

(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2014-534806

(P2014-534806A)

(43) 公表日 平成26年12月25日(2014.12.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2G045
C07K 16/30 (2006.01)	C07K 16/30	4B024
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B064
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B065
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-526468 (P2014-526468)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月21日 (2012. 8. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年4月21日 (2014. 4. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/066214
 (87) 国際公開番号 WO2013/026832
 (87) 国際公開日 平成25年2月28日 (2013. 2. 28)
 (31) 優先権主張番号 11178393.2
 (32) 優先日 平成23年8月23日 (2011. 8. 23)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 512036384
 ロシュ グリクアート アーゲー
 スイス国 ツェーハー 8952 シュリ
 ーレン, ヴァーギシュトラッセ 18
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 フライターク, オリビエ
 スイス国 ツェーハー 5028 ウエケ
 ン, オーバードルフシュトラッセ 9
 (72) 発明者 ジョルジュ, ギー
 ドイツ国 82392 ハーバッハ, ア
 ム ベルクグラーベン 11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗MCS P抗体

(57) 【要約】

本発明は、抗MCS P抗体及びそれを使用する方法を提供する。

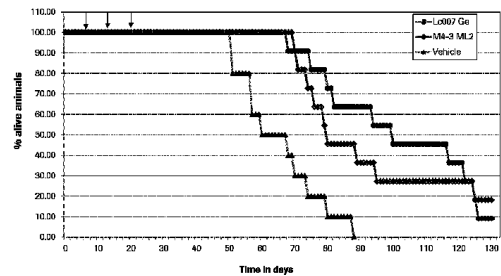


Figure 13

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体は、Fc領域中のオリゴ糖を改変するために糖鎖が操作され、非糖鎖操作抗体と比較して、抗体はADCCエフェクター機能が增加している、CSPGリピート含有ドメインを含むヒトMCS Pの膜基部エピトープに結合する単離された抗体。

【請求項 2】

CSPGリピート含有ドメインがCSPGリピート14（配列番号3）を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

Fc領域は、非糖鎖操作抗体と比較してフコース残基の数が減少している、請求項1又は2に記載の抗体。

10

【請求項 4】

抗体は、非糖鎖操作抗体と比較して、Fc領域においてGlcNAc残基のフコース残基に対する割合が増加している、請求項1から3の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

Fc領域は、非糖鎖操作抗体と比較して、二分されたオリゴ糖の割合が増加している、請求項1から4の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項1から5の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

抗体がヒト、ヒト化又はキメラ抗体である、請求項1から6の何れか一項に記載の抗体

20

【請求項 8】

抗体が完全長IgGクラスの抗体である、請求項7に記載の抗体。

【請求項 9】

抗体が、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、請求項1から8の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 10】

(a)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3を更に含む、請求項9に記載の抗体。

30

【請求項 11】

抗体が、(a)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、請求項1から8の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 12】

抗体が、(a)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、請求項1から8の何れか一項に記載の抗体。

40

【請求項 13】

(a)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3を更に含む、請求項12に記載の抗体。

【請求項 14】

抗体が、(a)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、請求項1から8の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 15】

(a)配列番号27のアミノ酸配列に少なくとも95%の配列同一性を有するVH配列

50

; (b) 配列番号 26 のアミノ酸配列に少なくとも 95% の配列同一性を有する V L 配列;
 ; 又は (c) (a) の V H 配列及び (b) の V L 配列を含む、請求項 1 から 8 の何れか一
 項に記載の抗体。

【請求項 16】

配列番号 27 の V H 配列を含む、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 17】

配列番号 26 の V L 配列を含む、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 18】

配列番号 27 の V H 配列及び配列番号 26 の V L 配列を含む、請求項 15 に記載の抗体
 。

10

【請求項 19】

(a) 配列番号 32 のアミノ酸配列に少なくとも 95% の配列同一性を有する V H 配列;
 ; (b) 配列番号 31 のアミノ酸配列に少なくとも 95% の配列同一性を有する V L 配列;
 ; 又は (c) (a) の V H 配列及び (b) の V L 配列を含む、請求項 1 から 8 の何れか一
 項に記載の抗体。

【請求項 20】

配列番号 32 の V H 配列を含む、請求項 19 に記載の抗体。

【請求項 21】

配列番号 31 の V L 配列を含む、請求項 19 に記載の抗体。

【請求項 22】

配列番号 32 の V H 配列及び配列番号 31 の V L 配列を含む、請求項 19 に記載の抗体
 。

20

【請求項 23】

請求項 1 から 22 の何れか一項に記載の抗体をコードする単離された核酸。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項 25】

抗体が産生されるように請求項 24 に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体を産
 生する方法。

【請求項 26】

請求項 1 から 22 の何れか一項に記載の抗体及び細胞傷害性薬物を含むイムノコンジュ
 ゲート。

30

【請求項 27】

請求項 1 から 22 の何れか一項に記載の抗体及び薬学的に許容される担体を含む薬学的
 製剤。

【請求項 28】

医薬として使用のための請求項 1 から 22 の何れか一項に記載の抗体又は請求項 26 に
 記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 29】

癌を治療するための請求項 1 から 22 の何れか一項に記載の抗体又は請求項 26 に記載
 のイムノコンジュゲートの使用。

40

【請求項 30】

癌が M C S P を発現する癌である、請求項 29 の使用。

【請求項 31】

癌が、皮膚癌 (メラノーマ及び基底細胞癌を含む)、神経膠腫 (神経膠芽腫を含む)、
 骨癌 (骨肉腫など)、及び白血病 (ALL 及び AML を含む) からなる群から選択される
 、請求項 30 の使用。

【請求項 32】

細胞溶解を誘導するための、請求項 1 から 22 の何れか一項に記載の抗体の使用。

【請求項 33】

50

医薬の製造のための請求項 1 から 2 2 の何れか一項に記載の抗体又は請求項 2 6 に記載のイムノコンジュゲートの使用。

【請求項 3 4】

医薬が癌の治療用である、請求項 3 3 の使用。

【請求項 3 5】

医薬が細胞溶解の誘導用である、請求項 3 3 の使用。

【請求項 3 6】

請求項 1 から 2 2 の何れか一項に記載の抗体又は請求項 2 6 に記載のイムノコンジュゲートの治療的有効量を個体に投与することを含む、癌を有する個体を治療する方法。

【請求項 3 7】

癌が M C S P を発現する癌である、請求項 3 6 の方法。

【請求項 3 8】

癌が、皮膚癌（メラノーマ及び基底細胞癌を含む）、神経膠腫（神経膠芽腫を含む）、骨癌（骨肉腫など）、及び白血病（A L L 及び A M L を含む）からなる群から選択される、請求項 3 7 の方法。

【請求項 3 9】

細胞溶解を誘導するために、請求項 1 から 2 2 の何れか一項に記載の抗体又は請求項 2 6 に記載のイムノコンジュゲートの治療的有効量を個体に投与することを含む、個体において細胞溶解を誘導する方法。

【請求項 4 0】

サンプル中に存在する抗体と M C S P との間の抗体 - M C S P 複合体の形成を許容する条件下で、請求項 1 から 2 2 の何れか一項に記載される抗体とサンプルを接触させ、そして免疫検出法により複合体の有無を検出することを含む、M C S P の免疫組織化学的アッセイ。

【請求項 4 1】

サンプルが、新鮮な組織サンプル、凍結組織サンプル、又はホルマリン固定、パラフィン包埋組織サンプルである、請求項 4 0 に記載のアッセイ。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年8月23日に提出された欧州特許出願番号 E P 1 1 1 7 8 3 9 3 . 2 号の優先権を主張し、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【技術分野】

【0 0 0 2】

発明の分野

本発明は、抗 M C S P 抗体、及び疾患の治療のために同じものを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

M C S P

メラノーマコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（M C S P）は、メラノーマ癌の大部分において発現される大きな膜貫通型プロテオグリカンである。M C S P はまた、神経膠芽細胞腫、骨肉腫、軟骨肉腫、A L L 及び A M L の幾つかの型を含む他の癌で、及び基底細胞癌で発現される。これは、初期の細胞表面メラノーマの進行のマーカーとして役立つ、そして腫瘍細胞の増殖、転移、遊走、浸潤、及び血管新生の刺激に参与している。Staub, E. et al., FEBS Letters, 527:114-118 (2002); Campoli, M. et al., Crit.Rev. Immunol. 24:267-296 (2004); Vergilis, I. J., J Invest Dermatol, 125:526-531 (2005); Yang, J., JCB, 165:881-891 (2004); Luo, W., J. Immuno., 176:6046-6054 (2006)。

10

20

30

40

50

【0004】

抗体のグリコシル化

オリゴ糖成分が、物理的安定性、プロテアーゼの攻撃に対する耐性、免疫系との相互作用、薬物動態、及び特定の生物学的活性を含む、治療的糖タンパク質の有効性に関連する特性に有意に影響を与えることができる。そうした特性は、オリゴ糖の有無だけでなく、その特定の構造に依存し得る。オリゴ糖構造と糖タンパク質の機能との間において幾つかの一般化を行うことができる。例えば、特定のオリゴ糖構造は、特定の糖鎖結合タンパク質との相互作用を介して血流からの糖タンパク質の迅速なクリアランスを媒介し、一方他は、抗体に結合されて、望ましくない免疫反応を引き起こす(Jenkins et al., Nat Biotechnol 14, 975-81 (1996))。

10

【0005】

IgG1型抗体は、癌の免疫療法の中で最も一般的に使用される抗体であり、各CH2ドメインのAsn297で保存されたN-結合型糖鎖付加部位を持つ糖タンパク質である。Asn297に付着した2つの複雑な二分岐オリゴ糖は、CH2ドメインの間に埋葬され、ポリペプチド骨格との広範な接触を形成し、そしてそれらの存在は、例えば抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)などのエフェクター機能を媒介するために抗体にとって必須である(Lifely et al., Glycobiology 5, 813-822 (1995); Jefferis et al., Immunol Rev 163, 59-76 (1998); Wright and Morrison, Trends Biotechnol 15, 26-32 (1997))。

20

【0006】

モノクローナル抗体の細胞媒介性エフェクター機能は、Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999) 及び米国特許第6,602,684号(国際公開第99/54342号)において説明したように、それらのオリゴ糖成分を操作することによって高めることができる。Umanaらは、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)において、二分されたオリゴ糖の形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII(GnTII)の過剰発現は、それらの細胞中に産生される抗体のインビトロでのADCC活性を有意に増大させることを示した。Asn297の糖の組成における変化又はその消失はまた、抗体のFcドメインのFcR及び補体C1qタンパク質への結合にも影響を及ぼす(Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999); Davies et al., Biotechnol Bioeng 74, 288-294 (2001); Mimura et al., J Biol Chem 276, 45539-45547 (2001); Radaev et al., J Biol Chem 276, 16478-16483 (2001); Shields et al., J Biol Chem 276, 6591-6604 (2001); Shields et al., J Biol Chem 277, 26733-26740 (2002); Simmons et al., J Immunol Methods 263, 133-147 (2002))。

30

【発明の概要】

【0007】

概要

本発明は、抗MCS P抗体及びそれを使用する方法を提供する。本発明の一態様は、ヒトMCS Pの膜基部のエピトープに結合する単離された抗体を提供し、ここで抗体は、Fc領域中のオリゴ糖を改変するために糖鎖が操作され、非糖鎖操作抗体と比較して、抗体はADCCエフェクター機能が増加していることを特徴とする。一実施態様において、ヒトMCS Pの膜基部エピトープは、CS PGリピート含有ドメインを含むことを含む。一実施態様において、CS PGのリピート含有ドメインはCS PGリピート14(配列番号3)を含む。一実施態様において、抗体のFc領域は、非糖鎖操作抗体と比較してフコース残基の数が減少している。一実施態様において、抗体は、非糖鎖操作抗体と比較して、Fc領域においてGlcNAc残基のフコース残基に対する割合が増加している。一実施態様において、抗体のFc領域は、非糖鎖操作抗体と比較して、二分されたオリゴ糖の割合が増加している。ある実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体である。ある実施態様では、抗体はヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である。ある実施態様では、抗体は、完全長IgGクラスの抗体である。

40

50

【0008】

一実施態様において、抗体は、配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。一実施態様において、抗MCS P抗体は、配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。一実施態様において、抗MCS P抗体は、配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2；配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3；配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

10

【0009】

一実施態様において、抗MCS P抗体は、配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。一実施態様において、抗MCS P抗体は、配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。一実施態様において、抗MCS P抗体は、配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H2；配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3；配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

20

【0010】

一実施態様において、抗MCS P抗体は、配列番号29のアミノ酸配列に対して少なくとも95%配列同一性を有するVH配列；配列番号28のアミノ酸配列に対して少なくとも95%配列同一性を有するVL配列；又は配列番号29のアミノ酸配列に対して少なくとも95%配列同一性を有するVH配列及び配列番号28のアミノ酸配列に対して少なくとも95%配列同一性を有するVL配列を含む。

【0011】

一実施態様において、抗MCS P抗体は、配列番号29のVH配列；配列番号28のVL配列を含む。一実施態様において、抗MCS P抗体は、配列番号29のVH配列及び配列番号28のVL配列を含む。

30

【0012】

一実施態様において、抗MCS P抗体は、配列番号32のアミノ酸配列に対して少なくとも95%配列同一性を有するVH配列；配列番号31のアミノ酸配列に対して少なくとも95%配列同一性を有するVL配列；又は配列番号32のアミノ酸配列に対して少なくとも95%配列同一性を有するVH配列及び配列番号32のアミノ酸配列に対して少なくとも95%配列同一性を有するVL配列を含む。

【0013】

一実施態様において、抗MCS P抗体は、配列番号29のVH配列；配列番号28のVL配列を含む。一実施態様において、抗MCS P抗体は、配列番号29のVH配列及び配列番号28のVL配列を含む。

40

【0014】

本発明の別の態様は、本明細書に記載される抗MCS P抗体をコードする単離された核酸を提供する。本発明の別の態様は、そのような核酸を含む宿主細胞を提供する。本発明の別の態様は、抗体が産生されるように宿主細胞を培養することを含む抗体の製造方法を提供する。

【0015】

本発明の別の態様は、上に記載される抗MCS P抗体を含むイムノコンジュゲート、及び細胞傷害性薬物を提供する。本発明の別の態様は、上に記載される抗MCS P抗体を含むイムノコンジュゲート、及び薬学的に許容される担体を提供する。

【0016】

50

本発明の別の態様は、医薬として使用のための、上に記載される抗MCS P抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。本発明の別の態様は、皮膚癌（メラノーマ及び基底細胞癌を含む）、神経膠腫（神経膠芽腫を含む）、骨癌（例えば骨肉腫など）、及び白血病（ALL及びAMLを含む）を含む癌、特にMCS Pを発現する癌を治療するための、上に記載される抗MCS P抗体又はそのイムノコンジュゲートを提供する。

【0017】

本発明の別の態様は、細胞溶解を誘導するための、上に記載される抗MCS P抗体の使用を提供する。本発明の別の態様は、癌の治療のための又は細胞溶解を誘導するための医薬などの医薬の製造における、上に記載される抗MCS P抗体又はそのイムノコンジュゲートの使用を提供する。

10

【0018】

本発明の別の態様は、上に記載される抗MCS P抗体又はそのイムノコンジュゲートの有効量を投与することを含む、癌を有する個体を治療する方法を提供する。癌は、例えば、MCS Pを発現する癌、例えば皮膚癌（メラノーマ及び基底細胞癌を含む）、神経膠腫（神経膠芽腫を含む）、骨癌（例えば骨肉腫など）、及び白血病（ALL及びAMLを含む）である。

【0019】

本発明の別の態様は、上に記載される抗MCS P抗体又はそのイムノコンジュゲートの有効量を個体に投与することを含む、個体における細胞溶解を誘導する方法を提供する。

20

【0020】

本発明の別の態様は、サンプル中に存在する抗体とMCS Pとの間の抗体 - MCS P複合体の形成を許容する条件下で、上に記載される抗MCS P抗体とサンプルを接触させ、そして免疫検出法により複合体の有無を検出することを含む、MCS Pの免疫組織化学的アッセイを提供する。一実施態様では、サンプルは、新鮮な組織サンプルである。一実施態様において、サンプルは凍結又はホルマリン固定、パラフィン包埋組織（FFPET）である。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1は、Colo38細胞において表面MCS Pに対するキメラ抗体のLC007の結合親和性を示すFACSアッセイの結果を示すグラフである。

30

【図2】図2は、A2058及びA375癌細胞において、表面MCS Pに対するキメラ抗体のLC007の結合親和性を示すFACSアッセイの結果を示すグラフである。

【図3】図3は、MCS PのCS PGリピートを含有する構造の概略図である。

【図4】図4は、MCS PのCS PGリピート構築物についてLC007の結合特異性を示すグラフである。

【図5】図5は、抗体LC007は、カニクイザル構築物に対して対応するヒト発現構築物に対するのと類似の親和性で結合することを示すFACSアッセイの結果を示すグラフである。

【図6】図6は、非糖鎖操作及び糖鎖操作LC007抗体の両方のADCCの効果を示すグラフである。

40

【図7】図7は、糖鎖操作LC007抗体のADCC効果が、ヒトU86MG神経膠芽腫細胞株において観察されることを示すグラフである。

【図8】図8は、LC007抗体の複数のヒト化変異体の結合特性を示すグラフである。

【図9】図9は、LC007のヒト化変異体は、親LC007糖鎖操作抗体のADCC活性を保持することを示すグラフである。

【図10】図10は、LC007のヒト化変異体は、親LC007糖鎖操作抗体のADCC活性を保持することを示すグラフである。

【図11】図11は、ヒト化糖鎖操作抗MCS P抗体は、ビヒクル対照と比較してMV3腫瘍細胞株を保有するトランスジェニックFCGR3A SCIDマウスにおいて有意に

50

生存期間を増加させることを示す生存曲線を示す。

【図12】図12は、キメラ糖鎖操作抗MCS P抗体は、ビヒクル対照と比較してMDA - MB - 435腫瘍細胞株を保有するトランスジェニックFCGR3A SCIDマウスにおいて有意に生存期間を増加させることを示す生存曲線を示す。

【図13】図13は、キメラ糖鎖操作抗MCS P抗体及びそのヒト化変異体であるM4 - 3 ML2、の両方が、ビヒクル対照と比較してMDA - MB - 435腫瘍細胞株を保有するトランスジェニックFCGR3A SCIDマウスにおいて有意に生存期間を増加させることを示す生存曲線を示す。

【0022】

本発明の実施態様の詳細な記述

10

1. 定義

本明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」とは、下記に定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られる軽鎖可変ドメイン(VL)フレームワーク又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有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同一のアミノ酸配列を含んでもよく、又はそれはアミノ酸配列の変化を含み得る。幾つかの実施態様において、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、又は2以下である。幾つかの実施態様において、VLアクセプターヒトフレームワークは、Vはヒト免疫グロブリンのフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に、配列が同一である。

20

【0023】

「親和性」とは、分子(例えば、抗体)の単一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相互作用の総和の強度を指す。本明細書で使用する場合、特に断らない限り、「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の相互作用を反映している本質的な結合親和性を指す。そのパートナーYに対する分子Xの親和性は、一般的に解離定数(Kd)で表すことができる。親和性は、本明細書に記載したものを含む、当技術分野で知られている一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例示であって典型的な実施態様は、以下で説明される。

30

【0024】

「親和性成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数の超可変領域(HVR)において一又は複数の改変を持つものである。

【0025】

「血管新生障害」は、非腫瘍性状態及び腫瘍性状態の両方を含む、血管新生の任意の調節不全を指す。腫瘍性状態としては、限定されないが、以下に記載のものを含む。非腫瘍性疾患には、限定するものではないが、望ましくない又は異常な肥大、関節炎、慢性関節リウマチ(RA)、乾癬、乾癬の斑、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化、アテローム動脈硬化性斑、未熟児の網膜症を含む糖尿病性及び他の増殖性の網膜症、水晶体後繊維増殖、血管新生緑内障、年齢関連性黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、角膜移植片拒絶、網膜/脈絡叢血管新生、虹彩(angle)(ルベオーシス)の血管新生、眼性新生血管疾患、脈管再狭窄、動静脈奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺の過形成(グレーブズ病を含む)、角膜及び他の組織移植、慢性炎症、肺炎症、急性肺損傷/ARDS、敗血症、原発性肺高血圧症、悪性の肺滲出、大脳浮腫(例えば、急性脳卒中/非開放性頭部損傷/外傷と関連している)、滑液炎症、RAのパンヌス形成、筋炎骨化、高親和性骨形成、骨関節炎(OA)、抵抗性腹水、多嚢胞性卵巣の疾患、子宮内膜症、液体性疾患の第3の間隔(3rd spacing)(腓炎、コンパートメント症候群、熱傷、腸疾患)、子宮頸線維腫、早産、慢性炎症、例えばIBD(クローン病および潰瘍性大腸炎)、腎臓同種異系移植片拒絶反応、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群

40

50

、望ましくない又は異常な組織塊成長（癌以外）、血友病関節、肥大した瘢痕、体毛成長の抑制、Osler-Weber症候群、化膿性肉芽腫水晶体後繊維増殖、強皮症、トラコーマ、脈管粘着力、関節滑膜炎、皮膚炎、子癩前症、腹水、心嚢貯留液（例えば心外膜炎と関連しているもの）および胸水が含まれる。

【0026】

用語「抗MCS P抗体」及び「MCS Pに結合する抗体」は、抗体が、MCS Pを標的とし、診断薬剤及び/又は治療的薬剤として有用であるように、十分な親和性でMCS Pに結合することができる抗体を指す。一実施態様において、抗MCS P抗体の、無関係な、非MCS Pタンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）によって測定される場合、抗体のMCS Pへの結合の約10%未満である。ある実施態様において、MCS Pへ結合する抗体は、解離定数（Kd）が、 $1\mu\text{M}$ 、 100nM 、 10nM 、 1nM 、 0.1nM 、 0.01nM 、又は 0.001nM （例えば、 10^{-8}M 未満、例えば、 10^{-8}M から 10^{-13}M 、例えば、 10^{-9}M から 10^{-13}M ）を有する。ある実施態様において、抗MCS P抗体は、異なる種由来のMCS P間で保存されているMCS Pのエピトープに結合する。

10

【0027】

用語「抗体」は最も広い意味で用いられ、様々な抗体構造を包含し、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、及び、所望の抗原結合活性を示す限り、抗体断片を含む。

【0028】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原を結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアボディ、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を含む。

20

【0029】

参照抗体として「同一のエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいて50%以上、参照抗体のその抗原への結合をブロックする抗体、逆に競合アッセイにおいて50%以上、その抗体のその抗原への結合をブロックするその参照抗体を指す。典型的な競合アッセイが、本明細書において提供される。

【0030】

用語「癌」及び「癌性」は、無秩序な細胞成長/細胞増殖を典型的に特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を記述する。癌の例には、限定されないが、癌腫、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫、及び白血病を含む。そのような癌のより具体的な例は、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、骨癌（例えば骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫）、消化器癌、膵臓癌、神経膠腫を含む、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、皮膚癌（例えば、メラノーマ及び基底細胞癌）、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、白血病、及びその他のリンパ増殖性疾患、及び様々な型の頭頸部癌を包含する。

30

【0031】

用語「細胞増殖性障害」及び「増殖性疾患」は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する障害を言う。一実施態様において、細胞増殖性疾患は癌である。

40

【0032】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の起源又は種から由来し、一方重鎖及び/又は軽鎖の残りが異なる起源又は種から由来する抗体を指す。

【0033】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の5つの主要なクラスがあり：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、及びこれらのいくつかは、さらにサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂に、IgG₃、IgG₄、IGA₁、及びIgA₂に分けることができる。免疫グロブリン

50

の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 δ 、 ϵ 、 μ 、及び μ と呼ばれる。

【0034】

本明細書で用いられる「細胞傷害性薬物」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞死又は破壊を生ずる物質を指す。細胞傷害性薬物は、限定されないが、放射性同位体（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及びLuの放射性同位体）；化学療法剤又は薬物（例えば、メトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド）、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシンまたは他の挿入剤）、成長阻害剤、酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素など、抗生物質、小分子毒素などの毒素、又は細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素（それらの断片及び/又はその変異体を含む）、及び以下に開示される様々な抗腫瘍剤又は抗癌剤を包含する。

10

【0035】

「エフェクター機能」とは、抗体のアイソタイプにより変わる、抗体のFc領域に起因する生物学的活性を指す。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞障害(CDC)；Fcレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)；貪食作用；細胞表面レセプター（例えば、B細胞レセプター）のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化が含まれる。

20

【0036】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的又予防的結果を達成するために必要な用量及び期間での、有効な量を指す。

【0037】

用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む、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。その用語は、天然配列Fc領域と変異体Fc領域を含む。一実施態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226又はPro230から重鎖のカルボキシル末端まで伸長する。しかし、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は存在しているか、又は存在していない場合がある。本明細書に明記されていない限り、Fc領域又は定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるように、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

30

【0038】

「フレームワーク」又は「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のドメインで構成される：FR1、FR2、FR3、及びFR4。従って、HVR及びFR配列は一般にVH(又はVL)の以下の配列に現れる：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0039】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」は、本明細書中で互換的に使用され、天然型抗体構造と実質的に類似の構造を有するか、又は本明細書で定義されるFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

40

【0040】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養」は互換的に使用され、外因性の核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含める。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」を含み、継代の数に関係なく、それに由来する一次形質転換細胞及び子孫が含まれる。子孫は親細胞と核酸含量が完全に同一ではないかもしれないが、突然変異が含まれる場合がある。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能又は生物活性を有する変異型子孫が本明細書におい

50

て含まれる。

【0041】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により産生されるか、又はヒト抗体のレパートリー又は他のヒト抗体をコードする配列を利用した非ヒト起源に由来する抗体のそれ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する。

【0042】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」とは、ヒト免疫グロブリンV_L又はV_Hフレームワーク配列の選択において最も一般的に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的には、ヒト免疫グロブリンV_L又はV_H配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからのものである。一般的には、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3にあるサブグループである。一実施態様において、V_Lについて、サブグループは上掲のKabatらにあるサブグループC₁である。一実施態様において、V_Hについて、サブグループは上掲のKabatらにあるサブグループI₁である。

10

【0043】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基、及びヒトFR由来アミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。所定の実施態様において、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には2つの可変ドメインの全てを実質的に含み、HVR(例えば、CDR)の全て又は実質的に全てが、非ヒト抗体のものに対応し、全てまたは実質的にFRの全てが、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体の「ヒト化型」、例えば、非ヒト抗体は、ヒト化を遂げた抗体を指す。

20

【0044】

本明細書で使用される用語「超可変領域」又は「HVR」は、配列が超可変であるか、及び/又は構造的に定義されたループ(「超可変ループ」)を形成する抗体可変ドメインの各領域を指す。一般的に、天然型4鎖抗体は、V_H(H₁、H₂、H₃)に3つ、及びV_L(L₁、L₂、L₃)に3つの6つのHVRを含む。HVRは、一般的に超可変ループ由来及び/又は「相補性決定領域」(CDR)由来のアミノ酸残基を含み、後者は、最高の配列可変性であり、及び/又は抗原認識に参与している。典型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)で生じる。(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。典型的なCDR(CDR-L₁、CDR-L₂、CDR-L₃、CDR-H₁、CDR-H₂、及びCDR-H₃)は、アミノ酸残基L₁の24-34、L₂の50-56、L₃の89-97、H₁の31-35B、H₂の50-65、及びH₃の95-102で生じる。(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。V_HのCDR₁の例外を除いて、CDRは一般的に超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRは、抗原に接触する残基である「特異性決定残基」又は「SDR」をも含む。SDRは、略称(abbreviated-)CDR、又はa-CDRと呼ばれる、CDRの領域内に含まれている。典型的なa-CDR(a-CDR-L₁、a-CDR-L₂、a-CDR-L₃、a-CDR-H₁、a-CDR-H₂、及びa-CDR-H₃)は、アミノ酸残基L₁の31-34、L₂の50-55、L₃の89-96、H₁の31-35B、H₂の50-58、及びH₃の95-102で生じる。(Amaguro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)を参照のこと)。特に断らない限り、可変ドメイン内のHVR残基及び他の残基(例えば、FR残基)は、上掲のKabatらに従い、本明細書において番号が付けられる。

30

40

【0045】

「イムノコンジュゲート」は、一以上の異種分子にコンジュゲートした抗体であり、限

50

定されないが、細胞傷害性薬物を含む。

【0046】

「個体」又は「被検体」は、哺乳動物である。哺乳動物は、限定されないが、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、霊長類（例えば、ヒト、サルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含む。所定の実施態様において、個体又は被検体はヒトである。

【0047】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から分離されたものである。幾つかの実施態様において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換又は逆相HPLC）により決定されるように、95%以上または99%の純度に精製される。抗体純度の評価法の総説としては、例えばFlatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照のこと。

10

【0048】

「単離された」核酸は、その自然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子を含むが、しかし、その核酸分子は、染色体外又はその自然の染色体上の位置とは異なる染色体位置に存在している。

【0049】

「抗MCS P抗体をコードする単離された核酸」は、抗体の重鎖及び軽鎖（又はその断片）をコードする一以上の核酸分子を指し、単一のベクター又は別個のベクター内のそのような核酸分子、及び宿主細胞の一以上の位置に存在するそのような核酸分子を含む。

20

【0050】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、例えば、天然に生じる変異を含み、又はモノクローナル抗体製剤の製造時に発生し、一般的に少量で存在している変異体などの、可能性のある変異体抗体を除き、集団を構成する個々の抗体は同一であり、及び/又は同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を一般的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、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。従って、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、限定されないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含む様々な技術によって作成され、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、本明細書に記載されている。

30

【0051】

「ネイキッド抗体」とは、異種の部分（例えば、細胞傷害性部分）又は放射性標識にコンジュゲートしていない抗体を指す。ネイキッド抗体は薬学的製剤中に存在してもよい。

【0052】

「天然型抗体」は、天然に生じる様々な構造をとる免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然型IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から成る約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、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）を有し、3つの定常ドメイン（CH1、CH2およびCH3）が続く。同様に、N末端からC末端に、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）を有し、定常軽鎖（CL）ドメインが続く。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 ）とラムダ（ λ ）と呼ばれる、2つのタイプのいずれかに割り当てることができる。

40

【0053】

用語「パッケージ挿入物」は、効能、用法、用量、投与、併用療法、禁忌についての情

50

報、及び/又はそのような治療用製品の使用に関する警告を含む、治療用製品の商用パッケージに慣習的に含まれている説明書を指すために使用される。

【0054】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、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ならば間隙を導入した後、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、参照ポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大の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、配列をアラインするための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネテック社によって作製され、ソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2もまた、ジェネテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、又はそのソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIXのV4.0Dを含む、UNIXオペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

10

20

【0055】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(或いは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して所定の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される:

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2により、AとBのそのプログラムのアラインメントにおいて同一と一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に断らない限り、本明細書で使用されるすべての%アミノ酸配列同一性値が、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用し、直前の段落で説明したように得られる。

30

【0056】

用語「薬学的製剤」は、その中に有効で含有される活性成分の生物学的活性を許容するような形態であって、製剤を投与する被検体にとって許容できない毒性である他の成分を含まない調製物を指す。

【0057】

「薬学的に許容される担体」は、被検体に非毒性であり、有効成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体は、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含む。

40

【0058】

特に断らない限り、本明細書で使用される用語「MCS P」は、霊長類(例えばヒト)及びげっ歯類(例えば、マウス、ラット)などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物由来の任意のMCS P(メラノーマコンドロイチン硫酸プロテオグリカン)を指す。その用語は、「完全長」、未処理のMCS P並びに細胞内でのプロセッシングから生じた任意の形態のMCS Pを含む。その用語はまた、天然に存在するMCS Pの変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を包含する。MCS Pはまた、コンドロイチン硫酸プロテオグ

50

リカン4 (CSPG4)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンNG2、高分子量メラノーマ関連抗原(HMW-MAA)、及びメラノーマコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとしても知られる。典型的なヒトMCS Pのアミノ酸配列は、配列番号1に示される。Puschke G., et al., Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:9710-9715(1996), Staub E., et al., A novel repeat in the melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan defines a new protein family, FEBS Lett. 527:114-118(2002); Genbank 受託番号: NP_001888も参照。

【0059】

本明細書で用いられるように、「治療」(及び「治療する(treat)」または「治療している(treating)」など文法上の変形)は、治療されている個体の自然経過を変えようとする臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の過程においてのいずれかで実行できる。治療の望ましい効果は、限定されないが、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善を含む。幾つかの実施態様において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるか又は疾患の進行を遅くするために使用される。

【0060】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に関与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然型抗体の可変重鎖ドメイン及び軽鎖(それぞれVHおよびVL)は、4つの保存されたフレームワーク領域(FR)と3つの超可変領域(HVR)を含む各ドメインを持ち、一般的に似たような構造を有する。(例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., 91頁(2007)を参照)。単一のVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。更に、特定の抗原に結合する抗体は、相補的なVL又はVHドメインのそれぞれのライブラリーをスクリーニングするために、抗原に特異的に結合する抗体由来のVH又はVLドメインを用いて単離することができる。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887(1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628(1991)を参照。

【0061】

本明細書で使用される、用語「ベクター」は、それがリンクされている別の核酸を伝播することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、並びにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある種のベクターは、それらが動作可能なようにリンクされている核酸の発現を指示することができる。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と言う。

【0062】

II. 組成物及び方法

本発明は、癌などの細胞増殖性疾患の治療及び/又は診断における使用を見出す抗MCS P抗体を提供する。ある実施態様において、MCS Pの膜基部のエピトープに特異的に結合する抗体が提供される。所定の実施態様において、MCS Pに結合し強化されたエフェクター機能を有する抗体が提供される。

【0063】

A. 典型的な抗MCS P抗体

一態様において、本発明は、MCS Pに結合する単離された抗体を提供する。特に、本発明において提供される抗MCS P抗体は、ヒトMCS Pの膜基部のエピトープに特異的に結合する。Staub E., et al., FEBS Lett. 527:114-118(2002)に議論されるように、MCS Pの膜基部領域は、CSPGリピートドメインとも呼ばれる複数の新規な繰り返しドメインから構成されている。図3本発明の抗MCS P抗体は、CSPGリピート含有ドメインを含むヒトMCS Pの膜基部ドメインに存在するエピトープに結合する。一実施態様において、CSPGリピート含有ドメインは、ヒトMCS Pの1937-2043のアミノ酸に対応しているCSPGリピート14を含む。一実施態様において、CSPGリピー

10

20

30

40

50

ト14ドメインは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する。別の実施態様において、CSPGリピート含有ドメインは、CSPGリピート14を含み、そしてCSPGリピート15の少なくとも一部を含む。CSPGリピート15ドメインはヒトMCSPのアミノ酸2044-2246に対応している。一実施態様において、CSPGリピート15ドメインは、配列番号4に示されるアミノ酸配列を有する。一実施態様において、CSPGリピート含有ドメインは、配列番号5のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、CSPGリピート含有ドメインは、天然の膜貫通ドメインを持たない配列番号5のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、CSPGのリピート含有ドメインはCSPGリピート13-15を含む。一実施態様において、CSPGリピート含有ドメインは、配列番号6のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、CSPGリピート含有ドメインは、天然の膜貫通ドメインを持たない配列番号6のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、CSPGのリピート含有ドメインはCSPGリピート12-15を含む。一実施態様において、CSPGリピート含有ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、CSPGリピート含有ドメインは、天然の膜貫通ドメインを持たない配列番号7のアミノ酸配列を含む。ある実施態様において、天然膜貫通ドメインは、VIIPMLVLLLLALILPLLFY(UniProtエントリ-Q6UVK1)(配列番号44)である。

10

【0064】

一実施態様において、抗MCSP抗体は、MCSPを発現する細胞の溶解を誘導する。溶解は、エフェクター機能、例えば、C1q結合及び補体依存性細胞傷害(CDC);Fc受容体結合;抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC);ファゴサイトーシス;細胞表面受容体(例えば、B細胞レセプター)の下方制御;及びB細胞活性化などを媒介することにより、又は細胞のアポトーシスを直接誘導することによりなど任意のメカニズムによって誘導することができる。

20

【0065】

一実施態様において、抗MCSP抗体は、非糖鎖操作型親抗MCSP抗体と比較してエフェクター機能の少なくとも一つの増加を有するように糖鎖操作されている。エフェクター機能の増加は、Fc受容体への結合親和性の増加、抗体依存性細胞傷害(ADCC)の増加;NK細胞への結合の増加;マクロファージへの結合の増加;多形核細胞への結合の増加;単球への結合の増加;アポトーシスを誘導する直接的なシグナル伝達;樹状細胞成熟の増加;又はT細胞プライミングの増加である。糖鎖操作抗MCSP抗体は、MCSPの同じエピトープに向けられる非糖鎖操作抗体に比べて、MCSPを発現する癌に罹患している被験者における生存利益を提供する。

30

【0066】

一態様において、本発明は、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1;(b)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2;(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3;(d)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L1;(e)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2;及び(f)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一、二、三、四、五、又は六のHVRを含む抗MCSP抗体を提供する。

40

【0067】

一態様において、本発明は、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1;(b)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2;(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗MCSP抗体を提供する。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0068】

一態様において、本発明は、(a)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L1;

50

(b) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 ; (c) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される、少なくとも一つの VL HVR 配列、少なくとも二つの VL HVR 配列、又は三つ全ての VL HVR 配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(b) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (c) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む。

【0069】

その他の態様において、本発明の抗 MCS P 抗体は、(a) (i) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(ii) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (iii) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 から選択される少なくとも一つの VH HVR 配列、少なくとも二つの VH HVR 配列、又は三つ全ての VH HVR 配列を含む VH ドメイン、及び (b) (i) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(ii) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (c) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される少なくとも一つの VL HVR 配列、少なくとも二つの VL HVR 配列、又は三つ全ての VL HVR 配列を含む VL ドメインを含む。

10

【0070】

別の態様において、本発明は、(a) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 ; (b) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 ; (c) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 ; (d) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 ; (e) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 ; 及び (f) 配列番号 12 から選択されるアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む抗 MCS P 抗体を提供する。

20

【0071】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 ; (b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 ; (c) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 ; (d) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 ; (e) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 ; 及び (f) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される、少なくとも一、二、三、四、五、又は六の HVR を含む抗 MCS P 抗体を提供する。

30

【0072】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 ; (b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 ; (c) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 から選択される、少なくとも一つの VH HVR 配列、少なくとも二つの VH HVR 配列、又は三つ全ての VH HVR 配列を含む抗 MCS P 抗体を提供する。更なる実施態様において、抗体は、(a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (c) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含む。

40

【0073】

一態様において、本発明は、(a) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 ; (b) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 ; (c) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 から選択される、少なくとも一つの VL HVR 配列、少なくとも二つの VL HVR 配列、又は三つ全ての VL HVR 配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR - L1、(b) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR - L2、及び (c) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 を含む。

40

【0074】

別の態様において、本発明の抗 MCS P 抗体は、(a) (i) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む HVR - H1、(ii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む HVR - H2、及び (iii) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 から選択される少なくとも一つの VH HVR 配列、少なくとも二つの VH HVR 配列、又は三つ全ての VH HVR

50

R配列を含むVHドメイン、及び(b)(i)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVLHVR配列、少なくとも二つのVLHVR配列、又は三つ全てのVLHVR配列を含むVLドメインを含む。

【0075】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号12から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗MCSP抗体を提供する。

10

【0076】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号12から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗MCSP抗体を提供する。

【0077】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号12から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗MCSP抗体を提供する。

20

【0078】

別の態様において、本発明は、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号12から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗MCSP抗体を提供する。

【0079】

一態様において、抗MCSP抗体は、配列番号27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%、又は100%の配列同一性を有するVH配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVH配列は、参照配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗MCSP抗体は、MCSPへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号2において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の(すなわちFR内の)領域で生じる。任意で、抗MCSP抗体は、配列番号27のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様において、VHは、(a)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される一、二、又は三のHVRを含む。

30

40

【0080】

その他の態様において、配列番号26のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む、抗MCSP抗体が提供される。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVL配列は、参照配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗MCSP抗体は

50

、M C S Pへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号26において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、H V R外の(すなわちF R内の)領域で生じる。任意で、抗M C S P抗体は、配列番号26のV L配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様において、V Lは、(a)配列番号10のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b)配列番号11のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c)配列番号12のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される一、二、又は三のH V Rを含む。

【0081】

その他の態様において、抗M C S P抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかにあるV H、及び上記に与えられた実施態様の何れかにあるV Lを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号27のアミノ酸配列を含むV H、及び配列番号26のV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

10

【0082】

別の態様において、抗M C S P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%、又は100%の配列同一性を有するV H配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するV H配列は、参照配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗M C S P抗体は、M C S Pへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号32において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、H V R外の(すなわちF R内の)領域で生じる。任意で、抗M C S P抗体は、配列番号32のV H配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様において、V Hは、(a)配列番号17のアミノ酸配列を含むH V R - H 1、(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むH V R - H 2、及び(c)配列番号16のアミノ酸配列を含むH V R - H 3から選択される一、二、又は三のH V Rを含む。

20

【0083】

別の態様において、抗M C S P抗体は、配列番号31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%、又は100%の配列同一性を有するV L配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するV L配列は、参照配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗M C S P抗体は、M C S Pへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号31において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、H V R外の(すなわちF R内の)領域で生じる。任意で、抗M C S P抗体は、配列番号31のV L配列を、その配列の翻訳後修飾を含み、含む。特定の実施態様において、V Lは、(a)配列番号13のアミノ酸配列を含むH V R - L 1、(b)配列番号11のアミノ酸配列を含むH V R - L 2、及び(c)配列番号12のアミノ酸配列を含むH V R - L 3から選択される一、二、又は三のH V Rを含む。

30

40

【0084】

その他の態様において、抗M C S P抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかにあるV H、及び上記に与えられた実施態様の何れかにあるV Lを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号32のアミノ酸配列を含むV H、及び配列番号31のアミノ酸配列を含むV L配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0085】

別の態様において、抗M C S P抗体は、配列番号29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%、又は100%の配列同一性を有するV H配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は

50

99%の同一性を有するVH配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗MCS P抗体は、MCS Pへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号29において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗MCS P抗体は、配列番号29のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様において、VHは、（a）配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される一、二、又は三のHVRを含む。

【0086】

別の態様において、抗MCS P抗体は、配列番号28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%、又は100%の配列同一性を有するVL配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVL配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗MCS P抗体は、MCS Pへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号28において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗MCS P抗体は、配列番号28のVL配列を、その配列の翻訳後修飾を含み、含む。特定の実施態様において、VLは、（a）配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（b）配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（c）配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される一、二、又は三のHVRを含む。

【0087】

その他の態様において、抗MCS P抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかにあるVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかにあるVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号29のアミノ酸配列を含むVH、及び配列番号28のアミノ酸配列を含むVL配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0088】

別の態様において、抗MCS P抗体は、配列番号35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%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する重鎖配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗MCS P抗体は、MCS Pへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号35において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗MCS P抗体は、配列番号35の重鎖配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。

【0089】

その他の態様において、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%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖を含む、抗MCS P抗体が提供される。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する軽鎖配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗MCS P抗体は、MCS Pへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号34において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗MCS P抗体は、配列番号34の軽鎖配列を、その配列の翻訳後修飾を含み、含む。

10

20

30

40

50

【0090】

その他の態様において、抗MCS P抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかにある重鎖、及び上記に与えられた実施態様の何れかにある軽鎖を含む。一実施態様において、抗体は、配列番号35のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号34のアミノ酸配列を含む軽鎖配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。

【0091】

別の態様において、抗MCS P抗体は、配列番号37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%、又は100%の配列同一性を有する重鎖配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する重鎖配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗MCS P抗体は、MCS Pへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号37において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗MCS P抗体は、配列番号37の重鎖配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。

10

【0092】

その他の態様において、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%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖を含む、抗MCS P抗体が提供される。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する軽鎖配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗MCS P抗体は、MCS Pへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号36において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗MCS P抗体は、配列番号36の軽鎖配列を、その配列の翻訳後修飾を含み、含む。

20

【0093】

その他の態様において、抗MCS P抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかにある重鎖、及び上記に与えられた実施態様の何れかにある軽鎖を含む。一実施態様において、抗体は、配列番号37のアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号36のアミノ酸配列を含む軽鎖配列を、それらの配列の翻訳後修飾を含み、含む。更なる態様において、本発明は、本明細書に与えられた抗MCS P抗体と同一エピトープ（単数又は複数）に結合する抗体を提供する。

30

【0094】

一実施態様において、配列番号27のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号26のアミノ酸配列を含むVLを有する抗MCS P抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。別の実施態様において、配列番号32のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号31のアミノ酸配列を含むVLを有する抗MCS P抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

40

【0095】

他の実施態様において、本明細書に記載の抗MCS P抗体と同じエピトープへの結合について競合する抗体が提供される。

【0096】

一実施態様において、抗MCS P抗体と同じエピトープに結合し及び/又は抗MCS P抗体と同じエピトープへの結合について競合する抗体は、例えば、ADCC活性を含む、Fc媒介性細胞傷害などのエフェクター機能活性を示す。

【0097】

一実施態様において、抗MCS P抗体は、ヒトMCS Pの膜基部エピトープに結合する。一実施態様において、抗MCS P抗体は、CSPGリピート含有ドメインを含むヒトM

50

C S Pの膜基部エピトープに結合する。一実施態様において、抗M C S P抗体は、配列番号5のアミノ酸配列に由来する、該配列中にある、又は該配列と重複するヒトM C S Pの膜基部エピトープに結合する。

【0098】

一実施態様において、抗M C S P抗体は、配列番号4のアミノ酸配列に由来する、該配列中にある、又は該配列と重複するヒトM C S Pの膜基部エピトープに結合する。一実施態様において、抗M C S P抗体は、配列番号3のアミノ酸配列に由来する、該配列中にある、又は該配列と重複するヒトM C S Pの膜基部エピトープに結合する。

【0099】

本発明の更なる態様では、上記実施態様のいずれかに記載の抗M C S P抗体は、キメラ、ヒト化又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施態様において、抗M C S P抗体は、抗体断片、例えば、F v、F a b、F a b'、s c F v、ダイアボディ、又はF (a b')₂断片である。その他の態様において、抗体は、全長抗体、例えば、インタクトなI g G 1抗体、又は本明細書において定義された他の抗体クラス又はアイソタイプである。

10

【0100】

一実施態様において、抗M C S P抗体はマウスモノクローナル抗体L C 0 0 7である。この抗体の重鎖及び軽鎖の核酸配列は、それぞれ配列番号37及び36に示される。一実施態様において、抗M C S P抗体はマウスモノクローナル抗体L C 0 0 7に由来するキメラ抗体である。一実施態様において、抗M C S P抗体はマウスモノクローナル抗体L C 0 0 7に由来するヒト化抗体である。一実施態様において、抗M C S P抗体はマウスモノクローナル抗体L C 0 0 7に由来するヒト抗体である。

20

【0101】

更なる態様にて、以下のセクション1 - 7で説明されるように、上記実施態様のいずれかに記載の抗M C S P抗体は、単独または組み合わせで、任意の特徴を組み込むことができる：

【0102】

1. 抗体親和性

所定の実施態様において、本明細書において与えられる抗体は、解離定数(K d)が、1 μ M、1 0 0 n M、1 0 n M、1 n M、0 . 1 n M、0 . 0 1 n M、又は0 . 0 0 1 n M (例えば、1 0⁻⁸ M未満、例えば、1 0⁻⁸ Mから1 0⁻¹³ M、例えば、1 0⁻⁹ Mから1 0⁻¹³ M)。

30

【0103】

一実施態様において、以下のアッセイにより説明されるように、K dは、目的の抗体のF a b型とその抗原を用いて実施される放射標識抗原結合アッセイ(R I A)により測定される。非標識抗原の力価測定系の存在下で、最小濃度の(¹²⁵I) - 標識抗原にてF a bを均衡化して、抗F a b抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するF a bの溶液結合親和性を測定する(例としてChen, et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)を参照)。アッセイの条件を決めるために、M I C R O T I T E R (登録商標)マルチウェルプレート(Thermo Scientific)を5 μ g / m lの捕獲抗F a b抗体(Cappel Labs)を含む5 0 m M炭酸ナトリウム(p H 9 . 6)にて一晚コートして、その後2 % (w / v)のウシ血清アルブミンを含むP B Sにて室温(およそ2 3)で2 ~ 5時間、ブロックする。非吸着プレート(Nunc #269620)に、1 0 0 p M又は2 6 p Mの[¹²⁵I]抗原を段階希釈した所望のF a bと混合する(例えば、Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)の抗V E G F抗体、F a b - 1 2の評価と一致する)。ついで目的のF a bを一晚インキュベートする；しかし、インキュベーションは平衡状態に達したことを確認するまでに長時間(例えばおよそ6 5時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば1時間)インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを0 . 1 %のポリソルベート2 0 (T W E E N - 2 0 (登録商標))を含むP B Sにて8回洗浄する。プレートが乾燥したら、1 5 0 μ l / ウェルの

40

50

閃光物質 (MICROSCINT - 20TM; Packard) を加え、プレートに TOPCOUNTTM 計測器 (Packard) にて 10 分間計測する。最大結合の 20% か又はそれ以下濃度の Fab を選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。

【0104】

他の実施態様によると、~10 反応単位 (RU) の固定した抗原 CM5 チップを用いて 25 の BIACORE (登録商標) - 2000 又は BIACORE (登録商標) - 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を用いる表面プラズモン共鳴アッセイを使用して K_d を測定する。簡単に言うと、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、提供者の指示書に従って N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) 及び N-ヒドロキシスクシニミド (NHS) で活性化する。抗原を 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.8) で 5 µg/ml (~0.2 µM) に希釈し、結合したタンパク質の反応単位 (RU) がおよそ 10 になるように 5 µl/分の流速で注入する。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために 1 M のエタノールアミンを注入する。動力学的な測定のために、Fab の 2 倍の段階希釈 (0.78 nM から 500 nM) を、25 で、およそ 25 µl/分の流速で 0.05% ポリソルベート 20 (TWEEN - 20TM) 界面活性剤 (PBST) を含む PBS に注入する。会合センサーグラム及び解離センサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル (simple one-to-one Langmuir binding model) (BIACORE (登録商標) Evaluation ソフトウェアバージョン 3.2) を用いて、会合速度 (k_{on}) と解離速度 (k_{off}) を算出する。平衡解離定数 (K_d) を k_{off}/k_{on} 比として算出する。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999) を参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計 (stop-flow equipped spectrophotometer) (Aviv Instruments) 又は攪拌キュベットを備えた 8000 シリーズ SLM - AMINCOTM 分光光度計 (ThermoSpectronic) で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS (pH 7.2)、25 の、20 nM の抗抗原抗体 (Fab 型) の蛍光放出強度 (励起 = 295 nm; 放出 = 340 nm、帯域通過 = 16 nm) における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

【0105】

2. 抗体断片

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片は、限定されないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、及び scFv 断片、及び下記の他の断片を含む。所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。scFv 断片の総説については、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; また、国際公開第 93/16185 号; 及び米国特許第 5,571,894 号及び第 5,587,458 号も参照。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、かつインビボ半減期を増加させた Fab 及び F(ab')₂ 断片の議論については、米国特許第 5,869,046 号を参照のこと。

【0106】

ダイアボディは 2 価または二重特異性であり得る 2 つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第 404,097 号; 国際公開第 1993/01161 号; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); 及び Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) を参照。トリアボディ及びテトラボディもまた Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003) に記載されている。

【0107】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部、又は軽鎖可変ドメインの全て又は一部を含む抗体断片である。ある実施態様において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, MA; 例えば、米国特許第 6,2

10

20

30

40

50

48, 516 B1号を参照)。

【0108】

抗体断片は様々な技術で作成することができ、限定されないが、本明細書に記載するように、インタクトな抗体の分解、並びに組換え宿主細胞(例えば、大腸菌又はファージ)による生産を含む。

【0109】

3. キメラ及びヒト化抗体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。所定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサル等の非ヒト霊長類由来の可変領域)及びヒト定常領域を含む。更なる例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

【0110】

所定の実施態様において、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、ヒトに対する免疫原性を低減するために、親の非ヒト抗体の特異性と親和性を保持したまま、ヒト化されている。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR(またはその一部)が、非ヒト抗体から由来し、FR(またはその一部)がヒト抗体配列に由来する、一以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意で、ヒト定常領域の少なくとも一部をも含む。幾つかの実施態様において、ヒト化抗体の幾つかのFR残基は、例えば抗体特異性又は親和性を回復もしくは改善するために、非ヒト抗体(例えば、HVR残基が由来する抗体)由来の対応する残基で置換されている。

【0111】

ヒト化抗体およびそれらの製造方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)に総説され、更に、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); 米国特許第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号、及び第7,087,409号; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (SDR(a-CDR) グラフティングを記述); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (「リサーフェシング」を記述); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (「FRシャッフリング」を記述); 及びOsbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) 及びKlimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (FRのシャッフリングへの「誘導選択」アプローチを記述)に記載されている。

【0112】

ヒト化に用いられ得るヒトフレームワーク領域は、限定されないが、「ベストフィット」法を用いて選択されるフレームワーク領域(例えば、Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)); 軽鎖または重鎖の可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列由来の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); 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細胞系フレームワーク領域(例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)を参照); 及びFRライブラリスクリーニング由来の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)を含む。

【0113】

4. ヒト抗体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を用いて生産することができる。ヒト抗体は一般的にvan Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 及びLonberg, Cur

10

20

30

40

50

r. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)に記載されている。

【0114】

ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答して、インタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を持つ又はインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に、免疫原を投与することにより調製することができる。このような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置換するか、又は染色体外に存在するかもしくは動物の染色体にランダムに組み込まれている、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含む。このようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に不活性化される。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の総説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)を参照。また、例えば、XENOMOUSETM技術を記載している、米国特許第6,075,181号及び第6,150,584号；HuMab（登録商標）技術を記載している米国特許第5,770,429号；K-MMOUSE（登録商標）技術を記載している米国特許第7,041,870号及び、Velocimouse（登録商標）技術を記載している米国特許出願公開第2007/0061900号）を参照。このような動物で生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることにより、更に改変される可能性がある。

10

【0115】

ヒト抗体は、ハイブリドーマベース法によって作成することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ細胞株が記載されている。（例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及びBoerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)を参照）。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体はまた、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)に記載されている。更なる方法は、例えば、米国特許第7,189,826号（ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載している）及びNi, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)（ヒト-ヒトハイブリドーマを記載している）に記載されたものを含む。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）もまた、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)に記載される。

20

30

【0116】

ヒト抗体はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択されたFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成され得る。このような可変ドメイン配列は、次に所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術が、以下に説明される。

【0117】

5. ライブラリー由来の抗体

本発明の抗体は、所望の活性または活性（複数）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することができる。例えば、様々な方法が、ファージディスプレイライブラリーを生成し、所望の結合特性を有する抗体についてのライブラリーをスクリーニングするために、当該技術分野で知られている。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)に総説され、更に、例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); 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)に記載されてい

40

50

る。

【0118】

所定のファージディスプレイ法において、VH及びVL遺伝子のレパートリーがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により個別にクローニングされ、ファージライブラリーにランダムに再結合され、その後、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは、通常、抗体断片を、単鎖Fv(scFv)断片、またはFab断片のいずれかとして提示する。免疫された起源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要性を伴うことなく免疫原に高親和性抗体を提供する。代わりに、Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)に記載されるように、ナイーブなレパートリーが、任意の免疫感作無しで、広範囲の非自己抗原及び自己抗原に対して、抗体の単一起源を提供するために、(例えば、ヒトから)クローン化することができる。最後に、ナイーブなライブラリーはまた、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)に記載されるように、非常に可変なCDR3領域をコードし、インビトロで再構成を達成するために、幹細胞由来の未転位V遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含むPCRプライマーを使用することにより合成することができる。ヒト抗体ファージライブラリーを記述する特許公報は、例えば、米国特許第5750373号、及び米国特許出願公開第2005/0079574号、第2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936号及び第2009/0002360号を含む。

10

20

【0119】

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、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体の断片とみなされる。

【0120】

6. 多重特異性抗体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる部位に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある実施態様において、結合特異性の一つはMCS Pに対してであり、他は、任意の他の抗原に対してである。ある実施態様において、二重特異性抗体は、MCS Pの二つの異なるエピトープに結合することができる。二重特異性抗体はまたMCS Pを発現する細胞に対して細胞傷害性薬物を局在化させるために用いることができる。二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片として調製することができる。

30

【0121】

多重特異性抗体を作製するための技術は、限定されないが、異なる特異性を有する二つ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))、国際公開第93/08829号、及びTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照)及び「ノブ・イン・ホール」工学(例えば、米国特許第5,731,168号を参照)を含む。多重特異抗体はまた、抗体のFc-ヘテロ2量体分子を作成するための静電ステアリング効果を操作すること(国際公開第2009/089004A1号)、2つ以上の抗体又は断片を架橋すること(例えば米国特許第4,676,980号、及びBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)を参照)、二重特異性抗体を生成するためにロイシンジッパーを使用すること(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)を参照)、二重特異性抗体フラグメントを作製するため、「ダイアボディ」技術を使用すること(例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照)、単鎖Fv(sFv)ダイマーを使用すること(例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照)、及び、例えばTutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)に記載されているように、三重特異性抗体を調製することによって作成することができる。

40

【0122】

「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能性抗原結合部位を持つ改変抗体もまた本明

50

細書に含まれる（例えば、米国特許出願公開第2006/0025576A1号を参照）。

【0123】

本明細書中の抗体又は断片はまた、M C S P並びにその他の異なる抗原（例えば米国特許出願公開第2008/0069820号参照）に結合する抗原結合部位を含む、「2重作用(Dual Acting) F A b」又は「D A F」を含む。

【0124】

7. 抗体変異体

ある実施態様において、本明細書で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/又は他の生物学的特性を改善することが望まれ得る。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改変を導入することにより、またはペプチド合成によって調製することができる。このような改変は、例えば、抗体のアミノ酸配列内における、残基の欠失、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有していることを条件として、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが、最終コンストラクトに到達させるために作成され得る。

10

【0125】

a) 置換、挿入、および欠失変異体

ある実施態様において、一つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換型変異誘発の対象となる部位は、H V RとF Rを含む。保存的置換は、表1の「保存的置換」の見出しの下に示されている。より実質的な変更が、表1の「典型的な置換」の見出しの下に与えられ、アミノ酸側鎖のクラスを参照して以下に更に説明される。アミノ酸置換は、目的の抗体に導入することができ、その産物は、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の減少、又はA D C C又はC D Cの改善についてスクリーニングされる。

20

表 1

元の残基	典型的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

【 0 1 2 6 】

アミノ酸は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性の親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖配向に影響する残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

40

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。

【 0 1 2 7 】

置換された変異体の一つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体など）の以上の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的には、更なる研究のために選択され得られた変異体は、親抗体と比較して、特定の生物学的特性の改変（例えば、改善）（例えば、親和性の増加、免疫原性を減少）を有し、及び/又は親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持しているであろう。典型的な置換型変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば、本明細書に記載される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

50

生成され得る。簡潔に言えば、一つ以上のHVR残基が変異し、変異体抗体は、ファージ上に表示され、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【0128】

変更（例えば、置換）は、例えば抗体の親和性を向上させるために、HVRで行うことができる。このような変更は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程中に高頻度で変異を受けるコドンにコードされた残基で（例えばChowdhury, *Methods Mol Biol.* 207:179-196 (2008)を参照）、及び/又はSDR（a-CDR）で行うことができ、得られた変異体VH又はVLが結合親和性について試験される。二次ライブラリから構築し選択し直す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。親和性成熟の幾つかの実施態様において、多様性が、種々の方法（例えば、変異性PCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチドを標的とした突然変異誘発）の何れかにより、成熟のために選択された可変遺伝子中に導入される。次いで、二次ライブラリが作成される。次いで、ライブラリは、所望の親和性を持つ抗体変異体を同定するためにスクリーニングされる。多様性を導入するもう一つの方法は、いくつかのHVR残基（例えば、一度に4から6残基）がランダム化されたHVR指向のアプローチを伴う。抗原結合に關与するHVR残基は、例えばアラニンスキャニング突然変異誘発、またはモデリングを用いて、特異的に同定され得る。CDR-H3及びCDR-L3がしばしば標的にされる。

10

20

【0129】

所定の実施態様において、置換、挿入、または欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限りにおいて、一以上のHVR内で生じる可能性がある。例えば、実質的に結合親和性を低下させない保存的改変（例えば本明細書で与えられる保存的置換）をHVR内で行うことができる。このような改変は、HVR「ホットスポット」又はSDRの外側であってもよい。上記に与えられた変異体VH又はVL配列の所定の実施態様において、各HVRは不変であるか、又はわずか1個、2個または3個のアミノ酸置換が含まれているかの何れかである。

【0130】

突然変異誘発のために標的とすることができる抗体の残基又は領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085により説明されるように、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、標的残基の残基またはグループ（例えば、arg、asp、his、lys及びgluなどの荷電残基）が同定され、抗原と抗体との相互作用が影響を受けるかどうかを判断するために、中性または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）に置換される。更なる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の位置に導入され得る。代わりに、又は更に、抗原抗体複合体の結晶構造が、抗体と抗原との接触点を同定する。そのような接触残基及び隣接残基が、置換の候補として標的にされるか又は排除され得る。変異体はそれらが所望の特性を含むかどうかを決定するためにスクリーニングされ得る。

30

【0131】

アミノ酸配列挿入は、一残基から百以上の残基を含有するポリペプチド長にわたるアミノ及び/又はカルボキシル末端融合、並びに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニン残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体は、酵素に対する抗体のN末端またはC末端への融合（例えばADEPTの場合）、または抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドへの融合を含む。

40

【0132】

b) グリコシル化変異体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少す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、一以上のグリコシル化部位が作成または削除されるようにアミノ酸配列を変えること

50

によって簡便に達成することができる。

【0133】

抗体がFc領域を含む場合には、それに付着する糖を変えることができる。哺乳動物細胞によって生成された天然型抗体は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN-結合により一般的に付着した分岐鎖、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。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合した、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、シアル酸、並びにフコースを含み得る。幾つかの実施態様において、本発明の抗体におけるオリゴ糖の改変は、一定の改善された特性を有する抗体変異体を作成するために行われ得る。

10

【0134】

一実施態様において、抗体変異体は、Fc領域に(直接または間接的に)付着されたフコースを欠いた糖鎖構造を有して提供される。例えば、このような抗体のフコース量は、1%から80%、1%から65%、5%から65%、または20%から40%であり得る。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析法によって測定されるAsn297に付着しているすべての糖構造の合計(例えば、コンプレックス、ハイブリッド及び高マンノース構造)に対して、Asn297の糖鎖中のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域(Fc領域残基のEU番号付け)でおよそ297の位置に位置するアスパラギン残基を指し、しかし、Asn297もまた位置297の上流または下流のおよそ±3アミノ酸に、すなわち抗体の軽微な配列変異に起因して、位置294と300の間に配置され得る。このようなフコシル化変異体はADCC機能を改善させた可能性がある。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号(Presta, L.);米国特許出願公開第2004/0093621号(協和発酵工業株式会社)を参照。「フコース非修飾」又は「フコース欠損」抗体変異体に関連する出版物の例としては、米国特許出願公開第2003/0157108号、国際公開第2000/61739号、国際公開第2001/29246号、米国特許出願公開第2003/0115614号、米国特許出願公開第2002/0164328号、米国特許出願公開第2004/0093621号、米国特許出願公開第2004/0132140号、米国特許出願公開第2004/0110704号、米国特許出願公開第2004/0110282号、米国特許出願公開第2004/0109865号、国際公開第2003/085119号、国際公開第2003/084570号、国際公開第2005/035586号、国際公開第2005/035778号、国際公開第2005/053742号、国際公開第2002/031140号、Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)が含まれる。非フコシル化抗体を産生する能力を有する細胞株の例としては、タンパク質フコシル化を欠損しているLec13 CHO細胞(Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986);米国特許出願公開第2003/0157108 A1号、Presta, L.;及び国際公開第2004/056312 A1号, Adamsら、特に実施例11)、及びノックアウト細胞株、例えばアルファ-1、6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞(例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006);及び国際公開第2003/085107号を参照)を含む。

20

30

40

【0135】

抗体変異体は、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分されている二分されたオリゴ糖を更に備えている。このような抗体変異体はフコシル化を減少させ、及び/又はADCC機能を改善している可能性がある。そのような抗体変異体の例は、例えば、国際公開第2003/011878号(Jean-Mairettら);米国特許第6,602,684号(Umanaら);及び米国特許出願公開第2005/0123546号(Umanaら)に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも

50

1つのガラクトース残基を持つ抗体変異体も提供される。このような抗体変異体はC D C機能を改善させた可能性がある。このような抗体変異体は、例えば、国際公開第1997/30087号(Patelら)；国際公開第1998/58964号(Raju, S.)；及び国際公開第1999/22764号(Raju, S.)に記載されている。

【0136】

従って、本発明は、宿主細胞によって産生される本発明の抗M C S P抗体のグリコシル化プロファイルを修飾するための方法を対象としており、前記宿主細胞中で、本発明の抗M C S P抗体をコードする核酸、又はグリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、又はそうしたポリヌクレオチドを含むベクターを発現させることを含む。グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する遺伝子は、(1, 4) - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI I I (G n T I I I)、 - マンノシダーゼI I (M a n I I)、(1, 4) - ガラクトシルトランスフェラーゼ(G a l T)、(1, 2) - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI (G n T I)、(1, 2) - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(G n T I I)を含む。一実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する遺伝子の組み合わせは、宿主細胞中で発現される(例えば、G n T I I I及びM a n I I)。同様に、この方法はまた、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子が破壊されたか又はそうでなければ非活性化された宿主細胞内(例えば、1 - 6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の活性がロックアウトされた宿主細胞)で抗M C S P抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドの発現を網羅する。別の実施態様において、本発明の抗M C S P抗体は、前記抗体のグリコシル化パターンを修飾するためにG n T I I I活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを更に発現する宿主細胞で生産することができる。特定の実施態様において、G n T I I I活性を有するポリペプチドは、ゴルジ常駐性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドである。用語「ゴルジ局在化ドメイン」は、ゴルジ複合体内の部位にポリペプチドを固定することに関するゴルジ常在性ポリペプチドのアミノ酸配列を指す。一般的に、局在化ドメインは酵素のアミノ末端「尾部」を含む。別の好ましい実施態様において、G n T I I I活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現する宿主細胞における本発明の抗M C S P抗体の発現は、増加したF c受容体結合親和性及び増加したエフェクター機能を有する抗M C S P抗体をもたらす。従って、一実施態様において、本発明は、(a) G n T I I I活性を有するポリペプチドをコードする配列を含む単離された核酸；及び(b) ヒトのM C S Pに結合するキメラ、霊長類化又はヒト化抗体など本発明の抗M C S P抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞を対象とする。好ましい実施態様において、G n T I I I活性を有するポリペプチドは、G n T I I Iの触媒ドメインを含む融合ポリペプチドであり、ゴルジ局在化ドメインは、マンノシダーゼI Iの局在化ドメインである。このような融合ポリペプチドを生成し、増加したエフェクター機能を有する抗体を産生するためにそれらを使用するための方法は、米国仮特許出願第60/495, 142号及び米国特許出願公開第2004/0241817号に開示され、その内容全体が参照により本明細書に援用される。特定の実施態様において、宿主細胞によって生産された修飾された抗M C S P抗体は、I g G定常領域又はF c領域を含むその断片を有する。別の特定の実施態様において、抗M C S P抗体は、ヒト化又はヒト抗体又はF c領域を含むそれらの断片である。

【0137】

本発明の宿主細胞により産生されたグリコシル化が改変された抗M C S P抗体は、典型的には、宿主細胞の修飾の結果(例えば、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子の発現により)、F c受容体結合親和性の増加及び/又はエフェクター機能の増加を示す。好ましくは、F c受容体結合の増加は、F c R I I I a受容体などF c活性化受容体への結合の増加である。エフェクター機能の増加は、好ましくは以下の一つ又は複数における増加である：F c媒介性細胞傷害性の増加、抗体依存性細胞食作用(A D C P)の増加、サイトカイン分泌の増加、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性の抗原取り込みの増加、F c媒介性細胞傷害の増加、N K細胞への結合の増加、マクロファージへの結合の増加、多

10

20

30

40

50

形核細胞 (PMNC) への結合の増加、単球への結合の増加、標的結合抗体の架橋の増加、直接的シグナル伝達誘導性アポトーシスの増加、樹状細胞成熟の増加、又はT細胞プライミングの増加。

【0138】

一態様において、本発明は、糖鎖操作されていない抗MCS P抗体と比較した場合、抗体依存性細胞傷害性を含むエフェクター機能が増加した抗MCS P抗体(例えば、変異体抗体)のグリコフォームを提供する。抗体のグリコシル化学は以前に記載されている。例えば、米国特許第6,602,684号を参照し、参照によりその全体が援用される。グリコシル化に関する遺伝子の活性を変化させた宿主細胞からの抗MCS P抗体の生産の方法もまた本明細書に詳細が記述される(例えば下の「発現ベクター及び宿主細胞」と題された節を参照)。本発明の抗MCS P抗体のADCCの増加もまた、例えば親和性成熟または親和性を向上させる他の方法によって、MCS Pに対する抗体の親和性を増加させることによって、達成される(Tang et al., J. Immunol. 2007, 179:2815-2823を参照)。これらのアプローチの組み合わせもまた、本発明に包含される。

10

【0139】

いくつかのタイプの癌の治療のための非コンジュゲート化モノクローナル抗体(mAb)の臨床試験で、最近、有望な結果が得られている。Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25 (1997); Deo et al., Immunology Today 18:127 (1997)。キメラ非コンジュゲート化IgG1は、低悪性度又は濾胞性B細胞非ホジキンリンパ腫のために承認されている。Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25 (1997)、別の非コンジュゲート化モノクローナル抗体であるが、固形乳腫瘍を対象としたヒト化IgG1もまた、第III相臨床試験で有望な結果を示した。Deo et al., Immunology Today 18:127 (1997)。これら二つのmAbの抗原はそれぞれの腫瘍細胞において高度に発現され、抗体は、インビトロ及びインビボでエフェクター細胞によって強力な腫瘍破壊を媒介する。これに対して、細かな腫瘍特異性を有する他の多くの非コンジュゲート化mAbは、臨床的に有用であるのに十分な効力のエフェクター機能を引き起こすことはできない。Frost et al., Cancer 80:317-33 (1997); Surfus et al., J. Immunother. 19:184-91 (1996)。これらの弱いmAbのいくつかのために、補助的サイトカイン療法が現在試験されている。サイトカインの添加は、循環リンパ球の活性及び数を増加させることによって抗体依存性細胞傷害(ADCC)を刺激することができる。Frost et al., Cancer 80:317-33 (1997); Surfus et al., J. Immunother. 19:184-91 (1996)。ADCC、標的細胞上の溶解性攻撃は、抗体の定常領域(Fc)への白血球受容体の結合の際に引き起こされる。Deo et al., Immunology Today 18:127 (1997)。

20

30

【0140】

非コンジュゲート化IgG1のADCC活性を増大させるために異なるが、しかし相補的なアプローチは、抗体のFc領域を操作することである。タンパク質工学研究では、FcRはIgGのCH2ドメインの下側のヒンジ領域と相互作用することが示されている。Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69 (1996)。しかしながら、FcR結合はまた、CH2領域において保存されたアスパラギン297で共有結合したオリゴ糖の存在を必要とする。Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69 (1996); Wright and Morrison, Trends Biotech. 15:26-31 (1997)は、オリゴ糖とポリペプチドの両方が相互作用部位に直接寄与するか、又はオリゴ糖が活性なCH2ポリペプチドのコンフォメーションを維持するために必要であるかの何れかを示唆している。オリゴ糖構造の改変は、従って、相互作用の親和性を増加させる手段として検討することができる。

40

【0141】

IgG分子は、そのFc領域内の2つのN-結合型オリゴ糖、各重鎖上に1つ、を運ぶ。任意の糖タンパク質として、抗体は、同じポリペプチド骨格を共有するが、グリコシル化部位に付着された異なる糖鎖を持つグリコフォームの集団として生成される。血清IgGのFc領域に通常見られるオリゴ糖は、低レベルの末端シアル酸及び二分したN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、及び様々な程度の末端のガラクトシル化とコアフコ

50

シル化を持つ複雑な二分岐型である(Wormald et al., *Biochemistry* 36:130-38 (1997)). 幾つかの研究では、Fc R結合のために必要な最小限の炭水化物構造はオリゴ糖コア内にあることを示唆している。Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996)。

【0142】

非コンジュゲート化治療用モノクローナル抗体の産生のために産業界及びアカデミアで使用されるマウス又はハムスター由来の細胞株は、要求されるオリゴ糖決定因子をFc部位に対して通常付着させる。これらの細胞株で発現されるIgGは、しかしながら、血清中のIgGの低い量で見いだされる分岐したGlcNAcを欠いている。Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995)。対照的に、ラット骨髄腫が産生するヒト化IgG1 (CAMPATH-1H)は、そのグリコフォームの一部に分岐したGlcNAcを保有することが最近観察された。Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995)。ラット細胞由来抗体は、有意に低い抗体濃度で、標準的な細胞株で産生されるCAMPATH-1H抗体とインビトロのADCC活性において同様の最大に達した。

10

【0143】

CAMPATH抗原は、リンパ腫細胞上に高レベルで通常存在し、このキメラmAbは、分岐したGlcNAcの非存在下で高いADCC活性を有する。Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995)。N-結合型グリコシル化経路では、分岐したGlcNAcがGnTIIIによって付加される。Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986)。

【0144】

以前の研究では、クローン化されたGnTIII酵素遺伝子の異なるレベルを外部制御される様式で発現するように以前に操作された、単一の抗体産生CHO細胞株を使用した(Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999))。このアプローチでは、グリコシルトランスフェラーゼ(例えば、GnTIII)の発現及び修飾された抗体のADCC活性間の厳密な相関関係を初めて確立した。従って、本発明は、抗体産生宿主細胞内での糖転移酵素遺伝子の発現レベルを変化させたことによる、グリコシル化を変化させたFc領域又はFc領域に等価な領域を含む、抗MCS P抗体を意図する。特定の実施態様において、遺伝子発現レベルの変化はGnTIII活性の増加である。GnTIII活性の増加は、抗体のFc領域において、二分されたオリゴ糖の割合の増加、並びにフコース残基の割合の減少をもたらす。この抗体又はその断片は、Fc受容体結合親和性を増加させ、かつエフェクター機能を増加させている。

20

30

【0145】

本発明はまた、修飾されたオリゴ糖を有する本発明の抗MCS P抗体を産生するための方法を対象とし、(a)グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸を、本発明に係る抗FAP抗体の産生を可能にする条件下で発現させるように操作された宿主細胞を培養し、ここで、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する前記ポリペプチドが、前記宿主細胞により産生される前記抗MCS P抗体のFc領域においてオリゴ糖を修飾するために十分な量で発現され；及び(b)前記抗MCS P抗体を単離することを含む。一実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドはGnTIIIである。その他の実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する2つのポリペプチドがある。特定の実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する2つのポリペプチドはGnTIII及びManIIである。その他の実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドは、GnTIIIの触媒ドメインを含む融合ポリペプチドである。より特定の実施態様において、融合ポリペプチドはさらに、ゴルジ常駐性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む。好ましくは、前記ゴルジ局在化ドメインは、マンノシダーゼI又はGnTIIIのゴルジ局在化ドメインである。あるいは、ゴルジ局在化ドメインは、マンノシダーゼIの局在化ドメイン、GnTIIIの局在化ドメイン、及び1-6コアフコシルトランスフェラーゼの局在化ドメインからなる群から選択される。本発明の方法によって産生された抗MCS P抗体は、Fc受容体結合親和性が増加し及び/又はエフェクター機

40

50

能が増加している。一般に、エフェクター機能の増加は、以下の一つ又は複数を含み得る：Fc媒介性細胞傷害性の増加（抗体依存性細胞傷害の増加を含む）、抗体依存性細胞食作用（ADCP）の増加、サイトカイン分泌の増加、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性の抗原取り込みの増加、NK細胞への結合の増加、マクロファージへの結合の増加、単球への結合の増加、多形核細胞への結合の増加、直接的シグナル伝達誘導性アポトーシスの増加、標的結合抗体の架橋の増加、樹状細胞成熟の増加、又はT細胞プライミングの増加。Fc受容体結合親和性の増加は、好ましくは、FcRIIIaなどのFc活性化受容体への結合の増加である。特定の好ましい実施態様において、ABMはヒト化抗体又はその断片である。

【0146】

一実施態様において、抗MCS P抗体のFc領域における二分されたN-結合型オリゴ糖の割合は、全オリゴ糖のうち少なくとも約100%から約10%、具体的には少なくとも約50%、より具体的には少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、又は少なくとも約90-95%である。更に別の実施態様において、本発明の方法により産生される抗体は、本発明の方法によるそのオリゴ糖の修飾の結果として、Fc領域に非フコシル化オリゴ糖の割合が増加している。一実施態様において、非フコシル化オリゴ糖の割合は、少なくとも約20%から約100%、具体的には少なくとも約50%、少なくとも約60%から少なくとも約70%、及びより具体的には少なくとも約75%である。非フコシル化オリゴ糖は、ハイブリッド又は複合体型のものであり得る。更に別の実施態様において、本発明の方法により産生される抗体は、本発明の方法によるそのオリゴ糖の修飾の結果として、Fc領域に二分されたオリゴ糖の割合が増加している。一実施態様において、二分されたオリゴ糖の割合は、少なくとも約20%から約100%、具体的には少なくとも約50%、少なくとも約60%から少なくとも約70%、及びより具体的には少なくとも約75%である。特定の好ましい実施態様において、宿主細胞及び本発明の方法によって産生された抗MCS P抗体は、Fc領域における二分された非フコシル化オリゴ糖の割合が増加している。二分された非フコシル化オリゴ糖は、ハイブリッド又は複合体の何れかであり得る。具体的には、本発明の方法は、抗体のFc領域のオリゴ糖の少なくとも約10%から約100%、具体的には少なくとも約15%、より具体的には少なくとも約20%から約50%、より具体的には少なくとも約20%から約25%、及びより具体的には少なくとも約30%から約35%が二分され、非フコシル化型である抗体を産生するために使用することができる。本発明の抗MCS P抗体は、抗MCS P抗体のFc領域のオリゴ糖の少なくとも約10%から約100%、具体的には少なくとも約15%、より具体的には少なくとも約20%から約25%、及びより具体的には少なくとも約30%から約35%が二分され、ハイブリッドで、非フコシル化型であるFc領域をも含み得る。

【0147】

別の実施態様において、本発明は、本発明の方法により産生される、エフェクター機能を増大させ、及び/又はFc受容体結合親和性が増加するように操作された抗MCS P抗体を対象とする。エフェクター機能の増加は、限定されないが、以下の一つ又は複数を含み得る：Fc媒介性細胞傷害性の増加（抗体依存性細胞傷害の増加を含む）、抗体依存性細胞食作用（ADCP）の増加、サイトカイン分泌の増加、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性の抗原取り込みの増加、NK細胞への結合の増加、マクロファージへの結合の増加、単球への結合の増加、多形核細胞への結合の増加、直接的シグナル伝達誘導性アポトーシスの増加、標的結合抗体の架橋の増加、樹状細胞成熟の増加、又はT細胞プライミングの増加。好ましい実施態様において、Fc受容体結合親和性の増加は、Fc活性化受容体、最も好ましくはFcRIIIaへの結合の増加である。一実施態様において、抗体は、インタクトな抗体である。一実施態様において、抗体は、Fc領域を含む抗体断片、又は免疫グロブリンのFc領域に等価な領域を含む融合タンパク質である。

【0148】

本発明は、Fc受容体結合親和性が増加し、好ましくはFc活性化受容体への結合の増

10

20

30

40

50

加し、及び/又は抗体依存性細胞傷害を含むエフェクター機能が增加した本発明の抗体のグリコフォームの産生のための宿主細胞系の作製及び使用のための方法を更に提供する。本発明の抗体を用いて使用することができる糖鎖工学の方法論は、米国特許第6602684号、米国特許出願公開第2004/0241817 A1号、米国特許出願公開第2003/0175884 A1号、米国仮特許出願第60/441307号及び国際公開第2004/065540号により詳細に説明されており、それらの各々の内容全体は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本発明の抗体は、あるいは、米国特許出願公開第2003/0157108号(ジェネンテック)、又は欧州特許第1176195 A1号、国際公開第03/084570号、国際公開第03/085119号及び米国特許出願公開第2003/0115614号、米国特許出願公開第2004/093621号、米国特許出願公開第2004/110282号、米国特許出願公開第2004/110704号、米国特許出願公開第2004/132140号(Kyowa)に開示された技術に従って、Fc領域にフコース残基を減少させるように糖鎖を操作することができる。これらの文献のそれぞれの内容は、その全体が本明細書中に参考として援用される。本発明の糖鎖操作抗体はまた、米国特許出願公開第60/344,169号及び国際公開第03/056914号(GlycoFi, Inc.)又は国際公開第2004/057002号及び国際公開第2004/024927号(Greenovation)(それらの各々の内容が、その全体が本明細書中に参考として援用される)に教授されるものなど、修飾された糖タンパク質を産生する発現系において生産することができる。

10

20

30

40

50

【0149】

別の態様において、本発明は、改変されたグリコシル化パターンを有する本発明の抗体の生成のための宿主細胞発現系を提供する。特に、本発明は、改良された治療的価値を有する本発明の抗体のグリコフォームの生成のための宿主細胞系を提供する。従って、本発明は、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを発現するために選択または操作された宿主細胞発現系を提供する。具体的な実施態様において、グリコシルトランスフェラーゼ活性は、GnTIIを活性である。一実施態様において、GnTII活性を有するポリペプチドは、異種ゴルジ常駐性ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドである。具体的には、宿主細胞発現系は、構成的又は制御されたプロモーター系に作動可能に連結されたGnTIIを有するポリペプチドをコードする組換え核酸分子を含むように操作されてもよい。

【0150】

一の特定の実施態様において、本発明は、GnTII活性を有し、及び異種ゴルジ常在ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドコードする少なくとも一の核酸を発現するように操作された宿主細胞を提供する。一態様において、宿主細胞は、GnTII活性を有し、及び異種ゴルジ常在ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドコードする少なくとも一の遺伝子を含む核酸により操作される。

【0151】

一般に、上述した細胞株を含む培養細胞株の任意のタイプが、本発明の宿主細胞株を操作するためのバックグラウンドとして使用することができる。好ましい実施態様では、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YOMIエローマ細胞、P3X63マウス骨髄腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞またはハイブリドーマ細胞、他の哺乳動物細胞、酵母細胞、昆虫細胞、又は植物細胞が、本発明の操作された宿主細胞を生成するためのバックグラウンド細胞株として使用される。

【0152】

本発明は、本明細書で定義される異種ゴルジ常在ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドを含む、グリコシルトランスフェラーゼ活性、例えば、GnTII活性を有するポリペプチドを発現する任意の操作された宿主細胞を包含することが意図される。

【0153】

グリコシルトランスフェラーゼ活性、例えば、GnTII活性を有するポリペプチド

をコードする一又は複数の核酸が、構成的プロモーターの制御の下、又は代わりに、制御された発現系の下で発現させることができる。このようなシステムは、当技術分野でよく知られており、上述したシステムが含まれている。グリコシルトランスフェラーゼ活性、例えばGnTIIIIを活性を有し、異種ゴルジ常在ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドをコードする幾つかの異なる核酸が宿主細胞系内に含まれる場合、それらの幾つかは、構成的プロモーターの制御下で発現させることができ、一方で他は調節されるプロモーターの制御下で発現される。グリコシルトランスフェラーゼ活性、例えば、GnTIIII活性を有する融合ポリペプチドの発現レベルは、例えば、ウエスタンブロット分析、ノーザンブロット分析、レポーター遺伝子発現分析又はグリコシルトランスフェラーゼ活性、例えばGnTIIIIを活性の測定を含む、一般的に当技術分野で公知の方法によって決定される。あるいは、GnTIIIIの生合成産物に結合するレクチン、例えば、E4-PHAレクチンを用いてもよい。あるいは、グリコシルトランスフェラーゼ活性、例えばGnTIIII活性を有するポリペプチドをコードする核酸により操作された細胞により産生される抗体によって媒介されるFc受容体結合の増加又はエフェクター機能の増加を測定する機能的アッセイを使用することができる。

10

20

30

40

50

【0154】

本発明の抗体のコード配列を含有し、生物学的に活性な遺伝子産物を発現する宿主細胞は、少なくとも4つの一般的なアプローチ；(a)DNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーション；(b)「マーカー」遺伝子機能の有無；(c)宿主細胞内でのそれぞれのmRNA転写物の発現により測定されるように転写のレベルを評価すること；及び(d)イムノアッセイによって、又はその生物学的活性によって測定されるような遺伝子産物の検出により同定され得る。

【0155】

第一のアプローチでは、抗MCS P抗体のコード配列、及び/又はグリコシルトランスフェラーゼ(例えば、GnTIIII)活性を有するポリペプチドのコード配列の存在は、それぞれ個々のコード配列又はその一部若しくは誘導体に相通的であるヌクレオチド配列を含むプローブを用いたDNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーションによって検出することができる。

【0156】

第二のアプローチでは、特定の「マーカー」遺伝子機能(例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、メトトレキセートに対する耐性、形質転換表現型、バキュロウイルスなどにおける包埋体形成)の有無に基づいて、組換え発現ベクター/宿主系を同定し、選択することができる。例えば、本発明の抗体のコード配列、又はその断片、及び/又はグリコシルトランスフェラーゼ(例えば、GnTIIII)活性を有するコード配列がベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入される場合、それぞれのコード配列を含む組換え体は、マーカー遺伝子機能の欠如によって同定することができる。あるいは、マーカー遺伝子は、コード配列の発現を制御するために使用される同一又は異なるプロモーターの制御下でコード配列とタンデムに配置することができる。誘導又は選択に応答するマーカーの発現は、本発明の抗体のコード配列、及び/又はグリコシルトランスフェラーゼ(例えば、GnTIIII)活性を有するポリペプチドのコード配列の発現を示す。

【0157】

第三のアプローチでは、本発明の抗体又はその断片のコード領域、及び/又はグリコシルトランスフェラーゼ(例えば、GnTIIII)活性を有するポリペプチドのコード配列の転写活性は、ハイブリダイゼーションアッセイにより評価することができる。例えば、RNAは、本発明の抗体又はその断片のコード配列、及び/又はグリコシルトランスフェラーゼ(例えば、GnTIIII)活性を有するポリペプチド又はその特定部分のコード配列に相同なプローブを用いたノーザンブロットによって単離し、分析することができる。あるいは、宿主細胞の全核酸を抽出し、そのようなプローブへのハイブリダイゼーションについてアッセイすることができる。

【0158】

第四のアプローチにおいて、タンパク質産物の発現は、例えばウェスタンブロット、放射免疫沈降、酵素結合免疫アッセイ等の免疫アッセイによって免疫学的に評価することができる。発現系の成功の最終的な試験は、しかしながら、生物学的に活性な遺伝子産物の検出を含む。

【0159】

c) Fc領域変異体

ある実施態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変を、本明細書で提供される抗体のFc領域に導入することができ、それによってFc領域変異体を生成する。Fc領域の変異体は、1つまたは複数のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾(例えば置換)を含むヒトFc領域の配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域)を含んでもよい。

10

【0160】

ある実施態様において、本発明は、インビボにおける抗体の半減期が重要であるが、ある種のエフェクター機能(例えば補体およびADCCなど)が不要または有害である用途のための望ましい候補とならしめる、全てではないが一部のエフェクター機能を有する抗体変異体を意図している。インビトロ及び/又はインビボでの細胞毒性アッセイを、CDC活性及び/又はADCC活性の減少/枯渇を確認するために行うことができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイは、抗体がFcR結合を欠くが(それゆえ、おそらくADCC活性を欠く)、FcRn結合能力を保持していることを確認するために行うことができる。ADCC、NK細胞を媒介する初代細胞は、FcRIIIのみを発現するが、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)の464ページの表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号(例えば、Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)を参照)及びHellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)を参照)に説明される。あるいは、非放射性アッセイ法を用いることができる(例えば、フローサイトメトリー用のACTITM非放射性細胞傷害性アッセイ(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; 及びCytotox 96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照。この

ようなアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。代わりとして、又は更に、対象の分子の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ような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。C1q結合アッセイはまた、抗体が体C1qを結合することができないこと、したがって、CDC活性を欠いていることを確認するために行うことができる。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号のC1qおよびC3c結合ELISAを参照。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行うことができる(例えば、Gazzano-Santoro 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)。FcRn結合、及びインビボでのクリアランス/半減期の測定ではまた、当該分野で公知の方法を用いて行うことができる(例えば、Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)を参照)。

20

30

40

【0161】

1つの受容されるインビトロADCCアッセイは以下の通りである。

- 1) このアッセイは、抗体の抗原結合領域によって認識される標的抗原を発現することが知られている標的細胞を使用する;
- 2) このアッセイは、エフェクター細胞として、ランダムに選択された健常ドナーの血液から単離されたヒト末梢血単球細胞(PBMC)を使用する;
- 3) このアッセイは以下のプロトコールに従って使用される。

50

i) P B M C を、標準的な密度遠心分離手順を使用して単離し、R P M I 細胞培養培地中、 5×10^6 細胞 / m l で懸濁する；

i i) 標的細胞を、標準的な培養方法によって増殖させ、90% よりも高い生存度を有する指数増殖期から収集し、R P M I 細胞培養培地中で洗浄し、100 マイクロキュリーの ^{51}Cr で標識し、細胞培養培地で2回洗浄し、そして105 細胞 / m l の密度で細胞培養培地中に再懸濁する；

i i i) 100 マイクロリットルの上記の最終的な標的細胞懸濁物を、96 ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに移す；

i v) 抗体を、細胞培養培地中で4000 ng / m l から0.04 ng / m l まで段階希釈し、得られる抗体溶液の50 マイクロリットルを96 ウェルマイクロタイタープレート中の標的細胞に加えて、上記の全体の濃度範囲を網羅する種々な抗体濃度を3通りで試験する；

v) 最大放出 (M R) コントロールのために、標識された標的細胞を含む、プレート中の3つのさらなるウェルは、抗体溶液 (上記の要点 i v) の代わりに、50 マイクロリットルの2% (V / V) 非イオン性界面活性剤 (Nonidet, Sigma, St. Louis) の水溶液を受容する；

v i) 自発性放出 (S R) コントロールのために、標識された標的細胞を含む、プレート中の3つのさらなるウェルに、抗体溶液 (上記の要点 i v) の代わりに、50 マイクロリットルの R P M I 細胞培養培地を受容する；

v i i) 次に、96 ウェルマイクロタイタープレートを、 $50 \times g$ で1分間遠心分離し、そして1時間4 でインキュベートする；

v i i i) 50 マイクロリットルの P B M C 懸濁液 (上記の要点 i) を各ウェルに加えて25 : 1 のエフェクター : 標的細胞比を生じ、そしてプレートをインキュベーター中、5% のCO₂ 大気、37 下に4時間配置する；

i x) 各ウェルからの無細胞上清を収集し、実験的に放出された放射能 (E R) をガンマカウンターを使用して定量する；

x) 特異的溶解のパーセンテージを、計算式 $(E R - M R) / (M R - S R) \times 100$ に従って各抗体濃度について計算し、ここで、E R は抗体濃度について定量された平均放射能 (上記の要点 i x を参照のこと) であり、M R はM R コントロール (上記の要点 v を参照のこと) についての定量された平均放射能 (上記の要点 i x を参照のこと) であり、そしてS R はS R コントロール (上記の要点 v i を参照のこと) についての定量された平均放射能 (上記の要点 i x を参照のこと) である；

4) 「A D C C の増加」は、上記の試験された抗体濃度範囲内で観察される特異的溶解の最大パーセンテージの増加、及び / 又は上記の試験された抗体濃度範囲内で観察される特異的溶解の最大パーセンテージの半分を達成するために必要とされる抗体の濃度の減少のいずれかとして定義される。A D C C の増加は、上記のアッセイを用いて測定される、当業者に公知である同じ標準的な産生、精製、製剤、及び保存の方法を使用して、同じ型の宿主細胞によって産生される、同じ型の抗体によって媒介されるA D C C に比例するが、これは、G n T I I I を過剰発現するように操作された宿主細胞によって産生されなかった。

【0162】

エフェクター機能が減少した抗体は、F c 領域の残基238、265、269、270、297、327、329の一つ以上の置換を有するものが含まれる (米国特許第6737056号)。そのようなF c 変異体は、残基265及び297のアラニンへの置換を有する、いわゆる「D A N A」F c 変異体を含む、アミノ酸位置265、269、270、297及び327の2以上での置換を有するF c 変異体を含む (米国特許第7,332,581号)。

【0163】

F c R への結合を改善又は減少させた特定の抗体変異体が記載されている。(例えば、米国特許第6,737,056号；国際公開第2004/056312号、及びShields

10

20

30

40

50

et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照)。

【0164】

所定の実施態様において、抗体変異体はA D C Cを改善する1つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、F c領域の位置298、333、及び/又は334における置換(E Uの残基番号付け)を含む。

【0165】

幾つかの実施態様において、改変された(すなわち改善されたか減少した)C1q結合及び/又は補体依存性細胞傷害(CDC)を生じる、F c領域における改変がなされ、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開第99/51642号、及びIdusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)に説明される。

10

【0166】

増加した半減期を持ち、胎仔への母性IgGの移送を担う、新生児Fc受容体(FcRn)への結合が改善された抗体(Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))が、米国特許出願公開第2005/0014934A1号(Hinton et al.)に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域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。このようなFc変異体は、Fc領域の残基の1以上の置換を有するものが含まれる: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434、例えば、Fc領域の残基434の置換(米国特許第7,371,826号)。

20

【0167】

Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); 米国特許第5,648,260号; 米国特許第5,624,821号; 及び、Fc領域の変異体の他の例に関しては国際公開第94/29351号も参照のこと。

【0168】

d) システイン改変抗体変異体

ある実施態様において、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作抗体、例えば、「thioMabs」を作成することが望まれ得る。特定の実施態様において、置換された残基は、抗体のアクセス可能な部位で生じる。それらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、それによって抗体のアクセス可能な部位に配置され、本明細書中でさらに記載されるように、イムノコンジュゲートを作成するために、例えば薬物部分またはリンカー-薬剤部分などの他の部分に抗体をコンジュゲートするために使用することができる。ある実施態様において、一以上の以下の残基がシステインで置換され得る: 軽鎖のV205(Kabatの番号付け); 重鎖のA118(EU番号付け); 及び重鎖Fc領域のS400(EU番号付け)。システイン改変抗体は、例えば、米国特許第7521541号に記載のように生成され得る。

30

【0169】

e) 抗体誘導体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、当技術分野で知られ、容易に入手される追加の非タンパク質部分を含むように更に改変することができる。抗体の誘導体化に適した部分としては、限定されないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例は、限定されないが、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の共重合体、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-トリオキソラン、エチレン/無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸(単独重合体又はランダム共重合体の何れか)及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコール単独重合体、プロピレンオキシド/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及びこれらの混合物を包含する。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドはその水中での安定性に起因して製造における利点を有し得る。ポリマーは何れか

40

50

の分子量のものであってよく、そして分枝鎖又は未分枝鎖であってよい。抗体に結合するポリマーの数は変動してよく、そして、一以上の重合体が結合する場合は、それらは同じか又は異なる分子であってよい。一般的に、誘導体化に使用するポリマーの数及び/又は種類は、限定されないが、向上させるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が限定された条件下で治療に使用されるのか等を含む考慮に基づいて決定することができる。別の実施態様において、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る抗体と非タンパク質部分とのコンジュゲートが提供される。一実施態様において、非タンパク質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、任意の波長であって良いが、限定されないものの、通常の細胞に害を与えないが、抗体 - 非タンパク質部分の近位細胞が死滅される温度に非タンパク質部分を加熱する波長が含まれる。

10

【0170】

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号で説明したように、組換えの方法および組成物を用いて製造することができる。一実施態様において、本明細書に記載される抗MCS P抗体をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列、及び/又は抗体のVHを含むアミノ酸配列(例えば、抗体の軽鎖及び/又は重鎖)をコードし得る。更なる実施態様において、そのような核酸を含む1つ以上のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。更なる実施態様において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。一実施態様において、宿主細胞は以下を含む(例えば、以下で形質転換される): (1) 抗体のVLを含むアミノ酸配列、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は(2) 抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一ベクター、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二ベクター。一実施態様において、宿主細胞は、真核生物、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、NS0、Sp20細胞)である。一実施態様において、抗MCS P抗体を作る方法が提供され、その方法は、上記のように、抗体の発現に適した条件下で、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含み、および必要に応じて、宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から抗体を回収することを含む。

20

【0171】

抗MCS P抗体の組換え生産のために、例えば上述したように、抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内での更なるクローニング及び/又は発現のために1つ以上のベクターに挿入される。このような核酸は、容易に単離され、従来の手順を用いて(例えば、抗体の重鎖と軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合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って)配列決定することができる。

30

【0172】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適切な宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞を含む。例えば、特に、グリコシル化およびFcエフェクター機能が必要ない場合には、抗体は、細菌で産生することができる。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、第5,789,199号及び第5,840,523号を参照。(また、大腸菌における抗体の発現を説明している、Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照)。発現の後、抗体は可溶性画分において細菌の細胞ペーストから単離され得、更に精製することができる。

40

【0173】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、菌類や酵母菌株を含む抗体をコードするベクターのための、適切なクローニング宿主又は発現宿主であり、そのグリコシル化経路が、「ヒト化」されており、部分的または完全なヒトのグリコシル化パターンを有する抗体の生成をもたらす。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)、及びLi et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)を参照。

50

【0174】

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物と脊椎動物）から派生している。無脊椎動物細胞の例としては、植物および昆虫細胞が挙げられる。多数のパキウウイルス株が同定され、これらは特に *Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用することができる。

【0175】

植物細胞培養を宿主として利用することができる。例えば、米国特許第 5 9 5 9 1 7 7 号、第 6 0 4 0 4 9 8 号、第 6 4 2 0 5 4 8 号、第 7 1 2 5 9 7 8 号及び第 6 4 1 7 4 2 9 号（トランスジェニック植物における抗体産生に関する *PLANTIBODIESTM* 技術を記載）を参照。

10

【0176】

脊椎動物細胞もまた宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適応された哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40 (COS-7) で形質転換されたサル腎臓 CV1 株、ヒト胚腎臓株 (Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977) に記載された 293 細胞又は 293 細胞、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、マウスのセルトリ細胞 (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 (BRL 3A)、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、および FS4 細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHFR-CHO 細胞 (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)) を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、及び Y0、NS0 および Sp2/0 などの骨髄腫細胞株を含む。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞系の総説については、例えば、Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) を参照。

20

【0177】

C. アッセイ

本明細書で提供される抗 MCS P 抗体は、同定され、当技術分野で公知の様々なアッセイによってその物理的 / 化学的性質及び / 又は生物学的活性についてスクリーニングされ、または特徴づけることができる。

30

【0178】

1. 結合アッセイとその他のアッセイ

一態様において、本発明の抗体は、例えば ELISA、ウエスタンブロット法など公知の方法により、その抗原結合活性について試験される。

【0179】

別の態様において、競合アッセイを、MCS P に対する結合について本明細書に記載される抗 MCS P 抗体と競合する抗体を同定するために用いることができる。ある実施態様では、このような競合する抗体は、本明細書に記載される抗 MCS P 抗体によって結合される同じエピトープ（例えば線状又はコンホメーションエピトープ）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典型的な方法が、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) に提供されている。

40

【0180】

典型的な競合アッセイにおいて、固定化 MCS P は、MCS P に結合する第一の標識された抗体、及び MCS P へ結合について第一の抗体と競合する能力について試験された未標識の第二の抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第二抗体はハイブリドーマ上清中に存在してもよい。コントロールとして、固定化 MCS P が、第二の未標識の抗体でなく、第一の標識された抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第一の抗体の MCS P

50

への結合を許容する条件下でインキュベートした後、過剰の未結合の抗体が除去され、固定化されたM C S Pに結合した標識の量が測定される。もし、固定化M C S Pに結合した標識の量が、コントロールサンプルと比較して試験サンプル中で実質的に減少している場合、それは、第二抗体が、M C S Pへの結合に対して、第一の抗体と競合していることを示している。Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照。

【0181】

2. 活性のアッセイ

一態様において、アッセイは、生物学的活性を有するそれらの抗M C S P抗体を同定するために与えられる。インビボ及び/又はインビトロでこのような生物学的活性を有する抗体もまた提供される。

10

【0182】

所定の実施態様において、本発明の抗体は、そのような生物学的活性について試験される。

【0183】

D. イムノコンジュゲート

本発明はまた、化学療法剤又は薬物、成長抑制剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素活性毒素、又はそれらの断片）、又は放射性同位元素など、1つ以上の細胞傷害性薬物にコンジュゲートした本明細書中の抗M C S P抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

20

【0184】

一実施態様において、イムノコンジュゲートは、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)であって、そこでは抗体は、限定されないが、メイタンシノイド(米国特許第5208020号、第5416064号及び欧州特許EP0425235B1を参照);モノメチルアウリスタチン薬物部分DE及びDF(MMAE及びMMAF)(米国特許第5635483号及び5780588号及び7498298号を参照)などのアウリスタチン;ドラスタチン、カリケアマイシン又はその誘導体(米国特許第5712374号、5714586号、5739116号、5767285号、5770701号、5770710号、5773001号、及び5877296号を参照;Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993);及びLode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998));ダウノマイシン又はドキソルピシンなどのアントラサイクリン(Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002);及び米国特許第6,630,579号を参照);メトトレキサート、ビンデシン、ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセルなどのタキサン、トリコテセン、及びCC1065を含む一つ以上の薬物とコンジュゲートしている。

30

【0185】

その他の実施態様において、イムノコンジュゲートは、酵素的に活性な毒素又はその断片にコンジュゲートした、本明細書に記載の抗体を含み、限定されないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(*Phytolaca americana*)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(*Momordica charantia*)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(*Saponaria officinalis*)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。

40

50

【0186】

その他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、放射性コンジュゲートを形成するために放射性原子にコンジュゲートした本明細書に記載されるような抗体を含む。様々な放射性同位体が放射性コンジュゲートの生産のために入手可能である。例としては、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及び Lu の放射性同位体を含む。検出のために放射性コンジュゲートを使用するとき、それはシンチグラフィ試験のための放射性原子、例えば Tc^{99m} 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴 (NMR) 画像化 (磁気共鳴画像化 $mr i$ としても知られている) のためのスピン標識、例えば再び、ヨウ素 - 123、ヨウ素 - 131、インジウム - 111、フッ素 - 19、炭素 - 13、窒素 - 15、酸素 - 17、ガドリニウム、マンガ

10

【0187】

抗体と細胞傷害性薬物のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、 N -スクシンイミジル 3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート (SPDP)、スクシンイミジル 4-(N -マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの 2 官能性誘導体 (例えばジメチルアジピミデート HCl)、活性エステル (例えばジスクシンイミジルズベレート)、アルデヒド (例えばグルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物 (例えばビス(p -アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体 (例えばビス(p -ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えばトルエン 2, 6-ジイソシアネート) 及びビス活性フッ素化合物 (例えば 1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン) など、を使って作成され得る。Vitetta et al., Science 238:1098 (1987) に記載されるように、例えば、リシンイムノトキシンを調製することができる。カーボン-14-標識 1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションのためのキレート剤の例である国際公開第 94/11026 号を参照。リンカーは、細胞中に細胞毒性薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光解離性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); 米国特許第 5, 208, 020 号) が使用され得る。

20

30

【0188】

本明細書において、イムノコンジュゲート又は ADC は、限定されないが、市販の (例えば Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A からの)、BMP5、EMCS、GMB5、HBVS、LC-SMCC、MBSMPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMB5、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMPB、及びスルホ-SMPB、SVSB (スクシンイミジル (4-ビニルスルホン) ベンゾエート) を含むクロスリンカー試薬を用いて調製されるコンジュゲートを明示的に意図する。

【0189】

E. 診断及び検出のための方法および組成物

40

ある実施態様において、本明細書で提供される抗 MCS P 抗体の何れかは、生物学的サンプル中の MCS P の存在を検出するのに有用である。特に、LC007 抗体はウエスタンブロット並びに新鮮凍結し、固定された組織上で MCS P を認識することが決定され、この抗体及び LC007 と同じエピトープを認識するその変異体は、MCS P の存在を検出するための種々の技術に適した抗体であることを示している。本明細書で使用する「検出する」という用語は、定量的又は定性的検出を包含する。

【0190】

一実施態様において、診断又は検出の方法に使用される抗 MCS P 抗体が提供される。更なる態様において、生物学的サンプル中の MCS P の存在を検出する方法が提供される。所定の実施態様において、本方法は、抗 MCS P 抗体の MCS P への結合を許容する条

50

件下で、本明細書に記載のように抗MCS P抗体と生物学的サンプルを接触させること、及び複合体が抗MCS P抗体とMCS Pとの間に形成されているかどうかを検出することを含む。そのような方法は、インビトロ又はインビボでの方法であり得る。一実施態様において、本方法は、免疫組織化学(IHC)に基づくアッセイである。MCS PのIHCアッセイは、一般に、抗MCS P抗体のMCS Pへの結合を許容する条件下で、抗MCS P抗体と組織サンプルを接触させること、及び複合体が抗MCS P抗体とMCS Pとの間に形成されているかどうかを検出することを含む。MCS P抗体-抗原複合体の有無は、蛍光、イムノゴールド、又は酵素媒介染色法を含む当技術分野で公知の任意の免疫検出法により、検出することができる。分析は、新鮮な組織サンプル、又は凍結若しくは固定された(例えば、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織(FFPET)サンプルについて実施することができる。例えば、Miller et al., Fixation and epitope retrieval in diagnostic immunohistochemistry: a concise review with practical considerations. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. (2000) 8(3): 228-235を参照。

10

【0191】

一実施態様において、例えばMCS Pが患者の選択のためのバイオマーカーであるなど、抗MCS P抗体が抗MCS P抗体による治療に好適な被検体を選択するために使用される。

本発明の抗体を用いて診断することができる例示的な疾患は、細胞増殖性疾患又は血管新生障害を含む、MCS Pの発現によって特徴付けられる障害を含む。一実施態様において、障害は、例えば皮膚癌(メラノーマ及び基底細胞癌を含む)、神経膠腫(神経膠芽腫を含む)、骨癌(骨肉腫など)、及び白血病(ALL及びAMLを含む)などの癌である。

20

【0192】

ある実施態様において、標識された抗MCS P抗体が提供される。標識は、限定されるものではないが、(例えば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、放射性標識など)直接検出される標識又は部分、並びに、例えば、酵素反応又は分子間相互作用を介して間接的に検出される酵素又はリガンドのような部分が含まれる。典型的な標識は、限定されないが、ラジオアイソトープ³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I、フルオロフォア、例えば希土類キレート又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、ルシェフェラーゼ、例えばホタルルシェフェラーゼ及び細菌ルシェフェラーゼ(米国特許第4737456号)、ルシェフェリン、2,3-ジヒドロフタルジネジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、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、ヘテロサイクリックオキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、色素前駆体を酸化する過酸化水素を利用する酵素、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、又はマイクロペルオキシダーゼと共役したもの、ピオチン/アビジン、スピンラベル、バクテリオファージラベル、安定な遊離ラジカルなどが含まれる。

30

【0193】

F. 薬学的製剤

本明細書に記載の抗MCS P抗体の薬学的製剤は、所望の程度の純度を有するその抗体と任意の薬学的に許容される担体(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.: Williams and Wilkins PA, USA (1980))とを、凍結乾燥製剤または水性溶液の形態で混合することによって調製される。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量および濃度でレシピエントに毒性でなく、そしてこれには、限定しないが、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸のような緩衝液; アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤; 防腐剤(例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド; ヘキサメチルベンジルクロライド; 塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール; アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン; カテコール; レゾルシノール; シクロヘキサノール; 3-ペンタノール; お

40

50

よび m - クレゾール) ; 低分子量 (約 10 残基未満) ポリペプチド ; タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン ; 親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン ; アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン ; マンノサッカライド、ジサッカライド、およびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物 ; キレート剤、例えば、EDTA ; 糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール ; 塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体 (例えば、Zn - タンパク質錯体) ; 及び / 又はポリエチレングリコール (PEG) 等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。本明細書における典型的な薬学的に許容される担体は、介在性薬物分散剤、例えば、水溶性の中性アクティブヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (s H A S E G P)、例えば、r H u P H 2 0 (H Y L E N E X (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を更に含む。所定の典型的な s H A S E G P 及び使用法は、r H u P H 2 0 を含み、米国特許出願公開第 2005 / 0260186 号及び第 2006 / 0104968 に開示されている。一態様において、s H A S E G P は、コンドロイチナーゼなどの 1 つまたは複数の追加のグルコサミノグリカンと組み合わせられる。

10

【0194】

典型的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第 6267958 号に記載されている。水性の抗体製剤は、米国特許第 6171586 号及び国際公開第 2006 / 044908 号に記載されているものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン - 酢酸緩衝液を含む。

20

【0195】

本明細書の製剤はまた、治療を受けている特定の徴候のために必要な一以上の活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものが含まれる場合がある。このような活性成分は、意図した目的のために有効な量で組み合わせられ適切に存在する。

【0196】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合法によって、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン - マイクロカプセル及びポリ (メチルメタクリレート (methylmethacrylate)) マイクロカプセル) により、コロイド薬物送達系で (例えばリポソーム、アルブミンミクロスフィア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル) 又はマクロ・エマルジョンで調製されたマイクロカプセルに封入されてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示される。

30

【0197】

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスが成形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形をしている。

【0198】

インビボ投与に使用される製剤は、一般的に無菌である。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜を通して濾過することにより、達成することができる。

【0199】

G . 治療方法及び組成物

40

本明細書で提供される抗 M C S P 抗体のいずれかを、治療方法で使用することができる。

【0200】

一態様では、医薬として使用するための抗 M C S P 抗体が提供される。更なる態様では、癌の治療に使用するための抗 M C S P 抗体が提供される。ある実施態様において、治療の方法に使用される抗 M C S P 抗体が提供される。所定の実施態様において、本発明は、個体に抗 M C S P 抗体の有効量を投与することを含む、癌を有する個体を治療する方法における使用のための抗 M C S P 抗体を提供する。一つのそのような実施態様において、本方法は、例えば後述するように、少なくとも 1 つの追加の治療薬の有効量を個体に投与することを更に含む。更なる実施態様において、本発明は、メラノーマの治療に使用するた

50

めの抗MCS P抗体を提供する。上記実施態様のいずれかに記載の「個体」は、好ましくはヒトである。

【0201】

更なる態様にて、本発明は、医薬の製造又は調製における抗MCS P抗体の使用を提供する。一実施態様において、本医薬は癌の治療のためのものである。更なる実施態様において、本医薬は、癌を有する個体に、医薬の有効量を投与することを含む、癌を治療する方法で使用するためのものである。一つのそのような実施態様において、本方法は、例えば後述するように、少なくとも1つの追加の治療薬の有効量を個体に投与することを更に含む。上記実施態様の何れかに記載の「個体」は、ヒトであり得る。

【0202】

更なる態様にて、本発明は、癌を治療する方法を提供する。一実施態様において、本方法は、そうした癌を有する個体に、抗MCS P抗体の有効量を投与することを含む。一つのそのような実施態様において、この方法は、後述するように、少なくとも1つのさらなる治療剤の有効量を個体に投与することを更に含む。上記実施態様の何れかに記載の「個体」は、ヒトであり得る。

【0203】

一実施態様において、上記態様において、癌は、その構成細胞の表面上にMCS Pを発現する。一実施態様において、上記の態様の癌は、例えば皮膚癌（メラノーマ及び基底細胞癌を含む）、神経膠腫（神経膠芽腫を含む）、骨癌（骨肉腫など）、及び白血病（ALL及びAMLを含む）の中から選択される。一実施態様において、上記の態様にある癌はメラノーマである。

【0204】

更なる態様において、本発明は、例えば、上記の治療法のいずれかに使用される、本明細書で提供される抗MCS P抗体のいずれかを含む薬学的製剤を提供する。一実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗MCS P抗体のいずれか、及び薬学的に許容される担体を含む。その他の実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗MCS P抗体のいずれかと、少なくとも1つの更なる治療剤を、例えば後述するように含む。

【0205】

本発明の抗体は、治療において、単独で、または他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体は少なくとも1つの更なる治療剤と同時投与され得る。

【0206】

上記のこうした併用療法は、併用投与（2つ以上の治療剤が、同一または別々の製剤に含まれている）、及び、本発明の抗体の投与が、追加の治療剤及び/又はアジュバントの投与の前、同時、及び/又はその後起きうる分離投与を包含する。本発明の抗体はまた放射線治療と併用して用いることができる。

【0207】

本発明の抗体（および任意の追加の治療剤）は、任意の適切な手段によって投与することができ、経口、肺内、および鼻腔内、及び局所治療が所望される場合、病巣内投与が含まれる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が含まれる。投薬は、その投与が短期間か又は長期であるかどうか部分的に依存し、任意の適切な経路、例えば、静脈内または皮下注射などの注射により行うことができる。限定するものではないが、単回又は様々な時間点にわたる複数回投与、ボラス投与、及びパルス注入を含む様々な投与スケジュールが、ここで考えられる。

【0208】

本発明の抗体は良好な医療行為に合致した方法で処方され、投与され、投薬される。この観点において考慮すべき要因は、治療すべき特定の障害、治療すべき特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与日程及び医療従事者が知る他の要因を包含する。抗体は、必要ではないが任意で、問題となる障害の予防又は治

10

20

30

40

50

療のために、現在使用中の一又は複数の薬剤とともに処方される。そのような他の薬剤の有効量は製剤中に存在する抗体の量、障害又は治療の種類及び上記した他の要因に依存する。これらは一般的には本明細書に記載されるのと同じ用量及び投与経路において、又は、本明細書に記載された用量の1%から99%で、又は経験的に/臨床的に妥当であると決定された任意の用量及び任意の経路により使用される。

【0209】

疾患の予防又は治療のためには、本発明の抗体の適切な用量（単独で使用されるか、又は、一以上の更なる治療的薬剤との組み合わせられる場合）は治療すべき疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体を予防又は治療目的のいずれにおいて投与するか、以前の治療、患者の臨床的履歴及び抗体に対する応答性、及び担当医の判断に依存する。抗体は、患者に対して、単回、又は一連の治療にわたって適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一回以上の別個の投与によるか、連続注入によるかに関わらず、抗体約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば $0.1\text{mg}/\text{kg}$ から $10\text{mg}/\text{kg}$ ）が患者への投与のための初期候補用量となり得る。1つの典型的な一日あたり用量は上記した要因に応じて約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上の範囲である。数日間以上にわたる反復投与の場合には、状態に応じて、治療は疾患症状の望まれる抑制が起こるまで持続するであろう。1つの例示される抗体用量は約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ から約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲である。従って、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 又は $10\text{mg}/\text{kg}$ の1つ以上の用量（又はこれらの何れかの組み合わせ）を患者に投与してよい。このような用量は断続的に、例えば毎週又は3週毎（例えば患者が約2から約20、例えば抗体の約6投与量を受けるとして）投与してよい。初期の高負荷投与量の後に一以上の低投与量が投与され得る。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターされる。

【0210】

上記の製剤または治療方法のいずれかが、抗MCS P抗体の代わりか又は抗MCS P抗体に加えて、本発明のイムノコンジュゲートを用いて行うことができることが理解される。

【0211】

H. 製造品

本発明の他の実施態様において、上述した障害の治療、予防、及び/又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。製造品は、容器とラベルまたは容器上にある又は容器に付属するパッケージ挿入物を含む。好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ、IV輸液バッグ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成されうる。容器は、疾患の治療、予防、及び/又は診断に有効である、それ自体が、又はその他の組成物と併用される化合物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針による穴あきストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも一の活性剤は本発明の抗体である。ラベルまたはパッケージ挿入物は、組成物が特定の症状の治療のために使用されることを示している。更に、製造品は、(a)組成物が本発明の抗体を包含する組成物を含む第一の容器；および(b)組成物が更なる細胞障害性又はその他の治療的薬剤を包含する組成物を含む第二の容器を含み得る。本発明の本実施態様における製造品は、組成物が特定の疾患を治療することに用いることができることを示すパッケージ挿入物をさらに含んでもよい。別法として、または加えて、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝化塩水、リンガー溶液およびデキストロス溶液を含む第二（または第三）の容器をさらに含んでもよい。これは、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジを含む、商業的およびユーザーの立場から望まれる他の物質のさらに含んでもよい。

【0212】

上記の製造品のいずれかは、抗A x 1抗体の代わりか又はそれに加えて、本発明のイムノコンジュゲートを含み得ることが理解される。

【実施例】

【0213】

以下は本発明の方法および組成物の例である。上記提供される一般的な説明を前提として、他の様々な実施態様が実施され得ることが理解される。

【0214】

例1 - 抗MCS P抗体の産生

免疫化及びハイブリドーマの生成

Balb/cマウスを、KLH (SVPE AARTEAGKPE SSTPTGEPG PMASSPEPAVA KGGFLSFLLEAN (配列番号2)) に結合したヒトのMCS P配列の2177 - 2221に対応する合成ペプチドで、4回、4週間毎に腹腔内に免疫し、続いてMCS Pを発現するColo38細胞(Giacomini P, Natali P, Ferrone S J Immunol. 1985 Jul;135(1):696-702)で2回の免疫化を行った。初回免疫は完全アジュバント中で行い、全て不完全アジュバント中での追加免疫が続いた。

10

【0215】

血清試験採血を採取し、ビオチンに結合されたMCS Pペプチドaa2177 - 2221を使用して最大半量の血清力価を測定し、ストレプトアビジンELISAマイクロタイタープレート上にコーティングした。最大半量の力価が1:50,000であるマウスが静脈内追加免疫のために選択された。融合前に第4日で静脈内追加免疫がMCS Pペプチド20µg及びColo38細胞を用いて実施された。静脈内追加免疫後3日間、脾臓細胞を回収し、Ag8ミエローマ細胞と融合させた。

20

【0216】

スクリーニング及びハイブリドーマの特性評価

MCS P特異的抗体のスクリーニングは、ストレプトアビジンマイクロタイタープレート上にコーティングしたMCS P - ビオチンペプチドのアミノ酸2177から2221 (配列番号2) に結合する抗体を同定することによって開始された。MCS P固定化ペプチドに結合する陽性クローンを、無血清培地中で増殖させた(Hyclone ADCF-Mab -Thermo Scientific、カタログ番号SH30349.02)。

【0217】

MCS Pの天然型への結合は、ヒトのMCS Pを高レベルで過剰発現するColo38細胞上でFACS分析により行った。MCS Pの検出可能なレベルを発現しない前立腺癌PC3系列を陰性対照として使用した。リード抗体の特異性を更に特徴付けるために、二重免疫細胞化学分析を、キメラリード抗体(ヒトFcを発現する)と組み合わせた二重染色のために市販の樹立された抗MCS P抗体(インビトロジェン、カタログ番号41-2000、クローンLHM2)を用いてColo38細胞で行った。免疫蛍光標識によって示されるように、一抗体、LC007は、Colo38細胞の表面MCS Pを強く染色したが、PC3細胞上では陰性であった。

30

【0218】

実施例2: キメラ化

mRNAは、抗体クローンLC007を発現するハイブリドーマ細胞株から単離され、商業的に入手可能なキットを用いてcDNAに変換した。重鎖(配列番号39)及び軽鎖(配列番号38)のcDNAの単離体を配列決定し、各セグメントは、ヒトIgG1およびの定常領域に融合させた。

40

【0219】

配列は、HEK-EBNA細胞において、ヒト免疫グロブリンのシグナルペプチドを用いて発現させ、従来のプロテインA及びサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いて精製した。

【0220】

結合活性は以下の方法により決定した。標的細胞を、細胞解離緩衝液を用いて培養フラスコから剥離し、計数して生存能力をチェックした。細胞を再懸濁させ、PBS-0.1%BSA中で 1.111×10^6 (生存)細胞/mlに調整した。この懸濁液の180µ

50

1を丸底96ウェルプレート中の各ウェルに移し(200,000細胞/ウェル)、400gで、4分間遠心分離し、再懸濁した。PBS-0.1%BSA(10 μ g/mlから0.002 μ g/ml)中の抗体希釈液20 μ lを各ウェルに加えた。試料は、400gで、4分間遠心分離し、再懸濁した。二次抗体は、FITC-コンジュゲート結合AffiniPure F(ab')₂断片ヤギ抗ヒトIgG Fc γ Fragment Specific(ジャクソン・イムノリサーチ・ラボ#109-096-098)を加え、サンプルは400gで、4分間遠心分離し、再懸濁した。蛍光は、フローサイトメーター(例えば、FACSカントII)で測定した。滴定の結果を図1及び2に示す。Morgan AC Jr, Galloway DR, Reisfeld RA. Hybridoma. 1981;1(1):27-36に記載の抗体9.2.27; GenBank受託番号:GI:20797193及びGI:20797189(それぞれ軽鎖と重鎖)を参照として使用した(図2)。ヒトメラノーマ細胞株Colo38、A2058、及びA375を使用した。Giacomini et al. 1985(Colo38について)。Marquardt H, Todaro GJ. J Biol Chem. 1982 May 10;257(9):5220-5(A2058について)。Geiser M, Schultz D, Le Cardinal A, Voshol H, Garcia-Echeverria C. Cancer Res. 1999 Feb 15;59(4):905-10(A375について)。

10

20

30

40

50

【0221】

実施例3: MCS P抗原上LC007抗体の結合エピトープの決定

LC007抗体はメラノーマ細胞に良好な結合を示したが、元の免疫原には弱い結合であった。従って、抗体LC007のエピトープマッピングを、抗原上の正確な結合部位を決定するために行った。このため、様々な数のCS PGリピートと呼ばれるヒトMCS Pの膜基部リピート領域を各々が含む、MCS P抗原の複数の切断型バージョンが生成された。Staub E., et al., FEBS Lett. 527:114-118(2002)。

【0222】

構築物1は、CS PGリピート15を含み(配列番号4)、構築物2は、CS PGリピート14-15を含み(配列番号5)、構築物3は、CS PGリピート13-15を含み(配列番号6)、及び構築物4は、CS PGリピート12-15を含んでいた(配列番号7)。図3は、MCS PのCS PGリピートを含有する構造の概略図を提供する。これらの構築物は、元の膜貫通領域を含有しており、FACSによるLC007結合の検出のためHEK-EBNA細胞上に発現された。図4は、この実験の結果を示す。MCS Pリピート15と天然膜貫通ドメインのみを含む構築物は、任意の有意な結合を示さなかった。対照的に、ドメイン14及び15を含む全ての構築物は、有意な結合を示した。このことは、結合エピトープは反復14の範囲内であるか又はリピート14が存在する場合にのみ再構成されるかの何れかであり、リピート15の一部又はCS PGリピートと膜貫通ドメイン間の構造をとらない領域も潜在的に含まれていることを示している。

【0223】

また、LC007は、ウェスタンブロット上で(変性型、線状エピトープ)並びに新鮮な凍結及び固定化組織上でMCS Pを認識すると決定された。ウェスタンブロット分析はまた、LC007は、MCS P断片及びグリコシル化変異体を認識するがMCS P陰性細胞株上のタンパク質は認識しないことを示した。このように、LC007抗体は、免疫組織化学(IHC)に基づく分析、例えば、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織(FFPET) IHC分析を含む、MCS Pの存在を検出するための様々な技術に適した抗体である。

【0224】

実施例4: ヒト及びカニクイザル抗原との交差反応性の決定

発現構築物は、カニクイザル抗原に対する交差反応性を試験するため、カニクイザルMCS Pタンパク質のC末端部分、分泌のためのシグナルペプチド及びN末端FLAG-タグ(配列番号8)を含んで生成した。このドメインは、ドメインD3と称した。Tillet, F. et. Al, J. Biol. Chem. 272: 10769-10776 (1997)。類似の構築物はヒトの対応物(配列番号9)において行われた。これら二つの構築物をコードする発現プラスミドを、HEK-EBNA細胞中に電気穿孔しし、そして発現を、抗FLAG抗体を用いて確認した

。LC007抗体の結合は、フローサイトメトリーによって試験した。図5は、抗体LC007は、カニクイザル構築物に対して対応するヒト発現構築物に対するのと類似の親和性で結合することを示す。

【0225】

実施例5：糖鎖操作LC007抗体

LC007抗体の糖鎖操作変異体は、GnT-III糖転移酵素発現ベクターと共に又はGnT-III発現ベクター+ゴルジマンノシダーゼIII発現ベクターと共に抗体発現ベクターの同時トランスフェクションによって産生された。

【0226】

例6 糖鎖操作LC007抗体のADCC

ADCCアッセイ

標的：エフェクター比が1：19で、LC007糖鎖操作抗体および対照抗体サンプルの異なる濃度の存在下での、37で16時間のインキュベーションの間の、ヒトリンパ球（エフェクター）によるColo38ヒト悪性メラノーマ細胞（標的）の溶解を蛍光色素の保持を介して測定した。Kolber et al, 1988, J. Immunol. Methods 108: 255-264。IMR-32細胞を、20分間蛍光色素カルセインAMで標識した（最終濃度3.3μM）。標識された細胞（8万細胞/ウェル）を糖鎖操作LC007抗体及び対照抗体サンプルの異なる濃度で1時間インキュベートした。次いで、単球が枯渇した単核細胞を添加し（1,500,000細胞/ウェル）、細胞混合物を5%CO₂大気中37で16時間インキュベートした。上清を捨て、細胞をHBSSで一度洗浄し、トリトンX-100（0.1%）中で溶解した。Colo38細胞中の蛍光色素の保持を蛍光光度計を用いて測定し（Perkin Elmer, Luminescence Spectrometer LS 50B（カリフォルニア州フォスターシティー）、特定の溶解を、標的の抗体への曝露の代わりに界面活性剤への曝露から生じる、全溶解対照と比較して算出した。抗体の非存在下でのシグナルを細胞毒性0%に設定した。各抗体濃度を三つ組で分析し、アッセイは別々に3回繰り返した。図6に示すように、非糖鎖操作LC007抗体（LC007wt）はADCC作用を示した。LC007糖鎖操作抗体（LC007g2）は非糖鎖操作LC007と比較してADCCの増加を示した。従って、非糖鎖操作LC007抗体それ自体は、糖鎖工学によって更に増強することができる一部のADCC活性を示す。これに対して、Buraggi G, et al. Int J Biol Markers. 1986 Jan-Apr;1(1):47-54)に記載の抗体225.28Sのヒト化バージョンである抗MCS P抗体MHLGKV9G2は、このアッセイにおいて有意なADCCの誘導を示さなかった。225.28抗体の結合エピトープは、MCS P抗原のN末端部分、又は膜遠位部分内にあると決定された。Colo38細胞上に存在しない、EGF受容体に結合する糖鎖操作GA201抗体を、対照として含めた。この抗体によるADCCの欠如は、NK細胞の活性化は、腫瘍細胞上の標的の存在を介して生じなければならないことを示している。

【0227】

図7は、糖鎖操作LC007抗体のADCCが、ヒトU86MG神経膠芽腫細胞株においても観察されることを示す。

【0228】

例7 糖鎖操作LC007抗体のヒト化

ヒト化の手順は古典的なループグラフティングの手順に従って行った(Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Nature. 1986 May 29-Jun 4;321(6069):522-5. P. Carter et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Vol. 89, pp. 4285-4289, May 1992)。簡潔には、マウス抗体のCDR（配列番号10、11、12、14、15、及び16）をヒトフレームワーク配列：軽鎖についてIMGT受託番号IGKV1D-39*01とIGKJ1、及び重鎖についてIMGT受託番号：IGHV4-31*02とIGHJ4に移植し、配列番号29のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体を生じた。

【0229】

10

20

30

40

50

抗体構築物は、標的MCS P抗原への結合親和性を保持するために最適化した。図8は、異なるヒト化変異体の結合特性を示す。ヒト残基を有する抗体構築物は抗原への結合の低下を示すことが確定したため、ヒトの残基Val71およびArg94は、それらの対応するマウスのカウンターパートであるアルギニン、アスパラギン酸によってそれぞれ置換された。図8に示すように、重鎖の位置94にArgを有する構築物M4-2 ML1 (カバット番号付け) (配列番号30 (この配列でD98Rに相当する))、及び重鎖の位置74でValを有するM4-6 ML1 (カバット番号付け) (配列番号33 (この配列でR72Vに相当する))は、MCS P抗原への結合の減少を示し、抗体の結合特異性に対するこれらの残基の関連性を示している。対応するマウスのカウンターパートであるアルギニンおよびアスパラギン酸をそれぞれを持つそれらの構築物は、結合活性を保持し、例えばそれらの抗体はM4-1 (配列番号29) 及びM4-3 (配列番号32) の重鎖構築物を有する。

10

【0230】

CDR-H1残基Asn35は、対応するヒト生殖系列のセリン残基に対して置換した。図8に示すように、この置換を含む構築物M4-7 ML1 (配列番号25) は、標的MCS P抗原への結合の減少を示し、この残基は、抗原結合力の保持に関与していることを示している。

【0231】

さらなる構築物は、抗MCS P抗体の結合特性における他の残基の関連性を示した。HVR-L1 (配列番号21) における位置7でアルギニン残基をセリンと置換すると、MCS P抗原に対する結合活性の減少をもたらした。HVR-L2 配列番号21の位置1でアスパラギン酸チロシンのアスパラギン酸との置換、及び位置2でアラニンのスレオニンとの置換もまたMCS P抗原に対する結合活性の減少をもたらした。

20

【0232】

キメラLC007及びヒト化変異体M4-3 ML2に対する一価結合親和性はピアコアアッセイを用いて決定した。簡潔には、抗体はアミンカップリングを介して化学的にCM5チップ (ピアコア) 上に固定化した (EDC-NHSにより活性化、各抗体について5000 RUの結合、エタノールアミンで失活)。MCS P D3の組換えドメインを分析物として用いた。実験は、ピアコアT100でHBS-EP+のランニングバッファ中、25、37で実施した。MCS P D3の1:2希釈系列 (50 nMから1.56 nMに至るまで) を、240秒間チップ表面上に注入し (会合)、その後300秒間ランニングバッファを注入した (解離)。表面は、注射の間に、30秒間、10 mMのグリシンpH2により再生し、センサーグラムは1:1結合モデル (RI=0及びR最大=局所) を用いて適合させ、Kdを決定した。

30

【0233】

LC007キメラ抗体のKdは、25で9.8 nM及び37で10.8 nMであると決定された。M4-3 ML2抗体のKdは、25で11.4 nM及び37で16.6 nMであると決定された。

【0234】

実施例8 糖鎖操作LC007抗体のヒト化変異体のADCC

40

糖鎖操作LC007抗体のためのヒト化変異体のADCC活性を、標的細胞としてColo38細胞を用いて乳酸デヒドロゲナーゼにより測定した。ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) をエフェクター細胞として使用し、本質的に製造業者の説明書に従ってHistopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, Mo. 63178 USA) を用いて調製した。簡単には、静脈血を健常なボランティアからヘパリン化シリンジで採取した。血液は、(Ca⁺⁺又はMg⁺⁺を含まない) PBSで1:0.75-1.3希釈してHistopaque-1077に重層した。勾配は中断することなく室温 (RT) で30分間、400 x gで遠心分離した。PBMCを含有する界面相を回収し、PBS (二つの勾配由来の細胞あたり50 ml) で洗浄し、RTで10分間300倍のgで遠心分離によって回収した。PBSでのペレットの再懸濁後、PBMCを計数し、RTで10分間、200 x gでの遠心分離によ

50

って再度洗浄した。次いで、細胞を、その後の手順に適切な培地中に再懸濁した。

【0235】

A D C C アッセイのために使用したエフェクター - 対標的の比率は、それぞれ、P B M C およびNK細胞について25 : 1及び10 : 1であった。エフェクター細胞は、丸底96ウェルプレートのウェル当たり50 μ lを追加するために適切な濃度でA I M - V培地中で調製した。標的細胞はC o l o 3 0細胞であった。標的細胞を計数し、P B S中で洗浄し、そしてマイクロウェルあたり100 μ lで30,000細胞を追加するためにミリリットルあたり0.3 \times 百万でA I M - Vに再懸濁した。抗体は、A I M - Vで希釈し、事前に蔭かれた標的細胞に50 μ l添加され、R Tで10分間標的に結合させた。次いで、エフェクター細胞を加え、プレートを5% C O 2を含む加湿大気中で37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートした。標的細胞の死滅は、細胞傷害性検出キット(ロシュ・ダイアグノスティックス、R o t k r e u z、スイス)を用いて、損傷した細胞からの乳酸脱水素酵素(L D H)放出の測定によって評価した。4時間のインキュベーション後、プレートを800 \times gで遠心分離した。各ウェルからの100 μ lの上清を、新しい透明な平底96ウェルプレートに移した。キットから100 μ lの呈色基質緩衝液を各ウェルに添加した。呈色反応のV m a xの値は、S O F T M A X P R Oソフトウェア(モレキュラーデバイス、サニーベール、カリフォルニア州94089、米国)を用いて、少なくとも10分間、490 nmでE L I S Aリーダーで測定した。自発的なL D H放出を、抗体ではなく標的とエフェクター細胞のみを含有するウェルから測定した。最大放出は標的細胞のみ及び1%トリトンX - 100を含有するウェルから決定した。特異的抗体媒介性死滅の割合は以下のように計算した： $(X - S R) / (M R - S R) \times 100$ 、ここで、特異的抗体濃度でのV m a xの平均であり、S Rは自発的放出のV m a xの平均であり、そしてM Rは最大放出のV m a xの平均である。

10

20

【0236】

図9は、このアッセイの結果を示し、ヒト化変異体は、親の糖鎖操作L C 0 0 7抗体のA D C C活性を保持していることを確認する。

【0237】

生存している標的細胞を洗浄し、実施例6に記載のアッセイを用いて0.1%トリトンX - 100を含有する5 m Mのホウ酸塩緩衝液を用いた細胞溶解後に、カルセイン測定(Wellstar Victor3 1420 Multilabel Counter)により定量した。このアッセイの結果を図10に示す。

30

【0238】

実施例9 マウス異種移植アッセイ

9.1 F c g R 3トランスジェニックS C I DマウスにおけるM V 3細胞

(チャールズリバー、リヨン、フランスから購入した)20 F c g R 3 A t g S C I Dマウスは、徹底したガイドライン(G V - S o l a s ; F e l a s a ; T i e r s c h G)に従って、12時間明るく/12時間暗いの日々のサイクルを伴ったI V C (Isolated Ventilated Cages)条件下で維持された。実験研究プロトコールは見直され、地方政府によって承認された(P 2 0 0 5 0 8 6)。到着後、動物は、観察のため新しい環境に慣れるために一週間維持された。連続的な健康モニタリングを定期的実施した。

40

【0239】

M V 3腫瘍細胞株(van Muijen GN, et al., Int J Cancer. 48(1):85-91 (1991))は5% C O 2で水飽和大気中で37 $^{\circ}$ Cで10%ウシ胎児血清(インビトロジェン、スイス)を補充したD M E M培地(G I B C O、スイス)中で日常的に培養した。培養継代は、3日ごとにトリプシン/ E D T A 1 \times (G I B C O、スイス)継代(splitting)により行った。注射の日に、腫瘍細胞は培養フラスコ(G r e i n e r B i o - O n e)からトリプシン - E D T A (G i b c o、スイス)を用いて回収し、び50 m lの培地に移し、1回洗浄し、A I M V (G i b c o、スイス)に再懸濁した。A I M Vで更に洗浄後、細胞濃度を、細胞計数器を用いて測定した。A I M V培地200 μ lの中0.2 \times 10⁶細胞を各F c g R 3 A t g S C I Dマウスの尾静脈に注射した。

50

【0240】

治療法

異種移植マウスを、各群は9匹のマウスからなる処置群またはビヒクル対照群のいずれかに割り当てた。処置群は、静脈内に、ヒト化糖鎖操作抗MCS Pモノクローナル抗体M4-3 ML2の25mg/kgを投与した。ビヒクル(溶媒)対照群は、ビヒクルのみを静脈内投与した。両群は、7日目、14日目、および21日目に3回の投与を受けた。

【0241】

統計分析は、ログランク(Mantel-Cox)検定: $p = 0.0033$ 、及びGehan-Breslow-Wilcoxon検定: $p = 0.0039$ を用いて治療法から得られたデータについて行った。

10

【0242】

結果

図11に示されるように、ヒト化糖鎖操作抗MCS P抗体は、ビヒクル対照群と比較して、このモデルにおいて生存時間を著しく増加させる。

【0243】

9.2 FcgR3トランスジェニックSCIDマウスにおけるMDA-MB-435細胞

MDA-MB435細胞は元々ATCCから入手し、増殖後Glycart内部細胞バンクに寄託された。MDA-MB435腫瘍細胞株は、5%CO₂で水飽和気中37で、10%ウシ胎児血清(インビトロジェン、スイス)及び1%のGlutamaxを補充したRPMI培地(GIBCO、スイス)中で日常的に培養した。培養継代は、3日ごとにトリプシン/EDTA1x(GIBCO、スイス)継代(splitting)により行った。

20

【0244】

(チャールズリバー、リヨン、フランスから購入した)FcgR3A tg SCIDマウスは、徹底したガイドライン(GV-Solas; Felasa; TierschG)に従って、12時間明るく/12時間暗いの日々のサイクルを伴ったIVC(Isolated Ventilated Cages)条件下で維持された。実験研究プロトコルは見直され、地方政府によって承認された(P2005086)。到着後、動物は、観察のため新しい環境に慣れるために一週間維持された。連続的な健康モニタリングを定期的実施した。

【0245】

注射の日に、腫瘍細胞は培養フラスコ(Greiner Bio-One)からトリプシン-EDTA(Gibco、スイス)を用いて回収し、び50mlの培地に移し、1回洗浄し、AIMV(Gibco、スイス)に再懸濁した。AIMVで更に洗浄後、細胞濃度を、細胞計数器を用いて測定した。AIMV培地200 μ lの中 0.2×10^6 細胞を各FcgR3A tg SCIDマウスの尾静脈に注射した。

30

【0246】

治療法

異種移植マウスを、処置群またはビヒクル対照群のいずれかに割り当てた。処置群は、キメラ糖鎖操作抗MCS Pモノクローナル抗体を静脈内に投与した。ビヒクル(溶媒)対照群は、ビヒクルのみを静脈内投与した。両群は、7日目、14日目、および21日目に3回の投与を受けた。

40

【0247】

結果

図12に示されるように、キメラ糖鎖操作抗MCS P抗体は、ビヒクル対照群と比較して、このモデルにおいて生存時間を著しく増加させる。

【0248】

9.3 FcgR3トランスジェニックSCIDマウスにおけるMDA-MB-435細胞

ヒト化抗体M4-3 ML2(配列番号32のVH及び配列番号31のVLを含む)が親のキメラ抗体LC007と比較されたことを除き、実施例9.2と同じプロトコルに従

50

った、これらの抗体の両方が糖を操作されている。

【 0 2 4 9 】

結果

図 1 3 に示されるように、親のキメラ抗体 L C 0 0 7 及びそのヒト化糖鎖操作変異体の両方とも、ビヒクル対照群と比較して、このモデルにおいて生存時間を著しく増加させる

。

表 A：配列表の説明

配列番号	説明	
配列番号 1	ヒト MCSP	
配列番号 2	MCSP ペプチド (ヒト MCSP のアミノ酸 2177-2221)	
配列番号 3	CSPG リピート 14 (ヒト MCSP のアミノ酸 1937-2043)	
配列番号 4	CSPG リピート 15 (ヒト MCSP のアミノ酸 2044-2246)	10
配列番号 5	CSPG リピート 14-15 (ヒト MCSP のアミノ酸 1937-2246)	
配列番号 6	CSPG リピート 13-15 (ヒト MCSP のアミノ酸 1828-2246)	
配列番号 7	CSPG リピート 12-15 (ヒト MCSP のアミノ酸 1702-2246)	
配列番号 8	カニクイザル MCSP の D3 ドメイン (細胞外部分)	
配列番号 9	ヒト MCSP の D3 ドメイン (細胞外部分)	
配列番号 10	LC007 キメラ抗体 HVR-L1 ML1 HVR-L1	20
配列番号 11	LC007 キメラ抗体 HVR-L2 ML1 HVR-L2 ML2 HVR-L2	
配列番号 12	LC007 キメラ抗体 HVR-L3 LC007 ヒト化抗体 ML1 HVR-L3 LC007 ヒト化抗体 ML2 HVR-L3	30
配列番号 13	LC007 ヒト化抗体 ML2 HVR-L1	
配列番号 14	LC007 キメラ抗体 HVR-H1 LC007 ヒト化抗体 M4-1 HVR-H1	
配列番号 15	LC007 キメラ抗体 HVR-H2	
配列番号 16	LC007 キメラ抗体 HVR-H3 LC007 ヒト化抗体 M4-1 HVR-H3 LC007 ヒト化抗体 M4-3 HVR-H3	40
配列番号 17	LC007 ヒト化抗体 M4-3 HVR-H1	
配列番号 18	LC007 ヒト化抗体 M4-1 HVR-H2 LC007 ヒト化抗体 M4-3 HVR-H2	

配列番号	説明	
配列番号 19	LC007 ヒト化抗体 ML3 HVR-L1	
配列番号 20	LC007 ヒト化抗体 L7A HVR-L1	
配列番号 21	LC007 ヒト化抗体 L7B HVR-L1	
配列番号 22	LC007 ヒト化抗体 ML5 HVR-L2	
配列番号 23	LC007 ヒト化抗体 L7C HVR-L2	10
配列番号 24	LC007 ヒト化抗体 L7D HVR-L2	
配列番号 25	LC007 ヒト化抗体 M4-7 HVR-H1	
配列番号 26	LC007 キメラ抗体 VL	
配列番号 27	LC007 キメラ抗体 VH	
配列番号 28	LC007 ヒト化抗体 ML1 VL	
配列番号 29	LC007 ヒト化抗体 M4-1 VH	20
配列番号 30	LC007 ヒト化抗体 M4-2 VH	
配列番号 31	LC007 ヒト化抗体 ML2 VL	
配列番号 32	LC007 ヒト化抗体 M4-3 VH	
配列番号 33	LC007 ヒト化抗体 M4-6 VH	
配列番号 34	LC007 キメラ抗体 軽鎖	
配列番号 35	LC007 キメラ抗体 重鎖	
配列番号 36	LC007 ヒト化抗体 ML2 軽鎖	30
配列番号 37	LC007 ヒト化抗体 M4-3 重鎖	
配列番号 38	LC007 マウス抗体 軽鎖 核酸配列	
配列番号 39	LC007 マウス抗体 重鎖 核酸配列	
配列番号 40	LC007 キメラ抗体 軽鎖 核酸配列	
配列番号 41	LC007 キメラ抗体 重鎖 核酸配列	
配列番号 42	LC007 ヒト化抗体 ML2 軽鎖 核酸配列	40
配列番号 43	LC007 ヒト化抗体 M4-3 重鎖 核酸配列	
配列番号 44	MCSP 膜貫通ドメイン	

【 0 2 5 0 】

前述の発明は、理解を明確にする目的のために例示および実施例によってある程度詳細に説明してきたが、説明や例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。すべての特許および本明細書に引用される科学文献の開示は、参照によりその全体が援用される。

【 図 1 】

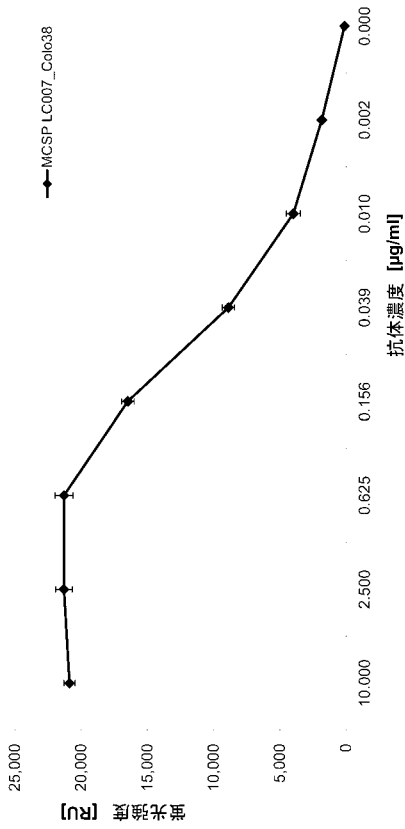


Figure 1

【 図 2 】

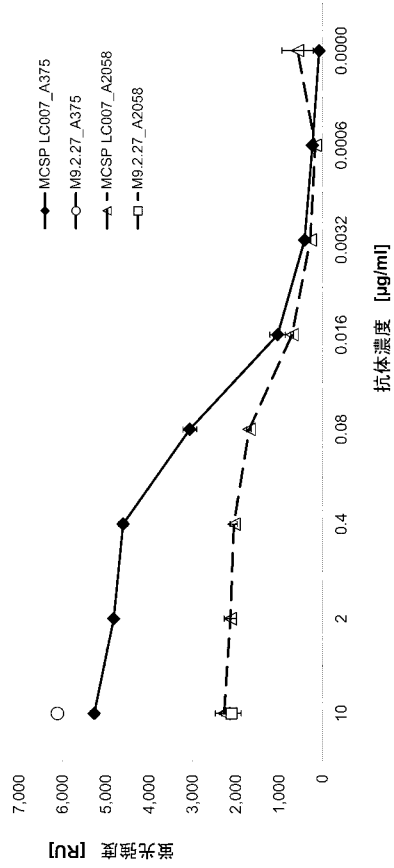


Figure 2

【 図 3 】

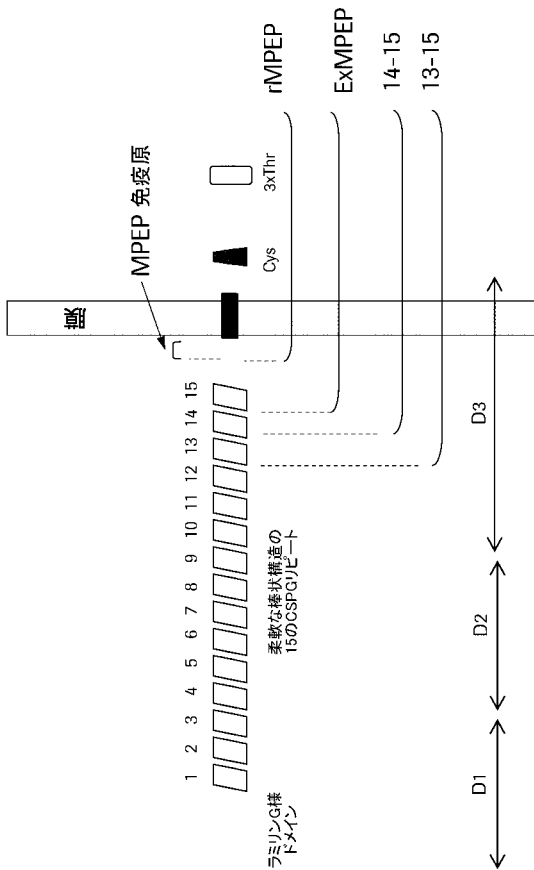


Figure 3

【 図 4 】

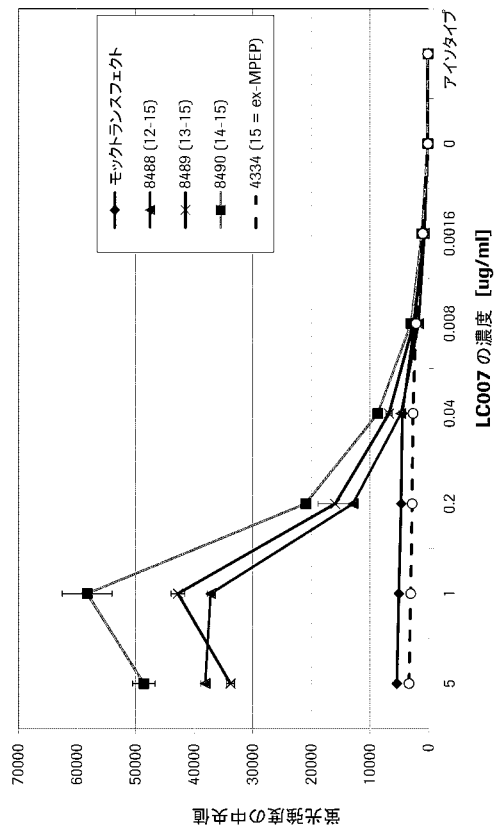


Figure 4

【 図 5 】

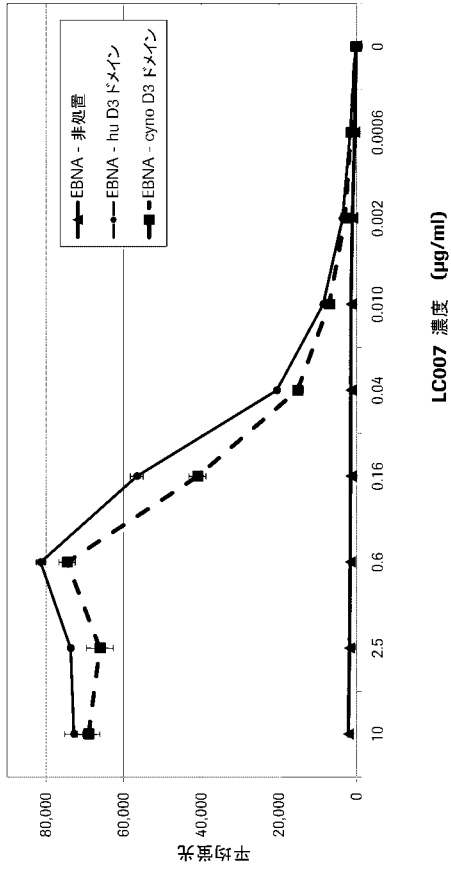


Figure 5

【 図 6 】

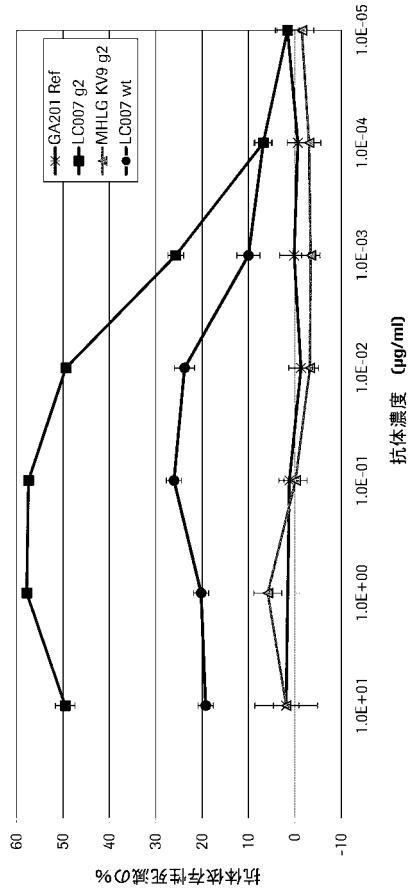


Figure 6

【 図 7 】

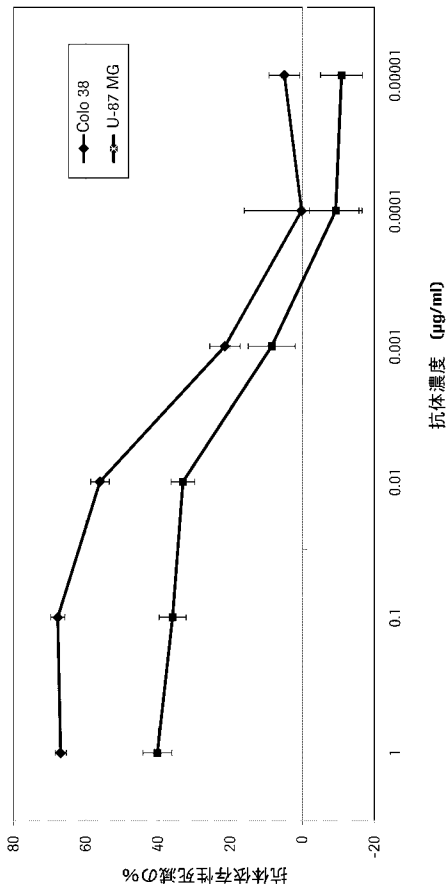


Figure 7

【 図 8 】

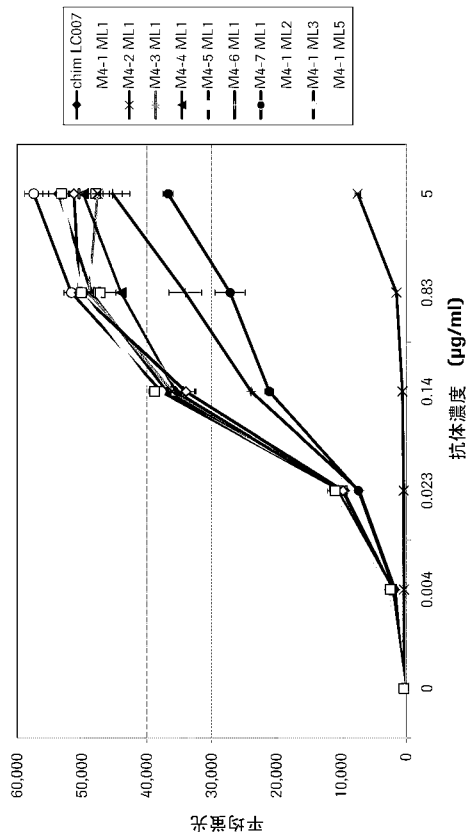


Figure 8

【 図 9 】

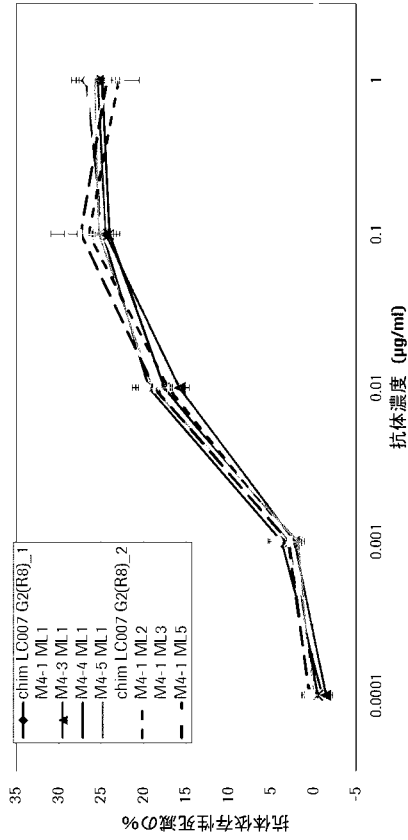


Figure 9

【 図 10 】

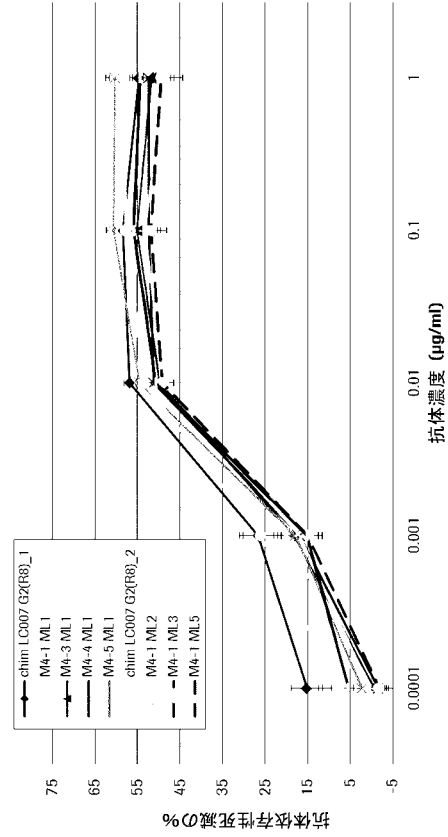


Figure 10

【 図 11 】

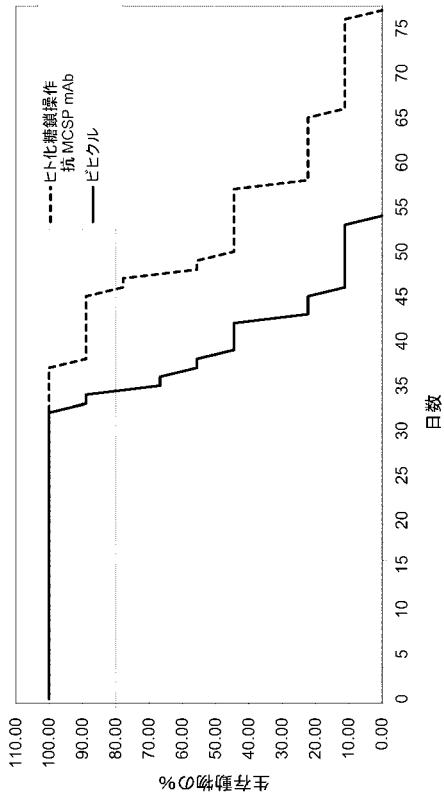


Figure 11

【 図 12 】

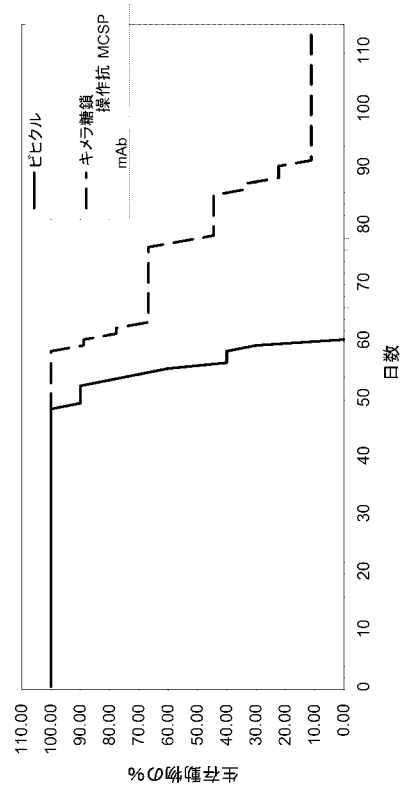


Figure 12

【 図 1 3 】

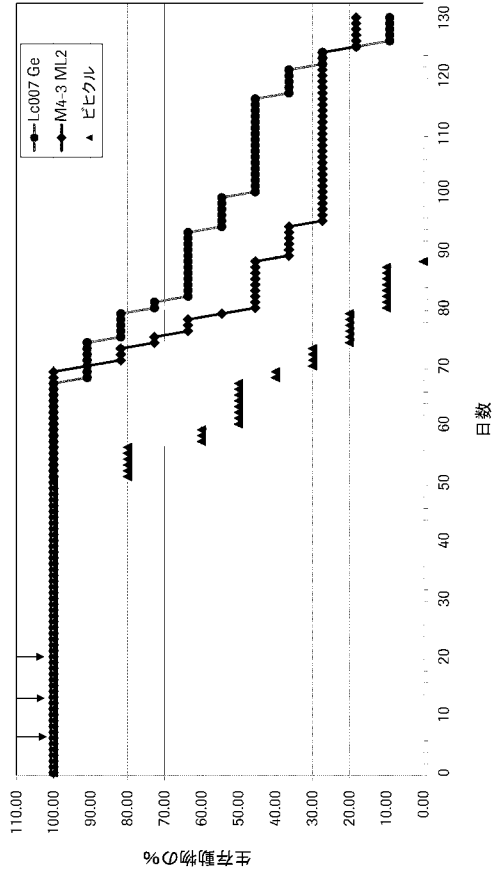


Figure 13

【 配 列 表 】

2014534806000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/066214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/18 C07K16/30 A61P35/00 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, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/030625 A2 (CELLDEX THERAPEUTICS INC [US]; KELER TIBOR [US]; VITALE LAURA A [US];) 13 March 2008 (2008-03-13) examples 1-4 -----	1-41
Y	WO 2006/032127 A1 (ARIUS RES INC [CA]) 30 March 2006 (2006-03-30) page 31, lines 21-24 pages 15-16, paragraph bridging page 17, paragraph 1 pages 4-5 page 6, paragraph 1 pages 8-9 examples 11-12 -----	1-41
Y	US 2008/095785 A2 (FERRONE SOLDANO [US]) 24 April 2008 (2008-04-24) the whole document -----	1-41
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 October 2012		15/11/2012
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 Domingues, Helena

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/066214

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/54342 A1 (UMANA PABLO [CH]; JEAN MAIRET JOEL [CH]; BAILEY JAMES E [CH]) 28 October 1999 (1999-10-28) pages 31,34-35 pages 38-39 -----	1-41
Y	WO 02/079255 A1 (IDEC PHARMA CORP [US]; REFF MITCHELL E [US]; DAVIES JULIAN [US]) 10 October 2002 (2002-10-10) pages 60-62,65 -----	1-41
Y	SHIELDS ROBERT L ET AL: "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ3 and antibody-dependent cellular toxicity", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 30, 26 July 2002 (2002-07-26), pages 26733-26740, XP002442140, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M202069200 the whole document -----	1-41
Y	BLUEMEL CLAUDIA ET AL: "Impact of binding epitope and antigen size on the cytotoxic activity of MCSP-specific BiTE antibodies for treatment of melanoma", PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 51, April 2010 (2010-04), page 1294, XP001526314, & 101ST ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; WASHINGTON, DC, USA; APRIL 17 -21, 2010 ISSN: 0197-016X the whole document -----	1-41
Y,P	MÖSSNER, EKKEHARD ET AL.: "M4-3-ML2, a novel glycoengineered humanized IgG1 antibody, targeting a membrane-proximal epitope of MCSP/CSPG4 exhibits potent ADCC induction in vitro and in vivo anti-tumoral efficacy in disseminated melanoma models", CANCER RESEARCH, vol. 72, no. 8, Suppl. 1 15 April 2012 (2012-04-15), XP002685066, Retrieved from the Internet: URL: http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/short/72/8_MeetingAbstracts/LB-236?rss=1 [retrieved on 2012-10-11] the whole document -----	1-41

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/066214

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008030625 A2	13-03-2008	US 2010303816 A1	02-12-2010
		WO 2008030625 A2	13-03-2008
WO 2006032127 A1	30-03-2006	AU 2005287814 A1	30-03-2006
		CA 2579905 A1	30-03-2006
		CN 101107267 A	16-01-2008
		EP 1799712 A1	27-06-2007
		JP 2008514550 A	08-05-2008
		US 2005063967 A1	24-03-2005
		US 2009098045 A1	16-04-2009
		WO 2006032127 A1	30-03-2006
		US 2008095785 A2	24-04-2008
US 2008214791 A1	04-09-2008		
WO 9954342 A1	28-10-1999	AT 458007 T	15-03-2010
		AU 3657899 A	08-11-1999
		DK 1071700 T3	07-06-2010
		EP 1071700 A1	31-01-2001
		EP 2180007 A2	28-04-2010
		EP 2261229 A2	15-12-2010
		ES 2340112 T3	28-05-2010
		JP 4334141 B2	30-09-2009
		JP 2002512014 A	23-04-2002
		JP 2009100748 A	14-05-2009
		PT 1071700 E	23-04-2010
		US 6602684 B1	05-08-2003
		US 2004072290 A1	15-04-2004
		US 2005074843 A1	07-04-2005
		US 2005079605 A1	14-04-2005
		US 2009304690 A1	10-12-2009
		US 2011142825 A1	16-06-2011
US 2011294984 A1	01-12-2011		
US 2012122206 A1	17-05-2012		
WO 9954342 A1	28-10-1999		
WO 02079255 A1	10-10-2002	AU 2002307037 B2	07-08-2008
		AU 2008243164 A1	04-12-2008
		CA 2442801 A1	10-10-2002
		EP 1383800 A1	28-01-2004
		JP 2005500018 A	06-01-2005
		JP 2009055913 A	19-03-2009
		NO 20034396 A	02-12-2003
		US 2003003097 A1	02-01-2003
		WO 02079255 A1	10-10-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 B	
	G 0 1 N 33/48 P	
	G 0 1 N 33/53 Y	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNIX

(72)発明者 メスナー, エッケハルト
 スイス国 ツェーハー - 8 2 8 0 クロイツリンゲン, フェルゼンブルクヴェーク 5

(72)発明者 ムンディグル, オラフ
 ドイツ国 8 2 3 6 2 ヴァイルハイム, タッシーロリング 1 6

(72)発明者 タフィン, ジェラルド
 フランス国 エフ - 6 8 1 0 0 ミュルーズ, リュ ドゥ レスト 2 4

(72)発明者 ウマーニャ, パブロ
 スイス国 ツェーハー - 8 8 3 2 ヴォルララウ, フェルゼンラインシュトラッセ 2 8

Fターム(参考) 2G045 AA26 BA14 BB24 CB02 DA44 FA16 FB03
 4B024 AA01 BA53 CA04 DA02 GA03
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CE10 CE11 DA01
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA93X AB01 AC14 BC03 BC07 BD14
 CA25
 4C085 AA13 AA14 AA16 AA33 CC22 CC23
 4H045 AA11 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2014534806A5	公开(公告)日	2015-10-08
申请号	JP2014526468	申请日	2012-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	罗切格利卡特公司		
申请(专利权)人(译)	罗氏Gurikato AG		
[标]发明人	フライタークオリビエ ジョルジュギー メスナーエツケハルト ムンディグルオラフ タフィンジェラルド ウマーニャパブロ		
发明人	フライターク, オリビエ ジョルジュ, ギー メスナー, エツケハルト ムンディグル, オラフ タフィン, ジェラルド ウマーニャ, パブロ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/30 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/18 C07K16/3053 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/41 C07K2317/732 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/30 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395. D A61K39/395.N A61K39/395.Y A61P35/00 A61P35/02 G01N33/574.B G01N33/48.P G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CB02 2G045/DA44 2G045/FA16 2G045/FB03 4B024 /AA01 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/CE11 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065 /BD14 4B065/CA25 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA33 4C085/CC22 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
优先权	2011178393 2011-08-23 EP		
其他公开文献	JP2014534806A		

摘要(译)

本发明提供了抗MCSP抗体及其使用方法。

