

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-29139

(P2017-29139A)

(43) 公開日 平成29年2月9日(2017.2.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46 ZNA	4B065
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4C084
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4C085
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	4C086

審査請求 有 請求項の数 31 O L (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-146495 (P2016-146495)  
 (22) 出願日 平成28年7月26日 (2016.7.26)  
 (62) 分割の表示 特願2013-509591 (P2013-509591) の分割  
 原出願日 平成23年4月1日 (2011.4.1)  
 (31) 優先権主張番号 1053712  
 (32) 優先日 平成22年5月12日 (2010.5.12)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(71) 出願人 513186615  
 ラボラトワール フランセ ドゥ フラク  
 ションマン エ デ バイオテクノロジー  
 ズ  
 Laboratoire Francais  
 Du Fractionnement  
 Et Des Biotechnolo  
 gies  
 フランス、エフ-91940 レ イリ、  
 ゼッドア ドゥ クータブーフ、アヴェニ  
 ユー デ トロピク、3  
 3, avenue des Tropi  
 ques, ZA de Courtab  
 oeuf, F-91940 Les U  
 lis, FRANCE

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターを指向する新規な変異ヒト化12G4抗体及びそのフラグメント

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 主要な婦人科ガンの卵巣ガン治療用の対応する非変異キメラ抗体のものと少なくとも等しい親和性及びAMHR-IIレセプターに関する特異性を有し、免疫応答を誘引しない変異ヒト化12G4抗体又はそのフラグメントの提供。

【解決手段】 抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターを指向する新規な変異ヒト化12G4抗体及びそのフラグメントに関して、ヒト化抗体中に存在するアミノ酸の変異により、特にはヒト化抗体のペプチド配列を改変するがヒドロパシー指標(すなわち、疎水性及び電荷)を維持することにより、前記親和性を増大させること。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a) - アミノ酸配列が配列番号 2 又は配列番号 4 で表される可変領域、及び  
 - アミノ酸配列が配列番号 6 又は配列番号 6 と少なくとも 80% の同一性を有する配列で表される定常領域

を含んでなるか又は該両領域からなる軽鎖と、

b) - アミノ酸配列が配列番号 8 又は配列番号 10 で表される可変領域、及び  
 - アミノ酸配列が配列番号 12 又は配列番号 12 と少なくとも 80% の同一性を有する配列で表される定常領域

を含んでなるか又は該両領域からなる重鎖と

を含んでなるか又は該両鎖からなるヒト化 12G4 モノクローナル抗体であって、該抗体は変異しており、軽鎖及び/又は重鎖に少なくとも 1 つの変異を含み、かつヒト抗-ミューラー管ホルモン II 型レセプター (AMHR II) に対して、

a) - アミノ酸配列が配列番号 14 で表される可変領域、及び

- アミノ酸配列が配列番号 6 で表される定常領域

からなる軽鎖と、

b) - アミノ酸配列が配列番号 18 又は配列番号 10 で表される可変領域、及び

- アミノ酸配列が配列番号 12 で表される定常領域と

からなる重鎖

を含んでなるか又は該両鎖からなるキメラ 12G4 モノクローナル抗体の該レセプターに対するものと少なくとも等しい  $K_D$ 、好ましくは  $10^{-7}$  M を下回る、特に  $10^{-8}$  M を下回る、特に  $10^{-9}$  M ~  $10^{-11}$  M の範囲の  $K_D$  を有するヒト化 12G4 モノクローナル抗体。

## 【請求項 2】

軽鎖可変領域の少なくとも 1 つの CDR 中に少なくとも 1 つの変異を含み、前記キメラ 12G4 モノクローナル抗体のものと少なくとも等しい、前記レセプターに対する親和性を有する、請求項 1 に記載の変異ヒト化 12G4 モノクローナル抗体。

## 【請求項 3】

軽鎖可変領域の少なくとも 1 つの CDR 中の前記変異の少なくとも 1 つが、アミノ酸配列が配列番号 2 で表される軽鎖可変領域のアミノ酸 179 ~ アミノ酸 184 を含有する領域中に含まれる CDR に位置する、請求項 1 又は 2 に記載の変異ヒト化 12G4 モノクローナル抗体。

## 【請求項 4】

アミノ酸 179 ~ アミノ酸 184 を含有する領域中に含まれる CDR 中に位置する前記変異の少なくとも 1 つが、以下のアミノ酸置換 : S179P、E184K、E184G、E184D、S182F の少なくとも 1 つに相当する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の変異ヒト化 12G4 モノクローナル抗体。

## 【請求項 5】

軽鎖 (VL) の FR 領域中に少なくとも 1 つの変異を更に含んでなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の変異ヒト化 12G4 モノクローナル抗体。

## 【請求項 6】

重鎖中に少なくとも 1 つの変異を更に含んでなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の変異ヒト化 12G4 モノクローナル抗体。

## 【請求項 7】

軽鎖 (VL) の FR 領域中の前記変異の少なくとも 1 つがアミノ酸 179 ~ アミノ酸 184 を含有する領域に隣接する FR 領域中に位置する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の変異ヒト化 12G4 モノクローナル抗体。

## 【請求項 8】

軽鎖 (VL) の FR 領域中の前記変異の少なくとも 1 つが、以下のアミノ酸置換 : I132T、A143T、T150A、S158P、L175Q、Y178H、V187A、S192T、G197D、F212S の少なくとも 1 つに相当する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の変異ヒト化 12G4 モノクローナル抗体。

## 【請求項 9】

10

20

30

40

50

重鎖中の前記変異の少なくとも1つが、以下のアミノ酸置換：Q1E、Q3E、Q3R、Q6E、A9T、V11A、K12R、K13R、K19E、V20A、A24G、A24V、A24T、Q39E、A40V、S31G、L45P、D56N、A76T、A79T、R87G、T58A、Q62R、V67M、I70N、T74A、S77P、A79T、S88P、E89D、F102S、A103T、L110P、S114Tの少なくとも1つに相当する、請求項1～8のいずれか1項に記載の変異ヒト化12G4モノクローナル抗体。

【請求項10】

下記：

a) 1つのCDR中に位置するアミノ酸で以下の置換：S179P、E184K、E184G、E184D、S182Fの少なくとも1つがなされている、アミノ酸配列が配列番号2で表される可変領域、又は1つのCDR中に位置するアミノ酸で以下の置換：S179P、E184K、E184G、E184D、S182Fの少なくとも1つがなされ、FR領域中に位置するアミノ酸で以下の置換：I132T、A143T、T150A、S158P、L175Q、Y178H、V187A、S192T、G197D、F212Sの少なくとも1つがなされている、アミノ酸配列が配列番号2で表される可変領域と、アミノ酸配列が配列番号6で表される定常領域とを含んでなるか若しくは該両領域からなる軽鎖、及び

b) 以下のアミノ酸置換：Q1E、Q3E、Q3R、Q6E、A9T、V11A、K12R、K13R、K19E、V20A、A24G、A24V、A24T、Q39E、A40V、S31G、L45P、D56N、A76T、A79T、R87G、T58A、Q62R、V67M、I70N、T74A、S77P、A79T、S88P、E89D、F102S、A103T、L110P、S114Tの少なくとも1つがなされている、アミノ酸配列が配列番号58で表される重鎖から選択される軽鎖及び重鎖を有する、請求項1～9のいずれか1項に記載の変異ヒト化12G4モノクローナル抗体。

【請求項11】

a) アミノ酸配列が：

- 配列番号22若しくは配列番号24、又は
- 配列番号30若しくは配列番号32、又は
- 配列番号34若しくは配列番号36、又は
- 配列番号46若しくは配列番号48

で表される可変領域と、アミノ酸配列が配列番号6で表される定常領域とを含んでなるか又は該両領域からなる軽鎖

b) アミノ酸配列が：

- 配列番号38若しくは配列番号40、
- 配列番号26若しくは配列番号28、
- 配列番号8若しくは配列番号10、
- 配列番号42若しくは配列番号44、
- 配列番号50若しくは配列番号52

で表される可変領域と、アミノ酸配列が配列番号12で表される定常領域とを含んでなるか又は該両領域からなる重鎖

から選択される軽鎖及び重鎖を有する、請求項1～10のいずれか1項に記載の変異ヒト化12G4モノクローナル抗体。

【請求項12】

a) - 配列番号70若しくは配列番号72で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖、及び

b) - 配列番号74若しくは配列番号76で表されるアミノ酸配列からなる重鎖

又は

a) - 配列番号78若しくは配列番号80で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖、及び

b) - 配列番号58若しくは配列番号60で表されるアミノ酸配列からなる重鎖

又は

a) - 配列番号82若しくは配列番号84で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖、及び

b) - 配列番号86若しくは配列番号88で表されるアミノ酸配列からなる重鎖

又は

a) - 配列番号78若しくは配列番号80で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖、及び

b) - 配列番号90若しくは配列番号92で表されるアミノ酸配列からなる重鎖  
又は

a) - 配列番号94若しくは配列番号96で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖、及び

b) - 配列番号98若しくは配列番号100で表されるアミノ酸配列からなる重鎖  
を有する、請求項10に記載の変異ヒト化12G4モノクローナル抗体。

【請求項13】

Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、dsFv、scFv、Sc(Fv)<sub>2</sub>、「ダイアボディ」からなるフラグメント群より選択される、請求項1～12のいずれか1項に記載の変異ヒト化12G4モノクローナル抗体のフラグメント。

【請求項14】

10

請求項1～12のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の軽鎖をコードする配列及び/又は請求項1～12のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の重鎖をコードする配列を含んでなるか又は該配列の両方若しくは一方からなる核酸。

【請求項15】

軽鎖をコードする配列が、以下の配列：

a) 1つのCDR中で以下のアミノ酸置換：S179P、E184K、E184G、E184D、S182Fの1以上を可能にする少なくとも1つのコドン置換がなされている、配列番号53で表される軽鎖可変領域をコードする配列、又は

b) - 1つのCDR中で以下のアミノ酸置換：S179P、E184K、E184G、E184D、S182Fの1以上を可能にする少なくとも1つのコドン置換がなされ、かつ

20

- 1つのFR中で以下のアミノ酸置換：I132T、A143T、T150A、S158P、L175Q、Y178H、V187A、S192T、G197D、F212Sの1以上を可能にする少なくとも1つのコドンの少なくとも1つの置換がなされている、配列番号53で表される軽鎖可変領域をコードする配列と、配列番号5で表される定常領域をコードする配列とを含んでなるか又は該両配列からなる請求項14に記載の核酸。

【請求項16】

重鎖をコードする配列が、以下の配列：

a) 以下のアミノ酸置換：Q1E、Q3E、Q3R、Q6E、A9T、V11A、K12R、K13R、K19E、V20A、A24G、A24V、A24T、Q39E、A40V、S31G、L45P、D56N、A76T、A79T、R87G、T58A、Q62R、V67M、I70N、T74A、S77P、A79T、S88P、E89D、F102S、A103T、L110P、S114Tの1以上を可能にする少なくとも1つのコドン置換がなされている、配列番号57

30

を含んでなるか又は該配列からなる請求項14に記載の核酸。

【請求項17】

請求項15に記載の軽鎖及び請求項16に記載の重鎖を含んでなる請求項14に記載の核酸。

【請求項18】

軽鎖をコードする配列が、以下：

a) 可変領域：

- 配列番号21若しくは配列番号23、又は
- 配列番号29若しくは配列番号31、又は
- 配列番号33若しくは配列番号35、又は
- 配列番号45若しくは配列番号47、又は

40

b) 定常領域

- 配列番号5

から選択される可変領域をコードする配列及び定常領域をコードする配列を含んでなるか又は該両配列からなる、請求項14～17のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項19】

重鎖をコードする配列が、以下：

a) 可変領域：

- 配列番号25若しくは配列番号27、又は

50

- 配列番号7若しくは配列番号9、又は
- 配列番号37若しくは配列番号39、又は
- 配列番号41若しくは配列番号43、又は
- 配列番号49若しくは配列番号51、

## b) 定常領域

- 配列番号11

から選択される 可変領域をコードする配列及び定常領域をコードする配列を含んでなるか又は該両配列からなる、請求項14～17のいずれか1項に記載の核酸。

## 【請求項20】

軽鎖をコードする配列が以下の配列：

10

- 配列番号69若しくは配列番号71、又は
- 配列番号77若しくは配列番号79、又は
- 配列番号81若しくは配列番号83、又は
- 配列番号93若しくは配列番号95

から選択され、重鎖をコードする配列が以下の配列：

- 配列番号73若しくは配列番号75、又は
- 配列番号57若しくは配列番号59、又は
- 配列番号85若しくは配列番号87、又は
- 配列番号89若しくは配列番号91、又は
- 配列番号97若しくは配列番号99

20

から選択される、請求項14～19のいずれか1項に記載の核酸。

## 【請求項21】

軽鎖をコードする配列及び重鎖をコードする配列が以下のとおり：

a) 軽鎖をコードする配列 配列番号69若しくは配列番号71、及び

b) 重鎖をコードする配列 配列番号73若しくは配列番号75

又は、

a) 軽鎖をコードする配列 配列番号77若しくは配列番号79、及び

b) 重鎖をコードする配列 配列番号57若しくは配列番号59

又は、

a) 軽鎖をコードする配列 配列番号81若しくは配列番号83、及び

b) 重鎖をコードする配列 配列番号85若しくは配列番号87

30

又は、

a) 軽鎖をコードする配列 配列番号77若しくは配列番号79、及び

b) 重鎖をコードする配列 配列番号89若しくは配列番号91

又は、

a) 軽鎖をコードする配列 配列番号93若しくは配列番号95、及び

b) 重鎖をコードする配列 配列番号97若しくは配列番号99

である請求項14～20のいずれか1項に記載の核酸。

## 【請求項22】

請求項14～21のいずれか1項に記載の少なくとも1つの核酸を含んでなり、該核酸がその発現を可能にするエレメントの制御下にある発現ベクター。

40

## 【請求項23】

・ 以下の配列：配列番号71、79、83又は95を有する核酸から選択され、その発現を可能にするエレメントの制御下にある第1の核酸、及び

・ 以下の配列：配列番号59、75、87、91又は99を有する核酸から選択され、その発現を可能にするエレメントの制御下にある第2の核酸

を含んでなる請求項22に記載の発現ベクター。

## 【請求項24】

請求項14～21のいずれか1項に記載の核酸及び/又は請求項22に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞又は細胞株。

50

## 【請求項 25】

少なくとも、

- ・ 請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体、又は
- ・ 請求項 14 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の核酸、又は
- ・ 請求項 22 若しくは 23 に記載のベクター、又は
- ・ 前記モノクローナル抗体の請求項 13 に記載のフラグメント

を、医薬的に許容可能なビヒクルと共に含んでなる医薬組成物、特にワクチン組成物。

## 【請求項 26】

10  
 卵巣ガン患者の治療において、同時、別途又は逐次に使用するための組合せ製剤としての、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を含んでなる第 1 の医薬製剤と、従来の抗ガン化合物、特にパクリタキセル又は白金塩、特にオキサリプラチン、シスプラチン又はカルボプラチンを含んでなる第 2 の医薬製剤とを含んでなる製品。

## 【請求項 27】

ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターと関係する病状、特に卵巣ガンの治療又は予防に使用する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体、又は前記モノクローナル抗体の請求項 13 に記載のフラグメント、又は請求項 14 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の核酸、又は請求項 22 若しくは 23 に記載のベクター、又は請求項 24 に記載の細胞を含んでなる医薬組成物。

## 【請求項 28】

20  
 ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターと関係する病状、特に卵巣ガンの診断及び/又はモニタリングに使用する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体、又は前記モノクローナル抗体の請求項 13 に記載のフラグメントを含んでなる医薬組成物。

## 【請求項 29】

従来の抗ガン薬、特にパクリタキセル又は白金塩、特にオキサリプラチン、シスプラチン又はカルボプラチンを更に含んでなる、請求項 27 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 30】

- ・ 請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体、又は
- ・ 前記モノクローナル抗体の請求項 13 に記載のフラグメント、又は
- ・ 請求項 14 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の核酸、又は
- ・ 請求項 22 若しくは 23 に記載のベクター、又は
- ・ 請求項 24 に記載の細胞

30  
 を少なくとも含んでなる、ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターと関係する病状、特に卵巣ガンの診断に使用するキット。

## 【請求項 31】

以下の工程：

- a . 患者から事前に取り出した生検を標識する工程
- b . ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターの存在を決定する工程

40  
 を含んでなる、ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターと関係する病状、特に卵巣ガンの診断を補助するデータを取得する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターを指向する新規な変異ヒト化12G4抗体及びそのフラグメントに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

卵巣ガンは、婦人科ガンの主要な原因であり、女性におけるガンの死亡原因の上位 5 番目であり、以下の 3 つの組織学的起源を有する：

表面上皮(種々のサブタイプを有する上皮腫瘍)(これは卵巣ガンの 85 ~ 90 % を占める)

10

20

30

40

50

性索/間質(顆粒膜腫瘍(卵巣ガン全体の3%))(卵巣腫瘍の約10%を占める)  
生殖細胞(卵巣ガンの5%を占める)。

これは、第1ステージの間は一般に無症候性であり、よってそのあだ名は「サイレントキラー」である(La Marca A., Volpe A. 抗-Mullerian hormone and ovarian cancer. Human Reproduction Update, Vol.13, No.3 pp. 265-273, 2007)。

#### 【0003】

4つのステージ及び予後が存在する(FIGO classification: International Federation of Gynaecology and Obstetrics)。ステージ2から生存率が相当減少する:

ステージI: 卵巣に限定した腫瘍(5年生存率: 90~70%)、  
ステージII: 1又は2の卵巣に腫瘍、骨盤に拡大(5年生存率: 70~40%)、  
ステージIII: 1又は2の卵巣に腫瘍、骨盤外に拡大(5年生存率: 20%)、  
ステージIV: 腹膜転移を除く遠位転移(5年生存率: <10%)、

(Fauci, Braunwaldら, Principles of internal medicine. Harrison's 17th edition / National Cancer Institute cancer.gov / CNGOF (French National Colleges of Gynaecologists and Obstetricians)。

#### 【0004】

卵巣ガンの治療に使用する主要なストラテジは、手術、及び特に一次治療としての、カルボプラチンとパクリタキセルとの混合物のような化学療法である。

最近、セテュキマブ(cetuximab)(これは表皮成長因子レセプター(EGFR)を指向する)のようなモノクローナル抗体もまた開発された(Ozols R. F.ら, Focus on epithelial ovarian cancer, Cancer Cell. 2004, Jan; 5(1): 19-24)。

CA-125を指向するアバゴボマブ(abagovomab)、血管内皮増殖因子(VEGF-A)を指向するアバスチン(Avastin)、又は葉酸レセプター (FRA)を指向するファレテツマブ(farletuzumab)のような他のモノクローナル抗体が現在、第III相である。

#### 【0005】

ヒト抗-ミューラー管ホルモンは、TGF- $\beta$ ファミリーのメンバーである560アミノ酸の糖タンパク質である。これは、ミューラー管の変性を引き起こす、胎生精巣のセルトリ細胞により放出されるホルモンである。

これは、成人では、セルトリ細胞及びライディッヒ細胞(精巣)並びに顆粒膜細胞(卵巣)で発現される。

これは、濾胞形成の調節における成人卵巣の活性において役割を演じる。

#### 【0006】

抗-ミューラー管ホルモンII型レセプター(AMHR-II)は、573アミノ酸のペプチドであり、セリン-スレオニンキナーゼ活性を有する。

これは、ヒト生殖系の発生と関係するミューラー管の退化に関与する。ミューラー管は、男性では萎縮し、前立腺小胞(prostatic vesicle)及び精巣垂を形成するに過ぎないが、女性では存続し、ファローピウス管、子宮及び膣のほとんどを生じる。

このレセプターは、しばしば、ヒト卵巣の腫瘍性上皮細胞に発現する。

#### 【0007】

国際出願WO 2008/053330は、卵巣ガン治療用のAMHR-IIを指向するマウス12G4モノクローナル抗体を記載する。しかし、ヒトにおけるマウスモノクローナル抗体の投与が免疫応答を引き起こすことは当業者に周知である。

この国際出願は、該抗体がキメラ又はヒト化であり得るとも述べているが、それ自体を記載してはいない。

しかし、キメラ抗体もまた免疫反応を誘引する。ヒト化抗体は、僅かに免疫原性であるが、その抗原結合親和性は減少することがあり、結果として活性が弱くなるという欠点を有する。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本出願によれば、ヒト化抗体中に存在するアミノ酸の変異により、特にヒト化抗体のペプチド配列を改変するがヒドロパシー指標(すなわち、疎水性及び電荷)を維持することにより、例えば以下のアミノ酸置換：アルギニン-リジン又はグルタミン酸-アスパラギン酸又はセリン-スレオニン又はグルタミン-アスパラギン又はバリン-ロイシン-イソロイシン置換により、前記親和性を増大させることができる。

【0009】

本発明の目的の1つは、対応する非変異キメラ抗体のものと少なくとも等しい親和性及びAMHR-IIレセプターに関する特異性を有し、免疫応答を誘引しない変異ヒト化12G4抗体又はそのフラグメントを提供することである。

本発明の別の1つの目的はまた、AMHR-IIレセプターの前記特異的抗体を作製する手段を提供することである。

本発明は更に、これら抗体の卵巣ガン治療薬としての使用に関する。

【0010】

本発明は、ヒト化12G4モノクローナル抗体に関し、該抗体は、

a) - アミノ酸配列が配列番号2(リーダー無し)若しくは配列番号4(リーダー有り)で表される可変領域と、

- アミノ酸配列が配列番号6若しくは配列番号6と少なくとも80%の同一性を有する配列で表される定常領域と

を含んでなるか又は該両領域からなる軽鎖

b) - アミノ酸配列が配列番号8(リーダー無し)若しくは配列番号10(リーダー有り)で表される可変領域と、

- アミノ酸配列が配列番号12若しくは配列番号12と少なくとも80%の同一性を有する配列で表される定常領域と

を含んでなるか又は該両領域からなる重鎖

を含んでなるか又は該両鎖からなり、該ヒト化12G4モノクローナル抗体は変異しており、軽鎖及び/又は重鎖に少なくとも1つの変異を含み、かつヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプター(AMHRII)に対して、

- アミノ酸配列が配列番号14(リーダー無し)で表される可変領域と、

- アミノ酸配列が配列番号6で表される定常領域

b) - アミノ酸配列が配列番号18(リーダー無し)又は配列番号10(リーダー有り)で表される可変領域と、

- アミノ酸配列が配列番号12で表される定常領域と

からなる重鎖

を含んでなるか又は該両鎖からなるキメラ12G4モノクローナル抗体の該レセプターに対するものと少なくとも等しい $K_D$ 、好ましくは $10^{-7}$ Mを下回る、特に $10^{-8}$ Mを下回る、特に $10^{-9}$ M ~  $10^{-11}$ Mの範囲の $K_D$ を有する。

【0011】

本発明の抗体はまた、マウス12G4抗体のものの3分の1又は2分の1に少なくとも等しい親和性を示す。

本説明を通して、配列番号の後の括弧中の表現「リーダー有り」は、当該配列がシグナルペプチド(すなわち、当該タンパク質が分泌されることを規定するペプチド)又は該シグナルペプチドをコードする配列を含んでなることを示す。

反対に、括弧中の表現「リーダー無し」は、当該配列がシグナルペプチドも該シグナルペプチドをコードする配列も含まないことを示す。

【0012】

本発明は、本発明の変異ヒト化12G4抗体が、CDR(3つの抗原認識決定領域)中、すなわち抗原への親和性及び結合に重要であり、原則として、同じヒドロパシー指標のアミノ酸の置換のみを許容する領域中に、ヒドロパシー指標が関係しない少なくとも1つの変異((例えば、アルギニン-リジン、グルタミン酸-アスパラギン酸、セリン-スレオニン、グルタミン-アスパラギン又はバリン-ロイシン-イソロイシン)を有するにもかかわらず、依然

10

20

30

40

50

として、以下の特性を有する：

- 対応するキメラ12G4抗体のものと少なくとも類似するか又はそれより小さくさえあるAMHR-IIレセプターに対する $K_D$ (実施例1に従って決定)を有し、したがって対応するキメラ12G4抗体のものと、又は従来技術の抗体若しくは抗体フラグメントに関して等しいか又はそれより大きい親和性を有する

- AMHR-IIレセプターに対する特異性を有する

- 免疫応答を誘引しないか、又はマウス抗体より小さな反応を誘引する

という本発明者らの知見に基づく。

#### 【0013】

例として、実施例1は、CHO又はYB2/0細胞において産生した本発明の抗体で得られた $K_D$ を提示する。

本説明を通して、用語「12G4」及び用語「LFB112」(この用語も使用する)は、同じものを指称し、同一抗体を表す。

前記抗体の親和性は、当業者に周知のBIAcoreアッセイにより決定することができる。

本発明において、用語「抗体」とは、免疫グロブリン(獲得免疫応答に關与する四本鎖からなる多量体タンパク質)をいう。

免疫グロブリンは当業者に周知であり、各々が重鎖及び軽鎖からなる2つの二量体のアセンブリからなる。この多量体の複合体は、2つのシステイン間のジスルフィド橋架けによる軽鎖及び重鎖の結合によって組み立てられ、2つの重鎖自体もまた2つのジスルフィド橋架けにより互いに結合している。

#### 【0014】

各重鎖及び各軽鎖は、定常領域及び可変領域からなる。抗体を形成する鎖アセンブリは、特徴的なY字型の三次元構造を規定し得、ここで、

- Yの基部は、補体及びFcレセプターにより認識される定常領域Fcに相当し、

- Yの腕の端部は、それぞれ、軽鎖可変領域と重鎖可変領域とのアセンブリに相当する。

より正確には、各軽鎖は、可変領域( $V_L$ )及び定常領域( $C_L$ )からなる。各重鎖は可変領域( $V_H$ )と、3つの定常ドメイン $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 及び $C_{H3}$ からなる定常領域とからなる。ドメイン $C_{H2}$ 及び $C_{H3}$ はドメインFcを形成する。

抗体の構造を図1に模式的に示す。

#### 【0015】

軽鎖可変領域は、4つのフレームワーク領域により囲まれた3つの抗原認識決定領域(CDR)からなる。可変領域の三次元折り畳みは、3つのCDRが当該タンパク質の同じ側に曝され、特定抗原を認識する特異的構造の形成を可能にするものである。

抗体の軽鎖又は重鎖可変領域の数珠構造を図2に示す。

#### 【0016】

本発明に記載の抗体は、単離・精製されており、しかもヒト化されているので天然抗体とは異なる。これら抗体は成熟である。すなわち、これら抗体は、抗原の認識を可能にするアドホック(ad hoc)三次元構造を有し、抗原認識に必須の全ての翻訳後修飾(特に、グリコシル化並びに分子内及び分子間ジスルフィド橋架けの形成)を有する。

これらはモノクローナル抗体である。すなわち、これらは、抗体の混合物に相当し、したがって同一タンパク質中の幾つかの抗原決定基を認識することができるポリクローナル抗体とは対照的に、AMHR-IIレセプター中の1つの抗原決定基を唯一認識する。

「キメラモノクローナル抗体」は、本発明においては、構成する各軽鎖及び/又は各重鎖の配列が、少なくとも2つの異なる動物(又はヒト)に由来するハイブリッド配列を含んでなるか又は該配列からなる、単離された抗体を意味する。

特に、キメラ12G4抗体はマウス/ヒトハイブリッドであり、これは、軽鎖及び重鎖の配列の或る領域がマウス12G4免疫グロブリンの配列に由来し、前記重鎖及び軽鎖の残りの配列が1つ(場合によっては幾つか)のヒト免疫グロブリンの配列に由来することを示す。

図18は、キメラ12G4抗体産生用発現ベクターのマップを示す。

10

20

30

40

50

## 【0017】

「ヒト化12G4モノクローナル抗体」は、本発明においては、(特に、マウス)12G4抗体の各軽鎖及び各重鎖のCDRのみが、ヒト抗体の軽鎖及び重鎖にグラフトされている、単離された抗体を意味する。

図19は、ヒト化12G4抗体産生用発現ベクターのマップを示す。

以下では、表現「キメラ12G4抗体」及び「非変異キメラ12G4抗体」は同じ抗体を指称する。

「変異ヒト化12G4モノクローナル抗体」は、本発明においては、軽鎖可変領域及び/又は軽鎖定常領域及び/又は重鎖可変領域又は重鎖定常領域に少なくとも1つの変異がなされているヒト化12G4モノクローナル抗体を意味する。

10

## 【0018】

よって、本発明の変異ヒト化モノクローナル抗体の定義は、下記の両方を包含する：

- 上記のような変異ヒト化抗体、特にヒト/マウス抗体の前駆体、及び
- 上記のような変異ヒト化抗体、特にヒト/マウス。

1つの有利な実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域の少なくとも1つのCDR中に少なくとも1つの変異を含んでなり、前記レセプターに対して前記キメラ12G4モノクローナル抗体のものと少なくとも等しい親和性を有する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

この実施形態においては、単一の変異が存在する場合、それはCDR1又はCDR2又はCDR3に位置する。

20

1より多い変異が存在する場合、第2及びその他の変異は、抗体のCDR1及び/又はCDR2及び/又はCDR3及び/又は他の任意の領域に位置することができる。

## 【0019】

1つの有利な実施形態において、本発明は、軽鎖(VL)のFR領域中に少なくとも1つの変異を更に含んでなる、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

本発明において、本発明者らは、少なくとも1つの変異がヒト化12G4抗体のCDR1又はCDR2又はCDR3中及び軽鎖可変領域(特にFR)中になされたとき、該少なくとも1つの変異は、アミノ酸のヒドロパシー指標が必ずしも適合しないにもかかわらず、該ヒト化抗体の活性の保持を可能にするだけでなく、非変異キメラ抗体のものと少なくとも等しい親和性を有するが免疫応答を引き起こさないか又は起こしても重大でない変異ヒト化抗体の取得をも可能にすることを見出した。

30

## 【0020】

1つの有利な実施形態において、本発明は、CDR1中に少なくとも1つの変異を、軽鎖(VL)のFR領域中に少なくとも1つの変異を含んでなる、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

本発明において、本発明者らは、少なくとも1つの変異がヒト化12G4抗体のCDR1中及び軽鎖可変領域(特にFR)中になされたとき、該少なくとも1つの変異はアミノ酸のヒドロパシー指標が必ずしも適合しないにもかかわらず、該ヒト化抗体の活性の保持を可能にするだけでなく、非変異キメラ抗体のものと少なくとも等しい親和性を有するが免疫応答を引き起こさない変異ヒト化抗体の取得をも可能にすることを見出した。

40

## 【0021】

1つの有利な実施形態において、本発明は、CDR2中に少なくとも1つの変異を、軽鎖(VL)のFR領域中に少なくとも1つの変異を含んでなる、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

本発明において、本発明者らは、少なくとも1つの変異がヒト化12G4抗体のCDR2中及び軽鎖可変領域(特にFR)中になされたとき、該少なくとも1つの変異は、アミノ酸のヒドロパシー指標が必ずしも適合しないにもかかわらず、該ヒト化抗体の活性の保持を可能にするだけでなく、非変異キメラ抗体のものと少なくとも等しい親和性を有するが免疫応答を引き起こさない変異ヒト化抗体の取得をも可能にすることを見出した。

## 【0022】

50

1つの有利な実施形態において、本発明は、CDR3中に少なくとも1つの変異を、軽鎖(VL)のFR領域中に少なくとも1つの変異を含んでなる、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

本発明において、本発明者らは、少なくとも1つの変異がヒト化12G4抗体のCDR3中及び軽鎖可変領域(特にFR)中になされたとき、該少なくとも1つの変異は、アミノ酸のヒドロパシー指標が必ずしも適合しないにもかかわらず、該ヒト化抗体の活性の保持を可能にするだけでなく、非変異キメラ抗体のものと少なくとも等しい親和性を有するが免疫応答を引き起こさない変異ヒト化抗体の取得をも可能にすることを見出した。

#### 【0023】

1つの有利な実施形態において、本発明は、AMHR IIレセプターを発現する細胞、特にCov434、Asc 1及びMETA 2815に対してADCCを有する、特に前記非変異ヒト化12G4モノクローナル抗体の同じ細胞に対するものより大きなADCCを有する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

ADCC(抗体-依存細胞性細胞毒性)は、抗体が抗原を認識すると、抗体のFc部分が、キラー細胞のレセプター-Fc に認識される(キラー細胞は、結合後、該抗原を有する細胞を殺傷し得る)機構である。

本発明において、本発明者らは、少なくとも1つの変異がヒト化12G4抗体(この抗体の親和性は、対応するキメラ又はマウス抗体に比して格段に減少している(実施例2))の1以上のCDR中でなされたとき、該少なくとも1つの変異は、CDRが抗原認識に特に重要な領域に相当するにもかかわらず、該ヒト化抗体の活性の保持を可能にするだけでなく、非変異キメラ抗体のものと少なくとも等しい親和性を有し、免疫応答を引き起こさないか又はより小さな反応を引き起こす変異ヒト化抗体の取得をも可能にすることを見出した。

#### 【0024】

本発明に関しては、使用した番号付けは、ScFvフラグメントの番号付けに基づき、ヒト化12G4抗体について図3A及び3Bに示されるように、重鎖は1~115と番号付けられ、軽鎖は131~236と番号付けられる(図中、灰色影付きピーズは前記配列に存在しないアミノ酸に相当する)。

2つの鎖は、アミノ酸116~130を含んでなるリンカーによって結合している。

1つの有利な実施形態において、本発明は、軽鎖可変領域の少なくとも1つのCDR中の前記少なくとも1つの変異が、アミノ酸配列が配列番号2で表される軽鎖可変領域のアミノ酸179~アミノ酸184を含有するCDRに含まれる領域に位置する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

アミノ酸179~アミノ酸184を含有する領域は、完全なCDRに相当しない。

#### 【0025】

この実施形態において、抗体が唯一の変異を有する場合、それは、アミノ酸179~アミノ酸184を含有する軽鎖CDRの領域中に位置する。

この抗体は、当然のことながら、他のCDR中に他の変異を有することができる。

本発明において、本発明者らは、少なくとも1つの変異がヒト化12G4抗体のCDRのアミノ酸179~184を含む領域中でなされたとき、該少なくとも1つの変異が、該ヒト化抗体の活性の保持を可能にするだけでなく、非変異キメラ抗体のものと少なくとも等しい親和性を有し、免疫応答を引き起こさない変異ヒト化抗体の取得をも可能にすることを見出した。

#### 【0026】

1つの有利な実施形態において、本発明は、アミノ酸179~アミノ酸184を含有するCDR中の領域に位置する前記少なくとも1つの変異が、以下のアミノ酸置換:S179P、E184K、E184G、E184D、S182Fの少なくとも1つに相当する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

本発明で使用する表記法は、当業者に知られた一文字表記に相当する。

例えば、表記S179Pは、179位のアミノ酸セリンがプロリンで置換されていることを意味する。

10

20

30

40

50

## 【0027】

本発明において、本発明者らは、少なくとも1つの変異がヒト化12G4抗体のCDRのアミノ酸179~184を含んでなる領域中になされたとき、該少なくとも1つの変異は、置き換わったアミノ酸のヒドロパシー指標が必ずしも適合しないにもかかわらず、該ヒト化抗体の活性の保持を可能にするだけでなく、非変異キメラ抗体のものと少なくとも等しい親和性を有する変異ヒト化抗体の取得をも可能にすることを見出した。

例として、図17は、本発明による変異ヒト化抗体の、AMHR-IIレセプターに対する結合親和性を示す。6B\_78抗体は、軽鎖可変領域のCDR中に位置する唯一の変異、グルタミン酸がリジンで置換された変異(E184K)(すなわち、酸性アミノ酸の塩基性アミノ酸での置換)を有し、結果として(反対電荷であるので)全く異なる電荷を有するが、依然として活性を示し、特に、非変異ヒト化12G4抗体よりかなり良好で、非変異キメラ12G4抗体のものと等しい親和性を示し、免疫応答を引き起こさない。

10

## 【0028】

1つの有利な実施形態において、本発明は、少なくとも1つの変異を軽鎖(VL)のFR領域中に更に含んでなる、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

本発明において、本発明者らは、少なくとも1つの変異がヒト化12G4抗体のCDRのアミノ酸179~184を含む領域中及び軽鎖可変領域中、特にFR中になされたとき、該少なくとも1つの変異は、アミノ酸のヒドロパシー指標が必ずしも適合しないにもかかわらず、該ヒト化抗体の活性の保持を可能にするだけでなく、非変異キメラ抗体のものと少なくとも等しい親和性を有し、免疫応答を引き起こさない変異ヒト化抗体の取得をも可能にすることを見出した。

20

## 【0029】

1つの有利な実施形態において、本発明は、少なくとも1つの変異を重鎖中に更に含んでなる、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

本発明において、本発明者らは、少なくとも1つの変異がヒト化12G4抗体のCDRのアミノ酸179~184を含む領域中、軽鎖可変領域中、特にFR中及び重鎖中になされたとき、該少なくとも1つの変異は、アミノ酸のヒドロパシー指標が必ずしも適合しないにもかかわらず、該ヒト化抗体の活性の保持を可能にするだけでなく、非変異キメラ抗体のものと少なくとも等しい親和性を有し、免疫応答を引き起こさない変異ヒト化抗体の取得をも可能にすることを見出した。

30

## 【0030】

1つの有利な実施形態において、本発明は、軽鎖(VL)のFR領域中の前記少なくとも1つの変異がアミノ酸179~アミノ酸184を含有する領域に隣接するFR領域中に位置する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

例として、図17並びに表I及びVII(ELISAにより決定した標的AMHR-II-Fcへの固定)は、本発明による変異ヒト化抗体のAMHR-IIレセプターへの結合親和性を提示する。

## 【0031】

よって、3C\_23抗体は、以下の3つの変異：

- 軽鎖可変領域のCDR中の、セリンがプロリンで置換された変異(S179P)(すなわち、親水性アミノ酸の疎水性アミノ酸での置換)
- 軽鎖の可変領域中、特にFR中の、変異(I177T)(すなわち、親水性で、更には国際出願WO 2008/053330によればヒドロパシー指標が全く異なった値(イソロイシンについては+4.5、スレオニンについては-0.7)であるアミノ酸での疎水性アミノ酸の置換)、及び
- 重鎖中の変異(Q3R)(すなわち、グルタミンのアルギニンでの置換；ヒドロパシー指標の値は、国際出願WO 2008/053330によれば、グルタミンの-3.5からアルギニンの-4.5に変化する)

40

を有し、更に、非変異ヒト化12G4抗体のものよりかなり良好で、非変異キメラ12G4抗体のものより大きな親和性を有する。

## 【0032】

更に、3C\_23K抗体は、3C\_23抗体の変異とは別に、軽鎖可変領域のCDR中に、グルタミン

50

酸がリジンで置換された第2の変異(E184K)(すなわち、酸性アミノ酸の塩基性アミノ酸での置換)もまた有し、結果として(反対の符号であるので)全く異なる電荷を有するにもかかわらず、依然として活性、特に、非変異ヒト化12G4抗体のものよりかなり良好で、非変異キメラ12G4抗体のものより大きい親和性を示し、免疫応答を引き起こさない。

【0033】

1つの有利な実施形態において、本発明は、軽鎖(VL)のFR領域中の前記少なくとも1つの変異が、以下のアミノ酸置換：I132T、A143T、T150A、S158P、L175Q、I177T、Y178H、V187A、S192T、G197D、F212Sの少なくとも1つに相当する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、重鎖中の前記少なくとも1つの変異が、以下のアミノ酸置換：Q1E、Q3E、Q3R、Q6E、A9T、V11A、K12R、K13R、K19E、V20A、A24G、A24V、A24T、Q39E、A40V、S31G、L45P、D56N、A76T、A79T、R87G、T58A、Q62R、V67M、I70N、T74A、S77P、A79T、S88P、E89D、F102S、A103T、L110P、S114Tの少なくとも1つに相当する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

【0034】

1つの有利な実施形態において、本発明は、下記：

a) 1つのCDR中に位置する以下のアミノ酸置換：S179P、E184K、E184G、E184D、S182Fの少なくとも1つがなされている、アミノ酸配列が配列番号2で表される可変領域、又は

1つのCDR中に位置する以下のアミノ酸置換：S179P、E184K、E184G、E184D、S182Fの少なくとも1つ、及び領域FR中に位置する以下のアミノ酸置換：I132T、A143T、T150A、S158P、L175Q、Y178H、V187A、S192T、G197D、F212Sの少なくとも1つがなされている、アミノ酸配列が配列番号2で表される可変領域

と、アミノ酸配列が配列番号6で表される定常領域とを含んでなるか若しくは該両領域からなる軽鎖

b) 以下のアミノ酸置換：Q1E、Q3E、Q3R、Q6E、A9T、V11A、K12R、K13R、K19E、V20A、A24G、A24V、A24T、Q39E、A40V、S31G、L45P、D56N、A76T、A79T、R87G、T58A、Q62R、V67M、I70N、T74A、S77P、A79T、S88P、E89D、F102S、A103T、L110P、S114Tの少なくとも1つがなされている、アミノ酸配列が配列番号58で表される重鎖

から選択される軽鎖及び重鎖を有する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

【0035】

実施例3の表VIIは、得られた種々のクローン及びそれらの置換を提示する。この表はまた、ヒドロパシー指標は、変異に応じてかなり変化するが、抗原についての親和性及び/又は活性の喪失を導かず、或る種のクローンについて、対応するキメラ抗体に比して親和性の増大(1以上の比 本発明のAb/キメラ抗体)が得られることを可能にさえすることを示す。

この実施形態において、事前に得られた2つの抗体の組合せに由来し、非変異キメラ12G4抗体に比してAMHR-IIレセプターに関する親和性及び活性が更に増大した抗体を構成することが可能である。

【0036】

1つの有利な実施形態において、本発明は、下記：

a) アミノ酸配列が

- 配列番号22(リーダー無し)若しくは配列番号24(リーダー有り)、又は
- 配列番号30(リーダー無し)若しくは配列番号32(リーダー有り)、又は
- 配列番号34(リーダー無し)若しくは配列番号36(リーダー有り)、又は
- 配列番号46(リーダー無し)若しくは配列番号48(リーダー有り)

で表される可変領域と、アミノ酸配列が配列番号6で表される定常領域とを含んでなるか又は該両領域からなる軽鎖

b) アミノ酸配列が

- 配列番号38(リーダー無し)、若しくは配列番号40(リーダー有り)、

- 配列番号26(リーダー無し),若しくは配列番号28(リーダー有り)、
- 配列番号8(リーダー無し),若しくは配列番号10(リーダー有り)、
- 配列番号42(リーダー無し),若しくは配列番号44(リーダー有り)、
- 配列番号50(リーダー無し),若しくは配列番号52(リーダー有り)

で表される可変領域と、アミノ酸配列が配列番号12で表される定常領域とを含んでなるか又は該両領域からなる重鎖

から選択される軽鎖及び重鎖を有する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体に関する。

【0037】

1つの有利な実施形態において、本発明は、

10

a) - 配列番号70(リーダー無し)若しくは配列番号72(リーダー有り)で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖と、

b) - 配列番号74(リーダー無し)若しくは配列番号76(リーダー有り)で表されるアミノ酸配列からなる重鎖と

を有する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体(3C\_23抗体)

又は

a) - 配列番号78(リーダー無し)若しくは配列番号80(リーダー有り)で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖と、

b) - 配列番号58(リーダー無し)若しくは配列番号60(リーダー有り)で表されるアミノ酸配列からなる重鎖と

20

を有する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体(6B\_78抗体)

又は

a) - 配列番号82(リーダー無し)若しくは配列番号84(リーダー有り)で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖と、

b) - 配列番号86(リーダー無し)若しくは配列番号88(リーダー有り)で表されるアミノ酸配列からなる重鎖と

を有する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体(3C\_23K抗体)

又は

a) - 配列番号78(リーダー無し)若しくは配列番号80(リーダー有り)で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖と、

b) - 配列番号90(リーダー無し)若しくは配列番号92(リーダー有り)で表されるアミノ酸配列からなる重鎖と

30

を有する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体(4C\_35抗体)

又は

a) - 配列番号94(リーダー無し)若しくは配列番号96(リーダー有り)で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖と、

b) - 配列番号98(リーダー無し)若しくは配列番号100(リーダー有り)で表されるアミノ酸配列からなる重鎖と

を有する、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体(5B\_42抗体)

に関する。

40

【0038】

別の1つの観点によれば、本発明は、Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、dsFv、scFv、Sc(Fv)<sub>2</sub>、「ダイアボディ」からなるフラグメント群より選択される、上記のような変異ヒト化12G4モノクローナル抗体のフラグメントに関する。

別の1つの観点によれば、本発明は、上記のモノクローナル抗体の軽鎖をコードする配列、及び/又は上記のモノクローナル抗体の重鎖をコードする配列を含んでなるか若しくは該配列からなる核酸に関する。

【0039】

1つの有利な実施形態において、本発明は、軽鎖をコードする配列が、以下の配列：

a) 1つのCDR中で以下のアミノ酸置換：S179P、E184K、E184G、E184D、S182Fの1以上を

50

可能にする少なくとも1つのコドン置換がなされている、配列番号53で表される軽鎖可変領域をコードする配列、又は

b) - 1つのCDR中で以下のアミノ酸置換：S179P、E184K、E184G、E184D、S182Fの1以上を可能にする少なくとも1つのコドン置換、及び

- 1つのFR中で以下のアミノ酸置換：I132T、A143T、T150A、S158P、L175Q、Y178H、V187A、S192T、G197D、F212Sの1以上を可能にする少なくとも1つのコドンの少なくとも1つの置換

がなされている、配列番号53で表される軽鎖可変領域をコードする配列

と、配列番号5で表される定常領域をコードする配列とを含んでなるか又は該両配列からなる上記核酸に関する。

#### 【0040】

1つの有利な実施形態において、本発明は、重鎖をコードする配列が、以下の配列：

a) 以下のアミノ酸置換：Q1E、Q3E、Q3R、Q6E、A9T、V11A、K12R、K13R、K19E、V20A、A24G、A24V、A24T、Q39E、A40V、S31G、L45P、D56N、A76T、A79T、R87G、T58A、Q62R、V67M、I70N、T74A、S77P、A79T、S88P、E89D、F102S、A103T、L110P、S114Tの1以上を可能にする少なくとも1つのコドン置換がなされている、配列番号57を含んでなるか又は該配列からなる、上記核酸に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、上記の軽鎖及び重鎖を含んでなる上記核酸に関する。

#### 【0041】

1つの有利な実施形態において、本発明は、軽鎖をコードする配列が、以下：

a) 可変領域：

- 配列番号21(リーダー無し)若しくは配列番号23(リーダー有り)、又は
- 配列番号29(リーダー無し)若しくは配列番号31(リーダー有り)、又は
- 配列番号33(リーダー無し)若しくは配列番号35(リーダー有り)、又は
- 配列番号45(リーダー無し)若しくは配列番号47(リーダー有り)、又は

b) 定常領域

- 配列番号5

から選択される可変領域をコードする配列及び定常領域をコードする配列を含んでなるか又は該両配列からなる、上記の核酸に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、重鎖をコードする配列が、以下：

a) 可変領域：

- 配列番号25(リーダー無し)若しくは配列番号27(リーダー有り)、又は
- 配列番号7(リーダー無し)若しくは配列番号9(リーダー有り)、又は
- 配列番号37(リーダー無し)若しくは配列番号39(リーダー有り)、又は
- 配列番号41(リーダー無し)若しくは配列番号43(リーダー有り)、又は
- 配列番号49(リーダー無し)若しくは配列番号51(リーダー有り)、

b) 定常領域

- 配列番号11

から選択される可変領域をコードする配列及び定常領域をコードする配列を含んでなるか又は該両配列からなる、上記の核酸に関する。

#### 【0042】

1つの有利な実施形態において、本発明は、軽鎖をコードする配列が以下の配列：

- 配列番号69(リーダー無し)若しくは配列番号71(リーダー有り)、又は
- 配列番号77(リーダー無し)若しくは配列番号79(リーダー有り)、又は
- 配列番号81(リーダー無し)若しくは配列番号83(リーダー有り)、又は
- 配列番号93(リーダー無し)若しくは配列番号95(リーダー有り)、

から選択され、重鎖をコードする配列が以下の配列：

- 配列番号73(リーダー無し)若しくは配列番号75(リーダー有り)、又は
- 配列番号57(リーダー無し)若しくは配列番号59(リーダー有り)、又は

- 配列番号85(リーダー無し)若しくは配列番号87(リーダー有り)、又は
  - 配列番号89(リーダー無し)若しくは配列番号91(リーダー有り)、又は
  - 配列番号97(リーダー無し)若しくは配列番号99(リーダー有り)、
- から選択される、上記核酸に関する。

## 【0043】

1つの有利な実施形態において、本発明は、軽鎖をコードする配列及び重鎖をコードする配列が

a)軽鎖をコードする配列 配列番号69(リーダー無し)若しくは配列番号71(リーダー有り)及び

b)重鎖をコードする配列 配列番号73(リーダー無し)若しくは配列番号75(リーダー有り)である上記核酸(3C\_23抗体)、又は、

a)軽鎖をコードする配列 配列番号77(リーダー無し)若しくは配列番号79(リーダー有り)及び

b)重鎖をコードする配列 配列番号57(リーダー無し)若しくは配列番号59(リーダー有り)である上記核酸(6B\_78抗体)、又は、

a)軽鎖をコードする配列 配列番号81(リーダー無し)若しくは配列番号83(リーダー有り)及び

b)重鎖をコードする配列 配列番号85(リーダー無し)若しくは配列番号87(リーダー有り)である上記核酸(3C\_23K抗体)、又は、

a)軽鎖をコードする配列 配列番号77(リーダー無し)若しくは配列番号79(リーダー有り)及び

b)重鎖をコードする配列 配列番号89(リーダー無し)若しくは配列番号91(リーダー有り)である上記核酸(4C\_35抗体)、又は、

a)軽鎖をコードする配列 配列番号93(リーダー無し)若しくは配列番号95(リーダー有り)、及び

b)重鎖をコードする配列 配列番号97(リーダー無し)若しくは配列番号99(リーダー有り)である上記核酸(5B\_42抗体)

に関する。

## 【0044】

別の1つの観点によれば、本発明は、上記核酸の少なくとも1つを含んでなり、該核酸がその発現を可能にするエレメントの制御下にある発現ベクターに関する。

「発現ベクター」は、本発明においては、少なくとも1つの生物における複製(重複化)を可能にするエレメントを有するDNA分子を規定する。複製を可能にするこれらエレメントは、特に、酵母若しくは細菌における複製起点、又はウイルスの複製を制御するエレメントである。

本発明によるベクターは、特に、プラスミド、ファージ、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、複製可能ウイルス又は組込み型ウイルスの改変ゲノムなどである。

これらベクターは、制御するヌクレオチド配列の発現(すなわち、RNAへの転写)を可能にするヌクレオチド配列を有することから、「発現ベクター」と呼ばれる。

## 【0045】

本発明において、ベクター中に含有される前記核酸配列は、「その発現を可能にするエレメントの制御下」に配置される。これは、発現ベクターが、ウイルスのプロモーター(例えば、シミアンウイルスSV40若しくはサイトメガロウイルス(CMV)の初期プロモーター又はラウス肉腫ウイルス(RSV)のプロモーター配列、特に、TATAAボックスを含んでなる配列又はプロモーター)のような転写開始配列を少なくとも1つ有することを意味する。更に、前記ベクターはまた、哺乳動物遺伝子、特にヒト遺伝子に由来する少なくとも1つの転写終止配列、特にポリアデニル化配列を有する。

ベクター中に含有されるヌクレオチド配列の発現に不可欠であるこれら配列には、前記配列の発現を調節又は改変するための他の配列を付加し得る。非限定的なリストには以下が含まれる：哺乳動物、特にヒトの遺伝子のイントロン、エンハンサータイプの転写調節

10

20

30

40

50

配列、又は哺乳動物、特にヒトの遺伝子の、転写されているが翻訳されていない配列。

【0046】

本発明の1つの有利な実施形態は、以下の配列：配列番号59、71、75、79、83、87、91、95又は99を含んでなる核酸から選択される少なくとも1つの核酸を含んでなる、上記の発現ベクターに関する。

別の1つの有利な実施形態において、本発明は、

- ・ 以下の配列：配列番号71、79、83又は95を有する核酸から選択され、その発現を可能にするエレメントの制御下にある第1の核酸、及び
  - ・ 以下の配列：配列番号59、75、87、91又は99を有する核酸から選択され、その発現を可能にするエレメントの制御下にある第2の核酸
- を含んでなる、上記の発現ベクターに関する。

10

【0047】

したがって、この発現ベクターは、2つの前記核酸配列を含んでなり、より具体的には上記モノクローナル抗体の軽鎖をコードする核酸配列及び上記モノクローナル抗体の重鎖をコードする核酸配列を含んでなる。

好ましくは、発現ベクターは、上記モノクローナル抗体の軽鎖をコードする核酸配列の発現を可能にする第1のエレメント及び上記モノクローナル抗体の重鎖をコードする核酸配列の発現を可能にする第2のエレメントを含有し、前記核酸配列の発現を可能にする第1のエレメント及び第2のエレメントは、同一であっても異なってもよいが、好ましくは同一である。これら制御エレメントは、特に、ウイルスRSVの長末端反復(LTR)配列である。

20

【0048】

本発明の別の1つの実施形態は、少なくとも1つの抗生物質耐性遺伝子を含んでなる上記発現ベクターに関する。

「少なくとも1つの耐性遺伝子」は、本発明においては、発現ベクターが1つ又は2つ又は3つ又は4つ又は5つ又は6つの抗生物質耐性遺伝子を含有することができることを意味する。

「抗生物質耐性遺伝子」は、本発明においては、その発現産物が細胞に対して細胞分裂停止効果(増殖の阻害)又は細胞溶解効果(細胞死)を発揮する遺伝子を規定する。本発明に係る抗生物質は、特に原核細胞に対して効果を有するが、酵母、植物、昆虫、両生類又は哺乳動物にかかわらず、真核細胞に対して効果を有することもある。

30

【0049】

より具体的には、発現ベクターは、原核細胞に特異的な抗生物質耐性遺伝子及び真核細胞に特異的な少なくとも1つ、好ましくは2つの抗生物質耐性遺伝子を有する。

原核細胞に特異的な抗生物質としては：アンピシリン、テトラサイクリン及びその誘導体、ハイグロマイシン、カナマイシンなどが挙げられる。真核細胞に特異的な抗生物質として：G418、ジェネテシン(G418の塩)、ピューロマイシン、メトトレキサート、プラスチジンなどが挙げられる。

【0050】

重鎖及び軽鎖をコードする興味対象の転写単位(TU)が、cDNAの形態で、RSVプロモーターの依存性下にクローニングされる。このプロモーターは、ラウス肉腫ウイルスのLTR(長末端反復)に相当し、これは、5'領域にエンハンサーエレメントを含有する。

40

オルタナティブスプライシングに最適化され、5'側のヒト $\beta$ -グロビンから単離されたドナー配列及び3'側の免疫グロブリンの重鎖可変領域の遺伝子に由来するアクセプター配列から構成された人工イントロンが、プロモーターの直ぐ3'側にクローニングされる。興味対象のTUは、重鎖についてはヒト起源(hGH)の成長ホルモン(GH)遺伝子に、軽鎖についてはウシ起源の成長ホルモン(bGH)遺伝子に由来するポリアデニル化配列で終止する。ポリAの選択におけるこの起源の相違は、興味対象の遺伝子間の組換えを制限する目的を有する。LTRRSVプロモーター、キメライントロン、cDNA及びポリA配列のこの組合せは、YB 2/0細胞株における高い転写及び翻訳活性を付与するので、選択した。

50

## 【 0 0 5 1 】

発現ベクターは、興味対象のTUに加えて、化学分子に対する抵抗性のための幾つかのTUを含有する。

Bla遺伝子：この遺伝子(ベクターの制限マップ中でAmpと呼ばれる)は、細菌中の酵素-ラクタマーゼを発現し(原核生物プロモーター)、アンピシリンに対する抵抗性を付与する。

Neo遺伝子：この遺伝子は、プロモーターSV40の制御下に酵素npt II(ネオマイシン-ホスホトランスフェラーゼII)をコードし、この遺伝子が発現するトランスフェクト哺乳動物細胞に、種々の抗生物質、例えばネオマイシン、カナマイシン又はG418に対する抵抗性を付与する。

Dhfr遺伝子：この遺伝子は、プロモーターSV40の制御下に酵素DHFR(ジヒドロ葉酸還元酵素)をコードし、メトトレキサート(MTX)に対する抵抗性を付与する。この方法は、MTXの濃度を増大させることによる遺伝子増幅に使用することができ、したがってトランスフェクト細胞による抗体産生の増加を生じ得る。

## 【 0 0 5 2 】

図18~22は、クローン3C\_23、6B\_78、3C\_23K、4C\_35及び5B\_42を作製するために使用した発現ベクターのマップを示す。

## 【 0 0 5 3 】

別の1つの観点において、本発明は、上記核酸及び/又は上記発現ベクターにより形質転換された宿主細胞又は細胞株に関する。

具体的には、前記細胞又は細胞株は、

- ・ 25%未満のアポトーシスを示し、
- ・ 細胞分裂の間に安定であり、
- ・ 少なくとも14 µg/mlの上記モノクローナル抗体を分泌する

点で特徴付けられる。

細胞安定性の概念は、本発明によるモノクローナル抗体の発現を可能にする少なくとも1つのベクターを含有する細胞に由来するクローン化細胞のクローニングから生じる細胞が、種々の分裂の間、抗生物質耐性を保存し、モノクローナル抗体を産生することができることである。

## 【 0 0 5 4 】

更に別の1つの観点において、本発明は、少なくとも、

- ・ 上記モノクローナル抗体、又は
- ・ 上記核酸、又は
- ・ 上記ベクター、又は
- ・ 上記モノクローナル抗体のフラグメント

を、医薬的に許容可能なビヒクルと共に含んでなる医薬組成物、特にワクチン組成物に関する。

有利には、本発明は、少なくとも1つの上記モノクローナル抗体を医薬的に許容可能なビヒクルと共に含んでなる医薬組成物、特にワクチン組成物に関する。

## 【 0 0 5 5 】

活性成分の投薬量は、特に、投与方法に依存し、当業者により容易に決定される。

「医薬的に許容可能なビヒクル」とは、細胞、細胞培養物、組織又は生物のような生物学的系と共存可能な非毒性の材料をいう。

治療有効量(単位用量)は、週1回以上の投与で数週間又は数ヶ月間の、0.01mg/kgから500mg/kgまで、好ましくは0.1mg/kgから500mg/kgまで、好ましくは0.1mg/kgから100mg/kgまで、好ましくは0.1mg/kgから20mg/kgまで、好ましくは0.1mg/kgから10mg/kg、より好ましくは1mg/kgから10mg/kgまで変化し得る。

更に、治療有効量(単位用量)は、週1回以上の投与で数週間又は数ヶ月間の、0.2mg/m<sup>2</sup>から10g/m<sup>2</sup>まで、好ましくは0.2mg/m<sup>2</sup>から1mg/m<sup>2</sup>まで、好ましくは2mg/m<sup>2</sup>から1g/m<sup>2</sup>まで、好ましくは20mg/m<sup>2</sup>から1g/m<sup>2</sup>、より好ましくは20mg/m<sup>2</sup>から0.5g/m<sup>2</sup>まで変化し得る

10

20

30

40

50

。

## 【 0 0 5 6 】

本発明の医薬組成物は、具体的には、(特に注射又は穏やかな灌流により)静脈内に、皮下に、全身に、浸潤により局所に、経口で、又はエアロゾルにより呼吸若しくは肺経路で投与することができる。

非経口投与用の調製物は、滅菌の水性又は非水性溶液、懸濁液又はエマルジョンを含むことができる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油(例えばオリーブ油)、又は注射可能な有機エステル(例えばオレイン酸エチル)である。水性ビヒクルは、水、アルコール/水溶液、エマルジョン又は懸濁液を含む。

## 【 0 0 5 7 】

本発明の医薬組成物の有利な医薬形態は、経口経路により投与ことができ、

- ・ 上記モノクローナル抗体、又は
- ・ 上記核酸、又は
- ・ 上記発現ベクター、又は
- ・ 前記モノクローナル抗体の上記フラグメント

を賦形剤と共に、噴霧剤の存在下又は非存在下に含む。

## 【 0 0 5 8 】

本発明の1つの実施形態において、エアロゾルは、変異ヒト化抗体及び賦形剤を含有する液体の形態である。賦形剤は、ほとんどの場合、アルコールであるが、当業者に公知の任意の他の賦形剤を本発明に関連して使用することができる。液体形態のエアロゾルは、噴霧剤ガス、例えばクロロフルオロカーボン(CFC)又はヒドロフルオロカーボン(HFA)と組み合わせることができる。

液体形態のエアロゾルはまた、液体微小粒子及び賦形剤からなることもできる。この場合、賦形剤は、合成ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ラクトース又はヒドロキシエチルデンプン(HES)から選択することができる。微小粒子は、その後、注入器(insufflator)を用いて投与される。

## 【 0 0 5 9 】

本発明の別の1つの実施形態において、エアロゾルは粉体の形態である。粉体は、1 ~ 10  $\mu\text{m}$ 、好ましくは9  $\mu\text{m}$ 未満、好ましくは5  $\mu\text{m}$ 未満のサイズの粒子から構成される。非限定的な例として、乾燥粉末を取得するための以下の方法を使用することができる：超音波の有方向沈降(ultrasound, directed precipitation)による、凍結乾燥又は結晶化を伴う噴霧。

エアロゾルは、液体形態か又は固体形態かに依存して、空気式、超音波式若しくは篩型であり得るネブライザーを用いるか、又は液体製剤については(加圧液体型、機械式、電気流体力学的、加熱型の)計量エアロゾルを用いるか、又は固体製剤については吸入器を用いて投与される(Reychler G., Dessanges JF及びVecellio L, Rev. Mal. Respir, 2007; 24: 1013-1023)。

## 【 0 0 6 0 】

別の1つの観点によれば、本発明は、ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターに

関係する疾患、特に  
 卵巣ガン、特に転移卵巣ガン、漿液性ガン、副腎腫、類内膜、膠状上皮、  
 前立腺ガン、  
 生殖細胞ガン、  
 子宮内膜ガン、  
 子宮の悪性混合ミューラー腫瘍、  
 平滑筋肉腫、  
 子宮内膜間質性肉腫

の患者の治療において、同時、別々又は逐次に使用するための組合せ調製物として、上記モノクローナル抗体を含む第1の医薬調製物と、従来の抗ガン剤化合物、特にパクリタキセル又は白金塩、特にオキサリプラチン、シスプラチン若しくはカルボプラチンを含む

10

20

30

40

50

第2の医薬調製物とを含んでなる生成物に関する。

【0061】

別の1つの観点によれば、本発明は、少なくとも：

- ・ 上記モノクローナル抗体、又は
- ・ 前記モノクローナル抗体の上記フラグメント、又は
- ・ 上記核酸、又は
- ・ 上記ベクター、又は
- ・ 上記細胞

の、ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターに関係する疾患、特に：  
 卵巣ガン、特に転移卵巣ガン、漿液性ガン、副腎腫、類内膜、膠状上皮、  
 前立腺ガン、  
 生殖細胞ガン、  
 子宮内膜ガン、  
 子宮の悪性混合ミューラー腫瘍、  
 平滑筋肉腫、  
 子宮内膜間質性肉腫

10

の治療又は予防を意図する医薬を製造するための使用に関する。

【0062】

「治療」は、症状が認識できる発症した病状を処置することを意味する。「予防」は、  
 前記病状の発症を防ぐことを意味する。

20

1つの有利な実施形態において、本発明は、上記抗体又はその上記フラグメントの、卵  
 巣ガンを診断し、及び/又はモニターするための使用に関する。

1つの有利な実施形態において、本発明は、従来の抗ガン剤薬、特にパクリタキセル  
 、又は白金塩、特にオキサリプラチン、シスプラチン若しくはカルボプラチンを追加的  
 に含んでなる上記抗体又はその上記フラグメントの使用に関する。

【0063】

別の1つの観点によれば、本発明は：

ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターに関係する病状、特に：  
 卵巣ガン、特に転移卵巣ガン、漿液性ガン、副腎腫、類内膜、膠状上皮、  
 前立腺ガン、  
 生殖細胞ガン、  
 子宮内膜ガン、  
 子宮の悪性混合ミューラー腫瘍、  
 平滑筋肉腫、  
 子宮内膜間質性肉腫

30

の治療又は予防に使用するための、

- ・ 上記モノクローナル抗体、又は
- ・ 前記モノクローナル抗体の上記フラグメント、又は
- ・ 上記核酸、又は
- ・ 上記ベクター、又は
- ・ 上記細胞、

40

に関する。

【0064】

1つの有利な実施形態において、上記モノクローナル抗体又はその上記フラグメントは  
 、ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターに関係するガン、特に：

卵巣ガン、特に転移卵巣ガン、漿液性ガン、副腎腫、類内膜、膠状上皮、  
 前立腺ガン、  
 生殖細胞ガン、  
 子宮内膜ガン、  
 子宮の悪性混合ミューラー腫瘍、

50

平滑筋肉腫、  
子宮内膜間質性肉腫

を診断し、及び/又はモニターするために使用する。

1つの有利な実施形態において、上記モノクローナル抗体若しくはその上記フラグメント、又は上記核酸又は上記ベクター又は上記細胞は、従来の抗ガン剤薬、特にバクリタキセル、又は白金塩、特にオキサリプラチン、シスプラチン若しくはカルボプラチンを追加的に含んでなる。

【0065】

別の1つの観点によれば、本発明は、少なくとも：

- ・ 上記モノクローナル抗体、又は
- ・ 前記モノクローナル抗体の上記フラグメント、又は
- ・ 上記核酸、又は
- ・ 上記ベクター、又は
- ・ 上記細胞、

を含んでなる、ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターに関する病状、特に卵巣ガンの診断に使用するキットに関する。

【0066】

別の1つの観点によれば、本発明は、以下の工程：

- a. 患者から事前に取得した生検を標識する工程、
  - b. ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターの存在を決定する工程
- を含んでなる、ヒト生物学的サンプルについて、ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターに関する病状、特に卵巣ガンを診断する方法に関する。

【0067】

別の1つの観点によれば、本発明は、以下の工程：

- a. 患者から生検を取得する工程、
  - b. 生検を標識する工程、
  - c. ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターの存在を決定する工程
- を含んでなる、ヒト生物学的サンプルについて、ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターに関する病状、特に卵巣ガンを診断する方法に関する。

生検の標識は当業者に周知の技法に従って行う。

レセプターの存在は、当業者に周知の技法、例えばイムノアッセイ、結合などにより決定することができる。

【0068】

別の1つの観点によれば、本発明は、以下の工程：

- a. 患者から生検を取得する工程、
- b. 生検を標識する工程、
- c. ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターの存在を決定する工程、
- d. ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターの存在が決定された場合、
  - i. 上記モノクローナル抗体、又は
  - ii. 前記モノクローナル抗体の上記フラグメント、又は
  - iii. 上記核酸、又は
  - iv. 上記ベクター、又は
  - v. 上記細胞

で患者を治療する工程

を含んでなる、ヒト生物学的サンプルについて、ヒト抗-ミューラー管ホルモンII型レセプターに関する病状、特に卵巣ガンを治療する方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】図1は、抗体の模式図に相当する。黒色の部分は重鎖定常部分に相当し、濃灰色の部分は軽鎖定常部分に相当し、淡灰色の部分は重鎖可変部分に相当し、白色の部分は軽

10

20

30

40

50

鎖可変部分に相当する。-S-S-は、2つのシステイン間に樹立されたジスルフィド橋架けを表す。CDR及びフレームワーク領域を矢印で示す。Fab及びFcフラグメントも示す。

【図2】図2は、免疫グロブリンの軽鎖又は重鎖の可変部分のアミノ酸配列の数珠様模式図に相当する。黒色のビーズはフレームワーク領域を形成するアミノ酸に相当し、灰色のビーズはCDRを表すアミノ酸に相当する。

【図3】図3は、ヒト化12G4抗体の重鎖可変部分のアミノ酸配列(図3A：アミノ酸1～115、配列番号8)及び軽鎖可変部分のアミノ酸配列(図3B：アミノ酸131～236、配列番号2)の数珠様模式図に相当し、番号付けは変異の位置を規定するために採用した。灰色影付きビーズは、配列中に存在しないため番号付けでカウントされないアミノ酸に相当する。

【図4】図4は、キメラ12G4抗体の重鎖可変部分のアミノ酸配列(配列番号66)の数珠様模式図に相当する。

【図5】図5は、キメラ12G4抗体の軽鎖可変部分のアミノ酸配列(配列番号62)の数珠様模式図に相当する。

【図6】図6は、非変異ヒト化12G4抗体及び変異ヒト化12G4抗体(6B\_78)の重鎖可変部分のアミノ酸配列(それぞれ配列番号58及び配列番号58)の数珠様模式図に相当する。

【図7】図7は、非変異ヒト化12G4抗体の軽鎖可変部分のアミノ酸配列(配列番号54)の数珠様模式図に相当する。

【図8】図8は、変異ヒト化12G4抗体(3C\_23)の重鎖可変部分のアミノ酸配列(配列番号74)の数珠様模式図に相当する。

【図9】図9は、変異ヒト化12G4抗体(3C\_23)の軽鎖可変部分のアミノ酸配列(配列番号70)の数珠様模式図に相当する。

【図10】図10は、変異ヒト化12G4抗体の軽鎖可変部分(6B\_78)のアミノ酸配列(配列番号78)の数珠様模式図に相当する。

【図11】図11は、変異ヒト化12G4抗体(3C\_23K)の重鎖可変部分のアミノ酸配列(配列番号86)の数珠様模式図に相当する。

【図12】図12は、変異ヒト化12G4抗体(3C\_23K)の軽鎖可変部分のアミノ酸配列(配列番号82)の数珠様模式図に相当する。

【図13】図13は、変異ヒト化12G4抗体(4C\_35)の重鎖可変部分のアミノ酸配列(配列番号90)の数珠様模式図に相当する。

【図14】図14は、変異ヒト化12G4抗体(4C\_35)の軽鎖可変部分のアミノ酸配列(配列番号78)の数珠様模式図に相当する。

【図15】図15は、変異ヒト化12G4抗体(5B\_42)の重鎖可変部分のアミノ酸配列(配列番号98)の数珠様模式図に相当する。

【図16】図16は、変異ヒト化12G4抗体(5B\_42)の軽鎖可変部分のアミノ酸配列(配列番号94)の数珠様模式図に相当する。

【図17】図17は、本発明による変異抗体(Fab)で得られた、従来のELISAアッセイにおけるAMHR-IIレセプターに対する抗体結合親和性の測定を表す。X軸は(Fab)の濃度を $\mu\text{g/ml}$ で示し、Y軸は450nmのODを示す。中抜き白丸印で示す点線曲線は非変異ヒト化12G4抗体の結合を表す。黒塗り三角印で示す曲線は、軽鎖可変領域のCDR中に変異(E184K)を有する変異ヒト化12G4抗体(6B\_78抗体)の結合を表す。中抜き白三角印で示す曲線は、軽鎖可変領域のCDR中に変異(S179P)を、軽鎖可変領域のFR領域中に変異(I177T)を、重鎖可変領域中に変異(Q3R)を有する変異ヒト化12G4抗体(3C\_23抗体)の結合を表す。中抜き白丸印で示す曲線は、軽鎖可変領域のCDR中に変異(E184K)を、軽鎖可変領域のCDR中に変異(S179P)を、軽鎖可変領域のFR領域中に変異(I177T)を、重鎖可変領域中に変異(Q3R)を有する変異ヒト化12G4抗体(3C\_23K抗体)の結合を表す。黒塗り丸印で示す曲線は非変異キメラ12G4抗体の結合を表す。

【図18】図18は、リーダー-VH AMHR-IIが重鎖可変領域(VH AMHR-II)に融合し、重鎖可変領域自体はヒト免疫グロブリンの定常領域(CH T125)に融合している重鎖と、リーダー-VK AMHR-IIが軽鎖可変領域(VK AMHR-II)に融合し、軽鎖可変領域自体はヒト免疫グロブリンの定常領域(CK T125)に融合している軽鎖とを含有するキメラ12G4抗体のためのH622-14ク

10

20

30

40

50

ローニングベクターの模式図に相当する。種々の調節エレメント(プロモーター、キメライントロン、ポリアデニル化部位など)並びに抗生物質耐性遺伝子及び複製起点もまた示されている。

【図19】図19は、ヒト化リーダー-VH AMHR-IIが重鎖可変領域(ヒト化VH AMHR-II)に融合し、重鎖可変領域自体はヒト免疫グロブリンの定常領域(CH T125)に融合している重鎖と、リーダー-VK AMHR-IIが軽鎖可変領域(ヒト化VK AMHR-II)に融合し、軽鎖可変領域自体はヒト免疫グロブリンの定常領域(CK T125)に融合している軽鎖とを含有する非変異ヒト化12G4抗体のためのH622-18クローニングベクターの模式図に相当する。種々の調節エレメント(プロモーター、キメライントロン、ポリアデニル化部位など)並びに抗生物質耐性遺伝子及び複製起点もまた示されている。

10

【図20】図20は、リーダー-VH 3C\_23が重鎖可変領域(VH 3C\_23)に融合し、重鎖可変領域自体はヒト免疫グロブリンの定常領域(CH T125)に融合している重鎖と、リーダー-VK 3C\_23が軽鎖可変領域(VK 3C\_23)に融合し、軽鎖可変領域自体はヒト免疫グロブリンの定常領域(CK T125)に融合している軽鎖とを含有する変異ヒト化12G4抗体3C\_23のためのH622-18クローニングベクター-MAO 3C23の模式図に相当する。種々の調節エレメント(プロモーター、キメライントロン、ポリアデニル化部位など)並びに抗生物質耐性遺伝子及び複製起点もまた示されている。

【図21】図21は、ヒト化リーダー-VH AMHR-IIが重鎖可変領域(ヒト化VH AMHR-II)に融合し、重鎖可変領域自体はヒト免疫グロブリンの定常領域(CH T125)に融合している重鎖と、リーダー-VK 6B\_78が軽鎖可変領域(VK 6B\_78)に融合し、軽鎖可変領域自体はヒト免疫グロブリンの定常領域(CK T125)に融合している軽鎖とを含有する変異ヒト化12G4抗体6B\_78のためのH622-18クローニングベクター-MAO 6B\_78の模式図に相当する。種々の調節エレメント(プロモーター、キメライントロン、ポリアデニル化部位など)並びに抗生物質耐性遺伝子及び複製起点もまた示されている。

20

【図22】図22は、リーダー-VH 3C\_23Kが重鎖可変領域(VH 3C\_23K)に融合し、重鎖可変領域自体はヒト免疫グロブリンの定常領域(CH T125)に融合している重鎖と、リーダー-VK 3C\_23Kが軽鎖可変領域(VK 3C\_23K)に融合し、軽鎖可変領域自体はヒト免疫グロブリンの定常領域(CK T125)に融合している軽鎖とを含有する変異ヒト化12G4抗体3C\_23KのためのH622-18クローニングベクター-MAO 3C\_23Kの模式図に相当する。種々の調節エレメント(プロモーター、キメライントロン、ポリアデニル化部位など)並びに抗生物質耐性遺伝子及び複製起点もまた示されている。

30

【図23】図23は、scFvフラグメントの構築のための模式的プロトコルを表す。VHの領域2/3の下方の黒矢印は、ペプチド結合のN-末端側2/3をコードする配列を示す。VLの領域2/3の下方の黒矢印は、ペプチド結合のC-末端側2/3をコードする配列を示す。

【図24】図24A及び24Bは、pMG62-Fab発現ベクター中への、mLFB112及びhuLFB112抗体の軽鎖VL-CL及び重鎖VH-CH1のヌクレオチド配列のサブクローニングを示す。図24A：mLFB112。図24B：huLFB112。

【図25】図25は、非変異ヒト化12G4抗体のものと比較した本発明のヒト化抗-AMHR II抗体のADCC活性を提示する。結果は、加えた抗体の量(ng/ml)(X軸)の関数としてのASC1細胞のパーセンテージ溶解(Y軸)として表す。平均±SEM。菱形印で示す曲線は抗-AMHR II抗体3C\_23(R901 3C\_23)を表し、上向き三角印で示す曲線は抗-AMHR II抗体6B\_78(R901 6B\_78)を表し、下向き三角印で示す曲線は抗-AMHR II抗体3C\_23K(R901 3C\_23K)を表し、丸印で示す曲線は非変異ヒト化抗-AMHR II抗体12G4を表す。

40

【図26】図26は、cov434-AMHR II株の作製に使用したpIRES-neoプラスミド発現ベクターのマップを示す。

【図27】図27A及び27Bは、YB2/0細胞(図27A)及びCHO細胞(図27B)中で産生されたキメラ及びヒト化抗-AMHR II抗体の、COV434-AMHR II株に対するADCC活性を提示する。結果は、加えた抗体の量(ng/ml)(X軸)の関数としてのCOV434-AMHR II細胞のパーセンテージ溶解(Y軸)として表す。3アッセイの平均±SEM。図27A：菱形印で示す曲線は非変異キメラ12G4抗-AMHR II抗体を表し、塗りつぶし四角印で示す曲線は抗-AMHR II抗体YB2/0 3C\_23(R901 3

50

C\_23)を表し、下向き三角印で示す曲線は抗-AMHR11抗体YB2/0 6B\_78(R901 6B\_78)を表し、上向き三角印で示す曲線は抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23K(R901 3C\_23K)を表し、中抜き四角印で示す曲線はネガティブコントロールとして使用した抗-CD20抗体を表す。図27B：菱形印で示す曲線は非変異キメラ12G4抗-AMHR11抗体を表し、上向き三角印で示す曲線は抗-AMHR11抗体CHO 3C\_23(R901 3C\_23)を表し、下向き三角印で示す曲線は抗-AMHR11抗体CHO 3C\_23K (R901 3C\_23K)を表し、丸印で示す曲線は抗-AMHR11抗体CHO 6B\_78(R901 6B\_78)を表し、中抜き四角印で示す曲線はネガティブコントロールとして使用した抗-CD20抗体を表す。

【図28】図28は、YB2/0及びCHO細胞中で産生したヒト化抗-AMHR11抗体の、Asc 1株に対するADCC活性を示す。結果は、加えた抗体の量(ng/ml)(X軸)の関数としてのAsc 1細胞のパーセンテージ溶解(Y軸)として表す。3テストの平均±SEM。菱形印で示す曲線は抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23Kを表し、上向き三角印で示す曲線は抗-AMHR11抗体CHO 3C\_23Kを表す。

10

【図29】図29は、YB2/0及びCHO中で産生したヒト化抗-AMHR11抗体の、META 2815株に対するADCC活性を示す。結果は、加えた抗体の量(ng/ml)(X軸)の関数としてのMETA 2815細胞のパーセンテージ溶解(Y軸)として表す。3テストの平均±SEM。菱形印で示す曲線は抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23Kを表し、上向き三角印で示す曲線は抗-AMHR11抗体CHO 3C\_23Kを表し、丸印で示す曲線はネガティブコントロールとして使用した抗-CD20抗体(抗-CD20 A/R603 09/045)を表す。

【図30】図30は、COV434-AMHR11細胞の増殖に対する抗-AMHR11抗体3C\_23Kの効果を示す。値100%は、抗体なしで観察されたCOV434-AMHR11細胞の増殖に相当する(3テストの平均±SD)。左から右へ、ヒストグラムは：抗体なしコントロール、抗P24抗体、抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23K、抗-AMHR11抗体CHO 3C\_23K、架橋剤(CK)の存在下での抗P24抗体、CKの存在下での抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23K、CKの存在下での抗-AMHR11抗体CHO 3C\_23K、1 µg/mlのコルヒチンを示す。

20

【図31】図31は、META 2815細胞の増殖に対する抗-AMHR11抗体3C\_23Kの効果を示す。値100%は、抗体なしで観察されたMETA 2815細胞の増殖に相当する(3テストの平均±SD)。左から右へ、ヒストグラムは：抗体なしのコントロール、抗P24抗体、抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23K、抗-AMHR11抗体CHO 3C\_23K、架橋剤単独、架橋剤(CK)の存在下での抗P24抗体、CKの存在下での抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23K、CKの存在下での抗-AMHR11抗体CHO 3C\_23K、1 µg/mlのコルヒチンを示す。

30

【図32】図32A及び32Bは、cov434-AMHR11モデルにおいて、合計18回の注射(黒矢印)について2~3日間隔にて10mg/kg/注射の用量で実施した抗体の腹腔内注射による3C23K-YB2/0での処置の効果の下での腫瘍体積(図32A)及び生存曲線(図32B)の変動を示す。図32A：Y軸：腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)、X軸：腫瘍細胞注射後の日数、菱形印で示す曲線：ビヒクル、四角印で示す曲線：抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23K。図32B：Y軸：パーセンテージ生存率、X軸：腫瘍細胞注射後の日数、菱形印で示す曲線：ビヒクル、四角印で示す曲線：抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23K。

【図33】図33A及び33Bは、Asc1a5モデルにおいて、合計18回の注射(黒矢印)について2~3日間隔にて10mg/kg/注射の用量で実施した抗体の腹腔内注射による3C\_23K-YB2/0での処置の効果の下での腫瘍体積(図33A)及び生存曲線(図33B)の変動を示す。図33A：Y軸：腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)、X軸：腫瘍細胞注射後の日数、菱形印で示す曲線：ビヒクル、四角印で示す曲線：抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23K。図33B：Y軸：パーセンテージ生存率、X軸：腫瘍細胞注射後の日数、菱形印で示す曲線：ビヒクル、四角印で示す曲線：抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23K。

40

【図34】図34A及び34Bは、META 2815モデルにおいて、合計18回の注射(黒矢印)について2~3日間隔にて10mg/kg/注射の用量で実施した抗体の腹腔内注射による3C\_23K-YB2/0での処置の効果の下での腫瘍体積(図34A)及び生存曲線(図34B)の変動を示す。図34A：Y軸：腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)、X軸：腫瘍細胞注射後の日数、菱形印で示す曲線：ビヒクル、四角印で示す曲線：抗-AMHR11抗体YB2/0 3C\_23K。図34B：Y軸：パーセンテージ生存率、X軸

50

：腫瘍細胞注射後の日数、菱形印で示す曲線：ピヒクル、四角印で示す曲線：抗-AMHR II 抗体YB2/0 3C\_23K。

【実施例】

【0070】

実施例

実施例1：抗-AMHR-II抗体の親和性の測定

抗体のその抗原AMHR-IIについての親和性は、BIAcore X100(BIAcore, GE Healthcare)でのSPR(表面プラズモン共鳴)技法により測定する。領域Fcとの融合タンパク質の形態で発現させたAMHR-II組換えレセプターを、そのアミン官能基と、タイプCM5センサチップの表面に存在するスクシンイミドエステル中で活性化されたデキストランのカルボキシル基との間を共有結合することにより固定化する。センサチップのCOOH基は、EDC/NHS混合物(0.1MのN-ヒドロキシスクシンイミド及び0.1Mの3-(N,N-ジメチルアミノ)プロピル-N-エチルカルボジイミド)で10 µl/分の流量にて7分間活性化し、次いで10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0)中5 µg/mlに希釈したAMHR-II/Fc融合タンパク質を、300RUに達するように、センサチップのトラック2に5 µl/分にて注入する。融合タンパク質のアミンと反応しなかったエステル基は、エタノールアミン-HCl(1 M, pH8.5)の溶液の10 µl:分のフローにて7分間の注入により不活化させる。(ネガティブコントロールとして用いる)トラック1を、トラック2と同様に活性化し、不活化した。

10

【0071】

全ての測定は25 °Cにて行う。分析すべき抗体は、HBS-EPランニング緩衝液(BIAcore, GE Healthcare)中で6.25~3333nMの濃度に希釈し、30 µl/分のフローで2分間センサチップに注入する。解離工程を10分間モニターした後、10mMグリシン緩衝液(pH1.5)の10 µl/分での30秒間の注入により表面を再生する。

20

BIAevaluation 3.1ソフトウェアの1:2動力学モデルを用いて、得られたセンサグラム(sensorgram)を分析する。

【0072】

結果

抗体をCHO又はYB 2/0細胞中で産生した(表I)。

【表 1】

表 I

抗体	変異	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)	$K_D^{+17}/K_D^{変異}$
12G4 - キメラ	NA	$3,5 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^{-4}$	212	-
6B_78 YB2/0	VL-E184K	$1,6 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	82	2,6
3C_23 YB2/0	VH-Q3R VL-I177T/S179P	$3,6 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^{-3}$	92	2,3
3C_23K YB2/0	VH-Q3R VL-I177T/S179P/E184K	$4 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10^{-4}$	21	10
6B_78 CHO	VL-E184K	$1,5 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	81	2,6
3C_23 CHO	VH-Q3R VL-I177T/S179P	$5 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^{-3}$	86	2,5
3C_23K CHO	VH-Q3R VL-I177T/S179P/E184K	$4,1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^{-3}$	25	8,5

10

20

## 【 0 0 7 3 】

6B\_78及び3C\_23抗体に導入した変異は、AMHR-II抗原に関する親和性に、キメラ抗体(12G4 - キメラ)に比して2.3~2.6倍の増大を誘導する。

2つの抗体6B\_78及び3C\_23の変異は相乗効果を有し；6B\_78抗体の変異の3C\_23抗体への導入は、親和性に10倍の増大を引き起こす。

30

## 【 0 0 7 4 】

実施例 2 : cov434-AMHR-II細胞に対するキメラ又はヒト化マウス12G4抗体の親和性測定 (配列 : GGGGNTQDRAQVEMQGSR (配列番号101) 及びGGGGNTQARGQVEMQGSR (配列番号102) (ネガティブコントロールペプチド用)のエピトープペプチド)

## 【表 2】

	結合定数	解離定数	平衡時の親和定数
ヒト化12G4	$1.83 \times 10^3 M^{-1} \cdot s^{-1}$	$9.62 \times 10^{-3} s^{-1}$	$5.26 \times 10^{-6} M$
キメラ12G4	$6.49 \times 10^3 M^{-1} \cdot s^{-1}$	$1.53 \times 10^{-3} s^{-1}$	$2.35 \times 10^{-7} M$
マウス12G4		$1.47 \times 10^{-3} s^{-1}$	$10^{-7} M$ のオーダー

40

AMHR-IIヒトレセプターについて測定したキメラ抗体の親和性は、約 $10^{-8} M$ である。

## 【 0 0 7 5 】

実施例 3 : 変異ヒト化12G4抗体の作製

マウス抗体はキメラ抗体と実質的に等価であり、強い親和性を示す。

50

ヒト化12G4抗体(huLFB112)は、マウス12G4抗体(mLFB112)の超可変CDRループを、ヒト性フレームワークタンパク質にグラフトすること(「CDRグラフティング」)によって取得した。

ヒト化抗体は、マウス抗体と比較して親和性をかなり喪失している。

したがって、最終目的は、マウス抗体の当初の結合特性を回復するように、ヒト化抗体の親和性を増大させることである。この最適化は、Millegen社が保有するMutaGen技術による分子進化のサイクルを用いることによって実施する。

【0076】

### 3.1 分子ツールの構築及び検証

#### 3.1.1 scFvフラグメントの構築

マウス及びヒト化抗体の軽鎖及び重鎖可変領域(それぞれ、VL及びVH)をコードするヌクレオチド配列を、適切なプライマーを用いるPCRにより増幅した。scFvタイプの組換え抗体フラグメントを作製するために、増幅配列を組み合わせた。この方法で幾つかの構築を行った：VH-VL又はVL-VH方向及び2つの異なるペプチド結合(15又は18アミノ酸のペプチド結合)の使用。マウス抗体について4つ、ヒト化抗体について4つの、合計8つの構築を行った。scFvフラグメントの構築の原理を、下記で説明する(スキームI)。次いで、これらscFvをコードする配列を、Millegenファージミド発現ベクター(pMG58)中にサブクロニングした。このベクターにより、scFvタイプの抗体フラグメントの発現が可能になり、それらフラグメントの、タイプM13バクテリオファージの表面への提示が可能になる(ファージ-scFv)。

マウス及びヒト化抗体のVH及びVLドメインのヌクレオチド配列は、DNA配列決定によって検証した。

プロトコルを図23にまとめる。

【0077】

#### 3.1.2 ファージ表面へのscFvの発現及びELISAによる特徴決定

供給した標的の量(80 µg)では、なされた8つ全ての構築を試験することはできなかった。以下では、scFvの形態で発現したマウス抗体mLFB112をmVH-VLと呼び、ヒト化抗体huLFB112はhuVH-VLと呼ぶ。

【0078】

##### 3.1.2.1 ファージ-scFvの作製

一方ではscFv mVH-VLをコードするDNAを含有するpMG58ベクターにより、他方ではscFv huVH-VLをコードするDNAを含有するpMG58ベクターにより形質転換したXL1-Blue細菌を、30 ℃にて0.5~0.6のOD600nmまで培養する。IPTGの添加及び細菌の補助ファージ(M13K07, New England Biolabs)での感染後、培養物を26 ℃にて一晩培養する。翌日、ファージ粒子(ファージ-scFv)を培養上清から回収し、PEG/NaCl溶液を用いて沈降させ、濃縮し(100×)、定量する。

この場合、2つのscFvについて、 $8 \times 10^{11}$ ファージ/mlのオーダーの濃縮が得られる。

【0079】

##### 3.1.2.2 ELISA-ファージアッセイ

ファージ表面に産生されたscFv mVH-VL及びhuVH-VLの機能性を、直接ELISAアッセイにより検証した。

プロトコル：

1) 標的の固定：PBS1×中5 µg/mlに希釈した100 µl/ウェル(すなわち、500ng/ウェル)の組換え標的を、4 ℃にて一晩。Nunc-Immuno Plate Maxisorpマイクロタイタープレートの使用。

2) 飽和：200 µl/ウェルのPBS1×-スキムミルク4%、37 ℃にて2時間のインキュベーション。

3) 結合：100 µl/ウェルの、PBS1×-ミルク2%-Tween20 0.05%中に希釈したファージ-マウス及びヒト化scFv溶液(2倍希釈系列)、37 ℃にて2時間のインキュベーション。

4) 検出：100 µl/ウェルの、ペルオキシダーゼにカップリングした抗-ファージM13抗体(

10

20

30

40

50

希釈率1/10000、GE Healthcare)、37 にて2時間のインキュベーション。

5)検出：100  $\mu$  l/ウェルのTMB

6)中和：100  $\mu$  l/ウェルの H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

7)450nmでのOD測定

【 0 0 8 0 】

結果(表II)：

【表 3】

表 II

ファージ数/ウェル	mVH-VL			huVH-VL			比 mVH-VL/ huVH-VL
	+ 被覆	被覆なし	Diff	+ 被覆	被覆なし	Diff	
3,00E+10	2,805	0,158	2,647	1,247	0,150	1,097	2,4
3,00E+10	2,193	0,085	2,107	0,689	0,096	0,593	3,6
3,00E+09	1,570	0,064	1,506	0,395	0,072	0,323	4,7
3,00E+09	0,946	0,059	0,887	0,226	0,056	0,170	5,2
3,00E+09	0,495	0,049	0,446	0,135	0,049	0,086	5,2

Diff：特異的結合(被覆ありのウェルと被覆なしのウェルとの差)

比mVH-VL/huVH-VLは特異的結合(「Diff」)の値を用いて算出

【 0 0 8 1 】

### 3.1.3：Fabフラグメントの構築

抗体mLFB112及びhuLFB112の軽鎖VL-CL及び重鎖VH-CH1のヌクレオチド配列を、pMG62-Fab発現ベクター中にサブクローニングした(図24A及び24B)。

pMG62-Fab発現ベクター

A) 2つの鎖VL-CL及びVH-CH1は、軽鎖上流のpLacプロモーターから始まるように発現させ、重鎖VH-CH1は、検出用タグ(ペプチドV5)及びIMACでの精製用タグ(6 x His)に融合させる。

B) 軽鎖及び重鎖の各々はプロモーターに依存性である。RBS：リボソーム結合部位。

【 0 0 8 2 】

### 3.2 分子ツールの構築及び検証

MutaGen<sup>TM</sup>によるライブラリの構築

この工程のための目的は、scFvあたり1~2アミノ酸変異を有する5 x 10<sup>6</sup>変形体のデータベースを取得することであった。

変異を、MutaGen<sup>TM</sup>技術によりヒト化抗体huLFB112のドメインVL及びVHに導入した。最終的に、scFvあたり1~5アミノ酸変異を有する約5 x 10<sup>7</sup>の変異クローンから構成される大きなデータベースが得られた。すなわち、当初に想定したものの10倍の多様性が得られた。

このため、異なる実験条件に従って幾つかのサブデータベースを構築した：異なるヌクレオチドプライマー、使用するムターゼ酵素、及び複製数により規定される条件U、M、US及びUE。これらサブデータベースは数が4であり、R20U、45M、R20US及びR20UEと名付けられた。これら全てのサブデータベースで合計295配列について、異なる変異誘発特性を正確に規定した。下記の表IIIは、配列決定操作の分析から得られた基本データの概念を示す。

【 0 0 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表Ⅲ. 種々のサブデータベースの変異の分析

	データベースの名称				合計
	R20U	45M	R20US	R20UEta	
データベースのサイズ	2,0E+07	6,0E+06	9,9E+07	5,0E+05	1,3E+08
条件	U	M	US	UE	
配列数	87	67	85	56	295

10

## ヌクレオチド配列の分析

kbあたりの 変異の頻度	2,76	3,66	3,31	4,9
欠失の%	10%	20%	6%	5%
付加の%	2%	-	0,8%	-
置換の%	72%	80%	93%	95%
kbあたりの 変異の頻度 (欠失を除く)	2,0	2,45	3,10	3,68

20

【表 4 - 2】

## アミノ酸配列の分析

配列の(重量)% (+サイレント変異)	63%	46%	44%	41%	
リーディングフレームシフトを 伴う配列(+停止 コドン)の%	13%	28%	13%	27%	
変異アミノ酸を 有する配列の%	24%	25%	43%	32%	
変異アミノ酸を 有するscFvクローンの 数	4,8E+06	1,5E+06	4,3E+07	1,6E+05	4,9E+07
scFvあたりの アミノ酸変異 の数	1,3	1,2	1,8	2,11	
1つの変異アミノ酸を 有するscFvクローン	65%	49%	50%	33%	2,5E+07
2つの変異アミノ酸を 有するscFvクローン	25%	34%	33%	39%	1,6E+07
3つの変異アミノ酸を 有するscFvクローン	10%	13%	8%	6%	4,2E+06
4つの変異アミノ酸を 有するscFvクローン	-	4%	6%	22%	2,5E+06
5つの変異アミノ酸を 有するscFvクローン	-	-	3%	-	1,2E+06

10

20

30

## 【0084】

## 3.2. 選択条件の樹立

異なる選択戦略を評価するために、ファージ-マウスscFvとファージ-ヒト化scFvとの人工的混合物を調製した(1/200混合物、mLFB112/huLFB112)。この目的はデータベースのスクリーニングをシミュレートすることである。このスクリーニングシミュレーションにより、この人工混合物内の最近縁クローン(most affine clone)(すなわち、この場合にはマウスクローンmLFB112)を迅速に増幅するという目的を有する種々の選択条件の検証が可能にならなければならない。

40

## 【0085】

評価した種々の戦略:

i) 選択サイクルの経過中における一定量の固定標的の使用(Cond 1)

ii) 選択サイクルの経過中における固定標的の量の減少(Cond 2)

iii) 「 $k_{off}$ 」条件についての試験: ファージ-scFvと標的との長いインキュベーション時間

50

(Cond 3)

これら種々の条件を3回の選択サイクルで行った。各選択サイクル後に保持されたクローンについて、配列決定を行った。結果を下記の表IVに示す。

【 0 0 8 6 】

【表 5】

表IV. 3つのスクリーニングストラテジの評価

条件 1	Bp1	Bp2	Bp3
被覆	500 ng	500 ng	500 ng
選択サイクルに使用した scFvファージ 数	1,6E+11	1,2E+11	2,0E+11
選択サイクルの終時に回収した scFvファージ 数	3,3E+5	2,4E+5	2,7E+6
mLFB112/huLFB112 の %	0/100	1/99	90/10

10

条件 2	Bp1	Bp2	Bp3
被覆	500 ng	100 ng	100 ng
選択サイクルに使用した scFvファージ 数	1,6E+11	1,2E+11	1,8E+11
選択サイクルの終時に回収した scFvファージ 数	3,3E+5	2,4E+5	2,7E+6
mLFB112/huLFB112 の %	0/100	1/99	30/70

20

条件 3	Bp1	Bp2	Bp3
被覆	500 ng	100 ng $k_{off}$	100 ng $k_{off}$
選択サイクルに使用した scFvファージ 数	1,6E+11	1,8E+11	1,6E+11
選択サイクルの終時に回収した scFvファージ 数	3,3E+5	6,7E+5	2,0E+6
mLFB112/huLFB112 の %	0/100	1/99	30/70

30

40

【 0 0 8 7 】

これら結果からは、条件 1 (固定量の標的) が、より良好な親和性を有するクローン (mLFB112) の増幅について最高性能 (10中9クローン) を示すように見える。より少量の標的 (100ng/ウェル) を用いると、適切性が減少するようである；3回の選択サイクル後、10中僅か3クローンが、より良好な親和性を有するクローンに相当する。同じことが、長いインキュベーション時間に基づく条件 3 (「 $k_{off}$  選択」) にも言え、この条件は、クローン mLFB112 の十分な増幅を可能にしない。更に、この最後に言及した条件について3サイクル後に回収したファージの数は高くない ( $2 \times 10^4$  ファージ)。したがって、このプロジェクトに関して構築されたデータベースのように、より多様化したクローン混合物については、条件 2 及び 3 の使用は推奨できないようである。

50

## 【 0 0 8 8 】

## 3.3. 一次スクリーニング(選択サイクル)

したがって、スクリーニング条件の樹立後、2つのスクリーニング条件の使用を決定した：

Cond A：1  $\mu\text{g}$ /ウェルの標的で4回の選択サイクル、次いで0.5  $\mu\text{g}$ /ウェルで3回の選択サイクル

Cond B：0.5  $\mu\text{g}$ /ウェルで6回の選択サイクル

得られた結果を下記表Vに示す。

## 【 0 0 8 9 】

## 【表6】

10

表V：選択サイクルの結果

条件A	選択	選択	選択	選択	選択	選択
	サイクル	サイクル	サイクル	サイクル	サイクル	サイクル
	1	2	3	4	5	6
被覆	1 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$	0,5 $\mu\text{g}$	0,5 $\mu\text{g}$
選択サイクルに使用した scFv7アージ数	4,8E+11	8,0E+11	2,8E+11	8,0E+11	4,5E+11	6,0E+11
選択サイクルの終時に回収した scFv7アージ数	2,0E+5	1,3E+5	2,4E+5	7,5E+5	7,3E+5	1,4E+5
条件B	選択	選択	選択	選択	選択	選択
	サイクル	サイクル	サイクル	サイクル	サイクル	サイクル
	1	2	3	4	5	6
被覆	0,5 $\mu\text{g}$	0,5 $\mu\text{g}$	0,5 $\mu\text{g}$	0,5 $\mu\text{g}$	0,5 $\mu\text{g}$	0,5 $\mu\text{g}$
選択サイクルに使用した scFv7アージ数	4,8E+11	8,0E+11	3,2E+11	6,4E+11	7,5E+10	4,2E+11
選択サイクルの終時に回収した scFv7アージ数	2,0E+5	8,6E+5	5,4E+5	1,3E+5	2,6E+5	6,5E+5

20

30

40

## 【 0 0 9 0 】

これらの選択後、3回目の選択サイクルから始まる取得クローンを配列決定した。得られた結果を、出発データベースについて得られたものと比較した(表VI)。

【表 7】

表VI：配列決定の結果

	データベース	選択 サイクル 3	選択 サイクル 4	選択 サイクル 5	選択 サイクル 6
配列数	295	87	168	114	98
変異アミノ酸を 有する配列の%	39%	26%	26%	35%	20%
リーディングフレームシフト を伴う配列の%	14%	13%	27%	32%	49%
配列(+サイト変異) の(重量)%	47%	61%	48%	34%	32%

データベース：4つのデータベースR20U、45M、R20US、R20Uetaの混合から  
得られる当初のデータベース

これら配列決定操作の分析により、冗長なクローンの存在が明らかとなった。まとめると、配列決定したクローンの全てから、113の独特な変異クローンが得られた。

【0091】

#### 3.4. 二次スクリーニング(ELISA-ファージ)

二次スクリーニングは、一次スクリーニングの終時に選択したクローンを個々に解析することからなる。このために、113の独特な変異クローンを培養プレートに移した(96ウェル-1.2ml)。

ファージ粒子の産生後、ファージ-scFvを含有する培養上清を、ELISA結合アッセイを実施するために使用した。変異クローンの結合を2つの希釈物で評価した(scFv-ファージを含有する上清の1/2及び1/4)。scFv-ファージ形式で構築したマウスクローン(mLFB112)及びヒト化クローン(huLFB112)を、アッセイプレートの各々で参照として使用した。変異クローンの各々を少なくとも2回試験した。

結果を、変異クローンと参照huLFB112及びmLFB112との間の結合比、すなわち差(OD405nm)として表す。

- ヒト化scFv huLFB112に対する比(比/huLFB112)
- マウスscFv mLFB112に対する比(比/mLFB112)

【0092】

試験した113クローンのうち、最良のクローンのみを下記で示す。

下記の表VIIは、得られた種々のクローン、及び軽鎖及び/又は重鎖に存在する変異(アミノ酸の位置及び置換)、並びにELISAにより決定したクローンの結合親和性を示す。

置換の後に示した値は、種々の置換に応じたヒドロパシー指標の値の変化に相当する。

結合親和性の値は、AMHRR-IIレセプターについての、非変異ヒト化12G4抗体の結合親和性又は非変異キメラ12G4抗体の結合親和性に対する本発明の抗体の結合親和性の比に相当する。

示された結合親和性の値は、少なくとも4つの値の平均値であり、括弧内の数字は標準偏差に相当する。

表VIIは、行った置換と共に、置換が、ヒドロパシー指標の大きな変化を導くにもかかわらず、該レセプターに対する抗体の結合親和性は、非変異ヒト化12G4抗体のものより遥

10

20

30

40

50

かに大きく、非変異キメラ12G4抗体のものと少なくとも等しい：1に等しいか又は1より大きい比 本発明のAB/キメラ12G4。

変異ヒト化抗体は、キメラ若しくはマウス抗体のものに回復している親和性、又はキメラ若しくはマウス抗体のものより大きくさえある親和性を示す。

【 0 0 9 3 】

【表 8 - 1】

表Ⅶ

	番号付け	番号付け	ELISAにより決定した 標的AMHR II-Fcへの結合	
	VH	VL	比 本発明のAb/ ヒト化12G4	比 本発明のAb/ キメラ12G4
クローン	1 - 115	131 - 236		
4C_35	L45P +3,8_-1,6	E184K -3,5_-3,9	4,3 (0,5)	1,9 (0,4)
5B_81	L45P +3,8_-1,6	-	3,5 (0,9)	1,6 (0,3)
6B_78	-	E184K -3,5_-3,9	NT	NT
3C_23	Q3R -3,5_-4,5	I177T +4,5_-0,7 S179P -0,8_-1,6	2,6 (1,1)	1,2 (0,3)
3C_23K	Q3R -3,5_-4,5	I177T +4,5_-0,7 S179P -0,8_-1,6 E184K -3,5_-3,9	NT	NT
5B_42	T74A -0,7_1,8	S179P -0,8_-1,6	NT	NT
4F_196	Q3E -3,5_-3,5 Q62R -3,5_-4,5 E89D -3,5_-3,5	-	3,0 (1,0)	1,5 (0,3)
6B_87	Q1E -3,5_-3,5 A24V +1,8_+4,2	-	2,1 (0,2)	1,0 (0,1)
4F_169	Q6E -3,5_-3,5 T58A -0,7_+1,8	-	2,0 (0,7)	1,0 (0,2)
3D_74	-	S158P -0,8_-1,6	2 (0,7)	0,8 (0,2)
4C_44	R87G -3,9_-0,4		NT	NT
5A_66	V67M +4,2_+1,9	F212S +2,8_-0,8	2,2 (0,4)	1,1 (0,1)
6B_14	S31G -0,8_-0,4 Q39E -3,5_-3,5	-	2,6 (0,3)	1,1 (0,2)
4C_47	Q3E -3,5_-3,5 S88P -0,8_-1,6	-	NT	NT
4E_153	D56N -3,5_-3,5 I70N +4,5_-3,5 F102S +2,8_-0,8	-	2,0 (0,4)	1,0 (0,1)
3C_24	-	E184G -3,5_-0,4	NT	NT
5B_18	Q3E -3,5_-3,5 A9T +1,8_-0,7 A103T +1,8_-0,7	-	1,8 (0,2)	0,9 (0,2)
5B_84	Q1E -3,5_-3,5 A24G +1,8_-0,4	-	NT	NT
6B_86	Q3E -3,5_-3,5	G179D -0,4_-3,5	NT	NT
4D_91	Q1E -3,5_-3,5 V11A +4,2_+1,8	-	1,7 (0,1)	0,8 (0,2)

10

20

30

40

【表 8 - 2】

6B_76	A40V +1,8_+4,2	S179P -0,8_-1,6	1,7 (0,1)	0,8 (0,2)
5A_28	-	Y178H -1,3_-3,2 S179P -0,8_-1,6	1,6 (0,6)	0,8 (0,2)
3D_57	A76T +1,8_-0,7 A79T +1,8_-0,7	-	NT	NT
6A_80	A24V +1,8_+4,2 Q62E -3,5_-3,5	-	1,5 (0,2)	1,3 (0,1)
5B_67	K12R -3,9_-4,5	-	NT	NT
5B_86	S31G -0,8_-0,4 Q39E -3,5_-3,5	I132T +4,5_-0,7 A143T +1,8_-0,7	NT	NT
5A_73	A24V +1,8_+4,2	-	NT	NT
5B_33	A76T +1,8_-0,7	-	NT	NT
3B_71	S114T -0,8_-0,7	S179P -0,8_-1,6	NT	NT
3B_87	-	L175Q +3,8_-3,5	NT	NT
3D_68	-	T150A -0,7_1,8	NT	NT
4E_112	L110P +3,8_-1,6	V187A +4,2_+1,8 S192T -0,8_-0,7	NT	NT
5B_54	A24T +1,8_-0,7	-	NT	NT
6A_18	K13R -3,9_-4,5	-	NT	NT
3C_40	-	P224A -1,6_+1,8	NT	NT
5A_83	Q62E -3,5_-3,5 S179P -0,8_-1,6 A79T +1,8_-0,7	-	NT	NT
5A_19	Q3E -3,5_-3,5	S182F -0,8_+2,8	NT	NT
3A_29	V20A +4,2_+1,8	-	NT	NT

(Q1E, Q3E, Q6E, K19E, Q39E 及び Q62E: 終止コドンTAGは、使用した細菌 E.Coli XL1-blue においてEに翻訳される)

NT: 試験せず

#### 【 0 0 9 4 】

実施例 4 : 親和性が改善されたクローンの比較

本発明による可溶性変異抗体 (Fab) で得られた従来の ELISA アッセイにおける AMHR-II レセプターに対する抗体の結合親和性を決定することによって、ポジティブクローン 3C\_23K、3C\_23 及び 6B\_78 を互いに比較した。

得られた結果を図 17 に示す。

#### 【 0 0 9 5 】

実施例 5 : トランスフェクト株 AMHR II cov434-AMHR II の樹立

顆粒膜腫瘍株 cov434 (van den Berg-Bakker, C. ら, 1993. Establishment and characterization of 7 ovarian carcinoma cell lines and one granulosa tumour cell line: Growth features and cytogenetics. International Journal of Cancer 53: 613; Zhang, H. ら, 2000. Characterization of an immortalized human granulosa cell line (COV434). Molecular Human Reproduction 6: 146) の AMHR II をコードする cDNA を発現するが AMHR II を発現しないプラスミドのトランスフェクションにより、cov434-AMHR II 株を作製した。

簡潔には、AMHR II の cDNA を市販のプラスミド pIRES-neo (Clontech - Takara Bio Europe

, France ; references 6060-1)中にクローニングした。IRES配列に起因して、AMHR11及びneoは、同じ1つのプロモーターCMVの制御下に発現する(図26)。

この構築物を顆粒膜ガン株cov434(トランスフェクション剤Fugene, Roche)中に安定的にトランスフェクトした。次いで、得られたトランスフェクタントを、サイトメトリ及びウェスタンブロッティングによりAMHR11レセプターの発現についてスクリーニングした。サブクローニング後、pIRES-neoタイプのベクターを含有する細胞クローンcov434-AMHR11-1F3をインビトロ及びインビボ研究のために維持した。以下で、この株をcov434-AMHR11と指称する。

#### 【0096】

実施例6：子宮上皮ガン腫患者の腹水又は生検からの一次細胞株の樹立

腹水サンプルに由来する株(Asc 1株)の樹立における主要工程は以下のとおりである：

- D0：腹水を与え、直後にサンプル培養開始。サンプルを1000 rev/分にて5分間遠心分離し、ペレットを2 mLのT25プラスチック播種用培地(RPMI 10%FCS培地)中に採取する。
- D2~D46：定期的な顕微鏡観察を伴う培養。この間、新鮮培地を定期的に添加する。混入した赤血球及び線維芽細胞を除去するため、PBSで洗浄もまた一日おきに行う。

D13付近で、全ての混入細胞が見られなくなり、依然として不均質なコンフルエントな細胞クローンが観察される(2つの異なるタイプ)。

- D46：トランスファー：D46に均質な腫瘍細胞クローンが観察される。その後、細胞を洗浄し、スクレーピングによりトランスファーして2つのT75プラスチックに再播種する。
- D61：FACSによるAMHR11発現の評価：PBSでの洗浄後、細胞をスクレーパーから脱着させ、フローサイトメトリにより分析する(標識AcM 12G4 10 µg/mL、Ac11抗-マウスFITC)。この段階でデータベースを構築する。AMHR11レセプター発現を確認するために、ポジティブAMHR11株を更に10日間培養する。
- D71：FACSによるAMHR11発現の確認

#### 【0097】

このように樹立された株をRPMI 10%FCS培地中に、1週間あたり1継代で維持する(1/15希釈)。

生検の場合(META 2815株)、初代腫瘍を先ずヌードマウスで維持し(肩甲骨間空間にサンプル移植、マウスで連続2継代)、次いで腫瘍を取り出し、二分した後、培養培地に採取する。その後は、腹水サンプルのものと同一のプロトコルを適用する。

#### 【0098】

実施例7：種々の候補ヒト化抗体の親和性の評価

本研究は、元のマウス12G4抗体並びにYB2/0で産生した候補のヒト化抗体3C23、6B78及び3C23K(それぞれ配列3C\_23、6B\_78及び3C\_23Kのもの)について行った。これら抗体の親和性はcov434-AMHR11細胞で評価した。

簡潔には、 $K_D$ は、一定数のcov434-AMHR11細胞に漸増量の放射活性標識抗体を添加することによって飽和法により決定した。細胞(50 µl PBS/BSA 0.5%中  $1 \times 10^6$ )を、ヨウ素125( $^{125}I$ )で事前に標識した漸増量の抗体の存在下で、4 にて1時間インキュベートした(最終容量150 µl)。各抗体について、標識及び未標識抗体(84.4 µg/ml)の溶液からPBS/BSA 0.5%中4倍希釈を行った。細胞を100倍モル過剰の未標識抗体の存在下でインキュベートすることにより、非特異的固定を評価した。

インキュベーション後、サンプルを液体窒素中で凍結した後、ガンマカウンターで分析した。特異的固定は、過剰の未標識抗体の存在下で得られた固定を減算することにより決定した。

PRISMソフトウェアで行ったスキッチャード分析により、表VIIIに示した親和性定数の決定が可能になった。

#### 【0099】

10

20

30

40

## 【表 9】

表Ⅷ：抗-AMHR II抗体の解離定数 ( $K_D$ )

	マウス12G4	3C23	6B78	3C23K
$K_D$ (nM)	15,41 +/- 0,97	7,33 +/-0,44	6,68 +/- 0,21	5,30 +/- 0,38

本研究によれば、ヒト化抗-AMHR II抗体3C23Kは、他の2つの候補抗体6B78及び3C23と比較して、最良の親和性( $K_D = 5.3\text{nM}$ )を有しているようである。3C23K抗体もまた、元のマウス12G4抗体のもの( $K_D = 15.4\text{nM}$ )より約3倍大きい親和性を有している。

10

## 【0100】

実施例 8：本発明の抗体のADCC活性 対 非変異ヒト化12G4抗体のADCC活性の比較

## 1 材料及び方法

## 1.1 方法の原理

## ADCC

患者から得られたASC1標的細胞は、接着性であり、アッセイ前日に調製する。これらをトリプシンで脱着させ、平底プレートにおいてEMS + 5%FCS中、 $50\mu\text{l}$ /ウェルの割合にて $6 \times 10^5$ 細胞/mlの濃度でインキュベートする。プレートを $37^\circ\text{C}$ 、7% $\text{CO}_2$ にて一晩インキュベートする。

翌日、細胞はウェルの底に付着している。上清を吸引し、NK及び抗体の存在下でアッセイを行うためにウェルあたり必要な容量の緩衝液を加える。

20

キラー細胞(NK細胞)は、Miltenyi社により開発されたネガティブ涸渇技法(Miltenyi Biotec - NK cell isolation kit human ref 130-092-657)により、健常ドナーの末梢血から事前に精製する。ADCC技法は、NK細胞をASC1標的細胞と種々の濃度のヒト化抗-AMHR II抗体(0.005 ~ 5000ng/ml)の存在下、10/1のE/T比でインキュベートすることからなる。4時間のインキュベーション後、抗-AMHR II抗体により誘導される細胞傷害活性は、上清中、溶解した標的細胞が放出する乳酸脱水素酵素(LDH)と呼ばれる細胞内酵素を測定することで比色法により測定する(Roche Diagnostics - Cytotoxicity Detection Kit LDH ref 11644793001)。

30

## 【0101】

## 1.2 調べたエレメント

## - 抗-AMHR II抗体：

- ・ 829 10 054, ヒト化YB2/0, R901 3C23K
- ・ 829 10 050, ヒト化YB2/0, R901 3C23
- ・ 829 10 051, ヒト化YB2/0, R901 6B78
- ・ 632 07 107, 非変異ヒト化抗-AMHR II 12G4

## - ASC1細胞培養物 871 10 063

結果を図25に示す。

## 【0102】

表IXは、図25に対応する生データを示す。

40

【表 1 0】

表Ⅹ：

Ab ng/ml	Ab ng/ml (Log)	溶解% (ADC 1193 11 081)			
		829 10 050 3C23 YB20	829 10 051 6B78 YB20	829 10 054 3C23K YB20	632 07 107 抗 AMHR II hum 1st
0,001	-3,000	0	0	0	0
0,005	-2,301	8	14	8	18
0,05	-1,301	9	5	10	2
0,5	-0,301	13	3	26	0
5	0,699	35	28	51	7
50	1,699	46	42	67	24
500	2,699	52	48	79	50
5000	3,699	63	53	75	50

10

20

【0 1 0 3】

表Ⅹは、種々の抗体で得られたEmax及びEC50を示す。

【表 1 1】

表Ⅹ

	829 10 050 3C23 YB20	829 10 051 6B78 YB20	829 10 054 3C23K YB20	632 07 107 抗 AMHR II hum 1st
Emax (溶解%)	65,55	51,89	79,02	52,40
EC50 (ng/ml)	6,298	5,383	1,704	52,35

30

【0 1 0 4】

実施例 9：本発明の抗体のADCC活性 対 キメラ12G4抗体のADCC活性の比較

ヒト化候補抗体3C\_23K(配列3C\_23Kのha12G4：変異VHQ3R(配列番号82(リーダー無し)若しくは配列番号84(リーダー有り))及びVLI177T/S179P/E184K(配列番号86(リーダー無し)若しくは配列番号88(リーダー有り))のADCC活性を評価した。

簡潔には、エフェクター細胞(NKキラー細胞；NK：ナチュラルキラー)は、健常ドナーの末梢血から、フィコールでの単核細胞精製の第1工程後に、Miltenyi社により開発されたネガティブ涸渇技法(Miltenyi Biotec - NK cell isolation kit human ref 130-092-657)で事前に精製する。ADCC活性のインビトロアッセイは、NK細胞を標的細胞(cov434-AMHR II、Asc 1及びMETA 2815株)と種々の濃度の抗-AMHR II抗体(キメラ抗体ch12G4、YB2/0で産生したヒト化3C\_23K-YB2/0抗体及びCHOで産生した3C\_23K-CHO)の存在下でインキュベートすることからなる。適用したエフェクター/標的比は15/1である。抗体は0.005～5000ng/mlの濃度で培養培地中で希釈する。

40

【0 1 0 5】

4時間のインキュベーション後、抗-AMHR II抗体により誘導される細胞傷害活性は、上清中、溶解した標的細胞が放出する乳酸脱水素酵素(LDH)と呼ばれる細胞内酵素を測定す

50

ることで比色法により測定する(Roche Diagnostics - Cytotoxicity Detection Kit LDH ref 11644793001)。

パーセンテージ溶解は以下の式から算出する：

$$\% \text{溶解} = [(ER - SR)/(100 - SR)] - [(NC - SR)/(100 - SR)]$$

式中、

ER = 抗体及びNK細胞の存在下でのLDHの放出

SR = 標的細胞単独からのLDHの自然放出

NC = NK細胞の存在下且つ抗体の非存在下でのLDHの放出

結果は、抗体の量の関数としてのパーセンテージ溶解で表す。Emax及びEC50値は、PRISMソフトウェアで算出する。

10

#### 【 0 1 0 6 】

cov434-AMHR11株について得られた結果を図27に示す。3C\_23K-CHO抗体の低い活性のため、本アッセイ条件下でプラトーは得ることができない。抗体の効力を比較するために、このケースでは、キメラ抗体のプラトーの50%に達するに必要な3C\_23K-CHO抗体の量を表す相対50% (50% relative)の計算を行う(キメラ抗体の相対50% = 1)。この評価によれば、COV434-AMR11株について最良のADCC活性を有するヒト化抗体は、YB2/0で産生した3C\_23K抗体(相対50% : 0.84)である。配列3C\_23及び6B\_78のヒト化抗体は、それぞれ6.41及び36.92に等しい相対50%の値を有する。

Asc 1株について得られた結果を図28に示す。3C\_23K-YB2/0抗体は、Asc 1細胞に対して用量依存性の細胞傷害活性を有し、EC50は2.24ng/mlと見積もられる。3C\_23K-CHO抗体の低い活性のため、本アッセイ条件下でプラトーは得ることができない。2つの抗体の効力を比較するために、このケースでは、3C\_23K-YB2/0抗体のプラトーの50%に達するに必要な3C\_23K-CHO抗体の量を表す相対50%の計算を行う(3C\_23K-YB2/0抗体の相対50% = 1)。この評価によれば、3C\_23K-YB2/0抗体の細胞傷害活性は、CHOで産生した抗体のもの(相対50% = 39.4)より約40倍大きい。

20

#### 【 0 1 0 7 】

同様に、図29に提示した結果は、抗体3C\_23K-YB2/0及び3C\_23K-CHOが、META 2815細胞に対する用量依存性溶解を誘導することを示す。3C\_23K-YB2/0抗体の細胞傷害活性(EC50 = 30.5ng/ml)は、3C\_23K-CHO抗体のもの(EC50 = 466.9ng/ml)より約146倍大きい。

まとめると、これら結果は、YB2/0で産生した3C\_23K抗-AMHR11抗体が、AMHR11抗原を発現する細胞の溶解を誘導する能力を有することを示す。抗-AMHR11-YB2/0と抗-AMHR11-CHO抗体との間でのEC50の相違は、低い抗原発現条件下又は腫瘍への抗体の低い浸透条件下での抗-AMHR11-YB2/0抗体に関する或る利点を示唆している。

30

#### 【 0 1 0 8 】

##### 実施例10：細胞増殖の研究

細胞増殖の阻害は、試験する抗-AMHR11抗体の存在下又は非存在下で経時的に細胞増殖を測定することにより証明した。

簡潔には、標的細胞(cov434-AMHR11、Asc 1、META2815)を、P6プレート中(1 × 10<sup>5</sup>細胞/ウェル)、CHO又はYB2/0で発現させた抗-AMHR11抗体(10 µg/ml)の存在下に、架橋剤(AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG, Fc Fragment Specific ref: 109-006-008, Jackson Immunoresearch, France)有り又は無しで、72時間37 °Cにて培養する。細胞をトリプシンで5分間処理した後、細胞の生存能(トリパンブルー)に基づく自動細胞計数器であるCEDEXで計数する。増殖阻害のポジティブコントロールを、1 µg/mlのコルヒチン(Ref: C3915, Sigma-Aldrich, France)の存在下に確立する。ネガティブコントロールを、無関係の抗体(抗-P24)の存在下に確立する。全ての希釈物は培養培地(RPMI, 10% FCS)中に調製する。結果は、値100%が抗体の非存在下で観察された細胞増殖に対応する、パーセンテージ増殖として表す。

40

#### 【 0 1 0 9 】

cov434-AMHR11株で得られた結果を図30に示す。

これらの観察によれば、抗体3C\_23K-YB2/0及び3C\_23K-CHOは、架橋剤(CK)の存在下で、

50

cov434-AMHR11細胞の細胞増殖の約40%阻害を誘導する。この細胞増殖停止効果は、無関係の抗体(抗体p24)の存在下では観察されない一方、コルヒチンポジティブコントロール(10 μg/ml)は88%阻害を誘導する。

同様に、図31に提示された結果は、抗体3C\_23K-YB2/0及び3C\_23K-CHOが、架橋剤(CK)の存在下で、META 2815株に対して、細胞増殖の約40%阻害を誘導することを示す。

この細胞増殖阻害は、cov434-AMHR11及びMETA 2815株に対して抗-AMHR11抗体が誘導する細胞シグナリングの結果であるのかもしれない。

#### 【0110】

実施例11：COV434-AMHR11腫瘍に対する3C\_23K-YB2/0抗体のインビボ効果

3C\_23K-YB2/0抗体の抗腫瘍効力を、COV434-AMHR11腫瘍細胞の皮下注射(s.c.)後の雌性スイスヌードマウスに対する遅発処理で評価した。抗体の腹腔内(i.p.)注射(inj)は、2~3日の間隔にて10mg/kg/injの用量で計18回行った。3C\_23K-YB2/0抗体で処理した群をピヒクル(PBS)で処理した群と比較した。

#### 【0111】

##### - 材料及び方法

雌性スイスヌードマウスを使用した(Harlan)。実験の0日目に、マウスに、Matrigelと混合した $7 \cdot 10^6$ のCOV434-AMHR11腫瘍細胞(比1:1)の皮下注射を行った。次いで、これら動物を、16日目(腫瘍体積84~270mm<sup>3</sup>)から始まるPBS又は3C\_23K-YB2/0(10mg/kg/inj)のi.p.注射により処理した(週あたり3回の注射を6週間(計18注射))。

腫瘍体積は週あたり2~3回測定した。腫瘍体積(TV)は以下の式を用いて算出した：

$TV (mm^3) = (長さ \times 幅 \times 高さ) / 2$  式中、長さは腫瘍の最長径に相当し、幅は腫瘍の最短径に相当する。

平均腫瘍体積(MTV)を用いて腫瘍増殖曲線をプロットした。個々の腫瘍体積が2000mm<sup>3</sup>に達したときに動物を安楽死させた。各群において、群中の動物の30%を安楽死させたときに曲線を止めた。

#### 【0112】

腫瘍増殖阻害(T/C)(ピヒクルで処理したコントロール群のメジアン腫瘍体積に対する処理群のメジアン腫瘍体積の比として規定)は、以下のとおり算出した： $T/C = (処理群のメジアンTV / ピヒクル群のメジアンTV) \times 100$

- 42%を上回るT/C、この物は効果なしと考えられる。
- 42%~10%のT/C、この物は抗-腫瘍効果を有する
- 10%を下回るT/C、この物は真に効果的である。

種々の群間の統計学的差を、ANOVA比較を用いるKruskal-Wallis検定で得た(Statgraphics centurion XVソフトウェア)。P<0.05であれば、差を有意と見做した。本研究の生存パラメータの比較のためのログランク検定もまたANOVAにより行った(Statgraphics centurion XVソフトウェア)。P<0.05であれば、差を有意と見做した。

#### 【0113】

##### - 結果

COV434-AMHR11において遅延が観察された(図32A及び32B)ので、3C\_23K-YB2/0抗体は抗-腫瘍活性を示す。

一旦処理が開始された後の各測定点での腫瘍体積の統計学的比較は、3C\_23K-YB2/0抗体が腫瘍増殖を遅延させることを示す(Kruskal-Wallis、ANOVAによる)。3C\_23K-YB2/0処理群とピヒクル処理群との間で算出したT/C比は、一旦処理が開始された後の全ての測定点で有意差を示す。ログランク検定もまた、生存に関して、3C\_23K-YB2/0処理群がピヒクル処理群とは統計学的に異なることを示す。

#### 【0114】

下記の表XIは、cov434-AMHR11モデルにおける3C\_23K-YB2/0処理の効果の下での腫瘍体積(処理/コントロール比T/C(%))の進展を示す。

10

20

30

40

【表 1 2】

表 X I

測定日	15	21	25	30	32
T/C %	108	60	42	22	13

【 0 1 1 5】

下記の表XIIは、cov434-AMHRIIモデルで得られた統計学的分析を示す。

10

【表 1 3】

表 X II

測定日	Anova			Kruskall wallis		
	F- 比	P- 値	Sig.	検定	P- 値	Sig.
15	0,03	0,8628		0,00577	0,93945	
21	8,34	0,0098	*	5,67427	0,01721	*
5	12,95	0,0021	*	10,56570	0,00115	*
30	34,94	0,0000	*	13,73030	0,00021	*
32	39,04	0,0000	*	12,90670	0,00033	*

20

【 0 1 1 6】

30

実施例12：Asc1A5腫瘍に対する3C\_23K-YB2/0抗体のインビボ効果

3C\_23K-YB2/0抗体の抗腫瘍効力を、Asc1A5腫瘍細胞(元のAsc 1株のクローン)の皮下注射(s.c.)後の雌性スイスヌードマウスに対する遅発処理で評価した。抗体の腹腔内(i.p.)注射(inj)は、2～3日の間隔にて10mg/kg/injの用量で計18回行った。3C\_23K-YB2/0抗体で処理した群をピヒクル(PBS)で処理した群と比較した。

【 0 1 1 7】

- 材料及び方法

雌性スイスヌードマウスを使用した(Harlan)。実験の0日目に、マウスに、Matrigelと混合した $7 \cdot 10^6$ のAsc1A5腫瘍細胞(比1:1)の皮下注射を行った。次いで、これら動物を、12日目(腫瘍体積 $40 \sim 160 \text{mm}^3$ )から始まるPBS又は3C\_23K-YB2/0(10mg/kg/inj)のi.p.注射により処理した(週あたり3回の注射を6週間(計18注射))。

40

腫瘍体積は週あたり2～3回測定した。腫瘍体積(TV)は以下の式を用いて算出した：

$TV (\text{mm}^3) = (\text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ}) / 2$  式中、長さは腫瘍の最長径に相当し、幅は腫瘍の最短径に相当する。

平均腫瘍体積(MTV)を用いて腫瘍増殖曲線をプロットした。個々の腫瘍体積が $2000 \text{mm}^3$ に達したときに動物を安楽死させた。各群において、群中の動物の30%を安楽死させたときに曲線を止めた。

【 0 1 1 8】

腫瘍増殖阻害(T/C)(ピヒクルで処理したコントロール群のメジアン腫瘍体積に対する処理群のメジアン腫瘍体積の比として規定)は、以下のとおり算出した： $T/C = (\text{処理群のメ$

50

ジアンTV/ビヒクル群のメジアンTV) × 100

- 42%を上回るT/C、この物は効果なしと考えられる。
- 42% ~ 10%のT/C、この物は抗-腫瘍効果を有する
- 10%を下回るT/C、この物は真に効果的である。

種々の群間の統計学的差を、ANOVA比較を用いるKruskal-Wallis検定で得た(Statgraphics centurion XVソフトウェア)。P < 0.05であれば、差を有意と見做した。本研究の生存パラメータの比較のためのログランク検定もまたANOVAにより行った(Statgraphics centurion XVソフトウェア)。P < 0.05であれば、差を有意と見做した。

【 0 1 1 9 】

- 結果

Asc1A5モデルにおいてビヒクル処理群と比較して腫瘍増殖に遅延が観察された(図33A及び33B)ので、3C\_23K-YB2/0抗体は抗-腫瘍活性を示す。

一旦処理が開始された後の各測定点での腫瘍体積の統計学的比較は、3C\_23K-YB2/0抗体が腫瘍増殖を遅延させることを示す(Kruskal-Wallis、ANOVAによる)。3C\_23K-YB2/0処理群とビヒクル処理群との間で算出したT/C比は、一旦処理が開始された後の全ての測定点での有意差を示す。ログランク検定もまた、生存に関して、3C\_23K-YB2/0処理群がビヒクル処理群とは統計学的に異なることを示す。

【 0 1 2 0 】

下記の表XIIIは、Asc1a5モデルで得られた3C\_23K-YB2/0処理の効果の下での腫瘍体積(処理/コントロール比T/C(%))の進展を示す。

【表 1 4】

表XIII

測定日	12	17	24	27	31	35
T/C %	101	33	8	8	7	6

【 0 1 2 1 】

下記の表XIVは、Asc1a5モデルで得られた統計学的分析を示す。

10

20

30

【表 15】

表 XIV

測定日	Anova			Kruskall wallis		
	F-比	P-値	Sig.	検定	P-値	Sig.
12	0,02	0,8817		0,0995	0,7523	
17	29,19	0,0001	*	11,3108	0,0007	*
24	103,56	0	*	11,2941	0,0007	*
27	32,08	0,0001	*	11,3108	0,0007	*
31	33,37	0	*	11,3274	0,0007	*
35	57,97	0	*	10,5788	0,0011	*

10

20

【0122】

実施例13：Meta2815腫瘍に対する3C\_23K-YB2/0抗体のインビボ効果

3C\_23K-YB2/0抗体の抗腫瘍効力を、Meta 2815腫瘍細胞の皮下注射(s.c.)後の雌性スイスヌードマウスに対する遅発処理で評価した。抗体の腹腔内(i.p.)注射(inj)は、2～3日の間隔にて10mg/kg/injの用量で計18回行った。3C\_23K-YB2/0抗体で処理した群をビヒクル(PBS)で処理した群と比較した。

【0123】

- 材料及び方法

雌性スイスヌードマウスを使用した(Harlan)。実験の0日目に、マウスに、 $8 \cdot 10^6$ のMeta2815腫瘍細胞の皮下注射を行った。次いで、これら動物を、33日目(腫瘍体積45～240mm<sup>3</sup>)から始まるPBS又は3C\_23K-YB2/0(10mg/kg/inj)のi.p.注射により処理した(週あたり3回の注射を6週間(計18注射))。

30

腫瘍体積は週あたり2～3回測定した。腫瘍体積(TV)は以下の式を用いて算出した：

$TV (mm^3) = (長さ \times 幅 \times 高さ) / 2$  式中、長さは腫瘍の最長径に相当し、幅は腫瘍の最短径に相当する。

平均腫瘍体積(MTV)を用いて腫瘍増殖曲線をプロットした。個々の腫瘍体積が2000mm<sup>3</sup>に達したときに動物を安楽死させた。各群において、群中の動物の30%を安楽死させたときに曲線を止めた。

【0124】

40

腫瘍増殖阻害(T/C)(ビヒクルで処理したコントロール群のメジアン腫瘍体積に対する処理群のメジアン腫瘍体積の比として規定)は、以下のとおり算出した： $T/C = (処理群のメジアンTV / ビヒクル群のメジアンTV) \times 100$

- 42%を上回るT/C、この物は効果なしと考えられる。
- 42%～10%のT/C、この物は抗-腫瘍効果を有する
- 10%を下回るT/C、この物は真に効果的である。

種々の群間の統計学的差を、ANOVA比較を用いるKruskal-Wallis検定で得た(Statgraphics centurion XVソフトウェア)。P < 0.05であれば、差を有意と見做した。本研究の生存パラメータの比較のためのログランク検定もまたANOVAにより行った(Statgraphics centurion XVソフトウェア)。P < 0.05であれば、差を有意と見做した。

50

## 【 0 1 2 5 】

## - 結果

Meta2815モデルにおいてビヒクル処理群と比較して腫瘍増殖に遅延が観察された(図34A及び34B)ので、3C\_23K-YB2/0抗体は抗-腫瘍活性を示す。

一旦処理が開始された後の各測定点での腫瘍体積の統計学的比較は、3C\_23K-YB2/0抗体が腫瘍増殖を遅延させることを示す(Kruskal-Wallis、ANOVAによる)。3C\_23K-YB2/0処理群とビヒクル処理群との間で算出したT/C比は、一旦処理が開始された後の全ての測定点での有意差を示す。ログランク検定もまた、生存に関して、3C\_23K-YB2/0処理群がビヒクル処理群とは統計学的に異なることを示す。

## 【 0 1 2 6 】

下記の表XVは、META 2815モデルにおける3C\_23K-YB2/0処理の効果の下での腫瘍体積(処理/コントロール比T/C(%))の進展を示す。

## 【表 1 6】

表XV

測定日	33	38	42	47	52
T/C %	92	38	26	22	21

## 【 0 1 2 7 】

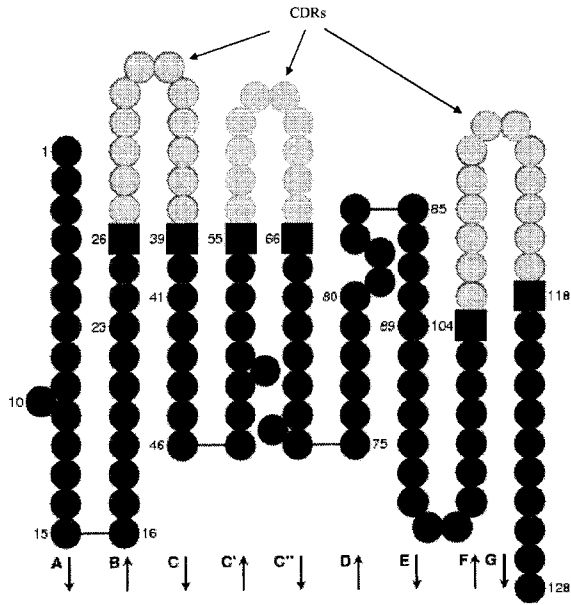
下記の表XVIは、META 2815モデルで得られた統計学的分析を示す。

## 【表 1 7】

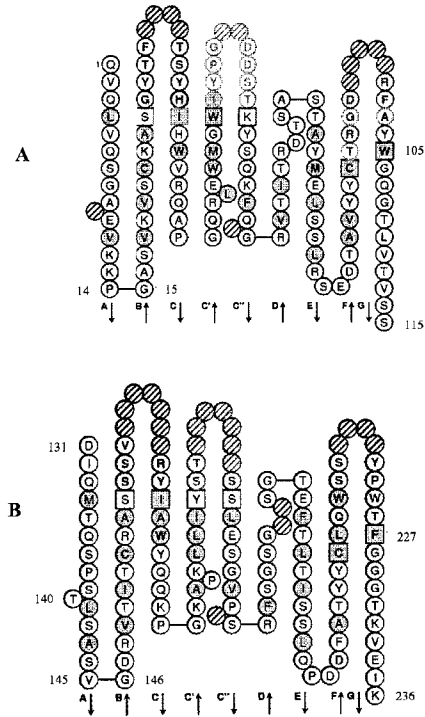
表XVI

測定日	Anova			Kruskall wallis		
	F-比	P-値	Sig.	検定	P-値	Sig.
33	0	0,9899		0	1	
38	11,21	0,0007	*	8,30769	0,0039	*
42	9,51	0,0116	*	7,41026	0,0064	*
47	12,7	0,0052	*	8,33684	0,0038	*
52	16,14	0,0024	*	8,30769	0,0039	*

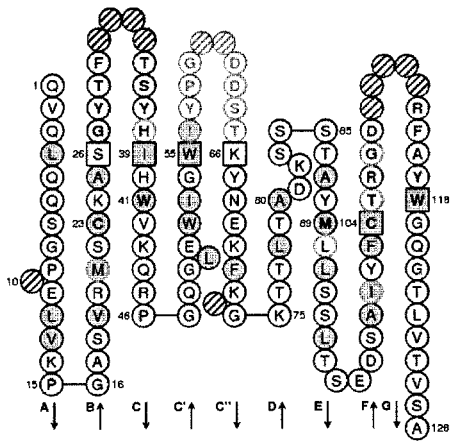
【 図 2 】



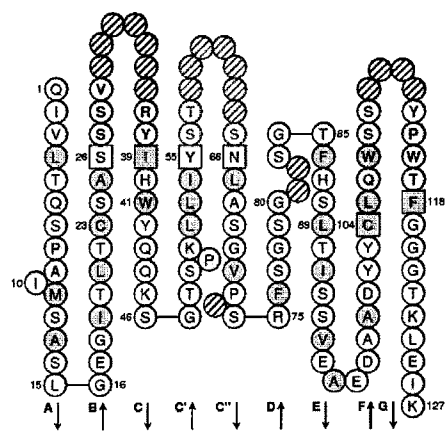
【 図 3 】



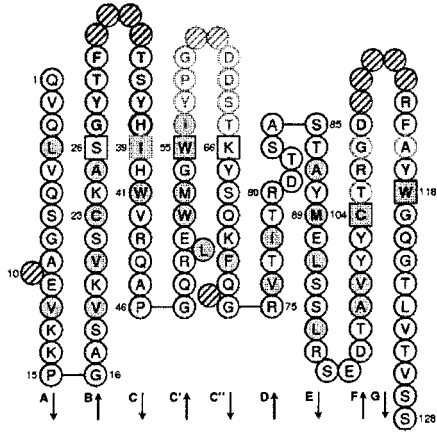
【 図 4 】



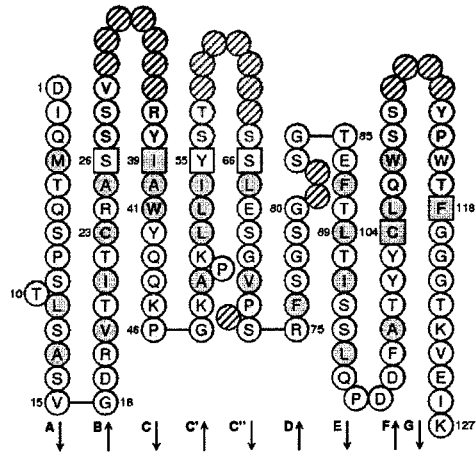
【 図 5 】



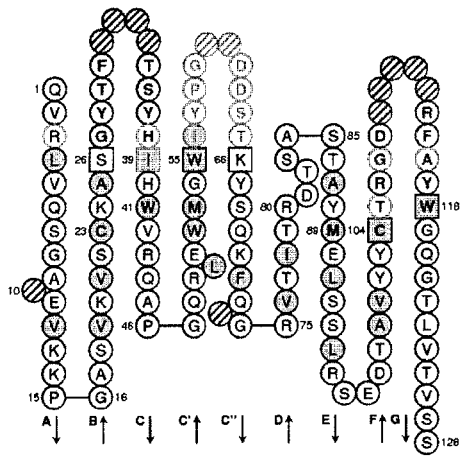
【 図 6 】



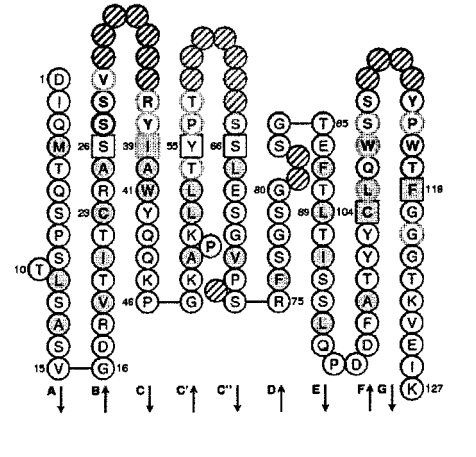
【 図 7 】



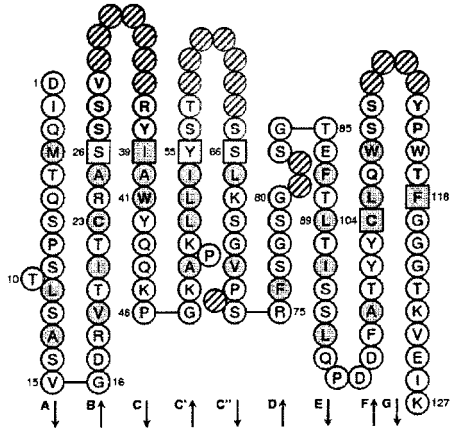
【 図 8 】



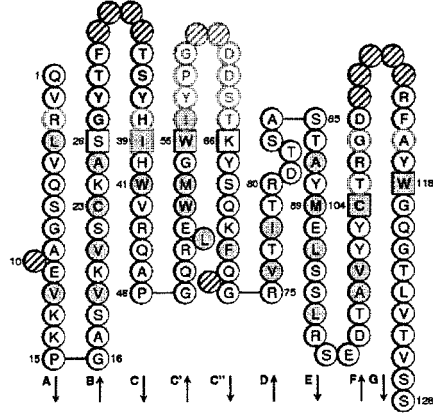
【 図 9 】



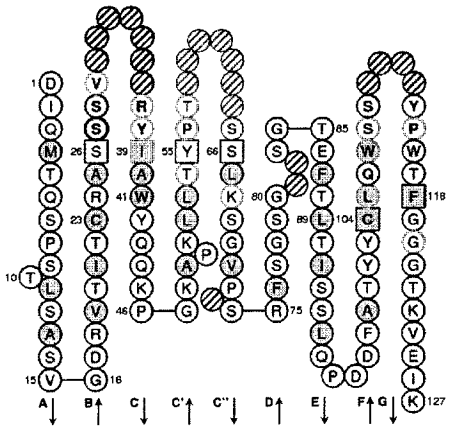
【 図 1 0 】



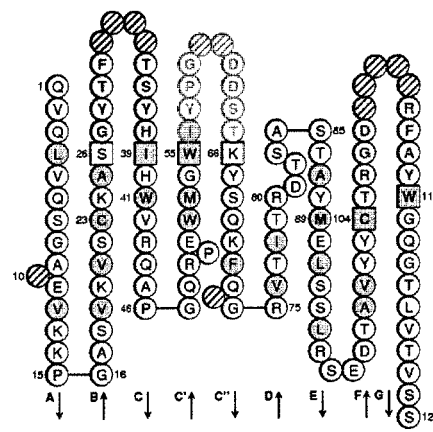
【 図 1 1 】



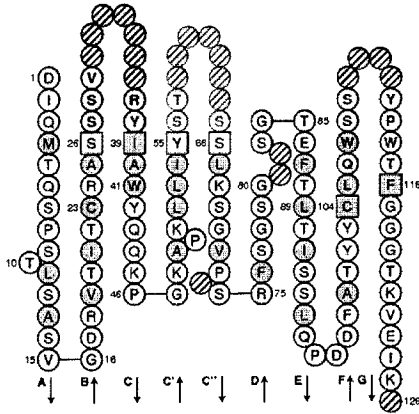
【 図 1 2 】



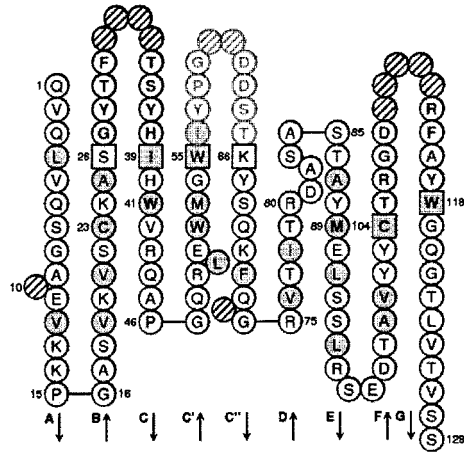
【 図 1 3 】



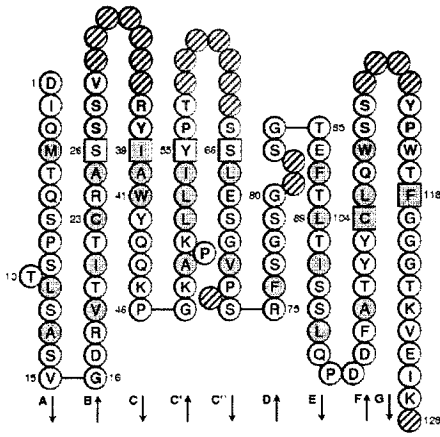
【 図 1 4 】



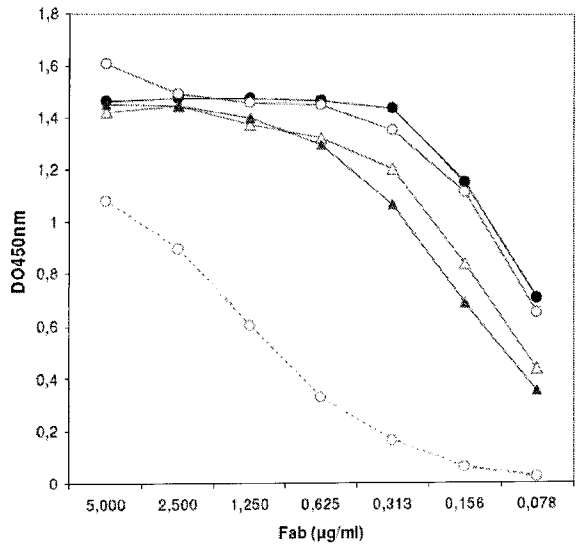
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

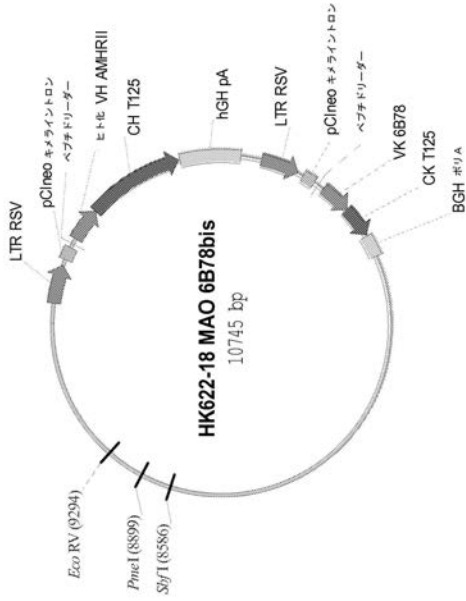


【 図 1 7 】

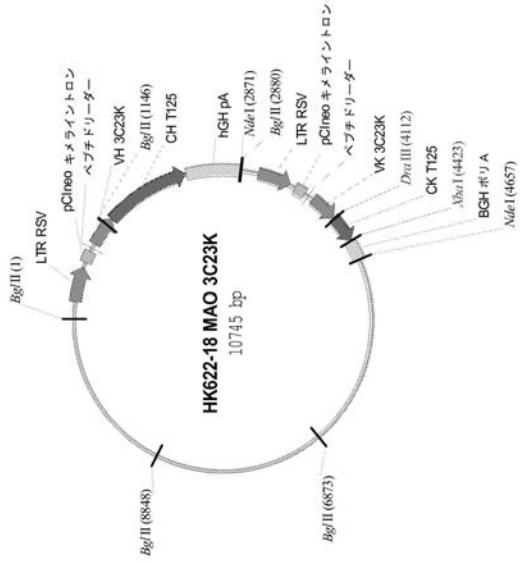




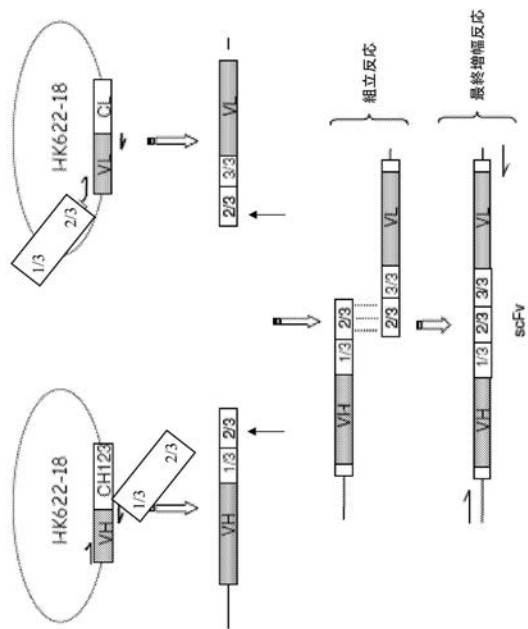
【 2 1 】



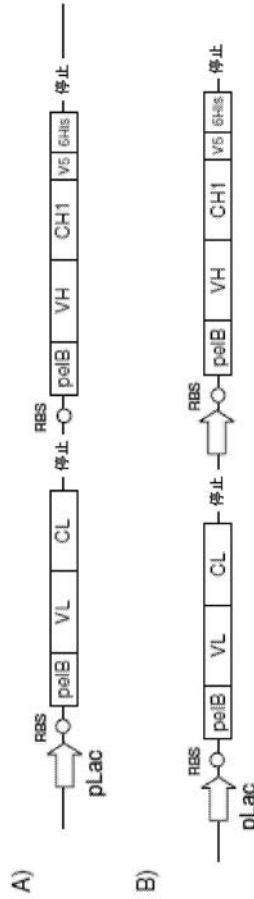
【 2 2 】



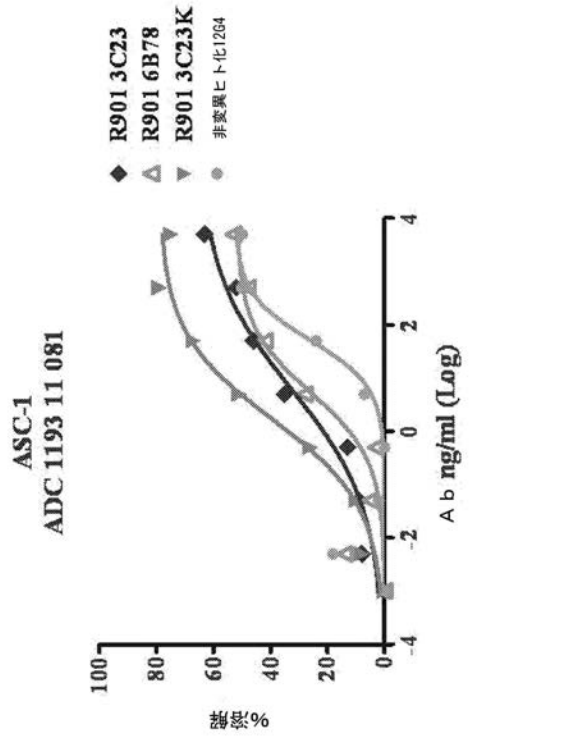
【 2 3 】



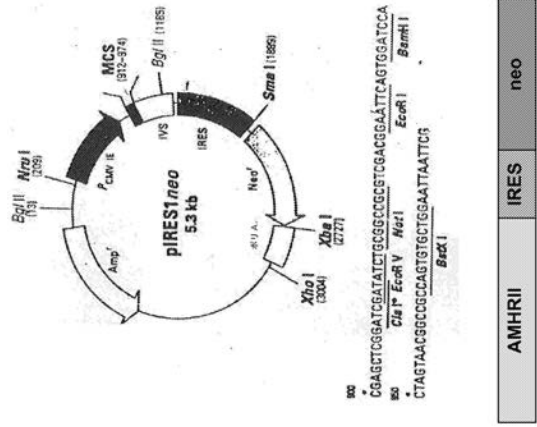
【 2 4 】



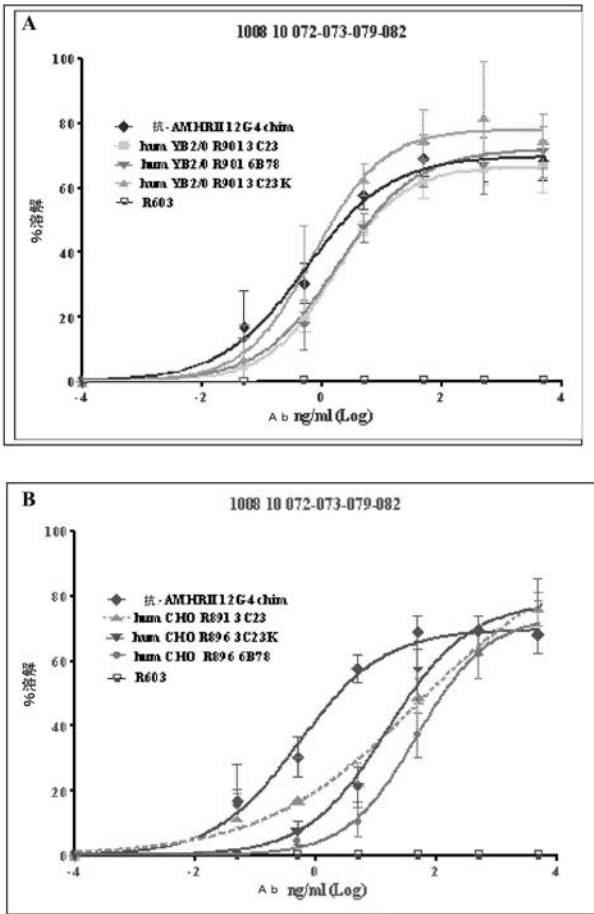
【 図 2 5 】



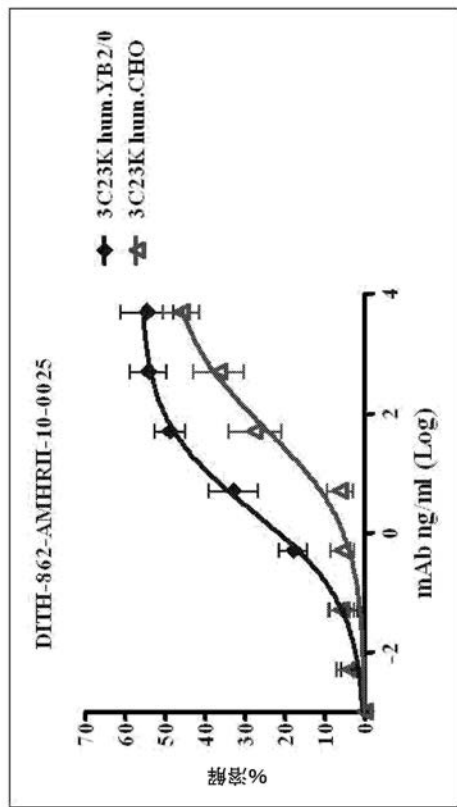
【 図 2 6 】



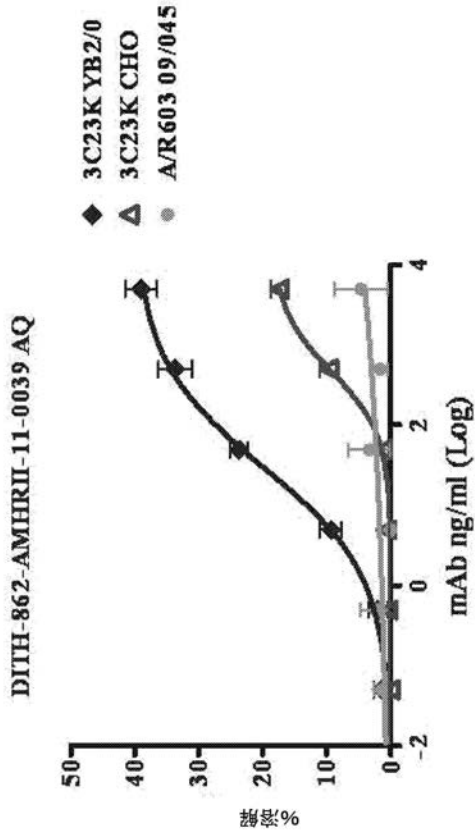
【 図 2 7 】



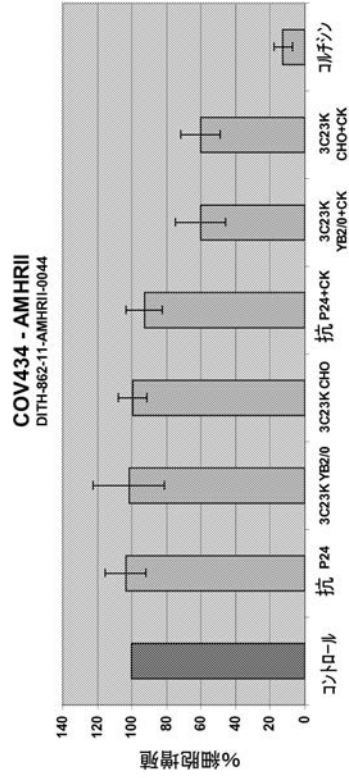
【 図 2 8 】



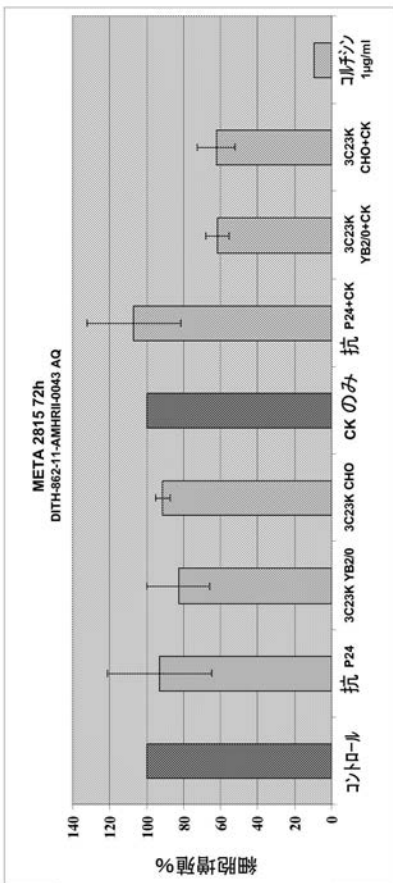
【 図 2 9 】



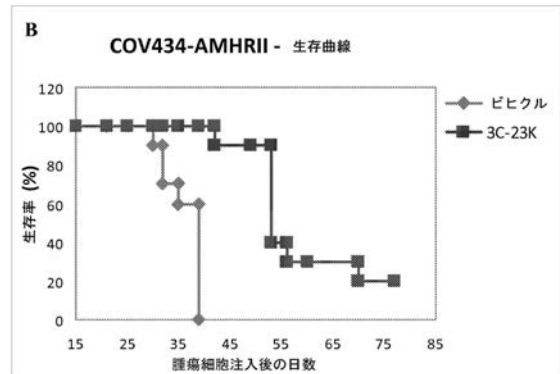
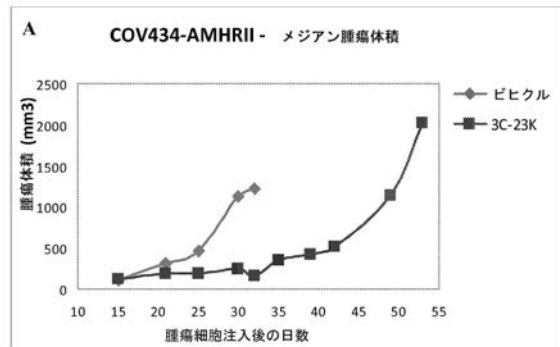
【 図 3 0 】



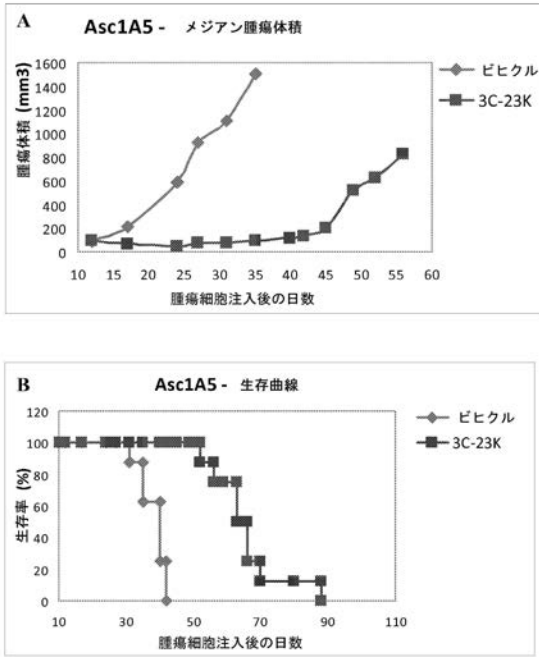
【 図 3 1 】



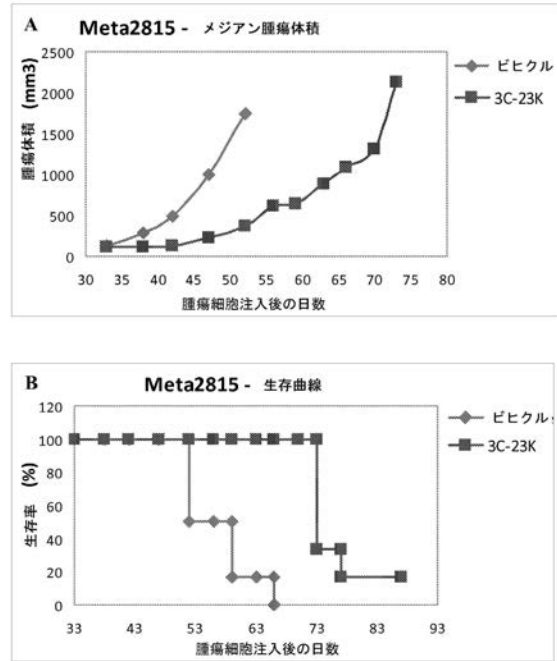
【 図 3 2 】



【 図 3 3 】



【 図 3 4 】



【 配 列 表 】

[201702913900001.app](#)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 2 0 6
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 A	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 31/282	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 N	
	G 0 1 N 33/574 Z	
	G 0 1 N 33/577 B	

(71)出願人 506360871

ユニベルシテ モンペリエ ファースト

UNIVERSITE MONTPELLIER 1

フランス、エフ - 3 4 0 6 7 モンペリエ セデックス 2、ブルヴァール アンリ フォース、5

5, boulevard Henri IV, F - 3 4 0 6 7 Montpellier Cedex 2 FRANCE

(71)出願人 512291019

サントル レジオナル ド ルtte コントル ル キャンサー

CENTRE REGIONAL DE LUTTE CONTRE LE CANCER

フランス、エフ - 3 4 2 9 8 モンペリエ セデックス 5、パーク ユーロメディシン、リュデ アポティケール、208

208, rue des Apothicaires, Parc Euromedecine, F - 3 4 2 9 8 Montpellier Cedex 5, France

(71)出願人 591100596

アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メディカル

フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 101

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(74)代理人 100159385

弁理士 甲斐 伸二

(74)代理人 100163407

弁理士 金子 裕輔

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(72)発明者 ベーレンス, クリスチャン

フランス、エフ - 9 1 1 2 0 パレゾー、アンジャン シュマン ド ヴィレーヌ、10

(72)発明者 ナヴァロ - トイロン, イザベル

フランス、エフ - 3 4 9 8 0 サン ジェリ ドュ フェスク、リュ ド ベアウレガルド 7 7

5

F ターム(参考) 4B063 QA19

4B065	AA01X	AA98X	AC14	CA25	CA44	CA46						
4C084	AA13	AA19	NA05	ZA811	ZB091	ZB261	ZB262	ZC411	ZC751			
4C085	AA14	CC01	CC23	DD62	EE01	EE03	GG02	GG04	GG08	GG10		
	KA04	KB82	LL12	LL18								
4C086	AA01	AA02	BA02	HA12	HA24	HA26	HA28	MA02	MA04	NA05		
	ZA81	ZB09	ZB26	ZC41	ZC75							
4C087	AA01	AA02	BB65	CA04	CA12	CA16	MA02	NA05	NA14	ZA81		
	ZB09	ZB26	ZC41	ZC75								
4C206	AA01	AA02	JA16	MA02	MA04	NA05	ZA81	ZB09	ZB26	ZC41		
	ZC75											
4H045	AA10	AA30	BA10	BA41	CA40	DA76	EA20	EA22	EA51	FA74		

专利名称(译)	新型突变人源化12G4抗体及其针对人抗苗勒管激素II型受体的片段		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017029139A</a>	公开(公告)日	2017-02-09
申请号	JP2016146495	申请日	2016-07-26
[标]申请(专利权)人(译)	LABORATOIRES 捻法语德分数Mann等德生物技术 法国血液分割暨生化制品实验室 ユニベルシテモンペリエファースト UNIV蒙彼利埃II サントルレジオナルドルッテコントルルキヤンサー CENT NAT德吕特癌症中心 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	LABORATOIRES 捻法语德分数Mann等德生物技术 ユニベルシテ蒙彼利埃第一 圣米卡レジオ鸣人ルッテ鯤土耳其啤酒キヤンサー Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗		
[标]发明人	ベーレンスクリスチャン ナヴァロトイロンイザベル		
发明人	ベーレンス,クリスチャン ナヴァロ-トイロン,イザベル		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/46 C12N5/10 C12Q1/68 C12Q1/04 C07K16/28 A61K39/395 A61P37/04 A61P35/00 A61P15/00 A61P43/00 A61K49/00 A61K45/00 A61K48/00 A61K35/12 A61K31/337 A61K33/24 A61K31/282 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577 A61K39/00		
CPC分类号	A61K31/282 A61K31/337 A61K31/7088 A61K33/24 A61K2039/505 A61P15/00 C07K16/2869 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/92 A61K39/3955 A61K39/39558 A61K45/06 C07K16/2863 C07K16/46 C07K2317/64 G01N33/57449 G01N2333/72		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/46.ZNA C12N5/10 C12Q1/68.A C12Q1/04 C07K16/28 A61K39/395.N A61K39/395.T A61P37/04 A61P35/00 A61P15/00 A61P43/00.121 A61K49/00.A A61K45/00 A61P43/00.111 A61K48/00 A61K35/12 A61K31/337 A61K33/24 A61K31/282 G01N33/53.N G01N33/574.Z G01N33/577.B A61K49/00 C07K16/28.ZNA C12N15/13 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B065/AA01X 4B065/AA98X 4B065/AC14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/NA05 4C084/ZA811 4C084/ZB091 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC411 4C084/ZC751 4C085/AA14 4C085/CC01 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/GG08 4C085/GG10 4C085/KA04 4C085/KB82 4C085/LL12 4C085/LL18 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BA02 4C086/HA12 4C086/HA24 4C086/HA26 4C086/HA28 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZA81 4C086/ZB09 4C086/ZB26 4C086/ZC41 4C086/ZC75 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/CA04 4C087/CA12 4C087/CA16 4C087/MA02 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZA81 4C087/ZB09 4C087/ZB26 4C087/ZC41 4C087/ZC75 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/JA16 4C206/MA02 4C206/MA04 4C206/NA05 4C206/ZA81 4C206/ZB09 4C206/ZB26 4C206/ZC41 4C206/ZC75 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	清稻本潤一		
优先权	2010053712 2010-05-12 FR		
其他公开文献	JP6435295B2		

摘要(译)

要解决的问题：提供突变的人源化12G4抗体，其具有至少等于相应的非突变嵌合抗体的亲和力，用于治疗主要妇科癌症的卵巢癌和对AMHR-II受体的特异性并且不吸引免疫应答，提供该片段。 解决方案：对于针对抗苗勒管激素II型受体及其片段的新型突变型人源化12G4抗体，特别是通过人源化抗体中存在的氨基酸的突变来修饰人源化抗体的肽序列。通过维持亲水指数（即疏水性和电荷）来增加所述亲和力。 【选择图】无

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開番号 特願2017-29139A (P2017-29139A)
		(43) 公開日 平成29年2月9日(2017.2.9)
(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	4 B 0 6 3
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 C 0 8 6
		審査請求 有 請求項の数 31 O L (全 56 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2016-146495 (P2016-146495)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成28年7月26日(2016.7.26)	ラボラトワール フランセ ドゥ フラク
(62) 分割の表示	特願2013-509591 (P2013-509591) の分割	シオンマン エ デ ハイオテクノロジ
原出願日	平成23年4月1日(2011.4.1)	ス Laboratoire Francais Du Fractionnement Et Des Biotechnolo gies
(31) 優先権主張番号	1053712	フランス、エフ-91940 レ イリ、
(32) 優先日	平成22年5月12日(2010.5.12)	ゼッドア ドゥ タータプーフ、アヴェニ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	ユー デ トロビタ、3 3, avenue des Tropi ques, ZA de Courtab oeuf, F-91940 Les U lis, FRANCE
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 ヒト抗-ミューラー管ホルモン1 I 型レセプターを指向する新規な変異ヒト化12G4抗体及其そのフラグメント		