

(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2012-502649

(P2012-502649A)

(43) 公表日 平成24年2月2日(2012.2.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
<b>C 0 7 K 16/28 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 T	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/574 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 126 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-527406 (P2011-527406)	(71) 出願人	504333972 メディミュオン, エルエルシー アメリカ合衆国 20878 メリーラン ド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミ ュオン ウェイ
(86) (22) 出願日	平成21年9月18日 (2009.9.18)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成23年5月12日 (2011.5.12)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 国際出願番号	PCT/GB2009/051216	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(87) 国際公開番号	W02010/032059	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 国際公開日	平成22年3月25日 (2010.3.25)		
(31) 優先権主張番号	61/098, 685		
(32) 優先日	平成20年9月19日 (2008.9.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD105 を対象とする標的結合剤およびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、CD105 に対する標的結合剤およびかかる薬剤の使用に関する。より具体的には、本発明は、CD105 を対象とする完全ヒトモノクローナル抗体に関する。記載される標的結合剤は、CD105 の活性および/または過剰産生と関連する疾病の治療において、および診断薬として実用的である。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C D 1 0 5 に特異的に結合する単離された抗体であって、前記抗体は、  
 1 n M 未満の  $K_D$  でヒト C D 1 0 5 に結合することと、  
 5 % を超えて H U V E C 細胞の細胞増殖を阻害することと、  
 S M A D 2 リン酸化を増加させることと、  
 抗血管新生活性を示すことと、  
 A D C C 活性を示すことと、  
 を含む特性のうちの 1 つ以上を示す、単離された抗体。

## 【請求項 2】

前記抗体は、哺乳動物における腫瘍の成長および / または転移を阻害する、請求項 1 に記載の単離された抗体。

## 【請求項 3】

前記抗体は、5 0 0 p M 未満の  $K_d$  で C D 1 0 5 に結合する、請求項 1 ~ 2 のうちのいずれか 1 項に記載の単離された抗体。

## 【請求項 4】

前記抗体は、抗体 4 . 1 2 0、9 H 1 0、1 0 C 9、4 D 4、1 1 H 2、6 B 1、4 . 3 7、6 B 1 0、3 C 1、または 6 A 6 のうちのいずれか 1 つである、請求項 1 ~ 3 のうちのいずれか 1 項に記載の単離された抗体。

## 【請求項 5】

前記抗体は、モノクローナル抗体 4 . 1 2 0 である、請求項 4 に記載の単離された抗体。

## 【請求項 6】

前記抗体は、モノクローナル抗体 4 . 3 7 である、請求項 4 に記載の単離された抗体。

## 【請求項 7】

前記抗体は、モノクローナル抗体 6 B 1 0 である、請求項 4 に記載の単離された抗体。

## 【請求項 8】

前記抗体は、モノクローナル抗体 4 D 4 . 1 である、請求項 4 に記載の単離された抗体。

## 【請求項 9】

前記抗体は、配列番号 2 6 の配列を含み、配列番号 2 6 は、表 6 の各行に示される生殖系列および非生殖系列の残基の一意的な組み合わせのうちのいずれか 1 つを含む、請求項 1 ~ 8 のうちのいずれか 1 項に記載の単離された抗体。

## 【請求項 1 0】

前記抗体は、配列番号 2 8 の配列を含み、配列番号 2 8 は、表 7 の各行に示される生殖系列および非生殖系列の残基の一意的な組み合わせのうちのいずれか 1 つを含む、請求項 1 ~ 9 のうちのいずれか 1 項に記載の単離された抗体。

## 【請求項 1 1】

前記抗体は、配列番号 3 0 の配列を含み、配列番号 3 0 は、表 8 の各行に示される生殖系列および非生殖系列の残基の一意的な組み合わせのうちのいずれか 1 つを含む、請求項 1 ~ 1 0 のうちのいずれか 1 項に記載の単離された抗体。

## 【請求項 1 2】

前記抗体は、配列番号 3 2 の配列を含み、配列番号 3 2 は、表 9 の各行に示される生殖系列および非生殖系列の残基の一意的な組み合わせのうちのいずれか 1 つを含む、請求項 1 ~ 1 1 のうちのいずれか 1 項に記載の単離された抗体。

## 【請求項 1 3】

C D 1 0 5 への結合に対して、抗体 4 . 1 2 0、9 H 1 0、1 0 C 9、4 D 4、1 1 H 2、6 B 1、4 . 3 7、6 B 1 0、3 C 1、または 6 A 6 のうちのいずれか 1 つと競合する、完全ヒトモノクローナル抗体。

## 【請求項 1 4】

10

20

30

40

50

CD105上で、抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、または6A6のうちのいずれか1つと同じエピトープに結合する、完全ヒトモノクローナル抗体。

【請求項15】

a) 表2に示されるCDR3配列、  
 b) 表2に示されるCDR1、CDR2、もしくはCDR3配列のうちのいずれか1つ、  
 c) 表2に示される可変軽鎖配列のCDR1、CDR2、およびCDR3配列、または  
 d) 表2に示される可変重鎖配列のCDR1、CDR2、およびCDR3配列  
 を含むアミノ酸配列を含む、単離された抗体。

【請求項16】

CD105に免疫特異的に結合し、

(a) 配列番号2のVH CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VH CDR1と、

(b) 配列番号2のVH CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VH CDR2と、

(c) 配列番号2のVH CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VH CDR3と、

(d) 配列番号4のVL CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VL CDR1と、

(e) 配列番号4のVL CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VL CDR2と、

(f) 配列番号4のVL CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VL CDR3と、

を含む、抗体。

【請求項17】

前記抗体は、

(a) 配列番号2のVH CDR1、CDR2、およびCDR3と、

(b) 配列番号4のVL CDR1、CDR2、およびCDR3と、

を含む、請求項16に記載の単離された抗体。

【請求項18】

CD105に免疫特異的に結合し、

(a) 配列番号26のVH CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VH CDR1と、

(b) 配列番号26のVH CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VH CDR2と、

(c) 配列番号26のVH CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VH CDR3と、

(d) 配列番号28のVL CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VL CDR1と、

(e) 配列番号28のVL CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VL CDR2と、

(f) 配列番号28のVL CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VL CDR3と、

を含む、抗体。

【請求項19】

前記薬剤は、

(a) 配列番号26のVH CDR1、CDR2、およびCDR3と、

(b) 配列番号28のVL CDR1、CDR2、およびCDR3と、

を含む、請求項18に記載の単離された抗体。

【請求項20】

10

20

30

40

50

CD105に免疫特異的に結合し、配列番号26のアミノ酸と少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメインを含み、配列番号28のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み、CD105に結合する活性を有する、抗体。

【請求項21】

CD105に免疫特異的に結合し、

(a) 配列番号30のVH CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VH CDR1と、

(b) 配列番号30のVH CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VH CDR2と、

(c) 配列番号30のVH CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VH CDR3と、

(d) 配列番号32のVL CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VL CDR1と、

(e) 配列番号32のVL CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VL CDR2と、

(f) 配列番号32のVL CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、VL CDR3と、

を含む、抗体。

【請求項22】

前記抗体は、

(a) 配列番号30のVH CDR1、CDR2、およびCDR3と、

(b) 配列番号32のVL CDR1、CDR2、およびCDR3と、

を含む請求項21に記載の単離された抗体。

【請求項23】

CD105に免疫特異的に結合し、配列番号30のアミノ酸と少なくとも90%の同一性を有する重鎖可変ドメインを含み、配列番号32のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み、CD105に結合する活性を有する、抗体。

【請求項24】

前記抗体は、モノクローナル抗体の結合断片である、請求項1～23のうちのいずれか1項に記載の単離された抗体。

【請求項25】

前記抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である、請求項1～24のうちのいずれか1項に記載の単離された抗体。

【請求項26】

前記結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、およびdAb断片からなる群から選択される、請求項10に記載の単離された抗体。

【請求項27】

American Type Culture Collection(ATCC)にPTA-9514の番号で寄託され、Mab4.120VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる重鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む、可変重鎖アミノ酸配列、

American Type Culture Collection(ATCC)にPTA-9513の番号で寄託され、Mab4.120VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる軽鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む、可変軽鎖アミノ酸配列、または、

American Type Culture Collection(ATCC)にPTA-9514の番号で寄託され、Mab4.120VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる重鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む、可変重鎖アミノ酸配列、およびAmerican Type Culture Collection(ATCC)にPTA-9513の番

10

20

30

40

50

号で寄託され、Mab4.120VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる軽鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む可変軽鎖アミノ酸配列、

のうちのいずれか1つを含むアミノ酸配列を含む、抗体。

【請求項28】

American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9517の番号で寄託され、Mab4.37VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる重鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む、可変重鎖アミノ酸配列、

American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9512の番号で寄託され、Mab4.37VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる軽鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む、可変軽鎖アミノ酸配列、または、

American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9517の番号で寄託され、Mab4.37VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる重鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む、可変重鎖アミノ酸配列、およびAmerican Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9512の番号で寄託され、Mab4.37VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる軽鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む、可変軽鎖アミノ酸配列、

のうちのいずれか1つを含むアミノ酸配列を含む、抗体。

【請求項29】

American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9510の番号で寄託され、Mab6B10VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる重鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む、可変重鎖アミノ酸配列、

American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9499の番号で寄託され、Mab6B10VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる軽鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む、可変軽鎖アミノ酸配列、または、

American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9510の番号で寄託され、Mab6B10VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる重鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む、可変重鎖アミノ酸配列、およびAmerican Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9499の番号で寄託され、Mab6B10VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる軽鎖CDRのうちの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む、可変軽鎖アミノ酸配列、

を含むアミノ酸配列を含む、抗体。

【請求項30】

標的薬剤または請求項1～29のうちのいずれか1項に記載の抗体を含む、組成物。

【請求項31】

前記抗体または請求項1～30のうちのいずれか1項に記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項32】

前記抗体または、請求項1～31のうちのいずれか1項に記載の抗体をコードする、核酸分子。

【請求項33】

悪性腫瘍の治療を必要とする動物を選択することと、請求項1～32のいずれか1項に

10

20

30

40

50

記載の治療上有効な投与量の抗体を前記動物に投与することと、を含む、動物における悪性腫瘍の治療方法。

【請求項 3 4】

前記動物は、ヒトである、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体 4 . 1 2 0、9 H 1 0、1 0 C 9、4 D 4、1 1 H 2、6 B 1、4 . 3 7、6 B 1 0、3 C 1、または 6 A 6 からなる群から選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記悪性腫瘍は、黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、肝細胞（肝臓）癌、甲状腺腫瘍、胃癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、肺癌、神経膠芽腫、子宮内膜癌、腎癌、結腸癌、膵癌、食道癌、頭頸部癌、中皮腫、肉腫、胆管癌（胆管細胞癌）、小腸腺癌、小児悪性腫瘍、および類表皮癌からなる群から選択される、請求項 3 3 ~ 3 5 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 3 7】

悪性腫瘍を治療するための、請求項 3 0 に記載の組成物の使用。

【請求項 3 8】

前記悪性腫瘍は、黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、肝細胞（肝臓）癌、甲状腺腫瘍、胃癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、肺癌、神経膠芽腫、子宮内膜癌、腎癌、結腸癌、膵癌、食道癌、頭頸部癌、中皮腫、肉腫、胆管癌（胆管細胞癌）、小腸腺癌、小児悪性腫瘍、および類表皮癌からなる群から選択される、請求項 3 7 に記載の組成物の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CD105 に対する標的結合剤およびかかる薬剤の使用に関する。より具体的には、本発明は、CD105 を対象とする完全ヒトモノクローナル抗体に関する。記載される標的結合剤は、CD105 の活性および/または過剰産生と関連する疾病の治療において、および診断薬として有用である。

【背景技術】

30

【0002】

別名エンドグリンと称される CD105 は、活性化された血管内皮細胞上に発現される膜貫通糖タンパク質である (Letamendia A, Lastres P, Botella LM, et al. J Biol Chem 1998; 273: 33011-9)。また、CD105 は、腫瘍血管系で高度に発現し、マクロファージ、線維芽細胞、および合胞体栄養細胞を含む他の限定された数の細胞型上で弱く発現することが報告されている (Fonsatti E et al., Oncogene 2003: 22: 6557-6563)。

【0003】

CD105 は、180 kDa のホモ二量体タンパク質を形成する、それぞれ 95 kDa の 2 つのジスルフィド結合されたサブユニットからなる (Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. J Biol Chem 1999; 274: 584-94)。CD105 遺伝子は、長さ 40 kb であり、ヒト染色体 9q34 に位置する (Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P, Altomonte M, Maio M. Curr Cancer Drug Targets 2003; 3: 427-32、Rius C, Smith JD, Almendro N, et al. Blood 1998; 92: 4677-90)。mRNA 転写物は、長さ 3.4 kb であり、14 個のエクソンからなる。エクソン 1 ~ 12 は、細胞外ドメインをコードするが、膜貫通ドメインはエクソン 13 によって、および細胞質ドメインはエクソン 14 によってコードされる。2 つの異なる CD105 のアイソフォームが同定されてお

40

50

り、長(L-CD105/エンドグリン)および短(S-CD105/エンドグリン)と命名されている。上記アイソフォームは、細胞質尾部内で、アミノ酸組成が異なる。より具体的には、Lアイソフォームが主であり、細胞質ドメインに47個の残基を含有するが、Sアイソフォームは、14個のアミノ酸のみを含有する(Gougos A, Letarte M. *J Biol Chem* 1990; 265: 8361 - 8364、Lastres P et al. *Biochem J*, 1990; 301: 765 - 768)。

#### 【0004】

CD105は、形質転換成長因子-(TGF-)受容体のための補助受容体であり、TGF-のシグナル伝達I型およびII型受容体と共に、ヘテロ二量体を形成し、TGF-に対する応答を調節することができる(Yamashita H et al., *J Biol Chem*, 1994; 269: 1995 - 2001、Guerrero-Esteo M et al., *J Biol Chem* 2002; 277: 29197 - 29209)。TGF-は、アクチビンおよび骨形成タンパク質(BMP)を含むタンパク質のより大きなスーパーファミリーの一部であるサイトカインである(Piek E et al., *FASEB J*, 1999; 13: 2105 - 2124)。TGF-スーパーファミリーのメンバーは、I型およびII型セリン/スレオニンキナーゼ受容体、およびSmadと称されるそれらの下流核エフェクターを通して細胞応答を媒介する(Heldin C-H et al., *Nature*, 1997; 390: 465 - 471)。内皮細胞において、TGF-が、2つのI型受容体経路、つまりアクチビン受容体様5キナーゼALK5およびALK1を活性化することが示されている。ALK1の活性化は、Smad1/5リン酸化反応を促進し、細胞増殖および移動を刺激する。対照的に、ALK5の活性化は、Smad2/3リン酸化反応を誘導し、細胞増殖および移動を阻害する(Goumans M-J et al., *EMBO J* 2002; 21: 1743 - 1753)。したがって、静止内皮細胞では、ALK5が、TGF-シグナル伝達の主な媒介物である。しかし、血管形成中は、ALK1が優先的に活性化される(Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, ten Dijke P. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 599 - 608)。

#### 【0005】

CD105における突然変異は、遺伝性出血性毛細血管拡張症I型(またはオスラー-レンドウエーバー症候群1)の原因となる(Bobik A. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2006; 26: 1712 - 20)。この症候群は、遺伝性の常染色体優性の疾患であり、多システムの血管異形成、鼻出血の再発、皮膚粘膜毛細血管拡張症、および肺、脳、肝臓、および消化管の動静脈奇形を特徴とする(Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. *Chest* 2005; 128: 585 - 90S、Bobik A. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2006; 26: 1712 - 20)。CD105における突然変異を特徴とする遺伝性出血性毛細血管拡張症1、およびALK1における突然変異を特徴とする遺伝性出血性毛細血管拡張症2の疾病の2つの遺伝型が記載されている(Bobik A. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2006; 26: 1712 - 20、Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, ten Dijke P. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 599 - 608)。CD105(CD105<sup>+/+</sup>)のヘテロ接合体遺伝子型のトランスジェニックげっ歯類モデルでは、マウスは不規則な、拡張した、および薄壁の血管を示し、関連する血管平滑筋細胞は野生型動物より少ない。興味深いことに、CD105ヘテロ接合体マウスは、成人期まで生存するが、ホモ接合ヌル突然変異(CD105<sup>-/-</sup>)を示すマウスは発育せず、不完全な卵黄嚢血管新生、心臓弁の異常、および不規則な心室発生が原因でE11.5までに胚の致死に至る(Arthur HM, Ure J, Smith AJ, et al., *Dev Biol* 2000; 217: 42 - 53、Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, et

al. Science 1999; 284: 1534 - 7)。したがって、上記の結果は、血管恒常性におけるCD105の重要性を強調する。近年、CD105は、内皮細胞移動および細胞骨格形成の調節にも関係するとされている(Conley BA et al., J Biol Chem 2004; 279: 27440 - 27449、Sanz-Rodriguez F et al., J Biol Chem, 2004; 279: 32858 - 32868)。

【0006】

CD105の発現は、癌患者の予後不良に関連することが報告されている。より具体的には、CD105の発現は、乳癌、肺癌、および結腸直腸癌患者の全体的生存率の低さと相関関係が示された(Kumar S et al., Cancer Res 1999; 59: 856 - 861、Tanaka F et al., Clin Cancer Res 2001; 7: 3410 - 3415、Li C et al., Br J Cancer 2003; 88: 1424 - 5 1431)。また、上述の胃腸、乳房、前立腺、頭頸部の腫瘍では、CD105の発現が遠隔転移疾患の存在と関連していた(Ding S, Li C, Lin S, et al. Hum Pathol 2006; 37: 861 - 6、Saad RS, El-Gohary Y, Memari E, Liu YL, Silverman JF. Hum Pathol 2005; 36: 955 - 61、Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Mod Pathol 2004; 17: 197 - 203、Li C, Guo B, Wilson PB, et al. Int J 20  
Oncol 2000; 89: 122 - 6、Yang LY, Lu WQ, Huang GW, Wang W. BMC Cancer 2006; 6: 110、El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, et al. Am J Clin Pathol 2007; 127: 572 - 9、Chien CY, Su CY, Hwang CF, Chuang HC, Chen CM, Huang CC. J Surg Oncol 2006; 94: 413 - 7)。

【0007】

近年、VEGF経路の阻害後のCD105の発現の濃度増加が報告されている。膵癌異種移植モデルでは、CD105転写レベルが、抗VEGF中和抗体で治療されたマウスで2倍以上上方制御された(Bockhorn M et al., Clin Cancer Res. 2003; 9: 4221 - 4226)。膀胱癌異種移植モデルでは、免疫組織化学によって測定されたCD105濃度が、抗VEGF中和抗体で治療されたマウスの腫瘍コア内で上昇した(Davis D et al., Cancer Res. 2004; 64: 4601 - 4610)。

【0008】

さらに、CD105の発現は、低酸素症によって増加し、アポトーシスから低酸素細胞を防御することが報告されており、CD105の阻害は低酸素ストレスの下、細胞のアポトーシスを増加した(Li C, Issa R, Kumar P, et al. J Cell Sci 2003; 116: 2677 - 85.)。CD105 mRNAおよびプロモーター活性も、低酸素状態の下、著しく上昇した。(Li C, Issa R, Kumar P, et al. J Cell Sci 2003; 116: 2677 - 85)。したがって、低酸素症は、血管内皮細胞におけるCD105遺伝子5の発現に対して強力な刺激であると考えられる。

【0009】

したがって、CD105シグナル伝達を制御する新しい手段を同定する必要がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Letamendia A, Lastres P, Botella L M, et al. J Biol Chem 1998; 273: 33011 - 9

10

20

30

40

50

- 【非特許文献2】Fonsatti E et al., *Oncogene* 2003; 22: 6557 - 6563
- 【非特許文献3】Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. *J Biol Chem* 1999; 274: 584 - 94.
- 【非特許文献4】Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P, Altomonte M, Maio M. *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3: 427 - 32
- 【非特許文献5】Rius C, Smith JD, Almendro N, et al. *Blood* 1998; 92: 4677 - 90.
- 【非特許文献6】Gougos A, Letarte M. *J Biol Chem* 1990; 265: 8361 - 8364 10
- 【非特許文献7】Lastres P et al. *Biochem J*, 1990; 301: 765 - 768
- 【非特許文献8】Yamashita H et al., *J Biol Chem*, 1994; 269: 1995 - 2001
- 【非特許文献9】Guerrero-Esteo M et al., *J Biol Chem* 2002; 277: 29197 - 29209
- 【非特許文献10】Piek E et al., *FASEB J*, 1999; 13: 2105 - 2124
- 【非特許文献11】Heldin C-H et al., *Nature*, 1997; 390: 465 - 471 20
- 【非特許文献12】Goumans M-J et al., *EMBO J* 2002; 21: 1743 - 1753
- 【非特許文献13】Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, ten Dijke P. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 599 - 608
- 【非特許文献14】Bobik A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1712 - 20.
- 【非特許文献15】Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. *Chest* 2005; 128: 585 - 90S 30
- 【非特許文献16】Arthur HM, Ure J, Smith AJ, et al., *Dev Biol* 2000; 217: 42 - 53
- 【非特許文献17】Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, et al. *Science* 1999; 284: 1534 - 7
- 【非特許文献18】Conley BA et al., *J Biol Chem* 2004; 279: 27440 - 27449
- 【非特許文献19】Sanz-Rodriguez F et al., *J Biol Chem*, 2004; 279: 32858 - 32868
- 【非特許文献20】Kumar S et al., *Cancer Res* 1999; 59: 856 - 861 40
- 【非特許文献21】Tanaka F et al., *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3410 - 3415
- 【非特許文献22】Li C et al., *Br J Cancer* 2003; 88: 1424 - 5 1431
- 【非特許文献23】Ding S, Li C, Lin S, et al. *Hum Pathol* 2006; 37: 861 - 6
- 【非特許文献24】Saad RS, El-Gohary Y, Memari E, Liu YL, Silverman JF. *Hum Pathol* 2005; 36: 955 - 61
- 【非特許文献25】Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebre 50

z z e J , M e d i c h D , S i l v e r m a n J F . M o d P a t h o l 2  
0 0 4 ; 1 7 : 1 9 7 - 2 0 3

【非特許文献26】Li C , G u o B , W i l s o n P B , e t a l . I n t  
J o C a n c e r 2 0 0 0 ; 8 9 : 1 2 2 - 6

【非特許文献27】Yang LY , L u W Q , H u a n g G W , W a n g W . B  
M C C a n c e r 2 0 0 6 ; 6 : 1 1 0

【非特許文献28】El - G o h a r y Y M , S i l v e r m a n J F , O l s o n  
P R , e t a l . A m J C l i n P a t h o l 2 0 0 7 ; 1 2 7 : 5 7 2 -  
9

【非特許文献29】Chien CY , S u C Y , H w a n g C F , C h u a n g  
H C , C h e n C M , H u a n g C C . J S u r g O n c o l 2 0 0 6 ; 9 4  
: 4 1 3 - 7

【非特許文献30】B o c k h o r n M e t a l . , C l i n C a n c e r R  
e s . 2 0 0 3 ; 9 : 4 2 2 1 - 4 2 2 6

【非特許文献31】D a v i s D e t a l . , C a n c e r R e s . 2 0 0 4 ;  
6 4 : 4 6 0 1 - 4 6 1 0

【非特許文献32】Li C , I s s a R , K u m a r P , e t a l . J C e l l  
l S c i 2 0 0 3 ; 1 1 6 : 2 6 7 7 - 8 5 .

【発明の概要】

【0011】

本発明は、CD105に特異的に結合し、CD105の生物活性を阻害する標的結合剤に関する。本発明の実施形態は、CD105に特異的に結合し、CD105依存性のTGF- $\beta$ シグナル伝達を阻害する標的結合剤に関する。例えば、本発明のCD105の結合剤は、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 3、アクチビン-A、BMP-2、および/またはBMP-7等のCD105リガンドとTGF- $\beta$ 1受容体複合体のCD105部分との結合を阻害する。

【0012】

本発明の実施形態は、CD105に特異的に結合し、CD105リガンドとCD105の結合を阻害する標的結合剤に関する。本発明の一実施形態において、標的結合剤はCD105と特異的に結合し、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 3、アクチビン-A、BMP-2、および/またはBMP-7のCD105リガンドとCD105との結合を阻害する。一実施形態において、標的結合剤は、標的結合剤なしで発生するであろう結合と比べて、CD105リガンドとCD105との結合を、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、阻害する。

【0013】

本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤は、CD105と5ナノモル(nM)未満の結合親和性( $K_D$ )で結合する。他の実施形態において、標的結合剤は、4nM、3nM、2nM、または1nM未満の $K_D$ で結合する。本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤は、CD105と950ピコモル(pM)未満の $K_D$ で結合する。本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤は、CD105と900ピコモル未満の $K_D$ で結合する。他の実施形態において、標的結合剤は、800pM、700pM、または600pM未満の $K_D$ で結合する。本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤は、CD105と500ピコモル未満の $K_D$ で結合する。他の実施形態において、標的結合剤は、400pM未満の $K_D$ で結合する。さらに他の実施形態において、標的結合剤は、300pM未満の $K_D$ で結合する。いくつかの他の実施形態において、標的結合剤は、200pM未満の $K_D$ で結合する。いくつかの他の実施形態において、標的結合剤は、100pM未満の $K_D$ で結合する。1つの特定の実施形態において、本発明の標的結合剤は

、ヒトCD105と10pM未満の親和性 $K_D$ で結合することができる。別の特定の実施形態において、本発明の標的結合剤は、ヒトCD105と1pM未満の親和性 $K_D$ で結合することができる。 $K_D$ は、本明細書に記載されるか、または当業者に知られる方法を使用して評価することができる(例えば、Biacoreアッセイ、ELISA、FACS)(Biacore International AB, Uppsala, Sweden)。

【0014】

本発明の標的結合剤または抗体の結合特性は、解離または会合速度(それぞれ $k_{off}$ および $k_{on}$ )を参照することにより測定することもできる。

【0015】

本発明の一実施形態において、標的結合剤または抗体は、少なくとも $10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、または少なくとも $10^8 M^{-1} s^{-1}$ の $k_{on}$ 率(抗体(Ab)+抗原(Ag) $k_{on}$  Ab-Ag)を有することができる。

【0016】

本発明の別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、 $5 \times 10^{-1} s^{-1}$ 未満、 $10^{-1} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-2} s^{-1}$ 未満、 $10^{-2} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満、 $10^{-3} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $10^{-4} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ 未満、 $10^{-5} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ 未満、 $10^{-6} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-7} s^{-1}$ 未満、 $10^{-7} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-8} s^{-1}$ 未満、 $10^{-8} s^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-9} s^{-1}$ 未満、 $10^{-9} s^{-1}$ 未満、または $10^{-10} s^{-1}$ 未満の $k_{off}$ 率((Ab-Ag) $k_{off}$  抗体(Ab)+抗原(Ag))を有することができる。

【0017】

いくつかの例において、本発明の標的結合剤は、他種からの他のCD105タンパク質と交差反応する。一実施形態において、標的結合剤、例えば本発明の4.120、6B1、9H10、10C9、4D4、11H2、4.37、6B10、3C1、および6A6は、カニクイザルCD105と交差反応する。別の実施形態において、本発明の標的結合剤は、マウスCD105、例えば6B1と交差反応する。

【0018】

本発明の標的結合剤は、抗増殖活性も有し得る。特定の例において、本発明の抗体は、少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上で、増殖を阻害することができる。一実施形態において、本発明の抗体は、抗体濃度が $50 \mu g/mL$ の場合、2~30%、4~25%、または8~20%の範囲でHUVEC細胞の増殖を阻害することができる。

【0019】

本発明の別の実施形態において、標的結合剤は、血管形成を調節することができる。1つの例において、本発明の抗体は、血管延長および/または分岐数を阻害することができる。1つの特定の実施形態において、本発明の抗体は、血管延長を少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上、阻害することができる。例えば、抗体6B10は、実施例6において記載される全ウェル画像解析方法において、血管延長を少なくとも20%、例えば20~30%の間、および分岐数を少なくとも40%、例えば40~60%の間、阻害することができる。

【0020】

本発明の別の実施形態において、本発明の抗体は、細胞のアクチン細胞骨格構造を調節することができる。1つの特定の例において、3C.1、6B1、6B10、10C9、

10

20

30

40

50

4.120、または4.37の標的抗体は、内皮細胞のアクチン細胞骨格構造の顕著な調節を引き起こすことができる。

【0021】

本発明の別の実施形態において、本発明の標的結合剤は、TGF-シグナル伝達を妨害する。一実施形態において、本発明の標的結合剤、例えば4D4、6A6、6B10、9H10、4.120、または4.37は、pSMAD2リン酸化反応を媒介する。

【0022】

本発明の別の実施形態において、標的結合剤は、SN6抗体、例えば6A6、6B10、9H10、または3C1と、交差競合する。

【0023】

いくつかの実施形態において、標的結合剤は、血管形成と関連する状態を治療することができる。本発明の一実施形態において、標的結合剤は、哺乳動物における腫瘍成長および/または転移を阻害する。具体的には、標的結合剤は、固形腫瘍を治療するために使用可能である。標的結合剤は、化学療法計画等の、他の抗癌治療と組み合わせて、または単独で腫瘍成長および/または転移を阻害することができる。単独療法として使用される場合、本発明の標的結合剤は、抗VEGF療法等の他の療法が失敗した患者に使用され得る。別の実施形態において、標的結合剤は、糖尿病性網膜症および血管新生による黄斑変性症等の眼疾患を治療することができる。さらに別の実施形態において、標的結合剤は、関節リウマチ、変形性関節症、喘息、クローン病、潰瘍性大腸炎、および慢性炎症性疾患等の慢性炎症性疾患を治療するために使用することができる。

10

20

【0024】

本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤は、抗体である。本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤は、モノクローナル抗体である。本発明の一実施形態において、標的結合剤は、完全ヒトモノクローナル抗体である。本発明の別の実施形態において、標的結合剤は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプの完全ヒトモノクローナル抗体である。本発明の別の実施形態において、標的結合剤は、IgG2アイソタイプの完全ヒトモノクローナル抗体である。このアイソタイプは、他のアイソタイプと比べて、低減した、エフェクター機能を誘発する可能性を有し、これは、毒性低減をもたらし得る。本発明の別の実施形態において、標的結合剤は、IgG1アイソタイプの完全ヒトモノクローナル抗体である。IgG1アイソタイプは、他のアイソタイプと比べて、増加した、ADCCおよび/またはCDCを誘発する可能性を有し、これは、改善された有効性をもたらし得る。IgG1のアイソタイプは、他のアイソタイプ、例えばIgG4と比べて、改善された安定性を有し、これは、改善された生物学的利用率、または改善された産生の容易さ、もしくはより長い半減期をもたらし得る。一実施形態において、IgG1アイソタイプの完全ヒトモノクローナル抗体は、z、za、またはfアロタイプである。

30

【0025】

本発明の一実施形態において、CD105と特異的に結合する標的結合剤は、1nM未満の $K_D$ でヒトCD105と結合することと、5%を超えて、例えば5~20%の間でHUVEC細胞の細胞増殖を阻害することと、SMAD2リン酸化反応を増加することと、抗血管新生活性を示すことと、ADCC活性を示すことと、を含む上記の特性のうちの1つ以上を示すことができる。

40

【0026】

さらなる実施形態は、CD105に特異的に結合する標的結合剤または抗体であり、表2に示す相補性決定領域(CDR)配列のうち1つ以上を含む配列を含む。本発明の実施形態は、表2に示す重鎖可変ドメインからのCDR1、CDR2、またはCDR3配列のいずれか1つを含む配列を含む標的結合剤、または抗体を含む。さらなる実施形態は、CD105と特異的に結合する標的結合剤または抗体であり、表2に示す重鎖可変ドメインのCDR配列を2つ含む。別の実施形態において、標的結合剤、または抗体は、表2に示

50

す重鎖可変ドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む配列を含む。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す軽鎖可変ドメインのCDR配列のうちの一つを含む配列を含む。本発明の実施形態は、表2に示す重鎖可変ドメインのCDR1、CDR2、またはCDR3配列のいずれか一つの配列を含む標的結合剤または抗体を含む。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す重鎖可変ドメインのCDR配列の2つを含む配列を含む。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す軽鎖可変ドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む配列を含む。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す重鎖可変ドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3配列、ならびに表2に示す軽鎖可変ドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、標的結合剤は、抗体である。特定の実施形態において、標的結合剤は、完全ヒトモノクローナル抗体である。特定の他の実施形態において、標的結合剤は、完全ヒトモノクローナル抗体の結合断片である。

10

20

30

40

50

【0027】

一実施形態において、本発明の抗体は、

- (a) 配列番号2のVH CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号2のVH CDR1と、
- (b) 配列番号2のVH CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号2のVH CDR2と、
- (c) 配列番号2のVH CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号2のVH CDR3と、
- (d) 配列番号4のVL CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号4のVL CDR1と、
- (e) 配列番号4のVL CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号4のVL CDR2と、
- (f) 配列番号4のVL CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号4のVL CDR3と、を含む。

【0028】

別の実施形態において、本発明の抗体は、

- (a) 配列番号26のVH CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号26のVH CDR1と、
- (b) 配列番号26のVH CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号26のVH CDR2と、
- (c) 配列番号26のVH CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号26のVH CDR3と、
- (d) 配列番号28のVL CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号28のVL CDR1と、
- (e) 配列番号28のVL CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号28のVL CDR2と、
- (f) 配列番号28のVL CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号28のVL CDR3と、を含む。

【0029】

さらに別の実施形態において、本発明は、

- (a) 配列番号30のVH CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号30のVH CDR1と、
- (b) 配列番号30のVH CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号30のVH CDR2と、
- (c) 配列番号30のVH CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号30のVH CDR3と、
- (d) 配列番号32のVL CDR1に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号32のVL CDR1と、

酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号32のVL CDR1と、  
(e)配列番号32のVL CDR2に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号32のVL CDR2と、  
(f)配列番号32のVL CDR3に対して同一、または1、2、または3つのアミノ酸残基置換を含むアミノ酸配列を有する、配列番号32のVL CDR3と、を含む抗体を含む。

【0030】

別の実施形態において、標的結合剤は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC)にPTA-9514、PTA-9511、またはPTA-9510の番号で寄託され、Mab4.120VH、Mab4.37VH、またはMab6B10VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる可変重鎖配列のCDR1、CDR2、またはCDR3のいずれか1つを含む配列を含むことができる。別の実施形態において、標的結合剤は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC)にPTA-9513、PTA-9512、またはPTA-9499番号で寄託され、Mab4.120VL、Mab4.37VL、またはMab6B10VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる可変軽鎖配列のCDR1、CDR2、またはCDR3のいずれか1つを含む配列を含むことができる。

10

【0031】

一実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC)にPTA-9514番号で寄託され、Mab4.120VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされるCDR3を含む可変重鎖アミノ酸配列を含む。

20

【0032】

一実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日にAmerican Type Culture Collection (ATCC)にPTA-9514番号で寄託され、Mab4.120VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされるCDR3を含む可変重鎖アミノ酸配列、ならびに2008年9月17日にAmerican Type Culture Collection (ATCC)にPTA-9513番号で寄託され、Mab4.120VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされるCDR3を含む可変軽鎖アミノ酸配列を含む。

30

【0033】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC)にPTA-9514番号で寄託され、Mab4.120VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体のCDRのうち少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つを含む可変重鎖アミノ酸配列を含む。

【0034】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC)にPTA-9514番号で寄託され、Mab4.120VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体のCDRのうち少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つを含む可変軽鎖アミノ酸配列を含む。

40

【0035】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC)にPTA-9514番号で寄託され、Mab4.120VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体のCDRのうち少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む可変重鎖アミノ酸配列、ならびに2008年9月17日に、

50

American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9513 番号で寄託され、Mab4.120VL と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の CDR のうち少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つを含む可変軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0036】

一実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9511 番号で寄託され、Mab4.37VH と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる CDR3 を含む可変重鎖アミノ酸配列を含む。

【0037】

一実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9511 番号で寄託され、Mab4.37VH と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる CDR3 を含む可変重鎖アミノ酸配列、ならびに 2008年9月17日に American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9512 番号で寄託され、Mab4.37VL と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる CDR3 を含む可変軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0038】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9511 番号で寄託され、Mab4.37VH と指定されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の CDR のうち少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つを含む可変重鎖アミノ酸配列を含む。

【0039】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9512 番号で寄託され、Mab4.37VL と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の CDR のうち少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つを含む可変軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0040】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は 2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9511 番号で寄託され、Mab4.37VH と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の CDR のうち少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つを含む可変重鎖アミノ酸配列、ならびに 2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9512 番号で寄託され、Mab4.37VL と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の CDR のうち少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つを含む可変軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0041】

一実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9510 番号で寄託され、Mab6B10VH と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる CDR3 を含む可変重鎖アミノ酸配列を含む。

【0042】

一実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9510 番号で寄託され、Mab6B10VH と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる CDR3 を含む可変重鎖アミノ酸配列、ならびに 2008年

10

20

30

40

50

9月17日にAmerican Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9499番号で寄託され、Mab6B10VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされるCDR3を含む可変軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0043】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9510番号で寄託され、Mab6B10VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体のCDRのうち少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つを含む可変重鎖アミノ酸配列を含む。

10

【0044】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9499番号で寄託され、Mab6B10VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体のCDRのうち少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つを含む可変軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0045】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9510番号で寄託され、Mab6B10VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体のCDRのうち少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む可変重鎖アミノ酸配列、ならびに2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9499番号で寄託され、Mab6B10VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体のCDRのうち少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つを含む可変軽鎖アミノ酸配列を含む。

20

【0046】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9514番号で寄託され、Mab4.120VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の可変重鎖を含む。

30

【0047】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9511番号で寄託され、Mab4.37VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の可変重鎖を含む。

【0048】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9510番号で寄託され、Mab6B10VHと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の可変重鎖を含む。

40

【0049】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9513番号で寄託され、Mab4.120VLと命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の可変軽鎖を含む。

【0050】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) にPTA-9512番号で寄託され、Mab4.37VLと命名されたプラスミド中のポリヌ

50

クレオチドによってコードされる抗体の可変軽鎖を含む。

【0051】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9499 番号で寄託され、Mab6B10VL と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の可変軽鎖を含む。

【0052】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9514 番号で寄託され、Mab4.120VH と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の可変重鎖、ならびに2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9513 番号で寄託され、Mab4.120VL と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の可変軽鎖を含む。

10

【0053】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9512 番号で寄託され、Mab4.37VL と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の可変軽鎖、ならびに2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9511 番号で寄託され、Mab4.37VH と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の可変重鎖を含む。

20

【0054】

別の実施形態において、本発明の標的結合剤または抗体は、2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9510 番号で寄託され、Mab6B10VH と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の可変重鎖、ならびに2008年9月17日に、American Type Culture Collection (ATCC) に PTA-9499 番号で寄託され、Mab6B10VL と命名されたプラスミド中のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の可変軽鎖を含む。

30

【0055】

当業者は、CDR決定を容易に達成することができることは、知られている。例えば、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3 を参照。Kabata は、多数の種類抗体アイソタイプからの免疫グロブリン鎖の多配列アラインメントを提供する。整列された配列は、単一番号方式、すなわち Kabata 番号方式によって番号が付けられる。Kabata 配列は、1991の出版以来更新され、電子配列データベース（最新のダウンロード可能なバージョンは、1997）として利用可能である。任意の免疫グロブリン配列は、Kabata 参照配列で整列をすることによって、Kabata によって番号が付けることができる。したがって、Kabata 番号方式は、免疫グロブリン鎖の番号付けのための、統一システムを提供する。

40

【0056】

一実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す重鎖配列のうちのいずれか1つの配列を含む。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、抗体4.120、4.37、および6B10の重鎖配列のうちのいずれか1つを含む配列を含む。

【0057】

軽鎖の無差別性は、当該技術において確立されている。したがって、抗体4.120、4.37、および6B10、または本明細書に開示される別の抗体の重鎖配列のうちのいずれか1つを含む配列を含む標的結合剤または抗体は、表2に示す、または抗体4.12

50

0、4.37、および6B10、または本明細書に開示される別の抗体の軽鎖配列のうちのいずれか1つをさらに含むことができる。いくつかの実施形態において、抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である。

【0058】

一実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す軽鎖配列のうちのいずれか1つの配列を含む。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、抗体4.120、4.37、および6B10の軽鎖配列のうちのいずれか1つを含む配列を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である。

【0059】

いくつかの実施形態において、標的結合剤は、4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、および6A6を含む群から選択されるモノクローナル抗体である。一実施形態において、標的結合剤は、完全ヒトモノクローナル抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、および6A6のうちの1つ以上を含む。特定の実施形態において、標的結合剤は、モノクローナル抗体4.120である。特定の他の実施形態において、標的結合剤は、モノクローナル抗体4.37である。特定の他の実施形態において、標的結合剤は、モノクローナル抗体6B10である。

10

【0060】

一実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す配列のうちのいずれか1つから選択される重鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含む配列を含むことができる。一実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す配列のうちのいずれか1つから選択される軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含む配列を含むことができる。一実施形態において、標的結合剤または抗体は、抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、および6A6のCDRのうちのいずれか1つから選択される重鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含む配列を含むことができる。一実施形態において、標的結合剤または抗体は、抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、および6A6のCDRのうちのいずれか1つから選択される軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含む配列を含むことができる。

20

【0061】

別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す完全ヒトモノクローナル抗体4.120、4.37、または6B10のうちのいずれか1つのCDR1、CDR2、またはCDR3のうちのいずれか1つを含む配列を含むことができる。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す完全ヒトモノクローナル抗体4.120、4.37、または6B10のうちのいずれか1つのCDR1、CDR2、またはCDR3のうちのいずれか1つを含む配列を含むことができる。一実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す完全ヒトモノクローナル抗体4.120、4.37、または6B10のCDR1、CDR2、およびCDR3を含む配列を含むことができる。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す完全ヒトモノクローナル抗体4.120、4.37、または6B10のCDR1、CDR2、およびCDR3を含む配列を含むことができる。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す完全ヒトモノクローナル抗体4.120、4.37、または6B10のCDR1、CDR2、およびCDR3を含む配列、および表2に示す完全ヒトモノクローナル抗体4.120、4.37、または6B10のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である。

30

40

【0062】

別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す完全ヒトモノクローナル抗体4.120のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む配列、および表2に示す完全ヒトモノクローナル抗体4.120のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、表2に示す完全ヒトモノクロー

50

ナル抗体 4 . 3 7 の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列を含む配列、および表 2 に示す完全ヒトモノクローナル抗体 4 . 3 7 の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列を含む。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、表 2 に示す完全ヒトモノクローナル抗体 6 B 1 0 の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列を含む配列、および表 2 に示す完全ヒトモノクローナル抗体 6 B 1 0 の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である。

【 0 0 6 3 】

本発明のさらなる実施形態は、表 2 に示す配列のうちのいずれか 1 つのフレームワーク領域および C D R に及ぶ隣接配列、特に F R 1 ~ F R 4 または C D R 1 ~ C D R 3、を含む配列を含む標的結合剤または抗体である。一実施形態において、標的結合剤または抗体は、表 2 に示すモノクローナル抗体 4 . 1 2 0、4 . 3 7、または 6 B 1 0 の配列のうちのいずれか 1 つのフレームワーク領域および C D R に及ぶ隣接配列、特に F R 1 ~ F R 4 または C D R 1 ~ C D R 3、を含む配列を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である。

10

【 0 0 6 4 】

別の実施形態において、薬剤もしくは抗体、またはこれらの抗原結合部分は、配列番号 2 の配列を含む重鎖ポリペプチドを含む。一実施形態において、薬剤もしくは抗体、またはこれらの抗原 - 結合部分は、配列番号 4 の配列を含む軽鎖ポリペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態において、抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である。

20

【 0 0 6 5 】

一実施形態は、標的結合剤もしくは抗体、またはこれらの抗原結合部分を提供し、薬剤もしくは抗体、またはこれらの抗原結合部分は、配列番号 2 6 の配列を含む重鎖ポリペプチドを含む。一実施形態において、薬剤もしくは抗体、またはこれらの抗原結合部分は、配列番号 2 8 の配列を含む軽鎖ポリペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態において、抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である。

30

【 0 0 6 6 】

別の実施形態において、薬剤もしくは抗体、またはこれらの抗原結合部分は、配列番号 3 0 の配列を含む重鎖ポリペプチドを含む。別の実施形態において、薬剤もしくは抗体、または抗原結合部分は、配列番号 3 2 の配列を含む軽鎖ポリペプチドをさらに含む。いくつかの実施形態において、抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である。

30

【 0 0 6 7 】

一実施形態において、標的結合剤もしくは抗体は、開示された C D R、あるいは重鎖または軽鎖フレームワーク配列内に、2 0、1 6、1 0、9、またはそれ以下、例えば 1、2、3、4、または 5 もの数のアミノ酸添加、置換、欠失、および / もしくは挿入を含む。かかる修飾は、C D R および / またはフレームワーク配列内の任意の残基において行われる可能性がある。いくつかの実施形態において、抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体である。

【 0 0 6 8 】

一実施形態において、標的結合剤または抗体は、本明細書に開示された C D R、フレームワーク領域および C D R に及ぶ隣接配列（特に F R 1 ~ F R 4 または C D R 1 ~ C D R 3）、本明細書に開示された軽鎖もしくは重鎖配列、または本明細書に開示された抗体の変異体または誘導体を含む。変異体は、表 2 に示す C D R 1、C D R 2、または C D R 3、表 2 に示すフレームワーク領域および C D R に及ぶ隣接配列（特に F R 1 ~ F R 4 または C D R 1 ~ C D R 3）、本明細書に開示された軽鎖または重鎖配列、または本明細書に開示されたモノクローナル抗体のうちのいずれかにおいて、2 0、1 6、1 0、9、またはそれ以下、例えば 1、2、3、4、または 5 もの数のアミノ酸付加、置換、例えば保存アミノ酸置換、欠失、および / または挿入を有する配列を含む標的結合剤または抗体を含む。変異体は、表 2 に示す C D R 1、C D R 2、または C D R 3、表 2 に示すフレームワーク領域および C D R に及ぶ隣接配列（特に F R 1 ~ F R 4 または C D R 1 ~ C D R 3）、本明細書に開示された軽鎖もしくは重鎖配列、または本明細書に開示されたモノク

40

50

ーナル抗体のうちのいずれかと少なくとも約60、70、80、85、90、95、98、または約99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む標的結合剤または抗体を含む。2つのアミノ酸配列の同一性パーセントは、対タンパク質の整列を含むがこれに限定されない、当業者に知られている、任意の方法によって決定することができる。一実施形態において、変異体は、自然発生的であり、または組換えDNA技術もしくは突然変異誘発技術を使用した天然配列のインピボ操作によって導入される、本明細書に開示されたCDR配列もしくは軽鎖もしくは重鎖ポリペプチドの変化を含む。自然発生的変異体は、外来抗原に対する抗体の生成の間、対応する生殖系列のヌクレオチド配列においてインピボで生成されるものを含む。一実施形態において、誘導体は、2つ以上の抗体が結合される抗体である、異種抗体である可能性がある。誘導体は、化学修飾された抗体を含む。例は、水溶性ポリマー、N結合型、またはO結合型の炭水化物、糖類、リン酸塩、および/または他のかかる分子等の、1つ以上のポリマーの共有結合を含む。誘導体は、付着した分子の種類または位置のどちらかにおける、自然発生的または出発抗体と異なる方法で修飾される。誘導体は、自然に抗体の存在する、1つ以上の化学基の欠失をさらに含む。

10

#### 【0069】

一実施形態において、標的結合剤は、二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。二重特異性抗体を産生する方法は、当業者に知られている。(例えば、Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)、Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)、Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)、Hollinger et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)、米国特許第4,474,893号、第4,714,681号、第4,925,648号、第5,573,920号、第5,601,81号、第95,731,168号、第4,676,980号、および第4,676,980号、WO第94/04690号、WO第91/00360号、WO第92/200373号、WO第93/17715号、WO第92/08802号、およびEP03089。)一例において、本発明の二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるCD105エピトープに対して結合特異性を有する抗体である。本発明のCD105標的結合剤の多くは、異なるエピトープを有する、または異なる部分または重複エピトープを有するため、本発明の二重特異性抗体は、異なるまたは重複するエピトープを有するCD105標的結合剤のいずれかの組み合わせを含むことができることが意図される。例えば、6A6および6B10は、4D4および10C9とは異なるエピトープを有する。一例において、二重特異性抗体は、6A6または6B10の可変または超可変領域、および4D4または10C9の可変または超可変領域を有する。

20

30

#### 【0070】

本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤または抗体は、配列番号26を含む配列を含む。特定の実施形態において、配列番号26は、表5の各行に示す生殖系列および非生殖系列残基の組み合わせのうちのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態において、配列番号26は、表5に示す生殖系列残基のうちのいずれか1つ、いずれか2つ、またはすべての2つを含む。特定の実施形態において、配列番号2は、表5の各行に示す生殖系列および非生殖系列残基の一意的な組み合わせを含む。他の実施形態において、標的結合剤または抗体は、VH3-33、D6-13、およびJH6、ドメインを有する生殖系列配列から生じ、1つ以上の残基は、この位置において、対応する生殖系列残基を産出するために突然変異された。

40

#### 【0071】

本発明のさらなる実施形態は、CD105との結合に対して本発明の標的結合剤または抗体と競合する、標的結合剤または抗体である。本発明の別の実施形態において、CD1

50

05との結合に対して本発明の標的結合剤または抗体と競合する抗体が存在する。別の実施形態において、標的結合剤または抗体は、CD105との結合に対して、完全ヒトモノクローナル抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、または6A6のうちのいずれか1つと競合する。「競合する」とは、標的結合剤または抗体が、CD105との結合に対して、完全ヒトモノクローナル抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、または6A6のうちのいずれか1つと競合する、すなわち競合が単一方向性であることを示す。

【0072】

本発明の実施形態は、CD105との結合に対して、完全ヒトモノクローナル抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、または6A6のうちのいずれか1つと交差競合する、標的結合剤または抗体を含む。「交差競合する」とは、標的結合剤または抗体が、CD105との結合に対して、完全ヒトモノクローナル抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、または6A6のうちのいずれか1つと競合し、またその逆も同様に競合すること、すなわち、競合が二方向性であることを示す。

10

【0073】

本発明のさらなる実施形態は、CD105との結合に対して競合する、標的結合剤または抗体である。本発明の別の実施形態において、CD105との結合に対して、本発明の標的結合剤または抗体と交差競合する、標的結合剤または抗体が存在する。

20

【0074】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の標的結合剤または抗体と同じ、CD105上のエピトープと結合する、標的結合剤または抗体である。本発明の実施形態は、完全ヒトモノクローナル抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、または6A6のうちのいずれか1つと同じ、CD105上のエピトープと結合する、標的結合剤または抗体も含む。

【0075】

本発明の他の実施形態は、本明細書に記載される標的結合剤または抗体のいずれかをコードする単離核酸分子、本明細書に記載される標的結合剤または抗体をコードする単離核酸分子を有するベクター、またはかかる核酸分子のいずれかで形質転換された宿主細胞を含む。本発明の実施形態は、CD105と特異的に結合する完全ヒト単離標的結合剤をコードする核酸分子を含み、TGF-等のCD105リガンドとCD105受容体の結合を阻害する。本発明は、本明細書に定義される厳しい状況または低ストリージェンシーのハイブリダイゼーション状況で、本明細書に記載される標的結合剤または抗体のいずれかをコードするポリヌクレオチドにハイブリッドする、ポリヌクレオチドも包含する。本発明の実施形態は、結合剤をコードする核酸分子を含むベクターも含む。追加の実施形態は、核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を含む。

30

【0076】

当業者に知られているように、抗体は、有利に、例えばポリクローナル、オリゴクローナル、モノクローナル、キメラの、ヒト化の、および/または完全ヒト抗体であることができる。

40

【0077】

本発明の実施形態が、いかなる特定の形態の抗体、または生成もしくは産生の方法にも限定されないことが理解されるであろう。本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤は、完全ヒトモノクローナル抗体の結合断片である。例えば、標的結合剤は、全長抗体（例えば、無傷ヒトFc領域を有する）または抗体結合断片（例えば、Fab、Fab'、またはF(ab')<sub>2</sub>、FV、またはdAb）であることができる。さらに、抗体は、dAb断片等の、CD105に結合する、らくだ科、またはヒト単一VHまたはVLDメイン等の単ドメイン抗体であることができる。

【0078】

50

本明細書に記載される本発明の実施形態は、これらの抗体を産生する細胞も提供する。細胞の例は、ハイブリドーマ、またはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、CHO細胞の変異体（例えばDG44）およびCD105に対する抗体を産出するNS0細胞等の組換え作製した細胞を含む。CHO細胞の変異体についての追加情報は、本明細書にすべてが参照により組み込まれる、AndersenとReilly（2004）Current Opinion in Biotechnology 15, 456-462において見つけることができる。抗体は、抗体を分泌するハイブリドーマから、または遺伝子または抗体をコードする遺伝子で、形質転換されたまたはトランスフェクトされた組換え技術によって作られた細胞から製造することができる。

【0079】

さらに、本発明の一実施形態は、核酸分子を発現して抗体を産出する条件下で宿主細胞を培養し、次いで抗体を回復することによって本発明の抗体を産出する方法である。本発明の実施形態が、抗体産出のために宿主細胞へトランスフェクトされた際に、抗体またはその断片の増加した収量ために最適化した核酸配列を含む本発明の抗体または抗体の断片をコードする任意の核酸分子も含むことを理解するべきである。

【0080】

本明細書におけるさらなる実施形態は、ヒトCD105を発現している細胞、ヒトCD105を含有する単離細胞膜、精製したヒトCD105、またはその断片、および/または1つ以上のオーソログ配列またはその断片で哺乳動物に免疫を与えることによって、CD105と特異的に結合し、CD105の生物活性を阻害する抗体を産出する方法を含む。

【0081】

他の実施形態において、本発明は、本発明の標的結合剤または抗体またはその結合断片、および薬学的に許容可能な担体または希釈剤を含む組成物を提供する。

【0082】

本発明のさらなる実施形態は、増殖性、血管由来の疾病を患う動物を、CD105に特異的に結合する標的結合剤の治療効果のある量を投与することによって効果的に治療する方法を含む。特定の実施形態において、この方法は、腫瘍、癌、および/または細胞増殖疾患の治療が必要な動物を選択すること、およびCD105と特異的に結合する標的結合剤の治療効果のある量を動物に投与することをさらに含む。

【0083】

本発明のさらなる実施形態は、腫瘍性疾患を患う動物を、CD105に特異的に結合する標的結合剤の治療効果のある量を投与することによって効果的に治療する方法を含む。特定の実施形態において、この方法は、腫瘍性疾患の治療が必要な動物を選択すること、およびCD105と特異的に結合する標的結合剤の治療効果のある量をその動物に投与することをさらに含む。

【0084】

本発明のさらなる実施形態は、悪性腫瘍を患う動物を、CD105に特異的に結合する標的結合剤の治療効果のある量を投与することによって効果的に治療する方法を含む。特定の実施形態において、この方法は、悪性腫瘍の治療が必要な動物を選択すること、およびCD105と特異的に結合する標的結合剤の治療効果のある量をその動物に投与することをさらに含む。

【0085】

本発明のさらなる実施形態は、CD105発現と関連する疾病または状態に苦しむ動物を、CD105と特異的に結合する標的結合剤の治療効果のある量を投与することによって、効果的に治療する方法を含む。特定の実施形態において、この方法は、CD105発現と関連する疾患または状態に対する治療が必要な動物を選択すること、およびCD105と特異的に結合する標的結合剤の治療効果のある量をその動物に投与することをさらに含む。

【0086】

10

20

30

40

50

悪性腫瘍は、黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、肝細胞（肝臓）癌、甲状腺腫瘍、胃癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、肺癌、神経膠芽腫、子宮内膜癌、腎癌、結腸癌、膵癌、食道癌、頭頸部癌、中皮腫、肉腫、胆管癌（胆管細胞癌）、小腸腺癌、小児悪性腫瘍、および類表皮癌からなる群から選択することができる。

【0087】

治療可能な増殖または血管新生疾病は、黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、進行性非小細胞肺癌、肝細胞（肝臓）癌、甲状腺腫瘍胃癌、胆嚢癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、腎細胞癌、肺癌、神経膠芽腫、子宮内膜癌、腎癌、結腸癌、膵癌、食道癌、頭頸部癌、中皮腫、肉腫、胆管癌（胆管細胞癌）、小腸腺癌、小児悪性腫瘍、類表皮癌、および慢性骨髄性白血病を含む白血病等の、腫瘍性疾患を含む。

10

【0088】

一実施形態において、本発明の標的結合剤は、肺、乳房、結腸直腸、前立腺、卵巣、肝細胞癌、頭頸部、神経膠芽腫、食道を含む固形腫瘍を治療するために使用することができる。

【0089】

一実施形態において、本発明は、CD105に単独で、または部分的に依存している腫瘍患者においてCD105を阻害するために使用することに適している。

【0090】

本発明のさらなる実施形態は、増殖性、血管新生関連の疾病を患う動物を治療するための薬物の調合における、本発明の標的結合剤または抗体の使用を含む。特定の実施形態において、その使用は、増殖性、血管新生関連の疾病の治療を必要とする動物を選択することをさらに含む。

20

【0091】

本発明のさらなる実施形態は、腫瘍性疾患を患う動物を治療するための薬物の調合における、本発明の標的結合剤または抗体の使用を含む。特定の実施形態において、その使用は、腫瘍性疾患の治療を必要とする動物を選択することをさらに含む。

【0092】

本発明のさらなる実施形態は、非腫瘍性疾患を患う動物を治療するための薬物の調合における、本発明の標的結合剤または抗体の使用を含む。特定の実施形態において、その使用は、非腫瘍性疾患の治療を必要とする動物を選択することをさらに含む。

30

【0093】

本発明のさらなる実施形態は、悪性腫瘍を患う動物を治療するための薬物の調合における、本発明の標的結合剤または抗体の使用を含む。特定の実施形態において、その使用は、悪性腫瘍の治療を必要とする動物を選択することをさらに含む。

【0094】

本発明のさらなる実施形態は、疾病またはCD105発現と関連する状況に苦しむ動物を治療するための薬物の調合における、本発明の標的結合剤または抗体の使用を含む。特定の実施形態において、その使用は、疾患またはCD105発現と関連する状態に対する治療が必要な動物を選択することをさらに含む。

【0095】

本発明のさらなる実施形態は、増殖性、血管新生関連の疾病を患う動物を治療するための薬物として、本発明の標的結合剤または抗体を使用することを含む。

40

【0096】

本発明のさらなる実施形態は、非腫瘍性疾患を患う動物を治療するための薬物として、本発明の標的結合剤または抗体を使用することを含む。

【0097】

本発明のさらなる実施形態は、悪性腫瘍を患う動物を治療するための薬物として、本発明の標的結合剤または抗体を使用することを含む。

【0098】

本発明のさらなる実施形態は、疾病またはCD105発現と関連する状況に苦しむ動物

50

を治療するための薬物として、本発明の標的結合剤または抗体を使用することを含む。

【0099】

本発明のさらなる実施形態は、CD105により誘発される疾患を患う動物を治療するための薬物として、本発明の標的結合剤または抗体を使用することを含む。

【0100】

一実施形態において、  
増殖性、血管新生関連の疾病、  
腫瘍性疾患、  
悪性腫瘍、  
眼疾患、  
慢性炎症性疾患、  
疾病もしくはCD105発現と関連する状態の治療は、  
前述の疾病または状態のいずれかを管理する、改善する、防止することを含む。

10

【0101】

一実施形態において、腫瘍性疾患の治療は、腫瘍成長、腫瘍成長遅延、腫瘍の退行、腫瘍の縮小、治療の停止における腫瘍の再生までの時間増加、腫瘍再発までの時間増加、疾病の進行の遅れを阻害することを含む。

【0102】

本発明のいくつかの実施形態において、治療される動物はヒトである。

【0103】

本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤は完全ヒトモノクローナル抗体である。

20

【0104】

本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤は、完全ヒトモノクローナル抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、および6A6からなる群から選択される。

【0105】

本発明の実施形態は、本明細書に記載される標的結合剤、および治療薬を含む複合体を含む。本発明のいくつかの実施形態において、治療薬は毒素である。他の実施形態において、治療薬は放射性同位体である。さらに他の実施形態において、治療薬は医薬組成物である。

30

【0106】

別の態様において、患者における癌性細胞を選択的に死滅させる方法が提供される。その方法は、患者へ完全ヒト抗体複合体を投与することを含む。その完全ヒト抗体複合体は、CD105および薬剤に結合することができる抗体を含む。その薬剤は、毒素、放射性同位体、または癌細胞を死滅させる別の物質のいずれかである。その抗体複合体は、このようにして癌細胞を選択的に死滅させる。

【0107】

一態様において、CD105と特異的に結合する抱合型の完全ヒト抗体が提供される。抗体に付属するものは、薬剤であり、抗体の細胞との結合は、細胞に対する薬剤の送達という結果となる。一実施形態において、上記の複合型完全ヒト抗体は、CD105の細胞外ドメインに結合する。別の実施形態において、抗体および複合化された毒素は、CD105を出現する細胞によって内部移行する。別の実施形態において、薬剤は細胞傷害性薬物である。別の実施形態において、薬剤は、例えばサポリン、またはアウリスタチン、緑膿菌外毒素、ゲロニン、リシン、カリチアマイシン、またはマイタンシンに基づいた免疫複合体等である。さらに別の実施形態において、薬剤は放射性同位体である。

40

【0108】

本発明の標的結合剤または抗体は、単独で投与され得る、または追加の抗体もしくは化学療法剤もしくは放射線療法と組み合わせて投与され得る。例えば、細胞粘着、浸潤、血管形成、または増殖を遮断するCD105抗体のモノクローナル、オリゴクローナル、ま

50

たはポリクローナル混合物は、腫瘍細胞増殖を阻害することが知られている薬物と組み合わせ投与され得る。さらに、本発明のCD105標的薬剤は、他の化学療法治療、例えば抗VEGF薬剤を含む治療が失敗した患者において使用することができる。

#### 【0109】

本発明の別の実施形態は、本明細書に開示される抗体が患者または患者試料におけるCD105の濃度を検出するために利用される疾病または状態を診断する方法を含む。一実施形態において、その患者試料は血液もしくは血清もしくは尿である。さらなる実施形態において、危険因子の同定、疾病の診断、および疾病の病期分類の方法は、抗CD105抗体を使用して発現および/またはCD105の過剰発現の同定を含むことを示す。いくつかの実施形態において、その方法は、細胞上でCD105と特異的に結合する完全ヒト抗体複合体を患者に投与することを含む。その抗体複合体は、CD105に特異的に結合する抗体および標識を含む。その方法は、患者における標識の存在を観察することをさらに含む。比較的多い標識の量は、疾病の比較的高い危険性を示し、比較的低い標識の量は、疾病の比較的低い危険性を示す。一実施形態において、標識は緑色蛍光タンパク質である。

10

#### 【0110】

本発明は、患者試料におけるCD105の濃度をアッセイし、患者からの生体試料と本明細書に開示される抗体とを接触させることを含み、かかる試料におけるかかる抗体およびCD105の間の結合度を検出するための方法をさらに提供する。さらに特定の実施形態において、その生体試料は血液、血漿、または血清である。

20

#### 【0111】

本発明の別の実施形態は、本明細書に開示される抗体と血清または細胞が接触させることによって細胞におけるCD105の発現と関連する状態を診断し、CD105の存在を検出するための方法を含む。一実施形態において、その状態は、腫瘍性疾患を含むがこれに限定されない、増殖性、血管新生、細胞粘着、または浸潤関連の疾病であることができる。

#### 【0112】

別の実施形態において、本発明は、CD105関連の疾病を検査するために、哺乳類の組織、細胞、または体液におけるCD105を検出するためのアッセイキットを含む。そのキットは、本明細書に開示される抗体および存在する場合、CD105との抗体の反応を示すための手段を含む。一実施形態において、抗体はモノクローナル抗体である。一実施形態において、CD105と結合する抗体は、標識される。別の実施形態において、抗体は非標識一次抗体であり、キットは一次抗体を検出するための手段をさらに含む。一実施形態において、その検出するための手段は、抗免疫グロブリンである標識二次抗体を含む。その抗体は、蛍光色素、酵素、放射性核種、および放射線不透過物質からなる群から選択されるマーカーで標識され得る。

30

#### 【0113】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される標的結合剤または抗体は、補体に結合し補体依存性細胞傷害(CDC)に關与するそれらの能力を強化するために修飾され得る。他の実施形態において、標的結合剤または抗体は、エフェクター細胞を活性化し抗体依存性細胞傷害(ADCC)に關与するそれらの能力を強化するために修飾され得る。さらに他の実施形態において、本明細書に開示される標的結合剤または抗体は、エフェクター細胞を活性化し、抗体依存性細胞傷害(ADCC)に關与するそれらの能力を強化するため、および補体に結合し補体依存性細胞傷害(CDC)に關与するそれらの能力を強化するために、修飾され得る。

40

#### 【0114】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される標的結合剤または抗体は、補体に結合し補体依存性細胞傷害(CDC)に關与するそれらの能力を低減するために修飾され得る。他の実施形態において、標的結合剤または抗体は、エフェクター細胞を活性化し抗体依存性細胞傷害(ADCC)に關与するそれらの能力を低減するために修飾され得る。

50

さらに他の実施形態において、本明細書に開示される標的結合剤または抗体は、エフェクター細胞を活性化し、抗体依存性細胞傷害（ADCC）に關与するそれらの能力を低減するため、および補体に結合し補体依存性細胞傷害（CDC）に關与するそれらの能力を低減するために、修飾され得る。

【0115】

特定の実施形態において、本明細書に開示される標的結合剤または抗体、および本発明の組成物の半減期は、少なくとも約4～7日である。特定の実施形態において、本明細書に開示される標的結合剤または抗体および本発明の組成物の平均半減期は、少なくとも約2～5日、3～6日、4～7日、5～8日、6～9日、7～10日、8～11日、8～12、9～13、10～14、11～15、12～16、13～17、14～18、15～19、または16～20日である。他の実施形態において、本明細書に開示される標的結合剤または抗体、および本発明の組成物の平均半減期は、少なくとも約17～21日、18～22日、19～23日、20～24日、21～25日、22～26日、23～27日、24～28日、25～29日、または26～30日である。さらなる実施形態において、本明細書に開示される標的結合剤または抗体、および本発明の組成物の半減期は、約50日までであることができる。特定の実施形態において、抗体および本発明の組成物の半減期は、当業者に知られている方法で延長され得る。かかる延長は、順に抗体組成物の投薬の量および/または頻度を低減する。改善されたインビボ半減期を含む抗体およびそれを調合する方法は、米国特許第6,277,375号、および国際公開第WO98/23289号および第WO97/3461号に開示される。

10

20

【0116】

別の実施形態において、本発明は容器を含む製品を提供する。その容器は、本明細書に開示される標的結合剤または抗体を含有する組成物、およびCD105の発現または過剰発現を特徴とする疾病を含むがこれに限定されない、細胞粘着、浸潤、血管形成、および/または増殖関連の疾病を治療するために使用することができることを示す添付文書またはラベルを含む。

【0117】

他の実施形態において、本発明は、本明細書に開示される標的結合剤または抗体を含有する組成物、および治療を必要とする対象に組成物を投与する使用説明書を含むキットを提供する。

30

【0118】

本発明は、変異Fc領域を含むタンパク質の形成を提供する。すなわち、非自然発生的Fc領域、例えば1つ以上の非自然発生的アミノ酸残基を含むFc領域である。また、本発明の変異Fc領域によって包含されるものは、アミノ酸欠失、添加、および/または修飾を含むFc領域である。

【0119】

Fc領域を含むタンパク質の血清半減期は、FcRnに対するFc領域の結合親和性を増加させることによって増加することができる。一実施形態において、Fc変異タンパク質は、同等の分子に比べて血清半減期が改善している。

【0120】

別の実施形態において、本発明はFc変異体を提供し、Fc領域は、Kabattに記載のEUインデックスによって番号づけされた239、330、および332からなる群から選択される1つ以上の位置において、少なくとも1つの非自然発生的アミノ酸を含む。特定の実施形態において、本発明はFc変異体を提供し、Fc領域は、Kabattに記載のEUインデックスによって番号づけされた239D、330L、および332Eからなる群から選択される、少なくとも1つの非自然発生的アミノ酸を含む。任意に、Fc領域は、Kabattに記載のEUインデックスによって番号付けられた252、254、および256からなる群から選択される、1つ以上の位置において追加の非自然発生的アミノ酸をさらに含むことができる。特定の実施形態において、本発明はFc変異体を提供し、Fc領域は、Kabattに記載のEUインデックスによって番号づけされた239D、33

40

50

0 L、および 3 3 2 E からなる群から選択される少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸、および K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 5 2 Y、2 5 4 T、および 2 5 6 E からなる群から選択される 1 つ以上の位置において、少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸を含む。

【 0 1 2 1 】

別の実施形態において、本発明は F c 変異体を提供し、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 3 4、2 3 5、および 3 3 1 からなる群から選択される 1 つ以上の位置において、少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸を含む。特定の実施形態において、本発明は F c 変異体を提供し、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 3 4、2 3 5 F、2 3 5 Y、および 3 3 1 S からなる群から選択される少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸を含む。さらに特定の実施形態において、本発明の F c 変異体は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号付けられた 2 3 4 F、2 3 5 F、および 3 3 1 S の非自然発生的アミノ酸残基を含む。別の特定の実施形態において、本発明の F c 変異体は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号付けられた 2 3 4 F、2 3 5 Y、および 3 3 1 S の非自然発生的アミノ酸残基を含む。任意に、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号付けられた 2 5 2、2 5 4、および 2 5 6 からなる群から選択される、1 つ以上の位置において追加の非自然発生的アミノ酸をさらに含むことができる。特定の実施形態において、本発明は F c 変異体を提供し、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 3 4 F、2 3 5 F、2 3 5 Y、および 3 3 1 S からなる群から選択される少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸、および K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 5 2 Y、2 5 4 T、および 2 5 6 E からなる群から選択される 1 つ以上の位置において、少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸を含む。

10

20

【 0 1 2 2 】

別の実施形態において、本発明は F c 変異タンパク質製剤を提供し、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 3 9、3 3 0、および 3 3 2 からなる群から選択された 1 つ以上の位置において、少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸を含む。特定の実施形態において、本発明は F c 変異タンパク質製剤を提供し、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 3 9 D、3 3 0 L、および 3 3 2 E からなる群から選択される少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸を含む。任意に、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号付けられた 2 5 2、2 5 4、および 2 5 6 からなる群から選択される、1 つ以上の位置において追加の非自然発生的アミノ酸をさらに含むことができる。特定の実施形態において、本発明は F c 変異タンパク質製剤を提供し、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 3 9 D、3 3 0 L、および 3 3 2 E からなる群から選択される少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸、および K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 5 2 Y、2 5 4 T、および 2 5 6 E からなる群から選択される 1 つ以上の位置における少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸を含む。

30

【 0 1 2 3 】

別の実施形態において、本発明は F c 変異タンパク質製剤を提供し、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 3 4、2 3 5、および 3 3 1 からなる群から選択される 1 つ以上の位置において、少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸を含む。特定の実施形態において、本発明は F c 変異タンパク質製剤を提供し、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 3 4 F、2 3 5 F、2 3 5 Y、および 3 3 1 S からなる群から選択される少なくとも 1 つの非自然発生的アミノ酸を含む。任意に、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号付けられた 2 5 2、2 5 4、および 2 5 6 からなる群から選択される、1 つ以上の位置において追加の非自然発生的アミノ酸をさらに含むことができる。特定の実施形態において、本発明は F c 変異タンパク質製剤を提供し、F c 領域は、K a b a t に記載の E U インデックスによって番号づけされた 2 3 4 F、2 3 5 F、2 3 5 Y、および 3 3 1 S から

40

50

なる群から選択される少なくとも1つの非自然発生的アミノ酸、およびKababに記載のEUIンデックスによって番号づけされた252Y、254T、および256Eからなる群から選択される1つ以上の位置において、少なくとも1つの非自然発生的アミノ酸を含む。

#### 【0124】

非自然発生的Fc領域を生成する方法は、当業者に知られている。例えば、アミノ酸置換および/または欠失は、部位特異的な変異原性(Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985))、PCR変異原性(Higuchi, in "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, pp. 177-183 (1990))、およびカセット変異導入(Wellset al., 遺伝子 34:315-323 (1985))を含むがこれに限定されない変異原性の方法によって生成され得る。好ましくは、部位特異的な変異原性は、重複伸長PCR方法により実施される(Higuchi, in "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, New York, pp. 61-70 (1989))。重複伸長PCRの技術(Higuchi, ibid.)は、任意の所望の突然変異を標的配列(出発DNA)に導入するためにも使用され得る。例えば、重複伸長法におけるPCRの第1回目は、2つのPCRセグメント(セグメントAおよびB)を産出する、外部プライマー(プライマー1)および内部変異原性プライマー(プライマー3)を含む、および別々に第2の外部プライマー(プライマー4)および内部プライマー(プライマー2)を含む標的配列を増幅することを含む。その内部変異原性プライマー(プライマー3)は、所望の突然変異を特定する標的配列に対するミスマッチを含有するように設計されている。PCRの第2回目において、PCRの第1回目の生成物(セグメントAおよびB)は、2つの外部プライマー(プライマー1および4)を使用してPCRによって増幅される。結果として生じた全長PCRのセグメント(セグメントC)は、制限酵素で消化され、結果として生じた断片は、適切なベクターにクローン化される。変異原性の第1段階として、出発DNA(例えば、Fc融合タンパク質、抗体または単にFc領域をコードする)は、変異原性ベクターに操作可能にクローン化される。プライマーは、所望のアミノ酸置換を反映するように設計される。変異Fc領域の生成に有用な他の方法は、当業者に知られている(例えば、米国特許第5,624,821号、第5,885,573号、第5,677,425号、第6,165,745号、第6,277,375号、第5,869,046号、第6,121,022号、第5,624,821号、第5,648,260号、第6,528,624号、第6,194,551号、第6,737,056号、第6,821,505号、第6,277,375号、米国特許公開第2004/0002587号およびPCT公開第WO94/29351号、第WO99/58572号、第WO00/42072号、第WO02/060919号、第WO04/029207号、第WO04/099249号、第WO04/063351を参照)。

#### 【0125】

本発明のいくつかの実施形態において、本明細書において提供される抗体の糖鎖付加パターンは、ADCCおよびCDCエフェクター機能を増強するように修飾される。Shields RL et al., (2002) JBC. 277:26733、Shinkawa T et al., (2003) JBC. 278:3466、およびOkazaki A et al., (2004) J. Mol. Biol., 336:1239を参照。いくつかの実施形態において、Fc変異タンパク質は、操作された糖型、すなわちFc領域を含む分子に、共有結合している炭水化物組成を1つ以上含む。操作された糖型は、エフェクター機能の増強または低減を含むがこれに限定されない、様々な目的で使用することができる。操作された糖型は、当業者に知られている任意の方法、例えば操作されたまたは変異発現株を使用することによる、1つ以上の酵素、例えばDI Nアセチルグ

ルコサミン転移酵素 I I I ( G n T I 1 1 ) との同時発現によって、各種生物または各種生物からの細胞株における F c 領域を含む分子を発現することによって、または F c 領域を含む分子が発現された後に炭水化物を修飾することによって、生成され得る。操作された糖型を生成する方法は、当業者に知られており、Umana et al, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180、Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294、Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740、Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) 米国特許第 6,602,684 号、米国第 10/277,370 号、米国第 10/113,929 号、PCT 第 WO00/61739A1 号、PCT 第 WO01/292246A1 号、PCT 第 WO02/311140A1 号、PCT 第 WO02/30954A1 号、Potillegent (登録商標) 技術 (Biowa, Inc., Princeton, N.J.)、GlycoMAb (登録商標) 糖鎖付加技術工学 (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland) に記載されるものを含むがこれに限定されない。例えば、第 WO00061739 号、第 EA01229125 号、米国第 20030115614 号、Okazaki et al., 2004, JMB, 336:1239-49 を参照。

#### 【0126】

したがって、一実施形態において、本発明の抗 CD105 抗体の F c 領域は、アミノ酸残基の変化した糖鎖付加を含む。別の実施形態において、アミノ酸残基の変化した糖鎖付加は、エフェクター機能を低下させる。別の実施形態において、アミノ酸残基の変化した糖鎖付加は、エフェクター機能を増加させる。特定の実施形態において、F c 領域は低減したフコシル化を有する。別の実施形態において、F c 領域はアフコシル化される (例えば、米国特許出願公開第 2005/0226867 号)。一態様において、増加したエフェクター機能、特に、宿主細胞 (例えば、CHO 細胞、コウキクサ) において生成される ADC C を含むこれらの抗体は、親細胞による抗体の産出と比較して 100 倍以上高い ADC C を含む非常に脱フコシル化された抗体を産出するために設計された (Morie et al., 2004, Biotechnol Bioeng 88:901-908、Cox et al., 2006, Nat Biotechnol., 24:1591-7)。

#### 【0127】

F c 領域の糖鎖付加は、エフェクター機能を増加または減少するために修飾することができることも当業者に知られている (例えば、Umana et al, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180、Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294、Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740、Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) 米国特許第 6,602,684 号、米国第 10/277,370 号、米国第 10/113,929 号、PCT 第 WO00/61739A1 号、PCT 第 WO01/292246A1 号、PCT 第 WO02/311140A1 号、PCT 第 WO02/30954A1 号、Potillegent (登録商標) 技術 (Biowa, Inc., Princeton, N.J.)、GlycoMAb (登録商標) 糖鎖付加技術工学 (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland) 。したがって、一実施形態において、本発明の抗体の F c 領域は、アミノ酸残基の変化した糖鎖付加を含む。別の実施形態において、アミノ酸残基の変化した糖鎖付加は、エフェクター機能を低下させる。別の実施形態において、アミノ酸残基の変化した糖鎖付加は、エフェクター機能を増加させる。特定の実施形態において、F c 領域は低減したフコシル化を有する。別の実施形態において、F c 領域はアフコシル化される (例えば、米国特許出願公開第 2005/0226867 号)。

#### 【図面の簡単な説明】

## 【 0 1 2 8 】

【図 1】抗体 4 . 3 7 および 4 . 1 2 0 の H U V E C 増殖アッセイの結果を示す棒グラフを描写する。

【図 2】抗体 4 D 4、6 A 6、6 B 1、6 B 1 0、1 1 H 2、9 H 1 0、3 C 1、および 1 0 C 9 の H U V E C 増殖アッセイの結果を示す棒グラフを描写する。

【図 3】血管の長さ ( m m ) および分岐数に対する抗体 4 D 4、6 B 1、6 B 1 0、および 1 0 C 9 の効果を示す棒グラフを描写する。

【図 4】ピニング研究の結果を示す棒グラフを描写する。具体的には、H U V E C 細胞に S N 6 が結合することを妨害するための、抗体 4 D 4、6 A 6、6 B 1、6 B 1 0、1 1 H 2、9 H 1 0、3 C 1、4 . 3 7、4 . 1 2 0、および 1 0 C 9 の能力を示す。

【図 5】抗体 4 . 1 2 0、4 D 4、6 B 1 0、および 4 . 3 7 のヘモグロビン ( h b ) 量を測定する C o l o 2 0 5 マトリゲルブラグアッセイの結果を示す棒グラフを描写する。

【図 6】抗体 4 . 1 2 0、4 D 4、6 B 1 0、および 4 . 3 7 の C D 3 1 陽性染色を測定する C o l o 2 0 5 マトリゲルブラグアッセイからの結果を示す棒グラフを描写する。

【図 7】抗体 4 D 4、6 A 6、6 B 1、6 B 1 0、1 1 H 2、9 H 1 0、3 C 1、4 . 3 7、4 . 1 2 0、および 1 0 C 9 の A D C C 活性を示す棒グラフを描写する。

【図 8】抗体 4 . 1 2 0 の C D C 活性を示す棒グラフを描写する。

【図 9】抗体 4 D 4、6 A 6、6 B 1、6 B 1 0、1 1 H 2、9 H 1 0、3 C 1、4 . 3 7、4 . 1 2 0、および 1 0 C 9 の内面化の結果を示す棒グラフを描写する。

【発明を実施するための形態】

## 【 0 1 2 9 】

本発明の実施形態は、例えば T G F - シグナル伝達を阻害する抗体等の一組の新規 C D 1 0 5 遮断分子に関する。かかる分子は、単剤あるいは他の結合抗体 / 薬剤と組み合わせて使用され得る。それらは、任意の標準または新規の抗癌剤と組み合わせて使用することもできる。

## 【 0 1 3 0 】

本発明の実施形態は、C D 1 0 5 に結合する標的結合剤に関する。いくつかの実施形態において、標的結合剤は、C D 1 0 5 に結合し、T G F - 等の C D 1 0 5 リガンドとその受容体、C D 1 0 5 との結合を阻害する。いくつかの実施形態において、この結合は C D 1 0 5 関連効果のうち 1 つ以上の態様を中和、遮断、阻害、抑止、または妨げることができる。一実施形態において、標的結合剤はモノクローナル抗体、またはその結合断片である。かかるモノクローナル抗体は、本明細書において抗 C D 1 0 5 抗体と称される。

## 【 0 1 3 1 】

本発明の他の実施形態は、完全ヒト抗 C D 1 0 5 抗体、および治療上有益である抗体調製を含む。一実施形態において、本発明の抗 C D 1 0 5 抗体の調合物は、C D 1 0 5 の強い結合親和性、内皮細胞アポトーシスを促進するまたは内皮細胞の増殖を阻害する、細胞骨格形成を調節する、管形成を阻害する能力、および A D C C および / または C D C 活性を通して内皮細胞毒素に誘導する能力を含む、所望の治療特性を有する。

## 【 0 1 3 2 】

さらに、本発明の実施形態は疾病を治療するためにこれらの抗体を使用する方法を含む。本発明の抗 C D 1 0 5 抗体は、健康な組織の C D 1 0 5 媒介された腫瘍形成および腫瘍浸潤を防止するために有益である。さらに、C D 1 0 5 抗体は、A M D 等の眼疾病、関節リウマチ等の炎症性疾患、および循環器疾患および敗血症ならびに腫瘍性疾患等の、血管形成と関連する疾病を治療するために有益であり得る。転移性癌、リンパ管腫瘍、および血液癌を含む、悪性腫瘍の任意のタイプを特徴とする任意の疾病を、この阻害機構によって治療することもできる。ヒトにおける代表的な癌は、膀胱腫瘍、腎細胞癌、乳房の腫瘍、前立腺腫瘍、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨肉腫、脳および C N S 癌 ( 例えば、神経膠腫腫瘍 )、子宮頸癌、絨毛腫、結腸および直腸癌、結合組織癌、消化器癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部の癌、胃癌、上皮性内腫瘍、腎癌、喉頭癌、白血病、肝癌、肺癌 ( 例えば、小細胞および非小細胞 )、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫

10

20

30

40

50

、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌（例えば、唇、舌、口、および咽頭）、卵巣癌、膵癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、腎癌、呼吸器系の癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、泌尿系の癌、ならびに他の細胞腫および肉腫を含む。犬、猫、および他のペットにおいて一般に診断される悪性疾患は、リンパ肉腫、骨肉腫、乳房腫瘍、マスト細胞腫、脳腫瘍、黒色腫、腺扁平上皮癌、カルチノイド肺腫瘍、気管支腺腫瘍、細気管支肺胞上皮癌、線維腫、粘液軟骨腫、肺肉腫、神経肉腫、骨腫、乳頭腫、網膜芽細胞腫、ユーイング肉腫、ウィルムス腫瘍、パーキットリンパ腫、小膠細胞腫、神経芽細胞腫、骨巨細胞腫、口腔腫瘍、線維肉腫、骨肉腫および横紋筋肉腫、性器扁平上皮癌、伝染性病腫瘍、精巣腫瘍、セミノーマ、セルトリ細胞腫瘍、血管周囲細胞腫、組織球腫、緑色腫（例えば顆粒球性肉腫）、角膜乳頭腫、角膜乳頭腫扁平上皮癌、血管肉腫、胸膜中皮腫、基底細胞腫、胸腺腫、胃腫瘍、副腎癌、口腔乳頭腫、血管内皮腫および嚢胞腺腫、濾胞性リンパ腫、腸リンパ肉腫、線維肉腫および肺扁平上皮癌を含むがこれに限定されない。フェレット等のげっ歯類において、代表的な癌は、インスリノーマ、リンパ腫、肉腫、神経腫、膵島細胞腫瘍、胃MALTリンパ腫、および胃腺癌を含む。農業家畜が患う新生物は、（牛における）白血病、血管周囲細胞腫および牛眼新生物、（馬における）包皮線維肉腫、潰瘍性扁平上皮癌、包皮癌、結合組織新生物およびマスト細胞腫、（豚における）肝細胞癌、（羊における）リンパ腫および肺腺腫症、（鳥類における）肺肉腫、リンパ腫、ラウス肉腫、細網内皮症、線維肉腫、腎芽細胞腫、B細胞リンパ腫およびリンパ性白血病、（魚における）網膜芽細胞腫、肝新生物、リンパ肉腫（リンパ芽球性リンパ腫）、形質細胞性白血病および浮袋肉腫、細菌ヒツジ偽結核菌に起因する羊およびヤギの慢性的な疾患、感染性疾患、伝染病、およびヤーグジークテに起因する羊の伝染性肺癌、乾酪性リンパ節炎（CLA）を含む。

10

20

#### 【0133】

本発明の他の実施形態は、生体試料におけるCD105量を特に測定するための診断検査を含む。アッセイキットは、本明細書に開示される標的結合剤または抗体を、かかる抗体を検出するために必要な標識とともに含むことができる。これらの診断検査は、細胞粘着、浸潤、血管形成、または腫瘍性疾患を含むがこれに限定されない増殖に関係した疾病の検査をするために有益である。

#### 【0134】

本発明の別の態様は、CD105の生物活性の拮抗薬であり、拮抗薬はCD105と結合する。一実施形態において、拮抗薬は抗体等の標的結合剤である。拮抗薬は、本明細書に記載される抗体、例えば抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、および6A6から選択され得る。

30

#### 【0135】

一実施形態において、CD105の生物活性の拮抗薬は、CD105に結合することができ、その結果CD105受容体にリガンド結合することを阻害するまたは抑圧して、それにより腫瘍の血管形成および/または細胞増殖を阻害する。

#### 【0136】

一実施形態は、完全ヒトモノクローナル抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、および6A6と同じ（単数または複数の）エピトープと結合する標的結合剤である。

40

#### 【0137】

一実施形態は、完全ヒトモノクローナル抗体4.120、9H10、10C9、4D4、11H2、6B1、4.37、6B10、3C1、および6A6と同じ（単数または複数の）エピトープと結合する抗体である。

#### 【0138】

一実施形態は、本明細書に上述される標的結合剤を産出するハイブリドーマである。一実施形態において、本明細書に上述される抗体の軽鎖および/または重鎖を産出するハイブリドーマである。一実施形態において、ハイブリドーマは、完全ヒトモノクローナル抗体の軽鎖および/または重鎖の産出をする。別の実施形態において、ハイブリドーマは、

50

完全ヒトモノクローナル抗体 4 . 1 2 0、9 H 1 0、1 0 C 9、4 D 4、1 1 H 2、6 B 1、4 . 3 7、6 B 1 0、3 C 1、および 6 A 6 の軽鎖および / または重鎖を産出する。あるいは、ハイブリドーマは、完全ヒトモノクローナル抗体 4 . 1 2 0、9 H 1 0、1 0 C 9、4 D 4、1 1 H 2、6 B 1、4 . 3 7、6 B 1 0、3 C 1、および 6 A 6 と同じ ( 単数または複数の ) エピトープと結合する抗体を産出することができる。

【 0 1 3 9 】

別の実施形態は本明細書に上述の標的結合剤をコードする核酸分子である。一実施形態において、本明細書に上述される抗体の軽鎖または重鎖をコードする核酸分子である。一実施形態において、核酸分子は完全ヒトモノクローナル抗体の軽鎖または重鎖をコードする。さらに別の実施形態は、抗体 4 . 1 2 0、9 H 1 0、1 0 C 9、4 D 4、1 1 H 2、6 B 1、4 . 3 7、6 B 1 0、3 C 1、および 6 A 6 から選択される完全ヒトモノクローナル抗体の軽鎖または重鎖をコードする核酸分子である。

10

【 0 1 4 0 】

本発明の別の実施形態は、本明細書に上述される核酸分子または分子を含むベクターであり、ベクターは本明細書に上述定義される標的結合剤をコードする。本発明の一実施形態において、本明細書に上述される核酸分子または分子を含むベクターであり、ベクターは本明細書に上述定義される抗体の軽鎖および / または重鎖をコードする。

【 0 1 4 1 】

本発明のさらに別の実施形態は、本明細書に上述されるベクターを含む宿主細胞である。あるいは、宿主細胞は 2 つ以上のベクターを含むことができる。

20

【 0 1 4 2 】

さらに、本発明の一実施形態は、核酸分子を発現し、標的結合剤を産出する条件の下、宿主細胞を培養し、続いて標的結合剤を回収することによって本発明の標的結合剤を産出する方法である。本発明の一実施形態には、核酸分子を発現して抗体を産出する条件下で、宿主細胞を培養し、その後、抗体を回収することによって本発明の抗体を産出する方法が含まれる。

【 0 1 4 3 】

一実施形態において、本発明は、本明細書に上述の標的結合剤をコードする少なくとも 1 つの核酸分子で少なくとも 1 つの宿主細胞をトランスフェクトし、宿主細胞において核酸分子を発現し、標的結合剤を単離することによって標的結合剤を作る方法を含む。一実施形態において、本発明は、本明細書に上述の抗体をコードする少なくとも 1 つの核酸分子で少なくとも 1 つの宿主細胞をトランスフェクトし、宿主細胞において核酸分子を発現して、抗体を単離することによって抗体を作る方法を含む。

30

【 0 1 4 4 】

別の態様によると、本発明は本明細書に記載される拮抗薬を投与することによって CD 1 0 5 の生物活性を拮抗する方法を含む。その方法は、血管形成の治療が必要な動物および / または増殖を選択すること、および CD 1 0 5 の生物活性の拮抗薬の治療上有効な投与量をその動物に投与することを含むことができる。

【 0 1 4 5 】

本発明の別の態様は、本明細書に上述の標的結合剤を投与することによって CD 1 0 5 の生物活性を拮抗する方法を含む。その方法は、血管形成および / または増殖の治療が必要な動物を選択すること、および CD 1 0 5 の生物活性を拮抗する標的結合剤の治療上有効な投与量をその動物に投与することを含むことができる。

40

【 0 1 4 6 】

本発明の別の態様は、本明細書に上述の抗体を投与することによって CD 1 0 5 の生物活性を拮抗する方法を含む。その方法は、血管形成および / または増殖の治療が必要な動物を選択すること、および CD 1 0 5 の生物活性を拮抗する抗体の治療上有効な投与量をその動物に投与することを含むことができる。

【 0 1 4 7 】

別の態様によると、CD 1 0 5 の生物活性の拮抗薬の治療上有効な量を投与することに

50

よって、動物における血管形成および/または増殖を治療する方法が提供されている。その方法は、血管形成および/または増殖の治療が必要な動物を選択すること、およびCD 105の生物活性の拮抗薬の治療上有効な投与量をその動物に投与することを含むことができる。

【0148】

別の態様によると、CD 105の生物活性を拮抗する標的結合剤の治療上有効な量を投与することによって動物における血管形成および/または増殖を治療する方法が提供されている。その方法は、血管形成および/または増殖の治療が必要な動物を選択すること、およびCD 105の生物活性を拮抗する標的結合剤の治療上有効な投与量をその動物に投与することを含むことができる。標的結合剤は、単独で投与され得る、または追加の抗体もしくは化学療法剤もしくは放射線療法と組み合わせて投与され得る。

10

【0149】

別の態様によると、CD 105の生物活性を拮抗する抗体の治療上有効な量を投与することによって動物における血管形成および/または増殖を治療する方法が提供されている。その方法は、血管形成および/または増殖の治療が必要な動物を選択すること、およびCD 105の生物活性を拮抗する抗体の治療上有効な投与量をその動物に投与することを含むことができる。抗体は、単独で投与され得る、または追加の抗体もしくは化学療法剤もしくは放射線療法と組み合わせて投与され得る。

【0150】

別の態様によると、CD 105の生物活性を拮抗する拮抗薬の治療上有効な量を投与することによって動物における癌を治療する方法が提供されている。その方法は、癌の治療が必要な動物を選択すること、およびCD 105の生物活性を拮抗する拮抗薬の治療上有効な投与量をその動物に投与することを含むことができる。拮抗薬は、単独で投与され得る、または追加の抗体もしくは化学療法剤もしくは放射線療法と組み合わせて投与され得る。

20

【0151】

別の態様によると、CD 105の生物活性を拮抗する標的結合剤の治療上有効な量を投与することによって動物における癌を治療する方法が提供されている。その方法は、癌の治療が必要な動物を選択すること、およびCD 105の生物活性を拮抗する標的結合剤の治療上有効な投与量をその動物に投与することを含むことができる。標的結合剤は、単独で投与され得る、または追加の抗体もしくは化学療法剤もしくは放射線療法と組み合わせて投与され得る。

30

【0152】

別の態様によると、CD 105の生物活性を拮抗する抗体の治療上有効な量を投与することによって動物における癌を治療する方法が提供されている。その方法は、癌の治療が必要な動物を選択すること、およびCD 105の生物活性を拮抗する抗体の治療上有効な投与量をその動物に投与することを含むことができる。抗体は、単独で投与され得る、または追加の抗体もしくは化学療法剤もしくは放射線療法と組み合わせて投与され得る。

【0153】

別の態様によると、CD 105の生物活性を拮抗する抗体の治療上有効な量を投与することによって動物における腫瘍細胞、増殖、接着、浸潤、および/または血管形成を低減するまたは阻害する方法が提供されている。その方法は、増殖、細胞粘着、浸潤および/または血管形成の低減または阻害が必要な動物を選択すること、およびCD 105の生物活性を拮抗する抗体の治療上有効な投与量をその動物に投与することを含むことができる。抗体は、単独で投与され得る、または追加の抗体もしくは化学療法剤もしくは放射線療法と組み合わせて投与され得る。

40

【0154】

別の態様によると、CD 105の生物活性を拮抗する抗体の治療上有効な量を投与することによって動物における腫瘍成長および/または転移を低減する方法が提供されている。その方法は、腫瘍成長および/または転移の低減が必要な動物を選択すること、および

50

CD105の生物活性を拮抗する抗体の治療上有効な投与量をその動物に投与することを含むことができる。抗体は、単独で投与され得る、または追加の抗体もしくは化学療法剤もしくは放射線療法と組み合わせて投与され得る。

【0155】

本発明の別の態様によると、腫瘍の血管形成および/または細胞増殖の治療するための薬物の製造のためのCD105の生物活性の拮抗薬の使用が提供されている。一実施形態において、CD105の生物活性の拮抗薬は、本発明の標的結合剤である。一実施形態において、CD105の生物活性の拮抗薬は、本発明の抗体である。

【0156】

本発明の別の態様によると、腫瘍の血管形成および/または細胞増殖の治療するための薬物の使用のためのCD105の生物活性の拮抗薬が提供されている。一実施形態において、CD105の生物活性の拮抗薬は、本発明の標的結合剤である。一実施形態において、CD105の生物活性の拮抗薬は、本発明の抗体である。

10

【0157】

本発明の別の態様によると、血管形成および/または増殖の治療のための薬物の製造のためのCD105の生物活性を拮抗する標的結合剤または抗体の使用が提供されている。

【0158】

本発明の別の態様によると、血管形成および/または増殖の治療のための薬物として使用するためにCD105の生物活性を拮抗する標的結合剤または抗体の使用が提供されている。

20

【0159】

本発明の別の態様によると、疾患関連の血管形成および/または増殖の治療のための薬物の製造のためのCD105の生物活性を拮抗する標的結合剤または抗体の使用が提供されている。

【0160】

本発明の別の態様によると、疾患関連の血管形成および/または細胞増殖の治療をするための薬物を使用するためのCD105の生物活性を拮抗する抗体が提供されている。

【0161】

本発明の別の態様によると、哺乳動物における癌の治療をするための薬物の製造をするためのCD105の生物活性の拮抗薬の使用が提供されている。一実施形態において、CD105の生物活性の拮抗薬は、本発明の標的結合剤である。一実施形態において、CD105の生物活性の拮抗薬は、本発明の抗体である。

30

【0162】

本発明の別の態様によると、哺乳動物における癌の治療をするための薬物の使用のためのCD105の生物活性の拮抗薬が提供されている。一実施形態において、CD105の生物活性の拮抗薬は、本発明の標的結合剤である。一実施形態において、CD105の生物活性の拮抗薬は、本発明の抗体である。

【0163】

本発明の別の態様によると、哺乳動物における癌の治療をするための薬物の製造をするためのCD105の生物活性を拮抗する標的結合剤の使用が提供されている。

40

【0164】

本発明の別の態様によると、哺乳動物における癌の治療をするための薬物の使用のためのCD105の生物活性を拮抗する標的結合剤が提供されている。

【0165】

本発明の別の態様によると、哺乳動物における癌の治療をするための薬物の製造をするためのCD105の生物活性を拮抗する抗体の使用が提供されている。

【0166】

本発明の別の態様によると、哺乳動物における癌の治療をするための薬物の使用のためのCD105の生物活性を拮抗する抗体が提供されている。

【0167】

50

本発明の別の態様によると、動物における増殖および/または血管形成の低減または阻害のための薬物の製造のためのCD105の生物活性を拮抗する標的結合剤または抗体の使用が提供されている。

【0168】

本発明の別の態様によると、動物における増殖および/または血管形成の低減または阻害のための薬物の製造のためのCD105の生物活性を拮抗する標的結合剤または抗体の使用が提供されている。

【0169】

本発明の別の態様によると、動物における腫瘍成長および/または転移を低減するための薬物の製造のためのCD105の生物活性を拮抗する標的結合剤または抗体の使用が提供されている。

10

【0170】

本発明の別の態様によると、動物における腫瘍成長および/または転移を低減するための薬物の使用のためのCD105の生物活性を拮抗する標的結合剤または抗体が提供されている。

【0171】

一実施形態において、本発明は、CD105受容体シグナル伝達に単独で、または部分的に依存している腫瘍を有する患者においてCD105を拮抗するために使用することに特に適している。

【0172】

本発明の別の態様によると、CD105の生物活性の拮抗薬および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物が提供されている。一実施形態において、拮抗薬は抗体を含む。本発明の別の態様によると、CD105の生物活性の拮抗薬および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物が提供されている。一実施形態において、拮抗薬は抗体を含む。

20

【0173】

いくつかの実施形態において、CD105と特異的に結合する抗体の以下の投与後、血液から余分な循環抗体を取り除くために、洗浄剤が投与される。

【0174】

抗CD105抗体は患者試料におけるCD105の検出に有用である、したがって、本明細書に記載される病状の診断に有用である。さらに、(以下の実施例に明示する)CD105媒介されるシグナル伝達活性を大幅に阻害する能力に基づき、抗CD105抗体はCD105発現に起因する症状および状態の治療において治療効果を有する。具体的な実施形態において、本明細書における抗体および方法はCD105に誘導された血管形成、増殖および/または細胞内シグナル伝達に起因する症状の治療に関する。さらなる実施形態は、黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、肝細胞(肝臓)癌、甲状腺腫瘍胃癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、肺癌、神経膠芽腫、子宮内膜癌、腎癌、結腸癌、および膵癌等の、腫瘍性疾患を含む血管形成および/または増殖に関係する疾病を治療するために、本明細書に記載される抗体および方法を使用することを含む。抗体は、関節炎、アテローム性動脈硬化、および血管形成を含む疾病における細胞粘着および/または浸潤を治療する場合に有用であり得る。

30

40

【0175】

本発明の別の実施形態は、疾病に関係する細胞粘着、浸潤、血管形成、または増殖の検査をするため、哺乳類の組織、細胞、または体液におけるCD105の検出をするためのアッセイキットを含む。そのキットは、CD105と結合する標的結合剤および存在する場合CD105と標的結合剤の反応を示す手段を含む。一実施形態において、CD105と結合する標的結合剤は標識される。別の実施形態において、標的結合剤は非標識であり、キットは標的結合剤を検出するための手段をさらに含む。好ましくは、標的結合剤は、蛍光色素、酵素、放射性核種、および放射線不透過性材料からなる群から選択されるマーカで標識される。

【0176】

50

本発明の別の実施形態は、疾病に関係する細胞粘着、浸潤、血管形成、または増殖の検査をするため、哺乳類の組織、細胞、または体液におけるCD105の検出をするためのアッセイキットを含む。そのキットは、CD105と結合する抗体および存在する場合、CD105との抗体の反応を示すための手段を含む。抗体は、モノクローナル抗体であり得る。一実施形態において、CD105と結合する抗体は、標識される。別の実施形態において、抗体は非標識一次抗体であり、キットは一次抗体を検出するための手段をさらに含む。一実施形態において、その手段は、抗免疫グロブリンである標識二次抗体を含む。好ましくは、その抗体は、蛍光色素、酵素、放射性核種、および放射線不透過性材料からなる群から選択されるマーカーで標識される。

【0177】

本明細書に開示される抗体について、さらなる実施形態、性質等は、以下に追加詳細を提供する。

【0178】

#### 配列表

本発明の実施形態は以下の表1に記載される特定の抗体を含む。この表は、各抗CD105抗体の識別番号を、それぞれの対応する重鎖および軽鎖遺伝子およびポリペプチドの可変ドメインの配列番号とともに報告する。各抗体は識別番号を与られている。

【表 1】

mAb 識別番号	配列	配列番号
4.120	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	1
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	2
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	3
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	4
9H10	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	5
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	6
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	7
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	8
10C9	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	9
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	10
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	11
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	12
4D4	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	13
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	14
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	15
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	16
11H2	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	17
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	18
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	19
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	20
6B1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	21
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	22
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	23
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	24
4.37	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	25
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	26
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	27
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	28

10

20

30

40

6B10	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	29
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	30
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	31
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	32
3C1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	33
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	34
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	35
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	36
6A6	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	37
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	38
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	39
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	40

10

## 【 0 1 7 9 】

表 2 は、抗体重鎖領域とそれらの同族生殖系列重鎖領域、および抗体軽鎖領域とそれらの同族生殖系列軽鎖領域を比較する表である。

20

【表 2】

配列番号	鎖	鎖	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
2	4.120VH	4.120VH				QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG GSIS	SYVWS	WIRQPAG KGLEWIG	RITYSGSTN YNPSLKS	RVTMSVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAR	RDIGATIKGF DY	WGQGTLLVTVSS
41	生殖系 列	生殖系 列	VH4-59	D5-12	JH4	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSG GSIS	SYVWS	WIRQPPG KGLEWIG	YIYYSGSTN YNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAR	-DIVATI-YF DY	WGQGTLLVTVSS
4	4.120Vk	4.120Vk				DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITIC	RASQSISS YLN	WYQQKPG KAPKLLI Y	AASSLQS	GVPSRFSGSGGTDFI LTISSSLQPEDFATYYC	QQSYSTP-T	FCQCTRLEIK
42	生殖系 列	生殖系 列	Vk02/012		Jk5	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITIC	RASQSISS YLN	WYQQKPG KAPKLLI Y	AASSLQS	GVPSRFSGSGGTDFI LTISSSLQPEDFATYYC	QQSYSTPIT	FGQCTRLEIK
6	9H10VH	9H10VH				QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FAFI	NYGMH	WVRQAPG KGLDWVA	VISYDGSNK YYTDSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	DLMGATLFDN	WGQGTLLVTVSS
43	生殖系 列	生殖系 列	VH3-30*01	DI-26	JH4	QVQLVFSGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VISYDGSNK YYVADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	---GATYFDY	WGQGTLLVTVSS

10

20

30

40

8	9H10VL	9H10VL					SYVLTQPPSVSVA PGQTARISC	GGNNIGSK SVH	WYQKPG QAPVLVV Y	DDSDRPS	GIPERFSGNSGNTAT LTIISRVEAGDEADYYC	QVWDSDDHV V	FGGGTKLTVL
44	生殖系 列	生殖系 列	V2-14		JL2		SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC	GGNNIGSK SVH	WYQKPG QAPVLVV Y	DDSDRPS	GIPERFSGNSGNTAT LTIISRVEAGDEADYYC	QVWDSDDHV V	FGGGTKLTVL
10	10C9VH	10C9VH					QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFR	SYGMI	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLDLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	DRIAAARYN GMDV	WGQGTTVTVSS
45	生殖系 列	生殖系 列	VH3-33	D6-13	JH6		QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	--IAAA-YYY GMDV	WGQGTTVTVSS
12	10C9Vk	10C9Vk					AIVMTQSPDSLAV SLGERATINC	KSSQSVLY SSNNKNYL A	WYQKPG QPPNLLF Y	WASTRES	GVPDRFVSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYC	QQYYDSPLT	FGGGTKVEIK
46	生殖系 列	生殖系 列	VkB3		Jk4		DIVMTQSPDSLAV SLGERATINC	KSSQSVLY SSNNKNYL A	WYQKPG QPPKLLI Y	WASTRES	GVPDRFSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYC	QQYYSTPLT	FGGGTKVEIK
14	4D1VH	4D1VH					QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	VLGATGGYYY YYGMDV	WGQGTTVTVSS
47	生殖系 列	生殖系 列	VH3-33	D1-26	JH6		QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	--GAT---YYY YYGMDV	WGQGTTVTVSS

10

20

30

40

16	4D4VL	4D4VL				SYELTQPPSVSVS PGQTASITC	SGDKLGDK YAC	WYQQKPG QSPVLVI Y	QDIKRPS	GIPERFSGSKSGNTAT LTISGTQAMDEADYYC	QAWDSST-VV	FGGGTKLTVL
48	生殖系 列	生殖系 列	V2-1		JL2	SYELTQPPSVSVS PGQTASITC	SGDKLGDK YAC	WYQQKPG QSPVLVI Y	QDSKRPS	GIPERFSGSNGNTAT LTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTAVV	FGGGTKLTVL
18	11H2VH	11H2VH				QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLDWA	TIWYDGSYK YYADSVKQ	RFTISRDNKNTLSLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	DGKYPPFDY	WGQGLTVTVSS
49	生殖系 列	生殖系 列	VH3-33	D5-24	JH4	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	DG--YFDY	WGQGLTVTVSS
20	11H2VL	11H2VL				SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC	GGNITGSK SVH	WYQQKPG QAPVLVW Y	DDSDRPS	GIPERFSGSNGNTAT LTISRVEAGDEADYYC	QWDRSSDHV V	FGGGTKLTVL
50	生殖系 列	生殖系 列	V2-14		JL2	SYVLTQPPSVSVA PGQTARITC	GGNITGSK SVH	WYQQKPG QAPVLVW Y	DDSDRPS	GIPERFSGSNGNTAT LTISRVEAGDEADYYC	QVWSSSDHV V	FGGGTKLTVL
22	6B1VH	6B1VH				QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVR	DYSSGWY	WGQGLTVTVSS
51	生殖系 列	生殖系 列	VH3-33	D6-19	JH4	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VIWYDGSNK YYADSVKQ	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	-YSSGWY	WGQGLTVTVSS

10

20

30

40

24	6B1VL	6B1VL				SYELTQPPSYSVS PGQPARITC	SGDALPKK YAY	WYQKSG QAPVLY Y	EDSKRPS	GIPERFSGSSSGTMT LTTISGAQVFEADYSC	YSIDSSVNHV V	FGGKTKLTVL
52	生殖系 列	生殖系 列	V2-7	JL2		SYELTQPPSYSVS PGQPARITC	SGDALPKK YAY	WYQKSG QAPVLY Y	EDSKRPS	GIPERFSGSSSGTMT LTTISGAQVEDEADYYC	YSTDSSGNHV V	FGGKTKLTVL
26	4.37VH	4.37VH			QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	DYGMH	WVRQAPG KGLEWA	VIWYDGSNK YYADSVKVG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	AAGFYYYGCM DV	WGQGTTVTVSS	
53	生殖系 列	生殖系 列	VH3-33	JH6	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWA	VIWYDGSNK YYADSVKVG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	AAGFYYYGCM DV	WGQGTTVTVSS	
28	4.37Vk	4.37Vk			DIWMTQSPVLSLPPV TPGEPASISCTC	RSSQSLLY SNGYNYLD	WYLQKPG QSPQLLI Y	LGSNRAS	GVPDRFSGSGGTDFI LKISRVEAEDVGLYYC	MRALQTPFT	FGPCTKVDIK	
54	生殖系 列	生殖系 列	Vka3/A19	Jk3	DIWMTQSPVLSLPPV TPGEPASISCTC	RSSQSLLH SNGYNYLD	WYLQKPG QSPQLLI Y	LGSNRAS	GVPDRFSGSGGTDFI LKISRVEAEDVGLYYC	MQALQTPFT	FGPCTKVDIK	
30	6B10.1V H	6B10.1V H			QEQQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCTASG FTFS	NYGIH	WVRQAPG KGLEWT	VISYDGSKK YYADSVKVG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	AFSTMVRGVD H	WGQGTLYTVSS	
55	生殖系 列	生殖系 列	VH3-30*01	JH4	QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWA	VIWYDGSNK YYADSVKVG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	---TMVRGVD Y	WGQGTLYTVSS	

10

20

30

40

32	6B10. 1V k	6B10. 1V k						DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITC	QASQDIYK SLN	WYQQKPG KAPKLLI Y	DASNLET	GVPSRFGSGSGTDFT FTISSLQPEDFARYFC	QQYDNLPLT	FGGTRVEIK
56	生殖系 列	生殖系 列	Vk08/018			Jk4	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITC	QASQDISN YLN	WYQQKPG KAPKLLI Y	DASNLET	GVPSRFGSGSGTDFT FTISSLQPEDIATYYC	QQYDNLPLT	FGGTKVEIK	
34	3C1VH	3C1VH					QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	IISYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	GCRDYVYAMD V	WGQGTTVTVSS	
57	生殖系 列	生殖系 列	VH3-30*01	D3-16	JH6		QVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASG FTFS	SYGMH	WVRQAPG KGLEWVA	VISYDGSNK YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	GG--YYVGM V	WGQGTTVTVSS	
36	3C1Vk	3C1Vk					DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITC	RASQNIYS YLN	WFQQKPG KAPKLLI Y	TASSLQS	GVPSRFGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC	QQGYSTPLT	FGGKTKVDIK	
58	生殖系 列	生殖系 列	Vk02/012			Jk4	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITC	RASQISS YLN	WYQQKPG KAPKLLI Y	AASSLQS	GVPSRFGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC	QQSYSTPLT	FGGKTKVEIK	
38	6A6. 2VH	6A6. 2VH					EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS	SYAMS	WVRQAPG KGLEWVS	TISGGHST YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	IAPAGPHFDY	WGQGTLYTVSS	
59	生殖系 列	生殖系 列	VH3-23	D6-13	JH4		EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS	SYAMS	WVRQAPG KGLLWVS	AISGSGST YYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAK	IAAAG-YFDY	WGQGTLYTVSS	

10

20

30

40

40	6A6. 2VL	6A6. 2VL				TRSSGSA SNFYQ	WYQRP SSPTTVI Y	EHNQRPS	GVPDRFSGSIDSSSS ASLTISGLKTEDEADY YC	QFYDRNSHWV	FGGTKLTVL
60	生殖系 列	生殖系 列	V1-22	JL3 b	NFMLTQPHSVSES PGKTVTFSC	TRSSGSA SNFYQ	WYQRP SSPTTVI Y	FDNQRPS	GVPDRFSGSIDSSSS ASLTISGLKTEDEADY YC	QSYDSSN-WV	FGGTKLTVL

10

20

30

40

## 定義

別に定義されていない限り、本明細書に使用されている科学および技術用語は、当業者によって一般に理解されている意味を有するものとする。さらに、内容によって特に必要とされていない限り、単数の用語は複数を含むものとし、複数の用語は単数を含むものとする。概して、本明細書に記載される細胞および組織培養、分子生物学、およびタンパク質およびオリゴまたはポリヌクレオチド化学、およびハイブリダイゼーションに関連して、および、それらの手法で利用される用語は、当業者によく知られており一般的に使用される。

### 【0181】

標準的な技術は、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、および組織培養および形質転換（例えば、電気穿孔法、リポフェクション）に対して使用される。酵素反応および精製法は、製造者の仕様によって、または当該技術において一般的に達成されるか、または本明細書に記載されるように実施される。前述の手法および手順は、一般的に当業者によく知られている従来の方法によって、および本明細書に引用され論じられる様々な一般的なおよびより特定の指示において記載されるとおりに実施される。例えば本明細書に参照により組み込まれている、Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)) を参照。本明細書に記載される分析化学、有機合成化学、および医薬品および薬化学に関して、および、その検査法および手法で使用される用語は、当業者によく知られており一般的に使用される。化学合成、化学分析、医薬品、製剤、および配達、および患者の治療に対して標準技術が使用される。

### 【0182】

本開示に従って利用される際、以下の用語は、別に示されない限り以下の意味を有することを理解すべきである。

### 【0183】

拮抗薬または阻害剤は、ポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質、低分子量化合物、オリゴヌクレオチド、オリゴペプチド、RNA干渉 (RNAi)、アンチセンス、組換えタンパク質、抗体もしくはその断片、または複合体もしくはその融合タンパク質であることができる。RNAiの概説については、Milhavet O, Gary DS, Mattson MP. (*Pharmacol Rev.* 2003 Dec; 55(4): 629-48. Review) およびアンチセンスを参照 (Opalinska JB, Gewirtz AM. を参照 (*Sci STKE.* 2003 Oct 28; 2003(206): pe47.))

化合物は約2000ダルトン未満の分子量を含む低分子量化合物のいずれをも指す。

### 【0184】

「CD105」という用語は、CD105抗原の別名でもしられるCD105タンパク質、END、エンドグリン、FLJ41744、HHT1、ORW、およびORW1である分子のことを指す。

### 【0185】

「中和する」または「阻害する」という用語は、抗体等の標的結合剤に言及する場合、標的抗原の活性を排除する、低減する、またはかなり低減するための抗体の能力に関する。したがって、「中和する」本発明の抗CD105抗体は、CD105の活性を排除するまたは大幅に低減することができる。中和CD105抗体は、例えば、CD105リガンドと例えばTGF-等のCD105との結合を妨害するために作用することができる。この結合を妨害することによって、CD105シグナル媒介する活性が、大幅にまたは完全に排除される。理想的には、CD105に対する中和抗体は、腫瘍血管形成および/または細胞増殖を阻害する。

### 【0186】

「CD105の生物活性の拮抗薬」は、CD105の活性を排除、低減または大幅に低

10

20

30

40

50

減することができる。「CD105の生物活性の拮抗薬」は、CD105シグナル伝達を排除、低減または大幅に低減することができる。「CD105の生物活性の拮抗薬」は、腫瘍血管形成および/または細胞増殖を排除または大幅に低減することができる。

【0187】

「CD105シグナル伝達の低減」は、本発明の標的結合剤、抗体、または拮抗薬がない場合のシグナル伝達のレベルと比べて、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、CD105シグナル伝達の低減を包含する。

10

【0188】

「最適化した」配列は、非生殖系列の配列を生殖系列の配列に1つ以上の残基において突然変異するように、突然変異した抗体配列（本明細書に記載される抗体の可変重鎖または軽鎖のいずれか）であり、糖鎖付加部位または不對システイン等の配列から構造負担の低減をさらに含むことができる。

【0189】

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、ポリペプチド配列の天然タンパク、断片、または類似体に言及する、一般用語である。したがって、天然タンパク、断片、および類似体は、ポリペプチド属の種属である。本発明に従う好ましいポリペプチドは、ヒト重鎖免疫グロブリン分子およびヒト軽鎖免疫グロブリン分子、ならびに重鎖免疫グロブリン分子と または 軽鎖免疫グロブリン分子等の軽鎖免疫グロブリン分子を含む組み合わせ、および逆もまた同様に含む組み合わせ、ならびにそれらの断片および類似体によって形成された抗体分子を含む。本発明に従う好ましいポリペプチドは、単にヒト重鎖免疫グロブリン分子またはその断片も含むことができる。

20

【0190】

本明細書で使用され物体に適用される、物体に使用する際、「天然」または「自然発生的な」という用語は、物体を自然界で見つけることができる事実を指す。例えば、自然界における源から単離されることができ、研究室で、またはそれ以外で、人間によって意図的に修飾されていない、生物（ウイルスを含む）において存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は自然発生である。

30

【0191】

本明細書に使用される「操作可能に結合された」という用語は、意図された方法で機能することを可能にする関係にあるように記載された構成要素の位置を指す。例えば、コード配列と「操作可能に結合された」制御配列は、コード配列の発現が制御配列と適合性がある状態の下で実現するような方法で接続される。

【0192】

本明細書で参照される「ポリヌクレオチド」という用語は、少なくとも10塩基長のヌクレオチドのポリマー形態、リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドのいずれか、またはいずれかのヌクレオチド種の修飾形態、またはRNA-DNAヘテロ2本鎖を意味する。その用語は、DNAの一本鎖および二本鎖型を含む。

40

【0193】

本明細書で参照される「オリゴヌクレオチド」という用語は、自然発生的および非自然発生的結合によって結合された自然発生し、修飾されたヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは一般的に200塩基以下の長さを含む、ポリヌクレオチドサブセットである。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、10~60塩基の長さおよび最も好ましくは12、13、14、15、16、17、18、19、または20~40塩基の長さである。オリゴヌクレオチドは典型的には、例えばプローブ用に、一本鎖であるが、オリゴヌクレオチドは、例えば遺伝子の突然変異体の構造において使用するために、二本鎖であることができる。オリゴヌクレオチドは、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれで

50

あってもよい。

【0194】

本明細書に参照される「自然発生的ヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。本明細書で参照される「修飾ヌクレオチド」という用語は、修飾または置換糖類等を含むヌクレオチドを含む。本明細書に参照される「オリゴヌクレオチド結合」という用語は、ホスホロチオエート、ジチオリン酸、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニラデート、ホスホロアミデート等のオリゴヌクレオチド結合を含む。例えば開示が本明細書に参照によって組み込まれている、LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986)、Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984)、Stein et al. Nucl. Acid Res. 16:3209 (1988)、Zon et al. Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991)、Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991))、Stec et al. 米国特許第5,151,510号、Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)、を参照。オリゴヌクレオチドは、検出のための標識を必要に応じて含むことができる。

10

20

【0195】

本明細書に参照される「選択的にハイブリッド形成する」という用語は、検出可能および特異的に結合することを意味する。ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、およびそれらの断片は、大量の非特異的核酸との検出可能な結合を最小限にするハイブリダイゼーションおよび洗浄条件の下、核酸鎖と選択的にハイブリッド形成する。高いストリンジェンシー条件は、当業者に知られていて、本明細書に論じられているように、選択的なハイブリダイゼーション状態を実現するために使用することができる。一般的に、対象のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、または抗体の断片と核酸配列との間の核酸配列の相同性は、少なくとも80%になり、より典型的には、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、99%、および100%のより高い相同性が好ましい。

30

【0196】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)(0.9M NaCl/90mM Naクエン酸、pH7.0)において約45°Cでのフィルター結合DNAとのハイブリダイゼーションの後、0.2X SSC/0.1% SDSにおいて約50~65°Cで1つ以上の洗浄が続き、高ストリンジェントな条件は、6X SSCにおいて約45°Cでフィルター結合DNAとのハイブリダイゼーションの後、0.1X SSC/0.2% SDSにおいて約60°Cで1つ以上の洗浄が続き、または当業者に知られている任意の他のストリンジェントなハイブリダイゼーション状態を含むがこれに限定されない(例えば、Ausubel, F.M. et al., eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. および John Wiley および Sons, Inc., NY at pages 6.3.1~6.3.6 および 2.10.3 を参照)。2つのアミノ酸配列は、部分的または完全な同一性が配列間に存在する場合、「相同」である。例えば85%の相同性は、2つの配列が最大限整合するように整列された際に、アミノ酸の85%が同一であることを意味する。(整合された2つの配列のいずれかにおける)ギャップは、最大限の整合において許可され、5以下のギャップ長は好ましいが、2以下がより好ましい。もう1つの方法としておよび好ましくは、突然変異データ行列および6以上のギャップペナルティでALIGNプログラムを使用して5を超える整列スコア(標準偏差単位において)を有する場合、この用語が本明細書で使用されるように、2つのタンパク質配列(または少なくとも約30アミノ酸長のタンパク質配列由来のポリペプチド配列)は

40

50

、相同である。Dayhoff, M. O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101 - 110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) およびこの volume の Supplement 2, pp. 1 - 10 を参照。ALIGN プログラムを使用して最適に整列された際、その 2 つの配列またはその部分が、それらのアミノ酸が 50% 以上同一の場合、より好ましくは相同である。2 つのオルソログ配列内に相同性の異なる領域が存在し得ることを理解すべきである。例えば、マウスおよびヒト相同分子種の機能部位は、非機能領域よりも高い相同性を有することができる。

【0197】

本明細書に使用される「に対応する」という用語は、ポリヌクレオチド配列が参照ポリヌクレオチド配列のすべてまたは一部と相同である（すなわち、厳密に進化的にはなく、同一である）、またはポリペプチド配列が参照ポリペプチド配列と同一であることを意味する。

【0198】

対照的に、本明細書で使用される「に相補的である」という用語は、相補配列が参照ポリヌクレオチド配列のすべてまたは一部と相同であることを意味する。説明のため、ヌクレオチド配列「TATAC」は参照配列「TATAC」に対応し、参照配列「GTATA」に相補的である。

【0199】

「配列同一性」という用語は、比較ウィンドウ上で、2 つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列が同一である（すなわち、ヌクレオチド単位または残基単位基準で）ことを意味する。「配列同一性の割合 (%)」という用語は、比較ウィンドウ上で 2 つの最適に整列された配列を比較すること、同一核酸塩基（例えば、A、T、C、G、U、または I）またはアミノ酸残基が両方の配列において発生する位置の数を決定して、整合された位置の数を得ること、比較ウィンドウにおける位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で整合された位置の数を割ること、および結果に 100 をかけて、配列同一性の割合 (%) を得ることによって計算される。本明細書で使用される「大幅な同一性」は、ポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の特徴を意味し、少なくとも 18 ヌクレオチド（6 アミノ酸）位置の比較ウィンドウ上、頻繁に少なくとも 24 ~ 48 ヌクレオチド（8 ~ 16 アミノ酸）位置のウィンドウ上で参照配列と比較して、ポリヌクレオチドまたはアミノ酸は少なくとも 85% の配列同一性、好ましくは少なくとも 90 ~ 95% の配列同一性、より好ましくは少なくとも 99% の配列同一性を有する配列を含み、配列同一性の割合 (%) は、参照配列と比較ウィンドウ上の参照配列の合計で 20% 以下の欠失または添加を含むことができる配列を比較することによって計算される。その参照配列は、大きい配列のサブセットであることができる。

【0200】

本明細書で使用される、20 の典型的にはアミノ酸およびそれらの略称は、従来の使用方法に従う。本明細書に参照によって組み込まれる Immunology - A Synthesis (2<sup>nd</sup> Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)) を参照。20 の通常アミノ酸の立体異性体（例えば、D-アミノ酸）、  
-、二置換アミノ酸、Nアルキルアミノ酸、乳酸、および他の非通常アミノ酸等の非天然アミノ酸も、本発明のポリペプチドに対する適切な成分であることができる。非通常アミノ酸の例は、4ヒドロキシプロリン、カルボキシグルタミン酸、  
- N、N、Nトリメチルリジン - Nアセチルリジン、オリン酸化セリン、Nアセチルセリン、Nホルミルメチオニン、3メチルヒスチジン、5ヒドロキシリジン、  
- Nメチルアルギニン、および他の同様のアミノ酸およびイミノ酸（例えば、4ヒドロキシプロリン）を含む。本明細書で使用されるポリペプチド表記法において、標準的な使用方法および慣習に従って、左手方向はアミノ末端方向であり、右手方向はカルボキシル末端方向である。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 0 1 】

同様に、別に指定がない限り、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左手末端は5'末端であり、二本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向は5'方向と呼ばれる。新生RNAの転写の添加の5'から3'の方向は、転写方向と呼ばれ、RNAと同じ配列を有し、RNA転写の5'から5'末端であるDNA鎖上の配列領域は、「上流配列」と呼ばれ、RNAと同じ配列を有し、RNA転写の3'から3'末端であるDNA鎖上の配列領域は、「下流配列」と呼ばれる。

## 【 0 2 0 2 】

ポリペプチドに適用される「大幅な同一性」という用語は、デフォルトギャップ量を使用してGAPまたはBESTFITプログラムによって等、最適に整列された際に、2つのペプチド配列が少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性、および最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一ではない残基位置は保存アミノ酸置換によって異なる。保存アミノ酸置換は、同様の側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり、脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸群はセリンおよびトレオニンであり、アミド含有の側鎖を有するアミノ酸の群はアスパラギンおよびグルタミンであり、芳香族側鎖を有するアミノ酸の群はフェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり、基礎側鎖を有するアミノ酸の群はリジン、アルギニン、およびヒスチジンであり、硫黄含有の側鎖を有するアミノ酸の群はシステインおよびメチオニンである。好ましい保存アミノ酸置換群は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸アスパラギン酸、およびアスパラギン-グルタミンである。

## 【 0 2 0 3 】

本明細書に記載の、抗体または免疫グロブリン分子のアミノ酸配列における小さな変化は、アミノ酸配列における変化が本明細書に記載される抗体または免疫グロブリン分子と少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、および最も好ましくは99%の配列同一性を維持することを条件として、本発明によって包含されることを意図する。特に、保存アミノ酸置換が意図される。保存的置換は、関連した側鎖を有するアミノ酸のファミリー内で起こるものである。遺伝的にコードされたアミノ酸は、一般的に以下のファミリーに分けられる：(1)酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸塩、(2)塩基性=リジン、アルギニン、ヒスチジン、(3)非極性=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、および(4)非荷電極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。より好ましいファミリーは以下のとおりである：セリンおよびトレオニンは、脂肪族ヒドロキシファミリーであり、アスパラギンおよびグルタミンは、アミド含有のファミリー、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンは、脂肪族ファミリー、およびフェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、芳香族ファミリーである。例えば、特に置換がフレームワーク部位内のアミノ酸を伴わない場合、ロイシンのイソロイシンまたはバリンとの、アスパラギン酸塩のグルタミン酸塩との、トレオニンとのセリンの単独の置換、またはアミノ酸の構造的に関係があるアミノ酸との同様の置換は、結合機能または結果として生じる分子の特性に大きな影響を与えないことを期待することは妥当である。アミノ酸変化が機能性ペプチドを生じるかは、容易にポリペプチド誘導体の比活性をアッセイすることによって測定することができる。アッセイを、本明細書において詳細に記載する。抗体または免疫グロブリン分子の断片または類似体は、当業者によって容易に調製され得る。断片または類似体の好ましいアミノおよびカルボキシ末端は、機能ドメインの境界近くに発生する。構造および機能ドメインは、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列データを公開または私有の配列データベースと比較することによって同定することができる。好ましくは、コンピュータによる比較方法が、知られている構造および/または機能の他のタンパク質において発生する配列モチーフまたは予測された

10

20

30

40

50

タンパク質配座ドメインを同定するために使用される。既知の三次元構造に折畳むタンパク質配列を同定する方法は、知られている。Bowie et al. Science 253:164 (1991)。したがって、前述の例は、当業者は本明細書に記載される抗体に従って構造および機能ドメインを定義するために使用することができる配列モチーフおよび構造配座を、認めることができることを示す。

#### 【0204】

グルタミルおよびアスパラギン残基は、それぞれに対応するグルタミンおよびアスパルチル残基に頻りに脱アミド化される。これらの残基は、中性または塩基条件で、脱アミド化される。これらの残基の脱アミド化された形態は、本発明の範囲内である。

#### 【0205】

一般的に、タンパク質におけるシステイン残基は、システイン-システインジスルフィド結合に関与するか、または折り畳みタンパク質領域の一部である場合、ジスルフィド結合形成から立体的に保護される。タンパク質におけるジスルフィド結合形成は、複雑な過程であり、環境の酸化還元電位および特殊化したチオール-ジスルフィド交換酵素によって決定される (Creighton, Methods Enzymol. 107, 305-329, 1984; Houee-Levin, Methods Enzymol. 353, 35-44, 2002)。システイン残基がタンパク質構造において対を有さず、折畳むことによって立体的に保護されない場合、ジスルフィド混合として知られている過程において溶液からの遊離システインと共にジスルフィド結合を形成することができる。ジスルフィドスクランブルとして知られる別のプロセスにおいて、遊離システインは自然発生的ジスルフィド結合 (抗体構造において存在するもの等) を妨げ、低結合、低生物活性および/または低安定性を引き起こし得る。

#### 【0206】

好ましいアミノ酸置換は、(1) タンパク質分解に対する感受性を低減し、(2) 酸化に対する感受性を低減し、(3) タンパク質複合体を形成するために結合親和性を変更し、(4) 結合親和性を変更し、(4) かかる類似体の他の物理化学的または機能特性を与えるまたは修飾するものである。類似体は、自然発生的なペプチド配列以外の配列の様々な突然変異を含むことができる。例えば、単一または複数のアミノ酸置換 (好ましくは保存アミノ酸置換) は、自然発生的な配列において作製することができる (好ましくは分子間接触を形成するドメイン外のポリペプチドの一部において)。保存アミノ酸置換は、親配列の構造性を大幅に変更すべきではない (例えば、置換アミノ酸は、親配列において発生するらせんを破壊、または親配列を特徴づける他の種類の二次構造妨害する傾向があるべきではない)。当該技術分野で認められたポリペプチド二次および三次構造の例は、それぞれが本明細書に参照によって組み込まれる Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984))、Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991))、および Thornton et al. Nature 354:105 (1991) に記載される。

#### 【0207】

さらに、かかる方法は、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠失する抗体分子を生成するために、鎖内ジスルフィド結合に加わる1つ以上の可変領域システイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用することができる。

#### 【0208】

「CDR領域」または「CDR」という用語は、抗体に抗原結合特異性を与える抗体の重鎖および軽鎖の超可変領域を示すことを意図している。CDRは、Kabatsシステム (Kabats, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition. US Department of Health and ヒト Servic

10

20

30

40

50

es, Public Service, NIH, Washington) およびそれ以降の版に従って定義され得る。抗体は、典型的には3個の重鎖CDRおよび3個の軽鎖CDRを含む。CDR(単数または複数)という用語は、状況に従って、抗原に対する抗体、または抗体が認識するエピトープに対する抗体の親和性による結合に關与するアミノ酸残基の大部分を含むこれらの領域のうちの1つまたはこれらの領域の複数、またはすべてに従って示すために本明細書で使用される。

#### 【0209】

重鎖の第3のCDR(HCDR3)は、より大きいサイズの可変性を有する(本質的に、それを引き起こす遺伝子の配列のメカニズムによる、より大きな多様性)。それは、2個のアミノ酸ほど短いこともあり得るが、既知の最長サイズは26個である。CDRの長さは、特定の根本にあるフレームワークが適応することができる長さによって変化し得る。機能的に、HCDR3は抗体の特異性の決定において役割を果たす(Segal et al., PNAS, 71:4298-4302, 1974, Amit et al., Science, 233:747-753, 1986, Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901-917, 1987, Chothia et al., Nature, 342:877-883, 1989, Caton et al., J. Immunol., 144:1965-1968, 1990, Sharon et al., PNAS, 87:4814-4817, 1990, Sharon et al., J. Immunol., 144:4863-4869, 1990, Kabat et al., J. Immunol., 147:1709-1719, 1991)。

#### 【0210】

本明細書に言及される「一組のCDR」という用語は、CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。したがって、一組のHCDRはHCDR1、HCDR2、およびHCDR3を指し、一組のLCDRはLCDR1、LCDR2、およびLCDR3を指す。

#### 【0211】

アミノ酸配列が本明細書に提示されている、およびCD105に対する標的薬剤および抗体に用いられることができるものを含む、VHおよびVLドメインの変異体および本発明のCDRは、配列変異または突然変異、および所望の特徴を有する抗原への標的に対するスクリーニングによって、得ることができる。所望の特徴の例は、抗原に特異的な既知の抗体と比較した、抗原に対する増加した結合親和性、活性が知られている場合、抗原に特異的である既知の抗体と比較した、抗原活性の増加した中和、特異的なモル比における、既知の抗体またはリガンドとの、抗原に対する特定の競合能力、リガンド-受容体複合体を免疫沈降させる能力、特定のエピトープに結合する能力、直線状エピトープ、例えばペプチド結合スキャンを使用して同定したペプチド配列(例えば直線状のおよび/または制約された配座において検査されるペプチドを使用する)、非連続残基によって形成される配座エピトープ、CD105の新規生物活性または下流分子を調節する能力、CD105に結合し、および/または中和する能力、および/または他の所望の特性のいずれかに対するもの、を含むがこれに限定されない。

#### 【0212】

CDRのアミノ酸配列、抗体VHまたはVLドメイン、および抗原結合部位内で置換作製するために必要な技術は、当該技術分野において利用可能である。本明細書に開示された抗体分子の変異体は、本発明において産出し使用することができる。構造/特性-活性関係に対して多変量データ解析技術を適用する計算化学の先導に従って(Wold, et al. Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics - Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski), D. Reid Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984)抗体の定量的な活性と性質との関係は、統計的回帰、パターン認識および識別等の既知の数学的方法を使用して抽出することができる(Norman et al. Applied Regression Analysis. Wiley-Intersc

10

20

30

40

50

ience; 3rd edition (April 1998)、Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995)、Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000)、Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999)、Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002)、Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery)。いくつかの事例において、抗体の特性は、抗体配列、機能および三次元構造の経験的および理論モデル(例えば、接触され得る残基または計算された物理化学的性質の解析)から導くことができ、これらの性質は、単一および組み合わせとみなすことができる。

#### 【0213】

VHドメインおよびVLドメインからなる抗体抗原-結合部位は、典型的には、軽鎖可変ドメイン(VL)から3つおよび重鎖可変ドメイン(VH)から3つの、6つのループのポリペプチドによって形成される。既知の原子構造の抗体の解析は、配列と抗体結合部位の三次構造との間の関係を解明した。これらの関係は、VHドメインにおける第3の領域(ループ)を除き、結合部位ループが少数の主鎖配座である極限構造のうちの1つを有することを意味する。特定のループにおいて形成された極限構造は、ループにおけるおよびフレームワーク領域における両方において、サイズおよび重要な部位における特定の残基の存在によって測定されることが示された。

#### 【0214】

配列-構造関係のこの研究は、配列は知られているが、三次元構造が未知の抗体内の、CDRループの三次元構造を維持するために重要であり、したがって結合特異性を維持する上で重要な残基を予測するために用いることができる。これらの予測は、予測と先導の最適化実験からの出力との比較によって裏づけされ得る。構造的アプローチにおいて、モデルは、WAMなどの、無料で使用できるまたは商用のパッケージのいずれかを使用して抗体分子を作製することができる。タンパク質の視覚化およびInsight I I (Accelrys, Inc.)またはDeep View等の解析ソフトウェアパッケージは、CDRにおける各位で可能な置換を評価するために使用することができる。この情報は、最小限のまたは活性上の有益な効果を有する可能性があるまたは他の所望の特性を与える置換を作製することができる。

#### 【0215】

本明細書で使用される「ポリペプチド断片」という用語は、アミノ末端および/またはカルボキシル末端欠失を有するが、残りのアミノ酸配列が例えば全長cDNA配列から推測される自然発生的な配列における対応する位置と同一である場所のポリペプチドを指す。断片は、典型的には少なくとも5、6、8、または10アミノ酸長、好ましくは少なくとも14アミノ酸長、より好ましくは少なくとも20アミノ酸長、通常は少なくとも50

アミノ酸長、およびさらにより好ましくは少なくとも70アミノ酸長である。本明細書で使用される「類似体」という用語は、少なくとも次の特性のうちの1つを含む推測されたアミノ酸配列の一部と実質上同一性を有する少なくとも25アミノ酸のセグメントからなるポリペプチドを指す：(1)適切な結合条件下でのCD105との特異結合、(2)適切なTGF / CD105結合を遮断する能力、または(3)CD105活性を阻害する能力。典型的には、ポリペプチド類似体は、自然発生的な配列に関して保存アミノ酸置換(または付加もしくは欠失)を含む。類似体は、典型的には少なくとも20アミノ酸長、好ましくは少なくとも50アミノ酸長またはそれ以上であり、多くの場合、全長自然発生的なポリペプチドと同じ長さであることができる。

#### 【0216】

ペプチド類似体は、医薬産業において鑄型ペプチドのものに類似している性質を有する非ペプチド薬として一般的に使用される。これらの種類の非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣薬(peptide mimetics)」および、「ペプチド模倣薬(peptidomimetics)」と呼ぶ(本明細書で参照により組み込まれるFaucher, J. Adv. Drug Res. 15:29(1986)、Veber and Freidinger TINS p.392(1985)、およびEvans et al. J. Med. Chem. 30:1229(1987))。かかる化合物は、頻りにコンピュータ化された分子モデリングの助けによって開発される。治療的に有用なペプチドと構造的に似ているペプチド模倣薬は、同等の治療または予防効果を産出するために使用することができる。一般的に、ペプチド模倣薬は、ヒト抗体等の、パラダイムポリペプチド(すなわち、生化学的性質または薬理活性を有するポリペプチド)と構造的に似ているが、当業者によく知られている方法によって $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ (シスおよびトランス)、 $-COCH_2-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ 、および $-CH_2SO-$ からなる群から選択された結合によって随意おきかえられた1つ以上のペプチド結合を有する。同じ種類のD-アミノ酸を含むコンセンサス配列のうち1つ以上のアミノ酸の計画的な置換(例えばL-リジンの代わりに、D-リジン)は、より安定したペプチドを生成するために使用することができる。さらに、コンセンサス配列または十分に等しいコンセンサス配列変化を含む制約されたペプチドは、例えばペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成する能力がある内部システイン残基を追加することによって、当業者に知られている方法で生成され得る(本明細書に参照により組み込まれているRizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387(1992))。

#### 【0217】

抗体は、単独でまたは既知の技術で提供された他のアミノ酸配列と組み合わせ、オリゴクローナル、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラの抗体、CDR移植された抗体、多特異的な抗体、二重特異性抗体、触媒抗体、キメラの抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、抗イデオタイプ抗体、および、可溶または結合形態で標識することができる抗体、ならびにそれらの断片、変異体、またはその誘導体であることができる。抗体は、任意の種から提供され得る。

#### 【0218】

本明細書で使用される「抗体」(免疫グロブリン)(単数及び複数)は、モノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、ラクダ化抗体、およびキメラ抗体を包含する。本明細書で使用される「抗体」(単数および複数)は、抗原鎖の抗原決定基の特性と補完的である内側面形状および電荷分布を含む三次元結合空間を有するポリペプチド鎖の折畳みから形成される少なくとも1つの結合ドメインを含むポリペプチドまたはポリペプチドの群を指す。天然抗体は、典型的には2つの同一の軽鎖(L)および2つの同一の重鎖(H)からなる約150,000ダルトンのヘテロテトラマー糖タンパク質である。各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合による重鎖と結合されるが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で変化する。それぞれの重鎖および軽鎖は、規則的間隔をおいた鎖内ジスルフィド架橋も有する。それぞれ

10

20

30

40

50

の重鎖は、一端において可変ドメイン（VH）を有し、後にある数の定常ドメインが続く。それぞれの軽鎖は、1つの末端に可変ドメインを（VL）、もう一方の末端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1の定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列する。軽鎖は、軽鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を基に鎖または鎖のどちらかに分類される。軽鎖の可変ドメインは、本明細書においてVKとして示され得る。「可変領域」という用語は、重鎖または軽鎖の可変ドメインを説明するためにも使用することができる。特定のアミノ酸残基は、軽鎖および重鎖の可変ドメイン間のインターフェースとして形成されると考えられる。各軽鎖/重鎖対の可変領域は、抗体の結合部位を形成する。かかる抗体は、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス等を含むがこれに限定されない、哺乳動物から生じることができる。

10

## 【0219】

「抗体」（単数および複数）という用語は、本発明の抗体の結合断片を含み、例示的な断片は、一本鎖のFvs（scFv）、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、ドメイン抗体、Fv断片、Fab断片、F（ab'）断片、F（ab'）<sub>2</sub>断片、所望の生物活性を示す抗体、ジスルフィド安定した可変領域（dsFv）、二量体可変領域（二重特異性抗体）、抗イデオタイプ（抗Id）抗体（例えば本発明の抗Id抗体と抗体を含む）、細胞内抗体、直線状抗体、および上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片から生成された多特異的な抗体を含む。具体的には、抗体は免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片、すなわち抗原-結合部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子は、任意の種類（例えばIgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2）またはサブクラスであることができる。

20

## 【0220】

酵素、パペインでの抗体の消化は、「Fab」断片、および抗原結合活性を有さないが結晶化をする能力を有する「Fc」断片としても知られる2つの同一の抗原結合断片をもたらす。酵素、ペプシンでの抗体の消化は、抗体分子の2つの腕が結合されたままで残り、2つの抗原の結合部位を含むF（ab'）<sub>2</sub>断片をもたらす。F（ab'）<sub>2</sub>断片は、抗原に交差結合する能力を有する。

## 【0221】

本明細書で使用される場合、「Fv」は、抗原の認識、および抗原の結合部位の両方を保持する抗体の最小限の断片を指す。この領域は、タイトな非共有または共有結合にある、1つの重鎖および1つの軽鎖の可変ドメインの二量体からなる。これが、それぞれの可変ドメインの3つのCDRが相互作用して、VH-VL二量体の表面において抗原結合部位を定義する構成である。全体的に、これらの6つのCDRが、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、全体の結合部位のよりも低い親和性であるが、単一可変ドメイン（または3つのCDRに特異的な抗原のみを含むFvの半分）でさえも、抗原を認識して結合する能力がある。

30

## 【0222】

本明細書で使用される場合、「Fab」は、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖のCH1ドメインを含む抗体の断片を指す。

40

## 【0223】

本明細書で使用される場合、「dAb」は、ヒト抗体の最小の機能結合単位である抗体の断片を指す。「dAb」は単ドメイン抗体であり、抗体重鎖の可変ドメイン（VHドメイン）または抗体軽鎖の可変ドメイン（VLドメイン）のいずれかを含む。各dAbは、6つの自然発生的CDRのうち3つを含有する（Ward et al., *Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli*. *Nature* 341, 544-546 (1989)、Holt, et al., *Domain antibodies: protein for therapy*, *Trends Biotechnol.* 21, 4

50

84 - 49 (2003) )。11 ~ 15 kDa の範囲の分子量で、それらは断片抗原結合 (Fab) 2 より 4 倍小さく、一本鎖 Fv (scFv) 分子の半分のサイズである。

【0224】

本明細書で使用される場合、「らくだ科」は、軽鎖が欠けている重鎖二量体からなるが、それにも関わらず、広範囲におよぶ抗原結合レパートリーを有する抗体分子を指す。(Hamers - Casterman C, Atarhouch T, Muyl dermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 363: 446 - 448)。

10

【0225】

「二重特異性抗体」という用語は、同じポリペプチド鎖 ( $V_H - V_L$ ) において軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) と結合した重鎖可変ドメイン ( $V_H$ ) を含む断片の 2 つの抗原結合部位を含む小さい抗体の断片を指す。同じ鎖において 2 つのドメイン間で組み合わせることを可能にするには短すぎるリンカーを使用して、そのドメインは、強制的に別の鎖の相補ドメインと組み合わせられ、2 つの抗原結合部位を作製する。二重特異性抗体は、例えば、EP 第 404,097 号、WO 第 93/11161 号、および Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 (1993) により詳しく記載される。

【0226】

完全抗体の断片が、抗原を結合する機能を行うことができることが示されている。断片の結合の例は、 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ 、および  $CH1$  ドメインからなる Fab 断片 (Ward, E. S. et al., (1989) Nature 341, 544 - 546)、 $V_H$  および  $CH1$  ドメインからなる Fd 断片 (McCafferty et al (1990) Nature, 348, 552 - 554)、単一抗体の  $V_L$  および  $V_H$  ドメインからなる Fv 断片 (Holt et al (2003) Trends in Biotechnology 21, 484 - 490)、(iv)  $V_H$  または  $V_L$  ドメインからなる dAb 断片 (Ward, E. S. et al., Nature 341, 544 - 546 (1989)、McCafferty et al (1990) Nature, 348, 552 - 554、Holt et al (2003) Trends in Biotechnology 21, 484 - 490]、(v) 単離された CDR 領域、(vi) 2 つの結合された Fab 断片を含む二価断片である  $F(ab')$  2 断片、(vii)  $V_H$  ドメインおよび  $V_L$  ドメインが、2 つのドメインが会合して抗原結合部位を形成することを可能にするペプチドリンカーによって結合される、一本鎖の Fv 分子 (scFv) (Bird et al., (1988) Science, 242, 423 - 426、Huston et al., (1988) PNAS USA, 85, 5879 - 5883)、(viii) 二重特異的な一本鎖の Fv 二量体 (PCT/US 第 92/09965 号) および (ix) 遺伝子融合によって構築される多価または多特異的な断片である「二重特異性抗体」(WO 第 94/13804 号、Holliger, P. (1993) et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444 - 6448) である。Fv、scFv、または二重特異性抗体分子は、 $V_H$  と  $V_L$  ドメインとを結合するジスルフィド架橋の取り込みによって安定化され得る (Reiter, Y. et al., Nature Biotech, 14, 1239 - 1245, 1996)。 $CH3$  ドメインとつながった scFv を含むミニボディも作製され得る (Hu, S. et al., (1996) Cancer Res., 56, 3055 - 3061)。結合断片の他の例は、抗体ヒンジ領域から 1 つ以上のシステインを含む重鎖  $CH1$  ドメインのカルボキシル末端における少数の残基の添加によって Fab 断片とは異なる  $Fab'$ 、および定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を持つ  $Fab'$  断片である、 $Fab' - SH$  である。

20

30

40

【0227】

「可変」という用語は、可変ドメインの特定部分が、抗体間で、配列において広範囲に

50

わたって異なる、および特定の抗原に対して各特定の抗体の結合特異性の原因であるという事実を指している。しかし、可変性は、均一に抗体の可変ドメインにわたって分布されない。可変性は、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方における、相補性決定領域(CDR)と称される部分に集中している。可変ドメインのより高度に保存された部位は、フレームワーク領域(FR)と称される。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインのそれぞれは、大部分がループ結合を形成する3つのCDRによって結び付けられるおよび場合によってはシート構造の一部を形成するシート配置をとる4つのFR領域を含む。各鎖におけるCDRは、他の鎖からのCDRと、FR領域に極めて接近して結合される、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)を参照)。定常ドメインは、一般的に抗原結合に直接関与しないが、抗原結合親和性に影響を与え、ADCC、CDC、および/またはアポトーシスにおける抗体の関与等の様々なエフェクター機能を示すことができる。

#### 【0228】

本明細書で使用される場合、「超可変領域」は、抗原への結合と関連する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変ドメインは、「相補性決定領域」または「CDR」のアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基24~34(L1)、50~56(L2)、および89~97(L3)、および重鎖可変ドメインの残基31~35(H1)、50~65(H2)、および95~102(H3)、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))および/または「超可変ループ」からの残基(例えば、軽鎖可変ドメインにおける残基26~32(L1)、50~52(L2)および91~96(L3)、および重鎖可変ドメインにおける残基26~32(H1)、53~55(H2)、および96~101(H3)、Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987))を包含する。「フレームワーク」または「FR」残基は、CDRの側面に立つそれらの可変ドメイン残基である。FR残基は、キメラの、ヒト化の、ヒト、ドメイン抗体、二重特異性抗体、ワクチン抗体(vaccibody)、直線状抗体、および二重特異性抗体において存在する。

#### 【0229】

本明細書で使用される標的結合剤、標的結合タンパク質、特異的に結合するタンパク質等の用語は、標的部位と優先的に結合する抗体またはその結合断片を指す。一実施形態において、標的結合剤は1つの標的部位のみに対して特異的である。他の実施形態において、標的結合剤は、2つ以上の標的部位に対して特異的である。一実施形態において、標的結合剤は、モノクローナル抗体であり得、標的部位はエピトープであり得る。

#### 【0230】

抗体の「結合断片」は、組換えDNA技術または無傷の抗体の酵素的化学開裂によって産出される。結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、dAb、および一本鎖の抗体を含む。「二重特異性」または「二機能性」の抗体以外の抗体は、それぞれの結合部位が同一であると理解される。過度の抗体が対抗受容体に結合された受容体の量を少なくとも約20%、40%、60%、または80%、およびよりいつもは約85%を超える(インビトロ競合結合アッセイで測定される)低減する場合、抗体は大幅に受容体と対抗受容体との接着を阻害する。

#### 【0231】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体と特異的に結合することができるタンパク質決定因子のいずれかを含む。エピトープ決定因子は、通常アミノ酸または糖側鎖等の分子の化学的活性表面群からなり、特定の三次構造的ならびに特定の

10

20

30

40

50

電化特性を有し得るが必ずしも有すると限らない。解離定数が $\leq 1 \mu\text{M}$ 、好ましくは $\leq 100 \text{ nM}$ 、および最も好ましくは $\leq 10 \text{ nM}$ の場合、抗体は抗原に特異的に結合されると言われる。

【0232】

本明細書で使用される「薬剤」という用語は、化学化合物、化学化合物の混合物、生体高分子、または生物由来物質から作製された抽出物を意味する。

【0233】

CD105ポリペプチドに関して、「活性である」または「活性」は、天然CD105ポリペプチドの生物または免疫学的活性を有するCD105ポリペプチドの部分を目指す。本明細書で使用される場合、「生物の」とは天然CD105ポリペプチドの活性に起因する生物機能を指す。好ましいCD105生物活性は、例えばCD105により誘導される細胞粘着および浸潤および/または血管形成および/または増殖を含む。

10

【0234】

本明細書で使用される「哺乳動物」は、哺乳動物と考えられる動物のいずれをも指す。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0235】

本明細書で使用される「動物」は、哺乳動物と考えられる動物を包含する。好ましくは、動物はヒトである。

【0236】

「mAb」という用語は、モノクローナル抗体を指す。

20

【0237】

本明細書で使用される場合、「リポソーム」は、哺乳動物に対するCD105ポリペプチド等の本発明のCD105ポリペプチドまたは抗体を含み得る、薬物の投与に有用であり得る小さい小胞を指す。

【0238】

本明細書で使用される「標識」または「標識された」は、ポリペプチドに検出可能な部分、例えば放射標識、蛍光ラベル、酵素標識、化学発光標識、またはビオチニル基を追加することを示す。放射性同位体または放射性核種は $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ を含むことができ、蛍光ラベルはローダミン、ランタニド蛍光体、またはFITCを含むことができ、酵素標識は西洋ワサビペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、発光酵素、アルカリ性ホスファターゼを含むことができる。

30

【0239】

追加標識は、例示説明するが、限定しない目的でグルコース-6-リン酸脱水素酵素（「G6PDH」アルファ-D-ガラクトシダーゼ、グルコース酸化酵素、グルコースアミラーゼ、炭酸脱水酵素、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸脱水素酵素、およびペルオキシダーゼ等の酵素、色素、追加蛍光ラベルまたは蛍光物質は、ルオレセインおよびその誘導體、蛍光色素、GFP（「緑色蛍光タンパク質」の代わりにGFP）、ダンシル、ウンベリフェロン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フトアルデヒド、およびフルオレサミン等を含み、ランタニドクリプテートおよびキレート、例えばユーロピウム等（Perkin Elmer and Cis Bio International）のフルオロフォア、イソルミノール、ルミノール、およびジオキセタン等の化学発光標識または化学発光物質、感光薬、補酵素、酵素基質、ラテックスまたは炭素粒子等の粒子、色素、触媒、または他の検出可能な基でさらに標識され得る金属ゾル、微結晶、リポソーム、細胞等、ビオチン、ジゴキシゲニン、または5-プロモデオキシウリジン等の分子、例えば緑膿菌外毒素群（PEまたは細胞傷害性断片またはその突然変異体）、ジフテリア毒素、または細胞傷害性断片、またはその突然変異体、ボツリヌス毒素A、B、C、D、E、またはF、リシン、またはその細胞傷害性断片、例えばリシンA、アプリン、またはその細胞傷害性の断片、サポリンまたはその細胞傷害性断片、ヤマゴボウ抗ウイルス毒素またはその細胞傷害性断片、およびブリヨジン1、また

40

50

はその細胞傷害性断片から選択された毒素部分等の毒素部分を含む。

【0240】

本明細書に使用される「医薬品または薬剤」という用語は、患者に適切に投与された場合、好ましい治療効果を誘発することができる化学化合物または組成物を指す。本明細書における他の化学用語は、The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))、(参照によって本明細書に組み込まれる)によって例示されるように、技術的に慣例的用法に従って使用される。

【0241】

本明細書に使用される「十分に純粋な」は、目的種が存在する主な種を意味し(すなわち、モルベースにおいて、組成物における他のどの個別の種よりもより豊富である)、および好ましくは十分に純粋な画分は、目的種が存在するすべての高分子種のうち少なくとも約50%(モルベースにおいて)を含む組成物である。一般的に、十分に純粋な組成物は、組成物における約80%を超える、より好ましくは約85%、90%、95%、および99%を超える存在するすべての高分子種を含む。最も好ましくは、目的種は本質的な均質に精製され(汚染物質種は従来の検出方法で組成物において検出されることができない)、組成物は本質的に単一の高分子種からなる。

10

【0242】

「患者」という用語は、ヒトおよび獣医学的対象を含む。

【0243】

「抗体依存の細胞媒介細胞傷害」および「ADCC」は、IgFc受容体(FcR)を発現する非特異性の細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、好中球、およびマクロファージ)が、標的細胞における結合抗体を認識し、次に標的細胞の溶解を引き起こす細胞性反応を指す。ADCCを媒介する一次細胞であるNK細胞は、FcγRIIIのみを発現するが、単球はFcRI、FcRII、およびFcRIIIを発現する。造血細胞上のFcRs発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)のページ464の表3に要約される。対象の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載されるインビトロADCCアッセイ等を実施することができる。かかるアッセイの有用なエフェクター細胞は、末梢血単核球(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞を含む。代わりに、またはさらに、対象の分子のADCC活性は、例えばClynes et al. PNAS (USA) 95: 652-656 (1988)に開示される動物モデル等においてインビボで評価され得る。「補体依存性細胞傷害」および「CDC」は、抗体が殺細胞機能を実施するメカニズムを指す。それは、補体の第1成分の抗生物質C1qと、抗原と複合したIgs、IgG、またはIgMのFcドメインとの結合によって開始される(Hughes-Jones, N. C., and B. Gardner. 1979. Mol. Immunol. 16: 697)。C1qは、大きく、70 μg/mLの濃度でヒト血清において存在する約410 kDaの複雑な構造を持つ糖タンパク質である(Cooper, N. R. 1985. Adv. Immunol. 37: 151)。2つのセリンプロテアーゼC1rおよびC1sと共に、C1qは補体の第1の成分である複合体C1を形成する。C1qのN末端球状頭部の少なくとも2つは、C1活性化のため、したがって補体カスケードの開始のためにIgsのFcと結合されなければならない(Cooper, N. R. 1985. Adv. Immunol. 37: 151)。

20

30

40

【0244】

本明細書に使用される「抗体半減期」という用語は、抗体分子の投与後の平均生存期間の単位である抗体の薬物動態特性を意味する。抗体半減期は、例えば血清または血漿において測定して(すなわち循環半減期)または他の組織において、患者の体または特定の部分から免疫グロブリンの既知量の50%を排除するために必要な時間として表現され得る。半減期は、1つの免疫グロブリンまたは免疫グロブリンのクラスによって異なる。一

50

般的には、抗体半減期における増加は、投与された抗体に対する循環における平均滞留時間（MRT）の増加を引き起こす。

【0245】

「アイソタイプ」という用語は、抗体の重鎖または軽鎖の定常領域の分類を指す。抗体の定常ドメインは、抗原との結合に関与しないが、様々なエフェクター機能を示す。重鎖定常領域のアミノ酸配列に依存して、所与のヒト抗体または免疫グロブリンは、免疫グロブリンの5つの主要クラス、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMのうちの1つに割り当てることができる。これらのクラスのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えばIgG1（1）、IgG2（2）、IgG3（3）、およびIgG4（4）、ならびにIgA1およびIgA2にさらに分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常領域は、それぞれ、  
、  
、  
、  
、  
およびμと称される。免疫グロブリンの異なるクラスの構造および三次元配置は、よく知られている。様々なヒト免疫グロブリンのクラスのうち、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、およびIgMのみが補体を活性化することで知られている。ヒトIgG1およびIgG3は、ヒトにおいて媒介することで知られている。ヒト軽鎖定常領域は、  
、  
およびの2つの主要クラスに分類され得る。

10

【0246】

所望する場合、CD105と特異的に結合する抗体のアイソタイプは、例えば異なるアイソタイプの生物の性質を活用するために、切り替えることができる。例えば状況次第で、CD105に対する治療抗体として抗体の生成に関連して、抗体が補体に結合することおよび補体依存性細胞傷害（CDC）に関与することができることが望ましい場合がある。限定なしに以下を含むその能力を有する抗体のアイソタイプが多く存在する：マウスIgM、マウスIgG2a、マウスIgG2b、マウスIgG3、ヒトIgM、ヒトIgA、ヒトIgG1、およびヒトIgG3。他の実施形態において、CD105に対抗する治療抗体として抗体の生成に関連して、抗体がエフェクター細胞上のFc受容体に結合することおよび抗体依存性細胞傷害（ADCC）に関与することができることが望ましい場合がある。限定なしに以下を含むその能力を有する抗体のアイソタイプが多く存在する：マウスIgG2a、マウスIgG2b、マウスIgG3、ヒトIgG1、およびヒトIgG3。生成される抗体は最初はかかるアイソタイプを持つ必要がなく、むしろ生成される抗体は任意のアイソタイプを持つことができ、抗体は当業者によく知られている従来の技術を使用してその後アイソタイプ切り替えができることが理解されるであろう。特にかかる技術は、直接組換え技術の使用を含む（例えば米国特許第4,816,397号を参照）、細胞間融合技術（例えば米国特許第5,916,771号および第6,207,418号）。

20

30

【0247】

一例として、本明細書で論じられる抗CD105抗体は、完全ヒト抗体である。抗体が所望のCD105への結合を持つ場合、（抗体の特異性および親和性のいくつかを定義する）同じ可変領域を持ちながら、ヒトIgM、ヒトIgG1、またはヒトIgG3アイソタイプを生成するために容易にアイソタイプ切り替えをすることができるであろう。かかる分子は、補体を修理することおよびCDCに関与することができ、および/またはエフェクター細胞にFc受容体を結合することおよびADCCに関与することが可能であろう。

40

【0248】

「全血アッセイ」は、天然エフェクターの源として未分画血液を使用する。血液は、多核白血球（PMN）および単核球（MNC）等のFcR発現細胞エフェクターとともに、血漿に補体を含有する。したがって、全血アッセイは、インビトロでの、ADCCおよびCDCエフェクターメカニズム両方の相乗効果の同時評価を可能にする。

【0249】

本明細書で使用される「治療効果のある」量は、対象にとっていくらかの改善または利益を提供する量である。別の言い方をすると、「治療効果のある」量は、少なくとも1つ

50

の臨床症状において、緩和、軽減、および/または低減を提供する量である。本発明の方法で治療され得る疾患と関連する臨床症状は、当業者によく知られている。さらに、当業者は、対象にいくつかの利益が提供される限り、治療効果は完全または治癒するものである必要がないことを理解するであろう。

【0250】

本明細書で使用される「および/または」という用語は、2つの特定の特性または成分の、片方と共にまたは片方なしでの、それぞれの特定の開示としてみなされる。例えば「Aおよび/またはB」は、本明細書において(i)A、(ii)B、ならびに(iii)AおよびBのそれぞれの特定の開示として、それぞれが個別に提示されているかのように、みなされる。

【0251】

抗体構造

基本抗体構造単位は、四量体を含むことで知られている。それぞれの四量体は、2つのポリペプチド鎖の相同対からなり、各対は1つの「軽」(約25kDa)および1つの「重」鎖(約50~70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に關与する約100~110以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシル末端部分は、主にエフェクター機能に關与する定常領域を定義する。ヒト軽鎖は、および軽鎖として分類される。重鎖は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、または $\epsilon$ として分類され、それぞれIgM、IgD、IgA、およびIgEとして抗体のアイソタイプを定義する。軽鎖および重鎖内で、可変および定常領域は、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、約10個以上のアミノ酸の「D」領域も含む。一般的に、Fundamental Immunology Ch.7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))を参照(本明細書においてすべてが参照によって組み込まれる)。それぞれの軽/重鎖の対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。

【0252】

したがって、無傷の抗体は2つの結合部位を有する。二機能性または二重特異性抗体を除いて、2つの結合部位は同一である。

【0253】

すべての鎖はCDRとも称される3つの超可変領域によって結合される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。各対の2つの鎖のCDRは、フレームワーク領域によって整列され、特定のエピトープと結合することを可能にする。N末端からC末端まで、軽鎖および重鎖の両方は、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4のドメインを含む。各ドメインに対するアミノ酸の割り当ては、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))、または Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)、Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989)の定義に従う。

【0254】

二重特異的または二機能性抗体は、2つの異なる重鎖/軽鎖の対および2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。一例を挙げると、本発明の二重特異的抗体は、少なくとも2つの異なるCD105エピトープに対する結合特異性を有する抗体である。本発明のCD105標的結合剤の多くは、異なるエピトープを有する、または異なる部分または重複エピトープを有するため、本発明の二重特異性抗体は、異なるまたは重複するエピトープを有するCD105標的結合剤のいずれかの組み合わせを含むことができることが意図される。例えば、6A6および6B10は、4D4および10C9と異なるエピトープを有する。一例を挙げると、二重特異的抗体は、6A6または6B10の超可変領域、それに対して少なくとも50、60、70、80、または90%の相同性を有する領域、および4D4または10C9の可変または超可変領域、またはそれに対して少な

10

20

30

40

50

くとも50、60、70、80、または90%の相同性を有する領域を有する。

【0255】

二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の結合を含む様々な方法によって産出され得る。例えば、Song sivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315 - 321 (1990), Kostelny et al. J. Immunol. 148: 1547 - 1553 (1992)を参照。二重特異性抗体は、単一の結合部位を有する断片(例えば、Fab、Fab'、およびFv)の形で存在しない。典型的には、抗体抗原結合部位を提供するために、VHドメインはVLドメインと対になるが、単独でVHまたはVLドメインは、抗原を結合するために使用することができる。VHドメイン(表2を参照)は、VLドメイン(表2を参照)と対となり、VHおよびVLドメインの両方を含む抗体抗原結合部位が形成されるようになる。

10

【0256】

典型的には、二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。代表的な二重特異性抗体は、CD105タンパク質の2つの異なるエピトープに結合することができる。他のかかる抗体は、CD105結合部位と別のタンパク質の結合部位とを組み合わせることができる。あるいは、抗CD105のアームは、CD105発現細胞に対して細胞防御メカニズムを集中および局部集中するために、T細胞受容体分子(例えばCD3)、またはFcRI(CD64)、FcRII(CD32)、およびFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)に対するFc受容体等の白血球において分子の誘発と結合するアームと組み合わせることができる。二重特異性抗体は、細胞傷害性薬物を、CD105を発現する細胞に局部集中するためにも使用され得る。これらの抗体は、CD105結合アームおよび細胞傷害性薬物(例えばサポリン、抗インターフェロン-、ピンカルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサート、または放射性同位元素ハプテン)に結合するアームを持つ。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片(例えば、F(ab')<sub>2</sub>二重特異性抗体)として調製され得る。二重特異性抗体の作製方法は、当業者に知られている。(例えば、Millstein et al., Nature, 305: 537 - 539 (1983)、Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655 - 3659 (1991)、Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986)、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547 - 1553 (1992)、Hollinger et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 (1993)、Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994)、米国特許第4,474,893号、第4,714,681号、第4,925,648号、第5,573,920号、第5,601,81号、第5,731,168号、第4,676,980号、第5,897,861号、第5,660,827号、第5,811,267号、第5,849,877号、第5,948,647号、第5,959,084号、第6,106,833号、第6,143,873号、および第4,676,980号、WO第94/04690号、およびWO第92/20373号を参照。)

20

30

40

【0257】

全長二重特異性抗体の従来産出は、2つの免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の対の同時発現に基づいているが、2つの鎖は異なる特異性を有する(Millstein et al., Nature, 305: 537 - 539 (1983))。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の無作為な類別のため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10個の異なる抗体分子の潜在的な混合物を産出し、そのうち1個のみが正確な二重特異的構造を有する。通常は親和性クロマトグラフィーの工程によって行われる正確な分子の精製は、かなり厄介であり、製品収率は低い。同様の手順は、WO第93/08829号、およびTraunecker et al., EMBO J., 10: 3655 - 3659 (1991)に開示される。

50

## 【0258】

異なるアプローチによると、所望の結合特異性を含む抗体可変ドメイン（抗体抗原結合部位）は、免疫グロブリンの定常ドメイン配列と融合される。好ましくは、ヒンジC<sub>H</sub>2、およびC<sub>H</sub>3領域の少なくとも一部を含むIg重鎖の定常ドメインと融合される。少なくとも1つの融合に存在する、軽鎖結合のために必要な部位を含有する第1の重鎖の定常領域（C<sub>H</sub>1）を有することが好ましい。免疫グロブリンの重鎖融合をコードするDNA、および、必要に応じて、免疫グロブリンの軽鎖が、別々の発現ベクターに挿入され、適切な宿主細胞にコトランスフェクトされる。構築において使用される3つのポリペプチド鎖の不等率が、所望の二重特異的抗体の最適生産量を提供する場合、これは実施形態における3つのポリペプチド断片の相互の割合を調整する中でより大きな柔軟性を提供する。しかし等比の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収率を生じる場合、または比率が所望の鎖状結合の産出率において大きな影響を与えない場合、2つまたは3つのポリペプチド鎖のすべてに対してのコード配列を単一発現ベクターに挿入することが可能である。

10

## 【0259】

このアプローチの一実施形態では、二重特異性抗体は、片方のアームにおける第1の結合特異性を含むハイブリッド免疫グロブリンの重鎖、およびもう一方のアームにおける（第2の結合特異性を提供する）ハイブリッド免疫グロブリンの重鎖 - 軽鎖対からなる。二重特異性分子の半分のみにおける免疫グロブリンの軽鎖の存在が分離の安易な方法を提供するため、この非対称構造は、所望されない免疫グロブリン鎖状結合からの所望の二重特異的化合物の分離を容易にすることができる。二重特異性抗体の生成のさらなる詳細は、例えばSuresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照。

20

## 【0260】

米国特許第5,731,168号に記載される別のアプローチによると、抗体分子の対の間のインターフェースは、組換え細胞培養から回収されるヘテロ二量体の割合を最大にするために操作され得る。好ましいインターフェースは、少なくともC<sub>H</sub>3ドメインの一部を含む。この方法では、第1の抗体分子のインターフェースからの1つ以上の小さいアミノ酸の側鎖が、より大きい側鎖と置き換えられる（例えば、チロシンまたはトリプトファン）。大きい側鎖に対して同一または同様のサイズの代償性の「腔」は、大きいアミノ酸の側鎖を小さいもの（例えば、アラニンまたはトレオニン）と置き換えることによって、第2の抗体分子のインターフェースにおいて作製される。これは、他の不要なホモ二量体等の最終産物上のヘテロ二量体の収率を増加するためのメカニズムを提供する。

30

## 【0261】

二重特異性抗体は、交差結合または「ヘテロ複合体」の抗体を含む。例えば、ヘテロ複合体における抗体のうちの1つは、アビジンと、他方はビオチンと複合することができる。かかる抗体は、例えば不要細胞に対して免疫細胞を標的にすること（米国特許第4,676,980号）、およびHIV感染の治療のために（米国特許第5,897,861号）提案されている。ヘテロ複合体の抗体は、任意の架橋法を使用して作製され得る。適切な架橋剤は、当業者によく知られていて、多くの架橋技術と共に、米国特許第4,676,980号に開示される。

40

## 【0262】

抗体断片から二重特異性抗体を生成するための技術も、文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は化学結合を使用して調合され得る。Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)は、無傷抗体が、タンパク分解で分割されて、F(ab)<sub>2</sub>断片を生成する手順を記載している。これらの断片は、近接のジチオールを安定するおよび分子間のジスルフィド形成を防止するために、ジチオール錯体形成剤、亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元される。生成されるFab断片は、チオニトロ安息香酸(TNB)の誘導体に変換される。Fab-TNB誘導体のうちの1つは、メルカプトエチルアミンで還元することで、Fab-チオールに変換され、他のFab-T

50

NB誘導体の等モル量と混合されて、二重特異的抗体が形成される。産出された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用することができる。

#### 【0263】

最近の進歩は、二重特異性抗体を形成するために化学的に複合化することができる、大腸菌からのFab-SH断片の直接回収を容易にしている。Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は、完全ヒト化の二重特異的抗体F(ab)<sub>2</sub>分子の産出を記載する。それぞれのFab断片は、大腸菌から別々に分泌され、インビトロで定向化学結合に供し、二重特異的抗体を形成した。このようにして形成された二重特異的抗体は、ErbB2受容体過剰発現する細胞および正常ヒトT細胞に結合することができ、ならびにヒト乳腺腫瘍標的に対してヒト細胞傷害性リンパ球の溶解作用を引き起こすことができた。

10

#### 【0264】

組換え細胞培養から直接二重特異的抗体の断片を作製し単離するための様々な技術も、記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して産出されている。Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)。FosおよびJuntanパク質からのロイシンジッパーペプチドが、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のFab部分と結び付けられた。抗体ホモ二量体は、ヒンジ領域において還元されてモノマーを形成し、再酸化して抗体のヘテロ二量体を形成した。この方法は、抗体のホモ二量体の産出に対して利用することもできる。

Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)に記載された「二重特異性抗体」技術は、二重特異的抗体の断片を作製するための別のメカニズムを提供した。断片は、同じ鎖における2つのドメイン間で対にすることを許すには短すぎる、リンカーによってV<sub>L</sub>に連結されているV<sub>H</sub>を含む。したがって、1つの断片のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインは、別の断片の相補的なV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>ドメインと強制的に対にされ、それにより2つの抗原結合部位を形成する。一本鎖Fv(sFv)二量体の使用によって、二重特異的抗体の断片を作製するための別の戦略も報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994)および米国特許第5,591,828号、第4,946,778号、第5,455,030号、および第5,869,620号を参照。

20

#### 【0265】

##### ヒト抗体および抗体のヒト化

ヒト抗体は、マウスまたはラット可変および/または定常領域を持つ、抗体に関連する問題のいくつかを避ける。かかるマウスまたはラット由来のタンパク質の存在は、抗体の迅速除去を引き起こし得、または患者による抗体に対する免疫反応の生成を引き起こし得る。マウスまたはラット由来の抗体の利用を避けるために、げっ歯類、他の哺乳動物または動物が完全ヒト抗体を産出するように、完全ヒト抗体はげっ歯類、他の哺乳動物または動物への機能的ヒト抗体の遺伝子座の導入を通して生成され得る。

30

#### 【0266】

完全ヒト抗体を生成するための1つの方法は、ヒト重鎖遺伝子座およびカッパ軽鎖遺伝子座の、最大1000kbサイズまでであるがそれ未満の生殖系列形成された断片を含有するように操作されたマウスのXenomouse(登録商標)株の使用を通してである。Mendez et al. Nature Genetics 15: 146-156 (1997)およびGreen and Jakobovits J. Exp. Med. 188: 483-495 (1998)を参照。Xenomouse(登録商標)株は、Amgen, Inc.より入手できる(Fremont, California, U.S.A.)。

40

#### 【0267】

かかるマウスは、ヒト免疫グロブリン分子および抗体を産出することができ、マウス免疫グロブリン分子および抗体の産出ができない。それを達成するために利用する技術は、1996年12月3日に出願された米国特許出願第08/759,620号、および19

50

98年6月11日に公開された国際特許出願WO第98/24893号、および2000年12月21日に公開されたWO第00/76310号に開示され、それらの開示は本明細書に参照により組み込まれる。開示が、本明細書に参照と組み込まれるMendez et al. Nature Genetics 15:146-156(1997)も参照。

【0268】

マウスのXenomouse(登録商標)株の産出は、1990年1月12日に出願された米国特許出願第07/466,008号、1990年11月8日に出願された第07/610,515号、1992年7月24日に出願された第07/919,297号、1992年7月30日に出願された第07/922,649号、1993年3月15日に出願された第08/031,801号、1993年8月27日に出願された第08/112,848号、1994年4月28日に出願された第08/234,145号、1995年1月20日に出願された第08/376,279号、1995年4月27日に出願された第08/430,938号、1995年6月5日に出願された第08/464,584号、1995年6月5日に出願された第08/464,582号、1995年6月5日に出願された第08/463,191号、1995年6月5日に出願された第08/462,837号、1995年6月5日に出願された第08/486,853号、1995年6月5日に出願された第08/486,857号、1995年6月5日に出願された第08/486,859号、1995年6月5日に出願された第08/462,5131996年10月2日に出願された第08/724,752号、1996年12月3日に出願された第08/759,620号、2001年11月30日に出願された米国公開第2003/0093820号および米国特許第6,162,963号、第6,150,584号、第6,114,598号、第6,075,181号、および第5,939,598号、および日本特許第3068180B2号、第3068506B2号、および第3068507B2号にさらに論じられ、描写される。1996年6月12日に付与が公開された欧州特許EP第0463151B1号、1994年2月3日に公開された国際特許出願WO第94/02602号、1996年10月31日に公開された国際特許出願WO第96/34096号、1998年6月11日に公開されたWO第98/24893号、2000年12月21日に公開されたWO第00/76310号も参照。上記の特許、出願、および参照のそれぞれの開示は、本明細書にすべてが参照により組み込まれる。

【0269】

代替アプローチでは、GenPharm International, Inc.を含む他のものは、「ミニ遺伝子座」アプローチを利用している。ミニ遺伝子座アプローチでは、外因性Ig遺伝子座が、Ig遺伝子座から断片の(個々の遺伝子)包含を通して擬態される。したがって、1つ以上のV<sub>H</sub>遺伝子、1つ以上のD<sub>H</sub>遺伝子、1つ以上のJ<sub>H</sub>遺伝子、μ定常領域、および通常は第2の定常領域(好ましくは定常領域)は、動物に挿入するためにコンストラクトに形成される。このアプローチは、Surani et al. に対して米国特許第5,545,807号、それぞれLonbergおよびKayに対しての米国特許第5,545,806号、第5,625,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,661,016号、第5,770,429号、第5,789,650号、第5,814,318号、第5,877,397号、第5,874,299号、および第6,255,458号、KrimpenfortおよびBernseachに対しての米国特許第5,591,669号、および第6,023,010号、Berns et al. に対しての第5,612,205号、第5,721,367号、第5,789,215号、およびChoiおよびDunnに対しての米国特許第5,643,763号、および1990年8月29日に出願されたGenPharm International米国特許出願第07/574,748号、1990年8月31日に出願された第07/575,962号、1991年12月17日に出願された第07/810,279号、1992年3月18日に出願された第07/853,408号、1

992年6月23日に出願された第07/904,068号、1992年12月16日に出願された第07/990,860号、1993年4月26日に出願された第08/053,131号、1993年7月22日に出願された第08/096,762号、1993年11月18日に出願された第08/155,301号、1993年12月3日に出願された第08/161,739号、1993年12月10日に出願された第08/165,699号、1994年3月9日に出願された第08/209,741号に記載され、開示は本明細書で参照により組み込まれる。欧州特許第0546073B1号、国際特許出願WO第92/03918号、WO第92/22645号、WO第92/22647号、WO第92/22670号、WO第93/12227号、WO第94/00569号、WO第94/25585号、WO第96/14436号、WO第97/13852号、およびWO第98/24884号、および米国特許第5,981,175号もさらに参照し、これらの開示は参照によりすべて本明細書に組み込まれる。Taylor et al., 1992、Chen et al., 1993、Tuailon et al., 1993、Choi et al., 1993、Lonberg et al., (1994)、Taylor et al., (1994)、およびTuailon et al., (1995)、Fishwild et al., (1996)をさらに参照し、これらの開示は参照によってすべて本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0270】

Kirinは、染色体の大部分、または染色体のすべてが微小核体融合によって導入されたマウスからのヒト抗体の生成を示した。欧州特許出願第773288号、および第843961号を参照、これらの開示は本明細書で参照により組み込まれる。さらに、KirinのTcマウスをMedarexのミニ遺伝子座(Humab)マウスと異種交配させて生まれたKM(登録商標)-マウスが、生成されている。これらのマウスは、KirinマウスのヒトIgH導入染色体およびGenpharmマウスの鎖導入遺伝子を有する(Ishida et al., Cloning Stem Cells, (2002)4:91-102)。

20

#### 【0271】

ヒト抗体は、インビトロ方法によっても得ることができる。適切な例は、ファージディスプレイ(Medimmune、Morphosys、Dyax、Biosite/Medarex、Xoma、Symphogen、Alexion(以前はProliferon)、Affimed)、リボソームディスプレイ(Medimmune)、イーストディスプレイ等を含むがこれに限定されない。

30

#### 【0272】

##### 抗体の調製

本明細書に記載される抗体は、以下に記載されるXenoMouse(登録商標)技術の利用によって調製された。かかるマウスは、ヒト免疫グロブリン分子および抗体を産出することができ、マウス免疫グロブリン分子および抗体の産出ができない。それを達成するために利用される技術は、本明細書の背景の節に開示される特許、出願、および参照に開示される。しかし具体的には、マウスおよびそこから抗体の遺伝子導入産出の好ましい実施形態は、1996年12月3日に出願された米国特許出願第08/759,620号、および1998年6月11日に公開された国際特許出願WO第98/24893号、および2000年12月21日に公開されたWO第00/76310号に開示され、これらの開示は本明細書で参照により組み込まれる。Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156(1997)を参照、これらの開示は本明細書に参照により組み込まれる。

40

#### 【0273】

かかる技術の使用によって、様々な抗原に対する完全ヒトモノクローナル抗体が、産出されている。基本的には、XenoMouse(登録商標)株のマウスが、対象の抗原(例えばCD105)で免疫され、(B細胞等の)リンパ細胞が過免疫マウスから回収され、回収されたリンパ球は、骨髓型の細胞株と融合されて、不死化ハイブリドーマ細胞株を

50

調製する。これらのハイブリドーマ細胞株は、対象の抗原に特異的な抗体を産出したハイブリドーマ細胞株を同定するために、スクリーニングされ、選択される。本明細書では、CD105に特異的な抗体を産出する複数のハイブリドーマ細胞株の産出方法を提供する。さらに本明細書では、かかる抗体の重鎖および軽鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列解析を含むかかる細胞株によって産出された抗体の特性評価を提供する。

#### 【0274】

あるいは、ハイブリドーマを精製するために骨髓腫細胞と融合する代わりに、B細胞を直接アッセイすることができる。例えば、CD19+B細胞は、過免疫Xenomouse（登録商標）マウスから単離することができ、抗体を分泌する血漿細胞へ増殖および分化させることができる。細胞上清からの抗体は、CD105免疫原に対する反応性についてELISAによってスクリーニングされる。上清は、CD105上の、対象機能のドメインへの結合に対して異なる抗体をさらにマッピングするために、CD105の断片に対する免疫反応性についてスクリーニングすることができる。抗体は他の関係したヒトエンドグリコシダーゼについて、およびCD105の相同分子種であるラット、マウス、およびカニクイザル等の非ヒト霊長類に対してスクリーニングすることができ、最後のものは、種の交差反応を決定するためである。対象の抗体を含有するウェルからのB細胞を、個々のまたは貯蔵されたウェルのいずれかからハイブリドーマを作製するための融合を含む様々な方法によって、またはEBVの感染もしくは既知の不死化遺伝子による形質移入によって、次いで適切な培地に植えることによって、不死化することができる。あるいは、所望の特異性で抗体を分泌する単一血漿細胞は、CD105特異的溶血ブランクアッセイを使用して単離される（例えばBabcock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48 (1996)を参照）。溶解を標的とした細胞は、好ましくはCD105抗原で覆われているヒツジ赤血球(SRBC)である。

10

20

#### 【0275】

対象の免疫グロブリンおよび補体を分泌する血漿細胞を含有するB細胞培養の存在下での、ブランクの形成は対象の血漿細胞を取り囲むヒツジ赤血球の特定のCD105媒介溶解を示す。ブランクの中心における単一の抗原特異的血漿細胞は、単離することができ、抗体の特異性をコードする遺伝子情報が、単一の血漿細胞から単離される。逆転写の後にPCR(RT-PCR)を使用して、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域をコードするDNAをクローンすることができる。かかるクローン化されたDNAは、適切な発現ベクター、好ましくはpcDNA等のベクターカセット、より好ましくは免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の定常ドメインを含有するようなpcDNAベクターにさらに挿入され得る。生成されたベクターは、宿主細胞、例えばHEK293細胞、CHO細胞に、トランスフェクトされ、転写の融合、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために、適切に修飾された従来の栄養培地において培養することができる。

30

#### 【0276】

CD105に特異的に結合する抗体が、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株で発現され得ることを理解されるであろう。特定の抗体をコードする配列を、適切な哺乳動物の宿主細胞を形質転換するために使用することができる。形質転換は、例えばウイルスに（またはウイルスベクターに）ポリヌクレオチドをパッケージし、ウイルス（またはベクター）で宿主細胞を形成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既知の方法であることができ、または（特許が本明細書で参照によって組み込まれている）米国特許第4,399,216号、第4,912,040号、第4,740,461号、および第4,959,455号に例示される当業者に知られている形質移入手順であることができる。使用される形質転換の手順は、形質転換される宿主に依存する。異種性ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための方法は、当業者によく知られており、デキストラン媒介した形質移入、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介した形質移入、原形質融合、電気穿孔、リポソームにおけるポリヌクレオチドの被包、および核へのDNAの直接微量注入を含む。

40

#### 【0277】

50

発現のための宿主として使用できる哺乳動物細胞株は、当業者によく知られており、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な多くの不死化細胞株を含み、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 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)、ヒト上皮腎臓 293 細胞、および多くの他の細胞株を含むがこれに限定されない。特に好適な細胞株は、どの細胞株が高い発現量を有し、恒常的 CD105 結合特性を含む抗体を産出するか決定して選択される。

【0278】

細胞間の融合技術において、骨髓腫、CHO 細胞または他の細胞株は任意の所望のアイソタイプを含む重鎖を持つように調製され、別の骨髓腫、CHO 細胞または他の細胞株は軽鎖を持つように調製される。その後かかる細胞は融合され、無傷抗体を発現する細胞株を単離することができる。

10

【0279】

したがって、抗体の候補は、上記に論じたように所望の「構造的な」性状を満たすように生成されると、一般的にそれらは、アイソタイプ切り替えによって所望の「機能的な」性状の少なくとも確信とともに提供され得る。

【0280】

治療のための投与および製剤

本発明の実施形態は、疾患の治療として有用である抗 CD105 抗体の無菌の医療製剤を含む。かかる処方は、天然 CD105 特異的リガンド、例えば TGF- 等の CD105 への結合を阻害し、それにより例えば血清または組織 CD105 発現が異常に上昇される病態を効果的に治療するであろう。抗 CD105 抗体は、好ましくは例えば TGF- 等の天然 CD105 特異的リガンドを強く阻害するように適切な親和性を持ち、好ましくはヒトにおいて低頻度の投与を可能とするように適切な作用の持続時間を有する。作用の長期持続時間は、皮下または筋肉注射等の代替の非経口経路による少ない頻度およびより便利な服薬スケジュールを可能にするであろう。

20

【0281】

無菌製剤は、凍結乾燥および抗体の再構成前または後に、例えば無菌ろ過膜を通してろ過することによって作製され得る。抗体は、通常、凍結乾燥した形態または溶液で保存される。治療抗体組成物は、一般的に無菌のアクセスポートを有する容器、例えば皮下注射針で穴を開けることができるストッパー等の製剤の取り出しを可能にするアダプターを有する静脈注射用の溶液袋またはバイアル中に配置される。

30

【0282】

抗体投与の経路は、既知の方法、例えば静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼球内、動脈内、くも膜下、吸入、または病巣内経路による注射または注入、腫瘍部位に直接注射、または以下に記載される徐放システムに従う。抗体は、好ましくは注入、またはボラス注射によって継続して投与される。

【0283】

治療的に利用される抗体の有効量は、例えば治療目的、投与の経路、および患者の状態に依存する。したがって、治療専門家は、最適な治療効果を得るために、必要であれば、用量を滴定し投与の経路を修正することが好ましい。典型的には、臨床医は、用量が所望の効果を達成するまで抗体を投与する。この治療の進捗は、従来のアッセイによって、または本明細書に記載されるアッセイによって、簡単に観察される。

40

【0284】

本明細書に記載される抗体は、薬剤として許容できる担体との混合物において調製され得る。この治療組成物は、静脈内、または鼻もしくは肺を通して、好ましくは液体もしくは (凍結乾燥された) 粉末エアロゾルとして投与され得る。組成物は、必要に応じて非経口でまたは皮下に投与される。全身的に投与される場合、治療組成物は無菌であり、発熱物質が含まれず、pH、等張性、および安定性を十分顧慮する、非経口的に許容できる溶液の中にあるべきである。この条件は、当業者に知られている。簡潔に述べると、本明細

50

書に記載される化合物の投与製剤は、所望の純度を有する化合物を、薬剤として許容される担体、賦形剤、または安定剤と混合することによって、保存または投与するために調製される。かかる物質は、用量および利用される濃度においてレシピエントに対して非毒性であり、TRIS HCl、リン酸塩、クエン酸、酢酸、および他の有機酸性塩等の緩衝液、アスコルビン酸等の抗酸化物、ポリアルギニン等の低分子量（約10残基未満）のペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質、ポリビニルピロリドン等の親水性のポリマー、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、またはアルギニン等のアミノ酸、セルロースまたはその誘導体、ブドウ糖、マンノース、またはデキストリンを含む単糖、二糖、および他の炭水化物、EDTA等のキレート剤、マンニトールまたはソルビトール等の糖アルコール、ナトリウム等の対イオンおよび/またはTWEEN、PLURONICS、またはポリエチレングリコール等の非イオン界面活性剤を含む。

10

## 【0285】

注射のための無菌組成物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>th</sup> ed, Lippincott Williams & Wilkens Publishers (2003))に記載されるように従来の薬務に従って処方され得る。例えば、水、またはゴマ、ピーナッツ、もしくは綿実油等の自然発生の植物油、またはオレイン酸エチル等の合成脂肪質の媒体等の薬剤として許容される担体中で活性化化合物の溶解または懸濁が所望であり得る。緩衝液、防腐剤、抗酸化物等を、認められた薬務に従って組み込まれることができる。

20

## 【0286】

持続放出製剤の適切な例は、ポリペプチドを含有する固形疎水性ポリマーの半透性のマトリクスであって、そのマトリクスが造形品、フィルム、マイクロカプセルの形であるものを含む。半透性のマトリクスの例は、Langer et al., J. Biomed Mater. Res., (1981) 15: 167-277およびLanger, Chem. Tech., (1982) 12: 98-105に記載されるようにポリエステル、ヒドロゲル（例えばポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリル酸)またはポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、EP58,481）、L-グルタミン酸およびエチル-L-グルタミン酸塩のコポリマー（Sidman et al., Biopolymers, (1983) 22: 547-556）、非分解性のエチレン酢酸ビニル（Langer et al., supra）、LUPRON Depot（登録商標）等の分解性乳酸グリコール酸のコポリマー（乳酸グリコール酸コポリマーおよびリュプロリド酢酸塩からなる注射用微粒子）、およびポリ-D-( )-3-ヒドロキシ酪酸（EP133,988）を含む。

30

## 【0287】

エチレンビニル酢酸および乳酸グリコール酸等のポリマーは100日以上にわたって分子を放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルは短い期間タンパク質を放出する。内包されたタンパク質が体内に長時間残る場合、それらは37°Cにおける水分の暴露により変性するまたは凝集し得、生物活性の損失および免疫原性の変化の可能性がある。合理的な戦略を、関与するメカニズムに依存して、タンパク質の安定のために考案することができる。例えば凝集メカニズムがジスルフィド交換による分子間のS-S結合形成であることが見出された場合、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分含量を制御し、適切な添加剤を使用し、特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成することができる。

40

## 【0288】

持続放出される組成物は、懸濁液において結晶を維持することができる適切な製剤に懸濁している抗体の結晶の調製物も含む。これらの調製物は、皮下にまたは腹腔内に注入された時に持続放出効果を産出することができる。他の組成物は、リボソーム捕捉（liposomally entrapped）抗体も含む。かかる抗体を含有するリボソームは、本来知られている方法で調製される。米国特許DE第3,218,121号、Eps

50

tein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82:3688-3692、Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77:4030-4034、EP 52,322、EP 36,676、EP 88,046、EP 143,949、142,641、日本特許出願第83-118008、米国特許第4,485,045、および第4,544,545号、およびEP102,324を参照。

【0289】

ある患者に対する抗体製剤の用量は、担当医師によって、疾患の重症度および種類、体重、性別、食生活、時間および投与の経路、他の投与中の薬剤および他の関連臨床要因を含む、薬物の作用を変更することが知られている様々な要因を考慮して、決定される。治療効果のある用量は、インピトロまたはインピボ方法のいずれによっても決定され得る。

10

【0290】

本明細書に記載される治療的に利用される抗体の有効量は、例えば治療目的、投与の経路、および患者の状態に依存する。したがって、治療専門家は、最適な治療効果を得るために、必要であれば、用量を滴定し投与の経路を修正することが好ましい。典型的な1日の服用量は、上記の要因によって、患者の体重1kgあたり、約0.0001mg/kg、0.001mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg、1mg/kg、10mg/kgから100mg/kg、1000mg/kg、10000mg/kg以上までにわたる可能性がある。用量は、上記の要因に依存して、患者の体重1kgあたり、0.0001mg/kg~20mg/kg、0.0001mg/kg~10mg/kg、0.0001mg/kg~5mg/kg、0.0001~2mg/kg、0.0001~1mg/kg、0.0001mg/kg~0.75mg/kg、0.0001mg/kg~0.5mg/kg、0.0001mg/kg~0.25mg/kg、0.0001~0.15mg/kg、0.0001~0.10mg/kg、0.001~0.5mg/kg、0.01~0.25mg/kg、または0.01~0.10mg/kgであることができる。典型的には、臨床医は所望の効果を達成する用量に達するまで治療抗体を投与する。この療法の進捗は、従来のアッセイによって、または本明細書に記載されるアッセイによって、簡単に観察される。

20

【0291】

本発明の抗体の用量は、繰り返すことができ、投与間に、少なくとも1日、2日、3日、5日、10日、15日、30日、45日、2ヶ月、75日、3ヶ月、または少なくとも6ヶ月の間を置くことができる。

30

【0292】

本明細書における組成物および方法に従った治療物質の投与は、改善された伝達、送達、耐性等を提供するために、製剤に組み込まれる適切な担体、賦形剤、および他の薬剤とともに投与されることが理解されるであろう。これらの製剤は、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油、脂質、(Lipofectin(登録商標)等の)小胞を含有する(陽イオン性または陰イオン性)脂質、DNA複合体、無水吸収ペースト、水中油および油中水乳濁液、乳濁液カーボワックス(様々な分子量のポリエチレングリコール)、半固体のジェル、およびカーボワックスを含有する半固体の混合物を含む。前述の混合物のいずれも、製剤における活性成分が製剤によって不活性化されず、製剤は生理的に適合性を有し、投与の経路で許容できるという条件で、本発明に従う治療および療法において適切であり得る。Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2):210-8(2000)、Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60(2000)、Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery - some emerging conce

40

50

pts" J Pharm Sci . 89 ( 8 ) : 967 - 78 ( 2000 )、Powell et al . " Compendium of excipients for parenteral formulations " PDA J Pharm Sci Technol . 52 : 238 - 311 ( 1998 )、および薬剤師によく知られている製剤、賦形剤、および担体に関する追加情報に対するそれらの中の引用を参照。

#### 【0293】

##### 他の治療法のデザインおよび生成

本発明に従って、およびCD105について本明細書において産出され特徴付けられた抗体の活性に基づいて、抗体部分を越える他の治療様式のデザインが容易にされる。かかる様式は、二重特異性抗体、抗毒素、および放射標識治療等の進化した抗体治療法、単一ドメイン抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、またはdAb等の抗体断片、ペプチド治療の生成、新規骨格におけるCD105結合ドメイン、遺伝子治療、特に細胞内抗体、アンチセンス治療、および小分子を含むがこれらに限定されない。

10

#### 【0294】

抗原結合部位は、フィブロネクチンまたはシトクロムB等の非抗体タンパク質の骨格におけるCDRの配置によって(Haan & Maggos (2004) BioCentury, 12(5): A1-A6、Koide et al. (1998) Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151、Nygren et al. (1997) Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469)、または所望の標的に対する結合特異性を与えるようにタンパク質の骨格内のループのアミノ酸残基をランダム化するまたは突然変異することで、提供され得る。タンパク質において新しい結合部位を操作するための骨格は、Nygren et al. (Nygren et al. (1997) Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469)によって詳細に考察されている。抗体模倣物のためのタンパク質の骨格は、発明者が少なくとも1つのランダム化されたループを有するフィブロネクチンタイプI I Iドメインを含むタンパク質(抗体模倣物)を説明する、本明細書に参照により全体が組み込まれているWO/第0034784号に開示される。1つ以上のCDR、例えば一組のHC DRが移植される適切な骨格は、免疫グロブリン遺伝子のスーパーファミリーの任意のドメインメンバーによって提供され得る。骨格は、ヒトまたは非ヒトタンパク質であることができる。非抗体タンパク質の骨組の強みは、少なくともいくつかの抗体分子よりも小さい、および/または製造が容易な骨格分子において抗原-結合部位が提供されることである。結合メンバーの小さなサイズは、細胞に進入する、組織に深く浸透する、または他の構造内の標的に到達する、または標的抗原のタンパク質の腔内で結合することができる能力等の有用な生理学的性質を付与し得る。非抗体タンパク質の骨格における抗原結合部位の使用は、Wess, 2004 (Wess, L. In: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004)によって概説されている。典型的には、安定した骨格を有するタンパク質であり、1つ以上のループのアミノ酸配列の可変ループは、標的抗原に結合する抗原結合部位を作るために特異的またはランダムに突然変異される。かかるタンパク質は、黄色ブドウ球菌からのAタンパク質のIgG結合ドメイン、トランスフェリン、アルブミン、テトラネクチン、フィブロネクチン(例えば10thフィブロネクチンタイプI I Iドメイン)、リポカリン、ならびに結晶性および他のAffilin(登録商標)の骨格(Scil Proteins)を含む。他のアプローチの例は、分子内のジスルフィド結合を有するタンパク質であるサイクロチドに基づく合成の「微小体」、マイクロタンパク質(Versabodies(登録商標)、Amunix)、およびアンキリンリピートタンパク質(DARpins、Molecular Partners)を含む。

20

30

40

#### 【0295】

抗体配列および/または抗原結合部位に加えて、本発明による標的結合剤は、例えば、

50

折りたたんだドメイン等の例えばペプチドまたはポリペプチドを形成する、または抗原と結合する能力に加えて分子に別の機能的特徴を与える、他のアミノ酸を含むことができる。本発明の標的結合剤は、検出可能標識を保有することができる、または毒素または標的的部分または酵素に（例えばペプチジル結合またはリンカーを通して）複合化され得る。例えば、標的結合剤は（例えば酵素ドメインにおいて）触媒部位、ならびに抗原結合部位を含むことができ、そこでは、抗原結合部位は抗原と結合し、したがって、抗原に対して触媒部位を標的にする。触媒部位は、例えば開裂によって、抗原の生物学的機能を阻害することができる。

【0296】

進化した抗体治療の生成に関連して、補体結合が望ましい属性の場合、例えば二重特異性抗体、抗毒素、または放射標識を使用して細胞を殺滅するための補体への依存を避けることが可能である。

【0297】

例えば、二重特異性抗体は、(i)複合体にされた、1つはCD105に対して特異性を有し、もう1つは第2の分子に対する特異性を有する2つの抗体、(ii)CD105に対して特異的な1つの鎖および第2の分子に対して特異的な第2の鎖を有する単一抗体、または(iii)CD105および他の分子に対して特異性を有する一本鎖の抗体を含むように生成され得る。かかる二重特異性抗体は、よく知られている技術を使用して生成され得る。例えば(i)および(ii)に関しては、Fanger et al. Immunol Methods 4:72-81 (1994)およびWright and Harris (上記)、(iii)に関しては、例えば参照Trauneker et al. Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992)を参照。それぞれの場合、第2の特異性は、CD16またはCD64（例えばDeo et al. Immunol. Today 18:127 (1997)を参照）またはCD89（例えばValerius et al. Blood 90:4485-4492 (1997)を参照）を含むがこれに限定されない重鎖活性化受容体に対して作製され得る。

【0298】

抗体は、当業者によく知られている技術を利用して、抗毒素として働くために修飾され得る。例えばVitetta Immunol Today 14:252 (1993)を参照。米国特許第5,194,594号も参照。放射標識された抗体の調製に関連して、かかる修飾された抗体は、当業者によく知られている技術を利用して容易に調製することもできる。例えばJunghans et al. in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))を参照。米国特許第4,681,581号、第4,735,210号、第5,101,827号、第5,102,990号(RE35,500)、第5,648,471号、および第5,697,902号も参照。それぞれの抗毒素、または放射標識された分子は、おそらく所望の多量体酵素サブユニットオリゴマー化ドメインを発現する細胞を殺滅するであろう。

【0299】

抗体が薬剤（例えば放射性同位体、医薬組成物、または毒素）に連結される場合、薬剤は、有糸分裂阻害、アルキル化、代謝拮抗、抗血管新生、アポトーシス性、アルカロイド、COX-2、および抗菌剤、およびその組み合わせの群から選択される薬剤学的性質を持つことが意図される。薬物は、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、スルホン酸アルキル、ニトロソウレア、トリアゼン、葉酸類似体、アントラサイクリン、タキサン、COX-2阻害剤、ピリミジン類似体、プリン類似体、代謝拮抗、抗生物質、酵素、エピポドフィロトキシン、白金配位複合体、ピンカルカロイド、置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制薬、拮抗薬、エンドスタチン、タキソール、カンプトテシン、オキサリプラチン、ドキソルピシン、および類似体、およびその組み合わせの群から選択することができる。

10

20

30

40

50

## 【0300】

ある特定の例では、本発明の標的薬剤は、治療薬または毒素、例えばカリチアマイシンおよびエスペラマイシン等のエンジインファミリー分子のメンバーに複合化される。化学的毒素は、デュオカルマイシン（米国特許第5,703,080号、第4,923,990号）、メトトレキサート、ドキシソルピシン、メルファラン、クロラムブシル、ARA-C、ビンデシン、マイトマイシンC、シスプラチン、エトポシド、プレオマイシン、および5-フルオロウラシルからなる群から採用することができる。化学療法剤の例は、アドリアマイシン、ドキシソルピシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド（Ara-C）、シクロホスファミド、チオテパ、タキソテル（ドセタキセル）、プスルファン、サイトキシン、タキソール、メトトレキサート、シスプラチン、メルファラン、ピンブラスチン、プレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ピノレルピン、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン、（米国特許第4,675,187号）、メルファラン、および他の関係するナイトロジェンマスタードも、含む。

10

## 【0301】

特定の実施形態において、本発明の標的薬剤は、細胞分裂停止、細胞傷害性、または免疫抑制剤に複合化される。一実施形態において、細胞傷害性薬物は、エンジン、レキシトロブシン、デュオカルマイシン、タキサン、クリプトフィジン、バッカチン誘導体、ポドフィロトキシン、ピューロマイシン、ドラスタチン、マイタンシノイド、ドラスタチン、およびピンカルカロイドからなる群から選択される。具体的な実施形態において、細胞傷害性薬物は、パクリタキセル、ドセタキセル、CC-1065、トリコテン、SN-38、トポテカン、モルフォリノ-ドキシソルピシン、リゾキシシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、ドラスタチン-10、エキノマイシン、コンプレタスタチン、カリチアマイシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビンデシン、ピノレルピン、VP-16、カンプトテシン、エピチロンA、エピチロンB、ノコダゾール、コイチシン、コルシミド、エストラムスチン、セマドチン、ディスコデルモリド、エリユテロピン、マイタンシンDM-1、アウリスタチンE、AEB、AEVB、AEFP、MMAE、またはネトロブシン（米国特許第2005/0238649号）、およびそれらの誘導体である。

20

## 【0302】

特定の他の実施形態において、細胞毒性剤は、マイタンシンまたはマイタンシノイド、およびその誘導体であり、本発明の標的薬剤は1つ以上のマイタンシノイド分子と複合化される。マイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。マイタンシンは、最初に東アフリカの低木 *Maytenus serrata*（米国特許第3,896,111号）から単離された。その後、ある微生物がマイタンシノールおよびC-3マイタンシノールエステル等のマイタンシノイドも産出することが発見された（米国特許第4,151,042号）。合成マイタンシノールおよび誘導体およびそれらの類似体は、例えば米国特許第4,137,230号、第4,248,870号、第4,256,746号、第4,260,608号、第4,265,814号、第4,294,757号、第4,307,016号、第4,308,268号、第4,308,269号、第4,309,428号、第4,313,946号、第4,315,929号、第4,317,821号、第4,322,348号、第4,331,598号、第4,361,650号、第4,364,866号、第4,424,219号、第4,450,254号、第4,362,663号、および第4,371,533号に開示される。それらの治療指数を改善する試みで、マイタンシンおよびマイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体に複合化されている。マイタンシノイドを含有する免疫複合体およびそれらの治療上の使用は、例えば米国特許第5,208,020号、第5,416,064号、および欧州特許EP第0425235B1号に開示される。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) は、ヒト結腸直腸癌に向けられたモノクローナル抗体C242と

30

40

50

結合したDM1と命名されたマイタンシノイドを含む免疫複合体を記載する。その複合体は、培養された結腸癌細胞に対して高く細胞傷害性であること、およびインビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍性活性を示すことが分かった。Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992)は、マイタンシノイドが、ヒト結腸癌細胞株において抗原と結合するマウス抗体A7と、またはHER-2/neu癌遺伝子と結合する別のマウスモノクローナル抗体TA.1と、ジスルフィドリンカーを通して複合化された免疫複合体を記載する。TA.1-マイタンシノイド複合体の細胞毒性は、1細胞につき $3 \times 10^5$  HER-2の表面抗原を発現するヒト乳癌細胞株SK-BR-3においてインビトロで試験された。この薬物複合体は、遊離マイタンシノイド薬剤と同様の細胞毒素の程度を達成し、抗体分子ごとのマイタンシノイド分子の数を増加することによって増加させることが可能であった。A7マイタンシノイド複合体は、マウスにおいて低い全身性細胞毒素を示した。したがって、本発明は、ある癌の治療のためのマイタンシノイド薬剤と複合化される標的薬剤を意図する。

### 【0303】

特定の他の実施形態において、対象とする別の免疫複合体は、1つ以上のカリチアマイシン分子と複合化される本発明の標的薬剤を含む。カリチアマイシンファミリーの抗菌物質は、サブピコモル濃度において二本鎖のDNA切断を産出することができる。カリチアマイシンファミリーの複合体の調製については、米国特許第5,712,374号、第5,714,586号、第5,739,116号、第5,767,285号、第5,770,701号、第5,770,710号、第5,773,001号、第5,877,296号(すべてAmerican Cyanamid Company)を参照。使用することができるカリチアマイシンの構造的類似体は、 $1^I$ 、 $2^I$ 、 $3^I$ 、N-アセチル- $1^I$ 、PSAGおよび $1^I$ を含むがこれに限定されない(Hinman et al. Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al. Cancer Research 58:2925-2928 (1998)および前述のAmerican Cyanamidに付与された米国特許)。抗体が複合化され得る別の抗腫瘍剤は、抗葉酸剤であるQFAである。カリチアマイシンおよびQFAの両方は、作用の細胞内部位を有し、細胞膜を容易に越えることはない。したがって、抗体を媒介した内部移行によるこれらの薬剤の細胞取り込みは、それらの細胞傷害性の効果を非常に高める。

### 【0304】

本発明の免疫複合体において使用できる他の毒素は、毒レクチン、リシン、アブリン、モデシン、ボツリヌス、およびジフテリア毒素等の植物毒素を含む。もちろん、様々な毒素の組み合わせを、1つの抗体分子と組み合わせることができ、それによって、可変細胞毒素を提供する。本発明の併用療法において適切に利用される毒素の実例は、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼI、ブドウ球菌エンテロトキシンA、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素、およびシュードモナスエンドトキシンである。例えばPastan et al., Cell, 47:641 (1986)、およびGoldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians, 44:43 (1994)を参照。使用することができる酵素的に活発な毒素およびその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖(緑膿菌から)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ニガウリ阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテシンを含む。

### 【0305】

適切な毒素および化学療法剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co., 1995)、およびGoodman And Gilman's The Pharma

10

20

30

40

50

col o g i c a l B a s i s o f T h e r a p e u t i c s , 7 t h E d . ( M a c M i l l a n P u b l i s h i n g C o . 1 9 8 5 ) に記載される。他の適切な毒素および/または化学療法剤は、当業者に知られている。

【0306】

放射性同位体の例は、局在化および/またはセラピーに使用され得る 放出体、陽電子放出体、およびX線放出体、および療法に使用され得る 放出体および 放出体を含む。診断、予後、およびステージ分類に対して有用な前に記載した放射性同位体は、治療にも有用である。

【0307】

抗癌または抗白血病薬剤の限定されない例は、ドキソルピシン(アドリアマイシン)、ダウノルピシン(ダウノマイシン)、イダルピシン、デトルピシン、カルミノマイシン、エピルピシン、エソルピシン、およびモルフォリノ等のアントラサイクリン、ならびに置換誘導体、それらの組み合わせおよび修飾を含む。例示的な医薬品は、シスプラチン、タキソール、カリチアマイシン、ピンクリスチン、シタラピン(Ara-C)、シクロホスファミド、プレドニゾン、ダウノルピシン、イダルピシン、フルダラビン、クロラムブシル、インターフェロン、ヒドロキシウレア、テモゾロマイド、サリドマイド、およびブレオマイシン、および誘導体、それらの組み合わせおよび修飾を含む。好ましくは、抗癌または抗白血病は、ドキソルピシン、モルフォリノドキソルピシン、またはモルフォリノダウノルピシンである。

【0308】

本発明の抗体は、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、未修飾抗体のものを超える半減期(例えば、血清半減期)を有する抗体も包含する。該抗体半減期は、約15日を超える、約20日を超える、約25日を超える、約30日を超える、約35日を超える、約40日を超える、約45日を超える、約2ヶ月を超える、約3ヶ月を超える、約4ヶ月を超える、または約5ヶ月を超えることができる。哺乳動物、好ましくはヒトにおける、本発明の抗体またはその断片の増加した半減期は、哺乳動物における該抗体または抗体断片の高い血清力価を生じ、したがって、該抗体または抗体断片の投与の頻度を低減し、および/または投与される該抗体または抗体断片の濃度を低減する。インビボ半減期を増加した抗体またはその断片は、当業者に知られている技術によって生成され得る。例えば、増加したインビボ半減期を有する抗体またはその断片は、FcドメインおよびFcRn受容体の間の相互作用に關与するとして同定されたアミノ酸残基を修飾する(例えば、置換する、欠失させる、または付加する)ことによって生成され得る(例えば、本明細書に参照によって全体が組み込まれている国際公開WO第97/34631号およびWO第02/060919号を参照)。増加したインビボ半減期を有する抗体またはその断片は、高分子量のポリエチレングリコール(PEG)等のポリマー分子を該抗体または抗体断片に結合させることによって生成され得る。PEGは、多機能リンカーの有無にかかわらず、該抗体または抗体断片のNもしくはC末端に対するPEGの部位特異的な複合化を通してまたはリジン残基に存在するアミノ基を通して、該抗体または抗体断片に結合され得る。生物活性の最小の損失を生じる線状または分岐ポリマー誘導体化が使用される。複合度は、抗体とPEG分子との適切な複合を確かにするため、SDS-PAGEおよび質量分析によって厳重に監視される。未反応PEGは、例えば、サイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィーによって抗体PEG複合体から分離され得る。

【0309】

上記の実施形態において、当業者によって理解されるように、親和性の値は重要であり得るが、抗体の特定の機能によっては、他の要因も同様にまたはそれ以上に重要であり得る。例えば、抗毒素(抗体に関連する毒素)に対して、標的と抗体と結合の作用は有用であるが、いくつかの実施形態において、所望の最終結果は、細胞への毒素の内部移行である。したがって、高率の内部移行を有するかかる抗体が、これらの状況において望ましい。したがって、一実施形態において、内部移行における高効率を有する抗体が意図される。内部移行の高効率は、内部移行された抗体率として測定することができ、低値から10

10

20

30

40

50

0%までであることができる。例えば、様々の実施形態で、0.1~5、5~10、10~20、20~30、30~40、40~45、45~50、50~60、60~70、70~80、80~90、90~99、および99~100%が、高効率であり得る。当業者に理解されるように、所望の効率は、例えば関連する薬剤、1つの範囲に投与可能な抗体の量、抗体薬剤の複合体の副作用、治療される問題の種類（例えば癌の種類）および重症度に依存して、異なる実施形態においては異なり得る。

#### 【0310】

他の実施形態において、本明細書に開示される抗体は、CD105の発現における変化に関連する疾患または障害に対してスクリーニングするために、哺乳類の組織または細胞におけるCD105発現の検出のためのアッセイキットを提供する。そのキットは、CD105と結合する抗体および存在する場合、抗原との抗体の反応を示すための手段を含む。

10

#### 【0311】

##### 組み合わせ

本明細書に定義される標的結合剤または抗体は、単独の療法として適用され得るか、または本発明の化合物に加えて、従来の手術または放射線治療または化学療法を伴うことができる。かかる化学療法は、以下の抗腫瘍剤のカテゴリーうちの1つ以上を含むことができる。

#### 【0312】

(i) アルキル化剤（例えばシスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、テモゾロマイド、およびニトロソウレア）、代謝拮抗剤（例えばフロロピリミジン様5フルオロウラシルおよびテガフル等のゲムシタピンおよび抗葉酸剤、ラルチトレキセド、メトトレキサート、シトシンアラビノシド、ならびにヒドロキシウレア）、抗腫瘍性抗生物質（例えばアントラサイクリン様アドリアマイシン、ブレオマイシン、ドキシソルピシン、ダウノマイシン、エビルピシン、イダルピシン、マイトマイシンC、ダクチノマイシンおよびミトラマイシン）、有糸分裂阻害剤（例えばピンカアルカロイド様ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシンおよびビノレルピンおよびタキソイド様タキソールおよびタキソテルおよびポロキナーゼ阻害剤）、ならびにトポイソメラーゼ阻害剤（例えばエピポドフィロトキシン様エトポシドおよびテニポシド、アムサクリン、トポテカンおよびカンプトテシン）等の内科的腫瘍学において使用される、他の抗増殖/抗悪性腫瘍剤およびその組み合わせ、

20

30

(ii) 抗エストロゲン剤（例えばタモキシフェン、フルベストラント、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロキシフェン、およびヨードキシフェン）、抗アンドロゲン（例えばピカルタミド、フルタミド、ニルタミド、および酢酸シプロテロン）、LHRH拮抗薬またはLHRHアゴニスト（例えばゴセレリン、リュープロレリン、およびブセレリン）、プロゲステゲン（例えば酢酸メゲストロール）、アロマターゼ阻害剤（例えばアナストロゾール、レトロゾール、ボラゾールおよびエキセメスタン）、ならびにフィナステライド等の5-レダクターゼの阻害剤等の細胞分裂停止剤、

(iii) 抗浸潤剤（例えばc-Srcキナーゼファミリー阻害剤様4-(6-クロロ-2,3-メチレンジオキシアニリノ)-7-[2-(4-メチルピペラジン-1-イル)エトキシ]-5-テトラヒドロピラン-4-イルオキシキナゾリン(AZD0530、国際特許出願WO第01/94341号)およびN-(2-クロロ-6-メチルフェニル)-2-{6-[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル]-2-メチルピリミジン-4-イルアミノ}チアゾール-5-カルボキサミド(dasatinib, BMS-354825; J. Med. Chem., 2004, 47, 6658-6661)、ならびにメタロプロテイナーゼ阻害剤様マリマスタット、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体機能の阻害剤、またはカテプシンの阻害剤、セリンプロテアーゼの阻害剤、例えばマトリプターゼ、ヘプシン、ウロキナーゼ、ヘパラナーゼの阻害剤)、

40

(iv) フルダラビン、2-クロロデオキシアデノシン、クロラムブシルまたはドキシ

50

ルピシンおよびその組み合わせ、例えばフルダラビン+シクロホスファミド、CVP：シクロホスファミド+ビンクリスチン+プレドニゾン、ACVBP：ドキシソルピシン+シクロホスファミド+ビンデシン+プレオマイシン+プレドニゾン、CHOP：シクロホスファミド+ドキシソルピシン+ビンクリスチン+プレドニゾン、CNOP：シクロホスファミド+ミトキサントロン+ビンクリスチン+プレドニゾン、m-BACOD：メトトレキサート+プレオマイシン+ドキシソルピシン+シクロホスファミド+ビンクリスチン+デキサメタゾン+ロイコボリン、MACOP-B：メトトレキサート+ドキシソルピシン+シクロホスファミド+ビンクリスチン+プレドニゾン固定用量+プレオマイシン+ロイコボリン、またはProMACE-CytaBOM：プレドニゾン+ドキシソルピシン+シクロホスファミド+エトポシド+シタラビン+プレオマイシン+ビンクリスチン+メトトレキサート+ロイコボリン等の等の細胞傷害性薬物、

(v) 成長因子機能の阻害剤、例えばかかる阻害剤は、成長因子抗体および成長因子受容体抗体（例えば抗erbB2抗体トラスツズマブ[Herceptin（登録商標）]、抗EGFR抗体パニツムマブ、抗erbB1抗体セツキシマブ[Erbbitux、C225]およびStern et al. Critical reviews in oncology/hematology, 2005, Vol. 54, pp 11-29）に開示される任意の成長因子または成長因子受容体抗体を含み、かかる阻害剤は、チロシンキナーゼ阻害剤、例えば上皮性成長因子ファミリーの阻害剤（例えばN-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-メトキシ-6-(3-モルホリノプロポキシ)キナゾリン-4-アミン(ゲフィチニブ、ZD1839)、N-(3-エチニルフェニル)-6、7-bis(2-メトキシエトキシ)キナゾリン-4-アミン(エルロチニブ、OSI-774)および6-アクリルアミド-N-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-(3-モルホリノプロポキシ)-キナゾリン-4-アミン(CI1033)等のRas/Rafシグナル伝達阻害剤等のEGFRファミリーチロシンキナーゼ阻害剤、ラパチニブ等のerbB2チロシンキナーゼ阻害剤、肝細胞成長因子ファミリーの阻害剤、イマチニブ等の血小板由来の成長因子ファミリーの阻害剤、セリン/トレオニンキナーゼの阻害剤（例えばファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、例えばソラフェニブ(BAY43-9006)）、MEKおよび/またはAKTキナーゼを通して細胞シグナリングの阻害剤、肝細胞成長因子ファミリーの阻害剤、c-kit阻害剤、ablキナーゼ阻害剤、IGF受容体(インスリン様成長因子)キナーゼ阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤(例えばAZD1152、PH739358、VX-680、MLN8054、R763、MP235、MP529、VX-528、およびAX39459)、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、CDK2および/またはCDK4阻害剤、ならびにBcl-2、Bcl-XL、例えばABT-737等の生存シグナル伝達タンパク質の阻害剤も含む。

#### 【0313】

(vi) 例えば血管内皮成長因子の効果を阻害する[例えば抗血管内皮細胞成長因子抗体ババシズマブ(Avastin(登録商標))、スニチニブリンゴ酸塩(Sunitinib(登録商標))、ソラフェニブ(Nexavar(登録商標))および4-(4-臭素-2-フルオロアニリノ)-6-メトキシ-7-(1-メチルピペリジン-4-イルメトキシ)キナゾリン(ZD6474、WO第01/32651号内の実施例2)、4-(4-フルオロ-2-メチルインドール-5-イルオキシ)-6-メトキシ-7-(3-ピロリジン-1-イルプロポキシ)キナゾリン(AZD2171、WO第00/47212号内の実施例240)、パタラニブ(PTK787、WO第98/35985号)およびSU11248(スニチニブ、WO第01/60814)等のVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤、国際特許出願WO第97/22596号、WO第97/30035号、WO第97/32856号、WO第98/13354号、WO第00/47212号、およびWO第01/32651号に開示される化合物、ならびに他のメカニズムによって働く化合物(例えばリノマイド、インテグリンv3機能の阻害剤、およびアンジオスタチン)]またはコロニー刺激要因1(CSF1)もしくはCSF1受容体の効果を阻害するものなどの、抗血管新生剤、

10

20

30

40

50

(vii) コンプレタスタチンA4、および国際特許出願WO第99/02166号、WO第00/40529号、WO第00/41669号、WO第01/92224号、WO第02/04434号およびWO第02/08213号に開示される化合物等の血管損傷剤、

(viii) アンチセンス療法、例えば抗bc12アンチセンスであるG-3139(ゲナセンス)等の、上で列挙した標的に向けられたもの、

(ix) 例えば異常p53または異常BRCA1またはBRCA2等の異常遺伝子を置換するアプローチ、シトシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼ、または細胞ニトロレダクターゼ酵素を使用したもの等のGDEPT(遺伝子指向性酵素プロドラッグ療法)アプローチ、多剤耐性遺伝子セラピー等の、化学療法または放射線治療への患者の耐性を増加するためのアプローチを含む遺伝子セラピーアプローチ、ならびに

(x) 例えばCD52に向けられたモノクローナル抗体であるアレムツズマブ(campath-1H(登録商標))での治療、またはCD22に向けられた抗体での治療、患者の腫瘍細胞の免疫原性を増加するエクスピボおよびインピボアプローチ、インターロイキン2、インターロイキン4、または顆粒球-マクロファージコロニー刺激要因等のサイトカインでの形質移入、CTLA-4機能を阻害するモノクローナル抗体での治療等のT細胞アネルギーを減らすためのアプローチ、サイトカインをトランスフェクトした樹枝状細胞等のトランスフェクトされた免疫細胞を使用したアプローチ、サイトカイントランスフェクトされた腫瘍細胞株を使用したアプローチ、および抗イディオタイプ抗体を使用したアプローチを含む免疫療法アプローチ、

(xi) ベルケード(ボルテゾミド)等のプロテアソーム阻害剤等のタンパク質分解の阻害剤、

(xii) 例えば、受容体リガンドを隔離する、受容体と結合するリガンドを遮断する、または受容体シグナリング(例えば、増強された受容体分解または低下した発現量による)を減らす(抗体または可溶性外部受容体ドメイン構造等の)ペプチドまたはタンパク質を使用する生物学的治療アプローチ。

#### 【0314】

一実施形態において、本明細書で定義される抗腫瘍治療は、本発明の化合物に加えて、アルキル化剤(例えばシスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、テモゾロマイド、およびニトロソウレア)、代謝拮抗剤(例えばフロロピリミジン様5フルオロウラシルおよびテガフル等のゲムシタピンおよび抗葉酸剤、ラルチトレキセド、メトトレキサート、シトシンアラビノシド、ならびにヒドロキシウレア)、抗腫瘍抗生物質(例えばアントラサイクリン様アドリアマイシン、プレオマイシン、ドキシソルピシン、ダウノマイシン、エピルピシン、イダルピシン、マイトマイシンC、ダクチノマイシンおよびミトラマイシン)、有糸分裂阻害剤(例えばピンカアルカロイド様ピンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンおよびピノレルピンおよびタキソイド様タキソールおよびタキソテルおよびポロキナーゼ阻害剤)、ならびにトポイソメラーゼ阻害剤(例えばエピボドフィロトキシシン様エトポシドおよびテニポシド、アムサクリン、トポテカンおよびカンプトテシン)等の内科的腫瘍学で使用される他の抗増殖/抗悪性腫瘍剤およびその組み合わせでの治療を含むことができる。

#### 【0315】

一実施形態において、本明細書に定義される抗腫瘍治療は、本発明の化合物に追加して、ゲムシタピンでの治療を含むことができる。

#### 【0316】

かかる組み合わせ治療は、治療の個々の構成要素の同時、順次、または分離投与方法で達成され得る。かかる併用製品は、本明細書に記載される用量の範囲内の、本発明の化合物またはその薬剤として許容される塩、および許容できる用量の範囲内の他の薬剤を使用する。

#### 【実施例】

## 【0317】

実施した実験、および得た結果を含む以下の実施例を例証目的のみのために提供し、これらは本明細書の教示にたいして限定すると解釈されるものではない。

## 【実施例1】

## 【0318】

免疫化および力価決定

細胞および形質移入

マウスプレB細胞株B300-19を、10%ウシ胎仔血清、50 $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、100U/mLペニシリン、および100 $\mu$ g/mLストレプトマイシンを含有するRPMI1640培地において培養した。HEK293F細胞を、10%FBS、2mMのL-グルタミン、50 $\mu$ MのBME、100単位のペニシリン $g/mL$ 、100単位のMCGストレプトマイシン $/mL$ を追加したDMEM/F12(50/50混合)培地で成長させた。ヒトCD105発現プラスミドを、製造者の指示に従って、リポフェクタミン2000試薬(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用してHEK293FまたはB300-19細胞にトランスフェクトした。形質移入が48時間進行した後、2週間の1mg/mL G418(Invitrogen, Carlsbad, CA)による選択を行った。安定したG418耐性クローンを、一次マウス抗ヒトCD105モノクローナル抗体で染色し、FACSで解析した。B300-19安定形質移入体を、免疫化のために使用したが、HEK293F安定形質移入体は、スクリーニングのために使用した。

10

20

## 【0319】

免疫化

免疫化を組換え可溶性CD105(R&D Systems、カタログ番号1097-EN-025/CF)、またはヒトCD105を発現する安定的にトランスフェクトされたB300-19細胞を使用して実施した。

## 【0320】

組換え可溶性CD105での免疫化のためには、XenoMouse(登録商標)株XM3B3L3:IgG1KLおよびXM3C1L3:IgG4KLを使用して、可溶性タンパク質の10 $\mu$ g/マウスを初期の追加免疫において提供した後、次の追加免疫において5 $\mu$ g/マウスを続けた。ヒトCD105を安定的に発現するB300-19形質移入体細胞を使用する免疫化のためには、モノクローナル抗体を、XenoMouse(登録商標)マウス株XM3C1L3:IgG4KLおよびXM2L3:IgG2KLを順次免疫化することによって開発した。XenoMouse動物を、すべての注射について、足蹠経路を通して従来の手段によって免疫化した。それぞれの注射の総容積は、1マウスにつき50 $\mu$ l、1足蹠につき25 $\mu$ lであった。

30

## 【0321】

免疫化は、開示が本明細書に参照により組み込まれる1996年12月3日に出願された米国特許出願第08/759,620号、および1999年6月11日に公開された国際特許出願WO第98/24893号および2000年12月21日に公開されたWO第00/76310号に開示される方法に準じて実施された。免疫化プログラムを、表3に要約する。

40

## 【0322】

力価による収集のための動物の選択

ヒトCD105に対する抗体の力価を、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を使用した天然抗原結合のためのFACS染色によって試験した。免疫化プログラムの最後に、融合を、実施例2に記載される電気穿孔によって、マウス骨髓腫細胞および脾臓から単離されたリンパ球および免疫化したマウスのリンパ節を使用して実施した。

【表 3】

## 免疫化プログラムの要約

キャンペーン	群	免疫原	株	マウスの数	免疫化経路
1	1	組換え可溶性 CD105(R&D Systems: カタ ログ #:1097-EN-025 /CF)	IgG1	10	足蹠、2回/週、x4週間
1	1	組換え可溶性 CD105(R&D Systems: カタ ログ #:1097-EN-025 /CF)	IgG4	10	足蹠、2回/週、x4週間
2	2	B300.19/ ヒト CD105	IgG2	10	IP/尾/BIP、2回/週、x8 週間、その後、IP/尾 /BIP、1回/隔週、x6週間
2	2	B300.19/ ヒト CD105	IgG4	10	IP/尾/BIP、2回/週、x8 週間、その後、IP/尾 /BIP、1回/隔週、x6週間

「IP」は、「腹腔内」を指す。

「BIP」は「尾基部/腹腔内」を指す。

## 【実施例 2】

## 【0323】

リンパ球の回収、B細胞の単離、融合、およびハイブリドーマの生成  
免疫化したマウスを、頸椎脱臼によって屠殺し、流入領域リンパ節を収集し、それぞれの  
コホートからプールした。このプログラムのために4回収集を実施した。

## 【0324】

リンパ球系細胞を、DMEM中で粉碎して、組織から細胞を除去することにより解離し  
、細胞をDMEMに懸濁させた。細胞を数え、1億個のリンパ球につき0.9mLのDM  
EMを細胞ペレットに追加して、細胞を静かではあるが、完全に再懸濁させた。1億個の  
細胞につき100 $\mu$ LのCD90+電磁ビーズを使用して、細胞を15分間4において  
電磁ビーズと細胞をインキュベートすることによって標識した。最大10<sup>8</sup>個の陽性細胞  
(または最大2 $\times$ 10<sup>9</sup>個の全ての細胞)含有する磁気標識された細胞懸濁液を、LS+  
カラムおよびDMEMで洗浄されたカラムに充填した。総流出液を、CD90陰性画分と  
して収集した(これらの細胞の大半はB細胞と予想された)。

## 【0325】

融合をATCC、カタログ番号CRL1580(Kearney et al, J. I  
mmunol. 123, 1979, 1548-1550)より購入した非分泌性骨髓腫P  
3X63Ag8.653細胞を、洗浄されて濃縮されたDay6のB細胞と1対4の比率  
で、混合することによって実施した。細胞混合物を、静かに4分間400 $\times$ gで遠心分離  
することによってペレット化した。容器を傾けて上清を移した後、静かに1mLピペット  
を使用して細胞を混ぜた。予熱したPEG(10<sup>6</sup>個のB-細胞につき1mL)を1分に  
わたって、静かにかき混ぜながらゆっくり加えた後、1分間混合した。予熱したIDME  
M(10<sup>6</sup>個のB-細胞につき2mL)を2分にわたって、静かにかき混ぜながら加えた

。最後に予熱したIDMEM(10<sup>6</sup>個のB-細胞につき8mL)を3分にわたって加えた。

#### 【0326】

融合した細胞を6分間400xgで沈降させ、10<sup>6</sup>個のB-細胞につき20mLの選択培地(DMEM(Invitrogen)、L-グルタミン、pen/strep、MEM非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、2-メルカプトエタノール(すべてInvitrogenから)、HA-アザセリンヒポキサンチン、およびOPI(オキサロ酢酸、ピルビン酸塩、ウシインシュリン)(両方ともSigmaから)およびIL-6(Boehringer Mannheim)で補充した15%FBS(Hyclone)に再懸濁した。細胞を20~30分37℃にてインキュベートし、200mLの選択培地において再懸濁し、T175フラスコにおいて3~4日間培養した。

10

#### 【0327】

融合後3日目に、細胞を収集し、8分間400xgで沈降させ、10<sup>6</sup>個の融合したB細胞につき10mLの選択培地において再懸濁した。ハイブリドーマ集団のFACS解析を実施し、細胞を次に凍らした。

#### 【0328】

ハイブリドーマを選択培地において日常的に増殖させた。抗ヒトCD105抗体を潜在的に産出するハイブリドーマから収集された全部の上清を次のスクリーニングアッセイに供した。

#### 【実施例3】

20

#### 【0329】

FMATおよびFACSによる候補抗体の選択

培養の14日後、ハイブリドーマ上清を蛍光微量アッセイ技術(FMAT)によってCD105特異的抗体についてスクリーニングした。ハイブリドーマ上清を、ヒトCD105を安定的に発現するHEK293F形質移入体細胞に対してスクリーニングを行い、親HEK293F細胞に対して逆スクリーニングを行った。

#### 【0330】

(一次スクリーニングに基づく)CD105陽性ハイブリドーマ細胞からの培養上清を除去し、CD105陽性ハイブリドーマ細胞を新鮮なハイブリドーマ培養培地で懸濁し、24ウェルプレートに移した。培地内での2日後、これらの上清を二次確認スクリーニングにおいて評価した。二次確認スクリーニングにおいて、事前に陽性と同定されたものを、抗CD105抗体が完全ヒトであることを確認するために、以下のように、別々に使用した2組あるいは3組の検出抗体を用いて、HUVEC細胞におけるFMATおよび/またはFACSにより、スクリーニングをおこなった: ヒト鎖検出のために1.25μg/mLGAH-Cy5(JIR#109-176-098)、ヒトカップ軽鎖検出のために1.25μg/mLGAH-PE(S.B.#2063-09)、およびヒト軽鎖検出のために1.25μg/mLGAH-PE(S.B.#2073-09)。

30

#### 【0331】

総計824個の完全ヒト抗CD105抗体を、ヒトCD105を安定的に発現するHEK293F形質移入体細胞を使用してFMATで測定される第1のキャンペーンから同定した。第2の免疫化キャンペーンでは、ヒトCD105を安定的に発現するHEK293F形質移入体細胞を使用したFMATで決定して、788個の完全ヒト抗CD105抗体の合計を生成した。両方のキャンペーンについて、抗体を次にHUVEC細胞においてFMATおよび/またはFACSでスクリーニングし、カニクイザルおよびマウスCD105オルソログに対する交差反応を評価した。カニクイザルおよびマウス由来のCD105をクローンし、交差反応調査において使用するために、HEK293F細胞の表面に発現した。カニクイザルおよびマウスに対して交差反応を示す抗体を繰り越し、機能アッセイにおいてさらに評価した。

40

【表 4】

## 完全ヒトCD105特異的モノクローナル抗体

キャンペーン	抗原	FMAT (HEK293/huCD105)	FMAT/FACS (HUVEC細胞)	FMAT/FACS カニクイザル	FMAT/FACS マウス
1	可溶性CD105	824	621	140	9
2	B300.19/huC D105	788	461	416	8

10

## 【実施例 4】

## 【0332】

## 抗増殖活性

HUVEC細胞株において抗増殖活性を示す抗体株をスクリーニングおよび同定するため、Almar Blueアッセイを実施した。手短に言えば、HUVEC細胞をCambrex Corp. から入手し、0.5% FBSを補充したEGM2培地において維持した。細胞を96ウェルプレートにおいて、1000細胞/ウェル(90 $\mu$ l/ウェル)の濃度で播いた。細胞を37 $^{\circ}$ Cおよび5%CO<sub>2</sub>で、72時間インキュベートした。抗体を添加後72時間でアッセイを終了し、Almar Blueアッセイを実施した。細胞を50 $\mu$ g/mLの濃度の抗体で処理した。処理試料の生存率の決定は、標準試料(すなわち処置なし)100%生存可能に正規化することに基づいた。

20

## 【0333】

解析は、抗CD105抗体ハイブリドーマ株の大半が抗増殖活性を示さなかったことを明らかにした。図1に示すように、キャンペーン1から、2つのハイブリドーマを同定し、4.120および4.37と命名したが、それらは、50 $\mu$ g/mLの抗体濃度において細胞増殖の顕著な阻害を示した。

30

## 【0334】

キャンペーン2について、8つの追加株を同定し増殖アッセイにて調査した。図2および表5に示すように、細胞増殖の阻害は、平均8%から20%の範囲であった。

## 【表 5】

mAb	抑制率 実験 1	抑制率 実験 2	抑制率 実験 3	抑制率 実験 4	抑制率 実験 5	抑制率 実験 6	抑制率 実験 7	抑制率 実験 8	抑制率 平均	標準偏差
4D4.1	22.18	27	16	14.83	14.81	29.15	16.8	18.31	19.9	5.61
6A6.2	9.57	28.26	21.12	21.6	15.33	20.52	19.38	18.4	19.27	5.37
6B1.1	13.14	-4.12	15.47	5.27	9.05	7.33	11.74	6.07	7.99	6.05
6B10.1	14.05	21.56	17.58	10.85	8.66	10.88	5.1	11.98	12.58	5.15
11H2.1	14.24	32.05	11.7	25.22	16.9	11.64	20.8	4.11	17.09	8.78
9H10.2	21.41	27.47	11.02	28.09	11.85	16.87	17.22	12.98	18.36	6.72
3C1.1	14.51	25.31	5.6	22.8	11.26	15.37	19.62	10.03	15.56	6.69
10C9.2	11.2	8.36	1.63	15.46	11.41	14.49	0.31	3.54	8.3	5.84

40

## 【実施例 5】

## 【0335】

## SMAD2リン酸化反応アッセイ

抗CD105抗体がsmad2のリン酸化反応を媒介するか否かを測定するために、s

50

mad2リン酸化反応アッセイを実施した。簡潔に述べると、6ウェルプレートにおいて、1ウェルにつき90,000個のHUVEC細胞を播いた。細胞を、0.5% FBSを補充したEGM2培地において培養した。細胞を増加する抗体の濃度(0.5、1.0、および2.0 μg/mL)で24時間処理した後、ウェスタンブロット分析を行った。ホスホ-smad2の検出を、pSmad2特異抗体(Cell Signaling Cat #3101)を使用して実施した。Smad2の総レベルを、特定のSmad2抗体(Cell Signaling Cat #3102)を使用して検出した。結果は、抗体4.37がsmad2リン酸化反応の用量依存的な阻害を媒介したことを示す。抗体4.120、4D4、6B10、6A6、および9H10に対してこれらの結果を認めた。Smad2のリン酸化反応が内皮細胞の増殖および移動を阻害することが報告されていることに注意することが重要である(Goumans M-J et al., EMBO J 2002; 21:1743-1753)。

10

#### 【実施例6】

##### 【0336】

CD105阻害抗体はインビトロでの管形成を低減する

CD105阻害抗体をインビトロ共培養アッセイにおいて内皮細胞管形成を低減する能力について試験した(TCS Cell Works Cat no. ZHA-1000)。1日目に、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)およびヒト2倍体線維芽細胞を24ウェルプレート内の共培養として得た。CD105遮断抗体を50 μg/mLの抗体濃度で、1日目におよび11日間にわたり一定の間隔で、培養に導入した。培地を4、7、および9日目に補充した。共培養モデルを、(共培養アッセイで供給された)TCS最適化培地または、1%グルタミンおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充した、2%ウシ胎仔血清(FCS)MCD B131培地(以下2%FS MCD B131培地と称する)において維持した。共培養モデルを37で、加湿の5%CO<sub>2</sub>/95%の空気環境にて維持した。

20

##### 【0337】

細管形成を製造者の指示によって細管染色キット(TCS Cell Works Cat no. ZHA-1225)を使用してCD31に対する細管の固定および染色した後、11日目に検査した。簡潔に述べると、細胞を室温(RT)で30分間70%氷冷エタノールで固定した。細胞を遮断し、その後室温にて、60分間抗ヒトCD31で処理した。プレートを洗浄し、室温で60分間アルカリ性ホスファターゼ(AP)と複合化したヤギ抗マウスIgGでおよび処理した。AP複合化した二次抗体と共にインキュベートした後、プレートを洗浄し5-臭素-4-クロロ-3-インドリルリン酸塩/ニトロブルーテトラゾリウム(BCIP/NBT)基質を約10分間添加した。10分間以内の濃い紫色の発生は、細管形成を示した。プレートを次に洗浄し、放置して空気乾燥した。

30

##### 【0338】

細管成長の定量化をZeiss KS400 3.0 Image Analyserを使用して全ウェル画像解析法で実施した。定量化方法で測定された形態学的パラメータは、細管の全長であった。各24ウェル内のすべての細管形成を、エッジ後退アーティファクトを避けるために、100 μmの深さの縁を除いて測定した。

40

##### 【0339】

図3に図示すように、mAb6B10はインビトロで内皮細胞管形成を阻害することに有効であった。この抗体は、アイソタイプ対照と比較して、血管の長さを約24%阻害し、分岐の数を47%阻害した。データは、この抗体が血管新生プロセスをモデルする機能アッセイにおいて活性であることを示す。

#### 【実施例7】

##### 【0340】

アクチン調節アッセイ

キャンペーン1および2の抗CD105抗体のパネルがヒト内皮細胞の細胞骨格構造に影響するか解明するために、アクチン調節アッセイを実施した。手短に言うと、HUV E

50

C細胞を4ウェルchamber slideに播き(40,000細胞/ウェル)、0.5%FBSを補充したEGM2培地において維持した。抗CD105抗体を30 $\mu$ g/mLの抗体濃度で72時間、HUVEC細胞とともにインキュベートした。抗体インキュベーション後、細胞を4%ホルムアルデヒドで10分間固定した後、10分間0.5%Triton X-100で透過化した。透過化後、細胞を室温でAlexa Fluor 488ファロイジン(ファロイジン、Molecular Probes、#A12379)で染色した。細胞を染色後PBSで洗浄し、共焦点顕微鏡を使用して検査した。モノクローナル抗体10C9、3C1、6B1、4.120、4.37、および6B10は、HUVEC細胞におけるアクチン細胞骨格構造の顕著な調節を媒介した。

#### 【実施例8】

##### 【0341】

抗体SN6(HUVECS)と比較したXENOMOUSEモノクローナル抗CD105抗体のエピトープニング

FACSベースのピニング解析を、Xenomouse抗体のパネルが市販のSN6抗体と交差競合するかを解明するために、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において実施した。Seon laboratoryは、先ずSN6抗体を生成し、この抗体は、用量依存的な手法でヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の成長を抑えることが報告されているSN6シリーズと称されるmAbのパネルのうちの一つである(She X et al., Int. J. Cancer, 2004, 108:251-7)。

##### 【0342】

手短に言うと、HUVEC細胞におけるタイトレーション(titration)をFITCで蛍光標識されたSN6抗体(Abcam)で実施した。結合に対するEC<sub>50</sub>濃度は、2 $\mu$ g/mLと決定された。その後、HUVEC細胞を非標識Xenomouse抗CD105mAbのタイトレーションでインキュベートし、洗浄し、そして2 $\mu$ g/mLのSN6抗体でインキュベートした。図4に示すように、SN6抗体の結合率を非標識Xenomouse mAbの5 $\mu$ g/mLの存在下で示す。

##### 【0343】

興味深いことに、抗体6A6および6B10は、SN6結合の顕著な阻害を示し、これらのmAbが同じエピトープに対して競合することを示唆した。他の抗体は、部分的にSN6と競合し、部分的または重複エピトープを示唆した。抗体4D4および10C9は、弱い遮断を示し、これらのmAbがSN6抗体と同じエピトープを共有しない可能性があることを意味する。同様に重要であるが、これらの結果は、このXenomouse抗CD105抗体のパネルは広範なエピトープ特異性を示すことを示唆する。

#### 【実施例9】

##### 【0344】

CD105KI/KOマウスにおけるCOLO205マトリゲルプラグアッセイ

Xenomouse mAbのインビボ活性を試験するために、マトリゲルプラグアッセイを実施した。抗CD105抗体のマウス交差反応の欠如のため、この試験をCD105KI/KO-SCID動物において実施した。

##### 【0345】

手短に述べると、Matrigel(登録商標)と混合した500万個のColo205腫瘍細胞をCD105KI/KO-SCIDマウスに注入した。マウスは、10mpkの抗体用量で腹腔内に抗体治療を週に2回受けた。プラグを8日目に単離し、IHCおよびヘモグロビン量によってCD31発現について解析した。IHC染色を、抗CD31抗体を使用して実施した(BD, Cat 550274)。試料を亜鉛固定剤において固定し、パラフィン遮断に埋め込んだ。組織薄片をVentana automationを使用してCD31抗体で染色した。画像をAperioイメージングシステムを使用してスキャンした。IHC陽性染色を、Aperioカラーデコンボリューションソフトウェアを使用して解析した。

##### 【0346】

10

20

30

40

50

ヘモグロビン量のために、脱イオン水を、プラグの重量(5.0 mL/g)に基づいて、マトリゲル試料チューブに追加した。マトリゲル試料を、Polytronホモジナイザーを使用して均質化した。試料を次に10分間3700 rpmで遠心分離した。上清の一定分量250 µLを同量の2 x Drabkin溶液と混合した。混合物をボルテックスし、再度遠心分離した。この混合物の一定分量200 µLを解析のために96ウェルプレートに蒔いた。吸光度を540 nmで測定した。並行して、標準曲線希釈を1 x Drabkin溶液に中のヘモグロビン標準を使用して実施した。試料濃度を標準曲線から決定した。

#### 【0347】

図5に示すように、この試験の結果は、mAb4D4、6B10、4.120、および4.37がヘモグロビン量の低減を媒介したことを示す。抗体6B10および4.37は、CD31染色(図6)の低減も媒介し、これらの抗体がインビボで抗血管新生活性を示すことを意味する。

10

#### 【実施例10】

#### 【0348】

#### CD105抗体の構造解析

抗体の可変重鎖および可変軽鎖を、DNA配列を決定するために配列決定した。抗CD105抗体の完全な配列情報を、各 および 鎖状結合に対してヌクレオチドおよびアミノ酸配列とともに配列表に提供する。可変重配列をVHファミリー、D領域配列、およびJ領域配列を測定するために解析した。配列を、一次アミノ酸配列を決定するために翻訳し、体細胞超変異を評価するために生殖系列VH、DおよびJ領域配列と比較した。

20

#### 【0349】

表2は抗体重鎖領域と同族の生殖系列重鎖領域とを、および抗体 軽鎖領域と同族生殖細胞系軽鎖領域とを比較する表である。特定の抗体は、アミノ酸レベルで、それぞれの生殖系列配列と異なる場合、抗体配列は生殖系列配列に突然変異することができることも理解されるべきである。かかる補正突然変異は、標準分子生物学的技術を使用して、1、2、3、またはそれ以上の位置、または任意の突然変異した位置の組み合わせで発生することができる。限定されない例として、表5は、4.37の重鎖配列(配列番号26)が、位置31(突然変異1)においてDからSまで、および位置102(突然変異2)においてFからYまで、対応する生殖系列配列(表2参照)と異なることを示す。したがって、4.37の重鎖をコードするアミノ酸またはヌクレオチド配列は、これらの部位のいずれかまたはすべてにおいて修飾され得る。以下の表5~9は、4.37、6B10、4.120の生殖系列からのかかる変動の位置を図示する。各行は、太字で示された位置における、生殖系列および非生殖系列の残基の一意的な組み合わせを表す。

30

#### 【0350】

別の実施形態において、本発明は、本発明の抗体の不均一性に影響する可能性のある配列において任意の構造上の問題点を交換することを含む。かかる問題点は、糖鎖付加部位、不对システイン、表面が露出したメチオニン等を含む。かかる不均一性の危険性を低減するために、かかる構造上の問題点のうちの一つ以上を取り除くために、変更を行うことが提案される。

40

#### 【0351】

本明細書に記載される「最適化した」配列は、非生殖系列配列を一つ以上の残基において生殖系列配列に逆変異し、さらに糖鎖付加部位等の配列から構造上の問題点を取り除くために修飾しうるように、突然変異された、表2に開示される抗体配列である。

#### 【0352】

本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤または抗体は、配列番号26を含む配列を含む。特定の実施形態において、配列番号26は、表5の各行に示す生殖系列および非生殖系列残基の組み合わせのうちの一つを含む。いくつかの実施形態において、配列番号26は、表5に示す生殖系列残基のうちの一つ、いずれか2つ、または2つのすべてを含む。特定の実施形態において、配列番号26は、表5の各行に示す

50

生殖系列および非生殖系列残基の一意的な組み合わせを含む。他の実施形態において、標的結合剤または抗体は、V H 3 - 3 3、D 6 - 1 3、および J H 6 領域を有する生殖系列配列から生じ、1つ以上の残基が、この位置において、対応する生殖系列残基を産出するために突然変異されている。

【表 6】

示された残基番号における生殖系列に対する 4. 3 7 重鎖 (配列番号 2 6)

の例示的な突然変異

31	102
D	F
S	F
D	Y
S	Y

10

【0 3 5 3】

本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤または抗体は、配列番号 2 8 を含む配列を含む。特定の実施形態において、配列番号 2 8 は、表 6 の各行に示す生殖系列および非生殖系列残基の組み合わせのうちのいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態において、配列番号 2 8 は、表 6 に示す生殖系列残基のうちのいずれか 1 つ、いずれか 2 つ、または 2 つ両方、いずれか 3 つ、または 3 つすべてを含む。特定の実施形態において、配列番号 2 8 は、表 6 の各行に示す生殖系列および非生殖系列残基の一意的な組み合わせを含む。他の実施形態において、標的結合剤または抗体は、V K A 3 / A 1 9 および J K 3 領域を有する生殖系列配列から生じ、生殖系列配列 1 つ以上の残基が、この位置において、対応する生殖系列残基を産出するために突然変異されている。

20

【表 7】

示された残基番号における生殖系列に対する 4. 3 7 軽鎖 (配列番号 2 8) の例示的な

突然変異

31	90	95
Y	L	R
H	L	R
Y	V	R
H	V	R
Y	L	Q
H	L	Q
Y	V	Q
H	V	Q

30

40

【0 3 5 4】

本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤または抗体は、配列番号 3 0 を含む配列を含む。特定の実施形態において、配列番号 3 0 は、表 7 の各行に示す生殖系列および非生殖系列残基の組み合わせのうちのいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態において、配列番号 3 0 は、表 7 に示す生殖系列残基のうちのいずれか 1 つ、いずれか 2 つ、いずれか 3 つ、いずれか 4 つ、いずれか 5 つ、いずれか 6 つ、いずれか 7 つ、または 7 つす

50

べてを含む。特定の実施形態において、配列番号30は、表7の各行に示す生殖系列および非生殖系列残基の一意的な組み合わせを含む。他の実施形態において、標的結合剤または抗体は、VH3-30\*01、D3-10、およびJH4領域を有する生殖系列配列から生じ、1つ以上の残基が、この位置において、対応する生殖系列残基を産出するために突然変異されている。

【表8】

示された残基番号における生殖系列に対する6B10重鎖(配列番号30)の例示的な

突然変異

2	23	31	34	49	57	109
E	T	N	I	T	K	Y
V	T	N	I	T	K	Y
E	A	N	I	T	K	Y
V	A	N	I	T	K	Y
E	T	S	I	T	K	Y
V	T	S	I	T	K	Y
E	A	S	I	T	K	Y
V	A	S	I	T	K	Y
E	T	N	M	T	K	Y
V	T	N	M	T	K	Y
E	A	N	M	T	K	Y
V	A	N	M	T	K	Y
E	T	S	M	T	K	Y
V	T	S	M	T	K	Y
E	A	S	M	T	K	Y
V	A	S	M	T	K	Y
E	T	N	I	A	K	Y
V	T	N	I	A	K	Y
E	A	N	I	A	K	Y
V	A	N	I	A	K	Y
E	T	S	I	A	K	Y
V	T	S	I	A	K	Y
E	A	S	I	A	K	Y
V	A	S	I	A	K	Y
E	T	N	M	A	K	Y
V	T	N	M	A	K	Y
E	A	N	M	A	K	Y

10

20

30

40

V	A	N	M	A	K	Y
E	T	S	M	A	K	Y
V	T	S	M	A	K	Y
E	A	S	M	A	K	Y
V	A	S	M	A	K	Y
E	T	N	I	T	N	Y
V	T	N	I	T	N	Y
E	A	N	I	T	N	Y
V	A	N	I	T	N	Y
E	T	S	I	T	N	Y
V	T	S	I	T	N	Y
E	A	S	I	T	N	Y
V	A	S	I	T	N	Y
E	T	N	M	T	N	Y
V	T	N	M	T	N	Y
E	A	N	M	T	N	Y
V	A	N	M	T	N	Y
E	T	S	M	T	N	Y
V	T	S	M	T	N	Y
E	A	S	M	T	N	Y
V	A	S	M	T	N	Y
E	T	N	I	A	N	Y
V	T	N	I	A	N	Y
E	A	N	I	A	N	Y
V	A	N	I	A	N	Y
E	T	S	I	A	N	Y
V	T	S	I	A	N	Y
E	A	S	I	A	N	Y
V	A	S	I	A	N	Y
E	T	N	M	A	N	Y
V	T	N	M	A	N	Y
E	A	N	M	A	N	Y
V	A	N	M	A	N	Y
E	T	S	M	A	N	Y

10

20

30

40

V	T	S	M	A	N	Y
E	A	S	M	A	N	Y
V	A	S	M	A	N	Y
E	T	N	I	T	K	H
V	T	N	I	T	K	H
E	A	N	I	T	K	H
V	A	N	I	T	K	H
E	T	S	I	T	K	H
V	T	S	I	T	K	H
E	A	S	I	T	K	H
V	A	S	I	T	K	H
E	T	N	M	T	K	H
V	T	N	M	T	K	H
E	A	N	M	T	K	H
V	A	N	M	T	K	H
E	T	S	M	T	K	H
V	T	S	M	T	K	H
E	A	S	M	T	K	H
V	A	S	M	T	K	H
E	T	N	I	A	K	H
V	T	N	I	A	K	H
E	A	N	I	A	K	H
V	A	N	I	A	K	H
E	T	S	I	A	K	H
V	T	S	I	A	K	H
E	A	S	I	A	K	H
V	A	S	I	A	K	H
E	T	N	M	A	K	H
V	T	N	M	A	K	H
E	A	N	M	A	K	H
V	A	N	M	A	K	H
E	T	S	M	A	K	H
V	T	S	M	A	K	H
E	A	S	M	A	K	H

10

20

30

40

V	A	S	M	A	K	H
E	T	N	I	T	N	H
V	T	N	I	T	N	H
E	A	N	I	T	N	H
V	A	N	I	T	N	H
E	T	S	I	T	N	H
V	T	S	I	T	N	H
E	A	S	I	T	N	H
V	A	S	I	T	N	H
E	T	N	M	T	N	H
V	T	N	M	T	N	H
E	A	N	M	T	N	H
V	A	N	M	T	N	H
E	T	S	M	T	N	H
V	T	S	M	T	N	H
E	A	S	M	T	N	H
V	A	S	M	T	N	H
E	T	N	I	A	N	H
V	T	N	I	A	N	H
E	A	N	I	A	N	H
V	A	N	I	A	N	H
E	T	S	I	A	N	H
V	T	S	I	A	N	H
E	A	S	I	A	N	H
V	A	S	I	A	N	H
E	T	N	M	A	N	H
V	T	N	M	A	N	H
E	A	N	M	A	N	H
V	A	N	M	A	N	H
E	T	S	M	A	N	H
V	T	S	M	A	N	H
E	A	S	M	A	N	H
V	A	S	M	A	N	H
E	T	N	I	T	K	Y

10

20

30

40

V	T	N	I	T	K	Y
E	A	N	I	T	K	Y
V	A	N	I	T	K	Y
E	T	S	I	T	K	Y
V	T	S	I	T	K	Y
E	A	S	I	T	K	Y
V	A	S	I	T	K	Y
E	T	N	M	T	K	Y
V	T	N	M	T	K	Y
E	A	N	M	T	K	Y
V	A	N	M	T	K	Y
E	T	S	M	T	K	Y
V	T	S	M	T	K	Y
E	A	S	M	T	K	Y
V	A	S	M	T	K	Y
E	T	N	I	A	K	Y
V	T	N	I	A	K	Y
E	A	N	I	A	K	Y
V	A	N	I	A	K	Y
E	T	S	I	A	K	Y
V	T	S	I	A	K	Y
E	A	S	I	A	K	Y
V	A	S	I	A	K	Y
E	T	N	M	A	K	Y
V	T	N	M	A	K	Y
E	A	N	M	A	K	Y
V	A	N	M	A	K	Y
E	T	S	M	A	K	Y
V	T	S	M	A	K	Y
E	A	S	M	A	K	Y
V	A	S	M	A	K	Y
E	T	N	I	T	N	Y
V	T	N	I	T	N	Y
E	A	N	I	T	N	Y

10

20

30

40

V	A	N	I	T	N	Y
E	T	S	I	T	N	Y
V	T	S	I	T	N	Y
E	A	S	I	T	N	Y
V	A	S	I	T	N	Y
E	T	N	M	T	N	Y
V	T	N	M	T	N	Y
E	A	N	M	T	N	Y
V	A	N	M	T	N	Y
E	T	S	M	T	N	Y
V	T	S	M	T	N	Y
E	A	S	M	T	N	Y
V	A	S	M	T	N	Y
E	T	N	I	A	N	Y
V	T	N	I	A	N	Y
E	A	N	I	A	N	Y
V	A	N	I	A	N	Y
E	T	S	I	A	N	Y
V	T	S	I	A	N	Y
E	A	S	I	A	N	Y
V	A	S	I	A	N	Y
E	T	N	M	A	N	Y
V	T	N	M	A	N	Y
E	A	N	M	A	N	Y
V	A	N	M	A	N	Y
E	T	S	M	A	N	Y
V	T	S	M	A	N	Y
E	A	S	M	A	N	Y
V	A	S	M	A	N	Y
E	T	N	I	T	K	H
V	T	N	I	T	K	H
E	A	N	I	T	K	H
V	A	N	I	T	K	H
E	T	S	I	T	K	H

10

20

30

40

V	T	S	I	T	K	H
E	A	S	I	T	K	H
V	A	S	I	T	K	H
E	T	N	M	T	K	H
V	T	N	M	T	K	H
E	A	N	M	T	K	H
V	A	N	M	T	K	H
E	T	S	M	T	K	H
V	T	S	M	T	K	H
E	A	S	M	T	K	H
V	A	S	M	T	K	H
E	T	N	I	A	K	H
V	T	N	I	A	K	H
E	A	N	I	A	K	H
V	A	N	I	A	K	H
E	T	S	I	A	K	H
V	T	S	I	A	K	H
E	A	S	I	A	K	H
V	A	S	I	A	K	H
E	T	N	M	A	K	H
V	T	N	M	A	K	H
E	A	N	M	A	K	H
V	A	N	M	A	K	H
E	T	S	M	A	K	H
V	T	S	M	A	K	H
E	A	S	M	A	K	H
V	A	S	M	A	K	H
E	T	N	I	T	N	H
V	T	N	I	T	N	H
E	A	N	I	T	N	H
V	A	N	I	T	N	H
E	T	S	I	T	N	H
V	T	S	I	T	N	H
E	A	S	I	T	N	H

10

20

30

40

V	A	S	I	T	N	H
E	T	N	M	T	N	H
V	T	N	M	T	N	H
E	A	N	M	T	N	H
V	A	N	M	T	N	H
E	T	S	M	T	N	H
V	T	S	M	T	N	H
E	A	S	M	T	N	H
V	A	S	M	T	N	H
E	T	N	I	A	N	H
V	T	N	I	A	N	H
E	A	N	I	A	N	H
V	A	N	I	A	N	H
E	T	S	I	A	N	H
V	T	S	I	A	N	H
E	A	S	I	A	N	H
V	A	S	I	A	N	H
E	T	N	M	A	N	H
V	T	N	M	A	N	H
E	A	N	M	A	N	H
V	A	N	M	A	N	H
E	T	S	M	A	N	H
V	T	S	M	A	N	H
E	A	S	M	A	N	H
V	A	S	M	A	N	H
E	T	N	I	T	K	Y
V	T	N	I	T	K	Y
E	A	N	I	T	K	Y
V	A	N	I	T	K	Y
E	T	S	I	T	K	Y
V	T	S	I	T	K	Y
E	A	S	I	T	K	Y
V	A	S	I	T	K	Y
E	T	N	M	T	K	Y

10

20

30

40

V	T	N	M	T	K	Y
E	A	N	M	T	K	Y
V	A	N	M	T	K	Y
E	T	S	M	T	K	Y
V	T	S	M	T	K	Y
E	A	S	M	T	K	Y
V	A	S	M	T	K	Y
E	T	N	I	A	K	Y
V	T	N	I	A	K	Y
E	A	N	I	A	K	Y
V	A	N	I	A	K	Y
E	T	S	I	A	K	Y
V	T	S	I	A	K	Y
E	A	S	I	A	K	Y
V	A	S	I	A	K	Y
E	T	N	M	A	K	Y
V	T	N	M	A	K	Y
E	A	N	M	A	K	Y
V	A	N	M	A	K	Y
E	T	S	M	A	K	Y
V	T	S	M	A	K	Y
E	A	S	M	A	K	Y
V	A	S	M	A	K	Y
E	T	N	I	T	N	Y
V	T	N	I	T	N	Y
E	A	N	I	T	N	Y
V	A	N	I	T	N	Y
E	T	S	I	T	N	Y
V	T	S	I	T	N	Y
E	A	S	I	T	N	Y
V	A	S	I	T	N	Y
E	T	N	M	T	N	Y
V	T	N	M	T	N	Y
E	A	N	M	T	N	Y

10

20

30

40

V	A	N	M	T	N	Y
E	T	S	M	T	N	Y
V	T	S	M	T	N	Y
E	A	S	M	T	N	Y
V	A	S	M	T	N	Y
E	T	N	I	A	N	Y
V	T	N	I	A	N	Y
E	A	N	I	A	N	Y
V	A	N	I	A	N	Y
E	T	S	I	A	N	Y
V	T	S	I	A	N	Y
E	A	S	I	A	N	Y
V	A	S	I	A	N	Y
E	T	N	M	A	N	Y
V	T	N	M	A	N	Y
E	A	N	M	A	N	Y
V	A	N	M	A	N	Y
E	T	S	M	A	N	Y
V	T	S	M	A	N	Y
E	A	S	M	A	N	Y
V	A	S	M	A	N	Y
E	T	N	I	T	K	H
V	T	N	I	T	K	H
E	A	N	I	T	K	H
V	A	N	I	T	K	H
E	T	S	I	T	K	H
V	T	S	I	T	K	H
E	A	S	I	T	K	H
V	A	S	I	T	K	H
E	T	N	M	T	K	H
V	T	N	M	T	K	H
E	A	N	M	T	K	H
V	A	N	M	T	K	H
E	T	S	M	T	K	H

10

20

30

40

V	T	S	M	T	K	H
E	A	S	M	T	K	H
V	A	S	M	T	K	H
E	T	N	I	A	K	H
V	T	N	I	A	K	H
E	A	N	I	A	K	H
V	A	N	I	A	K	H
E	T	S	I	A	K	H
V	T	S	I	A	K	H
E	A	S	I	A	K	H
V	A	S	I	A	K	H
E	T	N	M	A	K	H
V	T	N	M	A	K	H
E	A	N	M	A	K	H
V	A	N	M	A	K	H
E	T	S	M	A	K	H
V	T	S	M	A	K	H
E	A	S	M	A	K	H
V	A	S	M	A	K	H
E	T	N	I	T	N	H
V	T	N	I	T	N	H
E	A	N	I	T	N	H
V	A	N	I	T	N	H
E	T	S	I	T	N	H
V	T	S	I	T	N	H
E	A	S	I	T	N	H
V	A	S	I	T	N	H
E	T	N	M	T	N	H
V	T	N	M	T	N	H
E	A	N	M	T	N	H
V	A	N	M	T	N	H
E	T	S	M	T	N	H
V	T	S	M	T	N	H
E	A	S	M	T	N	H

10

20

30

40

V	A	S	M	T	N	H
E	T	N	I	A	N	H
V	T	N	I	A	N	H
E	A	N	I	A	N	H
V	A	N	I	A	N	H
E	T	S	I	A	N	H
V	T	S	I	A	N	H
E	A	S	I	A	N	H
V	A	S	I	A	N	H
E	T	N	M	A	N	H
V	T	N	M	A	N	H
E	A	N	M	A	N	H
V	A	N	M	A	N	H
E	T	S	M	A	N	H
V	T	S	M	A	N	H
E	A	S	M	A	N	H
V	A	S	M	A	N	H

10

20

30

## 【 0 3 5 5 】

本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤または抗体は、配列番号 3 2 を含む配列を含む。特定の実施形態において、配列番号 3 2 は、表 8 の各行に示す生殖系列および非生殖系列残基の組み合わせのうちいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態において、配列番号 3 2 は、表 8 に示す生殖系列残基のうちいずれか 1 つ、いずれか 2 つ、いずれか 3 つ、いずれか 4 つ、いずれか 5 つ、いずれか 6 つ、いずれか 7 つ、いずれか 8 つ、いずれか 9 つ、または 9 つすべてを含む。特定の実施形態において、配列番号 3 2 は、表 8 の各行に示す生殖系列および非生殖系列残基の一意的な組み合わせを含む。他の実施形態において、標的結合剤または抗体は、V k、V k 0 8 / 0 1 8、および J K 4 領域を有する生殖系列配列から生じ、生殖系列配列 1 つ以上の残基が、この位置において、対応する生殖系列残基を産出するために突然変異されている。

【表 9】

示された残基番号における生殖系列に対する 6 B 1 0 軽鎖 (配列番号 3 2) の例示的突然変異

30	31	32	39	45	83	85	87	103
Y	K	S	R	K	F	R	F	R
S	K	S	R	K	F	R	F	R
Y	N	S	R	K	F	R	F	R
S	N	S	R	K	F	R	F	R
Y	K	Y	R	K	F	R	F	R
S	K	Y	R	K	F	R	F	R
Y	N	Y	R	K	F	R	F	R
S	N	Y	R	K	F	R	F	R
Y	K	S	K	K	F	R	F	R
S	K	S	K	K	F	R	F	R
Y	N	S	K	K	F	R	F	R
S	N	S	K	K	F	R	F	R
Y	K	Y	K	K	F	R	F	R
S	K	Y	K	K	F	R	F	R
Y	N	Y	K	K	F	R	F	R
S	N	Y	K	K	F	R	F	R
Y	K	S	R	N	F	R	F	R
S	K	S	R	N	F	R	F	R
Y	N	S	R	N	F	R	F	R
S	N	S	R	N	F	R	F	R
Y	K	Y	R	N	F	R	F	R
S	K	Y	R	N	F	R	F	R
Y	N	Y	R	N	F	R	F	R
S	N	Y	R	N	F	R	F	R
Y	K	S	K	N	F	R	F	R
S	K	S	K	N	F	R	F	R
Y	N	S	K	N	F	R	F	R
S	N	S	K	N	F	R	F	R

10

20

30

40

Y	K	Y	K	N	F	R	F	R
S	K	Y	K	N	F	R	F	R
Y	N	Y	K	N	F	R	F	R
S	N	Y	K	N	F	R	F	R
Y	K	S	R	K	I	R	F	R
S	K	S	R	K	I	R	F	R
Y	N	S	R	K	I	R	F	R
S	N	S	R	K	I	R	F	R
Y	K	Y	R	K	I	R	F	R
S	K	Y	R	K	I	R	F	R
Y	N	Y	R	K	I	R	F	R
S	N	Y	R	K	I	R	F	R
Y	K	S	K	K	I	R	F	R
S	K	S	K	K	I	R	F	R
Y	N	S	K	K	I	R	F	R
S	N	S	K	K	I	R	F	R
Y	K	Y	K	K	I	R	F	R
S	K	Y	K	K	I	R	F	R
Y	N	Y	K	K	I	R	F	R
S	N	Y	K	K	I	R	F	R
Y	K	S	R	N	I	R	F	R
S	K	S	R	N	I	R	F	R
Y	N	S	R	N	I	R	F	R
S	N	S	R	N	I	R	F	R
Y	K	Y	R	N	I	R	F	R
S	K	Y	R	N	I	R	F	R
Y	N	Y	R	N	I	R	F	R
S	N	Y	R	N	I	R	F	R
Y	K	S	K	N	I	R	F	R
S	K	S	K	N	I	R	F	R
Y	N	S	K	N	I	R	F	R
S	N	S	K	N	I	R	F	R
Y	K	Y	K	N	I	R	F	R
S	K	Y	K	N	I	R	F	R
Y	N	Y	K	N	I	R	F	R

10

20

30

40

S	N	Y	K	N	I	R	F	R
Y	K	S	R	K	F	T	F	R
S	K	S	R	K	F	T	F	R
Y	N	S	R	K	F	T	F	R
S	N	S	R	K	F	T	F	R
Y	K	Y	R	K	F	T	F	R
S	K	Y	R	K	F	T	F	R
Y	N	Y	R	K	F	T	F	R
S	N	Y	R	K	F	T	F	R
Y	K	S	K	K	F	T	F	R
S	K	S	K	K	F	T	F	R
Y	N	S	K	K	F	T	F	R
S	N	S	K	K	F	T	F	R
Y	K	Y	K	K	F	T	F	R
S	K	Y	K	K	F	T	F	R
Y	N	Y	K	K	F	T	F	R
S	N	Y	K	K	F	T	F	R
Y	K	S	R	N	F	T	F	R
S	K	S	R	N	F	T	F	R
Y	N	S	R	N	F	T	F	R
S	N	S	R	N	F	T	F	R
Y	K	Y	R	N	F	T	F	R
S	K	Y	R	N	F	T	F	R
Y	N	Y	R	N	F	T	F	R
S	N	Y	R	N	F	T	F	R
Y	K	S	K	N	F	T	F	R
S	K	S	K	N	F	T	F	R
Y	N	S	K	N	F	T	F	R
S	N	S	K	N	F	T	F	R
Y	K	Y	K	N	F	T	F	R
S	K	Y	K	N	F	T	F	R
Y	N	Y	K	N	F	T	F	R
S	N	Y	K	N	F	T	F	R
Y	K	S	R	K	I	T	F	R
S	K	S	R	K	I	T	F	R

10

20

30

40

Y	N	S	R	K	I	T	F	R
S	N	S	R	K	I	T	F	R
Y	K	Y	R	K	I	T	F	R
S	K	Y	R	K	I	T	F	R
Y	N	Y	R	K	I	T	F	R
S	N	Y	R	K	I	T	F	R
Y	K	S	K	K	I	T	F	R
S	K	S	K	K	I	T	F	R
Y	N	S	K	K	I	T	F	R
S	N	S	K	K	I	T	F	R
Y	K	Y	K	K	I	T	F	R
S	K	Y	K	K	I	T	F	R
Y	N	Y	K	K	I	T	F	R
S	N	Y	K	K	I	T	F	R
Y	K	S	R	N	I	T	F	R
S	K	S	R	N	I	T	F	R
Y	N	S	R	N	I	T	F	R
S	N	S	R	N	I	T	F	R
Y	K	Y	R	N	I	T	F	R
S	K	Y	R	N	I	T	F	R
Y	N	Y	R	N	I	T	F	R
S	N	Y	R	N	I	T	F	R
Y	K	S	K	N	I	T	F	R
S	K	S	K	N	I	T	F	R
Y	N	S	K	N	I	T	F	R
S	N	S	K	N	I	T	F	R
Y	K	Y	K	N	I	T	F	R
S	K	Y	K	N	I	T	F	R
Y	N	Y	K	N	I	T	F	R
S	N	Y	K	N	I	T	F	R
Y	K	S	R	K	F	R	Y	R
S	K	S	R	K	F	R	Y	R
Y	N	S	R	K	F	R	Y	R
S	N	S	R	K	F	R	Y	R
Y	K	Y	R	K	F	R	Y	R

10

20

30

40

S	K	Y	R	K	F	R	Y	R
Y	N	Y	R	K	F	R	Y	R
S	N	Y	R	K	F	R	Y	R
Y	K	S	K	K	F	R	Y	R
S	K	S	K	K	F	R	Y	R
Y	N	S	K	K	F	R	Y	R
S	N	S	K	K	F	R	Y	R
Y	K	Y	K	K	F	R	Y	R
S	K	Y	K	K	F	R	Y	R
Y	N	Y	K	K	F	R	Y	R
S	N	Y	K	K	F	R	Y	R
Y	K	S	R	N	F	R	Y	R
S	K	S	R	N	F	R	Y	R
Y	N	S	R	N	F	R	Y	R
S	N	S	R	N	F	R	Y	R
Y	K	Y	R	N	F	R	Y	R
S	K	Y	R	N	F	R	Y	R
Y	N	Y	R	N	F	R	Y	R
S	N	Y	R	N	F	R	Y	R
Y	K	S	K	N	F	R	Y	R
S	K	S	K	N	F	R	Y	R
Y	N	S	K	N	F	R	Y	R
S	N	S	K	N	F	R	Y	R
Y	K	Y	K	N	F	R	Y	R
S	K	Y	K	N	F	R	Y	R
Y	N	Y	K	N	F	R	Y	R
S	N	Y	K	N	F	R	Y	R
Y	K	S	R	K	I	R	Y	R
S	K	S	R	K	I	R	Y	R
Y	N	S	R	K	I	R	Y	R
S	N	S	R	K	I	R	Y	R
Y	K	Y	R	K	I	R	Y	R
S	K	Y	R	K	I	R	Y	R
Y	N	Y	R	K	I	R	Y	R
S	N	Y	R	K	I	R	Y	R

10

20

30

40

Y	K	S	K	K	I	R	Y	R
S	K	S	K	K	I	R	Y	R
Y	N	S	K	K	I	R	Y	R
S	N	S	K	K	I	R	Y	R
Y	K	Y	K	K	I	R	Y	R
S	K	Y	K	K	I	R	Y	R
Y	N	Y	K	K	I	R	Y	R
S	N	Y	K	K	I	R	Y	R
Y	K	S	R	N	I	R	Y	R
S	K	S	R	N	I	R	Y	R
Y	N	S	R	N	I	R	Y	R
S	N	S	R	N	I	R	Y	R
Y	K	Y	R	N	I	R	Y	R
S	K	Y	R	N	I	R	Y	R
Y	N	Y	R	N	I	R	Y	R
S	N	Y	R	N	I	R	Y	R
Y	K	S	K	N	I	R	Y	R
S	K	S	K	N	I	R	Y	R
Y	N	S	K	N	I	R	Y	R
S	N	S	K	N	I	R	Y	R
Y	K	Y	K	N	I	R	Y	R
S	K	Y	K	N	I	R	Y	R
Y	N	Y	K	N	I	R	Y	R
S	N	Y	K	N	I	R	Y	R
Y	K	S	R	K	F	T	Y	R
S	K	S	R	K	F	T	Y	R
Y	N	S	R	K	F	T	Y	R
S	N	S	R	K	F	T	Y	R
Y	K	Y	R	K	F	T	Y	R
S	K	Y	R	K	F	T	Y	R
Y	N	Y	R	K	F	T	Y	R
S	N	Y	R	K	F	T	Y	R
Y	K	S	K	K	F	T	Y	R
S	K	S	K	K	F	T	Y	R
Y	N	S	K	K	F	T	Y	R

10

20

30

40

S	N	S	K	K	F	T	Y	R
Y	K	Y	K	K	F	T	Y	R
S	K	Y	K	K	F	T	Y	R
Y	N	Y	K	K	F	T	Y	R
S	N	Y	K	K	F	T	Y	R
Y	K	S	R	N	F	T	Y	R
S	K	S	R	N	F	T	Y	R
Y	N	S	R	N	F	T	Y	R
S	N	S	R	N	F	T	Y	R
Y	K	Y	R	N	F	T	Y	R
S	K	Y	R	N	F	T	Y	R
Y	N	Y	R	N	F	T	Y	R
S	N	Y	R	N	F	T	Y	R
Y	K	S	K	N	F	T	Y	R
S	K	S	K	N	F	T	Y	R
Y	N	S	K	N	F	T	Y	R
S	N	S	K	N	F	T	Y	R
Y	K	Y	K	N	F	T	Y	R
S	K	Y	K	N	F	T	Y	R
Y	N	Y	K	N	F	T	Y	R
S	N	Y	K	N	F	T	Y	R
Y	K	S	R	K	I	T	Y	R
S	K	S	R	K	I	T	Y	R
Y	N	S	R	K	I	T	Y	R
S	N	S	R	K	I	T	Y	R
Y	K	Y	R	K	I	T	Y	R
S	K	Y	R	K	I	T	Y	R
Y	N	Y	R	K	I	T	Y	R
S	N	Y	R	K	I	T	Y	R
Y	K	S	K	K	I	T	Y	R
S	K	S	K	K	I	T	Y	R
Y	N	S	K	K	I	T	Y	R
S	N	S	K	K	I	T	Y	R
Y	K	Y	K	K	I	T	Y	R
S	K	Y	K	K	I	T	Y	R

10

20

30

40

Y	N	Y	K	K	I	T	Y	R
S	N	Y	K	K	I	T	Y	R
Y	K	S	R	N	I	T	Y	R
S	K	S	R	N	I	T	Y	R
Y	N	S	R	N	I	T	Y	R
S	N	S	R	N	I	T	Y	R
Y	K	Y	R	N	I	T	Y	R
S	K	Y	R	N	I	T	Y	R
Y	N	Y	R	N	I	T	Y	R
S	N	Y	R	N	I	T	Y	R
Y	K	S	K	N	I	T	Y	R
S	K	S	K	N	I	T	Y	R
Y	N	S	K	N	I	T	Y	R
S	N	S	K	N	I	T	Y	R
Y	K	Y	K	N	I	T	Y	R
S	K	Y	K	N	I	T	Y	R
Y	N	Y	K	N	I	T	Y	R
S	N	Y	K	N	I	T	Y	R
Y	K	S	R	K	F	R	F	K
S	K	S	R	K	F	R	F	K
Y	N	S	R	K	F	R	F	K
S	N	S	R	K	F	R	F	K
Y	K	Y	R	K	F	R	F	K
S	K	Y	R	K	F	R	F	K
Y	N	Y	R	K	F	R	F	K
S	N	Y	R	K	F	R	F	K
Y	K	S	K	K	F	R	F	K
S	K	S	K	K	F	R	F	K
Y	N	S	K	K	F	R	F	K
S	N	S	K	K	F	R	F	K
Y	K	Y	K	K	F	R	F	K
S	K	Y	K	K	F	R	F	K
Y	N	Y	K	K	F	R	F	K
S	N	Y	K	K	F	R	F	K
Y	K	S	R	N	F	R	F	K

10

20

30

40

S	K	S	R	N	F	R	F	K
Y	N	S	R	N	F	R	F	K
S	N	S	R	N	F	R	F	K
Y	K	Y	R	N	F	R	F	K
S	K	Y	R	N	F	R	F	K
Y	N	Y	R	N	F	R	F	K
S	N	Y	R	N	F	R	F	K
Y	K	S	K	N	F	R	F	K
S	K	S	K	N	F	R	F	K
Y	N	S	K	N	F	R	F	K
S	N	S	K	N	F	R	F	K
Y	K	Y	K	N	F	R	F	K
S	K	Y	K	N	F	R	F	K
Y	N	Y	K	N	F	R	F	K
S	N	Y	K	N	F	R	F	K
Y	K	S	R	K	I	R	F	K
S	K	S	R	K	I	R	F	K
Y	N	S	R	K	I	R	F	K
S	N	S	R	K	I	R	F	K
Y	K	Y	R	K	I	R	F	K
S	K	Y	R	K	I	R	F	K
Y	N	Y	R	K	I	R	F	K
S	N	Y	R	K	I	R	F	K
Y	K	S	K	K	I	R	F	K
S	K	S	K	K	I	R	F	K
Y	N	S	K	K	I	R	F	K
S	N	S	K	K	I	R	F	K
Y	K	Y	K	K	I	R	F	K
S	K	Y	K	K	I	R	F	K
Y	N	Y	K	K	I	R	F	K
S	N	Y	K	K	I	R	F	K
Y	K	S	R	N	I	R	F	K
S	K	S	R	N	I	R	F	K
Y	N	S	R	N	I	R	F	K
S	N	S	R	N	I	R	F	K

10

20

30

40

Y	K	Y	R	N	I	R	F	K
S	K	Y	R	N	I	R	F	K
Y	N	Y	R	N	I	R	F	K
S	N	Y	R	N	I	R	F	K
Y	K	S	K	N	I	R	F	K
S	K	S	K	N	I	R	F	K
Y	N	S	K	N	I	R	F	K
S	N	S	K	N	I	R	F	K
Y	K	Y	K	N	I	R	F	K
S	K	Y	K	N	I	R	F	K
Y	N	Y	K	N	I	R	F	K
S	N	Y	K	N	I	R	F	K
Y	K	S	R	K	F	T	F	K
S	K	S	R	K	F	T	F	K
Y	N	S	R	K	F	T	F	K
S	N	S	R	K	F	T	F	K
Y	K	Y	R	K	F	T	F	K
S	K	Y	R	K	F	T	F	K
Y	N	Y	R	K	F	T	F	K
S	N	Y	R	K	F	T	F	K
Y	K	S	K	K	F	T	F	K
S	K	S	K	K	F	T	F	K
Y	N	S	K	K	F	T	F	K
S	N	S	K	K	F	T	F	K
Y	K	Y	K	K	F	T	F	K
S	K	Y	K	K	F	T	F	K
Y	N	Y	K	K	F	T	F	K
S	N	Y	K	K	F	T	F	K
Y	K	S	R	N	F	T	F	K
S	K	S	R	N	F	T	F	K
Y	N	S	R	N	F	T	F	K
S	N	S	R	N	F	T	F	K
Y	K	Y	R	N	F	T	F	K
S	K	Y	R	N	F	T	F	K
Y	N	Y	R	N	F	T	F	K

10

20

30

40

S	N	Y	R	N	F	T	F	K
Y	K	S	K	N	F	T	F	K
S	K	S	K	N	F	T	F	K
Y	N	S	K	N	F	T	F	K
S	N	S	K	N	F	T	F	K
Y	K	Y	K	N	F	T	F	K
S	K	Y	K	N	F	T	F	K
Y	N	Y	K	N	F	T	F	K
S	N	Y	K	N	F	T	F	K
Y	K	S	R	K	I	T	F	K
S	K	S	R	K	I	T	F	K
Y	N	S	R	K	I	T	F	K
S	N	S	R	K	I	T	F	K
Y	K	Y	R	K	I	T	F	K
S	K	Y	R	K	I	T	F	K
Y	N	Y	R	K	I	T	F	K
S	N	Y	R	K	I	T	F	K
Y	K	S	K	K	I	T	F	K
S	K	S	K	K	I	T	F	K
Y	N	S	K	K	I	T	F	K
S	N	S	K	K	I	T	F	K
Y	K	Y	K	K	I	T	F	K
S	K	Y	K	K	I	T	F	K
Y	N	Y	K	K	I	T	F	K
S	N	Y	K	K	I	T	F	K
Y	K	S	R	N	I	T	F	K
S	K	S	R	N	I	T	F	K
Y	N	S	R	N	I	T	F	K
S	N	S	R	N	I	T	F	K
Y	K	Y	R	N	I	T	F	K
S	K	Y	R	N	I	T	F	K
Y	N	Y	R	N	I	T	F	K
S	N	Y	R	N	I	T	F	K
Y	K	S	K	N	I	T	F	K
S	K	S	K	N	I	T	F	K

10

20

30

40

Y	N	S	K	N	I	T	F	K
S	N	S	K	N	I	T	F	K
Y	K	Y	K	N	I	T	F	K
S	K	Y	K	N	I	T	F	K
Y	N	Y	K	N	I	T	F	K
S	N	Y	K	N	I	T	F	K
Y	K	S	R	K	F	R	Y	K
S	K	S	R	K	F	R	Y	K
Y	N	S	R	K	F	R	Y	K
S	N	S	R	K	F	R	Y	K
Y	K	Y	R	K	F	R	Y	K
S	K	Y	R	K	F	R	Y	K
Y	N	Y	R	K	F	R	Y	K
S	N	Y	R	K	F	R	Y	K
Y	K	S	K	K	F	R	Y	K
S	K	S	K	K	F	R	Y	K
Y	N	S	K	K	F	R	Y	K
S	N	S	K	K	F	R	Y	K
Y	K	Y	K	K	F	R	Y	K
S	K	Y	K	K	F	R	Y	K
Y	N	Y	K	K	F	R	Y	K
S	N	Y	K	K	F	R	Y	K
Y	K	S	R	N	F	R	Y	K
S	K	S	R	N	F	R	Y	K
Y	N	S	R	N	F	R	Y	K
S	N	S	R	N	F	R	Y	K
Y	K	Y	R	N	F	R	Y	K
Y	N	Y	R	N	F	R	Y	K
S	N	Y	R	N	F	R	Y	K
Y	K	S	K	N	F	R	Y	K
S	K	S	K	N	F	R	Y	K
Y	N	S	K	N	F	R	Y	K
S	N	S	K	N	F	R	Y	K
Y	K	Y	K	N	F	R	Y	K

10

20

30

40

S	K	Y	K	N	F	R	Y	K
Y	N	Y	K	N	F	R	Y	K
S	N	Y	K	N	F	R	Y	K
Y	K	S	R	K	I	R	Y	K
S	K	S	R	K	I	R	Y	K
Y	N	S	R	K	I	R	Y	K
S	N	S	R	K	I	R	Y	K
Y	K	Y	R	K	I	R	Y	K
S	K	Y	R	K	I	R	Y	K
Y	N	Y	R	K	I	R	Y	K
S	N	Y	R	K	I	R	Y	K
Y	K	S	K	K	I	R	Y	K
S	K	S	K	K	I	R	Y	K
Y	N	S	K	K	I	R	Y	K
S	N	S	K	K	I	R	Y	K
Y	K	Y	K	K	I	R	Y	K
S	K	Y	K	K	I	R	Y	K
Y	N	Y	K	K	I	R	Y	K
S	N	Y	K	K	I	R	Y	K
Y	K	S	R	N	I	R	Y	K
S	K	S	R	N	I	R	Y	K
Y	N	S	R	N	I	R	Y	K
S	N	S	R	N	I	R	Y	K
Y	K	Y	R	N	I	R	Y	K
S	K	Y	R	N	I	R	Y	K
Y	N	Y	R	N	I	R	Y	K
S	N	Y	R	N	I	R	Y	K
Y	K	S	K	N	I	R	Y	K
S	K	S	K	N	I	R	Y	K
Y	N	S	K	N	I	R	Y	K
S	N	S	K	N	I	R	Y	K
Y	K	Y	K	N	I	R	Y	K
S	K	Y	K	N	I	R	Y	K
Y	N	Y	K	N	I	R	Y	K
S	N	Y	K	N	I	R	Y	K

10

20

30

40

Y	K	S	R	K	F	T	Y	K
S	K	S	R	K	F	T	Y	K
Y	N	S	R	K	F	T	Y	K
S	N	S	R	K	F	T	Y	K
Y	K	Y	R	K	F	T	Y	K
S	K	Y	R	K	F	T	Y	K
Y	N	Y	R	K	F	T	Y	K
S	N	Y	R	K	F	T	Y	K
Y	K	S	K	K	F	T	Y	K
S	K	S	K	K	F	T	Y	K
Y	N	S	K	K	F	T	Y	K
S	N	S	K	K	F	T	Y	K
Y	K	Y	K	K	F	T	Y	K
S	K	Y	K	K	F	T	Y	K
Y	N	Y	K	K	F	T	Y	K
S	N	Y	K	K	F	T	Y	K
Y	K	S	R	N	F	T	Y	K
S	K	S	R	N	F	T	Y	K
Y	N	S	R	N	F	T	Y	K
S	N	S	R	N	F	T	Y	K
Y	K	Y	R	N	F	T	Y	K
S	K	Y	R	N	F	T	Y	K
Y	N	Y	R	N	F	T	Y	K
S	N	Y	R	N	F	T	Y	K
Y	K	S	K	N	F	T	Y	K
S	K	S	K	N	F	T	Y	K
Y	N	S	K	N	F	T	Y	K
S	N	S	K	N	F	T	Y	K
Y	K	Y	K	N	F	T	Y	K
S	K	Y	K	N	F	T	Y	K
Y	N	Y	K	N	F	T	Y	K
S	N	Y	K	N	F	T	Y	K
Y	K	S	R	K	I	T	Y	K
S	K	S	R	K	I	T	Y	K
Y	N	S	R	K	I	T	Y	K

10

20

30

40

S	N	S	R	K	I	T	Y	K
Y	K	Y	R	K	I	T	Y	K
S	K	Y	R	K	I	T	Y	K
Y	N	Y	R	K	I	T	Y	K
S	N	Y	R	K	I	T	Y	K
Y	K	S	K	K	I	T	Y	K
S	K	S	K	K	I	T	Y	K
Y	N	S	K	K	I	T	Y	K
S	N	S	K	K	I	T	Y	K
Y	K	Y	K	K	I	T	Y	K
S	K	Y	K	K	I	T	Y	K
Y	N	Y	K	K	I	T	Y	K
S	N	Y	K	K	I	T	Y	K
Y	K	S	R	N	I	T	Y	K
S	K	S	R	N	I	T	Y	K
Y	N	S	R	N	I	T	Y	K
S	N	S	R	N	I	T	Y	K
Y	K	Y	R	N	I	T	Y	K
S	K	Y	R	N	I	T	Y	K
Y	N	Y	R	N	I	T	Y	K
S	N	Y	R	N	I	T	Y	K
Y	K	S	K	N	I	T	Y	K
S	K	S	K	N	I	T	Y	K
Y	N	S	K	N	I	T	Y	K
S	N	S	K	N	I	T	Y	K
Y	K	Y	K	N	I	T	Y	K
S	K	Y	K	N	I	T	Y	K
Y	N	Y	K	N	I	T	Y	K
S	N	Y	K	N	I	T	Y	K

10

20

30

## 【 0 3 5 6 】

本発明のいくつかの実施形態において、標的結合剤または抗体は、配列番号 2 を含む配列を含む。特定の実施形態において、配列番号 2 は、表 9 の各行に示す生殖系列および非生殖系列残基の組み合わせのうちのいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態において、配列番号 2 は、表 9 に示す生殖系列残基のうちのいずれか 1 つ、いずれか 2 つ、いずれか 3 つ、いずれか 4 つ、いずれか 5 つ、いずれか 6 つ、または 6 つすべてを含む。特定の実施形態において、配列番号 2 は、表 9 の各行に示す生殖系列および非生殖系列残基の一意的な組み合わせを含む。他の実施形態において、標的結合剤または抗体は、VH 4 - 5 9、D 5 - 1 2、および JH 4 領域を有する生殖系配列から生じ、生殖系列配列 1 つ以上の残基は、この位置において、対応する生殖系列残基を産出するために突然変異されている。

40

【表 10】

示された残基番号における生殖系列に対する 4. 1 2 0 重鎖 (配列番号 2) の例示的突

然変異

41	50	54	69	101	106
A	R	T	M	G	G
P	R	T	M	G	G
A	Y	T	M	G	G
P	Y	T	M	G	G
A	R	Y	M	G	G
P	R	Y	M	G	G
A	Y	Y	M	G	G
P	Y	Y	M	G	G
A	R	T	I	G	G
P	R	T	I	G	G
A	Y	T	I	G	G
P	Y	T	I	G	G
A	R	Y	I	G	G
P	R	Y	I	G	G
A	Y	Y	I	G	G
P	Y	Y	I	G	G
A	R	T	M	V	G
P	R	T	M	V	G
A	Y	T	M	V	G
P	Y	T	M	V	G
A	R	Y	M	V	G
P	R	Y	M	V	G
A	Y	Y	M	V	G
P	Y	Y	M	V	G
A	R	T	I	V	G
P	R	T	I	V	G
A	Y	T	I	V	G
P	Y	T	I	V	G
A	R	Y	I	V	G
P	R	Y	I	V	G

10

20

30

40

A	Y	Y	I	V	G
P	Y	Y	I	V	G
A	R	T	M	G	Y
P	R	T	M	G	Y
A	Y	T	M	G	Y
P	Y	T	M	G	Y
A	R	Y	M	G	Y
P	R	Y	M	G	Y
A	Y	Y	M	G	Y
P	Y	Y	M	G	Y
A	R	T	I	G	Y
P	R	T	I	G	Y
A	Y	T	I	G	Y
P	Y	T	I	G	Y
A	R	Y	I	G	Y
P	R	Y	I	G	Y
A	Y	Y	I	G	Y
P	Y	Y	I	G	Y
A	R	T	M	V	Y
P	R	T	M	V	Y
A	Y	T	M	V	Y
P	Y	T	M	V	Y
A	R	Y	M	V	Y
P	R	Y	M	V	Y
A	Y	Y	M	V	Y
P	Y	Y	M	V	Y
A	R	T	I	V	Y
P	R	T	I	V	Y
A	Y	T	I	V	Y
P	Y	T	I	V	Y
A	R	Y	I	V	Y
P	R	Y	I	V	Y
A	Y	Y	I	V	Y
P	Y	Y	I	V	Y

10

20

30

40

## 【0357】

当業者は、CDR境界を定義する代替方法があることに気付くであろう。表2aにおけるVH CDR1の出発残基を、Scaviner D, Barbie V, Ruiz M, Lefranc M-P. Protein Displays of the Human Immunoglobulin Heavy, Kappa and Lambd

50

a Variable and Joining Regions. Exp Clin Immunogenet 1999, 16:234-240に記載される方法に従って定義した。表2における残りのCDR境界をKabattの定義に従って定義する。

【0358】

表2における残りのCDR境界をKabattの定義にしたがって定義する。

【実施例11】

【0359】

FACS KD決定

抗CD105抗体の親和性をFACSによって測定した。簡潔に述べると、CD105を発現するHUVEC細胞を、約500万細胞/mLの濃度で、FACS緩衝液(2%FBS、0.05%NaN<sub>3</sub>)において再懸濁した。細胞を氷上に保持した。精製した抗体を、96ウェルプレートにおいて11ウェルにわたってろ過した1xPBS(2x)において、連続的に希釈した。各列の12番目のウェルは、緩衝液のみを含有した。細胞および1xPBSを、最終容積が30μL/ウェルとなり各ウェルは約100,000細胞を含有するように、各mAbウェルに添加した。プレートを4で3時間プレートシェーカーにおき、その後回転させ、PBSで3回洗浄した。蛍光色素標識された二次ヤギヒトポリクローナル抗体を、200μL容積で各ウェルに添加した。プレートを4で40分間インキュベートした後、回転させ、PBSで3回洗浄した。

10

【0360】

各mAb濃度に対する10,000細胞の幾何平均蛍光(GMF)を、FACSCalibur機器を使用して測定した。分子mAb濃度の関数としてのGMFの非線形プロットを、以下の方程式を使用してScientistソフトウェアを使用して当てはめた。

20

【数1】

$$F = P' \cdot \frac{(K_D + L_T + 1) - \sqrt{((K_D + L_T + 1))^2 - 4(L_T)}}{2}$$

【0361】

上記の方程式において、F = 幾何平均蛍光、L<sub>T</sub> = 分子mAb総濃度、P' = 恣意の蛍光単位を結合したmAbに関連付ける比例定数、およびK<sub>D</sub> = 平衡解離定数である。P'およびK<sub>D</sub>を非線形解析において自由に動かすようにして、各mAbに対してK<sub>D</sub>の推定値を得た。以下の表は、結果として得た、各mAbに対するK<sub>D</sub>結果を列挙する。

30

【表11】

mAb	K <sub>D</sub> (pM)
4D4.1	622.2
3C1.1	871.5
6A6.2	<1150
6B1.1	2300
6B10.1	<149.06
9H10.2	<583.75
10C9.2	<748.01
11H2.1	337.7
4.12	770.1
4.37κ	<716.79

40

50

## 【実施例 12】

## 【0362】

CD105抗体のADCCおよびCDC活性

## (1) ADCCアッセイ

PMBCからのNK濃縮を、RosetteSep（登録商標）ヒトNK細胞濃縮混合物およびプロトコール（StemCell Technologies Inc.、Vancouver、BC）を使用して実施した。簡潔に述べると、ドナーからの全血をヘパリン化されたまたはEDTA被覆管において採取し、RosetteSep（登録商標）プロトコールに従って室温で20分間、2.25mLのRosetteSep（登録商標）ヒトNK細胞濃縮混合物（StemCell Technologies Inc.、Vancouver、BC）でインキュベートした。試料を同等の容積の2%のFBSを含有するPBSで希釈し、30mLの血液混合物を15mLのFicoll上に層にした（Amersham Biosciences、円錐管）。管を室温で30分間、2150rpmで遠心分離し、界面層をきれいな50mLの円錐管に移した。2%のFBSを含有するPBSを添加した後、1200rpmで10分間、遠心分離した。上清を捨て、ペレットを1mLのPBSに懸濁し氷上で保存した。細胞を、血球計を使用して数え、溶液の1mLごとのNK細胞の濃度を決定した。

10

## 【0363】

カルセインAMは、カルセインの細胞透過性形態である。カルセインAMが細胞質に浸透すると、細胞におけるエステラーゼによって加水分解され細胞内に保持されるカルセインとなる。カルセインを使用する生死判別試験は、信頼でき、標準<sup>5</sup> <sup>1</sup>Crリリースアッセイと良好に相関する。簡潔に述べると、標的細胞（HUVEC細胞）収集し、培地において、 $1 \times 10^6$ 細胞/mLで再懸濁した。カルセインAM（Sigma C1359）を添加して最終濃度を10 $\mu$ Mとした（2mL細胞において5 $\mu$ l）。細胞を37 $^{\circ}$ Cで45分間インキュベートした。細胞を10分間1200RPMで回転し、上清を捨て、ペレットを新たな増殖培地（2x）に再懸濁した。ペレットを75 $\mu$ lの増殖培地につき10,000細胞に再懸濁した。丸底プレートにおいて標的細胞を75 $\mu$ l（10,000細胞/ウェル）に蒔いた。抗体を10 $\mu$ g/mLで、培地において希釈した50 $\mu$ l/ウェルで、標的細胞に添加し、室温で30分間インキュベートさせた。インキュベーション後、75 $\mu$ lのエフェクター細胞を100,000細胞/ウェルで添加し、37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートさせた。インキュベーション後、プレートを1200RPMで5分間回転した。上清（100 $\mu$ L）を平らで黒く、透明な底のプレートに移し（Costar、cat.no.3603）蛍光を測定した。ジギトニンを最大のカルセイン放出を測定するため、陽性対照として使用した。

20

30

## 【0364】

（図7に示す）データは、特性を試験した10のmAbすべてが、ADCC活性を示し、mAb4D4、9H10、および6B10が最大レベルの溶解活性を示した。

## 【0365】

## (2) CDCアッセイ

白血病細胞においてCD105の発現が、報告されたため（Haruta, Y. et al, 1986, PNAS, 83:7898-7902）、抗CD105mAbを、白血病細胞株のいくつかにわたる補体活性について特性試験をした。手短かに言うと、白血病細胞株（KG1、REH、KG1a、U937）をウェルにつき100,000細胞でCostar96ウェル平底プレート（Corning Inc. Life Sciences, Lowell, MA）に蒔いた。10個の抗CD105mAb（10 $\mu$ g/mL）を組織培養培地に添加し、室温で10分間インキュベートさせた。正常ヒト血清を10~50%の間の濃度で添加し、増殖培地で希釈した。血清を1時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートさせた。CellTiter Glo試薬（Promega Corp.、Madison、WI）を細胞に添加し、暗闇で室温にて10分間インキュベートさせ、プロトコール手順に従って値を読んだ。データ（図8）は、mAb4.120のみが、すべての試験した

40

50

白血病細胞株にわたって、補体活性を誘発したことを示す。

【実施例 13】

【0366】

CD105 抗体の抗体内部移行

抗体の内部移行調査を、抗 CD105 MAB が HUVEC 細胞における CD105 の内部移行を誘発することができるか否かを測定するために実施した。以下の内部移行アッセイを実施した。HUVEC 細胞を反応物ごとに 300,000 細胞で等分し、4 で 1 時間、10 μG / ML の各抗 CD105 MAB と共にインキュベートした。細胞を FACS 緩衝液 (PBS 中 2% の FCS) で 2 回洗浄し、次に 5 μG / ML の FITC に複合化したヤギ FAB 抗ヒト (重鎖 + 軽鎖) 二次抗体と共に、FACS 緩衝液において 4 で 45 分間インキュベートした。次いで HUVEC 細胞を 200 μL の FACS 緩衝液で一度洗浄した。各試料の 2 つのチューブを 4 で、および 1 つのチューブを 37 で 1 時間インキュベートし、その後細胞を 200 μL の FACS 緩衝液で一度洗浄した。次に 100 μL の 200 MM の TRIS (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (TCEP) を 1 つの試料に 4 でおよび 1 つの試料に 37 で添加し、これらの試料を 4 で 30 分間インキュベートした。最後に、細胞を FACS 緩衝液で一度洗浄し、フローサイトメトリーで値を読んだ。内部移行率 (%) を以下の方程式で幾何平均より決定した。内部移行率 =  $( (37 + TCEP) - (4 + TCEP) ) / ( (4 - TCEP) - (4 + TCEP) ) \times [100]$ 。

10

【0367】

20

結果は、すべての抗 CD105 MAB が内部移行を媒介し、約 25 ~ 30% の細胞表面抗体を 1 時間以内に CD105 との相互作用を通して内部移行したことを示す (図 9 を参照)。急速に内部移行する 1C1 抗体を、陽性対照として使用した。(JACKSON, D. ET AL., 2008, CANCER RES., 68: 9367 - 74)。結果は細胞表面抗体の約 40% が 1C1 抗体で内部移行したことを示す。

【0368】

したがって、これらのデータは、上述の抗 CD105 MAB が CD105 抗原を発現する細胞に対して毒素を送達するための免疫複合体として効果的な薬剤であり得ることを示唆する。

【0369】

30

参照による組み込み

特許、特許出願、論文、教科書等を含む本明細書に引用されるすべての文献、およびそれらに引用される文献は、すでに含まれていない限りにおいて、これによって、本明細書に全体が参照にすることにより組み込まれる。

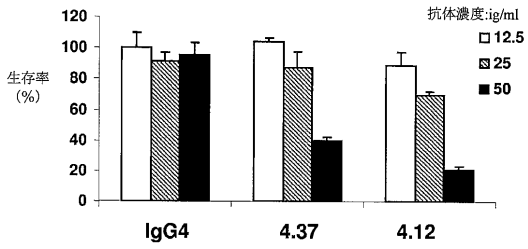
【0370】

等価物

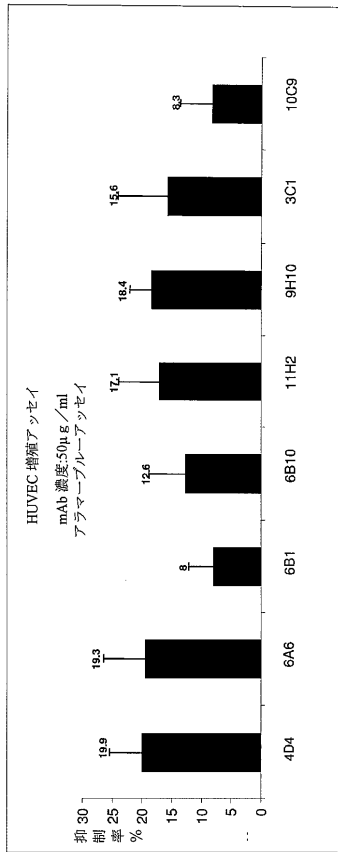
前述の明細書は、当業者が本発明を実行することを可能にするために十分であると考えられる。前述の記載および実施例は、本発明の特定の好ましい実施形態を詳述し、発明者によって意図される最良の形態を記載する。前述のものがいかに文章で詳細を詳述していても、本発明は多くの方法で実施することができ、本発明は添付の請求項およびその等価物のいずれかに従って解釈されるべきであることが理解されるであろう。

40

【 図 1 】

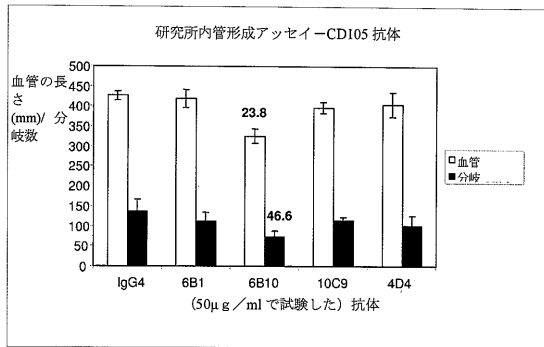


【 図 2 】

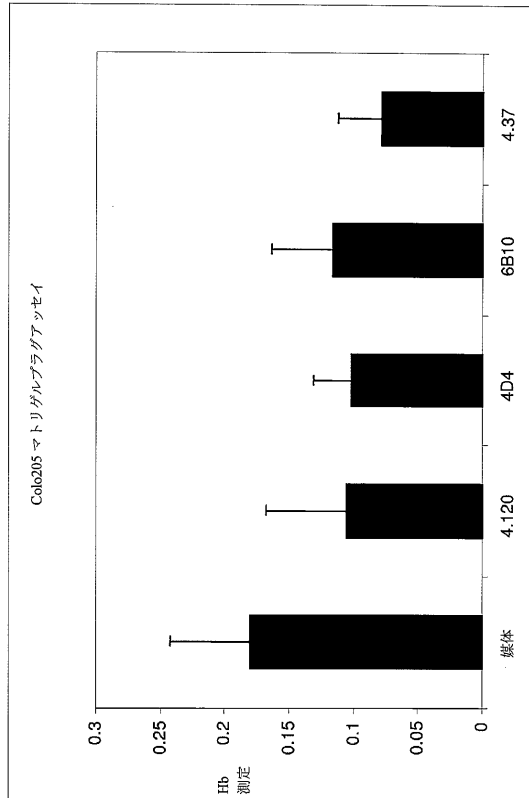


\*IgG4 および IgG2 アイソタイプ対照に対して正規化。8 つの実験のデータ要約。

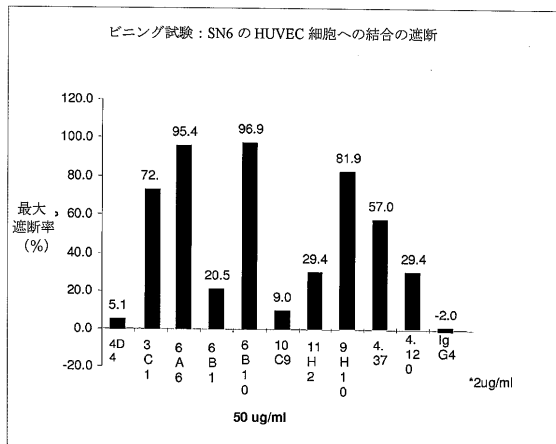
【 図 3 】



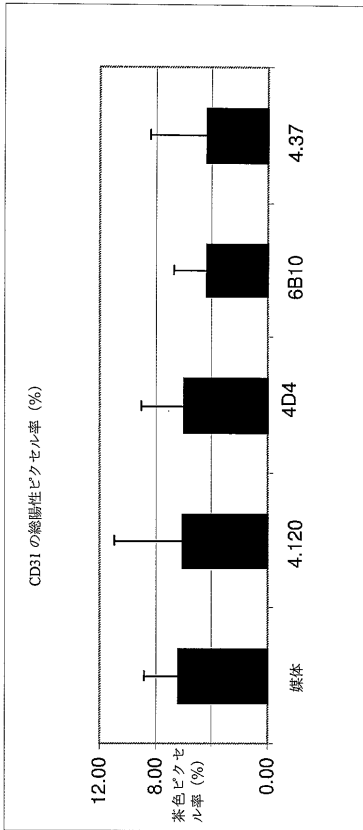
【 図 5 】



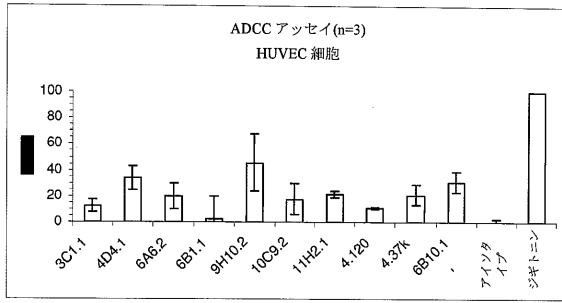
【 図 4 】



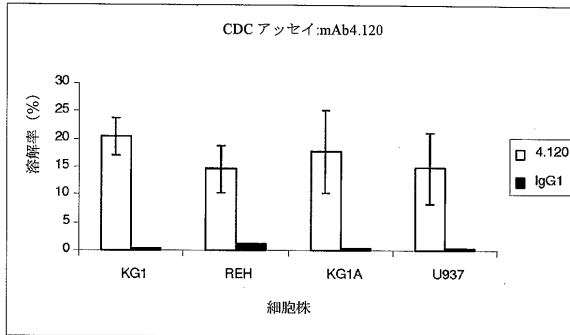
【 図 6 】



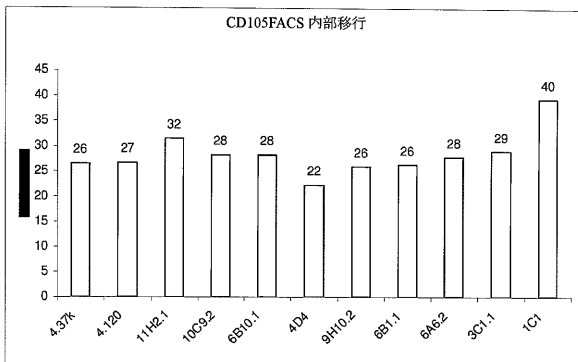
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2012502649000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2009/051216
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/28 A61K39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 190 660 B1 (SEON BEN K [US]) 20 February 2001 (2001-02-20) claim 1; figures 4,5	1-38
X	TAKAHASHI N ET AL: "Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combine immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD., US, vol. 61, no. 21, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 7846-7854, XP008090433 ISSN: 0008-5472 figures 3-5	1-38
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
*E* earlier document but published on or after the international filing date		*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
*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)		*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.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*B* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search  13 November 2009		Date of mailing of the international search report  28/04/2010
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  Weiki, Martina

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2009/051216

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>TSUJIE MASANORI ET AL: "Anti-tumor activity of an anti-endoglin monoclonal antibody is enhanced in immunocompetent mice" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 122, no. 10, May 2008 (2008-05), pages 2266-2273, XP002555257 ISSN: 0020-7136 figures 4,5</p>	1-38
A	<p>VOLKEL T ET AL: "Isolation of endothelial cell-specific human antibodies from a novel fully synthetic scFv library" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 317, no. 2, 30 April 2004 (2004-04-30), pages 515-521, XP004500241 ISSN: 0006-291X figure 4B</p>	1-38
A	<p>MATSUNO F ET AL: "Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 5, no. 2, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 371-382, XP002975037 ISSN: 1078-0432 the whole document</p>	1-38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB2009/051216**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.:

see ANNEX

**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/GB2009/051216

**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 (partially), 2 (partially), 3 (completely), 4-38 (partially)

Claims relating to antibodies against CD105 wherein the antibody binds to human CD105 with a KD of less than 1nM

2. claims: 1, 2, 4-38 (all partially)

Claims relating to antibodies against CD105 wherein the antibody inhibits cell proliferation of HUVEC cells by greater than 5%, increases SMAD2 phosphorylation or exhibits anti-angiogenic activity

3. claims: 1, 2, 4-38 (all partially)

Claims relating to antibodies against CD105 wherein the antibody exhibits ADCC activity

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
information on patent family members

International application No  
PCT/GB2009/051216

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6190660	B1	20-02-2001	NONE

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53		D
<b>G 0 1 N 33/577 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/577		B

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

(72) 発明者 バブクック, ジョン  
 カナダ国 ブイ5エー 1ブイ7 ブリティッシュコロンビア州, バーナビー, エンタープライズ  
 ストリート 7990, アムジェン ブリティッシュ コロンビア

(72) 発明者 バリー, サイモン, トマス  
 イギリス国 エスケー10 4ティージー マックルズフィールド チェシャー, アルダーリー  
 パーク, アストラゼネカ アールアンドディー アルダーリー

(72) 発明者 ガジット - ボーンスタイン, ガディ  
 アメリカ合衆国 02451 マサチューセッツ州, ウォルサム, ゲートハウス ドライブ 35  
 , アストラゼネカ アールアンドディー ボストン

(72) 発明者 レイン, ナオミ  
 アメリカ合衆国 02451 マサチューセッツ州, ウォルサム, ゲートハウス ドライブ 35  
 , アストラゼネカ アールアンドディー ボストン

(72) 発明者 チョウ, チン  
 アメリカ合衆国 02451 マサチューセッツ州, ウォルサム, ゲートハウス ドライブ 35  
 , アストラゼネカ アールアンドディー ボストン

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA45 CA01 GA11 HA01  
 4C085 AA14 BB36 CC22 CC23 DD62 EE01  
 4H045 AA11 BA10 CA41 DA76 EA28 EA51 EA54 FA74

专利名称(译)	CD 105的目标结合剂及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012502649A</a>	公开(公告)日	2012-02-02
申请号	JP2011527406	申请日	2009-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司, 有限责任公司		
[标]发明人	バブクックジョン バリーサイモントマス ガジットボーンスタインガディ レインナオミ チヨウチン		
发明人	バブクック,ジョン バリー,サイモン,トマス ガジット-ボーンスタイン,ガディ レイン,ナオミ チヨウ,チン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/574 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/2896 A61K2039/505 C07K2317/565 C07K2317/73 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/28.ZNA A61K39/395.T A61P35/00 G01N33/574.Z G01N33/53.D G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA45 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/EA54 4H045/FA74		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	61/098685 2008-09-19 US		
其他公开文献	JP2012502649A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及使用该靶结合剂, 和这些药剂针对CD105。更具体地说, 本发明涉及涉及CD105-全人单克隆抗体。如在与CD105-的活性和/或过量产生有关的疾病的治疗中所述, 并且是作为诊断剂的实际定向结合剂。  
技术领域

m A b 識別番号	配列	配列番号
4. 120	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	1
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	2
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	3
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	4
9H10	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	5
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	6
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	7
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	8
10C9	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	9
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	10
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	11
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	12
4D4	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	13
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	14
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	15
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	16
11H2	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	17
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	18
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	19
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	20
6B1	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	21
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	22
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	23
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	24
4. 37	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	25
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	26
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	27
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	28