

(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2019-509019

(P2019-509019A)

(43) 公表日 平成31年4月4日 (2019. 4. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 3
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B 0 6 5
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	4 C O 7 6
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C O 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 96 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-535363 (P2018-535363)
 (86) (22) 出願日 平成29年1月6日 (2017.1.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年8月17日 (2018.8.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL2017/050003
 (87) 国際公開番号 W02017/119811
 (87) 国際公開日 平成29年7月13日 (2017.7.13)
 (31) 優先権主張番号 16150698.5
 (32) 優先日 平成28年1月8日 (2016.1.8)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 512011185
 アイム・セラピューティクス・ベー・フェー
 オランダ・NL-1105・ペーアー・アムステルダム・ザイドースト・マイベルグ
 ドレーフ・59
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療用抗CD9抗体

(57) 【要約】

本発明は、新規の結合化合物及びそれらの治療用途を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

図 2 に示す C D 9 配列の K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、及び L 1 7 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸を含む C D 9 のエピトープに特異的な、単離された合成若しくは組み換え抗体、又はその機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項 2】

図 2 に示す C D 9 配列の K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及び F 1 7 6 に対応するアミノ酸を含む C D 9 のエピトープに特異的な、請求項 1 に記載の単離された合成若しくは組み換え抗体、又はその機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項 3】

配列 D Y A M H と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する重鎖 C D R 1 配列と、
配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する重鎖 C D R 2 配列と、
配列 A V S G Y Y P Y F D Y と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する重鎖 C D R 3 配列と、
配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する軽鎖 C D R 1 配列と、
配列 W A S T R E S と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する軽鎖 C D R 2 配列と、
配列 Q Q Y Y T T P と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する軽鎖 C D R 3 配列と、
を含む、請求項 1 又は 2 に記載の単離された合成若しくは組み換え抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項 4】

配列 D Y A M H と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する重鎖 C D R 1 配列と、
重鎖 C D R 2 配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G と、
配列 A V S G Y Y P Y F D Y と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する重鎖 C D R 3 配列と、
軽鎖 C D R 1 配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G と、
配列 W A S T R E S と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する軽鎖 C D R 2 配列と、
軽鎖 C D R 3 配列 Q Q Y Y T T P と、
を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項 5】

重鎖 C D R 1 配列 D Y A M H 又は D Y A M Y と、
重鎖 C D R 2 配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G と、
重鎖 C D R 3 配列 A V S G Y Y P Y F D Y 又は A V S G Y F P Y F D Y 又は A V S G Y Y P Y F H Y 又は A V S G Y F P Y F H Y と、
軽鎖 C D R 1 配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G と、
軽鎖 C D R 2 配列 W A S T R E S 又は W A S I R E S と、
軽鎖 C D R 3 配列 Q Q Y Y T T P と、
を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項 6】

配列 E V Q V V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M H W V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I V Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q L N S L R A E D T A F Y Y C A K A V S G Y Y P Y F D Y W G Q G I L V T V S S と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する重鎖可変領域の配列を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項 7】

配列 D I V M T Q S P D S L S V S L G E R A T I N C K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F

TLTISSSLQAEDVAVYYCQQYYTTPSTFGQGTRLEIKと少なくとも80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域の配列を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項8】

重鎖可変領域の配列EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIIVYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYYPYFDYWGQGILVTVSS、若しくは

EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIIVYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFDYWGQGILVTVSS、若しくは

EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIIVYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFDYWGQGILVTVSS、若しくは

EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIIVYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFHYWGQGILVTVSS、若しくは

EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIIVYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFDYWGQGILVTVSS、若しくは

EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIIVYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFDYWGQGILVTVSS、及び／又は

EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMYWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIIVYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQLNSLRAEDTAFYYCAKAVSGYFPYFHYWGQGILVTVSS、及び／又は

軽鎖可変領域の配列DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYL GWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITISSSLQAEDVAVYYCQQYYTTPSTFGQGTRLEIK、若しくは

DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYL GWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITISSSLQAEDVAVYYCQQYYTTPSTFGQGTRLEIKを含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項9】

ヒト抗体又はその機能性部分若しくは機能的等価物である、請求項1～8のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項10】

黒色腫細胞、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、及び食道癌細胞に結合可能である、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項11】

前記抗体が、IgGアイソタイプ、好ましくはIgG1又はIgG3である、請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項12】

10

20

30

40

50

アミノ酸位置 3 4 5 にアルギニンを含む、請求項 1 1 に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項 1 3】

図 2 に記載のとおり、C D 9 配列のアミノ酸、K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及び F 1 7 6 への結合性について抗体 A T 1 4 - 0 1 2 と競合する、単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項 1 4】

別の化合物に結合する、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項 1 5】

前記その他の化合物が、検出可能な標識、化学療法剤、毒性部分、免疫調節分子、別の C D 9 特異的結合化合物、又は放射性化合物である、請求項 1 4 に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項 1 6】

最大で 6 0 アミノ酸残基長を有する、単離された組み換え又は精製 C D 9 ペプチドであって、前記ペプチドは、図 2 に示すとおり、C D 9 アミノ酸位置 1 6 9 ～ 1 7 6 内に位置する少なくとも 6 つのアミノ酸残基と同一である少なくとも 6 つのアミノ酸残基を含む、ペプチド。

【請求項 1 7】

図 2 に示す C D 9 配列の K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及び F 1 7 6 に対応するアミノ酸を含む、請求項 1 6 に記載の単離された組み換え又は精製 C D 9 ペプチド。

【請求項 1 8】

図 2 に示すとおり C D 9 配列の F 1 7 6 に対応するアミノ酸を更に含む、請求項 1 6 又は 1 7 に記載の単離された組み換え又は精製 C D 9 ペプチド。

【請求項 1 9】

請求項 1 ～ 1 5 の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物の少なくとも 1 つの C D R 配列をコードする、少なくとも 1 5 ヌクレオチド長の単離された合成若しくは組み換え核酸分子、又はそれらの機能的等価物。

【請求項 2 0】

請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物の、少なくとも前記重鎖 C D R 1 ～ 3 配列と、前記軽鎖 C D R 1 ～ 3 配列とをコードする、請求項 1 9 に記載の核酸分子又は機能的等価物。

【請求項 2 1】

請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物の、少なくとも前記重鎖可変領域の配列、及び／又は前記軽鎖可変領域の配列をコードする、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の核酸分子又は機能的等価物。

【請求項 2 2】

g a t t a t g c c a t g c a c と、
g g t a t t a g t t g g a a t a g t g g t a g c a t a g t
c t a t g c g g a c t c t g t g a a g g g c と、
g c c g t g a g t g g t t a t t a t c c c t a c t t t g a
c t a c ; 及び
a a g t c c a g c c a g a g t g t t t t a t a c a g c t c
c a a c a a t a a g a a c t a c t t a g g t と、
t g g g c a t c t a c c c g g g a a t c c と、
c a g c a a t a t t a t a c t a c t c c t と、

からなる群から選択された配列と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 9 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の核酸分子又は機能的等価物。

【請求項 2 3】

配列 g a a g t g c a g g t g g t g g a g t c t g g g g g a g
g c t t g g t a c a g c c t g g c a g g t c c c t g a g a c
t c t c c t g t g c a g c c t c t t g g a t t c a c c t t t g
a t g a t t a t g c c a t g c a c t g g g t c c g g c a a g
c t c c a g g g a a g g g c c t g g a g t g g g t c t c a g
g t a t t a g t t g g a a t a g t g g t a g c a t a g t c t
a t g c g g a c t c t g t g a a g g g c c g a t t c a c c a
t c t c c a g a g a c a a c g c c a a g a a c t c c c t g t
a t c t g c a a c t g a a c a g t c t g a g a g c t g a g g
a c a c g g c c t t c t a t t a c t g t g c a a a a g c c g 10
t g a g t g g t t a t t a t c c c t a c t t t g a c t a c t
g g g g c c a g g g a a t t t t g g t c a c c g t c t c c t
c a と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、及び／又は g a c a t c
g t g a t g a c c c a g t c t c c a g a c t c c c t g t c t
g t g t c t c t g g g c g a g a g g g c c a c c a t c a a c
t g c a a g t c c a g c c a g a g t g t t t t a t a c a g c
t c c a a c a a t a a g a a c t a c t t a g g t t g g t a c
c a g c a g a a a c c a g g a c a g c c t c c t a a g c t g
c t c a t t t a c t g g g c a t c t a c c c g g g a a t c c
g g g g t c c c t g a c c g a t t c a g t g g c a g c g g g 20
t c t g g g a c a g a t t t c a c t c t c a c c a t c a g c
a g c c t g c a g g c t g a a g a t g t g g c a g t t t a t
t a c t g t c a g c a a t a t t a c t a c t c c t t c c
a c c t t c g g c c a a g g g a c a c g a c t g g a g a t t
a a a と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 19～22 のいずれ
か一項に記載の核酸分子又は機能的等価物。

【請求項 24】

請求項 1～15 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物をコードする、核酸分子又はその機能的等価物。

【請求項 25】

cDNA、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、又は DNA／RNA ヘリックスを含む、請求項 19～24 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 26】

非ヒト宿主細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項 19～25 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 27】

請求項 19～26 のいずれか一項に記載の核酸分子又は機能的等価物を含む、ベクター。

【請求項 28】

請求項 19～26 のいずれか一項に記載の核酸分子若しくは機能的等価物、又は請求項 27 に記載のベクターを含む、単離された又は組み換え細胞、又は非ヒト動物。 40

【請求項 29】

請求項 1～15 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、又は請求項 19～26 のいずれか一項に記載の核酸分子若しくは機能的等価物、又は請求項 27 に記載のベクター、又は請求項 28 に記載の細胞を含む、組成物。

【請求項 30】

前記組成物が、製薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤も含む製薬学的組成物である、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

請求項 1～15 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、請 50

求項 19～26 のいずれか一項に記載の核酸分子若しくは機能的等価物、請求項 27 に記載のベクター、又は請求項 28 に記載の細胞、及び CD9 発現細胞に関連する疾患、好ましくは CD9 陽性癌の治療及び／又は予防に有用な治療薬、を含む、パーツからなるキット。

【請求項 32】

前記薬剤が、C3 転換酵素の形成を刺激可能な、又は C3 転換酵素の形成の阻害を中和可能な薬剤である、請求項 31 に記載のパーツからなるキット。

【請求項 33】

前記薬剤が、CD55 ブロッキング抗体、CD46 ブロッキング抗体、又は CD59 ブロッキング抗体、好ましくは CD55 ブロッキング抗体である、請求項 32 に記載のパーツからなるキット。

10

【請求項 34】

前記薬剤が、共抑制的 T 細胞分子に特異的なブロッキング抗体である、請求項 31 に記載のパーツからなるキット。

【請求項 35】

前記抗体が、抗 CTLA4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 PD-L2 抗体、抗 SIRPα 抗体、抗 TIM3 抗体、抗 LAG3 抗体、抗 CD276 抗体、抗 CD272 抗体、抗 KIR 抗体、抗 A2AR 抗体、抗 VISTA 抗体、及び抗 IDO 抗体からなる群から選択され、好ましくは PD1 ブロッキング抗体、又は PDL1 ブロッキング抗体である、請求項 34 に記載のパーツからなるキット。

20

【請求項 36】

医薬品又は予防薬として使用するための、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、又は請求項 19～26 のいずれか一項に記載の核酸分子若しくは機能的等価物、又は請求項 27 に記載のベクター、又は請求項 28 に記載の細胞。

【請求項 37】

CD9 発現細胞に関連する疾患を少なくともある程度治療又は予防する方法に使用するための、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、又は請求項 19～26 のいずれか一項に記載の核酸分子若しくは機能的等価物、又は請求項 27 に記載のベクター、又は請求項 28 に記載の細胞。

30

【請求項 38】

CD9 発現細胞に関連する疾患の診断に使用するための、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物。

【請求項 39】

前記疾患が、CD9 陽性癌、骨粗鬆症、関節炎、肺炎、COPD、大腸炎、及び自然リンパ球に関連する疾患からなる群から選択される、請求項 37 又は 38 に記載の使用のための抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、又は核酸分子若しくは機能的等価物、又はベクター、又は細胞。

【請求項 40】

前記 CD9 陽性癌が、黒色腫、結腸直腸癌、膵臓癌、食道癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、扁平上皮癌、AML、多発性骨髄腫、胃癌、肝癌、脳癌、カポジ肉腫、粘表皮癌、絨毛癌、線維肉腫、子宮頸癌、神経膠腫、腺癌、肺腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、及び小細胞肺癌からなる群から選択される、請求項 39 に記載の使用のための抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、又は核酸分子若しくは機能的等価物、又はベクター、又は細胞。

40

【請求項 41】

前記抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、又は核酸分子若しくは機能的等価物、又はベクター、又は細胞が、CD9 発現細胞に関連する疾患、好ましくは CD9 陽性癌の治療及び／又は予防に有用な治療薬と組み合わせられる、請求項 38～40 のいずれか一項に記載の使用のための、抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、又は核酸分子若しくは機能的等価物、又はベクター、又は細胞。

50

【請求項 4 2】

前記薬剤が、C 3 転換酵素の形成を刺激可能、又は C 3 転換酵素の形成の阻害を中和可能である、請求項 4 1 に記載の使用のための、抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、又は核酸分子若しくは機能的等価物、又はベクター、又は細胞。

【請求項 4 3】

前記薬剤が、C D 5 5 ブロッキング抗体、C D 4 6 ブロッキング抗体、又は C D 5 9 ブロッキング抗体、好ましくは C D 5 5 ブロッキング抗体である、請求項 4 2 に記載の使用のための、抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、又は核酸分子若しくは機能的等価物、又はベクター、又は細胞。

【請求項 4 4】

前記薬剤が、共抑制的 T 細胞分子に特異的なブロッキング抗体である、請求項 4 1 に記載の使用のための、抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、又は核酸分子若しくは機能的等価物、又はベクター、又は細胞。

【請求項 4 5】

前記抗体が、抗 C T L A 4 抗体、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、抗 P D - L 2 抗体、抗 S I R P α 抗体、抗 T I M 3 抗体、抗 L A G 3 抗体、抗 C D 2 7 6 抗体、抗 C D 2 7 2 抗体、抗 K I R 抗体、抗 A 2 A R 抗体、抗 V I S T A 抗体、及び抗 I D O 抗体からなる群から選択され、好ましくは P D 1 ブロッキング抗体、又は P D L 1 ブロッキング抗体である、請求項 4 4 に記載の使用のための、抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、又は核酸分子若しくは機能的等価物、又はベクター、又は細胞。

【請求項 4 6】

サンプルが C D 9 発現細胞を含むかどうかを判定するための、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物の使用。

【請求項 4 7】

サンプルが C D 9 発現腫瘍細胞を含むかどうかを判定するための、請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 4 8】

C D 9 発現細胞がサンプル中に存在するかどうかを測定する方法であって、

前記サンプルを、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物と接触させることと、

前記抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を、C D 9 発現細胞（存在する場合）に結合させることと、

C D 9 発現細胞に、前記抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物が結合するか否かを判定することにより、前記サンプル中に C D 9 発現細胞が存在しているか否かを判定することと、

を含む、方法。

【請求項 4 9】

前記 C D 9 発現細胞が C D 9 陽性腫瘍細胞である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を産生するための方法であって、前記方法は、請求項 1 9 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターを有する細胞を準備することと、前記細胞に前記核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターを翻訳させることにより、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の前記抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を産生することと、を含み、前記方法は、好ましくは、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を回収、精製、及び／又は単離することを更に含む、方法。

【請求項 5 1】

C D 9 発現細胞に関連する疾患を少なくともある程度治療又は予防する方法であって、治療有効量の、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、請求項 1 9 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の核酸分子若しくは機能的等価物、又

10

20

30

40

50

は請求項 27 に記載のベクター、又は請求項 28 に記載の細胞、又は請求項 29 若しくは 30 に記載の組成物を、治療又は予防を必要としている個体に投与することを含む、方法。

【請求項 52】

前記疾患が、CD9 陽性癌、骨粗鬆症、関節炎、肺炎、COPD、大腸炎、及び自然リンパ球に関連する疾患からなる群から選択される、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記 CD9 陽性癌が、黒色腫、結腸直腸癌、膵臓癌、食道癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、扁平上皮癌、AML、多発性骨髄腫、胃癌、肝癌、脳癌、カポジ肉腫、粘表皮癌、絨毛癌、線維肉腫、子宮頸癌、神経膠腫、腺癌、肺腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、及び小細胞肺癌からなる群から選択される、請求項 52 に記載の方法。

10

【請求項 54】

前記抗体又は機能性部分若しくは機能性等価物、又は核酸分子若しくは機能的等価物、又はベクター、又は細胞が、CD9 発現細胞に関連する疾患、好ましくは CD9 陽性癌の治療及び／又は予防に有用な治療薬と組み合わせられる、請求項 51～53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

前記薬剤が、C3 転換酵素の形成を刺激可能な、又は C3 転換酵素の形成の阻害を中和可能な薬剤である、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記薬剤が、CD55 ブロッキング抗体である、請求項 55 に記載の方法。

20

【請求項 57】

前記薬剤が、共抑制的 T 細胞分子に特異的なブロッキング抗体である、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 58】

前記抗体が、抗 CTLA4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 PD-L2 抗体、抗 SIRPα 抗体、抗 TIM3 抗体、抗 LAG3 抗体、抗 CD276 抗体、抗 CD272 抗体、抗 KIR 抗体、抗 A2AR 抗体、抗 VISTA 抗体、及び抗 IDO 抗体からなる群から選択され、好ましくは PD1 ブロッキング抗体、又は PDL1 ブロッキング抗体である、請求項 57 に記載の方法。

30

【請求項 59】

個体が CD9 陽性癌に罹患しているかどうかを判定するための *ex vivo* 法であって、前記方法は、

前記個体由来の腫瘍細胞を、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物と接触させることと、

前記抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を、CD9 発現細胞（存在する場合）に結合させることと、

CD9 発現細胞が、前記抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物に結合するか否かを判定することにより、前記個体が CD9 陽性癌に罹患している否か判定することと、

を含む、*ex vivo* 法。

40

【請求項 60】

請求項 1～15 のいずれか一項に記載の抗体、又は請求項 36～45 のいずれか一項に記載の使用のための抗体、又は請求項 46 若しくは 47 に記載の使用、又は請求項 48～59 のいずれか一項に記載の方法であって、前記抗体は、抗体 AT14-012 又はその機能性部分若しくは機能的等価物である、抗体又は使用又は方法。

【請求項 61】

請求項 16～18 のいずれか一項に記載の CD9 ペプチドをコードする、単離された合成又は組み換え核酸分子、又はそれらの機能的等価物。

【請求項 62】

請求項 61 に記載の核酸分子又は機能的等価物を含む、ベクター。

50

【請求項 6 3】

請求項 6 1 に記載の核酸分子若しくは機能的等価物、及び／又は請求項 6 2 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 6 4】

免疫細胞及び／又は C D 9 に特異的な抗体又はその機能性部分若しくは機能的等価物を、産生、結合、検出、及び／又は得るための、請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の C D 9 ペプチドの使用、又は請求項 6 1 に記載の核酸分子若しくは機能的等価物、又は請求項 6 2 に記載のベクターの使用。

【請求項 6 5】

請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の C D 9 ペプチド、又は請求項 6 1 に記載の核酸分子若しくは機能性等価物、又は請求項 6 2 に記載のベクターで非ヒト動物を免疫することを含む、C D 9 特異的免疫細胞又は C D 9 特異的抗体を産生するための方法。

10

【請求項 6 6】

前記非ヒト動物から C D 9 特異的な免疫細胞又は抗体を回収することを更に含む、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

請求項 6 5 又は 6 6 に記載の方法により得ることができる、抗体又は免疫細胞。

【請求項 6 8】

請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の C D 9 ペプチド、又は請求項 6 1 に記載の核酸分子若しくは機能的等価物、又は請求項 6 2 に記載のベクターを含む、免疫原性組成物。

20

【請求項 6 9】

請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の C D 9 ペプチドと、抗体が結合した、又は免疫細胞結合した C D 9 ペプチドを検出する手段と、を含む、診断キット。

【請求項 7 0】

医薬品又は予防薬として使用するための、請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の C D 9 ペプチド、又は請求項 6 1 に記載の核酸分子若しくは機能的等価物、又は請求項 6 2 に記載のベクター。

【請求項 7 1】

免疫療法に使用するための、請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の C D 9 ペプチド、又は請求項 6 1 に記載の核酸分子若しくは機能的等価物、又は請求項 6 2 に記載のベクター。

30

【請求項 7 2】

診断用薬として使用するための、請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の C D 9 ペプチド。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、生物学、免疫学、及び医薬の分野に関する。

【背景技術】

40

【0002】

黒色腫は、悪性メラノサイトにより生じる。黒色腫は、主に紫外線暴露により生じる。あらゆる異なる種類の皮膚癌のうち、悪性黒色腫は最も死亡率が高い。2012年には、世界中でおよそ55,000人もの人々が転移性黒色腫で死亡したものと推定されており、その数は毎年確実に増加している。転移が生じていない場合、ほとんどの患者は黒色腫を除去することにより治療される。黒色腫が転移した患者は、化学療法、放射線療法、及び／又は近年開発された、T細胞療法若しくはいわゆるチェックポイント阻害抗体などの免疫療法により治療される。これらの新規の免疫療法は、免疫系がメラノサイト腫瘍細胞を認識し、かつ攻撃可能であることを明示する。しかし、かかる治療に対する奏効率は50%未満であり、5年生存率は約30%である。そのため、更なる治療選択肢が強く求め

50

られている。本発明は、黒色腫及びその他の疾患を中和、予防、及び／又は検出するための手段及び方法を提供する。

【0003】

本発明のいくつかの実施形態は、患者由来のものでありCD9に特異的なヒト抗体を提供する。重要なことに、この抗体は、免疫療法後に完全寛解している後期のIV期の黒色腫患者に由来するものであり、かつ治療から10年後も良好に生存する。ヒト抗体のAT14-012は、黒色腫細胞、膵臓癌細胞、食道癌細胞、及び結腸癌細胞などのCD9を含む細胞に結合することができる。

【0004】

膜貫通タンパク質であり、なかでもMRP-1、MIC3、DRAP-27、及びTSPAN-29とも呼称されるCD9は、分子量約23~27kDaのテトラスパニンである。CD9は、メラノサイト、内皮細胞、ある種の神経細胞、骨格筋細胞 (musculoskeletal cells)、及びある種の免疫細胞などといった、多数の種類の細胞の表面上に遍在する。CD9は血小板上にも存在する。CD9は、4つの膜貫通ドメイン、1つの小型の細胞内ループ、並びにEC1ドメイン及びEC2ドメインと呼称される2つの細胞外ループを有する (図1)。CD9は、最も重要なインテグリン類 ($\beta 1$ インテグリン)、EWIタンパク質 (EWI-2及びEWI-F)、CD81、CD63、及びEGFRなどの多数の他のタンパク質と相互作用する。CD9は、特に、腫瘍の増殖及び転移を含む、細胞の接着、増殖、及び遊走において機能する。血小板を含む数多くの種類の細胞の細胞表面上にCD9が存在するという点から、既知のCD9特異的抗体には副作用の恐れがあった。実際に、Kawakatsuらは、1993年に、抗CD9抗体の血小板凝集効果により、霊長類モデルにおいて致死性の血栓症が導かれたことを報告している。抗CD9抗体を注射されたサルは、肺血栓症により5分以内に死亡した。これは、本出願の実施例：「既知の抗CD9抗体ALB6は血小板の強固な凝集を誘導する (実施例3)」において確認される。いくつかのCD9抗体が開発され、報告されているものの、これまでのところ、この重篤な副作用に起因して、これらの既知のCD9抗体のうち臨床試験に進められたものはない。

【0005】

但し、興味深いことに、実施例に示すとおり、抗体AT14-012は、初代メラニン細胞よりも黒色腫細胞に対して結合親和性が高い。更に、AT14-012は、初代結腸上皮細胞よりも、結腸癌に対して結合活性が高い。更に、AT14-012は、幾種類かの初代AML球、及び複数の骨髓腫細胞株に結合した一方で、初代ヒト扁桃細胞に対して示した反応性はごくわずかであった。実施例は、抗体AT14-012が、CD9単量体よりもクラスタ化したCD9に対して優先的に結合することを示す。CD9のパルミトイル化により、CD9のホモクラスタの形成が望ましいこと、並びにCD9ホモクラスタのレベルは、原発性腫瘍細胞、特に転移性腫瘍細胞をもとに評価されることが知られている (Yang et al., 2006)。したがって、AT14-012の好適な結合は、抗体AT14-012が、CD9を発現している非腫瘍細胞よりも幾つかの腫瘍細胞に対して高い結合親和性を有するという発見に関係し得る。また、クラスタ化されたCD9に結合した結果、AT14-012が多量体化することにより、腫瘍の増殖又は疾患の拡散を特異的に阻害する機序がトリガーされ得る。

【0006】

重要なことに、例えばALB6などの既知のCD9特異的抗体は、副作用として血栓症のリスクを伴うことから、上記のとおり血小板の凝集に関し深刻な副作用を有する一方、本発明者らは、抗体AT14-012、及び同じ固有のエピトープに結合するAT14-012の幾つかの多様体は、in vitroにおいて、検出され得る血小板凝集を何ら誘導しないことを実証した。AT14-012及びかかる多様体は血小板に結合し、更にはわずかに活性化させたものの、凝集は観察されなかった。これは、AT14-012及びそれらの多様体について、血栓症のリスクを有意に低減させるという、既知のCD9特異的抗体を上回る重要な利点を提供する。実際に、AT14-012に由来した黒色腫患

者は、血栓症の徴候を何ら示さなかった。実際のところ、この黒色腫患者は、免疫療法により生じる有害な副作用の徴候は何ら示さず、色素が失われることで生じる皮膚疾患である白斑ですら示さなかった。

【0007】

上記特性の観点から、抗体A T 1 4－0 1 2、又は同じ結合特異性を有するその機能性部分、若しくは機能的等価物、若しくはその多様体は、黒色腫などのC D 9を発現している細胞に関連する疾患を中和、予防、及び／又は検出するのに魅力的な選択肢である。かかる抗体は、完全に寛解し長期にわたり黒色腫の生存者となっている黒色腫患者より単離されたものであるという事実から、治療有用性はすでに明らかである。更に、実施例に示すとおり、A T 1 4－0 1 2は、黒色腫細胞、膵臓癌細胞、食道癌細胞、及び結腸癌細胞、幾種類かのA M L球、及び複数の骨髓腫細胞株に結合する。また、実施例は、A T 1 4－0 1 2が*in vivo*黒色腫マウスモデルにおいて、腫瘍の増殖及び転移巣の成長を有意にすることを示した。したがって、抗体A T 1 4－0 1 2、並びに結合特異性が同じ機能性部位及び機能的等価物、並びにA T 1 4－0 1 2と同じエピトープに特異的であり、かつ／又はC D 9の同じエピトープに対する結合についてA T 1 4－0 1 2と競合する、その他の結合化合物は、C D 9を含有する細胞に関連する疾患（例えば、C D 9陽性腫瘍、骨粗鬆症、関節炎、肺炎、C O P D、結腸炎、アルツハイマー病、及び自然リンパ球に関連する疾患など）を検出する及び／又はかかる疾患に対抗するのに特に好適である。更に、C D 9は細胞外小胞でも発現し、かかる小胞も、抗体A T 1 4－0 1 2又は上記の結合化合物の標的である。

【0008】

実施例に示すとおり、抗体A T 1 4－0 1 2は、m 4領域中に存在するC D 9エピトープに結合する。このエピトープは、少なくとも、図2に示すと通りのC D 9配列のK 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及びF 1 7 6に対応するC D 9のアミノ酸を含む。特に、A T 1 4－0 1 2は、図2に記載のC D 9配列のアミノ酸K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及びF 1 7 6に結合することが実証されている。

【0009】

C D 9特異的抗体は当業界で既知である。しかしながら、これらの抗体は多くの場合ヒトのものではなく、異なるエピトープを認識する。記載のヒト抗体は、免疫グロブリン重鎖と軽鎖がランダムに対になっている人工ライブラリに由来する。対照的に、A T 1 4－0 1 2は、天然に対となっている重鎖及び軽鎖を有するヒト患者に由来した。例えば、国際公開第2 0 0 9／1 5 7 6 2 3号は、ヒトファージディスプレイライブラリより得られ、図2に示すC D 9配列のアミノ酸位置1 8 6～1 9 1に結合する抗体1 0 E 4を記載する。

【0010】

国際公開第2 0 1 4／1 4 5 9 4 0号は、図2に示すC D 9配列のアミノ酸位置1 1 2～1 9 1への結合を示す、マウスC D 9特異的なモノクローナル抗体Z 9．1及びZ 9．2を記載し、国際公開第W O 2 0 1 3／0 9 9 9 2 5号は、図2に示すC D 9配列のアミノ酸位置1 1 2～1 9 4への結合を示す、マウス抗体C D 9－1 2 A 1 2を記載する。

【0011】

国際公開第2 0 0 4／0 0 7 6 8 5号は、図2に示すC D 9配列のアミノ酸位置1 6 7～1 7 1に存在するアミノ酸配列P K K D Vに結合する抗体m A b 7に関する。

【0012】

国際公開第9 5／0 3 3 8 2 3号は、C D 9配列G L W L R F Dに結合するマウスモノクローナル抗体E S 5．2 D 8に関する。この配列は、図2に示すC D 9配列のアミノ酸位置3 1と3 7との間に位置する。

【0013】

欧州特許第0 5 0 8 4 1 7号は、C D 9のアミノ酸配列に対するマウス抗体を請求し、この配列は、図2に示すC D 9配列のアミノ酸位置3 5～6 0、1 1 3～1 4 2、1 3 1～1 6 6、及び1 6 3～1 9 1から選択される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】国際公開第2014/145940号

【特許文献2】国際公開第2004/007685号

【特許文献3】国際公開第95/033823号

【特許文献4】欧州特許第0508417号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

10

当業界で既知であるその他のCD9特異的抗体は、マウス抗体ALB6及びHI9aである。実施例に示すとおり、これらのマウス抗体は、AT14-012とは異なるエピトープにも結合する。例えば、AT14-012は、図2に示すように、CD9アミノ酸K169、D171、V172、L173、及びF176に有意に結合する一方、ALB6は、これらのアミノ酸残基に有意には結合しない。更に、実施例に示すとおり、抗体AT14-012は、CD9の残基112～134（図2に示すとおり付番）がCD81の対応する領域により置き換えられたCD9変異体（変異体m1）に結合可能であるのに対し、抗体ALB6及びHI9aは、この変異体には結合不可能である。更に、HI9aは変異体m4（CD9の残基168～180は、CD81の対応する領域により置き換えられた）に結合可能であるのに対し、AT14-012はこの変異体m4には結合しない。最後に、実施例は、抗体ALB6が、m3中のQ161及びm4中のF176に結合することを示す。そのため、ALB6及びHI9aは、AT14-012とは異なるエピトープに結合する。

20

【課題を解決するための手段】

【0016】

この実施例は、AT14-012の反応性が霊長類に限定され、CD9を発現しているマウス及びウサギの血小板への結合は観察されなかったことを示す。この実施例は、例えば、マウスCD9に結合するマウス抗体ALB6及びHI9aよりもAT14-012の方が結合する、CD9におけるエピトープの固有性を確認する。

結論として、本発明により、新規CD9エピトープに特異的な新規ヒトCD9特異的抗体が提供される。

30

【0017】

したがって、本発明の幾つかの実施形態は、図2に記載のCD9配列のアミノ酸位置154～181内に位置する少なくとも6つのアミノ酸に特異的（すなわち、特異的に結合可能）な、単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。好ましくは、かかる抗体又は機能性部分又は機能的等価物は、図2に記載のCD9配列のアミノ酸位置168～181内に位置する少なくとも6つのアミノ酸について特異的である。同様にして、図2に記載のCD9配列のアミノ酸位置168～181内に位置する少なくとも5アミノ酸に特異的（すなわち、特異的に結合可能）な、単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。

40

【0018】

いくつかの実施形態は、CD9のエピトープに特異的な単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供し、かかるエピトープは、図2に示すCD9配列のアミノ酸K169、D171、V172、L173、及びT175からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態は、CD9のエピトープに特異的な単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供し、かかるエピトープは、図2に示すCD9配列のアミノ酸K169、D171、V172、及びL173からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基を含む。本発明のかかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等

50

価物は、好ましくは、図2に記載のCD9配列のアミノ酸F176にも特異的に結合することができる。いくつかの実施形態は、CD9のエピトープに特異的な抗体、又は機能性部分若しくは機能的等価物を提供し、かかるエピトープは、図2に示すCD9配列のアミノ酸K169、D171、V172、L173、T175、及びF176からなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態は、CD9のエピトープに特異的なかかる抗体、又は機能性部分若しくは機能的等価物を提供し、かかるエピトープは、図2に示すCD9配列のアミノ酸K169、D171、V172、L173、T175、及びF176からなる群から選択される少なくとも3つ、又は少なくとも4つ、又は少なくとも5つのアミノ酸残基を含む。好ましくは、かかるエピトープは、図2に記載のCD9配列のアミノ酸K169、D171、V172、L173、及びF176からなる群から選択される少なくとも3、4、又は5つのアミノ酸残基を含む。好ましい実施形態は、図2に示すCD9配列のK169、D171、V172、L173、及びF176に対応するアミノ酸を含む、CD9のエピトープに特異的な本発明の単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。いくつかの実施形態は、図2に示すCD9配列のK169、D171、V172、L173、及びF176に対応するアミノ酸を含む、CD9エピトープに特異的な、本発明の単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。

10

【0019】

本明細書で使用する時、用語「図2に記載のCD9配列」は、図2に示すヒトCD9タンパク質のアミノ酸配列を意味する（UniProt番号P21926；Genbank受入番号NP-001760）。

20

【0020】

本明細書で使用する時、表現「図2に記載のCD9アミノ酸位置X及びY内に位置する」並びに「図2に記載のCD9配列のアミノ酸位置X及びY内に位置する」は、記載の位置の間に存在する、並びにX及び／又はYのアミノ酸を含む、配列を包含する。更に、かかる用語は、位置X及び／又はYのアミノ酸を含有しない、かかる列挙された位置の間に存在する配列を包含する。

【0021】

本明細書で使用する時、用語「抗体」は、少なくとも、標的エピトープに特異的な軽鎖可変領域（VL）と対になっている重鎖可変領域（VH）を含む、免疫グロブリンタンパク質を指す。

30

【0022】

「抗体の機能性部分」は、本明細書において、その量は必須ではなく、本質的にかかる抗体と少なくとも1つの特性を共有している部分として定義される。かかる機能性部分は、かかる抗体と同一の抗原を結合可能であるが、必ずしも同程度に結合しない。一実施形態では、抗体の機能性部分は、少なくとも重鎖可変ドメイン（VH）を含む。抗体の機能性部分の非限定例は、単ドメイン抗体、一本鎖抗体、ナノボディ、ユニボディ、一本鎖可変フラグメント（scFv）、Fdフラグメント、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメントである。

40

【0023】

「抗体の機能的等価物」とは、抗体の少なくとも1つのCDR配列、好ましくは重鎖CDR3配列を含む、人工的な結合化合物として本明細書において定義される。かかる機能的等価物は、好ましくは、抗体の重鎖CDR3配列に加えて、かかる抗体の軽鎖CDR3配列を含む。より好ましくは、かかる機能的等価物は、抗体の重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3配列に加えて、かかる抗体の軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む。抗体の機能的等価物は、例えば、抗体に、得られる化合物の少なくとも抗原結合特性が本質的にほぼ同じであるような（その量は必ずしも同等ではない）変更を加えることによって作製される。このような作製は、例えば、抗体の全体的な機能には本質的に影響しないよう、概して類似の特性（大きさ、疎水性など）をもつ別の残基でアミノ酸残基を

50

置換することによる保存的アミノ酸置換によるものなどの、数多くの方法によってなされる。

【0024】

当業者には周知のとおり、抗体の重鎖は、免疫グロブリン分子を構成する2種類の鎖のうちの大きい方である。重鎖は、定常ドメインと可変ドメインとを含み、可変ドメインは抗原結合に関係する。抗体の軽鎖は、免疫グロブリン分子を構成する2種類の鎖のうちの小さい方である。軽鎖は、定常ドメインと可変ドメインとを含む。可変ドメインは、多くの場合（ただし、常にではない）、抗原結合に参与する重鎖の可変ドメインと一緒にである。

【0025】

相補性決定領域（CDR）は、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインに存在する超可変領域である。全抗体の場合、重鎖のCDR1～3、及び結合している軽鎖のCDR1～3は一緒に、抗原結合部位を形成する。

【0026】

本明細書で使用する時、用語「本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物」は、「本発明の結合化合物」としても言及される。

【0027】

本明細書において、用語「特異的な」、「特異的に結合できる」、及び「特異的に結合可能」は互換可能に使用され、かつ抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物と、そのエピトープとの相互作用を指す。これは、かかる抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、その他の抗原又はアミノ酸配列よりもかかるエピトープに優先的に結合することを意味する。したがって、抗体、機能性部分、又は等価物は、その他の抗原又はアミノ酸配列に非特異的に結合し得るものの、かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物の、それらのエピトープに対する結合親和性は、かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物のその他の抗原又はアミノ酸配列に対する非特異的な結合親和性よりも有意に高い。

【0028】

CD9の特定のエピトープに結合可能である本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、かかるCD9のエピトープが別のタンパク質中にも存在する場合、その他の非CD9細胞にも特異的であり得る。この場合、本明細書においてCD9に特異的なものとして言及される抗体は、同じエピトープを含むその他のタンパク質にも特異的である。

【0029】

「結合親和性」は、抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物のある1つの結合部分と、その結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有相互作用の合計強度を指す。本明細書で使用する時、別途記載のない限り、「結合親和性」は、結合対（例えば、抗体及び抗原）のメンバー同士の1:1相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。親和性は、概して、 k_a の k_d に対する比として計算される平衡解離定数（ K_D ）により表すことができる。例えば、Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293: 865~881. を参照されたい。親和性は、当該技術分野で既知である、例えば、BiaCore (GE Healthcare) などの表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイ、又はIBIS Technologies BV (Hengelo, the Netherlands) のIBIS-iSPR装置、若しくはKinexaなどの溶液相アッセイといった、一般的な手法により測定され得る。

【0030】

アミノ酸配列又は核酸配列についての同一性%、あるいは用語「配列同一性%」は、本明細書において、2つの配列を並べて、必要とされる場合にはギャップを導入して最大の同一性%を得た後で、候補となるアミノ酸配列又は核酸配列中の残基が参照配列中の残基と同一である%として定義される。アラインメントのための方法及びコンピュータプログラムは当業界で既知であり、例えば、「Align 2」などがある。

【0031】

本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、好ましくは、黒色腫細胞、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、並びに食道癌細胞に結合可能である。かかる結合化合物は、様々な種類の癌を中和するのに好適であり、したがって、広範な用途を有する。少なくとも黒色腫に特異的であることが好ましい。

【0032】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、ヒト抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物である。典型的には非ヒトCDR又は可変領域の配列がヒトレシピエントにおいて抗マウス免疫応答を引き起こすマウス抗体又はヒト化抗体とは対照的に、かかるヒトアミノ酸配列が存在することで、ヒト患者における治療上の使用中に副作用が生じる可能性が減少する。

10

【0033】

1つの特に好ましい実施形態では、かかる抗体が、IgGアイソタイプ、好ましくはIgG1又はIgG3である、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物が提供される。これは、ヒトにおける医療用途に有効である。

【0034】

本発明の好ましい抗体は抗体AT14-012である。少なくとも黒色腫、膵臓癌細胞、食道癌細胞、及び結腸癌細胞、幾種類かのAML球、及びいくつかの複数の骨髓腫細胞株に結合することから、この抗体は好ましい。更に、AT14-012が*in vivo*における転移を中和することが実証されている。したがって、この抗体は、例えば、黒色腫などのCD9陽性腫瘍細胞を含む癌などといったCD9発現細胞に関連する疾患に対抗するのに特に好適である。興味深いことに、AT14-012はIgG3アイソタイプであり、VH3-09ファミリーに属する。抗体AT14-012の重鎖CDR1配列、CDR2配列、及びCDR3配列、並びに軽鎖CDR1配列、CDR2配列、及びCDR3配列は、表1及び図3に記載される。

20

【0035】

本明細書で使用する時、用語「AT14-012」は、少なくとも抗体AT14-012の重鎖及び軽鎖のCDR1～3配列、好ましくは重鎖及び軽鎖可変領域の配列を有するすべての抗体並びにそれらの機能性部分及び機能的等価物を含む。かかる抗体並びに機能性対及び機能的等価物は、例えば、単離された及び／又は精製された抗体、組み換え抗体、及び／又は例えば、CHO細胞などの産生宿主細胞用にコドン最適化されたAT14-012核酸配列を使用して得られた抗体、を含む。

30

【0036】

表1及び図3に記載のAT14-012配列をもとに、CD9に特異的なAT14-012の少なくとも1つのCDR配列を含む、抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を作製可能である。したがって、表1及び図3に記載の抗体AT14-012の少なくとも1つのCDR配列を含む単離された組み換え及び／又は合成抗体若しくはそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が提供される。かかる少なくとも1つのCDR配列は、好ましくは、少なくともCDR3配列を含む。したがって、少なくとも、配列AVSGYYPYFDYを有する重鎖CDR3配列と、配列QQYYTTPを有する軽鎖CDR3配列と、を含む、単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が提供される。好ましくは、抗体AT14-012の、少なくとも2つのCDR、より好ましくは少なくとも3つのCDRを含む、結合化合物が提供される。いくつかの実施形態では、抗体AT14-012の重鎖及び軽鎖の少なくとも2つ又は3つのCDRは、本発明の1つの結合化合物中に一緒に存在する。好ましくは、本発明の結合化合物は、抗体AT14-012の3つすべての重鎖CDRと、3つすべての軽鎖CDRとを含む。

40

【0037】

所望により、少なくとも1つのかかるCDR配列は、好ましくは、結合効率、選択性、及び／又は安定性を改良するために最適化され、これにより多様体結合化合物を作製する。これは例えば、得られる化合物の安定性及び／又は結合効率を好ましく試験し、改良さ

50

れたCD9特異的結合化合物が選択された後の変異導入法によりなされる。当業者であれば、本発明の少なくとも1つの改変(altered)CDR配列を含む多様体を十分作製可能である。例えば、保存的アミノ酸置換が適用される。保存的アミノ酸置換の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシン、又はメチオニンなどの1つの疎水性残基の、別の疎水性残基への置換、並びに1つの極性残基の、別の極性残基への置換、例えば、アルギニンのリジンへの置換、グルタミン酸のアスパラギン酸への置換、又はグルタミンのアスパラギンへの置換などがある。好ましくは、抗体AT14-012のCDR配列と少なくとも80%同一であり、望ましいCD9結合特性が維持されている、又は更には改良されているCDR配列を含む、抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物が提供される。したがって、抗体AT14-012のCDR配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む多様体結合化合物も本発明の範囲内である。好ましくは、かかる結合化合物は、抗体AT14-012の重鎖及び軽鎖CDR1~3配列と少なくとも80%同一である、重鎖及び軽鎖CDR1~3配列を含む。好ましくは、かかる多様体のCDR配列は、もとのAT14-012のCDR配列と3つ以下、好ましくは2つ以下、好ましくは1つ以下のアミノ酸が異なっている。

10

【0038】

CDR配列を最適化するのに加えて、結合効率又は安定性を改良するために、少なくとも1つのフレームワーク領域中の少なくとも1つの配列を最適化することができる。これは、結合効率又は安定性を改良するためになされる。フレームワーク配列は、例えば、得られる結合化合物の特性が好ましく試験された後にかかるフレームワーク配列をコードする核酸分子を変異させることにより最適化される。このようにして、改良された結合化合物を得ることができる。好ましい実施形態では、本発明による抗体におけるフレームワーク領域には、ヒト生殖系列配列が使用される。ヒト生殖系列配列は、フレームワーク領域が由来している個体に固有で、かつ別のヒト個体に投与したときに免疫原性応答を生じさせ得る、体細胞変異を含有する傾向が低いことから、ヒト生殖系列配列の使用は、かかる抗体の免疫原性に関するリスクを最小化する。したがって、AT14-012のフレームワーク領域と比較して、フレームワーク領域において少なくとも1つの変異を含む、本発明の合成若しくは組み換え抗体、又は機能性部分若しくは機能的等価物が更に提供される。更に、又はあるいは、抗体AT14-012の定常領域と比較して、定常領域において少なくとも1つの変異を含む、本発明の合成若しくは組み換え抗体、又は機能性部分若しくは機能的等価物が提供される。AT14-012と比較して少なくとも1つの変異を有するかかる結合化合物は天然には生じない。その代わりに人工的に作製されている。一実施形態では、抗体AT14-012のIgG3Fc領域は、IgG1Fc領域により少なくとも部分的に置き換えられている。この置き換えは、典型的には得られる免疫グロブリンの安定性を増大させ、かつ半減期を延長させる。

20

30

【0039】

いくつかの実施形態では、本発明の結合化合物は、ヒト可変領域を含む。いくつかの実施形態では、かかる結合化合物は、ヒト定数領域及びヒト可変領域を含む。いくつかの好ましい実施形態では、かかる結合化合物はヒト抗体である。ヒトの治療用途に関し、ヒトCD9特異的抗体の使用は、非ヒト抗体の使用よりも有利である。in vivoにおけるヒト疾患の診断及び／又は治療のための非ヒト抗体の使用は、数多くの因子により妨害を受ける。特に、ヒト抗体は、非ヒト抗体を異物として認識する恐れがあり、これにより、非ヒト抗体に対し免疫原性応答が生じ、結果として副作用及び／又は抗体の体内循環からの高速なクリアランスが生じ得る。ヒト抗体は、ヒト個体に投与した場合に副作用の可能性を減少させるのに加え、非ヒト抗体に比べてクリアランスが低減されることから多くの場合体内循環における半減期が長くなる。

40

【0040】

いくつかの実施形態では、本発明の結合化合物はキメラ抗体である。このようなキメラ抗体では、本発明の結合化合物には、例えば、対象の付加的結合部位などの、対象の配列が提供される。

50

【0041】

本発明の結合化合物は、好ましくはモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、単一の分子種からなる抗体である。モノクローナル抗体は、モノクローナル抗体産生細胞又は組み換えDNA技術により大量に生産することができる。

【0042】

したがって、例えば、変異導入などの当該技術分野で知られている技術を用いて、抗体A T 1 4 - 0 1 2に基づく多様体結合化合物を生成することができる。典型的には、抗原特異性を維持しつつ、80～99%の配列変化が許容される。したがって、一実施形態は、

配列D Y A M Hと少なくとも80%の配列同一性を有する重鎖C D R 1配列と、

配列G I S W N S G S I V Y A D S V K Gと少なくとも80%の配列同一性を有する重鎖C D R 2配列と、

配列A V S G Y Y P Y F D Yと少なくとも80%の配列同一性を有する重鎖C D R 3配列と、

配列K S S Q S V L Y S S N N K N Y L Gと少なくとも80%の配列同一性を有する軽鎖C D R 1配列と、

配列W A S T R E Sと少なくとも80%の配列同一性を有する軽鎖C D R 2配列と、

配列Q Q Y Y T T Pと少なくとも80%の配列同一性を有する軽鎖C D R 3配列と、を含む、単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、好ましくは、図2に記載のC D 9配列のK 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、及びL 1 7 3からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸を含むC D 9エピトープに特異的であり、より好ましくは図2に記載のC D 9配列のK 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及びF 1 7 6に対応するアミノ酸を含むC D 9エピトープに特異的である。

【0043】

好ましくは、かかる配列同一性は、少なくとも85%、より好ましくは少なくとも86%、より好ましくは少なくとも87%、より好ましくは少なくとも88%、より好ましくは少なくとも89%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも91%、より好ましくは少なくとも92%、より好ましくは少なくとも93%、より好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%、より好ましくは100%である。

【0044】

本明細書で使用するC D Rの付番及び定義は、別途記載のない限りK a b a t e t a l (1991)によるものである。K a b a t 付番、E U 付番、及びI M G T 付番などの異なる付番系間の対応は、当業者には周知である。

【0045】

したがっていくつかの実施形態は、

配列D Y A M Hと少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖C D R 1配列と、

配列G I S W N S G S I V Y A D S V K Gと少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖C D R 2配列と、

配列A V S G Y Y P Y F D Yと少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖C D R 3配列と、

配列K S S Q S V L Y S S N N K N Y L Gと少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖C D R 1配列と、

配列W A S T R E Sと少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖C D R 2配列と、

配列Q Q Y Y T T Pと少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖C D R 3配列と、を含む、単離された合

成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、好ましくは、図2に記載のCD9配列のK169、D171、V172、及びL173からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸を含むCD9エピトープに特異的であり、より好ましくは図2に記載のCD9配列のK169、D171、V172、L173、及びF176に対応するアミノ酸を含むCD9エピトープに特異的である。

【0046】

いくつかの実施形態は、

配列DYAMHと少なくとも97%の配列同一性を有する重鎖CDR1配列と、

配列GISWNSGSI VYADSVKGと少なくとも97%の配列同一性を有する重鎖CDR2配列と、

配列AVSGYYPYFDYと少なくとも97%の配列同一性を有する重鎖CDR3配列と、

配列KSSQSVLYSSNNKNYLGと少なくとも97%の配列同一性を有する軽鎖CDR1配列と、

配列WASTRESと少なくとも97%の配列同一性を有する軽鎖CDR2配列と、

配列QQYYTTPと少なくとも97%の配列同一性を有する軽鎖CDR3配列と、を含む、単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、好ましくは、図2に記載のCD9配列のK169、D171、V172、及びL173からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸を含むCD9エピトープに特異的であり、より好ましくは図2に記載のCD9配列のK169、D171、V172、L173、及びF176に対応するアミノ酸を含むCD9エピトープに特異的である。

【0047】

この実施例では、重鎖CDR1における1つの変異、及び／又はCDR3における1つ若しくは2つの変異、及び／又は軽鎖CDR2における1つの変異により、抗体AT14-012と同じエピトープに結合し、かつAT14-012の結合親和性と同等の又はそれよりも高い結合親和性を有する抗体が得られることが示されている。重要なことに、実施例において更に示すとおり、重鎖CDR1中及び／又は重鎖CDR3中及び／又は軽鎖CDR2中にかかる変異を有する抗体AT14-012の変異体も、AT14-012と比較して多様体がCD9に対し高い親和性を有する場合でさえも、血小板を凝集させないという特性を有する。そのため、実施例は、抗体AT14-012の重鎖CDR1、重鎖CDR3配列、及び軽鎖CDR2配列に対して少なくとも80%同一性である重鎖CDR1配列及び／又は重鎖CDR3配列を含む抗体は、CD9の新規エピトープに対する特異性、並びに血小板凝集の非存在（absence of platelet aggregation）などといった、抗体AT14-012と同様の新規及び固有の特性を有することを示す。抗体AT14-012の親和性は、血小板凝集の非存在には関係しないものの、その代わりに、血小板凝集の非存在に伴う重要な特徴には、CD9の固有のエピトープの認識がある。

【0048】

したがって、一実施形態は、図2に示すCD9配列のアミノ酸K169、D171、V172、及びL173からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基を含み、かつ

配列DYAMHと少なくとも80%の配列同一性を有する重鎖CDR1配列と、

重鎖CDR2配列GISWNSGSI VYADSVKGと、

配列AVSGYYPYFDYと少なくとも80%の配列同一性を有する重鎖CDR3配列と、

軽鎖CDR1配列KSSQSVLYSSNNKNYLGと、

配列WASTRESと少なくとも85%の配列同一性を有する軽鎖CDR2配列と、

軽鎖CDR3配列QQYYTTPと、

を含む、CD9のエピトープに特異的な単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそ

これらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、好ましくは、図2に示すCD9配列のK169、D171、V172、L173、及びF176に対応するアミノ酸を含むCD9エピトープに特異的である。

【0049】

抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、図2に示すCD9配列のK169、D171、V172、及びL173からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸を含むCD9エピトープに対し特異的であるかを判定する方法は、当該技術分野では十分にあり、例えば、本明細書において実施例に記載される。実際に、実施例は、CD9に対する結合の仕方、抗体により結合されるCD9のエピトープ、及びCD9に対する抗体親和性を示す。

10

【0050】

実施例は、結合特異性及び親和性に影響を及ぼすことなく、かつ／又は結合特異性及び親和性の度合いに影響を及ぼすことなく、フレームワーク領域における変異を導入可能であることも示す。実際に、重鎖フレームワーク領域1におけるT29N変異、軽鎖フレームワーク領域3におけるL94P変異、及び軽鎖フレームワーク領域4におけるL120V変異（IMG T付番）は、AT14-012の結合に対し、又はaT14-012と比較して結合が改良されているAT14-012の多様体の改良されている結合性に対し大きな影響を及ぼさなかった。

【0051】

前述のとおり、典型的には所与のCDR配列の最大で3つのアミノ酸残基は、種類として同じ結合活性を保持させつつ（本質的に同等なのであって、その量は必ずしも同等ではない）変更可能である。そのため、本発明の結合化合物は、好ましくは、重鎖及び軽鎖CDR1～3配列を含有し、ここで、最大で3つ、好ましくは最大で2つ、より好ましくは最大で1つのアミノ酸は、抗体AT14-012の重鎖及び軽鎖CDR1～3配列と異なっている。いくつかの実施形態では、本発明の結合化合物の重鎖及び軽鎖CDR1～3配列は、抗体AT14-012の重鎖及び軽鎖CDR1～3配列と同一である。したがって、

20

配列DYAMHを有する重鎖CDR1配列と、

配列GISWNSGSI VYADSVKGを有する重鎖CDR2配列と、

配列AVSGYYPYFDYを有する重鎖CDR3配列と、

配列KSSQS VLYSSNNKNYLGを有する軽鎖CDR1配列と、

配列WASTRESを有する軽鎖CDR2配列と、

30

配列QQYYTTPを有する軽鎖CDR3配列と、を含む、単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

【0052】

いくつかの実施形態では、本発明の結合化合物の重鎖及び軽鎖CDR1～3配列は、AT14-012の重鎖及び軽鎖CDR1～3配列と同一であり、抗体AT14-012と同等以上の親和性を有する。

【0053】

したがって、

40

配列DYAMYを有する重鎖CDR1配列と、

配列GISWNSGSI VYADSVKGを有する重鎖CDR2配列と、

配列AVSGYYPYFDYを有する重鎖CDR3配列と、

配列KSSQS VLYSSNNKNYLGを有する軽鎖CDR1配列と、

配列WASTRESを有する軽鎖CDR2配列と、

配列QQYYTTPを有する軽鎖CDR3配列と、を含む、単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

【0054】

したがって、

配列DYAMHを有する重鎖CDR1配列と、

50

配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、
配列 A V S G Y F P Y F D Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、
配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、
配列 W A S T R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、
配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

【 0 0 5 5 】

したがって、

配列 D Y A M H を有する重鎖 C D R 1 配列と、
配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、 10
配列 A V S G Y Y P Y F H Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、
配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、
配列 W A S T R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、
配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

【 0 0 5 6 】

したがって、

配列 D Y A M Y を有する重鎖 C D R 1 配列と、
配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、
配列 A V S G Y F P Y F D Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、 20
配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、
配列 W A S T R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、
配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

【 0 0 5 7 】

したがって、

配列 D Y A M Y を有する重鎖 C D R 1 配列と、
配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、
配列 A V S G Y Y P Y F H Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、
配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、 30
配列 W A S T R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、
配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

【 0 0 5 8 】

したがって、

配列 D Y A M H を有する重鎖 C D R 1 配列と、
配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、
配列 A V S G Y F P Y F H Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、
配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、
配列 W A S T R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、 40
配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

【 0 0 5 9 】

したがって、

配列 D Y A M Y を有する重鎖 C D R 1 配列と、
配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、
配列 A V S G Y F P Y F H Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、
配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、
配列 W A S T R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、
配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは 50

組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

【0060】

更に、

配列 D Y A M Y を有する重鎖 C D R 1 配列と、

配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、

配列 A V S G Y Y P Y F D Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、

配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、

配列 W A S I R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、

配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

10

【0061】

したがって、

配列 D Y A M H を有する重鎖 C D R 1 配列と、

配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、

配列 A V S G Y F P Y F D Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、

配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、

配列 W A S I R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、

配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

20

【0062】

更に、

配列 D Y A M H を有する重鎖 C D R 1 配列と、

配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、

配列 A V S G Y Y P Y F H Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、

配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、

配列 W A S I R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、

配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

30

【0063】

更に、

配列 D Y A M Y を有する重鎖 C D R 1 配列と、

配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、

配列 A V S G Y F P Y F D Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、

配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、

配列 W A S I R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、

配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

【0064】

更に、

配列 D Y A M Y を有する重鎖 C D R 1 配列と、

配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、

配列 A V S G Y Y P Y F H Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、

配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、

配列 W A S I R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、

配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

40

【0065】

更に、

配列 D Y A M H を有する重鎖 C D R 1 配列と、

配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、

50

配列 A V S G Y F P Y F H Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、
 配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、
 配列 W A S I R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、
 配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
 組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

【0066】

更に、

配列 D Y A M Y を有する重鎖 C D R 1 配列と、
 配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、
 配列 A V S G Y F P Y F H Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、
 配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、
 配列 W A S I R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、
 配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
 組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。

【0067】

特に好ましい抗体は：

配列 D Y A M Y を有する重鎖 C D R 1 配列と、
 配列 G I S W N S G S I V Y A D S V K G を有する重鎖 C D R 2 配列と、
 配列 A V S G Y F P Y F D Y を有する重鎖 C D R 3 配列と、
 配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G を有する軽鎖 C D R 1 配列と、
 配列 W A S T R E S を有する軽鎖 C D R 2 配列と、
 配列 Q Q Y Y T T P を有する軽鎖 C D R 3 配列と、を含む、単離された合成若しくは
 組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。実施
 例に示すとおり、かかる抗体は、特に高い親和性を有する（図19Bを参照のこと）。

【0068】

好ましくは、本発明の結合化合物は、抗体 A T 1 4 - 0 1 2 の可変重鎖配列及び／又は
 可変軽鎖配列、あるいは少なくとも80%同一な重鎖及び軽鎖可変配列を含む。抗体 A T
 1 4 - 0 1 2 の重鎖及び軽鎖可変領域も、表1及び図3に記載する。したがって、配列 E
 V Q V V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M H W V R Q A P
 G K G L E W V S G I S W N S G S I V Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L
 Q L N S L R A E D T A F Y Y C A K A V S G Y Y P Y F D Y W G Q G I L V T V S S と
 少なくとも80%の配列同一性を有する重鎖可変領域の配列、及び／又は配列 D I V M T
 Q S P D S L S V S L G E R A T I N C K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G W Y Q Q K
 P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q
 A E D V A V Y Y C Q Q Y Y T T P S T F G Q G T R L E I K と少なくとも80%の配列
 同一性を有する軽鎖可変領域の配列、あるいは、上記の A T 1 4 - 0 1 2 の重鎖及び／又
 は軽鎖可変領域の配列と少なくとも85%、より好ましくは少なくとも86%、より好ま
 しくは少なくとも87%、より好ましくは少なくとも88%、より好ましくは少なくとも
 89%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも91%、より好ま
 しくは少なくとも92%、より好ましくは少なくとも93%、より好ましくは少なくとも
 94%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ま
 しくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも
 99%、又は更には100%同一である配列を含む、本発明の抗体又は機能性部分若しく
 は機能的等価物が更に提供される。好ましくは、重鎖及び軽鎖可変領域において、重鎖 C
 D R 1 配列、C D R 2 配列、及び C D R 3 配列は、配列 D Y A M H (C D R 1)、G I S
 W N S G S I V Y A D S V K G (C D R 2)、及び A V S G Y Y P Y F D Y (C D R 3)
 と少なくとも80%の配列同一性を有し、軽鎖 C D R 1 配列、C D R 2 配列、及び C D R
 3 配列は、配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G (C D R 1)、W A S T R E S (C
 D R 2)、及び Q Q Y Y T T P (C D R 3) と少なくとも80%の配列同一性を有する。
 かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、好ましくは、図2に記載の C D 9 配

10

20

30

40

50

列の K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、及び L 1 7 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸を含む C D 9 エピトープに特異的であり、より好ましくは図 2 に記載の C D 9 配列の K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及び F 1 7 6 に対応するアミノ酸を含む C D 9 エピトープに特異的である。同一性が高くなるほど、結合化合物は抗体 A T 1 4-0 1 2 に類似するようになる。好ましくは、本発明の結合化合物は、表 1 及び図 3 に記載するように、抗体 A T 1 4-0 1 2 の重鎖可変領域の配列と、軽鎖可変領域の配列とを両方含み、あるいは抗体 A T 1 4-0 1 2 と少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 8 5 %、又は少なくとも 8 6 %、又は少なくとも 8 7 %、又は少なくとも 8 8 %、又は少なくとも 8 9 %、又は少なくとも 9 0 %、又は 9 1 %、又は少なくとも 9 2 %、又は少なくとも 9 3 %、又は少なくとも 9 4 %、又は少なくとも 9 5 %、又は少なくとも 9 6 %、又は少なくとも 9 7 %、又は少なくとも 9 8 %、又は少なくとも 9 9 % 同一である重鎖及び軽鎖可変領域の配列を両方含む。

10

【0069】

特に好ましいものは、図 2 に記載の C D 9 配列の K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、及び L 1 7 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸を含む C D 9 エピトープに特異的であり、好ましくは図 2 に記載の C D 9 配列の K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及び F 1 7 6 に対応するアミノ酸を含む C D 9 エピトープに特異的であり、かつ、

重鎖可変領域配列 E V Q V V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M H W V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I V Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q L N S L R A E D T A F Y Y C A K A V S G Y Y P Y F D Y W G Q G I L V T V S S、若しくは

20

E V Q V V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M Y W V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I V Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q L N S L R A E D T A F Y Y C A K A V S G Y F P Y F D Y W G Q G I L V T V S S、若しくは

E V Q V V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M H W V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I V Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q L N S L R A E D T A F Y Y C A K A V S G Y F P Y F D Y W G Q G I L V T V S S、若しくは

30

E V Q V V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M H W V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I V Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q L N S L R A E D T A F Y Y C A K A V S G Y F P Y F H Y W G Q G I L V T V S S、若しくは

E V Q V V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M Y W V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I V Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q L N S L R A E D T A F Y Y C A K A V S G Y F P Y F D Y W G Q G I L V T V S S、若しくは

E V Q V V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M Y W V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I V Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q L N S L R A E D T A F Y Y C A K A V S G Y F P Y F D Y W G Q G I L V T V S S、若しくは

40

E V Q V V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A M Y W V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I V Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q L N S L R A E D T A F Y Y C A K A V S G Y F P Y F H Y W G Q G I L V T V S S、並びに／又は

配列 D I V M T Q S P D S L S V S L G E R A T I N C K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y T T P S T F G Q G T R L E I K と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域の配列 [好ましくは、C D R 1、C D R

50

2、及びCDR3配列は、配列KSSQSVLYSSNNKNYLG(CDR1)、WASTRES(CDR2)、及びQQYYTTP(CDR3)、と少なくとも80%の配列同一性を有する」、より好ましくは軽鎖可変領域の配列DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLGWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQQYYTTPSTFGQGTRLEIK、若しくはDIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLGWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQQYYTTPSTFGQGTRLEIKを含む、抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物である。

10

【0070】

すでに前述しているとおり、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、かかる免疫グロブリンのin vivoにおける安定性の観点から、好ましくは、IgGアイソタイプ、より好ましくはIgG1又はIgG3である。更に、実施例に示すとおり、抗体AT14-012は、抗体がIgG3骨格にある場合に腫瘍細胞における補体依存性細胞傷害(CDC)をトリガー可能である。更に、IgG Fcテール(E345R, Kabat 1991に記載のEU付番)における変異により、標的に対する結合時に抗体を六量体にし、腫瘍細胞の表面上にC1qを付着させ、更にCDCを介した濃度依存性細胞死を誘導する(De Jong 2016)。そのため、特に好ましい実施形態では、本発明の抗体、機能性部分、又は機能的等価物はIgG3アイソタイプである。更に好ましい実施形態では、本発明の抗体、機能性部分、又は機能的等価物は、IgGアイソタイプ、好ましくはIgG1又はIgG3、より好ましくはIgG3であり、アミノ酸位置345(EU付番)にアルギニンを含む。

20

【0071】

実施例に示すとおり、抗体AT14-012は、図2に示すCD9配列のアミノ酸K169、D171、V172、L173、及びF176に特異的に結合可能である。現在では、同じエピトープについてAT14-012と競合する結合化合物を得ることができること、又はかかる化合物が作製可能であることが判明している。例えば、上記のアミノ酸残基のうち少なくとも4つ、好ましくは少なくとも5つ、又は6つを含むCD9ペプチドが提供され、あるいは上記のアミノ酸残基のうち少なくとも4つ、好ましくは少なくとも5つ、又は6つからなるCD9ペプチドが提供され、この場合、非ヒト動物は、かかるCD9ペプチド、又はかかるCD9ペプチドを含む免疫原性化合物、又はかかるCD9ペプチドをコードするそれらの核酸分子若しくは機能的等価物により免疫された後、好ましくは1回以上追加免疫が投与される。続いて、CD9に特異的な抗体は、かかる非ヒト動物から回収される。あるいは、又は更に、CD9特異的B細胞は、かかる非ヒト動物から回収される。かかるCD9特異的B細胞は、CD9に特異的な抗体の産生に特に好適である。かかる免疫動物から回収されたCD9特異的B細胞は、例えば、CD9特異的抗体が得られるハイブリドーマの産生に使用される。他の実施形態では、かかる免疫動物から回収されたかかるCD9特異的B細胞は、例えば、欧州特許第1974017号及び米国特許第9,127,251号に記載のとおり、Bcl-6核酸により形質導入され、及び例えば、Bcl-xL又はMcl-1などの抗/アポトーシス性の核酸により形質導入され、長期にわたりex vivoでのB細胞培養液で培養される。この方法では、B細胞の長期複製培養物が生成され、かかるB細胞は、抗体の複製及び産生の両方を行う。いくつかの実施形態では、かかるハイブリドーマにより又はかかるB細胞の培養により産生されたCD9特異的な抗体は回収され、例えば、好ましくは副作用を低減するために、かかる抗体をヒト化した後で抗CD9治療に使用される。いくつかの実施形態では、かかる非ヒト動物より得られた抗体及び/又はB細胞は、CD9に対する結合に関し、抗体AT14-012と競合性について試験される。かかる試験は、例えば、CD9発現細胞を、かかる非ヒト動物から得られたかかる抗体又はB細胞とともにインキュベートした後で、抗体AT14-012を加えることによりなされる。対照として、CD9発現細胞は、好ましく

30

40

50

は任意のその他の抗体又はB細胞の非存在下で抗体A T 1 4－0 1 2とインキュベートされる。C D 9発現細胞を、かかる非ヒト動物より得られた抗体又はB細胞と予めインキュベートすることで、A T 1 4－0 1 2のかかる細胞に対する結合に影響することは明らかである場合、かかる非ヒト動物より得られたかかる抗体又はB細胞は、C D 9に対する結合に関しA T 1 4－0 1 2と競合するものと判断される。

【0072】

いくつかの実施形態では、かかる非ヒト動物から得られるC D 9特異的B細胞の可変性ドメインをコードする核酸配列は、C D 9特異的な可変ドメインの核酸配列を得ることために配列決定され、その後で、これらの配列を含む1つ以上の核酸分子は、C D 9特異的抗体の産生のため、大腸菌、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、NSO細胞（マウス骨髄腫）又は293（T）細胞などの産生細胞に導入される。かかる1つ以上の核酸配列は、好ましくはかかる産生細胞用にコドン最適化されている。本明細書で使用する
10
とき、用語「コドン」は、特異的なアミノ酸残基をコードするヌクレオチドのトリプレット（又はそれらの機能的等価物）を意味する。用語「コドン最適化」は、もとの動物の核酸配列に由来する1つ以上のコドンが、ある種の産生細胞により好まれる1つ以上のコドンにより置き換えられることを意味する。これらの置き換えコドンは、好ましくは、置き換えられるもとの動物のコドンと同じアミノ酸残基をコードする。

【0073】

いくつかの実施形態では、かかる非ヒト動物から得られた、又はかかる非ヒト動物の免疫細胞から得られたC D 9特異的抗体はヒト化される、すなわち、ヒトにおける有害な副作用を低減させるために、かかる動物のアミノ酸配列の少なくとも一部、好ましくはフレームワーク配列の少なくとも一部又はすべてが、ヒト配列により置き換えられている。
20

【0074】

好適な免疫手順及びアジュバントを含む動物を免疫するプロトコル、かかる免疫動物から抗体及び／又は免疫細胞を得て精製するための手順、競合試験、並びに非ヒト抗体のヒト化手順は当業界で周知である。例えば、Hanly et al, 1995を参照のこと。

【0075】

いくつかの実施形態では、C D 9特異的な免疫グロブリン（典型的には、Fabフラグメント）を同定及び／又は単離するために、図2に示すとおり、K169、D171、V172、L173、T175、及びF176からなる群から選択されるC D 9アミノ酸残基、好ましくは、K169、D171、V172、L173、及びF176からなる群から選択されるC D 9アミノ酸残基のうち、少なくとも4つ、好ましくは少なくとも5つ、又は6つを含む、又はそれらからなるC D 9ペプチド、あるいはかかるC D 9ペプチドを含む化合物は、ファージディスプレイライブラリのスクリーニングに使用される。いくつかの実施形態では、ナープファージディスプレイライブラリが使用される。好ましい実施形態では、一名以上の黒色腫患者に由来するファージディスプレイライブラリが使用されることから、かかるライブラリにはすでに偏りが生じている。いくつかの実施形態では、かかるファージディスプレイライブラリより得られたC D 9特異的免疫グロブリンは、C D 9に対する結合に関し、抗体A T 1 4－0 1 2と競合性について試験される。これは
30
40
例えば、本明細書に記載の競合試験を用い行われる。

【0076】

上記の方法により得られ、産生され、又は選択された抗体は、典型的には、同じC D 9エピトープの少なくとも一部に関し、抗体A T 1 4－0 1 2と競合する。したがって、C D 9に対する結合について、抗体A T 1 4－0 1 2と競合する単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、更に提供される。いくつかの実施形態は、図2に示すように、K169、D171、V172、L173、及びF176からなる群から選択される少なくとも4つのC D 9アミノ酸に対する結合について抗体A T 1 4－0 1 2と競合する、単離された合成若しくは組み換え抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。いくつかの実施形態では、かかる抗体又は
50

機能性部分若しくは機能的等価物は、図2に記載のとおり、K169、D171、V172、L173、及びF176からなる群から選択されるCD9のアミノ酸のうち少なくとも4つ、又は少なくとも5つに対する結合性について抗体AT14-012と競合する。いくつかの実施形態では、かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、図2に記載のとおり、CD9のアミノ酸であるK169、D171、V172、L173、及びF176に対する結合性について抗体AT14-012と競合する。

【0077】

本発明の別の態様は、別の化合物に結合する本発明の抗体若しくは機能性部分又は機能的等価物を提供する。一実施形態では、本発明の結合化合物は、化学療法剤、又は他の毒性化合物、又は放射性化合物などの別の治療部分に結合して、いわゆる「抗体薬物コンジュゲート」を形成する。別の実施形態では、本発明の結合化合物に結合する部分は、例えば、CD3特異的抗体などの免疫調節分子である。このようなCD3特異的抗体はT細胞に結合することができ、本発明の結合化合物に結合した場合には、T細胞を、黒色腫細胞のようなCD9を含む細胞を容易に標的化し、これにより抗黒色腫T細胞応答を高める。これは、更に強い抗黒色腫効果をもたらす。したがって、本発明の1つの好ましい実施形態は、本発明のCD9特異的結合化合物と、免疫調節分子、好ましくはCD3特異的結合化合物とを含む、二重特異的又は多重特異的な結合化合物を提供する。別の好ましい実施形態は、抗CD9化合物を提供し、かかる化合物は、CD9に特異的な本発明の結合化合物と、毒性部分とを含む。いくつかの他の実施形態では、本発明の結合化合物は、標識と連結している。これにより、例えば、かかる標識された結合化合物を使用して、黒色腫細胞などのCD9含有細胞を検出することが可能になる。他の実施形態は、別のCD9特異的結合化合物に連結した本発明の結合化合物を提供する。いくつかの実施形態では、かかるその他のCD9特異的結合化合物も、本発明の結合化合物である。したがって、互いに連結している本発明の結合化合物、例えば、2つの連結したAT14-012抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を2つ含む化合物、が提供される。いくつかの実施形態では、本発明の結合化合物は、二重特異性化合物を産生することために、例えば、既知の抗CD9抗体などの別のCD9特異的結合化合物に連結されている。いくつかの実施形態では、抗体AT14-012の重鎖は、二重特異性抗体を産生するために、別のCD9特異的抗体の重鎖と対形成されている。本発明の二重特異性化合物及び二重特異性抗体により、例えば、特に、かかる2つの連結した結合化合物が異なるCD9エピトープに特異的なものである場合に、CD9含有細胞に対する結合性を向上させることができる。このような二重特異性化合物及び／又は二重特異性抗体はそれ故、治療又は診断用途に非常に適している。本発明の二重特異性化合物及び二重特異性抗体は、異なるCD9含有細胞が同一の二重特異的結合性化合物に結合しているアッセイにおいても使用することができる。

【0078】

いくつかの実施形態では、合成又は組み換え抗体が提供される、あるいは本発明の抗体の1つのFabフラグメント、好ましくはAT14-012フラグメント、及び別のCD9特異的抗体の1つのFabフラグメントを含む、それらの機能性部分又は機能的等価物が提供される。得られる結合化合物は、CD9に対して単一特異的であるが、各Fabアームは、典型的には自己のCD9エピトープに結合する。いくつかの実施形態では、Fabフラグメントによって認識されるエピトープは互いに異なる。別の実施形態では、エピトープは同じである。Fabアームは、親和性の異なるエピトープに結合することができる。あるいは、Fabアームは、それらのエピトープを本質的に同じ親和性で結合し、すなわち、FabアームのKDの差は、互いに30%以下、好ましくは20%以下、又は10%以下である。

【0079】

いくつかの実施形態では、合成又は組み換え抗体が提供される、あるいは本発明の抗体の1つのFabフラグメント、好ましくはAT14-012フラグメント、及び別の抗体の1つのFabフラグメントを含む、それらの機能性部分又は機能的等価物が提供される

。例えば、このような抗体は、本発明の抗体の1つのF a bフラグメントと、相補的な調節タンパク質に特異的なブロッキング抗体又は共抑制的 (co-inhibitory) T細胞分子に特異的なブロッキング抗体の、1つのF a bフラグメントと、を含む。かかる抗体中に存在するF a bフラグメントに由来する相補的な調節タンパク質に特異的なブロッキング抗体の好ましい例は、C D 5 5ブロッキング抗体、C D 4 6ブロッキング抗体、又はC D 5 9ブロッキング抗体、より好ましくはC D 5 5ブロッキング抗体である。かかる抗体に存在するF a b断片に由来する共抑制的T細胞分子に特異的なブロッキング抗体に対するブロッキング抗体の好ましい例は、抗C T L A 4抗体、抗P D - 1抗体、抗P D - L 1抗体、抗P D - L 2抗体、抗S I R P α抗体、抗T I M 3抗体、抗L A G 3抗体、抗C D 2 7 6抗体、抗C D 2 7 2抗体、抗K I R抗体、抗A 2 A R抗体、抗V I S T A抗体、及び抗I D O抗体、好ましくは抗P D - 1抗体、又は抗P D - L 1抗体である。 10

【0080】

したがって、別の化合物に連結した本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物が更に提供される。いくつかの実施形態では、かかるその他の化合物は、検出可能な標識、化学療法剤、毒性部分、免疫調節分子、別のC D 9特異的結合化合物、又は放射性化合物である。いくつかの実施形態では、別の化合物、例えば、前述の化合物のうちのいずれか1つに連結した、抗体A T 1 4 - 0 1 2を提供する。いくつかの実施形態は、抗体A T 1 4 - 0 1 2のF a bフラグメントと別のC D 9特異的抗体のF a bフラグメントとを含む二重特異性抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。いくつかの実施の形態は、別のC D 9特異的抗体と対形成している抗体A T 1 4 - 0 1 2の重鎖を含む、二重特異性抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。 20

【0081】

いくつかの実施形態では、本発明の結合化合物は、例えば、酸不安定性ヒドラゾンリンカー、若しくは国際公開第2010/087994号に詳述される、シトルリン-バリンのようなペプチドリンカーなどのリンカーを開始、又はチオエーテル結合により、又はソルターゼAにより触媒されるアミド基転移により、例えば化学療法剤又はC D 3特異的抗体などの別の部分と連結される。

【0082】

ソルターゼにより触媒されるアミド基転移は、抗体重鎖上、好ましくは重鎖のC末端部分上、及びかかる抗体に連結した部分上のソルターゼ認識部位 (L P E T G G) の操作を含む。抗体及び部分は、更に典型的には、G G G G S配列と、精製目的のためのH I Sタグなどのタグとを含有する。次に、ソルターゼにより介在されるアミド基転移が実施された後、クリックケミストリーによる結合が実施される。ソルターゼにより触媒されるアミド基転移では、「クリックケミストリー結合」は、抗体重鎖上のソルターゼモチーフへの、及び抗体に連結される部分 (タンパク質、ペプチド、又は抗体) 上のソルターゼモチーフへのグリシンの付加を介し、ソルターゼにより付加される、例えば、アルキン含有試薬、及び例えば、アジド含有試薬の化学的カップリングを典型的には含む。したがって、一実施形態では、本発明は、ソルターゼ認識部位 (L P E T G G) が抗体の重鎖上に、好ましくは重鎖のC末端部分上に設計 (engineered) され、好ましくは、G G G G S配列と、H I Sタグなどの精製タグとを更に含有する、本発明の抗体を提供する。 30 40

【0083】

別の実施形態では、本発明の結合化合物は、チオエーテル結合を介して別の部分に連結されている。このような場合、本発明の結合化合物には、1つ以上のシステインが組み込まれていることが好ましい。システインはチオール基を含み、したがって本発明の結合化合物に1つ以上のシステインを組み込むことにより、又は本発明の結合化合物を1つ以上のシステインによる1つ以上でアミノ酸の置き換えることにより、かかる結合化合物を別の部分に連結させることが可能である。かかる1つ以上のシステインは、好ましくは、かかる結合化合物の折りたたみに著しい影響を及ぼさず、かつ抗原結合又はエフェクター機能を著しく変化させない部分において、本発明の結合化合物に導入される。したがって、本発明は、抗体A T 1 4 - 0 1 2の重鎖配列を含む本発明の結合化合物も提供し、ここで 50

、かかる A T 1 4 - 0 1 2 配列の少なくとも 1 つのアミノ酸（システイン以外）は、システインにより置き換えられている。

【 0 0 8 4 】

本発明の別の態様は、別の治療薬と組み合わせられた本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。例えば、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、C D 9 発現細胞と関連する疾患、好ましくは、C D 9 陽性癌、骨粗鬆症、関節炎、肺炎症、C O P D、大腸炎、及び自然リンパ球に関連する疾患からなる群から選択される疾患を少なくともある程度治療又は予防することのできる別の薬剤と組み合わせられる。本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、C D 9 陽性癌の治療及び／又は予防に有用である別の治療薬と組み合わせられるかかる薬剤の例は、相補的調節タンパク質、共抑制的 T 細胞分子に特異的な抗体、変異した B R A F（例えば、ベムラフェニブ又はダブラフェニブ）に対する少分子、及びその他の化学療法剤である。したがって、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を、C D 9 発現細胞、好ましくは C D 9 陽性癌と関連する疾患の治療及び／又は予防に有用な治療薬と組み合わせることにより、本発明の C D 9 発現細胞に関連する疾患を少なくともある程度治療又は予防するための使用又は方法が提供される。本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物と、C D 9 発現細胞、好ましくは C D 9 陽性癌に関連する疾患の治療及び／又は予防に有用な治療薬とを含むパーツからなるキットも提供される。かかる薬剤の好ましく、かつ非限定例は、相補的調節タンパク質、共抑制的 T 細胞分子に特異的な抗体、変異した B R A F（例えば、ベムラフェニブ又はダブラフェニブ）に対する少分子、及びその他の化学療法剤である。例えば、実施例は、抗体 A T 1 4 - 0 1 2 E 3 4 5 R が腫瘍細胞を、C 3 転換酵素形成の阻害剤である C D 5 5 を発現しないヒト補体因子の存在下で、C D C により効果的に殺傷することを示す。そのため、かかる抗体を、C 3 転換酵素の形成を刺激可能な、又は C 3 転換酵素の形成の阻害を中和可能な薬剤、例えば C D 5 5 ブロッキング抗体と組み合わせたときに、腫瘍細胞の補体依存性細胞死が誘導され得る。ブロッキングにより C D C を増強する、C D 4 6 ブロッキング抗体又は C D 5 9 ブロッキング抗体などといった、その他の補体調節タンパク質に対する抗体も、本発明の抗体、機能性部分、又は機能的等価物と有利に組み合わせることができる。

【 0 0 8 5 】

したがって、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を、C 3 転換酵素の形成を刺激可能な、又は C 3 転換酵素の形成の阻害に対抗可能な薬剤と組み合わせることにより、本発明の C D 9 発現細胞に関連する疾患を少なくともある程度治療又は予防するための使用又は方法が提供される。かかる薬剤は、好ましくは C D 5 5 ブロッキング抗体、C D 4 6 ブロッキング抗体、又は C D 5 9 ブロッキング抗体、より好ましくは C D 5 5 ブロッキング抗体である。かかる疾患は、好ましくは、C D 9 陽性癌であり、より好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、膵臓癌、食道癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌（stomach cancer）、扁平上皮癌、A M L、多発性骨髄腫、胃癌（gastric cancer）、肝癌、脳癌、カポジ肉腫、粘表皮癌、絨毛癌、線維肉腫、子宮頸癌、神経膠腫、腺癌、肺腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、及び小細胞肺癌からなる群から選択される。

【 0 0 8 6 】

本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物と、C D 9 発現細胞、好ましくは C D 9 陽性癌に関連する疾患の治療及び／又は予防に有用な治療薬とを含むパーツからなるキットも提供される。好ましい実施形態では、かかる薬剤は、C 3 転換酵素の形成を刺激可能な、又は C 3 転換酵素の形成の阻害を中和可能な薬剤である。かかる薬剤は、好ましくは C D 5 5 ブロッキング抗体、C D 4 6 ブロッキング抗体、又は C D 5 9 ブロッキング抗体、より好ましくは C D 5 5 ブロッキング抗体である。核酸分子又は機能的等価物、本発明のベクター又は細胞、及び C 3 転換酵素の形成を刺激可能な又は C 3 転換酵素の形成阻害を中和可能な薬剤を含むパーツからなるキットも提供される。かかる薬剤は、好ましくは C D 5 5 ブロッキング抗体、C D 4 6 ブロッキング抗体、又は C D 5 9 ブロッキング抗体、より好ましくは C D 5 5 ブロッキング抗体である。

【0087】

本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物は、更に所望により、PD1-PDL1系の抗体ブロッキングなどといった共抑制的T細胞分子に特異的な抗体と更に組み合わせられる。PD1-PDL1系をブロックする抗体、特にPD1に結合するものは、現在では、様々な後期癌患者の治療に広範に使用されている。実施例は、抗体AT14-012を、抗PD-1抗体であるニボルマブ（Opdivo, Bristol-Myers Squibb）と組み合わせると、AT14-012のみによる治療と比較して、腫瘍増殖の抑制が強く増強されることを示す。

【0088】

共抑制性T細胞分子に対する抗体は、好ましくはブロッキング抗体である。本明細書で使用する時、「ブロッキング抗体」は、抗原に対して結合することで、抗原とその標的との相互作用を低減又はブロックする抗体又はフラグメントを指す。例えば、CTLA-4に対するブロッキング抗体は、細胞発現したCD80及びCD86（B7-1及びB7-2）への可溶性ヒトCTLA-4の結合を低減又はブロックすることにより、CTLA-4のT細胞抑制活性を抑制する抗体を指す。共抑制的なT細胞分子に対し好適な抗体としては、限定するものではないが、細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）、programmed death-1（PD-1）、PD-リガンド1（PD-L1）、PD-L2、シグナル調節タンパク質α（SIRPα）、T細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン-3含有分子3（TIM3）、リンパ球活性遺伝子3（LAG3）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、CD276、CD272、A2AR、VISTA、及びインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ（IDO）に対し特異的なブロッキング抗体が挙げられる。

【0089】

したがって、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を、共抑制的T細胞分子に特異的なブロッキング抗体と組み合わせることにより、本発明のCD9発現細胞に関連する疾患を少なくともある程度治療又は予防するための使用又は方法が提供される。かかる抗体は、好ましくは、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗SIRPα抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗CD276抗体、抗CD272抗体、抗KIR抗体、抗A2AR抗体、抗VISTA抗体、及び抗IDO抗体からなる群から選択される。更なる免疫療法成分として使用するのに好適な抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ランブロリズマブ、イピリムマブ、及びリリルマブ（lirilumab）である。特に好ましい実施形態では、かかる抗体は、PD1-PDL1系をブロッキングする抗体、例えば抗PD1抗体又は抗PDL1抗体、より好ましくは抗PD1抗体である。かかる疾患は、好ましくは、CD9陽性癌であり、より好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、膵臓癌、食道癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、扁平上皮癌、AML、多発性骨髄腫、胃癌、肝癌、脳癌、カポジ肉腫、粘表皮癌、絨毛癌、線維肉腫、子宮頸癌、神経膠腫、腺癌、肺腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、及び小細胞肺癌からなる群から選択される。

【0090】

本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物と、共抑制的T細胞分子に特異的なブロッキング抗体とを含むパーツからなるキットもまた提供される。核酸分子又は機能的等価物と、本発明のベクター又は細胞と、共抑制的T細胞分子に特異的なブロッキング抗体とを含むパーツからなるキットもまた提供される。かかる抗体は、好ましくは、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗SIRPα抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗CD276抗体、抗CD272抗体、抗KIR抗体、抗A2AR抗体、抗VISTA抗体、及び抗IDO抗体からなる群から選択される。更なる免疫療法成分として使用するのに好適な抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ランブロリズマブ、イピリムマブ、及びリリルマブ（lirilumab）である。特に好ましい実施形態では、かかる抗体は、PD1-PDL1系をブロッキングする抗体、例えばPD1ブロッキング抗体又はPDL1ブロッキング抗体、より好ましくはPD1ブロッキング

抗体である。

【0091】

本発明のパーツからなるキットは、本発明の抗体、機能性部分、又は機能的等価物を含む医薬組成物と、C3転換酵素の形成を刺激可能な薬剤、又はC3転換酵素の形成の抑制を中和可能な薬剤、好ましくはCD55ブロッキング抗体、又は共抑制的T細胞分子に特異的なブロッキング抗体、好ましくはPD1若しくはPD-L1ブロッキング抗体を含む、医薬組成物とを充填した、1つ以上の容器も含み得る。パーツ又は1つ以上の容器のキットは、所望により、医薬的に許容され得る1つ以上の賦形剤を更に含む。このようなパーツ又は容器のキットと関連するものとして、これらは様々な記述資料、例えば使用のための取扱説明書、又は販売を規制する政府機関によって規定された形態の注意書きとすることができ、この注意書きは、製造、使用、又は販売の機関による承認を反映している。好ましくは、パーツからなるキットは、使用のための取扱説明書を含む。

10

【0092】

請求項1～15のいずれか一項に記載の抗体、又は機能性部分若しくは機能的等価物と、CD9発現細胞に関連する疾患（好ましくはCD9陽性の癌）の治療及び／又は予防に有用な治療薬と、医薬的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤と、を含む、医薬組成物も提供される。好ましい実施形態では、かかる薬剤は、C3転換酵素の形成を刺激可能である、又はC3転換酵素の形成の阻害を中和可能である薬剤であり、好ましくは、CD55ブロッキング抗体、CD46ブロッキング抗体、又はCD59ブロッキング抗体、より好ましくはCD55ブロッキング抗体である。更に好ましい実施形態では、かかる薬剤は、共抑制的T細胞分子に特異的なブロッキング抗体であり、好ましくは、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗SIRPα抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗CD276抗体、抗CD272抗体、抗KIR抗体、抗A2AR抗体、抗VISTA抗体、及び抗IDO抗体、より好ましくはPD1ブロッキング抗体、又はPD-L1ブロッキング抗体からなる群から選択される。

20

【0093】

同様にして、本明細書により、本発明の抗体、機能性部分若しくは機能的等価物、又は結合化合物の少なくとも1つのCDR領域をコードする核酸分子及びそれらの機能的等価物、及びベクターが提供される。好ましくは、かかる結合化合物の少なくとも重鎖CDR1～3領域と、軽鎖CDR1～3領域は、本発明の1つ以上の核酸分子又は機能的等価物又はベクターによりコードされる。いくつかの実施形態では、本発明の結合化合物の重鎖及び軽鎖可変領域がコードされる。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物の少なくとも1つのCDR領域をコードする、少なくとも15ヌクレオチド長の単離された合成若しくは組み換え核酸分子、又はそれらの機能的等価物、又はベクターを提供する。好ましくは、かかるCDR領域は、抗体AT14-012、又は抗体AT14-012と同等以上の結合親和性を有する、本明細書に記載のその変異体に由来するCDR領域である。

30

【0094】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸分子は、少なくとも30ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも50ヌクレオチド長、より好ましくは少なくとも75ヌクレオチド長を有する。本発明の核酸分子は、例えば、本発明の抗体を産生可能なB細胞から単離される。かかるB細胞は、好ましくは、抗体AT14-012、又は抗体AT14-012と同等以上の結合親和性を有する本明細書に記載のその変異体を産生する。いくつかの実施形態は、少なくとも、AT14-012、又は抗体AT14-012と同等以上の結合親和性を有する本明細書に記載のその変異体の重鎖CDR3配列及び軽鎖CDR3配列をコードする、1つ以上の核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターを提供する。

40

【0095】

本明細書で使用するとき、用語「本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物の少なくとも1つのCDR領域をコードする、少なくとも15ヌクレオチド長の単離された合成若しくは組み換え核酸分子、又はその機能的等価物」は、本明細書において、「本発

50

明の核酸分子又は機能的等価物」も指す。

【0096】

本明細書で使用する時、本発明の核酸分子又は核酸配列は、好ましくは、ヌクレオチド鎖を含み、より好ましくはDNA、cDNA、又はRNAを含む。他の実施形態では、本発明の核酸分子又は核酸配列は、例えば、DNA/RNAヘリックス、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（locked nucleic acid）（LNA）、及び／又はリボザイムなどの、その他の種類の核酸構造物を含む。このようなその他の核酸構造物は、核酸配列の機能的等価物と呼ばれる。したがって、用語「核酸分子の機能的等価物」は、天然のヌクレオチドと同じ機能を示す非天然のヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、及び／又は非ヌクレオチド構築ブロックを含む鎖を包含する。

10

【0097】

抗体AT14-012の重鎖及び軽鎖CDR領域をコードする核酸配列を表1及び図3に示す。表1及び図3に記載のCDR核酸配列のうちのいずれか1つと異なる配列を有するものの、表1及び図3に示すものと同じCDRアミノ酸配列をコードする核酸コドンが存在する核酸分子も本発明により包含される。例えば、かかる核酸分子は、例えば、抗体AT14-012と同様のCDRアミノ酸配列を有する本発明の結合化合物の大量産生を可能にする、大腸菌、又はチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、NSO細胞（マウス骨髄腫）又は293（T）細胞などといった産生細胞用にコドン最適化されている、核酸配列を含む。抗体産生が任意の組み換え抗体産生系によりなされ得ることに留意されたい。本明細書に記載される4とおりの産生細胞系は、現在までに使用可能な数多くの系のうちのわずか数例に過ぎない。本明細書で使用する時、用語「コドン」は、特定のアミノ酸残基をコードするヌクレオチドのトリプレット（又はそれらの機能的等価物）を意味する。用語「コドン最適化」は、もとのヒト核酸配列に由来する1つ以上のコドンが、ある種の抗体産生系により好まれる1つ以上のコドンにより置き換えられることを意味する。これらの置き換えコドンは、好ましくは、置き換えられるもとのヒトコドンと同じアミノ酸残基をコードする。あるいは、1つ以上の置き換えコドンは、異なるアミノ酸残基をコードする。これにより、好ましくは保存的アミノ酸置換が生じるものの、これは必須ではない。典型的には、定常領域及びフレームワーク領域において1つ以上のアミノ酸置換が概して許容される。CDR領域には、置換されたもとのヒトコドンと同じアミノ酸残基をコードするコドンを使用することが好ましい。

20

30

【0098】

更に、抗体AT14-012のCDR配列と同一ではないもののこれをベースとしている重鎖又は軽鎖CDRをコードする核酸分子も、得られるCDRが抗体AT14-012のCDR配列と少なくとも80%の配列同一性を有するのであれば本発明に包含される。

【0099】

したがって、更に、抗体AT14-012のCDR配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む核酸分子若しくはそれらの機能的等価物、又はベクターが提供される。好ましくは、得られるCDRは、本発明の抗体のもとのCDR配列と、3つ以下、好ましくは2つ以下、好ましくはわずか1つのアミノ酸のみが異なる。

40

【0100】

いくつかの実施形態は、少なくとも、抗体AT14-012、又は同等以上の結合親和性を有するそれらの多様体の、重鎖CDR1～3領域と軽鎖CDR1～3領域とをコードする、本発明の1つ以上の核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターを提供する。したがって、

配列DYAMH若しくはDYAMYをコードする核酸配列をコードする重鎖CDR1、及び／又は

配列GISWNSGSIIVYADSVKGをコードする核酸配列をコードする重鎖CDR2、及び／又は

50

配列 A V S G Y Y P Y F D Y、若しくは A V S G Y F P Y F D Y、若しくは A V S G Y Y P Y F H Y、若しくは A V S G Y F P Y F H Y をコードする核酸配列をコードする重鎖 C D R 3、及び／又は

配列 K S S Q S V L Y S S N N K N Y L G をコードする核酸配列をコードする軽鎖 C D R 1、及び／又は

配列 W A S T R E S 若しくは W A S I R E S をコードする核酸配列をコードする軽鎖 C D R 2、及び／又は

配列 Q Q Y Y T T P をコードする核酸配列をコードする軽鎖 C D R 3、を含む、本発明の 1 つ以上の核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターが更に提供される。

【0101】

更に、

g a t t a t g c c a t g c a c と、
g g t a t t a g t t g g a a t a g t g g t a g c a t a g t
c t a t g c g g a c t c t g t g a a g g g c と、
g c c g t g a g t g g t t a t t a t c c c t a c t t t g a
c t a c と、
a a g t c c a g c c a g a g t g t t t t a t a c a g c t c
c a a c a a t a a g a a c t a c t t a g g t と、
t g g g c a t c t a c c c g g g a a t c c と、
c a g c a a t a t t a t a c t a c t c c t と、からなる群から選択
される 1 つ以上の配列と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列を含む、1 つ以上の
核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターが提供される。

【0102】

これらは、表 1 及び図 3 に記載の抗体 A T 1 4 0 1 2 の重鎖及び軽鎖 C D R 1 ~ 3 核酸配列である。いくつかの実施形態では、かかる配列同一性は、少なくとも 85 %、又は少なくとも 86 %、又は少なくとも 87 %、又は少なくとも 88 %、又は少なくとも 89 %、又は少なくとも 90 %、又は少なくとも 91 %、又は少なくとも 92 %、又は少なくとも 93 %、又は少なくとも 94 %、又は少なくとも 96 %、又は少なくとも 96 %、又は少なくとも 97 %、又は少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 %、又は 100 % である。

【0103】

好ましくは、上記の A T 1 4 - 0 1 2 の重鎖及び軽鎖 C D R 1 ~ 3 配列、又はこれらと少なくとも 80 % 同一である配列がすべて存在する。したがって更に、

配列 g a t t a t g c c a t g c a c と少なくとも 80 % の配列同一性を有する核酸配列をコードする重鎖 C D R 1 と、

配列 g g t a t t a g t t g g a a t a g t g g t a g c a t a
g t c t a t g c g g a c t c t g t g a a g g g c と少なくとも 80 %
の配列同一性を有する配列をコードする重鎖 C D R 2 と、

配列 g c c g t g a g t g g t t a t t a t c c c t a c t t t
g a c t a c と少なくとも 80 % の配列同一性を有する配列をコードする重鎖 C D R 3
と、

配列 a a g t c c a g c c a g a g t g t t t t a t a c a g c
t c c a a c a a t a a g a a c t a c t t a g g t と少なくとも 80 %
の配列同一性を有する配列をコードする軽鎖 C D R 1 と、

配列 t g g g c a t c t a c c c g g g a a t c c と少なくとも 80 %
の配列同一性を有する配列をコードする軽鎖 C D R 2 と、

配列 c a g c a a t a t t a t a c t a c t c c t と少なくとも 80 %
の配列同一性を有する配列をコードする軽鎖 C D R 3 と、を含む 1 つ以上の核酸分子若しくは機能的等価物、又はベクターが提供される。

【0104】

いくつかの実施形態では、かかる配列同一性は、少なくとも85%、又は少なくとも86%、又は少なくとも87%、又は少なくとも88%、又は少なくとも89%、又は少なくとも90%、又は少なくとも91%、又は少なくとも92%、又は少なくとも93%、又は少なくとも94%、又は少なくとも96%、又は少なくとも96%、又は少なくとも97%、又は少なくとも98%、又は少なくとも99%、又は100%である。好ましくは、コードされるCDRアミノ酸配列は、抗体AT14-012の重鎖及び軽鎖CDR1～3アミノ酸配列と、3つ以下、好ましくは2つ以下、好ましくはわずか1つのアミノ酸のみが異なる。

【0105】

いくつかの実施形態は、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物の少なくとも重鎖可変領域の配列及び／又は軽鎖可変領域の配列をコードする、本発明の核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターを提供する。好ましくは、かかる少なくとも1つの核酸分子、又は機能的等価物若しくはベクターは、少なくとも抗体AT14-012の重鎖可変領域の配列、及び／又は軽鎖可変領域の配列、かかる配列と少なくとも80%同一である配列をコードする。

【0106】

したがって、更に、配列 g a a g t g c a g g t g g t g g a g t c t
g g g g g a g g c t t g g t a c a g c c t g g c a g g t c c
c t g a g a c t c t c c t g t g c a g c c t c t g g a t t c
a c c t t t g a t g a t t a t g c c a t g c a c t g g g t c
c g g c a a g c t c c a g g g a a g g g c c t g g a g t g g
g t c t c a g g t a t t a g t t g g a a t a g t g g t a g c
a t a g t c t a t g c g g a c t c t g t g a a g g g c c g a
t t c a c c a t c t c c a g a g a c a a c g c c a a g a a c
t c c c t g t a t c t g c a a c t g a a c a g t c t g a g a
g c t g a g g a c a c g g c c t t c t a t t a c t g t g c a
a a a g c c g t g a g t g g t t a t t a t c c c t a c t t t
g a c t a c t g g g g c c a g g g a a t t t t g g t c a c c
g t c t c c t c a と少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、及び／又は配列 g a c a t c g t g a t g a c c c a g t c t c c a g a c t
c c c t g t c t g t g t c t c t g g g c g a g a g g g c c a
c c a t c a a c t g c a a g t c c a g c c a g a g t g t t t
t a t a c a g c t c c a a c a a t a a g a a c t a c t t a g
g t t g g t a c c a g c a g a a a c c a g g a c a g c c t c
c t a a g c t g c t c a t t t a c t g g g c a t c t a c c c
g g g a a t c c g g g g t c c c t g a c c g a t t c a g t g
g c a g c g g g t c t g g g a c a g a t t t c a c t c t c a
c c a t c a g c a g c c t g c a g g c t g a a g a t g t g g
c a g t t t a t t a c t g t c a g c a a t a t t a t a c t a
c t c c t t c c a c c t t c g g c c a a g g g a c a c g a c
t g g a g a t t a a a と少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、1つ以上の核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターが提供される。

【0107】

好ましくは、本発明の1つ以上の核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターは、表1及び図3に示すAT14-012の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域に類似した重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の両方をコードする。したがって、更に、配列 g a a g t g c a
g g t g g t g g a g t c t g g g g g a g g c t t g g t a c a
g c c t g g c a g g t c c c t g a g a c t c t c c t g t g c
a g c c t c t g g a t t c a c c t t t g a t g a t t a t g c
c a t g c a c t g g g t c c g g c a a g c t c c a g g g a a

g g g c c t g g a g t g g g t c t c a g g t a t t a g t t g
 g a a t a g t g g t a g c a t a g t c t a t g c g g a c t c
 t g t g a a g g g c c g a t t c a c c a t c t c c a g a g a
 c a a c g c c a a g a a c t c c c t g t a t c t g c a a c t
 g a a c a g t c t g a g a g c t g a g g a c a c g g c c t t
 c t a t t a c t g t g c a a a a g c c g t g a g t g g t t a
 t t a t c c c t a c t t t g a c t a c t g g g g c c a g g g
 a a t t t t g g t c a c c g t c t c c t c a と少なくとも 80 % の配
 列同一性を有する配列を含む、及び／又は配列 g a c a t c g t g a t g a c c
 c a g t c t c c a g a c t c c c t g t c t g t g t c t c t g
 g g c g a g a g g g c c a c c a t c a a c t g c a a g t c c
 a g c c a g a g t g t t t t a t a c a g c t c c a a c a a t
 a a g a a c t a c t t a g g t t g g t a c c a g c a g a a a
 c c a g g a c a g c c t c c t a a g c t g c t c a t t t a c
 t g g g c a t c t a c c c g g g a a t c c g g g g t c c c t
 g a c c g a t t c a g t g g c a g c g g g t c t g g g a c a
 g a t t t c a c t c t c a c c a t c a g c a g c c t g c a g
 g c t g a a g a t g t g g c a g t t t a t t a c t g t c a g
 c a a t a t t a t a c t a c t c c t t c c a c c t t c g g c
 c a a g g g a c a c g a c t g g a g a t t a a a と少なくとも 80
 % の配列同一性を有する配列を含む、1 つ以上の核酸分子若しくは機能的等価物又はベク
 ターが提供される。

10

20

【0108】

いくつかの実施形態では、かかる配列同一性は、少なくとも 85 %、又は少なくとも 86 %、又は少なくとも 87 %、又は少なくとも 88 %、又は少なくとも 89 %、又は少なくとも 90 %、又は少なくとも 91 %、又は少なくとも 92 %、又は少なくとも 93 %、又は少なくとも 94 %、又は少なくとも 96 %、又は少なくとも 96 %、又は少なくとも 97 %、又は少なくとも 98 %、又は少なくとも 99 %、又は 100 % である。

【0109】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体又は機能性部分若しくは等価物をコードする核酸分子及びそれらの機能的等価物並びにベクターが提供される。いくつかの実施形態では、抗体 A T 1 4 - 0 1 2、又はその機能性部分、若しくは機能的等価物をコードする核酸分子及びそれらの機能的等価物並びにベクターが提供される。いくつかの実施形態では、かかる核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターは、大腸菌、C H O、N S O、又は 2 9 3 細胞といった非ヒト宿主細胞などの非ヒト組み換え発現系のためにコドン最適化されている。

30

【0110】

いくつかの実施形態では、本発明の核酸分子又は機能的等価物を含むベクターが提供される。本明細書で使用するとき、「本発明の核酸分子又は機能的等価物を含むベクター」は、「本発明のベクター」としても参照される。これらの用語は、本発明の 1 つ以上の核酸分子又は機能的等価物を含む本発明の 1 つ以上のベクターを包含する。本明細書で使用するとき、単数に関する用語「a」は、用語「1 つ以上 (one or more)」を包含する。

40

【0111】

本発明の 1 つ以上の核酸分子又は機能的等価物を含むベクターを構築するための方法もまた、当業界で知られている。本発明のベクターを作製するのに適したベクターの非限定例は、レトロウイルスベクター及びシチウイルスベクターである。かかるベクターは、様々な用途に適している。例えば、本発明の治療的に有益な核酸配列を含む本発明のベクターは、黒色腫の予防又は治療用途に適している。このようなベクターを、かかるベクターの投与を必要としている個体、好ましくはヒトに投与することで、かかる予防又は治療用核酸配列の *in vivo* での発現が生じ、これにより黒色腫の少なくともある程度の治

50

療又は予防がもたらされる。かかるベクターは、対象とする核酸分子の *in vitro* での発現、例えば、本発明の抗体又は機能的等価物の（商用）産生に関する用途にも使用できる。そのため、本発明の核酸分子、機能的等価物及びベクターは、CD9に特異的な本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を生成するのに特に有用である。このような生成は、核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターを細胞に導入することによりなされ、細胞の核酸翻訳機構により、コードされた抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物が産生される。いくつかの実施形態では、本発明の結合化合物の重鎖及び軽鎖可変領域をコードする少なくとも1つの核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターは、例えば、大腸菌、CHO、NSO、又は293（T）細胞などの、いわゆる産生細胞において発現され、これらのうちのいくつかは商用の抗体産生に適している。注目すべきことに、任意の組み換え抗体産生系が好適であり、言及したこれらの4とおりの産生細胞系は、現在までに使用可能である数多くの系のうちのごくわずかな例に過ぎない。本明細書において前述したとおり、このような場合では、核酸分子又はそれらの機能的等価物を使用することが好ましく、ここで、本明細書で提供されるもとのヒトAT14-012配列は、産生細胞用にコドン最適化されている。かかる産生細胞の増殖により、本発明の結合化合物を産生可能な産生細胞株が得られる。好ましくは、かかる産生細胞株は、ヒトにおける使用のための抗体を産生するのに適している。そのため、かかる産生細胞株は、好ましくは、病原性微生物などの病原性物質を含まない。いくつかの実施形態では、抗体AT14-012はかかる産生細胞株で産生される。

10

【0112】

20

したがって、本発明の少なくとも1つの核酸分子及び／若しくは機能的等価物並びに／又はベクターを含む、単離された又は組み換え細胞が提供される。かかる細胞は、好ましくは本発明の結合化合物が産生可能な抗体産生細胞、例えば抗体AT14-012などである。本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を産生するための方法が更に提供され、かかる方法は、本発明の少なくとも1つの核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターを細胞に供給することと、かかる細胞に、かかる少なくとも1つの核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターを翻訳させて、本発明のかかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を産生させることと、を含む。いくつかの実施形態では、かかる抗体は、重鎖変異H40Y、Y112F、及びD116H並びに／又は軽鎖変異T66I（IMGT付番）を場合により1つ以上有するAT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物である。本発明のかかる方法は、好ましくは、本発明のかかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を回収、精製、及び／又は単離する工程を更に含む。得られた本発明の結合化合物は、例えば、場合により追加の精製、単離、又は加工工程後にヒトの治療又は診断に使用するのに好適である。

30

【0113】

いくつかの実施形態では、本発明の少なくとも1つの核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターが、例えば、*in vivo*での抗体産生のため非ヒト動物に導入される。したがって、本発明の少なくとも1つの核酸分子若しくは機能的等価物又はベクターを含む、単離又は組み換え非ヒト動物が更に提供される。トランスジェニック非ヒト動物の作製方法は当該技術分野で知られている。例えば、EC Lee, Nature Biotechnology, 2013を参照のこと。

40

【0114】

本発明の結合化合物は、黒色腫に対する使用に適している。更に、CD9は例えば、CD9も発現するその他の種類の腫瘍などといった、その他の疾患においても役割を有する。CD9陽性細胞に関連する疾患のその他の非限定例には、骨粗鬆症及び関節炎（Iwai et al. 及びHattori et al.）、肺炎及びCOPD（Takeda et al. 及びJin et al.）、並びに大腸炎（Wagner et al.）がある。例えば、CD9は、卵巣の摘出により誘導され得る骨粗鬆症及びコラーゲン誘導性関節炎の骨侵食下で活性化している破骨細胞において豊富に発現している（Iwai et al. and Hattori et al.）。CD9は、生得的なリン

50

パ系細胞でも発現する。C D 9 陽性細胞に関連する疾患のその他の非限定例は、ウイルス感染症（例えば、H I V 又はヘルペス又はインフルエンザ）、細菌感染症、C M V 網膜炎、口腔カンジダ症、グランツマン血小板無力症、及びジフテリアである。

【0115】

本発明の結合化合物はC D 9 に特異的であり、これらの疾患に対しても使用するのに好適である。したがって、本発明の結合化合物は、医薬品又は予防薬として使用するのに特に好適である。したがって、医薬品及び／又は予防薬として使用するための、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物が提供される。いくつかの実施形態では、ヒト個体を治療した際に有害な副作用が生じる可能性を低減するために、ヒト配列からなる本発明の結合化合物が使用される。かかる抗体は、好ましくは、抗体A T 1 4 - 0 1 2 を含む。したがって、抗体A T 1 4 - 0 1 2 が、医薬品及び／又は予防薬としての使用のため、更に提供される。いくつかの実施形態では、ヒト配列は、同じA T 1 4 - 0 1 2 アミノ酸、又はそれらと少なくとも80%の同一性を有する配列をコードするコドン最適化した核酸配列を所望により使用して、A T 1 4 - 0 1 2 の配列をもとに合成又は組み換えにより作製される。

【0116】

同様にして、医薬品及び／又は予防薬として使用するための、核酸分子又は本発明の機能的等価物、あるいはかかる核酸分子又は本発明の機能的等価物を含む本発明のベクター、あるいは本発明の細胞が提供される。本発明の1つ以上の核酸分子又は機能的等価物（を含むベクター）が投与されるとき、核酸分子又は機能的等価物は、*i n s i t u*で本発明の結合化合物へと翻訳される。得られる本発明の結合化合物は続いて、C D 9 発現細胞に関連する疾患、例えばC D 9 発現腫瘍、骨粗鬆症、関節炎、肺炎、C O P D、大腸炎、又は自然リンパ球に関連する疾患を中和又は予防する。同様にして、本発明の細胞を、かかる中和又は予防を必要としている患者に導入することにより、本発明の治療又は予防抗C D 9 抗体、又は機能性部分若しくは機能的等価物の*i n v i v o*生成が生じる。

【0117】

いくつかの実施形態は、C D 9 発現細胞に関連する疾患を少なくともある程度治療又は予防する方法に使用するための、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物、あるいは本発明の抗体若しくは機能性部分若しくは機能的等価物、又は本発明の核酸分子若しくは機能的等価物若しくはベクター、又は本発明の細胞を提供する。いくつかの実施形態は、C D 9 発現細胞に関連する疾患を少なくともある程度治療又は予防する方法に使用するための抗体A T 1 4 - 0 1 2 を提供する。本明細書で使用するときに、用語「C D 9 発現細胞に関連する疾患」は、C D 9 発現疾患に特異的な細胞の存在を包含する何らかの疾患を意味する。いくつかの実施形態では、このような細胞は、C D 9 発現悪性細胞でよくあるような疾患の原因因子である。いくつかの実施形態では、このような細胞が存在することで、例えば炎症及び／又は疼痛などを行った有害症状が生じる。C D 9 発現細胞に関連する疾患の非限定例は、C D 9 発現腫瘍細胞を有する癌、例えば、黒色腫、結腸直腸癌、膵臓癌、食道癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、基底細胞癌、扁平上皮癌、A M L、多発性骨髄腫、胃癌、肝癌、子宮頸癌、腎細胞癌、前立腺癌、脳癌、カボジ肉腫、粘膜表皮癌、絨毛癌、線維肉腫、子宮頸癌、神経膠腫、腺癌、肺腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、及び小細胞肺癌などである。

【0118】

本明細書で使用するときに、C D 9 を発現する腫瘍細胞は、C D 9 陽性腫瘍細胞又はC D 9 陽性悪性細胞とも呼ばれる。腫瘍細胞の少なくとも一部がC D 9 を発現する癌は、「C D 9 陽性癌」と呼ばれる。C D 9 発現細胞に関連する疾患のその他の非限定例は、骨粗鬆症、関節炎、肺炎、C O P D、大腸炎、及び自然リンパ球に関連する疾患である。

【0119】

C D 9 発現細胞に関連する疾患を少なくともある程度治療又は予防する方法に使用するための、本発明の抗体若しくは機能性部分若しくは機能的等価物、又は本発明の核酸分子若しくは機能的等価物若しくはベクター、又は本発明の細胞、が更に提供され、かかる疾

患は、C D 9 陽性癌、骨粗鬆症、関節炎、肺炎、C O P D、大腸炎、及び自然リンパ球に関連する疾患からなる群から選択される。かかるC D 9 陽性癌は、好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、膵臓癌、食道癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、扁平上皮癌、A M L、多発性骨髄腫、胃癌、肝癌、脳癌、カポジ肉腫、粘表皮癌、絨毛癌、線維肉腫、子宮頸癌、神経膠腫、腺癌、肺腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、及び小細胞肺癌からなる群から選択される。

【0120】

実施例は、A T 1 4 - 0 1 2 は、抗体依存性細胞傷害（A D C C）により黒色腫細胞を殺傷可能である一方で、初代ヒト動脈内皮細胞（H A E C）の場合には観察される細胞死が最小限のものであったことを示す。更に、抗体A T 1 4 - 0 1 2 は、かかる抗体が I g G 3 骨格内のものである場合に補体依存性細胞傷害（C D C）をトリガー可能であることが示されている。そのため、理論に束縛されるものではないが、A T 1 4 1 2 の抗腫瘍反応性は、少なくともある程度はA D C Cにより介在されるものであることが推測される。したがって、好ましい実施形態では、本発明の、あるいは本発明に使用するための抗体、機能性部分、又は機能的等価物、により、C D 9 発現細胞における抗体依存性細胞傷害（A D C C）及び／又は補体依存性細胞傷害（C D C）を誘導可能である。

【0121】

引用されたいずれかの方法に使用するのに好ましい抗体は、抗体A T 1 4 - 0 1 2、又は抗体A T 1 4 - 0 1 2と同様の結合特異性及び同等以上の親和性の、本明細書に記載の抗体A T 1 4 - 0 1 2の変異体である。

【0122】

いくつかの実施形態では、所望により変異H 4 0 Y、Y 1 1 2 F、及びD 1 1 6 H、及び／又は軽鎖変異T 6 6 I（I M G T付番）のうち1つ以上を有する抗体A T 1 4 - 0 1 2、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物、あるいは場合によりH 4 0 Y、Y 1 1 2 F、及びD 1 1 6 H、並びに／又は軽鎖変異T 6 6 I（I M G T付番）の1つ以上を有するA T 1 4 - 0 1 2をコードするそれらの少なくとも1つの核酸分子又は機能的等価物、あるいはそれらの機能性部分又は機能的等価物、あるいはかかる核酸分子又は機能的等価物を含む少なくとも1つのベクター又は細胞が、黒色腫を少なくともある程度治療及び／又は予防するために好ましく使用される。本明細書で使用する時、用語「黒色腫を少なくともある程度治療及び／又は予防すること」は、患者に黒色腫細胞が存在することでもたらされる黒色腫の増殖を中和すること、及び／又は症状を軽減することを含む。したがって、黒色腫を少なくともある程度治療及び／又は予防するための医薬品及び／又は予防薬の調製のための、所望により変異H 4 0 Y、Y 1 1 2 F、及びD 1 1 6 H、並びに／又は軽鎖変異T 6 6 I（I M G T付番）のうち1つ以上を有する抗体A T 1 4 - 0 1 2又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物、あるいは場合によりH 4 0 Y、Y 1 1 2 F、及びD 1 1 6 H、並びに／又は軽鎖変異T 6 6 I（I M G T付番）の1つ以上を有するA T 1 4 - 0 1 2をコードする少なくとも1つの核酸分子又は機能的等価物、あるいはそれらの機能性部分又は機能的等価物、あるいはかかる核酸分子又は機能的等価物を含む少なくとも1つのベクター又は細胞も提供される。黒色腫を少なくともある程度治療及び／又は予防するための方法に使用するための、所望により変異H 4 0 Y、Y 1 1 2 F、及びD 1 1 6 H、並びに／又は軽鎖変異T 6 6 I（I M G T付番）の1つ以上を有する抗体A T 1 4 - 0 1 2又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物、あるいは場合によりH 4 0 Y、Y 1 1 2 F、及びD 1 1 6 H、並びに／又は軽鎖変異T 6 6 I（I M G T付番）の1つ以上を有するA T 1 4 - 0 1 2をコードするそれらの少なくとも1つの核酸分子又は機能的等価物、あるいはそれらの機能性部分又は機能的等価物、あるいはかかる核酸分子又は機能的等価物を含む少なくとも1つのベクター又は細胞が、更に提供される。

【0123】

いくつかの実施形態では、本発明の結合化合物は、化学療法薬又はその他の毒性化合物又は放射性化合物又は免疫調節分子、例えば、C D 3 特異的抗体などの治療用の部分に連結されて、それぞれいわゆる「抗体-薬剤コンジュゲート」又は「キメラ抗原受容体（C

A R) T細胞」を形成する。これらは、骨髓増殖性又はリンパ球増殖性疾患に対抗可能である。

【0124】

更なる実施形態は、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を含む組成物を提供する。本発明の核酸分子又は機能的等価物を含む組成物、並びに本発明のベクター又は細胞を含む組成物も提供される。いくつかの実施形態では、かかる抗体は、変異H40Y、Y112F、及びD116H並びに／又は軽鎖変異T66I (IMG T付番) を場合により1つ以上有するAT14-012である。いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、変異H40Y、Y112F、及びD116H、並びに／又は軽鎖変異T66I (IMG T付番) を場合により1つ以上有する抗体AT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物、並びに別のCD9特異的抗体を含む。かかるその他のCD9特異的抗体は、好ましくは、AT14-012とは異なるCD9エピトープに結合する。黒色腫細胞又はその他のCD9陽性腫瘍細胞などのCD9陽性細胞に結合及び／又はこれらを中和するための異なるCD9特異的結合化合物のこのような組み合わせは特に好適である。

10

【0125】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は医薬組成物である。かかる医薬組成物は、好ましくは、医薬的に許容される担体、希釈剤、及び／又は賦形剤も含む。例えば、好適な担体の非限定例は、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、血清アルブミン (例えば、BSA又はRSA)、及びオボアルブミンを含む。好ましい一実施形態では、かかる好適な担体は、例えば、生理食塩水などの溶液を含む。本発明の医薬組成物は、好ましくはヒト用途に好適である。

20

【0126】

本発明は、CD9発現細胞に関連する疾患を少なくともある程度治療又は予防する方法であって、治療有効量の、本発明の抗体又は機能性部分又は機能的等価物、及び／あるいは本発明の核酸分子又は機能的等価物、及び／あるいは本発明のベクター又は細胞、及び／あるいは本発明の組成物を、かかる治療又は予防を必要としている個体に投与することを含む、方法を更に提供する。本明細書で使用する時、「個体」又は「対象」は、ヒト又は非ヒト動物であり、好ましくはCD9陽性癌、骨粗鬆症、関節炎、肺炎、COPD、大腸炎、又は自然リンパ球に関連する疾患に罹患しているヒト患者である。いくつかの実施形態では、かかるヒト個体は、黒色腫患者である。かかる組成物は、好ましくは本発明の医薬組成物である。本発明の結合化合物又は核酸分子又は機能的等価物又はベクター又は医薬組成物は、好ましくは、1回以上の注射により投与される。本発明の結合化合物の投与に典型的な用量は、体重1kg当たり0.1mg~10mgである。

30

【0127】

本発明の結合化合物は、CD9発現細胞の検出にも特に有用である。例えば、個体、好ましくはヒトがCD9発現細胞に関連する疾患に罹患している疑いがある場合、本発明の結合化合物を用い、CD9発現細胞 (CD9陽性細胞とも呼称される) の存在について、かかる個体由来の血液又は組織サンプルなどのサンプルを試験することができる。いくつかの実施形態では、かかるサンプルは、CD9陽性細胞に特異的に結合する本発明の結合化合物と混合される。本発明の化合物に結合した、例えば、黒色腫細胞などのCD9陽性細胞は、当該技術分野で既知の、例えば、磁気ビーズを利用する単離、ストレプトアビジンコートビーズを利用する単離、又はカラムに固定した二次抗体を利用する単離などが挙げられるがこれらに限定されない任意の手法を用い、サンプルから単離する、及び／又は検出することができる。あるいは又は更に、本発明の結合化合物は、かかる結合化合物を検出可能なものとするために標識される。かかる結合化合物は、例えば、蛍光標識、酵素標識、又は放射性標識されている。あるいは、本発明の結合化合物は、かかる結合化合物に対する標識二次抗体を利用して検出される。

40

【0128】

本発明の結合化合物が患者のサンプル成分に結合する場合、CD9陽性細胞

50

が存在することを示す。このようにして、黒色腫細胞などの疾患特異的なCD9陽性細胞を検出可能である。したがって、いくつかの実施形態は、サンプルがCD9発現細胞を含むかどうかを判定するための、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物の使用を提供する。いくつかの実施形態では、サンプルがCD9発現腫瘍細胞を含むかどうかを判定するため、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物が使用される。CD9発現細胞、好ましくはCD9陽性腫瘍細胞がサンプル中に存在するか否かを判定するための方法であって、

かかるサンプルを、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物と接触させることと、

かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を、CD9発現細胞（存在する場合）に結合させることと、

CD9発現細胞、例えば、CD9陽性腫瘍細胞に、かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物が結合するか否かを判定することにより、かかるサンプル中にCD9発現（腫瘍）細胞が存在しているか否かを判定することと、を含む、方法も提供される。いくつかの実施形態では、かかるCD9発現腫瘍細胞は黒色腫細胞である。

【0129】

実施例に示すとおり、抗体AT14-012は、例えばCD9陽性腫瘍細胞などのCD9陽性細胞を検出するのに特に適する。したがって、サンプルがCD9発現細胞を含むかどうかを判定するための、変異H40Y、Y112F、及びD116H、並びに／若しくは軽鎖変異T66I（IMGT付番）の1つ以上を場合により有する抗体AT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物の使用、が更に提供される。サンプルが、例えば黒色腫細胞、又は大腸癌細胞、又は膵臓癌細胞、又は食道癌細胞、又は肺癌細胞、又は乳癌細胞、又は卵巢癌細胞、又は胃癌細胞、又は扁平上皮癌細胞、又はAML細胞、又は多発性骨髄腫細胞、又は胃癌細胞、又は肝癌細胞、又は脳癌細胞、又はカボジ肉腫細胞、又は粘膜表皮癌細胞、又は絨毛癌細胞、又は線維肉腫細胞、又は子宮頸癌細胞、又はグリオーマ細胞、又は腺癌細胞、又は肺腺癌細胞、又は非小細胞肺癌細胞、又は膀胱癌細胞、又は小細胞肺癌細胞などのCD9発現細胞を含むかどうかを判定するための、変異H40Y、Y112F、及びD116H、並びに／又は軽鎖変異T66I（IMGT付番）のうちの1つ以上を所望により有する抗体AT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物の使用も提供される。

【0130】

CD9発現細胞、好ましくはCD9陽性腫瘍細胞がサンプル中に存在するか否かを判定するための方法であって、

かかるサンプルを、変異H40Y、Y112F、及びD116H、並びに／又は軽鎖変異T66I（IMGT付番）の1つ以上を場合により有する抗体AT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物と接触させることと、

変異H40Y、Y112F、及びD116H（IMGT付番）のうちの1つ以上を場合により有する抗体AT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物をCD9発現細胞（存在する場合）と結合させることと、

例えば、CD9陽性腫瘍細胞などのCD9発現細胞に、変異H40Y、Y112F、及びD116H（IMGT付番）並びに／若しくは軽鎖変異T66I（IMGT番号）の1つ以上を場合により有する抗体AT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が結合するか否かを判定することにより、CD9発現細胞がかかるサンプル中に存在するか否かを判定することと、を含む、方法も提供される。

【0131】

いくつかの実施形態は、かかるサンプルが血液サンプル、又は骨髄サンプル、又は生検を含む、本発明の方法を提供する。いくつかの実施形態では、黒色腫及び／又は扁平上皮癌について試験するために、かかる生検は皮膚組織に由来する。いくつかの実施形態では、胃癌、大腸癌、食道癌、又は胃癌について試験するために、かかる生検は腸に由来するものである。いくつかの実施形態では、かかる生検は、膵臓癌の試験用には膵臓組織、又

10

20

30

40

50

は肺癌の試験用には肺組織、又は乳癌の試験用には乳房組織、又は卵巣癌の試験用には卵巣組織、又は肝癌の試験用には肝臓組織、又は脳癌の試験用には脳組織、又は粘膜表皮癌の試験用には粘膜表皮組織、又は子宮頸癌の試験用には子宮頸部組織、又は膀胱癌の試験用には膀胱組織に由来する。いくつかの実施形態では、かかるサンプルは、例えば、AML、多発性骨髄腫、癌に関連する細胞外小胞（エキソソーム）、又は上記のいずれかの固形腫瘍の転移の存在についての試験に有用である血液サンプルである。

【0132】

本発明の結合化合物についてのかかる試験結果は、サンプルの分類に有用である。例えば、個体サンプルが悪性CD9陽性細胞を含有していることが明らかである場合、サンプルは疾患に関連する細胞を含有するものとして分類される。かかる分類は、続いてCD9発現細胞に関連する疾患についての診断に使用され得る。したがっていくつかの実施形態は、CD9発現細胞に関連する疾患の診断に使用するための、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。かかる疾患は、好ましくは、CD9陽性癌、関節炎、肺炎、COPD、大腸炎、及び自然リンパ球に関連する疾患からなる群から選択される。かかるCD9陽性癌は、好ましくは、黒色腫、結腸直腸癌、膵臓癌、食道癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、扁平上皮癌、AML、多発性骨髄腫、胃癌、肝癌、脳癌、カポジ肉腫、粘表皮癌、絨毛癌、線維肉腫、子宮頸癌、神経膠腫、腺癌、肺腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、及び小細胞肺癌からなる群から選択される。一部の好ましい実施形態では、変異H40Y、Y112F、及びD116H、並びに／又は軽鎖変異T66I（IMGT付番）の1つ以上を場合により有する抗体AT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物は、上記の検出及び診断に使用される。したがって、CD9発現細胞に関連する疾患の診断に使用するための、変異H40Y、Y112F、及びD116H、並びに／又は軽鎖変異T66I（IMGT付番）の1つ以上を所望により有する抗体AT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物の使用、も提供される。いくつかの実施形態は、黒色腫、結腸直腸癌、膵臓癌、食道癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、扁平上皮癌、AML、多発性骨髄腫、胃癌、肝癌、脳癌、カポジ肉腫、粘表皮癌、絨毛癌、線維肉腫、子宮頸癌、神経膠腫、腺癌、肺腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、及び小細胞肺癌の診断に使用するための、変異H40Y、Y112F、及びD116H、並びに／又は軽鎖変異T66I（IMGT付番）の1つ以上を有する抗体AT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を提供する。

【0133】

個体がCD9陽性癌に罹患しているか否かを測定するためのex vivo法であって、

かかる個体由来の腫瘍細胞を、本発明の抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物と接触させることと、

かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を、CD9発現細胞（存在する場合）に結合させることと、

CD9発現細胞が、かかる抗体又は機能性部分又は機能的等価物に結合するか否かを判定することにより、かかる個体がCD9陽性癌に罹患している否かを判定することと、を含む、ex vivo法も提供される。

【0134】

このようなCD9陽性癌の非限定例は上掲のものである。好ましくは、変異H40Y、Y112F、及びD116H、並びに／又は軽鎖変異T66I（IMGT付番）のうちの1つ以上を場合により有する抗体AT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、かかる方法に使用される。したがって、いくつかの実施形態は、個体がCD9陽性癌に罹患しているか否かを判定するためのex vivo法であって、

かかる個体由来の腫瘍細胞を、変異H40Y、Y112F、及びD116H、並びに／又は軽鎖変異T66I（IMGT付番）の1つ以上を場合により有する抗体AT14-012、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物と接触させることと、

かかる抗体又は機能性部分若しくは機能的等価物を、CD9発現細胞（存在する場合

）に結合させることと、

C D 9 発現細胞が、かかる抗体又は機能性部分又は機能的等価物に結合するか否かを判定することにより、かかる個体が C D 9 陽性癌に罹患している否か判定することと、を含む、*ex vivo* 法も提供される。

【0135】

実施例に示すとおり、抗体 A T 1 4 - 0 1 2 は、図 2 に示す C D 9 配列の位置 1 5 4 ~ 1 8 1、好ましくは 1 6 8 ~ 1 8 1 内に位置する少なくとも 5 つの C D 9 アミノ酸に結合する。抗体 A T 1 4 - 0 1 2 は、図 2 に示すとおり C D 9 配列の K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及び F 1 7 6 に対応する C D 9 のアミノ酸を含む C D 9 エピトープを結合する。特に、A T 1 4 - 0 1 2 は、この C D 9 配列のアミノ酸 K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及び F 1 7 6 に結合する。現在では、C D 9 に特異的な更なる抗体を得ること又は生成することが可能となったことが知られている。本明細書で前述したとおり、抗体の取得又は生成は、例えば、上記のアミノ酸残基を少なくとも 4 つ、好ましくは少なくとも 5 つ含む C D 9 ペプチド、又は上記のアミノ酸残基の少なくとも 4 つ、好ましくは少なくとも 5 つのからなる C D 9 ペプチド、又はかかる C D 9 ペプチドを含む免疫原性化合物、又はかかる C D 9 ペプチドをコードする核酸分子若しくはそれらの機能的等価物で非ヒト動物を免疫した後、1 種以上のブースターを投与することによりなされ得る。続いて、C D 9 に特異的な抗体及び／又は B 細胞は、かかる非ヒト動物から回収することができる。いくつかの実施形態では、かかる抗体又は B 細胞は、C D 9 への結合性に関し、抗体 A T 1 4 - 0 1 2 と競合性について試験される。

【0136】

代替的に又は更に、C D 9 特異的免疫グロブリン、典型的には F a b フラグメントを同定及び／又は単離するためにかかる C D 9 ペプチドを用い、ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングする。得られた抗体、B 細胞、又は F a b フラグメントは、典型的には C D 9 への結合について抗体 A T 1 4 - 0 1 2 と競合する。いくつかの実施形態では、競合アッセイを行う。

【0137】

上記の C D 9 ペプチド及びそれらの使用も本発明に包含される。したがって、いくつかの実施形態は、最大で 6 0 アミノ酸残基長を有する、単離された、組み換え又は精製 C D 9 ペプチドを提供し、かかるペプチドは、図 2 に示すとおり、C D 9 アミノ酸位置 1 5 4 ~ 1 8 1、好ましくはアミノ酸位置 1 6 8 ~ 1 8 1 内に位置する少なくとも 5 つのアミノ酸残基と同一である少なくとも 5 つのアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態は、最大で 6 0 アミノ酸残基長を有する、単離された、組み換え又は精製 C D 9 ペプチドを提供し、かかるペプチドは、図 2 に示すとおり、C D 9 アミノ酸位置 1 5 4 ~ 1 8 1、好ましくはアミノ酸位置 1 6 8 ~ 1 8 1 内に位置する少なくとも 6 つのアミノ酸残基と同一である少なくとも 6 つのアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、かかる C D 9 ペプチドは、図 2 に示すとおり C D 9 アミノ酸位置 1 6 9 ~ 1 7 6 内に位置する 5 又は 6 個のアミノ酸残基と同一である 5 又は 6 個のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、かかる単離された、組み換え又は精製 C D 9 ペプチドは、図 2 に示すとおり C D 9 配列の K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及び F 1 7 6 に対応するアミノ酸を少なくとも含む。いくつかの実施形態では、かかる単離された、組み換え又は精製 C D 9 ペプチドは、図 2 に示すとおり C D 9 配列の K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、及び T 1 7 5 に対応するアミノ酸を少なくとも含む。好ましくは、かかる C D 9 ペプチドは、図 2 に示すとおり C D 9 配列の F 1 7 6 に対応するアミノ酸を更に含む。

【0138】

本明細書で使用する時、上記のペプチドの任意のものは、「本発明の C D 9 ペプチド」と呼ばれる。

【0139】

いくつかの実施形態では、本発明の C D 9 ペプチドは最大で 5 5 アミノ酸残基長を有する。いくつかの実施形態では、本発明の C D 9 ペプチドは、最大で 5 0 アミノ酸残基長、

又は最大で45アミノ酸残基長、又は最大で40アミノ酸残基長を有する。いくつかの実施形態では、本発明のCD9ペプチドは、最大で35アミノ酸残基長、又は最大で30アミノ酸残基長、又は最大で25アミノ酸残基長、又は最大で20アミノ酸残基長、又は最大で15アミノ酸残基長を有する。いくつかの実施形態では、本発明のかかるCD9ペプチドは、10アミノ酸残基長、又は9アミノ酸残基長、又は8アミノ酸残基長を有する。

【0140】

図2に記載のとおりヒトCD9タンパク質の位置154～181内に位置している、好ましくはかかるCD9タンパク質の位置168～181内に位置している少なくとも6つのアミノ酸残基と同一である、引用されたアミノ酸残基に加えて、本発明のCD9ペプチドは、その他のアミノ酸残基を更に含み得る。いくつかの実施形態では、かかるその他のアミノ酸残基は、ヒトCD9配列からは由来しない。「非CD9アミノ酸残基」と呼ばれる、かかるその他のアミノ酸残基は、例えば、安定性を増強する、及び／又は免疫原性を増強する、及び／又はCD9ペプチドを例えば分子足場又は担体などの別の部分に連結するよう機能し得る。このような足場又は担体の非限定例には、キーホールリンペットヘモシアニン、及びCLIPS足場がある（例えば、国際公開第2004/077062号に記載のビス（プロモメチル）ベンゼン、トリス（プロモメチル）ベンゼン、及びテトラ（プロモメチル）ベンゼンなど）。したがって、いくつかの実施形態は、最大で60アミノ酸残基長を有する、単離された、組み換え又は精製CD9ペプチドを提供し、かかるペプチドは、図2に示すとおり、CD9アミノ酸位置154～181、好ましくはアミノ酸位置168～181内に位置する少なくとも5つのアミノ酸残基と同一である少なくとも5つのアミノ酸残基を含む。好ましくは、かかるペプチドは、図2に示すとおりCD9アミノ酸位置154～181、好ましくはアミノ酸位置168～181内に位置し、好ましくは、図2に示すとおりCD9配列のK169、D171、V172、L173、及びF176からなる群から選択され、より好ましくは、図2に示すとおりCD9配列のK169、D171、V172、L173、及びF176を少なくとも含む、少なくとも6つのアミノ酸残基と同一である少なくとも6つのアミノ酸残基を含み、ここで、かかるペプチドは、少なくとも1個、又は少なくとも2個、又は少なくとも3個、又は少なくとも4個、又は少なくとも5個、又は少なくとも10個、又は少なくとも20個、又は少なくとも30個、又は少なくとも40個、又は少なくとも50個の非CD9アミノ酸残基を更に含み、かかる非CD9アミノ酸残基の配列の完全長配列は、図2に示すとおり、対応するCD9アミノ酸位置には存在しない。好ましくは、かかるペプチドは、図2に示すとおりCD9アミノ酸位置154～181、好ましくはアミノ酸位置168～181内に位置し、好ましくは、図2に示すとおりCD9配列のK169、D171、V172、L173、T175、及びF176からなる群から選択され、より好ましくは、図2に示すとおりCD9配列のK169、D171、V172、L173、T175、及びF176を少なくとも含む、少なくとも6つのアミノ酸残基と同一である少なくとも6つのアミノ酸残基を含む。かかるペプチドは、用語「本発明のCD9ペプチド」にも包含される。いくつかの実施形態は、単離された、最大で60アミノ酸残基長を有する、組み換え又は精製CD9ペプチドを提供し、ここで、かかるペプチドは、図2に示すとおりCD9アミノ酸位置154～181、好ましくはアミノ酸位置168～181内に位置する少なくとも6つのアミノ酸残基と同一であり、好ましくは、図2に示すとおりCD9配列のK169、D171、V172、L173、及びF176、より好ましくはK169、D171、V172、L173、T175、及びF176を少なくとも含む、少なくとも5つのアミノ酸残基を含み、かかるペプチドは、非CD9アミノ酸残基を含有する別のペプチドに連結される。いくつかの実施形態は、最大で60アミノ酸残基長を有する、単離された、組み換え又は精製CD9ペプチドを提供し、かかるペプチドは、図2に示すとおり、CD9配列の少なくともK169、D171、V172、及びL173及びT175を含み、かつ図2に示すCD9配列のF176残基も好ましくは含み、ここで、かかるペプチドは、非CD9アミノ酸残基を含有している別のペプチドに連結される。いくつかの実施形態では、かかるペプチドは、ペプチド結合を介して互いに結合される。他の実施形態

では、かかるペプチドは、例えば、リンカーなどの他の非ペプチド結合を介して互いに連結されている。

【0141】

当業者には既知のとおり、免疫原性の配列が提供されれば、かかる配列にある程度の変更を加えて、得られる免疫原の免疫原性及び／又は安定性を好ましく最適化することができる。この最適化は、例えば、得られる化合物の安定性及び／又は免疫原性が好ましく試験され、改良されたCD9抗原性化合物が選択された後に、変異導入手順によりなされる。当業者は、あるアミノ酸配列から始まる抗原多様体を十分に生成することができる。いくつかの実施形態では、1つ以上のアミノ酸残基を任意の他のアミノ酸残基により置き換えて、得られる化合物を試験することを包含する、置換のネット解析(replacement net analysis)が実施される。一部の好ましい実施形態では、保存的アミノ酸置換が用いられる。保存的アミノ酸置換の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシン、又はメチオニンなどの1つの疎水性残基の、別の疎水性残基への置換、並びに1つの極性残基の、別の極性残基への置換、例えば、アルギニンのリジンへの置換、グルタミン酸のアスパラギン酸への置換、又はグルタミンのアスパラギンへの置換などがある。保存的アミノ酸置換の別の例としてはセリンのスレオニンへの置換、及びチロシンのフェニルアラニンへの置換が挙げられる。

【0142】

したがって、本発明の、単離された、組み換え又は精製CD9ペプチドが更に提供され、ここで、図2に示すとおりのCD9配列のK169、D171、V172、L173、T175、及びF176からなる群から選択された少なくとも1つのアミノ酸残基は別のアミノ酸残基で置換され、ここで、かかるペプチドは、図2に示すCD9配列のK169に対応するアミノ酸位置にアルギニンを含み、かつ／又は図2に示すCD9配列のD171に対応するアミノ酸位置にグルタミン酸を含み、かつ／又は図2に示すCD9配列のV172に対応するアミノ酸位置に、イソロイシン、ロイシン、及びメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基を含み、かつ／又は図2に示すCD9配列のL173に対応するアミノ酸位置に、イソロイシン、バリン、及びメチオニンからなる群から選択されるアミノ酸残基を含み、かつ／又は図2に示すCD9配列のT175に対応するアミノ酸位置にセリンを含み、かつ／又は図2に示すCD9配列のF176に対応するアミノ酸位置にチロシンを含む。

【0143】

つまり、位置169のリジンがアルギニンで置換されている、及び／又は位置171のアスパラギン酸がグルタミン酸で置換されている、及び／又は位置172のバリンがイソロイシン、ロイシン、若しくはメチオニンで置換されている、及び／又は位置173のロイシンがイソロイシン、バリン、若しくはメチオニンで置換されている、及び／又は位置176のフェニルアラニンがチロシンで置換されている、本発明のCD9ペプチドが提供される。これらは保存的アミノ酸置換であり、得られるペプチドは尚も抗体AT14-012に結合することができる。得られるペプチドは、CD9への結合について、好ましくはCD9における同じエピトープへの結合について、抗体AT14-012と競合する、抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物に結合することができる、又はこれらを生成することができる。

【0144】

いくつかの実施形態では、本発明のCD9ペプチドのアミノ酸残基は、真核生物において天然に生ずる20種類のアミノ酸残基から選択され、これらは「標準(standard)」又は「古典的(canonical)」アミノ酸とも呼称される。あるいは、本発明のCD9ペプチドには、例えば、Dアミノ酸(すなわち、アミノ酸のD立体異性体)又はN-メチルアミノ酸などの非天然なアミノ酸残基が含有される。

【0145】

本発明のCD9ペプチドをコードする核酸分子、又はそれらの機能的等価物も、本発明に包含される。したがって、本発明のCD9ペプチドをコードする、単離された合成又は

組み換え核酸分子、又はそれらの機能的等価物が更に提供される。かかる核酸分子又は機能的等価物は、好ましくは、ヌクレオチド鎖を含み、より好ましくはDNA、cDNA、又はRNAを含む。他の実施形態では、かかる核酸分子又は機能的等価物は、例えば、DNA/RNAヘリックス、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、及び／又はリボザイムなどの、その他の種類の核酸構造物を含む。

【0146】

かかる核酸分子及び機能的等価物は、例えば、大腸菌細胞、CHO細胞、NSO細胞、又は293（T）細胞などといった宿主細胞などの核酸発現系を用いる、本発明のCD9ペプチドの産生に、例えば有用である。いくつかの実施形態では、本発明のかかる核酸分子又は機能的等価物は遺伝子送達ビヒクル中に存在し、かかる核酸分子又は機能的等価物を、対象とする細胞中に導入するのを容易にする。本発明の核酸分子又は機能的等価物を、遺伝子送達ビヒクル、好ましくはベクターが更に提供される。本発明の核酸分子若しくは機能的等価物、及び／又は本発明の遺伝子送達ビヒクルを含む宿主細胞も、本明細書において提供される。

【0147】

上記のとおり、本発明のCD9ペプチド、又は本発明のCD9ペプチドをコードする核酸分子若しくは機能的等価物は、例えば、CD9への結合について抗体AT14-012と競合する抗体などといった、本発明のCD9特異的な抗体を得るのに有用である。これは例えば、かかるCD9ペプチド、又は本発明のCD9ペプチドをコードする核酸分子若しくは機能的等価物（を含むベクター）で非ヒト動物を免疫することにより実施することができる。あるいは又は更に、ファージディスプレイライブラリがスクリーニングされる。したがって、いくつかの実施形態は、例えば、B細胞などの免疫細胞、及び／又は例えば、CD9に特異的なFabフラグメントなどといった、抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を、産生、結合、検出、及び／又は得るための、本発明のCD9ペプチドの使用、又は本発明の核酸分子若しくは機能的等価物の使用、又は本発明のベクターの使用を提供する。かかる免疫細胞又は抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物は、好ましくは黒色腫細胞に特異的に結合可能である。免疫原として使用するための、本発明のCD9ペプチド、並びに免疫原として使用するための、本発明のCD9ペプチドをコードする核酸分子又は機能的等価物も、本明細書において提供される。

【0148】

本発明のCD9ペプチド、又は本発明の核酸分子若しくは機能的等価物若しくはベクターで非ヒト動物を免疫することを含む、CD9特異的免疫細胞又はCD9特異的抗体を産生するための方法も提供される。かかる方法は、好ましくは、かかる非ヒト動物からCD9特異的な免疫細胞又は抗体を回収することを更に含む。前述のとおり、かかる免疫細胞、又は抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物は、好ましくは黒色腫細胞に特異的に結合可能である。

【0149】

本発明の方法により得られる、CD9特異的抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物、並びに本発明の方法により得られる免疫細胞も、本明細書において提供される。かかるCD9特異的抗体、機能性部分、機能的等価物、又は免疫細胞は、好ましくはCD9への結合について抗体AT14-012と競合する。

【0150】

かかる非ヒト動物は、好ましくは、げっ歯類又はウシなどの哺乳動物を含む。いくつかの実施形態において、かかる非ヒト動物は、マウス、ラット、ウサギ、ラマ、ラクダ、ブタ、家禽、牛、ヤギ、ウマ、類人猿、及び／又はゴリラを含む。

【0151】

いくつかの実施形態は、組成物、好ましくは本発明のCD9ペプチドを含む免疫原性組成物を提供する。いくつかの実施形態では、かかるCD9ペプチドは、医薬的に許容される担体又は足場に連結される。いくつかの実施形態は、本発明のCD9ペプチドをコードする核酸分子又はその機能的等価物を含む組成物、好ましくは免疫原性組成物を提供する

。いくつかの実施形態は、かかる核酸分子又はそれらの機能的等価物を含む組成物、好ましくは、免疫原性組成物を提供する。本発明の免疫原性組成物は、好ましくは例えば、担体、希釈剤、賦形剤、又は充填剤などの生体適合性添加剤を更に含む。いくつかの実施形態は、本発明のCD9のペプチドを含むワクチン、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物を含むワクチン、又は本発明のCD9ペプチドをコードする核酸分子又はその機能的等価物を含むワクチンを提供する。いくつかの実施形態は、製薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤を更に含む製薬学的組成物である、本発明の組成物を提供する。

【0152】

本発明のCD9ペプチドは、例えば、生物学的サンプル中の、CD9特異的抗体、又はB細胞若しくはT細胞などのCD9特異的免疫細胞といった、CD9特異的結合化合物の存在について試験するのにも有用である。CD9特異的抗体及び／又はCD9特異的免疫細胞の存在についてスクリーニングするために、例えば、抗体、B細胞、及び／又はT細胞を含む個体由来のサンプル、又はかかるサンプルの画分を、本発明のCD9ペプチド又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物とインキュベートする。かかるサンプル中又はかかるサンプル画分中にかかる抗体又は免疫細胞が存在しており、本発明のかかるCD9ペプチドに結合するようである場合、かかるサンプルは、CD9特異的結合化合物（すなわち、抗体及び／又は免疫細胞）に関し陽性であるとして分類される。

【0153】

CD9特異的抗体又はCD9特異的免疫細胞は、例えば、ウェスタンブロット、（捕捉）ELISA、又はRIAなどの免疫アッセイを用い検出及び／又は定量される。これらのアッセイは、当該技術分野において公知である。例えば、本発明の標識CD9ペプチド（場合により、T細胞を検出するためのMHC複合体という観点によるもの）を、未結合の結合化合物を洗い流した後で、血液サンプル、又は組織サンプル（例えば、皮膚サンプル）、又は抗体、B細胞、及び／又はT細胞を含むかかるサンプルの画分とともに、インキュベートする。続いて、本発明のかかる標識CD9ペプチドがCD9特異的抗体又は免疫細胞により結合したかどうかを判定する。いくつかの実施形態では、本発明の未標識のCD9ペプチド又は本発明のCD9ペプチドを含む未標識の化合物（場合により、MHC複合体という観点によるもの）を、抗体及び／又は免疫細胞を含む、例えば、血液サンプル又は組織サンプル（例えば、皮膚サンプル）などのサンプルと、又は抗体、B細胞、及び／若しくはT細胞を含むかかるサンプルの画分と接触させる。インキュベート後、未結合の抗体及び未結合の免疫細胞を除去するために、好ましくは1回以上の洗浄工程を実施する。続いて、例えば、ヒト抗体又はヒト免疫細胞を特異的な対象としており、例えば蛍光化合物又は例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ若しくはアルカリホスファターゼなどのマーカーを連結している抗体を使用して、抗体又は免疫細胞が本発明のかかるCD9ペプチドに結合しているかどうかを試験する。更なる洗浄工程後、例えば、発光を測定することにより、又は西洋ワサビペルオキシダーゼ若しくはアルカリホスファターゼの基質を添加することにより、二次抗体が結合しているかどうか好ましく判定される。これらの検出技術は、当該技術分野において公知である。

【0154】

いくつかの実施形態では、本発明のCD9ペプチド、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物若しくは組成物（場合により、MHC複合体という観点によるもの）を、抗体及び／又は免疫細胞を富化させたサンプルの画分と接触させる。いくつかの実施形態では、かかる画分は、*in vitro* B細胞培養物又は*in vitro* T細胞培養物である。いくつかの実施形態では、本発明のCD9ペプチド、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物若しくは組成物を、抗Ig抗体又はプロテインA若しくはG精製法を用い精製されたCD19陽性細胞及び／又は抗体／B細胞画分について選抜することにより得られた、例えば、生体サンプルより本質的に精製した抗体及び／又は免疫細胞（例えば、精製B細胞画分など）と接触させる。プロテインA又はG精製法は当該技術分野で知られており、プロトコル及び試薬は市販されている。本明細書で使用するとき、用語「サンプルから本質的に精製された免疫細胞」は、得られる画分を構成する細胞のうち少なくとも8

0 %、好ましくは少なくとも85 %、より好ましくは少なくとも90 %、又は少なくとも95 %が免疫細胞であることを意味する。用語「サンプルから本質的に精製された抗体」は、得られる画分を構成する物質 (mass) のうち少なくとも80 %、より好ましくは少なくとも85 %、より好ましくは少なくとも90 %、又は少なくとも95 %が抗体であることを意味する。

【0155】

したがって、CD9特異的な免疫細胞及び／若しくはCD9特異的抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物を結合及び／又は検出するための、本発明のCD9ペプチドの使用、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物若しくは組成物の使用が更に提供される。かかる免疫細胞、及び／又は抗体若しくはそれらの機能性部分若しくは機能的等価物は、好ましくは、例えば黒色腫細胞などのCD9陽性腫瘍細胞に結合可能である。本明細書では、抗体及び／又は免疫細胞などのCD9特異的結合化合物を検出する部分として使用するための、本発明のCD9ペプチド、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物、並びにサンプルがCD9特異的抗体及び／又はCD9特異的免疫細胞を含むかどうかを判定する方法であって、本発明のCD9ペプチド、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物若しくは組成物を、かかるサンプル、又は抗体及び／若しくは免疫細胞を含むかかるサンプルの画分とともにインキュベートした後で、かかる本発明のCD9ペプチドにCD9特異的抗体及び／若しくはCD9特異的免疫細胞が結合しているかどうかを判定することと、又はかかる本発明のCD9ペプチドを含むかかる化合物にCD9特異的抗体及び／又はCD9特異的免疫細胞が結合しているかどうかを判定することと、を含む方法もまた、提供する。かかる結合が検出された場合、かかるサンプルは、CD9特異的抗体及び／又はCD9特異的免疫細胞、例えば、黒色腫などのCD9陽性腫瘍細胞に特異的に結合可能な抗体及び／又は免疫細胞を含むと結論付けられる。

【0156】

サンプルがCD9特異的な抗体及び／又はCD9特異的な免疫細胞を含むか判定する方法であって、本発明のCD9ペプチド、若しくは本発明のCD9ペプチドを含む化合物（場合により、MHC複合体という観点によるもの）を、かかるサンプルから本質的に精製された抗体及び／若しくは免疫細胞とともにインキュベートすることと、続いてかかる本発明のCD9ペプチドにCD9特異的抗体及び／若しくはCD9特異的免疫細胞が結合しているかどうか、又はかかる本発明のCD9ペプチドを含むかかる化合物にCD9特異的抗体及び／若しくはCD9特異的免疫細胞が結合しているかどうかを判定することと、を含む、方法も提供される。

【0157】

いくつかの実施形態では、個体がCD9発現細胞に関連する疾患を有するかを判定するために上記の検出試験の結果を使用する。例えば、CD9陽性腫瘍の存在について試験した個体由来のサンプルが、CD9特異的免疫細胞及び／又はCD9特異的抗体を含有するようであった場合、かかる個体は、例えば黒色腫などのCD9陽性腫瘍に罹患していると結論付けることができる。かかるサンプルは、好ましくは腫瘍細胞を含む。例えば、黒色腫細胞の存在について試験するために、黒色腫の疑いのある皮膚領域の生検が好ましく使用される。あるいは又は更に、CD9陽性腫瘍細胞についての試験には、転移腫瘍は多くの場合血液及びリンパ系を循環することから、血液サンプル又はリンパ節サンプルも有用である。

【0158】

したがって、診断用薬として使用するための本発明のCD9ペプチド、並びに診断用薬として使用するための本発明のCD9ペプチドを含む化合物又は組成物も提供される。CD9発現細胞に関連する疾患（例えば、CD9陽性腫瘍、又は骨粗鬆症、又は関節炎、又は肺炎、又はCOPD、又は大腸炎、又は自然リンパ球に関連する疾患など）を診断するための本発明のCD9ペプチドの使用、及びCD9発現細胞に関連する疾患（例えば、CD9陽性腫瘍、又は骨粗鬆症、又は関節炎、又は肺炎、又はCOPD、又は大腸炎、又は自然リンパ球に関連する疾患など）を診断するための本発明のCD9ペプチドを含む化合

物又は組成物の使用が更に提供される。いくつかの実施形態では、かかるCD9陽性癌は黒色腫である。したがって、いくつかの実施形態は、黒色腫の診断に使用するための本発明のCD9ペプチド、及び黒色腫を診断するための診断キットの作製のための本発明のCD9ペプチドの使用を提供する。

【0159】

本発明のCD9ペプチド、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物若しくは組成物と、

抗体が結合したCD9ペプチド又は免疫細胞が結合したCD9ペプチドを検出する手段と、

を含む、診断キットが更に提供される。

10

【0160】

かかる手段は、例えば、ヒト抗体又はヒト免疫細胞を特異的に対象とする標識抗体を包含する。いくつかの実施形態では、かかる標識抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼとコンジュゲートされる。

【0161】

いくつかの実施形態は、本発明のCD9ペプチド、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物若しくは組成物（場合により、MHC複合体という観点によるもの）を、かかる個体の抗体及び／又は免疫細胞と接触させることと、かかる本発明のCD9ペプチド、又は本発明のCD9ペプチドを含むかかる化合物若しくは組成物に、かかる個体のかかる抗体及び／又は免疫細胞の少なくとも1つが結合しているかを診断することと、を含む、個体がCD9陽性腫瘍を有するかどうかを診断する方法を提供する。本発明のかかるCD9ペプチド又はかかる化合物にかかる個体の抗体及び／又は免疫細胞が結合する場合、かかる個体はCD9陽性腫瘍を有すると結論付けられる。いくつかの実施形態では、かかるCD9陽性腫瘍は黒色腫ある。いくつかの実施形態では、本発明のCD9ペプチド、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物を、かかる個体の抗体及び／又は免疫細胞を含むサンプル（例えば、血液サンプル若しくは骨髄サンプル、又は例えば、皮膚組織などの生検）と接触させる。他の実施形態では、本発明のCD9ペプチド又は化合物を、かかる個体由来するサンプルの画分と接触させ、ここで、かかる画分は免疫細胞及び／又は抗体を含む。いくつかの実施形態では、本発明のCD9ペプチド又は化合物を、かかるサンプルから本質的に精製された抗体及び／又は免疫細胞（例えば、CD19陽性細胞を選抜することにより得られた精製B細胞画分、及び／又は抗Ig抗体若しくはプロテインA若しくはG精製方法を用い精製された抗体／B細胞画分）と接触させる。

20

30

【0162】

本発明の新規CD9ペプチド、及びそれらをコードする核酸分子及び機能的等価物の興味深い別の用途には、免疫療法がある。例えば、本発明のCD9ペプチド、又はそれをコードする核酸分子及び機能的等価物は、CD9陽性腫瘍の治療に使用される。本明細書で使用する時、「治療」は、少なくとも1つの症状の緩和、及び／又は少なくとも一時的な疾患の遅延若しくは更には進行の停止を包含する。1つの好ましい実施形態では、本発明のCD9ペプチド、又はそれらをコードする核酸分子若しくは機能的等価物、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物若しくは組成物は、かかる患者の免疫系をブーストさせて免疫反応を増強させるために、CD9陽性癌の患者に投与される。いくつかの実施形態では、場合により、*ex vivo*での増殖（expansion）後に患者に投与されるCD9特異的T細胞又はB細胞を得ることを目的として、CD9陽性癌の患者に由来するナイーブT細胞又はB細胞を、*ex vivo*で培養し、本発明のCD9ペプチド（T細胞培養の場合には、場合によりMHC複合体という観点によるもの）又は化合物とともにインキュベートする。いくつかの実施形態では、かかるCD9陽性癌は黒色腫である。

40

【0163】

いくつかの実施形態では、養子細胞療法が用いられる。CD9陽性癌に由来するT細胞は、好ましくは、本発明のCD9ペプチド（場合により、MHC複合体という観点によるもの）を用い、又は本発明のCD9ペプチド（場合により、MHC複合体という観点によ

50

るもの)を含む化合物若しくは組成物を用い、結合又は活性について試験される。かかるCD9ペプチドを認識するT細胞を*ex vivo*で増殖させた後、患者に投与すると、抗CD9 T細胞応答が生じることになる。

【0164】

いくつかの実施形態では、ドナーリンパ球の養子細胞療法が用いられる。同種HSC Tを施行されたCD9陽性癌患者から単離されたドナーT細胞、又はHSC Tドナーから単離されたドナーT細胞を、MHC複合体の文脈におけるCD9ペプチドを使用して、又はMHC複合体の文脈における本発明のCD9ペプチドを含む化合物を使用して、CD9の結合又は活性化について好ましく試験し、かかるCD9ペプチドを認識するドナーT細胞を*ex vivo*で増殖させ、続いて患者に投与することで、抗CD9同種T細胞の応答を生じさせる。

10

【0165】

いくつかの実施形態では、CD9特異的結合部分を持たせるために、T細胞を改変する。かかるT細胞は、好ましくは、CD9陽性癌患者から誘導される。いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体(CAR) T細胞が産生される。かかる細胞は、対象とする結合特異性を備え、好ましくは抗体に由来するT細胞受容体が改変されたT細胞である。典型的には、モノクローナル抗体から誘導された一本鎖可変領域(scFv)をCD3-ζ膜貫通領域と融合させることで、CAR-T細胞が産生され、これにより、scFvによる標的認識時にζシグナルが誘導される。

【0166】

いくつかの実施形態によると、本発明のCD9ペプチド、又はそれらをコードする核酸分子若しくは機能的等価物、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物若しくは組成物は、CD9特異的抗体及び／又はB細胞の産生及び／又は単離を目的として使用され、結果的に改変T細胞の産生に使用される。例えば、かかるCD9ペプチド又は化合物又は核酸分子又は機能的等価物は、CD9特異的抗体又はB細胞の誘導、検出、及び／又は単離を目的として使用される。続いて、いくつかの実施形態では、かかるCD9特異的抗体の重鎖及び／又は軽鎖可変領域がT細胞に提供されることにより、CD9特異性を備えた改変T細胞が産生される。いくつかの実施形態では、続いて、これらの改変T細胞がCD9陽性癌患者に投与され、腫瘍特異的T細胞反応が生じる。いくつかの実施形態では、かかる改変T細胞はCAR T細胞である。いくつかの実施形態では、かかるCD9特異的抗体又はB細胞を、CD9への結合について抗体AT14-012との競合を試験した後で、かかる抗体の重鎖及び／又は軽鎖可変領域をT細胞に提供する。かかる競合する抗体は、CD9特異性を有する改変T細胞の産生のため好ましく選択される。

20

30

【0167】

したがって、薬剤として使用するための、本発明のCD9ペプチド、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物若しくは組成物、又は本発明のCD9ペプチドをコードする核酸分子若しくはそれらの機能的等価物が更に提供される。CD9特異的なT細胞の産生のための、本発明のCD9ペプチド(場合により、MHC複合体という観点によるもの)の使用、又は本発明のCD9ペプチド(場合により、MHC複合体という観点によるもの)を含む化合物若しくは組成物の使用、又は本発明のかかるCD9ペプチドをコードする核酸分子又はそれらの機能的等価物の使用、もまた提供される。いくつかの実施形態では、改変されたT細胞を産生するための方法であって、CD9陽性癌患者由来の抗体含有サンプル又はB細胞含有サンプルを、本発明のCD9ペプチド又は化合物と接触させて、抗CD9抗体に対する結合抗体、又はB細胞を得た後、かかるCD9特異的抗体又はB細胞から1つ以上のCD9特異的ドメインを得ることと、並びにかかる1つ以上のドメインをT細胞に提供することと、を含む方法が提供される。いくつかの実施形態は、改変T細胞を産生するための方法であって、非ヒト動物を、本発明のCD9ペプチド又は化合物又は核酸分子又はそれらの機能的等価物により免疫して、CD9に対する免疫反応を誘導した後、かかる非ヒト動物由来のCD9特異的抗体に由来するCD9特異的ドメイン又はCD9特異的B細胞の1つ以上を得ることと、あるいはかかる1つ以上のCD9特異的ドメインを

40

50

コードする1つ以上の核酸配列を得ることと、かかる1つ以上のドメイン又はかかる1つ以上の核酸配列をT細胞に提供することと、を含む、方法を提供する。

【0168】

免疫療法に使用するための、本発明のCD9ペプチド、及び免疫療法に使用するための、本発明のCD9ペプチドをコードする核酸分子又はその機能的等価物も、本明細書において提供される。免疫療法に使用するための、本発明のCD9ペプチドを含む化合物又は組成物も本明細書において提供される。いくつかの実施形態は、CD9発現細胞に関連する疾患（例えば、CD9陽性腫瘍、又は骨粗鬆症、又は関節炎、又は肺炎、又はCOPD、又は大腸炎、又は自然リンパ球に関連する疾患）に対する薬剤を調製するための、本発明のCD9ペプチドの使用、又は本発明のCD9ペプチドを含む化合物若しくは組成物の使用、又は本発明のCD9ペプチドをコードする核酸分子若しくはその機能的等価物の使用を提供する。いくつかの実施形態では、かかるCD9陽性腫瘍は、黒色腫、結腸直腸癌、膵臓癌、食道癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、扁平上皮癌、AML、多発性骨髄腫、胃癌、肝癌、脳癌、カポジ肉腫、粘表皮癌、絨毛癌、線維肉腫、子宮頸癌、神経膠腫、腺癌、肺腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、及び小細胞肺癌からなる群から選択される。

10

【0169】

いくつかの実施形態では、本明細書に前出したとおりの本発明の検出試験の結果は、個体が、CD9陽性腫瘍（例えば、黒色腫など）に対し検出可能な免疫反応を示すかどうかの診断に使用される。これは、例えば、免疫療法を施行され、抗腫瘍免疫応答を誘導された患者が、かかる腫瘍に罹患しているかどうかを診断するのに好ましい。したがって、いくつかの実施形態は、本発明のCD9ペプチド（場合により、MHC複合体という観点によるもの）、又はかかる本発明のCD9ペプチドを含む化合物若しくは組成物を、かかる個体の抗体及び／又は免疫細胞と接触させることと、かかる本発明のCD9ペプチド、又はかかる本発明のCD9ペプチドを含むかかる化合物若しくは組成物に、かかる個体のかかる抗体及び／又は免疫細胞のうちの少なくとも1つが結合しているかどうかを判定することと、を含む、個人がCD9陽性腫瘍に対し免疫反応を提示するかどうかについての診断方法を提供する。かかるCD9ペプチド又はかかる化合物が結合する場合、かかる個体がCD9陽性腫瘍に対する免疫応答を提示することを意味する。

20

【0170】

いくつかの実施形態では、CD9への結合について抗体AT14-012に競合する単離された組み換え若しくは精製抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が黒色腫の治療に使用される。実施例に記載されるとおり、抗体AT14-012は、完全寛解した黒色腫患者から得られており、AT14-012は黒色腫に対して有効であることが実証される。したがって、CD9についてAT14-012と競合する抗体も有効である。そのため、黒色腫患者に対するかかる抗体の投与は、黒色腫細胞を効果的に中和し及び／又はかかる細胞を殺傷する。したがって、いくつかの実施形態では、薬剤として使用するための、CD9への結合について抗体AT14-012と競合する単離された組み換え若しくは精製抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、提供される。いくつかの実施形態では、薬剤として使用するための、CD9への結合について抗体AT14-012と競合する、単離された組み換え若しくは精製抗体又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物が、提供される。

30

40

【0171】

黒色腫を少なくともある程度治療する又は予防するための方法に使用するための、CD9への結合について抗体AT14-012と競合する、単離された組み換え若しくは精製抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物、並びに、黒色腫に対する薬剤の調製の際に使用するための、CD9への結合について抗体AT14-012と競合する、単離された組み換え若しくは精製抗体、又はそれらの機能性部分若しくは機能的等価物の、提供される。

【0172】

本出願は同じ実施形態の一部として、又は別個の実施形態の一部として特徴を記載し得

50

るものの、本発明の範囲は、本明細書に記載される特徴のすべて又は一部の任意の組み合わせを含む実施形態も包含する。

【0173】

本発明は、以下の実施例によっても更に説明される。これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではなく、本発明の単に明確にするために提供される。

【図面の簡単な説明】

【0174】

【図1A】図1. ヒトCD9の構造の概略図。ヒトテトラスパニンCD9の概略図。テトラスパニンは、4つのスパニング膜貫通領域と、2つの細胞外ループ（小さな細胞外ループ1（EC1）と大きな細胞外ループ2（EC2））を特徴とする。CD9のEC2は、2つのシステイン結合（赤色）（C152-C181及びC153-C167）と、保存的に隣接する残基（G154及びP168）とにより構造的に及び立体配置的に規定される。テトラスパニンファミリーメンバーの中でも高度に可変的な2つの領域が、アミノ酸位置154~167と、168~181とに存在する（紫色で示す）。

【図1B】2つ目の細胞外ループについての模式図。対応するアミノ酸番号を表示し、2つ目の細胞外ループを5つの異なる領域に分割した模式図を示す。これらの領域は、CD81などのその他のテトラスパニンファミリーメンバーとの重なりをもとに選択された。これらの領域は、エピトープマッピング研究において更に記載する（図5）。

【図2】ヒトCD9のアミノ酸配列（UniProt番号P21926）

【図3】抗体AT14-012のアミノ酸配列及び核酸配列。CDR付番は、Kabateal（1991）によるものである。

【図4A】図4. 標的ID。AT14-012は、約25kDaの大きさの抗原と反応する。非還元及び還元条件下でのウェスタンブロットは、Caco2、Me1BLM、及び対照HL-60細胞株のライセート（50µg）に対するAT14-012の結合を明らかにした（実施例2の材料及び方法を参照のこと）。AT14-012は、約25kDaの大きさの抗原に対し反応性を示し、サンプルを還元したときには反応性が消失することから、AT14-012は立体構造的なエピトープに反応していることが示唆される。

【図4B】AT14-012による癌細胞株に対する免疫沈降についての質量分析により、CD9は標的であるとして示される。ソルターゼビオチン標識したAT14-012又は対照AT10-002を、Caco2、Me1BLM、又は対照HL-60のライセートとともにインキュベートした。免疫沈降させた溶出物をゲルでの泳動にかけ、クーマシーブルーで染色したところ、約25kDaの大きさのバンドを確認可能であった。この位置のバンドはウェスタンブロットの結果と重なる。質量分析により、CD9はAT14-012抗原であることが明らかとなった。MS分析により、Me1BLM細胞株に関しては同様にCD9が沈殿したのに対し、HL-60の溶出物に関してはCD9は観察されなかったことが特定された。

【図4C】市販の抗体ALB6によるCD9の確認。IP溶出により、AT14-012及び抗CD9抗体ALB6に関する反応性から、CD9はAT14-012の標的抗原となることが確認された一方で、HL-60ライセートのIP溶出物に関しては反応性は見られなかったことが示された。

【図5A】図5. エピトープマッピング。ハイブリッド変異体又はスワップ変異体によるエピトープマッピングにより、細胞外ループ2（EC2）、及びより特異的な領域154~180がAT14-012の主要なエピトープであることが明らかになった。エピトープマッピングにより、細胞外ループ2は、すべての抗CD9抗体のエピトープを有していることが明らかとなった。AT14-012は、可変性CD9ループのm3及びm4に対する結合の消失を示した。

【図5B】EC2の領域m4のアラニンスキャニングによるエピトープマッピング。HI9a、ALB6、及びAT14-012（-Alexa647標識）は、領域m4のアラニン変異体に対し反応する。HI9aを陽性対照とした。両方の抗体に対し結合の消失を示した残基はF176だけであった。更に5つの残基（K169、D171、V172、

10

20

30

40

50

L 1 7 3、及び T 1 7 5) が、A T 1 4-0 1 2 に対する結合性の消失を示した。

【図 6 A】図 6. 腫瘍の結合。A T 1 4-0 1 2 は、固体腫瘍に対して広範な結合反応性を有する。フローサイトメトリー解析による、一連の固体腫瘍細胞株に対する結合性についての A T 1 4-0 1 2 抗体と A T 1 0-0 0 2 抗体との比較。

【図 6 B】A T 1 4-0 1 2 は、選択された数の急性骨髄性白血病細胞株に結合する。フローサイトメトリー解析による、一連の A M L 細胞株に対する結合性についての A T 1 4-0 1 2 抗体と C D 3 0 抗体との比較。

【図 6 C】A T 1 4-0 1 2 は、選択された数の複数の骨髄腫細胞株に結合する。フローサイトメトリー解析による、一連の M M 細胞株に対する結合性についての、C D 9 と、未染色及び A T 1 4-0 1 2 抗体 (unstained and AT14-012) と A T 1 0-0 0 2 抗体との比較。

【図 7 A】図 7. 健常な細胞に対する結合。A T 1 4-0 1 2 は、初代メラノサイトと比較して黒色腫に対し強力に結合する。黒色腫細胞株及び初代メラノサイトに対する A T 1 4-0 1 2 の結合についての分析。健常な細胞に対する結合についての陰性対照としては A T 1 0-0 0 2 (抗インフルエンザ) を含め、陽性対照としてはパニツムマブ (抗 E G F R 1) を含めた。一次抗体による染色後、フローサイトメトリーによる可視化のため、抗 I g G-P E で細胞を標識した。

【図 7 B】A T 1 4-0 1 2 は、初代結腸上皮細胞よりも結腸癌に強力に結合する。結腸癌細胞株及び初代結腸上皮細胞に結合する C D 9 P E 及び A T 1 4-0 1 2 A 6 4 7 についてのフローサイトメトリー解析。陰性対照としては A T 1 0-0 0 2 A 6 4 7 (抗インフルエンザ) を含め、C o l o-3 2 0 細胞上での C D 9 発現がないことを確認するためには抗 C D 8 1 P E を含めた。

【図 7 C】A T 1 4-0 1 2 は、初代へんとうリンパ球よりも黒色腫に強力に結合する。へんとうリンパ球を抗 C D 4、C D 8、及び C D 9 抗体で染色して、C D 4 T 細胞、C D 8 T 細胞、及び C D 1 9 B 細胞をそれぞれ識別した。

【図 8 A】図 8. 血小板。A T 1 4-0 1 2 はヒト血小板に結合する。固定した又は固定していない健常ヒト血小板を、C D 4 1、C D 9 又は A T 1 4-0 1 2 ビオチン / S A-P e C y 7 で染色した。ヒストグラムでは C D 4 1 陽性をゲート化した。

【図 8 B】A T 1 4-0 1 2 は健常な血小板を活性化する。T R A P (陽性対照ペプチド)、A L B 6 (陽性対照マウス I g G 1 抗体)、F L A G (陰性対照マウス I g G 1 抗体)、A T 1 0-0 0 2、又は A T 1 4-0 1 2 抗体を加えインキュベートした P R P に対するフローサイトメトリーにより、表面 C D 6 2 P 発現を判定した。

【図 8 C】A T 1 4-0 1 2 は血小板の凝集を誘導しない。全血を様々な刺激剤とともにインキュベートして、マルチプレートリーダーを使用して測定を行い、血小板凝集の誘導について試験した。

【図 9 A】図 9. I n v i v o 実験。A T 1 4-0 1 2 は、i n v i v o におけるリンパ節転移を阻害する。両側腹部に 5 0 0, 0 0 0 個の M e l B L M G F P / ルシフェラーゼ黒色腫細胞を皮下移植した N S G マウスを、A T 1 4-0 1 2 又は A T 1 0-0 0 2 (対照抗体) で処置する。矢印により示されるリンパ節転移は、ルシフェリンの注入し、体内の臓器を露出させた後でバイオルミネセンスイメージャーにより可視化した。

【図 9 B】A T 1 4-0 1 2 は、i n v i v o において原発性黒色腫腫瘍の増殖を妨げる。両側腹部に 2 0 0, 0 0 0 個の M e l B L M G F P / ルシフェラーゼ黒色腫細胞を皮下移植した N S G マウスを、実験の開始後 A T 1 4-0 1 2 又は A T 1 0-0 0 2 (対照抗体) で処置する。腫瘍の増殖は、ノギスを用い測定した。

【図 9 C】A T 1 4-0 1 2 は、i n v i v o において黒色腫腫瘍を認識する。A T 1 0-0 0 2 (抗インフルエンザ) 又は A T 1 4-0 1 2 のいずれかで処置した、又は未処置のママとした N S G マウスから、M e l B L M 皮下腫瘍を回収し、パラフィン包埋した。H R P 標識した抗 λ 又は抗 κ 抗体により、抗免疫組織化学的切片を染色した。

【図 9 D】A T 1 4-0 1 2 処置後表面の C D 9 量は低下した。A T 1 4-0 1 2 又は A T 1 0-0 0 2 (対照抗体) で処置した N S G マウスから回収した皮下 M e l B L M 腫瘍

10

20

30

40

50

を分解し、フローサイトメトリーのため、AT10-002-ビオチン、AT-14-012-ビオチンビオチンと、それに続いて蛍光標識をコンジュゲートしたストレプトアビジンで、又は直接標識したHI9a-CD9若しくは抗IgG抗体で染色した。Fortessa X20 (Becton Dickinson) でサンプルを測定した。

【図9E】図9E~G AT14-012はSK-MEL-5黒色腫増殖を妨げる。皮下にSK-MEL-5黒色腫腫瘍を保持しているNSGマウスを、AT14-012又はAT10-002（対照抗体）で処置した。図9E：各時点でノギスで測定し腫瘍の増殖を評価した。灰色の領域は、抗体による処置期間を示す。図9F：単離した腫瘍をex vivoで秤量した。重量はマウスあたりの平均値である。図9G：liberase処置により腫瘍を消化し、フローサイトメトリーのためCD9-HI9a-PEで染色した。

【図10A】図10. AT14-012結合は、近年樹立された腫瘍細胞株におけるCD9の発現と相関する。短期間培養した黒色腫細胞に対するAT14-012及びCD9-HI9aの結合についてのフローサイトメトリー解析。黒色腫細胞の、CD9-HI9a、AT14-012、及びAT10-002抗インフルエンザ（対照）抗体による染色についてのヒストグラム。

【図10B】バックグラウンドの染色について補正した、AT14-012のシグナルの平均蛍光強度とCD9-HI9aのシグナルの平均蛍光強度との比較。矢印は、もとのAT14-012患者に由来する黒色腫サンプルMe106、07及びMe105、18を示す。

【図10C】樹立した細胞株（PANC01及びCAPAN2）と、患者由来の新しい膵臓癌腫瘍細胞（53M及び193）とに対するAT14-012及びCD9-HI9aの結合についてのフローサイトメトリー解析。

【図11A】図11. AT14-012の結合は（非）ヒト哺乳動物に限定される。NOD-SCID γ c-/-（NSG）マウス。

【図11B】ニュージーサンド白ウサギ。

【図11C】カニクイザル及びヒトから単離した多血小板血漿画分を、CD41発現血小板について電子的にゲート化した。それぞれの種の血小板に対するAT10-002、AT14-012、及び抗CD9の結合をフローサイトメトリーにより測定した。

【図12A】図12. 抗体依存性細胞疾患（ADCC）。クロム標識したMe1BLM若しくはヒト動脈内皮細胞。

【図12B】クロム標識した短期培養した初代黒色腫細胞を記載の抗体とともにインキュベートし、全ヒトPBMCに対しする適正量を求めた。上清にクロムが放出されることにより細胞死を判定した。

【図13A】図13. AT14-012は補体介在性の腫瘍細胞死をトリガーする。黒色腫細胞株を、記載の抗体と、ヒト血清とともにインキュベートした後、抗C1q抗体を使用するフローサイトメトリーにより、C1qの付着について試験した。

【図13B】黒色腫細胞株を、記載の抗体と、ヒト血清とともにインキュベートした後、抗C1q抗体を使用するフローサイトメトリーにより、C1qの付着について試験した。

【図13C】懸濁物、又は記載の抗体及びウサギ補体を終夜結合させた黒色腫細胞をインキュベートすることにより、補体介在性細胞疾患を求めた。

【図13D】懸濁物、又は記載の抗体及びウサギ補体を終夜結合させた黒色腫細胞をインキュベートすることにより、補体介在性細胞疾患を求めた。

【図13E】CD55陽性（Me1BLM）及びCD55陰性（Colo-205）を記載の抗体及びヒト血清とともにインキュベートする。結合させた細胞懸濁物の細胞死の割合は、フローサイトメトリーを用いDAPIにより、又は顕微鏡観察を用いTO-PRO3によりそれぞれ測定される。

【図14A】図14. AT14-012は、ホモクラスタ化したCD9に対し望ましく結合する。2つの黒色腫及び1つの癌腫細胞株を、パルミトイル化阻害剤2-BPとともに、又はDMSOのみで36時間インキュベートした。細胞を脱離させ、フローサイトメトリーのため、AT10-002インフルエンザ対照抗体、又は異なるCD9抗体、AT1

10

20

30

40

50

4-012、又は市販のHI9a及びALB6クローンで染色した。

【図14B】AT10-002シグナルのヒストグラムの平均蛍光強度は、CD9シグナルのm. f. i. により推定した。比率は、対応する Δ m. f. i. の値をDMSO条件についての Δ m. f. i. 値で除算したものである。2-BP値及び異なる細胞株に対するプロット。比率が1である場合、抗体の結合は脱パルミトイル化により影響を受けなかったことを示す。

【図15】HL60細胞上で発現した領域m3のアラニンスキャニングは、AT14-012の結合について全く低下を示さなかった($n=2$)。驚くべきことに、本発明者らは、m3領域における1つのアミノ酸の交換ではAT14-012の結合は妨げられないことを突き止めた。野生型CD9、CD9/CD81 EC2ハイブリッド変異体、EC2 m3 CD9/CD81ハイブリッド変異体を対象として含めた。結合データと、既報のデータとが合致していることが示される(図5)。

【図16A】図16. AT14-012は、市販のマウス抗CD9抗体と比較してCD9に対する親和性が低い。AT14-012(+対照としてAT10-002)及び市販の抗体HI9a及びALB6(+対照として、プレート上にCD9タンパク質が存在していることを検出するための抗-FLAG及びOKT3)の、CD9への結合について比較した。

【図16B】SPR曲線は、単一スポットしたCD9-3xFLAG-ウサギFc-ソルターゼ-ビオチンタンパク質に対し様々な抗体を注射した際の、抗CD9抗体AT14-012、ALB6、及びHI9aの結合を示す。

【図16C】ヒトCD9に対する、異なる抗体の親和性を、SPRにより測定した(k_a については $10^4 \text{ 秒}^{-1} * \text{M}^{-1}$ 、 k_d については 10^{-5} 秒^{-1} 、 K_D についてはpM)。7324RUの組み換え体CD9-3xFLAG-ウサギFc-ソルターゼ-ビオチン($0.5 \mu\text{g/mL}$)でコートされた1つのCD9スポットに対する結果を示す。結合速度を算出するため、3つのデュプリケート注射に由来するデータを1:1結合モデルに当てはめた。 0.5 又は $1.0 \mu\text{g/mL}$ CD9-3xFLAG-ウサギFc-ソルターゼ-ビオチンでコートした3つのスポットに対する測定から得られた平均及び標準偏差を示す。*: 正確に当てはめた場合に抗体の解離速度(k_d)が明らかに低すぎる場合、 $0.1 * 10^{-5}$ の値を使用した。いずれも $0.5 \mu\text{g/mL}$ CD9-3xFLAG-ウサギFc-ソルターゼ-ビオチンでコートした2つのスポットに対する、2つの適正量の平均を示す。結合力価を計算するため、3つのデュプリケートでの注射から得られたデータを使用した。

【図17A】図17. K169、D171、V172、L173及びF176は、AT14-012エピトープの一部である。組み換え発現させたm4アラニン変異体に対しAT14-012(三角形、すべてのグラフのうち最も下側の線)、ALB6(円形)、及びHI9a(四角形)を結合させたELISAデータ。

【図17B】CD9の相同モデル上に示されたAT14-012のエピトープ(ECは細胞外及びICは細胞内配置)。CD81相同モデル(2AVZ; Seigneuret et al., 2006)を使用して、I-Tasserサーバー(Yang et al., 2015)を用い相同モデルを作成した。2016年11月時点で、結晶構造は既報であり(Zimmerman et al., 2016)、かつこの結晶構造をベースとして新しく作成されたCD9相同モデルは、AT14-012エピトープに関する残基の配置に関して何ら可能性を示さなかった。

【図17C】異なる種(図11を参照)由来の細胞に対するAT14-012の結合についてのFACSデータ、及び複数種(本箇所)に由来するCD9配列(残基23~228)のアラインメントにより、AT14-012エピトープを裏付ける。配列は、2016年6月ころにウェブサイトのensembl.orgで検索した。見つけられたすべての種に関し、最初の22残基は十分には解明されなかったため、本明細書では省略する。AT14-012は、カニクイザル細胞と反応することが知られている一方、ウサギ細胞又はマウス細胞への結合についてアッセイした場合には結合しない。C167及びC182

10

20

30

40

50

(緑色)が隣合う領域m4のアラインメント(明灰色)、より具体的には、AT14-012の結合に関与する5つの残基(暗灰色)をハイライトしている。明らかに、F176L変異は、AT14-012の結合を低下させない(図11C中、カニクイザル細胞に対するAT14-012の結合を参照のこと)。

【図18A】図18. 単一細胞として選別した2H15 B細胞とSPR (IBIS)とを使用するAT14-012の親和性の改良。濃度を増加させてAT14-012組み換え体を8回連続して注射することによるSPR曲線(タンパク質0nM-1.33nM-4.0nM-13.30nM-40.0nM-133.0nM-及び0nM)。緑色の線は、CD81に対する結合反応性(がなかったこと)を意味し、オレンジは抗ヒトIgG-Fcに対する結合、灰色は抗CH1ナノボディに対する結合、及び青色はCD9への結合を意味する。抗IgG-Fc及びaCH1の比を用い、B細胞上清中のIgGの濃度及び完全性を観察することができる(Bを参照のこと)。

【図18B】材料及び方法に記載したSPRでの800個のクローンの選別後、本発明者らは新しく生育させたB細胞の上清を再度その結合性についてアッセイした。8つのクローンでは増加した(1D5、1F5、2D12、4H10、6E10、9E5、10B9、及び10D1)のに対し、4つの疑いのあるクローンは最終的に増加しなかった(1C9、2H10、9A9、9D12)。開始時及び終了時には、参照として組み換えAT14-012を注入する。

【図18C】特定されたクローンの親和性を含む配列解析により、それらの会合/解離特性に関係する変異の重複が示された。第1群は、速い会合と遅い解離を示し、第2群は、速い会合と速い解離を示し、第3群は、野生型配列と比較して明確な差はなかったことを示す(1G2、1G3、1G4、1G5)。

【図19A】図19. 高親和性変異体であるAT14-012の設計、発現、及び解析、並びにSPR。主要な変異は重鎖のみに位置したことから、ここでは重鎖のアラインメントのみを示す。また、第1群(赤色; H40Y及びY112F)並びに第2群(青紫; D116H及びT29N)並びに両群の組み合わせ(H40Y、Y112F、D116H、及びT29N)を作製した。対照として、CD9の結合が消失する変異を1つ加えて、結果を検証した(暗青; G110D)。もとのAT14-012/2H15超変異を黄色でハイライトする。IMGT番号系によるCDR付番(Lefranc 1997, Lefranc 1999及びLefranc et al. 2003)。

【図19B】Me1WBO又は2つの異なるドナー細胞より短期間培養した健常メラノサイトを、異なるAT14-012多様体のCHO産生上清とともにインキュベートした。ヤギー抗-ヒトIgG-PE二次抗体を使用して、フローサイトメトリーにより結合を検出した。

【図19C-1】Me1WBO又は2つの異なるドナー細胞より短期間培養した健常メラノサイトを、異なるAT14-012多様体のCHO産生上清とともにインキュベートした。ヤギー抗-ヒトIgG-PE二次抗体を使用して、フローサイトメトリーにより結合を検出した。

【図19C-2】Me1WBO又は2つの異なるドナー細胞より短期間培養した健常メラノサイトを、異なるAT14-012多様体のCHO産生上清とともにインキュベートした。ヤギー抗-ヒトIgG-PE二次抗体を使用して、フローサイトメトリーにより結合を検出した。

【図19D】異なるAT14-012多様体のCHO産生上清を、CD9コートしたチップで、SPRによりアッセイした(デュプリケートで示す)。#=CHO産生上清。親和性は、 k_a については $10^4 \text{ 秒}^{-1} * \text{M}^{-1}$ とし、 k_d については 10^{-5} 秒^{-1} とし、 K_D についてはpMとした。いずれも $0.5 \mu\text{g/mL}$ CD9-3xFLAG-ウサギFc-ソルターゼ-ビオチンでコートした2つのスポットに対する、2つの反応の平均を示す。変異体のサンプルは、精製していない産生上清をPBSTで1倍希釈したものとした。-: 結合は検出されなかった。*: 結合が検出されたものの、良好な適合は不可能性である。

10

20

30

40

50

【図19E】異なるAT14-012多様体のCHO産生上清を、CD9コートしたチップで、SPRによりアッセイした（デュプリケートで示す）。# = CHO産生上清。親和性は、 k_a については $10^4 \text{ 秒}^{-1} * \text{M}^{-1}$ とし、 k_d については 10^{-5} 秒^{-1} とし、 K_D についてはpMとした。いずれも $0.5 \mu\text{g/mL}$ CD9-3xFLAG-ウサギFc-ソルターゼ-ビオチンでコートした2つのスポットに対する、2つの反応の平均を示す。変異体のサンプルは、精製していない産生上清をPBSTで1倍希釈したものとした。-：結合は検出されなかった。*：結合が検出されたものの、良好な適合は不可能性である。

【図20】AT14-012高親和性変異体を使用する血小板凝集アッセイ。TRAP、ALB6、及びこれまでに評価した精製組み換え体完全長AT14-012 IgG1及びIgG3（対照AT10-002 IgG1抗体を含む）を合わせて対照とした。

【図21】B細胞により産生された抗体AT14-012/2H15はIGHG3*16のアロタイプである。AT14-012/2H15 B細胞からmRNAを単離した。図の出典はVidarsson et al., 2014である。

【図22A】図22. in vivoにおいて、AT14-012を抗PD1と組み合わせると、腫瘍の増殖が抑制される。ヒト免疫系を保有しているNSGマウスにSK-MEL-5ルシフェラーゼ発現黒色腫細胞を皮下移植する。マウスを、週に2回記載の抗体で処置する。腫瘍の増殖をルシフェラーゼイメージングにより測定する。灰色の領域は、抗体による処置期間を示す。

【図22B】実験終了時の腫瘍の大きさと、抗体の初回注射時の腫瘍の大きさをもとに、腫瘍増殖の抑制率（TGI）を算出する。

【実施例】

【0175】

実施例1-AT14-012 B細胞クローンの単離

材料及び方法

黒色腫細胞培養物。黒色腫細胞株MelBLM、Mel136.2、及びMelWBOを、Rosalie Luiten (Academic Medical Centre, Dept. of Dermatology) より得て、標準的な組織培養法を用い、8%ウシ胎児血清を添加したIMDM (Life Technologies) で維持した。細胞表面タンパク質の破損を最小限にするため、腫瘍細胞はAccutase (Life Technologies) 又はEDTAを使用して取り除いた。

【0176】

黒色腫ドナーのPBMC。実験プロトコルは、ライデン大学メディカルセンターの医療倫理委員会 (Medical Ethical Committee) により承認された。自己血液由来の腫瘍特異的T細胞を、IFN α (Verdegaaal Cancer Immunol Immunother 2011) と組み合わせることで養子移入することによりステージIVの黒色腫患者を治療した。治療後、腫瘍は退縮し、患者はこのコホートでは長期生存者のみである。治療の5年後、血液を採取し、フィコールを使用した密度勾配法でPBMCを単離した後、B細胞の単離まで液体窒素で凍結した。

【0177】

B細胞の不活化。FACSAria (Becton Dickinson) を使用して、解凍した患者PBMCから全IgG B細胞を選別し、Kwakkenbos Nat Med 2010に記載のとおり不活化した。簡潔に記載すると、全IgG B細胞を培養し、組み換えマウスIL-21の存在下でL細胞を発現しているCD40Lに対し、36時間にわたり活性化した。レトロウイルスを使用した形質導入により、本発明者らの所有するBcl6及びBcl-xLとマーカー遺伝子GFPとを発現する構築物をB細胞に導入し、B細胞を不活化した。

【0178】

B細胞の培養。不活化したB細胞を、8% FCS (HyClone)、ペニシリン/ストレプトマイシン (Roche)、及び組み換えマウスIL-21 (50 ng/mL、

10

20

30

40

50

自家製造)を添加したIMDM(Gibco)で維持した。ガンマ線照射(50 Gy)したCD40L発現マウス線維芽細胞をフィーダー細胞としてインキュベートした。培養物を定期的に試験したところ、マイコプラズマ陰性であった。

【0179】

黒色腫に結合するB細胞クローンの単離。不死化IgG⁺B細胞を、384ウェルプレートの1ウェル当たり25個ずつ播種し、L細胞及びmIL21を用い増殖させた。約2週間の培養後、抗体を含有するB細胞の上清を、黒色腫細胞株の混合物に対する結合について試験した。抗ヒトIgG-PE抗体(Southern Biotech)を使用して、フローサイトメトリー(FACS Canto and LSR Fortessa X20, Becton Dickinson)により陽性の結合を可視化した。陽性の微量培養物(minicultures)を増殖させ、シングルセル分取したB細胞に対しかかる手順を繰り返して、25個細胞微量培養物から黒色腫に反応するB細胞クローンを回収した。パニツムマブ(抗EGFR1)を陽性対照抗体としてインキュベートした。

10

【0180】

組み換え抗体の産生。組み換え抗体の産生のため、RNeasy(登録商標)ミニキット(Qiagen)により全RNAを単離し、cDNAを生成し、PCRを実施し、重鎖及び軽鎖可変領域をpCR2.1TAクローニングベクター(Invitrogen)にクローニングした。逆転写酵素又はDNAポリメラーゼを排除するため、変異を導入した複数のクローンを配列決定した。AT14-012の重鎖及び軽鎖可変領域をクローニングし、ヒトIgG1又はIgG3及びκ定常領域によってpcDNA3.1(Invitrogen)ベースのベクターにインフレイムでクローニングした。得られるベクターを293T細胞に一過性トランスフェクトし、AKTA精製システム(General Electric Lifesciences)を用い培養上清から組み換え抗体を精製した。対照とすることを目的として、インフルエンザウイルスのHA抗原を認識する無関係な対照抗体(AT10-002)を実験に含めた。

20

【0181】

結果

黒色腫結合B細胞クローンの同定及び単離。皮膚黒色腫及びステージIVの進行性の転移性疾患を有する患者を、腫瘍反応性の自己T細胞の養子移入(Verdegaaal Cancer Immunol Immunotherapy 2011)により治療した。この治療のため、腫瘍組織を外科的に得て、自己黒色腫細胞株の樹立に使用した。末梢血の単核細胞を血液から単離し、T細胞培地中で、致死量の線照射(lethally irradiated)を施した自己黒色腫細胞と共培養した。4週間の培養後、機能性アッセイ(Verdegaaal Cancer Immunol Immunotherapy 2011)により、培養したT細胞の腫瘍反応性を確認した。患者に増殖させた自己T細胞を2回導入すると完全な応答を示し、かつ治療から9年以上後にも腫瘍がない。

30

【0182】

自己T細胞療法から5年後に単離したPBMCから、全IgG⁺B細胞プールに、本発明者らの所有するBcl6/Bcl-xLコンストラクトをレトロウイルスにより導入した。不死化させたGFP陽性細胞を、黒色腫結合抗体の存在について、フローサイトメトリーにより試験した。AT14-012と命名されたIgG3⁺B細胞クローンは、最初に試験した黒色腫細胞株(MelBLM及びMelWBO)の療法に対し強い反応性を示した。重鎖及び軽鎖可変配列を決定し(図3を参照のこと)、293細胞又はCHO細胞における組み換え抗体の産生のため、IgG1及びIgG3の骨格の両方でDNAのクローニングを行った。

40

【0183】

実施例2-AT14-012の標的抗原はCD9である

材料及び方法

AT14-012の標的の同定及び検証

大腸癌細胞株Caco2の細胞(ATCC HTB-37)、黒色腫細胞株MelBL

50

Mの細胞、ヒト前骨髄球性白血病細胞株HL-60の細胞（陰性対照）を溶解させ（0.5% Triton X114（Sigma）、150mM NaCl、10mM Tris-HCl（pH7.4）、1.5mM MgCl₂、プロテアーゼ阻害剤及びホスファターゼ阻害剤（Roche）を添加）、無関連な抗体（自家製造したRSV抗体D25）、プロテインG、及びストレプトアビジンビーズ（Pierce）を用いてそれぞれを明らかにし非特異的な結合タンパク質を除去した。AT14-012を直接ウェスタンブロットするため、本発明者らは、精製した組み換えAT14-012を、TBS+5% BSA（Thermo Fisher）及び0.1% Tween 20（Sigma）中で少なくとも1時間室温でインキュベートし、SDS-Pageを行い、ライセートをブロットした。ブロットをTBSTで5分間×3回洗浄し、TBST+5% BSA中やギ抗ヒトIgG（HRP標識、1:10,000希釈；Jackson Laboratories）で検出した。再度、ブロットを5分間×3回洗浄した後、化学発光処理し、発光させた。次に、由来の明らかなライセートを、予めビーズに結合させた黒色腫特異的抗体AT14-012又はインフルエンザ特異的抗体AT10-002（陰性対照として）とともに、インキュベートした（4℃、3時間）。抗体とインキュベートしたビーズを溶解緩衝液中で3回洗浄して、結合したタンパク質をビーズから溶出させ（0.1Mグリシン（pH10.5）、150mM NaCl、1% Triton X100、1mM EDTA）、1:10体積量の2M Tris（pH7.4）で中和した。再度、サンプルをSDS-PAGEゲルで泳動した。85%のIPサンプルをSDS-PAGEにかけ、Imperial protein stain（Pierce）で全タンパク質を染色し、質量分析により特異的なバンドを切り出した。免疫沈降（IP）サンプルの残りをSDS-PAGEにかけ、免疫ブロットのためPVDF膜（Bio-Rad）に転写した。ウェスタンブロット解析のため、かかるブロットをAT14-012又はマウス抗CD9（クローンALB6、Beckmann Coulter）とともにインキュベートし、CD9の同定を確認した（データ不掲載）。

【0184】

エピトープマッピング

最初に、CD9（対CD81）のハイブリッド変異体を作製することによりエピトープマッピングを実施した。CD9には、2つの細胞外ループ、すなわち、小さなEC1（残基34～58；又はSEL）と、AT14-012の結合パートナーとして機能し得る大きなEC2（残基112～195；又はLEL）とがある（図1a）。野生型のCD9構築物に加えて、本発明者らは、対応するCD81残基に関し、第1の小さなループを置き換える1つのスワップ変異体（swap mutant）と、大きなループを置き換える1つのスワップ変異体とを生成した。第2のループを更に分解するため、本発明者らは、対応するCD81領域に対し、5つのスワップ変異、すなわち、m1（対応するCD81残基により置換したCD9の残基112～134）、m2（対応するCD81残基により置換したCD9の残基135～151）、m3（対応するCD81残基により置換したCD9の残基154～166）、m4（対応するCD81残基により置換したCD9の残基168～180）、及びm5（対応するCD81残基により置換したCD9の残基182～195を）、を生じさせることにより、予想されるαヘリックス領域（alpha helical stretches）を置き換える、より小規模なスワップ変異（smaller swap mutants）を提案した（図1bを参照のこと）。システインはテトラスパニン（C152、C153、C167、及びC181）間で保存されていることから、構造特性／折りたたみは、表記の領域をスワップした後にも影響を受けることはない。二次構造の予測により、CD9の折りたたみはその他のテトラスパニンの場合の様式と同様であることが示されることから、このアプローチはシステインが保存される限りは機能するものと示唆される。すべてのCD9及びスワップ多様体は、CD9遺伝子のGeneArt（Thermo Fisher Scientific）により作製し、ウェスタンブロットで検出することができるようC末端にFLAGタグを付与した（3x FLAG：DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK）。CD9のcDNAを、pHEF-TIG第3世代レンチウイルスベクターにクロ

ーニングした（CD9のcDNAには、3'にIRES-GFPをもたせた）。HEK293T細胞においてVSV-Gレンチウイルス粒子を産生させた。レトロネクチン（Takara, Clontech, Japan）の存在下で、複数の黒色腫CD9陰性細胞株HL-60（ATCC；CCL-240）にこれらのウイルスを導入し、GFPについて選別してCD9を過剰発現している細胞のみを含む集団を得た。AT14-012と、その他の市販の抗CD9抗体（ALB6；Beckmann Coulter and H19a；Biolegend）の、FACSの結合結果に基づいて、m4領域にアラニン変異を作成して（残基K169A、K170A、D171A、V172A、L173A、E174A、T175A、F176A、T177A、V178A、K179A、及びS180A）、このm4領域に特異的なアミノ酸がエピトープに関係するかを試験した。

10

【0185】

CD9のm3領域にアラニンスキャニングを使用したエピトープマッピング

前述のとおりアラニンスキャニングを実施した（図5Bに關係する材料及び方法を参照のこと）。CD9のcDNAを、を含有しているpHEF-TIG第3世代レンチウイルスベクターにクローニングした（CD9のcDNAには、3'にIRES-GFPをもたせた）。HEK293T細胞においてVSV-Gレンチウイルス粒子を産生させた。レトロネクチン（Takara, Clontech, Japan）の存在下で、複数のミエローマCD9陰性細胞株HL-60（ATCC；CCL-240）にこれらのウイルスを導入し、GFPについて選別してCD9を過剰発現している細胞のみを含む集団を得た。AT14-012と、その他の市販の抗CD9抗体（ALB6及びH19a）の、FACSの結合結果に基づいて、m3領域にアラニン変異を作成して（残基G154A、L155A、G157A、G158A、V159A、E160A、Q161A、F162A、I163A、S164A、D165A、I166A）、このm3領域に特異的なアミノ酸がエピトープに関係するかを試験した。

20

【0186】

結果

AT14-012の標的はCD9である。

本発明者らは、FACSにおいてAT14-012の結合が高かったことから、大腸癌細胞Caco2（ATCC HTB-37）を使用し、AT14-012の標的を特定した。但し、黒色腫細胞株MelBLMライセートに対しても同様の方法で確認した。Caco2細胞、MelBLM細胞、又はHL-60細胞のライセートをSDS-Pageにかけ、ウェスタンブロットし、AT14-012の反応について調査し、ヤギ抗ヒトポリクローナルIgG（HRP labeled；Jackson laboratories）により検出した。かかるブロットにより、約25kDaの大型タンパク質に対する応答性が示された（図4a）。ライセートを還元条件下で泳動すると、反応性又はシグナルが消失したことから、抗体は、システインにより支持される立体構造をもって構成されるエピトープに反応することを意味する。Caco2又はMelBLMのライセートの免疫沈降物（IP）を、ビオチン標識しソルターゼタグを付したAT14-012とともにインキュベートした場合にも、約25kDaのバンドが生じた（図4b）。Caco2/MelBLMライセートのAT10-002 IPでも、HL-60ライセートのIPでも見られなかったことから、このバンドは特異的なものであった。免疫沈降のバンドの質量分析（MS）分析により、CD9が標的タンパク質であることが明らかとなった。MelBLM細胞のIPについては、クーマシー染色ではバンドが視認されなかったものの、MS解析では同様にCD9抗原が沈降していたことが示された。細胞外ループ2に属する4つの細胞外ペプチドを同定したところ、タンパク質カバレッジは10%であった。疎水性であることに起因して検出が難しいことから、膜貫通ペプチドは同定されなかった。ウェスタンブロット解析により、AT14-012がCD9に結合していることが確認された（図4c）。簡潔に記載すると、Caco2又はHL-60のライセートを、AT14-012又はインフルエンザ特異的抗体AT10-002により免疫沈降した。再度、AT14-012及びマウス抗CD9（クローンALB6）によるウェスタンブロット解析か

30

40

50

ら、C D 9 は A T 1 4 - 0 1 2 の結合標的であることを確認した（図 4 c）。

【0187】

C D 9 は、正常な細胞及び悪性細胞で広範に発現される。これまでに C D 9 特異的抗体が作製されており、市販されている（例えば、A L B 6 及び H I 9 a）。本発明者らは、C a c o 2 細胞及び B L M 細胞で C D 9 が発現していることをこれらの抗体により確認した。A T 1 4 - 0 1 2 との競合試験により、すべての市販の抗体は A T 1 4 - 0 1 2 の結合と競合し得ること、並びに A T 1 4 - 0 1 2 そのものと競合し得ることが示された（データ不掲載）。

【0188】

A T 1 4 - 0 1 2 の結合エピトープをより特異的に同定するため、材料及び方法の節に記載のとおり C D 9 ホモログの C D 8 1 のタンパク質領域をスワッピングして、ハイブリッド変異体を作成した。これらの変異体に対する抗体 A T 1 4 - 0 1 2、A L B 6、及び H I 9 a の結合を試験した。本発明者らは、細胞外ループ 2（E C 2）に結合するすべての抗 C D 9 抗体は、C D 8 1 の E C 2 をスワッピングさせた場合に結合の低下を示す一方、第 1 の細胞外ループをスワッピングさせた場合には結合は維持されることを特定した。H L 6 0 細胞に空ベクターを導入した場合、すなわち細胞に誘導を行わなかった場合には、すべての抗体で結合は観察されなかった。C D 9 に特異的な領域を C D 8 1 の対応する領域とスワッピングさせたハイブリッド変異体 m 1、m 2、m 3、m 4、及び m 5 により、E C 2 ループ上のエピトープを更に評価した（図 1 b）。二次構造を維持するため、システインには触れずにそのままとしたことに留意されたい。m 2 領域及び m 5 領域のスワッピングでは、いずれの抗 C D 9 抗体の結合にも影響は生じなかったことから、これらの領域にはエピトープは存在していなかったことが示される。本発明者らは、領域 m 3 をスワッピングした場合に、すべての抗体は結合を無効化されたことを示すことができたことから、このことは、試験したすべての抗体残基に関しエピトープがこの領域に存在することを示す。A T 1 4 - 0 1 2 は m 1 変異体に対する結合を維持したのに対し、すべての市販の抗体は結合性を失った。A L B 6 及び A T 1 4 - 0 1 2 は、m 4 変異体に対しては結合性の消失を示したのに対し、H I 9 a は結合性を保持した。これらの結果は、A T 1 4 - 0 1 2 の主なエピトープが m 3 及び／又は m 4 に存在することを示す。これを受け、本発明者らは、最初に m 4 におけるアラニン変異体を作製した（材料及び方法の節に記載のとおり）。ここでは H I 9 a を、導入した H L 6 0 細胞の細胞表面上での C D 9 アラニン変異体の発現の制御についての陽性対照とした。A L B 6 を、この市販の広範に使用されている抗 C D 9 抗体が類似するエピトープを有するかどうかを研究する際の比較とした。F A C s 解析後、本発明者らは、F 1 7 6 A が A L B 6 に対する結合の消失を示した唯一のアラニン変異体であることを示した。A T 1 4 - 0 1 2 の場合と同様、残基 K 1 6 9、D 1 7 1、V 1 7 2、L 1 7 3、T 1 7 5、及び F 1 7 6 をアラニンで置換した場合、結合の消失が観察された。したがって、本発明者らは、少なくとも 5 つの追加のアミノ酸が異なっていることを除き、A T 1 4 - 0 1 2 のエピトープは A L B 6 のエピトープと重複することを示した。

【0189】

A T 1 4 - 0 1 2 のエピトープは直線的なものであり、残基は m 4 領域のみに存在する。C D 9 / C D 8 1 ハイブリッド変異体に対する結合性が消失したことから、本発明者らは、領域 m 4 のアラニンスキャニングによる結合試験後、m 3 領域について、更に詳細に試験を行った（図 1 5 を参照のこと）。本発明者らは、A 1 5 6 を除き、アミノ酸 1 5 4 ~ 1 6 6 にまたがる領域 m 3 において、アラニン変異体を作製した。本発明者らは、C D 9 陰性の H L 6 0 細胞株に形質導入し、C D 9 発現細胞を G F P バルク選別した。細胞に結合する A T 1 4 - 0 1 2、A L B 6、及び H I 9 a を F A C S により試験した。驚くべきことに、この領域では、A T 1 4 - 0 1 2 又は H I 9 a の結合を損なわせる単一アラニン置換は存在しなかった。E C 2 及び m 3 の C D 9 / C D 8 1 ハイブリッド変異体は、すべての抗体に関し結合性の消失を示したため、本発明者らは、この特定のハイブリッドはおそらくは折りたたみが不適切であるものと仮定した。C D 8 1 の結晶構造及び C D 9 の

相同モデルにより（図15を参照のこと）、m3領域はm1、m2、及びm4間のある位置に「固定（locked）」される。したがって、すべての抗CD9抗体について、この領域に対しアミノ酸の大幅な変更が生じた場合に結合は消失するようである。ちなみに、ALB6は、Q161A変異体に対する結合性を消失していたことから、本発明者らは、ALB6のエピトープについても解決した（m3におけるQ161、及びm4におけるF176）。領域m3及びm4におけるアラニンスキャニング解析後、本発明者らは、AT14-012は、立体配座的にともに保持される又はCD9の他の周辺部分により誘導される、線状に折りたたまれたエピトープを対象とする、という仮説を立てることができた（m2、m3、及びm5、図15中の相同モデルを参照されたい）。

【0190】

AT14-012はクラスタ化したCD9に対し選好的に結合する。Martin Hemlerの研究室により、CD9のパルミトイル化には、CD9のホモクラスタの形成が望ましいこと、並びにCD9ホモクラスタのレベルは、初代腫瘍細胞、特に遊走性腫瘍細胞をもとに評価されることが示されている（Yang JBC 2006）。CD9腫瘍細胞のパルミトイル化状態におけるAT14-012の依存性（dependence）を求めるため、CD9腫瘍細胞を、パルミトイル化阻害剤として知られる2-ブロモパルミテート（2-BP）の存在下で培養した。黒色腫BLM細胞は、2-BP処理細胞へのAT14-012の結合性が低下している一方で、市販のCD9 HI9a抗体の結合性は、脱パルミトイル化により影響を受けないことを明瞭に示す〔図14A、B〕。興味深いことに、観察される効果は、非常に侵襲性の高いMelBLM（Bartolome AJP 2009）で最も強く、非遊走大腸癌のCaCo2細胞では見られなかった。これにより、CD9のホモクラスタは、進行疾患において高レベルであり、AT14-012は腫瘍の進行を監視するのに使用され得ることが示される。

【0191】

実施例3-AT14-012の機能特性

材料及び方法

腫瘍細胞株。黒色腫（MelBLM、MelWBO、Mel136.2）、大腸癌（CaCo2、Colo320、HT29、LSTR）、膵臓癌（PANC-1、CAPAN-2、MiaPACA、BxPC3）、食道癌（OE19、OE33）、急性骨髄性白血病（THP-1）の細胞株を、標準的な組織培養条件下で維持した。細胞表面タンパク質の破損を最小限にするため、腫瘍細胞はAccutase（Life Technologies）を使用して取り除いた。

【0192】

フローサイトメトリー及び抗体96ウェルプレートにて50,000個の細胞を対象とするフローサイトメトリーによる解析を行うため、剥離させた固体腫瘍細胞及び初代線維芽細胞、非接着性腫瘍細胞及びその他の初代細胞を準備した。細胞を、CD4、CD8、CD9、CD19、CD41、CD62P、CD81（Biolegend）に対する市販の抗体とともにインキュベートした。自家作成したAT10-002、抗CD30、又はAT14-012は、未標識、ビオチン又はAlexa 647標識のいずれかとした。標識されていない抗体及びビオチン標識抗体を、それぞれ抗IgG-PE（Southern Biotech）又は抗ストレプトアビジンPeCy7（Becton Dickinson）により二次染色した。いくつかの実施形態では、パニツムマブ（抗EGFR1）を陽性対照抗体としてインキュベートした。FACS Canto and LSRII Fortessa X20（Becton Dickinson）でサンプルを解析した。

【0193】

血小板活性化。クエン酸塩を入れた採血管（Becton Dickinson）に健常なボランティアより採取した血液を800gで10分間遠心分離した。多血小板血漿画分（PRP）の上部を回収し、血小板活性化試験に使用した。簡潔に記載すると、10μLのPRPに10μg/mLの抗体、Fab2フラグメント、又は陽性対照のトロンビン

受容体活性化ペプチド (TRAMP) を添加し、室温で 20 分間インキュベートした。直接コンジュゲートさせた抗体 (direct conjugated antibodies) (Biolegend) を使用して、CD41 及び CD62P/P-セレクチンの細胞表面発現についてサンプルをフローサイトメトリー (LSRFortessa X20, Bd) により解析した。刺激していない血小板において、CD9 HI9a の発現を測定した。

【0194】

血小板凝集。健常なボランティアから、クエン酸塩を入れた採血管 (Becton Dickinson) に血液を採取した。300 μ L の全血を 300 μ L のアッセイ緩衝液と混合し、37 $^{\circ}$ C で 2 分間加温した。陽性対照ペプチド又は抗体 (終濃度 10 μ g/mL) を添加し、Multiplate analyser (Cobas/Roche) を使用して時間内の血小板の凝集を測定した。

10

【0195】

マウス異種移植片。免疫不全マウスに、高濃度マトリゲル (High Concentration Matrigel) (Corning) で、200, 000~500, 000 個のルシフェラーゼ/GFP 発現 Me1BLM 細胞を皮下移植した。AT14-012 又は AT10-002 対照抗体を 10 mg/kg でマウスに静脈投与した。抗体による処置は腫瘍注射日に開始する、あるいは腫瘍を 3 週間成長させた原発性の皮下腫瘍の増殖又は転移下腫瘍の成長をそれぞれ測定した。皮下腫瘍の成長は、ノギス、又はルシフェリン (Promega) の注射後フォトンイメージャー (Biospace lab) を使用するルシフェラーゼイメージングの両方で測定した。転移の存在は、実験の終了時に視認及びルシフェラーゼイメージングにより視覚化した。

20

【0196】

近年樹立された腫瘍細胞株。

黒色腫患者から腫瘍組織片を外科的に取り除き、分解し、培養した。標準的な組織培養条件下で細胞の増殖を維持した。膵臓癌患者より得られた腫瘍組織は、直接細胞株を樹立するには小さく、最初に NSG マウスの皮膚下に移植される。増殖する腫瘍を回収し、分解し、標準的な組織培養条件下で維持する。EpCam の発現をもとに、ヒト腫瘍細胞及びマウス由来の腫瘍浸潤性線維芽細胞をフローサイトメーターによるセルソーティングにより分離した。

【0197】

結果

AT14-012 は広範な腫瘍反応性を有した。黒色腫細胞株 Me1BLM 及び Me1WBO に対する結合をもとに AT14-012 を同定した。その後、AT14-012 は、試験したすべての黒色腫細胞株に対し結合反応性を示すことが判明した (図 6a 及び図 7a)。比較的大部分の文献は、CD9 は様々な固体腫瘍細胞で広範に発現しており、上方制御されていることを示す。この流れから、本発明者らは AT14-012 が一連の大腸癌細胞株、食道癌細胞株、及び膵臓癌細胞株と反応することを見出した (図 6a 及び図 7b)。したがって、AT14-012 と相互作用しないことが判明した唯一の固体腫瘍細胞株は、CD9 陰性 Colo-320 大腸癌細胞株である (図 7b)。程度 (extend) は弱くなるものの、CD9 は造血細胞でも発現していることが判明した。図 6b 及び図 6c において、AT14-012 は、選ばれた数の急性骨髄性白血病細胞及び骨髄性白血病細胞と反応可能であることが示された (AT14-012 は、BL-007、BL-009、BL-037、BL-054、及び BL-058 に結合するようであるのに対し、BL-014、BL-030、及び BL-055 とは結合しない)。要するに、この結果から、AT14-012 は、黒色腫のみならず十分に広範な治療用途に有用であることが示される。

30

40

【0198】

AT14-012 は初代細胞よりも腫瘍に対して強力に結合する。現在臨床で固体癌の治療に使用されている治療用抗体のうち、主に腫瘍で発現する抗原を認識するものはない。しかしながら、これらの抗体の治療域は、抗原が健常細胞よりも腫瘍細胞で高発現する

50

場合に示される。例えば、トラスツズマブ（ハーセプチン）は、HER2を過剰発現している乳癌の治療に使用される。同様に、このCD9は、広範な固体癌においてしばしばアップレギュレートされることが知られている。AT14-012が、健常細胞よりも腫瘍細胞に対して強く反応する場合、AT14-012はハーセプチン同様の治療条件下で使用され得る。更に、本発明者らは、AT14-012が初代メラノサイトよりも黒色腫細胞に対し強く反応することを見出した（図7a；AT14-012は、すべての黒色腫細胞株に結合する一方、初代線維芽細胞には結合しない。AT14-012は、初代メラノサイトに結合するものの、ほとんどの黒色腫細胞株の場合と比較してその強度は弱い）。また、AT14-012は、初代大腸上皮細胞よりも大腸癌細胞に対し強く反応する（図7b；AT14-012は、初代大腸上皮細胞（下側パネル）よりもCaCo2（上側パネル）に対して強く結合する）。最後に、AT14-012は、初代へんとうT及びBリンパ球よりも黒色腫MelBLM細胞に結合することが判明した（図7c；中央及び右側の列の下方のイメージは、AT14-012のMelBLMへの結合が、AT14-012の全CD4⁺T細胞、全CD8⁺T細胞、及び全CD19⁺B細胞に対する結合（中央及び右側の列上方のイメージ）よりも強力であることを示す。これらのデータにより、AT14-012は現在固体腫瘍の抗体治療に用いられている臨床条件について有用であることが示される。

【0199】

AT14-012は赤血球に結合し活性化するものの、凝集は誘導しない。これまでに、CD9は血小板で高発現していること、並びにCD9を標的とする抗体は、血小板の活性化及び凝集を誘導する場合があります、これにより抗CD9抗体による治療を受けている患者では血栓症が誘導されるおそれがあることが報告されている。AT14-012を単離した黒色腫患者は血栓症の症状を何ら示さなかったものの、本発明者らにはAT14-012がこの重篤な副作用を誘導しないことを保証する必要があった。

【0200】

最初に、AT14-012の血小板への結合を求めた。健常なボランティア由来の多血小板血漿（PRP）を市販の抗CD9抗体とともにインキュベートした、又はAT14-012で染色した。血小板の自己活性化に起因する、CD9の細胞表面発現におけるあらゆる差異を除外するため、血小板を固定した。文献から予想されたとおり、市販のCD9

H19a抗体は血小板に強く結合する（図8aの下側のイメージ）。これに合致して、AT14-012は、血小板とも強い相互作用を示した（図8aの上側のイメージ）。

【0201】

次に、本発明者らは、血小板がAT14-012との相互作用により活性化されるかを評価した。P-セレクチン／CD62Pの細胞表面のアップレギュレートにより示されるとおり、トロンビン受容体活性化ペプチド（TRAP）及び市販のCD9抗体ALB6のいずれもが血小板の活性化を刺激することが知られている。実際のところ、健常なボランティアに由来するPRPをTRAP又はALB6とともにインキュベートしたところ、非刺激条件下及びFLAG抗体に適合する無関係のALB6アイソタイプと比較して、CD62Pの表面誘導が示される（図8b）。同様に、IgG1及びIgG3の両方の組み換えフォーマットにおけるAT14-012、並びにもとのB細胞クローンの上清から精製した抗体は、血小板を活性化可能であった（図8b）。

【0202】

最後に、AT14-012が血小板の凝集を誘導するかを判定した。この判定のため、全血を、AT10-002抗体及びAT14-012抗体のFab2フラグメントの添加について前述したものと同一刺激剤とともにインキュベートした。予測されたとおり、TRAPペプチド及びALB6抗体は血小板の強固な凝集を誘導した（図8c）。市販のCD9 ALB6抗体とは対照的に、AT14-012は、異なるいずれのフォーマット（B細胞上清（2H15）から精製したIgG1、IgG3、又はFab2フラグメント）においても血小板の凝集をトリガーしなかった（図8c）。これにより結局のところ、AT14-012は血小板に結合し、血小板を活性化するものの、AT14-012と血小

板との相互作用による血小板凝集は誘導されないことが示される。これらの発見は、A T 1 4 - 0 1 2 ドナーでは血栓症の症状が何ら示されなかったという観察とも合致する。そのため、本発明者らは、A T 1 4 - 0 1 2 は、重篤な副作用として血栓症を伴うことなく臨床使用することができるとして結論づける。

【0203】

A T 1 4 - 0 1 2 は、原発性腫瘍及び二次性腫瘍の増殖を減弱させる。腫瘍の異種移植マウスモデルを作成して、i n v i v o 条件下でのA T 1 4 - 0 2 の抗腫瘍効果を求めた。免疫不全マウスは腫瘍の異種移植について好適なモデルである。

【0204】

マウスには、両側腹部に対し、マトリゲルで500, 000個のルシフェラーゼ／GFP発現Me1BLM細胞を皮下移植した。腫瘍を三週間増殖させた後、マウスには10mg/mL A T 1 4 - 0 1 2 又は本発明者らの対照抗インフルエンザ抗体（A T 1 0 - 0 0 2）を、1週間又は2週間にわたり週に2回（皮下腫瘍の大きさに応じ調整）静脈内注射した。腫瘍細胞の移植から4又は5週間後、マウスを屠殺し、体内の臓器を露出させた。A T 1 0 - 0 0 2 処理群において、4匹のマウスのうち3匹では大きなルシフェラーゼ陽性リンパ節がみられたことから、Me1BLM腫瘍細胞は、リンパ節に転移して二次腫瘍を形成し得ることが示される。際立って対照的に、A T 1 4 - 0 1 2 抗体を投与した5匹のマウスのうち、リンパ節への転移の徴候を示したものはなかった（図9a）。これにより、A T 1 4 - 0 1 2 は腫瘍の転移を阻害可能であることが実証される。

【0205】

追跡実験において、マウスには200, 000個のMe1BLM GFP／ルシフェラーゼ腫瘍細胞を両側腹部に投与した。このとき、抗体の注射は（2週間にわたり週に2回、マウスの体重1kg当たり抗体10mg）は、腫瘍の移植と同時に開始した。皮下腫瘍の大きさは、週に2度ノギスにより測定した。図9bに示すとおり、腫瘍の増殖は、対照処理群と比較してA T 1 4 - 0 1 2 処理群において低下した。これにより、A T 1 4 - 0 1 2 は腫瘍の増殖に対して悪影響を有することが示される。

【0206】

A T 1 4 - 0 1 2 又はA T 1 0 - 0 0 2 対照抗体で処理したマウスから回収したMe1BLM皮下腫瘍を、A T 1 4 - 0 1 2 抗体の結合の存在について免疫組織化学により試験した。腫瘍組織をパラフィン包埋させた後、それぞれ抗体A T 1 0 - 0 0 2 又はA T 1 4 - 0 1 2 の軽鎖を認識する、HRP標識した抗λ又は抗κとともに、切片をインキュベートした。予想されるとおり、A T 1 0 - 0 0 2 抗インフルエンザ抗体（対照）は腫瘍組織には結合しなかったのに対し、A T 1 4 - 0 1 2 は腫瘍組織の外側層に明確に結合し、かつより深い層への透過を示す（図9C）。A T 1 4 - 0 1 2 抗体又はA T 1 0 - 0 0 2 対照抗体で処理したマウスから回収したMe1BLM皮下腫瘍細胞の単細胞消化物を、CD9抗体A T 1 4 - 0 1 2 及びHI9aの結合について試験する。A T 1 4 - 0 1 2 で処理したマウスから回収した腫瘍細胞は、A T 1 4 - 0 1 2 及びCD9 HI9aの両方に関し、A T 1 0 - 0 0 2 処理したマウスから回収した腫瘍細胞と比較して結合の低下を示す（図9D）。両方の治療群由来の腫瘍細胞も抗IgG抗体についての染色が陰性であることから、観察された効果は、注射されたA T 1 4 - 0 1 2 抗体によりA T 1 4 - 0 1 2 エピトープが予め専有されていたことに起因するものではない（図9D）。

【0207】

興味深いことに、A T 1 4 - 0 1 2 の反復実験においても、皮下増殖しているSK-MEL-5黒色腫瘍の増殖を減退させ得る（図9E）。腫瘍の増殖阻害における影響は、腫瘍の重量を測定したときにより顕著である。A T 1 4 - 0 1 2 処理した腫瘍は、A T 1 0 - 0 0 2 処理したマウスの対応する腫瘍と比較して明らかに重量が少ない（図9F）。ex vivoで単離及び分解したSK-MEL-5腫瘍において、CD9の発現レベルを測定したとき、A T 1 4 - 0 1 2 処理したMe1BLM腫瘍で観察されるとおり、腫瘍細胞におけるCD9レベルの低下が確認されたことには留意されたい（図9G）。

【0208】

A T 1 4 - 0 1 2 は、最近の患者由来の黒色腫及び膵臓腫瘍細胞に結合する。A T 1 4 - 0 1 2 は、樹立された広範な固体腫瘍細胞株を認識可能である（図 6 A）。次に、A T 1 4 - 0 1 2 結合反応性が、癌患者から最近単離された腫瘍サンプルにも適用可能であるかどうかを試験する。短期間培養した、患者由来の黒色腫細胞を、A T 1 4 - 0 1 2 の結合について試験した。試験したすべての初代黒色腫サンプルにおいて、A T 1 4 - 0 1 2 について陽性のシグナルが観察された（図 1 0 A ~ B）。A T 1 4 - 0 1 2 の結合及び C D 9 の発現には強い相関が観察された（図 1 0 B）。A T 1 4 - 0 1 2 が由来する黒色腫患者より誘導された腫瘍細胞は、パネル中で A T 1 4 - 0 1 2 の結合が最も高いことには留意されたい。同様にして、患者由来の膵臓癌腫瘍細胞に C D 9 抗体を結合させた。樹立した膵臓癌細胞株に対する A T 1 4 - 0 1 2 の有効な結合と一致して（図 6 A）、A T 1 4 - 0 1 2 は、試験した患者由来の膵臓癌細胞株の両方に対しても強い反応性を示す（図 1 0 C）。

10

【0209】

A T 1 4 - 0 1 2 の反応性は霊長類に限定される。概してテトラスパニン及び特に C D 9 は、多数の細胞及び組織において広く発現しており、遠い種間においても進化的に保存されていることが示されている（G a r c i a - E s p a n a, G e n o m i c s, 2 0 0 8）。マウス、ウサギ、カニクイザル、及びヒトの血小板を A T 1 4 - 0 1 2 の結合について試験する。予想したとおり、C D 9 は、試験したすべての種の血小板で発現する。しかしながら、A T 1 4 - 0 1 2 は、カニクイザル及びヒトの血小板とのみ反応し、マウス及びウサギに対する結合は観察されなかった（図 1 1 A ~ C）。これらから、A T 1 4 - 0 1 2 の反応性は霊長類に限定されることが示される。

20

【0210】

実施例 4 - 補体及び抗体依存性細胞傷害

材料及び方法

補体依存性細胞傷害（C D C）アッセイ

懸濁物又は接着している黒色腫細胞を抗体により室温で一時間半標識した。続いて、細胞をウサギ補体（S 7 7 6 4, S i g m a）とともに 3 7 °C で 4 5 分間インキュベートした。懸濁物及び接着細胞のそれぞれについて、D A P I 及びフローサイトメトリー（F o r t e s s a X 2 0, B e c t o n D i c k i n s o n）又は T o P R O 3 及び顕微鏡観察（O p e r e t t a, P e r k i n E l m e r）により細胞死の割合をもとめる。

30

【0211】

抗体依存性細胞傷害（A D C C）アッセイ

^{51}Cr 標識した標的細胞を 1 0 g 抗体とともに 3 7 °C で 3 0 分間インキュベートする。C D 3 枯渇した P B M C を段階希釈し加えた後、更に 4 時間インキュベートする。W a l l a c カウンターを使用して、上清に放出された ^{51}Cr の存在を L u m a P l a t e s （P e r k i n E l m e r）で検出する。抗体を誘導した細胞溶解物についてプロットした値を ^{51}Cr の自然放出について補正する。

【0212】

結果

40

A T 1 4 - 0 1 2 は、抗体依存性細胞傷害（A D C C）をトリガーする。A T 1 4 - 0 1 2 が、抗体依存性細胞傷害（A D C C）により腫瘍細胞を殺傷する能力を保有しているかどうかを判定するべく、腫瘍細胞を放射性クロムで標識した後、抗体 A T 1 4 - 0 1 2 、陰性対照の抗体 A T 1 0 - 0 0 2 （抗インフルエンザ）、又は陽性対照の抗体（セツキシマブ、抗 E G F R 1）とインキュベートした。P B M C のエフェクター細胞／黒色腫標的細胞の比は異なっていた。培地中の死細胞からのクロムの放出をもとに、細胞死の割合を求めた。初代ヒト動脈上皮細胞（H A E C）を標的細胞として使用した場合、A T 1 4 - 0 1 2 の A D C C による M e l B L M 殺傷能力はセツキシマブに劣っているものの、観察された細胞死は最小限のものであった（図 1 2 A）。同時に、A T 1 4 - 0 1 2 による A D C C での細胞の殺傷について、短期培養した、患者由来の初代黒色腫細胞を試験した

50

。異なる黒色腫細胞間である程度の差異は観察されたものの、A T 1 4 - 0 1 2 は、A T 1 0 - 0 0 2 対照抗体よりも高いA D C C 活性を示すことができた（図 1 2 B）。これらにより、A T 1 4 - 0 1 2 の抗腫瘍反応性は少なくともある程度A D C C により介在されることが示される。

【0213】

A T 1 4 - 0 1 2 は、補体依存性細胞傷害（C D C）をトリガーする。補体介在性細胞傷害（C D C）をトリガーする能力について、A T 1 4 - 0 1 2 抗体のいくつかの多様体を試験した。2 H 1 5 は、もとのA T 1 4 - 0 1 2 不死化 I g G 3 B 細胞クローンより誘導された抗体である。I g G 1 又は I g G 3 の両方を骨格にして、2 H 1 5 をベースにしたA T 1 4 - 0 1 2 組み換え抗体を産生した。更に、本発明者らは、F c テールに E 3 4 5 R 変異を含むA T 1 4 - 0 1 2 I g G 1 抗体の多様体を構築した。この変異は、特定の抗体とその標的に五量体を形成させることにより、補体介在性細胞傷害（C D C）を効果的にトリガーすることが示されている（de Jong, P L O S B i o l o g y, 2 0 1 6）。

【0214】

ヒト血清の存在下で、黒色腫株懸濁物を様々なA T 1 4 - 0 1 2 多様体とともにインキュベートした後、細胞表面上のC 1 q の存在について試験した。予想されるとおり、A T 1 4 - 0 1 2 五量体化多様体にはC 1 q の付着が観察された。更に、C 1 q の付着は、もとのB細胞クローンから精製した2 H 1 5 抗体及び組み換え体として産生されたA T 1 4 - 0 1 2 I g G 3 についてもみられた。I g G 1 として作製したA T 1 4 - 0 1 2 はC 1 q に結合しなかったことには留意されたい〔図 1 3 A、B〕。ウサギ補体の存在下で、M e l B L M 又はS K - M E L 5 懸濁物を、A T 1 0 - 0 0 2 対照抗インフルエンザ抗体又はA T 1 4 - 0 1 2 多様体のいずれかとインキュベートした。A T 1 4 - 0 1 2 I g G 1 抗体は、抗インフルエンザ抗体（陰性対照）同様、細胞傷害を全く誘導しない〔図 1 3 C〕。際立って対照的に、かつ既報の所見と合致して〔de Jong, P L O S B i o l o g y, 2 0 1 6〕、E 3 4 5 R 変異の導入により、抗体はC D C による濃度依存性の細胞死を誘導する〔図 1 3 C〕。これらの観察は、黒色腫細胞懸濁物及び接着している黒色腫細胞と比較可能である〔図 1 3 C、D〕。g G 3 として作成した、対象とするA T 1 4 - 0 1 2 組み換え体（したがって、E 3 4 5 R 変異は含まない）もC D C をトリガー可能である〔図 1 3 D〕。驚くべきことに、もとのB細胞の産生した2 H 1 5 抗体はC 1 q と結合するものの、補体介在性細胞死は誘導しない〔図 1 3 A、C〕。A T 1 4 - 0 1 2 E 3 4 5 R は、ウサギ補体の存在下で、C D C により効率的に腫瘍細胞を殺傷する。A T 1 4 - 0 1 2 E 3 4 5 R は、ヒトC 1 q を細胞表面に引き付ける一方〔図 1 3 A、B〕、かかる抗体は、ヒト補体因子の存在下で、C D C 介在性の細胞死をトリガー不可能である〔図 1 3 E〕。本発明者らは、ウサギ補体とヒト補体とで細胞殺傷が一致しないことは、補体調節タンパク質（C R P）の発現に関連するものなのかどうかを調査した。C 3 転換酵素の形成の阻害剤であるC D 5 5 の発現を完全に欠損しているC o l o - 2 0 5 では、ヒト血清の存在下で、抗体介在性のC D C は可能であった〔図 1 3 E〕。これにより、A T 1 4 - 0 1 2 は、C D 5 5 ブロッキング抗体と組み合わせたときに補体依存性細胞死を誘導可能であることが示唆される。

【0215】

実施例 5 - 親和性の測定

材料及び方法

E L I S A 結合 A T 1 4 - 0 1 2 と市販の抗 C D 9 抗体の比較

A T 1 4 - 0 1 2 （I g G 1）及びヒトA T 1 0 - 0 0 2 抗体（対照）の結合をE L I S A フォーマットでアッセイし、市販の抗体A L B 6、H I 9 a、及び抗F L A G マウス抗体（対照）（プレートに対するC D 9 - 3 x F L A G - ウサギF c - S o r t - ビオチンの検出用）、及び抗C D 3 O K T 3（ムロモナブ）と比較した。E L I S A の設定は、上記C D 9 分子のビオチニル化量についてのアッセイと同様である。A T 1 4 - 0 1 2 と同様、段階希釈して市販の抗体を添加した。市販の抗体はヤギ抗マウスH R P 標識抗体

(1:4000, Jackson)で検出したのに対し、ヒト抗体は、ヤギ抗ヒトHRP標識抗体(1:4000, Jackson)で検出した。よりよい方法で親和性の違いを比較するため、本発明者らは、CD9-3xFLAG-ウサギFc-ソルターゼ-ビオチンコートSPRチップで抗体に表面プラズモン共鳴(SPR)アッセイを行った。GraphPad 7.0ソフトウェアを使用してEC50値を計算した。

【0216】

表面プラズモン共鳴(SPR)による親和性測定

A IMMプローブ検出についての記載(下記参照)と同様の方法で抗CD9抗体の結合用のチップを作製した。ここで、AT14-012(+対照)の親和性は「古典的な」設定で測定し、チップは、各抗体の注入後に再生する。組み換え抗体を結合バッファ(PBS+0.05% Tween20+0.05%アジ化ナトリウム+0.01% BSA)に段階希釈してチップに注入し、IBIS Mx96装置で結合を解析した。各注入では複合体を注入し、8分間インキュベートした後、システムバッファ(PBS+0.05% Tween20+0.05%アジ化ナトリウム)で12分間十分に洗浄し、解離を測定した。各被験抗体について、少なくとも3回注入を繰り返し、結合バッファを注入しないものを参照として使用した。それぞれの連続的な注入の後、チップは10mMグリシン-HCl(pH2.0)+150mM NaClで再生した。実験データは、SPRint Xソフトウェア(IBIS Technologies)で処理し、Scrubber2ソフトウェア(BioLogic)を使用して速度定数を求めた。

【0217】

CD9-EC2-3xFLAG-ウサギ-Fc-ソルターゼ-HIS(+対照CD81-EC2-3xFLAG-ウサギ-Fc-ソルターゼHIS)のクローニング、発現、精製、及びソルターゼAによる部位特異的ビオチニル化Freestyle cells(Thermo)を順応させ、かかる細胞を、シェーカープラットフォーム(140rpm)に設置しベントキャップをした125mLのCorningフラスコにて、8% CO₂下、無血清Freestyle培地(Gibco)で37℃で一週間培養した。3xFLAGタグ(-DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK-)と、その後ろにウサギIgG1タンパク質(アミノ酸108~322;UniProt P01870)のFc領域(CH2-CH3)とを融合させた、CD9配列の細胞外大型ループ2(アミノ酸112~195;UniProt P21926)を含むpcDNA3.4ベクターを使用して、一過性の遺伝子導入を行った。CD9と3xFLAGタグの間には-GGGT-リンカーを入れ、3xFLAGとウサギFcの間には-GSS-リンカーを入れた。ソルターゼHISタグ(-LPETGGHHHHHStoP)とFc部位との間には-GGGS-リンカーを入れた。制限酵素のNcoI及びPmeI(NEB)を使用して、インサートをpcDNA3.4ベクターにクローニングし、Qiagen plasmid maxikitによりDNAの大量調製物を単離した。DNA(3µgのプラスミド)と、6µLのExtreme Gene9(Sigma)のOptimem(Gibco)溶液とを、別々に100µL Optimem中で10分間インキュベートした。100µLのOptimem-Extreme Gene9溶液混合物を、100µLのOptimem-DNA混合物に添加し、更に30分間インキュベートした後、0.5×10⁶個/mLの培養物3mLに滴加した。2日後、培地には、更に2mLの新鮮なFreestyle培地を加えた。培養開始から5~7日目に培地を回収し、以後の使用のため-80℃のフリーザーに入れた。大量産生の必要がある場合には培養条件をスケールアップした。定量的ウサギIgG ELISA(Jackson)を用い、タンパク質産生を測定した。培地を解凍し、ろ過した後、AKTA Explorerシステム(GE)にて、1mL/minの流速で5mLのプロテインGカラム(GE Healthcare)にアプライした。安定なUV280/215nmのベースラインが得られるまで、PBSでカラムを予め平衡化した。サンプルのアプライ後、安定したUV280/215nmベースラインが維持されるまで、カラムの少なくとも5倍量のPBSでカラムを再度洗浄した。結合したタンパク質を0.2Mグリシン+150mM NaCl(pH 2.5)で溶出

した。頂部のタンパク質画分を1:10体積/体積量の1M Tris (pH 9.0)で中和した。各画分を合わせ、PBSで平衡化したSuperdex 200 16/60カラム(GE)にアプライした。単量体のピークを回収し、このタンパク質に適した吸光度/大きさ設定によりnanodrop 1000システムで定量した。以後の使用のためタンパク質を分割し、短期保存のため-20℃で保存した。ソルターゼAの酵素反応によりHISタグが除去される分子に対しビオチン部分を酵素的に付加するモル比10倍のGGG-ビオチンヌクレオフィルとともに、酵素ソルターゼA(調製についてはWagner et al., 2014を参照のこと)をモル比1:1で使用した。時折穏やかにボルテックスをかけながら、25mM Tris、150mM NaCl (pH 7.5)、及び2mM CaCl₂で37℃で4時間反応させた。1mM EDTAで反応を停止させた。ビオチニル化したCD9タンパク質、並びにより小さな成分(遊離のGGG-ビオチンヌクレオフィル及び遊離のHISタグ)を、PBSで平衡化したSuperdex 200 16/60カラムでソルターゼAから分離した。頂部の画分を回収した。ビオチニル化量はELISAにより確認した。簡潔に記載すると、PBS中5µg/mLのストレプトアビジンにより、96ウェルの高結合ELISAプレート(Costar)をコートした。ビオチニル化CD9を、10µg/mLの初期濃度からPBS+2.5% BSAで二段階希釈(serial two-step dilution)してウェルに注入し、1時間置いた。同様に、PBST+2.5% BSA中、1時間で最適なシグナルを評価するため、グリッドが見えるようにAT14-012を段階希釈して添加した。PBST+2.5% BSA中、ヤギ抗ヒトHRP標識抗体(1:4000希釈, Jackson)をインキュベートしてAT14-012を検出し、TMB/H₂O₂酸性溶液により現像(developed)した。1M H₂SO₄を使用して反応を停止させ、Perkin Elmer Envisionプレートリーダーで450nmで測定した。タンパク質を十分にビオチニル化した。最適濃度は2.5~5µg/mLであった。CD9のコード領域をCD81のEC2コード領域(アミノ酸113~201; UniProt P60033)で置き換えた、対照タンパク質CD81-EC2-3xFLAG-ウサギFc-ソルターゼ-HISにも上記のすべての工程を繰り返した。抗CD81抗体クローンJS81(BD)を使用するELISAにより、このタンパク質の完全性(integrity)及びビオチニル化を確認し、ヤギ抗マウスHRP標識抗体(Jackson)で検出した。

【0218】

ELISAにおいて可溶性CD9-EC2-FLAG-rabbit-Fcタンパク質を用いるAT14-012のエピトープマッピング

領域m4(アミノ酸169~180)のアラニン変異体を、上記のpcDNA3.4ベクターにクローニングした。タンパク質を小規模(3mL)で発現させ、ウサギIgG ELISAを用い定量した。AT14-012、ALB6、及びHI9aの結合を評価するため、本発明者らは、PBS中5µg/mLの抗FLAG抗体(Sigma)で終夜コーティングした。未精製の無血清上清を、PBST+2.5% BSA中1µg/mLのFLAG抗体と1時間結合させた。洗浄後、捕捉したCD9-FLAG-ウサギFc-ソルターゼHIS分子に、ランダムにビオチニル化したHI9a、ALB6、及びAT14-012を結合させた。結合した抗体は、ストレプトアビジン-HRP(1:10,000希釈, Thermo)で検出した。上記のとおりELISAを展開(developed)した。抗体のランダムビオチニル化は、EZ-Link NHS-Biotinキット(Thermo)を使用して実施した。精製した抗体のPBS溶液を、モル比10倍のビオチン標識と室温で30分間インキュベートした。分子ふるいにより反応を停止した。PBSで予め平衡化したSuperdex 200 16/60カラムにサンプルをアプライ(1mg/mLで1mL)することで、ビオチニル化抗体を未結合の標識から分離した。

【0219】

m4環状ペプチドの作成。

CD9のm4領域(167-PKKDVLETF TVKS-180)をpeptide synthesis labにより合成し、アセトニトリル勾配を用いるLCMSで解

析し、R P-H P L Cで精製した。ペプチドを完全に凍結乾燥した。このペプチドには、システインノット（C D 8 1の結晶構造を参照）が形成する間隔を模倣するための追加の2つのセリンと、それに続いて、ペプチドを円形にする2つのシステインとを隣接させた。検出又は捕捉を目的として、N末端には、1つのP E G 2基ビオチン-P E G（2）-C S P K K D V L E T F T V K S S C（システインが連結される）を間においてビオチン部分を配置した。

【0220】

結果

A T 1 4-0 1 2は中程度に親和性のある抗体である。最初に、A T 1 4-0 1 2の重鎖（4つのアミノ酸を置換）及び軽鎖（3つのアミノ酸を置換）にもたらされる超変異の量では、免疫系は、患者において、可変ドメインの配列に更に超変異をもたらすのに適切な負荷を受けなかったことが示される。第2に、本発明者らは、他社によりこれまでに開発された市販の抗体は血小板凝集を誘導したのに対し、A T 1 4-0 1 2は血小板の凝集を誘導しなかったことを示すことができた。また、患者は血栓症状又は血小板減少症状（抗体の介在する血小板の破壊又は凝集に起因する、血小板数の低下）を全く発症せず、未診断の問題を解決する何らかの薬剤による治療を受けなかった。A T 1 4-0 1 2の低親和性が、最適な血小板表現系をもたらす抗C D 9抗体の「タイプ」に関係する特性に役立つものであるのか、あるいはA T 1 4-0 1 2が標的とするC D 9（m 4）上の固有のエピトープを使用することで、血小板の状態が最適な非凝集的なものになるのかは主な疑問である。一般的に使用されている市販のマウス抗C D 9抗体との結合親和性の違いを評価するため、組み換え体として発現させた、C D 9の第2の細胞外ループ（E C 2）を使用して、E L I S AでA T 1 4-0 1 2の結合を試験した。本発明者らは、これまでに試験したすべての抗C D 9抗体のエピトープはE C 2ループに存在していることを明らかにしていた（図5）。ヒトとマウス（市販）抗体とで、2つのE L I S Aの設定は異なっているものの（異なる二次抗体により検出）、本発明者らは、A T 1 4-0 1 2のE C 5 0（E C 5 0は約2 5 0 n g / m L）は、市販のH I 9 a（E C 5 0は約2 0 n g / m L）及びA L B 6（E C 5 0は約1 3 n g / m L）と比較して有意に低いと推定することができた。A T 1 4-0 1 2の親和性を市販の抗体の親和性と比較して良好に推定するため、本発明者らは、表面プラズモン共鳴（S P R）を使用する無標識検出法を用いた。C D 9層を作成したS P Rチップに3回に分けて注入を行った。この設定におけるA T 1 4-0 1 2の親和性の平均はn Mの範囲（約4 4 n M）であり、市販の抗体の親和性の平均は、A L B 6では約1 4 5 p M、及びH I 9 aでは約2 . 3 3 p Mであった（図1 6）。A T 1 4-0 1 2について測定された解離速度はH I 9 aと比較して7 0 0倍も速かった。これは、A T 1 4-0 1 2はC D 9から極めて容易に解離し得ることを意味する。H I 9 aは、解離速度（ k_d ）が低いことにより、親和性が約1 9, 0 0 0倍も高かった。A T 1 4-0 1 2について明らかになった結果を受け、本発明者らは、H I 9 a又はA L B 6の長期解離時間については試験しなかった。A L B 6は結合後にもゆっくりと解離可能であり（H I 9 aと比較して解離は約2 2倍多い）、H I 9 aと比較してある程度劣るものの尚も非常に高い親和性に寄与した。

【0221】

組み換え体として発現させたC D 9-E C 2 m 4アラニン変異体を使用することにより、A t 1 4-0 1 2のエピトープの確認。抗C D 9抗体を、F L A G-タグで捕捉したC D 9-E C 2-3 x F L A G-ウサギF cタンパク質に対しインキュベートすることにより、E L I S A設定を使用して、ランダムビオチニル化エピトープを更に詳細に調査した。材料及び方法に記載のとおり、アラニン変異体（図5に記載するとおり、アミノ酸K 1 6 9 A~S 1 8 0 A）をクローニングし、発現させた。アラニン変異体を位置K 1 6 9 A、D 1 7 1 A、L 1 7 3 A、F 1 7 6 Aに作製した場合、A T 1 4-0 1 2の結合は完全に消失し、V 1 7 2 Aに関しては結合の有意な低下を観察することができる（図1 7 A）。これはこれまでのF A C Sデータとも合致する（図5）。A L B 6は、F 1 7 6 A変異体については、これまでに観察されたとおり結合の低下を示した。H I 9 aは、いずれ

の変異体についても反応性を全く失わず、E L I S A プレート上の C D 9 タンパク質の存在についての内部標準となる。したがって、本発明者らは、H I 9 a のエピトープは m 3 又は m 4 には存在せず、あるいは、H I 9 a の親和性はこの S P R 設定において値が有意に高いことから、単一のアラニン変異ではこれらの領域は破壊されないと結論づけることができる。C D 9 について構成した相同性に対しエピトープをマッピングしたところ（図 1 7 B、赤色でハイライト）、かかるタンパク質の細胞外部分の縁部に位置した。F A C s による m 3 のアラニンスキャンでは、A T 1 4 - 0 1 2 の結合性の低下は全く観察されず、本発明者らは、E L I S A 又は S P R では、環状に構成された m 4 ペプチドに対する結合を示すことができなかった（データ非掲載）。したがって、本発明者らは、m 4 領域の適切な折りたたみは、A T 1 4 - 0 1 2 のエピトープを構造上直線的なものにする他の C D 9 領域（m 3 及び m 5）により強く影響を受けるものと仮定する。エピトープマッピングのデータを更に詳細に確認し、C D 9 エピトープ並びに A T 1 4 - 0 1 2 パラトープに対する各単一のアミノ酸の関与を評価するには、共結晶が必要とされる。A T 1 4 - 0 1 2 を、カニクイザル細胞、マウス細胞、及びウサギ細胞などの様々な種に対し結合させて、エピトープマッピングデータを更に確認した（図 1 1）。A T 1 4 - 0 1 2 は、カニクイザル細胞と反応可能であったのに対し、ウサギ細胞又はマウス細胞に対する結合についてアッセイした場合には結合はなかった。A T 1 4 - 0 1 2 のエピトープに関係する 5 つの残基を図 1 7 C にアラインメントする（暗い／赤色でハイライト）。ウサギ及びマウス C D 9 の m 4 配列について観察されたとおり、あまりに多くの残基を変化させると、明らかに A T 1 4 - 0 1 2 結合は失われた。おそらく、領域 m 4 におけるウサギ変異 V 1 7 2 I、T 1 7 5 S、F 1 7 6 I 及び T 1 7 7 Q）及びマウス変異（D 1 7 2 Q、V 1 7 2 L、T 1 7 5 S 及び T 1 7 7 Q）により、A T 1 4 - 0 1 2 エピトープの主要な立体構造的な変化又はシフトが生じており、このような変化又はシフトにより、A T 1 4 - 0 1 2 結合の低下の説明がつくであろう。ちなみに、F 1 7 6 L 変異のみでは、カニクイザル細胞に対する A T 1 4 - 0 1 2 の結合の低下は誘導されない（図 1 7 C）。

【0 2 2 2】

実施例 6 - A T 1 4 - 0 1 2 の親和性の改良

材料及び方法

単一細胞として選別した 2 H 1 5 B 細胞と、S P R とを使用して、A T 1 4 - 0 1 2 の親和性を改良する

適切な培養条件で、約 2 0 × 3 8 4 ウェルプレート内で B D F A C s A R I A I I を使用して、同定した A T 1 4 - 0 1 2 の親 B 細胞クローン（2 H 1 5 ; I g G 3）に対し単一細胞の選別を行った。B c l 6 / B c l - x L 導入 G F P 陽性細胞を観察する O p e r e t t a 共焦点機器（P e r k i n g E l m e r）により、B 細胞の増殖（約 7 0 %）をモニタした。陽性シグナルのあるウェルを新しい 9 6 ウェルプレート（全部で 8 プレート）に移し、1 ~ 2 週間培養した後、上清を 9 6 ウェル P C R プレートに回収し（1 0 0 μ L）、P B S + 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 + 0 . 0 5 % アジ化ナトリウムにより 1 : 1 希釈し、以後使用するまで密閉して - 8 0 ° C のフリーザーで凍結した。もとの 2 H 1 5 クローンの上清と、C D 9 又は C D 8 1 に結合しなかった抗 H R V クローンの対照 I g G 3 B 細胞の上清とに 2 つのウェルを割り付けた。I B I S M x 9 6 装置（I B I S T e c h n o l o g i e s）で S P R を実施した。C F M マイクロ流体スポットデバイス（W a s a t c h M i c r o f l u i d i c s）を使用して、ストレプトアビジンで予めコートした S P R チップ（G - S T R E P H 8 2 5 - 0 6 5（S e n s T e c h n o l o g i e s）にタンパク質を固定した。ビオチニル化抗ヒト C H 1 ナノボディ（T h e r m o）及びビオチニル化完全長抗ヒト F c 抗体（J a c k s o n）を、定量的（I g G 濃度を評価する）及び定性的（I g G 強度）測定のため、様々な濃度でスポットした。C D 9 - 及び C D 8 1 - 3 x F L A G - ウサギ F c - ソルターゼービオチンも様々な濃度でスポットして、A T 1 4 - 0 1 2（I g G 1）の組み換え抗体の段階希釈に対し C D 9 の結合を評価した。スポットした同量の C D 9 及び C D 8 1 を比較できることから、すべてのスポットについて結合を評価した。前述の I B I S 表面プラズモン共鳴イメ

ージャーを使用して I g G の結合をモニタし、各濃度の注入を行った後、チップを 10 mM グリシン-HCl (pH 2.0) + 150 mM NaCl で再生した。プレート毎の注入の全量の詳細は次のとおりのもとした：(1) PBST を 2 回注入してベースラインを取得、(2) 抗ウサギを 1 回注入して CD9 及び CD81 がチップ上に存在しており、かつ過剰なストリッピング (extensive stripping) に起因した経時的分解／使用による分解がないことを確認、(3) PBST を 1 回注入、(4) AT14-012 I g G 1 組み換え体を段階希釈することにより、I g G 濃度並びに CD9 の結合 (結合の対照として CD81) について RU を測定 [タンパク質 1.33-4.0-13.30-40.0-133.0 nM]、(5) B 細胞上清を 2 列 (A1~A12、及び B1~B12)、(6) AT14-012 I g G 1 組み換え体を 1 回注入、(7) B 細胞上清を 2 列 (C1~C12 及び D1~D12)、(8) AT14-012 I g G 1 組み換え体を 1 回注入、(9) PBST を 1 回注入、(10) B 細胞上清を 2 列 (E1~E12 及び F1~F12)、(11) AT14-012 I g G 1 組み換え体を 1 回注入、(12) プレートに応じて、ウェルを犠牲にして対照 B 細胞の上清を誘導 (I g G 3 HRV クローンプレート 1=G1、プレート 2=G2 など)、(13) B 細胞上清を 1 列 (プレート番号に応じて GX?~GX?)、(14) プレートに応じて、ウェルを犠牲にして対照 B 細胞の上清を誘導 (2H15; I g G 3 親クローン、プレート 1=G1、プレート 2=G2 など)、(15) B 細胞上清を 1 列 (プレート番号に応じて HX?~HX?)、(16) AT14-012 I g G 1 組み換え体を 1 回注入、(17) AT14-012 I g G 1 組み換え体の段階希釈により、I g G 濃度並びに CD9 の結合 (結合の対照として CD81) について RU を測定し [タンパク質 1.33-4.0-13.30-40.0-133.0 nM]、測定の開始時及び終了後の RU の差を確認、(18) 抗ウサギを 1 回注入し、CD9 及び CD81 がチップ上に存在しており、かつ過剰なストリッピングに起因した経時的分解／使用による分解がないことを確認、(19) PBST を最後に 1 回注入。合計して 117 の注入と、8 分間の会合時間及び 8 分間の脱離時間 (プレート毎に約 50 時間の合計実行時間となる) で対照 (PBST 及び組み換え AT14-012 I g G 1) の確認をした。SPRint X ソフトウェア (IBIS Technologies) でデータを処理した。B 細胞のサブクローン RNA の単離、cDNA 増幅、及び配列決定は前述のとおり実施した (Kwakkenbos et al., 2010)。

【0223】

AT14-012 高親和性変異体の発現及び解析

培地を 2~3 日おきに新しくして、CHO1-KSV 細胞株を CD CHO 培地で一週間培養した。細胞には、野生型 AT14-012 を含む、記載の一重変異体 (H40Y、Y112F、D116H、及び T29N)、二重変異体の組み合わせ (H40Y/Y112F、及び D116H/T29N)、並びに四重変異体の組み合わせ (H40Y/Y112F/D116H/T29N)、並びに CD9 の結合を示さない対照変異 (G110D) を一過性に発現させた (出典: Rajendra et al., 2015)。簡潔に記載すると、 4.0×10^6 個/mL (10 mL) の細胞を、0.25% DMA (Sigma) を添加した CD CHO 培地に入れた。培養物には、 $3.2 \mu\text{g/mL}$ DNA (重鎖及び軽鎖を発現する pXC39 ベクター) と、続いて PEImax (Sigma) とを添加した。2 日後、10 mL の新鮮な培地を供給した。7 日後に培地を回収し、I g G 定量 ELISA (Jackson) を用い I g G 発現を定量した。MelWBO 培養細胞に対する結合について、細胞培養上清を、AIMM プローブ法に使用するものと同じ SPR チップ設定を使用して FACS 及び類似の方法により試験した (別の場所を参照のこと)。Seaview ソフトウェア (Gouy et al., 2010) を使用してアラインメントを行った。

【0224】

結果

SPR を使用することによる高親和性 AT14-012 多様体の開発。上記のとおり、AT14-012 抗体の開発にまつわる主要な関心事 (main question) は、高親和性の

多様体（A L B 6 と同等の親和性）が血小板の凝集を導くかというものであった。あるいは、親和性が何らかの差異をもたらすかかる固有のエピトープを、A T 1 4 - 0 1 2 は標的にするのかという疑問がある。A I D としても知られる活性化誘導シチジンデアミナーゼは、不死化させた B 細胞レパトリーにおいても発現し、活性がある。A I D の発現により、増殖停止及び細胞死をもたらす遺伝的不安定性は生じず、播種したウェルのうち 63 % は、堅調な発現を示した（K w a k k e n b o s e t a l . , 2 0 1 0）。したがって、A I D は、尚も無作為に、又は好ましくは変異の生じやすい場所に変異を誘導可能である。高親和性の抗体／抗原結合をもたらす変異を同定する 1 つのアプローチには、蛍光標識した可溶性 C D 9 タンパク質に結合する単一の B 細胞を選別し、I g G 発現について比較するというものがある。簡潔に記載すると、本発明者らは、単量体形態、三量体形態（ストレプトアビジン－P E を使用する）又は多量体形態（P E 標識デキストラマー）のいずれの形態において、可溶性 C D 9 を 2 H 1 5 B 細胞に結合させる任意の設定を発見できなかった（データ非掲載）。これはおそらく、2 H 1 5 の B 細胞受容体の、B 細胞そのものの表面上に発現している C D 9 への c i s タイプの結合によるものである。したがって、本発明者らは、もとの 2 H 1 5 B 細胞の単細胞の選別には同様の設定を使用し、但し今度は、産生された I g G の組み換え C D 9 - E C 2 タンパク質に対する結合を S P R（A T 1 4 - 0 1 2 親和性の測定に使用した C D 9 に類似するタンパク質）において試験した。単一の 2 H 1 5 B 細胞は、特に、変異が結合を増強させるかどうかを試験するのに十分な量の I g G を産生可能である。最初に、本発明者らは、2 H 1 5 を大量培養した上清中の I g G を使用する最適な S P R 設定について試験し、組み換え A T 1 4 - 0 1 2 の濃度の上昇を対照と比較した（図 1 8 A）。2 H 1 5 I g G の適切な会合及び解離の検証後、本発明者らは、B 細胞上清において観察される I g G 濃度及び完全性が、適切に求められた I g G 濃度下での、精製した A T 1 4 - 0 1 2 組み換え体の結合に関連し得るものであった設定を使用した（図 1 8 A を参照のこと）。抗ヒト F c 及び抗 C H 1 に対する結合の比により、濃度と、抗体の安定産生との間に良好な相関が示された。抗ヒト F c の S P R 曲線は線形に増加したのに対し、抗 C H 1 の S P R 曲線は対数的に増加した。本発明者らは、8 枚の 9 6 ウェルプレートの評価（約 8 0 0 クローン）及び約 4 0 0 時間の S P R 実施時間後に、結合パターンの増強された、あるいは変更された 1 3 個のクローンを同定することができた（元データは非掲載）。これらのクローンを培養し、新しく作製した S P R チップで再度評価した（図 1 8 B）。

【 0 2 2 5 】

当初の 1 3 個のクローンのうちわずか 8 つのみが尚も結合の有意な増強を示した。異なる 3 群を設定した。第 1 群は、会合が速く、解離は遅かった（クローン 1 D 5、1 F 5、4 H 1 0、1 0 B 9、及び 1 0 D 1）。第 2 群は、会合が速かっただけでなく、解離も遅かった（クローン 2 D 1 2、4 D 4、6 E 1 0、及び 9 E 5）。そして、第 3 群は、何ら差異を示さなかった（クローン 1 C 9、2 H 1 0、9 A 9、及び 9 D 1 2）。高親和性クローンの結合の増強についても、2 つの異なる黒色腫細胞株で試験し、検出した（データ非掲載）。再度、第 1 群のクローンは、F A C s において最良の細胞集団シフトを示した。クローン重鎖における 1 つの単一変異により、S P R における及び細胞に対する結合パターンが増強する（図 1 8 C を参照のこと）。驚くべきことに、クローンのうち 4 D 4 のみが、軽鎖変異を有しており、かつ重鎖には変異を有していなかった。本発明者らはまた、I g G の発現を示したものの C D 9 には結合しなかったいくつかのクローンを評価した（「d i s P R O V E」と呼ばれる、クローン 1 E 3、1 E 4、1 E 5、1 F 1 2、2 A 3、及び 5 B 1）。また、本発明者らは、解析した全 8 0 0 のクローンのうち、一致する結合パターンを示したいくつかのクローン（1 G 2、1 G 3、1 G 4、及び 1 G 5）を含めた。これらのクローンは最も生殖系列様のものであったことが確立された（図 1 8 C）。最も重要な変異は H 4 0 Y（4 x）及び Y 1 1 2 F（1 x）（第 1 群）並びに D 1 1 6 H（2 x）及び T 2 9 N（1 x）（第 2 群）であった。他のクローンが重鎖に同じ変異を有しておりかつ C D 9 親和性が同等であったことから、いずれも軽鎖に位置するものである L 1 2 0 V 変異（クローン 4 H 1 0）及び S 2 8 N（クローン 9 E 5）は省略した。

【0226】

組み換え体A T 1 4－0 1 2 バックグラウンドの高親和性変異体及びそれらの組み合わせの評価。高親和性変異を、C H O細胞において一重、二重、又は四重変異体として一過性発現させた（位置及びアラインメントについては、図19Aを参照のこと）。野生型A T 1 4－0 1 2、及びC D 9への結合が消失している変異体G 1 1 0 Dを対照として一緒に用いた。S D S－p a g e及びウェスタンブロットにより、完全性及び分解産物について抗体をアッセイした。抗体をウサギ抗ヒトI g G重鎖／軽鎖抗体で検出したとき、明確な異常性は検出されなかった（データ非掲載）。産生上清を段階希釈して使用して黒色腫細胞に使用して、C D 9の細胞表面結合に対する結合を評価した（図19B）。C D 9への結合を欠損しているG 1 1 0 D変異は、C D 9に対する結合に正真正銘干渉する。T 2 9 Nは、結合の改良に対し、B細胞の上清の選別について観察されたような目立った影響は有しなかった。D 1 1 6 Hは、予想されるとおりの結合の改良を示す。これらの2群の2つの変異体の組み合わせは、単一のD 1 1 6 Hの結合と比較してより強いシグナルをもたらすものではなかった。更に、この結果から、組み換え体ではT 2 9 N変異体の影響がなかったことの説明がつく。幸運なことに、第1群の変異体の結合は、すべての一重変異体の中で最も影響を有するH 4 0 Yで有意に増大した。二重の第1群変異体（H 4 0 Y／Y 1 1 2 F）については、その効果は更に増強される。四重多様体は、二重の第1群変異体と比べて有益な効果を全く示さなかった。野生型A T 1 4－0 1 2（図7A）に関して観察される結合パターンと合致して、高親和性の多様体は、短期間培養した健常なメラノサイトよりも黒色腫細胞に対する結合の増強を示す（図19C）。C D 9 S P R設定を使用して、正確な結合プロファイルを得た（図19D）。会合定数及び解離定数の全体像をもって、より強力な結合への関与が良好に説明された（図19E）。T 2 9 Nを除いたすべての一重変異体が結合親和性の増強に働いた。H 4 0 Y変異体は、100倍の増強を示し、Y 1 1 2 Fに関しては50倍、D 1 1 6 Hに関しては10倍の増強を示した。第1群の変異を組み合わせると、野生型A T 1 4－0 1 2と比較して親和性が250倍も高くなった（約220 pM）。驚くべきことに、四重変異体は、第1群二重変異体と比較して二倍弱（約455 pM）であった。これにより抗体は、A L B 6の親和性に匹敵する範囲の親和性を有するようになる。このマウス抗C D 9抗体は血小板の凝集を誘導し、血小板凝集アッセイにおいて陽性対照として使用されることが知られている。ここでは、相当の結合親和性を有するため、血小板の凝集が親和性に関連するか、又はエピトープに関連するものであるかの疑問に回答する。

【0227】

親和性が向上したA T 1 4－0 1 2 変異体は血小板を凝集しない。文献どおり、本発明者らは、市販の抗C D 9抗体であるA L B 6抗体は血小板の凝集を誘導することを観察した。際立って対照的に、全血を抗C D 9抗体A T 1 4－0 1 2とインキュベートしても血小板の凝集は生じない。重要なことに、高親和性の変異体を本発明者らの血小板凝集アッセイで試験した場合、A T 1 4－0 1 2 親和性の改良された多様体のうち血小板の凝集を誘導し得るものはなかった（図20）。かかるアッセイには、血小板凝集の陽性対照としてA L B 6抗体を含めた。第1群変異体を二重に有する場合の親和性は、A L B 6抗体の親和性とおおよそ等しい（図16C）。これにより、A T 1 4－0 1 2の親和性は、血小板凝集が非存在であることには関係せず、むしろC D 9上の固有のエピトープの認識こそが重要な特徴であることが示される。

【0228】

実施例7－I g Gアイソタイプ及びアロタイプ

材料及び方法

患者由来の腫瘍試料及び癌細胞株をもとにしたC D 9のオープンリーディングフレームの配列決定

簡潔に記載すると、T r i z o l 試薬を使用してm R N Aを単離し、ランダムプライマーを使用してc D N Aの増幅を行った。H u a n g e t a l . , 1998に記載のC D 9特異的プライマーを使用してP C RによりC D 9を増幅した。短期培養した2つの原

発性腫瘍試料源（AT14-012が由来）の凍結細胞のペレットからCD9配列を解析した。皮膚の病巣に由来するものはMe105.18と表記し、脳の病巣に由来するものはMe106.07と表記した。その他の黒色腫患者に由来しともにAT14-012の結合が陽性である、その他の短期培養した2つの原発性腫瘍試料を対照とした。更に、黒色腫細胞株のMe1BLM、Me1WBO、A375、及びJurkat T細胞株（CD9の結合は陰性）、並びにAML細胞株HL-60を使用し、CD9の配列を評価した。B細胞クローンの2H15及びIgG3抗HRV B細胞クローンも解析した。PCR産物そのものに対し配列決定を行った（CD9-fw 5'-TGCACTCTGTATCCAGCGCCA-3'及びCD9-rev 5'-CTCAGGGA TGTAAGCTGACT-3'）。

10

【0229】

IgG3 2H15アロタイプの配列決定

Trizol法（Kwakkenbos et al., 2010）を用いRNAを単離して、2H15 B細胞クローンのIgG3定常領域を決定した。cDNAはランダムプライマーを使用して作製した。CH1フォワードプライマー（5'-CACCAAGGGCCCATCTCGGTCTTC-3'）及びCH3リバープライマー（5'-TCATTACCCGGAGACAGG-3'）を使用して、PCR反応を実施した。プライマーは、IMGTウェブサイトで見られるヒトIgG3配列をもとに作製した。

（<http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/alleles/index.php?species=Homo%20sapiens&group=IGHC&gene=IGHG3>）。PCR産物そのもの（fw及びrev）に対し配列決定を行い、Vidarsson et al., 2014によりアロタイプを決定した。

20

【0230】

患者のB細胞レパートリーに由来するAT14-012 IgG特異的重鎖及び軽鎖の配列決定

B細胞の選別時に患者の全B細胞レパートリーについて単離したRNAプールをもとに構築したcDNAから、AT14-012の様々な重鎖及び軽鎖を別々に増幅した。Trizol法によりRNAを単離し、既報の方法によりcDNAを作製した（Kwakkenbos et al., 2010）。最初に、重鎖を増幅させるため、2つのVH3ファミリー特異的フォワードプライマーVH3-9L（5'-CCATGGAGTTGGGACTGAGC-3'）及びVH3LB（5'-CACCATGGARYTKKGRCTBHGC-3'）と、IgG特異的リバープライマーOCG1（5'-GTCCACCTTGGTGTTGCTGGGCTT-3'）、OCG2（5'-CTGCTGAGGGA GTAGAGTCC-3'）及びOCG3（5'-GGTGTGCACGCCGCTGGTCAG-3'）を使用して、プレ増幅工程を実施した。Qiagenゲル抽出キットによりDNAゲルからPCR産物を回収した。AT14-012特異的な配列を増幅するため、二次増幅工程を実施した。段階的に最も広いVDJ再編成配列を網羅するよう再編成したHCDR3領域を認識する、1つのAT14-012特異的重鎖フォワードプライマー（5'-gtgtccagtgtgaagtgcagg-3'）と、4つの異なるリバープライマーAT14-012Hrev A（5'-GGGATAATAACCATCTCAGGC-3'）、AT14-012Hrev B（5'-GTAGGGATAATAACCATCTCAC-3'）、AT14-012Hrev C（5'-GTCAAAGTAGGGATAATAAC-3'）及びAT14-012Hrev D（5'-CCAGTAGTCAAAGTAGGG-3'）とを使用して、4つの異なるPCR反応を実施した。本明細書では、フレームワーク4は配列決定しない。A、B、C及びD PCRからの最終的なPCR産物を合わせて、1つの単一DNAミックスをpCR2.1 TAクローニングベクター（Thermo）に連結した。HCDR3領域に対し段階的にアニーリングしたため、すべてのリバープライマーにより増幅されたのかを配列決

30

40

50

定により識別することができた。一般的なM13リバースプライマー及びM13フォワードプライマーを使用してインサートを配列決定した。AT14-012の軽鎖を増幅するため、同様のプロトコルを実施した。VK4ファミリーステップを増幅するフォワードプライマーは、VK4L-Fw-leader-ATG: 5'-ACCATGGTGTTCAGACCCAG-3'及びVK4L 5'-TYYCTSYTSCCTYTGGATCTCTG-3'とし、リバースプライマーはOCK 5'-ACACTCTCCCTGTGTAAGCTCTT-3'とした。AT14-012に特異的な二次増幅工程では、フォワードプライマーはFw1-1412L 5'-CAGTCTCCAGACTCCCTGT-3'とし、LCDR3に特異的な3つのリバースプライマーは、AT14-012Lrev A (5'-GGCCGAAGGTGGGAAGGAGTAG-3')、AT14-012Lrev B (5'-GTCCCTTGGCCGAAGGTGGGAAG-3')、及びAT14-012Lrev C (5'-TGTCCCTTGGCCGAAGGTGG-3')とした。もう一度述べておくと、軽鎖のフレームワーク4は、このPCR法では解明しなかった。

【0231】

結果

AT14-012は変異していないCD9を認識する。AT14-012により認識されるCD9上のエピトープが変異していないことを確認するため、異なる一連の細胞タイプに対し配列解析を実施した。もとの患者に由来する黒色腫細胞を含む腫瘍細胞及びAT14-012/2H15のもとのB細胞でRT-PCRを行った。試験した細胞はすべて、AT14-012エピトープ中に変異体なかったことから、AT14-012はCD9の野生型配列を認識していることが確認された。また、これらのデータは、Bc16/xL不死化B細胞で発現しているそれぞれのCD9ドメインは野生型配列であることを示す。

【0232】

B細胞由来の2H15/AT14-012抗体はIGHG3*16のアロタイプである。もとの患者由来のAT14-012/2H15 B細胞はIgG3アイソタイプである。産生された抗体のアロタイプを特定するため、B細胞のmRNAを単離し、Fc領域に特異的なプライマーを使用してRT-PCRにかけた。得られた配列と合わせて、既報のデータ(Vidarsson et al., 2014)から、AT14-012患者由来のB細胞クローンはIGHG3*16のアロタイプであることが明らかとなった(図21)。AT14-012となる、及びAT14-012となるべき抗体に対しIgG3アロタイプが及ぼす影響については現在不明である。CDCなどのエフェクター機能アッセイにおいてすべてのアロタイプをサイドバイサイドで比較している発表はない。

【0233】

AT14-012重鎖及び軽鎖配列は、全B細胞レパートリーから回収され得る

ここでの、本発明者らの目的は、AT14-012配列が患者の全B細胞レパートリー中に存在するかを調査することであった。PCRによるアプローチを用い、可変重鎖(VH3)及び軽鎖(VK4) IgGファミリーに対しプレ増幅工程を行い、本発明者らは、AT14-012特異的な二次PCR中に超変位が導入された適切なAT14-012配列を得るのに成功した(材料及び方法を参照のこと)。本アプローチの制限に起因して、両鎖ともフレームワーク領域4の解明は不能であった。重鎖には明瞭な超変異の追加又は欠失はみられなかったものの(データ非掲載)、軽鎖の位置T109(IMG付番)において、本発明者らは超変異はすべての配列に導入されたわけではないことに気づいた。もとの生殖系列配列はセリンを含有しており、この超変異は特性がある程度保存されていて、全体的な構造又はCD9結合に大きな影響を及ぼさない(試験せず)。

【0234】

実施例8-抗PD1抗体の比較

材料及び方法

ヒト免疫系マウスの作成(van Lent, Methods Mol Biol, 2

10

20

30

40

50

010)

亜致死的に放射線照射した（350 cGy）新生児（1週齢未満）のNSGマウスに、ヒトCD34⁺CD38⁻造血前駆細胞を肝内注射した。十分に再構成され、かつヒト免疫細胞を産生するマウスを、異種移植実験に適したものと判定する。

【0235】

結果

AT14-012と抗PD1とを組み合わせることによる、*in vivo*での黒色腫増殖の強力な阻害。PD1-PDL1系をブロックする抗体、特にPD1に結合するものは、現在では、様々な後期癌患者の治療に広範に使用されている。応答速度は癌の種類によって異なり、一般的には、ごくわずかな患者のみが治療に良好に応答する。抗PD1抗体と、新規又は登録済みの化合物との組み合わせを試験するべく、多くの臨床試験が行われている。本発明者らは、ヒト免疫系（HIS）マウスモデルにおいて、ニボルマブ（Opdivo, Bristol-Myers Squibb）の存在下での腫瘍細胞の根絶におけるAT14-012の有効性について試験した。ヒト造血幹細胞をNSGマウスに移植して、HISマウスを作成した（van Lent, Methods Mol Biol, 2010）。血液循環にヒト免疫が存在することを特徴とする免疫系の形成後、マウスにはルシフェラーゼ発現黒色腫細胞の皮下移植を行った。治療の開始前に、腫瘍を4週間増殖させて約100mm³の大きさにした。マウスは4つの異なる処置群に無作為に割り付け、週に2回抗体を腹腔内注射した。

AT10-002（15mg/kg）+PBS AT10-002（15mg/kg）+ニボルマブ（2.5mg/kg）

AT14-012（15mg/kg）+PBS AT14-012（15mg/kg）+ニボルマブ（2.5mg/kg）

ルシフェラーゼイメージングにより判定されたとおり、AT14-012抗体のみを投与したマウスは、AT10-002（抗インフルエンザ）群のマウスと比較して腫瘍増殖の遅延を示した（図22A, B）。驚くべきことに、AT14-012を抗PD1抗体と組み合わせて投与した場合、腫瘍増殖の阻害は、その他の抗体レジメンと比較して強く増強された（図22A）。屠殺日の腫瘍の大きさと、治療開始時の腫瘍の大きさとの関連を算出することで、AT14-012+ニボルマブを組み合わせると、腫瘍の大きさがほぼ70%縮小することが明らかになった（図22B）。これらのデータから、AT14-012抗-CD9抗体とT細胞刺激抗体との組み合わせは、腫瘍細胞の根絶に大きな可能性を有していることが明らかに示される。

【0236】

【表 1】

表 1. 抗体 AT 14-012

重鎖CDR1	DYAMH
重鎖CDR2	GISWNSGSIVYADSVKG
重鎖CDR3	AVSGYYPYFDY
軽鎖CDR1	KSSQSVLYSSNNKNYL
軽鎖CDR2	WASTRES
軽鎖CDR3	QQYYTTP
重鎖	EVQVVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIS WNSGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLR AEDTAFYYCAKAVSGYYPY FDYWGGGILVTSS
軽鎖	DIVMTQSPDLSVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLGWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTTPSTFGQGT RLEIK
重鎖CDR1	gat tat gcc atg cac
重鎖CDR2	ggt att agt tgg aat agt ggt agc ata gtc tat gcg gac tct gtg aag ggc
重鎖CDR3	gcc gtg agt ggt tat tat ccc tac ttt gac tac
軽鎖CDR1	aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta ggt
軽鎖CDR2	tgg gca tct acc cgg gaa tcc
軽鎖CDR3	cag caa tat tat act act cct
重鎖	gaa gtg cag gtg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt gat gat tat gcc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc tca ggt att agt tgg aat agt ggt agc ata gtc tat gcg gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc ctg tat ctg caa ctg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttc tat tac tgt gca aaa gcc gtg agt ggt tat tat ccc tac ttt gac tac tgg ggc cag gga att ttg gtc acc gtc tcc tca
軽鎖	gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg tct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc aac tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc tcc aac aat aag aac tac tta ggt tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aag ctg ctc att tac tgg gca tct acc cgg gaa tcc ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tat act act cct tcc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa

【0237】

参照文献

de Jong, et al. A Novel Platform for the
Potentiation of Therapeutic Antibodies B
ased on Antigen-Dependent Formation of I
gG Hexamers at the Cell Surface. PLoS Bio
l. 2016 Jan 6;14(1)

Gouy et al. SeaView version 4: A multipla
tform graphical user interface for seque
nce alignment and phylogenetic tree buil
ding. Mol Biol Evol. 2010 Feb;27(2):221~4.

Hanly et al. Review of polyclonal antibo
dy production procedures in mammals and
poultry. ILAR Journal (1995); Vol. 37, Number

3 : 93 ~ 118

Hattori et al. Downregulation of rheumatoid arthritis-related antigen RA-A47 (HSP 47/colligins-2) in chondrocytic cell lines induces apoptosis and cell-surface expression of RA-A47 in association with CD9. *J. Cell Physiol.* (2005); 202 (1) : 191 ~ 204

Huang et al. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am J Pathol.* 1998 Sep; 153 (3) : 973 ~ 83.

Iwai et al. Abundant expression of tetraspanin CD9 in activated osteoclasts in ovariectomy-induced osteoporosis and in bone erosions of collagen-induced arthritis. *Rheumatol. Int.* (2008); 28 (3) : 225 ~ 231

Jin et al. Statins decrease lung inflammation in mice by upregulating tetraspanin CD9 in macrophages. *PLoS One* (2013); Sep 9; 8 (9) : e73706.

Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991).

Kawakatsu et al. Antithrombotic effect of an anti-glycoprotein IIB/IIIA antibody in primate lethal thrombosis. *Thromb Res.* 1993 May 1; 70 (3) : 245 ~ 54.

Kwakkenbos MJ et al. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat Med.* 2010. 16 (1) : 123 ~ 8.

Lee, E. C. et al. Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nature Biotechnology* (2014); 32 (4) : 356 ~ 363.

Lefranc MP, 「Unique database numbering system for immunogenetic analysis」 *Immunology Today*, 18, 509 (1997). PMID: 9386342.

Lefranc MP, 「The IMGT unique numbering for immunoglobulins, T cell Receptors and Ig-like domains」, *The Immunologist*. 1999; 7, 132 ~ 136.

Lefranc MP, et al. 「IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains」 *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55 ~ 77 (2003).

Musunuri et al. Increased Levels of Extr

acellular Microvesicle Markers and Decreased Levels of Endocytic/Exocytic Proteins in the Alzheimer's Disease Brain. *J Alzheimers Dis.* 2016 Oct 18;54(4):1671~1686.

Rajendra et al. A high cell density transient transfection system for therapeutic protein expression based on a CHO GS-knockout cell line: process development and product quality assessment. *Biotechnol Bioeng.* 2015 May;112(5):977~86.

10

Seigneuret et al. Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and hepatitis C virus receptor CD81: conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily. *Biophys J.* 2006 Jan 1;90(1):212~27.

Takeda et al. Preventive role of tetraspanin CD9 in systemic inflammation of COPD. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* (2015);53(6):751~760

20

Van Lent et al. In vivo modulation of gene expression by lentiviral transduction in 「human immune system」 Rag2-/-gamma c-/-mice. *Methods Mol Biol.* 2010;595:87~115.

Verdegaal et al. Successful treatment of metastatic melanoma by adoptive transfer of blood-derived polyclonal tumor-specific CD4+ and CD8+ T cells in combination with low-dose interferon-alpha. *Cancer Immunol Immunother* (2011);60(7):953~963.

30

Vidarsson et al. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014 Oct 20;5:520.

Wagner et al. Budesonide treatment of patients with collagenous colitis restores normal eosinophil and T-cell activity in the colon. *Inflamm. Bowel Dis.* (2010);16(7):1118~1126.

40

Wagner et al. Bispecific antibody generated with sortase and click chemistry has broad antiinfluenza virus activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Nov 25;111(47):16820~5.

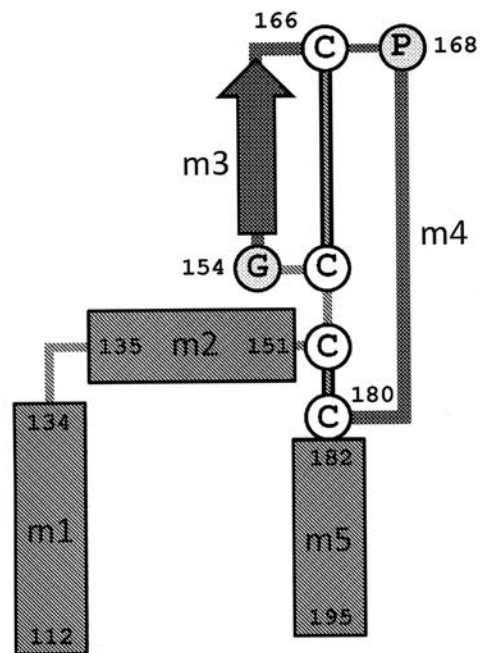
Yang et al., Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2015 Dec 17;52:5.8.1~15.

Zimmerman et al. Crystal Structure of a

50

Full-Length Human Tetraspanin Reveals a
Cholesterol-Binding Pocket. Cell. 2016 Nov
3; 167 (4) : 1041~1051. e11.

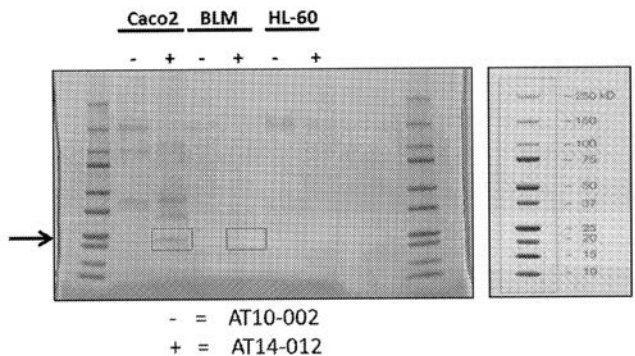
【図 1 B】



【図 3】

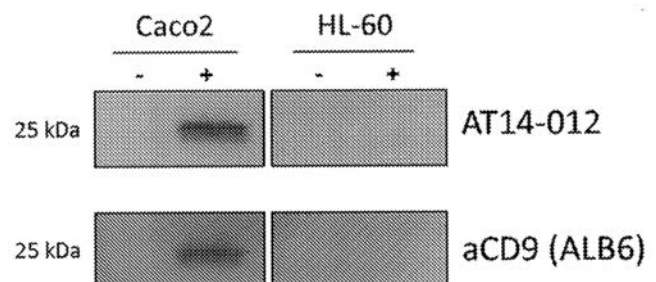
10	20	30	40	50
MPVKGGTKCI	KYLLFGFNFI	FWLAGIAVLA	IGLWLRFDSQ	TKSIFEQETN
60	70	80	90	100
NNNSSFYTG	VILIGAGALM	MLVGFGLGCC	AVQESQCMLG	LFFGFLLVIF
110	120	130	140	150
AIEIAAAIW	YSHKDEVIKE	VQEFYKDTYN	KLKTKDEPQR	ETLKAHYAL
160	170	180	190	200
NCCGLAGGVE	QFISDICPKK	DVLETFTVKS	CPDAIKEVFD	NKFHIIGAVG
210	220			
IGIAVVMIFG	MIFSMILCCA	IRNRREMV		

【図 4 B】



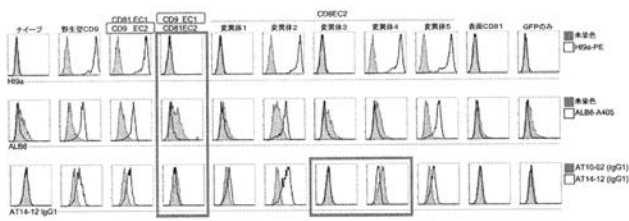
【図 4 C】

【図 4 C】



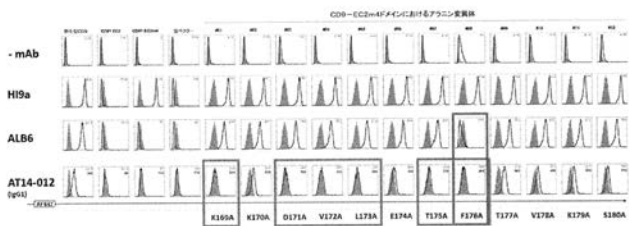
【図 5 A】

エピトープマッピング (FACS):
CD9/CD81ハイブリッド変異体EC1-EC2-EC2m1-EC2m2-EC2m3-EC2m4-EC2m5

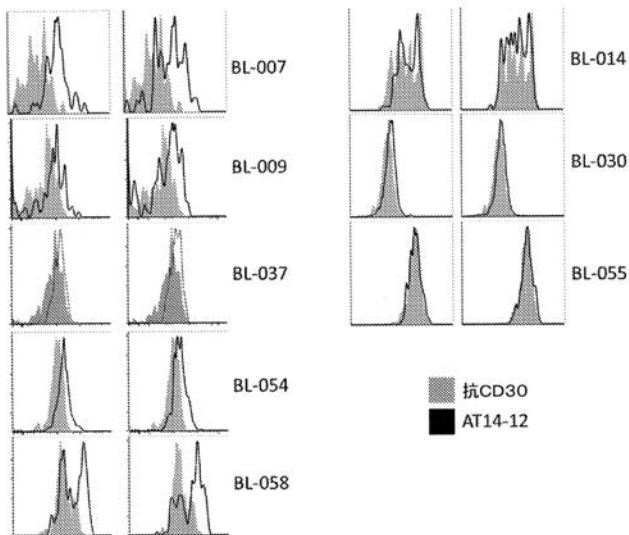


【図 5 B】

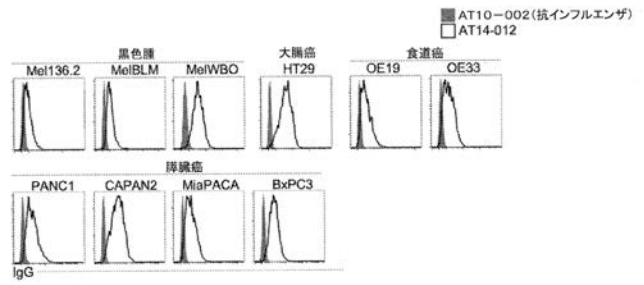
エピトープマッピング (FACS):
CD9 EC2m4アラニン変異体



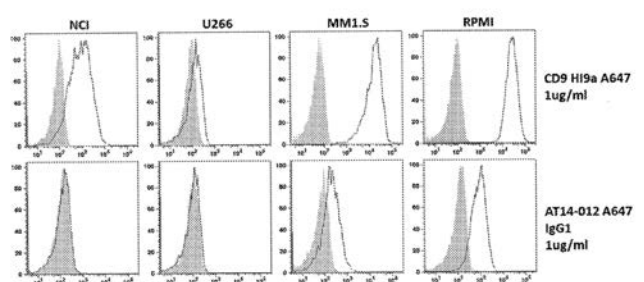
【図 6 B】



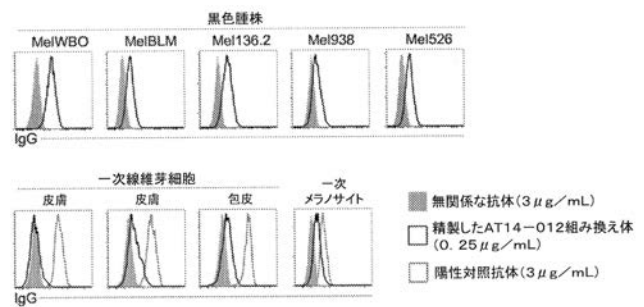
【図 6 A】



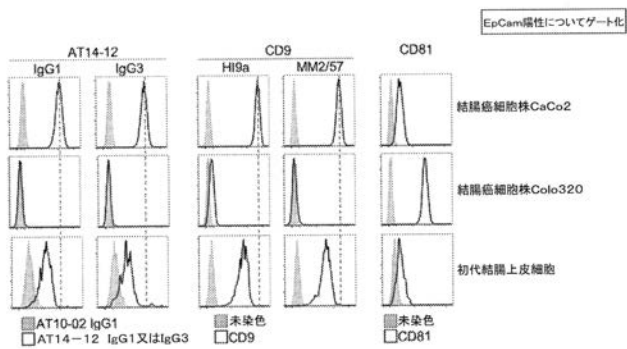
【図 6 C】



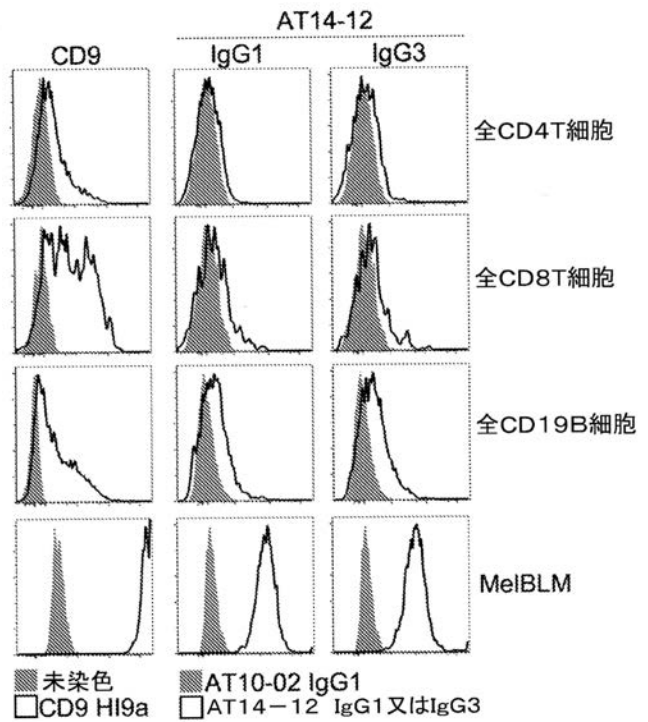
【図 7 A】



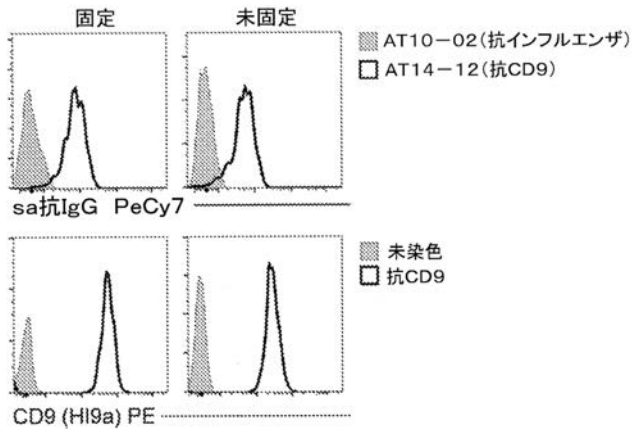
【図 7 B】



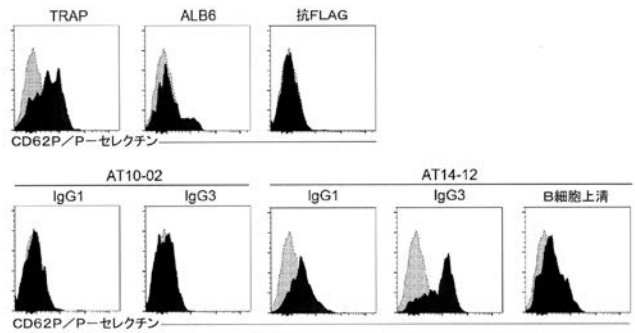
【図 7 C】



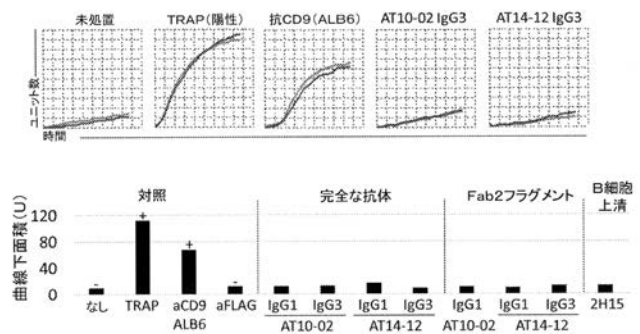
【図 8 A】



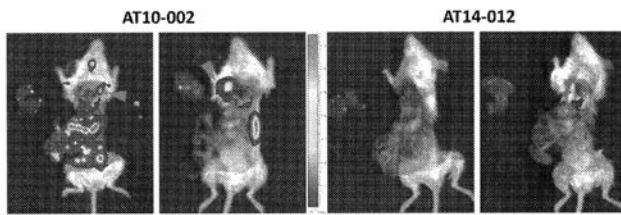
【図 8 B】



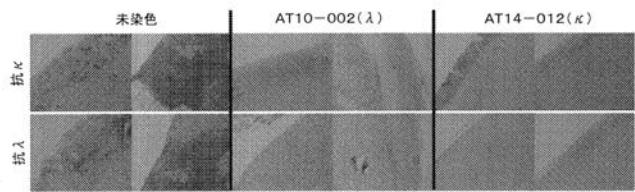
【図 8 C】



【図 9 A】

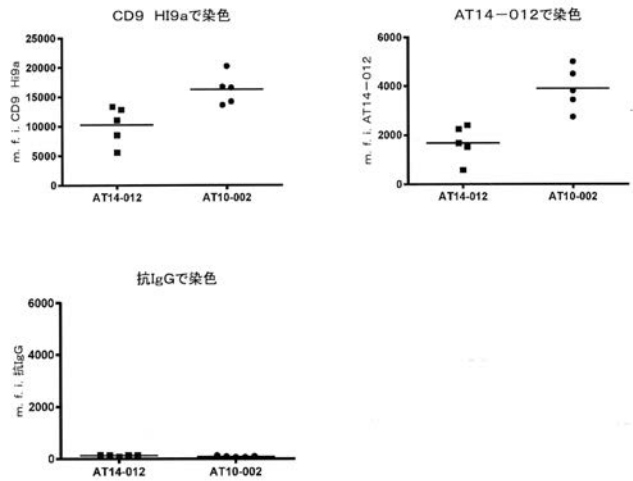
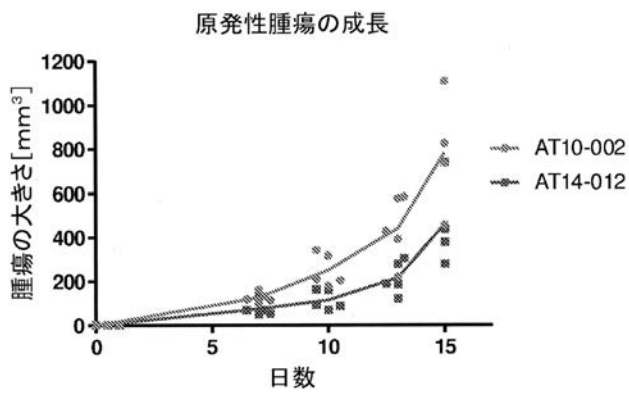


【図 9 C】

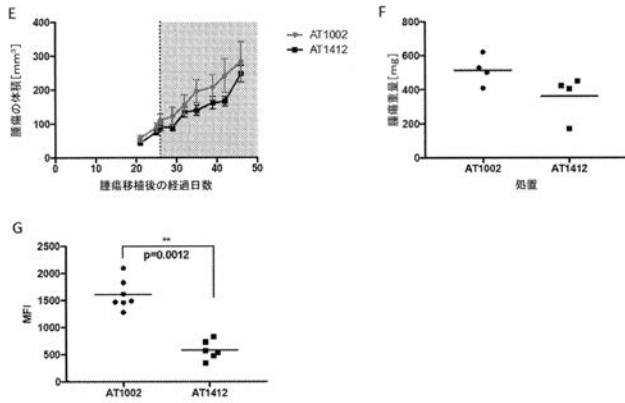


【図 9 D】

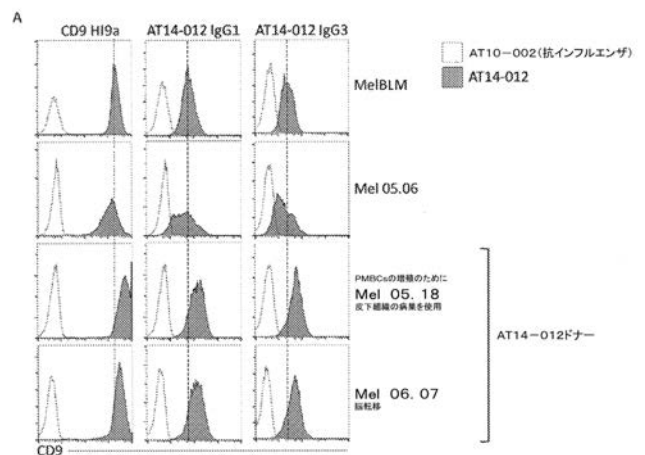
【図 9 B】



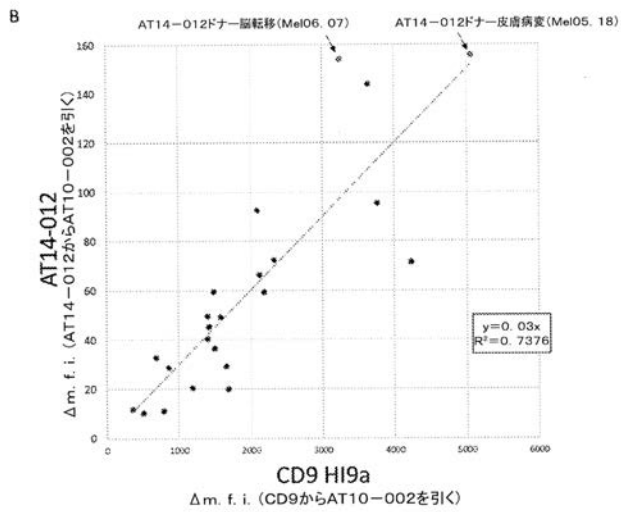
【図 9 E】



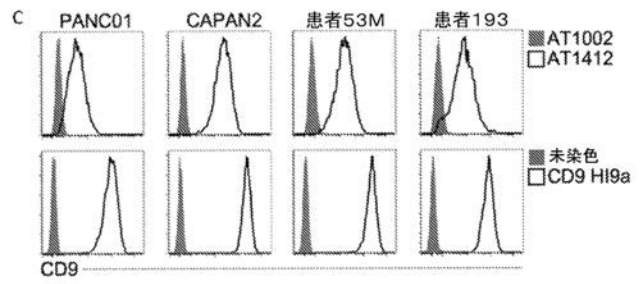
【図 10 A】



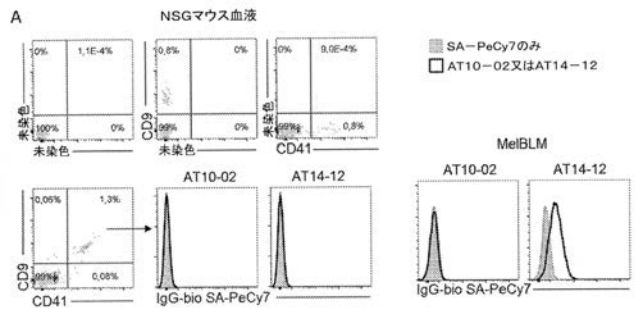
【図 10 B】



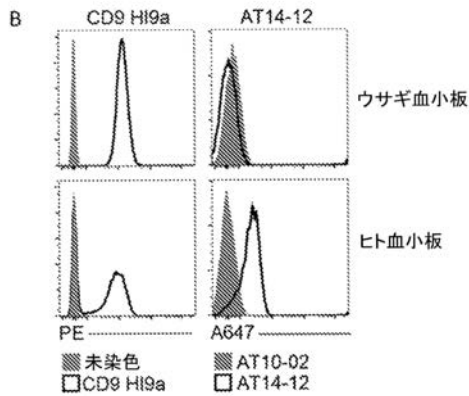
【図 10 C】



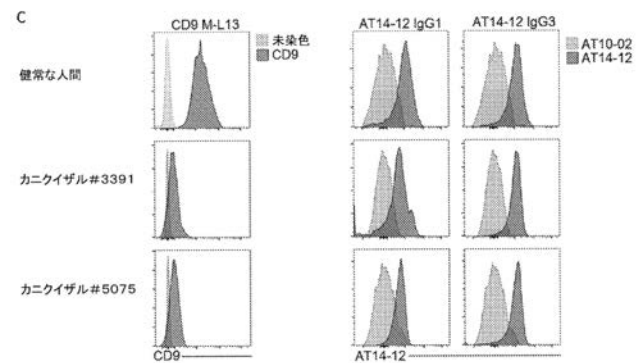
【図 11 A】



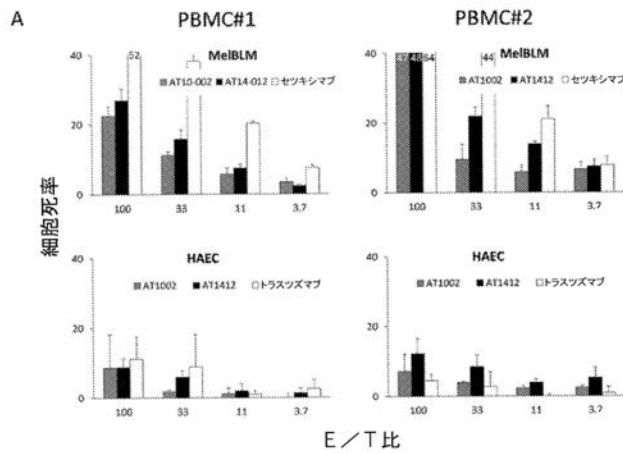
【図 11 B】



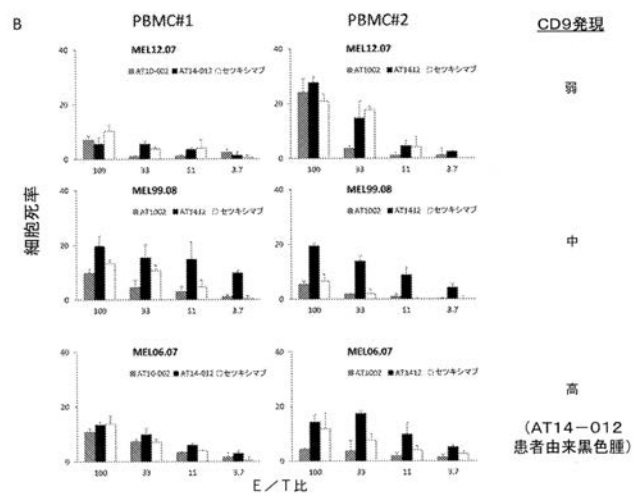
【図 11 C】



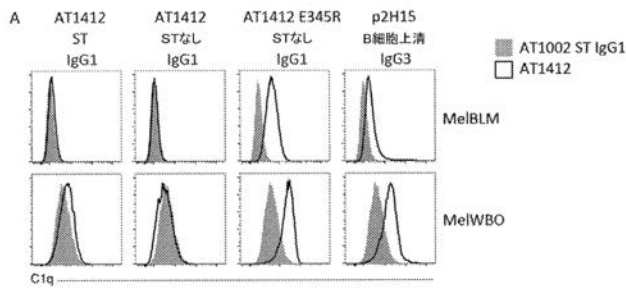
【図 1 2 A】



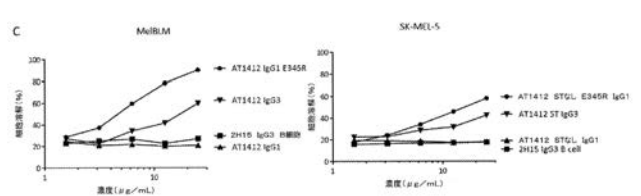
【図 1 2 B】



【図 1 3 A】

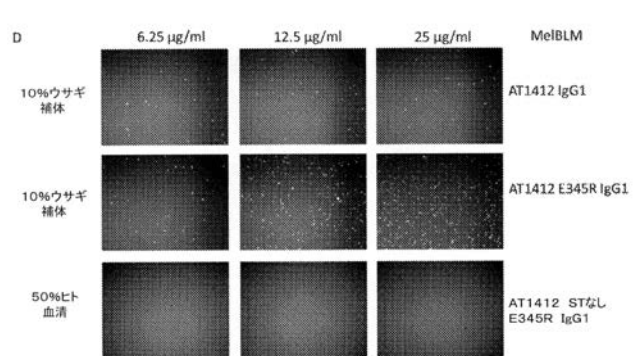
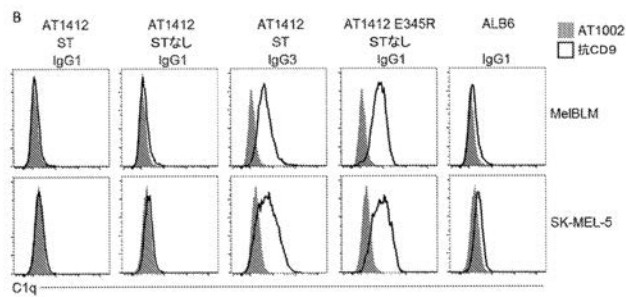


【図 1 3 C】

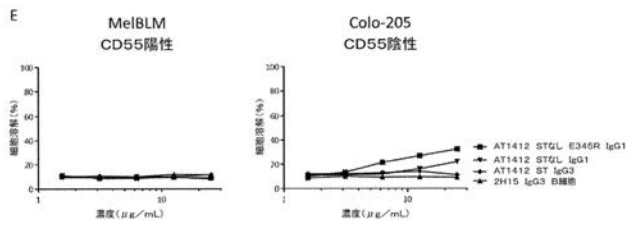


【図 1 3 D】

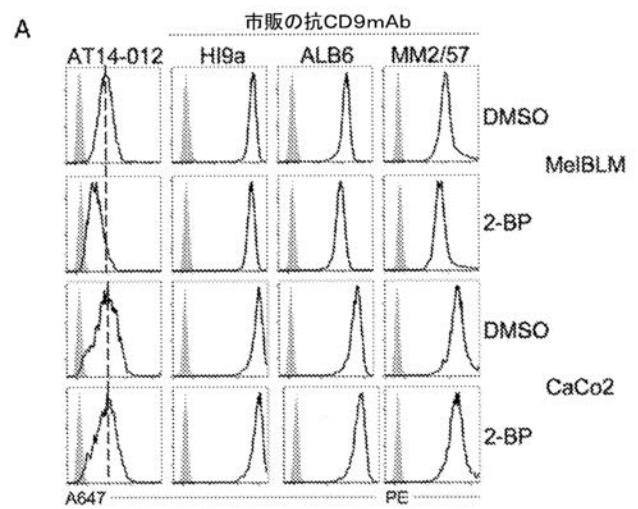
【図 1 3 B】



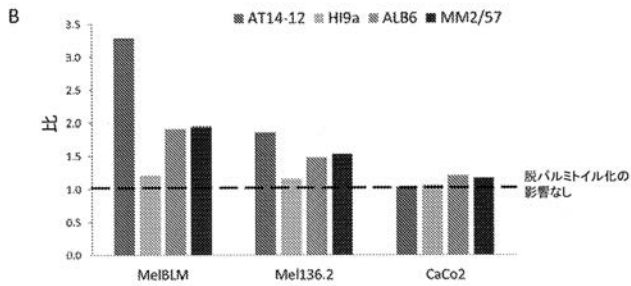
【図 1 3 E】



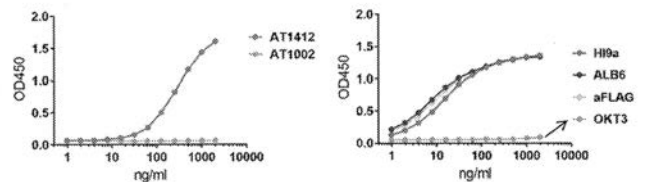
【図 1 4 A】



【図 1 4 B】

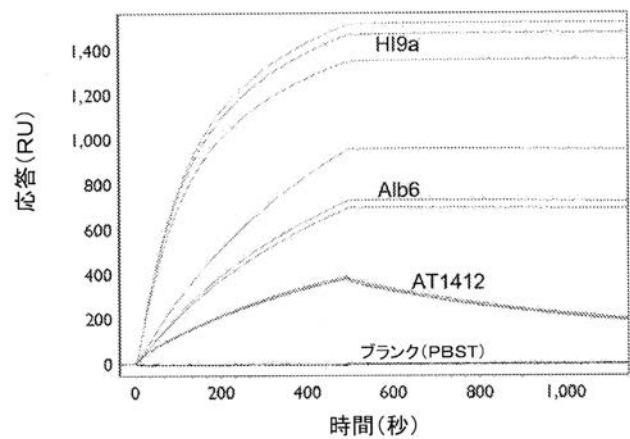
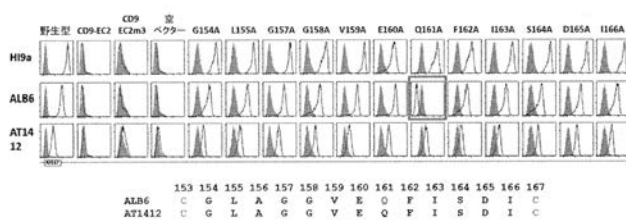


【図 1 6 A】



【図 1 6 B】

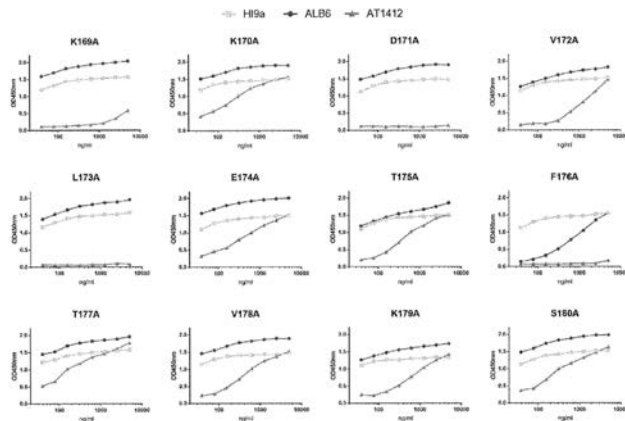
【図 1 5】



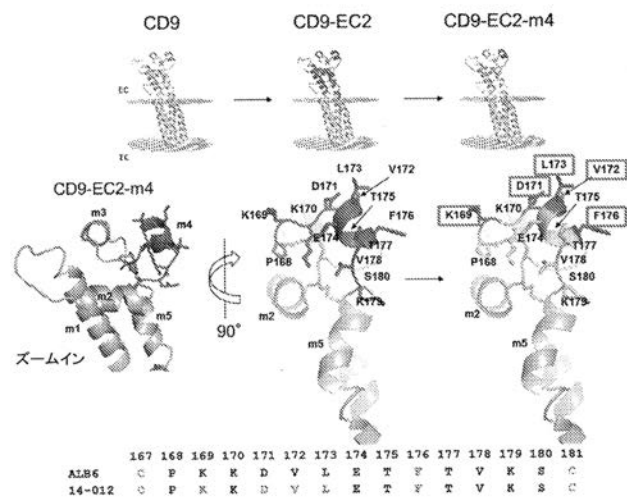
【図 16 C】

抗体:	k_a	k_d	K_D
AT1412	1.62 ($\pm$ 0.52)	71.0 ($\pm$ 20.6)	44,300 ($\pm$ 1,500)
H19a	43.0 ($\pm$ 2.1)	0.1 *	2.33 ($\pm$ 0.11)
ALB6	15.1 ($\pm$ 1.3)	2.16 ($\pm$ 0.30)	145 ($\pm$ 8)

【図 17 A】



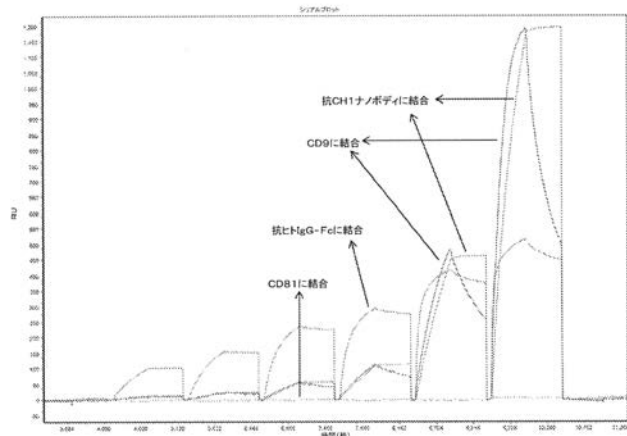
【図 17 B】



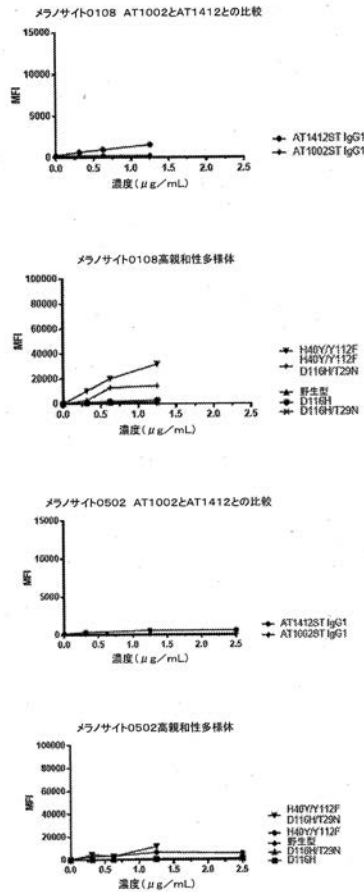
【図 17 C】

ヒト	23	33	43	53	63	73	83
LAGIAVLAI	LNLRFDSQTK	SIFEQETNN	NSSFTGVYI	LIGAGALML	VGFLLCGGAV	QESQMLGLF	
テナガザル							
ゴリラ							
オランウータン							
チンパンジー							
マカク							
ヒト							
ウサギ							
マウス							
ヒト	93	103	113	123	133	143	153
FGFLLVIFAI	EIAAALNGYS	HKDEVIKEVQ	EFYKDTYNKL	KTKDEFQRET	LKAIHYALNC	CGLAGGVEQF	
テナガザル							
ゴリラ							
オランウータン							
チンパンジー							
マカク							
ヒト							
ウサギ							
マウス							
ヒト	163	173	183	193	203	213	223
ISDICEK	PERTVKSCP	DAKEVFQNK	PHIIGAVGIG	IAVMIFQMI	FSMLCCAIR	RNRKRV	
テナガザル							
ゴリラ							
オランウータン							
チンパンジー							
マカク							
ヒト							
ウサギ							
マウス							

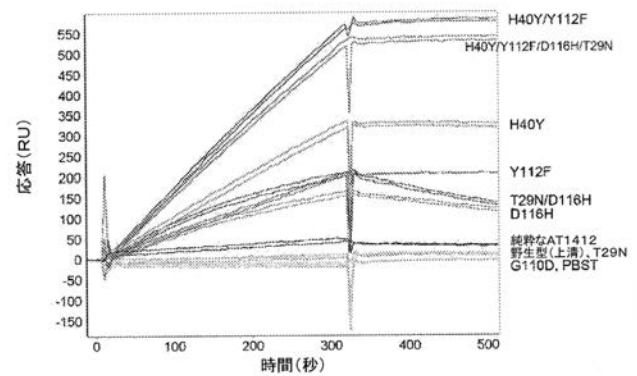
【図 18 A】



【図 19 C - 2】



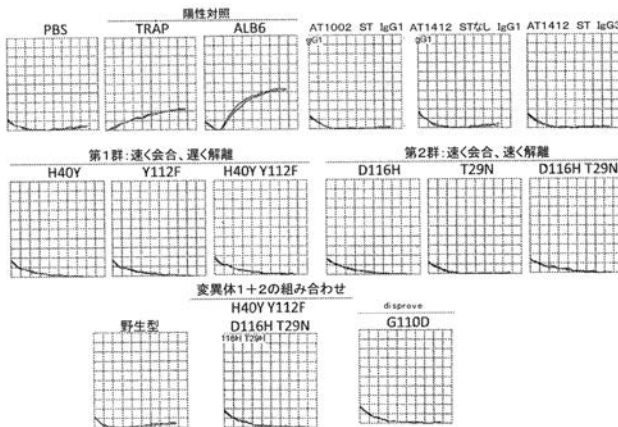
【図 19 D】



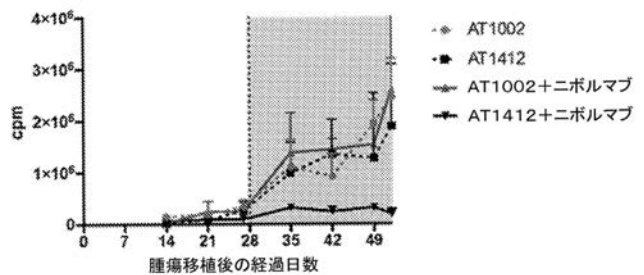
【図 19 E】

精製された抗体	k_{on}	k_{off}	K_D
AT1412*	1.66 (± 0.22)	80.8 (± 1.1)	49,500 ($\pm 7,500$)
H40Y*	37.2 (± 1.3)	20.2 (± 1.1)	543 (± 11)
Y112F*	18.5 (± 1.2)	20.3 (± 2.1)	1,090 (± 40)
H40Y/Y112F*	16.4 (± 1.6)	3.69 (± 1.31)	219 (± 58)
D116H*	47.0 (± 0.8)	217 (± 3)	4,620 (± 140)
T29N*	2.59 (± 0.41)	126 (± 10)	50,100 ($\pm 12,100$)
D116/T29H*	70.8 (± 1.1)	297 (± 1)	4,190 (± 80)
H40Y/Y112F/D116H/T29N*	15.3 (± 1.6)	6.92 (± 0.31)	455 (± 27)
G110D*	-	-	-

【図 20】



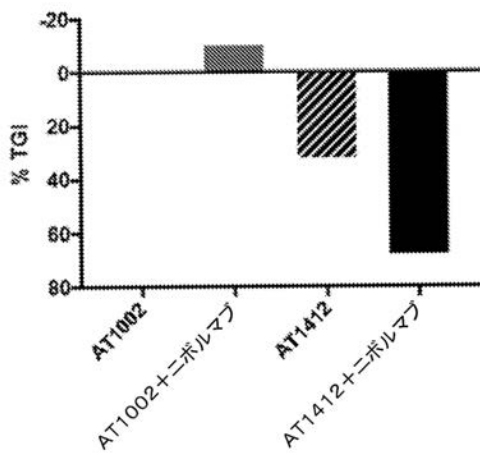
【図 22 A】



【図 21】

CH1	ヒンジ	エキソン1~4	CH2	CH3	
G3m(b*)	S	SL	+	+	IGHG3*01,*05,*10, AJ390236
G3m(b*)	S	SL	+	+	IGHG3*04, X96549
G3m(b*)	S	SL	+	+	IGHG3*09, AJ390242
G3m(b*)	S	SL	+	+	IGHG3*11, AJ390247
G3m(b*)	S	SL	+	+	IGHG3*12, AJ390252
G3m(b*)	S	SL	+	+	IGHG3*06,*07, AJ390237
G3m(b*)	S	SL	+	+	IGHG3*08, AJ390241
G3m(c3*)	S	SL	+	+	IGHG3*13, AJ390244
G3m(c3c5*)	S	SL	+	+	IGHG3*03, X16110
G3m(g*)	S	SL	+	+	IGHG3*14, AJ390254
G3m(g*)	S	SL	+	+	IGHG3*15, AJ390260
G3m(g*)	S	SL	+	+	IGHG3*16, AJ390263
G3m(s*)	S	SL	+	+	IGHG3*17, AJ390272
G3m(s*)	S	SL	+	+	IGHG3*18, AJ390276
G3m(s*)	S	SL	+	+	IGHG3*19, AJ390279(71, 74)

【図 2 2 B】



【配列表】

2019509019000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/NL2017/050003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 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)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/157623 A1 (KOREA RES INST OF BIOSCIENCE [KR]; UNIV SUNKYUNKWAN FOUND [KR]; PARK) 30 December 2009 (2009-12-30) claims 1-22; examples 1-2 ----- -/--	1-72

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

11 April 2017

Date of mailing of the international search report

16/05/2017

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

Le Flao, Katell

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/NL2017/056003

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MENENDEZ J ET AL: "506 POSTER The apogenic anti-CD9 antibody, AR40A746.2.3, inhibits tumor growth in breast and pancreatic cancer and targets cancer stem cells in acute myeloid leukemia", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER. SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 6, no. 12, 1 October 2008 (2008-10-01), page 161, XP025534570, ISSN: 1359-6349, DOI: 10.1016/S1359-6349(08)72440-6 [retrieved on 2008-10-01] abstract	1-72
X	----- MENENDEZ J ET AL: "Anti-CD9 antibody, AR40A746.2.3, inhibits tumor growth in pancreatic and breast cancer models and recognizes CD9 on CD34+CD38- leukemic cancer stem cells", AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING; [CANCER RESEARCH; APRIL 2004, VOLUME 64, ISSUE 7, SUPPLEMENT], AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 49, 12 April 2008 (2008-04-12), page 949, XP001525541, ISSN: 0197-016X abstract	1-72
X	----- EP 2 803 673 A1 (SHIONOGI & CO [JP]) 19 November 2014 (2014-11-19) claims 1-13; figures 2,3; examples 1-9	1-72
X	----- WO 2010/054007 A1 (FABRUS LLC [US]; SMIDER VAUGHN [US]; GRAZIANO JAMES [US]; MAO HELEN HO) 14 May 2010 (2010-05-14) sequence 1748	6,19-35
X	----- WO 2008/084410 A2 (HUMABS LLC [US]; LANZAVECCHIA ANTONIO [CH]; MACAGNO ANNALISA [CH]) 17 July 2008 (2008-07-17) sequence 40	7,19-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2017/050003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009157623	A1	30-12-2009	EP 2207803 A1 21-07-2010 KR 20100002207 A 06-01-2010 US 2011195027 A1 11-08-2011 WO 2009157623 A1 30-12-2009
EP 2803673	A1	19-11-2014	CA 2860163 A1 04-07-2013 CN 104302667 A 21-01-2015 EP 2803673 A1 19-11-2014 JP 5952309 B2 13-07-2016 JP WO2013099925 A1 07-05-2015 KR 20140107615 A 04-09-2014 US 2015010913 A1 08-01-2015 WO 2013099925 A1 04-07-2013
WO 2010054007	A1	14-05-2010	AU 2009313551 A1 14-05-2010 AU 2009313560 A1 14-05-2010 AU 2016204719 A1 28-07-2016 CA 2742968 A1 14-05-2010 CA 2742969 A1 14-05-2010 DK 2356270 T3 12-12-2016 EP 2356146 A1 17-08-2011 EP 2356270 A1 17-08-2011 JP 5882058 B2 09-03-2016 JP 2012508016 A 05-04-2012 JP 2012508017 A 05-04-2012 JP 2016040246 A 24-03-2016 JP 2016127850 A 14-07-2016 US 2011318339 A1 29-12-2011 US 2012058906 A1 08-03-2012 US 2016194627 A1 07-07-2016 WO 2010054007 A1 14-05-2010 WO 2010054010 A1 14-05-2010
WO 2008084410	A2	17-07-2008	AU 2008204258 A1 17-07-2008 BR P10806185 A2 30-08-2011 CA 2673755 A1 17-07-2008 CN 101657467 A 24-02-2010 CO 6220862 A2 19-11-2010 CR 10961 A 20-11-2009 CY 1114271 T1 31-08-2016 DK 2118140 T3 01-07-2013 EC SP099547 A 30-11-2009 EP 2118140 A2 18-11-2009 EP 2487187 A2 15-08-2012 EP 2860189 A2 15-04-2015 ES 2426987 T3 28-10-2013 ES 2526907 T3 16-01-2015 GT 200900188 A 29-11-2011 HK 1139158 A1 18-10-2013 HK 1174344 A1 27-02-2015 HR P20130877 T1 25-10-2013 IL 199585 A 31-07-2014 JP 5710123 B2 30-04-2015 JP 2010516229 A 20-05-2010 JP 2014141501 A 07-08-2014 KR 20090127256 A 10-12-2009 KR 20140101884 A 20-08-2014 MA 31225 B1 01-03-2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2017/050003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		MY 150709 A	28-02-2014
		NZ 578844 A	31-08-2012
		PT 2118140 E	29-08-2013
		PT 2487187 E	05-02-2015
		RU 2009129403 A	10-02-2011
		SG 177943 A1	28-02-2012
		SG 191635 A1	31-07-2013
		SG 192399 A1	30-08-2013
		SI 2118140 T1	30-10-2013
		TN 2009000285 A1	31-12-2010
		UA 100682 C2	25-01-2013
		US 2008213265 A1	04-09-2008
		US 2012076802 A1	29-03-2012
		US 2013101604 A1	25-04-2013
		US 2014056914 A1	27-02-2014
		WO 2008084410 A2	17-07-2008
		ZA 200905408 B	26-05-2010

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	15/67	(2006.01)	C 1 2 N	15/67	Z	4 C 0 8 6	
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K	67/027		4 C 0 8 7	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 H 0 4 5	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19			
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21			
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10			
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04			
C 1 2 N	5/0781	(2010.01)	C 1 2 N	5/0781			
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K	16/30			
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	L		
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	39/395	T		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	47/68			
A 6 1 K	50/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00			
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	50/00	1 0 0		
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K	49/00			
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	31/7088			
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/12			
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 P	35/00			
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/76			
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	E		
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D		
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	C		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00			
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1		
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/10			
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02			
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	29/00			
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	A 6 1 P	11/00			
			A 6 1 P	1/04			
			A 6 1 P	7/00			
			A 6 1 P	37/02			
			A 6 1 K	39/395	Y		
			A 6 1 K	39/395	V		
			G 0 1 N	33/53	Y		
			C 0 7 K	16/46			

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

(72)発明者 ヘルゲン・スピツ

オランダ・1105・ペーアー・アムステルダム・ザイドースト・マイベルグドレーフ・59内

- (72)発明者 パウラ・マリア・ウィルヘルミナ・ファン・ヘルデン
オランダ・１１０５・ペーアー・アムステルダム・ザイドースト・マイベルグドレーフ・５９内
- (72)発明者 レムコ・スホット
オランダ・１１０５・ペーアー・アムステルダム・ザイドースト・マイベルグドレーフ・５９内
- (72)発明者 ウーター・ポス
オランダ・１１０５・ペーアー・アムステルダム・ザイドースト・マイベルグドレーフ・５９内
- (72)発明者 クリスティン・ファトマワティ
オランダ・１１０５・ペーアー・アムステルダム・ザイドースト・マイベルグドレーフ・５９内
- (72)発明者 ダニエル・ミヒール・ゴー
オランダ・１１０５・ペーアー・アムステルダム・ザイドースト・マイベルグドレーフ・５９内
- (72)発明者 クーン・ワグナー
オランダ・１１０５・ペーアー・アムステルダム・ザイドースト・マイベルグドレーフ・５９内
- (72)発明者 ジュリエン・クリスチャン・ヴィラウディ
オランダ・１１０５・ペーアー・アムステルダム・ザイドースト・マイベルグドレーフ・５９内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS33
4B065 AA91X AA93X AA94Y AB01 AC12 AC14 AC20 BA02 BA24 BA30
CA25 CA44 CA46
4C076 AA95 CC04 CC07 CC09 CC14 CC15 CC16 CC27 CC41 EE41
EE59 FF68
4C084 AA02 AA03 AA07 AA12 AA13 AA17 CA53 MA02 MA05 MA66
NA05 NA14 ZA511 ZA591 ZA681 ZA961 ZA971 ZB072 ZB111 ZB261
ZC412 ZC751
4C085 AA13 AA14 AA25 AA26 AA27 BB01 BB31 BB36 BB41 BB42
BB43 EE01 EE03 EE05 GG01 KA26 KB82 LL18
4C086 AA01 AA02 AA03 EA18 MA01 MA02 MA04 MA05 NA05 NA14
ZA51 ZA59 ZA68 ZA96 ZA97 ZB07 ZB11 ZB26 ZC41 ZC75
4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 BC83 CA12 MA02 MA05 NA05 NA14
ZA51 ZA59 ZA68 ZA96 ZA97 ZB07 ZB11 ZB26 ZC41 ZC75
4H045 AA11 BA10 BA40 BA71 BA72 CA40 DA50 DA76 DA86 EA28
EA50 EA51 EA54 FA74 GA21

专利名称(译)	治疗用抗CD9抗体		
公开(公告)号	JP2019509019A	公开(公告)日	2019-04-04
申请号	JP2018535363	申请日	2017-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	它的治疗，裴衰落		
[标]发明人	ヘルゲンスピツ パウラマリアウィルヘルミナファンヘルデン レムコスホットテ ウーターボス クーンワーグナー		
发明人	ヘルゲン・スピツ パウラ・マリア・ウィルヘルミナ・ファン・ヘルデン レムコ・スホットテ ウーター・ボス クリスティン・ファトマワティ ダニエル・ミヒール・ゴ クーン・ワーグナー ジュリエン・クリスチャン・ヴィラウディ		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K14/705 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/67 A01K67/027 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/04 C12N5/0781 C07K16/30 A61K39/395 A61K47/68 A61K48/00 A61K50/00 A61K49/00 A61K31/7088 A61K35/12 A61P35/00 A61K35/76 A61K45/00 A61P43/00 A61P19/10 A61P19/02 A61P29/00 A61P11/00 A61P1/04 A61P7/00 A61P37/02 G01N33/53 C07K16/46		
CPC分类号	C07K16/2896 A61K2039/505 A61K2039/507 A61P35/00 C07K14/70596 C07K16/2818 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/54 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/734 G01N33/57492 G01N2333/70596		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C07K14/705 C12N15/12 C12N15/63.Z C12N15/67.Z A01K67/027 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/04 C12N5/0781 C07K16/30 A61K39/395.L A61K39/395.T A61K47/68 A61K48/00 A61K50/00.100 A61K49/00 A61K31/7088 A61K35/12 A61P35/00 A61K35/76 A61K39/395.E A61K39/395.D A61K39/395.C A61K39/395.N A61K45/00 A61P43/00.121 A61P19/10 A61P19/02 A61P29/00 A61P11/00 A61P1/04 A61P7/00 A61P37/02 A61K39/395.Y A61K39/395.V G01N33/53.Y C07K16/46		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC12 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/BA30 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC09 4C076/CC14 4C076/CC15 4C076/CC16 4C076/CC27 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF68 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA12 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/CA53 4C084/MA02 4C084/MA05 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA511 4C084/ZA591 4C084/ZA681 4C084/ZA961 4C084/ZA971 4C084/ZB072 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C084/ZC412 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/BB01 4C085/BB31 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/BB43 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE05 4C085/GG01 4C085/KA26 4C085/KB82 4C085/LL18 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA18 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA05 4C086/NA05 4C086/NA14 4C086/ZA51 4C086/ZA59 4C086/ZA68 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB26 4C086/ZC41 4C086/ZC75 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB63 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA02 4C087/MA05 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZA51 4C087/ZA59 4C087/ZA68 4C087/ZA96 4C087/ZA97 4C087/ZB07 4C087/ZB11		

4C087/ZB26 4C087/ZC41 4C087/ZC75 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/EA54 4H045/FA74 4H045/GA21

代理人(译) 村山彦
安倍晋三龙彦

优先权 2016150698 2016-01-08 EP

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

本发明提供了新颖的结合化合物及其治疗用途。

(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2019-509019 (P2019-509019A)	
				(43) 公表日 平成31年4月4日(2019. 4. 4)	
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)		C 1 2 N 15/13		Z N A 4 B 0 6 3	
C O 7 K 16/28 (2006. 01)		C O 7 K 16/28		4 B 0 6 5	
C O 7 K 14/705 (2006. 01)		C O 7 K 14/705		4 C 0 7 6	
C 1 2 N 15/12 (2006. 01)		C 1 2 N 15/12		Z 4 C 0 8 4	
C 1 2 N 15/63 (2006. 01)		C 1 2 N 15/63		4 C 0 8 5	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 96 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2018-535363 (P2018-535363)		(71) 出願人 512011185			
(86) (22) 出願日 平成29年1月6日 (2017. 1. 6)		アイム・セラピューティクス・ベー・フェー			
(85) 翻訳文提出日 平成30年8月17日 (2018. 8. 17)		オランダ・ネーデルラント・マイヘルグ			
(86) 国際出願番号 PCT/NL2017/050003		ドレーフ・59			
(87) 国際公開番号 W02017/119811		(74) 代理人 100108453			
(87) 国際公開日 平成29年7月13日 (2017. 7. 13)		弁理士 村山 靖彦			
(31) 優先権主張番号 16150698. 5		(74) 代理人 100110364			
(32) 優先日 平成28年1月8日 (2016. 1. 8)		弁理士 実広 信哉			
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)		(74) 代理人 100133400			
		弁理士 阿部 達彦			
				最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 治療用抗CD9抗体					