

(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2013-522167

(P2013-522167A)

(43) 公表日 平成25年6月13日(2013.6.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	2G045
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B024
C12Q 1/37 (2006.01)	C12Q 1/37	4B063
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4C084
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 121	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-553054 (P2012-553054)
 (86) (22) 出願日 平成23年2月11日 (2011. 2. 11)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年10月4日 (2012. 10. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/024636
 (87) 国際公開番号 W02011/100620
 (87) 国際公開日 平成23年8月18日 (2011. 8. 18)
 (31) 優先権主張番号 61/304, 334
 (32) 優先日 平成22年2月12日 (2010. 2. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 607 オークランド フランクリン ス
 トリート 1111 トゥエルフス フロ
 ア
 (74) 代理人 100149294
 弁理士 内田 直人
 (72) 発明者 クレイク, チャールズ エス.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94
 131, サンフランシスコ, オーク パー
 ク ドライブ 520

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 uPAR結合剤及びその使用方法

(57) 【要約】

本開示は、ウロキナーゼプラスミノージェン活性化因子受容体 (uPAR / CD87) に結合し、及び/又はその活性を調節する結合剤 (例として抗体)、抗体を含む組成物、及び抗体又は組成物の使用を伴う方法に関する。

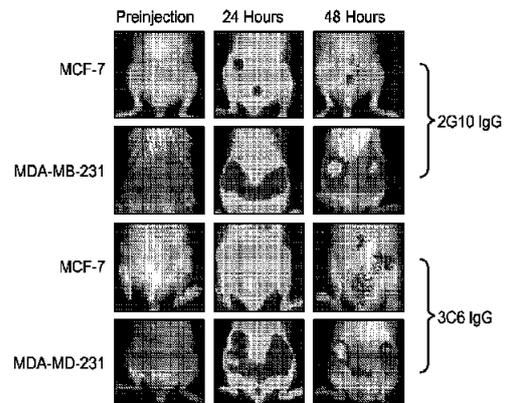


FIG. 12

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体 (uPAR) に特異的に結合し、uPAR への結合についてインテグリンと競合する、結合剤。

【請求項 2】

前記インテグリンが 1 インテグリンである、請求項 1 に記載の結合剤。

【請求項 3】

前記インテグリンが 5 1 又は 3 1 インテグリンである、請求項 2 に記載の結合剤。

【請求項 4】

uPAR への結合についてクローン 3C6 由来の抗体と競合する、請求項 1 に記載の結合剤。

【請求項 5】

a) 図 1 に記載の 3C6 V_H CDR 1 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 1、

b) 図 1 に記載の 3C6 V_H CDR 2 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 2、及び

c) 図 1 に記載の 3C6 V_H CDR 3 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 3

を含む、請求項 1 に記載の結合剤。

【請求項 6】

a) 図 1 に記載の 3C6 V_L CDR 1 のアミノ酸配列を含む V_L CDR 1、

b) 図 1 に記載の 3C6 V_L CDR 2 のアミノ酸配列を含む V_L CDR 2、及び

c) 図 1 に記載の 3C6 V_L CDR 3 のアミノ酸配列を含む V_L CDR 3

を含む、請求項 5 に記載の結合剤。

【請求項 7】

a) 3C6 の V_H の完全長アミノ酸配列に対して少なくとも 85% のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む重鎖、及び

b) 3C6 の V_L の完全長アミノ酸配列に対して少なくとも 85% のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、請求項 6 に記載の結合剤。

【請求項 8】

ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体に特異的に結合し、

a) 図 1 に記載の 2E9 V_H CDR 1 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 1、

b) 図 1 に記載の 2E9 V_H CDR 2 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 2、及び

c) 図 1 に記載の 2E9 V_H CDR 3 のアミノ酸配列を含む V_H CDR 3

を含む、単離された抗体。

【請求項 9】

a) 2E9 の V_H の完全長アミノ酸配列に対して少なくとも 85% のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む重鎖、並びに

b) V_L CDR 1、V_L CDR 2 及び V_L CDR 3 を含み、V_L CDR 1、V_L CDR 2 及び V_L CDR 3 のアミノ酸配列が

(i) 2E9 1 の V_L CDR 1、V_L CDR 2 及び V_L CDR 3 のアミノ酸配列、並びに

(ii) 2G10 の V_L CDR 1、V_L CDR 2 及び V_L CDR 3 のアミノ酸配列からそれぞれ独立して選択される軽鎖

を含む、請求項 8 に記載の単離された抗体。

【請求項 10】

a) 2E9 の完全長 V_H に対して少なくとも 85% のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む重鎖、及び

b) 2E9 の完全長 V_L に対して少なくとも 85% のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、請求項 8 に記載の単離された抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1】

u P A R への結合についてクローン 2 E 9 由来の抗体と競合する、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 1 2】

ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子受容体に特異的に結合し、

a) 図 1 に記載の 2 G 1 0 V_H C D R 1 のアミノ酸配列を含む V_H C D R 1、

b) 図 1 に記載の 2 G 1 0 V_H C D R 2 のアミノ酸配列を含む V_H C D R 2、及び

c) 図 1 に記載の 2 G 1 0 V_H C D R 3 のアミノ酸配列を含む V_H C D R 3

を含む、単離された抗体。

【請求項 1 3】

b) 2 G 1 0 の完全長 V_H に対して少なくとも 8 5 % のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む重鎖、並びに

c) V_L C D R 1、V_L C D R 2 及び V_L C D R 3 を含み、V_L C D R 1、V_L C D R 2 及び V_L C D R 3 のアミノ酸配列が

(i) 2 G 1 0 の V_L C D R 1、V_L C D R 2 及び V_L C D R 3 のアミノ酸配列、

(i i) 1 F 6 の V_L C D R 1、V_L C D R 2 及び V_L C D R 3 のアミノ酸配列、

(i i i) 1 D 5 の V_L C D R 1、V_L C D R 2 及び V_L C D R 3 のアミノ酸配列、

(i v) 3 H 7 の V_L C D R 1、V_L C D R 2 及び V_L C D R 3 のアミノ酸配列、

(v) 2 B 8 の V_L C D R 1、V_L C D R 2 及び V_L C D R 3 のアミノ酸配列、並び

に

(v i) 4 B 6 の V_L C D R 1、V_L C D R 2 及び V_L C D R 3 のアミノ酸配列

からそれぞれ独立して選択される軽鎖

を含む、請求項 1 2 に記載の単離された抗体。

【請求項 1 4】

a) 2 G 1 0 の完全長 V_H に対して少なくとも 8 5 % のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む重鎖、及び

b) 2 G 1 0 の完全長 V_L に対して少なくとも 8 5 % のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、請求項 1 2 に記載の単離された抗体。

【請求項 1 5】

u P A R への結合についてクローン 2 G 1 0 由来の抗体と競合する、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

放射標識されている、請求項 1、8 又は 1 2 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

請求項 1 に記載の結合剤又は請求項 8 若しくは 1 2 に記載の抗体及び薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 1 8】

請求項 1 に記載の結合剤及び抗体を含む第二の結合剤を含み、抗体を含む前記第二の結合剤が u P A R への結合についてウロキナーゼと競合する、請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

前記第二の抗体が請求項 8 又は 1 2 に記載の抗体である、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

請求項 8 に記載の抗体及び請求項 1 2 に記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 2 1】

請求項 1 に記載の結合剤又は請求項 8 若しくは 1 2 に記載の抗体をがん性の疑いがある細胞と接触させること、

前記細胞に結合した前記結合剤又は前記抗体を検出すること

10

20

30

40

50

を含む、がん細胞を検出する方法。

【請求項 2 2】

前記細胞ががんを持つ疑いがある対象の中にある、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記がん細胞が乳がん細胞である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記結合剤又は前記抗体が検出可能に標識されている、請求項 2 1 又は 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記検出することが前記対象の組織を撮像することを含む、請求項 2 1 に記載の方法。

10

【請求項 2 6】

前記抗体が放射標識されている、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記検出することが単一光子放射型コンピュータ断層撮影を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

がんを持つ対象を治療する方法であって、前記対象に請求項 1 7 に記載の組成物を投与することを含み、前記投与することが前記対象中のがん細胞の増殖を低減させる、又はがん細胞の移動若しくは転移を低減させる、方法。

【請求項 2 9】

抗がん剤を投与することをさらに含む、請求項 2 8 に記載の方法。

20

【請求項 3 0】

ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体 (u P A R) を結合する結合剤を求めてスクリーニングする方法であって、

a) u P A R を候補の剤と接触させること、

b) 前記候補の剤の u P A R との結合を検出すること

を含み、前記検出することが、前記候補の剤の非存在下での 1 インテグリンへの u P A R の結合と比べた、前記候補の剤の存在下での 1 インテグリンへの u P A R の結合の減少を検出することを含む、方法。

【請求項 3 1】

前記結合を検出することが u P A R 活性の調節を検出することを含む、請求項 3 0 に記載の方法。

30

【請求項 3 2】

前記検出することが酵素結合免疫吸着測定法を利用することを含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記検出することがプロテアーゼ活性を検出することを含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記候補の剤が抗体を含む、請求項 3 0 に記載の方法。

40

【請求項 3 5】

請求項 1 に記載の結合剤又は請求項 8 若しくは 1 2 に記載の抗体、及び u P A R を発現する細胞を検出するための試薬を含む、対象中のがん細胞を検出するためのキット。

【請求項 3 6】

u P A R を含む細胞を、第一の u P A R シグナル伝達経路を阻害する u P A R 結合剤と接触させること、及び

前記細胞を、第二の u P A R シグナル伝達経路を阻害する抗 u P A R 抗体と接触させること

を含む、u P A R シグナル伝達を阻害する方法。

50

【請求項 37】

uPAR 結合剤が、uPAR への uPA の結合により仲介されるシグナル伝達を阻害する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

抗 uPAR 抗体が、uPAR へのインテグリンの結合により仲介されるシグナル伝達を阻害する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

インテグリンが 1 インテグリンである、請求項 36 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は 2010 年 2 月 12 日に提出された米国仮出願シリアル番号第 61/304,334 号の優先権の利益を主張するものであり、その出願は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究に関する記述

本発明は米国国立衛生研究所により付与された助成金番号 CA072006 及び CA128765、並びに米国国立総合医科学研究所により付与された助成金番号 073210 の下での政府支援を使用してなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

20

【背景技術】

【0003】

ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体 (uPAR 又は CD87 (表面抗原分類 87)) は 3 つの相同なシステインリッチドメインからなる 45 ~ 55 kDa のグリコシル化タンパク質である。このタンパク質はグリコシルホスファチジルイノシトールのアンカーを通じて細胞膜の細胞外側単分子膜に局在する。uPAR は炎症、転移及び浸潤、組織リモデリング、血管新生及び細胞接着を包含する幅広い種々の細胞プロセスを仲介する。

【0004】

これらのプロセスの多くは、細胞表面において様々なリガンドが膜結合 uPAR へと高度に特異的に結合することにより開始される。1 つのかかる相互作用は uPAR と uPA との間にあり、細胞外及び細胞内の両方のシグナル伝達イベントを仲介する。

30

【0005】

細胞外プロ uPA の uPAR への結合はその活性化を促進する。結果として uPA はプラスミンなどのプロテアーゼを活性化し、プロテアーゼは直接的及び間接的に細胞外マトリックス (ECM) を分解する。さらに、プラスミンはプロ uPA を活性化することができ、これは ECM 分解を加速する正のフィードバックループをもたらす。uPAR はまた、増殖性のシグナル伝達経路を活性化することにより細胞内で働くことも可能である。uPAR は RGD 非依存的な細胞のシグナル伝達及び移動を仲介する複合体においてインテグリンファミリー接着受容体と直接的に会合するものと見られている。したがって、uPAR はがんの発達及びがんの転移において役割を果たす。

40

【発明の概要】

【0006】

本開示は、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体 (uPAR / CD87) に結合してその活性を調節する剤 (例として抗体)、剤を含む組成物、及び組成物の使用を伴う方法に関する。

【0007】

また本開示により提供されるのは、1 つ若しくは複数の相補性決定領域 (CDR) を含む重鎖可変領域及び / 又は 1 つ若しくは複数の CDR を含む軽鎖可変領域を含む抗体であり、ここで抗体は uPAR 結合について uPA 及び / 又はインテグリンタンパク質などの

50

リガンドと競合するものである。抗体を用いる方法、異なる抗体の組み合わせ及びそれらの組成物もまた提供される。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】ファージディスプレイにより同定されたuPAR結合Fabについての配列同一性を示す図である。パネルA、22個の固有のクローンの重鎖及び軽鎖タンパク質配列は、パーセント同一性樹形図を生成するように整列された。パネルB、固有のFab各々のCDRループ配列は整列され、配列同一性を指し示すように網掛けされた。H1、H2及びH3はそれぞれ重鎖(V_H)CDR1、CDR2及びCDR3をいう。同様にL1、L2及びL3はそれぞれ軽鎖(V_L)CDR1、CDR2及びCDR3をいう。

10

【図2】Fab存在下でのuPAのuPARへの結合を示す図である。uPA非存在下で結合されたFabに対するuPA存在下で結合されたFabの比はパーセンテージとして報告される。

【図3】一過性トランスフェクションによるIgG発現を示す図である。パネルA、Fab配列はpTT5-Sp-H1中に重鎖及び軽鎖配列を独立してサブクローニングすることによりIgG1スキャフォールド上に移植された。パネルB、精製された抗体のSDS-PAGE分析を示す図である。

【図4】uPAR抗体の相互作用の平衡アフィニティー決定を示す図である。分析物(uPAR)濃度に対する分析物インジェクションの間の最大表面プラスモン共鳴応答のパーセントが示される。2E9(白丸)、1A8(白の四角)、2G10(黒の菱形)及び2B1(x)についてのカーブフィッティングは、表中にまとめられるK_D値を生じさせた。

20

【図5】ヒト抗uPAR抗体を使用したHEK細胞表面uPARの検出を示す図である。(パネルA~D)、白のプロファイルは対照の全ヒトIgGでの染色を表し、網掛けのプロファイルはヒト抗uPAR抗体での染色を表す。ヒト抗uPAR抗体の同一性は網掛けされたプロファイル内に指し示される(パネルA=1A8、パネルB=2B1、パネルC=2E9、パネルD=2G10)。

【図6】ヌードマウス中の腫瘍異種移植片のインビボ画像である。腫瘍は2G10 IgGを用いて標識されるか、又はルシフェラーゼ発現細胞を通じて可視化された。上段左:MDA-MB-231腫瘍を有するマウス。上段右:2G10 IgGで標識されたMDA-MB-231腫瘍を有するマウス。中段左:MCF-7/Luc+腫瘍を有するマウス。中段右:2G10 IgGで標識されたMCF-7腫瘍を有するマウス。下段:可視化のためにルシフェリンと接触させたMCF-7/Luc+腫瘍を有するマウス。円で囲まれた領域は標識された2G10 IgG又はルシフェラーゼ活性に由来する高シグナルの領域を指す。

30

【図7】H1299細胞中のuPA/uPARが仲介する浸潤及びシグナル伝達の阻害を示す図である。パネルA、Matrigel浸潤実験の結果は未処理の対照で観察される浸潤のパーセント阻害として表現される。パネルBはERK(細胞外シグナル制御キナーゼ)のリン酸化に対する抗体の効果について試験する実験の結果を描写する。

【図8】推定uPAR/α1インテグリンアンタゴニストとしての3C6の決定を示す図である。パネルAはERKのリン酸化に対する抗体の効果を描写する。パネルBは2G10(uPAR/uPAアンタゴニスト)が3C6(uPAR/α1インテグリンアンタゴニスト)と直接的に比較される接着アッセイを示す。パネルCは2つの異なるECMコーティングに対する抗体処理の接着を比較する正規化グラフである。

40

【図9】3C6は細胞表面uPARに結合し、α5β1インテグリンとのuPARの会合を抑制することを示す図である。パネルAはuPAR発現細胞への結合実験の結果を描写する。パネルBはuPARのα5β1インテグリンとの会合に対する抗体の効果を検査する免疫沈降実験の結果を描写する。

【図10】2G10及び3C6細胞を用いた組み合わせ処理はMatrigel/コラーゲンI及びコラーゲンIの中を通ったH1299の浸潤潜在力を減少させる相乗効果をも

50

たらしことを示す図である。実験は、抗体を使用して前処理され、コラーゲンIコーティングされた(パネルA)又はMatrigel/コラーゲンIコーティングされた(パネルB)24ウェルTranswellプレートの表面膜上に播種されたH1299細胞を用いて行われた。

【図11】高レベルのuPARを発現するがん細胞株(MDA-MB-231)及び低レベルのuPARを発現する別のがん細胞株(MCF-7)への2G10 Fabの結合を示す図である。F i t c 蛍光は結合した抗体の量を指し示す。細胞はまた抗体非存在下でも分析された。

【図12】2つの異なるがん細胞株を注射された免疫不全マウスのインビボ画像である。高レベルのuPARを発現するがん細胞株はMDA-MB-231で、低レベルのuPARを発現するがん細胞株はMCF-7である。触知可能な腫瘍が出現した後、2nmolの標識2G10 IgG又は3C6 IgGがマウス中に注射された。

【図13】Alexa-Fluor 488標識2G10 Fab(パネルA)又はf i t c標識3C6 Fab(パネルB)で染色されたMDA-MB-231細胞の蛍光顕微鏡写真である。細胞はまたDAPIでも染色された。パネルC、パラフィン包埋された乳房腫瘍の2G10 Fab染色。

【図14】2G10 IgG注射(250µCi)後48時間時に¹¹¹In-DOTA-2G10を使用して撮像されたMDA-MB-231異種移植マウスのAmira処理された描写である。CTの骨格画像は白色で見られることができる。濃い灰色は腫瘍を表す。パネルA、腹側;パネルB、90°における矢状断図;パネルC、背側;パネルD、180°における矢状断図。矢印は抗体が結合する位置を指し、これは腫瘍の位置に相当する。

【図15】2G10 Fabを使用して処理された又は未処理のMDA-MB-231細胞の細胞増殖抑制状態を実証するフローサイトメトリーのグラフである。

【図16】アラニンスキャニングされたuPAR変異体を用いた3C6についてのエピソードマッピング実験を示す図である(パネルA)。uPAR構造の正面(上)及び背面(下)の描写。矢印はインテグリン結合部位を指す(パネルB)。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本開示はウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)に結合する剤(例として抗体、アプタマー及び/又はペプチドなど)、剤を含む組成物、及び組成物の使用を伴う方法に関する。本明細書に開示される剤及び使用方法は、他のタンパク質へのuPARの結合を破壊することによりuPARを調節することができる。

【0010】

本明細書に開示される一定の抗体は、uPAR結合についてヒトFabファージディスプレイライブラリをスクリーニングすることにより見出された。抗体及びuPARについてのいくつかの研究は、抗体がuPA及び/又はインテグリンタンパク質などのリガンドのuPARへの結合を妨げるという特徴、同様に抗体を、uPARを発現する細胞に特異的にするという他の特徴を含むことを明らかにする。本明細書に提示されるデータは、方法及び組成物中のuPAR結合を破壊する剤(例として抗体)の適用を支持するが、この適用は複数のタイプのヒト疾患(例としてがん)の診断及び治療を包含するものである。

【0011】

スクリーニングの方法もまた、相手へのuPAR結合を特異的に阻害する/破壊するuPAR結合剤を同定する又は設計するために提供される。

【0012】

1つ又は複数の本開示の組成物を含有するキット、同様に本開示の方法における使用のための説明書を有するキットもまた提供される。

【0013】

本発明及び本発明の具体的な実施形態が記述される前に、本発明は、それ自体としてもちろん変動し得ることから、記述される特定の実施形態に限定されないと理解されるもの

10

20

30

40

50

である。また本明細書に用いられる用語法は単に特定の実施形態を記述する目的であり、限定的であることは意図されないと理解されるものでもあるが、これは本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるためである。

【0014】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限との間にある、文脈が他を明確に指示しない限り下限の単位の10分の1までの値、及びその定められた範囲の中の任意の他の定められた又は間にある値は本発明の範囲内に含まれると理解される。定められた範囲中に何らかの具体的に除かれる限界値があるなら、これらのより狭い範囲の上限及び下限がより狭い範囲の中に独立して包含され得ることも本発明の範囲内に含まれる。定められた値が限界値の一方又は両方を包含する場合、それら包含される両限界値のいずれかを除く範囲もまた本発明中に包含される。

10

【0015】

他に定義されない限り、本明細書に用いられる全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する技術分野における当業者により一般に理解されるものと同じ意味を持つ。本明細書に記述されるものと類似又は等価である任意の方法及び材料が本発明の実施又は試験において用いることもできるが、代表的な方法及び材料がここで記述される。本明細書に述べられる全ての刊行物は、刊行物が引用されるのに関係した方法及び/又は材料を開示及び記述するために、参照により本明細書に組み込まれる。

【0016】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において用いられる単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が明確に他を指示しない限り複数の指示対象を包含することに留意しなければならない。それ故に、例えば「抗原(an antigen)」への言及は複数のかかる抗原を包含し、「ペプチド(the peptide)」への言及は1つ又は複数のペプチド及び当業者に知られるその等価物その他を包含する。

20

【0017】

本明細書で議論される刊行物は、ただ本出願の出願日より前のそれらの開示のために提供される。本明細書中の何物も、本発明が先行発明によりかかる刊行物に先立つ権利を与えられないという承認として解釈されるものではない。さらに提供される刊行物の日付は、独立して確認されることが必要であろう実際の発行日と異なることがある。

【0018】

定義

組成物、かかる組成物を含有する医薬製剤、並びにかかる組成物を生産及び使用する方法を記述する場合、以下の用語は他に指し示されない限り以下の意味を持つ。下に定義されるあらゆる成分が種々の置換成分で置換され得ること、及び各定義はそれらの範囲内でのかかる置換された成分を包含するように意図されることも理解されるべきである。

30

【0019】

用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は本出願全体にわたって交換可能に用いられ、共有結合性で付着された少なくとも2個のアミノ酸を意味するものであって、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド及びそれらの断片を包含する。タンパク質は天然起源のアミノ酸及びペプチド結合、又は合成のペプチド模倣構造から成り立ち得る。それ故に本明細書に用いられる「アミノ酸」又は「ペプチド残基」は天然起源及び合成のアミノ酸の両方を意味する。例えばホモフェニルアラニン、シトルリン及びノルロイシンは本発明の目的のために考えられるアミノ酸である。「アミノ酸」はまたプロリン及びヒドロキシプロリンなどのイミノ酸残基を包含する。側鎖は(R)又は(S)配置のいずれかであり得る。通常、アミノ酸は、グリシン以外は(S)又はL配置である。非天然起源の側鎖が用いられる場合、非アミノ酸置換基は、例えばインビボの分解を妨げる又は遅延させるために用いられ得る。天然起源のアミノ酸が用いられてもよく、タンパク質は、内因性又は遺伝子組換えで発現させたもののいずれかである細胞性タンパク質であってもよい。場合によっては、本発明のタンパク質は当該技術分野で理解される任意のタンパク質のインビボ又はインビトロのタンパク質合成技術を用いて合成してもよい。用語「ポリ

40

50

ペプチド」及び「タンパク質」は融合タンパク質を包含し、この融合タンパク質はN末端のメチオニン残基を伴った又は伴わない異種のアミノ酸配列との融合タンパク質、異種及び同種のリーダー配列との融合物；免疫学的にタグ付加されたタンパク質；検出可能な融合相手との融合タンパク質、例として蛍光タンパク質、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼなどを融合相手として包含する融合タンパク質；その他を包含するが、これらに限定されるものではない。ポリペプチドは任意のサイズであり得るもので、用語「ペプチド」とは長さが5～50残基（例として8～20残基）であるポリペプチドをいう。場合によっては、タンパク質は、他のペプチド又は非ペプチド分子の共有結合性又は非共有結合性の付着により修飾されていてもよく、この分子は、下により詳細に記述される蛍光色素、ポリエチレングリコール若しくは他のポリマー、ビオチン、酵素、放射性核種、MRI造影剤、治療薬又は化学療法剤からなる分子又は組成物を1つ又は複数包含するが、これらに限定されるものではない。

【0020】

本明細書の「核酸」により、DNA又はRNA、又はデオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの両方を含有する分子のいずれかが意味される。核酸は天然起源であっても又は合成で作られたものであってもよく、1つ又は複数のヌクレオチドが天然起源のヌクレオチドを超えて修飾される、天然起源ポリヌクレオチドのアナログをそれ自体として包含する。

【0021】

本明細書に用いられる用語「内因性」とは、生物内にある天然起源のタンパク質などの生体分子をいう。

【0022】

抗体にコンジュゲートされた担体の文脈において用いられる用語「担体」は、ペプチド又はタンパク質の担体、非ペプチド又はタンパク質の担体（例として非ペプチドポリマー）を包含する。

【0023】

用語「細胞表面抗原」（又は「細胞表面エピトープ」）とは、少なくとも1つの細胞周期又は細胞の発生ステージの間、細胞外でのアクセスが可能な細胞表面上の抗原（又はエピトープ）をいい、細胞周期の全ステージの間、細胞外でのアクセスが可能な抗原を包含する。本文脈における「細胞外でのアクセスが可能な」とは、細胞膜の透過を必要とせず

【0024】

本明細書に用いられる用語「化学療法」とは剤（例として薬剤、抗体など）、とりわけ興味深いがんの治療を伴う疾患の治療におけるがん性の細胞を選択的に破壊する剤（複数可）の使用をいう。

【0025】

本明細書に用いられる「がん細胞」とは新生物性の細胞表現型を呈する細胞をいい、例えば異常な細胞成長、異常な細胞増殖、密度依存的成長阻害の喪失、足場非依存的な成長潜在力、免疫不全の非ヒト動物モデルにおいて腫瘍の成長及び/若しくは発達を促す能力、並びに/又は任意の適当な細胞変質の指標のうちの1つ又は複数により特徴づけられ得る。「がん細胞」は本明細書で「腫瘍細胞」又は「がん性の細胞」と交換可能に用いられ得るもので、固形腫瘍、半固形腫瘍、原発腫瘍、転移性腫瘍その他のがん細胞を範囲に含む。

【0026】

用語「コンジュゲートされる」とは、1つの目的分子を第二の目的分子と近位で会合させる、共有結合性又は非共有結合性のいずれか、通常は共有結合性の化学結合を一般にいう。

【0027】

用語「抗原」及び「エピトープ」は当該技術分野でよく理解されており、免疫系の構成成分、例として抗体又はT細胞抗原受容体により特異的に認識される高分子（例としてポ

10

20

30

40

50

リペプチド)の部分を用いる。本明細書に用いられるように、用語「抗原」は抗原性のエピトープ、例として抗原性のエピトープである抗原の断片を範囲に含む。エピトープは溶液中で、例として他の分子から離れて、抗体により認識することができる。エピトープがクラス I 又はクラス II の主要組織適合複合体分子と会合される場合、エピトープは T 細胞抗原受容体により認識することができる。

【0028】

用語「誘導体」及び「変異体」とは、本開示の化合物及び抗体に由来する構造又は配列を持つ任意の化合物又は抗体をいうがこれらに限定されるものではなく、それらの構造/配列は本明細書に開示されるものと十分に類似しており、その類似性に基づき、当業者により、特許請求の範囲に記載される及び/又は参照される化合物又は抗体と同じ又は類似の活性及び有用性を呈するものと期待されるであろうものである。場合によっては、変異体は本開示の少なくとも1つの化合物又は抗体と50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%又はそれ以上、相同又は同一であり得る。

10

【0029】

本明細書で提供される用語である組成物の「有効量」は、非致死性だが、望まれる有用性を提供するのに十分な組成物の量を意味するように意図される。例えば、障害又は感染症を治療するのに好ましい応答を対象の中で誘発することについて、有効量は例としてがん転移のコントロールを提供するように、がん細胞を除去するように、細菌又はウイルス感染を減少させるように障害に関連した症状を除去する又は減少させる量である。下に指摘されるであろうように、必要とされる正確な量は、種、年齢、対象の全身の病態、治療される病態又は疾患の重症度、用いられる特定の組成物、その投与様式その他によって対象ごとに変動するであろう。それ故に、正確な「有効量」を特定するのは不可能である。一方、適当な有効量は単なる日常的な実験を用いて当業者により決定され得る。

20

【0030】

用語「免疫療法」とは、疾患抗原への免疫応答を調節することによる疾患(例としてウイルス若しくは細菌感染症、又はがん)の治療をいう。本出願の文脈において、免疫療法とは抗体(例としてモノクローナル抗体)の投与により対象中で抗菌及び/又は抗がん免疫応答を提供することをいう。

30

【0031】

本明細書に用いられる用語「と組み合わせて」とは、例えば第二の療法の投与の全過程の間、第一の療法が投与される場合;第一の療法が第二の療法の投与と重複している期間に投与される場合、例として第二の療法の投与前に第一の療法の投与が始まり、第二の療法の投与が終わる前に第一の療法の投与が終わる場合;第一の療法の投与前に第二の療法の投与が始まり、第一の療法の投与が終わる前に第二の療法の投与が終わる場合;第二の療法の投与が始まる前に第一の療法の投与が始まり、第一の療法の投与が終わる前に第二の療法の投与が終わる場合;第一の療法の投与が始まる前に第二の療法の投与が始まり、第二の療法の投与が終わる前に第一の療法の投与が終わる場合の使用をいう。そのように、「と組み合わせて」は2以上の療法の投与を伴う処方計画をいうこともできる。本明細書に用いられる「と組み合わせて」はまた、同じ又は異なる製剤で、同じ又は異なる経路により、及び同じ又は異なる剤形タイプで投与され得る2以上の療法の投与をいう。

40

【0032】

用語「単離される」は、天然で化合物に付随する構成成分の全て又はいくつかから化合物が分離されることを意味するように意図される。「単離される」はまた、製造(例として化学合成、組換え発現、培地その他)の間に化合物に付随する構成成分の全て又はいくつかから分離された化合物の状態をいう。

【0033】

用語「抗体」とは、抗原についてのポリペプチドの特異的な結合アフィニティーを授ける相補性決定領域(CDR)からなるポリペプチドをいう。「抗体」は抗体が任意の目的クラス(例としてIgM、IgG及びそれらのサブクラス)に属し得るポリクローナル抗

50

体及びモノクローナル抗体の調製物を範囲に含み、同様にハイブリッド抗体、改変抗体 (altered antibody)、共有結合的修飾抗体、F(ab')₂断片、F(ab)分子、Fv断片、ファージ上に提示される一本鎖可変領域断片(scFv)、一本鎖抗体(例として一本鎖Fab)、単ドメイン抗体、アフイボディ、二特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、及び元の抗体分子の免疫学的結合特性を呈するそれらの機能的断片を包含する調製物を範囲に含む。本明細書に記述される抗体は、例として放射性同位体、検出可能な産物を生成する酵素、蛍光タンパク質その他で検出可能に標識されていてもよい。抗体は他の成分にさらにコンジュゲートされていてもよく、他の成分は細胞傷害性分子又は(例としてがん細胞への抗がん薬剤の送達を提供するための)他の分子、特異的な結合ペアのメンバー、例としてビオチン(ビオチン-アビジン特異的結合ペアのメンバー)その他のなどである。抗体はまた、ポリスチレンプレート又はビーズ、試験紙その他の支持体(例として固体支持体)に結合していてもよい。

10

20

30

40

50

【0034】

抗体はカッパ及びラムダ軽鎖並びにアルファ、ガンマ(IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)、デルタ、イプシロン及びミュー重鎖又は他種の等価物を包含することができる。完全長の免疫グロブリン「軽鎖」(通常は約25kDa又は約214アミノ酸である)はNH₂末端において約110アミノ酸の可変領域を、及びCOOH末端においてカッパ又はラムダ定常領域を含む。完全長の免疫グロブリン「重鎖」(約50kDa又は約446アミノ酸である)は、可変領域(約116アミノ酸である)及び前述の重鎖定常領域の1つ、例としてガンマ(約330アミノ酸である)を同様に含む。

【0035】

軽鎖又は重鎖の可変領域はCDRとも呼ばれる3つの高頻度可変領域により割り込まれた「フレームワーク」領域(FR)から一般に構成される。フレームワーク領域及びCDRの広さは正確に定義されている(「Sequences of Proteins of Immunological Interest」E. Kabatら、U.S. Department of Health and Human Services、1991年、及びLefrancら、IMGT, the international Immunogenetics information system(登録商標)、Nucleic Acids Res.、2005年、33、D593~D597ページを参照)。Kabat番号付けシステムについての詳細な議論はkabatdatabase.com/index.htmlでWorld Wide Web上に提供される。CDR及びフレームワークの配列はChothia番号付けシステムによっても定義され得る。異なる軽鎖又は重鎖のフレームワーク領域配列は種内で比較的保存されている。抗体のフレームワーク領域は構成軽鎖及び重鎖の組み合わせられたフレームワーク領域であり、CDRを配置及び整列するのに機能する。抗原のエピトープへの結合は、CDRによって主に担われている。

【0036】

用語「モノクローナル抗体」とは均一な抗体集団を持つ抗体組成物をいう。この用語はそれが作られる様式により限定されない。この用語は免疫グロブリン分子全体、同様にFab分子、F(ab')₂断片、Fv断片、ファージ上に提示される一本鎖可変領域断片(scFv)、抗体の抗原結合部分及び非抗体タンパク質を含む融合タンパク質、並びに元のモノクローナル抗体分子の結合特性を呈する他の分子を範囲に含む。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を作る方法は当該技術分野で知られており、より十分に下に記述される。

【0037】

抗体の特性の文脈における用語「抗体の特異的な結合」又は「抗原特異的な抗体」とは、異なる抗原の均一な混合物中に存在する特定の抗原に優先的に結合する抗体の能力をいう。ある実施形態において、特異的な結合相互作用は試料中の望ましい抗原と望ましくない抗原とを(又は「標的」抗原と「非標的」抗原とを)、いくつかの実施形態において約10から100倍以上よりも大きく(例として約1000又は10,000倍より大きく

）識別するであろう。抗体 - 抗原複合体において特異的に結合する場合の抗体と抗原との間のアフィニティーは、 10^{-6} Mより小さい、 10^{-7} Mより小さい、 10^{-8} Mより小さい、 10^{-9} Mより小さい、 10^{-9} Mより小さい、 10^{-11} Mより小さい、又は約 10^{12} Mより小さいかそれ以下の K_D （解離定数）により特徴づけられることができる。

【0038】

「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸側鎖の化学的及び物理的特性（例として電荷、サイズ、疎水性／親水性）を共有する別のアミノ酸残基へのあるアミノ酸残基の置換をいう。「保存的置換」はgly、ala；val、ile、leu；asp、glu；asn、gln；ser、thr；lys、arg；及びphe、tyrというアミノ酸残基のグループ内での置換を包含するように意図されるが、これらに限定されるものではない。本明細書に開示される抗体の文脈における保存的アミノ酸置換は、抗体と目的のプロテアーゼとの間の相互作用を保存するように選択される。サイズ、化学的特性及び／又は形状を保存することができる他の保存的置換はval、thr；asp、asn、glu、gln；leu、phe、tyr、trp；lys、leu；trp、phe及びtyr；並びにala、val、tyrを包含する。

10

【0039】

用語「薬学的に許容される」とは、生物学的に又はその他の点で望ましくないものでない材料、すなわち、望ましくない生物学的作用を何ら引き起こすことなく、又はそれが含有される医薬組成物のその他の構成成分のいずれとも有害な様式で相互作用することなく、選択された医薬品有効成分と一緒に個体に投与され得る、医学的に許容される品質及び組成の材料をいう。

20

【0040】

本明細書に用いられる用語「薬学的に許容される賦形剤」とは、対象への目的化合物（複数可）の投与のための薬学的に許容される媒体を提供する任意の適切な物質をいう。「薬学的に許容される賦形剤」は薬学的に許容される希釈剤、薬学的に許容される添加物及び薬学的に許容される担体といわれる物質を範囲に含むことができる。

【0041】

用語「精製される」は、目的の化合物が天然で化合物に付随する構成成分から分離されて濃縮された形態で提供されることを意味するように意図される。「精製される」はまた、製造（例として化学合成、組換え発現、培地その他）の間に化合物に付随することができる構成成分から分離され、濃縮された形態で提供される目的の化合物をいう。典型的に、化合物は少なくとも重量で50%から60%であって、天然に関連する又は製造の間に関連する有機分子を含まない場合に、実質的に純粋である。一般に、調製物は重量で少なくとも75%、より通常は少なくとも90%、一般に少なくとも99%は目的の化合物が占める。実質的に純粋な化合物は、例えば天然資源（例として細菌）からの抽出により、化合物を化学的に合成することにより、又は精製と化学修飾との組み合わせにより得られることができる。実質的に純粋な化合物はまた、例えば目的の抗体を結合する化合物を持つ試料を濃縮することによっても得られることができる。純度は、任意の適当な方法、例としてクロマトグラフィー、質量分析、HPLC分析、ポリアクリルアミドゲル電気泳動などにより、測定することができる。

30

40

【0042】

用語「対象」はヒト、哺乳類及びuPARを任意の形式で含有する他の動物にわたることが意図される。用語「対象」、「宿主」、「患者」及び「個体」は診断又は療法が望まれる任意の哺乳動物の対象、とりわけヒトをいうように本明細書で交換可能に用いられる。他の対象はウシ、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマなどを包含し得る。

【0043】

本明細書に記述されるがん療法及び診断の文脈において、「対象」又は「患者」は、腫瘍を持つ、持つ疑いがある又は腫瘍を発達させるリスクがある対象をいうように本明細書

50

で交換可能に用いられる。場合によっては、がんは活性のある及び/又は制御不全の u P A R を発現するがん性の細胞に関連したものである。かかる対象から得られる試料は、本開示の方法における使用に同じく適している。

【 0 0 4 4 】

本明細書に用いられるように、用語「決定すること」、「測定すること」、及び「査定すること」及び「アッセイすること」は交換可能に用いられ、量的及び質的な決定の両方を包含する。

【 0 0 4 5 】

特許請求の範囲はあらゆる任意選択の又は代わりの要素を除くように立案され得ることがさらに留意される。そのように、この記載は特許請求の範囲の要素の列挙又は「否定的な」限定の使用に関係した「ただ」、「単に」その他の除外的な用語法の使用のための先行詞として機能を果たすことが意図される。

10

【 0 0 4 6 】

本明細書中で引用される全ての刊行物及び特許はあたかも個々の各刊行物又は特許が参照により組み込まれると具体的に個別で指し示されたように本明細書に参照により組み込まれ、刊行物が引用されるのに関係した方法及び/又は材料を開示し記述するように参照により本明細書に組み込まれる。あらゆる刊行物の引用は出願日より前の開示のためであり、本発明が先行発明によりかかる刊行物に先立つ権利を与えられないという承認として解釈されるべきではない。さらに、提供される刊行物の日付は、独立して確認されることが必要であろう実際の発行日と異なることがある。参照により本明細書に組み込まれる文書中で設定された用語の定義が本明細書に明示的に定義される用語の定義と矛盾する限りにおいて、本明細書で設定される定義が優先される。

20

【 0 0 4 7 】

本明細書で利用可能な方法及び組成物の例が最初により高度に詳細に記述され、本開示の方法における使用を見出し得る様々の具体的な組成物、製剤、キットその他の概説、同様に本開示の方法及び組成物が使用を見出す代表的な適用の議論がその後続く。

【 0 0 4 8 】

u P A R 結合剤

本開示は u P A R 結合剤 (例として抗 u P A R 抗体、「u P A R 抗体」ともいわれる) を提供する。u P A R 結合剤の例はアプタマー (核酸及び/又はペプチド)、抗体、小分子及び他の生体分子を包含するが、これらに限定されるものではない。剤が抗体である場合、抗体は全抗体 (例として I g G)、その抗原結合断片、一本鎖 F a b、一本鎖 F v (例として二特異性抗体又は V_HH)、F a b ' 2、ミニ抗体 (m i n i b o d y) 及び抗体の部分を含む合成 u P A R 抗体を包含する。主題の剤の標的である u P A R は、ウロキナーゼプラスミノージェン活性化因子受容体、ウロキナーゼ受容体、u P A 受容体又は C D 8 7 (表面抗原分類 8 7) としても知られている。u P A R は 3 つの異なる L y - 6 / u P A R / アルファニューロトキシンファミリーのドメインから構成される。3 つのドメインは全て、一次的なリガンドであるウロキナーゼの高アフィニティーの結合に参与する。一次的なリガンドであるウロキナーゼのほか、u P A R はピトロネクチン、u P A R 関連タンパク質 (u P A R A P) 及び膜タンパク質のインテグリンファミリーを包含するいくつかの他のタンパク質と相互作用する。

30

40

【 0 0 4 9 】

本明細書に用いられるように、「u P A R」とはウロキナーゼプラスミノージェン活性化因子受容体をいい、そのアミノ酸配列が天然起源の対立遺伝子変異体及び/又はそのアイソフォームのアミノ酸配列と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % 同一であるものを包含する。変異体は発現ががんに関連する変異を包含することもできる。多くの哺乳動物の u P A R 及びそれらの相当するアイソフォームが当該技術分野で知られている。例えば、最も長いヒトアイソフォームのアミノ酸配列は G e n B a n k A c c e s s i o n N o . N P _ 0 0 2 6 5 0 . 1 及び U n i P r o t A c c e s s i o n

50

No. Q03405として利用可能である。

【0050】

リガンド及び/又はインテグリンのuPARへの結合は増殖に導くことができるシグナル伝達に参与する。活性化されたuPARにより開始される一定のシグナル伝達カスケードは細胞の形状、接着及び移動性の制御を仲介し、それ故に細胞浸潤において役割を果たす。したがって、uPA及び/又はインテグリン(例として5¹又は3¹などの1インテグリン)などのリガンドがuPARに結合するのを妨げることで、増殖性のシグナル伝達カスケードの作用及び血管新生につながるそれらのシグナルを低減させることができる。主題の結合剤は、uPARに結合するタンパク質(例としてインテグリン及び/又はリガンド)との競合的結合のみならずuPAR仲介性の細胞シグナル伝達の強力な阻害をも可能にするという特徴を呈することができる。本開示のuPAR結合剤は種々の適用における使用を見出すことができ、この使用はuPARシグナル伝達に関連した疾患又は病態を患う宿主を治療する様々な方法における使用、同様にuPAR発現に関連した様々な疾患及び病態の診断における使用を包含する。例えば、抗体などである主題の剤はuPAR上のインテグリン結合部位に特異的であり、がん細胞の増殖又は転移を阻害するのに用いられ得る。主題の剤のさらなる使用が後述される。

10

【0051】

uPAR発現細胞は本開示のuPAR抗体の標的としての機能を果たすことができる。例えば、本開示のuPAR結合剤(例として抗体)は、表面に露出したuPARを発現するヒト細胞を結合するように用いることができる。uPARを発現する細胞は主題の抗体を用いて標識されるが、uPARを発現しない細胞は標識されないように、結合は特異的であり得る。細胞中で発現されるuPARは内因性のもの、組換え体、天然起源の変異体及びアイソフォーム、並びに/又はヒトuPARのホモログ(マウス、ラット、ウシ、霊長類など)であり得る。とりわけ、がん細胞により発現されるuPAR分子は、主題の抗体により結合せらる。かかる抗体は診断方法における使用のためにがん細胞(例としてuPAR陽性がん)を特異的に標識するのに有用であり得るもので、後により詳細に記述される。

20

【0052】

参考として、uPARのアミノ酸配列を下に提供する。uPARのアミノ酸配列はまた、3BT1として同定されている、RSCB Protein Data Bank中に見出すことができる。uPAR中でのアミノ酸残基の位置をいうのに本開示中で用いられる番号付けシステムは、以下のアミノ酸配列の文脈におけるものとなる。

30

LRCMQCKTNGDCRVEECALGQDLCRTTIVRLWEEGEELELVKSCSTHSEKTNRTLSYRTGLKITSLTEVVCGLDLCNQGN
SGRAVTYSRSRYLECISCGSSDMSCERGRHQSLQCRSPEEQCLDVVTHWIQEGEEGRPKDDRHLRGCGYLPGCPGNSNGFH
NNDTFHFLKCCNNTTKCNEGPILLELENLPQNGRQCYSCKGNSTHGCSSSEETFLIDCRGPMNQCLVATGTHEPKNQSYMVRG
CATASMCQHAHLGDAFSMNHIDVSCCTKSGCNHPDLDVQYR(配列番号1)

【0053】

本開示はインテグリンのuPARへの結合と競合する及び/又は結合を破壊するuPAR剤(例として抗体)を提供する。インテグリンは5¹又は3¹などの1インテグリンを範囲に含む。剤はそれ故にインテグリンの細胞(例として、uPARを発現するヒト細胞)への結合を阻害することにおける使用を見出す。例えば、クローン3C6の抗体は5¹及び3¹インテグリンのuPARへの結合を阻害する。この阻害はインテグリンとuPARとの間の相互作用に参与するエピトープ(例としてインテグリン結合部位)への抗体の結合、又はuPARがインテグリンへのuPARのアフィニティーを減少させるような方法で修飾されるための結合部位の外側のエピトープ(例としてアロステリック部位)への抗体の結合に起因し得る。そのように、本開示のuPAR抗体はインテグリン結合部位(例として5¹及び/又は3¹インテグリン結合部位)中に位置するエピトープに結合する抗体と競合することができる。本開示の抗体の1つ又は複数のエピトープはドメインIII中に見出されることができ、これはアミノ酸残基およそ192位からおよそ275位までのuPARのアミノ酸配列に相当する。ドメインIIIの

40

50

外側の他のエピトープはまた、uPARへのインテグリン又は本開示の抗体の結合アフィニティーにも寄与し得る。

【0054】

本開示の抗体は、D262、E208、E230、H249及びS156の残基のうちの1つ又は複数を包含するエピトープに結合する抗体と競合することができるものを包含し、ここでS156はドメインII中に位置するが、これ以外は全てドメインIII中に位置する。例えば、抗体は残基E208を包含するエピトープに結合する、又はこのエピトープに結合する抗体と競合することができる。別の例において、エピトープは残基H249及びD262を包含することができる。あるいは、エピトープはE230又はS156を包含する。詳細については実施例16及び図16を参照されたい。

10

【0055】

本開示はまた、uPARへのuPAの結合と競合する及び/又は阻害する剤を提供する。uPARの内因性リガンドであるウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA、ウロキナーゼとしても知られる)は、IUBM酵素命名法に従ってEC3.4.21.73として記述されるプロテアーゼ活性を呈する酵素ファミリーの一員である。uPAR抗体は、uPAが結合するのと同じuPARの部位又はuPA結合部位の外側の異なる部位(例としてアロステリック部位)に抗体が結合する場合は、競合的阻害により、又は非競合的阻害により、uPARへのuPAの結合を減少させることができる。uPARへのuPAの結合を阻害することができる抗体の例は、クローン2E9由来の抗体及びクローン2G10由来の抗体を包含する。

20

【0056】

そのように、本開示のuPAR抗体は、uPA結合部位中に位置するエピトープに結合する抗体と競合することができる。uPA結合部位の1つ又は複数のエピトープはuPARのドメインI及び/又はドメインII中に見出すことができる。ドメインIはアミノ酸残基およそ1位からおよそ80位までのuPARのアミノ酸配列に相当する。ドメインIIはアミノ酸残基およそ91位からおよそ191位までのuPARのアミノ酸配列に相当する。

【0057】

上述のとおり、uPARについての抗体のアフィニティーは解離定数 K_D により記述され得る。本開示の抗体は、例えばuPARについての K_D が約1000nM未満、約500nM未満、約300nM未満、約200nM未満、約100nM未満、約80nM未満、約60nM未満、約55nM未満、約50nM未満、約40nM未満、約30nM未満、約25nM未満、約20nM未満、約10nM未満、約5nM未満、約2nM未満、約1nM未満、約750pM未満、約500pM未満、約300pM未満、約200pM未満、約100pM未満又は約50pM未満のものを包含する。例えば、クローン2G10由来の二価IgG抗体は K_D が約40.5nMである。本開示の抗体の他の例についての K_D 値は図4を参照されたい。

30

【0058】

本開示のuPAR抗体はuPARリガンド又はインテグリンの結合に関連した細胞のシグナル伝達の減少を促進する抗体を包含する。かかる抗体は例えばuPARへの結合により細胞の増殖を減少させることにおける使用を見出すことができる。細胞のシグナル伝達作用は細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)、マイトジェン活性化キナーゼ(MAPK)、及び/又は微小管関連タンパク質キナーゼなどのuPARシグナル伝達に関連したキナーゼのリン酸化レベルの調節(例として減少)により査定することができる。例えば、本開示の抗体はuPAR依存的なERKリン酸化を阻害し、結果としてERK活性化を阻害することができるものを包含する。本開示の抗体はフィブロネクチン依存的なERKリン酸化を阻害することができるものを包含する。本開示の抗体は細胞表面uPARへの結合により細胞の増殖の阻害を促進することができるものを包含する。

40

【0059】

本開示の抗体は、細胞外マトリックス中へのuPAR発現細胞の浸潤の減少を促進する

50

ことができるもの、及び/又はuPAR発現細胞の接着(例としてフィブロネクチン又はビトロネクチン依存的な接着)の減少を促進することができるものを包含する。細胞の浸潤能力はがん細胞の転移潜在力と相関した表現型である。例えば、図1中の抗体(例としてクローン2E9、2G10及び3C6由来の抗体)はがん細胞浸潤の阻害を促進する。クローン3C6由来の抗体はフィブロネクチン又はビトロネクチン依存的な細胞接着の減少も促進する。本開示の抗体はuPAR発現がん細胞の移動を低減させることにおける使用を見出すことができるものを包含する。

【0060】

アミノ酸配列

本開示のuPAR結合剤は、uPARのリガンド結合領域及び/又はインテグリン結合領域中のエピトープを結合する抗体を包含する。主題の抗体のいくつかの例は図1中に提示され、下に記述される。

【0061】

本開示の抗体は、図1中でそれぞれH1、H2及びH3として指定されるV_HCDR1、V_HCDR2又はV_HCDR3と約85%、90%、95%、98%、99%又は100%同一である重鎖CDRを1、2又は3個持つ抗体を包含する。本開示の抗体は、図1中でそれぞれL1、L2、L3として指定されるV_LCDR1、V_LCDR2又はV_LCDR3と約85%、90%、95%、98%、99%又は100%同一である軽鎖CDRを1、2又は3個持つ抗体を包含する。全てのCDRは同一の抗体由来でもよく、又は図1中に収載される及び/若しくは下に記述される異なる抗体から独立して選択してもよい。

【0062】

V_H及びV_LのCDRはフレームワーク領域(FR)により分離される。FRのアミノ酸配列は本明細書に開示されるuPAR抗体のFRにより説明される。uPAR抗体は、FR又は本明細書に開示されるフレームワーク領域と異なるアミノ酸配列を持つ他のリンカーを含有するものを包含する。保存的アミノ酸置換はまた、CDR、フレームワーク領域又はリンカー領域の任意のアミノ酸残基について考えられ得る。他の置換が図1、パネルB中で提供されるアラインメントに基づいて考えられてもよい。

【0063】

抗体の重鎖又は軽鎖ポリペプチド内の任意選択のリンカーは、アミノ酸残基又は非ペプチドポリマーを含んでもよい。リンカーの長さは約1から約100までのモノマー、例として約2から約5まで、約7から約10まで、約10から約15まで、約15から約20まで、約20から約25まで、約25から約30まで、約30から約50まで、約50から約75まで、又は約75から約100までのモノマーであり得る。

【0064】

本開示のuPAR抗体の例は、3C6 V_Lとして記載されるアミノ酸配列の連続する一続きと少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%、又は100%のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を持つ軽鎖ポリペプチドを含む抗体を包含する。

【0065】

本開示のuPAR抗体の例は、2E9 V_Lとして記載されるアミノ酸配列の連続する一続きと少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%、又は100%のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を持つ軽鎖ポリペプチドを含む抗体を包含する。

【0066】

本開示のuPAR抗体の例は、2G10 V_Lとして記載されるアミノ酸配列の連続する一続きと少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%、又は100%のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を持つ軽鎖ポリペプチドを含む抗体を包含する。

【0067】

本開示のuPAR抗体の例は、3C6 V_Hとして記載されるアミノ酸配列の連続する一続きと少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%、又は100%のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を持つ重鎖ポリペプチドを含む抗体を包含する。

【0068】

本開示のuPAR抗体の例は、2E9 V_Hとして記載されるアミノ酸配列の連続する一続きと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%、又は100%のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を持つ重鎖ポリペプチドを含む抗体を包含する。

【0069】

本開示のuPAR抗体の例は、2G10 V_Hとして記載されるアミノ酸配列の連続する一続きと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%、又は100%のアミノ酸配列同一性があるアミノ酸配列を持つ重鎖ポリペプチドを含む抗体を包含する。

【0070】

本開示のuPAR抗体の例は、図1中に収載される抗体のいずれかにおいて表現される軽鎖又は重鎖ポリペプチド配列を含む抗体を包含する。かかる抗体はまた、図1中に収載される抗体のような任意のCDR及びフレームワーク領域(FR)を包含することもできる。

【0071】

本開示のuPAR抗体の例は、図1中の軽鎖ポリペプチド可変領域のCDR(CDR1、CDR2又はCDR3)を1つ又は複数含む軽鎖ポリペプチド、及び図1中の任意の重鎖ポリペプチド可変領域のCDR(CDR1、CDR2又はCDR3)を1つ又は複数含む重鎖ポリペプチドを含む抗体を包含する。上に記載される1つ又は複数のCDR中の1つ又は複数のアミノ酸残基は、主題の抗体中で欠失され、挿入され、又は置換され得る。保存的置換もまた存在し得る。

【0072】

本開示のuPAR抗体は任意のサブクラス(例としてIgG、IgE、IgD、IgA又はIgM)に属し得る。抗体は完全にヒトのものであっても、又はヒト化モノクローナル抗体であってもよい。ヒト及び非ヒトのアミノ酸配列から構成されるキメラ抗体もまた本開示により考えられる。本開示の抗体は、抗体、及び本明細書に記述される抗体、例として本明細書に例示される抗体のいずれかにより結合されるエピトープの結合を競合する抗体の免疫学的結合特性を呈することが可能な抗体断片を範囲に含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'及びF(ab')₂、Fd、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖免疫グロブリン(例として重鎖又はその部分及び軽鎖又はその部分が融合されたもの)、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、二特異性抗体、三特異性抗体、四特異性抗体、scFv、アフイボディ、ミニ抗体、Fabミニ抗体並びに二量体scFv、並びに特異的な抗原結合領域が形成されるよう立体構造中にV_L及びV_Hドメインを含む任意の他の断片を包含するが、これらに限定されるものではない。一本鎖抗体を包含する抗体断片は可変領域(複数可)を単独で含んでもよく、又は以下のものの全体又は部分と組み合わせて含んでもよい：重鎖定常ドメイン又は重鎖上の、例としてCH1、CH2、CH3といったその部分、膜貫通及び/又は細胞質ドメイン、並びに軽鎖定常ドメイン、例としてC_{クッパ}若しくはC_{ラムダ}ドメイン、又は軽鎖上のその部分。また本開示中で包含されるのは、可変領域(複数可)とCH1、CH2、CH3、C_{クッパ}、C_{ラムダ}、膜貫通及び細胞質ドメインとの任意の組み合わせである。1つ又は複数の抗体断片はまた環化形として提供してもよい。

【0073】

本開示はまた、望まれる特性(例として血清半減期の増加、抗がん活性など)を提供することができる成分へのコンジュゲーションにより修飾される剤(例として抗体)を提供する。かかる抗体コンジュゲートは下により詳細に記述される。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

アミノ酸及び核酸配列

u P A R 結合剤は図 1 中及び下に収載される任意の配列の連続配列と少なくとも 8 0 % (例として少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % 又は 1 0 0 %) 同一である連続アミノ酸配列を含むことができる。

【 0 0 7 5 】

2B3 V_H :

QLQLQESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWRQAPGKGLEWVAVI SYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLY
LQMNLSRAEDTAVYYCARPYSSSWYSVGNYGIDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号2)

10

【 0 0 7 6 】

2B3 V_L :

QAVLTQPSSLSASPGASASLTCTLRDIDIGTARIYWYQQKPGSPPQYLLNYKSDLYTEKASGVPSRFSGSKDASANAGI
LLISGLQSEDEADYYCLIWHNNAWVFGGKLTTLVGLGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD
GSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号3)

【 0 0 7 7 】

2B7 V_H :

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWyNDYAESVKSRIVINVDTSKN
QFSLQLNSVTPEDTAAAYCARDPPGLDDSDI WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号4)

20

【 0 0 7 8 】

2B7 V_L :

QSVVTQPPSVSGAPGQRVIVSCTGSSNI GAGFDVHWYQQLPGTVPKLLI YGNTNRPSGVPDRFSGSKAGTSASLAI TGL
QAEDEADYYCQAYDDSLQGYVFGTGKLTTLVGLGPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV
KAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号5)

【 0 0 7 9 】

2B8 V_H :

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSKSAAWNI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWyNDYAVSVKSRITINPDTSKN
QFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPPGLDDSDI WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICVNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号6)

30

【 0 0 8 0 】

2B8 V_L :

LDVVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDVGVYYCMQAFQTPVTFGGGKMEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号7)

【 0 0 8 1 】

2B11 V_H :

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWyNDYAVSVKSRITINPDTSKN
QFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDSSGLGSDYFDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
TVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号8)

40

【 0 0 8 2 】

2B11 V_L :

LDIQMTQSPSLSASVGRVITCQAPHDI KNNLNWYQQKPKAPKLLIFDASNLETGVPDRFSGSGSGTDFTLK
PEDIATYYCQQFDLPLTFGGGKTKVDMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号9)

【 0 0 8 3 】

2D5 V_H :

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNI RQSPSRGLEWLGRTYYRSKWyNDYAVSVKSRITINPDTSKN
QFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPPGLDDSDI WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号10)

50

【 0 0 8 4 】

2D5 V_L :

LDIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQTISSSLAWYQQKPGKAPNLLIYKASTLEGGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQSYTTPLTFGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号11)

【 0 0 8 5 】

2E7 V_H :

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRIIINPDTSKN
QFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPGGPLDDSDFIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号12)

10

【 0 0 8 6 】

2E7 V_L :

LDIQLTQSPSLSASVGDRVTITCQAPHDIKNNLNWYQQKPGKAPKLLIFDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDIATYYCQQFHDLPLTFGGGKTKVDMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号13)

【 0 0 8 7 】

2E9 V_H :

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKDEDYDYWGSYRQYPSRYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号
14)

20

【 0 0 8 8 】

2E9 V_L :

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLYKYASWYQQKPGQSPVLIYQDKKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTI
SGTQAMDEADYYCQAWDSSTSVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV
ETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWQKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号15)

【 0 0 8 9 】

2G10 V_H :

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRIIINPDTSKN
QFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPGGPLDDSDFIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号16)

30

【 0 0 9 0 】

2G10 V_L :

LDVVMTQSPSLPVTGPGEASISCRSSQSLLRSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLR
ISRVEAEDVGVYYCMQALQTPFTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号17)

【 0 0 9 1 】

2G12 V_H :

EVQLVDTGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKDWGRNIAVAGTLDYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号18)

40

【 0 0 9 2 】

2G12 V_L :

LSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGQKYVSWYQRRPGQSPQLLVIYQDKKRPSGIPERISGSNSGHATLTI
SATQAMDEAEYFCQAWDSNTAPYVFGTGTQVTVLSQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKA
GVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWQKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号19)

【 0 0 9 3 】

3C6 V_H :

QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSNSTNYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSL
KLSSVTAADTAVYYCARGRRFGDFDYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

50

GALTSVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号20)

【 0 0 9 4 】

3C6 V_L :

QPVLTTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPPGIPERFSGSNSGNTATLTI SRVEAG
DEADYYCQVWDDSSSDHSPFGTGTKVTVLGGPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG
VETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号21)

【 0 0 9 5 】

3C7 V_H :

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKN
QFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPPGGLDDSDI WGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号22)

10

【 0 0 9 6 】

3C7 V_L :

LDIQLTQSPPSLSASVGDVRTITCQAPHDIKNNLNWYQQKPGKAPKLLIFDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFLTK
PEDIATYYCQQFDDLPLTFGGGTKVDMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHEVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号23)

【 0 0 9 7 】

3D6 V_H :

QVQLQQSGPGLVNPSTLSVTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITIKPDTSKN
QFSLQLNSVTPDDTAVYYCARDPPGGLDDSDI WGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号24)

20

【 0 0 9 8 】

3D6 V_L :

LDIQMTQSPPSLSASVGDVRTITCQAPHDIKNNLNWYQQKPGKAPKLLIFDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFLTK
PEDIATYYCQQFDDLPLTFGGGTKVDMKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号25)

【 0 0 9 9 】

3H7 V_H :

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITIKPDTSKN
QFSLQLNSVTPDDTAVYYCARDPPGGLDDSDI WGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号26)

30

【 0 1 0 0 】

3H7 V_L :

LDVVMTQSPPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLRNNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSTRASGVPDRFSGSGSGTDFLTK
ISRVEAEDGVYYCMQAFQTPLTFGGGKMEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号27)

【 0 1 0 1 】

4B6 V_H :

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKN
QFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPPGGLDDSDI WGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号28)

40

【 0 1 0 2 】

4B6 V_L :

LEIVLTQSPPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLRNNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFLTK
ISRVEAEDGVYYCMQAFQTPLTFGGGKMEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号29)

【 0 1 0 3 】

4C1 V_H :

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISASGGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
LQMSSLRAEDTAVYYCVKERPDYDFWSAFDPWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT

50

VSWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (配列番号30)

【0104】

4C1 V_L:

LDVVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDVGVYYCMQGTHTWPPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号31)

【0105】

剤がIgG抗体である場合、IgGのV_HはC末端において付加的なFc領域を含有し得る。Fc領域は以下の配列の連続配列と少なくとも80% (例として少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は100%) 同一である連続アミノ酸配列を含んでもよい。

LLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号32)

【0106】

一定のCDRが下の表中に別々に収載される。他のCDRは図1、パネルB中に見出すことができる。

【0107】

【表1】

表1 Kabatデータベースに従った3C6及び2G10の相補性決定領域

軽鎖	3C6	2G10
CDR1	GGNNIGSKSVH (配列番号:3)	RSSQSLLRSNGYNYLD (配列番号:34)
CDR2	DDSDRPP (配列番号:35)	LGSIRAS (配列番号:36)
CDR3	QVWDSSSDHSP (配列番号:37)	MQALQTPFT (配列番号:38)
重鎖		
CDR1	GGSFSGYYWSW (配列番号:39)	GDSVSSNSAAWN (配列番号:40)
CDR2	EINHSGSTNYPNLSLKS (配列番号:41)	RTYYRSKWYNDYAVSVKS (配列番号:42)
CDR3	GRRFGDFDY (配列番号:43)	DPGGPLDSDFDI (配列番号:44)

【0108】

組換え抗体

本開示の剤は組換え法により生産される抗体であり得る。かかる抗体は、図1中に収載される抗体のいずれか及び/又は上で収載される配列のいずれかの連続配列と少なくとも80% (例として少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%) 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドの発現により生産することができる。核酸のパーセント同一性は比較される配列のうちより短いものに基づく。初期パラメーターを用いてフィルターを用いないBLASTN (2.0.8) (Altschulら (1997年) Nucl. Acids. Res. 25: 3389~3402 ページ) などの周知のプログラムが配列比較を行うのに利用してもよい。本開示の抗体をコードする核酸の例は下で後に議論される。

【0109】

組換え抗体を生産する方法は当該技術分野で知られている。例えば、抗体又はせめて重鎖ポリペプチドCDR又はせめて軽鎖ポリペプチドCDRをコードする核酸は、宿主細胞

中に直接的に導入され、その細胞はコードされた抗体の発現を誘導するのに十分な条件下でインキュベートされる。組換え抗体は宿主細胞中の内因性グリコシルトランスフェラーゼによりグリコシル化されていてもよく、非グリコシル化されていてもよく、又は変化したグリコシル化パターンを持っていてもよい。

【0110】

組換え抗体はキメラ抗体を包含する。キメラ抗体はヒト及び非ヒトの部分を含む免疫グロブリン分子である。より具体的には、ヒト化キメラ抗体の抗原結合領域（又は可変領域）は非ヒト（例としてマウス）起源であり、キメラ抗体の定常領域（免疫グロブリンに生物学的エフェクター機能を授ける）はヒト起源である。キメラ抗体は非ヒト抗体分子の抗原結合特異性及びヒト抗体分子により授けられるエフェクター機能を持つことができる。キメラ抗体を生成する多数の方法が当業者に周知である。代替的なアプローチは、組換えDNA技術によりヒト定常領域に非ヒト抗体のCDR領域を連結することによるヒト化抗体の生成である。Queenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029~10033ページ（1989年）を参照されたい。

10

【0111】

ヒト抗体

uPAR結合剤は完全ヒト抗体であり得る。ヒト抗体は、特徴的にはヒトのポリペプチド配列から主に構成される。主題のヒト抗体は、幅広い種々の方法により生産することができる（例としてLarrickら、米国特許第5,001,065号を参照）。ヒト抗体はHardら（1999年）Journal of Biological Chemistry, 274, 18218~18230ページに記述されるような完全ヒトFabファージディスプレイライブラリに由来してもよい。

20

【0112】

ヒト抗体は、トリオーマ細胞（3つの細胞の子孫、このうち2つはヒトで1つはマウスである）中で初めに生産することもできる。抗体をコードする遺伝子は次いでクローニングされて他の細胞、とりわけ非ヒト哺乳動物細胞中で発現される。トリオーマ技術によりヒト抗体を生産するための一般的なアプローチは、Ostbergら Hybridoma 1983年、2: 361~367ページ、Ostberg、米国特許第4,634,664号、及びEngelmanら、米国特許第4,634,666号により記述されている。トリオーマはヒト細胞から作られる普通のハイブリドーマよりも安定的に抗体を生産することが見出されている。したがって、本開示はuPARに結合する抗体をコードする核酸配列を含むDNA分子（例として2E9、2G10又は3C6をコードする核酸）を考える。核酸配列は下で後に記述されるであろう。

30

【0113】

コンジュゲート

本開示のuPAR結合剤は、目的の成分への化学的コンジュゲーションにより修飾することができる。例えば、剤は異なるタイプの第二の分子に（例として核酸が非核酸に、又はペプチドが非ペプチドに）コンジュゲートされ得る。剤が抗体である場合、第二の分子にコンジュゲートされた抗体は「抗体コンジュゲート」といわれる。主題の抗体コンジュゲートは、細胞、とりわけがん細胞の成長を改変するのに有用であり得る。剤を含有する組成物はコンジュゲートの凝集物を範囲に含むことができるが、これはコンジュゲート凝集物が細胞により容易に取り込まれるためである。

40

【0114】

コンジュゲートされた剤は、望まれる活性を保持する一方、付加的な望まれる特性を分け与えるためにコンジュゲートの第二分子の特性を活用する。例えば、主題の剤（例として抗体）を第二の分子にコンジュゲートすることができるが、この第二の分子は、溶解性、保存又は他の取り扱い特性、細胞透過性、半減期に役立ち、特定の細胞（例として神経細胞、白血球など）又は細胞位置（例としてリソソーム、エンドソーム、ミトコンドリアなど）、組織又は他の身体位置（例として血液、神経組織、特定の器官など）を標的にすることなどにより放出及び/又は分布をコントロールするものである。他の例はアッセイ

50

、追跡その他のための色素、蛍光団又は他の検出可能な標識若しくはレポーター分子のコンジュゲーションを包含する。より具体的には、主題の抗体は第二の分子にコンジュゲートされることができ、この第二の分子はペプチド、ポリペプチド、色素、蛍光団、ルシフェラーゼ、核酸、炭水化物や、ドデシルアミン、オレオイルアミンその他などのN-ラウロイル、N-オレオイル、脂肪族アミンのN-脂肪族アシル基を包含する脂質成分の付着物などの脂質その他である。

【0115】

本開示は、コンジュゲートされていない材料と比べて細胞の取り込みを改変する成分を含むコンジュゲートされた剤をさらに提供する。コンジュゲートは、コンジュゲートされていない材料と比べて増加した細胞の取り込みを呈し得る。代替的な実施形態において、コンジュゲートは、コンジュゲートされていない材料と比べて減少した細胞の取り込みを呈する。この態様において、細胞の取り込み効率は、エンドサイトーシスを促進又は阻害する小さい有機若しくは無機の分子、ポリマー、ペプチド又はタンパク質に連結することにより増加又は減少することができる。例えば、所定の抗体は、標的受容体のリガンド又は別の抗体などのエンドサイトーシスのメカニズムによってより容易に貪食される大分子に連結されうる。抗体又は、他のリガンドは次いでエンドサイトーシスにより内部に入ることができ、エンドサイトーシス小胞がリソソームと融合すると酸加水分解又は酵素活性によりペイロードが放出される。そのように、コンジュゲートは、コンジュゲートされていない剤と比べてエンドサイトーシスが増加したものであってもよい。細胞の取り込みを減少させるため、コンジュゲートは細胞表面上で抗体を保持するリガンドを包含することができ、これは細胞の取り込みをコントロールするものとして有用であり、又は場合によっては、ある細胞タイプの中で取り込みを減少させる一方で他の細胞タイプの中で取り込みを増加させることができる。

10

20

【0116】

コンジュゲートされた剤の他の特徴は、コンジュゲートがコンジュゲートされていない剤と比べて毒性を低減させることを包含し得る。別の特徴はコンジュゲートがコンジュゲートされていない材料よりも効率的にがん細胞を標的にし得ることである。付加的な例は、本開示の抗体を補完し、増強し、亢進し、又はそうでなければ本開示の抗体に関係して相乗的に作動することができる1つ又は複数の分子とコンジュゲートされた本開示の抗体を包含する。例えば、剤が抗体である場合、抗体は細胞の殺傷又はクリアランスをさらに促進するため、がん又は細菌細胞の部位への送達のための抗がん薬を任意選択で付着されていることができ、ここで抗がん薬は例として抗増殖成分（例としてVEGFアンタゴニスト、例として抗VEGF抗体又はアプタマー）、毒素（例として抗がん毒素、例としてリシン、シュードモナスエクソトキシンAその他）、放射性核種（例として⁹⁰Y、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、ホウ素中性子捕獲のための¹⁰Bその他）、抗がん薬（例としてドキシソルピシン、カリケマイシン、マイタンシノイドDM1、オーリスタチン、カウペシタビン（caupecitabine）、5-フルオロウリシル（fluorouracil）、ロイコボリン、イリノテルカン（irinotecan）その他）であり、及び/又は抗体は改善された薬物動態学的プロファイルを提供するように任意選択で（例としてPEG化、高グリコシル化その他により）修飾することができる。

30

40

【0117】

本開示は、uPAR結合剤が異種のタンパク質を包含するように修飾された組換え融合抗体、すなわちクローン由来の抗体の一部でないポリペプチドに連結された組換え融合抗体を範囲に含むと考える。例えば、3C6重鎖ポリペプチド若しくは2G10軽鎖ポリペプチド、2E9抗体断片又はそれらの任意の組み合わせは、レポータータンパク質又は望まれる抗がん作用を持つタンパク質につながれ得る。レポータータンパク質は蛍光タンパク質であっても又はルシフェラーゼであってもよい。抗体はまた、第二の抗体（又はせめてその抗原結合部分）にコンジュゲートされていてもよいが、この第二の抗体は例として、血管新生の主要メディエーターである血管内皮増殖因子（VEGF）に対して向けられる抗体などの血管新生性又は増殖性の因子に特異的に結合する抗体であり、この抗体がコ

50

ンジュゲートの特異的ながん細胞へと向けさせて抗VEGF抗体がVEGFを不活性化し、それ故に血管新生を阻害する。核酸配列が提供される場合に目的の融合タンパク質を生産する方法は当該技術分野で周知である。

【0118】

uPAR結合剤はまた、直接的に又は間接的にのいずれかで検出可能に標識され得る。直接的な標識は放射性同位体（例として ^{125}I ； ^{35}S 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ その他）；産物がシグナルを生成する酵素（例としてルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼその他）；蛍光標識（例としてフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリンその他）；EDTAなどの金属キレート基を通じて抗体に付着される蛍光発光金属、例として ^{152}Eu 又はランタニド系列の他の金属；化学発光化合物、例としてルミノール、イソルミノール、アクリジニウム塩その他；生物発光化合物、例としてルシフェリン；蛍光タンパク質；又はMRI造影剤その他を包含する。間接的な標識は、主題の抗体に特異的な第二の抗体（上記のように標識される）；及び特異的な結合ペア、例としてビオチン-アビジンその他を包含する。

10

【0119】

ポリエチレングリコール（PEG）修飾抗体

コンジュゲートの例は1つ又は複数のポリ（エチレングリコール）（PEG）成分を含有するよう修飾された剤（例として抗体）を包含する。かかる抗体は「PEG化された剤」といわれる。剤が抗体である場合、抗体はPEG化された抗体、例としてuPARに特異的に結合するPEG化された組換え抗体を包含する。抗体のPEG化に適している方法及び試薬は当該技術分野で周知である。一般的に、抗体へのコンジュゲーションに適しているPEGは、一般に室温で水可溶性であり、一般式が $\text{R}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n\text{O}-\text{R}$ であり、式中Rは水素又はアルキル若しくはアルカノール基などの保護基、nは1から1000までの整数である。Rが保護基である場合、一般に1から8個までの炭素を持つ。

20

【0120】

PEGはアミノ基との反応性がある官能基を生成するよう修飾された水酸基を少なくとも1つ持ち得るが、ここでアミノ基は例としてリジン残基のイプシロンアミノ基、ポリペプチドN末端における遊離アミノ基、又はアスパラギン、グルタミン、アルギニン若しくはヒスチジンのアミノ基などの任意の他のアミノ基である。

30

【0121】

PEGはまた、抗体ポリペプチド中の遊離カルボキシル基との反応性があるように誘導体化されていてもよい。重鎖又は軽鎖ポリペプチドのカルボキシル末端における遊離カルボキシル基との反応性がある適切なPEGの誘導体は、PEGアミン及びPEGのヒドラジン誘導体（例として $\text{PEG}-\text{NH}-\text{NH}_2$ ）を包含するが、これらに限定されるものではない。

【0122】

付加的なPEGの誘導体は末端のチオカルボン酸基である $-\text{CO}_2\text{H}$ を含むが、この基はアミノ基と選択的に反応してアミド誘導体を生成するものである。他の実施形態において、PEGはPEG鎖の末端においてN-ヒドロキシスクシンイミダートなどの反応性エステルを含む。かかるN-ヒドロキシスクシンイミダート含有PEG分子は選ばれたアミノ基と中性の6.5~7.5などの特定のpH条件で反応する。

40

【0123】

PEGは抗体のアミノ酸残基に直接的に又はリンカーを通じてコンジュゲートすることができる。いくつかの実施形態において、リンカーは、抗体ポリペプチドに付加され、リンカー修飾された抗体ポリペプチドを形成する。かかるリンカーは様々な機能性、例としてリンカー修飾された抗体ポリペプチドにPEG試薬をカップリングするためのスルフヒドリル、アミノ又はカルボキシル基などの反応性基を提供する。抗体ポリペプチドにコンジュゲートされ得るPEGは直鎖状である。他の実施形態において、抗体ポリペプチドに

50

コンジュゲートされる PEG は分枝状である。分枝状 PEG 誘導体は例として「スター PEG (star-PEG)」及び多分岐 PEG の誘導体といった当該技術分野で知られているものである。

【0124】

医薬組成物

本開示は 1 つ又は複数の uPAR 結合剤 (例として抗体) を含有する医薬組成物を提供する。本開示の組成物は 2 以上のタイプの剤 (例として抗体) を含有するものを範囲に含む。組成物は少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4 又はそれ以上の異なるタイプの剤 (例として抗体) を含有し得る。主題の組成物中の剤が抗体である場合、抗体はそのアミノ酸配列、コンジュゲーションによる修飾、アフィニティー、結合する uPAR のエピトープ、及び/又は uPAR により仲介される細胞シグナル伝達に対する作用の点で異なり得る。例えば、組成物はインテグリン (例として 1 インテグリン) の uPAR への結合と競合する第一の抗体、及び uPAR への結合についてウロキナーゼと競合する第二の抗体を含有し得る。あるいは、組成物は uPAR に結合し、ウロキナーゼの uPAR への結合と競合する第一の抗体、及び uPAR に結合し、ウロキナーゼの uPAR への結合と競合し、第一の抗体の結合と競合する又は競合しない第二の抗体を含有してもよい。組み合わせられた抗体を有する組成物の例は、クローン 3C6 由来の抗体並びにクローン 2G10 及び/又は 2E9 由来の抗体の両方を含有するものである。

10

【0125】

関係する例において、組成物は第一の uPAR シグナル伝達経路を阻害する第一の結合剤 (例として抗 uPAR 抗体); 及び第二の uPAR シグナル伝達経路を阻害する第二の結合剤 (例として抗 uPAR 抗体) を含有することができる。1 つ又は複数の結合剤により影響される異なる uPAR シグナル伝達経路はクロストークし得る。本明細書に用いられる「クロストーク」とは、シグナル誘導条件が複数の応答及び/又はシグナル伝達経路を活性化できるように 1 つ又は複数のシグナル構成成分が共有される異なるシグナル伝達経路をいう。1 つ又は複数のシグナル伝達経路を阻害する剤を 1 つ又は複数含有する主題の組成物は、がん細胞の細胞接着、増殖及び/又は移動を相乗的に阻害することができる。例えば、結合剤により阻害されうるあるシグナル伝達経路は uPAR への uPA の結合により仲介される一方、別の経路は uPAR へのインテグリン (例として 1 インテグリン) の結合により仲介される。

20

30

【0126】

主題の組成物中に包含され得る他の剤は、病態を治療するのに有用な剤を包含する。例えば、下で後に議論される併用療法は、1 つ又は複数の主題の抗体に加えて 1 つ又は複数の薬剤を含有する主題の組成物を用い得る。

【0127】

医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤を包含することができ、これは水性溶液 (例として生理食塩水) などの溶液であることができる。組成物は生理的条件に近づけるのに必要とされる薬学的に許容される補助剤を含有してもよく、この補助剤は pH 調整及び緩衝剤、毒性調整剤その他であり、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムその他である。

40

【0128】

本開示の抗体は、下に記述される方法における使用のため、非経口投与用に処方することができる。抗体が注射可能な液体として投与される場合 (静脈内、動脈内、又は組織中に直接的に投与される実施形態においてなど)、抗体製剤は、使用準備済の剤形として提供してもよく、又は薬学的に許容される担体及び賦形剤から構成される再構成可能な保存安定粉末若しくは液体として提供してもよい。

【0129】

医薬組成物は塩、例として NaCl、MgCl、KCl、MgSO₄ など; 緩衝剤、例としてトリスバッファー、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸) (HEPES)、2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸 (MES)

50

、2 - (N - モルフォリノ) エタンスルホン酸ナトリウム塩 (M E S)、3 - (N - モルフォリノ) プロパンスルホン酸 (M O P S)、N - トリス [ヒドロキシメチル] メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸 (T A P S) など ; 可溶化剤 ; 界面活性剤、例として T w e e n - 2 0 などの非イオン性界面活性剤など ; プロテアーゼ阻害剤 ; グリセロール ; その他のうちの1つ又は複数を含むこともできる。

【 0 1 3 0 】

医薬製剤中の剤 (例として抗体) の濃度は重量で約 0 . 1 % 未満、通常は 2 % 又は少なくとも約 2 % から、2 0 % から 5 0 % 以上までも変動することができ、選択される特定の投与様式及び患者のニーズに従って、液体の容量、粘度などにより一次的に選択されるであろう。結果として生じる組成物は溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル、粉末、ゲル、

10

【 0 1 3 1 】

本開示の組成物は治療的に有効な量の主題の剤 (例として抗体)、同様に必要な場合は任意の他の適合性構成成分を包含することができる。「治療的に有効な量」により、個体へのその量の投与が単回投与、同一の又は異なる抗体又は組成物の一連の一部としてのどちらであっても、望まれる作用 (例として細胞増殖の阻害) を提供するのに有効であることが意味される。治療的に有効な量は投与計画及び対象の病態の診断解析 (例として u P A R 特異的な抗体を用いて細胞表面エピトープの有無についてモニターすること) その他に

20

【 0 1 3 2 】

本開示の文脈における動物、例としてヒトに投与される組成物の量は、合理的な期間にわたって動物中で予防的又は治療的応答をきたすのに十分であるべきで、投与の目標、治療される個体の健康及び物理的なコンディション、年齢、望まれる回復の度合、抗体組成物の製剤、治療する臨床医の医学的状況についての査定及び他の関連性のある因子に依存して変わる。当業者は投薬が利用される特定の化合物の強さ、動物の病態及び動物の体重、同様に病気の重症度及び疾患のステージを包含する種々の因子に依存することも認識するであろう。用量のサイズはまた、特定の化合物の投与に付随する可能性があるあらゆる有害な副作用の存在、特質及び広さにより決定されるであろう。それ故に量は比較的広い範囲の中になるであろうと予想されるが、それでもなお上述の特徴などの対象の様々な特徴を通じてルーチン的に決定することができる。

30

【 0 1 3 3 】

また、適切な用量及び投薬計画は望まれる成長抑制性の応答に影響することが知られている抗がん剤との比較により決定することができる。かかる投薬は著しい副作用のない低用量の細胞成長阻害をもたらす投薬を包含する。一定の化合物を妥当な用量で適切な投与を伴って使用することで、本開示の化合物は、例として細胞成長の部分的阻害から本質的に完全な阻害までの幅広い範囲の細胞内作用を提供することができる。投薬治療は単一の用量スケジュールであっても複数の用量スケジュール (例として漸増用量及び維持用量を包含する) であってもよい。下に指し示されるように、主題の組成物は他の剤と一緒に投与してもよく、それ故に用量及び処方計画はこの文脈において、その上、対象のニーズに合わせるように変動することができる。

40

【 0 1 3 4 】

生産方法

剤が抗体である場合、抗体はハイブリドーマ、組換え及びファージディスプレイ技術又はそれらの組み合わせの使用を包含する当該技術分野で知られている幅広い種々の技術を用いて調製することができる。例えば、抗体は、全抗体又は F a b をコードする発現カセットを含有する大腸菌 (E . c o l i) 又は哺乳動物細胞から作られ得る。抗体はまた、u P A R を含有する免疫原性組成物を使用して免疫された動物宿主由来のハイブリドーマ細胞から単離してもよい。

【 0 1 3 5 】

抗 u P A R 抗体の抗原結合断片を包含する抗 u P A R 抗体はまた、遺伝子工学により生

50

産してもよい。タンパク質が組換え技術を用いて生産される場合、タンパク質は任意の適切なコンストラクト及び任意の適切な宿主細胞を用いて、細胞内タンパク質として生産しても又は分泌タンパク質として生産してもよく、ここで宿主細胞は原核生物又は真核生物の細胞、例えばそれぞれ細菌（例として大腸菌）又は酵母宿主細胞などであることができる。

【0136】

宿主細胞として用いられ得る真核生物細胞の例は酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞及び/又は植物細胞を包含する。哺乳動物宿主細胞が用いられる場合、細胞はヒト細胞（例としてHeLa、293、H9及びJurkat細胞）；マウス細胞（例としてNIH3T3、L細胞及びC127細胞）；霊長類細胞（例としてCos1、Cos7及びCV1）及びハムスター細胞（例としてチャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）のうちの1つ又は複数を包含し得る。

10

【0137】

初めの抗原特異性を保持する1つの重鎖遺伝子及び1つの軽鎖遺伝子を各々含有するベクターは、発現ベクター中への抗体をコードする核酸の適当なセクションの挿入により生産され得る。重鎖及び軽鎖を共発現する（例えばインタクトな抗体、抗体分子のFab断片又は抗原結合断片を含む）クローンのライブラリもまた生成することができる。これらの遺伝子を保有するベクターは、宿主（例として細菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞又は他の適切なタンパク質生産宿主細胞）中にコトランスフェクトされ得る。あるいは、重鎖及び軽鎖は単一のベクター中に挿入されて宿主（例として細菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞又は他の適切なタンパク質生産宿主細胞）中にトランスフェクトしてもよい。

20

【0138】

遺伝的材料を宿主細胞中に導入する方法は、例えば形質転換、エレクトロポレーション、コンジュゲーション、リン酸カルシウム法、カチオン性ペプチドに基づく方法、ポリエチレンジミンに基づく方法その他を包含する。伝達の方法は、導入される抗体をコードする核酸の安定発現を提供するように、例えば抗生物質耐性マーカーの選択（例としてゲンチマイシン（gentimycin）、アンピシリン、カナマイシン、G418その他を用いて）、又は代謝マーカーの選択（例としてメチオニンシルホキシイミンを伴った又は伴わない無グルタミン培地におけるグルタミン合成の選択、又はメトトレキサートを伴った又は伴わないDHFRの選択）をさせることなどにより選択することができる。抗体をコードする核酸は遺伝性のエピソーム要素（例としてプラスミド）として提供されることができ、又はゲノムに組み込まれることができる。目的抗体の生産における使用のための種々の適当なベクターは市販されている。抗体遺伝子の合成がトランスフェクトされた宿主中で誘導される場合、重鎖及び軽鎖のタンパク質は、抗原又は免疫原との結合をアッセイすることで検出されることができ、当該技術分野で知られている技術を用いて単離することができる活性のある抗体を生産するために自己組織化する。

30

【0139】

一本鎖Fv及び他の抗体を生産するのに用いることができる技術のさらなる例は、Hustonら、Methods in Enzymology 1991年、203:46~88ページ；及びSkerraら（1988年）Science 240:1038~1040ページに記述されるものを包含する。抗体は当該技術分野で知られている種々の技術、張り合わせ（venueering）又は表面再構成（resurfacing）、及びチェーンシャフリング（chain shuffling）を用いてヒト化することができる。抗体の単離及び精製は当該技術分野で知られている技術を用いて達成されることができ、重量で少なくとも50%から60%であって、抗体が天然に関連する又は製造の間に関連する有機分子を含まない抗体含有調製物を提供することができる。

40

【0140】

核酸

本開示は、例として重鎖及び軽鎖をコードする又は重鎖及び軽鎖の断片をコードする発現カセットの発現により、本明細書に開示されるuPAR抗体を発現する細胞を考える。

50

コードする核酸の例は、図1中に表現されるCDRと少なくとも約85%、90%、95%、98%、99%又は100%同一であるCDRを1つ又は複数含むポリペプチドをコードする核酸を包含する。別の例において、抗体は図1中に表現される軽鎖及び重鎖相補性決定領域(CDR)ポリペプチド配列と少なくとも約85%、90%、95%、98%、99%又は100%同一である軽鎖及び重鎖CDRポリペプチド配列を1つ又は複数持つ。

【0141】

uPARに結合する抗体の重鎖をコードする核酸配列の例は、配列番号\ \及び\ \を包含する。uPARに結合する抗体の軽鎖をコードする核酸配列の例は、配列番号\ \及び\ \を包含する。本開示は主題の抗体の重鎖ポリペプチドの少なくとも1つのCDR又は軽鎖ポリペプチドの少なくとも1つのCDRをコードする外因性ポリヌクレオチドを含有する組換え宿主細胞をさらに考える。

10

【0142】

主題の剤が(例として組換え抗体を生産するために)核酸によりコードされる場合、核酸は下に収載される任意の配列の連続配列と少なくとも80%(例として少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は100%)同一である連続核酸配列を含むことができる。

【0143】

1A8 V_H:

GCCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTACAAGAGATCCGGGGGGGGCTCTCGATGATAGTTTTGATATCTGGGGCCAAAGGACAATGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号45)

20

【0144】

1A8 V_L:

CTTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTGTCTGTATCTGTAGGAGACAGAGTACCCTCACTTGCCAGGGCAGTCAGGTCAATTAACAACCACTTAAATTGGTATCAACAACAACCAAGGGAAAAGCCCCTAAGCTCCTGGTCTACGATGCATCCATCTGGAAAACAGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAGCGGCCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGTCTGATAATCTCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTAGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号46)

30

【0145】

1D5 V_H:

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGCGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATATTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGAATCTGTGAAAAGTCAATAGTCATCAACGTAGACACATCCAAGAACAGTTCTCCCTGCAGTTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGGGCTCTCGATGATAGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAACAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号47)

40

50

【 0 1 4 6 】

1D5 V_L :

CTTGAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
 TCAGAGCCTCCTGCGTAATAATGGATACAACATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGA
 TCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGTCCCTGACAGGTTGAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAA
 ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCATTTCACTTTTCGGCCCTGG
 GACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC
 CAGTCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCT
 GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCGCGAAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA
 GCTTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号48)

10

【 0 1 4 7 】

1F6 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGA
 CAGTGTCTCTAGCAACAGTGTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACAT
 ACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCCGTGAAAAGTGAATAATTATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
 CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGCCCTCT
 CGATGATAGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
 CCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
 CTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCTACGTGAATCACAAGCCCA
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号49)

20

【 0 1 4 8 】

1F6 V_L :

CTTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
 TCAGAGCCTCCTGCGTAGTAATGGATACAACATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGA
 TCTATTTGGGTTCTATTCGGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTGAGTGGCAGTGGATCGGGCACAGATTTTACACTGAGA
 ATTAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACCCCGTTCACTTTTGGCCAGGG
 GACCAAGCTGGAGATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC
 CAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCT
 GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCGCGAAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA
 GCTTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号50)

30

【 0 1 4 9 】

1G9 V_H :

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGG
 CTCCATCAGCAGTAGTAGTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCT
 ATTATAGTGGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC
 TCCCTGAAGCTGACCTCTGTGACCGCCGACAGACAGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACTAAACGCCACCCGATTTACTA
 CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
 TCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
 CCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACT
 CTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号51)

40

【 0 1 5 0 】

1G9 V_L :

CTTGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAG
 TCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
 ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAG
 CCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGACGAGCGTAGCAACTGGCCTCCGATGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCT

50

GGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCT
CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT
AACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGC
AGACTACGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAAAGAGCTTCAACA
GGGAGAGTGT (配列番号52)

【 0 1 5 1 】

2B1 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGA
CAGTGTCTCTAGTAACAGTGTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGGAGGACAT
ACTACAGGTCCAAGTGGTATTATGATTATGCAGTCTCTGTGAAAGGTGGAATAACCTTACCCAGACACATCCAAGAAC
CAGGTCTCCCTGCACCTGAACGCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGGCTCT
CGATGATAGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCG
GTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
CTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
GCAACCCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号53)

10

【 0 1 5 2 】

2B1 V_L :

CTTGACATCCAGTTGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACTATCACTTGCCAGGCGCC
TCACGACATTAAGAACAAATTTAAATTTGGTATCAACAGAAAACCAGGGAAAAGCCCTAAACTCCTGATCTTCGACGCATCTA
ATTTGGAGACGGGAGTCCCATCAAGATTCAGTGAAGTGGATCTGGGACAAATTTTGTGCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATATTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTCATGATCTCCCGCTCACTTTCCGGCGAGGGACCAAGGTAGACAT
GAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG
TGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
CGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
AGTGT (配列番号54)

20

【 0 1 5 3 】

2B3 V_H :

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATG
ATGGAAGCAATAAACTACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCGAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACCCTATAGCAGCAGCTGGTACAGCGT
TGGGAACTACGGTATAGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACT
CTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号55)

30

【 0 1 5 4 】

2B3 V_L :

CAGGCTGTGCTGACTCAGCCGTCTTCCCTCTCTGCATCTCCTGGAGCATCAGCCAGTCTCACCTGCACCTTACGCAGAGA
CATTGATATTGGAACCGCCAGGATTTACTGGTACCAACAGAAGCCAGGGAGCCCCCCCCAGTATCTCCTGAACTACAAAT
CAGACTTGTACACGGAGAAGGCCCTCTGGAGTCCCAGCCGCTTCTCTGGATCCAAGGATGCTTCGGCCAATGCAGGCATT
TTGCTCATCTCTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTCTGATTTGGCACAACAATGCTTGGGTGTTCCGG
CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGTCAGCCAAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGC
TTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGAT
GGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCAAACCTCCAAAACAGAGCAACAACAAGTACCGGCCAGCAGCTACCT
GAGCCTGACGCCCGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGA
CAGTGGCCCTACAGAATGTTCA (配列番号56)

40

【 0 1 5 5 】

50

2B7 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGCGCCATCTCCGGGGA
 CAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACAT
 ATTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGAACTGTGAAAAGTCGAATAGTCATCAACGTAGACACATCCAAGAAC
 CAGTTCTCCCTGCAGTTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGCGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGGCTCT
 CGATGATAGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
 CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACGGTGTCTGGAAGCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
 CTCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号57)

10

【 0 1 5 6 】

2B7 V_L :

CAGTCTGTCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCGCCAGGTGAGAGGGTCATCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTC
 CAACATCGGGGCAGGCTTTGATGTACACTGGTATCAGCAGCTTCCAGGAACAGTCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACA
 CAAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGGCTGGCACCTCAGCTCCCTGGCCATCACTGGGCTC
 CAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGGCTTATGACGACTCCCTGCAAGTTATGTCTTCGGCACAGGGACCAA
 GTTAACCGTCGTCGGTCAGCCCAAGGCCAACCCACTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGCCAACA
 AGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTC
 AAGGCGGAGTGGAGACCACCAAACCTCCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCC
 CGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTA
 CAGAATGTTCA (配列番号58)

20

【 0 1 5 7 】

2B8 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGA
 CAGTGTCTCTAGCAAGAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACAT
 ACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGCCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
 CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGGCTCT
 CGATGATAGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
 CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACGGTGTCTGGAAGCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
 CTCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCTACGTGAATCACAAGCCCA
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号59)

30

【 0 1 5 8 】

2B8 V_L :

CTTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
 TCAGAGCCTCCTGCGTAGTAATGGATACAACATTTAGATTGGTACCTGCAGAAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGA
 TCTATTTGGTTCTACTCGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCGGGCACAGATTTTACTGAAA
 ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTTTTCAAACCTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGG
 GACCAAGATGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTC
 CAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCT
 GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAAGA
 GCTTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号60)

40

【 0 1 5 9 】

2B11 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGA
 CAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACAT
 ACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
 CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATTCGGGACTGGGGTC
 AGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC

50

TGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTC
CCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA
ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号61)

【 0 1 6 0 】

2B11 V_L :

CTTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACTATCACTTGCCAGGCGCC
TCACGACATTAAGAAACAATTTAAATTGGTATCAACAGAAAACAGGGAAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTTCGACGCATCTA
ATTTGGAGACGGGAGTCCCATCAAGATTCAAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAAAATTTTGTGCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATATTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTGTATCTCCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTAGACAT
GAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGGAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG
TGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
CGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
AGTGT (配列番号62)

10

【 0 1 6 1 】

2D5 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGA
CAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTGTTGAACTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACAT
ACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCCGTGAAAAGTGAATAATTATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGCCCTCT
CGATGATAGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
CCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
GTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
CTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号63)

20

【 0 1 6 2 】

2D5 V_L :

CTTGACATCCAGTTGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGAGTCAACCATTACTTGCCGGGCCAG
TCAGACTATAAGTAGTTCGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAAAGCCCCTAACCTCCTGATCTATAAGCGTCTA
CATTAGAAGGTGGGGTCCCCTCGCGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
CCTGAAGATTTTGAACCTACTACTGTCAACAGAGTTACACTACCCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT
CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG
TGTGCCTGTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
CGAGAAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
AGTGT (配列番号64)

30

【 0 1 6 3 】

2E7 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGA
CAGTGTCTCTAGTAACAGTGTCTGTTGAACTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGGAGGACAT
ACTACAGGTCCAAGTGGTATTATGATTATGCAGTCTCTGTGAAAGTGAATAACCTTACCCAGACACATCCAAGAAC
CAGGTCTCCCTGCACCTGAACGCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGCCCTCT
CGATGATAGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
CCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
GTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
CTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号65)

40

【 0 1 6 4 】

2E7 V_L :

50

CTTGACATCCAGTTGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACTATCACTTGCCAGGCGCC
 TCACGACATTAAGAACAATTTAAATTTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAAGCCCTAAACTCCTGATCTTCGACGCATCTA
 ATTTGGAGACGGGAGTCCCATCAAGATTCAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAAATTTTGTGCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
 CCTGAAGATAATTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTCATGATCTCCCCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTAGACAT
 GAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG
 TGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
 CGAGAAACACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
 AGTGT (配列番号66)

【 0 1 6 5 】

10

2E9 V_H :

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
 CACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTA
 GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCGAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAAGATGAGGATTATGATTACGTTTGGGG
 GAGTTATCGACAATACCCAGTCGCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCAT
 CGGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
 CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCCT
 AGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC
 ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号67)

【 0 1 6 6 】

20

2E9 V_L :

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGGAGATAATTT
 GGGGTATAAATATGCTTCCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGATCATCTATCAAGATAAGAAGCGGC
 CCTCTGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATG
 GATGAGGCTGACTATTACTGTGAGCGTGGGACAGCAGCACTTCTGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCCT
 AGGTACAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCACCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGG
 TGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTG
 GAGACCACCACACCCTCCAACAAGCAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAA
 GTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA
 (配列番号68)

【 0 1 6 7 】

30

2G10 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAAGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGA
 CAGTGTCTCTAGCAACAGTGTCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACAT
 ACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCCGTGAAAAGTCGAATAATTATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
 CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGGCTCT
 CGATGATAGTTTTGATATCTGGGGCAAGGGACAATGGTACCCTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
 CCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCG
 GTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCCTCAGGACTCTA
 CTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号69)

【 0 1 6 8 】

40

2G10 V_L :

CTTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
 TCAGAGCCTCCTGCGTAGTAATGGATACAACATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGA
 TCTATTTGGGTTCTATTCGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCGGGCACAGATTTTACACTGAGA
 ATTAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACCCGTTCACTTTTGGCCAGGG
 GACCAAGCTGGAGATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTC

50

CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCT
GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA
GCTTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号70)

【 0 1 6 9 】

2G12 V_H :

GAGGTGCAGCTGGTGGACACTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
CACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATTAGTGGTA
GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTATTGTGCGAAAGATTGGGGAAGAAATATAGCAGTGGC
TGGTACCCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCC
TGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTC
CCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA
ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGT (配列番号71)

10

【 0 1 7 0 】

2G12 V_L :

CTTTCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGGTGTCCCAGGACAGACAGCCAGCATTACCTGCTCTGGAGATAA
ATTGGGACAAAAGTATGTTTCATGGTATCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCTACTGGTCATCTTTCAAGATGACAAGC
GGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGAATCTCTGGCTCCAACCTCTGGGCACACAGCCACTCTGACCATCAGCGGACCCAGGCT
ATGGATGAGGCTGAGTATTTCTGTCAAGCGTGGGACAGTAACACTGCCCTTATGTCTTCGGAAGTGGGACCCAGGTAC
CGTCCTAAGTCAGCCCAAGGCCAACCCACTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGCCAACAAGGCCA
CACTAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCG
GGAGTGGAGACCACCAACCCCTCCAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCCGAGCA
GTGGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAAT
GCTCT (配列番号72)

20

【 0 1 7 1 】

3C6 V_H :

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGG
GTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATA
GTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGCAGAAGGTTCCGGGATTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGA
GCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCA
GGCGCCCTGACCAGCGGCTCCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGAC
CGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
AAGTTGAGCCAAATCTTGT (配列番号73)

30

【 0 1 7 2 】

3C6 V_L :

CAGCCTGTGCTGACTCAGCCCCCTCGGTGTGAGTGGCCCCAGGAAAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACAT
TGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTGCTATGATGATAGCGACCCGGC
CCCCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAATTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTGAAGCCGGG
GATGAGGCCGACTATTACTGTGAGGTGTGGGATAGTAGTAGTACTCCTCCCTTCGGAAGTGGGACCAAGGTACCCGT
CCTAGGTGAGCCAAAGCCAACCCACTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGCCAACAAGGCCACAC
TAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA
GTGGAGACCACCAACCCCTCCAACAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCCGAGCAGTG
GAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGCT
CT (配列番号74)

40

【 0 1 7 3 】

3C7 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGA

50

CAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACAT
 ACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCCGTGAAAAGTCGAATAATTATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
 CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGGCTCT
 CGATGATAGTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCC
 CCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
 CTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号75)

【 0 1 7 4 】

3C7 V_L :

CTTGACATCCAGTTGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACTATCACTTGCCAGGCGCC
 TCACGACATTAAGAACAATTTAAATTTGGTATCAACAGAAAACAGGGAAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTTCGACGCATCTA
 ATTTGGAGACGGGAGTCCCATCAAGATTCAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAAAATTTTGTGCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
 CCTGAAGATATTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTGATGATCTCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTAGACAT
 GAAACGAACTGTGGTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG
 TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
 CGAGAAACACGAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
 AGTGT (配列番号76)

【 0 1 7 5 】

3D6 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAACCCCTCGCAGACCCTCTCAGTCACATGTGCCATCTCCGGGGA
 CAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGGAGGACAT
 ACTACAGGTCAAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAAACAGACACATCCAAGAAC
 CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGTCTCT
 CGATGATTCTTTTATATCTGGGGCCAAGGGACACGGTACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCC
 CCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
 CTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号77)

【 0 1 7 6 】

3D6 V_L :

CTTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCACCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACTATCACTTGCCAGGCGCC
 TCACGACATTAAGAACAATTTAAATTTGGTATCAACAGAAAACAGGGAAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTTCGACGCATCTA
 ATTTGGAGACGGGAGTCCCATCAAGATTCAGTGGAAAGTGGATCTGGGACAAAATTTTGTGCTCACCATCAGCAGCCTGCAG
 CCTGAAGATATTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTGATGATCTCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTAGACAT
 GAAACGAACTGTGGTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG
 TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTA
 CGAGAAACACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
 AGTGT (配列番号78)

【 0 1 7 7 】

3F7 V_H :

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGGAGACCCTGTCCCTCACTTGCACTGTCTCTGGTGG
 CTCTTCAGCAGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATTTCTGACA
 GTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCCAGTCTCGAGTACCATATCATTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
 AAAGTGAAGTCTGTGACCGCCACAGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGAGGCCCGCTATTTCATGATTACGTTTGGGG
 GAGTTATCGCCGCCCTCGCGAGAAATATGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTACCGTCTCAAGCGCCTCCACCAAGG
 GCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC
 TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTTACA

10
20
30
40
50

GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG
TGAATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号79)

【 0 1 7 8 】

3F7 V_L :

CTTAATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAGACGGTTACTATCTCCTGCACCCGCAGCAG
TGGCAGCGTTGCCAGCAACTATGTCCACTGGTACCAGCAGCGACCCGGCAGTTCCCCCTCATTCTAATCCATGAGTTTA
ACATAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCAGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCT
GGACTGACGACTGAGGACGAGGCTGATTACTATTGTCACTTCTGTCAACAACCTTCAATGGGTGCTCGGCGGAGGGAC
CAAGCTGACCGTCCCTGGGTGAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGTCACTCTGTTCCACCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCA
ACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCC
GTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGAC
GCCTGAGCAGTGGAAATCCCACAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCC
CTACAGAATGTTCA (配列番号80)

10

【 0 1 7 9 】

3H7 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGA
CAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACAT
ACTACAGGTCGAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCAATAACCATCAAACCAGACACATCCAAGAAC
CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGACGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGGTCTCT
CGATGATTCTTTTATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC
CCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACC
GTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
CTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号81)

20

【 0 1 8 0 】

3H7 V_L :

CTTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
TCAGAGCCTCCTGCGTAGTAATGGATACAACATTTAGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGA
TCTATTTGGGTTCTACTCGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCGGGCAGATTTTACACTGAAA
ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTTTTCAAACCTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGG
GACCAAGATGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
GAACTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC
CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCT
GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCGTCACAAAGA
GCTTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号82)

30

【 0 1 8 1 】

4B6 V_H :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGA
CAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACAT
ACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCCGTGAAAAGTCAATAATTATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
CAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGATCCGGGGGGGCTCT
CGATGATAGTTATGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACCGTCTCAAGCGCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCC
CCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACC
GTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
CTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCCA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号83)

40

【 0 1 8 2 】

4B6 V_L :

CTTGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
TCAGAGCCTCCTGCGTAGTAATGGATACAACATTTAGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGA

50

TCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAA
 ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTTTTCAAACCTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGG
 GACCAAGATGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC
 CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCT
 GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA
 GCTTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号84)

【 0 1 8 3 】

4C1 V_H :

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
 CACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTAGTGCTA
 GTGGTGGTAGCACAGACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTGTAT
 CTTCAAATGAGCAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAAAGAGCGTCCGGATTACGATTTTTGGAG
 TGCCTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACGCTTCAAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
 CACCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGGTACG
 GTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCT
 CAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA
 CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT (配列番号85)

10

【 0 1 8 4 】

4C1 V_L :

CTTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG
 TCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCGGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGA
 TCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAA
 ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGGTACACACTGGCCTCCGACTTTTGGCCAGGG
 GACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTC
 CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCT
 GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAACTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA
 GCTTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号86)

20

【 0 1 8 5 】

重鎖のC末端において任意選択で存在するFc領域は、以下のDNA配列の連続配列と
 80% (例として少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも
 98%又は100%)の同一性を持つ連続ヌクレオチド配列によりコードすることができる。

30

TTGCTAGCACCcTcCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
 GGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCcTGACCAGCGGCGTCCACACCTTCCCGGCTGTcCTACAGTCCCTCCGGACTCT
 ACTCCCTCAGCAGCGTAGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
 AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA
 ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
 CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT
 GCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCTGCACCAGGACTG
 GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
 AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCGTGACC
 TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC
 CACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTgACAAGAGCAGGTgGCAGCAGG
 GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGgCTCTGCACaAcCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
 AAA (配列番号87)

40

【 0 1 8 6 】

診断方法

本開示は原位置の又は対象から単離された生物学的試料中のuPARを検出する方法を

50

提供する。一定のがん（例として転移性がん）はuPARを過剰発現することから、uPARの検出は診断、療法の選出及び予後に役立つことができる。主題の方法は、細胞を含有する試料を主題の剤（例として抗体）と接触させること；及び試料中の細胞への主題の剤（例として抗体）の結合を直接的に又は間接的に検出することを一般に伴う。細胞がuPAR陽性細胞（例としてがん細胞）を持つ疑いがある若しくは持つことが知られている患者、治療を受ける患者、又は治療への感受性について試験される患者から得られた生物学的試料中にある場合、細胞はインビトロのものであることができる。細胞はインビボのものであることができ、例として細胞はがん細胞を持つことについての疑いがある患者、治療を受ける患者、又は治療への感受性について試験される患者中のものである。

【0187】

uPARを結合する抗体は、当該技術分野で知られている免疫診断技術において抗uPAR抗体を用いて、検出可能なレベルのuPARを発現する細胞（例としてがん細胞）を持つ又は持つ疑いがある対象の生物学的試料中でuPAR発現細胞を検出するのに用いることができる。本開示は、uPAR発現がん細胞の検出の目的に適している抗体を提供する。主題の抗体を用いて検出することができるがん細胞のいくつかの例は乳房のがん細胞を包含する。主題の方法により検出することができる乳がん細胞の例は、Her2/neu、エストロゲン受容体及びプロゲステロン受容体について陰性であるトリプルネガティブのがん細胞を包含する（Pal SKら（2009年）*Maturitas* 63:269~274ページ；Ahmad Aら（2009年）*Journal of Cellular Biochemistry* 108:916~925ページ）。検出することができる他のがんは、卵巣、前立腺、精巣、結腸、直腸、肺、脳、血液、骨、骨髄中のがん、又は白血病、線維肉腫及び神経膠芽腫を包含するがこれらに限定されない身体中の任意の他の器官若しくは組織中のがんを包含する。

【0188】

かかる診断は本明細書に開示される療法を受け入れられる患者を同定するのに、及び/又は療法への応答をモニターするのに有用であることができる。

【0189】

適切な免疫診断技術はインビトロ及びインビボの方法（例としてイメージング）の両方を包含するが、これらに限定される必要はない。本明細書に用いられる語句「インビボイメージング」とは、生きた哺乳類の全身において検出可能なタンパク質（例として検出可能に標識された3C6）の存在を検出する方法をいう。蛍光抗体及びルシフェラーゼがコンジュゲートされた抗体などの光学的に検出可能な剤又は放射性標識された剤はインビボイメージングにより検出され得る。インビボイメージングは2次元、同様に3次元の哺乳類画像を提供するのに用いられ得る。電荷結合素子カメラ、フォトダイオード、アバランシェフォトダイオード、光電子増倍管、CMOS又は3次元断層撮影装置がインビボイメージングを行うのに用いられ得る。例えば、Burdette JE（2008年）*Journal of Mol. Endocrin.* 40:253~261ページは、インビボイメージングのためのコンピュータ断層撮影、磁気共鳴イメージング、超音波検査、陽電子放出断層撮影、単一光子放射型コンピュータ断層撮影などの使用を概説する。生きた動物中のルシフェラーゼ発現のリアルタイムイメージングのために検出可能な標識を用いる方法は、本明細書に開示される主題の方法における使用に容易に適合させることができる（例としてGreer LFら（2002年）*Luminescence* 17:43~74ページ）。生きた動物中の蛍光タンパク質のインビボイメージングは、例としてHoffman（2002年）*Cell Death and Differentiation* 9:786~789ページに記述される。いくつかの実施形態において、インビボイメージングは生きた組織を透過するように設計された波長の光を発光する標識を検出することにより実施してもよい。かかる標識は赤外及び近赤外の色素又はタンパク質などの長波長発光の蛍光色素又はタンパク質を包含し、この色素又はタンパク質は約600nmから約800nm、約650nmから約800nm又は約700nmから約800nmの範囲で発光する色素又はタンパク質を包含するが、これらに限定されるものではない。

10

20

30

40

50

あるいは、生きた組織を透過する光を発するように設計された標識は非蛍光試薬を包含してもよく、この試薬は赤色シフトされたルシフェラーゼを包含するが、これに限定されるものではない。

【0190】

インビボイメージングはコンピュータ断層撮影、磁気共鳴イメージング、超音波検査、陽電子放出断層撮影、単一光子放射型コンピュータ断層撮影 (SPECT) などを伴うこともできる (詳細については Burdette J E (2008年) Journal of Mol. Endocrin., 40:253~261ページを参照)。SPECTはまた、主題の方法の中で統合X線CAT (CT) スキャナ (SPECT/CT) を使用して用いることもできる。上記の多くのインビボイメージング方法からの情報は対象中の抗体の3次元分布を提供することができる。より詳細については実施例14を参照されたい。

10

【0191】

主題の方法を用いて検出される細胞がインビボのものである場合、方法は患者中の特定のuPAR陽性細胞の有無及び/又はuPAR陽性細胞の位置を決定することができる。例えば主題の方法は、uPARについて陽性のがん細胞が元の腫瘍から離れて移動したかどうか、リンパ節中のuPARについて陽性のがん細胞の有無の決定を助けることができ、及び/又はuPAR陽性細胞を含有するリンパ節の同定を助けることができる。いくつかの実施形態において、本方法は、uPAR陽性がん細胞に向けられた抗がん治療を包含する抗がん治療の進行を追跡するのに用いられ得るが、これは例えばインビボで腫瘍サイズの何かしらの減少又は増加を検出することによる。本方法は局所注射を通じて主題の抗体を投与することを伴うことができ、局所注射は例として腫瘍部位若しくはuPARを発現する細胞を持つ疑いがある部位におけるもの、又は注入 (例として動脈又は静脈注入) を包含するが、これらに限定されない、抗体を全身的に投与することによるもの、又は注射 (例として静脈内、動脈内、髄腔内、頭蓋内、皮下、筋肉内又は当該技術分野で知られている他の注射の方法) によるものである。

20

【0192】

本方法がインビトロのものである場合、生物学的試料はuPARが存在し得る任意の試料であることができ、組織、細胞全体及びそれらの抽出物を包含するが、これらに限定されるものではない。例えばアッセイは、組織学的な組織試料中の細胞上のuPARの検出を伴うことができる。例えば組織試料は、(例としてホルマリン処理により) 固定され、支持体中 (例としてパラフィン中) に包埋されて提供してもよく、又は凍結された非固定されていない組織であってもよい。

30

【0193】

アッセイは幅広い種々の形態を取ることができ、競合、直接反応又はサンドイッチタイプのアッセイなどがある。アッセイの例は、ウエスタンブロット; 凝集試験; 酵素標識及び仲介イムノアッセイ、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) など; ビオチン/アビジンタイプのアッセイ; ラジオイムノアッセイ; 免疫電気泳動; 免疫沈降、蛍光活性化細胞分取その他を包含する。反応は一般に、蛍光標識、化学発光標識、放射性標識、酵素標識などの検出可能な標識又は色素分子、又は試料中の抗原と、抗原と反応する抗体との間の複合体の形成を検出する他の方法を包含する。

40

【0194】

アッセイは、抗原-抗体複合体が結合している固相支持体からの液相中の結合していない抗体の分離を伴うことができる。用いることができる固体支持体は、ニトロセルロース (例として膜又はマイクロタイターウェルの形態で); ポリ塩化ビニル (例としてシート又はマイクロタイターウェル); ポリスチレンラテックス (例としてビーズ又はマイクロタイタープレート); ポリビニリジンフルオリド; ジアゾ化紙; ナイロン膜; 活性化ビーズ、磁気応答ビーズその他などの基板を包含する。

【0195】

固体支持体が用いられる場合、固体支持体は通常は最初に、構成成分が支持体に十分に

50

固定されるように適切な結合条件下で固相構成成分（例として抗uPAR抗体）と反応する。時折、支持体への固定は、より良好な結合特性を有するタンパク質に、又は抗体結合活性又は特異性を著しく喪失することなく支持体上の抗体の固定を提供するタンパク質に、抗体を最初にカップリングすることにより増強することができる。適切なカップリングタンパク質は、ウシ血清アルブミン（BSA）を包含する血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、オボアルブミン及び当業者に周知の他のタンパク質などの高分子を包含するが、これらに限定されるものではない。抗体を支持体に結合させるのに用いることができる他の分子は、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマーその他を包含するが、ここで抗体を固定するのに用いられる分子は抗原に特異的に結合する抗体の能力に悪影響を与えないという条件である。かかる分子及びこれらの分子を抗体にカップリングする方法は当業者に周知である。

10

【0196】

固体支持体が固相構成成分と反応した後、あらゆる非固定の固相構成成分は洗浄により支持体から除去され、支持体に結合している構成成分は次いで適切な結合条件下でuPARを含有する疑いがある生物学的試料と接触させられる。あらゆる非結合のリガンドを除去するように洗浄した後、第二のバインダー成分が適切な結合条件下で添加されるが、ここで第二のバインダーは結合したリガンドと選択的に会合する能力がある。次いで当該技術分野で周知の技術を用いて第二のバインダーの有無が検出することができる。

20

【0197】

あるいは抗体は、例えばタンパク質A、タンパク質G、タンパク質L又は1つ若しくは複数の主題の抗体のFc領域を認識する抗体に共有結合的に付着されたビーズ又は他の固体表面を1つ又は複数の主題の抗体と接触させることを通じて、ビーズに非共有結合的にカップリングしてもよい。ビーズ又は他の固体表面は次いで試験される組織、細胞又は抽出物と接触させてもよく、あるいは洗浄され、集められて（例として遠心分離により）、抗体-抗原複合体の有無を決定するのに分析してもよい。

【0198】

ELISA法を用いることができ、この方法では、マイクロタイタープレートのウェルを主題の抗uPAR抗体を使用してコーティングする。uPARを含有する又は含有する疑いがある生物学的試料（例として活性があるuPARを発現する腫瘍細胞）が次いでコーティングされたウェルに添加される。抗体を結合させるのに十分なインキュベーション時間の後、プレート（複数可）は結合していない成分を除去するように洗浄され、検出可能に標識された第二の結合分子が添加される。第二の結合分子はあらゆる捕捉された抗原と反応するようにされ、プレートが洗浄されて、当該技術分野で周知の方法を用いて第二の結合分子の有無が検出される。

30

【0199】

望まれる場合、生物学的試料（例としてuPAR発現細胞）由来の結合されたuPARの有無は、抗体リガンドに対して向けられた抗体を含む第二のバインダーを用いて容易に検出することができる。例えば、多数の抗ウシ、抗ウサギ、抗ウマ、抗ラット、抗マウス及び抗ヒトの免疫グロブリン（Ig）分子は、当業者に知られている方法を用いて、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ又はウレアーゼなどの検出可能な酵素標識に容易にコンジュゲートされ得るものとして、当該技術分野で知られている。適当な酵素基質が次いで検出可能なシグナルを生成するよう用いられる。他の関係する実施形態において、競合的なタイプのELISA技術が当業者に知られる方法を用いて実施することができる。

40

【0200】

アッセイはまた、抗体とuPARとが沈殿条件下で複合体を形成するように、溶液中でも実行することもできる。例えば抗体は、直接的な化学的又は間接的カップリングなどによる当該技術分野で知られているカップリング技術を用いて固相粒子（例としてアガロースビーズその他）に付着させることができる。抗体がコーティングされた粒子は、次いで

50

、u P A Rを含有する疑いがある生物学的試料と適切な結合条件下で接触させるが、これは、洗浄及び/又は遠心分離を用いて沈殿させ、試料から分離することができる粒子 - 抗体 - u P A R複合体凝集物の形成を提供するためである。反応混合物は、上記の免疫診断法などの多数の標準的な方法のいずれかを用いて、抗体 - 抗原複合体の有無を決定するよう分析することができる。

【0201】

アッセイはまた、蛍光活性化細胞分取F A C Sにより溶液中で実行されることもできる。例えばu P A Rを含む又は含む疑いがあることが知られている生物学的試料は、本発明の抗体と接触させてもよい。主題の抗体は、本明細書に記述される又は一般に当該技術分野で知られているように、直接的に標識されていてもよく（例として蛍光で標識される）、又は間接的に標識されていてもよい（例として二次抗体を通じて）。生物学的試料は次いでF A C S装置を用いてカウントされ、場合によってはソートしてもよい。場合によっては固定された細胞がカウント又はソートしてもよく、他の場合には生きた細胞がカウント又はソートしてもよい。

10

【0202】

診断アッセイ中で用いられる試験試料はu P A Rが存在し得る任意の試料であることができ、細胞及び組織並びにそれらの抽出物を包含するが、これらに限定されるものではない。いくつかの実施形態において、とりわけがん細胞の検出を伴う実施形態などにおいて、インタクトな生きた細胞を含有する、診断される対象からの試料を用いてアッセイを実行するのが望ましいであろう。u P A R検出は次いで細胞の細胞外表面上で査定することができる。

20

【0203】

診断アッセイは原位置で実行されることもできる。例えば抗u P A R抗体は検出可能に標識され、細胞表面のu P A Rの発現により特徴づけられるがんを持つ疑いがある対象に投与され、当該技術分野で利用可能なイメージング法を用いて検出される検出可能に標識された抗体に結合されることができ、このイメージング法は本明細書に記述されるインビボイメージング法を包含するが、これに限定されるものではない。

【0204】

本明細書に記述される診断アッセイは、抗体に基づく療法を用いた療法をより受け入れやすい又はより受け入れにくいがんを対象が持つかどうかを決定するのに、同様に対象における治療の進行をモニターするのに用いることができる。診断アッセイはまた、他の併用療法の経過を査定するのに用いてもよい。それ故に診断アッセイは、臨床医による療法及び治療計画の選択を知らせることができる。

30

【0205】

u P A Rは抗体の特異的結合の検出により、例として図1に収載される抗体の抗原結合特異性を持つモノクローナル抗体(m A b)の特異的結合の検出により検出することができる。例えば、3 C 6反応性抗原、2 E 9反応性抗原及び/又は2 G 1 0反応性抗原はがん細胞の細胞表面上に存在し得る。抗原は透過処理された試験細胞中で検出されることもできる。例えば、正常細胞中の抗体染色パターンと違う3 C 6抗体(又は3 C 6の抗原結合特異性を持つ抗体)での染色パターンを呈する試験がん細胞は、3 C 6反応性抗原を呈するがん性の細胞として同定される。かかるがんはそれ故に、3 C 6反応性抗原に特異的に結合する抗体(例として3 C 6)を使用した療法を受け入れられる。

40

【0206】

前記の方法に従ってu P A Rでの免疫により生成される抗体を包含する上記のアッセイ試薬は、上記のイムノアッセイを実行するため、適切な説明書及び他の必要な試薬と共にキットの形で提供することができる。キットは、用いられる特定のイムノアッセイによって、適切な標識及び他の包装された試薬及び材料(すなわち洗浄バッファーその他)を含有することもできる。上記のものなどの標準的なイムノアッセイはこれらのキットを用いて実行することができる。

【0207】

50

治療方法

本開示のuPAR結合剤(例として抗体)は、uPAR発現細胞により仲介される増殖性障害の治療のための治療法としての使用を見出すことができる。例えば、1つ又は複数のuPAR結合剤(例として抗体)は、uPAR発現がんの療法(予防及び診断後の療法を包含する)において、又はがん細胞がuPARを発現するがんの診断において用いることができる。uPAR発現がんを持つ、持つ疑いがある、又はuPAR発現がんを発達させるリスクがある対象は、本明細書に記述される療法及び診断について考えられる。かかる対象から得られる試料は、本開示の方法における使用に同じく適している。

【0208】

「治療」により、宿主を苦しめる病態に関連した症状のせめて寛解が達せられることが意味されるが、ここで寛解はパラメーター、例として治療されている病態に関連した症状の大きさのせめて低減をいうように広い意味で用いられる。それ自体として治療はまた、宿主が病態、又はせめて病態を特徴づける症状にそれ以上苦しめないように、病的状態又はせめてそれに関連した症状が完全に阻害される、例として発生するのを妨げられる、又は止められる、例として終結させられる状況を包含する。それ故に治療は、(i)予防、すなわち、例として有害な状態への疾患の進行を妨げることといった臨床症状を発達させないようにさせることを包含する、臨床症状の発達のリスクを低減させること；(ii)阻害、すなわち、臨床症状の発達又はさらなる発達を抑止すること、例として腫瘍の負荷を減少させるように及び/又はがん転移を減少させるように例として活性のある疾患を緩和する又は完全に阻害すること、を包含する。かかる治療はまた、病的状態若しくはより進んだ疾患状態に向けた病的状態の進行又はせめてそれらに関連した症状が、低減され又は失速する状況も包含する。場合によっては、治療は、1つ又は複数の主題の抗体の投与を含む治療を受ける患者集団と治療を受けない対照集団との間の平均生存時間がより大きくなる状況を包含する。場合によっては、平均生存時間の増加は統計的に有意であり得る。

【0209】

種々の宿主が本方法に従って治療可能である。一般にかかる宿主は「哺乳類」又は「哺乳動物」であり、これらの用語は食肉目(例としてイヌ及びネコ)、齧歯目(例としてマウス、モルモット及びラット)及び霊長目(例としてヒト、チンパンジー及びサル)を包含する哺乳綱内の生物を記述するのに広く用いられる。多くの実施形態において、宿主はヒトであろう。場合によっては、宿主は胸腺欠損、ヌード又はその他の免疫不全である齧歯類(例としてマウス、ラット又はモルモット)であってもよい。場合によっては、宿主は、別の種由来のヒトの又は他の哺乳動物のがん細胞が宿主中に導入され、次いで1つ又は複数の主題の抗体が結果として生じる腫瘍を治療するために投与される異種指向性がんモデルを表してもよい。

【0210】

がん治療の方法において、uPARに特異的な1つ又は複数の剤(例として抗体)を投与することは、抗体に曝露されたがん性細胞の増殖の低減及び/又はがん細胞の転移阻害の低減を促進する。本方法はuPARに特異的な1つ又は複数の剤(例として抗体)を含有する薬学的に許容される製剤の有効量を対象に投与することを伴う。剤は細胞成長及び/又は転移を遅延させる又はそうでなければ抑止する作用を持つことができる。がん細胞に対する剤の作用は用量依存的であることができ、それ故に調整可能である。

【0211】

関係する実施形態において、治療される対象は、非がん性の細胞と比べて過度に活性のある又は過度に大量のuPARを発現する細胞を所有する。uPARはがん細胞などの細胞表面上に発現することができる。この態様は、uPARを発現する又は呈示する細胞は本開示の結合抗体を使用した治療をより受け入れることができるという点で、本開示の方法の文脈において有益であることができる。抗体は、例えばuPARの存在が検出可能でない時点で療法が開始される場合に対象に投与されることができ、それ故に限定的であることは意図されない。疾患症状の最初の徴候の前に、潜在的な疾患の最初の徴候の際に又

10

20

30

40

50

は疾患の診断の前若しくは後に抗体療法を開始することも可能である。

【0212】

がん

uPAR 結合剤（例として抗体）組成物は、細胞外でのアクセスが可能な細胞表面上に uPAR を発現するがんの治療中の抗がん療法において用いられ得る。

【0213】

正常なヒト組織中の uPAR 及びプラスミノゲン活性化系の他のメンバーの存在は、一過性で低い存在量であるように見える。この存在は、転移性がん細胞を包含するがん細胞などの異常な細胞の中でのみ高頻度である。uPAR の高レベルの発現は主にがん細胞中に存在することから、主題の組成物を使用した治療は、存在を検出してがんの成長を局在化させるのに用いることができ、かつ、がん増殖の成長を遮断することができる。uPAR は非がん性の細胞と比較してがん細胞上でより高いレベルで発現し得るが、これは本明細書に開示される療法の限定ではないことに留意すべきである。

10

【0214】

本明細書に記述される主題の組成物は、例えば例として腫瘍サイズを低減させるといったがん性細胞の増殖を低減させるため、腫瘍の負荷を低減させるため、転移潜在力を減少させるため（例としてがん細胞の移動を低減させるため）及び／又は患者における転帰を改善するため、対象（例としてヒト患者）に投与することができる。言い換えれば、組成物は、例としてがん転移につながるあらゆるシグナル伝達イベントを減少させることにより、細胞成長、細胞分裂を低減させるのに、及び／又はがん細胞の浸潤性を減少させるのに用いることができる。がんの浸潤性を減少させるいくつかの方法は、がん細胞の元のがん部位を離れる能力を低減させること、がん細胞の移動能力及び移動後のがん細胞の身体領域への付着能力を低減させることを伴う。

20

【0215】

とりわけ抗体療法を受け入れられるがんは、細胞増殖のマーカー（例として Ki-67 抗原）を実験することにより、及び／又は 1 つ若しくは複数の主題の抗体（例として 3C6、2G10、2E9）により若しくは uPAR に特異的な他の抗体により（例としてインビトロアッセイにおけるように）結合される uPAR の存在 / アクセス可能性を実験することにより、同定することができる。

【0216】

がんのタイプ

抗がん療法が前記の抗体組成物の投与を含む場合、抗がん療法はとりわけがん細胞に向けられたものであることができる。例えば 1 つ又は複数の主題の抗体（例として 3C6、2G10、2E9）は、uPAR 発現がん細胞を結合し得る。例において説明されるように、3C6、2G10 及び 2E9 は、結合するのに、同様に uPAR の様々な機能的活性を阻害するのに高度に有効である。

30

【0217】

uPAR を呈示するがんの例は上皮起源のがん細胞を包含するが、これに限定されるものではない。いくつかの例は、扁平上皮癌、血液系新生物、胃がん、リンパ節、結腸直腸がん、膵臓がん、肝臓がん及び免疫学的な障害である。他のより具体的ながんの例は、上で議論されるように、乳がん（例としてトリプルネガティブの乳房腫瘍）、卵巣がん、前立腺がん、肺がん、白血病、線維肉腫、神経膠芽腫及び前立腺がんを包含する。

40

【0218】

併用療法

本明細書に記述される治療方法は、1 つ又は複数の他の療法と組み合わせた uPAR 剤（例として抗体）の投与を包含することができる。下の併用療法は、1 つの療法のみが投与される処方計画と比べて相加的又は相乗的な利点を提供することができる。

【0219】

併用療法の例は、2 以上のタイプの剤（例として抗体）を対象に投与することを伴う。医薬組成物について上記されるように、治療方法は、例えば 1 つ又は複数の主題の抗体を

50

包含する異なるタイプの抗体を少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3又はそれ以上、同時に又は順次投与することを伴い得る。抗体は、結合するuPARのエピトープが相違してもよい。本方法は、例えば、療法の必要がある対象にクローン3C6由来の抗体並びにクローン2G10及び/又は2E9由来の抗体を投与することを伴ってもよい。抗体はまた、uPARのエピトープと同一のもの又は重複しているものを結合してもよい。本方法は、例えば各々uPARとuPAとの間の相互作用を阻害する2以上の抗体、若しくは各々uPARとインテグリンとの間の相互作用を阻害する2以上の抗体、若しくは各々uPARとビトロネクチンとの間の相互作用を阻害する2以上の抗体、若しくは各々uPARとuPARAPとの間の相互作用を阻害する2以上の抗体を投与することを伴ってもよく、又は本方法はuPARに結合するが1つ又は複数の先の相互作用を阻害しない2以上の抗体を投与することを伴ってもよく、又はそれらの任意の組み合わせを伴ってもよい。

【0220】

併用療法の方法は、様々なやり方でがんを治療することができる。主題の組成物について上述されるように、主題の方法は、1つ又は複数のuPARシグナル伝達経路を阻害する1つ又は複数の剤を利用することができる。2以上のシグナル伝達経路が剤による標的にされる場合、がん細胞の細胞接着、増殖及び/又は移動の相乗的阻害が存在することができる。例えば、結合剤により阻害することができるあるシグナル伝達経路はuPAのuPARへの結合により仲介される一方、別の経路はインテグリン(例として51又は31などの1インテグリン)のuPARへの結合により仲介される。

【0221】

主題の抗体と一緒に投与されてもされなくてもよい付加的な標準抗がん治療薬は、免疫療法、化学療法剤及び外科手術(例として下にさらに記述されるもの)を包含するが、これらに限定されるものではない。加えて主題の抗体の治療的投与は、抗がん療法を使用した対象の治療後の処置であることもでき、ここで抗がん療法は例えば外科手術、放射線療法、化学療法剤の投与その他であることができる。抗uPAR抗体を利用する免疫療法と組み合わせて主題の抗体を用いたがん療法は、とりわけ興味深い。

【0222】

例えば主題の抗体は、1つ若しくは複数の化学療法剤(例としてシクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニゾン(CHOP))と組み合わせて、並びに/又は放射線治療と組み合わせて、並びに/又は外科的介入(例として腫瘍を除去するための外科手術前後のもの)、放射線療法、骨髄移植、生物学的応答調節物質治療及びそのものの一定の組み合わせと組み合わせて、投与することができる。放射線療法は、ビームなどの外部から適用される線源又は小放射線源の移植によるもののいずれかから送達されるX線又はガンマ線を包含するが、これらに限定されるものではない。

【0223】

組み合わせでの使用に適している化学療法剤(uPAR抗体と別々に処方されるか、共に処方されるかのいずれか)は、種々の剤を包含することができる。かかる剤の例は下により詳細に議論される。

【0224】

化学療法剤はがん細胞の増殖を低減させる非ペプチド性(すなわち非タンパク質性)化合物であってもよく、細胞傷害剤及び細胞増殖抑制剤を範囲に含む。化学療法剤の非限定的な例は、アルキル化剤、ニトロソウレア、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生物質、植物(ツルニチニチソウ)アルカロイド及びステロイドホルモンを包含する。

【0225】

細胞の増殖を低減させるように働く剤は、当該技術分野で知られていて、広く用いられる。かかる剤はナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホン酸塩及びトリアゼンなどのアルキル化剤を包含し、メクロレタミン、シクロホスファミド(CYTOXAN(商標))、メルファラン(L-サルコリシン)、カルムスチン(BCNU)、ロムスチン(CCNU)、セムスチン(メチルCCNU)、スト

レプトゾシン、クロロゾトシン、ウラシルマスタード、クロルメチン、イホスファミド、クロラムブシル、ピボプロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスフォルアミン、ブスルファン、ダカルバジン及びテモゾロミドを包含するが、これらに限定されるものではない。

【0226】

代謝拮抗剤は葉酸アナログ、ピリミジンアナログ、プリンアナログ及びアデノシンデアミナーゼ阻害剤を包含し、シタラビン(CYTOSAR-U)、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル(5-FU)、フロクスウリジン(FudR)、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン(6-MP)、ペントスタチン、5-フルオロウラシル(5-FU)、メトトレキサート、10-プロパルギル-5,8-ジデアザ葉酸(PDDF、CB3717)、5,8-ジデアザテトラヒドロ葉酸(DDATHF)、ロイコボリン、リン酸フルダラビン、ペントスタチン及びゲムシタビンを包含するが、これらに限定されるものではない。

10

【0227】

適切な天然物及びそれらの誘導体(例としてツルニチニチソウアルカロイド、抗腫瘍抗生物質、酵素、リンホカイン及びエピポドフィロトキシン)は、Ara-C、パクリタキセル(TAXOL(登録商標))、ドセタキセル(TAXOTERE(登録商標))、デオキシコホルマイシン、マイトマイシン-C、L-アスパラギナーゼ、アザチオプリン;ブレキナル;アルカロイド、例としてピンクリスチン、ピンブラスチン、ピノレルピン、ピンデシンなど;ポドフィロトキシン、例としてエトポシド、テニポシドなど;抗生物質、例としてアントラサイクリン、塩酸ダウノルピシン(ダウノマイシン、ルビドマイシン、セルピジン)、イダルピシン、ドキシソルピシン、エピルピシン及びモルフォリノ誘導体など;フェノキシゾンビスシクロペプチド(phenoxizone biscyclopeptide)、例としてダクチノマイシン;塩基性糖ペプチド、例としてプレオマイシン;アントラキノン配糖体、例としてプリカマイシン(ミトラマイシン);アントラセンジオン、例としてミトキサントロン;アジリノピロロインドールジオン(azirino pyrrolo indole dione)、例としてマイトマイシン;大環状免疫抑制剤、例としてシクロスポリン、FK-506(タクロリムス、プロGRAF)、ラパマイシンなど;その他を包含するが、これらに限定されるものではない。

20

【0228】

他の抗増殖性の細胞傷害剤は、ナベルベン(navelbene)、CPT-11、アナストラゾール(anastrozole)、レトラゾール(letrozole)、カベシタビン、レロキサフィン(reloxafine)、シクロホスファミド、イフォスアミド(ifosamide)及びドロロキサフィン(droloxafine)である。

30

【0229】

抗増殖活性を持つ微小管作用剤(microtubule affecting agent)もまた使用に適していて、アコルヒチン(NSC406042)、ハリコンドリンB(NSC609395)、コルヒチン(NSC757)、コルヒチン誘導体(例としてNSC33410)、ドルスタチン10(dolstatin10)(NSC376128)、メイタンシン(NSC153858)、リゾキシシン(NSC332598)、パクリタキセル(TAXOL(登録商標))、TAXOL(登録商標)誘導体、ドセタキセル(TAXOTERE(登録商標))、チオコルヒチン(NSC361792)、トリチルシステリン(trityl cysterin)、硫酸ピンブラスチン、硫酸ピンクリスチン;エポチロンA、エポチロンB、ディスコデルモリドを包含するがこれらに限定されない天然及び合成エポチロン;エストラムスチン、ノコダゾールその他を包含するが、これらに限定されるものではない。

40

【0230】

使用に適しているホルモン調節因子及びステロイド(合成アナログを包含する)は、例としてプレドニゾン、デキサメタゾンなどの副腎皮質ステロイド;エストロゲン及びプロ

50

ゲスチン、例としてカブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、エストラジオール、クロミフェン、タモキシフェンなど；並びに副腎皮質抑制剤、例としてアミノグルテチミド；17 - エチニルエストラジオール；ジエチルスチルベストロール、テストステロン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、メチルプレドニゾロン、メチルテストステロン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、リユープロリド、フルタミド（ドロゲニル）、トレミフェン（フェアストン）及びZOLADEX（登録商標）を包含するが、これらに限定されるものではない。エストロゲンは増殖及び分化を刺激し、それ故エストロゲン受容体に結合する化合物はこの活性を遮断するのに用いられる。コルチコステロイドはT細胞の増殖を阻害し得る。

10

【0231】

他の化学療法剤は、金属錯体、例としてシスプラチン（cis-DDP）、カルボプラチンなど；ウレア、例としてヒドロキシウレア；及びヒドラジン、例としてN - メチルヒドラジン；エピドフィロトキシン（epidophyllotoxin）；トポイソメラーゼ阻害剤；プロカルバジン；ミトキサントロン；ロイコボリン；テガフルンなどを包含する。他の目的抗増殖剤は、免疫抑制剤、例としてミコフェノール酸、サリドマイド、デソキシスパーガリン（desoxy spergualin）、アザスポリン（azaspoline）、レフルノミド、ミゾリピン、アザスピラン（SKF105685）；IRESSA（登録商標）（ZD1839、4 - （3 - クロロ - 4 - フルオロフェニルアミノ） - 7 - メトキシ - 6 - （3 - （4 - モルフォリニル）プロポキシ）キナゾリン）などを包含する。

20

【0232】

プロテオソーム阻害剤、及びキナーゼ阻害剤、

【0233】

「タキサン」は、パクリタキセル、同様に任意の活性のあるタキサン誘導体又はプロドラッグを包含する。「パクリタキセル」（例えばドセタキセル、TAXOL（登録商標）、TAXOTERE（登録商標）（ドセタキセル製剤）、パクリタキセルの10 - デスアセチルアナログ及びパクリタキセルの3' N - デスベンゾイル - 3' N - t - ブトキシカルボニルアナログなどのアナログ、製剤及び誘導体を包含することが本明細書で理解されるべきである）は当業者に知られている技術を利用して容易に調製され得るし、又は例えばSigma Chemical Co., St. Louis, Mo.（タイヘイヨウイチイ（Taxus brevifolia）由来のT7402、又はタキサス・ヤナンシス（Taxus yannanensis）由来のT-1912）を包含する種々の市販源から得られ得る。

30

【0234】

パクリタキセルとは、通常化学的に利用可能な形態のパクリタキセルのみならず、アナログ及び誘導体（例として上述のTAXOTERE ドセタキセル）並びにパクリタキセルコンジュゲート（例としてパクリタキセルPEG、パクリタキセルデキストラン又はパクリタキセルキシロース）をもいうことが理解されるべきである。

40

【0235】

用語「タキサン」内にまた包含されるのが、親水性誘導体及び疎水性誘導体の両方を包含する種々の知られている誘導体である。タキサン誘導体は、ガラクトース及びマンノース誘導体；ピペラジノ；タキサン誘導体；6 - チオ誘導体；スルフェンアミド誘導体；並びにタキソール誘導体を包含するが、これらに限定されるものではない。タキサン誘導体はさらにパクリタキセルのプロドラッグを包含し得る。

【0236】

併用療法が投与される場合、抗体組成物の投与以外の療法又は治療は、主題の抗体の投与と同時に投与の前又は後の5時間以上までの間のいつでも、例として投与の前又は後の10時間、15時間、20時間以上において投与することができる。例として主題の抗

50

体が別の治療的処置の前又は後に投与される場合、主題の抗体及び他の治療的介入は、順次投与又は適用することができる。あるいは例として主題の抗体及び第二の療法が同時に投与され、例として第二の療法が薬剤である時に対象に投与される2つの別々の製剤又は単一の組成物中に組み合わせられたものとして主題の抗体と一緒に投与することができる場合、主題の抗体及び他の療法は同時に投与される。上に説明されるように順次投与されるか同時に投与されるかにかかわらず、治療は本開示の目的のために一緒に又は組み合わせで投与されると考えられる。

【0237】

投薬

本方法において、有効量の剤（例としてuPAR抗体）を必要とする対象に投与される。例えばいくつかの実施形態において、uPAR結合剤はuPAR発現がん細胞の成長及び/又は増殖の阻害を促進することができる。投与される量は、投与の目標、治療される個体の健康及び物理的なコンディション、年齢、望まれる回復の度合、主題の剤の製剤、治療する臨床医の医学的状況についての査定及び他の関連性のある因子によって変動することができる。投与される量は、通例の臨床試験を通じて決定することができる比較的広い範囲の中になるであろうと予想される。例えばがん細胞の成長を阻害するのに利用される主題の剤の量は、その他の点で不可逆的に対象に毒性となる量（すなわち最大耐性用量）のおおよそを超えない。他の場合において、この量は毒性の閾値の前後か又はずっと低いものであるが、なお有効な濃度範囲にあり、又は閾値用量と同じくらい低い。

10

【0238】

個々の用量は対象に対する測定可能な作用を生み出すのに必要とされる量を典型的に下回らず、抗体の吸収、分布、代謝及び排泄（「ADME」）についての薬物動態及び薬理に基づいて、それ故に対象内での組成物の性質に基づいて決定され得る。これは投与の経路、同様に投薬量についての考慮を包含していて、例えば非経口の（全身性又は局所性作用のために消化管以外の経路により適用される）適用のために調整することができる。例えば主題の抗体の投与は典型的には注射を通じたものであり、注射はしばしば静脈内、筋肉内、腫瘍内、頭蓋内、動脈内、眼球内、髄腔内、又はそれらの組み合わせである。

20

【0239】

uPAR結合剤（例として抗体）は注入又は局所注射により投与され得る。剤はまた、がん性の細胞を除去するための外科的介入などの他の治療的介入の前に、同時に、又は後に投与されることもできる。上述のとおり、uPAR抗体はまた併用療法の一部として投与されることもでき、併用療法においては免疫療法、がん化学療法又は放射線療法のうちの少なくとも1つが対象に投与される（上に詳細が記述される）。

30

【0240】

剤の性質及び対象内でのその相当する生物学的活性は、目的の標的に存在する剤の画分に対して典型的に判断される。例えばひとたび投与された抗体は、がん細胞及びがん性の組織の中でuPAR又は材料を濃縮する他の生物学的標的と共に集積することができる。それ故に目的の標的中に経時的に集積するように抗体が投与される投与計画は、個々の用量を低下させるための戦略の一部であることができる。このことはまた、例えばインビボでより緩徐に取り除かれる抗体の用量はインビトロのアッセイから計算される有効濃度と比べてより低下させることができる（例としてインビトロの有効量はmM濃度に近く、対してインビボはmM濃度より少ない）ことも意味する。

40

【0241】

例として用量又は投与計画の有効量は、uPARを阻害又は結合する所定の抗体のIC₅₀から判断することができる。「IC₅₀」により、インビトロの50%阻害に必要とされる薬剤の濃度が意図される。あるいは有効量は所定の抗体濃度のEC₅₀から判断することができる。「EC₅₀」により、インビボの最大作用の50%を得るのに必要とされる血漿濃度が意図される。

【0242】

一般的に、本開示のuPAR結合剤に関して、有効量は計算されるIC₅₀の200倍

50

を通常は超えない。典型的に、投与される抗体の量は計算される IC_{50} の約 200 倍未満、約 150 倍未満、約 100 倍未満であり、多くの実施形態では約 75 倍未満、約 60 倍、50 倍、45 倍、40 倍、35 倍、30 倍、25 倍、20 倍、15 倍、10 倍未満、さらに約 8 倍未満又は 2 倍である。1つの実施形態において、有効量は計算される IC_{50} の約 1 倍から 50 倍、時に計算される IC_{50} の約 2 倍から 40 倍、約 3 倍から 30 倍又は約 4 倍から 20 倍である。他の実施形態において有効量は計算される IC_{50} と同じであり、ある実施形態において有効量は計算される IC_{50} より多い量である。

【0243】

有効量は計算される EC_{50} の 100 倍を超えないものであり得る。例えば投与される抗体の量は計算される EC_{50} の約 100 倍未満、約 50 倍未満、約 40 倍、35 倍、30 倍又は 25 倍未満であり、多くの実施形態では約 20 倍未満、約 15 倍未満、さらに約 10 倍、9 倍、9 倍、7 倍、6 倍、5 倍、4 倍、3 倍、2 倍又は 1 倍未満である。1つの実施形態において、有効量は計算される EC_{50} の約 1 倍から 30 倍、時に計算される EC_{50} の約 1 倍から 20 倍、又は約 1 倍から 10 倍である。他の実施形態において有効量は計算される EC_{50} と同じであり、ある実施形態において有効量は計算される EC_{50} より多い量である。

10

【0244】

有効量はアッセイから、安全性及び漸増及び量域臨床試験、個々の臨床医 - 患者関係、同様に本明細書に記述される実施例部で説明されるものなどのインビトロ及びインビボのアッセイから容易に経験的に決定することができる。

20

【0245】

IC_{50} は、インビトロで剤が uPAR (例として uPAR 単独、又はインテグリンを伴う uPAR などの複合化された uPAR) に結合するのを阻害することにより計算され得る。この態様は、3C6 抗体が uPAR に結合するのを阻害する目的の剤の能力を査定することにより行われることができる。一般的に本手法は、標準的な ELISA により行われるが、これはプレートが例に記述されるように uPAR を使用して、濃度約 $1 \mu g / ml$ でコーティングされ、次いで抗体結合の阻害及び IC_{50} を決定するため、実験例に記述されるように処理され利用されるものである。これらの剤及び本目的の様々な態様に適している他の剤が利用することができる。

【0246】

投与の経路

方法を実施するのにおいて、投与の経路 (主題の剤が療法又は診断の必要がある対象中に持ち込まれるパス) は変動し得るが、ここでは主題の抗体についての代表的な投与の経路が下により高度に詳細に記述される。主題の剤単独又は上記の組み合わせは、全身的に (例として非経口投与により、例として静脈内経路により)、又は局所的に (例として局所の腫瘍部位において、例として腫瘍内投与により (例として固形腫瘍中に、リンパ腫又は白血病における転移リンパ節中に)、固形腫瘍を供給する血管内への投与など)、投与することができる。

30

【0247】

非経口投与に適している製剤は、水性及び非水性の等張性滅菌注射溶液を包含し、この注射溶液は抗酸化剤、バッファー、静菌薬、並びに製剤を予定される受容者の血液と等張にする溶質、並びに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤及び保存料を包含することができる水性及び非水性の滅菌懸濁液を含有することができる。製剤は単回用量又は複数回用量でアンプル及びバイアルなどの密封容器中に存在することができ、例えば注射については水などの滅菌液体賦形剤の使用直前の添加のみを必要とする冷凍乾燥された (凍結乾燥された) コンディションで保存することができる。即時注射溶液及び懸濁液は、前記の種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製することができる。

40

【0248】

本開示の製剤は、吸入を通じて投与されるエアロゾル製剤にされることもできる。これらエアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素その他などの加圧され

50

た許容される噴霧剤中に入れられることができる。これらエアロゾル製剤はまた、噴霧器又はアトマイザ中での使用のためなどの非加圧調製物のための医薬としても処方され得る。

【0249】

坐薬製剤はまた、乳化基剤又は水可溶性基剤などの種々の基剤と混合することによって提供される。膣投与に適している製剤はペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、発泡体として存在し得る。

【0250】

シロップ剤、エリキシル剤及び懸濁液などの直腸投与のための単位剤形が投与され得るが、ここで各投薬単位は抗体組成物を含有する組成物の予め決められた量を含有する。同様に注射又は静脈内投与のための単位剤形は、滅菌水、通常の生理食塩水又は別の薬学的に許容される担体中の溶液として、組成物中で抗体を含み得る。

本明細書に用いられる用語「単位剤形」とはヒト及び動物の対象のための単位の投薬として適切な物理的に分離した単位をいい、各単位は薬学的に許容される希釈剤、担体又は媒体との関連において望まれる作用を生み出すのに十分な量に計算された、本開示の化合物の予め決められた量を含有する。新規の単位剤形の明細は、利用される特定の化合物及び達せられる作用、並びに宿主中での各化合物に関連した薬力学に依存する。

【0251】

スクリーニングの方法

本開示のスクリーニング方法は、uPARを結合する結合剤についてのスクリーニングに利用することができる。本方法は、uPARを候補の剤と接触させること及び候補の剤のuPARとの結合を検出することを伴うことができる。本方法はまた、uPARを候補の剤と接触させること、並びにuPARを候補の剤と接触させるステップの前、後又は最中にuPARを1つ又は複数の知られているuPARのリガンドと接触させること、次いで候補の剤のuPARとの結合、又は1つ若しくは複数のリガンドのuPARとの結合、又は候補の剤及び1つ若しくは複数のuPARリガンド両方の結合を検出することを伴ってもよい。本方法はまた、uPAR結合剤をスクリーニングするための、抗体、アダプターをコードするコンストラクトのライブラリ、及び/又は小分子のライブラリの使用を伴ってもよい。結合剤は、その強力なuPAR活性の阻害、成熟したuPARの発現の阻害、及び/又はuPARと相互作用するタンパク質（リガンド及び/又はインテグリン、例として 1 インテグリン）についての結合アフィニティーの阻害で選択され得る。本方法は当該技術分野で知られている方法に従って遂行され得る。

【0252】

簡潔には、uPAR（例としてuPAR単独又はそのリガンド及び/又はインテグリンと複合化したuPAR）は候補の剤と接触させられる。候補の剤のuPARへの結合は、uPARについての結合アフィニティーがあるかを見るために測定される。リガンド（例としてuPA、ピトロネクチン及び/又はuPARAP）への、又はインテグリンファミリーのメンバーへのuPARの結合を破壊する候補の剤の能力もまた査定される。uPARのその相互作用する相手（例として 1 インテグリン）への結合を破壊するのに有効な候補の剤は、診断的及び治療的組成物並びに使用方法において用いられる可能性のある剤に選択される。uPARのその相互作用する相手への結合を破壊することができる候補の剤は、uPARのその相互作用する相手への結合アフィニティーを競合的に又は非競合的に減少させることができるものを範囲に含む。

【0253】

可能性のある剤のスクリーニングに用いられ得るuPARは、前記のuPARを包含する。主題のスクリーニング方法において用いられる代表的なuPARは、完全長uPAR、成熟uPAR、GPiアンカーを欠くuPARの断片などのuPARの断片、uPAR単独又は1つ若しくは複数のリガンドに若しくはインテグリンファミリーのメンバーに結合したuPARを包含するが、これらに限定されるものではない。

【0254】

スクリーニング方法の例において、uPAR（例としてuPA又は1インテグリンの存在下又は非存在下のuPAR）は、疎水性の吸着、ビオチン-アビジン相互作用及びNi²⁺-6xHis相互作用などの共有結合性又は非共有結合性の相互作用を通じて、ELISAプレート上又はビーズ上に固定され得る。候補の剤の集団は次いで固定化uPARと共にインキュベートされ、洗浄され、回収される。選択の間、結合された候補は回収されて同定される。複数の連続的な選択ラウンドは、uPARに特異的な結合剤として働く候補の選択を確実にする。プラズマ共鳴、ウエスタンブロット、機能アッセイ（例として浸潤性、プロテアーゼ活性及び/又は下流標的のリン酸化）、蛍光活性化細胞分取などの他の方法はまた、uPARを結合できる、又はuPARを結合して1つ若しくは複数のリガンド若しくは1インテグリンへのその相互作用を阻害できる剤をスクリーニングして選ぶのに用いることもできる。方法がプロテアーゼアッセイを伴う場合、蛍光発生ペプチド又は発色基質（例としてspectrazyme UK）が当該技術分野で知られている方法に従って用いられてもよい（例としてZimmermanら（1978年）PNAS 75:750~753ページ）。切断される基質の量又は基質が切断される速度の変化を検出することにより、剤は、uPARに結合されるプロテアーゼ活性の量を変化させるその能力に基づいて選択されるであろう。スクリーニング方法において利用される様々なアッセイは、候補の剤の存在下又は非存在下でのuPARの結合及び/又は活性を比較することを伴うことができる。

10

【0255】

候補のuPAR結合剤はまた、剤がリガンド結合部位又はインテグリン結合部位のいずれかについてのアフィニティーを持つことが知られている部位を含有するように操作してもよい。

20

【0256】

また本開示により考えられるのは、本明細書に記述される候補のuPAR結合剤をコードする核酸コンストラクトのライブラリである。ライブラリは、本明細書に開示されるあらゆる抗体に共通するポリペプチド領域（例としてフレームワーク領域又は重鎖CDR3）を1つ又は複数持つであろう複数の候補のプロテアーゼ結合剤をコードする。

【0257】

キット及びシステム

また提供されるのが、上記のように本方法を実施することにおける使用を見出し得るキット及びシステムである。例えば、キット及びシステムは抗uPAR抗体（例として3C6、2E9若しくは2G10又は本明細書に記述される任意の抗体）、かかる抗体をコードする核酸（特に3C6、2E9又は2G10の重鎖及び/又は軽鎖のCDRをコードする核酸）、又はかかる核酸を含有する組換え細胞などの本明細書に記述される組成物の1つ又は複数を包含し得る。キットの他の任意選択の構成成分は、抗uPAR抗体を投与するための及び/又は診断アッセイを実施するためのバッファーなどを包含する。キットの組換え核酸はまた、非3C6、2E9又は2G10コード核酸の定常領域へのそれらのライゲーションを促進するため、制限部位、マルチクロニングサイト、プライマー部位などを持ってよい。キットの様々な構成成分は別々の容器中に存在してもよく、又はある適合性構成成分は望まれる場合は単一の容器中で予め組み合わされていてもよい。

30

40

【0258】

本方法を実施するためのキット及びシステムは、本明細書に記述される抗体組成物を包含する1つ又は複数の医薬製剤を包含し得る。そのように、キットは1つ又は複数の単位投薬として存在する単一の医薬組成物を包含してもよい。なお他の実施形態において、キットは2以上の別々の医薬組成物を包含してもよい。

【0259】

上の構成成分に加えて、キットは方法を実施するための説明書をさらに包含し得る。これらの説明書は種々の形態でキットの中に存在してもよく、そのうちの1つ又は複数はキット中又はキット上に存在してもよい。これら説明書が存在し得る1つの形態は、適切な媒体又は基板上に印刷された情報としてのものであり、例として情報が印刷された1枚又

50

は複数枚の紙、キットの包装の中又は上、添付文書の中などである。なお別の手段は、情報が記録されているコンピュータ読み取り可能な媒体、例としてフロッピーディスク、CD、フラッシュドライブ、サムドライブなどであろう。存在し得るなお別の手段は、離れたサイトにおける情報にアクセスするためにインターネットを通じて用いられ得るウェブサイトのアドレスである。任意の好都合な手段がキット中に存在し得る。

【0260】

キットは細胞増殖性疾患を患う宿主を治療することにおける使用のために提供され得る。このキットは、uPARに特異的な抗体並びに対象中のがん細胞の成長及び/又は転移を阻害することによりがん性の病態を患う宿主を治療する方法における医薬組成物の有効な使用のための説明書を含む医薬組成物を包含する。かかる説明書は、適切な取り扱い特性、投与計画及び投与の方法その他を包含し得るのみならず、疾患に関連したuPARについて対象を任意選択でスクリーニングするための説明書をさらに包含することができる。この態様は本開示の抗体を使用した治療への対象の潜在的な応答性を判断するのにおいてキットの実施者を補助することができるが、これはがんのタイプ及び成長ステージに対する治療のタイミング及び持続期間を包含するものである。それ故に別の実施形態において、キットは、細胞外でのアクセスが可能ながん細胞表面上のuPARを検出するための、3C6、2E9及び/又は2G10などの抗体又は他の試薬をさらに包含してもよい。キットはまた、蛍光団などの検出可能な標識とのコンジュゲートを含有する抗体を包含してもよい。

10

【0261】

本明細書で利用される用語「システム」とは、本方法を実施する目的のために寄せ集められた単一の又は不同性の組成物中に存在する、本明細書に記述される抗体及び1つ又は複数の第二の治療剤の収集物をいう。例えば、寄せ集められて対象に共投与される別々に得られたuPARに特異的な抗体及び化学療法剤は、本開示によるシステムである。

20

【0262】

以下の実施例は本発明をさらに説明するものであり、決してその範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0263】

本明細書に記述される実施例及び実施形態は単に説明の目的であること、並びにそれらに照らした様々な修飾又は変更は当業者に示唆されるであろうもので、本出願の趣旨及び範囲並びに添付の特許請求の範囲内に包含されるものであることが理解される。本明細書に引用される全ての刊行物、特許及び特許出願は全ての目的のため、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0264】

材料と方法

以下の方法及び材料が下の実施例において用いられた。

【0265】

uPARの発現及び精製

ヒト可溶性uPARのcDNA(残基1~277)は昆虫細胞発現ベクターpACgp67(BD Biosciences)中にライゲーションされた。pACgp67及びBaculogold DNA(BD Biosciences)は、製造業者のプロトコールに従ってLipofectamine(登録商標)(Invitrogen)を用いてヨトウガ(Spodoptera frugiperda)9(Sf9)細胞中にコトランスフェクトされた。感染細胞の培養上清はトランスフェクション後7日で収集された。

40

【0266】

uPARは抗体アフィニティークロマトグラフィーにより捕捉され、溶出され、次いで一晚透析された後、溶出のために0から1MまでのNaClの直線勾配を用いてMonoQ(GE Life Sciences)カラム上で高速タンパク質液体クロマトグラフ

50

ィーにより精製された。

【0267】

ファージディスプレイライブラリの構築

完全なヒトナイーブFabファージディスプレイライブラリはde Haardら(1999年) J Biol Chem 274:18218~18230ページにより記述される方法を用いて構築された。簡潔には、末梢血リンパ球RNAがcDNAに変換された。結果として生じたライブラリは、重鎖にC末端ヘキサヒスチジン及びc-mycタグを融合するファージミドベクター中にクローニングされた。大スケールのファージレスキューはM13K07ヘルパーファージを用いて実施された。

【0268】

ファージディスプレイのパニング

ヒト可溶性uPARは50mM炭酸ナトリウム pH9.5中の10µg/mlでNunc Maxisorp(商標)96ウェルマイクロプレート(eBioScience)に固定され、結合されていないuPARが洗浄により除去された。uPARコーティングされたウェルは次いでミルクでブロッキングされ、洗浄され、予めブロッキングされた一定分量のファージライブラリがウェル間に分配された。結合されていないファージが洗浄で除かれ、結合されたファージは大腸菌(Escherichia coli(E.coli))TG1細胞を添加することにより回収された。感染TG1細胞は選択プレート上に広げられ、一晚増殖され、プレートのスクレーピングにより収集された。ファージは液体培地中でM13K07ヘルパーファージ感染を使用して増幅された。Fabをディスプレイするファージが培養上清から収集され、PEG沈殿により濃縮された。

【0269】

第二及び第三のパニングのラウンドは第一ラウンドと同様に実行されたが、弱く結合されたファージを除去するためにいっそうストリンジェントにされた。

【0270】

培養上清中のFabの発現

ファージ感染された大腸菌TG1コロニーは選択培地中で増殖され、対数増殖を示す培養液へのイソプロピル-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG;終濃度1mM)の添加によりFab発現が誘導された。培養液は一晚振とうされ、周辺質のFab発現が誘導されて、その小部分が培養上清中に漏出した。一晚のインキュベーションに続いて、漏出したFabを含有するTG1培養上清が遠心分離により集められた。

【0271】

周辺質画分の調製

96ウェルプレートスケールで増殖され、IPTGによりFab発現を誘導されたファージ感染TG1培養液からの細胞ペレットは、50µlの100mMトリス pH8.0、25%グルコース、100µg/ml鶏卵白リゾチーム中に再懸濁され、室温で30分間振とうされた。300µlの氷冷水が次いで添加され、強力なピペティングで混合された。周辺質画分は遠心分離により清澄化された。

【0272】

Fabの精製

個々のFabクローンは大腸菌BL21細胞中で(TG1細胞について記述されるように)発現された。周辺質画分は、製造業者のプロトコールに従ってChelating Sepharose(商標)(GE Life Science)を用いた固定化ニッケルキレートクロマトグラフィーにより精製された。

【0273】

精製されたタンパク質はSDS-PAGEにより分析され、ウシ血清アルブミン(BSA)標品を用いたBCA(商標)Protein Assay Kit(Pierce)を使用して濃度が推定された。各Fabは、製造業者のプロトコールに従ってPenta-His西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲート抗体(Qiagen)を用いたウエスタンブロットにより発現を分析された。ウエスタンブロットは、ECL P

10

20

30

40

50

l u s (商 標) 化 学 発 光 試 薬 (G E L i f e S c i e n c e) を 用 い て T y p h o o n 撮 像 装 置 (G E L i f e S c i e n c e) 上 で 可 視 化 さ れ た。

【 0 2 7 4 】

u P A R の E L I S A

u P A R 結 合 F a b は、5 0 μ l の 1 μ g / m l u P A R で コーティングされた N u n c M a x i s o r p (商 標) 9 6 ウェルプレート上で検出された。F a b (培 養 上 清、周 辺 質 画 分、又 は 2 2 . 5 μ g / m l の 精 製 さ れ た タ ン パ ク 質 の い ず れ か) は プレートのウェルにアプライされ、次いで洗浄された。結合された F a b は 1 0 0 μ g / m l の H R P コ ン ジ ュ ゲ ー ト さ れ た 抗 m y c 抗 体 ク ロ ー ン 9 E 1 0 (R o c h e) を 用 い て 検 出 さ れ た。u P A R で コーティングされていない3つのウェルは非特異的な F a b 結 合 の 対 照 10 として包含された。培養上清を用いた E L I S A アッセイについて、結合された 9 E 1 0 - H R P は、製造業者のプロトコールに従って 4 5 0 n m で の エ ン ド ポ イ ン ト 解 析 の た め の 1 - S t e p (商 標) T u r b o - T M B E L I S A (P i e r c e) を 用 い て 検 出 さ れ た。全ての他の実験について、結合された 9 E 1 0 - H R P は T M B 基 質 存 在 下 の 6 5 0 n m で の 吸 光 度 の 変 化 速 度 と し て 検 出 さ れ た。

【 0 2 7 5 】

配列解析

全 3 6 個 の u P A R 結 合 ク ロ ー ン の 重 鎖 及 び 軽 鎖 の 発 現 カ セ ッ ト が 配 列 決 定 さ れ た。重鎖及び軽鎖配列の相補性決定領域 (C D R) は C l u s t a l W 2 サ ー バ ー (L a r k i n ら (2 0 0 7 年) B i o i n f o r m a t i c s 2 3 : 2 9 4 7 ~ 2 9 4 8 ペ ー ジ) 20 上で整列された。

【 0 2 7 6 】

競合的 E L I S A

9 5 μ l の 各 F a b は、6 n M の 高 分 子 量 u P A (H M W - u P A) (A m e r i c a n D i a g n o s t i c a) と 組 み 合 わ さ れ た。結果として生じた混合物は、前のセクション中で記述された u P A R コーティングされたマイクロプレートウェルと共にインキュベートされた。u P A R で コーティングされないウェルは、H M W - u P A の 何 ら か の 非 特 異 的 結 合 に つ い て の 対 照 の た め に 包 含 さ れ た。u P A R で コーティングされ H M W - u P A な し で 全 て の F a b に 対 し て イ ン キ ュ ベ ー ト さ れ た ウェルは、非特異的なプロテアーゼ活性の対照のために包含された。最大の u P A 結 合 は、何 ら の F a b な し で H M W - u P A を u P A R コーティングされたウェルと共にインキュベートすることにより決定された。結合されていない F a b 及 び H M W - u P A は 洗 浄 に よ り 除 去 さ れ た。結合された H M W - u P A の 量 は、発色性の u P A 基 質 である S p e c t r a z y m e (登 録 商 標) U K (A m e r i c a n D i a g n o s t i c a) を 用 い て 処 理 さ れ た ウェル中でタンパク質分解活性をアッセイすること、及び 4 0 5 n m で の 吸 光 度 の 変 化 速 度 を モ ニ タ ー す る こ と に よ り 測 定 さ れ た。ウェルはさらにアッセイされ、前のセクション中で記述されたように 9 E 1 0 - H R P を 用 い て 結 合 さ れ た F a b の 存 在 が 検 出 さ れ た。 30

【 0 2 7 7 】

F a b 存 在 下 で の u P A 活 性

F a b は 2 つ の や り 方 で u P A の 直 接 的 な 阻 害 に つ い て 試 験 さ れ た。第一に、1 μ g / m l の H M W - u P A が u P A R コーティングされたプレート中でインキュベートされた ; 結合されていない H M W - u P A は 洗 浄 に よ り 除 去 さ れ、F a b は 2 5 μ g / m l で ウェルに添加された。F a b の 存 在 下 及 び 非 存 在 下 で の H M W - u P A の 活 性 は 上 記 の よ う に 測 定 さ れ た。第二に、1 0 n M H M W - u P A 及 び 低 分 子 量 u P A (L M W - u P A) (A m e r i c a n D i a g n o s t i c a) が 4 5 0 n M F a b の 存 在 下 及 び 非 存 在 下 で マ イ ク ロ タ イ タ ー プ レ ー ト 中 で イ ン キ ュ ベ ー ト さ れ た。H M W - u P A 及 び L M W - u P A の 活 性 は、上 記 の よ う に タ ン パ ク 質 分 解 活 性 を ア ッ セ イ す る こ と に よ り 3 連 で 測 定 さ れ た。 40

【 0 2 7 8 】

ヒト I g G 1 抗 体 の 発 現 及 び 精 製

50

重鎖及び軽鎖 Fab 配列は PCR により増幅され、pTT5 ベクター (National Research Council of Canada) の改変体であるベクター pTT5-SP-H1 中に別々にクローニングされた。重鎖及び軽鎖発現ベクターは NEB Turbo Competent E. coli (NEB) 中に形質転換され、大スケールのプラスミド調製が Pure Yield Plasmid Midiprep システム (Promega) を用いて実施された。全ての完全長抗体発現クローンの配列が確認された。

【0279】

the Canadian National Research Council の Yves Durocher からの寛大な贈与物である HEK-293-EBNA1 細胞は、50 µg/ml G418 を補われた GIBCO (登録商標) FreeStyle (商標) 293 Expression Medium (Invitrogen) に順応された。pTT5 プラスミドをコードする重鎖及び軽鎖は、製造業者のプロトコールに従って jetPEI (商標) (Polypplus) を使用して細胞中にコトランスフェクトされた。細胞はトランスフェクション後 4 日から 5 日間インキュベートされ、その後 IgG 含有使用済み培地が収集された。IgG は Protein A アガロース (Pierce) アフィニティーカラム上で精製され、100 mM クエン酸塩 pH 3.0 で溶出され、中和され、PBS に対して一晩透析されて、4℃ で保存された。IgG 発現レベルは Easy-Titer Human IgG Assay Kit (Pierce) 及び 280 nm での分光光度の読み取りを用いて決定された。

10

20

【0280】

表面プラスモン共鳴

uPAR と 1A8、2B1、2G10 及び 2E9 との間の相互作用アフィニティーは、Biacore 1000 を用いた平衡表面プラスモン共鳴 (SPR) により決定された。結合力の作用を抑制するため、抗体は Biacore CM5 チップの表面上に固定され、可溶性 uPAR が分析物として流された。4 個の Biacore CM5 チップフローセルは製造業者のプロトコールに従って、1-エチル-3-[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-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を使用して順次処理された。1A8、2B1、2E9 及び 2G10 IgG は各々 10 mM 酢酸ナトリウム pH 5.0 中で 5 µg/ml に希釈され、次いでおよそ 2700 の相対応答単位を得るように別々のフローセルに固定された。抗体固定後、フローセルは 1 M エタノールアミン pH 8.5 でブロックされた。基準表面を提供する EDC/NHS 活性化の後、各 CM5 チップ上のフローセルはすぐに 1 M エタノールアミン pH 8.5 を使用して処理された。

30

【0281】

可溶性ヒト uPAR は 450 nM、225 nM、112.5 nM、56.25 nM、28.13 nM、14.1 nM、7 nM、3.5 nM、1.8 nM 及び 0 nM の濃度でフローセルに対してインジェクトされた。結合された uPAR は 10 mM グリシン pH 1.5 を使用して除去された。機器応答値が記録され、解析のために Scrubber 2 (BioLogic Software) 中にインポートされた。データは二重参照法 (26) を用いて正規化され、Scrubber 2 中で実行される一部位結合モデルを用いて解析された。応答値はインジェクションの最終の 1 分間にわたる 0.05% 未満の変化により判定される安定なプラトーに到達した。

40

【0282】

フローサイトメトリー

HEK293 細胞又は HEK293 uPAR 細胞のいずれかのコンフルエントなフラスコは TrypLE Express (Gibco) を使用して処理された。収集された細胞は Stain Buffer (BD Pharmingen) 中に再懸濁され、 5×10^5 又は 1×10^6 個のいずれかの細胞が抗体染色のためにチューブに移された。1A8、2B1、2E9、2G10 及び全ヒト IgG (Sigma) は終濃度 5 µg/ml にな

50

るように添加された。2G10及び3C6 Fabは終濃度50 μ g/mlになるように添加された。抗体添加後、全ての試料は4で30分間ローテータ上でインキュベートされ、遠心分離により収集され、500 μ lのStain Buffer中に再懸濁された。IgG試料は再懸濁され、20 μ lのフルオレセインイソチオシアネート(FITC)コンジュゲートされたマウス抗ヒトモノクローナル抗体(BD Pharmingen)と共にインキュベートされ、一方、Fab試料はAlexa Fluor(登録商標)488コンジュゲートされたマウス抗cMycモノクローナル抗体(AbD Serotec)と共にインキュベートされた。5 \times 10⁵個の細胞がBeckton Dickinson FACSCaliburサイトメーターを使用して分析された。データ解析はFlowJoバージョン7.2.4を使用して実施された。

10

【0283】

マウス異種移植片の生成

皮下のMCF-7/Luc+(ルシフェラーゼを発現するMCF-7細胞)及び同所性のMDA-MB-231/Luc+腫瘍異種移植片は、MCF7及びMDA-MB-231-Luc乳がん細胞株を使用して生成された。MDA-MB-231-Luc細胞は安定的にルシフェラーゼを発現するように改変されたMDA-MB-231細胞であり、そのため腫瘍はインジェクトされたルシフェリンの生物発光検出を通じて撮像されることのできる。

【0284】

IgGの蛍光標識

2G10 IgGは製造業者のプロトコールに従ってAlexa Fluor 680(Invitrogen, Carlsbad, CA)で標識された。タンパク質はSuperdex 75 FPLCカラム(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)上で未反応の色素から精製された。標識の度合いは製造業者のプロトコール中で指示されるようにUV/Vis分光光度法を用いて決定された。1モルの2G10 IgGあたりで平均15モルの色素が達せられた。

20

【0285】

マウスの光学的イメージング

マウスは次のように取り扱われ、注射され、撮像された。簡潔には、Alexa Fluor 680標識2G10 IgGがマウス1匹あたり \sim 0.25nmol IgGに達するように尾静脈注射により投与された。画像は規定の間隔でLiving Image 2.50.2ソフトウェア(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)を用いてIVIS 50上で蛍光モードで集められた。uPAR陽性腫瘍(MDA-MB-231)及びuPAR陰性腫瘍(MCF-7)の両方について各々2匹のマウスが撮像された。生物発光画像もまた前記のように得られた。全てのインビボ研究は機関の承認の下で指示されたように実施された。

30

【0286】

接着アッセイ

細胞接着アッセイは前記のように実施された(Weiら(2007年)J Biol Chem 282:3929~3939ページ)。簡潔には、H1299細胞(2 \times 10⁵個)は抗uPAR Fab(10mg/ml)、RGDペプチド又はRADペプチド(0.4mM)を伴って又は伴わずに、フィブロネクチン(FN)コーティングされた(10 μ g/ml)プレート上に播種された。付着された細胞はメタノールで固定され、ギムザ染色が550nmでの光学濃度を測定することによる比色分析のために用いられた。FNはSigma-Aldrich(St. Louis, MO)から購入された。RGD及びRADペプチドはAnaspec(San Jose, CA)から購入された。

40

【0287】

ERKリン酸化アッセイ

血清枯渇させたH1299細胞は、表面に結合された内因性uPAを除去するために50mMグリシン-HCl、100mM NaCl、pH3.0で3分間洗浄され、0.5

50

M HEPES、0.1M NaCl pH7.5を使用して氷上で10分間中和された。細胞は10 μ g/mlの1A8、2B1、2E9、2G10又は対照ヒトIgGを使用して37 $^{\circ}$ Cで1時間前処理された。プロウPAは10nMになるように添加され、ERK活性化を惹起するために37 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートされた。インキュベーション後、細胞はプロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤(Sigma-Aldrich)を補われたRIPAバッファー(Pierce)中で溶解され、リン酸化及び全ERKについてプロットされた(Cell Signaling)。FN刺激性のERKリン酸化の場合においては、細胞は溶解前にFN(10 μ g/ml)コーティングされた表面上で30分間培養された。

【0288】

浸潤アッセイ

H1299ヒト肺がん細胞(1 \times 10⁵個)は1A8、2B1、2E9、2G10又は対照ヒトIgG(各10 μ g/ml)を使用して、及び2G10、3C6、2G10+3C6 Fab(各10 μ g/ml)を使用して、37 $^{\circ}$ Cで1時間前処理された。細胞は次いでFNをプレコーティングされた底部を有するBD Biocoat(商標)Matrigel(商標)Invasion Chamber(BD Biosciences)上に播種され、次いで5mg/ml BSAを含有する無血清DMEM中で一晩培養された。ウシ胎仔血清が下のチャンパーに添加された。24時間後、膜の上部チャンパー面上のMatrigel及び細胞が除去され、膜の底部チャンパー面上の細胞はメタノールで固定され、ギムザで染色され、10%酢酸中で抽出され、595nmにおいてプレートリーダー中で測定された。全てのアッセイは3連で実施され、データは抗体によるパーセント阻害として表現された： $\% \text{阻害} = ((OD_{595, Ab} - OD_{595, Ctrl}) / OD_{595, Ab}) \times 100$ 。

【0289】

抗uPAR共免疫沈降

H1299細胞(1 \times 10⁷個)はプロテアーゼ阻害剤(Sigma)及び1mM PMSFを補われたTriton溶解バッファー(50mM HEPES、pH7.5、150mM NaCl及び1% Triton X-100)中で溶解された。清澄化された溶解液は最初に抗uPAR Fab(10 μ g/ml)と共に4 $^{\circ}$ Cで1時間、次いでPenta-His抗体(Qiagen)と共に1時間、最後に50 μ lの混合されたProtein A-及びProtein G-Agaroseビーズと共に一晩、インキュベートされた。免疫沈降物はSDS-PAGE並びにuPAR及びVインテグリンについてのウエスタンブロット分析に供された。抗uPARモノクローナル抗体(R2)はMichael Ploug(Finsen Lab、Copenhagen、Denmark)からの寛大な贈与物であった。抗Vインテグリンポリクローナル抗体はChemicon(Temecula、CA)から購入された。

【0290】

実施例1 フェージディスプレイはuPAR結合Fabを同定する

パニングの前に、マイクロプレート表面への非変性uPARの結合がuPARコーティング表面への高分子量uPA(HMW-uPA)の結合を検出することにより確認された。HMW-uPAの結合は、uPARコーティングされたプレートをHMW-uPAと共にインキュベートしてストリンジェントに洗浄した後に、uPA基質であるspectrazyme UKを使用したマイクロプレートウェル内の特異的なタンパク質分解活性の存在により検出される。

【0291】

ヒトuPARを結合する能力があるFabが3ラウンドのパニングの後に得られたが、このパニングにおいては弱く結合されたFab提示フェージを除去するための洗浄がいくつかストリンジェントにされた。384個の独立したクローンがパニングの最終ラウンドから評価された。これらのFabを細菌中で発現させることができることを確認するため、培養上清(IPTG添加後に漏れたFabの小画分がその中に存在)がuPARに結合

10

20

30

40

50

する能力がある F a b の存在について試験された。これら 384 個のクローンから、96 個が再現性のある u P A R 結合に基づいてさらなる分析のために選択された。周辺質タンパク質画分が次いで 96 個のクローンから調製された。これらの画分を使用した E L I S A 分析は、培養上清のそれと比較してより強く、より一貫性のシグナルを与えた。96 個のクローンのうち、36 個の候補がバックグラウンドの 8 倍を超える強さの平均シグナルを有する u P A R の強いバインダーとして確認された。

【0292】

実施例 2 配列解析及び小スケール発現は固有の F a b を同定する

36 個の候補は配列決定され、100 ml 培養スケールでの発現について評価された。重鎖及び軽鎖発現カセットの配列決定は、36 個の候補のうち 22 個が固有の F a b 配列を持つことを明らかにした。これらの配列の C l u s t a l W アラインメントは、又は軽鎖を持つことにより定義される 2 つの別個の抗体グループを有するパーセント同一性樹状図を生じさせた (図 1、パネル A)。いくつかの高度に関係した配列のサブグループは軽鎖グループ内にあることが明白な一方、比較的低い度合いの配列類似性を有する 8 個の抗体は軽鎖グループ内にあることが明白である。図 1 のパネル A 中で、同一クローンの数が重複した F a b 配列について括弧の中に指し示される。軽鎖同一性 (又は) により定義される F a b のサブグループもまた標識される。垂直の線は 82% の配列同一性の閾値を指し示す。82% カットオフの右側に枝分かれする配列は等価と考えられる。

10

【0293】

固有の F a b 各々の 6 個の相補性決定領域 (C D R) のアラインメント (図 1、パネル B) は、C D R 配列が図 1、パネル A の樹状図中で観察されるサブグループ分けパターンを決定することを示す。抗体 C D R 間の最も低い対配列同一性は 22% であった。各 C D R ループの名称はアラインメントの上に指し示される。82% より高い配列同一性を有する F a b 重鎖及び軽鎖タンパク質配列は一緒にグループ化された (囲み内)。

20

【0294】

22 個の固有の F a b の大腸菌中での発現レベルは 100 ml 培養液の I P T G 誘導の後に決定された。ヒスチジン - タグ付加された周辺質画分からの F a b は浸透圧ショックにより得られ、ニッケルをキレートしたセファロースカラム上で精製され、ウエスタンブロットにより発現について分析された。アスタリスクは大腸菌 R o s e t t a - g a m i (商標) B 細胞中で発現しなかった F a b クローンを指し示す。2 E 9 以外の残りの F a b の小スケール発現は、250 µg / L 大腸菌培養液を生じさせた。生じた F a b 2 E 9 の発現は 5 倍低かった。

30

【0295】

精製された F a b は u P A R E L I S A によりさらに性質決定された。結合された抗体の初めの測定は異なる F a b 間の大きなばらつきを呈したが、固定化 u P A R への u P A 結合を測定する対照実験は同様のばらつきを示さなかったことから、これらの差異は異なる F a b 間の結合様式又はアフィニティーの本来の不同性を反映することが示唆される。

【0296】

さらなる探求のための F a b のリストは、個々のクローンをその配列及び細菌の発現能力に基づいてクラスター化することにより狭められた。82% より高い又は 82% と等しい配列類似性を有する配列は一緒にクラスター化された (図 1)。これらのグループ分けから、代表的なクローンが大腸菌 R o s e t t a - g a m i (商標) B 細胞中の発現レベルに基づいて各グループから選択されたが、これは囲みの左側に指し示され、このようにさらなる分析のために F a b のリストを 12 個のクローンに狭めるものである。

40

【0297】

実施例 3 競合的 E L I S A は u P A R 結合について u P A と最も競合的なものとして 2 E 9 及び 2 G 1 0 を同定する

精製された 12 個の残りのクローン由来の F a b は、固定化 u P A R への結合について

50

u P A と競合する能力について分析された。u P A の存在は、各 F a b の存在下及び非存在下での結合されたタンパク質分解活性の量により測定された (図 2)。u P A の存在は結合されたタンパク質分解活性の量により決定されたもので、反応進行曲線からの初期速度として報告される。最大の u P A 結合は F a b なしで u P A をインキュベートすることにより決定されたもので、「 F a b なし」と標識される。データは、u P A R 結合について u P A と競合しない F a b から最大の競合を示す F a b まで、左から右にプロットされる。1 A 8 及び 2 B 1 について、u P A の存在下及び非存在下で u P A R に結合される F a b の量は E L I S A により決定された。このアッセイは u P A / u P A R 相互作用のコンペティターとして 2 E 9 及び 2 G 1 0 を同定した。対照は、これらの抗体が u P A のタンパク質分解活性を直接的に阻害しないことを示した。

10

【 0 2 9 8 】

競合的 E L I S A のデータはまた、1 A 8 及び 2 B 1 は u P A R 結合について u P A と競合しないことも示唆した。これらの F a b は弱い u P A コンペティターではないことを検証するため、u P A 非存在下で結合された F a b に対する u P A 存在下で結合された F a b の比が計算された (図 2、挿入図)。u P A の存在下及び非存在下で結合される F a b の量は同じ u P A R コーティングされたウェル中で決定されたもので、それ故、F a b のいくらかの損失は測定間の処理に起因すると予想される。このアッセイは 1 A 8 及び 2 B 1 が u P A R 上の非 u P A 結合部位を結合することを検証した。2 つの最も強い非競合的バインダーである 1 A 8 及び 2 B 1、並びに 2 つの最も強い競合的阻害剤である 2 G 1 0 及び 2 E 9 がさらなる分析のために選ばれた。

20

【 0 2 9 9 】

実施例 4 哺乳動物細胞中の完全長 I g G 発現は大量の抗体を生産する

1 A 8、2 B 1、2 G 1 0 及び 2 E 9 の重鎖及び軽鎖配列は、H E K - 2 9 3 - E B N A 1 細胞中への一過性トランスフェクションによる高レベル発現のため哺乳動物発現ベクター p T T 5 - S P H 1 中にクローニングされた。この一過性発現ベクターのプラスミドマップは図 3 に示される。所定の抗体について、p T T 5 - S P - H 1 重鎖ベクター及び p T T 5 - S P - H 1 軽鎖ベクターの両方が発現のため H E K - 2 9 3 - E B N A 1 細胞中にコトランスフェクトされた。変動する比の重鎖及び軽鎖発現プラスミドのコトランスフェクションは、重鎖及び軽鎖 D N A の等量は軽鎖プラスミド粒子が重鎖プラスミド粒子と比較してわずかに過剰であることに相当し、これが最も高いレベルの抗体を生産することを明らかにした。1 μ g : 4 μ l の全 D N A : P E I 比、及びサブコンフルエントな H E K 2 9 3 - E B N A 1 細胞の維持は、90% より高いトランスフェクション効率をもたらした。トランスフェクション後の収集に最適な時間は 4 から 5 日であった。抗体発現収量は配列依存的で、1 m l スケールで 20 m g / L から 100 m g / L 培養上清の間、大スケールの試験 (500 m l) において 10 m g / L から 50 m g / L の間で変動した。

30

【 0 3 0 0 】

実施例 5 表面プラスモン共鳴は u P A R についての低い n M アフィニティーを明らかにする

u P A R と抗体 1 A 8、2 B 1、2 G 1 0 及び 2 E 9 との間の一価の相互作用アフィニティーは、B i a c o r e 1 0 0 0 を用いた平衡表面プラスモン共鳴法により決定された。分析物 (u P A R) 濃度に対する機器応答の解析は、ナノモルの範囲中にある一価の解離定数を生じさせた (図 4)。

40

【 0 3 0 1 】

実施例 6 フローサイトメトリーは u P A R 発現細胞の特異的標識を示す

同定された抗体の u P A R を結合する能力は、u P A R が細胞表面上に提示されることから、フローサイトメトリーにより分析された。膜結合されたヒト u P A R を安定発現する H E K - 2 9 3 細胞は完全長の抗 u P A R I g G 又はアイソタイプ対照で標識された。抗 u P A R I g G は抗ヒト F c F I T C - コンジュゲート二次抗体を使用して検出された。標識された細胞はフローサイトメーター上で分析された (図 5)。ヒト抗 u P A R 抗体の相対的染色強度を定量化するため、同じゲート (図 5 中に示される水平の線) が

50

各試料に適用された。uPAR発現についての細胞染色陽性の%はゲートの上に指し示される。試験された全ての抗体はuPAR発現HEK-293細胞の力強い標識を指し示したが、uPAR発現を欠く元のHEK-293細胞の標識は示さなかった。

【0302】

同様の実験ががん細胞株を用いて2G10 Fabについて行われた。MCF-7（低uPAR発現）及びMDA-MB-231（高uPAR発現）は、uPARの相対的発現が以前に性質決定されている2つの乳がん細胞株である。MCF-7細胞及びMDA-MB-231細胞は2G10と接触させられ、2G10の結合は2つの細胞株間を区別することが可能であったが、これはuPARのレベルと一致していた（図11）。

【0303】

実施例7 IgGはuPAR陽性腫瘍を標識するが、uPAR陰性腫瘍を標識しないインビボでの抗体の結合を試験するため、蛍光で標識された2G10 IgGはヌードマウス中のuPARを発現する乳房腫瘍異種移植片を撮像するのに用いられた。uPARを発現することが知られるがん細胞株は、フローサイトメトリーを通じて2G10結合について予めスクリーニングされた。2つの乳房細胞株、2G10により標識される能力についてMDA-MB-231、及び検出可能に標識される能力がないことについてMCF-7が選ばれた。図6中の代表的なマウスにおいて示されるように、2G10 IgGはuPAR発現MDA-MB-231腫瘍異種移植片を標識することが可能であったが、MCF-7移植片を標識することは不可能であった。図はMDA-MB-231についての24時間時を示すが、シグナル強度が最も高かった時にシグナルは1週間にわたって持続したことは、これらの抗体が好ましい薬物動態を持つであろうことを示唆する。

【0304】

MDA-MB-231腫瘍異種移植片から切片が採取されてパラフィン中に包埋された。uPARについて探索するため、これらの切片はAlexa Fluor 488標識2G10 Fab（パネルA）及びFITC標識3C6 Fab（パネルB）で標識された（図13）。2G10及び3C6の染色パターンは異なり、この差は2G10及び3C6が異なるuPARエピトープに結合することを示唆する。パラフィン包埋された高悪性度の乳房腫瘍を染色する2G10 Fabの染色能力が図13のパネルC中に示される。その後パラフィン包埋が続くホルマリン固定のより厳しい保存条件の下、2G10はそのuPARエピトープに結合することが可能であった。2G10染色はいくつかの細胞中で他よりも強いことが見出された。高強度の染色細胞はマクロファージであろう。これらの抗体はuPARに特異的であることが見出されたが、それはパラフィン包埋された膜結合uPARを過剰発現する操作されたHEK293細胞株に対する探索が高い結合シグナルをもたらす一方、元のHEK293細胞株はそうでないためである。

【0305】

追加のインビボ実験が高又は低uPAR発現細胞株（それぞれMDA-MB-231及びMCF-7）を移植された免疫不全マウスを用いて行われた（図12）。触知可能な腫瘍が現れる移植後期間の後、2ナノモルの標識2G10又は3C6 IgG抗体がマウス中に注射された。注射48時間後、抗体で染色されたマウスの写真が撮影された。MDA-MB-231細胞由来のuPAR発現腫瘍中で抗体の取り込みが観察されたが、uPAR欠損細胞（MCF-7）由来の腫瘍中では観察されなかった。抗体アンタゴニスト2G10及び3C6の両方とも同じ結果を生み出した（上の2列及び下の2列）。

【0306】

実施例8 2E9及び2G10はH1299の浸潤を減少させる

H1299細胞もまた、uPARへのuPA結合に依存的な様式で、Matrigelなどの細胞外マトリックス構成成分の中を通過して移動する又は浸潤することがインビトロで示されている（Tangら（2008年）J Cell Sci 121:3747~3756ページ）。インビトロでの強いMatrigel浸潤表現型は、インビボでのがん細胞の転移潜在力と相関すると思われる。図6のパネルA中に示される実験のため、H1299細胞は抗体（10 µg/ml）：2E9、2G10、2B1及び1A8を使用し

10

20

30

40

50

て前処理され、その後24時間、Matrigelを浸潤させられた。中を通過して移動してフィルターの底部に付着された細胞は固定され、ギムザで染色され、10%酢酸で抽出された。細胞の浸潤性はOD_{595nm}を測定することにより評価される。H1299細胞によるMatrigel浸潤に対する抗体1A8、2B1、2G10及び2E9の作用の解析は、2G10及び2E9はいずれも移動を阻害する能力がある一方、1A8及び2B1はその能力がないことを示す(図7、パネルA)。

【0307】

実施例9 2E9及び2G10はH1299細胞中のuPA依存的なERKリン酸化を減少させる

ヒト肺がん細胞株H1299は、uPAのuPARへの結合により仲介されるシグナル伝達イベントに依存的な増殖促進性のERKリン酸化及び活性化を呈する。この細胞株はuPA結合が引き金になるuPAR依存的な増殖促進性シグナルを阻害する抗uPAR抗体の能力を試験するのに用いられた。内因性uPARを発現するH1299細胞は血清枯渇され、酸洗浄され、抗体(10µg/ml)を使用して前処理され、次いでプロuPA(10nM)と共にインキュベートされた。溶解液は抗pERK(上部パネル)及び抗全ERK(下部パネル)を使用してイムノプロットされた(図7、パネルB)。

【0308】

結果は、抗体1A8及び2B1は試験された条件下でERKリン酸化を阻害しないことを実証する。一方、2E9及び2G10はuPARへのuPA結合と競合するもので、ERKリン酸化を阻害することが可能である。

【0309】

実施例10 3C6はH1299細胞中でFN依存的なERKリン酸化を減少させ、FN及びVN依存的な接着を抑制する

H1299細胞中のFN依存的なERKリン酸化の活性化は、uPAR/1/FN複合体の形成に依存する。固有の抗uPAR FabのいずれかがuPAR/1相互作用を妨害するかを決定するため、FNコーティングされたウェル中に播種されたH1299細胞中のERKリン酸化を減少させる能力が試験された。実施例9における実験と同様に、H1299細胞は血清枯渇され、酸洗浄され、Fab(10µg/ml):2B1、2B7、2B11、2D5、2E9、2G10、2G12、3C6及び4C1を使用して前処理され、FNコーティングされた表面(10µg/ml)上で30分間培養されて、その後溶解された。溶解液は抗pERK(上部)及び抗全ERK(下部)を使用してイムノプロットされた(図8、パネルA)。3C6はFN依存的なERKリン酸化を顕著に減少させることが可能であるとして同定された。

【0310】

3C6の機能的作用をさらに性質決定するため、FN接着アッセイが利用された。1/FN相互作用は、RGDペプチドによる拮抗に感受性であるuPAR非依存的な背景において、及びRGDペプチドに耐性であるuPAR依存的な背景において、発生することができる(Weiら(2007年)J Biol Chem 282:3929~3939ページ)。H1299細胞は、抗uPAR抗体及びRGD又はRADペプチドを伴って又は伴わずに、FNコーティングされた(10µg/ml)又はVNコーティングされた(5µg/ml)96ウェルプレート上に播種された。RGDペプチド及び3C6の両方の存在下で、FNコーティングされたウェルへのH1299接着は完全に抑制された(図8、パネルB)。この作用の選択性は、RADペプチド及び陰性対照としてのFab形態のuPAコンペティターである2G10の包含により検証された。

【0311】

uPAR/1インテグリン仲介性の接着を破壊する3C6の能力は一般化可能かを決定するため、uPAR/31仲介性H1299細胞のVNへの接着能力が性質決定された。FN接着アッセイと同様のアッセイにおいて、3C6はRGDペプチドの存在下でH1299細胞のVNへの接着も妨げることができると見出されたが(図8、パネルB)、このことは3C6が複数の1インテグリンとのuPAR複合体の機能を特異的に

10

20

30

40

50

遮断することが可能であることを示唆する。図8のパネルC中に見られるように、2つの異なるECMコーティングに対する各抗体処理についての接着を比較する正規化グラフが、RGD処理されたウェルから読み取られた平均値をRAD処理されたウェルからの平均値で除算することにより得られた。3C6処理は2G10処理よりも少なくとも4倍大きく、uPAR仲介性のインテグリン接着を破壊することが見出された。

【0312】

実施例11 3C6 FabはuPAR過剰発現HEK細胞を結合する

3C6は細胞の表面上に提示されるuPARを認識することを確認するため、抗uPAR IgGを性質決定するのに用いられたのと同じフローサイトメトリーアッセイがここで用いられた。3C6依存的な細胞の作用の調査はFab形態の抗体を使用してなされたことから、この形式の抗体(例としてFab)がフローサイトメトリーのために用いられた。2G10 Fabは、細胞性uPAR発現HEK-293細胞を結合する拮抗的な抗体の能力についてのベンチマークとして包含された。uPARを過剰発現するHEK293細胞は、細胞表面のuPARに結合する3C6の能力を確認するため、3C6及び2G10で染色された。結果は図9のパネルA中に示される。破線の白いプロファイルは2G10 Fabでの染色を表す。網掛けのプロファイルは3C6 Fabでの染色を表す。実線の白いプロファイルはFab染色はないが、AlexaFluor 488コンジュゲートされた二次を包含するものを表す。データは、たとえ2G10 Fabほど頑強ではなくても、3C6がuPARを過剰発現する細胞に結合することができることを指し示す。

【0313】

実施例12 3C6はH1299細胞中のuPAR及び51の会合を妨げる

3C6は51インテグリンとのuPARの会合を直接的に遮断したかを決定するため、3C6及び2G10がH1299溶解液からuPARを免疫沈降するのに用いられた。H1299溶解液は抗uPAR Fab(2G10又は3C6)、Penta-His抗体及びProtein A/Gアガロースと共にインキュベートされた。結果として生じた免疫沈降物は、uPAR及び51インテグリンの両方についてのウエスタンブロットで分析された。

【0314】

結果として生じた免疫沈降物は、uPAR及び51インテグリンの両方についてのウエスタンブロットで分析された。結果は、3C6は51インテグリンとのuPARの会合を妨げる一方、2G10は妨げないことを指し示す(図9、パネルB)。

【0315】

実施例13 3C6はH1299の浸潤を減少させ、2G10及び3C6は架橋されたマトリックスの中を通ったH1299浸潤を相乗的に阻害する

移動はECMの接着及び分解の調節を必要とする複雑な現象である。図7、パネルA中に示されるように、2E9及び2G10によるuPAR/uPA複合体の拮抗はH1299細胞の浸潤を阻害する。3C6はuPAR/1複合体を拮抗することによる浸潤に対する同様の作用を持つかを決定するため、uPAコンペティターFabである2G10との3C6 Fabの潜在的な相乗作用がMatrigel/コラーゲンI又はコラーゲンIの中を通った細胞浸潤を遮断する能力について試験された。H1299細胞は抗体(2G10、3C6及び2G10/3C6を5~10µg/mlで)を使用して前処理され、その後、コラーゲンIコーティングされた(図10、パネルA)又はMatrigel/コラーゲンIコーティングされた(図10、パネルB)24ウェルTranswellプレートの上部膜上に播種された(10⁵個の細胞/ウェルを3連で)。細胞は24時間インキュベートされた。中を通して移動してフィルターの底部に付着された細胞は固定され、ギムザで染色され、10%酢酸で抽出された。細胞の浸潤性はOD_{595nm}を測定することにより評価される。結果は、未処理の対照中で観察される阻害のパーセンテージとして表現される。図10のパネルA中に示されるように、2G10及び3C6 FabがコラーゲンIの中を通った浸潤を阻害するだけでなく、組み合わされた投薬もまた相乗的

10

20

30

40

50

な応答を呈する。

【0316】

追加として、より生理的に移動及びECM分解に関連する手がかりを含有したマトリックスを提供するため、浸潤アッセイがMatrigel及びコラーゲンIの両方からなる基質に対して繰り返された。結果は、相乗的応答をもたらす同時的な2G10及び3C6処理を伴うコラーゲンIコーティングされたインサートで観察されたものと一致した(図10、パネルB)。

【0317】

実施例14 ^{111}In を使用したDOTA-2G10 IgGの放射標識及びインビボSPECT/CTイメージング

放射標識のため、DOTA-2G10 IgGは1×PBSで2µMに希釈された。これは250µg/ml前後の重量体積濃度に相当する。200µlのDOTA-2G10 IgG一定分量(50µgのIgG)は0.01N HCl中で12µlの $^{111}\text{InCl}_3$ (2.59mCi)と共に37°Cで50分間インキュベートされた。放射性TLCを用いて、DOTAキレートを使用した ^{111}In の標識効率は90%と決定された。放射標識抗体は、1×PBSバッファーを使用して予め平衡化されたPD-10カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより、未反応の $^{111}\text{InCl}_3$ から分離された。0.5mlの画分がカラムから集められ、放射性TLCにより放射標識IgGの存在についてアッセイされた。高放射性純度を有する画分は次いで、サイズがおよそ400nm³のMDA-MB-321がん異種移植片を担う6週齢のヌードマウスの尾静脈中に注射された。注射は250µCiの2G10 IgGを使用してなされた。マウスは次いでGamma Medica Ideas X-SPECT SPECT/CTスキャナを用いて48時間時に撮像された。CT及びSPECT画像は製造業者により提供されたソフトウェアを用いて再構成され、融合された。データは次いでVisage Imaging Amiraソフトウェアを用いて解析された。 ^{111}In -DOTA-2G10 IgGで標識されたMDA-MB-321異種移植片の処理された画像は、4つの異なる視野を伴って図14中に示される。濃い灰色の領域により指し示されるように、2G10はuPAR発現腫瘍を特異的に標識した。MDA-MB-321異種移植片の背側、腹側及び矢状断図もまた図14中の様々なパネルで示される。

【0318】

実施例15 2G10はMDA-MB-231細胞中で細胞増殖抑制状態を誘導可能である

MDA-MB-231細胞は、ヨウ化プロビジウム染色を用いて細胞死又は細胞増殖抑制特性の何らかのレベルを査定するため、1µMの2G10 Fabを使用して4日間処理された。細胞増殖抑制特性とは細胞の成長及び/又は分裂の阻害をいう。図15中のフローサイトメトリー実験により示されるように、2G10は処理された細胞中で細胞増殖抑制状態を誘導し、細胞をG0/G1細胞周期状態に捕捉した。

【0319】

実施例16 アラニンスキャニングされたuPAR変異体上の3C6のエピトープマッピング

インテグリンコンペティター抗体である3C6の結合エピトープについての初めの解析を提供するため、フローサイトメトリーに基づくエピトープマッピング研究がアラニンスキャニングされたuPARの変異体に対して実行された。図16、パネルA中に示されるのは、結果の描写である。各変異はuPARのドメイン3中に位置し、3C6結合により弱く又はより強い程度に影響を与える。したがって、考慮される全てのuPAR変異はuPARのドメイン3中に存在し、これは1インテグリン結合への主要な貢献者として考えられる。この部位はuPA結合部位の反対側に位置する(図16、パネルB)。

【0320】

先の発明は理解の明確性の目的のための説明及び例としていくらか詳細に記述されているが、一定の変更及び改変が添付の特許請求の範囲の趣旨又は範囲から逸脱することなく

10

20

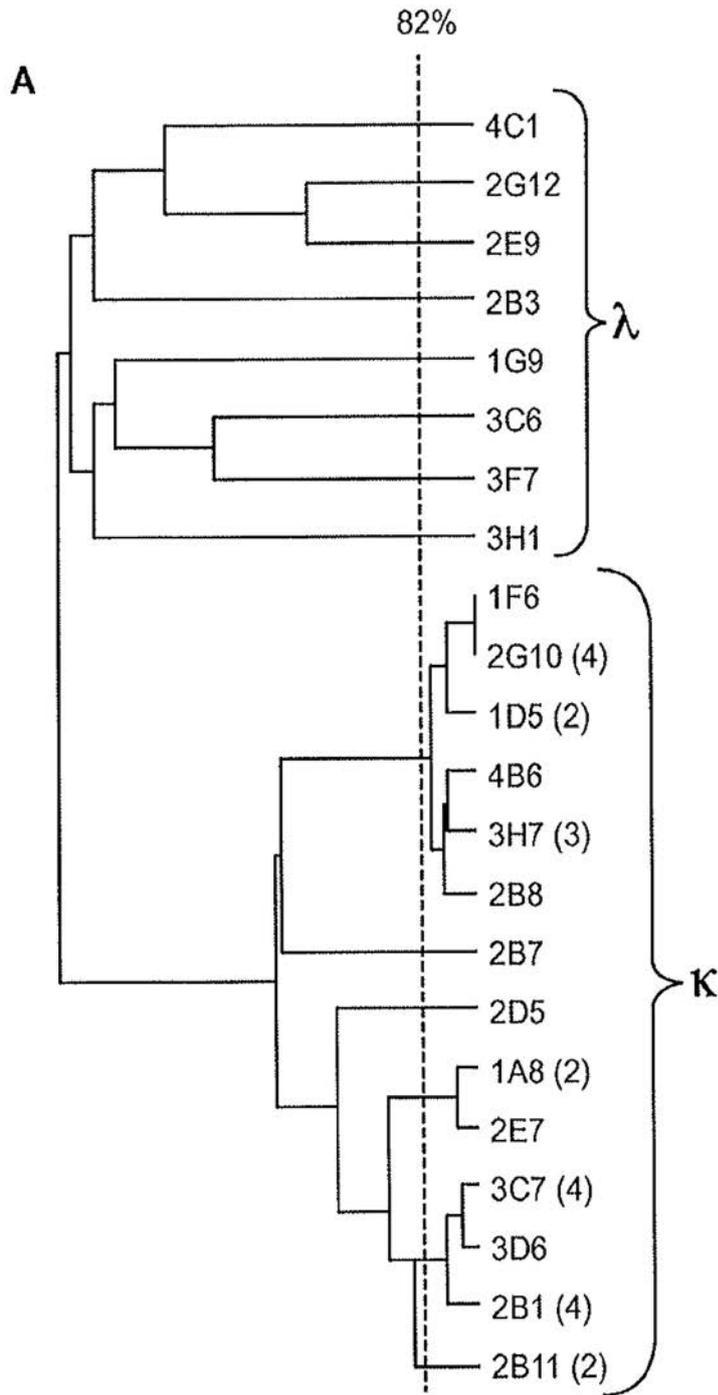
30

40

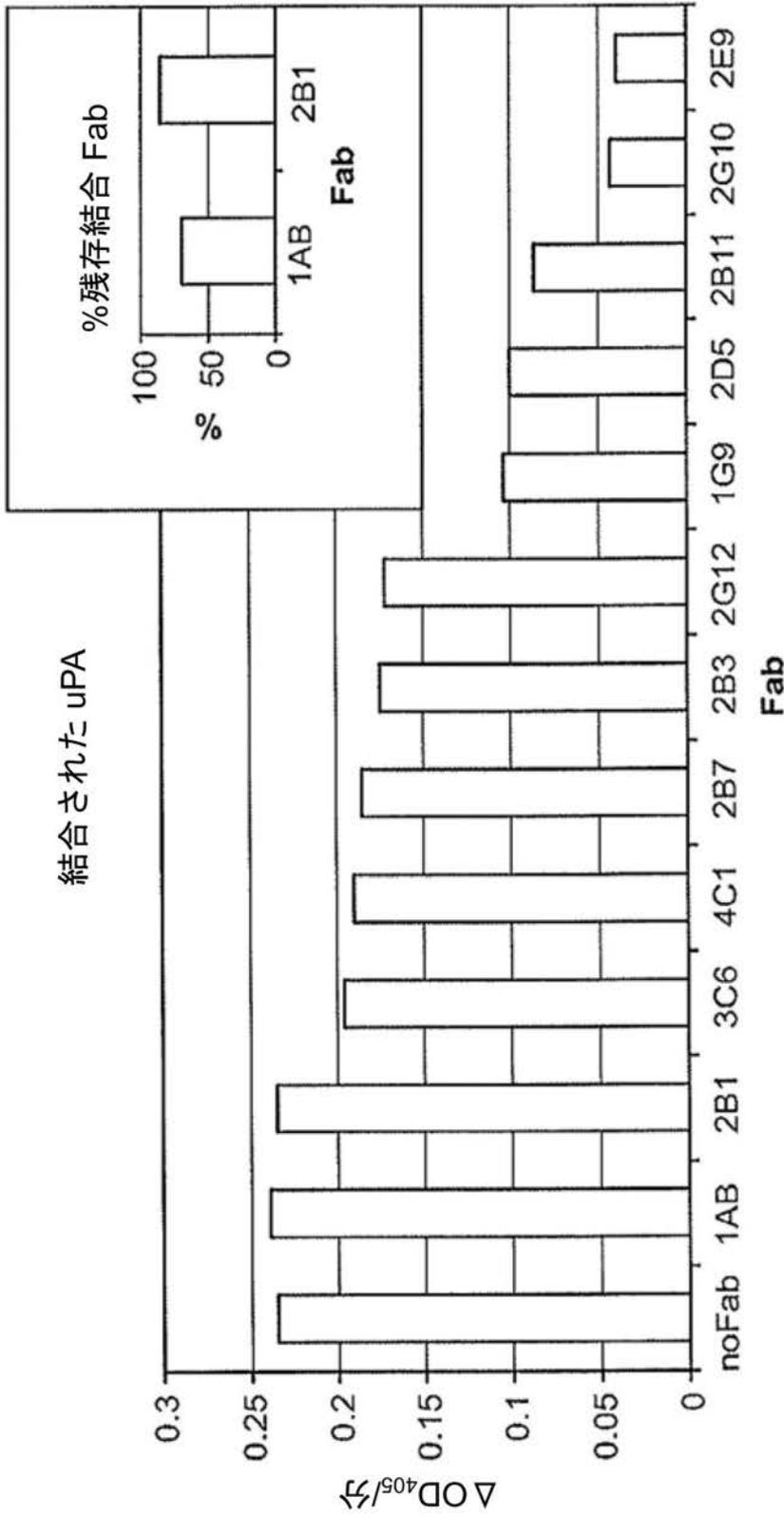
50

なされ得ることは、本発明の教示に照らして当業者に直ちに明らかである。

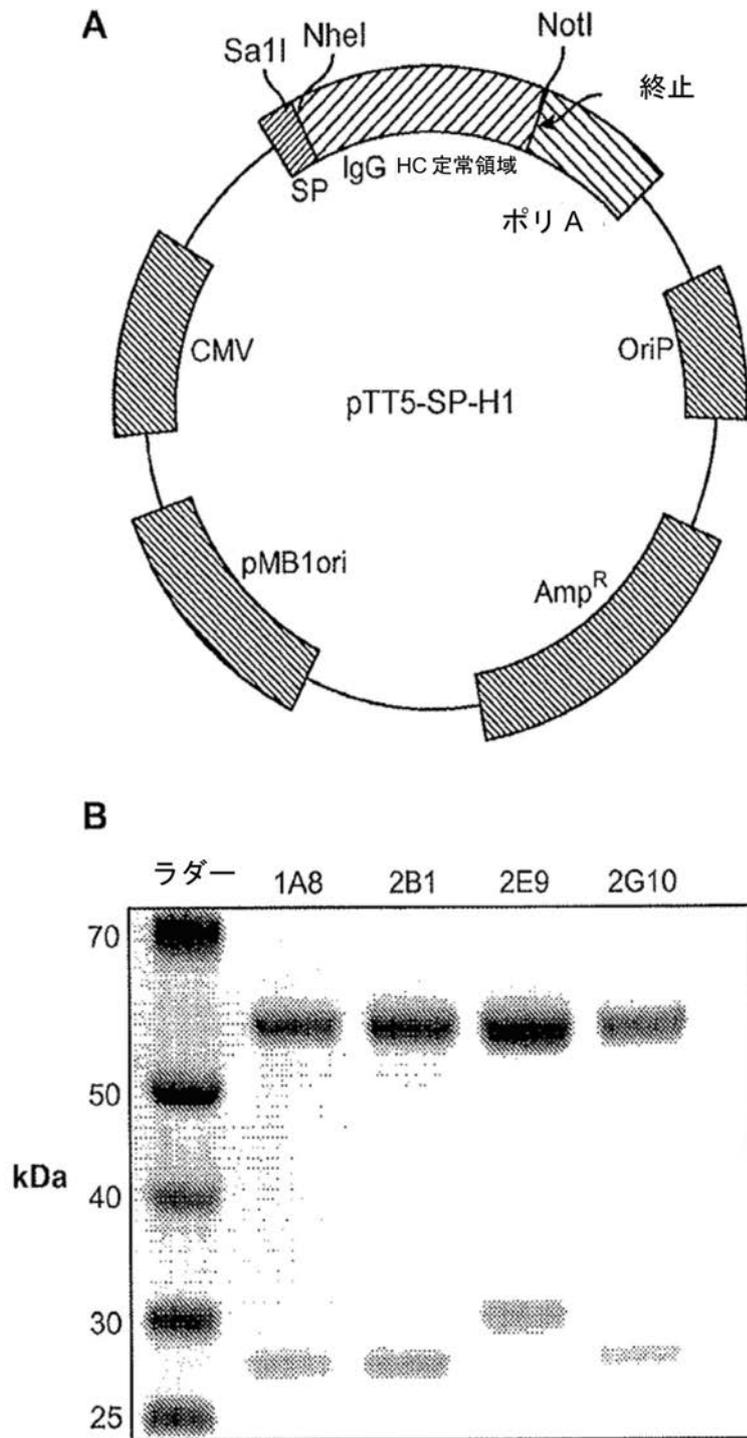
【 図 1 A 】



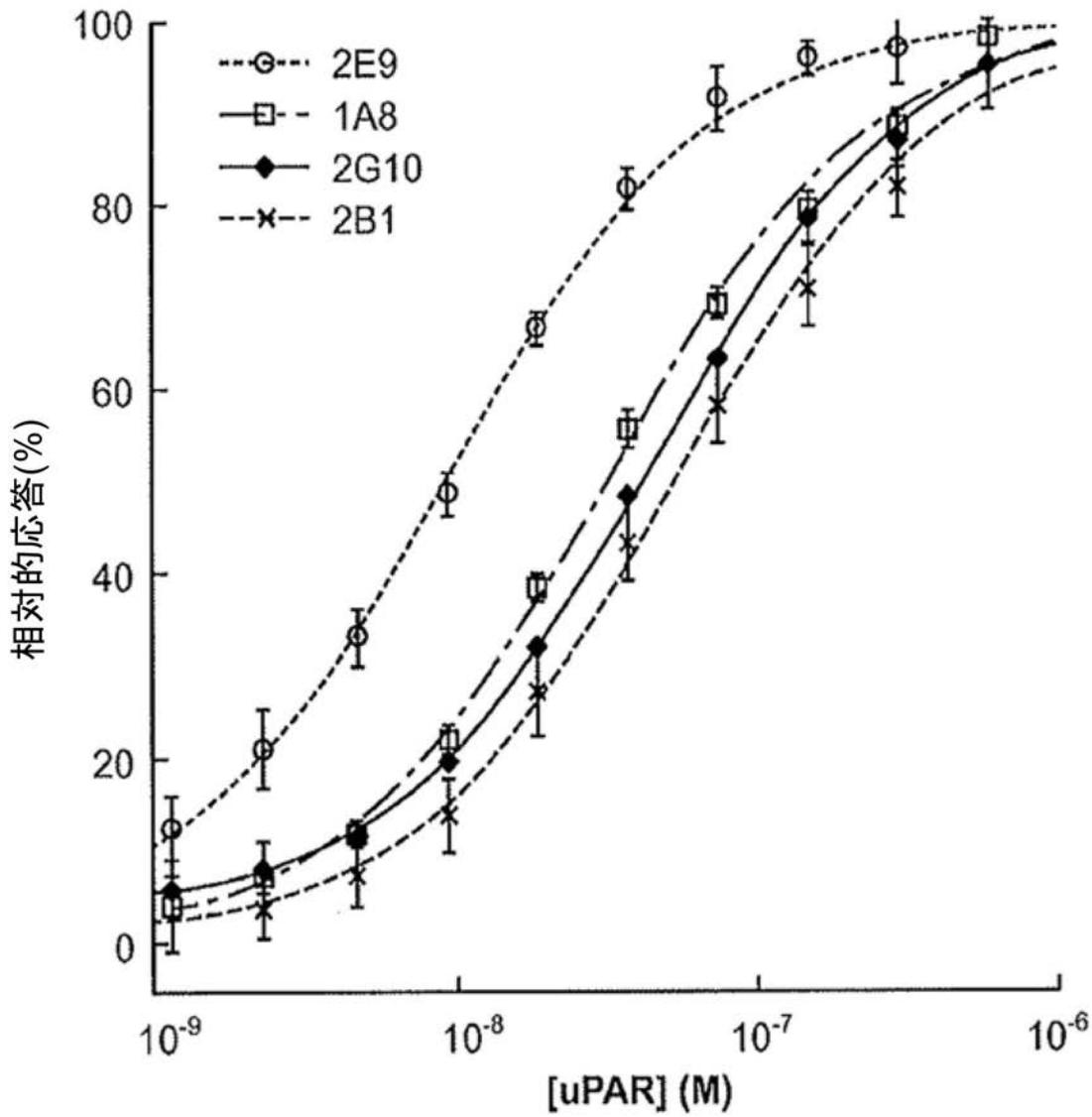
【 図 2 】



【 図 3 】

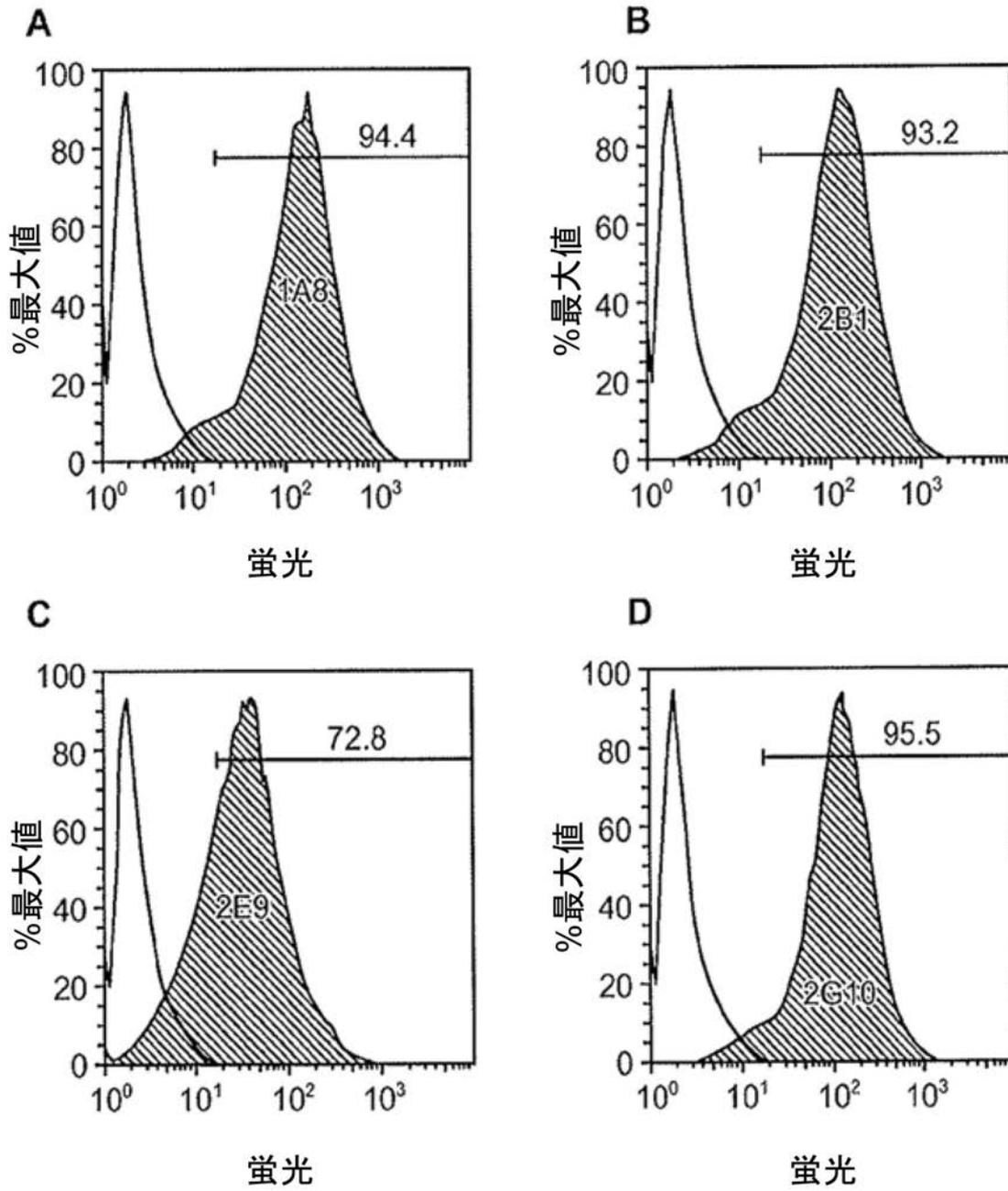


【图 4】

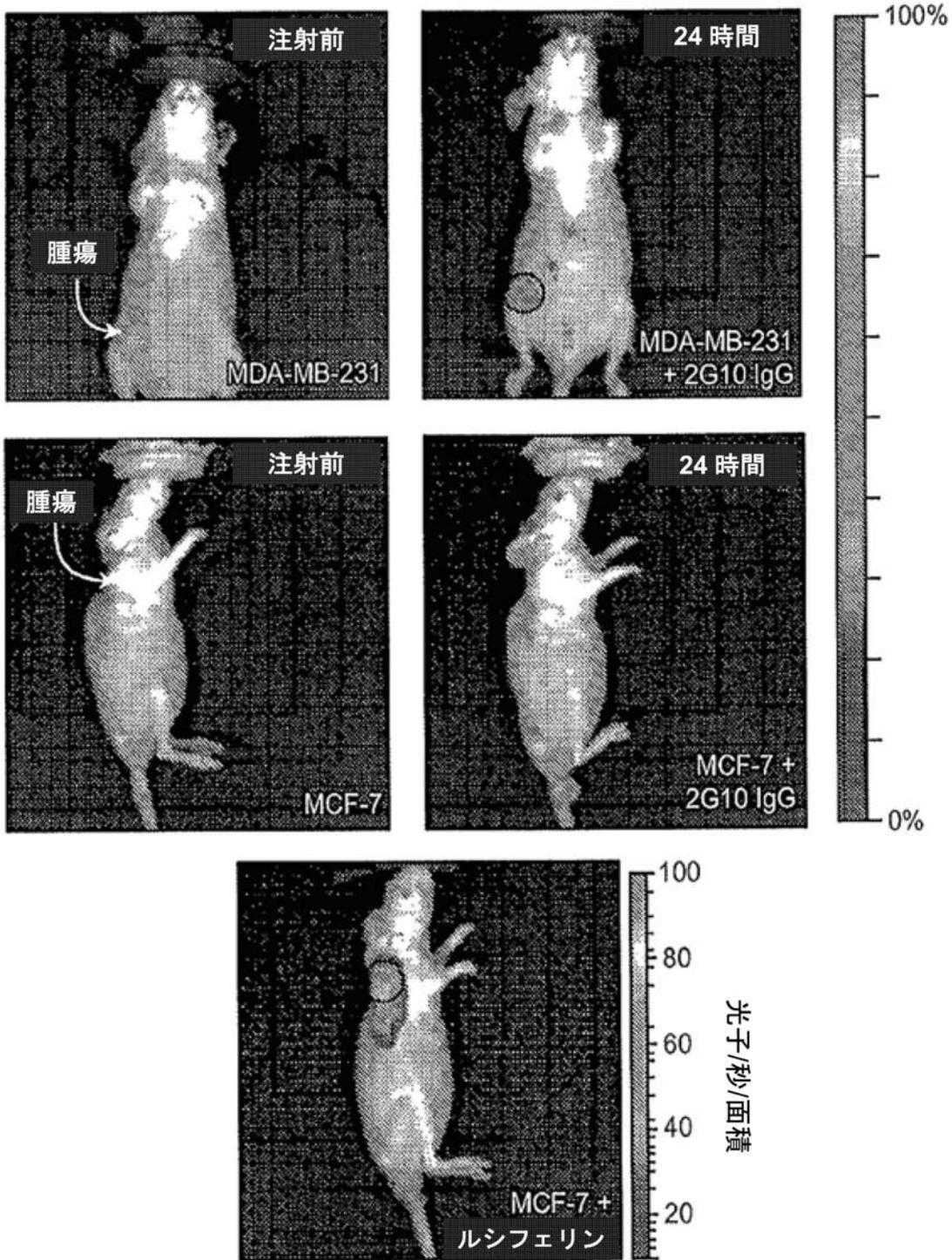


抗体	1A8	2B1	2E9	2G10
Kd (nM)	23.8+/-0.2	53.5+/-0.2	9.2+/-0.02	40.5+/-0.1

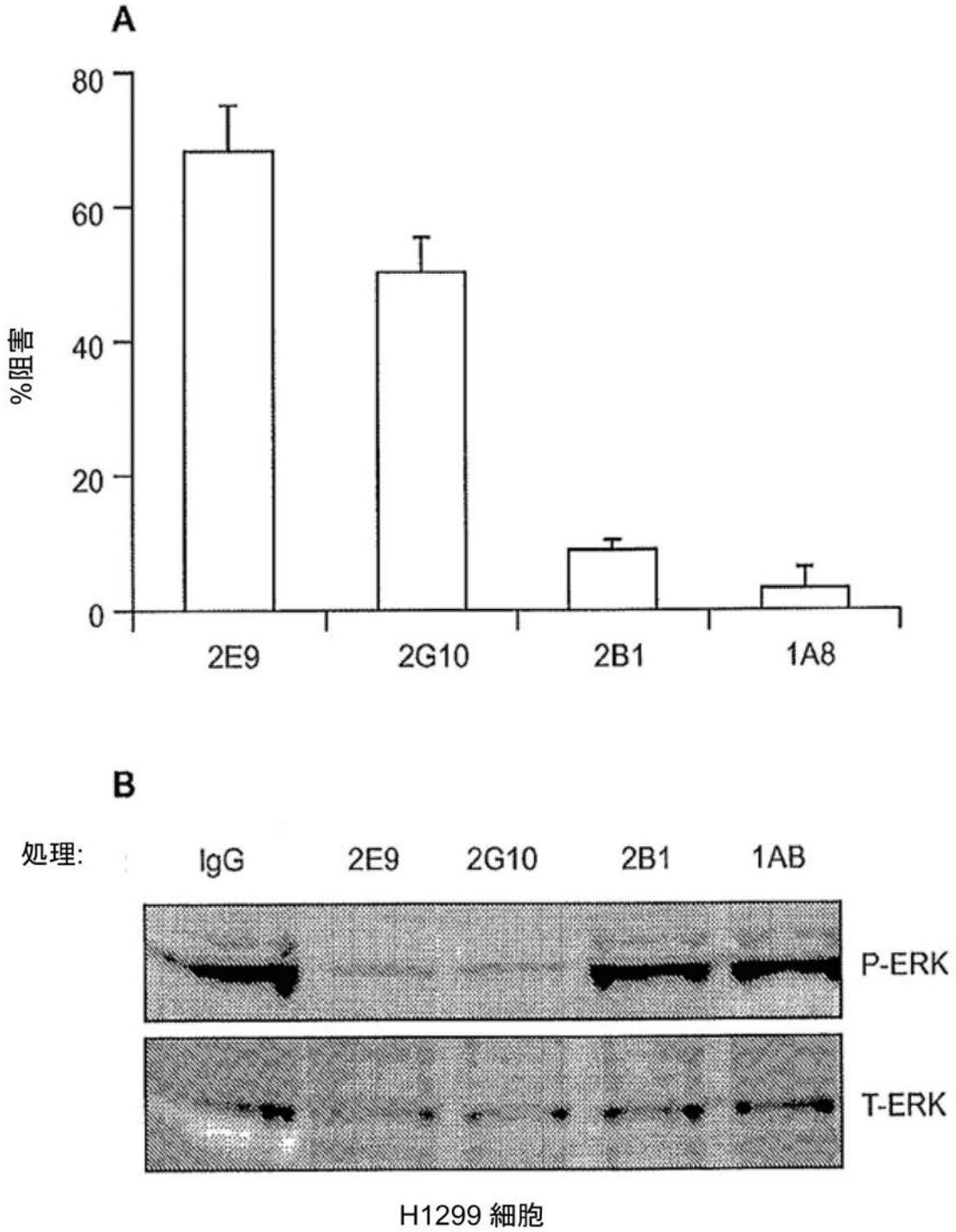
【 図 5 】



【 図 6 】

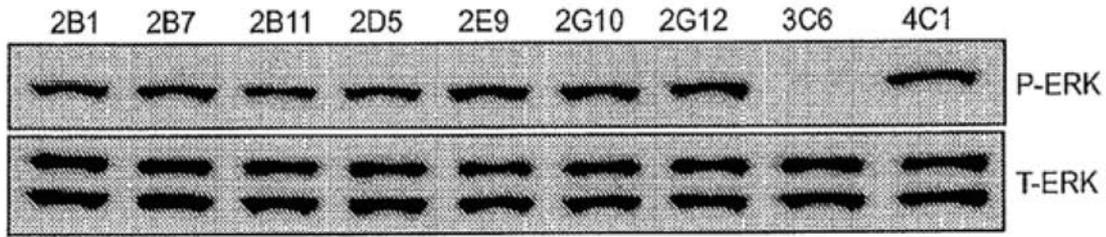


【 図 7 】

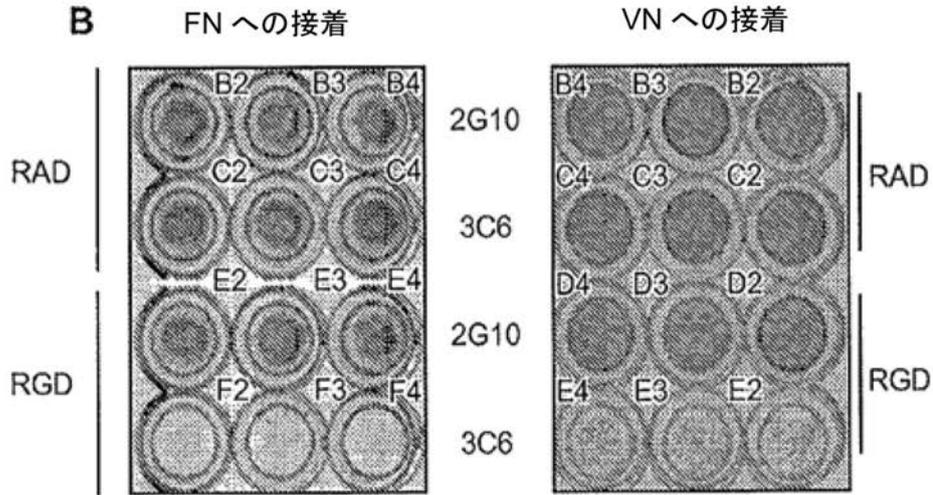


【 図 8 】

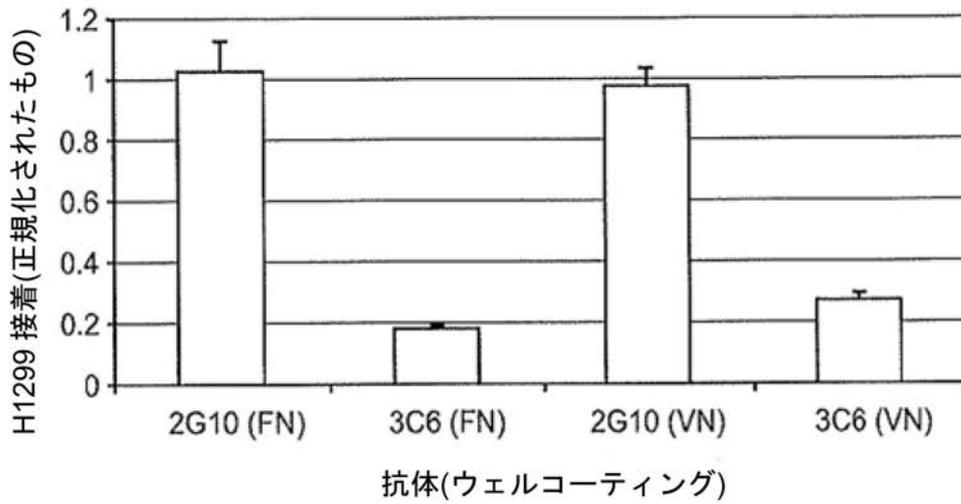
A



B

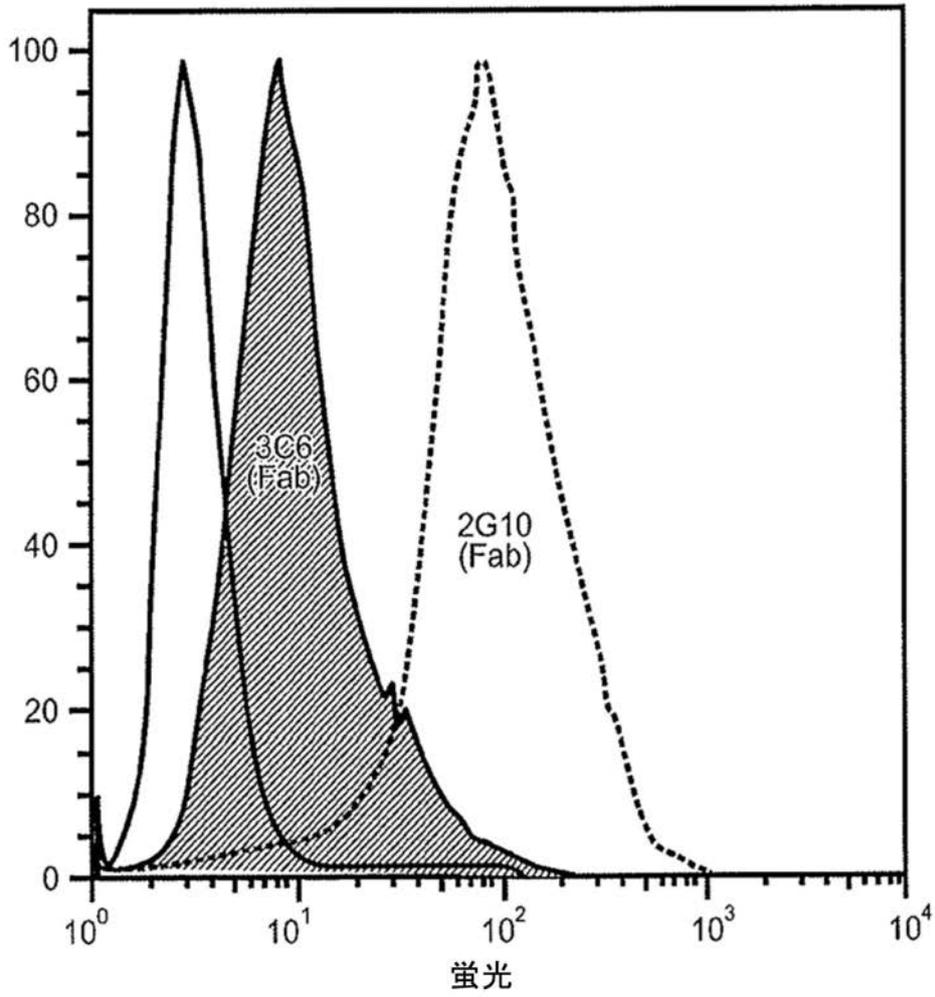


C

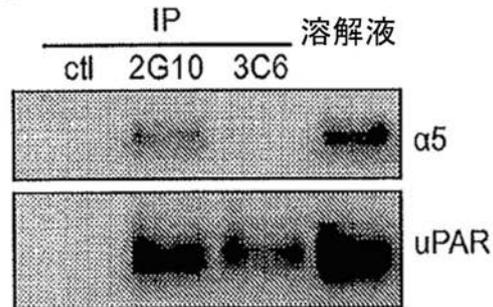


【 図 9 】

A

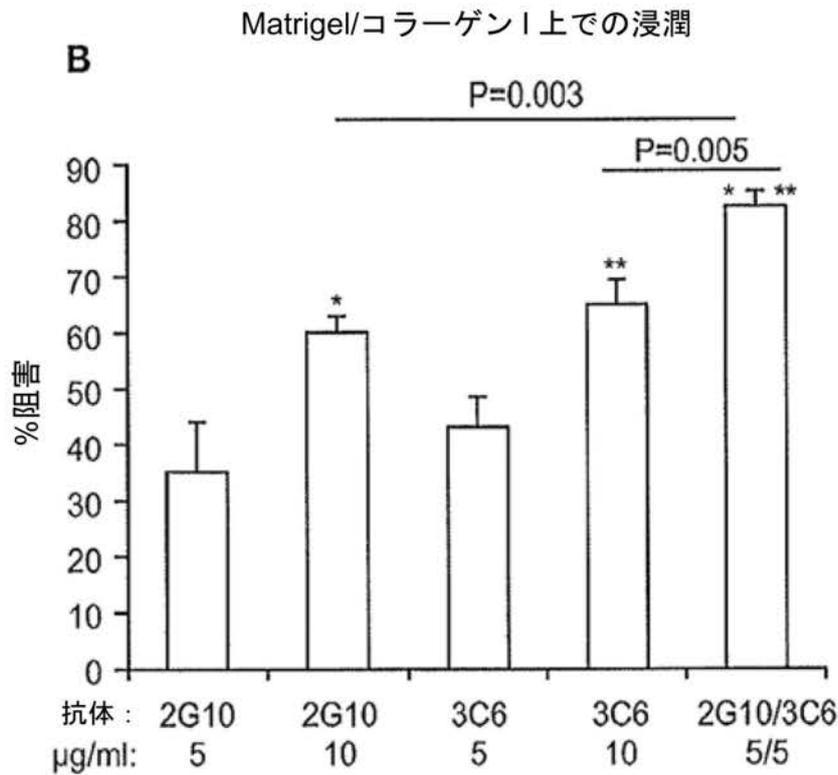
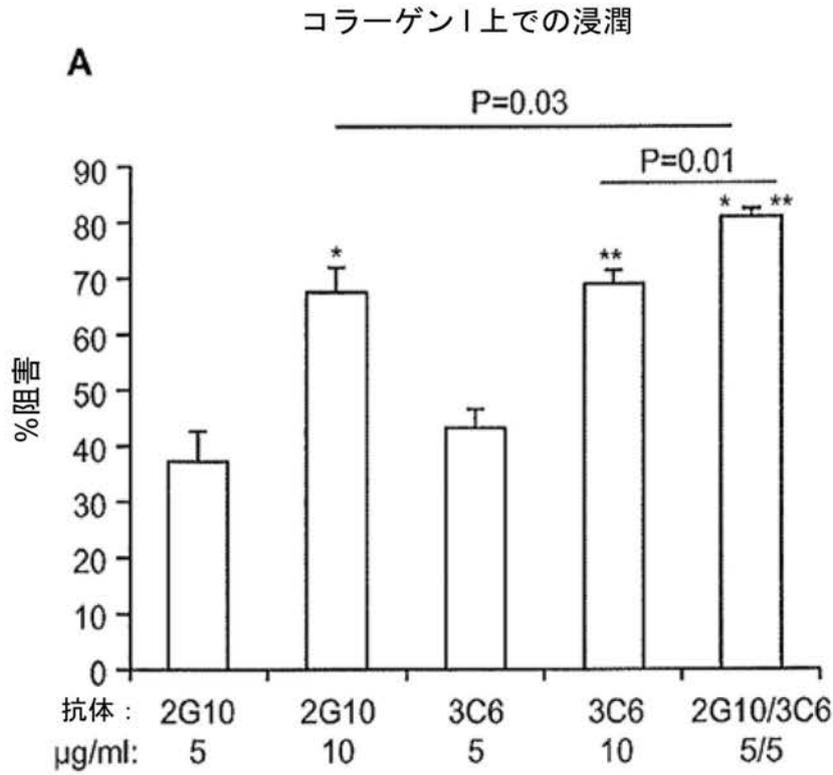


B



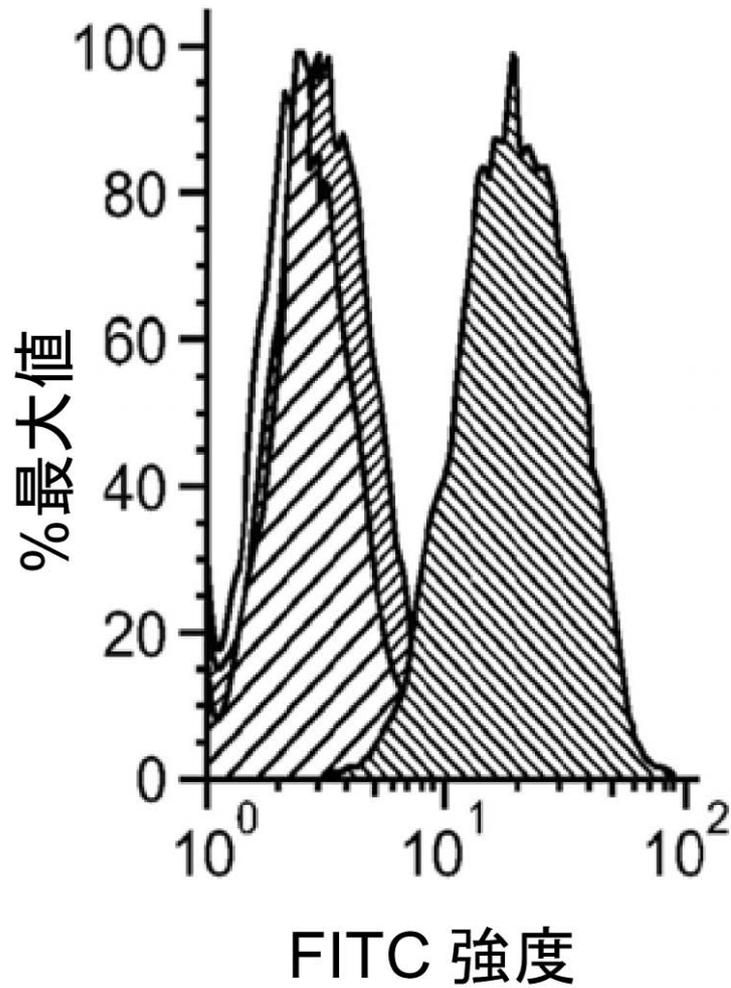
H1299 細胞

【図10】

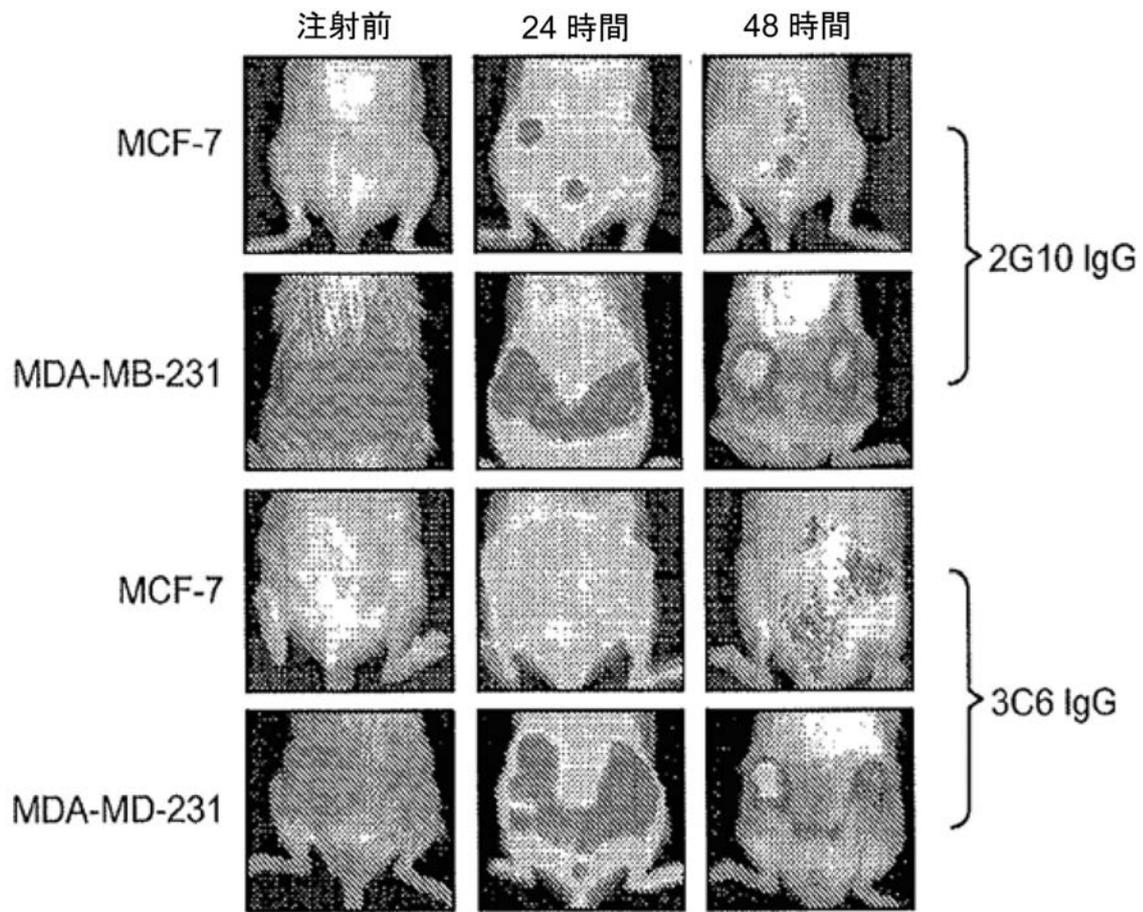


【図 1 1】

- ▨ 10nM の 2G10 Fab を使用した MDA-MB-23
- ▧ MDA-MB-231 ブランク
- ▩ 10nM の 2G10 Fab を使用した MCF-7
- MCF-7 ブランク

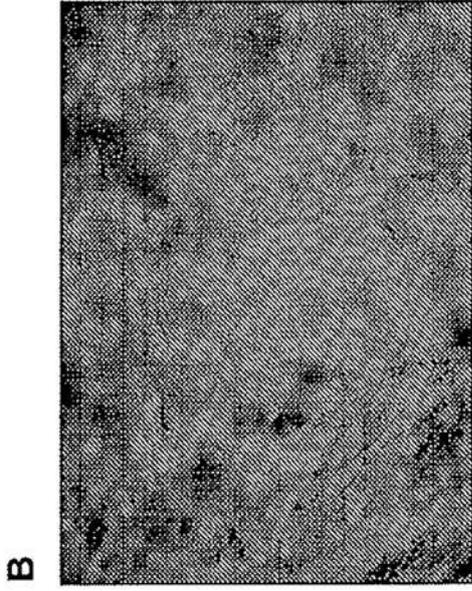


【 図 1 2 】

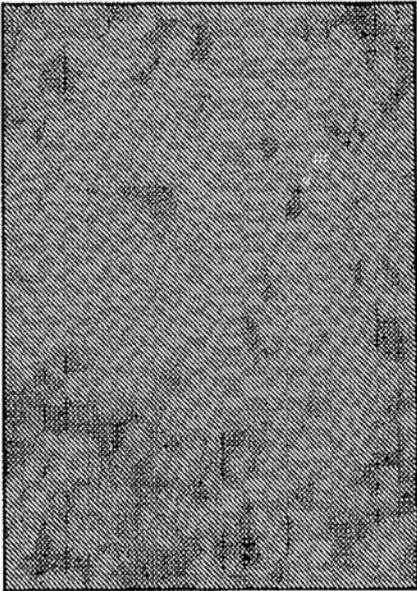


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

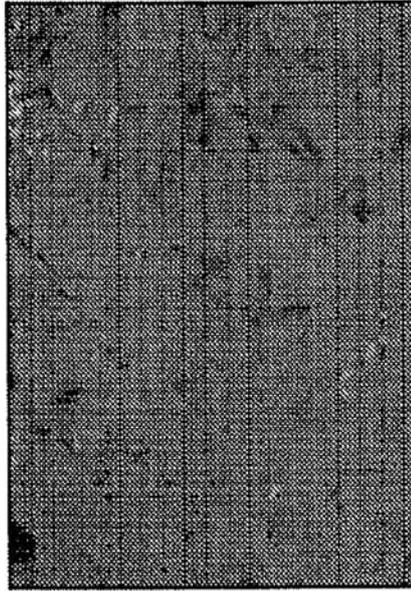
【 図 1 3 】



B

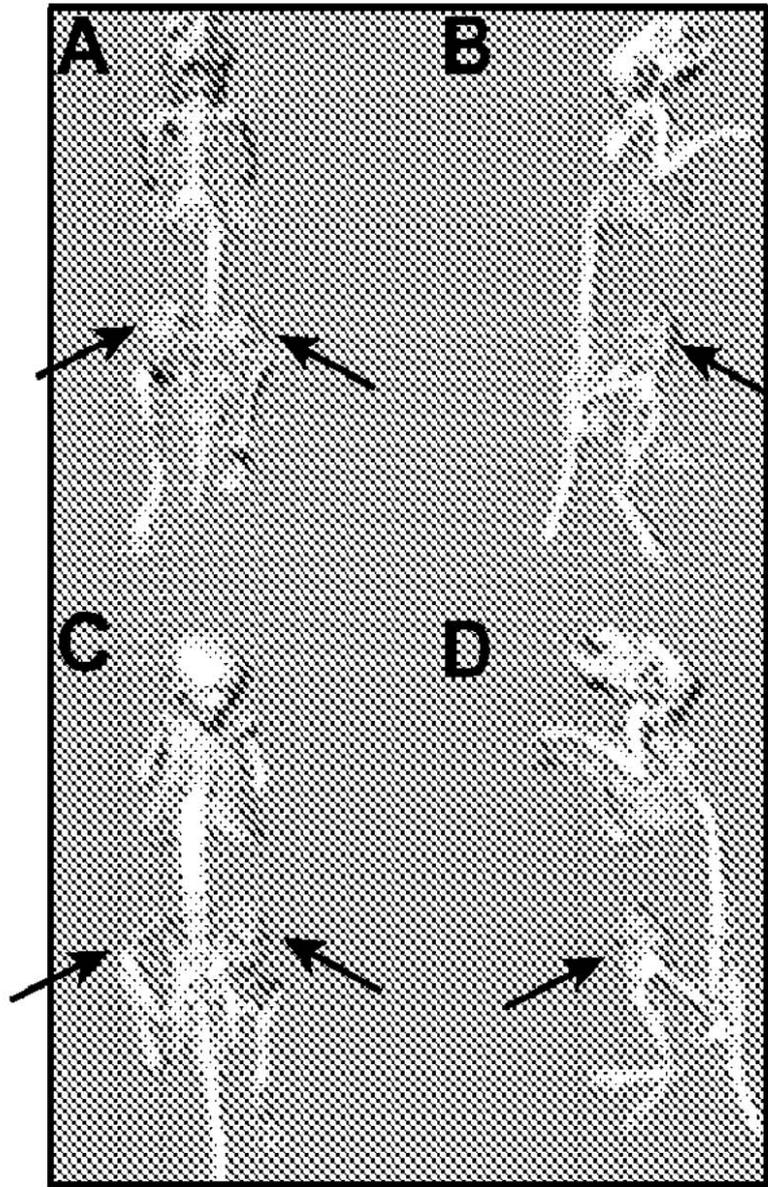


A

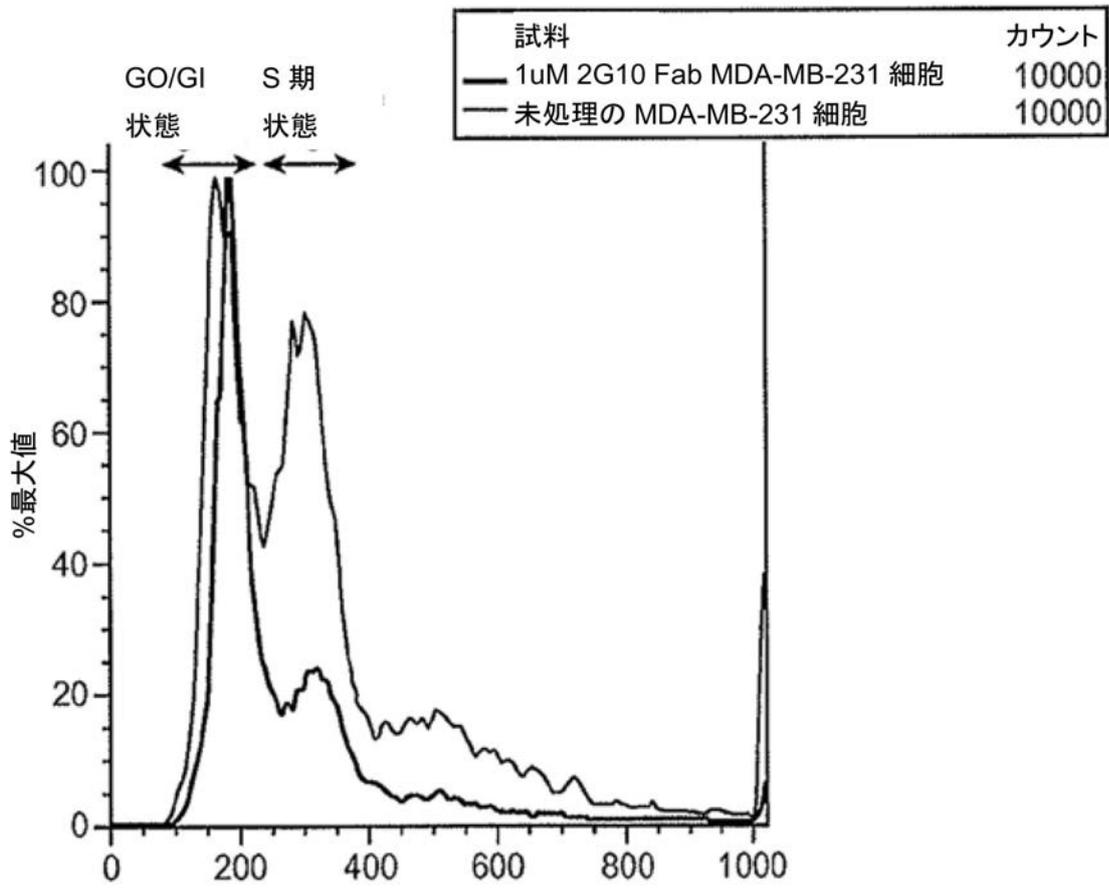


C

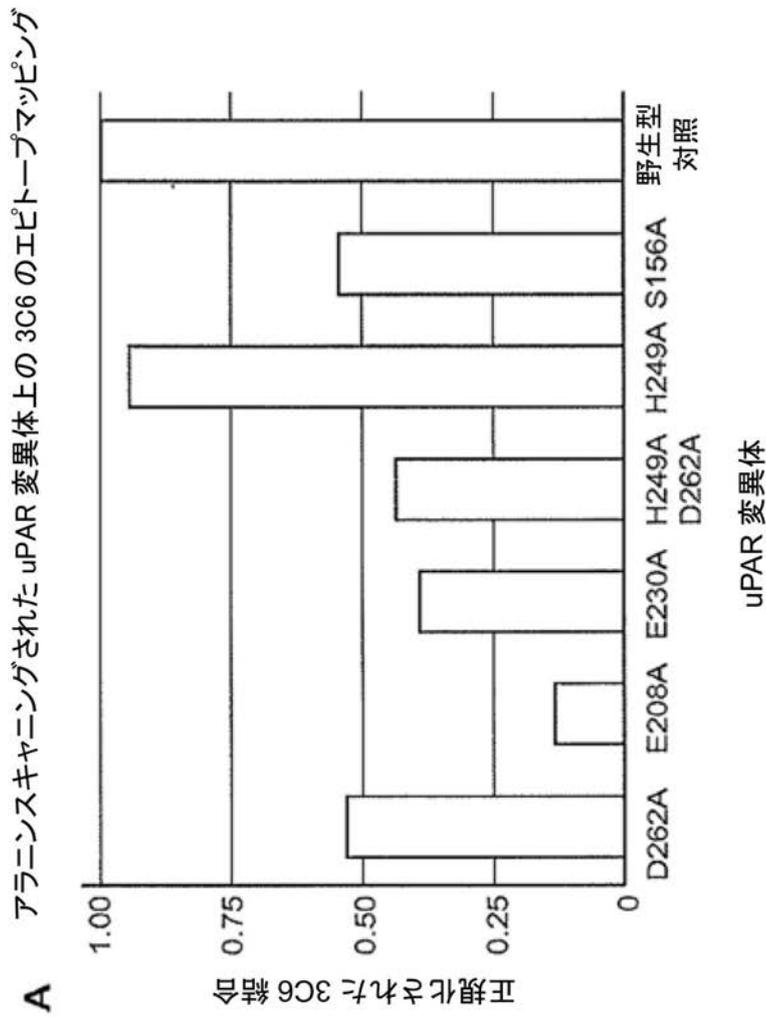
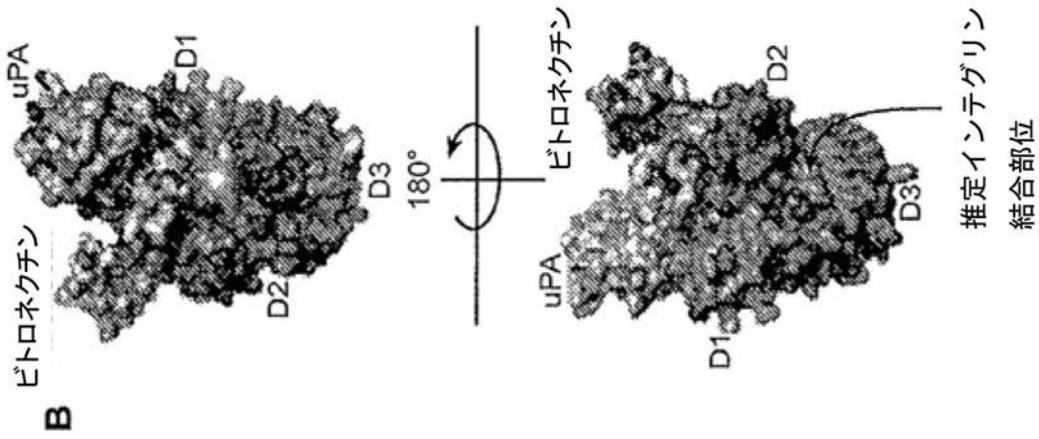
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【 配 列 表 】

2013522167000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/24636																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C07K 16/28; A61K 39/395; G01N 33/48 (2011.01) USPC - 530/388.22; 424/143.1; 436/64 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 530/388.22; 424/143.1; 436/64 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 530/388.22; 424/143.1; 436/64 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (PGPB, USPT, EPAB, JPAB); Google Scholar; GenCore sequence search (AA) Search terms: Urokinase receptor (UPAR, CD87 PLAUR), urokinase (UPA), Integrin, Integrin beta 1, integrin beta 1 alpha 3, integrin beta 1 beta 5, binding agent, antagonist, antibody, breast cancer																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X --- Y --- A</td> <td>WO 2001/017544 A1 (CHAPMAN et al.) 15 March 2001 (15.03.2001). Especially pg 2 ln 22-26, pg 20 ln 5-7, pg 27 ln 15-17, pg 37 ln 6-14.</td> <td style="text-align: center;">1, 2, 16, 17, 21-23, 26, 28, 29, 35 3, 16, 25, 27 4-7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>WEI et al. Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with Integrin alpha3beta. Mol. Biol. Cell.; October 2001; Vol. 12, No.10; pg 2975-2986. Especially abstract.</td> <td style="text-align: center;">3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>YEBFA et al. Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin alphavbeta5-directed cell migration. J. Biol. Chem.; 15 November 1996; Vol. 271, No. 46; pg 29393-29399. Especially pg 29394 left col para 1, 29396 right col para 3</td> <td style="text-align: center;">18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>BENARD et al. Imaging in breast cancer: Single-photon computed tomography and positron-emission tomography. Breast Cancer Res.; 12 March 2005; Vol. 7, No. 4; pg 153-162. Especially abstract.</td> <td style="text-align: center;">25, 27</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">X,P</td> <td>DURISETI et al. Antagonistic anti-urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) antibodies significantly inhibit uPAR-mediated cellular signaling and migration. J. Biol. Chem.; ePub 25 May 2010; Vol. 285, No. 35; pg 26876-26888.</td> <td style="text-align: center;">4-7</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X --- Y --- A	WO 2001/017544 A1 (CHAPMAN et al.) 15 March 2001 (15.03.2001). Especially pg 2 ln 22-26, pg 20 ln 5-7, pg 27 ln 15-17, pg 37 ln 6-14.	1, 2, 16, 17, 21-23, 26, 28, 29, 35 3, 16, 25, 27 4-7	Y	WEI et al. Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with Integrin alpha3beta. Mol. Biol. Cell.; October 2001; Vol. 12, No.10; pg 2975-2986. Especially abstract.	3	Y	YEBFA et al. Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin alphavbeta5-directed cell migration. J. Biol. Chem.; 15 November 1996; Vol. 271, No. 46; pg 29393-29399. Especially pg 29394 left col para 1, 29396 right col para 3	18	Y	BENARD et al. Imaging in breast cancer: Single-photon computed tomography and positron-emission tomography. Breast Cancer Res.; 12 March 2005; Vol. 7, No. 4; pg 153-162. Especially abstract.	25, 27	X,P	DURISETI et al. Antagonistic anti-urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) antibodies significantly inhibit uPAR-mediated cellular signaling and migration. J. Biol. Chem.; ePub 25 May 2010; Vol. 285, No. 35; pg 26876-26888.	4-7
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X --- Y --- A	WO 2001/017544 A1 (CHAPMAN et al.) 15 March 2001 (15.03.2001). Especially pg 2 ln 22-26, pg 20 ln 5-7, pg 27 ln 15-17, pg 37 ln 6-14.	1, 2, 16, 17, 21-23, 26, 28, 29, 35 3, 16, 25, 27 4-7																		
Y	WEI et al. Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with Integrin alpha3beta. Mol. Biol. Cell.; October 2001; Vol. 12, No.10; pg 2975-2986. Especially abstract.	3																		
Y	YEBFA et al. Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin alphavbeta5-directed cell migration. J. Biol. Chem.; 15 November 1996; Vol. 271, No. 46; pg 29393-29399. Especially pg 29394 left col para 1, 29396 right col para 3	18																		
Y	BENARD et al. Imaging in breast cancer: Single-photon computed tomography and positron-emission tomography. Breast Cancer Res.; 12 March 2005; Vol. 7, No. 4; pg 153-162. Especially abstract.	25, 27																		
X,P	DURISETI et al. Antagonistic anti-urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) antibodies significantly inhibit uPAR-mediated cellular signaling and migration. J. Biol. Chem.; ePub 25 May 2010; Vol. 285, No. 35; pg 26876-26888.	4-7																		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" 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 July 2011 (25.07.2011)		Date of mailing of the international search report 29 JUL 2011																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 871-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 671-272-4300 PCT OSP: 671-272-7774																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/24636

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.: 19, 20 and 24
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:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: claims 1-7, 16-18, 21-23, 25-29 and 35, directed to a binding agent that specifically binds to uPAR and competes with an Integrin for binding to uPAR, further wherein the agent comprises the variable region CDR sequences of antibody 3C8.
 Group II: claims 8-11, 16-18, 21-23, 25-29 and 35, directed to an isolated antibody that specifically binds to uPAR, wherein the antibody comprises variable region CDR sequences of antibody 2E9.
 Group III: claims 12-18, 21-23, 25-29 and 35, directed to an isolated antibody that specifically binds to uPAR, wherein the antibody comprises variable region CDR sequences of antibody 2G10.
 Group IV: claims 30-34, directed to a method for screening for a binding agent that binds to uPAR, comprising: a) contacting uPAR with a candidate agent; and b) detecting binding of the candidate agent with uPAR, wherein the detecting comprises detecting a decrease in binding of uPAR to beta1 integrin in the presence of the candidate agent.

-----continued on Extra 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-7, 16-18, 21-23, 25-29 and 35

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/US 11/24636

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003/0070185 A1 (JAKOBOVITS et al.) 10 April 2003 (10.04.2003) Especially SEQ ID NO: 2	5-7
A	US 2003/0099647 A1 (DESHPANDE et al.) 29 May 2003 (29.05.2003). Especially SEQ ID NO: 44	5-7
A	US 2005/0044589 A1 (BUCHER-LARSEN et al.) 24 February 2005 (24.02.2005). Especially SEQ ID NO: 19.	5-7
A	VAN DER PLUJM et al. Urokinase-receptor/Integrin complexes are functionally involved in adhesion and progression of human breast cancer in vivo. Amer. J. Pathol.; September 2001; Vol. 159, No. 3; pg 971-982. Especially abstract.	21, 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/24636

continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)

Group V: claims 36-39, directed to a method of inhibiting uPAR signaling.

The inventions listed as Groups I - V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the Group V claims is a method of inhibiting uPAR signaling - not required by the claims of any other Group. The special technical feature of the Group IV claims is a method for screening for a binding agent that binds to uPAR - not required by the claims of any other Group. The special technical features of the Group I claims is a binding agent that specifically binds to uPAR and competes with an integrin for binding to uPAR - not required by the claims of any other Group. Groups II and III are both directed to anti-uPAR antibodies, and share this common technical element with Group I, however, each Group is directed to antibodies comprising distinct and different sequences.

The only common technical element shared by the above groups is that they are related to uPAR binding entities. Groups I-III and V share a further common technical element in that they are related to antibodies that bind to uPAR. Groups I and IV share a further common technical element in that they are related to decreasing binding of uPAR with at least one integrin. These common technical elements do not represent an improvement over the prior art of US 2009/0123476 A1 to Elvin et al., which discloses antibodies which bind to uPAR and inhibit interactions with Integrins (para [0011]). Therefore, the inventions of Groups I - V lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	C 1 2 Q 1/02	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. フロッピー

(72) 発明者 ドゥリセティ, クリシュナ サイ
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 1 5 8, サンフランシスコ, 1 8 ティーエイチ ストリ
 ート 3 6 5 0, アパートメント. 3

(72) 発明者 ゲッツ, デイビット エイチ.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 1 1 8, サンフランシスコ, ファンストン アベニュー
 4 7 8

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 AA40 CB02 DA20 DA37 FB01 FB03 FB07 FB15
 4B024 AA01 AA12 BA53 CA04 CA07 DA02 EA02 FA02 GA11 HA03
 4B063 QA18 QQ36 QQ79 QR33 QR59 QR77 QR80 QS05 QS36 QX01
 4C084 AA19 NA05 ZB261 ZB262 ZC751
 4C085 AA13 AA14 BB11 BB36 BB37 BB41 BB43 CC21 CC23 DD21
 DD33 EE01 EE03
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74