。

【0167】

別の態様において、抗L g R 5抗体が提供され、その抗体は、上に提供される実施形態のいずれかにあるようなV H、および上に提供される実施形態のいずれかにあるようなV Lを含む。一実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号26および配列番号25におけるV HおよびV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。

【0168】

さらなる態様において、本発明は、本明細書に提供される抗L g R 5抗体と同じエピトープに結合する、抗体を提供する。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号26のV H配列および配列番号25のV L配列を含む抗L g R 5抗体と同じエピトープに結合する、抗体が提供される。ある特定の実施形態において、アミノ酸22～123からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号67のエピトープに結合する、抗体が提供される。ある特定の実施形態において、アミノ酸1～102からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号68のエピトープに結合する、抗体が提供される。

【0169】

本発明のさらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗L g R 5抗体は、ヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一実施形態において、抗L g R 5抗体は、抗体断片、例えば、F v、F a b、F a b'、s c F v、二重特異性抗体、またはF（a b'）₂断片である。別の実施形態において、本抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、本明細書に定義されるI g G 2 a抗体または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

【0170】

さらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗L g R 5抗体は、下の第1～

10

20

30

40

50

7 節に記載される特長のうちのいずれをも、単独でまたは組み合わせて、組み込んでもよい。

【0171】

抗体 3 G 1 2 および他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a) 配列番号 48 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 49 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 50 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 46 アミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (f) 配列番号 47 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つの H V R を含む、抗 L g R 5 抗体を提供する。

10

【0172】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 48 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 49 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および (c) 配列番号 50 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または全ての 3 つの V H H V R 配列を含む、抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、配列番号 50 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。別の実施形態において、本抗体は、配列番号 50 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 および配列番号 47 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、配列番号 50 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、配列番号 47 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、および配列番号 49 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 48 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 49 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および (c) 配列番号 50 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。

20

【0173】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 46 アミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 47 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または全ての 3 つの V L H V R 配列を含む、抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 46 アミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 47 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

30

【0174】

別の態様において、本発明の抗体は、(a) (i) 配列番号 48 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(i i) 配列番号 49 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および (i i i) 配列番号 50 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または全ての 3 つの V H H V R 配列を含む、V H ドメイン、ならびに (b) (i) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(i i) 配列番号 46 アミノ酸配列を含む H V R - L 2 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または全ての 3 つの V L H V R 配列を含む、V L ドメイン、ならびに (c) 配列番号 47 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

40

【0175】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 48 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 49 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 50 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 46 アミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (f) 配列番号 47 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、抗体を提供する。

【0176】

上の実施形態のいずれにおいても、抗 L g R 5 抗体は、ヒト化されている。一実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、上の実施形のいずれかにあるような H V R を含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコン

50

センサスフレームワークをさらに含む。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒトV_Lカッパコンセンサス(V_{L_K})フレームワークおよび/またはヒトV_H下位集団3コンセンサス(V_{H₃})フレームワークである。

【0177】

別の態様において、抗LgR5抗体は、配列番号22のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン(V_H)配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号22のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する、V_H配列は、参照配列と比べて、置換(例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗LgR5抗体は、LgR5に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、総計1~10個のアミノ酸が、配列番号22のアミノ酸配列において置換され、挿入され、および/または欠失されている。ある特定の実施形態において、総計1~5個のアミノ酸が、配列番号22のアミノ酸配列において置換され、挿入され、および/または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域で(すなわち、FRにおいて)生じる。

10

【0178】

任意に、抗LgR5抗体は、配列番号22のV_H配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、V_Hは、(a)配列番号48のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号49のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c)配列番号50のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

20

【0179】

別の態様において、抗LgR5抗体が提供され、その抗体は、配列番号21のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン(V_L)を含む。ある特定の実施形態において、配列番号21のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する、V_L配列は、参照配列と比べて、置換(例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗LgR5抗体は、LgR5に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、総計1~10個のアミノ酸が、配列番号21のアミノ酸配列において置換され、挿入され、および/または欠失されている。ある特定の実施形態において、総計1~5個のアミノ酸が、配列番号21のアミノ酸配列において置換され、挿入され、および/または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域で(すなわち、FRにおいて)生じる。

30

【0180】

任意に、抗LgR5抗体は、配列番号21のV_L配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、V_Lは、(a)配列番号45のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号46アミノ酸配列を含むHVR-L2、および(c)配列番号47のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

40

【0181】

別の態様において、抗LgR5抗体が提供され、その抗体は、上に提供される実施形態のいずれかにあるようなV_H、および上に提供される実施形態のいずれかにあるようなV_Lを含む。一実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号22および配列番号21におけるV_HおよびV_L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。

【0182】

さらなる態様において、本発明は、本明細書に提供される抗LgR5抗体と同じエピトープに結合する、抗体を提供する。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号22

50

の V H 配列および配列番号 2 1 の V L 配列を含む抗 L g R 5 抗体と同じエピトープに結合する、抗体が提供される。ある特定の実施形態において、アミノ酸 3 2 4 ~ 4 2 3 からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号 6 7 のエピトープに結合する、抗体が提供される。いくつかの実施形態において、アミノ酸 3 0 3 ~ 4 0 2 からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号 6 8 のエピトープに結合する、抗体が提供される。ある特定の実施形態において、アミノ酸 3 2 4 ~ 5 5 5 からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号 6 7 のエピトープに結合する、抗体が提供される。いくつかの実施形態において、アミノ酸 3 0 3 ~ 5 3 4 からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号 6 8 のエピトープに結合する、抗体が提供される。

【 0 1 8 3 】

本発明のさらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗 L g R 5 抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、抗体断片、例えば、F v、F a b、F a b'、s c F v、二重特異性抗体、または F (a b')₂ 断片である。別の実施形態において、本抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、本明細書に定義される I g G 1 抗体または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

【 0 1 8 4 】

さらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗 L g R 5 抗体は、下の第 1 ~ 7 節に記載される特長のうちのいずれをも、単独でまたは組み合わせて、組み込んでもよい。

【 0 1 8 5 】

抗体 2 H 6 および他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (f) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つの H V R を含む、抗 L g R 5 抗体を提供する。

【 0 1 8 6 】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および (c) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または全ての 3 つの V H H V R 配列を含む、抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。別の実施形態において、本抗体は、配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 および配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、および配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を含む。さらなる実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、および (c) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。

【 0 1 8 7 】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または全ての 3 つの V L H V R 配列を含む、抗体を提供する。一実施形態において、本抗体は、(a) 配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、および (c) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む。

【 0 1 8 8 】

別の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(ii)配列番号56から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVH HVR配列を含む、VHドメイン、ならびに(b)(i)配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-L2から選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての3つのVL HVR配列を含む、VLドメイン、ならびに(c)配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0189】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および(f)配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、抗体を提供する。

【0190】

上の実施形態のいずれにおいても、抗LgR5抗体は、ヒト化されている。一実施形態において、抗LgR5抗体は、上の実施形態のいずれかにあるようなHVRを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。ある特定の実施形態において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒトVLカッパコンセンサス(VL_K)フレームワークおよび/またはヒトVH下位集団3(VH₃)フレームワークである。

【0191】

別の態様において、抗LgR5抗体は、配列番号24のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号24のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する、VH配列は、参照配列と比べて、置換(例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗LgR5抗体は、LgR5に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、総計1~10個のアミノ酸が、配列番号24のアミノ酸配列において置換され、挿入され、および/または欠失されている。ある特定の実施形態において、総計1~5個のアミノ酸が、配列番号24のアミノ酸配列において置換され、挿入され、および/または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域で(すなわち、FRにおいて)生じる。

【0192】

任意に、抗LgR5抗体は、配列番号24のVH配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、VHは、(a)配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および(c)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

【0193】

別の態様において、抗LgR5抗体が提供され、その抗体は、配列番号23のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する、軽鎖可変ドメイン(VL)を含む。ある特定の実施形態において、配列番号23のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する、VL配列は、参照配列と比べて、置換(例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗LgR5抗体は、LgR5に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、総計1~10個のアミノ酸が、配列番号23のアミノ酸配列において置換され、挿入され、および/または欠失されている。あ

る特定の実施形態において、総計 1 ~ 5 個のアミノ酸が、配列番号 23 のアミノ酸配列において置換され、挿入され、および / または欠失されている。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、HVR の外側の領域で (すなわち、FR において) 生じる。

【0194】

任意に、抗 LgR5 抗体は、配列番号 23 の VL 配列のアミノ酸配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、VL は、(a) 配列番号 51 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(b) 配列番号 52 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、ならびに (c) 配列番号 53 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される、1 つ、2 つ、または 3 つの HVR を含む。

10

【0195】

別の態様において、抗 LgR5 抗体が提供され、その抗体は、上に提供される実施形態のいずれかにあるような VH、および上に提供される実施形態のいずれかにあるような VL を含む。一実施形態において、本抗体は、それぞれ配列番号 24 および配列番号 23 における VH および VL 配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含めて、含む。

【0196】

さらなる態様において、本発明は、本明細書に提供される抗 LgR5 抗体と同じエピトープに結合する、抗体を提供する。例えば、ある特定の実施形態において、配列番号 24 の VH 配列および配列番号 23 の VL 配列を含む抗 LgR5 抗体と同じエピトープに結合する、抗体が提供される。ある特定の実施形態において、アミノ酸 324 ~ 423 からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号 67 のエピトープに結合する、抗体が提供される。いくつかの実施形態において、アミノ酸 303 ~ 402 からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号 68 のエピトープに結合する、抗体が提供される。ある特定の実施形態において、アミノ酸 324 ~ 555 からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号 67 のエピトープに結合する、抗体が提供される。いくつかの実施形態において、アミノ酸 303 ~ 534 からの、その内の、またはそれと重複する、配列番号 68 のエピトープに結合する、抗体が提供される。

20

【0197】

本発明のさらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗 LgR5 抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一実施形態において、抗 LgR5 抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、二重特異性抗体、または F(ab')₂ 断片である。別の実施形態において、本抗体は、実質的に完全長の抗体、例えば、本明細書に定義される IgG1 抗体または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

30

【0198】

さらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗 LgR5 抗体は、下の第 1 ~ 7 節に記載される特長のうちのいずれをも、単独でまたは組み合わせて、組み込んでよい。

【0199】

1. 抗体親和性

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、1 μM 以下、100 nM 以下、10 nM 以下、1 nM 以下、0.1 nM 以下、0.01 nM 以下、または 0.001 nM 以下の、および任意に、10⁻¹³ M 以上である、解離定数 (K_d) を有する。(例えば、10⁻⁸ M 以下、例えば、10⁻⁸ M ~ 10⁻¹³ M、例えば、10⁻⁹ M ~ 10⁻¹³ M)。

40

【0200】

一実施形態において、K_d は、目的の抗体の Fab バージョンおよびその抗原と共に行われる、放射標識抗原結合アッセイ (RIA) によって、次のアッセイによって記載されるように測定される。抗原に対する Fab の溶液結合親和性は、Fab を、未標識抗原の一連の滴定の存在下で、最小濃度の (¹²⁵I) 標識抗原と平衡化し、次いで抗 Fab 抗

50

体コーティングプレートと結合した抗原を捕捉することによって、測定される（例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999) を参照されたい）。アッセイのための条件を確立するために、MICRO TITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）を、50 mMの炭酸ナトリウム（pH 9.6）中5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の捕捉抗Fab抗体（Cappel Labs）で一晩コーティングし、その後、PBS中2%（w/v）ウシ血清アルブミンにより、室温（およそ23℃）で2～5時間ブロッキングする。非吸着性のプレート（Nunc 番号269620）中で、100 pMまたは26 pM [^{125}I] - 抗原を、目的のFabの段階希釈液と混合する（例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593 - 4599 (1997) における、抗VEGF抗体Fab - 12の評価と一致）。目的のFabを次いで一晩インキュベートするが、インキュベーションは、平衡に到達することを確実にするために、より長い期間（例えば、約65時間）継続してもよい。その後、混合物を、室温での（例えば、1時間にわたる）インキュベーションのために、捕捉プレートに移す。溶液を次いで除去し、プレートを、PBS中0.1%ポリソルベート20（TWEEN - 20（登録商標））で8回洗浄する。プレートが乾燥したとき、150 μL /ウェルのシンチラント（scintillant）（MICROSCINT - 20（商標）；Packard）を添加し、プレートをTOPCOUNT（商標） γ 計数器（Packard）により10分間計数する。最大結合の20%以下をもたらず各Fabの濃度を、競合結合アッセイにおいて使用するために選定する。

10

20

30

40

【0201】

別の実施形態によれば、Kdは、BIACORE（登録商標）- 2000またはBIACORE（登録商標）- 3000（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を使用した表面プラスモン共鳴アッセイを使用して、25℃で、約10応答単位（RU）で固定化された抗原CM5チップを用いて測定される。簡潔に述べると、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ（CM5, BIAcore, Inc.）を、N - エチル - N' - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩（EDC）およびN - ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）により、供給業者の指示に従って活性化する。抗原を10 mMの酢酸ナトリウム（pH 4.8）で5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （約0.2 μM ）まで希釈した後、5 μL /分の流速で注射して、カップリングされたタンパク質のおよそ10応答単位（RU）を達成する。抗原の注射後、1 Mのエタノールアミンを注射して、未反応の基をブロッキングする。動態測定のために、Fab（0.78 nM～500 nM）の2倍段階希釈液を、PBS中、0.05%ポリソルベート20（TWEEN - 20（商標））界面活性剤（PBST）と共に、25℃で、およそ25 μL /分の流速で注射する。会合速度（ k_{on} ）および解離速度（ k_{off} ）を、単純な1対1Langmuir結合モデル（BIACORE（登録商標）Evaluation Software第3.2版）を使用して、会合センサグラムおよび解離センサグラムを同時に適合することによって、算出する。平衡解離定数（Kd）は、比率 k_{off}/k_{on} として算出する。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999) を参照されたい。オン速度が、上の表面プラスモン共鳴アッセイによって、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ を超える場合、オン速度は、攪拌されたキュベットを備えるストップフロー装着分光光度計（Aviv Instruments）または8000 - シリーズSLM - AMINCO（商標）分光光度計（Thermo Spectronic）等の分光計において測定される、漸増濃度の抗原の存在下で、25℃で、PBS（pH 7.2）中20 nM抗 - 抗原抗体（Fab型）の蛍光発光強度（励起 = 295 nm、発光 = 340 nm、16 nm帯域通過）の増加または減少を測定する、蛍光消光技法を使用することによって、決定することができる。

【0202】

2. 抗体断片

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片には、Fab、Fab'、Fab' - SH、F(ab')₂、Fv、およびscFv断

50

片、ならびに下に記載される他の断片が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の抗体断片の概説については、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129 - 134 (2003) を参照されたい。scFv断片の概説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269 - 315 (1994) を参照されたく、また、国際公開第93/16185号、および米国特許第5,571,894号および同第5,587,458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、増加した体内半減期を有する、FabおよびF(ab')₂断片の考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

10

【0203】

二重特異性抗体は、二価性または二重特異性であり得る、2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404,097号、国際公開第1993/01161号、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129 - 134 (2003)、およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448 (1993) を参照されたい。三重特異性抗体および四重特異性抗体もまた、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129 - 134 (2003) に記載される。

【0204】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部分または軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部分を含む、抗体断片である。ある特定の実施形態において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA、例えば、米国特許第6,248,516 B1号を参照されたい)。

20

【0205】

抗体断片は、本明細書に記載される、インタクトな抗体のタンパク質分解、ならびに組み換え宿主細胞(例えば、大腸菌またはファージ)による産生を含むが、これらに限定されない、種々の技法によって作製することができる。

【0206】

3. キメラおよびヒト化抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、およびMorrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 - 6855 (1984) に記載される。一実施例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサル等の非ヒト霊長類に由来する可変領域)およびヒト定常領域を含む。さらなる実施例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のそれから変更された、「クラススイッチされた」抗体である。キメラ抗体には、それらの抗原結合断片が含まれる。

30

【0207】

ある特定の実施形態において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的に、非ヒト抗体は、親の非ヒト抗体の特異性および親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減するために、ヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR(またはそれらの部分)が非ヒト抗体に由来し、FR(またはそれらの部分)がヒト抗体配列に由来する、1つ以上の可変ドメインを含む。任意にヒト化抗体はまた、ヒト定常領域の少なくとも一部分も含む。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元するまたは改善するために、非ヒト抗体(例えば、HVR残基が由来する抗体)由来の対応する残基で置換される。

40

【0208】

ヒト化抗体およびそれらを作製する方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13: 1619 - 1633 (2008) に概説され、また例えば、Riechmann et al., Nature 332: 323

50

- 329 (1988)、Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号、および同第7,087,409号、Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (SDR(a-CDR)移植法を記載する)、Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (「リサーフェシング(resurfacing)」を記載する)、Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (「FRシャフリング」を記載する)、ならびにOsbourne et al., Methods 36:61-68 (2005) および Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (FRシャフリングへの「誘導選択(guided selection)」アプローチを記載する)にさらに記載される。

10

【0209】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、「最良適合(best-fit)」法を使用して選択されるフレームワーク領域(例えば、Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)を参照されたい)、軽鎖または重鎖可変領域の特定の下位集団のヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域(例えば、Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)、および Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)を参照されたい)、ヒト成熟(体細胞突然変異した)フレームワーク領域またはヒト生殖細胞株フレームワーク領域(例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)を参照されたい)、ならびにFRライブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域(例えば、Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) および Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)を参照されたい)が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0210】

4. ヒト抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で既知の種々の技法を使用して産生することができる。ヒト抗体は、一般に、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001) および Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)に記載される。

30

【0211】

ヒト抗体は、免疫原を、抗原投与に応答してインタクトなヒト抗体またはヒト可変領域を含むインタクトな抗体を産生するように修飾されたトランスジェニック動物に投与することによって、調製されてもよい。かかる動物は典型的に、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換える、または染色体外に存在するか、もしくは動物の染色体中に無作為に組み込まれる、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部分を含有する。かかるトランスジェニックマウスにおいて、内因性免疫グロブリン遺伝子座は一般に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)を参照されたい。また、例えば、米国特許第6,075,181号および同第6,150,584号(XENOMOUSE(商標)技術を記載する)、米国特許第5,770,429号(HuMab(登録商標)技術を記載する)、米国特許第7,041,870号(K-MOUSE(登録商標)技術を記載する)、ならびに米国特許出願公開第US 2007/0061900号(VelociMouse(登録商標)技術を記載する)も参照されたい。かかる動物によって生成されるインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって、さらに修飾されてもよい。

40

50

【0212】

ヒト抗体はまた、ハイブリドーマベースの方法によって作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株が記載されている。(例えば、Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、およびBoerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991)を参照されたい)。ヒトB-細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されるヒト抗体もまた、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)に記載される。追加の方法には、例えば、米国特許第7,189,826号(ハイブリドーマ細胞株由来のモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載する)、およびNi, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)(ヒト-ヒトハイブリドーマを記載する)に記載されるものが含まれる。ヒトハイブリドーマ技術(Trioma technology)はまた、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005)およびVollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)にも記載される。

10

20

【0213】

ヒト抗体はまた、Fvクローン可変ドメイン配列をヒト由来ファージディスプレイライブラリから単離することによって、生成されてもよい。かかる可変ドメイン配列は次いで、所望のヒト定常ドメインと組み合わせられてもよい。抗体ライブラリからヒト抗体を選択するための技法が、下に記載される。

【0214】

5. ライブラリ由来抗体

本発明の抗体は、コンビナトリアルライブラリを、所望の活性(単数または複数)を有する抗体についてスクリーニングすることによって、単離されてもよい。例えば、ファージディスプレイライブラリを生成し、かかるライブラリを、所望の結合特性を保有する抗体についてスクリーニングするための、多様な方法が当該技術分野で知られている。かかる方法は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)に概説され、またさらに、例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554、Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)、Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992)、Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004)、Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004)、Felthouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004)、およびLee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)に記載される。

30

40

【0215】

ある特定のファージディスプレイ法において、VHおよびVL遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別個にクローニングされ、ファージライブラリ中で無作為に組み換えられ、それを次いで、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)に記載されるように、抗原

50

結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは典型的に、1本鎖Fv(s c F v)断片としてまたはFab断片としてのいずれかで、抗体断片を提示する。免疫された源からのライブラリは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。代替的に、ナイーブレパートリーをクローニングして(例えば、ヒトから)、Griffiths et al., EMBO J, 12:725-734(1993)によって記載されるように、いずれの免疫化も伴わずに、広範な非自己抗原およびまた自己抗原に対する抗体の単一の源を提供することができる。最後に、ナイーブラライブラリはまた、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388(1992)に記載されるように、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、無作為配列を含有するPCRプライマーを使用して高度可変CDR3領域をコードし、体外で再配列を達成することによって、合成的に作製することができる。ヒト抗体ファージライブラリを記載する特許公開には、例えば、米国特許第5,750,373号、および米国特許公開第2005/0079574号、同第2005/0119455号、同第2005/0266000号、同第2007/0117126号、同第2007/0160598号、同第2007/0237764号、同第2007/0292936号、および同第2009/0002360号が含まれる。

10

【0216】

ヒト抗体ライブラリから単離された抗体または抗体断片は、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされる。

20

【0217】

6. 多重特異性抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有する、モノクローナル抗体である。ある特定の実施形態において、結合特異性のうちの一方は、LgR5に対するものであり、他方は、任意の他の抗原に対するものである。ある特定の実施形態において、結合特異性のうちの一方は、LgR5に対するものであり、他方は、CD3に対するものである。例えば、米国特許第5,821,337号を参照されたい。ある特定の実施形態において、二重特異性抗体は、LgR5の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体をまた使用して、細胞傷害性薬剤を、LgR5を発現する細胞に局限化させてもよい。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製することができる。

30

【0218】

多重特異性抗体を作製するための技法には、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組み換え共発現(Milstein and Cuello, Nature 305:537(1983)、国際公開第93/08829号、およびTrauncker et al., EMBO J. 10:3655(1991)を参照されたい)、「ノブ・イン・ホール(knob-in-hole)」操作(例えば、米国特許第5,731,168号を参照されたい)が含まれるが、これらに限定されない。多重特異性抗体はまた、静電的ステアリング(electrostatic steering)効果を操作して抗体Fc-ヘテロ二量体分子を作製すること(国際公開第2009/089004A1号)、2つ以上の抗体または断片を架橋すること(例えば、米国特許第4,676,980号、およびBrennan et al., Science, 229:81(1985)を参照されたい)、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生すること(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)を参照されたい)、「二重特異性抗体」技術を使用して二重特異性抗体断片を作製すること(例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)を参照されたい)、および1本鎖Fv(s F v)二量体を使用すること(例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368(1994)を参照さ

40

50

れたい)、ならびに例えば、T u t t e t a l . J . I m m u n o l . 1 4 7 : 6 0 (1 9 9 1) に記載される三重特異性抗体を調製することによって、作製されてもよい。

【 0 2 1 9 】

「オクトパス (O c t o p u s) 抗体」を含む、3 つ以上の機能的抗原結合部位を有する操作された抗体もまた、本明細書に含まれる (例えば、米国公開特許第 2 0 0 6 / 0 0 2 5 5 7 6 A 1 号を参照されたい) 。

【 0 2 2 0 】

本明細書における抗体または断片にはまた、L g R 5 ならびに別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む、「二重作用 (D u a l A c t i n g) F A b 」または「D A F 」が含まれる (例えば、米国公開特許第 2 0 0 8 / 0 0 6 9 8 2 0 号を参照されたい) 。

10

【 0 2 2 1 】

7 . 抗体変異体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性および / または他の生物学的特性を改善することが望ましいことがある。抗体のアミノ酸配列変異体は、適切な修飾を、抗体をコードするヌクレオチド配列中に導入することによって、またはペプチド合成によって、調製されてもよい。かかる修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列からの残基の欠失、および / またはそこへ残基の挿入、および / またはその内の残基の置換が含まれる。欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせを作製して、最終構築物に到達することができるが、但し、その最終構築物が、所望の特性、例えば、抗原結合性を保有することを条件とする。

20

【 0 2 2 2 】

a) 置換、挿入、および欠失変異体

ある特定の実施形態において、1 つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換型突然変異生成に対する目的の部位には、H V R および F R が含まれる。保存的置換は、表 1 において、「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化は、表 1 において、「例となる置換」の見出しの下に提供され、またアミノ酸側鎖クラスを参照して下にさらに記載される。アミノ酸置換が目的の抗体中に導入され、生成物が、所望の活性、例えば、保持 / 改善された抗原結合、減少した免疫原性、または改善された A D C C もしくは C D C について、スクリーニングされてもよい。

表 1

元の残基	例となる置換	好ましい置換
A l a (A)	V a l、L e u、I l e	V a l
A r g (R)	L y s、G l n、A s n	L y s
A s n (N)	G l n、H i s、A s p、L y s、A r g	G l n
A s p (D)	G l u、A s n	G l u
C y s (C)	S e r、A l a	S e r
G l n (Q)	A s n、G l u	A s n
G l u (E)	A s p、G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n、G l n、L y s、A r g	A r g
I l e (I)	L e u、V a l、M e t、A l a、P h e、ノルロイシン	L e u
L e u (L)	ノルロイシン、I l e、V a l、M e t、A l a、P h e	I l e
L y s (K)	A r g、G l n、A s n	A r g
M e t (M)	L e u、P h e、I l e	L e u
P h e (F)	T r p、L e u、V a l、I l e、A l a、T y r	T y r
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l、S e r	S e r
T r p (W)	T y r、P h e	T y r
T y r (Y)	T r p、P h e、T h r、S e r	P h e
V a l (V)	I l e、L e u、M e t、P h e、A l a、ノルロイシン	L e u

アミノ酸は、次の一般的な側鎖特性に従って分類されてもよい：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、
- (2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n、
- (3) 酸性：A s p、G l u、
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g、
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：G l y、P r o、
- (6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【 0 2 2 3 】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの 1 つのメンバーを別のクラスと交換することを伴うであろう。

【 0 2 2 4 】

置換変異体の 1 つの種類は、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の 1 個以上の超可変領域残基を置換することを伴う。一般に、さらなる研究のために選択される、結果と

して生じる変異体（複数可）は、親抗体と比べて、ある特定の生物学的特性（例えば、増加した親和性、低減された免疫原性）における修飾（例えば、改善）を有することになり、および／または親抗体の、実質的に保持されたある特定の生物学的特性を有することになる。例となる置換変異体は、例えば、本明細書に記載されるもの等のファージディスプレイベースの親和性成熟技法を使用して、好都合に生成され得る、親和性成熟抗体である。簡潔に述べると、1個以上のHVR残基が突然変異させられ、変異体抗体がファージ上で提示され、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【0225】

変化（例えば、置換）は、HVRにおいて、例えば、抗体親和性を改善するために、行われてもよい。かかる変化は、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で突然変異を経るコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207: 179-196 (2008)を参照されたい）、および／またはSDR(a-CDR)において行われてもよく、結果として生じる変異体VHまたはVLが、結合親和性について試験される。二次ライブラリを構築し、そこから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施形態において、多様性が、多様な方法（例えば、変異性PCR、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指向性突然変異生成）のうちのいずれかによって、成熟のために選定された可変遺伝子中に導入される。二次ライブラリが次いで作り出される。ライブラリは次いで、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を特定するために、スクリーニングされる。多様性を導入するための別の方法は、数個のHVR残基（例えば、1回に4～6個の残基）が無作為化される、HVR指向性アプローチを伴う。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング突然変異生成またはモデリングを使用して、具体的に特定されてもよい。特にCDR-H3およびCDR-L3が、しばしば標的とされる。

【0226】

ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、かかる変化が、抗原に結合する抗体の能力を実質的に低減しない限り、1つ以上のHVR内で生じてもよい。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的变化（例えば、本明細書に提供される保存的置換）が、HVRにおいて行われてもよい。かかる変化は、HVR「ホットスポット」またはSDRの外側にあってもよい。上に提供される変異体VHおよびVL配列のある特定の実施形態において、各HVRは、変化させられないか、またはわずか1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換を含有するにすぎないかのいずれかである。

【0227】

突然変異生成のための標的とされ得る、抗体の残基または領域の特定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085によって記載される、「アラニンスキャニング突然変異生成」と呼ばれるものである。この方法において、標的残基（例えば、arg、asp、his、lys、およびglu等の荷電残基）のうちのある残基または基が特定され、中性または負荷電アミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）によって置き換えられて、抗体の抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定する。さならる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の場所に導入されてもよい。代替的に、または追加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造を使用して、抗体と抗原との間の接触点が特定される。かかる接触残基および隣接する残基は、置換の候補として標的とされるか、または排除されてもよい。変異体は、それらが所望の特性を含有するかどうかを決定するために、スクリーニングされてもよい。

【0228】

アミノ酸配列挿入は、1個の残基から100個以上の残基を含有するポリペプチドの範囲の長さである、アミノ末端および／またはカルボキシル末端融合、ならびに単一のまた

10

20

30

40

50

は多数のアミノ酸残基の配列内 (i n t r a s e q u e n c e) 挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入型変異体には、抗体の血清半減期を増加させる酵素 (例えば、A D E P Tのための) またはポリペプチドに対する抗体のN末端またはC末端への融合が含まれる。

【0229】

b) グリコシル化変異体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるように変化させられる。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作り出されるか、または除去されるように、アミノ酸配列を変化させることによって、好都合に遂行されてもよい。

10

【0230】

抗体がF c領域を含む場合、そこに結合した炭水化物が変化させられてもよい。哺乳類細胞によって産生される天然抗体は、典型的に、一般にN-結合によって、F c領域のC H 2ドメインのA s n 2 9 7に結合される、分岐した二分岐オリゴ糖を含む。例えば、W r i g h t e t a l . T I B T E C H 1 5 : 2 6 - 3 2 (1 9 9 7) を参照されたい。オリゴ糖には、種々の炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (G l c N A c)、ガラクトース、およびシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「ステム」においてG l c N A cに結合したフコースが含まれ得る。いくつかの実施形態において、本発明の抗体におけるオリゴ糖の修飾は、ある特定の改善された特性を有する抗体変異体を作り出すために行われてもよい。

20

【0231】

一実施形態において、F c領域に (直接的にまたは間接的に) 結合されるフコースを欠いた炭水化物構造を有する、抗体変異体が提供される。例えば、かかる抗体におけるフコースの量は、1% ~ 80%、1% ~ 65%、5% ~ 65%、または20% ~ 40%であってもよい。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されるように、M A L D I - T O F質量分析法によって測定するとき、A s n 2 9 7に結合した全ての糖鎖構造 (例えば、複合体、ハイブリッド、および高マンノース構造) の合計と比べた、A s n 2 9 7における糖鎖内のフコースの平均量を算出することによって決定される。A s n 2 9 7は、F c領域における約297位 (F c領域残基のE u付番) に位置するアスパラギン残基を指すが、A s n 2 9 7はまた、抗体における小規模な配列変異に起因して、297位から約±3アミノ酸上流または下流、すなわち、294位~300位の間にも位置する。かかるフコシル化変異体は、改善されたA D C C機能を有し得る。例えば、米国特許公開第U S 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8号 (P r e s t a , L .)、同第U S 2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1号 (K y o w a H a k k o K o g y o C o . , L t d) を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異体に関連する刊行物の例としては、米国公開特許第2003/0157108号、国際公開第2000/61739号、国際公開第2001/29246号、米国公開特許第2003/0115614号、米国公開特許第2002/0164328号、米国公開特許第2004/0093621号、米国公開特許第2004/0132140号、米国公開特許第2004/0110704号、米国公開特許第2004/0110282号、米国公開特許第2004/0109865号、国際公開第2003/085119号、国際公開第2003/084570号、国際公開第2005/035586号、国際公開第2005/035778号、国際公開第2005/053742号、国際公開第2002/031140号、O k a z a k i e t a l . J . M o l . B i o l . 3 3 6 : 1 2 3 9 - 1 2 4 9 (2 0 0 4)、Y a m a n e - O h n u k i e t a l . B i o t e c h . B i o e n g . 8 7 : 6 1 4 (2 0 0 4) が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生することが可能な細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損したL e c 1 3 C H O細胞 (R i p k a e t a l . A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s . 2 4 9 : 5 3 3 - 5 4 5 (1 9 8 6)、米国特許出願第U S 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8 A 1号、P r e s t a , L、および国際公開第2004/056312 A1号、A d a m s e t a l . , (特

30

40

50

に実施例 11 で))、および α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞等のノックアウト細胞株(例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614(2004)、Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688(2006)、および国際公開第2003/085107号を参照されたい)が挙げられる。

【0232】

二分されたオリゴ糖類を有する、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖類がGlcNAcによって二分される、抗体変異体がさらに提供される。かかる抗体変異体は、低減されたフコシル化および/または改善されたADCC機能を有し得る。かかる抗体変異体の例は、例えば、国際公開第2003/011878号(Jean-Mairetら)、米国特許第6,602,684号(Umanaら)、および米国公開特許第2005/0123546号(Umanaら)に記載される。Fc領域に結合したオリゴ糖類において少なくとも1個のガラクトース残基を有する、抗体変異体もまた提供される。かかる抗体変異体は、改善されたCDC機能を有し得る。かかる抗体変異体は、例えば、国際公開第1997/30087号(Patelら)、国際公開第1998/58964号(Raju, S.)、および国際公開第1999/22764号(Raju, S.)に記載される。

【0233】

c) Fc領域変異体

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体のFc領域に導入され、それによってFc領域変異体を生成してもよい。Fc領域変異体は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾(例えば、置換)を含む、ヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域)を含んでもよい。

【0234】

ある特定の実施形態において、本発明は、いくつかのエフェクター機能を保有するが、全てのエフェクター機能は保有せず、それにより、体内での抗体の半減期が重要であるが、なおもある特定のエフェクター機能(補体およびADCC等)が不必要または有害である場合の適用に対する望ましい候補となる、抗体変異体を企図する。体外および/または体内細胞傷害性アッセイを実行して、CDCおよび/またはADCC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイを実行して、抗体がFcγR結合を欠いている(よって、ADCC活性を欠いている可能性が高い)が、FcRn結合能力を保持していることを確実にすることができる。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、Fc(RIIのみを発現するが、一方で単球は、Fc(RI、Fc(RII、およびFc(RIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991)の464ページの表3に要約される。目的の分子のADCC活性を評価するための体外アッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号(例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063(1986)を参照されたい)およびHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502(1985)、5,821,337(Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361(1987)を参照されたい)に記載される。代替的に、非放射性アッセイ法が用いられてもよい(例えば、フローサイトメトリーのためのACTI(商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA、およびCytotox 96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照されたい。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー細胞が含まれる。代替的に、または追加的に、目的の分

10

20

30

40

50

子のADCC活性は、体内で、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656(1998)に開示されるもの等の動物モデルにおいて、評価されてもよい。C1q結合アッセイをまた行って、抗体がC1qに結合不可能であり、よってCDC活性を欠いていることを確認してもよい。例えば、国際公開第2006/029879号および国際公開第2005/100402号におけるC1qおよびC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい(例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163(1996)、Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052(2003)、およびCragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743(2004)を参照されたい)。FcRn結合および体内クリアランス/半減期決定もまた、当該技術分野で既知の方法を使用して行うことができる(例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006)を参照されたい)。

【0235】

低減されたエフェクター機能を有する抗体には、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、および329のうちの1つ以上の置換を有するものが含まれる(米国特許第6,737,056号)。かかるFc突然変異体には、アラニンへの残基265および297の置換を有するいわゆる「DANA」Fc突然変異体を含む(米国特許第7,332,581号)、アミノ酸265、269、270、297、および327位のうちの2つ以上において置換を有するFc突然変異体が含まれる。

【0236】

FcRへの改善されたまたは減少した結合を有する、ある特定の抗体変異体が記載される。(例えば、米国特許第6,737,056号、国際公開第2004/056312号、およびShields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)を参照されたい)。

【0237】

ある特定の実施形態において、抗体変異体は、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298、333、および/または334位(残基のEU付番)における置換を有する、Fc領域を含む。

【0238】

いくつかの実施形態において、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開第99/51642号、およびIdusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184(2000)に記載されるように、変化した(すなわち、改善されたまたは減少したのいずれか)C1q結合および/または補体依存性細胞傷害作用(CDC)をもたらす変化が、Fc領域において行われる。

【0239】

母体のIgGの胎児への移入に関与する、増加した半減期および新生児型Fc受容体(FcRn)への改善された結合を有する抗体(Guyer et al., J. Immunol. 117:587(1976)およびKim et al., J. Immunol. 24:249(1994)が、米国公開特許第2005/0014934A1号(Hintonら)に記載される。それらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する、1つ以上の置換を内部に有するFc領域を含む。かかるFc変異体には、Fc領域残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または434のうちの1つ以上における置換、例えば、Fc領域残基434の置換(米国特許第7,371,826号)を有するものが含まれる。

【0240】

また、Fc領域変異体の他の例に関して、Duncan & Winter, Nature 322:738-40(1988)、米国特許第5,648,260号、米国特許第5

、 6 2 4 、 8 2 1 号、および国際公開第 9 4 / 2 9 3 5 1 号も参照されたい。

【 0 2 4 1 】

d) システイン操作された抗体変異体

ある特定の実施形態において、抗体の 1 個以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作された抗体、例えば、「チオ M a b」を作り出すことが望ましい場合がある。特に実施形態において、置換残基は、抗体の利用しやすい部位において生じる。それらの残基をシステインで置換することによって、反応性のチオール基はそれによって、抗体の利用しやすい部位に位置付けられ、それを使用して、抗体を、薬物部分またはリンカー - 薬物部分等の他の部分に複合して、本明細書にさらに記載される、免疫複合体を作り出してもよい。ある特定の実施形態において、次の残基のうちの任意の 1 個以上が、システインで置換されてもよい：軽鎖の V 2 0 5 (K a b a t 付番)、重鎖の A 1 1 8 (E U 付番)、および重鎖 F c 領域の S 4 0 0 (E U 付番)。システイン操作された抗体は、例えば、米国特許第 7 , 5 2 1 , 5 4 1 号に記載されるように生成されてもよい。

10

【 0 2 4 2 】

例となる h u 8 E 1 1 . v 2 軽鎖 (L C) V 2 0 5 C チオ M a b は、それぞれ配列番号 6 4 および 7 4 の重鎖および軽鎖配列を有する。例となる h u 8 E 1 1 . v 2 重鎖 (H C) A 1 1 8 C チオ M a b は、それぞれ配列番号 7 5 および 6 3 の重鎖および軽鎖配列を有する。例となる h u 8 E 1 1 . v 2 重鎖 (H C) S 4 0 0 C チオ M a b は、それぞれ配列番号 7 6 および 6 3 の重鎖および軽鎖配列を有する。

20

【 0 2 4 3 】

例となる Y W 3 5 3 軽鎖 (L C) V 2 0 5 C チオ M a b は、それぞれ配列番号 6 6 および 7 7 の重鎖および軽鎖配列を有する。例となる Y W 3 5 3 重鎖 (H C) A 1 1 8 C チオ M a b は、それぞれ配列番号 7 8 および 6 5 の重鎖および軽鎖配列を有する。例となる Y W 3 5 3 重鎖 (H C) S 4 0 0 C チオ M a b は、それぞれ配列番号 7 9 および 6 5 の重鎖および軽鎖配列を有する。

【 0 2 4 4 】

さらなる例となる V 2 0 5 C システイン操作されたチオ M a b は、配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、および 23 から選択される可変領域ならびに配列番号 80 の定常領域を含む、軽鎖と、配列番号 4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、および 24 から選択される可変領域ならびに I g G 1 等のヒト重鎖定常領域を含む、重鎖とを含む。さらなる例となる A 1 1 8 C システイン操作されたチオ M a b は、配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、および 23 から選択される可変領域ならびにカップ軽鎖定常領域等のヒト軽鎖定常領域を含む、軽鎖と、配列番号 4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、および 24 から選択される可変領域ならびに配列番号 81 の定常領域を含む、重鎖とを含む。さらなる例となる S 4 0 0 C システイン操作されたチオ M a b は、配列番号 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、および 23 から選択される可変領域ならびにカップ軽鎖定常領域等のヒト軽鎖定常領域を含む、軽鎖と、配列番号 4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、および 24 から選択される可変領域ならびに配列番号 82 の定常領域を含む、重鎖とを含む。

30

40

【 0 2 4 5 】

e) 抗体誘導体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、当該技術分野で既知であり、容易に入手可能な、追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに修飾されてもよい。抗体の誘導体化に好適な部分には、水溶性ポリマーが含まれるが、これらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール (P E G)、エチレングリコール / プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ - 1 , 3 - ジオキソラン、ポリ - 1 , 3 , 6 - トリオキサン、エチレン / 無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸 (ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、およびデキストランま

50

たはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレン(propylene)グリコールホモポリマー、プロリプロピレン(prolypropylene)オキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性に起因して、製造における利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量のものであってもよく、分岐しているか、または非分岐であり得る。抗体に結合したポリマーの数は、様々であってもよく、1つを超えるポリマーが結合される場合、それらは、同じ分子または異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数および/または種類は、改善対象の抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が規定の条件下で療法において使用されるかどうか等を含むが、これらに限定されない考慮に基づいて、決定することができる。

10

【0246】

別の実施形態において、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る、抗体および非タンパク質性部分の複合体が提供される。一実施形態において、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブ(Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605(2005))である。放射線は、任意の波長のものであってもよく、一般の細胞を害さないが、非タンパク質性部分を、抗体-非タンパク質性部分に近位の細胞が死滅させられる温度まで加熱する波長が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0247】

B. 組み換え法および組成物

抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載される、組み換え法および組成物を使用して産生されてもよい。一実施形態において、本明細書に記載される、抗LgR5抗体をコードする単離核酸が提供される。かかる核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および/またはVHを含むアミノ酸配列(例えば、抗体の軽鎖および/または重鎖)をコードし得る。さらなる実施形態において、かかる核酸を含む1つ以上のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。さらなる実施形態において、かかる核酸を含む宿主細胞が提供される。1つのかかる実施形態において、宿主細胞は、(1)抗体のVLを含むアミノ酸配列および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または(2)抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター、および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む(例えば、それらで形質転換されている)。一実施形態において、宿主細胞は、真核性、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはリンパ球系細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20細胞)である。一実施形態において、抗LgR5抗体を作製する方法が提供され、本方法は、上に提供される抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に好適な条件下で培養することと、任意に、抗体を宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から回収することを含む。

30

【0248】

抗LgR5抗体の組み換え産生のために、例えば、上述の、抗体をコードする核酸が、単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニングおよび/または発現のために、1つ以上のベクター中に挿入される。かかる核酸は、従来の手順を使用して(例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能である、オリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離され、配列決定され得る。

40

【0249】

抗体コードベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞には、本明細書に記載される原核または真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされない場合に、細菌において産生されてもよい。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号、および同第5,840,523号を参照されたい。(ま

50

た、大腸菌における抗体断片の発現を記載する、Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245 - 254 も参照されたい)。発現後、抗体は、可溶性画分において細菌細胞ペーストから単離されてもよく、またさらに精製することができる。

【0250】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核微生物は、抗体コードベクターに好適なクローニングまたは発現宿主であり、それには、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的または完全ヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす、真菌および酵母株が含まれる。Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409 - 1414 (2004)、および Li et al., Nat. Biotech. 24: 210 - 215 (2006) を参照されたい。

10

【0251】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物および脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物および昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と併せて、特にヨトウガ細胞のトランスフェクションのために、使用され得る、多数のパキウウイルス株が特定されている。

【0252】

植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第 5,959,177 号、同第 6,040,498 号、同第 6,420,548 号、同第 7,125,978 号、および同第 6,417,429 号（トランスジェニック植物において抗体を産生するための PLANTIBODIES（商標）技術を記載している）を参照されたい。

20

【0253】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で成長するように適合される哺乳類細胞株が、有用であり得る。有用な哺乳類宿主細胞株の他の例としては、SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 株（COS-7）；ヒト胚性腎臓株（例えば、Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977) に記載される、293 または 293 細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, Biol. Reprod. 23: 243 - 251 (1980) に記載される、TM4 細胞）；サル腎臓細胞（CV1）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸がん細胞（HELA）；イヌ腎臓細胞（MDCK）；バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝がん細胞（Hep G2）；マウス乳腺腫瘍（MMT 060562）；例えば、Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44 - 68 (1982) に記載される、TRI 細胞；MRC 5 細胞；および FS4 細胞がある。他の有用な哺乳類宿主細胞株には、DHFR⁺ CHO 細胞（Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980) を含む、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞；ならびに Y0、NS0、および Sp2/0 等の骨髓腫細胞株が含まれる。抗体産生に好適なある特定の哺乳類宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255 - 268 (2003) を参照されたい。

30

40

【0254】

C. アッセイ

本明細書に提供される抗 LgR5 抗体は、それらの物理 / 化学特性および / または生物活性について、当該技術分野で既知の種々のアッセイによって、特定され、スクリーニングされ、または特徴付けられてもよい。

【0255】

50

一態様において、本発明の抗体は、その抗原結合活性について、例えば、E L I S A、B I A C o r e（登録商標）、F A C S、またはウェスタンブロット等の既知の方法によって、試験される。

【0256】

別の態様において、競合アッセイを使用して、L g R 5 への結合に対して、本明細書に記載される抗体のいずれかと競合する抗体を特定してもよい。ある特定の実施形態において、かかる競合抗体は、本明細書に記載される抗体によって結合される、同じエピトープ（例えば、直線状または立体配座エピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例となる方法は、M o r r i s（1996）“E p i t o p e M a p p i n g P r o t o c o l s ,” i n M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y v o l . 6 6（H u m a n a P r e s s , T o t o w a , N J）に提供される。

10

【0257】

例となる競合アッセイにおいて、固定化されたL g R 5は、L g R 5に結合する第1の標識抗体（例えば、本明細書に記載される抗体のいずれか）、およびL g R 5への結合に対して第1の抗体と競合するその能力について試験されている第2の未標識抗体を含む、溶液中でインキュベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定化されたL g R 5が、第1の標識抗体を含むが、第2の未標識抗体を含まない、溶液中でインキュベートされる。L g R 5への第1の抗体の結合を許容する条件下でのインキュベーション後、過剰の非結合抗体が除去され、固定化されたL g R 5に関連する標識の量が測定される。固定化されたL g R 5に関連する標識の量が、対照試料と比べて試験試料中で実質的に低減される場合、それは、第2の抗体がL g R 5への結合に対して第1の抗体と競合していることを示す。H a r l o w a n d L a n e（1988）A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l c h . 1 4（C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y）を参照されたい。

20

【0258】

D. 免疫複合体

本発明はまた、本明細書において、化学療法剤もしくは化学療法薬、成長阻害性薬剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはそれらの断片）、または放射性同位体（すなわち、放射性複合体（r a d i o c o n j u g a t e））等の、1つ以上の細胞傷害性薬剤に複合される抗L g R 5抗体を含む、免疫複合体も提供する。

30

【0259】

免疫複合体は、腫瘍への薬物部分の標的化された送達を可能にし、いくつかの実施形態においては、複合されていない薬物の全身投与が、正常な細胞にとって許容できないレベルの毒性をもたらし得る場合に、腫瘍中の細胞内蓄積を可能にする（P o l a k i s P .（2005）C u r r e n t O p i n i o n i n P h a r m a c o l o g y 5 : 3 8 2 - 3 8 7）。

【0260】

40

抗体-薬物複合体（A D C）は、強力な細胞傷害性薬物の標的を抗原発現腫瘍細胞に定め（T e i c h e r , B . A .（2009）C u r r e n t C a n c e r D r u g T a r g e t s 9 : 9 8 2 - 1 0 0 4）、それによって、有効性を最大限にし、オフターゲット毒性を最小限にすることにより治療指数を増強することによって、抗体および細胞傷害性薬物の両方の特性を組み合わせる、標的を定められた化学療法分子である（C a r t e r , P . J . a n d S e n t e r P . D .（2008）T h e C a n c e r J o u r . 1 4（3）: 1 5 4 - 1 6 9、C h a r i , R . V .（2008）A c c . C h e m . R e s . 4 1 : 9 8 - 1 0 7）。

【0261】

本発明のA D C化合物には、抗がん活性を有するものが含まれる。いくつかの実施形態

50

において、ADC化合物には、薬物部分に複合された、すなわち、共有結合された、抗体が含まれる。いくつかの実施形態において、本抗体は、リンカーを通じて薬物部分に共有結合される。本発明の抗体-薬物複合体(ADC)は、有効用量の薬物を腫瘍組織に選択的に送達し、それによって、治療指数(「治療濃度域」)を増加させながら、より高い選択性、すなわちより低い効果的用量が、達成され得る。

【0262】

抗体-薬物複合体(ADC)の薬物部分(D)は、細胞傷害性または細胞静止効果を有する任意の化合物、部分、または基を含んでもよい。薬物部分は、チューブリン結合、DNA結合またはインターカレーション、ならびにRNAポリメラーゼ、タンパク質合成、および/またはトポイソメラーゼの阻害を含むが、これらに限定されない機構によって、それらの細胞傷害性および細胞静止効果を付与し得る。例となる薬物部分には、メイタンシノイド、ドラスタチン、オーリスタチン、カリケアミシン、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)、ネモルピシンおよびその誘導体、PNU-159682、アントラサイクリン、デュオカルマイシン、ピンカアルカロイド、タキサン、トリコテセン、CC1065、カンプトテシン、エリナフィド、ならびに細胞傷害性活性を有するそれらの立体異性体、同配体、類似体、および誘導体が含まれるが、これらに限定されない。かかる免疫複合体の非限定的な例が、下にさらに詳細に考察される。

10

【0263】

1. 例となる抗体-薬物複合体

抗体-薬物複合体(ADC)化合物の例となる実施形態は、腫瘍細胞を標的とする抗体(Ab)、薬物部分(D)、およびAbをDに結合するリンカー部分(L)を含む。いくつかの実施形態において、本抗体は、リジンおよび/またはシステイン等の1個以上のアミノ酸残基を通じて、リンカー部分(L)に結合される。

20

【0264】

例となるADCは、式I、



を有し、式中、pは、1~約20である。いくつかの実施形態において、抗体に複合され得る薬物部分の数は、遊離システイン残基の数によって限定される。いくつかの実施形態において、遊離システイン残基は、本明細書に記載される方法によって抗体アミノ酸配列中に導入される。式Iの例となるADCには、1、2、3、または4個の操作されたシステインアミノ酸を有する抗体が含まれるが、これらに限定されない(Lyon, R. et al (2012) Methods in Enzymol. 502:123-138)。いくつかの実施形態において、1個以上の遊離システイン残基が、操作の使用なしに、抗体においてすでに存在しており、その場合、既存の遊離システイン残基を使用して、抗体を薬物に複合してもよい。いくつかの実施形態において、本抗体は、1個以上の遊離システイン残基を生成するために、抗体の複合前に還元条件に曝露される。

30

【0265】

a) 例となるリンカー

「リンカー」(L)は、1個以上の薬物部分(D)を抗体(Ab)に連結して、式Iの抗体-薬物複合体(ADC)を形成するために使用することができる、二機能性または多機能性部分である。いくつかの実施形態において、抗体-薬物複合体(ADC)は、薬物におよび抗体に共有結合するための反応性官能基を有するリンカーを使用して、調製することができる。例えば、いくつかの実施形態において、抗体の(Ab)システインチオールは、リンカーの反応性官能基との結合、または薬物-リンカー中間体を形成して、ADCを作製することができる。

40

【0266】

一態様において、リンカーは、抗体上に存在する遊離システインと反応して、共有結合を形成することが可能である、官能性を有する。非限定的な例となるかかる反応性官能基には、マレイミド、ハロアセトアミド、 α -ハロアセチル、コハク酸イミドエステル、4

50

- ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル等の活性化エステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアン酸塩、およびイソチオシアン酸塩が含まれる。例えば、K l u s s m a n , e t a l (2 0 0 4) , B i o c o n j u g a t e C h e m i s t r y 1 5 (4) : 7 6 5 - 7 7 3 の 7 6 6 ページにおける複合方法、およびその中の実施例を参照されたい。

【0267】

いくつかの実施形態において、リンカーは、抗体上に存在する求電子基と反応することが可能である、官能性を有する。例となるかかる求電子基には、アルデヒド基およびケトンカルボニル基が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、リンカーの反応性官能基のヘテロ原子は、抗体上の求電子基と反応し、抗体単位との共有結合を形成することができる。非限定的な例となるかかる反応性官能基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸塩、およびアリールヒドラジドが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0268】

リンカーは、1つ以上のリンカー構成要素を含んでもよい。例となるリンカー構成要素には、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」または「vc」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-コハク酸イミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタン酸塩(「SPP」)、および4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボン酸塩(「MCC」)が含まれる。種々のリンカー構成要素は、当該技術分野で知られており、このうちのいくつかは下に記載される。

20

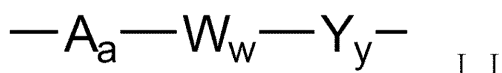
【0269】

リンカーは、薬物の放出を容易にする「開裂可能リンカー」であってもよい。非限定的な例となる開裂可能リンカーには、酸不安定性リンカー(例えば、ヒドラゾンを含む)、プロテアーゼ感受性(例えば、ペプチダーゼ感受性)リンカー、感光性リンカー、またはジスルフィド含有リンカー(Chari et al., Cancer Research 52:127-131(1992)、米国公開特許第5208020号)が含まれる。

【0270】

ある特定の実施形態において、リンカーは、次の式II、

30

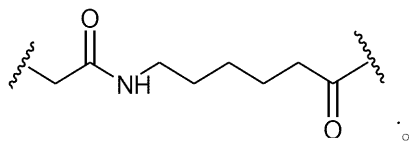
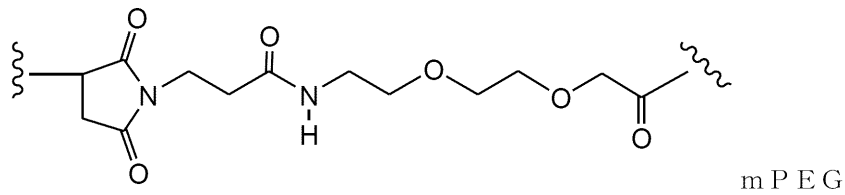
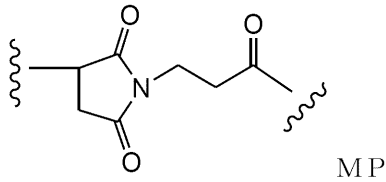
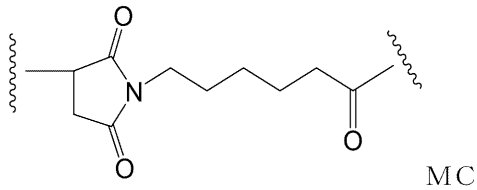


を有し、式中、Aは、「ストレッチャー(stretcher)単位」であり、aは、0～1の整数であり、Wは、「アミノ酸単位」であり、wは、0～12の整数であり、Yは、「スペーサー単位」であり、yは、0、1、または2である。式IIのリンカーを含むADCは、式I(A)、すなわちAb-(A_a-W_w-Y_y-D)pを有し、式中、Ab、D、およびpは、式Iについて上にあるように定義される。かかるリンカーの例となる実施形態は、米国特許第7,498,298号に記載され、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

40

【0271】

いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、抗体を別のリンカー構成要素にまたは薬物部分に連結する、「ストレッチャー単位」(A)を含む。非限定的な例となるストレッチャー単位が下に示される(ここで波線は、抗体、薬物、または追加のリンカー構成要素への共有結合の部位を示す)：



10

20

30

40

50

【 0 2 7 2 】

いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、「アミノ酸単位」(W)を含む。いくつかのかかる実施形態において、アミノ酸単位は、プロテアーゼによるリンカーの開裂を可能にし、それによって、リソソーム酵素等の細胞内プロテアーゼへの曝露時に免疫複合体からの薬物の放出を促進する(Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21: 778 - 784)。例となるアミノ酸単位には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、およびペンタペプチドが含まれるが、これらに限定されない。例となるジペプチドには、バリン - シトルリン(v cまたはval - cit)、アラニン - フェニルアラニン(a fまたはala - phe)、フェニルアラニン - リジン(f kまたはphe - lys)、フェニルアラニン - ホモリジン(phe - homolys)、およびN - メチル - バリン - シトルリン(Me - val - cit)が含まれるが、これらに限定されない。例となるトリペプチドには、グリシン - バリン - シトルリン(gly - val - cit)およびグリシン - グリシン - グリシン(gly - gly - gly)が含まれるが、これらに限定されない。アミノ酸単位は、自然発生アミノ酸残基、ならびに/または微量アミノ酸、および/もしくはシトルリン等の非自然発生アミノ酸類似体を含んでもよい。アミノ酸単位は、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C、およびD、またはプラスミンプロテアーゼによる、酵素的開裂のために設計し、最適化することができる。

【 0 2 7 3 】

典型的に、ペプチド型リンカーは、2つ以上のアミノ酸および/またはペプチド断片の間にペプチド結合を形成することによって、調製することができる。かかるペプチド結合は、例えば、液相合成法に従って、調製することができる(例えば、E. Schröder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76 - 136, Academic Press)。

【 0 2 7 4 】

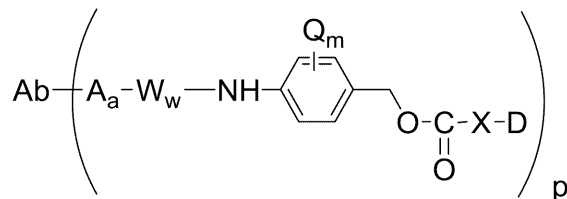
いくつかの実施形態において、リンカー構成要素は、直接、またはストレッチャー単位および/もしくはアミノ酸単位を通じてのいずれかで、抗体を薬物部分に連結する、「スペーサー単位」(Y)を含む。スペーサー単位は、「自己犠牲型 (self-immolative)」または「非自己犠牲型」であり得る。「非自己犠牲型」スペーサー単位は、ADCの開裂時にスペーサー単位の一部または全てが薬物部分に結合したままであるものである。非自己犠牲型スペーサー単位の例としては、グリシンスペーサー単位およびグリシン-グリシンスペーサー単位が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、腫瘍細胞関連プロテアーゼによる、グリシン-グリシンスペーサー単位を含有するADCの酵素的開裂は、ADCの残りの部分からのグリシン-グリシン-薬物部分の放出をもたらす。いくつかのかかる実施形態において、グリシン-グリシン-薬物部分

10

【0275】

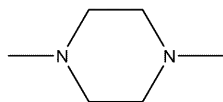
「自己犠牲型」スペーサー単位は、薬物部分の放出を可能にする。ある特定の実施形態において、リンカーのスペーサー単位は、p-アミノベンジル単位を含む。いくつかのかかる実施形態において、p-アミノベンジルアルコールは、アミド結合を介してアミノ酸単位に結合し、カルバミン酸塩、メチルカルバミン酸塩、または炭酸塩が、ベンジルアルコールと薬物との間に作製される (Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15: 1087-1103)。いくつかの実施形態において、スペーサー単位は、p-アミノベンジルオキシカルボニル (PAB) を含む。いくつかの実施形態において、自己犠牲型リンカーを含むADCは、構造、

20



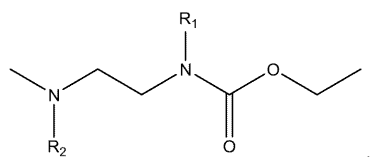
30

を有し、式中、Qは、-C₁~C₈アルキル、-O-(C₁~C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、または-シアノであり、mは、0~4の範囲の整数であり、Xは、1つ以上の追加のスペーサー単位であり得るか、または非存在であり得、pは、1~約20の範囲である。いくつかの実施形態において、pは、1~10、1~7、1~5、または1~4の範囲である。非限定的な例となるXスペーサー単位には、



および

40



が含まれ、式中、R₁およびR₂は独立して、HおよびC₁~C₆アルキルから選択される。いくつかの実施形態において、R₁およびR₂は各々、-CH₃である。

【0276】

50

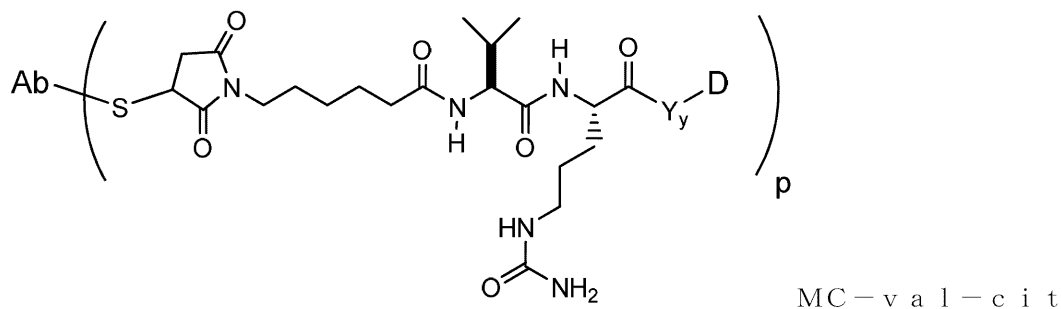
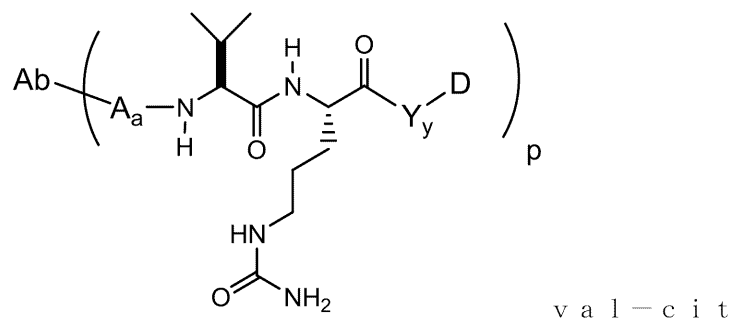
自己犠牲型スペーサーの他の例としては、2 - アミノイミダゾール - 5 - メタノール誘導体等の、P A B 基と電子工学的に同様である芳香族化合物（米国特許第 7, 375, 078 号、Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9: 2237）およびオルト - またはパラ - アミノベンジルアセタールが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、置換および非置換 4 - アミノ酪酸アミド（Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2: 223）、適切に置換されたビシクロ[2.2.1]およびビシクロ[2.2.2]環系（Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94: 5815）、ならびに 2 - アミノフェニルプロピオン酸アミド（Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55: 5867）等の、アミド結合加水分解時に環化を経るスペーサーを使用することができる。グリシン残基の α - 炭素への薬物の結合は、ADC において有用であり得る自己犠牲型スペーサーの別の例である（Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27: 1447）。

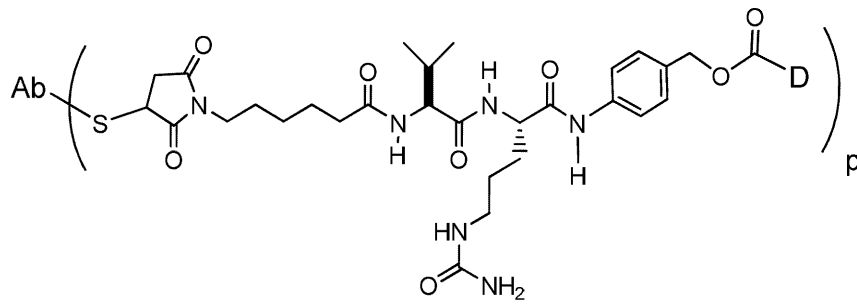
【0277】

いくつかの実施形態において、リンカー L は、分岐する多機能性リンカー部分を通じた、抗体への 1 つ超の薬物部分の共有結合のための、樹状型リンカーであり得る（Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12: 2213 - 2215、Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 1761 - 1768）。樹状リンカーは、ADC の効力に関連する、薬物対抗体のモル比、すなわち、負荷を増加させることができる。故に、抗体が 1 個のみの反応性システインチオール基を担持する場合、多数の薬物部分が、樹状リンカーを通じて結合され得る。

【0278】

非限定的な例となるリンカーが、式 I の ADC の関連において下に示される：

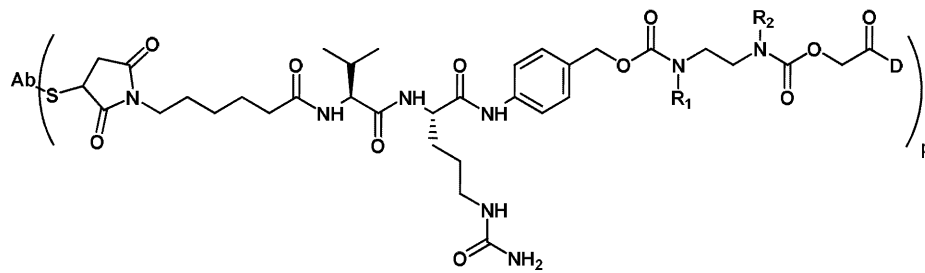
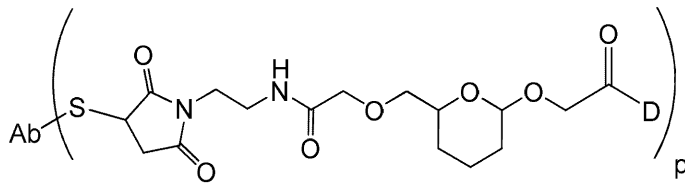




MC-val-c

i t-PAB

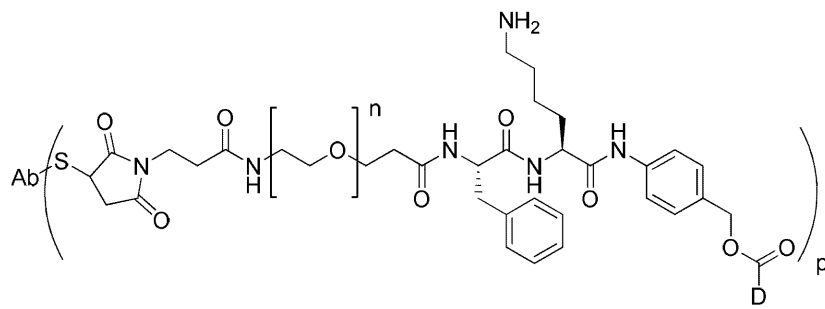
10



20

(式中、 R_1 および R_2 は独立して、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される)。いくつかの実施形態において、 R_1 および R_2 は各々、 $-CH_3$ である。

30



Phe-Lys-

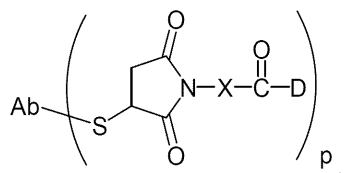
PAB-Ab、

40

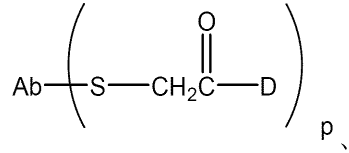
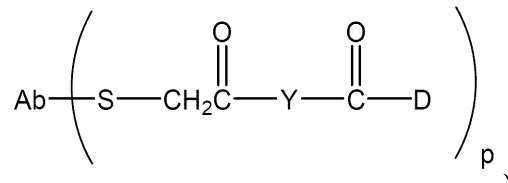
(式中、 n は、 $0 \sim 12$ である)。いくつかの実施形態において、 n は、 $2 \sim 10$ である。いくつかの実施形態において、 n は、 $4 \sim 8$ である。

【0279】

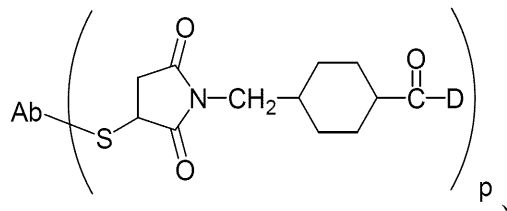
さらなる非限定的な例となるADCには、次の構造が含まれる：



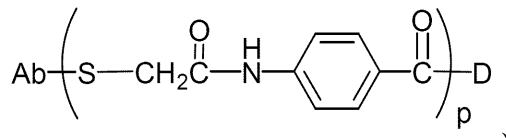
50



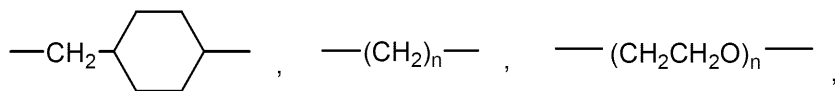
10



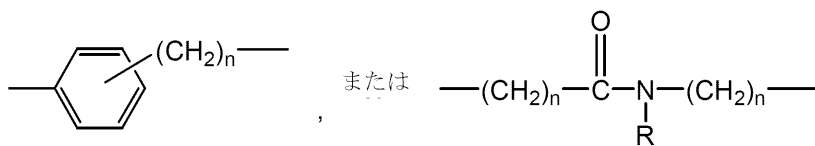
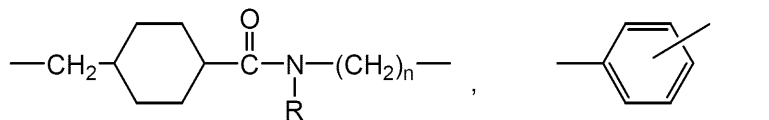
20



(式中、Xは、

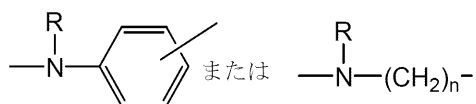


30



であり、Yは、

40



であり、各 R は独立して、H または C₁ - C₆ アルキルであり、n は、1 ~ 12 である)

【0280】

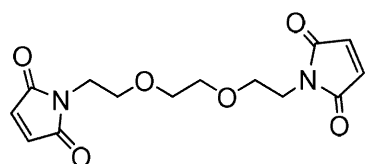
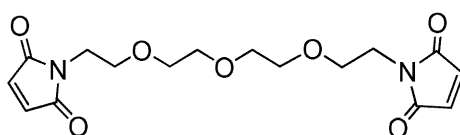
いくつかの実施形態において、リンカーは、溶解度および / または反応性を調節する基で置換される。非限定的な例として、スルホン酸塩 (- SO₃⁻) またはアンモニウム等

50

の荷電置換基は、リンカー試薬の水溶性を増加させ、抗体および／もしくは薬物部分とのリンカー試薬のカップリング反応を促進し得るか、またはADCを調製するために用いられる合成経路に応じて、DとのAb-L（抗体-リンカー中間体）、もしくはAbとのD-L（薬物-リンカー中間体）のカップリング反応を促進し得る。いくつかの実施形態において、リンカーの一部が抗体にカップリングされ、リンカーの一部が薬物にカップリングされ、次いでAb-（リンカー部分）^aが薬物-（リンカー部分）^bにカップリングされて、式IのADCを形成する。

【0281】

本発明の化合物は、次のリンカー試薬、すなわちビス-マレイミド-トリオキシエチレングリコール（BMPEO）、N-（β-マレイミドプロピルオキシ）-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル（BMPS）、N-（ε-マレイミドカプロイルオキシ）コハク酸イミドエステル（EMCS）、N-[γ-マレイミドブチリルオキシ]コハク酸イミドエステル（GMB S）、1,6-ヘキサン-ビス-ビニルスルホン（HBVS）、コハク酸イミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシ-（6-アミドカプロン酸塩）（LC-SMCC）、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル（MBS）、4-（4-N-マレイミドフェニル）酪酸ヒドラジド（MPBH）、コハク酸イミジル3-（プロモアセトアミド）プロピオン酸塩（SBAP）、コハク酸イミジルヨード酢酸塩（SIA）、コハク酸イミジル（4-ヨードアセチル）アミノ安息香酸塩（SIAB）、N-コハク酸イミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオン酸塩（SPDP）、N-コハク酸イミジル-4-（2-ピリジルチオ）ペンタン酸塩（SPP）、コハク酸イミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸塩（SMCC）、コハク酸イミジル4-（p-マレイミドフェニル）酪酸塩（SMPB）、コハク酸イミジル6-[(β-マレイミドプロピオンアミド)ヘキサン酸塩]（SMPH）、イミノチオラン（IT）、スルホ-EMCS、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、およびスルホ-SMPB、ならびにコハク酸イミジル-（4-ビニルスルホン）安息香酸塩（SVSB）を用いて、また次のビス-マレイミド試薬、すなわちジチオビスマレイミドエタン（DTME）、1,4-ビスマレイミドブタン（BMB）、1,4-ビスマレイミジル-2,3-ジヒドロキシブタン（BMDB）、ビスマレイミドヘキサン（BMH）、ビスマレイミドエタン（BMOE）、BM(PEG)₂（下に示される）、およびBM(PEG)₃（下に示される）；イミドエステルの二機能性誘導体（アジブイミド酸ジメチルHCl等）、活性エステル（スベリン酸ジスクシンイミジル等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス-（p-ジアゾニウムソイル等）-エチレンジアミン）、ジイソシアン酸塩（トルエン2,6-ジイソシアン酸塩等）、およびビス活性フッ素化合物（1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等）を含めて、調製される、ADCを明示的に企図するが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ビス-マレイミド試薬は、チオール含有薬物部分、リンカー、またはリンカー-薬物中間体への、抗体におけるシステインのチオール基の結合を可能にする。チオール基と反応性である他の官能基には、ヨードアセトアミド、プロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアン酸塩、およびイソチオシアン酸塩が含まれるが、これらに限定されない。

BM(PEG)₂BM(PEG)₃

【0282】

10

20

30

40

50

ある特定の有用なリンカー試薬は、Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL), Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO) 等の、種々の商業的供給源から得るか、または当該技術分野において、例えば、Tokiet al (2002) J. Org. Chem. 67: 1866 - 1872、Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38: 5257 - 60、Walker, M. A. (1995) J. Org. Chem. 60: 5352 - 5355、Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7: 180 - 186、米国公開特許第6214345号、国際公開第02/088172号、米国公開特許第2003130189号、米国公開特許第2003096743号、国際公開第03/026577号、国際公開第03/043583号、および国際公開第04/032828号に記載される、手順に従って合成することができる。

10

【0283】

炭素 - 14 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 (MX-DTPA) は、抗体への放射性ヌクレオチドの複合のための、例となるキレート剤である。例えば、国際公開第94/11026号を参照されたい。

【0284】

b) 例となる薬物部分

(1) メイタンシンおよびメイタンシノイド

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、1個以上のメイタンシノイド分子に複合される抗体を含む。メイタンシノイドは、メイタンシンの誘導体であり、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂 (mitotic) 阻害剤である。メイタンシンは、東アフリカの低木メイテナス・セラタ (Maytenus serrata) から最初に単離された (米国特許第3896111号)。その後、ある特定の微生物もまた、メイタンシノールおよびC-3メイタンシノールエステル等のメイタンシノイドを産生することが発見された (米国特許第4,151,042号)。合成メイタンシノイドは、例えば、米国特許第4,137,230号、同第4,248,870号、同第4,256,746号、同第4,260,608号、同第4,265,814号、同第4,294,757号、同第4,307,016号、同第4,308,268号、同第4,308,269号、同第4,309,428号、同第4,313,946号、同第4,315,929号、同第4,317,821号、同第4,322,348号、同第4,331,598号、同第4,361,650号、同第4,364,866号、同第4,424,219号、同第4,450,254号、同第4,362,663号、および同第4,371,533号に開示される。

20

30

【0285】

メイタンシノイド薬物部分は、それらが、(i) 発酵または醗酵産物の化学修飾もしくは誘導体化によって調製するのに比較的利用しやすく、(ii) 抗体への非ジスルフィドリンカーを通じた複合に好適な官能基による誘導体化を受けやすく、(iii) 血漿中で安定しており、(iv) 多様な腫瘍細胞株に対して有効であるので、抗体 - 薬物複合体における魅力的な薬物部分である。

40

【0286】

メイタンシノイド薬物部分として使用するのに好適なある特定のメイタンシノイドは、当該技術分野で知られており、既知の方法に従って天然源から単離するか、または遺伝子操作技術を使用して産生することができる (例えば、Yuet al (2002) PNAS 99: 7968 - 7973を参照されたい)。メイタンシノイドはまた、既知の方法に従って合成的に調製されてもよい。

【0287】

例となるメイタンシノイド薬物部分には、C-19 - デクロロ (米国特許第4256746号) (例えば、アンサミトシン (ansamycin) P2の水素化アルミニウムリチウム還元によって調製される) ; C-20 - ヒドロキシ (またはC-20 - デメチ

50

ル) + / - C - 19 - デクロロ (米国特許第 4 3 6 1 6 5 0 号および同第 4 3 0 7 0 1 6 号) (例えば、ストレプトミセスもしくはアクチノミセスを使用したデメチル化、または LAH を使用した脱塩素によって調製される) ; および C - 20 - デメトキシ、C - 20 - アシルオキシ (- O C O R) 、 + / - デクロロ (米国特許第 4 , 2 9 4 , 7 5 7 号) (例えば、塩化アシルを使用したアシル化によって調製される) 等の、修飾された芳香族環を有するもの、ならびに芳香族環の他の位置に修飾を有するものが含まれるが、これらに限定されない。

【0288】

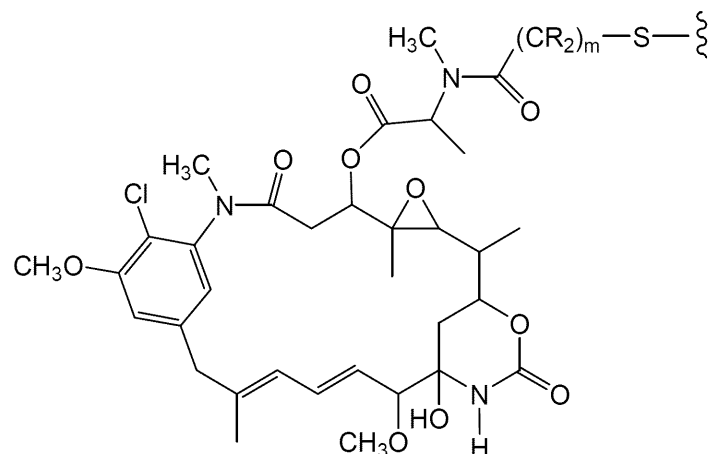
例となるメイタンシノイド薬物部分にはまた、C - 9 - S H (米国特許第 4 4 2 4 2 1 9 号) (例えば、 H_2S または P_2S_5 とのメイタンシノールの反応によって調製される) ; C - 14 - アルコキシメチル (デメトキシ / CH_2OR) (米国公開特許第 4 3 3 1 5 9 8 号) ; C - 14 - ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル (CH_2OH または CH_2OAc) (米国特許第 4 4 5 0 2 5 4 号) (例えば、ノカルジアから調製される) ; C - 15 - ヒドロキシ / アシルオキシ (米国公開特許第 4 3 6 4 8 6 6 号) (例えば、ストレプトミセスによるメイタンシノールの変換によって調製される) ; C - 15 - メトキシ (米国特許第 4 3 1 3 9 4 6 号および同第 4 3 1 5 9 2 9 号) (例えば、トレビア・ヌーディフロラ (*Trewia nudiflora*) から単離される) ; C - 18 - N - デメチル (米国特許第 4 3 6 2 6 6 3 号および同第 4 3 2 2 3 4 8 号) (例えば、ストレプトミセスによるメイタンシノールのデメチル化によって調製される) ; および 4 , 5 - デオキシ (米国公開特許第 4 3 7 1 5 3 3 号) (例えば、メイタンシノールの三塩化チタン / LAH 還元によって調製される) 等の、修飾を有するものも含まれる。

【0289】

メイタンシノイド化合物上の多くの位置は、結合位置として有用である。例えば、エステル結合は、従来のカップリング技法を使用したヒドロキシル基との反応によって形成され得る。いくつかの実施形態において、反応は、ヒドロキシル基を有する C - 3 位、ヒドロキシメチルで修飾された C - 14 位、ヒドロキシル基で修飾された C - 15 位、およびヒドロキシル基を有する C - 20 位において生じ得る。いくつかの実施形態において、結合は、メイタンシノールまたはメイタンシノール類似体の C - 3 位において形成される。

【0290】

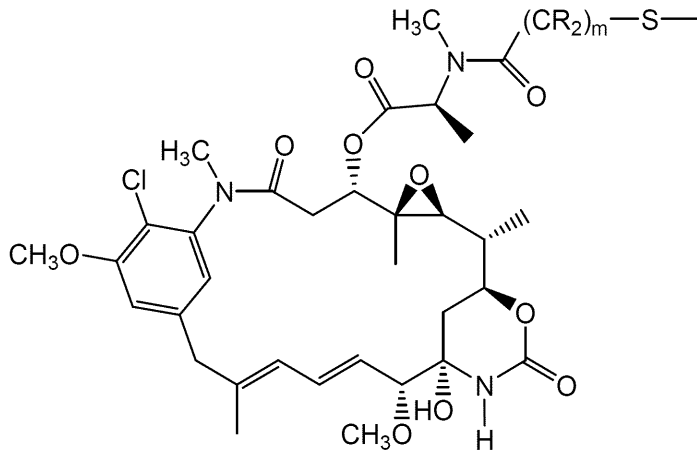
メイタンシノイド薬物部分は、次の構造を有するものを含む：



(式中、波線は、ADC のリンカーへの、メイタンシノイド薬物部分の硫黄原子の共有結合を示す。各 R は独立して、H または $C_1 - C_6$ アルキルであり得る)。アミド基を硫黄原子に結合するアルキレン鎖は、メタニル、エタニル、またはプロピルであり得、すなわち、m は、1、2、または 3 である (米国公開特許第 6 3 3 4 1 0 号、米国公開特許第 5 2 0 8 0 2 0 号、Charl et al (1992) Cancer Res. 52 : 127 - 131、Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci USA 93 : 8618 - 8623)。

【 0 2 9 1 】

メイタンシノイド薬物部分の全ての立体異性体、すなわちキラル炭素における R および S 配置の任意の組み合わせが、本発明の ADC について企図される（米国公開特許第 7 2 7 6 4 9 7 号、米国公開特許第 6 9 1 3 7 4 8 号、米国公開特許第 6 4 4 1 1 6 3 号、米国公開特許第 6 3 3 4 1 0 号（RE 3 9 1 5 1）、米国公開特許第 5 2 0 8 0 2 0 号、Widdison et al (2006) J. Med. Chem. 49: 4392 - 4408、参照によりそれらの全体が組み込まれる）。いくつかの実施形態において、メイタンシノイド薬物部分は、次の立体化学を有する：

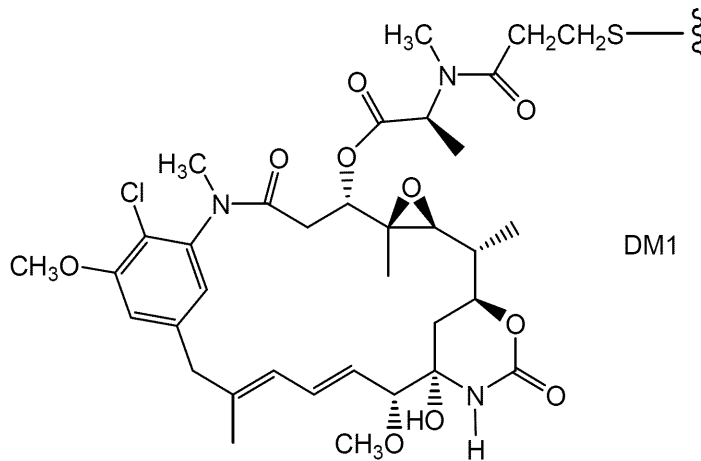


10

20

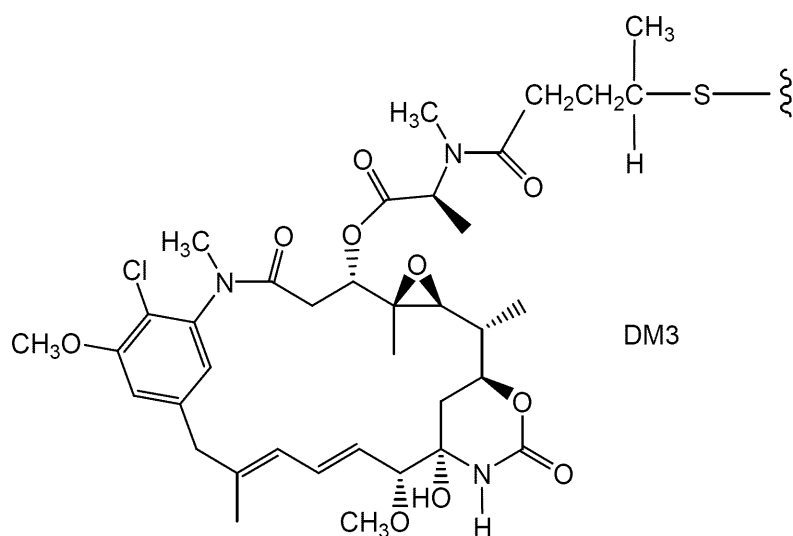
【 0 2 9 2 】

メイタンシノイド薬物部分の例となる実施形態には、次の構造を有する、DM 1、DM 3、および DM 4 が含まれるが、これらに限定されない：



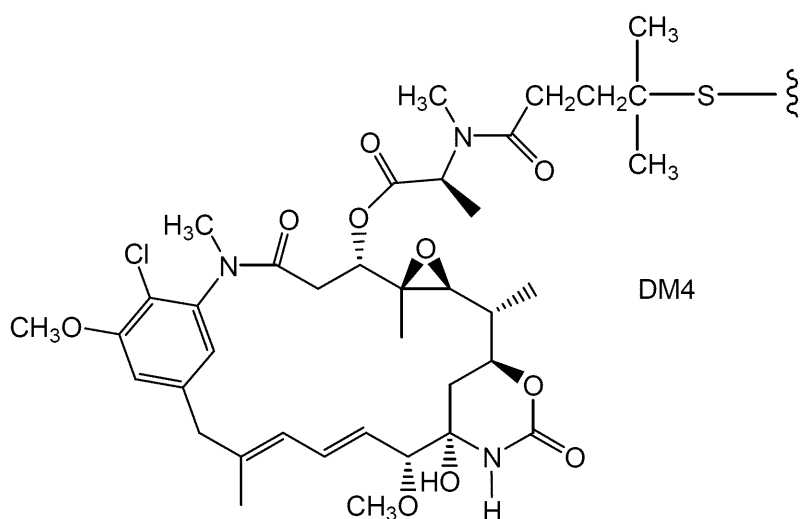
DM1

30



DM3

10



DM4

20

30

(式中、波線は、抗体 - 薬物複合体のリンカー (L) への、薬物の硫黄原子の共有結合を示す)。

【0293】

他の例となるメイタンシノイド抗体 - 薬物複合体は、次の構造および略号を有する (式中、Abは、抗体であり、pは、1 ~ 約20である。いくつかの実施形態において、pは、1 ~ 10であるか、pは、1 ~ 7であるか、pは、1 ~ 5であるか、またはpは、1 ~ 4である) :



A b - S P P - D M 1



A b - S M C C -

30



50

【0295】

メイタンシノイドを含有する免疫複合体、それを作製する方法、およびそれらの治療的使用は、例えば、米国特許第5,208,020号および同第5,416,064号、米国公開特許第2005/0276812 A1号、および欧州特許第EP 0 425 235 B1号に開示され、それらの開示は参照により本明細書に明示的に組み込まれる。また、Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996)、およびChari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992)も参照されたい。

【0296】

いくつかの実施形態において、抗体-メイタンシノイド複合体は、抗体またはメイタンシノイド分子のいずれの生物活性も有意に減少させることなく、抗体をメイタンシノイド分子に化学結合することによって調製されてもよい。例えば、米国特許第5,208,020号を参照されたい（その開示は参照により本明細書に明示的に組み込まれる）。いくつかの実施形態において、1抗体分子当たり平均3~4個のメイタンシノイド分子が複合されたADCが、抗体の機能または溶解度に悪影響を及ぼすことなく標的細胞の細胞傷害性を増強することにおいて、有効性を示してきた。いくつかの事例において、毒素/抗体の1個の分子でさえも、裸の抗体の使用を上回って細胞傷害性を増強することが予想される。

10

【0297】

抗体-メイタンシノイド複合体を作製するための例となる連結基には、例えば、本明細書に記載されるもの、ならびに米国特許第5208020号、欧州特許第0 425 235 B1号Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992)、米国公開特許第2005/0276812 A1号、および米国公開特許第2005/016993 A1号に開示されるものが含まれ、それらの開示は参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

20

【0298】

(2) オーリスタチンおよびドラスタチン

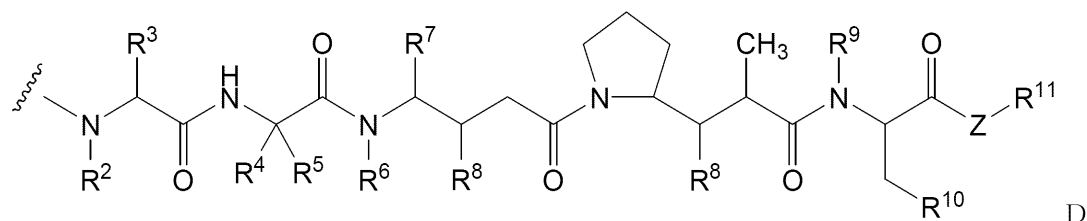
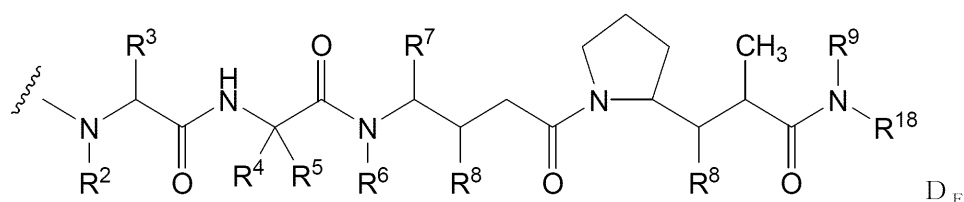
薬物部分には、ドラスタチン、オーリスタチン、ならびにそれらの類似体および誘導体が含まれる（米国公開特許第5635483号、米国公開特許第5780588号、米国公開特許第5767237号、米国公開特許第6124431号）。オーリスタチンは、海洋軟体動物化合物ドラスタチン-10の誘導体である。いかなる特定の理論にも拘束されることを意図するものではないが、ドラスタチンおよびオーリスタチンは、微小管運動、GTP加水分解、ならびに核および細胞分裂に干渉し（Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45 (12): 3580-3584）、抗がん（米国公開特許第5663149号）および抗真菌活性を有すること（Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965）が示されてきた。ドラスタチン/オーリスタチン薬物部分は、ペプチド性薬物部分のN（アミノ）末端またはC（カルボキシル）末端を通じて抗体に結合し得る（国際公開第02/088172号、Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21 (7): 778-784、Francisco et al (2003) Blood 102 (4): 1458-1465）。

30

40

【0299】

例となるオーリスタチン実施形態には、米国公開特許第7498298号および米国公開特許第7659241号に開示される、次のN末端連結モノメチルオーリスタチン薬物部分D_EおよびD_Fが含まれ、その開示は参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる：



10

F

(式中、 D_E および D_F の波線は、抗体または抗体 - リンカー構成要素への共有結合部位を示し、各場所において独立して、

R^2 は、H および $C_1 \sim C_8$ アルキルから選択され、

R^3 は、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ 炭素環、アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 炭素環)、 $C_3 \sim C_8$ 複素環、および $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 複素環) から選択され、

R^4 は、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ 炭素環、アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 炭素環)、 $C_3 \sim C_8$ 複素環、および $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 複素環) から選択され、

R^5 は、H およびメチルから選択されるか、

または R^4 および R^5 は一緒に、炭素環式環を形成し、式 - ($C R^a R^b$)_n - を有し、式中、 R^a および R^b は独立して、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、および $C_3 \sim C_8$ 炭素環から選択され、n は、2、3、4、5、および 6 から選択され、

R^6 は、H および $C_1 \sim C_8$ アルキルから選択され、

R^7 は、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ 炭素環、アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - アリール、 $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 炭素環)、 $C_3 \sim C_8$ 複素環、および $C_1 \sim C_8$ アルキル - ($C_3 \sim C_8$ 複素環) から選択され、

各 R^8 は独立して、H、OH、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_3 \sim C_8$ 炭素環、および O - ($C_1 \sim C_8$ アルキル) から選択され、

R^9 は、H および $C_1 \sim C_8$ アルキルから選択され、

R^{10} は、アリールもしくは $C_3 \sim C_8$ 複素環から選択され、

Z は、O、S、NH、もしくは NR^{12} であり、式中、 R^{12} は、 $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、

R^{11} は、H、 $C_1 \sim C_{20}$ アルキル、アリール、 $C_3 \sim C_8$ 複素環、- ($R^{13}O$)_m - R^{14} 、もしくは - ($R^{13}O$)_m - CH(R^{15})₂ から選択され、

m は、1 ~ 1000 の範囲の整数であり、

R^{13} は、 $C_2 \sim C_8$ アルキルであり、

R^{14} は、H もしくは $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、

R^{15} の各出現は独立して、H、COOH、- (CH_2)_n - N(R^{16})₂、- (CH_2)_n - SO₃H、もしくは - (CH_2)_n - SO₃ - $C_1 \sim C_8$ アルキルであり、

R^{16} の各出現は独立して、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、もしくは - (CH_2)_n - COOH であり、

R^{18} は、- C(R^8)₂ - C(R^8)₂ - アリール、- C(R^8)₂ - C(R^8)₂ - ($C_3 \sim C_8$ 複素環)、および - C(R^8)₂ - C(R^8)₂ - ($C_3 \sim C_8$ 炭素環) から選択され、

50

n は、0 ~ 6 の範囲の整数である)。

【0300】

一実施形態において、 R^3 、 R^4 および R^7 は独立して、イソプロピルまたは *sec*-ブチルであり、 R^5 は、-H またはメチルである。例となる実施形態において、 R^3 および R^4 は各々、イソプロピルであり、 R^5 は、-H であり、 R^7 は、*sec*-ブチルである。

【0301】

なおも別の実施形態において、 R^2 および R^6 は各々、メチルであり、 R^9 は、-H である。

【0302】

依然として別の実施形態において、 R^8 の各出現は、-OCH₃ である。

10

【0303】

例となる実施形態において、 R^3 および R^4 は各々、イソプロピルであり、 R^2 および R^6 は各々、メチルであり、 R^5 は、-H であり、 R^7 は、*sec*-ブチルであり、 R^8 の各出現は、-OCH₃ であり、 R^9 は、-H である。

【0304】

一実施形態において、 Z は、-O- または -NH- である。

【0305】

一実施形態において、 R^{10} は、アリールである。

【0306】

例となる実施形態において、 R^{10} は、-フェニルである。

20

【0307】

例となる実施形態において、 Z が -O- であるとき、 R^{11} は、-H、メチル、または *t*-ブチルである。

【0308】

一実施形態において、 Z が -NH であるとき、 R^{11} は、-CH(R^{15})₂ であり、式中、 R^{15} は、-(CH₂) _{n} -N(R^{16})₂ であり、 R^{16} は、-C₁~C₈ アルキルまたは -(CH₂) _{n} -COOH である。

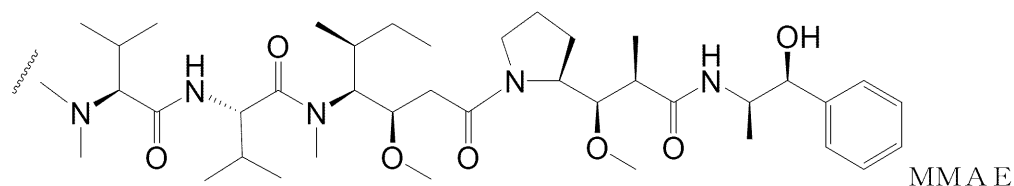
【0309】

別の実施形態において、 Z が -NH であるとき、 R^{11} は、-CH(R^{15})₂ であり、式中、 R^{15} は、-(CH₂) _{n} -SO₃H である。

30

【0310】

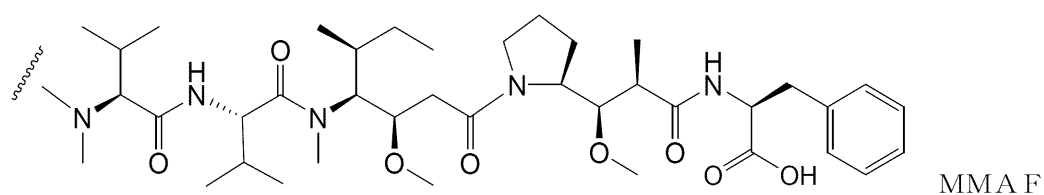
式 D_E の例となるオーリスタチン実施形態は、次の MMAE であり、式中、波線は、抗体-薬物複合体のリンカー (L) への共有結合を示す：



40

【0311】

式 D_F の例となるオーリスタチン実施形態は、次の MMAF であり、式中、波線は、抗体-薬物複合体のリンカー (L) への共有結合を示す：



50

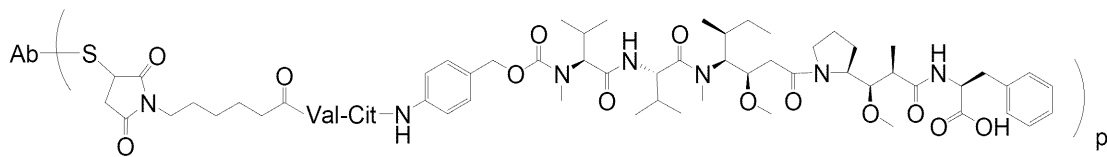
【 0 3 1 2 】

他の例となる実施形態には、ペントペプチドオーリスタチン薬物部分のC末端にフェニルアラニンカルボキシ修飾を有するモノメチルパリン化合物（国際公開第2007/008848号）、およびペントペプチドオーリスタチン薬物部分のC末端にフェニルアラニン側鎖修飾を有するモノメチルパリン化合物（国際公開第2007/008603号）が含まれる。

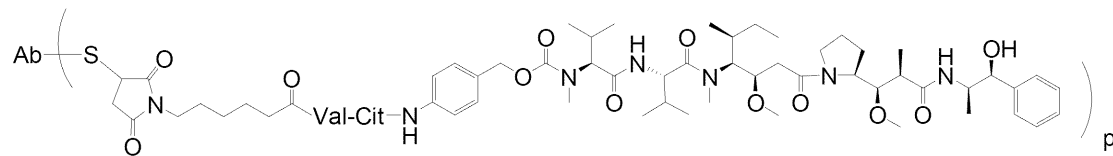
【 0 3 1 3 】

MMAEまたはMMAFおよび種々のリンカー構成要素を含む、式IのADCの非限定的な例となる実施形態は、次の構造および略号を有する（式中、「Ab」は、抗体であり、pは、1～約8であり、「Val-Cit」は、パリン-シトルリンジペプチドであり、「S」は、硫黄原子である：

10

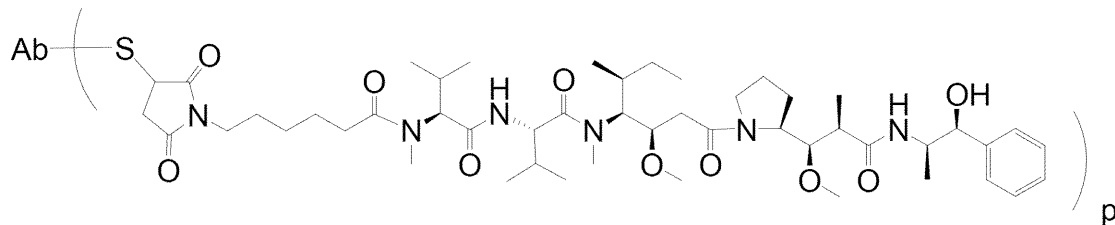


Ab-MC-vc-PAB-MMAF



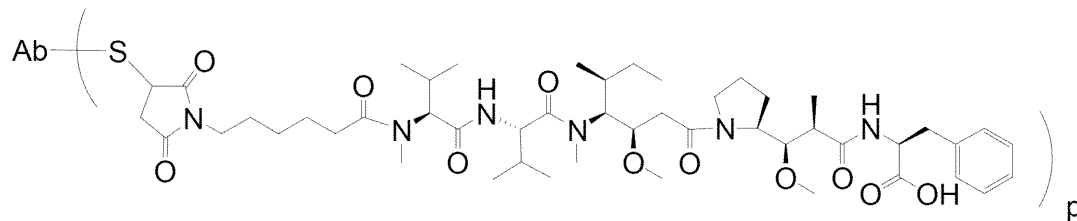
20

Ab-MC-vc-PAB-MMAE



30

Ab-MC-MMAE



40

Ab-MC-MMAF。

【 0 3 1 4 】

MMAFおよび種々のリンカー構成要素を含む、式IのADCの非限定的な例となる実施形態には、Ab-MC-PAB-MMAFおよびAb-PAB-MMAFがさらに含まれる。タンパク分解性に開裂可能でないリンカーによって抗体に結合したMMAFを含む免疫複合体は、タンパク分解性に開裂可能なリンカーによって抗体に結合したMMAFを含む免疫複合体に匹敵する活性を保有することが示されてきた（Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124）。いくつかのかかる実施形態において、薬物放出は、細胞内の抗体分解によって達成され

50

【0315】

典型的に、ペプチドベースの薬物部分は、2つ以上のアミノ酸および/またはペプチド断片との間にペプチド結合を形成することによって、調製することができる。かかるペプチド結合は、例えば、液相合成法に従って、調製することができる(例えば、E. Schrodter and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照されたい)。オーリスタチン/ドラスタチン薬物部分は、いくつかの実施形態において、米国公開特許第7498298号、米国公開特許第5635483号、米国公開特許第5780588号、Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465、Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277、Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725、Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859-863、およびDoronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7): 778-784の方法に従って調製されてもよい。

10

【0316】

いくつかの実施形態において、MMAE等の式D_E、およびMMAF等の式D_Fのオーリスタチン/ドラスタチン薬物部分、ならびにMC-MMAF、MC-MMAE、MC-Vc-PAB-MMAF、およびMC-Vc-PAB-MMAE等のそれらの薬物-リンカー中間体および誘導体は、米国公開特許第7498298号、Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17: 114-124、およびDoronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21: 778-784に記載される方法を使用して調製されてもよく、次いで目的の抗体に複合されてもよい。

20

【0317】

(3) カリケアミシン

いくつかの実施形態において、免疫複合体は、1個以上のカリケアミシン分子に複合される抗体を含む。抗生物質のカリケアミシンファミリー、およびそれらの類似体は、ピコモル以下の濃度で2本鎖DNA切断をもたらすことが可能である(Hinman et al., (1993) Cancer Research 53: 3336-3342、Lode et al., (1998) Cancer Research 58: 2925-2928)。カリケアミシンは、細胞内作用部位を有するが、ある特定の事例において、形質膜を容易に通過しない。したがって、抗体媒介性内部移行を通じたこれらの薬剤の細胞取り込みは、いくつかの実施形態において、それらの細胞傷害効果を大幅に増強し得る。カリケアミシン薬物部分との抗体-薬物複合体を調製する非限定的な例となる方法は、例えば、米国公開特許第5712374号、米国公開特許第5714586号、米国公開特許第5739116号、および米国公開特許第5767285号に記載される。

30

【0318】

(4) ピロロベンゾジアゼピン

いくつかの実施形態において、ADCは、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)を含む。いくつかの実施形態において、PDB二量体は、具体的なDNA配列を認識し、それに結合する。天然物アントラマイシンであるPBDは、1965年に最初に報告された(Leimgruber, et al., (1965) J. Am. Chem. Soc., 87: 5793-5795、Leimgruber, et al., (1965) J. Am. Chem. Soc., 87: 5791-5793)。それ以来、自然発生および類似体の両方として、いくつかのPBDが、報告されてきており(Thurston, et al., (1994) Chem. Rev. 1994, 433-465)、三環式PBD足場の二量体が含まれる(米国公開特許第6884799号、米国公開特許第7049311号、米国公開特許第7067511号、米国公開特許第7265105号、米国公開特許第7511032号、米国公開特許第7528126号、米国公開特許第7557099号)

40

50

。いかなる特定の理論にも拘束されることを意図せずに、二量体構造が、B型DNAの副溝との等螺旋性(isohelicity)に適切な三次元形状を付与し、結合部位において滑り嵌めをもたらすと考えられている(Kohn, In Antibiotics III, Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975)、Hurley and Needham-Vandevanter, (1986) Acc. Chem. Res., 19:230-237)。C2アリール置換基を担持する二量体PBD化合物は、細胞傷害性薬剤として有用であることが示されてきた(Hartley et al (2010) Cancer Res. 70(17):6849-6858、Antonow (2010) J. Med. Chem. 53(7):2927-2941、Howard et al (2009) Bioorganic and Med. Chem. Letters 19(22):6463-6466)。

10

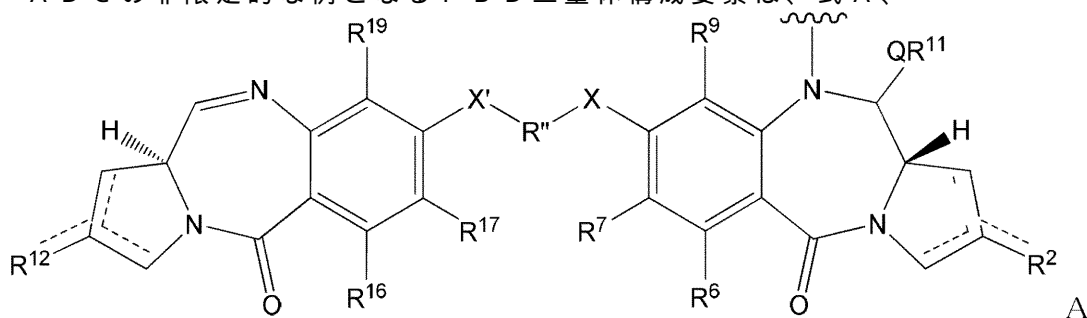
【0319】

PBD二量体は、抗体に複合されており、結果として生じるADCは、抗がん特性を有することが示されてきた。PBD二量体上の非限定的な例となる結合部位には、5員のピロリ環、PBD単位間のテザー、およびN10-C11イミン基が含まれる(国際公開第2009/016516号、米国公開特許第2009/304710号、米国公開特許第2010/047257号、米国公開特許第2009/036431号、米国公開特許第2011/0256157号、国際公開第2011/130598号)。

【0320】

ADCの非限定的な例となるPBD二量体構成要素は、式A、

20



のもの、ならびにその塩および溶媒和物であり、式中、

30

波線は、リンカーへの共有結合部位を示し、

点線は、C1とC2またはC2とC3との間の二重結合の任意の存在を示し、

R²は独立して、H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R、およびCORから選択され、任意に、ハロまたはジハロからさらに選択され、R^Dは独立して、R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H、およびハロから選択され、

R⁶およびR⁹は独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn、およびハロから選択され、

R⁷は独立して、H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn、およびハロから選択され、

Qは独立して、O、S、およびNHから選択され、

40

R¹¹は、H、もしくはRであるか、または、QがOである場合、SO₃Mであるか、のいずれかであり、式中、Mは、金属陽イオンであり、

RおよびR'は各々独立して、任意に置換されるC₁-₈アルキル、C₁-₁₂アルキル、C₃-₈ヘテロシクリル、C₃-₂₀複素環、およびC₅-₂₀アリール基から選択され、任意に、基NRR'に関して、RおよびR'は、それらが結合する窒素原子と一緒に、任意に置換される4、5、6、または7員の複素環式環を形成し、

R¹²、R¹⁶、R¹⁹、およびR¹⁷は、それぞれ、R²、R⁶、R⁹、およびR⁷について定義される通りであり、

R''は、C₃-₁₂アルキレン基であり、その鎖は、1個以上のヘテロ原子、例えば、O、S、N(H)、NMe、および/または芳香族環、例えば、ベンゼンまたはピリジンに

50

よって分断され得、それらの環は、任意に置換されており、
XおよびX'は独立して、O、S、およびN(H)から選択される。

【0321】

いくつかの実施形態において、RおよびR'は各々独立して、任意に置換されるC₁-₁₂アルキル、C₃-₂₀複素環、およびC₅-₂₀アリール基から選択され、任意に、基NR R'に関して、RおよびR'は、それらが結合する窒素原子と一緒に、任意に置換される4、5、6、または7員の複素環式環を形成する。

【0322】

いくつかの実施形態において、R⁹およびR¹⁹は、Hである。

【0323】

いくつかの実施形態において、R⁶およびR¹⁶は、Hである。

【0324】

いくつかの実施形態において、R⁷は、R¹⁷は両方とも、OR^{7A}であり、式中、R^{7A}は、任意に置換されるC₁-₄アルキルである。いくつかの実施形態において、R^{7A}は、Meである。いくつかの実施形態において、R^{7A}は、C₆H₅であり、式中、Phは、フェニル基である。

【0325】

いくつかの実施形態において、Xは、Oである。

【0326】

いくつかの実施形態において、R¹¹は、Hである。

【0327】

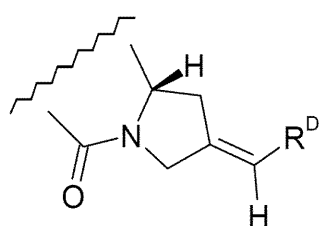
いくつかの実施形態において、各単量体単位においてC2とC3との間に二重結合が存在する。

【0328】

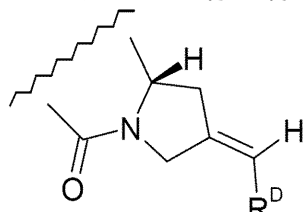
いくつかの実施形態において、R²およびR¹²は独立して、HおよびRから選択される。いくつかの実施形態において、R²およびR¹²は独立して、Rである。いくつかの実施形態において、R²およびR¹²は独立して、任意に置換されるC₅-₂₀アリールまたはC₅-₇アリールまたはC₈-₁₀アリールである。いくつかの実施形態において、R²およびR¹²は独立して、任意に置換されるフェニル、チエニル、ナプチル(naphthyl)、ピリジル、キノリニル、またはイソキノリニルである。いくつかの実施形態において、R²およびR¹²は独立して、=O、=CH₂、=CH-R^D、および=C(R^D)₂から選択される。いくつかの実施形態において、R²およびR¹²は各々、=CH₂である。いくつかの実施形態において、R²およびR¹²は各々、Hである。いくつかの実施形態において、R²およびR¹²は各々、=Oである。いくつかの実施形態において、R²およびR¹²は各々、=CF₂である。いくつかの実施形態において、R²および/またはR¹²は独立して、=C(R^D)₂である。いくつかの実施形態において、R²および/またはR¹²は独立して、=CH-R^Dである。

【0329】

いくつかの実施形態において、R²および/またはR¹²が=CH-R^Dであるとき、各基は独立して、下に示される配置のいずれかを有し得る：



(I)



(II)

いくつかの実施形態において、=CH-R^Dは、配置(I)にある。

10

20

30

40

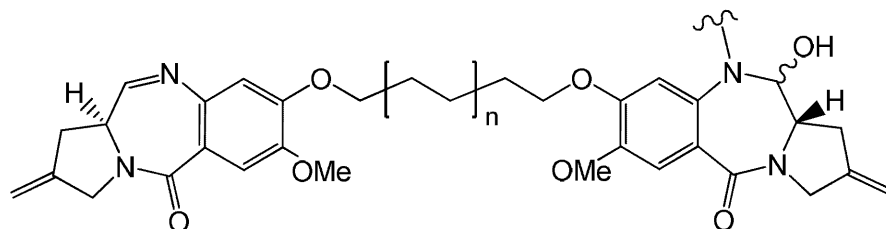
50

【0330】

いくつかの実施形態において、 R'' は、 C_3 アルキレン基または C_5 アルキレン基である。

【0331】

いくつかの実施形態において、ADCの例となるPBD二量体構成要素は、式A(I)、



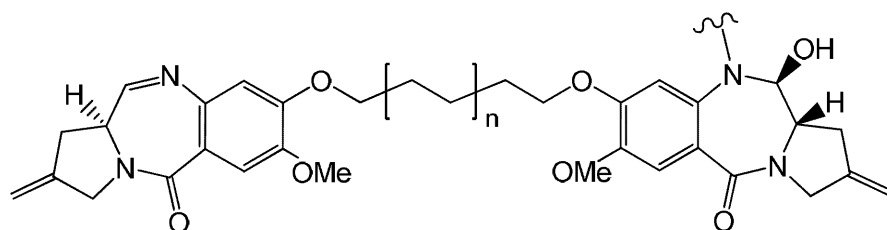
A(I)、

10

の構造を有し、式中、 n は、0または1である。

【0332】

いくつかの実施形態において、ADCの例となるPBD二量体構成要素は、式A(II)、



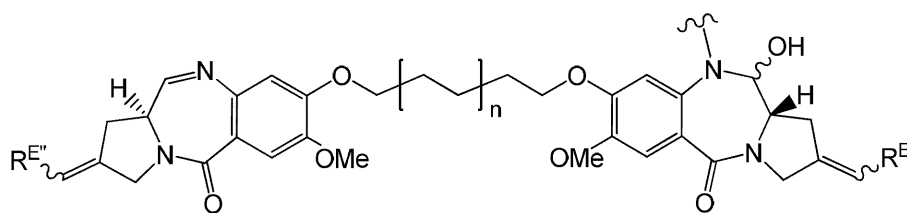
A(II)、

20

の構造を有し、式中、 n は、0または1である。

【0333】

いくつかの実施形態において、ADCの例となるPBD二量体構成要素は、式A(III)、



A(III)

I)、

30

の構造を有し、式中、 R^E および $R^{E'}$ は各々独立して、Hまたは R^D から選択され、式中、 R^D は、上にあるように定義され、 n は、0または1である。

40

【0334】

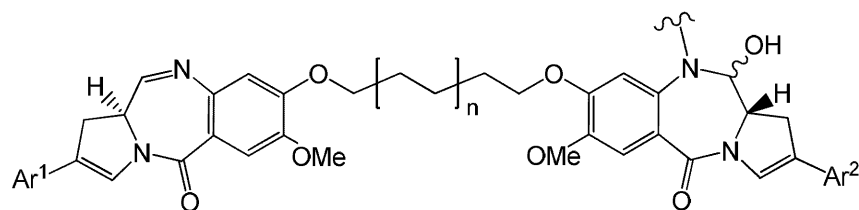
いくつかの実施形態において、 n は、0である。いくつかの実施形態において、 n は、1である。いくつかの実施形態において、 R^E および / または $R^{E'}$ は、Hである。いくつかの実施形態において、 R^E および $R^{E'}$ は、Hである。いくつかの実施形態において、 R^E および / または $R^{E'}$ は、 R^D であり、式中、 R^D は、任意に置換される C_{1-12} アルキルである。いくつかの実施形態において、 R^E および / または $R^{E'}$ は、 R^D であり、式中、 R^D は、メチルである。

【0335】

いくつかの実施形態において、ADCの例となるPBD二量体構成要素は、式A(IV)

50

)、



A(IV)、

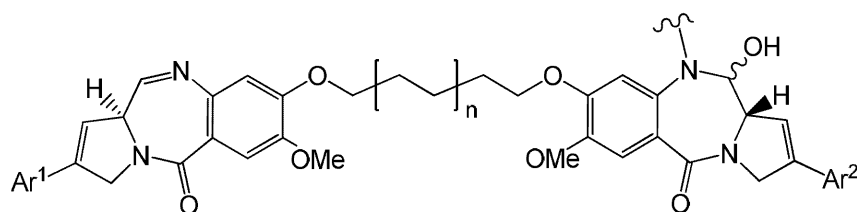
の構造を有し、式中、 Ar^1 および Ar^2 は各々独立して、任意に置換される C_{5-20} アリールであり、 Ar^1 および Ar^2 は、同じであっても異なってもよく、 n は、0 または 1 である。

10

【0336】

いくつかの実施形態において、ADC の例となる PBD 二量体構成要素は、式 A(V)

、



A(V)、

20

の構造を有し、式中、 Ar^1 および Ar^2 は各々独立して、任意に置換される C_{5-20} アリールであり、 Ar^1 および Ar^2 は、同じであっても異なってもよく、 n は、0 または 1 である。

【0337】

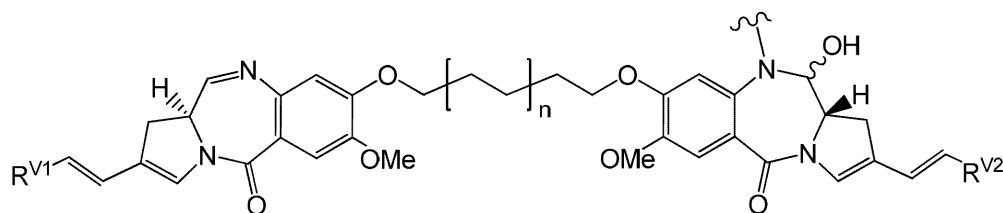
いくつかの実施形態において、 Ar^1 および Ar^2 は各々独立して、任意に置換されるフェニル、フラニル、チオフェニル、およびピリジルから選択される。いくつかの実施形態において、 Ar^1 および Ar^2 は各々独立して、任意に置換されるフェニルである。いくつかの実施形態において、 Ar^1 および Ar^2 は各々独立して、任意に置換されるチエン-2-イルまたはチエン-3-イルである。いくつかの実施形態において、 Ar^1 および Ar^2 は各々独立して、任意に置換されるキノリニルまたはイソキノリニルである。キノリニルまたはイソキノリニル基は、任意の利用可能な環の位置を通じて、PBD コアに結合されてもよい。例えば、キノリニルは、キノリン-2-イル、キノリン-3-イル、キノリン-4-イル、キノリン-5-イル、キノリン-6-イル、キノリン-7-イル、およびキノリン-8-イルであり得る。いくつかの実施形態において、キノリニルは、キノリン-3-イルおよびキノリン-6-イルから選択される。イソキノリニルは、イソキノリン-1-イル、イソキノリン-3-イル、イソキノリン-4-イル、イソキノリン-5-イル、イソキノリン-6-イル、イソキノリン-7-イル、およびイソキノリン-8-イルであり得る。いくつかの実施形態において、イソキノリニルは、イソキノリン-3-イルおよびイソキノリン-6-イルから選択される。

30

40

【0338】

ADC のさらなる非限定的な例となる PBD 二量体構成要素は、式 B、



B

のもの、ならびにその塩および溶媒和物であり、式中、

50

波線は、リンカーへの共有結合部位を示し、

OHに接続された波線は、SまたはR配置を示し、

R^{V1} および R^{V2} は独立して、H、メチル、エチル、およびフェニル（このフェニルは、特に4位において、フルオロで任意に置換されてもよい）、ならびにC₅-6ヘテロシクリルから選択され、式中、 R^{V1} および R^{V2} は、同じであっても異なってもよく、nは、0または1である。

【0339】

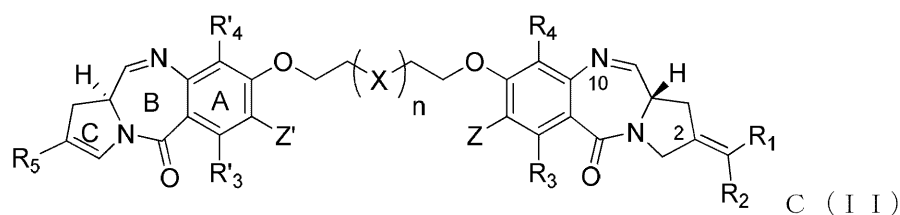
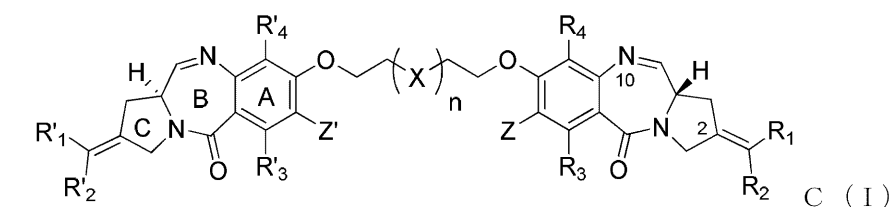
いくつかの実施形態において、 R^{V1} および R^{V2} は独立して、H、フェニル、および4-フルオロフェニルから選択される。

【0340】

いくつかの実施形態において、リンカーは、B環のN10イミン、C環のC-2エンド/エキソ位、またはA環を連結するテザー単位を含む、PBD二量体薬物部分の種々の部位のうちの1つにおいて結合されてもよい（下の構造C(I)およびC(II)を参照されたい）。

【0341】

ADCの非限定的な例となるPBD二量体構成要素には、式C(I)およびC(II)



が含まれる。

【0342】

式C(I)およびC(II)は、それらのN10-C11イミン型で示される。例となるPBD薬物部分にはまた、下の表に示される、カルビノールアミンおよび保護されたカルビノールアミン型も同様に含まれる：

イミン	カルビノールアミン	保護されたカルビノールアミン
------------	------------------	-----------------------

（式中、

Xは、CH₂（n = 1 ~ 5）、N、またはOであり、

ZおよびZ'は独立して、ORおよびNR₂から選択され、式中、Rは、1 ~ 5個の炭素原子を含有する第一級、第二級、または第三級アルキル鎖であり、

R₁、R'₁、R₂、およびR'₂は各々独立して、H、C₁ ~ C₈アルキル、C₂ ~ C₈アルケニル、C₂ ~ C₈アルキニル、C₅ - 20アリール（置換アリールを含む）、C₅ - 20ヘテロアリール基、-NH₂、-NHMe、-OH、および-SHから選択され

、いくつかの実施形態において、アルキル、アルケニル、およびアルキニル鎖は、最大5個の炭素原子を含み、

R_3 および R'_3 は独立して、H、OR、NHR、および NR_2 から選択され、Rは、1～5個の炭素原子を含有する第一級、第二級、または第三級アルキル鎖であり、

R_4 および R'_4 は独立して、H、Me、およびOMeから選択され、

R_5 は、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、 $C_2 \sim C_8$ アルケニル、 $C_2 \sim C_8$ アルキニル、 C_{5-20} アリール（ハロ、ニトロ、シアノ、アルコキシ、アルキル、ヘテロシクリルによって置換されたアリールを含む）、および C_{5-20} ヘテロアリール基から選択され、いくつかの実施形態において、アルキル、アルケニル、およびアルキニル鎖は、最大5個の炭素原子を含み、

10

R_{11} は、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、または保護基（アセチル、トリフルオロアセチル、t-ブトキシカルボニル（BOC）、ベンジルオキシカルボニル（CBZ）、9-フルオレニルメチレンオキシカルボニル（Fmoc）、またはバリン-シトルリン-PAB等の自己犠牲単位を含む部分等）であり、

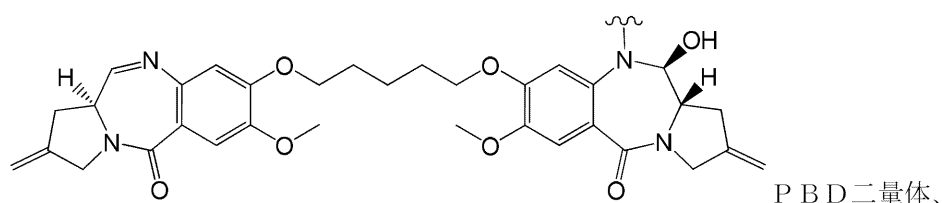
R_{12} は、H、 $C_1 \sim C_8$ アルキル、または保護基であり、

R_1 、 R'_1 、 R_2 、 R'_2 、 R_5 、もしくは R_{12} のうちの1つの水素、またはA環の間の $-OCH_2CH_2(X)_nCH_2CH_2O-$ スペーサーの水素は、ADCのリンカーに接続された結合と置き換えられている）。

【0343】

ADCの例となるPDB二量体部分には、次のものが含まれるが、これらに限定されない（波線は、リンカーへの共有結合の部位を示す）：

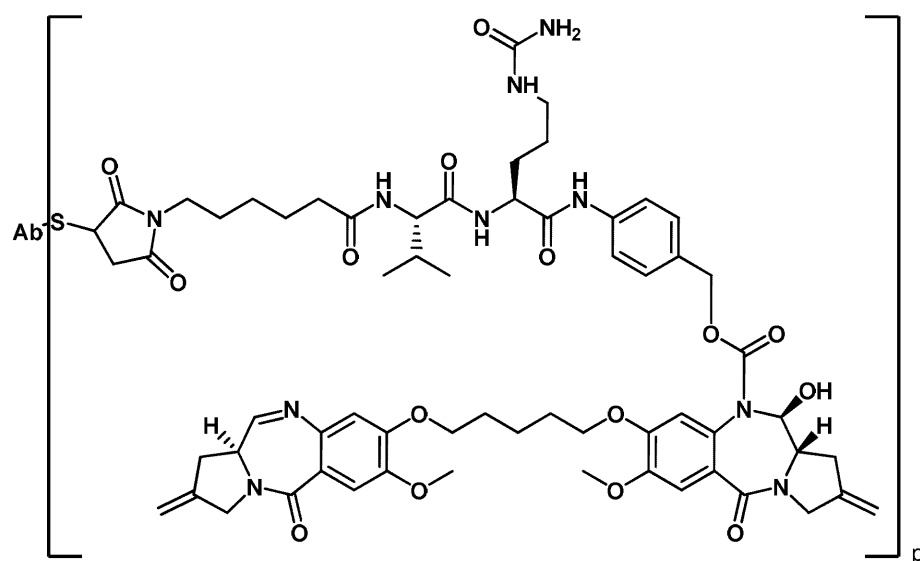
20



【0344】

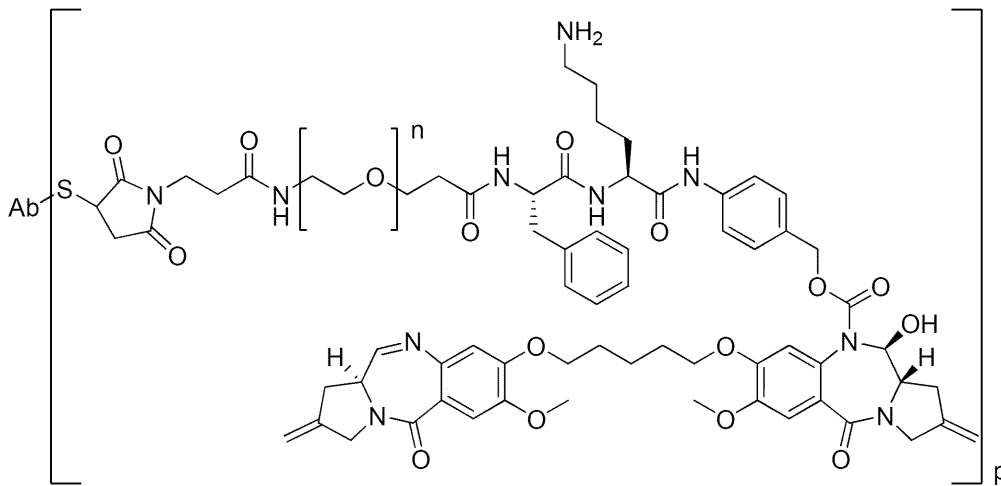
PDB二量体を含むADCの非限定的な例となる実施形態は、次の構造を有する：

30



40

PDB二量体-val-cit-PAB-Ab、



10

PBD二量体 - Phe - Lys - PAB - Ab (式中、
nは、0 ~ 12である)。いくつかの実施形態において、nは、2 ~ 10である。いくつかの実施形態において、nは、4 ~ 8である。いくつかの実施形態において、nは、4、5、6、7、および8から選択される。

【0345】

PBD二量体 - val - cit - PAB - AbおよびPBD二量体 - Phe - Lys - PAB - Abのリンカーは、プロテアーゼ開裂可能である一方で、PBD二量体 - マレイミド - アセタールのリンカーは、酸不安定性である。

20

【0346】

PBD二量体およびPBD二量体を含むADCは、当該技術分野で既知の方法に従って調製されてもよい。例えば、国際公開第2009/016516号、米国公開特許第2009/304710号、米国公開特許第2010/047257号、米国公開特許第2009/036431号、米国公開特許第2011/0256157号、国際公開第2011/130598号を参照されたい。

【0347】

(5) アントラサイクリン

30

いくつかの実施形態において、アントラサイクリンを含むADC。アントラサイクリンは、細胞傷害性活性を示す抗生物質化合物である。いかなる特定の理論にも拘束されることを意図するものではないが、試験は、アントラサイクリンが、1) 細胞のDNA中への薬物分子のインターカレーションによって、DNA依存性核酸合成を阻害すること、2) 薬物により遊離ラジカルが産生され、それが次いで細胞高分子と反応して、細胞への損傷を引き起こすこと、および/または3) 薬物分子の細胞膜との相互作用を含む、いくつかの異なる機構によって、細胞を死滅させるように作動し得ることを示してきた(例えば、C. Peterson et al., "Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia" in Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy, N. R. Bachur, "Free Radical Damage" 同著書、97 ~ 102ページを参照されたい)。それらの細胞傷害性の可能性のために、アントラサイクリンは、白血病、乳がん、肺がん、卵巣腺がん、および肉腫等の多数のがんの治療において使用されてきた(例えば、P. H. Wiernik, in Anthracycline: Current Status And New Developments p 11を参照されたい)。

40

【0348】

非限定的な例となるアントラサイクリンには、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ダウノマイシン、ネモルビシン、およびそれらの誘導体が含まれる。ダウノルビ

50

シンおよびドキソルビシンの免疫複合体およびプロドラッグが、調製され、研究されてきた (Kratz et al (2006) Current Med. Chem. 13: 477-523、Jeffrey et al (2006) Bioorganic & Med. Chem. Letters 16: 358-362、Torgov et al (2005) Bioconj. Chem. 16: 717-721、Nagy et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 829-834、Dubowchik et al (2002) Bioorg. & Med. Chem. Letters 12: 1529-1532、King et al (2002) J. Med. Chem. 45: 4336-4343、欧州特許第0328147号、米国公開特許第6630579号)。抗体-薬物複合体BR96-ドキソルビシンは、腫瘍関連抗原Lewis-
 Yと特異的に反応し、第I相およびII相試験において評価されてきた (Saleh et al (2000) J. Clin. Oncology 18: 2282-2292、Ajani et al (2000) Cancer Jour. 6: 78-81、Tolcher et al (1999) J. Clin. Oncology 17: 478-484)。

10

【0349】

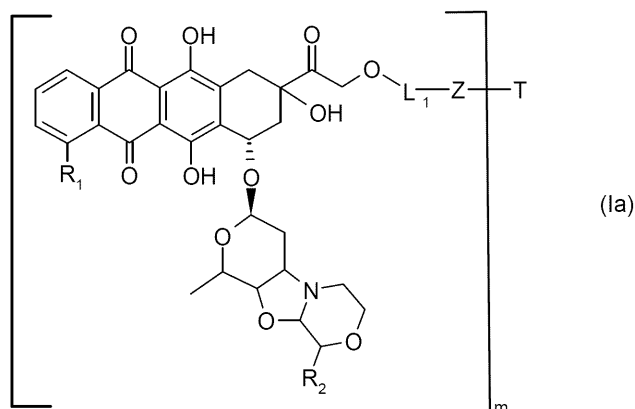
PNU-159682は、ネモルビシンの強力な代謝産物 (または誘導体) である (Quintieri, et al. (2005) Clinical Cancer Research 11(4): 1608-1617)。ネモルビシンは、ドキソルビシンのグリコシドアミノ上に2-メトキシモルホリノ基を有する、ドキソルビシンの半合成類似体であって、臨床評価段階にあり (Grandi et al (1990) Cancer Treat. Rev. 17: 133、Ripamonti et al (1992) Brit. J. Cancer 65: 703)、肝細胞がんに対する第II/III相試験が含まれる (Sun et al (2003) Proceedings of the American Society for Clinical Oncology 22, Abs 1448、Quintieri (2003) Proceedings of the American Association of Cancer Research, 44: 1st Ed, Abs 4649、Pacciarini et al (2006) Jour. Clin. Oncology 24: 14116)。

20

【0350】

30

ネモルビシンまたはネモルビシン誘導体を含む非限定的な例となるADCは、式Ia、



40

に示され、式中、 R_1 は、水素原子、ヒドロキシ、またはメトキシ基であり、 R_2 は、 $C_1 \sim C_5$ アルコキシ基、またはその薬剂的に許容される塩であり、 L_1 および Z は共に、本明細書に記載されるリンカー (L) であり、 T は、本明細書に記載される抗体 (Ab) であり、 m は、1 ~ 約20である。いくつかの実施形態において、 m は、1 ~ 10、1 ~ 7、1 ~ 5、または1 ~ 4である。

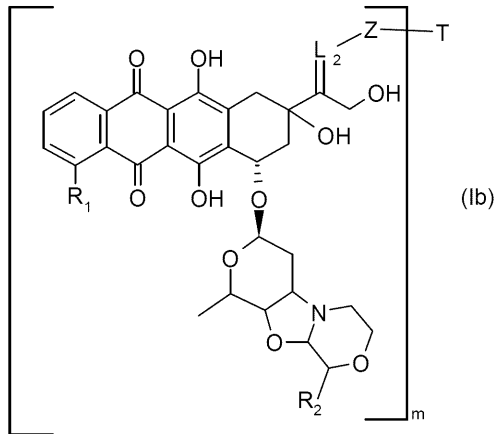
【0351】

50

いくつかの実施形態において、 R_1 および R_2 は両方とも、メトキシ (- OMe) である。

【 0 3 5 2 】

ネモルピシンまたはネモルピシン誘導体を含むさらなる非限定的な例となるADCは、式Ib、



10

に示され、式中、 R_1 は、水素原子、ヒドロキシ、またはメトキシ基であり、 R_2 は、 $C_1 \sim C_5$ アルコキシ基、またはその薬剂的に許容される塩であり、 L_2 および Z は共に、本明細書に記載されるリンカー (L) であり、 T は、本明細書に記載される抗体 (Ab) であり、 m は、1 ~ 約 20 である。いくつかの実施形態において、 m は、1 ~ 10、1 ~ 7、1 ~ 5、または 1 ~ 4 である。

20

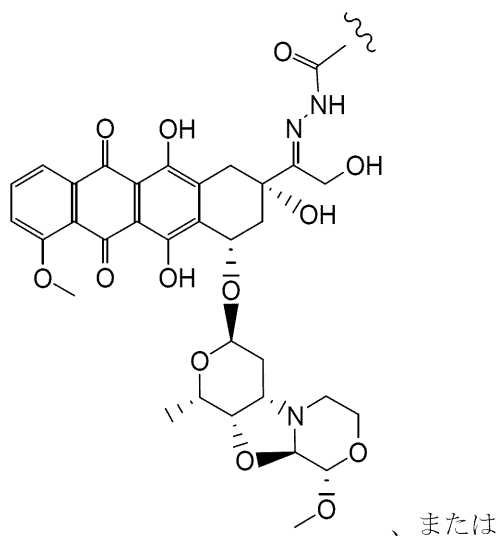
【 0 3 5 3 】

いくつかの実施形態において、 R_1 および R_2 は両方とも、メトキシ (- OMe) である。

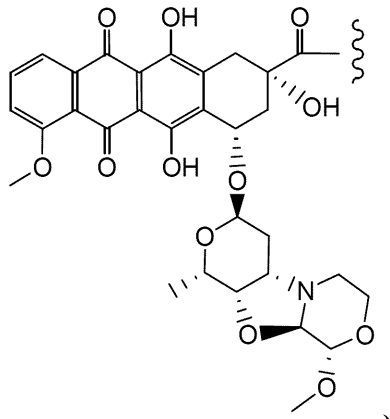
【 0 3 5 4 】

いくつかの実施形態において、ネモルピシン含有ADCのネモルピシン構成要素は、PNU-159682である。いくつかのかかる実施形態において、ADCの薬物部分は、次の構造のうちの1つを有し得る：

30



40



10

(式中、波線は、リンカー (L) への結合を示す)。

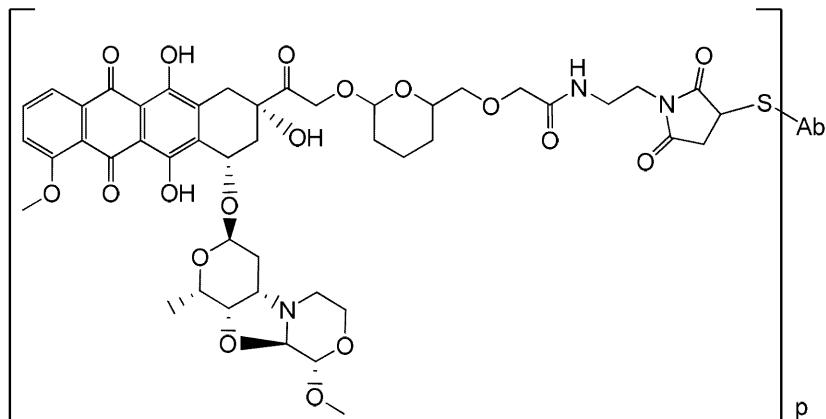
【 0 3 5 5 】

PNU - 1 5 9 6 8 2 を含む、アントラサイクリンは、数個の結合部位、および本明細書に記載されるリンカーを含む多様なリンカー (米国公開特許第 2 0 1 1 / 0 0 7 6 2 8 7 号、国際公開第 2 0 0 9 / 0 9 9 7 4 1 号、米国公開特許第 2 0 1 0 / 0 0 3 4 8 3 7 号、国際公開第 2 0 1 0 / 0 0 9 1 2 4 号) を通じて、抗体に複合されてもよい。

20

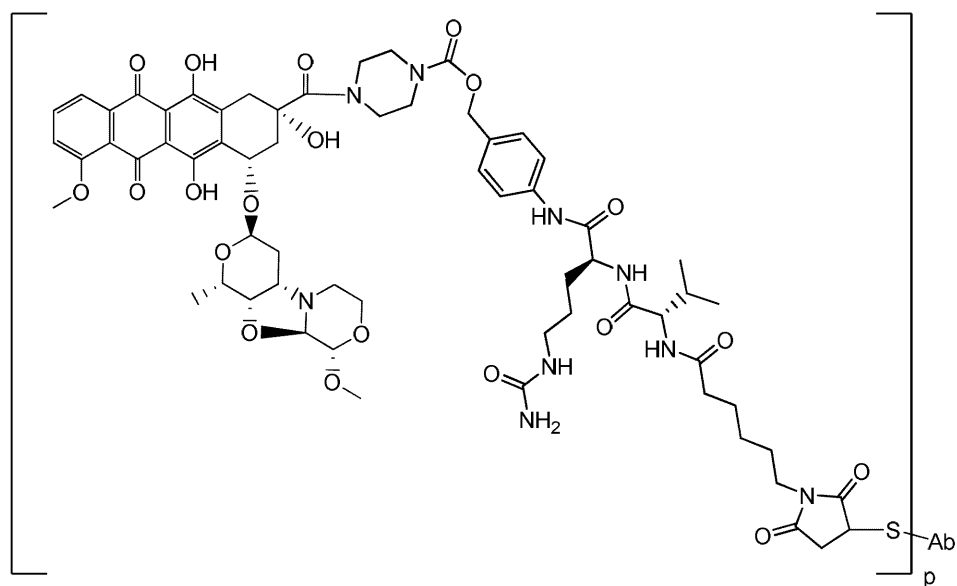
【 0 3 5 6 】

ネモルピシンおよびリンカーを含む例となるADCには、次のものが含まれるが、これらに限定されない：



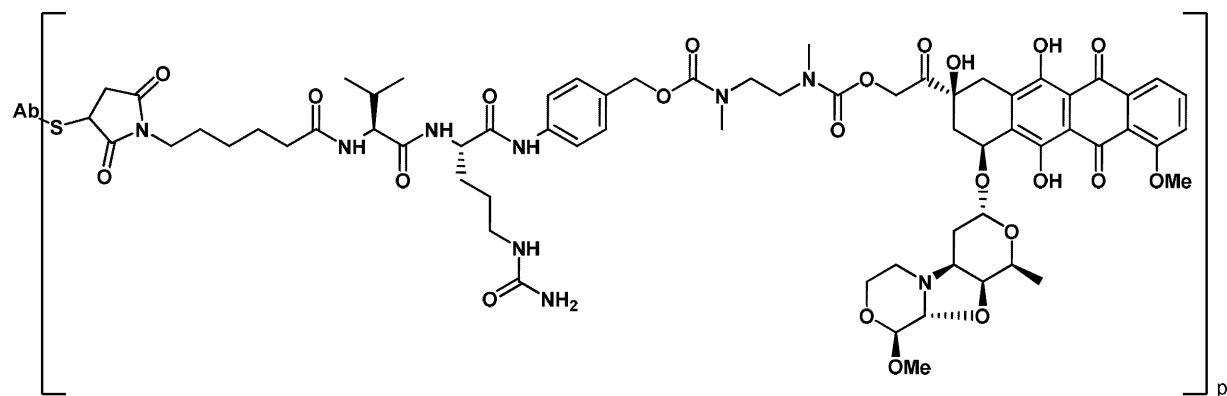
30

PNU - 1 5 9 6 8 2 マレイミドアセタール - A b、



10

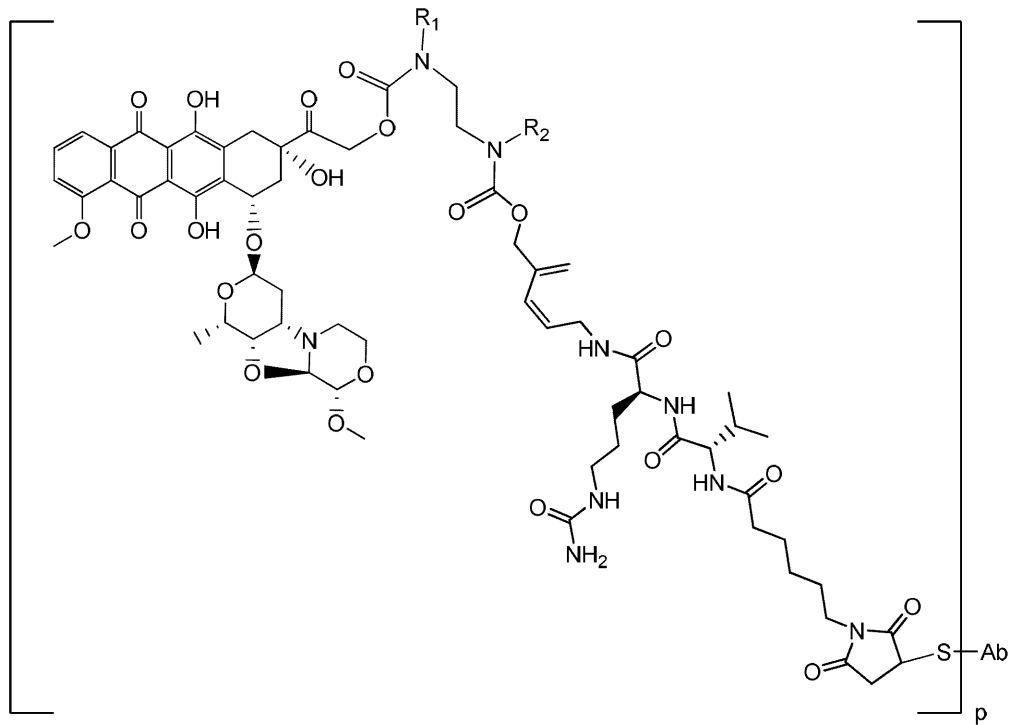
PNU-159682-val-cit-PAB-Ab、



20

30

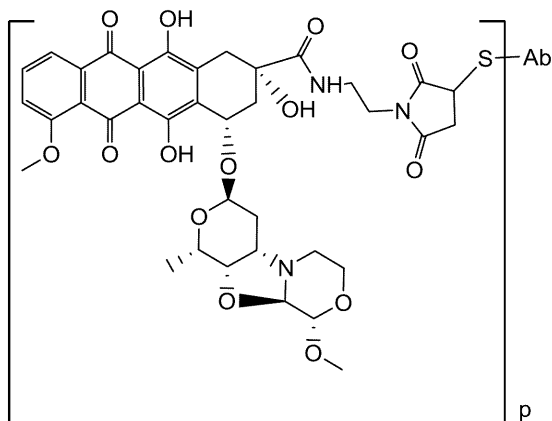
PNU-159682-val-cit-PAB-スパーサー-Ab、



10

20

PNU - 159682 - val - cit - PAB - スペーサー ($R^1 R^2$) - Ab (式中
、
 R^1 および R^2 は独立して、H および $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択される) 、および



30

PNU - 159682 - マレイミド - Ab。

【0357】

PNU - 159682 マレイミドアセタール - Ab のリンカーは、酸不安定性である一方で、PNU - 159682 - val - cit - PAB - Ab、PNU - 159682 - val - cit - PAB - スペーサー - Ab、および PNU - 159682 - val - cit - PAB - スペーサー ($R^1 R^2$) - Ab のリンカーは、プロテアーゼ開裂可能である。

40

【0358】

(6) 他の薬物部分

薬物部分にはまた、ゲルダナマイシン (Mandler et al (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92 (19): 1573 - 1581、Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 1025 - 1028、Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13: 786 - 791) ; ならびにジフテリアA鎖、ジフテリア毒

50

素の非結合活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチン（*dianthin*）タンパク質、フィトラカ・アメリカナ（*Phytolacca americana*）タンパク質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、ニガウリ阻害剤、クルシン（*curcin*）、クロチン（*crotin*）、サバオナリア・オフィシナリス（*sapaonarria officinalis*）阻害剤、ゲロニン（*gelonin*）、ミトゲリン（*mitogellin*）、レストリクトシン（*restrictocin*）、フェノマイシン（*phenomycin*）、エノマイシン（*enomycin*）、およびトリコテセン（*tricothecene*）を含むが、これらに限定されない、それらの酵素活性毒素および断片も含まれる。例えば、国際公開第93/21232号を参照されたい。

10

【0359】

薬物部分にはまた、核酸分解活性（例えば、リボヌクレアーゼまたはDNAエンドヌクレアーゼ）を有する化合物も含まれる。

【0360】

ある特定の実施形態において、免疫複合体は、高放射性原子を含んでもよい。放射性物質複合（*radioconjugated*）抗体の産生のために、多様な放射性同位体は利用可能である。例としては、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、およびLuの放射性同位体が挙げられる。いくつかの実施形態において、免疫複合体が検出に使用されるとき、それは、シンチグラフィ検査のための放射性原子、例えば、 Tc^{99} もしくは I^{123} 、またはジルコニウム-89、ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、もしくは鉄等の、核磁気共鳴（NMR）画像法（磁気共鳴画像法、MRIとしても知られる）のためのスピン標識を含んでもよい。ジルコニウム-89は、例えば、PET画像法のために、種々の金属キレート剤に複合体化され、抗体に複合される（国際公開第2011/056983号）。

20

【0361】

放射標識または他の標識が、既知の方式で免疫複合体に組み込まれてもよい。例えば、ペプチドは、例えば、1個以上の水素の代わりに1個以上のフッ素-19原子を含む、好適なアミノ酸前駆体を使用して、生合成または化学合成されてもよい。いくつかの実施形態において、 Tc^{99} 、 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、および In^{111} 等の標識は、抗体におけるシステイン残基を介して結合することができる。いくつかの実施形態において、 Y^{90} は、抗体のリジン残基を介して結合することができる。いくつかの実施形態において、IODOGEN法（Fraker et al (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57）を使用して、ヨウ素-123を組み込むことができる。“*Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*”（Chatall, CRC Press 1989）は、ある特定の他の方法を記載する。

30

【0362】

ある特定の実施形態において、免疫複合体は、プロドラッグ活性化酵素に複合される抗体を含んでもよい。いくつかのかかる実施形態において、プロドラッグ活性化酵素は、プロドラッグ（例えば、ペプチジル化学療法剤、国際公開第81/01145号を参照されたい）を、抗がん剤等の活性な薬物に変換する。かかる免疫複合体は、いくつかの実施形態において、抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ療法（「ADEPT」）において有用である。抗体に複合され得る酵素には、リン酸塩含有プロドラッグを遊離薬物へと変換するのに有用である、アルカリホスファターゼ；硫酸塩含有プロドラッグを遊離薬物へと変換するのに有用である、アリールスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗がん剤5-フルオロウラシルへと変換するのに有用である、シトシンデアミナーゼ；ペプチド含有プロドラッグを遊離薬物へと変換するのに有用である、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、スプチリシン、カルボキシペプチダーゼ、およびカテプシン（カテプシンBおよ

40

50

び L 等) 等のプロテアーゼ; D - アミノ酸置換基を含有するプロドラッグを変換するのに有用である、D - アラニルカルボキシペプチダーゼ; グリコシル化プロドラッグを遊離薬物へと変換するのに有用である、 β - ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ等の炭水化物開裂酵素; β - ラクタムにより誘導体化された薬物を遊離薬物へと変換するのに有用である、 β - ラクタマーゼ; ならびにそれらのアミン窒素においてそれぞれフェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基により誘導体化された薬物を遊離薬物へと変換するのに有用である、ペニシリン V アミダーゼおよびペニシリン G アミダーゼ等のペニシリンアミダーゼが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、酵素は、当該技術分野で周知の組み換え DNA 技術によって、抗体に共有結合されてもよい。例えば、Neuberger et al., Nature 312: 604 - 608 (1984) を参照されたい。

【0363】

c) 薬物負荷

薬物負荷は、式 I の分子における 1 抗体当たりの薬物部分の平均数である、p によって表される。薬物負荷は、1 抗体当たり 1 ~ 20 個の薬物部分 (D) の範囲であり得る。式 I の ADC は、1 ~ 20 個の範囲の薬物部分と共に複合された抗体の集団を含む。複合反応からの ADC の調製における、1 抗体当たりの薬物部分の平均数は、質量分析法、ELISA アッセイ、および HPLC 等の従来手段によって特徴付けられてもよい。p の単位での ADC の定量分布がまた決定されてもよい。いくつかの事例において、p がある特定の値である同種の ADC の、他の薬物負荷を有する ADC からの分離、精製、および特性評価は、逆相 HPLC または電気泳動等の手段によって達成されてもよい。

【0364】

いくつかの抗体 - 薬物複合体について、p は、抗体上の結合部位の数によって限定され得る。例えば、上のある特定の例となる実施形態にあるように、結合がシステインチオールである場合、抗体は、1 個のみもしくは数個のシステインチオール基を有し得るか、または、1 個のみもしくは数個の十分に反応性のチオール基を有し得、それを通じてリンカーが結合され得る。ある特定の実施形態において、より高い薬物負荷、例えば、5 超の p は、ある特定の抗体 - 薬物複合体において凝集、不溶性、毒性、または細胞透過性の喪失を引き起こし得る。ある特定の実施形態において、ADC についての平均薬物負荷は、1 ~ 約 8、すなわち約 2 ~ 約 6、または約 3 ~ 約 5 の範囲である。実際、ある特定の ADC について、1 抗体当たりの薬物部分の最適な比率は、8 未満であり得、また約 2 ~ 約 5 であり得ることが示されてきた (米国公開特許第 7 498 298 号)。

【0365】

ある特定の実施形態において、理論上の最大数よりも少ない薬物部分が、複合反応中に抗体に複合される。抗体は、下に考察されるように、例えば、薬物 - リンカー中間体またはリンカー試薬と反応しないリジン残基を含有し得る。一般に、抗体は、薬物部分に連結し得る多くの遊離および反応性システインチオール基を含有せず、実際、抗体におけるほとんどのシステインチオール残基は、ジスルフィド架橋として存在する。ある特定の実施形態において、抗体は、ジチオスレイトール (DTT) またはトリカルボニルエチルホスフィン (TCEP) 等の還元剤により、部分または完全還元条件下で還元されて、反応性システインチオール基を生成し得る。ある特定の実施形態において、本抗体は、リジンまたはシステイン等の反応性求核基を明らかにするために、変性条件に供される。

【0366】

ADC の負荷 (薬物 / 抗体比) は、異なる方式で、ならびに例えば、(i) 抗体と比べてモル過剰の薬物 - リンカー中間体またはリンカー試薬を限定すること、(ii) 複合反応時間または温度を限定すること、および (iii) システインチオール修飾のための部分または限定的還元条件によって、制御されてもよい。

【0367】

1 個を超える求核基が薬物 - リンカー中間体またはリンカー試薬と反応する場合、結果として生じる生成物は、1 個以上の薬物部分の分布が抗体に結合した、ADC 化合物の混

10

20

30

40

50

合物であることを理解されたい。1抗体当たりの平均数薬物は、抗体に特異的および薬物に特異的である、二重ELISA抗体アッセイによって混合物から算出されてもよい。個々のADC分子は、質量分析法によって混合物中で特定され、HPLC、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって、分離されてもよい(例えば、McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7): 299-307、Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10: 7063-7070、Hamblett, K. J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004、Alley, S. C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004を参照されたい)。ある特定の実施形態において、単一の負荷値を有する同種のADCが、電気泳動またはクロマトグラフィーによって複合混合物から単離されてもよい。

10

20

【0368】

d) 免疫複合体を調製するある特定の方法

式IのADCは、(1)抗体の求核基を二価リンカー試薬と反応させて、共有結合を介してAb-Lを形成し、続いて薬物部分Dと反応させることと、(2)薬物部分の求核基を二価リンカー試薬と反応させて、共有結合を介してD-Lを形成し、続いて抗体の求核基と反応させることとを含む、いくつかの経路によって、当業者に既知の有機化学反応、条件、および試薬を用いて調製されてもよい。後者の経路を介して式IのADCを調製するための例となる方法は、米国公開特許第7498298号に記載され、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

30

【0369】

抗体上の求核基には、(i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えば、リジン、(iii) 側鎖チオール基、例えば、システイン、および(iv) 抗体がグリコシル化される糖ヒドロキシルまたはアミノ基が含まれるが、これらに限定されない。アミン、チオール、およびヒドロキシル基は、求核性であり、(i) NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート(haloformate)、および酸ハロゲン化物等の、活性エステル、(ii) ハロアセトアミド等のアルキルおよびベンジルハロゲン化物、ならびに(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含む、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と反応して、共有結合を形成することが可能である。ある特定の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、抗体が完全または部分還元されるように、DTT(ジチオスレイトール)またはトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)等の還元剤での処理によって、リンカー試薬との複合に対して反応性にされ得る。各システイン架橋はこのようにして、理論上、2つの反応性のチオール求核剤を形成するであろう。追加の求核基は、リジン残基の修飾を通じて、例えば、リジン残基を2-イミノチオラン(Trautの試薬)と反応させて、アミンのチオールへの変換をもたらすことによって、抗体中に導入することができる。反応性のチオール基もまた、1個、2個、3個、4個、またはそれを超えるシステイン残基を導入することによって(例えば、1個以上の非天然システインアミノ酸残基を含む変異体抗体を調製することによって)、抗体中に導入され得る。

40

50

【0370】

本発明の抗体 - 薬物複合体はまた、アルデヒドまたはケトンカルボニル基等の抗体上の求電子基と、リンカー試薬または薬物上の求核基との間の反応によって産生されてもよい。リンカー試薬上の有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸塩、およびアリールヒドラジドが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、本抗体は、リンカー試薬または薬物上の求核置換基と反応可能である求電子部分を導入するように修飾される。別の実施形態において、グリコシル化抗体の糖を、例えば、過ヨウ素酸塩酸化試薬で酸化させて、リンカー試薬または薬物部分のアミン基と反応し得るアルデヒドまたはケトン基を形成してもよい。結果として生じるイミンシッフ塩基群は、安定した結合を形成し得るか、または例えば、水素化ホウ素試薬によって還元されて、安定したアミン結合を形成し得る。一実施形態において、グリコシル化された抗体の炭水化物部分の、ガラクトースオキシダーゼまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとの反応は、抗体において、薬物上の適切な基と反応することができるカルボニル（アルデヒドおよびケトン）基を生み出し得る（Hermanson, Bioconjugate Techniques）。別の実施形態において、N末端セリンまたはスレオニン残基を含有する抗体は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応して、第1のアミノ酸の代わりにアルデヒドの産生をもたらすことができる（Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3: 138 - 146、米国公開特許第5362852号）。かかるアルデヒドは、薬物部分またはリンカー求核剤と反応させることができる。

10

20

【0371】

薬物部分上の例となる求核基には、(i) NHS エステル、HOBt エステル、ハロホルメート、および酸ハロゲン化物等の、活性エステル、(ii) ハロアセトアミド等のアルキルおよびベンジルハロゲン化物、ならびに(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含む、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と反応して、共有結合を形成することが可能な、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸塩、およびアリールヒドラジド基が含まれるが、これらに限定されない。

【0372】

ADCを調製するために使用され得る、非限定的な例となるクロスリンカー試薬は、本明細書における「例となるリンカー」と題される節に記載される。かかるクロスリンカー試薬を使用して、タンパク質性部分および化学部分を含む、2つの部分を連結する方法は、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、抗体および細胞傷害性薬剤を含む融合タンパク質は、例えば、組み換え技法またはペプチド合成によって作製されてもよい。組み換えDNA分子は、互いに隣接しているか、または複合体の所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって隔離されているかのいずれかの、複合体の抗体および細胞傷害性部分をコードする領域を含んでもよい。

30

【0373】

なおも別の実施形態において、抗体は、腫瘍の事前標的化（pre-targeting）において利用するために「受容体」（ストレプトアビジン等）に複合されてもよく、その腫瘍の事前標的化において抗体 - 受容体複合体が、患者に投与され、続いて除去剤を使用した血液循環からの非結合複合体の除去、次いで細胞傷害性薬剤（例えば、薬物または放射性ヌクレオチド）に複合されている「リガンド」（例えば、アビジン）の投与が行われる。

40

【0374】

E. 診断および検出のための方法および組成物

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗LgR5抗体のいずれも、生体試料中のLgR5の存在を検出するために有用である。本明細書で使用される「検出すること」という用語は、定量または定性検出を包含する。「生体試料」は、例えば、細胞または組織（例えば、がん性のまたはがん性の可能性がある結腸、結腸直腸、小腸、子宮内

50

膜、膵臓、または卵巣組織を含む、生検材料)を含む。

【0375】

一実施形態において、診断または検出方法において使用するための抗LgR5抗体が提供される。さらなる態様において、生体試料中のLgR5の存在を検出する方法が提供される。ある特定の実施形態において、本方法は、生体試料を、本明細書に記載される抗LgR5抗体と、LgR5への抗LgR5抗体の結合を許容する条件下で接触させることと、複合体が、生体試料中で、抗LgR5抗体とLgR5との間で形成されるかどうかを検出することを含む。かかる方法は、体外方法であっても、体内方法であってもよい。一実施形態において、例えば、LgR5が患者の選択のためのバイオマーカーである場合、抗LgR5抗体を使用して、抗LgR5抗体での治療法にふさわしい対象を選択する。さらなる実施形態において、生体試料は、細胞または組織(例えば、がん性のまたはがん性の可能性がある結腸、結腸直腸、小腸、子宮内膜、膵臓、または卵巣組織を含む、生検材料)である。

10

【0376】

さらなる実施形態において、抗LgR5抗体は、例えば、がんを診断する、がんの予後を判定する、もしくはがんを病期分類する、適切な治療過程を決定する、または治療法に対するがんの反応を監視する目的のために、体内で使用されて、例えば、体内画像法によって、対象におけるLgR5陽性がんを検出する。体内検出のための当該技術分野で既知の1つの方法は、例えば、van Dongen et al., The Oncologist 12:1379-1389(2007) and Verel et al., J. Nucl. Med. 44:1271-1281(2003)に記載される、免疫-陽電子放出断層撮影(免疫-PET)である。かかる実施形態において、対象においてLgR5陽性がんを検出するための方法が提供され、本方法は、標識された抗LgR5抗体を、LgR5陽性がんを有するかまたはそれを有することが疑われる対象に投与することと、対象における標識された抗LgR5抗体を検出することを含み、その標識された抗LgR5抗体の検出は、対象におけるLgR5陽性がんを示す。かかる実施形態のある特定のものにおいて、標識された抗LgR5抗体は、 ^{68}Ga 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 、および ^{124}I 等の陽電子放出体に複合される抗LgR5抗体を含む。特定の実施形態において、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。

20

【0377】

さらなる実施形態において、診断または検出方法は、基質に固定化された第1の抗LgR5抗体を、LgR5の存在について試験されるべき生体試料と接触させることと、その基質を第2の抗LgR5抗体に曝露することと、その第2の抗LgR5が、生体試料中で、第1の抗LgR5抗体とLgR5との間の複合体に結合されるかどうかを検出することと、を含む。基質は、任意の支持培地、例えば、ガラス、金属、セラミック、ポリマービーズ、スライド、チップ、および他の基質であってもよい。ある特定の実施形態において、生体試料は、細胞または組織(例えば、がん性のまたはがん性の可能性がある結腸、結腸直腸、小腸、子宮内膜、膵臓、または卵巣組織を含む、生検材料)を含む。ある特定の実施形態において、第1または第2の抗LgR5抗体は、本明細書に記載される抗体のいずれかである。いくつかのかかる実施形態において、第2の抗LgR5抗体は、8E11、または例えば、本明細書に記載される、8E11に由来する抗体であってもよい。いくつかのかかる実施形態において、第2の抗LgR5抗体は、YW353、または例えば、本明細書に記載される、YW353に由来する抗体であってもよい。いくつかの実施形態において、第1または第2の抗LgR5抗体は、3G12および2H6、ならびに例えば、本明細書に記載される、3G12および/または2H6に由来する抗体から選択される。

30

40

【0378】

上の実施形態のいずれかにより診断または検出され得る、例となる障害には、LgR5陽性結腸直腸がん(腺がんを含む)、LgR5陽性小腸がん(腺がん、肉腫(例えば、平滑筋肉腫)、カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、およびリンパ腫を含む)、LgR5陽

50

性卵巣がん（卵巣漿液性腺がんを含む）、L g R 5 陽性膵臓がん（膵管腺がんを含む）、およびL g R 5 陽性子宮内膜がん等の、L g R 5 陽性がんが含まれる。いくつかの実施形態において、L g R 5 陽性がんは、本明細書における実施例Bに記載される条件下で、「0」（腫瘍細胞の90%超における非常に弱いまたはゼロの染色に対応する）を超える抗L g R 5 免疫組織化学（IHC）またはインサイツハイブリダイゼーション（ISH）スコアを受けるがんである。別の実施形態において、L g R 5 陽性がんは、本明細書における実施例Bに記載される条件下で定義するとき、1+、2+、または3+レベルでL g R 5 を発現する。いくつかの実施形態において、L g R 5 陽性がんは、L g R 5 mRNAを検出する逆転写酵素PCR（RT-PCR）アッセイに従って、L g R 5 を発現するがんである。いくつかの実施形態において、RT-PCRは、定量RT-PCRである。

10

【0379】

ある特定の実施形態において、標識された抗L g R 5 抗体が提供される。標識には、直接検出される標識または部分（蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、および放射性標識等）、ならびに例えば、酵素反応または分子相互作用を通じて、間接的に検出される酵素またはリガンド等の部分が含まれるが、これらに限定されない。例となる標識には、放射性同位体 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、および ^{131}I 、希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体等のフルオロフォア、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ（*luciferases*）、例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖質オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸塩デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化させる酵素、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、またはマイクロペルオキシダーゼとカップリングされた、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ等の複素環式オキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定した遊離ラジカル等が含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態において、標識は、陽電子放出体である。陽電子放出体には、 ^{68}Ga 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 、および ^{124}I が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、陽電子放出体は、 ^{89}Zr である。

20

30

【0380】

F. 医薬製剤

本明細書に記載されるL g R 5 抗体または免疫複合体の医薬製剤は、所望の程度の純度を有するかかる抗体または免疫複合体を、1つ以上の任意の薬剤的に許容される担体（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することによって、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、調製される。薬剤的に許容される担体は、一般に、用いられる投薬量および濃度で、受容者に対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム等；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール等）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTA等のキレート薬剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール等の糖類；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；ならびに/またはポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤が含まれるが、これらに

40

50

限定されない。本明細書における例となる薬剤的に許容される担体には、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（*sHASEGP*）、例えば、*rHuPH20*（*HYLENE X*（登録商標）、*Baxter International, Inc.*）等のヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質等の、介在性（*instertial*）薬物分散剤がさらに含まれる。*rHuPH20*を含む、ある特定の例となる*sHASEGP*および使用法は、米国特許公開第2005/0260186号および同第2006/0104968号に記載される。一態様において、*sHASEGP*は、コンドロイチナーゼ等の1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【0381】

例となる凍結乾燥抗体または免疫複合体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載される。水性抗体または免疫複合体製剤には、米国特許第6,171,586号および国際公開第2006/044908号に記載されるものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

10

【0382】

本明細書における製剤はまた、治療されている特定の適応症に対する必要に応じて、1つ超の活性成分、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない相補的活性を有する成分を含有してもよい。例えば、いくつかの事例において、例えば、*LgR5*陽性結腸がんまたは*LgR5*陽性結腸直腸がん等の*LgR5*陽性がんの治療のために、*Avastin*（登録商標）（*ペバシズマブ*）をさらに提供することが望ましい場合がある。

20

【0383】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合によって調製される、マイクロカプセル、例えば、それぞれ、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）中またはマクロエマルジョン中の、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタクリレート（*methyl methacrylate*））マイクロカプセル中に、封入されてもよい。かかる技術は、*Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)*に開示される。

【0384】

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例としては、抗体または免疫複合体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、そのマトリクスは、造形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。

30

【0385】

体内投与のために使用されるべき製剤は、一般に滅菌されている。滅菌状態は、例えば、滅菌濾過膜を通じた濾過によって、容易に遂行され得る。

【0386】

G. 治療方法および組成物

本明細書に提供される抗*LgR5*抗体または免疫複合体のいずれも、方法、例えば、治療方法において使用され得る。

【0387】

一態様において、本明細書に提供される抗*LgR5*抗体または免疫複合体は、*LgR5*陽性細胞の増殖を阻害する方法において使用され、本方法は、細胞を、抗*LgR5*抗体または免疫複合体に、細胞の表面上の*LgR5*への抗*LgR5*抗体または免疫複合体の結合を許容する条件下で曝露し、それによって細胞の増殖を阻害することを含む。ある特定の実施形態において、本方法は、体外方法または体内方法である。さらなる実施形態において、細胞は、結腸、結腸直腸、小腸、卵巣、脾臓、または子宮内膜細胞である。

40

【0388】

いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗*LgR5*抗体または免疫複合体は、がんの細胞のうちの少なくとも一部分に*Kras*遺伝子における突然変異および/または大腸腺腫症（*APC*）遺伝子における突然変異を含む、がんを治療する方法において

50

使用される。種々の実施形態において、がんは、結腸、結腸直腸、小腸、卵巣、膵臓、および子宮内膜がんから選択される。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される抗LgR5抗体または免疫複合体は、がんの細胞のうちの少なくとも一部分にKras遺伝子における突然変異および/またはAPC遺伝子における突然変異を含む、結腸または結腸直腸がんを治療する方法において使用される。がん（結腸および結腸直腸がんを含む）において見出される、非限定的な例となるKras突然変異には、Krasコドン12（例えば、G12D、G12V、G12R、G12C、G12S、およびG12A）、コドン13（例えば、G13DおよびG13C）、コドン61（例えば、G61H、G61L、G61E、およびG61K）、およびコドン146における突然変異が含まれる。例えば、Yokota, Anticancer Agents Med. Chem., 12:163-171 (2012)、Wicki et al., Swiss Med. Wkly, 140:w13112 (2010)を参照されたい。がんにおいて見出される、非限定的な例となるAPC突然変異には、切断型APC遺伝子産物をもたらす停止コドンおよびフレームシフト突然変異等の、突然変異クラスター領域(MCR)における突然変異が含まれる。例えば、Chandra et al., PLoS One, 7:e34479 (2012)、およびKohler et al., Hum. Mol. Genet., 17:1978-1987 (2008)を参照されたい。

10

【0389】

いくつかの実施形態において、がんを治療する方法は、抗LgR5抗体または免疫複合体を対象に投与することを含み、その対象は、がん細胞のうちの少なくとも一部分にKras突然変異および/またはAPC突然変異を含むがんを有する。いくつかの実施形態において、がんは、結腸、結腸直腸、小腸、卵巣、膵臓、および子宮内膜がんから選択される。いくつかの実施形態において、がんは、結腸および/または結腸直腸がんである。いくつかの実施形態において、対象は、がん細胞のうちの少なくとも一部分にKras突然変異および/またはAPC突然変異を含むがんを有することが予め定義されている。いくつかの実施形態において、がんは、LgR5陽性である。

20

【0390】

試料中の種々のバイオマーカーの存在は、いくつかの方法論によって分析することができ、このうちの多くは、当該技術分野で知られ、当業者によって理解されており、免疫組織化学(「IHC」)、ウェスタンブロット分析、免疫沈降、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFA、蛍光標識細胞分取(「FACS」)、Mass ARRAY、プロテオミクス、定量血液系アッセイ(例として血清ELISA)、生化学酵素活性アッセイ、インサイツハイブリダイゼーション、サザン分析、ノーザン分析、全ゲノム配列決定、定量リアルタイムPCR(「qRT-PCR」)および例えば、分岐鎖DNA、SISBA、TMA等の他の増幅型の検出法を含む、ポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)、RNA-Seq、FISH、マイクロアレイ分析、遺伝子発現プロファイリング、および/または遺伝子発現の連鎖解析(「SAGE」)、ならびにタンパク質、遺伝子、および/または組織アレイ分析によって行うことができる多種多様なアッセイのうちの任意のものが含まれるが、これらに限定されない。遺伝子および遺伝子産物の状態の評価のための典型的なプロトコルは、例えば、Ausubel et al., eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Units 2(Northern Blotting)、4(Southern Blotting)、15(Immunoblotting)、および18(PCR Analysis)に見出される。Rules Based MedicineまたはMeso Scale Discovery(「MSD」)から利用可能なもの等の、多項目免疫測定法もまた使用され得る。

30

40

【0391】

体外での細胞増殖の阻害は、Promega(Madison, WI)から市販されている、Cell Titer - Glo(商標) Luminescent Cell Viability Assayを使用してアッセイされてもよい。そのアッセイは、代謝的に

50

活性な細胞を示す、存在するATPの定量に基づいて、培養物中の生存細胞の数を決定する。Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88、米国特許第6602677号を参照されたい。アッセイは、自動化高処理スクリーニング(HTS)を受けやすくする、96ウェルまたは384ウェル形式で行われてもよい。Cree et al. (1995) Anti Cancer Drugs 6: 398-404を参照されたい。アッセイ手順は、単一の試薬(Cell Titer-Glo (登録商標) 試薬)を培養細胞に直接添加することを伴う。これは、細胞溶解およびルシフェラーゼ反応によって生み出される発光シグナルの生成をもたらす。発光シグナルは、培養物中に存在する生存細胞の数に直接比例する、存在するATPの量に比例する。データは、ルミノメーターまたはCCDカメラ画像化デバイスによって記録することができる。発光出力は、相対発光量(RLU)として表される。

10

【0392】

別の態様において、薬品として使用するための抗LgR5抗体または免疫複合体が提供される。さらなる態様において、治療方法において使用するための抗LgR5抗体または免疫複合体が提供される。ある特定の実施形態において、LgR5陽性がんの治療において使用するための抗LgR5抗体または免疫複合体が提供される。ある特定の実施形態において、本発明は、LgR5陽性がんを有する個体を治療する方法において使用するための抗LgR5抗体または免疫複合体を提供し、本方法は、個体に、有効量の抗LgR5抗体または免疫複合体を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、例えば、下に記載されるような、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。

20

【0393】

さらなる態様において、本発明は、薬品の製造または調製における、抗LgR5抗体または免疫複合体の使用を提供する。一実施形態において、薬品は、LgR5陽性がんの治療のためのものである。さらなる実施形態において、薬品は、LgR5陽性がんを治療する方法において使用するためのものであり、本方法は、LgR5陽性がんを有する個体に、有効量の薬品を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、例えば、下に記載されるような、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。

【0394】

さらなる態様において、本発明は、LgR5陽性がんを治療するための方法を提供する。一実施形態において、本方法は、かかるLgR5陽性がんを有する個体に、有効量の抗LgR5抗体または免疫複合体を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、下に記載されるような、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。

30

【0395】

上の実施形態のいずれかによるLgR5陽性がんは、例えば、LgR5陽性結腸または結腸直腸がん(腺がんを含む)、LgR5陽性小腸がん(腺がん、肉腫(例えば、平滑筋肉腫)、カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、およびリンパ腫を含む)、LgR5陽性卵巣がん(卵巣漿液性腺がんを含む)、LgR5陽性膵臓がん(膵管腺がんを含む)、およびLgR5陽性子宮内膜がんであり得る。いくつかの実施形態において、LgR5陽性がんは、本明細書における実施例Bに記載される条件下で、「0」(腫瘍細胞の90%超における非常に弱いまたはゼロの染色に対応する)を超える抗LgR5免疫組織化学(IHC)またはインサイツハイブリダイゼーション(ISH)スコアを受けるがんである。別の実施形態において、LgR5陽性がんは、本明細書における実施例Bに記載される条件下で定義するとき、1+、2+、または3+レベルでLgR5を発現する。いくつかの実施形態において、LgR5陽性がんは、LgR5 mRNAを検出する逆転写酵素PCR(RT-PCR)アッセイに従って、LgR5を発現するがんである。いくつかの実施形態において、RT-PCRは、定量RT-PCRである。

40

【0396】

50

上の実施形態のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

【0397】

さらなる態様において、本発明は、例えば、上の治療方法のいずれかにおいて使用するための、本明細書に提供される抗LgR5抗体または免疫複合体のいずれかを含む、医薬製剤を提供する。一実施形態において、医薬製剤は、本明細書に提供される抗LgR5抗体または免疫複合体のいずれかと、薬剤的に許容される担体とを含む。別の実施形態において、医薬製剤は、本明細書に提供される抗LgR5抗体または免疫複合体のいずれかと、例えば、下に記載されるような、少なくとも1つの追加の治療剤とを含む。

【0398】

本発明の抗体または免疫複合体は、治療法において、単独で、または他の薬剤と組み合わせることで使用することができる。例えば、本発明の抗体または免疫複合体は、少なくとも1つの追加の治療剤と同時に投与されてもよい。ある特定の実施形態において、追加の治療剤は、例えば、LgR5陽性結腸がんまたはLgR5陽性結腸直腸がん等のLgR5陽性がんの治療のための、Avastin（登録商標）（ペバシズマブ）である。

【0399】

上述のかかる併用療法は、併用投与（2つ以上の治療剤が同じまたは別個の製剤中に含まれる）、および別個の投与を包含し、別個の投与の場合、本発明の抗体または免疫複合体の投与は、追加の治療剤および/またはアジュバントの投与の前、それと同時に、および/またはその後に行われる。本発明の抗体または免疫複合体はまた、放射線療法と組み合わせて使用することもできる。

【0400】

本発明の抗体または免疫複合体（および任意の追加の治療剤）は、非経口、肺内、および鼻腔内、ならびに局所両方のために所望される場合、病変内投与を含む、任意の好適な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。投薬は、任意の好適な経路による、例えば、投与が短時間であるか長期的であるかに部分的に応じて、静脈内または皮下注射等の、注射により行うことができる。単回または種々の時点にわたる複数回投与、ボラス投与、およびパルス注入を含むが、これらに限定されない、種々の投薬スケジュールが本明細書で企図される。

【0401】

本発明の抗体または免疫複合体は、良好な医療行為と一致した様式で、製剤化され、投薬され、投与されるであろう。この文脈における考慮の要因には、治療されている特定の障害、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的病態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール管理、および医療従事者に既知の他の要因が含まれる。抗体または免疫複合体は、必要ではないが、任意に、問題の障害を予防または治療するために現在使用される1つ以上の薬剤と共に製剤化される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体または免疫複合体の量、障害または治療の種類、および上に考察された他の要因に依存する。これらは、一般に、本明細書に記載されるのと同じ投薬量で、本明細書に記載される投与経路により、または本明細書に記載される投薬量の約1～99%、または適切であると経験的/臨床的に決定される任意の投薬量で、任意の経路によって、使用される。

【0402】

疾患の予防または治療のために、本発明の抗体または免疫複合体の適切な投薬量（単独でまたは1つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用されるとき）は、治療対象の疾患の種類、抗体または免疫複合体の種類、疾患の重症度および経過、抗体または免疫複合体が予防目的または治療目的で投与されるかどうか、以前の治療法、患者の病歴および抗体または免疫複合体への反応、ならびに主治医の裁量に依存するであろう。抗体または免疫複合体は、患者に、1回で、または一連の治療にわたって、好適に投与される。疾患の種類および重症度に応じて、例えば、1回以上の別個の投与によってであれ、または持続注入によってであれ、約1μg/kg～15mg/kg（例えば、0.1mg/kg～1

10

20

30

40

50

0 mg / kg) の抗体または免疫複合体が、患者への投与のための初回の候補投薬量であり得る。1つの典型的な1日投薬量は、上述の要因に応じて、約1 μg / kg ~ 100 mg / kg 以上の範囲であり得る。病態に応じて数日間またはより長い日数にわたる反復投与について、治療は、一般に、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続されるであろう。抗体または免疫複合体の1つの例となる投薬量は、約0.05 mg / kg ~ 約10 mg / kg の範囲内であろう。故に、約0.5 mg / kg、2.0 mg / kg、4.0 mg / kg、または10 mg / kg (またはそれらの任意の組み合わせ) の1回以上の用量が患者に投与されてもよい。かかる用量は、断続的に、例えば、毎週または3週間毎に (例えば、患者が抗体の約2 ~ 約20回、または例えば、約6回用量を受容するように) 投与されてもよい。初回よりも高い負荷用量、続いて1回以上のより低い用量が投与されてもよい。しかしながら、他の投薬レジメンが有用であってもよい。この治療法の進行は、従来の技術およびアッセイによって容易に監視される。

10

【0403】

上の製剤または治療方法のうちのいずれも、本発明の免疫複合体および抗LgR5抗体の両方を使用して行われ得ることが理解される。

【0404】

H. 製品

本発明の別の態様において、上述の障害の治療、予防、および/または診断に有用な物質を含有する製品が提供される。製品は、容器、および容器上のまたは容器に関連したラベルまたは添付文書を含む。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグ等が含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチック等の多様な材料から形成され得る。容器は、組成物を、それ自体で、または障害を治療する、予防する、および/もしくは診断するのに有効な別の組成物と組み合わせで保有し、また滅菌アクセスポートを有し得る (例えば容器は、静脈注射用溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアルであり得る)。組成物中の少なくとも1つの活性な薬剤は、本発明の抗体または免疫複合体である。標識または添付文書は、組成物が選定した病態を治療するために使用されることを表示する。さらに、製品は、(a) 組成物がその中に含有された第1の容器 (その組成物は本発明の抗体または免疫複合体を含む)、および (b) 組成物がその中に含有された第2の容器 (その組成物はさらなる細胞傷害性薬剤または治療剤を含む) を含んでもよい。本発明のこの実施形態の製品は、組成物が特定の病態を治療するために使用され得ることを表示する、添付文書をさらに含んでもよい。代替的に、または追加的に、製品は、注射用静菌水 (B W F I)、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液またはデキストロース溶液等の、薬剤的に許容される緩衝液を含む、第2の (または第3の) 容器をさらに含んでもよい。それは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジを含む、商業的およびユーザの立場から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

20

30

【実施例】

【0405】

III. 実施例

以下は、本発明の方法および組成物の実施例である。上に提供される一般的説明を考慮すると、種々の他の実施形態が実施され得ることが理解される。

40

【0406】

A. ヒトLgR5遺伝子発現

ヒトLgR5遺伝子発現を、遺伝子発現情報を含む専有のデータベースを使用して分析した (Gene Express (登録商標)、Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD)。Gene Express (登録商標) データベースのグラフ解析を、マイクロアレイプロファイルビューアを使用して行った。図1は、種々の組織におけるヒトLgR5遺伝子発現のグラフ表示である。y軸上の目盛りは、ハイブリダイゼーションシグナル強度に基づいた遺伝子発現レベルを示す。列挙される各組織の名称から延長する線の左側および右側の両側に点が見える。線の左側に見える点は、正常な組織における遺伝子発現を表し、線の右側に見える点は、腫瘍および患部組織における遺伝子

50

発現を表す。図 1 は、ある特定の腫瘍または患部組織における、それらの正常な対応物と比べて増加した L g R 5 遺伝子発現を示す。特に、L g R 5 は、結腸直腸腫瘍、子宮内膜腫瘍および卵巣腫瘍において実質的に過剰発現される。図 1 の挿入図は、L g R 5 が少なくとも次の結腸腫瘍、すなわち腺がん、良性腫瘍、および転移性結腸腫瘍において、また 50 % 未満の結腸腫瘍含量（図 1 の挿入図における「低腫瘍」）を有する組織においても過剰発現されるが、正常な結腸、クローン病、または潰瘍性大腸炎においては過剰発現されないことを示す。ヒト L g R 5 発現は、正常な組織においてよりはるかに低く、正常な脳、筋肉、卵巣、および胎盤組織において発現レベルが低い。

【0407】

B. 結腸腫瘍におけるヒト L g R 5 の蔓延率

結腸直腸がんにおける L g R 5 の発現を評価するために、57 個の原発性結腸直腸腺がんを複数の源から入手した（Asterand, Detroit, MI、Bio-Options, Fullerton, CA、University of Michigan, Ann Arbor, MI、Cytomyx, Rockville, MD、Cooperative Human Tissue Network, Nashville, TN、Indivumed, Hamburg, Germany、ProteoGenex, Culver City, CA）。試料の 44 パーセントは、男性からのものであり、患者の平均年齢は、66 歳であった（31～93 歳の範囲）。組織マイクロアレイ（TMA）を、Bubendorf L, et al., J Pathol 2001 Sep; 195 (1): 72-9 に記載される二重コア（duplicate core）を使用して組み立て、それには対症例からの 5 つの正常な結腸直腸粘膜試料が含まれた。

【0408】

L g R 5 発現を、インサイツハイブリダイゼーションによって、表 2 に示されるオリゴヌクレオチドプローブを使用して決定した。例えば、Jubb AM, et al., Methods Mol Biol 2006; 326: 255-64 を参照されたい。分析前に、β-アクチンについての ISH を使用して、結腸直腸がん組織における mRNA 完全性を確認した。

表 2. 同位体インサイツハイブリダイゼーションプローブに対するプライマー配列

遺 伝 子	G e n b a n k 受 入	プローブに相補的なヌクレオチド	アンチセンス (AS) または センス (S)	順方向プライマー (5' ~ 3')	逆方向プライマー (5' ~ 3')
L g r 5	N M _ _ 0 0 3 6 6 7	5 0 8	AS	ACCAACTGCAT CCTAAACTG (配列番号 83)	ACCGAGTTTCA CCTCAGCTC (配列番号 84)
L g r 5	N M _ _ 0 0 3 6 6 7	4 9 6	S	ACATTGCCCTG TTGCTCTTC (配列番号 85)	ACTGCTCTGAT ATACTCAATC (配列番号 86)

【0409】

訓練された病理学者が、下の分類表に従って、染色の強度（銀色の粒）ならびに幅を考慮して、L g R 5 ハイブリダイゼーション強度をスコア化した。

0（陰性）：腫瘍細胞の 90 % 超における非常に弱いまたはゼロのハイブリダイゼーション

1+（軽度）：優勢的なハイブリダイゼーションパターンが弱い

2 + (中程度) : 優勢的なハイブリダイゼーションパターンが新生細胞の大部分 (5 0 % 超) において中程度に強い

3 + (強) : 優勢的なハイブリダイゼーションパターンが新生細胞の大部分 (5 0 % 超) において強い

センスプローブを、ハイブリダイゼーションの特異性の対照とするために使用した。

【 0 4 1 0 】

図 2 は、1 +、2 +、および 3 + レベルの染色を有する、例となる結腸腫瘍切片を示す。上パネルは暗視野画像を示し、下パネルは明視野画像を示す。暗視野画像における銀色の粒の沈着は、プローブのハイブリダイゼーションおよび L g R 5 m R N A の発現を示す。分析された結腸腫瘍切片のうちの約 7 7 % (4 1 / 5 3) が L g R 5 陽性で、1 +、2 +、または 3 + レベルの染色を示し、このうち 3 4 % (1 8 / 5 3) が 2 + または 3 + 染色を示した。分析された 5 7 個の試料のうちの 4 個は、L g R 5 発現について情報価値がなかった。

10

【 0 4 1 1 】

結腸腫瘍における L g R 5 発現の有意性を評価するために、結腸直腸腺がんに対する外科的切除を受けたことのある患者の集団ベースの系列を、1988 年から 2003 年までの St James' University Hospital (Leeds, UK) の病理記録から遡及的に集めた。組織マイクロアレイ (TMA) を、Bubendorf L, et al., J Pathol 2001 Sep; 195 (1) : 72 - 9 に記載されるように、1 患者当たり正常な粘膜の 1 つのコアおよび腺がんの 3 つのコアにより構築した。ISH を行い、上述のようにスコア化した。同じ腫瘍からの 3 つのコアにわたる発現の不均一性もまた決定したが、それは 3 つのコアのうちの 1 つにおいて特定のレベルの不一致を示した腫瘍の割合として表される。例えば、3 つのコアが、+ 1、+ 3、および + 3 のスコアを有した場合、その腫瘍からの 3 つのコアのうちの 1 つは、2 の差で不一致である。

20

【 0 4 1 2 】

図 3 A は、インサイツハイブリダイゼーションによって測定される、結腸腫瘍組織マイクロアレイにおける 0、1 +、2 +、および 3 + レベルの L g R 5 染色の蔓延率を示す。結腸腫瘍組織の 7 5 % が、1 +、2 +、または 3 + レベルの染色を示し、このうち 3 7 % が 2 + または 3 + 染色を示した。図 3 B は、L g R 5 発現の不均一性を示す。腫瘍の 6 7 % は、3 つのコアにわたって不均一性を何ら示さなかった。3 2 % は、3 つのコアのうちの 1 つにおいて 1 の不一致を示し、1 % のみが 1 超の不一致を示した。

30

【 0 4 1 3 】

C. マウスモノクローナル抗体生成

ヒト L g R 5 に対するモノクローナル抗体を、次の手順を使用して生成した。C 末端 His 標識 Fc を有するヒト L g R 5 細胞外ドメイン (E C D、アミノ酸 2 2 ~ 5 5 7) を、バキュロウイルス発現系から発現させ、Ni - N T A カラム (Q i a g e n) により精製し、続いて以前に記載されたように (K i r c h h o f e r e t a l .、2 0 0 3) 2 0 m M の M E S (p H 6 . 0)、6 M グアニジン H C l 中、Superdex 2 0 0 カラムによりゲル濾過し、- 8 0 °C での保管のために P B S 中に透析した。

40

【 0 4 1 4 】

1 5 匹の Balb / c マウス (Charles River Laboratories International, Inc., Hollister, CA, USA) に、乳酸リンゲル液中の hu L g R 5 プラスミド DNA (尾静脈を介して)、または代謝可能なスクアレン (4 v / v %)、Tween 8 0 (0 . 2 v / v %)、トレハロース 6 , 6 - ジミコレート (0 . 0 5 w / v %)、およびモノホスホリルリピド A (0 . 0 5 w / v %、Sigma Aldrich, USA) を含有するアジュバント中の上述の組み換えヒト L g R 5 E C D (後足蹠を介して) のいずれかを注射した。6 ~ 9 回の注射後、血清力価を、標準的な酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) および F A C S によって評価した。総計 5 匹のマウスから採取した脾臓 B 細胞を、マウス骨髓腫細胞 (X 6 3 . A g

50

8.653、American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)と、電気融合(Hybrimune、Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA)によって融合した。10~14日後、ハイブリドーマ上清を、抗体分泌について、ELISAによってスクリーニングした。全ての陽性クローンを次いで増大させ、huLgR5およびmuLgR5への結合について(すなわち、293-huLgR5および293-muLgR5細胞への結合について)、ELISAおよびFACSによって再スクリーニングした。ハイブリドーマクローン8E11.1.1(DNA免疫マウスから特定された)、および2H6.3.5、および3G12.2.1(双方ともタンパク質免疫マウス由来)は、2回のサブクローニング(限界希釈による)後に高い免疫結合を示し、それをINTEGRACE Line 1000バイオリアクター(INTEGRACE Biosciences AG, Zizers, Switzerland)における精製のためにスケールアップした。上清を次いで親和性クロマトグラフィーによって精製し、滅菌濾過し、PBS中4で保管した。IsoStripマウスmAbアイソタイプ判定キット(Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN, USA)を使用して、mAbのアイソタイプをIgG1(カッパ軽鎖)と決定した。

【0415】

図4は、ある特定の特性と共に生成される、ある特定のモノクローナル抗体を示し、このうちのいくつかは、下にさらに詳細に記載される。

【0416】

D. マウスモノクローナル抗体のクローニングおよびキメラ化

モノクローナル抗体8E11、3G12、および2H6を、次のようにクローニングし、キメラ化した。

【0417】

総RNAを、標準方法を使用して、マウス8E11、マウス3G12、またはマウス2H6を産生するハイブリドーマ細胞から抽出した。可変軽(VL)および可変重(VH)ドメインを、RT-PCRを使用して、重鎖および軽鎖に対する縮重プライマーにより増幅した。順方向プライマーは、VLおよびVH領域のN末端アミノ酸配列に特異的であった。それぞれ、LCおよびHC逆方向プライマーを、複数種にわたって高度に保存されている、定常軽(CL)および定常重ドメイン1(CH1)における領域に対してアニーリングするように設計した。挿入物のポリヌクレオチド配列を、通例の配列決定方法を使用して決定した。8E11 VLおよびVHアミノ酸配列が、それぞれ、図5および6に示される(それぞれ、配列番号3および4)。3G12および2H6 VLおよびVHアミノ酸配列が、それぞれ、図7および8に示される。抗体3G12のVLおよびVH配列が、それぞれ、配列番号21および22に示され、抗体2H6のVLおよびVH配列が、それぞれ、配列番号23および24に示される。

【0418】

各抗体を、マウス重鎖可変領域をヒトIgG1重鎖定常領域上にクローニングし、軽鎖可変領域をヒトカッパ軽鎖定常領域上にクローニングすることによって、キメラ化した。

【0419】

E. 8E11のヒト化

モノクローナル抗体8E11を下に記載されるようにヒト化した。残基番号は、Kabata et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)に従う。

【0420】

アクセプターヒトコンセンサスフレームワーク上への直接の可変領域グラフトニング

8E11のヒト化中に構築された変異体を、IgGの形態で評価した。マウス8E11由来のVLおよびVHドメインを、ヒトVLカッパIV(VL_{KIV})およびヒトVH下

10

20

30

40

50

位集団 I (VH_I) コンセンサス配列とアライメントした。マウス 8E11 (mu8E11) 抗体由来の超可変領域を、VL_{KI_V} および VH_I アクセプターフレームワーク中へと操作して、8E11.v1 を生成した。具体的には、mu8E11 VL ドメインから、24 ~ 34 (L1) 位、50 ~ 56 (L2) 位、および 89 ~ 97 (L3) 位を VL_{KI_V} 中にグラフィティングした。mu8E11 VH ドメインから、26 ~ 35 (H1) 位、49 ~ 65 (H2) 位、および 95 ~ 102 (H3) 位を VH_I 中にグラフィティングした。加えて、VH のフレームワーク III における 71 位および 78 位を、8E11.v1 においてマウス配列から保持した。それらの残基は、CDR 構造を調整し、抗原適合を微調整し得る、「バーニア (Vernier)」ゾーンとして作用するフレームワーク残基の一部であることが見出された。例えば、Foot et al. and Winter, J. Mol. Biol. 224: 487 - 499 (1992) (図 5 および 6) を参照されたい。これらの CDR 定義は、それらの配列超可変性によって定義される位置 (Wu, T. T. & Kabat, E. A. (1970)、それらの構造的な位置 (Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987)、および抗原 - 抗体接触へのそれらの関与 (MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732 - 745 (1996)) を含む。

10

【0421】

追加の 8E11 変異体を生成して、軽鎖における 68 位、ならびに重鎖における 67 位および 69 位等の、他のバーニア位の寄与を評価した。ヒト化 8E11.v2 を、重鎖可変領域の 67 位および 69 位に 2 個の追加マウス残基を保持することによって生成した。8E11.v2 および他の変異体についての軽鎖可変領域配列および重鎖可変領域配列が、それぞれ、図 5 および 6 に示される。

20

【0422】

8E11 のヒト化変異体を、Kunkel 突然変異誘発によって、各超可変領域に対して別個のオリゴヌクレオチドを使用して生成した。正しいクローンを DNA 配列決定によって特定した。

【0423】

変異体の評価

スクリーニング目的のために、IgG 変異体を 293 細胞内で最初に産生した。VL および VH をコードするベクターを、293 細胞中にトランスフェクトした。IgG を細胞培養培地から、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーによって精製した。

30

【0424】

ヒト LgR5 に対する各 8E11 IgG 変異体の親和性を、表面プラズモン共鳴によって、BIAcore (商標) - 3000 を使用して決定した。BIAcore (商標) リサーチグレード CM5 チップを、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) および N - ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) 試薬により、供給業者の指示に従って活性化した。ヤギ抗ヒト Fc IgG をチップにカップリングして、各フローセルにおいておよそ 10,000 応答単位 (RU) を達成した。未反応のカップリング基を、1 M エタノールアミンによりブロックした。動態測定のために、抗 LgR5 抗体を捕捉して、およそ 300 の RU を達成した。ヒト LgR5 ECD (バキュロウイルス株において発現された His - Fc に融合されたアミノ酸 22 ~ 557、または CHO 細胞から発現された Fc に融合されたアミノ酸 22 ~ 558、125 nM ~ 0.49 nM) の 2 倍段階希釈液を、HBS - P 緩衝液 (0.01 M HEPES (pH 7.4)、0.15 M NaCl、0.005 % 界面活性剤 P20) 中、25 °C で、30 μL / 分の流速により注射した。会合速度 (k_{on}) および解離速度 (k_{off}) を、1:1 Langmuir 結合モデル (BIAcore (商標) Evaluation Software 第 3.2 版) を使用して算出した。平衡解離定数 (K_d) は、比率 k_{off} / k_{on} として算出した。

40

【0425】

結果

50

8 E 1 1 のヒト化のために使用されるヒトアクセプターフレームワークは、ヒト V L カッパ I V コンセンサス (V L _{K I V}) およびアクセプター V H フレームワーク V H _I に基づく。mu 8 E 1 1 の 8 つのヒト化変異体を産生し、L g R 5 親和性について、B I A c o r e (商標) によって試験した。各々の変異体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域が、それぞれ、図 5 および 6 に示される。親和性測定の結果が、図 9 に示される。

【 0 4 2 6 】

8 E 1 1 . v 1 の結合親和性を改善するために、軽鎖における 6 8 位ならびに重鎖における 6 7 位および 6 9 位を、mu 8 E 1 1 におけるこれらの位置で見出される残基へと変更した。重鎖における 7 1 位および 7 8 位を、ヒトフレームワーク V H _I におけるこれらの位置で見出される残基へと変更した。これらの変化させられた軽鎖および重鎖の組み合わせを I g G として発現させ、上述のように精製し、ヒト L g R 5 への結合について、B i a c o r e によって評価した (図 9) 。

【 0 4 2 7 】

変異体 h u 8 E 1 1 . v 2 を、h u 8 E 1 1 . v 1 重鎖の 6 7 位および 6 9 位を、mu 8 E 1 1 におけるそれらの位置で見出される残基へと変更することによって、生成した。h u 8 E 1 1 . v 2 の親和性 (K _D) は、親 c h 8 E 1 1 抗体とほぼ同じであることが見出された。

【 0 4 2 8 】

ヒト化 8 E 1 1 . v 2 に対する変更の概要

6 マウス 8 E 1 1 C D R (2 4 ~ 3 4 (L 1) 位、50 ~ 5 6 (L 2) 位および 8 9 ~ 9 7 (L 3) 位、2 6 ~ 3 5 (H 1) 位、4 9 ~ 6 5 (H 2) 位、および 9 3 ~ 1 0 2 (H 3) 位として定義される) を、ヒトコンセンサス V L _{K I V} および V H _I アクセプタードメイン中にグラフィティングした。6 7 位、6 9 位、7 1 位、および 7 8 位を、mu 8 E 1 1 由来のマウス残基に戻した。ヒト化 8 E 1 1 . v 2 は、L g R 5 に対してキメラ 8 E 1 1 と同等の親和性を有する。

【 0 4 2 9 】

本出願全体を通じて、マウスモノクローナル抗体 8 E 1 1 、2 H 6 、および 3 G 1 2 は、代替形態において、それぞれ、8 E 1 1 、m 8 E 1 1 、または mu 8 E 1 1 、および 2 H 6 、m 2 H 6 、または mu 2 H 6 、および 3 G 1 2 、m 3 G 1 2 、または mu 3 G 1 2 と称される。キメラモノクローナル抗体 8 E 1 1 、2 H 6 、および 3 G 1 2 は、それぞれ、キメラ 8 E 1 1 または c h 8 E 1 1 、キメラ 2 H 6 または c h 2 H 6 、およびキメラ 3 G 1 2 または c h 3 G 1 2 と称される。ヒト化モノクローナル抗体 8 E 1 1 . v 2 はまた、8 E 1 1 v 2 、h 8 E 1 1 v . 2 、または h u 8 E 1 1 v . 2 と称されてもよい。

【 0 4 3 0 】

F . ファージディスプレイによるヒトモノクローナル抗体の生成

N 末端 F L A G を含むヒト L g R 5 E C D (アミノ酸 2 2 ~ 5 5 5) を、C H O 細胞内で発現させ、抗 F L A G 樹脂上で一晚精製し、次いで 0 . 1 M 酢酸 (p H 2 . 7) で溶出した。タンパク質を次いで、P B S 中、Superdex 200 カラムによるゲル濾過によって精製し、次いで - 8 0 °C での保管のために P B S 中に透析した。

【 0 4 3 1 】

ヒト I g G レパートリーの天然の多様性を模倣する、選択された相補的決定領域 (H 1 、H 2 、H 3) における合成の多様性を有するヒトファージ抗体ライブラリを、パンニングに使用した。F a b 断片を、M 1 3 バクテリオファージ粒子 (p a r t i c a l s) (L e e e t a l . (2 0 0 4) J M o l B i o l 3 4 0 , 1 0 7 3 - 9 3) の表面上において二価性で提示した。上述のように産生されたヒト L g R 5 E C D (アミノ酸 2 2 ~ 5 5 5) を抗原として使用した。N u n c 9 6 ウェル M a x i S o r p i m プレート (i m m n o p l a t e s) (N u n c) を、L g R 5 E C D タンパク質 (1 0 μ g / m L) により 4 時間一晚コーティングし、1 % B S A を補充した P B S T 緩衝液 (P B S 、0 . 0 5 % T w e e n 2 0) により 1 時間ブロッキングした。抗体ファージライブラリを添加し、室温で一晩インキュベートした。プレートを P B S T 緩衝液で

10

20

30

40

50

洗浄し、結合されたファージを50 mMのHCL / 500 mMのNaCl で30分間溶出し、等体積の1 Mトリス塩基で中和した。回収したファージを大腸菌XL-1青色細胞内で増幅した。後続の選択ラウンド中に、ファージ抗体のインキュベーション時間を2時間まで減少させ、プレート洗浄の厳密性を徐々に増加させた(Liang et al., (2007) J Mol Biol 366, 815-829)。ヒトLgR5 ECDに結合する固有かつ特異的なファージ抗体を、ファージELISAおよびDNA配列決定によって特定した。YW353を含むある特定のクローンを、VLおよびVH領域をそれぞれLPG3およびLPG4ベクター中へとクローニングすることによって、完全長IgGに再配列した。抗体を哺乳動物細胞内において一過性で発現させ、プロテインAカラム(Carter et al., (1992) Proc Natl Acad Sci U S A 89, 4285-9)により精製した。

【0432】

ヒト抗体YW353についての軽鎖および重鎖可変領域配列が、それぞれ、図10および11に示される(配列番号26および25)。ヒト抗体YW353についてのIgG1重鎖およびカッパ軽鎖配列が、それぞれ、配列番号66および65に示される。YW353は、ヒト抗体ファージライブラリから生成されたので、「YW353」および「huYW353」という用語は、本明細書で交換可能に使用される。

【0433】

G. 種の交差反応性

モノクローナル抗体を試験して、それらがヒト以外の種由来のLgR5と交差反応するかどうかを決定した。図12A~Cは、ヒト(配列番号67)、カニクイザル(配列番号69)、ラット(配列番号70)、およびマウス(配列番号72)LgR5の間のアライメントを示す。全ての4つの種の間で同一である残基がアスタリスク(*)によって示される。図4は、gDエピトープ標識LgR5(ヒト、カニクイザル、ラット、またはマウスLgR5)により安定的にトランスフェクトされ、10 µg/mL YW353、ch8E11、hu8E11.v2、2H6、または3G12抗体で染色され、R-フィコエリトリン複合ヤギ抗ヒト抗体により検出された、293細胞のFACS分析の結果を示す。トランスフェクトされていない293細胞は、通常、LgR5を発現しない。YW353抗体は、ヒトおよびカニクイザルLgR5に結合するが、ラットまたはマウスLgR5には結合しない。ch8E11およびhu8E11.v2抗体は、LgR5の全ての4つの種に結合するが、ラットLgR5への結合は、ヒト、カニクイザル、またはマウスLgR5への結合ほど強力ではない。2H6抗体は、ヒトおよびマウスLgR5に結合するが、カニクイザルまたはラットLgR5への結合については試験されなかった。3G12抗体は、ヒトLgR5への強力な結合、マウスLgR5へのそれより強力でない結合を示すが、カニクイザルまたはラットLgR5への結合については試験されなかった。

【0434】

H. 抗体親和性

ヒトLgR5に対する各抗体の親和性を、表面プラスモン共鳴によって、BIAcore(商標)-3000を使用して、実質的に実施例Eに上述されるように決定した。

【0435】

図4に示されるように、YW353抗体は、ヒトLgR5に、1.6 nMの親和性で結合した。ch8E11およびhu8E11.v2抗体は、ヒトLgR5に、それぞれ、2.4 nMおよび3.1 nMの親和性で結合した。2H6および3G12抗体は、ヒトLgR5に、それぞれ、208 nMおよび72 nMの親和性で結合した。

【0436】

スキャッチャード分析を次の標準手順(Holmes et al., Science 256: 1205-1210 (1992))に従って行って、YW353、ch8E11、およびhu8E11.v2抗体の相対的結合親和性を決定した。

【0437】

抗Lgr5抗体を、間接的なヨードゲン(Iodogen)法を使用して、[I¹²⁵

〕標識した。[I ^{1 2 5}] 標識された抗 L g r 5 抗体を、N A P - 5 カラム (G E H e a l t h c a r e) を使用したゲル濾過によって、遊離 ^{1 2 5} I - N a から精製し、精製されたヨウ素化抗 L g r 5 抗体は、13.92 ~ 19.01 μ C i / μ g の範囲の特異的活性を有した。固定濃度の [I ^{1 2 5}] 標識抗体および漸減濃度の段階希釈された未標識抗体を含有する、50 μ L 体積の競合アッセイ混合物を、96 ウェルプレート中に配置した。ヒト、ラット、またはマウス L g r 5 を安定的に発現する 293 細胞を、増殖培地中で、5 % C O ₂ 中、37 °C で培養した。細胞を、S i g m a 細胞解離溶液を使用してフラスコから取り外し、それを 2 % ウシ胎仔血清 (F B S)、50 m M の H E P E S (p H 7 . 2)、および 0 . 1 % アジ化ナトリウムを含む、ダルベッコ変法イーグル培地中 (D M E M) から構成された結合緩衝液で洗浄した。洗浄された細胞を 96 ウェルプレートに、0 . 2 m L の結合緩衝液中、250,000 細胞の密度で添加した。各ウェル中の [I ^{1 2 5}] 標識抗体の最終濃度は、200 p M であった。競合アッセイにおける未標識抗体の最終濃度は、500 n M から、10 回の 2 倍希釈ステップを通じて、0 n M までの緩衝液のみのアッセイの範囲であった。競合アッセイを三通りで行った。競合アッセイを室温で 2 時間インキュベートした。2 時間のインキュベーション後、競合アッセイを M i l l i p o r e M u l t i s c r e e n 濾過プレート (B i l l e r i c a , M A) に移し、結合緩衝液で 4 回洗浄して、遊離部分を結合された [I ^{1 2 5}] 標識抗体から分離した。フィルターを W a l l a c W i z a r d 1470 y 計数器 (P e r k i n E l m e r L i f e a n d A n a l y t i c a l S c i e n c e s I n c . ; W e l l e s l e y , M A) により計数した。結合データを、M u n s o n および R o b a r d の適合アルゴリズムを使用して抗体の結合親和性を決定する (M u n s o n a n d R o b a r d 1980)、N e w L i g a n d ソフトウェア (G e n e n t e c h) を使用して評価した。

【0438】

図 4 に示されるように、Y W 3 5 3 は、安定的にトランスフェクトされた 293 細胞上で発現された g D 標識ヒト L g R 5 に、0 . 2 n M の親和性で結合した。C h 8 E 1 1 は、安定的にトランスフェクトされた 293 細胞上で発現された g D 標識ヒト L g R 5 および g D 標識マウス L g R 5 に、それぞれ、0 . 4 n M および 0 . 2 n M の親和性で結合した。H u 8 E 1 1 v 2 は、安定的にトランスフェクトされた 293 細胞上で発現された g D 標識ヒト L g R 5、g D 標識マウス L g R 5、および g D 標識ラット L g R 5 に、それぞれ、0 . 3 ~ 0 . 7 n M、0 . 5 ~ 0 . 6 n M、および 2 . 4 ~ 2 . 8 n M の親和性で結合した。これらの K d 値は、一般に、B I A c o r e (登録商標) によって決定されるものよりも低かった。

【0439】

I . エピトープマッピング

各抗体によって結合された L g R 5 の領域を決定するために、種々の N 末端および / または C 末端欠失を伴う g D エピトープ標識 L g R 5 によって一過性でトランスフェクトされた 293 細胞を、10 μ g / m L Y W 3 5 3、c h 8 E 1 1、h u 8 E 1 1 v 2、2 H 6、または 3 G 1 2 抗体で染色し、結合を R - フィコエリトリン複合ヤギ抗ヒト抗体により検出した。抗体 Y W 3 5 3、8 E 1 1、2 H 6、および 3 G 1 2 は全て、g D エピトープ標識完全長 L g R 5 に結合した。抗体 2 H 6 および 3 G 1 2 は、g D エピトープ標識 L g R 5 _{324 ~ 907} (配列番号 67 のアミノ酸 324 ~ 907) に結合した。抗体 Y W 3 5 3 および 8 E 1 1 は、g D エピトープ標識 L g R 5 _{324 ~ 907} に結合しなかった。抗体 Y W 3 5 3 のみが、C 末端 G P I アンカーを有する g D エピトープ標識 L g R 5 _{22 ~ 123} (配列番号 67 のアミノ酸 22 ~ 123) に結合した。抗体 Y W 3 5 3 および 8 E 1 1 の両方が、C 末端 G P I アンカーを有する g D エピトープ標識 L g R 5 _{22 ~ 323} (配列番号 67 のアミノ酸 22 ~ 323) に結合したが、抗体 2 H 6 および 3 G 1 2 は、結合しなかった。最後に、抗体のうちのいずれも g D エピトープ標識 L g R 5 _{424 ~ 907} (配列番号 67 のアミノ酸 424 ~ 907) に結合しなかった。

【0440】

10

20

30

40

50

図 4 は、「エピトープ領域」と題される欄におけるそれらの結果を要約する。その図に示されるように、抗体 Y W 3 5 3 は、配列番号 6 7 のアミノ酸 2 2 ~ 1 2 3 の領域におけるエピトープに結合し、抗体 8 E 1 1 およびそのヒト化変異体は、配列番号 6 7 のアミノ酸 2 2 ~ 3 2 3 の領域におけるエピトープに結合し、抗体 2 H 6 および 3 G 1 2 は、配列番号 6 7 のアミノ酸 3 2 4 ~ 4 2 3 の領域におけるエピトープに結合する。

【 0 4 4 1 】

J . 抗 L g R 5 抗体薬物複合体の産生

より大規模な抗体産生のために、抗体を C H O 細胞内で産生した。V L および V H をコードするベクターを、C H O 細胞中にトランスフェクトし、I g G を、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーによって細胞培養培地から精製した。

10

【 0 4 4 2 】

抗 L g R 5 抗体 M M A E 複合体

抗 L g R 5 抗体 - 薬物複合体 (A D C) を、Y W 3 5 3 (それぞれ配列番号 6 6 および 6 5 に示される I g G 1 重鎖およびカッパ軽鎖配列)、h u 8 E 1 1 v 2 (それぞれ配列番号 6 4 および 6 3 に示される I g G 1 重鎖およびカッパ軽鎖配列)、m u 8 E 1 1、c h 8 E 1 1、2 H 6、c h 2 H 6、3 G 1 2、および c h 3 G 1 2 を、本明細書に描写されている薬物 - リンカー部分 M C - v c - P A B - M M A E に複合することによって産生した。便宜上、薬物 - リンカー部分 M C - v c - P A B - M M A E はときに、これらの実施例においておよび図において、「v c M M A E」または「V C E」と称される。複合前に、抗体を、T C E P により、国際公開第 2 0 0 4 / 0 1 0 9 5 7 A 2 号に記載される手法に従った標準方法を使用して、部分的に還元した。部分的に還元された抗体を、例えば、D o r o n i n a e t a l . (2 0 0 3) N a t . B i o t e c h n o l . 2 1 : 7 7 8 - 7 8 4 および米国公開特許第 2 0 0 5 / 0 2 3 8 6 4 9 A 1 号に記載される手法に従った標準方法を使用して、薬物 - リンカー部分に複合した。簡潔に述べると、部分的に還元された抗体を薬物 - リンカー部分と組み合わせて、抗体の還元されたシステイン残基への薬物 - リンカー部分の複合を可能にした。複合反応を反応停止処理し、A D C を精製した。各 A D C についての薬物負荷 (1 抗体当たりの薬物部分の平均数) を決定し、それは抗 L g R 5 抗体について 3 . 3 ~ 4 . 0 の間であった。抗体 - v c M M A E 免疫複合体の構造が、図 3 5 A に示される (p = 薬物負荷)。

20

【 0 4 4 3 】

抗 L g R 5 抗体 P N U 複合体

抗 L g R 5 抗体 - P N U 薬物複合体 (A D C) を、Y W 3 5 3 A 1 1 8 C チオ M a b (それぞれ配列番号 7 8 および 6 5 に示される I g G 1 A 1 1 8 C 重鎖およびカッパ軽鎖配列) または h u 8 E 1 1 v 2 チオ M a b (それぞれ配列番号 7 5 および 6 3 に示される I g G 1 A 1 1 8 C 重鎖およびカッパ軽鎖配列) を、P N U 薬物 - リンカー部分に複合することによって産生した。複合前に、抗体をジチオスレイトール (D T T) により還元して、ブロッキング基 (例えば、システイン) を、チオ - 抗体の操作されたシステインから除去した。このプロセスはまた、抗体の鎖間ジスルフィド結合を還元する。還元された抗体を精製して、放出されたブロッキング基を除去し、鎖間ジスルフィドを、デヒドロアスコルビン酸 (d h A A) を使用して再酸化させた。

40

【 0 4 4 4 】

v a l - c i t リンカーおよび P N U を含む抗体 - 薬物複合体のために、インタクトな抗体を薬物 - リンカー部分 M C - v a l - c i t - P A B - スペーサー - P N U - 1 5 9 6 8 2 (「v a l - c i t」はまた、本明細書で「v c」と称され得る) と組み合わせて、抗体の操作されたシステイン残基への薬物 - リンカー部分の複合を可能にした。複合反応を、いずれの遊離リンカー - 薬物部分とも反応する過剰の N - アセチル - システインを添加することによって反応停止処理し、A D C を精製した。A D C についての薬物負荷 (1 抗体当たりの薬物部分の平均数) は、約 1 . 8 ~ 2 の範囲内であった。抗体 - v c P N U 免疫複合体の構造が、図 3 5 B に示される (p = 薬物負荷)。

【 0 4 4 5 】

50

アセタールリンカーおよびPNUを含む抗体-薬物複合体のために、インタクトな抗体を薬物-リンカー部分MC-アセタール-PNU-159682と組み合わせて、抗体の操作されたシステイン残基への薬物-リンカー部分の複合を可能にした。複合反応を、いずれの遊離リンカー-薬物部分とも反応する過剰のN-アセチル-システインを添加することによって反応停止処理し、ADCを精製した。ADCについての薬物負荷(1抗体当たりの薬物部分の平均数)は、約1.8~2であった。抗体-アセタール-PNU免疫複合体の構造が、図35Cに示される(p=薬物負荷)。

【0446】

開裂不可能なリンカーおよびPNUを含む抗体-薬物複合体のために、インタクトな抗体を薬物-リンカー部分MC-PNU-159682と組み合わせて、抗体の操作されたシステイン残基への薬物-リンカー部分の複合を可能にした。複合反応を、いずれの遊離リンカー-薬物部分とも反応する過剰のN-アセチル-システインを添加することによって反応停止処理し、ADCを精製した。ADCについての薬物負荷(1抗体当たりの薬物部分の平均数)は、約1.8~2であった。抗体-PNU免疫複合体の構造が、図35Dに示される(p=薬物負荷)。

10

【0447】

抗LgR5抗体PBD複合体

抗LgR5抗体-PBD薬物複合体(ADC)を、YW353 A118CチオMab(それぞれ配列番号78および65に示されるIgG1 A118C重鎖およびカッパ軽鎖配列)またはhu8E11v2チオMab(それぞれ配列番号75および63に示されるIgG1 A118C重鎖およびカッパ軽鎖配列)を、PBD薬物-リンカー部分に複合することによって産生した。複合前に、抗体をジチオスレイトール(DTT)により還元して、ブロッキング基(例えば、システイン)を、チオ-抗体の操作されたシステインから除去した。このプロセスはまた、抗体の鎖間ジスルフィド結合を還元する。還元された抗体を精製して、放出されたブロッキング基を除去し、鎖間ジスルフィドを、デヒドロアスコルビン酸(dhAA)を使用して再酸化させた。

20

【0448】

val-citリンカーおよびPBDを含む抗体-薬物複合体のために、インタクトな抗体を薬物-リンカー部分MC-val-cit-PAB-PBD(「val-cit」はまた、本明細書で「vc」と称され得る)と組み合わせて、抗体の操作されたシステイン残基への薬物-リンカー部分の複合を可能にした。複合反応を、いずれの遊離リンカー-薬物部分とも反応する過剰のN-アセチル-システインを添加することによって反応停止処理し、ADCを精製した。ADCについての薬物負荷(1抗体当たりの薬物部分の平均数)は、約1.8~2の範囲内であった。抗体-vcPBDの構造が、図35Eに示される(p=薬物負荷)。

30

【0449】

K. ラットにおける抗LgR5抗体-薬物複合体の毒性

抗LgR5抗体8E11.v2-vcMMAEの毒性の可能性を評価するために、6匹のオスSprague-Dawleyラットに、12mg/kgの8E11.v2-vcMMAEを週1回、4週間にわたって投与し、6匹のオスSprague-Dawleyラットに、20mg/kgの8E11.v2-vcMMAEを週1回、2週間にわたって投与した。4匹のオスSprague-Dawley対照ラットに、ビヒクル単独を週1回、2週間にわたって投与し、4匹のオスSprague-Dawley対照ラットに、ビヒクル単独を週1回、4週間にわたって投与した。2週間群のラットを12日目に死体解剖し、4週間群のラットを26日目に死体解剖した。

40

【0450】

簡潔に述べると、8E11.v2-vcMMAEを投与された全てのラットは、対照ラットと比較して、低減された赤血球(red cell)量(赤血球(red blood cells)、ヘマトクリット、ヘモグロビン、および網状赤血球)、好中球、および血小板を示した。20mg/kgの8E11.v2-vcMMAEを投与されたラット

50

はまた、対照ラットと比較して、低減された白血球数およびリンパ球も示した。加えて、8 E 1 1 . v 2 - v c M M A E を投与された全てのラットは、対照ラットと比較して、肝臓酵素 A L T、A S T、A L P、および G G T の増加、および増加した総ビリルビン (b i l l i r u b i n) を示した。

【 0 4 5 1 】

この研究から収集された組織の組織病理学的分析は、8 E 1 1 . v 2 - v c M M A E を投与されたラットにおけるリンパ系および造血性組織の細胞枯渇、ならびに急速に分裂している組織における増加した有糸分裂像を示した。2 0 m g / k g の 8 E 1 1 . v 2 - v c M M A E を投与されたラットはまた、最小の肝臓壊死、最小の増加した有糸分裂像および単細胞の陰窩細胞壊死 / アポトーシス、ならびに最小の軽度肺胞組織球症および I I 型細胞過形成も示した。

10

【 0 4 5 2 】

観察された病理変化は、他の v c M M A E 抗体 - 薬物複合体を投与されたラットにおいて観察された病理と同様であった。消化管における L g R 5 抗原依存性毒性のいずれの証拠も存在しないようであった。

【 0 4 5 3 】

L . L o V o 結腸がん細胞株異種移植片における抗 L g R 5 抗体 - 薬物複合体の有効性
抗 L g R 5 A D C の有効性を、L o V o 結腸がん異種移植片モデルを使用して調査した。L o V o 細胞は、A P C 突然変異を有する結腸直腸腺がん細胞株 (A T C C 番号 C C L 2 2 9) である。L g R 5 は、L o V o 細胞において高度に発現され、それをマイクロアレイ、T a q M a n (登録商標) 定量 R T - P C R、インサイツハイブリダイゼーション、F A C S、およびウェスタンブロットによって確認した。H B S S - マトリゲル中、5 0 0 万個の L o V o 細胞 (Y W 3 5 3 を使用した F A C S により L g R 5 陽性) を N C R ヌードマウスの背側に皮下注射し、接種から 6 日後のマウスに、5 m g / k g のマウス抗 g p 1 2 0 - v c M M A E 対照抗体 - 薬物複合体、ヒト抗 g D 5 B 6 - v c M M A E 対照抗体 - 薬物複合体、h u Y W 3 5 3 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、m u 8 E 1 1 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、m u 2 H 6 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、もしくは m u 3 G 1 2 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体の単回静脈内注射、またはビヒクル (P B S) 単独による単回静脈内注射を行った。注射の 1 日後、抗体の存在を P K 採血によって確認した。

20

30

【 0 4 5 4 】

図 1 3 に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、試験された全ての 4 つの抗 L g R 5 抗体 - 薬物複合体により達成された。

【 0 4 5 5 】

M . D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片における抗 L g R 5 抗体 - 薬物複合体の有効性
抗 L g R 5 A D C の有効性を、 β - カテニン突然変異を有する D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片モデルを使用して調査した。L g R 5 は、D 5 1 2 4 腫瘍において高度に発現され、それをマイクロアレイ、T a q M a n (登録商標) 定量 R T - P C R、インサイツハイブリダイゼーション、F A C S、およびウェスタンブロットによって確認した。2 0 ~ 3 0 m m ³ の D 5 1 2 4 腫瘍断片 (Y W 3 5 3 および 8 E 1 1 を使用した F A C S により L g R 5 陽性) を N C R ヌードマウスの背側面領域の皮下に埋め込み、移植の 1 8 日後、マウスに、6 m g / k g のヒト抗 g D 5 B 6 - v c M M A E 対照抗体 - 薬物複合体、3 m g / k g もしくは 6 m g / k g の h u Y W 3 5 3 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、3 m g / k g もしくは 6 m g / k g の c h 8 E 1 1 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、3 m g / k g もしくは 6 m g / k g の c h 2 H 6 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、または 3 m g / k g もしくは 6 m g / k g の c h 3 G 1 2 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体の単回静脈内注射、またはビヒクル (ヒスチジン緩衝液 : 2 0 m M のヒスチジン酢酸塩、2 4 0 m M のショ糖、0 . 0 2 % T w e e n 2 0 (p H 5 . 5) ; 図 1 4 における「 H B # 8 」) 単独による単回静脈内注射を行った。注射の 1 日および 8 日後、抗体の存在を P K 採血によって確認した。

40

50

【0456】

図14に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、huYW353 - vcMMAE、ch8E11 - vcMMAE、およびch3G12 - vcMMAEの両方の用量で達成された。実質的な腫瘍成長阻害はまた、6mg/kgのch2H6 - vcMMAEでも達成された。

【0457】

YW353 - vcMMAEの種々の用量の有効性を次いで、上述のD5124膵臓がん異種移植片モデルにおいて試験した。20~30mm³のD5124腫瘍断片(YW353および8E11を使用したFACSによりLgR5陽性)をNCRヌードマウスの背側面領域の皮下に埋め込み、移植から23日後のマウスに、0.5mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、もしくは12mg/kgのhuYW353 - vcMMAE抗体 - 薬物複合体、または12mg/kgのhuYW353、または7.2mg/kgもしくは14.4mg/kgのヒト抗gD5B6 - vcMMAE対照抗体 - 薬物複合体の単回静脈内注射、またはビヒクル(ヒスチジン緩衝液: 20mMのヒスチジン酢酸塩、240mMのショ糖、0.02% Tween 20 (pH 5.5)); 図15における「HB#8」)単独による単回静脈内注射を行った。注射の1、4、および14日後、抗体の存在をPK採血によって確認した。

10

【0458】

図15に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、3mg/kgのhuYW353 - vcMMAEで達成され、ほぼ完全な腫瘍成長阻害が、6mg/kgおよび12mg/kgのhuYW353 - vcMMAEで達成された。

20

【0459】

N. マウス腸腫瘍発生モデルにおけるmu8E11およびmu8E11 - vcMMAEの有効性

mu8E11およびmu8E11 - vcMMAEの有効性を、マウス腸腫瘍発生モデルAPC^{min/+}、LSL-Kras^{G12D}、VillinCre(「AKVマウス」)において調査した。AKVマウスは、APC^{min/+}、VillinCre(「AVマウス」)とLSL-Kras^{G12D}マウスとの交配の結果得られたものである。AVマウスは、結腸において0~4個の腺種および小腸において100個の腺種を発症したが、AKVマウスは、結腸において平均140個の腺種および小腸において100個の腺種を発症した(データは示されず)。LgR5 mRNA発現をAVおよびAKVマウスの正常な組織およびポリープにおいて測定し、LgR5が、AKVマウスの小腸および結腸の両方からのポリープにおいて有意に過剰発現されることが見出された(図16)。AKVマウスの小腸および結腸におけるLgR5の発現を可視化するために、AKVマウスを、Lgr5遺伝子に位置するヒトジフテリア毒素受容体cDNAにインフレームで連結された、高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)を含有するカセットを有するマウスと交配させた。Tian et al., Nature, 478: 255 - 260 (2011)を参照されたい。小腸ポリープおよび大腸ポリープにおけるEGFP発現の面積を、AKV Lgr5^{DTR/+}マウスにおいて可視化した。その実験の結果が、図20に示される。LgR5発現が、小腸ポリープと結腸ポリープとの間で有意に異ならず、さらに、腫瘍サイズとLgR5+面積との間に何ら相関が存在しないことが見出された。腫瘍の平均LgR5+面積は8%であったが、腫瘍間で大幅に異なった。予備結果は、ヒトの結腸直腸腫瘍におけるLgR5+面積が、マウスにおけるよりも有意に高い場合があることを示し、これはヒトにおける抗LgR5 ADC療法の治療指数がマウスにおけるよりもさらに良好であり得ることを示唆している。

30

40

【0460】

これらの動物内で腸陰窩と腫瘍との間のLgr5発現差異を評価するために、AKV Lgr5^{DTR/+}マウスからの腸管を得て、組織切片上でEGFPの直接可視化を行った。腫瘍および正常な陰窩をその後、各EGFP陽性(positive)ピクセルの強度について定量した。相対的EGFP強度を決定するために、強度スコアをEGFP+面積で除する。

50

図 2 3 に示されるように、L g R 5 発現は、A K V L g r 5^{D T R} / + マウスの腸陰窩におけるよりも、腫瘍においてより高い。

【 0 4 6 1 】

全体的な生存研究を A K V マウスにより行って、抗 L g R 5 抗体が生存期間を増加し得るかどうかを決定した。10 匹の A K V マウスに、15 mg / kg の mu 8 E 1 1 - M C - v c - P A B - M M A E を投与し、6 匹の A K V マウスに、15 mg / kg の mu 8 E 1 1 を投与し、9 匹のマウスに、15 mg / kg の対照抗体抗 g p 1 2 0 - M C - v c - M M A E を投与した。抗体および A D C を、6 週齢から開始して、マウスが死亡するか、または瀕死状態（重度の嗜眠、体重減少、および貧血の徴候に関連する標準的な基準によって決定される）であるとされるか、のいずれかまで毎週投与し、瀕死状態の場合、マウスを屠殺した。

10

【 0 4 6 2 】

全体的な生存研究の結果が、図 1 7 に示される。無処置の対照データは、22 匹の A K V マウスについての既存の生存率を表す。その実験において、mu 8 E 1 1 または mu 8 E 1 1 - M C - v c - P A B - M M A E のいずれかを投与された A K V マウスは、無処置の A K V マウスまたは対照 A D C を投与された A K V マウスよりも有意により長い生存時間を有した。これらの結果に基づいて、追加の動物を上述のように評価した。その実験の結果が、図 1 9 に示される。より大きい実験において、mu 8 E 1 1 - M C - v c - P A B - M M A E を投与された A K V マウスは、無処置の A K V マウスまたは対照 A D C を投与された A K V マウスよりも有意により長い生存時間を有し、また、mu 8 E 1 1 を投与されたマウスよりも有意により長い生存時間を有した。死亡した時点で、対照 A D C および抗 L g R 5 - A D C を投与された A K V マウスは、同様の数およびサイズのポリープを有したが、これは抗 L g R 5 - A D C が疾患を緩徐にし、それによって生存時間を延長し得ることを示唆している。

20

【 0 4 6 3 】

抗 L g R 5 抗体および / または抗 L g R 5 A D C が A K V マウスの消化器腫瘍においてアポトーシスを引き起したかどうかを決定するために、切断型カスパーゼ 3 の存在を腫瘍面積の関数として測定した。死亡した時点で収集されたホルマリン固定パラフィン包埋 (F F P E) 小腸および結腸組織を、切断型カスパーゼ 3 に対する免疫組織化学染色 (C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g i e s , D a n v e r s , M A , カタログ番号 9 6 6 1 L) に供した。染色されたスライドの画像を O l y m p u s N a n o z o o m e r 自動スライド走査プラットフォームによって獲得し、手動で特定された腫瘍特異的面積を M a t l a b ソフトウェアパッケージ (M a t h w o r k s , N a t i c k , M A) において分析した。陽 (P o s t i v e l y) 染された面積および総腫瘍面積を定量した。まれではあるが、切断型カスパーゼ 3 は、抗 L g R 5 A D C での処置後に陰窩において可視的であったが、対照 A D C 処置動物においては観察されず、これは L g R 5 発現細胞が特異的に標的とされていることを示唆している。

30

【 0 4 6 4 】

その実験の結果が、図 1 8 に示される。抗 L g R 5 抗体投与および抗 L g R 5 A D C 投与の両方が、切断型カスパーゼ 3 の存在に対して陽性であった A K V マウスにおいて、対照 A D C 処置 A K V マウスと比較して、腫瘍面積の割合の統計的に有意な増加を引き起こした。

40

【 0 4 6 5 】

アポトーシスが L g R 5 + 細胞内で生じることを実証するために、A K V L g r 5^{D T R} / + マウスに、15 mg / kg の mu 8 E 1 1 - M C - v c - P A B - M M A E または 15 mg / kg の対照抗体抗 g p 1 2 0 - M C - v c - M M A E を投与した (1 日目) 。 4 日目、マウスを屠殺し、消化管 (小腸および大腸) からの腫瘍を、E G F P および切断型カスパーゼ 3 の発現について可視化した。総細胞面積当たりの C C 3 + G F P + 面積の量を次いで決定した。図 2 1 A に示されるように、抗 L g R 5 - A D C 処置マウスは、対照処置マウスよりも高い割合の C C 3 + G F P + 面積を有する傾向があったが、その実験

50

において統計的 (statistically) に有意でなかった。図 2 1 B は、対照 A D C 処置マウス (左パネル) および抗 L g R 5 - A D C 処置マウス (右パネル) からの、例となる免疫組織化学染色を示す。これらの結果は、抗 L g R 5 - A D C 処置時の L g R 5 発現細胞内で増加したアポトーシスへの傾向を実証する。

【 0 4 6 6 】

L g R 5 発現細胞の細胞増殖が抗 L g R 5 処置によって影響を受けるかどうかを決定するために、1細胞面積当たりの K i 6 7 + 面積を、対照 - A D C 処置および抗 L g R 5 - A D C 処置 A K V L g r 5^{D T R} / + マウスの消化管からの E G F P + 細胞集団および E G F P - 細胞集団において測定した。K i 6 7 は、細胞増殖に関連する核タンパク質である。免疫組織化学染色のための K i 6 7 抗体は、Neomarker から得た。その実験の結果が、図 2 2 に示される。K i 6 7 染色によって測定するとき、対照 A D C よりも抗 L g R 5 - A D C で処置された A K V L g r 5^{D T R} / + マウスからの腫瘍において、E G F P + および E G F P - 細胞集団の両方における有意により少ない増殖細胞面積が存在した。これらの結果は、抗 L g R 5 - A D C が増殖性子孫の増殖を低減、および / またはその形成を阻害することを示唆する。

【 0 4 6 7 】

O . D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片における抗 L g R 5 抗体 - 薬物複合体の有効性

抗 L g R 5 A D C の有効性を、 β - カテニン突然変異を有する D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片モデルを使用して調査した。L g R 5 は、D 5 1 2 4 腫瘍において高度に発現され、それをマイクロアレイ、TaqMan (登録商標) 定量 R T - P C R、インサイツハイブリダイゼーション、F A C S、およびウェスタンブロットによって確認した。20 ~ 30 mm³ の D 5 1 2 4 腫瘍断片を N C R ヌードマウスの背側面領域の皮下に埋め込み、移植の 22 日後、マウスに、2 . 62 mg / kg もしくは 5 . 23 mg / kg の h u Y W 3 5 3 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、3 mg / kg もしくは 6 mg / kg の c h 8 E 1 1 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、または 3 mg / kg もしくは 6 mg / kg の h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、または 6 mg / kg のヒト化抗 g D 5 B 6 - v c M M A E 対照抗体 - 薬物複合体の単回静脈内注射、またはビヒクル (ヒスチジン緩衝液: 20 mM のヒスチジン酢酸塩、240 mM のショ糖、0 . 02 % Tween 20 (pH 5 . 5)) 単独による単回静脈内注射を行った (n = 1 群当たり 8 匹のマウス)。注射の 1 日および 8 日後、抗体の存在を P K 採血によって確認した。

【 0 4 6 8 】

図 2 4 に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、h u Y W 3 5 3 - v c M M A E の両方の用量、h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E の両方の用量、および 6 mg / kg の c h 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E で達成された。

【 0 4 6 9 】

h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体の種々の用量の有効性を次いで、上述の D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片モデルにおいて試験した。20 ~ 30 mm³ の D 5 1 2 4 腫瘍断片を N C R ヌードマウスの背側面領域の皮下に埋め込み、移植から 26 日後のマウスに、0 . 5 mg / kg、1 mg / kg、3 mg / kg、6 mg / kg、もしくは 12 mg / kg の h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、または 15 mg / kg の h u 8 E 1 1 v 2、または 6 . 37 mg / kg もしくは 12 . 73 mg / kg のヒト化抗 g D 5 B 6 - v c M M A E 対照抗体 - 薬物複合体、または 15 mg / kg のヒト化抗 g D 対照抗体の単回静脈内注射、またはビヒクル (ヒスチジン緩衝液: 20 mM のヒスチジン酢酸塩、240 mM のショ糖、0 . 02 % Tween 20 (pH 5 . 5)) 単独による単回静脈内注射を行った (n = 1 群当たり 8 匹のマウス)。

【 0 4 7 0 】

図 2 5 に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、3 mg / kg および 6 mg / kg の h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E で達成され、腫瘍退縮が、12 mg / kg の h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E で達成された。

【 0 4 7 1 】

P. L o V o X 1 . 1 結腸がん細胞株異種移植片における抗 L g R 5 抗体 - 薬物複合体の有効性

抗 L g R 5 A D C の有効性を、L o V o 結腸がん異種移植片モデルを使用して調査した。L o V o 細胞は、A P C 突然変異を有する結腸直腸腺がん細胞株 (A T C C 番号 C C L 2 2 9) であり、垂系 L o V o X 1 . 1 をマウスにおける最適な成長のために誘導した。簡潔に述べると、マウスに L o V o 細胞を播種した。腫瘍が成長し始めると、望ましい成長速度を有する腫瘍を採取した。腫瘍を分割し、培養により成長させて、細胞株 L o V o X 1 . 1 を樹立した。L g R 5 は、L o V o X 1 . 1 細胞において発現され、それをマイクロアレイ、T a q M a n (登録商標) 定量 R T - P C R 、インサイツハイブリダイゼーション、F A C S 、およびウェスタンブロットによって確認した。H B S S - マトリゲル中、5 0 0 万個の L o V o X 1 . 1 細胞を C . B - 1 7 S C I D マウスの背側に皮下注射し、接種から 1 3 日後のマウスに、3 m g / k g もしくは 6 m g / k g の h u Y W 3 5 3 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、3 m g / k g もしくは 6 m g / k g の h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、1 5 m g / k g の h u 8 E 1 1 v 2 抗体、1 5 m g / k g のヒト化抗 g D 5 B 6 対照抗体、または 6 m g / k g のヒト化抗 g D 5 B 6 - v c M M A E 対照抗体 - 薬物複合体の単回静脈内注射、またはビヒクル (ヒスチジン緩衝液 : 2 0 m M のヒスチジン酢酸塩、2 4 0 m M のショ糖、0 . 0 2 % T w e e n 2 0 (p H 5 . 5)) 単独による単回静脈内注射を行った (n = 1 群当たり 1 0 匹のマウス) 。

10

【 0 4 7 2 】

20

図 2 6 に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、6 m g / k g の h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E および 6 m g / k g の h u Y W 3 5 3 - v c M M A E で達成された。

【 0 4 7 3 】

次いで、h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体の種々の用量の有効性を、上述の L o V o X 1 . 1 結腸直腸腺がん異種移植片モデルにおいて試験した。H B S S - マトリゲル中、5 0 0 万個の L o V o X 1 . 1 細胞を C . B - 1 7 S C I D マウスの背側に皮下注射し、接種から 1 0 日後のマウスに、1 m g / k g 、3 m g / k g 、6 m g / k g 、1 0 m g / k g 、もしくは 1 5 m g / k g の h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、または 1 5 m g / k g の h u 8 E 1 1 v 2 、または 6 m g / k g もしくは 1 5 m g / k g のヒト化抗 g D 5 B 6 - v c M M A E 対照抗体 - 薬物複合体の単回静脈内注射、またはビヒクル (ヒスチジン緩衝液 : 2 0 m M のヒスチジン酢酸塩、2 4 0 m M のショ糖、0 . 0 2 % T w e e n 2 0 (p H 5 . 5)) 単独による単回静脈内注射を行った (n = 1 群当たり 9 匹のマウス) 。注射の 1 、7 、および 1 4 日後、抗体の存在を P K 採血によって確認した。

30

【 0 4 7 4 】

図 2 7 に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、6 m g / k g 、1 0 m g / k g 、および 1 5 m g / k g の h u 8 E 1 1 v 2 - v c M M A E で達成された。

【 0 4 7 5 】

Q. D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片における抗 L g R 5 抗体 - 薬物複合体の有効性

抗 L g R 5 A D C の有効性を、 β - カテニン突然変異を有する D 5 1 2 4 膵臓がん異種移植片モデルを使用して調査した。L g R 5 は、D 5 1 2 4 腫瘍において高度に発現され、それをマイクロアレイ、T a q M a n (登録商標) 定量 R T - P C R 、インサイツハイブリダイゼーション、F A C S 、およびウェスタンブロットによって確認した。2 0 ~ 3 0 m m ³ の D 5 1 2 4 腫瘍断片を N C R ヌードマウスの背側面領域の皮下に埋め込み、移植の 2 6 日後、マウスに、1 m g / k g の h u Y W 3 5 3 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、1 m g / k g の h u Y W 3 5 3 - v c P N U 抗体 - 薬物複合体、1 m g / k g の h u Y W 3 5 3 - P N U 抗体 - 薬物複合体、1 m g / k g の h u Y W 3 5 3 - アセタール - P N U 抗体 - 薬物複合体、または 1 m g / k g のヒト化抗 g D 5 B 6 - v c P N U 対照抗体 - 薬物複合体、1 m g / k g のヒト化抗 g D 5 B 6 - P N U 対照抗体 - 薬物複合体、または 1 m g / k g のヒト化抗 g D 5 B 6 - アセタール - P N U 対照抗体 - 薬物複合

40

50

体の単回静脈内注射、またはピヒクル（ヒスチジン緩衝液：20 mMのヒスチジン酢酸塩、240 mMのショ糖、0.02% Tween 20（pH 5.5））単独による単回静脈内注射を行った（n = 1群当たり9匹のマウス）。注射の3、7、および14日後、抗体の存在をPK採血によって確認した。

【0476】

図28に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、1 mg/kgのhuYW353-vcMMAEおよび1 mg/kgのhuYW353-アセタール-PNUにより達成され、ほぼ完全な腫瘍成長阻害が、1 mg/kgのhuYW353-vcPNUにより達成された。1 mg/kgのhuYW353-アセタール-PNUで処置されたマウスのうちの1匹は、完全寛解を示した（すなわち、マウスは、試験の終了時に検出可能な腫瘍を何ら有しなかった）。加えて、1 mg/kgのhuYW353-vcPNUで処置されたマウスのうちの2匹は、部分寛解（すなわち、0日目の最初の腫瘍量の50%超の低減）を示した。

10

【0477】

R. D5124 膵臓がん異種移植片における抗LgR5抗体-薬物複合体の有効性

hu8E11v2抗体-薬物複合体の種々の用量の有効性を、D5124 膵臓がん異種移植片モデルにおいて試験した。20~30 mm³のD5124 腫瘍断片をNCRヌードマウスの背側面領域の皮下に埋め込み、移植から22日後のマウスに、2 mg/kgのhu8E11v2-vcMMAE抗体-薬物複合体、または2 mg/kgのhu8E11v2-vcPNU、または2 mg/kgもしくは10 mg/kgのhu8E11v2-アセタール-PNU、または2 mg/kgもしくは10 mg/kgのhu8E11v2-PNU、2 mg/kgのヒト化抗gD 5B6-vcPNU対照抗体-薬物複合体、10 mg/kgのヒト化抗gD 5B6-アセタール-PNU対照抗体-薬物複合体、または10 mg/kgのヒト化抗gD 5B6-PNU対照抗体-薬物複合体の単回静脈内注射、またはピヒクル（ヒスチジン緩衝液：20 mMのヒスチジン酢酸塩、240 mMのショ糖、0.02% Tween 20（pH 5.5））単独による単回静脈内注射を行った（n = 1群当たり8匹のマウス）。

20

【0478】

図29に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、2 mg/kgのhu8E11v2-アセタール-PNUで達成され、ほぼ完全な腫瘍成長阻害が、10 mg/kgのhu8E11v2-アセタール-PNU、2 mg/kgのhu8E11v2-vcPNU、ならびに2 mg/kgおよび10 mg/kgのhu8E11v2-PNUで達成された。

30

【0479】

S. LoVo 結腸がん細胞株異種移植片における抗LgR5抗体-薬物複合体の有効性

抗LgR5 ADCの有効性を、LoVo 結腸がん異種移植片モデルを使用して調査した。LoVo細胞は、APC突然変異を有する結腸直腸腺がん細胞株（ATCC番号CCL 229）であり、亜系LoVoX1.1をマウスにおける最適な成長のために誘導した。簡潔に述べると、マウスにLoVo細胞を播種した。腫瘍が成長し始めると、望ましい成長速度を有する腫瘍を採取した。腫瘍を分割し、培養により成長させて、細胞株LoVoX1.1を樹立した。LgR5は、LoVoX1.1細胞において発現され、それをマイクロアレイ、TaqMan（登録商標）定量RT-PCR、インサイツハイブリダイゼーション、FACS、およびウェスタンブロットによって確認した。HBSS-マトリゲル中、500万個のLoVoX1.1細胞をC.B-17 SCIDマウスの背側面に皮下注射し、接種から11日後のマウスに、2 mg/kgのhu8E11v2-vcMMAE抗体-薬物複合体、2 mg/kgのhu8E11v2-vcPNU、2 mg/kgのhu8E11v2-アセタール-PNU、または2 mg/kgのhu8E11v2-PNU、または2 mg/kgのヒト化抗gD 5B6-vcPNU対照抗体-薬物複合体、2 mg/kgのヒト化抗gD 5B6-アセタール-PNU対照抗体-薬物複合体、または2 mg/kgのヒト化抗gD 5B6-PNU対照抗体-薬物複合体の単回静脈内注射、またはピヒクル（ヒスチジン緩衝液：20 mMのヒスチジン酢酸塩、240 mMのショ糖

40

50

、0.02% Tween 20 (pH 5.5)) 単独による単回静脈内注射を行った (n = 1 群当たり 10 匹のマウス)。注射の 1、7、および 14 日後、抗体の存在を PK 採血によって確認した。

【0480】

図 30 に示されるように、この実験において、ある特定の対照抗体は、実質的な腫瘍成長阻害を示すようであった (2 mg / kg のヒト化抗 g D 5 B 6 - v c P N U および 2 mg / kg のヒト化抗 g D 5 B 6 - アセタール - P N U 対照抗体 - 薬物複合体を参照されたい)。

【0481】

先の実験において対照抗体の非特異的な効果が見られたので、LoVoX1.1 結腸直腸腺がんモデルを、異なる対照抗体 - 薬物複合体 (LoVo 細胞の表面上で発現されない異なる抗原に結合する) を用いて、および腫瘍細胞上の可能性のある非特異的な抗体結合部位を遮断するための過剰の抗 g D 対照抗体の投与を用いて、試験した。HBSS - マトリゲル中、500 万個の LoVoX1.1 細胞を C.B - 17 SCID マウスの背側面に皮下注射し、接種から 7 日後のマウスに、10 mg / kg の hu8E11v2 - アセタール - P N U 抗体 - 薬物複合体、または 10 mg / kg のチオAb - アセタール - P N U 対照抗体 - 薬物複合体、またはピヒクル (50 mM のリン酸ナトリウム、240 mM のシヨ糖、0.02% Tween 20 (pH 7)) 単独の単回静脈内注射を与えた (n = 1 群当たり 5 匹のマウス)。加えて、マウスに、30 mg / kg のヒト化抗 g D 対照抗体 (腹腔内) を、試験抗体の投与と同日であるが、その 4 時間前から開始して、研究の終了まで週 1 回投与した。

10

20

【0482】

図 31 に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、10 mg / kg の hu8E11v2 - アセタール - P N U により達成され、対照抗体は、腫瘍成長を阻害しなかった。

【0483】

T.D5124 膵臓がん異種移植片における抗 LgR5 抗体 - 薬物複合体の有効性

YW353 抗 LgR5 ADC の有効性を、 β - カテニン突然変異を有する D5124 膵臓がん異種移植片モデルを使用して調査した。LgR5 は、D5124 腫瘍において高度に発現され、それをマイクロアレイ、Ta q M a n (登録商標) 定量 RT - P C R、インサイツハイブリダイゼーション、F A C S、およびウェスタンブロットによって確認した。20 ~ 30 mm³ の D5124 腫瘍断片を N C R ヌードマウスの背側面領域の皮下に埋め込み、移植の 26 日後、マウスに、1 mg / kg の huYW353 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、1 mg / kg の huYW353 - v c P B D 抗体 - 薬物複合体、または 1 mg / kg のヒト化抗 g D 5 B 6 - v c P B D 対照抗体 - 薬物複合体の単回静脈内注射、またはピヒクル (ヒスチジン緩衝液: 20 mM のヒスチジン酢酸塩、240 mM のシヨ糖、0.02% Tween 20 (pH 5.5)) 単独による単回静脈内注射を行った (n = 1 群当たり 9 匹のマウス)。注射の 1、7、および 14 日後、抗体の存在を PK 採血によって確認した。

30

【0484】

図 32 に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、1 mg / kg の huYW353 - v c M M A E および 1 mg / kg の huYW353 - v c P B D により達成された。1 mg / kg の huYW353 - v c P B D で処置されたマウスのうちの 1 匹は、完全寛解を示した (すなわち、マウスは、試験の終了時に検出可能な腫瘍を何ら有しなかった)。

40

【0485】

別個の実験において、hu8E11v2 抗 LgR5 ADC を、D5124 膵臓がん異種移植片モデルを使用して調査した。20 ~ 30 mm³ の D5124 腫瘍断片を N C R ヌードマウスの背側面領域の皮下に埋め込み、移植の 22 日後、マウスに、2 mg / kg の hu8E11v2 - v c M M A E 抗体 - 薬物複合体、2 mg / kg の hu8E11v2 - v c P B D 抗体 - 薬物複合体、または 2 mg / kg のヒト化抗 g D 5 B 6 - v c P B D 対照抗体 - 薬物複合体の単回静脈内注射、またはピヒクル (ヒスチジン緩衝液: 20 mM

50

のヒスチジン酢酸塩、240 mMのショ糖、0.02% Tween 20 (pH 5.5)) 単独による単回静脈内注射を行った (n = 1 群当たり 8 匹のマウス)。

【0486】

図33に示されるように、実質的な腫瘍成長阻害が、2 mg/kgのhu8E11v2 - vcMMAEにより達成され、腫瘍退縮が、2 mg/kgのhu8E11v2 - vcPBDにより達成された。

【0487】

U. LoVoX1.1 結腸がん細胞株異種移植片における抗LgR5抗体 - 薬物複合体の有効性

抗LgR5 ADCの有効性を、LoVoX1.1 結腸がん異種移植片モデルを使用して調査した。LoVo細胞は、APC突然変異を有する結腸直腸腺がん細胞株 (ATCC 番号CCL 229) であり、亜系LoVoX1.1をマウスにおける最適な成長のために誘導した。簡潔に述べると、マウスにLoVo細胞を播種した。腫瘍が成長し始めると、望ましい成長速度を有する腫瘍を採取した。腫瘍を分割し、培養により成長させて、細胞株LoVoX1.1を樹立した。LgR5は、LoVoX1.1細胞において発現され、それをマイクロアレイ、TaqMan (登録商標) 定量RT-PCR、インサイツハイブリダイゼーション、FACS、およびウェスタンブロットによって確認した。HBSS - マトリゲル中、500万個のLoVoX1.1細胞をC.B-17 SCIDマウスの背側に皮下注射し、接種から11日後のマウスに、2 mg/kgのhu8E11v2 - vcMMAE抗体 - 薬物複合体、2 mg/kgのhu8E11v2 - vcPBD抗体 - 薬物複合体、または2 mg/kgのヒト化抗gD 5B6 - vcPBD対照抗体 - 薬物複合体の単回静脈内注射、またはビヒクル (ヒスチジン緩衝液: 20 mMのヒスチジン酢酸塩、240 mMのショ糖、0.02% Tween 20 (pH 5.5)) 単独による単回静脈内注射を行った (n = 1 群当たり 10 匹のマウス)。注射の1、7、および14日後、抗体の存在をPK採血によって確認した。

10

20

【0488】

図34に示されるように、完全な腫瘍成長阻害が、2 mg/kgのhu8E11v2 - vcPBDにより達成された。

【0489】

上述の発明は、明確な理解のための例示説明および例としてある程度詳細に記載されたが、これらの説明および例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書で引用される全ての特許および科学文献の開示は、参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる。

30

配列表

配 列 番 号	説明	配列
1	h u κ_{1V}	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S V L Y S S N N K N Y L A W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P F T F G Q G T K V E I K R
2	h u V H ₁	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y Y I H W V R Q A P G Q G L E W I G W I N P G S G N T N Y A Q K F Q G R V T I T R D T S T S T A Y L E L S S L R S E D T A V Y Y C A R F D Y W G Q G T L V T V S S
3	m u 8 E 1 1 軽鎖 可変領域	N I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D N Y G N S F M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P A R F S G S G S R T D F T L T I D P V E A D D A A T Y Y C Q Q N Y E D P F T F G S G T K V E I K R
4	m u 8 E 1 1 重鎖 可変領域	Q V Q L Q Q S G T E L M K P G A S V K I S C K A T G Y T F S A Y W I E W I K Q R P G H G L E W I G E I L P G S D S T D Y N E K F K V K A T F S S D T S S N T V Y I Q L N S L T Y E D S A V Y Y C A R G G H Y G S L D Y W G Q G T T L K V S S
5	h u 8 E 1 1 . v 1 軽鎖可変領域	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C R A S E S V D N Y G N S F M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q N Y E D P F T F G Q G T K V E I K R
6	h u 8 E 1 1 . v 1 重鎖可変領域	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F S A Y W I E W V R Q A P G Q G L E W I G E I L P G S D S T D Y N E K F K V R V T I T S D T S T S T V Y L E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G G H Y G S L D Y W G Q G T L V T V S S

10

20

30

40

7	h u 8 E 1 1 . v 2 軽鎖可変領域	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C R A S E S V D N Y G N S F M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q N Y E D P F T F G Q G T K V E I K R
8	h u 8 E 1 1 . v 2 重鎖可変領域	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F S A Y W I E W V R Q A P G Q G L E W I G E I L P G S D S T D Y N E K F K V R A T F T S D T S T S T V Y L E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G G H Y G S L D Y W G Q G T L V T V S S
9	h u 8 E 1 1 . v 3 軽鎖可変領域	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C R A S E S V D N Y G N S F M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P D R F S G S G S R T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q N Y E D P F T F G Q G T K V E I K R
1 0	h u 8 E 1 1 . v 3 重鎖可変領域	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F S A Y W I E W V R Q A P G Q G L E W I G E I L P G S D S T D Y N E K F K V R V T I T S D T S T S T V Y L E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G G H Y G S L D Y W G Q G T L V T V S S
1 1	h u 8 E 1 1 . v 4 軽鎖可変領域	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C R A S E S V D N Y G N S F M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P D R F S G S G S R T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q N Y E D P F T F G Q G T K V E I K R
1 2	h u 8 E 1 1 . v 4 重鎖可変領域	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F S A Y W I E W V R Q A P G Q G L E W I G E I L P G S D S T D Y N E K F K V R A T F T S D T S T S T V Y L E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G G H Y G S L D Y W G Q G T L V T V S S
1 3	h u 8 E 1 1 . v 5 軽鎖可変領域	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C R A S E S V D N Y G N S F M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y L A S N L E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q N Y E D P F T F G Q G T K V E I K R
1	h u 8 E 1 1 . v	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G

10

20

30

40

4	5 重鎖可変領域	YTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE I LPGSDSTDY NEKFKVRVTI TRDTSTS TAY LELSSLRSED TAVYYCARGG HY GSLDYWGQ GTLVTVSS
1 5	h u 8 E 1 1 . v 6 軽鎖可変領域	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRAS ESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL L IYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTL TIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TF GQGTKVEI KR
1 6	h u 8 E 1 1 . v 6 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASG YTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE I LPGSDSTDY NEKFKVRVTI TADTSTS TAY LELSSLRSED TAVYYCARGG HY GSLDYWGQ GTLVTVSS
1 7	h u 8 E 1 1 . v 7 軽鎖可変領域	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRAS ESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL L IYLASNLES GVPDRFSGSG SRTDFTL TIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TF GQGTKVEI KR
1 8	h u 8 E 1 1 . v 7 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASG YTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE I LPGSDSTDY NEKFKVRVTI TRDTSTS TAY LELSSLRSED TAVYYCARGG HY GSLDYWGQ GTLVTVSS
1 9	h u 8 E 1 1 . v 8 軽鎖可変領域	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRAS ESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL L IYLASNLES GVPDRFSGSG SRTDFTL TIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TF GQGTKVEI KR
2 0	h u 8 E 1 1 . v 8 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASG YTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE I LPGSDSTDY NEKFKVRVTI TADTSTS TAY LELSSLRSED TAVYYCARGG HY GSLDYWGQ GTLVTVSS
2 1	m u 3 G 1 2 軽鎖 可変領域	DVVMQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSS QSLV HSNNGNTYLQW YLQKPGQSPK L

10

20

30

40

		LIYKVS NRF SGVPDR FSGS GSGTDFT LKI SRVEAEDLGI YFCSQSTHFP YT FGGGTKLE IKR
2 2	mu 3 G 1 2 重鎖 可変領域	QVQLQQPGAE MVKPGASVKL SCKASV DTFN SYWMHWVKQR PGQGLEWIGE I NPSNGRRTNY IEKFKNRATV TVDKSSS TAF MQLSSLTSED SAVYYCATGW YF DVWGAGTT VTVSS
2 3	mu 2 H 6 軽鎖可 変領域	DIVMTQSPSS LTVTAGEKVT MSCKSS QSLL NSGNQKNYLT WFQQKPGQPP K LLIYWASTR ESGVPDRFTG GSGTDF TLT ISNVQAEDLA VYYCQNDYSF PF TFGQGTKV EIKR
2 4	mu 2 H 6 重鎖可 変領域	EVQLQQSGPE LVKPGTSMKI SCKASG YSFT GYTMNWVKQS HKNGLEWIGL I NCYNGGTNY NQKFKGKATL TVDKSSS TAF MELLSSLTSED SAVYYCARGG ST MITPRFAY WGQGT LVTVS S
2 5	YW 3 5 3 軽鎖可 変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRAS QDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS A SFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISS LQP EDFATYYCQQ SYTTPPTFGQ GT KVEIKR
2 6	YW 3 5 3 重鎖可 変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASG FTFT SYSISWVRQA PGKGLEWVAE I YPPGGYTDY ADSVKGRFTI SADTSKN TAY LQMNSLRAED TAVYYCAKAR LF FDYWGQGT LVTVSS
2 7	mu 8 E 1 1 H VR L 1	RASESVDNYG NSF MH
2 8	mu 8 E 1 1 H VR L 2	LASNLES
2 9	mu 8 E 1 1 H VR L 3	QQNYEDPFT
3 0	mu 8 E 1 1 H VR H 1	GYTFSAYWIE

10

20

30

40

3 1	m u 8 E 1 1 H VR H2	E I L P G S D S T D Y N E K F K V
3 2	m u 8 E 1 1 H VR H3	G G H Y G S L D Y
3 3	H u 8 E 1 1 軽鎖 (LC) フレーム ワーク1 (FR1)	D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C
3 4	H u 8 E 1 1 L C FR2	W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y
3 5	H u 8 E 1 1 . v 1 LC FR3 H u 8 E 1 1 . v 2 LC FR3 H u 8 E 1 1 . v 5 LC FR3 H u 8 E 1 1 . v 6 LC FR3	G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C
3 6	H u 8 E 1 1 . v 3 LC FR3 H u 8 E 1 1 . v 4 LC FR3 H u 8 E 1 1 . v 7 LC FR3 H u 8 E 1 1 . v 8 LC FR3	G V P D R F S G S G S R T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C
3 7	H u 8 E 1 1 L C FR4	F G Q G T K V E I K R
3 8	H u 8 E 1 1 重鎖 (HC) フレーム ワーク1 (FR1)	E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S
3 9	H u 8 E 1 1 H C FR2	W V R Q A P G Q G L E W I G
4 0	H u 8 E 1 1 . v 1 HC FR3 H u 8 E 1 1 . v 3 HC FR3	R V T I T S D T S T S T V Y L E L S S L R S E D T A V Y Y C A R

10

20

30

40

4 1	Hu8E11. v 2 HC FR3 Hu8E11. v 4 HC FR3	RATFTSDTST STVYLELSSL RSEDTA VYYC AR
4 2	Hu8E11. v 5 HC FR3 Hu8E11. v 7 HC FR3	RVTITRDTST STAYLELSSL RSEDTA VYYC AR
4 3	Hu8E11. v 6 HC FR3 Hu8E11. v 8 HC FR3	RVTITADTST STAYLELSSL RSEDTA VYYC AR
4 4	Hu8E11 H C FR4	WGQGTLVTVS S
4 5	mu3G12 H VR L1	RSSQSLVHSN GNTYLQ
4 6	mu3G12 H VR L2	KVSNRFS
4 7	mu3G12 H VR L3	SQSTHFPYT
4 8	mu3G12 H VR H1	VDTFNSYWMH
4 9	mu3G12 H VR H2	EINPSNGRTN YIEKFKN
5 0	mu3G12 H VR H3	GWYFDV
5 1	mu2H6 HV R L1	KSSQSLLNSG NQKNYLT
5 2	mu2H6 HV R L2	WASTRES
5 3	mu2H6 HV R L3	QNDYSFPFT
5 4	mu2H6 HV R H1	GYSFTGYTMN
5 5	mu2H6 HV R H2	LINCYNNGGTN YNQKFKG

10

20

30

40

5	m u 2 H 6 HV	GGSTMITPRF AY
6	R H 3	
5	YW 3 5 3 HV	RASQDVSTAV A
7	R L 1	
5	YW 3 5 3 HV	SASFLYS
8	R L 2	
5	YW 3 5 3 HV	QQSYTTPPT
9	R L 3	
6	YW 3 5 3 HV	GFTFTSYSIS
0	R H 1	
6	YW 3 5 3 HV	EIYPPGGYTD YADSVKG
1	R H 2	
6	YW 3 5 3 HV	ARLFFDY
2	R H 3	
6	h u 8 E 1 1 . v 2 軽鎖	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRAS ESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL L IYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTL TIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TF GQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQ LK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWK VDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S STLTLISKADY EKHKVYACEV THQG LSSPVT KSFNRGEC
6	h u 8 E 1 1 . v 2 重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASG YTFS AYWIEWVRQA PGQGLEWIGE I LPGSDSTDY NEKFKVRATF TSDTSTS TVY LELSSLRSED TAVYYCARGG HY GSLDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFP LA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPE PVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSG L YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVN HKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISR TPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV D GVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVL TVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP AP

10

20

30

40

		IEKTISKA KGQPREPQVY TLPSPREE MT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWE SNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYS K LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALH NHYTQK SLSLSPGK	
6 5	YW353軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRAS QDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS A SFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISS LQP EDFATYYCQQ SYTTPPTFGQ GT KVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSG TA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNA LQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTL T LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSP VTKSFN RGEC	10
6 6	YW353重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASG FTFT SYSISWVRQA PGKGLEWVAE I YPPGGYTDY ADSVKGRFTI SADTSKN TAY LQMNSLRAED TAVYYCAKAR LF FDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLA PS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPV TVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLY S LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHK PSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTP EVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG V EVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTV LHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IE KTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMT KN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESN GQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKL T VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNH YTQKSL SLSLSPGK	20 30 40
6 7	ヒトLgR5前駆 体; LGR5__ヒ トNP__0036 58; シグナル配	MDTSRLGVLL SLPVLLQLAT GGSSPR SGVL LRGCPHCHC EPDGRMLLRV D CSDLGLSEL PSNLSVFTSY LDLSMNN ISQ LLPNPLPSLR FLEELRLAGN AL	

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

		TDVPVQ AFRSLSALQA MTLALNKIHH IADHAFGNLS SLVVLHLHNN RIHSLG KKCF DGLHSLETLD LNYNNLDEFP T AIKTLSNLK ELGFHSNNIR SIPERAF VGN PSLITIHFYD NPIQFVGISA FQ HLP E LRTL TLNGASQITE FPDLTGTA TL ESLTLTGAKI SSLPQTVCDQ LPN LQVLDLS YNLLEDLPSL SGCQKLQKI D LRHNEIYEIK GGTFQQLFNL RSLN LARNKI AIIHPNAFST LPSLIKLDLS SNLLSSF PVT GLHGLTHLKL TGNRAL QSLI PSANFPELKI IEMPYAYQCC A FGGCENVYK IPNQWNKDDS SSVDDL R KKD AGLFQVQDER DLEDFLLD FE ED LKVLHSVQ CSPPPGPFKP CEHLFGSW LI RIGVWTTAVL ALSCNALVAF TVF RTPLYIS SIKLLIGVIA VVDILMGVS S AILAVVD TFT FGSFAQHGA WEGG IGCQIV GFLSIFASES SVFLLT LAAL ERGF SVKCSS KFEMKAPLSS LKAIIL LCVL LALT IATVPL LGGSEYNASP L CLPLPFGEP STTGYMVALV LLNSLCF LIM TIAYTRLYCS LEKG ELENLW DC SMVKHTAL LLFTNCILYC PVAFLSFS SL LNLTFISPEV IKFILLVIVP LPA CLNPLLY IVFNPHFKED MGSLGKQTR F WTRAKHPSLL SINSDDVEKR SCDS TQALVS FTHASIA YDL PSDSGSSPAY PMTESCHLSS VAFVPCL	10 20 30
7 2	マウスL g R 5 前 駆体 ; LGR 5 __ マウスNP__0 3 4 3 2 5 ; シグナ ル配列=アミノ酸 1 ~ 2 1	MDTSCVHMLL SLLALLQLVA AGSSPG PDAI PRGCP SHCHC ELDGRMLLRV D CSDLGLSEL PSNLSVFTSY LDL SMNN ISQ LPASLLHRLC FLEELRLAGN AL THIPKGAF TGLHSLKVLM LQNNQLRQ VP EEALQNL RSL QSLRLDANHI SYV PPSCFSG LHSLRHLWLD DNALTDVPV	40

[illegible]

		IADYAFGNLS SLVVLHLHNN RIHSLG KKCF DGLHSLETLD LNYNNLDEFP T AIKTLSNLK ELGFHSNNIR SIPERAF VGN PSLITIHFYD NPIQFVGVS FQ HLPRLTL TLNGASHITE FPHLTGTA TL ESLLTLTGAKI SSLPQAVCDQ LPN LQVLDLS YNLLEDLPSL SGCQKLQKI D LRHNEIYEIK GSTFQQLFNL RSLN LAWNKI AIIHPNAFST LPSLIKLDLS SNLLSSFPVT GLHGLTHLKL TGNRAL QSLI PSANFPELKI IEMPSAYQCC A FGGCENVYK ISNQWNKDDG NSVDDLH KKD AGLFQVQDER DLEDFLLDFE ED LKALHSVQ CSPSPGPFKP CEHLFGSW LI RIGVWTTAVL ALSCNALVAL TVF RTPLYIS SIKLLIGVIA VVDILMGVS S AVLAAVDAFT FGRFAQHGAW WEDG IGCQIV GFLSIFASES SIFLLTLAAL ERGFSVKCSS KFEVKAPLFS LRAIVL LCVL LALTATIPL LGGSKYNASP L CLPLPFGEPT STTGYMVALV LLNSLCF LIM TIAYTKLYCS LEKGELENLW DC SMVKHIAL LLFANCILYC PVAFLSFS SL LNLTFISPDV IKFILLVIVP LPS CLNPLLY IVFNPHFKED MGS LGKHTR F WMRSKHASLL SINSDDVEKR SCES TQALVS FTHASIAAYDL PSTSGASPAY PMTESCHLSS VAFVPCL	10 20 30
74	hu8E11. v2 V205Cシステイン操作された軽鎖 (Igκ)	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRAS ESVD NYGNSFMHWY QQKPGQPPKL L IYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTL TIS SLQAEDVAVY YCQQNYEDPF TF GQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQ LK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWK VDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S STLTLSKADY EKHKVYACEV THQG	40

40

		NH Y T Q K S L S L S P G K
7 7	Y W 3 5 3 V 2 0 5 C システイン 操作された軽鎖 (I g κ)	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P C T K S F N R G E C
7 8	Y W 3 5 3 A 1 1 8 C システイン 操作された重鎖 (I g G 1)	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T S Y S I S W V R Q A P G K G L E W V A E I Y P P G G Y T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K A R L F F D Y W G Q G T L V T V S S C S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
7 9	Y W 3 5 3 S 4 0 0 C システイン 操作された重鎖 (I g G 1)	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T S Y S I S W V R Q A P G K G L E W V A E I Y P P G G Y T D Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K A R L F F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K

10

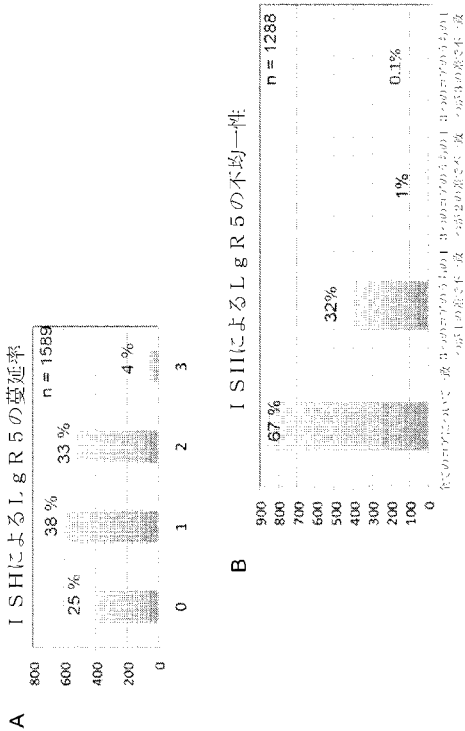
20

30

40

		PSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTP EVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG V EVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTV LHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IE KTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMT KN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESN GQPENNY KTTTPVLDCD GSFFLYSKL T VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNH YTQKSL SLSPGK	10
8 0	V205Cシステム操作された軽鎖定常領域 (Igκ)	TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVC LLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN S QESVTEQDS KDSTYSLST LTLSKAD YEK HKVYACEVTH QGLSSPCTKS FN RGEC	20
8 1	A118Cシステム操作された重鎖定常領域 (IgG1)	CSTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALG CLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV H TFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLG TQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KS CDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPP KP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HED PEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQY N STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKC KVSNAK LAPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFY PSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV L DSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFS CSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	30
8 2	S400Cシステム操作された重鎖定常領域 (IgG1)	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALG CLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV H TFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLG TQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KS CDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPP KP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HED PEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQY N STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKC	40

【図 3】

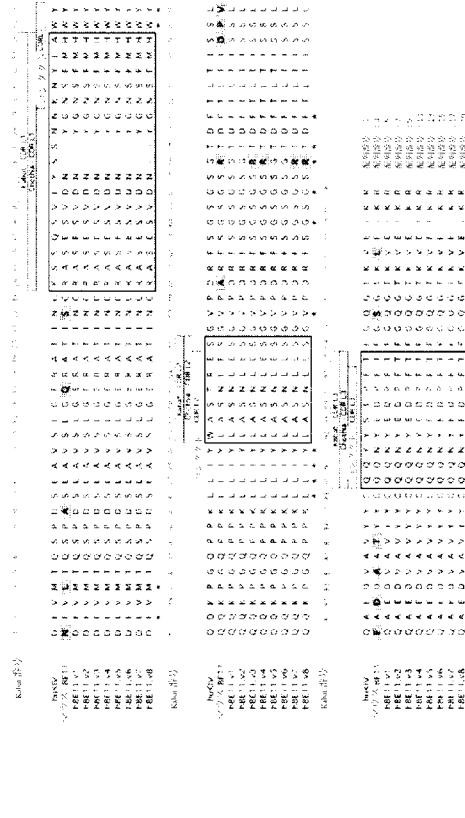


【図 4】

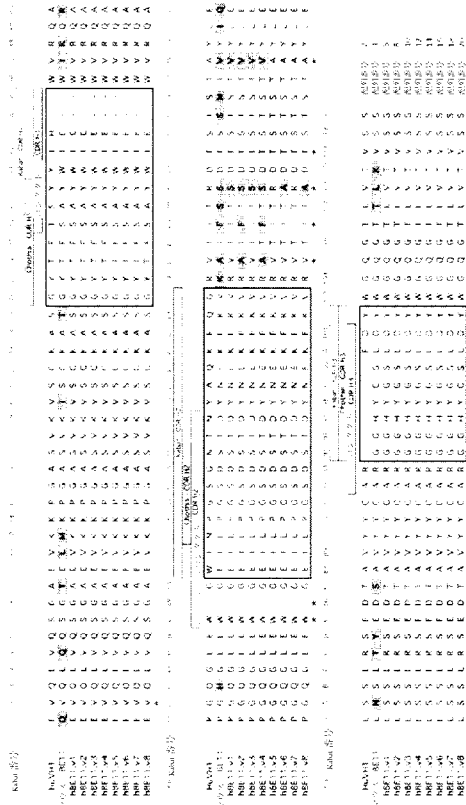
抗体	エピトープ領域	抗Lgr5モノクローナル抗体				IHC	ウェスタンブロット	親和性 (キヤンティド)
		ヒト	マウス	ラット	マウス			
YW353	22-123	+++	+++	+++	+++	陽性	陽性	1.6 nM
ch8E11	22-323	+++	+++	+++	+++	陽性	陽性	2.4 nM
hu8E11 v2	22-323	+++	+++	+++	+++	陽性	陽性	0.4 nM (Hu) 0.2 nM (Mu)
								0.307 nM (Hu) 0.6-0.6 nM (Mu) 2.4-2.8 nM (Hu)
2H6	324-423	++	nd.	nd.	++	NS	+++	208 nM
3G12	324-423	+++	nd.	nd.	+	NS	+++	72 nM

n, d. = not determined
NS = not significant

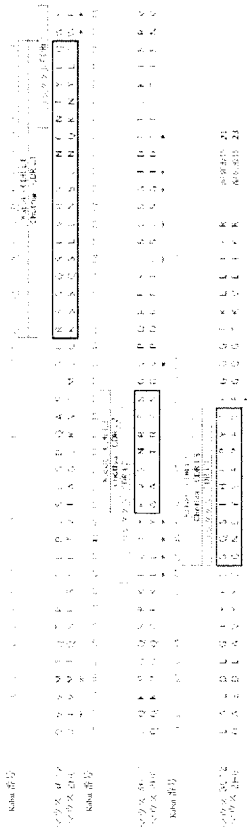
【図 5】



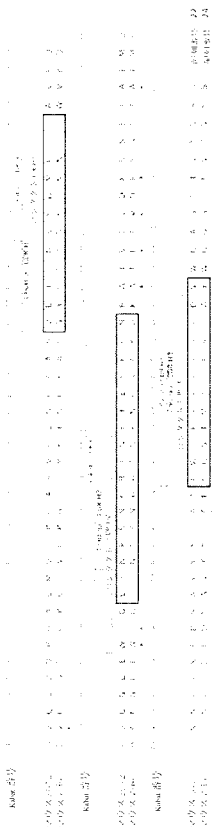
【図 6】



【図 7】



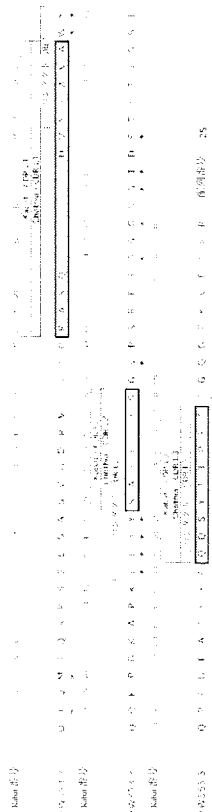
【図 8】



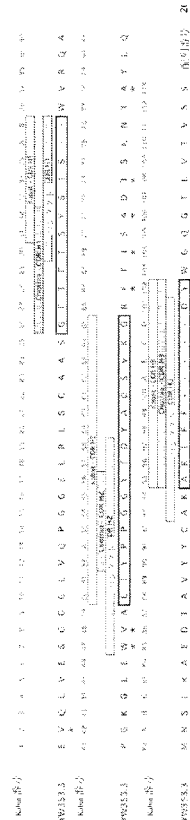
【図 9】

	VL (Gross V)	VH (Gross V)	$K_{max} (10^{-6} M^{-1} S^{-1})$	$K_{min} (10^{-6} S^{-1})$	KD(M)
hRE11.V1	CDR 9801F	CDR 9801F + 71S/78V	1.53	7.72	5.05
hRE11.V2	CDR 9801F	CDR 9801F + 67A/69F/71S/78V	7.79	8.53	3.10
hRE11.V3	CDR 9801F + 68R	CDR 9801F + 71S/78V	1.12	5.3	4.73
hRE11.V4	CDR 9801F	CDR 9801F + 67A/69F/71S/78V	2.54	9.22	3.63
hRE11.V5	CDR 9801F	CDR 9801F + 71R/78A	0.65	9.33	14.35
hRE11.V6	CDR 9801F	CDR 9801F + 71R/78A	1.43	20.2	14.13
hRE11.V7	CDR 9801F + 68R	CDR 9801F + 71R/78A	1.17	25.6	22.05
hRE11.V8	CDR 9801F	CDR 9801F + 71A/78A	2.42	21.7	8.97
hRE11	hRE11.V1	hRE11.VH	2.1	6.4	3.00

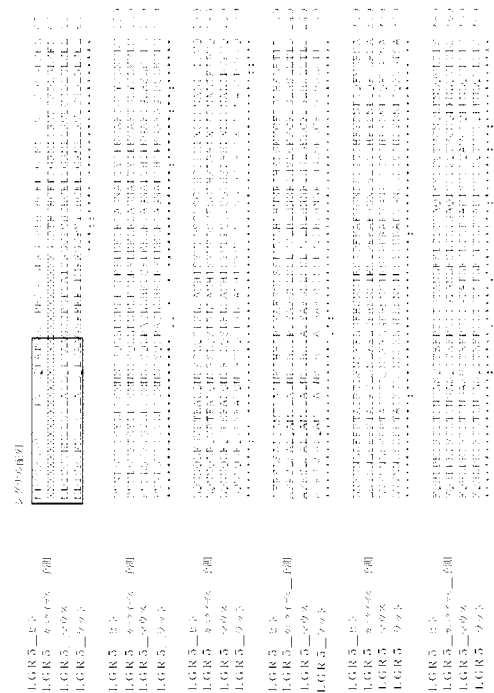
【図 10】



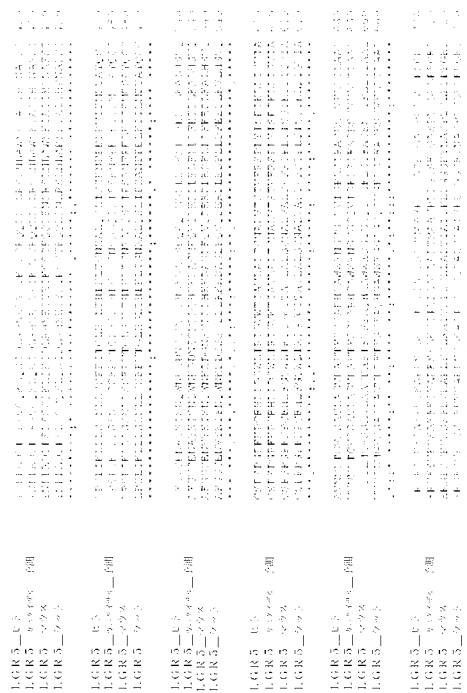
【図 1 1】



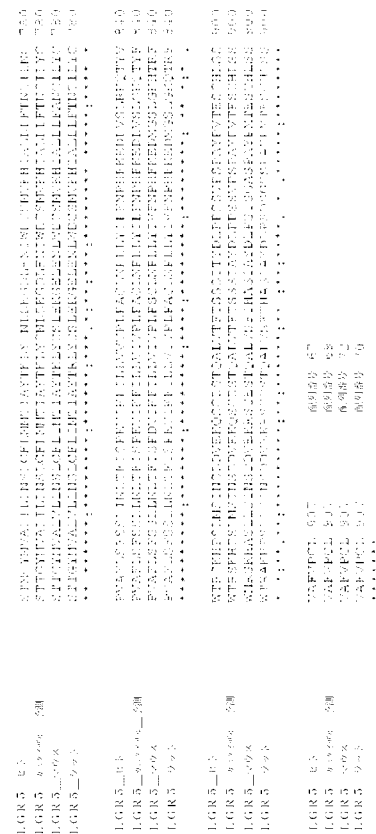
【図 1 2 A】



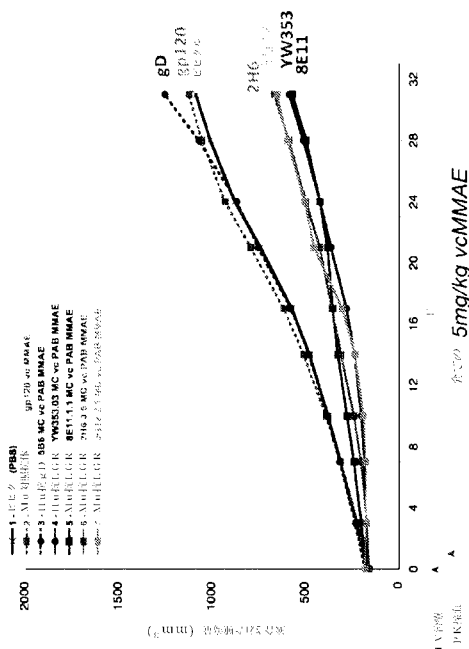
【図 1 2 B】



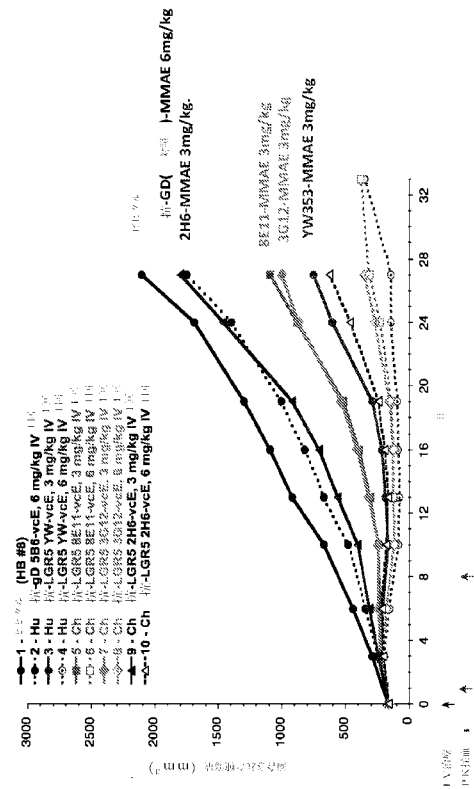
【図 1 2 C】



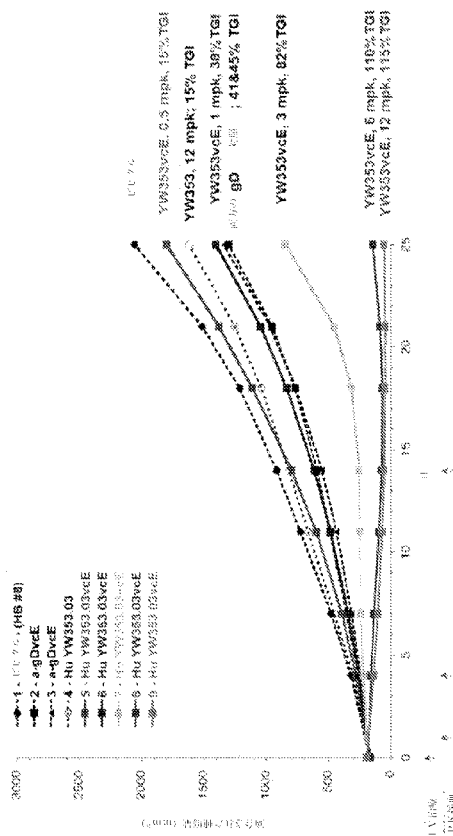
【図 13】



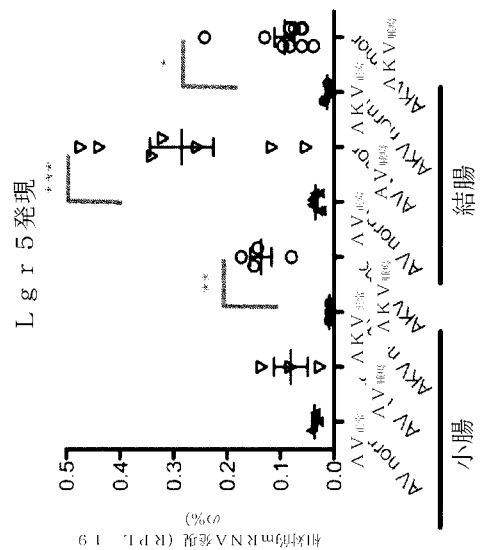
【図 14】



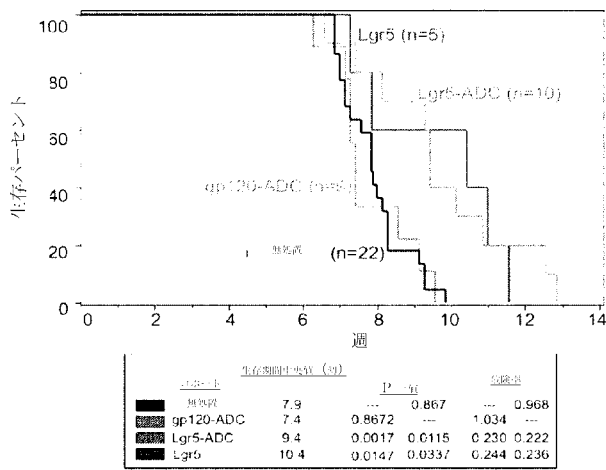
【図 15】



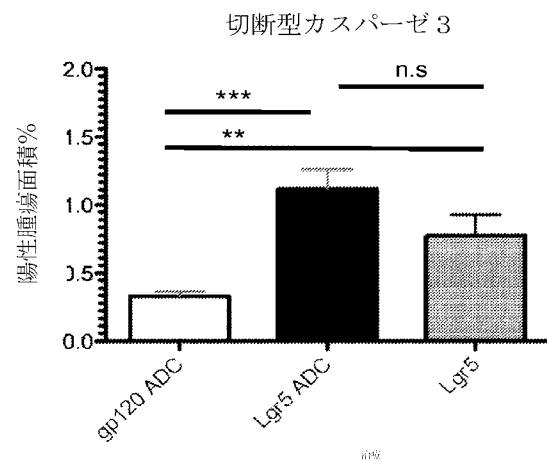
【図 16】



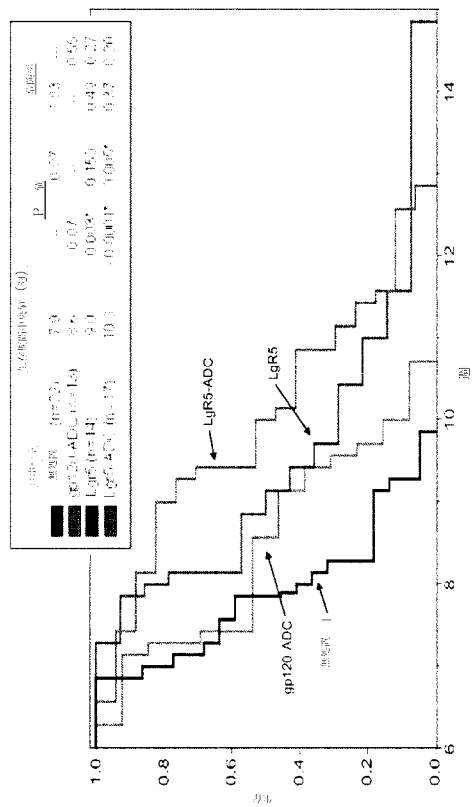
【図 17】



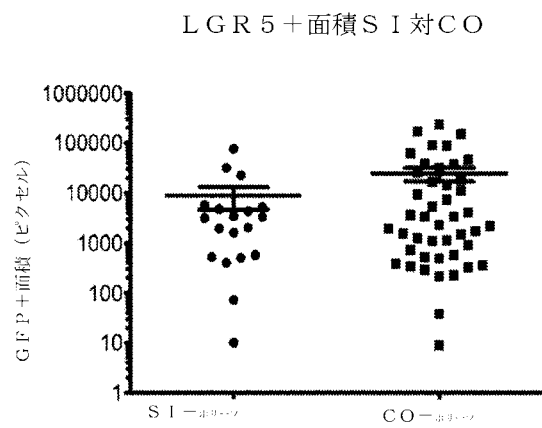
【図 18】



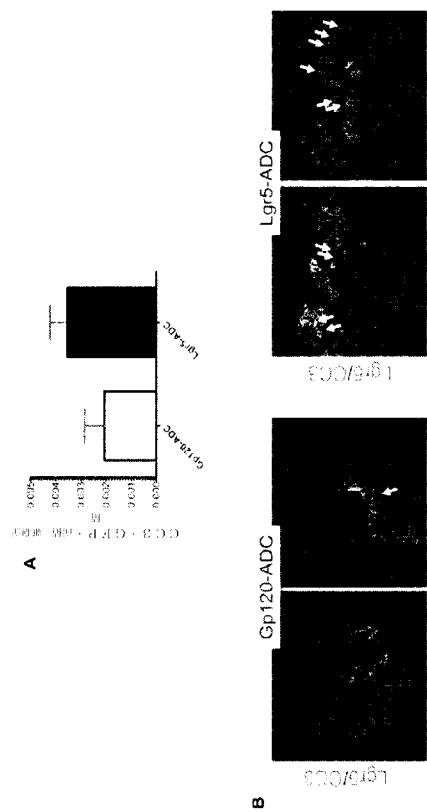
【図 19】



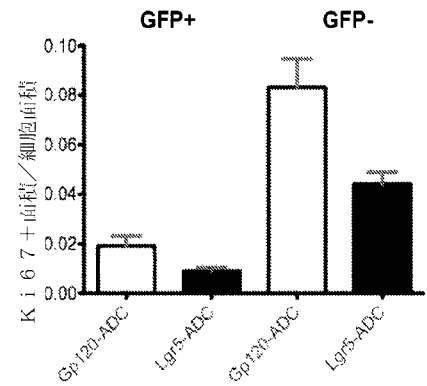
【図 20】



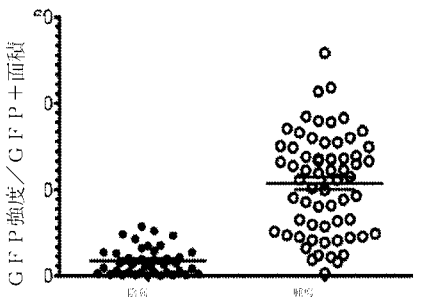
【 図 2 1 】



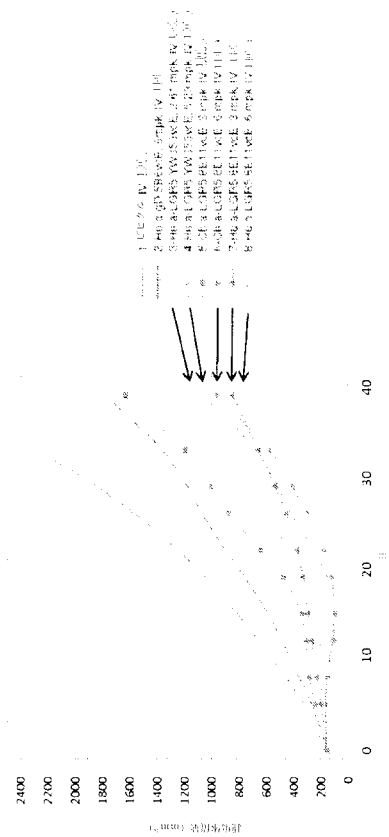
【 図 2 2 】



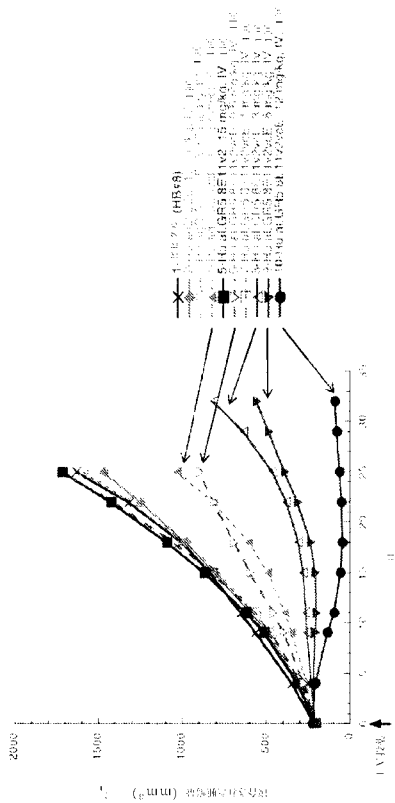
【 図 2 3 】



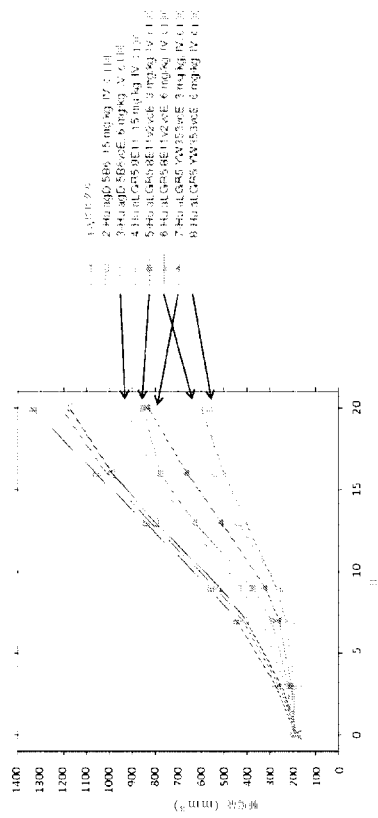
【 図 2 4 】



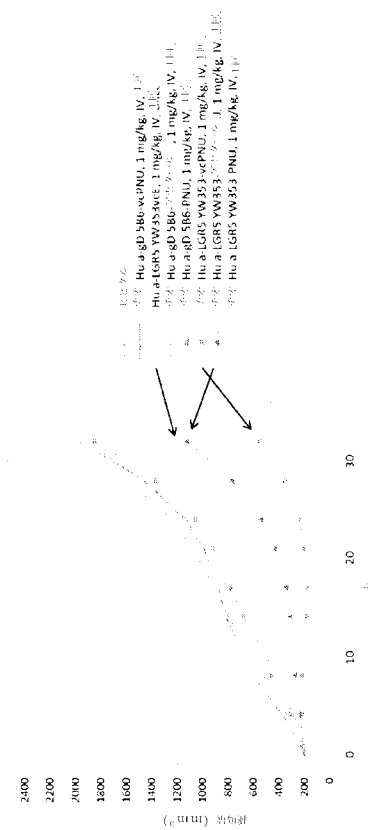
【 図 2 5 】



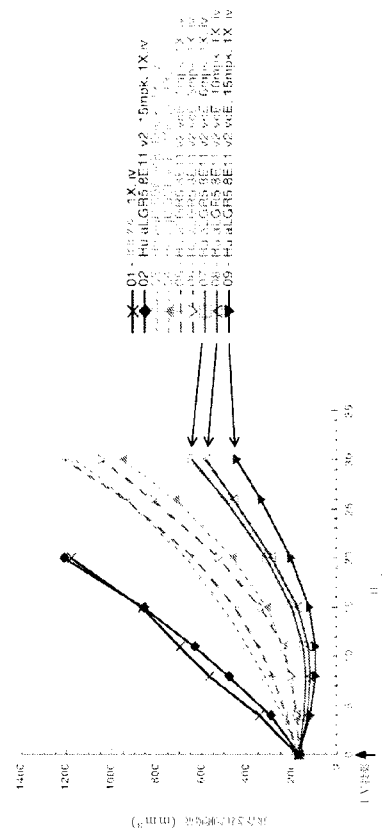
【 図 2 6 】



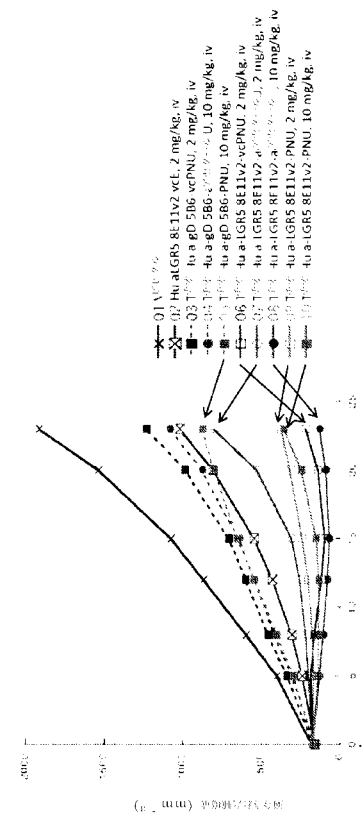
【 ㄨ 2 8 】



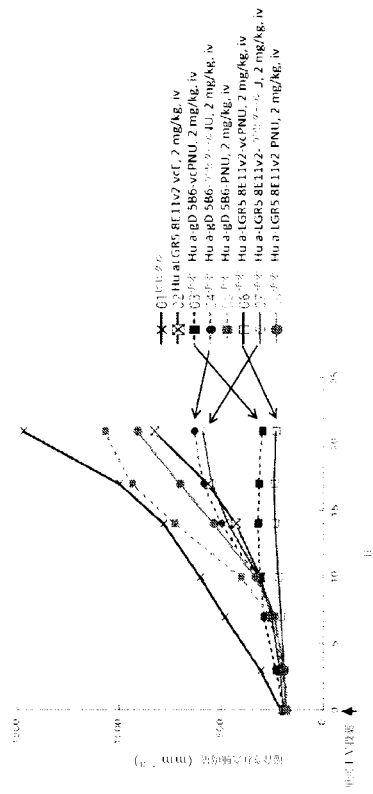
【 図 2 7 】



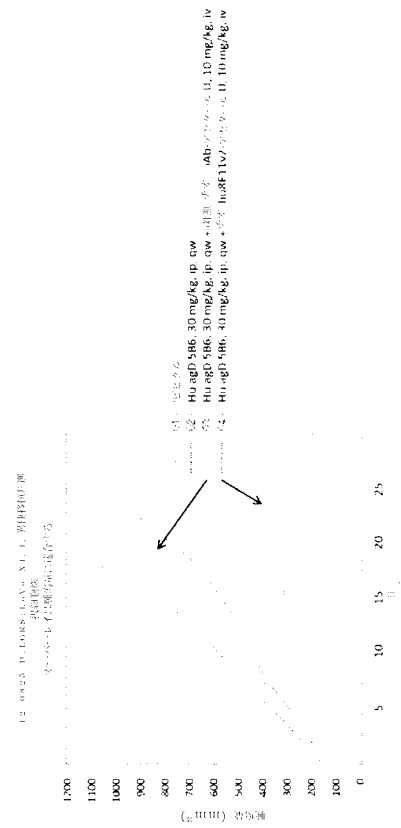
【 図 2 9 】



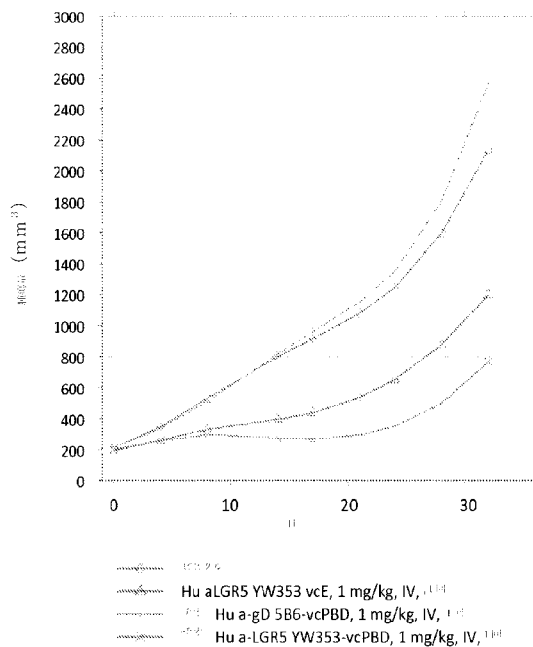
【図 30】



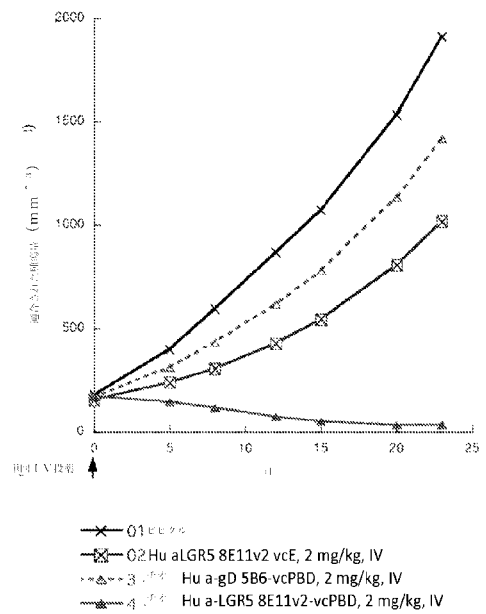
【図 31】



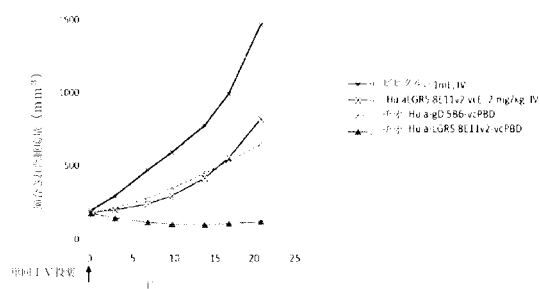
【図 32】



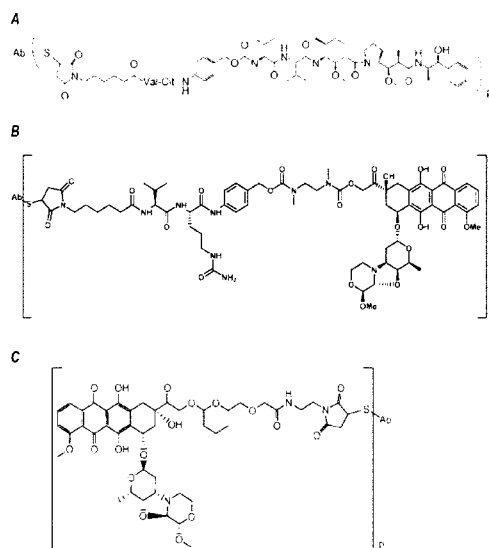
【図 33】



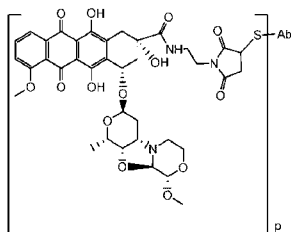
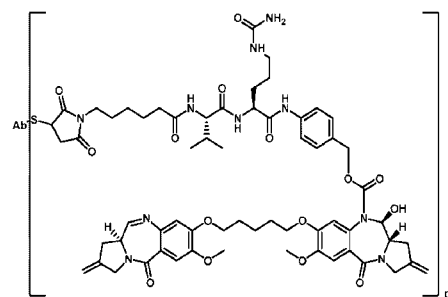
【図 3 4】



【図 3 5 - 1】



【図 3 5 - 2】

D**E**

【配列表】

2019030303000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年10月12日(2018.10.12)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載の発明。

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 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 C 0 8 6	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08		
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 K	38/07	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	38/07		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	47/68		
A 6 1 K	31/537	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	31/7034	(2006.01)	A 6 1 K	31/537		
A 6 1 K	31/551	(2006.01)	A 6 1 K	31/7034		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	31/551		
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D	
A 6 1 K	31/706	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A	
			A 6 1 K	31/706		

- (72)発明者 ボラキス, ポール
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 ボルソン, アンドリュー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 ヴィジ, ラジェッシュ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 ウー, イェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
- (72)発明者 リャン, ウェイ - チーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA05 DA14
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 BA02 CA25 CA44 CA46
4C076 AA95 CC27 CC42 EE41A EE59A FF70
4C084 AA02 AA13 AA19 BA01 BA23 BA32 BA41 BA50 CA59 MA02
NA05 NA15 NA20 ZB261 ZB262
4C085 AA14 AA15 AA16 AA25 BB36 CC23 DD62 EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 CB11 CB22 EA03 EA11 NA15 ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 BA11 BA41 BA51 DA76 EA28 EA51 FA10
FA74

【外国語明細書】
2019030303000001.pdf

专利名称(译)	抗LGR5抗体和免疫复合物		
公开(公告)号	JP2019030303A	公开(公告)日	2019-02-28
申请号	JP2018171781	申请日	2018-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ホンゴジョアン マオウェイコアン ポラキスポール ポルソンアンドリュウ ヴィジラジェッシュ ウーイエン リャンウェイチーン		
发明人	ホンゴ, ジョ-アン マオ, ウエイコアン ポラキス, ポール ポルソン, アンドリュウ ヴィジ, ラジェッシュ ウー, イエン リャン, ウエイ-チーン		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K16/46 C12N15/62 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K19/00 A61K45/00 A61K39/395 A61K38/07 A61K47/68 A61K48/00 A61K31/537 A61K31/7034 A61K31/551 G01N33/53 G01N33/574 A61K31/706		
CPC分类号	A61K47/6803 A61K47/6809 A61K47/6817 A61K47/6849 A61K47/6859 A61K47/6863 A61K2039/505 C07K16/28 C07K16/30 C07K16/3046 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/73 C07K2317/92 G01N33/6893 A61K47/50		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C07K16/46 C12N15/62.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K19/00 A61K45/00 A61K39/395.N A61K39/395.T A61K38/07 A61K47/68 A61K48/00 A61K31/537 A61K31/7034 A61K31/551 G01N33/53.D G01N33/574.A A61K31/706		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/CC42 4C076/EE41A 4C076/EE59A 4C076/FF70 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084 /AA19 4C084/BA01 4C084/BA23 4C084/BA32 4C084/BA41 4C084/BA50 4C084/CA59 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA15 4C084/NA20 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085 /AA16 4C085/AA25 4C085/BB36 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/CB11 4C086/CB22 4C086/EA03 4C086/EA11 4C086/NA15 4C086/ZB26 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA11 4H045/BA41 4H045/BA51 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA10 4H045/FA74		
优先权	61/618232 2012-03-30 US 61/683048 2012-08-14 US 61/778710 2013-03-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供抗LgR5抗体和免疫复合物以及使用它们的方法。抗体结合人LgR5的特定表位，并且对LgR5的亲合力为5nM或更低结合的免疫缀合物，包括抗体和细胞毒性剂。【选择图】无

特開2019-30303

(P2019-30303A)

(平成31年2月28日 (2019. 2. 28))

(51) Int. Cl.		F 1		(43) 公開日		平成31年2月28日 (2019. 2. 28)
C 1 2 N	15/13	(2006. 01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	テーパーコード (参考)
C O 7 K	16/28	(2006. 01)	C O 7 K	16/28		4 B O 6 4
C O 7 K	16/46	(2006. 01)	C O 7 K	16/46		4 B O 6 5
C 1 2 N	15/62	(2006. 01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C O 7 6
C 1 2 N	1/15	(2006. 01)	C 1 2 N	1/15		4 C O 8 4
						4 C O 8 5
審査請求 有		請求項の数 1		O L		外国語出願 (全 158 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-171781 (P2018-171781)	(71) 出願人	509012625
(22) 出願日	平成30年9月13日 (2018. 9. 13)		ジェネンテック、 インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2015-503644 (P2015-503644) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
原出願日	平成25年3月29日 (2013. 3. 29)	(74) 代理人	110002077
(31) 優先権主張番号	61/618, 232		園田・小林特許業務法人
(32) 優先日	平成24年3月30日 (2012. 3. 30)		ホンゴ、 ジョーアン
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
(31) 優先権主張番号	61/683, 048		8 0、 サウス サン フランシスコ、
(32) 優先日	平成24年8月14日 (2012. 8. 14)		ディーエヌエー ウェイ 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	マオ、 ウェイコアン
(31) 優先権主張番号	61/778, 710		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
(32) 優先日	平成25年3月13日 (2013. 3. 13)		8 0、 サウス サン フランシスコ、
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ディーエヌエー ウェイ 1
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗 L G R 5 抗体および免疫複合体