

(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2014-509835

(P2014-509835A)

(43) 公表日 平成26年4月24日(2014.4.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNAA	2G045
<b>C07K 16/30 (2006.01)</b>	C07K 16/30	4B024
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C12P 21/08	4B064
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4B065
<b>C12N 1/19 (2006.01)</b>	C12N 1/19	4C084

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-544871 (P2013-544871)  
 (86) (22) 出願日 平成23年12月19日 (2011.12.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年8月19日 (2013.8.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/065895  
 (87) 国際公開番号 W02012/087962  
 (87) 国際公開日 平成24年6月28日 (2012.6.28)  
 (31) 優先権主張番号 61/459,962  
 (32) 優先日 平成22年12月20日 (2010.12.20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625  
 ジェネンテック, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス  
 サンフランシスコ ディーエヌエー  
 ウェイ 1  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教  
 (72) 発明者 デニス, マーク  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940  
 80, サウス サン フランシスコ,  
 ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー  
 ジェネンテック, インコーポレイテ  
 ッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗メソテリン抗体及びイムノコンジュゲート

(57) 【要約】

本発明は、抗メソテリン抗体とイムノコンジュゲート及び同じものを使用する方法を提供する。

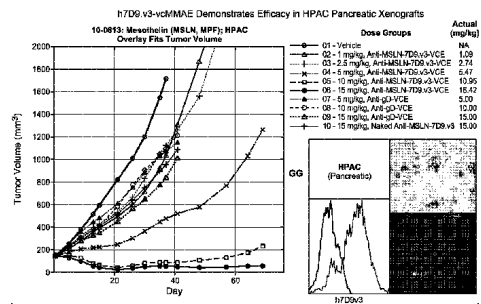


FIG. 26

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

( i ) E 1 5 3 及び D 1 7 4 を含む配列番号 4 3 のエピトープに結合し、任意で以下の特徴の一以上を有する抗体：

( a ) メソテリンのグリコシル化形態に対する結合の減少を示さない；

( b ) メソテリンの M U C 1 6 に対する結合を遮断しない；及び

( c ) 5 n M の親和性でメソテリンに結合する；

( i i ) E 2 1 1 を含む配列番号 4 3 のエピトープに結合し、任意で以下の特徴の一以上を有する抗体：

( a ) メソテリンの M U C 1 6 に対する結合を遮断しない；及び

( b ) 5 n M の親和性でメソテリンに結合する；

及び

( i i i ) 配列番号 4 3 のアミノ酸配列 1 - 1 3 1 内のエピトープに結合し、5 n M の親和性でメソテリンに結合する抗体

から選択されるメソテリンに結合する単離された抗体。

## 【請求項 2】

モノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 3】

ヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 4】

メソテリンに結合する抗体断片である、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 5】

メソテリンが配列番号 4 3 のヒトメソテリンである、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 6】

抗体が、

( a ) ( i ) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、( i i ) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び ( i i i ) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ；

( b ) ( i ) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3、( i i ) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3、及び ( i i i ) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ；又は

( c ) A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 6 4 を有するハイブリドーマ 1 9 C 3 により産生される抗体の H V R - H 3、H V R - L 3 及び H V R - H 2 を含む、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 7】

抗体が、

( a ) ( i ) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( i i ) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( i i i ) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ；

( b ) ( i ) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、( i i ) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び ( i i i ) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ；又は

( c ) A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 6 4 を有するハイブリドーマ 1 9 C 3 により産生される抗体の H V R - H 1、H V R - H 2 及び H V R - H 3 を含む、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 8】

( a ) ( i ) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ；( i i ) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ；( i i i ) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ；( i v ) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ；( v ) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ；及び ( v i ) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

H V R - L 3 ;

( b ) ( i ) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; ( i i ) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; ( i i i ) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ; ( i v ) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; ( v ) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び ( v i ) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 ; 又は

( c ) A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 6 4 を有するパイブリドーマ 1 9 C 3 により産生される抗体の H V R - H 1 、 H V R - H 2 、 H V R - H 3 、 H V R - L 1 、 H V R - L 2 及び H V R - L 3

を含む、請求項 7 に記載の抗体。

10

【請求項 9】

抗体が、

( a ) ( i ) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、 ( i i ) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、 及び ( i i i ) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 ;

( b ) ( i ) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、 ( i i ) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、 及び ( i i i ) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 ; 又は

( c ) A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 6 4 を有するパイブリドーマ 1 9 C 3 により産生される抗体の H V R - L 1 、 H V R - L 2 及び H V R - L 3

20

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 10】

配列番号 2 5 のフレームワーク F R 2 配列と配列番号 2 7 の F R 3 配列を含む軽鎖可変ドメインを更に含む、請求項 8 ( a ) 又は 9 ( a ) に記載の抗体。

【請求項 11】

抗体が、

( a ) 配列番号 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列 ;

( b ) 配列番号 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列 ;

30

( c ) ( a ) の V H 配列及び ( b ) の V L 配列 ;

( d ) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列 ;

( e ) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列 ;

( f ) ( d ) の V H 配列及び ( e ) の V L 配列 ;

( g ) A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 6 4 を有するパイブリドーマ 1 9 C 3 により産生される抗体の V H 配列のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V H 配列 ;

( h ) A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 6 4 を有するパイブリドーマ 1 9 C 3 により産生される抗体の V L 配列のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する V L 配列 ;

40

( i ) ( g ) の V H 配列及び ( h ) の V L 配列 ;

を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 12】

配列番号 8 の V H 配列、配列番号 1 6 の V H 配列、又は A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 6 4 を有するパイブリドーマ 1 9 C 3 により産生される抗体の V H 配列を含む、請求項 1 1 に記載の抗体。

【請求項 13】

配列番号 4 の V L 配列、配列番号 1 2 の V L 配列、又は A T C C 受託番号 P T A - 1 1

50

464を有するバイブリドーマ19C3により産生される抗体のVL配列を含む、請求項11に記載の抗体。

【請求項14】

(a)配列番号8のVH配列及び配列番号4のVL配列；(b)配列番号16のVH配列及び配列番号12のVL配列；(c)ATCC受託番号PTA-11464を有するバイブリドーマ19C3により産生される抗体のVH配列及びVL配列；又は(d)ATCC受託番号PTA-11464を有するバイブリドーマ19C3により産生される抗体を含む抗体。

【請求項15】

IgG1、IgG2a又はIgG2b抗体である、請求項1に記載の抗体。

10

【請求項16】

請求項1から15の何れか一項に記載の抗体をコードする単離された核酸。

【請求項17】

請求項16に記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項18】

請求項17に記載の宿主細胞を抗体が産生されるように培養することを含む、抗体を産生する方法。

【請求項19】

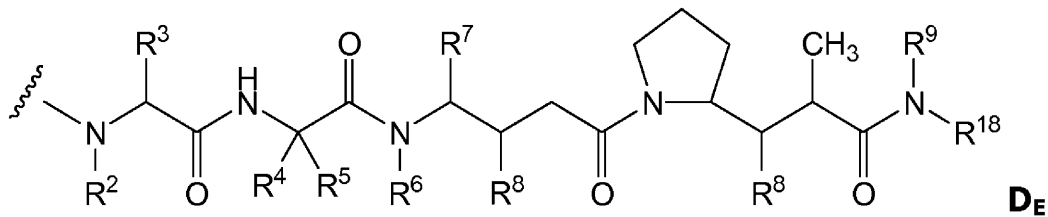
式Ab-(L-D)pを有するイムノコンジュゲートであって、

(a)Abは請求項1から15の何れかの抗体であり；

20

(b)Lはリンカーであり；

(c)Dは式D<sub>E</sub>の薬物であり



かつ、R<sup>2</sup>及びR<sup>6</sup>の各々はメチルであり、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>の各々はイソプロピルであり、R<sup>5</sup>はH、R<sup>7</sup>はsec-ブチルであり、各R<sup>8</sup>はCH<sub>3</sub>、O-CH<sub>3</sub>、OH、及びHから独立に選択され；R<sup>9</sup>はHであり；かつR<sup>18</sup>は-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-アリールであり；及び

30

(d)pは1~8の範囲である

イムノコンジュゲート。

【請求項20】

薬物がアウリスタチンである、請求項19に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項21】

薬物がMMAEである、請求項20に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項22】

40

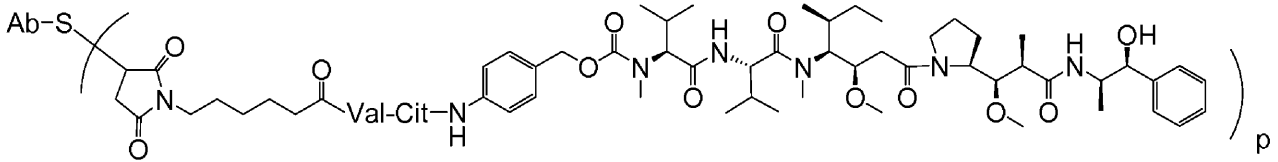
リンカーがプロテアーゼにより切断可能である、請求項19に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項23】

リンカーがval-citジペプチドを含む、請求項22に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項24】

Sが硫黄原子である式



を有する、請求項 19 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 25】

p が 2 ~ 5 の範囲である、請求項 24 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 26】

請求項 8 (a) の抗体を含む、請求項 24 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 27】

請求項 8 (b) の抗体を含む、請求項 24 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 28】

請求項 14 (a) の抗体を含む、請求項 24 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 29】

請求項 14 (b) の抗体を含む、請求項 24 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 30】

請求項 19 から 29 の何れか一項に記載のイムノコンジュゲート及び薬学的に許容される担体を含む薬学的製剤。

【請求項 31】

付加的治療薬を更に含む請求項 30 に記載の薬学的製剤。

【請求項 32】

付加的治療薬がゲムシタピンである、請求項 31 に記載の薬学的製剤。

【請求項 33】

付加的治療薬は、細胞傷害性薬物に結合した抗 MUC16 抗体である、請求項 31 に記載の薬学的製剤。

【請求項 34】

医薬として使用のための、請求項 19 から 29 の何れかに記載のイムノコンジュゲート

。

【請求項 35】

メソテリン陽性癌の治療において使用のための、請求項 19 から 29 の何れかに記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 36】

メソテリン陽性癌が、膵臓癌、卵巣癌、肺癌、子宮内膜癌、及び中皮腫から選択される、請求項 35 における使用のためのイムノコンジュゲート。

【請求項 37】

メソテリン陽性癌が二重陽性癌である、請求項 35 における使用のためのイムノコンジュゲート。

【請求項 38】

医薬の製造のための、請求項 19 から 29 の何れかに記載のイムノコンジュゲートの使用。

【請求項 39】

医薬が二重陽性癌の治療用である、請求項 38 に記載の使用。

【請求項 40】

メソテリン陽性癌が、膵臓癌、卵巣癌、肺癌、子宮内膜癌、及び中皮腫から選択される、請求項 39 に記載の使用。

【請求項 41】

メソテリン陽性癌が二重陽性癌である、請求項 39 における使用。

【請求項 42】

10

20

30

40

50

メソテリン陽性癌を有する個体を治療する方法であって、該方法が請求項 19 から 29 の何れかに記載のイムノコンジュゲートの有効量を個体に投与することを含む方法。

【請求項 43】

メソテリン陽性癌が、膵臓癌、卵巣癌、肺癌、子宮内膜癌、及び中皮腫から選択される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

メソテリン陽性癌が二重陽性癌である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 45】

付加的治療薬を個体へ投与することを更に含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 46】

付加的治療薬がゲムシタピンである、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

付加的治療薬は、細胞傷害性薬物に結合した抗 MUC16 抗体である、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

メソテリン陽性細胞の増殖を阻害する方法であって、該方法が、細胞の表面上のメソテリンに対するイムノコンジュゲートの結合を許容する条件下で、請求項 19 から 29 の何れかに記載のイムノコンジュゲートに細胞を曝露することを含み、それにより細胞の増殖を阻害することを含む方法。

【請求項 49】

細胞が、膵臓、卵巣、肺、又は子宮内膜癌細胞又は中皮腫細胞である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

細胞が二重陽性癌である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 51】

標識にコンジュゲートした、請求項 1 から 15 の何れかに記載の抗体。

【請求項 52】

標識が陽電子放出体である、請求項 51 に記載の抗体。

【請求項 53】

陽電子放出体が  $^{89}\text{Zr}$  である、請求項 52 に記載の抗体。

【請求項 54】

生物学的サンプル中のヒトメソテリンを検出する方法であって、該方法が、天然に生じるヒトメソテリンに対する抗メソテリン抗体の結合を許容する条件下で、生物学的サンプルを請求項 1 から 15 の何れかに記載の抗メソテリン抗体と接触させることを含み、生物学的サンプル中で抗メソテリン抗体と天然に生じるヒトメソテリンの間に複合体が形成されるかを決定することを含む方法。

【請求項 55】

抗メソテリン抗体が請求項 8 (c)、14 (c) 及び 14 (d) の何れかに記載の抗体である、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

生物学的サンプルが、膵臓癌サンプル、卵巣癌サンプル、肺癌サンプル、子宮内膜癌サンプル、又は中皮腫サンプルである、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 57】

方法が、組織切片における免疫組織化学法を実施することを含む、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 58】

生物学的サンプルが血清である、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 59】

(i) 標識された抗メソテリン抗体が請求項 1 から 15 の何れかに記載の抗メソテリン抗体を含む、標識された抗メソテリン抗体をメソテリン陽性癌を有する又は有すると疑わ

10

20

30

40

50

れる被検体に投与し、及び ( i i ) 標識された抗メソテリン抗体が被検体におけるメソテリン陽性癌を示す、標識された抗メソテリン抗体を被検体において検出することを含む、メソテリン陽性癌を検出するための方法。

【請求項 6 0】

標識された抗メソテリン抗体が請求項 8 ( a ) 又は 1 4 ( a ) に記載の標識された抗体である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

標識された抗メソテリン抗体が、陽電子放出体にコンジュゲートした抗メソテリン抗体を含む、請求項 5 9 又は請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

陽電子放出体が  $^{89}\text{Zr}$  である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

( i ) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; ( i i ) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; ( i i i ) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ; ( i v ) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; ( v ) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び ( v i ) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 6 4】

配列番号 2 5 のフレームワーク F R 2 配列と配列番号 2 7 の F R 3 配列を含む軽鎖可変ドメインを更に含む、請求項 6 3 記載の抗体。

【請求項 6 5】

( i ) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 ; ( i i ) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 ; ( i i i ) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 ; ( i v ) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 ; ( v ) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 ; 及び ( v i ) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 6 6】

A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 6 4 を有するバイブリドーマ 1 9 C 3 により産生される抗体の H V R - H 1 、 H V R - H 2 、 H V R - H 3 、 H V R - L 1 、 H V R - L 2 、 及び H V R - L 3 を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 6 7】

配列番号 8 の V H 配列、及び配列番号 4 の V L 配列を含む、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 6 8】

配列番号 1 6 の V H 配列、及び配列番号 1 2 の V L 配列を含む、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 6 9】

A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 6 4 を有するバイブリドーマ 1 9 C 3 により産生される抗体の V H 配列及び V L 配列を含む、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 7 0】

A T C C 受託番号 P T A - 1 1 4 6 4 を有するバイブリドーマ 1 9 C 3 により産生される、請求項 1 4 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

関連出願

本出願は 2 0 1 0 年 1 2 月 2 0 日に出願された米国仮出願番号 6 1 / 4 5 9 9 6 2 の 3 5 U S C 1 1 9 ( e ) に基づく利益を主張し、その内容は参照により本明細書に援用される。

【0002】

配列表

10

20

30

40

50

本出願は、E F S - W e b 経由で A S C I I フォーマットで提出された配列表を含み、その全体が本明細書中で参照することにより援用される。2011年11月29日に作成された前記 A S C I I コピーは P 4 5 3 2 R 1 - W O . t x t と命名され、53,169 バイトの大きさである。

【技術分野】

【0003】

発明の分野

本発明は、抗メソテリン抗体とイムノコンジュゲート及び同じものを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

メソテリンは、通常は中皮（腹膜、心膜、及び胸膜）に限定される発現を有する細胞表面糖タンパク質である。しかし、メソテリンは様々な腫瘍タイプにおいて有意に過剰発現される。メソテリンは M U C 1 6 ( C A 1 2 5 も呼ばれる)、以前に卵巣腫瘍抗原として同定されたムチン様糖タンパク質と相互作用する。M U C 1 6 は、少なくとも14,000 残基を含む細胞外ドメインを持っており、ムチン反復呼ばれる各々156 アミノ酸のタンデムリピートにより特徴づけられる。(例えば、O'Brien et al., *Tumour Biol.* 22:348-366 (2001); Yin et al., *J. Biol. Chem.* 276:27371-27375 (2001)を参照。)メソテリンと M U C 1 6 の間の相互作用はヘテロタイプの細胞接着および転移に重要な役割を果たすと考えられている。(例えば、Rump et al., *J. Biol. Chem.* 279:9190-9198 (2004)を参照)。

【0005】

メソテリンは71 k D a の前駆体タンパク質として合成され、その成熟部分は、細胞表面上に発現される。その前駆体タンパク質は、フューリンによって31 k D a の脱落成分 ( s h e d c o m p o n e n t ) および40 k D a のメソテリン成分(巨核球増強因子、または M P F と呼ばれる)にタンパク質分解性に切断される。後者の成分は、G P I 結合を介して細胞表面に会合したままであり得るが、またタンパク質分解機構を介して脱落され得る。

【0006】

当該分野において、癌のようなメソテリン関連症状の診断および治療のためにメソテリンを標的とする薬剤に対する必要性がある。本発明は、その必要性を満たし、他の利点を提供する。

【発明の概要】

【0007】

概要

本発明は、抗メソテリン抗体とイムノコンジュゲート及び同じものを使用する方法を提供する。

一態様において、メソテリンに結合する単離された抗体が提供され、その抗体は、以下から選択される：( i ) E 1 5 3 及び D 1 7 4 を含む配列番号43のエピトープに結合し、任意で以下の特徴の一以上を有する抗体：( a ) メソテリンのグリコシル化型に対する結合の減少を示さず；( b ) M U C 1 6 に対するメソテリンの結合を遮断せず；及び( c ) 5 n M 以下の親和性でメソテリンに結合する；( i i ) E 2 1 1 を含む配列番号43のエピトープに結合し、任意で以下の特徴の一以上を有する抗体：( a ) M U C に対するメソテリンの結合を遮断せず；及び( b ) 5 n M 以下の親和性でメソテリンに結合する；及び配列番号43のアミノ酸1~131内のエピトープに結合し、5 n M 以下の親和性でメソテリンに結合する抗体。ある態様では、抗体は、モノクローナル抗体である。ある実施態様において、抗体はヒト、ヒト化、又はキメラ抗体である。ある実施態様において、抗体はメソテリンに結合する抗体断片である。ある実施態様において、メソテリンは、配列番号43のヒトメソテリンである。

10

20

30

40

50

## 【0008】

ある実施態様において、抗体は、(a)(i)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(ii)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び(iii)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(b)(i)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(ii)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び(iii)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H2；又は(c)ATCC受託番号PTA-11464を有するバイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-H3、HVR-L3、及びHVR-H2を含む。ある実施態様において、抗体は、(a)(i)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(b)(i)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H3；又は(c)ATCC受託番号PTA-11464を有するバイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。そのような実施態様において、抗体は、(a)(i)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(iii)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(iv)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(v)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(vi)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3；(b)(i)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(iii)配列番号39のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(iv)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(v)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(vi)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L3；又は(c)ATCC受託番号PTA-11464を有するバイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)(i)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(iii)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(iv)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3；又は(c)ATCC受託番号PTA-11464を有するバイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含み、かつ更に、配列番号25のフレームワークFR配列及び配列番号27のFR3配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

10

20

30

## 【0009】

ある実施態様において、抗体は、(a)(i)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3；(b)(i)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L3；又は(c)ATCC受託番号PTA-11464を有するバイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む。そのような実施態様において、抗体は、配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含み、更に、配列番号25のフレームワークFR2配列及び配列番号27のFR3配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

40

## 【0010】

ある実施態様において、抗体は、(a)配列番号8のアミノ酸配列に少なくとも95%配列同一性を有するVH配列；(b)配列番号4のアミノ酸配列に少なくとも95%配列同一性を有するVL配列；(c)(a)のVH配列及び(b)のVL配列；(d)配列番号16のアミノ酸配列に少なくとも95%配列同一性を有するVH配列；(e)配列番号

50

12のアミノ酸配列に少なくとも95%配列同一性を有するVL配列；(f)(d)のVH配列及び(e)のVL配列；(g)ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVH配列のアミノ酸配列に少なくとも95%配列同一性を有するVH配列；(h)ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVL配列のアミノ酸配列に少なくとも95%配列同一性を有するVL配列；又は(i)(g)のVH配列及び(h)のVL配列を含む。そのような実施態様において、抗体は、配列番号8のVH配列、配列番号16のVH配列、又はATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVH配列を含む。別のそのような実施態様において、抗体は、配列番号4のVL配列、配列番号12のVL配列、又はATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVL配列を含む。

10

## 【0011】

更なる態様において、本発明は、(a)配列番号8のVH配列及び配列番号4のVL配列；(b)配列番号16のVH配列及び配列番号12のVL配列；(c)ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVH配列及びVL配列を含む抗体；又は(d)ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体を提供する。

## 【0012】

ある実施態様において、上記実施態様の何れかに記載の抗体は、IgG1、IgG2a又はIgG2b抗体である。

20

## 【0013】

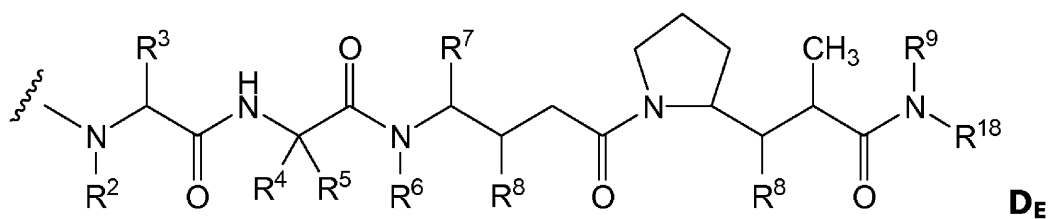
更なる態様において、本発明は上記実施態様の何れかに記載の抗体をコードする単離された抗体を提供する。一実施態様において、核酸分子を含む宿主細胞が提供される。別の実施態様において、抗体を産生する方法が提供され、該方法は抗体が産生されるように宿主細胞を培養することを含む。

## 【0014】

更なる態様において、式Ab-(L-D)pを有するイムノコンジュゲートが提供され

- (a) Abは上記実施態様の何れかにある抗体であり；
- (b) Lはリンカーであり；
- (c) Dは式D<sub>E</sub>の薬物であり

30



かつ、R<sup>2</sup>及びR<sup>6</sup>の各々はメチルであり、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>の各々はイソプロピルであり、R<sup>5</sup>はH、R<sup>7</sup>はsec-ブチルであり、各R<sup>8</sup>はCH<sub>3</sub>、O-CH<sub>3</sub>、OH、及びHから独立に選択され；R<sup>9</sup>はHであり；かつR<sup>18</sup>は-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-アリールであり；

40

- (d) pは1~8の範囲である。

## 【0015】

一実施態様において、薬物はアウリスタチンである。そのような実施態様において、薬物はMMAEである。別の実施態様において、リンカーはプロテアーゼにより切断可能である。そのような実施態様において、リンカーはval-citジペプチドを含む。

## 【0016】

更なる実施態様において、イムノコンジュゲートは式を有し：

50



肺、中皮腫、又は子宮内膜の細胞である。別の実施態様において、宿主細胞は、二重陽性細胞である。

【0022】

別の態様において、本発明は上記実施態様の何れかにある抗体を提供し、該抗体は標識にコンジュゲートしている。一実施態様において、標識は陽電子放射体である。そのような実施態様において、陽電子放射体は<sup>89</sup>Zrである。

【0023】

別の態様において、生物学的サンプル中のヒトメソテリンを検出する方法が提供され、該方法は、天然に生じるヒトメソテリンに対する抗メソテリン抗体の結合を許容する条件下で、生物学的サンプルを上記実施態様の何れかにある抗メソテリン抗体と接触させることを含み、生物学的サンプル中で抗メソテリン抗体と天然に生じるヒトメソテリンの間に複合体が形成されるかを決定することを含む。一実施態様において、抗メソテリン抗体は、(a) ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3；(b) ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVH配列及びVL配列；又は(d) ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体を含む。別の実施態様において、生物学的サンプルは、膵臓癌サンプル、卵巣癌サンプル、肺癌サンプル、子宮内膜癌サンプル、又は中皮腫サンプルである。別の実施態様において、本方法は、組織切片上で免疫組織化学法を実行することを含む。別の実施態様において、生物学的サンプルは血清である。

10

20

【0024】

更なる態様において、メソテリン陽性癌を検出する方法が提供され、該方法は標識された抗メソテリン抗体を、メソテリン陽性癌を有するか又は有することが疑われる被験体に投与することを含み、ここでは該抗メソテリン抗体は上記実施態様の何れかにあり、そして被験体において標識された抗メソテリン抗体を検出し、ここでは標識された抗メソテリン抗体の検出は被験体におけるメソテリン陽性癌を示す。一実施態様において、標識された抗メソテリン抗体は、陽電子放射体にコンジュゲートした抗メソテリン抗体を含む。そのような実施態様において、陽電子放射体は<sup>89</sup>Zrである。

30

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1は、メソテリンが前駆体タンパク質の、31kDaの脱落成分(she d component)および40kDaのメソテリン成分(巨核球増強因子、またはMPFとも呼ばれる)へのタンパク質性分解により生成されることを示す。後者の成分は、細胞表面に会合したままであり得るが、また脱落され得る。「CHO」は4つのグリコシル化部位を示し、1つはMPFに、3つはメソテリンにある。

【図2】図2は、実施例Aに記載されるように、様々な組織におけるヒトメソテリン遺伝子のレベルの図解を示す。

【図3】図3は、実施例Bに記載されるように、単離された抗メソテリンモノクローナル抗体の特性を示す。

40

【図4】図4は、マウス抗体7D9(mu7D9)及びそのヒト化変異体(7D9.v1及び7D9.v3)の可変軽鎖領域配列のアラインメントを示す。

【図5】図5は、マウス抗体7D9(mu7D9)及びそのヒト化変異体(7D9.v1及び7D9.v3)の可変重鎖領域配列のアラインメントを示す。

【図6】図6は、実施例Cに記載されるように、7D9のキメラ及びヒト化変異体の特性を示す。

【図7】図7は、マウス抗体22A10(22A10)及びそのヒト化変異体(hu22A10移植片及び22A10.v83)の可変軽鎖領域配列のアラインメントを示す。

【図8】図8は、マウス抗体22A10(22A10)及びそのヒト化変異体(hu22A10移植片及び22A10.v83)の可変重鎖領域配列のアラインメントを示す。

50

【図 9】図 9 A は、実施例 C に記載されるように、安定的にメソテリンでトランスフェクトされた B J A B 細胞における 2 2 A 1 0 のヒト化変異体のスキッチャード分析を示す。

【図 1 0】図 9 B は、実施例 C に記載されるように、同様に安定的にトランスフェクトされた B J A B 細胞由来の 2 2 A 1 0 のヒト化変異体によるメソテリンの免疫沈降を示す。

【図 1 0 A】図 1 0 A は、7 D 9 のヒト化変異体の超可変領域及びフレームワーク領域の配列を示す。

【図 1 0 B】図 1 0 B は、2 2 A 1 0 のヒト化変異体の超可変領域及びフレームワーク領域の配列を示す。

【図 1 1】図 1 1 は、実施例 D に記載されるように、異なる種由来のメソテリン間の配列相同性を示す。図 1 1 は、出現順に、配列番号 4 3 及び 4 6 ~ 4 8 をそれぞれ開示する。

【図 1 2】図 1 2 は、実施例 D に記載されるように、異なる種由来のメソテリンとの h 7 D 9 . v 3 及び h 2 2 A 1 0 . v 8 3 の交差反応性を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、実施例 E に記載されるように、安定的にメソテリンを発現するトランスフェクトされた細胞株及び内因性メソテリンを発現する細胞株のスキッチャード解析により決定される場合のヒト化抗メソテリン抗体の親和性を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、実施例 F に記載されるように、抗体 7 D 9 又は 2 2 A 1 0 及び図 3 にリストされた他のモノクローナル抗体の間の拮抗アッセイの結果を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、実施例 G に記載されるように、エピトープマッピングに使用されるキメラメソテリンのコンストラクト（縮尺通りに素描）を示す。図 1 5 は、配列番号 5 1 ~ 5 3 の「E V E K」、「D A E Q」及び「D V E R」をそれぞれ開示する。

【図 1 6】図 1 6 は、実施例 G に記載されるように、キメラメソテリンを発現する細胞に対する 7 D 9 と 2 2 A 1 0 の結合を評価する F A C S の結果を示す。

【図 1 7】図 1 7 は、実施例 G に記載されるように、h 7 D 9 . v 3 及び h 2 2 A 1 0 . v 8 3 が結合するアミノ酸を同定するための変異戦略を示す。図 1 7 は、配列番号 5 1 として「E V E K」、配列番号 5 4 ~ 5 7 としてそれぞれ「ヒト 1 3 2 - 2 1 2」、「カニクイザル 1 3 2 - 2 1 2」、「ラット 1 3 2 - 2 1 2」及び「マウス 1 3 2 - 2 1 2」を、配列番号 5 8 ~ 7 3 としてそれぞれヒトとマウスの「M U T 1」、「M U T 3」、「M U T 6」、「M U T 7」、「M U T 9」、「M U T 1 0」、「M U T 1 3」、及び「M U T 1 5」を、及び配列番号 7 3 と 7 4 としてそれぞれ「S T K D」と「S V K D」を開示する。

【図 1 8 A】図 1 8 A は、実施例 G に記載されるように、ヒトメソテリン変異体を発現する細胞に対する h 7 D 9 . v 3 と h 2 2 A 1 0 . v 8 3 の結合を評価する F A C S の結果を示す。

【図 1 8 B】図 1 8 B は、実施例 G に記載されるように、カニクイザルメソテリン変異体を発現する細胞に対する h 7 D 9 . v 3 の結合を評価する F A C S の結果を示す。

【図 1 9 B】図 1 9 は、実施例 G に記載されるように、7 D 9 / h 7 D 9 . v 3 と 2 2 A 1 0 / h 2 2 A 1 0 . v 8 3 が結合するエピトープ無いの鍵となるアミノ酸を示す。図 1 9 は、出現順に、配列番号 5 4 ~ 5 7 をそれぞれ開示する。

【図 2 0】図 2 0 は、実施例 H に記載されるように、グリコシル化されたメソテリンに対する h 7 D 9 . v 3 の結合を示す。

【図 2 1】図 2 1 は、実施例 I に記載されるように、抗体 1 9 C 3 , 7 D 9 及び 2 2 A 1 0 が M U C 1 6 に対するメソテリンの結合を阻害するか及びその逆も同様かを決定する 2 つのアッセイの結果を示す。

【図 2 2】図 2 2 は、実施例 J に記載されるように、免疫組織化学法（I H C）による膵管腺癌におけるメソテリンの発現を示す。

【図 2 3】図 2 3 は、実施例 J に記載されるように、免疫組織化学法（I H C）による卵巣漿液性腺癌腫瘍におけるメソテリンの発現を示す。

【図 2 4】図 2 4 は、実施例 J に記載されるように、免疫組織化学法（I H C）による非小細胞肺癌（N S C L C）腺癌におけるメソテリンの発現を示す。

10

20

30

40

50

【図25】図25は、実施例Jに記載されるように、免疫組織化学法（IHC）によるカニクイザル由来組織におけるメソテリンの発現（右パネル）を示す。

【図26】図26は、実施例Lに記載されるように、イムノコンジュゲートh7D9.v3-vcMMAEは、HPAC膵臓異種移植片における有効性を実証することを示す。

【図27】図27は、実施例Mに記載されるように、イムノコンジュゲートh7D9.v3-vcMMAEは、原発性膵臓異種移植片における有効性を実証することを示す。

【図28】図28は、実施例Nに記載されるように、イムノコンジュゲートh7D9.v3-vcMMAEは、卵巣腫瘍異種移植片における有効性を実証することを示す。

【図29】図29は、実施例Oに記載されるように、イムノコンジュゲートh7D9.v3-vcMMAEは、肺扁平上皮癌の異種移植モデルにおける有効性を実証することを示す。

10

【図30】図30は、実施例Pに記載されるように、イムノコンジュゲートh7D9.v3-vcMMAEのヒトメソテリンに対する有効性が、トランスフェクトされたBJAB異種移植腫瘍モデルにおけるカニクイザルメソテリンに対するイムノコンジュゲートh22A10.v83-vcMMAEのそれに似ていることを示す。

【図31】図31は、実施例Pに記載されるように、イムノコンジュゲートh7D9.v3-vcMMAEの有効性が、中皮腫及び卵巣腫瘍モデルにおけるイムノコンジュゲートh22A10.v83-vcMMAEのそれに似ていることを示す。

【図32】図32は、実施例Qに記載されるように、MUC16はメソテリンと複合体を形成し、2つのタンパク質が二重陽性細胞株から共脱落されることを示す。

20

【図33】図33は、7D9でなく、19C3が予め結合したMUC16をメソテリンから外すことを示す。

#### 【0026】

本発明の実施態様の詳細な記述

#### I. 定義

本明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」とは、下記に定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られる軽鎖可変ドメイン（VL）フレームワーク又は重鎖可変ドメイン（VH）フレームワークのアミノ酸配列を含有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク”に由来する”アクセプターヒトフレームワークは、その同一のアミノ酸配列を含んでもよく、又はそれはアミノ酸配列の変化を含み得る。幾つかの実施態様において、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。幾つかの実施態様において、VLアクセプターヒトフレームワークは、Vはヒト免疫グロブリンのフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に、配列が同一である。

30

#### 【0027】

「親和性」とは、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合相互作用の総和の強度を指す。本明細書で使用する場合、特に断らない限り、「結合親和性」は、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1:1の相互作用を反映している本質的な結合親和性を指す。そのパートナーYに対する分子Xの親和性は、一般的に解離定数（Kd）で表すことができる。親和性は、本明細書に記載したものを含む、当技術分野で知られている一般的な方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例示であって典型的な実施態様は、以下で説明される。

40

#### 【0028】

「親和性成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数の超可変領域（HVR）において一又は複数の改変を持つものである。

#### 【0029】

用語「抗メソテリン抗体」及び「メソテリンに結合する抗体」は、メソテリンを標的と

50

し、診断薬剤及び/又は治療的薬剤として有用であるように、十分な親和性でメソテリンに結合することができる抗体を指す。一実施態様において、抗メソテリン抗体の、無関係な、非メソテリタンパク質への結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ (RIA) によって測定される場合、抗体のメソテリンへの結合の約10%未満である。ある実施態様において、メソテリンへ結合する抗体は、解離定数 (Kd) が、 $1 \mu\text{M}$ 、 $100 \text{ nM}$ 、 $10 \text{ nM}$ 、 $1 \text{ nM}$ 、 $0.1 \text{ nM}$ 、 $0.01 \text{ nM}$ 、又は  $0.001 \text{ nM}$  (例えば、 $10^{-8} \text{ M}$  未満、例えば、 $10^{-8} \text{ M}$  から  $10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9} \text{ M}$  から  $10^{-13} \text{ M}$ ) を有する。ある実施態様において、抗メソテリン抗体は、異なる種由来のメソテリン間で保存されているメソテリンのエピトープに結合する。

#### 【0030】

用語「抗体」は本明細書において最も広い意味で用いられ、様々な抗体構造を包含し、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体 (例えば二重特異性抗体)、及び、所望の抗原結合活性を示す限り、抗体断片を含む。

#### 【0031】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部を含み、かつインタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SHは、F(ab')<sub>2</sub>、ダイアボディ、直鎖状抗体、単鎖抗体分子 (例えば scFv)、及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

#### 【0032】

参照抗体として「同一のエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいて50%以上、参照抗体のその抗原への結合をブロックする抗体、逆に競合アッセイにおいて50%以上、その抗体のその抗原への結合をブロックするその参照抗体を指す。典型的な競合アッセイが、本明細書において提供される。

#### 【0033】

用語「癌」及び「癌性」は、無秩序な細胞成長/細胞増殖を典型的に特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を記述する。癌の例には、限定されないが、癌腫、リンパ腫 (例えば、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫)、芽細胞腫、肉腫、及び白血病を含む。そのような癌のより具体的な例は、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化器癌、膵臓癌、神経膠腫を含む、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、白血病、及びその他のリンパ増殖性疾患、及び様々な型の頭頸部癌を包含する。

#### 【0034】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の起源又は種から由来し、一方重鎖及び/又は軽鎖の残りが異なる起源又は種から由来する抗体を指す。

#### 【0035】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体の5つの主要なクラスがあり：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM、及びこれらのいくつかは、さらにサブクラス (アイソタイプ)、例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>に、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IGA<sub>1</sub>、及びIgA<sub>2</sub>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ドメインは、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 、及び $\nu$ と呼ばれる。

#### 【0036】

本明細書で用いられる「細胞傷害性薬物」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞死又は破壊を生ずる物質を指す。細胞傷害性薬物は、限定されないが、放射性同位体 (例えば、At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>、Pb<sup>212</sup>及びLuの放射性同位体)：化学療法剤又は薬物 (例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ピンカルカロイド (ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマ

10

20

30

40

50

イシンC、クロラムブシル、ダウノルピシンまたは他の挿入剤)、成長阻害剤、酵素及びその断片、例えば核酸分解酵素など、抗生物質、小分子毒素などの毒素、又は細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素(それらの断片及び/又はその変異体を含む)、及び以下に開示される様々な抗腫瘍剤又は抗癌剤を包含する。

【0037】

用語「二重陽性癌」は、メソテリン - 及びMUC16陽性の両方である細胞を含む癌を指す。

【0038】

用語「二重陽性細胞」は、その表面上でメソテリンとMUC16の両方を発現する細胞を指す。

10

【0039】

「エフェクター機能」とは、抗体のアイソタイプにより変わる、抗体のFc領域に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)、貪食、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)のダウンレギュレーション、及びB細胞の活性化を含む。

【0040】

薬剤、例えば、薬学的製剤の「有効量」とは、所望の治療的又予防的結果を達成するために必要な用量及び期間での、有効な量を指す。

【0041】

用語「エピトープ」は、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位を指す。

20

【0042】

用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。その用語は、天然配列Fc領域と変異体Fc領域を含む。一実施態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226又はPro230から重鎖のカルボキシル末端まで伸長する。しかし、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は存在しているか、又は存在していない場合がある。本明細書に明記されていない限り、Fc領域又は定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるように、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

30

【0043】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的に4つのFRのドメイン、FR1、FR2、FR3、及びFR4で構成される。従って、HVR及びFR配列は一般にVH(又はVL)の以下の配列に現れる: FR1 - H1(L1) - FR2 - H2(L2) - FR3 - H3(L3) - FR4。

【0044】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」は、本明細書中で互換的に使用され、天然型抗体構造と実質的に類似の構造を有するか、又は本明細書で定義されるFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

40

【0045】

用語「メソテリンのグリコシル化形態」は、糖鎖残基の付加により翻訳後修飾されるメソテリンの天然に生じる形態を指す。

【0046】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養」は互換的に使用され、外因性の核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含める。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」を含み、継代の数に関係なく、それに由来する一次形質転換細胞及び子孫が含まれる。子孫は親細胞と核酸含量が完全に同一ではないかもしれ

50

ないが、突然変異が含まれる場合がある。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能又は生物活性を有する変異型子孫が本明細書において含まれる。

【0047】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により産生されるか、又はヒト抗体のレパトリー又は他のヒト抗体をコードする配列を利用した非ヒト起源に由来する抗体のそれに対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

【0048】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」とは、ヒト免疫グロブリンV L又はV Hフレームワーク配列の選択において最も一般的に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的には、ヒト免疫グロブリンV L又はV H配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからのものである。一般的には、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3にあるサブグループである。一実施態様において、V Lについて、サブグループは上掲のK a b a tらにあるサブグループCUPPIである。一実施態様において、V Hについて、サブグループは上掲のK a b a tらにあるサブグループIIIである。

10

【0049】

「ヒト化」抗体は、非ヒトH V R由来のアミノ酸残基、及びヒトF R由来アミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。所定の実施態様において、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には2つの可変ドメインの全てを実質的に含み、H V R（例えば、C D R）の全て又は実質的に全てが、非ヒト抗体のものに対応し、全てまたは実質的にF Rの全てが、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体の「ヒト化型」、例えば、非ヒト抗体は、ヒト化を遂げた抗体を指す。

20

【0050】

本明細書で使用される用語「超可変領域」又は「H V R」は、配列が超可変であるか、及び/又は構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの各領域を指す。一般的に、天然型4鎖抗体は、V H（H 1、H 2、H 3）に3つ、及びV L（L 1、L 2、L 3）に3つの6つのH V Rを含む。H V Rは、一般的に超可変ループ由来及び/又は「相補性決定領域」（C D R）由来のアミノ酸残基を含み、後者は、最高の配列可変性であり、及び/又は抗原認識に関与している。典型的な超可変ループはアミノ酸残基26-32（L 1）、50-52（L 2）、91-96（L 3）、26-32（H 1）、53-55（H 2）、及び96-101（H 3）で生じる。(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。典型的なC D R（C D R - L 1、C D R - L 2、C D R - L 3、C D R - H 1、C D R - H 2、及びC D R - H 3）は、アミノ酸残基L 1の24-34、L 2の50-56、L 3の89-97、H 1の31-35B、H 2の50-65、及びH 3の95-102に生じる。(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。V HのC D R 1の例外を除いて、C D Rは一般的に超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。C D Rは、抗原に接触する残基である「特異性決定残基」又は「S D R」を含む。S D Rは、略称(a b b r e v i a t e d - ) C D R、又はa - C D Rと呼ばれる、C D Rの領域内に含まれている。典型的なa - C D R（a - C D R - L 1、a - C D R - L 2、a - C D R - L 3、a - C D R - H 1、a - C D R - H 2、及びa - C D R - H 3）は、アミノ酸残基L 1の31-34、L 2の50-55、L 3の89-96、H 1の31-35B、H 2の50-58、及びH 3の95-102に生じる。(Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)を参照)；特に断らない限り、可変ドメイン内のH V R残基及び他の残基（例えば、F R残基）は、上掲のK a b a tらに従い、本明細書において番号が付けられる。

30

40

50

## 【0051】

「イムノコンジュゲート」は、1つ以上の異種分子にコンジュゲートした抗体であり、限定されないが、細胞傷害性薬物を含む。

## 【0052】

「個体」又は「被検体」は、哺乳動物である。哺乳動物は、限定されないが、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、霊長類（例えば、ヒト、サルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含む。ある実施態様において、個体又は被検体はヒトである。

## 【0053】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から分離されたものである。幾つかの実施態様において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換又は逆相HPLC）により決定されるように、95%以上または99%の純度に精製される。抗体純度の評価法の総説としては、例えばFlatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照のこと。

10

## 【0054】

「単離された核酸」は、その自然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子を含むが、しかし、その核酸分子は、染色体外又はその自然の染色体上の位置とは異なる染色体位置に存在している。

## 【0055】

「抗メソテリン抗体をコードする単離された核酸」は、抗体の重鎖及び軽鎖（又はその断片）をコードする一以上の核酸分子を指し、単一のベクター又は別個のベクター内のそのような核酸分子、及び宿主細胞の一以上の位置に存在するそのような核酸分子を含む。

20

## 【0056】

用語「メソテリン」は本明細書で使用される場合、細胞無いでメソテリン前駆体タンパク質のプロセッシングから生じる任意の天然の成熟したメソテリンを指す。その用語は、任意の脊椎動物起源由来のメソテリンを含み、特に明記しない限り、例えば霊長類（例えばヒト及びカニクイザル）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳動物を含む。その用語はまた、天然に存在する標的の変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を包含する。典型的なヒトメソテリン前駆体タンパク質のアミノ酸配列が配列番号42に示され、典型的なヒトメソテリンが配列番号43に示される。更なる典型的なメソテリンの配列が本明細書に記述される。

30

## 【0057】

用語「メソテリン陽性癌」は、細胞上にメソテリンを発現する細胞を含む癌を指す

## 【0058】

用語「メソテリン陽性細胞」は、その表面上でメソテリンを発現する細胞を指す。

## 【0059】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、例えば、天然に生じる変異を含み、又はモノクローナル抗体製剤の製造時に発生し、一般的に少量で存在している変異体などの、可能性のある変異体抗体を除き、集団を構成する個々の抗体は同一であり、及び/又は同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を一般的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。従って、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、限定されないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含む様々な技術によって作成され、モノクローナル抗体を作製するためのそのような方法及び他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

40

50

## 【 0 0 6 0 】

用語「MUC16陽性癌」は、細胞上にMUC16を発現する細胞を含む癌を指す。

## 【 0 0 6 1 】

用語「MUC16陽性細胞」は、その表面上でMUC16を発現する細胞を指す。

## 【 0 0 6 2 】

「ネイキッド抗体」とは、異種の部分（例えば、細胞傷害性部分）又は放射性標識にコンジュゲートしていない抗体を指す。ネイキッド抗体は薬学的製剤中に存在してもよい。

## 【 0 0 6 3 】

「天然型抗体」は、天然に生じる様々な構造をとる免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然型IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から成る約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）を有し、3つの定常ドメイン（CH1、CH2およびCH3）が続く。同様に、N末端からC末端に、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）を有し、定常軽鎖（CL）ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ $\kappa$ ）とラムダ（ $\lambda$ ）と呼ばれる、2つのタイプのいずれかに割り当てることができる。

10

## 【 0 0 6 4 】

用語「パッケージ挿入物」は、効能、用法、用量、投与、併用療法、禁忌についての情報、及び/又はそのような治療用製品の使用に関する警告を含む、治療用製品の商用パッケージに慣習的に含まれている説明書を指すために使用される。

20

## 【 0 0 6 5 】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入した後、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、参照ポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign（DNASTAR）ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインするための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネテック社によって作製され、ソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2もまた、ジェネテック社、サウスサンフランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、又はそのソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIXのV4.0Dを含む、UNIXオペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

30

40

## 【 0 0 6 6 】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性（或いは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して所定の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる）は次のように計算される：

分率  $X/Y$  の 100 倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2により、AとBのそのプロゲ

50

ラムのアラインメントにおいて同一と一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に断らない限り、本明細書で使用されるすべての%アミノ酸配列同一性値が、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用し、直前の段落で説明したように得られる。

【0067】

用語「薬学的製剤」は、その中に有効で含有される活性成分の生物学的活性を許容するような形態であって、製剤を投与する被検体にとって許容できない毒性である他の成分を含まない調製物を指す。

10

【0068】

「薬学的に許容される担体」は、被検体に非毒性であり、有効成分以外の製剤処方中の成分を指す。薬学的に許容される担体は、限定されないが、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は保存剤を含む。

【0069】

本明細書で用いられるように、「治療」（及び「治療する（treat）」または「治療している（treating）」など文法上の変形）は、治療されている個体の自然経過を変えようと試みる臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の過程においてのいずれかで実行できる。治療の望ましい効果は、限定されないが、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善を含む。幾つかの実施態様において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるか又は疾患の進行を遅くするために使用される。

20

【0070】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に關与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然型抗体の可変重鎖ドメイン及び軽鎖（それぞれVHおよびVL）は、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）と3つの超可変領域（HVR）を含む各ドメインを持ち、一般的に似たような構造を有する。（例えば、Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6<sup>th</sup> ed., W.H. Freeman and Co., 91頁(2007)を参照）。単一のVH又はVLドメインが、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。更に、特定の抗原に結合する抗体は、相補的なVL又はVHドメインのそれぞれのライブラリーをスクリーニングするために、抗原に特異的に結合する抗体由来のVH又はVLドメインを用いて単離することができる。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)を参照。

30

【0071】

本明細書で使用される、用語「ベクター」は、それがリンクされている別の核酸を伝播することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、並びにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある種のベクターは、それらが動作可能なようにリンクされている核酸の発現を指示することができる。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と言う。

40

【0072】

II. 組成物及び方法

一態様において、本発明は、メソテリンに結合する抗体及びそのような抗体を含むイムノコンジュゲートの一部に基づく。本発明の抗体とイムノコンジュゲートは、例えば、メソテリン陽性癌の診断又は治療のために、有用である。

【0073】

A. 典型的な抗メソテリン抗体

一態様において、本発明は、メソテリンに結合する単離された抗体を提供する。細胞内でメソテリン前駆体タンパク質の切断から得られる天然に生じるメソテリンは、図1に示されるようにメソテリンと巨核球増強因子（MPF）を生成する。メソテリンは前駆体タ

50

ンパク質に対してC末端の切断を含む。そのような切断はGPIアンカーの付着を可能にし得る。細胞培養物又は動物の血清中において、メソテリンは細胞表面に例えばGPIアンカーを介して結合したままであり得、又はメソテリンは細胞から遊離され得（例えば、GPIアンカーが未だ同定されていない酵素により切断され得）、脱落メソテリンを生産する。

【0074】

典型的な天然に生じるヒトメソテリン前駆体タンパク質の配列が配列番号42に与えられ、対応するメソテリンの配列が配列番号43（対応するアミノ酸は配列番号42の296～580）に示される。別のメソテリン配列は配列番号42のアミノ酸296～598に対応する。配列番号44は配列番号42の天然に生じる変異体であり、そのプロセッシングは配列番号45の配列を有するメソテリンを生じる。配列番号45は配列番号43に比べてアミノ酸116で8つのアミノ酸挿入を含む。配列番号45に示されるメソテリンの変異体形態は腫瘍細胞株において～5%のメソテリン転写物を含むように見える。

10

【0075】

ある実施態様において、抗メソテリン抗体は、以下の特徴の少なくとも一以上を任意の組み合わせで有する：

(a) (i) E153及びD174又は(ii) E211を含む配列番号43のエピトープに結合する；

(b) メソテリンの別のグリコシル化形態に対する結合の変更又は減少を示すか又は示さない；

20

(c) メソテリンのMUC16に対する結合を遮断するか又は遮断しない；

(d) 5 nM以下の親和性、又は代わりに1 nM以下、又は代わりに0.5 nM以下、又は代わりに0.1 nM以下、及び任意で0.0001 nM以上の親和性でメソテリンに結合する。

上記実施態様の何れかにおいて、MUC16に対するメソテリンの結合を遮断しない抗体は、MUC16に対するメソテリンの結合を増強する抗体である。

【0076】

一実施態様において、抗メソテリン抗体は、E153とD174を含む配列番号43のエピトープへ結合する。そのような実施態様において、抗メソテリン抗体は、以下の特徴の少なくとも一以上を任意の組み合わせで更に有する：

30

(a) メソテリンのグリコシル化形態に対する結合の減少を示さない；

(b) メソテリンのMUC16に対する結合を遮断しない；

(c) 5 nM以下の親和性、又は代わりに1 nM以下、又は代わりに0.5 nM以下、及び任意で0.0001 nM以上の親和性でメソテリンに結合する。

そのような実施態様において、MUC16に対するメソテリンの結合を遮断しない抗体は、MUC16へのメソテリンの結合を増強し、及び/又はその抗体は1 nM以下の親和性で結合する。上記特徴を有する典型的な抗体は7D9及びそのヒト化変異体、例えば本明細書に開示されるh7D9.v3である。上記実施態様の何れかにおいて、抗メソテリン抗体に結合するメソテリンはヒトメソテリンである。

【0077】

40

別の実施態様において、抗メソテリン抗体は、E211を含む配列番号43のエピトープへ結合する。そのような実施態様において、抗メソテリン抗体は、以下の特徴の少なくとも一以上を更に有する：

(a) メソテリンのMUC16に対する結合を遮断しない；

(b) 5 nM以下の親和性、又は代わりに1 nM以下、又は代わりに0.5 nM以下、及び任意で0.0001 nM以上の親和性でメソテリンに結合する。

そのような実施態様において、MUC16に対するメソテリンの結合を遮断しない抗体は、MUC16へのメソテリンの結合を増強し、及び/又はその抗体は1 nM以下の親和性で結合する。上記特徴を有する典型的な抗体は22A10及びそのヒト化変異体、例えば本明細書に開示される22A10.v83である。上記実施態様の何れかにおいて、抗メ

50

ソテリン抗体に結合するメソテリンはヒトメソテリン、カニクイザルメソテリン及びノ又はラットメソテリンである。

【0078】

別の実施態様において、抗メソテリン抗体：

(a) 配列番号43のアミノ酸1~131内のエピトープに結合し；及び

(b) 5 nM以下の親和性、又は代わりに1 nM以下、又は代わりに0.5 nM以下、又は代わりに0.1 nM以下、及び任意で0.0001 nM以上の親和性でメソテリンに結合する。

そのような実施態様において、抗体はMUC16に対するメソテリンの結合を遮断し、及びノ又は配列番号43のアミノ酸1~64又は1~70内のエピトープに結合する。そのような実施態様において、抗体はメソテリンに結合したMUC16と置換する。上記特徴を有する典型的な抗体は本明細書に開示される19C3である。上記実施態様の何れかにおいて、抗メソテリン抗体に結合するメソテリンはヒトメソテリンである。

10

【0079】

アッセイ

抗メソテリン抗体が、「E153及びD174を含む配列番号43のエピトープに結合する」か又は「E211を含む配列番号43のエピトープに結合する」かを定めるために、それらの残基が配列番号43を含むポリペプチド中で変異され、そして293細胞で発現される変異ポリペプチドに対する抗体の結合が、実施例Gに記載されるようにFACSにより試験され、ここで、変異ポリペプチドに対する抗体の結合の実質的な減少(70%以上の減少)又は消失は、抗体がE153及びD174を含む又はE211を含む配列番号43のエピトープに結合することを示している。

20

【0080】

抗メソテリン抗体が「メソテリンのグリコシル化形態に対する結合の減少を示さない」かどうかを決定するために、実施例Hに記載されるように、タグ付きヒトメソテリンがCHO細胞内で発現され、(タグを手段として)精製され、MonoSカラムの電荷により、メソテリンのグリコシル化が高(画分A11)、中間(A12)、低(B1)及び低から無(B5)に更に分離される。各画分を事前に結合した抗メソテリン抗体を含むチップ上に流し、オンとオフの割合が各分画に対して測定される。各画分についての親和性が互いに25%以内であれば、それは抗体がメソテリンのグリコシル化形態に対する結合の低下を提示していないことを示している。

30

【0081】

抗メソテリン抗体が「MUC16に対するメソテリンの結合を遮断する」、「MUC16に対するメソテリンの結合を遮断しない」又は「MUC16に対するメソテリンの結合を増強する」かを決定するために、次のようにMUC16結合アッセイが行われる。具体的には、MUC16のビオチン化断片(ムチン反復のうち3つを包含する)が抗メソテリン抗体の有無によらずメソテリンを安定的に発現するA431細胞とインキュベートし、MUC16-ビオチン結合のレベルがストレプトアビジン-PEでFACSによって決定される。メソテリンのMUC16の結合部位は、暫定的にメソテリンの最初の64個のアミノ酸にマッピングされている(Kaneko et al., J. Biol Chem. 284:3739-49 (2009))。逆に、安定的にMUC16を発現するPC3細胞を、抗メソテリン抗体とブレインキュベートされた精製メソテリン-his8(配列番号49として開示された「his8」と共にインキュベートし、精製メソテリン-his8:抗体複合体のMUC16発現細胞に対する結合がAlexa-647がコンジュゲートした抗His6抗体(配列番号50として開示された「His6」)を使用してFACSにより決定される。上記アッセイの何れかにおいて、FACSシグナルが抗メソテリン抗体の欠損よりも存在下において50%以上低い場合、その抗体はMUC16に対するメソテリンの結合を遮断すると考えられる。上記アッセイの何れかにおいて、FACSシグナルが抗メソテリン抗体の存在下において50%以上減少しない場合、その抗体はMUC16に対するメソテリンの結合を遮断しないと考えられる。上記アッセイの後者において、FACSシグナルが抗メソテリン抗体

40

50

の欠損よりも存在下において増加する場合、その抗体はMUC16に対するメソテリンの結合を増強すると考えられる。

#### 【0082】

抗メソテリン抗体が、「5 nM以下の親和性、又は代わりに1 nM以下の親和性、又は代わりに0.5 nM以下の親和性、又は代わりに0.1 nM以下の親和性」で結合するかどうか、親和性が本明細書中のセクションII.A.1に記載されるようにBiacoreアッセイに従って決定される。具体的には、~10反応単位(RU)で固定した抗原CM5チップを用いて25°でのBIACORE(登録商標)-2000又はBIACORE(登録商標)-3000(BIACORE, Inc., Piscataway, NJ)を用いる表面プラズモン共鳴アッセイを使用してKdを測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, Biacore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。使用されるべき抗原は、実施例Bに記載されるように大腸菌から産生され単離されたメソテリンである。抗原を10 mM酢酸ナトリウム(pH 4.8)で5 µg/ml(~0.2 µM)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(RU)がおよそ10を達成するように5 µl/分の流速で注入する。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために1 Mのエタノールアミンを注入する。動力学的な測定のために、Fabの2倍の段階希釈(0.78 nMから500 nM)を、25°で、およそ25 µl/分の流速で、0.05%ポリソルベート20(TWEEN 20™)界面活性剤(PBST)を含むPBSに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model)(BIACORE(登録商標)Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(kon)と解離速度(koff)を算出した。平衡解離定数(Kd)をkoff/kon比として算出した。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)を参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-AMINCO™分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、PBS(pH 7.2)中、25°の、20 nMの抗抗原抗体(Fab型)の蛍光放出強度(励起=295 nm; 放出=340 nm、帯域通過=16 nm)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

#### 【0083】

抗体7D9及び他の実施態様

一態様において、本発明は、(a)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1;(b)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2;(c)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3;(d)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1;(e)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2;及び(f)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一、二、三、四、五、又は六のHVRを含む抗メソテリン抗体を提供する。

#### 【0084】

一態様において、本発明は、(a)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1;(b)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2;(c)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号19のアミノ酸配列を含

むHVR-L3、及び配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

【0085】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2；(c)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVLHVR配列、少なくとも二つのVLHVR配列、又は三つ全てのVLHVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

10

【0086】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVHHVR配列、少なくとも二つのVHHVR配列、又は三つ全てのVHHVR配列を含むVHドメイン、及び(b)(i)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVLHVR配列、少なくとも二つのVLHVR配列、又は三つ全てのVLHVR配列を含むVLドメインを含む。

20

【0087】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

【0088】

上記実施態様の何れかにおいて、抗メソテリン抗体はヒト化されている。一実施態様において、抗メソテリン抗体は、上記実施態様の何れかにおけるHVRを含み、更に、ヒトアクセプターフレームワーク、例えばヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークを含む。ある実施態様において、ヒトアクセプターフレームワークは、ヒトVLカッパIコンセンサス(VL<sub>KI</sub>)フレームワーク及び/又はVHフレームワークVH<sub>ATA</sub>であり、それは3箇所：R71A、N73T、及びL78AでヒトVHサブグループIIIコンセンサス(VH<sub>III</sub>)と異なる(Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992))。別の実施態様において、抗メソテリン抗体は、上記実施態様の何れかにあるHVRを含み、更に、配列番号25のフレームワークFR2配列と配列番号27のFR3配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。そのような実施態様において、軽鎖可変ドメインフレームワークは、配列番号25のFR2配列と配列番号27のFR3配列を有する修飾されたヒトVLカッパIコンセンサス(VL<sub>KI</sub>)フレームワークである。

30

40

【0089】

別の態様において、抗メソテリン抗体は、配列番号8のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVH配列は、参照配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗メソテリン抗体はメソテリンへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号8において、合計1から

50

10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の(すなわちFR内の)領域で生じる。任意で、抗メソテリン抗体は、配列番号8のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様において、VHは、(a)配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される一、二、又は三のHVRを含む。

【0090】

その他の態様において、配列番号4のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む、抗メソテリン抗体が提供される。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVL配列は、参照配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗メソテリン抗体はメソテリンへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号4において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の(すなわちFR内の)領域で生じる。任意で、抗メソテリン抗体は、配列番号4のVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様において、VLは、(a)配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号18のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号19のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される一、二、又は三のHVRを含む。

10

20

【0091】

その他の態様において、抗メソテリン抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかにあるVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかにあるVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号8及び配列番号4のそれぞれVHとVLを、それらの配列の翻訳後修飾を含み含む。

【0092】

更なる態様において、本発明は、本明細書に与えられた抗メソテリン抗体と同一エピトープに結合する抗体を提供する。例えば、ある実施態様において、配列番号8のVH配列及び配列番号4のVL配列を含む抗メソテリン抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号43のアミノ酸配列152~175から、アミノ酸配列152~175以内、又はアミノ酸配列152~175と重複するエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、E153とD174を含む配列番号43のエピトープへ結合する抗体が提供される。そのような実施態様において、抗体はアミノ酸残基E153とD174に結合する。

30

【0093】

本発明の更なる態様では、上記実施態様のいずれかに記載の抗メソテリン抗体は、キメラ、ヒト化又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施態様において、抗メソテリン抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、又はF(ab')<sub>2</sub>断片である。その他の態様において、抗体は、全長抗体、例えば、IgG1抗体、又は本明細書において定義された他の抗体クラス又はアイソタイプである。

40

【0094】

更なる態様にて、以下のセクション1-7で説明されるように、上記実施態様のいずれかに記載の抗メソテリン抗体は、単独または組み合わせで、任意の特徴を組み込むことができる：

【0095】

抗体22A10及び他の実施態様

一態様において、本発明は、(a)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号38又は39のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号35の

50

アミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一、二、三、四、五、又は六のHVRを含む抗メソテリン抗体を提供する。

【0096】

一態様において、本発明は、(a)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号38又は39のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される、少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、配列番号38又は39のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。その他の実施態様において、抗体は、配列番号38又は39のアミノ酸配列を含むHVR-H3、及び配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、配列番号38又は39のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L3、及び配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、(a)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(c)配列番号38又は39のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む。

10

【0097】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L2；(c)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される、少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、(a)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

20

【0098】

その他の態様において、本発明の抗体は、(a)(i)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii)配列番号38又は39のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも一つのVH HVR配列、少なくとも二つのVH HVR配列、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン、及び(b)(i)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c)配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも一つのVL HVR配列、少なくとも二つのVL HVR配列、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

30

【0099】

その他の態様において、本発明は、(a)配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号38又は39のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号35から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体を提供する。

40

【0100】

上記実施態様の何れかにおいて、抗メソテリン抗体はヒト化されている。一実施態様において、抗メソテリン抗体は、上記実施態様の何れかにおけるHVRを含み、更に、アクセプターヒトフレームワーク、例えばヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークを含む。ある実施態様において、ヒトアクセプターフレームワークは、VL<sub>K1</sub>及び/又はVH<sub>I1I1</sub>アクセプターフレームワークである。

【0101】

別の態様において、抗メソテリン抗体は、配列番号16のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%

50

、97%、98%、又は99%の同一性を有するVH配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗メソテリン抗体はメソテリンへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号16において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗メソテリン抗体は、配列番号16のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様において、VHは、（a）配列番号36のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号37のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号38又は39のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される一、二、又は三のHVRを含む。

#### 【0102】

その他の態様において、配列番号12のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（VL）を含む、抗メソテリン抗体が提供される。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVL配列は、参照配列に対して置換（例えば保存的置換）、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗メソテリン抗体はメソテリンへ結合する能力を保持する。ある実施態様において、配列番号12において、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の（すなわちFR内の）領域で生じる。任意で、抗メソテリン抗体は、配列番号12のVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施態様において、VLは、（a）配列番号33のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（b）配列番号34のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（c）配列番号35のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される一、二、又は三のHVRを含む。

#### 【0103】

その他の態様において、抗メソテリン抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかにあるVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかにあるVLを含む。一実施態様において、抗体は、配列番号16及び配列番号12のそれぞれVHとVLを、それらの配列の翻訳後修飾を含み含む。

#### 【0104】

更なる態様において、本発明は、本明細書に与えられた抗メソテリン抗体と同一エピトープに結合する抗体を提供する。例えば、ある実施態様において、配列番号16のVH配列及び配列番号12のVL配列を含む抗メソテリン抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、配列番号43のアミノ酸配列211~327から、アミノ酸配列211~327以内、又はアミノ酸配列211~327と重複するエピトープに結合する抗体が提供される。ある実施態様において、E211を含む配列番号43のエピトープへ結合する抗体が提供される。そのような実施態様において、抗体はアミノ酸残基E211に結合する。

#### 【0105】

本発明の更なる態様では、上記実施態様のいずれかに記載の抗メソテリン抗体は、キメラ、ヒト化又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施態様において、抗メソテリン抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、又はF(ab')<sub>2</sub>断片である。その他の態様において、抗体は、全長抗体、例えば、IgG1抗体、又は本明細書において定義された他の抗体クラス又はアイソタイプである。

#### 【0106】

更なる態様にて、以下のセクション1-7で説明されるように、上記実施態様のいずれかに記載の抗メソテリン抗体は、単独または組み合わせで、任意の特徴を組み込むことができる：

#### 【0107】

抗体19C3及び他の実施態様

一態様において、本発明は、ATCC受託番号PTA-11464を有するバイブリド

10

20

30

40

50

ーマ19C3により産生される抗体の少なくとも一、二、三、四、五又は六のHVRを含む抗メソテリン抗体を提供する。このセクションの目的のために、HVRは、本明細書に定義されるように、CDRに対応するアミノ酸領域により説明される。

【0108】

一態様において、本発明は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体の少なくとも一、少なくとも二、又は三つ全てのVH HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-H3を含む。別の実施態様において、抗体は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-H3及びHVR-L3を含む。更なる実施態様において、抗体は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-H3、HVR-L3及びHVR-H2を含む。更なる実施態様において、抗体は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3を含む。

10

【0109】

別の態様において、本発明は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体の少なくとも一、少なくとも二、又は三つ全てのVL HVR配列を含む抗体を提供する。一実施態様において、抗体は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3を含む。

20

【0110】

別の態様において、本発明の抗体は、(a) ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体の少なくとも一、少なくとも二、又は三つ全てのVH HVR配列を含むVHドメイン；及び(b) ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体の少なくとも一、少なくとも二、又は三つ全てのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。

【0111】

別の態様において、本発明は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む抗体を提供する。

30

【0112】

上記実施態様の何れかにおいて、抗メソテリン抗体はヒト化されている。そのような実施態様において、抗体は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のヒト化形態である。更なる実施態様において、抗メソテリン抗体は、上記実施態様の何れかにおけるHVRを含み、更に、アクセプターヒトフレームワーク、例えばヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークを含む。

【0113】

別の態様において、抗メソテリン抗体は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVHに対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。ある実施態様において、VH配列は、参照配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗メソテリン抗体はメソテリンへ結合する能力を保持する。所定の実施態様において、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVHにおいて、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の(すなわちFR内の)領域で生じる。任意で、抗メソテリン抗体は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVH配列を、その配列の翻

40

50

訳後修飾を含んで含む。特定の実施態様において、VHは、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3から選択される少なくとも一、二又は三つのHVRを含む。

【0114】

別の態様において、抗メソテリン抗体が与えられ、該抗体は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVLに対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)配列を含む。ある実施態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVL配列は、参照配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗メソテリン抗体はメソテリンへ結合する能力を保持する。所定の実施態様において、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVLにおいて、合計1から10のアミノ酸が、置換、挿入及び/又は欠失している。ある実施態様において、置換、挿入、又は欠失は、HVR外の(すなわちFR内の)領域で生じる。任意で、抗メソテリン抗体は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVL配列を、その配列の翻訳後修飾を含んで含む。特定の実施態様において、VLは、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のHVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3から選択される少なくとも一、二又は三つのHVRを含む。

10

20

【0115】

その他の態様において、抗メソテリン抗体が提供され、その抗体は、上記に与えられた実施態様の何れかにあるVH、及び上記に与えられた実施態様の何れかにあるVLを含む。一実施態様において、抗体は、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体のVH及びVL配列を、その配列の翻訳後修飾を含んで含む。

【0116】

更なる態様において、本発明は、本明細書に与えられた抗メソテリン抗体と同一エピトープに結合する抗体を提供する。例えば、ある実施態様において、ATCC受託番号PTA-11464を有するパイブリドーマ19C3により産生される抗体と同じエピトープに結合する抗体が与えられる。

30

【0117】

本発明の更なる態様では、上記実施態様のいずれかに記載の抗メソテリン抗体は、キメラ、ヒト化又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一実施態様において、抗メソテリン抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、又はF(ab')<sub>2</sub>断片である。その他の態様において、抗体は、全長抗体、例えば、IgG2b抗体、又は本明細書において定義された他の抗体クラス又はアイソタイプである。

【0118】

更なる態様にて、以下のセクション1-7で説明されるように、上記実施態様のいずれかに記載の抗メソテリン抗体は、単独または組み合わせで、任意の特徴を組み込むことができる：

40

【0119】

1. 抗体親和性

所定の実施態様において、本明細書において与えられる抗体は、解離定数(Kd)が、1µM、100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM、又は0.001nM、及び任意で10<sup>-13</sup>M(例えば、10<sup>-8</sup>M未満、例えば、10<sup>-8</sup>Mから10<sup>-13</sup>M、例えば、10<sup>-9</sup>Mから10<sup>-13</sup>M)を有する。

【0120】

一実施態様において、以下のアッセイにより説明されるように、Kdは、目的の抗体の

50

F a b型とその抗原を用いて実施される放射標識抗原結合アッセイ ( R I A ) により測定される。非標識抗原の滴定系列の存在下で、最小濃度の (  $^{125}I$  ) - 標識抗原にて F a b を均衡化して、抗 F a b 抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対する F a b の溶液結合親和性を測定する ( 例として Chen, et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999) を参照 ) 。アッセイの条件を決めるために、M I C R O T I T E R ( 登録商標 ) マルチウェルプレート ( T h e r m o S c i e n t i f i c ) を  $5 \mu g / m l$  の捕獲抗 F a b 抗体 ( C a p p e l L a b s ) を含む  $50 m M$  炭酸ナトリウム ( p H 9 . 6 ) にて一晚コートして、その後  $2 \% ( w / v )$  のウシ血清アルブミンを含む P B S にて室温 ( およそ  $23^{\circ}C$  ) で  $2 \sim 5$  時間、ブロックする。非吸着プレート ( N u n c # 269620 ) に、 $100 p M$  又は  $26 p M$  の [  $^{125}I$  ] 抗原を段階希釈した目的の F a b と混合する ( 例えば、Presta et al, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599 の抗 V E G F 抗体、F a b - 12 の評価と一致する ) 。ついで目的の F a b を一晚インキュベートする ; しかし、インキュベーションは平衡状態に達したことを確認するまでに長時間 ( 例えばおよそ  $65$  時間 ) かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で ( 例えば  $1$  時間 ) インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを  $0.1 \%$  のポリソルベート  $20$  ( T w e e n 20 ( 登録商標 ) ) を含む P B S にて  $8$  回洗浄する。プレートが乾燥したら、 $150 \mu l /$  ウェルの閃光物質 ( M I C R O S C I N T - 20  $^{T M}$  ; P a c k a r d ) を加え、プレートを T O P C O U N T  $^{T M}$  計測器 ( P a c k a r d ) にて  $10$  分間計測する。最大結合の  $20 \%$  か又はそれ以下濃度の F a b を選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。

#### 【 0 1 2 1 】

他の実施態様に従って、 $\sim 10$  反応単位 ( R U ) の固定した抗原 C M 5 チップを用いて  $25^{\circ}C$  の B I A C O R E ( 登録商標 ) - 2000 又は B I A C O R E ( 登録商標 ) - 3000 ( B I A c o r e , I n c . , P i s c a t a w a y , N J ) を用いる表面プラズモン共鳴アッセイを使用して  $K_d$  を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ ( C M 5 , B I A c o r e I n c . ) を、提供者の指示書に従って N - エチル - N ' - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - カルボジイミド塩酸塩 ( E D C ) 及び N - ヒドロキシスクシニミド ( N H S ) で活性化した。抗原を  $10 m M$  酢酸ナトリウム ( p H 4 . 8 ) で  $5 \mu g / m l ( \sim 0.2 \mu M )$  に希釈し、結合したタンパク質の反応単位 ( R U ) がおよそ  $10$  になるように  $5 \mu l /$  分の流速で注入する。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために  $1 M$  のエタノールアミンを注入する。動力学的な測定のために、F a b の  $2$  倍の段階希釈 (  $0.78 n M$  から  $500 n M$  ) を、 $25^{\circ}C$  で、およそ  $25 \mu l /$  分の流速で、 $0.05 \%$  ポリソルベート  $20$  ( T W E E N 20  $^{T M}$  ) 界面活性剤 ( P B S T ) を含む P B S に注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル ( s i m p l e o n e - t o - o n e L a n g m u i r b i n d i n g m o d e l ) ( B I A C O R E ( 登録商標 ) E v a l u a t i o n ソフトウェアバージョン  $3.2$  ) を用いて、会合速度 (  $k_{on}$  ) と解離速度 (  $k_{off}$  ) を算出した。平衡解離定数 (  $K_d$  ) を  $k_{off} / k_{on}$  比として算出した。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999) を参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が  $10^6 M^{-1} s^{-1}$  を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計 ( s t o p - f l o w e q u i p p e d s p e c t r o p h o m e t e r ) ( A v i v I n s t r u m e n t s ) 又は攪拌キュベットを備えた  $8000$  シリーズ S L M - A M I N C O  $^{T M}$  分光光度計 ( T h e r m o S p e c t r o n i c ) で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、P B S ( p H 7 . 2 ) 中、 $25^{\circ}C$  の、 $20 n M$  の抗抗原抗体 ( F a b 型 ) の蛍光放出強度 ( 励起 =  $295 nm$  ; 放出 =  $340 nm$  、帯域通過 =  $16 nm$  ) における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

#### 【 0 1 2 2 】

##### 2 . 抗体断片

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片は

、限定されないが、F a b , F a b ' , F a b ' - S H , F ( a b ' ) <sub>2</sub> , F v , 及び s c F v 断片、及び下記の他の断片を含む。所定の抗体断片の総説については、Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)を参照。s c F v 断片の総説については、例えば、Pluckhuen, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)を参照；また、国際公開第93/16185号；及び米国特許第5,571,894号及び第5,587,458号も参照。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、かつインビボ半減期を増加させたF a b 及びF ( a b ' ) <sub>2</sub> 断片の議論については、米国特許第5869046号を参照のこと。

#### 【0123】

ダイアポディは2価または二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404,097号；国際公開第1993/01161号；Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)；及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)を参照。トリアポディ及びテトラポディもまた Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。

#### 【0124】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部、又は軽鎖可変ドメインの全て又は一部を含む抗体断片である。所定の実施態様において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば、米国特許第6,248,516 B1号を参照)。

#### 【0125】

抗体断片は様々な技術で作成することができ、限定されないが、本明細書に記載するように、インタクトな抗体の分解、並びに組換え宿主細胞(例えば、大腸菌又はファージ)による生産を含む。

#### 【0126】

### 3. キメラ及びヒト化抗体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。所定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサル等の非ヒト霊長類由来の可変領域)及びヒト定常領域を含む。更なる例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のものから変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

#### 【0127】

所定の実施態様において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減するために、親の非ヒト抗体の特異性と親和性を保持したまま、ヒト化されている。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR(またはその一部)が、非ヒト抗体から由来し、FR(またはその一部)がヒト抗体配列に由来する、一以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意で、ヒト定常領域の少なくとも一部をも含む。所定の実施態様において、ヒト化抗体の幾つかのFR残基は、抗体特異性又は親和性を回復もしくは改善するために、非ヒト抗体(例えば、HVR残基が由来する抗体)由来の対応する残基で置換されている。

#### 【0128】

ヒト化抗体およびそれらの製造方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)に総説され、更に、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)；Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)；米国特許第5,821,337,7,527,791,6,982,321,及び7,087,409；Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)(SDR(a-CDR)グラフィングを記述)；Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)(「リサーフェシング」を記述)；Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)(「FRシャッフリング」を記述)；及

10

20

30

40

50

びOsborn et al., *Methods* 36:61-68 (2005)及びKlimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (FRのシャッフリングへの「誘導選択」アプローチを記述)に記載されている。

#### 【0129】

ヒト化に用いられ得るヒトフレームワーク領域は、限定されないが、「ベストフィット」法を用いて選択されるフレームワーク領域(例えば、Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); 軽鎖または重鎖の可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列由来のフレームワーク領域(例えば、Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 及びPresta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)を参照); ヒト成熟(体細胞変異)フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系フレームワーク領域(例えば、Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)を参照); 及びFRライブラリスクリーニング由来のフレームワーク領域(例えば、Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997)及びRosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)を参照)を含む。

10

#### 【0130】

#### 4. ヒト抗体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を用いて生産することができる。ヒト抗体は一般的にvan Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 及びLonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)に記載されている。

20

#### 【0131】

ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答して、インタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を持つ又はインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に、免疫原を投与することにより調製することができる。このような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置換するか、又は染色体外に存在するかもしくは動物の染色体にランダムに組み込まれている、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含む。このようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般的に不活性化される。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の総説については、Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)を参照。また、例えば、XENOMOUSE<sup>TM</sup>技術を記載している、米国特許第6,075,181号及び6,150,584号; Humab(登録商標)技術を記載している米国特許第5,770,429号; K-MOUSE(登録商標)技術を記載している米国特許第7,041,870号及び、Velocimouse(登録商標)技術を記載している米国特許出願公開第2007/0061900号)を参照。このような動物で生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることにより、更に改変される可能性がある。

30

#### 【0132】

ヒト抗体は、ハイブリドーマベース法によって作成することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ細胞株が記載されている。(例えば、Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及びBoerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)を参照)ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体はまた、Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)に記載されている。更なる方法は、例えば、米国特許第7,189,826号(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載している)及びNi, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (ヒト-ヒトハイブリドーマを記載している)に記載されたものを含む。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)もまた、Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 及びVollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)に記載される。

40

50

## 【0133】

ヒト抗体はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択されたFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成され得る。このような可変ドメイン配列は、次に所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術が、以下に説明される。

## 【0134】

## 5. ライブラリー由来の抗体

本発明の抗体は、所望の活性または活性（複数）を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。例えば、様々な方法が、ファージディスプレイライブラリーを生成し、所望の結合特性を有する抗体についてのライブラリーをスクリーニングするために、当該技術分野で知られている。そのような方法は、例えば、Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)に総説され、更に、例えば、McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 及びLee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)に記載されている。

## 【0135】

所定のファージディスプレイ法において、VH及びVL遺伝子のレポーターがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により個別にクローニングされ、ファージライブラリーにランダムに再結合され、その後、Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは、通常、抗体断片を、単鎖Fv（scFv）断片、またはFab断片のいずれかとして提示する。免疫された起源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要性なしで免疫原に高親和性抗体を提供する。代わりに、Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993)に記載されるように、ナイーブなレポーターが、任意の免疫感作無しで、広範囲の非自己抗原及び自己抗原に対して、抗体の単一起源を提供するために、（例えば、ヒトから）クローニングすることができる。最後に、ナイーブなライブラリーはまた、Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)に記載されるように、非常に可変なCDR3領域をコードし、インビトロで再構成を達成するために、幹細胞由来の未転位V遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含むPCRプライマーを使用することにより合成することができる。ヒト抗体ファージライブラリーを記述する特許公報は、例えば、米国特許第5,750,373号、及び米国特許出願公開第2005/0079574号、2005/0119455号、2005/0266000号、2007/0117126号、2007/0160598号、2007/0237764号、2007/0292936号及び2009/0002360を含む。

## 【0136】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体または抗体断片は、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体の断片とみなされる。

## 【0137】

## 6. 多重特異性抗体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる部位に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある実施態様において、結合特異性の一つはメソテリンに対してであり、他は、任意の他の抗原に対してである。ある実施態様において、二重特異性抗体は、メソテリンの二つの異なるエピトープに結合することができる。二重特異性抗体はまたメソテリンを発現する細胞に対して細胞傷害性薬物を局在化させるために

用いることができる。二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片として調製することができる。

#### 【0138】

多重特異性抗体を作製するための技術は、限定されないが、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の組換え共発現 (Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983))、国際公開第93/08829号、及びTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照)及び“knob-in-hole”エンジニアリング(例えば、米国特許第5,731,168号を参照)を含む。多重特異抗体はまた、抗体のFc-ヘテロ2量体分子を作成するための静電ステアリング効果を操作すること(国際公開第2009/089004A1号)、2つ以上の抗体又は断片を架橋すること(例えば米国特許第4,676,980号、及びBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)を参照)、二重特異性抗体を生成するためにロイシンジッパーを使用すること(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)を参照)、二重特異性抗体フラグメントを作製するため、「ダイアボディ」技術を使用すること(例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照)、単鎖Fv(sFv)ダイマーを使用すること(例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照)、及び、例えばTutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)に記載されているように、三重特異性抗体を調製することによって作成することができる。

10

#### 【0139】

「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能性抗原結合部位を持つ改変抗体もまた本明細書に含まれる(例えば、米国特許出願公開第2006/0025576A1号を参照)。

20

#### 【0140】

本明細書中の抗体又は断片はまた、メソテリン並びにその他の異なる抗原(例えば米国特許出願公開第2008/0069820号参照)に結合する抗原結合部位を含む、「2重作用(Dual Acting)FAb」又は「DAF」を含む。

#### 【0141】

##### 7. 抗体変異体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望まれ得る。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することにより、またはペプチド合成によって調製することができる。このような改変は、例えば、抗体のアミノ酸配列内における、残基の欠失、及び/又は挿入及び/又は置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有していることを条件として、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが、最終コンストラクトに到達させるために作成され得る。

30

#### 【0142】

##### a) 置換、挿入、および欠失変異体

ある実施態様において、一つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換突然変異の対象となる部位は、HVRとFRを含む。保存的置換は、表1の「望ましい置換」の見出しの下に示されている。より実質的な変更が、表1の「典型的な置換」の見出しの下に与えられ、アミノ酸側鎖のクラスを参照して以下に更に説明される。アミノ酸置換は、目的の抗体に導入することができ、その産物は、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の減少、又はADCC又はCDCの改善についてスクリーニングされた。

40

表 1

元の残基	典型的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

## 【 0 1 4 3 】

アミノ酸は共通の側鎖特性に基づいてグループに分けることができる：

- ( 1 ) 疎水性：ノルロイシン，Met，Ala，Val，Leu，Ile；
- ( 2 ) 中性の親水性：Cys，Ser，Thr，Asn，Gln；
- ( 3 ) 酸性：Asp，Glu；
- ( 4 ) 塩基性：His，Lys，Arg；
- ( 5 ) 鎖配向に影響する残基：Gly，Pro；
- ( 6 ) 芳香族：Trp，Tyr，Phe．

40

## 【 0 1 4 4 】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。

## 【 0 1 4 5 】

置換変異体の一つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体など）の一以上の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的には、さらなる研究のために選択され得られた変異体は、親抗体と比較して、特定の生物学的特性の改変（例えば、改善）（例えば、親和性の増加、免疫原性を減少）を有し、及び/又は親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持しているであろう。典型的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば、本明

50

細書に記載されるファージディスプレイベースの親和性成熟技術を用いて、簡便に生成され得る。簡潔に言えば、一つ以上のHVR残基が変異し、変異体抗体は、ファージ上に表示され、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

#### 【0146】

変更（例えば、置換）は、例えば抗体の親和性を向上させるために、HVRで行うことができる。このような変更は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程中に高頻度で変異を受けるコドンにコードされた残基で（例えばChowdhury, *Methods Mol Biol.* 207:179-196 (2008)を参照）、及び/又はSDR（a-CDR）で行うことができ、得られた変異体VH又はVLが結合親和性について試験される。二次ライブラリから構築し選択し直すことによる親和性成熟が、例えばHoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)に記載されている。親和性成熟の幾つかの実施態様において、多様性が、種々の方法（例えば、変異性PCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド指定突然変異誘発）のいずれかにより、成熟のために選択された可変遺伝子中に導入される。次いで、二次ライブラリが作成される。次いで、ライブラリは、所望の親和性を持つ抗体変異体を同定するためにスクリーニングされる。多様性を導入するもう一つの方法は、いくつかのHVR残基（例えば、一度に4から6残基）がランダム化されたHVR指向のアプローチを伴う。抗原結合に關与するHVR残基は、例えばアラニンスキャニング突然変異誘発、またはモデリングを用いて、特異的に同定され得る。CDR-H3及びCDR-L3がしばしば標的にされる。

10

20

#### 【0147】

所定の実施態様において、置換、挿入、または欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限りにおいて、一以上のHVR内で発生する可能性がある。例えば、実質的に結合親和性を低下させない保存的改変（例えば本明細書で与えられる保存的置換）をHVR内で行うことができる。このような改変は、HVR「ホットスポット」又はSDRの外側であってもよい。上記に与えられた変異体VH又はVL配列の所定の実施態様において、各HVRは不変であるか、又はわずか1個、2個または3個のアミノ酸置換が含まれているかの何れかである。

#### 【0148】

突然変異誘発のために標的とすることができる抗体の残基又は領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085により説明されるように、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、標的残基の残基またはグループ（例えば、arg、asp、his、lys及びgluなどの荷電残基）が同定され、抗原と抗体との相互作用が影響を受けるかどうかを判断するために、中性または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）に置換される。更なる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の位置に導入され得る。代わりに、又は更に、抗原抗体複合体の結晶構造が、抗体と抗原との接触点を同定するために用いられる。そのような接触残基及び隣接残基が、置換の候補として標的にされるか又は排除され得る。変異体はそれらが所望の特性を含むかどうかを決定するためにスクリーニングされ得る。

30

40

#### 【0149】

アミノ酸配列挿入は、一残基から百以上の残基を含有するポリペプチド長にわたるアミノ及び/又はカルボキシル末端融合、並びに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニン残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体は、酵素に対する抗体のN末端またはC末端への融合（例えばADEPTの場合）、または抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドへの融合を含む。

#### 【0150】

##### b) グリコシル化変異体

所定の実施態様において、本明細書で提供される抗体は抗体がグリコシル化される程度を増加または減少するように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は

50

、一以上のグリコシル化部位が作成または削除されるようにアミノ酸配列を変えることによって簡便に達成することができる。

【0151】

抗体がFc領域を含む場合には、それに付着する糖を変えることができる。哺乳動物細胞によって生成された天然型抗体は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN-結合により一般的に付着した分岐鎖、二分岐オリゴ糖を含んでいる。例えばWright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、二分岐糖鎖構造の「幹」のGlcNAcに結合した、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、シアル酸、並びにフコースを含み得る。幾つかの実施態様において、本発明の抗体におけるオリゴ糖の改変は一定の改善された特性を有する抗体変異型を作成するために行われ得る。

10

【0152】

一実施態様において、抗体変異体は、Fc領域に(直接または間接的に)付着されたフコースを欠いた糖鎖構造を有して提供される。例えば、このような抗体のフコース量は、1%から80%、1%から65%、5%から65%、または20%から40%であり得る。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析法によって測定されるAsn297に付着しているすべての糖構造の合計(例えば、コンプレックス、ハイブリッド及び高マンノース構造)に対して、Asn297の糖鎖中のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域(Fc領域残基のEU番号付け)でおよそ297の位置に位置するアスパラギン残基を指し、しかし、Asn297もまた位置297の上流または下流のおよそ±3アミノ酸に、すなわち抗体の軽微な配列変異に起因して、位置294と300の間に配置され得る。このようなフコシル化変異体はADC機能改善させた可能性がある。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号(Presta, L.);米国特許出願公開第2004/0093621号(協和発酵工業株式会社)を参照。「フコース非修飾」又は「フコース欠損」抗体変異体に関連する出版物の例としては、米国特許出願公開第2003/0157108号、国際公開第2000/61739号、国際公開第2001/29246号、米国特許出願公開第2003/0115614号、米国特許出願公開第2002/0164328号、米国特許出願公開第2004/0093621号、米国特許出願公開第2004/0132140号、米国特許出願公開第2004/0110704号、米国特許出願公開第2004/0110282号、米国特許出願公開第2004/0109865号、国際公開第2003/085119号、国際公開第2003/084570号、国際公開第2005/035586号、国際公開第2005/035778号、国際公開第2005/053742号、国際公開第2002/031140号、Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)が含まれる。非フコシル化抗体を産生する能力を有する細胞株の例としては、タンパク質フコシル化を欠損しているLecl3CHO細胞(Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986);米国特許出願公開第2003/0157108 A1号, Presta, L.;及び国際公開第2004/056312 A1号, Adamsら、特に実施例11にて)、及びノックアウト細胞株、アルファ-1、6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞(例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006);及び国際公開第2003/085107号を参照)を含む。

20

30

40

【0153】

抗体変異体が、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分されている二分オリゴ糖とともに更に与えられる。このような抗体変異体はフコシル化を減少させ、及び/又はADC機能を改善している可能性がある。そのような抗体変異体の例は、例えば、国際公開第2003/011878号(Jean-Mairetら);米国特許第6,602,684号(Umanaら);及び米国特許出願公開第

50

2005/0123546号(Umanaら)に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を持つ抗体変異体も提供される。このような抗体変異体はCDC機能を改善させた可能性がある。このような抗体変異体は、例えば、国際公開第1997/30087号(Patelら)；国際公開第1998/58964号(Raju, S.)；及び国際公開第1999/22764号(Raju, S.)に記載されている。

#### 【0154】

##### c) Fc領域変異体

ある実施態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変を、本明細書で提供される抗体のFc領域に導入することができ、それによってFc領域変異体を生成する。Fc領域の変異体は、1つまたは複数のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾(例えば置換)を含むヒトFc領域の配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域)を含んでもよい。

10

#### 【0155】

ある実施態様において、本発明は、インビボにおける抗体の半減期が重要であるが、ある種のエフェクター機能(例えば補体およびADCCなど)が不要または有害である用途のための望ましい候補とならしめる、全てではないが一部のエフェクター機能を有する抗体変異体を意図している。インビトロ及び/又はインビボでの細胞毒性アッセイを、CDC活性及び/又はADCC活性の減少/枯渇を確認するために行うことができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイは、抗体がFcR結合を欠くが(それゆえ、おそらくADCC活性を欠く)、FcRn結合能力を保持していることを確認するために行うことができる。ADCC、NK細胞を媒介する初代細胞は、FcRIIIのみを発現するが、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)の464ページの表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号(例えば、Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)を参照)及びHellstrom, I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)を参照)に説明される。あるいは、非放射性アッセイ法を用いることができる(例えば、フローサイトメトリー用のACTI<sup>TM</sup>非放射性細胞傷害性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; 及びCytotox 96(登録商標)非放射性細胞毒性アッセイ(Promega, Madison, WI)を参照。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、又は更に、目的の分子のADCC活性は、Clynes et al., *PNAS USA* 95:652-656 (1998)に開示されるように、インビボで、例えば動物モデルにおいて評価することができる。C1q結合アッセイはまた、抗体が体C1qを結合することができないこと、したがって、CDC活性を欠いていることを確認するために行うことができる。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号のC1qおよびC3c結合ELISAを参照。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行うことができる(例えば、Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); 及びCragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)を参照)。FcRn結合、及びインビボでのクリアランス/半減期の測定ではまた、当該分野で公知の方法を用いて行うことができる(例えば、Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)を参照)。

20

30

40

#### 【0156】

エフェクター機能が減少した抗体は、Fc領域の残基238、265、269、270、297、327、329の一つ以上の置換を有するものが含まれる(米国特許第6737056号)。そのようなFc変異体は、残基265及び297のアラニンへの置換を有する、いわゆる「DANA」Fc変異体を含む、アミノ酸位置265、269、270、

50

297及び327の2以上での置換を有するFc変異体を含む(米国特許第7,332,581号)。

【0157】

FcRへの改善又は減少させた結合を持つ特定の抗体変異体が記載されている。(例えば、米国特許第6,737,056号;国際公開第2004/056312号、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照)。

【0158】

所定の実施態様において、抗体変異体はADCCを改善する1つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の位置298、333、及び/又は334における置換(EUの残基番号付け)を含む。

【0159】

幾つかの実施態様において、改変された(すなわち改善されたか減少した)C1q結合及び/又は補体依存性細胞傷害(CDC)を生じる、Fc領域における改変がなされ、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開第99/51642号、及びIdusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)に説明される。

【0160】

増加した半減期を持ち、胎仔への母性IgGの移送を担う、新生児Fc受容体(FcRn)への結合が改善された抗体(Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))が、米国特許出願公開第2005/0014934 A1号(Hinton et al.)に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する一つまたは複数の置換を有するFc領域を含む。このようなFc変異体は、Fc領域の残基の1以上の置換を有するものが含まれる: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424又は434、例えば、Fc領域の残基434の置換(米国特許第7,371,826号)。

【0161】

Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988);米国特許第5,648,260号;米国特許第5,624,821号;及び、Fc領域の変異体の他の例に関しては国際公開第94/29351号も参照のこと。

【0162】

d) システイン改変抗体変異体

所定の実施態様において、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン改変抗体、例えば、「thioMabs」を作成することが望まれ得る。所定の実施態様において、置換された残基は、抗体のアクセス可能な部位で起きる。それらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、それによって抗体のアクセス可能な部位に配置され、本明細書中でさらに記載されるように、イムノコンジュゲートを作成するために、例えば薬物部分またはリンカー-薬剤部分などの他の部分に抗体をコンジュゲートするために使用することができる。ある実施態様において、一以上の以下の残基がシステインで置換され得る: 軽鎖のV205(Kabatの番号付け);重鎖のA118(EU番号付け);及び重鎖Fc領域のS400(EU番号付け)。システイン改変抗体は、例えば、米国特許第7521541号に記載のように生成され得る。

【0163】

e) 抗体誘導体

ある実施態様において、本明細書で提供される抗体は、当技術分野で知られ、容易に入手されている追加の非タンパク質部分を含むように更に改変することができる。抗体の誘導体化に適した部分としては、限定されないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例は、限定されないが、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキソラン、エチレン/無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸(単独

10

20

30

40

50

重合体又はランダム共重合体の何れか)及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコール単独重合体、プロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール(例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール及びこれらの混合物を包含する。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドはその水中での安定性のために製造上の利点を有し得る。ポリマーは何れかの分子量のものであってよく、そして分枝鎖又は未分枝鎖であってよい。抗体に結合するポリマーの数は変動してよく、そして、一以上の重合体が結合する場合は、それらは同じか又は異なる分子であることができる。一般的に、誘導体化に使用するポリマーの数及び/又は種類は、限定されないが、向上させるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が特定の条件下で治療に使用されるのか等を考慮しながら決定することができる。

10

#### 【0164】

その他の実施態様において、放射線への曝露によって選択的に加熱されてもよい抗体と非タンパク質部分とのコンジュゲートが、提供される。一実施態様において、非タンパク質部分はカーボンナノチューブである(Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)。放射線は、任意の波長であって良いが、限定されないものの、通常の細胞に害を与えないが、抗体-非タンパク質部分の近位細胞が死滅される温度に非タンパク質部分を加熱する波長が含まれる。

#### 【0165】

##### B. 組換え方法及び組成物

抗体は、例えば米国特許第4,816,567号で説明したように、組換えの方法および組成物を用いて製造することができる。一実施態様において、本明細書に記載される抗メソテリン抗体をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列、及び/又は抗体のVHを含むアミノ酸配列(例えば、抗体の軽鎖及び/又は重鎖)をコードし得る。更なる実施態様において、そのような核酸を含む1つ以上のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。更なる実施態様において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。一実施態様において、宿主細胞は以下を含む(例えば、以下で形質転換される): (1) 抗体のVLを含むアミノ酸配列、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は(2) 抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一ベクター、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二ベクター。一実施態様において、宿主細胞は、真核生物、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、またはリンパ系細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20細胞)である。一実施態様において、抗メソテリン抗体を作る方法が提供され、その方法は、上記のように、抗体の発現に適した条件下で、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含み、および必要に応じて、宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から抗体を回収することを含む。

20

30

#### 【0166】

抗メソテリン抗体の組換え生産のために、例えば上述したように、抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニングおよび/または発現のために1つ以上のベクターに挿入される。このような核酸は、容易に単離され、従来の手順を用いて(例えば、抗体の重鎖と軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)配列決定することができる。

40

#### 【0167】

抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適切な宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞又は真核細胞を含む。例えば、特に、グリコシル化およびFcエフェクター機能が必要ない場合には、抗体は、細菌で産生することができる。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、第5,789,199号及び第5,840,523号を参照。(また、大腸菌における抗体の発現を説明している、Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照。)発現の後、抗体は可溶性画分において細菌の細胞ペーストから単離され得、更に精製することができる。

50

## 【0168】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、菌類や酵母菌株を含む抗体をコードするベクターのための、適切なクローニング宿主又は発現宿主であり、そのグリコシル化経路が、「ヒト化」されており、部分的または完全なヒトのグリコシル化パターンを有する抗体の生成をもたらす。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)、及びLi et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)を参照。

## 【0169】

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物と脊椎動物）から派生している。無脊椎動物細胞の例としては、植物および昆虫細胞が挙げられる。多数のパキウウイルス株が同定され、これらは特に *Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用することができる。

10

## 【0170】

植物細胞培養を宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5959177号、第6040498号、第6420548号、第7125978号及び第6417429号（トランスジェニック植物における抗体産生に関する *PLANTIBODIES<sup>TM</sup>* 技術を記載）を参照。

## 【0171】

脊椎動物細胞もまた宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40 (COS-7) で形質転換されたサル腎臓 CV1 株、ヒト胚腎臓株 (Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977) に記載された 293 細胞又は 293 細胞、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、マウスのセルトリ細胞 (Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980) に記載される TM4 細胞)、サル腎臓細胞 (CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa)、イヌ腎臓細胞 (MDCK; パッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A)、ヒト肺細胞 (W138); ヒト肝臓細胞 (HepG2)、マウス乳腺腫瘍 (MMT060562)、例えば Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982) に記載される TRI 細胞、MRC5 細胞、および FS4 細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHF R - CHO 細胞 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)) を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、及び Y0、NS0 および Sp2/0 などの骨髄腫細胞株を含む。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞系の総説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) を参照。

20

30

## 【0172】

## C. アッセイ

本明細書で提供される抗メソテリン抗体は、同定され、当技術分野で公知の様々なアッセイによってその物理的/化学的性質及び/又は生物学的活性についてスクリーニングされ、または特徴づけることができる。

## 【0173】

一態様において、本発明の抗体は、例えば ELISA、FACS 又はウエスタンブロット法など公知の方法により、その抗原結合活性について試験される。

40

## 【0174】

その他の態様において、競合アッセイが、メソテリンに対する結合について本明細書に記載される抗体の何れかと競合する抗体を同定するために用いることができる。所定の実施態様において、このような競合する抗体は、本明細書に記載される抗体により結合される同一のエピトープ（例えば、直鎖状又は立体構造エピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な典型的な方法が、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) に提供されている。

50

## 【0175】

典型的な競合アッセイにおいて、固定化メソテリンは、メソテリンに結合する第一の標識された抗体（例えば本明細書に記載される何れかの抗体）、及びメソテリンへの結合について第一の抗体と競合する能力について試験された第二の未標識抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第二抗体はハイブリドーマ上清中に存在してもよい。コントロールとして、固定化メソテリンが、第二の未標識の抗体でなく、第一の標識された抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第一の抗体のメソテリンへの結合を許容する条件下でインキュベートした後、過剰の未結合の抗体が除去され、固定化されたメソテリンに結合した標識の量が測定される。もし、固定化メソテリンに結合した標識の量が、コントロールサンプルと比較して試験サンプル中で実質的に減少している場合、それは、第二抗体が、

10

メソテリンへの結合に対して、第一の抗体と競合していることを示している。Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照。

## 【0176】

## D. イムノコンジュゲート

本発明はまた、化学療法剤又は薬物、成長抑制剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素活性毒素、又はそれらの断片）、又は放射性同位元素など、1つ以上の細胞傷害性薬物にコンジュゲートした本明細書中の抗メソテリン抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

## 【0177】

一実施態様において、イムノコンジュゲートは、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)であって、そこでは抗体は、限定されないが、メイタンシノイド(米国特許第5208020号、第5416064号及び欧州特許EP0425235B1を参照);モノメチルアウリスタチン薬物部分DE及びDF(MMAE及びMMAF)(米国特許第5635483号及び5780588号及び7498298号を参照)などのアウリスタチン;ドラスタチン、カリケマイシン又はその誘導体(米国特許第5712374号、5714586号、5739116号、5767285号、5770701号、5770710号、5773001号、及び5877296号を参照;Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993);及びLode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998));ダウノマイシン又はドキソルピシンなどのアントラサイクリン(Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002);及び米国特許第6,630,579号を参照);メトトレキサート、ビンデシン、ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセルなどのタキサン、トリコテセン、及びCC1065を含む一つ以上の薬物とコンジュゲートしている。

20

30

## 【0178】

その他の実施態様において、イムノコンジュゲートは、酵素的に活性な毒素又はその断片にコンジュゲートした、本明細書に記載の抗体を含み、限定されないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデクシン(modectin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチン(*dianthin*)タンパク質、フィトラカ・アメリカナ(*Phytolacca americana*)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(*Momordica charantia*)インヒビター、クルシン(*curcumin*)、クロチン(*crotin*)、サパオナリア・オフィシナリス(*Saponaaria officinalis*)インヒビター、ゲロニン(*gelonin*)、ミトゲリン(*mitogellin*)、レストリクトシン(*restrictocin*)、フェノマイシン(*phenomycin*)、エノマイシン(*enomycin*)及びトリコテセン(

40

50

tricothecene) が含まれる。

【0179】

その他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、放射性コンジュゲートを形成するために放射性原子にコンジュゲートした本明細書に記載されるような抗体を含む。様々な放射性同位体が放射性コンジュゲートの生産のために入手可能である。例としては、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$  及び  $Lu$  の放射性同位体を含む。検出のためにコンジュゲートを使用する場合は、それはシンチグラフィ試験のための放射性原子、例えば  $Tc^{99m}$  又は  $I^{123}$ 、又は核磁気共鳴 (NMR) 画像化 (磁気共鳴画像化  $mri$  としても知られている) のためのスピン標識、例えば再び、ヨウ素 - 123、ヨウ素 - 131、インジウム - 111、フッ素 - 19、炭素 - 13、窒素 - 15、酸素 - 17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含んでよい。

10

【0180】

抗体と細胞傷害性薬物のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、 $N$ -スクシンイミジル 3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート (SPDP)、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 (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの 2 官能性誘導体 (例えばジメチルアジピミデート HCL)、活性エステル (例えばジスクシンイミジルズベレート)、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体 (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 (例えばトルエン 2,6-ジイソシアネート) 及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、を使って作成され得る。Vitetta et al., Science 238:1098 (1987) に記載されるように、例えば、リシンイムノトキシンを調製することができる。カーボン-14-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 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションのためのキレート剤の例である国際公開第 94/11026 号を参照。リンカーは、細胞中に細胞毒性薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光解離性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); 米国特許第 5,208,020 号) が使用され得る。

20

30

【0181】

本明細書において、イムノコンジュゲート又は ADC は、限定されないが、市販の (例えば Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A からの)、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBSMPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、SVSB (スクシンイミジル(4-ビニルスルホン)ベンゾエート) を含むクロスリンカー試薬を用いて調製されるコンジュゲートを特に熟考する。

40

【0182】

アウリスタチンとドラスタチンを含むイムノコンジュゲート

幾つかの実施態様において、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドラスタチンペプチドアナログ又は、誘導体、例えばアウリスタチンにコンジュゲートした本発明の抗体を含む (米国特許第 5635483 号; 第 5780588 号)。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP の加水分解、及び核及び細胞分裂を妨害することが示されており (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)、かつ抗癌 (米国特許第 5663149 号) 及び抗真菌活性 (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965) を有する。ドラスタチン又はオーリスタチン薬剤部分は、ペプチド性薬剤部分の  $N$  (アミノ) 末端又は  $C$  (カルボキシル) 末端を介し

50

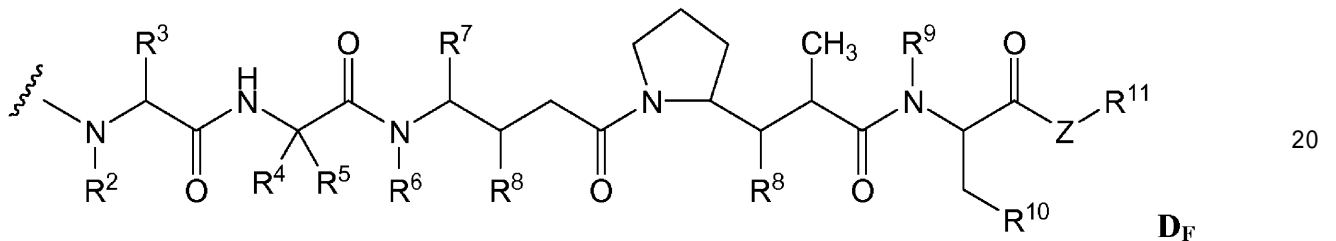
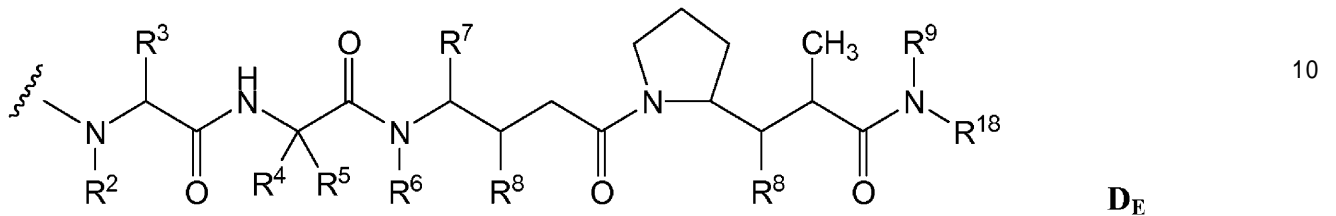
て抗体に結合することができる（国際公開第02/088172号）。

【0183】

典型的なアウリスタチンの実施形態は、N末端結合モノメチルオーリスタチン薬剤部分のDEとDFを含む。米国特許第7,659,241号、第7,498,298号及び同第7,745,394号を参照。

【0184】

ペプチド性薬剤部分は以下の式D<sub>E</sub>及びD<sub>F</sub>から選択され得る。



ここで、D<sub>E</sub>及びD<sub>F</sub>の波線は、抗体又は抗体-リンカー成分に対する共有結合性付着部位を示す。

R<sup>2</sup>は、H及びC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルから選択される；

R<sup>3</sup>は、H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環、アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環)、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>複素環及びC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>複素環)から選択される；

R<sup>4</sup>は、H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環、アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環)、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>複素環及びC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>複素環)から選択される；

R<sup>5</sup>は、H及び、メチルから選択される；

又はR<sup>4</sup>とR<sup>5</sup>は、一緒に環状炭素を形成し、式(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>-を有し、ここでR<sup>a</sup>とR<sup>b</sup>はH、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル及びC<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環から独立に選択され、nは2, 3, 4, 5及び6から選択される。

R<sup>6</sup>は、H及びC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルから選択される；

R<sup>7</sup>は、H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環、アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-アリール、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環)、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>複素環及びC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>複素環)から選択される；

各R<sup>8</sup>は、H、OH、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>炭素環及びO-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキル)から独立に選択される；

R<sup>9</sup>は、H及びC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルから選択される；

R<sup>10</sup>はアリール又はC<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>複素環から選択される；

Zは、O、S、NH、又はNR<sup>12</sup>であり、R<sup>12</sup>はC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルである；

R<sup>11</sup>はH、C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>アルキル、アリール、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>複素環、-(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup>、又は-(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>から選択される；

mは1から1000の範囲の整数である；

R<sup>13</sup>は、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>アルキルである；

R<sup>14</sup>は、H又はC<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>アルキルから選択される；

10

20

30

40

50

$R^{15}$  の各出現は、独立に、 $H$ 、 $COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、又は  $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$  アルキルである；

$R^{16}$  の各出現は、独立に  $H$ 、 $C_1-C_8$  アルキル、又は  $-(CH_2)_n-COOH$  である；

$R^{18}$  は  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -アリール、 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$  複素環)、及び  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$  炭素環) から選択され；及び

$n$  は 0 から 6 の範囲の整数である。

【0185】

一実施態様において、 $R^3$ 、 $R^4$  及び  $R^7$  は独立にイソプロピル又は *sec*-ブチルであり、 $R^5$  は  $-H$  又はメチルである。典型的な実施態様において、 $R^3$  及び  $R^4$  は各々イソプロピルであり、 $R^5$  は  $-H$  であり、及び  $R^7$  は *sec*-ブチルである。

10

【0186】

更に別の実施態様において、 $R^2$  及び  $R^6$  は各々メチルであり、及び  $R^9$  は  $-H$  である。

【0187】

更に別の実施態様において、 $R^8$  の各出現は  $-OCH_3$  である。

【0188】

典型的な実施態様において、 $R^3$  及び  $R^4$  は各々イソプロピルであり、 $R^2$  及び  $R^6$  は各々メチルであり、 $R^5$  は  $-H$  であり、 $R^7$  は *sec*-ブチルであり、 $R^8$  の各出現は  $-OCH_3$  であり、及び  $R^9$  は  $-H$  である。

20

【0189】

一実施態様において、 $Z$  は  $-O-$  又は  $-NH-$  である。

【0190】

一実施態様において、 $R^{10}$  はアリールである。

【0191】

典型的な実施態様において、 $R^{10}$  はフェニルである。

【0192】

典型的な実施態様において、 $Z$  は  $-O-$  であり、 $R^{11}$  は  $-H$ 、メチル又は *t*-ブチルである。

30

【0193】

一実施態様において、 $Z$  は  $-NH$  であり、 $R^{11}$  は  $-CH(R^{15})_2$  であり、ここで  $R^{15}$  は  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$  であり、及び  $R^{16}$  は  $-C_1-C_8$  アリール又は  $-(CH_2)_n-COOH$  である。

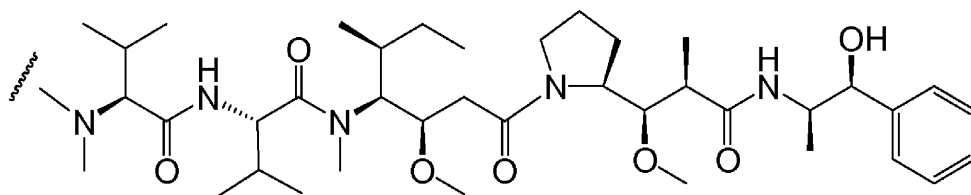
【0194】

別の実施態様において、 $Z$  は  $-NH$  であり、 $R^{11}$  は  $-CH(R^{15})_2$  であり、ここで  $R^{15}$  は  $-(CH_2)_n-SO_3H$  である。

【0195】

式  $D_E$  の典型的なアウリスタチンの実施態様は MMAE (モノメチルアウリスタチン E) であり、ここで波線は抗体-薬物コンジュゲートのリンカーへの共有結合性付着を示す；

40



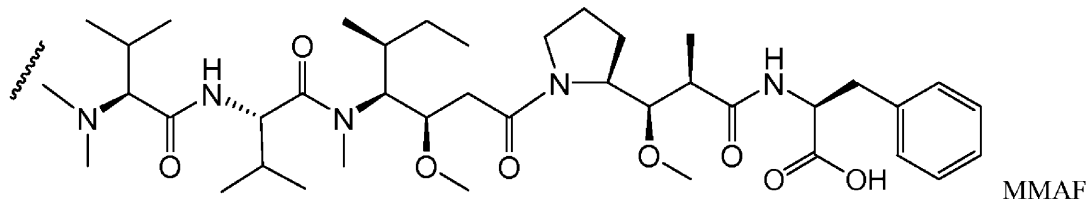
MMAE

【0196】

式  $D_F$  の典型的なアウリスタチンの実施態様は MMAF (モノメチルアウリスタチン F)

50

、アウリスタチン E (MMAE) の変異体で薬物の C 末端にフェニルアラニンを持つ) であり、ここで波線は抗体 - 薬物コンジュゲートのリンカーへの共有結合性付着を示す (例えば、米国特許出願公開第 2005/0238649 号及び Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124 を参照) :



10

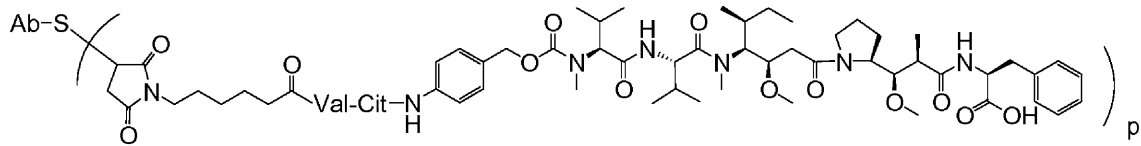
## 【0197】

一態様において、限定されないが、上記のようなトリエチレングリコールエステル (TEG) を含む親水性基は、R<sup>11</sup> において薬物部分に結合することができる。任意の特定の理論に拘束されることなく、親水性基は、薬物部分の内在化と非凝集を助ける。

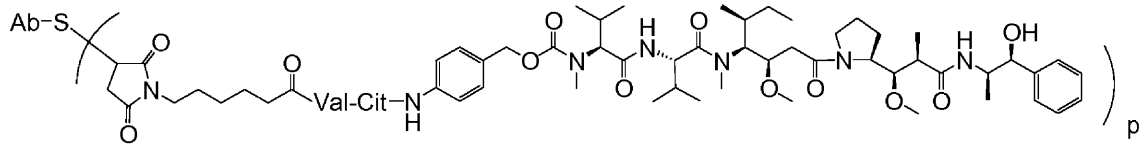
## 【0198】

アウリスタチン / ドラスタチン 又はその誘導体を含む、ADC の例示的な実施態様は、米国特許出願公開第 2005/0238649 A1 号及び Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124 に記載されており、それは明示的に参照により本明細書に組み込まれる。MMAE 又は MMAF 及び様々なリンカー成分を含む、ADC の例示的な実施態様は以下の構造を有し (ここで「Ab」は抗体であり; p は薬物負荷 (抗体あたりの薬物部分の平均数) であり約 1 から約 8 の範囲であり; 「vc」は「val-cit」、即ちバリン - シトルリンジペプチドであり、及び「S」は硫黄原子である:

20

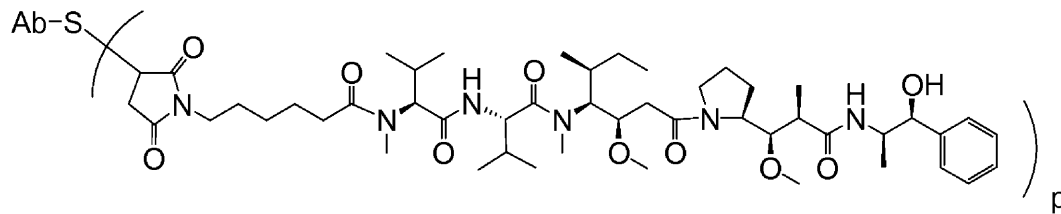


Ab-MC-vc-PAB-MMAF



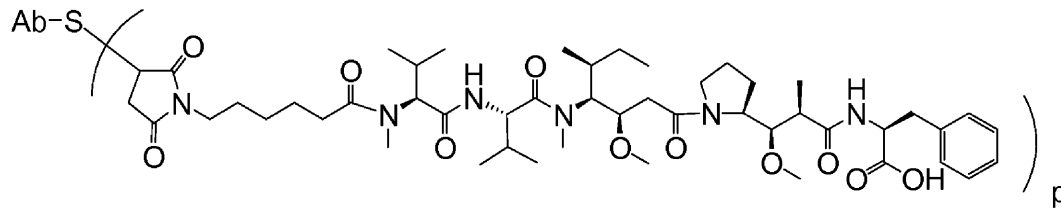
Ab-MC-vc-PAB-MMAE

10



Ab-MC-MMAE

20



Ab-MC-MMAF

30

MMAF及び様々なリンカー成分を含むADCの典型的な実施態様は、Ab-MC-PAB-MMAF及びAb-PAB-MMAFを含む。興味深いことに、タンパク質分解的に切断可能ではないリンカーによって抗体に結合したMMAFを含むイムノコンジュゲートは、タンパク質分解切断可能なリンカーによって抗体に結合したMMAFを含むイムノコンジュゲートと同等の活性を有することが示されている。Doronina et al. (2006) *Biocjugate Chem.* 17:114-124を参照。このような場合、薬物放出は、細胞内での抗体の分解によってもたらされると考えられる。Id.

## 【0199】

典型的には、ペプチド系薬物部分は、2つ以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片の間のペプチド結合を形成することにより調製することができる。そのようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で周知である液相合成法 (E. Schroeder and K. Luebke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照) により、調製することができる。アウリスタチン/ドラスタチン薬物部分は、米国特許出願公開第2005/0238649 A1号; 米国特許第5635483号; 米国特許第5780588号; Pettit et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; 及びDoronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784の方法に従って調製することができる。

40

## 【0200】

50

特に、式 D<sub>F</sub> のアウリスタチン / ドラスタチン薬物部分、例えば M M A F 及びその誘導体は、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 3 8 6 4 9 A 1 号及び Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124 に記載される方法を用いて調製され得る。式 D<sub>E</sub> のアウリスタチン / ドラスタチン薬物部分、例えば M M A F は、Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784 に記載される方法を用いて調製され得る。薬物 - リンカー部分の M C - M M A F , M C - M M A E , M C - v c - P A B - M M A F , 及び M C - v c - P A B - M M A E は、簡便に常法により、例えば、Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784、及び米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 3 8 6 4 9 A 1 号に記載されるように合成することができ、次いで目的の抗体にコンジュゲートされる。

#### 【 0 2 0 1 】

E . 診断及び検出のための方法および組成物

ある実施態様において、本明細書で提供される抗メソテリン抗体の何れかは、生物学的サンプル中のメソテリンの存在を検出するのに有用である。本明細書で使用する「検出」という用語は、定量的または定性的検出を包含する。「生物学的サンプル」は、例えば細胞又は組織（例えば、癌または潜在的癌性の膵臓、卵巣、肺、または子宮内膜組織、または中皮腫を含む生検材料）又は血清を含む。

#### 【 0 2 0 2 】

一実施態様において、診断又は検出の方法に使用される抗メソテリン抗体が提供される。更なる態様において、生物学的サンプル中のメソテリンの存在を検出する方法が提供される。ある実施態様において、本方法は、抗メソテリン抗体のメソテリンへの結合を許容する条件下で、本明細書に記載のように抗メソテリン抗体と生物学的サンプルを接触させること、及び生物学的サンプル中で複合体が抗メソテリン抗体とメソテリンとの間に形成されているかどうかを検出することを含む。そのような方法は、インビトロ又はインビボでの方法であり得る。一実施態様において、例えばメソテリンが患者の選択のためのバイオマーカーであるなど、抗メソテリン抗体が抗メソテリン抗体による治療に適格な被検体を選択するために使用される。更なる実施態様において、生物学的サンプルは血清であり、例えば癌細胞から血清中へ脱落したメソテリンが検出される。

#### 【 0 2 0 3 】

更なる実施態様において、例えば、癌を診断し、予後予測し、又は病期を分類し、治療の適切なコースを決定し、又は治療に対する癌の応答をモニタリングすることを目的として、例えばインビボでのイメージングにより、被験体のメソテリン陽性癌を検出するために、抗メソテリン抗体がインビボで使用される。インビボでの検出のために当該技術分野で知られた一方法は、例えば van Dongen et al., The Oncologist 12:1379-1389 (2007) and Verel et al., J. Nucl. Med. 44:1271-1281 (2003) に記載される免疫陽電子放出断層撮影 (イムノPET) である。そのような実施態様において、被験体においてメソテリン陽性癌を検出する方法が提供され、該方法は標識された抗メソテリン抗体を、メソテリン陽性癌を有するか又は有することが疑われる被験体に投与することを含み、そして被験体において標識された抗メソテリン抗体を検出し、ここでは標識された抗メソテリン抗体の検出は被験体におけるメソテリン陽性癌を示す。そのような実施態様において、標識された抗メソテリン抗体は、例えば  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ , 及び  $^{124}\text{I}$  などの陽電子放出体にコンジュゲートした抗メソテリン抗体を含む。特定の実施態様において、陽電子放射体は  $^{89}\text{Zr}$  である。

#### 【 0 2 0 4 】

更なる実施態様において、診断又は検出の方法は、基板 ( s u b s t r a t e ) に固定した第一の抗メソテリン抗体を、メソテリンの存在について試験されるべき生物学的サンプルと接触させ、該基板を第二の抗メソテリン抗体に曝露し、生物学的サンプル中で第二の抗メソテリンが、第一の抗メソテリン抗体とメソテリンの間の複合体に結合するかどうかを検出することを含む。基板は、任意の支える媒体、例えば、ガラス、金属、セラミック、ポリマービーズ、スライド、チップ、および他の基板であってもよい。ある実施態様において、生物学的サンプルは細胞又は組織（例えば、癌または潜在的癌性の膵臓、卵巣

10

20

30

40

50

、肺、または子宮内膜組織、または中皮腫を含む生検材料)又は血清、即ちメソテリンが脱落した血清を含む。ある実施態様において、第一又は第二の抗メソテリン抗体は、本明細書に記載される抗体の何れかである。そのような実施態様において、第二の抗メソテリン抗体は、本明細書に記載される 19C3 又は 19C3 から由来する抗体であり得る。

#### 【0205】

上記実施態様の何れかに従って診断され又は検出され得る典型的な疾患は、メソテリン陽性膵臓癌(膵管腺癌を含む)、メソテリン陽性の卵巣癌(卵巣漿液腺癌を含む)、メソテリン陽性肺癌(非小細胞肺癌(NSCLC)を含む)、中皮腫、及びメソテリン陽性子宮内膜癌などのメソテリン陽性癌が含まれる。一実施態様において、メソテリン陽性癌は、「0」より大きい抗メソテリン免疫組織化学法(IHC)スコアを受ける癌であり、それは本明細書の実施例Jに記載される条件下で、腫瘍細胞の90%超において非常に弱い染色又は無染色に対応する。別の実施態様において、メソテリン陽性癌は、本明細書の実施例Jに記載される条件下で定められる場合、メソテリンを1+、2+、又は3+のレベルでメソテリンを発現する。上記実施態様の何れかに係るメソテリン陽性癌は、二重陽性癌であり得る。

10

#### 【0206】

ある実施態様において、標識された抗メソテリン抗体が提供される。標識は、限定されるものではないが、(例えば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、放射性標識など)直接検出される標識又は部分、並びに、例えば、酵素反応又は分子間相互作用を介して間接的に検出される酵素又はリガンドのような部分が含まれる。典型的な標識は、限定されないが、ラジオアイソトープ<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、及び<sup>131</sup>I、フルオロフォア、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシェフェラーゼ、例えばホタルルシェフェラーゼ及び細菌ルシェフェラーゼ(米国特許第4737456号)、ルシェフェリン、2,3-ジヒドロフタルジネジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘテロサイクリックオキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、色素前駆体を酸化する過酸化水素を利用する酵素、例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、又はマイクロペルオキシダーゼと共役したもの、

20

30

#### 【0207】

##### F. 薬学的製剤

本明細書に記載の抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートの薬学的処方物は、所望の程度の純度を有するその抗体又はイムノコンジュゲートと任意の薬学的に許容される担体(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.: Williams and Wilkins PA, USA (1980))とを、凍結乾燥製剤または水性溶液の形態で混合することによって調製される。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量および濃度でレシピエントに毒性でなく、そしてこれには、限定しないが、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸のような緩衝液;アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤;防腐剤(例えば、オクタデシルジメチオルベンジルアンモニウムクロライド;ヘキサメトニウムクロライド;塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール;アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン;カテコール;レゾルシノール;シクロヘキサノール;3-ペンタノール;およびm-クレゾール);低分子量(約10残基未満)ポリペプチド;タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン;親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン;アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン;マ

40

50

ンノサッカライド、ジサッカライド、およびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び/又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。本明細書における典型的な薬学的に許容される担体は、介在性薬物分散剤、例えば、水溶性の中性アクティブヒアルロニダーゼ糖タンパク質（SHASEGP）、例えば、rHuPH20（HYLENE X（登録商標）、Baxter International, Inc.）などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質を更に含む。所定の典型的なSHASEGP及び使用法は、rHuPH20を含み、米国特許出願公開第2005/0260186号及び第2006/0104968に開示されている。一態様において、SHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1つまたは複数の追加のグルコサミノグリカンと組み合わせられる。

10

**【0208】**

典型的な凍結乾燥抗体又はイムノコンジュゲート製剤は、米国特許第6267958号に記載されている。水性の抗体製剤又はイムノコンジュゲート製剤は、米国特許第6171586号及び国際公開第2006/044908号に記載されているものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

**【0209】**

本明細書の製剤はまた、治療を受けている特定の徴候のために必要な一以上の活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものが含まれる場合がある。例えば、例えばメソテリン陽性膵臓癌（膵臓腺癌）などのメソテリン陽性癌の治療のために、ゲムシタピンを更に提供することが望まれ得る。別の実施例において、例えば、メソテリン陽性卵巣癌（卵巣漿液腺）又は二重陽性卵巣癌などのメソテリン陽性癌又は二重陽性癌の治療のために、細胞傷害性薬物にコンジュゲートした抗MUC16抗体を更に提供することが望まれ得る。このような活性成分は、意図した目的のために有効な量で組み合わせられ適切に存在する。

20

**【0210】**

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合法によって、例えばヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート（methyl methacrylate））マイクロカプセルのそれぞれによって、コロイド薬物送達系（例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロ・エマルジョンなどの調製されたマイクロカプセルに封入されてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示される。

30

**【0211】**

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体又はイムノコンジュゲートを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスが成形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形をしている。

**【0212】**

インピボ投与に使用される製剤は、一般的に無菌である。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜を通して濾過することにより、達成することができる。

40

**【0213】****G. 治療的方法及び組成物**

本明細書で提供される抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートのいずれかを、例えば治療方法などの方法で使用することができる。

**【0214】**

一態様において、本明細書において提供される抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートが、メソテリン陽性細胞の増殖を阻害する方法において使用され、該方法は、細胞の表面上でメソテリンに対する抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートの結合を許容する条件下で、細胞を抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートに曝露することを含み、

50

それにより細胞の増殖を阻害することを含む。ある実施態様において、方法はインビトロ又はインビボの方法である。更なる実施態様において、細胞は、脾臓、卵巣、肺、中皮腫、又は子宮内膜の細胞である。更なる実施態様において、細胞は、二重陽性細胞である。

【0215】

インビトロにおける細胞増殖の阻害は、プロメガ社（ウィスコンシン州マディソン）から市販されている、CellTiter-Glo<sup>TM</sup> 発光細胞生存率アッセイを使用してアッセイされ得る。そのアッセイは、代謝活性細胞の指標である存在するATPの定量に基づき、培養液中で生存細胞の数を決定する。See Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88、米国特許第6602677号、Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88、米国特許第6602677号を参照。アッセイは、自動化ハイスループットスクリーニング（HTS）に適するように、96穴形式又は384穴形式で行うことができる。Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404を参照。アッセイ法では、直接培養細胞に単一試薬（CellTiter-Glo（登録商標）試薬）を追加することを含む。これにより、細胞溶解とルシフェラーゼ反応により生成した発光シグナルの生成を生じる。発光シグナルは、培養中に存在する生存細胞の数に直接的に比例しているATPの存在量に比例する。データは、ルミノメーター又はCCDカメラ撮像装置により記録することができる。発光出力は相対光単位（RLU）として表される。

10

【0216】

別の態様では、医薬として使用するための抗メソテリン抗体が提供される。更なる態様において、治療の方法に使用される抗メソテリン抗体が提供される。ある実施態様において、メソテリン陽性癌の治療の方法に使用される抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートが提供される。ある実施態様において、本発明は、メソテリン陽性癌を有する個体を治療する方法における使用のための抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートを提供し、該方法は個体に抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートの有効量を投与することを含む。一つのそのような実施態様において、本方法は、例えば後述するように、少なくとも1つの付加的治療薬の有効量を個体に投与することを更に含む。

20

【0217】

更なる態様にて、本発明は、医薬の製造又は調製における抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートの使用を提供する。一実施態様において、本医薬はメソテリン陽性癌の治療のためのものである。更なる実施態様において、本医薬は、メソテリン陽性癌を治療する方法で使用するためのものであり、該方法はメソテリン陽性癌を有する個体に、医薬の有効量を投与することを含む。一つのそのような実施態様において、本方法は、例えば後述するように、少なくとも1つの付加的治療薬の有効量を個体に投与することを更に含む。

30

【0218】

更なる態様にて、本発明は、メソテリン陽性癌を治療する方法を提供する。一実施態様において、本方法は、そうしたメソテリン陽性癌を有する個体に、抗メソテリン陽性抗体又はイムノコンジュゲートの有効量を投与することを含む。一つのそのような実施態様において、この方法は、後述するように、少なくとも1つのさらなる治療剤の有効量を個体に投与することを更に含む。

40

【0219】

上記実施態様の何れかに従うメソテリン陽性癌は、例えば、メソテリン陽性脾臓癌（膵管腺癌を含む）、メソテリン陽性の卵巣癌（卵巣漿液腺癌を含む）、メソテリン陽性肺癌（非小細胞肺癌（NSCLC）を含む）、中皮腫、及びメソテリン陽性子宮内膜癌などのメソテリン陽性癌であり得る。一実施態様において、メソテリン陽性癌は、「0」より大きい抗メソテリン免疫組織化学法（IHC）スコアを受ける癌であり、それは本明細書の実施例Jに記載される条件下で、腫瘍細胞の90%超において非常に弱い染色又は無染色に対応する。別の実施態様において、メソテリン陽性癌は、本明細書の実施例Jに記載される条件下で定められる場合、メソテリンを1+、2+、又は3+のレベルでメソテリン

50

を発現する。上記実施態様の何れかに係るメソテリン陽性癌は、二重陽性癌であり得る。

【0220】

上記実施態様の何れかに記載の「個体」は、ヒトであり得る。

【0221】

更なる態様において、本発明は、例えば、上記の治療法のいずれかに使用される、本明細書で提供される抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートのいずれかを含む薬学的製剤を提供する。一実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートいずれか、及び薬学的に許容される担体を含む。その他の実施態様において、薬学的製剤は、本明細書で提供される抗メソテリン抗体又はイムノコンジュゲートのいずれかと、少なくとも1つの更なる治療剤を、例えば後述するように含む。

10

【0222】

本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、治療において、単独で、または他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは少なくとも1つの更なる治療剤と同時に投与され得る。所定の実施態様において、更なる治療薬はゲムシタピンである。ある実施態様において、付加的治療薬は、細胞傷害性薬物に結合した抗MUC16抗体である。

【0223】

上記のこうした併用療法は、併用投与（2つ以上の治療剤が、同一または別々の製剤に含まれている）、及び、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートの投与が、追加の治療剤及び/又はアジュバントの投与の前、同時、及び/又はその後起きうる分離投与を包含する。本発明の抗体又はイムノコンジュゲートはまた放射線治療と併用して用いることができる。

20

【0224】

本発明の抗体又はイムノコンジュゲート（および任意の追加の治療剤）は、任意の適切な手段によって投与ことができ、経口、肺内、および鼻腔内、及び局所治療が所望される場合、病巣内投与が含まれる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与が含まれる。投薬は、その投与が短期間か又は長期であるかどうか部分的に依存し、任意の適切な経路、例えば、静脈内または皮下注射などの注射により行うことができる。限定されないが、様々な時間点にわたる、単一または複数回投与、ボラス投与、パルス注入を含む様々な投与スケジュールが本明細書で考えられている。

30

【0225】

本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは良好な医療行為に合致した方法で処方され、投与され、投薬される。この観点において考慮すべき要因は、治療すべき特定の障害、治療すべき特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与日程及び医療従事者が知る他の要因を包含する。抗体又はイムノコンジュゲートは、必要ではないが任意で、問題となる障害の予防又は治療のために、現在使用中の一又は複数の薬剤とともに処方される。そのような他の薬剤の有効量は製剤中に存在する抗体又はイムノコンジュゲートの量、障害又は治療の種類及び上記した他の要因に依存する。これらは一般的には本明細書に記載されるのと同じ用量及び投与経路において、又は、本明細書に記載された用量の1%から99%で、又は経験的に/臨床的に妥当であると決定された任意の用量及び任意の経路により使用される。

40

【0226】

疾患の予防又は治療のためには、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートの適切な用量（単独で使用されるか、又は、一以上の更なる治療的薬剤との組み合わせられる場合）は治療すべき疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体を予防又は治療目的のいずれにおいて投与するか、以前の治療、患者の臨床的履歴及び抗体に対する応答性、及び担当医の判断に依存する。抗体又はイムノコンジュゲートは、患者に対して、単回、又は一連の治療にわたって適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一回以上の別個の投与によるか、連続注入によるかに関わらず、抗体又はイムノコンジュゲート

50

の約 1 μg / kg から 15 mg / kg (例えば 0.1 mg / kg から 10 mg / kg) が患者への投与のための初期候補用量となり得る。1つの典型的な一日当たり用量は上記した要因に応じて約 1 μg / kg から 100 mg / kg 又はそれ以上の範囲である。数日間以上に渡る反復投与の場合には、状態に応じて、治療は疾患症状の望まれる抑制が起こるまで持続するであろう。1つの例示される抗体又はイムノコンジュゲートの用量は約 0.05 mg / kg から約 10 mg / kg の範囲である。従って、約 0.5 mg / kg、2.0 mg / kg、4.0 mg / kg 又は 10 mg / kg の1つ以上の用量(又はこれらの何れかの組み合わせ)を患者に投与してよい。このような用量は断続的に、例えば毎週又は3週毎(例えば患者が約2から約20、例えば抗体の約6投与量を受けるように)投与してよい。初期の高負荷用量の後、1つ以上の低用量を投与してよい。しかしながら、他の用量用法も使用してよい。この治療法の進行は従来手法及び試験により容易にモニタリングされる。

10

【0227】

上記の製剤または治療方法の任意のものが、本発明のイムノコンジュゲート及び抗メソテリン抗体の両方を用いて実施され得ることが理解される。

【0228】

H. 製造品

本発明の他の実施態様において、上述した障害の治療、予防、及び/又は診断に有用な物質を含む製造品が提供される。製造品は、容器とラベルまたは容器上にあるまたは容器に付属するパッケージ挿入物を含む。好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ、IV輸液バッグ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成されうる。容器は、疾患の治療、予防、及び/又は診断に有効である、それ自体が、又はその他の組成物と併用される化合物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る(例えば、容器は皮下注射針による穴あきストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも一の活性剤は本発明の抗体又はイムノコンジュゲートである。ラベルまたはパッケージ挿入物は、組成物が特定の症状の治療のために使用されることを示している。更に、製造品は、(a)組成物が本発明の抗体又はイムノコンジュゲートを包含する組成物を含む第一の容器; および(b)組成物が更なる細胞障害性又はその他の治療的薬剤を包含する組成物を含む第二の容器を含み得る。本発明の本実施態様における製造品は、組成物が特定の疾患を治療することに用いることができることを示すパッケージ挿入物をさらに含んでもよい。別法として、または加えて、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝化塩水、リンガー溶液又はデキストロス溶液を含む第二(または第三)の容器をさらに含んでもよい。これは、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジを含む、商業的およびユーザーの立場から望まれる他の物質のさらに含んでもよい。

20

30

【0229】

I. 生物材料の寄託

以下の生物学的材料が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801ユニバーシティブルバード、マナサス、バージニア州20110-2209, 米国(ATCC)に寄託されている:

40

ハイブリドーマの名称	ATCC 番号	寄託日
MPF:3542 (19C3.1.2)	PTA-11464	2010年11月9日

上記に参照される寄託されたハイブリドーマは本明細書に言及される19C抗体を産生する。

【0230】

この寄託は、特許手続及びその規制(ブダペスト条約)の目的のために微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定の下で行われた。これは、寄託日から30年間の寄託したサンプルの供給の最近の要求から少なくとも5年間、生存可能な培養の維持を

50

保証する。本寄託はブダペスト条約の条項のもとでATCCにより利用可能になり、ジェネンテック社とATCCの間の合意に従い、寄託材料の公への利用可能性に関して寄託者により課された全ての制限は、関連する米国特許の承諾の際に取消不能の形で削除されることを保証し、関連する米国特許の発行の際、又は任意の米国又は外国特許出願の公に対する公開の際に、いずれか早い方の時点で、公に対しての寄託物の培養物の子孫の永続的かつ無制限な利用可能性を保証し、かつ35 U.S.C. § 122及びそれに準拠した米国特許商標庁長官の規則に従って(886 O.G. 638に特に関連して37 C.F.R. § 1.14を含み)、権利を付与された米国特許商標庁長官により決定される者に対する子孫の利用可能性を保証する。

#### 【実施例】

#### 【0231】

#### III. 実施例

以下は本発明の方法および組成物の例である。上記提供される一般的な説明を前提として、他の様々な実施態様が実施され得ることが理解される。

#### 【0232】

#### A. ヒトメソテリン遺伝子発現

ヒトメソテリン遺伝子発現は遺伝子発現情報を含む専用データベースを使用して分析した(Gene Express (登録商標), Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD)。Gene Express (登録商標)データベースのグラフィカル解析をマイクロアレイプロファイルビューアを使用して行った。図2は、左に一覧される様々な組織におけるヒトメソテリン遺伝子発現のグラフィック表示である。グラフの上部のスケールは、ハイブリダイゼーションシグナル強度に基づく遺伝子発現レベルを示す。点が、各々のリストされた組織に隣接する線の上下両方に表示される。線の上に現れる点は正常組織における遺伝子発現を示し、線の下に現れる点は腫瘍及び疾患組織における遺伝子発現を示す。図2は、所定の腫瘍又は疾患組織において、それらの正常カウンターパートと比較したメソテリン遺伝子発現の増加を示す。特に、メソテリンは、腺癌と中皮腫を含む卵巣癌、膵臓癌、子宮内膜、肺腫瘍において実質的な過剰発現を示している。ヒトメソテリンの発現は、正常中皮(腹膜、心膜、及び胸膜)を除いて、正常組織に本質的に存在しない。

#### 【0233】

#### B. 抗体生成

ヒトメソテリンに対するモノクローナル抗体は、以下の手順を使用して生成された。各々N末端ユニザイムHis (HQ) タグに融合している、ヒトMPFメソテリン(配列番号42のアミノ酸34-580)又はヒトメソテリン(配列番号42のアミノ酸296-580)の何れかが大腸菌58F3で発現され、Ni-NTAカラム(Qiagen)で精製され、その後以前に記載の通り(Kirchhofer et al., 2003) 20 mMのMES、pH 6.0 6 MのGdnHCl中でセファデックス200カラムでゲル濾過し、1 mMのHCl中で-80 °Cでの貯蔵用に透析した。

#### 【0234】

5匹のBalb/cマウス(Charles River Laboratories, Hollister, CA)が、Ribiアジュバント中で2 µgの2つの抗原混合物で6回過免疫した(Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO)。2匹の最良のマウスが直接ELISAにより高い抗体力価に基づいて選択され、それらのB細胞はプールされ、以前に記載されたものと類似した改変プロトコルを使用して、マウスミエローマ細胞(X63.Ag8.653; American Type Culture Collection, Manassas, VA)により融合された。(Koehler and Milstein, 1975; Hongo et al., 1995)。10~12日後に、上清をハイブリドーマから回収し、直接ELISAにより両方の抗原に対する結合について(別個に)スクリーニングした。適切にフォールドし、グリコシル化された、細胞表面に発現したメソテリンの認識を確かめるために、ELISA陽性上清がgDメソテリントラ

10

20

30

40

50

ンスフェクトSVT2細胞上で更にFACSによりスクリーニングされた(gDは、抗gD抗体とともに陽性コントロールとして使用されるN-末端エピトープタグである)。陽性ハイブリドーマが限定希釈により2回サブクローニングされ、11がスケールアップされ、抗体がプロテインAクロマトグラフィーにより精製された。

#### 【0235】

図3は、以下に更に詳述される特性と共に、単離されたモノクローナル抗体を示す。

#### 【0236】

##### C.7D9と22A10のヒト化

モノクローナル抗体7D9と22A10は以下に記載されるようにヒト化された。残基番号はKabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に従う。

#### 【0237】

##### 1.7D9のヒト化

##### a) マウス7D9可変ドメインのクローニング

全RNAを、標準的な方法を用いてマウス7D9を産生するハイブリドーマ細胞から抽出した。可変軽鎖(VL)及び可変重鎖(VH)ドメインが、重鎖および軽鎖に対する縮重プライマーによりRT-PCRを用いて増幅された。順方向プライマーは、VLおよびVH領域のN末端アミノ酸配列に特異的であった。それぞれ、LCおよびHC逆方向プライマーは、種を超えて高度に保存されている定常軽鎖(CL)及び定常重鎖ドメイン1(CH1)の領域にアニーリングするように設計された。挿入物のポリヌクレオチド配列は通常の方法を使用して決定された。7D9のVLとVHアミノ酸配列は図4と5にそれぞれ示される。

#### 【0238】

##### b) アクセプターヒトコンセンサスフレームワーク上への直接的超可変領域の移植

7D9のヒト化の最中に構築された変異体はIgGの形態で評価された。マウス7D9由来のVL及びVHドメインはヒトVLカッパI(VL<sub>KI</sub>)及びヒトVHサブグループIII(VH<sub>III</sub>)コンセンサス配列に整列された。マウス7D9(mu7D9)抗体からの超可変領域は7D9.v1を生成するためにVL<sub>KI</sub>及びVH<sub>ATA</sub>アクセプターフレームワーク中へ設計された。アクセプターVHフレームワークVH<sub>ATA</sub>は、3つの位置: R71A, N73T, 及びL78AでVH<sub>III</sub>と異なる(Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992))。7D9のVLドメインから、位置24-34(L1), 50-56(L2)及び89-97(L3)がVL<sub>KI</sub>へ移植された。7D9のVHドメインから、位置26-35(H1), 49-65(H2)及び95-102(H3)がVH<sub>ATA</sub>へ移植された(図1及び2)。CDRの定義は、それらの配列の超可変性(Wu, T. T. & Kabat, E. A. (1970))、それらの構造上の位置(Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987))及び抗原-抗体接触におけるそれらの関与(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))により定義される位置を含む。

#### 【0239】

直接移植片、7D9.v1は各超可変領域に対して別個のオリゴヌクレオチドを使用して、クンケル変異誘発により生成された。重鎖あるいは軽鎖のどちらかに対して3つのリン酸化オリゴヌクレオチドが、最終容積が40µlで、50mM Tris pH 7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>中の571ngのクンケルテンプレートに加えられた。混合物は90°Cで2分間、50°Cで5分間アニールされ、次いで氷上で冷却された。10µlのアニールされたテンプレートは、室温で2時間、0.5µlの100mMのATP, 0.5µlの25mMのdNTPs(dATP, dCTP, dGTP及びdTTPの各々25mM), 1µlの100mMのDTT, 1µlの10XTMバッファー(0.5MのTris pH 7.5, 0.1MのMgCl<sub>2</sub>), 80U T4リガーゼ及び4U T7ポリメラーゼを加えることにより総容積が13.6µlに充填された。10µlの充填され連結された生成物は次いでXL1-ブルー細胞中へ形質転換された(Stratagene)。正しいクローンがDNA配列決定により同定され、IgGとして発現された。

## 【0240】

## c) 変異体の評価

7D9 変異体はCHO-過性導入によりIgGとして発現された。IgGをプロテインGアフィニティークロマトグラフィーで精製した。ヒトメソテリンの各7D9 IgG変異体の親和性は、BiAcCoreTM-2000を使用して表面プラズモン共鳴によって決定された。BiAcCoreの研究品質等級CM5チップが、BiAcCoreからのアミンカップリングキットを使用して組換えヒトメソテリン由来の大腸菌のおよそ110RUで固定された。各7D9変異体の段階的2倍希釈物(0.05%のTween20を含有するPBS中に0.488から1000nM)が30μl/分の流速で注入された。各サンプルは5分間の会合と3~5分間の解離により解析された。各注入の後、チップは10mMのグリシンpH1.7を使用して再生された。結合応答は、同様の密度で固定化された無関係のIgGとともにフローセルからRUを差し引くことにより補正された。 $k_{on}$ と $k_{off}$ の同時フィッティングの1:1Langmuirモデルが動力的解析に用いられた。

10

## 【0241】

## d) 結果

7D9のヒト化に使用されたヒトアクセプターフレームワークは、ヒトVLカッパIコンセンサス(VL<sub>KI</sub>)及びアクセプターVHフレームワークVH<sub>ATA</sub>に基づいており、それは3箇所:R71A,N73T,及びL78AでヒトVHサブグループIIIIコンセンサス(VH<sub>III</sub>)とは異なる(Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992))。マウス7D9のVLおよびVHドメインがヒトVL<sub>KI</sub>及びVH<sub>III</sub>ドメインと整列され;超可変領域が同定されてヒトアクセプターフレームワークへ移植され、7D9.v1を生成した(図4及び5)。IgGとして、7D9.v1の親和性は、BiAcCoreにより評価されると、mu7D9(キメラ7D9としてフォーマットされる)に比べて~2倍減少する(図6)。

20

## 【0242】

7D9.v1の結合親和性を改善するために、軽鎖の位置36と87及び重鎖の位置48、67、69、71、73、75、76、78及び80がmu7D9におけるこれらの位置で見いだされる残基へ変更された。これらの変更された軽鎖と重鎖と7D9.v1からの鎖との組み合わせがCHO中へトランスフェクトされ、IgGとして発現され、BiAcCoreによりヒトメソテリンに対する結合について評価された(図6)。

30

## 【0243】

変異体7D9.v2と7D9.v3は、その両方が変更された軽鎖を含み、キメラ7D9に匹敵する親和性を有していた。変異体7D9.v3は軽鎖の2つの位置で7D9.v1と異なっている。どちらの変化もmu7D9のそれに匹敵する結合を改善するには十分でなかった(図6)。

## 【0244】

ヒト化7D9.v3についての変更の概要6匹のマウス7D9のCDR(位置24-34(L1),50-56(L2)及び89-97(L3),26-35(H1),49-65(H2)及び93-102(H3)として定義される)がヒトコンセンサスVL<sub>KI</sub>及びVH<sub>ATA</sub>アクセプタードメイン中へ移植された。2つの付加的なフレームワーク残基の、軽鎖の36と87が元のマウスの残基へ変えられ、mu7D9に対して匹敵する親和性を持つ7D9.v3をもたらした。

40

## 【0245】

## 2.2.2A10のヒト化

## a) マウス2.2.2A10可変ドメインのクローニング

全RNAを、標準的な方法を用いてマウス2.2.2A10を産生するハイブリドーマ細胞から抽出した。可変軽鎖(VL)及び可変重鎖(VH)ドメインが、重鎖(HC)および軽鎖(LC)に対する縮重プライマーによりRT-PCRを用いて増幅された。順方向プライマーは、VLおよびVH領域のN末端アミノ酸配列に特異的であった。それぞれ、LC

50

およびHC逆方向プライマーは、種を超えて高度に保存されている定常軽鎖(C<sub>L</sub>)及び定常重鎖ドメイン1(CH<sub>1</sub>)の領域にアニーリングするように設計された。挿入物のポリヌクレオチド配列は通常の配列決定法を使用して決定された。22A10のV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>アミノ酸配列は図7と8にそれぞれ示される。

【0246】

b) アクセプターヒトコンセンサスフレームワーク上への直接的超可変領域の移植

22A10のヒト化の最中に構築された変異体は、IgGの形態で評価され、又はファージ上にFabとして一価で提示された。この作業に使用されたファージミドは一価のFab-g3提示ベクターであり、単一のphoAプロモーターの制御下で2つのオープンリーディングフレームからなる。第一のオープンリーディングフレームは、アクセプター軽鎖のV<sub>L</sub>とCH<sub>1</sub>ドメインに融合したstIIシグナル配列からなり、第二はアクセプター重鎖のV<sub>H</sub>とCH<sub>1</sub>ドメインに融合したstIIシグナル配列からなり、マイナーファージコートタンパク質P3が続く。

10

【0247】

マウス22A10由来のV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインがヒトV<sub>L</sub>カッパI(V<sub>L<sub>K<sub>I</sub></sub></sub>)及びヒトV<sub>H</sub>サブグループIII(V<sub>H<sub>III</sub></sub>)コンセンサス配列に整列された。マウス22A10(mu22A10)抗体からの超可変領域は22A10移植片を生成するためにV<sub>L<sub>K<sub>I</sub></sub></sub>及びV<sub>H<sub>III</sub></sub>アクセプターフレームワーク中へ設計された。22A10のV<sub>L</sub>ドメインから、位置24-34(L<sub>1</sub>), 50-56(L<sub>2</sub>)及び89-97(L<sub>3</sub>)がV<sub>L<sub>K<sub>I</sub></sub></sub>へ移植された。22A10のV<sub>H</sub>ドメインから、位置26-35(H<sub>1</sub>), 49-65(H<sub>2</sub>)及び95-102(H<sub>3</sub>)がV<sub>H<sub>III</sub></sub>へ移植された(図7及び8)。CDRの定義は、それらの配列の超可変性(Wu, T. T. & Kabat, E. A. (1970))、それらの構造上の位置(Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987))及び抗原-抗体接触におけるそれらの関与(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))により定義される位置を含む。

20

【0248】

22A10移植片は各超可変領域に対して別個のオリゴヌクレオチドを使用して、クンケル変異誘発により生成された。重鎖あるいは軽鎖のどちらかに対して3つのリン酸化オリゴヌクレオチドが、最終容積が40µlで、50mMのTris pH7.5, 10mMのMgCl<sub>2</sub>中の571ngのクンケルプレートに加えられた。混合物は90で2分間、50で5分間アニールされ、次いで氷上で冷却された。10µlのアニールされたプレートは、室温で2時間、0.5µlの100mMのATP, 0.5µlの25mMのdNTPs(dATP, dCTP, dGTP及びdTTPの各々25mM), 1µlの100mMのDTT, 1µlの10XTMバッファー(0.5MのTris pH7.5, 0.1MのMgCl<sub>2</sub>), 80U T4リガーゼ及び4U T7ポリメラーゼを加えることにより総容積が13.6µlに充填された。10µlの充填され連結された生成物は次いでXL1-ブルー細胞中へ形質転換された(Stratagene)。正しいクローンがDNA配列決定により同定され、IgGとして発現された。

30

【0249】

c) 超可変領域のソフトランダム化

22A10移植片はソフトランダム化の戦略を使用して親和性成熟された。配列の多様性は、毒性オリゴヌクレオチド合成戦略を用いて、マウス可変領域配列に向かうバイアスが維持されるように、各超可変領域に別々に導入した(Gallop et al., J Med Chem 37:1233-51 (1994))。多様化した各位置において、野生型アミノ酸をコードするコドンは各位置における平均50%突然変異率をもたらすヌクレオチドの70-10-10-10混合物で毒されている。配列の多様性は、クンケル突然変異誘発を使用して22A10移植片の超可変領域に導入され、別々にソートされた6つのソフト無作為化ファージライブラリーを生成した。6つのライブラリーが作成され、各々は単一のソフト無作為超可変領域から成る。

40

【0250】

50

## d) ファージライブラリーの生成

各超可変領域に多様性を導入するように設計されたオリゴヌクレオチドは、37 で1時間、660 ngのオリゴヌクレオチド、50 mMのTris pH7.5, 10 mMのMgCl<sub>2</sub>, 1 mMのATP, 20 mMのDTT、及び5 Uポリヌクレオチドキナーゼを含有する20 µlの反応物中に別々にリン酸化された。

## 【0251】

各ライブラリーに対して、2 µlのリン酸化オリゴヌクレオチドが、最終容積が10 µlで、50 mMのTris pH7.5, 10 mMのMgCl<sub>2</sub>中の300 ngのクンケルテンプレートに加えられた。混合物は90 で2分間、50 で5分間アニールされ、次いで氷上で冷却された。アニールされたテンプレートは、室温で2時間、0.5 µlの10 mMのATP, 0.5 µlの10 mMのdNTPs (dATP, dCTP, dGTP及びdTTPの各々10 mM), 1 µlの100 mMのDTT, 1 µlの10 X TMバッファー(0.5 MのTris pH7.5, 0.1 MのMgCl<sub>2</sub>), 80 U T4リガーゼ及び4 U T7ポリメラーゼを加えることにより総容積が20 µlに充填された。次いで、これらの充填され連結された生成物は、各々XL1 - ブルー細胞中に形質転換され、37 で2時間、5 µg/mlのテトラサイクリンとM13/KO7ヘルパーファージ(MOI10)を含む0.5 mlの2YT中で増殖され、次いでプールされ50 µg/mlのカルベニシリンを含有する500 mlの2YTへ移され、37 で16時間増殖された。

10

## 【0252】

20

## e) ファージ選択

固体ファージセクションにおいて、293由来のヒト又はカニクイザルメソテリンが、マキシソープマイクロタイタープレート(Nunc, Rochester, NY)上の50 mMの炭酸水素ナトリウムpH9.6中において4 で一晩固定化された。プレートをカゼインブロッカーを使用して少なくとも1時間ブロックした(Pierce, Rockford, IL)。

## 【0253】

ファージを培養上清から回収し、5%の粉ミルクと0.05%のTween20(PBSBT)を含有するPBSに懸濁した。ファージライブラリーを添加し、1時間インキュベートした後、マイクロタイターウェルを0.05%のトゥイーン20(PBSBT)を含むPBSで十分に洗浄し、結合したファージを、20 mMのHCl、500 mMのKClで30分間ウェルをインキュベートすることにより溶出した。溶出したファージは、1 MのTris、pH8を用いて中和し、XL1 - ブルー細胞とM13/KO7ヘルパーファージを使用して増幅し、2YT, 50 µg/mlのカルベニシリン中、37 で一晩増殖させた。標的を含有するウェルから溶出されたファージの力価を、濃縮度を評価するために、非標的物を含有するウェルから回収されたファージの力価と比較した。

30

## 【0254】

溶液相ファージの選択については、293由来のヒト又はビオチン化カニクイザルのメソテリンが、5%粉ミルクおよび0.05%のTween20(PBSBT)を含むPBS中に懸濁させたファージに追加された。インキュベーション後に、ビオチン化メソテリンに結合したファージが、ストレプトアビジンでコートされたマイクロタイタープレート上にて5分間捕捉された。マイクロタイターウェルを0.05%のトゥイーン20(PBSBT)を含むPBSで十分に洗浄し、結合したファージを、20 mMのHCl、500 mMのKClで30分間ウェルをインキュベートすることにより溶出した。溶出したファージは、1 MのTris、pH8を用いて中和し、XL1 - ブルー細胞とM13/KO7ヘルパーファージを使用して増幅し、2YT, 50 µg/mlのカルベニシリン中、37 で一晩増殖させた。標的を含有するウェルから溶出されたファージの力価を、濃縮度を評価するために、非標的物を含有するウェルから回収されたファージの力価と比較した。

40

## 【0255】

溶液相ファージの選択については、選択ストリンジェンシーを、溶液中で低下するピオ

50

チン化メソテリンの濃度に結合したファージを捕捉しその後10分間ニュートラビジン上で捕捉すること(速度選択オン)、及び弱く結合したファージを洗い流すことができるように洗浄時間と温度を上昇させること(速度選択オフ)の両方により、徐々に増加させた(Fuh et al., J. Mol. Biol. 340:1073-1093 (2004)).

#### 【0256】

##### f) IgG産生

スクリーニング目的のために、IgG変異体は最初に293細胞で産生された。VL及びVH(25 $\mu$ g)をコードするベクターをFUGENEシステムを使用して293細胞にトランスフェクトした(Roche, Basel, Switzerland)。500 $\mu$ lのFuGeneは、FBSを含有しない4.5mlのDMEM培地と混合され、室温で5分間インキュベートした。各鎖(25 $\mu$ g)がこの混合物に対して添加され、室温で20分間インキュベートし、次いで、5%のCO<sub>2</sub>中37 $^{\circ}$ Cで一晩のトランスフェクションのために、5本のT-150フラスコに移された。翌日、トランスフェクション混合物を含有する培地は除去され、0.1ml/Lの微量元素(A0934)および10mg/Lのインスリン(A0940)を含む23mlのPS04培地で置換された。細胞を更に5日間インキュベートした後、培地を5分間の1000rpmで回収し、0.22 $\mu$ mの低タンパク質結合フィルターを使用して滅菌濾過した。サンプルは、全ての125ml培地について2.5mlの0.1%PMSFを添加後に4 $^{\circ}$ Cで貯蔵することができた。IgGをプロテインGアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

10

#### 【0257】

##### g) 親和性決定

ヒト又はカニクイザルのメソテリンの22A10IgG変異体の親和性を、BiacoreTM-2000を使用して表面プラズモン共鳴によって決定した。Biacoreの研究品質等級CM5チップが、Biacoreからのアミンカップリングキットを使用して組換えヒト又はカニクイザルのメソテリン由来の大腸菌のおよそ110RUで固定された。各22A10変異体の段階的2倍希釈物(0.05%のTween20を含有するPBS中に0.488から1000nM)が30 $\mu$ l/分の流速で注入された。各サンプルは5分間の会合と3~5分間の解離により解析された。各注入の後、チップは10mMのグリシンpH1.7を使用して再生された。結合応答は、同様の密度で固定化された無関係のIgGとともにフローセルからRUを差し引くことにより補正された。 $k_{on}$ と $k_{off}$ の同時フィッティングの1:1Langmuirモデルが動力的解析に用いられた。

20

30

#### 【0258】

##### h) 結果

22A10のヒト化のために使用したヒトアクセプターフレームワークはコンセンサスヒトカップIのVLドメイン及びコンセンサスヒトサブグループIIIのVHドメインに基づいていた。mu22A10のVL及びVHドメインはヒトカップI及びサブグループIIIと整列され;各相補性決定領域(CDR)が同定されてヒトアクセプターフレームワークへ移植され、IgGとして発現され得る又はファージ上にFabとして呈示され得るCDRグラフトを生成した(図7及び8)。

#### 【0259】

6つのソフトランダム化ライブラリが生成され、そこでは多様性が22A10CDR移植片の各CDRに別々に導入された。ライブラリーが、ヒト及びカニクイザルのメソテリンに対して(293細胞由来、カニクイザル又はヒトメソテリンのグリコシル化形態への結合を改善する目的で)、固相及び溶液選別戦略の両方を使用してパンされた。非標識化標的の追加はより速い解離速度(off rates)を持つクローンを除去するために使用することができる一方で、溶液選別法はビオチン化標的濃度及びファージ捕捉時間の操作を通じて、高親和性クローンが選択されることを可能にする(Fuh et al. J. Mol. Biol. 340:1073-1093 (2004)).各ライブラリーの最後のラウンドからのクローンがDNA配列解析のために採取され、CDR-L2及びCDR-H2を除いて各CDRで標的された配列の変化が明らかにされ、抗原結合を改善するための多くの可能なバ変形を示唆し

40

50

ている。ヒト又はカニクイザルのどちらかのメソテリンで選択された幾つかのクローンは、CDR-H2に変化があり、最も豊富なものは位置99でチロシンからイソロイシンへの変化を有していた。この変異体は、幾つか他のと一緒に、IgGとして発現され、ピアコア及びキャッチャー解析によりメソテリンへの結合について特徴づけられた(図9A)。いくつかのクローンは22A10の移植片の親和性を超えていた。

#### 【0260】

ヒト化22A10変異体が、安定的にメソテリンを発現する細胞株からメソテリンを免疫沈降するために使用された。異なる種のgDタグ付きメソテリンを安定的に発現するBJAB細胞が、図9Bに示されるように、ヒト化22A10変異体(Gr, 移植片; v1(1), v17(17)及びv83(83))、又は比較のためにh7D9.v3、h5B6抗-gD又はhIgG陰性コントロールと共に免疫沈降された。免疫沈降物が洗浄され、gD-メソテリンを検出するために、マウス抗-gD抗体でウエスタンブロットした。h2210.v83は、3種のメソテリン全てを免疫沈降するその性能において最良のh22A10変異体であった(カニクイザル、上; ヒト、中央; 及びラット、下のブロット)。一番右のレーンは、全発現レベルの比較のために20%の入力溶解物(免疫沈降せず)を示している。分子量マーカー(kDa)は左側に示されている。

10

#### 【0261】

ヒト化22A10.v83についての変更の概要ヒトコンセンサスキャパIのVL及びサブグループIIIのVHへの6つのマウス22A10 CDR(位置24-34(L1), 50-56(L2), 89-97(L3), 26-35(H1), 49-65(H2)及び95-102(H3)として定義される)の移植片から開始して、CDRソフト無作為化が、ヒト及びカニクイザルのメソテリンへの結合を改善するCDR H3(Y99I)の変化を同定するために使用された。22A10.v83は高親和性結合を示し、かつまた、他のヒト化変異体に比してより多くの結合部位を認識する能力を示した。

20

#### 【0262】

この出願を通じて、マウスモノクローナル抗体の7D9と22A10は、別の方法では7D9、m7D9又はmu7D9; 及び22A10、m22A10又はmu22A10として言及される。ヒト化モノクローナル抗体の7D9.v3及び22A10.v83は、別の方法では、他に指定されない限り、7D9.v3、h7D9.v3又はhu7D9.v3; 及び22A10.v83、h22A10.v83又はhu22A10.v83としてそれぞれ言及される。

30

#### 【0263】

##### D. 種の交差反応性

モノクローナル抗体は、それらが、ヒト以外の種由来のメソテリンと交差反応するかどうかを決定するために試験した。図11は、ヒト(配列番号43)、カニクイザル(配列番号46)、ラット(配列番号47)及びマウス(配列番号48)のメソテリンの間の配列相同性を示す。網掛け(shaded)残基は、少なくとも二つの種の間で同一である。網掛けの無い残基は、4種の少なくとも二つの間で異なる。図12は、gDエピトープタグ付きメソテリン(ヒト、カニクイザル、ラットまたはマウスメソテリン)で安定的にトランスフェクトされ; 10 µg/mlのh7D9.v3、h22A10.v83又は抗gD h5B6で染色され; Alexa647抗ヒト抗体で検出された; 293細胞のFACS解析の結果を示す。トランスフェクトされていない293細胞は、通常はメソテリンを発現しない("WT")。h7D9.v3はヒトメソテリンに特異的であるが、h22A10.v83は、ヒト、カニクイザルおよびラットメソテリンに結合するが、マウスメソテリンに結合しない。抗-gD染色はマウスメソテリンが実際に発現していることを検証した。

40

#### 【0264】

##### E. 抗体親和性

h7D9.v3及びh22A10.v83の相対的結合親和性を決定するために、スキッチャード分析を標準的手順に従って(Holmes et al., Science 256:1205-1210 (1992))

50

)、簡単には、非標識化抗体濃度を増加させつつ、離脱細胞を $[I^{125}]$ で標識したh7D9.v3又はh22A10.v83とともに2時間室温でインキュベートし、洗浄し、シンチレーションカウンティングによって細胞に結合した放射能を定量することにより行った、データは、新しいリガンド(New Ligand)プログラムで非線形回帰曲線フィッティングにより分析し(Genentech, Inc., South San Francisco, CA)、Kd値を見積もった(Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220-239 (1980))。

#### 【0265】

図13に示されるように、h7D9.v3は、安定的にトランスフェクトされた293細胞株、BJAB細胞株及びHT1080細胞株で発現されるgDタグ付きヒトメソテリンに対してそれぞれ0.2, 0.25及び0.97 nMの親和性で結合した。これらのKd値は、4つ臓器と2つの卵巣細胞株において内因性メソテリンで見られる範囲を包含する(0.41 - 1 nM)。同じ安定な細胞株で発現されるヒトメソテリンに対するh22A10.v83の親和性は、内因性ヒトメソテリンに対するその親和性(~9 - 10 nM)に従って、それぞれ2.7, 1.8及び6.2 nMであった。h22A10.v83は安定的にトランスフェクトされた293細胞とBJAB細胞に発現されたラットメソテリンに、それぞれ7.3 nM及び2.7 nMの親和性で結合し、これは正常な胸膜細胞株4/4-RM4で内因性のラットメソテリンに対して観察された6.2 nMでのKdに一致する(Aronson et al., In Vitro 17: 61-70 (1981))。

#### 【0266】

##### F. エピトープ群

7D9と22A10が図3に記載されている他の抗メソテリン抗体と同じエピトープを共有するかどうかを決定するために、モノクローナル抗体のエピトープマッピングが、標準的なクロス・ブロッキングELISAにより実施された。96穴のNunc Immunosorbプレート(Nalge Nunc, USA)が、コーティングバッファー(50 mMの炭酸ナトリウム、pH 9.5)中の $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のヒトメソテリン細胞外ドメインの $100 \mu\text{L}$ と共に4で一晚コーティングされた。続く全ての工程は室温で実施された。 $200 \mu\text{L}$ の洗浄バッファー(0.05%のTween 20、pH 7.4を含有するPBS)で3回洗浄後、プレートをELISAバッファー(0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)と0.05% Tween 20、pH 7.4を含有するPBS)で60分間ブロックした。次いでマウスモノクローナル抗体7D9又は22A10がELISAバッファーに $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ で2時間添加された(ウェルあたり $100 \mu\text{L}$ )。洗浄無しで、全試験抗メソテリン抗体のビオチン化バージョンが最終濃度が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで30分間添加された。 $200 \mu\text{L}$ の洗浄バッファーで3回洗浄後、任意のビオチン化抗体の結合が、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(Zymed; Carlsbad, CA)を30分間1:5000の希釈度で添加することによって検出された。上記のように3回の洗浄後、 $100 \mu\text{L}$ の発色性3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質を5分間添加した(BioFX Laboratories; Owings Mills, MD)。発色反応は $100 \mu\text{L}$ の停止試薬の添加により停止され(BioFX Laboratories)、吸光度をウルトラマイクロプレートリーダーで $620 \text{nm}$ で読み取った(Biotek Instruments; Winooski, VT)。ビオチン化抗体のそれぞれの可能な結合の最大の程度を、非ビオチン化抗体7D9と22A10の欠損下でそれらをメソテリンとともにインキュベートすることにより並行して測定した。

#### 【0267】

結果を図14に示す。9つのビオチン化抗メソテリン抗体のいずれかによるシグナル(\*)は、一次抗体をめぐる競合の欠如を示している(比較のために一次抗体の欠損下での各ビオチン化抗体による最大結合はまた、右の群に表示されている)。7D9(図14で7D9.5.2として言及)は、7D9が存在するときには結合できない唯一の抗体であるが、一方、22A10は通常は結合する(左の群における黒いバー)。逆に、22A1

10

20

30

40

50

0 が事前に結合されている場合、22A10 は結合できない（中央の群の最後のバー）が一方7D9 および他の抗体は可能である。従って、7D9 と22A10 は互いに競合しないだけでなく、各々は他の7つの抗体とは区別されるエピトープに結合する。7D9 はそれ自身によって競合されるが、任意の別の抗体によってはされない（ELISA コート抗体7D9 又は22A10 の欠損下でプレート上のメソテリンに対する各々の抗体結合についての最大シグナルに対して各バーを比較せよ）。同様に、22A10 のみがそれ自身と競合するが、7D9 を含む別の抗体とは競合しない。従って、7D9 と22A10 はお互いに対して及び他の単離されたモノクローナル抗体に対して異なるエピトープを有する。

#### 【0268】

G. ヒト：マウス及びカニクイザル：ヒトメソテリンキメラを使用するエピトープマッピング及び変異解析

h7D9 . v3 を固定化ヒトメソテリンに結合させ、次いでこれらをトリプシンとインキュベートし、抗体で保護された残りのペプチドを溶出して質量分析により同定するトリプシンペプチドマッピング実験を実施した。それらの実験は、配列番号43のアミノ酸133 - 183 をh7D9 . v3 結合部位として結びつけた。この領域を確認するために、我々は、マウスメソテリン（コンストラクト#385）又はカニクイザルメソテリン（コンストラクト#383）でなく、ヒトメソテリン（図15に示されるコンストラクト#387）のと7D9 の反応をキメラを生成するために利用し、我々はそれを切断変異体よりも良好にフォールドするはずであると予測した。我々は、マウスのコンストラクトにヒトの配列を導入するために、アミノ酸131でのサイレントMfeI部位（QLをコードする）及びアミノ酸213でのサイレントBglII部位（DLをコードする）を用いて、ヒト：マウスメソテリンキメラ（#398及び#399）を構築した。更に、カニクイザルのコンストラクト（#400）が作成され、そこではアミノ酸131 - 178がMfeI部位を介してヒトメソテリンのそれらと置換された。各コンストラクトは発現を確認するためのN - 末端のgDタグ（図示せず）を有していた。

#### 【0269】

図15に示されるgDタグ付きのGPI固着されたメソテリンコンストラクトは一過性に293細胞で発現され、0.02 µg/mlのマウス7D9、1 µg/mlのマウス22A10、又は1 µg/mlの抗gDタグにより染色された（発現差異レベルを標準化するため）。Alexa488抗マウス抗体による検出後、サンプルが洗浄され、FACSにより解析され、蛍光強度データは、野生型293陰性コントロール細胞上の任意のバックグラウンド染色を差し引いた後で、抗-gDシグナルに標準化した。図16に示されるように、7D9はヒト：マウスキメラ#399（ヒトアミノ酸1~213を有する）に結合するが、全長マウスメソテリン#385又は#398（ヒトアミノ酸の1~131からのみを有する）の何れにも結合せず、7D9がアミノ酸131と213の間のエピトープに結合することを示唆している。カニクイザル：ヒトのキメラ#400（ヒトアミノ酸131 - 178を有する）に結合するその能力、しかし全長カニクイザル（#383）でなく、はアミノ酸131と178の間にエピトープを制限した。（22A10よりも7D9で見られる比較的低い結合の%は50倍低い7D9の抗体濃度によるものである）。

#### 【0270】

同じキメラが、ラット、カニクイザル及びヒト（ただし、マウスでなく）反応性22A10エピトープをマッピングするために使用された。結合はキメラ#399、しかし#398でなく、を発現する細胞で観察された。従って、22A10はアミノ酸131 - 213の間の決定的残基を持つエピトープに結合する。（図16）。

#### 【0271】

7D9と22A10はお互いに競合しないゆえ（図13）、それらはおそらく、アミノ酸131から213内の異なるエピトープに結合する。それらの異なるエピトープを同定するために、ヒトのメソテリンの2 - 4アミノ酸伸張が、#399キメラグラウンドにおいて対応するマウスのアミノ酸に変異された。4種の間でアミノ酸132 - 212のアラインメントが、15の変異体の位置を示す番号付きボックスを付して図17に示されてい

10

20

30

40

50

る。図17の下に表に一覧された15の変異体の各々において、マウスの配列(下)に変異されたヒトの配列(上)が示されている。(記:変異11は成功裏には生成されなかった。)

#### 【0272】

図17から変異体11を除く全変異体が293細胞に発現され、図16にあるように、各抗体のヒト化バージョン1(即ち、h7D9.v3, h22A10.v83及びh5B6抗gDタグ(陽性コントロール))の5µg/mが使用されたことを除き、検出のために使用されるAlexa488抗マウス抗体によりFACS解析を受けた。結果は発現レベルに対して正規化するために抗gDシグナルの割合として示される蛍光データとともに図18Aに示される。(記:変異体#13は293細胞中で発現しなかったのでデータセットから削除されている)。h7D9.v3は#6と#9を除いて全変異体に結合したが、一方h22A10.v83は#15を除いて全変異体に結合した(矢印)。

10

#### 【0273】

異なる種のメソテリンのアラインメントにより、h7D9.v3エピトープにおいて鍵となる残基が、ヒト配列と非交差反応性カニクイザル配列の間で異なる2つのアミノ酸に特定された:変異体#6のE153及び変異体#9のD174。抗体結合のためのそれらの残基の重要性は、対応するヒト残基に対してカニクイザルのメソテリンで同等の残基を変異させることにより確認した(即ち、R153をE及びG174をD)。h7D9.v3、これは、それ以外の場合カニクイザルのメソテリンに結合しない、はカニクイザルのメソテリン変異体に結合することができた(図18B)。ヒトメソテリンの配列の残基E152がQに変異されたさらなる研究は、h7D9.v3結合の障害をもたらし、残基E152が抗体結合において役割を果たしていることを示唆している。

20

#### 【0274】

最近予測されたメソテリンのアルマジロ様リピート構造に基づいて(Sathyanarayana et al., BMC Structural Biology 9:1 (2009))、7D9抗体は、おそらくメソテリンの内側ヘリックス4と外側ヘリックス5を架橋する可能性がある。同様に、h22A10.v83は、マウスではなく、ラットと交差反応するため、変異体#15の残基E211(上掲Sathyanarayanaらの外側ヘリックス6にある)はそのエピトープの重要な決定因子である可能性がある。図19は、h7D9.v3とh22A10.v83によって結合される残基を示している。

30

#### 【0275】

H. h7D9.v3の結合はグリコシル化により障害されない。

h7D9.v3がグリコシル化メソテリンに結合するかを決定するために、C末端にHisタグを付けたヒトメソテリンがCHO細胞で発現され、精製され、SDS-PAGEゲル上のクーマシーブルー染色により示されるように、MonoSカラムの電荷に従って、高(画分A11)、中間(A12)、低(B1)及び低から無(B5)に更に分離された。(図20、上段左)。各画分を事前に結合したh7D9.v3でチップ上に流動させ、オンとオフの割合が測定され、各画分(図20左下)に対しての同一の親和性(1.5nM)が明らかにされ、h7D9.v3の結合は、グリコシル化によって障害されないことを示唆している。これらのデータは、h7D9.v3は、安定的にgD-ヒトメソテリンを発現する(そのgDエピトープタグはグリコシル化部位を欠いている)HT1080細胞由来のヒト化抗-gD h5B6抗体と同じバンドの全てを免疫沈降させることができることを示すことによって確認され、h7D9.v3は、グリコシル化状態に関係なくヒトのメソテリンを免疫沈降することができることを示唆している。対照的に、ヒト化22A10は優先的に低分子量(少なくともグリコシル化)の種を免疫沈降させ、22A10の結合はグリコシル化により影響され得ないことを示唆している。(図20、右)。

40

#### 【0276】

h7D9.v3と比較して、試験抗体のグリコシル化メソテリンへ結合する能力を評価するためにFACSアッセイが実施され、そこではOVCA3細胞への試験抗体の結合がOVCA3細胞へのh7D9.v3の結合と比較される。適切な2次抗体がOVCA

50

R3細胞へのh7D9、v3及び試験抗体の結合を検出するために使用された(例えば、Alexa647抗ヒト抗体がh7D9、v3の結合の検出に使用される)。

【0277】

I.モノクローナル抗体19C3はメソテリンに対するMUC16の相互作用を遮断するモノクローナル抗体は、それらがメソテリンに対するMUC16の結合を遮断することができるかどうかを決定するために試験された。MUC16の精製ビオチン化断片(Muc16-Bt、3回のムチン繰り返しを持つ)の、A431細胞(通常はメソテリンを発現しない)上で安定的に発現されるメソテリンへの結合が図21(「抗体無し(no Ab)」)、左パネルに示される。19C3(しかし7D9ではない)の5倍モル比を用いた細胞のプレインキュベーションは、図21、左パネルに示されているように、ストレプトアビジン-PEによるFACSによって検出されるように、メソテリンに対するMUC16-Btの結合を阻害した。逆に、組換えC末端his8タグ付きメソテリン(293細胞から精製)の安定的にMUC16を発現するPC3細胞への結合が、指定された抗メソテリン抗体の5倍モル過剰の非存在下又は存在下で評価され(図21右パネル)、これらはAlexa647抗his6を抗体でFACSにより検出した。19C3(7D9または22A10でなく)とメソテリンのプレインキュベーションは、MUC16発現細胞に対するメソテリンの結合を阻害する(図21、右パネル)。実際には、7D9と22A10は、このアッセイにおいてMUC16に対するメソテリンの結合を強化するように見える。

10

【0278】

20

J.様々な癌のタイプにおけるヒトメソテリンの罹患率

種々の癌におけるヒトメソテリンの発現は、免疫組織化学法を用いて解析した。膵管腺癌(図22)、卵巣漿液腺(図23)及び非小細胞肺癌(図24)のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)腫瘍マイクロアレイ(腫瘍ごとに1mmのコア)が、顕微鏡スライド上に切片化され、脱パラフィン処理され、希釈アルコール系を通して再水和された。スライドは、標的回復溶液(Dako, Glostrup, Denmark)を使用して抗原回復のために前処理され、反応停止し、ブロックされ、そしてダコの自動染色液上で60分間、10µg/mlのマウス抗ヒトメソテリンモノクローナル抗体19C3で染色された。洗浄後、19C3はビオチン化抗マウス抗体で、続いてABC複合体(VECTASTAIN ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA)で検出され、そしてDAB(Pierce Laboratories)を色素原として視覚化した。次いで、スライドをマイヤーズヘマトキシリンで対比染色し、アルコール及びキシレンの系列で脱水し、有機封入剤を使用してカバーガラスを装着した(PermaMount, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)。

30

【0279】

メソテリンの染色(茶色)は、強度(茶色染色の暗さ)並びに染色の幅を考慮して、以下の方式に従って訓練された病理学者によってスコア化された。各メソテリンスコアの代表例は、それぞれの腫瘍タイプに対して図22-24に示されている。

40

0(陰性):腫瘍細胞の>90%で非常に弱いか又は全く染色無し

1+(軽度):優勢な染色パターンは弱い

2+(中等度):優勢な染色パターンは、腫瘍細胞の大部分(>50%)で適度に強い

3+(強):優勢な染色パターンは、腫瘍細胞の大部分(>50%)で強い

【0280】

図22は、膵管腺癌の70%が、1+、2+又は3+レベルでの染色を示し、メソテリン陽性であることを示しており、33%は2+又は3+の染色を示している。図23は、卵巣漿液腺癌98%が、メソテリン陽性であり、74%が2+又は3+のレベルでの染色を示している。また、卵巣漿液性腺癌からの8つの試験された転移の全てがメソテリン陽性であり、原発性卵巣腫瘍は転移後にメソテリンの発現を失わないことを示唆している。

50

図 2 4 は、44% の非小細胞肺癌 (NSCLC、腺癌のサブタイプ) が、メソテリン陽性であり、26% が 2 + 又は 3 + のレベルでの染色を示している。更に、メソテリン陽性原発性 NSCLC 患者の腫瘍に由来する試験され適合した転移の 8 つのうち 3 つ (38%) が、メソテリン陽性染色を保持していた。

#### 【0281】

メソテリンはまた、19C3 抗体を用いて IHC により決定されるように、中皮腫や子宮内膜癌で発現している。

#### 【0282】

カニクイザルにおけるメソテリンの発現も調べた。ヒト (ホルマリン固定パラフィン包埋切片) 及びカニクイザル (凍結切片) からの肺胸膜と心臓心膜中皮の切片が切片化され、それぞれ、19C3 モノクローナル抗体又は 22A10 モノクローナル抗体で染色された。ヒト中皮は、19C3 で特異的に染色し (図 2 5、左)、カニクイザル中皮は 22A10 で特異的に染色した (図 2 5、右)。これらの結果は、22A10 は、ヒトと同様の分布を有する、内因性カニクイザルメソテリンを認識できることを示している。

10

#### 【0283】

##### K. 抗メソテリン抗体薬物コンジュゲートの製造

抗メソテリン抗体薬物コンジュゲート (ADC) は、h7D9.v3 と h22A10.v83 を薬物リンカー部分 MC - vc - PAB - MMAE にコンジュゲートすることにより生成され、それは上のセクション II.D に図示されている。便宜上、薬物リンカー部分 MC - vc - PAB - MMAE は、実施例及び図中において、「vcMMAE」又は「VCE」として別に言及される。(例えば、h7D9.v3 - MC - vc - PAB - MMAE はこれらの実施例において、及び図において、h7D9.v3 - vcMMAE 又は h7D9.v3 - VCE と言及される。) コンジュゲーションに先立って、抗体は、国際公開第 2004/010957 A 2 号に記載された方法に従う標準的な方法を用いて、部分的に TCEP で還元した。部分的に還元された抗体は、Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784 及び米国特許出願公開第 2005/0238649 A 1 号に記載の方法に従い、標準的な方法を用いて薬物リンカー部分にコンジュゲートされた。簡単には、部分的に還元された抗体は、システイン残基への該部分のコンジュゲーションを可能にするために、薬物リンカー成分と結合された。コンジュゲーション反応を急冷し、ADC を精製した各 ADC に対する薬物負荷 (抗体当たりの薬物部分の平均数) を決定し、

20

30

#### 【0284】

##### L. インビボ HPAC モデルにおける h7D9.v3 - vcMMAE の有効性

h7D9.v3 - vcMMAE の有効性を膵臓腺癌異種移植モデルを用いて調べた。HBS5 中の 500 万個の HPAC 細胞 (19C3 による IHC によりメソテリン陽性 (2+)) を SCID ベージュ・マウスに皮下注射し、腫瘍に、1.1, 2.7, 5.5, 11, 及び 16.4 mg/kg で h7D9.v3 - vcMMAE を (3.5 MMAE / 抗体で)、又は 5.10 及び 15 mg/kg で h5B6 抗 gD - vcMMAE を (抗体あたり 3.3 MMAE とともに)、又は 15 mg/kg のネイキッド h7D9.v3 を (MMAE 無し) 投与した。図 2 6 に示されるように、実質的な腫瘍増殖阻害は 5.5 mg/kg の h7D9.v3 - vcMMAE で達成され、退縮は 11 - 16 mg/kg の h7D9.v3 - vcMMAE で達成されたが、有意な効果は 15 mg/kg の gD - vcMMAE 又はネイキッド抗体では観察されなかった。全体的な増殖率に基づいてモデル化されたカーブのフィットが示されている。図 2 6 の右下のパネルは、FACS 解析、HPAC 細胞における h7D9.v3 の内在化、IHC を示す。

40

#### 【0285】

##### M. 原発性膵臓腺癌モデルにおける h7D9.v3 - vcMMAE の有効性

h7D9.v3 - vcMMAE の有効性が原発性膵臓腺癌モデルにおいて調査された (Oncotest, GmbH, Germany)。原発性ヒトメソテリン陽性膵腫瘍のかたまり (IHC によりメソテリンを 1 - 2+ で発現する) を、5.10 及び 20 mg/kg

50

g の h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E ( 3 . 5 M M A E / 抗体 ) を投与された雌の N M R I ヌードマウスに皮下移植した。平均腫瘍体積 ± 標準偏差が図 2 7 にプロットされている。有意な腫瘍増殖阻害は h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E のすべての用量で見いだされた。原発性膵臓腫瘍の I H C が右側に示される。

【 0 2 8 6 】

N . 卵巣癌モデルにおける h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E の有効性

h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E の有効性を膵臓腺癌異種移植モデルを用いて調べた。1 0 0 0 万個の O v C a r 3 x 2 . 1 細胞 ( 1 9 C 3 による I H C によりメソテリン陽性 ( 2 - 3 + ) ) が C B 1 7 S C I D ベージュマウスの乳腺脂肪体に注入され、続いて 1 , 2 . 5 , 5 , 1 0 及び 1 5 m g / k g の h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E ( 3 . 5 M M A E / 抗体 ) 又は h 5 B 6 抗 g D - v c M M A E ( 3 . 3 M M A E / 抗体 ) が投与された。図 2 8 に示されるように、中程度の活性が 2 . 5 m g / k g の h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E で見られ、退縮は 5 m g / k g 以上で見られたが、抗 g D - v c M M A E は 5 m g / k g 未滿で活性を示さなかった ( 1 0 m g / k g で中程度の活性を示すだけで 1 5 m g / k g では腫瘍は静止した ) 。全体的な増殖率に基づいてモデル化されたカーブのフィットが示されている。図 2 8 の右のパネルは、F A C S 解析、O v C a r 3 x 2 . 1 細胞における h 7 D 9 . v 3 の内在化、I H C を示す。

10

【 0 2 8 7 】

O . 肺癌モデルにおける h 7 D 9 . v 3 0 - v c M M A E の有効性

h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E の有効性を肺癌 ( 扁平上皮癌 ) 異種移植モデルを用いて調べた。5 0 0 万個の H 2 2 6 x 2 細胞 ( I H C によりメソテリン陽性 ( 3 + ) ) が、C B 1 7 S C I D マウスの脇腹に H B S S : マトリゲルの 5 0 : 5 0 ミックスで注入された。平均腫瘍体積 ± 標準偏差が図 2 9 にプロットされる。h 7 D 9 v 3 - v c M M A E ( 3 . 5 M M A E / 抗体 ) は 5 m g / k g で中程度の活性を示し、1 0 m g / k g で腫瘍は静止したが、抗 g D - v c M M A E コンジュゲート : ( 3 . 9 7 M M A E / 抗体 ) は両方の用量において有意な活性が無かった。図 2 9 の右のパネルは、F A C S 解析、H 2 2 6 x 2 細胞における h 7 D 9 . v 3 の内在化、I H C を示す。

20

【 0 2 8 8 】

P . h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E と h 2 2 A 1 0 . v 8 3 - v c M M A E は類似の有効性を有する。

30

h 2 2 A 1 0 . v 8 3 - v c M M A E に比べた h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E の有効性が調べられた。g D ヒトメソテリン ( 左 ) 又は g D カニクイザルメソテリン ( 右 ) のどちらかを安定的に発現する 2 0 0 0 万個の B J A B 細胞を、H B S S バッファー中で C B 1 7 S C I D マウスに皮下接種した。マウスは、( B J A B - g D ヒトメソテリンを接種されたマウスに ) h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E 又は ( B J A B - g D カニクイザルメソテリンを接種されたマウスに ) h 2 2 A 1 0 . v 8 3 - v c M M A E を 0 . 5 又は 2 m g / k g で投与され、又は陽性コントロールとして及び 2 種類の細胞株の間での発現の任意の相違に対する正規化群として使用される抗 g D - v c M M A E を 2 m g / k g で投与された。平均腫瘍体積 ± 標準偏差が図 3 0 にプロットされている。h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E と h 2 2 A 1 0 . v 8 3 - v c M M A E の両方が、B J A B - g D ヒトメソテリン腫瘍及び B J A B - g D カニクイザルメソテリン腫瘍のそれぞれに対して、2 m g / k g で、g D - v c M M A E コントロールよりも良好な活性を示した。この実験における陰性コントロールは、v c M M A E にコンジュゲートした無関係であった抗体であり、それは有意な活性を示さなかった。

40

【 0 2 8 9 】

h 2 2 A 1 0 . v 8 3 - v c M M A E の活性を更に評価するために、図 2 9 の H 2 2 6 x 2 腫瘍と図 2 8 に説明されるように増殖した O v C a r 3 x 2 . 1 腫瘍に指定された濃度の h 7 D 9 . v 3 - v c M M A E 及び h 2 2 A 1 0 . v 8 3 - v c M M A E ( 3 . 5 3 M M A E / 抗体 ) 、又は陰性コントロールとして抗 g D - v c M M A E が投与された。平均腫瘍体積 ± 標準偏差が図 3 1 にプロットされている。h 7 D 9 . v 3 と比較して、F A

50

C Sによるこれらの細胞株の両方に対するネイキッドh 2 2 A 1 0 . v 8 3の著しく弱い結合にも関わらず、h 2 2 A 1 0 . v 8 3 - v c M M A Eは、H 2 2 6 x 2モデルにおいてh 7 D 9 . v 3 - v c M M A Eと同様に効果的であり(左上パネル)、6 m g / k gを投与後の腫瘍の速い退縮によって示されるように、O v C a r 3 x 2 . 1モデルにおいてごくわずかに活性が小さかった(右上パネル)。

【0290】

Q . M U C 1 6とメソテリンは「二重陽性」細胞株で複合体を形成する。

細胞株でのM U C 1 6とメソテリンとの相互作用を調べた。メソテリンおよびM U C 1 6の両方を発現するO v C a r 3細胞を、1%のN P 4 0緩衝液中で溶解した。図32の左パネルに示されるように、溶解物をm 7 D 9またはアイソタイプコントロールI g Gで免疫沈降させ、抗M U C 1 6抗体(上プロット)またはh 7 D 9(下のプロット)でウエスタンプロットを行い、メソテリン:M U C 1 6複合体又は全メソテリンをそれぞれ検出した。(20%の非免疫沈降インプットが左レーンに示される。)m 7 D 9はO v C a r 3細胞溶解物からメソテリンとM U C 1 6を共免疫沈降することができた。その結果は、M U C 1 6は、メソテリンおよびM U C 1 6の両方を発現する細胞株(すなわち、「二重陽性」細胞株)においてメソテリンと複合体を形成することを示している。

【0291】

図32、右パネルに示されるように、メソテリン又はM U C 1 6の何れかに対する抗体が、指定された細胞株が増殖する条件培地からそれらのタンパク質を免疫沈降させるために使用された。その細胞株は、メソテリンのみ(H P A C S)、M U C 1 6のみ(A 4 3 1)発現する、何れも発現しない(H 5 2 0)、又は両方を発現する(O v C a r 3, C A P A N - 2, E K V X及びO v C a r 4 2 9細胞)。抗メソテリンキメラ抗体c h 7 D 9(上と下のパネル)又は抗M U C 1 6のみ1 6抗体(中央パネル)が免疫沈降に使用された。洗浄した免疫沈降物はマウス抗メソテリン抗体2 E 5(上)又はマウス抗M U C 1 6 Bドメイン(M 1 1様)抗体1 . B . 8 2 3でウエスタンプロット(W B)した(U S B i o l o g i c a l, S w a m p s c o t t, M A;中央と下のパネル)。従って、上のパネルはメソテリンを発現する細胞株からの免疫沈降したメソテリンを示し、中央パネルはM U C 1 6を発現する細胞株からの免疫沈降したM U C 1 6を示し、下のパネルは、両方のタンパク質を発現する細胞株(二重陽性細胞株)に特異的である、共免疫沈降したメソテリン:M U C 1 6複合体を示す。これらの結果は、メソテリンはM U C 1 6に結合しつつ培地中に離脱することが可能であることを示唆している。従って、本発明の抗体および免疫複合体は、二重陽性の癌を含む、メソテリン陽性癌を治療するために有用である。

【0292】

R . 7 D 9でなく、1 9 C 3はメソテリンから事前に結合したM U C 1 6を外す。

M U C 1 6の存在下でメソテリンに対する1 9 C 3の結合を調べた。M U C 1 6ビオチン(1 u g / m l又は9 . 2 n M)を、メソテリンを発現するH T 1 0 8 0細胞に事前に結合させた。1 9 C 3(5 u g / m l)が、事前に結合したM U C 1 6と置換するかどうかを決定するために添加された。M U C 1 6 - ビオチンをS A P E検出試薬を用いて検出し、結合した抗体をA l e x a 4 8 8抗マウス抗体を用いて検出した。図33は、1 9 C 3が実際にM U C 1 6と置換し、メソテリンに結合することができたことを示している。M U C 1 6結合部位の外側のメソテリンの領域に結合する抗体7 D 9(3 3 n M)が、陰性コントロールとして使用され、期待通りに、事前に結合したM U C 1 6を置換することができなかった。追加実験では、1 9 C 3はまた、0 . 1 u g / m lでM U C 1 6を置換するが、一方抗体2 E 5は5 u g / m lでのみでM U C 1 6を置換することができる(データ非表示)ことを実証した。

【0293】

前述の発明は、理解を明確にする目的のために例示および実施例によってある程度詳細に説明してきたが、説明や例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。すべての特許および本明細書に引用される科学文献の開示は、参照によりその全体

10

20

30

40

50



【 図 3 】

抗メソリンモノクローナル抗体

mAb	アイソタイプ	エピトープ群	エピトープ領域	muc16の結合をブロッカーする?	Kd (nM) ピアコア
7D9	G1	A	152-175	Enhances	0.23
19C3	G2b	C	1-70	YES	0.06
2E5	G2	C	1-70	YES	0.49
8B11	G1	B1	71-131	No	138
17A5	G1	B1	71-131	No	n.d.
11H8	G2b	B1	71-131	No	n.d.
16D5	G2a	B2	71-131	Enhances	2.21
18D12	G2b	B3	131-178	No	n.d.
3H2	G1	B	71-131	Enhances	n.d.
22A10	G2a	D	209-212	Enhances	4.25
15F7	G2a	E	1-131	No	n.d.
12F6	G2a	E	n.d.	n.d.	780

FIG. 3

【 図 5 】

可変重鎖領域のアラインメント(マウス及びヒト7D9)

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A B 36 37 38 39 40 41

hum III E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G P T T F S S Y A M S M V R Q A A P  
mu7D9 Q V Q L Q S G G A E A A K P G A S S C A S G V T T F T T F T T Y M H R H V V Q Q P  
7D9.v1 E V Q L V E S G G C J V Q P G C S L R L S C A A S G V T T F T T F T T Y M H R H V V R Q A P  
7D9.v3 E V Q L V E S G G C J V Q P G C S L R L S C A A S G V T T F T T F T T Y M H R H V V R Q A P

Kabat# 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a b c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

hum III G K G L E W V I S G D G G S T Y A D S V K G R F T I S R D N S K N I L Y L  
mu7D9 G G L E W I G Y I R P S T G T T E Y N Q K F X D K A R L T A D H S S T A Y V Q  
7D9.v1 G K G L E W V G Y I R P S T G Y T E Y N Q K F X D R F T I S X N T A Y L  
7D9.v3 G K G L E W V C Y I R P S T C Y T E Y N Q K F X D R F T I S A D C F S X N T A Y L

Kabat# 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I J K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112

hum III Q H R S L R A E D T A V Y I C R R G P D Y W G Q C F I L V T V S 5  
mu7D9 Q E S L E S L D S I V Y I C R R S X R U I D I H C C C T L S J C V S G 6  
7D9.v1 Q H R S L R A E D T A V Y I C R R S X R L I D I H G G C G T L V C V S 7  
7D9.v3 Q H R S L R A E D T A V Y I C R R S X R L I D I H G G C G T L V C V S 8

Chothia - CDR H1 Kabat - CDR H1 接離 - CDR H1  
Chothia - CDR H2 Kabat - CDR H2 接離 - CDR H2  
Chothia - CDR H3 Kabat - CDR H3 接離 - CDR H3

FIG. 5

【 図 4 】

可変軽鎖基のアラインメント(マウス及びヒト7D9)

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

huK1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R R V T I T C R A S Q S I S W Y L A W Y Q  
mu7D9 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R R V T I T C R A S Q S I S W Y L A W Y Q  
7D9.v1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R R V T I T C R A S Q S I S W Y L A W Y Q  
7D9.v3 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R R V T I T C R A S Q S I S W Y L A W Y Q

Kabat# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 A 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

huK1 Q K P G K A P K L L I Y A S S L E S G V P S R P S G S G S G T D P T L T I S S L Q P  
mu7D9 Q K P G K A P K L L I Y A S S L E S G V P S R P S G S G S G T D P T L T I S S L Q P  
7D9.v1 Q K P G K A P K L L I Y A S S L E S G V P S R P S G S G S G T D P T L T I S S L Q P  
7D9.v3 Q K P G K A P K L L I Y A S S L E S G V P S R P S G S G S G T D P T L T I S S L Q P

Kabat# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

huK1 E D P A T Y V C Q Q Y N S L P W T P G G G T K V E I K R 1  
mu7D9 E D P A T Y V C Q Q Y N S L P W T P G G G T K V E I K R 2  
7D9.v1 E D P A T Y V C Q Q Y N S L P W T P G G G T K V E I K R 3  
7D9.v3 E D P A T Y V C Q Q Y N S L P W T P G G G T K V E I K R 4

Kabat - CDR L1 Chothia - CDR L1 接離 - CDR L1  
Kabat - CDR L2 Chothia - CDR L2 接離 - CDR L2  
Kabat - CDR L3 Chothia - CDR L3 接離 - CDR L3

FIG. 4

【 図 6 】

7D9のキメラ及びヒト変異体

	LC	HC	ヒトMSLNに対するKD(nM)
キメラ 7D9	キメラ	キメラ	1.84
7D9.v1	V <sub>K1</sub> 移植片	VH <sub>ATA</sub> 移植片	3.98
7D9.v2	Y36F, Y87F	V48I, F67A, I69L, K75S, N76S及びL80M	1.78
7D9.v3	Y36F, Y87F	VH <sub>ATA</sub> 移植片	1.9
7D9.v4	V <sub>K1</sub> 移植片	V48I, F67A, I69L, K75S, N76S及びL80M	3.01
7D9.v5	Y36F	VH <sub>ATA</sub> 移植片	3.49
7D9.v6	Y87F	VH <sub>ATA</sub> 移植片	4.08

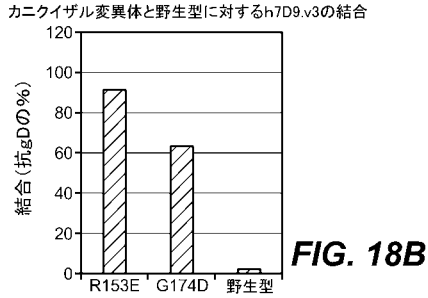
FIG. 6



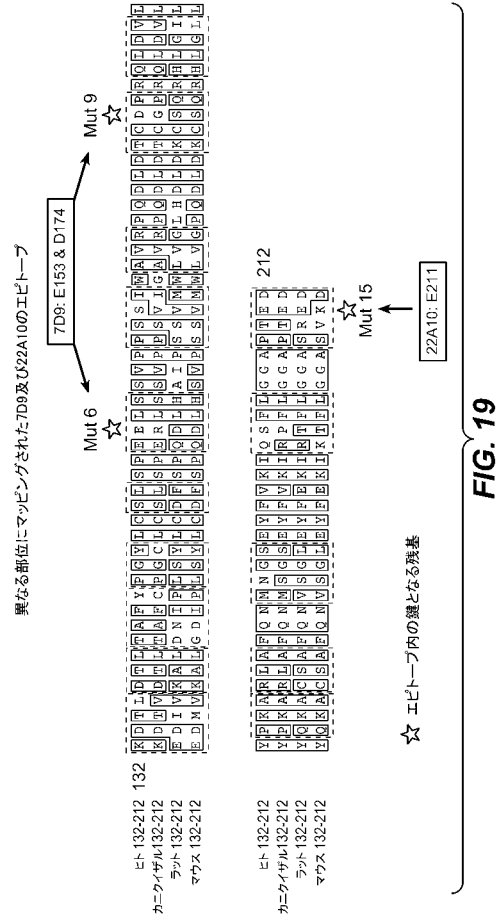




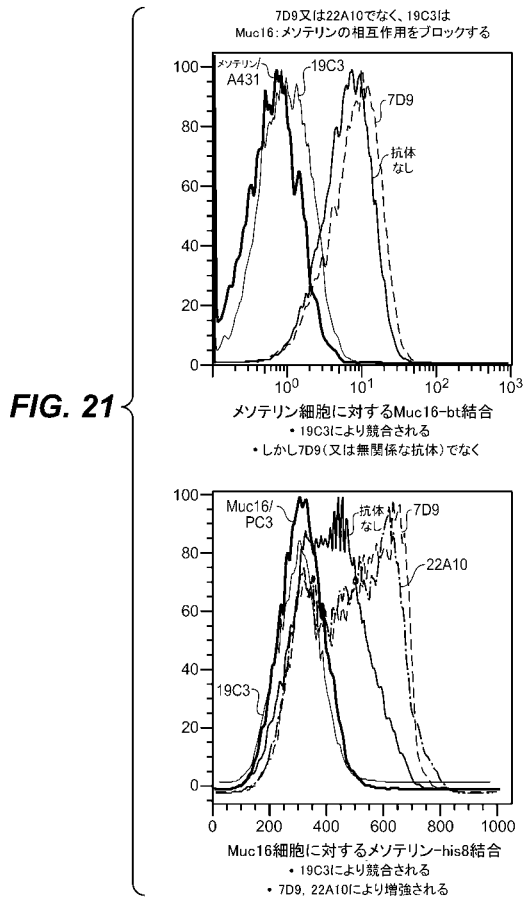
【 図 1 8 B 】



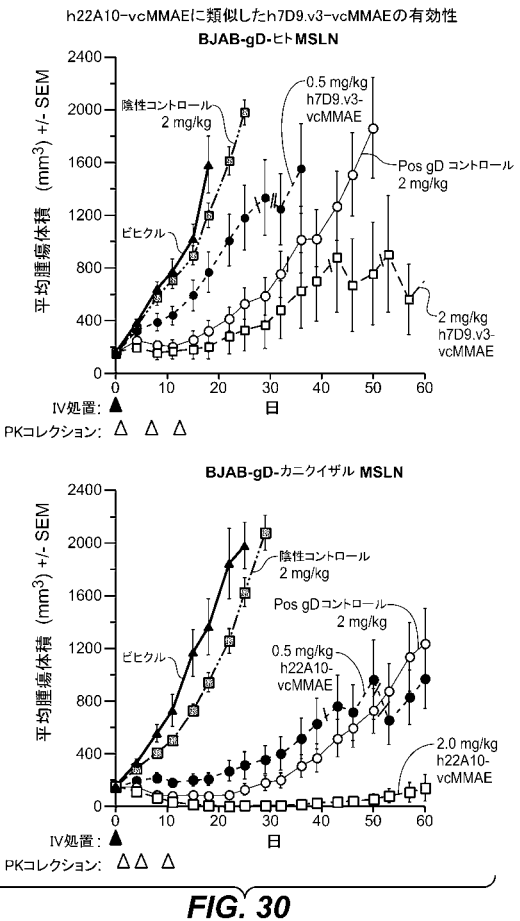
【 図 1 9 】



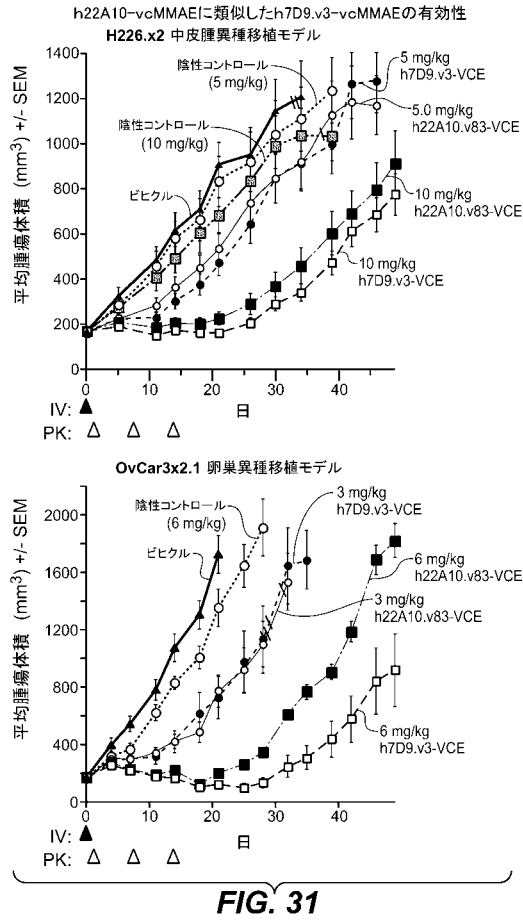
【 図 2 1 】



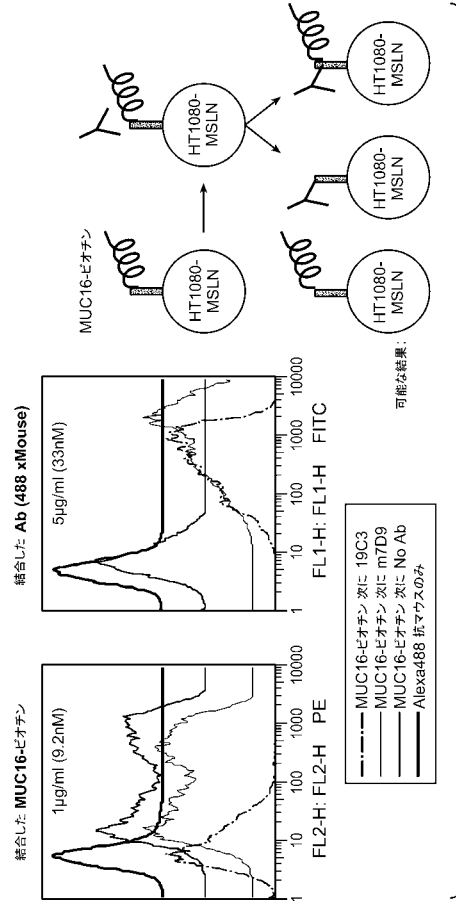
【 図 3 0 】



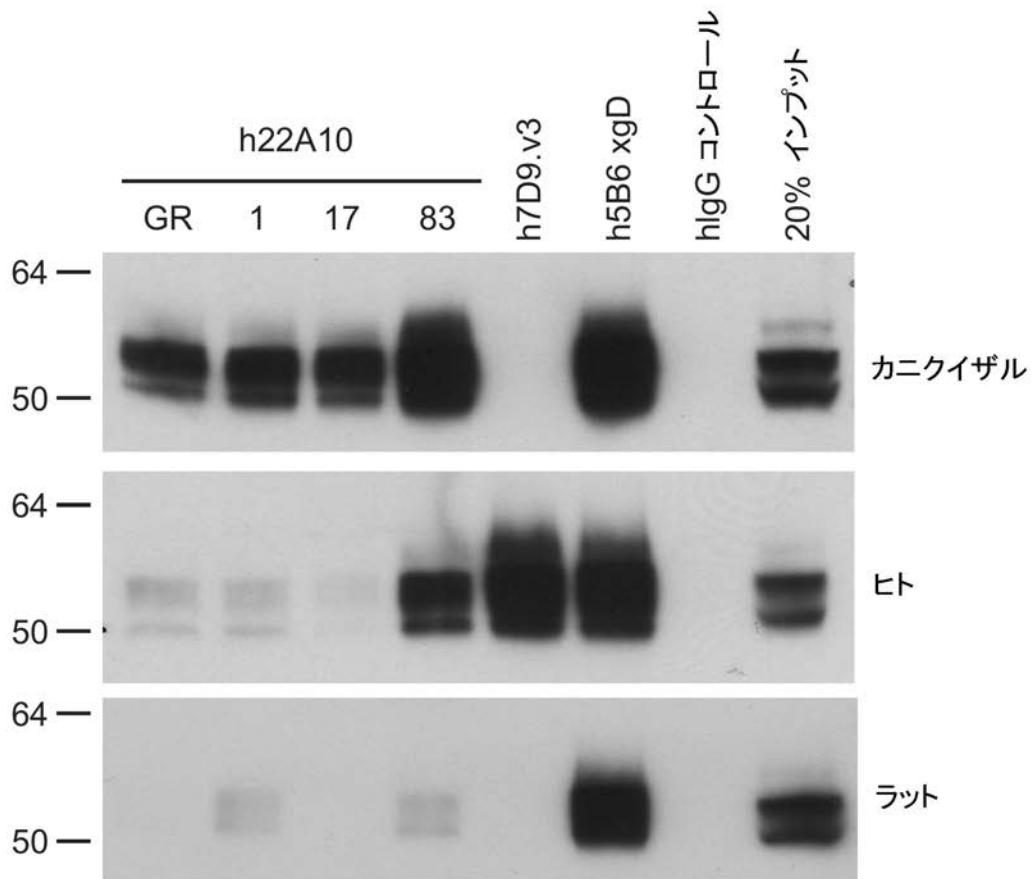
【 図 3 1 】



【 図 3 3 】

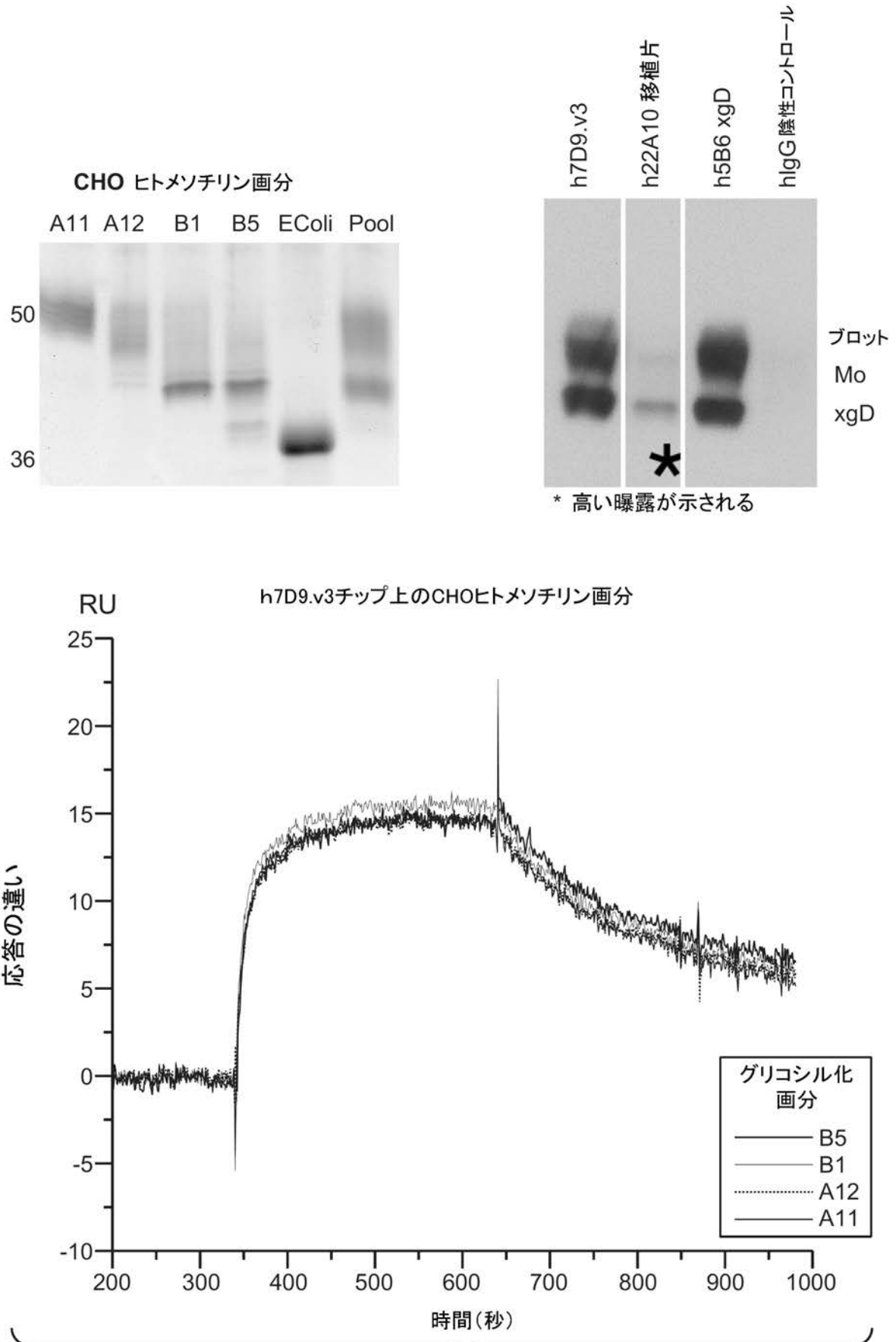


【 図 9 B 】



**FIG. 9B**

【 図 2 0 】

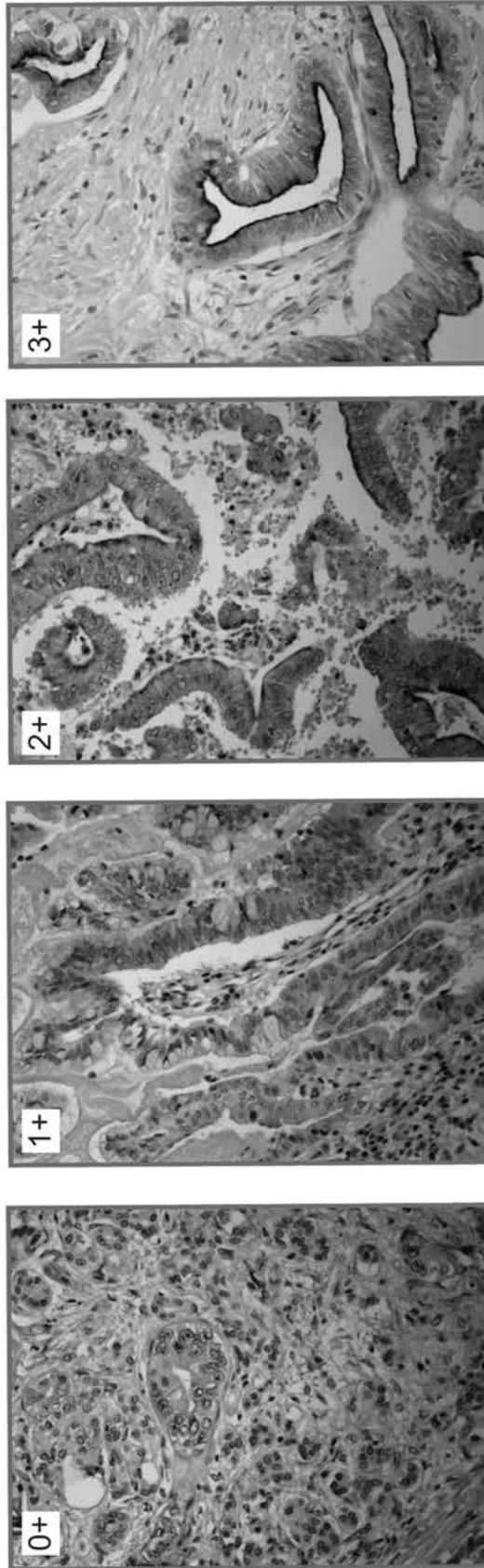


**FIG. 20**

【 図 2 2 】

膵管腺癌 (PDAC) のメソテリンIHC

	IHC スコア			
	0+	1+	2+	3+
PDAC (N=76)	30%	37%	24%	9%

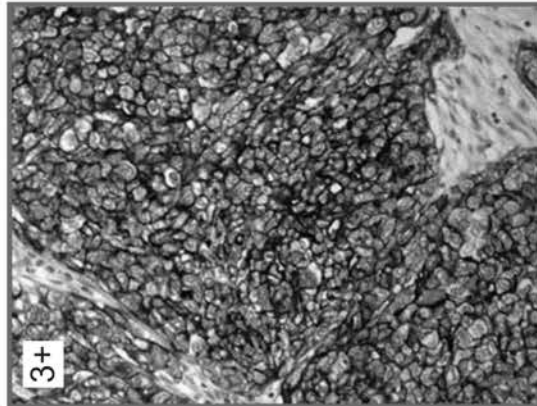
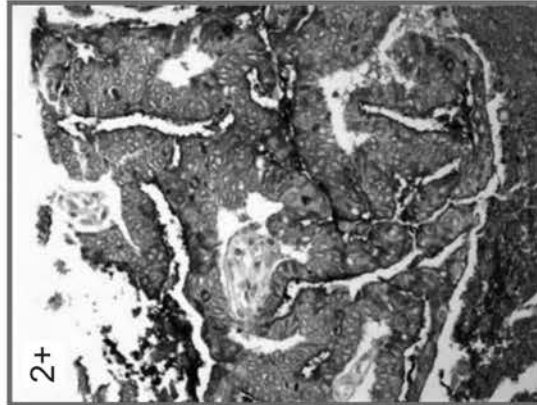
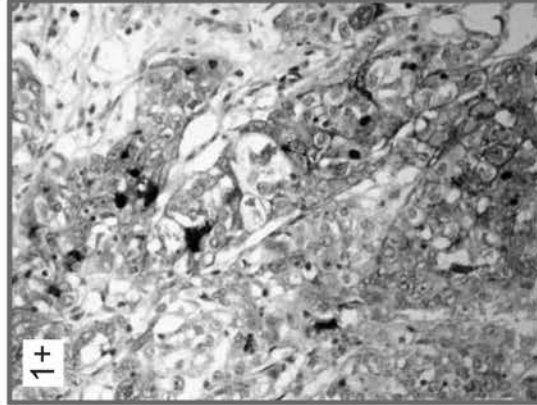
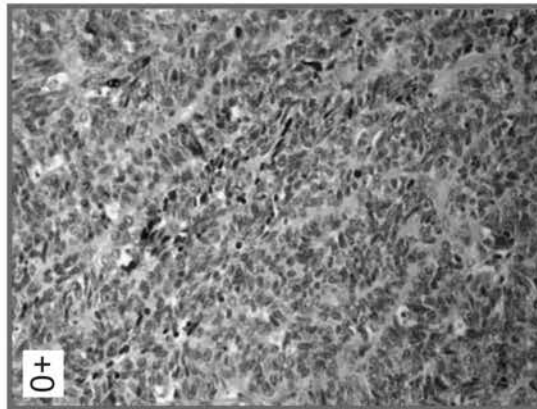


70% PDAC 陽性, 33% ≥ 2+

FIG. 22

卵巣腫瘍のメンテリンIHC

	IHC スコア			
	0+	1+	2+	3+
漿液性腺癌 (N=43)	2%	23%	44%	30%



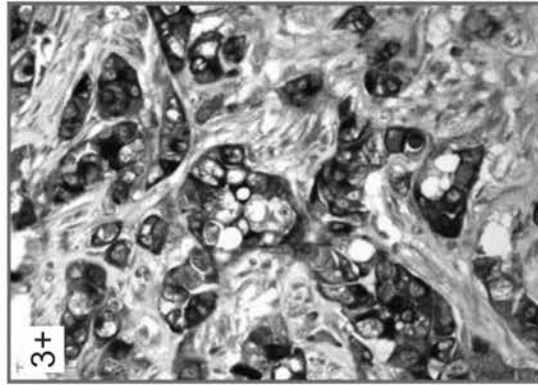
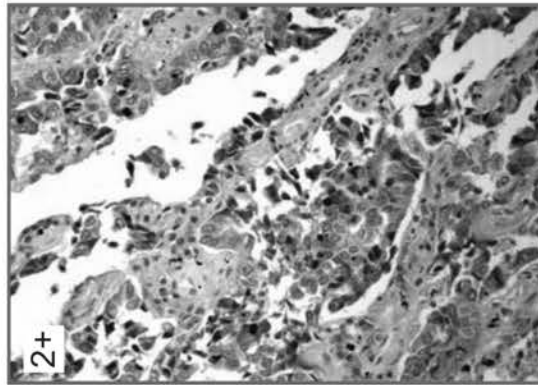
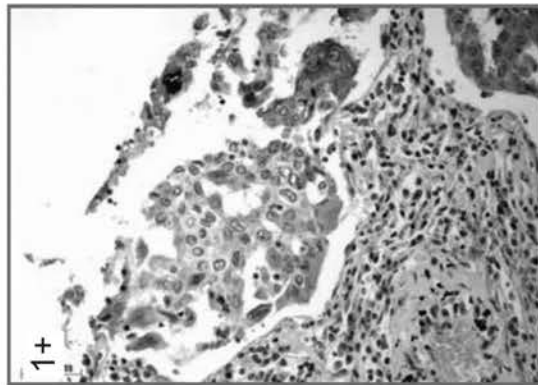
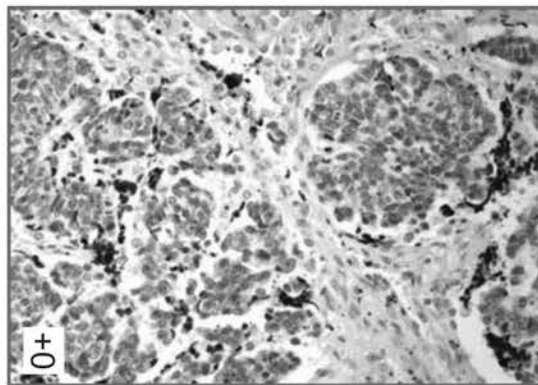
98% 漿液陽性, 74% ≥ 2+. 8/8が漿液転移陽性に適合した

**FIG. 23**

【 図 2 4 】

NSCLC腺癌のメンテリンIHC

	IHC スコア			
	0+	1+	2+	3+
NSCLC (N=77)	56%	18%	16%	10%

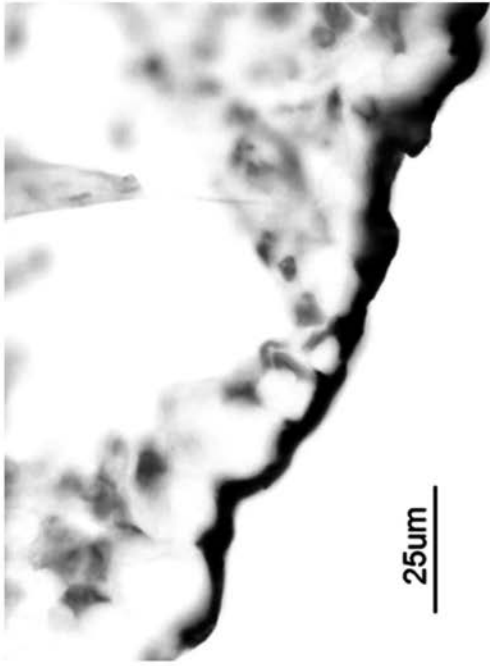


44% NSCLC 陽性, 26%  $\geq 2+$ . 3/8 (38%) 転移陽性に適合する

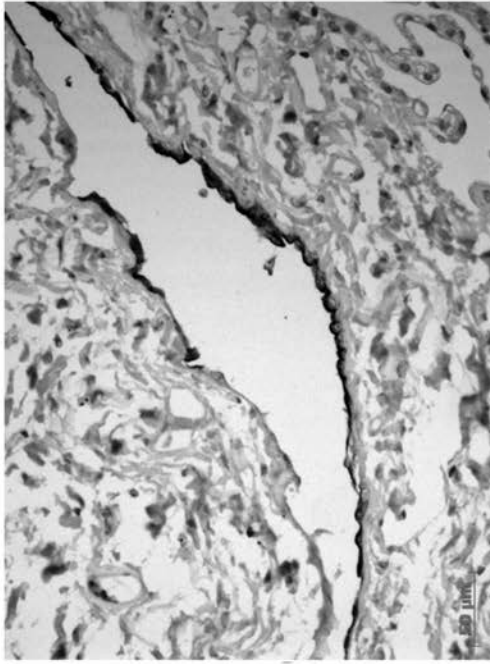
**FIG. 24**

【 図 2 5 】

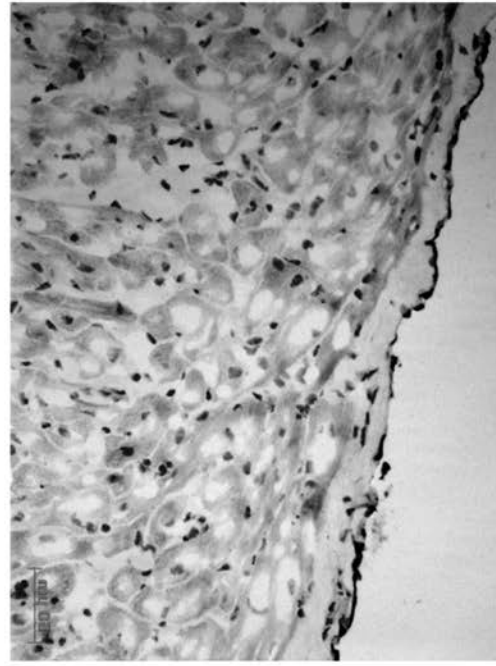
カニクイザル(凍結) 22A10



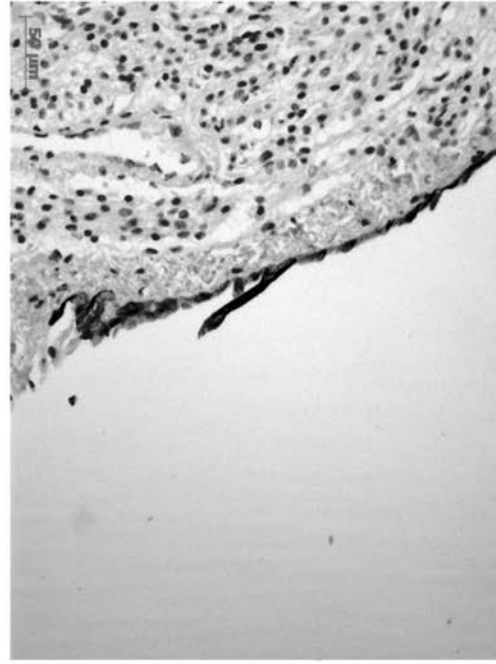
ヒト (FFPE) 19C3



肺胸膜



H2008-857-2



H2009-341

心臓の心膜

FIG. 25

【 図 26 】

h7D9.v3-vcMMAEはHPAC膵臓異種移植片において有効性を実証する

10-0813: モンテリン (MSLN, MPF); HPAC  
オーバーレイは腫瘍体積に適合する

投薬群	実際 (mg/kg)
01 - ビヒクル	NA
02 - 1 mg/kg, 抗 MSLN-7D9.v3-VCE	1.09
03 - 2.5 mg/kg, 抗 MSLN-7D9.v3-VCE	2.74
04 - 5 mg/kg, 抗 MSLN-7D9.v3-VCE	5.47
05 - 10 mg/kg, 抗 MSLN-7D9.v3-VCE	10.95
06 - 15 mg/kg, 抗 MSLN-7D9.v3-VCE	16.42
07 - 5 mg/kg, 抗 gD-VCE	5.00
08 - 10 mg/kg, 抗 gD-VCE	10.00
09 - 15 mg/kg, 抗 gD-VCE	15.00
10 - 15 mg/kg, ネイキッド抗 MSLN-7D9.v3	15.00

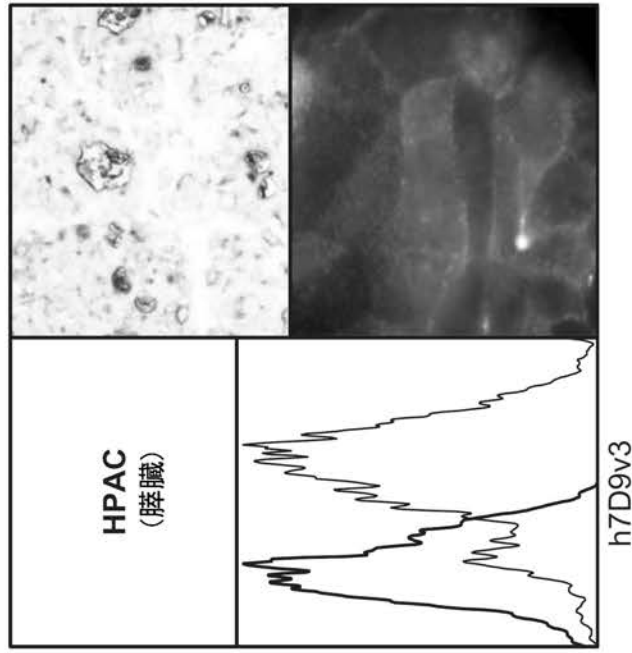
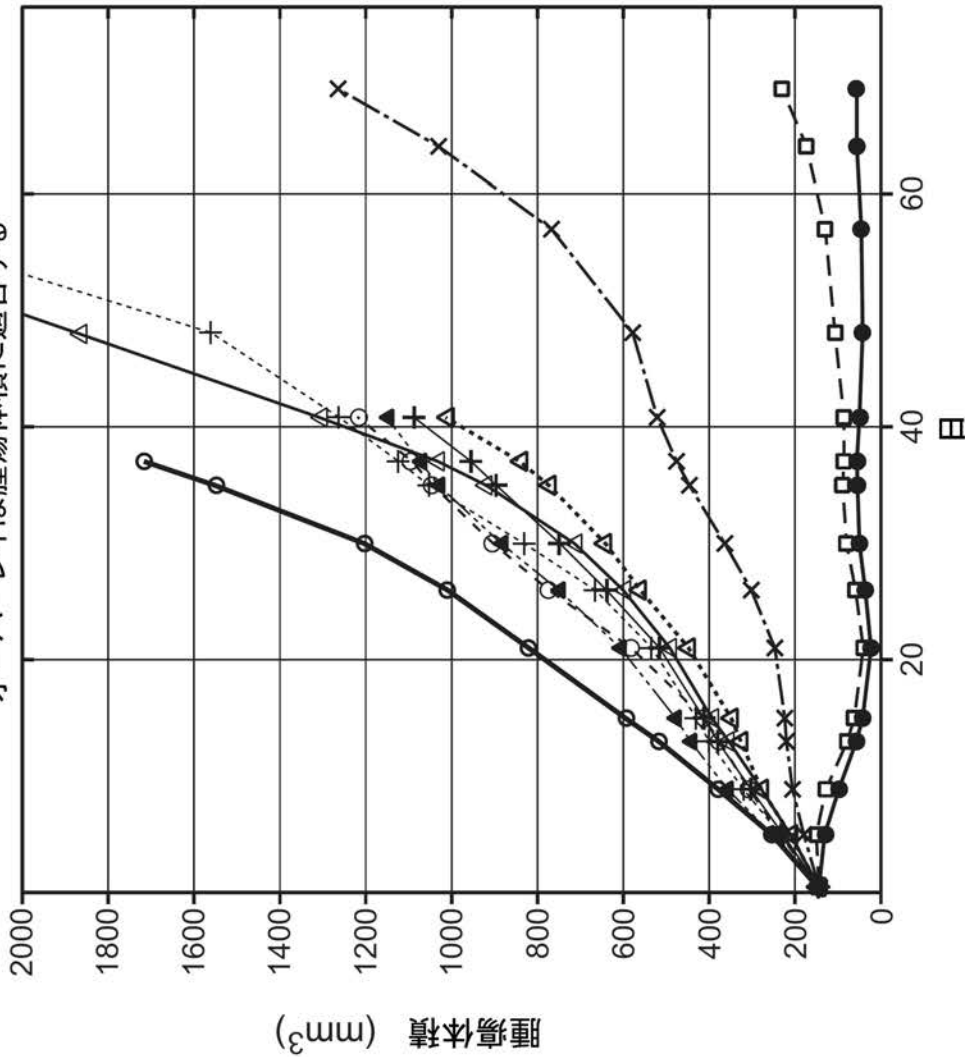


FIG. 26

【 図 2 7 】

h7D9.v3-vcMMAE は原発性膵臓異種移植片における有効性を実証する

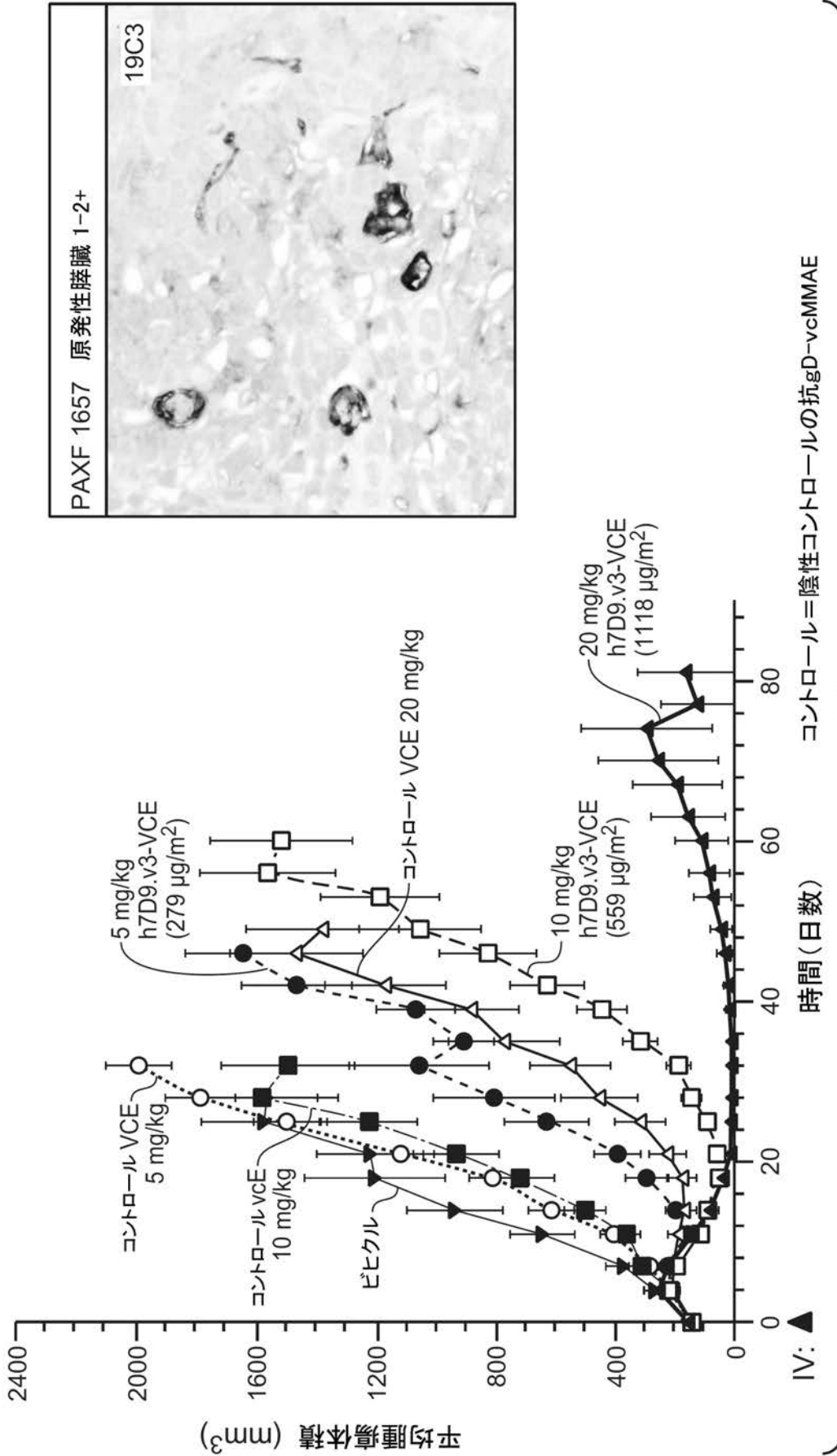


FIG. 27

【 図 2 8 】

h7D9.v3-vcMMAE は卵巣異種移植モデルにおける有効性を実証する

10-0813 C: マンデリン (MSLN, MPF); OvCar-3 x2.1  
オーバーレイは腫瘍体積に適合する

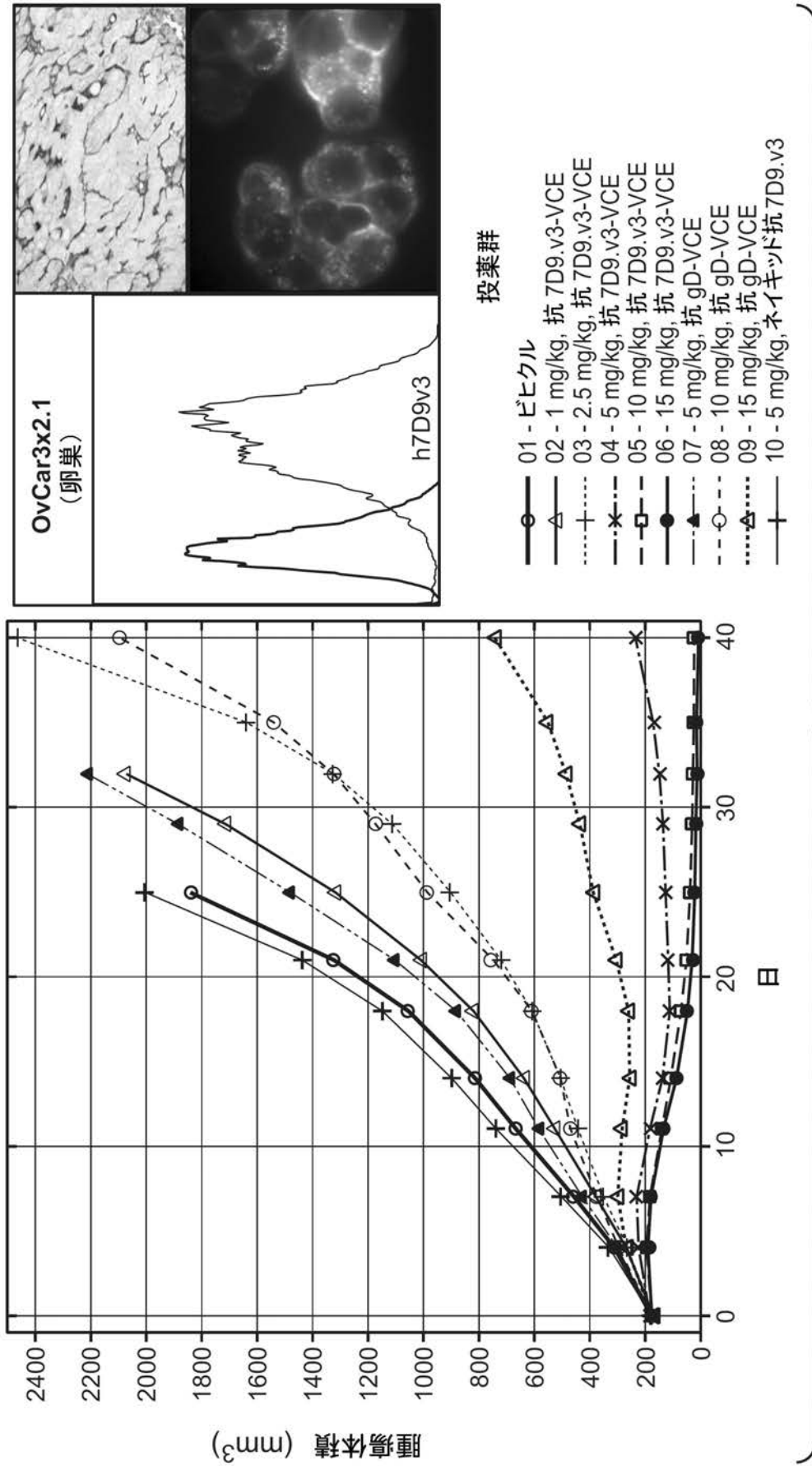


FIG. 28

【 図 2 9 】

h7D9.v3-vcMMAE は肺癌(扁平上皮癌)異種移植モデル  
における有効性を実証する

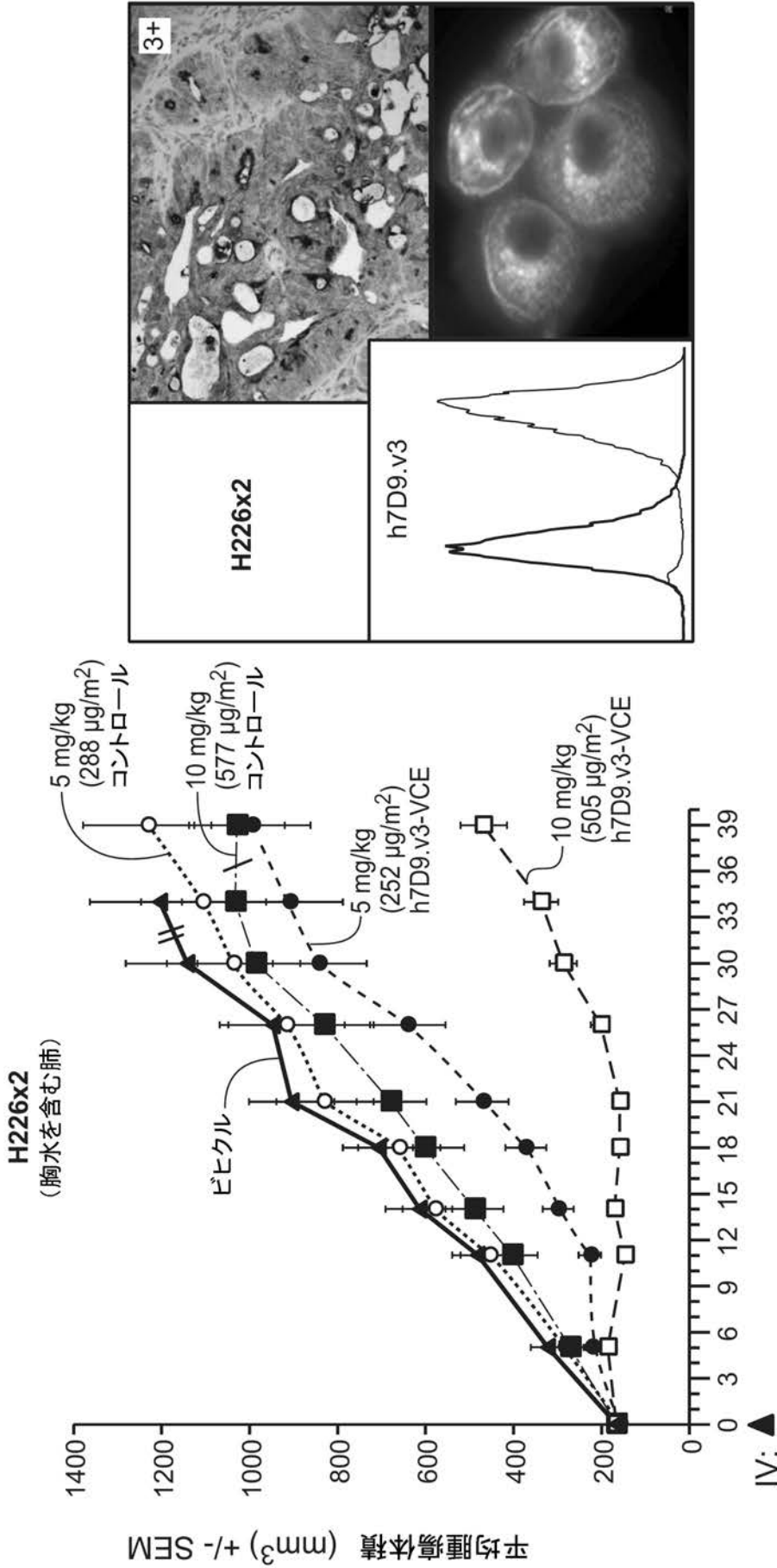
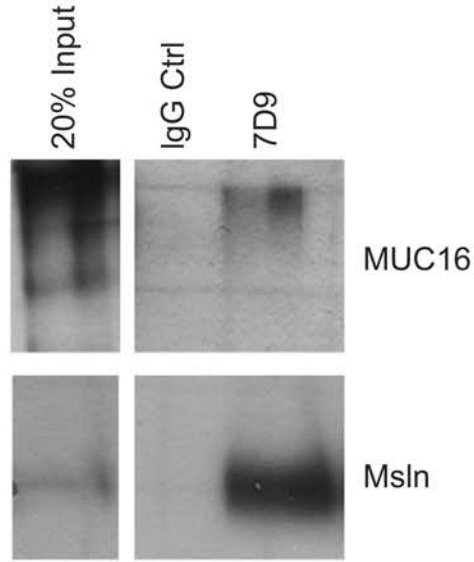


FIG. 29

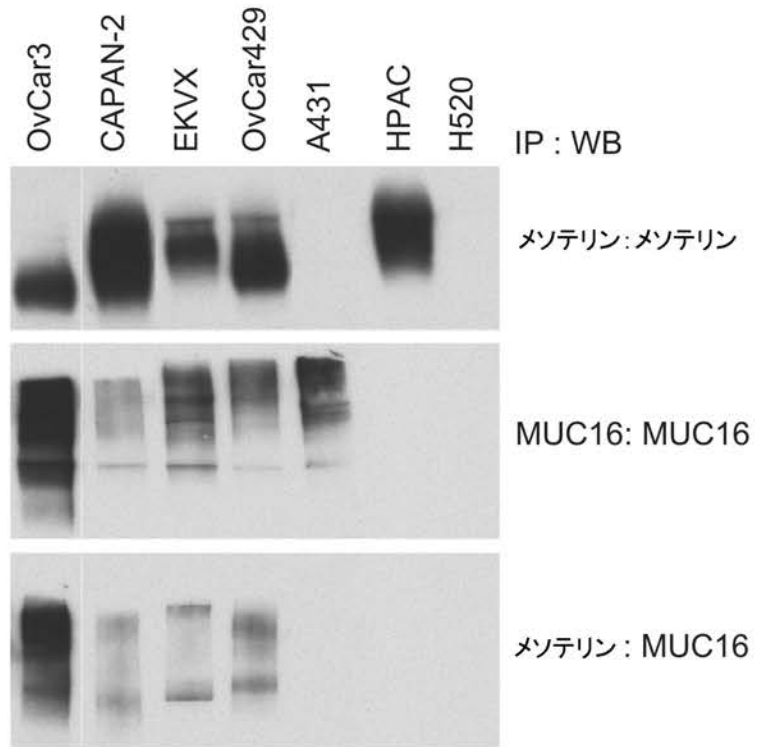
【 図 3 2 】

MUC16はメソテリンと複合体をつくり、  
2つのタンパク質が二重陽性細胞株から共脱離される



MUC16はOvCar3細胞溶解物中において  
メソテリンと共免疫沈降する

**FIG. 32**



条件培地は、両方のタンパク質を発現する株からのみ  
メソテリンとMUC16の共免疫沈降を示す

【 配 列 表 】

2014509835000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/065895
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. C07K16/30	A61K47/48	A61K39/395 A61P35/00
ADD.		
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 A61P A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<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	FENG YANG ET AL: "A novel human monoclonal antibody that binds with high affinity to mesothelin-expressing cells and kills them by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, AMERICAN ASSOCIATION OF CANCER RESEARCH, US, vol. 8, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 1113-1118, XP009136266, ISSN: 1535-7163 page 114, right-hand column, paragraph 2 - page 115, left-hand column, paragraph 1; figure 4 page 116, right-hand column ----- -/--	1-70
<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  25 June 2012		Date of mailing of the international search report  04/07/2012
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  Siaterli, Maria

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2011/065895**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.:

**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 SEARCH REPORT

International application No PCT/US2011/065895
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ONDA MASANORI ET AL: "New monoclonal antibodies to mesothelin useful for immunohistochemistry, fluorescence-activated cell sorting, Western blotting, and ELISA", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 11, no. 16, 15 August 2005 (2005-08-15), pages 5840-5846, XP002408962, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0578 page 5844, right-hand column; tables 1,2 page 5845, left-hand column -----	1-70
X	HASSAN RAFFIT ET AL: "Preclinical evaluation of MORAb-009, a chimeric antibody targeting tumor-associated mesothelin", CANCER IMMUNITY, ACADEMY OF CANCER IMMUNOLOGY, CH, vol. 7, 16 December 2007 (2007-12-16), page 20, XP009136272, ISSN: 1424-9634 page 2, left-hand column page 3, right-hand column; figures 3a,4,5 page 5 - page 6 -----	1-5, 15-59, 61,62, 66,69,70
X	WO 2009/045957 A1 (MEDAREX INC [US]; TERRETT JONATHAN A [GB]; POGUE SARAH L [US]; TOY KRI) 9 April 2009 (2009-04-09) examples 2,3,6 -----	1-70
X	WO 2006/099141 A2 (MORPHOTEK INC [US]; EBEL WOLFGANG [US]; GRASSO LUIGI [US]; NICOLAIDES) 21 September 2006 (2006-09-21) claims 1-44; examples 1-3 -----	1-70
X	WO 2010/111282 A1 (US GOVERNMENT [US]; HO MITCHELL [US]; PASTAN IRA [US]) 30 September 2010 (2010-09-30) paragraph [0237]; figure 6; examples 4,5; tables 1,2 -----	1-70
X	ONDA M ET AL: "Megakaryocyte Potentiation Factor Cleaved from Mesothelin Precursor Is a Useful Tumor Marker in the Serum of Patients with Mesothelioma", CLIN. CANCER RES., vol. 12, no. 14, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 4225-4231, XP008109241, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0472 paragraph [results]; table 1 ----- -/--	1-70

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2011/065895

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 2009/068204 A1 (BAYER SCHERING PHARMA AG [DE]; KAHNERT ANTJE [DE]; LIGHT DAVID [US]; S) 4 June 2009 (2009-06-04) examples 1,2; table 5 -----	1-70
X	WO 2009/120769 A1 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; DIMITROV DIMITER S [US]; FENG YANG [U] 1 October 2009 (2009-10-01) page 60, line 18 - page 61, line 14; claims 1-35 page 62, line 10 - line 23 -----	1-70

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/065895

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2009045957 A1	09-04-2009	AR 068590 A1	18-11-2009		
		AU 2008308956 A1	09-04-2009		
		CA 2700860 A1	09-04-2009		
		CN 101951946 A	19-01-2011		
		CO 6300960 A2	21-07-2011		
		EA 201070412 A1	29-10-2010		
		EP 2195017 A1	16-06-2010		
		JP 2010539981 A	24-12-2010		
		KR 20100093033 A	24-08-2010		
		NZ 584633 A	25-11-2011		
		TW 200922620 A	01-06-2009		
		US 2011262448 A1	27-10-2011		
		WO 2009045957 A1	09-04-2009		
		WO 2006099141 A2	21-09-2006	AU 2006223301 A1	21-09-2006
AU 2011200251 A1	10-02-2011				
CA 2600505 A1	21-09-2006				
EP 1861425 A2	05-12-2007				
EP 2322560 A1	18-05-2011				
JP 2008532523 A	21-08-2008				
US 2006204506 A1	14-09-2006				
US 2010028336 A1	04-02-2010				
WO 2006099141 A2	21-09-2006				
WO 2010111282 A1	30-09-2010	AU 2010230063 A1	20-10-2011		
		CA 2756393 A1	30-09-2010		
		EP 2411416 A1	01-02-2012		
		US 2012107933 A1	03-05-2012		
		WO 2010111282 A1	30-09-2010		
WO 2009068204 A1	04-06-2009	AU 2008329221 A1	04-06-2009		
		CA 2706529 A1	04-06-2009		
		CN 101952319 A	19-01-2011		
		CO 6280409 A2	20-05-2011		
		CR 11456 A	12-11-2010		
		DO P2010000150 A	15-09-2010		
		EC SP10010191 A	30-07-2010		
		EP 2215121 A1	11-08-2010		
		JP 2011504372 A	10-02-2011		
		KR 20100097660 A	03-09-2010		
		MA 31862 B1	01-11-2010		
		US 2011027268 A1	03-02-2011		
		WO 2009068204 A1	04-06-2009		
		WO 2009120769 A1	01-10-2009	AU 2009228361 A1	01-10-2009
				CA 2718321 A1	01-10-2009
EP 2257572 A1	08-12-2010				
US 2011020361 A1	27-01-2011				
WO 2009120769 A1	01-10-2009				

International Application No. PCT/ US2011/ 065895

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 10, 60, 63, 64, 67(completely); 1-9, 11-54, 56-59, 61, 62(partially)

anti mesothelin antibodies that bind an epitope of SEQ ID NO:43 comprising E153 & D174

---

2. claims: 65, 68(completely); 1-9, 11-54, 56-59, 61, 62(partially)

anti mesothelin antibodies that bind an epitope of SEQ ID NO:43 comprising E211

---

3. claims: 55, 66, 69, 70(completely); 1-9, 11-54, 56-59, 61, 62(partially)

anti mesothelin antibodies that bind within amino acids 1-131 of SEQ ID NO:43 and with an affinity of < 5 nM

---

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	4 H 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 49/02 C	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 V	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 A	
	G 0 1 N 33/53 Y	
	G 0 1 N 33/48 P	

(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, MD, RU, T, J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, 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, 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, VN

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1 . U N I X

- (72)発明者 スケールズ, スザンナ ジェー.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 スペンサー, スーザン ディー.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 チャン, イン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サン フランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA44  
 4B024 AA01 BA45 BA61 CA01 DA01 DA02 DA05 DA06 DA11 EA04  
 GA01 GA11 HA08  
 4B064 AG26 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01  
 4B065 AA01X AA26X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AB02 BA01 BA08  
 BD22 CA24 CA25 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA19 BA02 BA14 DA27 MA02 MA44 MA52  
 MA56 MA59 MA66 NA05 NA13 ZB26 ZC75  
 4C085 AA14 AA16 AA26 CC02 DD21 DD62 DD63 EE01 EE03 GG02  
 GG03 GG04 GG06 GG08 GG10 HH03 KA04 KA29 KB07 LL18  
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA17 MA01 MA02 MA04 MA44 MA52  
 MA56 MA59 MA66 NA05 NA13 ZB26 ZC75

4H045 AA11 AA20 AA30 BA09 BA42 BA50 BA51 BA52 BA71 CA40  
DA75 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014509835A5</a>	公开(公告)日	2015-02-12
申请号	JP2013544871	申请日	2011-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	デニスマーク スケールズスザンナジェー スペンサーズーザンディー チャンイン		
发明人	デニス, マーク スケールズ, スザンナ ジェー. スペンサー, スーザン ディー. チャン, イン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/30 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61K45/00 A61K38/00 A61K31/7068 A61P35/00 A61P43/00 A61K51/00 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/48		
CPC分类号	A61K45/00 C07K16/28 C07K16/30 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/76 C07K2317/77 C07K2317/92 G01N33/574 G01N33/57423 G01N33/57438 G01N33/57442 G01N33/57449 G01N2333/705 A61K31/7068 A61K38/08 A61K47/6803 A61K47/6849 A61K51/1027 A61K2039/505 A61K47/6817 A61K47/6869 A61K39/395 A61K47/50 A61K39/39558 A61K45/06 A61K47/6851 A61K2039/507 C07K2317/56		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/30 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/395. L A61K39/395.T A61K45/00 A61K37/02 A61K31/7068 A61P35/00 A61P43/00.121 A61K49/02.C G01N33/53.V G01N33/574.A G01N33/53.Y G01N33/48.P		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA44 4B024/AA01 4B024/BA45 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024 /DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064 /CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065 /AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/BD22 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA19 4C084/BA02 4C084 /BA14 4C084/DA27 4C084/MA02 4C084/MA44 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA13 4C084/ZB26 4C084/ZC75 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA26 4C085 /CC02 4C085/DD21 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4C085/HH03 4C085/KA04 4C085/KA29 4C085 /KB07 4C085/LL18 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA17 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA44 4C086/MA52 4C086/MA56 4C086/MA59 4C086/MA66 4C086 /NA05 4C086/NA13 4C086/ZB26 4C086/ZC75 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA42 4H045/BA50 4H045/BA51 4H045/BA52 4H045/BA71 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045 /DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
优先权	61/459962 2010-12-20 US		
其他公开文献	JP6253987B2 JP2014509835A		

#### 摘要(译)

本发明提供抗间皮素抗体和免疫缀合物及其使用方法。

