

(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2017-518737

(P2017-518737A)

(43) 公表日 平成29年7月13日 (2017.7.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 3
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 121 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-564022 (P2016-564022)	(71) 出願人	500287639
(86) (22) 出願日	平成27年4月21日 (2015.4.21)		ミレニアム ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成28年12月19日 (2016.12.19)		MILLENNIUM PHARMACE UTICALS, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/026806		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 3 9, ケンブリッジ, ランズダウン ストリート 40
(87) 国際公開番号	W02015/164330	(74) 代理人	100097456
(87) 国際公開日	平成27年10月29日 (2015.10.29)		弁理士 石川 徹
(31) 優先権主張番号	61/982, 098	(72) 発明者	レイチェル エル. ブレイク
(32) 優先日	平成26年4月21日 (2014.4.21)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 1 7 6 0 ナティク マンチェスター プ レイス 21
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/004, 496		
(32) 優先日	平成26年5月29日 (2014.5.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 SYK 標的治療薬のための抗 p SYK 抗体分子及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、pSYKと結合する抗体分子、及びSYK標的治療薬による治療についての診断、予後、SYK標的治療薬による治療のための患者の選択、又はSYK標的治療薬の薬力学プロファイルの評価のための該抗体分子の使用方法に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列の配列番号11、12及び13をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びにアミノ酸配列の配列番号14、15及び16をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子。

【請求項 2】

前記抗pSYK抗体分子が、モノクローナル抗体である、請求項1記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 3】

前記抗pSYK抗体分子が、ウサギ抗体又はウサギ由来の抗体である、請求項1記載の抗pSYK抗体分子。

10

【請求項 4】

前記抗体が、ウサギモノクローナル抗体である、請求項3記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 5】

さらに、配列番号8によるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号10によるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 6】

前記抗pSYK抗体分子が、検出可能な標識にコンジュゲートされている、請求項1～5のいずれか一項記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 7】

前記検出可能な標識が、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、色素を酸化するために過酸化水素を使用する酵素と結合している、糖オキシダーゼ、複素環オキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、及び安定なフリーラジカルからなる群から選択される、請求項6記載の抗pSYK抗体分子。

20

【請求項 8】

前記検出可能な標識が、フルオレセイン又はその誘導体、ローダミンもしくはその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及び2,3-ジヒドロフタラジンジオンから選択されるフルオロフォアである、請求項6記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 9】

前記検出可能な標識が、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{188}Rh 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}Br 、 ^{81}Rb / ^{81}M Kr、 ^{87}M Sr、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{113}M In、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{132}I 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Pb 、 ^{206}Bi 、及び ^{213}Bi からなる群から選択される放射性物質である、請求項6記載の抗pSYK抗体分子。

30

【請求項 10】

請求項1又は請求項5記載の抗体分子をコードする単離核酸配列。

【請求項 11】

請求項10記載の単離核酸配列を含む細胞。

【請求項 12】

抗体分子の生成を可能にする条件下で請求項12記載の細胞を培養し、それによって請求項1又は請求項5記載の抗体分子を生成することを含む、請求項1又は請求項6記載の抗体分子の生成方法。

40

【請求項 13】

請求項1又は請求項5記載の抗体分子の軽鎖及び重鎖の一方又は両方を含むベクター。

【請求項 14】

生体試料中のpSYK分子を検出する方法であって、前記生体試料と請求項1～9のいずれか一項記載の抗体分子とを接触させること、及び前記抗体分子が前記pSYK分子に結合するかどうかを決定することを含む、前記方法。

【請求項 15】

前記検出方法が、免疫組織化学アッセイを含む、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

50

前記生体試料が、pSYK発現癌を有することが疑われる患者に由来する腫瘍生検である、請求項14又は請求項15記載の方法。

【請求項 17】

さらに、前記生体試料中のpSYK発現を定量化する工程を含む、請求項14～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

前記pSYK発現の定量化が、前記生体試料中の細胞質pSYK発現を含む、請求項16記載の方法。

【請求項 19】

前記定量化工程が、Hスコアアプローチを含む、請求項16又は17記載の方法。

10

【請求項 20】

前記pSYK発現癌が、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である、請求項16記載の方法。

【請求項 21】

前記血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病（CLL）である、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

前記血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病である、請求項20記載の方法。

【請求項 23】

前記血液悪性腫瘍が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、請求項20記載の方法。

20

【請求項 24】

請求項1～9のいずれか一項記載の抗pSYK抗体分子及び使用説明書を含むキット。

【請求項 25】

さらにSYK標的治療薬を含む、請求項24記載のキット。

【請求項 26】

前記SYK標的治療薬が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、請求項25記載のキット。

【請求項 27】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項25記載のキット。

30

【請求項 27】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1S,2R）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項25記載のキット。

【請求項 28】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項25記載のキット。

【請求項 29】

前記SYK標的治療薬が、シス-6-（2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項25記載のキット。

40

【請求項 30】

前記SYK標的治療薬が、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項25記載のキット。

。

【請求項 31】

前記SYK標的治療薬が、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-7-フルオロ-4-（3-メチルイソチアゾール-5-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）

50

)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項25記載のキット。

【請求項32】

1以上のpSYK発現細胞によって特徴付けられる疾患を有する患者を治療する方法であって、

- a. 請求項14～19のいずれか一項記載の方法を用いて、前記患者から取得された生体試料中のpSYKタンパク質発現を検出すること；及び
- b. 前記生体試料がpSYKを発現する場合に、前記患者にSYK標的治療薬を投与すること、を含む、前記方法。

【請求項33】

前記検出工程が、a) 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と前記生体試料とを接触させる工程；並びに

b) 前記抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程、を含む、請求項32記載の方法。

【請求項34】

前記検出工程が、免疫組織化学を介して行われる、請求項33記載の方法。

【請求項35】

前記SYK標的治療薬が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、請求項32記載の方法。

【請求項36】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項32記載の方法。

【請求項36】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1S,2R）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項32記載の方法。

【請求項37】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項32記載の方法。

【請求項38】

前記SYK標的治療薬が、シス-6-（2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項32記載の方法。

【請求項39】

前記SYK標的治療薬が、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項32記載の方法。

【請求項40】

前記SYK標的治療薬が、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-7-フルオロ-4-（3-メチルイソチアゾール-5-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項32記載の方法。

【請求項41】

前記1以上のpSYK発現細胞によって特徴付けられる疾患が、癌である、請求項32～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

前記pSYK発現癌が、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である、請求項41記載の方法。

【請求項43】

10

20

30

40

50

前記血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病（CLL）である、請求項42記載の方法。

【請求項 4 4】

前記血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病である、請求項42記載の方法。

【請求項 4 5】

前記血液悪性腫瘍が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、請求項42記載の方法。

【請求項 4 6】

前記生体試料が、細胞又は組織生検である、請求項32～45のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 7】

前記細胞又は組織生検が、腫瘍生検である、請求項46記載の方法。

10

【請求項 4 8】

SYK標的治療薬に対する癌細胞の感受性を決定する方法であって、

a) 癌を有する患者由来の癌細胞から試料を提供する工程；

b) 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と前記試料とを接触させる工程；並びに

c) 前記抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出し、それによって、SYK標的治療薬に対する癌の感受性を決定し、かつ/又は対象がSYK標的治療薬による治療の候補であるか否かを決定する工程、

20

を含む、前記方法。

【請求項 4 9】

対象がSYK標的治療薬の潜在的な候補であるか否かを評価する方法であって、

a) 癌を有する患者由来の癌細胞から試料を提供する工程；

b) 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と前記試料とを接触させる工程；並びに

c) 前記抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出し、それによって、SYK標的治療薬に対する癌の感受性を決定し、かつ/又は対象がSYK標的治療薬による治療の候補であるか否かを決定する工程、

30

を含む、前記方法。

【請求項 5 0】

前記検出工程が、免疫組織化学又は免疫蛍光を介して行われる、請求項48又は請求項49記載の方法。

【請求項 5 1】

前記癌が、血液悪性腫瘍である、請求項48～50のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 2】

前記血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病（CLL）である、請求項50記載の方法。

【請求項 5 3】

前記血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病である、請求項50記載の方法。

40

【請求項 5 4】

前記血液悪性腫瘍が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、請求項50記載の方法。

【請求項 5 5】

さらに、前記患者にSYK標的治療薬を投与する工程を含む、請求項48～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 6】

前記SYK標的治療薬が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、請求項55記載の方法。

【請求項 5 7】

50

前記SYK標的治療薬が、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項55記載の方法。

【請求項57】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1S,2R）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項55記載の方法。

【請求項58】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項55記載の方法。 10

【請求項59】

前記SYK標的治療薬が、シス-6-（2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項55記載の方法。

【請求項60】

前記SYK標的治療薬が、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項55記載の方法。

【請求項61】

前記SYK標的治療薬が、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-7-フルオロ-4-（3-メチルイソチアゾール-5-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項55記載の方法。 20

【請求項62】

生体試料と、配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子を含む反応混合物。

【請求項63】

前記生体試料が、1以上の細胞を含む、請求項62記載の反応混合物。 30

【請求項64】

前記生体試料が、組織試料を含む、請求項62記載の反応混合物。

【請求項65】

前記組織試料が、パラフィン包埋組織試料である、請求項63記載の反応混合物。

【請求項66】

前記生体試料が、原発性又は転移性の腫瘍生検試料である、請求項62記載の反応混合物。

【請求項67】

前記生体試料が、スライド上にマウントされる、請求項62記載の反応混合物。

【請求項68】

前記細胞が、慢性リンパ性白血病細胞である、請求項63記載の反応混合物。 40

【請求項69】

前記細胞が、急性骨髄性白血病細胞である、請求項63記載の反応混合物。

【請求項70】

前記細胞が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫細胞である、請求項63記載の反応混合物。

【請求項71】

前記細胞が、末梢T細胞リンパ腫細胞である、請求項63記載の反応混合物。

【請求項72】

前記生体試料が、pSYKタンパク質を含有することが疑われる、請求項62記載の反応混合 50

物。

【請求項 7 3】

さらに、抗pSYK抗体とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出するのに適する試薬を含む、請求項62～72のいずれか一項記載の反応混合物。

【請求項 7 4】

個別化癌治療レポートを作成する方法であって、

- a) pSYK発現癌を有することが疑われる癌患者から取得された1以上の癌細胞を含む生体試料と、配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子とを接触させる工程；
 - b) 請求項14～19のいずれか一項記載の方法を用いて、前記生体試料中の抗pSYK分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程；
 - c) 前記生体試料中のpSYK発現を定量化する工程；
 - d) SYK標的治療薬を含むデータベースに対して前記pSYK発現レベルを比較する工程；並びに
 - e) SYK標的治療薬、必要に応じて、前記pSYK発現レベルに基づいた投与計画を選択する工程、
- を含む、前記方法。

【請求項 7 5】

前記pSYK発現癌が、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である、請求項74記載の方法。

【請求項 7 6】

前記血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病（CLL）である、請求項75記載の方法。

【請求項 7 7】

前記血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病である、請求項75記載の方法。

【請求項 7 8】

前記血液悪性腫瘍が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、請求項75記載の方法。

【請求項 7 9】

前記検出工程が、免疫組織化学を介して行われる、請求項74～78のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 0】

前記pSYK発現の定量化が、前記生体試料中の細胞質pSYK発現を含む、請求項74～79のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 1】

前記定量化工程が、Hスコアアプローチを含む、請求項74～80のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 2】

SYK標的治療薬の薬力学を評価する方法であって、

- a) 患者にSYK標的治療薬を投与する工程；
- b) 前記患者からpSYKを発現することが疑われる1以上の細胞を含む生体試料を取得する工程；
- c) 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と、前記生体試料とを接触させる工程；
- d) 請求項14～19のいずれか一項記載の方法を用いて、前記生体試料中の前記抗pSYK分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程；
- e) 前記生体試料中のpSYK発現を定量化する工程；

f) SYK標的治療薬を含むデータベースに対して前記pSYK発現レベルを比較する工程；並びに

g) 必要に応じて、前記pSYK発現レベルに基づいて、前記投与計画を調整する工程、を含む、前記方法。

【請求項 8 3】

前記pSYK発現癌が、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である、請求項82記載の方法。

【請求項 8 4】

前記血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病（CLL）である、請求項83記載の方法。

【請求項 8 5】

前記血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病である、請求項83記載の方法。

【請求項 8 6】

前記血液悪性腫瘍が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、請求項83記載の方法。

【請求項 8 7】

前記検出工程が、免疫組織化学を介して行われる、請求項82～86のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 8】

前記pSYK発現の定量化が、前記生体試料中の細胞質pSYK発現を含む、請求項82～87のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 9】

前記定量化工程が、Hスコアアプローチを含む、請求項82～88のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 0】

前記SYK標的治療薬が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、請求項82記載の方法。

【請求項 9 1】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項82記載の方法。

【請求項 9 1】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1S,2R）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項82記載の方法。

【請求項 9 2】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項82記載の方法。

【請求項 9 3】

前記SYK標的治療薬が、シス-6-（2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項82記載の方法。

【請求項 9 4】

前記SYK標的治療薬が、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項82記載の方法。

【請求項 9 5】

前記SYK標的治療薬が、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-7-フルオロ-4-（3-メチルイソチアゾール-5-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項82記載の方法。

【請求項 9 6】

10

20

30

40

50

SYK阻害剤として化合物を特定するための方法であって、

- a) pSYKを含む細胞と試験化合物とを接触させること；及び
- b) 前記細胞内のリン酸化又はY525/526に対する前記試験化合物の効果を測定すること、を含み、前記試験化合物がY525/526のリン酸化を阻害する場合、該試験化合物はSYK阻害剤である、前記方法。

【請求項 97】

SYK阻害剤での癌治療のための支払い方法であって、

- a) 腫瘍細胞を含む患者試料中のSYKの活性化状態を記録すること、及び
- b) 前記SYK活性化状態が良好な結果を示す場合に、SYK阻害剤治療の支払いすること、を含む、前記方法。

10

【請求項 98】

前記SYK阻害剤が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、請求項37記載の方法。

【請求項 99】

SYK阻害剤で癌患者を治療する方法であって、前記患者から取得された腫瘍細胞からの試料中のpSYKを検出すること、及びpSYKが前記試料中で検出された場合に、前記SYK阻害剤で前記癌患者を治療すること、を含む、前記方法。

【請求項 100】

さらに、前記腫瘍試料中のpSYKのレベルを測定すること、前記レベルと参照試料中の前記pSYKのレベルを比較すること、及び前記pSYKレベルが前記参照試料から上昇している場合に、前記SYK阻害剤で前記患者を治療すること、を含む、請求項99記載の方法。

20

【請求項 101】

前記pSYKの検出が、配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体と前記試料とを接触させることを含む、請求項99又は100記載の方法。

【請求項 102】

前記検出が、免疫組織化学アッセイを含む、請求項101記載の方法。

【請求項 103】

前記免疫組織化学アッセイが、増幅工程を含む、請求項102記載の方法。

【請求項 104】

30

さらに、リン酸化B細胞リンカータンパク質（pBLNK）、リン酸化ブルトン型無ガンマグロブリン血症チロシンキナーゼ（pBTK）及び全SYKからなる群から選択される1以上の分子を検出することを含む、請求項102記載の方法。

【請求項 105】

さらに、CD34及びCD117からなる群から選択される1以上の分子を検出することを含む、請求項102記載の方法。

【請求項 106】

前記癌患者が、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、末梢T細胞リンパ腫（PTCL）、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（MCL）及びびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）からなる群から選択される腫瘍を有する、請求項102記載の方法。

40

【請求項 107】

前記SYK阻害剤が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、請求項102記載の方法。

【請求項 108】

pSYKを含む腫瘍を有する患者の治療であって、該患者に治療有効量の縮合複素芳香族ピロリジンを投与する工程を含む治療に使用するための縮合複素芳香族ピロリジノン、その医薬として許容し得る塩又は医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

50

本発明は、pSYKと結合する抗体分子、及びSYK標的治療薬による治療についての診断、予後、SYK標的治療薬による治療のための患者の選択、又はSYK標的治療薬の薬力学プロファイルの評価のための該抗体分子の使用方法に関する。

【0002】

(関連出願)

本出願は、2014年4月21日出願の米国仮出願第61/982,098号及び2014年5月29日出願の米国仮出願第62/004,496号の優先権を主張するものである。上記出願の全内容は、その全体が引用により本明細書中に組み込まれている。

【0003】

(配列表)

本出願は、電子的に読み取り可能な形式で本明細書とともに提出される配列表を含む。配列表の電子ファイルは、2015年4月20日に作成され、「223266-370406 MIL81 Sequence Listing_ST25.txt」と名付けられ、47.4KB (48,590バイト) のサイズを有する。電子ファイル「223266-370406 MIL81 Sequence Listing_ST25.txt」内の配列表の全内容は、引用により本明細書中に組み込まれている。

【背景技術】

【0004】

(背景)

脾臓チロシンキナーゼ (SYK) は、72 kDaの非受容体細胞質チロシンキナーゼである。SYKは、ゼータ関連タンパク質70 (ZAP-70) の配列に類似した一次アミノ酸配列を有し、受容体を介したシグナル伝達に関与する。SYKのN末端ドメインは、多くの免疫受容体複合体の細胞質シグナル伝達ドメインに見られるニリン酸化免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (ITAM) に結合する2つのSrc-ホモロジー2 (SH2) ドメインを含有している。C末端は、触媒ドメインを含有し、受容体誘導性のSYK活性化及びその後の下流のシグナルの伝達に関与するいくつかの触媒ループ自己リン酸化部位を含む。SYKは、リンパ球 (B細胞、T細胞、及びNK細胞)、顆粒球 (好塩基球、好中球、及び好酸球)、単球、マクロファージ、樹状細胞、並びにマスト細胞を含む、獲得免疫及び自然免疫に関与する多くの細胞型で発現する。SYKは、上部呼吸器系における気道上皮及び線維芽細胞を含む他の細胞型で発現する。例えば、Martin Turnerらの文献、Immunology Today (2000) 21(3):148-54;及びMichael P. Sandersonらの文献、Inflammation & Allergy-Drug Targets (2009) 8:87-95を参照されたい。

【0005】

癌患者における治療薬に伴う継続的な問題の1つは、治療薬に対する反応の個人差である。成功した癌治療薬のさらなる開発は進んでいるが、一部の患者だけが任意の特定の治療薬に応答する。狭い治療指数及び多くの利用可能な癌治療薬の毒性の可能性により、そのような応答の差異は、不要で、無効な、さらに潜在的に有害な治療薬投与計画を受けている患者に潜在的に寄与している。個々の患者を治療するために、設計された治療薬を最適化することができれば、そのような状況は低減できるか、又はさらには排除することができる。さらに、設計された標的化治療薬は、全般的に、患者のより集中的で、成功する治療薬を提供し得る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

(発明の概要)

SYKは、B細胞受容体 (BCR) の活性化、B細胞の遊走、及びB細胞の分極に関与するものを含む、造血系の細胞における様々なシグナル伝達カスケードに関与する。異常なSYKの活性化は、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、末梢T細胞リンパ腫 (PTCL)、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫及びびまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) を含むいくつかの造血器悪性腫瘍に関係づけられている。SYK関連疾患の効果的な管理の一環として、異常なSYK活性化を有する患者を特定する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本開示は、少なくとも部分的に、新規抗リン酸化脾臓チロシンキナーゼ（pSYK）抗体の発見に基づいている。本開示は、本明細書に提供される方法によるpSYKの検出及び/又は測定による癌治療の予後並びに選択に関する。本開示はさらに、癌を有する対象がSYK阻害剤による治療に応答するという発見に関する。一態様において、本発明は、癌を有する対象から取得される細胞を含む生体試料中のpSYK、例えば、チロシン525及び/又は526がリン酸化されたSYK（pSYK Y525/526）の発現増加に関する。したがって、特定の実施態様において、本発明は、患者からの試料がpSYK Y525/526のレベルの上昇を示す場合に、SYK阻害剤で癌患者を治療することに関する。

10

【発明の効果】

【0008】

本発明の一態様は、本明細書に開示されるとおり、抗pSYK抗体分子に関する。該抗pSYK抗体分子は、裸の抗体分子及び免疫複合体の構成要素として有用であり得る。したがって、別の態様において、本発明は、本明細書に記載の抗pSYK抗体分子及び治療薬剤又は標識を含む免疫複合体を特徴とする。本発明はまた、例えば、pSYK並びにpSYKを発現する細胞又は組織の検出のために、本明細書に記載の抗pSYK抗体分子と免疫複合体を使用する方法を特徴とする。そのような方法は、とりわけ、SYK媒介性疾患の診断、予後、画像化、又は病期分類に有用である。したがって、いくつかの態様において、本発明はSYK標的治療薬、例えば、抗pSYK抗体治療薬又はSYK阻害剤などの治療薬剤を含む治療薬投与計画による治療のための対象を選択する方法を特徴とする。本発明はまた、疾患を有する対象がSYK標的治療薬、例えば、本明細書に記載のSYK標的治療薬の潜在的な候補であるか否かを決定するインビトロ法又はインビボ法を特徴とする。いくつかの態様において、該治療は、情報を取得すること、並びに/又はpSYK発現レベルを決定するために試料もしくは対象を評価すること、及び該試料又は対象がpSYKを発現している場合に、SYK標的治療薬、例えば、SYKの小分子阻害剤などの本明細書に記載のSYK標的治療薬を投与すること、を含む。他の態様において、本方法は、対象から試料を取得し、例えば、本明細書に記載の抗pSYK抗体を用いることなどの本明細書に記載の検出法又は測定法によってpSYK発現レベル又は活性化状態を決定し、かつその決定に基づいて、該対象のための標的治療を選択することにより、個別化治療レポート、例えば、SYK標的治療レポートを作成することを特徴とする。

20

30

【0009】

抗pSYK抗体、例えば、本明細書に記載の抗pSYK抗体はSYK標的治療薬の薬力学評価にも有用である。いくつかのそのような実施態様において、SYK標的治療薬の投与量は、pSYK発現レベルに基づいて調整されてよい。

【0010】

別の実施態様において、本発明はまた、抗pSYK抗体分子のアミノ酸配列をコードする単離核酸及び/又は組換え核酸、並びにベクター及びかかる核酸を含む宿主細胞、並びに抗pSYK抗体分子を生成する方法に関する。また、本明細書では、pSYKの発現を検出するための、抗pSYK抗体を含む反応混合物及びキット、例えば、本明細書に記載の免疫複合体、並びに例えば、本明細書に記載の抗pSYK抗体を含むインビトロアッセイを特徴とする。

40

【0011】

一実施態様において、本発明は、アミノ酸配列の配列番号11、12及び13をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びにアミノ酸配列の配列番号14、15及び16をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子を提供する。いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、ウサギ又はウサギ由来の抗体である。いくつかの実施態様において、該抗体は、ウサギモノクローナル抗体である。

【0012】

50

いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体分子はさらに、配列番号8によるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号10によるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0013】

いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、検出可能な標識にコンジュゲートされる。いくつかの実施態様において、該検出可能な標識は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、色素を酸化するために過酸化水素を使用する酵素と結合している、糖オキシダーゼ、複素環オキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、及び安定なフリーラジカルからなる群から選択される。いくつかの実施態様において、該検出可能な標識は、フルオレセイン又はその誘導体、ローダミンもしくはその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及び2,3-ジヒドロフタラジンジオンから選択されるフルオロフォアである。いくつかの実施態様において、該検出可能な標識は、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{188}Rh 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}Br 、 $^{81}\text{Rb}/^{81\text{M}}\text{Kr}$ 、 $^{87\text{M}}\text{Sr}$ 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 $^{113\text{M}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{132}I 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Pb 、 ^{206}Bi 、及び ^{213}Bi からなる群から選択される放射性物質である。

【0014】

一実施態様において、本発明は、抗pSYK抗体分子をコードする単離核酸配列を提供する。一実施態様において、本発明は、単離核酸を含む細胞を提供する。一実施態様において、本発明は、抗pSYK抗体分子を生成する方法であって、抗体分子の生成を可能にする条件下で細胞を培養することを含む、前記方法を提供する。一実施態様において、本発明は、抗pSYK抗体分子の軽鎖及び重鎖の一方又は両方を含むベクターを提供する。一実施態様において、本発明は、生体試料中のpSYK分子を検出する方法であって、a) 該抗体分子と該生体試料とを接触させること、及びb) 前記抗体分子が前記pSYK分子に結合するか否かを決定することを含む、前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、該検出方法は免疫組織化学アッセイを含む。いくつかの実施態様において、該生体試料は、pSYK発現癌を有することが疑われる患者に由来する腫瘍生検である。いくつかの実施態様において、本方法はさらに、前記生体試料中のpSYK発現を定量化する工程を含む。いくつかの実施態様において、pSYK発現の定量化は、前記生体試料中の細胞質pSYK発現を含む。いくつかの実施態様において、該定量化工程はHスコアアプローチを含む。

【0015】

いくつかの実施態様において、該pSYK発現癌は、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病 (CLL) である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) である。

【0016】

一実施態様において、本発明は、該抗pSYK抗体分子及び使用説明書を含むキットを提供する。いくつかの実施態様において、該キットはさらにSYK標的治療薬剤を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-((1S,2R)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、シス-6-(2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H

-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(3-メチルイソチアゾール-5-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。

【0017】

一実施態様において、本発明は、1以上のpSYK発現細胞によって特徴付けられる疾患を有する患者を治療する方法であって、a.該患者から取得された生体試料中のpSYKタンパク質発現を検出すること；及びb.該生体試料がpSYKを発現する場合に、該患者にSYK標的治療薬剤を投与することを含む、前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、該検出工程は、a)配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域(CDR1、CDR2、及びCDR3)；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域(CDR1、CDR2、及びCDR3)を含む抗pSYK抗体分子と該生体試料とを接触させる工程；並びにb)該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程を含む。いくつかの実施態様において、該検出工程は、免疫組織化学を介して行われる。

【0018】

いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-((1S,2R)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、シス-6-(2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(3-メチルイソチアゾール-5-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。

【0019】

いくつかの実施態様において、1以上のpSYK発現細胞によって特徴付けられる疾患は癌である。いくつかの実施態様において、該pSYK発現癌は、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病(CLL)である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病(AML)である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)である。いくつかの実施態様において、該生体試料は、細胞又は組織生検である。いくつかの実施態様において、該細胞又は組織生検は、腫瘍生検である。

【0020】

一実施態様において、本発明は、SYK標的治療薬剤に対する癌細胞の感受性を決定する方法であって、a)癌を有する患者由来の癌細胞から試料を提供する工程；b)配列番号11

10

20

30

40

50

、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と該試料とを接触させる工程；並びにc）該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出し、それによって、SYK標的治療薬剤に対する癌の感受性を決定し、かつ/又は対象がSYK標的治療薬による治療の候補であるか否かを決定する工程を含む、前記方法を提供する。

【0021】

一実施態様において、本発明は、対象がSYK標的治療薬の潜在的な候補であるか否かを評価する方法であって、a) 癌を有する患者由来の癌細胞から試料を提供する工程；b) 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と該試料とを接触させる工程；並びにc) 該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出し、それによって、SYK標的治療薬剤に対する癌の感受性を決定し、かつ/又は対象がSYK標的治療薬による治療の候補であるか否かを決定する工程、又はSYK標的治療薬による治療の候補として該対象を特定する工程を含む、前記方法を提供する。

【0022】

いくつかの実施態様において、該検出工程は、免疫組織化学を介して行われる。

【0023】

いくつかの実施態様において、該癌は血液悪性腫瘍である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病（CLL）である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病（AML）である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である。

【0024】

いくつかの実施態様において、本方法はさらに、該患者にSYK標的治療薬剤を投与する工程を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-（（1S,2R）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、シス-6-（2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬剤は、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-7-フルオロ-4-（3-メチルイソチアゾール-5-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。

【0025】

一実施態様において、本発明は、生体試料と、配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と、を含む反応混合物を提供する。いくつかの実施態様において、該生体試料は、1以上の細胞を含む。いくつかの実施態様において、該生体試

料は、該患者から取得された癌細胞を含む。いくつかの実施態様において、該生体試料は、組織試料を含む。いくつかの実施態様において、該組織試料は、パラフィン包埋組織試料である。いくつかの実施態様において、該生体試料は、原発性又は転移性の腫瘍生検試料である。いくつかの実施態様において、該生体試料は、スライド上にマウントされる。

【0026】

いくつかの実施態様において、該細胞は、慢性リンパ性白血病細胞である。いくつかの実施態様において、該細胞は、急性骨髄性白血病細胞である。いくつかの実施態様において、該細胞は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫細胞である。いくつかの実施態様において、該細胞は、末梢T細胞リンパ腫細胞である。いくつかの実施態様において、該生体試料は、pSYKタンパク質を含有することが疑われる。

10

【0027】

いくつかの実施態様において、該反応混合物はさらに、該抗pSYK抗体とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出するのに適する試薬を含む。

【0028】

一実施態様において、本発明は、個別化癌治療レポートを作成する方法であって、a) pSYK発現癌を有することが疑われる癌患者から取得された1以上の癌細胞を含む生体試料と、配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子とを接触させる工程；b) 該生体試料中の抗pSYK分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程；c) 該生体試料中のpSYK発現を定量化する工程；d) SYK標的治療薬の選択からの発現レベルを含むデータベースに対してpSYK発現レベルを比較する工程；並びにe) SYK標的治療薬、必要に応じて、該pSYK発現レベルに基づく投与計画を選択する工程を含む、前記方法を提供する。

20

【0029】

いくつかの実施態様において、該pSYK発現癌は、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病（CLL）である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病（AML）である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である。

30

【0030】

いくつかの実施態様において、該検出工程は、免疫組織化学を介して行われる。いくつかの実施態様において、pSYK発現の定量化は、前記生体試料中の細胞質pSYK発現を含む。いくつかの実施態様において、該定量化工程は、Hスコアアプローチを含む。

【0031】

一実施態様において、本発明は、SYK標的治療薬の薬力学を評価する方法であって、a) 患者にSYK標的治療薬を投与する工程；b) pSYKを発現することが疑われる1以上の細胞を含む生体試料を該患者から取得する工程；c) 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と、該生体試料とを接触させる工程；d) 該生体試料中の抗pSYK分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程；e) 該生体試料中のpSYK発現を定量化する工程；f) SYK標的治療薬を含むデータベースに対してpSYK発現レベルを比較する工程；並びにg) 必要に応じて、該pSYK発現レベルに基づいて投与計画を調整する工程を含む、前記方法を提供する。

40

【0032】

いくつかの実施態様において、該pSYK発現癌は、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病（CLL）である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病（AML）である。いくつかの実施態様において、該血液悪性腫瘍は、びまん性大細胞型B細胞

50

胞リンパ腫 (DLBCL) である。

【0033】

いくつかの実施態様において、該検出工程は、免疫組織化学を介して行われる。いくつかの実施態様において、pSYK発現の定量化は、前記生体試料中の細胞質pSYK発現を含む。いくつかの実施態様において、該定量化工程は、Hスコアアプローチを含む。

【0034】

いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬は、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬は、6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬は、6-((1S,2R)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬は、6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬は、シス-6-(2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬は、6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。いくつかの実施態様において、該SYK標的治療薬は、6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(3-メチルイソチアゾール-5-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む。

【0035】

一実施態様において、本発明は、SYK阻害剤として化合物を特定するための方法であって、a) pSYKを含む細胞と試験化合物とを接触させること；及びb) 該細胞内のリン酸化又はY525/526に対する該試験化合物の効果を測定することを含み、該試験化合物がY525/526のリン酸化を阻害する場合に、該試験化合物はSYK阻害剤である、前記方法を提供する。

【0036】

一実施態様において、本発明は、SYK阻害剤での癌治療のための支払い方法であって、a) 腫瘍細胞を含む患者試料中のSYKの活性化状態を記録すること、及びb) 該SYK活性化状態が良好な結果を示す場合に、該SYK阻害剤治療のための支払いをすることを含む、前記方法を提供する。

【0037】

本明細書に記載の全ての刊行物、特許出願、特許及び他の参考文献は、その全体が引用により組み込まれる。

【0038】

本明細書に開示する本発明（複数可）の他の特徴、目的、及び利点は、説明及び図面から、並びに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0039】

(図面の簡単な説明)

【図1】血液悪性腫瘍及びリンパ腫悪性腫瘍の細胞、異種移植片並びに原発腫瘍におけるSYK RNAベースラインのスクリーンを示す。HBL1を後の実験で添加した。矢印は、SYK RNAを低発現、中発現、及び高発現する細胞（それぞれLY10、HBL1、PHTX-95L）の例を指す。

【図2】MIL81ハイブリドーマサブクローンのMIL81-1-8、MIL81-2-1、及びMIL81-99-1からの抗体と比較した、Epitomics社の抗pSYK Y525/6抗体（Epitomics 2175-1）を用いるPHTX 95L異種移植組織のpSYK IHC染色を示す。異種移植片移植マウスを、処置しないか、又はSYK阻害剤（化合物A）で処置した。

【図 3】MIL81ハイブリドーマサブクローンからの抗体と比較した、Epitomics 2175-1抗体を用いたPHTX 95L異種移植組織のpSYK IHC染色を定量化する。異種移植片移植マウスは、処置されない（対照）か又はSYK阻害剤（化合物A）で処置した。MIL81-1-8は、その強度及びシグナル・ノイズ比により最高のものである。

【図 4】MIL81-1-8抗体と比較した、Epitomics 2175-1抗体を用いたPHTX 95L異種移植組織のpSYK IHCバックグラウンド染色を示す。

【図 5】MIL81-1-8抗体と比較した、Epitomics社の抗pSYK Y525/6抗体を用いたHBL1異種移植組織のpSYK IHC染色を示す。異種移植片移植マウスを、処置しないか、又はSYK阻害剤（化合物A）で処置した。

【図 6】MIL81-1-8抗体と比較した、Epitomics社の抗pSYK Y525/6抗体を用いたOCI LY10異種移植組織のpSYK IHC染色を示す。異種移植片移植マウスを、処置しないか、又はSYK阻害剤（化合物A）で処置した。

【図 7】MIL81-1-8抗体と比較した、SYK発現レベルが異なる3つの異種移植モデル（PHTX-95L、HBL1、及びOCI-LY10）の、Epitomics 2175-1を用いたpSYK IHC染色を定量化する。異種移植片移植マウスを、処置しないか、又はSYK阻害剤（化合物A、120又は90mg/kg）で処置した。

【図 8】DLBCL組織マイクロアレイ（TMA）コア内の他のマーカーのEpitomics 2175-1（pSYK Y525/526）、Epitomics #2173（SYK pY323）及びEpitomics #1688（全SYK）の染色と比較したMIL81-1-8抗体IHC染色パターンを示す。これは、MIL81-1-8がこれらの試料に対する、いくつかのpSYK抗体を用いて観察されるオフターゲット（核染色）効果を有することを示す。

【図 9】過バナジン酸処理WSU-DLCL細胞のペレット、PHTX-95L異種移植片又はDLBCL腫瘍のTMAコアを用いたMIL81-1-8検証試験のためのペプチドブロッキングを示す。ペプチド免疫原が、組織とのインキュベーション前に該抗体に付加された場合、pSYK IHC染色はブロックされる。

【図 10】過バナジン酸処理WSU-DLCL細胞のペレット、PHTX-95L異種移植片又は正常な脾臓組織の試料を用いたMIL81-1-8検証試験のためのホスファターゼ処理を示す。抗体染色の前に、いくつかのスライドをホスファターゼで処理した。MIL81-1-8は、正常な脾臓内のいくつかの細胞を除いて、ホスファターゼ処理組織を染色しない。

【図 11】DLBCL組織生検上のMIL81-1-8 IHCの細胞質染色及び核染色を示す。細胞質染色は生検の周囲で優勢であるが、核染色は生検の内側部分で優勢である。

【図 12】MIL81-1-8抗体、Epitomics 2175-1（pSYK Y525/526）抗体、Epitomics #2173（SYK pY323）抗体及びEpitomics #1688（全SYK）抗体によるDLBCL生検組織の周辺部の細胞質IHC染色を示す。

【図 13】MIL81-1-8抗体、Epitomics 2175-1（pSYK Y525/526）抗体、Epitomics #2173（SYK pY323）抗体及びEpitomics #1688（全SYK）抗体によるDLBCL生検の内側部分の核IHC染色を示す。

【図 14】DLBCL組織生検上の市販のSYK抗体（Epitomics #2173（SYK pY323）抗体及びEpitomics 2175-1（pSYK Y525/526）抗体）と比較したMIL81-1-8を示す。これは、MIL81-1-8が市販のEpitomics 2175-1を上回る改善を提供することを示す。

【図 15】DLBCL組織生検（図14の生検及び追加の生検）上のMIL81-1-8抗体並びに市販のSYK抗体（Epitomics #1688（全SYK）抗体、Epitomics #2173（SYK pY323）抗体及びEpitomics 2175-1（pSYK Y525/526）抗体）の病理スコアを示す。これは、MIL81-1-8が市販のEpitomics 2175-1を上回る改善を提供することを示す。

【図 16】MIL81-1-8抗体、Epitomics 2175-1（pSYK Y525/526）抗体、Epitomics #2173（SYK pY323）抗体及びEpitomics #1688（全SYK）抗体によるSYK陰性株（H1650肺腺癌）の異種移植片の染色を示す。Epitomics #1688によって、1：100希釈（通常濃度の4倍）であっても染色されないことに留意されたい。

【図 17】MIL81-1-8抗体、Epitomics 2175-1（pSYK Y525/526）抗体、Epitomics #2173（SYK pY323）抗体及びCell Signaling Technologies社の2711 pSYK Y525/526抗体による

10

20

30

40

50

SYK陰性株（H1650肺腺癌）の異種移植片の染色を示す。

【図 1 8】WSU-DLCL細胞ペレット、TMD8リンパ腫細胞株の異種移植片及び化合物Aで処置したマウス内で増殖させたTMD8リンパ腫細胞株の異種移植片のMIL81-1-8分子クローン抗体染色と比較したMIL81-1-8ハイブリドーマサブクローン抗体を示す。

【図 1 9】HBL1異種移植片、PHTX95L異種移植片、及び化合物Aで処置したマウスからのPHTX95L腫瘍の異種移植片のMIL81-1-8分子クローン抗体染色と比較したMIL81-1-8ハイブリドーマサブクローン抗体を示す。

【図 2 0】DLBCL腫瘍又は正常なリンパ節のヒト生検を用いた、MIL81-1-8分子クローン抗体と比較したMIL81-1-8ハイブリドーマサブクローン抗体を示す。

【図 2 1】様々なDLBCL細胞株における処置の72時間後の化合物AのEC₅₀を示す。

【図 2 2】OCI-LY10（ABC）異種移植モデルにおける化合物Aの抗腫瘍活性を示す。

【図 2 3】PHTX-95L原発DLBCLモデルにおける化合物Aの抗腫瘍活性を示す。

【図 2 4】OCI-LY19（GCB）異種移植モデルにおける化合物Aの抗腫瘍活性を示す。

【図 2 5】非増幅IHC及び化合物Aでのマウスの処置後の結果と比較した、AMP HQ IHCで染色した時のPHTX-95L（DLBCL）異種移植モデルにおける染色の違いを示す。

【図 2 6】非増幅IHC（図26のA、C、E）と比較した、AMP HQ IHC（図26のB、D、F）で染色した時のヒトDLBCL生検試料で観察されるオフターゲット核染色の減少を示す。図26のA及びB、1倍；C及びD、5倍；E及びF、20倍。

【図 2 7】MV-4-11（AML）細胞ペレット、NCI-H82（肺）細胞ペレット、及びKG-1（AML）異種移植組織上の二重TSA免疫蛍光染色の染色パターンを示す。

【図 2 8】上昇したpSYK Y525/526を検出するために、二重MIL81-1-8 CD34/CD117を用いたIFアッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0040】

（詳細な説明）

癌を治療する方法であって、SYKの小分子阻害剤などの治療有効量のSYK阻害剤又はその医薬として許容し得る塩もしくは医薬組成物を患者に投与することを含む、前記方法を本明細書に記載する。いくつかの実施態様において、本発明は、癌を治療する方法であって、腫瘍試料がpSYKレベルの上昇によって特徴付けられる癌患者に、治療有効量のSYK阻害剤又はその医薬として許容し得る塩もしくは医薬組成物を投与することを含む、前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、本発明は、癌を治療する方法であって、生体試料、例えば、腫瘍試料がpSYKレベルの上昇によって特徴付けられる癌患者に、SYKの小分子阻害剤などのSYK阻害剤又はその医薬として許容し得る塩もしくは医薬組成物を含む治療有効量の治療薬の投与計画を施すことを含む、前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、本発明は、癌を治療する方法であって、例えば、pSYK免疫組織化学（IHC）アッセイによって測定した場合に、腫瘍試料がpSYK Y525/526を有することによって特徴付けられる癌患者に、SYKの小分子阻害剤などの治療有効量のSYK阻害剤又はその医薬として許容し得る塩もしくは医薬組成物を投与することを含む、前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、本発明は、SYK阻害剤を含む治療薬投与計画を継続する方法であって、該SYK阻害剤でのある程度の治療後に該患者から第2の生体試料を取得すること、pSYKのレベルを測定すること、かつ該第2の試料が第1の試料中よりもpSYKのレベルが上昇しているか、又はpSYKが少ないと特徴付けられる場合に治療を継続すること、を含む前記方法を提供する。

【0041】

いくつかの実施態様において、本方法はさらに、リン酸化B細胞リンカータンパク質（pBLNK）及び/もしくはリン酸化ブルトン型無ガンマグロブリン血症チロシンキナーゼ（pBTK）などの追加のリン酸化タンパク質並びに/又は任意のアミノ酸残基（複数可）上のリン酸の存在に関係なく検出されるSYKなどの全SYKを検出すること（例えば、Epitomics 1688-1抗体を用いて）を含む。特定の実施態様において、本方法はさらに、リン酸化Fms関連チロシンキナーゼ3（pFLT3）を検出することを含む。

【0042】

特定の実施態様において、本発明は、pSYK Y525/526などのpSYKの存在が測定される場合に依拠して、治療を始めるか、継続するか、又は開始する工程をさらに含む治療方法に関する。加えて、本方法は、患者が、例えば、同じ治療薬投与計画を受け、良好な結果を有すると特定された患者と比較して、例えば、SYK阻害剤での治療により好ましくない結果を示すことが予想されることを、pSYK Y525/526などのpSYKの存在又は再出現が示す場合に依拠してSYK標的治療薬を中止、中断、変更又は停止する工程をさらに含む治療方法を含む。別の態様において、本明細書に記載されるように、治療、例えば、SYK阻害剤でまだ治療されていない患者の分析、及び治療のための患者の特定並びにpSYKの存在に基づく治療結果の予測のための方法が提供される。このような方法は、治療薬、例えば、SYK阻害剤で治療しないこと、治療薬、例えば、SYK阻害剤で治療すること、もう1つの追加の治療薬と組み合わせてSYK阻害剤で治療すること、SYK阻害剤に対する代替治療薬で治療すること、又は例えば、標準的なSYK阻害剤治療薬に対して良好な結果を有すると特定された患者の投薬及び/又は投与計画と比較して、治療薬、例えば、SYK阻害剤のより積極的な投薬及び/もしくは投与計画で治療すること、を含むことができる。このように、提供される本発明の方法は、治療薬、例えば、SYK阻害剤の治療薬投与計画の効果のない又は不適切な使用を排除することができる。

10

【0043】

追加の方法は、薬剤の活性、薬剤の有効性を決定するための方法、又は新しい治療薬もしくは組み合わせを特定するための方法を含む。このような方法は、例えば、本明細書に記載の抗体もしくは方法により検出又は測定されるように、pSYKの存在又は量に影響するその能力に基づいて、例えば、癌、例えば、血液癌又は固形腫瘍癌を治療するのに有用であるとして、例えば、SYK阻害剤として薬剤を特定するための方法を含む。いくつかの実施態様において、癌を有する患者の良好な結果を示す方法で、pSYK、例えば、pSYK Y526/526の存在を減少させる阻害剤（すなわち、細胞集団中で、該阻害剤はpSYKを含む細胞に対して選択する）は、該癌の候補薬剤である。別の実施態様において、pSYKを含む腫瘍細胞の生存率を減少させるか、又は好ましくない多量のpSYKを減少させることができる薬剤は、該癌を治療するための候補治療薬剤である。

20

【0044】

追加の方法は、癌治療薬、例えば、SYK阻害剤の治療薬投与計画に対する結果の指標について患者のpSYKの量を見直すことによって、癌、例えば、血液癌又は固形腫瘍癌を治療するか又は治療の代金を支払うか否かを評価し、良好な結果が示された場合に、該患者の癌治療薬に支払いがなされるべきか否かを決定し、癌治療薬の代金を支払う方法を含む。

30

【0045】

SYKは、免疫受容体（B細胞及びFc受容体）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）の潜伏及び形質転換、並びに細胞間相互作用及び細胞-マトリックス相互作用に関連するタンパク質を介したシグナル伝達の重要なメディエーターである。SYKは、リンパ腫/白血病、EBV関連腫瘍及び他の固形腫瘍において活性化される。SYK、BTK及びPI3K δ は、BCR活性化悪性腫瘍において臨床的に検証された標的である。SYKは、自然免疫及び獲得免疫、細胞接着、破骨細胞の成熟、血小板活性化及び血管発生を含むいくつかの生物学的プロセスを調節する。SYKは、そのSH2ドメインと受容体チロシンリン酸化免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）ドメインとの間の相互作用を介して、原形質膜で活性化受容体と共に集合してシグナル伝達複合体、例えば、シグナロソームを構築する。ITAMドメインのリン酸化は、一般に、受容体の結合時のSRCサブファミリーキナーゼによって媒介される。SYKを介したより稀なシグナル伝達はITAM非依存的であり得る。SYKによってリン酸化されるすぐ下流のエフェクターには、VAV1、PLCG1などのホスホリパーゼCガンマ（PLC γ ）、PI-3-キナーゼ、LCP2及びBLNKが含まれる。BCR結合時に活性化されると、SYKは、下流のシグナル伝達アダプター及びエフェクターに活性化BCRを連結するアダプターであるBLNKをリン酸化及び活性化する。SYKはまた、PLCG1及びPKCシグナル伝達経路をリン酸化し、活性化する。SYKはまた、BTKをリン酸化し、B細胞抗原受容体（BCR）結合型シグナル伝達

40

50

におけるその活性を調節する。SYKはまた、T細胞受容体シグナル伝達並びに真菌、細菌及びウイルス病原体に対する自然免疫応答で役割を果たしている。SYKはまた、それが血液及びリンパ管・血管分離を調節することができる、血管発生を含む非免疫過程においても役割を果たしている。SYKは、破骨細胞の発達及び機能に必要とされ、コラーゲンによる血小板の活性化において機能している。

【 0 0 4 6 】

ヒトSYKのヌクレオチド配列（GenBank受託番号NM_003177;配列番号1）：

【化 1】

acactgggag gaagtgcggg cgcctgccc gggcgcggtta aggaagttgc ccaaaatgag
 gaagagccgc gggcccggcg gctgaggcca ccccggcggc ggctggagag cgaggaggag
 cgggtggccc cgcgctgcgc ccgcctcgc ctacactggc gcaggtggac acctgcgcag
 gtgtgtgccc tccggcccct gaagcatggc cagcagcggc atggctgaca gcgccaacca
 cctgcccttc ttttccggca acatcacccg ggaggaggca gaagattacc tgggccaggg
 gggcatgagt gatgggcttt atttgctgcg ccagagccgc aactacctgg gtggcttcgc
 cctgtccgtg gccacggga ggaaggcaca ccactacacc atcgagcggg agctgaatgg
 cacctacgcc atcgccggtg gcaggacca tgccagcccc gccgacctct gccactacca
 ctcccaggag tctgatggcc tggctctgcct cctcaagaag cccttcaacc ggccccaaagg
 ggtgcagccc aagactgggc cctttgagga tttgaaggaa aacctcatca gggaatatgt
 gaagcagaca tggaacctgc agggtcaggc tctggagcag gccatcatca gtcagaagcc
 tcagctggag aagctgatcg ctaccacagc ccatgaaaa atgccttggg tccatggaaa
 aatctctcgg gaagaatctg agcaaattgt cctgatagga tcaaagacaa atggaaagtt
 cctgatccga gccagagaca acaacggctc ctacgccctg tgctgtctgc acgaagggaa
 ggtgtctcac tatcgcatcg acaaagacaa gacagggag ctctccatcc ccgagggaaa
 gaagttcgac acgctctggc agctagtcga gcattattct tataaagcag atggtttgtt
 aagagttctt actgtcccat gtcaaaaaat cggcacacag ggaaatgtta attttggagg
 ccgtccacaa cttccagggt cccatcctgc gacttggtea gcgggtggaa taatctcaag
 aatcaaatca tactccttcc caaagcctgg ccacagaaag tcctcccctg cccaagggaa
 ccggcaagag agtactgtgt cattcaatcc gtatgagcca gaacttgac cctgggctgc
 agacaaaggc cccagagag aagccctacc catggacaca gaggtgtacg agagccccta
 cgcggacccc gaggagatca ggccaagga ggtttacctg gaccgaaagc tgctgacgct
 ggaagacaaa gaactgggct ctggtaattt tggaactgtg aaaaagggt actacaaat
 gaaaaagtt gtgaaaaccg tggctgtgaa aatactgaaa aacgaggcca atgacccgc
 tcttaagat gagttattag cagaagcaaa tgtcatgcag cagctggaca acccgtaacat
 cgtgcggatg atcgggatat gcgaggccga gtcctggatg ctggttatgg agatggcaga
 acttgggtccc ctcaataagt atttgcagca gaacagacat gtcaaggata agaacatcat
 agaactgggt catcaggttt ccatgggcat gaagtacttg gaggagagca attttgtgca
 cagagatctg gctgcaagaa atgtgttgct agttacccaa cattacgcca agatcagtga
 tttcggactt tccaaagcac tgcgtgctga tgaaaactac tacaaggccc agacccatgg
 aaagtggcct gtcaagtggg acgctccgga atgcatcaac tactacaagt tctccagcaa
 aagcgatgtc tggagctttg gagtgttgat gtgggaagca ttctcctatg ggcagaagcc
 atatcgaggg atgaaaggaa gtgaagtcac cgctatgtta gagaaaggag agcggatggg
 gtgccctgca ggggtgccaa gagagatgta cgatctcatg aatctgtgct ggacatacga
 tgtggaaaac agcccggat tcgcagcagt ggaactgcgg ctgcgcaatt actactatga
 cgtggtgaac taaccgctcc cgcacctgtc ggtggctgcc tttgatcaca ggagcaatca
 caggaaaatg tatccagagg aattgattgt cagccacctc cctctgccag tcgggagagc
 caggcttggg tggaacatgc ccacaacttg tcacccaaag cctgtcccag gactcacct
 ccacaaagca aaggcagtc cgggagaaaa gacggatggc aggatccaag gggctagctg

10

20

30

40

gatttgtttg ttttcttgtc tgtgtgattt tcatacaggt tattttttacg atctgtttcc
aaatcccttt catgtctttc cacttctctg ggtcccggg tgcatttggt actcatcggg
cccagggaca ttgcagagtg gcctagagca ctctcacccc aagcggcctt ttccaaatgc
ccaaggatgc cttagcatgt gactcctgaa ggaaggcaa aggcagagga atttggctgc
ttctacggcc atgagactga tccctggcca ctgaaaagct ttcttgacaa taaaaatgtt
ttgaggcttt aaaaagaaaa tcaagtttga ccagtgcagt ttctaagcat gtagccagtt
aaggaaagaa agaaagaaaa aaaaaaagg cctggatact gcttttgctg tctctgttat
gagatggaag acttacatgt ttgtgataaa aggggaccat gagaatgaat tggcttggt
tactttcccc ctgaaatcct ctctcctgca gactgtcttg aagacctggt gactggtaaa
taaagccctg catggaggct gcacagcagg ggcaagaggc ccatcccca gcactcact
gaggacagct tcaggctgcc ttctctgaa cgtgggtccac accttcctct cctccacaga
gaggggtgcc ccagaatccc ctgtcgcttt ctgtgtctgc aatggggggc agcacaggga
tcaaagccat ctaaagagtt tccaaagaaa gtattaattc agaacaagcc aaagaccctg
agcctcacca caaacaggcc ttttgagtg tgaatttgag ttgaagatac aagatcggag
aatgattttt tggctttaac taatcctcat cttcatgttt gatctttaag aagtcacac
ccattgattt cagttttgct gtacctcttg aaagttaaag agacatctca gcactttagg
aggccgaggc ggttgatca cttgaggtaa ggagtttgag actagcctgg ccaatatggt
aaaaccccat ctctactaaa aatacaaaaa ttagccgggc atggtggcat gtgtctgtag
tcccagctac tcgggaggct gaggcaggag aatcgcttga acccaggaaa cggaggctgc
agttagccaa gatcatgcc ctgcactcca gcttgggcat cacagcgaga ctctgtcaaa
acaaacaaac aaaaaacaa cttaaagagg taatttagcc atcattctta tgccagcaga
tataaataaa cttggacca tctggtcttc agctaaacct gagacatttt aaagtgcag
gacagccatg gacagcaggc cctcctctaa caggggatgc aaggcatgga gaaagacaat
cagtacccaa gctcagccac agaagacagg agtcactcat ataacttggt tttagaagtt
tttggtagcc acgcacactt tctgaaatca cactatctgg tggtttaatc atatttttaa
agacagaatc cctgagtgtg gagcagattc tcaaaacaca tttagaatcc ctgaaattag
aaagatcaat gacaaaatat ctgtcagcca ggccacaaac aggtgtaaaa ttatgaaagg
agtggttgga tgtgccaagt ttggtaaagt ggtgactgca tctgagaaag aggctgtgag
gctgaactct tggtggtctt cttctgtaac ttccagaggg agtcttcaac acaggccccg
tgctcgtagg aatacggtag cacctatgta ggaagtgcgt ggagttttct gtcttctttc
tgtgtgattt ttggcctttt tatcagcact tctcccctcc caggagcctg gggatgccaa
acatccagaa tgtgatggga caagatggg gcaggggcct cacctccctg cagaggctccg
gccaggctct cttgtccctg gacaatctcc tgagcctctc tgcttggtgg agcaggcacc
tgtgtgcaga attcccactg tggccagcac gaggaagtct tttctagtga aaatgtgtct
tgtggtcagg aataattatc ctttcccctg tagccaccaa ggagggcaa tagagaaagg
taacctaat gaaggattgg tcatgtgaaa agggctacat ttgggaagct gggaaaggcc
tccaggcttc tagagcagct agcttgggct ggattctcat acccaggctg ccccttgat
tgttctaccc aagcttttcc ctggggtctg ggctcactcc ataaggtaag gtgcctttta
ccttatggtc cttcttttagc aggtaacaaa ggagcatcag gggcaggctg ccttggtggc
atcacactgg ctagtgaggc cgtgaatatc ttgtcccca gcagggccga cagtttctat
cacagaaaac agtgtgttca gtggtgaaaa tegtgtcatg catgttttca tctgagcgtg

10

20

30

40

```

tccttctccc atactcccta tcagccagcc ctgctgttag ctgctgtatg gtgattgcac
ttggacatca gtccaatgac tgcaagtcgg cctggatttt cacttgcaga ggctacagct
gcattgtcag gtctcccagc cctgcagaga gctccctcca ctggtttagca gtgtgttgtg
ttttccattc atttcagaag agctacattg tgtcactgga cattttttaa aactgtgatt
tttaataaaa attttaaatt tgctttgtga tgaaaaaaa

```

ヒトSYKのアミノ酸配列 (UniProtKB/Swiss-Prot P43405又はGenPept NP_003168;配列番号2) :

【化2】

```

MASSGMADSANHLPPFFGNITREEAEDYLVQGGMSDGLYLLRQSRNYLGGFALSVAHGRKAH
HYTIERELNGTYAIAGGRTHASPADLCHYHSQESDGLVCLLKKPFNRPQGVQPKTGPFEDLK
ENLIREYVKQTWNLQGQALEQAIISQKPQLEKLIATTAHEKMPWFHGKISRSESEQIVLIGS
KTNGKFLIRARDNNGSYALCLLHEGKVLHYRIDKDKTGKLSIPEGKKFDTLWQLVEHYSYKA
DGLLRVLTVPQCQKIGTQGNVNFGRPQLPGSHPATWSAGGIISRIKSYSFPKPGHRKSSPAQ
GNRQESTVSFNPYEPPELAPWAADKGPQREALPMDTEVYESPYADPEEIRPKEVYLDRLTL
EDKELGSGNFGTVKKGYYQMKKVVKTVAVKILKNEANDPALKDELLAEANVMQQLDNPYIVR
MIGICEAESWMLVMEMAELGPLNKYLQQNRHVKDKNIIELVHQVSMGMKYLEESNFVHRDLA
ARNVLLVTQHYAKISDFGLSKALRADENYYKAQTHGKWVPWKWYAPECINYYKFSSKSDVWSF
GVLWWEAFSYGQKPYRGMKGSEVTAMLEKGERMGCPAGCPREMYDLMNLCWTYDVENRPGFA
AVELRLRNYYYDVVN

```

【0047】

静止状態の細胞又は非刺激細胞では、SYKは、不活性であり、部分的に（不完全に）リン酸化される。活性のあるSYKを提供するために、Y296、S297、Y323、Y348、Y352、Y630などのSYK上のいくつかの部位をリン酸化すると、リン酸化SYK (pSYK) 活性化が生じ得る。複数の部位がリン酸化されると、SYKはシグナル伝達パートナーと結合する。完全に活性のあるpSYKは、チロシンY525/526で自己リン酸化する。完全に活性のあるpSYKは、その後、シグナル伝達カスケードの下流のタンパク質をリン酸化する。B細胞では、B細胞受容体 (BCR) の刺激及びCD79a及びbのITAMドメインのその後のリン酸化は、SYKの膜への動員及びSYKのリン酸化をもたらす。異常なBCR媒介性のSYK活性化は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL)、濾胞性リンパ腫 (FL)、マントル細胞リンパ腫 (MCL) 又は慢性リンパ性白血病 (CLL) の発症につながり得る。骨髄細胞では、SYKの活性化は、Fcγ受容体によって媒介される。異常なFcγ受容体媒介性SYK活性化は、急性骨髄性白血病 (AML) 又は骨髄異形成症候群 (MDS) の発症につながり得る。EBV感染細胞では、SYKの活性化は、ヒトヘルペスウイルス4潜伏膜タンパク質2A (LMP2A) を介して媒介される。異常なLMP2A媒介性SYK活性化は、上咽頭癌、リンパ腫又は胃癌の発生につながり得る。

【0048】

pSYKは、様々な癌に関与するタンパク質として特徴付けられており、したがって、診断又は治療の標的として役立ち得る。pSYKに対する抗体分子は、pSYK発現癌細胞を検出するために、裸の形態又は標識された形態で使うことができる。本発明の抗pSYK抗体分子は、ヒトpSYKと結合することができる。いくつかの実施態様において、本発明の抗pSYK抗体分子は、pSYKへのリガンドの結合を阻害することができる。他の実施態様において、本発明の抗pSYK抗体分子は、pSYKへのリガンドの結合を阻害しない。

【0049】

本発明は、活性化SYKを有するいくつかの腫瘍細胞を検出するのに市販の抗pSYK抗体で

は不十分であるという認識に部分的に基づいている。いくつかの実施態様において、市販の抗pSYK抗体は、pSYK Y525/526の検出に不十分である。いくつかの実施態様において、市販の抗pSYK抗体は、癌（例えば、PTCL、DLBCL、FL、MCL、CLL、AML、MDS、上咽頭癌、リンパ腫、胃癌、乳癌、卵巣癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌）及び移植後リンパ増殖性障害（PT-LPD））を有する患者から取得された試料中のpSYK Y525/526の検出に不十分である。pSYKに特異的な市販の抗体には、Epitomics社のカタログ番号2175-1（pSYK Y525/6）；Cell Signaling Technologies社のカタログ番号2710（pSYK Y525/6）；Cell Signaling Technologies社のカタログ番号2711（pSYK Y525/6）；Abgent社のカタログ番号AP3271a（pSYK Y525/6）が含まれる。したがって、特定の実施態様において、記載の抗体分子は、癌細胞を検出する改良された方法を提供する改良試薬である。いくつかの実施態様において、本明細書に記載の抗体分子は、癌患者から取得された試料中などの、pSYK Y525/526の量を検出又は測定する改良された方法を提供する改良試薬である。いくつかの実施態様において、本明細書に記載の抗体分子は、免疫細胞化学、免疫蛍光、又は免疫組織化学などの細胞ベースアッセイにおいてpSYK Y525/526を検出及び/又は測定する改良された方法を提供する改良試薬である。特定のそのような実施態様において、本明細書に記載の抗体分子は、改善された強度を提供する。特定のそのような実施態様において、本明細書に記載の抗体分子は、改善されたダイナミックレンジを提供する。例えば、図2、3、7、14を参照されたい。

【0050】

本明細書に記載の抗pSYK Y525/526抗体の結合から生じるシグナルの定量化は、シグナル・ノイズ比及びダイナミックレンジ、すなわち、最低値と最高値の間の違いが、市販の抗pSYK Y525/526抗体の結合から生じるシグナルよりもより高いことを示す。シグナル検出の大きなダイナミックレンジは、対象の腫瘍細胞、古い腫瘍標本、損傷のある腫瘍標本もしくはアーカイブ腫瘍標本、又は多量のpSYK Y525/526を発現しない腫瘍を含む試料中のpSYK Y525/526を検出する能力を提供する。これは、偽陰性の結果の数を減らし、正しい治療薬投与計画のより高い確実性を提供する。

【0051】

本明細書に記載の抗pSYK Y525/526抗体を用いる、対象からの腫瘍細胞を含む試料中のpSYK Y525/526の特異的な検出及び/又は定量は、完全に活性のあるSYK、すなわち、シグナル伝達カスケードの下流のBTK、BLNK又はPLC γ などのタンパク質のリン酸化を引き起こすpSYKを示す。これは、SYK依存性である腫瘍を示し得ない、部分的リン酸化、部分的活性化又は非自己リン酸化pSYKを検出することなどからの偽陽性の結果の数を減らす。本明細書に記載の抗pSYK Y525/526抗体が優位性を発揮するのは、pSYK Y525/526ペプチド免疫原に対して作られていることと合わせて、自己リン酸化pSYKを用いて選択するからであり得る。さらなる選択は、免疫細胞化学（ICC）、免疫蛍光（IF）及び免疫組織化学（IHC）などの特定の3次元アッセイにおける該抗体の性能試験を含んでいた。

【0052】

定義

本明細書で特に定義しない限り、本発明に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。一般的に、本明細書に記載の、細胞及び組織培養、分子生物学、並びにタンパク質及びオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの化学並びにタンパク質及びオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法並びにそれらの技術は、当技術分野で公知のものである。GenBank又はGenPept受託番号並びに有用な核酸配列及びペプチド配列は、米国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnological Information) (NCBI), Bethesda MDによって維持されるウェブサイトで見つけることができる。番号の有無に関わらず全ての太文字で書かれた巨大分子名は、NCBIの遺伝子データベースに記載されているタンパク質又は遺伝子の名前である。本明細書に記載の遺伝子データベース名に対応する配列は、引用により本明細書中に組み込まれている。組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、並びに組織培養及び形質転換及びトランスフェクション（例えば、エレ

クトロポレーション、リポフェクション)のための標準的な技術が使用される。酵素反応及び精製技術は、製造業者の仕様書に従って行われるか、又は当技術分野において一般的に達成されるように又は本明細書に記載のとおりに行われる。前述の技術及び手順は、例えば、本明細書を通じて引用及び議論される様々な一般的かつより具体的な参考文献に記載されているように、一般的に当技術分野で公知の方法に従って行われる。例えば、Sambrookらの文献、分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)) ; Harlow, E. 及び Lane, D. の文献、(1988) 抗体：実験マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. を参照されたい、又は一般的に、Buchwalow 及び Bocker の文献、免疫組織化学の基礎と方法(Immunohistochemistry Basics and Methods) (2010, Springer-Verlag, Berlin, Germany) を参照されたい。関連して利用される命名法、並びに本明細書に記載の実験手順及び技術は、当技術分野で公知である。さらに、文脈によって特に必要とされない限り、単数形の用語は複数を含み、複数形の用語は単数を含む。

10

【0053】

冠詞「1つ(a)」、「1つ(an)」及び「少なくとも1つ」は、冠詞の文法上の目的語の1つ又は2つ以上を指すために本明細書で使用される。一例として、「1つの要素」は、1つ又は2つ以上の要素、少なくとも1つの要素を意味する。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先する。

【0054】

用語「約」は、大まかに、又はおよその領域において大体を意味するために本明細書で使用される。用語「約」が数値範囲と併せて使用される場合、「約」は、記載される数値の上及び下に境界を拡張することによってその範囲を修正する。一般に、用語「約」は、10%の分散によって規定値の上及び下の数値を修正するために本明細書で使用される。

20

【0055】

本明細書で使用される場合、「脾臓チロシンキナーゼ」又は「p72-Syk」タンパク質としても知られている「SYK」は、ヒトSYKタンパク質などの哺乳動物のチロシンタンパク質キナーゼSYKを指す。本明細書で使用される場合、「SYK」はまた、Y525及び/又はY526以外の部位でリン酸化されたヒトSYKタンパク質を指す。特定のそのような実施態様において、特定のリン酸化残基は、(配列番号2で示される) 残基番号の前の「p」と共に示される。例えば、チロシン残基323の位置でリン酸化されたSYKは、本明細書ではSYK pY323と呼ばれる。ヒトSYKは、配列番号2に示されるタンパク質及びその天然に存在するアイソフォーム又は対立遺伝子のタンパク質変異体を指す。配列番号2の中の対立遺伝子は、配列番号1に示されるSYKの核酸配列によってコードされ得る。1つのSYK変異体は、インフレームエクソンを欠き、配列番号2のアミノ酸残基282~305を含まない配列番号2のポリペプチド変異体をコードする。他の変異体は当技術分野で公知である。例えば、NCBI SNPデータベースで観察されるように、ヒトSYKのいくつかの一塩基多型(SNP)がある。典型的には、天然に存在する対立遺伝子変異体は、配列番号2のSYK配列と少なくとも90%、95%、97%、98%又は99%同一のアミノ酸配列を有する。転写物は、635個のアミノ酸のタンパク質産物をコードし、GenBank受託番号：NM_003177に記載されている。SH2ドメインは、膜貫通タンパク質のリン酸化ITAMドメインとSYKの相互作用を媒介する。SYKタンパク質は、細胞質の非受容体チロシンキナーゼとして特徴付けられ、自然免疫及び獲得免疫、細胞接着、破骨細胞の成熟、血小板活性化及び血管発生を含むいくつかの生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしていると考えられている。

30

40

【0056】

本明細書で使用される場合、用語「抗体分子」、「抗体」、「免疫グロブリン」及び「抗体(複数)」は、抗体の天然に存在する形態、例えば、ポリクローナル抗体(例えば、IgG、IgA、IgM、IgE)並びにモノクローナル抗体及び組換え抗体又は一本鎖抗体、二本鎖及び多重鎖のタンパク質などの抗体ペプチド、キメラ抗体、CDR移植抗体、ヒト抗体及びヒト化抗体及び多重特異性抗体、並びに上記の全ての断片及び誘導体、その断片(例えば、

50

dAb、scFv、Fv、Fab、F(ab)₂'、Fab') 並びに機能的重鎖抗体などの誘導体、ナノボディ、例えば、他の鎖、例えば、軽鎖の完全な可変領域と対になった場合に、重鎖及び軽鎖可変領域全体で観察されるものの少なくとも25、50、75、85又は90%の結合を可能にする誘導体、並びに特異的結合についてインタクトな抗体と競合する、少なくとも1つの所望のエピトープに対する特異性を有する抗体の任意の部分（例えば、エピトープに特異的に結合するように十分なCDR配列を有し、かつ十分なフレームワーク配列を有する断片）を広く包含する。用語「抗体」はまた、モノボディ及びダイアボディなどの合成並びに遺伝子操作された変異体を含む。用語「抗体分子」には入らないが、本発明はまた、「抗体類似体（複数可）」などの誘導体、他の非抗体分子タンパク質ベースの骨格、例えば、特異的抗原結合を提供するためにCDRを使用する融合タンパク質及び/又は免疫複合体を含む。

10

【0057】

本明細書で使用される場合、用語「pSYK」、「p-SYK」及び「リン酸-SYK」は、リン酸化された脾臓チロシンキナーゼ（SYK）を指す。「抗pSYK抗体分子」は、リン酸化SYK、例えば、ヒトリン酸化SYKと相互作用するか又は認識する、例えば、結合する（例えば、特異的に結合する）抗体分子（すなわち、抗体、抗体又は抗体類似体の抗原結合断片）を指す。例示的な抗pSYK抗体分子は、表1及び表2にまとめられたものなどである。特定のそのような実施態様において、本明細書で使用される「pSYK」、「p-SYK」及び「リン酸-SYK」は、特に、配列番号2のチロシン525及び/又は526の位置でリン酸化されているSYKを指す。

【0058】

20

本明細書で使用される場合、用語「pBTK」又は「リン酸-ブルトン型無ガンマグロブリン血症チロシンキナーゼ」は、GenPept受託番号NP_000052、配列番号26で表されるポリペプチド、又はそのアミノ酸残基の少なくとも1つがリン酸化されたそのアイソフォームを意味する。いくつかの実施態様において、pBTKは、配列番号26のチロシン551の位置でリン酸化されている（「BTK pY551」）。他の実施態様において、pBTKは、配列番号26のチロシン223の位置でリン酸化されている（「BTK pY223」）。

【0059】

本明細書で使用される場合、用語「pBLNK」又は「リン酸-B細胞リンカータンパク質」は、GenPept受託番号NP_037446、配列番号27で表されるポリペプチド、又はそのアミノ酸残基の少なくとも1つがリン酸化されたそのアイソフォームを意味する。いくつかの実施態様において、pBTKは、配列番号27のチロシン96の位置でリン酸化されている（「BLNK pY96」）。他の実施態様において、pBTKは、配列番号27のチロシン84の位置でリン酸化されている（「BLNK pY84」）。

30

【0060】

本明細書で使用される場合、用語「pFLT3」又は「リン酸-fms-関連チロシンキナーゼ3」は、GenPept受託番号NP_004110、配列番号28で表されるポリペプチド、又はそのアミノ酸残基の少なくとも1つがリン酸化されたそのアイソフォームを意味する。いくつかの実施態様において、pFLT3は、配列番号28のチロシン591の位置でリン酸化されている（「FLT3 pY591」）。他の実施態様において、pFLT3は、配列番号28のチロシン969の位置でリン酸化されている（「FLT3 pY969」）。

40

【0061】

本明細書で使用される場合、「SYK阻害剤」、「SYK標的治療薬剤」又は「SYK標的治療薬」は、SYKの活性化を阻害するか、SYKもしくはpSYKの活性を阻害するか、又はSYKの自己リン酸化を阻害する化合物である。いくつかの実施態様において、SYK阻害剤は、pSYKの自己リン酸化を阻害する。いくつかの実施態様において、SYK阻害剤によって阻害される自己リン酸化は、配列番号2のチロシン残基525及び/又はチロシン残基526での自己リン酸化である。SYK阻害剤は、当技術分野で公知であるいくつかのうちの1つであり得るか、又は例えば、W01999/31073又はW02009/136995に記載されているような、R406などのATP競合物もしくは非加水分解性ATP類似体、ピセアタンノール、フォスタマチニブ、ジアミノピリミジンカルボキサミド、例えば、W02009/131687に記載されているようなピロロピリ

50

ミジン、及び縮合複素芳香族ピロリジノンからなる群から選択され得る。特定の実施態様において、SYK阻害剤は、縮合複素芳香族ピロリジノンであってよい。特定の実施態様において、縮合複素芳香族ピロリジノンは、引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許第8,440,689号に記載のピロロピリミジノン（例えば、6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[3,4-c]ピリミジン-5-オン）又はピロロピリジノン（例えば、1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン）の化合物であり得る。いくつかの縮合複素芳香族ピロリジノン化合物は、本明細書に記載されている。そのような1つの縮合複素芳香族ピロリジノンは、化合物Aとして本明細書に記載されている。SYK阻害剤を含む治療薬投与計画は、化合物Aなどの縮合複素芳香族ピロリジノンで対象を治療することを含んでよい。

【0062】

10

用語「CDRの抗原結合群」又は「結合を可能にするのに十分なCDRの数」（及び類似の言語）は、本明細書で使用される場合、フレームワーク中に置かれ、他の鎖の完全な可変領域と対になるか、又は同様の長さで同じ数のCDRを有する他の鎖の可変領域の一部、例えば、軽鎖と対になった場合に、例えば、重鎖及び軽鎖可変領域全体で観察されるもののうちの少なくとも25、50、75、85又は90%の結合を可能にするような鎖、例えば、重鎖の十分なCDRを指す。

【0063】

本明細書で使用される場合、用語「ヒト化抗体」は、親抗体の抗原結合特性を保持するか、又は実質的に保持するが、ヒトにおいて免疫原性が低い非ヒト抗体、例えば、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス）、ヒツジ又はヤギに由来する抗体を指す。ヒト化は、本明細書で使用される場合、脱免疫化抗体を含むことが意図される。典型的には、ヒト化抗体は、非ヒトCDR並びにヒトの又はヒト由来のフレームワーク領域及び定常領域を含む。

20

【0064】

用語「修飾された」抗体は、本明細書で使用される場合、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現させた抗体、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである非ヒト動物（例えば、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジもしくはヤギ）から単離された抗体、又はヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを伴う任意の他の手段によって調製、発現、作製又は単離された抗体などの、組換え手段により調製、発現、作製又は単離された抗体を指す。そのような修飾された抗体は、ヒト化抗体、CDR移植抗体（例えば、第1の抗体からのCDR及び異なる供給源、例えば、第2の抗体からのフレームワーク領域又はコンセンサスフレームワークを有する抗体）、キメラ抗体、インビトロで（例えば、ファージディスプレイによって）生成された抗体を含み、必要に応じて、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列もしくはヒト免疫グロブリン遺伝子由来の可変領域又は定常領域、或いはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の代替の免疫グロブリン配列へのスプライシングを伴う任意の手段によって調製、発現、作製又は単離された抗体を含んでよい。特定の実施態様において、修飾抗体分子は、参照抗体からの配列変化を有する抗体分子を含む。

30

【0065】

用語「単一特異性抗体」は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性及び親和性を示す抗体又は抗体調製物を指す。この用語は、「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」を含む。

40

【0066】

用語「二重特異性抗体」又は「二機能性抗体」は、各結合部位が異なり、異なるエピトープを認識する、2つのエピトープに対する二重の結合特異性を示す抗体を指す。

【0067】

用語「非コンジュゲート抗体」及び「裸の抗体」は、非抗体部分、例えば、薬剤又は標識にコンジュゲートされていない抗体分子を指すために互換的に使用される。

【0068】

用語「免疫複合体」、「抗体-薬物複合体」及び「抗体複合体」のそれぞれは、交換的

50

に使用され、非抗体部分、例えば、薬剤又は標識にコンジュゲートされている抗体を指す。用語「薬剤」は、化学化合物、化学化合物の混合物、生体高分子、又は生物物質から作製された抽出物を示すために本明細書で使用される。用語「治療薬剤」は、生物活性を有する薬剤を指す。例示的な治療薬は化学療法剤である。

【0069】

「細胞傷害剤」は、アルキル化剤、腫瘍壊死因子阻害剤、インターカレーター、微小管阻害剤、キナーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤及びトポイソメラーゼ阻害剤を含むが、これらに限定されない、細胞の機能に直接干渉することによって主に細胞死を引き起こす化合物を指す。「毒性ペイロード」は、本明細書で使用される場合、細胞に送達された場合に、細胞死をもたらす十分な量の細胞傷害剤を指す。毒性ペイロードの送達は、本発明の抗体又は抗原結合断並びに細胞傷害剤を含む十分な量の免疫複合体の投与によって達成されてよい。毒性ペイロードの送達は、細胞傷害剤を含む免疫複合体であって、本発明の抗体又はその抗原結合断片を認識し、結合する第2の抗体又はその抗原結合断片を含む十分な量の免疫複合体を投与することによって達成されてもよい。

【0070】

本明細書で使用される場合、語句「に由来する」配列又は「指定配列に特異的な」配列は、例えば、指定配列の連続領域に対応する、すなわち、指定配列の連続領域と同一又は相補的な大体少なくとも6個のヌクレオチドもしくは少なくとも2個のアミノ酸、少なくとも約9個のヌクレオチドもしくは少なくとも3個のアミノ酸、少なくとも約10~12個のヌクレオチドもしくは4個のアミノ酸、又は少なくとも約15~21個のヌクレオチド又は5~7個のアミノ酸の連続配列を含む配列を指す。特定の実施態様において、該配列は、指定されたヌクレオチド又はアミノ酸配列の全てを含む。該配列は、当技術分野で公知の技術によって決定されるような特定の配列に固有の配列領域と相補的（ポリヌクレオチド配列の場合）又は同一であってよい。配列が由来し得る領域は、特異的エピトープをコードする領域、CDRをコードする領域、フレームワーク配列をコードする領域、定常ドメイン領域をコードする領域、可変ドメイン領域をコードする領域、並びに非翻訳領域及び/又は非転写領域を含むが、これらに限定されない。誘導される配列は、必ずしも研究中の興味のある配列から物理的に誘導されないが、ポリヌクレオチドが由来する領域（複数可）中の塩基配列によって提供される情報に基づく化学合成、複製、逆転写又は転写を含むが、これらに限定されない任意の方法で作製されてよい。このように、誘導される配列は、元のポリヌクレオチドのセンス又はアンチセンス配向のいずれかを表し得る。加えて、指定配列の組み合わせに相当する領域の組み合わせは、意図する用途と一致するように、当技術分野で公知の方法で変更又は組み合わせられてよい。例えば、配列は、それぞれが指定配列の一部を含み、指定配列と同一ではないが、指定配列由来の配列を表すことが意図される領域で中断された2つ以上の連続配列を含んでよい。抗体分子に関連して「それから誘導される」は、比較抗体に機能的又は構造的に関連する抗体分子を含み、例えば、類似の配列もしくは構造又は実質的に同じ配列もしくは構造を有する、例えば、同じもしくは類似のCDR、フレームワーク又は可変領域を有する抗体分子を含む。抗体についての「それから誘導される」はまた、連続していても又は連続していなくてもよいが、番号付け方式に従って定義もしくは特定されるか、又は一般的な抗体構造と相同性があるか、又は比較配列の三次元近接、すなわち、CDRもしくはフレームワーク領域内にある残基、例えば、1個以上、例えば、2、3、4、5、6個以上の残基を含む。用語「それから誘導される」は、物理的にそれから誘導されることに限定されないが、別の抗体を設計するための、任意の方法による、例えば、比較抗体からの配列情報の使用による作製を含み、単に配列類似性を指すことができる。本明細書で使用される場合、語句「によってコードされる」は、ポリペプチド配列をコードする核酸配列を指し、該ポリペプチド配列又はその一部は、該核酸配列によりコードされるポリペプチドからの少なくとも3~5個のアミノ酸、少なくとも8~10個のアミノ酸、又は少なくとも15~20個のアミノ酸のアミノ酸配列を含有する。

【0071】

2つの配列間の「相同性」の計算を以下のように行うことができる。配列を、最適な比

較目的のために整列させる（例えば、ギャップは、最適な整列のために第1及び第2のアミノ酸配列もしくは核酸配列のうち的一方又は両方に導入することができ、非相同配列は、比較目的のために無視することができる）。比較目的のために整列させた参照配列の長さは、該参照配列の長さの少なくとも30%、40%、又は50%、少なくとも60%、又は少なくとも70%、80%、90%、95%、又は100%である。次いで、対応するアミノ酸位置もしくはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置を、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドが占める場合、分子はその位置で同一である（本明細書で使用される場合、アミノ酸又は核酸の「同一性」は、アミノ酸又は核酸の「相同性」と同等である）。2つの配列間のパーセント同一性は、2つの配列の最適な整列のために導入する必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮した、これらの配列が共有する同一位置の数の関数である。

10

【0072】

配列の比較及び2つの配列間のパーセント相同性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成されてよい。2つのアミノ酸配列間のパーセント相同性は、当技術分野で公知の任意の方法を用いて決定されてよい。例えば、Needleman及びWunschの文献、J.Mol.Biol.48: 444-453 (1970)、ブロッサム(Blossum)62マトリックス又はPAM250マトリックスのいずれか、並びに16、14、12、10、8、6、又は4のギャップウエイト、及び1、2、3、4、5、又は6の長さウエイトを用いた、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムに組み込まれているアルゴリズム。2つのヌクレオチド配列間のパーセント相同性も、NWSgapdna.CMPマトリックス及び40、50、60、70、又は80のギャップウエイト及び1、2、3、4、5、又は6の長さウエイトを用いて、GCGソフトウェアパッケージ（Accelrys社、San Diego, Calif.）中のGAPプログラムを用いて決定することができる。相同性の決定のためのパラメータの例示的なセットは、ギャップペナルティを12、ギャップ延長ペナルティを4、及びフレームシフトギャップペナルティを5とするブロッサム62スコアリングマトリックスである。

20

【0073】

本明細書で使用される場合、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件を説明する。ハイブリダイゼーション反応を行うためのガイダンスは、分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)、John Wiley & Sons, N.Y. (1989)、6.3.1-6.3.6の中に見ることができる。水性及び非水性の方法がその参考文献に記載されており、どちらを用いてもよい。本明細書で言及される特異的なハイブリダイゼーション条件は、以下のとおりである：1) 約45℃での6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）中での低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、続いて、少なくとも50℃での0.2×SSC、0.1% SDS中での2回の洗浄（洗浄の温度は、低ストリンジェンシー条件については55℃まで上昇させてもよい）；2) 約45℃での6×SSC中での中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、続いて、60℃での0.2×SSC、0.1% SDS中での1回以上の洗浄；3) 約45℃での6×SSC中での高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、続いて、65℃での0.2×SSC、0.1% SDS中での1回以上の洗浄；及び4) 65℃での0.5Mのリン酸ナトリウム、7% SDSである非常に高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、続いて、65℃での0.2×SSC、1% SDSでの1回以上の洗浄。非常に高いストリンジェンシー条件（4）が好ましい条件となる場合が多く、特記しない限り使用されるべきものである。本発明の抗体及びその抗原結合断片は、ポリペプチドの機能に対して実質的な影響を及ぼさない追加の保存的又は非必須アミノ酸置換を有してよいことが理解される。特定の置換が許容される、すなわち、結合活性などの所望の生物学的特性に悪影響を及ぼさないか否かは、Bowie, J Uらの文献、Science 247: 1306-1310 (1990)又はPadlanらの文献、FASEB J.9: 133-139 (1995)に記載されるように決定されてよい。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば

30

40

50

、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。

【0074】

「非必須」アミノ酸残基は、生物活性を消失させることなく、又は実質的に変化させることなく、結合剤、例えば、抗体の野生型配列から変えることができる残基であるが、「必須」アミノ酸残基は、そのような変化をもたらす。抗体において、必須アミノ酸残基は、特異性決定残基（SDR）であってよい。

10

【0075】

本明細書で使用される場合、用語「単離された」は、その元の環境（例えば、それが天然に存在する場合は自然環境）から取り出される物質を指す。例えば、生きている動物内に存在する天然のポリヌクレオチド又はポリペプチドは単離されていないが、自然系に共存する物質のいくつか又は全てから分離されている同じポリヌクレオチド又はDNA又はポリペプチドは単離されている。そのようなポリヌクレオチド又はポリペプチドはベクターの一部であり得、かつ/又はそのようなポリヌクレオチド又はポリペプチドは、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドを含む単離細胞又は培養細胞を含む組成物、例えば、混合物、溶液もしくは懸濁液の一部であり得、該ベクター又は組成物がその天然環境の一部ではないという点でなお単離されている。

20

【0076】

本明細書で使用される場合、用語「作動可能に連結された」は、記載される構成要素がそれらの意図された様式で機能することを可能にする関係にある状況を指す。したがって、例えば、コード配列に「作動可能に連結された」制御配列は、コード配列の発現が制御配列と適合する条件下で達成されるように結合されている。

【0077】

本明細書で使用される場合、用語「ベクター」は、別のポリヌクレオチドセグメントが、例えば、接着セグメントの複製及び/又は発現をもたらすように結合しているレプリコンを指す。

30

【0078】

本明細書で使用される場合、用語「制御配列」は、それが連結されているコード配列の発現を達成するのに必要であるポリヌクレオチド配列を指す。そのような制御配列の特性は宿主生物に依存して異なる。原核生物では、そのような制御配列には、一般的に、プロモーター、リボソーム結合部位及びターミネーター、場合によっては、エンハンサーが含まれる。このように、用語「制御配列」は、少なくともその存在が発現に必要な全ての構成要素を含むことが意図され、その存在が有利である追加の構成要素、例えば、リーダー配列を含んでもよい。

【0079】

本明細書で使用される場合、用語「精製された生成物」は、その生成物が通常関連している細胞構成物から、かつ/又は興味の試料中に存在し得る他の種類の細胞から単離された生成物の調製物を指す。

40

【0080】

本明細書で使用される場合、用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合できるタンパク質決定基を指す。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性のある表面基からなり、通常、特異的な三次元構造特性並びに特異的な電荷特性を有する。いくつかのエピトープは、直線状エピトープであるが、他のものは立体構造エピトープである。直線状エピトープは、連続したアミノ酸の一次配列が、認識されるエピトープを含むエピトープである。直線状エピトープは、典型的には、少なくとも3、より一般的には少なくとも5、例えば、約8～約10個の連続したアミノ酸を含む。立体構造エピト

50

ープは、a) 例えば、リガンド結合に依存して、又は修飾（例えば、リン酸化）に依存して、シグナル伝達分子によって特定のタンパク質立体構造で結合する抗体にのみさらされる直鎖状配列；又はb) タンパク質の2以上の部分からの、又はマルチサブユニットタンパク質においては2以上のサブユニットからの構造的特徴であって、結合に参与する3次元空間内に十分に近接している前記構造的特徴の組み合わせなどの少なくとも2つの状況から生じ得る。

【0081】

本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、IgM、IgA、IgE又はIgG）を指す。

【0082】

本明細書で使用される場合、用語「検出剤」、「標識」又は「標識された」は、ポリペプチド又は糖タンパク質上の検出可能なマーカーの取り込みを指すために使用される。ポリペプチド及び糖タンパク質を標識する様々な方法が当技術分野で公知であり、使用されてよい。ポリペプチド用の標識の例としては、以下のもの：放射性同位体又は放射性核種（例えば、インジウム（ ^{111}In ）、ヨウ素（ ^{131}I 又は ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテチウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、ビスマス（ ^{212}Bi 又は ^{213}Bi ）、硫黄（ ^{35}S ）、炭素（ ^{14}C ）、トリチウム（ ^3H ）、ロジウム（ ^{188}Rh ）、テクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、プラセオジウム、又はリン（ ^{32}P ）又は陽電子放出放射性核種、例えば、炭素-11（ ^{11}C ）、カリウム-40（ ^{40}K ）、窒素-13（ ^{13}N ）、酸素-15（ ^{15}O ）、フッ素-18（ ^{18}F ）、ガリウム-68（ ^{68}Ga ）、及びヨウ素-121（ ^{121}I ））、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体、Cy3、又はCy5などのシアニン（Cy）蛍光色素、アレクサフルオロ488、アレクサフルオロ592、オレゴングリーン、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光、ビオチニル基（マークされたアビジンによって検出することができるもの、例えば、ストレプトアビジン部分及び蛍光マーカーを含有する分子又は光学法もしくは比色法によって検出することができる酵素活性）、並びに二次レポーターにより認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様において、標識は、潜在的な立体障害を減少させるために様々な長さのスペーサーアームによって接着される。

【0083】

本明細書で使用される場合、抗pSYK抗体分子についての「特異的結合」、「特異的に結合する」又は「結合特異性」は、抗体分子が、非リン酸化SYK、ホスファターゼ（PPase）処理されたSYKもしくはpSYKもしくは非SYKタンパク質、例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）、ラット肉腫ウイルス癌遺伝子相同体（RAS）、又はヒトアクチンに結合する親和性よりも高い親和性でpSYK、例えば、ヒトリン酸化SYKタンパク質に結合することを意味する。典型的には、抗pSYK分子は、リン酸化SYK、例えば、ヒトリン酸化SYKタンパク質に対するその K_d の2倍より大きい、10倍より大きい、100倍より大きい、1,000倍より大きい、 10^4 倍より大きい、 10^5 倍より大きい、又は 10^6 倍より大きい、非リン酸化SYK又は非SYKタンパク質、例えば、BSA、RAS又はアクチンに対する K_d を有する。 K_d の決定において、リン酸化SYK及び非リン酸化SYK又は非SYKタンパク質、例えば、BSA、RAS又はアクチンに対する K_d は、同じ条件下で行われるべきである。いくつかの実施態様において、pSYK Y525/526への特異的結合を有する抗pSYK抗体は、配列番号2の任意の他のチロシン、セリン又はトレオニンの位置でリン酸化されたSYKに結合する親和性よりも高い親和性でpSYK Y525/526に結合する。

【0084】

用語「親和性」又は「結合親和性」は、見かけの結合定数又は K_a を指す。 K_a は、解離定数（ K_d ）の逆数である。抗体は、特定の標的分子に対して、例えば、少なくとも 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 及び 10^{11}M^{-1} の結合親和性を有してよい。第2の標的に比べて第1の標的への抗体のより高い結合親和性は、第2の標的との結合に対する K_A （又は数値 K_D ）よ

10

20

30

40

50

りも第1の標的との結合に対するより高い K_A （又はより小さい数値 K_D ）によって示され得る。そのような場合には、該抗体は、第2の標的（例えば、第2の立体構造中の同一タンパク質もしくはその模倣体；又は第2のタンパク質）に比べて、第1の標的（例えば、第1の立体構造中のタンパク質又はその模倣体）に対して特異性を有する。結合親和性（例えば、特異性又は他の比較について）の違いは、少なくとも1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、又は 10^5 倍であってよい。結合親和性は、平衡透析、平衡結合、ゲル濾過、ELISA、表面プラズモン共鳴、又は分光法（例えば、蛍光アッセイを用いる）を含む様々な方法によって決定され得る。例えば、抗pSYK抗体分子の相対的親和性は、pSYK発現細胞を用いたFACS測定により、pSYKタンパク質、pSYK Y525/526ペプチド（例えば、抗pSYK抗体分子を増やすために使用される免疫原）に対するELISA測定から測定されてよい。

10

【0085】

結合親和性を評価するための例示的な条件は、トリス緩衝液（pH7.5の50mMのトリス、150mMのNaCl、5mMの CaCl_2 ）におけるものである。これらの技術は、結合タンパク質（又は標的）の濃度の関数として、結合した結合タンパク質及び遊離している結合タンパク質の濃度を測定するために使用され得る。結合した結合タンパク質（[結合]）の濃度は、遊離している結合タンパク質（[遊離]）の濃度及び標的上の結合タンパク質の結合部位の濃度に関連し、（N）は、次式により標的分子あたりの結合部位の数である：

$$[\text{結合}] = N \cdot [\text{遊離}] / ((1/K_A) + [\text{遊離}])$$

【0086】

K_A の正確な決定を行うことは必ずしも必要ではないが、結合した結合タンパク質の濃度は、時には、例えば、ELISA又はFACS分析などの方法を用いて決定される親和性の定量的な測定値を得るのに十分であり、 K_A に比例するので、より高い親和性が、例えば、2倍より高いか否かを決定することなどの比較のために、例えば、機能アッセイにおける活性により、例えば、インビトロもしくはインビボアッセイによって親和性の定性的測定値を得るか、又は親和性の推定(inference)値を得るために使用されてよい。抗pSYK抗体分子の親和性は、リアルタイム生体分子相互作用分析（BIA）などの技術を用いて測定することもできる（例えば、Sjolander, S, 及びUrbaniczky, C, の文献、1991, Anal. Chem. 63:2338-2345並びにSzaboらの文献、1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705を参照されたい）。本明細書で使用される場合、「BIA」又は「表面プラズモン共鳴」は、相互作用物のいずれも標識することなく、リアルタイムで生体特異的相互作用を研究するための技術（例えば、BIACORE(商標)）である。結合表面における質量の変化（結合事象の指標）は、表面付近の光の屈折率の変化（表面プラズモン共鳴（SPR）の光学現象）をもたらし、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として用いられ得る検出可能なシグナルをもたらし。

20

30

【0087】

BIACORE(商標)T100システム(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)を用いた抗pSYK抗体分子の親和性の測定を簡単に説明する。抗pSYK抗体（プレップA）は、pH4.0の10nMの酢酸ナトリウムで適切な濃度（例えば、20 $\mu\text{g/mL}$ ）まで希釈してよく、参照/対照抗体（プレップB）は、pH4.0の10mMの酢酸ナトリウムで適切な濃度（例えば、10 $\mu\text{g/mL}$ ）まで希釈してよい。次いで、各抗体は、標準的なアミンカップリングを使用して、いくつかのCM4 BIACOREチップに共有結合で固定してよい。調製した各CM4チップについては、プレップA抗体は、およそ75~100 RUで2つのフローセル上に固定してよく、プレップB抗体は、およそ70~80 RUで1つのフローセルに固定してよい。各CM4チップの残りの第4のフローセルは、参照フローセルとして使用されてよい。

40

【0088】

本明細書で使用される場合、用語「治療する」又は「治療」は、物質又は対象を変更するための治療薬剤の投与として定義される。癌の文脈において、「治療」は、さらなる腫瘍の成長を防止又は阻害するため、及び腫瘍の収縮を引き起こすための治療薬の使用を意味する。そのような使用は、より長い生存時間を提供することができる。治療は、腫瘍の

50

転移の防止を含むことも意図される。腫瘍は、癌又は腫瘍の少なくとも1つの症状（反応性/非反応性、進行までの時間、又は当技術分野で公知であり、本明細書に記載の指標によって決定されるような）が緩和、終了、減速、最小化、又は防止される場合に、「阻害される」又は「治療される」。本明細書でさらに説明するとおり、治療薬投与計画（例えば、SYK阻害剤を含む）を用いた治療に基づく物理的又はその他の腫瘍の任意の症状のいかなる改善も本発明の範囲内である。該治療は、障害、障害の症状又は障害素因、例えば、癌を治癒する(cure)、治癒する(heal)、緩和する、軽減する、改変する、救済する、寛解させる、和らげる、改善するか又は影響を与えることであってよい。理論に束縛されるものではないが、治療は、インビトロ又はインビボでの細胞の阻害、消失、もしくは死滅を引き起こすか、又はそうでなければ障害、例えば、本明細書に記載の障害（例えば、癌）を媒介する細胞、例えば、異常な細胞の能力を減少させることと考えられる。SYK標的治療薬の投与は、対象、例えば、患者に抗pSYK抗体分子又はSYK阻害剤を提供することであるか、又は対象に戻される対象からの単離された組織もしくは細胞への、例えば、適用による投与であり得る。抗pSYK抗体分子又はSYK阻害剤は、単独で、又は第2の薬剤と組み合わせて投与されてもよい。

【0089】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、哺乳動物、霊長類、ヒト及び非ヒト動物を含むことが意図される。例えば、対象は、SYKによって媒介される障害、疾患、もしくは状態などの障害、疾患、又は状態、例えば、上記のような異常なBCR媒介性SYK活性化障害（例えば、DLBCL、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、又は慢性リンパ性白血病）、異常なFcγ受容体媒介性SYK活性化障害（例えば、急性骨髄性白血病もしくは骨髄異形成症候群）又は異常LMP2A媒介性SYK活性化障害（例えば、上咽頭癌、リンパ腫、もしくは胃癌）を有する患者（例えば、ヒト患者もしくは動物患者）であってよい。特定のそのような実施態様において、該障害、疾患、又は状態は、急性骨髄性白血病（AML）、B細胞慢性リンパ性白血病（BCLL）、B細胞リンパ腫（例えば、マントル細胞リンパ腫（MCL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL））、濾胞性リンパ腫、及びT細胞リンパ腫（例えば、末梢T細胞リンパ腫）などの血液癌、白血病、リンパ腫又は骨髄腫の悪性腫瘍、並びに肺癌（小細胞肺癌及び非小細胞肺癌）、膵臓癌、及び結腸癌などの上皮癌（すなわち、癌腫）を含む異常細胞増殖に関連する。上記の血液悪性腫瘍及び上皮癌に加えて、いくつかの実施態様において、該状態は、とりわけ、白血病（慢性骨髄性白血病及び慢性リンパ性白血病（CLL））、並びに乳癌、尿生殖器癌、皮膚癌、骨癌、前立腺癌、及び肝臓癌；脳の癌；喉頭、胆嚢、直腸、副甲状腺、甲状腺、副腎、神経組織、膀胱、頭、首、胃、気管支、及び腎臓の癌；基底細胞癌、扁平上皮癌、転移性皮膚癌、骨肉腫、ユーイング肉腫、細網肉腫、及びカポジ肉腫；骨髄腫、EBV関連腫瘍及び他の固形腫瘍、巨細胞腫、脾臓細胞腫、急性及び慢性のリンパ球腫瘍並びに急性及び慢性の顆粒球性腫瘍、有毛細胞腫瘍、腺腫、髓様癌、褐色細胞腫、粘膜神経腫、腸神経節腫、過形成性角膜神経腫瘍、マルファン症候群様体質腫瘍、ウィルムス腫瘍、セミノーマ、卵巣腫瘍、平滑筋腫瘍(leiomyomate r tumor)、子宮頸部形成異常、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、骨髄異形成症候群（MDS）、横紋筋肉腫、星状細胞腫、非ホジキンリンパ腫、悪性高カルシウム血症、真性多血症、腺癌、多形膠芽細胞腫、神経膠腫、リンパ腫、及び悪性黒色腫を含む他の種類の癌を含み得る。特定の実施態様において、該障害、疾患又は状態は、PTCL、DLBCL、FL、MCL、CLL、AML、MDS、上咽頭癌、リンパ腫、胃癌、乳癌、卵巣癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌）及びPT-LPDから選択される。いくつかの実施態様において、DLBCLは、胚中心B細胞様（GCB）サブタイプ、活性化B細胞様（ABC）サブタイプ及び非胚中心B細胞様（非GCB）サブタイプからなる群から選択されるサブタイプとして分類される。

【0090】

癌に加え、いくつかの実施態様において、該状態は、とりわけ、良性前立腺肥大、再狭窄、過形成、滑膜増殖障害、網膜症又は眼の他の血管新生障害などの非悪性増殖性疾患を含む異常な細胞増殖に関連する他の疾患を含んでよい。いくつかの実施態様において、該状態は、このようなSYK発現状態、pSYK発現状態もしくはSYK活性化状態の症状；又はこの

10

20

30

40

50

ようなSYK発現状態、pSYK発現状態もしくはSYK活性化状態の素因を含んでもよい。SYK、BTK及びPI3K δ は、BCR活性化悪性腫瘍における臨床的に検証された標的である。本発明の用語「非ヒト動物」は、特に断りのない限り、全ての非ヒト脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類などの非ヒト哺乳動物及び非哺乳動物、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類、マウス、ラット、ウサギ又はヤギなどを含む。一実施態様において、「対象」は、マウス、ラット、ウサギ又はヤギのうちの1以上又は全てを除外する。

【0091】

本明細書で使用される場合、障害を治療するのに「有効な」もしくは「十分な」抗pSYK抗体分子又は治療薬の量、又は「治療有効量」もしくは「治療上十分な量」は、対象への単回用量又は複数回用量の投与の際に、(a) 治療される障害又は疾患状態の重症度の検出可能な減少を引き起こす；(b) 疾患もしくは障害の患者の症状を改善又は緩和する；又は(c) 治療される障害もしくは疾患状態又は細胞、例えば、癌細胞（例えば、SYK発現腫瘍細胞、pSYK発現腫瘍細胞もしくはSYK活性化腫瘍細胞）の進行を減速もしくは防止するか、又は他の方法でそれらを安定化するかもしくはそれらの安定性を延長する（例えば、癌のさらなる腫瘍成長を防止する）のに有効であるか、或いは本明細書に記載の障害を有する対象を、そのような治療が存在しない場合に予想されるものを超えて延長治療、軽減、緩和又は改善するのに有効である抗体分子の量を指す。本明細書で使用される場合、腫瘍又は癌の「増殖を阻害すること」は、その増殖及び/もしくは転移を減速、中断、阻止又は停止することを指し、必ずしも腫瘍増殖の完全な除去を示すものではない。任意の特定の患者のための特定の投薬量及び治療投与計画は、使用される特定の化合物の活性、患者の年齢、体重、全般的健康、性別、及び食事、投与の時間、排泄の速度、薬物の組み合わせ、治療する医師の判断、及び治療される特定の疾患の重症度を含む様々な要因に依存し得る。

【0092】

H-スコアアプローチは、腫瘍型内及び腫瘍型間の染色の強度及び腫瘍の染色率の差異を決定するための最適なデータ解像度を提供する。H-スコアアプローチはまた、陽性染色の閾値を決定するための優れたツールを提供する。この方法では、0~3+の範囲の染色強度を有する腫瘍内の細胞のパーセンテージ（0~100）が提供される。本方法を用いて、0、0.5、1、2及び3の強度を有するスコアが提供された。マーカーに依存して、0.5染色は、陽性又は陰性としてスコア化されてよく、かつマーカーの軽度であるが知覚できる染色を反映する。Hスコアを得るために、腫瘍細胞のパーセンテージは各強度で乗算され、加算される。

【0093】

Hスコア = (%腫瘍*1) + (%腫瘍*2) + (%腫瘍*3)

【0094】

例えば、腫瘍が20%陰性（0）、30%+1、10%+2、40%+3である場合、これは170のHスコアを与える。

【0095】

腫瘍細胞の100%が3+強度で標識される場合、最大H-スコアは、細胞内局在（すなわち、頂端又は細胞質）あたり300（100%*3）である。最初に、対照として、単独の総H-スコアを、試料の比較に使用しなかったが、各強度での細胞の分解率の見直しに加えて評価した。例えば、90のスコアは、腫瘍細胞の90%が1+強度で染色されるか、又は細胞の30%が3+強度で染色されることを表すことができる。これらの試料は、同じH-スコアを有するが、非常に異なるpSYK発現を有する。各強度でスコア化される細胞のパーセンテージは変化してよいが、通常は10%刻みでスコア化される；しかしながら、単一構成要素のスコア化の小さなパーセンテージは、あるレベルの染色が存在することを実証するために、1%及び5%と同様に推定されてもよい。pSYKについては、頂端染色は、1及び5%などの低レベルの増分で評価するために考慮されてよい。

【0096】

抗pSYK抗体

とりわけ、pSYK発現を検出するのに有用な抗pSYK抗体分子を本明細書に記載する。いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、自己リン酸化pSYKを検出するのに有用である。いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、pSYK Y525/526を検出するのに有用である。いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、活性化pSYK、例えば、BLNK、BTK、又はPLC γ のリン酸化をもたらすことができるSYKを検出するのに有用である。例えば、pSYK検出に有用な抗pSYK抗体分子は、pSYK、例えば、pSYK Y525/526に対して、例えば、少なくとも 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 又は 10^{11}M^{-1} の結合親和性で特異的にpSYKに結合する非ヒト抗pSYK抗体分子（例えば、非ヒト及び非マウス抗体分子）を含み得る。該抗pSYK抗体分子は、例えば、本明細書に記載の非ヒト、非マウス及び非ラット抗体分子、例えば、ウサギ抗pSYKの抗体分子であり得る。

10

【0097】

特定の態様において、本発明は、表1及び表2にまとめたものなどの特徴を含む抗pSYK抗体分子に関する。他の態様において、本発明は、表3、表4、表5及び/又は表6にまとめたものなどの特徴を含む抗pSYK抗体分子に関する。

【0098】

一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、ウサギハイブリドーマ抗体であり、抗体MIL81-1-8のうちの1つである。一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、抗体MIL81-1-8に由来する。別の実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、ウサギハイブリドーマ抗体であり、MIL81-2-1である。一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、抗体MIL81-2-1に由来する。別の実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、ウサギハイブリドーマ抗体であり、MIL81-99-1である。一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、抗体MIL81-99-1に由来する。

20

【0099】

一実施態様において、抗pSYK抗体分子は、例えば、直接結合アッセイ又は競合結合アッセイによって測定されたとおり、pSYKに対する親和性を有する。一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-12}\text{M}$ 未満、又は $1 \times 10^{-13}\text{M}$ 未満の K_d を有する。一実施態様において、該抗体分子は、IgG、又はその抗原結合断片であり、 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 未満、又は $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 未満の K_d を有する。一実施態様において、抗pSYK抗体分子、例えば、MIL81-1-8抗体又はそれに由来する抗体は、約80～約200pM、約50～約400pM、約100～約300pM、約100～約150pM又は約120pMの K_d を有する。一実施態様において、抗pSYK抗体分子、例えば、MIL81-1-8抗体又はそれに由来する抗体は、約 $0.9 \sim 1.25 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、又は約 $1.1 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の k_a を有する。一実施態様において、該抗体分子は、ScFvであり、 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 未満、 $1 \times 10^{-12}\text{M}$ 未満、又は $1 \times 10^{-13}\text{M}$ 未満の K_d を有する。

30

【0100】

天然に存在する哺乳動物の抗体構造単位は、四量体に代表される。各四量体はポリペプチド鎖の2つのペアで構成され、各ペアは1つの「軽」鎖（約25kDa）及び1つの「重」鎖（約50～70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識を担う約100～110個以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主としてエフェクター機能を担う定常領域を定義する。ヒト軽鎖は、 κ 軽鎖及び λ 軽鎖として分類することができる。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、又はイプシロンとして分類され、それぞれIgM、IgD、IgG、IgA、及びIgEとして抗体アイソタイプを定義し得る。軽鎖及び重鎖内で、可変領域及び定常領域は、約12個以上のアミノ酸の「J」領域によって連結され、重鎖はまた、約10個以上のアミノ酸の「D」領域を含む。一般的に、基本的な免疫学(Fundamental Immunology) 第7章 (Paul, W. 編、第2版、Raven Press, N.Y. (1989))を参照されたい。各軽鎖/重鎖ペアの可変領域は、抗体結合部位を形成する。特定の態様において、該抗pSYK抗体分子のアイソタイプは、異なるガンマ重鎖を有する、4つのサブクラスのIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4に分類され得るIgG免疫グロブリンである。ほとんどの治療用抗体は、IgG1アイソタイプのヒト抗体、キメラ抗体、又はヒト化抗体である。特定の実

40

50

施態様において、該抗pSYK抗体分子はウサギIgG抗体である。

【0101】

各重鎖と軽鎖のペアの可変領域は、抗原結合部位を形成する。したがって、インタクトなIgG抗体は、同一である2つの結合部位を有する。しかしながら、二機能性抗体又は二重特異性抗体は、2つの異なる重鎖/軽鎖ペアを有し、2つの異なる結合部位をもたらす人工的なハイブリッド構築物である。

【0102】

鎖は全て、相補性決定領域又はCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって連結された比較的保存されたフレームワーク領域（FR）の同じ一般構造を示す。各ペアの2つの鎖からのCDRは、特異的エピトープへの結合を可能にする、フレームワーク領域によって整列される。N末端からC末端まで、軽鎖及び重鎖の両方は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、免疫学的に関心のあるタンパク質のカバット配列（National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987及び1991)）の定義、又はChothia及びLeskの文献、J. Mol. Biol.196:901-917 (1987);Chothiaらの文献、Nature 342:878-883 (1989)に従う。本明細書で使用される場合、CDRは、重鎖（HCDR1、HCDR2、HCDR3）及び軽鎖（LCDR1、LCDR2、LCDR3）の各々について言及される。

【0103】

抗pSYK抗体分子は、上記のウサギ抗体のうちのいずれか1つの重鎖及び軽鎖の一方又は両方のCDRの全て、又はCDRの抗原結合サブセットを含むことができる。可変領域及びCDRを含むウサギハイブリドーマ抗体のアミノ酸配列は、表3及び表5の中で見ることができる。

【0104】

したがって、一実施態様において、該抗体分子は、以下のもののうちの一方又は両方を含む：（a）1個、2個、3個、又は抗原結合数の上記のウサギハイブリドーマ抗体のうちのいずれか1つの軽鎖CDR（LCDR1、LCDR2及び/もしくはLCDR3）。特定の実施態様において、該CDR（複数可）は、以下のようなLCDR1～3のうちの1つ以上又は全てのアミノ酸配列を含んでよい：LCDR1、又は1～7個のアミノ酸が保存的置換されている修飾LCDR1）LCDR2、又は1個もしくは2個のアミノ酸が保存的置換されている修飾LCDR2）；或いはLCDR3、又は1個もしくは2個のアミノ酸が保存的置換されている修飾LCDR3；（b）1個、2個、3個、又は抗原結合数の上記のウサギハイブリドーマ抗体のうちの1つの重鎖CDR（HCDR1、HCDR2及び/もしくはHCDR3）。特定の実施態様において、該CDR（複数可）は、以下のようなHCDR1～3のうちの1つ以上又は全てのアミノ酸配列を含んでよい：HCDR1、又は1個もしくは2個のアミノ酸が保存的置換されている修飾HCDR1；HCDR2、又は1～4個のアミノ酸が保存的置換されている修飾HCDR2；或いはHCDR3、又は1個もしくは2個のアミノ酸が保存的置換されている修飾HCDR3。

【0105】

抗pSYK抗体分子の生成に有用な免疫原には、pSYK、例えば、ヒトpSYK発現細胞；pSYK発現細胞の膜画分；pSYKを発現する組換え細胞；単離又は精製されたpSYK、例えば、ヒトpSYKタンパク質（例えば、生化学的に単離されたpSYK、又はその一部（例えば、pSYKのリン酸化部位を含む部分もしくはペプチド、例えば、配列番号2の少なくとも約8、10、12、14、16、20、24、28又は32個のアミノ酸残基を含む））が含まれる。いくつかの実施態様において、抗pSYK抗体を作製するための免疫原は、ヒトSYKのTyr525/526の周囲の残基に相当する合成リン酸化ペプチドである。一実施態様において、該ペプチド免疫原は、チロシン525及び/又は526上にリン酸で修飾された、配列番号2のアミノ酸520～529である。

【0106】

免疫原は、生化学的操作、精製、免疫又は抗体価の測定を支援するために、異種配列に融合されてよい。そのような免疫原は、pSYK、例えば、リン酸化ドメインの一部、及び非pSYKポリペプチドを含む部分を含んでよい。精製又は固体支持体、例えば、アフィニティークラムもしくはマイクロタイタープレート又は他の適切なアッセイ基質/チップ上への固定化を容易にするために融合タンパク質を構築するための選択が多く存在する。例えば

、融合部分は、ドメイン、例えば、グルタチオンに結合することができるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/キナーゼ (GST) ; プロテインA又はプロテインGに結合することができる免疫グロブリンのFc領域; アミノ酸残基、例えば、アフィニティーカラム上のニッケル又はコバルトと結合することができる2個、3個、4個、5個、又は6個のヒスチジン残基; エピトープタグ、例えば、タグ特異的抗体と結合することができるc-myc癌遺伝子の一部 (mycタグ)、FLAGタグ (米国特許第4,703,004)、ヘマグルチニン (HA) タグ、T7遺伝子10タグ、V5タグ、HSVタグ、又はVSV-Gタグ; 又は補因子、例えば、ストレプトアビジンと結合することができるビオチンを付加することができる。いくつかの実施態様において、ペプチド免疫原は末端システインを有するので、該ペプチドはハプテン又は担体タンパク質にコンジュゲートされてもよい。いくつかの実施態様において、該ペプチド免疫原はN末端システインを有する。

10

【0107】

免疫グロブリンのFc部分を含む免疫原は、効率的な抗体作製のために宿主の免疫監視構成要素によってpSYKエピトープに構造的なアクセスを可能にする構成で、溶液中で又は細胞に接着させるかのいずれかでpSYKを保持することができる。Fc領域を含む免疫グロブリン重鎖は、鎖間ジスルフィド結合を介して二量体へと会合するため、Fc領域との融合から生じる免疫原は二量体である。

【0108】

宿主種、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギにおける免疫化のための免疫原に融合させるための、非宿主種、例えば、ヒトIg Fc領域由来のFc部分は、アジュバントとして作用する。このアジュバント機能は、FcとpSYKエピトープの両方に対して特異的な抗体を誘発することができる。Fc反応性抗体は、スクリーニングの間に特定され、廃棄されてよい。Fc部分は、野生型配列又はエフェクター機能を変更するように変異させた配列を有してよい。例えば、変異定常領域 (変異型) は、Fc受容体への結合及び/又は補体を固定する能力を最小限にするために、融合タンパク質に組み込まれてよい (例えば、Winterらの特許、GB 2,209,757 B; Morrisonらの特許公開、WO 89/07142; Morganらの特許公開、WO 94/29351を参照されたい)。特定の実施態様において、Fc領域の基準に従って番号を付けられたリジン235及びグリシン237を、例えば、アラニンに変異させる。Fc変異IgGを有する免疫原/融合タンパク質は、宿主におけるFc受容体との相互作用を減少させることができる。

20

30

【0109】

本明細書に記載の抗pSYK抗体分子、例えば、ウサギモノクローナル抗体、又はそのヒト化バージョンが結合し得るpSYK分子からの有用なエピトープ、例えば、参照エピトープは、透過性細胞、膜分画、細胞溶解物及び組織切片内で観察され得る。

【0110】

例えば、抗pSYK抗体分子に対するエピトープは、配列番号2の残基500~550; 配列番号2の残基510~540; 配列番号2の残基515~530からの残基 (複数可) ; 又は本発明の抗pSYK抗体分子に結合するその断片、例えば、そのMIL81-1-8結合断片内に存在するか、又はそれらを含んでよい。そのような断片は、残基525/526及び配列番号2の周囲の残基を含んでよく、リン酸化、例えば、チロシン525の位置でリン酸化され、かつ/又はチロシン526の位置でリン酸化されてよい。いくつかの実施態様において、抗pSYK抗体分子、例えば、MIL81-1-8抗体のエピトープは、SYKアミノ酸配列内の、すなわち、配列番号2の残基約1~635から選択される1個以上の追加のアミノ酸残基をさらに含む立体構造エピトープである。

40

【0111】

そのようなエピトープ又はリン酸化ドメイン、例えば、配列番号2のアミノ酸残基500~550、510~540、515~530もしくは520~529からの残基 (複数可) 又はそれら由来の抗体分子内に存在するか、或いはそれらを含むエピトープに対して作製された抗体は、本明細書に記載されるように、治療用又は診断用抗体として有用であり得る。

【0112】

一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、以下の特性のうちの1以上を有する: a) 該

50

抗pSYK抗体分子は、表1及び表2にまとめられた上記の抗pSYK抗体分子、又はウサギハイブリドーマ抗体（例えば、MIL81-1-8、MIL81-2-1もしくはMIL81-99-1）のうちの1つと結合、例えば、細胞質pSYK又は精製pSYKへの結合について競合する；b) 該抗pSYK抗体分子は、表1及び表2にまとめられた上記の抗pSYK抗体分子、又はウサギハイブリドーマ抗体（例えば、MIL81-1-8、MIL81-2-1もしくはMIL81-99-1）のうちの1つとしてpSYK上の同じ、又は実質的に同じエピトープに結合する。一実施態様において、該抗体は、ペプチドアレイアッセイのうちの1以上によって、又は細胞質調製物又は膜調製物中で発現させた配列番号2の切断変異体、キメラもしくは点変異体への結合によって決定されたとおり、例えば、これらのアッセイが本明細書に記載されたとおりと同じエピトープと結合する；c) 該抗pSYK抗体分子は、表1及び表2にまとめられた上記の抗pSYK抗体分子、又はウサギハイブリドーマ抗体（例えば、MIL81-1-8、MIL81-2-1もしくはMIL81-99-1）のうちの1つのエピトープと共通の少なくとも1、2、3、4、5、8、10、15又は20個の連続アミノ酸残基を有するエピトープに結合する；d) 該抗pSYK抗体分子は、本発明の抗pSYK抗体が結合するヒトpSYKの領域と結合し、その領域、例えば、細胞質領域は、10～15、10～20、20～30、又は20～40残基長であり、結合は、例えば、切断変異体への結合によって決定される。一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、ヒトpSYKのリン酸化ドメインと結合する。一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、配列番号2のアミノ酸残基500～550、510～540、515～530又は520～529によって定義されたヒトpSYK部分と結合し得る。一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、配列番号2のアミノ酸残基525及び/又は526の位置のリン酸化部位と結合する；又はe) 該抗pSYK抗体分子は、本明細書に記載の参照エピトープに結合する。

10

20

【0113】

一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、SYK配列：RADEN-pY-pY-KAQ（チロシン525及び526がリン酸で修飾された配列番号2のアミノ酸520～529）と結合する。

【0114】

いくつかの実施態様において、該抗体分子は、立体配座エピトープと結合する。他の実施態様において、抗体分子は、直線状エピトープと結合する。

【0115】

該抗pSYK抗体分子は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単一特異性抗体、キメラ抗体（米国特許第6,020,153号を参照されたい）又はヒト化抗体又はその抗体断片もしくは誘導体であってよい。前述の任意の合成変異体及び遺伝子操作された変異体（米国特許第6,331,415号を参照されたい）も、本発明によって企図される。モノクローナル抗体は、従来のマウスモノクローナル抗体方法論（例えば、Kohler及びMilsteinの文献の、標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術(the standard somatic cell hybridization technique)、Nature 256:495(1975)；一般に、Harlow,E.及びLane,D.(1988)の文献、抗体：実験マニュアル(Antibodies:Laboratory Manual)、Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, N.Y)、及びそれらの各々が引用によりその全体が本明細書中に組み込まれている、米国特許第7,402,409号、同第7,429,487号、同第7,462,697号、同第7,575,896号、同第7,732,168号、及び同第8,062,867号に記載されているように、融合パートナー細胞株で免疫したウサギから単離したB細胞を融合することによって作製されたウサギ-ウサギハイブリドーマを用いてカスタムウサギモノクローナル抗体（RabMab(登録商標)）を生成する、Epitomics社（Burlingame, CA）によって提供されるウサギモノクローナル抗体技術及びサービスを含む様々な技術によって生成され得る。

30

40

【0116】

タンパク質、例えば、pSYKもしくは可溶性部分、又は免疫原ペプチド、配列番号25などのpSYKの部分を含む融合タンパク質、又はそれからの細胞画分もしくは膜画分、例えば、表面露出pSYK又はその部分を発現する細胞での免疫化は、例えば、アジュバント、例えば、完全フロイントアジュバントとの反応を誘導するような方法で注射用に調製された免疫原を用いて実行されてよい。他の適切なアジュバントには、TITERMAX GOLD（登録商標）アジュバント(CYTRX社、Los Angeles, Calif.)及びミョウバンが含まれる。配列番号25などの小ペプチド免疫原は、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）などのより大きな

50

分子と連結されてよい。マウス又はウサギに、いくつかの部位に、例えば、腹膜 (i.p.)、尾の付け根、もしくはフットパッド、又は部位の組み合わせ、例えば、iPと尾の付け根 (BIP) に、いくつかの方法で、例えば、皮下、静脈内又は筋肉内注入してよい。ブースター注射は、同じ又は異なる免疫原を含むことができ、さらに、アジュバント、例えば、不完全フロイントアジュバントを含むことができる。DNA、例えば、SYKをコードするDNAもしくはその一部又はpSYKもしくはその一部を含む融合タンパク質での免疫化は、遺伝子銃技術を用いて注入され得る。例えば、DNAは、顕微鏡レベルの金粒子上にロードされ、短い期間にわたって頻繁な間隔でマウス又はウサギに注入される。

【0117】

一般に、モノクローナル抗体が望ましい場合、ハイブリドーマは、不死化細胞株 (例えば、SP2/0などの骨髓腫細胞株、P3X63Ag8.653又はヘテロ骨髓腫) からの適切な細胞と抗体産生細胞とを融合することによって生成される。抗体産生細胞は、ヒト、ヒト抗体トランスジェニック動物もしくは興味のある抗原で免疫した他の適切な動物 (例えば、ウサギ) の末梢血又は脾臓又はリンパ節から取得され得る。ヒト由来の抗体 (例えば、ヒト抗体) を産生する細胞は、適切な方法、例えば、ヒト抗体産生細胞とヘテロ骨髓腫もしくはトリオマーの融合、又はエプスタイン・バーウイルスでの感染を介して活性化されたヒトB細胞の不死化を用いて生成され得る (例えば、米国特許第6,197,582号 (Trakht); Niedbalaらの文献、Hybridoma, 17:299-304 (1998); Zaneellaらの文献、J Immunol Methods, 156:205-215 (1992); 及びGustafssonらの文献、Hum Antibodies Hybridomas, 2:26-32 (1991)を参照されたい)。いくつかの実施態様において、融合は、両方の刊行物の内容が引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許第5,675,063号からの融合パートナー細胞株240E-1又は米国特許第7,429,487号からの240E-Wを使用して行われる。

【0118】

融合又は不死化された抗体産生細胞 (ハイブリドーマ) は、選択的培養条件を用いて単離されるか、又は限界希釈によってクローン化されてよい。所望の特異性を有する抗体を産生する細胞は、適切なアッセイ (例えば、ELISA (例えば、マイクロタイターウェル上に固定化された免疫原を用いた) 又はpSYKもしくはその一部を発現する細胞上でのFACSによる) を用いて特定され得る。例えば、pSYK-免疫原が親和性試薬である融合部分を含む場合、この部分は、pSYK又はその一部を含む融合タンパク質が、マトリックス、例えば、プロテインGコーティングされるか、ストレプトアビジンコーティングされるか、グルタチオン誘導体化されるか又は抗体コーティングされたマイクロタイタープレートもしくはアッセイチップに結合するのを可能にすることができ、次いで、それらは免疫血清又はハイブリドーマもしくは抗体を発現する組換え細胞からの馴化培地と組み合わせられ、混合物は複合体形成に貢献する条件下 (例えば、塩及びpHについての生理的条件で) インキュベートされる。インキュベーション後、これらのマイクロタイタープレートウェル又はチップセルは、任意の非結合成分を除去するために洗浄され、抗pSYK抗体による結合が測定される。

【0119】

いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体を特定するためのスクリーニングは、免疫原への結合を測定する。いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体を特定するためのスクリーニングは、pSYKへの結合を測定する。いくつかの実施態様において、該pSYKはGSTタグ付き組換えSYKである。いくつかの実施態様において、該GSTタグ付き組換えSYKは自己リン酸化される。いくつかの実施態様において、該pSYKは、活性化SYKを含む細胞からの溶解物の構成要素である。抗pSYK抗体を特定し、特異性を保証するのに有用な対照試薬は、非刺激細胞、Y525もしくはY526以外の部位でリン酸化されたSYKを含む試料、又はT細胞タンパク質ホスファターゼ (New England Biolabs, Ipswich, MA) で処理された試料などのホスファターゼ処理された試料を用いることを含む。いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体を特定するためのスクリーニングは、自己リン酸化pSYKを含む組成物への結合とホスファターゼ処理したpSYKを含む組成物への結合を比較し、その結合が、ホスファターゼ処理された組成物中において低減又は排除される抗体を選択する。

【0120】

特定の実施態様において、例えば、インビボ又は治療用途について、本発明の抗体はヒト化抗体である。ヒト化抗体の利点は、ヒト化抗体が対象レシピエントにおいて抗体の免疫原性を潜在的に減少又は排除し、それによって、生物学的利用率の増加及び有害な免疫反応の可能性の低減を可能にし、ひいては、複数の抗体投与を潜在的に可能にすることである。

【0121】

ヒト化及びディスプレイテクノロジー及び抗体への修飾

ヒト化抗体分子は、非ヒトmAb又は非ヒト誘導体化mAbに固有の免疫反応及びアレルギー反応を最小限にし、ひいてはヒト対象に投与される抗体の有効性及び安全性を増加させ得る。ヒト化抗体分子の使用は、繰り返しの抗体投与を必要とする、炎症、自己免疫、及び癌などの慢性並びに再発性のヒト疾患の治療において実質的な利点を提供し得る。

【0122】

免疫原性が低下したヒト化抗体の生成は、適切なライブラリーを使用して、ヒト化の技術及びディスプレイ技術と関連させて達成されてよい。マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギなどの非ヒト種からの抗体は、当技術分野で公知の技術を用いてヒト化又は霊長類化され得ることが理解されるであろう。例えば、Winter及びHarrisの文献、*Immunol Today* 14:43-46 (1993)並びにWrightらの文献、*Crit.Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992)を参照されたい。興味のある抗体は、CH1、CH2、CH3、ヒンジドメイン、及び/又はフレームワークドメインを対応するヒト配列で置換するために、組換えDNA技術により操作され得る(WO 92/02190並びに米国特許第5,530,101号、同第5,585,089号、同第5,693,761号、同第5,693,792号、同第5,714,350号、及び同第5,777,085号を参照されたい)。キメラ免疫グロブリン遺伝子の構築のためのIg cDNAの使用も、当技術分野で公知である(Liuらの文献、*Proc Natl Acad Sci USA* 84:3439 (1987)及びJ. *Immunol.* 139:3521 (1987))。mRNAは、ハイブリドーマ又は抗体を産生する他の細胞から単離され、cDNAを生成するために使用される。興味のあるcDNAは、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって増幅され得る(米国特許第4,683,195号及び同第4,683,202号)。

【0123】

代替方法として、ファージディスプレイ技術(例えば、McCaffertyらの文献、*Nature*, 348:552-553 (1990)を参照されたい)が、免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子から、例えば、非免疫化ドナーからのレパートリーからインビトロでヒト抗体又は他の種由来の抗体、並びに抗体断片を生成するために使用されてよい。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、M13又はfdなどの糸状バクテリオファージのメジャー又はマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかにインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として提示される。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含有するので、抗体の機能特性に基づく選択も、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をもたらす。このように、ファージはB細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、多様な形式で実行され得る;それらの概説については、例えば、Johnson及びChiswellの文献、*Current Opinion in Structural Biology*, 3:564-571 (1993)を参照されたい。

【0124】

V遺伝子セグメントのいくつかの供給源が、ファージディスプレイのために使用され得る。Clacksonらの文献、*Nature*, 352:624-628 (1991)は、免疫化マウスの脾臓に由来するV遺伝子の小さなランダムコンビナトリアルライブラリーから多様な抗オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーが構築され得、(自己抗原を含む)多様な抗原に対する抗体は、基本的に、Marksらの文献、*J.Mol.Biol.* 222:581-597(1991)、又はGriffithsらの文献、*EMBO J.*, 12:725-734(1993)によって記載される技術に従って単離され得る。米国特許第5,565,332号及び同第5,573,905号も参照されたい。ディスプレイライブラリーは、人工のアミノ酸配列を含有する抗体又は抗体の抗原結合断片を含有し得る。例えば、該ライブラリーは、人工のCDR(例えば、ランダムアミノ酸配列

）及びヒトフレームワーク領域を含有するFab断片を含有し得る（例えば、米国特許第6,300,064号（Knappikら）を参照されたい）。

【0125】

ヒト定常領域遺伝子の配列は、Kabatらの文献（1991）免疫学的に興味のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、N.I.H.公開番号91-3242、NCBI IgBLASTデータベース又は英国ロンドン大学のバイオインフォマティクスグループによって維持されているAbysis抗体データベースの中で見つけられ得る。ヒトC領域遺伝子は、既知のクローンから容易に入手可能である。アイソタイプの選択は、補体固定、又は抗体依存性細胞傷害性における活性などの所望のエフェクター機能によって導かれる。アイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4であり得る。特定の実施態様において、本発明の抗体分子はIgG1及びIgG2である。特定の実施態様において、本発明の抗体分子はIgG2である。ヒト軽鎖定常領域のκ又はλのいずれかが使用され得る。その後、キメラヒト化抗体を従来の方法によって発現させる。

【0126】

いくつかの実施態様において、本発明の抗pSYK抗体分子は、pSYKを発現する細胞、例えば、腫瘍細胞に抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘導し得る。IgG1及びIgG3のアイソタイプを有する抗体は、Fc受容体に結合する能力のために、抗体依存性細胞障害性能のエフェクター機能を誘発するのに有用である。IgG2及びIgG4のアイソタイプを有する抗体は、Fc受容体に結合する能力が低いので、ADCC応答を最小限にするのに有用である。関連する実施態様において、例えば、改変された真核細胞株の中での成長により、抗pSYK抗体が結合する細胞をFc受容体が認識し、結合し、かつ/又は細胞傷害性を媒介する能力を高めるように、Fc領域の置換又は抗体のグリコシル化組成の変更が行われてもよい（例えば、米国特許第7,317,091号、同第5,624,821号及び、WO 00/42072、Shieldsらの文献、J.Biol.Chem. 276: 6591-6604 (2001)、Lazarらの文献、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 103: 4005-4010 (2006)、Satohらの文献、Expert Opin Biol.Ther.6: 1161-1173 (2006)を含む出版物を参照されたい）。特定の実施態様において、抗体又は抗原結合断片（例えば、ヒト由来の抗体、ヒト抗体）は、機能（例えば、エフェクター機能）を変えるか、又は目的に合わせるアミノ酸の置換もしくは交換を含んでよい。例えば、ヒト由来の定常領域（例えば、γ1定常領域、γ2定常領域）は、補体活性化及び/又はFc受容体結合を減少させるように設計されてよい（例えば、教示全体が引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許第5,648,260号(Winterら)、同第5,624,821号(Winterら)及び同第5,834,597号(Tsoら)を参照されたい）。特定の実施態様において、そのようなアミノ酸の置換又は交換を含有するヒト由来の定常領域のアミノ酸配列は、ヒト由来の未変化の定常領域のアミノ酸配列の全長にわたって少なくとも約95%同一、又はヒト由来の未変化の定常領域のアミノ酸配列の全長にわたって少なくとも約99%同一である。

【0127】

さらに別の実施態様において、エフェクター機能は、抗体のグリコシル化パターンを調節することによって変更されてもよい。変更とは、抗体に見られる1以上の炭水化物部分の欠失、及び/又は抗体に存在しない1以上のグリコシル化部位の付加を意味する。例えば、抗体のFc領域に結合するフコースを欠損する成熟炭水化物構造を有する、ADCC活性が増強された抗体は、米国特許出願公開第2003/0157108（Presta）に記載されている。米国特許出願公開第2004/0093621（協和発酵工業株式会社）も参照されたい。Glycofi社も、抗体の特異的糖形態を産生できる酵母細胞株を開発した。ヒト化抗体は、CDR移植法を用いて行われてもよい。そのようなヒト化抗体の作製技術は、当技術分野で公知である。一般に、ヒト化抗体は、pSYKに結合する抗体の可変重鎖及び可変軽鎖配列をコードする核酸配列を取得し、可変重鎖及び可変軽鎖配列中の相補性決定領域すなわち「CDR」を特定し、ヒトフレームワーク核酸配列上にCDR核酸配列を移植することによって生成される（例えば、米国特許第4,816,567号及び同第5,225,539号を参照されたい）。CDR及びフレームワーク残基の位置が決定され得る（Kabat,E.A.らの文献、(1991)免疫学的に興味のあるタンパク質の配列、第5版、米国保健社会福祉省、NIH公開番号91-3242(Sequences of Protein

s of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)及びChothia,C.らの文献、J.Mol.Biol.196:901-917(1987)を参照されたい)。本明細書に記載の抗pSYK抗体分子は、表5及び表6に列挙したCDRアミノ酸配列及びCDRをコードする核酸配列を有する。いくつかの実施態様において、表5及び6の配列は、本明細書に記載の治療又は診断方法で使用するためのpSYKを認識する分子に組み込まれてよい。選択されるヒトフレームワークは、インビボ投与に適したものであり、それが免疫原性を示さないことを意味する。例えば、そのような決定は、そのような抗体をインビボで使用した以前の経験及びアミノ酸類似性の研究によって行われてよい。適切なフレームワーク領域は、ドナー抗体、例えば、抗pSYK抗体分子の同等部分（例えば、フレームワーク領域）のアミノ酸配列内のフレームワーク領域の長さにわたって少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有するヒト由来の抗体から選択されてよい。アミノ酸配列同一性は、デフォルトパラメータを用いて、CLUSTAL Wなどの適切なアミノ酸配列整列アルゴリズムを用いて決定され得る（Thompson J.D.らの文献、Nucleic Acids Res.22:4673-4680（1994））。

10

【0128】

ヒト化されるクローン抗体のCDR及びFRが特定されると、CDRをコードするアミノ酸配列が特定され、対応する核酸配列は、選択されたヒトFR上に移植される。これは、公知のプライマー及びリンカーを用いて行われ、その選択は当技術分野で公知である。特定のヒト抗体のCDRの全ては、非ヒトCDRの少なくとも一部と交換されてよく、又はCDRの一部のみが非ヒトCDRと交換されてよい。所定の抗原に対するヒト化抗体の結合に必要なCDRの数を置き換えることのみが必要である。CDRが選択されたヒトFR上に移植された後に、生じた「ヒト化」可変重鎖及び可変軽鎖配列を発現させて、pSYKに結合するヒト化Fv又はヒト化抗体を生成する。特定の実施態様において、CDR移植（例えば、ヒト化）抗体は、ドナー抗体と類似の、実質的に同じ、又はドナー抗体よりも優れた親和性でpSYKタンパク質と結合する。典型的には、ヒト化可変重鎖及び軽鎖配列をヒト定常ドメイン配列との融合タンパク質として発現させ、その結果、pSYKに結合するインタクトな抗体が得られる。しかしながら、定常配列を含有しないヒト化Fv抗体が生成され得る。

20

【0129】

また、特定のアミノ酸が、置換、欠失又は付加されたヒト化抗体は、本発明の範囲内である。特に、ヒト化抗体は、抗原への結合を改善するようにフレームワーク領域中のアミノ酸置換を有してよい。例えば、選択された、ヒト化免疫グロブリン鎖の少数のアクセプターフレームワーク残基は、対応するドナーアミノ酸と交換され得る。置換の位置は、CDRに隣接するアミノ酸残基を含むか、又はCDRと相互作用することが可能であるアミノ酸残基を含む（例えば、米国特許第5,585,089号又は同第5,859,205号を参照されたい）。アクセプターフレームワークは、成熟ヒト抗体フレームワーク配列又はコンセンサス配列であり得る。本明細書で使用される場合、用語「コンセンサス配列」は、最も頻繁に観察されるか、又は関連ファミリーメンバー間の領域中の配列の各位置における最も一般的な残基から考案された配列を指す。いくつかのヒト抗体コンセンサス配列が利用可能であり、ヒト可変領域の異なるサブグループのコンセンサス配列を含む（Kabat,E.A.らの文献、免疫学的に興味のあるタンパク質の配列、第5版、米国保健社会福祉省、米国政府印刷局(1991)(Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office)を参照されたい)。Kabatデータベースとその出願は、例えば、メリーランド州ベセスダの米国立バイオテクノロジー情報センターのIgBLASTを介して、オンラインで自由に利用可能である（Johnson,G.及びWu,T.T.,Nucleic Acids Research 29: 205-206（2001）も参照されたい）。

30

40

【0130】

抗体をヒト化するための他の技術は、1992年12月23日に公開されたPadlanらのEP 519596 A1に記載されている。

【0131】

50

該抗pSYK抗体分子は、内容が引用により本明細書中に組み込まれている、PCT公開番号WO 98/52976及びWO 00/34317に開示された方法によって、ヒトT細胞エピトープの特異的な欠失又は「脱免疫化」によっても修飾され得る他のヒト化抗体を含む。簡単に説明すると、抗pSYK抗体のウサギの、又は他の非ヒト種の重鎖及び軽鎖の可変領域は、MHCクラスIIに結合するペプチドについて分析され得る；これらのペプチドは、潜在的なT細胞エピトープを表す。PCT公開番号WO 98/52976及びWO 00/34317に記載されるように、潜在的なT細胞エピトープの検出のために、「ペプチドスレッディング(peptide threading)」と命名されたコンピュータモデリングアプローチが適用され、加えて、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベースは、ウサギVH及びVL配列に存在するモチーフについて検索され得る。これらのモチーフは、18種の主要MHCクラスII DRアロタイプのいずれにも結合し、したがって潜在的なT細胞エピトープを構成する。検出された潜在的なT細胞エピトープは、可変領域内の少数のアミノ酸残基を置換することによって、又は単一アミノ酸置換によって除去され得る。抗pSYK抗体の脱免疫化VH及びVLがウサギVH及びVL遺伝子の変異誘発によって構築された後に、変異誘発された可変配列は、必要に応じて、ヒト定常領域、例えば、ヒトのIgG1、IgG2又はK（カッパ）定常領域に融合されてよい。

【0132】

他の実施態様において、CDR移植抗体による免疫反応の低下は、CDR中のアミノ酸残基の、変更、例えば、欠失、置換によって達成され得る（Kashmiriらの文献、Methods 36:25-34（2005）、米国特許第6,818,749号、Tanらの文献、J.Immunol.169:1119-1125(2006)）。例えば、特定の実施態様において、抗原との接触に關与する位置の残基は変更されない。典型的には、そのような残基、特異性決定残基（SDR）は、抗体間で高レベルの変動性を示す位置にある。例えば、クラスタル法(Higgins D.G.らの文献、Meth.Enzymol.266: 383-402（1996））によって抗pSYK抗体分子、例えば、本明細書に記載の抗体から導出されるコンセンサス配列は、SDRを特定するのに役立つ。本明細書に記載の抗pSYK抗体分子において、該SDRは、以下のもの、少なくとも最初の残基又はいくつかの実施態様において、重鎖CDR1の最初の4残基；少なくともN末端部分、例えば、重鎖CDR2の最初の7、10又は13残基；重鎖CDR3のほぼ全て；C末端部分、例えば、軽鎖CDR1の6、8、又は9残基後；軽鎖CDR2のほぼ最初、中間及び/又は最後の残基；並びに軽鎖CDR3のほとんど、又は少なくとも2もしくは3残基後、である。したがって、抗pSYK抗体分子のヒト化又は修飾後のpSYKタンパク質への結合を維持するために、該抗pSYK抗体分子のCDR中のそのようなSDR残基は、CDR又はフレームワーク領域の他の残基中の残基よりも、例えば、ウサギ残基からヒトコンセンサス残基への変化をあまり受け入れない。逆に、特定の実施態様において、非ヒト、例えば、ウサギのCDR中の残基をヒトCDR、例えば、抗pSYK抗体のCDR内のコンセンサスとして特定された残基に変更することが有益であり得る。

【0133】

インタクトな抗体ではない抗pSYK抗体もまた、本発明において有用である。そのような抗体は、上記抗体のいずれかに由来し得る。この種の有用な抗体分子には、(i) Fab断片、VL、VH、CL及びCHIドメインからなる一価の断片；(ii) F(ab')₂断片、ヒンジ領域でスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価の断片；(iii) VH及びCHIドメインからなるFd断片；(iv) 抗体の単一アームのVH及びVLドメインからなるFv断片；(v) VHドメインからなるdAb断片（Wardらの文献、Nature 341:544-546(1989)）；(vii) VHHドメインからなる単ドメインの機能的重鎖抗体（ナノボディとして知られている）例えば、Cortez-Retamozoらの文献、Cancer Res.64:2853-2857(2004)、及びその中で引用される参考文献を参照されたい；(vii) 単離されたCDR、例えば、抗原結合断片を提供するのに十分なフレームワークと共に1以上の単離されたCDRが含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインのVL及びVHは、別々の遺伝子によってコードされているが、それらは、組換え法を用いて、VL及びVH領域が対になって一価の分子を形成している単一タンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって連結され得る（単鎖Fv（scFv）として知られる；例えば、Birdらの文献、Science 242: 423-426（1988）；及びHustonらの文献、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85: 5879-5883（1988）を参照されたい）。そのような一本鎖抗体

も、抗体の用語「抗原結合断片」内に包含されることが意図される。これらの抗体断片は、当業者に知られる従来の技術を用いて取得され、これらの断片は、インタクトな抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。

【0134】

Fv、F(ab')₂及びFabなどの抗体断片は、例えば、プロテアーゼ又は化学的切断によって、インタクトなタンパク質の切断により調製され得る。

【0135】

特定の実施態様において、1つもしくは両方の重鎖及び軽鎖のCDR配列の一部又は全ては、別の抗体分子に、例えば、CDR移植抗体分子、ヒト化抗体分子、又はキメラ抗体分子に使用されてよい。

【0136】

実施態様は、細胞質pSYKへの結合を可能にするのに十分なCDR、例えば、本明細書に記載のウサギハイブリドーマ抗体のうちの1つ由来の全6つのCDRを含む抗体分子を含む。

【0137】

一実施態様において、該CDR、例えば、HCDRの全て、もしくはLCDRの全て、又は全6つのCDRは、ヒト又はヒト由来のフレームワーク領域（複数可）に埋め込まれている。ヒトフレームワーク領域の例としては、ヒト生殖細胞系フレームワーク配列、親和性成熟した（インビボ又はインビトロのいずれかで）ヒト生殖細胞系配列、又は合成ヒト配列、例えば、コンセンサス配列が挙げられる。一実施態様において、重鎖フレームワークは、IgG1又はIgG2のフレームワークである。一実施態様において、軽鎖フレームワークは、カップ

【0138】

一実施態様において、該抗pSYK抗体分子、例えば、CDR移植抗体分子又はヒト化抗体分子は、pSYKへの結合を可能にするのに十分なCDR、例えば、本明細書に記載の抗体のうちの1つ由来の全6つのCDR、例えば、表5に列挙した配列を含む（表5に列挙されているCDRのアミノ酸配列をコードする例示的核酸配列は、本明細書の表6に提供される）。特定の実施態様において、抗pSYK抗体分子はMIL81-1-8からのCDRを含む。

【0139】

インビボでの治療又は診断に使用するための抗体断片は、その血清半減期を向上させる修正から恩恵を被ることができる。抗体のインビボ血清半減期を増加させることが意図される適切な有機部分は、親水性ポリマー基（例えば、直鎖状又は分岐鎖状のポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、及びモノメトキシポリエチレングリコールなどのポリアルカングリコール）、炭水化物（例えば、デキストラン、セルロース、及び多糖など）、親水性アミノ酸のポリマー（例えば、ポリリジン、及びポリアスパラギン酸塩など）、ポリアルカンオキシド及びポリビニルピロリドン）、脂肪酸基（例えば、モノカルボン酸又はジカルボン酸）、脂肪酸エステル基、脂質基（例えば、ジアシルグリセロール基、スフィンゴ脂質基（例えば、セラミジル(ceramidyl)）又はリン脂質基（例えば、ホスファチジルエタノールアミン基）から選択される1つ、2つもしくはそれ以上の直鎖又は分枝鎖部分を含み得る。

【0140】

特定の実施態様において、有機部分は、非コンジュゲート抗体部分と比較して、生じた免疫複合体の機能を有機部分が損なわない（例えば、抗原結合親和性を低下させない）所定の部位に結合される。有機部分は、約500Da～約50,000Da、約2000、約5000、約10,000又は約20,000Daの分子量を有してよい。ポリペプチド、例えば、抗体を有機部分で修飾するための実施例及び方法は、例えば、米国特許第4,179,337号、同第5,612,460号、PCT公開番号WO 95/06058及びWO 00/26256、並びに米国特許出願公開第20030026805号で見ることができる。

【0141】

抗pSYK抗体分子は、上記のウサギハイブリドーマ抗体のうちの1つの重鎖及び軽鎖の一方又は両方の可変領域の全て、又はその抗原結合断片を含み得る。

【0142】

一実施態様において、(a)の軽鎖のアミノ酸配列は、1、2、3、4、5、10、又は15個もの数の残基が(a)(i~ii)で言及される参照アミノ酸配列(複数可)のうちの1つと異なってよい。特定の実施態様において、相違は保存的置換である。特定の実施態様において、相違はフレームワーク領域にある。一実施態様において、(b)の重鎖アミノ酸配列は、1、2、3、4、5、10、又は15個もの数の残基が(b)(i~ii)で言及される参照アミノ酸配列(複数可)のうちの1つと異なってよい。特定の実施態様において、相違は保存的置換である。特定の実施態様において、相違はフレームワーク領域にある。

【0143】

一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、(a)(i)表3の軽鎖可変領域アミノ酸配列、例えば、配列番号10、もしくは(ii)表4のヌクレオチド配列によりコードされる軽鎖可変領域アミノ酸、例えば、配列番号9の全ての、又はそれらのいずれかの抗原結合断片の軽鎖アミノ酸配列;及び(b)(i)表3の重鎖可変領域アミノ酸配列、例えば、配列番号8、もしくは(ii)表4のヌクレオチド配列によりコードされる重鎖アミノ酸配列、例えば、配列番号7の全ての、又はそれらのいずれかの抗原結合断片の重鎖アミノ酸配列のうちの一方又は両方を含む。

【0144】

一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、a)本発明の抗pSYK抗体分子の軽鎖可変領域と少なくとも85、90、95、97又は99%の相同性を有する軽鎖可変領域、又はその抗原結合断片;及び(b)本発明の抗pSYK抗体分子の重鎖可変領域と少なくとも85、90、95、97又は99%の相同性を有する重鎖可変領域、又はその抗原結合断片のうちの一方又は両方を含む。

【0145】

本発明の抗pSYK抗体の可変領域のアミノ酸配列は、表3の中に見ることができる。

【0146】

1つのアプローチでは、重鎖及び軽鎖のJ領域をコードするコンセンサス配列を用いて、ヒトC領域セグメントへのV領域セグメントのその後の連結のために、J領域に有用な制限部位を導入するためのプライマーとして使用するのためのオリゴヌクレオチドを設計してよい。C領域cDNAは、ヒト配列における類似の位置に制限部位を配置するために部位特異的変異誘発により修飾してよい。

【0147】

発現ベクターは、プラスミド、レトロウイルス、コスミド、YAC、及びEBV由来のエピソームなどを含む。都合の良いベクターは、任意のVH又はVL配列が容易に挿入されて、発現できるように遺伝子操作された適切な制限部位を有する、機能的に完全なヒトCH又はCL免疫グロブリン配列をコードするものである。そのようなベクターにおいて、スプライシングは、通常、挿入されたJ領域中のスプライスドナー部位とヒトC領域に先行するスプライスアクセプター部位との間、またヒトCHエキソン内で起こるスプライス領域で起こる。適切な発現ベクターは、いくつかの構成要素、例えば、複製開始点、選択マーカー遺伝子、転写制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター)などの1以上の発現制御エレメント及び/又は1以上の翻訳シグナル、シグナル配列もしくはリーダー配列などを含有してよい。ポリアデニル化及び転写終結は、コード領域の下流の天然染色体部位で起こる。生じたキメラ抗体は、任意の強力なプロモーターと連結されてよい。使用され得る適切なベクターの例としては、哺乳動物宿主に適しているもの、並びにシミアンウイルス40(SV40)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、アデノウイルス2、ウシパピローマウイルス(BPV)、パポウイルスBK変異体(BKV)、又はマウス及びヒトのサイトメガロウイルス(CMV)、並びにモロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)、天然のIgプロモーターなどのウイルス複製システムに基づくものが挙げられる。単一コピー又は複数コピーで維持されるか、又は例えば、LTRを介して、もしくは複数の組込み部位を有する遺伝子操作された人工染色体を介して、宿主細胞の染色体に組み込まれるベクターを含む様々な適切なベクターが、当技術分野で公知である(Lindenbaumらの文献、Nucleic Acids Res.3

10

20

30

40

50

2:el72 (2004)、Kennardらの文献、Biotechnol.Bioeng.Online May 20,2009)。適切なベクターのさらなる例は、後のセクションに列挙されている。

【0148】

したがって、本発明は、抗体をコードする核酸、抗体の抗原結合断片（例えば、ヒト化抗体、キメラ抗体、もしくは前述のいずれかの抗原結合断片）、抗体鎖（例えば、重鎖、軽鎖）又はpSYKタンパク質と結合する抗体鎖の抗原結合部分を含む発現ベクターを提供する。

【0149】

真核宿主細胞での発現は、そのような細胞が適切に折り畳まれ、免疫学的に活性のある抗体を構築及び分泌する可能性が原核細胞よりも高いので、有用である。しかしながら、不適切な折り畳みによって不活性な任意の生成抗体は、既知の方法に従って再生可能であり得る(Kim及びBaldwinの文献、「小タンパク質の折り畳み反応における特異的中間体及びタンパク質の折り畳みのメカニズム(Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding)」、Ann.Rev.Biochem. 51,pp. 459-89 (1982))。宿主細胞は、本発明による抗体相同体でもある軽鎖二量体又は重鎖二量体などのインタクトな抗体の部分を生産することが可能である。

【0150】

さらに、本明細書の他の箇所に記載されるとおり、抗体又はヒトもしくは非ヒト種からの抗体は、限定されないが、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイを含むディスプレイタイプの技術、及び他の技術を介して、当技術分野で周知の技術を用いて作製されてよく、生じた分子は親和性成熟などの追加の成熟に供されてよく、そのような技術は当技術分野で公知である。Winter及びHarrisの文献、Immunol Today 14:43-46 (1993)及びWrightらの文献、Crit. Reviews in Immunol.12125-168 (1992)、Hanes及びPluchthauの文献、PNAS USA 94:4937-4942 (1997)(リボソームディスプレイ)、Parmley及びSmithの文献、Gene 73:305-318 (1988)(ファージディスプレイ)、Scottの文献、TIBS 17:241-245 (1992)、Cwirlaらの文献、Proc Natl Acad Sci USA 87:6378-6382 (1990)、Russelらの文献、Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993)、Hoganboomらの文献、Immunol.Reviews 130:43-68 (1992)、Chiswell及びMcCaffertyの文献、TIBTECH 10:80-84 (1992)、並びに米国特許第5,733,743号。ディスプレイ技術がヒトではない抗体を生産するために利用される場合は、そのような抗体は、上記のようにヒト化されてよい。

【0151】

作製される抗体は、最初に、特定の所望のアイソタイプを有する必要はないが、むしろ、作製される抗体は任意のアイソタイプを有し、依然としてpSYK分子への所望の結合を有し得ることは理解されたい。例えば、MIL81-1-8ウサギハイブリドーマによって産生される抗体は、ウサギIgGアイソタイプを有する。抗体のアイソタイプは、その後、当技術分野で公知の従来の技術を用いて、例えば、ヒトのIgG1、IgG2、又はIgG3に切り替えられてよい。そのような技術は、とりわけ、直接組換え技術（例えば、米国特許第4,816,397号を参照されたい）、細胞間融合技術（例えば、米国特許第5,916,771号を参照されたい）の使用を含む。細胞間融合技術では、任意の所望のアイソタイプを有する重鎖を有する骨髓腫又は他の細胞株が調製され、軽鎖を有する別の骨髓腫又は他の細胞株が調製される。そのような細胞は、その後、融合されてよく、インタクトな抗体を発現する細胞株が単離されてよい。

【0152】

したがって、上述したように、所望の「構造」特質を満たす抗体候補が作製されるので、それらは、一般に、アイソタイプスイッチを介して、望まれる少なくとも特定の追加の「機能的」特質が提供され得る。

【0153】

一実施態様において、可変領域又はその抗原結合断片は、作製に用いた定常領域以外の定常領域（もしくはその断片）、例えば、別の抗体からの定常領域（もしくはその断片）

、又は合成の定常領域（もしくはその断片）に結合され得る。特定の実施態様において、定常領域は、IgG1又はIgG2の定常領域（もしくはその断片）である。配列変更は、抗体分子のエフェクター活性を変えるために、可変領域又は定常領域で行われ得る。

【0154】

他のpSYK結合剤の設計及び作製

生成され、pSYKに関して本明細書で特徴付けられる抗体は、他の抗体、他のアンタゴニスト、もしくは抗体以外の化学的部分を含む他の治療又は診断モダリティーの設計を提供する。そのようなモダリティーには、限定されないが、類似の結合活性又は機能を有する抗体、二重特異性抗体、免疫複合体、及び放射性標識剤などの高度な抗体治療薬並びに診断薬が含まれ、ペプチド剤、特に、細胞内抗体、及び小分子の作製が含まれる。さらに、上述したように、本発明の抗体のエフェクター機能は、治療用又はイメージング用などの様々なインビボ使用のために、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA1、IgA2、IgE、又はIgMへのアイソタイプスイッチングによって変更されてよい。

【0155】

二重特異性抗体に関連して、(i) 2つの抗体、pSYKに特異性を有するものと、共にコンジュゲートされる第2の分子に特異性を有する別のもの、(ii) pSYKに特異的な1つの鎖及び第2の分子に特異的な第2の鎖を有する単一抗体、又は(iii) pSYK及び他の分子に特異性を有する一本鎖抗体を含む二重特異性抗体が作製され得る。そのような二重特異性抗体は、公知の技術を用いて作製され得る。例えば、二重特異性抗体は、（同じ種類の又は異なる種類の）2以上の抗体を架橋することによって生成され得る。適切な架橋剤には、適切なスペーサー（例えば、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）で分離された2つの別個の反応基を有するヘテロ二機能性のもの又はホモ二機能性のもの（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）が含まれる。そのようなリンカーは、Pierce Chemical Company, Rockford, Illから入手可能である。例えば、Fangerらの文献、Immunomethods 4: 72-81 (1994) 並びにWinter及びHarrisの文献、Immunol Today 14:43-46 (1993) 並びにWrightらの文献、Crit.Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992)を参照されたく、かつ(iii)に関連して、例えば、Trauneckerらの文献、Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992)、Songsivilai及びLachmannの文献、Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990)、Kostelnyらの文献、J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)を参照されたい。

【0156】

加えて、「カッパボディ(Kappabodies)」(Illらの文献、「重鎖及び軽鎖可変領域の両方の特性を有するハイブリッド免疫グロブリンドメインの設計及び構築(Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions)」Protein Eng 10:949-57 (1997))、「ミニボディ(Minibodies)」(Martinらの文献、EMBO J. 13:5303-9 (1994)、米国特許第5,837,821号)、「ダイアボディ(Diabodies)」(Holligerらの文献、Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-6448 (1993))、又は「ジャヌシン(Janusins)」(Trauneckerらの文献、EMBO J. 10:3655-3659 (1991) 及びTrauneckerらの文献、Int J Cancer Suppl 7:51-52 (1992))も調製され得る。

【0157】

核酸及びポリペプチド

別の実施態様において、本発明は、本明細書に記載の抗体分子をコードするか、又は表すポリヌクレオチド及びポリペプチド配列に関する。このようなポリヌクレオチドは、重鎖及び軽鎖の各々の可変領域並びに定常領域の両方をコードするが、他の組み合わせも、本明細書に記載の組成物に応じて、本発明によって企図される。本発明はまた、これらのポリヌクレオチドに相補的な開示されたポリヌクレオチド及び核酸配列に由来するオリゴヌクレオチド断片を企図する。

【0158】

該ポリヌクレオチドは、RNA又はDNAの形態であり得る。DNA、cDNA、ゲノムDNA、核酸類似体及び合成DNAの形態のポリヌクレオチドは、本発明の範囲内である。DNAは、二本鎖又は一本鎖であってもよく、一本鎖の場合は、コード（センス）鎖又は非コード（アンチセ

10

20

30

40

50

ンス)鎖であってよい。該ポリペプチドをコードするコード配列は、本明細書に提供されるコード配列と同一であってもよく、又は遺伝暗号の重複性又は縮重の結果として、コード配列は、本明細書に提供されるDNAと同じポリペプチドをコードする異なるコード配列であってよい。

【0159】

提供される特定の実施態様において、ポリヌクレオチドは、例えば、表4にまとめたとおり、本発明の少なくとも1つの重鎖可変領域及び少なくとも1つの軽鎖可変領域をコードする。

【0160】

本発明はまた、ポリヌクレオチドの欠失、置換又は付加などの修飾を含有する変異体ポリヌクレオチド、及び変異体ポリヌクレオチド配列に起因する任意のポリペプチド修飾を含む。本発明のポリヌクレオチドはまた、本明細書に提供されるコード配列の変異体であるコード配列を有し得る。例えば、変異体ポリヌクレオチドは、表4に列挙されているポリヌクレオチドと少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は97%の同一性を有してよい。特定の実施態様において、変異体ポリヌクレオチドは、抗pSYK抗体分子をコードする。

【0161】

本発明はさらに、本発明の抗体、並びにそのようなポリペプチドの断片、類似体及び誘導体を表すポリペプチドに関する。本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然に生成されたポリペプチド又は合成ポリペプチドであってよい。本発明のポリペプチドの断片、誘導体又は類似体は、1以上のアミノ酸残基が保存アミノ酸残基又は非保存アミノ酸残基と置換されており、かつそのような置換アミノ酸残基が遺伝暗号によりコードされていても、されていなくてもよいものであり得る;又は、1以上のアミノ酸残基が置換基を含むものであり得る;又は該ポリペプチドが該ポリペプチド(例えば、ポリエチレングリコール)の半減期を増加させる化合物などの別の化合物と融合しているものであり得る;又は、追加のアミノ酸が、リーダーもしくは分泌配列、又はポリペプチドもしくはプロタンパク質配列の精製に用いられる配列などの、該ポリペプチドに融合されたものであり得る。そのような断片、誘導体及び類似体は、本発明の範囲内である。様々な態様において、本発明のポリペプチドは、部分的に精製された、又は精製された生成物であり得る。

【0162】

本発明のポリペプチドは、例えば、表2又は表3にまとめられた、本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列、又は1以上のアミノ酸置換による小さな差異により異なるアミノ酸配列を有することができる。該差異は、置換アミノ酸が、類似の構造的又は化学的性質を有する、典型的には約1~5個の範囲のアミノ酸における「保存的变化」、例えば、ロイシンとイソロイシンの交換もしくはトレオニンとセリンの交換;リジンとアルギニン又はヒスチジンの交換であり得る。対照的に、差異は、非保存的变化、例えば、グリシンとトリプトファンの交換を含み得る。類似の小さな差異は、アミノ酸の欠失もしくは挿入又はその両方を含み得る。

【0163】

生物学的又は免疫学的活性を変更することなく、どのアミノ酸残基が置換、挿入、又は欠失され得るかの決定、かつどのくらい多くのアミノ酸残基が、置換、挿入、又は欠失され得るかの決定におけるガイダンスは、当技術分野で公知のコンピュータープログラム、例えば、DNASTARソフトウェア(DNASTAR社、Madison, Wis.)を用いて見つけられ得る。

【0164】

別の態様において、本発明は、抗pSYK抗体分子をコードする単離核酸及び/又は組換え核酸を特徴とする。特定の実施態様において、該核酸は、本明細書に記載の抗体分子、抗体分子の重鎖、軽鎖、軽鎖可変領域、重鎖可変領域、重鎖及び軽鎖の一部(例えば、全長の重鎖可変領域と対になった場合には、抗原結合である軽鎖可変領域断片、又は全長の軽鎖可変領域と対になった場合には、抗原結合である重鎖可変領域断片)、並びにCDRのうちの1以上をコードする。実施態様は、ベクター、例えば、発現ベクター内に配置される

そのような核酸を含む。さらに、本発明は、例えば、そのようなプラスミドによってコードされる抗体分子を発現する宿主細胞によって生成される抗体分子を包含する。

【0165】

一実施態様において、軽鎖可変領域、例えば、表3に記載の軽鎖可変領域をコードする配列、例えば、表4に列挙された配列、その抗原結合断片、又は本明細書に記載の軽鎖の1つ、2つもしくは3つのCDR（及び必要に応じて、フレームワーク領域）、例えば、表5に記載のCDR、例えば、表6のCDRをコードする配列；並びに重鎖可変領域、例えば、表3に記載の重鎖可変領域をコードする配列、例えば、表4に列挙された配列、その抗原結合断片、又は本明細書に記載の重鎖の1つ、2つ、もしくは3つのCDR（及び必要に応じてフレームワーク領域）、例えば、表5に記載のCDR、例えば、表6のCDRをコードする配列、のうちの1つ又は両方を含むベクター、例えば、発現ベクターが提供される。

10

【0166】

提供される特定の実施態様において、ポリヌクレオチドは、本発明の抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域又は少なくとも1つの軽鎖可変領域をコードする。本明細書に提供される特定の実施態様において、ポリヌクレオチドは、本発明の抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域及び1つの軽鎖可変領域をコードしてよい。一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、（a）選択されるストリンジェンシー条件下で、（i）本明細書、例えば、表4に記載の抗pSYK抗体分子をコードする核酸配列の補体、又は（ii）本発明の抗pSYK抗体分子の軽鎖をコードする任意の核酸配列、例えば、表1及び表2にまとめられた上記のウサギ抗体のうちの1つとハイブリダイズする核酸によってコードされる軽鎖可変領域、又はその抗原結合断片；並びに（b）選択されるストリンジェンシー条件下で、（i）本明細書、例えば、表4に記載の抗pSYK抗体分子をコードする核酸配列の補体、又は（ii）本発明の抗pSYK抗体分子の重鎖をコードする任意の核酸配列、例えば、表1及び表2にまとめられた上記のウサギ抗体のうちの1つとハイブリダイズする核酸によってコードされる重鎖可変領域、又はその抗原結合断片、のうちの1つ又は両方を含む。

20

【0167】

一実施態様において、選択されるストリンジェンシー条件は、例えば、それらの条件が本明細書に記載されるとおり、高いストリンジェンシー又は非常に高いストリンジェンシー条件である。

【0168】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターで遺伝子操作された宿主細胞及び組換え技術による本発明の抗体の生成を提供する。適切なDNA配列は、様々な手順によってベクターに挿入されてよい。一般に、DNA配列は、当技術分野で公知の手順により適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。発現ベクター中のポリヌクレオチド配列は、mRNA合成を管理する適切な発現制御配列（すなわち、プロモーター）に作動可能に連結される。そのようなプロモーターの例としては、ラウス肉腫ウイルスLTR又は初期もしくは後期SV40プロモーター、大腸菌(E.coli) lacもしくはtrp、ファージラムダPLプロモーター及び原核細胞（例えば、大腸菌用のtac、T3、T7プロモーター）もしくは真核細胞（例えば、サイトメガロウイルスプロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、EF-1aプロモーター）又はそれらのウイルス内での遺伝子発現を制御することが知られている他のプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。発現ベクターはまた、翻訳開始及び転写終結のためのリボソーム結合部位を含有する。該ベクターはまた、発現を増幅するための適切な配列を含んでよい。例えば、該ベクターは、SV40などのシミアンウイルス、ポリオーマウイルス、サイトメガロウイルス、ウシパピローマウイルスもしくはモロニー肉腫ウイルス由来のものなどのウイルス起源、又はゲノム起源の転写刺激DNA配列であるエンハンサーを含有してよい。該ベクターはまた、複製開始点を含んでよい。該ベクターは、外来性の複製開始点を含有するように構築されてよく、そのような複製開始点は、SV40もしくは別のウイルス供給源由来であり得るか、又は宿主細胞の染色体複製機構によるものであり得る。

40

【0169】

50

加えて、該ベクターは、必要に応じて、様々な宿主におけるメトトレキサートによる選択を可能にするジヒドロ葉酸レダクターゼマーカー遺伝子などのトランスフェクトされた宿主細胞の選択用のマーカー遺伝子、又は原核細胞で使用される β -ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性）、Tet遺伝子（テトラサイクリン耐性用）、又はネオマイシン、GA418（ジェネティシン、ネオマイシン誘導体）gpt（ミコフェノール酸）、アンピシリン、もしくはハイグロマイシン耐性遺伝子などの抗生物質、又はチミジンキナーゼ、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼなどの非存在などの、宿主細胞の遺伝子損傷を補完する遺伝子を含む。宿主の栄養要求性マーカーの遺伝子産物をコードする遺伝子（例えば、LEU2、URA3、HIS3）は、しばしば酵母で選択マーカーとして使用される。

10

【0170】

本発明の抗体を取得するために、本発明の抗体の軽鎖及び重鎖可変領域並びに軽鎖及び重鎖定常領域をコードする1以上のポリヌクレオチド配列は、ベクターに組み込まれるべきである。本発明の抗体の軽鎖及び重鎖をコードするポリヌクレオチド配列は、1種又は複数種のベクターに組み込まれ、次いで、宿主細胞に組み込まれ得る。

【0171】

哺乳動物細胞内での発現に適する発現ベクターには、例えば、pCDM8、pcDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、pEF-1(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.)、pCMV-SCRIPT、pFB、pSG5、pXT1(Stratagene, La Jolla, Calif.)、pCDEF3(Goldman, L.A.らの文献、Biotechniques, 21: 1013-1015 (1996))、pSVSPORT (GIBCO division of Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.)、pEF-Bos(Mizushima, S.らの文献、Nucleic Acids Res., 18:5322 (1990))、Bicistronic GPX(登録商標)Retrovector (Gala Biotech, Middleton, Wis.)、pTT5(National Research Council, Ottawa, ON, Canada; 米国特許出願公開第20050170450号又は同第20100261275号)などが含まれる。

20

【0172】

原核細胞（大腸菌）、昆虫細胞（ショウジョウバエシュナイダー(*Drosophila Schnieider*)S2細胞、Sf9細胞）及び酵母（*P.メタノリカ*(*P.methanolica*)、*P.パストリス*(*P. pastoris*)、出芽酵母(*S.cerevisiae*))などの様々な発現宿主での使用に適する発現ベクターも利用できる。典型的なベクターは、pLTK58（野生型IgG1のFc配列）及びpLTK59（変異したIgG1のFc配列）である（米国特許出願公開第20060147445号を参照されたい）。

30

【0173】

理解されたとおり、本発明による抗体は、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株で発現させてよい。特定の抗体のためのcDNA又はゲノムクローンをコードする配列は、適切な哺乳動物又は非哺乳動物宿主細胞のために使用してよい。形質転換は、例えば、ウイルスに（又はウイルスベクター中に）ポリヌクレオチドをパッケージングすること及びウイルス（又はベクター）で宿主細胞を形質導入することを含む、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の公知の方法によるものか、又は異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための当技術分野で公知のトランスフェクション手順、例えば、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リボソームへのポリヌクレオチド(複数可)のカプセル化及びDNA分子の直接マイクロインジェクションによるものであり得る。使用される形質転換手順は、形質転換される宿主に依存する。哺乳動物細胞への異種ポリヌクレオチドの導入方法は、当技術分野で公知であり、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、微粒子銃、リボソームへのポリヌクレオチド(複数可)のカプセル化、ペプチド複合体、デンドリマー、及び核へのDNAの直接マイクロインジェクションを含むが、これらに限定されない。

40

【0174】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載の核酸を含む宿主細胞を特徴とする。特定の実施態様において、該細胞は、本明細書に記載の抗体分子、又はその構成要素を発現

50

する。さらなる実施態様は、抗体分子、例えば、本明細書に記載の抗pSYK抗体分子、例えば、ウサギ抗体分子、又はそのヒト化バージョンを生成する方法であって、発現に適する条件下で宿主細胞を維持することを含み、それにより免疫グロブリン鎖（複数可）が発現し、抗体分子が生成される、前記方法を提供する。さらなる実施態様は、重鎖及び軽鎖抗体配列をコードする、上記の発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。宿主細胞は真核細胞、例えば、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、又は原核細胞、例えば、大腸菌であってよい。例えば、哺乳動物細胞は、培養細胞又は細胞株であってよい。典型的な哺乳動物細胞には、リンパ球細胞株（例えば、NSO）、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、COS細胞が含まれる。特定の実施態様において、培養された宿主細胞は、MIL81-1-8抗体分子をコードする核酸配列を含むCHO細胞である。別の実施態様において、該宿主細胞はハイブリドーマMIL81-1-8である。

10

【0175】

さらに、細胞には、卵母細胞、及びトランスジェニック動物からの細胞、例えば、乳腺上皮細胞が含まれる。例えば、本明細書に記載の抗体分子をコードする核酸は、トランスジェニック非ヒト動物において発現され得る。

【0176】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当技術分野で公知であり、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、NSO細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、ヒト胚腎臓（HEK）293細胞（例えば、293-6E細胞、例えば、米国特許第8,551,774号を参照されたい）及びいくつかの他の細胞株を含むが、これらに限定されない、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)）から入手可能な多くの不死化細胞株を含む。細菌、酵母、昆虫、及び植物を含むが、これらに限定されない非哺乳動物細胞も、組換え抗体を発現させるために使用され得る。グリコシル化を排除するための抗体CH2ドメインの部位特異的変異誘発は、非ヒトグリコシル化に起因する免疫原性、薬物動態、及び/又はエフェクター機能のいずれかの変化を防止するために使用され得る。発現方法は、どのシステムが最も高い発現レベルをもたらし、構成的pSYK結合特性を有する抗体を生成するかを決定することによって選択される。

20

【0177】

さらなる実施態様は、抗pSYK抗体分子、例えば、ウサギ抗体分子又はそのヒト化バージョンを生成する方法であって、免疫グロブリンの発現に適する条件下で、本明細書に記載の核酸、例えば、表4又は表6に列挙された1以上の核酸配列を含む宿主細胞を維持することを含み、それによって、免疫グロブリン鎖が発現され、かつpSYKと結合する抗体分子、例えば、ウサギ抗体分子、もしくはそのヒト化バージョン、又はその断片もしくは変異体が生成される、前記方法を提供する。例えば、抗体分子の発現方法は、抗体分子、例えば、ウサギ抗体軽鎖又はそのヒト化バージョンをコードする第1の組換え核酸分子、及び抗体分子、例えば、ウサギ抗体の重鎖又はそのヒト化バージョンをコードする第2の組換え核酸分子が単一の発現ベクターに含まれる宿主細胞の使用を含む。他の実施態様において、それらは別々のベクター内にある。本方法はさらに、所望であれば、抗体、抗体の抗原結合断片、抗体鎖もしくは抗体鎖の抗原結合断片を単離又は回収する工程を含んでよい。

30

40

【0178】

例えば、pSYKタンパク質と結合するウサギ（又はヒト化）抗体の重鎖及び軽鎖をコードする核酸分子（すなわち、1以上の核酸分子）、又はそのような核酸分子（複数可）を含む発現構築物（すなわち、1以上の構築物）は、核酸分子（複数可）が、1以上の発現制御エレメント（例えば、ベクター中の、細胞内での処理によって作製された構築物中の、宿主細胞ゲノムに組み込まれた）に作動可能に連結されるように、選択された宿主細胞に適する任意の方法（例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、感染）を用いて組換え宿主細胞を作製するのに適する宿主細胞に導入されてよい。生じた組換え宿主細胞は、発現に適する条件下で（例えば、インデューサーの存在下で、適切な非ヒト動物において、適切な塩、増殖因子、抗生物質、栄養補給剤などを補充した適切な

50

培地中で)維持することができ、それによってコードされるポリペプチド(複数可)が生成される。所望であれば、コードされたタンパク質は、単離又は回収してよい(例えば、動物、宿主細胞、培地、ミルクから)。このプロセスは、トランスジェニック非ヒト動物の宿主細胞(例えば、WO 92/03918号、GenPharm Internationalを参照されたい)又は植物における発現を包含する。

【0179】

さらに、産生細胞株からの本発明の抗体(又はそこからの他の部分)の発現は、いくつかの既知の技術を用いて増強され得る。例えば、グルタミン合成酵素及びDHFR遺伝子発現系は、特定の条件下で発現を増強するための一般的なアプローチである。高発現細胞クローンは、限界希釈クローニング、マイクロドロップ技術、又は当技術分野で公知の任意の他の方法などの従来の技術を用いて特定され得る。GSシステムは、欧州特許第0 216 846号、同第0 256 055号、及び同第0 323 997号並びに欧州特許出願第89303964.4号に関連して、全体又は部分的に議論されている。

【0180】

本発明の改変抗体、又はその抗原結合部分の組換え発現用の例示的なシステムでは、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターは、リン酸カルシウムによって媒介されるトランスフェクションによってdhfr-CHO細胞に導入される。該組換え発現ベクター内で、抗体重鎖及び抗体軽鎖の遺伝子は各々、遺伝子の高レベルの転写を促進するために、エンハンサー/プロモーター調節エレメント(例えば、CMVエンハンサー/AdMLPプロモーター調節エレメント又はSV40エンハンサー/AdMLPプロモーター調節エレメントなどの、SV40、CMV、及びアデノウイルスなどに由来する)に作動可能に連結される。該組換え発現ベクターはまた、メトトレキサート選択/増幅を用いて該ベクターでトランスフェクトされたCHO細胞の選択を可能にするDHFR遺伝子を担持する。選択された形質転換宿主細胞は、抗体重鎖及び軽鎖の発現を可能にするために培養され、インタクトな抗体が培地から回収される。標準的な分子生物学的技術は、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養して、培地から抗体を回収するために使用される。

【0181】

本発明の抗体はまた、興味の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖配列についてトランスジェニックである哺乳動物又は植物の作製並びにそれらからの回収可能な形態での抗体の生成を介して遺伝子導入で生成されてよい。哺乳動物におけるトランスジェニック生成に関連して、抗体は、ヤギ、ウシ、又は他の哺乳動物内で生成され、それらのミルクから回収され得る。例えば、米国特許第5,827,690号、同第5,756,687号、同第5,750,172号、及び同第5,741,957号を参照されたい。

【0182】

本明細書に記載の抗体、その抗原結合断片、抗体鎖及び抗原結合部分はまた、化学合成によって、又は任意の他の適切な方法によって、適切なインビトロ発現系で生成されてよい。

【0183】

融合タンパク質及び免疫複合体

本明細書に記載の抗pSYK抗体は、任意の適切な方法(例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合又はその他)によって1以上の非抗体分子実体に機能的に連結されてよい。

【0184】

本明細書に記載の抗pSYK抗体分子及び非抗体部分が単一の連続ポリペプチド鎖の構成要素である融合タンパク質が作製され得る。非抗体部分は、抗体部分に関して、N末端、C末端、又は内部に配置されてよい。例えば、いくつかの実施態様は、pETベクター(例えば、pET-15b、Novagen)、ファージベクター(例えば、pCNATAB 5 E、Pharmacia)、又は他のベクター(例えば、pRIT2TプロテインA融合ベクター、Pharmacia)などの適切な発現ベクターに免疫グロブリン配列をコードする核酸を挿入することによって生成されてよい。

生じた構築物は、非抗体部分（例えば、ヒスチジンタグ、Eタグ、プロテインAのIgG結合ドメイン）を含む抗体鎖を生成するために発現させてよい。融合タンパク質は、適当なアフィニティマトリックスを用いたクロマトグラフィーなどの任意の適切な技術を用いて単離又は回収され得る（例えば、分子生物学の最新プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)(Ausubel, F.M. (編)らの文献、第2巻、補遺26、pp.16.4.1-16.7.8 (1991)を参照されたい)。

【0185】

本発明は、特定の実施態様において、細胞、例えば、透過性細胞を指向し、それに内在化される抗pSYK抗体分子を提供する。抗pSYK抗体分子は、標的が発現されない細胞ではなく、pSYKを発現する細胞へ又はその中に、治療薬剤又は検出可能な薬剤を送達することが可能である。したがって、本発明はまた、治療薬剤又は検出可能な薬剤にコンジュゲートされる、本明細書に記載の抗pSYK抗体分子を含む抗pSYKの免疫複合体を提供する。特定の実施態様において、抗pSYK免疫複合体のpSYKに対する親和性は、非コンジュゲート抗体の親和性の少なくとも10、25、50、75、80、90、又は95%である。これは、細胞質pSYK又は単離pSYKを用いて決定され得る。一実施態様において、該抗pSYK抗体分子、例えば、免疫複合体は、本明細書に記載のアッセイによって決定されるように、1000、500、250、100、又は50pM未満のLD50を有する。

【0186】

該抗pSYK抗体分子は、当技術分野で公知の技術を利用して免疫複合体として作用するように修飾されてよい。例えば、Vitetta Immunol Today 14:252 (1993)を参照されたい。米国特許第5,194,594号も参照されたい。放射性標識抗体の調製も、当技術分野で公知の技術を利用して容易に調製され得る。例えば、Junghansらの文献、癌化学療法及び生物療法(Cancer Chemotherapy and Biotherapy)655-686(第2版、Chafner及びLongo(編)、Lippincott Raven(1996))を参照されたい。米国特許第4,681,581号、同第4,735,210号、同第5,101,827号、同第5,102,990号(米国再特許第35,500号)、同第5,648,471号、及び同第5,697,902号を参照されたい。

【0187】

抗pSYK抗体配列

ウサギモノクローナル抗pSYK抗体を、実施例でより詳細に議論されるように作製した。簡単に説明すると、ウサギモノクローナル抗体MIL81-1-8、MIL81-2-1及びMIL81-99-1を、ウサギの従来免疫技術によって作製した。真のウサギ-ウサギハイブリドーマは、Epitomics社(Burlingame, CA)で、免疫ウサギから単離したB細胞とEpitomics社の融合パートナー細胞株を融合させることによって作製された(米国特許第7,429,487号を参照されたい)。pSYKに対する抗体の特異性は、ELISA、ウェスタンブロット、免疫蛍光、AlphaLISA、免疫細胞化学及び免疫組織化学を含むいくつかの方法によって試験した。

【0188】

下記の表1に、ヒトSYKのTyr525/526の周囲の残基に相当する合成リン酸化ペプチドを含む免疫原を使用して作製し、pSYKを含むスクリーニングから選択したウサギモノクローナル抗pSYK抗体MIL81-1-8の配列をまとめる。

【0189】

軽鎖及び重鎖可変領域の配列を決定した。下記の表2は、いくつかの抗体の可変領域についての配列番号のまとめである。ウサギ抗pSYK抗体の重鎖及び軽鎖の各々の可変領域のアミノ酸配列並びに核酸配列を、それぞれ、表3及び表4に示す。

【0190】

抗pSYK抗体の重鎖及び軽鎖のCDRの各々のアミノ酸配列並びに核酸配列を、それぞれ表5及び表6に示す。

【0191】

CDRの配列決定は、毒素コンジュゲーション部位として役立ち得る残基の存在量の決定を可能にした。例えば、抗原結合領域の不對遊離システインは、アウリスタチンコンジュゲーションのための部位であり得、リジンはメイタンシンコンジュゲーションのための部

10

20

30

40

50

位であり得る。CDRのアミノ酸への毒素のコンジュゲーションは、pSYKに対する抗体の結合親和性を変化させる懸念をもたらす。したがって、特定の実施態様において、該CDRは、治療薬剤にコンジュゲートされ得るアミノ酸を欠く。

【0192】

表1：抗pSYKウサギmAbの重鎖及び軽鎖の配列番号のまとめ

【表1】

mAb	Ig鎖	核酸配列番号	アミノ酸配列番号
MIL81-1-8 3H3	重	3	4
MIL81-1-8 3L2	軽	5	6

10

【0193】

MIL81-1-8 3H3核酸(配列番号3)

【化3】

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGGTGTCCAGTGTCTCAGTC
GGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAG
TCTCTGGAATCGACCTCAATAGTTATATAATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGGAATGGATCGGAATCATTAGTCGTCTGGTAAACACATACTACGCGAGCTGGCCGAAAGG
CCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCG
AGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGCATATCTTTATACTAGTGGTACGATGAGCGTC
TGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGGCAACCTAAGGCTCCATCAGTCTTCCC
ACTGGCCCCCTGCTGCGGGGACACACCCAGCTCCACGGTGACCCTGGGCTGCCTGGTCAAAG
GGTACCTCCCGGAGCCAGTGACCGTGACCTGGAACTCGGGCACCCTCACCAATGGGGTACGC
ACCTTCCCGTCCGTCCGGCAGTCCTCAGGCCTCTACTCGCTGAGCAGCGTGGTGAGCGTGAC
CTCAAGCAGCCAGCCCGTCACCTGCAACGTGGCCCACCCAGCCACCAACACCAAAGTGGACA
AGACCGTTGCGCCCTCGACATGCAGCAAGCCACGTGCCCACCCCTGAACTCCTGGGGGGA
CCGTCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCACGCACCCCGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGATGACCCCGAGGTGCAGTTCACATGGTACA
TAAACAACGAGCAGGTGCGCACCGCCCGCCGCGCTACGGGAGCAGCAGTTC AACAGCACG
ATCCGCGTGGTCAGCACCCCTCCCCATCGCGCACCAAGGACTGGCTGAGGGGCAAGGAGTTCAA
GTGCAAAGTCCACAACAAGGCACTCCCGGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAGAG
GGCAGCCCCTGGAGCCGAAGGTCTACACCATGGGCCCTCCCCGGGAGGAGCTGAGCAGCAGG
TCGGTCAGCCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCTTCCGACATCTCGGTGGAGTGGGA
GAAGAACGGGAAGGCAGAGGACAACACTACAAGACCACGCCGGCCGTGCTGGACAGCGACGGCT
CCTACTTCCTCTACAGCAAGCTCTCAGTGCCACGAGTGAGTGGCAGCGGGGCGACGTCTTC
ACCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCTTGACACAACCACTACACGCAGAAGTCCATCTCCCGCTC
TCCGGGTAAATGA

20

30

40

MIL81-1-8 3H3アミノ酸(配列番号4)

【化 4】

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

10

20

MIL81-1-8 3L2核酸(配列番号5)

【化 5】

ATGGACACGAGGGCCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAG
 ATGTGCTGACATTGTGATGACCCAGACTCCATCCCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCACAG
 TCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGAGCATTAGTAGTTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAA
 CCAGGGCAGCCTCCCAAACCTCCTGATCTACAGGGCATCCACTCTGGTATCTGGGGTCCCATC
 GCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTG
 CCGATGCTGCCACTTACTATTGTCAACATACTTATTTTGGTAGTGATTATGTTGGTGGTTTC
 GGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAGGTGATCCAGTTGCACCTACTGTCCTCATCTTCCC
 ACCAGCTGCTGATCAGGTGGCAACTGGAACAGTCACCATCGTGTGTGTGGCGAATAAATACT
 TTCCCGATGTCACCGTCACCTGGGAGGTGGATGGCACCACCCAAACAACCTGGCATCGAGAAC
 AGTAAAACACCGCAGAATTCTGCAGATTGTACCTACAACCTCAGCAGCACTCTGACACTGAC
 CAGCACACAGTACAACAGCCACAAAGAGTACACCTGCAAGGTGACCCAGGGCACGACCTCAG
 TCGTCCAGAGCTTCAATAGGGGTGACTGTTAG

40

MIL81-1-8 3L2アミノ酸(配列番号6)

【化 6】

```

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

```

10

【0194】

表2：抗pSYKウサギmAbの可変領域の配列番号のまとめ

【表 2】

mAb	Ig鎖	核酸配列番号	アミノ酸配列番号
MIL81-1-8 3H3	重	7	8
MIL81-1-8 3L2	軽	9	10

20

【0195】

表3：抗pSYKウサギmAbのmAb可変領域のアミノ酸配列

【表 3】

mAb	Ig鎖	配列番号	アミノ酸配列
MIL81-1-8 3H3	重	8	QCQSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLNSYI MSWVRQAPGKGLEWIGIISRRGNTYYASWPKGRF TISKSTTTVDLKITSPTTEDTATYFCARAYLYTS GTMSVWGPGTLVTVSSGQ
MIL81-1-8 3L2	軽	10	ADIVMTQTPSPVEAAVGGTVTIKCQASESISYI SWYQQKPGQPPKLLIYRASTLVSGVPSRFGSGS GTDFTLTISDLECADAAATYYCQHTYFGSDYVGGF GGGTEVVVKGD

30

40

【0196】

表4：抗pSYKウサギmAbのmAb可変領域をコードする核酸配列

【表 4】

mAb	IgG鎖	配列 番号	核酸配列
MIL81-1-8 3H3	重	7	cagtgtcagtcggtggaggagtcggggggtcgcc tggtcacgcctgggacacccctgacactcacctg cacagtctctggaatcgacctcaatagttatata atgagttgggtccgccagggtccaggaaggggc tggaatggatcggaatcattagtcgtcgtggtaa cacatactacgcgagctggccgaaaggccgattc accatctccaaaacctcgaccacggtggatctga aatcaccagtcgcgacaaccgaggacacggccac ctatttctgtgccagagcatatctttatactagt ggtacgatgagcgtctggggcccaggcaccctgg tcaccgtctcctcagggcaa
MIL81-1-8 3L2	軽	9	gctgacattgtgatgaccagactccatccccg tggaggcagctgtggaggcacagtcaccatcaa gtgccaggccagtgagagcattagtagttactta tcctggatcagcagaaaccagggcagcctccca aactcctgatctacagggcatccactctggtatc tgggggtcccatcgcggttcaaaggcagtggtatc gggacagatttactctcaccatcagcgacctgg agtgtgccgatgctgccacttactattgtcaaca tacttattttggtagtgattatgttggtggttc ggcggagggaccgaggtggtggtcaaaggatgat

10

20

【 0 1 9 7 】

表5：抗pSYKウサギmAbのCDRのアミノ酸配列

30

【表 5】

mAb	IgG鎖	配列 番号	アミノ酸配列
MIL81-1-8 3H3	VH CDR1	11	IDLNSYIMS
MIL81-1-8 3H3	VH CDR2	12	IISRGNITYYASWPKG
MIL81-1-8 3H3	VH CDR3	13	AYLYTSGTMSV
MIL81-1-8 3L2	VK CDR1	14	QASESISSYLS
MIL81-1-8 3L2	VK CDR2	15	RASTLVS
MIL81-1-8 3L2	VK CDR3	16	QHTYFGSDYVGG

40

【 0 1 9 8 】

表6：抗pSYKウサギmAbのCDRの核酸配列

【表 6】

mAb	Ig鎖	配列 番号	核酸配列
MIL81-1-8 3H3	VH CDR1	17	atcgacctcaatagttatataatgagt
MIL81-1-8 3H3	VH CDR2	18	atcattagtcgctcggtggaacacatactacgcga gctggccgaaaggc
MIL81-1-8 3H3	VH CDR3	19	gcatactctttatactagtggtacgatgagcgtc
MIL81-1-8 3L2	VK CDR1	20	caggccagtgagagcattagtagttacttatcc
MIL81-1-8 3L2	VK CDR2	21	agggcatccactctggtatct
MIL81-1-8 3L2	VK CDR3	22	caacatacttattttggtagtgattatgttggtg gt

10

【0199】

抗体標識及び検出

本明細書に記載の方法、例えば、インビトロ及びインビボ検出、例えば、診断、病期分類、又は画像化法において使用される抗pSYK抗体分子は、結合した又は結合していない結合剤の検出を容易にするために、検出可能な薬剤で直接又は間接的に標識されてよい。間接的な標識化は、抗pSYK抗体、例えば、該抗体のFc部分と結合する抗ウサギ抗体などの二次抗体と接触させることを含む。該二次抗体は、標識に結合するか、又は物質を検出可能な物質へ酵素的に変換する検出可能な薬剤又は部分にコンジュゲートされてよい。適切な検出可能な薬剤には、様々な生物学的に活性のある酵素、リガンド、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、化学発光物質、生物発光物質、発色物質、電子密度物質、常磁性（例えば、核磁気共鳴活性）物質、及び放射性物質が含まれる。

20

【0200】

いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、放射性イオン、例えば、インジウム（ ^{111}In ）、ヨウ素（ ^{131}I 又は ^{125}I ）、イットリウム（ ^{90}Y ）、ルテチウム（ ^{177}Lu ）、アクチニウム（ ^{225}Ac ）、ビスマス（ ^{212}Bi 又は ^{213}Bi ）、硫黄（ ^{35}S ）、炭素（ ^{14}C ）、トリチウム（ ^3H ）、ロジウム（ ^{188}Rh ）、テクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、プラセオジウム、もしくはリン（ ^{32}P ）；又は陽電子放出放射性核種、例えば、炭素-11（ ^{11}C ）、カリウム-40（ ^{40}K ）、窒素-13（ ^{13}N ）、酸素-15（ ^{15}O ）、フッ素-18（ ^{18}F ）、ガリウム（ ^{68}Ga ）、及びヨウ素-121（ ^{121}I ）に結合される。インビトロ又はインビボ診断/検出方法で使用するのための、本発明の抗体にコンジュゲートされ得る追加の放射性薬剤を、以下に記載する。

30

【0201】

代表的な標識には、ユーロピウム、サマリウムもしくはテルビウムなどを含む希土類キレート、又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、Cy3、又はCy5などのシアニン(Cy)蛍光色素、アレクサフルオロ488、アレクサフルオロ592、オレゴングリーン及び2,3-ジヒドロフタラジンジオンなどのフルオロフォアが含まれる。抗pSYK抗体の直接的又は間接的な検出の他の例示的な標識には、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、ラクトペルオキシダーゼ、又はミクロペルオキシダーゼなどの色素前駆体を酸化するために過酸化水素を使用する酵素と結合される、HRP、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなどの複素環式オキシダーゼなどの、物質を検出可能な物質に酵素的に変換する部分、アビジンコンジュゲート標識に結合することができるビオチン、スピン標識、バクテリオファージ標識、及び安定なフリーラジカルなどの検出可能な物質に結合する部分

40

50

が含まれる。

【0202】

フルオロフォア及び発色団で標識された抗体分子は、当技術分野で公知の標準的な部分から調製され得る。抗体及び他のタンパク質は、約310nmまでの波長を有する光を吸収するので、蛍光部分は、310nmを超える又は400nmを超える波長で実質的な吸収を有するように選択されるべきである。種々の適切な蛍光化合物及び発色団は、Stryerの文献、Science, 162:526 (1968)及びBrand, L.らの文献、Annual Review of Biochemistry, 41: 843-868 (1972)によって記載されている。該抗体は、米国特許第3,940,475号、同第4,289,747号、及び同第4,376,110号に開示されているものなどの従来の手順により、蛍光発色基で標識されてよい。

10

【0203】

上記のいくつかの所望の特性を有する蛍光剤の1つのグループは、3,6-ジヒドロキシ-9-フェニルキサンチドロール由来のフルオレセイン及び3,6-ジアミノ-9-フェニルキサンチドロール由来のレサミン類及びローダミン類並びにリサミンローダミン Bを含むキサンテン色素である。9-o-カルボキシフェニルキサンチドロール(carboxyphenylxanthhydryl)のローダミン及びフルオレセイン誘導体は、9-o-カルボキシフェニル基を有する。フルオレセインイソチオシアネート及びフルオレスカミンなどのアミノ基並びにイソチオシアネート基などの反応性カップリング基を有するフルオレセイン化合物は、容易に入手可能である。蛍光化合物の別のグループは、 α 又は β 位にアミノ基を有するナフチルアミン類である。

20

【0204】

標識された抗体分子は、(i) アフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降などの標準的な技術により所定の抗原を単離すること；(ii) タンパク質の発現の量及びパターンを評価するために、(例えば、細胞溶解物、組織標本又は細胞上清中の) 所定の抗原を検出すること；(iii) 臨床試験手順の一部として組織中のタンパク質レベルを監視すること、例えば、所与の治療投与計画の有効性を決定すること、を含むいくつかの状況において、例えば、診断及び/又は実験で使用され得る。

【0205】

pSYKを検出するためのアッセイは、検出アッセイのための準備においてpSYK抗体を希釈するための一次抗体エンハンサーを含んでよい。当業者なら、一次抗体エンハンサーが、MIL81-1-8ウサギmAb (ウサギIgG) と同じアイソタイプ又はMIL81-1-8シグナルを増幅するのに適する類似の試薬を有する、ウサギ以外の種 (例えば、ヒト、ラット、ヤギ、マウスなど) で作られた抗ウサギ二次抗体であり得ることを認識するであろう。いくつかのエンハンサーが市販されている (例えば、Pierce Biotechnology社)。チラミドシグナル増幅 (TSA) システムなどのアッセイ増幅システムは、シグナル強度を増加させ、免疫組織化学及び免疫蛍光染色技術の両方でバックグラウンドを減少させるために使用することができる。TSAシステムが市販されている (例えば、Life Technologies、Grand Island, NY又はPerkinElmer社, Waltham, MA, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)。TSAシグナルは、AMP HQ法 (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) などのTSAのさらなる二次検出 (ハプテン電子供与体を用いる) によりさらに増幅することができる。

30

40

【0206】

インビトロ診断

本明細書に記載の抗pSYK抗体及び免疫複合体は、pSYKの有無を検出するため、例えば、対象から取得されたエクスピボ生体試料中のpSYKの有無を検出するため (すなわち、インビトロ検出)、又は対象におけるpSYKの有無もしくは分布を検出するため (すなわち、インビボ検出) に使用してよい。そのような検出方法は、種々の障害を検出もしくは診断するか、或いは治療的もしくは経済的な意思決定又は行動を導くのに有用である。本明細書で使用する用語「検出」は、定量的又は定性的な検出を包含する。pSYK又はSYKリン酸化タンパク質の検出は、本明細書で使用される場合、インタクトpSYKタンパク質の検出又は該抗pSYK抗体分子が結合するエピトープを含むpSYKタンパク質の一部の検出を意味する。

50

【0207】

したがって、別の態様において、本発明は、細胞又は組織、例えば、腫瘍細胞、又はpSYKを発現する1以上の細胞を有する腫瘍などの生体試料中のpSYK発現を検出する方法を特徴とする。本方法は、該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を可能にする条件下で、生体試料と本明細書に記載の抗pSYK抗体分子（例えば、MIL81-1-8）とを接触させること；該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出し、それによりpSYKタンパク質の存在を検出すること、例えば、pSYKを発現する細胞又は腫瘍を検出すること、を含む。

【0208】

一実施態様において、該抗pSYK抗体分子は、該検出可能な標識を含む免疫複合体である。検出可能な標識は、放射性薬剤であってよい。或いは、該検出可能な標識は、非放射性薬剤（例えば、上記のフルオロフォア又は発色団）である。pSYK Y525/526 IHCアッセイなどの、pSYKを測定するためのアッセイで使用するための試料は、癌に罹患した患者から取得された細胞を含む生体試料であり得る。特定の実施態様において、該生体試料は、pSYKを発現する正常及び/もしくは癌性の細胞又は組織を含む。特定の実施態様において、該正常及び/もしくは癌性の細胞又は組織は、他の細胞又は組織に対してより高いレベルでpSYKを発現し得る。試料は、癌由来の組織もしくは器官又は腫瘍細胞と正常細胞の混合物からの腫瘍細胞又は正常細胞を含有することができる。試料は、リンパ節などの腫瘍組織の近傍又は癌が転移によって広がる可能性がある、肝臓もしくは骨などの離れた組織に由来し得る。いくつかの実施態様において、該癌細胞は、白血病細胞、例えば、AMLもしくはCLLからの細胞、リンパ腫細胞、例えば、DLBCLもしくはFLからの細胞、又は固形腫瘍細胞、例えば、上咽頭癌もしくは胃癌からの細胞である。特定の実施態様において、該癌細胞は、PTCL、DLBCL、FL、MCL、CLL、AML、MDS、上咽頭癌、リンパ腫、胃癌、乳癌、卵巣癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌）及びPT-LPD細胞から選択される。特定の実施態様において、該癌細胞は、DLBCL、AML、及びCLL細胞から選択される。特定の実施態様において、該DLBCL細胞は、GCB DLBCL細胞、ABC DLBCL細胞及び非GCB DLBCL細胞からなる群から選択される。

【0209】

本明細書に記載の検出方法は、インビトロ又はインビボであれ、対象における障害を評価するために使用してよい。特定の実施態様において、該障害は、癌、腫瘍、リンパ腫又は白血病などの細胞増殖性障害である。特定の実施態様において、該細胞増殖性障害は、PTCL、DLBCL、FL、MCL、CLL、AML、MDS、上咽頭癌、リンパ腫、胃癌、乳癌、卵巣癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌）及びPT-LPDから選択される。いくつかの実施態様において、細胞増殖性障害は、AML、CLL又はDLBCLである。いくつかの実施態様において、該DLBCL障害は、サブタイプによって分類される。いくつかの実施態様において、該DLBCLサブタイプはGCBサブタイプである。いくつかの実施態様において、該DLBCLサブタイプはABCサブタイプである。いくつかの実施態様において、該DLBCLサブタイプは非GCBサブタイプである。

【0210】

一態様において、本発明は、インビトロで、生体試料中の（例えば、対象から取得された細胞又は組織生検中の）pSYKタンパク質の有無を検出する方法を提供する。本方法は、（i）対象から取得された生体試料と抗pSYK抗体分子又はその免疫複合体とを接触させること、及び（ii）該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出すること、を含む。複合体形成は、生体試料中のpSYKタンパク質の存在又はレベルの指標であり、複合体が形成されないことは、生体試料中のpSYKタンパク質の不在の指標となる。

【0211】

pSYK Y525/526 IHCアッセイなどのpSYKについてアッセイするための組織試料は、本明細書に記載の治療の候補者である患者から又は商業的供給源から取得することができる。腫瘍試料又は対照試料などの組織試料の商業的供給源には、PhenoPath Laboratories, PLLC, Seattle, WA; Proteogenix SAS, Obershausbergen, France; 及びU.S. Biomax社、Roc

10

20

30

40

50

kville, MDが含まれる。

【0212】

本明細書に記載の、インビトロ及びインビボの両方を含む方法、例えば、SYK標的治療薬のためのコンパニオン診断方法用の例示的な生体試料には、炎症性滲出液、血液、血清、血漿、尿、痰、骨髓穿刺液、乳頭吸引、腸液、便試料などの1個の細胞、複数の細胞、組織又は体液、及びそれらの単離物、又は口、喉もしくは子宮頸部などの粘膜組織を拭き取ることによって取得される物質が含まれる。特定の実施態様において、該生体試料は、癌細胞(複数可)又は組織を含む。例えば、該試料は、リンパ節生検などの、又はそれらの任意の転移部位からの組織試料からの腫瘍生検であってよい。別の実施態様において、該試料は、血液試料であるか、又は血液試料に由来する。いくつかの実施態様において、該血液試料は、腫瘍、例えば、リンパ球増加症から放出された腫瘍細胞を含む。他の実施態様において、該生体試料は、血液又は別の流体であってよく、該流体は癌細胞を含む。生体試料を、当技術分野のいくつかの方法のうちのいずれかを用いて取得してよい。さらに、生体試料を、ホルムアルデヒドなどの固定剤で処理し、パラフィンに包埋し、使用のために切片にしてよい。或いは、新鮮な組織又は凍結組織を使用してよい。他の実施態様において、微細針吸引液を使用してよい。特定の実施態様において、該生体試料は、細胞又は組織生検である。特定の実施態様において、該細胞又は組織生検は腫瘍生検である。いくつかの実施態様において、該腫瘍生検は針生検である。

10

【0213】

骨髓の血液腫瘍、例えば、骨髓腫瘍又は白血病において、腫瘍の一次解析は、骨髓試料、例えば、骨髓腫瘍又は白血病腫瘍細胞を含む試料にて行うことができる。しかしながら、いくつかの腫瘍細胞は、(例えば、クロノタイプ腫瘍細胞、循環内皮細胞は)、全血中の一定の割合の細胞集団である。これらの細胞はまた、骨髓移植用製剤中の顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)での患者の治療、血液腫瘍、例えば、白血病、リンパ腫及び骨髓腫のための標準的な治療の際に血液中に動員され得る。これらの細胞はまた、化学療法治療、例えば、イブルチニブなどのBTK阻害剤による治療、フォスタマチニブなどのSYK阻害剤による治療、又はイデラリシブなどのPI3K δ 阻害剤による治療から動員され得る。多発性骨髓腫中の循環腫瘍細胞の例は、例えば、Pilarskiらの文献、(2000) Blood 95:1056-65及びRigolinらの文献、(2006) Blood 107:2531-5によって研究されている。したがって、例えば、治療の結果を決定するためのマーカーのインビトロ測定のための非侵襲性試料は、末梢血試料を含むことができる。したがって、末梢血中の細胞は、pSYKの量を決定するために試験することができる。

20

30

【0214】

採血容器は、デキストロース又はアルブミン又は緩衝液、例えば、リン酸塩又はリンゲル液などの血液の完全性を維持する添加剤と共に、抗凝固剤、例えば、ヘパリン又はエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、クエン酸ナトリウム又はクエン酸溶液を含むことができる。タンパク質安定剤、例えば、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼなどのプロテアーゼを阻害する薬剤を試料に添加することができる。2種以上のプロテアーゼの阻害剤カクテルなどのいくつかのプロテアーゼ阻害剤は、容易に入手可能である。マーカーの量が、試料中のDNAのレベルを測定することによって測定される場合には、DNA安定剤、例えば、デオキシリボヌクレアーゼI阻害剤などのデオキシリボヌクレアーゼを阻害する薬剤を試料に添加することができる。マーカーの量が、試料中のRNAのレベルを測定することによって測定される場合には、RNA安定剤、例えば、阻害剤又はリボヌクレアーゼA、リボヌクレアーゼB、もしくはリボヌクレアーゼCなどのリボヌクレアーゼを阻害する薬剤を試料に添加することができる。2種以上のデオキシリボヌクレアーゼ又はリボヌクレアーゼ用の阻害剤カクテルなどのいくつかのデオキシリボヌクレアーゼ又はリボヌクレアーゼ阻害剤は、容易に入手可能である。安定剤を含む採血容器の例としては、採血時のRNA安定化に有用なPAXGENE(登録商標)チューブ(PREANALYTIX, Valencia, CA)、及び採血時の循環腫瘍細胞の安定化に有用なCELLSAVE保存チューブ(Janssen Diagnostics, LLC)が挙げられる。末梢血試料又は腫瘍滲出物は、(例えば、腫瘍に富む試料又は腫瘍を枯渇させた

40

50

試料（例えば、参照試料用）をもたらしために）改変、例えば、分画、選別又は濃縮することができる。改変された試料の例としては、例えば、ネガティブ選択、例えば、白血球と赤血球の分離（例えば、高密度糖又はポリマー溶液（例えば、FICOLL（登録商標）溶液（Amersham Biosciences division of GE healthcare, Piscataway, NJ）もしくはHISTOPAQUE（登録商標）-1077溶液、Sigma-Aldrich Biotechnology LP及びSigma-Aldrich社、St. Louis, MO）を通るディファレンシャル遠心分離）及び/又は選択剤（例えば、直接単離（例えば、B細胞マーカーに結合する磁気ビーズ（例えば、Miltenyi Biotec, Auburn, CAからの）を含む細胞の溶液への磁場の適用又は蛍光活性化細胞選別）のための、CD5、CD19、CD20、CD34、CD38、CD117、CD138、CD133、もしくはZAP70などの腫瘍細胞マーカー、B細胞マーカー又は骨髄前駆細胞マーカーに結合する試薬）への細胞の結合による陽性選択によって収集することができるクロノタイプ骨髄腫細胞(clonotypic myeloma cell)が挙げられる。一実施態様において、ディファレンシャル遠心法は、腫瘍細胞を含む細胞層を濃縮する。腫瘍細胞層を単離し、pSYK検出のために固定することができる。非骨髄腫試料、例えば、固形腫瘍からの腫瘍滲出物は、例えば、当技術分野で公知の腫瘍細胞の選択マーカーを使用して、腫瘍細胞を濃縮するために骨髄腫試料と類似の方法によって治療することができる。いくつかの実施態様において、CD5、CD19及びCD20から選択されるマーカーへの結合による選択は、リンパ腫患者、例えば、CML癌患者などの癌患者からの試料中の腫瘍細胞を濃縮することができる。いくつかの実施態様において、CD34及びCD117から選択されるマーカーへの結合による選択は、癌患者、例えば、骨髄性腫瘍患者、例えば、AML癌患者からの試料中の腫瘍細胞を濃縮することができる。

10

20

【0215】

試料、例えば、腫瘍、例えば、生検又は骨髄、血液もしくは改変された血液（例えば、腫瘍細胞を含む試料）、腫瘍滲出液及び/又は参照試料、例えば、マッチした対照（例えば、生殖系列又は非腫瘍）試料は、試料中のpSYKの量を検出又は評価する前に、様々な周知の収集後の調製及び貯蔵技術（例えば、溶解、核酸及び/もしくはタンパク質の抽出、又は分離、固定、貯蔵、凍結、限外濾過、濃縮、蒸発、遠心分離など）に供することができる。

【0216】

特定の実施態様において、試験細胞又は組織は、pSYK発現に関連する障害を有することが疑われる個体から取得される。特定の実施態様において、試験細胞又は組織は、pSYKの発現増加に関連する障害を有することが疑われる個体から取得される。

30

【0217】

一実施態様において、対象からの試料中の、又は対象中のpSYKのレベルは、対照物質、例えば、対象の細胞と同じ組織起源の正常細胞又はそのような正常な細胞に匹敵するレベルでpSYKを有する細胞中の参照レベル、例えば、pSYKのレベルと比較される。血液腫瘍を有する患者については、正常な特性、例えば、非リン酸化SYK又はY525もしくはY526ではない残基がリン酸化されたSYKのための対照となる参照試料を、患者の皮膚又は頬スワブから取得することができる。固形腫瘍については、腫瘍細胞を含む典型的な試料は、原発腫瘍又は隣接するリンパ節の生検である。低侵襲性手段によって得られる、例えば、腫瘍部位から脱落するか又は掻き取られた固形腫瘍試料には、子宮頸部スミア（例えば、子宮頸癌患者からの）、腫瘍滲出液、例えば、リンパ液、囊胞液、乳頭吸引（例えば、乳癌患者からの）、腹水、胸水、痰（例えば、肺癌患者からの）、婦人科体液（例えば、卵巣癌患者からの）、尿、便（例えば、大腸癌について）が含まれる。固形腫瘍については、通常のSYK発現のための対照となる参照試料は、患者の血液、皮膚試料、又は患者からの頬スワブから取得することができる。

40

【0218】

本方法は、例えば、pSYKの検出レベルに応答する障害の診断、予後、治療の有効性の評価、又は病期分類を提供することを含み得る。対照物質と比較して、試料又は対象におけるより高いレベルのpSYKは、pSYKの発現増加と関連する障害の存在を示す。対照物質と比較した、試料又は対象におけるpSYKのより高いレベル、例えば、1.2倍、1.5倍、2.0倍、3

50

倍、4倍、5倍もしくは10倍又はそれ以上のレベルは、治療の有効性の相対的な不足、比較的より不良の予後、又は疾患の後期も示し得る。pSYKのレベルはまた、将来の治療、例えば、多かれ少なかれ積極的な治療の必要性、もしくは1つの治療投与計画から別の治療投与計画への切り替えの必要性を評価又は選択するために使用してよい。いくつかの実施態様において、本方法はさらに、少なくとも部分的に決定されたpSYKレベルに基づくSYK標的治療薬、例えば、本明細書に記載のSYK標的治療薬を選択すること、及び必要に応じて対象への選択されたSYK標的治療薬を投与すること、を含む。

【0219】

SYKの小分子阻害剤などの抗pSYK抗体分子とpSYKの間の複合体形成は、pSYK抗原に結合した抗体（又は抗体断片）もしくは結合していない抗体分子のいずれかを測定又は可視化することにより検出され得る。当業者は、pSYKへの抗pSYK抗体の結合を検出するための多くの方法を容易に理解することができる。いくつかの方法は、本明細書に記載の実施例に含まれている。そのような方法には、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ALPHALISA（登録商標）イムノアッセイ（PerkinElmer, Waltham, MA）などのELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）もしくはその変形、DELTA（登録商標）免疫診断システム（PerkinElmer, Waltham, MA）などの「サンドイッチ」イムノアッセイもしくはその変形、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、タンパク質Aイムノアッセイ、フローサイトメトリー、及び免疫組織化学（IHC）などの当技術分野で公知の抗原結合アッセイが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施態様において、pSYK検出方法は、フローサイトメトリー、IHC、及び蛍光活性化細胞選別（FACS）から選択される。特定の実施態様において、pSYK検出方法は、フローサイトメトリー及びIHCから選択される。特定の実施態様において、pSYK検出方法は、フローサイトメトリーである。特定の実施態様において、pSYK検出方法はIHCである。いくつかの実施態様において、IHC法は、チラミドシグナル増幅、AMP HQ システム（Ventana Medical Systems, Tucson, AZ）などの西洋ワサビペルオキシダーゼ多量体増幅又はAMP HQの増幅を用いるチラミドシグナル増幅などのシグナルの増強又は増幅を使用する。

【0220】

特定の実施態様において、pSYKは、本発明の抗pSYK抗体を用いた免疫組織化学によって検出又は測定される。免疫組織化学技術は、pSYKを発現する細胞を特定し、基本的に染色するために使用してよい。そのような「染色」はまた、転移性移動の分析を可能にする。本明細書に記載のものなどの抗pSYK抗体は固定細胞と接触し、細胞中に存在するpSYKは該抗体と反応する。該抗体は、細胞を染色するために、検出可能に標識されるか、又は標識された二次抗体もしくはプロテインAを間接的に用いて検出される。特定の一実施態様において、該MIL81-1-8抗体は、生体試料中のpSYK発現を検出又は測定するためのIHCアッセイにおいて使用される。

【0221】

抗原結合アッセイにおいて、ある程度の変動は、試料調製法及び試料の質にあり得る変動に起因し得る。本方法は、アーカイブ試料の使用を企図しているので、ある程度の劣化がアッセイ前に生じ得る。pSYK、例えば、pSYK Y525/526を検出することと、IHCなどのいくつかの当技術分野で公知の免疫化学技術によるバックグラウンド染色に対して高いシグナルを維持することとの間のバランスが取られ得る。例えば、施術者は、必要に応じて、アッセイ前の選択及び/又はIHCアッセイの選択を行ってよい。アッセイ前の選択の例としては、抗体の選択、例えば、正常な試料、例えば、正常なヒト組織又は非活性SYKなどの、検出が望まれないタンパク質に対する抗体製剤のプレ吸収による交差反応を除去するステップ、標識もしくは発色試薬の選択、及び生体試料の固定方法が挙げられる。IHCアッセイの選択の例としては、非特異的結合をブロックするための方法又は試薬の選択、抗体結合前の固定構造体の立体構造を開くためにスライドを（例えば、72℃又は95℃）に加熱するか否か、並びに組織切片の洗浄、例えば、TWEEN 20などの、ポリソルベートなどの非イオン性洗剤又は界面活性剤を含む溶液での洗浄のための方法又は試薬の選択が挙げられる。IHCアッセイの条件の最適化は、当技術分野で周知であり、技術ガイド、例えば、Buc

hwalow及びBockerの文献、免疫組織化学の基礎と方法(Immunohistochemistry Basics and Methods)(2010, Springer-Verlag, Berlin, Germany)が利用可能である。IHCは、Ventana B ENCHMARK(商標)スライド染色プラットフォームもしくはVentanaディスカバリーXT(Ventana Medical Systems社、Tuscon, AZ)又はLeica BOND RX (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL、もしくは適切な診断用自動染色プラットフォーム)などの自動機械によって行うことができる。自動化されたIHCアッセイは、SYK標的癌治療のための臨床試験の登録基準として、及び一般的には、SYK標的治療薬を受け取るべき患者(例えば、癌患者)の選択のためのスクリーニングツールとしてpSYK発現腫瘍について癌患者をスクリーニングするための有用なツールである。

【0222】

10

いくつかの実施態様において、pSYK抗原結合アッセイは、バックグラウンド構造、例えば、pSYK Y525/526を含まないタンパク質又は構造への結合を減少させるために、タンパク質ブロッキング試薬で試料を処理することを含む。例としては、IgG2などのウサギIgG、BSA、カゼイン、HiBlock (Perkin Elmer, Waltham, MA) 又はタンパク質ブロック (Dako, Carpinteria, CA) が挙げられる。いくつかの実施態様において、該試料は、例えば、ペルオキシダーゼの発色法を用いる場合、内因性の組織ペルオキシダーゼをブロックするために過酸化剤で処理される。他の実施態様において、EGTA、グリセロリン酸又はフェナントロリンなどのアルカリホスファターゼブロッキング試薬は、pSYKの脱リン酸化を阻害することができる。いくつかの実施態様において、該試料は、EDTAなどで脱灰を受ける。

【0223】

20

例えば、蛍光エネルギー移動 (FET、例えば、Lakowiczらの特許、米国特許第5,631,169号;Stavrianopoulosらの特許、米国特許第4,868,103号を参照されたい)の技術を利用することによって、いずれかの構成要素 (pSYKもしくは抗体分子) のさらなる操作又は標識を行うことなく、pSYKと抗pSYK抗体分子の複合体形成を直接検出することも可能である。第1の「ドナー」分子上のフルオロフォア標識は、適切な波長の入射光による励起時に、その放出された蛍光エネルギーが第2の「アクセプター」分子上の蛍光標識によって吸収され、これが今度は、吸収されたエネルギーによって蛍光を発することができるように選択される。或いは、「ドナー」タンパク質分子は、単にトリプトファン残基の天然の蛍光エネルギーを利用してもよい。「アクセプター」分子標識が「ドナー」のそれと区別され得るように、異なる波長の光を放射する標識が選択される。標識間のエネルギー移動の効率は分子を隔てる距離に関係するので、分子間の空間的關係が評価され得る。結合が分子間で生じる状況において、アッセイ中の「アクセプター」分子標識の蛍光放射が最大であるべきである。FET結合事象は、当技術分野で周知の標準的な蛍光検出手段により (例えば、蛍光光度計を使用して) 都合よく測定され得る。

【0224】

30

別の例では、pSYKを認識する抗体分子の能力の決定は、リアルタイム生体分子相互作用分析 (BIA) などの技術を利用することによってアッセイ成分のいずれか (pSYK又は抗体分子) を標識することなく達成され得る (例えば、Sjolander, S, 及びUrbaniczky, C, の文献, 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345並びにSzaboらの文献、1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705を参照されたい)。本明細書で使用される場合、「BIA」又は「表面プラズモン共鳴」は、相互作用物のいずれかを標識することなく、リアルタイムで生体特異的相互作用を研究するための技術である (例えば、BIACORE(商標))。結合表面における質量の変化 (結合事象の指標) は、表面付近の光の屈折率の変化 (表面プラズモン共鳴 (SPR) の光学現象) をもたらし、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として用いられ得る検出可能なシグナルをもたらす。

【0225】

40

試料、細胞又は腫瘍に結合する抗pSYK抗体の定量化を、画像解析ソフトウェアなどのコンピュータープログラムが支援することができる。そのようなプログラムは、非特異的な試料の変動からのノイズを低減することができ、シグナルの強度を統合することができ、複数の標識の色に由来する入力を計算して、pSYK抗体分子を検出するための特異的標識に

50

よって特異的寄与を決定すること、かつ/又はアッセイで検出されるpBTK又はpBLNKなどの第2のマーカの標識を定量化することができる。IHCのためのコンピュータープログラム、例えば、画像解析ソフトウェアの例としては、Definiens社の組織スタジオ(Tissue Studio) (Definiens社, Carlsbad, CA) 又はAPERIO(登録商標)SCANSCOPE(商標)スライドスキャナ又はEPATHOLOGY(商標)システム (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) が挙げられる。コンピュータ支援定量化を含む定量方法は、校正試料を使用して校正することができる。校正試料は、例えば、アッセイ対照として使用するために、染色手順の前に調製されるか、又は染色手順中に調製することができる。校正試料の例としては、未染色試料又は染色手順中に染色されないままの試料又は通常のIgGで染色される試料;全SYK抗体などの非pSYK抗体により染色される試料、又は染色手順中に非pSYK抗体で染色するための試料;T細胞のタンパク質ホスファターゼ (New England Biolabs, Ipswich, MA) で処理された試料などの、pSYK抗体により染色されるホスファターゼ処理試料、又は染色手順中にホスファターゼで前処理するための試料;pSYK抗体により予め染色されるか、又は染色手順中にpSYK抗体で染色するためのWSU-DLCL2細胞、TMD8リンパ腫腫瘍の異種移植片 (Tohdaらの文献、(2006) Leuk. Res. 30:1385-1390) 又はPHTX95L腫瘍異種移植片などの、過バナジン酸処理されるかもしくはBCR架橋されたリンパ腫の細胞ペレットなどのpSYK量が高い試料;未処理のWSU-DLCL2細胞 (Al-Katibらの文献、(1998) Clin. Cancer Res. 4:1305-1314) 又はOCI-LY10腫瘍細胞 (National Cancer Institute, Bethesda, MD) 異種移植片のペレットなどのpSYK量が高い試料、或いはpSYK抗体により予め染色されるか、又は染色手順中にpSYK抗体で染色するための、SYKもしくはRASのキナーゼドド (kd) 変異体などの陰性対照タンパク質を発現するNIH-3T3細胞などの細胞の試料、RASを有するキメラ、例えば、ITK-RASなどのRAS組換え構築物でトランスフェクトされた細胞などの細胞の試料が挙げられる。校正試料は、陽性染色又は強い染色及び陰性染色、弱い染色又はバックグラウンド染色について予想されるレベルを予め特定することにより、細胞検査技師又は病理学者などの実行者、スキャナー又は画像解析ソフトウェアの感度を調整するのに役立ち得る。

【0226】

いくつかの実施態様において、試料中のpSYKを検出するためのアッセイは、pSYKが細胞質中で検出された場合に、pSYKの存在を示す。いくつかの実施態様において、試料中のpSYKを検出するためのアッセイは、pSYKが細胞質及び細胞膜内で検出された場合に、pSYKの存在を示す。いくつかの実施態様において、試料中のpSYKを検出するためのアッセイは、pSYKが核及び細胞質で検出された場合に、pSYKの存在を示す。

【0227】

いくつかの実施態様において、例えば、腫瘍細胞を含む試料中のpSYKを検出するためのアッセイは、偽陽性結果の検出を制限することができる。いくつかの実施態様において、試料中のpSYKを検出するためのアッセイは、pSYKが核のみにおいて検出された場合、pSYKの不在を示す。いくつかの実施態様において、試料中のpSYKを検出するためのアッセイは、pSYKが細胞膜内のみにおいて検出された場合に、pSYKの不在を示す。いくつかの実施態様において、試料中のpSYKを検出するためのアッセイは、pSYKが膜又は核において検出され、全SYKに結合する試薬と試料の一部とを接触させるさらなるステップが全SYKを検出しない場合に、pSYKの不在を示す。いくつかの実施態様において、試料中のpSYKを検出するためのアッセイは、pSYKが膜又は核において検出され、その一部のホスファターゼ処理後の試料の一部での抗pSYK抗体と接触させるさらなるステップが抗pSYK抗体による結合を妨げない場合に、pSYKの不在を示す。いくつかの実施態様において、試料中のpSYKを検出するためのアッセイは、pSYKが膜又は核において検出され、pY525/526ペプチド免疫原を予め吸着させた抗pSYK抗体で該試料の一部を染色するさらなるステップが予め吸着させた抗pSYK抗体による結合を妨げない場合に、pSYKの不在を示す。

【0228】

いくつかの実施態様において、細胞におけるpSYK発現は、細胞質中で検出されるpSYKの量を測定することによって定量化される。いくつかの実施態様において、細胞を含む試料中のpSYK発現は、陽性染色、例えば、腫瘍細胞の細胞質染色からバックグラウンド染色、

例えば、核又は非腫瘍細胞の染色を差し引くことによって定量化される。いくつかの実施態様において、細胞を含む試料中のpSYK発現は、式 $(N_p + N_{sp}) / N_{全}$ により定量化され、式中、 N_p は正のピクセルの数であり、 N_{sp} は強い正のピクセルの数であり、 $N_{全}$ は強い正のピクセル+正のピクセル+弱い正ピクセル+負のピクセルの数である。いくつかの実施態様において、定量化は、10倍～200倍又は10倍～50倍の倍率でIHC試料にて行われる。いくつかの実施態様において、定量化は、20倍の倍率でIHC試料にて行われる。

【0229】

いくつかの態様において、本開示は、本明細書に記載の抗体分子（例えば、MIL81-1-8、MIL81-2-1もしくはMIL81-99-1）又は本明細書に記載の抗体分子を含む免疫複合体、及び例えば、標識及び生体試料、例えば、本明細書に記載の生体試料を含む反応混合物を特徴とする。他の実施態様において、該反応混合物は、本明細書に記載の抗体分子（例えば、MIL81-1-8、MIL81-2-1もしくはMIL81-99-1）又は本明細書に記載の抗体分子を含む免疫複合体、並びに、例えば、標識及び生体試料、例えば、本明細書に記載の生体試料から取得又は単離されるpSYKを含んでよい。

【0230】

特定の実施態様において、上述したものなどの方法は、pSYKを含む細胞から取得された膜調製物においてpSYKへの抗pSYK抗体の結合を検出することを含む。他の実施態様において、方法はさらに、その表面上で発現した非SYKマーカーを検出する試薬によって細胞の結合を検出することを含む。そのような実施態様において、非SYKマーカーは、CD5、CD19、CD20、（例えば、Leica Biosystems PA0192抗体が結合するような）変異CD79などのCD79、CD34、CD38、CD117、CD138、CD133、LMP2A及びZAP70などの腫瘍細胞マーカー、B細胞マーカー又は骨髓前駆細胞マーカーから選択することができる。特定の実施態様において、pSYKを検出することを含む方法はさらに、CD34及び/又はCD117を検出することを含む。特定の実施態様において、本方法は、透過条件下などの、pSYKへの抗pSYK抗体の結合を許容する条件下で、抗pSYK抗体と細胞とを接触させること、及び複合体が抗pSYK抗体とpSYKの間に形成されるか否かを検出すること、を含む。透過条件下でpSYKへの抗pSYK抗体の結合を検出するための例示的なアッセイは、必要に応じて、CD34又はCD117などの細胞表面分子を使用してゲーティングすることを含む、フローサイトメトリーアッセイ又は蛍光活性化細胞選別、「FACS」アッセイなどの免疫蛍光アッセイである。

【0231】

インビボ診断

さらに別の実施態様において、本発明は、インビボでpSYKを発現する細胞又は組織の有無を検出するための方法を提供する。本方法は、（i）対象（例えば、癌を有する患者）に、検出可能な標識又はマーカーにコンジュゲートした抗体もしくはその抗原結合断片などの、本発明の抗pSYK抗体分子（すなわち、MIL81-1-8）、又はその抗原結合断片を投与すること；（ii）pSYKを発現する組織もしくは細胞への前記検出可能な標識又はマーカーを検出するための手段に該対象をさらすこと、を含む。このようなインビボ方法は、癌などの障害を有する患者の評価、診断、病期分類及び/又は予後のために使用され得る。本方法は、（i）抗pSYK抗体分子又はその免疫複合体を対象に投与すること；かつ（ii）該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出すること、を含む。複合体形成は、対象におけるpSYKの存在又はレベルの指標となるが、複合体が形成されないことは、対象におけるpSYKの不在の指標となる。

【0232】

そのような個体は転移したpSYK発現癌を有すると診断され得、静脈内投与などによって、医薬として許容し得る担体又は希釈剤を含む医薬組成物及び抗pSYK抗体分子を含むコンジュゲート化合物並びに活性部分が放射性物質である活性部分を該個体に投与し、pSYKを発現する細胞の存在を示す放射能の局所的な蓄積又は凝集の存在を検出することによって、転移したpSYK発現癌細胞が検出され得る。本発明のいくつかの実施態様において、該医薬組成物は、医薬として許容し得る担体又は希釈剤、及び抗pSYK抗体分子を含むコンジュゲート化合物、並びに活性部分が放射性物質である活性部分を含み、該抗pSYK抗体分子は

、本明細書に記載のMIL81-1-8抗体、又はその断片もしくは誘導体である。

【0233】

特定の一実施態様において、放射性核種は、インビボ画像化法における造影剤として使用するために、本発明の抗pSYK抗体分子にコンジュゲートしてよい。造影剤は、有用な診断手順であり、転移した細胞の位置を特定するために使用される手順である。例えば、個体は転移した癌を有すると診断され得、静脈内投与などにより、医薬として許容し得る担体又は希釈剤を含む医薬組成物、及び本発明の抗pSYK抗体分子を含むコンジュゲート化合物、並びに活性部分が放射性核種である活性部分を該個体に投与し、pSYKを発現する細胞の存在を示す放射能の局所的な蓄積又は凝集の存在を検出することによって、転移した癌細胞が検出され得る。

10

【0234】

画像化は、当業者に周知の多くの手順によって行うことができ、そのような手順で有用な適切な造影剤は、周知の手段によって本発明の抗pSYK抗体分子にコンジュゲートされ得る。本発明による画像診断に有用な標識の例としては、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{188}Rh 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}Br 、 ^{81}Rb / ^{81}MKr 、 ^{87}Msr 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 $^{113\text{M}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{132}I 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Pb 並びに ^{206}Bi 、及び ^{213}Bi などの放射性標識；フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光標識；核磁気共鳴活性標識；単一光子放射断層撮影（「SPECT」）検出器、又は陽電子放出断層撮影（「PET」）スキャナーにより検出される酸素、窒素、鉄、炭素又はガリウム（例えば、 ^{68}Ga 、 ^{18}F ）の陽電子放出同位体；ルシフェリンなどの化学発光物質；及びペルオキシダーゼ又はホスファターゼなどの酵素マー

20

【0235】

該抗体は、当技術分野で公知の技術を用いてそのような試薬で標識されてよい。例えば、それらの各々が引用により本明細書中に組み込まれている、Magerstadt, M.の文献、(1991) 抗体コンジュゲート及び悪性疾患(Antibody Conjugates And Malignant Disease), CRC Press, Boca Raton, Fla.;並びにBarchel, S. W.及びRhodes, B. H.の文献、(1983) 放射画像診断及び放射線治療(Radioimaging and Radiotherapy), Elsevier, NY, N.Y.は、抗体のアミノ酸への様々な治療用及び診断用放射性核種のコンジュゲーションを教示している。そのような反応は、適切なキレート剤及び/又はリンカーを有する本発明の抗pSYK抗体分子に放射性核種をコンジュゲートするために適用されてよい。抗体の放射性標識に関連する技術については、Wensel及びMearesの文献、(1983) 放射免疫画像診断及び放射免疫療法(Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy), Elsevier, N.Y.も参照されたい。D. Colcherらの文献、Meth. Enzymol. 121: 802-816 (1986)も参照されたい。

30

【0236】

放射性標識抗体の場合において、該抗体は、患者に投与され、該抗体が反応する抗原を有する腫瘍に局在化され、例えば、ガンマカメラ又は放射断層撮影又はコンピュータ断層撮影を用いる放射性核種スキャニングなどの公知の技術を用いてインビボで検出されるか、又は「画像化」される。例えば、A.R.Bradwellらの文献、「抗体の画像化における発展(Developments in Antibody Imaging)」、癌の検出及び治療のためのモノクローナル抗体(Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy)、R. W. Baldwinら(編)、pp65-85(Academic Press 1985)を参照されたい。或いは、放射性標識が陽電子（例えば、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 、及び ^{13}N 、 ^{68}Ga ）を放射する、ブルックヘブン国立研究所(Brookhaven National Laboratory)に設置され、Pet VIと命名されたものなどの陽電子放射型横断断層撮影スキャナー(positron emission transaxial tomography scanner)を使用してよい。

40

【0237】

他の実施態様において、本発明は、対象、例えば、ヒト対象が放射性同位体にコンジュ

50

ゲートされた抗pSYK抗体分子を投与されたときに、異なる組織が暴露される線量、例えば、放射線量を決定するための方法を提供する。本方法は、(i) 本明細書に記載の抗pSYK抗体分子、例えば、放射性同位体で標識された抗pSYK抗体分子を対象に投与すること；(ii) 放射性同位体のいくつか又は全てが、該対象の身体から除去されるまで、様々な時点の異なる組織、例えば、腫瘍、又は血液中にある放射性同位体の量を測定すること；及び(iii) 解析した各組織に受け取られた放射線の総線量を計算すること、を含む。測定は、放射性標識された抗pSYK抗体分子を(0日目に)該対象に投与した後の、予定された時点、例えば、1、2、3、5、7、及び12日目に行われてよい。時間積分され、かつ放射性同位体の比活性を乗じた、所定の組織に存在する放射性同位体の濃度を用いて、所定の組織が受ける線量を計算してよい。1種類の放射性同位体、例えば、ガンマエミッター、例えば、 ^{111}In で標識された抗pSYK抗体分子を用いて生み出された薬理学的な情報を用いて、容易に測定することができない異なる放射性同位体、例えば、ベータエミッター、例えば、 ^{90}Y から、同じ組織が受け取る予想線量を計算してよい。

10

【0238】

SYK標的治療薬のためのコンパニオン診断

本明細書に記載のインビトロ及びインビボ診断法は、癌などの増殖性疾患を有する患者が、該患者の細胞もしくは組織の表面上又はその中のpSYK発現の有無それぞれ又はpSYK発現のレベルに基づいて、SYK標的治療薬で治療されるべきか否かを通知するのに有用である。細胞表面上又は細胞内のpSYKを発現する1以上の細胞を有する患者は、SYK標的治療薬による治療の候補となり得る。

20

【0239】

特定の態様において、本発明は、pSYKを発現する疾患もしくは障害を有するか又は、有することが疑われる患者のSYK標的治療薬への感受性を決定する方法であって、(i) 対象から取得された生体試料と本発明の抗pSYK抗体分子とを接触させる工程；(ii) 該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程を含み、複合体形成は該生体試料中のpSYKタンパク質の存在又はレベルの指標であるが、複合体を形成しないこと又は非特異的な複合体形成は該生体試料中のpSYKタンパク質の不在の指標であり、それによってSYK標的治療薬への該患者の感受性を決定する、前記方法を提供する。特定の実施態様において、該生体試料中の抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成は、本明細書に記載の抗体分子、例えば、本明細書に記載のMIL81-1-8抗体を用いる免疫組織化学又は免疫蛍光を介して検出される。いくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体は、SYK標的治療薬に対する該患者の感受性を決定するために、1以上の追加の抗体と組み合わせて使用される。該抗pSYK抗体と組み合わせて使用される抗体の例としては、BTK pY551抗体(ABCAM(登録商標)、カタログ番号ab40770)などの抗pBTK抗体及びBLNK pY96抗体(Cell Signaling Technologies、カタログ番号3601)などの抗pBLNK抗体が挙げられるが、これらに限定されない。追加の抗体には、FLT3、VAV1、PLCG1、PI-3-キナーゼ(PI3K δ 及びPI3K δ/γ)、並びにLCP2に対する抗体が含まれる。該抗pSYK抗体と組み合わせて使用され得る抗体の他の例としては、例えば、CD5、CD19、CD20、(例えば、Leica Biosystems PA0192抗体が結合するような)変異CD79などのCD79、CD34、CD38、CD117、CD138、CD133、LMP2A及びZAP70から選択される、細胞表面分子に対する抗体などの非SYK抗体が挙げられる。そのような抗体は、当業者に周知であり、市販品として容易に入手可能である。本発明のいくつかの実施態様において、該抗pSYK抗体はSYK標的治療薬の薬力学を評価する方法において使用される。いくつかの実施態様において、本方法は、患者にSYK標的治療薬を投与する工程；該患者からpSYKを発現することが疑われる1以上の細胞を含む生体試料を取得する工程；該生体試料と抗pSYK抗体とを接触させる工程；該生体試料中の該抗pSYK分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程；該生体試料中のpSYK発現、必要に応じて1以上の対照試料又は校正試料を定量化する工程；校正試料又はSYK標的治療薬の研究におけるpSYK発現レベルを含むデータベースに対して該pSYK発現レベルを比較する工程；並びに、必要に応じて、該pSYK発現レベルに基づいて投与計画を調整する工程、のうちの一部又は全てを含む。

30

40

50

【0240】

特定の態様において、本発明は、1以上のpSYK発現細胞（例えば、慢性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、又は末梢T細胞リンパ腫などの血液悪性腫瘍）によって特徴付けられる疾患を有する患者を治療する方法であって、a. 該患者から取得された生体試料（例えば、細胞、組織生検、又は腫瘍生検）中のpSYKタンパク質発現を検出すること；b. 該生体試料がpSYKを発現する場合に、該患者にSYK標的治療薬（例えば、SYKの小分子阻害剤）を投与することを含む、前記方法を提供する。特定のそのような実施態様において、検出工程は、i) 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）：並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と該生体試料とを接触させること：かつii) 該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出すること、を含む。特定のそのような実施態様において、該検出工程は、免疫組織化学を用いて行われる。

10

【0241】

特定の態様において、本発明は、1以上のpSYK発現細胞（例えば、慢性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、又は末梢T細胞リンパ腫などの血液悪性腫瘍）によって特徴付けられる疾患を有する患者を治療する方法であって、該患者にSYK標的治療薬（例えば、SYKの小分子阻害剤）を投与することを含む、前記方法を提供する。したがって、特定の態様において、本発明は、慢性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、及び末梢T細胞リンパ腫から選択される血液悪性腫瘍を有する患者を治療する方法であって、本明細書に開示される化合物を投与することを含む、前記方法を提供する。いくつかの実施態様において、該びまん性大細胞型B細胞リンパ腫は、胚中心B細胞様（GCB）サブタイプである。いくつかの実施態様において、該びまん性大細胞型B細胞リンパ腫は、活性化B細胞様（ABC）サブタイプである。いくつかの実施態様において、該びまん性大細胞型B細胞リンパ腫は、非胚中心B細胞様（非GCB）サブタイプである。特定の態様において、本発明は、患者の腫瘍を治療するためのSYK阻害治療薬投与計画を決定するために使用するためのインビトロ方法であって、配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）：並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と該試料とを接触させることによって、該患者から取得された試料中のpSYKレベルを決定すること；かつii) 該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出することを含む、前記方法を提供する。

20

30

【0242】

いくつかの態様において、本発明は、pSYK発現、例えば、本明細書に記載の抗体及び方法によって検出される発現を有すると特徴付けられる障害又は癌の治療に使用するための医薬、例えば、SYK阻害剤の製造を提供する。

【0243】

本明細書に記載のコンパニオン診断方法を用いて評価（例えば、診断）及び/又は治療され得る例示的な疾患/障害には、急性骨髄性白血病、B細胞慢性リンパ性白血病（BCLL）、B細胞リンパ腫（例えば、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）（例えば、GCB DLBCL、ABC DLBCL又は非GCB DLBCL）、及びT細胞リンパ腫（例えば、末梢T細胞リンパ腫）などの血液悪性腫瘍、並びに肺癌（小細胞肺癌及び非小細胞肺癌）、膵臓癌、及び結腸癌などの上皮癌（すなわち、癌腫）を含む、異常な細胞増殖に関連する障害、疾患、及び状態が含まれるが、これらに限定されない。上記の血液悪性腫瘍及び上皮癌に加えて、いくつかの実施態様において、該状態は、とりわけ、白血病（慢性骨髄性白血病及び慢性リンパ性白血病（CLL））；乳癌、尿生殖器癌、皮膚癌、骨癌、前立腺癌、及び肝臓癌；脳の癌；喉頭、胆嚢、直腸、副甲状腺、甲状腺、副腎、神経組織、膀胱、頭、首、胃、気管支、及び腎臓の癌；基底細胞癌、扁平上皮癌、転移性皮膚癌、骨肉腫、ユーイング肉腫、細網肉腫、及びカポジ肉腫；骨髄腫、EBV関連腫瘍及び他の固形腫瘍、巨細胞腫、脾臓細胞腫瘍、急性及び慢性のリンパ球腫瘍並びに急性及び慢性

40

50

の顆粒球性腫瘍、有毛細胞腫瘍、腺腫、髓様癌、褐色細胞腫、粘膜神経腫、腸神経節腫、過形成性角膜神経腫瘍、マルファン症候群様体質腫瘍、ウィルムス腫瘍、セミノーマ、卵巣腫瘍、平滑筋腫瘍(leiomyomater tumor)、子宮頸部形成異常、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、骨髄異形成症候群、横紋筋肉腫、星状細胞腫、非ホジキンリンパ腫、悪性高カルシウム血症、真性多血症、腺癌、多形膠芽細胞腫、神経膠腫、リンパ腫、及び悪性黒色腫を含む他の種類の癌を含み得る。癌に加えて、いくつかの実施態様において、該状態は、とりわけ、良性前立腺肥大、再狭窄、過形成、滑膜増殖障害、網膜症又は眼の他の血管新生障害などの非悪性増殖性疾患を含む、異常な細胞増殖に関連する他の疾患を含み得る。いくつかの実施態様において、該状態は、そのようなSYK発現状態の症状;又はそのようなSYKを発現する状態に対する素因を含み得る。

10

【0244】

特定の実施態様において、1以上のpSYK発現細胞によって特徴付けられる疾患は、PTCL、DLBCL、FL、MCL、CLL、AML、MDS、上咽頭癌、リンパ腫、胃癌、乳癌、卵巣癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌）及びPT-LPDから選択される。特定の実施態様において、該DLBCLは、GCBサブタイプ、ABCサブタイプ又は非GCBサブタイプである。特定の実施態様において、1以上のpSYK発現細胞によって特徴付けられる疾患は、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍などの癌である。特定のそのような実施態様において、該血液悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病（CLL）である。特定のそのような実施態様において、該血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病（AML）である。特定のそのような実施態様において、該血液悪性腫瘍は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である。特定のそのような実施態様において、1以上のpSYK発現細胞によって特徴付けられる疾患は、CLL、AML、DLBCL及びEBV-リンパ性腫瘍又は固形腫瘍の悪性腫瘍から選択される。特定の実施態様において、1以上のpSYK発現細胞によって特徴付けられる疾患は、CLL、AML、及びDLBCLから選択される。

20

【0245】

本発明の方法は、SYK標的治療薬で患者を治療するか否かを決定する。本明細書に提供される方法はまた、例えば、患者からの腫瘍細胞試料中のpSYKの存在又はレベルに基づいて、例えば、本明細書に記載のSYK標的治療薬での個別化治療レポート、例えば、個別化癌治療レポートの作成を可能にする。本方法はまた、障害又は癌の治療のための支払いを決定する。そのような方法は、さらに、例えば、個別化癌治療レポートに示されているように、その癌がpSYKを有するか、又はpSYKのレベルが増加していると特徴付けられる患者の治療、例えば、SYK標的治療薬による治療の代金を支払うことを含み得る。特定の実施態様において、該SYK標的治療薬は、細胞傷害剤にコンジュゲートされた抗pSYKヒトIgG1モノクローナル抗体であるが、該mAbは、表5（アミノ酸配列）及び表6（対応する核酸配列）に列挙された3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を有する軽鎖可変領域（VL）及び3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を有する重鎖可変領域（VH）、並びに表3（アミノ酸配列）及び表4（対応する核酸配列）に列挙された重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。

30

【0246】

本発明のいくつかの態様において、該SYK標的治療薬は、SYKアンタゴニスト又はSYK阻害剤である。一実施態様において、該SYK標的治療薬は、ペプチドアンタゴニスト、ATP競合剤又はSYKの小分子阻害剤である。特定の実施態様において、該SYK標的治療薬は、SYKの小分子阻害剤などのSYK阻害化合物を含む。特定の実施態様において、該SYK標的治療薬は、SYKの小分子阻害剤である。特定のそのような実施態様において、該SYKの小分子阻害剤は、ピロロピリミジノン（例えば、6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[3,4-c]ピリミジン-5-オン）又はピロロピリジノン（例えば、1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン）などの縮合複素芳香族ピロリジノンを含む。特定の実施態様において、該SYKの小分子阻害剤は、その開示が引用により本明細書中に組み込まれている、米国特許第8,440,689号の中で見つけられ得る。

40

【0247】

50

いくつかの実施態様において、該SYKの小分子阻害剤は、以下の化合物：

- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（m-トリルアミノ）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 4-（1H-インダゾール-6-イルアミノ）-6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（4-フルオロ-3-メチルフェニルアミノ）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（m-トリルアミノ）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン； 10
- 6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-クロロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（ピラゾロ[1,5-a]ピリジン-3-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（3-（メチルスルホニル）フェニルアミノ）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン； 20
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロペンチルアミノ）-4-（3-（メチルスルホニル）フェニルアミノ）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- （R）-4-メチル-2-（4-（3-（メチルスルホニル）フェニルアミノ）-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ）ペンタンアミド；
- （R）-4-メチル-2-（4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ）ペンタンアミド；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（ベンゾフラン-3-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（イミダゾ[1,2-a]ピリジン-3-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン； 30
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（ベンゾ[b]チオフェン-3-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1S,2R）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- （R）-6-（2-アミノ-3-エトキシプロピルアミノ）-4-（m-トリルアミノ）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- （R）-6-（2-アミノ-3-エトキシプロピルアミノ）-7-フルオロ-4-（m-トリルアミノ）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（2-アミノ-3,3,3-トリフルオロプロピルアミノ）-4-（m-トリルアミノ）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン； 40
- （R）-4-メチル-2-（3-オキソ-4-（m-トリルアミノ）-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ）ペンタンアミド；
- 6-（シス-4-アミノテトラヒドロフラン-3-イルアミノ）-4-（m-トリルアミノ）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（1-エチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（1-エチル-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン；
- 6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（1-シクロプロピル-1H-ピラゾール- 50

- 4-イル) -1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-4-(1-シクロプロピル-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- シス-6-(2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-(シス-2-アミノ-4,4-ジフルオロシクロペンチルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-(シス-2-アミノ-3,3-ジフルオロシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-(シス-2-アミノ-3,3-ジフルオロシクロヘキシルアミノ)-4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-(シス-2-アミノ-3,3-ジフルオロシクロヘキシルアミノ)-4-(1-シクロプロピル-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- (R)-2-(7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;
- (R)-2-(4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;
- (R)-2-(4-(1-シクロプロピル-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;
- (R)-2-(4-(ベンゾフラン-3-イル)-7-フルオロ-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;
- (R)-2-(7-フルオロ-3-オキソ-4-(ピラゾロ[1,5-a]ピリジン-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-クロロ-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-3-オキソ-4-(m-トリルアミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-7-カルボニトリル;
- (R)-6-(2-アミノ-3-メトキシプロピルアミノ)-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- (R)-6-(2-アミノ-3-メトキシプロピルアミノ)-3-オキソ-4-(m-トリルアミノ)-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-7-カルボニトリル;
- (R)-6-(2-アミノ-3-メトキシプロピルアミノ)-7-フルオロ-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 7-アクリロイル-6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-ヨード-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-(1H-ピラゾール-4-イル)-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-(シス-2-アミノ-3,3-ジフルオロシクロヘキシルアミノ)-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-(1-メチル-1H-ピラゾール-5-イル)-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((3R,4R)-4-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-3-イルアミノ)-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

- 1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-メチル-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-d]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(m-トリルアミノ)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-メチル-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- (R)-6-(2-アミノ-3-メトキシプロピルアミノ)-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(ピラゾロ[1,5-c]ピリジン-3-イル)-1H-ピロロ[3,4-d]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-4-(ベンゾフラン-3-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- (S)-6-(3-アミノピロリジン-1-イル)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- (S)-6-(3-アミノピペリジン-1-イル)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-イソプロピル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 7-フルオロ-4,6-ビス(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-ブromo-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- (R)-6-(2-アミノ-3-メトキシプロピルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(チオフェン-3-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(4-メチルチオフェン-2-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(4-メチルチオフェン-2-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(チオフェン-3-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- (R)-2-(7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-N,4-ジメチルペンタンアミド;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(5-メチルチオフェン-2-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- (R)-2-(7-フルオロ-4-(4-メチルチオフェン-2-イル)-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;
- (R)-2-(7-フルオロ-3-オキソ-4-(チオフェン-3-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;
- (R)-2-(7-フルオロ-4-(5-メチルチオフェン-2-イル)-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;
- 6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-4-(2-アミノチアゾール-5-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;
- (R)-2-(7-フルオロ-4-(フラン-2-イル)-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;
- (R)-2-(7-フルオロ-4-(フラン-3-イル)-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]

ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;

(R)-2-(7-フルオロ-4-(5-メチルフラン-2-イル)-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;

(R)-2-(4-(4-シアノチオフエン-2-イル)-7-フルオロ-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;

(R)-2-(4-(4-シアノチオフエン-2-イル)-7-フルオロ-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;

(R)-2-(7-フルオロ-3-オキソ-4-(チアゾール-5-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;

(R)-2-(7-フルオロ-4-(イソチアゾール-5-イル)-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;

6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-1,1-ジチル-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(2-メチルチアゾール-5-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(5-メチルチオフエン-2-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-1-メチル-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

(R)-2-(7-フルオロ-3-オキソ-4-(チオフエン-2-イル)-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;

6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(チオフエン-2-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(チアゾール-5-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(チオフエン-2-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(4-(トリフルオロメチル)-1H-イミダゾール-1-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(4-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(3-メチルイソチアゾール-5-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(2-メチルチアゾール-5-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

(R)-2-(7-フルオロ-4-(2-メチルチアゾール-5-イル)-3-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-6-イルアミノ)-4-メチルペンタンアミド;

6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-4-(5-クロロチオフエン-2-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-4-(1-シクロプロピル-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン;

のうちの1以上、前述の化合物のいずれかの立体異性体;又は前述の化合物もしくは立体異性体のいずれかの医薬として許容し得る塩を含む。

【0248】

いくつかの実施態様において、該SYKの小分子阻害剤は、6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩(化合物A)である。いくつか

10

20

30

40

50

の実施態様において、該SYKの小分子阻害剤は、6-（（1S,2R）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩である。いくつかの実施態様において、該SYKの小分子阻害剤は、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩である。いくつかの実施態様において、該SYKの小分子阻害剤は、シス-6-（2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩である。いくつかの実施態様において、該SYKの小分子阻害剤は、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-4-（1-（ジフルオロメチル）-1H-ピラゾール-4-イル）-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩である。いくつかの実施態様において、該SYKの小分子阻害剤は、6-（（3R,4R）-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ）-7-フルオロ-4-（3-メチルイソチアゾール-5-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩である。特定の実施態様において、SYKのそのような小分子阻害剤は、経口投与（錠剤又はカプセル剤を投与することなどによる）、静脈内投与、皮下投与、又は任意の他の適切な方法によって投与されてよい。特定の実施態様において、投与は、1日2回又は1日1回であってよい。特定の実施態様において、投与は、1週間に7、6、5、4、3、2、又は1回であってよい。

10

【0249】

20

いくつかの実施態様において、SYK、BTK、BLNK、FLT3、VAV1、PLCG1、PI-3キナーゼ（PI3K δ 及びPI3K δ/γ ）、及びLCP2のうちの1以上の阻害剤、又はそれらの任意の組み合わせが患者に投与される。特定の実施態様において、SYKの阻害剤は、FLT3の阻害剤と組み合わせて投与されてよい。特定の実施態様において、小分子阻害剤などの阻害剤は、SYKとFLT3の両方の阻害剤として作用し得る。

【0250】

上述したように、本明細書に記載の抗体分子は、正常組織対新生物組織中のpSYKタンパク質の存在の評価を可能にし、それを通して、疾患の存在もしくは重症度、疾患の進行及び/又は治療の有効性が評価され得る。例えば、治療は監視され、有効性が評価され得る。一例では、pSYKタンパク質は、増殖性疾患を有する対象から取得された第1の試料中で検出及び/又は測定され、治療が開始され得る。その後、第2の試料が該対象から取得され、該試料中のpSYKタンパク質が検出及び/又は測定され得る。第2の試料中で検出又は測定されたpSYKタンパク質量の減少は、治療効果の指標であり得る。

30

【0251】

キット

本明細書に記載の抗pSYK抗体分子又は免疫複合体を含むキットも、本発明の範囲内である。「キット」は、pSYKを特異的に検出するための少なくとも1種類の試薬、例えば、本明細書に記載の抗体を含む任意の製品（例えば、パッケージ又は容器）である。さらに、抗pSYK抗体分子又は免疫複合体を含むリボソーム組成物を含むキットが含まれる。該キットは、使用のための説明書、他の試薬、例えば、標識、治療薬、又は標識もしくは治療薬に抗体をキレート化するか、又はそうでなければ結合させるのに有用な試薬、又は放射線防護組成物；投与用の抗体を調製するための装置又は他の物質；医薬として許容し得る担体；対象に投与するための装置又は他の物質を含む1以上の他の要素を含み得る。使用説明書は、インビトロで、例えば、試料、例えば、癌を有する患者からの生検、体液もしくは細胞中の、又はインビボでpSYKを検出するための、該抗pSYK抗体分子又は免疫複合体の診断用途のための説明書を含み得る。説明書は、例えば、癌患者で推奨される投与量及び/又は投与様式を含む治療用途のためのガイダンスを含み得る。他の説明書は、キレート剤、標識又は治療薬への該抗体の結合についての、又は、例えば、未反応のコンジュゲーション成分からのコンジュゲート抗体の精製のための説明書を含み得る。上述のように、該キットは、標識、例えば、本明細書に記載の標識のいずれかを含み得、かつ必要に応じて、

40

50

さらに増幅試薬を含み得る。上述のように、該キットは、治療薬、例えば、本明細書に記載の治療薬を含み得る。いくつかの適用において、該抗体は、他の成分、例えば、キレート剤又は標識又は治療薬、例えば、放射性同位体、例えば、イットリウム又はルテチウムと反応する。そのような場合において、該キットは、出発物質又は反応中間体から完成品を分離するのに使用するための、反応を実行するための反応容器又は分離装置、例えば、クロマトグラフィーカラムのうちの1以上を含み得る。

【0252】

該キットはさらに、適宜、1以上の別々の医薬製剤に処方される診断薬もしくは治療薬、例えば、本明細書に記載の診断薬もしくは治療薬などの少なくとも1種類の追加の試薬、及び/又は1以上の追加の抗pSYK抗体分子もしくは免疫複合体を含有してよい。該キットは、さらに、少なくとも1種類の追加のタンパク質を検出するために少なくとも1種類の追加の試薬を含有してよい。該追加のタンパク質は、BTK pY551などのpBTK、BLNK pY96などのpBLNK又はpFLT3であってよい。該追加のタンパク質は、FLT3、VAV1、PLCG1、PI-3キナーゼ（PI3K δ 及びPI3K δ/γ ）又はLCP2であってよい。該追加のタンパク質は、細胞表面分子、例えば、CD5、CD19、CD20、変異CD79などのCD79、CD34、CD38、CD117、CD138、CD133、LMP2A又はZAP70であり得る。したがって、該キットは、追加のタンパク質に対する抗体などのpSYK抗体及び非pSYK抗体を含んでよい。該キットはさらに、タンパク質安定剤、RNA安定剤、DNA安定剤又はリン酸安定剤などの、試料を安定化する試薬を含有してよい。該キットはさらに、本明細書に記載の校正試料を含有してよい。該キットはさらに、pSYK抗体の予備吸着のための免疫原ペプチド、例えば、配列番号25又はホスファターゼなどの特異的染色を確認するための試薬を含有してよい。該キットはさらに、腫瘍サブタイプを特定するための試薬を含有してよい。いくつかの実施態様において、腫瘍のサブタイプを特定するための試薬は、びまん性B細胞リンパ腫サブタイプを特定する。いくつかの実施態様において、該びまん性大細胞型B細胞リンパ腫サブタイプは、胚中心B細胞様（GCB）サブタイプである。いくつかの実施態様において、該びまん性大細胞型B細胞リンパ腫サブタイプは、活性化B細胞様（ABC）サブタイプである。いくつかの実施態様において、該びまん性大細胞型B細胞リンパ腫サブタイプは、非胚中心B細胞様（非GCB）サブタイプである。

【0253】

該キットはさらに、放射線防護剤を含有してよい。同位体、例えば、 ^{90}Y イットリウム（ ^{90}Y ）の放射線分解の性質が知られている。この放射線分解を克服するために、放射線防護剤は、それらが例えば、 ^{90}Y などの同位体の該抗体への標識反応を阻害しないか、又はそうでなければ悪影響を及ぼさないという意味で、そのような放射線防護剤が良性である限り、例えば、反応緩衝液中に含まれ得る。本発明の製剤緩衝液は、イットリウム又は他の強力な放射性核種による放射線分解を最小限にするヒト血清アルブミン（HSA）又はアスコルビン酸などの放射線防護剤を含んでよい。他の放射線防護剤は、当技術分野において公知であり、本発明の製剤緩衝液、すなわち、フリーラジカル捕捉剤（フェノール、亜硫酸塩、グルタチオン、システイン、ゲンチシン酸、ニコチン酸、アスコルビルパルミテート、グリセロール、HOP（O） H_2 、ナトリウムホルムアルデヒドスルホキシレート、 Na_2S 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、及び SO_2 など）において使用されてもよい。

【0254】

提供されるキットは、キレート剤がコンジュゲートされたタンパク質又はペプチドを、患者への投与のための治療用放射性同位体で放射性標識するのに有用なものである。該キットは、(i) キレート剤がコンジュゲートされた抗体を含有するバイアル、(ii) 放射性標識抗体を安定化し、患者に放射性標識抗体を投与するための製剤緩衝液を含有するバイアル、及び (iii) 放射性標識手順を実行するための説明書、を含む。該キットは、例えば、説明書で推奨されているように、良好な条件下で十分な時間、キレート剤がコンジュゲートされた抗体を放射性同位体又はその塩に暴露することを提供する。十分な純度、比活性及び結合特異性を有する放射性標識抗体が生成される。該放射性標識抗体は、例えば、製剤緩衝液で適切な濃度まで希釈し、さらなる精製の有無に関わらず、患者に直接投

与してよい。キレート剤がコンジュゲートされた抗体は、凍結乾燥形態で供給されてよい。

【0255】

スクリーニングアッセイ

本発明は、例えば、SYKのリン酸化、発現もしくはSYK経路活性に対して阻害効果を有するか、或いは例えば、SYK経路中のSYK基質もしくはタンパク質の発現又は活性に対して、或いはSYK機能の下流のエフェクター、例えば、Akt/mTORもしくはNF- κ Bの発現もしくは活性に対して刺激効果又は阻害効果を有するSYK阻害剤、すなわち、候補化合物もしくは試験化合物又は候補薬剤もしくは試験薬剤（例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチドミメティック、ペプトイド、小分子もしくは他の薬物）を特定する方法（本明細書で「スクリーニングアッセイ」とも呼ばれる）を提供する。このように特定された化合物を用いて、治療プロトコル中の標的（例えば、pSYK）の活性を調節するか、標的の生物学的機能を詳しく説明するか、又はpSYK相互作用を破壊する化合物を特定することができる。細胞、例えば、血液腫瘍又は固形腫瘍（例えば、PTCL、DLBCL（例えば、GCBサブタイプ、ABCサブタイプ又は非GCBサブタイプ）、FL、MCL、CLL、AML、MDS、上咽頭癌、リンパ腫、胃癌、乳癌、卵巣癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌）、及びPT-LPD）からの細胞、又は細胞株、例えば、化合物Aに応答せず、変異SYK遺伝子、又は活性のあるSYK経路を有する患者からの腫瘍の外植片から増殖させた細胞の死、アポトーシス又は老化を引き起こす化合物は、例えば、SYK阻害剤を特定することができる。

【0256】

他の実施態様において、該アッセイは、SYKの1以上の活性、例えば、ITAMドメイン、CD79a、CD79b、ATP、BLNKからなる群から選択されるリガンドと結合する能力、ヌクレオチド、例えば、ATP又はADPと結合する能力；ヌクレオチド、例えば、ATPを加水分解する能力；CD79と結合する能力、シグナロソームと結合する能力；チロシンをリン酸化する能力；自己リン酸化する能力；BLNKをリン酸化する能力；細胞周期を制御する能力、細胞シグナル伝達を調節する能力；及び/又は腫瘍細胞の生存を支持する能力を調節する化合物を特定することができる。

【0257】

本発明の試験化合物は、生物学的ライブラリー；ペプチドライブラリー（ペプチドの機能を有する分子のライブラリーであって、酵素分解に耐性があるが、それにもかかわらず、生物活性が残っている新規の非ペプチド骨格を有するライブラリー；例えば、Zuckermannらの文献、(1994) J. Med. Chem. 37:2678-85を参照されたい）；空間的にアドレス可能なパラレル固相又は液相のライブラリー；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；及びアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を含む、当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチのいずれかを使用して取得することができる。生物学的ライブラリー及びペプチドライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマー又は化合物の小分子ライブラリーに適用できる(Lam(1997) Anticancer Drug Des.12:145)。追加の化合物は、前のセクションで説明したSYK阻害剤を開示する刊行物に提供されるガイダンスから合成することができる。

【0258】

化合物のライブラリーは、溶液中（例えば、Houghtenの文献、(1992) Biotechniques 13: 412-421）、又はビーズ上（Lamの文献、(1991) Nature 354:82-84）、チップ（Fodorの文献、(1993) Nature 364:555-556）、細菌（Ladnerの米国特許第5,223,409号）、胞子（Ladnerの米国特許第5,223,409号）、プラスミド（Cullらの文献、(1992) Proc Natl Acad Sci USA 89: 1865-1869）、又はファージ上（Scott及びSmithの文献、(1990) Science 249: 386-390；Devlinの文献、(1990) Science 249: 404-406；Cwirlaらの文献、(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6378-6382；Feliciの文献、(1991) J. Mol. Biol. 222: 301-310；Ladnerの文献、上記）に存在することができる。

【0259】

一実施態様において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、その中で、SYKタンパク質、pSYKもしくはその生物学的に活性のある部分又はITK-SYK（Streubelらの文献、2006 Leukemia 20：313-318）を発現する細胞が試験化合物と接触して、SYK活性又は細胞の生存を調節する試験化合物の能力が決定される。一実施態様において、インビトロの細胞ベースアッセイは、栄養欠乏、例えば、低血清又は低グルコースの条件下で増殖させた細胞にて実施される。SYK活性を調節する試験化合物の能力を決定することは、例えば、ITAMドメイン、CD79a、CD79b、ATP、BLNKからなる群から選択されるリガンドと結合するSYKの能力、ヌクレオチド、例えば、ATP又はADPと結合する能力；ヌクレオチド、例えば、ATPを加水分解するSYKの能力；CD79と結合する能力、シグナロソームと結合するSYKの能力；チロシンをリン酸化するSYKの能力；自己リン酸化するSYKの能力；BTKをリン酸化するSYKの能力；BLNKをリン酸化するSYKの能力；細胞周期を制御するSYKの能力、細胞シグナル伝達及び/又は腫瘍細胞の生存を調節する細胞の能力を監視することなどによって、SYK機能アッセイで達成することができる。試験化合物の効果を、試験化合物に暴露されない対照細胞、キナーゼデッドITK-SYKなどのSYKのキナーゼデッド変異体を含む細胞、RASなどのBCR経路を介してシグナル伝達をしない分子を含む細胞、ITK-RASを含む細胞と比較することができる。いくつかの実施態様において、試験薬剤の存在下でのSYKの活性を、pSYKを含む細胞が耐性を有するSYK阻害剤、例えば、化合物Aなどのピロロピリミジノン（例えば、6,7-ジヒドロ-5H-ピロロ[3,4-c]ピリミジン-5-オン）又はピロロピリジノン（例えば、1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン）などの縮合複素芳香族ピロリジノンの存在下での活性と比較することができる。該細胞は、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト起源であり得る。他の実施態様において、該アッセイは、インビトロ又はインビボ、例えば、異種移植腫瘍モデルにおいて、薬剤耐性細胞株においてpSYKに構造的に又は機構的に類似した酵素の変異体を調節する試験化合物の能力を決定することができる。細胞生存率又は細胞増殖が低下した場合に、該化合物は、薬物耐性又はSYK阻害剤の調節因子として特定される。

【0260】

情報の使用

1つの方法において、例えば、患者の腫瘍のSYK活性化状態、例えば、本明細書に記載されるように測定されたpSYKの存在又は量についての情報、又は患者が良好な結果を有することが期待されるか否かについての情報は、第三者、例えば、病院、診療所、政府機関、償還の当事者又は保険会社（例えば、生命保険会社）に提供される（例えば、伝達される、例えば、電子的に伝達される）。例えば、医療処置の選択、医療処置の代金を支払うか否か、償還の当事者による支払い、又はサービスもしくは保険のコストは、該情報の関数であり得る。例えば、第三者は、情報を受け取り、該情報に少なくとも部分的に基づいて決定を行い、必要に応じて情報を伝達するか、又は情報に基づいて手順、支払い、支払いのレベル、適用範囲などの選択を行う。該方法において、p525/526などのpSYKの存在又は量は、本明細書に記載されるように決定される。該方法はさらに、SYK治療のための支払い又は保険料の請求を含み得る。

【0261】

一実施態様において、保険（例えば、生命又は医療）の保険料は、治療結果（例えば、有益な量）に関連付けられているpSYKの存在又はレベルに関する情報の関数として評価される。例えば、保険料は、本明細書に記載の患者の癌のpSYKが被保険者候補（又は保険の適用範囲を求める候補）と基準値（例えば、非罹患者）又は参照試料、例えば、マッチした対照の間で異なる場合に、（例えば、一定の割合で）増大させることができる。保険料は、本明細書に記載のpSYKの評価結果に応じて調整することもできる。例えば、保険料は、例えば、pSYKの関数、例えば、本明細書に記載のpSYKの評価結果として、リスクを分配するために評価することができる。別の例において、保険料は、治療結果を知っている患者から取得された保険数理データの関数として評価される。

【0262】

SYK活性又はpSYK発現についての情報、例えば、本明細書に記載のpSYKの評価結果（例

えば、有益な量)は、例えば、生命保険の引受過程で 사용할 ことができる。該情報は、対象についてのプロフィールに組み込むことができる。該プロフィール内の他の情報は、例えば、生年月日、性別、配偶者の有無、銀行情報、クレジット情報、及び子供などが含まれ得る。保険証券は、プロフィール内の情報の1以上の他の項目と共に、pSYKについての情報の関数、例えば、本明細書に記載のpSYKの評価結果として推奨され得る。保険料又はリスク評価はまた、マーカー又はマーカーセットの情報の関数として評価することができる。一実施態様において、期待される治療結果に基づいてポイントが割り当てられる。

【0263】

一実施態様において、SYKについての情報、その活性又はpSYKの量、例えば、本明細書に記載のpSYKの評価結果は、対象に提供されるサービスもしくは治療の代金を支払う(又は本明細書で言及される別の決定を行う)、かつ/又はサービスもしくは治療の代金を支払うために、資金の移動を許可するか否かを判断する機能によって分析される。例えば、本明細書に記載のpSYKの分析結果は、対象が良好な結果を有することが期待されることを示し、治療過程が必要であることを示唆し、それによって、対象に提供されるサービスもしくは治療の代金を支払う認可を示すか又は認可を行う結果をもたらし得る。一例において、本明細書に記載されるように検出される腫瘍細胞、例えば、AML、CLL又はDLBCLなどの血液癌由来の細胞を含む試料中で測定されるpSYK量が決定され、該pSYK量が良好な結果を特定する場合に、支払いが許可されるか、又は行われる。例えば、ある者、例えば、病院、介護者、政府機関、もしくは保険会社又は医療費を支払うかもしくは払い戻す他の者は、当事者、例えば、対象患者以外の当事者が該患者に提供されるサービス(例えば、特定の治療薬)又は治療の代金を支払うか否かを決定するために、本明細書に記載の方法の結果を使用することができる。例えば、第一者、例えば、保険会社は、患者へ又は患者に代わって財務支払いを提供するか否か、例えば、第三者、例えば、患者に提供されるサービスもしくは治療のための商品もしくはサービスのベンダー、病院、医師、又は他の介護者に返済するか否かを決定するために、本明細書に記載の方法の結果を使用することができる。例えば、第一者、例えば、保険会社は、保険プラン又はプログラム、例えば、健康保険もしくは生命保険のプラン又はプログラムを継続するか、中止するか、個人を登録するか否かを決定するために本明細書に記載の方法の結果を使用することができる。

【0264】

一態様において、本開示は、データを提供する方法を特徴とする。本方法は、支払いが提供されるか否かを決定するための記録、例えば、本明細書に記載の記録を提供するために、本明細書に記載のデータ、例えば、本明細書に記載の方法によって生成されたデータを提供することを含む。いくつかの実施態様において、該データは、コンピュータ、コンパクトディスク、電話、ファクシミリ、電子メール、又は手紙によって提供される。いくつかの実施態様において、該データは、第一者によって第二者に提供される。いくつかの実施態様において、第一者は、対象、ヘルスケア提供者、治療する医師、健康維持機構(HMO)、病院、政府機関、又は薬物を販売もしくは供給する者から選択される。いくつかの実施態様において、第二者は、第三者の支払人、保険会社、雇用者、雇用者出資の健康保険、HMO、又は政府機関である。いくつかの実施態様において、第一者は、対象、医療提供者、治療する医師、HMO、病院、保険会社、又は薬物を販売もしくは供給する者から選択され、第二者は政府機関である。いくつかの実施態様において、第一者は、対象、医療提供者、治療する医師、HMO、病院、保険会社、又は薬物を販売もしくは供給する者から選択され、第二者は保険会社である。

【0265】

別の態様において、本開示は、患者についてのSYKのリスト及び値、例えば、p525/526の活性、存在又はp525/526の量を含む、記録(例えば、コンピュータ読み取り可能な記録)又は個別化治療レポート、例えば、個別化癌治療レポートを特徴とする。いくつかの実施態様において、該記録は、治療の異なる時点で、例えば、治療前及び治療後に取得したSYK値又はpSYK値の各態様についての2以上の値を含む。

【0266】

以下の実施例は、例示であるが、本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0267】

(実施例)

実施例1：SYK阻害

SYK活性を阻害する化合物の能力は、インビトロ及びインビボアッセイを含む、様々な方法を用いて評価され得る。そのようなアッセイの例は、その全体が本明細書中に組み込まれている米国特許第8,440,689号に開示されている。以下のインビトロアッセイは、FAM標識されたSYK特異的基質

【化7】

10

(5FAM-KKKKEEIYFFFG-NH₂, 配列番号:23)

のSYK媒介性リン酸化を阻害する試験化合物の能力を測定する。

【0268】

簡単に説明すると、SYKタンパク質を、ヒト脾臓チロシンキナーゼをコードするcDNAから調製し、バキュロウイルス発現ベクターを用いて昆虫細胞で発現させた。該cDNAはOpen Biosystems社から購入した。SYKキナーゼドメイン（残基356～635）をPCRにより増幅し、BamHI/XbaI部位でプラスミドpFastBac1（Invitrogen）にクローニングした。

【化8】

20

Met-Ala-Lys-SYK(356-635)-HHHHHH (配列番号:24)

をコードする組換えプラスミドを配列決定し、大腸菌DH10Bac株に形質転換した。組換えバクミドDNAを単離し、Sf9昆虫細胞にトランスフェクトした。組換えウイルスを、トランスフェクション後72時間に回収した。高力価ウイルスストックを、約0.01の感染多重度（MOI）でSf9細胞に感染させることにより調製した。Sf9細胞（10L）の懸濁液を、組換えウイルス（MOI=5）で感染させ、48時間、ウェーブバイオリアクター（GE-Healthcare）中でインキュベートした。次いで、これらの細胞を収集し、-80℃で保存した。

【0269】

30

発現タンパク質を精製するために、凍結Sf9細胞（10L）を小さい（<1cm）の粒子に破壊し、20mM トリス（pH7.6）、0.25mM TCEP、100mM NaCl、5%グリセロール及びプロテアーゼ阻害剤を含有する溶解緩衝液（300mL）に懸濁した。この懸濁液を完全に解凍するまで室温で攪拌し、回転ブレードホモジナイザーでさらに2～4分間溶解し、次いで、1時間、4200 gで遠心分離した。遠心分離後、チーズクロスを通して上清を注ぎ、10mM トリス（pH7.6）、0.25mM TCEP、300mM NaCl、5%グリセロール、及び20mM イミダゾールを含有する洗浄緩衝液で予め平衡化したニッケルキレート樹脂（PROBOND（商標）樹脂、Invitrogen）と組み合わせた。混合物を冷室で3時間攪拌し、次いで、10分間、900 gで遠心分離した。この樹脂を洗浄緩衝液（50mL）に分散させ、900 gで10分間遠心分離し、少量（5mL）の洗浄緩衝液に再分散させ、次いで、使い捨てPoly-Prepクロマトグラフィーカラムに注ぎ、タンパク質がクマシー緩衝液（約120mLの洗浄緩衝液）中で観察されなくなるまで、それを通して洗浄緩衝液を重力により通過させた。10mM HEPES（pH7.4）、150mM NaCl、10%グリセロール、5mM DTT、及び400mM イミダゾールを含有する溶出緩衝液（30mL）を用いて、樹脂からSYKタンパク質を溶出した。溶出液を濃縮し（5mL）、さらにスーパーデックス200カラム（1.2mL/分で160分間、10mM HEPES（pH7.4）、10mM NaCl、10mM MgCl₂、0.1mM EDTA、及び0.25mM TCEP）上で精製した。クロマトグラフィー画分をSDS-PAGE上に流し、必要な画分をプールし、濃縮した。最終送出緩衝液は、10mM HEPES（pH7.4）、10mM メチオニン、150mM NaCl、10%グリセロール、5mM DTTであった。

40

【0270】

SYK阻害は、50mM HEPES、10mM NaCl、10mM MgCl₂、0.2mM EDTA、0.01% EDA（ブリジ35

50

）、1mM DTT、及び0.1mg/mlのBSAを含有するpH7.3の緩衝液中で、黒色384ウェルプレートフォーマットを使用して決定した。各試験化合物を、2倍段階希釈を用いて11のデータポイントについてDMSOで調製し、各希釈が3% DMSOを含有するように緩衝液に添加した。各ウェルに3 μ Mの

【化9】

5FAM-KKKKEEIYFFFG-NH₂, 配列番号: 23

（緩衝液中）を2 μ L、希釈した試験化合物（緩衝液中3% DMSO）を2 μ L、並びに2.4nM SYK及び45 μ M ATP（緩衝液中）を2 μ L加えた。反応混合物を60分間室温でインキュベートし、50mM Hepes、30mM EDTA、0.1% トリトンX-100（pH7.3）を添加することによりクエンチした。蛍光標識基質及び反応後の生成物を定量化するために、試験プレートをキャリアパーLC-3000上にロードし、微小流体ベースの分離によって変換率を測定した。対応するIC₅₀値を、標準IC₅₀の式に対する化合物濃度及び阻害率の非線形カーブフィッティングにより計算し、IC₅₀がモル濃度であるpIC₅₀、すなわち、-log（IC₅₀）として報告することができる。

10

【0271】

実施例2：ウサギモノクローナル抗体の作製

pSYKタンパク質に対するウサギモノクローナル抗体を、Epitomics社（Burlingame, CA）によって提供されるRabMAbサービスを使用して作製した。

20

【0272】

ニュージーランド白ウサギ（2.5～3ヶ月齢、体重約2.5Kg、ID番号4784、4785、4786及び4787）を、hSYKの残基520～529をカバーするペプチドで免疫し、チロシン525及びチロシン526に対応する残基をリン酸化する

【化10】

(C-RADEN-pY-pY-KAQ, 配列番号: 25)

。このペプチドを、N末端に付加されたシステインのスルフヒドリル部分を介してKLHに連結した。従来の免疫技術を用い、アジュバント（SigmaAldrich, St. Louis, MO）を用いて、免疫を行った。最初の注射は完全フロイントアジュバント（CFA）を用い、その後の注射は変性アジュバント（SFA）を使用した。免疫原を、3週間+2週間+2週間+採血1+2週間+採血2のスケジュールで、複数の部位に皮下注射によって投与した。血清力価が最も高いウサギである番号4786を、米国特許第7,429,487号からのEpitomics融合パートナー細胞株240E-W及びポリエチレングリコール（PEG）を使用することを含む方法を用いて、脾臓摘出及びモノクローナル融合の候補として選択した。

30

【0273】

このウサギ（番号4786）の一部のリンパ球を用いて、市販の抗体（Epitomics 2175-1）を生成した。このウサギの他のリンパ球を凍結保存し、本明細書に記載のpSYK抗体の融合及び作製のために後で使用した。

【0274】

別々の2日（1日目及び2日目）に、2億個のリンパ球細胞を1億個の融合パートナー細胞と融合し、それぞれ、20枚の96ウェルプレートに播種した。これらのプレートを、標準的な条件下で、組織培養インキュベーター中で維持した。細胞増殖を、融合後2～3週間調べ、増殖を有するウェル数を試験ウェルの総数で割ることを用いて、融合効率をコンピュータで計算した。1日目の融合の融合効率を98%の融合効率と測定し、2日目の融合効率は98%であった。

40

【0275】

実施例3：スクリーニング物質の作製

リン酸化ペプチドY525/526免疫原はEpitomics社が調製した。ELISAによって試験した場合、この物質はEpitomics 2175-1と結合したが、抗hSYK抗体（Epitomics 1688-1）とは結合しなかった。

50

【0276】

GST-hSYKを、バキュロウイルス感染Sf9細胞で発現させ、グルタチオンセファロース親和性樹脂によりアフィニティー精製した。インビトロキナーゼ (IVK) pSYKについては、単離したGST-SYKを1mM ATP、1mM MgCl₂中で、室温で1時間インキュベートし、自己リン酸化を生じさせた。5mM EDTAを添加することにより反応を停止し、0.1% SDSで処理するために少量を取り除いて、4℃で保存し、アルファスクリーン分析のために使用するか、又はさらに精製せずに-80℃で保存した。この試料は、後に、ハイブリドーマのスクリーニングアッセイのためにEpitomics社で使用した。試料の一部を、抗SYK (Cell Signaling Technologies #2712) 及びEpitomics 2175-1を用いるウェスタンブロッティングのために、SDS-PAGEにより分析した。組換え物質の大部分は、Y525/526の位置でリン酸化されることが確認された。

10

【0277】

自己リン酸化GST-pSYKの一部を、pSYKに対する抗体の特異性を確認するために、T細胞タンパク質ホスファターゼ (TC-PTP、New England Biolabs)、チロシン特異的ホスファターゼで処理した。この物質 (PPアーゼ-pSYK又は脱pSYK) は、抗hSYK抗体 (Epitomics 1688-1又はCell Signaling Technologies #2712) へのその結合を保持するが、Epitomics 2175-1又はCell Signaling Technologies #2710への結合をほとんど失っている。

【0278】

追加の細胞培養物質を用いて、B細胞受容体 (ヤギ抗ヒトIgのAffiniPure F(ab')₂断片、カタログ番号109-006-127、Jackson Immuno Research Laboratories社、West Grove, PA) の架橋を介して、又は60分の時間経過にわたって過バナジン酸処理 (細胞1mL中に以下のもの25 µL; Na₃VO₄ 50 µL、9.1M H₂O₂ (31%) 5.5 µL、H₂O 944.5 µl) で刺激したWSU-DLCL2 (ヒトびまん性大細胞型B細胞リンパ腫) 細胞を利用して抗体をスクリーニングした。各時点で、細胞を回収し、プロテアーゼ阻害剤カクテルI (Calbiochem: 539131-10VL) 及び1×HALTの一般的なタンパク質ホスファターゼ阻害剤カクテル (Thermo: 78428) の両方を含有するMPER (Thermo: 7850) に溶解した。

20

【0279】

上述したように、LY10 (OCI-LY10) 細胞も、架橋又は過バナジン酸での刺激の有無に関わらず、溶解物として使用した。Ly10細胞は、WSU-DLCL2細胞に比べて弱いSYK発現を有する (図1)。この弱いSYK及び/又はpSYK発現を、未処理の3種類の細胞株、架橋剤で10分間処理した3種類の細胞株、又はWSU-DLCL2細胞では10分間、2.5nMの過バナジン酸で処理し、Ly10細胞では30分間、5nMの過バナジン酸で処理した3種類の細胞株-WSU-DLCL2、LY10及びHBL1における、異なるSYK及びpSYK抗体 (pSYK、Epitomics 2175-1及びCST 2710; SYK pY352、CST 2717; SYK pY323、Epitomics 2173及びCST 2715) での染色を比較するためにウェスタンブロット研究で確認した。この研究はまた、BLNK抗体 (CST 3575、SC8382及びSC15345) 並びにpBLNK抗体 (BD558366、CST 36015及びSC28517-12) でのブロットの染色を含む。Epitomics 2175抗体及び2173抗体並びにCST SYK pY352抗体は、架橋処理したWSU-DLCL2細胞とHBL1細胞の両方においてバンドを検出したが、過バナジン酸処理をかなり強化しないとLy10細胞においてバンドを検出しなかった (BLNKは、CST 3575及びSC15345抗体によって全ての試料で検出されたが、pBLNK検出は、架橋した細胞及び過バナジン酸処理した細胞におけるpSYK検出に匹敵した)。この研究の1つの結論は、核酸の結果を広げ、LY10架橋試料において弱いpSYKシグナルを明らかにした。

30

40

【0280】

スクリーニング物質の品質管理を行った。ELISAアッセイを、Epitomics社 (Burlingame, CA) で行った。Epitomics 2175-1による結合について試験したELISAアッセイを、抗SYK抗体 (Epitomics 1688-1、SYKのキナーゼドメインに近い配列に対応するペプチドに対して作られた) による結合と比較した。

【0281】

細胞溶解物のウェスタンブロットを、Epitomics社の2種類の市販抗体を用いて行った。全SYKの強い発現を、刺激していない場合と刺激した場合の両方で、WSU-DLCL2細胞とLY10

50

細胞の両方で確認した。陽性対照のEpitomics # 2175は、刺激したWSU-DLCL2細胞及びLY10細胞からの試料中のpSYKバンドにのみ結合した（WSU-DLCL2よりもLY10において若干低い強度）。

【0282】

実施例4：抗体スクリーニング

初期スクリーニング

以下のように、各融合について最低2つのプレートを調べた：標準ELISA法を用いて、GST-SYK-pを1ウェル当たり50ngでコーティングしたプレートを用いて、全40プレートをスクリーニングした。1：10K希釈したウサギ4786の血液を陽性対照として使用した。0.5を超えるO.D.を有する103個のクローンは、推定陽性とみなし、さらに24ウェルプレート中で増殖させた。

10

【0283】

その後の確認スクリーニングを、GST-SYK-p及びGST-SYK-np 50ngでコーティングしたプレートを用いたELISAによって行った。30個のクローンは、GST-SYK-pに対して陽性であることが確認され、それらの中で29個がGST-SYK-p特異的と特定され、すなわち、それらは陰性対照タンパク質に対して陰性であった。

【0284】

第2レベルのスクリーニング

30マルチクローンの上清をウェスタンブロット、AlphaLISA、及び免疫蛍光によるさらなる試験に供した。

20

【0285】

ウェスタンブロットを、GST-pSYK (IVK)、及びホスファターゼ処理したGST-pSYKのSDS-PAGEゲルから調製した。各ハイブリドーママルチクローン上清をブロットへの結合について試験した。対照には、抗pSYK抗体、Epitomics 2175-1又はCell Signaling Technologies社の抗SYK pY323抗体、及び抗SYK pY352抗体を含めた。この方法により、脱リン酸化pSYKと比較して良好なリン酸化pSYKの結合を有するマルチクローンハイブリドーマ上清は、1、2、19、24、39、49、52、53、55、59、63、70、81、84、85、87、98及び99であった。

【0286】

AlphaLISA(登録商標)発光近接アッセイ(PerkinElmer社、Waltham, MA)を、アルファスクリーン96ウェルマイクロタイタープレートにて二重に行った。各個々のハイブリドーマ上清の2セットについて、列挙した2nMのSYK試料(IVK及びPPアーゼ処理した組換えGST-SYK試料)25 µlを、室温で2時間、ハイブリドーマ上清5 µl並びにHiBlock(PerkinElmer #AL004C)中25 µg/mlのグルタチオン供与体(PerkinElmer #6765300)及びプロテインAアクセプタービーズ(PerkinElmer #6760137M)25 µlに加えた。この方法により、マルチクローン1、2、19、24、39、49、53、54、55、63、70、84、85、87、96、98及び99の上清について、バックグラウンドに対して良好なシグナルが存在した。マルチクローン94の上清は、リン酸特異性を有していなかった(リン酸化試料と脱リン酸化試料の両方に強く結合した)。

30

【0287】

マルチクローン上清の免疫蛍光アッセイを、IL2誘導性T細胞キナーゼ(ITK)-SYK融合タンパク質構築物の2つのバージョンである野生型(wt、Streubelらの文献、2006 Leukemia 20:313-318)及びそのキナーゼデッド(kd)変異体のうちの1つの脂質：DNA複合体(FuGENE 6、3:1比)で24時間トランスフェクトし、96ウェルプレートの1ウェルあたり3000個の細胞を播種したHeLa細胞にて行った。アッセイ前に、これらの細胞を過バナジン酸で15分間処理し、次いで、標準的な方法により抗体蛍光染色のために固定した。対照には、全SYK抗体による染色、pSYK Y525/526抗体による染色、ヘマグルチニン(HA)の染色、及び細胞密度を確認するためのDAPI(ヘキスト試薬)DNA染色を含めた。最高染色のマルチクローン上清は、1、2、24、36、53、54及び99であった。次のレベルでは、優れた上清は、96、55、59、63、70、84、85及び87であった。

40

50

【 0 2 8 8 】

下の表は、これらの3つの試験による結果をまとめたものである。

【表 7】

抗体試料	ウェスタンブロット		AlphaLISAシグナル		免疫蛍光	
	pSYK	de-pSYK	pSYK	de-pSYK	wt SYK	KD SYK
マルチクローン1	++++	+	86412	171	++++	-
マルチクローン2	++++	+	111834	523	++++	-
マルチクローン19	+++	+	70728	333	+++	+/-
マルチクローン24	++++	+	34419	922	++++	-
マルチクローン36	-	-	8778	1064	++++	-
マルチクローン39	++	+/-	22686	124	+++	-
マルチクローン43	+/-	-	1511	200	-	-
マルチクローン49	++	+/-	11704	247	++	+/-
マルチクローン52	++	+/-	2565	257	++	-
マルチクローン53	++++	+	44080	333	+++	-
マルチクローン54	+/-	-	48336	608	++	-
マルチクローン55	++++	+	64572	532	++++	+
マルチクローン57	-	-	333	390	-	-

10

20

マルチクローン59	++	+/-	4209	228	+	-
マルチクローン60	-	-	314	266	-	+/-
マルチクローン61	+/-	-	428	200	-	+
マルチクローン63	++	+/-	11752	162	+	-
マルチクローン67	+	+/-	5073	124	-	-
マルチクローン70	+++	+/-	18725	152	+/-	-
マルチクローン79	+/-	-	8541	295	+	-
マルチクローン81	+++	+/-	475	181	+/-	-
マルチクローン82	+/-	-	437	238	-	-
マルチクローン84	++++	+	189060	2860	+	-
マルチクローン85	++++	+	65094	466	+	-
マルチクローン87	++	+/-	21147	456	+/-	-
マルチクローン94	-	-	87343	135869	-	-
マルチクローン96	+/-	-	223868	4418	++	-
マルチクローン98	++++	+	20216	285	++	++++
マルチクローン99	++++	+	138862	1083	++++	-
マルチクローン102	+/-	-	2917	200	-	-
Epitomics 2175-1	++++	+				
抗 SYK	+++	++++				
抗 pSYK Y525/526 CST	+	+/-				
抗 SYK pY323	++++	-				
抗 SYK pY352	+++	+/-				

10

20

30

【0289】

一部のマルチクローン上清も、細胞溶解物のウェスタンブロットにてスクリーニングした。WSU-DLCL2細胞及びLY10細胞の溶解物中でのSYKへの結合を比較した。マルチクローン1及び2からの抗体は、刺激したWSU-DLCL2細胞からの試料上のSYKに適度に結合した。マルチクローン99からの抗体は、刺激したWSU-DLCL2細胞からの試料上のSYKに強く結合し、刺激したLY10細胞からの試料上のSYKに適度に結合した。これらの抗体はまた、両方の種類の刺激していない細胞と刺激した細胞の両方の中のいくつかの余分なバンドに結合した。市販の抗pSYK Y525/526抗体は、刺激した両方の種類の細胞からの試料中のSYKに強く結合し、刺激していない細胞からの試料中のバンドのいずれにも結合しなかった。

40

【0290】

上記のアッセイ後に、15種類のマルチクローンハイブリドーマ上清を免疫細胞化学及び免疫組織化学のために選択した。これらは、上清1、2、19、24、36、53、54、55、59、63、70、84、85、96及び99であった。

【0291】

第3のレベルのスクリーニング

免疫細胞化学を、未処理のWSU-DLCL2試料又はFab架橋によって活性化したWSU-DLCL2試

50

料にて行った。活性化のために、Fab架橋を、培養中に、細胞にFabを添加することにより行う。Fabは、SYK経路を活性化する細胞の表面タンパク質を架橋する。200×10⁶個の細胞の細胞ペレットをペレットとしてホルマリン固定し、パラフィン包埋し、染色のために切片にした。陰性対照は、NIH 3T3 ITK-RAS（RASに融合されたITK）であった。1つの工程で、これらの上清を、熱処理（95℃、8分）前に、エピトープを暴露する場合又は暴露しない場合で、細胞試料との結合について試験した。

【0292】

結果を以下の表に提供する。

【表8】

	非加熱		加熱		
上清	陰性対照: NIH 3T3 ITK- Ras	陽性対照: WSU-DLCL Fab 架橋	陰性対照: NIH 3T3 ITK- Ras	陽性対照: WSU-DLCL Fab 架橋	結果
Epitomics 2175-1			+/-	+	良好であるが 弱い
81-1	+/-	++	+/-	++	良好
81-2	+/-	++	+/-	++	良好
81-19	+	++	+/-	++	OK
81-24	-	++	+/-	+	良好
81-36	+++	+++	+++	+++	不良
81-53	+++	+++	+++	+++	不良
81-54	+/-	++	+/-	++	OK
81-55	+++	+++	+++	+++	不良
81-59	-	-	-	-	不良
81-63	-	+	-	+/-	不良
81-70	+++	++	++	+++	不良
81-84	+/-	++	+/-	++	良好
81-85	+/-	++	+/-	++	良好
81-96	+/-	+	+/-	+	OK
81-99	+	+++	+	+++	良好

【0293】

市販の抗体（Epitomics 2175-1）は、加熱すると、陰性対照ペレットにおいてわずかに稀に染色されたバックグラウンド細胞を有していた。実際の陽性染色は大部分が膜であり、非常にわずかに細胞質が濁っていた。上清81-1、81-2、81-24、81-54、81-84、81-85、81-96及び81-99については、プロトコルとして非加熱を選んだ。上清81-19については、加熱プロトコルは、非特異的なバックグラウンドをほとんど有していなかった。

【0294】

上清81-1、81-2、81-24は、陰性対照においてはほとんど～全くバックグラウンドを示さず、陽性対照は強いシグナルを示したので、これらの上清を異種移植に使用した。上清

81-19、81-54、81-84、81-85及び81-99は、陰性対照においてほとんどバックグラウンドを示さず、陽性対照は強いシグナルを示したので、これらの上清を異種移植に使用した。上清81-96は、陰性対照においてほとんどバックグラウンドを示さず、陽性対照は弱いシグナルを示したので、この上清を異種移植に使用した。上清81-36、81-53、81-55、及び81-70は、加熱と非加熱の両方のプロトコルで、多くの非特異的染色が存在した。これらの上清を追求しなかった。加熱又は非加熱プロトコルのいずれかによって、上清81-59については染色が観察されず、上清81-63については非常に弱い染色が観察された。これらの81-59及び81-63の上清は追求しなかった。

【0295】

要約すると、良好なICC染色が、マルチクローン上清1、2、24、84、85及び99によって得られた;OK ICC染色が、上清19、54及び96によって得られた。不良のICC染色が、上清36、53、55、59、63及び70によって得られた。良好な染色及びOK染色の上清を、異種移植試料上の染色についてスクリーニングした。

【0296】

第4レベルのスクリーニング

ICCアッセイにおける良好な染色パターンについて選択された9つの上清を、PHTX-95L（ヒトリンパ腫の原発腫瘍）を用いてスクリーニングした。一般的には、約200mm³サイズに成長させるために、原発ヒト腫瘍片をNOD SCIDマウスに移植した。腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）切片を、Ventana Discovery XT自動化IHC/ISH研究スライド染色システム（Ventana Medical Systems社、Tucson, AZ）を用いて、標準Ventana生産プロトコルに従って染色した。一般的なプロトコルは、メーカーの試薬のEZ prep（Ventana 950-100）、反応緩衝液（Ventana 950-300）、セル・コンディショニング1（Ventana 950-124）、ヘマトキシリン（Ventana 760-2021）及びブルーイング試薬（Ventana 760-2037）を使用した。Epitomics #2175を使用して、全てのIHCを、抗体及びULTRAMAP（商標）抗ウサギHRP試薬（Ventana 760-4315）をインキュベートするために熱を使用する一般的なプロトコルに従って染色した。マルチクローン上清81-19 IHCについてのIHCアッセイを、抗体及びOMNIMAP（商標）抗ウサギHRP試薬（Ventana 760-4311）をインキュベートするために熱を使用する一般的なプロトコルに従って行った;他の全ての上清の結合についての染色は、抗体及びOMNIMAP（商標）抗ウサギHRP試薬（Ventana 760-4311）をインキュベートするために熱を使用しない一般的なプロトコルに従った。Dakoタンパク質ブロック（カタログ番号X0909）は、全3つのプロトコルで使用した最適なブロックであり、Dako抗体希釈液（カタログ番号S0809）を用いて、Epitomics 2175-1抗体を希釈した。

【0297】

これらの上清におけるICCアッセイと比較するためのFFPE細胞ペレットからのWSU-DLCL DMSO切片（低SYK発現体）、FFPE細胞ペレットからのWSU-DLCL Fab架橋切片（中間のSYK発現体）、FFPE細胞ペレットからのWSU-DLCL過バナジン酸、WSU-DLCL過バナジン酸切片（高SYK発現体）の染色の間で染色を比較した。ペレット化のための細胞採取の前に15分間の過バナジン酸=2.5 µM。未処置のPHTX-95L移植マウス又はSYKキナーゼ活性（化合物A）の阻害剤の単回投与によって処置したPHTX-95L移植マウスに、120mg/kgで経口投与した。投与後2時間の時点で、10%ホルマリン固定及びIHCの処理のために腫瘍を収集した。結果を以下の表に提供する。

【0298】

【表 9】

	WSU-DLCL DMSO	WSU-DLCL Fab 架橋	WSU-DLCL 過バナジン酸	PHTX95L 未処置	PHTX95L 処置	結果
Epitomics 2175-1	+/-	+	+++	++	+	良好だが 弱い
81-1	+	++	+++	++	+	良好
81-2	+	++	+++	++	+	良好
81-19	+	++	+++	++	++	不良な バックグラウンド
81-24	+	++	+++	++	+	良好
81-54	+	++	+++	+	+	不良な バックグラウンド
81-84	+	++	+++	++	+	良好
81-85	+	++	+++	++	+	良好
81-96	+	+	+++	+	+	弱い
81-99	+	+++	+++	++	++	良好

10

20

【0299】

30

このアッセイでは、未処置対処置の異種移植片を比較した場合に、81-1及び81-2は染色強度が減少した。上清81-24については、未処置対処置の異種移植片を比較した場合に、強度は減少したが、それはあまり強くはなかった。81-84、81-85の上清については、未処置対処置の異種移植片を比較した場合に、強度は減少したが、陰性対照にある程度のバックグラウンドがあった。81-99については、処置と未処置の間に差があった。顕著なバックグラウンドが観察されたが、染色は非常に強かった。しかしながら、精製及び滴定により、必要な染色差を与える可能性がある。上記の上清をさらなる検討に相当と判断した。以下の上清をさらなる研究における追求に不適当と判断した：81-54の上清については、処置した場合に、ある程度の非特異的な染色があり、この上清によって染色も組織上で非常に弱いものであった。上清81-19については、処置した異種移植片は、ある程度の非特異的な染色を有していた。上清81-96については、未処置と処置の間に差はなかった。また、染色は非常に弱かった。

40

【0300】

要約すると、このIHCアッセイから、2つの上清を不良のバックグラウンドを有するものとして排除し、1つを弱い染色を有するものとして排除した。残りの6つの上清をランク付けした：1) 81-1、2) 81-2、3) 81-99、4) 81-24、5) 81-85及び6) 81-84。

【0301】

マルチクローン上清評価後に、p-Y525-SYK特異的マルチクローンの81-1、81-2及び81-9の3種をサブクローン化して、それぞれ12種のサブクローンを作製した。サブクローニングを、限界細胞希釈法を用いて行った。いくつかのサブクローン上清を、AlphaLISA及びI

50

HCによりスクリーニングした。

【0302】

これらのサブクロンのAlphaLISAアッセイを、HiBlock (PerkinElmer #AL004C) 中、最終アッセイ条件試料で1/2希釈した2nM SYK試料（組換えインビトロ自己リン酸化試料又はタンパク質ホスファターゼで処理した同じ試料のいずれか）25 μ l、ハイブリドーマ上清5 μ l及び25 μ g/mlのグルタチオン供与体（PerkinElmer：#6765300）並びにプロテインAアクセプタービーズ（PerkinElmer #6760137M）を用いて、室温で2時間、二重に行った。結果は下記の表にある。

【0303】

【表10】

サブクローン	IVK- pSYK	PPase- pSYK	サブクローン	IVK- pSYK	PPase- pSYK	サブクローン	IVK- pSYK	PPase- pSYK
1-1	246449	12882	2-1	224789	3487	99-1	175019	6403
1-2	248596	14336	2-2	156294	3297	99-2	216581	8284
1-3	256130	12844	2-3	62957	627	99-3	166241	7990
1-4	162498	8883	2-4	131138	1501	99-4	206473	6536
1-5	199377	12379	2-5	182353	2926	99-5	187068	10070
1-6	214662	12322	2-6	18972	333	99-6	183559	9880
1-7	288050	12132	2-7	207110	1359	99-7	231278	7477
1-8	248948	13129	2-8	220619	1064	99-8	193724	5007
1-9	248226	8569	2-9	3553	418	99-9	258514	589
1-10	299203	17138	2-10	81311	399	99-10	209124	1406
1-11	265962	17813	2-11	182220	1929	99-11	267378	4123
1-12	268223	16198	2-12	169936	1121	99-12	240949	4703

【0304】

サブクロンの多くは、このアッセイでは良好に見えた（IVK処理した試料において強いシグナル及びホスファターゼ処理した試料において非常に弱いシグナル）。マルチクローン2からのサブクローンでは、最低レベルのバックグラウンドが生じた。

【0305】

上記の第4レベルのスクリーニングに記載したように、全てのサブクローンについて抗体及びOMNIMAP(商標)抗ウサギHRP試薬（Ventana760-4311）のインキュベーションに熱を使用しない一般的なプロトコルに従う染色プロトコル後に、Ventana Discovery XTを用いてサブクロンのIHCアッセイを行い、pSYK Y525/526抗体、Epitomics 2175-1を用いるIHCを、抗体及びULTRAMAP（商標）抗ウサギHRP試薬（Ventana760-4315）のインキュベーションに熱を使用する一般的なプロトコルに従って染色した。試料の陰性対照ITK-RasのFFPE細胞ペレット（陰性対照）、陽性対照のWSU-DLCL Fab架橋FFPE細胞ペレット（陽性対照）。

【0306】

サブクロンのIHCスクリーニングの半定量的結果は以下の表にある。

【表 1 1】

サブクローン	陰性対照	陽性対照	サブクローン	陰性対照	陽性対照	サブクローン	陰性対照	陽性対照
1-1	+	+++	2-1	-	++	99-1	+/-	+++
1-2	+	+++	2-2	-	++	99-2	+/-	+++
1-3	+/-	+++	2-3	-	++	99-3	+	+++
1-4	+/-	+++	2-4	-	++	99-4	+	+++
1-5	+/-	+++	2-5	+/-	++	99-5	+	+++
1-6	+/-	+++	2-6	-	++	99-6	+	+++
1-7	+/-	+++	2-7	-	++	99-7	+	+++
1-8	-	+++	2-8	+/-	++	99-8	+	+++
1-9	+	+++	2-9	-	+	99-9	+/-	+++
1-10	+/-	+++	2-10	+/-	++	99-10	+/-	+++
1-11	+	+++	2-11	-	++	99-11	+/-	+++
1-12	+/-	+++	2-12	-	++	99-12	+/-	+++

10

20

【0307】

陰性対照上の染色と比較した陽性対照上の染色の強度を考慮して、サブクローンを各マルチクローンについてランク付けした：

マルチクローン 81-1サブクローン、最高～最低：8、10、12、5、6、7、3、4、11、1、2、9。

マルチクローン 81-2サブクローン、最高～最低：1、2、3、4、6、7、10、11、12、5、8、9。

マルチクローン 81-99サブクローン、最高～最低：1、10、11、12、2、9、3、4、5、6、7、8。

【0308】

サブクローン #81.1-8、81.2-1及び81.99-1のハイブリドーマ細胞を、大規模化及び精製のために選択した。

30

【0309】

ハイブリドーマを、CELLINE(商標)二区画使い捨てバイオリアクター (Integra Biosciences社、Hudson, NH) 又は標準的な組織培養フラスコのいずれかで、懸濁液中で増殖させた。培養上清を一段階精製 (プロテインAクロマトグラフィー後に緩衝液交換) し、後の研究のための抗体を作製した。

【0310】

Ventana Discovery XT自動染色装置及び前のアッセイと同様の染色プロトコルを用いて、上記の未処置マウスもしくはSYK阻害剤処置マウスからのPHTX 95L異種移植片においてpSYKを染色するIHC結果の定性的及び定量的評価により、抗体の最終選択を行った (図2を参照されたい)。

40

【0311】

定量分析を、20倍の倍率で、陽性ピクセルカウントV9アルゴリズムに従ってAperio社のスペクトル解析を用いて行った。5%未満の正の量についてのバックグラウンドから真の細胞質染色を画定するプログラムの困難さのために、シグナル・ノイズ比よりもむしろ陽性ピクセル分析を使用した。以下の表は定量分析の結果を有する。

【0312】

表. 総ピクセルあたりのパーセント陽性ピクセルの割合の定量化 (図3)

【表 1 2】

抗体	PHTX 95L 未処置	PHTX95L SYK 阻害剤
Epitomics 2175-1	8.21	0.56
MIL81-1-8	25.19	11.30
MIL81-2-1	22.28	15.50
MIL81-99-1	15.27	9.92

【0 3 1 3】

10

実施例5：MIL81-1-8免疫組織化学的研究

MIL81-1-8抗体を用いたIHCアッセイを行い、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）患者試料由来のHBL1異種移植組織及びいくつかの原発性ヒト組織異種移植片（PHTX-95L、OCI LY10）におけるpSYK発現を雌SCIDマウスで評価した。ホルマリン固定し、パラフィン包埋（FFPE）した組織におけるpSYKタンパク質レベルを5 μ m厚の切片で評価し、Ventana Medical Systems(Tucson, AZ)Discovery XT自動染色装置で1時間、MIL81-1-8抗体（3.5 μ g/mL）とインキュベートした。抗体を、16分間、OmniMapヤギ抗ウサギHRP二次抗体（Ventana Medical Systems）とインキュベートし、3,3'-ジアミノベキシジン(diaminobexidine)（DAB）基質マップシステムで発色させた。スライドをヘマトキシリンで対比染色し、Aperio全スライド走査システム(whole slide scanning system)（XT）を用いて画像化した。

20

【0 3 1 4】

上述したように、pSYKレベルは、これらの組織間で、PHTX-95Lにおいて最高スコアで顕著に異なった（図7）。市販の抗体Epitomics pSYKカタログ番号2175-1（Y525/526）を用いたPHTX-95L異種移植片の染色により、試験した全3種のMIL81クローンがEpitomics 2175-1よりも非常に良好に作用し、MIL81-1-8が最高性能を示したことが明らかになった。図3。図3及び図4に見られるように、MIL81-1-8の性能は、強度及びシグナル・ノイズ比によりEpitomics 2175-1よりも優れていた。

【0 3 1 5】

同様の結果が、Leica自動染色装置にて自動化プロトコルを用いてMIL81-1-8サブクローンで得られた。ホルマリン固定し、パラフィン包埋した組織におけるpSYKタンパク質レベルを、Leicaマイクロシステムズ(Wetzlar, Germany)BOND RX自動染色装置にて、MIL81-1-8抗体（3.5 μ g/mL）と30分間インキュベートした。抗体をウサギ抗ヤギHRP二次抗体（Leica Laboratories）とインキュベートし、3,3'-ジアミノベキシジン（DAB）基質マップシステムで発色させた。スライドをヘマトキシリンで対比染色し、Aperio全スライド走査システム（XT）を用いて画像化した。MIL81-1-8抗体を、染色の特異性について、市販のpSYK抗体Epitomics pSYKカタログ番号2175-1（Y525/526）と比較した。MIL81-1-8は、より高い希釈/より低い濃度で 사용할 ことができ、より低いバックグラウンドを有していた（PHTX95L異種移植片の染色の図4を参照されたい；1：3200でのMIL81-1-8 最低のバックグラウンド；1：25での2175、高いバックグラウンド）。2175によるこの高いバックグラウンドは、SYK阻害剤での異種移植片保有マウスの処置によって除去されなかった（図5-HBL1異種移植；図6-Ly10異種移植；図7にまとめた）。2175抗体は、未処置の及びSyk-阻害剤で処置したHBL1腫瘍又は未処置の及びSyk-阻害剤で処置したLy-10腫瘍を区別することができなかった（図7）。しかしながら、MIL81-1-8 pSYK抗体は、中程度の発現（HBL1）及び低発現（Ly10）異種移植片においてpSYKの存在を特異的に検出することができた。pSYK染色の検出可能な低下傾向はまた、SYK阻害剤で処置したマウスからの中程度の発現の異種移植片及び低発現異種移植片の試料において抗pSYK MIL81-1-8抗体によって観察された（図5～7）。

30

40

【0 3 1 6】

陽性と判定され、pSYKに特異的であるMIL81-1-8染色は細胞質であった（例えば、図3、

50

図12を参照されたい)。時々、核染色がMIL81-1-8抗体を用いた場合に検出される。この染色は、全SYK抗体で染色された試料中で検出されないため、オフターゲットであると考えられる(図8)。この現象は、抗SYK p323抗体でも観察されたので、pSYK抗体に限定されるものではない(図8)。MIL81-1-8抗体による核染色はまた、組織マイクロアレイからのコア(図9-DLBCL TMAを参照されたい)、組織試料の内部からの細胞(図11及び図13)及び正常リンパ組織からの試料(図10の脾臓、図20のリンパ節)などの古い(少なくとも3年齢)アーカイブ試料で観察された。この周辺試料の細胞質染色-内部試料の核染色も、SYK pY323抗体で観察された(図12対図8及び図13)。本研究で試験した試料には、切断し、保存した試料及び切断した新鮮な試料が含まれた。組織試料及び切断切片における抗原の経時的な安定性並びに切断試料の経時的な新鮮さが、さらなる研究のために考慮される。MIL81-1-8抗体による他のオフターゲット染色も、H1650細胞株(肺腺癌)の異種移植片上で観察され(図16及び17)、これらはSYK RNAについて陰性であった(示さない)。全SYK抗体は、4倍の濃度(典型的な1:400希釈の代わりに1:100、図16)でさえ、これらの細胞と結合しなかった。抗SYK pY323及び抗pSYK(CST 2711)などのリン酸化残基のエピトープに対する他の抗体は、膜性だけでなく、細胞質染色を含むこの染色を示した。

10

【0317】

リンパ腫細胞におけるMIL81-1-8の特異性の検証には、過バナジン酸処理WSU-DLCL細胞のペレット、PHTX-95L異種移植片又はDLBCL腫瘍のTMAコアを使用した。ペプチド免疫原を、組織とのインキュベーション前に該抗体に添加した場合に、pSYK IHC染色はブロックされた(図9)。MIL81-1-8染色の特異性の別の検証には、抗体インキュベーションの前にスライドのホスファターゼ処理を使用した。ホスファターゼ処理は、正常な脾臓の核染色を除いて、pSYK抗体が結合するエピトープを排除した(図10)。ホスファターゼ処理した試料のこの核染色により、試料中の核のみの染色は一般的にオフターゲットで、したがってpSYK陰性であると判断した。

20

【0318】

上記の最初のIHC実験の結果に基づいて、MIL81-1-8染色は、最近生検されたDLBCL組織においてEpitomics 2175-1よりもはるかに強く、はっきりしているので、MIL81-1-8は低pSYK Y525/6発現患者を特定する可能性がより高い(図14及び図15)。

【0319】

実施例6:MIL81-1-8の分子クローニング

30

MIL81-1-8抗体を、哺乳動物細胞における一過性トランスフェクションによる生成及び配列決定のために組換えベクターにクローニングした。

【0320】

哺乳動物細胞における一過性トランスフェクションによる生成及び配列決定のために、重鎖及び軽鎖の可変領域の両方のcDNAをRT-PCR増幅し、pTT5ベクターにクローニングした(カナダ国立研究評議会、米国特許出願公開第20050170450号又は同第20100261275号を参照されたい)。5つのクローンを生成した。プラスミドを、大腸菌dH5 α 細菌中で増幅し、哺乳動物細胞へのトランスフェクションに十分な物質を得る(米国特許第8,551,774号)。プラスミドは、たった1本の鎖を保持するので、軽鎖を含むプラスミドを、重鎖を含むプラスミドと共トランスフェクトする。293細胞における初期の小規模トランスフェクション後に、培養上清をELISAによって試験し、配列決定した。全てのクローンが同じ配列を有していた。

40

【0321】

分子クローン抗体(MIL81-1-8 3H3/3L2)の結合活性を、ウェスタンブロットにより確認した。

【0322】

ブロット上に含まれる試料は、バキュロ/Sf9システムで生成したGSTタグ付き組換えSYKであった。組換えSYKは、未処理か、ホスファターゼで処理するか、又は上記のようにインビトロキナーゼ反応(IVK)に供するかのいずれかであった。他の試料には、休止させるか又はB細胞受容体の10分間の架橋により刺激したWSU-DLCL2細胞からの溶解物を含めた

50

。全ての試料は、抗hSYK抗体（Epitomics #1688）と結合した。陽性対照Epitomics 2175-1は、ホスファターゼ処理した組換えSYK及び非刺激WSU-DLCL2試料以外の全てと結合した。IVK試料は、未処理の組換えSYKより強いバンドを有していた。81-1-8抗体の分子クローンも、未処理のSYKバンドよりも強くIVK処理SYKバンドを染色した。この抗体はまた、刺激したWSU-DLCL2細胞からのバンド（及びいくつかの余分なバンド）を染色した。この抗体は、ホスファターゼ及び非刺激のWSU-DLCL2細胞からのバンドを少し染色した。

【0323】

該分子クローン抗体も、IHCにより評価した。上記のMIL81-1-8ハイブリドーマ上清から精製した抗体の免疫組織化学的染色を、一過的に共トランスフェクトしたHEK293細胞の培養上清から精製したMIL81-1-8 3H3/3L2クローン抗体による染色と比較した（また、一段階精製-プロテインAクロマトグラフィー、その後に緩衝液交換が続く）。

10

【0324】

これらの抗体を比較するために用いた試料には、WSU-DLBCL細胞ペレット、TMD8リンパ腫細胞株（DLBCL）移植マウスからの異種移植片試料を含めた（未処置のマウス又は120mg/kgで経口投与するSYKキナーゼ活性の阻害剤（化合物A）の単回投与によって処置したマウス。投与後2時間の時点で、腫瘍を10%ホルマリン固定及びIHCの処理のために収集した）。

【0325】

分子クローンは未処置試料を染色し、膜強度は処置試料中のハイブリドーマよりわずかに弱い（図18）。両方の抗体について、染色は、化合物A処置したTMD8異種移植マウスからの試料において減少した。

20

【0326】

別の研究では、エプスタイン・バーウイルス陰性B細胞リンパ腫細胞株HBL1、未処置のPHTX95L移植マウス又は上記のSYK阻害剤で処置したPHTX95L移植マウスからの異種移植片を含む試料の染色の比較を行った。

【0327】

分子クローン及びハイブリドーマ抗体の両方は、HBL1を適度に染色し、PHTX95L未処置試料を強く染色した。両方の抗体について、染色は、化合物Aで処置したPHTX95L異種移植マウスからの試料上で減少した（図19）。

【0328】

該分子クローン抗体を、ヒト組織の生検を染色するためのハイブリドーマの抗体と比較した。3つのDLBCL患者試料及び患者からの1つの正常リンパ節試料（非腫瘍形成性）があった。該分子クローンの核強度は、ハイブリドーマ抗体による染色と比較して著しく減少しているため、細胞質染色及び膜染色がより強く観察される（図20）。核染色が、オフターゲットとみなされ、pSYKの不在の決定をもたらす場合には、細胞質染色又は膜染色に対して核染色が低いMIL81-1-8のバージョンは、より少ない偽陰性の結果をもたらす可能性がある。

30

【0329】

要約すると、分子クローンの染色パターンは、ハイブリドーマ染色パターンに非常に類似していると思われる。試験した全ての細胞ペレット、異種移植片及びヒトの生検について全ての同じ領域及び区域が染色されている。該分子クローンは、若干弱い強度で膜を染色するように見えるが、そのオフターゲット核染色は大幅に減少する。これは、細胞質染色及び膜染色を見易くすることを可能にする。全体として、該分子クローン抗体は、ハイブリドーマ抗体よりもわずかに良好であると思われる。

40

【0330】

実施例7：化合物Aは、SYKを阻害することにより、DLBCLモデルにおいて抗腫瘍活性を示す

化合物Aは、現在、第I相臨床試験で評価されているSYKの治験阻害剤である。化合物Aは、3.2nMのIC50でSYKを阻害し、関連モデルのサブセットにおいて25~400nMのEC50で細胞増殖を阻害する能力を有する。関連モデルの拡張セットでは、化合物Aは、25nM~4 µMのE

50

C50で細胞増殖を阻害することが見出された（図21）。

【0331】

【表13】

	酵素				
活性 /IC ₅₀ (nM)	SYK	FLT3	ZAP70	VEGFR	JAK3
化合物 A	3.2	4.6	87	140	110

10

【0332】

60mg/kgの化合物Aの毎日の経口投与は、ABC（OCI-LY-10（TGI 50%）、HBL-1及び原発性ヒト腫瘍異種移植モデルのPHTX-95L（120mg/kgでTGI 70%）、GCB（OCI-LY-19（TGI 37%））及び非ABC/GCB（WSU（TGI約50%））のサブタイプを表すDLBCL細胞株の異種移植モデルにおいて抗腫瘍活性を示した。

【0333】

別の実験セットでは、化合物Aを、OCI-LY10 ABC DLBCL異種移植片（図22）、PHTX-95L 原発性DLBCL腫瘍異種移植片（図23）を有するSCIDマウスに21日間、1日1回経口投与し、OCI-LY19 GCB DLBCL異種移植片（図24）を有する雌SCIDマウスに14日間、1日1回経口投与した。平均腫瘍体積が約200mm³のときに処置を開始した場合の平均腫瘍体積（mm³）±SEM（N=8/群）を示す。

20

【0334】

【表14】

モデル	60 mg/kg	120 mg/kg
PHTX-95L (原発性 DLBCL)	56%	70%
OCI-LY10 (ABC)	50%	59%
HBL-1 (ABC)	32%	36%
TMD8 (ABC)	45%*	-
WSU	52%	-
OCI-LY19 (GCB)	33%**	-

30

*14日目に計算したTGI

**16日目に計算したTGI

【0335】

興味深いことに、OCI-LY-19 GCB型DLBCLモデルでは、60mg/kgの化合物Aは、BTK阻害剤を上回る活性の増加（TGI 15%）を示し、BTKの上流のBCRシグナル伝達の阻害がより広い範囲のB細胞悪性腫瘍のサブタイプの治療に有益であり得るという仮説が示唆された（図24）。

40

【0336】

pSYK（pSYK525）及びpBLNK（pBLNK65）の発現の時間経過を、PHTX-95Lの原発性DLBCL異種移植片を有するNOD SCIDマウスにおいて、120mg/kgの化合物Aの単回投与後に評価した。腫瘍を経時的に採取し、パラフィン包埋し、pSYK、pBLNK及び切断型カスパーゼ3（Cl-Casp-3）についての免疫組織化学により染色した。これらのリン酸化タンパク質の時間依存的阻害及び切断型カスパーゼ3の発現の増加、アポトーシスマーカーも、ここで研究されたDLBCLモデルで観察された。pSYKについての15種の原発性DLBCL試料の表現型の評価及び他の関連経路マーカーにより、SYKの活性化がかなりの数の分子的に異質のDLBCL試料で

50

発生し、BCR経路の活性化と一貫して関連していることが明らかになった。これらの結果は共に、SYKの活性化が様々なサブセットのDLBCL試料で生じ、化合物AがDLBCLの様々なサブタイプの前臨床モデルにおいて活性を示したことを示唆する。

【0337】

本発明を示し、その提供される実施態様を参照して説明してきたが、形態及び詳細の様々な変更が、添付の特許請求の範囲に包含される本発明の範囲から逸脱することなくなされ得ることは当業者なら理解するであろう。

【0338】

実施例8：増幅されたDAB IHC DLBCL患者の選択アッセイの作成

ヒトDLBCL生検試料及びいくつかの原発性ヒト組織異種移植片（PHTX-95L、OCI-LY10）において、染色強度を増加させ、pSYK発現の非特異的染色を減少させるために、Mil-81-1-8 3H3/3L2クローン及びVentana Amp HQ DAB増幅システムを用いるIHCアッセイを行った。ホルマリン固定し、パラフィン包埋（FFPE）した組織におけるpSYKタンパク質レベルを、5 µm厚の切片にて評価し、Ventana Medical Systems (Tucson, AZ) Discovery XT自動染色装置上で、MIL81-1-8 3H3/3L2抗体（0.05 µg/mL）と1時間インキュベートした。抗体を、16分間、OmniMapヤギ抗ウサギHRP二次抗体（Ventana Medical Systems）とインキュベートした。DiscoveryAMP TSA HQキット（Ventana Medical Systems）を16分間適用し、その後、16分間、Discovery 抗-HQ HRP(Ventana Medical Systems)抗体とインキュベートした。次いで、染色を、3,3'-ジアミノベキシジン（DAB）基質マップシステムを用いて発色させた。スライドをヘマトキシリンで対比染色し、Aperio全スライド走査システム（XT）を用いて画像化した。比較の染色を、Leica自動染色装置上で自動化プロトコルを用いて、MIL81-1-8 3H3/3L2抗体を用いて得た。ホルマリン固定し、パラフィン包埋した組織中のpSYKタンパク質レベルを、Leica Microsystems(Wetzlar, Germany) BOND RX自動染色装置上で、30分間、MIL81-1-8 3H3/3L2抗体（0.16 µg/mL）とインキュベートした。抗体を、ウサギ抗ヤギHRP二次抗体（Leica Laboratories）を用いてインキュベートし、3,3'-ジアミノベキシジン（DAB）基質マップシステムで発色させた。スライドをヘマトキシリンで対比染色し、Aperio全スライド走査システム（XT）を用いて画像化した。AMP HQ及びLeica IHCの染色を比較し、染色の特異性を決定した。AMP HQは、より高い希釈（1：3200希釈して使用した標準IHC（Leica）及び1：10,000希釈して使用した増幅（AMP HQ）IHC）で使用した場合でさえ、膜染色を特定することができ、細胞質バックグラウンドは低かった（PHTX-95L染色の図25を参照されたい）。AMP HQは、（化合物A）で処置した動物からの原発性ヒト異種移植片の試料において、ビヒクルと比較して染色が減少する明確な評価を可能にした。ヒトDLBCL生検で観察される核のオフターゲット染色も非常に減少し、陽性染色領域の決定をより容易に特定することが可能になる（図26）。82のヒトDLBCL生検の連続切片を、AMP HQ及びLeica IHCの両方で染色した。それぞれを、陽性（膜染色が認められた）又は陰性（膜染色が認められない）のいずれかでスコア化した。これらの82の試料のうち、24はLeica IHCによって陽性とみなされ、34はAMP HQによって陽性とみなされた。増幅方法は、10以上の陽性試料を特定し、標準IHCによってpSYK陽性と特定された試料を1つだけ見落とした。DLBCLサブタイプ（生殖細胞Bリンパ球(germ cell B lymphocyte)（GCB）又は非GCB）からの試料を分析した時に、増幅IHCシステムは28の試料中24の試料を非GCBと特定し、典型的には活性化SYKを有していることが判明した。標準IHCシステムは、37の試料中23の試料のみを非GCBと特定した。

【0339】

表：膜染色の有無（+又は-）

【表 1 5】

IHC					サブタイプ化		
		+	-	合計	GCB	非 GCB	合計
Amp HQ	+	23	11	34	4	24	28
	-	1	47	48	14	23	37
	合計	24	58	82	18	47	65

10

【0 3 4 0】

上記のこのAMP HQ染色実験の結果に基づいて、AMP HQ MIL81-1-8染色は、Leica IHC法よりもヒトDLBCL生検組織及びDLBCL異種移植片組織において非常に強く、はっきりしており、pSYK Y525/6発現患者を特定する能力が増強していると決定された。

【0 3 4 1】

実施例9：増幅免疫蛍光AML患者の選択アッセイの作成

FICOLL（登録商標）溶液（Amersham Biosciences division of GE healthcare, Piscataway, NJ）及び22分間の1800rpmでの遠心分離を用いて全血から抽出された末梢血単核細胞（PBMC）を用いて、増幅免疫蛍光AML患者の選択アッセイを行った。次いで、濁った白色層を残りの部分から抽出し、最低12時間、10%中性緩衝ホルマリン中で固定した。細胞をヒストゲル(histogel)に埋め込み、次いで、パラフィンブロックに加工した。これらのAML PBMCブロックを5μmの切片上で評価し、Leica Bond RX (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)自動染色装置にて1時間、MIL81-1-8 3H3/3L2 (0.10 μg/mL)とインキュベートした。抗体を、ヤギ抗ウサギ二次抗体（Vector Laboratories）を用いてビオチン化した。次いで、このビオチン化複合体を、pSYK Y525/6抗原にすぐ隣接する組織に共有結合しているAlexa Fluor（登録商標）488（Life Technologies）にコンジュゲートしたチラミドシグナル増幅(Tyramide Signal Amplification) (TSA) 分子で染色した。この組織を、MIL81-1-8 3H3/3L2及びビオチン化二次を取り除くpH6.0のクエン酸ナトリウム溶液中で95℃まで加熱し、共有結合したTSA及びAlexa Fluor（登録商標）のみが残った。このスライドを、CD34とCD117の市販の抗体カクテル（CD34 ab81289及びCD117 ab32363, Abcam, Cambridge, MA）と1時間インキュベートした。抗体を、ヤギ抗ウサギ二次抗体（Vector Laboratories）を用いてビオチン化した。次いで、このビオチン化複合体を、CD34/CD117抗原にすぐ隣接する組織に共有結合しているAlexa Fluor（登録商標）594（Life Technologies社）にコンジュゲートしたチラミドシグナル増幅（TSA）分子で染色した。細胞核を目で見えるようにするために、核色素ヘキスト33342を5分間添加した。これらのスライドを、Prolong Gold(Life Technologies)マウンティングメディアを用いてカバースリップし、Nikon WSI顕微鏡又はAperio全スライドスキャナ（FL）のいずれかを用いて画像化した。CD34/CD117染色がAML腫瘍芽細胞を特定し、MIL81-1-8 3H3/3L2と共局在する細胞は、pSYK Y525/6が上方制御されたAML腫瘍芽細胞を示した。6つの視野及びDefiniensイメージング解析ソフトウェア（Definiens, Munich, Germany）を用いて、分析を行った。

20

30

40

【0 3 4 2】

MV-4-11 AML細胞ペレット（低CD34発現を有することが知られている）、NCI-H82肺細胞ペレット（pSYK及びCD34/CD117の陰性対照）、及びKG-1異種移植片（pSYK及びCD34/CD117のための陽性対照）を用いて、この技術の特異性の検証を行った。MV-4-11は、高レベルのpSYK及び低レベルのCD34/CD117を示し、NCI-H82はいずれの抗体でも染色を示さず、KG-1異種移植片は、両方とも高レベルのpSYK Y525/6とCD34/CD117を示し、これらは期待される結果であった（図27）。

【0 3 4 3】

収集した11のAML PBMCの中から、これらのうちの4つはpSYK Y525/6の上昇したレベルを有することが特定された。上記の初期IF実験の結果に基づいて、二重MIL81-1-8 CD34/CD1

50

17 IFアッセイの使用を介して、pSYK Y525/526が上昇したPBMC試料を特定することができた。

【図 1】

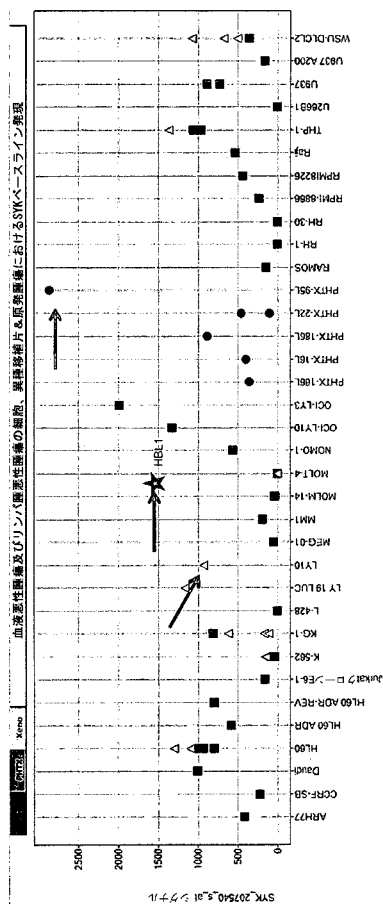


図 1

【図 2】

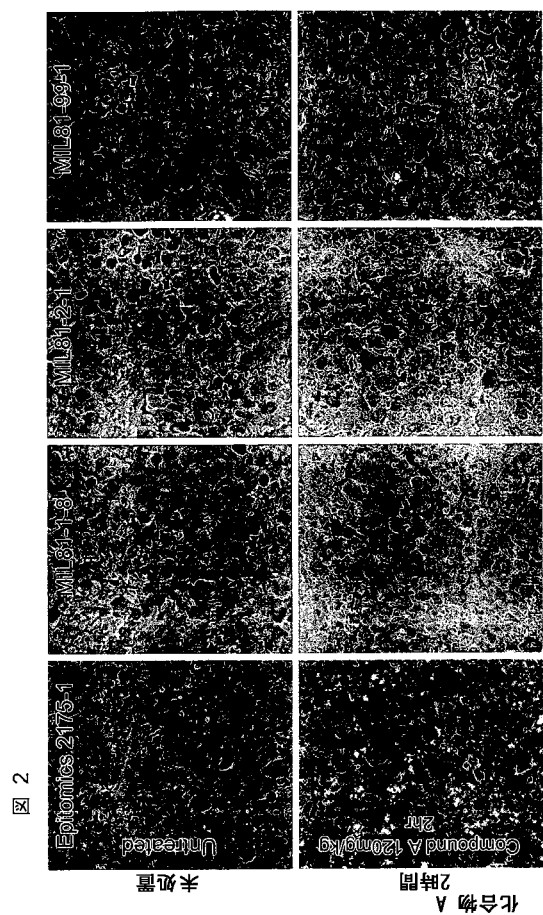


図 2

【図 3】

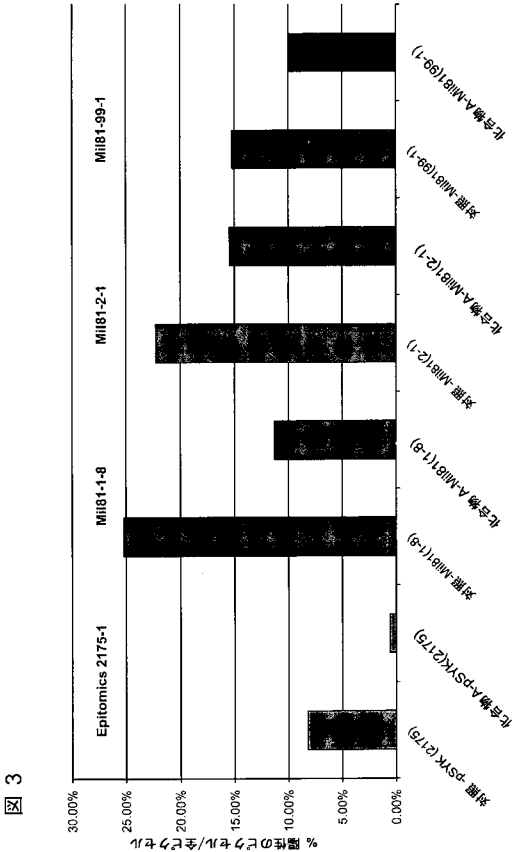


図 3

【図 4】

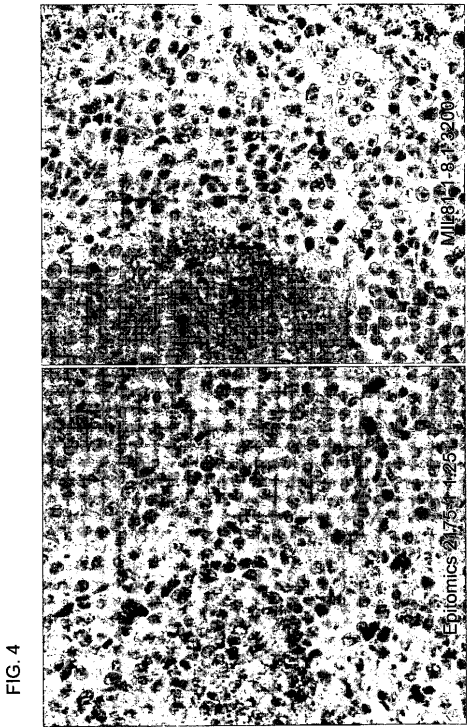


FIG. 4

【図 5】

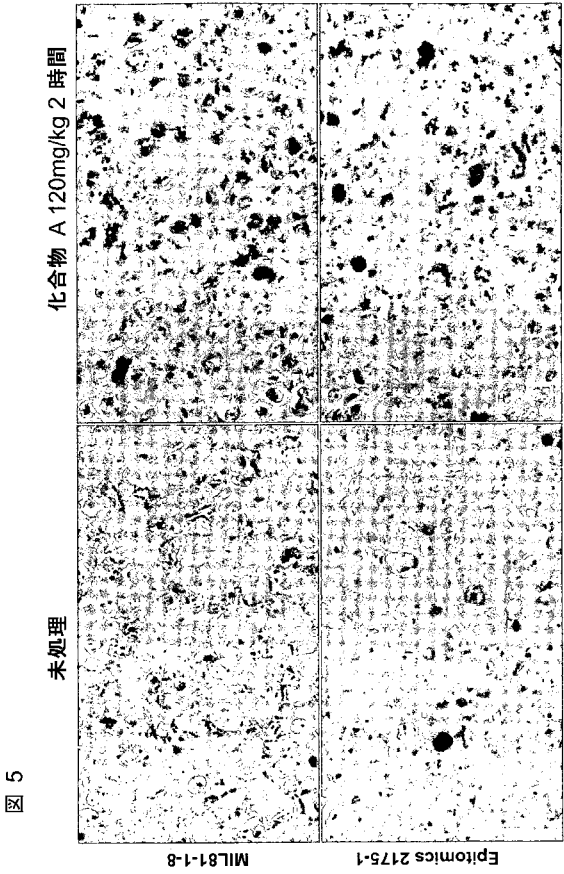


図 5

【図 6】

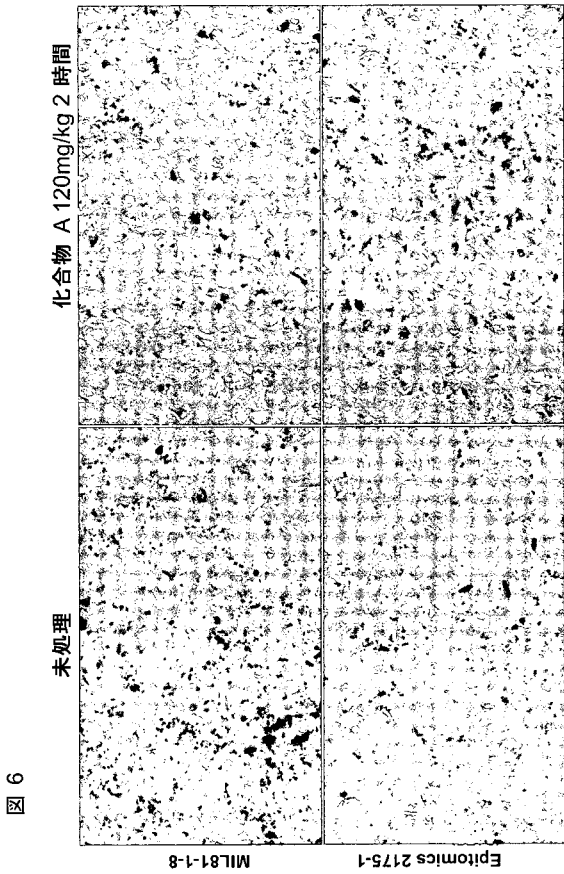


図 6

【図 7】



【圖 8】

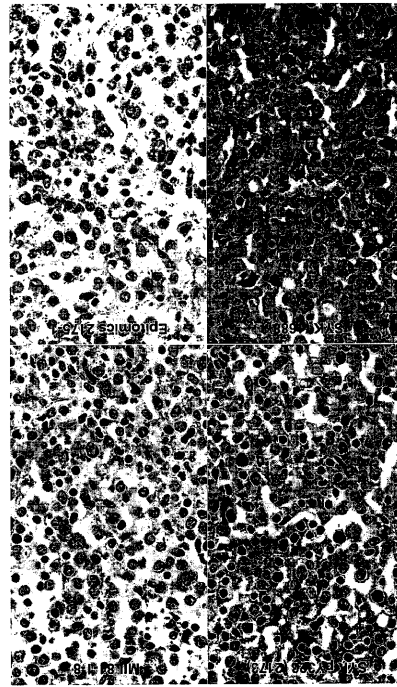
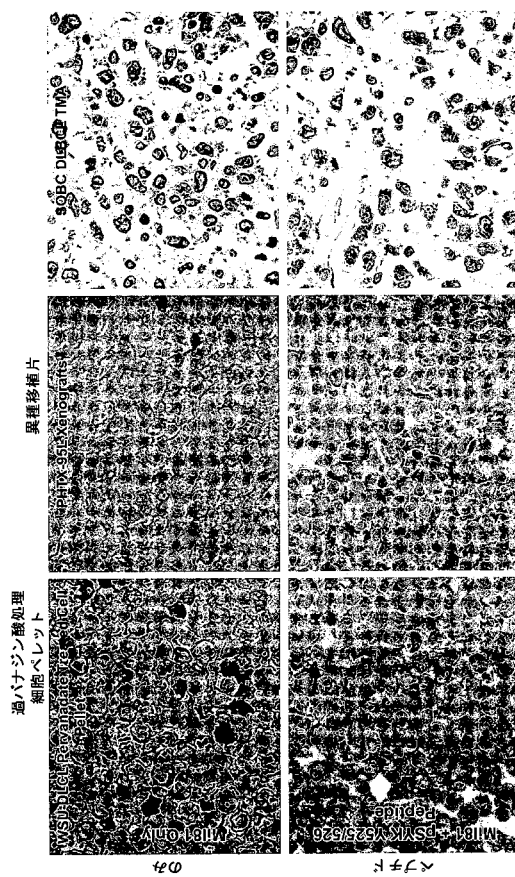
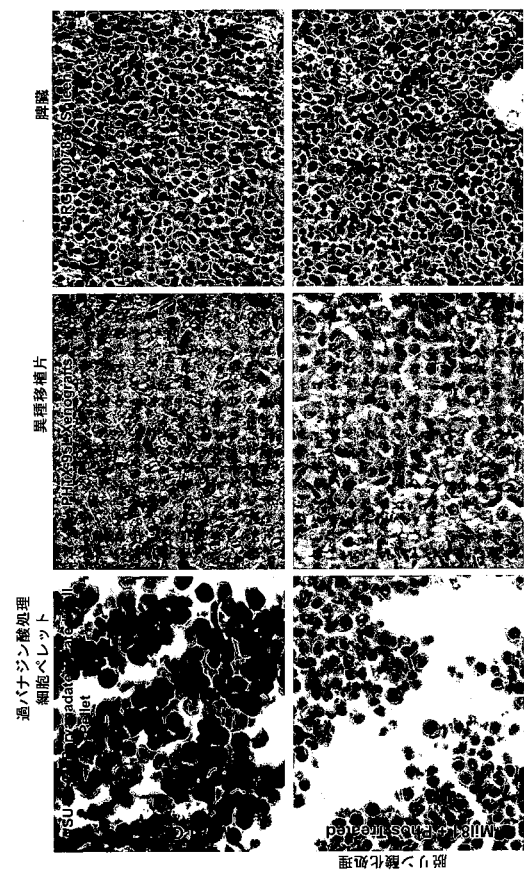


FIG. 8

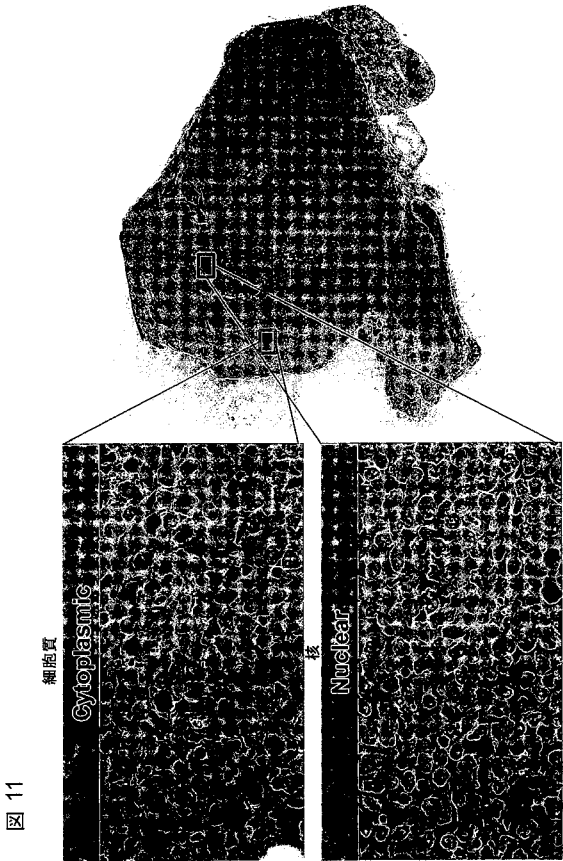
【图 9】



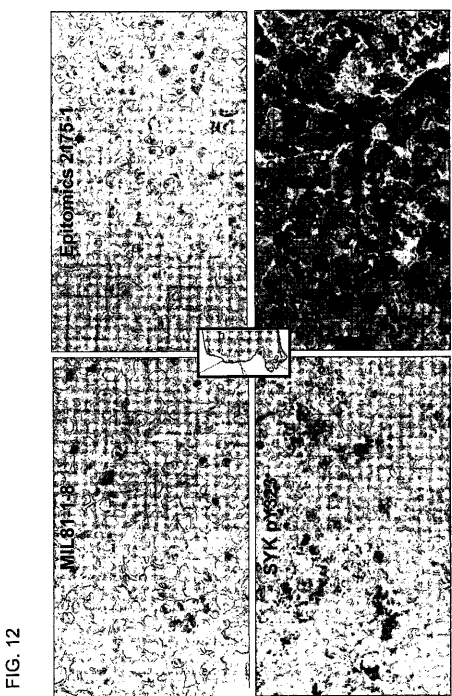
【 図 1 0 】



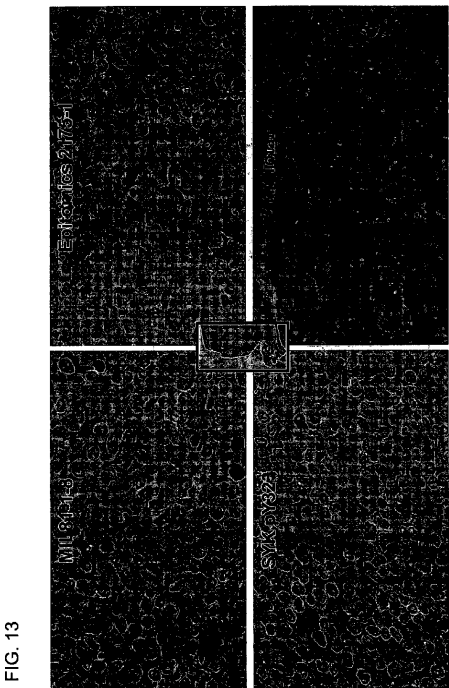
【図 1 1】



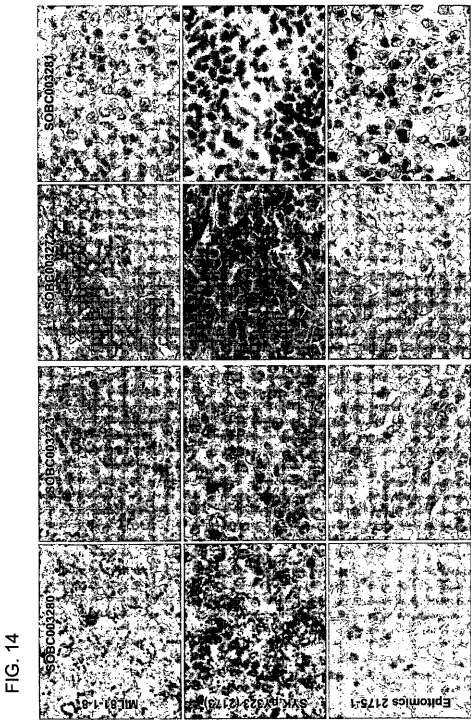
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



【 図 1 5 】

試料 ID	全 SYK	MIL81-1-8	SYK pY323 (2173) 染色	Epitomics 2175-1
SOBC003280 (2012)	+++	++	++	+(弱い POS)
SOBC003273 (2012)	+++	++	++	+(弱い POS)
SOBC003272 (2011)	+++	++	++	+(弱い POS)
SOBC003281 (2012)	+++	+	+	+(弱い POS)
SOBC003271 (2011)	+++	+	+	+(弱い POS)
SOBC003270 (2012)	+++	+	+	+(弱い POS)
SOBC003279 (2012)	+++	+/-	-	-
SOBC003278 (2012)	+++	+/-	+/-	-
SOBC003276 (2012)	+++	+/-	+/-	+/-
SOBC003269 (2012)	+++	+/-	-	+/-
SOBC003268 (2012)	+++	+/-	-	-
SOBC003283 (2012)	+++	-	-	+/-
SOBC003277 (2012)	+++	-	-	-
SOBC003275 (2012)	+++	-	+/-	+/-
SOBC003274 (2012)	+++	-	-	-
% 陽性	100%	40%	40%	~40%

図 15

【 図 1 6 】

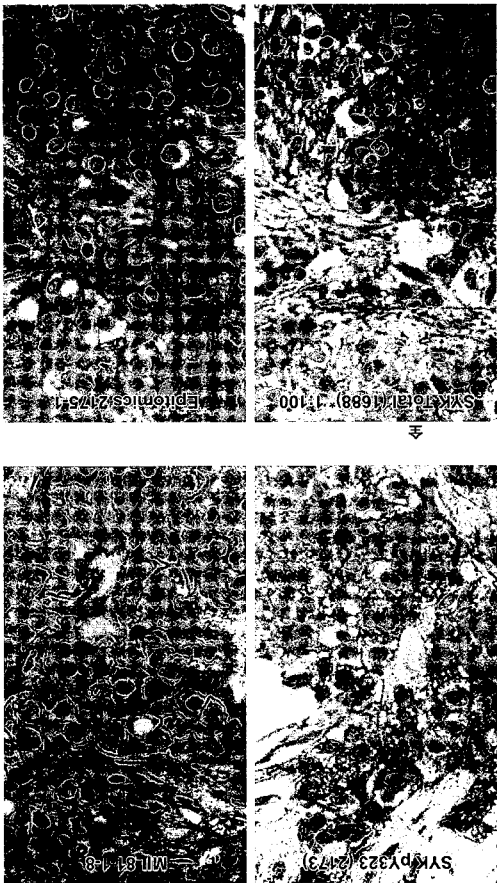


図 16

【 図 1 7 】

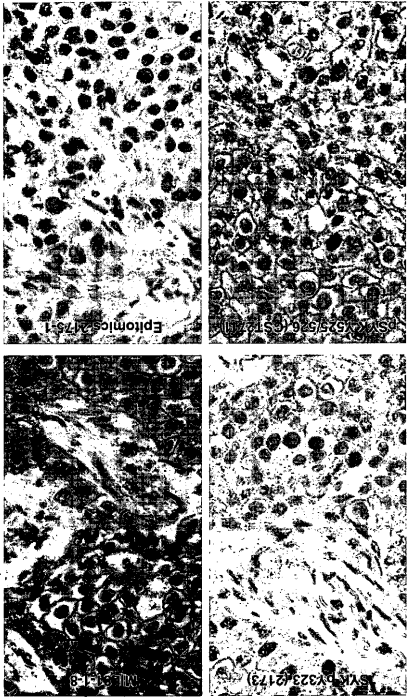


FIG. 17

【 図 1 8 】

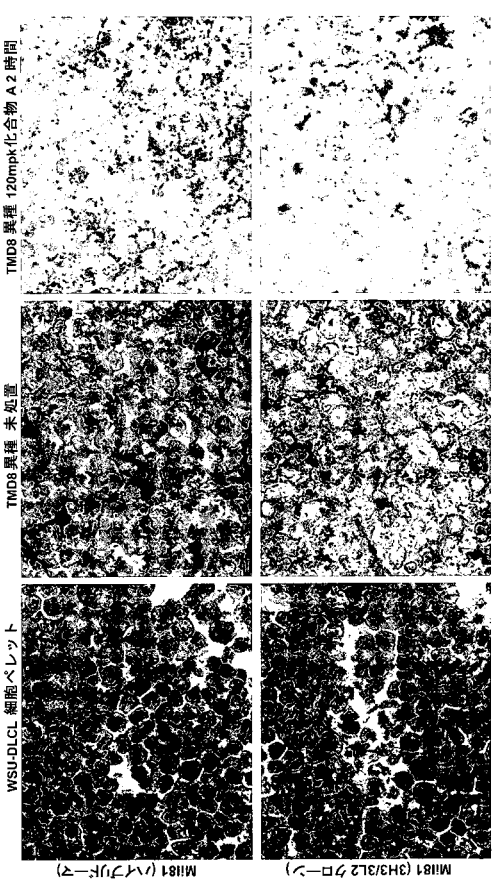
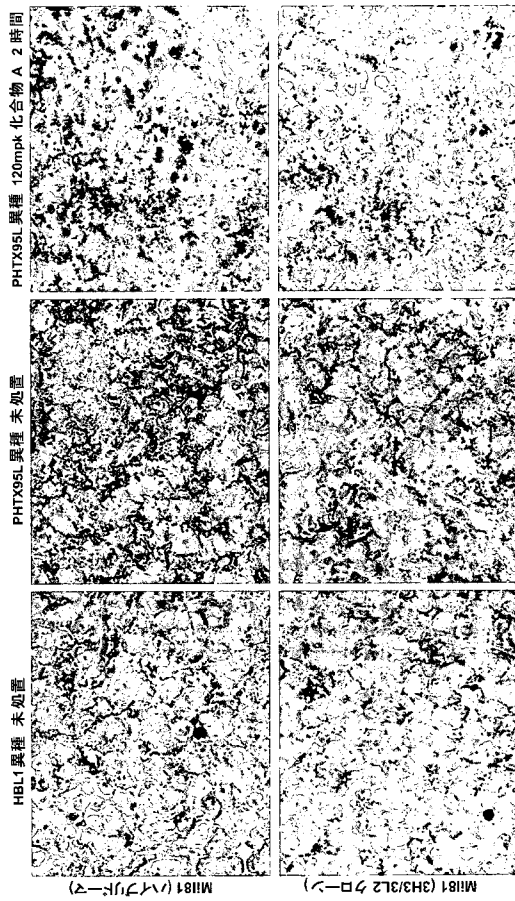
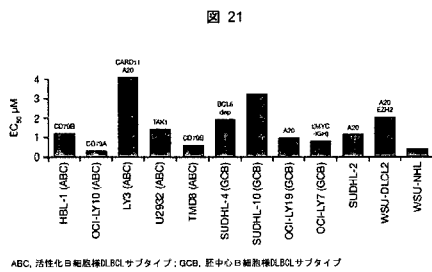


図 18

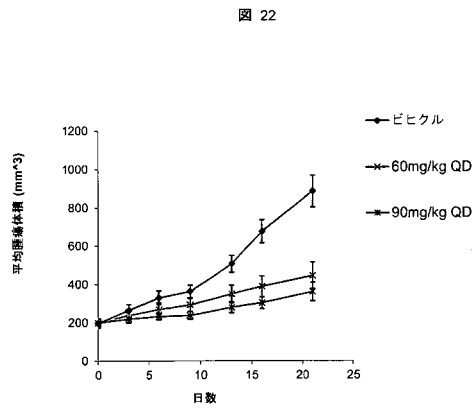
【図 19】



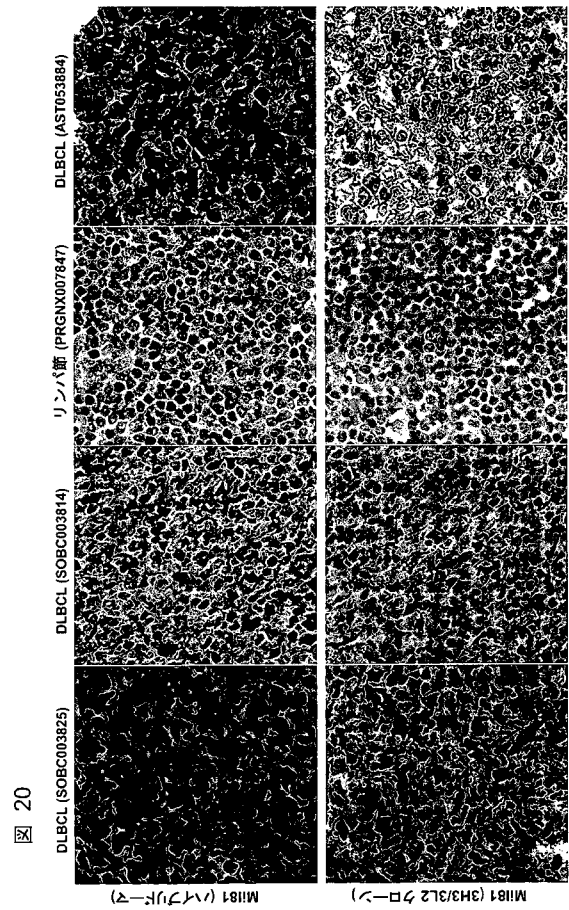
【図 21】



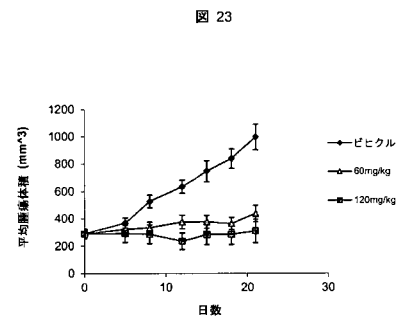
【図 22】



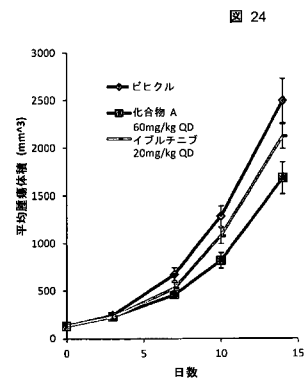
【図 20】



【図 23】

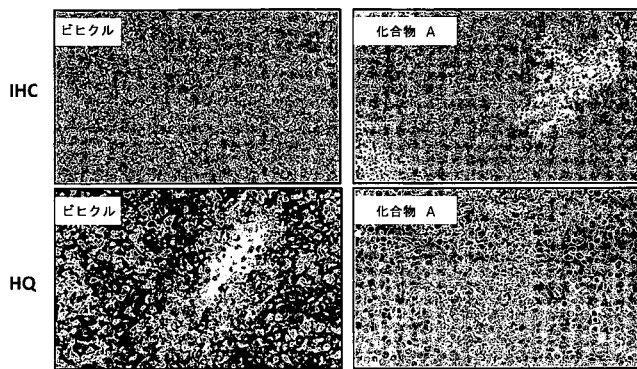


【図 24】



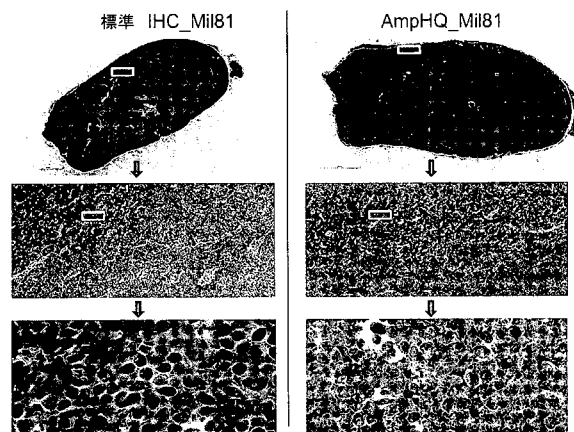
【図 25】

図 25



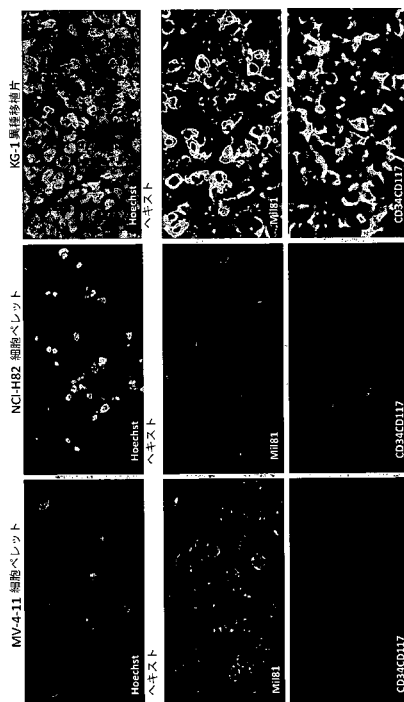
【図 26】

図 26



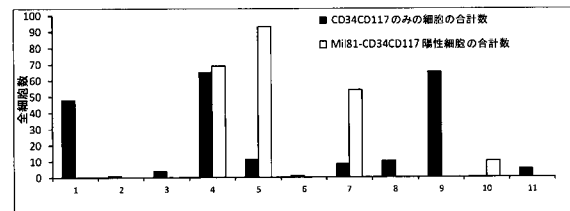
【図 27】

図 27



【図 28】

図 28



【手続補正書】

【提出日】平成29年1月27日(2017.1.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列の配列番号11、12及び13をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びにアミノ酸配列の配列番号14、15及び16をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む、抗pSYK抗体分子。

【請求項 2】

前記抗pSYK抗体分子が、モノクローナル抗体である、請求項1記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 3】

前記抗pSYK抗体分子が、ウサギ抗体又はウサギ由来の抗体である、請求項1記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 4】

前記抗体が、ウサギモノクローナル抗体である、請求項3記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 5】

さらに、配列番号8によるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号10によるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 6】

前記抗pSYK抗体分子が、検出可能な標識にコンジュゲートされている、請求項1～5のいずれか一項記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 7】

前記検出可能な標識が、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、色素を酸化するために過酸化水素を使用する酵素と結合している、糖オキシダーゼ、複素環オキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、及び安定なフリーラジカルからなる群から選択される、請求項6記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 8】

前記検出可能な標識が、フルオレセイン又はその誘導体、ローダミンもしくはその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及び2,3-ジヒドロフタラジンジオンから選択されるフルオロフォアである、請求項6記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 9】

前記検出可能な標識が、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{188}Rh 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}Br 、 ^{81}Rb / ^{81}M Kr、 ^{87}M Sr、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{113}M In、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{132}I 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Pb 、 ^{206}Bi 、及び ^{213}Bi からなる群から選択される放射性物質である、請求項6記載の抗pSYK抗体分子。

【請求項 10】

請求項1又は請求項5記載の抗pSYK抗体分子をコードする単離核酸配列。

【請求項 11】

請求項10記載の単離核酸配列を含む細胞。

【請求項 12】

前記抗pSYK抗体分子の生成を可能にする条件下で請求項11記載の細胞を培養することを含む、請求項1又は請求項5記載の抗pSYK抗体分子を生成するための方法。

【請求項 13】

1以上のpSYK発現細胞によって特徴付けられる疾患の治療のための医薬の製造におけるSYK標的治療薬の使用であって、該治療が：

a. 請求項1記載の抗pSYK抗体分子と、生体試料とを接触させる工程；及び

該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程、を含む方法を用いて、該疾患を有する患者から取得された該生体試料中のpSYKタンパク質発現を検出すること；並びに

b. 該生体試料がpSYKを発現する場合に、該患者に該SYK標的治療薬を投与すること、を含む、前記使用。

【請求項14】

前記SYK標的治療薬が、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、請求項13記載の使用。

【請求項15】

前記疾患が、急性骨髄性白血病である、請求項13又は14記載の使用。

【請求項16】

前記疾患が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、請求項13又は14記載の使用。

【請求項17】

SYK標的治療薬の薬力学を評価する方法であって、

a. 投与計画に従って患者に該SYK標的治療薬を投与する工程；

b. 該患者からpSYKを発現することが疑われる1以上の細胞を含む生体試料を取得する工程；

c. 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と、該生体試料とを接触させる工程；

d. 該生体試料中の該抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程；

e. 前記生体試料中のpSYK発現を定量化してpSYK発現レベルを決定する工程；

f. 該SYK標的治療薬を含むデータベースに対して該pSYK発現レベルを比較する工程；並びに

g. 必要に応じて、前記pSYK発現レベルに基づいて、該投与計画を調整する工程、を含む、前記方法。

【請求項18】

癌を治療するための医薬の製造におけるSYK阻害剤の使用であって、該治療が、癌患者から取得された腫瘍細胞からの試料中のpSYKを検出すること、及びpSYKが該試料中で検出された場合に、該SYK阻害剤で該癌患者を治療することを含む、前記使用。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0343

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0343】

収集した11のAML PBMCの中から、これらのうちの4つはpSYK Y525/6の上昇したレベルを有することが特定された。上記の初期IF実験の結果に基づいて、二重MIL81-1-8 CD34/CD17 IFアッセイの使用を介して、pSYK Y525/526が上昇したPBMC試料を特定することができた。

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

（構成1）

アミノ酸配列の配列番号11、12及び13をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びにアミノ酸配列の配列番号14、15及び16をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子。

(構成 2)

前記抗pSYK抗体分子が、モノクローナル抗体である、構成1記載の抗pSYK抗体分子。

(構成 3)

前記抗pSYK抗体分子が、ウサギ抗体又はウサギ由来の抗体である、構成1記載の抗pSYK抗体分子。

(構成 4)

前記抗体が、ウサギモノクローナル抗体である、構成3記載の抗pSYK抗体分子。

(構成 5)

さらに、配列番号8によるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号10によるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、構成1記載の抗pSYK抗体分子。

(構成 6)

前記抗pSYK抗体分子が、検出可能な標識にコンジュゲートされている、構成1～5のいずれか一記載の抗pSYK抗体分子。

(構成 7)

前記検出可能な標識が、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、色素を酸化するために過酸化水素を使用する酵素と結合している、糖オキシダーゼ、複素環オキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、及び安定なフリーラジカルからなる群から選択される、構成6記載の抗pSYK抗体分子。

(構成 8)

前記検出可能な標識が、フルオレセイン又はその誘導体、ローダミンもしくはその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及び2,3-ジヒドロフタラジンジオンから選択されるフルオロフォアである、構成6記載の抗pSYK抗体分子。

(構成 9)

前記検出可能な標識が、 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{188}Rh 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}Br 、 ^{81}Rb 、 $^{81\text{M}}\text{Kr}$ 、 $^{87\text{M}}\text{Sr}$ 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 $^{113\text{M}}\text{In}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{132}I 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Pb 、 ^{206}Bi 、及び ^{213}Bi からなる群から選択される放射性物質である、構成6記載の抗pSYK抗体分子。

(構成 10)

構成1又は構成5記載の抗体分子をコードする単離核酸配列。

(構成 11)

構成10記載の単離核酸配列を含む細胞。

(構成 12)

抗体分子の生成を可能にする条件下で構成12記載の細胞を培養し、それによって構成1又は構成5記載の抗体分子を生成することを含む、構成1又は構成6記載の抗体分子の生成方法。

(構成 13)

構成1又は構成5記載の抗体分子の軽鎖及び重鎖の一方又は両方を含むベクター。

(構成 14)

生体試料中のpSYK分子を検出する方法であって、前記生体試料と構成1～9のいずれか一記載の抗体分子とを接触させること、及び前記抗体分子が前記pSYK分子に結合するか否かを決定することを含む、前記方法。

(構成 15)

前記検出方法が、免疫組織化学アッセイを含む、構成14記載の方法。

(構成 16)

前記生体試料が、pSYK発現癌を有することが疑われる患者に由来する腫瘍生検である、構成14又は構成15記載の方法。

(構成 17)

さらに、前記生体試料中のpSYK発現を定量化する工程を含む、構成14～16のいずれか一記載の方法。

(構成18)

前記pSYK発現の定量化が、前記生体試料中の細胞質pSYK発現を含む、構成16記載の方法

。

(構成19)

前記定量化工程が、Hスコアアプローチを含む、構成16又は17記載の方法。

(構成20)

前記pSYK発現癌が、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である、構成16記載の方法。

(構成21)

前記血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病 (CLL) である、構成20記載の方法。

(構成22)

前記血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病である、構成20記載の方法。

(構成23)

前記血液悪性腫瘍が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) である、構成20記載の方法。

(構成24)

構成1～9のいずれか一記載の抗pSYK抗体分子及び使用説明書を含むキット。

(構成25)

さらにSYK標的治療薬を含む、構成24記載のキット。

(構成26)

前記SYK標的治療薬が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、構成25記載のキット。

(構成27)

前記SYK標的治療薬が、6- ((1R,2S) -2-アミノシクロヘキシルアミノ) -7-フルオロ-4- (1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル) -1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3 (2H) -オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成25記載のキット。

(構成27)

前記SYK標的治療薬が、6- ((1S,2R) -2-アミノシクロヘキシルアミノ) -7-フルオロ-4- (1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル) -1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3 (2H) -オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成25記載のキット。

(構成28)

前記SYK標的治療薬が、6- ((1R,2S) -2-アミノシクロヘキシルアミノ) -4- (1- (ジフルオロメチル) -1H-ピラゾール-4-イル) -7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3 (2H) -オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成25記載のキット。

(構成29)

前記SYK標的治療薬が、シス-6- (2-アミノシクロヘキシルアミノ) -7-フルオロ-4- (1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル) -1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3 (2H) -オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成25記載のキット。

(構成30)

前記SYK標的治療薬が、6- ((3R,4R) -3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ) -4- (1- (ジフルオロメチル) -1H-ピラゾール-4-イル) -7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3 (2H) -オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成25記載のキット。

(構成31)

前記SYK標的治療薬が、6- ((3R,4R) -3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ) -7-フルオロ-4- (3-メチルイソチアゾール-5-イル) -1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3 (2H) -オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成25記載のキット。

(構成32)

1以上のpSYK発現細胞によって特徴付けられる疾患を有する患者を治療する方法であって、

a. 構成14～19のいずれか一記載の方法を用いて、前記患者から取得された生体試料中のpSYKタンパク質発現を検出すること；及び

b. 前記生体試料がpSYKを発現する場合に、前記患者にSYK標的治療薬を投与すること、を含む、前記方法。

(構成 3 3)

前記検出工程が、a) 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域 (CDR1、CDR2、及びCDR3) ; 並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域 (CDR1、CDR2、及びCDR3) を含む抗pSYK抗体分子と前記生体試料とを接触させる工程 ; 並びに

b) 前記抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程、を含む、構成32記載の方法。

(構成 3 4)

前記検出工程が、免疫組織化学を介して行われる、構成33記載の方法。

(構成 3 5)

前記SYK標的治療薬が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、構成32記載の方法。

(構成 3 6)

前記SYK標的治療薬が、6- ((1R,2S) -2-アミノシクロヘキシルアミノ) -7-フルオロ-4- (1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル) -1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成32記載の方法。

(構成 3 6)

前記SYK標的治療薬が、6- ((1S,2R) -2-アミノシクロヘキシルアミノ) -7-フルオロ-4- (1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル) -1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成32記載の方法。

(構成 3 7)

前記SYK標的治療薬が、6- ((1R,2S) -2-アミノシクロヘキシルアミノ) -4- (1- (ジフルオロメチル) -1H-ピラゾール-4-イル) -7-フルオロ-1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成32記載の方法。

(構成 3 8)

前記SYK標的治療薬が、シス-6- (2-アミノシクロヘキシルアミノ) -7-フルオロ-4- (1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル) -1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成32記載の方法。

(構成 3 9)

前記SYK標的治療薬が、6- ((3R,4R) -3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ) -4- (1- (ジフルオロメチル) -1H-ピラゾール-4-イル) -7-フルオロ-1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成32記載の方法。

(構成 4 0)

前記SYK標的治療薬が、6- ((3R,4R) -3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ) -7-フルオロ-4- (3-メチルイソチアゾール-5-イル) -1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成32記載の方法。

(構成 4 1)

前記1以上のpSYK発現細胞によって特徴付けられる疾患が、癌である、構成32～40のいずれか一記載の方法。

(構成 4 2)

前記pSYK発現癌が、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である、構成41記載の方法。

(構成 4 3)

前記血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病 (CLL) である、構成42記載の方法。

(構成 4 4)

前記血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病である、構成42記載の方法。

(構成 4 5)

前記血液悪性腫瘍が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) である、構成42記載の方法。

(構成 4 6)

前記生体試料が、細胞又は組織生検である、構成32～45のいずれか一記載の方法。

(構成 4 7)

前記細胞又は組織生検が、腫瘍生検である、構成46記載の方法。

(構成 4 8)

SYK標的治療薬に対する癌細胞の感受性を決定する方法であって、

a) 癌を有する患者由来の癌細胞から試料を提供する工程；

b) 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と前記試料とを接触させる工程；並びに

c) 前記抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出し、それによって、SYK標的治療薬に対する癌の感受性を決定し、かつ/又は対象がSYK標的治療薬による治療の候補であるか否かを決定する工程、を含む、前記方法。

(構成 4 9)

対象がSYK標的治療薬の潜在的な候補であるか否かを評価する方法であって、

a) 癌を有する患者由来の癌細胞から試料を提供する工程；

b) 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と前記試料とを接触させる工程；並びに

c) 前記抗pSYK抗体分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出し、それによって、SYK標的治療薬に対する癌の感受性を決定し、かつ/又は対象がSYK標的治療薬による治療の候補であるか否かを決定する工程、を含む、前記方法。

(構成 5 0)

前記検出工程が、免疫組織化学又は免疫蛍光を介して行われる、構成48又は構成49記載の方法。

(構成 5 1)

前記癌が、血液悪性腫瘍である、構成48～50のいずれか一記載の方法。

(構成 5 2)

前記血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病（CLL）である、構成50記載の方法。

(構成 5 3)

前記血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病である、構成50記載の方法。

(構成 5 4)

前記血液悪性腫瘍が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、構成50記載の方法。

(構成 5 5)

さらに、前記患者にSYK標的治療薬を投与する工程を含む、構成48～54のいずれか一記載の方法。

(構成 5 6)

前記SYK標的治療薬が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、構成55記載の方法。

(構成 5 7)

前記SYK標的治療薬が、6-（（1R,2S）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成55記載の方法。

(構成 5 7)

前記SYK標的治療薬が、6-（（1S,2R）-2-アミノシクロヘキシルアミノ）-7-フルオロ-4-（1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル）-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3（2H）-オン又はその

医薬として許容し得る塩を含む、構成55記載の方法。

(構成58)

前記SYK標的治療薬が、6-((1R,2S)-2-アミノシクロヘキシルアミノ)-4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成55記載の方法。

(構成59)

前記SYK標的治療薬が、シス-6-(2-アミノシクロヘキシルアミノ)-7-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成55記載の方法。

(構成60)

前記SYK標的治療薬が、6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-4-(1-(ジフルオロメチル)-1H-ピラゾール-4-イル)-7-フルオロ-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成55記載の方法。

(構成61)

前記SYK標的治療薬が、6-((3R,4R)-3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ)-7-フルオロ-4-(3-メチルイソチアゾール-5-イル)-1H-ピロロ[3,4-c]ピリジン-3(2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成55記載の方法。

(構成62)

生体試料と、配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域(CDR1、CDR2、及びCDR3)；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域(CDR1、CDR2、及びCDR3)を含む抗pSYK抗体分子を含む反応混合物。

(構成63)

前記生体試料が、1以上の細胞を含む、構成62記載の反応混合物。

(構成64)

前記生体試料が、組織試料を含む、構成62記載の反応混合物。

(構成65)

前記組織試料が、パラフィン包埋組織試料である、構成63記載の反応混合物。

(構成66)

前記生体試料が、原発性又は転移性の腫瘍生検試料である、構成62記載の反応混合物。

(構成67)

前記生体試料が、スライド上にマウントされる、構成62記載の反応混合物。

(構成68)

前記細胞が、慢性リンパ性白血病細胞である、構成63記載の反応混合物。

(構成69)

前記細胞が、急性骨髄性白血病細胞である、構成63記載の反応混合物。

(構成70)

前記細胞が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫細胞である、構成63記載の反応混合物。

(構成71)

前記細胞が、末梢T細胞リンパ腫細胞である、構成63記載の反応混合物。

(構成72)

前記生体試料が、pSYKタンパク質を含有することが疑われる、構成62記載の反応混合物。

(構成73)

さらに、抗pSYK抗体とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出するのに適する試薬を含む、構成62～72のいずれか一記載の反応混合物。

(構成74)

個別化癌治療レポートを作成する方法であって、

a) pSYK発現癌を有することが疑われる癌患者から取得された1以上の癌細胞を含む生体試料と、配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領

域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子とを接触させる工程；

b) 構成14～19のいずれか一記載の方法を用いて、前記生体試料中の抗pSYK分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程；

c) 前記生体試料中のpSYK発現を定量化する工程；

d) SYK標的治療薬を含むデータベースに対して前記pSYK発現レベルを比較する工程；並びに

e) SYK標的治療薬、必要に応じて、前記pSYK発現レベルに基づいた投与計画を選択する工程、

を含む、前記方法。

（構成75）

前記pSYK発現癌が、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である、構成74記載の方法。

（構成76）

前記血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病（CLL）である、構成75記載の方法。

（構成77）

前記血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病である、構成75記載の方法。

（構成78）

前記血液悪性腫瘍が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である、構成75記載の方法。

（構成79）

前記検出工程が、免疫組織化学を介して行われる、構成74～78のいずれか一記載の方法。

（構成80）

前記pSYK発現の定量化が、前記生体試料中の細胞質pSYK発現を含む、構成74～79のいずれか一記載の方法。

（構成81）

前記定量化工程が、Hスコアアプローチを含む、構成74～80のいずれか一記載の方法。

（構成82）

SYK標的治療薬の薬力学を評価する方法であって、

a) 患者にSYK標的治療薬を投与する工程；

b) 前記患者からpSYKを発現することが疑われる1以上の細胞を含む生体試料を取得する工程；

c) 配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体分子と、前記生体試料とを接触させる工程；

d) 構成14～19のいずれか一記載の方法を用いて、前記生体試料中の前記抗pSYK分子とpSYKタンパク質との間の複合体形成を検出する工程；

e) 前記生体試料中のpSYK発現を定量化する工程；

f) SYK標的治療薬を含むデータベースに対して前記pSYK発現レベルを比較する工程；並びに

g) 必要に応じて、前記pSYK発現レベルに基づいて、前記投与計画を調整する工程、を含む、前記方法。

（構成83）

前記pSYK発現癌が、白血病及びリンパ腫から選択される血液悪性腫瘍である、構成82記載の方法。

（構成84）

前記血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病（CLL）である、構成83記載の方法。

(構成 8 5)

前記血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病である、構成83記載の方法。

(構成 8 6)

前記血液悪性腫瘍が、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) である、構成83記載の方法。

(構成 8 7)

前記検出工程が、免疫組織化学を介して行われる、構成82～86のいずれか一記載の方法。

(構成 8 8)

前記pSYK発現の定量化が、前記生体試料中の細胞質pSYK発現を含む、構成82～87のいずれか一記載の方法。

(構成 8 9)

前記定量化工程が、Hスコアアプローチを含む、構成82～88のいずれか一記載の方法。

(構成 9 0)

前記SYK標的治療薬が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、構成82記載の方法。

(構成 9 1)

前記SYK標的治療薬が、6- ((1R,2S) -2-アミノシクロヘキシルアミノ) -7-フルオロ-4- (1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル) -1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成82記載の方法。

(構成 9 1)

前記SYK標的治療薬が、6- ((1S,2R) -2-アミノシクロヘキシルアミノ) -7-フルオロ-4- (1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル) -1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成82記載の方法。

(構成 9 2)

前記SYK標的治療薬が、6- ((1R,2S) -2-アミノシクロヘキシルアミノ) -4- (1- (ジフルオロメチル) -1H-ピラゾール-4-イル) -7-フルオロ-1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成82記載の方法。

(構成 9 3)

前記SYK標的治療薬が、シス-6- (2-アミノシクロヘキシルアミノ) -7-フルオロ-4- (1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル) -1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成82記載の方法。

(構成 9 4)

前記SYK標的治療薬が、6- ((3R,4R) -3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ) -4- (1- (ジフルオロメチル) -1H-ピラゾール-4-イル) -7-フルオロ-1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成82記載の方法。

(構成 9 5)

前記SYK標的治療薬が、6- ((3R,4R) -3-アミノテトラヒドロ-2H-ピラン-4-イルアミノ) -7-フルオロ-4- (3-メチルイソチアゾール-5-イル) -1H-ピロロ [3,4-c] ピリジン-3 (2H)-オン又はその医薬として許容し得る塩を含む、構成82記載の方法。

(構成 9 6)

SYK阻害剤として化合物を特定するための方法であって、

a) pSYKを含む細胞と試験化合物とを接触させること；及び

b) 前記細胞内のリン酸化又はY525/526に対する前記試験化合物の効果を測定すること、を含み、前記試験化合物がY525/526のリン酸化を阻害する場合、該試験化合物はSYK阻害剤である、前記方法。

(構成 9 7)

SYK阻害剤での癌治療のための支払い方法であって、

a) 腫瘍細胞を含む患者試料中のSYKの活性化状態を記録すること、及び

b) 前記SYK活性化状態が良好な結果を示す場合に、SYK阻害剤治療の支払いすること、を含む、前記方法。

(構成 98)

前記SYK阻害剤が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、構成37記載の方法。

(構成 99)

SYK阻害剤で癌患者を治療する方法であって、前記患者から取得された腫瘍細胞からの試料中のpSYKを検出すること、及びpSYKが前記試料中で検出された場合に、前記SYK阻害剤で前記癌患者を治療すること、を含む、前記方法。

(構成 100)

さらに、前記腫瘍試料中のpSYKのレベルを測定すること、前記レベルと参照試料中の前記pSYKのレベルを比較すること、及び前記pSYKレベルが前記参照試料から上昇している場合に、前記SYK阻害剤で前記患者を治療すること、を含む、構成99記載の方法。

(構成 101)

前記pSYKの検出が、配列番号11、12及び13によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの重鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）；並びに配列番号14、15及び16によるアミノ酸配列をそれぞれ含む3つの軽鎖相補性決定領域（CDR1、CDR2、及びCDR3）を含む抗pSYK抗体と前記試料とを接触させることを含む、構成99又は100記載の方法。

(構成 102)

前記検出が、免疫組織化学アッセイを含む、構成101記載の方法。

(構成 103)

前記免疫組織化学アッセイが、増幅工程を含む、構成102記載の方法。

(構成 104)

さらに、リン酸化B細胞リンカータンパク質（pBLNK）、リン酸化ブルトン型無ガンマグロブリン血症チロシンキナーゼ（pBTK）及び全SYKからなる群から選択される1以上の分子を検出することを含む、構成102記載の方法。

(構成 105)

さらに、CD34及びCD117からなる群から選択される1以上の分子を検出することを含む、構成102記載の方法。

(構成 106)

前記癌患者が、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、末梢T細胞リンパ腫（PTCL）、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（MCL）及びびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）からなる群から選択される腫瘍を有する、構成102記載の方法。

(構成 107)

前記SYK阻害剤が、縮合複素芳香族ピロリジノンを含む、構成102記載の方法。

(構成 108)

pSYKを含む腫瘍を有する患者の治療であって、該患者に治療有効量の縮合複素芳香族ピロリジンを投与する工程を含む治療に使用するための縮合複素芳香族ピロリジノン、その医薬として許容し得る塩又は医薬組成物。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017518737000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/026806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/30 C07K16/40 A61K39/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Katsue Suzuki-Inoue ET AL: "Glycoproteins VI and Ib-IX-V stimulate tyrosine phosphorylation of tyrosine kinase Syk and phospholipase C[gamma] 2 at distinct sites", Biochem. J, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 1023-1029, XP055197909, Retrieved from the Internet: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1224016/pdf/14656219.pdf [retrieved on 2015-06-24]	96
Y	the whole document ----- -/--	97-100, 102-107

☒ 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

1 July 2015

Date of mailing of the international search report

15/09/2015

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

Hix, Rebecca

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/026806

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. ZHANG ET AL: "Phosphorylation of Syk Activation Loop Tyrosines Is Essential for Syk Function: AN IN VIVO STUDY USING A SPECIFIC ANTI-Syk ACTIVATION LOOP PHOSPHOTYROSINE ANTIBODY", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 45, 7 August 2000 (2000-08-07), pages 35442-35447, XP055197912, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M004549200 the whole document	96-100, 102-107
X	WO 2011/045352 A2 (NOVARTIS FORSCHUNGSSTIFTUNG [CH]; UNIV HOSPITAL BASEL [CH]; HEMMINGS B) 21 April 2011 (2011-04-21) the whole document	99,100
Y	the whole document	102-107
Y	R M LARIVE ET AL: "Phosphoproteomic analysis of Syk kinase signaling in human cancer cells reveals its role in cell-cell adhesion", ONCOGENE, vol. 28, no. 24, 4 May 2009 (2009-05-04), pages 2337-2347, XP055197947, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2009.99 the whole document	96-107
X	MAIKE BUCHNER ET AL: "Spleen Tyrosine Kinase Is Overexpressed and Represents a Potential Therapeutic Target in Chronic Lymphocytic Leukemia", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 69, no. 13, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 5424-5432, XP002662991, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4252 the whole document	99,100, 106
Y	the whole document	96-98, 102-105, 107
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/026806

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. E. SPURGEON ET AL: "The Selective Syk Inhibitor P505-15 (PRT062607) Inhibits B Cell Signaling and Function In Vitro and In Vivo and Augments the Activity of Fludarabine in Chronic Lymphocytic Leukemia", JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 344, no. 2, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 378-387, XP055198122, DOI: 10.1124/jpet.112.200832	99,100, 106
Y	the whole document	96-98, 102-105, 107
X	----- CHEN LINFENG ET AL: "SYK Inhibition Modulates Distinct PI3K/AKT- Dependent Survival Pathways and Cholesterol Biosynthesis in Diffuse Large B Cell Lymphomas", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 23, no. 6, 10 June 2013 (2013-06-10), pages 826-838, XP028566587, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCR.2013.05.002	99,100, 106
Y	the whole document	96-98, 102-105, 107
X	----- BURKE RUSSELL T ET AL: "A potential therapeutic strategy for chronic lymphocytic leukemia by combining Idelalisib and GS-9973, a novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor.", ONCOTARGET 28 FEB 2014, vol. 5, no. 4, 28 February 2014 (2014-02-28), pages 908-915, XP002741384, ISSN: 1949-2553	99,100, 106
Y	the whole document	96-98, 102-105, 107
A	----- T. KUROSAKI ET AL: "Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling", JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 182, no. 6, 1 December 1995 (1995-12-01), pages 1815-1823, XP055197915, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.182.6.1815 the whole document -----	1-107
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/026806

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. ZHANG ET AL: "Phosphorylation of Tyr342 in the Linker Region of Syk Is Critical for Fc RI Signaling in Mast Cells", MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 22, no. 23, 1 December 2002 (2002-12-01), pages 8144-8154, XP055197913, ISSN: 0270-7306, DOI: 10.1128/MCB.22.23.8144-8154.2002 the whole document	1-107
Y,P	ROBERT L. GEAHLEN: "Getting Syk: spleen tyrosine kinase as a therapeutic target", TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, vol. 35, no. 8, 1 August 2014 (2014-08-01) , pages 414-422, XP055197945, ISSN: 0165-6147, DOI: 10.1016/j.tips.2014.05.007 the whole document	96-107
T	"Anti-Syk (phospho Y525) antibody [EP575(2)Y] ab62350", 24 June 2015 (2015-06-24), XP055198073, Retrieved from the Internet: URL:http://www.abcam.com/Syk-phospho-Y525-antibody-EP5752Y-ab62350.pdf [retrieved on 2015-06-24] abstract	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/026806

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-107

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2015/ 026806

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-107

An anti-pSYK antibody molecule comprising three heavy chain complementarity determining regions (CDR1, CDR2, and CDR3) comprising amino acid sequences SEQ ID NOs: 11, 12 and 13, respectively; and three light chain complementarity determining regions (CDR1, CDR2, and CDR3) comprising amino acid sequences SEQ ID NOs: 14, 15 and 16, respectively, nucleic acid encoding said antibody, method of producing said antibody, cell and kit comprising said antibody, methods of detecting and treating patients using said antibody, method of determining sensitivity of cancer cells to a SYK-targeted therapeutic agent, the method comprising contacting the sample with said anti-pSYK antibody, method of evaluating whether a subject is a potential candidate for a SYK-targeted therapy, the method comprising contacting the sample with said anti-pSYK antibody molecule, reaction mixture comprising a biological sample and said anti-pSYK antibody molecule, method for generating a personalized cancer treatment report, said method comprising the steps of contacting a biological sample comprising one or more cancer cells obtained from a cancer patient suspected of having a pSYK-expressing cancer with said anti-pSYK antibody molecule, method of evaluating the pharmacodynamics of a SYK-targeted therapy, said method comprising the steps of contacting the biological sample with said anti-pSYK antibody molecule, method for identifying a compound as SYK inhibitor, comprising measuring the effect of the test compound on the phosphorylation of Y525/526 in the cell, and wherein the test compound is an SYK inhibitor if it inhibits the phosphorylation of Y525/526 and method treating a cancer with a SYK inhibitor

2. claim: 108

A fused heteroaromatic pyrrolidinone, a pharmaceutically acceptable salt or a pharmaceutical composition thereof for use in treating a patient having a tumor comprising pSYK, comprising the step of administering a therapeutically effective amount of the fused heteroaromatic pyrrolidinone to the patient.

Information on patent family members

PCT/US2015/026806

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
<i>G 0 1 N 33/577 (2006.01)</i>	G 0 1 N	33/577	B	4 H 0 4 5
<i>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</i>	G 0 1 N	33/574	A	
<i>G 0 1 N 33/535 (2006.01)</i>	G 0 1 N	33/535		
<i>G 0 1 N 33/534 (2006.01)</i>	G 0 1 N	33/534		
<i>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</i>	G 0 1 N	33/53	D	
<i>G 0 1 N 33/533 (2006.01)</i>	G 0 1 N	33/533		
<i>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</i>	A 6 1 K	45/00		
<i>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</i>	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
<i>A 6 1 K 31/437 (2006.01)</i>	A 6 1 K	31/437		
<i>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</i>	A 6 1 P	35/02		
<i>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</i>	C 1 2 N	1/15		
<i>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</i>	C 1 2 N	1/19		
<i>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</i>	C 1 2 N	1/21		
<i>C 0 7 K 16/46 (2006.01)</i>	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, 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, KN, KP, KR, 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, UA, UG, US

(72)発明者 アン エル. ブルクハート
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 9 3 8 イプスウィク パインズワムプ ロード 1
0 5

(72)発明者 ヘレン ディー. ヘ マクドウガル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 8 1 ウェレスレイ ウォルセスター ストリート
7 5 9

(72)発明者 カルビアフ カンナン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 6 5 ニュートン オウバーン ストリート 4 7

(72)発明者 マシュー テイセン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 8 8 0 ウェイクフィールド フィッチ コート 7

(72)発明者 ステフェン エム. ティレル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 8 2 ウェレスレイ アップサン ロード 4 0

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ27 QS33 QX02
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AC14 CA25 CA44
4C084 AA17 NA14
4C086 AA01 AA02 CB05 MA01 MA04 NA14 ZB27 ZC41
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA22
FA74

专利名称(译)	用于SYK靶向治疗剂的抗pSYK抗体分子及其用途		
公开(公告)号	JP2017518737A	公开(公告)日	2017-07-13
申请号	JP2016564022	申请日	2015-04-21
[标]申请(专利权)人(译)	米伦纽姆医药公司		
申请(专利权)人(译)	千年制药公司		
[标]发明人	レイチエルエルブレイク アンエルブルクハードト ヘレンディーヘマクドウガル カルピアフカンナン マシューティセン ステフェンエムティレル		
发明人	レイチエル エル.ブレイク アン エル.ブルクハードト ヘレン ディー.ヘ マクドウガル カルピアフ カンナン マシュー ティセン ステフェン エム.ティレル		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/40 C12N5/10 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/577 G01N33/574 G01N33/535 G01N33/534 G01N33/53 G01N33/533 A61K45/00 A61P43/00 A61K31/437 A61P35/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C07K16/46		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/30 C07K16/40 C07K2317/34 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/40 C12N5/10 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/577.B G01N33/574.A G01N33/535 G01N33/534 G01N33/53.D G01N33/533 A61K45/00 A61P43/00.111 A61K31/437 A61P35 /02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C07K16/46		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ27 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064 /CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AC14 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA17 4C084/NA14 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB05 4C086/MA01 4C086 /MA04 4C086/NA14 4C086/ZB27 4C086/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/FA74		
代理人(译)	石川彻		
优先权	61/982098 2014-04-21 US 62/004496 2014-05-29 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了结合pSYK的抗体分子，以及用SYK靶向治疗剂治疗的诊断，预后，用SYK靶向治疗剂治疗的患者的选择或SYK靶向治疗剂的药效学概况的评估。 抗体分子。 [选择图]无

(51) Int. Cl.		F 1		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 B O 6 3
C O 7 K	16/40 (2006.01)	C O 7 K	16/40		4 B O 6 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 B O 6 5
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08		4 C O 8 4
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02		4 C O 8 6
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 121 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2016-564022 (P2016-564022)	(71) 出願人	500287639		
(86) (22) 出願日	平成27年4月21日 (2015. 4. 21)	ミレニアム ファーマシューティカルズ、 インコーポレイテッド			
(85) 翻訳文提出日	平成28年12月19日 (2016. 12. 19)	M I L L E N N I U M P H A R M A C E U T I C A L S , I N C .			
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/026806	アメリカ合衆国 マサチューセッツ オ 2 1 3 9 , ケンブリッジ, ランスダウン ストリート 4 0			
(87) 国際公開番号	W02015/164330	(74) 代理人	100097456		
(87) 国際公開日	平成27年10月29日 (2015. 10. 29)	弁理士 石川 徹			
(31) 優先権主張番号	61/982, 098	(72) 発明者 レイチェル エル. ブレイク			
(32) 優先日	平成26年4月21日 (2014. 4. 21)	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 オ 1 7 6 0 ナティク マンチェスター レイス 2 1			
(33) 優先権主張国	米国 (US)	最終頁に続く			
(31) 優先権主張番号	62/004, 496				
(32) 優先日	平成26年5月28日 (2014. 5. 28)				
(33) 優先権主張国	米国 (US)				
(54) 【発明の名称】 S Y K 標的治療薬のための抗 p S Y K 抗体分子及びその使用					