

(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2019-517993  
(P2019-517993A)

(43) 公表日 令和1年6月27日(2019.6.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28 ZNA	4B063
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C07K 16/46	4B064
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4B065
<b>C12N 1/19 (2006.01)</b>	C12N 1/19	4C076
<b>C12N 1/21 (2006.01)</b>	C12N 1/21	4C084

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-548141 (P2018-548141)  
 (86) (22) 出願日 平成29年3月14日 (2017.3.14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年9月11日 (2018.9.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/055920  
 (87) 国際公開番号 WO2017/157895  
 (87) 国際公開日 平成29年9月21日 (2017.9.21)  
 (31) 優先権主張番号 62/308,443  
 (32) 優先日 平成28年3月15日 (2016.3.15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506000184  
 イナート・ファルマ・ソシエテ・アノニム  
 INNATE PHARMA PHARM  
 A S. A.  
 フランス、エフー13009マルセイユ、  
 アブニュ・ドゥ・リュミニエール117番  
 (74) 代理人 100145403  
 弁理士 山尾 憲人  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史  
 (74) 代理人 100157956  
 弁理士 稲井 史生  
 (74) 代理人 100170520  
 弁理士 笹倉 真奈美

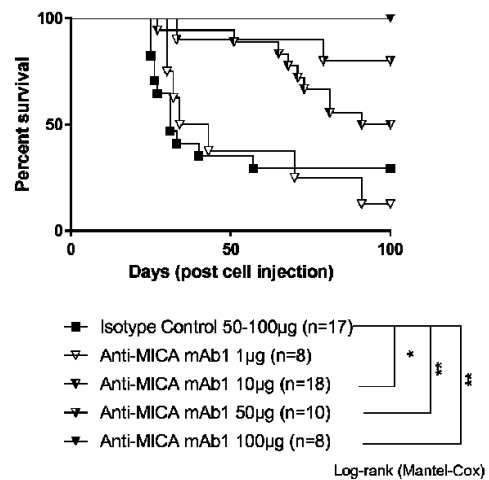
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗MICA抗体

(57) 【要約】

本発明は、ヒトMICAポリペプチドに結合し得る抗原結合タンパク質を提供する。抗原結合タンパク質は、MICA発現細胞により特徴づけられる障害、特に癌の治療において増加した活性を有する。

Figure 3



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒトMICAポリペプチドに結合するモノクローナル抗体または抗体断片であって、  
(a) 配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)；

または

(b) 配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)；

を含む抗体または抗体断片。

**【請求項 2】**

配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む、請求項1に記載の抗体。

**【請求項 3】**

配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む、請求項1に記載の抗体。

**【請求項 4】**

ヒトMICAポリペプチドに結合する抗体または抗体断片であって、配列番号6のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%または98%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)、および配列番号7のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%または98%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含み、前記VHは、72c位におけるリジン(K)残基および74位におけるグルタミン(Q)残基を含み、前記VLは、71位におけるチロシン(Y)を含み、残基の番号付与は、Abnum番号付与に従う)抗体または抗体断片。

**【請求項 5】**

前記VLが、Abnum83位におけるフェニルアラニン(F)を含む、請求項4に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記VHが、Abnum30位におけるトレオニン(T)、67位におけるバリン(V)および71位におけるアルギニン(R)を含む、請求項4または5に記載の組成物。

**【請求項 7】**

前記VHが、Abnum48位におけるイソロイシン(I)を含む、請求項4～6のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 8】**

前記VHが、Abnum48位におけるメチオニン(M)を含む、請求項4～6のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 9】**

前記VHヒトアクセプターフレームワークが、IGHV4-bからのものであり、Jセグメントが、IGHJ6からのものである、請求項4～8のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 10】**

前記VLドメインヒトアクセプターフレームワークが、IGKV3-11からのものであり、前記Jセグメントが、IGKJ2からのものである、請求項4～9のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 11】**

前記抗体が、配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-H1；配列番号31のアミノ酸配列を含むCDR-H2；配列番号32のアミノ酸配列を含むCDR-H3；配列番号33のアミノ酸配列を含むCDR-L1；配列番号34のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および配列番号35のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む、請求項4～10のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 12】**

前記抗体が、配列番号1のアミノ酸配列を含む細胞表面MICAポリペプチドに配列番号2のアミノ酸配列を含む細胞表面MICAポリペプチド、配列番号3のアミノ酸配列を含む細胞表面MICAポリペプチド、および配列番号4のアミノ酸配列を含む細胞表面MICAポリペプチドに結合する、請求項1～11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

前記抗体が、配列番号1のアミノ酸配列を含むMICAポリペプチドを表面において発現するように作製されたC1R細胞、配列番号2のアミノ酸配列を含むMICAポリペプチドを表面において発現するように作製されたC1R細胞、配列番号3のアミノ酸配列を含むMICAポリペプチドを表面において発現するように作製されたC1R細胞、および配列番号4のアミノ酸配列を含むMICAポリペプチドを表面において発現するように作製されたC1R細胞への結合についての $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下または任意選択で、 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のフローサイトメトリーにより測定される $\text{EC}_{50}$ により特徴づけられる、請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項14】

前記抗体が、配列番号36のアミノ酸配列を含む細胞表面MICBポリペプチドにさらに結合する、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項15】

前記抗体が、膜結合ヒトMICAとNKGD2との相互作用を遮断する、請求項1～14のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項16】

前記VHが、ヒト重鎖定常ドメインに融合しており、前記VLが、ヒト軽鎖定常領域に融合している、請求項1～15のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項17】

ヒトFcγRIIIA受容体に結合するヒト重鎖定常領域を含む、請求項1～16のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項18】

前記抗体が、表面プラズモン共鳴により測定されるMICAポリペプチドへの二価結合についての $10^{-9}\text{M}$ 未満の $K_d$ を有する、請求項1～17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項19】

前記抗体が、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、ダイアボディ、単鎖抗体断片、または異なる抗体からの断片を含む多重特異的抗体から選択される抗体断片である、請求項1～18のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項20】

毒性剤にコンジュゲートまたは共有結合している、請求項1～19のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項21】

検出可能な部分にコンジュゲートまたは共有結合している、請求項1～20のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項22】

請求項1～21のいずれか一項に記載の抗体、および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

40

【請求項23】

請求項1～22のいずれか一項に記載の抗体を含み、任意選択で、請求項1～22のいずれか一項に記載の抗体を特異的に認識する標識二次抗体をさらに含むキット。

【請求項24】

請求項1～19のいずれか一項に記載の抗体を産生する組換え宿主細胞。

【請求項25】

疾患の治療または予防が必要とされる個体における疾患の治療または予防に使用される、請求項1～21のいずれか一項に記載の抗体または請求項22に記載の組成物。

50

## 【請求項 26】

MICA 発現細胞を同定するインビトロ方法であって、個体から生物学的試料を得ること、前記試料を請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の抗体と接触させること、ならびに前記抗体が前記試料中の MICA および / または MICB ポリペプチドに結合するか否かを評価することを含む方法。

## 【請求項 27】

MICA 発現疾患関連細胞を同定するインビトロ方法であって、疾患関連細胞を含む個体から生物学的試料を得ること、前記疾患関連細胞を請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の抗体と接触させること、ならびに前記抗体が疾患関連細胞に結合するか否かを評価することを含み、前記抗体が疾患関連細胞に結合するという知見は、前記個体が疾患を有すること、前記個体が疾患関連細胞を保有することおよび / または前記疾患関連細胞が MICA を発現することを示す方法。

10

## 【請求項 28】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の抗体による治療に応答する疾患を有する個体を選択するインビトロ方法であって、前記個体中の腫瘍細胞および / または免疫抑制マクロファージまたは骨髄細胞が MICA ポリペプチドを発現するか否か、任意選択で、前記細胞が上昇レベルの MICA ポリペプチドを発現するか否かを決定することを含み、MICA ポリペプチドまたは上昇レベルの MICA ポリペプチドの発現は、レスポンドー個体を示す方法。

## 【請求項 29】

請求項 26 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法により MICA ポリペプチドまたは MICA 発現細胞を有することが見出された個体における癌の治療または予防において使用される、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 22 に記載の組成物。

20

## 【請求項 30】

前記疾患が癌である、請求項 25 ~ 29 のいずれか一項に記載の組成物または方法。

## 【請求項 31】

前記個体が、MICA \* 001、MICA \* 004、MICA \* 007 および MICA \* 008 からなる群から選択される MICA アレルを担持する細胞を有する、請求項 25 ~ 30 のいずれか一項に記載の組成物または方法。

## 【請求項 32】

同一の投与レジメンを使用し、細胞が MICA \* 001 を発現する患者、細胞が MICA \* 004 を発現する患者、細胞が MICA \* 007 を発現する患者、および細胞が MICA \* 008 を発現する患者を治療する、請求項 25 ~ 32 のいずれか一項に記載の組成物または方法。

30

## 【請求項 33】

前記方法が、個体中で発現される特定の MICA アレルのアイデンティティを決定する治療前のステップを有さない、請求項 25 ~ 30 のいずれか一項に記載の組成物または方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

40

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

本出願は、2016年3月15日に出願された米国仮出願第 62 / 308, 443 号明細書の利益を主張し；それは任意の図面および配列表を含め参照により全体として本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

## 配列表の参照

本出願は、電子フォーマットの配列表とともに出願されている。配列表は、2017年3月13日に作出され、44KBサイズの標題「MICA 2 PCT\_\_ST25 t x t」のファイルとして提供される。配列表の電子フォーマット中の情報は、参照により全体

50

として本明細書に組み込まれる。

【0003】

本発明は、MICAポリペプチドに結合し得る抗原結合タンパク質を提供する。抗原結合タンパク質は、MICA発現細胞、特に癌により特徴づけられる障害の治療における増加された活性を有する。

【背景技術】

【0004】

免疫受容体NKGD2は、通常、ヒトT細胞（例えば、CD8<sup>+</sup>T細胞、T細胞）およびNK細胞上で発現される。事前に活性化されたCD8<sup>+</sup>細胞上で、NKGD2はDAP10会合を介するCD28およびTCRシグナリングの相乗共刺激因子として機能する一方、NK細胞中では、それは直接的活性化因子として機能する。したがって、リガンドエンゲージメント時、NKGD2は、対合DAP10アダプタータンパク質を介して活性化または共刺激シグナルを直接運搬し、それにより癌および感染性疾患免疫を促進する。

10

【0005】

ヒトNKGD2(hNKGD2)についての種々のリガンド、例として、主要組織適合遺伝子複合体クラスI関連鎖AおよびBポリペプチド(MICAおよびMICB)、UL16-結合タンパク質(ULBP)ファミリー、およびレチノイン酸初期転写産物-1(retinoic acid early transcript-1)(RAET1)ファミリーが同定および特徴決定されている。MICAは、上皮腫瘍と会合することが多く、微生物感染により誘導され、ある自己免疫疾患病巣中で異常発現される。MICAの構造は、12プラットフォームドメインおよび膜近位Ig様3ドメインを有するMHCクラスIのタンパク質フォールドと類似する(非特許文献1)。MICAおよびその近縁MICBは、NKGD2についてのリガンドとしても機能し、両方とも多型性であり、多型はNKGD2についての親和性に影響することが示されている(非特許文献2)。

20

【0006】

MHCクラスI鎖(MIC)遺伝子を欠くマウスにおいて、ULBPと構造的に関連するタンパク質のファミリーであるレチノイン酸初期(RAE-1)分子がNKGD2についてのリガンドとして機能する。RAE-1発現は、発癌性物質により誘導され、T細胞の抗腫瘍活性を刺激することが示されている。しかしながら、ネズミNKGD2は、ヒトMICAポリペプチドを認識する(非特許文献3)。

30

【0007】

癌生物学におけるMICAの役割は、MICAが腫瘍細胞の細胞表面(例えば、\*019アレル)から、およびエキソソームの表面上(\*08アレル)で可溶性形態として放出されるという事実により複雑化されている(非特許文献4)。可溶性MICA(sMICA)は、例えば、胃腸悪性腫瘍を有する患者の血清中で高レベルにおいて検出することができる(非特許文献5)。MMP、ADAM10およびADAM17、ならびにジスルフィドイソメラーゼErp5は、MICAの開裂およびシェディングにおける役割を有することが報告されている(非特許文献6;非特許文献7;および非特許文献8)。膜結合MICAは、NKおよび/またはT細胞上でのNKGD2の発現を下方モジュレートすることが報告されている(非特許文献9)。特に、前掲の非特許文献3は、MICA Tgマウスを試験し、非トランスジェニック脾細胞上での表面NKGD2の下方調節が、MICAトランスジェニックマウスからの脾細胞とのインビトロでの共培養後に最も明白であり、H2Kb-MICAマウスからの血清による処理後にわずかに明白であるにすぎない一方、対照細胞および非tgLMからの血清とのインキュベーションはそれぞれ効果を有さないことを結論づけ、その全データは、H2-K-MICA NK細胞上の低減された表面NKGD2がNKGD2機能不全をもたらすことおよびインビボでNKGD2下方調節が主として細胞結合MICAへの持続曝露により引き起こされることを示唆する。

40

【0008】

NK細胞上のNKGD2がsMICAにより下方調節され(非特許文献10;非特許文

50

献 1 1 ; 非特許文献 1 2 )、より低い反応性の NK 細胞をもたらす報告も現れている。この根拠は明らかになり得る。それというの、類似の系が観察されており、数あるタンパク質ファミリーのうち、例えば、I g 様および TNF スーパーファミリーは、可溶性形態として放出され、分子のその放出はリガンド密度の低減により細胞間相互作用に影響し、それぞれの受容体を担持する NK 細胞をモジュレートすることが示されているためである ( 非特許文献 8 )。結果的に、抗 M I C A 抗体を生成する試みは、M I C A シェディングを阻害する抗体の開発に集中している。

#### 【 0 0 0 9 】

健常細胞上の N K G 2 D リガンド M I C A および M I C B の発現は、免疫活性化とトランスとの間の平衡を破壊し、自己免疫を誘引し得ることも報告されている。遺伝的連鎖研究は、一部の M I C A アレルが 1 型糖尿病に正に関連し、R a e 1 を島細胞上で発現する前糖尿病 N O D マウスにおける疾患の発達を、自己反応性 C D 8 + T 細胞の拡張および機能を低減させる N K G 2 D 遮断 m A b による処理により完全に予防することができることを示している。M I C A および M I C B 分子は、R A 滑膜細胞中でも大幅に上方調節され、N K G 2 D 依存的に T 細胞を活性化させる。さらに、関節リウマチ患者は、血清および炎症関節中の高レベルの I L - 1 5 および T N F - a を有し、それが C D 4 + C D 2 8 - サブセットの T 細胞上で N K G 2 D の発現を誘導することが報告されている。セリアック病において、腸内での上皮内 N K G 2 D + C D 8 + T リンパ球の大量浸潤が報告されており、M I C タンパク質は活性疾患を有する患者における上皮細胞の表面上で強力に発現されるようになる。炎症性腸障害において、M I C 発現のレベルの増加が腸上皮細胞上で見出され、N K G 2 D を発現する腸上皮 C D 4 + T 細胞の数は腸炎症と相関することが見出された。

10

20

#### 【 0 0 1 0 】

N K G 2 D 系に基づき炎症を治療するこれまでのアプローチは、N K G 2 D リガンドではなく N K G 2 D 自体の遮断に集中している ( 非特許文献 1 3 ; 非特許文献 1 4 ; 非特許文献 1 5 )。1 つの可能性は、N K G 2 D リガンドではなく N K G 2 D へのこの集中が種々のリガンドおよび一部の場において多数のアレルを含む N K G 2 D リガンド系を標的化する困難性の認識に起因することである。

#### 【 0 0 1 1 】

M I C A および M I C B について、9 7 を超える M I C A アレルおよび少なくとも 3 1 の M I C B アレルが認識されている。1 2 ドメイン ( N K G 2 D 界面に関与するドメイン ) における M I C ポリペプチドにわたる 4 3 % のアミノ酸同一性が存在するにすぎず、アミノ酸置換の 8 0 % が非保存的であり ( 非特許文献 1 6 ; 非特許文献 1 7 )、そのことは、集団における大多数の個体に有効な抗体を得る可能性が低いことを示唆する。さらに、M I C A 中の 1 2 9 位におけるメチオニン / パリン二形性は、N K G 2 D 結合の差を決定し、残基 1 2 9 の側鎖は部分的に埋め込まれており、第 1 の 2 ヘリカルストレッチ中のグルタミン 1 3 6、アラニン 1 3 9 およびメチオニン 1 4 0 との疎水性相互作用を形成するが、それは M I C A のパリン 1 2 9 形態との比較においてこのドメインにおける立体構造の差に関連し得る ( 非特許文献 1 6 )。

30

#### 【 0 0 1 2 】

まとめると、治療剤により M I C A を標的化する新たなアプローチが必要とされている。

40

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 非特許文献 】

#### 【 0 0 1 3 】

【 非特許文献 1 】 L i e t a l . 2 0 0 1 N a t . I m m u n o l . 2 : 4 4 3

【 非特許文献 2 】 S t e i n l e e t a l . 2 0 0 1 I m m u n o g e n e t i c s 5 3 : 2 7 9

【 非特許文献 3 】 W i e m a n n ( 2 0 0 5 ) J . I m m u n o l . 1 7 5 : 8 2 0 - 8 2 9

50

【非特許文献4】Ashiru et al (2010) Cancer Res. 70 (2) : 481 - 489

【非特許文献5】Salih et al, 2002 J. Immunol. 169 : 4098

【非特許文献6】Walldhauer (2008) Cancer Research 68 (15) 6368 - 76

【非特許文献7】Kaiser et al (2007) Nature

【非特許文献8】Salih (2002) J. Immunol 169 : 4098 - 4102

【非特許文献9】Von Liliendorf - Toal et al. (2010) Cancer Immunol. Immunother. 10

【非特許文献10】Groh et al. (2002) Nature

【非特許文献11】Arreygue - Garcia (2008) BMC

【非特許文献12】Jinushi et al. (2005) J. Hepatol.

【非特許文献13】Ogasawara et al. (2004) Immunity 20 (6) : 757 - 767

【非特許文献14】Andersson et al (2011) Arthritis. Rheum. 63 (9) : 2617 - 2629

【非特許文献15】Steigerwald et al (2009) MAbs 1 (2) : 115 - 127 20

【非特許文献16】Steinle et al. (2001) Immunogenetics 53 : 279 - 287

【非特許文献17】Steinle et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 : 12510 - 12515

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0014】

一態様において、本発明は、とりわけ、ヒトMICAアレルにわたる（ならびに非ヒト霊長類MICAに対する）高親和性を有する抗体の発見から生じる。

#### 【0015】

一実施形態において、抗MICA抗原結合ドメイン、またはその抗原結合ドメインを含むタンパク質（例えば、モノクローナル抗体、多重特異的結合タンパク質、二重特異的抗体など）であって、前記抗原結合ドメインが、

(a) 配列番号6のアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、95%または98%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）、および

(b) 配列番号7のアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、95%または98%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）

を含む抗MICA抗原結合ドメイン、またはその抗原結合ドメインを含むタンパク質が提供される。

#### 【0016】

一実施形態において、VLは、Abnum71位（FR3中）におけるチロシン（Y）アミノ酸残基を含む。一実施形態において、VLは、Abnum83位におけるフェニルアラニン（F）を含む。

#### 【0017】

一実施形態において、重鎖可変領域（VH）は、72c位における残基とAbnum74位における残基との間のH結合により互いに相互作用し得る、Abnum72c位（FR2中）および74位（FR3中）におけるアミノ酸残基を含む。一実施形態において、VHは、Abnum72c位におけるリジン（K）アミノ酸残基および74位におけるグルタミン残基を含む。一実施形態において、VHは、Abnum30位におけるトレオニン（T）を含む。一実施形態において、VHは、Abnum48位におけるイソロイシン 50

( I ) を含む。一実施形態において、V H は、A b n u m 6 7 位におけるバリニン ( V ) を含む。一実施形態において、V H は、A b n u m 7 1 位におけるアルギニン ( R ) を含む。

#### 【 0 0 1 8 】

一実施形態において、V H ヒトアクセプターフレームワークのV H セグメントは I G H V 4 - b ( 例えば、I G H V 4 - b \* 0 2 ) からのものであり、J セグメントは I G H J 6 ( 例えば、I G H J 6 \* 0 1 ) からのものである。一実施形態において、V H の C D R 1、2 および 3 は、それぞれ配列番号 3 0、3 1 および 3 2 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、V L ドメインヒトアクセプターフレームワークは I G K V 3 - 1 1 ( 例えば、I G K V 3 - 1 1 \* 0 1 ) からのものであり、J セグメントは I G K J 2 ( 例えば、I G K J 2 \* 0 1 ) からのものである。一実施形態において、V L の C D R 1、2 および 3 は、それぞれ配列番号 3 3、3 4 および 3 5 のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、ヒト重鎖および/または軽鎖アクセプターフレームワークは、アミノ酸が、非ヒト哺乳動物 ( 例えば、ネズミ、ラット ) 中の特定の位置に存在するアミノ酸により置換されている 1 つ以上の復帰突然変異を含む。一実施形態において、ヒト重鎖アクセプターフレームワーク 1 ( F R 1 ) は、A b n u m 3 0 位におけるトレオニン ( T ) を含み、天然存在ヒトV H セグメントと比較して他の突然変異を含有しない。一実施形態において、ヒト重鎖アクセプターフレームワーク 2 ( F R 2 ) は、天然存在ヒトV H セグメントと比較して突然変異を有さない。一実施形態において、ヒト重鎖アクセプターフレームワーク 3 ( F R 3 ) は、A b n u m 7 1 位におけるアルギニン ( R ) を含み、天然存在ヒトV H セグメントと比較して他の突然変異を含有しない。一実施形態において、ヒト重鎖アクセプターフレームワーク 4 ( F R 4 ) は、天然存在ヒトV H セグメントと比較して突然変異を有さない。一実施形態において、ヒト軽鎖アクセプターフレームワーク 3 ( F R 3 ) は、A b n u m 7 1 位におけるチロシンを含み、天然存在ヒトV H セグメントと比較して他の突然変異を含有しない。一実施形態において、ヒト軽鎖アクセプターフレームワーク 1、2 および 4 ( F R 1、F R 2 および F R 4 ) は、天然存在ヒトV H セグメントと比較して突然変異を有さない。

10

20

#### 【 0 0 1 9 】

本明細書の任意の態様の一実施形態において、V H は、配列 3 0、3 1 および 3 2 に示されるそれぞれのアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む。一実施形態において、V L は、配列番号 3 3、3 4 および 3 5 に示されるそれぞれのアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む。

30

#### 【 0 0 2 0 】

一実施形態において、抗 M I C A 抗原結合ドメイン、またはその抗原結合ドメインを含むタンパク質 ( 例えば、モノクローナル抗体、多重特異的結合タンパク質、二重特異的抗体など ) であって、

( a ) 任意選択で、フレームワーク領域中の 1、2 または 3 つのアミノ酸残基置換をさらに含む配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

( b ) 任意選択で、フレームワーク領域中の 1、2 または 3 つのアミノ酸残基置換をさらに含む配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

40

を含む抗 M I C A 抗原結合ドメイン、またはその抗原結合ドメインを含むタンパク質が提供される。

#### 【 0 0 2 1 】

一実施形態において、抗 M I C A 抗原結合ドメイン、またはその抗原結合ドメインを含むタンパク質 ( 例えば、モノクローナル抗体、多重特異的結合タンパク質、二重特異的抗体など ) であって、

( a ) 任意選択で、フレームワーク領域中の 1、2 または 3 つのアミノ酸残基置換をさらに含む配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

( b ) 任意選択で、フレームワーク領域中の 1、2 または 3 つのアミノ酸残基置換をさらに含む配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

50

を含む抗MICA抗原結合ドメイン、またはその抗原結合ドメインを含むタンパク質が提供される。

【0022】

実施形態のいずれかの一態様において、軽鎖可変領域は、71位(Abnum番号付与)におけるチロシン(Y)残基を含む。

【0023】

実施形態のいずれかの別の態様において、重鎖可変領域は、72c位(Abnum番号付与)としてのリジン(K)残基を含む。

【0024】

一実施形態において、抗MICA抗原結合ドメイン、またはその抗原結合ドメインを含むタンパク質(例えば、モノクローナル抗体、多重特異的結合タンパク質、二重特異的抗体など)であって、前記抗原結合ドメインが、

(a) 配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体結合ドメイン;

(b) 配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体結合ドメイン;ならびに

(c) 配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体結合ドメイン

からなる群から選択される抗MICA抗原結合ドメイン、またはその抗原結合ドメインを含むタンパク質が提供される。

【0025】

一実施形態において、ヒトMICAに結合するモノクローナル抗体であって、

(a) 配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体;

(b) 配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体;ならびに

(c) 配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体;

からなる群から選択されるモノクローナル抗体が提供される。

【0026】

一態様において、改変塩橋を有するヒトフレームワークを有する抗MICA抗体であって;タンパク質中の塩橋は、互いに十分に近接しており静電気引力が認められる逆荷電残基間のH結合である抗体が提供される。一態様において、軽鎖FR3中のアミノ酸置換を有するヒトフレームワークを有する抗MICA抗体が提供される。一態様において、抗体は、72c位および74位(Abnum番号付与)における残基間の重鎖FR3領域中のH結合を含む。

【0027】

抗体は、特に、MICAの主なファミリーを表すことが決定される2つの主要なMICA群のそれぞれからの主要なMICAアレルに結合する: NKG2Dに強力的に結合するグループ1アレル(例として、MICA\*001、\*002、\*007、\*012、\*017および\*018)およびNKG2Dに弱く結合するグループ2(MICA\*004、\*006、\*008、\*009および\*019)。サブセットMICA\*001、\*004、\*007および\*008または\*001、\*004、\*007、\*008および\*019上に存在するエピトープに結合することにより、抗体は、ほとんど全ての個体に存在する両方の群のアレルをカバーする。任意選択で、抗体は、\*001を表面において発現するように作製された細胞への、\*004を表面において発現するように作製された細胞への、\*007を表面において発現するように作製された細胞への、および\*008を表面において発現するように作製された細胞への結合についての1μg/ml以下、任意選択で0.5μg/ml以下、0.3μg/ml以下または0.2μg/ml以下のフローサイトメトリーにより測定されるEC<sub>50</sub>を有する。任意選択で、抗体は、\*004を表面

10

20

30

40

50

において発現するように作製された細胞、\* 0 0 7を表面において発現するように作製された細胞、および\* 0 0 8を表面において発現するように作製された細胞への結合についての $0.1 \mu\text{g/ml}$ 以下、任意選択で、 $0.07 \mu\text{g/ml}$ 以下のフローサイトメトリーにより測定される $\text{EC}_{50}$ を有する。抗体は、任意選択で、ヒトMICAポリペプチドを発現する細胞にさらに結合する。

#### 【0028】

一実施形態において、MICAアレルに結合し得る抗体は、それぞれのMICAポリペプチドを表面において発現する細胞（それぞれのMICAアレルの一方が形質移入されたが、他方のMICAアレルを発現しない細胞）への結合についてのフローサイトメトリーにより測定されるヒトMICA\* 0 0 4、\* 0 0 7および/または\* 0 0 8についてのその結合親和性と $1-10\log$ 未満だけ異なるヒトMICA\* 0 0 1への結合についての $\text{EC}_{50}$ を有する。一実施形態において、抗体は、ヒトMICA\* 0 0 4、\* 0 0 7および/または\* 0 0 8を表面において発現する細胞への結合についてのフローサイトメトリーにより測定される $0.510\log$ 、 $0.310\log$ または $0.210\log$ 以下だけ互いに異なるヒトMICA\* 0 0 4、\* 0 0 7および/または\* 0 0 8ポリペプチドへの結合についての $\text{EC}_{50}$ を有する。

10

#### 【0029】

任意選択で、 $\text{EC}_{50}$ は、本明細書の実施例の方法に従って、またはPCT公開の国際公開第2013/117647号パンフレットの実施例3、例えば、目的のMICA核酸を含有するRSV.5neoベクター（GenBank（NCBI）、アクセッション番号M83237のもの）が形質移入されたC1R細胞（ATCC参照番号CRL-1993（商標））、フローサイトメトリーによるデータ収集および4パラメーターモデルを使用する $\text{EC}_{50}$ 計算に従って測定する。

20

#### 【0030】

高い親和性結合は、とりわけ、CDCおよび/またはADCCを効率的に媒介するために抗体について有利である。

#### 【0031】

本開示の抗体は、細胞（例えば、腫瘍細胞）の表面上のMICAと、NKG2D（例えば、NK細胞およびT細胞上）との相互作用を遮断し得る。したがって、Fc受容体により結合されるFcドメインを含む場合のADCCおよび/またはCDC活性の誘導に加え、それらの抗体は、NKG2Dの膜MICA誘導下方モジュレーションを遮断し得るそれらの能力のために、例えば、癌および/または感染性疾患の治療に有用である。さらに、ADCCおよび/またはCDC活性を媒介する能力に加え、またはその代替として、それらの抗体は、T細胞および/またはNK細胞活性のM2マクロファージ媒介抑制を低減させるそれらの能力のために有用である。他の実施形態において、ADCCおよび/またはCDC活性を実質的に誘導しない（例えば、FcγRIIIa受容体により結合されるFcドメインを含まない）抗体は、NKG2Dの膜MICA誘導下方モジュレーションを遮断し得、ならびに/またはT細胞および/もしくはNK細胞活性のM2マクロファージ媒介抑制を低減させ得るその能力のために、炎症および/または自己免疫障害の治療に有用であり得る。いっそうさらなる実施形態において、抗体は、毒性剤（例えば、細胞毒性部分）にコンジュゲートさせ、MICA発現細胞（例えば、腫瘍細胞）の枯渇または死滅を引き起こすために使用することができる。

30

40

#### 【0032】

一態様において、本発明の抗MICA抗体を使用する治療方法が提供される。抗体は、本明細書の実施形態のいずれかにおいて予防的または治療的治療として使用することができる。治療有効量の抗体を予防有効量の抗体を交換することができる。一態様において、癌、自己免疫障害または炎症障害を有する個体を治療する方法であって、個体にMICAポリペプチドに特異的に結合する本開示による薬学的有効量の抗原結合化合物を投与することを含む方法が提供される。

#### 【0033】

50

一態様において、個体におけるMICA発現細胞（例えば、癌細胞）を排除する方法であって、患者にMICAポリペプチドに特異的に結合する本開示による薬学的有効量の抗原結合化合物を投与することを含む方法が提供される。一態様において、癌を有する個体におけるNK細胞および/またはT細胞活性の骨髄由来抑制細胞（MDSC）媒介抑制を克服し、または低減させる方法であって、個体にMICAポリペプチドに特異的に結合する本開示による薬学的有効量の抗原結合化合物を投与することを含む方法が提供される。一態様において、癌を有する個体における骨髄由来抑制細胞（MDSC）および/またはM2マクロファージ、例えば、腫瘍組織滞留MDSCまたはM2細胞の免疫抑制活性を排除または阻害する方法であって、個体にMICAポリペプチドに特異的に結合する本開示による薬学的有効量の抗原結合化合物を投与することを含む方法が提供される。

10

#### 【0034】

別の態様において、患者がMICAポリペプチド、例えば、本開示の抗体により結合されるMICAポリペプチド（1つ以上のMICAアレル）を発現する疾患関連細胞（例えば、腫瘍細胞）を有するか否かを評価することを含む方法（例えば、診断アッセイ、レスポンスアッセイなどを実施する方法）が提供される。前記方法は、例えば、疾患関連細胞を含む患者からの生物学的試料を得ること、前記疾患関連細胞をそのような抗体と接触させること、および抗体が疾患関連細胞に結合するか否かを評価することを含み得る。MICAが疾患関連細胞により発現されるという知見は、患者がMICA発現細胞により特徴づけられる病態を有し、および/または本開示の抗MICA抗体による治療に好適であることを示す。患者は、MICA発現細胞により特徴づけられる特定の疾患に好適な治療によりさらに治療することができる。任意選択で、患者は、抗MICA抗体により治療する。一実施形態において、本方法は、癌を有する対象を選択するために使用し、疾患関連細胞は癌細胞である。

20

#### 【0035】

これらの態様は本明細書に提供される詳細な説明においてより完全に記載され、追加の態様、特徴部および利点はその詳細な説明から明らかである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0036】

【図1】抗MICA mAb 1が、ヒトKHYG-1CD16発現NK細胞による陰性対照（ヒトIgG1アイソタイプ対照抗体）と、およびその親（非改変）キメラ抗体と比較したC1R-MICA\*001および\*008細胞の特異的溶解を誘導したことを示し、それにより、それらの抗体がMICA\*001および\*008発現標的細胞に対するADCを誘導することを示す。

30

【図2】抗MICA mAb 1が、M1またはM2マクロファージを用いてまたは用いずに721.221-MICA\*001腫瘍細胞に対するNK細胞活性化の強力な増加を引き起こしたことを示す。対照的に、アイソタイプ対照においてはNK活性化が一般にかなり低いだけでなく、M2マクロファージとの腫瘍細胞およびNK細胞のインキュベーションもNK活性化の強力な減少を引き起こした。

【図3】アイソタイプ対照または1μgの抗MICA抗体mAb 1を受けたマウスが注射後100日間生存しなかった一方、少なくとも10μgの抗MICA抗体を受けたマウスにおいて有意に改善された生存期間が観察されたことを示す。100μgの用量において、抗MICA抗体mAb 1は全てのマウスにおいて100日間の生存期間を達成した。

40

【図4】左側パネルにアイソタイプ対照を受けたマウス、および右側パネルに抗MICA抗体mAb 1を受けたマウスを示す。個々の腫瘍容積を示す。CR = 完全奏功。抗MICA抗体mAb 1による処理は、腫瘍容積の減少を引き起こした。

【図5】抗MICA抗体mAb 1により処理されたマウスが、アイソタイプ対照により処理されたマウスと比較して減少した腫瘍細胞数を示したことを示す。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0037】

本発明の抗体は、MICA発現細胞ならびにMICB発現細胞、特に腫瘍細胞および炎

50

症または自己免疫プロセスに關与する細胞を直接的に、および特異的に標的化し得る。

【0038】

MICA (PERB11.1) は、MHCクラスIポリペプチド関連配列A (例えば、UniProtKB/Swiss-Prot Q29983参照)、その遺伝子およびcDNAならびにその遺伝子産物、またはその天然バリエーションを指す。MICA遺伝子およびタンパク質の命名は、異なるアレルについての配列のアクセッション番号への参照と一緒に、Frigoul A. and Lefranc, M-P. Recent Res. Devel. Human Genet., 3 (2005): 95-145 ISBN: 81-7736-244-5に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。MICA遺伝子およびタンパク質配列は、タンパク質およびDNAレベルにおける多型を含み、Cancer Research UKおよびEuropean Bioinformatics Institute (EBI)により維持される<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/align.html>からも利用可能である。

10

【0039】

MICAのアミノ酸配列は、Bahram et al (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 6259-6263およびBahram et al. (1996) Immunogenetics 44: 80-81に最初に記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。MICA遺伝子は多型性であり、細胞外 1、2、および 3ドメイン中の多数のバリエーションアミノ酸の特有の分布を示す。MICAの多型をさらに定義するため、Petersdorf et al. (1999) は、共通のおよび希少なHLA遺伝子型を有する275個体の中でそのアレルを試験した。ヒトMICAの細胞外 1、2、および 3ドメインのアミノ酸配列を配列番号1~5に示す。完全MICA配列は、23アミノ酸のリーダー配列、ならびに膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインをさらに含む。選択ヒトMICAアレルの細胞外 1、2、および 3ドメインのアミノ酸配列を配列番号1~5に示す。MICA\*001のアミノ酸配列を配列番号1に示し、それはGenbankアクセッション番号AAB41060に対応する。ヒトMICAアレルMICA\*004のアミノ酸配列を配列番号2に示し、それはGenbankアクセッション番号AAB41063に対応する。ヒトMICAアレルMICA\*007のアミノ酸配列を配列番号3に示し、それはGenbankアクセッション番号AAB41066に対応する。ヒトMICAアレルMICA\*008のアミノ酸配列を配列番号4に示し、それはGenbankアクセッション番号AAB41067に対応する。ヒトMICAアレルMICA\*019のアミノ酸配列を配列番号5に示し、それはGenbankアクセッション番号AAD27008に対応する。ヒトMICAのアミノ酸配列はGenbankアクセッション番号CAI18747に示される(配列番号36)。

20

30

【0040】

【表 1】

MICA アレル	配列番号	アミノ酸配列	
MICA*001	1	EPHSLRYNLT VLSWDGVSQS GFLTEVHLDG QPFLRCDRQK CRAKPOGQWA EDVLGNKTWD RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFSLQ NLETKEWTMP QSSRAQTLAM NVRNFLKEDA MKTkTHYHAM HADCLQELRR YLKSgVVLRR TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASGFYPW NITLSWRQDG VLSHDTQQW GDVLPDNGT YQTWVATRIC QGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS	10
MICA*004	2	EPHSLRYNLT VLSWDGVSQS GFLAEVHLDG QPFLRYDRQK CRAKPOGQWA EDVLGNKTWD RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFSLQ NVETEETVP QSSRAQTLAM NVRNFLKEDA MKTkTHYHAM HADCLQELRR YLESSVVLRR RVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASSFYPR NITLTWRQDG VLSHDTQQW GDVLPDNGT YQTWVATRIC QGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS	
MICA*007	3	EPHSLRYNLT VLSWDGVSQS GFLAEVHLDG QPFLRCDRQK CRAKPOGQWA EDVLGNKTWD RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFSLQ NLETEEWTMP QSSRAQTLAM NVRNFLKEDA MKTkTHYHAM HADCLQELRR YLKSgVVLRR TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASGFYPW NITLSWRQDG VLSHDTQQW GDVLPDNGT YQTWVATRIC QGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS	20
MICA*008	4	EPHSLRYNLT VLSWDGVSQS GFLAEVHLDG QPFLRYDRQK CRAKPOGQWA EDVLGNKTWD RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFSLQ NLETEEWTVP QSSRAQTLAM NVRNFLKEDA MKTkTHYHAM HADCLQELRR YLESGVVLRR TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASSFYPR NIILTWRQDG VLSHDTQQW GDVLPDNGT YQTWVATRIC RGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS	30
MICA*019	5	EPHSLRYNLT VLSWDGVSQS GFLAEVHLDG QPFLRYDRQK CRAKPOGQWA EDVLGNKTWD RETRDLTGNG KDLRMTLAHI KDQKEGLHSL QEIRVCEIHE DNSTRSSQHF YYDGELFSLQ NLETEEWTVP QSSRAQTLAM NVRNFLKEDA MKTkTHYHAM HADCLQELRR YLESSVVLRR TVPPMVNVTR SEASEGNITV TCRASSFYPR NIILTWRQDG VLSHDTQQW GDVLPDNGT YQTWVATRIC RGEEQRFTCY MEHSGNHSTH PVPS	
MICB	36	MGLGRVLLFL AVAFPFAPPA AAAEPHSLRY NLMVLSQDGS VQSGFLAEGH LDGQPFLRYD RQKRRAKPQG QWAEDVLGAK TWDTEDELTL ENGQDLRRTL THIKDQKGLL HSLQEIRVCE IHEDSSTRGS RHFYYDGELF LSQNLETQES TVPQSSRAQT LAMNVTNFWK EDAMKTKTHY RAMQADCLQK LQRYLKSGVA IRRTVPPMVN VTCSEVSEGN ITVTCRASSF YPRNITLWR QDGVSLSHNT QQWGDVLPDG NGTYQTWVAT RIRQGEEQRF TCYMEHSGNH GTHPVPSGKA LVLQSQRTEF PYVSAAMPCE VIIIILCVPC CKKKTSAEAG PELVSLQVLD QHPVGTGDHR DAAQLGFQPL MSATGSTGST EGA	40

## 【 0 0 4 1 】

MICA遺伝子は、MhcSFおよびIgSFに属するタンパク質をコードする。このタンパク質は、膜貫通MHC-I-アルファ様（I-アルファ様）鎖であり、3つの細胞外ドメイン、2つの遠位G様ドメイン、G-アルファ1様（「D1」または「1」とも

称される)およびG-アルファ2様(「D2」または「2」とも称される)、および細胞膜に近位のC様ドメイン(「D3」または「3」とも称される)、ならびに3つの領域、結合領域、膜貫通領域および細胞質領域(IMG T (international Immunogenetics information system (登録商標))のIMG T Scientific Chart、<http://imgt.org>およびLeFranc et al. In Silico Biology, 2005; 5: 45-60による標識)を含む。リーダー、ECD、TMおよびCYドメインを含むMICA成熟タンパク質は、360~366アミノ酸から構成され、差は、膜貫通領域中のマイクロサテライト多型から生じる。1、2および3は、任意の好適な番号付与系(例えば、IMG T番号付与系)に従って定義することができる。一実施形態において、1ドメインは、配列番号1のMICAポリペプチドの残基位置1~88を含み; 2ドメインは、配列番号1のMICAポリペプチドの残基位置89~181を含み; 3ドメインは、配列番号1のMICAポリペプチドの残基位置182~274を含む。1および2ドメインは、A、B、CおよびD鎖、AB、BCおよびCDターンならびにヘリックスをそれぞれ含む。3ドメインは、A、B、C、D、E、FおよびG鎖、BCループ、CD鎖、DEターンおよびFGループを含む。O-グリカン(セリンまたはトレオニンに結合しているN-アセチルラクトサミン)および/またはN-グリカンを含む、1中に2つ、2中に1つおよび3ドメイン中に5つの8つの潜在的グリコシル化部位を有するMICAタンパク質は、高度にグリコシル化される。MICAは、ある細胞中で構成的に発現される一方、低レベルのMICA発現は、通常、宿主免疫細胞接着を生じさせない。しかしながら、MICAは、急速に増殖する細胞、例えば、腫瘍細胞上で上方調節される。全てのNKGD2リガンドのMICAは最も高度に発現され、それは広範な腫瘍タイプ(例えば、一般の癌種、膀胱癌、黒色腫、肺癌、肝細胞癌、膠芽細胞腫、前立腺癌、一般の血液悪性腫瘍、急性骨髄性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病および慢性リンパ球性白血病にわたり見出されている。近年、Tsuboi et al. (2011) (EMBO J: 1-13)は、O-グリカン分枝酵素、コア2-1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ(C2GnT)がMICA発現腫瘍細胞中で活性であることおよび腫瘍細胞からのMICAがコア2O-グリカン(N-アセチルガラクトサミンに連結しているN-アセチルグルコサミン分枝を含むO-グリカン)を含有することを報告した。

10

20

30

40

50

#### 【0042】

Bauer et al Science 285: 727-729, 1999は、NKGD2についてのストレス誘導性リガンドとしてのMICAについての役割を提供した。本明細書において使用される「MICA」は、MICA遺伝子の任意のバリエーション、誘導体、もしくはアイソフォームまたはそれらが指すコードされるタンパク質を含む任意のMICAポリペプチドを指す。MICA遺伝子は多型性であり、細胞外アルファ-1、アルファ-2、およびアルファ-3ドメイン中の多数のバリエーションアミノ酸の特有の分布を示す。種々のアレルバリエーションは、MICAポリペプチド(例えば、MICA)について報告されており、それらのそれぞれは、それぞれの用語、例として、例えば、ヒトMICAポリペプチドMICA\*001、MICA\*002、MICA\*004、MICA\*005、MICA\*006、MICA\*007、MICA\*008、MICA\*009、MICA\*010、MICA\*011、MICA\*012、MICA\*013、MICA\*014、MICA\*015、MICA\*016、MICA\*017、MICA\*018、MICA\*019、MICA\*020、MICA\*022、MICA\*023、MICA\*024、MICA\*025、MICA\*026、MICA\*027、MICA\*028、MICA\*029、MICA\*030、MICA\*031、MICA\*032、MICA\*033、MICA\*034、MICA\*035、MICA\*036、MICA\*037、MICA\*038、MICA\*039、MICA\*040、MICA\*041、MICA\*042、MICA\*043、MICA\*044、MICA\*045、MICA\*046、MICA\*047、MICA\*048、MICA\*049、MICA\*050、M

I C A \* 0 5 1、M I C A \* 0 5 2、M I C A \* 0 5 3、M I C A \* 0 5 4、M I C A \* 0 5 5、M I C A \* 0 5 6 およびさらなるM I C A アレルM I C A \* 0 5 7 ~ M I C A \* 0 8 7 により包含される。

【0043】

本明細書において使用される「h N K G 2 D」および、特に記載のない限り、または文脈により矛盾がない限り、用語「N K G 2 D」、「N K G 2 - D」、「C D 3 1 4」、「D 1 2 S 2 4 8 9 E」、「K L R K 1」、「キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーK、メンバー1」、または「K L R K 1」は、ヒトキラー細胞活性化受容体遺伝子、そのc D N A（例えば、G e n B a n k アクセション番号N M \_ 0 0 7 3 6 0）、およびその遺伝子産物（G e n B a n k アクセション番号N P \_ 0 3 1 3 8 6）、またはその天然バリエーションを指す。N K およびT細胞中で、h N K G 2 Dは、タンパク質、例えば、D A P 1 0（G e n B a n k アクセション番号A A G 2 9 4 2 5、A A D 5 0 2 9 3）とヘテロダイマーまたはより高次の複合体を形成し得る。本明細書においてh N K G 2 Dに起因する任意の活性、例えば、細胞活性化、抗体認識などは、ヘテロダイマーの形態のh N K G 2 D、例えば、h N K G 2 D - D A P 1 0、またはそれら2つの（および/または他の）成分とのより高次の複合体にも起因し得る。

10

【0044】

N K G 2 Dとの複合体中のM I C Aの三次元構造は、決定されている（例えば、L i e t a l . , N a t . I m m u n o l . 2 0 0 1 ; 2 : 4 4 3 - 4 5 1 ; コード1 h y r、およびI M G T / 3 D s t r u c t u r e - D B（K a a s e t a l . N u c l . A c i d s R e s . 2 0 0 4 ; 3 2 : D 2 0 8 - D 2 1 0）参照）。M I C AがN K G 2 Dホモダイマーとの複合体中に存在する場合、M I C A 2の残基63~73（I G M T番号付与）が配列され、ほぼ2つのヘリックスのターンを付与する。N K G 2 Dの2つのモノマーは、M I C Aとの相互作用に等しく寄与し、それぞれのN K G 2 Dモノマー中の7つの位置がM I C A 1または2ヘリックスドメインの1つと相互作用する。

20

【0045】

本発明は、本明細書に開示の抗M I C A抗体を使用する方法を提供し；例えば、細胞増殖または活性を阻害する方法、分子を細胞（例えば、毒性分子、検出可能マーカーなど）に送達する方法、細胞を標的化、同定または精製する方法、細胞を枯渇、殺傷または排除する方法、細胞増殖を低減させる方法であって、細胞、例えば、M I C Aポリペプチドを発現する腫瘍細胞を、M I C Aポリペプチドに結合する本開示の抗原結合化合物に曝露することを含む方法が提供される。本明細書における目的のため、「細胞増殖」は、細胞の成長または増殖の任意の態様、例えば、細胞成長、細胞分裂、または細胞周期の任意の態様を指し得ることが認識される。細胞は、細胞培養物（インビトロ）または哺乳動物（インビボ）、例えば、M I C A発現病変を罹患する哺乳動物中に存在し得る。またM I C Aポリペプチドを発現する細胞の死滅を誘導し、またはその細胞を増殖もしくは活性を阻害する方法であって、細胞を、細胞の死滅を誘導し、および/または細胞の増殖を阻害するために有効な量の毒性剤に結合しているM I C Aポリペプチドに結合する抗原結合化合物に曝露させることを含む方法も提供される。したがって、また増殖疾患、およびM I C Aポリペプチドの細胞発現の病原性拡張により特徴づけられる任意の病態を罹患する哺乳動物を治療する方法であって、例えば、癌の治療のために、医薬有効量の本明細書に開示の抗体を投与することを哺乳動物に含む方法も提供される。

30

40

【0046】

定義

本明細書において使用される「a」または「an」は、1つ以上を意味し得る。特許請求の範囲において使用され、語「含む」とともに使用される場合、語「a」または「an」は、1つまたは2つ以上を意味し得る。本明細書において使用される「別の」は、少なくとも第2以上を意味し得る。

【0047】

「含む」が使用される場合、これは、任意選択で、「~から本質的になる」、または「

50

～からなる」により置き換えることができる。

【0048】

本明細書全体内で「癌の治療」などは、抗MICA結合剤（例えば、抗体）に関して挙げられる場合、それらは、（a）癌を治療する方法であって、（例えば、薬学的に許容可能な担体材料中の）抗MICA結合剤を、そのような治療が必要とされる個体、哺乳動物、特にヒトに、癌の治療を可能とする用量（治療有効量）で、任意選択で、本明細書で規定される用量（量）で（少なくとも1つの治療のために）投与するステップを含む方法；（b）癌の治療のための、抗MICA結合剤の使用、または前記治療（特にヒト）において使用される抗MICA結合剤；（c）癌の治療のための医薬調製物の製造のための、抗MICA結合剤の使用、癌の治療のための医薬調製物の製造のために抗MICA結合剤を使用する方法であって、抗MICA結合剤を薬学的に許容可能な担体と混合することを含む方法、もしくは癌の治療に適切な有効量の抗MICA結合剤を含む医薬調製物；または（d）a）、b）、およびc）の任意の組合せを意味し、本出願が出願される国において特許化の許容可能な主題に従う。

10

【0049】

本明細書において使用される用語「抗体」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を指す。重鎖中の定常ドメインのタイプに応じて、抗体は、5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMの1つに割り当てられる。これらのいくつかは、サブクラスまたはアイソタイプ、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4などにさらに分類される。例示的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、テトラマーを含む。それぞれのテトラマーは、2つの同一のポリペプチド鎖ペアから構成され、それぞれのペアは、1つの「軽」鎖（約25kDa）および1つの「重」鎖（約50～70kDa）を有する。それぞれの鎖のN末端は、主として抗原認識を担う約100～110以上のアミノ酸からなる可変領域を定義する。可変軽鎖（V<sub>L</sub>）および可変重鎖（V<sub>H</sub>）という用語はそれぞれ、これらの軽鎖および重鎖を指す。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、「アルファ」、「デルタ」、「イプシロン」、「ガンマ」および「ミュー」と称される。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元立体配置は周知である。IgGは、それらが生理学的状況における最も一般的な抗体であるため、およびそれらが研究室の環境において最も容易に作製されるため、本明細書で用いられる例示的なクラスの抗体である。任意選択で、抗体は、モノクローナル抗体である。抗体の特定の例は、ヒト化、キメラ、ヒト、またはそれ以外ではヒトに好適な抗体である。「抗体」として、本明細書に記載の抗体のいずれかの任意の断片または誘導体も挙げられる。

20

30

【0050】

用語「に特異的に結合する」は、抗体が、好ましくは、競合結合アッセイにおいて、タンパク質の組換え形態、その中のエピトープ、または単離標的細胞の表面上に存在する天然タンパク質のいずれかを使用して評価される場合、結合パートナー、例えばMICAおよびMICBに結合し得ることを意味する。競合結合アッセイおよび特異的結合を決定する他の方法は、下記にさらに記載され、当分野において周知である。

【0051】

抗体が特定のモノクローナル抗体「と競合する」と言われる場合、それは、抗体が、組換えMICA分子または表面発現MICA分子のいずれかを使用する結合アッセイにおいてモノクローナル抗体と競合することを意味する。例えば、試験抗体が結合アッセイにおいてMICAポリペプチドまたはMICA発現細胞への参照抗体の結合を低減させる場合、抗体は、参照抗体とそれぞれ「競合する」と言われる。

40

【0052】

本明細書において使用される用語「親和性」は、抗体のエピトープへの結合強度を意味する。抗体の親和性は、 $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$ （式中、 $[Ab-Ag]$ は抗体-抗原複合体のモル濃度であり、 $[Ab]$ は未結合抗体のモル濃度であり、 $[Ag]$ は未結合抗原のモル濃度である）として定義される解離定数K<sub>d</sub>により与えられる。親和

50

性定数  $K_d$  は、 $1/K_d$  により定義される。mAb の親和性を測定する方法は、Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)、Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992、1993)、および Muller, Meth. Enzymol. 92: 589-601 (1983) に見出すことができ、その参考文献は参照により全体として本明細書に組み込まれる。mAb の親和性を測定する当分野において周知の1つの標準的方法は、表面プラズモン共鳴 (SPR) スクリーニング (例えば、BIAcore (商標) SPR 分析装置による分析によるもの) の使用である。

10

**【0053】**

本明細書の範囲内で、「決定基」は、ポリペプチド上での相互作用または結合の部位を指定する。

**【0054】**

用語「エピトープ」は、抗原決定基を指し、抗体が結合する抗原上の区域または領域である。タンパク質エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基、および特異的抗原結合抗体またはペプチドにより有効に遮断されるアミノ酸残基、すなわち抗体の「フットプリント」内のアミノ酸残基を含み得る。それは、例えば、抗体または受容体と結合し得る複合抗原分子上の最も単純な形態または最小の構造領域である。エピトープは、直鎖または立体構造的 / 構造的であり得る。用語「直鎖エピトープ」は、アミノ酸の直鎖配列 (一次構造) 上で連続するアミノ酸残基から構成されるエピトープとして定義される。用語「立体構造的または構造的エピトープ」は、全てが連続しておらず、したがって、分子のフォールディング (二次、三次および / または四次構造) により互いに近接されるアミノ酸の直鎖配列の分離部分を表すアミノ酸残基から構成されるエピトープとして定義される。立体構造的エピトープは、三次元構造に依存する。したがって、用語「立体構造的」は、「構造的」と交換可能に使用されることが多い。

20

**【0055】**

MICA 発現細胞に関する用語「枯渇させる」または「枯渇させること」は、殺傷、排除、溶解またはそのような殺傷、排除もしくは溶解の誘導をもたらして試料中または対象中に存在するそのような MICA 発現細胞の数に負の影響を与えるプロセス、方法、または化合物を意味する。

30

**【0056】**

用語「抗体依存性細胞媒介細胞毒性」または「ADCC」は、当分野において十分理解されている用語であり、Fc 受容体 (FcR) を発現する非特異的細胞毒性細胞が標的細胞上の結合抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす細胞媒介反応を指す。ADCC を媒介する非特異的細胞毒性細胞としては、ナチュラルキラー (NK) 細胞、マクロファージ、単球、好中球、および好酸球が挙げられる。

**【0057】**

用語「補体依存性細胞毒性」または「CDC」は、当分野において十分理解されている用語であり、補体の存在下で標的を溶解する分子の能力を指す。補体活性化経路は、コグネイト抗原と複合体化している分子 (例えば、抗体) への補体系の第1の補体 (C1q) の結合により開始される。

40

**【0058】**

用語「薬剤」は、化合物、化合物の混合物、生物学的巨大分子、または生物学的材料から作製された抽出物を示すために本明細書において使用される。用語「治療剤」は、生物学的活性を有する薬剤を指す。

**【0059】**

本明細書における目的のため、「ヒト化」または「ヒト」抗体は、1つ以上のヒト免疫グロブリンの定常および可変フレームワーク領域が、動物免疫グロブリンの結合領域、例

50

例えばCDRと融合している抗体を指す。そのような抗体は、結合領域が由来する非ヒト抗体の結合特異性を維持するが、非ヒト抗体に対する免疫反応を回避するように設計される。そのような抗体は、抗原チャレンジに応答して特異的ヒト抗体を産生するように「遺伝子操作」されたトランスジェニックマウスまたは他の動物から得ることができる(例えば、Green et al. (1994) Nature Genet 7:13; Longberg et al. (1994) Nature 368:856; Taylor et al. (1994) Int Immun 6:579参照、それらの全教示は、参照により本明細書に組み込まれる)。完全ヒト抗体は、遺伝子または染色体形質移入(chromosomal transfection)法、およびファージディスプレイ技術により構築することもでき、それらは全て当分野において公知である(例えば、McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-553参照)。ヒト抗体は、インビトロで活性化されたB細胞により生成することもできる(例えば、米国特許第5,567,610号明細書および米国特許第5,229,275号明細書参照、それらは全て、参照により全体として組み込まれる)。

10

20

30

40

50

#### 【0060】

本明細書において使用される用語「抗原結合ドメイン」は、エピトープに免疫特異的に結合し得る三次元構造を含むドメインを指す。したがって、一実施形態において、前記ドメインは、超可変領域、任意選択で、抗体鎖のVHおよび/またはVLドメイン、任意選択で、少なくともVHドメインを含み得る。別の実施形態において、結合ドメインは、抗体鎖の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含み得る。別の実施形態において、結合ドメインは、非免疫グロブリン足場からのポリペプチドドメインを含み得る。

#### 【0061】

用語「超可変領域」は、本明細書において使用される場合、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、一般に、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)ならびに重鎖可変ドメイン中の31~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3);開示(Kabat et al. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD)参照)および/または「超可変ループ」からの残基(例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基26~32(L1)、50~52(L2)および91~96(L3)ならびに重鎖可変ドメイン中の26~32(H1)、53~55(H2)および96~101(H3);Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987;196:901-917)、または抗原結合を担う必須アミノ酸を決定する類似の系を含む。Kabat番号付与系を使用することにより、ペプチドの実際の直鎖アミノ酸配列は、可変ドメインのFRまたはCDRの短縮またはそれらへの挿入に対応してより少ないまたは追加のアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、CDRH2の残基52の後の単一アミノ酸インサート(Kabatに従う残基52a)および重鎖FR残基82の後の挿入残基(例えば、Kabatに従う残基82a、82b、および82cなど)を含み得る。残基のKabat番号付与は、所与の抗体について、「標準」Kabat番号付与配列との抗体の配列の相同性の領域におけるアラインメントにより決定することができる。別の好適な番号付与系は、Abnum系である。特に規定のない限り、免疫グロブリンについてのAbnumアミノ酸番号付与命名法を使用してVHおよびVLドメインの位置を指す(Abhinandan and Martin, (2008) Molecular Immunology 45:3832-3839参照、その開示は参照により組み込まれる)。Abnum系を使用する配列番号付与は、<http://www.bioinfo.org.uk/abs/abnum>において自動生成することもできる。しかしながら、当業者は代替番号付与系を使用し、Abnum番号付与に対応する位置を同定することができることが認識される。本明細書における「Amb位」、「Ab

m番号付与」および「Abmに従う」などの語句は、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインについてのこの番号付与系を指す。

【0062】

本明細書において使用される「フレームワーク」または「FR」残基は、CDRとして定義される領域を除く抗体可変ドメインの領域を意味する。それぞれの抗体可変ドメインフレームワークは、CDRにより離隔される連続領域にさらに下位分類することができる（FR1、FR2、FR3およびFR4）。

【0063】

用語「Fcドメイン」、「Fc部分」および「Fc領域」は、抗体重鎖、例えば、約アミノ酸(aa)230~約aa450(Kabat番号付与)のヒト(ガンマ)重鎖、または他のタイプの抗体重鎖(例えば、ヒト抗体についての、およびμ)におけるその相当配列、またはその天然アロタイプのC末端断片を指す。

10

【0064】

用語「単離された」、「精製された」または「生物学的に純粋な」は、通常、天然状態で見出される場合に材料に付随する成分を実質的または本質的に有さない材料を指す。純度および等質性は、典型的には、分析化学技術、例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーを使用して決定される。調製物中に存在する優勢種であるタンパク質は、実質的に精製される。

【0065】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書において交換可能に使用される。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工的な化学的模倣体である場合のアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーおよび非天然アミノ酸ポリマーに適用される。

20

【0066】

用語「組換え体」は、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに関して使用される場合、細胞、核酸、タンパク質またはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入もしくは天然核酸もしくはタンパク質の変化により改変されていること、または細胞がそのように改変された細胞に由来することを示す。したがって、例えば、組換え細胞は、天然(非組換え)形態の細胞内で見出されない遺伝子を発現し、または発現され、もしくは全く発現されない下で他で異常発現される天然遺伝子を発現する。

30

【0067】

本明細書における文脈内で、ポリペプチドまたはエピトープに「結合する」抗体という用語は、前記決定基に特異性および/または親和性を有して結合する抗体を指す。

【0068】

用語「同一性」または「同一である」は、2つ以上のポリペプチドの配列間の関係において使用される場合、2つ以上のアミノ酸残基の文字列間でのマッチの数によって決定された、ポリペプチド間の配列の関連性の程度を示す。「同一性」は、特定の数学モデルまたはコンピュータプログラム(すなわち、「アルゴリズム」)により対処されるギャップアラインメント(存在する場合)を有する2つ以上の配列の小さい方の中での同一のマッチのパーセントの尺度である。関連するポリペプチドの同一性は、公知の方法により容易に計算することができる。そのような方法としては、限定されるものではないが、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence An

40

50

alysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; および Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988) に記載のものが挙げられる。

【0069】

同一性を決定するための方法は、試験される配列間で最大マッチを与えるように設計される。同一性を決定するための方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記述されている。2つの配列間の同一性を決定するためのコンピュータプログラムの方法としては、GCGプログラムパッケージ、例としてGAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)) が挙げられる。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他のソース (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., 前掲) から公的に利用可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムを使用して同一性を決定することもできる。

10

【0070】

20

抗体の産生

本発明は、部分的には、得られる抗MICA可変領域が高い物理化学的安定性および主要なヒトMICAアレルについての高い結合親和性を有するように抗体CDRを取り込むことができる改変ヒトアクセプターフレームワーク配列の発見に基づく。さらに、ヒトアミノ酸配列の高い含有率を有する抗体が提供され、それによりヒト個体に投与された場合の免疫原性のリスク減少を提供する。有利には、抗体は、ヒト抗マウス抗体 (HAMMA) を誘発する低い潜在性を有する。

【0071】

抗MICA抗体VHおよびVL配列を以下の表1に提供し、それぞれのVHドメインおよびVLドメイン間で異なるアミノ酸に下線を付す。

30

【0072】

## 【表 2】

表 1

抗体ドメイン	アミノ酸配列
mAb1 VH	QVQLQESGPGLVK <b>P</b> SETLSLTCTVSGYSI <b>T</b> SDYAWN <b>W</b> IRQPPGK <b>G</b> LEWIGFVSYSG <b>T</b> TKY NPSLKSRVTIS <b>R</b> DTSKNQFSLK <b>L</b> SSVTAADTAVYYCARGYGF <b>D</b> YWGQGT <b>T</b> TVSS (配列番号 6)
mAb1 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSI <b>F</b> H <b>W</b> YQ <b>Q</b> KPGQAPRLLI <b>R</b> TSN <b>L</b> AS <b>G</b> IP ARFSGSGSGTD <b>Y</b> TLT <b>I</b> SSLEPEDFAVYYC <b>Q</b> QGT <b>T</b> IP <b>F</b> T <b>F</b> G <b>Q</b> G <b>T</b> KLEIK (配列番号 7)
mAb2 VH	QVQLQESGPGLVK <b>P</b> SETLSLTCTVSGYSI <b>T</b> SDYAWN <b>W</b> IRQPPGK <b>G</b> LEWIGFVSYSG <b>T</b> TKY NPSLKSRVTIS <b>R</b> DTSKNQFSLK <b>L</b> SSVTAADTAVYYCARGYGF <b>D</b> YWGQGT <b>T</b> TVSS (配列番号 8)
mAb2 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSI <b>F</b> H <b>W</b> YQ <b>Q</b> KPGQAPRLLI <b>R</b> TSN <b>L</b> AS <b>G</b> IP ARFSGSGSGT <b>S</b> YTLT <b>I</b> SSLEPEDFAVYYC <b>Q</b> QGT <b>T</b> IP <b>F</b> T <b>F</b> G <b>Q</b> G <b>T</b> KLEIK (配列番号 9)
mAb3 VH	QVQLQESGPGLVK <b>P</b> SETLSLTCTVSGYSI <b>T</b> SDYAWN <b>W</b> IRQPPGK <b>G</b> LEWIGFVSYSG <b>T</b> TKY NPSLKSRVTIS <b>R</b> DTSKNQFSLK <b>L</b> SSVTAADTAVYYCARGYGF <b>D</b> YWGQGT <b>T</b> TVSS (配列番号 10)
mAb3 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSI <b>F</b> H <b>W</b> YQ <b>Q</b> KPGQAPRLLI <b>R</b> TSN <b>L</b> AS <b>G</b> IP ARFSGSGSGTD <b>Y</b> TLT <b>I</b> SSLEPED <b>V</b> AVYYC <b>Q</b> QGT <b>T</b> IP <b>F</b> T <b>F</b> G <b>Q</b> G <b>T</b> KLEIK (配列番号 11)

10

20

## 【 0 0 7 3 】

本明細書におけるVHおよびVLドメインの位置は、免疫グロブリンについてのAbnumアミノ酸番号付与命名法を使用して記載される(Abhinandan and Martin, (2008) Molecular Immunology 45:3832-3839参照、その開示は、参照により組み込まれる)。Abnum系を使用する配列番号付与は、<http://www.bioinfo.org.uk/abs/abnum>において自動生成することもできる。しかしながら、当業者は代替番号付与系を使用し、Abnum番号付与に対応する位置を同定することができることが認識される。

30

## 【 0 0 7 4 】

一実施形態において、抗体は、ヒトサブグループIGHV4-b(例えば、IGHV4-b\*02)からの重鎖フレームワークを含み、JセグメントはIGHJ6(例えば、IGHJ6\*01)からのものである。一実施形態において、ヒト化抗体は、ヒトサブグループIGKV3-11(例えば、IGKV3-11\*01)からの軽鎖フレームワークを含み、JセグメントはIGKJ2(例えば、IGKJ2\*01)からのものである。

## 【 0 0 7 5 】

抗体は、例えば、その抗体の親和性、安定性、または他の特性を向上させるためのヒトフレームワーク配列中の1つ以上の突然変異をさらに含み得る。

40

## 【 0 0 7 6 】

抗MICA抗体のVHおよびVLアミノ酸配列の例を配列番号6~21にそれぞれ示す。一態様において、ヒトMICAポリペプチドに結合する単離抗体であって、配列番号30に記載のアミノ酸配列SDYAWNを含むHCDR1領域、またはその少なくとも3もしくは4つのアミノ酸の配列；配列番号31に記載のアミノ酸配列FVSYSGTTYNP SLKSを含むHCDR2領域、またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10の連続アミノ酸の配列；配列番号32に記載のアミノ酸配列GYGF DYを含むHCDR3領域、またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10の連続アミノ酸の配列；配列番号33に記載のアミノ酸配列SATSSISSIYFHを含むLCDR1領域、またはその少なくとも4、5、6、7、8、9もしくは10の連続アミノ酸の

50

配列；配列番号34に記載のアミノ酸配列RTSNLAを含むLCDR2領域、またはその少なくとも3、4もしくは5つの連続アミノ酸の配列；配列番号35に記載のアミノ酸配列QQGTTIPFTを含むLCDR3領域、またはその少なくとも5、6、7、もしくは8つの連続アミノ酸の配列を含む抗体が提供される。

【0077】

一態様において、ヒトMICAポリペプチドに結合する抗原結合ドメインまたは抗体であって、

- (a) 配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-H1；
- (b) 配列番号31のアミノ酸配列を含むCDR-H2；
- (c) 配列番号32のアミノ酸配列を含むCDR-H3；
- (d) 配列番号33のアミノ酸配列を含むCDR-L1；
- (e) 配列番号34のアミノ酸配列を含むCDR-L2；
- (f) 配列番号35のアミノ酸配列を含むCDR-L3；および
- (g) ヒト重鎖および軽鎖フレームワーク配列

を含み、

配列番号6のアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、95%または98%同一のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号7のアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、95%または98%同一のアミノ酸配列を含むVLを含む抗原結合ドメインまたは抗体が提供される。

【0078】

一実施形態において、軽鎖可変領域(VL)は、VLのCDR1内のアミノ酸との非共有結合を形成し得るAbnum71位(FR3中)におけるアミノ酸残基を含む。一実施形態において、VLは、Abnum71位(FR3中)におけるチロシン(Y)アミノ酸残基を含む。一実施形態において、VLは、Abnum83位におけるフェニルアラニン(F)を含む。

【0079】

一実施形態において、重鎖可変領域(VH)は、互いに相互作用してAbnum72c位における残基と74位における残基との間の塩橋、例えば、H結合を形成し得るAbnum72c位(FR2中)および74位(FR3中)におけるアミノ酸残基を含む。一実施形態において、VHは、Abnum72c位におけるリジン(K)アミノ酸残基および74位におけるグルタミン残基を含む。一実施形態において、VHは、Abnum30位におけるトレオニン(T)を含む。一実施形態において、VHは、Abnum48位におけるイソロイシン(I)を含む。一実施形態において、VHは、Abnum67位におけるバリン(V)を含む。一実施形態において、VHは、Abnum71位におけるアルギニン(R)を含む。

【0080】

一実施形態において、VHは、ヒトサブグループIGHV4-b(例えば、IGHV4-b\*02)からの重鎖フレームワークを含み、JセグメントはIGHJ6(例えば、IGHJ6\*01)からのものである。一実施形態において、VLは、ヒトサブグループIGKV3-11(例えば、IGKV3-11\*01)からの軽鎖フレームワークを含み、JセグメントはIGKJ2(例えば、IGKJ2\*01)からのものである。

【0081】

任意選択で、ヒトVHおよび/またはVLフレームワーク(例えば、またはその重鎖または軽鎖FR1、FR2、FR3および/またはFR4)は、非ヒト哺乳動物(例えば、マウスまたはラット)中の特定の位置に存在する残基を導入するための1つ以上の突然変異、例えば、復帰突然変異を含んでも含まなくてもよい。抗体は、例えば、その抗体の親和性、安定性、または他の特性を向上させるためのヒトフレームワーク配列中の1つ以上の追加の突然変異(例えば、復帰突然変異)をさらに含んでも含まなくてもよい。

【0082】

別の態様において、配列番号6または8のVHドメインと少なくとも約80%の配列同

10

20

30

40

50

一性（例えば、少なくとも約85%、90%、95%、97%、98%以上の同一性）を有するVHドメインを含む抗MICA抗体が提供される。別の態様において、配列番号7または9のVHドメインと少なくとも約80%の配列同一性（例えば、少なくとも約85%、90%、95%、97%、98%以上の同一性）を有するVLドメインを含む抗MICA抗体が提供される。

#### 【0083】

抗体をコードするDNAを調製し、適切な宿主中への形質移入に適切な発現ベクター中で配置することができる。次いで、その宿主を抗体、またはそのバリエーション、例えば、そのモノクローナル抗体のヒト化バージョン、抗体の活性断片、抗体の抗原認識部分を含むキメラ抗体、または検出可能部分を含むバージョンの組換え産生に使用する。

10

#### 【0084】

本開示のモノクローナル抗体をコードするDNAは、慣用の手順を使用して（例えば、ネズミ抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）容易に単離し、配列決定することができる。一態様において、本明細書の任意の実施形態の抗MICA抗体の重鎖または軽鎖をコードする核酸が提供される。DNAは、単離したら、発現ベクター中に配置することができ、次いでそれを他の場合には免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞、例えば、大腸菌（*E. coli*）細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞中に形質移入して組換え宿主細胞中のモノクローナル抗体の合成を得る。本明細書の他箇所に記載のとおり、そのようなDNA配列は、多数の目的のいずれかのために、例えば、抗体のヒト化、断片もしくは誘導体の産生のため、または例えば、抗体の結合特異性を最適化するための抗原結合部位中の抗体の配列の改変のために改変することができる。一実施形態において、抗体の軽鎖および/または重鎖をコードする単離核酸配列、ならびにそのような核酸を（例えば、ゲノム中で）含む組換え宿主細胞が提供される。抗体をコードするDNAの細菌中での組換え発現は、当分野において周知である（例えば、Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5, pp. 256 (1993); および Pluckthun, *Immunol.* 130, p. 151 (1992) 参照。

20

#### 【0085】

典型的には、本明細書において提供される抗MICA抗体は、約 $10^4$  ~ 約 $10^{11}$  M<sup>-1</sup>（例えば、約 $10^8$  ~ 約 $10^{10}$  M<sup>-1</sup>）の範囲のMICAポリペプチドについての親和性を有する。例えば、特定の態様において、本開示は、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）スクリーニング（例えば、BIACore（商標）SPR分析装置による分析）により測定されるMICAに関して $1 \times 10^{-9}$  M未満の平均解離定数（ $K_D$ ）を有する抗MICA抗体を提供する。より特定の例示的態様において、本開示は、MICA（例えば、MICA\*001、\*004、\*007および\*008アレル）についての約 $1 \times 10^{-8}$  M ~ 約 $1 \times 10^{-10}$  M、または約 $1 \times 10^{-9}$  M ~ 約 $1 \times 10^{-11}$  Mの $K_D$ を有する抗MICA抗体を提供する。

30

#### 【0086】

抗体は、例えば、約100、60、10、5、または1ナノモル濃度以下（すなわち、それよりも良好な親和性）、好ましくは、サブナノモル濃度または任意選択で、約500、200、100または10ピコモル濃度以下の平均 $K_D$ により特徴づけることができる。KDは、例えば、例えば、組換え産生ヒトMICAタンパク質をチップ表面上に固定化し、次いで試験すべき抗体を溶液中でアプライすることにより測定することができる。一実施形態において、本方法は、本開示の抗体とMICAへの結合について競合し得る（b）からの抗体を選択するステップ（d）をさらに含む。

40

#### 【0087】

試験抗体がそのVHおよび/VL中の改変を有する場合、対照（例えば、配列番号6および7のVHおよびVLを有する抗体、または配列番号8および9のVHおよびVLを有する抗体）および試験抗体を混合（または予備吸着し）、MICAポリペプチドを含有す

50

る試料にアプライする単純な競合アッセイを用いることができる。ウエスタンブロッティングに基づくプロトコルおよび Biacore (商標) 分析の使用は、そのような競合試験における使用に好適である。

#### 【0088】

ある実施形態において、対照抗体を、変動量の試験抗体と、MICA 抗原試料にアプライする前のある期間、予備混合する(例えば、約 1 : 10 または約 1 : 100)。他の実施形態において、対照および変動量の試験抗体は、MICA 抗原試料に曝露させる間、単純に混合することができる。(例えば、未結合抗体を除去するための分離または洗浄技術を使用することにより) 結合抗体を遊離抗体から、かつ(例えば、種特異的もしくはアイソタイプ特異的二次抗体を使用し、または対照抗体を検出可能な標識により特異的に標識することにより) 対照抗体を試験抗体から区別することができる限り、試験抗体が対照抗体の抗原への結合を低減させるか否かを決定することができ、それは試験抗体が対照抗体と実質的に同一のエピトープを認識することが示す。完全に無関連な抗体の不存在下での(標識)対照抗体の結合は、高値の対照として機能し得る。低値の対照は、標識対照抗体を全く同一のタイプの未標識抗体とインキュベートすることにより得ることができ、この場合、競合が生じ、標識抗体の結合を低減させる。試験アッセイにおいて、試験抗体の存在下での標識抗体の反応性における有意な低減は、実質的に同一のエピトープを認識する試験抗体、すなわち、標識対照抗体と「交差反応する」または競合する抗体を示す。対照抗体の MICA 抗原への結合を、少なくとも約 50%、例えば少なくとも約 60%、またはより好ましくは少なくとも約 80% もしくは 90% (例えば、約 65 ~ 100%) だけ低減させる任意の試験抗体を、約 1 : 10 ~ 約 1 : 100 の対照抗体 : 試験抗体の任意の比において、対照抗体と実質的に同一のエピトープまたは決定基に結合する抗体であるとみなす。一実施形態において、そのような試験抗体は、対照抗体の MICA 抗原への結合を、少なくとも約 90% (例えば約 95%) だけ低減させる。

10

20

#### 【0089】

競合は、例えばフローサイトメトリー試験により評価することもできる。そのような試験において、所与の MICA ポリペプチドを担持する細胞は、最初に例えば、対照抗体と、次いで蛍光色素またはビオチンにより標識された試験抗体とインキュベートすることができる。飽和量の対照抗体とのプレインキュベーション時に得られる結合が、対照抗体とのプレインキュベーションなしの抗体により得られる(蛍光を介して計測される)結合の、約 80%、任意選択で約 50%、約 40% 以下(例えば、約 30%、20% または 10%) である場合、抗体は、対照抗体と競合すると言われる。あるいは、飽和量の試験抗体とプレインキュベートされた細胞上の(蛍光色素またはビオチンによる)対照抗体抗体について得られる結合が、試験抗体とのプレインキュベーションなしの場合に得られる結合の、約 80%、任意選択で約 50%、約 40% 以下(例えば、約 30%、20% または 10%) である場合、抗体は、対照抗体と競合すると言われる。

30

#### 【0090】

試験抗体を、MICA 抗原が固定化された表面に飽和濃度において予備吸着およびアプライする単純な競合アッセイを用いることもできる。単純な競合アッセイにおける表面は、好ましくは Biacore (商標) チップ(または表面プラズモン共鳴分析に好適な他の媒体)である。次いで、対照抗体(例えば、配列番号 6 および 7 の VH および VL を有する抗体または配列番号 8 および 9 の VH および VL を有する抗体)を、MICA 飽和濃度において表面と接触させ、対照抗体の MICA および表面結合を計測する。対照抗体のこの結合を、試験抗体の不存在下での対照抗体の MICA 含有表面への結合と比較する。試験アッセイにおいて、試験抗体の存在下での対照抗体による MICA 含有表面の結合の有意な低減は、試験抗体が対照抗体と実質的に同一のエピトープを認識し、その結果、試験抗体が対照抗体と「交差反応する」ことを示す。対照抗体の MICA 抗原への結合を少なくとも約 30% 以上、好ましくは約 40% だけ低減させる任意の試験抗体を、対照抗体と実質的に同一のエピトープまたは決定基に結合する抗体であるとみなすことができる。好ましくは、そのような試験抗体は、対照抗体の MICA 抗原への結合を少なくとも約 5

40

50

0% (例えば、少なくとも約60%、少なくとも約70%以上)だけ低減させる。対照および試験抗体の順序は入れ替えることができ、すなわち、競合アッセイにおいて、最初に対照抗体を表面に結合させることができ、その後試験抗体を表面と接触させることが認識される。好ましくは、MICA抗原についてより高い親和性を有する抗体を最初に表面に結合させる。それというのも、二次抗体について見られる結合の減少(抗体が交差反応していると想定)がより顕著な大きさであると予期されるためである。そのようなアッセイのさらなる例が、例えば、Saunala (1995) *J. Immunol. Methods* 183:33-41に提供され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0091】

抗体がエピトープ領域内で結合するか否かの決定は、当業者に公知の手法において実施することができる。そのようなマッピング/特徴決定方法の一例として、抗MICA抗体についてのエピトープ領域を、MICAタンパク質中の露出アミン/カルボキシルの化学修飾を使用するエピトープ「フットプリンティング」により決定することができる。そのようなフットプリンティング技術の1つの具体例は、HXS (質量分析により検出される水素-重水素交換)の使用であり、この場合、受容体およびリガンドタンパク質のアミドプロトンの水素/重水素交換、結合、および逆交換が生じ、タンパク質結合に關与する骨格アミド基は逆交換から保護され、したがって重水素化されたままになる。関連領域は、この箇所において、ペプシタンパク質加水分解、高速マイクロボア高速液体クロマトグラフィー分離、および/またはエレクトロスプレーイオン化質量分析により同定することができる。例えば、Ehring *H, Analytical Biochemist* 20 *ry, Vol. 267 (2) pp. 252 - 259 (1999) Engen, J. R. and Smith, D. L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A - 265 A* 参照。好適なエピトープ同定技術の別の例は核磁気共鳴エピトープマッピング(NMR)であり、この場合、典型的には、遊離抗原および抗原結合ペプチド、例えば抗体と複合体化された抗原の二次元NMRスペクトルにおけるシグナルの位置を比較する。抗原は、典型的には、NMRスペクトルにおいて、抗原に対応するシグナルのみが見られ、抗原結合ペプチドからのシグナルが全く見られないように、 $^{15}\text{N}$ により選択的に同位体標識する。抗原結合ペプチドとの相互作用に關与するアミノ酸から生じる抗原シグナルは、典型的には、複合体のスペクトルにおける位置を、遊離抗原のスペクトルと比較してシフトさせ、結合に關与するアミノ酸をそのように同定することができる。例えば、Ernst *Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149 - 67; Huang et al., Journal of Molecular Biology, Vol. 281 (1) pp. 61 - 67 (1998);* および *Saito and Patterson, Methods. 1996 Jun; 9 (3): 516 - 24* 参照。

#### 【0092】

エピトープマッピング/特徴決定は、質量分析法を使用して実施することもできる。例えば、Downard, *J Mass Spectrom. 2000 Apr; 35 (4): 493 - 503* および *Kisellar and Downard, Anal Chem. 1999 May 1; 71 (9): 1792 - 1801* 参照。プロテアーゼ消化技術も、エピトープマッピングおよび同定に關して有用であり得る。抗原決定基関連領域/配列は、プロテアーゼ消化により、例えばトリプシンをMICAに対して約1:50の比またはpH7~8における一晚消化において使用し、次いでペプチド同定のための質量分析(MS)分析を行うことにより決定することができる。続いて、抗MICA結合剤によりトリプシン開裂から保護されるペプチドを、トリプシン消化を受けた試料と、抗体とインキュベートされ、次いで、例えば、トリプシンによる消化を受けた試料との比較により同定することができる(それにより、結合剤についてのフットプリントが明らかになる)。他の酵素、例えば、キモトリプシン、ペプシンなどをさらに、または代替的に類似のエピトープ特徴決定方法において使用することができる。さらに、酵素消化は、潜在的な抗原決定基配列が、表面露出されておらず、したがって、免疫原性/抗原性に關して最も關

10

20

30

40

50

連性が少ないMICAポリペプチドの領域内に存在するか否かを分析する迅速な方法を提供し得る。

【0093】

部位特異的突然変異誘発は、結合エピトープの解明に有用な別の技術である。例えば、「アラニンスキャニング」において、タンパク質セグメント内のそれぞれの残基をアラニン残基により置き換え、結合親和性についての結果を計測する。突然変異が結合親和性の有意な低減をもたらす場合、それは結合に関与する可能性が最も高い。構造エピトープに特異的なモノクローナル抗体（すなわち、フォールディングされていないタンパク質に結合しない抗体）を使用し、アラニン置換がタンパク質のフォールディング全体に影響を与えないことを確認することができる。例えば、Clackson and Wells, *Science* 1995; 267: 383-386; およびWells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1-6 参照。

10

【0094】

エピトープ「フットプリンティング」に電子顕微鏡を使用することもできる。例えば、Wang et al., *Nature* 1992; 355: 275-278 は、天然サゲモザイクウイルスのカプシド表面上のFab断片の物理的フットプリントを測定するため、低温電子顕微鏡観察、三次元画像再構成、およびX線結晶分析の協調的適用を使用した。

【0095】

エピトープ評価のための「ラベルフリー」アッセイの他の形態としては、表面プラズモン共鳴（SPR、Biacore（商標））および反射干渉分光法（RifS）が挙げられる。例えば、Faegerstam et al., *Journal Of Molecular Recognition* 1990; 3: 208-14; Nice et al., *J. Chroma-togr.* 1993; 646: 159-168; Leipert et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998; 37: 3308-3311; Kroeger et al., *Biosensors and Bioelectronics* 2002; 17: 937-944 参照。

20

【0096】

抗体と同一または実質的に同一のエピトープに結合する抗体を、本明細書に記載の例示的競合アッセイの1つ以上において同定することができることにも留意すべきである。一実施形態において、1-2ドメイン遮断抗体は、E100、D101およびN102からなる群から選択される1、2もしくは3つの残基、S103、T104およびR105からなる群から選択される1、2もしくは3つの残基、N121およびE123からなる群から選択される1もしくは2つの残基、ならびに/またはT124およびE126からなる群から選択される1もしくは2つの残基を含むエピトープに結合する。一実施形態において、1-2ドメイン遮断抗体は、残基：（配列番号1を参照）：E100、D101、N102、S103、T104、R105、N121、E123、T124およびE126からなる群から選択される1、2、3、4、5、6つ以上の残基を含むヒトMICAポリペプチド上のエピトープに結合する。

30

【0097】

一実施形態において、抗MICA抗体は、（配列番号1の野生型ヒトMICAポリペプチドと比較してE100A、D101S、N102A置換を有する突然変異ヒトMICAポリペプチドへの減少した結合を有する。一実施形態において、抗MICA抗体は、（配列番号1の野生型ヒトMICAポリペプチドと比較してS103A、T104S、R105A置換を有する突然変異ヒトMICAポリペプチドへの減少した結合を有する。一実施形態において、抗MICA抗体は、（配列番号1の野生型ヒトMICAポリペプチドと比較してN121A、E123S置換を有する突然変異ヒトMICAポリペプチドへの減少した結合を有する。一実施形態において、抗MICA抗体は、（配列番号1の野生型ヒトMICAポリペプチドと比較してT124AおよびE126A置換を有する突然変異ヒトMICAポリペプチドへの減少した結合を有する。

40

50

## 【0098】

一実施形態において、抗MICA抗体は、MICAポリペプチドに少なくとも部分的にMICAの2ドメイン内で結合する。任意選択で、抗体は、NKGD結合表面近傍のMICAの側面における2ドメインに結合し、このことは、この抗体が細胞表面MICAとNKGDとの相互作用を遮断する知見と一致する。

## 【0099】

ADCCおよびCDCを誘導する抗MICA抗体の能力の観点から、エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞毒性、マスト細胞脱顆粒、および食作用、ならびに免疫調節シグナル、例えば、リンパ球増殖および抗体分泌の調節に影響し得るFc受容体に結合するそれらの能力を増加させる改変を有する抗体を有利には作製することができる。典型的な改変としては、少なくとも1つのアミノ酸改変（例えば、置換、欠失、挿入）、および/または変化されたタイプのグリコシル化、例えば、低フコシル化を含む改変ヒトIgG1定常領域が挙げられる。そのような改変は、Fc受容体：FcRI(CD64)、FcRII(CD32)、およびFcRIII(CD16)との相互作用に影響し得る。FcRI(CD64)、FcRIIA(CD32A)およびFcRIII(CD16)は、活性化（すなわち、免疫系向上）受容体である一方、FcRIIB(CD32B)は、阻害（すなわち、免疫系減衰）受容体である。改変は、例えば、エフェクター（例えば、NK）細胞上のFcRIIIaへのFcドメインの結合を増加させ得る。

10

## 【0100】

抗MICA抗体は、任意選択で改変されているヒトIgG1またはIgG3アイソタイプのFcドメイン（またはその一部）を含む。ヒトIgG1Fc領域（GenBankアクセッション番号J00228）の230～447位配列のアミノ酸配列を以下に示す：

20

## 【化1】

PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号37)

## 【0101】

残基230～341(Kabat EU)は、FcCH2領域である。残基342～447(Kabat EU)は、FcCH3領域である。抗MICA抗体は、1つ以上の位置中の1つ以上のアミノ酸改変（例えば、置換、欠失、挿入）を有するバリエーションFc領域を含み得、その改変は、FcR（例として、活性化および阻害FcR）についてのバリエーションFc領域の親和性およびアビディティを増加させる。一部の実施形態において、前記1つ以上のアミノ酸改変は、FcRIIIAおよび/またはFcRIIAについてのバリエーションFc領域の親和性を増加させる。別の実施形態において、バリエーションFc領域は、同等の親抗体（すなわち、Fc領域中の1つ以上のアミノ酸改変を除き本明細書の抗体と同一のアミノ酸配列を有する抗体）のFc領域よりも低い親和性でFcRIIBにさらに特異的に結合する。例えば、Kabatアミノ酸310および435位におけるヒスチジン残基の一方または両方は、例えば、リジン、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、セリンまたはトレオニンにより置換されていく（例えば、PCT公開の国際公開第2007/080277号パンフレット参照）；そのような置換定常領域は、活性FcRIIIAへの結合を減少させずに阻害FcRIIBへの結合の減少を提供する。一部の実施形態において、そのような改変は、親抗体に対してFcRIIIAおよび/またはFcRIIAについてのバリエーションFc領域の親和性を増加させ、FcγRIIBについてのバリエーションFc領域の親和性も向上させる。他の実施形態において、前記1つ以上のアミノ酸改変は、親抗体のFc領域に対してFcRIIIAおよび/またはFcRIIAについてのバリエーションFc領域の親和性を増加させるが、FcRIIBに

30

40

50

ついでのパリアントFc領域の親和性を変化させない。別の実施形態において、前記1つ以上のアミノ酸改変は、親抗体に対してFcRIIIAおよびFcRIIBについてのパリアントFc領域の親和性を向上させるが、FcRIIBについての親和性を低減させる。親和性および/またはアビディティの増加は、(改変Fc領域を有さない)親分子の結合活性を細胞中で検出することができない低レベルのFcRを発現する細胞中での検出可能なFcRへの結合またはFcR関連活性をもたらす。

【0102】

一実施形態において、Fc領域のアミノ酸の前記1つ以上の改変は、1つ以上のFcR受容体についての抗体の親和性およびアビディティを低減させる。具体的な実施形態において、抗体は、パリアントFc領域であって、前記パリアントFc領域は、野生型Fc領域に対する少なくとも1つのアミノ酸改変を含み、パリアントFc領域は、1つのFcRにのみ結合し、前記FcRは、FcRIIIAまたはFcRIIAであるパリアントFc領域を含む。

【0103】

FcRIIIaまたはFcRn結合に影響する(それを向上させる)IgG1中の規定の突然変異も以下に記載する。

【0104】

【表3】

アイソタイプ	種	改変	エフェクター機能	改変の効果
IgG1	ヒト	T250Q/M428L	FcRn への結合の増加	半減期の増加
IgG1	ヒト	1M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	FcRn への結合の増加	半減期の増加
IgG1	ヒト	E333A	FcγRIIIa への結合の増加	ADCC および CDC の増加
IgG1	ヒト	S239D/A330L/I332E	FcγRIIIa への結合の増加	ADCC の増加
IgG1	ヒト	P257I/Q311	FcRn への結合の増加	不変の半減期
IgG1	ヒト	S239D/I332E/G236A	FcγRIIIa/FcγRIIIb 比の増加	マクロファージ食作用の増加

【0105】

FcRについての抗体の親和性および結合特性は、抗体-抗原またはFc-FcR相互作用、すなわち、それぞれ抗体への抗原の特異的結合またはFcRへのFc領域の特異的結合を測定する当分野において公知のインビトロアッセイ(生化学または免疫ベースアッセイ)、例として、限定されるものではないが、ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、免疫沈降アッセイを使用して測定することができる。

【0106】

一部の実施形態において、パリアントFc領域を含む抗体は、Fc領域のCH3ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸改変(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ以上のアミノ酸改変を有する)を含む。他の実施形態において、抗体は、Fc領域のCH2ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸改変(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ以上のアミノ酸改変を有する)を含むパリアントFc領域を含む。一部の実施形

態において、抗体は、少なくとも2つのアミノ酸改変（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9つ以上のアミノ酸改変を有する）を含み、少なくとも1つのそのような改変はCH3領域中に存在し、少なくとも1つのそのような改変はCH2領域中に存在する。任意選択で、抗体は、ヒンジ領域中のアミノ酸改変を含み得る。一実施形態において、任意選択で、Kabatat216~230位（Kabatat EU番号付与）のアミノ酸のスパン内のFc領域のCH1ドメイン中のアミノ酸改変が提供される。

【0107】

Fc改変の任意の組合せ、例えば、米国特許第7,632,497号明細書；米国特許第7,521,542号明細書；米国特許第7,425,619号明細書；米国特許第7,416,727号明細書；米国特許第7,371,826号明細書；米国特許第7,355,008号明細書；米国特許第7,335,742号明細書；米国特許第7,332,581号明細書；米国特許第7,183,387号明細書；米国特許第7,122,637号明細書；米国特許第6,821,505号明細書および米国特許第6,737,056号明細書；PCT公開の国際公開第2011/109400号パンフレット；国際公開第2008/105886号パンフレット；国際公開第2008/002933号パンフレット；国際公開第2007/021841号パンフレット；国際公開第2007/106707号パンフレット；国際公開第06/088494号パンフレット；国際公開第05/115452号パンフレット；国際公開第05/110474号パンフレット；国際公開第04/1032269号パンフレット；国際公開第00/42072号パンフレット；国際公開第06/088494号パンフレット；国際公開第07/024249号パンフレット；国際公開第05/047327号パンフレット；国際公開第04/099249号パンフレットおよび国際公開第04/063351号パンフレット；ならびにPresta, L. G. et al. (2002) Biochem. Soc. Trans. 30(4): 487-490; Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740およびShields, R. L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276(9): 6591-6604)に開示される異なる改変の任意の組合せを作製することができる。

【0108】

本開示は、バリエーションFc領域を含む抗MICA抗体であって、バリエーションFc領域は、分子が野生型Fc領域を含む分子に対して向上されたエフェクター機能を有するように、野生型Fc領域に対する少なくとも1つのアミノ酸改変（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ以上のアミノ酸改変を有する）を含み、任意選択で、バリエーションFc領域は、221、243、247、255、256、258、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、300、301、303、305、307、308、309、310、311、312、316、320、322、326、329、330、332、331、333、334、335、337、338、339、340、359、360、370、373、376、378、392、396、399、402、404、416、419、421、430、434、435、437、438および/または439位のいずれか1つ以上における置換を含む抗体を提供する。

【0109】

本開示は、バリエーションFc領域を含む抗MICA抗体であって、バリエーションFc領域は、分子が野生型Fc領域を含む分子に対して向上されたエフェクター機能を有するように、野生型Fc領域に対する少なくとも1つのアミノ酸改変（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9つ以上のアミノ酸置換を有する）を含み、任意選択で、バリエーションFc領域は、Kabatat329、298、330、332、333および/または334位のいずれか1つ以上における置換（例えば、S239D、S298A、A330L、I332E、E333Aおよび/またはK334A置換）を含む抗体を提供する。一実施形態において、バリエーションまたは野生型Fc領域を有する抗体は、抗体のFc受容体結合能を増加させる変化されたグリコシル化パターンを有し得る。そのような炭水化物改変は、例え

10

20

30

40

50

ば、変化されたグリコシル化機序を有する宿主細胞中で抗体を発現させることにより達成することができる。変化したグリコシル化機序を有する細胞は、当分野において記載されており、組換え抗体を発現し、それにより変化したグリコシル化を有する抗体を産生する宿主細胞として使用することができる。例えば、Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733 - 26740; Umam et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176 - 1、ならびに欧州特許第1, 176, 195号明細書; PCT公開の国際公開第06/133148号パンフレット; 国際公開第03/035835号パンフレット; 国際公開第99/54342号パンフレット参照、そのそれぞれは参照により全体として本明細書に組み込まれる。

#### 【0110】

一般に、変化されたグリコシル化を有するそのような抗体は、抗体が、ある所望の特性、例として、限定されるものではないが、非改変抗体または天然定常領域を有し、ネズミ骨髄腫NSOおよびチャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(Chand Robinson, Current Opinion Biotechnol. 2001, 12: 180 - 7)により生産される抗体、本明細書の実施例セクション、または組換え治療抗体を産生するために一般に使用される他の哺乳動物宿主細胞系において産生されるHEK293T発現抗体と比較して向上されたADCCおよびエフェクター細胞受容体結合活性を産生する特定のN-グリカン構造を有するように、「糖最適化(glyco-optimized)」されている。

#### 【0111】

哺乳動物細胞系中で産生されるモノクローナル抗体は、それぞれの重鎖のAsn297におけるN-結合グリコシル化部位を含有する。抗体上のグリカンは、典型的には、極めて低い分岐N-アセチルグルコサミン(分岐GlcNAc)を有しまたは有さず、高レベルのコアフコシル化を有する複雑な二分岐(bi-antennary)構造である。グリカン末端は、極めて低い末端シアル酸を含有しまたは含有せず、変動量のガラクトースを含有する。抗体機能に対するグリコシル化の効果の観点については、例えば、Wright & Morrison, Trend Biotechnol. 15: 26 - 31 (1997)参照。多数の研究が、抗体グリカン構造の糖組成の変化がFcエフェクター機能を変化させ得ることを示す。抗体活性に寄与する重要な炭水化物構造は、Fc領域N-結合オリゴ糖の最内部のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基へのアルファ-1, 6結合を介して結合しているフコース残基であると考えられる(Shields et al., 2002)。

#### 【0112】

Fc R結合は、ヒトIgG1、IgG2またはIgG3タイプのFc領域中の保存Asn297において共有結合しているオリゴ糖の存在を要求する。近年、非フコシル化オリゴ糖構造は、インビトロADCC活性の大幅な増加に関連している。「Asn297」は、Fc領域中の約297位において局在しているアミノ酸アスパラギンを指し; 抗体のマイナー配列変異に基づき、Asn297は、上流または下流(通常、+3以下のアミノ酸)に局在している一部のアミノ酸でもあり得る。

#### 【0113】

歴史的に、CHO細胞中で産生される抗体は、非フコシル化された種の約2~6%を含有する。YB2/0(ラット骨髄腫)およびLecl3細胞系(アルファ6-フコシルトランスフェラーゼの基質であるGDP-フコースまたはGDP糖中間体の欠損をもたらす欠損GDPマンノース4, 6-デヒドラターゼを有するCHO系のレクチン突然変異体は、78~98%の非フコシル化種を有する抗体を産生することが報告されている。他の例において、RNA干渉(RNAi)またはノックアウト技術を用いて細胞を遺伝子操作してFUT8mRNA転写産物レベルを減少させ、または遺伝子発現を完全にノックアウトすることができ、そのような抗体は、最大70%の非フコシル化グリカン含有することが報告されている。

#### 【0114】

10

20

30

40

50

本開示は、A s n 2 9 7における糖鎖によりグリコシル化されているM I C Aに結合する抗体であって、F c R I I IへのF c部分を介する増加された結合親和性を示す抗体を提供する。一実施形態において、抗体は、F c y R I I I aへの抗体結合および/またはA D C Cを改善するF c領域中の少なくとも1つのアミノ酸変化を含む定常領域を含む。

**【0115】**

一態様において、抗体は、それらの定常領域中で低フコシル化されている。そのような抗体は、アミノ酸変化を含み得、またはアミノ酸変化を含み得ないが、そのような低フコシル化を生じさせるための条件下で産生または処理することができる。一態様において、抗体組成物は、本明細書に記載のキメラ、ヒトまたはヒト化抗体を含み、組成物中の抗体種の少なくとも20、30、40、50、60、75、85、90、95%または実質的に全ては、フコースを欠くコア炭水化物構造（例えば、複合体、ハイブリッドおよび高マンノース構造）を含む定常領域を有する。一実施形態において、フコースを有するコア炭水化物構造を含む抗体を有さない抗体組成物が提供される。コア炭水化物は、好ましくは、A s n 2 9 7における糖鎖である。

10

**【0116】**

一実施形態において、抗体組成物、例えば、M I C Aに結合し、A s n 2 9 7における糖鎖によりグリコシル化されている組成物であって、抗体は、部分的にフコシル化されている組成物が開示される。部分的にフコシル化されている抗体は、A s n 2 9 7における糖鎖内のフコースを欠く組成物中の抗M I C A抗体の比率が20%~90%、例えば、20%~80%、例えば、20%~50%、55%、60%、70%もしくは75%、35%~50%、55%、60%、70%もしくは75%、または45%~50%、55%、60%、70%もしくは75%であることを特徴とする。任意選択で、抗体は、ヒトI g G 1またはI g G 3タイプのものである。

20

**【0117】**

糖鎖は、任意の特徴（例えば、複合体、ハイブリッドおよび高マンノース構造の存在および比率）、例として、ヒト細胞からの抗体の、または齧歯類細胞、ネズミ細胞（例えば、C H O細胞）もしくは鳥類細胞中で組換え発現される抗体のA s n 2 9 7に結合しているN-結合グリカンの特徴をさらに示し得る。

30

**【0118】**

一実施形態において、抗体は、細胞系がコア炭水化物中のフコースを欠くタンパク質を産生するように、フコシルトランスフェラーゼ酵素を欠いている細胞中で発現させる。例えば、細胞系M s 7 0 4、M s 7 0 5、およびM s 7 0 9は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子F U T 8（アルファ（1,6）フコシルトランスフェラーゼ）を欠き、その結果、M s 7 0 4、M s 7 0 5、およびM s 7 0 9細胞系中で発現される抗体はそれらのコア炭水化物上のフコースを欠く。これらの細胞系は、2つの置換ベクターを使用するC H O / D G 4 4細胞中でのF U T 8遺伝子の標的化破壊により作出された（Y a m a n e e t a l . による米国特許出願公開第20040110704号明細書；およびY a m a n e - O h n u k i e t a l . (2004) B i o t e c h n o l B i o e n g 87:614-22参照、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる）。他の例としては、F U T 8遺伝子を機能的に破壊するためのアンチセンス抑制、二本鎖RNA（d s RNA）干渉、ヘアピンRNA（h p RNA）干渉またはイントロン含有ヘアピンRNA（i h p RNA）干渉の使用が挙げられる。一実施形態において、抗体は、細胞系中で発現される抗体がアルファ1,6結合関連酵素の低減または排除による低フコシル化を示すように、機能的に破壊された、フコシルトランスフェラーゼをコードするF U T 8遺伝子を有する細胞系中で発現させる。

40

**【0119】**

一実施形態において、抗体は、遺伝子操作細胞系中で発現される抗体が抗体のA D C C活性の増加をもたらす分岐G l c N a c構造の増加を示すように、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、ベータ（1,4）-N-アセチルグルコサミニル-

50

トランスフェラーゼ III (GnTHI) を発現するように遺伝子操作された細胞系中で発現させる (Umana et al. による PCT 公開の国際公開第 99/54342 号パンフレット; および Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176-180、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる)。

#### 【0120】

別の実施形態において、抗体を発現させ、フコシダーゼ酵素を使用してフコシル残基を開裂させる。例えば、フコシダーゼアルファ-L-フコシダーゼは、抗体からフコシル残基を除去する (Tarentino, et al. (1975) Biochem. 14: 5516-5523)。他の例において、抗体を産生する細胞系をグリコシル化阻害剤により処理することができ; Zhou et al. Biotech. and Bioeng. 99: 652-665 (2008) は、非フコシル化オリゴマンノースタイプ N グリカンをもつ抗体の産生をもたらすアルファ-マンノシダーゼ I 阻害剤、キフネンシンによる CHO 細胞の処理を記載した。

10

#### 【0121】

一実施形態において、抗体は、フコシルを抗体の Fc 領域に結合する N-アセチルグルコサミンに付加するための低い酵素活性を天然で有し、またはその酵素活性を有さない細胞系、例えば、ラット骨髄腫細胞系 YB2/0 (ATCC CRL 1662) 中で発現させる。細胞系の他の例としては、フコシルを Asn (297) 結合炭水化物に結合させる能力の低減を有し、宿主細胞中で発現される抗体の低フコシル化をもたらすバリアント CHO 細胞系、Led3 細胞が挙げられる (国際公開第 03/035835 号パンフレット (Presta et al.); および Shields, R. X. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる)。別の実施形態において、抗体は、鳥類細胞、任意選択で、低フコース含有量を有する抗体を天然に生じさせる EBx (登録商標) 細胞 (Vivalis, France) 中で発現させる、例えば、国際公開第 2008/142124 号パンフレット。低フコシル化グリカンは、植物起源の細胞系中で産生することもでき、例えば、国際公開第 07/084926 A2 号パンフレット (Biolex Inc.)、国際公開第 08/006554 号パンフレット (Greenovation Biotech GmbH)、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

#### 【0122】

一実施形態において、抗体は、プロテアーゼによる開裂に対する減少した感受性を付与するアミノ酸置換を含む Fc ドメインを含む。マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) は、腫瘍形成と関連するプロテイナーゼの最も優勢なファミリーを表す。癌細胞は MMP を発現し得る一方、細胞外 MMP の大部分は腫瘍に浸潤する産生する異なるタイプの間質細胞により提供され、それぞれはプロテイナーゼおよびプロテイナーゼインヒビターの規定のセットを産生し、それらが細胞外空間中に放出され、腫瘍周囲の環境を特異的に変更する。腫瘍微小環境中に存在する MMP はヒンジ領域内で抗体を開裂し得、したがって、腫瘍部位内で機能するように設計される治療抗体の不活性化をもたらし得る。一実施形態において、アミノ酸置換を含む Fc ドメインは、GluV8、IdeS、ゼラチナーゼ A (MMP2)、ゼラチナーゼ B (MMP-9)、マトリックスメタロプロテイナーゼ-7 (MMP-7)、ストロメリシン (MMP-3)、およびマクロファージエラスターゼ (MMP-12) からなる群から選択されるプロテアーゼのいずれか 1、2、3 つ以上 (または全て) による開裂に対する減少した感受性を有する。一実施形態において、開裂に対する感受性が減少した抗体は、残基 E233-L234 および / または L235 におけるアミノ酸置換を含む Fc ドメインを含む。一実施形態において、抗体は、Kabab 残基 E233、L234、L235 および G236 におけるアミノ酸置換を含む Fc ドメインを含む。一実施形態において、抗体は、例えば、E233-L234-L235-G236 配列が P233-V234-A235 (G236 は欠失している) により置き換えられるように、1 つ以上の残基 233~238 におけるアミノ酸置換を含む Fc ドメインを含む。例えば、国際公開第 99/58572 号パンフレットおよび国際公開第 2012

30

40

50

087746号パンフレット参照、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0123】

抗原結合化合物を得たら、それを、NKG2DとMICA（例えば、膜結合MICA）との間の相互作用を遮断するその能力、NKまたはCD8T細胞上のNKG2Dの膜結合MICA誘導下方モジュレーションを阻害するその能力、MICA発現細胞（例えば、腫瘍細胞）の死滅を引き起こすその能力、MICA発現標的細胞に対してADCCもしくはCDCを誘導するその能力、および/またはMICA発現標的細胞の増殖を阻害し、および/もしくはその排除を引き起こすその能力について評価することができる。

【0124】

MICAとNKG2Dとの間の結合を低減させ、またはその相互作用を遮断する抗原結合化合物の能力の評価は、例えば、PCT公開の国際公開第2013/117647号パンフレットの実施例におけるように本方法の任意の好適な段階において実施することができる。例えば、MICAを表面上で発現する腫瘍細胞を、NKG2Dを表面上で発現する細胞（例えば、エフェクター細胞）と、候補抗MICA抗体を添加してまたは添加せずに接触させることができる。MICA発現細胞とNKG2D発現細胞との間の結合を評価することができる。結合を低減させない抗体を選択する。別の可能性は、単離MICAポリペプチドを単離NKG2Dポリペプチド、またはNKG2Dポリペプチドを表面において発現する細胞と接触させること、およびMICAとNKG2DポリペプチドまたはNKG2Dを発現する細胞との間の結合を評価することを含む。別の可能性は、単離NKG2DポリペプチドをMICAポリペプチドを表面において発現する細胞と接触させること、およびMICAポリペプチドまたはMICAを発現する細胞との間の結合を評価することを含む。

10

20

【0125】

例えば、薬剤がNKG2DとのMICA相互作用を遮断するか否かを決定するため、以下の試験を実施する：MICAが形質移入された細胞系C1RまたはRMAを、増加濃度の試験抗MICA mAbの存在下または不存在下で可溶性NKG2D-Fc融合タンパク質とインキュベートする。細胞を洗浄し、次いでNKG2D-Fc融合タンパク質のFc部分を認識する二次抗体とインキュベートし、再度洗浄し、フローサイトメーター（FACS Calibur, Beckton Dickinson）上で標準的方法により分析する。抗MICA mAbの不存在下で、NKG2D-Fcタンパク質は、C1RまたはRMA細胞に十分結合する。NKG2DへのMICA結合を遮断する抗MICA mAbの存在下で、NKG2D-Fcの細胞への結合が低減する。

30

【0126】

一実施形態において、MICAとNKG2Dとの間の結合を低減させ、またはその相互作用を遮断する抗原結合化合物の能力の評価は、NKG2D発現細胞（例えば、NKまたはT細胞）の機能に対する抗MICA抗体の効果を評価することにより実施することもできる。任意選択で、NKG2Dを発現するが、CD16を発現しないNKまたはT細胞を使用してCD16媒介ADCC効果のいかなる寄与も回避する。抗MICA抗体がMICA-NKG2D相互作用を低減させ、または遮断する場合、NKまたはT細胞のNKG2D媒介活性化を減衰させることが予測される。したがって、MICAとNKG2Dとの結合を低減させず、その相互作用を遮断もしない抗体は、NKまたはT細胞のNKG2D媒介活性化を実質的に低減も遮断もしない。これは、例が本明細書に記載の典型的な細胞毒性アッセイにより評価することができる。多数の細胞ベースアッセイのいずれか、例として、遺伝子発現ベース活性、細胞毒性ベースアッセイ、および増幅アッセイを使用してNKG2D活性を評価することができる。一態様において、インビトロアッセイは、受容体の発現が細胞の活性を検出可能に変化させ、例えば、NKG2Dリガンドにより活性化可能とする限り、ヒト患者からのNK細胞もしくはT細胞、または例えば、NKG2Dコードトランス遺伝子が形質移入されたT細胞系を使用する。NKG2D活性を反映する任意の好適な生理学的変化を使用して試験化合物または抗体の有用性を評価することができる。例えば、種々の効果、例えば、遺伝子発現、サイトカイン産生、細胞成長、細胞増殖、

40

50

pH、細胞内セカンドメッセンジャー、例えば、Ca<sup>2+</sup>、IP<sub>3</sub>、cGMP、もしくはcAMP、または活性、例えば、細胞毒性活性もしくは他のT細胞を活性化させる能力の変化を計測することができる。一実施形態において、受容体の活性は、NK G2D 応答遺伝子、例えば、CD25、IFN-ガンマ、またはTNF-アルファの発現を検出することにより評価する（例えば、Groh et al. (2003) PNAS 100: 9452-9457; Andre et al. (2004) Eur. J. Immunol 34: 1-11 参照）。一実施形態において、NK G2D 活性は、NK G2D + T またはNK細胞をMICA 発現細胞および抗MICA 抗体の存在下でインキュベートし、T またはNK細胞によるTNF-アルファまたはIFN-ガンマの放出を阻害する化合物または試験抗体の能力を評価することにより評価する。

10

## 【0127】

標的細胞のNK G2D 媒介殺傷を評価する例示的な細胞毒性アッセイも、本明細書の実施例に記載される。ここでは、<sup>51</sup>Crの標的細胞放出を計測することにより、MICA\*001またはMICA\*008 形質移入C1Rの主要なNK細胞媒介殺傷を低減させ、または阻害する抗MICA 抗体の能力。インビトロ細胞毒性アッセイは、例えば、Coligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993) の例に記載の当分野において周知の標準的方法により実施する。MICA 発現標的細胞を、<sup>51</sup>Crにより標識してからNK細胞を添加し、次いで殺傷を、殺傷の結果としての細胞から培地への<sup>51</sup>Crの放出に比例して推定する。

20

## 【0128】

ADCC、CDCを誘導し、またはそうでなければ（例えば、毒性剤の送達による）MICA 発現標的細胞の活性の排除もしくは阻害をもたらす抗原結合化合物の能力の評価は、任意の好適な段階において実施することができる。この評価は、治療的使用が予定される抗体（または他の化合物）の改変、産生および/または発達に關与する種々のステップの1つ以上において有用であり得る。例えば、活性は、抗原結合化合物を改変する方法、抗原結合化合物を発現する細胞（例えば、組換え抗原結合化合物を発現する宿主細胞）を得、機能抗体（または他の化合物）を産生するその能力について評価する方法、および/またはある量の抗原結合化合物を産生し、（例えば、産物のパッチまたはロットを試験するために）活性について評価すべき方法において評価することができる。一般に、抗原結合化合物は、MICA ポリペプチドに特異的に結合することが公知である。このステップは、複数（例えば、高スループットスクリーニング法を使用して極めて多数またはより少数）の抗原結合化合物を試験することを含み得る。

30

## 【0129】

CDCおよびADCCの試験を実施することができ、種々のアッセイ、例として、本明細書の実験実施例に記載のものにより測定することができる。ADCCの試験は、典型的には、結合した抗MICA 抗体を有するMICA 発現標的細胞（例えば、癌または他のMICA 発現細胞）が補体の関与なしでエフェクター細胞（例えば、Fc 受容体を担持する白血球）により認識される細胞媒介細胞毒性を評価することを含む。MICA 抗原を発現しない細胞を任意選択で対照として使用することができる。NK細胞の細胞毒性の活性化は、サイトカイン産生（例えば、IFN- 産生）または細胞毒性マーカー（例えば、CD107 動員）の増加を計測することにより評価する。任意選択で、抗体は、標的（MICA 発現）細胞の存在下で対照抗体（例えば、MICA に結合しない抗体、ネズミ定常領域を有するMICA 抗体）と比較して少なくとも20%、50%、80%、100%、200%または500%のサイトカイン産生、細胞毒性マーカーの発現、または標的細胞溶解の増加を誘導する。別の例において、標的細胞の溶解は、例えば、クロム放出アッセイにおいて検出し、任意選択で、抗体は、標的細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%または50%の溶解を誘導する。

40

## 【0130】

50

本発明の抗体の断片および誘導体（特に記載がなくまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、本出願において使用される用語「抗体（antibody）」または「抗体（antibodies）」により包含される）は、当分野において公知の技術により産生することができる。「断片」は、インタクト抗体の一部、一般に抗原結合部位または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、およびFv断片；ダイアボディ；連続アミノ酸残基の不断配列からなる一次構造を有するポリペプチドである任意の抗体断片（本明細書において「単鎖抗体断片」または「単鎖ポリペプチド」と称される）が挙げられる。

#### 【0131】

一態様において、本明細書の実施形態のいずれかの抗体の超可変領域（例えば、VHおよびVL）および目的抗原（MICA以外）に結合する超可変領域（例えば、VHおよびVL）を含む多重特異的（例えば、二重特異的）抗体または抗原結合タンパク質が提供される。一態様において、目的抗原は、免疫エフェクター細胞（例えば、NK細胞またはT細胞）の表面において発現される受容体（例えば、活性化受容体）である。一態様において、超可変領域を含むタンパク質またはポリペプチドが提供される。

10

#### 【0132】

細胞により発現される本開示の抗体または抗体断片、およびそれらを使用する癌の治療方法も包含される。例えば、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する細胞を構築することができる。CARは、典型的には、T細胞抗原受容体複合体ゼータ鎖の細胞内シグナリングドメインに融合している細胞外単鎖抗体（scFv）を含み、エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞により発現された場合にモノクローナル抗体の特異性に基づく抗原認識を再指向する能力を有するように遺伝子操作する。一態様において、一般に、細胞表面膜上で、細胞内シグナリングドメイン、膜貫通ドメイン（TM）およびMICA特異的細胞外ドメイン（例えば、抗体または抗体断片またはMICAに特異的に結合するモノクローナル抗体の可変重鎖および軽鎖領域に由来し、またはそれを含むドメイン）を含むMICA特異的キメラ免疫受容体を発現し、担持する遺伝子操作された免疫細胞が提供される。一実施形態において、VHおよびVLは、VHおよびVLまたは本開示である。MICA特異的キメラ免疫受容体、その受容体をコードするDNA構築物、およびその構築物を発現に適切な方向で含有するプラスミド発現ベクターも提供される。

20

#### 【0133】

抗MICA抗体は、医薬配合物中に1mg/ml～500mg/mlの濃度で取り込むことができ、前記配合物は、2.0～10.0のpHを有する。配合物は、緩衝液系、保存剤、等張化剤、キレート化剤、安定剤および表面活性剤をさらに含み得る。一実施形態において、医薬配合物は、水性配合物、すなわち、水を含む配合物である。そのような配合物は、典型的には、液剤または懸濁液である。さらなる実施形態において、医薬配合物は、水性液剤である。用語「水性配合物」は、少なくとも50%w/wの水を含む配合物として定義される。同様に、用語「水性液剤」は、少なくとも50%w/wの水を含む液剤として定義され、用語「水性懸濁液」は、少なくとも50%w/wの水を含む懸濁液として定義される。別の実施形態において、医薬配合物は、医師または患者が使用前に溶媒および/または希釈剤を添加する凍結乾燥配合物である。別の実施形態において、医薬配合物は、いかなる事前の溶解も不要の即時使用の乾燥配合物（例えば、凍結乾燥または噴霧乾燥）である。さらなる態様において、医薬配合物は、そのような抗体の水溶液、および緩衝液を含み、抗体は、1mg/ml以上の濃度で存在し、前記配合物は、約2.0～約10.0のpHを有する。別の実施形態において、配合物のpHは、約2.0～約10.0、約3.0～約9.0、約4.0～約8.5、約5.0～約8.0、および約5.5～約7.5からなるリストから選択される範囲である。さらなる実施形態において、緩衝液は、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸塩、グリシルグリシン、ヒスチジン、グリシン、リジン、アルギニン、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸ナトリウム、およびトリス（ヒドロキシメチル）-アミノメタン、ピシン、トリシン、リンゴ酸、コハク酸塩、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、アスパラギン酸またはそれら

30

40

50

の混合物からなる群から選択される。これらの規定の緩衝液のそれぞれのものは、代替実施形態を構成する。さらなる実施形態において、配合物は、薬学的に許容可能な保存剤をさらに含む。さらなる実施形態において、配合物は、等張剤をさらに含む。さらなる実施形態において、配合物は、キレート化剤も含む。さらなる実施形態において、配合物は、安定剤をさらに含む。さらなる実施形態において、配合物は、界面活性剤をさらに含む。Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995が簡便に参照される。他の成分がペプチド医薬配合物中に存在し得ることが考えられる。そのような追加の成分としては、湿潤剤、乳化剤、酸化防止剤、増量剤、等張性改変剤、キレート化剤、金属イオン、油性ビヒクル、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチンまたはタンパク質）および両性イオン（例えば、アミノ酸、例えば、ベタイン、タウリン、アルギニン、グリシン、リジンおよびヒスチジン）を挙げることができる。そのような追加の成分は、無論、医薬配合物の全安定性に悪影響を与えるべきではない。

10

20

30

40

50

#### 【0134】

抗体を含有する医薬組成物は、そのような治療が必要とされる患者に、いくつかの部位において、例えば、局所部位、例えば、皮膚および粘膜部位において、吸収を避ける部位において、例えば、動脈中、静脈中、心臓中の投与で、ならびに吸収を伴う部位において、例えば、皮膚中、皮膚下、筋肉中、または腹部中の投与で投与することができる。医薬組成物の投与は、そのような治療が必要とされる患者に対する、いくつかの投与経路、例えば、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、舌、舌下、頬、口腔内、経口、胃および小腸内、鼻腔、肺を介するもの、例えば、細気管支および肺胞またはその組合せ、上皮、皮膚、経皮、膈、直腸、眼球、例えば、結膜、尿管、および非経口を介するものであり得る。

#### 【0135】

##### 悪性腫瘍の診断および治療

一態様において、細胞の表面上のMICAポリペプチドに特異的に結合する本開示による抗原結合剤（例えば、抗体）を含む医薬組成物が提供される。抗体は、一実施形態において、細胞の成長もしくは活性（例えば、免疫抑制活性）を阻害し、ならびに/またはMICA陽性細胞の排除を、任意選択で、CDCおよび/もしくはADCCの誘導を介してもたす。組成物は、薬学的に許容可能な担体をさらに含む。

#### 【0136】

一態様において、MICA陽性細胞の成長もしくは活性の阻害、および/またはその枯渇が必要とされるヒト個体におけるMICA陽性細胞の成長もしくは活性を阻害し、および/またはそれを枯渇させる方法であって、前記個体に、本開示による組成物を投与するステップを含む方法が提供される。そのような治療方法は、多数の障害、例として、限定されるものではないが、癌の治療に使用することができる。

#### 【0137】

一態様において、MICA陽性免疫細胞、任意選択でMDS CまたはM2マクロファージ、任意選択で腫瘍浸潤免疫抑制免疫細胞の免疫抑制活性の排除または阻害が必要とされるヒト個体におけるMICA陽性免疫細胞、任意選択でMDS CまたはM2マクロファージ、任意選択で腫瘍浸潤免疫抑制免疫細胞の免疫抑制活性を排除または阻害する方法であって、前記個体に、本開示による組成物を投与するステップを含む方法が提供される。

#### 【0138】

一態様において、MICA陽性癌細胞の免疫抑制活性の排除および/または低減が必要とされるヒト個体におけるMICA陽性癌細胞の免疫抑制活性を排除し、および/または低減させる方法であって、前記個体に、本開示による組成物を投与するステップを含む方法が提供される。

#### 【0139】

一実施形態において、同一の投与レジメンを使用し、細胞がMICA\*001を発現する個体、細胞がMICA\*004を発現する個体、細胞がMICA\*007を発現する個体、および細胞がMICA\*008を発現する個体を治療する。一実施形態において、投

与レジメンは、個体（または個体の腫瘍）において発現されるMICAの特定のアレルに関係なく、同一の投与方式、同一の投与量および同一の投与頻度を含む。

【0140】

一態様において、治療の方法は、個体に、MICAに結合する抗原結合化合物を治療有効量で含む組成物を投与することを含む。治療有効量は、例えば、インビボでのMICA細胞の枯渇、もしくはその枯渇の増加、またはMICA発現腫瘍細胞に対するNKGD+エフェクター細胞（例えば、NK細胞）の活性化、反応性、細胞毒性および/もしくはIFN産生の頻度の増加を引き起こすために十分な量であり得る。治療有効量は、例えば、NK細胞および/またはT細胞活性のM2マクロファージ媒介抑制を克服し、または低減させるために十分な量であり得る。別の例において、治療有効量は、例えば、NK細胞および/もしくはT細胞活性の骨髄由来抑制細胞(MDSC)媒介抑制を克服し、もしくは低減させるために十分な量、または例えば、腫瘍組織中で骨髄由来抑制細胞(MDSC)および/もしくはM2マクロファージを排除するために十分な量であり得る。

10

【0141】

方法は、有利には、癌および他の増殖疾患、例として、限定されるものではないが、癌種、例として、膀胱癌、乳癌、結腸癌、腎臓癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌）、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、頸癌、甲状腺癌および皮膚癌、例として、扁平上皮癌腫；リンパ球系の造血腫瘍、例として、白血病、急性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、毛様細胞リンパ腫およびパーキットリンパ腫；骨髄細胞系の造血腫瘍、例として、急性および慢性骨髄性白血病、ならびに前骨髄球性白血病；間葉起点の腫瘍、例として、線維肉腫および横紋筋肉腫；他の腫瘍、例として、神経芽細胞腫および神経膠腫；中枢神経系および末梢神経系の腫瘍、例として、星細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫および神経鞘腫；間葉起点の腫瘍、例として、線維肉腫、横紋筋肉腫、および骨肉腫；ならびに他の腫瘍、例として、黒色腫、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺濾胞癌、および奇形癌の治療に利用される。治療することができる他の例示的障害としては、リンパ球系の造血腫瘍、例えば、T細胞およびB細胞腫瘍、例として、限定されるものではないが、T細胞障害、例えば、T前リンパ球性白血病(T-PLL)、例として、小細胞および脳状細胞タイプのもの；任意選択で、T細胞タイプの大型顆粒リンパ球性白血病(LGL)；セザリー症候群(SS)；成人T細胞白血病性リンパ腫(ATLL)；a/dT-NHL肝脾リンパ腫；末梢/胸腺後T細胞リンパ腫（多形性および免疫芽球性亜型）；血管免疫芽球性T細胞リンパ腫；血管中心性（鼻）T細胞リンパ腫；未分化(Ki1+)大細胞リンパ腫；腸T細胞リンパ腫；Tリンパ芽球性；およびリンパ腫/白血病(T-Lbly/T-ALL)が挙げられる。

20

30

【0142】

一部の実施形態において、抗MICA抗体または組成物の投与前に、患者の細胞上（例えば、腫瘍細胞）上のMICAの存在を評価し、例えば、患者中のMICA陽性細胞の相対レベルおよび活性を測定し、患者の細胞への抗体の結合効力を確認する。次いで、腫瘍細胞がMICAを発現する患者を、抗MICA抗体または組成物により治療することができる。このことは、障害の部位からsPBLまたは腫瘍細胞の試料を得、例えば、免疫アッセイを使用して試験してMICAおよび任意選択で細胞上のさらなる他のマーカーの相対的優位性を測定することにより達成することができる。他の方法、例えば、RNAベースの方法、例えば、RT-PCRまたはノザンプロットティングを使用してMICAおよび他の遺伝子の発現を検出することもできる。任意選択で、MICAを表面において発現する腫瘍細胞の存在についてのマーカーとして可溶性MICAを使用する。一実施形態において、個体から血清試料を得、可溶性MICAの存在を評価し、個体からの血清中の可溶性MICAの検出は、その個体が、表面におけるMICA（膜結合MICA）を発現する腫瘍細胞を含む腫瘍を有することを示す。

40

【0143】

一実施形態において、患者のMICA陽性細胞の活性もしくは成長を阻害し、またはそ

50

の細胞を枯渇させることが求められる場合、患者のMICA陽性細胞の増殖を阻害し、またはその細胞を枯渇させる抗MICA抗体の能力を評価する。MICA陽性細胞を抗MICA抗体または組成物により枯渇させる場合、患者を抗MICA抗体または組成物による治療に応答性であることを決定し、任意選択で、患者を抗MICA抗体または組成物により治療する。

【0144】

治療は、抗MICA抗体または化合物投与の複数のラウンドを含み得る。例えば、投与の初回ラウンド後、（例えば、個体の血清中の可溶性MICAの存在および/またはレベルを検出することにより）個体中のMICA発現細胞のレベルおよび/または活性を一般に再計測し、依然として上昇している場合、投与の追加のラウンドを実施することができる。このようにして、MICA検出および抗体または化合物投与の複数ラウンドを、例えば、障害が管理下になるまで実施することができる。

10

【0145】

一部の実施形態において、本方法は、前記患者に、免疫調節剤、ホルモン剤、化学療法剤、またはMICA発現細胞上に存在するポリペプチドに結合する二次抗体（例えば、枯渇抗体）から選択される適切な追加（第2）の治療剤を投与する追加のステップを含み得る。そのような追加の薬剤は、前記患者に、前記抗体と一緒に単一剤形として、または別個の剤形として投与することができる。抗体の投与量（または集散的に抗体および追加の治療剤の投与量）は、患者における治療応答を検出可能に誘導し、促進し、および/または向上させるために十分である。別個に投与する場合、抗体、断片、または誘導体および追加の治療剤は、望ましくは、患者に検出可能な併用治療利益をもたらす（例えば、タイミング、用量数などに関する）条件下で投与する。

20

【0146】

腫瘍（例えば、固形腫瘍）治療のため、例えば、本開示の抗MICA抗体組成物の投与は、古典的なアプローチ、例えば、手術、放射線療法、化学療法などとの組合せで使用することができる。したがって、本開示は、本抗体を手術または放射線治療と同時に、その前もしくはその後に使用し；または慣用の化学療法剤、放射線療法剤もしくは抗血管新生剤、もしくは標的化免疫毒素もしくはコアグュリガンド（coagulant）とともに、その前もしくはその後に患者に投与する併用療法を提供する。

30

【0147】

例示的な抗癌抗血管新生剤は、受容体チロシンキナーゼ、例として、限定されるものではないが、FGFR（線維芽細胞成長因子受容体、FGF-1, 2）、PDGFR（血小板由来成長因子受容体）、アングリオチン受容体（Ang-1, 2）、HGF（肝細胞成長因子受容体）、エフリン受容体（Eph）、VEGFR1、VEGFR-2, 3、PDGFR-、PDGFR-、CSF-1R、MET、Flt-3、c-Kit、bcrl/abl、p38アルファおよびFGFR-1によるシグナリングを阻害する。さらなる抗血管新生剤としては、VEGF発現および産生の種々の調節物質、例えば、EGFR、flt-1、KDR、HER-2、COX-2、またはHIF-1の1つ以上を阻害する薬剤を挙げることができる。別の好ましいクラスの薬剤としては、IMiD（免疫調節薬）、広範な効果、例として、免疫および非免疫関連効果の両方を有するサリドマイドに由来するアナログが挙げられる。IMiDクラスの代表例としては、CC-5013（レナリドミド、Revlimid（商標））、CC-4047（Actimid（商標））、およびENMD-0995が挙げられる。別のクラスの抗血管新生剤としては、シレンギチド（EMD121974、インテグリン阻害剤）、メタロプロテイナーゼ（MPP）、例えば、マリナスタット（marinastat）（BB-251）が挙げられる。別のクラスの抗血管新生剤としては、ファルネシル化阻害剤、例えば、ロナファルニブ（Sarasar（商標））、チピファルニブ（Zarnestra（商標））が挙げられる。他の抗血管新生剤、例えば、ベバクジマブ（Bevacuzimab）（mAb、阻害VEGF-A、Genentech）；IMC-1121B（mAb、阻害VEGFR-2、ImClone Systems）；CDP-791（ペグ化DiFab、VEG

40

50

FR-2、Celltech); 2C3 (mAb、VEGF-A、Peregrine Pharmaceuticals); VEGFトラップ(可溶性ハイブリッド受容体VEGF-A、PLGF(胎盤成長因子)Aventis/Regeneron)も、好適であり得る。別の好ましいクラスの薬剤としては、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)クラス、例として、例えば、PTK-787(TKI、VEGFR-1、-2、バタラニブ、Novartis); AEE788(TKI、VEGFR-2およびEGFR、Novartis); ZD6474(TKI、VEGFR-1、-2、-3、EGFR、Zactima、AstraZeneca); AZD2171(TKI、VEGFR-1、-2、AstraZeneca); SU11248(TKI、VEGFR-1、-2、PDGFR、スニチニブ、Pfizer); AG13925(TKI、VEGFR-1、-2、Pfizer); AG013736(TKI、VEGFR-1、-2、Pfizer); CEP-7055(TKI、VEGFR-1、-2、-3、Cephalon); CP-547,632(TKI、VEGFR-1、-2、Pfizer); GW786024(TKI、VEGFR-1、-2、-3、GlaxoSmithKline); GW786034(TKI、VEGFR-1、-2、-3、GlaxoSmithKline); ソラフェニブ(TKI、Bay43-9006、VEGFR-1、-2、PDGFR Bayer/Onyx); SU4312(TKI、VEGFR、PDGFR、Pfizer)、AMG706(TKI、VEGFR-1、-2、-3、Amgen)、XL647(TKI、EGFR、HER2、VEGFR、ErbB4、Exelixis)、XL999(TKI、FGFR、VEGFR、PDGFR、Flt-3、Exelixis)、PKC412(TKI、KIT、PDGFR、PKC、FLT3、VEGFR-2、Novartis)、AEE788(TKI、EGFR、HER2、VEGFR、Novartis)、OSI-930(TKI、c-kit、VEGFR、OSI Pharmaceuticals)、OSI-817(TKI、c-kit、VEGFR、OSI Pharmaceuticals)、DMPQ(TKI、ERGF、PDGFR、erbB2、p56、pkA、pkC)、MLN518(TKI、FLT3、PDGFR、c-KIT、C53518、Millennium Pharmaceuticals)、レスタウリニブ(lestaurinib)(TKI、FLT3、CEP-701、Cephalon)、ZD1839(TKI、EGFR、ゲフィチニブ、Iressa、AstraZeneca)、OSI-774(TKI、EGFR、エルロチニブ、Tarceva、OSI Pharmaceuticals)、ラパチニブ(TKI、ErbB-2、EGFR、GD-2016、Tykerb、GlaxoSmithKline)が挙げられる。VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、PDGFR-、Flt-3、c-Kit、p38アルファ、MET、c-RAF、b-RAF、bcr/ablおよびFGFR-1からなる群から選択される1つ以上の受容体チロシンキナーゼを阻害するチロシンキナーゼ阻害剤の例。

#### 【0148】

一実施形態において、第2の薬剤は、エフェクター細胞(例えば、NK細胞)活性化受容体の天然リガンドまたはNKG2D以外のNK細胞活性化受容体に結合し、その受容体を活性化させる抗体である。一実施形態において、薬剤は、標的細胞(例えば、感染細胞、腫瘍細胞、炎症促進細胞)の表面上のNKG2D以外のNK細胞活性化受容体の天然リガンドの存在を増加させる薬剤である。NK細胞活性化受容体としては、例えば、天然細胞毒性受容体、例えば、Nkp30、Nkp46、Nkp44または活性化KIR受容体(KIR2DS受容体、KIR2DS2、KIR2DS4)が挙げられる。本明細書において使用される用語「活性化NK受容体」は、刺激された場合、NK活性に関連する当分野において公知の任意の特性または活性の計測可能な増加、例えば、サイトカイン(例えば、IFN- およびTNF- 産生、細胞内遊離カルシウムレベル、例えば、本明細書の他箇所に記載の再指向殺傷アッセイにおいて細胞を標的化する能力、またはNK細胞増殖を刺激する能力の増加を引き起こすNK細胞の表面上の任意の分子を指す。用語「活性化NK受容体」としては、限定されるものではないが、活性化形態またはKIRタンパク

質（例えば、KIR2DSタンパク質）、NKp30、NKp46、NKp44、NKG2D、IL-2R、IL-12R、IL-15R、IL-18RおよびIL-21Rが挙げられる。

#### 【0149】

一実施形態において、抗癌剤は、腫瘍細胞の表面上のNKG2Dリガンドの発現を上方調節する化学療法剤または放射線である。これとしては、周知の化学療法、例として、イオン化およびUV照射、DNA複製の阻害剤、DNAポリメラーゼの阻害剤、クロマチン改変処理、ならびにアポトーシス誘導剤、例えば、HDAC阻害剤トリコスタチンAおよびバルプロ酸が挙げられる。好ましい治療は、DNA損傷応答経路を活性化させるもの、例えば、ATM（毛細血管拡張性運動失調症変異）もしくはATR（ATM-およびRad3関連）タンパク質キナーゼ、もしくはCHK1、またはさらにCHK2もしくはp53を活性化させるものである。後者の例としては、イオン化放射、DNA複製の阻害剤、DNAポリメラーゼ阻害剤およびクロマチン改変剤または処理、例として、HDAC阻害剤が挙げられる。NKG2Dリガンドを上方調節する組成物は、Gasser et al (2005) Nature 436 (7054) : 1186-90にさらに記載されている。NKG2Dは、数あるリガンドのうち、MHCクラスI関連MICAおよびMICB糖タンパク質と相互作用する活性化受容体である。MICAおよびMICB (Bauer et al. (1999) Science 285 : 727-729、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる)は、抗原提示における役割を有さず、一般に、腸管上皮中にのみ見出され、ウイルスおよび細菌感染、悪性形質転換、ならびに増殖により許容タイプの細胞中でストレス誘導され得る。NKG2Dは、CD28と類似する会合DAP10アダプタータンパク質を介してシグナリングするC型レクチン様活性化受容体である。それは、ほとんどのナチュラルキラー（NK）細胞、NKT細胞、T細胞CD8T細胞およびT細胞上で発現されるが、一般に、CD4T細胞上では発現されない。他のNKG2Dリガンドとしては、例えば、最初はヒトサイトメガロウイルス糖タンパク質UL16についてのリガンドとして同定されたULBPタンパク質、例えば、ULBP-1、-2、-3、-4、-5および-6が挙げられる (Cosman et al, (2001) Immunity 14 : 123-133、およびRaulet et al, (2013) Ann Review Immunology 31 : 413-41、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる)。

#### 【0150】

さらなる抗癌剤としては、アルキル化剤、細胞毒性抗生物質、例えば、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、植物誘導体、RNA/DNA代謝拮抗剤、および抗有糸分裂剤が挙げられる。好ましい例としては、例えば、シスプラチン (CDDP)、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソウレア (nitrosurea)、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、ブレオマイシン、プリコマイシン (plicomycin)、マイトマイシン、エトポシド (VP16)、タモキシフェン、ラロキシフェン、タキソール、ゲムシタピン、ナベルピン、トランス白金 (transplatinum)、5-フルオロウラシル、ピンクリスチン、ピンブラスチンおよびメトトレキサート、または上記の任意のアナログもしくは誘導体バリエーションを挙げることができる。

#### 【0151】

治療方法において、本開示の抗MICA抗体および第2の治療剤は、別個に、一緒に、もしくは連続的に、またはカクテルで投与することができる。一部の実施形態において、抗MICA抗体は、第2の治療剤の投与前に投与する。例えば、抗MICA抗体は、第2の治療剤の投与の約0~30日前に投与することができる。一部の実施形態において、抗MICA抗体は、第2の治療剤の投与の約30分~約2週間、約30分~約1週間、約1時間~約2時間、約2時間~約4時間、約4時間~約6時間、約6時間~約8時間、約8時間~1日、または約1~5日前に投与する。一部の実施形態において、抗MICA抗体

10

20

30

40

50

は、治療剤の投与と同時に投与する。一部の実施形態において、抗MICA抗体は、第2の治療剤の投与後に投与する。例えば、抗MICA抗体は、第2の治療剤の投与の約0～30日後に投与することができる。一部の実施形態において、抗MICA抗体は、第2の治療剤の投与の約30分～約2週間、約30分～約1週間、約1時間～約2時間、約2時間～約4時間、約4時間～約6時間、約6時間～約8時間、約8時間～1日、または約1～5日後に投与する。

#### 【0152】

本開示の抗MICA抗体は、キットに含めることができる。キットは、任意選択で、任意数の抗体および/または他の化合物、例えば、1、2、3、4、または他の任意数の抗MICA抗体および/または他の化合物をさらに含有し得る。キットの内容物についての本説明が決して限定されるものではないことが理解される。例えば、キットは、他のタイプの治療または診断剤を含有し得る。キットは、例えば本明細書に記載の方法を詳述する、抗体および/または薬剤を使用するための説明書も含み得る。

10

#### 【実施例】

#### 【0153】

##### 実施例1

##### 改変抗MICA抗体の産生

以下に示されるVHおよびVk可変領域を有する抗体を、本明細書に記載のヒトフレームワークおよびネズミKabab CDRを有するヒトIgG1抗体として産生した。簡潔に述べると、それぞれの抗体のVHおよびVk配列を、huIgG1由来定常ドメインおよびhuCk定常ドメインをそれぞれ含有するベクター中にクローニングした。2つの得られたベクターをCHO細胞系中に同時形質移入した。樹立された細胞プールを使用して抗体をCHO培地中で産生した。次いで、プロテインAを使用して抗体を精製した。

20

#### 【0154】

異なるヒトVH遺伝子セグメントに基づく3Dモデルを重ね合わせ、全てのアミノ酸の差異を1つずつ精査した。

#### 【0155】

軽鎖のCDR1の位置決めに影響し得る塩橋の導入がMICAへの結合に順次影響し得るか否かを調査するため、軽鎖中の残基F71(Abm番号付与)を、トリペプチドDF T内でチロシン(Y)により置換し、DY Tとした(F71Y置換)。CDR\_\_L1ループ直下の残基71におけるYによるFの置換は、CDR残基とのH結合を形成し得る。

30

#### 【0156】

さらに、さらなるバリエーション軽鎖において、二重置換(S70D/F71Y置換)を作製してD70をS70(Abnum番号付与)により置き換え、依然としてT72の置換を用いず；したがって、得られたAbnum残基70～72におけるトリペプチドをSY TからDF Tに変化させた。最後に、残基83(Abm番号付与)における置換を、単一F71Y置換を導入した軽鎖のバリエーション中で作製した。V83基はVL/CK界面において露出される一方、F83基はVLドメインの疎水性空孔内側に埋め込まれる。

#### 【0157】

重鎖においては、Abnum残基30における置換(S30T置換、フレームワーク1)およびAbnum残基71における置換(V71R置換、フレームワーク3)を全て有する4つのバリエーション鎖を構築し、ネズミ抗体中に存在する残基をヒト配列中の残基について置換した。残基30は、抗原に面し得るCDRフランキング残基である。残基71は、CDR\_\_H2ループの頂部直下の重要な位置を占め、CDR\_\_H2残基とのh結合を形成する。

40

#### 【0158】

これらのバリエーション鎖の3つ(鎖2、3および4)において、フレームワーク2中にAbnum残基48においてさらなる置換を導入した。イソロイシンをメチオニンにより置換した(I48M置換)。M48は、CDR\_\_H2直下に局在するVernier帯域残基である。これは、ネズミ抗体中の隣接残基とのいかなるh結合も形成しない一方、Ve

50

r n i e r 帯域残基は C D R 位置決めに重要であり得る。

【 0 1 5 9 】

さらに、2つのパリアント重鎖（鎖3および4）において、さらなるフレームワーク3置換を A b n u m 残基 7 2 c において作製した（K 7 2 c E 置換）。K 7 2 c は、ネズミフレームワーク中の Q 7 4 との H 結合を形成する。E 7 2 c および K 7 2 c は、主に K 7 2 c と Q 7 4 との間で形成される h 結合のため多様な立体構造を示す。したがって、考えられる塩橋は、残基 7 2 ~ 7 4 において除去された。

【 0 1 6 0 】

最後に、1つのパリアント重鎖（鎖4）において、さらなるフレームワーク3置換を A b n u m 残基 6 7 において作製した（V 6 7 I 置換）。I 6 7 は、C D R \_ H 2 の下方に局在する V e r n i e r 帯域残基である。

10

【 0 1 6 1 】

軽鎖において、A b n u m 残基 7 0、7 1 および 8 3 は、配列表（例えば、配列番号 7 または 9）の 7 1、7 2 および 8 4 位における残基にそれぞれ対応する。重鎖において、A b n u m 残基 3 0、4 8、6 7、7 1、7 2 c および 7 4 は、配列表（例えば、配列番号 6 または 8）の 3 0、4 9、6 8、7 2、7 6 および 7 8 位における残基にそれぞれ対応する。

【 0 1 6 2 】

それぞれの重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を以下の表 2 に示す。

【 0 1 6 3 】

20

【表 4】

表2

抗体ドメイン	配列番号	アミノ酸配列
mAb1 VH	6	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSI <u>T</u> SDYAWNWIRQPPGKGLEWIGFVSYSGTTKY NPSLKS RVTIS <u>R</u> DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYGFDYWGQGT TTVTVSS
mAb1 VL	7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISSELEPEDFAVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK
mAb2 VH	8	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSI <u>T</u> SDYAWNWIRQPPGKGLEWIGFVSYSGTTKY NPSLKS RVTIS <u>R</u> DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYGFDYWGQGT TTVTVSS
mAb2 VL	9	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGT <u>S</u> YTLTISSELEPEDFAVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK
mAb3 VH	10	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSI <u>T</u> SDYAWNWIRQPPGKGLEWIGFVSYSGTTKY NPSLKS RVTIS <u>R</u> DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYGFDYWGQGT TTVTVSS
mAb3 VL	11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISSELEPED <u>V</u> AVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK
mAb4 VH	12	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSI <u>T</u> SDYAWNWIRQPPGKGLEW <u>M</u> GFVSYSGTTKY NPSLKS RVTIS <u>R</u> DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYGFDYWGQGT TTVTVSS
mAb4 VL	13	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGTD <u>Y</u> TLTISSELEPEDFAVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK

30

40

【 0 1 6 4 】

【表 5】

mAb5 VH	14	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWRIRPPGKGLEW <u>M</u> GFVSYSGTTKY NPSLKSRVTIS <u>R</u> DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYGF <del>D</del> YWGQGT <del>T</del> TVTVSS	
mAb5 VL	15	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGT <u>S</u> YTLTISLLEPEDFAVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK	
mAb6 VH	16	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWRIRPPGKGLEW <u>M</u> GFVSYSGTTKY NPSLKSRVTIS <u>R</u> DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYGF <del>D</del> YWGQGT <del>T</del> TVTVSS	
mAb6 VL	17	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGT <u>D</u> YTLTISLLEPED <u>V</u> AVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK	10
mAb7 VH	18	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWRIRPPGKGLEW <u>M</u> GFVSYSGTTKY NPSLKSRVTIS <u>R</u> DTSE <u>N</u> QFSLKLSVTAADTAVYYCARGYGF <del>D</del> YWGQGT <del>T</del> TVTVSS	
mAb7 VL	19	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGT <u>D</u> YTLTISLLEPEDFAVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK	
mAb8 VH	20	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWRIRPPGKGLEW <u>M</u> GFVSYSGTTKY NPSLKSRVTIS <u>R</u> DTSE <u>N</u> QFSLKLSVTAADTAVYYCARGYGF <del>D</del> YWGQGT <del>T</del> TVTVSS	
mAb8 VL	21	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGT <u>S</u> YTLTISLLEPEDFAVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK	20
mAb9 VH	22	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWRIRPPGKGLEW <u>M</u> GFVSYSGTTKY NPSLKSRVTIS <u>R</u> DTSE <u>N</u> QFSLKLSVTAADTAVYYCARGYGF <del>D</del> YWGQGT <del>T</del> TVTVSS	
mAb9 VL	23	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGT <u>D</u> YTLTISLLEPED <u>V</u> AVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK	
mAb10 VH	24	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWRIRPPGKGLEW <u>M</u> GFVSYSGTTKY NPSLKSR <u>I</u> TIS <u>R</u> DTSE <u>N</u> QFSLKLSVTAADTAVYYCARGYGF <del>D</del> YWGQGT <del>T</del> TVTVSS	
mAb10 VL	25	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGT <u>D</u> YTLTISLLEPEDFAVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK	30
mAb11 VH	26	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWRIRPPGKGLEW <u>M</u> GFVSYSGTTKY NPSLKSR <u>I</u> TIS <u>R</u> DTSE <u>N</u> QFSLKLSVTAADTAVYYCARGYGF <del>D</del> YWGQGT <del>T</del> TVTVSS	
mAb11 VL	27	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGT <u>S</u> YTLTISLLEPEDFAVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK	
mAb12 VH	28	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSDYAWNWRIRPPGKGLEW <u>M</u> GFVSYSGTTKY NPSLKSR <u>I</u> TIS <u>R</u> DTSE <u>N</u> QFSLKLSVTAADTAVYYCARGYGF <del>D</del> YWGQGT <del>T</del> TVTVSS	
mAb12 VL	29	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSISSIYFHWYQQKPGQAPRLLIYRTSNLASGIP ARFSGSGSGT <u>D</u> YTLTISLLEPED <u>V</u> AVYYCQQGTTIPFTFGQGTKLEIK	40

## 【 0 1 6 5 】

## 実施例 2

## MICA アレルへの結合

実施例 1 の表 2 の抗体の結合を、C1R - MICA \* 001、C1R - MICA \* 004、C1R - MICA \* 007 および C1R - MICA \* 008 と称される Salih et al. (2003) Blood 102 (4) : 1389 - 91396 に記載の RSV.5neo ベクター (GenBank (NCBI)、アクセッション番号 M83237 のもの) が形質移入された MICA 発現 C1R 形質移入細胞 (ATCC 参照番号 CRL

- 1993 (商標) ) への結合について試験した。結合をフローサイトメトリーにより分析した。

【0166】

フローサイトメトリー。細胞を回収し、PBS 1x / BSA 0, 2% / EDTA 2mM の緩衝液中である用量範囲の抗MICAmAbを使用して4において30分の間染色した。染色緩衝液中での2回の洗浄後、細胞をマウス抗ヒトIgG1-PEモノクローナル抗体(1/11)により4において30分間染色した。2回の洗浄後、染色をBD FACS Canto II上で得、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。

【0167】

結果。表3の抗体のそれぞれは、MICAAレルの全てにわたり高い親和性結合を示した。しかしながら、驚くべきことに、mAb1およびmAb2は、MICAAレル\*01、\*04および\*07についての結合親和性の特に強力な改善を示した。MICAA\*01についての親和性は、ネズミ親VHおよびVLを有し、mAb1~12および他のヒトフレームワーク抗体と同一のヒト定常領域を共有する親抗体と比較して2倍超(mAb1について2.4倍、mAb2について約3倍)だけ改善された。mAb3も、親キメラ抗体と比較して改善された結合親和性を示したが、mAb1および2よりも小さい程度であった。結果を以下の表3に示す。

10

【0168】

mAb1、2および3は、全て、リジン(K)が72c位(Abnum)に存在する重鎖を共有する。この位置におけるリジン酸は、残基72cと74との間の塩橋を導入し得る。塩橋は、VH中の残基72cにおけるグルタミン酸(E)を有する種々の他のmAbにおいて使用された他の重鎖において導入されなかった。mAb1、2および3の重鎖は、48位におけるイソロイシンをさらに有する。mAb1および2は、チロシン(Y)がCDRL1ループ直下の71位(Abm番号付与)においてフェニルアラニンを置き換えてCDR残基との考えられる塩橋(H結合)を形成し、それによりCDRの位置決めを変化させると考えられる軽鎖を使用した。mAb3は、フェニルアラニン(F)がmAb1および2中のVL中の83位に存在する一方、mAb3は軽鎖中の83位(Abnum番号付与)におけるバリン(V)を有するという点でmAb1および2と異なる。

20

【0169】

【表6】

表3:

C1R形質移入細胞に対する示される抗MICA抗体の $\mu\text{g}/\text{ml}$ 単位での $\text{EC}_{50}$ 値

抗体	C1R- MICA*01	C1R- MICA*04	C1R- MICA*07	C1R- MICA*08
親抗体	0.4392	0.0618	0.0698	0.0716
mAb1	0.1841	0.0417	0.0330	0.0612
mAb2	0.1508	0.0381	0.0502	0.0699
mAb3	0.2645	0.0608	0.0612	0.0822
mAb4	0.3164	0.0630	0.0875	0.0859
mAb5	0.3177	0.0762	0.0493	0.0958
mAb6	0.4071	0.0838	0.0718	0.0953
mAb7	0.2880	0.0616	0.0668	0.0871
mAb8	0.1906	0.0481	0.0462	0.0551
mAb9	0.3178	0.0438	0.0519	0.0515
mAb10	0.3071	0.0631	0.0498	0.1443
mAb11	0.3196	0.0614	0.0513	0.0789
mAb12	0.4534	0.0672	0.0860	0.0642

10

20

40

50

## 【0170】

## 実施例3

抗体は、ADCCを介してMICA発現標的を殺傷し得る

mAbを、MICA\*008 (C1R-MICA\*008) またはMICA\*001 (C1R-MICA\*001) が形質移入されたC1R腫瘍細胞に対するADCCを媒介するその能力について試験した。

## 【0171】

手短に述べると、ヒトCD16 (Fアイソフォーム) が形質移入されたヒトNK細胞系KHYG-1の細胞溶解活性を、(Greiner)からのV底96ウェルプレート中で古典的な4時間の $^{51}\text{Cr}$ 放出アッセイにおいて評価した。手短に述べると、C1R-MICA\*008細胞を $^{51}\text{Cr}$  ( $100\mu\text{Ci}$  ( $3.7\text{MBq}$ ) /  $1 \times 10^6$ 個の細胞) により標識し、次いでhCD16F (ヒトIgG1に結合させるため) が形質移入されたKHYGと、10に等しいエフェクター/標的比において示される濃度における抗体の存在下で混合した。短時間の遠心分離および37°Cにおける4時間のインキュベーション後、 $50\mu\text{L}$ の上清を取り出し、 $^{51}\text{Cr}$ 放出をTopCount NXTベータ検出器 (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) により計測した。全ての実験群をトリPLICATEで分析し、特異的溶解の割合を以下のとおり決定した:  $100 \times (\text{平均cpm実験放出} - \text{平均cpm自発放出}) / (\text{平均cpm全放出} - \text{平均cpm自発放出})$ 。全放出の割合は2%のTriton X100 (Sigma) における標的細胞の溶解により得た。

## 【0172】

mAb1についての結果を図1に示す。mAb1およびキメラ親抗体は、それぞれ、陰性対照 (ヒトIgG1アイソタイプ対照抗体) と比較してヒトKHYG-1 hCD16F NK細胞系によるC1R-MICA\*008および\*001細胞の特異的溶解を誘導し、それにより、それらの抗体がMICA\*008および\*001発現標的細胞に対するAD

CCを誘導することを示した。標的細胞溶解の程度は細胞への抗体結合に相関し(図1) ; mAb1は、キメラ親抗体よりもいくらか大きい\*001細胞の特異的溶解を誘導した。

#### 【0173】

##### 実施例4

抗MICA抗体は、NK細胞活性のM2マクロファージ媒介抑制を克服する

NK細胞を、自己インビトロ単球由来M1またはM2マクロファージと24時間インキュベートした。次いで、非接着NK細胞を含有する培養上清を、MICA\*001が形質移入されたLCL-721.221細胞(EBV形質移入B細胞系)(LCL-721.221-MICA\*001細胞)とさらに24時間インキュベートした。NK上の活性化マーカーCD137をフローサイトメトリーにより計測した。抗MICA抗体mAb1またはアイソタイプ対照(IC)を10µg/mLにおいて使用した。

10

#### 【0174】

結果を図2に示す。平均+/-SD、n=4~7の独立健常ドナー。抗MICA mAb1は、M1またはM2マクロファージを用いるまたは用いない腫瘍細胞を含め721.221-MICA\*001腫瘍細胞に対するNK細胞活性化の強力な増加を引き起こした。腫瘍細胞およびNK細胞とM2マクロファージとのインキュベーションは、mAb1の存在下でNK細胞活性化の実質的な減少を引き起こさなかった。対照的に、アイソタイプ対照において、NK活性化が一般にかなり低いだけでなく、腫瘍細胞およびNK細胞とM2マクロファージとのインキュベーションもNK活性化の強力な減少を引き起こした。

20

#### 【0175】

##### 実施例5

ネズミRaji腫瘍モデルにおける抗MICA抗体のインビボ効力

第1部：静脈内投与、単回投与

NOD-SCIDマウスに、MICA\*001が形質移入されたRajiヒトバーキットリンパ腫細胞(Raji-MICA\*001細胞)を静脈内(i.v.)移植し、同日に1µg、10µg、50µgもしくは100µgの抗MICA mAb1または示される用量(µg/マウス、i.v.)のアイソタイプ対照(IC)の単回注射により処理した。

#### 【0176】

結果を図3に示す。アイソタイプ対照または1µgの抗MICA抗体mAb1を受けたほとんどのマウスが注射後100日間生存しなかった一方、少なくとも10µgの抗MICA抗体を受けたマウスにおいて有意に改善された生存期間が観察された。100µgの用量において、抗MICA抗体mAb1は全てのマウスにおいて100日間の生存期間を達成した。ログランク(マンテル-コックス)検定、10µg p=0.0303、50µg p=0.0081、100µg p=0.0024。

30

#### 【0177】

第2部：皮下、反復投与

NOD-SCIDマウス(n=12/群)にRaji-MICA\*001細胞を皮下移植した。マウスを10日目(腫瘍容積約120mm<sup>3</sup>)に無作為化し、次いで抗MICA抗体またはアイソタイプ対照(IC)(250µg/マウス、i.v.、3週間、週2回)により処理した。

40

#### 【0178】

結果を図4に示す。左側パネルはアイソタイプ対照を受けたマウスを示し、右側パネルは抗MICA抗体mAb1を受けたマウスを示す。個々の腫瘍容積を示す。CR=完全奏功。抗MICA抗体mAb1による処理は、腫瘍容積の減少を引き起こした。さらに、mAb1により処理されたマウスの17%に、アイソタイプ対照を受けたマウスの8%と比較して完全奏功が認められた。

#### 【0179】

##### 実施例6

50

ネズミ A 5 4 9 腫瘍モデルにおける抗 M I C A 抗体のインビボ効力

N O D - S C I D マウス ( n = 7 / 群 ) に A 5 4 9 細胞 ( ヒト肺癌腫 ; A T C C 参照番号 C C L - 1 8 5 ) を腹腔内注射 ( i . p . ) し、抗 M I C A 抗体 m A b 1 1 またはアイソタイプ対照 ( I C ) ( 1 0 μ g / マウス、 i . v . ) の単回注射により処理した。腹腔洗浄液 ( P C L ) 中の A 5 4 9 細胞数を処理 2 4 時間後に評価した。

【 0 1 8 0 】

結果を図 5 に示す。抗 M I C A 抗体 m A b 1 により処理されたマウスは、アイソタイプ対照により処理されたマウスと比較して減少した腫瘍細胞数を示した。個々のマウスおよび中央値を表示する。マン - ホイットニー比較  $p = 0 . 0 0 2 3$ 。

【 0 1 8 1 】

本明細書に引用される全ての参照文献、例として、刊行物、特許出願、および特許は、参照により全体として本明細書に、ならびにあたかもそれぞれの参照文献が参照により取り込まれることが個別具体的に示され、全体として本明細書に記載されるのと同程度 ( 法により許容される最大の程度 ) に、本明細書の他箇所特定文献の任意の別個に提供される組み込みに関係なく組み込まれる。

【 0 1 8 2 】

用語「 a 」および「 a n 」および「 t h e 」ならびに類似の参照の使用は、本明細書において特に示されない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、単数形および複数形の両方を包含するものと解釈すべきである。

【 0 1 8 3 】

特に記載のない限り、本明細書に提供される全ての正確な値は、対応する近似値を代表する ( 例えば、特定の因子または計測値に関連して提供される全ての正確な例示値は、適宜「約」により修飾される、対応する近似測定値も提供するものとみなすことができる ) 。

【 0 1 8 4 】

1 つ以上の要素に関して「含む」、「有する」、「例として」、または「含有する」などの用語を使用する本明細書の任意の様態または実施形態の本明細書の記載は、本明細書において特に示されない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、その特定の 1 つ以上の要素「からなる」、「から本質的になる」、または「を本質的に含む」という本明細書の類似の様態または実施形態への支持を提供するものとする ( 例えば、特定の要素を含むとして本明細書に記載の組成物は、本明細書において特に示されない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、その要素からなる組成物を記載するものとしても理解すべきである ) 。

【 0 1 8 5 】

本明細書に提供される任意のおよび全ての実施例、または例示的な語 ( 例えば、「例えば」 ) の使用は、本発明をより良好に説明するものにすぎず、特に特許請求されない限り、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書の語は、本発明の実施に必須のいかなる非特許請求の要素も示さないとは解釈すべきである。

10

20

30

【 図 1 】

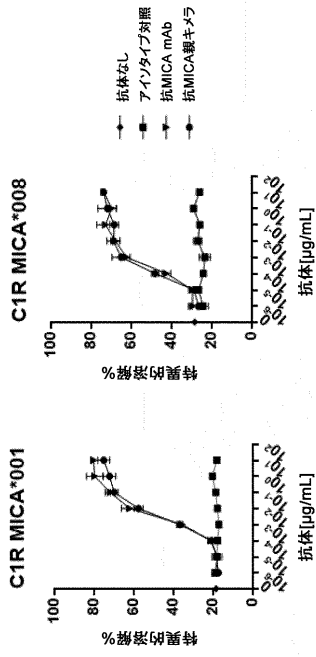


図 1

【 図 2 】

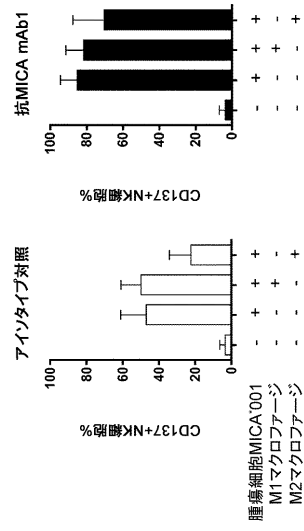


図 2

【 図 3 】

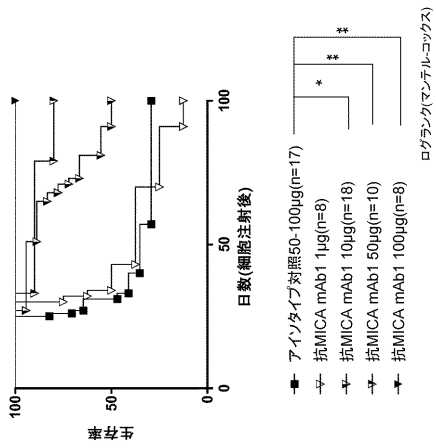


図 3

【 図 4 】

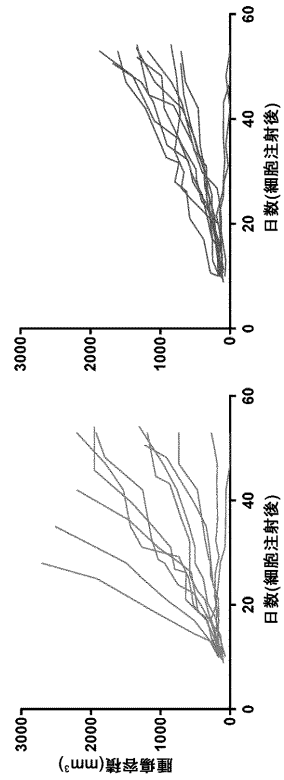
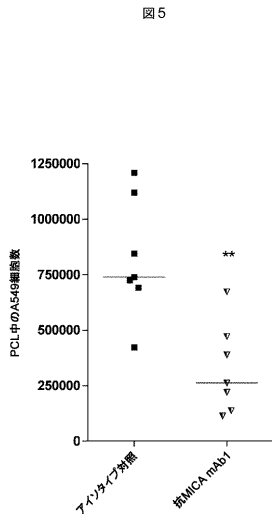


図 4

【 図 5 】



【 配 列 表 】

2019517993000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/055920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/00 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 A61K		
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) EP0-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/117647 A1 (INNATE PHARMA [FR]) 15 August 2013 (2013-08-15) cited in the application claims 24,26,35,37-47,7,41-47,27-33; sequences 46,47	1-33
A	----- ABHINANDAN K R ET AL: "Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 45, no. 14, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 3832-3839, XP023437109, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2008.05.022 [retrieved on 2008-07-09] -----	1-33
<input 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 2 May 2017		Date of mailing of the international search report 17/05/2017
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 Fleitmann, J

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/055920

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013117647 A1	15-08-2013	AU 2013218017 A1	11-09-2014
		CA 2862101 A1	15-08-2013
		CN 104244977 A	24-12-2014
		EP 2812027 A1	17-12-2014
		JP 2015508757 A	23-03-2015
		RU 2014131317 A	27-03-2016
		SG 11201404177P A	28-08-2014
		US 2015191542 A1	09-07-2015
		WO 2013117647 A1	15-08-2013
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 47/55 (2017.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/55	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D
	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 N 15/13	
	C 1 2 N 15/62	Z

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

(72) 発明者 マチュー・ブルリー

フランス 1 3 0 0 9 マルセイユ、ブルヴァール・デュ・ヴェソー 5 0 番、レ・ゾー・ドゥ・マザ  
ルギュー・パティマン・デ 4

(72) 発明者 ローラン・ゴージェ

フランス 1 3 0 0 8 マルセイユ、シュマン・デュ・ランシエ 3 0 番、レジダンス・ラ・サレット・  
パティマン 8

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ08 QR48 QS33 QX01  
4B064 AG27 CA19 CC24 DA05 DA14  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 BA02 CA25 CA44 CA46  
4C076 AA95 BB11 BB13 BB16 CC27 CC41 EE41 EE59  
4C084 AA17 MA66 NA05 NA13 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262  
4C085 AA14 AA25 AA26 BB31 BB41 BB43 CC05 CC31 DD62 EE01  
GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10  
4H045 AA11 AA30 BA41 DA76 DA83 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	抗MICA抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019517993A</a>	公开(公告)日	2019-06-27
申请号	JP2018548141	申请日	2017-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	伊纳特医药公司 INNATE PHARMA PHARMA		
申请(专利权)人(译)	惰性制药兴业ANONYME		
[标]发明人	マチューブルリー ローランゴージェ		
发明人	マチューブルリー ローランゴージェ		
IPC分类号	C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/04 A61P35/00 A61K39/395 A61P43/00 A61K47/68 A61K47/55 A61K45/00 A61P31/00 A61P37/06 A61P29/00 G01N33/53 G01N33/574 C12P21/08 C12N15/13 C12N15/62		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/2833 C07K2317/24 C07K2317/567 C07K2317/92 C07K2317/52 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/76 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57492 G01N2333/70539		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/04 A61P35/00 A61K39/395.N A61K39/395.T A61K39/395.L A61P43/00.111 A61K47/68 A61K47/55 A61K45/00 A61P31/00 A61P37/06 A61P29/00 A61P43/00.105 G01N33/53.D G01N33/574.D C12P21/08 C12N15/13 C12N15/62.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/BB11 4C076/BB13 4C076/BB16 4C076/CC27 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C084/AA17 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA13 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC05 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/DA83 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	阿依鸭毛 富田健二		
优先权	62/308443 2016-03-15 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了能够结合人MICA多肽的抗原结合蛋白。抗原结合蛋白在治疗以表达MICA的细胞为特征性疾病，特别是癌症中具有增强的活性。

Figure 3

