

(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2015-504302

(P2015-504302A)

(43) 公表日 平成27年2月12日(2015.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	2G045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 ZNAY	4B063
CO7K 16/28 (2006.01)	CO7K 16/28	4C076
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15 Z	4C084
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50 Z	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-539356 (P2014-539356)
 (86) (22) 出願日 平成24年11月5日 (2012.11.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年7月2日 (2014.7.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/071832
 (87) 国際公開番号 W02013/064684
 (87) 国際公開日 平成25年5月10日 (2013.5.10)
 (31) 優先権主張番号 11306416.6
 (32) 優先日 平成23年11月3日 (2011.11.3)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 500033483
 ビエール、ファーブル、メディカマン
 フランス国ブローニュ、ピヤンクール、ブ
 ラス、アベル、ガンズ、45
 (74) 代理人 100117787
 弁理士 勝沼 宏仁
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝
 (74) 代理人 100137497
 弁理士 大森 未知子
 (72) 発明者 シャルロット、ポーラルポール
 フランス国ジョンジエ、エパニー、リュ、
 デュ、シャン、ア、ラ、モワヌ、156
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原結合タンパク質および癌の治療のためのアドレッシング産物としてのその使用

(57) 【要約】

本発明は、タンパク質 A x 1 と特異的に結合することができる抗原結合タンパク質、特に、モノクローナル抗体、ならびに前記タンパク質をコードするアミノ酸配列および核酸配列に関する。一側面から、本発明は、A x 1 と特異的に結合することができ、かつ、A x 1 のインターナリゼーションを誘導することにより細胞にインターナライズされ得る抗原結合タンパク質または抗原結合フラグメントに関する。本発明はまた、毒素、放射性元素または薬物などの他の抗癌化合物と組み合わせたアドレッシング産物としての前記抗原結合タンパク質の使用、およびある種の癌の治療のためのその使用も含んでなる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i) 好ましくは配列番号 29 もしくは 30 の配列またはその天然変異体配列を有する、ヒトタンパク質 A x 1 と特異的に結合し、かつ、

ii) その前記ヒトタンパク質 A x 1 への結合の後にインターナライズされ、

配列番号 1 ~ 14 からなる群から選択されるアミノ酸配列を少なくとも含んでなることを特徴とする、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

好ましくは配列番号 31 もしくは 32 の配列またはその天然変異体配列を有する、ヒトタンパク質 A x 1 細胞外ドメインに局在するエピトープと特異的に結合することを特徴とする、請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 3】

そのエピトープと少なくとも 10^{-9} M の EC_{50} で結合することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 4】

少なくとも 200 の MFI 減少を誘導することを特徴とする、請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

モノクローナル抗体からなることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 6】

配列番号 1、2 および 3 の配列を含んでなる 3 つの軽鎖 CDR と、配列番号 4、5 および 6 の配列を含んでなる 3 つの重鎖 CDR とを含んでなる抗体からなることを特徴とする、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

配列番号 8 の配列または配列番号 8 と少なくとも 80% の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインを含んでなることを特徴とする、請求項 6 に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

配列番号 7 の配列または配列番号 7 と少なくとも 80% の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインを含んでなることを特徴とする、請求項 6 に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 9】

配列番号 7 の配列または配列番号 7 と少なくとも 80% の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 8 の配列または配列番号 8 と少なくとも 80% の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインとを含んでなることを特徴とする、請求項 6 に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

2011年7月28日にCNCM (パスツール研究所、フランス) に寄託されたハイブリドーマ I - 4505 に由来するモノクローナル抗体 1613F12 からなることを特徴とする、請求項 6 に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 11】

2011年7月28日にCNCM (パスツール研究所、フランス) に寄託されたマウスハイブリドーマ I - 4505。

【請求項 12】

タンパク質 A x 1 細胞外ドメイン、好ましくは、ヒトタンパク質 A x 1 細胞外ドメイン、より好ましくは、配列番号 31 もしくは 32 の配列またはその天然変異体配列を有するヒトタンパク質 A x 1 細胞外ドメイン、に局在するエピトープからなる宿主標的部位に、細胞傷害性薬剤を送達するためのアドレッシング産物として使用するための、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

50

【請求項 13】

細胞傷害性薬剤と結合された請求項 1 ~ 10 および 12 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質またはその抗原結合フラグメントを含んでなる免疫複合体。

【請求項 14】

癌の治療に使用するための、請求項 13 に記載の免疫複合体。

【請求項 15】

請求項 13 に記載の免疫複合体と少なくとも 1 種類の賦形剤および / または薬学上許容されるビヒクルとを含んでなる、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、タンパク質 A x 1 と特異的に結合することができる、新規な抗原結合タンパク質、特に、モノクローナル抗体、ならびに前記タンパク質をコードするアミノ酸配列および核酸配列に関する。一側面から、本発明は、A x 1 と特異的に結合することができ、A x 1 のインターナライゼーションを誘導することにより細胞にインターナライズされ得る新規な抗原結合タンパク質または抗原結合フラグメントに関する。本発明はまた、毒素、放射性元素または薬物などの他の抗癌化合物と組み合わせたアドレッシング産物としての前記抗原結合タンパク質の使用、およびある種の癌の治療のためのその使用も含んでなる。

【発明の背景】

20

【0002】

「A x 1」(「U f o」、「A r k」または「T y r o 7」とも呼ばれる)は、慢性骨髄性白血病患者から、マウス N I H 3 T 3 により過剰発現された際に形質転換を誘発する癌遺伝子としてクローニングされた。A x 1 は、T A M (T y r o 3、A x 1、M e r) ファミリーと呼ばれる受容体チロシンキナーゼ (R T K) の一ファミリーに属し、T y r o 3 (R s e、S k y、D t k、E t k、B r t、T i f)、A x 1、および M e r (E y k、N y k、T y r o - 1 2) を含む [Lemke G. Nat. Rev. Immunol. (2008).8. 327-336]。

【0003】

ヒトタンパク質 A x 1 は、アミノ酸 894 個のタンパク質であり、その配列は配列表に配列番号 29 として示されている。アミノ酸 1 ~ 25 はシグナルペプチドに相当し、このペプチドシグナルを含まないヒトタンパク質 A x 1 は、配列表に配列番号 30 として示されている。

30

【0004】

当初は成長停止特異的遺伝子として単離された G a s 6 は、T A M ファミリーのメンバーに共通リガンドである [Varnum B.C. et al. Nature (1995).373, 623-626]。G a s 6 は、A x 1 に対して最大の親和性を示し、次に T y r o 3、最後に M e r が続く [Nagata K. et al. J. Biol. Chem. (1996).271, 30022-30027]。G a s 6 は、リン脂質膜との結合を仲介する - カルボキシグルタミン酸 (G l a) リッチドメイン、4 つの上皮細胞増殖因子様ドメイン、および 2 つのラミニン G 様 (L G) ドメインからなる [Manfioletti G., Brancolini, C., Avanzi, G. & Schneider, C. Mol. Cell Biol. (1993).13, 4976-4985]。多くの他の R T K と同様、リガンドの結合は、受容体の二量体形成、および様々な細胞内シグナル伝達分子のドッキング部位として働くチロシン残基 (受容体 A x 1 に対しては、チロシン残基 779、821 および 866) の自己リン酸化をもたらす [Linger R.M. Adv. Cancer Res. (2008).100, 35-83]。さらに、A x 1 受容体は、リガンド依存性のプロセスを介しても活性化され得る。この活性化は、A x 1 受容体が過剰発現される場合に起こり得る。

40

【0005】

G a s 6 / A x 1 シグナル伝達は、i n v i t r o で多様な細胞において、細胞の増殖、接着、移動および生存を含む様々な細胞プロセスを調節することが示されている [Haf

50

izi S. & Dahlback, B. FEBS J. (2006).273, 5231-5244]。さらに、TAM受容体は先天免疫の制御に関与し、樹状細胞(DC)およびマクロファージにおいて病原体に対する炎症性応答を阻害する。また、TAM受容体は、これらの免疫細胞によるアポトーシス細胞の食作用も駆動し、ナチュラルキラー(NK)細胞の成熟および殺生活性に必要とされる[Lemke G. Nat. Rev. Immunol. (2008).8, 327-336]。

【0006】

通常の細胞では発現は弱い、主として線維芽細胞、骨髄前駆細胞、マクロファージ、神経系組織、心筋および骨格筋に見られ、そこで主要には細胞の生存を助ける。Gas6/Axl系は、血管平滑筋細胞のホメオスタシスを調節することにより血管生物学に重要な役割を果たしている[Korshunov V.A., Mohan, A.M., Georger, M.A. & Berk, B.C. Circ. Res. (2006).98, 1446-1452; Korshunov V.A., Daul, M., Massett, M.P. & Berk, B.C. Hypertension (2007).50, 1057-1062]。

10

【0007】

腫瘍細胞では、Axlは、細胞の浸潤および移動の調節に重要な役割を果たしている。Axlの過剰発現は、予後の悪さに関連しているだけでなく、乳癌、結腸癌、食道癌、肝細胞癌、胃癌、神経膠腫、肺癌、黒色腫、骨肉腫、卵巣癌、前立腺癌、横紋筋肉腫、腎臓癌、甲状腺癌および子宮内膜癌で報告されているように、様々なヒト癌の浸潤性の増長にも関連している[総説としてLinger R.M. Adv. Cancer Res. (2008).100, 35-83およびVerma A. Mol. Cancer Ther. (2011).10, 1763-1773]。乳癌では、Axlは、上皮間葉移行(EMT)の強力なエフェクターであると思われ; EMTプログラムは、その生物において癌細胞の移動および転移に積極的に寄与している[Thiery J.P. Curr. Opin. Cell Biol. (2003).15, 740-746]。

20

【0008】

また、Axlは、血管新生を調節することも示されている。実際に、内皮細胞におけるAxlのノックダウンは、管の形成および移動に障害を来すとともに[Holland S.J. et al. Cancer Res. (2005).65, 9294-9303]、特定の血管新生シグナル伝達経路を妨げた[Li Y. et al. Oncogene (2009).28, 3442-3455]。

【0009】

もっと最近では、ある範囲の細胞モデルに対して、薬剤耐性現象におけるAxl過剰発現の関与を記載している研究がいくつかある。下表1にこれらの研究をまとめる。

30

【0010】

【表 1】

表 1

参照文献	癌のタイプ	治療薬	細胞モデル
Macleod et al., 2005	卵巣癌	シスプラチン	PE01/PE01CDDP
Mahadevan et al., 2007	GIST	イマチニブ c-kit/PDGFRの阻害剤	GIST882 >GIST-R
Lay et al., 2007	NSCLC	ドキソルビシン	CL-1クローン CL1-5F4クローン
Hong et al., 2008	AML	ドキソルビシン/ シスプラチン	U937
Liu et al., 2009	乳癌	ラパチニブ (HER1およびHER2阻害剤)	HER2 (+) BT474 (J4)
Keating et al., 2010	星状細胞種	テモゾロミド カルボプラチン ビンクリスチン	G12 A172
Ye et al., 2010	NSCLC	エルロチニブ	HCC827

10

20

上記表 1 に挙げた完全な出典：

Macleod, K. et al. *Cancer Res.* (2005).65, 6789-6800

Mahadevan D. et al. *Oncogene* (2007).26, 3909-3919

Lay J.D. et al. *Cancer Res.* (2007).67, 3878-3887

Hong C.C. et al. *Cancer Lett.* (2008).268, 314-324

Liu L. et al. *Cancer Res.* (2009).69, 6871-6878

Keating A.K. et al. *Mol. Cancer Ther.* (2010).9, 1298-1307

Ye X. et al. *Oncogene* (2010).29, 5254-5264

30

【 0 0 1 1 】

このような文脈では、A x 1 R T K は、腫瘍学において興味深い標的と考えられる。いくつかのグループが、すでに、裸のモノクローナル抗体または標的化小分子を用いて、この g a s 6 / A x 1 軸を標的とする抗腫瘍戦略を開発している [Verma A. *Mol. Cancer Ther.* (2011).10, 1763-1773]。

【 発明の開示 】

【 0 0 1 2 】

第一の態様では、本発明は、i) ヒトタンパク質 A x 1 と特異的に結合し、かつ、i i) その前記ヒトタンパク質 A x 1 との結合の後にインターナライズされる、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントに関する。

40

【 0 0 1 3 】

より一般的には、本発明は、その前記標的 A x 1 との結合の後にインターナライズされ得る抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントの選択のための、タンパク質 A x 1 の使用に関する。より詳しくは、前記標的は、A x 1 の細胞外ドメインである。

【 0 0 1 4 】

従って、この特定の側面では、本発明は、哺乳動物細胞に目的分子を送達またはインターナライズすることができる化合物またはその結合フラグメントのスクリーニングのための *i n v i t r o* 法に向けられ、前記目的分子は前記化合物に共有結合され、前記方法は、以下の工程：

50

a) A x 1 タンパク質、またはその細胞外ドメイン (E C D)、またはそのエピトープと特異的に結合することができる化合物を選択する工程；

b) 場合により、前記目的分子または対照分子を、工程 a) で選択された前記化合物と共有結合させて複合体を形成する工程；

c) 工程 a) で選択された前記化合物、または工程 b) で得られた前記複合体を、その表面で A x 1 タンパク質またはその機能的フラグメントを発現する哺乳動物細胞、好ましくは、生細胞と接触させる工程；

d) 前記化合物または前記目的分子または前記複合体が前記哺乳動物細胞に細胞内送達またはインターナライズされたかどうかを決定する工程；および

e) 前記化合物を哺乳動物生細胞に目的分子を送達またはインターナライズすることができる化合物として選択する工程を含んでなる。

10

【 0 0 1 5 】

好ましい態様では、目的分子を哺乳動物生細胞に送達またはインターナライズすることができる前記化合物は、タンパク質（本明細書ではポリペプチドまたはペプチドとも呼ばれる）またはペプチド構造、特に、少なくとも 5、10、15 またはそれを超えるアミノ酸残基のアミノ酸配列、を含んでなるタンパク質様化合物であり、前記アミノ酸残基はグリコシル化することができる。

【 0 0 1 6 】

目的分子を哺乳動物生細胞に送達またはインターナライズすることができる前記化合物がタンパク質またはタンパク質様化合物である場合、前記化合物は、本明細書では、「抗原結合タンパク質」とも呼ばれ、前記抗原結合タンパク質またはその結合フラグメントは、

20

i) タンパク質 A x 1、好ましくは、ヒト A x 1 タンパク質と特異的に結合することができ、かつ、

i i) 前記 A x 1 タンパク質が前記哺乳動物細胞の表面で発現された場合に、その前記タンパク質 A x 1 との結合の後に、哺乳動物細胞にインターナライズされ得る。

【 0 0 1 7 】

好ましい態様では、前記哺乳動物生細胞は、ヒト細胞、好ましくは、A x 1 タンパク質受容体を天然に発現する細胞である。

30

【 0 0 1 8 】

特定の態様では、工程 c) の哺乳動物生細胞は、それらの表面で組換え A x 1 タンパク質を発現する哺乳動物細胞である。

【 0 0 1 9 】

これもまた好ましい態様において、前記目的分子は、細胞傷害性分子（本明細書では細胞傷害性または細胞増殖抑制性薬剤とも呼ばれる）である。

【 0 0 2 0 】

これもまた好ましい態様において、前記目的分子は、リンカー、より好ましくは、ペプチドリリンカー、より好ましくは、切断可能なペプチドリリンカー、より好ましくは、哺乳動物細胞に、特に、前記哺乳動物細胞のサイトゾルに含まれる天然の細胞内化合物により切断され得るリンカーを用いて、A x 1 タンパク質と結合することができる前記化合物に共有結合される。

40

【 0 0 2 1 】

これもまた好ましい態様において、A x 1 タンパク質と結合することができる前記化合物は、A x 1 タンパク質に、または A x 1 E D C ドメインに局在するそのエピトープに特異的に向けられている抗体、またはその機能的結合フラグメントである。

【 0 0 2 2 】

e) の選択工程は、細胞内送達またはインターナライゼーションの評価に関して当業者に知られているいずれの方法によっても具現化することができる。A x 1 タンパク質と特異的に結合することができる前記化合物の、または前記化合物と前記目的分子によって形成

50

される前記複合体の、または前記化合物と共有結合されている前記目的分子の、存在、不在、または活性を証明または評価することができるアッセイまたは試験は当業者に周知である（以下に開示されるこのような試験またはアッセイのいくつかの例を参照。ただし、これらの試験は以下の試験例に限定されない）。

【0023】

より詳しくは、これらの試験またはアッセイは、FACS、免疫蛍光、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、細胞傷害性/細胞増殖抑制性評価などによって具現化することができる。

【0024】

この側面では、本発明はまた、細胞傷害性化合物を哺乳動物細胞、好ましくは、生細胞に送達することができる細胞傷害性または細胞増殖抑制性複合体の製造のための *in vitro* 法にも向けられ、前記方法は、

10

細胞傷害性薬剤を、

i) A x 1 タンパク質、好ましくは、ヒト A x 1 タンパク質と特異的に結合することができ、かつ、

ii) 前記 A x 1 タンパク質が前記哺乳動物細胞の表面で発現された場合に、その前記タンパク質 A x 1 との結合の後に、哺乳動物細胞にインターナライズされる化合物に共有結合させる工程を含んでなる。

【0025】

好ましくは、前記化合物は、タンパク質様タンパク質、より好ましくは、A x 1 タンパク質に、または A x 1 EDC ドメインに局在するそのエピトープに特異的に向けられた抗体、または前記抗体の機能的結合フラグメントである。

20

【0026】

好ましい態様では、前記細胞傷害性薬剤は、前記抗 A x 1 抗体またはその機能的フラグメントに、リンカー、より好ましくは、ペプチドリナー、より好ましくは、切断可能なペプチドリナー、より好ましくは、限定されない例として天然の細胞内化合物により切断され得るリンカーを用いて共有結合される。

【0027】

TAMファミリーの他のメンバーと同様に、A x 1 細胞外ドメイン (ECD) は細胞接着分子のものと近接した構成を有する。A x 1 ECD は、2つの免疫グロブリン様ドメインの次に2つの隣接するフィブロネクチン III 型様ドメインがくる組合せを特徴とする [O'Bryan J.P. et al. Mol. Cell Biol. (1991).11, 5016-5031]。この2つのN末端免疫グロブリン様ドメインは、Gas6 リガンド結合に十分なものである [Sasaki T. et al. EMBO J. (2006).25, 80-87]。

30

【0028】

ヒトタンパク質 A x 1 の ECD は、配列番号 29 の配列のアミノ酸 1 ~ 451 に相当するアミノ酸 451 個のフラグメントであり、その配列は配列表に配列番号 31 として示されている。アミノ酸 1 ~ 25 はシグナルペプチドに相当し、このシグナルペプチドを含まないヒトタンパク質 A x 1 の ECD は、配列番号 29 の配列のアミノ酸 26 ~ 451 に相当し、配列番号 32 の配列により示される。

40

【0029】

これまでに、種々のインターナライゼーション様式が確認されている。これらのインターナライゼーション様式は、細胞内におけるタンパク質またはタンパク質複合体のインターナライズを方向付ける。エンドサイトーシス後、ほとんどの膜タンパク質または脂質は細胞表面に戻るが (リサイクリング)、一部の膜成分は後期エンドソームまたはゴルジに送達される [Maxfield F.R. & McGraw, T.E. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2004).5, 121-132]。

【0030】

好ましい態様では、本発明は、i) ヒトタンパク質 A x 1 と特異的に結合し、かつ、ii) その前記ヒトタンパク質 A x 1 との結合の後に、インターナライズされる、抗原結合

50

タンパク質、またはその抗原結合フラグメントに関し、前記抗原結合タンパク質が、配列番号1～14、または配列番号1～14と少なくとも80%、好ましくは、85%、90%、95%および98%の同一性を示す任意の配列からなる群から選択される少なくとも1種のアミノ酸配列を含んでなる。

【0031】

最も好ましい態様では、本発明は、

i) 好ましくは配列番号29もしくは30の配列またはその天然変異体配列を有する、ヒトタンパク質A x 1と特異的に結合し、かつ、

ii) その前記ヒトタンパク質A x 1との結合の後にインターナライズされ、

配列番号1～14からなる群から選択される少なくとも1種のアミノ酸配列を含んでなる抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントに関する。

10

【0032】

「結合タンパク質」または「抗原結合タンパク質」とは、別のタンパク質または分子（一般に抗原と呼ばれる）と特異的または全般的な親和性を有するペプチド鎖である。タンパク質を接触させると、結合が可能であれば、複合体を形成する。本発明の抗原結合タンパク質は、限定されるものではないが、好ましくは、抗体、抗体のフラグメントもしくは誘導体、タンパク質またはペプチドであり得る。

【0033】

本発明によれば、抗原結合タンパク質の「抗原結合フラグメント」とは、抗原結合タンパク質の標的（一般に抗原とも呼ばれる）と特異的に結合する能力を保持し、かつ、抗原結合タンパク質のアミノ酸配列の、少なくとも5個の連続するアミノ酸残基、少なくとも10個の連続するアミノ酸残基、少なくとも15個の連続するアミノ酸残基、少なくとも20個の連続するアミノ酸残基、少なくとも25個の連続するアミノ酸残基、少なくとも40個の連続するアミノ酸残基、少なくとも50個の連続するアミノ酸残基、少なくとも60個の連続するアミノ酸残基、少なくとも70個の連続するアミノ酸残基、少なくとも80個の連続するアミノ酸残基、少なくとも90個の連続するアミノ酸残基、少なくとも100個の連続するアミノ酸残基、少なくとも125個の連続するアミノ酸残基、少なくとも150個の連続するアミノ酸残基、少なくとも175個の連続するアミノ酸残基、少なくとも200個の連続するアミノ酸残基、または少なくとも250個の連続するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含んでなる、任意のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を示すものとする。

20

30

【0034】

抗原結合タンパク質が抗体である好ましい態様では、このような「抗原結合フラグメント」は、Fv、scFv（scは一本鎖を表す）、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv-Fcフラグメントもしくはダイアボディー、またはその半減期がポリ（アルキレン）グリコール、例えば、ポリ（エチレン）グリコールの付加（「ペグ化」）（ペグ化フラグメントはFv-PEG、scFv-PEG、Fab-PEG、F(ab')₂-PEGまたはFab'-PEGと呼ばれる）（「PEG」はポリ（エチレン）グリコールを表す）などの化学修飾によるか、またはリポソームへの封入によって延長されたと考えられる任意のフラグメントからなる群から選択され、前記フラグメントは、本発明による抗体の特徴的なCDRのうち少なくとも1つを有する。好ましくは、前記「抗原結合フラグメント」は、それらが由来する抗体の可変重鎖または軽鎖の部分配列からなるか、またはそれを含んでなると考えられ、前記部分配列は、それが由来する抗体と同じ結合特異性と、標的に対して十分な親和性、好ましくは、それが由来する抗体の親和性の少なくとも1/100、より好ましい様式では、少なくとも1/10に相当する親和性を保持するのに十分なものである。このような機能的フラグメントは、それが由来する抗体の配列の、最低5個のアミノ酸、好ましくは、10、15、25、50および100個の連続するアミノ酸を含むと考えられる。

40

【0035】

用語「エピトープ」は、抗体を含む抗原結合タンパク質により結合される抗原の領域で

50

ある。エピトープは、構造的または機能的と定義することができる。機能的エピトープは一般に、構造的エピトープのサブセットであり、相互作用の親和性に直接寄与する残基を持つ。エピトープはまた、コンフォメーション的でもあり得、すなわち、非直鎖アミノ酸から構成される。特定の態様では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、またはスルホニル基などの化学的に活性な分子の表面群である決定基を含み得、特定の態様では、特定の三次元構造の特徴および/または特定の電荷特徴を持ち得る。

【0036】

本出願では、エピトープは、ヒトタンパク質 A x 1 の細胞外ドメインに局在する。

【0037】

本発明の好ましい態様によれば、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントは、ヒトタンパク質 A x 1 細胞外ドメインに局在し、好ましくは、配列番号 31 もしくは 32 の配列またはその天然変異体配列を有するエピトープと特異的に結合する。

10

【0038】

「特異的に結合する」などとは、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントが、生理学的条件下で比較的安定な抗原と複合体を形成することを意図する。特異的結合は、少なくとも約 $1 \cdot 10^{-6}$ M 以下の平衡解離定数を特徴とし得る。2つの分子が特異的に結合するかどうかを決定するための方法は、当技術分野で周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴などが含まれる。疑念を避けるため、この用語は、前記抗原結合フラグメントが別の抗原と低レベルで結合または干渉できないことを意味するものではない。しかしながらやはり、好ましい態様としては、前記抗原結合フラグメントは前記

20

【0039】

この意味で、「 EC_{50} 」は、50%効果濃度を意味する。より厳密には、この50%効果濃度 (EC_{50}) という用語は、ある特定の暴露時間の後にベースラインと最大値の半分の応答を誘導する薬物、抗体または毒物の濃度に相当する。これは薬物の効力の尺度として慣用されている。従って、段階的用量反応曲線 (graded dose response curve) の EC_{50} は、その最大効果の50%が見られる化合物の濃度を表す。素量的用量反応曲線 (quantal dose response curve) の EC_{50} は、特定の暴露期間の後に、その集団の50%が応答を示す化合物の濃度を表す。濃度の尺度は一般に、比較的小さい濃度変化で急速に増加するS字曲線をたどる。これはベストフィット直線の微分によって数学的に求めることができる。

30

【0040】

好ましい態様として、本発明で決定された EC_{50} は、ヒト腫瘍細胞上に露出している A x 1 ECD に対する抗体結合の抗力を特徴付けた。 EC_{50} パラメータは、FACS分析を用いて決定される。 EC_{50} パラメータは、ヒト腫瘍細胞上で発現されたヒト A x 1 に対して最大結合の50%が見られる抗体濃度を表す。各 EC_{50} 値は、4パラメータ回帰曲線フィッティングプログラム (Prism Software) を用いて用量反応曲線の中点として計算した。このパラメータは、生理的状态/病的状態の代表例として選択されたものである。

40

【0041】

本発明の一態様では、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントは、そのエピトープと、少なくとも 10^{-9} M、優先的には $10^{-9} \sim 10^{-12}$ M の間の EC_{50} で結合する。

【0042】

本発明の別の態様は、哺乳動物細胞、好ましくは、ヒト細胞、好ましくは、生細胞内に、インターナライズされ得る抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントを選択するためのプロセスまたは方法であり、

i) A x 1、好ましくは、その EDC ドメインまたはそのエピトープと、特異的に結合する抗原結合タンパク質を選択する工程、および

ii) 哺乳動物細胞の表面で発現された A x 1 タンパク質とのそれらの結合の後に、前

50

記哺乳動物細胞にインターナライズされる、前記工程 i) から得られた前記抗原結合タンパク質を選択する工程を含んでなる。

【0043】

特定の態様では、前記哺乳動物細胞は、それらの表面で A x 1 タンパク質受容体を天然に発現するか、またはそれらの表面で組換え A x 1 タンパク質を発現する哺乳動物細胞、好ましくは、ヒト細胞である。

【0044】

このような方法またはプロセスは、i) A x 1 と少なくとも 10^{-9} M の EC⁵⁰ で特異的に結合する抗原結合タンパク質を選択する工程、および ii) それらの A x 1 との結合の後にインターナライズされる、前記工程から得られた抗原結合タンパク質を選択する工程を含んでなり得る。ii) の選択工程は、インターナライゼーションの評価に関して当業者に知られているいずれの方法によっても具現化することができる。より詳しくは、試験は、FACS、免疫蛍光、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、細胞傷害性評価などによって具現化することができる。

10

【0045】

本発明による抗原結合タンパク質のもう一つの特徴は、腫瘍細胞の増殖に対していずれの顕著な活性も持たないということである。より詳しくは、以下の例で示されるように、本発明による抗原結合タンパク質は、増殖 SN12C モデルに対していずれの顕著な *in vitro* 活性も持たない。

20

【0046】

腫瘍学において、mAb が治療効力を発揮し得る機構は複数存在するが、それらの活性は持続的利益をもたらすには十分でない。従って、特に化学療法薬としての薬物とそれらを組み合わせることでそれらの活性を増強するためにいくつかの戦略が採られてきた。組合せプロトコールに対する有効な代替法として、免疫毒素が癌を治療するための新規な治療選択肢となる [Beck A. et al. *Discov. Med.* (2010).10, 329-339; Alley S.C. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2009).330, 932-938]。抗体 - 薬物複合体 (ADC) は、mAb の特異性を利用し、かつ、細胞傷害性薬剤の送達を腫瘍に標的化する能力が mAb 活性と薬物活性の両方を著しく増強し得る一つのアプローチである。mAb は抗原と特異的に結合し、腫瘍細胞では実質的発現を伴うが、正常な細胞では発現が限定されることが理想的である。

30

【0047】

本発明は、特異的抗 A x 1 結合タンパク質、より詳しくは、A x 1 結合の後にインターナライズされる高い能力を示す特異的抗 A x 1 抗体を対象とする。このような抗原結合タンパク質は、免疫 - 薬物複合体成分の一つとして注目され、従って、それは連結された細胞傷害薬を標的癌細胞に向ける。一度インターナライズされると、細胞傷害薬は癌細胞の死を誘発する。

【0048】

免疫複合体療法で成功するための重要な鍵は、標的抗原特異性と、抗原結合タンパク質複合体の癌細胞へのインターナライゼーションであると思われる。明らかに、非インターナライズ性の抗原は、インターナライズ性の抗原よりも細胞傷害性薬剤を送達する効果が低い。インターナライゼーションプロセスは抗原間で異なり、結合タンパク質により影響を受け得る複数のパラメーターに依存する。細胞表面 RTK は、このようなアプローチを検討するために注目される抗原ファミリーを構成する。

40

【0049】

生体分子では、細胞傷害薬は細胞傷害活性をもたらし、使用する抗原結合タンパク質は癌細胞に対するその特異性をもたらすとともに、細胞傷害薬を適切にアドレス指定するために細胞内に入れるためのベクターとなる。

【0050】

よって、免疫複合体分子を改良するためには、担体結合タンパク質は、標的癌細胞への

50

高いインターナライズ能を示さなければならない。結合タンパク質がインターナライゼーションを媒介した効率は、標的エピトープによって有意に異なる。強力なインターナライズ性抗 A x 1 結合タンパク質の選択には、A x 1 のダウンレギュレーションを研究するだけでなく、細胞内に入る抗 A x 1 結合タンパク質を追跡する様々な実験データが必要である。

【0051】

好ましい態様では、本発明による抗原結合タンパク質のインターナライゼーションが、好ましくは、免疫蛍光（本出願の下記に例示される）またはインターナライゼーション機構を専門とする当業者に知られているいずれかの方法またはプロセスによって評価することができる。

10

【0052】

別の好ましい態様では、本発明による A x 1 - 抗原結合タンパク質複合体は、本発明の結合タンパク質が前記 A x 1 の E C D に結合した後にインターナライズされるので、細胞表面の A x 1 量の減少が引き起こされる。この減少は、当業者に知られているいずれの方法（ウエスタンブロット、FACS、免疫蛍光など）によって定量することができる。

【0053】

本発明の態様では、この減少（従ってインターナライゼーションを反映する）は、好ましくは FACS により測定し、非処理細胞で測定された平均蛍光強度（MFI）と、本発明による抗原結合タンパク質で処理した細胞で測定された MFI との間の差すなわちとして表すことができる。

20

【0054】

本発明の非限定例として、このは、i) 本発明の抗原結合タンパク質との 24 時間のインキュベーション期間の後のヒト腎腫瘍 SN12C 細胞、および ii) A1exa488 で標識された二次抗体を用い、非処理細胞および実施例 9 に記載の本発明の抗原結合タンパク質で処理した細胞で得られた MFI に基づいて決定される。このパラメーターは、下式で計算されると定義される。

【数 1】

$$\Delta (MFI_{24h} \text{非処理細胞} - MFI_{24h} \text{抗原結合タンパク質処理細胞})$$

30

MFI は細胞表面で発現された A x 1 に比例するので、この MFI 間の差は A x 1 のダウンレギュレーションを反映する。

【0055】

より好ましく、有利な側面では、本発明の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントは、少なくとも 200、好ましくは、少なくとも 300 の $(MFI_{24h} \text{非処理細胞} - MFI_{24h} \text{処理細胞})$ を誘発するモノクローナル抗体、好ましくは、単離された Mab からなる。

【0056】

本発明による抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントは、少なくとも 200 の MFI 減少を誘導する。

40

【0057】

より詳しくは、上述のは、以下のプロセス（例示的、非限定的例とみなされなければならない）に従って測定することができる：

- a) 目的の腫瘍細胞を本発明の抗原結合タンパク質で処理およびインキュベートし、
- b) 工程 a) の処理細胞と、並行して非処理細胞を、本発明の抗原結合タンパク質で処理し、
- c) 処理および非処理細胞に関して、抗原結合タンパク質と結合することができる二次標識抗体を用いて MFI（表面に存在する A x 1 の量を表す）を測定し、
- d) を、非処理細胞で得られた MFI から処理細胞で得られた MFI を差し引いた差

50

として計算する。

【0058】

用語「抗体」または「免疫グロブリン」は、互換的に、広義に使用され、モノクローナル抗体、好ましくは、単離されたM a b（例えば、全長または完全モノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、多価抗体または多重特異性抗体（例えば、それらが所望の生物活性を示す限り、二重特異性抗体）を含む。

【0059】

より詳しくは、このような分子は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖を含んでなる糖タンパク質からなる。各重鎖は、重鎖可変領域（またはドメイン）（本明細書ではH C V RまたはV Hと略される）と重鎖定常領域を含んでなる。重鎖定常領域は、3つのドメインC H 1、C H 2およびC H 3を含んでなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではL C V RまたはV Lと略される）と軽鎖定常領域を含んでなる。軽鎖定常領域は、1つのドメインC Lを含んでなる。V HおよびV L領域は、フレームワーク領域（F R）と呼ばれる、より保存性の高い領域に散在した、相補性決定領域（C D R）と呼ばれる超過変性領域にさらに細分することができる。各V HおよびV Lは、3つのC D Rと4つのF Rから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端方向に以下の順序：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4で配置されている。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、宿主組織、または免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第1の成分（C 1 q）を含む因子への免疫グロブリンの結合を仲介することができる。

10

20

【0060】

本発明の意味における抗体はまた、ある特定のその抗体フラグメントも含む。前記抗体フラグメントは、供給源または免疫グロブリンのタイプ（すなわち、I g G、I g E、I g M、I g Aなど）にかかわらず、所望の結合特異性および親和性を示し、すなわち、抗体フラグメントは、本発明の全長抗体に匹敵する親和性でA x 1タンパク質と特異的に結合することができる。

【0061】

一般に、モノクローナル抗体またはそれらの機能的フラグメント、特にマウス起源のもの調製には、特に手引き書“Antibodies” (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988)に記載されている技術またはKohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975)により記載されているハイブリドーマからの作製技術を参照することができる。

30

【0062】

本明細書において用語「モノクローナル抗体」または「M a b」とは、特定の抗原に向けられ、かつ、B細胞の単クローンまたはハイブリドーマによって生産され得る抗体分子を意味する。モノクローナル抗体はまた組換え型であってもよく、すなわち、タンパク質工学によって作製されてもよい。さらに、一般に様々な決定基またはエピトープに対する様々な抗体を含むポリクローナル抗体の作製とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原の単一のエピトープに対するものである。本発明は、単離された、または天然源から精製により得られた、または遺伝子組換えもしくは化学合成により得られた抗体に関する。

40

【0063】

本発明の好ましい態様は、配列番号1、2および3の配列、または配列番号1、2および3と少なくとも80%、好ましくは、85%、90%、95%および98%の同一性を示す任意の配列を含んでなる3つの軽鎖C D Rと；配列番号4、5および6の配列、または配列番号4、5および6と少なくとも80%、好ましくは、85%、90%、95%および98%の同一性を示す任意の配列を含んでなる3つの重鎖C D Rとを含んでなる抗体を含んでなる、またはからなる、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントである。

【0064】

50

本発明のより好ましい態様では、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 1、2 および 3 の配列を含んでなる 3 つの軽鎖 C D R と；配列番号 4、5 および 6 の配列を含んでなる 3 つの重鎖 C D R とを含んでなる抗体からなる。

【0065】

好ましい側面では、C D R 領域または C D R とは、I M G T により定義される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域を示すものとする。相反する記述がなければ、C D R は、本明細書では、I M G T ナンバリングシステムに従って定義される。

【0066】

I M G T 独自ナンバリングは、抗原受容体、鎖のタイプ、または種が何であれ可変ドメインを比較するために定義されたものである [Lefranc M.-P., *Immunology Today* 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003)]。I M G T 独自ナンバリングでは、保存されているアミノ酸は常に同じ位置を有し、例えば、システイン 23 (1st - C Y S)、トリプトファン 41 (C O N S E R V E D - T R P)、疎水性アミノ酸 89、システイン 104 (2nd - C Y S)、フェニルアラニンまたはトリプトファン 118 (J - P H E または J - T R P) がそうである。I M G T 独自ナンバリングは、フレームワーク領域の標準画定 (F R 1 - I M G T : 1 ~ 26 番、F R 2 - I M G T : 39 ~ 55 番、F R 3 - I M G T : 66 ~ 104 番および F R 4 - I M G T : 118 ~ 128 番) および相補性決定領域の標準画定 : C D R 1 - I M G T : 27 ~ 38 番、C D R 2 - I M G T : 56 ~ 65 番および C D R 3 - I M G T : 105 ~ 117 番を提供する。ギャップは非占有の位置を表し、C D R - I M G T 長 (括弧の間にドットで区切って示される、例えば、[8 . 8 . 1 3]) は、重要な情報となる。I M G T 独自ナンバリングは、I M G T C o l l i e r s d e P e r l e s と呼ばれる 2 次元グラフ [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., *Immunogenetics*, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)]、および I M G T / 3 次元構造 - D B の 3 次元構造 [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., *T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004)] で用いられる。

【0067】

本明細書において相反する記述がなければ、相補性決定領域または C D R は、I M G T ナンバリングシステムに従って定義される免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域を意味するものと理解される。

【0068】

しかしながら、C D R は、K a b a t ナンバリングシステム (Kabat et al., *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991 および 後続版) に従って定義することもできる。3 つの重鎖 C D R と 3 つの軽鎖 C D R が存在する。ここで、用語「C D R」は、それが認識する抗原またはエピトープに対する抗体の結合親和性を担うアミノ酸残基の大部分を含有する領域の、場合に応じて 1 以上の、またはさらには全部を示して用いられる。

【0069】

K a b a t ナンバリングシステムによれば、本発明は、配列番号 9、10 および 11 の配列、または配列番号 9、10 および 11 と少なくとも 80%、好ましくは、85%、90%、95% および 98% の同一性を示す任意の配列を含んでなる、K a b a t ナンバリングシステムに従って定義される 3 つの軽鎖 C D R と；配列番号 12、13 および 14 の配列、または配列番号 12、13 および 14 と少なくとも 80%、好ましくは、85%、90%、95% および 98% の同一性を示す任意の配列を含んでなる、K a b a t ナンバリングシステムに従って定義される 3 つの重鎖 C D R とを含んでなる抗体からなる抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0070】

本発明の意味において、2 つの核酸またはアミノ酸配列間の「同一性パーセンテージ」

は、最適なアラインメントの後に得られる、比較する2つの配列間で同一のヌクレオチドまたはアミノ酸残基のパーセンテージを意味し、このパーセンテージは単に統計的なものであり、2つの配列間の違いはそれらの全長にわたってランダムに分布している。2つの核酸またはアミノ酸配列の比較は、それらを最適にアラインした後にこれらの配列を比較することにより慣行するが、この比較はセグメントによるか、または「アライメントウィンドウ」を用いて行うことができる。比較のための配列の最適アライメントは、手作業による比較の他、Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482]のローカルホモロジーアルゴリズムの手段によるか、Neddleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48: 443]のローカルホモロジーアルゴリズムの手段によるか、Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444]の類似性検索法の手段によるか、またはこれらのアルゴリズムを用いるコンピュータソフトウェア (the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのG A P、B E S T F I T、F A S T AおよびT F A S T A、または比較ソフトウェアB L A S T N RもしくはB L A S T P)の手段によって行うことができる。

10

【0071】

2つの核酸またはアミノ酸配列間の同一性パーセンテージは、最適にアラインしたこれら2つの配列を比較することにより決定され、比較される核酸またはアミノ酸配列は、これらの2配列間の最適なアライメントのために、参照配列に対して付加または欠失を含み得る。同一性パーセンテージは、2配列間で、好ましくは2つの完全な配列間で、アミノ酸またはヌクレオチド残基が同一である位置の数を求め、この同一の位置の数をアライメントウィンドウの位置の総数で割り、その商に100を掛け、これらの2配列間の同一性パーセンテージを得ることにより算出される。

20

【0072】

例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>のサイトで利用可能なB L A S Tプログラム「B L A S T 2 s e q u e n c e s」(Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174:247-250)を、デフォルトパラメーター (特に、パラメーター「オープンギャップペナルティー」: 5、「エクステンションギャップペナルティー」: 2; 選択されるマトリックスは、例えば、このプログラムにより提案されている「B L O S U M 6 2」マトリックスである)とともに使用することができ、比較する2配列間の同一性パーセンテージはこのプログラムにより直接算出される。

30

【0073】

参照アミノ酸配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性を示すアミノ酸配列の好ましい例としては、参照配列、ある種の改変、特に、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、付加もしくは置換、末端切断または延長を含むものが挙げられる。1以上の連続的または非連続的アミノ酸の置換の場合、被置換アミノ酸が「等価な」アミノ酸に置き換えられる置換が好ましい。ここで「等価なアミノ酸」という表現は、対応する抗体の生物活性を改変せずに構造アミノ酸の1つで置換され得る任意のアミノ酸を示すものとし、これらの具体例は以下に定義される。

【0074】

等価なアミノ酸は、それらに代わって置換されるアミノ酸との構造的相同性が、または生成可能な種々の抗原結合タンパク質間の生物活性の比較試験の結果のいずれかに対して決定することができる。

40

【0075】

限定されない例として、下表2に、対応する改変抗原結合タンパク質の生物活性の著しい改変を生じさせることなく実施可能な置換の可能性をまとめる。当然のことながら、同じ条件で逆の置換も可能である。

【0076】

【表 2】

表 2

元の残基	置換 (s)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

10

20

本発明の態様は、配列番号 1、2 および 3 の配列、または配列番号 1、2 および 3 と少なくとも 80%、好ましくは、85%、90%、95% および 98% の同一性を示す任意の配列を含んでなる 3 つの軽鎖 CDR と；配列番号 8 の配列、または配列番号 8 と少なくとも 80%、好ましくは、85%、90%、95% および 98% の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインとを含んでなる、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントに関する。

30

【0077】

本発明の好ましい態様によれば、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 1、2 および 3 の配列を含んでなる 3 つの軽鎖 CDR と；配列番号 8 の配列、または配列番号 8 と少なくとも 80% の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインとを含んでなる。

40

【0078】

本発明の別の好ましい態様によれば、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 8 の配列、または配列番号 8 と少なくとも 80% の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインとを含んでなる。

【0079】

「配列番号 8 と少なくとも 80% の同一性を示す任意の配列」とは、3 つの重鎖 CDR、配列番号 4、5 および 6 を示し、加えて、それらの CDR に相当する配列、すなわち、配列番号 4、5 および 6 の外側の配列番号 8 の全配列と少なくとも 80% の同一性を示す配列を称することを意図する。

【0080】

本発明の別の態様は、配列番号 7 の配列、または配列番号 7 と少なくとも 80%、好ま

50

しくは、85%、90%、95%および98%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと；配列番号4、5および6の配列、または配列番号4、5および6と少なくとも80%、好ましくは、85%、90%、95%および98%の同一性を示す任意の配列を含んでなる3つの重鎖CDRとを含んでなる抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0081】

本発明の好ましい態様によれば、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号7の配列、または配列番号7と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと；配列番号4、5および6の配列を含んでなる3つの重鎖CDRとを含んでなる。

10

【0082】

本発明の別の好ましい態様によれば、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号7の配列、または配列番号7と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインとを含んでなる。

【0083】

「配列番号7と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列」とはまた、3つの軽鎖CDR、配列番号1、2および3を示し、加えて、これらのCDRに相当する配列、すなわち、配列番号1、2および3の外側の配列番号7の全配列と少なくとも80%の同一性を示す配列を称することを意図する。

【0084】

20

本発明の別の態様は、配列番号7の配列、または配列番号7と少なくとも80%、好ましくは、85%、90%、95%および98%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと；配列番号8の配列、または配列番号8と少なくとも80%、好ましくは、85%、90%、95%および98%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインとを含んでなる抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントに関する。

【0085】

本発明の好ましい態様によれば、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号7の配列、または配列番号7と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号8の配列、配列番号8と少なくとも80%の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインとを含んでなる。

30

【0086】

より明確にするため、下表3aに、本発明の抗原結合タンパク質に相当する種々のアミノ酸配列をまとめる(Mu = マウス)。

【0087】

【表 3】

表 3

	CDR ナンバリング	重鎖	軽鎖	配列番号	
1613F12	IMGT		CDR-L1	1	
			CDR-L2	2	
			CDR-L3	3	
		CDR-H1		4	
		CDR-H2		5	
		CDR-H3		6	
	Kabat			CDR-L1	9
				CDR-L2	10
				CDR-L3	11
		CDR-H1			12
		CDR-H2			13
		CDR-H3			14
			Mu.可変ドメイン		7
		Mu.可変ドメイン			8

10

20

【0088】

本発明の特定の側面は、マウス抗体、またはその誘導化合物もしくは抗原結合フラグメントに関し、前記抗体はまた、マウスとは異種の、特にヒトの抗体に由来する軽鎖および重鎖定常領域も含んでなることを特徴とする。

【0089】

本発明の別の特定の側面は、キメラ抗体、またはその誘導化合物もしくは抗原結合フラグメントに関し、前記抗体はまた、マウスとは異種の、特にヒトの抗体に由来する軽鎖および重鎖定常領域も含んでなることを特徴とする。

30

【0090】

本発明のさらに別の特定の側面は、ヒト化抗体、またはその誘導化合物もしくは抗原結合フラグメントに関し、ヒト抗体に由来する軽鎖および重鎖の定常領域がそれぞれ、または領域、および - 1、 - 2 または - 4 領域であることを特徴とする。

【0091】

本発明の別の側面は、2011年7月28日にCNCM（パスツール研究所、フランス）に寄託されたハイブリドーマI-4505に由来するモノクローナル抗体1613F12からなる抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントである。

【0092】

別の側面によれば、本発明は、本発明による抗原結合タンパク質を分泌することができるマウスハイブリドーマ、特に、2011年7月28日にFrench collection for microorganism cultures（CNCM、パスツール研究所、パリ、フランス）にI-4505の番号で提出されたマウス起源のハイブリドーマに関する。前記ハイブリドーマは、Balb/C免疫マウス脾細胞/リンパ球と骨髓腫Sp2/O-Ag 14細胞株の細胞との融合により得られたものである。

40

【0093】

別の側面によれば、本発明は、配列番号1、2および3の配列を含んでなる3つの軽鎖CDRと；配列番号4、5および6の配列を含んでなる3つの重鎖CDRとを含んでなる抗体を分泌することができるマウスハイブリドーマに関し、前記ハイブリドーマは、2011年7月28日にCNCM（パスツール研究所、パリ、フランス）にI-4505の番

50

号で提出されている。前記ハイブリドーマは、B a l b / C 免疫マウス脾細胞 / リンパ球と骨髄腫 S p 2 / O - A g 1 4 細胞株の細胞との融合により得られたものである。

【 0 0 9 4 】

本発明の対象は、2011年7月28日にCNCM（パスツール研究所、フランス）に寄託されたマウスハイブリドーマI - 4 5 0 5である。

【 0 0 9 5 】

本発明の抗原結合タンパク質はまた、キメラまたはヒト化抗体を含んでなる。

【 0 0 9 6 】

キメラ抗体は、所与の種の抗体に由来する本来の変領域（軽鎖および重鎖）を、その所与の種とは異種の抗体の軽鎖および重鎖の定常領域と組み合わせて含有するものである。

10

【 0 0 9 7 】

抗体、またはそのキメラフラグメントは、組換え遺伝学の技術を用いることにより作製することができる。例えば、キメラ抗体は、プロモーターと、本発明の非ヒト、特にマウス、モノクローナル抗体の変領域をコードする配列と、ヒト抗体定常領域をコードする配列とを含有する組換えDNAをクローニングすることによって作製することができる。このような1つの組換え遺伝子によりコードされている本発明によるキメラ抗体は、例えば、マウス - ヒトキメラであり得、この抗体の特異性は、マウスDNAに由来する変領域によって決定され、そのアイソタイプは、ヒトDNAに由来する定常領域によって決定される。キメラ抗体を作製するための方法については、Verhoeyn et al. (BioEssays, 8: 74, 1988)を参照。

20

【 0 0 9 8 】

別の側面では、本発明は、キメラ抗体からなる結合タンパク質を記載する。

【 0 0 9 9 】

特定の好ましい態様では、本発明のキメラ抗体、またはその抗原結合フラグメントは、配列番号7のアミノ酸配列を含んでなる軽鎖可変ドメイン配列を含んでなり、かつ、配列番号8のアミノ酸配列を含んでなる重鎖可変ドメイン配列を含んでなる。

【 0 1 0 0 】

別の側面では、本発明は、ヒト化抗体からなる結合タンパク質を記載する。

【 0 1 0 1 】

「ヒト化抗体」とは、非ヒト起源の抗体に由来するCDR領域を含有し、その抗体分子の他の部分は1つ（または数個の）ヒト抗体に由来する抗体を意味する。さらに、骨格セグメント残基（FRと呼ばれる）のいくつかは結合親和性を保存するために改変することができる(Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988)。

30

【 0 1 0 2 】

本発明のヒト化抗体またはそのフラグメントは、当業者に知られている技術（例えば、文献Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992;およびBebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992に記載されているものなど）によって作製することができる。このようなヒト化抗体は、in vitro診断またはin vivoにおける予防的処置および/もしくは治療的処置を含む方法におけるそれらの使用のために好ましい。例えば、PDLにより欧州特許第0451261号、同第0682040号、同第0939127号、同第0566647号または米国特許第5,530,101号、同第6,180,370号、同第5,585,089号および同第5,693,761号に記載されている「CDRグラフト」技術など、他のヒト化技術も当業者に知られている。米国特許第5,639,641号または同第6,054,297号、同第5,886,152号および同第5,877,293号も引用することができる。

40

【 0 1 0 3 】

さらに、本発明はまた、上記のマウス抗体から生じるヒト化抗体に関する。

50

【0104】

好ましい様式では、ヒト抗体由来の軽鎖および重鎖の定常領域はそれぞれ、または、および - 1、 - 2 または - 4 領域である。

【0105】

本発明の新規な側面は、以下の核酸（任意の縮重遺伝コードを含む）：

a) 本発明による抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントをコードする核酸；

b)

- ・ 配列番号 15 ~ 28 からなる群から選択される核酸配列、または
 - ・ 配列番号 15 ~ 20 の 6 つの核酸配列を含んでなる核酸配列、または
 - ・ 配列番号 21、22 の 2 つの核酸配列を含んでなる核酸配列
- を含んでなる核酸；

c) a) または b) に定義された核酸と相補的な核酸；および

d) パート a) もしくは b) に定義された核酸配列と、またはパート a) もしくは b) に定義された核酸配列との最適なアラインメントの後に少なくとも 80%、好ましくは、85%、90%、95% および 98% の同一性を有する配列と、高ストリンジェント条件下でハイブリダイズすることができる、好ましくは少なくとも 18 ヌクレオチドを有する、核酸

の中から選択されることを特徴とする単離された核酸に関する。

【0106】

下表 4 に、本発明の結合タンパク質に関する種々のヌクレオチド配列をまとめる（Mu = マウス）。

【0107】

【表 4】

表 4

	CDR ナンバリング	重鎖	軽鎖	配列番号	
1613F12	IMGT		CDR-L1	15	
			CDR-L2	16	
			CDR-L3	17	
		CDR-H1		18	
		CDR-H2		19	
		CDR-H3		20	
	Kabat			CDR-L1	23
				CDR-L2	24
				CDR-L3	25
		CDR-H1			26
		CDR-H2			27
		CDR-H3			28
				Mu.可変ドメイン	21
			Mu.可変ドメイン		22

【0108】

用語「核酸」、「核酸配列(nucleic sequence)」、「核酸配列(nucleic acid sequence)」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」は、本明細書において互換的に用いられ、改変または非改変型の、核酸のフラグメントまたは領域を定義し、非天然ヌクレオチドを含有する、または含有

しない、二本鎖DNA、一本鎖DNAまたはこれらのDNAの転写産物のいずれかである、ヌクレオチドの正確な配列を意味する。

【0109】

本発明の配列は単離および/または精製されたものであり、すなわち、それらは、少なくとも部分的に改変されたそれらの環境から、例えばコピーによって直接的または間接的にサンプリングされたものである。ここでまた、例えば宿主細胞の手段による組換え遺伝学によって得られた、または化学合成によって得られた単離された核酸も記載しておくべきであろう。

【0110】

「最適なアライメントの後に好ましい配列と少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%および98%の同一性パーセンテージを示す核酸配列」とは、参照核酸配列に対して、特に、欠失、末端切断、延長、キメラ融合および/または置換、特に規則的なものなどの特定の改変を示す核酸配列を意味する。好ましくは、これらは参照配列と同じアミノ酸配列をコードする配列（これは遺伝コードの縮重に関連する）、または好ましくは高ストリンジェント条件下、特に以下に定義される条件下で、参照配列と特異的にハイブリダイズし得る相補的配列である。

【0111】

高ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションとは、温度およびイオン強度に関する条件が、2つの相補的DNAフラグメント間でハイブリダイゼーションを維持させるように選択されることを意味する。単に例であるが、上記のポリヌクレオチドフラグメントを定義するためのハイブリダイゼーション工程の高ストリンジェント条件は有利には以下の通りである。

【0112】

DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションは、(1)5×SSC(1×SSCは0.15M NaCl+0.015Mクエン酸ナトリウム溶液に相当する)、50%ホルムアミド、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、10×デンハート液、5%デキストラン硫酸および1%サケ精子DNAを含有するリン酸バッファー(20mM、pH7.5)中、42°Cで3時間のプレハイブリダイゼーション；(2)プローブ長に応じた温度(すなわち、プローブ>100ヌクレオチド長の場合は42°C)で20時間の主要ハイブリダイゼーションの後、2×SSC+2%SDS中、20°C、20分の洗浄2回、0.1×SSC+0.1%SDS中、20°C、20分の洗浄1回、という二段階で行う。最後の洗浄は、プローブ>100ヌクレオチド長の場合は60°Cで30分間、0.1×SSC+0.1%SDS中で行う。定義されたサイズのポリヌクレオチドに関する上記の高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、当業者ならば、Sambrook et al. (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001)に記載の手順に従って、より長いまたは短いオリゴヌクレオチドに適合させることができる。

【0113】

本発明はまた、本発明に記載される核酸を含んでなるベクターに関する。

【0114】

本発明は、特に、このようなヌクレオチド配列を含むクローニングおよび/または発現ベクターを対象とする。

【0115】

本発明のベクターは好ましくは、所与の宿主細胞でのヌクレオチド配列の発現および/または分泌を可能とするエレメントを含む。従って、ベクターはプロモーター、翻訳開始および終結シグナル、ならびに好適な転写調節領域を含むであろう。ベクターは宿主細胞で安定に維持できなければならず、所望により、翻訳されたタンパク質の分泌を指定する特定のシグナルを有することができる。これらの種々のエレメントは、当業者により、用いる宿主細胞に従って選択および最適化される。この目的で、これらのヌクレオチド配列は選択された宿主内の自己複製ベクターに挿入することができるか、または選択された宿

10

20

30

40

50

主の組込型ベクターであり得る。

【0116】

このようなベクターは当業者により一般に用いられる方法によって作製され、得られたクローンは、リポフェクション、エレクトロポレーション、熱ショックまたは化学的方法などの標準的な方法によって好適な宿主に導入することができる。

【0117】

これらのベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルス起源のベクターである。それらは、本発明のヌクレオチド配列のクローニングまたは発現のために宿主細胞を形質転換するのに用いられる。

【0118】

本発明はまた、本発明に記載されるベクターにより形質転換された、または本発明に記載されるベクターを含んでなる、単離された宿主細胞を含んでなる。

【0119】

宿主細胞は原核生物系または真核生物系、例えば、細菌細胞、例えばまた、酵母細胞もしくは動物細胞、特に、哺乳動物細胞（ヒトを除く）、の中から選択することができる。また、昆虫細胞または植物細胞を用いることもできる。

【0120】

本発明はまた、本発明に従って形質転換された細胞を含む、ヒト以外の動物に関する。

【0121】

本発明の別の側面は、本発明による抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントの生産方法に関し、前記方法が以下の工程：

- a) 本発明による宿主細胞を培地中、好適な培養条件で培養する工程；および
 - b) このようにして生産された抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントの1つを培養培地または前記培養細胞から回収する工程
- を含んでなることを特徴とする。

【0122】

本発明による形質転換された細胞は、本発明による組換え抗原結合タンパク質の作製方法で用いられる。本発明によるベクター、および/またはベクターによって形質転換された細胞を用いることを特徴とする、本発明による抗原結合タンパク質の組換え型での作製方法も本発明に含まれる。好ましくは、本発明によるベクターによって形質転換された細胞は、前記抗原結合タンパク質の発現および前記組換えタンパク質の回収を可能とする条件下で培養される。

【0123】

すでに述べたように、宿主細胞は原核生物系または真核生物系から選択することができる。特に、このような原核生物系または真核生物系で分泌を促進する本発明のヌクレオチド配列を同定することができる。従って、このような配列を有する本発明によるベクターは、分泌させる組換えタンパク質の生産のために有利に使用することができる。実際、目的のこれらの組換えタンパク質の精製は、それらが宿主細胞の内部よりもむしろ細胞培養の上清中に存在するということにより容易となる。

【0124】

また、本発明の抗原結合タンパク質は化学合成によって作製することもできる。このような作製方法の1つもまた本発明の課題である。当業者ならば、固相技術（特にSteward et al, 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed., pp 71-95参照）、または部分的固相技術、または溶液中でのフラグメントの縮合もしくは慣例の合成によるなどの、化学合成法を知っている。化学合成によって得られ、対応する非天然アミノ酸を含み得るポリペプチドもまた本発明に含まれる。

【0125】

本発明の方法によって得ることができる抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントもまた本発明に含まれる。

【0126】

10

20

30

40

50

特定の側面によれば、本発明は、細胞傷害性薬剤を宿主標的部位に送達するためのアドレッシング産物 (addressing product) として使用するための、上記の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメントに関し、前記宿主標的部位は、タンパク質 A x 1 細胞外ドメイン、好ましくは、ヒトタンパク質 A x 1 細胞外ドメイン、より好ましくは、配列番号 31 もしくは 32 の配列、またはその天然変異体配列を有するヒトタンパク質 A x 1 細胞外ドメインに局在するエピトープからなる。

【0127】

好ましい態様では、前記宿主標的部位は、哺乳動物細胞、より好ましくは、ヒト細胞、より好ましくは、天然にまたは遺伝子組換えの手段により A x 1 タンパク質を発現する細胞の標的部位である。

10

【0128】

本発明は、細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされた本明細書に記載の抗原結合タンパク質を含んでなる免疫複合体 (immunoconjugate) に関する。

【0129】

本発明の意味において、「免疫複合体」とは、一般に、1種以上の治療薬と物理的に連結された少なくとも1種のアドレッシング産物を含んでなる化合物を意味し、従って、標的性の高い化合物を作り出す。

【0130】

好ましい態様では、このような治療薬は細胞傷害性薬剤からなる。

【0131】

「細胞傷害性薬剤」または「細胞傷害薬」とは、被験体に投与した際に、細胞機能を阻害または妨害すること、および/または細胞死を引き起こすことにより、被験体の身体で細胞増殖の進展、好ましくは、癌の発生を治療または予防する薬剤を意図する。

20

【0132】

多くの細胞傷害性薬剤が単離または合成されており、細胞増殖を阻害すること、または、限定的でなくとも、少なくとも有意に腫瘍細胞を破壊するまたは減少させることを可能とする。しかしながら、これらの薬剤の傷害活性は腫瘍細胞に限定されず、非腫瘍細胞も影響を受け、破壊され得る。より詳しくは、造血細胞または上皮細胞、特に粘膜の上皮細胞などの急速に更新する細胞に副作用が見られる。例として、消化管の細胞はこのような細胞傷害性薬剤の使用によって大きく影響を受ける。

30

【0133】

本発明の目的の1つはまた、腫瘍細胞に対する高い細胞傷害性を保持すると同時に正常細胞に対する副作用を制限することを可能とする細胞傷害性薬剤を提供できることである。

【0134】

より詳しくは、細胞傷害性薬剤は、好ましくは、限定されるものではないが、薬物 (すなわち、「抗体-薬物複合体」)、毒素 (すなわち、「免疫毒素」または「抗体-毒素複合体」)、放射性同位元素 (すなわち、「放射性免疫複合体」または「抗体-放射性同位元素複合体」) などからなり得る。

【0135】

本発明の第1の好ましい態様では、免疫複合体は、少なくとも1種類の薬物または薬剤に連結された結合タンパク質からなる。このような免疫複合体は、結合タンパク質が抗体、またはその抗原結合フラグメントである場合には、抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate) (または「ADC」と呼ばれる)。

40

【0136】

第1の態様では、このような薬物は、それらの作用様式に関して記載することができる。非限定例として、アルキル化剤 (例えば、ナイトロジェンマスタード、スルホン酸アルキル (alkyle-sulfonates)、ニトロソ尿素、オキサゾホリン (oxazophorins)、アジリジンまたはイミン-エチレン)、抗代謝産物、抗腫瘍抗生物質、有糸分裂阻害剤、クロマチン形成阻害剤、抗血管新生薬、抗エストロゲン作用薬、抗アンドロゲン作用薬、キレート剤

50

、鉄吸収促進剤、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、ホスホジエステラーゼ阻害剤、DNA阻害剤、DNA合成阻害剤(DNA synthetis inhibitors)、アポトーシス促進剤(Apopstotis stimulants)、チミジル酸阻害剤、T細胞阻害剤、インターフェロン拮抗薬、リボヌクレオシド三リン酸レダクターゼ阻害剤、アロマターゼ阻害剤、エストロゲン受容体拮抗薬、チロシンキナーゼ阻害剤、細胞周期阻害剤、タキサン、チューブリン阻害剤、血管新生阻害剤、マクロファージ刺激剤、ニューロキニン受容体拮抗薬、カンナビノイド受容体拮抗薬、ドーパミン受容体作動薬(Dopamine receptor agonsists)、顆粒球刺激因子作動薬、エリスロポエチン受容体作動薬、ソマトスタチン受容体作動薬、LHRH作動薬、カルシウム増感剤、VEGF受容体拮抗薬、インターロイキン受容体拮抗薬、破骨細胞阻害剤、ラジカル形成促進剤、エンドセリン受容体拮抗薬、ピンカアルカロイド、抗ホルモンもしくは免疫調節剤、または細胞傷害薬もしくは毒素の活性基準を満たす任意の他の新規な薬物が挙げられる。

10

【0137】

このような薬物は、例えば、VIDAL 2010の、癌腫学および血液学の段「細胞傷害薬」に付属する化合物にさかれた頁に引用されており、この文献に参照として引用されているこれらの細胞傷害性化合物が、本明細書で好ましい細胞傷害性薬剤として引用される。

【0138】

より詳しくは、限定されるものではないが、本発明によれば以下の薬物が好ましい：メクロレタミン、クロラムブコル(chlorambucol)、メルファレン(melphalen)、クロリドレート(chlorydrate)、ピボプロメン(pipobromen)、プレドニムスチン、リン酸二ナトリウム(disodium phosphates)、エストラムスチン、シクロホスファミド、アルトレタミン、トロフォスファミド、スルホフォスファミド、イフォスファミド、チオテパ、トリエチルエナミン、アルテトラミン(altetramine)、カルムスチン、ストレプトゾシン、フォテムスチン、ロムスチン、ブスルファン、トレオスルファン、インプロスルファン、ダカルバジン、シスプラチナム、オキサリプラチン、ロバプラチン、ヘプタプラチン(heptaplatin)、ミリプラチン水和物、カルボプラチン、メトトレキサート、ペメトレキセド、5-フルオルウラシル、フロクスウリジン、5-フルオロデオキシウリジン、カペシタピン、シタラピン、フルダラピン、シトシンアラビノシド、6-メルカプトプリン(6-MP)、ネララピン、6-チオグアニン(6-TG)、クロロデスオキシアデノシン(chlorodesoxyadenosine)、5-アザシチジン、ゲムシタピン、クラドリピン、デオキシコホルマイシン、テガフル、ペントスタチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、イダルピシン、バルルピシン、ミトキサントロン、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、プリカマイシン、マイトマイシンC、プレオマイシン、プロカルバジン、バクリタキセル、ドセタキセル、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルピン、トポテカン、イリノテカン、エトポシド、バルルピシン、塩酸アムルピシン、ピラルピシン、酢酸エリブチニウム、ゾルピシン、エピルピシン、イダルピシンおよびテニボシド、ラゾキシシン、マリマスタット、パチマスタット、プリノマスタット、タノマスタット、イロマスタット、CGS-27023A、ハロフジノン(halofuginon)、COL-3、ネオバスタット、サリドマイド、CDC 501、DMXAA、L-651582、スクアラミン、エンドスタチン、SU5416、SU6668、インターフェロン-、EMD121974、インターロイキン-12、IM862、アンギオスタチン、タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ヨードキシフェン、アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、フルタミド、ニルタミド、スプリロノラクトン(sprironolactone)、酢酸シプロテロン、フィナステリド、シミチジン(cimetidine)、ボルテゾミド(bortezomid)、ベルケード、ピカルタミド、シプロテロン、フルタミド、フルベストラン(fulvestran)、エキセメスタン、ダサチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、ニロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、レチノイド、レキシノイド、メトキサレン(met hoxsalene)、レプリン酸メチルアミノ、アルデスロイキン(aldesleukine)、OCT-43、デニロイキンジフリトクス(denileukin diflitox)、インターロイキン-2、タソネル

20

30

40

50

ミン(tasonermin)、レンチナン、シゾフィラン、ロキニメックス、ピドチモド、ペガデ
 マーゼ、チモペンチン(thymopentine)、ポリI : C、プロコダゾール(procodazol)、T i
 c B C G、コリネバクテリウム・パルブム(corynebacterium parvum)、NOV - 0 0
 2、ウクライン、レバミゾール、1 3 1 1 - c h T N T、H - 1 0 1、セルモロイキン、
 インターフェロン 2 a、インターフェロン 2 b、インターフェロン 1 a、インター
 ロイキン - 2、モベナキン、レキシン - G、テセロイキン、アクラルピシン、アクチノマ
 イシン、アルグラビン、アスパラギナーゼ、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダウノ
 マイシン、ロイコボリン、マソプロコール、ネオカルジノスタチン、ペプロマイシン、サル
 コマイシン、ソラマージン、トラベクテジン、ストレプトゾシン、テストステロン、ク
 ネカテキン、シネカテキン、アリトレチノイン、塩酸ベロテカン、カルステロン、ドロモ
 スタノロン、酢酸エリプチニウム、エチニルエストラジオール、エトボシド、フルオキシ
 メステロン、フォルメスタン、ホスフェトロール(fosfetrol)、酢酸ゴセレリン、アミノ
 レプリン酸ヘキシル、ヒストレリン、ヒドロキシプロゲステロン、イキサベピロン、ロイ
 プロリド、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲステロール、メチルプレドニゾロン
 、メチルテストステロン、ミルテホシン、ミトブロニトール、フェニルプロピオン酸ナド
 ドロン、酢酸ノレシンドロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、テムシロリムス(temsirr
 olimus)、テストラクトン、トリアムコノロン(triamcinolone)、トリプトレリン、酢酸バ
 プレオチド、ジノスタチンスチマラマー、アムサクリン、三酸化ヒ素、塩酸ピサントレン
 、クロラムブシル、クロルトリアニセン(chlortrianisene)、シス - ジアミンジクロロプ
 ラチニウム(cis-diamminedichloroplatinium)、シクロホスファミド、ジエチルスチルベ
 ストロール、ヘキサメチルメラミン、ヒドロキシ尿素、レナリドマイド、ロニダミン、メ
 クロレタナミン(mechlorethanamine)、ミトタン、ネダプラチン、塩酸ニムスチン、パミ
 ドロン酸塩、ピポプロマン、ポルフィマーナトリウム、ラニムスチン、ラゾキサソ、セム
 スチン、ソブゾキサソ、メシル酸塩、トリエチレンメラミン、ゾレンドロン酸、メシル酸
 カモスタット、ファドロゾールH C 1、ナフォキシジン、アミノグルテチミド、カルモフ
 ール、クロファラビン、シトシンアラビノシド、デシタピン、ドキシフルリジン、エノシ
 タピン、リン酸フルダラビン(fludarabine)、フルオロウラシル、フトラフル、ウラシル
 マスタード、アパレリクス、ベキサロテン、ラルチテルキセド(raltiterxed)、タミバロ
 テン、テモゾロミド、ポリノスタット、メガストロール(megastrol)、クロドロネートニ
 ナトリウム、レバミゾール、フェルモキシトール、鉄イソマルトシド、セレコキシブ、イ
 ブジラスト、ベンダムスチン、アルトレタミン、ミトラクトール、テムシロリムス、ブラ
 ラトレキサート、T S - 1、デシタピン、ピカルタミド、フルタミド、レトロゾール、ク
 ロドロネートニナトリウム、デガレリクス、クエン酸トレミフェン、二塩酸ヒスタミン、
 D W - 1 6 6 H C、ニトラクリン、デシタピン、塩酸イリノテカン(irinotecan)、アムサ
 クリン、ロミデプシン、トレチノイン、カバジタキセル、バンダタニブ、レナリドマイド
 、イバンドロン酸、ミルテホシン、ピテスペン、ミファミルチド、ナドロパリン、グラニ
 セトロン、オランダセトロン、トロピセトロン、アリザプリド、ラモセトロン、メシル酸
 ドラセトロン、ホスアプレピタントジメグルミン、ナビロン、アプレピタント、ドロナビ
 ノール、T Y - 1 0 7 2 1、リスリド水素マレイン酸塩、エピセラム、デフィプロチド、
 ダビガトランエテキシレート、フィルグラスチム、ペグフィルグラスチム、レディタクス
 、エポエチン、モルグラモスチム、オブレルベキン、シプロイセル - T、M - V a x、ア
 セチルL - カルニチン、塩酸ドネペジル、5 - アミノレプリン酸、アミノレプリン酸メチ
 ル、酢酸セトロレリクス、イコデキストリン、ロイプロレリン、メトビルフェニデート(m
 etbylphenidate)、オクトレオチド、アンレキサノクス、プレリキサフォル、メナテトレ
 ノン、アネトールジチオールチオン、ドキセルカルシフェロール、塩酸シナカルセト、ア
 レファセプト、ロミプロスチム、サイモグロブリン、チマルファシン、ウベニメクス、イ
 ミキモド、エベロリムス、シロリムス、H - 1 0 1、ラソフォキシフェン、トリロスタン
 、インカドロン酸塩、ガングリオシド、ペガプタニブ八ナトリウム、ベルトボルフィン(v
 ertoporfin)、ミノドロロン酸、ゾレンドロン酸、硝酸ガリウム、アレンドロン酸ナトリウ
 ム、エチドロロン酸二ナトリウム、パミドロロン酸二ナトリウム、デュタステライド、スチボ

10

20

30

40

50

グルコン酸ナトリウム、アルモダフィニル、デクスラゾキサソ、アミフォスチン、WF - 10、テモボルフィン、ダルベポエチンアルファ、アンセスチム、サルグラモスチム、パリフェルミン、R - 744、ネピデルミン、オブレルベキン、デニロイキンディフチトクス、クリサントスパーゼ、ブセレリン、デスロレリン、ランレオチド、オクトレオチド、ピロカルピン、ボセンタン、カリケアマイシン、メイタンシノイドおよびシクロニカート。

【0139】

より詳しくは、当業者は、“Association Francaise des Enseignants de Chimie Therapeutique”により編集された表題“traite de chimie therapeutique, vol. 6, Medicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edition TEC & DOC, 2003”の手引き書を参照することができる。

10

【0140】

本発明の第2の好ましい態様では、免疫複合体は、少なくとも1種の放射性同位元素と連結された結合タンパク質からなる。このような免疫複合体は、結合タンパク質が抗体、またはその抗原結合フラグメントである場合には、抗体 - 放射性同位元素複合体 (antibody-radioisotope conjugate) (または「ARC」と呼ばれる)。

【0141】

腫瘍の選択的破壊のためには、抗体は、放射性の高い原子を含んでなくてもよい。ARCの作製には様々な放射性同位元素が利用可能であり、例えば、限定されるものではないが、 At^{211} 、 C^{13} 、 N^{15} 、 O^{17} 、 F^{19} 、 I^{123} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 In^{111} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Tc^{99m} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、Lu、ガドリニウム、マンガンまたは鉄の放射性同位元素がある。

20

【0142】

このような放射性同位元素をARCに組み込むためには、当業者に知られているいずれの方法またはプロセスも使用することができる (例えば、“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”, Chatal, CRC Press 1989参照)。非限定例として、 Tc^{99m} または I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} および In^{111} はシステイン残基を介して結合させることができる。 Y^{90} はリシン残基を介して結合させることができる。 I^{123} はヨードゲン法(Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)を用いて結合させることができる。

30

【0143】

ARC分野の当業者の知識を示すために、チオ尿素リンカー - キレーターにより結合された抗CD20モノクローナル抗体と In^{111} または Y^{90} 放射性同位元素から構成されるARCであるゼヴァリン(商標)(Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)、またはカリケアマイシンと連結された抗CD33抗体から構成されるマイロターゲット(商標)(米国特許第4,970,198号;同第5,079,233号;同第5,585,089号;同第5,606,040号;同第5,693,762号;同第5,739,116号;同第5,767,285号;同第5,773,001号)など、いくつかの例を挙げることができる。もっと最近では、ホジキンリンパ腫の治療において最近FDAにより承認されたアドセトリスと呼ばれるADC(プレントキシマブドリンに相当する)を挙げることができる(Nature, vol. 476, pp380-381, 25 August 2011)。

40

【0144】

本発明の第3の好ましい態様では、免疫複合体は、少なくとも1種類の毒素と連結された結合タンパク質からなる。このような免疫複合体は、結合タンパク質が抗体、またはその抗原結合フラグメントである場合には、抗体 - 毒素複合体 (antibody-toxin conjugate) (または「ATC」と呼ばれる)。

【0145】

毒素は、生きている生物によって産生される有効かつ特異的な有毒物質である。毒素は

50

通常、数百（ペプチド）から10万（タンパク質）の間で分子量が異なり得るアミノ酸鎖からなる。毒素はまた、低分子有機化合物であってもよい。毒素は多くの生物、例えば、細菌、真菌、藻類および植物により産生される。それらの多くは極めて有毒であり、神経薬よりも数桁高い毒性を持つ。

【0146】

A T Cに使用される毒素としては、限定されるものではないが、チューブリン結合、D N A結合、またはトポイソメラーゼ阻害を含む機構によってそれらの細胞傷害作用を発揮し得る、あらゆる種類の毒素を含み得る。

【0147】

使用可能な酵素的に活性な毒素およびそのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性フラグメント、外毒素A鎖（緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来）、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデクシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(*Phytolacca Americana*)タンパク質(P A P I、P A P I I、およびP A P - S)、ニガウリ(*Momordica charantia*)阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ(*Saponaria officinalis*)阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセン(*tricothecenes*)が含まれる。

10

【0148】

ドラスタチン、オーリスタチン、トリコテセン、およびC C 1 0 6 5などの小分子毒素、ならびに毒素活性のあるこれらの毒素の誘導體も、本明細書において企図される。ドラスタチンおよびオーリスタチンは、微小管運動、G T P加水分解、および核・細胞分裂を妨げ、抗癌活性および抗真菌活性を有することが示されている。

20

【0149】

「リンカー」、「リンカー単位」、または「連結」とは、共有結合、または結合タンパク質を少なくとも1つの細胞傷害性薬剤に共有結合させる原子の鎖を含んでなる化学部分を意味する。

【0150】

リンカーは、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (S P D P)、スクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (S M C C)、イミノチオラン (I T)、イミドエステルの二官能性誘導體 (例えば、ジメチルアジピミデート H C 1)、活性エステル (例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス - アジド化合物 (例えば、ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導體 (例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、2 , 6 - ジイソシアネートトルエン)、およびビス - 活性フッ素化合物 (例えば、1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン) などの様々な二官能性タンパク質カップリング剤を用いて作製することができる。炭素 - 1 4 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミン五酢酸 (M X - D T P A) は、本アドレッシング系に細胞傷害性薬剤を結合させるためのキレート剤の一例である。他の架橋試薬としては、B M P S、E M C S、G M B S、H B V S、L C - S M C C、M B S、M P B H、S B A P、S I A、S I A B、S M C C、S M P B、S M P H、スルホ - E M C S、スルホ - G M B S、スルホ - K M U S、スルホ - M B S、スルホ - S I A B、スルホ - S M C C、およびスルホ - S M P B、ならびにS V S B (スクシンイミジル - (4 - ビニルスルホン) ベンゾエート) が挙げられ、これらは市販されている (例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill., U.S.Aから)。

30

40

【0151】

リンカーは、「非切断性」であっても「切断可能」であってもよい。

【0152】

好ましい態様では、それは細胞において細胞傷害性薬剤の放出を促進する「切断可能な」リンカーである。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不

50

安定性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカーが使用可能である。リンカーは、好ましい態様では、細胞内条件下で切断可能であり、その結果、リンカーの切断は細胞内環境で結合タンパク質から細胞傷害性薬剤を放出する。

【0153】

例えば、いくつかの態様では、リンカーは、細胞内環境中（例えば、リソソームまたはエンドソームまたは小胞内）に存在する切断剤によって切断可能である。リンカーは、例えば、限定されるものではないが、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼを含む細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断されるペプチジルリンカーであり得る。一般に、ペプチジルリンカーは、少なくとも2アミノ酸長または少なくとも3アミノ酸長である。切断剤としては、カテプシンBおよびDならびにプラスミンを含むことができ、これらは総て、ジペプチド薬物誘導体を加水分解して標的細胞内で活性薬の放出をもたらすことが知られている。例えば、癌性組織で発現の高いチオール依存性プロテアーゼであるカテプシン-Bにより切断可能であるペプチジルリンカーを使用することができる（例えば、Phe-LeuまたはGly-Phe-Leu-Glyリンカー）。特定の態様では、細胞内プロテアーゼにより切断可能であるペプチジルリンカーは、Val-CitリンカーまたはPhe-Lysリンカーである。細胞傷害性薬剤の細胞内タンパク質分解性放出を使用する1つの利点は、薬剤は一般に結合させると減弱され、複合体の血清安定性が一般に高いということである。

10

【0154】

他の態様では、切断可能なリンカーは、pH感受性であり、すなわち、あるpH値で加水分解を受けやすい。一般に、pH感受性リンカーは、酸性条件下で加水分解され得る。例えば、リソソーム中で加水分解され得る酸不安定性リンカー（例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シス-アコニットアミド、オルトエステル、アセタール、ケタールなど）が使用可能である。このようなリンカーは、血液の場合のように、中性pH条件下で比較的安定であるが、リソソームのおよそのpHであるpH5.5または5.0より低いと不安定である。特定の態様では、加水分解可能なリンカーは、チオエーテルリンカー（例えば、アシルヒドラゾン結合を介して治療薬と結合しているチオエーテル）である。

20

【0155】

さらに他の態様では、リンカーは、還元条件下で切断可能である（例えば、ジスルフィドリンカー）。様々なジスルフィドリンカーが当技術分野で公知であり、例えば、SAT A（N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート）、SPDP（N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート）、SPDB（N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート）およびSMPT（N-スクシンイミジル-オキシカルボニル- -メチル- -(2-ピリジル-ジチオ)トルエン）-、SPDBおよびSMPTを用いて形成され得るものが含まれる。

30

【0156】

非切断性または「非還元性」リンカーの非限定例としては、トラスツズマブと、連結された化学療法薬マイタンシンとを組み合わせた免疫複合体トラスツズマブ-DM1（TDM1）が挙げられる(Cancer Research 2008; 68: (22). November 15, 2008)。

40

【0157】

好ましい態様では、本発明の免疫複合体は、限定されるものではないが、i) 抗原結合タンパク質の求核基と二価リンカー試薬の反応と、その後の細胞傷害性薬剤との反応、またはii) 細胞傷害性薬剤の求核基と二価リンカー試薬の反応と、その後の抗原結合タンパク質の求核基との反応など、当業者に公知のいずれの方法によって作製してもよい。

【0158】

抗原結合タンパク質上の求核基は、限定されるものではないが、N末端アミン基、側鎖アミン基、例えば、リシン、側鎖チオール基、および抗原結合タンパク質がグリコシル化されている場合には糖ヒドロキシルまたはアミノ基が含まれる。アミン、チオール、およびヒドロキシル基は求核性であり、かつ、限定されるものではないが、活性エステル、例

50

えは、NHSエステル、HOBtエステル、ハロギ酸エステルおよび酸ハロゲン化物；ハロゲン化アルキルおよびベンジル、例えば、ハロアセトアミド；アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含むリンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と反応して共有結合を形成することができる。抗原結合タンパク質は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわち、システイン架橋を有してもよい。抗原結合タンパク質は、DTT（ジチオトレイトール）などの還元剤で処理することにより、リンカー試薬との結合に対して反応性とするすることができる。従って、各システイン架橋は、理論的には、2つの反応性チオール求核基を形成する。当業者に公知の任意の反応により、さらなる求核基を抗原結合タンパク質に導入することもできる。非限定例として、反応性チオール基は、1以上のシステイン残基を導入することにより、抗原結合タンパク質に導入することができる。

10

【0159】

免疫複合体は、リンカー試薬または細胞傷害性薬剤上の求核置換基と反応することができる求電子部分を導入するための抗原結合タンパク質の改変によって作出してもよい。グリコシル化された抗原結合タンパク質の糖を酸化して、リンカー試薬または細胞傷害性薬剤のアミン基と反応し得るアルデヒドまたはケトン基を形成することができる。生じたイミンシッフ塩基は安定な結合を形成し得るか、または還元されて安定なアミン結合を形成し得る。一態様では、グリコシル化された抗原結合タンパク質の糖鎖部分とガラクトースオキシダーゼかまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかとの反応により、タンパク質内に、薬物上の適当な基と反応することができるカルボニル（アルデヒドおよびケトン）基を得ることができる。別の態様では、N末端セリンまたはトレオニン残基を含有するタンパク質をメタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応させて、最初のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成することができる。

20

【0160】

特定の好ましい態様では、リンカー単位は以下の一般式を有し得る：



式中、

- T - は、ストレッチャー単位であり；
- a は、0または1であり；
- W - は、アミノ酸単位であり；
- w は独立に、1～12の範囲の整数であり；
- Y - は、スペーサー単位であり；
- y は、0、1または2である。

30

【0161】

存在する場合、ストレッチャー単位（- T -）は、抗原結合タンパク質とアミノ酸単位（- W -）を連結する。自然状態でまたは化学操作を介して抗原結合タンパク質上に存在し得る有用な官能基としては、スルフヒドリル、アミノ、ヒドロキシル、糖鎖のアノマーヒドロキシル基、およびカルボキシルが含まれる。好適な官能基は、スルフヒドリルおよびアミノである。スルフヒドリル基は、存在する場合、抗原結合タンパク質の分子内ジスルフィド結合の還元によって作出することができる。あるいは、スルフヒドリル基は、抗原結合タンパク質のリシン部分のアミノ基と2-イミノチオランまたは他のスルフヒドリル生成試薬を反応させることによって作出することができる。特定の態様では、抗原結合タンパク質は組換え抗体であり、かつ、1個以上のリシンを保持するように操作されている。より好ましくは、抗原結合タンパク質は、1個以上のシステインを保持するように操作することができる（cf. ThioMabs）。

40

【0162】

ある特定の態様では、ストレッチャー単位は、抗原結合タンパク質の硫黄原子と結合を形成する。この硫黄原子は、還元された抗原結合タンパク質のスルフヒドリル（- - SH）基に由来するものであり得る。

【0163】

他のある特定の態様では、ストレッチャー単位は、抗原結合タンパク質の硫黄原子とス

50

トレッチャー単位の硫黄原子の間のジスルフィド結合を介して抗原結合タンパク質と連結される。

【0164】

他の特定の態様では、ストレッチャーの反応性基は、抗原結合タンパク質のアミノ基に対して反応性であり得る反応性部位を含む。アミノ基は、アルギニンまたはリシンのものであり得る。好適なアミン反応性部位としては、限定されるものではないが、活性化エステル、例えば、スクシンイミドエステル、4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアネートおよびイソチオシアネートが含まれる。

【0165】

さらに別の側面では、ストレッチャーの反応性官能基は、抗原結合タンパク質上に存在し得る修飾された糖鎖基に対して反応性である反応性部位を含む。特定の態様では、抗原結合タンパク質は酵素的にグリコシル化されて糖鎖部分を提供する（抗原結合タンパク質が抗体である場合には、前記抗体は一般に自然状態でグリコシル化されていることに留意されたい）。糖鎖は過ヨウ素酸ナトリウムなどの試薬で軽度に酸化され得、酸化された糖鎖の、結果として生じたカルボニル単位は、ヒドラジド、オキシム、反応性アミン、ヒドラジン、チオセミカルバジド、カルボン酸ヒドラジン、またはアリアルヒドラジドなどの官能基を含有するストレッチャーと縮合することができる。

10

【0166】

アミノ酸単位(-W-)は、スペーサー単位が存在する場合には、ストレッチャー単位(-T-)をスペーサー単位(-Y-)と連結し、スペーサー単位が存在しない場合には、ストレッチャー単位を細胞傷害性薬剤と連結する。

20

【0167】

上述のように、-Ww-は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチドまたはドデカペプチド単位であり得る。

【0168】

いくつかの態様では、アミノ酸単位は、限定されるものではないが、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、アセチルまたはホルミルで保護されたリシン、アルギニン、トシルまたはニトロ基で保護されたアルギニン、ヒスチジン、オルニチン、アセチルまたはホルミルで保護されたオルニチンおよびシトルリンなどのアミノ酸残基を含んでなり得る。例示的アミノ酸リンカー成分としては、好ましくは、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチドまたはペンタペプチドが含まれる。

30

【0169】

例示的ジペプチドとしては、Val-Cit、Ala-Val、Lys-Lys、Cit-Cit、Val-Lys、Ala-Phe、Phe-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-トシル-Arg、Phe-N⁹-ニトロ-Argが含まれる。

【0170】

例示的トリペプチドとしては、Val-Ala-Val、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Phe-Phe-Lys、Gly-Gly-Gly、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lysが含まれる。

40

【0171】

例示的テトラペプチドとしては、Gly-Phe-Leu-Gly（配列番号33）、Ala-Leu-Ala-Leu（配列番号34）が含まれる。

【0172】

例示的ペンタペプチドとしては、Pro-Val-Gly-Val-Val（配列番号35）が含まれる。

【0173】

50

アミノ酸リンカー成分を含んでなるアミノ酸残基としては、天然アミノ酸、ならびに微量アミノ酸、およびシトルリンなどの非天然アミノ酸類似体が含まれる。アミノ酸リンカー成分は、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、CおよびD、またはプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断に対するそれらの選択性において設計および最適化することができる。

【0174】

リンカーのアミノ酸単位は、限定されるものではないが、腫瘍関連プロテアーゼを含む酵素によって酵素的に切断されて細胞傷害性薬剤を遊離することができる。

【0175】

アミノ酸単位は、特定の腫瘍関連腫瘍関連プロテアーゼによる酵素的切断に対するその選択性において設計および最適化することができる。好適な単位は、その切断がプロテアーゼ、カテプシンB、CおよびD、ならびにプラスミンにより触媒されるものである。

10

【0176】

スペーサー単位(-Y-)は、存在する場合、アミノ酸単位を細胞傷害性薬剤に連結する。スペーサー単位は、自壊的と非自壊的の2つの一般的なタイプのものである。非自壊的スペーサー単位は、免疫複合体からのアミノ酸単位の酵素的切断後も、スペーサー単位の一部または全部が細胞傷害性薬剤に結合したままとなるものである。非自壊的スペーサー単位の例としては、限定されるものではないが、(グリシン-グリシン)スペーサー単位およびグリンスペーサー単位が含まれる。細胞傷害性薬剤を遊離させるためには、標的細胞内でグリシン-薬物単位結合を切断するための非依存的加水分解反応が起こる。

20

【0177】

別の態様では、非自壊的スペーサー単位(-Y-)は、-Gly-である。

【0178】

一態様では、免疫複合体にスペーサー単位はない($y = 0$)。あるいは、自壊的スペーサー単位を含有する免疫複合体は、別途の加水分解工程の必要なく、細胞傷害性薬剤を放出することができる。これらの態様では、-Y-は、PAB基の窒素原子を介して-Ww-に連結され、かつ、炭酸基、カルバミン酸基またはエーテル基を介して-Dに直接接続されているp-アミノベンジルアルコール(PAB)単位である。

【0179】

自壊的スペーサーの他の例としては、限定されるものではないが、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体およびオルトまたはパラ-アミノベンジルアセタールなどのPAB基と電氣的に等価な芳香族化合物が含まれる。置換および非置換4-アミノ酪酸アミド、適切に置換されたピシクロ[2.2.1]およびピシクロ[2.2.2]環系ならびに2-アミノフェニルプロピオン酸アミドなど、アミド結合の加水分解時に容易に環化を受けるスペーサーを使用することができる。

30

【0180】

別の態様では、スペーサー単位は、分岐型のビス(ヒドロキシメチル)スチレン(BHMS)単位であり、これは細胞傷害性薬剤を追加導入するために使用することができる。

【0181】

最後に、本発明は、癌の治療において使用するための、上記免疫複合体に関する。

40

【0182】

癌は好ましくは、それらの表面でタンパク質A x 1の全部または一部を発現または過剰発現する腫瘍細胞を含む、A x 1関連癌から選択することができる。

【0183】

より詳しくは、前記癌は、乳癌、結腸、食道癌、肝細胞癌、胃癌、神経膠腫、肺癌、黒色腫、骨肉腫、卵巣癌、前立腺癌、横紋筋肉腫、腎臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌および任意の薬剤耐性現象である。本発明の別の目的は、本明細書に記載の免疫複合体を含んでなる医薬組成物である。

【0184】

より詳しくは、本発明は、本発明の免疫複合体を少なくとも1種の賦形剤および/また

50

は薬学上許容されるビヒクルとともに含んでなる医薬組成物に関する。

【0185】

本明細書において、「薬学上許容されるビヒクル」または「賦形剤」という表現は、二次反応を引き起こすことなく、かつ、例えば、有効化合物の投与の補助、体内におけるその寿命の延長および/またはその有効性の増強、溶液中でのその溶解度の増大、あるいはまたその保存性の改善を可能とする、医薬組成物中に含まれる化合物または化合物の組合せを示すものとする。これらの薬学上許容されるビヒクルおよび賦形剤は周知であり、当業者ならば、選択される有効化合物の性質および投与様式に対して適合させることができる。

【0186】

好ましくは、これらの免疫複合体は、全身経路、特に、静脈内経路によるか、筋肉内、皮内、腹腔内もしくは皮下経路によるか、または経口経路によって投与される。より好ましい様式では、本発明による免疫複合体を含んでなる組成物は、一連の様式で数回投与される。

【0187】

それらの投与様式、用量および最適な剤形は、例えば、患者の年齢または体重、患者の健康状態の重篤度、治療に対する耐用性、および報告されている副作用などの、患者に適合した治療の確立を一般に考慮した基準に従って決定することができる。

【0188】

本発明の他の特徴および利点は、実施例および図面を含む本明細書の続きで明らかとなる。図面の凡例を以下に示す。

【図面の簡単な説明】

【0189】

【図1】SN12C細胞でのMab-zap結合二次抗体を用いた*in vitro*細胞傷害性アッセイ。

【図2A-2C】ELISAによる、固定化したrhAx1-Fcタンパク質(2A)、rhDtk-Fc(2B)またはrhMer-Fc(2C)タンパク質に対する1613F12の結合特異性。

【図3】ヒト腫瘍細胞に対する1613F12結合のFACS分析。

【図4】固定化rmAx1-Fcタンパク質(「rm」はマウス組換えを表す)に対するELISA。

【図5】フローサイトメトリー法を用いて間接的標識プロトコールで決定されたCOS7細胞に対する1613F12結合。

【図6】:1613F12を用いたGas6結合の競合ELISA。

【図7】:SN12C細胞溶解液を用いたウエスタンブロットによるエピトープ結合分析。NH(非加熱);NR(非還元);H(加熱);R(還元)。GAPDHの検出は、ゲルに適切にサンプルがロードされたことの証拠となる。

【図8A-8B】ウエスタンブロットによる、SN12C細胞に1613F12が結合した後のAx1ダウンレギュレーションの研究。図8Aは、実施した3回の独立した実験に代表的なウエスタンブロット画像(ウエスタンブロット解析は、SN12C細胞上で1613F12を4時間および24時間インキュベートした後に行った)であり;図8Bは、「Quantity One」ソフトウェアを用いて表示したフィルムの光学密度の定量結果である。

【図9A-9C】1613F12とのインキュベーション後のSN12C細胞の免疫蛍光顕微鏡像。図9Aは、膜染色および細胞内染色の両場合のmIgG1アイソタイプ対照条件の写真である。図9Bは、膜染色の場合である。図9Cは、1613F12を用いた場合のAx1受容体および初期エンドソームマーカーEEA1の細胞内染色である。画像を重ね合わせたものを下に示し、可視化した同時局在を矢印で示す。

【図10】mIgG1アイソタイプ対照抗体の効果と比較した場合の*in vitro* SN12C細胞増殖に対する1613F12の効果。

10

20

30

40

50

【図11A - 11K】種々のヒト腫瘍細胞株を用いた1613F12 - サボリン免疫複合体の直接的細胞傷害性アッセイ。A - SN12C、B - Calu-1、C - A172、D - A431、E - DU145、F - MDA-MB435S、G - MDA-MB231、H - PC3、I - NCI-H226、J - NCI-H125、K - Panc1。

【実施例】

【0190】

実施例1：Ax1受容体のインターナリゼーション

免疫複合体アプローチは、標的抗原がインターナライズ性のタンパク質である場合により有効となるので、ヒト腫瘍細胞株に対するMab-Zap細胞傷害性アッセイを用いたAx1受容体インターナリゼーションを試験した。より厳密には、Mab-Zap試薬は、アフィニティー精製したヤギ抗マウスIgGとリボソーム不活化タンパク質サボリンを含む、化学複合体である。免疫複合体のインターナリゼーションが起これば、サボリンは破断して標的化薬剤から離れ、リボソームを不活化し、タンパク質合性の障害、そして最終的には細胞死をもたらす。Ax1陽性細胞において抗Ax1抗体mIgG1アイソタイプ対照抗体とともに72時間インキュベートした後に細胞の生存率を決定すれば、1613F12により誘導されたAx1受容体インターナリゼーションに関する結論を下すことができる。

10

【0191】

この実施例では、Qifikit試薬(Dako)を用いて決定されたAx1陽性の高い細胞を使用した。データを下表5に示す。

20

【0192】

【表5】

表5

ヒト腎臓癌SN12C細胞で決定したMAB154抗Ax1市販抗体の抗原結合能	
RTK	AXL
細胞株 \ 抗体	MAB154
SN12C	>100 000

30

【0193】

以下の実施例では、SN12C細胞を非限定例として用いた。その細胞表面で適当なレベルのAx1受容体を発現する他のいずれの細胞株も使用可能である。

40

【0194】

一定の濃度範囲の1613F12またはmIgG1アイソタイプ対照抗体を、細胞培養培地中、室温で30分間、100ngのMab-Zap(Advanced targeting systems)二次抗体とともにプレインキュベートした。これらの混合物を、白色の96ウェルマイクロプレートに平板培養したサブコンフルエント状態のSN12C細胞に添加した。プレートを37、5%CO₂の存在下で72時間インキュベートした。細胞の生存率は、Cell Titer Glo細胞増殖法を製造者(Promega)の説明書に従って用いて測定した。いくつかの対照実験を行う：i)二次免疫複合体を含まない場合、およびii)一次抗体を含まない場合。並行して、mIgG1アイソタイプ対照でもアッセイを行った。

50

得られた結果を図1に示す。

【0195】

1613F12は、SN12C細胞に対して約36%の最大細胞傷害作用を示す。この実験では、mIgG1アイソタイプ対照と考えられる9G4抗体の存在下で細胞傷害作用は見られなかった。一次抗体のみを含有するウェルでも細胞傷害性は見られなかった(データは示されていない)。従って、Ax1-1613F12-MabZapを含んでなる免疫複合体は標的細胞の効果的な細胞傷害性を誘発することから、Ax1受容体は、免疫複合体アプローチで標的とするのに都合のよい抗原であると思われる。

【0196】

実施例2：rhAx1-ECDに対する抗体の作製

Ax1受容体のヒト細胞外ドメイン(ECD)に対するマウスモノクローナル抗体(Mab)を作製するために、5個体のBALB/cマウスを、 $15 \sim 20 \cdot 10^6$ のCHO-Ax1細胞で5回(s.c.)および20 μ gのrhAx1-ECDで2回免疫した。初回免疫誘導はフロイントの完全アジュバント(Sigma、セントルイス、MD、USA)の存在下で行った。その後の免疫誘導にはフロイントの不完全アジュバント(Sigma)を加えた。

【0197】

融合3日前に、免疫マウスに、IFAを用い、 $20 \cdot 10^6$ のCHO-Ax1細胞および20 μ gのrhAx1-ECDの両方で追加免疫を行った。

【0198】

ハイブリドーマを作出するために、免疫マウス5個体のうち1個体(血清滴定後に選択)から採取した脾細胞およびリンパ球をそれぞれ脾臓の灌流および近位リンパ節の細断によって調製し、SP2/0-Ag14骨髄腫細胞(ATCC、ロックヴィル、MD、USA)と融合した。この融合プロトコールは、Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975)に記載されている。次に、融合した細胞に対してHAT選択を行った。一般に、モノクローナル抗体またはそれらの機能的フラグメントの調製では、特にマウス起源の場合には、特に手引き書“Antibodies” (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988)に記載されている技術を参照することができる。

【0199】

融合からおよそ10日後に、ハイブリッド細胞のコロニーをスクリーニングした。一次スクリーニングのために、ELISAを用い、ハイブリドーマの上清を、Ax1-ECDタンパク質に対して生成したMabの分泌に関して評価した。並行して、野生型CHOおよびAx1発現CHO細胞(ATCC)の両方の細胞表面に存在する細胞型のAx1に結合することができるMabを選択するためにFACS分析を行った。

【0200】

できるだけ速やかに、選択されたハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングし、その後、Ax1-ECDタンパク質に対するそれらの反応性に関してスクリーニングした。次に、クローニングしたMabのアイソタイプ分析を、Isotypingキット(カタログ番号5300.05、Southern Biotech、バーミンガム、AL、USA)を用いて行った。各ハイブリドーマから得られた1つのクローンを選択し、拡大培養した。

【0201】

ELISAアッセイを、純粋なハイブリドーマ上清を用いて以下のように行うか、または上清中のIgG含量が決定された場合には、5 μ g/mlから始めて滴定を実施した。その後、以下の11行で1/2連続希釈を行った。簡単に述べると、96ウェルELISAプレート(Costar 3690、Corning、NY、USA)をPBS中2 μ g/mlのrhAx1-Fcタンパク質(Rand D Systems、カタログ番号154-AL)またはrhAx1-ECD 50 μ l/ウェルで、4にで一晩コーティングした。次に、これらのプレートを0.5%ゼラチン(#22151、Serva

10

20

30

40

50

Electrophoresis GmbH、ハイデルベルク、ドイツ)を含有するPBSで37℃にて2時間ブロッキングした。プレートを軽くたたいて飽和バッファーを排出したところで、50 μ lの純粋なハイブリドーマ細胞上清または50 μ lの5 μ g/ml溶液をELISAプレートに加え、37℃で1時間インキュベートした。3回洗浄した後、50 μ lのセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ポリクローナルヤギ抗マウスIgG(#115-035-164、Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc.、ウエストグロブ、PA、USA)を、0.1%ゼラチンおよび0.05%Tween 20(w:w)を含有するPBS中、1/5000希釈で、37℃にて1時間加えた。次に、ELISAプレートを3回洗浄し、TMB(#UP664782、Uptima、Interchim、フランス)基質を加えた。室温で10分のインキュベーション時間の後、1M硫酸を用いて反応を停止させ、450nmで光学密度を測定した。

10

【0202】

フローサイトメトリーによる選択のため、10⁵細胞(野生型CHOまたはCHO-Ax1)を96ウェルプレートの各ウェルの、1%BSAおよび0.01%アジ化ナトリウムを含有するPBS(FACSバッファー)中に、4℃で平板培養した。2000rpmで2分の遠心分離の後、バッファーを除去し、供試するハイブリドーマ上清または精製したMab(1 μ g/ml)を加えた。4℃で20分のインキュベーション後、細胞を2回洗浄し、FACSバッファー中に1/500°希釈されたAlexa 488結合ヤギ抗マウス抗体(#A11017、Molecular Probes Inc.、ユージーン、USA)を加え、4℃で20分間インキュベートした。FACSバッファーでの最終洗浄の後、ヨウ化プロピジウムを各試験管に終濃度40 μ g/mlで加えた後に細胞をFACS(FacsCalibur、Becton-Dickinson)により分析した。細胞のみを含有するウェルおよびAlexa 488結合二次抗体とともにインキュベートした細胞を含有するウェルを陰性対照として含めた。アイソタイプ対照を各実験に用いた(Sigma、ref M90351MG)。少なくとも5000細胞を評価して蛍光強度(MFI)の平均値を計算した。

20

【0203】

より厳密には、融合は、採取した300 \times 10⁶の脾細胞と300 \times 10⁶の骨髓腫細胞(1:1比)で行った。得られた細胞懸濁液の200細胞を30枚の96ウェルプレートに2 \times 10⁶細胞/mlで平板培養した。

30

【0204】

rhAx1-ECDタンパク質に対するELISAおよび野生型CHOおよびAx1発現CHO細胞の両方を用いたFACS分析の双方による最初のスクリーニング(融合後14日前後)で、rhAx1-ECDコーティング上で約1の光学密度(OD)および野生型CHO細胞で50未満、CHO-Ax1細胞で約200のMFIを示す10個のハイブリドーマを選択することができた。

【0205】

これら10個のハイブリドーマを拡大培養し、限界希釈法によりクローニングした。各コードにつき、1枚の96ウェルプレートを準備した。平板培養9日後に、クローニングプレートからの上清を、まず、Ax1-ECDタンパク質の細胞外ドメインに対するそれらの結合特異性に関してELISAによりスクリーニングした。各コードの3つのクローンを拡大培養し、アイソタイプ分析を行った。ひと度産生されれば、抗Ax1抗体を細胞表面にAx1が結合した後にインターナライズされる能力に関してさらに検討した。

40

【0206】

実施例3: Ax1の結合特異性

この実施例では、まず、rhAx1-Fcタンパク質に対する1613F12の結合を検討した。次に、TAMファミリーの他の2つのメンバーrhDtk-FcおよびrhMer-Fcに対するその結合を検討した。

【0207】

50

簡単に述べると、組換えヒトA \times 1-Fc (R and D systems、カタログ番号154AL/CF)、rhDtk (R and D Systems、カタログ番号859-DK)またはrhMer-Fc (R and D Systems、カタログ番号891-MR)タンパク質をImmulon I I 96ウェルプレートに4で一晚コーティングし、0.5%ゼラチン溶液で1時間のブロッキング工程の後、1613F12精製抗体を開始濃度5 μ g/ml (3.33 10^{-8} M)で、37にさらに1時間加えた。次に、1/2連速希釈を12列にわたって行った。プレートを洗浄し、ヤギ抗マウス (Jackson) 特異的IgG-HRPを37で1時間加えた。反応の現像はTMB基質溶液を用いて行った。市販の抗A \times 1 Mab 154抗体も並行して用いた (データは示されていない)。コーティング対照は、HRP標識ヤギ抗ヒトIgG Fcポリクローナル血清 (Jackson、ref 109-035-098)の存在下および/またはHRP結合抗ヒスチジン抗体 (R and D Systems、ref: MAB050H)の存在下で実施した。一次抗体の不在下 (希釈剤(diluant))で非特異的結合は見られなかった。結果はそれぞれ図2A、2Bおよび2Cに示す。

【0208】

この実施例は、1613F12抗体がrhA \times 1-Fcタンパク質とのみ結合し、TAMファミリーの他の2つのメンバーrhDtkまたはrhMerには結合しないことを示す。TAMメンバー間で1613F12抗体の結合の交差特異性は見られない。

【0209】

実施例4：1613F12は腫瘍細胞で発現された細胞型のA \times 1を認識した

A \times 1発現レベルの定量を可能とするために、まず、較正ビーズと並行して市販のA \times 1抗体 (R and D Systems、ref: MAB154)を用い、ヒト腫瘍細胞上の細胞表面A \times 1発現レベルを確立した。次に、1613F12抗体を用いて、細胞表面A \times 1の結合を検討した。両場合とも、実験条件は以下に簡単に述べる通りとした。

【0210】

細胞表面結合の検討のため、10 μ g/ml (6.66 10^{-8} M)一次抗体溶液 (1613F12、MAB154 A \times 1市販の抗体またはmIgG1アイソタイプ対照9G4 Mab)の2倍連続希釈液を10点で作製し、4で20分間、2.10⁵細胞に適用する。1%BSAおよび0.01%NaN₃を添加したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)中で3回洗浄した後、細胞をヤギ抗マウスAlexa 488二次抗体 (1/500 \circ 希釈)とともに4で20分間インキュベートした。1%BSAおよび0.1%NaN₃を添加したPBS中でさらに3回洗浄した後、細胞をFACS (Facscaibur、Becton-Dickinson)により分析した。少なくとも5000細胞を評価して蛍光強度の平均値を計算した。

【0211】

MAB154 A \times 1抗体を用いた定量的ABC測定のために、QIFIKIT (商標)較正ビーズを用いる。QIFIKIT (商標)ビーズと並行し、細胞を飽和濃度のポリクローナルヤギ抗マウス免疫グロブリン/FITC (ヤギF(ab')₂)とともにインキュベートする。その後、供試細胞上の抗原部位の数を、検量線 (ビーズ上のMab分子の数に対する個々のビーズ集団の蛍光強度)の補間によって求める。

【0212】

4.1. 細胞表面A \times 1発現レベルの定量

ヒト腫瘍細胞表面のA \times 1発現レベルを、細胞表面抗原を評価するための定量的フローサイトメトリーキットである間接的免疫蛍光アッセイ (QIFIKIT (商標)法 (Dako、デンマーク))を用い、フローサイトメトリーにより決定した。較正グラフによってビーズの既知の抗原レベルの平均蛍光強度 (MFI)を比較すると、細胞株の抗体結合能 (ABC)が決定できる。

【0213】

表6は、A \times 1市販抗体MAB154 (R and D Systems)を用い、QIFIKIT (商標)を用いて決定した場合の、種々のヒト腫瘍細胞株 (SN12C、C

10

20

30

40

50

a1u-1、A172、A431、DU145、MDA-MB435S、MDA-MB231、PC3、NCI-H226、NCI-H125、MCF7、Panc1)(ATCC、NCI)の表面で検出されたA×1発現レベルを示す。値を抗原結合複合体(ABC)として示す。

【0214】

【表6】

表6

	MCF7	NCI-H125	MDA-MB-435S	Panc1	MDA-MB-231	Calu-1	SN12C
腫瘍タイプ/器官	乳房	NSCLC	乳房	膵臓	乳房	肺	腎臓
ABC (Qifikit)	71	5540	17814	36809	61186	>100000	>100000

10

	A172	A431	DU-145	PC3	NCI-H226
腫瘍タイプ/器官	膠芽腫	類表皮癌	前立腺	前立腺	NSCLC
ABC (Qifikit)	52421	3953	55268	8421	32142

20

【0215】

市販のA×1モノクローナル抗体(MAB154)で得られた結果は、A×1受容体は、検討するヒト腫瘍細胞に応じて様々なレベルで発現されることを示した。

【0216】

4.2. ヒト腫瘍細胞での1613F12によるA×1の検出

より具体的には、1613F12を用いて、A×1の結合を調べた。

【0217】

1613F12用量反応曲線を作成した。次に、種々のヒト腫瘍細胞を用いて得られたMFIをPrismソフトウェアで分析した。データを図3に示す。

【0218】

データは、飽和曲線プロフィールにより示されるように、1613F12は膜A×1受容体と特異的に結合することを示唆する。

【0219】

実施例5：1613F12種間交差特異性

1613F12の種交差特異性に取り組むため、マウスとサルの2つの種を検討した。まず、組換えマウス(rm)A×1受容体に対する結合をELISAにより調べる(図4)。次に、サルCOS7細胞がそれらの表面にA×1受容体を発現することから、これらの細胞を用いてフローサイトメトリー実験を行った(図5)。COS7細胞株は、アフリカミドリザルの腎臓細胞に由来するCV-1細胞株を、ラージT抗原を産生することができるがゲノム複製に欠陥を持つSV40ゲノムの一形態で不死化することにより得られたものである。

40

【0220】

rmA×1-Fc ELISA

簡単に述べると、組換えマウスA×1-Fc(Rand D systems、カタ

50

ログ番号 854 - AX / CF) タンパク質を Immulon II 96 ウェルプレートに 4 で一晚コーティングし、0.5%ゼラチン溶液で1時間のブロッキング工程の後、1613F12 精製抗体を開始濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($3.33 \times 10^{-8} \text{M}$) で 37 にてさらに1時間加えた。次に、1/2 連続希釈を12列にわたって行った。その後、プレートを洗浄し、ヤギ抗マウス (Jackson) 特異的 IgG HRP を 37 で1時間加えた。反応の現像は TMB 基質溶液を用いて行った。市販のマウス抗 Ax1 Mab 154 抗体も並行して用いる。コーティング対照は、HRP と結合したヤギ抗ヒト IgG Fc ポリクローナル血清 (Jackson, ref 109 - 035 - 098) の存在下および/または HRP 結合抗ヒスチジン抗体 (Rand D Systems, ref : MAB050H) の存在下で実施する。一次抗体の不在下 (希釈剤 (diluant)) で非特異的結合は見られない。

10

【0221】

結果は図4に示す。この図は、本発明に記載されている 1613F12 Mab がマウス Ax1 ECD ドメインに結合しないことを示す。

【0222】

FACS COS7

COS7 細胞を用いた 1613F12 細胞結合試験については、 2×10^5 細胞を、1613F12 または mIgG1 アイソタイプ対照 Mab) の $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($6.6 \times 10^{-8} \text{M}$) 抗体溶液の 1/2 連続希釈 (12点) によって作製した抗体濃度範囲で、4 にて20分間インキュベートした。1%BSA および 0.01% NaN_3 を添加したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で3回洗浄した後、細胞を二次抗体ヤギ抗マウス Alexa 488 (1/500 希釈) とともに 4 で20分間インキュベートした。1%BSA および 0.1% NaN_3 を添加した PBS 中でさらに3回洗浄した後、細胞を FACS (Facs caliber, Becton - Dickinson) により分析した。少なくとも 5000 細胞を評価し、蛍光強度の平均値を計算した。データは Prism ソフトウェアを用いて分析する。

20

【0223】

結果を図5に示す。1613F12 または mIgG1 アイソタイプ対照のいずれかを用いて COS7 細胞で確立した滴定曲線により、1613F12 が COS7 細胞の表面で発現されたサル細胞型の Ax1 受容体を認識できることが確認される。0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($4.2 \times 10^{-10} \text{M}$) を超える 1613F12 濃度でプラトーに達する。予想されたように、mIgG1 アイソタイプ対照の存在下では、結合は見られない。

30

【0224】

本実施例は、1613F12 はマウス Ax1 受容体と交差反応しないことを示す。対照的に、1613F12 は、COS7 細胞の表面で発現されたサル Ax1 受容体と強く結合する。

【0225】

実施例 6 : 1613F12 の存在下で行った Gas6 競合実験

抗 Ax1 Mab をさらに特徴付けるために、Gas6 競合アッセイを行った。このアッセイでは、遊離 rhAx1 - Fc タンパク質および抗 Ax1 抗体をインキュベートして抗原 - 抗体複合体を形成させ、次いで、これらの複合体をアッセイプレートの Gas6 コーティング表面に添加する。結合していない抗体 - 抗原複合体を洗い流した後、rhAx1 - Fc タンパク質のヒト Fc 部分に対する、酵素結合二次抗体を加える。次に、基質を加え、酵素 - 基質反応により誘発されたシグナル強度によって抗原濃度を決定することができる。

40

【0226】

簡単に述べると、供試抗 Ax1 Mab の存在下または不在下で、rhAx1 - Fc タンパク質を含んでなる反応混合物を、個別の飽和 (1倍 PBS 中 0.5%ゼラチン) プレートで調製する。系統 1 : マウス抗 Ax1 抗体の 2 倍希釈 ($80 \mu\text{g}/\text{ml}$ から始めて 12 列) を行う。次に、ELISA 希釈液 (diluant) (1倍 PBS 中、0.1%ゼラチン、

50

0.05% Tween 20)のみを含有する陰性対照系を除いて、0.5 µg/mlのrhAx1-Fcタンパク質(Rand Systems、ref.154AL/CF)を加える。ホモジナイゼーションの後、PBS中、6 µg/mlのrhGas6溶液(Rand Systems カタログ番号885-GS-CS/CF)の入ったGas6コーティングプレートに競合サンプルを添加する。インキュベーションおよび数回の洗浄の後、結合したrhAx1-Fcタンパク質を、ヤギ抗ヒトIgG-HRP(Jackson、ref.109-035-098)を用いて検出する。結合したところで、これらのプレートにTMB基質を加える。1M H₂SO₄酸溶液を加えることによって反応を停止させ、得られた光学密度を、マイクロプレートリーダー装置を用いて450nmで読み取る。

10

【0227】

この実験(図6)は、1613F12がその固定化リガンド上でrhAx1-Fc結合と競合し得ることを示す。Gas6結合との競合は、2.5 µg/ml(1.67 10⁻⁸ M)を超える濃度の1613F12抗体の存在下で起こる。10 µg/ml(6.67 10⁻⁸ M)を超える濃度の1613F12の存在下では、固定化Gas6に対するrhAx1-Fcの結合はもはや見られない。1613F12は、rhAx1-Fcに対するGas6結合を遮断する。

【0228】

実施例7：ウエスタンブロットによるエピトープ認識

1613F12が直鎖またはコンフォメーションエピトープを認識するかどうかを決定するため、SN12C細胞溶解液を用いてウエスタンブロット解析を行った。還元条件または非還元条件となるようにサンプルに異なる処理を施した。還元型のサンプルでバンドが見られれば、その供試抗体はECDドメインの直鎖エピトープを標的とし、そうでなければ、その抗体はAx1 ECDのコンフォメーションエピトープに対して生じたものである。

20

【0229】

SN12C細胞を、T162cm²フラスコにて、RPMI+10%熱失活FBS+2mM L-グルタミン中、5.10⁴細胞/cm²で播種し、5%CO₂雰囲気中、37で72時間培養した。次に、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄し、1.5mlの氷冷溶解バッファー[50mM Tris-HCl(pH7.5); 150mM NaCl; 1%Nonidet P40; 0.5%デオキシコール酸塩; および全プロテアーゼ阻害剤カクテル1錠と1%抗ホスファターゼ]で溶解させた。細胞溶解液を4で90分間振盪し、15000rpmで10分間、清澄化した。BCAを用いてタンパク質濃度を定量した。種々のサンプルを添加した。まず、10 µgの全細胞溶解液(20 µl中、10 µg)を還元条件(1倍サンプルバッファー(BIORAD)+1倍還元剤(BIORAD))で調製し、96で2分のインキュベーション後にSDS-PAGEに添加した。次に、10 µgの全細胞溶解液を別に2サンプル、非還元条件(1倍サンプルバッファー(BIORAD)単独中)で調製した。SDS-PAGEゲルに添加する前に、これら2つの前記サンプルのうち一方を96で2分のインキュベーションで加熱し、もう一方を氷上で維持する。泳動後、タンパク質をニトロセルロース膜に転写する。膜を室温にて1時間、TBS-tween 20 0.1%(TBST)、5%脱脂乳で飽和させ、4にて一晩、10 µg/mlの1613F12でプロービングした。抗体を、5%脱脂乾燥乳を含むTris緩衝生理食塩水-0.1% tween 20(v/v)(TBST)中に希釈した。次いで、膜をTBSTで洗浄し、ペルオキシダーゼ結合二次抗体(1/1000希釈)とともに室温で1時間インキュベートした。免疫反応性タンパク質をECL(Pierce #32209)で可視化した。Ax1を可視化した後、膜をTBSTで1回洗浄し、マウス抗GAPDH抗体(1/200000希釈)とともに室温で1時間インキュベートした。次いで、膜をTBSTで洗浄し、ペルオキシダーゼ結合二次抗体とともに、室温で1時間インキュベートした。膜を洗浄し、ECLを用いてGAPDHを可視化した。

30

40

50

結果を図7に示す。

【0230】

特異的バンドは基本的に非還元条件で見られるので、1613F12は主としてコンフォメーションエピトープを認識する。しかしながら、SN12C細胞溶解液の変性泳動条件でも弱いシグナルが検出され、このことは、1613F12が直鎖エピトープにも弱く結合し得ることを示している。

【0231】

実施例8：1613F12により誘発されたAx1ダウンレギュレーションの、ウエスタンブロットによる測定

以下の実施例では、Ax1受容体発現に対するAx1抗体の活性に取り組むため、ヒト腎細胞癌細胞株SN12C(ATCC)を選択した。SN12C細胞株はAx1受容体を過剰発現する。図8A~8Bの全細胞抽出液に対するウエスタンブロットにより、Ax1ダウンレギュレーションを検討した。

【0232】

SN12C細胞を、6ウェルプレートにて、RPMI+10%熱失活FBS+2mM L-グルタミン中、 6×10^4 細胞/cm²で播種し、5%CO₂雰囲気中、37℃で48時間培養した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄した後、細胞を、800ng/mlの組換えマウスgas6リガンド(Rand D Systems, ref: 986-GS/CF)または10μg/mlのmIgG1アイソタイプ対照抗体(9G4)または10μg/mlの本発明のAx1抗体のいずれかを含有する培地中で血清飢餓状態とし、さらに4時間または24時間インキュベートした。次に、培地を静かに除去し、細胞を冷PBSで2回洗浄した。細胞を200μlの氷冷溶解バッファー[50mM Tris-HCl(pH7.5); 150mM NaCl; 1%Nonidet P40; 0.5%デオキシコール酸塩; および完全プロテアーゼ阻害剤カクテル1錠と1%抗ホスファターゼ]で溶解させた。細胞溶解液を4℃で90分間振盪し、15000rpmで10分間、清澄化した。BCA法を用いてタンパク質濃度を定量した。全細胞溶解液(20μl中、10μg)をSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース膜に転写した。膜を室温にて1時間、TBS-tween 20 0.1%(TBST)、5%脱脂乳で飽和させ、4℃にて一晩、市販のM02 Ax1抗体0.5μg/ml(AbNova H00000558-M02)でプロービングした。抗体を、5%脱脂乾燥乳を含むTris緩衝生理食塩水-0.1% tween 20(v/v)(TBST)中に希釈した。次いで、膜をTBSTで洗浄し、ペルオキシダーゼ結合二次抗体(1/1000希釈)とともに室温で1時間インキュベートした。免疫反応性タンパク質をECL(Pierce #32209)で可視化した。Ax1を可視化した後、膜をTBSTで1回洗浄し、マウス抗GAPDH抗体(1/20000希釈)とともに室温で1時間インキュベートした。次いで、膜をTBSTで洗浄し、ペルオキシダーゼ結合二次抗体とともに、室温で1時間インキュベートした。膜を洗浄し、ECLを用いてGAPDHを可視化した。バンド強度を濃度計により定量した。

【0233】

図8Aおよび8Bに示す結果は3回の独立した実験の代表例であり、1613F12が、Ax1を過剰発現するヒト腫瘍細胞株でAx1をダウンレギュレートし得ることを示す。4時間の時点で、1613F12は66%の、そして、1613F12とともに24時間インキュベートした後には最大87%の、Ax1のダウンレギュレーションを誘発する。

【0234】

実施例9：細胞表面Ax1発現に対する1613F12の効果のフローサイトメトリー試験

フローサイトメトリー技術は、細胞表面のAx1受容体の標識を可能とする。この技術の使用は、膜Ax1発現に対する抗体の効果を強調することができる。本実施例では、高レベルのAx1を発現するヒト腎腫瘍SN12C細胞を用いた。

10

20

30

40

50

【0235】

SN12C腫瘍細胞株を、1%L-グルタミンおよび10%FCSを含むRPMI1640中で、実験前に3日間培養した。次に、トリプシンを用いて細胞を解離させ、6マルチウェルプレートの、1%L-グルタミンおよび5%FBSを含むRPMI1640中で平板培養した。翌日、目的抗体を10 μ g/mlで加えた。非処理ウェルも含めた。細胞を37 $^{\circ}$ C、5%CO₂でインキュベートする。24時間後、細胞をPBSで洗浄し、解離させ、FACSバッファー(PBS、1%BSA、0.01%アジ化ナトリウム)中で、同じ目的抗体とともにインキュベートした。処理細胞および非処理細胞に対して同じMabで得られたシグナル強度を比較するために、非処理ウェルも同じ抗体で染色した。細胞を4 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートし、FACSバッファーで3回洗浄した。Alexa488標識ヤギ抗マウスIgG抗体を20分間インキュベートし、細胞を3回洗浄した後、ヨウ化プロピジウム陰性細胞集団に対してFACS分析を行った。

10

【0236】

(i) T24時間にAb処理細胞に比べた場合の、非処理(Ab無し)細胞の表面で検出された蛍光シグナルの違い、および(ii)細胞表面に残留するAx1のパーセンテージ、の2つのパラメーターを決定する。残留Ax1のパーセンテージは次のように計算する。

$$\% \text{ 残留 Ax1} = (\text{MFI}_{\text{Ab 24h}} / \text{MFI}_{\text{no Ab 24h}}) \times 100$$

1つの代表的な実験(3つのうち)からのデータを表7に示す。これらの結果は、3回の独立した実験で再現された。

20

【0237】

非処理細胞および処理条件において同じ抗体によるMab染色間の違いは、検討下のMabの結合による細胞表面でのAx1タンパク質のダウンレギュレーションを反映する。抗体を含まない条件は、アイソタイプ対照抗体(m9G4)の存在下の条件と同様の結果をもたらした。

【0238】

【表7】

表7

標識	処置	T24hでのMFI	Δ (MFI _{Ab無し24h} - MFI _{Ab24h})	残留Ax1%
1613F12	Ab無し	938	514	45.2
	1613F12	424		
9G4	Ab無し	11	-2	117
	9G4	13		
MAB154	Ab無し	950	ND	ND
	9G4	ND		

30

40

【0239】

これらのデータは、1613F12で24時間処理した細胞の表面に検出された平均蛍光強度が1613F12で標識した非処理細胞で得られたMFIに比べて減少する(-514)ことを示す。1613F12抗体とともに24時間インキュベートした後、45.2%の細胞表面Ax1受容体がSN12C細胞表面に残留する。

【0240】

50

実施例 10 : 蛍光免疫細胞化学標識を用いた 1613F12 のインターナリゼーション試験

補足的インターナリゼーション結果を、直接的蛍光標識法を用いた共焦点顕微鏡観察により得る。

【0241】

簡単に述べると、SN12C腫瘍細胞株を、1%L-グルタミンおよび10%FCSを含むRPMI1640中で、実験前に3日間培養した。次に、トリプシンを用いて細胞を解離させ、カバーガラスを含む6マルチウェルプレートの、1%L-グルタミンおよび5%FBSを含むRPMI1640中で平板培養した。翌日、1613F12を10 μ g/mlで加えた。無関連の抗体で処理した細胞も含めた。その後、これらの細胞を37、5%CO₂で1時間および2時間インキュベートした。T0時間では、細胞表面への抗体の結合を判定するために、細胞を4で30分間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、パラホルムアルデヒドで15分間固定した。細胞をすすぎ、ヤギ抗マウスIgG Alexa 488抗体とともに4で60分間インキュベートして、細胞表面に残留する抗体を確認した。抗体の細胞への浸透を追跡するため、細胞を固定し、サポニンで透過処理を施した。ヤギ抗マウスIgG Alexa 488 (Invitrogen)を用いて膜抗体および細胞内抗体の両方を染色した。初期エンドソームを、EEA1に対するウサギポリクローナル抗体を用いて同定し、ヤギ抗ウサギIgG-Alexa 555抗体 (Invitrogen) で可視化した。細胞を3回洗浄し、Draq5を用いて核を染色した。染色後、細胞をProlong Gold封入剤 (Invitrogen) 中に封入し、Zeiss LSM 510共焦点顕微鏡を用いて分析した。

写真を図9A~9Cに示す。

【0242】

画像を共焦点顕微鏡によって得た。mIgG1アイソタイプ対照(9G4)の存在下では、膜染色も細胞内標識も見られない(図9A)。SN12C細胞を1613F12とともに1時間インキュベートした後すぐに膜抗Ax1標識の段階的損失が見られる(図9B)。1時間および2時間の時点で1613F12 Ax1抗体の細胞内蓄積が明らかに見られる(図9C)。細胞内抗体は初期エンドソームマーカーであるEEA1と同時局在する。これらの写真から、SN12C細胞への1613F12のインターナリゼーションが確認される。

【0243】

実施例 11 : in vitro抗Ax1媒介抗腫瘍活性

SN12C増殖アッセイ

ウェル当たり10000個のSN12C細胞を96ウェルプレートのFCS不含培地に播種し、37、5%CO₂雰囲気で一晩培養した。翌日、細胞を10 μ g/mlの各抗体とともに37で1時間プレインキュベートした。ウェルに直接リガンドを加えることにより、細胞をrmGas6 (Rand Systems、カタログ番号986-GS/CF)で処理し、または処理せず、その後、72時間放置して増殖させた。増殖は³Hチミジン組み込みに従って測定した

データを図10に示す。1613F12で効果は見られず、これをSN12C細胞に加えてもサイレントである。

【0244】

実施例 12 : 種々のヒト腫瘍細胞株における1613F12 - サポリン免疫複合体の細胞傷害効力

本実施例では、サポリン結合1613F12の細胞傷害効力を記載する。この目的で、ヒト腫瘍細胞株の大パネルを用いて、直接的in vitro細胞傷害性アッセイを行った(図11A~11K)。この腫瘍細胞株パネルは、種々の細胞表面Ax1発現を呈する。

【0245】

簡単に述べると、5000個の細胞を96ウェル培養プレートの100 μ lの5%FBS

10

20

30

40

50

Sの適切な培養培地中に播種した。5%CO₂雰囲気中、37℃で24時間インキュベートした後、一定の濃度範囲の免疫複合体(1613F12-サボリンまたは9G4-サボリンまたは裸の1613F12または9G4)を細胞に適用する。次に、培養プレートを37℃、加湿5%CO₂インキュベーター内で72時間インキュベートする。

【0246】

4日目に、細胞生存率を、Cell Titer - Glo (商標) Luminescent Cell Viabilityキット(Promega Corp.、マディソン、ウィスコンシン州)(このキットは、代謝的に活性な細胞の指標としての、存在するATPの定量に基づいて培養物中の生細胞の数を決定することができる)を用いて評価する。発光を照度計により記録する。

10

【0247】

発光出力から下式を用いて細胞傷害性のパーセンテージが計算される。

$$\text{細胞傷害性 \%} = 100 - \left[\left(\text{RLU}_{\text{Ab-sap}} \times 100 \right) / \text{RLU}_{\text{No Ab}} \right]$$

図11A~11Kには、一定範囲の1613F12-サボリン免疫複合体濃度で処理した(A)SN12C、(B)Calu-1、(C)A172、(D)A431、(E)DU145、(F)MDA-MB-435S、(G)MDA-MB-231、(H)PC3、(I)NCI-H226、(J)NCI-H125または(K)Panc1腫瘍細胞を用いた*in vitro*細胞傷害性アッセイにおいて明瞭に得られた免疫複合体濃度に応じた細胞傷害性パーセンテージを示すグラフがまとめられている。

20

【0248】

図11A~11Kは、1613F12-サボリン免疫複合体がこれらの種々のヒト腫瘍細胞株において細胞傷害性を誘発したことを示す。結果として得られた細胞傷害作用の効力はヒト腫瘍細胞株によって異なる。

【0249】

実施例13：ヒトAx1 ECDに対するAx1抗体の結合動態

次に、1613F12の親和性の測定を、Biacoreを用いて行った。

【0250】

Biacore Xを用いて、ヒトAx1 ECDに対するAx1抗体の結合動態を測定する。

30

【0251】

Biacoreシステムにより使用されている表面プラズモン共鳴(SPR)の光学現象に基づく機器は、標識を用いずに、リアルタイムでタンパク質-タンパク質相互作用の検出および測定を可能とする。

【0252】

簡単に述べると、バイオセンサーとしてセンサーチップCM5を用いて実験を実施した。抗体を捕捉するためのアミンカップリング化学を用い、ウサギIgGを、CM5センサーチップのフローセル1および2(FC1およびFC2)に9300~10000応答単位(RU)のレベルで固定化した。

【0253】

複数回のサイクルを用いて結合を評価する。各サイクルの測定は、HBS-EPバッファ中、流速30μl/分を用いて実施する。その後、FC2についてのみチップ上に供試Ax1抗体を1分間捕捉し、1613F12の場合には平均捕捉値が311.8RU(SD=5.1RU)となるまでとする。分析物(Ax1 ECD抗原)を、200nMから始め2倍連続希釈を用いて注入し、およそのkaおよびkdをリアルタイムで測定する。

40

【0254】

各サイクルの終了時には、10mM塩酸グリシンpH1.5溶液を注入して抗体-抗原複合体と捕捉抗体をともに除去することにより、表面を再生する。考慮するシグナルは、FC1とFC2の間に見られるシグナルの差(FC2-FC1)に相当する。会合速度(

50

k a) および解離速度 (k d) は、1対1ラングミュア結合モデルを用いて計算した。平衡解離定数 (K D) は k a / k d 比として求める。これらの実験値を B i a e v a l u a t i o n ソフトウェアバージョン 3 . 0 で分析した。データの精度を評価するためには 2 分析を行う。

データを下表 8 にまとめる。

【 0 2 5 5 】

【表 8】

表 8 : ヒト A x 1 E C D に対する 1 6 1 3 F 1 2 の結合動態および親和性

抗体	Ka (1/Ms)	Kd(1/s)	KD (M)	Chi ²
1613F12	1.06 10 ⁵	2.42 10 ⁻⁴	2.29 10 ⁻⁹	0.71 (0.6%)

10

【 0 2 5 6 】

A x 1 のヒト細胞外ドメイン (E C D) を作製するために、まず、ヒト可溶性 A X L 受容体をコードするヒト c D N A を P C R により p C E P 4 発現ベクターにクローニングした。次に、精製した産物を制限酵素 H i n d I I I および B a m H I で消化し、同じ酵素で予め切断した p C E P 4 発現ベクターに連結した。最後に、同定された組換えプラスミド p C E P [A X L] H i s ₆ を D N A シーケンシングによりさらに確認した。

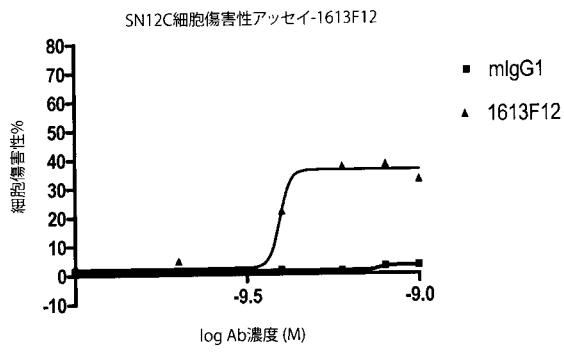
20

【 0 2 5 7 】

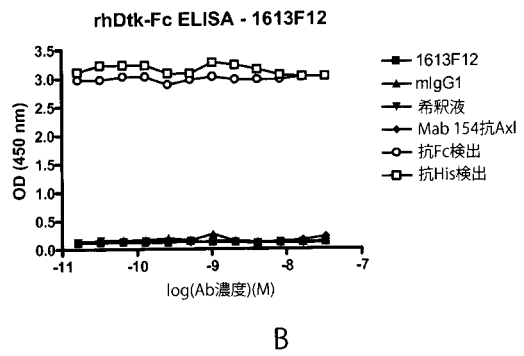
次いで、懸濁適合細胞 H E K 2 9 3 E を、4 m M グルタミンを含む E x - c e l l 2 9 3 (S A F C B i o s c i e n c e s) 培地で培養した。トランスフェクションは総て、直鎖 2 5 k D a ポリエチレンイミン (P E I) を用いて行った。トランスフェクト培養物を 5 % C O ₂ のインキュベーターにて、3 7 ° C 、 1 2 0 r p m で振盪しながら 6 日間維持した。細胞を遠心分離により回収し、組換え H i s タグを有するタンパク質を含有する上清を、精製のため、N i - N T A アガロースカラムで処理した。

30

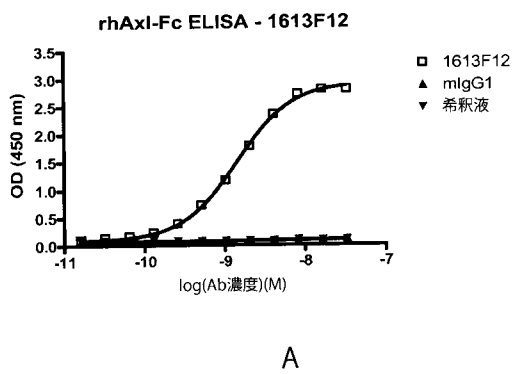
【 図 1 】



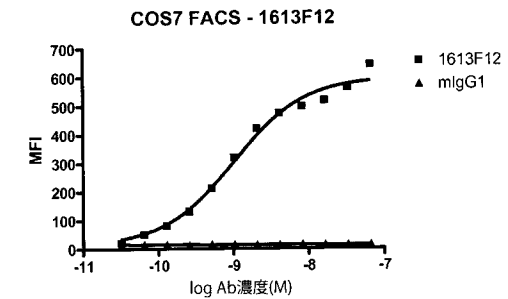
【 図 2 - 2 】



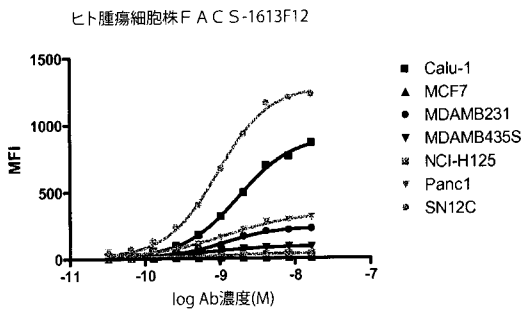
【 図 2 - 1 】



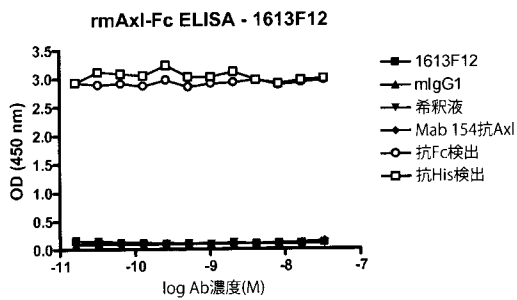
【 図 5 】



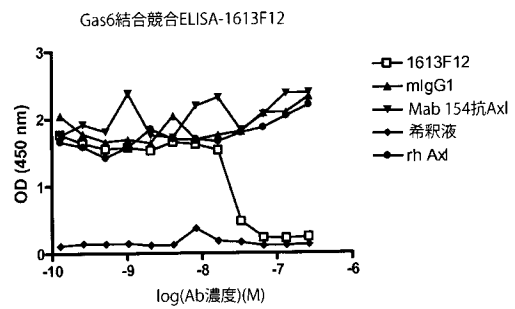
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 6 】



【 図 7 】

1613F12

NH H H

NR NR R

Axl

GAPDH

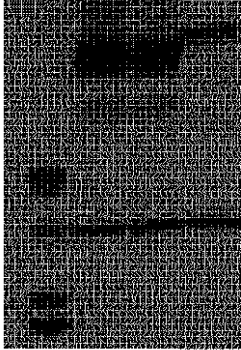
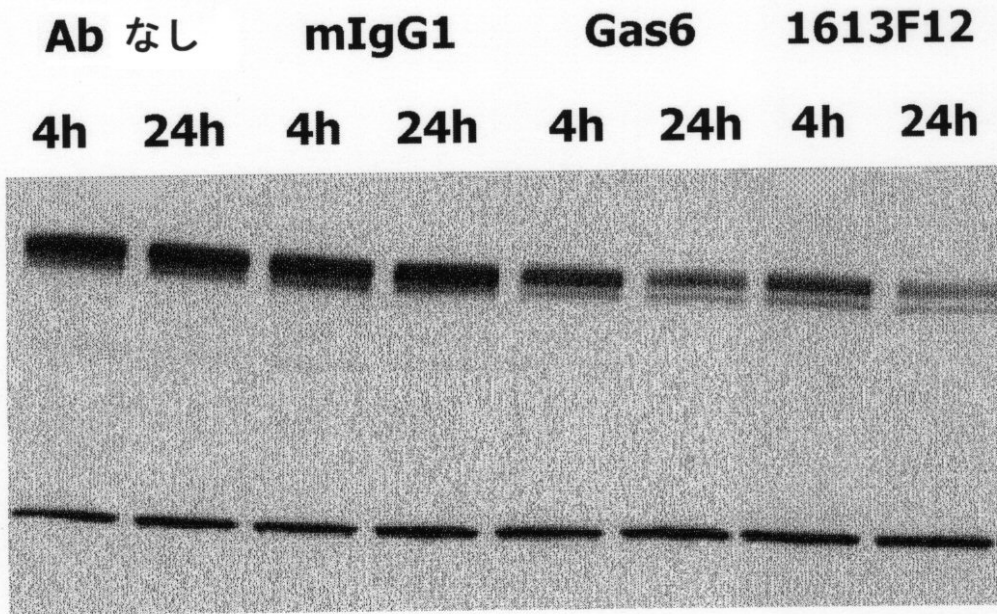


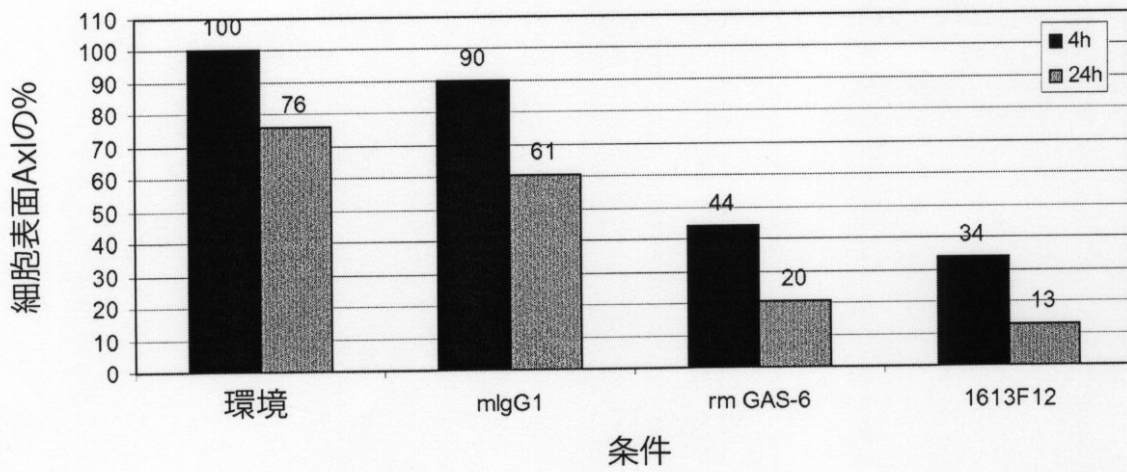
FIGURE 7

【 図 8 】



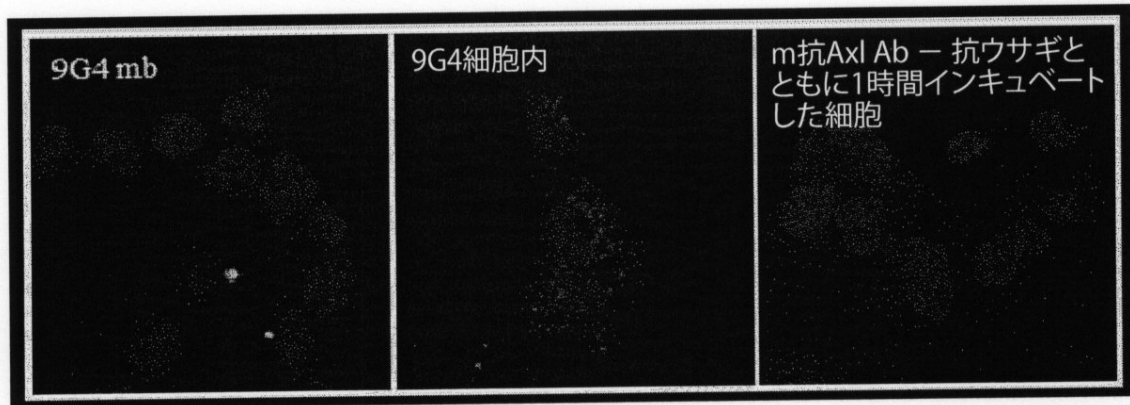
A

1613F12インキュベーション後のAx1受容体のSN12Cダウンレギュレーション

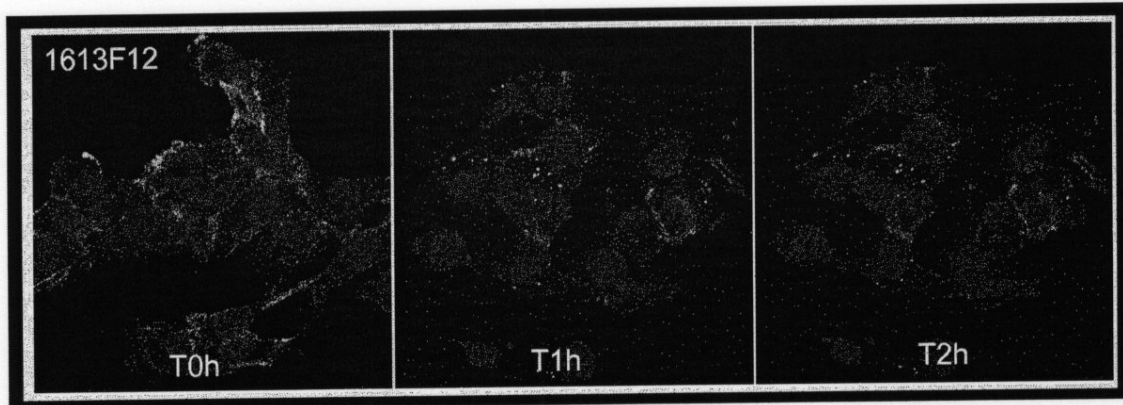


B

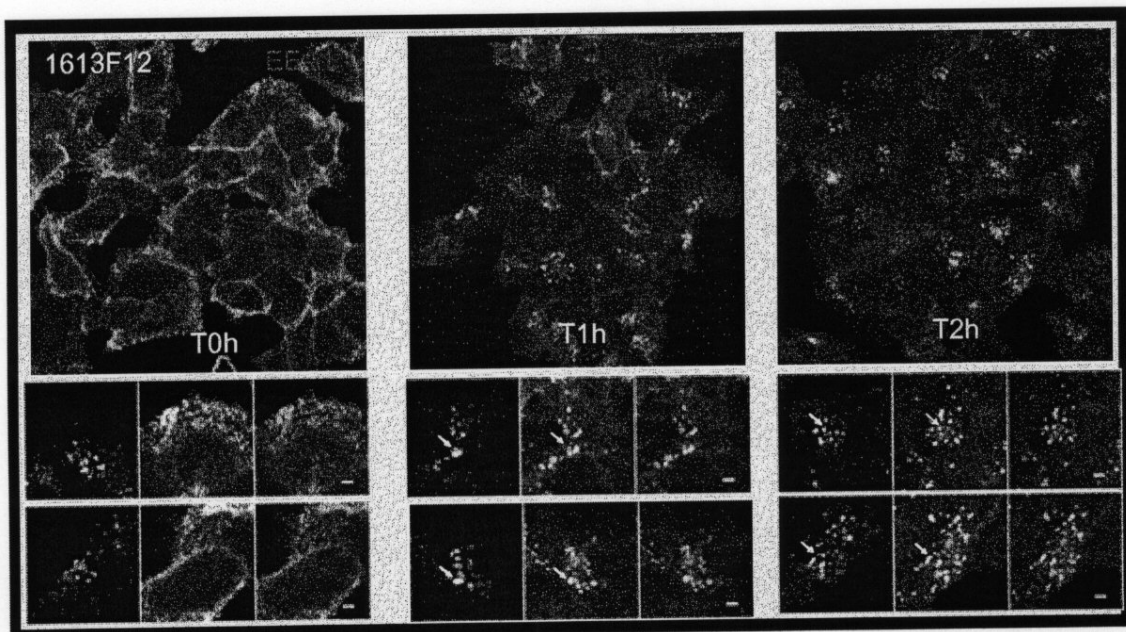
【 図 9 】



A

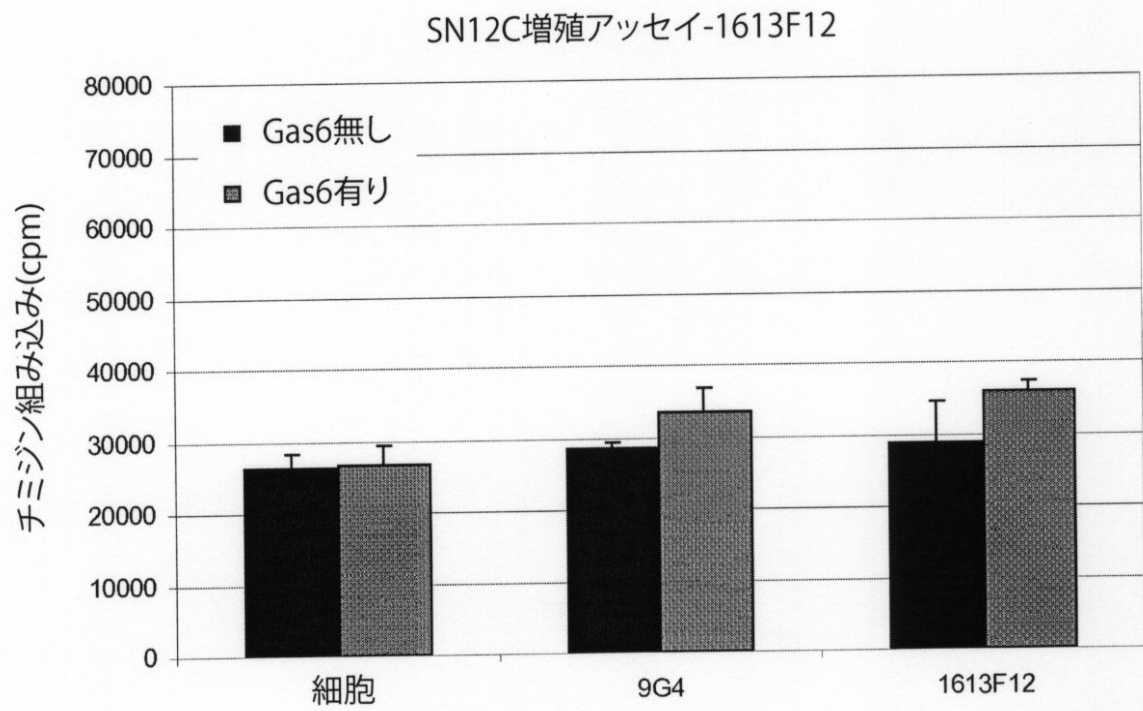


B

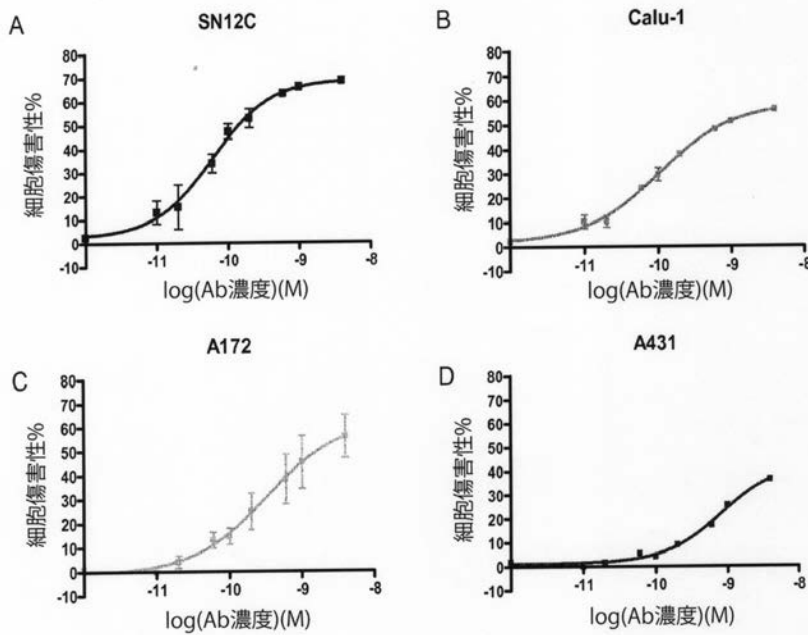


C

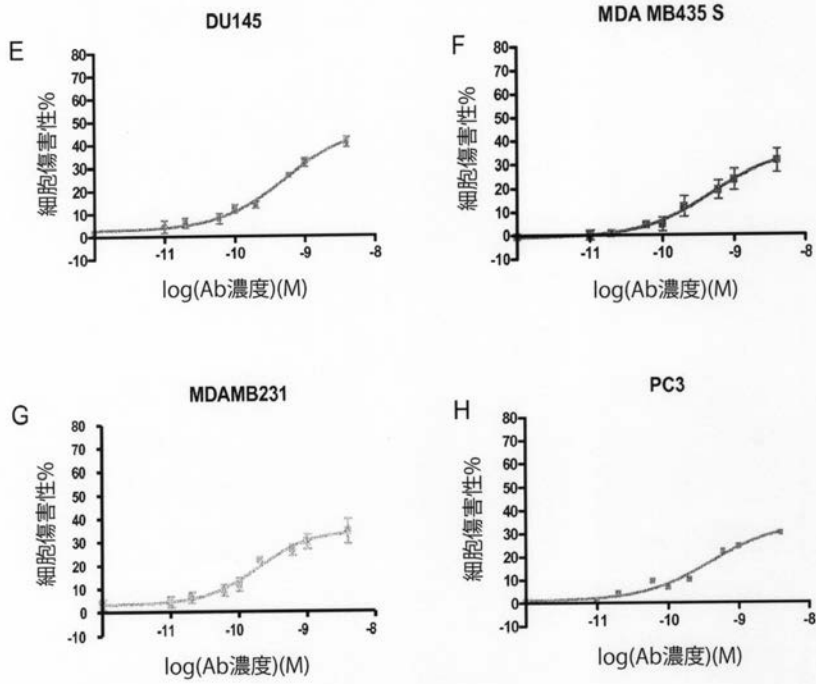
【 図 1 0 】



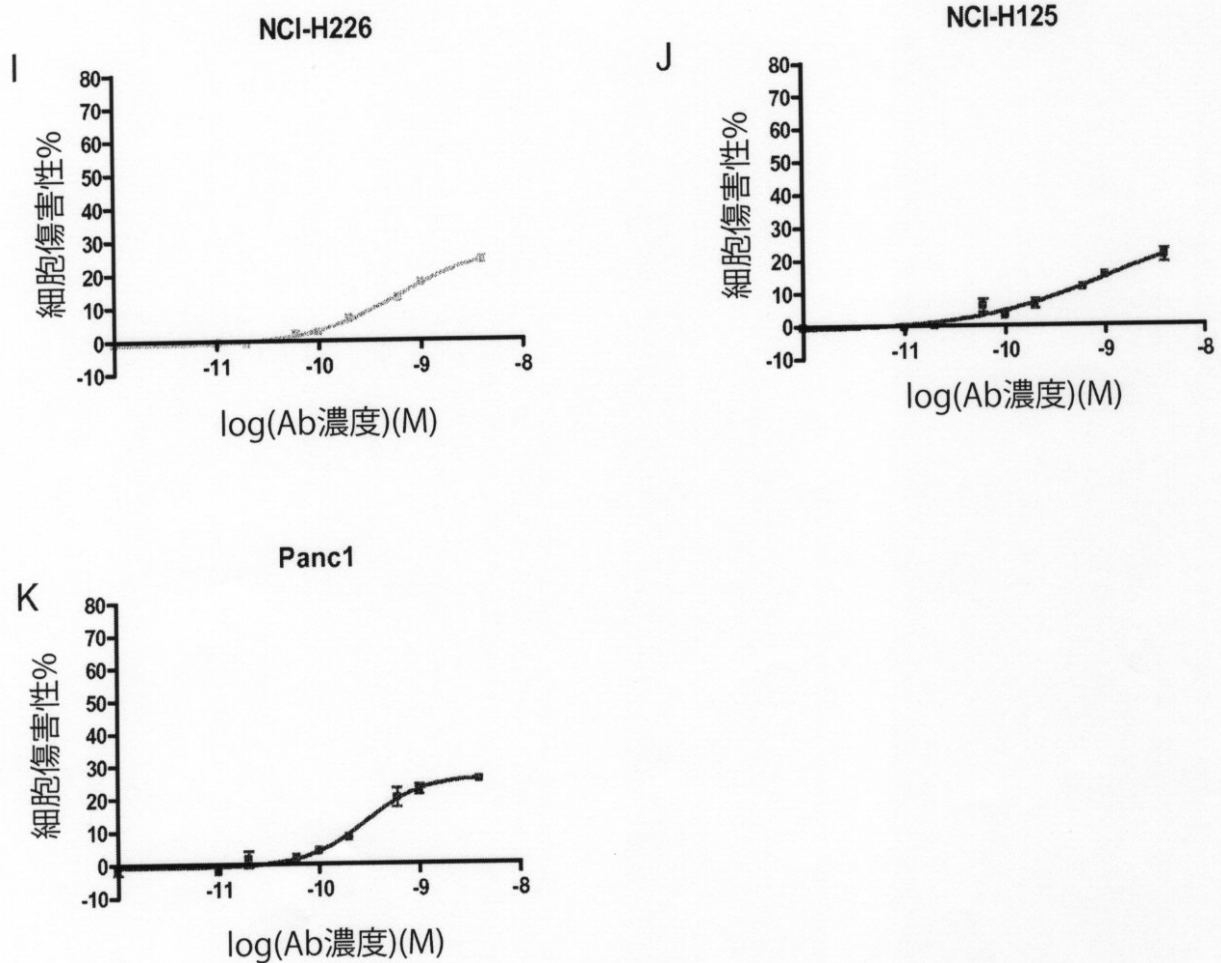
【 図 1 1 - 1 】



【 図 1 1 - 2 】



【図 1 1 - 3】



【配列表】

2015504302000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成26年8月4日(2014.8.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0257

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0257】

次いで、懸濁適合細胞HEK293Eを、4mMグルタミンを含むEx-cell 293(SAFC Biosciences)培地で培養した。トランスフェクションは総て、直鎖25kDaポリエチレンイミン(PEI)を用いて行った。トランスフェクト培養物を5%CO₂のインキュベーターシェーカーにて、37℃、120rpmで振盪しながら6日間維持した。細胞を遠心分離により回収し、組換えHisタグを有するタンパク質を含有する上清を、精製のため、Ni-NTAアガロースカラムで処理した。

本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) i) 好ましくは配列番号29もしくは30の配列またはその天然変異体配列を有する、ヒトタンパク質Ax1と特異的に結合し、かつ、

ii) その前記ヒトタンパク質Ax1への結合の後にインターナライズされ、

配列番号 1 ~ 14 からなる群から選択されるアミノ酸配列を少なくとも含んでなることを特徴とする、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

(2) 好ましくは配列番号 31 もしくは 32 の配列またはその天然変異体配列を有する、ヒトタンパク質 A x 1 細胞外ドメインに局在するエピトープと特異的に結合することを特徴とする、(1) に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

(3) そのエピトープと少なくとも 10^{-9} M の EC₅₀ で結合することを特徴とする、(1) または (2) に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

(4) 少なくとも 200 の MFI 減少を誘導することを特徴とする、(1) に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

(5) モノクローナル抗体からなることを特徴とする、(1) ~ (4) のいずれかに記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

(6) 配列番号 1、2 および 3 の配列を含んでなる 3 つの軽鎖 CDR と、配列番号 4、5 および 6 の配列を含んでなる 3 つの重鎖 CDR とを含んでなる抗体からなることを特徴とする、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

(7) 配列番号 8 の配列または配列番号 8 と少なくとも 80 % の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインを含んでなることを特徴とする、(6) に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

(8) 配列番号 7 の配列または配列番号 7 と少なくとも 80 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインを含んでなることを特徴とする、(6) に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

(9) 配列番号 7 の配列または配列番号 7 と少なくとも 80 % の同一性を示す任意の配列の軽鎖可変ドメインと、配列番号 8 の配列または配列番号 8 と少なくとも 80 % の同一性を示す任意の配列の重鎖可変ドメインとを含んでなることを特徴とする、(6) に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

(10) 2011年7月28日に CNCM (パスツール研究所、フランス) に寄託されたハイブリドーマ I - 4505 に由来するモノクローナル抗体 1613F12 からなることを特徴とする、(6) に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

(11) 2011年7月28日に CNCM (パスツール研究所、フランス) に寄託されたマウスハイブリドーマ I - 4505。

(12) タンパク質 A x 1 細胞外ドメイン、好ましくは、ヒトタンパク質 A x 1 細胞外ドメイン、より好ましくは、配列番号 31 もしくは 32 の配列またはその天然変異体配列を有するヒトタンパク質 A x 1 細胞外ドメイン、に局在するエピトープからなる宿主標的部位に、細胞傷害性薬剤を送達するためのアドレッシング産物として使用するための、(1) ~ (10) のいずれかに記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

(13) 細胞傷害性薬剤と結合された (1) ~ (10) および (12) のいずれかに記載の抗原結合タンパク質またはその抗原結合フラグメントを含んでなる免疫複合体。

(14) 癌の治療に使用するための、(13) に記載の免疫複合体。

(15) (13) に記載の免疫複合体と少なくとも 1 種類の賦形剤および / または薬学上許容されるビヒクルとを含んでなる、医薬組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

その表面で A x 1 タンパク質を発現する哺乳動物細胞に目的分子を送達またはインターナライズすることができる、抗原結合タンパク質またはその結合フラグメントのスクリーニングのための *in vitro* 法であって、前記目的分子は前記抗原結合タンパク質に

共有結合され、以下の工程：

a) A x 1 タンパク質と特異的に結合することができる抗原結合タンパク質を選択する工程；

b) 工程 a) で選択された抗原結合タンパク質に目的分子を共有結合させ、複合体を形成する工程；

c) 工程 b) で得られた複合体を、その表面で A x 1 タンパク質を発現する哺乳動物細胞と接触させる工程；

d) 前記複合体が、その表面で A x 1 タンパク質を発現する前記哺乳動物細胞に細胞内送達またはインターナライズされたかどうかを決定する工程；および

e) 前記抗原結合タンパク質を、その表面で A x 1 タンパク質を発現する哺乳動物細胞に目的分子を送達またはインターナライズすることができる化合物として選択する工程を含んでなることを特徴とする、方法。

【請求項 2】

工程 a) で選択された抗原結合タンパク質が、ヒトタンパク質 A x 1、好ましくは、配列 3 1 または 3 2 の配列を有する細胞外 (E C D)、と結合し得ることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 a) で選択された抗原結合タンパク質が、ヒトタンパク質 A x 1 細胞外 (E C D) と少なくとも 10^{-9} M、優先的には $10^{-9} \sim 10^{-12}$ M の間、の $E C_{50}$ で結合し得ることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 e) における選択が、FACS、免疫蛍光、フローサイトメトリー、ウエスタンブロットおよび細胞傷害性 / 細胞増殖抑制性評価法の群から選択される方法により具現化される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

細胞傷害性化合物をその表面で A x 1 タンパク質を発現する哺乳動物細胞に送達することができる細胞傷害性または細胞増殖抑制性複体の製造のための *in vitro* 法であって、細胞傷害性または細胞増殖抑制性薬剤を、

i) A x 1 タンパク質、好ましくは、ヒト A x 1 タンパク質、と特異的に結合し得ること、かつ、

ii) 前記 A x 1 タンパク質が前記哺乳動物細胞の表面で発現される場合に、その前記 A x 1 タンパク質への結合の後に哺乳動物細胞にインターナライズされることを特徴とする抗原結合タンパク質と共有結合させる工程を含んでなる、方法。

【請求項 6】

細胞傷害性化合物を哺乳動物細胞に送達することができる細胞傷害性または細胞増殖抑制性複体の製造のための *in vitro* 法であって、細胞傷害性薬剤を、

i) A x 1 タンパク質、好ましくは、ヒト A x 1 タンパク質、と特異的に結合することができる、かつ、

ii) 前記 A x 1 タンパク質が前記哺乳動物細胞の表面で発現される場合に、その前記タンパク質 A x 1 への結合の後に哺乳動物細胞にインターナライズされる化合物と共有結合させる工程を含んでなる、方法。

【請求項 7】

タンパク質 A x 1 細胞外ドメインに局在するエピトープからなる宿主標的部位に、細胞傷害性薬剤を送達するためのアドレッシング産物としての、

i) ヒトタンパク質 A x 1 に局在するエピトープと特異的に結合すること、および

ii) その前記ヒトタンパク質 A x 1 への結合の後にインターナライズされることを特徴とする、抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

前記タンパク質 A x 1 細胞外ドメインが、配列番号 3 1 もしくは 3 2 の配列またはその天然変異体配列を有するヒトタンパク質 A x 1 細胞外ドメインからなることを特徴とする

、請求項 7 に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

ヒトタンパク質 A x 1 細胞外 (E C D) 内のそのエピトープと少なくとも 10^{-9} M、優先的には、 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ M の間、の E C ₅₀ で結合し得ることを特徴とする、請求項 7 または 8 に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

少なくとも 200 の M F I 減少を誘導し得ることを特徴とする、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

モノクローナル抗体からなることを特徴とする、請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 12】

少なくとも 200、好ましくは、少なくとも 300、の (非処理細胞の M F I _{24h} - 処理細胞の M F I _{24h}) を誘発するモノクローナル抗体からなることを特徴とする、請求項 11 に記載の抗原結合タンパク質、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 13】

細胞傷害性薬剤とコンジュゲートされた請求項 7 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質またはその抗原結合フラグメントを含んでなる、免疫複合体。

【請求項 14】

癌の治療に使用するための、請求項 13 に記載の免疫複合体。

【請求項 15】

請求項 13 または 14 に記載の免疫複合体と少なくとも 1 種の賦形剤および / または薬学上許容されるビヒクルとを含んでなる、医薬組成物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/071832

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/091305 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; GIACCIA AMATO J [US]; RANKIN ERINN B) 28 July 2011 (2011-07-28) the whole document -----	1-15
X	WO 2011/014457 A1 (GENENTECH INC [US]; COUTO SUZANA [US]; HONGO JO-ANNE S [US]; KALLOP DA) 3 February 2011 (2011-02-03) the whole document -----	1-15
X	WO 2010/130751 A1 (U3 PHARMA GMBH [DE]; WIRTZ PETER [DE]; RUHE JENS [DE]; TAKIZAWA TAKESH) 18 November 2010 (2010-11-18) the whole document -----	1-15
	-/--	
<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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 January 2013		05/02/2013
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
		Marinoni J-C

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/071832

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG YI-XIANG ET AL: "AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression", CANCER RESEARCH, AACR, US PHILADELPHIA, PA, vol. 68, no. 6, 15 March 2008 (2008-03-15) , pages 1905-1915, XP002505662, ISSN: 1538-7445, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2661 the whole document -----	1-15
X	LIU REN ET AL: "Induction, regulation, and biologic function of Axl receptor tyrosine kinase in Kaposi sarcoma", BLOOD, vol. 116, no. 2, July 2010 (2010-07), pages 297-305, XP002671995, the whole document -----	1-15
X	EP 2 228 392 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 15 September 2010 (2010-09-15) the whole document -----	1-15
X	WO 2009/062690 A1 (U3 PHARMA GMBH [DE]; HETTMANN THORE [DE]; NIEWOEHNER JENS [DE]; RUHE J) 22 May 2009 (2009-05-22) the whole document -----	1-15
X	LI Y ET AL: "Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis", ONCOGENE, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 28, no. 39, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 3442-3455, XP002601155, ISSN: 0950-9232 the whole document -----	1-15
X	YE X ET AL: "An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies", ONCOGENE, vol. 29, no. 38, September 2010 (2010-09), pages 5254-5264, XP002671996, ISSN: 0950-9232 the whole document -----	1-15
X	EP 2 270 053 A1 (U3 PHARMA GMBH [DE]) 5 January 2011 (2011-01-05) the whole document -----	1-15
	----- -/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/071832

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/014755 A1 (UNIV COLORADO [US]; GRAHAM DOUGLAS KIM [US]; LINGER RACHEL [US]; DERYC) 4 February 2010 (2010-02-04) the whole document -----	1-15

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/071832

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011091305 A2	28-07-2011	AU 2011207381 A1	26-07-2012
		CA 2786149 A1	28-07-2011
		EP 2525824 A2	28-11-2012
		WO 2011091305 A2	28-07-2011

WO 2011014457 A1	03-02-2011	AR 077595 A1	07-09-2011
		TW 201106972 A	01-03-2011
		WO 2011014457 A1	03-02-2011

WO 2010130751 A1	18-11-2010	AR 076564 A1	22-06-2011
		AU 2010247464 A1	10-11-2011
		CA 2759836 A1	18-11-2010
		CN 102421802 A	18-04-2012
		EP 2430050 A1	21-03-2012
		JP 2012526530 A	01-11-2012
		KR 20120035145 A	13-04-2012
		TW 201105348 A	16-02-2011
		US 2012117670 A1	10-05-2012
		WO 2010130751 A1	18-11-2010

EP 2228392 A1	15-09-2010	AR 069333 A1	13-01-2010
		AU 2008321835 A1	22-05-2009
		CA 2706549 A1	22-05-2009
		CN 101918452 A	15-12-2010
		EP 2228392 A1	15-09-2010
		KR 20100097688 A	03-09-2010
		PE 10242009 A1	12-08-2009
		RU 2010123916 A	20-12-2011
		TW 200936160 A	01-09-2009
		US 2011044984 A1	24-02-2011
		WO 2009063965 A1	22-05-2009

WO 2009062690 A1	22-05-2009	AU 2008323206 A1	22-05-2009
		CA 2705164 A1	22-05-2009
		CN 101939336 A	05-01-2011
		CO 6280499 A2	20-05-2011
		EP 2220121 A1	25-08-2010
		JP 2011505120 A	24-02-2011
		KR 20100097684 A	03-09-2010
		RU 2010123888 A	20-12-2011
		US 2010330095 A1	30-12-2010
		WO 2009062690 A1	22-05-2009

EP 2270053 A1	05-01-2011	NONE	

WO 2010014755 A1	04-02-2010	US 2012230991 A1	13-09-2012
		WO 2010014755 A1	04-02-2010

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)		G 0 1 N	33/543	5 9 7	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K	39/395	E	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 K	39/395	T	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 P	35/00		
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K 47/48 (2006.01)		A 6 1 K	37/02		
		A 6 1 K	47/48		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 リリアンヌ、ゲシュ
フランス国アイゼ、ルート、ド、クルゼ、1 5

(72) 発明者 ニコラ、ブーテ
フランス国セルネクス、プラス、ド、レグリーズ、1 4

F ターム(参考) 2G045 AA24 CB01 FA37 FB03
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ79 QR77 QS02 QS32 QX02
4C076 AA95 CC27 CC41 EE41A EE59A
4C084 AA02 AA17 BA02 CA23 CA53 DA27 MA17 MA52 MA65 MA66
NA14 ZB261 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA21 AA26 CC05 CC23 DD63 DD86 DD88 EE01
FF03 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 EA20 FA74

专利名称(译)	抗原结合蛋白及其作为治疗癌症的寻址产品的用途		
公开(公告)号	JP2015504302A	公开(公告)日	2015-02-12
申请号	JP2014539356	申请日	2012-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	皮尔法伯制药公司		
申请(专利权)人(译)	皮埃尔法布尔, 曼药物		
[标]发明人	シャルロットポーラルポール リリアンヌゲシュ ニコラブーテ		
发明人	シャルロット、ポーラルポール リリアンヌ、ゲシュ ニコラ、ブーテ		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/53 C07K16/28 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/543 A61K39/395 A61P35/00 A61K45/00 A61K38/00 A61K47/48		
CPC分类号	A61K38/47 A61K47/6851 A61K2039/505 A61P35/00 A61P37/04 A61K47/6843 C07K14/71 C07K16 /2803 C07K16/32 C07K2317/76 C07K2317/77 C07K2319/30 C12N9/2497 C12Y302/02022 C07K16/30 G01N33/6854 C07K16/28 C07K16/18 C07K2317/14 C07K2317/20 C07K2317/33 C07K2317/73 C07K2317/92 C07K2319/74 G01N33/5035 G01N2333/912 G01N2500/04 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/02 G01N33/53.ZNA.Y C07K16/28 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/543.597 A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00 A61K45/00 A61K37/02 A61K47/48		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/CB01 2G045/FA37 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063 /QQ79 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS32 4B063/QX02 4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/CC41 4C076/EE41A 4C076/EE59A 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA02 4C084/CA23 4C084/CA53 4C084 /DA27 4C084/MA17 4C084/MA52 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084 /ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA26 4C085/CC05 4C085/CC23 4C085/DD63 4C085/DD86 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/FF03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085 /GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	中村KoTakashi		
优先权	2011306416 2011-11-03 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及能够特异性结合蛋白Axl的抗原结合蛋白,特别是单克隆抗体以及编码所述蛋白的氨基酸和核酸序列。从一个方面,本发明涉及能够特异性结合Axl并且通过诱导Axl内在化而内化到细胞中的抗原结合蛋白或抗原结合片段。本发明还包括使用所述抗原结合蛋白作为寻址产物与其他抗癌化合物如毒素,放射性元素或药物偶联以及将其用于治疗某些癌症的用途。

元の残基	置換 (s)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala