

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-522638

(P2014-522638A)

(43) 公表日 平成26年9月8日(2014.9.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H O 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2014-516371 (P2014-516371)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月22日 (2012.6.22)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年2月24日 (2014.2.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/062114
 (87) 国際公開番号 W02012/175691
 (87) 国際公開日 平成24年12月27日 (2012.12.27)
 (31) 優先権主張番号 11305793.9
 (32) 優先日 平成23年6月22日 (2011.6.22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/504, 258
 (32) 優先日 平成23年7月4日 (2011.7.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513246469
 インサーム (インスティテュ ナショナル
 ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシ
 エルシェ メディカル)
 INSERM (INSTITUT NAT
 IONAL DE LA SANTE ET
 DE LA RECHERCHE ME
 DICALE)
 フランス国 エフー75013 パリ リ
 ユ・ド・トルビアック 101

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 A x 1 抗体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、抗 A x 1 抗体、並びに診断及び治療方法におけるその抗体の使用に関する。特に、本発明は、H - C D R 1 領域にSEQ ID NO:2の配列を含み、H - C D R 2 領域にSEQ ID NO:3の配列を含み、H - C D R 3 領域にSEQ ID NO:4の配列を含む重鎖可変領域と、L - C D R 1 領域にSEQ ID NO:6の配列を含み、L - C D R 2 領域にSEQ ID NO:7の配列を含み、L - C D R 3 領域にSEQ ID NO:8の配列を含む軽鎖可変領域とを備えた A x 1 に対する特異性を有するモノクローナル抗体に関する。該モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10及びSEQ ID NO:11の配列を介して A x 1 の細胞外ドメインに結合する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H - C D R 1 領域にSEQ ID NO:2の配列を含み、H - C D R 2 領域にSEQ ID NO:3の配列を含み、H - C D R 3 領域にSEQ ID NO:4の配列を含む重鎖可変領域と、L - C D R 1 領域にSEQ ID NO:6の配列を含み、L - C D R 2 領域にSEQ ID NO:7の配列を含み、L - C D R 3 領域にSEQ ID NO:8の配列を含む軽鎖可変領域とを備えている A × 1 に対する特異性を有するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

前記重鎖可変領域は、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 3】

前記軽鎖可変領域は、SEQ ID NO:5のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

前記重鎖可変領域はSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を有し、且つ、前記軽鎖可変領域はSEQ ID NO:5のアミノ酸配列を有する請求項 2 又は 3 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

キメラ抗体、好ましくはキメラマウス/ヒト抗体である請求項 4 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

ヒト化抗体である請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項 7】

SEQ ID NO:9のアミノ酸配列、SEQ ID NO:10のアミノ酸配列及びSEQ ID NO:11のアミノ酸配列の A × 1 細胞外ドメインに結合する請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 8】

Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂及び二重特異性抗体からなる群から選択される請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体の断片。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖をコードする核酸配列。

30

【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 11】

請求項 9 に記載の核酸又は請求項 10 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は請求項 8 に記載のモノクローナル抗体の断片を含む医薬組成物。

【請求項 13】

薬物として使用するための請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は請求項 8 に記載のモノクローナル抗体の断片。

40

【請求項 14】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は請求項 8 に記載のモノクローナル抗体の断片を患者に投与することを含む癌の治療方法。

【請求項 15】

癌の診断に用いるための請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は請求項 8 に記載のモノクローナル抗体の断片。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は請求項 8 に記載のモノクローナル抗体の断片を患者に投与することを含むヒト免疫異常症、血栓性疾患、循環器疾

50

患、及びウイルス、細菌又は寄生生物の感染からなる群から選択される疾病の治療方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は請求項 8 に記載のモノクローナル抗体の断片を患者に投与することを含む自然免疫応答の活性化方法。

【請求項 18】

ヒト免疫異常症、血栓性疾患、循環器疾患、及びウイルス、細菌又は寄生生物の感染からなる群から選択される疾病の診断に用いるための請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体又は請求項 8 に記載のモノクローナル抗体の断片

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、抗 A x 1 抗体、並びに診断方法及び治療方法におけるその抗体の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

A x 1 は、T y r o 3 及び M e r を含む受容体型チロシンキナーゼ (R T K s) の T A M サブファミリーに属する。T A M 受容体は、細胞外領域における 2 つのイムノグロブリン様ドメイン及びデュアルフィブロネクチンタイプ III リピート、並びに細胞質キナーゼドメインの組み合わせにより特徴付けられる。T A M 受容体に対するリガンドは、G a s 6 (growth-arrest-specific 6) 及びプロテイン S、43% のアミノ酸配列同一性を示し、類似のドメイン構造を共にする 2 つのビタミン K 依存性タンパク質である。それぞれのタンパク質は、4 つの上皮成長因子 (E G F) 様モジュールの前に 11 の g - カルボキシグルタミン酸残基を含む N 末端 G I a ドメインと、2 つのタンデムラミニン G ドメインからなる C 末端性ホルモン結合クロブリン (S H B G) 様構造を有する。S H B G ドメインは、T A M 受容体に結合し、活性するために必要且つ十分であり、G I a ドメインは、負電荷を有する膜リン脂質に結合し、アポトーシス細胞に対する T A M を介した食作用における重要な役割を果たす。T A M 活性化及びシグナリングは、細胞の生存、増殖、遊走及び付着を含む複数の細胞反応に関係する。

20

【0003】

A x 1 又はそのリガンド G a s 6 の異常調節は、ヒトの種々の癌における病因に関係する。A x 1 の過剰発現は、種々のヒト癌 (肺癌、前立腺癌、乳癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、甲状腺癌、血液系癌、腎細胞癌及び膠芽腫等) において報告されており、侵襲性、転移及び予後不良に関係する。これらの知見は、A x 1 が腫瘍の成長、侵襲及び血管新生を含む腫瘍化の様々な面における制御に関連し、特に抗転移癌治療の開発及び薬剤耐性癌の治療を含む他の種々の癌治療といった癌における治療介入のための標的の代表となることを提示している。従って、抗 A x 1 モノクローナル抗体が、癌の治療における使用のために発表されてきた。例えば、抗 A x 1 抗体に関する公開は、WO2009/063965、WO2009/062690 及び WO2011/014457 を含む。

30

【0004】

免疫機能の阻害、血小板凝集及びウイルス感染誘導体の活性 (例えばエボラ及びラッサウイルスの取り込みは A x 1 により促進される) 等の A x 1 依存性又は非依存性リガンドの他の役割は、腫瘍学よりも他の適用のための治療標的として A x 1 の潜在力を強調する。

40

【発明の概要】

【0005】

本発明は、H - C D R 1 領域に SEQ ID NO:2 の配列を含み、H - C D R 2 領域に SEQ ID NO:3 の配列を含み、H - C D R 3 領域に SEQ ID NO:4 の配列を含む重鎖可変領域と、L - C D R 1 領域に SEQ ID NO:6 の配列を含み、L - C D R 2 領域に SEQ ID NO:7 の配列を含み、L - C D R 3 領域に SEQ ID NO:8 の配列を含む軽鎖可変領域とを備えた A x 1 に対する特異性を有するモノクローナル抗体に関する。該モノクローナル抗体は、SEQ ID NO:9、S

50

EQ ID NO:10及びSEQ ID NO:11の配列を介してA x 1の細胞外ドメインに結合する。

【0006】

(定義)

「A x 1」の用語は、本技術分野におけるその用語の一般的な意味を有し、ヒトA x 1を意味する。また、A x 1は、「Ark」、「Tyro-7」、「ufo」又は「jtk 11」としても知られている。

【0007】

「抗A x 1抗体」の用語は、A x 1に向かう抗体を意味する。

【0008】

本発明において、「抗体」又は「イムノグロブリン」は同一の意味を有し、本発明において同様に用いられ得る。本明細書で用いられる「抗体」の用語は、イムノグロブリン分子、及びイムノグロブリン分子の免疫学的活性部分、すなわち抗原に免疫特異的に結合する抗原結合サイトを含む分子を意味する。従って、抗体の用語は、全抗体分子のみならず、抗体断片、並びに抗体及び抗体断片の変異体（誘導体を含む）を含む。自然抗体において、2つの重鎖はジスルフィド結合により互いに結合し、それぞれの重鎖はジスルフィド結合により1つの軽鎖と結合している。ラムダ（ λ ）とカッパ（ κ ）の2つの軽鎖のタイプがある。抗体分子の機能活性を決定する5つの主な重鎖のクラス（イソタイプ）がある：IgM、IgD、IgG、IgA及びIgE。それぞれの鎖は、異なる配列ドメインを含む。軽鎖は可変ドメイン（VL）及び定常ドメイン（CL）の2つのドメインを含む。重鎖は、可変ドメイン（VH）及び3つの定常ドメイン（CH1、CH2及びCH3、これらをまとめてCHという）の4つのドメインを含む。軽鎖（VL）及び重鎖（VH）の両方の可変領域は、抗原に対する結合認識及び特異性を決定する。軽鎖（CL）及び重鎖（CH）の定常領域ドメインは、抗体鎖結合、分泌、胎盤移動、補体結合及びFc受容体（FcR）との結合等の重要な生物学的特性を与える。Fv断片は、イムノグロブリンのFab断片のN末端部であり、1つの軽鎖及び1つの重鎖の可変部からなる。抗体の特異性は、抗体結合サイトと抗原決定基との間の構造的相補性に帰する。抗体結合サイトは、高度可変領域又は相補性決定領域（CDRs）から主になる残基で構成されている。時々、非高度可変領域又はフレームワーク領域（FR）からの残基が、全ドメイン構造及び結合サイトに影響する。相補性決定領域又はCDRsは、ネイティブイムノグロブリン結合サイトの自然Fv領域の結合親和性及び特異性を定義するアミノ酸配列を意味する。イムノグロブリンの軽鎖は、L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3である3つのCDRを有し、イムノグロブリンの重鎖は、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3である3つのCDRを有する。従って、抗原結合サイトは、重鎖及び軽鎖のV領域のそれぞれのCDRのセットを含む6つのCDRを有する。フレームワーク領域（FRs）は、CDRsの間に配置されたアミノ酸配列を意味する。「キメラ抗体」の用語は、20G7D9抗体由来の抗体のVHドメイン及びVLドメイン、並びにヒト抗体のCHドメイン及びCLドメインを含む抗体を意味する。

【0009】

本発明において、「ヒト化抗体」は、ヒト抗体からの可変領域フレームワーク及び定常領域を有するが、20G7D9抗体のCDRsを保持する抗体を意味する。

【0010】

「Fab」の用語は、分子量が約50000であり、抗原結合活性を有し、プロテアーゼであるパインを用いてIgGを処理することにより得られる断片のうちH鎖のN末端側の約半分とL鎖の全体とが互いにジスルフィド結合により結合した抗体断片を意味する。

【0011】

「F(ab')₂」は、分子量が約100000であり、抗原結合活性を有し、プロテアーゼであるペプシンを用いてIgGを処理することにより得られる断片のうちヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたFabよりもわずかに長い抗体断片を意味する。

【0012】

10

20

30

40

50

「F a b'」の用語は、分子量が約50000であり、抗原結合活性を有し、F(a b')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することにより得られる抗体断片を意味する。

【0013】

一本鎖Fv(「scFv」)ポリペプチドは、ペプチドをコードするリンカーにより結合されたVH及びVLコード遺伝子を含む遺伝子融合から、通常、発現される共有結合されたVH::VLヘテロダイマーである。「dsFv」は、ジスルフィド結合により安定化されたVH::VLヘテロダイマーである。二価抗体断片及び多価抗体断片は、一価scFvsの結合により自発的に形成可能であり、又は二価sc(Fv)₂等のペプチドリッカーによる一価scFvsの結合により生じ得る。

10

【0014】

「二重特異性抗体」は、2つの抗原結合サイトを有する低分子抗体断片であり、同一のポリペプチド鎖(VH-VL)における軽鎖可変ドメイン(VL)に結合された重鎖可変ドメイン(VH)を含む断片を意味する。同一鎖における2つのドメイン間でペアにさせるには短すぎるリンカーを用いることによって、ドメインが他方の鎖の相補的なドメインとペアにすることができ、2つの抗原結合サイトが生成される。

【0015】

「精製」及び「単離」は、本発明に係る抗体又はヌクレオチド配列に用いる場合、示された分子が同一のタイプの他の生物学的高分子の実質的非存在下に在ることを意味する。本明細書で用いられる「精製」の用語は、示された分子が同一のタイプの生物学的高分子のうち、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、さらにより好ましくは少なくとも95重量%、最も好ましくは少なくとも98重量%存在することを意味する。特定のポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子は、ポリペプチドをコードしていない他の核酸分子が実質的に無い核酸分子を意味するが、その分子は、組成物の基本的特性に有害に影響しない追加の塩基又は成分を含み得る。

20

【0016】

(本発明の抗体)

本発明は、単離された抗A x 1抗体又はその断片を提供する。特に、本発明者らは、マウス抗A x 1抗体(20G7 D9)生成ハイブリドーマを生成した。本発明者らは、mAb 20G7 D9の軽鎖及び重鎖の可変領域をクローン化し、特徴付けて、表1に示す前記抗体の相補性決定領域(CDRs)ドメインを決定した。

30

【0017】

【表 1】

mAb 20G7 D9 ド メイン	配列
VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKMSCKAAGYTFSSYWIEWVRQRPQHGLEWIGEIFPGSDSTNY NEKFNDRATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARPLYGSSAWFAYWGQGLTVS A (SEQ ID NO:1)
H-CDR1	SYWIE (SEQ ID NO:2)
H-CDR2	EIFPGSDSTNYNEKFND (SEQ ID NO:3)
H-CDR3	PLYGSSAWFAY (SEQ ID NO:4)
VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLTWYQQKQRKSPQLLVYNAKTLAEGVPS RFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTYQCQHHYATPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:5)
L-CDR1	RASENIYSYLT (SEQ ID NO:6)
L-CDR2	NAKTLA (SEQ ID NO:7)
L-CDR3	QHHYATPWT (SEQ ID NO:8)

10

20

【0018】

従って、本発明は、H - C D R 1に係るSEQ ID NO:2、H - C D R 2に係るSEQ ID NO:3及びH - C D R 3に係るSEQ ID NO:4からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのC D Rを含む可変ドメインを有する重鎖を備えた、A x 1に特異性を有するモノクローナル抗体に関する。

【0019】

また、本発明は、L - C D R 1に係るSEQ ID NO:6、L - C D R 2に係るSEQ ID NO:7及びL - C D R 3に係るSEQ ID NO:8からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのC D Rを含む可変ドメインを有する軽鎖を備えた、A x 1に特異性を有するモノクローナル抗体に関する。

30

【0020】

本発明のモノクローナル抗体は、H - C D R 1に係るSEQ ID NO:2、H - C D R 2に係るSEQ ID NO:3及びH - C D R 3に係るSEQ ID NO:4からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのC D Rを含む可変ドメインを有する重鎖と、L - C D R 1に係るSEQ ID NO:6、L - C D R 2に係るSEQ ID NO:7及びL - C D R 3に係るSEQ ID NO:8からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのC D Rを含む可変ドメインを有する軽鎖とを含み得る。特に、本発明は、H - C D R 1領域にSEQ ID NO:2の配列を含み、H - C D R 2領域にSEQ ID NO:3の配列を含み、H - C D R 3領域にSEQ ID NO:4の配列を含む重鎖可変領域と、

40

L - C D R 1領域にSEQ ID NO:6の配列を含み、L - C D R 2領域にSEQ ID NO:7の配列を含み、L - C D R 3領域にSEQ ID NO:8の配列を含む軽鎖可変領域とを備えている抗A x 1モノクローナル抗体を提供する。

特定の実施形態において、前記抗体の重鎖可変領域は、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を有する、及び/又は前記抗体の軽鎖可変領域は、SEQ ID NO:5のアミノ酸配列を有する。

他の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、キメラ抗体、好ましくは、キメラマウス/ヒト抗体である。特に、前記マウス/ヒトキメラ抗体は、上記20G7 D9抗体の可変領域を含み得る。

【0021】

50

他の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、ヒト化抗体である。特に、前記ヒト化抗体において、可変ドメインは、ヒトアクセプタフレームワーク領域、任意に、有する場合はヒト定常ドメイン、及び上記のようなマウスCDRs等の非ヒトドナーCDRsを含む。

【0022】

さらに、本発明は、以下のものに限られないが、Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂及び二重特異性抗体を含む抗Ax1抗体断片を提供する。

【0023】

さらに、本発明は、Ax1の細胞外部分におけるSEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10及びSEQ ID NO:11のアミノ酸配列に結合する抗Ax1抗体又は断片を提供する。

10

【0024】

【表2】

mAb 20G7-D9	ヒトAx1 配列(エピトープ)
IgG 様ドメイン	TSSFSCSAHNAK (SEQ ID NO:9)
FN3 ドメイン1	GMGIQAGEPDPPEE (SEQ ID NO:10)
FN3 ドメイン2	TPEVLMDIGLRQE (SEQ ID NO:11)

20

【0025】

他の態様において、本発明は、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO:7及びSEQ ID NO:8からなる群から選択される配列を有するポリペプチドに関する。

【0026】

(本発明の抗体の生成方法)

本発明の抗Ax1抗体は、以下のものに限られないが、化学的、生物学的、遺伝学的又は酵素学的方法等の本技術分野において周知の方法により生成され得る。

【0027】

所望の配列のアミノ酸配列を知ること、当業者は、ポリペプチドの生成のための標準的方法により前記抗体を容易に生成できる。例えば、それらは、周知の固相法を用いて、好ましくは商業的に入手可能なペプチド合成装置 (Applied Biosystems, Foster City, Californiaにより製造されているもの等)を用いて、メーカーの説明書に従って合成され得る。また、本発明の抗体は、本技術分野において、周知の組み換えDNA技術により合成され得る。例えば、抗体は、発現ベクターの中への抗体をコードするDNA配列の組み込み、及び所望の抗体を発現し得る適当な真核又は原核の宿主生物の中への上記ベクターの導入後に、DNA発現産物として得られ、それらは周知の方法を用いて後に単離され得る。

30

【0028】

従って、本発明の更なる目的は、本発明に係る抗体をコードする核酸配列に関する。特に、その核酸配列は、本発明の抗体の重鎖又は軽鎖をコードする。

40

【0029】

通常、前記核酸は、DNA又はRNA分子であり、それらはプラスミド、コスミド、エキソソーム、人工染色体、ファージ又はウイルスベクター等の適当なベクターに含まれ得る。

【0030】

「ベクター」、「クローニングベクター」及び「発現ベクター」は、宿主生物のトランスフォーム及び導入された配列の発現 (例えば転写及び翻訳) の促進のために、DNA又はRNA配列 (例えば、外来遺伝子) を宿主細胞内に導入し得る媒体を意味する。

【0031】

50

本発明の更なる目的は、本発明の核酸を含むベクターに関する。

【0032】

そのようなベクターは、検体への投与によって前記抗体の発現を引き起こす又は発現を促すために、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター等の制御エレメントを含み得る。動物細胞のための発現ベクターに用いられるプロモーター及びエンハンサーの例は、SV40の初期プロモーター及びエンハンサー(Mizukami T.等. 1987)、モロニーマウス白血球ウイルスのLTRプロモーター及びエンハンサー(Kuwana Y等. 1987)、イムノグロブリンH鎖のプロモーター(Mason JO 等. 1985)及びエンハンサー(Gillies SD等. 1983)等を含む。

【0033】

動物細胞のための発現ベクターは、ヒト抗体C領域をコードする遺伝子が挿入及び発現され得る限り、用いられ得る。適当なベクターの例は、pAGE107 (Miyaji H 等. 1990)、pAGE103 (Mizukami T 等. 1987)、pHSG274 (Brady G 等. 1984)、pKCR (O'Hare K 等. 1981)、pSG1 beta d2-4-(Miyaji H 等. 1990)等を含む。

【0034】

プラスミドの他の例は、複製開始点を含む複製プラスミド、又はpUC、pcDNA、pBR等の組み込みプラスミドを含む。

【0035】

ウイルスベクターの他の例は、アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス及びAAVベクターを含む。そのような組み換えウイルスは、本技術分野において周知の方法によって、例えばトランスフェクションパッケージング細胞、又はヘルパープラスミド若しくはウイルスを用いた一過性トランスフェクション等によって生成され得る。ウイルスパッケージング細胞の一般例は、PA317細胞、PsiCRIP細胞、GPenv+細胞、293細胞等を含む。そのような複製欠損組み換えウイルスを生成するための詳細なプロトコールは、例えばWO 95/14785、WO 96/22378、US 5,882,877、US 6,013,516、US 4,861,719、US 5,278,056及びWO 94/19478に記載されている。

【0036】

本発明の更なる目的は、本発明に係る核酸及び/又はベクターによりトランスフェクション、感染又は形質転換された宿主細胞に関する。

【0037】

「形質転換」の用語は、通常導入される遺伝子又は配列によりコードされたタンパク質又は酵素である所望の物質を宿主細胞に生成させるために、宿主細胞へ導入された遺伝子又は配列を発現させる、「外来」(すなわち、外因性又は細胞外の)遺伝子、DNA又はRNA配列の導入を意味する。導入されたDNA又はRNAを受ける及び発現する宿主細胞は、「形質転換」されている。

【0038】

本発明の核酸は、適当な発現システムによる本発明の抗体の生成に用いられ得る。「発現システム」の用語は、例えばベクターにより運ばれる外来DNAによるコードされたタンパク質の発現のための条件、及び宿主への導入の条件といった適当な条件に基づく宿主細胞及び適合性ベクターを意味する。

【0039】

通常発現システムは、E.coli宿主細胞とプラスミドベクター、昆虫宿主細胞とバキュロウイルスベクター、及び哺乳動物宿主細胞とベクターを含む。他の宿主細胞の例は、以下のものに限られないが、原核細胞(細菌等)及び真核細胞(酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等)を含む。特定の例は、E.coli、Kluyveromyces又はSaccharomyces yeasts、哺乳動物細胞株(例えば、Vero細胞、CHO細胞、3T3細胞、COS細胞等)、及び初代培養哺乳動物細胞又は樹立哺乳動物細胞(例えば、リンパ芽球、線維芽細胞、胚細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞等)を含む。また、例としては、マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸レダクダーゼ遺伝子(以下、「DHF R遺伝子」という。)が欠損されたCHO細胞、ラットYB2/3HL.P2.G1

10

20

30

40

50

1. 16Ag.20細胞(ATCC CRL1662, 以下、「T B 2 / 0細胞」という。)等を含む。

【0040】

また、本発明は、本発明に係る抗体を発現する組み換え宿主細胞を生成する方法に関し、該方法は、(i)上記の組み換え核酸又はベクターをコンピテント宿主細胞内にインビトロ又はエクスピボで導入するステップと、(ii)得られた組み換え宿主細胞をインビトロ又はエクスピボで培養するステップと、(iii)任意で、上記抗体を発現及び/又は分泌する細胞を選択するステップとを備えている。そのような組み換え宿主細胞は、本発明の抗体の生成のために用いられ得る。

【0041】

他の特定の実施形態において、その方法は、(i) 20G7 D9抗体を発現させるのに適当な条件下でハイブリドーマ20G7D9を培養するステップと、(ii)発現された抗体20G7 D9を回収するステップとを備えている。

10

【0042】

本発明の抗体は、例えばプロテインAセファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又は親和性クロマトグラフィー等の従来イムノグロブリン精製方法により培養培地から適当に分離される。

【0043】

特定の実施形態において、本発明のヒトキメラ抗体は、上記のV L及びV Hドメインをコードする核酸配列を得ることにより生成され得る。ヒト抗体のC H及びヒト抗体のC Lをコードする遺伝子を有する動物細胞に対する発現ベクター内にそれらを挿入することによりヒトキメラ抗体発現ベクターを構築でき、動物細胞内にその発現ベクターを導入することによりコードされた配列を発現できる。

20

【0044】

ヒトキメラ抗体のC Hドメインとしては、ヒトイムノグロブリンに属する領域であればよいが、I g GクラスのC Hドメインが適当であり、I g G1, I g G2, I g G3及びI g G4等のI g Gクラスに属するサブクラスのいずれか1つも用いられ得る。また、ヒトキメラ抗体のC Lは、I gに属する領域であればよく、カッパクラス又はラムダクラスのC Lが用いられ得る。

【0045】

キメラ抗体の生成方法は、本技術分野において周知である従来組み換えD N A及び遺伝子導入技術を含む(Morrison SL. 等. (1984)、並びに特許文献US5,202,238;及びUS5,204,244を参照。)

30

【0046】

本発明のヒト化抗体は、上記のC D Rドメインをコードする核酸配列を得ることにより生成され得る。(i)ヒト抗体と同一の重鎖定常領域、及び(ii)ヒト抗体と同一の軽鎖定常領域をコードする遺伝子を有する動物細胞のための発現ベクター内にその配列を挿入することによりヒト化抗体発現ベクターを構築でき、動物細胞内にその発現ベクターを導入することによりその遺伝子を発現できる。

【0047】

ヒト化抗体発現ベクターは、抗体重鎖をコードする遺伝子及び抗体軽鎖をコードする遺伝子が別々のベクターに存在するタイプ、又は両方の遺伝子が同一のベクターに存在するタイプ(タンデムタイプ)のいずれかであってよい。ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易性、動物細胞への導入の容易性、及び動物細胞における抗体のH鎖とL鎖の発現レベルのバランスの点で、タンデムタイプのヒト化抗体発現ベクターの方が好ましい(Shitara K 等. 1994)。タンデムタイプのヒト化抗体発現ベクターの例は、pKANTEX93 (WO 97/10354)及びpEE18等を含む。

40

【0048】

従来組み換えD N A及び遺伝子導入技術に基づくヒト化抗体の生成方法は、本技術分野において周知である(例えば、Riechmann L. 等. 1988; Neuberger MS. 等. 1985を参照。)。抗体は、例えばC D Rグラフィティング(EP 239,400; PCT公開公報WO91/09967; U.S. Pa

50

t. No5,225,539; 5,530,101;及び5,585,089), 接合 (veneering) 又は 再建 (resurfacing) (EP 592,106; EP 519,596; Padlan EA (1991); Studnicka GM 等. (1994); Roguska MA. 等. (1994)), 及び鎖シャッフリング (chain shuffling) (U.S. Pat. No.5,565,332) を含む本技術分野において周知の種々の方法を用いてヒト化され得る。そのような抗体の調製のための一般的な組み換え DNA 技術も周知である (欧州特許出願 EP 125023及び国際特許出願WO 96/02576を参照。)

【0049】

本発明の Fab は、プロテアーゼであるパピンを用いて、Ax1と特異的に反応する抗体を処理することにより得られ得る。また、その Fab は、原核性発現システム又は真核性発現システムのためのベクター内に抗体の Fab をコードする DNA を挿入し、Fab を発現するための (適当な) 原核生物又は真核生物内にそのベクターを導入することにより生成され得る。

10

【0050】

本発明の F(ab')₂ は、プロテアーゼであるペプシンを用いて、Ax1と特異的に反応する抗体を処理することにより得られ得る。また、その F(ab')₂ は、チオエーテル結合又はジスルフィド結合を介して、以下に記載の Fab' を結合することにより得られ得る。

【0051】

本発明の Fab' は、還元剤であるジチオスレイトールを用いて、Ax1と特異的に反応する F(ab')₂ を処理することにより得られ得る。また、Fab' は、原核生物のための発現ベクター又は真核生物のための発現ベクター内に抗体の Fab' 断片をコードする DNA を挿入し、その発現を実行するための (適当な) 原核生物又は真核生物内にそのベクターを導入することにより生成され得る。

20

本発明の scFv は、上記の VH 及び VL ドメインをコードする cDNA を得て、scFv をコードする DNA を構築し、原核生物のための発現ベクター又は真核生物のための発現ベクター内にその DNA を挿入し、scFv を発現するための (適当な) 原核生物又は真核生物内にそのベクターを導入することにより生成され得る。ヒト化 scFv 断片を生成するために CDR グラフティングと呼ばれる周知の方法を用いることができ、それはドナーの scFv 断片から相補性決定領域 (CDRs) を選択すること、及び周知の三次元構造のヒト scFv 断片フレームワークにそれを移植することを含む。(例えば、WO98/45322; WO 87/02671; US5,859,205; US5,585,089; US4,816,567; EP0173494を参照。)

30

【0052】

本明細書において、記載されている抗体のアミノ酸配列変異は意図されている。例えば、それは、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善するために望ましい。ヒト化抗体が、ヒト抗体の VH 及び VL の FRs に、非ヒト動物由来の抗体の VH 及び VL における CDRs のみを単純に移植することにより生成された場合、抗原結合活性は非ヒト動物由来の元の抗体におけるその活性と比較して低減することが知られている。非ヒト抗体の VH 及び VL のうち CDRs だけでなく FRs におけるいくつかのアミノ酸残基は、抗原結合活性に直接又は間接的に関連している。それ故、それらのアミノ酸残基がヒト抗体の VH 及び VL の FRs 由来の異なるアミノ酸残基に置換されることは、結合活性の低減となると考えられる。ヒト CDR により移植された抗体におけるこの問題を解決するために、ヒト抗体の VH 及び VL の FR のアミノ酸配列のうち、抗体の結合に直接に関連するアミノ酸残基、CDR のアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、抗体の三次元構造を維持するアミノ酸残基、及び抗原への結合に直接に関連するアミノ酸残基を同定しなければならない。低減された抗原結合活性は、非ヒト動物由来の元の抗体のアミノ酸残基と同一のアミノ酸を置換することにより増大され得る。

40

【0053】

変異及び変更は、本発明の抗体の構造、及びそれらをコードする DNA 配列において行われてもよく、また、そうすることで、所望の特性を有する抗体をコードする機能性分子を得られる。

50

【0054】

アミノ酸配列の変更において、アミノ酸の疎水性指標が考慮され得る。タンパク質に相互作用的生物機能を与えることにおけるアミノ酸疎水性指標の重要性は、本技術分野において一般に理解されている。アミノ酸の相対的な疎水性は、結果物としてのタンパク質の二次構造に寄与することが認められており、それは、例えば酵素、基質、レセプター、DNA、抗体及び抗原等の他の分子とのタンパク質の相互作用を順に規定する。それぞれのアミノ酸は、それらの疎水性及び電荷特性に基づいて決められており、具体的に、それらは、イソロイシン(+4.5); バリン(+4.2); ロイシン(+3.8); フェニルアラニン(+2.8); システイン/シスチン (+2.5); メチオニン(+1.9); アラニン(+1.8); グリシン(-0.4); トレオニン(-0.7); セリン(-0.8); トリプトファン(-0.9); チロシン(-1.3); プロリン(-1.6); ヒスチジン(-3.2); グルタミン酸 (-3.5); グルタミン(-3.5); アスパラギン酸(-3.5); アスパラギン(-3.5); リジン(-3.9); 及びアルギニン(-4.5)と決められている。

10

【0055】

本発明の更なる対象は、本発明の抗体の機能が保存された変異体をも含む。

【0056】

「機能が保存された変異体」は、以下のものに限られないが、類似の特性(例えば、極性、水素結合ポテンシャル、酸性、塩基性、疎水性及び芳香性等)を有するアミノ酸との置換を含む、全体としての形態及びポリペプチドの機能を改変することなくタンパク質又は酵素における所定のアミノ酸が変更されているものである。保存されたアミノ酸以外のアミノ酸は、タンパク質において異なってもよい。類似の機能をもつ2つのタンパク質間のタンパク質又はアミノ酸配列の類似性の割合が異なってもよく、また、例えば類似性がMEGALIGNアルゴリズムに基づくクラスター法等によるアライメントスキームに従って決定される70%~99%であってもよい。また、「機能が保存された変異体」は、BLAST又はFASTAアルゴリズムによって決定されるような、少なくとも60%のアミノ酸の同一性、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%、より一層好ましくは少なくとも95%のアミノ酸の同一性を有しているポリペプチドを含み、天然または元のタンパク質と比較して、同一または実質的によく似た特性または機能を有しているポリペプチドを含む。

20

【0057】

アミノ酸が80%、好ましくは85%、好ましくは90%よりも高い同一性がある場合、又はより短い配列の全長に対して約90%、好ましくは95%よりも高い類似性がある(機能的な同一性がある)場合に、2つのアミノ酸配列は、「実質的に相同」又は「実質的に類似」である。好ましくは、類似配列又は相同配列は、例えば、GCG(Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin)のpileupプログラム、又はBLAST、FASTA等の配列比較アルゴリズムの何れかを用いたアライメントによって決定される。

30

【0058】

例えば、あるアミノ酸は、かなりの活性が欠損することなくタンパク質構造における他のアミノ酸により置換されてもよい。タンパク質の相互作用能力及びタンパク質の性質がタンパク質の生物学的機能活性を定義するため、類似の特性を有するタンパク質を得ることができれば、あるアミノ酸の置換はタンパク質配列において生じてもよく、また、その配列をコードするDNAにおいて生じてもよい。種々の変更は、抗体の生物学的活性の多くを欠損することが無いように、本発明の抗体の配列、又は該抗体をコードする対応のDNA配列において行われ得る。

40

【0059】

あるアミノ酸が類似の疎水性指標又はスコアを有する他のアミノ酸に置換されてもよく、その結果、類似の生物学的活性を有するタンパク質が生じる、すなわち生物機能的に同等のタンパク質が得られることは、本技術分野において周知である。

【0060】

上記概説のように、アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えばそれ

50

らの疎水性、親水性、電荷及びサイズ等に基づく。考慮される種々の前記特性を得る置換の例は、当業者に周知であり、アルギニンとリジン、グルタミン酸とアスパラギン酸、セリンとトレオニン、グルタミンとアスパラギン、及びバリンとロイシンとイソロイシン、を含む。

【0061】

従って、本発明は、重鎖を備えた抗体を提供し、その重鎖の可変ドメインは、SEQ ID NO: 2の配列と少なくとも90%又は95%の同一性を有するH - C D R 1と、SEQ ID NO: 3の配列と少なくとも90%又は95%の同一性を有するH - C D R 2と、SEQ ID NO: 4の配列と少なくとも90%又は95%の同一性を有するH - C D R 3と、SEQ ID NO: 6の配列と少なくとも90%又は95%の同一性を有するL - C D R 1と、SEQ ID NO: 7の配列と少なくとも90%又は95%の同一性を有するL - C D R 2と、SEQ ID NO: 8の配列と少なくとも90%又は95%の同一性を有するL - C D R 3とを備え、H - C D R 1に係るSEQ ID NO: 2、H - C D R 2に係るSEQ ID NO: 3、及びH - C D R 3に係るSEQ ID NO: 4を含む可変ドメインを有する重鎖と、L - C D R 1に係るSEQ ID NO: 6、L - C D R 2に係るSEQ ID NO: 7、及びL - C D R 3に係るSEQ ID NO: 8を含む可変領域を有する軽鎖とを含む抗体と実質的に同一の親和性で、より好ましくは、マウス抗A x 1抗体20G7 D9と実質的に同一の親和性でA x 1と特異的に結合する抗体を提供する。

10

【0062】

従って、本発明は、A x 1の細胞外部分のイムノグロブリン様ドメイン2、FN3ドメイン1及びFN3ドメイン2(A x 1のエピトープアミノ酸配列SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及びSEQ ID NO: 11)に結合する抗体を提供する。

20

【0063】

前記抗体は、本技術分野において周知の方法により特異的な結合のためにアッセイされ得る。多くの異なる競合的結合アッセイフォーマットがエピトープビニングのために用いられ得る。以下のものに限られないが、ウエスタンブロット、ラジオ免疫アッセイ、ELISA、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素アッセイ、ゲル拡散沈降素アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイ、及び補体結合アッセイ等の方法を用いる競合アッセイシステムを含む免疫アッセイが用いられ得る。そのようなアッセイは、ルーチンであり、本技術分野において周知である(例えば、Ausubel等, eds, 1994 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., New Yorkを参照)。例えば、BIACORE(登録商標)(GE Healthcare, Piscataway, NJ)は、モノクローナル抗体のエピトープピンパネルにルーチン的に用いられる種々の表面プラズモン共鳴アッセイフォーマットの1つである。さらに、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, EdHarlow and David Lane, 1988に記載されたルーチンクロスブロッキングアッセイが行われ得る。

30

【0064】

本発明の改変抗体は、例えば抗体の特性を改善するためのVH及び/又はVL内のフレームワーク残基における改変を含む。通常、そのようなフレームワークの改変は、抗体の免疫原性を低減させる。例えば、1つのアプローチは、1つ又はそれ以上のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系配列に「復帰突然変異」することである。特に、体細胞突然変異を受けた抗体は、その抗体に由来する生殖細胞系配列と異なるフレームワーク残基を含んでもよい。そのような残基は、その抗体に由来する生殖細胞系配列と抗体フレームワーク配列とを比較することにより同定され得る。フレームワーク領域の配列をそれらの生殖細胞系構造に戻すために、体細胞突然変異は、例えば部位特異的突然変異誘発又はPCRによる突然変異誘発により、生殖細胞系配列に復帰突然変異され得る。そのような「復帰突然変異」された抗体は、本発明に含まれることが意図される。フレームワークの改変の他のタイプは、T細胞のエピトープを除去して抗体の潜在的免疫原性を低減するために、フレームワーク領域内、又は1つ若しくはそれ以上のCDR領域内における1つ又はそれ以上の残基を改変することを含む。このアプローチは、「脱免疫性」とも呼ばれ、更な

40

50

る詳細はCarr等.による米国特許公開No.20030153043に記載されている。

【0065】

フレームワーク又はCDR領域内での追加的又は代替的な改変において、本発明の抗体は、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合及び/又は抗原依存性細胞毒性といった抗体の1つ又はそれ以上の機能的特性を変更するために、Fc領域内における改変を含むように設計されていてもよい。さらに、本発明の抗体は、化学的に改変されていてもよく（例えば、1つ又はそれ以上の化学的部位が抗体に結合され得る）、また、そのグリコシル化を変更するように改変されていてもよく、また、抗体の1つ又はそれ以上の機能的特性を変更するように改変されていてもよい。それらの実施形態のそれぞれは、以下にさらに詳細に記載されている。Fc領域における残基の番号付けは、KabatのEUインデックスに基づく。

10

【0066】

一実施形態において、CH1のヒンジ領域は、そのヒンジ領域のシステイン残基の番号が変更されるように、例えば増える又は減るように改変されている。このアプローチは、さらに、Bodmer等.による米国特許No.5,677,425に記載されている。CH1のヒンジ領域におけるシステイン残基の番号は、例えば軽鎖及び重鎖の構築を促進する、又は抗体の安定性を増大若しくは低減するように変更される。

【0067】

他の実施形態において、抗体のFcヒンジ領域は、抗体の生物学的半減期を低減するように改変される。特に、1つ又はそれ以上の改変は、その抗体における黄色ブドウ球菌プロテインA(SpA)との結合性が天然FcヒンジドメインのSpA結合性と比較して低くなるように、Fcヒンジ断片のCH2-CH3ドメインインターフェイス領域内に導入される。このアプローチは、Ward等.による米国特許No.6,165,745にさらに詳細に記載されている。

20

【0068】

他の実施形態において、抗体はその生物学的半減期を増大するために改変される。種々のアプローチが可能である。例えば、Ward等.による米国特許No.6,277,375に記載されているようにT252L、T254S、T256Fの変異の1つ又はそれ以上が導入される。代替的に、生物学的半減期を増大するために、抗体は、Presta等.による米国特許Nos.5,869,046及び6,121,022に記載されているように、IgGのFc領域のCH2ドメインにおける2つのループから得られるサルベージ受容体結合エピトープを含むようにCH1又はCL領域内で改変され得る。

30

【0069】

他の実施形態において、Fc領域は、抗体のエフェクター機能を変更するために、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基に置換することにより変更される。例えば、1つ又はそれ以上のアミノ酸は、抗体がエフェクターリガンドに対する変更された親和性を有するが本抗体の抗原結合能力を維持するように、異なるアミノ酸残基に置換され得る。親和性が変更されたエフェクターリガンドは、例えばFc受容体又は補体のC1コンポーネントとなり得る。このアプローチは、Winter等.による米国特許Nos.5,624,821及び5,648,260にさらに詳細に記載されている。

40

【0070】

他の実施形態において、抗体が変更されたC1q結合性、及び/又は低減された若しくは無効にされた低減補体依存性細胞傷害(CDC)を有するように、アミノ酸残基から選択される1つ又はそれ以上のアミノ酸は、異なるアミノ酸残基と置換され得る。このアプローチは、Idusogie等.による米国特許Nos.6,194,551にさらに詳細に記載されている。

【0071】

他の実施形態において、補体に結合するための抗体の能力を変更するように、1つ又はそれ以上のアミノ酸残基は変更されている。このアプローチは、Bodmer等.によるPCT公開公報WO 94/29351に記載されている。

【0072】

50

他の実施形態において、Fc領域は、1つ又はそれ以上のアミノ酸を改変することにより、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を媒介するための抗体の能力を増大する、及び/又はFcレセプターに対する抗体の親和性を増大するように改変されている。このアプローチは、PrestaによるPCT公開公報WO 00/42072にさらに記載されている。さらに、FcRI、FcRII、FcRIII及びFcRnに対するヒトIgG1における結合サイトは既に位置づけられており、改善された変異体は既に開示されている(Shields, R. L. 等., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604, WO2010106180を参照。)。

【0073】

他の実施形態において、抗体のグリコシル化が改変されている。例えば、脱グリコシル化抗体が作製され得る(すなわち、抗体がグリコシル化を欠いている。)。グリコシル化は、例えば抗原に対する抗体の親和性を増大するために変更され得る。そのような炭水化物修飾は、例えば抗体配列内の1つ又はそれ以上のグリコシル化のサイトを変更することによってなされ得る。例えば、1つ又はそれ以上のアミノ酸置換は、1つ又はそれ以上の可変領域フレームワークのグリコシル化サイトの除去することによるそのサイトにおけるグリコシル化の除去によってなされ得る。そのような脱グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増大し得る。そのようなアプローチは、Co等による米国特許Nos. 5,714,350及び6,350,861にさらに記載されている。

【0074】

追加的に又は代替的に、低減された量のフコシル残基を有する若しくはフコシル残基がないといった低フコシル化若しくは非フコシル化された抗体、又は増大された二分されたGlcNac構造を有する抗体のような、の変更されたグリコシル化のタイプを有する抗体が作製され得る。そのような変更されたグリコシル化パターンは、抗体のADCC能を増大するために行われる。そのような炭水化物修飾は、例えば変更されたグリコシル化機構を有する宿主細胞に抗体を発現することにより達成され得る。変更されたグリコシル化機構を有する細胞は、本技術分野において周知であり、本発明の組み換え抗体を発現する宿主細胞として用いられ得る。これにより変更されたグリコシル化を有する抗体を得られる。例えば、Hang等によるEP 1,176,195には、機能的に破壊されたFUT8遺伝子を有する細胞株が記載されており、FUT8遺伝子はフコシルトランスフェラーゼをコードし、そのような細胞株において発現された抗体は、低フコシル化を示す、又はフコシル残基がない。従って、一実施形態において、低フコシル化を示す、又はフコシル化パターンがない本発明の抗体は、細胞株における組み換え発現により生成され得る。それは、例えば、フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8の発現を不完全に行う動物細胞株である。PrestaによるPCT公開公報WO 03/035835には、Asn(297)結合炭水化物にフコースを結合する能力が低減されたCHO細胞株変異体、Lec13細胞変異体が記載されている。その宿主細胞で発現された抗体は低フコシル化となる(Shields, R.L. 等., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana等によるPCT公開公報WO 99/54342には、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ(例えば(1,4)-NアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するように設計された細胞株が記載されている。その設計された細胞株で発現された抗体は、抗体のADCC能が増大されるように、二分されたGlcNac構造が増大されている(Umana等., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180を参照。)。さらに、EurekaTherapeuticsには、フコシル残基が欠けた変更された哺乳動物グリコシル化パターンを有する抗体を生成できる遺伝子的に改変されたCHO哺乳動物細胞が記載されている(<http://www.eurekainc.com/a&boutus/companyoverview.html>)。代替的に、本発明の抗体は、哺乳動物様グリコシル化パターンのために改変され、グリコシル化パターンとしてフコースを欠いている抗体を生成できる酵母又は糸状菌で生成され得る(例えばEP1297172B1を参照。)

【0075】

本発明としてみなされる本発明の抗体の他の改変はペグ化である。抗体は、例えば抗体の生物学的(例えば血清)半減期の増大のためにペグ化され得る。抗体のペグ化のために、通常、抗体又はその断片は、1つ又はそれ以上のPEG基が抗体又は抗体断片に結合す

10

20

30

40

50

る条件下で、PEGの反応性エステル又はアルデヒド誘導体といったポリエチレングリコール(PEG)と反応される。ペグ化は、反応性PEG分子(又は類似の反応性・水溶性ポリマー)とのアシル化反応又はアルキル化反応により行われ得る。本明細書で用いられる「ポリエチレングリコール」の用語は、モノ(C1-C10)アルコキシ若しくはアリロキシポリエチレングリコール、又はポリエチレングリコールマレイミド等の他のタンパク質を誘導体化するために用いられるPEGの形態のいずれかを含むことを意図する。特定の実施形態において、ペグ化されるための抗体は、脱グリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化する方法は、本技術分野において周知であり、本発明の抗体に適用され得る。例えばNishimura等によるEP 0 154 316及びIshikawa等によるEP 0 401 384を参照できる。

10

【0076】

本発明により考えられる抗体の他の実施形態は、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域と、ヒト血清アルブミン又はその断片等の血清タンパク質との結合体又はタンパク質融合体であり、それらの結果生じた分子は半減期を増大させる。そのようなアプローチは、例えばBallance等のEP0322094に記載されている。

【0077】

他の可能性は、ヒト血清アルブミン等の血清タンパク質に結合可能タンパク質に対する本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を融合することであり、その結果生じた分子の半減期は増大する。そのようなアプローチは、例えばNygren等のEP 0 486 525に記載されている。

20

【0078】

(免疫結合体)

本発明の抗体は、抗A×1免疫結合体を形成するために、検出可能なラベルと結合され得る。適当な検出可能なラベルは、例えば放射性同位体、蛍光ラベル、化学発光ラベル、酵素ラベル、生物発光ラベル又は金コロイドを含む。そのような検出可能なラベルされた免疫結合体を作製及び検出する方法は、当業者に周知であり、以下により詳細に記載する。

【0079】

検出可能なラベルは、オートラジオグラフィにより検出される放射性同位体であり得る。本発明の目的のために特に有益なアイソトープは、³H、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S及び¹⁴Cである。

30

【0080】

また、抗A×1免疫結合体は、蛍光化合物によりラベルされ得る。蛍光ラベルされた抗体の存在は、適当な波長の光にその免疫結合体を当てて、それにより生じた蛍光により決定される。蛍光ラベル化合物は、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド及びフルオレスカミンを含む。

【0081】

代替的に、抗A×1免疫結合体は、化学発光化合物に抗体を結合することにより検出可能にラベルされ得る。化学発光ラベルされた免疫結合体の存在は、化学的反応の過程の間に生じる発光の存在を検出することにより決定される。化学発光ラベル化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びシュウ酸エステルを含む。

40

【0082】

同様に、生物発光化合物は、本発明の抗A×1免疫結合体をラベルするのに用いられ得る。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を増大する生物学的システムにおいて見出された化学発光の1つの型である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することにより決定される。ラベリングに有益な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びイクオリンを含む。

【0083】

50

代替的に、抗 A × 1 免疫結合体は、酵素を抗 A × 1 モノクローナル抗体に結合することにより検出可能にラベルされ得る。抗 A × 1 酵素結合体が適切な基質の存在下でインキュベートされるとき、酵素部分は、例えば分光光度法、蛍光分析法又は可視的手段により検出され得る化学的部分を生成するように基質と反応する。多特異的免疫結合体を検出可能にラベルするのに用いられ得る酵素の例は、ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼを含む。

【 0 0 8 4 】

本発明において用いられ得る他の適当なラベルは、当業者に周知である。抗 A × 1 モノクローナル抗体にマーカ一部を結合することは、本技術分野において周知の標準的な技術を用いて達成され得る。これに関する一般の方法論は、Kennedy等, Clin. Chim. Acta 70 :1, 1976;Schurs等., Clin. Chim. Acta 81:1, 1977; Shih 等., Int'l J. Cancer 46:11 01, 1990; Stein等.,Cancer Res. 50:1330, 1990;及び上記の Coliganに記載されている。

10

【 0 0 8 5 】

さらに、免疫化学検出の簡便性及び汎用性は、アビジン、ストレプトアビジン及びビオチンと結合された抗 A × 1 モノクローナル抗体を用いることにより向上され得る（例えば、Wilchek等. (eds), "Avidin-Biotin Technology," Methods In Enzymology (Vol. 184) (Academic Press 1990); Bayer等., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology," inMethods In Molecular Biology (Vol. 10) 149-162 (Manson, ed., The Humana Press, Inc. 1992)を参照。)。

20

【 0 0 8 6 】

イムノアッセイを行うための方法は、十分に確立されている(例えば、Cook及びSelf, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays," in Monoclonal Antibodies:Production, Engineering, and Clinical Application 180-208 (Ritter 及び Ladyman, eds ., Cambridge University Press 1995); Perry, "The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology," inMonoclonal Antibodies: Principles and Applications 107-120 (Birch 及び Lennox, eds., Wiley-Liss, Inc. 1995); Diamandis, Immunoassay(Academic Press, Inc. 1996)を参照。)。

【 0 0 8 7 】

他の態様において、本発明は、抗 A × 1 モノクローナル抗体 - 薬物結合体を提供する。ここで用いられる「抗 A × 1 モノクローナル抗体 - 薬物結合体」は、治療薬に結合された本発明に係る抗 A × 1 モノクローナル抗体をいう。そのような抗 A × 1 モノクローナル抗体 - 薬物結合体は、例えば A × 1 発現性癌の患者等の対象に投与されることで、A × 1 発現細胞に臨床的に有益な効果を生じさせる。上記投与は、通常単独での投与だけでなく他の治療薬と組み合わせて投与される。

30

【 0 0 8 8 】

一般的な実施形態において、抗 A × 1 モノクローナル抗体は細胞毒物に結合され、生じた抗体 - 薬物結合体は、A × 1 発現細胞（例えば A × 1 発現癌細胞）に取りこまれたとき又は吸収させたときに、A × 1 発現細胞（例えば A × 1 発現癌細胞）に細胞毒性作用又は細胞増殖抑制作用を示す。抗体に結合するのに特に適する部分は、化学療法剤、プロドラッグ変換酵素、放射性同位体若しくは化合物、又は毒物である。例えば、抗 A × 1 モノクローナル抗体は、化学療法剤又は毒物等（例えば、アプリン、リシン A、緑膿菌外毒素又はジフテリア毒素等の細胞増殖抑制剤又は細胞致死剤）の細胞毒物に結合され得る。

40

【 0 0 8 9 】

細胞毒物の有益なクラスは、例えば抗チューブリン剤、オーリスタチン、DNA マイナーグループ結合剤、DNA 複製阻害剤、アルキル化剤（例えばシスプラチン等の白金複合体、モノ白金、ビス白金、三核白金複合体、及びカルボプラチン）、アントラサイクリン、抗生物質、抗葉酸剤、代謝拮抗物質、化学療法増感剤、デュオカルマイシン、エトポシド、フッ化ピリミジン、イオノフォア、レキシトロプシン、ニトロソウレア、プラチノール、プレフォーミング化合物、プリン代謝拮抗物質、プロマイシン、放射線増感剤、スト

50

ロイド、タキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、又はピンカルカロイド等を含む。

【0090】

それぞれの細胞毒物は、例えばアンドロジェン、アントラマイシン (AMC)、アスパラギナーゼ、5-アザシチジン、アザチオプリン、プレオマイシン、ブサルファン、ブチオニン、スルホキシミン、カンプトテシン、カルボプラチン、カルムスチン (BSNU) CC-1065 (Li等., Cancer Res. 42:999-1004,1982)、クロランブシル、シスプラチン、コルヒシン、シクロホスファミド、シタラビン、シチジンアラビノシド、シトカラシンB、ダカルバジン、ダクチノマイシン (以前はアクチノマイシン)、ダウノルビシン、デカルバジン、ドセタキセル、ドキシソルビシン、エストロジェン、5-フルオロデオキシウリジン、エトポシドホスフェイト (VP-16)、5-フルオロウラシル、グラミシジンD、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、イリノテカン、ロムスチン (CCNU)、メクロレタミン、メルファラン、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトラマイシン、ミトマイシンC、ミトキサントロン、ニトロイミダゾール、パクリタキセル、プリカマイシン、プロカルビジン、ストレプトゾトシン、テノポシド (VM-26)、6-チオグアニン、チオTEPA、トポテカン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、及びビノレルピンを含む。

10

【0091】

特に適する細胞毒物は、例えばドラスタチン (例えばオーリスタチンE、AFP、MMAF、MMAE)、DNAマイナーグループ結合剤 (例えばエンジイン及びレキシトロボシン)、デュオカルマイシン、タキサン (例えばパクリタキセル及びドセタキセル)、ピューロマイシン、ピンカルカロイド、CC-1065、SN-38 (7-エチル-10-ヒドロキシ-カンプトテシン)、トポテカン、モルフォリノ-ドキシソルビシン、リゾキシシン、シアノモルフォリノ-ドキシソルビシン、エチノマイシン、コンプレスタチン、ネトロブシン、エボチロンA及びB、エストラムスチン、クリプトフィシン、セマドチン、メイタンシノイド、ディスコデルモリド、エリユテロピン、及びミトキサントロンを含む。

20

【0092】

特定の実施形態において、細胞毒物は、例えばドキシソルビシン、パクリタキセル、メルファラン、ピンカルカロイド、メトトレキサート、ミトマイシンC又はエトポシド等の従来化学療法剤である。さらに、CC-1065アナログ、カリケアミシン、ドラスタチン10のアナログ、リゾキシシン、及びパリトキシシン等の有効な薬物は、抗Ax1発現抗体に結合され得る。

30

【0093】

特定のバリエーションにおいて、細胞毒物又は細胞増殖抑制剤は、オーリスタチンE (ドラスタチン10とも知られている) 又はその誘導体である。通常、オーリスタチン誘導体は、例えばオーリスタチンEとケト酸との間で生成されるエステルである。例えば、オーリスタチンEは、AEB及びAEVBをそれぞれ生成するために、パラアセチル安息香酸又はベンゾイル吉草酸と反応され得る。他の一般的なオーリスタチン誘導体は、AFP (ジメチルパリン-パリン-ドライソロイイン-ドラプロリン-フェニルアラニン-p-フェニレンジアミン)、MMAF (ドパリン-パリン-ドライソロイニン-ドラプロリン-フェニルアラニン)、及びMAE (モノメチルオーリスタチンE) を含む。オーリスタチンE及びその誘導体の合成及び構造は、米国特許出願公開 No. 20030083263; 国際公開 WO 2002/088172 及び WO 2004/010957; 並びに 米国特許NO. 6,884,869; 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; 及び4,486,414に記載されている。

40

【0094】

他のバリエーションにおいて、細胞毒物は、DNAマイナーグループ結合剤 (例えば、米国特許No. 6,130,237を参照) である。例えば、特定の実施形態において、マイナーグループ結合剤は、CBI化合物である。他の実施形態において、マイナーグループ結合剤は、エンジインである。

50

【 0 0 9 5 】

特定の実施形態において、抗体 - 薬物結合体は、抗チューブリン剤を含む。抗チューブリン剤の例は、タキサン（例えばTaxol(登録商標) (パクリタキセル)、Taxotere(登録商標) (ドセタキセル)）、T 6 7 (Tularik)、ピンカルカロイド（例えばピンクリスチン、ピンラスチン、ピンデシン及びピノレルピン）、並びにドラスタチン（例えばオーリスタチンE、A F P、M M A F、M M A E、A E B、A E V B）を含む。他の抗チューブリン剤は、例えばバッカチン誘導体、タキサンアナログ（例えばエポチロンA及びB）、ノコダゾール、コルチシン及びコルシミド、エストラムスチン、クリプトフィシン、セマドチン、マイタンシノイド、コンプレタスタチン、ディスコデルモリド、並びにエリテロピンを含む。特定の実施形態において、細胞毒物は、抗チューブリン剤の他のグループであるメイタンシノイドである。例えば、特定の実施形態において、メイタンシノイドは、メイタンシン又はD M - 1 (ImmunoGen, Inc.; Chari等., Cancer Res.52:127-131, 1992を参照)である。

10

【 0 0 9 6 】

他の実施形態において、細胞毒物は、代謝拮抗剤である。代謝拮抗剤は、例えばプリンアンタゴニスト（例えばアゾチオプリン若しくはミコフェノレートモフェチル）、ジヒドロフォレートレダクターゼ阻害剤（例えばメトトレキサート）、アシクロビル、ガンシクロビル、ジドブジン、ピダラピン、リバパリン、アジドチミジン、シチジン、アラビノシド、アマンタジン、ジデオキシウリジン、イオドデオキシウリジン、ボスカーネット、又はトリフルリジンであってもよい。

20

【 0 0 9 7 】

他の実施形態において、抗A x 1モノクローナル抗体は、プロドラッグ転換酵素に結合されている。プロドラッグ転換酵素は、周知の方法を用いて抗体に組み換えで融合又は化学的に結合され得る。プロドラッグ転換酵素の例は、カルボキシペプチダーゼG 2、グルクロニダーゼ、ペニシリン - V - アミダーゼ、ペニシリン - G - アミダーゼ、ラクタマーゼ、 β -グルコシダーゼ、ニトロレダクターゼ、およびカルボキシペプチダーゼAである。

【 0 0 9 8 】

タンパク質、特に抗体に治療薬を結合するための方法は、周知である（例えば、Arnon等., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld 等. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom 等., "Antibodies For Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery (Robinson 等. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera 等. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin 等. eds., Academic Press, 1985); 及び Thorpe 等., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58. See also, e.g., PCT publication WO 89/12624を参照)。

30

【 0 0 9 9 】

(診断的使用)

本発明の更なる対象は、A x 1レベルが改変（増大又は低減）されるガン及び他の病気を診断及び/又はモニタリングするための本発明の抗A x 1抗体に関する。

40

【 0 1 0 0 】

好ましい実施形態において、本発明の抗体は、蛍光分子、放射性分子又は上記の本技術分野において周知の他のラベル等の検出可能な分子又は基質を用いてラベルされ得る。例えば、本発明の抗体は、本技術分野において周知の方法により放射性分子を用いてラベルされ得る。例えば、放射性分子は、以下のものに限られないが、I123, I124, In111, Re186, Re188等のシンチグラフ検査のための放射性原子を含む。本発明の抗体は、ヨウ素 1 2 3、ヨウ素 1 3 1、インジウム 1 1 1、フッ素 1 9、炭素 1 3、窒素 1 5、酸素 1 7、

50

ガドリニウム、マンガン又は鉄等の核磁気共鳴（NMR）イメージング（核磁気共鳴画像法、mriとも知られている）のためのスピンラベルを用いてラベルされ得る。抗体の投与の後、患者内における抗体の分布が検出される。特定のラベルの分布を検出する方法は、当業者に周知であり、適切な方法が用いられ得る。非限定的な例は、コンピュータ断層撮影（CT）、ポジトロン断層撮影（PET）、核磁気共鳴画像法（MRI）、蛍光、化学発光、及び超音波検査法を含む。

【0101】

本発明の抗体は、（例えばラジオイメージングにおける）A x 1の過剰発現に関連するガンの診断及び病期分類に有益となり得る。A x 1の過剰発現に関連するガンは、通常、以下のものに限られないが、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞性肺癌、胃癌、膵臓癌、グリオブラストーマ及びニューロフィブロマトーシス等のグリオ細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーマ、乳癌、大腸癌、メラノーマ、結腸直腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎臓癌、腎癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、サルコーマ、血液癌（白血病）、アストロサイトーマ、並びに頭及び首における種々のタイプの癌、又は他のA x 1の発現若しくは過剰発現をする過剰増殖性疾患を含む。

10

【0102】

本発明の抗体は、A x 1発現が増大又は低減される（可溶性A x 1型又は細胞A x 1型）癌以外の病気を診断するのに有益となり得る。

【0103】

通常、前記診断方法は、患者から得られた生物学的サンプルの使用を含む。本明細書で用いられる「生物学的サンプル」は、対象から得られた種々の型のサンプルを含み、診断アッセイ又はモニタリングアッセイに用いられ得る。生物学的サンプルは、以下のものに限られないが、血液及び他の生物の液体サンプル、生検材料若しくは組織培養物又はそれら由来の細胞及びその子孫等の固体組織サンプルを含む。例えば、生物学的サンプルは、A x 1過剰発現に関連する癌を有するそれぞれの懸濁液から回収された組織サンプルから得られた細胞を含み、好ましい実施形態においては、グリオーマ、胃、肺、膵臓、乳房、前立腺、腎臓、肝臓及び子宮内膜から得られた細胞を含む。従って、生物学的サンプルは、臨床サンプル、培養液中の細胞、細胞上清、細胞溶解液、血清、血漿、生物学的流体及び組織サンプルを含む。

20

【0104】

特定の実施形態において、本発明は、本発明の抗体を用いる患者からの細胞においてA x 1を検出することにより、患者におけるA x 1過剰発現に関連する癌を診断する方法である。特に、前記診断方法は、

30

(a) A x 1を発現する生物学的サンプルの細胞と複合体を形成する抗体が十分にある条件下で、本発明に係る抗体を用いてA x 1過剰発現に関連する癌に罹ったおそれがある患者の生物学的サンプルを回収するステップと、

(b) その複合体を検出及び/又は定量するステップとを含み、その複合体の検出は、A x 1過剰発現に関連する癌を指標とする。

【0105】

癌をモニターするために、すなわち、サンプルへの抗体の結合が増大又は低減するかどうか決定し、それによって、癌が進行又は改善しているかどうか決定するために、本発明に係る診断方法は異なる時間間隔で繰り返され得る。

40

【0106】

特定の実施形態において、本発明は、A x 1の発現若しくは過剰発現、又はA x 1の可溶性形態の低減若しくは増大に関連する病気の診断方法である。ヒト免疫障害、血栓性疾患（血栓症及びアテローム血栓症）及び心血管疾患は、本発明の抗A x 1抗体により診断され得る。

【0107】

(治療的使用)

本発明の抗体、断片又は免疫結合体は、A x 1過剰発現に優先的な癌に関連する疾病の

50

治療に有益となり得る。

【0108】

1) 本発明の抗 A x 1 抗体は、A x 1 及び / 又は G a s 6 の発現、過剰発現又は活性化に関連する過剰増殖性疾患の治療に用いられ得る。腫瘍組織に特に限定されず、例えば、扁平細胞癌、小細胞性肺癌、非小細胞性肺癌、胃癌、膵臓癌、グリオブラストーマ及びニューロフィブロマトーシス等のグリア細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーマ、乳癌、大腸癌、メラノーマ、結腸直腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎臓癌、腎癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、サルコーマ、血液癌(白血病)、アストロサイトーマ、並びに頭及び首における種々のタイプの癌を含む。2) 本発明の抗 A x 1 抗体は、先天的免疫反応の潜在的活性因子であり、敗血症等のヒト免疫障害の治療に用いられ得る。また、ワクチン等の免疫賦活剤として用いられ、(細菌、ウイルス、寄生生物に対する)抗感染因子として用いられ得る。3) 本発明の抗 A x 1 抗体は、静脈及び動脈血栓症並びにアテローム血栓症等の血栓症を予防又は治療し得る。

10

【0109】

4) 本発明の抗 A x 1 抗体は、心血管疾患を予防、防止又は治療し得る。

【0110】

5) 本発明の抗 A x 1 抗体は、ラッサウイルス及びエボラウイルス等のウイルスの侵入を防止又は阻害し、ウイルス感染の治療に用いられ得る。

【0111】

本明細書に記載された治療方法の実施形態のそれぞれにおいて、抗 A x 1 モノクローナル抗体又は抗 A x 1 モノクローナル抗体 - 薬物結合体は、治療しようとする疾病又は障害の管理に関する従来の方法論に一致した方法で実現される。本明細書の開示において、その抗体又は抗体 - 薬物の結合体の有効量は、疾病又は障害を防止する又は治療するために十分な時間及び条件下で、そのような治療が必要な患者に投与される。

20

【0112】

従って、本発明の対象は、本発明の抗体、断片又は免疫結合体の治療的有效量を用いて、それが必要な患者に投与することを含む、A x 1 の発現に関連する疾病の治療のための方法に関する。

【0113】

本発明において、本明細書で用いられる「治療すること (treating)」又は「治療 (treatment)」の用語は、そのような障害又は状態の進行を回復する、緩和する、阻害する又は防止することを意味する。その用語は、そのような障害又は状態の1つ又はそれ以上の症状に対して用いられる。

30

【0114】

本発明において、「患者」又は「それが必要な患者」の用語は、A x 1 の過剰発現に関連する疾病に冒されている又は冒されているおそれがあるヒトを意味する。

【0115】

本発明の抗体の「治療的有效量」は、医薬的治療に適用できる適切なベネフィット/リスク比において、癌を治療するための抗体の十分な量を意味する。しかしながら、本発明の抗体及び組成物の一日当たりの総用量は、健全な医学的判断の範囲内で主治医により決められ得ることが理解されるだろう。特定の患者のための特定の治療的有效用量レベルは、治療される障害及び障害の重症度、用いられる特定の抗体の活性、用いられる特定の組成物、患者の年齢、体重、健康状態、性別及び食事、投与時間、投与経路、用いられる特定の抗体の排出率、治療の期間、用いられる特定の抗体と組み合わせで用いられる又は同時に用いられる薬物、並びに医学分野で周知の因子等の種々の因子に依存するだろう。例えば、所望の治療効果を達成するために必要な用量よりも低いレベルの化合物の用量で開始すること、及び所望の効果が達成されるまで用量を徐々に増大することは当業者に周知である。

40

【0116】

特定の実施形態において、抗 A x 1 モノクローナル抗体又は抗体 - 薬物結合体は、疾病

50

又は障害の治療のための第2の薬物と組み合わせ用いられる。癌の治療のために用いられる場合、本発明の抗A×1モノクローナル抗体又は抗体-薬物結合体は、例えば手術、放射線療法、化学療法又はそれらの組み合わせ等の従来の癌治療と組み合わせ用いられ得る。特定の態様において、本発明に係る抗A×1抗体又は抗体-薬物結合体との組み合わせの癌治療のために有益な他の治療薬物は、抗血管新生薬を含む。いくつかの態様において、本発明に係る抗体又は抗体-薬物結合体は、サイトカイン(例えば腫瘍に対しての免疫反応を刺激するサイトカイン)と同時投与される。

【0117】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されているような抗A×1モノクローナル抗体又は抗体-薬物結合体は、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)と組み合わせ用いられる。

10

【0118】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されているような抗A×1モノクローナル抗体又は抗体-薬物結合体は、他の治療モノクローナル抗体(mAb)と組み合わせ用いられる。トラスツズマブ(ハーセプチン、Roche)、ペバシズマブ(アバスタチンRoche)、及びセツキシマブ(アービタックス、Merck)は、そのようなmAbと認可されている。他のmAbは、以下のものに限られないが、インフリキシマブ(レミケード、Johnson&Johnson)、リツキシマブ(リツキサン、Roche)、アダリムマブ(ヒュミラ、Abbott)及びナタリズマブ(タイサブリ、Biogen)を含む。

【0119】

20

(医薬組成物)

投与のために、抗A×1モノクローナル抗体又は抗体-薬物結合体は、医薬組成物として調製される。抗A×1モノクローナル抗体又は抗体-薬物結合体を含む医薬組成物は、医薬的に有益な組成物を調製するために周知の方法に従って調製され得る。治療分子は、医薬的に許容可能なキャリアとの混合物と組み合わせられる。組成物は、その投与が投与される患者に許容され得る場合、「医薬的に許容可能なキャリア」といわれる。無菌リン酸緩衝生理食塩水は、医薬的に許容可能なキャリアの一例である。他の適当なキャリアは、本技術分野において周知である(例えば、Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995を参照)。製剤は、1つ又はそれ以上の賦形剤、保存剤、可溶化剤、緩衝剤、バイアル表面等におけるタンパク質のロスを防止するためのアルブミン等をさらに含み得る。

30

【0120】

医薬組成物の形態、投与経路、用量及びレジメンは、当然、治療される患者の疾病の重症度、年齢、体重及び性別等といった条件に依存する。

【0121】

本発明の医薬組成物は、局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈、筋肉内、皮下又は眼内投与等のために製剤化され得る。

【0122】

好ましくは、医薬組成物は、注射可能な製剤のために医薬的に許容可能な媒体を含む。それらは、特に等張液、無菌液、食塩溶液(モノナトリウム若しくはジナトリウムリン酸、ナトリウム、カリウム、カルシウム若しくはマグネシウム塩化物等、又はそのような塩の混合物)、又はケースパイケースで無菌水又は生理食塩水が添加されて注射可能な溶液の構成となる乾燥、特に凍結乾燥組成物であってもよい。

40

【0123】

投与のために用いられる用量は、特に用いられる投与モード、関連性がある病態又は代替的に所望の治療期間といった種々のパラメータに適合され得る。

【0124】

医薬組成物の調製のために、抗体の有効量は、医薬的に許容可能なキャリア又は水媒体に溶解又は分散され得る。

【0125】

50

注射可能な適切な医薬形態は、無菌水溶液又は分散液、ゴマ油、落花生油又は水性プロピレングリコールを含む製剤、注射可能無菌溶液又は分散液の即時調製のための無菌粉末を含む。全ての場合、その形態は無菌でなければならず、容易に注射可能な程度まで流動的でなければならない。それは、製造及び保存の条件下で安定でなければならず、細菌及び菌類等の微生物のコンタミネーションに対して保護されてなければならない。

【0126】

遊離塩基又は薬理学的に許容可能な塩のような活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロース等の界面活性剤と適当に混合された水で調製され得る。また、分散液は、グリコール、液体ポリエチレングリコール及びそれらの混合液、並びに油で調製され得る。保存及び使用の通常条件下において、それらの製剤は、微生物の成長を妨げるために防腐剤を含む。

10

【0127】

本発明の抗体は、中性形態又は塩形態で組成物内に含まれ得る。医薬的に許容可能な塩は、(タンパク質の遊離アミノ基で形成された)酸付加塩、及び、例えば塩酸若しくはリン酸等の無機酸又は酢酸、シュウ酸、酒石酸及びマンデル酸等の有機酸で形成された酸付加塩を含む。遊離カルボキシル基で形成された塩は、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は水酸化二鉄等の無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩由来であってもよい。

【0128】

キャリアは、例えば水、エタノール、ポリオール(例えば、グリコール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等)、及び適当なそれらの混合物、並びに植物性油を含む溶媒又は分散媒であってもよい。適切な流動性は、例えばレクチン等のコーティングの使用によって、分散液の場合は必要とされる粒子のサイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の活動の防止は、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等の種々の抗菌剤及び抗真菌剤によりもたらされ得る。多くの場合、それは、例えば糖又は塩化ナトリウムといった等張剤を含むことが好ましい。注射可能な組成物の延長された吸収は、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンといった吸収遅延剤の使用によりもたらされ得る。

20

【0129】

無菌注射用液は、適当な溶媒における必要量の活性化合物を上述の種々の他の成分を組み合わせるにより調製され、適宜、その後ろに濾過滅菌される。一般に、分散液は、種々の無菌活性成分を、塩基性分散媒を含む無菌媒体及び必要な上述の他の成分と組み合わせられることにより調製される。無菌注射液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、その濾過滅菌された溶液から、所望の追加成分が加えられた活性成分の粉末をもたらす真空乾燥及び凍結乾燥方法である。

30

【0130】

直接の注射のためのより高い濃度の溶液の調製も考えられ、溶媒としてDMSOを使用すると非常に速く浸透されることが予想され、小さい腫瘍領域に対して抗濃度の活性剤を運ぶ。

【0131】

製剤形態に基づき、溶液は、投薬形態と相性が良い方式で、また、治療効果がある用量で投与される。製剤は、上記の注射用液等の種々の投薬形態で容易に投与され、薬物放出カプセル等も用いられ得る。

40

【0132】

水溶液の非経口投与のために、例えば溶液は、必要に応じて適当に緩衝されるべきであり、十分な塩又はグルコースを含む等張にされた液体希釈剤とすべきである。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内への投与に特に適する。これに関して、適用され得る無菌水性媒体は、本開示を考慮すれば当業者には明らかである。例えば、1回の投与量は、1mlの等張NaCl液に溶解され、1000mlの皮下注入液に加えられ得る、又は点滴の提示された領域において注入され得る(例えば、Remington's Pharmace

50

utical Sciences" 15th Edition, pages1035-1038 及び1570-1580を参照)。投与量のいくつかのバリエーションは、治療される患者の状態に依存して必然的に生じる。いずれにしても、投与の責任者が個々の患者のための適切な用量を決定する。

【0133】

本発明の抗体は、1回の投与において約0.0001~1.0mg、約0.001~0.1mg、約0.1~1.0mg又は約10mg含まれるように、治療混合物内に含有される。多数回投与もされ得る。

【0134】

静脈内又は筋肉内注射等の非経口投与のために製剤化された化合物に加えて、他の医薬的に許容可能な形態は、例えばタブレット又は経口投与のための他の固体、放出カプセル、及び近年用いられている他の形態を含む。

10

【0135】

特定の実施形態において、リポソーム及び/又はナノ粒子の使用は、宿主細胞内への抗体の導入のために考えられるものである。リポソーム及び/又はナノ粒子の形態及び使用は、当業者に周知である。

【0136】

ナノカプセルは、通常、安定且つ再生可能な方法で化合物を含有させ得る。細胞内における高分子繊維の過負荷による副作用を避けるために、超微細粒子(0.1µm程度)は、通常、インビボで分解され得るポリマーを用いて設計される。それらの要件に適合する生分解性ポリアルキルシアノアクリレートナノ粒子は、本発明に用いられることが考えられ、そのような粒子は、容易に作製され得る。

20

【0137】

リポソームは、水性媒体において分散され、多重膜の同心円状二分子小胞(多重膜小胞(MLVs))とも呼ばれる)を自然に形成するリン脂質から形成される。MLVsは、通常、25nm~4µmの径を有する。MLVを超音波処理すると、径が200~500であり、コアに水溶液を含む小さい単一小胞(SUVs)が形成される。リポソームの物理的特性は、pH、イオン強度及び二価カチオンの存在に依存する。

【0138】

(キット)

本発明は、本発明の少なくとも1つの抗体を含むキットも提供する。本発明の抗体を含むキットは、Ax1の発現(増大又は低減)を検出するために、又は治療的アッセイ若しくは診断的アッセイのために使用される。本発明のキットは、例えば組織培養プレート又はビーズ(例えばセファロースビーズ)といった固体担体と結合された抗体を含み得る。キットとしては、例えばELISA又はウエスタンブロットといったインビトロで検出及び定量するための抗体を含むものが提供され得る。検出に有益なそのような抗体は、蛍光又は放射線等のラベルが付加されていてもよい。

30

【0139】

本発明は、以下の図面及び実施例によってさらに詳細に説明される。しかしながら、それらの実施例及び図面は、本発明の範囲を限定するためのものであると解釈されるべきでない。

40

【図面の簡単な説明】

【0140】

【図1】hAx1に対するマウスモノクローナル抗体の親和性及び特異性を調べるためのELISA試験である。ヒトAx1Fc(h-Ax1)、マウスAx1Fc(m-Ax1)又はヒトMerFc(h-Mer)、Tyro-3-Fc(h-Tyro-3)でコートされたプレートは、モノクローナル抗Ax1抗体(mAb1, mAb2, mAb3, mAb4 or 20G7D9)を用いてインキュベートした。洗浄後、HRP結合抗マウスIgGを加えた。20G7D9は、h-Tyro-3、h-Mer又はm-Ax1と交差反応しない。

【図2】A549における細胞表面Ax1のフローサイトメトリー分析である。A549をモノクローナル抗Ax1抗体(mAb1, mAb2, mAb3, mAb4又は20G7D9)とフルオレセイン

50

結合抗マウスIgGとを用いて染色した。20G7 D9での染色により1桁シフトし、それらの細胞の表面におけるAx1の過剰発現が認められる。

【図3A】BIAcoreを用いたGas6の存在下又は非存在下における20G7 D9の親和性測定の結果を示す。Gas6の非存在下において、会合速度(k_a)及び解離速度(k_d)を1体1のラングミュア結合モデルを用いて算出した。平衡解離定数(K_D)を k_a/k_d 比として得た。20G7 D9は、約53 nMの K_D の高い親和性でヒトAx1に結合する。

【図3B】BIAcoreを用いたGas6の存在下又は非存在下における20G7 D9の親和性測定の結果を示す。20G7 D9は、Ax1に対するGas6リガンドの結合をブロックしない。

【図4】Ax1レセプターのリン酸化におけるmAb20G7D9の影響を調べるためのELISA試験である。BXPc3, Capan-1, PANC1及びMIAPaCa-2膵臓癌細胞を、血清不足条件下、マウス抗Ax1抗体存在下でプレインキュベートし、Gas6リガンドで処理した。細胞溶解物をPathScan(登録商標)Phospho-Axl (PanTyr) Sandwich ELISA plates (RD Systems, Minneapolis, MN)に移した。他の抗体と比較して、20G7 D9は、Gas6刺激細胞におけるAx1リン酸化レベルの減少により示される4つの細胞株でGas6媒介Ax1活性をブロック又は顕著に低減した。

【図5】細胞遊走及び増殖におけるマウス抗Ax1抗体の効果を調べるための、創傷治癒/傷アッセイ(Wound healing/scratch assay)である。A549細胞をコンフルエントになるまで増殖させた後、血清を欠乏させ、ピペットチップで傷を付けた。マウス抗Ax1 20G7 D9は、Gas6で細胞を処理したにもかかわらず、mAb1よりも顕著にクリアな領域の再生が減少した。

【図6】抗Ax1 20G7 D9の抗増殖効果を調べるための細胞生存率アッセイである。Capan-1, PANC1及びMIAPaCa-2膵臓癌細胞を培地内で増殖させ、所定濃度のmAb1又は20G7 D9で5日間処理した。細胞増殖率をMTSで測定した。20G7 D9は、試験した全ての細胞株の増殖をmAb1よりも阻害し、阻害の割合は濃度依存的である。

【図7A】モノクローナル抗Ax1 20G7 D9抗体は、Ax1受容体の速いダウンレギュレーションを誘導し、Akt経路を阻害する。Panc1細胞を、100 μ g/mlのmAb 20G7D9と種々の時間でインキュベートした。細胞を溶解し、総タンパク質を直接にウエスタンブロットに用いた。図7Aに示すようにmAb20G7D9は、Panc1細胞におけるAx1受容体の発現を速くダウンレギュレートする。mAb 20G7 D9を用いた1時間のインキュベートの後、細胞をGas6と30分間インキュベートし、チロシン702でのAx1受容体のリン酸化及びセリン473におけるAktのリン酸化の存在を、ウエスタンブロットにより解析した。

【図7B】モノクローナル抗Ax1 20G7 D9抗体は、Ax1受容体の速いダウンレギュレーションを誘導し、Akt経路を阻害する。Panc1細胞を、100 μ g/mlのmAb 20G7 D9と種々の時間でインキュベートした。細胞を溶解し、総タンパク質を直接にウエスタンブロットに用いた。図7Bに示すように、mAb 20G7 D9インキュベーションは、Gas6誘導型のAx1及びAktタンパク質のリン酸化の減少を引き起こす。

【図8A】ヌードマウスにおけるヒト三種陰性乳癌及びヒト膵臓癌に対するマウス抗Ax1抗体の効果を調べるための異種移植モデルである。MDA-MB-231(三種陰性乳癌細胞)又はMIAPaca-2, BXPc3(膵臓癌細胞)を無胸腺ヌードマウスの右側腹部に移植した。動物に300 μ gのマウス抗Ax1抗体を注射した。処理の間、腫瘍の増殖をカリパスで週1回モニターした。20G7 D9は、mAb1よりもヌードマウスにおける膵臓癌及び三種陰性癌の全体の増殖を低減した。

【図8B】ヌードマウスにおけるヒト三種陰性乳癌及びヒト膵臓癌に対するマウス抗Ax1抗体の効果を調べるための異種移植モデルである。MDA-MB-231(三種陰性乳癌細胞)又はMIAPaca-2, BXPc3(膵臓癌細胞)を無胸腺ヌードマウスの右側腹部に移植した。動物に300 μ gのマウス抗Ax1抗体を注射した。処理の間、腫瘍の増殖をカリパスで週1回モニターした。20G7 D9は、mAb1よりもヌードマウスにおける膵臓癌及び三種陰性癌の全体の増殖を低減した。

【図8C】ヌードマウスにおけるヒト三種陰性乳癌及びヒト膵臓癌に対するマウス抗Ax

10

20

30

40

50

1 抗体の効果を調べるための異種移植モデルである。MDA-MB-231 (三種陰性乳癌細胞)又はMIAPaca-2, BXPC3 (膵臓癌細胞)を無胸腺ヌードマウスの右側腹部に移植した。動物に300 µgの Maus抗Ax1抗体を注射した。処理の間、腫瘍の増殖をカリパスで週1回モニターした。20G7 D9は、mAb1よりもヌードマウスにおける膵臓癌及び三種陰性癌の全体の増殖を低減した。

【図8D】ヌードマウスにおけるヒト三種陰性乳癌及びヒト膵臓癌に対する Maus抗Ax1抗体の効果を調べるための異種移植モデルである。MDA-MB-231 (三種陰性乳癌細胞)又はMIAPaca-2, BXPC3 (膵臓癌細胞)を無胸腺ヌードマウスの右側腹部に移植した。動物に300 µgの Maus抗Ax1抗体を注射した。処理の間、腫瘍の増殖をカリパスで週1回モニターした。膵臓BXPC3異種移植マウスにおいて、媒体又はゲムシタピンと比較して全体の生存率を顕著に増大した。

【図8E】ヌードマウスにおけるヒト三種陰性乳癌及びヒト膵臓癌に対する Maus抗Ax1抗体の効果を調べるための異種移植モデルである。MDA-MB-231 (三種陰性乳癌細胞)又はMIAPaca-2, BXPC3 (膵臓癌細胞)を無胸腺ヌードマウスの右側腹部に移植した。動物に300 µgの Maus抗Ax1抗体を注射した。処理の間、腫瘍の増殖をカリパスで週1回モニターした。2回の注射を受けた外移片MIAPaca-2異種移植腫瘍において、mAb 20G7 D9によるAx1受容体の顕著なダウンレギュレーションが見られる。

【図9】hAx1-hFcの配列、及び抗Ax1 mAb 20G7 D9のエピトープの位置/配列である。抗Ax1抗体20G7 D9のエピトープを、トリプシン又はGluCプロテアーゼのいずれかを用いた制限タンパク分解アッセイ及びMALDI質量分析により同定した。図は、ヒトIgG1のFc部に融合されたAx1の細胞外ドメインのアミノ酸33から440までとヒスチジンタグとで構成された、この試験で用いられた抗原(hAx1-hFc)の構成を示す。Ax1タンパク質のイムノグロブリン様ドメイン及びフィブロネクチン3ドメインのそれぞれは、その配列に示されている。mAb 20G7 D9は、イムノグロブリン様ドメイン2と、第1及び第2のフィブロネクチンドメイン(タンパク質の配列において枠で囲まれた配列であり、表において示される)とに位置する3つのペプチド(立体構造エピトープ)に結合する。

【図10】ヒトAx1のエクトドメインのモデル、並びに抗Ax1マウスモノクローナル抗体20G7 D9のエピトープ及びGas6結合ドメインの位置を示す。図10Aは、4つ全てのラベルされたドメインを有するヒトAx1の細胞外ドメイン全体のモデルの模式図を示す。図10Bにおいて、Gas6のアミノ酸305~315の断片が薄灰色のシートとして加えられ、Ax1のイムノグロブリン様ドメイン1内にGas6結合ドメインが描かれている。図10Cは、灰色の面として、イムノグロブリン様ドメイン2並びにフィブロネクチンタイプIIIドメイン1及び2内における20G7 D9エピトープを示す。エピトープの3つの部分がそれぞれのドメインの外側面に位置することが確認される。図10CはGas6とエピトープとの相互作用部位がヒトAx1エクトドメインからそれぞれ離れて位置することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0141】

実施例1: Maus抗Ax1モノクローナル抗体の生成

Ax1に対するモノクローナル抗体をBalb/cマウスの連続免疫により得た。Balb/cマウスを、ヒトFcドメインに融合されたヒトAx1細胞外ドメイン(hAx1ECED) (hAx1-hFc protein; R&D system)を用いて過免疫した。Balb/cマウスに対して、10 µgの可溶性hAx1-hFcを0日目、14日目及び28日目に、完全フロイント(第1注射)又は不完全フロイント(第2及び第3注射)アジュバントの存在下で皮下注射した。以前に記載されたプロトコール(Salhi等, Biochem. J. 2004)を用いて、マウスからの脾臓細胞をマウスミエローマ細胞(PX63.Ag8.653; ATCC, Rockville, MD)と融合させた。細胞をハイブリドーマの選択のためのHAT培地を用いてプレートで培養した(10⁵/well)。12日後、上清を回収し、直接酵素結合免疫吸着法(ELISA)によるAx1結合特異性(hAx1-hFc又はhFc単独)でのスクリーニングを行った。限界希釈によるサブクローニングの2回目

の後に最も高い免疫結合を示す8つの陽性クローンを、インビトロでのラージスケールのmAbの生成のために増殖させた。条件上清をタンパク質G親和性クロマトグラフィーにより精製した。

【0142】

実施例2：マウス抗Ax1モノクローナル抗体は、マウスAx1又はヒトTAM受容体ファミリーの他のメンバーと交差反応しない

実施例2.1：ELISAにより測定されたように、マウス抗Ax1モノクローナル抗体は、マウスAx1又はヒトTAM受容体ファミリーの他のメンバーと交差反応しない

簡単に言うと、プレートにコートされたhAx1-hFcを、1%ウシ血清アルブミン(BSA)PBS、0.1% Tween 20 (PBST)で満たした。

10

【0143】

交差反応アッセイのために、コートされたプレートを、ヒトAx1-Fc (h-Ax1)、マウスAx1-Fc (m-Ax1)又はマウス Mer-Fc (h-Mer), Tyro-3-Fc (h-Tyro-3)と、37°Cで1時間インキュベートし、PBSTで4回洗浄した。プレートを抗Ax1mAbs (37°Cで2時間)とインキュベートし、PBSTで4回洗浄した。プレートをPBST、1%BSAで1:2000希釈されたHRP結合抗マウスIgG (Sigma)とインキュベートした(37°Cで1時間)。オルトフェニレンジアミン溶液(Sigma)を加え、暗所、室温で30分間反応させ、吸光度を450nmで測定した。

【0144】

濃度特異的様式で、選択された10種の抗hAx1ECDmAbsのh-Ax1に対する特異性を測定した(図1)。

20

【0145】

実施例2.2：FACSにより測定した結果、マウス抗Ax1モノクローナル抗体はAx1発現細胞に特異的に結合する

Ax1発現細胞を特異的に認識するためのマウス抗Ax1モノクローナル抗体の性能を、標準的方法を用いたFACSにより測定した。簡単に言うと、A549細胞(ATCC number: CCL-185)を回収し、生成された本発明のマウス抗Ax1モノクローナル抗体を用いて4°Cで1時間染色し、PBS BSAで3回洗浄し、フルオレセイン結合抗マウスIgG (1:50)を用いて暗所において4°Cで45分間染色した。サンプルをEPICSフローサイトメーター(Beckman-Coulter, Fullerton, CA)で分析した。図2に示すように、本発明のマウス抗Ax1モノクローナル抗体は、Ax1発現A549細胞に特異的に結合した。

30

【0146】

実施例2.3：BIAcoreにより評価されたマウス抗Ax1モノクローナル抗体の親和性測定

抗Ax1抗体の結合親和性の測定のために、BIAcore-3000装置を用いた表面プラズモン共鳴測定を用いた(BIACOREAB, Uppsala, Sweden)。研究室に配置されたProteomic Imaging and Molecular Interactions (M. Pugnieri)のプラットフォームからの施設で試験を行った。抗Ax1抗体とhAx1-hFcとの間の親和性を測定するために、マウス抗Ax1モノクローナル抗体を(アミンカップリングキット(BIACore AB)を用いて)hAx1-hFcでコートされたCM5バイオセンサチップにより捕捉した。反応速度測定のために、10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.005% 界面活性剤 P20 バッファーに含まれた種々の濃度の抗Ax1mAb (2 ~ 133 nM)を50 µl/minの流量、25°Cで注入した。会合速度(k_a)及び解離速度(k_d)を1体1のラングミュア結合モデル(BIACore Evaluation Software version 3.2)を用いて算出した。平衡解離定数(K_D)を k_a / k_d 比として算出した。示すように(図3A)、20G7 D9は、 K_D が $5.3 \times 10^{-8} M$ を示した。

40

【0147】

実施例3：マウス抗Ax1モノクローナル抗体はGas6の結合をブロックしない

競合試験のために、飽和濃度(625 nM)のGas6を(amine coupling kit (BIACore AB)を用いて)hAx1-hFcでコートされたCM5バイオセンサチップに導入した。マウス抗Ax1モノクローナル抗体(666 nM)を、Gas6を除去することなく

50

導入した。同一の試験を、まずマウス抗 A x 1 モノクローナル抗体 (666 nM) を導入し、次に Gas6 (625 nM) を導入して行った。20G7 D9 は h A x 1 E C D に対して Gas6 と競合しない結果を示した (図 3 B)。

【0148】

実施例 4 : 本発明のマウス抗 A x 1 モノクローナル抗体はインビトロでリガンド誘導性の A x 1 のリン酸化を阻害する

本発明のマウス抗 A x 1 モノクローナル抗体がリガンドである Gas6 誘導性の A x 1 のリン酸化を阻害するかどうか調べるために、E L I S A 試験を行った。簡単に言うと、BXPC3 (ATCC number: CRL-1687), Capan-1 (ATCC number: HTB-79), PANC1 (ATCC number: CRL-1469) 及び MIAPaCa-2 (ATCC number: CRL-1420) 細胞を、通常の培養培地を含む平底の 6 ウェルプレートに播種した。次の日に、24 時間、一晚中細胞を飢餓状態にするために、培養培地を無血清培地に交換した。細胞を本発明の 100 μ g/mL の精製抗 A x 1 マウスモノクローナル抗体とプレインキュベートし、その後、250 ng/mL の Gas6 の存在下又は非存在下において 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。その後、培地を除去し、細胞をホスファターゼ及びプロテアーゼ阻害剤 (Roche Diagnostics, Meylan, France) を添加した 50 μ L の溶解バッファー (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 (v/v), 10% グリセロール (v/v), 100 mM フッ化ナトリウム, 0.1 mM フッ化フェニルメチルするホニル, 1 mM オルトバナジウム酸ナトリウム (Sigma)) で 30 分間溶解した。細胞破片を遠心分離により除去し、タンパク質濃度をブラッドフォード比色反応により測定した。比色試験において 450 nm の吸光度を測定してリン酸化 A x 1 レベルを測定するために、メーカーによって記載されるように PathScan (登録商標) Phospho-Axl (PanTyr) Sandwich ELISA Kit (RD Systems, Minneapolis, MN) を用いた。

10

20

【0149】

図 4 に示すように、mAb 20G7D9 は、全ての膵臓癌細胞株において Gas6 リガンド誘導性 A x 1 リン酸化を強く阻害した。他の mAbs は、全ての膵臓癌細胞株において Gas6 リガンド誘導性 A x 1 リン酸化を阻害しない、又はわずかに阻害した。

【0150】

実施例 5 : 本発明の抗 A x 1 マウスモノクローナル抗体は細胞遊走を阻害する

人工的な傷の端における細胞が損傷領域に向かって移動する治癒プロセスを観察する損傷治癒アッセイ (wound healing assay) を行った。A549 細胞を、24 ウェルプレートにコンフルエンスで、またコンフルエンスに近い程度 (>90%) で培養した。無菌ピペットチップを用いてウェルの中央に損傷領域を作った。遊走細胞は、隆起部が拡大し、最終的に損傷領域に広がり、それを閉じ得る。その細胞を、PBS で緩やかにリンスし、100 μ g/mL の Gas6 の存在下又は非存在下で、本発明の精製マウス抗 A x 1 モノクローナル抗体 (100 μ g/mL) とインキュベートした。顕微鏡画像を用いて処理後 24 時間、細胞遊走速度を測定した。図 5 に示すように、mAb 20G7 D9 は、mAb 1 又は Gas6 処理細胞と対照的に治癒領域が見えるように細胞遊走を強く阻害した。

30

【0151】

実施例 6 : 本発明の抗 A x 1 マウスモノクローナル抗体は細胞増殖を阻害する

MIAPaCa-2, Capan-1 及び PANC1 膵臓癌細胞を 96 ウェルプレートに 4000 cells/well となるように播種し、マウス抗 A x 1 モノクローナル抗体 (25, 50 又は 100 μ g/mL) で 5 日間処理した。細胞増殖アッセイを MTS アッセイ (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム) を用いて行った。MTS は、細胞により組織培養培地に溶解され得るホルマジン生成物に還元される。490 nm におけるホルマジンの吸光度を、分光光度計を用いて測定した。図 6 に示すように、mAb 20G7 D9 は、膵臓細胞の増殖を強く阻害したが、他の A x 1 特異性抗体 (mAb 1) ではわずかな阻害が見られた。

40

【0152】

実施例 7 : 本発明の抗ヒト A x 1 マウスモノクローナル抗体は、A x 1 の発現をダウン

50

レギュレートし、Akt 経路を阻害する

mAb 20G7 D9により細胞遊走及びAx1リン酸化の阻害に関連するメカニズムを解明するために、Ax1レセプター及び下流のシグナル経路への直接の影響を分析した(Gas6リガンドによるAx1レセプターの活性化は、いくつかのキーシグナルカスケード、特にAkt経路を誘導すると報告されている)。Ax1レセプターのダウンレギュレーション、並びにAx1レセプター及びAktのリン酸化を、mAb 20G7 D9で処理された膵臓癌細胞株(Panc-1細胞)を用いてウエスタンブロットにより分析した。

【0153】

膵臓癌細胞株(Panc-1細胞)を、6ウェルプレートに播種し(1×10^6 cells/well)、100 ug/mlの20G7 D9と37 でインキュベートした。異なる時点で回収された細胞株をそれぞれ2 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、100 mM フッ化ナトリウム、10 mM オルトパナジン酸ナトリウム、及び1タブレットのコンプリートプロテアーゼ阻害剤混交物(Sigma, St Louis, MO)を含むバッファー(150 mM NaCl, 10 mM TRIS pH7.4, 1mM EDTA, 1%TRITONX 100)で溶解した。還元条件下で8%又は10%SDS-PAGEにより分離した後、タンパク質をポリフッ化ビニリデン膜(Millipore, Bedford, MA)に転写し、0.1% Tween 20及び5%脱脂粉乳を含むPBSに浸した。その膜を、Cell Signaling Technologyから得た抗ヒト-AXL (R&D systems)、抗リン酸化(Y702) Axl 又は抗リン酸化(S473) Aktの適当な希釈液内において4 で一晩中インキュベートした。イムノブロットをGAPDH (Millipore)に対する抗体を用いて標準化した。その後、その膜を、適当なホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体(Bio-Rad)とインキュベートし、ECL detection (Amersham)で処理し、G:BOX iChemi (Syngene)で分析した。

【0154】

細胞をmAb 20G7D9で処理した場合、Ax1の発現は90分後に速やかに減少し、24時間後ではほとんど検出できない(図7A)。リン酸化Ax1及びリン酸化Aktの量の感応は、細胞をGas6で刺激した場合に観察された。両方のシグナルは、mAb20G7 D9での前処理により顕著に阻害された(図7B)。

【0155】

実施例8：本発明の抗ヒトAx1マウスモノクローナル抗体はAx1レセプターのダウンレギュレートに関連するヒト三種陰性乳癌及び膵臓癌の増殖をインビボで低減する。

【0156】

全てのインビボ試験を試験動物研究のためのフランスのガイドライン(Agreement no. C 34-172-27)に従って行った。6週齢のメスの胸腺欠損ヌードマウスを、Harlanから購入した。三種陰性乳癌細胞(5×10^6 ; MDA-MB-231; ATCC number: HTB-26)又は膵臓癌細胞(3.5×10^6 , BXPC3; 5×10^6 , MIA PaCa-2)を胸腺欠損ヌードマウスの右側腹部に移植した。腫瘍が生じたマウスを、腫瘍が約 100 mm^3 の大きさに達した際に、異なる処理群にランダムに分けた。マウスに対して、媒体(0.9% NaCl)、 $300 \mu\text{g/injection}$ の本発明の抗Ax1マウスモノクローナル抗体のみ(連続4週間、1週間に2回)、又はゲムシタピン(GEMZAR)を腹腔内に注射することにより処理した。腫瘍体積を、カリパスを用いて週毎に測定した。BXPC3における結果を、腫瘍が予め定めた 2000 mm^3 の体積に達するのにかかる時間を用いた変形Kaplan-Meier生存率曲線により表した。中間遅延時間を、50%のマウスが 2000 mm^3 の体積に達する腫瘍を有する時間として定義した。抗hAxl mAb 20G7 D9では、MDA-MB-231及び膵臓異種移植片の腫瘍増殖が低減し、mAbでは低減しなかった(図8A, B, C)。変形Kaplan-Meier生存率曲線は、マウスを20G7 D9抗体で処理した場合、NaCl処理マウスと比較して、50%生存に達するのに15日間の遅延時間を示した(図8D)。

【0157】

他の試験系統において、mAb 20G7 D9又は不適切なマウスIgG1イソタイプmAb (Px)で処理されたMIA PaCa-2異種移植片を、2度のmAb注射の後に外移植し、Ax1レセプター(抗-Axl mAb, R&D systems)又はGAPDHコントロールタンパク質(抗GAPDH, Millipore)のウエスタンブロット検出を用いた。mAb 20G7D9処理は腫瘍におけるAx1発現の顕著

な低減を誘導した(図8E)。

【0158】

実施例9: マウス抗ヒトA x 1モノクローナル抗体のエピトープは3つのペプチドで構成された構造エピトープであり、1つはイムノグロブリン様ドメイン2に位置し、1つはフィブロネクチン3ドメイン1にあり、1つはヒトA x 1のフィブロネクチン3ドメイン2にある

エピトープ構造を定義するために、固定化された抗原-抗体複合体のタンパク質限定分解アッセイを行った。20G7 D9エピトープのマッピングのために、hAx1-hFcを生理的条件下で固定された20G7 D9モノクローナル抗体に親和性結合させた。20G7 D9により保護されていないhAx1-Fc残基を除去するために、一連のタンパク質分解酵素による切断(セリンプロテアーゼトリプシン及びエンドプロテイナーゼGluC)を行った。溶出後、保護された残基、すなわち20G7 D9エピトープについて、固定化された抗体に親和性結合されたペプチドのMALDI-MS分析により測定された分子量に基づいて同定した。

【0159】

販売者の手順書に従って、20G7 D9モノクローナル抗体(250 µg)を、室温で1時間ProMagMagnetics Microsphere PMC3N (Bangs Laboratories)に結合した。50 µgの20G7 D9マイクロビーズ複合体を50 µgのhAx1-hFc抗原(R&D system)とインキュベートし、4で90分間結合させた。バッファーで3回洗浄することにより、遊離抗原を除去した。20G7 D9とhAx1-hFcとの免疫複合体を0.35 µgのトリプシン又はGluCを用いて37で2時間15分間切断した。上清を遠心分離(2000g, 4°C, 3 min)により分離し、除去した。20G7 D9及びhAx1-hFc保護残基と結合したマイクロビーズをバッファーで3回洗浄した。0.1%のTFA(トリフルオロ酸)を用いて室温で40分間分離させた。合計1500回のレーザー発射したMALDI質量分析(ABSCIEX MALDI 4800、Laser Nd/YAG 355nm, 200Hz, 電圧20kV, 抽出時間250 ns)、により、スペクトルを得た。サンプルに用いられたマトリクスは、5mg/mLのシアン-4-ヒドロキシケイ皮酸(CHCA)とした。hAx1-hFc抗原(R&D system)の配列構成、及び同定された20G7 D9のエピトープ配列を図9に示す。マウスモノクローナル20G7 D9抗体は、1つがイムノグロブリン様2ドメイン(配列:TSSFSCEAHNAK)に位置し、1つがフィブロネクチンタイプIIIドメイン1に位置し(配列:GMGIQAGEPDPPEE)、1つがフィブロネクチンタイプIIIドメイン2(配列:TPEVLMDIGLRQE)に位置する3ペプチドで構成された立体構造3Dエピトープに結合する。

【0160】

実施例10: マウス抗ヒトA x 1モノクローナル抗体のエピトープは溶媒露出面に露出し、構造的にGas6の相互作用サイトから離れて位置している

ヒトA x 1タンパク質の細胞外ドメインモデルを2ステップで構築した。第1に、イムノグロブリン様ドメイン(ドメイン1及び2)を、コード2C5Dに基づいてProtein Data Bankで得られる結晶構造から抽出した。この構造は、A x 1エクトドメインの2つのイムノグロブリン様ドメインがGas6の第1ラミニンG様ドメインにクロスリンクされたA x 1/Gas6複合体を示す。あいにく、A x 1の2つのフィブロネクチンタイプIII(FN3)ドメインは、未だ結晶化されておらず、従って、モデル化される必要がある。そのモデルを、テンプレートとしてヒトチチンタンパク質(PDB id: 3LPW)のA鎖からのFN3タンデムA77-A78の3D構造を用いたホモロジーモデリングにより構築した。アライメントの後、2つのタンパク質の配列は、22.8%の同一性を共有する。イムノグロブリン様ドメインとフィブロネクチンタイプIIIドメインとを、2つのドメインの側鎖間の立体障害を最小化するために、二面角を変更するロイシン224とプロリン225との間で互いに結合させた。

【0161】

マウス抗A x 1抗体20G7 D9のエピトープ及びGas6結合ドメインを、ヒトA x 1のエクトドメイン全体のこのモデルにおいて同定した。このモデルは、A x 1における20G7 D9により認識され、表面に位置する3つの抗原性サイトの特定の位置を表した(図10)。また、このモデルは、3ペプチド(第1のものはIgG様2にあり、第2のものはF

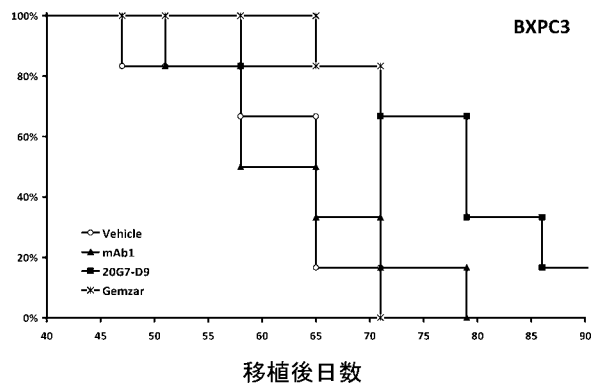
N 3 ドメイン 1 にあり、第 3 のものは A x 1 の F N 3 ドメイン 2 にある) で構成される 20 G7 D9 エピトープが、行われた競合試験 (実施例 3 ; 図 3 B) に従って、リガンド結合サイト (I g G 様ドメイン 1 に位置する G a s 6 結合サイト) から離れて位置することを表した。

【 0 1 6 2 】

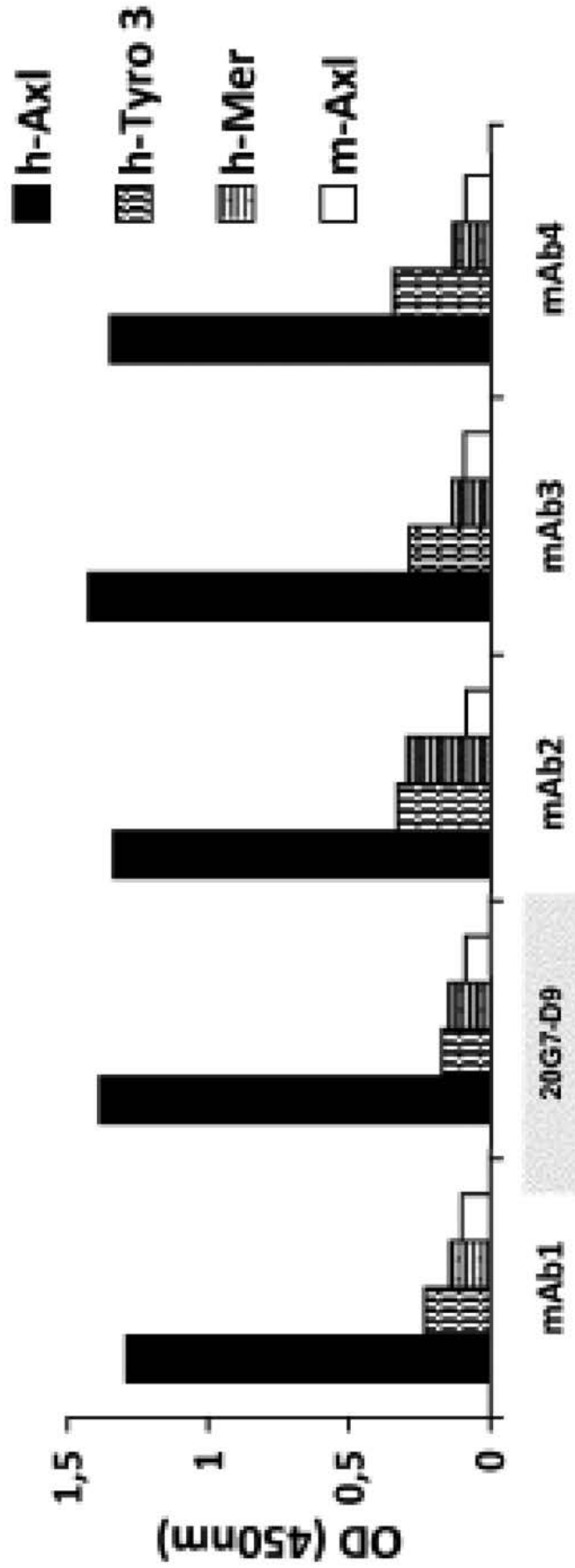
(参考文献)

本明細書における種々の参考文献が本発明に属する先端技術を記載する。これらの参考文献の開示は、本開示内に参照により援用される。

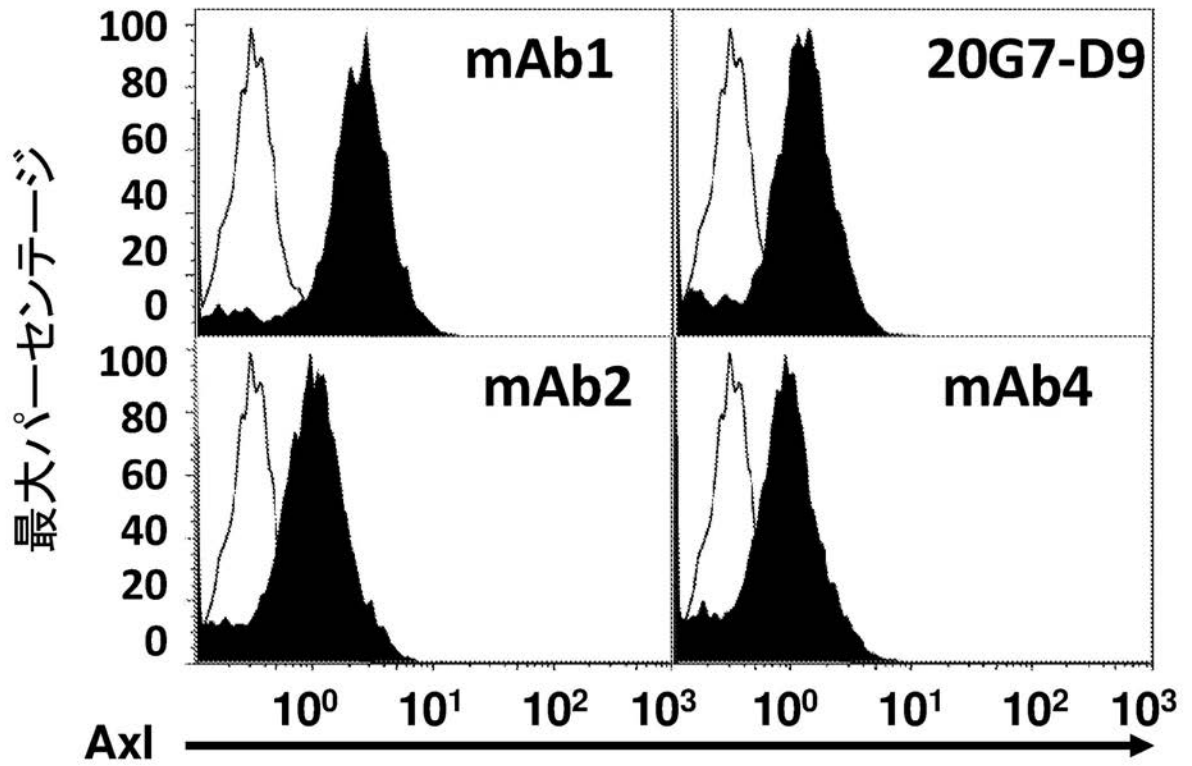
【 図 8 D 】



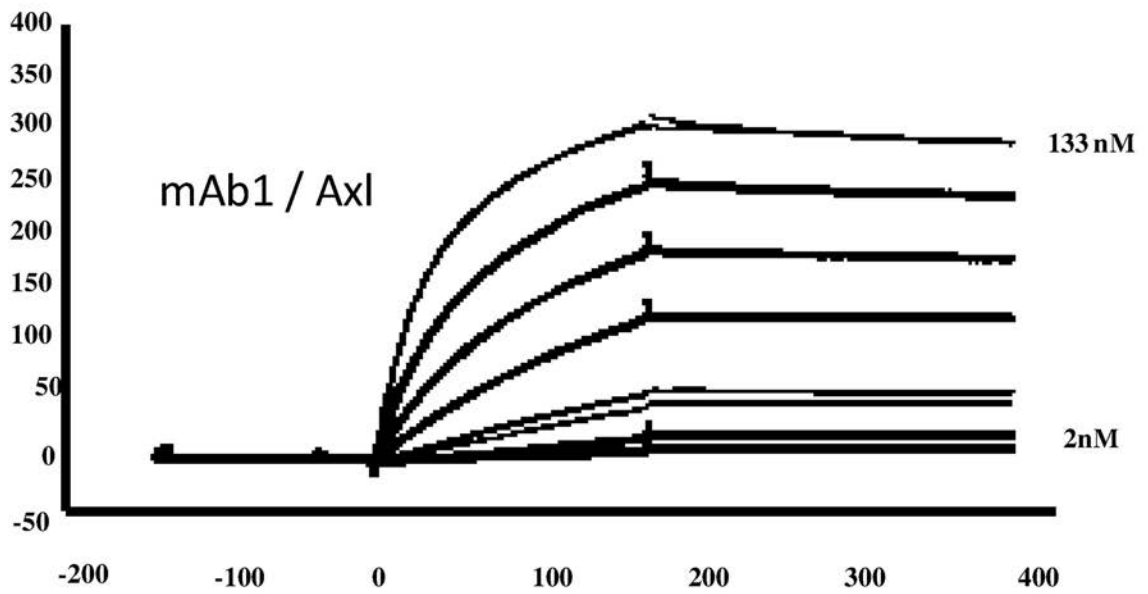
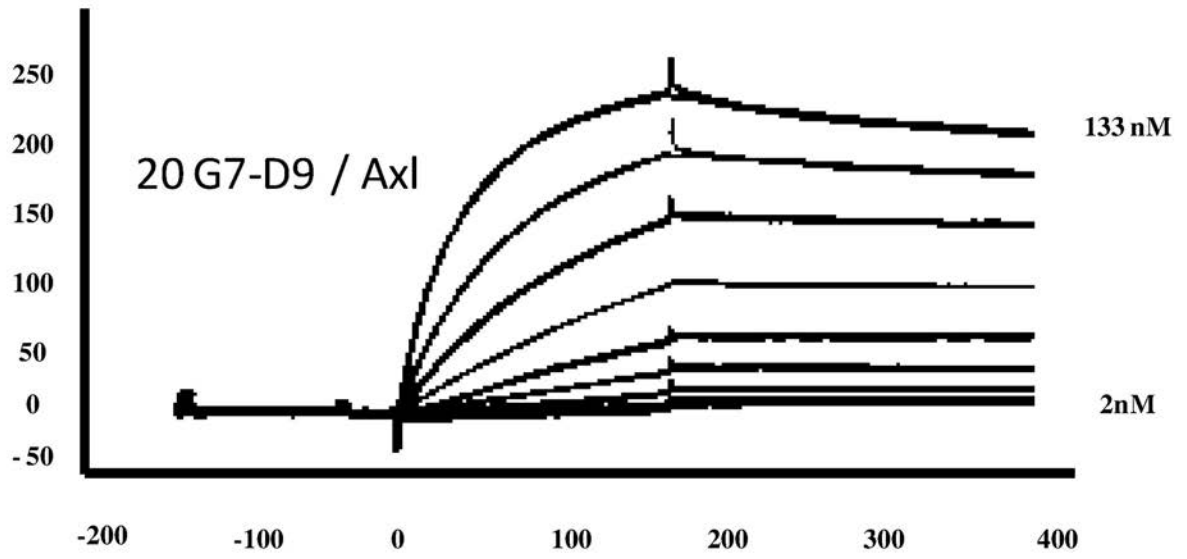
【 図 1 】



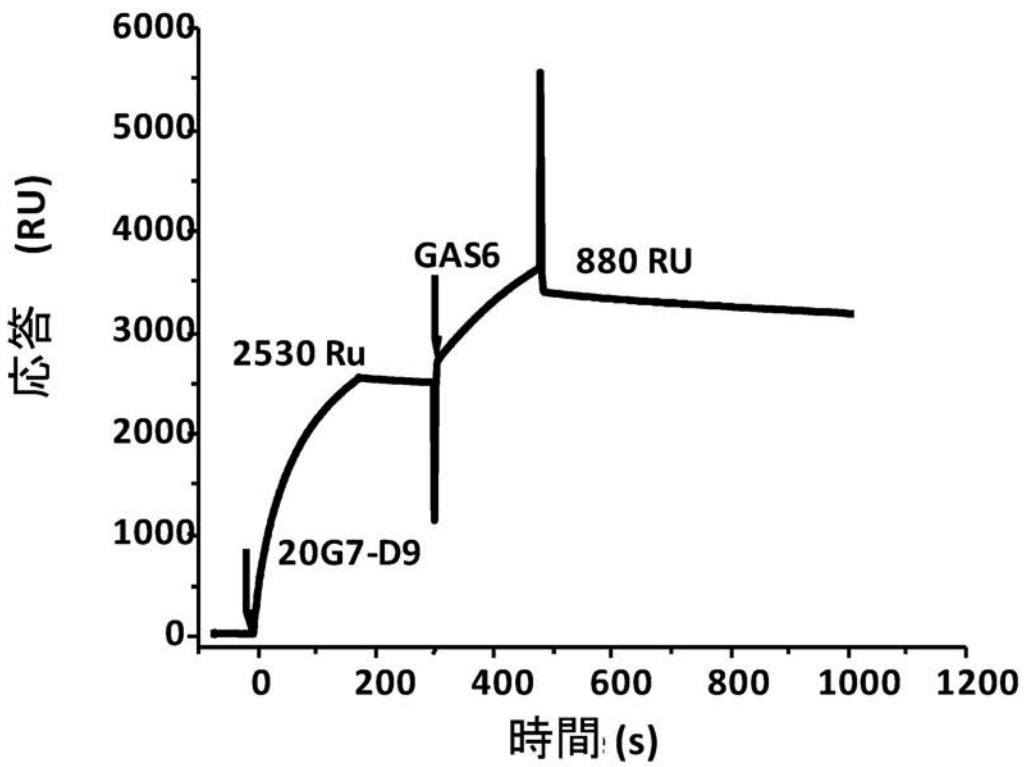
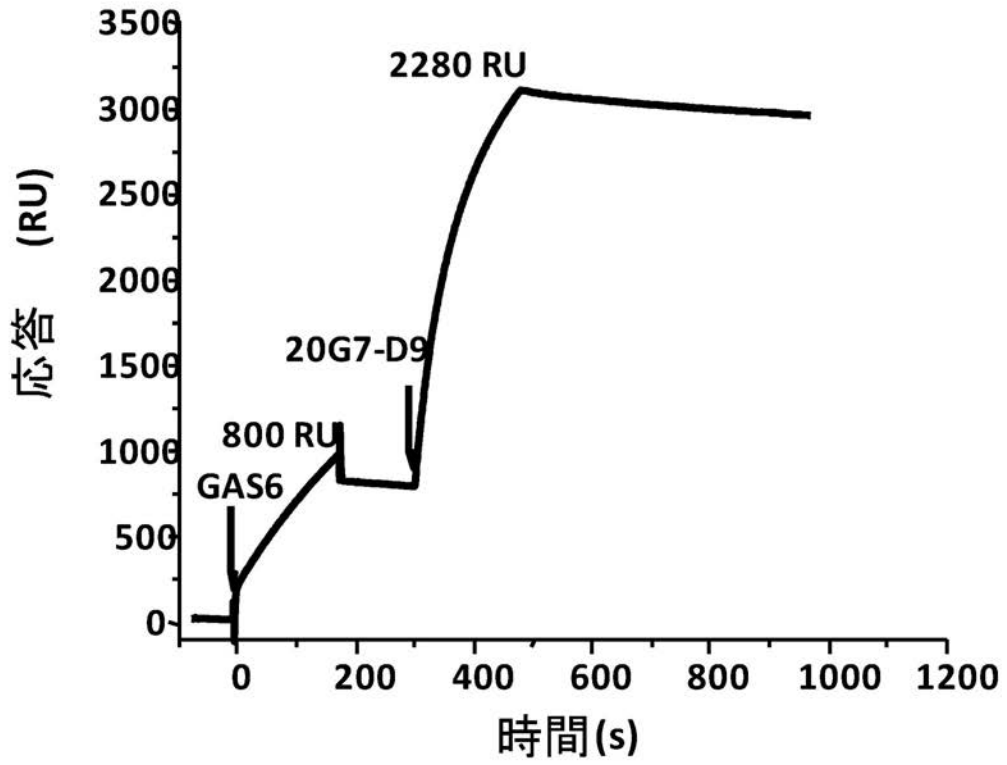
【 図 2 】



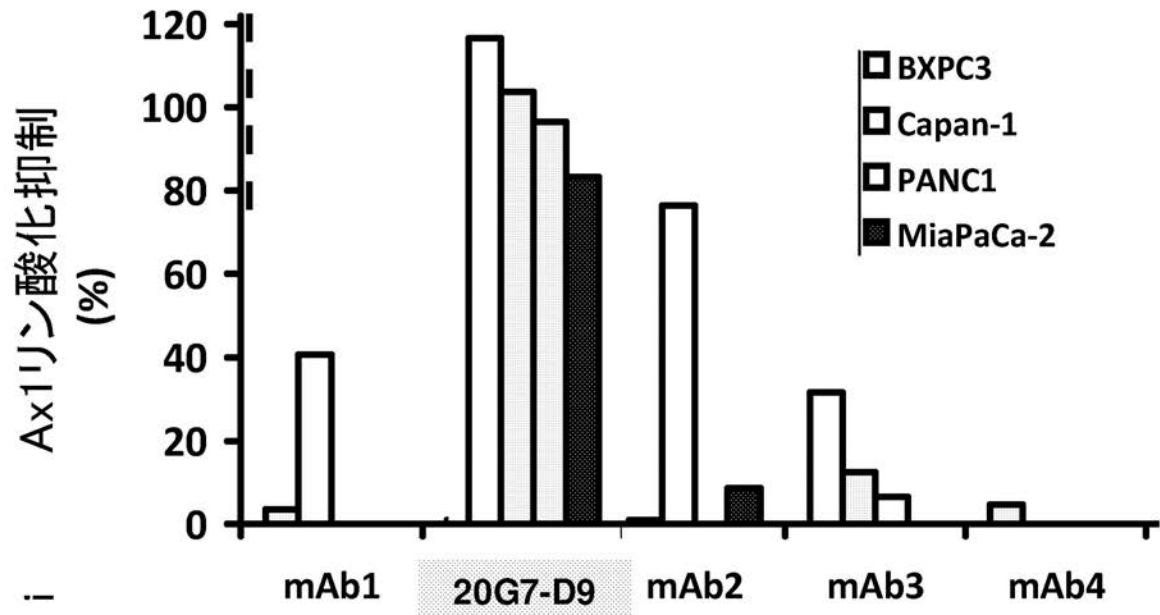
【 図 3 A 】



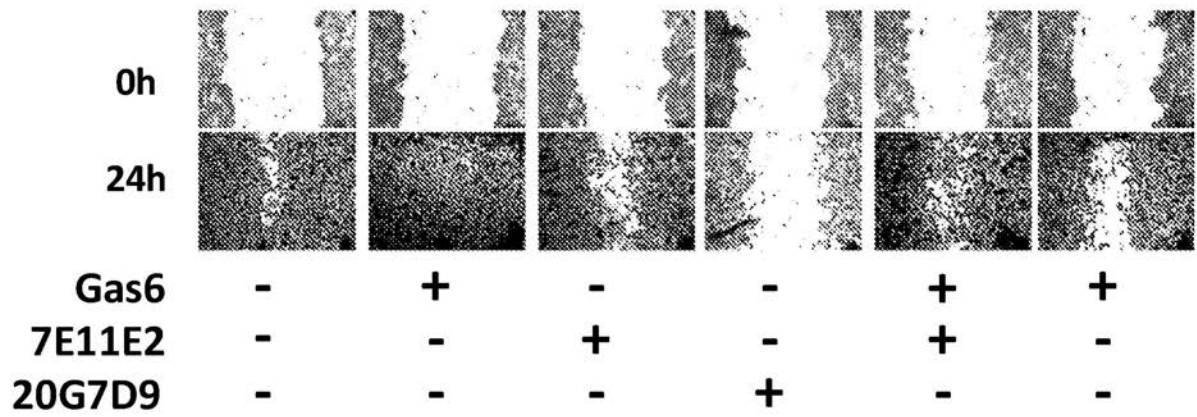
【 図 3 B 】



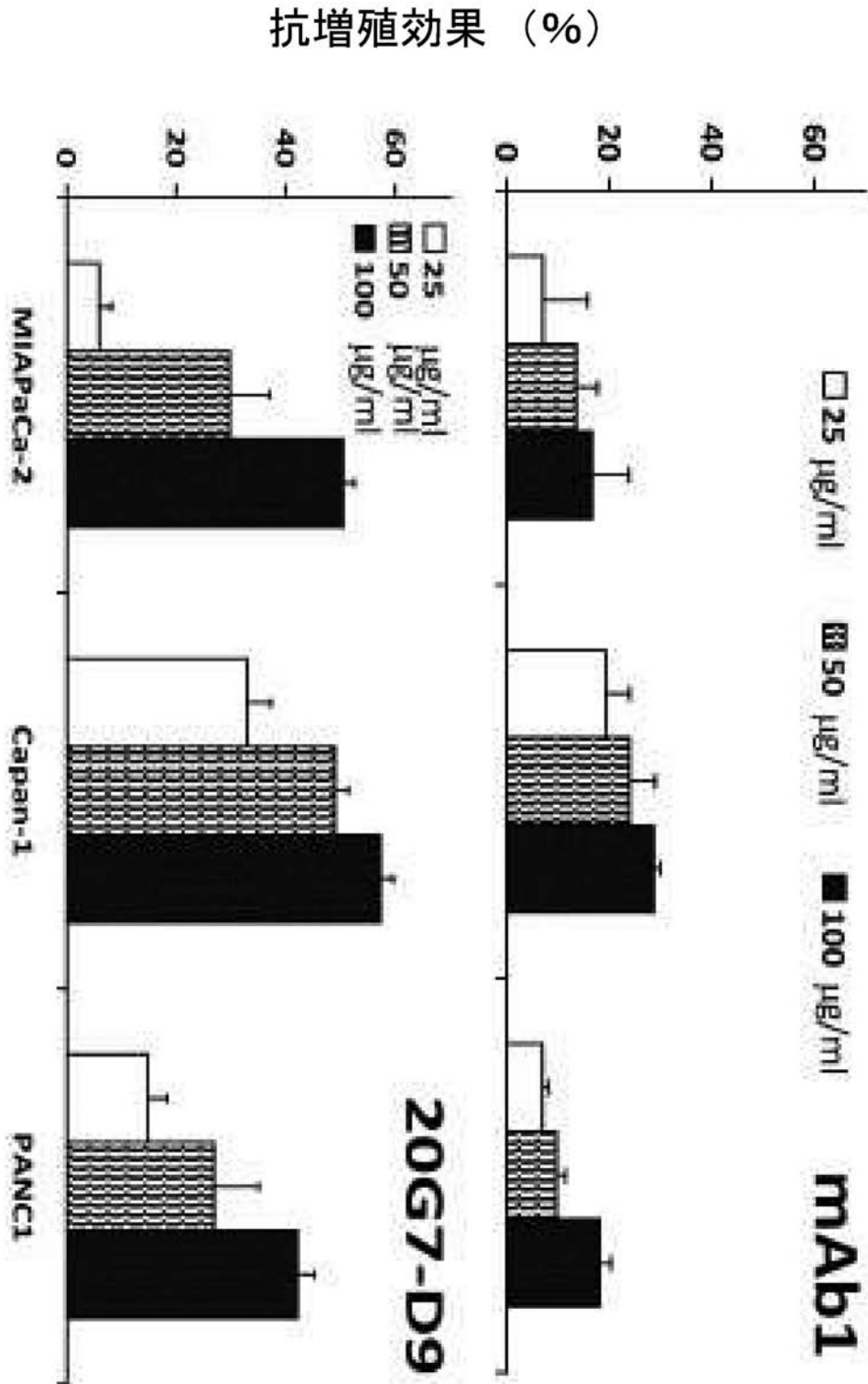
【 図 4 】



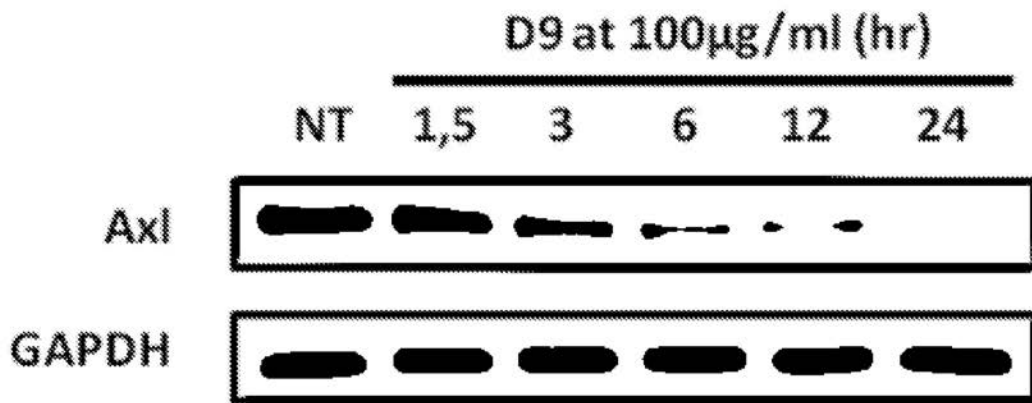
【 図 5 】



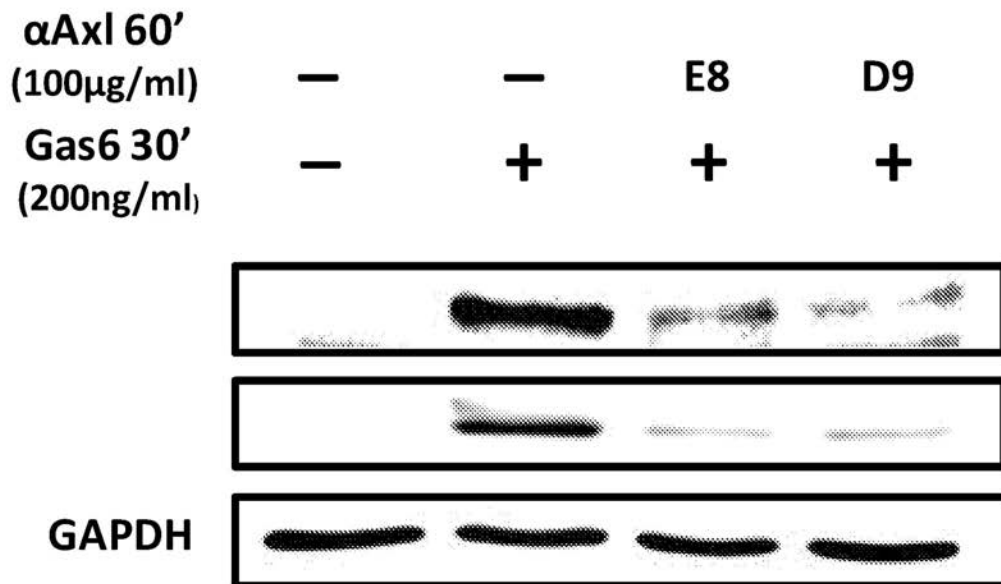
【 図 6 】



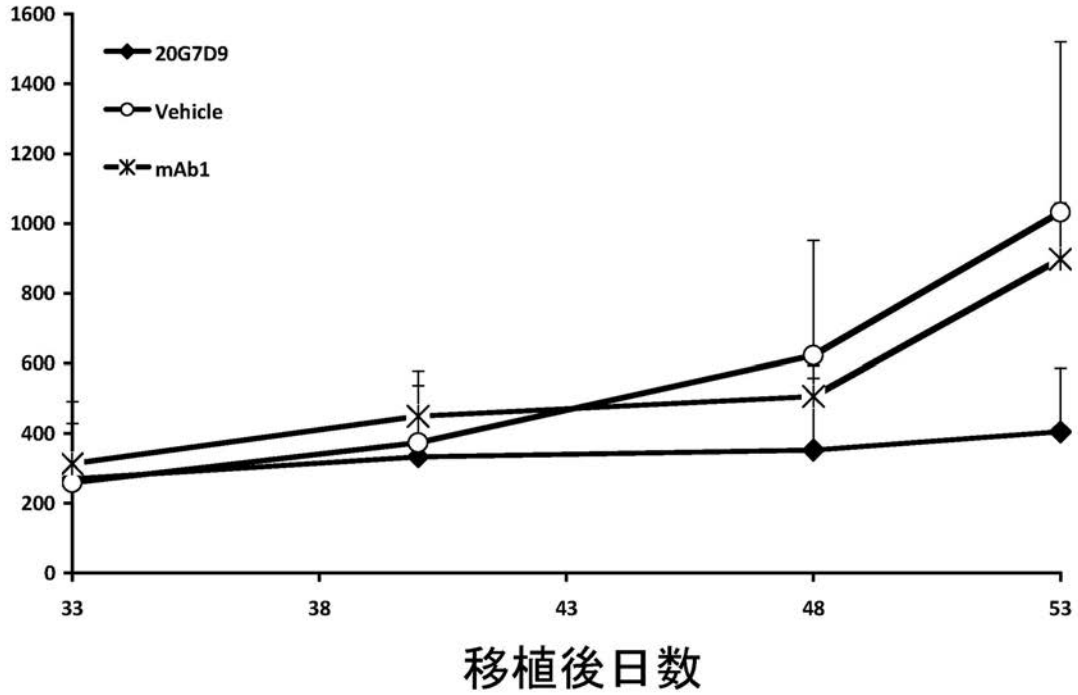
【 図 7 A 】



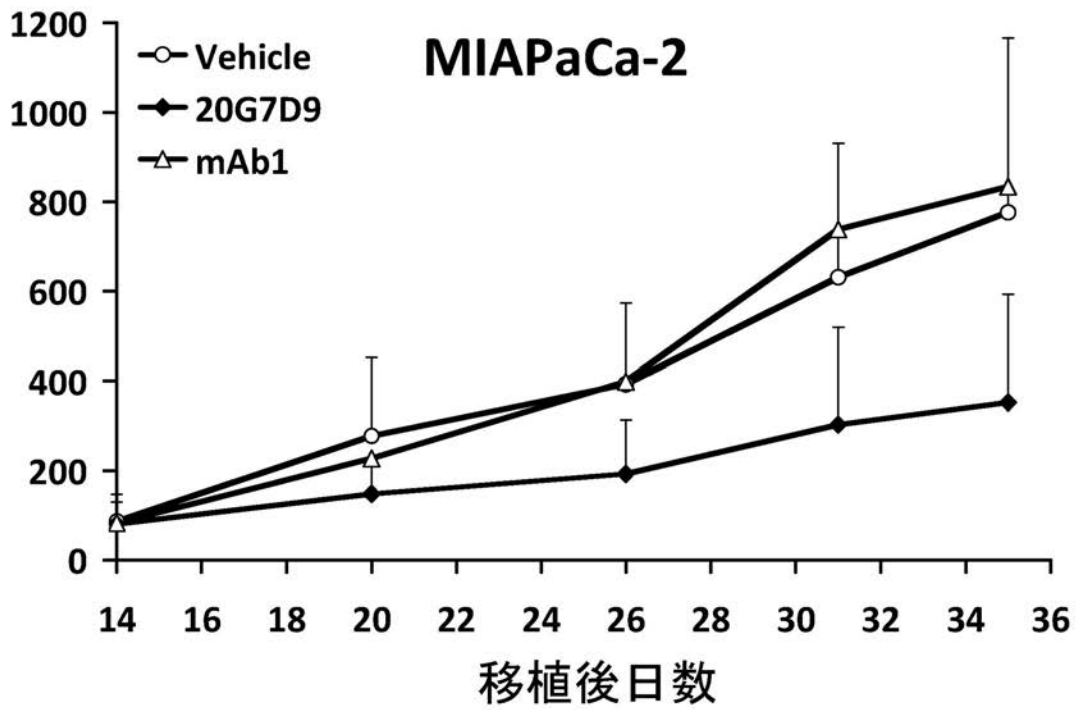
【 図 7 B 】



【 図 8 A 】



【 図 8 B 】



haxl-hFc composition

Human Axl (Glu33-Pro440)	DIEGRMD	Human IgG1 (Pro100-Lys330)	6His tag
-----------------------------	---------	-------------------------------	----------

33

EESPFGN PNITGARGL TGLRCOLV OGEPPVHML RDGQLELAD STOTVPLGE DEQDDWIVVS QLRITSLQLS

IgG like domain 1

DTGQYQCLVF LGHQTFVSPQ GYVGLGLPY FLEEPEDRTV AANTPPLNSC QAQPPPEVD LLMLODAVPL ATPRGHPQR

IgG like domain 2

SLHVPGLNKIT SSFSCFAHNA KGVTTSTRTAT ITVLPQOPRN LHIVSRQPTL LEVAWTPGLS GYPLTHCTL QAVLSNDG

FNIII domain 1

IQAGEPDPPE EPLTSQASVP PHQLRLGLSH PHTPYHIRVA CTSSQGPSSW THMLPVETPE GVPDGPPENI SATRNGSQAF

VHWQEPRAPI QGTLIGYRLA YQGQITPEVL MDIGLRQEVY LEIQGDGVSV NLTVCVAAYT AAGDGPMSLP VPLEAWRPVK

FNIII domain 2

440

EPSTPAFSWP DIEGRMDPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVDSHE DPEVKFNWYV

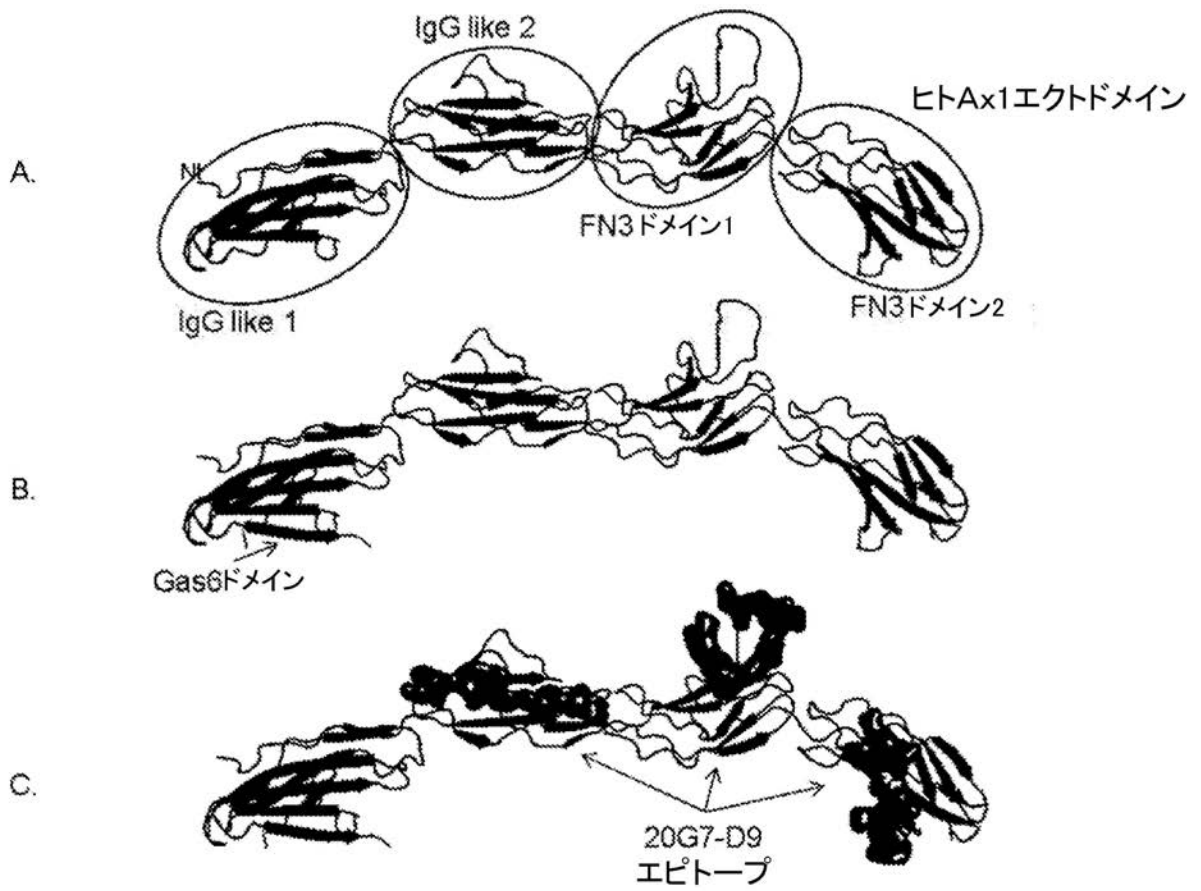
DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKÅ KGPQREPOVY TLPPSRDELIT

KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EMESNGQPEN NYKTTPEVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQÇ GNVFSCSVMH EALHNHYTQÇ

SLSLSPGKHH HHHH

20G7-D9 ephope	TSSFSCFAHNAK (IgG-like 2 : 200-211)
	GMGIQAGEPDPPEE (FNIII-1 : 268-281)
	TPEVLMDIGLRQÇ (FNIII-2 : 376-388)

【 図 1 0 】



【 配 列 表 】

[2014522638000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/062114

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 C07K16/28 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) A61K 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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 270 053 A1 (U3 PHARMA GMBH [DE]) 5 January 2011 (2011-01-05) paragraph [0001] - paragraph [0007]; examples 18-20 paragraphs [0055], [0056] -----	1-18
X	WO 2010/131733 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]; MAEDA ATSUSHIKO [JP]; MIYAMOTO HAJIM) 18 November 2010 (2010-11-18) examples 5-7 -----	1-18
X	EP 2 228 392 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 15 September 2010 (2010-09-15) examples 5,6 -----	1-18
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 August 2012		Date of mailing of the international search report 30/08/2012
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 Fellows, Edward

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/062114

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2270053	A1	05-01-2011	NONE
WO 2010131733	A1	18-11-2010	AR 076875 A1 13-07-2011 AU 2010248365 A1 22-12-2011 CA 2761891 A1 18-11-2010 CN 102459344 A 16-05-2012 CR 20110646 A 09-02-2012 EP 2431393 A1 21-03-2012 KR 20120024763 A 14-03-2012 MA 33405 B1 03-07-2012 PE 05622012 A1 06-06-2012 SG 176074 A1 29-12-2011 TW 201041595 A 01-12-2010 US 2012121587 A1 17-05-2012 WO 2010131733 A1 18-11-2010
EP 2228392	A1	15-09-2010	AR 069333 A1 13-01-2010 AU 2008321835 A1 22-05-2009 CA 2706549 A1 22-05-2009 CN 101918452 A 15-12-2010 EP 2228392 A1 15-09-2010 KR 20100097688 A 03-09-2010 PE 10242009 A1 12-08-2009 RU 2010123916 A 20-12-2011 TW 200936160 A 01-09-2009 US 2011044984 A1 24-02-2011 WO 2009063965 A1 22-05-2009
WO 2009062690	A1	22-05-2009	AU 2008323206 A1 22-05-2009 CA 2705164 A1 22-05-2009 CN 101939336 A 05-01-2011 CO 6280499 A2 20-05-2011 EP 2220121 A1 25-08-2010 JP 2011505120 A 24-02-2011 KR 20100097684 A 03-09-2010 RU 2010123888 A 20-12-2011 US 2010330095 A1 30-12-2010 WO 2009062690 A1 22-05-2009
WO 2011014457	A1	03-02-2011	AR 077595 A1 07-09-2011 TW 201106972 A 01-03-2011 WO 2011014457 A1 03-02-2011
EP 1382969	A1	21-01-2004	AT 462973 T 15-04-2010 AU 2003250984 A1 02-02-2004 AU 2009251103 A1 21-01-2010 CA 2493111 A1 22-01-2004 CN 1739030 A 22-02-2006 CN 102349997 A 15-02-2012 DK 1530724 T3 02-08-2010 EP 1382969 A1 21-01-2004 EP 1530724 A2 18-05-2005 EP 2228654 A2 15-09-2010 EP 2267454 A2 29-12-2010 ES 2343950 T3 13-08-2010 JP 2005532805 A 04-11-2005 JP 2011024580 A 10-02-2011 US 2005186571 A1 25-08-2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/062114

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/062690 A1 (U3 PHARMA GMBH [DE]; HETTMANN THORE [DE]; NIEWOEHNER JENS [DE]; RUHE J) 22 May 2009 (2009-05-22) the whole document -----	1-18
A	WO 2011/014457 A1 (GENENTECH INC [US]; COUTO SUZANA [US]; HONGO JO-ANNE S [US]; KALLOP DA) 3 February 2011 (2011-02-03) the whole document -----	1-18
A	EP 1 382 969 A1 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]) 21 January 2004 (2004-01-21) the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2012/062114

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/062114

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2004008147 A2	22-01-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

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

- (71)出願人 513325362
オリバース ファルマ
OriBase Pharma
フランス エフ - 3 4 1 8 9 モンペリエ セデックス4 リュ・デ・ラ・ヴァルシエール 1 6
8 2 - シーエス17383 キャップ ガンマ パーク ユーロメディスン
- (71)出願人 513324343
ユニベルシテ ドゥ モンペリエ 1
UNIVERSITE DE MONTPELLIER 1
フランス エフ - 3 4 0 0 6 モンペリエ セデックス6 ブールバード アンリ クアトリエム
- ベペ 1 0 1 7 5
- (71)出願人 513273362
インスティトゥ レジオナル ドゥ コンサ デ モンペリエ - ヴァル ドレル
フランス国 エフ - 3 4 2 9 8 モンペリエ セデックス5 パルク ユーロメディシーヌ リュ
デ アポティカイレ サントレ レジオナル ドゥ ルテ コントレ ル カンセ 2 0 8
- (74)代理人 100121728
弁理士 井関 勝守
- (72)発明者 ロベール ブルーノ
フランス エフ - 3 4 2 9 8 モンペリエ セデックス5 リュ・デ・アポティケール 2 0 8
ヴァルドレル - ポール ラマルク アイアールシーエム - インスティトゥ デ レシェルシェ
アン カンセロロジ デ モンペリエ インサーム - ユー896 / ユニベルシテ モンペリエ1 シ
ーアールエルシー
- (72)発明者 ファーブル ベネディクト
フランス エフ - 3 4 1 8 9 モンペリエ セデックス4 リュ・デ・ラ・ヴァルシエール 1 6
8 2 - シーエス17383 キャップ ガンマ パーク ユーロメディシネ オリバース ファル
マ
- (72)発明者 シューブ グエナエル
フランス エフ - 3 4 1 8 9 モンペリエ セデックス4 リュ・デ・ラ・ヴァルシエール 1 6
8 2 - シーエス17383 キャップ ガンマ パーク ユーロメディシネ オリバース ファル

マ

- (72)発明者 ヤスリ アズイズ
フランス エフ - 3 4 1 8 9 モンペリエ セデックス4 リュ・デ・ラ・ヴァルシエール 1 6
8 2 - シーエス17383 キャップ ガンマ パーク ユーロメディシネ オリバーズ ファル
マ
- (72)発明者 ラルボレット クリステル
フランス エフ - 3 4 2 9 8 モンペリエ セデックス5 リュ・デ・アポティケール 2 0 8
ヴァルドレル - ポール ラマルク アイアールシーエム - インスティトゥ デ レシェルシェ ア
ン カンセロロジ デ モンペリエ インサーム - ユー 8 9 6 / ウニベルシテ モンペリエ1 シ
ーアールエルシー
- (72)発明者 ルクワン ウィレム
フランス エフ - 3 4 2 9 8 モンペリエ セデックス5 リュ・デ・アポティケール 2 0 8
ヴァルドレル - ポール ラマルク アイアールシーエム - インスティトゥ デ レシェルシェ ア
ン カンセロロジ デ モンペリエ インサーム - ユー 8 9 6 / ウニベルシテ モンペリエ1 シ
ーアールエルシー
- (72)発明者 シャルデス ティエリ
フランス エフ - 3 4 2 9 8 モンペリエ セデックス5 リュ・デ・アポティケール 2 0 8
ヴァルドレル - ポール ラマルク アイアールシーエム - インスティトゥ デ レシェルシェ ア
ン カンセロロジ デ モンペリエ インサーム - ユー 8 9 6 / ウニベルシテ モンペリエ1 シ
ーアールエルシー
- (72)発明者 ラホック クリスチャン
フランス エフ - 3 4 2 9 8 モンペリエ セデックス5 リュ・デ・アポティケール 2 0 8
ヴァルドレル - ポール ラマルク アイアールシーエム - インスティトゥ デ レシェルシェ ア
ン カンセロロジ デ モンペリエ インサーム - ユー 8 9 6 / ウニベルシテ モンペリエ1 シ
ーアールエルシー
- (72)発明者 プレグラン アンドレ
フランス エフ - 3 4 2 9 8 モンペリエ セデックス5 リュ・デ・アポティケール 2 0 8
ヴァルドレル - ポール ラマルク アイアールシーエム - インスティトゥ デ レシェルシェ ア
ン カンセロロジ デ モンペリエ インサーム - ユー 8 9 6 / ウニベルシテ モンペリエ1 シ
ーアールエルシー

F ターム(参考) 4B024 BA53 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA02 EA03 EA04
FA02 FA06 FA07 GA11 HA03
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13 DA14
4C085 AA14 AA16 BB41 BB43 BB50 CC23
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	抗Axl抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2014522638A	公开(公告)日	2014-09-08
申请号	JP2014516371	申请日	2012-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	酒店千卡Insutiteyu国立Rasante埃杜拉尔壳壳医疗 INSERMINST NAT DELA SANTE & DE LA RECH MEDICALE ORIBASE PHARMA UNI-贝尔引用和蒙彼利埃1 UNIV DE蒙彼利埃 Instinet公司到寄存器织德保蒙彼利埃瓦尔多雷尔		
申请(专利权)人(译)	Insamu (Insutiteyu全国德拉桑特等德拉Rusherushe医疗) 奥利弗制药 Yuniberushite蒙彼利埃1 Instinet公司对商业中心莱斯去保护蒙彼利埃 - 瓦尔多雷尔		
[标]发明人	ロペールブルーノ ファールベネディクト シューブグエナエル ヤスリアズイズ ラルボレットクリステル ルクワンウイレム シャルデステイエリ ラホッククリスチャン プレグランアンドレ		
发明人	ロペール ブルーノ ファール ベネディクト シューブ グエナエル ヤスリ アズイズ ラルボレット クリステル ルクワン ウイレム シャルデス テイエリ ラホック クリスチャン プレグラン アンドレ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/06 A61P9/10 A61P9/00 A61P31/12 A61P31/04 A61P33/00 A61P37/04 G01N33/577 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/2863 C07K16/40 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/73 C07K2317/92 C07K16/28 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K16/30 G01N33/57492		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395.N A61P35/00 A61P37/06 A61P9/10 A61P9/00 A61P31/12 A61P31/04 A61P33/00 A61P37/04 G01N33/577.B G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA06 4B024/FA07 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA14 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2011305793 2011-06-22 EP 61/504258 2011-07-04 US		
其他公开文献	JP6033293B2		

摘要(译)

本发明涉及抗Axl抗体和该抗体在诊断和治疗方法中的用途。特别地，本发明包括H-CDR1区中的SEQ ID NO：2的序列，H-CDR2区中的SEQ ID NO：3的序列和H-CDR3区中的SEQ ID NO：4的序列。重链可变区，L-CDR1区中的SEQ ID NO：6的序列，L-CDR2区中的SEQ ID NO：7的序列，以及L-CDR3区中的SEQ ID NO：8的序列。和轻链可变区，其中单克隆抗体对Axl具有特异性。单克隆抗体通过序列SEQ ID NO：9，SEQ ID NO：10和SEQ ID NO：11与Axl的细胞外结构域结合。【选择图】无

图 8 D】

