

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-526618

(P2017-526618A)

(43) 公表日 平成29年9月14日(2017.9.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B064
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C084
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C085
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 88 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-572315 (P2016-572315)
 (86) (22) 出願日 平成27年6月10日 (2015.6.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年12月8日 (2016.12.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/035111
 (87) 国際公開番号 W02015/191715
 (87) 国際公開日 平成27年12月17日 (2015.12.17)
 (31) 優先権主張番号 62/010,637
 (32) 優先日 平成26年6月11日 (2014.6.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 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
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 ポルソン, アンドリュー ジー,
 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
 (72) 発明者 マオ, ウェイコアン
 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
 最終頁に続く

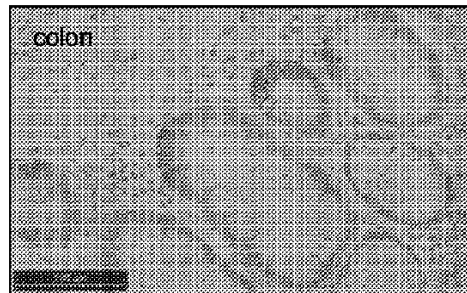
(54) 【発明の名称】 抗 L g R 5 抗体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は抗 L g R 5 抗体及びその使用方法を提供する。

【選択図】 図 5 A

FIG. 5A



【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、

(a) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、または

(b) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、前記抗体。

10

【請求項 2】

(a) (i) 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、(i i) 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、もしくは (i i i) (i) の V H 配列及び (i i) の V L 配列、または

(b) (i) 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、(i i) 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、もしくは (i i i) (i) の V H 配列と (i i) の V L 配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

20

【請求項 3】

配列番号 6 または配列番号 8 の V H 配列を含む請求項 1 または請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

配列番号 7 または配列番号 9 の V L 配列を含む先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5】

配列番号 6 の V H 配列及び配列番号 5 の V L 配列を含む、抗体。

【請求項 6】

配列番号 8 の V H 配列及び配列番号 7 の V L 配列を含む抗体。

【請求項 7】

モノクローナル抗体である先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗体。

30

【請求項 8】

マウス抗体、ウサギ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3、及び I g G 4 から選択される I g G である請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 1 0】

先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗体をコードする単離核酸。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の核酸を含む宿主細胞。

40

【請求項 1 2】

前記抗体が産生されるように請求項 1 1 に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体作製方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体及び細胞傷害性薬剤を含む、免疫複合体。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の免疫複合体及び薬学的に許容可能な担体を含む医薬製剤。

【請求項 1 5】

標識に結合した請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

50

【請求項 16】

前記標識が陽電子放出体である、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 17】

前記陽電子放出体が ^{89}Zr である、請求項 16 に記載の抗体。

【請求項 18】

生体試料中のヒト LgR5 の検出方法であって、前記抗 LgR5 抗体が前記ヒト LgR5 に結合するのを許容する条件下で、前記生体試料と請求項 1 ~ 9 及び請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の抗 LgR5 抗体とを接触させることと、前記抗 LgR5 抗体と前記生体試料の中のヒト LgR5 との間で複合体が形成されるかどうかを検出することと、を含む、前記方法。

10

【請求項 19】

前記抗 LgR5 抗体が請求項 4 または請求項 5 に記載の抗体である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記生体試料が結腸癌試料、大腸癌試料、小腸癌試料、子宮内膜癌試料、膵臓癌試料、または卵巣癌試料である、請求項 18 または請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

LgR5 陽性癌の検出方法であって、(i) LgR5 陽性癌を有する、または有することが疑われる対象に、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗 LgR5 抗体を含む標識抗 LgR5 抗体を投与することと、(ii) 前記対象中の前記標識抗 LgR5 抗体を検出することと、を含み、前記標識抗 LgR5 抗体の検出が前記対象における LgR5 陽性癌を識別する、前記方法。

20

【請求項 22】

前記標識抗 LgR5 抗体が、標識されている請求項 4 または請求項 5 に記載の抗体である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記標識抗 LgR5 抗体が陽電子放出体に結合した抗 LgR5 抗体を含む、請求項 21 または請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記陽電子放出体が ^{89}Zr である、請求項 23 に記載の方法。

30

【請求項 25】

癌患者が LgR5 陽性癌を有していることを特定する方法であって、前記抗 LgR5 抗体がヒト LgR5 に結合するのを許容する条件下で、前記患者由来の癌試料と、請求項 1 ~ 9 及び請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の前記抗 LgR5 抗体とを接触させることと、前記抗 LgR5 抗体と前記癌試料中のヒト LgR5 との間で複合体が形成されるかどうかを検出することと、を含む、前記方法。

【請求項 26】

前記抗 LgR5 抗体と前記癌試料中のヒト LgR5 との間の複合体が検出される場合に、前記癌患者が LgR5 陽性癌を有していると特定される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

抗 LgR5 抗体を含む免疫複合体を用いる治療に適した癌患者の選択方法であって、免疫組織化学 (IHC) を用いて前記患者由来の癌試料中の LgR5 発現レベルを決定することを含み、LgR5 発現レベルの上昇が、前記癌患者が抗 LgR5 抗体を含む免疫複合体 (immunocombination) を用いる治療から利益を得る可能性が高いことを示す、前記方法。

40

【請求項 28】

上昇した LgR5 発現レベルが IHC による 2+ または 3+ の染色である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

上昇した LgR5 発現レベルが IHC による 3+ の染色である、請求項 28 に記載の方

50

法。

【請求項 30】

請求項 1～9 及び請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の抗体を使用して IHC が実施される、請求項 27～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

抗 LgR5 抗体を含む免疫複合体を用いる治療に適した癌患者の選択方法であって、前記抗 LgR5 抗体がヒト LgR5 に結合するのを許容する条件下で、前記患者由来の癌試料と、請求項 1～9 及び請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の抗 LgR5 抗体とを接触させることと、前記抗 LgR5 抗体と前記癌試料中のヒト LgR5 との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、前記方法。

10

【請求項 32】

前記抗 LgR5 抗体と前記癌試料中のヒト LgR5 との間の複合体が検出される場合に前記癌患者が選択される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

癌患者の治療方法であって、前記患者に抗 LgR5 抗体を含む治療有効量の免疫複合体を投与することを含み、免疫組織化学 (IHC) を用いて、前記患者に由来する癌試料が高いレベルの LgR5 発現を有していると判定する、前記方法。

【請求項 34】

上昇した LgR5 発現レベルが、IHC による 2+ または 3+ の染色である、請求項 33 に記載の方法。

20

【請求項 35】

上昇した LgR5 発現レベルが IHC による 3+ の染色である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

請求項 1～9 及び請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の抗体を使用して IHC が実施される、請求項 33～35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

前記免疫複合体が、

(a) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、配列番号 56 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、配列番号 57 のアミノ酸配列を含む HVR-H3、配列番号 52 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、配列番号 53 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び配列番号 54 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、または

30

(b) 配列番号 73 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、配列番号 74 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、配列番号 75 のアミノ酸配列を含む HVR-H3、配列番号 70 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、配列番号 71 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び配列番号 72 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、または

(c) 配列番号 79 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、配列番号 80 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、配列番号 81 のアミノ酸配列を含む HVR-H3、配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び配列番号 78 のアミノ酸配列を含む HVR-L3、または

40

(d) 配列番号 85 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、配列番号 86 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、配列番号 87 のアミノ酸配列を含む HVR-H3、配列番号 82 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、配列番号 83 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び配列番号 84 のアミノ酸配列を含む HVR-L3

を含む抗 LgR5 抗体を含む、請求項 27～36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

前記抗 LgR5 抗体が、

(a) 配列番号 33 の VH 配列及び配列番号 32 の VL 配列、または

(b) 配列番号 51 の VH 配列及び配列番号 50 の VL 配列を含む、請求項 37 に記載の方法。

50

【請求項 39】

前記免疫複合体が細胞傷害性薬剤に結合した抗 L g R 5 抗体を含む、請求項 27 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】

前記癌試料が結腸癌試料、大腸癌試料、小腸癌試料、子宮内膜癌試料、膵臓癌試料、または卵巣癌試料である、請求項 25 ~ 39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、あらゆる目的のために全体が参照により本明細書に援用される 2014 年 6 月 11 日に出願された米国仮出願番号第 62 / 010637 号の利益を主張する。 10

【0002】

本発明は抗 L g R 5 抗体及び同抗体の使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

癌幹細胞仮説では、正常組織と同様に特殊細胞の個別の小集団が自己複製能を有し、かつ、絶えず腫瘍に存在すると仮定する。癌幹細胞 (CSC) は腫瘍の発生、進行、転移及び再発に関連するとされており、そのことがそれらの細胞を治療介入の望ましい標的とする。 20

【0004】

最もよく特徴付けられた組織幹細胞集団のうちの 1 つは、恒常的腸管上皮内に全ての分化細胞型を生じさせる胃腸管中のロイシンリッチリピート含有 G タンパク質共役受容体 5 (Lgr5) 陰窩細胞である。Lgr5 は活発に循環する腸幹細胞 (ISC) の表面に見られる 7 回膜貫通タンパク質である。ヒト Lgr5 は 907 アミノ酸のタンパク質であり、そのうちの約 540 個のアミノ酸がアミノ末端シグナル配列の切断後に細胞外空間に存在すると予測される。Lgr5 は外部ドメイン中に 17 の不完全なロイシンリッチリピートモチーフを含み、かつ、それらロイシンリッチリピートと 1 番目の膜貫通ドメインとの間に位置する高システイン領域を含む。 20

【0005】

Lgr5 発現 ISC は Wnt 調節に対して敏感であり、腸上皮の恒常的再生に主に関与する。しかしながらマウスにおける Lgr5 発現細胞の除去は腸上皮の恒常性に影響せず、このこと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。Tian et al., Nature 478: 255 - 259 (2011)。R-スポンジンは WNT3A による WNT シグナル伝達を強化し、RSPO1、RSPO2、RSPO3、及び RSPO4 の 4 種全ての R-スポンジンが Lgr5 に結合可能である。Lau et al., Nature 476: 293 - 297 (2011)。 30

【0006】

Lgr5+細胞は腸癌の起源細胞として機能し、かつ、CSC としても作用することも主張されており、このことから Lgr5+細胞の除去が腫瘍増殖と腫瘍維持に対して顕著な影響を与えている場合があることが示唆されている。 40

【0007】

Lgr5+細胞に由来する APC 突然変異体腫瘍の系譜追跡により、腸腫瘍中の複数の細胞種が Lgr5+前駆細胞に由来することが示される。また、Lgr5+細胞は腫瘍塊を発生させ、絶えず子孫細胞をその腫瘍塊に提供すると主張されており、このことから Lgr5+細胞の除去が腫瘍増殖と腫瘍維持に対して顕著な影響を与えている場合があることが示唆されている。しかしながら、長年にわたって、Lgr5 の発現の決定の問題点は、高品質の免疫組織化学 (IHC) 反応性抗体を欠くことであるとされている。

【0008】

当該技術分野では、癌などの Lgr5 関連症状の診断及び治療のための Lgr5 を標的とする薬剤が必要とされている。本発明はその要求を満たして他の利益を提供するもので 50

ある。

【発明の概要】

【0009】

抗LgR5抗体及び免疫複合体ならびにそれらの使用方法を提供する。免疫組織化学に有用な抗LgR5抗体を提供する。

【0010】

いくつかの実施形態において、LgR5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、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、または(b)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-H2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12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、または(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H3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9のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L3、または(b)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

10

20

【0011】

いくつかの実施形態において、本抗体は、(a)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L3、または(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

30

【0012】

いくつかの実施形態において、本抗体は、(a)(i)配列番号6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VH配列、(ii)配列番号5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VL配列、もしくは(iii)(i)のVH配列及び(ii)のVL配列、または(b)(i)配列番号8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VH配列、(ii)配列番号7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VL配列、もしくは(iii)(i)のVH配列及び(ii)のVL配列を含む。

【0013】

いくつかの実施形態において、本抗体は配列番号6または配列番号8のVH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または配列番号9のVL配列を含む。

40

【0014】

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、本抗体はマウス抗体、ウサギ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、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IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、及びIgG4から選択されるIgGである。

【0015】

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核酸が提供される。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コードする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コード

50

する核酸を含む宿主細胞を培養することを含む抗体作製方法が提供される。

【0016】

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及び細胞傷害性薬剤を含む免疫複合体が提供される。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及び細胞傷害性薬剤を含む免疫複合体と薬学的に許容可能な担体とを含む医薬製剤が提供される。

【0017】

いくつかの実施形態において、標識に結合した本明細書に記載される抗体が提供される。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。

10

【0018】

いくつかの実施形態において、生体試料中のヒトLgR5の検出方法が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、本明細書に記載される抗LgR5抗体がヒトLgR5に結合するのを許容する条件下で、前記生体試料と本明細書に記載の抗LgR5抗体とを接触させることを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、抗LgR5抗体と生体試料の中のヒトLgR5との間で複合体が形成されるかどうかを検出することをさらに含む。いくつかの実施形態において、生体試料は結腸癌試料、大腸癌試料、小腸癌試料、子宮内膜癌試料、膵臓癌試料、または卵巣癌試料である。

【0019】

いくつかの実施形態において、LgR5陽性癌の検出方法が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、(i)LgR5陽性癌を有する、または有することが疑われる対象に、本明細書に記載される抗LgR5抗体を含む標識抗LgR5抗体を投与することと、(ii)その対象中の標識抗LgR5抗体を検出することと、を含み、標識抗LgR5抗体の検出がその対象におけるLgR5陽性癌を識別する。いくつかの実施形態において、標識抗LgR5抗体は、陽電子放出体に結合した抗LgR5抗体を含む。いくつかの実施形態において、陽電子放出体は⁸⁹Zrである。

20

【0020】

いくつかの実施形態において、癌患者がLgR5陽性癌を有していると特定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LgR5抗体がヒトLgR5に結合するのを許容する条件下で、患者に由来する癌試料と本明細書に記載の抗LgR5抗体とを接触させることを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、抗LgR5抗体と癌試料中のヒトLgR5との間で複合体が形成されるかどうかを検出することをさらに含む。いくつかの実施形態において、抗LgR5抗体と癌試料中のヒトLgR5との間の複合体が検出される場合に、癌患者がLgR5陽性癌を有していると特定される。いくつかの実施形態において、前記癌試料は結腸癌試料、大腸癌試料、小腸癌試料、子宮内膜癌試料、膵臓癌試料、または卵巣癌試料である。

30

【0021】

いくつかの実施形態において、抗LgR5抗体を含む免疫複合体(immunocombination)を用いる治療に適した癌患者の選択方法が提供される。いくつかの実施形態において、方法は、免疫組織化学(IHC)を用いて患者由来の癌試料中のLgR5発現レベルを決定することを含む。いくつかの実施形態において、LgR5発現レベルの上昇は、癌患者が抗LgR5抗体を含む免疫複合体(immunocombination)を用いる治療から利益を得る可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態において、上昇したLgR5発現レベルはIHCによる2+または3+の染色である。いくつかの実施形態において、上昇したLgR5発現レベルはIHCによる3+の染色である。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使用してIHCが実施される。いくつかの実施形態において、前記癌試料は結腸癌試料、大腸癌試料、小腸癌試料、子宮内膜癌試料、膵臓癌試料、または卵巣癌試料である。

40

【0022】

いくつかの実施形態において、抗LgR5抗体を含む免疫複合体を用いる治療に適した

50

癌患者の選択方法であって、抗LgR5抗体がヒトLgR5に結合するのを許容する条件下で患者に由来する癌試料と本明細書に記載される抗LgR5抗体とを接触させることと、抗LgR5抗体とその癌試料中のヒトLgR5との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、抗LgR5抗体と癌試料中のヒトLgR5との間の複合体が検出される場合にその癌患者が選択される。いくつかの実施形態において、癌試料は結腸癌試料、大腸癌試料、小腸癌試料、子宮内膜癌試料、膵臓癌試料、または卵巣癌試料である。

【0023】

いくつかの実施形態において、癌患者の治療方法であって、抗LgR5抗体を含む治療有効量の免疫複合体を患者に投与することを含み、免疫組織化学(IHC)を用いて、患者に由来する癌試料が高いレベルのLgR5発現を有していると判定する、方法が提供される。いくつかの実施形態において、上昇したLgR5発現レベルはIHCによる2+または3+の染色である。いくつかの実施形態において、上昇したLgR5発現レベルはIHCによる3+の染色である。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使用してIHCが実施される。いくつかの実施形態において、癌試料は結腸癌試料、大腸癌試料、小腸癌試料、子宮内膜癌試料、膵臓癌試料、または卵巣癌試料である。

【0024】

いくつかの実施形態において、本免疫複合体は、(a)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号57のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-L3、または(b)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-L3、または(c)配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-L3、または(d)配列番号85のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号86のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号87のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号82のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号83のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号84のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗LgR5抗体を含む。いくつかの実施形態において、本免疫複合体は、(a)配列番号33のVH配列及び配列番号32のVL配列、または(b)配列番号51のVH配列及び配列番号50のVL配列を含む抗LgR5抗体を含む。いくつかの実施形態において、本免疫複合体は、細胞傷害性薬剤に結合した抗LgR5抗体を含む。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】実施例Aにおいて説明される様々な組織におけるヒトLgR5遺伝子発現のレベルを示しているグラフを示す。図1中の挿入図は、実施例Aにおいて説明される正常結腸組織及び結腸腫瘍におけるヒトLgR5遺伝子発現のレベルを示すグラフを示している。

【図2】実施例Bにおいて説明されるインサイチュハイブリダイゼーションによる結腸癌中のLgR5の発現を示す。

【図3A】(A)結腸腫瘍組織マイクロアレイにおける様々なレベルのLgR5発現の出現率、及び(B)各大腸腺癌試料由来の3つのコアにおけるLgR5発現の不均質性を示す。両方とも実施例Bにおいて説明されるインサイチュハイブリダイゼーションによって決定されている。

【図3B】(A)結腸腫瘍組織マイクロアレイにおける様々なレベルのLgR5発現の出現率、及び(B)各大腸腺癌試料由来の3つのコアにおけるLgR5発現の不均質性を示す。両方とも実施例Bにおいて説明されるインサイチュハイブリダイゼーションによって

10

20

30

40

50

決定されている。

【図4A】抗体LGR5.1-12及び抗体LGR5.26-1の(A)軽鎖と(B)重鎖のアラインメントを示す。接触領域、Chothia相補性決定領域、及びKabab相補性決定領域(CDR(超可変領域またはHVRとも呼ばれる))が示されている。Kabab HVRに下線が引かれている。

【図4B】抗体LGR5.1-12及び抗体LGR5.26-1の(A)軽鎖と(B)重鎖のアラインメントを示す。接触領域、Chothia相補性決定領域、及びKabab相補性決定領域(CDR(超可変領域またはHVRとも呼ばれる))が示されている。Kabab HVRに下線が引かれている。

【図5A】実施例Eにおいて説明される抗体LGR5.1-12による(A)結腸組織、(B)毛包、及び(C)脊髄の染色を示す。

【図5B】実施例Eにおいて説明される抗体LGR5.1-12による(A)結腸組織、(B)毛包、及び(C)脊髄の染色を示す。

【図5C】実施例Eにおいて説明される抗体LGR5.1-12による(A)結腸組織、(B)毛包、及び(C)脊髄の染色を示す。

【図6A】抗体YW353を使用するFACSによる(A)LoVo X 1.1異種移植腫瘍細胞及び(B)D5124異種移植腫瘍細胞の表面上のLgR5の検出、ならびに実施例Fにおいて説明される抗体LGR5.1-12を使用する免疫組織化学による(C)LoVo X 1.1異種移植腫瘍及び(D)D5124異種移植腫瘍の染色を示す。

【図6B】抗体YW353を使用するFACSによる(A)LoVo X 1.1異種移植腫瘍細胞及び(B)D5124異種移植腫瘍細胞の表面上のLgR5の検出、ならびに実施例Fにおいて説明される抗体LGR5.1-12を使用する免疫組織化学による(C)LoVo X 1.1異種移植腫瘍及び(D)D5124異種移植腫瘍の染色を示す。

【図6C】抗体YW353を使用するFACSによる(A)LoVo X 1.1異種移植腫瘍細胞及び(B)D5124異種移植腫瘍細胞の表面上のLgR5の検出、ならびに実施例Fにおいて説明される抗体LGR5.1-12を使用する免疫組織化学による(C)LoVo X 1.1異種移植腫瘍及び(D)D5124異種移植腫瘍の染色を示す。

【図6D】抗体YW353を使用するFACSによる(A)LoVo X 1.1異種移植腫瘍細胞及び(B)D5124異種移植腫瘍細胞の表面上のLgR5の検出、ならびに実施例Fにおいて説明される抗体LGR5.1-12を使用する免疫組織化学による(C)LoVo X 1.1異種移植腫瘍及び(D)D5124異種移植腫瘍の染色を示す。

【図7A】実施例Gにおいて説明される抗体LGR5.1-12を使用する結腸腫瘍の例示的な0、1+、2+、及び3+の染色を示す。

【図7B】実施例Gにおいて説明される抗体LGR5.1-12を使用する結腸腫瘍の例示的な0、1+、2+、及び3+の染色を示す。

【図7C】実施例Gにおいて説明される抗体LGR5.1-12を使用する結腸腫瘍の例示的な0、1+、2+、及び3+の染色を示す。

【図7D】実施例Gにおいて説明される抗体LGR5.1-12を使用する結腸腫瘍の例示的な0、1+、2+、及び3+の染色を示す。

【図8A】実施例Hにおいて説明される(A)抗体LGR5.1-12及び(B)抗体LGR5.26-1を使用するCXF233異種移植腫瘍試料の染色を示す。

【図8B】実施例Hにおいて説明される(A)抗体LGR5.1-12及び(B)抗体LGR5.26-1を使用するCXF233異種移植腫瘍試料の染色を示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

I. 定義

本明細書における「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に記載されるように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(VL)フレームワークまたは重鎖可変ドメイン(VH)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

10

20

30

40

50

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クは、その同じアミノ酸配列を含んでも良く、またはアミノ酸配列変化を含んでも良い。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、VLアクセプターヒトフレームワークは、配列に関してVL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。

【0027】

「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）との間の非共有結合性相互作用の合計の強度を指す。別途指定されない限り、本明細書において使用される場合、「結合親和性」は結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は一般的に解離定数(K_d)によって表され得る。親和性は、本明細書に記載される方法をはじめとする当技術分野において知られている一般的方法によって測定され得る。結合親和性測定の具体的な例示的实施形態及び模範的实施形態が以下に記載される。

10

【0028】

「親和性成熟」抗体は、変化を有しない親抗体と比較して1つまたは複数の超可変領域(HVR)に1つまたは複数の変化を有する抗体であって、そのような変化によって抗原への親和性が改善された抗体を指す。

【0029】

「抗LgR5抗体」及び「LgR5結合抗体」という用語は、抗体がLgR5を標的とする際に診断薬及び/または治療薬として有用となるように、十分な親和性でLgR5に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タンパク質に抗LgR5抗体が結合する度合いは、例えば、放射免疫アッセイ(RIA)またはスクッチャード解析、または例えばBiacoreなどの表面プラズモン共鳴によって測定される、抗体がLgR5に結合する度合いの約10%未満である。ある特定の实施形態において、LgR5に結合する抗体は、1µM以下、100nM以下、10nM以下、5nM以下、4nM以下、3nM以下、2nM以下、1nM以下、0.1nM以下、0.01nM以下、または0.001nM以下（例えば、10⁻⁸M以下、例えば10⁻⁸M~10⁻¹³M、例えば、10⁻⁹M~10⁻¹³M）の解離定数(K_d)を有する。ある特定の实施形態において、抗LgR5抗体は、様々な種のLgR5の間で保存されているLgR5のエピトープに結合する。

20

30

【0030】

「抗体」という用語は、最も広い意味で本明細書において使用され、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、二特異性抗体）、及び抗体断片を含むがこれらに限定されない様々な抗体構造体を包含する。

【0031】

本明細書において使用される「抗体薬品複合体」(ADC)という用語は「免疫複合体」という用語と同等である。

40

【0032】

「抗体断片」は、完全抗体の一部を含み、かつ、その完全抗体が結合する抗原に結合する完全抗体以外の分子を指す。抗体断片の例にはFv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、二重特異性抗体、直鎖状抗体、単鎖抗体分子（例えばscFv）、及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。

【0033】

基準抗体と「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基準抗体のその抗原への結合を50%以上阻害する抗体を指す。逆に基準抗体は、抗体のその抗原への結合を競合アッセイにおいて50%以上阻害する。例示的な競合アッセイが本明細書において提示される。

50

【0034】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的に無制御の細胞成長／増殖を特徴とする哺乳類動物における生理的状态を指すか、またはそのような状態を説明する。癌の例には、癌腫、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫）、芽腫、肉腫、及び白血病が挙げられるが、これらに限定されない。そのような癌のより具体的な例には、鱗状細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞性肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸部癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーマ、乳癌、結腸癌、大腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、陰門癌、甲状腺癌、肝癌、白血病及び他のリンパ増殖性障害、ならびに様々な種類の頭頸部癌が挙げられる。

10

【0035】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／または軽鎖の一部が特定の起源または種に由来し、一方でその重鎖及び／または軽鎖の残りの部分が異なる起源または種に由来する抗体を指す。

【0036】

抗体の「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。5つの主要な抗体クラス、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらの抗体クラスのうちのいくつかはサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂にさらに分類され得る。免疫グロブリンの様々なクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、及び μ と呼ばれる。

20

【0037】

本明細書において使用される「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞機能を抑制するかもしくは阻害する、かつ／または細胞死もしくは細胞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、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及びLuの放射性同位体）、化学療法剤または化学療法薬（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ピンカルカロイド（ピンクリスチン、ピンプラスチン、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、ダウノルピシンまたは他のインターカレート剤）、増殖抑制剤、核酸分解酵素などの酵素及びそれらの断片、抗生物質、細菌起源、真菌起源、植物起源、または動物起源の小分子毒素または酵素活性型毒素などの毒素であってそれらの断片及び／または変異体を含む毒素、ならびに以下で開示される様々な抗腫瘍剤または抗癌剤が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0038】

「エフェクター機能」は抗体のFc領域に起因する生物活性を指し、エフェクター機能は抗体のアイソタイプによって変化する。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）、食作用、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の発現低下、及びB細胞活性化が含まれる。

40

【0039】

薬剤、例えば医薬製剤の「有効量」は、投薬時における及び必要期間における所望の治療成果または予防成果を達成するために有効な量を指す。

【0040】

「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。

【0041】

本明細書における「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。その用語には、天然配列Fc領域及び変異Fc領域が含まれる。一実施形態において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226またはPro230から重鎖のカルボキシル末端にまで延在する。しかしながら、そのFc領域のC末端リシン（Lys447）は存在しても存在しなくても良い。

50

本明細書において別途明示されない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の付番は、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるEUインデックスとも呼ばれるEU付番システムに従うものである。

【0042】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的に4つのFRドメイン、すなわち、FR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。したがって、HVR配列及びFR配列は、一般的にVH(またはVL)において次の配列、すなわち、FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4で現れる。

10

【0043】

「完全長抗体」、「完全抗体」、及び「全抗体」という用語は、天然抗体構造と実質的に類似する構造を有する抗体、または本明細書において規定されるFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指すために本明細書において互換的に使用される。

【0044】

「グリコシル化形態のLgR5」という用語は、炭水化物残基の付加により翻訳後修飾されている天然発生のLgR5を指す。

【0045】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、かつ、外来性核酸が導入されている細胞を指し、そのような細胞の子孫を含む。宿主細胞には、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれ、それらには初代形質転換細胞及び継代数と無関係にその細胞に由来する子孫が含まれる。子孫は核酸内容が親細胞と完全に同一でなくても良いが、突然変異を含んでも良い。元の形質転換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子孫が本明細書に含まれる。

20

【0046】

「ヒト抗体」は、ヒトまたはヒト細胞によって産生される抗体のアミノ酸配列、またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト起源由来の抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するものである。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に除外している。

30

【0047】

「ウサギ抗体」は、ウサギまたはウサギ細胞によって産生される抗体のアミノ酸配列、またはウサギ抗体レパートリーもしくは他のウサギ抗体コード配列を利用する非ウサギ起源由来の抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するものである。

【0048】

「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VLフレームワーク配列またはヒト免疫グロブリンVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に現れるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的に、ヒト免疫グロブリンVL配列またはヒト免疫グロブリンVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからの選択である。一般的に、その配列サブグループは、Kabata et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD(1991), vols. 1-3のサブグループである。VLの一実施形態において、サブグループは、上記KabataらのサブグループIである。VHの一実施形態において、サブグループは、上記KabataらのサブグループIIIである。

40

【0049】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基及びヒトFR由来のアミノ酸残基

50

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、及び典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、その可変ドメインでは、HVR（例えば、CDR）の全てまたは実質的に全てが、非ヒト抗体のものに対応し、かつFRの全てまたは実質的に全てが、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は任意選択で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでも良い。抗体、例えば非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化された抗体を指す。

【0050】

「超可変領域」または「HVR」という用語は、本明細書において使用される場合、配列に関して超可変的であり、かつ/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。一般的に、天然四重鎖抗体は、VH内に3つ（H1、H2、H3）及びVL内に3つ（L1、L2、L3）の6つのHVRを含む。HVRは一般的に、超可変ループに由来するアミノ酸残基、及び/または「相補性決定領域」（CDR）に由来するアミノ酸残基を含み、後者は配列可変性が最も高く、かつ/または抗原認識に関与するものである。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26～32（L1）、50～52（L2）、91～96（L3）、26～32（H1）、53～55（H2）、及び96～101（H3）において生じる。（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。例示的なCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3）は、L1のアミノ酸残基24～34、L2のアミノ酸残基50～56、L3のアミノ酸残基89～97、H1のアミノ酸残基31～35B、H2のアミノ酸残基50～65、及びH3のアミノ酸残基95～102において生じる。（Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）。VH中のCDR1を例外として、CDRは一般的に、超可変ループを形成する前記アミノ酸残基を含む。CDRはまた、「特異性決定残基」または「SDR」も含み、それらは抗原と接触する残基である。SDRは、短縮型CDRまたはa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含有される。例示的なa-CDR（a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、及びa-CDR-H3）は、L1のアミノ酸残基31～34、L2のアミノ酸残基50～55、L3のアミノ酸残基89～96、H1のアミノ酸残基31～35B、H2のアミノ酸残基50～58、及びH3のアミノ酸残基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、HVR残基及び可変ドメイン中の他の残基（例えば、FR残基）は、上記Kabataのものに従って本明細書において付番される。

【0051】

「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つまたは複数の異種性分子（複数可）に結合した抗体である。免疫複合体は、「抗体薬品複合体」（ADC）という用語のものと同等のものである。

【0052】

「個体」または「患者」または「対象」は哺乳類動物である。哺乳類動物には、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類動物（例えば、ヒト、及びサルなどの非ヒト霊長類動物）、ウサギ、及びげっ歯類動物（例えば、マウス及びラット）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。

【0053】

「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、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ィー（例えば、イオン交換ま

10

20

30

40

50

たは逆相 H P L C) によって測定される 95% または 99% を超える純度にまで精製される。抗体純度の評価方法の総説については、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848: 79-87 (2007) を参照されたい。

【0054】

「単離核酸」は、その天然環境の構成成分から分離されている核酸分子を指す。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、染色体外に存在するか、またはその天然の染色体の位置とは異なる染色体の位置に存在する。

【0055】

「抗 L g R 5 抗体をコードする単離核酸」は、抗体重鎖及び抗体軽鎖（またはそれらの断片）をコードする 1 つまたは複数の核酸分子を指し、それには、単一のベクターまたは別個のベクター内のそのような核酸分子（複数可）、及び宿主細胞内の 1 つまたは複数の位置に存在するそのような核酸分子（複数可）が含まれる。

10

【0056】

本明細書において使用される場合、「L g R 5」という用語は、細胞内での L g R 5 前駆タンパク質のプロセッシングから生じる任意の天然成熟 L g R 5 を指す。その用語には、別途指定されない限り、霊長類動物（例えば、ヒト及びカニクイザルまたはアカゲザル）及びげっ歯類動物（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類動物を含む任意の脊椎動物起源の L g R 5 が含まれる。その用語にはまた、L g R 5 の天然変異体、例えばスプライシング変異体または対立遺伝子変異体も含まれる。シグナル配列（アミノ酸 1 ~ 21）を含む例示的なヒト L g R 5 前駆タンパク質のアミノ酸配列が配列番号 21 に示される。例示的な成熟ヒト L g R 5 のアミノ酸配列が配列番号 22 に示される。例示的なカニクイザル L g R 5 のアミノ酸 33 ~ 907 の予測配列が配列番号 23 に示される。例示的なラット L g R 5 前駆体のアミノ酸配列（シグナル配列であるアミノ酸 1 ~ 21 を含む）及び成熟配列が、それぞれ配列番号 24 及び 25 に示される。例示的なマウス L g R 5 前駆体のアミノ酸配列（シグナル配列であるアミノ酸 1 ~ 21 を含む）及び成熟配列が、それぞれ配列番号 26 及び 27 に示される。

20

【0057】

「L g R 5 陽性癌」という用語は、その表面に L g R 5 を発現する細胞を含む癌を指す。細胞が表面に L g R 5 を発現するかどうかの判定では、L g R 5 m R N A 発現が細胞表面上での L g R 5 発現に相関すると考える。いくつかの実施形態において、L g R 5 m R N A の発現は、インサイチュハイブリダイゼーション及び R T - P C R（定量的 R T - P C R を含む）から選択される方法によって判定される。あるいは、細胞表面上での L g R 5 の発現は、例えば、免疫組織化学、F A C S 等のような方法において L g R 5 に対する抗体を使用して判定され得る。

30

【0058】

「L g R 5 陽性癌細胞」という用語は、その表面に L g R 5 を発現する癌細胞を指す。

【0059】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を指す。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、想定される変異抗体、例えば天然発生の突然変異を含む変異抗体、またはモノクローナル抗体調製物の産生中に生じる変異抗体であって、一般的に少量で存在する変異体を除いて同一であり、かつ/または同じエピトープに結合する。典型的には様々な決定基（エピトープ）に対する様々な抗体を含むポリクローナル抗体調製物と対照的に、モノクローナル抗体調製物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ものである。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体の集団から得られることをその抗体の特徴として示し、任意の具体的な方法による抗体の産生が必要であるものと解釈されてはならない。例えば、本発明に準じて使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換え D N A 法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全体または一部を含む遺伝子導入動物を利用する方法を含むがそれらに限定されない様

40

50

々な技術によって作製されて良く、モノクローナル抗体を作製するためのそのような方法及び他の例示的な方法は本明細書で説明されている。

【0060】

「裸抗体」は、異種性部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射性標識に結合されていない抗体を指す。その裸抗体は医薬製剤中に存在し得る。

【0061】

「天然抗体」は、様々な構造を有する天然発生の免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合によって結合されている2つの同一の軽鎖及び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末端にかけて、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）及びそれに続く3つの定常ドメイン（CH1、CH2、及びCH3）を有する。同様に、N末端からC末端にかけて、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）及びそれに続く軽鎖定常（CL）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）と呼ばれる2つの種類のうちの1つに割り当てられ得る。

10

【0062】

「添付文書」という用語は、市販の治療用製品パッケージに習慣的に含まれており、かつそのような治療用製品の使用に関する適応症、使用法、服用量、投与、併用療法、禁忌、及び/または注意についての情報を含む指示書を指すために使用される。

【0063】

基準ポリペプチド配列に対する「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、基準ポリペプチド配列と候補配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要であればギャップを導入した後の基準ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一である候補配列内のアミノ酸残基のパーセンテージであって、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮していないパーセンテージとして定義される。当技術分野の範囲内にある様々な方法で、例えば、BLASTソフトウェア、BLAST-2ソフトウェア、ALIGNソフトウェアまたはMegalign（DNASTAR）ソフトウェアなどの入手可能なコンピューターソフトウェアを使用してパーセントアミノ酸配列同一性の決定を目的とした整列を行うことができる。当業者は、比較されている配列の全長にわたる最大アラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列させるための適切なパラメーターを決定することができる。しかしながら、本明細書では、配列比較コンピュータープログラムALIGN-2を使用して%アミノ酸配列同一性の値を作成する。ALIGN-2配列比較コンピュータープログラムはGenentech, Inc., によって作成された。そのソースコードは、ユーザー文書提出によって米国20559ワシントンDCの米国著作権局に提出されており、米国著作権登録番号第TXU510087号として登録されている。ALIGN-2プログラムは、カリフォルニア州サウス・サンフランシスコのGenentech, Inc., から入手することができるか、またはソースコードからそのプログラムをコンパイルすることができる。デジタルUNIX V4.0DをはじめとするUNIXオペレーティングシステム上で使用するには、ALIGN-2プログラムをコンパイルする必要がある。全ての配列比較パラメーターはALIGN-2プログラムによって設定され、変化しない。

20

30

40

【0064】

アミノ酸配列比較のためにALIGN-2が使用される状況において、所与のアミノ酸配列Aの所与のアミノ酸配列Bに対する%アミノ酸配列同一性、その配列との%アミノ酸配列同一性、またはその配列に対しての%アミノ酸配列同一性（代替として、所与のアミノ酸配列Bに対するある特定の%アミノ酸配列同一性、その配列とのある特定の%アミノ酸配列同一性、またはその配列に対してのある特定の%アミノ酸配列同一性を有する、または含む所与のアミノ酸配列Aと言い換えることができる）は、次のように計算する：
 $100 \times \text{分数 } X / Y$ 。

【0065】

50

式中、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2によってそのプログラムのAとBとのアラインメントの中の完全な一致としてスコアされたアミノ酸残基数であり、YはB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の長さと同じでない場合、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同じではないことが理解される。別途具体的に明言されない限り、本明細書において使用される全ての%アミノ酸配列同一性の値は、ALIGN-2コンピュータープログラムを使用して直前の段落において説明されているように得られる。

【0066】

「医薬製剤」という用語は、中に含まれる有効成分の生物活性を効果的なものにする形態の調製物であって、その製剤が投与される対象に許容されないほど有毒な追加成分を含まない調製物を指す。

10

【0067】

「薬学的に許容可能な担体」は、有効成分以外の対象にとって無毒である医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容可能な担体には、緩衝剤、賦形剤、安定化剤、または保存剤が含まれるがこれらに限定されない。

【0068】

本明細書において使用される「プラチナ配位体」は、例えば、限定されないが、DNAへ共有結合する能力に基づいて腫瘍に対する効力を発揮する、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、イプロプラチン、サトラプラチン、CI-973、AZ0473、DWA2114R、ネダプラチン、及びスピロプラチンなどの抗癌化学療法薬を指す。

20

【0069】

本明細書において使用される場合、「treatment（治療）」（及び「treat（治療する）」または「treating（治療すること）」のような文法上のその変形体）は、治療を受けている個体の自然経過を変えようと試みる臨床介入を指し、予防のために、または臨床病理過程の間に実施され得る。治療の望ましい効果には、疾患の発症または再発の防止、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的帰結の消失、転移の防止、疾患の進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、及び寛解または予後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、抗LgR5抗体は疾患の発症を遅らせるため、または疾患の進行を緩徐にするために使用される。

30

【0070】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に関与する抗体重鎖または抗体軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれVH及びVL）は、一般的に類似する構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）及び3つの超可変領域（HVR）を含む。（例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照されたい）。単一のVHドメインまたはVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分なものであり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、その抗原に結合する抗体のVHドメインまたはVLドメインを使用して、相補的なVLドメインまたはVHドメインのライブラリーをそれぞれスクリーニングして単離され得る。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。

40

【0071】

本明細書において使用される場合、「ベクター」という用語は、それが結合している別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。その用語には自己複製性核酸構造体としてのベクター及び導入される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、それらのベクターが機能的に結合する核酸の発現を指示することができる。そのようなベクターは本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。

【0072】

50

II．組成物及び方法

一態様において、本発明は、LgR5に結合する抗体及びそのような抗体を含む免疫複合体に部分的に基づく。本発明の抗体及び免疫複合体は、例えば、LgR5陽性癌の診断または治療に有用である。

【0073】

A．例示的な抗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、例えば活発に循環する腸幹細胞の表面に見られる7回膜貫通タンパク質である。LgR5は調査した結腸腫瘍切片の約77%において発現する。例えば、PCT公開第WO2013/149159号を参照されたい。シグナル配列(アミノ酸1~21)を含む例示的な天然発生ヒトLgR5前駆タンパク質配列が配列番号21に提示され、対応する成熟LgR5タンパク質配列が配列番号22(配列番号21のアミノ酸22~907に対応する)に示される。

10

【0074】

いくつかの実施形態において、本発明は、ヒトLgR5のアミノ酸22~322内のエピートプに結合する単離抗体を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、アミノ酸22~322の外側にあるヒトLgR5細胞外ドメイン内のエピートプに結合する単離抗体を提供する。いくつかの実施形態において、本発明はヒトLgR5のアミノ酸323~558内のエピートプに結合する単離抗体を提供する。

20

【0075】

LgR5．1-12抗体及び他の実施形態

一態様において、本発明は、(a)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号11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。

【0076】

一態様において、本発明は、(a)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号14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3つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、抗体は、配列番号14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、抗体は配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3及び配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。追加の実施形態において、抗体は配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。追加の実施形態において、抗体は、(a)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

30

【0077】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号11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3つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施形態において、抗体は、(a)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

40

【0078】

別の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号14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

50

も1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのVH HVR配列を含むVHドメインと、(b)(i)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号11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3つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインと、を含む。

【0079】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

10

【0080】

上記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、上記実施形態のいずれかの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。いくつかの実施形態において、抗LgR5抗体は、上記HVR及びウサギフレームワーク領域を含む。

【0081】

別の態様において、抗LgR5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(VH)配列を含む。ある特定の実施形態において、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、基準配列と比較して置換(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への結合能を保持する。ある特定の実施形態において、合計で1~10個のアミノ酸が配列番号6の中で置換、挿入、かつ/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(すなわち、FR内)で起こる。任意選択により、抗LgR5抗体は配列番号6のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、VHは、(a)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号14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

30

【0082】

別の態様において、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)を含む抗LgR5抗体が提供される。ある特定の実施形態において、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、基準配列と比較して置換(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への結合能を保持する。ある特定の実施形態において、合計で1~10個のアミノ酸は配列番号5の中で置換、挿入、かつ/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(すなわち、FR内)で起こる。任意選択により、抗LgR5抗体は配列番号5のVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、VLは、(a)配列番号9のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号11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

【0083】

別の態様において、上記実施形態のいずれかのVH及び上記実施形態のいずれかのVLを含む抗LgR5抗体が提供される。一実施形態において、抗体は、配列番号6及び配列

50

番号 5 にそれぞれ V H 配列及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【 0 0 8 4 】

追加の態様において、本発明は本明細書において提供される抗 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 6 の V H 配列及び配列番号 5 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。いくつかの実施形態において、ヒト L g R 5 への結合について配列番号 6 の V H 配列及び配列番号 5 の V L 配列を含む抗 L g R 5 抗体と競合する抗体が提供される。いくつかの実施形態において、ヒト L g R 5 への結合について配列番号 6 の V H 配列及び配列番号 5 の V L 配列を含む抗 L g R 5 抗体と競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 2 2 ~ 3 2 2 の外側にある L g R 5 細胞外ドメイン内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、h u Y W 3 5 3 抗体または 8 E 1 1 抗体のどちらかとヒト L g R 5 への結合について競合しない抗体。いくつかの実施形態において、ヒト L g R 5 のアミノ酸 3 2 3 ~ 5 5 8 内のエピトープに結合する抗体が提供される。

10

【 0 0 8 5 】

本発明の追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗 L g R 5 抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、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、例えば本明細書において定義される 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。

20

【 0 0 8 6 】

追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗 L g R 5 抗体は、以下の第 1 ~ 7 節に記載される特徴のいずれかを単独で、または組み合わせて組み込んで良い。

【 0 0 8 7 】

L g R 5 . 2 6 - 1 抗体及び他の実施形態

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (f) 配列番号 1 7 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。

30

【 0 0 8 8 】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (c) 配列番号 2 0 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 3 つ全ての 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、抗体は、配列番号 2 0 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、抗体は、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 及び配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を備える。追加の実施形態において、抗体は、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 を備える。追加の実施形態において、抗体は、(a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び (c) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 を含む。

40

【 0 0 8 9 】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (c) 配列番号 1 7 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 3 つ全ての 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、抗体は、(a) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列

50

を含むHVR-L2、及び(c)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0090】

別の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号20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3つ全てのVH HVR配列を含むVHドメインと、(b)(i)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号17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3つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

10

【0091】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号17から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0092】

上記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、上記実施形態のいずれかの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。いくつかの実施形態において、抗LgR5抗体は、上記HVR及びウサギフレームワーク領域を含む。

20

【0093】

別の態様において、抗LgR5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(VH)配列を含む。ある特定の実施形態において、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、基準配列と比較して置換(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への結合能を保持する。ある特定の実施形態において、合計で1~10個のアミノ酸は、配列番号8の中で置換、挿入、かつ/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、または欠失がHVRの外側の領域(すなわち、FR内)で起こる。任意選択により、抗LgR5抗体は、配列番号8のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、VHは、(a)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号20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。

30

【0094】

別の態様において、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)を含む抗LgR5抗体が提供される。ある特定の実施形態において、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、基準配列と比較して置換(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への結合能を保持する。ある特定の実施形態において、合計で1~10個のアミノ酸は、配列番号7の中で置換、挿入、かつ/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(すなわち、FR内)で起こる。任意選択により、抗LgR5抗体は、配列番号7のVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、VLは、(a)配列番号15のア

40

50

ミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号8のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号17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。

【0095】

別の態様において、上記実施形態のいずれかのVH及び上記実施形態のいずれかのVLを含む抗LgR5抗体が提供される。一実施形態において、抗体は、配列番号8及び配列番号7にそれぞれVH配列及びVL配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0096】

追加の態様において、本発明は、本明細書において提供される抗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配列及び配列番号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。いくつかの実施形態において、ヒトLgR5への結合について配列番号8のVH配列及び配列番号7のVL配列を含む抗LgR5抗体と競合する抗体が提供される。いくつかの実施形態において、ヒトLgR5のアミノ酸22~322内のエピトープへの結合について配列番号8のVH配列及び配列番号7のVL配列を含む抗LgR5抗体と競合する抗体が提供される。

10

【0097】

本発明の追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗LgR5抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、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、例えば本明細書において定義されるIgG2a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。

20

【0098】

追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗LgR5抗体は、以下の第1~7節に記載される特徴のいずれかを単独で、または組み合わせて組み込んで良い。

【0099】

8E11抗体及び他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号57のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号54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。

30

【0100】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号57のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-L3を備える抗体を提供する。

40

【0101】

上記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抗体は上記実施形態のいずれかの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})フレームワーク及び/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、その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中にR71S突然変異及びA78V突然変異を含むヒトVLカッパIVコンセンサス(VL_{KIV})フレームワーク及び/またはVHフレームワークVH₁である。

50

【 0 1 0 2 】

いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、上記実施形態のいずれかの H V R を含み、配列番号 6 5 ~ 6 8 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、上記実施形態のいずれかの H V R を含み、配列番号 6 6 の重鎖フレームワーク F R 3 配列をさらに含む。いくつかのそのような実施形態において、重鎖可変ドメインフレームワークは、配列番号 6 5 ~ 6 8 から選択される F R 3 配列を有する改変ヒト V H₁ フレームワークである。いくつかのそのような実施形態において、重鎖可変ドメインフレームワークは、配列番号 6 6 の F R 3 配列を有する改変ヒト V H₁ フレームワークである。

【 0 1 0 3 】

いくつかの実施形態において、抗 L g R 5 抗体は、上記実施形態のいずれかの H V R を含み、配列番号 6 1 の軽鎖フレームワーク F R 3 配列をさらに含む。いくつかのそのような実施形態において、重鎖可変ドメインフレームワークは、配列番号 6 1 の F R 3 配列を有する改変 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 0 4 】

別の態様において、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、及び 4 5 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 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 3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、及び 4 5 から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する V H 配列は、基準配列と比較して置換 (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 への結合能を保持する。ある特定の実施形態において、合計で 1 ~ 1 0 個のアミノ酸は、配列番号 3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、及び 4 5 から選択される配列の中で置換、挿入、かつ/または欠失されている。ある特定の実施形態において、合計で 1 ~ 5 個のアミノ酸は、配列番号 3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、及び 4 5 から選択される配列の中で置換、挿入、かつ/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、または欠失が H V R の外側の領域 (すなわち、F R 内) で起こる。

【 0 1 0 5 】

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 3 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 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 3 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 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 3 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 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 3 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 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 3 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 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 4 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 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 4 3 のアミノ酸配列に対し

10

20

30

40

50

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LgR5抗体は、配列番号45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。

【0106】

任意選択により、抗LgR5抗体は、配列番号31、33、35、37、39、41、43、及び45から選択されるVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、そのVHは、(a)配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号56のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号57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

【0107】

別の態様において、配列番号30、32、34、36、38、40、42、及び44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)を含む抗LgR5抗体が提供される。ある特定の実施形態において、配列番号30、32、34、36、38、40、42、及び44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、基準配列と比較して置換(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への結合能を保持する。ある特定の実施形態において、合計で1~10個のアミノ酸は、配列番号30、32、34、36、38、40、42、及び44から選択されるアミノ酸配列の中で置換、挿入、かつ/または欠失されている。ある特定の実施形態において、合計で1~5個のアミノ酸は、配列番号30、32、34、36、38、40、42、及び44から選択されるアミノ酸配列の中で置換、挿入、かつ/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、または欠失がHVRの外側の領域(すなわち、FR内)で起こる。

20

【0108】

いくつかの実施形態において、抗LgR5抗体は、配列番号30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LgR5抗体は、配列番号32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LgR5抗体は、配列番号34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LgR5抗体は、配列番号36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LgR5抗体は、配列番号38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LgR5抗体は、配列番号40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LgR5抗体は、配列番号42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。

30

40

50

。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 4 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン (V L) 配列を含む。

【 0 1 0 9 】

任意選択により、抗 L g R 5 抗体は、配列番号 3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、及び 4 4 から選択されるアミノ酸配列の V L 配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、V L は、(a) 配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(b) 配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び (c) 配列番号 5 4 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

10

【 0 1 1 0 】

別の態様において、上記実施形態のいずれかの V H 及び上記実施形態のいずれかの V L を含む抗 L g R 5 抗体が提供される。一実施形態において、抗体は、配列番号 3 1 及び配列番号 3 0 にそれぞれ V H 配列及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、抗体は、配列番号 3 3 及び配列番号 3 2 にそれぞれ V H 配列及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、抗体は、配列番号 3 5 及び配列番号 3 4 にそれぞれ V H 配列及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、抗体は、配列番号 3 7 及び配列番号 3 6 にそれぞれ V H 配列及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、抗体は、配列番号 3 9 及び配列番号 3 9 にそれぞれ V H 配列及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号 4 1 及び配列番号 4 0 の V H 配列及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、抗体は、配列番号 4 3 及び配列番号 4 2 にそれぞれ V H 配列及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。一実施形態において、抗体は、配列番号 4 5 及び配列番号 4 4 にそれぞれ V H 配列及び V L 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

20

【 0 1 1 1 】

追加の態様において、本発明は、本明細書において提供される抗 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 3 3 の V H 配列及び配列番号 3 2 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 2 2 ~ 3 2 3 由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号 2 1 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 ~ 3 1 2 由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号 2 2 のエピトープに結合する抗体が提供される。

30

【 0 1 1 2 】

本発明の追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗 L g R 5 抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、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、例えば本明細書において定義される 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。

40

【 0 1 1 3 】

追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗 L g R 5 抗体は、以下の第 1 ~ 7 節に記載される特徴のいずれかを単独で、または組み合わせて組み込んで良い。

【 0 1 1 4 】

Y W 3 5 3 抗体及び他の実施形態

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 8 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、(b) 配列番号 8 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、(c) 配列番号 8 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、(d) 配列番号 8 2 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、(e

50

）配列番号 83 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び（f）配列番号 84 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。

【0115】

別の態様において、本発明は、（a）配列番号 85 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、（b）配列番号 86 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、（c）配列番号 87 のアミノ酸配列を含む HVR - H3、（d）配列番号 82 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、（e）配列番号 83 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び（f）配列番号 84 から選択されるアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む抗体を提供する。

【0116】

上記実施形態のいずれかにおいても、抗 LgR5 抗体はヒト抗体である。

【0117】

別の態様において、抗 LgR5 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 51 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、基準配列と比較して置換（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 への結合能を保持する。ある特定の実施形態において、合計で 1 ~ 10 個のアミノ酸は、配列番号 51 の中で置換、挿入、かつ/または欠失されている。ある特定の実施形態において、合計で 1 ~ 5 個のアミノ酸は、配列番号 51 の中で置換、挿入、かつ/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、または欠失が HVR の外側の領域（すなわち、FR 内）で起こる。任意選択により抗 LgR5 抗体は、配列番号 51 の VH 配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、VH は、（a）配列番号 85 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、（b）配列番号 86 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び（c）配列番号 87 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。

【0118】

別の態様において、配列番号 50 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）を含む抗 LgR5 抗体が提供される。ある特定の実施形態において、配列番号 50 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、基準配列と比較して置換（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 への結合能を保持する。ある特定の実施形態において、合計で 1 ~ 5 個のアミノ酸は、配列番号 50 の中で置換、挿入、かつ/または欠失されている。ある特定の実施形態において、合計で 1 ~ 10 個のアミノ酸が配列番号 50 の中で置換、挿入、かつ/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（すなわち、FR 内）で起こる。任意選択により前記抗 LgR5 抗体は、配列番号 50 の VL 配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、その VL は、（a）配列番号 82 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、（b）配列番号 83 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び（c）配列番号 84 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。

【0119】

別の態様において、上記実施形態のいずれかの VH 及び上記実施形態のいずれかの VL を含む抗 LgR5 抗体が提供される。一実施形態において、抗体は、配列番号 51 及び配列番号 50 にそれぞれ VH 配列及び VL 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0120】

10

20

30

40

50

追加の態様において、本発明は、本明細書において提供される抗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51のVH配列及び配列番号50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22～123由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号21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由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号22のエピトープに結合する抗体が提供される。

【0121】

本発明の追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗LgR5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、例えば本明細書において定義されるIgG2a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。

10

【0122】

追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗LgR5抗体は、以下の第1～7節に記載される特徴のいずれかを単独で、または組み合わせて組み込んで良い。

【0123】

3G12抗体及び他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号72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。

20

【0124】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号75のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号72のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

30

【0125】

上記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、上記実施形態のいずれかの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カップコンセンサス(VL_K)フレームワーク及び/またはヒトVHサブグループ3コンセンサス(VH₃)フレームワークである。

【0126】

別の態様において、抗LgR5抗体は、配列番号47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47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、基準配列と比較して置換(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への結合能を保持する。ある特定の実施形態において、合計で1～10個のアミノ酸は、配列番号47のアミノ酸配列の中で置換、挿入、かつ/または欠失されている。ある特定の実施形態において、合計で1～5個のアミノ酸は、配列番号47のアミノ酸配列の中で置換、挿入、かつ/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(すなわち、FR内)で起こる。

40

50

【0127】

任意選択により、抗LgR5、抗体は配列番号47のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、VHは、(a)配列番号73のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号74のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号75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。

【0128】

別の態様において、配列番号46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)を含む抗LgR5抗体が提供される。ある特定の実施形態において、配列番号46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、基準配列と比較して置換(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への結合能を保持する。ある特定の実施形態において、合計で1~10個のアミノ酸は、配列番号46のアミノ酸配列の中で置換、挿入、かつ/または欠失されている。ある特定の実施形態において、合計で1~5個のアミノ酸は、配列番号46のアミノ酸配列の中で置換、挿入、かつ/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(すなわち、FR内)で起こる。

【0129】

任意選択により、抗LgR5抗体は、配列番号46のVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、そのVLは、(a)配列番号70のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号71のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号72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。

【0130】

別の態様において、上記実施形態のいずれかのVH及び上記実施形態のいずれかのVLを含む抗LgR5抗体が提供される。一実施形態において、抗体は、配列番号47と配列番号46にそれぞれVH配列及びVL配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0131】

追加の態様において、本発明は、本明細書において提供される抗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47のVH配列及び配列番号46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由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号21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由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号22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由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号21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由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号22のエピトープに結合する抗体が提供される。

【0132】

本発明の追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗LgR5抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、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、例えば本明細書において定義される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。

【0133】

追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗LgR5抗体は、以下の第1~

10

20

30

40

50

7 節に記載される特徴のいずれかを単独で、または組み合わせて組み込んで良い。

【0134】

2H6抗体及び他の実施形態

いくつかの実施形態において、本発明は、(a)配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号78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。

【0135】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号81のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号76のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号77のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号78のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0136】

上記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、上記実施形態のいずれかの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)フレームワーク及び/またはヒトVHサブグループ3(VH₃)フレームワークである。

【0137】

別の態様において、抗LgR5抗体は、配列番号49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49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、基準配列と比較して置換(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への結合能を保持する。ある特定の

【0138】

任意選択により、抗LgR5抗体は、配列番号49のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、VHは、(a)配列番号79のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号80のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号81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。

【0139】

別の態様において、配列番号48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)を含む抗LgR5抗体が提供される。ある特定の実施形態において、配列番号48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、基準配列と比較して置換(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への結合能を保持する。ある特定の

10

20

30

40

50

の中で置換、挿入、かつ/または欠失されている。ある特定の実施形態において、合計で 1 ~ 5 個のアミノ酸は、配列番号 48 のアミノ酸配列の中で置換、挿入、かつ/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（すなわち、FR 内）で起こる。

【0140】

任意選択により、抗 LgR5 抗体は、配列番号 48 のアミノ酸配列の VL 配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態において、VL は、(a) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(b) 配列番号 77 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (c) 配列番号 78 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

【0141】

別の態様において、上記実施形態のいずれかの VH 及び上記実施形態のいずれかの VL を含む抗 LgR5 抗体が提供される。一実施形態において、抗体は、配列番号 49 及び配列番号 48 にそれぞれ VH 配列と VL 配列を含み、それらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0142】

追加の態様において、本発明は、本明細書において提供される抗 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 49 の VH 配列及び配列番号 48 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 由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号 21 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 由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号 22 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 由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号 21 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 由来の、その中の、またはそれと重なる配列番号 22 のエピトープに結合する抗体が提供される。

20

【0143】

本発明の追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗 LgR5 抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、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、例えば本明細書において定義される 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

【0144】

追加の態様において、上記実施形態のいずれかによる抗 LgR5 抗体は、以下の第 1 ~ 7 節に記載される特徴のいずれかを単独で、または組み合わせて組み込んで良い。

【0145】

1. 抗体親和性

ある特定の実施形態において、本明細書において提供される抗体は、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 以下の解離定数 (Kd) を有し、任意選択により 10⁻¹³ M 以上 (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) である。

40

【0146】

一実施形態において、Kd は、以下のアッセイ法によって説明されるように Fab 型の目的の抗体及びその抗原を用いて実施される放射性標識抗原結合アッセイ (RIA) によって測定される。抗原に対する Fab の溶液結合親和性は、段階希釈シリーズの非標識抗原の存在下で最小濃度の (¹²⁵I) 標識抗原で Fab を平衡化し、次に抗 Fab 抗体被覆プレートを用いて結合抗原を捕捉することにより測定される (例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999) を参照されたい

50

)。アッセイの条件を確立するため、MICRO TITER (登録商標) マルチウェルプレート (Thermo Scientific) を 50 mM 炭酸ナトリウム (pH 9.6) 中の 5 μ g/ml の抗 Fab 補足抗体 (Cappel Labs) で一晚にわたって被覆し、その後で 2% (重量/体積) ウシ血清アルブミンの PBS を用いて室温 (約 23) で 2~5 時間にわたってブロッキングする。非吸着性プレート (Nunc 番号 269620) の中で、100 pM または 26 pM の [¹²⁵I] 標識抗原を目的の Fab の段階希釈物と混合する (例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997) 内の抗 VEGF 抗体である Fab-12 の評価と一致する)。その後、目的の Fab を一晚にわたってインキュベートするが、そのインキュベーションは平衡に達することを確実にするためにより長い時間 (例えば、約 65 時間) にわたって継続しても良い。その後、混合物を (例えば、1 時間にわたる) 室温でのインキュベーションのために捕捉プレートに移す。その後、その溶液を除去し、プレートを PBS 中の 0.1% ポリソルベート 20 (TWEEN-20 (登録商標)) で 8 回洗浄する。それらのプレートが乾いたら、150 μ l / ウェルのシンチラント (MICROSCINT-20 (商標); Packard) を加え、TOPCOUNT (商標) ガンマカウンター (Packard) 上でそれらのプレートを 10 分間にわたって計測する。最大結合の 20% 以下をもたらす各 Fab の濃度を競合結合アッセイに使用するために選択する。

【0147】

いくつかの実施形態において、K_d は、約 10 応答単位 (RU) の固定化抗原 CM5 チップと共に 25 で BIACORE (登録商標) - 2000 または BIACORE (登録商標) - 3000 (BIACORE, Inc., Piscataway, NJ) を使用する表面プラズモン共鳴アッセイを用いて測定される。簡単に説明すると、供給業者の指示に従って N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドヒドロクロリド (EDC) 及び N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を用いて、カルボキシメチル化デキストラン・バイオセンサーチップ (CM5, BIACORE, Inc.) を活性化する。10 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.8 を用いて抗原を 5 μ g/ml (約 0.2 μ M) に希釈した後に、5 μ l / 分の流速で注入して約 10 応答単位 (RU) の結合タンパク質を達成する。抗原の注入の後に、1 M エタノールアミンを注入して未反応基をブロックする。動態測定のために 0.05% ポリソルベート 20 (TWEEN-20 (商標)) 界面活性剤を含む PBS (PBST) の中に Fab の 2 倍段階希釈物 (0.78 nM ~ 500 nM) を 25 において約 25 μ l / 分の流速で注入する。単純一対一 Langmuir 結合モデル (BIACORE (登録商標) 評価ソフトウェアバージョン 3.2) を使用して結合センサーグラム及び解離センサーグラムを同時に適合させることにより結合速度 (k_{on}) 及び解離速度 (k_{off}) を計算する。平衡解離定数 (K_d) は、k_{off} / k_{on} の比として計算される。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999) を参照されたい。上記表面プラズモン共鳴アッセイによって結合速度が 10⁶ M⁻¹ 秒⁻¹ を超える場合、その結合速度は、攪拌キュベットと共にストップフロー装置分光光度計 (Aviv Instruments) または 8000 シリーズ SLM-AMINCO (商標) 分光光度計 (Thermo Spectronic) などの分光計において測定される抗原濃度が上昇する中での 25 における pH 7.2 の PBS 中の 20 nM の抗抗原抗体 (Fab 型) の蛍光放射強度 (励起 = 295 nm; 発光 = 340 nm、16 nm バンドパス) の増加または減少を測定する蛍光消光技術を用いることによって測定され得る。

【0148】

2. 抗体断片

ある特定の実施形態において、本明細書において提供される抗体は抗体断片である。抗体断片には、Fab 断片、Fab' 断片、Fab'-SH 断片、(Fab')₂ 断片、Fv 断片、及び scFv 断片、ならびに以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総説については、Hudson et al. Nat. Med. 9: 129-134 (2003) を参照されたい。scFv 断片の総説につい

10

20

30

40

50

ては、例えば、Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)を参照し、WO93/16185及び米国特許第5,571,894号及び同第5,587,458号も参照されたい。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含み、かつ増加したインビボ半減期を有するFab断片及び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。

【0149】

二重特異性抗体は、2つの抗原結合部位を有する二価または二特異性であり得る抗体断片である。例えば、EP404,097、WO1993/01161、Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)、及びHollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)を参照されたい。三重特異性抗体及び四重特異性抗体もHudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)に記載される。

10

【0150】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全体もしくは一部または軽鎖可変ドメインの全体もしくは一部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6248516(B1)号を参照されたい)。

20

【0151】

抗体断片は、本明細書に記載されるように完全抗体のタンパク質分解消化及び組換え宿主細胞(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様々な技術によって作製され得る。

【0152】

3. キメラ抗体及びヒト化抗体

ある特定の実施形態において、本明細書において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4816567号、及びMorrisson et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)に記載される。一例では、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、またはサルなどの非ヒト霊長類に由来する可変領域)とヒト定常領域を含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変更されている「クラススイッチ」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

【0153】

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。典型的には、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低下させるためにヒト化される。一般的に、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つまたは複数の可変ドメインを含む。また、ヒト化抗体は、任意選択で、ヒト定常領域の少なくとも一部を含むことになる。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基は、例えば、抗体の特異性または親和性を回復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)の対応する残基で置換される。

40

【0154】

ヒト化抗体及びその作製方法は、例えばAlmagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)において論評されており、例えばRiechmann et al., *Nature* 332:323-329 (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、及び同第7,087,40

50

9号、Kashmiri et al., Methods 36:25-34(2005)(SDR(a-CDR)移植について記載している)、Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498(1991)(「再表面化」について記載している)、Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60(2005)(「FRシャッフリング」について記載している)、ならびにOsbourn et al., Methods 36:61-68(2005)及びKlimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260(2000)(FRシャッフリングに対する「誘導選択(guided selection)」アプローチについて記載している)においてさらに説明されている。

【0155】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、「ベストフィット」法を用いて選択された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)、特定のサブグループの軽鎖可変領域または重鎖可変領域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)、及びPresta et al., J. Immunol., 151:2623(1993)を参照されたい)、ヒト成熟(体細胞変異)フレームワーク領域またはヒト生殖系列フレームワーク領域(例えば、Almagro and Franss on, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008)を参照されたい)、及びFRライブラリーのスクリーニングから得られるフレームワーク領域(例えば、Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684(1997)、及び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。

【0156】

4. ヒト抗体

ある特定の実施形態において、本明細書において提供される抗体はヒト抗体である。当技術分野において知られている様々な技術を用いてヒト抗体を作製することができる。ヒト抗体は、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74(2001)、及びLonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459(2008)において概ね説明されている。

【0157】

ヒト抗体は、抗原刺激に応答して完全ヒト抗体またはヒト可変領域を含む完全抗体を産生するように改変されている遺伝子導入動物に免疫原を投与することにより調製され得る。そのような動物は、典型的にはヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含んでおり、それらヒト免疫グロブリン遺伝子座は、内在性免疫グロブリン遺伝子座に置き換わっているか、または染色体外に存在するか、またはその動物の染色体中に無作為に組み込まれている。そのような遺伝子導入マウスでは、内在性免疫グロブリン遺伝子座は概ね不活化されている。遺伝子導入動物からヒト抗体を得るための方法の総説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125(2005)を参照されたい。例えば、XENOMOUSE(商標)テクノロジーについて記載している米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584号、HUMAB(登録商標)テクノロジーについて記載している米国特許第5,770,429号、K-MMOUSE(登録商標)テクノロジーについて記載している米国特許第7,041,870号、ならびにVELOCIMOUSE(登録商標)テクノロジーについて記載している米国特許出願公開第2007/0061900号も参照されたい)。そのような動物によって生成される完全抗体のヒト可変領域は、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改変されても良い。

【0158】

ヒト抗体はハイブリドーマベースの方法によっても作製され得る。ヒトモノクローナル

10

20

30

40

50

抗体の産生用のヒト骨髄腫株及びマウス-ヒト異種骨髄腫細胞株が説明されている(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)、及び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、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抗体の産生について記載している)及びNi, Xiandai *Mianyixue*, 26(4):265-268(2006)(ヒト-ヒトハイブリドーマについて記載している)において記載されている方法が含まれる。ヒトハイブリドーマテクノロジー(トリオマ・テクノロジー)も、Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937(2005)及びVollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91(2005)に記載されている。

【0159】

ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することでも作製され得る。そのような可変ドメイン配列を所望のヒト定常ドメインと組み合わせて良い。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技法は下に記載される。

【0160】

5. ライブラリー由来抗体

本発明の抗体は、所望の活性または所望の複数の活性を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離され得る。例えば、ファージディスプレイライブラリーを作製して、所望の結合特性を有する抗体についてそのようなライブラリーをスクリーニングするための様々な方法が当技術分野において知られている。そのような方法は、例えば、Hoogenboom *et al.* in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37(O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001、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)、Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472(2004)、及びLee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132(2004)においてさらに説明されている。

【0161】

ある特定のファージディスプレイ方法では、VH遺伝子及びVL遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別々にクローン化され、ファージライブラリー内で無作為に組み換えられ、次にそれらの遺伝子をWinter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455(1994)に記載されるように抗原結合性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は

、単鎖Fv (s c F v)断片またはFab断片として抗体断片を提示する。免疫を受けた起源に由来するライブラリーは、ハイブリドーマの構築を必要とせずその免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、ナイーブライブラリーを(例えばヒトから)クローン化して、Griffiths et al., EMBO J, 12:725-734 (1993)によって記載されるように免疫化を全く行うことなく、単一起源の抗体を広範囲の非自己抗原に対して提供することができ、かつ自己抗原に対しても提供することができる。最後に、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)によって記載されるように再構成前のV遺伝子断片を幹細胞からクローン化し、ランダム配列を含むPCRプライマーを使用して超可変CDR3領域をコード化し、かつ再構成をインビトロで達成することでナイーブライブラリーを合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリーについて記載している特許刊行物には、例えば、米国特許第5,750,373号、ならびに米国特許出願公開第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、及び同第2009/0002360号が含まれる。

10

【0162】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体または抗体断片は本明細書においてヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされる。

【0163】**6. 多重特異性抗体**

ある特定の実施形態において、本明細書において提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば二特異性抗体である。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、それらの結合特異性のうちの1つは、LgR5に対するものであり、他の結合特異性は他の任意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、二特異性抗体は、LgR5の2つの異なるエピトープに結合し得る。二特異性抗体は、LgR5を発現する細胞に細胞傷害性薬剤を局在化するためにも使用されても良い。二特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製され得る。

20

【0164】

多重特異性抗体の作製技術には、異なる特異性を有する2種類の免疫グロブリン重鎖軽鎖対の組換え共発現(Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983))、WO93/08829、及びTrauneker et al., EMBO J, 10:3655 (1991)を参照されたい)、及び「ノブ・イン・ホール」エンジニアリング(例えば、米国特許第5731168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、抗体Fcヘテロ二量体分子を作製するための工学的静電ステアリング作用(engineering electrostatic steering effect)(WO2009/089004(A1)号パンフレット)、2つ以上の抗体または断片の架橋(例えば、米国特許第4676980号、及びBrennan et al., Science, 229:81 (1985)を参照されたい)、二特異性抗体を作製するためのロイシンジッパーの使用(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547~1553 (1992)を参照されたい)、二特異性抗体断片を作製するための「二重特異性抗体」テクノロジーの使用(例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444~6448 (1993)を参照されたい)、及び単鎖Fv(s F v)ダイマーの使用(例えばGruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい)、及び例えばTutt et al., J. Immunol., 147:60 (1991)に記載されているような三特異性抗体の調製によっても作製され得る。

30

40

【0165】

50

「オクトパス抗体」をはじめとする3つ以上の機能性抗原結合部位を有する改変抗体も本明細書に含まれる（例えば、米国第2006/0025576(A1)号を参照されたい）。

【0166】

本明細書中の抗体または断片には、LgR5及び別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用性Fab」または「DAF」も含まれる（例えば、米国第2008/0069820号をされたい）。

【0167】

7. 抗体変異体

ある特定の実施形態において、本明細書において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、抗体の結合親和性及び/または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を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得る。そのような修飾には、例えば、その抗体のアミノ酸配列からの欠失、及び/またはその抗体のアミノ酸配列への挿入、及び/またはその抗体のアミノ酸配列内の残基の置換が含まれる。その最終的な構築物に到達するために欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを行うことができるが、但し、最終的な構築物は所望の特性、例えば抗原結合性を有することを条件とする。

10

【0168】

a) 置換変異体、挿入変異体、及び欠失変異体

ある特定の実施形態において、1つまたは複数のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換突然変異誘発のための目的部位には、HVR及びFRが含まれる。表1において「好ましい置換」という項目の下に保存的置換が示されている。より実質的な変化は、表1において「例示的な置換」という項目の下に提供されており、アミノ酸側鎖クラスに関連して以下でさらに説明されているものである。目的の抗体にアミノ酸置換を導入することができ、その生成物は、所望の活性について、例えば、抗原結合性の保持/改善、免疫原性の減少、またはADCCもしくはCDCの改善についてスクリーニングされる。

20

表 1

元の残基	例示的な置換	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

10

20

30

40

50

【0169】

アミノ酸は、側鎖の共通する特性に応じてグループ分けされ得る。

- (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) 鎖の配向に影響を与える残基：G l y、P r o；
- (6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0170】

非保存的置換には、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスのメンバーと交換することを伴うことになる。

【0171】

一種類の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の1つまたは複数の超可変領域残基の置換を伴う。それにより生じた変異体（複数可）は一般的に、選択

されて研究されるが、その親抗体と比較してある特定の生物学的特性が改変され（例えば、改善され）（例えば、親和性が上昇する、免疫原性が低下する）、かつ/またはその親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持することになる。例示的な置換変異体は親和性成熟抗体であり、親和性成熟抗体は、例えば本明細書に記載される技術のようなファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を用いて簡便に生成され得る。簡単に説明すると、1つまたは複数のHVR残基を突然変異させて、変異体抗体をファージ上に提示させ、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する。

【0172】

例えば、抗体親和性を改善するためにHVRに改変（例えば置換）を行って良い。そのような改変をHVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程の間に高頻度で突然変異を起こす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)及び/またはSDR(a-CDR)に行って良く、それにより生じる変異体VHまたはVLが結合親和性について検査される。二次ライブラリーを構築し、その二次ライブラリーから再選択することによる親和性成熟が、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、様々な方法のうちいずれか（例えば、エラーブローンPCR、チェーン・シャッフリング、またはオリゴヌクレオチド指定突然変異）によって、成熟させるために選択した可変遺伝子に多様性を導入する。次に二次ライブラリーを作製する。その後、そのライブラリーをスクリーニングして所望の親和性を有する任意の抗体変異体を特定する。多様性を導入するための別の方法は、いくつかのHVR残基（例えば、一度に4~6残基）が無作為選択されるHVR指向性アプローチを伴う。抗原結合に関わるHVR残基は、例えばアラニンスキヤニング突然変異誘発またはアラニンスキヤニングモデリングを用いて具体的に特定され得る。CDR-H3及びCDR-L3が特に標的とされることが多い。

【0173】

ある特定の実施形態において、抗体が抗原に結合する能力が置換、挿入、または欠失によって実質的に低下しない限り、そのような改変が1つまたは複数のHVR内に生じて良い。例えば、結合親和性を実質的に低下させることがない保存的改変（例えば、本明細書において規定された保存的置換）をHVR内に行って良い。そのような改変はHVR「ホットスポット」またはSDRの外側のものであって良い。上記変異VH配列及び変異VL配列のある特定の実施形態において、各HVRは改変されていないか、または1つ以下、2つ以下、もしくは3つ以下のアミノ酸置換を含んでいるかのどちらかである。

【0174】

突然変異誘発の標的とされ得る抗体残基または抗体領域の特定に有用な方法は、「アラニンスキヤニング突然変異誘発」と呼ばれ、Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085によって記載される。この方法では、標的残基の1つの残基または一群（例えば、アルギニン、アスパラギン酸、ヒスチジン、リシン、及びグルタミン酸などの荷電性残基）は特定され、中性アミノ酸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）で置換されて、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを判定される。最初の置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置に追加の置換を導入しても良い。代替としてまたは追加として、抗原抗体複合体の結晶構造を用いて、抗体と抗原との間の接触点を特定する。そのような接触残基及び隣接する残基は、置換の候補として標的されても除外されても良い。変異体をスクリーニングして、所望の特性を有しているかどうかを判定して良い。

【0175】

長さが1残基~100以上の残基を含むポリペプチドまでにわたるアミノ末端融合体及び/またはカルボキシル末端融合体、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入体がアミノ酸配列挿入体に含まれる。末端挿入体の例には、N末端メチオニル残基を有

10

20

30

40

50

する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体には、酵素（例えば、A D E P T用）、またはその抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドに対する抗体のN末端融合体またはC末端融合体が含まれる。

【0176】

b) グリコシル化変異体

ある特定の実施形態において、本明細書において提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増大または減少させるように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つまたは複数のグリコシル化部位が作製または除去されるようにアミノ酸配列を改変することによって簡便に達成され得る。

【0177】

抗体がFc領域を含む場合、その領域に結合している炭水化物が改変され得る。概して、哺乳類細胞によって産生される天然抗体は、典型的にはFc領域のCH2ドメインのAsn297へのN結合によって結合している分岐型二分岐オリゴ糖を含んでいる。例えば、Wright et al. TIBTECH 15:26~32 (1997)を参照されたい。そのオリゴ糖には、様々な炭水化物、例えばマンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、ならびに二分岐型オリゴ糖構造の「幹」にあるGlcNAcに結合しているフコースが含まれ得る。いくつかの実施形態において、本発明の抗体中のオリゴ糖の修飾は、ある特定の特性が改善された抗体変異体を作製するために行われ得る。

【0178】

一実施形態において、Fc領域に（直接的または間接的に）結合するフコースを欠いている炭水化物構造を有する抗体変異体が提供される。例えば、そのような抗体におけるフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%、または20%~40%の量であり得る。フコースの量は、例えば、WO2008/077546号に記載されているMALDI-TOFマスペクトロメトリーによって測定される、Asn297に結合している全ての糖構造体（例えば、複雑な混成及び高マンノース構造体）の総量に対する、Asn297にある糖鎖内のフコースの平均量を計算することで決定される。Asn297は、Fc領域内の位置約297（Fc領域残基のEu付番）に位置するアスパラギン残基を指すが、しかしながら、Asn297は、抗体のわずかな配列の変化のために位置297の約±3アミノ酸上流または下流、すなわち位置294~位置300に位置しても良い。そのようなフコシル化変異体は、改善されたADCC機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号（Presta, L.）、同第2004/0093621号（協和発酵工業株式会社）を参照されたい。「脱フコシル化」抗体変異体または「フコース欠損」抗体変異体に関連する刊行物の例には、米国第2003/0157108号、WO2000/61739号、WO2001/29246号、米国第2003/0115614号、米国第2002/0164328号、米国第2004/0093621号、米国第2004/0132140号、米国第2004/0110704号、米国第2004/0110282号、米国第2004/0109865号、WO2003/085119号、WO2003/084570号、WO2005/035586号、WO2005/035778号、WO2005/053742号、WO2002/031140号、Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)が含まれる。脱フコシル化抗体を産生することが可能である細胞株の例には、タンパク質フコシル化を欠損するLec13 CHO細胞（Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)、Presta, L.の米国特許出願公開第2003/0157108 (A1)号、及びAdamsらのWO2004/056312 (A1)号、特に実施例11)、ならびにアルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子であるFUT8のノックアウトCHO細胞などのノックアウト細胞株（例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)、Ka

10

20

30

40

50

nda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4): 680-688 (2006)、及びWO2003/085107号を参照されたい)が含まれる。

【0179】

抗体変異体はバイセクト型オリゴ糖をさらに含んでおり、例えば、それらの変異体では抗体のFc領域に結合している二分岐型オリゴ糖がGlcNAcによってバイセクト化される。そのような抗体変異体では、フコシル化が低下し、かつ/またはADCC機能が改善し得る。そのような抗体変異体の例は、例えば、WO2003/011878号(Jean-Mairet et al.)、米国特許第6,602,684号(Umana et al.)、及び米国第2005/0123546号(Umana et al.)に記載されている。Fc領域に結合しているオリゴ糖の中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。そのような抗体変異体は、改善されたCDC機能を有し得る。そのような抗体変異体は、例えば、WO1997/30087号(Patel et al.)、WO1998/58964号(Raju, S.)、及びWO1999/22764号(Raju, S.)に記載されている。

10

【0180】

c) Fc領域変異体

ある特定の実施形態において、本明細書において提供される抗体のFc領域に1つまたは複数のアミノ酸修飾を導入することによって、Fc領域変異体が生成され得る。そのFc領域変異体は、1つまたは複数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 Fc領域、IgG2 Fc領域、IgG3 Fc領域、またはIgG4 Fc領域)を含んで良い。

20

【0181】

ある特定の実施形態において、抗体変異体は、全てのエフェクター機能ではなくいくつかのエフェクター機能を有し、それによってその抗体変異体は、インビボでの抗体半減期が重要であるがある特定のエフェクター機能(補体及びADCCなど)が不要または有害になる用途にとって望ましい候補になる。インビトロ細胞傷害アッセイ及び/またはインビボ細胞傷害アッセイを実施してCDC活性及び/またはADCC活性の低下/除去を確認することができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイを実施して、抗体はFcR結合を欠いている(したがって、ADCC活性を欠いている可能性がある)がFcRn結合能を保持していることを確認することができる。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞はFc(RIIのみを発現し、一方で単球はFc(RI、Fc(RII、及びFc(RIIIを発現する。造血細胞でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457~492 (1991)の464頁の表3に要約されている。目的分子のADCC活性を評価するインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5500362号明細書(例えば、Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83: 7059-7063 (1986)を参照されたい)、及びHellstrom, I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82: 1499-1502 (1985)、第5821337号(Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166: 1351-1361 (1987)を参照されたい)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ方法(例えば、フローサイトメトリー用ACTI(商標)非放射性細胞傷害アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA)、及びCytotox96(登録商標)非放射性細胞傷害アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照されたい)を用いることができる。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。代替としてまたは追加として、目的分子のADCC活性は、例えば、Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95: 652~656 (1998)において開示されているモデルのような動物モデルにおいてインビボで評価され得る。また、C1q結合アッセイを実施して、抗

30

40

50

体がC1qに結合することができず、したがってCDC活性を欠いていることを確認しても良い。例えば、WO2006/029879号及びWO2005/100402号のC1q及びC3c結合性ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを実施して良い(例えば、Gazzano-Santorio et al., J. Immunol. Methods 202:163(1996)、Cragg, M. S. et al. Blood. 101:1045~1052(2003)、及びCragg, M. S. and M. J. Glennie Blood. 103:2738~2743(2004)を参照されたい)。FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期の決定も、当技術分野において知られている方法を用いて実施され得る(例えば、Petkova, S. B. et al. Int'l. Immunol. 18(12):1759~1769(2006)を参照されたい)。

10

【0182】

低下したエフェクター機能を有する抗体には、Fc領域の残基238、残基265、残基269、残基270、残基297、残基327及び残基329のうちの一つまたは複数の置換を有する抗体が含まれる(米国特許第6,737,056号)。そのようなFc突然変異体には、残基265及び残基297のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc突然変異体(米国特許第7332581号明細書)をはじめとしてアミノ酸位置265、位置269、位置270、位置297及び位置327のうちの一つ以上に置換を有するFc突然変異体が含まれる。

【0183】

FcRへの結合が改善された、または減少した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、WO2004/056312号、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)を参照されたい)。

20

【0184】

ある特定の実施形態において、抗体変異体は、ADCCを改善する一つまたは複数のアミノ酸置換、例えばFc領域の位置298、位置333、及び/または位置334(残基のEU付番)における置換を有するFc領域を含む。

【0185】

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、WO99/51642号、及びIdusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184(2000)に記載されるような、C1q結合及び/または補体依存性細胞傷害(CDC)を改変させる(すなわち、改善する、または低下させるかのいずれか)改変がFc領域に行われる。

30

【0186】

半減期が増加し、かつ母体IgGの胎児への移行を担う新生児Fc受容体(FcRn)への結合が改善された(Guyer et al., J. Immunol. 117:587(1976)及びKim et al., J. Immunol. 24:249(1994))抗体は、米国第2005/0014934(A1)号(Hinton et al.)に記載されている。それらの抗体は、Fc領域のFcRnへの結合を改善する一つまたは複数の置換を有するFc領域を含む。そのようなFc変異体には、Fc領域残基、すなわち、残基238、残基256、残基265、残基272、残基286、残基303、残基305、残基307、残基311、残基312、残基317、残基340、残基356、残基360、残基362、残基376、残基378、残基380、残基382、残基413、残基424または残基434のうちの一つまたは複数における置換、例えばFc領域残基434の置換(米国特許第7,371,826号明細書)を有する変異体が含まれる。

40

【0187】

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

50

624, 821号、及びWO94/29351号も参照されたい。

【0188】

d) システイン改変抗体変異体

ある特定の実施形態において、抗体の1つまたは複数の残基がシステイン残基で置換されているシステイン改変抗体、例えば「チオMAB」を作製することが望ましい場合がある。特定の実施形態において、置換残基は、抗体の接触可能な部位に生じる。それらの残基をシステインで置換することで、反応性チオール基は、抗体の接触可能な部位に配置され、本明細書においてさらに説明されるように、それらの反応性チオール基を使用してその抗体を薬品部分またはリンカー-薬品部分などの他の部分に結合させて、免疫複合体を作製することができる。ある特定の実施形態において、次の残基、すなわち、軽鎖のV205 (Kabab付番)、重鎖のA118 (EU付番)、及び重鎖Fc領域のS400 (EU付番)のうちのいずれか1つまたは複数がシステインで置換され得る。システイン改変抗体は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されるように作製され得る。

10

【0189】

e) 抗体誘導体

ある特定の実施形態において、本明細書において提供される抗体は、当技術分野において知られている、かつ容易に利用可能である追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに改変され得る。抗体の誘導体化に適切な部分には、水溶性重合体が含まれるがこれらに限定されない。水溶性重合体の非限定的な例には、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコール共重合体、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/無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸(ホモ重合体かランダム共重合体のどちらか)、及びデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモ重合体、プロリプロピレン(prolypropylene)オキシド/エチレンオキシド共重合体、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含ま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、水中で安定しているため、製造上の利点を有し得る。重合体は、任意の子量のもので良く、分岐していても分岐していなくても良い。抗体に結合している重合体の数は変化しても良く、1超の重合体が結合している場合には、それらの重合体は同一の分子または異なる分子であり得る。一般的に、誘導体化に使用される重合体の数及び/または種類は、改善される抗体の特定の特性または機能、その抗体誘導体が規定の条件下で治療に使用されることになるかどうか等を含むがこれらに限定されない考慮事項に基づいて決定され得る。

20

30

【0190】

別の実施形態において、抗体と放射線への曝露によって選択的に加熱され得る非タンパク質性部分との複合体が提供されて良い。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である(Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600~11605 (2005))。放射線は、任意の波長のもので良く、その放射線には普通の細胞を傷つけることはないが、抗体-非タンパク質性部分の近くにある細胞を殺滅する温度までその非タンパク質性部分を加熱する波長が含まれるがこれらに限定されない。

40

【0191】

B. 組換え方法及び組成物

抗体は、例えば米国特許第4,816,567号に記載される組換え方法及び組成物を用いて作製され得る。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。そのような核酸は、本抗体のVLを含むアミノ酸配列及び/または本抗体のVHを含むアミノ酸配列(例えば、本抗体の軽鎖及び/または重鎖)をコードし得る。追加の実施形態において、そのような核酸を含む1つまたは複数のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。追加の実施形態において、そのような核酸を

50

含む宿主細胞が提供される。一つのそのような実施形態において、宿主細胞は、(1)本抗体のV_Lを含むアミノ酸配列及び本抗体のV_H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)本抗体のV_Lを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1ベクター及び本抗体のV_Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2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、真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはリンパ系細胞(例えば、Y0細胞、NS0細胞、Sp20細胞)である。一実施形態において、抗LgR5抗体の作製方法であって、上記抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を抗体の発現に適切な条件下で培養することと、任意選択で宿主細胞(または宿主細胞培地)から抗体を回収することと、を含む、方法が提供される。

10

【0192】

抗LgR5抗体の組換え産生のため、抗体をコードする核酸、例えば上記のものを単離し、さらなるクローニング及び/または宿主細胞中での発現のために1つまたは複数のベクターに挿入させる。そのような核酸は、従来の技法を用いて(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより)容易に単離かつ配列決定され得る。

【0193】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に適切な宿主細胞には、本明細書に記載される原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、特にグリコシル化とFcエフェクター機能が必要ではないときには細菌内で抗体を作製して良い。細菌内での抗体断片及びポリペプチドの発現について、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号、及び同第5,840,523号を参照されたい(大腸菌内での抗体断片の発現について説明しているCharlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254頁も参照されたい)。発現後、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから本抗体を単離させて良く、本抗体をさらに精製することができる。

20

【0194】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母のような真核微生物は、抗体をコードするベクターにとって適切なクローニング宿主または発現宿主であり、それらの真核微生物には真菌株及び酵母株が含まれ、それらのグリコシル化経路は「ヒト化」されており、それによって部分的または完全にヒト型のグリコシル化パターンを有する抗体が産生される。Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004)、及びLi et al., *Nat. Biotech.* 24: 210-215 (2006)を参照されたい。

30

【0195】

グリコシル化抗体の発現に適切な宿主細胞はまた、多細胞生物(無脊椎動物及び脊椎動物)に由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物細胞及び昆虫細胞が含まれる。昆虫細胞と併用して、特にヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*)細胞の形質移入に使用することができる多数のパキユロウイルス株が特定されている。

40

【0196】

植物細胞培養物も宿主として利用可能である。例えば、(遺伝子導入植物内で抗体を産生するためのPLANTIBODIES(商標)テクノロジーについて記載している)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、及び同第6,417,429号を参照されたい。

【0197】

脊椎動物細胞も宿主として使用可能である。例えば、懸濁状態で増殖するように適応されてい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

50

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)、ヒト子宮頸癌細胞(HELA)、イヌ腎臓細胞(MDCK)、バッファローラット肝臓細胞(BRL3A)、ヒト肺細胞(W138)、ヒト肝臓細胞(HepG2)、マウス乳腺腫瘍(MMT060562)、例えばMather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44~68(1982)に記載されるTRI細胞、MRC5細胞、及びFS4細胞である。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))をはじめとするチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ならびにY0、NS0及びSp2/0などの骨髄腫細胞株が含まれる。抗体産生に適切なある特定の哺乳類宿主細胞株に関する総説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248(B.K.C. Lo, ed, Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268頁(2003)を参照されたい。

10

【0198】

C. アッセイ

本明細書において提供される抗LgR5抗体は、当技術分野において知られている様々なアッセイによってそれらの物理的/化学的特性及び/または生物活性について特定され、スクリーニングされるか、または特性付けられ得る。

20

【0199】

一態様において、本発明の抗体は、例えばELISA、FACS、またはウエスタンブロットなどの公知の方法によってその抗原結合活性について検査される。

【0200】

別の態様において、競合アッセイは、LgR5への結合につい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するために用いられ得る。ある特定の実施形態において、そのような競合抗体は、本明細書に記載される抗体が結合するのと同じエピトープ(例えば、直鎖状エピトープまたは立体構造エピトープ)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示的方法が、Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols,” in Methods in Molecular Biology vol. 66(Humana Press, Totowa, NJ)に提供されている。

30

【0201】

例示的な競合アッセイでは、LgR5に結合する第1標識抗体(例えば、本明細書に記載される抗体のいずれか)及びLgR5への結合についてその第1抗体と競合する能力について検査されている第2非標識抗体を含む溶液の中で、固定化LgR5がインキュベートされる。第2抗体はハイブリドーマ上清中に存在し得る。対照として、第2非標識抗体を含まないが第1標識抗体を含む溶液の中で、固定化LgR5がインキュベートされる。第1抗体がLgR5に結合するのを許容する条件下でインキュベートした後に、過剰な未結合抗体を除去して、固定化LgR5と結合した標識の量を測定する。検査試料中の固定化LgR5と結合した標識の量が対照試料と比較して実質的に減少している場合、そのことは、第2抗体がLgR5への結合について第1抗体と競合していることを示す。Harlow and Lane(1988)Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照されたい。

40

【0202】

D. 免疫複合体

本発明は、化学療法剤または化学療法薬、増殖抑制剤、毒素(例えば、タンパク質毒素、細菌起源、真菌起源、植物起源、もしくは動物起源の酵素活性型毒素、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)などの1つまたは複数の細胞傷

50

害性薬剤に結合した本明細書における抗 L g R 5 抗体を含む免疫複合体も提供する。

【0203】

免疫複合体は、薬品部分の腫瘍への標的化送達を可能にし、いくつかの実施形態においては、非複合化薬品の全身投与により正常細胞にとって許容できないレベルの毒性が生じ得る場合には、腫瘍中での細胞内蓄積を可能にする (Polakis P. (2005) Current Opinion in Pharmacology 5:382-387)。

【0204】

抗体薬物複合体 (ADC) は、抗原発現性腫瘍細胞に対する強力な細胞傷害薬 (Teicher, B. A. (2009) Current Cancer Drug Targets 9:982-1004) を標的とし、それによって効力を最大限に高めてオフターゲット毒性を最小限に抑えることで、治療指数を向上させることにより抗体及び細胞傷害薬の両方の特性を併せ持つ標的化化学療法分子である (Carter, P. J. and Senter P. D. (2008) The Cancer Jour. 14(3):154-169; Chari, R. V. (2008) Acc. Chem. Res. 41:98-107)。

10

【0205】

本発明の ADC 化合物には、抗癌活性を有するものが含まれる。いくつかの実施形態において、ADC 化合物には、その薬品部分に結合した、すなわち共有結合した抗体が含まれる。いくつかの実施形態において、抗体は、リンカーを介してその薬品部分に共有結合している。本発明の抗体薬品複合体 (ADC) は、腫瘍組織に有効用量の薬品を選択的に送達し、それによって治療指数 (「治療濃度域」) が向上させながらより高い選択性、すなわちより少ない有効用量が達成され得る。

20

【0206】

抗体薬品複合体 (ADC) の薬品部分 (D) には、細胞傷害性効果または細胞増殖抑制効果を有する任意の化合物、部分、または基が含まれ得る。薬品部分は、チューブリン結合、DNA 結合、またはインターカレーション、及び RNA ポリメラーゼの阻害、タンパク質合成の阻害、及び/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効果及び細胞増殖抑制効果を与え得る。例示的な薬品部分には、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、ピロロペンゾジアゼピン (PBD)、ネモルピシン及びその誘導体、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、ならびに細胞傷害活性を有するそれらの立体異性体、同配体、類似体、及び誘導体が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0207】

E. 診断及び検出のための方法及び組成物

ある特定の実施形態において、本明細書において提供される抗 L g R 5 抗体のいずれも、生体試料中の L g R 5 の存在の検出に有用である。本明細書において使用される「検出すること」という用語は、定量的検出または定性的検出を包含する。「生体試料」は、例えば、細胞または組織 (例えば、癌性の、または癌性の可能性がある結腸組織、大腸組織、小腸組織、子宮内膜組織、膵臓組織、または卵巣組織をはじめとする生検材料) を含む。

40

【0208】

一実施形態において、診断または検出の方法に使用される抗 L g R 5 抗体が提供される。追加の態様において、生体試料中の L g R 5 の検出方法が提供される。ある特定の実施形態において、本方法は、抗 L g R 5 抗体が L g R 5 に結合するのを許容する条件下で、生体試料と本明細書に記載される抗 L g R 5 抗体とを接触させることと、抗 L g R 5 抗体と生体試料中の L g R 5 との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む。そのような方法は、インビトロ方法またはインビボ方法であって良い。一実施形態において、L g R 5 が患者選択のためのバイオマーカーである場合、抗 L g R 5 抗体は、抗 L g R

50

5 抗体を用いる治療に適格である対象を選択するために使用される。追加の実施形態において、生体試料は細胞または組織（例えば、癌性の、または癌性の可能性がある結腸組織、大腸組織、小腸組織、子宮内膜組織、膵臓組織、または卵巣組織をはじめとする生検材料）である。

【0209】

追加の実施形態において、抗LgR5抗体は、例えば癌の診断、癌の予後予測、もしくは癌の病期分類、適切な治療過程の決定、または治療に対する癌の反応のモニタリングの目的で、例えばインビボイメージング法によって対象におけるLgR5陽性癌を検出するためにインビボで使用される。インビボ検出のための当技術分野において知られている一方法は、例えばvan Dongen et al., The Oncologist 12:1379-1389 (2007)及びVerel et al., J. Nucl. Med. 44:1271-1281 (2003)に記載される免疫陽電子放射断層撮影法（免疫PET）である。そのような実施形態において、対象におけるLgR5陽性癌の検出のための方法であって、LgR5陽性癌を有するか、または有することが疑われる対象に標識抗LgR5抗体を投与することと、対象中の標識抗LgR5抗体を検出することを含み、標識抗LgR5抗体の検出によって対象内のLgR5陽性癌が識別される、方法が提供される。そのような実施形態のうちのある特定の実施形態において、標識抗LgR5抗体は、⁶⁸Ga、¹⁸F、⁶⁴Cu、⁸⁶Y、⁷⁶Br、⁸⁹Zr、及び¹²⁴Iなどの陽電子放出体に結合した抗LgR5抗体を含む。特定の実施形態において、陽電子放出体は⁸⁹Zrである。⁸⁹Zr標識抗体の非限定的な例示的作製方法及び使用方法は、例えばPCT出願公開第WO2011/056983号に記載されている。いくつかの実施形態において、標識抗LgR5抗体は、1つまたは複数のジルコニウム錯体に結合したシステイン改変抗体である。例えば、WO2011/056983号を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0210】

追加の実施形態において、診断または検出の方法は、基材に固定化された第1抗LgR5抗体とLgR5の存在について検査される生体試料とを接触させることと、その基材を第2抗LgR5抗体に曝露することと、第2抗LgR5が第1抗LgR5抗体と生体試料中のLgR5との間の複合体に結合しているかどうかを検出することと、を含む。基材は、任意の支持媒体、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、及び他の基材であり得る。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、癌性の、または癌性の可能性がある結腸組織、大腸組織、小腸組織、子宮内膜組織、膵臓組織、または卵巣組織をはじめとする生検材料）を含む。ある特定の実施形態において、第1または第2抗LgR5抗体は、本明細書に記載される抗体のいずれかのものである。そのような実施形態において、第2抗LgR5抗体は、本明細書に記載されるLgR5.1-12抗体、またはLgR5.1-12抗体に由来する抗体であり得る。そのような実施形態において、第2抗LgR5抗体は、本明細書に記載されるLgR5.26-1抗体、またはLgR5.26-1抗体に由来する抗体であり得る。

【0211】

上記実施形態のいずれかに従って診断または検出され得る例示的障害には、LgR5陽性大腸癌（腺癌を含む）、LgR5陽性小腸癌（腺癌、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、及びリンパ腫を含む）、LgR5陽性卵巣癌（卵巣漿液性腺癌を含む）、LgR5陽性膵臓癌（膵管腺癌を含む）、及びLgR5陽性子宮内膜癌などのLgR5陽性癌が含まれる。

【0212】

いくつかの実施形態において、LgR5陽性癌は、本明細書の実施例に記載される条件下（例えば、実施例F、H、及びIを参照されたい）で、非常に弱い染色または無染色に対応するスコア「0」を超えるLgR5免疫組織化学（IHC）スコアを受ける癌である。別の実施形態において、LgR5陽性癌は、本明細書の実施例に記載される条件下（例えば、実施例F、H、及びIを参照されたい）で規定される1+、2+、または3+のレベルのLgR5を発現する。いくつかの実施形態において、1種類または複数種の細胞株

が、染色レベルの対照として使用され得る。例えば、いくつかの実施形態において、実施例 I の中の表 4 に示されている細胞株は、染色レベルの対照として使用して良い。例えば、いくつかの実施形態において、細胞株 SW480、RKO、COLO741、HCT-15、CX-1、HT-29、SW1116、HCA-7、及び/または COLO-205 は 0 染色の対照として使用して良く、細胞株 SW948、CACO-2、及び/または C2BBel は 1 + 染色の対照として使用して良く、かつ/または細胞株 T84、SW1463、SK-CO-1、及び/または LOVO は 2 + 染色の対照として使用して良い。いくつかの実施形態において、LgR5 陽性癌は、本明細書の実施例 H に記載される条件下で規定される 50 以上の Hスコア (50% + 基準を用いる 1 +、2 +、または 3 + の全体的スコアに対応する) を受ける癌である。いくつかの実施形態において、LgR5 陽性癌は、本明細書の実施例 H に記載される条件下で規定される 10 以上の Hスコア (10% + 基準を用いる 1 +、2 +、または 3 + の全体的スコアに対応する) を受ける癌である。

10

【0213】

いくつかの実施形態において、LgR5 陽性癌は、LgR5 mRNA を検出する逆転写酵素 PCR (RT-PCR) アッセイによると、LgR5 を発現している癌である。いくつかの実施形態において、RT-PCR は定量的 RT-PCR である。

【0214】

ある特定の実施形態において、標識抗 LgR5 抗体が提供される。標識には、直接的に検出される標識または部分 (蛍光標識、クロモフォア標識、電子密度標識、化学発光標識、及び放射活性標識など)、及び例えば酵素反応または分子間相互作用を介して間接的に検出される酵素またはリガンドなどの部分が含まれるがこれらに限定されない。例示的な標識には、放射性同位体 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、及び ^{131}I 、レアアースキレート剤またはフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンなどのフルオロフォア、ルセリフェラーゼ (luciferase)、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌性ルシフェラーゼ (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類、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、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、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、HRP などの色素前駆体を酸化するために過酸化水素を使用する酵素と共役するウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなどのヘテロ環オキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、またはミクロペルオキシダーゼ、ピオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定性フリーラジカルなど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 、及び ^{124}I が含ま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

【0215】

F. 医薬製剤

本明細書に記載される抗 LgR5 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そのような抗体または免疫複合体と 1 種類または複数種の任意選択の薬学的に許容可能な担体 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) とを混合することにより、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製される。薬学的に許容可能な担体は、採用される投薬量及び濃度では受容者にとって概ね無毒であり、それらには、リン酸、クエン酸及び他の有機酸などの緩衝剤、アスコルビン酸及びメチオニンをはじめとする抗酸化剤、保存剤 (オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、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、フェノールアルコール、ブチルアルコール、またはベンジルアルコール、メチルパラベンまたはプロピルパラベンなど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、及び m-クレゾールなど)、低分子量 (約 10 残基未満) ポリペプチド、血清アルブ

40

50

ミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性重合体、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、もしくはリシンなどのアミノ酸、グルコース、マンノース、もしくはデキストリンをはじめとする単糖類、二糖類、及び他の炭水化物、EDTAなどのキレート剤、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などの糖類、ナトリウムなどの塩形成性対イオン、金属配位体（例えばZnタンパク質配位体）、ならびに/またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれるがこれらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容可能な担体には、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）のような間質薬物分散剤、例えばrHuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質がさらに含まれる。rHuPH20をはじめとするある特定の例示的なsHASEGP及び使用方法は、米国特許公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。一態様において、sHASEGPはコンドロイチナーゼなどの1種または複数種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。

10

【0216】

例示的な凍結乾燥抗体製剤または凍結乾燥免疫複合体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤または水性免疫複合体製剤には、米国特許第6,171,586号及びWO2006/044908号に記載されているものが含まれ、後者は酢酸ヒスチジン緩衝液を含む。

20

【0217】

本明細書における製剤には、治療されている特定の適応症に必要なものとして1種類を超える有効成分、好ましくは相互に悪影響を与えない相補的活性を有する有効成分が含有されても良い。例えば、いくつかの例では、アバスチン（登録商標）（ペバシズマブ）を、例えばLgR5陽性結腸癌またはLgR5陽性大腸癌などのLgR5陽性癌の治療のためにさらに提供することが望ましい場合がある。

【0218】

有効成分は、例えばコアセルベーション技術または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えばヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセルまたはゼラチンマイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルによって、コロイド状薬品送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）中に、またはマクロエマルジョン中に封入され得る。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

30

【0219】

持続放出性調製物が調製され得る。持続放出性調製物の適切な例には、抗体または免疫複合体を含有する固形疎水性重合体の半透過性マトリックスが挙げられ、それらのマトリックスは、成形物品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態である。

【0220】

インビボ投与に使用される製剤は一般的に無菌性である。無菌性は、例えば、無菌濾過膜を通じた濾過によって容易に達成され得る。

40

【0221】**G. 治療の方法及び組成物**

本明細書において提供される前記抗LgR5抗体または免疫複合体のいずれも、方法、例えば治療方法に使用され得る。

【0222】

一態様において、本明細書において提供される抗LgR5抗体または免疫複合体は、LgR5陽性細胞の増殖の抑制方法であって、抗LgR5抗体または免疫複合体が細胞の表面上のLgR5に結合するのを許容する条件下で、細胞を抗LgR5抗体または免疫複合体に曝露し、それによってその細胞の増殖を抑制することを含む、方法に使用される。あ

50

る特定の実施形態において、本方法は、インビトロ方法またはインビボ方法である。追加の実施形態において、細胞は結腸細胞、大腸細胞、小腸細胞、卵巣細胞、膵臓細胞、または子宮内膜細胞である。

【0223】

いくつかの実施形態において、本明細書において提供される抗LgR5抗体または免疫複合体は、癌の細胞の少なくとも一部においてKras遺伝子に突然変異を含み、かつ/または大腸腺腫性ポリポーシス症(APC)遺伝子に突然変異を含む癌の治療方法に使用される。様々な実施形態において、癌は、結腸癌、大腸癌、小腸癌、卵巣癌、膵臓癌、及び子宮内膜癌から選択される。いくつかの実施形態において、本明細書において提供される抗LgR5抗体または免疫複合体は、癌の細胞の少なくとも一部においてKras遺伝子に突然変異を含み、かつ/またはAPC遺伝子に突然変異を含む結腸癌または大腸癌の治療方法に使用される。癌(結腸癌及び大腸癌を含む)に見られる非限定的な例示的Kras突然変異には、Krasのコドン12(例えば、G12D、G12V、G12R、G12C、G12S、及びG12A)、コドン13(例えば、G13D及びG13C)、コドン61(例えば、G61H、G61L、G61E、及びG61K)、及びコドン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。癌に見られる非限定的な例示的APC突然変異には、終止コドンなどの突然変異クラスター領域(MCR)中の突然変異、及び短縮型APC遺伝子産物を生じることになるフレームシフト突然変異が含まれる。例えば、Chandra et al., PLoS One, 7:e34479(2012)、及びKohler et al., Hum. Mol. Genet., 17:1978-1987(2008)を参照されたい。

10

20

【0224】

いくつかの実施形態において、癌の治療方法は、癌細胞の少なくとも一部にKras突然変異及び/またはAPC突然変異を含む癌を有する対象に抗LgR5抗体または免疫複合体を投与することを含む。いくつかの実施形態において、癌は、結腸癌、大腸癌、小腸癌、卵巣癌、膵臓癌、及び子宮内膜癌から選択される。いくつかの実施形態において、癌は、結腸癌及び/または大腸癌である。いくつかの実施形態において、対象は、癌細胞の少なくとも一部にKras突然変異及び/またはAPC突然変異を含む癌を有すると以前に判定されている。いくつかの実施形態において、癌はLgR5陽性である。

30

【0225】

試料中の様々なバイオマーカーの存在は多数の方法によって分析することができ、それらの方法の多くは当技術分野において知られており、かつ当業者に理解されており、それらの方法には、免疫組織化学(「IHC」)、ウエスタンブロット分析、免疫沈降、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFA、蛍光活性化細胞選別(「FACS」)、Mass ARRAY、プロテオミクス、(例えば血清ELISA等の)定量的血液ベースアッセイ、生化学的酵素活性アッセイ、インサイチュハイブリダイゼーション、サザン分析、ノーザン分析、全ゲノムシーケンシング、定量的リアルタイムPCR(「qRT-PCR」)及び、例えば、分岐DNA、SISBA、TMAなどの他の増幅型検出方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、及び/または遺伝子発現シリアル分析(「SAGE」)、ならびにタンパク質アレイ分析、遺伝子アレイ分析、及び/または組織アレイ分析によって実施され得る多種多様なアッセイのうちのいずれか1つが含まれるがこれらに限定されない。遺伝子及び遺伝子産物の状況を評価するための典型的なプロトコルが、例えばAusubel et al., eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Units 2(Northern Blotting), 4(Southern Blotting), 15(Immunoblotting) and 18(PCR Analysis)に見出される。Rules Based MedicineまたはMeso Scale Discovery(

40

50

「MSD」)等から入手可能な多重免疫アッセイを使用しても良い。

【0226】

インビトロ細胞増殖阻害は、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得る。そのアッセイは、代謝活性細胞の指標である存在するATPの定量に基づいて培養物中の生存細胞の数を測定する。Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81 - 88、米国特許第6602677号を参照されたい。そのアッセイは、96ウェル形式または384ウェル形式で実施されて良く、それによってそのアッセイが自動化ハイスループットスクリーニング (HTS) に適用可能になる。Cree et al. (1995) A

10

【0227】

別の態様において、医薬として使用される抗LgR5抗体または免疫複合体が提供される。追加の態様において、治療方法に使用される抗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陽性癌の治療に使用される抗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陽性癌を有する個体の治療方法であって、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、方法に使用される抗LgR5抗体または免疫複合体を提供する。一つのそのような実施形態において、本方法は、例えば以下に記載されるような少なくとも1種類の追加治療薬の有効量を個体に投与することをさらに含む。

20

【0228】

追加の態様において、本発明は、医薬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、医薬は、LgR5陽性癌の治療のためのものである。追加の実施形態において、医薬は、LgR5陽性癌の治療方法であって、LgR5陽性癌を有する個体に有効量の医薬を投与することを含む、方法に使用するためのものである。一つのそのような実施形態において、本方法は、例えば以下に記載されるような少なくとも1種類の追加治療薬の有効量を個体に投与することをさらに含む。

30

【0229】

追加の態様において、本発明は、LgR5陽性癌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、そのようなLgR5陽性癌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。一つのそのような実施形態において、本方法は、以下に記載されるような少なくとも1種類の追加治療薬の有効量を個体に投与することをさらに含む。

【0230】

上記実施形態のいずれかによるLgR5陽性癌は、例えば、LgR5陽性結腸癌または大腸癌 (腺癌を含む)、LgR5陽性小腸癌 (腺癌、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、及びリンパ腫を含む)、LgR5陽性卵巣癌 (卵巣漿液性腺癌を含む)、LgR5陽性膵臓癌 (膵管腺癌を含む)、及びLgR5陽性子宮内膜癌であり得る。

40

【0231】

いくつかの実施形態において、LgR5陽性癌は、本明細書の実施例に記載される条件下 (例えば、実施例F、H、及びIを参照されたい) で非常に弱い染色か、または無染色に対応するスコア「0」を超えるLgR5免疫組織化学 (IHC) スコアを受ける癌である。別の実施形態において、LgR5陽性癌は、本明細書の実施例に記載される条件下 (例えば、実施例F、H、及びIを参照されたい) で規定される1+、2+、または3+の

50

レベルの L g R 5 を発現する。いくつかの実施形態において、1 種類または複数種の細胞株は、染色レベルの対照として使用され得る。例えば、いくつかの実施形態において、実施例 I の中の表 4 に示されている細胞株は染色レベルの対照として使用して良い。例えば、いくつかの実施形態において、細胞株 S W 4 8 0、R K O、C O L O 7 4 1、H C T - 1 5、C X - 1、H T - 2 9、S W 1 1 1 6、H C A - 7、及び / または C O L O - 2 0 5 は 0 染色の対照として使用して良く、細胞株 S W 9 4 8、C A C O - 2、及び / または C 2 B B e 1 は 1 + 染色の対照として使用して良く、かつ / または細胞株 T 8 4、S W 1 4 6 3、S K - C O - 1、及び / または L O V O は 2 + 染色の対照として使用して良い。いくつかの実施形態において、L g R 5 陽性癌は、本明細書の実施例 H に記載される条件下で規定される 5 0 以上の H スコア (5 0 % + 基準を用いる 1 +、2 +、または 3 + の全体的スコアに対応する) を受ける癌である。いくつかの実施形態において、L g R 5 陽性癌は、本明細書の実施例 H に記載される条件下で規定される 1 0 以上の H スコア (1 0 % + 基準を用いる 1 +、2 +、または 3 + の全体的スコアに対応する) を受ける癌である。

10

【 0 2 3 2 】

いくつかの実施形態において、L g R 5 陽性癌は、L g R 5 m R N A を検出する逆転写酵素 P C R (R T - P C R) アッセイによると、L g R 5 を発現している癌である。いくつかの実施形態において、R T - P C R は定量的 R T - P C R である。

【 0 2 3 3 】

上記実施形態のいずれかによる「個体」はヒトであり得る。

【 0 2 3 4 】

追加の態様において、本発明は、例えば上記治療方法のいずれかに使用される本明細書において提供される抗 L g R 5 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、本明細書において提供される抗 L g R 5 抗体または免疫複合体のいずれか、及び薬学的に許容可能な担体を含む。別の実施形態において、医薬製剤は、本明細書において提供される抗 L g R 5 抗体または免疫複合体のいずれか、及び例えば以下に記載される少なくとも 1 種類の追加治療薬を含む。

20

【 0 2 3 5 】

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かのどちらかで使用され得る。例えば、本発明の抗体または免疫複合体は、少なくとも 1 種類の追加治療薬と共投与され得る。ある特定の実施形態において、追加治療薬は、例えば、L g R 5 陽性結腸癌または L g R 5 陽性大腸癌などの L g R 5 陽性癌の治療用のアバスチン (登録商標) (ペバシズマブ) である。

30

【 0 2 3 6 】

上述のそのような併用療法は、併用投与 (同一の製剤または別々の製剤に二種類以上の治療薬が含まれる場合) 及び分離投与を包含し、この場合、本発明の抗体または免疫複合体の投与は、追加治療薬及び / またはアジュバントの投与の前、投与と同時に、及び / または投与の後に起こり得る。本発明の抗体または免疫複合体は放射線療法と併用され得る。

【 0 2 3 7 】

抗体または免疫複合体 (及び任意の追加治療薬) は、非経口投与、肺内投与、及び鼻腔内投与、ならびに局所的治療に望まれる場合は傷害内投与を含む任意の適切な手段によって投与され得る。非経口注入には、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、または皮下投与が含まれる。投薬は、部分的には投与が短時間のものであるか長時間にわたるものであるかに応じて、任意の適切な経路によるもの、例えば静脈内注射または皮下注射などの注射によるものであって良い。単回投与または様々な時点での複数回投与、ポーラス投与、及びパルス注入を含むがこれらに限定されない様々な投与スケジュールが本明細書において企図される。

40

【 0 2 3 8 】

抗体または免疫複合体は、良好な医療行為と一致するように製剤され、投薬され、投与されることになる。この状況で考慮する因子には、治療されている特定の障害、治療されている特定の哺乳類動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方

50

法、投与スケジュールリング、及び医師に知られている他の因子が含まれる。抗体または免疫複合体は、問題の障害を予防または治療するために現在使用されている1種類または複数種の薬剤と共に製剤される必要はないが、任意選択でそのように製剤されても良い。そのような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、及び以上で考察した他の因子によって決定する。これらは一般的に、本明細書に記載されたものと同じ投薬量及び投与経路で使用されるか、または本明細書に記載される投薬量の約1%~99%の投薬量で使用されるか、または適切であると経験的/臨床的に判断される任意の投薬量及び任意の経路で使用される。

【0239】

疾患の予防または治療では、(単独で、または1種類以上の他の追加治療薬と組み合わせて使用されるとき)抗体または免疫複合体の適切な投薬量は、治療される疾患の種類、抗体または免疫複合体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体または免疫複合体が予防目的で投与されるのかまたは治療目的で投与されるのかということ、これまでの治療法、患者の病歴及び抗体または免疫複合体に対する応答、ならびに主治医の判断によって決定することになる。抗体または免疫複合体は、患者に一度に、または一連の治療を通して適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $15\text{mg}/\text{kg}$ (例えば $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ~ $10\text{mg}/\text{kg}$)の抗体または免疫複合体は、例えば1回または複数回分割投与されるものであっても、または連続注入されるものであっても、患者への投与のための初期候補投薬量であり得る。1つの典型的な一日投薬量は、上述の因子に応じて約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上範囲であり得る。病状に応じて数日以上にわたって投与を繰り返す場合、一般的には、疾患症状が所望の通りに抑制されるまで治療が持続されることになる。抗体または免疫複合体の1つの例示的な投薬量は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ~約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲となる。したがって、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 、または $10\text{mg}/\text{kg}$ (またはそれらの任意の組み合わせ)の用量が、1回または複数回にわたって患者に投与され得る。そのような用量は(例えば、患者が約2回~約20回、例えば、約6回の用量のその抗体を受容するように)断続的に、例えば毎週または3週間毎に投与され得る。初回の高めの負荷用量、及びそれに続く1回または複数回の低めの用量が投与され得る。しかしながら、他の投薬計画が有用な場合がある。この治療法の進捗は、従来技術及びアッセイによって容易にモニターされる。

【0240】

上記製剤または治療方法のいずれも免疫複合体及び抗LgR5抗体の両方を使用して実施されることが理解される。

【0241】

H. 製品

別の態様において、上記の障害の治療、予防、及び/または診断に有用な物質を含有する製品が提供される。その製品は、容器、その容器上またはその容器と関連付けられるラベルまたは添付文書を備える。適切な容器には、例えば、瓶、バイアル、注射器、静脈内投与用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などの様々な材料から形成され得る。容器は、組成物を、単独で、または障害の治療、予防、及び/または診断に有効である別の組成物と組み合わせて保持し、かつ無菌アクセスポートを有しても良い(例えば、容器は皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内投与用溶液バッグまたはバイアルであり得る)。組成物中の少なくとも1種類の活性薬剤は、抗LgR5抗体または免疫複合体である。ラベルまたは添付文書は、選択された病状の治療にその組成物が使用されることを示す。また、製品は、(a)抗体または免疫複合体を含む組成物の中に含む第1容器、及び(b)さらに細胞傷害性薬剤、さもなければ治療薬を含む組成物の中に含む第2容器を備え得る。この実施形態の製品は、特定の病状を治療するために組成物が使用可能であることを示している添付文書をさらに備えても良い。代替として、または追加として、製品は、静菌性注射用水(BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル溶液またはブドウ糖溶液などの薬学的に許容可能な緩衝液を含む第2(または第

3) 容器をさらに備えて良い。その製品には、商業的な立場及び使用者の立場から望ましい他の材料をさらに含んで良く、それらには、他の緩衝液、希釈液、フィルター、針、及び注射器が含まれる。

【実施例】

【0242】

以下は本発明の方法及び組成物の実施例である。上記概要を考慮すると、様々な他の実施形態が実施され得ることを理解されたい。

【0243】

A. ヒト LgR5 遺伝子発現

遺伝子発現情報を含む独占的データベース (Gene Express (登録商標), Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD) を使用してヒト LgR5 遺伝子発現を分析した。マイクロアレイプロファイルビューアーを使用して Gene Express (登録商標) データベースのグラフ分析を実施した。図1は、様々な組織におけるヒト LgR5 遺伝子発現のグラフ表示である。y軸上のスケールは、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表す。列挙されている各組織の名前から伸びている列の左と右の両方にドットが現れている。その列の左に現れているドットは、正常組織における遺伝子発現を表し、その列の右に現れているドットは腫瘍組織及び疾患組織における遺伝子発現を表す。図1は、ある特定の腫瘍組織または疾患組織の LgR5 遺伝子発現が、それらの正常な対応物と比較して上昇しているのを示している。特に、大腸腫瘍、子宮内膜腫瘍、及び卵巣腫瘍では LgR5 は実質的に過剰発現している。図1の挿入図は、LgR5 は少なくとも次の結腸腫瘍、すなわち腺癌、良性腫瘍、及び転移性結腸腫瘍において過剰発現し、かつ50%未満の結腸腫瘍量を有する組織(図1の挿入図内の「低腫瘍」)においても過剰発現するが、正常結腸、クローン病、または潰瘍性大腸炎では過剰発現しないことを示している。ヒト LgR5 発現は正常組織ではかなり低く、正常な脳組織、筋肉組織、卵巣組織、及び胎盤組織において発現が低レベルである。

【0244】

B. 結腸腫瘍におけるヒト LgR5 の出現率

大腸癌における LgR5 の発現を評価するために、複数の供給源 (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) から57の原発性大腸腺癌を入手した。44パーセントの試料は男性からのものであり、患者の平均年齢は66歳(31歳~93歳の範囲)であった。Bubendorf L, et al., J Pathol. 2001 Sep; 195(1): 72-9に記載されるように二重コアを使用して組織マイクロアレイ(TMA)を組み立てて、それらの組織マイクロアレイは適合症例に由来する5つの正常大腸粘膜試料を含ませた。

【0245】

表2に示されているオリゴヌクレオチドプローブを使用するインサイチュハイブリダイゼーションによって LgR5 発現を決定した。例えば、Jubb AM, et al., Methods Mol Biol 2006; 326: 255-64を参照されたい。

- アクチンのISHを用いて分析前の大腸癌組織におけるmRNAの完全性を確認した。

遺伝子	GeneBank受託番号	プローブに対して相補的なヌクレオチド	アンチセンス (AS) またはセンス (S)	フォワードプライマー (5' ~ 3')	リバースプライマー (5' ~ 3')
Lgr5	NM_003667	508	AS	ACCAACTGC ATCCTAAAC TG (配列番号92)	ACCGAGTTTC ACCTCAGCTC (配列番号93)
Lgr5	NM_003667	496	S	ACATTGCC TGTTGCTCT TC (配列番号94)	ACTGCTCTGA TATACTCAAT C (配列番号95)

10

20

【0246】

熟練した病理学者が、染色強度（銀粒子）及び染色幅を考慮して下のスキームに従ってLgr5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%超において非常に弱いハイブリダイゼーションであるか、またはハイブリダイゼーションがない

1+（軽度）：主要なハイブリダイゼーションパターンが弱い

2+（中程度）：主要なハイブリダイゼーションパターンが腫瘍性細胞の過半数（50%超）においてやや強い

3+（重度）：主要なハイブリダイゼーションパターンが腫瘍性細胞の過半数（50%超）において強い

ハイブリダイゼーションの特異性の対照にセンスプローブを使用した。

30

【0247】

図2は、1+レベル、2+レベル、及び3+レベルの染色を有する例示的な結腸腫瘍切片を示している。上のパネルは暗視野像を示し、下のパネルは明視野像を示している。暗視野像における銀粒子の沈着はプローブのハイブリダイゼーション及びLgr5 mRNAの発現を意味する。分析された結腸腫瘍切片の約77%（41/53）がLgr5陽性であり、1+レベル、2+レベル、または3+レベルの染色を示し、34%（18/53）が2+または3+の染色を示した。分析された57試料のうち4試料ではLgr5発現についての情報がなかった。

40

【0248】

結腸腫瘍におけるLgr5発現の有意性を評価するため、大腸腺癌の外科的切除を受けたことがある集団ベースの一連の患者の記録を1988年から2003年までのSt James' University Hospital (Leeds, UK)の病理学記録保管所から遡及的に集めた。Bubendorf L, et al., J Pathol. 2001 Sep; 195(1): 72-9に記載されるように患者当たり1つの正常粘膜のコア及び3つの腺癌のコアを使用して組織マイクロアレイ(TMA)を構成した。上記のようにISHを実施してスコア化を行った。同じ腫瘍に由来する3つのコアでの発現の不均質性も決定された。それは、3つのコアのうち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、及び+3のスコアを有した場合、その腫瘍に由来するそれら3つのコアのうち1つが2つと異なる

50

。

【0249】

図3Aは、インサイチュハイブリダイゼーションによって測定された結腸腫瘍組織マイクロアレイにおける0レベル、1+レベル、2+レベル、及び3+レベルのLgR5染色の出現率を示している。結腸腫瘍組織の75%が、1+レベル、2+レベル、または3+レベルの染色を示し、37%が2+または3+の染色を示した。図3BはLgR5発現の不均質性を示している。腫瘍の67%が3つのコアで不均質性を示さなかった。32%がそれら3つのコアのうちの1つの不一致を示し、1%だけが1を超える不一致を示した。

【0250】

C. 免疫組織化学に適切ではない市販の抗体

高品質の免疫組織化学(IHC)反応性抗体がないことがLgr5の発現の決定における長年の問題である。これまでは、限られた方法でLgr5のRNA発現が調査されてきた。しかしながら、胃、結腸、及び毛包を除くヒトにおける正常組織発現パターンについてのデータがほとんどない。

【0251】

IHC抗体として市販されている6種類の異なる商用抗体を免疫組織化学用の抗体としての安定性について検査した。293細胞の表面上で発現するLgR5への結合について、ウサギポリクローナル抗体MC-1235(MBL International Corp., Woburn, MA)を検査したところ、LgR5検出が観察されなかった。ウサギポリクローナル抗体MC-1236(MBL International Corp., Woburn, MA)は、LgR5が293細胞上で過剰発現するとき、それを染色することができたが、LoVo結腸癌細胞上ではベクターのみで形質移入された293細胞と比較して特異的LgR5染色は観察されなかった。さらに、MC-1236で染色された脳組織は血管内で高レベルの染色を示し、血清のバックグラウンド染色の可能性が示唆された。

【0252】

ウサギモノクローナル抗体2495-1(Epitomics, Burlingame, CA)は、293細胞の表面上で発現するLgR5を特異的に染色することが分かった。LoVo結腸癌細胞及びD5124結腸癌細胞は弱い細胞質染色を示し、いくつかのSW116結腸癌細胞は非常に弱い染色を示した。ヒトの結腸組織及び小腸組織は上皮区画において弱い染色を示し、腸陰窩を通して広範囲に拡散した細胞質染色を特徴とした。しかしながら、その陰窩の基底部分では特異的な染色は認められず、かつ検査された細胞株または組織のいずれにおいても膜特異的な染色は観察されなかった。

【0253】

さらに3種類の商用抗体、すなわちウサギポリクローナル抗体HPA012530(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、ウサギモノクローナル抗体LS-C105455(LifeSpan Biosciences, Inc., Seattle, WA)、及びマウスモノクローナル抗体TA503316(OriGene, Rockville, MD)を特異的LgR5染色について検査した。それらの抗体の中で正常なヒト小腸組織試料及び/またはヒト結腸組織試料の特異的膜染色を示す抗体もなければ、それらの組織内の陰窩底部で検出されるLgR5もなかった。

【0254】

D. ウサギモノクローナル抗体の生成

マウスにおけるIHC反応性抗体を開発する試みが何度か失敗した後、ウサギにおいてIHC反応性抗体を生成した。CHO細胞中で産生されるLgR5細胞外ドメイン(EC D)huFc(配列番号96)融合タンパク質でウサギを免疫化した。標準的プロトコルを用い、試験血液を使用してLgR5に対する血清抗体価を評価した。2匹のウサギが良好な免疫応答を有することが分かり、それらのウサギを脾臓摘出術及びモノクローナル融合の候補として選んだ。

【0255】

10

20

30

40

50

脾臓摘出術を実施し、脾臓細胞を単離し、 200×10^6 個のリンパ球細胞を 100×10^6 個の融合パートナー細胞と融合させて、96ウェルプレート(Epitomics, Burlingame, CA)上に播種させた。標準的条件下でそれらのプレートを培養した。

【0256】

標準的ELISAプロトコルを用いて、プレートをLgR5細胞外ドメイン(ECD)huFc融合体で被膜させて、プレートをスクリーニングした。3つのクローンを選択し、24ウェルプレート中に拡張させた。それら拡張されたクローンのうちの36クローンをELISA及びヒトまたはマウスのLgR5を発現する293細胞を使用する免疫組織化学(IHC)によって検査した。

10

【0257】

ヒト腸陰窩底部円柱細胞上のLgR5を認識する抗体がクローンによって産生されたかを判定することを含む追加の検査の後、抗体1-12及び26-1をクローニング用を選択した。簡単に説明すると、製造業者の指示に従ってTuboCaptureキット(Qiagen:カタログ番号72232)を使用してハイブリドーマ細胞由来のmRNAを単離し、次にオリゴdTプライマーを使用してcDNA内に逆転写させた。重鎖(VH)の可変領域をPCR増幅させた。軽鎖(LC)全体をPCRさせた。制限酵素HindIII及びKpnIを使用してPCR増幅されたVH領域を消化した。制限酵素HindIII及びNotIを使用してPCR増幅されたLCを消化した。Qiagen QIAquick PCR精製キット(カタログ番号28014)を使用して消化産物を精製した。精製後にVH及びLCを重鎖または軽鎖発現ベクターにライゲーションさせ、DH5細胞(MC Lab、カタログ番号DA-100)に形質転換させた。形質転換されたコロニーを選択し、対応する制限酵素を使用して予期されるサイズによって挿入物を確認した。予期されるサイズの挿入物を含むプラスミドを、TT5プライマーを使用して配列決定した。重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の配列が、抗体1-12については図4ならびに配列番号6及び5にそれぞれ示されており、抗体26-1については図4ならびに配列番号8及び7にそれぞれ示されている。

20

【0258】

軽鎖重鎖発現ベクター及び重鎖発現ベクターをCHO細胞に共形質移入して、プロテインAを使用して細胞培養上清から精製した。

30

【0259】

E. 抗体エピトープの決定

FACS競合アッセイを用いて抗体1-12及び26-1によって認識されるエピトープをマッピングした。簡単に説明すると、293細胞内においてヒトLgR5を発現させ、アミノ酸22~122を含むLgR5上のエピトープに結合することが以前から示されている抗体huYW353(配列番号98及び88にそれぞれ示されている重鎖配列及び軽鎖配列)、及びアミノ酸22~322を含むLgR5上のエピトープに結合することが以前から示されている抗体8E11(配列番号29及び28にそれぞれ示されている重鎖可変領域及び軽鎖可変領域)を使用して競合アッセイを実施した。

40

【0260】

抗体26-1はLgR5結合についてhuYW353及び8E11と競合することが分かり、一方で抗体1-12はLgR5結合についてhuYW353または8E11のどちらとも競合しないことが分かった(データを示さず)。したがって、抗体26-1はヒトLgR5のアミノ酸22~322の領域内のエピトープに結合し、一方で抗体1-12はその領域外のエピトープに結合することは明らかである。

【0261】

F. 正常組織でのLgR5の検出

抗体LGR5.1-12を使用して正常ヒト組織上でのLgR5の発現を検出した。Dako Universal Autostainer(Dako, Carpinteria, CA)上でLgr5の免疫組織化学(IHC)を実施した。簡単に説明すると、ホ

50

ルマリン固定パラフィン包埋した全組織及び組織マイクロアレイ切片を脱パラフィンし、Target Retrieval pH6 (Dako) を使用してPT Module (Thermo Scientific, Kalamazoo, MI) 中で20分間にわたって99 で抗原アンマスクングを実施した。内在性ペルオキシダーゼを4分間にわたる3% H₂O₂ のPBSの処理によって阻害し、アビジン/ビオチンブロッキングキット (Vector Labs, Burlingame, CA) を使用して内在性ビオチンをブロックした。10% 口バ血清の3% BSA / PBS を使用して内在性IgGをブロックし、Lgr5に対する一次抗体 (LGR5.1-12) を4 µg/ml で60分間にわたって室温でインキュベートした。ビオチン化口バ抗ウサギIgG (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) を30分間にわたって室温でインキュベートし、続いてVectastain ABC Elite - HRP (Vector Labs) で30分間にわたって室温で処理した。Metal-Enhanced DAB (Pierce Rockford, IL) を室温で5分間にわたって用いて抗体結合を検出し、Mayer's Hematoxylin (Rowley Biochemical, Danvers, MA) により切片を対比染色した。

10

【0262】

抗体LGR5.1-12は予期されるパターンで正常腸陰窩を染色した。図5Aを参照されたい。中程度の染色も毛包において観察され(図5B)、弱い染色が卵管、子宮内膜、副腎、及び脊髄において観察された(図5C)。

20

【0263】

G. 異種移植腫瘍でのLgR5の検出

LoVoX1.1異種移植モデルマウス及びD5124異種移植モデルマウスから単離された腫瘍をフローサイトメトリーにより分析して抗体YW353を使用してLgR5の表面発現を判定した。簡単に説明すると、LoVo1.1腫瘍またはD5124腫瘍を採取し、コラゲナーゼ酵素混合物を含む、1%ウシ血清アルブミン(BSA)のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)でそれらの腫瘍を処理した。腫瘍を37 で15分間にわたってインキュベートし、1%BSAを含むPBS中で細胞を洗浄した。細胞を遠沈させて、塩化アンモニウム-カリウム溶解緩衝液中に再懸濁させ、赤血球を溶解させた。1%BSAを含むPBS及び10%ウシ胎児血清(FBS)を含むRRMI1640培地で細胞を洗浄した。細胞を蛍光活性化細胞選別緩衝液(1%BSAを含むPBS)に再懸濁させて、抗LgR5抗体と共に45分間にわたってインキュベートし、続いてPE結合抗ヒト二次抗体と共に30分間にわたってインキュベートした。FACSCalibur(商標)フローサイトメーター(BD Biosciences)により分析を実施した。

30

【0264】

図6はその実験の結果を示している。(A)LoVoX1.1異種移植腫瘍細胞及び(B)D5124異種移植腫瘍細胞の表面上のLgR5は、抗体YW353を使用するFACSによって検出可能であった。免疫組織化学により、LgR5の発現は、抗体LGR5.1-12を使用すると、(C)LoVoX1.1異種移植腫瘍及び(D)D5124異種移植腫瘍の両方では2+となった。それぞれの染色レベルを示す視野の細胞のパーセンテージが(C)に示されているパネルの上部にある。

40

【0265】

H. 免疫組織化学による結腸腫瘍でのLgR5の出現率

結腸腫瘍におけるLgR5の出現率を決定するため、上記実施例(E)に記載されたように、抗体LGR5.1-12を使用して143試料の様々な結腸腫瘍に由来するコアを含む組織マイクロアレイに対して、免疫組織化学を実施した。

【0266】

それらの結腸腫瘍の40パーセントはLgR5に対して陽性であり、以下の基準を用いると、29%(41/143)のスコアは1+であり、9%(13/143)のスコアは2+であり、2%(3/143)のスコアは3+であった。

0 = 無染色、

50

- 1 + = 弱い染色、
- 2 + = 中程度の染色、及び
- 3 + = 強い染色。

【 0 2 6 7 】

残りの結腸腫瘍（ 8 6 / 1 4 3 ）のスコアは、抗体 L G R 5 . 1 - 1 2 を使用する I H C によって、 0 となった。図 7 A ~ D は、抗体 L G R 5 . 1 - 1 2 を使用する結腸腫瘍の例示的な 0、 1 +、 2 +、及び 3 + の染色を示している。

【 0 2 6 8 】

I H C 染色におけるかなりの不均質性が観察された。したがって、抗体 L G R 5 . 1 - 1 2 を使用して 1 9 の結腸癌腫瘍切片に対して I H C を実施した。それらの切片のうちの 3 つの切片が L g R 5 発現に対して陰性であり、 2 つの切片において細胞の 5 0 % 超が L g R 5 に対して陽性であり、残りの切片は、 0 % ~ 5 0 % の染色を示した。表 3 は、各レベルで染色された各切片の中の細胞のパーセンテージ、及び 5 0 % 基準（すなわち、細胞のうちの 5 0 % 以上が L g R 5 に対して陽性）または 1 0 % 基準（すなわち、細胞のうちの 1 0 % が L g R 5 に対して陽性）を使用する全体的スコアを示している。上記の D 5 1 2 4 異種移植腫瘍及び L o V o 異種移植腫瘍で観察された染色も比較のために含まれている。Hスコアは、（ 1 + の細胞染色の % ） + （ 2 + の細胞染色の % ） × 2 + （ 3 + の細胞染色の % ） × 3 に等しい。Hスコアは、各染色強度の細胞のパーセンテージを考慮するものである。

表3：抗体LGR5. 1-12を使用する結腸腫瘍切片の免疫組織化学

試料	0	+1	+2	+3	H-スコア	全体的スコア (50%+基準)	全体的スコア (10%+基準)
HP-2889	40	45	15	0	75	1+	1+
HP-9328	80	17	3	0	23	0	1+
HP-11394	85	10	5	0	20	0	1+
HP-19862	85	0	15	0	30	0	2+
HP-19882	75	25	0	0	25	0	1+
HP-20531	60	40	0	0	40	0	1+
HP-21638	25	65	10	0	85	1+	1+
HP-23099	85	15	0	0	15	0	1+
HP-23301	15	20	65	0	150	2+	2+
HP-23302	50	45	5	0	55	1+	1+
HP-23433	55	5	35	5	90	0	2+
HP-23451	95	5	0	0	5	0	0
HP-24574	75	10	15	0	40	0	2+
HP-24583	100	0	0	0	0	0	0
HP-24586	85	10	5	0	20	0	1+
HP-24589	100	0	0	0	0	0	0
HP-24592	90	10	0	0	10	0	1+
HP-24671	100	0	0	0	0	0	0
HP-24672	95	5	0	0	5	0	0

10

20

30

40

D 5 1 2 4 異種移植モデル	1 0	2 0	7 0	0	1 6 0	2 +	2 +
L O V O 異種移植モデル	4 5	2 0	2 5	1 0	1 0 0	2 +	2 +

【 0 2 6 9 】

これらの結果は、結腸腫瘍における L g R 5 発現が抗体 L G R 5 . 1 - 1 2 によって検出され得ることを示している。要約すると、L g r 5 RNA 及びタンパク質の発現は複数の正常組織区画内において観察され、L g r 5 は、不均質ではあるが結腸腫瘍において発現する。

10

【 0 2 7 0 】

I . 抗体 L G R 5 . 2 6 - 1 を使用する免疫組織化学

C X F 2 3 3 (ヒト結腸腫瘍モデル ; Oncotest) 異種移植腫瘍及び様々な結腸癌細胞株において抗体 L G R 5 . 2 6 - 1 による染色と抗体 L G R 5 . 1 - 1 2 による染色とを比較した。Dako Universal Autostainer (Dako , Carpinteria , CA) で L g r 5 の免疫組織化学 (IHC) を実施した。簡単に説明すると、ホルマリン固定パラフィン包埋した腫瘍組織を脱パラフィンし、Target Retrieval pH6 (Dako) を使用して PT Module (Thermo Scientific , Kalamazoo , MI) 中で 20 分間にわたって 9 9 で抗原アンマスキングを実施した。内在性ペルオキシダーゼを 4 分間にわたる 3 % H₂O₂ の PBS の処理によって阻害し、アビジン / ビオチンブロッキングキット (Vector Labs , Burlingame , CA) を使用して内在性ビオチンをブロックした。10 % 口バ血清の 3 % BSA / PBS を使用して内在性 IgG をブロックし、L g r 5 に対する一次抗体 (L G R 5 . 1 - 1 2 または 2 6 - 1) を 4 μ g / ml で 60 分間にわたって室温でインキュベートした。ビオチン化口バ抗ウサギ IgG (Jackson Immunoresearch , West Grove , PA) を 30 分間にわたって室温でインキュベートし、続いて Vectastain ABC Elite - HRP (Vector Labs) で 30 分間にわたって室温で処理した。Metal - enhanced DAB (Pierce , Rockford , IL) を室温で 5 分間にわたって用いて抗体結合を検出し、Mayer's Hematoxylin (Rowley Biochemical , Danvers , MA) により切片を対比染色した。

20

30

【 0 2 7 1 】

図 8 に示されるように、抗体 L G R 5 . 1 - 1 2 (A) 及び抗体 L G R 5 . 2 6 - 1 (B) は、C X F 2 3 3 異種移植腫瘍試料において類似の染色パターンを示す。

【 0 2 7 2 】

また、RNA 配列データを使用する l g r 5 遺伝子発現によって、各細胞株を次のレベルの発現、すなわち発現無し、非常に低い発現、低い発現、中程度の発現、及び高い発現として特徴付けた。加えて、実質的に上記のように、IHC によってそれらの細胞株において L g R 5 レベルを判定した。その実験の結果が表 4 に示されている。

40

表4：抗体LGR5. 1-12及びLGR5. 26-1を使用する結腸癌細胞株のIHC染色

RNA配列発現	細胞株	FACS	抗体1-12	抗体26-1
無し	SW480		0	0
無し	RKO		0	0
無し	COLO741		0	0
非常に低い	HCT-15		0	0
非常に低い	CX-1		0	0
非常に低い	HT-29		0	0
非常に低い	SW403		2+ (60%)	1+ (65%)
低い	SW1116		0	0
低い	HCA-7		0	0
低い	COLO-205		0	0
低い	LS180	-	0	1+ (10%)
低い	SW948		1+ (15%)	1+ (10%)
中程度	CACO-2		1+ (15%)	1+ (15%)
中程度	T84		2+ (40%)	2+ (40%)
中程度	KM-12		2+ (25%)	1+ (60%)
中程度	C2BBE1		1+ (10%)	1+ (15%)
高い	DLD-1	-	0	1+ (10%)
高い	SW620	-	0	1+ (20%)
高い	SW1463	+/-	2+ (50%)	2+ (25%)
高い	SK-CO-1	+/-	2+ (80%)	2+ (85%)
高い	LS174T	-	0	0
高い	LOVO	++	2+ (50%)	2+ (50%)

10

20

30

40

【0273】

抗体LGR5. 1-12及び抗体LGR5. 26-1の両方は、多種多様な結腸癌細胞株の表面上のLgR5を検出することができた。

【0274】

上述の発明は、明確な理解を目的とした図解及び例証によって幾らか詳細に記載されているが、説明及び例証は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書において引用されている全ての特許文献及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援用される。

【0275】

配列表

配列番号	説明	配列	
1	α L g R 5 . 1 - 1 2 抗体軽鎖	AYDMTQTPAS VEVAVGGT VT IK CQASQSIG SNLAWYQQKP GQPP KLLIYG ASNLASGVSS RFKGS SGTE FTLTISDLEC ADAATYYC QT TYGSSSDGFF WTFGGGTEVV VKGDPVAPT V LIFPPAADQV AT GTVTIVCV ANKYFPDVT V TWEV DGTTQT TGIENSKTPQ NSADCT YNLS STLTSTQY NSHKEYTC KV TQGTTSVVQS FNRGDC	10
2	α L g R 5 . 1 - 1 2 重鎖	QSLEESGGGL VQPEGS LTLT CT ASGFSFSR TYWICWDRQA PGKG LEW IAC IYAGGSDNTY YASWAK GRFT ISKTSSTTVT LQVTS LTA AD TATYFCARYY AGSSEYFN LW GPGTLVTVSS ASTKGPSVFP LA PCCGDTPS STVTLGCLVK GYLP EPVTVT WNSGTLTNGV RTFPSV RQSS GLYSLSSVVS VTSSSQPV TC NVAHPATNTK VDKTVAPSTC SKPTCPPPEL LGGPSVFI FP PK PKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQ DDPEVQ FTWYINNEQV RTARPP LREQ QFNSTIRVVS TLP IAHQD WL RGKEFKCKVH NKALPAPIEK TISKARGQPL EPKVYTMGPP RE ELSSRSVS LTCMINGFYP SDIS VEWEKN GKAEDNYKTT PAVLDS DGSY FLYSKLSVPT SEWQRGDV FT CSVMHEALHN HYTQKSI SRS PGK	20 30
3	α L g R 5 . 2 6 - 1 軽鎖	AFELTQTPSS VEA AVGGT VT IK CQASQSI S VGLAWYQQKP GQPP KLLIYK ASTLASGVPS RFKGS R SGTE FTLTISDLEC ADAATYYC QS YYDSSTTANV FGGGTEVVVK GDPVAPT VLI FPPAADQVAT GT VTIVCVAN KYFPDVT V TW EVDG TTQTTG IENSKTPQNS ADCTYN LSST LTLTSTQYNS HKEYTCKV	40

		TQ GTTSVVQSFN RGDC	
4	α L g R 5 . 2 6 - 1 重鎖	QSLEESGGDL VKPGGTLTLT CT ASGIDFSY YSYMCWVRQA PGKG LEWIAC IYAGTSGSTY YASWAK GRFT ISKTSSTTVT LQMISLTA AD TATYFCARSY YTFGVNGYAW DLWGPGTLVT VSSASTKGPS VF PLAPCCGD TPSSTVTLGC LVKG YLPEPV TVTWNSGTLT NGVRTF PSVR QSSGLYSLSS VVSVTSSS QP VTCNVAHPAT NTKVDKTVP STCSKPTCPP PELLGGPSVF IF PPKPKDTL MISRTPEVTC VVVD VSQDDP EVQFTWYINN EQVRTA RPPL REQQFNSTIR VVSTLPIA HQ DWLRGKEFKC KVHNKALPAP IEKTIKARG QPLEPKVYTM GP PREELSSR SVSLTCMING FYPS DISVEW EKNGKAEDNY KTTPAV LDSD GSYFLYSKLS VPTSEWQR GD VFTCSVMHEA LHNHYTQKSI SRSPGK	10
5	α L g R 5 . 1 - 1 2 輕鎖可變領域	AYDMTQTPAS VEVAVGGTVT IK CQASQSIG SNLAWYQQKP GQPP KLLIYG ASNLASGVSS RFKGS SGTE FTLTISDLEC ADAATYYC QT TYGSSSDGFF WTFGGGTEVV VK	30
6	α L g R 5 . 1 - 1 2 重鎖可變領域	QSLEESGGGL VQPEGSLTLT CT ASGFSFSR TYWICWDRQA PGKG LEWIAC IYAGGSDNTY YASWAK GRFT ISKTSSTTVT LQVTSLTA AD TATYFCARYY AGSSEYFNLW GPGTLVTVSS	
7	α L g R 5 . 2 6 - 1 輕鎖可變領域	AFELTQTPSS VEA AVGGTVT IK CQASQSIS VGLAWYQQKP GQPP KLLIYK ASTLASGVPS RFKGS SGTE FTLTISDLEC ADAATYYC QS YYDSSTTANV FGGGTEVVVK	40
8	α L g R 5 . 2 6 - 1 重鎖可變領域	QSLEESGGDL VKPGGTLTLT CT ASGIDFSY YSYMCWVRQA PGKG LEWIAC IYAGTSGSTY YASWAK	

		GRFT ISKTSSTTVT LQMISLTA AD TATYFCARSY YTFGVNGYAW DLWGPGTLVT VSS
9	α L g R 5. 1 - 1 2 HVR - L 1	QASQSIGSNL A
10	α L g R 5. 1 - 1 2 HVR - L 2	GASNLAS
11	α L g R 5. 1 - 1 2 HVR - L 3	QTTYGSSSDG FFWT
12	α L g R 5. 1 - 1 2 HVR - H 1	RTYWIC
13	α L g R 5. 1 - 1 2 HVR - H 2	CIYAGGSDNT YYASWAK
14	α L g R 5. 1 - 1 2 HVR - H 3	YYAGSSEYFN L
15	α L g R 5. 2 6 - 1 HVR - L 1	QASQSI SVGL A
16	α L g R 5. 2 6 - 1 HVR - L 2	KASTLAS
17	α L g R 5. 2 6 - 1 HVR - L 3	QSY YDSSTTA NV
18	α L g R 5. 2 6 - 1 HVR - H 1	YYSYMC
19	α L g R 5. 2 6 - 1 HVR - H 2	CIYAGTSGST YYASWAK
20	α L g R 5. 2 6 - 1 HVR - H 3	SY YTFGVNGY AWDL
21	ヒト L g R 5 前駆 体 ; LGR5_ ヒト NP_00	MDTSRLGVLL SLPVLLQLAT GG SSPRSGVL LRGCPHCHC EPDG RMLLRV DCSDLGLSEL PSNLSV

10

20

30

40

	<p>3658 ; シグナル配列 = アミノ酸 1 ~ 21 ; 22 ~ 558 は細胞外ドメイン (ECD) である</p>	<pre> FTSY LDLSMNNISQ LLPNPLPS LR FLEELRLAGN ALTYIPKGF TGLYSLKVLML LQNNQLRHVP TE ALQNLRSLS QSLRLDANHI SYVP PSCFSG LHSRLRHLWLD DNALTE IPVQ AFRSLSALQA MTLALNKI HH IPDYAFGNLS SLVVLHLHNN RIHSLGKKCF DGLHSLETLD LN YNNLDEFP TAIRTLSNLK ELGF HSNNIR SIPEKAFVGN PSLITI HFYD NPIQFVGRSA FQHLPELR TL TLNGASQITE FPDLTGTANL ESLTLTGAQI SSLPQTVCNQ LP NLQVLDLS YNLLEDLPSF SVCQ KLQKID LRHNEIYEIK VDTFQQ LLSL RSLNLAWNKI AIIHPNAF ST LPSLIKLDLS SNLLSSFPIIT GLHGLTHLKL TGNHALQSLI SS ENFPELVK IEMPYAYQCC AFGV CENAYK ISNQWKNKGDN SSMDDL HKKD AGMFQAQDER DLEDFLLD FE EDLKALHSVQ CSPSPGPFKP CEHLLDGWLI RIGVWTIAVL AL TCNALVTS TVFRSPLYIS PIKL LIGVIA AVNMLTGVSS AVLAGV DAFT FGSFARHGAW WENGVGCH VI GFLSIFASES SVFLLTLAAL ERGFSVKYSA KFETKAPFSS LK VIILLCAL LALTMAAVPL LGGS KYGASP LCLPLPFGE STMGYM VALI LLNSLCFLMM TIAYTKLY CN LDKGDLENIW DCSMVKHIAL LLFTNCILNC PVAFLSFSSL IN LTFISPEV IKFILLVVVP LPAC LNPLLY ILFNPHFKED LVSLRK QTYV WTRSKHPSLM SINSDDVE KQ SCDSTQALVT FTSSSITYDL PPSSVPSPAY PVTESCHLSS VA FVPCL </pre>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
22	<p>シグナル配列を含まないヒト成熟LgR5 ; アミノ酸 22 ~ 907</p>	<pre> GSSPRSGVL LRGCPHCHC EP DGRMLLRV DCSDLGLSEL PSNL SVFTSY LDLSMNNISQ LLPNPL PSLR FLEELRLAGN ALTYIPKG </pre>	

		AF TGLYSLKVLMLQNNQLRHVP TEALQNLRSLSLSLRDLANHISY VPPSCFSGLHSLRHLWLD DNAL TEIPVQAFRSLSALQAMTLALN KIHHPDYAFGNLSLVVLHLH NNRIHSLGKKCFDGLHSLETLD LNYNNLDEFTP TAIRTLSNLK EL GFHSNNIRSIPEKAFVGNPSLI TIHFYDNPIQFVGRSAFQHLPE LRTLTLNGASQITEFPDLTGTA NLESLTLTGAQISSLPQTVCNQ LPNLQVLDLSYNLLEDLPSFSV CQKLQKIDLRHNEIYEIKVDTF QQLLSLRSLNLAWNKI AIIHPN AFSTLPSLIKLDLS SNLLSSFP ITGLHGLTHLKL TGNHALQSLI SSENFPELKVIEMPYAYQCC AF GVCENAYKISNQWNKGDN SSMD DLHKKDAGMFQAQDER DLEDFL LDFEEDLKALHSVQ CSPSPGPF KPCHELLDGWLI RIGVWTIAVL ALTCNALVTS TVFRSPLYIS PI KLLIGVIA AVNMLTGVSS AVLA GVDAFTFGSFARHGAW WENGVG CHVIGFLSIFASES SVFLLTLA AL ERGFSVKYSA KFETKAPFSS LKVIILLCAL LALTMAAVPL LG GSKYGASP LCLPLPFGEPTMG YMVALI LLNSLCFLMM TIAYTK LYCN LDKGDLENIW DC SMVKHI AL LLFTNCILNC PVAFLSFSSSL INLTFISPEV IKFILLVVVPLP ACLNPLLY ILFNPHFKED LVSL RKQTYV WTRSKHPSLM SINSDD VEKQ SCDSTQALVT FTSSSITY DL PPSSVPSPAY PVTESCHLSS VAFVPCL	10 20 30 40
23	カニクイザルLgR5予想部分配列；全長前駆体のアミノ酸33～907に対応すると予想	GCPHCHCEPDGRMLLRVDC SD LGLSELPS NLSVFTSYLD LSMN NISQLL PNPLPSLRFL EELRLA GNAL TYIPKGAFTG LYSLKVLM LQ NNQLRQVPTE ALQNLRSLSQS LRLDANHISY VPPSCFSGLH SL	

		RHLWLDDN ALTEIPVQAF RSLS ALQAMT LALNKIHHIP DYAFGN LSSL VVLHLHNNRI HSLGKKCF DG LHSLETLDLN YNNLDEFPTA IRTLSNLKEL GFHSNNIRSI PE KAFVGNPS LITIHFYDNP IQFV GRSAFQ HLPRLTLTL NGASQI TEFP DLTGTANLES LTLTGAQI SS LPQTVCNQLP NLQVLDLSYN LLEDLPSFSV CQKLQKIDLR HN EIYEIKVD TFQQLLSLRS LNLA WNKIAI IHPNAFSTLP SLIKLD LSSN LLSSFPTGL HGLTHLKL TG NHALQSLISS ENFPELKIIE MPYAYQCCAF GVCENAYKIS NQ WNKGDNSS MDDLHKKDAG MFQV QDERDL EDFLLDFEED LKALHS VQCS PSPGPFKPC E HLLDGWLI RI GVWTIAVLAL TCNALVTSTV FRSPLYISPI KLLIGVIAVV NM LTGVSSAV LAGVDAFTFG SFAR HGAWWE NGVGCQVIGF LSIFAS ESSV FLLTLAALER GFSVKCSA KF ETKAPFSSLK VIILLCALLA LTMAAVPLLG GSEYGASPLC LP LPFGEPST TGYMVALILL NSLC FLMMTI AYTKLYCNLD KGDLEN IWDC SMVKHIALLL FTNCILYC PV AFLSFSSLLN LTFISPEVIK FILLVIVPLP ACLNPLLYIL FN PHFKEDLV SLGKQTYFWT RSKH PSLMSI NSDDVEKQSC DSTQAL VTFT SSSIAYDLPP SSVPSPAY PV TESCHLSSVA FVPCL	10 20 30
24	ラットLgR5前 駆体； LGR5 __ラット NP__ 00110025 4；シグナル配列 =アミノ酸1~2 1	MDTSRVRMLL SLLALLQLVA AG SPPRPDTM PRGCPSYCHC ELDG RMLLRV DCSDLGLSEL PSNLSV FTSY LDLSMNNISQ LPASLLHR LR FLEELRLAGN ALTHIPKGF AGLHSLKVLMLQNNQLRQVP EE ALQNLRSLSL QSLRLDANHI SYVP PSCFSG LHSLRHLWLD DNALTD VPVQ AFRSLSALQA MTLALNKI	40

		<p> LNYNNLDEF P TAIKTLSNLK EL GFHSNNIR SIPERAFVGN PSLI TIHFYD NPIQFVGISA FQHLPE LRTL TLNGASQITE FPDLTGTA TL ESLLTLTGAKI SSLPQTVCDQ LPNLQVLDLS YNLLEDLPSL SG CQKLQKID LRHNEIYEIK GGTF QQLFNL RSLNLRANKI AIIHPN AFST LPSLIKLDLS SNLLSSFP VT GLHGLTHLKL TGNRALQSLI PSANFPELKI IEMPYAYQCC AF GGCENVYK IPNQWNKDDS SSVD DLRKKD AGLFQVQDER DLEDFL LDFE EDLKVLSHVQ CSPPPGPF KP CEHLFGSWLI RIGVWTTAVL ALSCNALVAF TVFRTPLYIS SI KLLIGVIA VVDILMGVSS AILA VVDTFT FGSFAQHGA WEGGIG CQIV GFLSIFASES SVFLLTLA AL ERGFSVKCSS KFEMKAPLSS LKAIIILLCVL LALTIATVPL LG GSEYNASP LCLPLPFGE P STTG YMVALV LLNSLCFLIM TIAYTR LYCS LEKGELENLW DC SMVKHT AL LLFTNCILYC PVAFLSFSSL LNLTFISPEV IKFILLVIVP LP ACLNPLLY IVFNPHFKED MGSL GKQTRF WTRAKHPSLL SINSDD VEKR SCDSTQALVS FTHASIA Y DL PSDSGSSPAY PMTESCHLSS VAFVPCL </p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
26	<p> マウスLgR5前 駆体； LGR5 __マウス NP__ 034325；シ グナル配列=アミ ノ酸1～21 </p>	<p> MDTSCVHMLL SLLALLQLVA AG SSPGDAI PRGCPSHCHC ELDG RMLLRV DCSDLGLSEL PSNLSV FTSY LDLSMNNISQ LPASLLHR LC FLEELRLAGN ALTHIPKGA F TGLHSLKVLM LQNNQLRQVP EE ALQNLRS L QSLRLDANHI SYVP PSCFSG LHS LRHLWLD DNALTD VPVQ AFRSLSALQA MTLALNKI HH IADYAFGNLS SLVVLHLHNN RIHSLGKKCF DGLHSLETLD LN YNNLDEF P TAIKTLSNLK ELGF </p>	<p>40</p>

		<p>HSNNIR SIPERAFVGN PSLITI HFYD NPIQFVGVSA FQHLPELR TL TLNGASHITE FPHLTGTATL ESLTLTGAKI SSLPQAVCDQ LP NLQVLDLS YNLLEDLPSL SGCQ KLQKID LRHNEIYEIK GSTFQQ LFNL RSLNLAWNKI AIIHPNAF ST LPSLIKLDLS SNLLSSFVPT GLHGLTHLKL TGNRALQSLI PS ANFPELKI IEMPSAYQCC AFGG CENVYK ISNQWKNKDDG NSVDDL HKKD AGLFQVQDER DLEDFLLD FE EDLKALHSVQ CSPSPGPFKP CEHLFGSWLI RIGVWTTAVL AL SCNALVAL TVFRTPLYIS SIKL LIGVIA VVDILMGVSS AVLAAV DAFT FGRFAQHGAW WEDGIGCQ IV GFLSIFASES SIFLLTLAAL ERGFVSKCSS KFEVKAPLFS LR AIVLLCVL LALTIATIP LGGG KYNASP LCLPLPFGEP STTGYM VALV LLNSLCFLIM TIAYTKLY CS LEKGELENLW DCSMVKHIAL LLFANCILYC PVAFLSFSSL LN LTFISPDV IKFILLVIVP LPSC LNPLLY IVFNPHFKED MGSLGK HTRF WMRSKHASLL SINSDDVE KR SCESTQALVS FTHASIAIDL PSTSGASPAY PMTESCHLSS VA FVPCL</p>	10 20 30
27	シグナル配列を含まないマウス成熟LgR5 ; アミノ酸22~907	<p>GSSPGPDAI PRGCP SHCHC EL DGRMLLRV DCSDLGLSEL PSNL SVFTSY LDLSMNNISQ LPASLL HRLC FLEELRLAGN ALTHIPKG AF TGLHSLKVLM LQNNQLRQVP EEALQNLRS L QSLRLDANHI SY VPPSCFSG LHSLRHLWLD DNAL TDVPVQ AFRSLSALQA MTLALN KIIH IADYAFGNLS SLVVLHLH NN RIHSLGKKCF DGLHSLETLD LNYNNLDEFP TAIKTLSNLK EL GFHSNNIR SIPERAFVGN PSLI TIHFYD NPIQFVGVSA FQHLPE</p>	40

		<p>LRTL TLNGASHITE FPHLTGTA TL ESLTLTGAKI SSLPQAVCDQ LPNLQVLDLS YNLLEDLPSL SG CQKLQKID LRHNEIYEIK GSTF QQLFNL RSLNLAWNKI AIIHPN AFST LPSLIKLDLS SNLLSSFP VT GLHGLTHLKL TGNRALQSLI PSANFPELKI IEMPSAYQCC AF GGCENVYK ISNQWNKDDG NSVD DLHKKD AGLFQVQDER DLEDFL LDFE EDLKALHSVQ CSPSPGPF KP CEHLFGSWLI RIGVWTTAVL ALSCNALVAL TVFRTPLYIS SI KLLIGVIA VVDILMGVSS AVLA AVDAFT FGRFAQHGAW WEDGIG CQIV GFLSIFASES SIFLLTLA AL ERGFSVKCSS KFEVKAPLFS LRAIVLLCVL LALTIATIP L LG GSKYNASP LCLPLPFGEP STTG YMVALV LLNSLCFLIM TIAYTK LYCS LEKGELENLW DC SMVKHI AL LLFANCILYC PVAFLSFSSL LNLTFISPDV IKFILLVIVP LP SCLNPLLY IVFNPHFKED MGSL GKHTRF WMRSKHASLL SINSDD VEKR SCESTQALVS FTHASIA Y DL PSTSGASPAY PMTESCHLSS VAFVPCL</p>	10
28	m u 8 E 1 1 輕鎖 可変領域	<p>NIVLTQSPAS LAVSLGQRAT IS CRASESVD NYGNSFMHWY QQKP GQPPKL LIYLASNLES GVPARF SGSG SRTDFTLTID PVEADDAA TY YCQQNYEDPF TFGSGTKVEI KR</p>	20
29	m u 8 E 1 1 重鎖 可変領域	<p>QVQLQQSGTE LMKPGASVKI SC KATGYTFS AYWIEWIKQR PGHG LEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKV KATF SSDTSSNTVY IQLNSLTY ED SAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTTLKVSS</p>	30
30	h u 8 E 1 1 . v 1 輕鎖可変領域	<p>DIVMTQSPDS LAVSLGERAT IN CRASESVD NYGNSFMHWY QQKP</p>	40

		GQPPKL LIYLASNLES GVPDRF SGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVA VY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR	
3 1	h u 8 E 1 1 . v 1 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SC KASGYTFS AYWIEWVRQA PGQG LEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKV RVTI TSDTSTSTVY LELSSLRS ED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLVTVSS	10
3 2	h u 8 E 1 1 . v 2 軽鎖可変領域	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT IN CRASESVD NYGNSFMHWY QQKP GQPPKL LIYLASNLES GVPDRF SGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVA VY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR	
3 3	h u 8 E 1 1 . v 2 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SC KASGYTFS AYWIEWVRQA PGQG LEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKV RATF TSDTSTSTVY LELSSLRS ED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLVTVSS	20
3 4	h u 8 E 1 1 . v 3 軽鎖可変領域	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT IN CRASESVD NYGNSFMHWY QQKP GQPPKL LIYLASNLES GVPDRF SGSG SRTDFTLTIS SLQAEDVA VY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR	30
3 5	h u 8 E 1 1 . v 3 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SC KASGYTFS AYWIEWVRQA PGQG LEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKV RVTI TSDTSTSTVY LELSSLRS ED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLVTVSS	
3 6	h u 8 E 1 1 . v 4 軽鎖可変領域	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT IN CRASESVD NYGNSFMHWY QQKP GQPPKL LIYLASNLES GVPDRF SGSG SRTDFTLTIS SLQAEDVA VY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR	40
3 7	h u 8 E 1 1 . v 4 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SC KASGYTFS AYWIEWVRQA PGQG	

		LEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKV RATF TSDTSTSTVY LELSSLRS ED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLVTVSS	
38	h u 8 E 1 1 . v 5 輕鎖可變領域	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT IN CRASESVD NYGNSFMHWY QQKP GQPPKL LIYLASNLES GVPDRF SGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVA VY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR	10
39	h u 8 E 1 1 . v 5 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SC KASGYTFS AYWIEWVRQA PGQG LEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKV RVTI TRDTSTSTAY LELSSLRS ED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLVTVSS	
40	h u 8 E 1 1 . v 6 輕鎖可變領域	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT IN CRASESVD NYGNSFMHWY QQKP GQPPKL LIYLASNLES GVPDRF SGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVA VY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR	20
41	h u 8 E 1 1 . v 6 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SC KASGYTFS AYWIEWVRQA PGQG LEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKV RVTI TADTSTSTAY LELSSLRS ED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLVTVSS	30
42	h u 8 E 1 1 . v 7 輕鎖可變領域	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT IN CRASESVD NYGNSFMHWY QQKP GQPPKL LIYLASNLES GVPDRF SGSG SRTDFTLTIS SLQAEDVA VY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR	
43	h u 8 E 1 1 . v 7 重鎖可變領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SC KASGYTFS AYWIEWVRQA PGQG LEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKV RVTI TRDTSTSTAY LELSSLRS ED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLVTVSS	40
44	h u 8 E 1 1 . v 8 輕鎖可變領域	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT IN CRASESVD NYGNSFMHWY QQKP	

		GQPPKL LIYLASNLES GVPDRF SGSG SRTDFTLTIS SLQAEDVA VY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KR	
45	h u 8 E 1 1 . v 8重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SC KASGYTFS AYWIEWVRQA PGQG LEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKV RVTI TADTSTSTAY LELSSLRS ED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLVTVSS	10
46	m u 3 G 1 2 軽鎖 可変領域	DVVM TQTPLS LPVSLGDQAS IS CRSSQSLV HSNNGNTYLQW YLQK PGQSPK LL IYKVS NRF SGVPDR FSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDL GI YFCSQSTHFP YTFGGGKLE IKR	
47	m u 3 G 1 2 重鎖 可変領域	QVQLQQPGAE MVKPGASVKL SC KASVDTFN SYWMHWVKQR PGQG LEWIGE INPSNGRTNY IEKFKN RATV TVDKSSSTAF MQLSSLTS ED SAVYYCATGW YFDVWGAGTT VTVSS	20
48	m u 2 H 6 軽鎖可 変領域	DI VMTQSPSS LTVTAGEKVT MS CKSSQSLL NSGNQKNYLT WFQQ KPGQPP KLLIYWASTR ESGVPD RFTG SGSGTDFTLT ISNVQAED LA VYYCQNDYSF PFTFGQGTKV EIKR	30
49	m u 2 H 6 重鎖可 変領域	EVQLQQSGPE LVKPGTSMKI SC KASGYSFT GYTMNWVKQS HKNG LEWIGL INCYNGGTNY NQKFKG KATL TVDKSSSTAF MELLSSLTS ED SAVYYCARGG STMITPRFAY WGQGTLVTVS S	
50	YW 3 5 3 軽鎖可 変領域	DI QMTQSPSS LSASVGDRVT IT CRASQDVS TAVAWYQQKP GKAP KLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSG SGTD FTLTISLQP EDFATYYC QQ SYTTPPTFGQ GTKVEIKR	40
51	YW 3 5 3 重鎖可 変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SC AASGFTFT SYSISWVRQA PGKG LEWVAE IYPPGGYTDY ADSVKG	

		RFTI SADTSKNTAY LQMNSLRA ED TAVYYCAKAR LFFDYWGQGT LVTVSS	
52	mu8E11 H VR L1	RASESVDNYG NSFMMH	
53	mu8E11 H VR L2	LASNLES	
54	mu8E11 H VR L3	QQNYEDPFT	10
55	mu8E11 H VR H1	GYTFSAYWIE	
56	mu8E11 H VR H2	EILPGSDSTD YNEKFKV	
57	mu8E11 H VR H3	GGHYGSLDY	
58	Hu8E11 軽鎖 (LC) フレーム ワーク1 (FR1)	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT IN C	20
59	Hu8E11 L C FR2	WYQQKPGQPP KLLIY	
60	Hu8E11. v 1 LC FR3 Hu8E11. v 2 LC FR3 Hu8E11. v 5 LC FR3 Hu8E11. v 6 LC FR3	GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SL QAEDVAVY YC	30
61	Hu8E11. v 3 LC FR3 Hu8E11. v 4 LC FR3 Hu8E11. v 7 LC FR3 Hu8E11. v 8 LC FR3	GVPDRFSGSG SRTDFTLTIS SL QAEDVAVY YC	40
62	Hu8E11 L C FR4	FGQGTKVEIK R	
63	Hu8E11 重鎖 (HC) フレーム ワーク1 (FR1)	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SC KAS	
64	Hu8E11 H	WVRQAPGQGL EWIG	

	C FR 2	
6 5	H u 8 E 1 1 . v 1 HC FR 3 H u 8 E 1 1 . v 3 HC FR 3	RVTITS DTST STVYLELSSL RS EDTAVYYC AR
6 6	H u 8 E 1 1 . v 2 HC FR 3 H u 8 E 1 1 . v 4 HC FR 3	RATFTS DTST STVYLELSSL RS EDTAVYYC AR
6 7	H u 8 E 1 1 . v 5 HC FR 3 H u 8 E 1 1 . v 7 HC FR 3	RVTITR DTST STAYLELSSL RS EDTAVYYC AR
6 8	H u 8 E 1 1 . v 6 HC FR 3 H u 8 E 1 1 . v 8 HC FR 3	RVTITADTST STAYLELSSL RS EDTAVYYC AR
6 9	H u 8 E 1 1 H C FR 4	WGQGTLVTVS S
7 0	m u 3 G 1 2 H VR L 1	RSSQSLVHSN GNTYLQ
7 1	m u 3 G 1 2 H VR L 2	KVSNRFS
7 2	m u 3 G 1 2 H VR L 3	SQSTHFPHYT
7 3	m u 3 G 1 2 H VR H 1	VDTFNSYWMH
7 4	m u 3 G 1 2 H VR H 2	EINPSNGRTN YIEKFKN
7 5	m u 3 G 1 2 H VR H 3	GWYFDV
7 6	m u 2 H 6 HV R L 1	KSSQSLLNSG NQKNYLT
7 7	m u 2 H 6 HV R L 2	WASTRES
7 8	m u 2 H 6 HV R L 3	QNDYSFPFT
7 9	m u 2 H 6 HV R H 1	GYSFTGYTMN
8 0	m u 2 H 6 HV R H 2	LINCYNGGTN YNQKFKG
8 1	m u 2 H 6 HV	GGSTMITPRF AY

10

20

30

40

	R H3		
82	YW353 HV R L1	RASQDVSTAV A	
83	YW353 HV R L2	SASF LYS	
84	YW353 HV R L3	QQSYTTPPT	
85	YW353 HV R H1	GFTFTSYSIS	10
86	YW353 HV R H2	EIYPPGGYTD YADSVKG	
87	YW353 HV R H3	ARLFFDY	
88	h u 8 E 1 1 . v 2 軽鎖	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT IN CRASESVD NYGNSFMHWY QQKP GQPPKL LIYLASNLES GVPDRF SGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVA VY YCQQNYEDPF TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SG TASVVCLL NNFYPREAKV QWKV DNALQS GNSQESVTEQ DSKDST YSLS STLTLSKADY EKHKVYAC EV THQGLSSPVT KSFNRGEC	20
89	h u 8 E 1 1 . v 2 重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SC KASGYTFS AYWIEWVRQA PGQG LEWIGE ILPGSDSTDY NEKFKV RATF TSDTSTSTVY LELSSLRS ED TAVYYCARGG HYGSLDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PS SKSTSGGT AALGCLVKDY FPEP VTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQ SSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQT YI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VF LFPPKPKD TLMISRTPEV TCVV VDV SHE DPEVKFNWYV DGVEVH NAKT KPREEQYNST YRVVSVLT VL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TL PPSREEMT KNQVSLTCLV KGFY PSDIAV EWESNGQPEN NYKTPP PVL D SDGSFFLYSK LTVDKSRW	30 40

		QQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	
90	YW353軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT IT CRASQDVS TAVAWYQQKP GKAP KLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSG SGTD FTLTISLQP EDFATYYC QQ SYTTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SV VCLLNNFY PREAKVQWKV DNAL QSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLS STLT LSKADYEKHK VYACEVTH QG LSSPVTKSFN RGEC	10
91	YW353重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SC AASGFTFT SYSISWVRQA PGKG LEWVAE IYPPGGYTDY ADSVKG RFTI SADTSKNTAY LQMNSLRA ED TAVYYCAKAR LFFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SK STSGGTAA LGCLVKDYFP EPVT VSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSS GLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYI CN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LF PPKPKDTL MISRTPEVTC VVVD VSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNA KTKP REEQYNSTYR VVSVLTVL HQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTIKAKG QPREPQVYTL PP SREEMTKN QVSLTCLVKG FYPS DIAVEW ESNGQPENNY KTTTPPV LDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQ GN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK	20 30
92	アンチセンスフォワードプライマー	ACCAACTGCATCCTAAACTG	40
93	アンチセンスリバープライマー	ACCGAGTTTCACCTCAGCTC	
94	センスフォワードプライマー	ACATTGCCCTGTTGCTCTTC	
95	センスリバープライマー	ACTGCTCTGATATACTCAATC	
96	LgR5 ECD	GSSPRSGVLL RGCPTHCHCE PD	

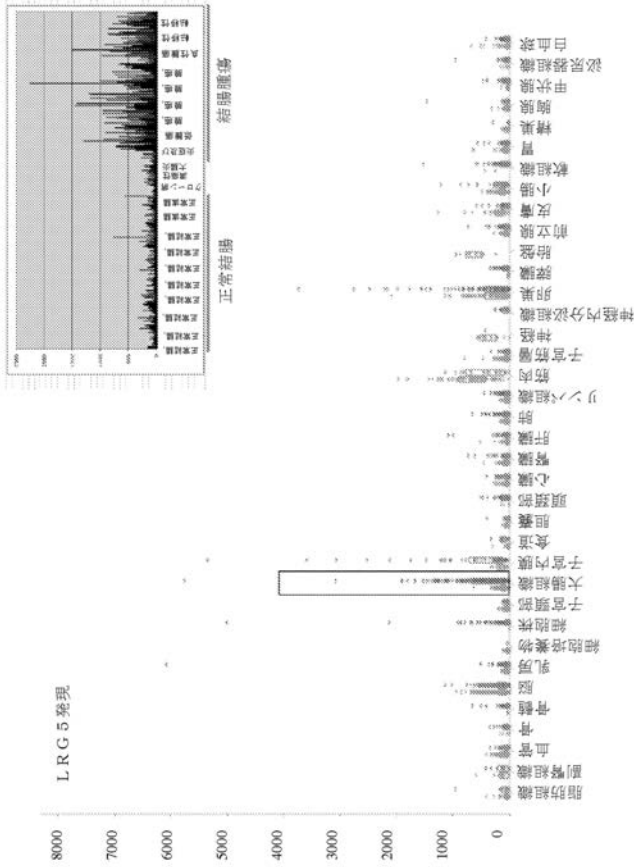
	<p>h u F c (1~537はL g R 5 E C Dで ある)</p>	<p>GRMLLRVD CSDLGLSELP SNLS VFTSYL DL SMNNISQL LPNPLP SLRF LEELRLAGNA LTYIPKGA FT GLYSLKVLML QNNQLRHVPT EALQNLRS LQ SLRLDANHIS YV PPSCFSGL HSLRHLWLDD NALT EIPVQA FRSLSALQAM TLALNK IHHI PDYAFGNLSS LVVLHLHN NR IHSLGKKCFD GLHSLETLDL NYNNLDEFPT AIRTLSNLKE LG FHSNNIRS IPEKAFVGNP SLIT IHFYDN PIQFVGRSAF QHLP EL RTLT LNGASQITEF PDLTGTAN LE SLTLTGAQIS SLPQTVCNQL PNLQVLDLSY NLLLEDLPSFS VC QKLQKIDL RHNEIYEIKV DTFQ QLLSLR SLNLAWNKIA IHPNA FSTL PSLIKLDLSS NLLSSFPI TG LHGLTHLKL TGNHALQSLIS SENFPELKVI EMPYAYQCCA FG VCENAYKI SNQWNKGDNS SMDD LHKKDA GMFQAQDERD LEDFLL DFEE DLKALHSVQC SPSPGPFK PC EHL LDGWGRA QVTDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KD TLMISRTP EVTCVVVDVS HEDP EVKFNW YVDGVEVHNA KTKPRE EQYN STYRVVSVLT VLHQDWLN GK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MT KNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEW ESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGS FFLY SKLTVDKSRW QQGNVFS C SV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>
--	---	--

10

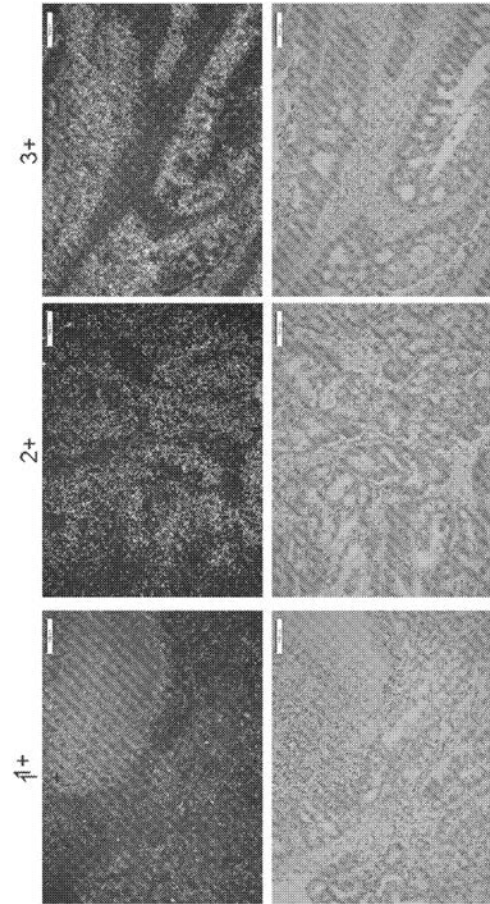
20

30

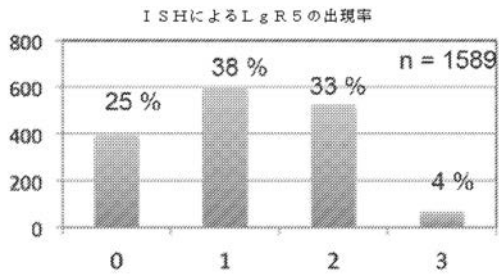
【 図 1 】



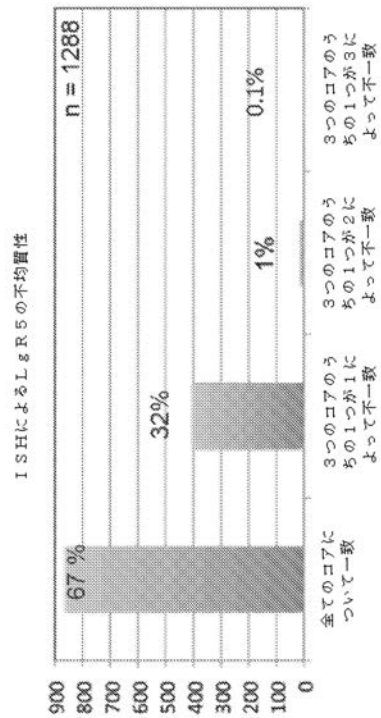
【 図 2 】



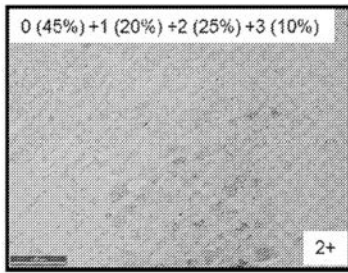
【 図 3 A 】



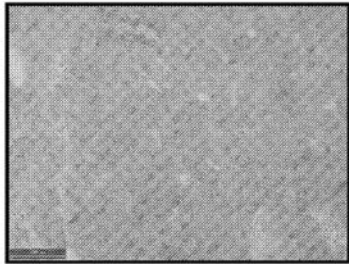
【 図 3 B 】



【 図 6 C 】



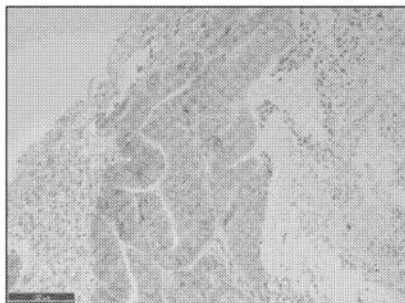
【 図 6 D 】



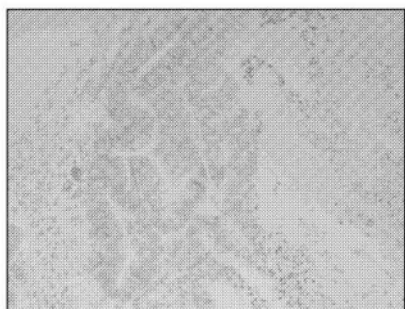
【 図 7 A 】



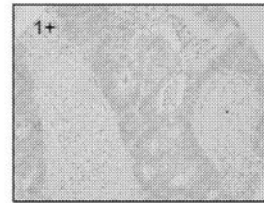
【 図 8 A 】



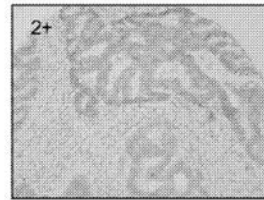
【 図 8 B 】



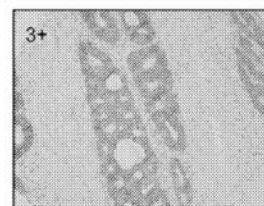
【 図 7 B 】



【 図 7 C 】



【 図 7 D 】



【配列表】

2017526618000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2015/035111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61P35/00 G01N33/577 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FENG-JUAN GAO ET AL: "Lgr5 over-expression is positively related to the tumor progression and HER2 expression in stage pTNM IV colorectal cancer", INT J CLIN EXP PATHOL, vol. 7, no. 4, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 1572-1579, XP055206734, tables 1, 2 figures 1, 2 ----- -/--	1-26, 30-32, 36-40
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 13 August 2015		Date of mailing of the international search report 30/10/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Brouns, Gaby

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/035111

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XIAO-SONG WU ET AL: "Lgr5 is a potential marker of colorectal carcinoma stem cells that correlates with patient survival", WORLD JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 10, no. 1, 15 November 2012 (2012-11-15), page 244, XP021121711, ISSN: 1477-7819, DOI: 10.1186/1477-7819-10-244 figure 1 page 2, right-hand column, paragraph 3 -----	1-26, 30-32, 36-40
Y	HIDEKAZU TAKAHASHI ET AL: "Significance of Lgr5Cancer Stem Cells in the Colon and Rectum", ANNALS OF SURGICAL ONCOLOGY, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 18, no. 4, 2 December 2010 (2010-12-02), pages 1166-1174, XP019888799, ISSN: 1534-4681, DOI: 10.1245/S10434-010-1373-9 page 1168, left-hand column, paragraph 2; figure 2 -----	1-26, 30-32, 36-40
Y	WO 2013/149159 A1 (GENENTECH INC [US]; HONGO JO-ANNE [US]; MAO WEIGUANG [US]; POLAKIS PAU) 3 October 2013 (2013-10-03) cited in the application paragraphs [0098], [0408], [0412] examples L-U figures 13-34 claims 44, 48, 50-52, 57-59 -----	15-17, 19,20, 22-24, 30,36-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/035111**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-26, 30-32, 36-40(all partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/035111

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2013149159	A1	03-10-2013	AR 090549 A1	19-11-2014
			AU 2013237892 A1	28-08-2014
			CA 2864311 A1	03-10-2013
			CL 2014002549 A1	16-01-2015
			CN 104411721 A	11-03-2015
			CO 7071096 A2	30-09-2014
			CR 20140441 A	17-11-2014
			EA 201491811 A1	30-01-2015
			EP 2831118 A1	04-02-2015
			JP 2015521027 A	27-07-2015
			KR 20150003162 A	08-01-2015
			PE 21672014 A1	13-12-2014
			PH 12014502132 A1	10-12-2014
			TW 201343674 A	01-11-2013
			US 2013336885 A1	19-12-2013
			WO 2013149159 A1	03-10-2013

International Application No. PCT/US2015/035111

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-26, 30-32, 36-40(all partially)

Relating to antibody LgR5.1-12 defined by CDRs as shown in SEQ ID NOs 9-14, optionally comprising a VH as defined by SEQ ID NO:6, and/or a VL as defined by SEQ ID NO:5, and uses thereof

2. claims: 1-26, 30-32, 36-40(all partially)

Relating to antibody LgR5.26-1 defined by CDRs as shown in SEQ ID NOs 15-20, optionally comprising a VH as defined by SEQ ID NO:8 and/or a VL as defined by SEQ ID NO:7, and uses thereof

3. claims: 27-29, 33-35(completely); 30, 36-40(partially)

Relating to selecting a cancer patient or treating a cancer patient with an anti-LgR5 immunoconjugate, based on detection of an elevated level of LgR5 in a sample of said patient using immunohistochemistry.

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	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
		C 1 2 P 21/08	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNIX

(72)発明者 ファイアスタイン, ロン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, 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 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
CA46

4C084 AA19 NA05 ZB261

4C085 AA13 AA14 AA16 AA19 BB01 BB11 BB41 BB43 CC23 DD62
GG01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017526618A5	公开(公告)日	2018-07-19
申请号	JP2016572315	申请日	2015-06-10
[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	ポルソンアンドリュージー マオウェイコアン ファイアスタインロン		
发明人	ポルソン, アンドリュー ジー, マオ, ウェイコアン ファイアスタイン, ロン		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C07K16/46 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/574 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/28 A61K39/39558 A61K2039/5152 C07K16/3046 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/70 G01N33/574 G01N33/57492 G01N2800/52		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C07K16/46 A61K39/395.T A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/53.Y C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065 /CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/NA05 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA19 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085 /GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	62/010637 2014-06-11 US		
其他公开文献	JP2017526618A		

摘要(译)

本发明提供抗LgR5抗体及其使用方法。 点域5A