

(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2019-503984

(P2019-503984A)

(43) 公表日 平成31年2月14日 (2019.2.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A N	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6886 Z	4 B O 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	4 C O 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-521955 (P2018-521955)	(71) 出願人	503469393 イエール ユニバーシティ アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー ヘブレン トウ ホイットニー アベニュー
(86) (22) 出願日	平成28年10月20日 (2016.10.20)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成30年6月14日 (2018.6.14)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/057814	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02017/074774	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成29年5月4日 (2017.5.4)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	62/247, 410		
(32) 優先日	平成27年10月28日 (2015.10.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化抗 D k k 2 抗体およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、Dickkopf2(DKK2)の阻害によって、CD8+細胞傷害性Tリンパ球(CTL)活性が増大し、腫瘍が低減し、従って腫瘍形成が抑制されるという発見に関する。よって、本明細書に記載の様々な態様において、本発明の方法は、有効量のヒト化抗DKK2抗体を患者に投与することによって癌を処置する方法、対象において抗腫瘍免疫を提供するための方法、細胞集団または組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激する方法、ならびに対象において腫瘍を抑制する方法に関する。さらに、本発明は、癌を診断するまたは癌もしくは転移を発症する素因を診断する方法、および癌を処置するための免疫療法処置または癌ワクチンの使用を決定するための方法を含む。さらに、本発明は、癌を処置するための薬学的組成物、ならびに上記の方法を実施するためのキットを包含する。

Ammino acid sequences of humanized anti-DKK2 antibodies.
Antibody humanization was based on mouse anti-DKK2 Y008-1-SF8 monoclonal antibody:

(FIG. 16A) SF8-HXT1-V1
HCL (IgG1), SEQ ID NO. 1
QVQVYQSGSLKEPGASVYKCASTGSGTAAIGCLVKDYFPPVTVSWN
SGALTSVHTTPAQVQSSGLYSLSVVTVPSSSLQDTYICNVNHRKPSNTRVDRVEP
KSKDKTHTCPKAPFELLGEGSVLPFPKSDTLADSRSTVTCVYVQVSHEDPSVAF
NWTYDGVGVHAKTSGREEDYNSITVYVSVLTVLHQQDWLNGKDYCKVSKALP
AMKRTSKAKGQPRPQVYTLPSKREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNQCP
ENNYKTTPVLDSDGSEFLYSLLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHSHYTKQSLSL
SPK

LCL (Kappa), SEQ ID NO. 2
DIVMTQSPDSLAIVSLGERATNCKSSGSGTAAIGCLVKDYFPPVTVSWN
SGALTSVHTTPAQVQSSGLYSLSVVTVPSSSLQDTYICNVNHRKPSNTRVDRVEP
KSKDKTHTCPKAPFELLGEGSVLPFPKSDTLADSRSTVTCVYVQVSHEDPSVAF
NWTYDGVGVHAKTSGREEDYNSITVYVSVLTVLHQQDWLNGKDYCKVSKALP
AMKRTSKAKGQPRPQVYTLPSKREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNQCP
ENNYKTTPVLDSDGSEFLYSLLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHSHYTKQSLSL
SPK

(FIG. 16B) SF8-HXT1-V2
HCL (IgG1), SEQ ID NO. 3
QVQVYQSGSLKEPGASVYKCASTGSGTAAIGCLVKDYFPPVTVSWN
SGALTSVHTTPAQVQSSGLYSLSVVTVPSSSLQDTYICNVNHRKPSNTRVDRVEP
KSKDKTHTCPKAPFELLGEGSVLPFPKSDTLADSRSTVTCVYVQVSHEDPSVAF
NWTYDGVGVHAKTSGREEDYNSITVYVSVLTVLHQQDWLNGKDYCKVSKALP
AMKRTSKAKGQPRPQVYTLPSKREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNQCP
ENNYKTTPVLDSDGSEFLYSLLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHSHYTKQSLSL
SPK

LCL (Kappa), SEQ ID NO. 4
DIVMTQSPDSLAIVSLGERATNCKSSGSGTAAIGCLVKDYFPPVTVSWN
SGALTSVHTTPAQVQSSGLYSLSVVTVPSSSLQDTYICNVNHRKPSNTRVDRVEP
KSKDKTHTCPKAPFELLGEGSVLPFPKSDTLADSRSTVTCVYVQVSHEDPSVAF
NWTYDGVGVHAKTSGREEDYNSITVYVSVLTVLHQQDWLNGKDYCKVSKALP
AMKRTSKAKGQPRPQVYTLPSKREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNQCP
ENNYKTTPVLDSDGSEFLYSLLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHSHYTKQSLSL
SPK

Note: Residues in bold and underlined denote those different between SF8-HXT1-V1 and SF8-HXT1-V2 of SF8-HXT1. Residues in bold and highlighted in grey refer to complementarity determining regions (CDRs).

FIGS. 16A-16B

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

その必要がある対象において癌を処置する方法であって、薬学的に許容される担体中の有効量のヒト化抗Dickkopf2(抗DKK2)抗体またはその断片を該対象に投与する段階を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記癌が、大腸腺腫性ポリポシス(adenomatosis polyposis coli)(APC)変異を発現する細胞を含む腫瘍を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記ヒト化抗DKK2抗体が中和活性を有する、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記ヒト化抗DKK2抗体が、アミノ酸配列SEQ ID NO:5を含むDKK2中和エピトープを標的とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記ヒト化抗DKK2抗体が、SEQ ID NO:1、2、および3からなる群より選択されるアミノ酸配列の少なくとも1つを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記癌が、結腸直腸癌、膵臓癌、胃癌、腸癌、膵臓癌、および食道癌からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記癌が転移性である、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 8】

化学療法剤、抗細胞増殖物質、免疫療法剤、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるさらなる作用物質を前記対象に投与する段階をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記さらなる作用物質がプログラム細胞死1(programmed cell death 1)(PD-1)抗体である、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記ヒト化抗DKK2抗体および前記さらなる作用物質が前記対象に同時投与される、請求項8に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記ヒト化抗DKK2抗体および前記さらなる作用物質が共製剤化され、かつ前記対象に同時投与される、請求項8に記載の方法。

【請求項 12】

投与経路が、吸入、経口、直腸、腔、非経口、局部的、経皮、肺、鼻腔内、頬側、眼、くも膜下腔内、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

ヒト化抗Dickkopf2(抗DKK2)抗体またはその断片と薬学的に許容される担体とを含む、対象において癌を処置するための薬学的組成物。

40

【請求項 14】

前記癌が、大腸腺腫性ポリポシス(APC)変異を発現する細胞を含む腫瘍を含む、請求項13に記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

前記ヒト化抗DKK2抗体が中和活性を有する、請求項13に記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

前記ヒト化抗DKK2抗体が、アミノ酸配列SEQ ID NO:5を含むDKK2中和エピトープを標的とする、請求項13に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

50

前記ヒト化抗DKK2抗体が、SEQ ID NO:1、2、および3からなる群より選択されるアミノ酸配列の少なくとも1つを含む、請求項13に記載の薬学的組成物。

【請求項18】

化学療法剤、抗細胞増殖物質、免疫療法剤、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるさらなる作用物質を含む、請求項13に記載の薬学的組成物。

【請求項19】

前記さらなる作用物質がプログラム細胞死1(PD-1)抗体である、請求項13に記載の薬学的組成物。

【請求項20】

前記癌が、結腸直腸癌、膵臓癌、胃癌、腸癌、膵臓癌、および食道癌からなる群より選択される、請求項13に記載の薬学的組成物。

10

【請求項21】

前記癌が転移性である、請求項13に記載の薬学的組成物。

【請求項22】

対象において抗腫瘍免疫を提供するための方法であって、有効量のヒト化抗Dickkopf2(抗DKK2)抗体またはその断片を薬学的に許容される担体と共に該対象に投与する段階を含む、前記方法。

【請求項23】

化学療法剤、抗細胞増殖物質、免疫療法剤、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるさらなる作用物質を前記対象にさらに投与する段階をさらに含む、請求項22に記載の方法。

20

【請求項24】

前記さらなる作用物質がプログラム細胞死1(PD-1)抗体である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記ヒト化抗DKK2抗体および前記さらなる作用物質が前記対象に同時投与される、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

対象において細胞集団または組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激するための方法であって、有効量のヒト化抗Dickkopf2(抗DKK2)抗体またはその断片を薬学的に許容される担体と共に該対象に投与する段階を含む、前記方法。

30

【請求項27】

前記ヒト化抗DKK2抗体が、アミノ酸配列SEQ ID NO:5を含むDKK2中和エピトープを標的とする、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記ヒト化抗DKK2抗体が、SEQ ID NO:1、2、および3のアミノ酸配列の少なくとも1つを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

前記T細胞媒介性免疫応答がCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答である、請求項26に記載の方法。

40

【請求項30】

対象において癌を診断するまたは癌を発症する素因を診断する方法であって、該方法は、該対象に由来する生物学的試料におけるDKK2遺伝子の発現レベルを判定する段階を含み、該対象に由来する生物学的試料におけるDKK2の発現レベルが、癌を有していない対象に由来する対照生物学的試料におけるDKK2発現のレベルと比較して増大していることが、癌または癌を発症する素因を該対象が有していることを示す指標であり、かつ、癌または癌を発症する素因が対象において検出された場合に該対象に対してヒト化抗DKK2抗体処置が推奨される、前記方法。

【請求項31】

前記癌が、結腸直腸癌、膵臓癌、胃癌、腸癌、膵臓癌、および食道癌からなる群より選

50

扱われる、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記対象に由来する生物学的試料におけるDKK2の発現レベルが、正常対照レベルより少なくとも10%高い、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記対象に由来する生物学的試料または正常対照におけるDKK2の発現レベルが、前記遺伝子のmRNAの検出、前記遺伝子によってコードされるタンパク質の検出、および前記遺伝子によってコードされるタンパク質の生物学的活性の検出からなる群より選択される方法を用いて判定される、請求項30に記載の方法。

【請求項 3 4】

その必要がある対象において癌に対するヒト化抗DKK2抗体処置の有効性を判定するための方法であって、該方法は、該対象に由来する生物学的試料におけるDickkopf2(DKK2)遺伝子の発現レベルを判定する段階を含み、該対象に由来する生物学的試料におけるDKK2の発現レベルが、癌を有していない対象に由来する対照生物学的試料におけるDKK2発現のレベルと比較して増大していることが、ヒト化抗DKK2抗体処置が有効であることを示す指標であり、かつ、ヒト化抗DKK2抗体処置が有効であると判定された場合に該対象に対してさらなる処置が推奨される、前記方法。

【請求項 3 5】

前記さらなる処置が、化学療法、放射線療法、免疫療法、および癌ワクチン療法からなる群より選択される少なくとも1つを含む、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記対象に由来する生物学的試料におけるDKK2の発現レベルが、正常対照レベルより少なくとも10%高い、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 7】

発現レベルが、前記遺伝子のmRNAの検出、前記遺伝子によってコードされるタンパク質の検出、および前記遺伝子によってコードされるタンパク質の生物学的活性の検出からなる群より選択される方法によって判定される、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記癌が、結腸直腸癌、膵臓癌、胃癌、腸癌、膵臓癌、および食道癌からなる群より選択される、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記対象が哺乳動物である、請求項1、13、22、26、30、および34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

哺乳動物がヒトである、請求項39に記載の方法。

【請求項 4 1】

アミノ酸配列SEQ ID NO:5を含むDKK2エピトープを標的とするヒト化抗Dickkopf2(抗DKK2)抗体を含む、組成物。

【請求項 4 2】

対象において癌を診断するためのまたは癌もしくは転移を発症する素因を診断するためのキットであって、アミノ酸配列SEQ ID NO:5を含むDKK2エピトープを標的とするヒト化抗DKK2抗体を含む、前記キット。

【請求項 4 3】

前記癌が、結腸直腸癌、膵臓癌、胃癌、腸癌、膵臓癌、および食道癌からなる群より選択される、請求項42に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、35U.S.C.119条(e)に基づいて、その全体が参照により本明細書に組み入れられ

10

20

30

40

50

る、2015年10月28日に出願された米国特許仮出願第62/247,410号に係る優先権を主張する。

【0002】

連邦政府の支援による研究または開発に関する記載

本発明は米国立衛生研究所によって付与された助成金GM112182に基づいて政府の支援を受けてなされた。米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

癌は世界的に重大な健康問題である。世界中で毎年数千万人が癌と診断され、最終的に患者の半分以上が癌で死亡する。米国では全男性の約半分、全女性の1/3が生涯のある時点で癌と診断され、4人に1人が癌で死亡する(Jemal et al., CA Cancer J. Clin., 2002, 52:23-47; Howlader et al., SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute)。最もよく確認されるヒト癌には、臓器および実質組織から生じた癌、例えば、結腸癌、肺癌、乳癌、胃癌、前立腺癌、および子宮内膜癌が含まれる。西半球では20人に1人が結腸癌に罹患する(Henderson, Nature Cell Biology, 2000, 2(9): p.653-60)。世界中で毎年100万人の新規患者が結腸癌と診断され、その半がこの疾患のために死亡する(Liu et al., Cell, 2002, 108(6): p.837-47)。

【0004】

過去何十年間に癌の処置および診断は著しく進歩した。癌のための処置選択肢には、外科手術、化学療法、放射線療法、および免疫療法が含まれる。さらに最近では、免疫系を刺激することにねらいを定めた免疫療法処置が数多くの調査を特に引き寄せてきた。免疫療法は非常に高い効果があり得るが、発生母地の臓器に関係なく一部の患者しか通常療法にตอบสนองしない。免疫療法の有効性および特異性を改善するために、この分野における新たな発見が明らかに必要とされている。

【0005】

Wntシグナル伝達は、細胞運命の決定、分化、極性、増殖、および移動を含む多種多様な細胞プロセスを制御する。分泌タンパク質のWntファミリーは、低密度リボタンパク質受容体関連(LRP)タンパク質5および6(LRP5/6)などのいくつかの受容体クラスに結合して、Wnt/ β -カテニン経路、Wnt/カルシウム経路、およびWnt/Jnk経路を含むいくつかの異なる細胞内シグナル伝達カスケードを活性化させる。LRP5/6へのWntの結合によって、分解のために β -カテニンを刺激する多タンパク質複合体の機能を遮断してその結果細胞質内および核内に β -カテニンが蓄積することでWnt/ β -カテニン経路が特異的に活性化される。核 β -カテニンは転写因子Lef/TCFファミリーのメンバーと複合体を形成し、遺伝子発現を活性化する。

【0006】

幹細胞機能の変化から生じる場合がある病理学的状態、例えば変性疾患および癌は、Wnt/ β -カテニン経路活性の変化と頻繁に関連付けられる。実際に、Wnt/ β -カテニン経路の過剰活性化は、時期尚早な幹細胞老化と、年齢に関連する幹細胞機能喪失とを誘導すると考えられている(Brack et al., Science, 2007, Vol.317 no. 5839 pp.807-810; Liu et al., Science, 2007, Vol.317 no. 5839 pp.803-806)。癌では、Wnt/ β -カテニン経路の過剰活性化は、他の細胞増殖調節遺伝子の変異と共に起こることが多く、異常な細胞増殖につながる場合がある(Reya and Clevers, Nature, 2005, 434(7035):843-50)。従って、進行中の多くの調査は、癌における潜在的な治療標的としてWnt/ β -カテニン経路に焦点を置いている(Breuhahn et al., Oncogene, 2006, 25: 3787-3800; Greten et al., Br J Cancer, 2009, 100: 19-23)。特に、癌ゲノム配列決定プロジェクトを含む、いくつかの調査研究から、結腸癌の80%超でWnt/ β -カテニン経路の主要なサプレッサーである大腸腺腫性ポリポシス(adenomatosis polyposis coli)(APC)遺伝子に変異しているか、さらには消失さえしていることが明らかになった(Kinzler and Vogelstein, Cell, 1996, Oct 18;87(2): 159-70. Review; Sjoblom et al., Science, 2006, Oct 13;314(5797):268-7

4; Mann et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(4): p.1603-8)。APCならびにGSK3 β およびアキシン(Axin)などのタンパク質は、分解のために β -カテニンをマーキングする複合体を形成する。APCの変異がこの複合体を破壊して細胞質 β -カテニンのレベルの増大とその核移行とを招く。 β -カテニンは、Wntシグナル伝達の最も重要なアダプターであるため、Wntリガンドに応答して発癌因子の発現を促進する。

【 0 0 0 7 】

Wntシグナル伝達はまた多数の分泌型ポリペプチドアンタゴニストでも調節される。これらの分泌型ポリペプチドアンタゴニストには、4種類の分泌型 Dickkopf(Dkk)タンパク質(Monaghan et al., Mech Dev, 1999. 87: 45-56; Krupnik et al., Gene, 1999. 238: 301-13)が含まれる。これらの4種類のDkkタンパク質のうちDKK1、2、および4は、WntコレセプターLRP5/6に高親和性で直接結合することで、有効な古典的Wntシグナル伝達アンタゴニストであることが証明されている(Mao et al., Nature, 2001. 411: 321-5; Semenov et al., Curr Biol, 2001. 11: 951-61; Bafico et al., Nat Cell Biol, 2001. 3: 683-6; Niehrs, Nature, 2006. 25: 7469-81)。DKK1は脊椎動物発生における頭部および心臓の形成において重要な役割を果たしていることが報告されている(Niida et al., Oncogene, 2004, Nov. 4; 23(52):8520-6)、Dkk2は脊椎動物発生において重大な役割を果たしているとは考えられない。Dkk2のないマウスは、血糖が少なく(Li et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109: 11402-7)、骨量が少なく(Li et al., Nat Genet, 2005. 37: 945-52)、かつ眼表面上皮に欠損がある(Gage et al., Dev Biol, 2008. 317: 310-24; Mukhopadhyay et al., Development, 2006. 133: 2149-54)。DKKタンパク質がWntアンタゴニストであることを考えると、DKKの不活化によってWnt活性が増大して従って癌形成が加速するというのが平凡な知恵の教えるところである。しかしながら、癌形成におけるDKKタンパク質の役割は直接調べられたことがない。

【 0 0 0 8 】

Dkk分子は2つの保存されたシステインリッチドメインを含有する(Niehrs, Nature, 2006. 25: 7469-81)。以前に、古典的Wntシグナル伝達の阻害ではDKK1およびDKK2の2番目のCysリッチドメインが重要な役割を果たしていることが示された(Li et al., J Biol Chem, 2002. 277: 5977-81; Brott and Sokol Mol. Cell. Biol, 2002. 22: 6100-10)。最近になって、DKK2の2番目のCysリッチドメインの構造は、このドメインの解析および図示された、DKKとLRP5/6とのおよびクレメン(Kremen)とのDKK相互作用に必要なアミノ酸残基であった(Chen et al., J Biol Chem, 2008. 283: 23364-70; Wang et al., J Biol Chem, 2008. 283: 23371-5)。LRP5/6とのDkk相互作用は、Dkkを介したWnt阻害のための主な機構の基礎となる。膜貫通タンパク質でもあるクレメン Dkkとの相互作用が、Wntシグナル伝達のDkk拮抗作用を促進すると示されたが、この相互作用には他の未解決の機能がある可能性がある。Alaスキャン変異誘発によって、LRP5の3番目のYWTD反復ドメイン上にあるアミノ酸残基がDKK1およびDKK2に結合するのに重要であると同定された(Zhang et al., Mol. Cell. Biol, 2004. 24: 4677-84)。これらの結果はDKK1/LRP6の3番目および4番目のYWTD反復ドメイン複合体の構造研究によって確認されている(Cheng et al., Nat Struct Mol Biol, 2011. 18: 1204-10; Chen et al., Dev Cell, 2011. 21: 848-61; Ahn et al., Dev Cell, 2011. 21: 862-73.; Bourhis et al., Structure, 2011.19: 1433-42)。構造研究の1つから、DKKのN末端と、LRPの1番目のYWTD反復ドメインとの間に別のDKK-LRP相互作用部位があることも明らかになった(Bourhis et al., Structure, 2011. 19: 1433-42)。

【 0 0 0 9 】

Wntシグナル伝達は、初期胚発生において役割があること、および腫瘍形成を促進することが最初に発見されたが、最近の研究から広範囲の生物学的プロセスにおいて役割を果たしていることが明らかになった。本発明は、平凡な知恵からではなく、腫瘍促進におけるWntアンタゴニストの役割の思いもよらない発見から始まっている。Wntシグナル伝達の変化をもたらすと考えられるこのWnt阻害物質の中和は、おそらく腫瘍免疫微小環境を調整することによって、腫瘍形成を阻害する。

【 0 0 1 0 】

10

20

30

40

50

明らかに、癌細胞の増殖を減らし、癌細胞死を誘発し、癌を処置するための新たな手法が必要とされている。本発明はこの必要を満たす。さらに、本発明は、抗癌免疫療法および癌診断を改善するための必要を満たす。

【発明の概要】

【0011】

本発明は、その必要がある対象において癌を処置する組成物および方法に関する。

【0012】

一局面において、癌を処置する方法は、薬学的に許容される担体中の有効量のヒト化抗Dickkopf2(抗DKK2)抗体またはその断片を対象に投与する段階を含む。

【0013】

10

別の局面において、本発明は、対象において癌を処置するための薬学的組成物を含む。本発明の薬学的組成物はヒト化抗Dickkopf2(抗DKK2)抗体またはその断片と薬学的に許容される担体とを含む。

【0014】

別の局面において、本発明は、対象において抗腫瘍免疫を提供するための方法を含む。さらに別の局面において、本発明は、対象において細胞集団または組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激するための方法を含む。本発明の方法は、有効量のヒト化抗Dickkopf2(抗DKK2)抗体またはその断片を薬学的に許容される担体と共に対象に投与する段階を含む。一部の態様において、T細胞媒介性免疫応答はCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答である。

20

【0015】

本発明はまた、対象において癌を診断する方法および癌を発症する素因を診断する方法も提供する。これらの方法は、対象に由来する生物学的試料におけるDKK2遺伝子の発現レベルを判定する段階を含み、対象に由来する生物学的試料におけるDKK2の発現レベルが、癌を有していない対象に由来する対照生物学的試料におけるDKK2発現のレベルと比較して増大していることが、癌または癌を発症する素因を対象が有していることを示す指標であり、かつ、癌または癌を発症する素因が対象において検出された場合に対象に対してヒト化抗DKK2抗体処置が推奨される。

【0016】

30

さらに、本発明は、その必要がある対象において癌に対するヒト化抗DKK2抗体処置の有効性を判定するための方法を提供する。前記方法は、対象に由来する生物学的試料におけるDickkopf2(DKK2)遺伝子の発現レベルを判定する段階を含み、対象に由来する生物学的試料におけるDKK2の発現レベルが、癌を有していない対象に由来する対照生物学的試料におけるDKK2発現のレベルと比較して増大していることが、ヒト化抗DKK2抗体処置が有効であることを示す指標であり、かつ、ヒト化抗DKK2抗体処置が有効であると判定された場合に対象に対してさらなる処置が推奨される。

【0017】

さらなる局面において、本発明は、アミノ酸配列SEQ ID NO:5を含むDKK2エピトープを標的とするヒト化抗Dickkopf2(抗DKK2)抗体を含む組成物を含む。

【0018】

40

なおさらなる局面において、本発明は、対象において癌を診断するためのまたは癌もしくは転移を発症する素因を診断するためのキットを含む。本発明のキットは、アミノ酸配列SEQ ID NO:5を含むDKK2エピトープを標的とするヒト化抗DKK2抗体を含む。

【0019】

一部の態様において、癌は、大腸腺腫性ポリポーシス(adenomatosis polyposis coli)(APC)変異を発現する細胞を含む腫瘍を含む。一部の態様において、ヒト化抗DKK2抗体は中和活性を有する。他の態様において、ヒト化抗DKK2抗体は、アミノ酸配列SEQ ID NO:5を含むDKK2中和エピトープを標的とする。さらに他の態様では、ヒト化抗DKK2抗体は、SEQ ID NO:1、2、および3からなる群より選択されるアミノ酸配列の少なくとも1つを含む。

【0020】

50

一部の態様において、癌は、結腸直腸癌、膵臓癌、胃癌、腸癌、膵臓癌、および食道癌からなる群より選択される。一部の態様において、癌は転移性である。

【0021】

一部の態様において、本発明の組成物および方法は、化学療法剤、抗細胞増殖物質、免疫療法剤、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択されるさらなる作用物質を対象に投与する段階をさらに含む。一部の態様において、さらなる作用物質はプログラム細胞死1(programmed cell death 1)(PD-1)抗体である。他の態様において、ヒト化抗DKK2抗体およびさらなる作用物質は対象に同時投与される。さらに他の態様では、ヒト化抗DKK2抗体およびさらなる作用物質は共製剤化され、対象に同時投与される。

【0022】

一部の態様において、投与経路は、吸入、経口、直腸、腔、非経口、局部的、経皮、肺、鼻腔内、頬側、眼、くも膜下腔内、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【0023】

一部の態様において、対象に由来する生物学的試料におけるDKK2の発現レベルは正常対照レベルより少なくとも10%高い。一部の態様において、対象に由来する生物学的試料または正常対照におけるDKK2の発現レベルは、遺伝子のmRNAの検出、遺伝子によってコードされるタンパク質の検出、および遺伝子によってコードされるタンパク質の生物学的活性の検出からなる群より選択される方法を用いて判定される。一部の態様において、さらなる処置は、化学療法、放射線療法、免疫療法、および癌ワクチン療法からなる群より選択される少なくとも1つを含む。

【0024】

一部の態様において、対象は哺乳動物である。他の態様において、哺乳動物はヒトである。

【図面の簡単な説明】

【0025】

本発明を例示する目的で、本発明のある特定の態様を図面に図示する。しかしながら、本発明は、図面に図示した態様の厳密な配置および手段に限定されない。

【0026】

【図1A】パブリックドメインにあるマイクロアレイデータの分析に基づいた、ヒトGI腫瘍におけるDKK2遺伝子発現のアップレギュレーションを図示した箱ひげ図である。

【図1B】パブリックドメインにあるマイクロアレイデータの分析に基づいた、ヒトGI腫瘍におけるDKK2遺伝子発現のアップレギュレーションを図示した箱ひげ図である。

【図1C】パブリックドメインにあるマイクロアレイデータの分析に基づいた、ヒトGI腫瘍におけるDKK2遺伝子発現のアップレギュレーションを図示した箱ひげ図である。

【図1D】パブリックドメインにあるマイクロアレイデータの分析に基づいた、ヒトGI腫瘍におけるDKK2遺伝子発現のアップレギュレーションを図示した箱ひげ図である。

【図2A】5F8抗DKK2モノクローナル抗体(mAb)を用いた免疫組織染色によって、様々な組織に由来する腫瘍の組織学的切片においてDKK2タンパク質が検出されたことを図示した画像である。

【図2B】5F8抗DKK2モノクローナル抗体(mAb)を用いた免疫組織染色によって、様々な組織に由来する腫瘍の組織学的切片においてDKK2タンパク質が検出されたことを図示した画像である。

【図3】DKK2を遺伝子不活化すると、マウス結腸癌モデルであるAPC(min)(APC^{min/+}とも呼ばれる)マウスにおいて腫瘍進行が抑制されることを示した一連のヒストグラムである。n>10、*、p<0.01。

【図4】APCKO(APC^{min/+}DKK2^{-/-})マウスにおける腫瘍量の減少を示した一連の画像である。これらの画像から、APCKO腫瘍はAPCマウスの腫瘍よりも小さく、かつ頻度が少ない傾向があることが分かった。

【図5】mAb 5F8および1A10抗体がDKK2タンパク質に結合することを図示し、HEK293細胞

10

20

30

40

50

におけるWnt活性アッセイによって、mAb 5F8および1A10がDKK2タンパク質によるWnt活性阻害を逆転できることを図示した一連のグラフである。

【図6】APC(min)マウスにmAb 5F8抗体が存在するとポリープ体積が減少することを証明したヒストグラムである。APC(min)マウスを150 μ gのmAb 5F8で10週齢から開始して6週間にわたって週2回処置した。

【図7】抗PD-1と比較した、同種異系移植片LLC腫瘍成長に対するmAb 5F8の抑制効果を図示したグラフである。免疫応答性C57BL/6マウスに腫瘍細胞を移植し、3日目にmAb処置を開始した(n=5)。

【図8】抗PD-1と比較した、LLC腫瘍細胞を移植したマウスの寿命延長に対するmAb 5F8の効果を図示したグラフである。この実験は図7と同じように行った。1.5CM³より大きな腫瘍体積をもつマウスは死んだとみなされ、安楽死させた。

【図9】抗PD-1と比較した、同種異系移植片MC38腫瘍成長に対するmAb 5F8の抑制効果を図示したグラフである。免疫応答性C57BL/6マウスに腫瘍細胞を移植し、6日目にmAb処置を開始した(n=5)。腫瘍体積の増加がプロットされた。

【図10】同種異系移植片腫瘍モデルでのmAb 5F8中和によって、グランザイムB陽性細胞および腫瘍細胞死の増加に伴って腫瘍量が少なくなることを示した一連のヒストグラムおよび画像である。マウス結腸癌細胞(MC38)を免疫応答性C57BL/6マウスに皮下移植し、生着して6日後から開始して抗DKK2 mAb(5F8, YAL-008-1-5F8としても知られる)で処置した。腫瘍成長曲線と、アポトーシス細胞およびグランザイムB陽性細胞を対象にした腫瘍切片の免疫染色を示した。n=5。

【図11】中和抗DKK2抗体がグランザイムB陽性NK細胞およびCD8細胞を増やすことを図示した一連のヒストグラムである。同種異系移植腫瘍の中にある細胞のフローサイトメトリ分析から、DKK2中和はCD45造血細胞の数もNK細胞の数もCD8⁺細胞の数も影響を及ぼさなかったが、腫瘍の中にあるグランザイムB陽性の造血細胞、NK細胞、およびCD8⁺細胞のパーセントを増やしたことが明らかになった。n=5。

【図12】同種異系移植片モデルにおける腫瘍進行に対するヒト化抗DKK2抗体の効果を図示した一連のグラフおよびヒストグラムである。MC38細胞をC57BL/6マウス(8週齢)に接種し、6日目、9日目、および12日目に抗体(200 μ g/処置)で処置した。抗体は有意な腫瘍成長阻害を示した。*、対照IgGに対してp<0.05(n=5、スチューデントt検定)。腫瘍をフローサイトメトリによって分析した。

【図13】NK細胞およびCD8細胞の活性化に対するヒト化抗DKK2抗体5F8-HXT1-V2の効果を図示した一連のヒストグラムである。5F8-HXT1-V2処置によって、CD8陽性リンパ球およびNK1.1陽性ニュートラルキラー(neutral killer)細胞を含むグランザイムB陽性免疫細胞が増加した。*、対照IgGに対してp<0.05(n=5、スチューデントt検定)。

【図14】移植MC38腫瘍の進行に対するマウス抗DKK2抗体Y008-1-5F8またはそのヒト化抗体5F8-HXT1-V2の抑制効果が宿主免疫に依存することを示した一連のグラフおよびヒストグラムである。これらの抗体は、JAXから購入したMC38移植免疫不全NSGマウスにおける腫瘍進行に対して抑制効果を有意に示さなかった。

【図15】ヒト化抗DKK2抗体がヒトDKK2タンパク質に結合することを証明したグラフである。ヒトDKK2タンパク質をELISAプレートにコーティングし、次いで、抗DKK2抗体とインキュベートし、その後、HRP結合二次抗体とインキュベートした。結合は、化学ルミネセンスアッセイを用いて、抗体とプレートとのバックグラウンド結合を差し引いた後に判定された。

【図16】ヒト化抗DKK2抗体のアミノ酸配列のリストである。抗体ヒト化はマウス抗DKK2 5F8モノクローナル抗体(5F8 mAb)に基づいた。図16A:重鎖1(HC1、IgG1; SEQ ID NO:1)および軽鎖1(LC1、 κ ; SEQ ID NO:2)を含む、ヒト化抗DKK2抗体の1バージョンである5F8-HXT1-V1のアミノ酸配列のリスト。図16B:重鎖2(HC2、IgG1; SEQ ID NO:3)および軽鎖1(LC1、 κ ; SEQ ID NO:2)を含む、ヒト化抗DKK2抗体の第2のバージョンである5F8-HXT1-V2のアミノ酸配列のリスト。赤色で強調した残基は、5F8-HXT1-V1と5F8-HXT1-V2との間で異なる残基を示している。太字の残基は相補性決定領域(CDR)を指している。

10

20

30

40

50

【図 1 7】ヒトNK細胞株(NK92)において、Wnt5Aと一緒にDKK2がグランザイムB発現を直接阻害したことを証明したグラフである。組換えWnt5aおよびDKK2(200ng/ml)をNK-92MI細胞に24時間添加し、グランザイムB含有量をフローサイトメトリーによって分析した。

【図 1 8】ヒト化抗DKK2抗体の抗原のアミノ酸配列(SEQ ID NO:4)と、それに由来するエピトープのアミノ酸配列(SEQ ID NO:5)のリストである。

【発明を実施するための形態】

【0027】

発明の詳細な説明

本発明は、Dickkopf2(DKK2)の阻害によって、ニュートラルキラー(NK)細胞およびCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を含む免疫エフェクター細胞の細胞傷害活性の増大ならびに腫瘍細胞アポトーシスの増大に付随して腫瘍形成が抑制されるという思いもよらない発見に関する。従って、本明細書に記載の様々な態様において、本発明の方法は、有効量のヒト化抗DKK2抗体を患者に投与することによって癌を処置する方法、対象において抗腫瘍免疫を提供するための方法、対象において細胞集団または組織に対する免疫エフェクター細胞性免疫応答を刺激する方法に関する。さらに、本発明は、癌を診断するまたは癌を発症する素因を診断する方法、および癌を処置するための免疫療法処置の使用を決定するための方法を含む。さらに、本発明は、癌を処置するための薬学的組成物、ならびに上記の方法を実施するためのキットを包含する。

【0028】

定義

特に定義のない限り、本明細書において用いられる技術用語および科学用語は全て、本発明が属する当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様のまたは等価な任意の方法および材料を、本発明を試験するための実施において使用することができるが、好ましい方法および材料を本明細書において説明する。本発明を説明およびクレームする際に、以下の専門用語を使用する。

【0029】

本明細書で使用する場合、専門用語は特定の態様を説明することだけを目的とし、限定することを目的としていないことも理解しなければならない。

【0030】

本明細書で使用する場合、「1つの(a)」および「1つの(an)」という冠詞は、冠詞の文法上の目的語の1つまたは複数(すなわち、少なくとも1つ)を指すために用いられる。例として、「1つの要素」は1つの要素または複数の要素を意味する。

【0031】

量、期間などの測定可能な値について言及している際に本明細書で使用する場合、指定された値からの±20%または±10%、より好ましくは±5%、さらにより好ましくは±1%、なおより好ましくは±0.1%のばらつきが、開示された方法を実施するのに適しているので、「約」という用語は、このようなばらつきを包含することを意味する。

【0032】

本明細書で使用する場合、「10%高い」とは、対照より少なくとも10%またはそれ以上、例えば、20%、30%、40%、もしくは50%、60%、70%、80%、90%高い、もしくはそれ以上高い発現レベル、および/または1.1倍、1.2倍、1.4倍、1.6倍、1.8倍、2.0倍もしくはそれ以上高い発現レベル、ならびにその間の任意のおよび全ての全増加分または部分的な増加分を指す。

【0033】

本明細書で使用する場合、「対照」または「参照」という用語は同義に用いられ、比較の基準として用いられる値(例えば、健常対象におけるDKK2発現レベル)を指す。

【0034】

本明細書中で使用する「対象」または「患者」はヒトでも非ヒト哺乳動物でもよい。非ヒト哺乳動物には、例えば、家畜およびペット、例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、およびマウス哺乳動物が含まれる。好ましくは、対象はヒトである。

【0035】

本明細書中で使用する「変異」とは、天然状態からの変化をもたらすDNA配列中の変化である。変異は、少なくとも1つのデオキシリボ核酸塩基、例えば、プリン(アデニンおよび/もしくはチミン)ならびに/またはピリミジン(グアニンおよび/もしくはシトシン)の欠失および/または挿入および/または重複および/または置換を含んでもよい。変異は、生物(対象)の観察可能な特徴(表現型)の識別可能な変化を生じてもよいかまたは生じなくてもよい。

【0036】

本明細書で使用する「免疫原性」という用語は、抗原またはエピトープなどの、ある特定の物質が哺乳動物の体内で免疫応答を誘発できることである。この免疫応答は体液性および/または細胞性でもよい。

10

【0037】

本明細書で使用する「活性化」という用語は、目に見えて分かる生化学的変化または形態学的変化を誘導するのに十分な細胞表面部分連結の後の細胞の状態を指す。T細胞の文脈では、このような活性化は、細胞増殖を誘導するように十分に刺激されているT細胞の状態を指す。T細胞の活性化はまた、サイトカイン産生および調節性または細胞溶解性のエフェクター機能の実行を誘導することもある。他の細胞の文脈では、この用語は、特定の物理化学的プロセスの上方制御または下方制御を意味する。「活性化T細胞」という用語は、現在細胞分裂しているか、サイトカインを産生しているか、調節性もしくは細胞溶解性のエフェクター機能を実行しているT細胞、および/または「活性化」プロセスを最近受けたことがあるT細胞を示す。

20

【0038】

本明細書で使用する場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は同義に用いられ、ペプチド結合で共有結合したアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質またはペプチドは少なくとも2つのアミノ酸を含有しなくてはならず、タンパク質配列またはペプチド配列を構成することができるアミノ酸の最大数に制限は設けられない。ポリペプチドは、ペプチド結合によって互いにつながっている2つまたはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を含む。本明細書で使用する、この用語は、当技術分野において、例えば、一般的にペプチド、オリゴペプチド、およびオリゴマーとも呼ばれる短い鎖と、当技術分野において一般的にタンパク質と呼ばれる長い鎖の両方を指す。タンパク質の中には多くのタイプがある。「ポリペプチド」には、例えば、特に、生物学的に活性な断片、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチド変種、修飾されたポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

30

【0039】

本発明の文脈において、よく出現する核酸塩基については以下の略語が用いられる。「A」はアデノシンを指す。「C」はシトシンを指す。「G」はグアノシンを指す。「T」はチミジンを指す。「U」はウリジンを指す。

【0040】

本明細書で使用する「RNA」という用語はリボ核酸と定義される。

40

【0041】

本明細書で使用する「免疫療法剤」という用語は、患者の免疫系を調整する任意の剤を含むことが意図される。「免疫療法」とは、患者の免疫系を変える処置を指す。

【0042】

本明細書で使用する「治療の」という用語は処置および/または予防を意味する。治療効果は、疾患状態の抑制、軽快、または根絶によって得られる。

【0043】

「処置」という用語は、本発明の文脈において使用する場合に、疾患または障害に対する治療的処置ならびに予防的または抑制的な措置を含むことが意図される。従って、例え

50

ば、処置という用語は、疾患または障害が発症する前または発症した後に作用物質と投与し、それによって、疾患または障害の全徴候を阻止することまたは取り除くことを含む。別の例として、疾患が臨床的に発現した後に疾患の症状と闘うための作用物質の投与は、疾患の「処置」を含む。これは癌の予防を含む。

【0044】

「生物学的試料」という用語は、生物または生物の成分(例えば、細胞)から得られた試料を指す。試料は、任意の生物学的な組織または液体の試料でもよい。しばしば、試料は、患者から得られた試料である「臨床試料」である。このような試料には、骨髓、心臓組織、痰、血液、リンパ液、血球(例えば、白血球)、組織もしくは細針生検試料、尿、腹水、および胸膜液、またはこれらに由来する細胞が含まれるが、これに限定されない。生物学的試料はまた、組織学的な目的で採取した凍結切片などの組織切片を含んでもよい。

10

【0045】

「DKKタンパク質」は、1つまたは複数のシステインリッチドメインを含有するDkkタンパク質ファミリーの中のタンパク質を指す。Dkkタンパク質ファミリーには、Dkk1、Dkk2、Dkk3、およびDkk4、ならびにこれらのタンパク質の1つまたは複数と配列レベルで、構造的に、または機能的に十分に関連する他の任意のタンパク質が含まれる。このタンパク質ファミリーは、例えば、Krupnik et al.(1999) Gene 238:301に記載されている。この定義には、Dkkタンパク質の対立遺伝子変種および変異体、例えば、本明細書において列挙された対立遺伝子変種および変異体も包含される。

【0046】

「等価な」という用語は、ヌクレオチド配列に関して使用する場合、機能的に等価なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を指すことが理解される。等価なヌクレオチド配列は、1つまたは複数のヌクレオチド置換、付加、または欠失だけ異なる配列、例えば、対立遺伝子変種を含み、従って、遺伝暗号の縮重のために本明細書に記載の核酸のヌクレオチド配列と異なる配列を含む。

20

【0047】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはその断片(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、または抗体の他の抗原結合部分配列)である。ヒト化抗体は、大部分は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)に由来する残基が、望ましい特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)、例えば、マウス、ラット、またはウサギのCDRに由来する残基によって置換されているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されるCDRまたはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。抗体性能をさらに磨きをかけ、最適化するために、これらの変更が加えられる。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、および典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、この場合、CDR領域の全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、FR領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のFR領域である。ヒト化抗体はまた、最適には、少なくとも、免疫グロブリン定常領域(Fc)の一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの一部も含む。さらなる詳細については、Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596, 1992を参照されたい。

30

40

【0048】

「ハイブリダイゼーション」とは、核酸鎖が塩基対合によって相補鎖と結合する任意のプロセスを指す。二本の一本鎖核酸が二本鎖二重鎖を形成する場合に「ハイブリダイズ」する。二本鎖領域は、一本鎖核酸の一方もしくは両方の完全長、または一方の一本鎖核酸の全ておよび他方の一本鎖核酸の部分配列を含んでもよいが、または、二本鎖領域は各核酸の部分配列を含んでもよい。ハイブリダイゼーションはまた、二本の鎖が依然として二本鎖らせんを形成するのであれば、ある特定のミスマッチを含む二重鎖が形成すること

50

含む。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、本質的に特異的なハイブリダイゼーションをもたらすハイブリダイゼーション条件を指す。プローブと、テンプレート核酸の標的部位の「特異的ハイブリダイゼーション」という用語は、ハイブリダイゼーションシグナルをはっきりと解読することができるように、プローブが主に標的とハイブリダイズすることを指す。さらに本明細書において説明するように、特異的ハイブリダイゼーションをもたらす、このような条件は、相同性領域の長さ、領域のGC含有率、ハイブリッドの融解温度「 T_m 」に応じて変化する。従って、ハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション溶液および洗浄液の塩含有率、酸性度、および温度の点で異なる。

【0049】

DNAまたはRNAなどの核酸に関して本明細書で使用する「単離された」という用語は、それぞれ、天然の高分子供給源に存在する他のDNAまたはRNAから分離された分子を指す。本明細書で使用する、単離された、という用語はまた、組換えDNA法によって生成された場合には細胞材料、ウイルス材料、もしくは培養培地を実質的に含まない核酸またはペプチド、または化学合成された場合には化学前駆体もしくは他の化学物質も指す。さらに、「単離された核酸」は、断片として天然には存在せず、天然状態で見いだされないと考えられる核酸断片を含むことを意味する。「単離された」という用語はまた、他の細胞のタンパク質から単離されたポリペプチドも指すために本明細書において用いられ、精製されたポリペプチドおよび組換えポリペプチドの両方を包含することが意図される。「単離された細胞」または「単離された細胞集団」とは、天然環境には存在しない細胞または細胞集団である。

【0050】

本明細書で使用する場合、「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸(DNA)、適宜、リボ核酸(RNA)などのポリヌクレオチドを指す。この用語はまた、等価物として、ヌクレオチド類似体から作製されたRNAまたはDNAの類似体と、説明されている態様に当てはまる場合には一本鎖(センスまたはアンチセンス)ポリヌクレオチドおよび二本鎖ポリヌクレオチドを含むことも理解されるはずである。EST、染色体、cDNA、mRNA、およびrRNAは、核酸と言及される可能性のある分子の代表例である。

【0051】

「幹細胞」は、望ましい細胞タイプに分化することができる細胞を指す。幹細胞には、胚性幹(ES)細胞;成人幹細胞;および体性幹細胞、例えば、未拘束の(uncommitted)中胚葉に由来するSP細胞が含まれる。「全能性」幹細胞は、中胚葉、内胚葉、および外胚葉の細胞を含む全ての組織タイプに分化することができる。「多分化能性」または「多能性」の幹細胞は、いくつかの運命のうちの少なくとも2つに分化することができる細胞である。

【0052】

「変種」という用語は、ポリヌクレオチド配列の文脈において用いられる場合には、遺伝子またはそのコード配列の変種に関連するポリヌクレオチド配列を包含することがある。この定義はまた、例えば、「対立遺伝子」、「スプライス」、「種」、または「多型」変種も含むことがある。これらのポリペプチドには、一般的に、互いに対して有意なアミノ酸同一性がある。多型変種は、ある特定の種の個体間の、特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列の変化である。多型変種は、ポリヌクレオチド配列が1塩基だけ異なる「一塩基多型」(SNP)を包含することがある。SNPの存在は、例えば、ある特定の集団、疾患状態、または疾患状態の性質を示すことがある。

【0053】

「Wntアンタゴニスト」または「Wnt阻害物質」という用語は、Wnt経路を介してシグナル伝達を下方制御する(例えば、抑制または阻害する)分子または組成物を指す。下方制御は、直接的に、例えば、Wntシグナル伝達経路におけるタンパク質の生理活性を阻害することによって行われてもよい、または間接的に、例えば、Wntシグナル伝達の下流メディエーター(例えば、TCF3)を阻害することによって、または β -カテニンなどの安定性を減少させることによって行われてもよい。Wntアンタゴニストの例には、Dkkポリペプチド

(Glinka et al., Nature, 1998, 391: 357-62; Niehrs, Trends Genet, 1999, 15(8):314-9)、クレセント(crescent)ポリペプチド(Marvin et al., Genes & Dev., 2001, 15: 316-327)、ケルベルス(cerberus)ポリペプチド(米国特許第6,133,232号)、WISE/スクレロスチン(Li et al., J Biol Chem, 2005, 280: 19883-7)、アキシンポリペプチド(Zeng et al., Cell, 1997, 90(1): 181-92; Itoh et al., Curr Biol, 1998, 8(10):591-4; Willert et al., Development, 1999, 126(18):4165-73)、Frzbポリペプチド(Cadigan et al., Cell, 1998, 93(5):767-77; 米国特許第6,133,232号; 米国特許第6,485,972号)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ(GSK)ポリペプチド(He et al., Nature, 1995, 374(6523): 617-22)、T細胞因子(TCF)ポリペプチド(Molenaar et al., Cell, 1996, 86(3):391-9)、ドミナントネガティブディシブルド(dishevelled)ポリペプチド(Wallingford et al., Nature, 2000, 405(6782): 81-5)、ドミナントネガティブN-カドヘリンポリペプチド(米国特許第6,485,972号)、ドミナントネガティブ β -カテニンポリペプチド(米国特許第6,485,972号)、下流転写因子(例えば、TCFなど)のドミナントネガティブ、Wntポリペプチドのドミナントネガティブ、LRP-フリズルド(frizzled)-wnt複合体を破壊する作用物質、ならびにWntを隔離する作用物質(例えば、クレセントおよびWntに対する抗体)が含まれるが、これに限定されない。Wntアンタゴニストポリペプチドは、哺乳動物、例えば、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、またはヒツジに由来してもよく、非哺乳動物、例えば、ゼノパス(Xenopus)、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ(Drosophila)、ニワトリ、またはウズラに由来してもよい。Wntアンタゴニストは、Dkk、クレセント、ケルベルス、アキシン、Frzb、GSK、TCF、ドミナントネガティブディシブルド、ドミナントネガティブN-カドヘリン、およびドミナントネガティブ β -カテニンポリペプチドを含むが、これに限定されない、様々なポリペプチドの断片、ホモログ、誘導体、対立遺伝子変種、およびペプチドミメティックも包含する。他の態様において、Wntアンタゴニストは抗体(例えば、Wnt特異的抗体)、ポリヌクレオチド、および低分子も含む。

【0054】

本明細書で使用する「癌」という用語は、癌腫、肉腫を含むが、これに限定されない任意の悪性腫瘍を含む。癌は、細胞が制御されずに、および/または異常に分裂し、次いで、周囲組織に侵入し、破壊することから生じる。本明細書で使用する「増殖する」および「増殖」とは、有糸分裂している細胞を指す。本明細書で使用する「転移」とは、発生した部位から悪性腫瘍が離れて広がることを指す。癌細胞は、血流を通して、リンパ系を通して、体腔を通過して、またはそれらの任意の組み合わせで転移してもよい。

【0055】

「癌腫」という用語は、周囲組織に浸潤する傾向および転移を生じる傾向がある上皮細胞で構成された悪性の新たな成長を指す。

【0056】

「癌ワクチン」という用語は、癌と闘うためまたは癌の発生に寄与する作用物質と闘うために免疫系を刺激するワクチンを指す。2つの大まかなタイプの癌ワクチン: 健常対象において癌が発症しないことを目的とする予防的癌ワクチンと、癌に対する身体の自然防御を強化することによって、既にある癌を処置することを目的とする治療的癌ワクチンがある(Lollini et al., Nature Reviews Cancer, 2006; 6(3):204-216)。本明細書で使用する「癌ワクチン」という用語は、予防的癌ワクチンと治療的癌ワクチンの両方を含むと解釈すべきである。

【0057】

「転移」という用語は、ある臓器または部分から別の隣接しない臓器または部分に癌が広がることを指す。

【0058】

「寛解させる」または「処置する」という用語は、実施した行為の結果として、癌またはメラノーマに関連する臨床徴候および/または症状が和らげられることを意味する。モニタリングされる徴候または症状は、特定の癌またはメラノーマに特有のものであり、熟練した臨床家に周知であり、同様に、徴候および状態をモニタリングするための方法も熟

練した臨床家に周知である。例えば、熟練した臨床家には、特定の腫瘍に通常用いられる画像診断法を用いて(例えば、腫瘍をモニタリングするために超音波または磁気共鳴画像(MRI)を用いて)、腫瘍のサイズまたは成長速度をモニタリングできることが公知である。

【0059】

本明細書で使用する場合、「薬学的組成物」という用語は、本発明において有用な少なくとも1種類の化合物と、他の化学成分、例えば、担体、安定剤、希釈剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、および/または賦形剤の混合物を指す。薬学的組成物は、化合物を生物に投与するのを容易にする。静脈内投与、経口投与、エアロゾル投与、非経口投与、眼投与、肺投与、および局部的投与を含むが、これに限定されない、化合物を投与する複数の技法が当技術分野において存在する。

10

【0060】

「薬学的に許容される担体」という言葉は、本発明の化合物が意図された機能を果たすことができるように、対象の中に、または対象に本発明の化合物を運搬または輸送することに関与する、薬学的に許容される塩、薬学的に許容される材料、組成物、または担体、例えば、液体または固体の増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、またはカプセル化材料を含む。典型的に、このような化合物は、ある臓器または身体の一部から別の臓器または身体の一部に運搬または輸送される。それぞれの塩または担体は、製剤の他の成分と適合し、対象を傷つけないという意味で「許容され」なければならない。薬学的に許容される担体として働く可能性のある材料のいくつかの例には、糖、例えば、ラクトース、グルコース、およびスクロース;デンプン、例えば、トウモロコシデンプンおよびバレイショデンプン;セルロースおよびその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロース;トラガカントゴム末;麦芽;ゼラチン;タルク;賦形剤、例えば、カカオ脂および坐剤ろう;油、例えば、ピーナッツ油、綿実油、ペニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、およびダイズ油;グリコール、例えば、プロピレングリコール;ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコール;エステル、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル;寒天;緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム;アルギン酸;発熱物質を含まない水;等張性食塩水;リンガー液;エチルアルコール;リン酸緩衝液;希釈剤;造粒剤;潤滑剤;結合剤;崩壊剤;湿潤剤;乳化剤;着色剤;離型剤;コーティング剤;甘味剤;着香剤;芳香剤;防腐剤;抗酸化物質;可塑剤;ゲル化剤;シックナー;硬化剤;止め薬;懸濁剤;界面活性剤;保湿剤;担体;安定剤;ならびに薬学的製剤において用いられる他の無毒の適合性物質、またはそれらの任意の組み合わせが含まれる。本明細書で使用する「薬学的に許容される担体」はまた、化合物の活性と適合し、対象に対して生理学的に許容される任意および全てのコーティング、抗菌剤および抗真菌剤、ならびに吸収遅延剤なども含む。補助的な活性化合物も組成物に取り入れられてもよい。

20

30

【0061】

本明細書で使用する「抗体」または「Ab」という用語は、抗原上にある特定のエピトープに特異的に結合するタンパク質、または免疫グロブリン分子に由来するポリペプチド配列を指す。抗体は、天然供給源または組換え供給源に由来するインタクトな免疫グロブリンでもよく、インタクトな免疫グロブリンの免疫反応性部分でもよい。本発明において有用な抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、細胞内抗体(「イントラボディ(intrabody)」)、Fv、FabおよびF(ab)₂、ならびに単鎖抗体(scFv)およびヒト化抗体を含む様々な形で存在してもよい(Harlow et al., 1998, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。抗体は天然供給源に由来してもよいが、または組換え供給源に由来してもよい。抗体は典型的には免疫グロブリン分子の四量体である。

40

【0062】

本明細書で使用する「合成抗体」という用語は、組換えDNA技術を用いて作製された抗

50

体、例えば、本明細書に記載のようにバクテリオファージが発現した抗体を意味する。この用語はまた、抗体をコードするDNA分子の合成によって抗体が作製され、かつこのDNA分子が抗体タンパク質を発現させるかまたは抗体を特定するアミノ酸配列を発現させ、このDNA配列またはアミノ酸配列が、使用可能でありかつ当技術分野において周知である合成DNAまたはアミノ酸配列技術を用いて得られている、抗体を意味することも解釈されなければならない。

【0063】

「抗体断片」という用語は、インタクトな抗体の少なくとも1つの部分またはその組換え変種を指し、抗原結合ドメイン、例えば、抗体断片と標的、例えば、抗原との認識および特異的結合を付与するのに十分な、インタクトな抗体の抗原性決定可変領域を指す。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片、scFv抗体断片、直鎖抗体、シングルドメイン抗体、例えば、sdAb(VLまたはVH)、VHHドメイン、および抗体断片から形成された多重特異性抗体が含まれるが、これに限定されない。「scFv」という用語は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体断片と、重鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体断片を含み、単鎖ポリペプチドとして発現することが得る融合タンパク質を指し、軽鎖可変領域および重鎖可変領域は短い可動性のポリペプチドリンカーを介して連続して連結されており、scFvは、これが得られたインタクトな抗体の特異性を保持している。定めのない限り、本明細書で使用するscFvは、VL可変領域およびVH可変領域を、例えば、ポリペプチドのN末端およびC末端について、どちらの順序でも有してもよく、scFvは、VL-リンカー-VHを含んでもよい、またはVH-リンカー-VLを含んでもよい。

【0064】

本明細書で使用する「抗体重鎖」とは、天然コンホメーションをとる抗体分子に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうちのより大きい鎖を指し、この「抗体重鎖」は通常、抗体が属するクラスを決定する。

【0065】

本明細書で使用する「抗体軽鎖」とは、天然コンホメーションをとる抗体分子に存在する2つのタイプのポリペプチド鎖のうちのより小さい鎖を指す。カッパ(κ)軽鎖およびラムダ(λ)軽鎖とは2つの主な抗体軽鎖アイソタイプを指す。

【0066】

本明細書で使用する「組換え抗体」という用語は、組換えDNA技術を用いて作製された抗体、例えば、バクテリオファージまたは酵母発現システムが発現した抗体を意味する。この用語はまた、抗体をコードするDNA分子の合成によって抗体が作製され、かつこのDNA分子が抗体タンパク質を発現させるかまたは抗体を特定するアミノ酸配列を発現させ、このDNA配列またはアミノ酸配列が、使用可能でありかつ当技術分野において周知である組換えDNA技術またはアミノ酸配列技術を用いて得られている、抗体を意味することも解釈しなければならない。

【0067】

本明細書で使用する「抗原」または「Ag」という用語は、免疫応答を誘発する分子と定義される。この免疫応答は、抗体産生、もしくは特定の免疫学的に能力のある細胞の活性化、またはその両方を伴ってもよい。当業者は、実質的に全てのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原として働くことができることを理解する。さらに、抗原は組換えDNAに由来してもよい、またはゲノムDNAに由来してもよい。従って、当業者は、この用語が本明細書において用いられた場合に、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが「抗原」をコードすることを理解する。さらに、当業者は、抗原が、遺伝子の完全長ヌクレオチド配列だけでコードされる必要はないことを理解する。本発明は、複数種の遺伝子の部分的ヌクレオチド配列の使用を含むが、これに限定されず、これらのヌクレオチド配列は、望ましい免疫応答を誘発するために様々な組み合わせで配置されることが容易に分かる。さらに、当業者は、抗原が「遺伝子」によってコードされる必要は全くないことを理解する。抗原は作製、合成されてもよい、または生物学的試料から得られてもよいことが容易に分かる

。このような生物学的試料には、組織試料、腫瘍試料、細胞、または生物学的液体が含まれ得るが、これに限定されない。

【0068】

「アプリケーター」という用語は、この用語が本明細書において用いられる場合に、本発明の化合物および組成物を投与するための、皮下注射器、ピペットなどを含むが、これに限定されない任意の装置を意味する。

【0069】

本明細書で使用する場合、「アプタマー」は、別の分子に特異的に結合することができる低分子を指す。アプタマーは、典型的には、ポリヌクレオチドベースまたはペプチドベースの分子である。ポリヌクレオチドアプタマーは、特定の標的分子、例えば、有機分子および無機分子の中でも特にペプチド、タンパク質、薬物、ビタミンに対して適切な結合親和性および特異性を有するように設計された高度に特異的な三次元コンホメーションをとり、通常、数本の核酸鎖を含む、DNA分子またはRNA分子である。このようなポリヌクレオチドアプタマーは、指数増菌(exponential enrichment)によるリガンドの体系的進化を用いることによって膨大なランダム配列集団より選択することができる。ペプチドアプタマーは、典型的には、特異的リガンドに結合する、タンパク質スキャフォールドに取り付けられた約10～約20アミノ酸のループである。ペプチドアプタマーは、酵母ツーハイブリッドシステムなどの方法を用いてコンビナトリアルライブラリーから特定および単離されてもよい。

10

【0070】

本明細書で使用する「抗腫瘍効果」という用語は、例えば、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、転移数の減少、平均余命の増加、腫瘍細胞増殖の減少、腫瘍細胞生存率の減少、または癌状態に関連する様々な生理学的症状の寛解を含むが、これに限定されない様々な手段によって明らかにすることができる生物学的効果を指す。「抗腫瘍効果」はまた、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞、および抗体が、最初の場所で腫瘍の発生を阻止する能力があることでも明らかにすることができる。

20

【0071】

本明細書で使用する「異種移植片」という用語は、ある種のドナーから採取し、別の種のレシピエントに移植した組織の移植片を指す。

【0072】

本明細書で使用する「同種異系移植片」という用語は、ある種のドナーから採取し、同種のレシピエントに移植した組織の移植片を指す。

30

【0073】

範囲:本開示全体を通じて、本発明の様々な局面を範囲の形で提示することができる。範囲の形での説明は単なる便宜および簡略のためのものであり、本発明の範囲に対する融通の利かない限定と解釈してはならないことが理解されるはずである。従って、範囲の説明は、可能性のある全ての部分範囲(subrange)ならびにその範囲内にある個々の数値を具体的に開示したとみなされるはずである。例えば、1～6などの範囲の説明は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの部分範囲、ならびにその範囲内にある個々の数値、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6を具体的に開示したとみなされるはずである。これは範囲の幅に関係なく適用される。

40

【0074】

説明

免疫系は活性化と抑制との間でバランスが保たれている。免疫監視から逃れることは、腫瘍が形成する必要条件の1つである。腫瘍が免疫監視から逃れる手法の1つは、多量の免疫抑制分子を産生することである。何年にもわたって、ますます多くの免疫抑制分子および免疫抑制機構が同定されている。これらの免疫抑制分子の中和が様々な悪性腫瘍を処置するのに有効であることが示されている。

【0075】

本発明は、ニュートラルキラー(NK)細胞およびCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の活性を

50

抑制する分泌型腫瘍形成エンハンサーDKK2の発見に関する。DKK2は、 β -カテニンによって媒介されるWntシグナル伝達を阻害し、 β -カテニンによって媒介されないWnt活性を変化させることができ、かつWnt非依存的機能も有し得る分泌タンパク質である。DKK2は多くの組織において発現しており、ヒト結腸直腸癌、胃腸癌、肝臓癌、腎臓癌、および膵臓癌において上方制御されている。下記の実験証拠から、DKK2阻害物質および中和抗体は、DKK2が発現している癌を処置するための重要な免疫調節剤であることが分かる。従って、DKK2は、これらの癌を処置するための有望な標的である。

【0076】

本発明の方法

本発明は、その必要がある対象において癌を処置する方法であって、薬学的に許容される担体中の有効量のヒト化抗DKK2抗体またはその断片を対象に投与する段階を含む、方法に関する。本発明のヒト化抗DKK2抗体は、DKK2発現を阻害するもしくは低下させる、および/または細胞、組織、もしくは体液におけるDKK2活性を阻害するもしくは低下させる。

【0077】

抗体

本発明は、ヒト化抗DKK2抗体を含む組成物を含む。一態様において、ヒト化抗DKK2抗体は、SEQ ID NO:1、2、および3(図16A~16B)からなる群より選択されるアミノ酸配列の少なくとも1つを含む。

【0078】

抗体を生成する方法は当技術分野において公知である。本発明に従って用いられる抗体を生成するための例示的な技法が本明細書において説明される。抗体は、天然供給源に由来するか組換え供給源に由来するかに関係なく、標的分子上に存在するエピトープに特異的に結合することができる任意の免疫グロブリン分子を含むことが当業者に理解される。一態様において、標的分子は含む。

【0079】

本発明の組成物および方法において用いられる標的分子に対する抗体がポリクローナル抗体(IgG)である場合、適切な動物に、完全長標的タンパク質を含むペプチドまたはその断片、上流制御因子またはその断片を接種することによって作製される。これらのポリペプチドまたはその断片は、化学合成および生物学的合成を含む当技術分野において公知の任意の方法によって得ることができる。

【0080】

次いで、標的分子またはその断片に特異的に結合する、接種された動物において産生された抗体は、動物から得られた液体から単離される。ヤギ、ヒツジ、ウマ、ラクダ、ウサギ、およびロバなどがあるが、これに限定されない、いくつかの非ヒト哺乳動物において、このように抗体を作製することができる。ポリクローナル抗体を作製するための方法は当技術分野において周知であり、例えば、Harlow et al., 1998, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NYに記載されている。

【0081】

完全長標的分子またはその断片に対して作製されたモノクローナル抗体は、任意の周知のモノクローナル抗体調製手順、例えば、Harlow et al.(1998, In: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY)およびTuszynski et al.(1988, Blood, 72: 109-115)に記載の手順を用いて調製することができる。ヒトモノクローナル抗体は米国特許出願公開第2003/0224490号に記載の方法によって調製することができる。抗原に対して作製されたモノクローナル抗体は、本明細書において引用された標準的な手順を用いて抗原で免疫されたマウスから作製される。本明細書に記載の手順を用いて得られたモノクローナル抗体をコードする核酸は、当技術分野において使用可能であり、例えば、Wright et al., 1992, Critical Rev. in Immunol. 12(3,4): 125-168およびその中で引用された参考文献に記載されている技術を用いてクローニングおよび配列決定することができる。

【0082】

本発明の方法において用いられる抗体が、完全長標的分子またはその断片に対する抗体

10

20

30

40

50

に対応する生物学的に活性な抗体断片または合成抗体である場合、抗体は以下の通りに調製される。望ましい抗体またはその断片をコードする核酸を適切なベクターにクローニングする。ベクターをトランスフェクションによって、多量の抗体またはその断片を作製するのに適した細胞に導入する。次いで、望ましい抗体をコードするDNAを細胞内で発現させ、それによって抗体を生成する。望ましいペプチドをコードする核酸は、当技術分野において使用可能であり、例えば、Wright et al., 1992, Critical Rev. in Immunol. 12(3,4): 125-168およびその中で引用された参考文献に記載されている技術を用いてクローニングおよび配列決定することができる。または、多量の望ましい抗体またはその断片を、化学合成技術を用いて合成することもできる。抗体のアミノ酸配列が既知であれば、当技術分野において公知の方法を用いて、望ましい抗体を化学合成することができる。

10

【0083】

一態様において、本発明は、標的分子上に存在するエピトープと特異的に反応するヒト化抗体の使用を含む。これらの抗体は標的分子に結合することができる。本発明において有用なヒト化抗体には、ヒトフレームワークと、標的となった細胞表面分子と特異的に反応する抗体、典型的にはマウス抗体に由来する1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)がある。

【0084】

一部の態様において、非ヒト抗体はヒト化することができる。この場合、ヒトにおいて天然に産生される抗体との類似性を高めるように非ヒト抗体の特定の配列または領域が改変される。例えば、本発明では、抗体またはその断片は非ヒト哺乳動物scFvを含む場合がある。一態様において、抗原結合ドメイン部分はヒト化される。

20

【0085】

ヒト化抗体は、CDRグラフトイング(例えば、欧州特許番号EP239,400;国際公開公報番号WO91/09967;ならびに米国特許第5,225,539号、同第5,530,101号、および同第5,585,089号を参照されたい。これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる)、ベニアリング(veneering)またはリサーフェシング(resurfacing)(例えば、欧州特許番号EP592,106およびEP519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814;ならびにRoguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973を参照されたい。これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる)、鎖シャッフリング(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,565,332号を参照されたい)、ならびに、例えば、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第US2005/0042664号、米国特許出願公開第US2005/0048617号、米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、国際公開公報番号WO9317105、Tan et al., J. Immunol., 169:1119-25 (2002)、Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000)、Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000)、Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16):10678-84 (1997)、Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996)、Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995)、Couto et al., Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995)、Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994)、およびPedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994)に開示される技法を含むが、これに限定されない、当技術分野において公知の様々な技法を用いて作製することができる。多くの場合、抗原結合を変えるために、好ましくは抗原結合を改善するために、フレームワーク領域にあるフレームワーク残基は、CDRドナー抗体に由来する対応する残基と置換される。これらのフレームワーク置換は、当技術分野において周知の方法によって、例えば、CDRおよびフレームワーク残基の相互作用をモデル化して抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定し、配列比較して特定の位置にある珍しいフレームワーク残基を特定することによって特定される(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Queen et al., 米国特許第5,585,089号;およびRiechmann et al., 1988, Nature, 332:323を参照されたい)。

30

40

【0086】

ヒト化抗体には、非ヒト供給源から導入された1つまたは複数のアミノ酸残基がある。

50

これらの非ヒトアミノ酸残基は「移入(import)」残基と呼ばれることが多く、典型的には、「移入」可変ドメインから取り出される。従って、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリン分子に由来する1つまたは複数のCDRと、ヒトに由来するフレームワーク領域を含む。抗体のヒト化は当技術分野において周知であり、本質的には、Winterおよび共同研究者(Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988))の方法に従って、ヒト抗体の対応する配列を、げっ歯類CDRまたはCDR配列で置換することによって、すなわち、CDRグラフティングによって行うことができる(EP239,400;PCT公開公報番号WO91/09967;および米国特許第4,816,567号;同第6,331,415号;同第5,225,539号;同第5,530,101号;同第5,585,089号;同第6,548,640号、これらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる)。このようなヒト化キメラ抗体では、インタクトなヒト可変ドメインよりもかなり小さな配列が、非ヒト種に由来する対応配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は、典型的に、いくつかのCDR残基と、ことによると、いくつかのフレームワーク(FR)残基が、げっ歯類抗体にある類似部位に由来する残基によって置換されているヒト抗体である。抗体のヒト化は、ベニアリングもしくはリサーフェシング(EP592,106; EP519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994);およびRoguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994))または鎖シャッフリング(米国特許第5,565,332号)でも実現することができる。これらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

10

20

30

40

50

【0087】

ヒト化抗体の作製において用いられる、軽鎖および重鎖両方のヒト可変ドメインの選択は抗原性を低減することを目的とする。いわゆる「ベストフィット」法に従って、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列が、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングされる。次いで、げっ歯類の配列に最も近いヒト配列がヒト化抗体用のヒトフレームワーク(FR)と認められる(Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)。これらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる)。別の方法では、軽鎖または重鎖の特定のサブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークが用いられる。いくつかの異なるヒト化抗体に同じフレームワークが用いられることがある(Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)。これらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

【0088】

標的抗原に対する高い親和性その他の好都合な生物学的特性を保持しながら抗体をヒト化することができる。本発明の一面によれば、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いた親配列および様々な概念上のヒト化製品の分析プロセスによって調製される。三次元免疫グロブリンモデルは一般に入手可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の考えられる三次元コンホメーション構造を図で示し、表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を詳細に調べることによって、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の、可能性がある役割を分析することができる、すなわち、候補免疫グロブリンが標的抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基を分析することができる。このように、標的抗原に対する高い親和性など望ましい抗体特徴が実現するように、レシピエント配列および移入配列からFR残基を選択し、組み合わせることができる。一般的に、CDR残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接かつ最も大きく関与する。

【0089】

ヒト化抗体はオリジナルの抗体とほぼ同じ抗原特異性を保持している。しかしながら、ある特定のヒト化方法を用いると、Wu et al., J. Mol. Biol., 294:151(1999)に記載のように「定向進化(directed evolution)」法を用いて、抗体と標的抗原との結合の親和性および/または特異性が高まる可能性がある。この内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0090】

一部の態様において、天然で結合しているプロモーター領域または異種プロモーター領域を含む発現制御DNA配列が、ヒト化免疫グロブリンコード配列に機能的に連結され得る。発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることができるベクターにおける真核生物プロモーターシステムでもよい。または、発現制御配列は、原核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトすることができるベクターにおける原核生物プロモーターシステムでもよい。ベクターが適切な宿主に組み込まれたら、宿主は、導入されたヌクレオチド配列の高レベル発現に適した条件下で維持され、要望に応じて、ヒト化した軽鎖、重鎖、軽鎖/重鎖二量体もしくはインタクトな抗体、結合断片、または他の免疫グロブリン型の収集および精製が続いてもよい(参照により本明細書に組み入れられる、Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, 1979)。

10

【0091】

当技術分野において周知の手順に従って、ヒト抗体、特に相補性決定領域(CDR)のDNA配列を単離することができる。好ましくは、ヒトCDR DNA配列は、国際公開公報番号WO1987/02671に記載のように不死化B細胞から単離される。本発明の抗体の生成において有用なCDRは、標的分子に結合することができるモノクローナル抗体をコードするDNAから同様に得られる場合がある。このようなヒト化抗体は、周知の方法を用いて、マウス、ラット、ラクダ、ラマ、ウサギ、または他の脊椎動物を含むが、これに限定されない、抗体を産生することができる任意の便利な哺乳動物供給源において作製することができる。定常領域およびフレームワークDNA配列に適した細胞ならびに抗体が発現および分泌される宿主細胞は、American Type Culture Collection, Manassas, VAなどの多数の供給源から入手することができる。

20

【0092】

DKK2に対して反応する特異的抗体または抗体断片を作製する別の方法は、細菌内で発現させた免疫グロブリン遺伝子またはその一部をコードする発現ライブラリーを、DKK2タンパク質またはペプチドを用いてスクリーニングすることを伴う。例えば、完全Fab断片、VH領域、およびFv領域を、ファージ発現ライブラリーを用いて細菌内で発現させることができる。例えば、Ward et al., Nature, 1989, 341: 544-546; Huse et al., Science, 1989, 246: 1275-1281; およびMcCafferty et al., Nature, 1990, 348: 552-554を参照されたい。このようなライブラリーを、例えば、DKK2ペプチドでスクリーニングすると、DKK2と反応する免疫グロブリン断片を同定することができる。または、SCID-huマウス(Genpharmから入手可能)を用いて、抗体またはその断片を生成することができる。

30

【0093】

さらなる態様において、抗体または抗体断片は、McCafferty et al., Nature, 1990, 348: 552-554に記載の技法を用いて作製した抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clackson et al., Nature, 1991, 352: 624-628およびMarks et al., J Mol Biol, 1991, 222: 581-597は、それぞれ、ファージライブラリーを用いたマウス抗体およびヒト抗体の単離について述べている。その後の刊行物は、鎖シャッフリング(chain shuffling)(Marks et al., BioTechnology, 1992, 10: 779-783)ならびに非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略である組み合わせ感染(combinatorial infection)およびインビボ組換え(Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 1993, 21: 2265-2266)による高親和性(nM範囲)ヒト抗体の生成について述べている。従って、これらの技法は、モノクローナル抗体を単離するための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ法の実行可能な代替法である。

40

【0094】

DNAはまた、例えば、相同マウス配列の代わりにヒト重鎖定常ドメインおよび軽鎖定常ドメインのコード配列を用いることによって改変されてもよく(米国特許第4,816,567号; Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81: 6851)、免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部もしくは一部を共有結合に

50

よりつなげることによって改変されてもよい。典型的に、このような非免疫グロブリンポリペプチドは抗体の定常ドメインの代わりに用いられるか、第1の抗原に対して特異性を有する、ある抗原結合部位と、異なる抗原に対して特異性を有する別の抗原結合部位を有するキメラ二価抗体を作り出すために、抗体の、ある抗原結合部位の可変ドメインの代わりに用いられる。

【0095】

機能的な抗体断片を生成するために様々な技法が開発されている。抗体断片は抗体の可変領域または抗原結合領域を含んでもよい。従来、これらの断片はインタクトな抗体のタンパク質分解消化を介して得られた(例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1992, 24: 107-117およびBrennan et al., Science, 1985, 229: 81を参照されたい)。しかしながら、今では、組換え宿主細胞がこれらの断片を直接、産生することができる。例えば、抗体断片を、前述の抗体ファージライブラリーから単離することができる。または、Fab'-SH断片を大腸菌から直接、回収し、化学結合して、F(ab')₂断片を形成することができる(Carter et al., Bio/Technology, 1992, 10: 163-167)。別のアプローチによれば、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養物から直接、単離することができる。抗体断片を生成するための他の技法は当業者に明らかである。他の態様において、えり抜きの抗体は単鎖Fv断片(scFv)である。WO93/16185; 米国特許第5,571,894号; および米国特許第5,587,458号を参照されたい。抗体断片はまた、例えば、米国特許第5,641,870号に記載のように、「直鎖抗体」でもよい。このような直鎖抗体断片は単一特異性または二重特異性でもよい。

【0096】

抗体模倣物または「非抗体結合タンパク質」は、抗体可変領域用の代替タンパク質フレームワークとして非免疫グロブリンタンパク質スキャフォールドを用いることによって、アドネクチン(adnectin)、アビマー(avimer)、単鎖ポリペプチド結合分子、および抗体様結合ペプチドミメティックを含む非免疫グロブリンタンパク質スキャフォールドを使用する(米国特許第5,260,203号; 同第5,770,380号; 同第6,818,418号および同第7,115,396号)。抗体と同じようにターゲティングし、標的に結合する他の化合物が開発されている。これらの「抗体模倣物」のいくつかは、抗体可変領域用の代替タンパク質フレームワークとして非免疫グロブリンタンパク質を使用する。抗体を、「抗体様結合ペプチドミメティック」(ABiP)と呼ばれる、さらに小さなペプチドミメティックに変えるための方法を使用することができる。抗体を、さらに小さなペプチドミメティックに変えるための方法論は抗体の代替物としても有用な場合がある(Murali et al. Cell Mol Biol, 2003, 49(2):209-216)。

【0097】

多ドメインを含み「アビマー」と呼ばれる単鎖ポリペプチドである融合タンパク質が、ヒト細胞外受容体ドメインからインビトロエキソンシャッフリングおよびファージディスプレイによって開発された。「アビマー」は、様々な標的分子に対する親和性および特異性の点で抗体といくらか似ている結合タンパク質の一種である(Silverman et al. Nat Biotechnol, 2005, 23: 1556-1561)。結果として生じた多ドメインタンパク質は、単エピートープ結合タンパク質と比較して改善した親和性(場合によってはnM以下の)および特異性を示すことができる複数の独立した結合ドメインを含むことができる。アビマーの構築方法および使用方法に関する、さらなる詳細は、例えば、米国特許出願公開第20040175756号、同第20050048512号、同第20050053973号、同第20050089932号、および同第20050221384号に開示される。

【0098】

非免疫グロブリンタンパク質フレームワークに加えて、RNA分子および非天然オリゴマー(例えば、プロテアーゼ阻害物質、ベンゾジアゼピン、プリン誘導体、およびβターン模倣物)を含むが、これに限定されない化合物においても抗体特性が模倣されてきた。上記の化合物は全て本発明と使用するのに適している。これらは、特異性が合わせられた抗体を設計するための全インビトロ法を開発することによって、動物において抗体を開発す

る制約を回避することを目標とした。

【0099】

当技術分野において公知のように、アプタマーは、特定の分子標的にしっかりと結合する核酸で構成される高分子である。TuerkおよびGold (Science, 1990, 249:505-510)は、アプタマーを選択するためのSELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)法を開示する。SELEX法では、核酸分子(例えば、1015個の異なる分子)の大きなライブラリーを生成する、および/または標的分子を用いてスクリーニングする。次いで、単離されたアプタマーを、標的結合および/またはアプタマー構造に寄与しない、あらゆるヌクレオチド(すなわち、コア結合ドメインまで切断されたアプタマー)を排除するようにさらに改良することができる。例えば、アプタマー技術の総説については、Jayase

10

【0100】

本発明の抗DKK2抗体に関する「中和」という用語または「DKK2活性を中和する抗体」という句は、DKK2と結合または接触すると、DKK2によって誘導される、細胞増殖活性、癌の転移、癌細胞の浸潤または癌細胞の移動、Wntシグナル伝達、腫瘍形成を促進する微小環境の確立が阻害される抗体を指すことが意図される。DKK2は細胞外に分泌され、癌細胞の増殖、移動、浸潤、および転移の必須の因子として機能するので、一部の抗DKK2抗体は、これらの活性を中和する可能性がある。本発明における中和抗体は、治療用途において、難治性疾患である癌および癌の転移を予防または処置するのに特に有用である。DKK2の過剰発現を特徴とする癌の転移を阻害するために、本発明における中和抗体は患者に投与されてもよい、または細胞と接触されてもよい。

20

【0101】

本発明の抗体は、当技術分野において公知の任意の方法によって免疫特異的結合についてアッセイすることができる。使用することができるイムノアッセイには、少数の例を挙げれば、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫測定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技法を用いた競合的アッセイシステムおよび非競合的アッセイシステムが含まれるが、これに限定されない。このようなアッセイは日常的であり、かつ当技術分野において周知である(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, (Ausubel et al., eds.), Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 2002を参照されたい)。

30

【0102】

併用療法

本明細書に記載の方法において同定された化合物は、癌を処置するのに有用な少なくとも1種類のさらなる化合物と組み合わせられた場合でも本発明の方法において有用である場合がある。さらなる化合物は、本明細書において同定された化合物、または癌の症状および/もしくは転移を処置すること、阻止すること、もしくは減少させることが公知である化合物、例えば、市販の化合物を含んでもよい。

【0103】

一局面において、本発明は、本発明において有用な作用物質は、治療用物質、例えば、化学療法剤、免疫療法剤、抗細胞増殖物質、またはそれらの任意の組み合わせを含むがこれに限定されない抗腫瘍剤と併用されてもよいことを意図する。例えば、以下の非限定的な例示的なクラスの任意の従来の化学療法剤が本発明に含まれる:アルキル化剤;ニトロソウレア;代謝拮抗物質;抗腫瘍性抗生物質;植物アルキロイド(alkyloid);タキサン;ホルモン剤;および多種多様な作用物質。

40

【0104】

アルキル化剤は、細胞内に存在する条件下でアルキル基を多くの電気陰性基に付加し、それによって、DNA複製を妨害して癌細胞が複製するのを阻止する能力があるために、このように名付けられた。ほとんどのアルキル化剤は細胞周期非特異的である。特定の局面

50

において、アルキル化剤は、DNA二重らせん鎖中のグアニン塩基を架橋結合することによって腫瘍成長を停止させる。非限定的な例には、ブスルファン、カルボプラチン、クロランプシル、シスプラチン、シクロホスファミド、ダカルバジン、イホスファミド、塩酸メクロレタミン、メルファラン、プロカルバジン、チオテパ、およびウラシルマスタードが含まれる。

【0105】

代謝拮抗物質は、細胞周期の合成(S)期の際にDNAに塩基が取り込まれないようにして正常な発生および分裂を阻止する。代謝拮抗物質の非限定的な例には5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、カペシタビン、シトシンアラビノシド、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、メトトレキセート、およびチオグアニンなどの薬物が含まれる。

10

【0106】

抗腫瘍性抗生物質は一般的に、細胞分裂に必要な酵素を妨害することによって、または細胞を取り囲む膜を変えることによって細胞分裂を阻止する。このクラスには、DNA構造を破壊することによって細胞分裂を阻止するように働き、その機能を終わらせる、ドキソルビシンなどのアントラサイクリンが含まれる。これらの作用物質は細胞周期非特異的である。抗腫瘍性抗生物質の非限定的な例には、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カルピシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ユベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシンが含まれる。

20

【0107】

植物アルカロイドは、有糸分裂を阻害するもしくは停止させるか、または細胞増殖に必要なタンパク質を細胞が生成するのを阻止する酵素を阻害する。頻繁に用いられる植物アルカロイドには、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン、およびビノレルピンが含まれる。しかしながら、本発明は、これらの植物アルカロイドにのみ限定されると解釈してはならない。

30

【0108】

タキサンは、細胞機能において重要な、微小管と呼ばれる細胞構造に影響を及ぼす。正常な細胞増殖において、微小管は、細胞が分裂を始めると形成されるが、細胞が分裂するのを停止すると、微小管は解体または破壊される。タキサンは微小管が分解するのを妨げ、その結果、癌細胞は微小管でかなり目詰まりするために増殖および分裂できなくなる。非限定的な例示的なタキサンにはパクリタキセルおよびドセタキセルが含まれる。

【0109】

例えば白血病、リンパ腫、および多発性骨髄腫を含む、ある特定のタイプの癌のために、ホルモン剤およびホルモン様薬物が用いられる。ホルモン剤およびホルモン様薬物は、これらの有効性を高めるために他のタイプの化学療法薬物と用いられることが多い。性ホルモンは、女性ホルモンまたは男性ホルモンの働きまたは産生を変えるために用いられ、乳癌、前立腺癌、および子宮内膜癌の成長を遅らせるために用いられる。多くの場合、これらのホルモンの産生の阻害(アロマターゼ阻害物質)または働きの阻害(タモキシフェン)を療法の補助として用いることができる。他の何らかの腫瘍もホルモン依存性である。タモキシフェンは、乳癌細胞の増殖を促進するエストロゲンの活性を妨害するホルモン剤の非限定的な例である。

40

【0110】

多種多様な作用物質には、ブレオマイシン、ヒドロキシウレア、L-アスパラギナーゼ、およびプロカルバジンなどの化学療法剤が含まれる。

【0111】

50

化学療法剤の他の例には、以下の化学療法剤：ナイトロジェンマスタード、例えば、クロランブシル、クロマファジン(chlomaphazine)、クロロホスファミド(chlorophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミノキシド、メルファラン、ノベムビシン(novembichin)、フェネストリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FU；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤(anti-adrenal)、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充剤、例えば、フロリン酸(frolic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトレキサート(edatrexate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルチン；ジアジクオン；エフロルニチン；酢酸エリブチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ボドフィリニック酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK@ラゾキサソ；シゾフラン(sizofuran)；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル(タキソール(TAXOLO)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ.)およびドキセタキセル(タキソテル(TAXOTERE)、Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン；ビンブラスチン；白金；エトボシド(VP-16)；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニボシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害物質RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)；レチノイン酸；エスペラミシン；ならびにカペシタビン、ならびにその薬学的に許容される塩、酸、および誘導体が含まれるが、これに限定されない。

10

20

30

40

50

【0112】

抗細胞増殖物質はアポトーシス誘導物質または細胞傷害物質とさらに定義することができる。アポトーシス誘導物質は、グランザイム、Bcl-2ファミリーメンバー、チトクロムC、カスパーゼ、またはそれらの組み合わせでもよい。例示的なグランザイムには、グランザイムA、グランザイムB、グランザイムC、グランザイムD、グランザイムE、グランザイムF、グランザイムG、グランザイムH、グランザイムI、グランザイムJ、グランザイムK、グランザイムL、グランザイムM、グランザイムN、またはそれらの組み合わせが含まれる。他の特定の局面において、Bcl-2ファミリーメンバーは、例えば、Bax、Bak、Bcl-Xs、Bad、Bid、Bik、Hrk、Bok、またはそれらの組み合わせである。

【0113】

さらなる局面において、カスパーゼは、カスパーゼ-1、カスパーゼ-2、カスパーゼ-3、カスパーゼ-4、カスパーゼ-5、カスパーゼ-6、カスパーゼ-7、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9、カスパーゼ-10、カスパーゼ-11、カスパーゼ-12、カスパーゼ-13、カスパーゼ-14、またはそれらの組み合わせである。特定の局面において、細胞傷害剤は、TNF- α 、ゲロニン、プロジギオシン、リボソーム阻害タンパク質(RIP)、シュードモナス属(Pseudomonas)エキソトキシン、クロストリジウム・ディフィシル(Clostridium difficile)毒素B、ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)VacA、エルシニア・エンテロコリチカ(Yersinia enterocolitica)YopT、ピオラセイン(Violacein)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸、イロフルベン、ジフテリア(Diphtheria)毒素、ミトギリリン(mitogillin)、リシン、ボツ

リヌス毒素、コレラ毒素、サボリン6、またはそれらの組み合わせである。

【0114】

免疫療法剤は、インターロイキン-2または他のサイトカイン、プログラム細胞死タンパク質1(PD-1)シグナル伝達阻害物質、例えば、PD-1に結合するモノクローナル抗体、イピリムマブでもよいが、これに限定されない。免疫療法剤はまた細胞傷害性Tリンパ球抗原A-4(CTLA-4)シグナル伝達もブロックすることができ、癌ワクチンおよび樹状細胞に基づく療法にも関連することができる。

【0115】

免疫療法剤はさらに、サイトカイン処理によってまたは養子細胞療法および/もしくは造血幹細胞移植による外因性細胞の導入によって活性化および増殖されたNK細胞でもよい。養子細胞療法に適したNK細胞は、自己由来NK細胞のエキスビボ増殖、末梢血に由来する未刺激のもしくは増殖された同種異系NK細胞、末梢血および臍帯血に由来するCD34+造血前駆細胞、ならびにNK細胞株を含む様々な供給源から得ることができる。キメラ抗原受容体またはサイトカインを発現する遺伝子組換えされたNK細胞も本発明において意図される。本発明に有用な別の免疫療法剤は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)が患者に投与される養子T細胞療法(ACT)に基づく剤である。投与されるT細胞は、主要組織適合性(MHC)に制限されないやり方で細胞表面抗原を認識する腫瘍特異的抗原受容体、例えば、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子操作することができる。または、投与されるT細胞は、MHC分子によって提示される細胞内抗原のエピトープを認識する従来の $\alpha\beta$ TCRでもよい。

【0116】

薬学的組成物および製剤

本発明は、本発明の方法において使用するためのヒト化抗DKK2抗体を含む薬学的組成物の使用を想定する。

【0117】

このような薬学的組成物は、対象に投与するのに適した形をとる。または、薬学的組成物は、1種類もしくは複数種の薬学的に許容される担体、1種類もしくは複数種のさらなる成分、またはこれらの何らかの組み合わせをさらに含んでもよい。薬学的組成物の様々な成分は、当技術分野において周知のように、例えば、生理学的に許容されるカチオンまたはアニオンと組み合わせられて、生理学的に許容される塩の形で存在してもよい。

【0118】

態様において、本発明の方法を実施するのに有用な薬学的組成物は、1ng/kg/day ~ 100mg/kg/dayの用量を送達するために投与されてもよい。別の態様において、本発明を実施するのに有用な薬学的組成物は、1ng/kg/day ~ 500mg/kg/dayの用量を送達するために投与されてもよい。

【0119】

本発明の薬学的組成物中の活性成分、薬学的に許容される担体、および任意のさらなる成分の相対量は、処置される対象の身元(identity)、大きさ、および状態に応じて、さらに、組成物が投与される経路に応じて変化する。例として、組成物は0.1% ~ 100%(w/w)の活性成分を含んでもよい。

【0120】

本発明の方法において有用な薬学的組成物は、吸入投与経路、経口投与経路、直腸投与経路、腔投与経路、非経口投与経路、局部的投与経路、経皮投与経路、肺投与経路、鼻腔内投与経路、頬側投与経路、眼投与経路、くも膜下腔内投与経路、静脈内投与経路、または別の投与経路のために適宜開発されてもよい。他の意図される製剤は、射出されるナノ粒子、リボソーム調製物、活性成分を含有する放出される赤血球、および免疫に基づく製剤を含む。投与経路は当業者に容易に明らかであり、処置されている疾患のタイプおよび重篤度、処置されている獣医学患者またはヒト患者のタイプおよび年齢などを含む任意の数の要因に左右される。

【0121】

本明細書に記載の薬学的組成物の製剤は、公知の任意の方法によって調製されてもよい

か、または薬理学の分野において今後開発されてもよい。一般的に、このような準備方法は、活性成分を担体または1種類もしくは複数種の他のアクセサリー成分と結合させる段階、次いで、必要であれば、または所望であれば、生成物を望ましい1回用量単位または複数回用量単位に成型または包装する段階を含む。

【0122】

本明細書で使用する「単位用量」は、活性成分の予め決められた量を含む、薬学的組成物の別々の量である。活性成分の量は、一般的に、対象に投与される活性成分の投与量に等しいか、またはこのような投与量の便利な一部分、例えば、このような投与量の1/2もしくは1/3である。単位剤形は単回一日量用の単位剤形でもよい、または、複数回一日量(例えば、1日につき約1~4回またはそれ以上)のうちの1つの単位剤形でもよい。複数回一日量が用いられる場合、単位剤形は各用量について同じでもよいまたは異なってもよい。

10

【0123】

本明細書において提供される薬学的組成物の説明は、主に、ヒトへの倫理的投与に適した薬学的組成物に向けられるが、このような組成物は、一般的に、全種類の動物に投与するのに適していると当業者に理解される。組成物を様々な動物に投与するのに適するようにするために、ヒトに投与するのに適した薬学的組成物を改良することは良く理解されており、通常の知識を有する獣医薬理学者(veterinary pharmacologist)が、もしあれば普通の実験だけで、このような改良を設計および実施することができる。本発明の薬学的組成物の投与が意図される対象には、ヒトおよび他の霊長類、商業的に関連する哺乳動物、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、およびイヌを含む哺乳動物が含まれるが、これに限定されない。

20

【0124】

一態様において、前記組成物は1種類または複数種の薬学的に許容される賦形剤または担体を用いて製剤化される。一態様において、薬学的組成物は、治療的有效量のヒト化抗DKK2抗体および薬学的に許容される担体を含む。薬学的に許容される担体は有用であり、グリセロール、水、食塩水、エタノール、ならびに他の薬学的に許容される塩溶液、例えば、リン酸および有機酸の塩を含むが、これに限定されない。これらの薬学的に許容される担体および他の薬学的に許容される担体の例は、Remington's Pharmaceutical Science, 1991, Mack Publication Co., New Jerseyに記載されている。

30

【0125】

担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、その適切な混合物、ならびに植物油を含有する溶媒または分散媒でもよい。例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合では必要とされる粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって適切な流動性を維持することができる。微生物の活動は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって阻止することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウム、または多価アルコール、例えば、マンニトールおよびソルビトールを組成物に含めることが好ましい。注射用組成物の長期吸収は、吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含めることによって可能になる。

40

【0126】

製剤は、従来賦形剤、すなわち、当業者に公知の経口投与、非経口投与、鼻投与、静脈内投与、皮下投与、経腸投与、または他の任意の適切な投与方法に適した、薬学的に許容される有機担体物質または無機担体物質と混合して用いられてもよい。製剤は滅菌されてもよく、所望であれば、補助剤、例えば、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼすための塩、緩衝液、着色剤、着色剤、および/または芳香物質などと混合されてもよい。これらは、所望の場合、他の活性剤、例えば、他の鎮痛剤と組み合わせられてもよい。

50

【0127】

本発明の組成物は、組成物の総重量に対して約0.005%～2.0%の防腐剤を含んでもよい。防腐剤は、環境中の汚染物質に曝露された場合に劣化するのを防ぐために用いられる。本発明に従って有用な防腐剤の例には、ベンジルアルコール、ソルビン酸、パラベン、イミドウレア(imidurea)、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される防腐剤が含まれるが、これに限定されない。特に好ましい防腐剤は、約0.5%～2.0%ベンジルアルコールおよび0.05%～0.5%ソルビン酸の組み合わせである。

【0128】

組成物は、好ましくは、化合物の分解を阻害する抗酸化物質およびキレート剤を含む。一部の化合物に好ましい抗酸化物質は、組成物の総重量に対して約0.01重量%～0.3重量%の好ましい範囲にあるBHT、BHA、 α -トコフェロール、およびアスコルビン酸、より好ましくは0.03重量%～0.1重量%の範囲にあるBHTである。好ましくは、キレート剤は、組成物の総重量に対して0.01重量%～0.5重量%の量で存在する。特に好ましいキレート剤には、組成物の総重量に対して約0.01重量%～0.20重量%の重量範囲にある、より好ましくは0.02重量%～0.10重量%の範囲にあるエデト酸塩(例えば、エデト酸二ナトリウム)およびクエン酸が含まれる。キレート剤は、製剤の貯蔵寿命に有害な場合がある、組成物中の金属イオンをキレート化するのに有用である。BHTおよびエデト酸二ナトリウムが、それぞれ、一部の化合物に特に好ましい抗酸化物質およびキレート剤であるが、他の適切なおよび等価な抗酸化物質およびキレート剤を、当業者に公知のように代用することができる。

10

20

【0129】

投与/投薬

投与のレジメンは、有効量を構成するものに提供を及ぼす可能性がある。例えば、治療用製剤は、癌に関連する外科的介入の前もしくは後に、または患者が癌と診断された直後に患者に投与されてもよい。さらに、いくつかの分割投与量ならびに時間をずらした(staggered)投与量が毎日または連続して投与されてもよいが、または、用量は連続注入されてももしくは大量瞬時投与されてもよい。さらに、治療状況または予防状況の切迫した要件により示されるように、治療用製剤の投与量は比例して増加または減少されてもよい。

【0130】

患者、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに対する本発明の組成物の投与は、公知の手順を用いて、患者において癌を処置するのに有効な投与量および期間で行うことができる。治療効果を実現するのに必要な治療用化合物の有効量は、使用される特定の化合物の活性、投与時間、該化合物の排出速度、処置期間、該化合物と併用される他の薬物、化合物、または材料、疾患または障害の状態、処置されている患者の年齢、性別、体重、状態、身体全体の健康、および前病歴などの要因、ならびに医学分野において周知の同様の要因に従って変化することがある。最適な治療応答を提供するように投与レジメンが調整されてもよい。例えば、いくつかの分割量が毎日投与されてもよいが、または、治療状況の切迫した要件により示されるように用量が比例して減少されてもよい。本発明の治療用化合物の有効な用量範囲の非限定的な例は約0.01～50mg/体重kg/日である。当業者であれば、関連する要因を研究し、過度の実験なく治療用化合物の有効量に関する決定を下すことができるだろう。

30

40

【0131】

化合物は、1日に数回もの頻度で動物に投与されてもよいが、または、1日に1回、1週間に1回、2週間に1回、1ヶ月に1回などの少ない頻度で、数ヶ月に1回もしくは1年に1回、またはそれ未満などのさらに少ない頻度で投与されてもよい。1日あたりに投薬される量の化合物が、非限定的な例では、毎日、1日おきに、2日ごとに、3日ごとに、4日ごとに、または5日ごとに投与されてもよいことが理解される。例えば、1日おきに投与する場合、月曜日に1日あたり5mgの用量が開始し、水曜日に、その後の1日あたり5mgの第1の用量が投与され、金曜日に、その後の1日あたり5mgの第2の用量が投与されてもよい。投薬の頻度は当業者に容易に明らかであり、処置されている疾患のタイプおよび重篤度ならびに動物

50

のタイプおよび年齢などがあるが、これに限定されない任意の数の要因に左右される。本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、患者への毒性無く、特定の患者、組成物、および投与方法について望ましい治療応答を実現するのに有効な活性成分の量を得るように変えられてもよい。当技術分野において通常の知識を有する医師、例えば、内科医または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定して処方することができる。例えば、内科医または獣医師は、望ましい治療効果を実現するために必要なレベルより少ないレベルで、薬学的組成物において用いられる本発明の化合物の投薬を開始し、望ましい効果を実現するまで投与量を徐々に増加させ得る。

【0132】

特定の態様では、投与を容易にするために、および投与量を均一にするために化合物を投与単位剤形で製剤化することが特に有利である。本明細書で使用する投与単位剤形とは、処置しようとする患者への単位投与として適した物理的に別個の単位を指す。それぞれの単位は、必要とされる薬学的ビヒクルに結合して望ましい治療効果を生じるように算出された所定量の治療用化合物を含有する。本発明の単位剤形は、(a)治療用化合物の独特の特徴および実現しようとする特定の治療効果によって、ならびに(b)患者における癌を処置するためのこのような治療用化合物を配合/製剤化する分野に固有の制約によって決定され、かつ(a)ならびに(b)に直接左右される。

【0133】

投与経路

当業者は、投与のために複数の経路を使用することができるが、特定の経路が別の経路よりも速やかでかつ効果的な反応を提供できることを認める。

【0134】

本発明の任意の組成物の投与経路には、吸入投与、経口投与、鼻投与、直腸投与、非経口投与、舌下投与、経皮投与、経粘膜投与(例えば、舌下投与、舌投与、(経頬)頬側投与、(経尿道)尿道投与、膣投与(例えば、経膣投与および膣周囲投与)、(鼻腔内)鼻投与、ならびに(経直腸)直腸投与)、膀胱内投与、肺内投与、十二指腸内投与、胃内投与、くも膜下腔内投与、皮下投与、筋肉内投与、皮内投与、動脈内投与、静脈内投与、気管支内投与、吸入投与、ならびに局所的投与が含まれる。適切な組成物および剤形には、例えば、錠剤、カプセル、カプレット、丸剤、ゲルキャップ(gel cap)、トローチ、分散液、懸濁液、溶液、シロップ、顆粒、ペース、経皮パッチ、ゲル、散剤、ペレット、マグマ、ロゼンジ、クリーム、ペースト、硬膏剤、ローション、ディスク、坐剤、鼻投与用または経口投与用の液体スプレー、吸入用の乾燥散剤またはエアロゾル化製剤、膀胱内投与用の組成物および製剤などが含まれる。本発明において有用だと考えられる製剤および組成物は、本明細書に記載の特定の製剤および組成物に限定されないことが理解されるはずである。

【0135】

徐放製剤および薬物送達システム

本発明の薬学的組成物の徐放製剤または持続放出製剤は従来技術を用いて作製することができる。場合によっては、使用される剤形は、様々な比率で望ましい放出プロファイルをもたらすようにヒドロプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリックス、ゲル、透析膜、浸透圧系、多層コーティング、微粒子、リボソーム、もしくはマイクロスフェア、またはそれらの組み合わせなどを用いて、剤形中の1種類または複数種の活性成分がゆっくりと放出されるもの、または徐放されるものとして提供することができる。本明細書に記載の徐放製剤を含む、当業者に公知の適切な徐放製剤は、本発明の薬学的組成物と使用するために容易に選択することができる。従って、徐放に合わせられた、経口投与に適した単回単位剤形、例えば、錠剤、カプセル、ゲルキャップ、およびカプレットは本発明に包含される。

【0136】

ほとんどの徐放薬学的製品には、非徐放対応物により成し遂げられるものと比べて薬物療法を改善するという共通の目的がある。理想的には、医学的処置の際に、最適に設計された徐放調製物を用いることは、最小限の原体を用いて、状態を最小限の時間で治癒また

10

20

30

40

50

は管理することを特徴とする。徐放製剤の利点には、薬物の活性が長期間にわたること、投与頻度が少ないこと、患者コンプライアンスが高いことが含まれる。さらに、徐放製剤を用いて、作用の開始時間、または薬物の血中濃度などの他の特徴に影響を及ぼすことができ、従って、副作用の発生に影響を及ぼすことができる。

【0137】

免疫応答刺激

一態様において、本発明は、有効量のヒト化抗DKK2抗体またはその断片を薬学的に許容される担体と共に対象に投与することによって、抗腫瘍免疫を提供するための方法およびT細胞媒介性免疫応答を刺激するための方法を含む。

【0138】

活性化Tリンパ球(T細胞)ならびに癌および感染症を処置するための免疫療法内での活性化Tリンパ球(T細胞)の使用は当技術分野において周知である(Melief et al., Immunol. Rev., 1995, 145: 167-177; Riddell et al., Annu. Rev. Immunol, 1995, 13:545-586)。本発明に開示されるように、DKK2が排除されるとCD8+細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が活性化され、腫瘍が抑制される。

【0139】

CTL活性化に関するマーカーは、細胞毒、例えば、パーフォリン、グランザイム、およびグラニュライシン、サイトカイン、IL-2、IL-4、CD25、CD54、CD69、CD38、CD45RO、CD49d、CD40L、CD137、CD134でもよいが、これに限定されない。本明細書の実施例のセクションに提示したように、試料中での、これらのマーカーのうち少なくとも1つのレベルの測定値を用いてCTL活性化を評価することができる。MoFloソーター(DakoCytomation, Fort Collins, Colo.)、FACSAria(商標)、FACSArray(商標)、FACSVantage(商標)、BD(商標)LSR II、およびFACSCalibur(商標)(BD Biosciences, San Jose, Calif)を含むが、これに限定されない様々な市販のセルソーターのどれを用いても、T細胞または一般的には本発明の任意の細胞を選別することができる。

【0140】

診断および処置

一態様において、本発明は、対象において癌を診断するまたは癌もしくは転移を発症する素因を診断する方法に関する。該方法は、対象に由来する生物学的試料におけるDKK2遺伝子の発現レベルを判定する段階を含み、正常対照DKK2発現のレベルと比較した場合のDKK2の発現レベルの増大が、対象が癌を有しているかまたは癌もしくは転移を発症する素因を有していることを示す指標である。本明細書に開示されるように、ヒト化抗DKK2抗体は、生物学的試料におけるDKK2の発現レベルを判定する発明の方法において使用される。

【0141】

別の態様において、本発明は、その必要がある対象において癌を処置するための免疫療法処置の有効性を判定する方法に関する。該方法は、対象に由来する生物学的試料におけるDKK2遺伝子の発現レベルを判定する段階を含み、正常対照におけるDKK2の発現レベルと比較した場合のDKK2の発現レベルの増大が、免疫療法処置が有効であることを示す指標である。本発明の一部の局面において、癌の処置は、固形腫瘍の処置、または転移の処置を含んでもよい。転移は、癌化細胞または悪性細胞が移動しており、癌をある部位から別の部位に広げている癌の一形態である。このような癌には、皮膚、乳房、脳、子宮頸部、精巣などの癌が含まれる。さらに具体的には、癌には、以下の臓器または系が含まれ得るが、これに限定されない:心臓、肺、胃腸、尿生殖路、肝臓、骨、神経系、婦人科学、血液学、皮膚、および副腎。さらに具体的には、本明細書の方法は、神経膠腫(シュワン腫、グリア芽細胞腫、星状細胞腫)、神経芽細胞腫、クロム親和細胞腫、パラガンリオーマ(paraganlioma)、髄膜腫、副腎皮質癌、腎臓癌、様々なタイプの血管癌、骨芽細胞型骨癌(osteoblastic osteocarcinoma)、前立腺癌、卵巣癌、子宮筋腫、唾液腺癌、脈絡叢癌、乳癌、脾臓癌、結腸癌、および巨核芽球性白血病を処置するのに使用することができる。皮膚癌には、悪性メラノーマ、基底細胞癌、扁平上皮癌、カルボジ(Karposi)肉腫、黒子、異形成母斑、脂肪腫、血管腫、皮膚線維腫、ケロイド、および乾癬が含まれる。本

10

20

30

40

50

明細書に開示されるように、ヒト化抗DKK2抗体は、生物学的試料におけるDKK2の発現レベルを判定する発明の方法において使用される。

【0142】

DKK2の発現の対照標準量

本発明の方法は、対象に由来する生物学的試料におけるDKK2発現の測定量と、DKK2発現の対照量(すなわち、参照)を比較する段階を含む。

【0143】

一態様において、DKK2発現の標準対照レベルは、健常対象におけるDKK2の発現のレベルを測定することによって得ることができる。好ましくは、健常対象は同様の年齢、性別、および人種の対象であり、どのタイプの重篤な疾患とも、特に、どのタイプの癌とも診断されることがない。

10

【0144】

別の態様において、DKK2の発現の対照量は、当技術分野において受け入れられているDKK2の発現の値である。この参照値は、標準的な統計方法を適用することによって、DKK2発現の平均値または中間値に基づいて対象群について算出されたベースライン値でもよい。

【0145】

一態様において、発現レベルは、遺伝子のmRNAの検出、遺伝子によってコードされるタンパク質の検出、および遺伝子によってコードされるタンパク質の生物学的活性の検出からなる群より選択される方法によって判定される。

【0146】

本発明のある特定の局面において、DKK2の発現レベルは対象に由来する試料中で判定される。試料は、好ましくは、本明細書において引用された試料に加えて、腫瘍細胞、腫瘍細胞の周囲から出た任意の液体(すなわち、白血病の血液、腫瘍組織など)、または腫瘍と生理学的に接触しているか、もしくは腫瘍の近くにある任意の液体、または他の任意の体液を含み、これらも本発明に含まれると考えなければならない。本明細書に開示されるように、ヒト化抗DKK2抗体は、生物学的試料におけるDKK2の発現レベルを判定する発明の方法において使用される。

20

【0147】

測定方法

DKK2発現のレベルを判定するために当業者に公知の任意の方法を使用することができる。例えば、マイクロアレイを使用することができる。マイクロアレイは当技術分野において公知であり、配列の点で遺伝子産物(例えば、mRNA、ポリペプチド、その断片など)と一致するプローブを既知の位置に特異的にハイブリダイズまたは結合させることができる表面からなる。関心対象の少なくとも1つの遺伝子を検出するために、ハイブリダイゼーション試料は、試験試料を少なくとも1つの核酸プローブと接触させることによって形成される。核酸プローブは、例えば、完全長核酸分子またはその一部、例えば、長さが少なくとも10、15、もしくは20ヌクレオチドであり、ストリンジェントな条件下で適切な標的と特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドでもよい。本発明の場合では、一部の態様において、DKK2を検出するためのプローブは、ヒトDKK2 mRNAまたはその断片にハイブリダイズすることができる標識核酸プローブである。他の態様において、核酸

プローブの配列は、SEQ ID NO:1、2および3(図16A~16B)からなる群より選択されるアミノ酸配列の1つまたは断片をコードする核酸配列である。ハイブリダイゼーション試料は、核酸プローブが関心対象の標的に特異的にハイブリダイズするのに十分な条件下で維持される。特異的ハイブリダイゼーションは、適宜、高ストリンジェンシー条件下または中程度のストリンジェンシー条件下で行うことができる。好ましい態様において、特異的ハイブリダイゼーションのためのハイブリダイゼーション条件は高ストリンジェンシーである。次いで、特異的ハイブリダイゼーションが存在すれば、標準的な方法を用いて検出される。核酸プローブと、試験試料中の遺伝子との間に特異的ハイブリダイゼーションが起これば、核酸プローブに存在する配列は対象のmRNAにも存在する。複数の核酸プローブも使用することができる。スキャナーによって検出されたハイブリダイゼーション強度デー

30

40

50

タは自動的に取得され、Affymetrix Microarray Suite(MASS)ソフトウェアによって処理される。150の標的強度を用いた発現レベルに対して生データが基準化される。少数の異なる遺伝子のmRNA発現プロファイルを測定する代替りの方法は、例えば、古典的なTaqMan(登録商標)Gene Expression AssaysまたはTaqMan(登録商標)Low Density Arrayマイクロ流体カード(micro fluidic card)(Applied Biosystems)のいずれかによる方法である。特に、本発明は好ましくはqPCRシステムを用いる。非限定的な例には、Bio-rad (Berkley, California)から市販されているPrimePCRPathways(登録商標)などの市販のキットが含まれる。

【0148】

試料、特にmRNAの転写状態も、当技術分野において公知の他の核酸発現技術によって測定することができる。当業者に公知の任意の方法を用いて試料からmRNAを単離することができる。非限定的な例には、市販のキット、例えば、Qiagen(Netherlands)から市販されているRNeasy(登録商標)またはMolecular Research Center, Inc.(Cincinnati, Ohio)から市販されているMini Kit the TRI Reagent(登録商標)が含まれ、これらを用いてRNAを分離することができる。一般的に、単離されたmRNAは、当技術分野において公知の方法を用いて増幅することができる。例えば、PCRまたはRT-PCR法を用いた増幅システムが当業者に公知である。増幅技術の概要については、例えば、Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York(1995)を参照されたい。

【0149】

mRNA発現をプロファイルするための別の正確な方法は、第一、第二、第三、ならびにそれに続く次世代の配列決定技術を含む次世代配列決定(NGS)の使用でもよい。

【0150】

本発明の他の局面において、試料中のペプチドまたはポリペプチドの量を決定するための当技術分野において公知の全ての手段によって、ペプチド、ポリペプチドの量を決定すること、またはペプチド、ポリペプチドの生物学的活性を検出することができる。これらの手段は、様々なサンドイッチアッセイ形式、競合アッセイ形式、または他のアッセイ形式で標識分子を用いることができるイムノアッセイ装置および方法を含む。このようなアッセイは、ペプチドまたはポリペプチドの存在または非存在を示すシグナルを発する。さらに、シグナルの強さを、好ましくは、試料中に存在するポリペプチドの量と直接的または間接的(例えば、逆比例(reverse-proportional))に相関させることができる。さらに適切な方法は、ペプチドまたはポリペプチドに特有の物理的特性または化学的特性、例えば、その正確な分子量またはNMRスペクトルを測定する段階を含む。該方法は、好ましくは、バイオセンサー、イムノアッセイと連結した光学装置、バイオチップ、分析装置、例えば、質量分析計、NMR分析器、またはクロマトグラフィー装置を含む。さらに、方法は、マイクロプレートELISAをベースとする方法、完全自動化イムノアッセイまたはロボットイムノアッセイ(例えば、Elecsys(商標)分析器で使用可能)、CBA(酵素コバルト結合アッセイ、例えば、Roche-Hitachi(商標)分析器で使用可能)、およびラテックス凝集アッセイ(例えば、Roche-Hitachi(商標)分析器で使用可能)を含む。

【0151】

キット

本発明は、少なくともDKK2の検出に有用な、標識された(例えば、フルオレサー(fluorescer)、クエンチャーなど)、または標識されていない、一組の好ましい抗体を含む。

【0152】

ある特定の態様において、キットが提供される。本明細書を考慮して、これらの方法において使用するための市販のキットが当業者に公知である。一般的に、キットは、関心対象のポリペプチドまたは核酸もしくはmRNAの存在を検出するのに適した検出試薬を含む。

【0153】

別の態様において、プローブセットまたは抗体のパネルがある。一部の態様において、抗体のパネルは、SEQ ID NO:4および5(図18)からなる群より選択されるアミノ酸配列の少

10

20

30

40

50

なくとも1つを含むDKK2エピトープを標的とするヒト化抗DKK2抗体を含む。一部の態様において、プローブセットのパネルは、DKK2レベルを検出し、癌診断または癌もしくは転移を発症する素因に関する情報を提供するように設計される。プローブセットは、特定のゲノムにおいて可能な限り多くのペプチドを検出することを目的としたプローブセットより小さく、かつ安価であるので特に有用である。本発明において、プローブセットは、癌遺伝子に関する情報を提供するポリペプチドの検出を対象にしている。プローブセットはまた、癌に関する情報を提供しないペプチドを検出する多数または少数のプローブを含んでもよい。このようなプローブは対照として、および基準化のために有用である(例えば、スパイクイン(spiked-in)マーカー)。プローブセットは乾燥した混合物でもよいが、または溶解した混合物でもよい。一部の態様において、プローブセットを固体支持体に取り付けて、プローブアレイを形成することができる。プローブは、抗体、または核酸(例えば、DNA、RNA、DNAおよびRNAの化学修飾型)、LNA(ロックド核酸)、またはPNA(ペプチド核酸)、または関心対象のペプチド配列もしくは核酸配列と特異的に相互作用することができる他の任意のポリマー化合物でもよい。

【0154】

キットは、本質的に任意の試料(例えば、白血病の血液、腫瘍細胞、腫瘍組織など)中のペプチド(例えば、DKK2、既知の癌マーカー、免疫アクチベーター、もしくはアポトーシスタンパク質)または核酸配列を単離および/または検出するために設計できることが意図される。本明細書を考慮して多種多様な試薬および方法が当技術分野において公知である。

【実施例】

【0155】

ここで、以下の実施例に関連して本発明を説明する。これらの実施例は例示目的のためだけに提供される。本発明は、これらの実施例に限定されると解釈してはならず、反対に、本明細書において提供される開示の結果として明らかになる任意および全てのバリエーションを包含すると解釈しなくてはならない。

【0156】

これ以上説明することなく、当業者は、前述の説明と以下の説明に役立つ実施例を用いて、本発明の化合物を作製および使用することができ、クレームされた方法を実施することができると考えられる。従って、以下の実施例は、本発明の好ましい態様を具体的に指し示し、決して、本開示の残りを限定すると解釈してはならない。

【0157】

実施例1: DKK2は広範囲の固形腫瘍において発現している

公的に利用可能な遺伝子発現データベースの分析から、DKK2は、直腸腺癌、結腸直腸癌、胃腺癌、および膵管腺癌を含む胃腸癌の多くにおいてアップレギュレートしていることが明らかになった(図1)。抗DKK2抗体を用いた免疫組織染色からでも、DKK2タンパク質は結腸、直腸、腎臓、肺、および胃に由来する腫瘍試料においてアップレギュレートしており、肝臓、乳房、子宮頸、および卵巣に由来する腫瘍試料において検出されることが明らかになった(図2)。これらのデータから、DKK2はヒト癌を処置するための関連する治療標的になり得ることが示唆される。

【0158】

実施例2: DKK2遺伝子欠失があるとAPC^{Min/+}マウスの腫瘍量が少なくなる

APC(min)(APC^{Min/+}マウスとしても知られる)およびAPC(min);DKK2^{-/-}マウスを特定病原体除去の動物施設に収容した。DKK2の非存在下では腫瘍進行は有意に遅くなった(図3および図4)。それに一致して、APCKOマウスでは、巨脾腫、胸腺萎縮、およびリンパ球減少症などの腫瘍によって誘導される異常(You, S., et al., Int J Exp Pathol, 2006, 87(3): p.227-36)は有意に少なかった。この腫瘍縮小現象は、一貫性のある結果と共に、高脂肪試料および低脂肪試料を与えた雄マウスおよび雌マウスの群において見られた。総合すると、これらのデータから、DKK2の非存在下では結腸癌進行は有意に遅くなることが強く示唆される。

10

20

30

40

50

【0159】

実施例3: 抗DKK2抗体の作製

DKK2は分泌され、腫瘍量を少なくするために抗体(Ab)で標的化するのに適した候補である。DKK2は眼瞼の発生に重要であるが(Gage et al., Dev Biol, 2008. 317(1):p.310-24)、成獣マウスにおいて重要な機能があることは知られていない。DKK2に対して高い特異性のある2つのmAbクローン(5F8および1A10)を開発した。これらはDKK2を中和し、DKK2のWntアンタゴニスト機能を阻害する(図5)。同じ5F8 CDRをもつヒト化抗体を作製し、これらのうち2つがDKK2タンパク質に対して同様の親和性を示した(図15)。

【0160】

実施例4: 結腸癌細胞の移植マウスモデルにおいてDKK2を標的化することで、DKK2は腫瘍挙動および微小環境の調節にとって重要な要素であることが分かった

MC38細胞はC57BLマウスのマウス結腸癌に由来し、免疫応答性WT C57BLマウスに移植されると非常に速く進行する。従って、この異種移植片モデルは、高悪性度の進行性腫瘍モデルに代わる良い手段として役立つ。これを用いて、進行癌を処置する抗DKK2 Abの治療能力を試験することができる。ある研究では、C57BLマウス(n=5/群)にMC38細胞を移植した。6日後に、マウスを、腹腔内(IP)経路を介して8mg/kgのマウスIgGまたはmAb 5F8で処置した。mAb 5F8は有意な腫瘍成長阻害を示した(図9)。腫瘍切片の免疫染色から、mAb 5F8は腫瘍細胞アポトーシスおよびグランザイムB陽性細胞を増やすことが明らかになった(図10)。重要なことに、これらの移植腫瘍に浸潤した白血球のフローサイトメトリー分析から、CD45細胞の数にもNK細胞の数にもCD8⁺細胞の数にも骨髓系細胞の数にもCD4の数にも差が無いことが分かったが、YAL008-1-5F8で処置すると、グランザイムB陽性のNK細胞およびCD8⁺細胞を含むグランザイムB陽性CD45陽性白血球が有意に増加した(図11)。これらの結果から、DKK2中和を介した腫瘍進行抑制においてエフェクター免疫細胞の調節が関与する機構が示唆される。

【0161】

実施例5: DKK2抗体は同種異系移植片モデルにおいて肺腫瘍形成を抑制する

マウスLLC肺癌細胞をC57BLマウスに移植し、抗DKK2抗体(YAL008-1-5F8)で処置した。この抗体は腫瘍形成を抑制し(図7)、担癌マウスの生存期間を延ばした(図8)。

【0162】

実施例6: NK細胞活性化に対するDKK2およびWntの効果

脾臓に由来するヒトNK細胞株NK-92および初代マウスNK細胞ならびにMC38移植腫瘍を、DKK2、Wnt3a、Wnt5a、およびDKK1の組換えタンパク質の存在下または非存在下、ならびにWnt阻害剤(LGK-974を含む)およびGSK阻害剤(CHIR99021を含む)の存在下または非存在下でグランザイム発現および細胞傷害活性があるかどうか試験した。このように、DKK2およびWntによるNK細胞活性化の調節を評価した。実験結果から、組換えDKK2およびWnt5aはヒトNK92細胞におけるグランザイムB発現を阻害したことが分かった(図17)。このことから、DKK2は免疫エフェクター細胞の阻害に直接関与している可能性があることが示唆される。

【0163】

実施例7: 抗DKK2抗体は免疫依存的に腫瘍形成を阻害する

成熟したBリンパ球およびTリンパ球、骨髓系細胞、ならびにNK細胞が無い免疫不全NSGマウスにMC38細胞を移植した時に、mAb 5F8もヒト化5F8も腫瘍成長に対する抑制効果を全く示さなかった(図14)。これらの結果から、DKK2中和は宿主免疫の存在に応じて腫瘍形成を阻害することが分かる。

【0164】

実施例8: 抗DKK2抗体はPD-1抗体と結び付けられた時に腫瘍形成を最適に抑制する

C57BLマウス(n=5/群)にLLC細胞またはMC38細胞を移植した。数日後、マウスを、腹腔内(IP)経路を介して16mg(1種類の抗体につき8mg)/kgのマウスIgG、抗DKK2抗体(5F8)および/または抗マウスPD-1抗体で処置した。腫瘍形成に対するmAb 5F8の効果はPD-1抗体と比較した(Cancer Res. 2005 Feb 1;65(3): 1089-96)。LLC同種異系移植片肺腫瘍モデルでは、腫瘍妨害に対するmAb 5F8の効果はPD-1抗体の効果とほぼ同じであり、mAb 5F8およびPD-1

10

20

30

40

50

抗体の組み合わせはPD-1抗体単独より大きな腫瘍進行抑制を示した(図7)。5F8、ならびに mAb 5F8およびPD-1抗体の組み合わせはPD-1抗体単独での使用と比較して生存期間の延長を示した(図8)。図9は、単独で投与された時の、または他の抗体と組み合わせて投与された時の、MC38結腸癌モデルにおける腫瘍形成に対するmAb 5F8の比較効果を図示する。このMC38モデルではPD-1抗体は腫瘍形成に有意な効果を示さなかった。

【0165】

実施例9: ヒト化抗DKK2抗体は腫瘍成長を有意に阻害することができる

ヒト化抗DKK2抗体である5F8-HXT1-V1および5F8-HXT1-V2を調製した。これらは非常に高い親和性でヒトDKK2タンパク質に結合することが示された(図15)。両抗体とも同種異系移植片モデル(MC38細胞)において有意な腫瘍成長阻害を示した(図12)。図13から、5F5-HXT1-V2処置によって、CD8陽性リンパ球およびNK1.1陽性ニュートラルキラー細胞を含むグランザイムB陽性免疫細胞が増加したことが証明された。

【0166】

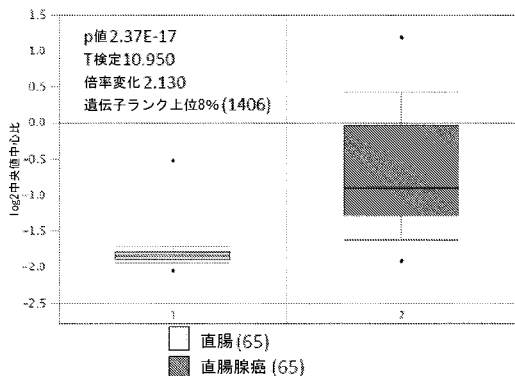
本明細書において引用された全ての特許、特許出願、刊行物の開示は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0167】

本発明は、特定の態様に関連して開示されたが、本発明の他の態様およびバリエーションが、本発明の真の精神および範囲から逸脱することなく当業者によって考案され得ることが明らかである。添付の特許請求の範囲は、全てのこのような態様および等価なバリエーションを含むと解釈されることが意図される。

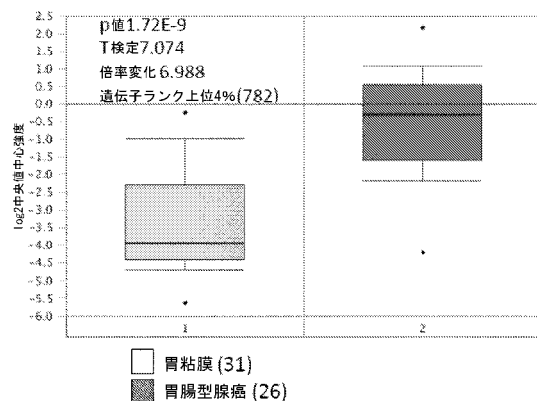
【図1A】

直腸腺癌



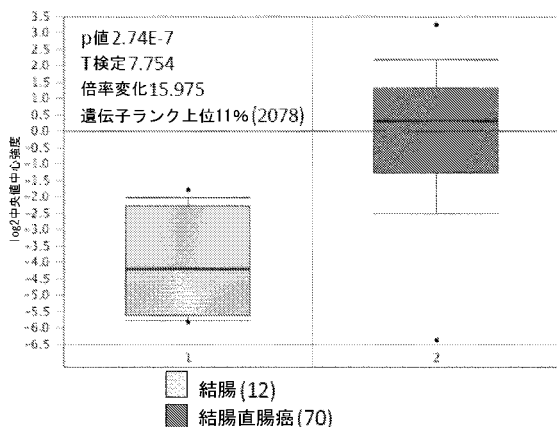
【図1C】

胃腸型腺癌

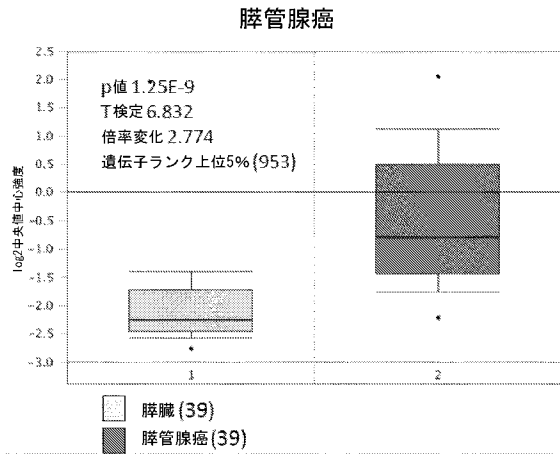


【図1B】

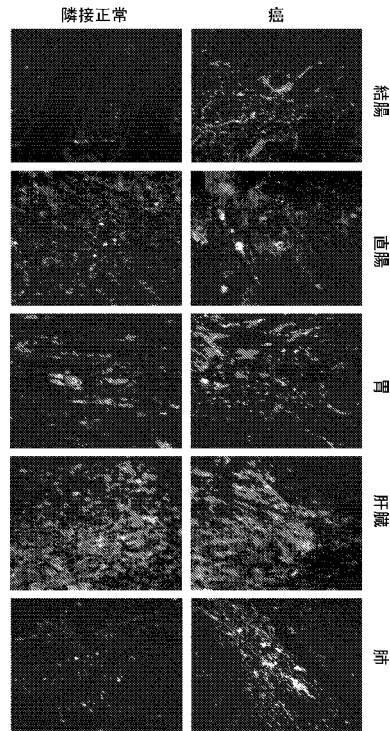
結腸直腸癌



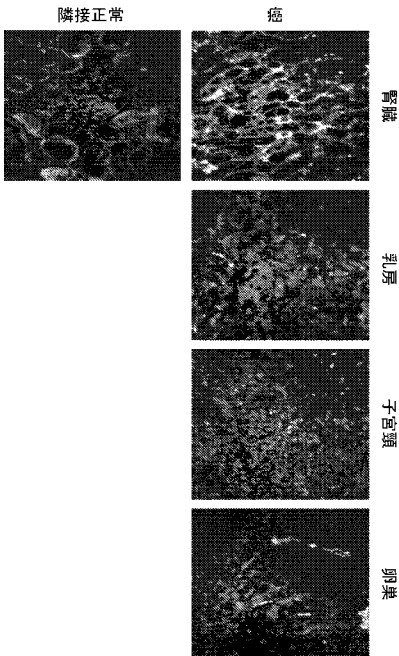
【図 1 D】



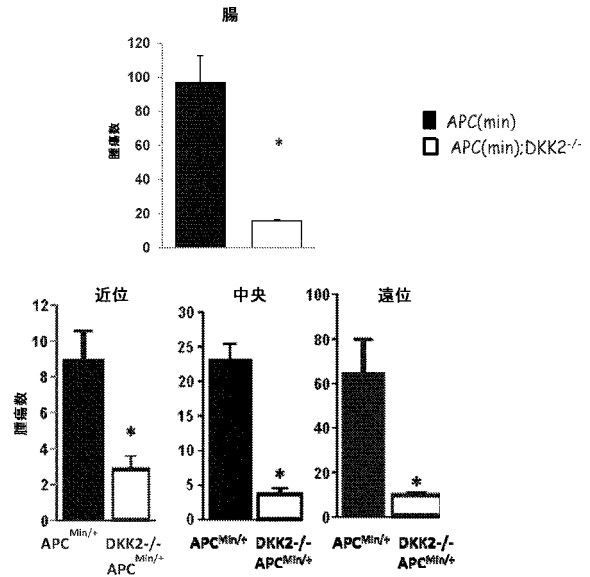
【図 2 A】



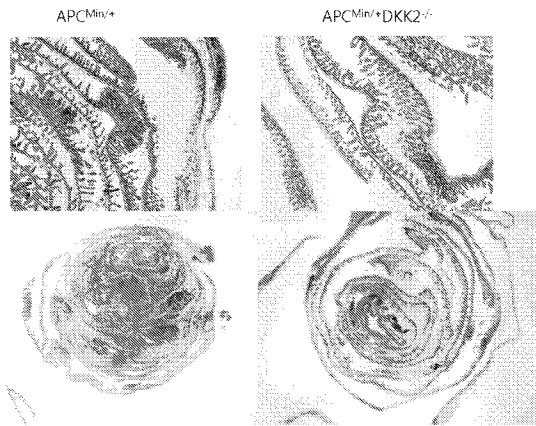
【図 2 B】



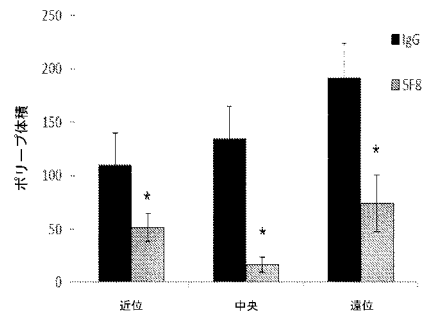
【図 3】



【図 4】

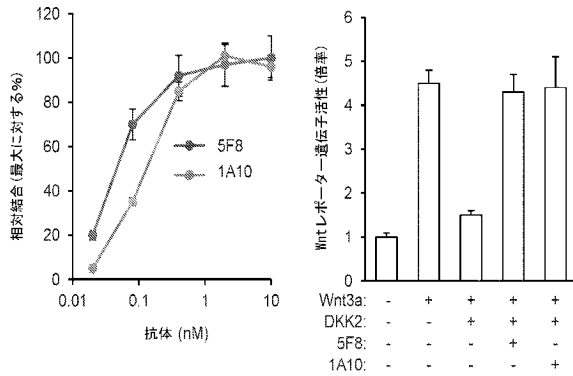


【図 6】

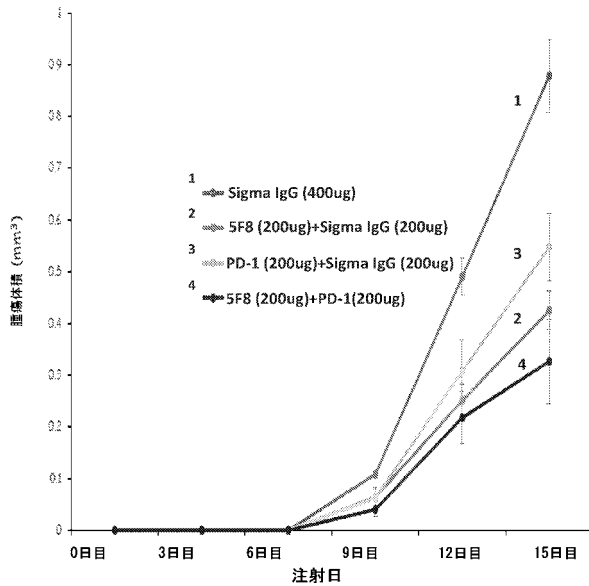


10週齢から開始して6週間にわたって週2回、APC(min)マウスにIP注射(4mg/kg)

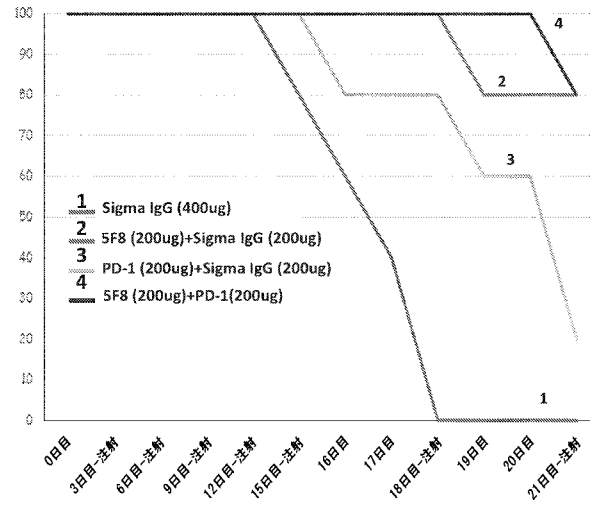
【図 5】



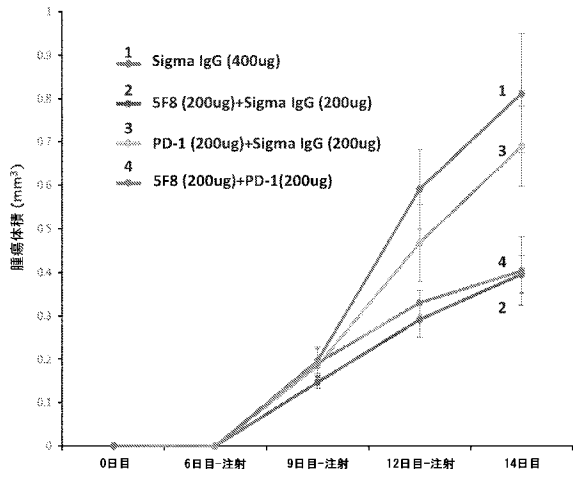
【図 7】



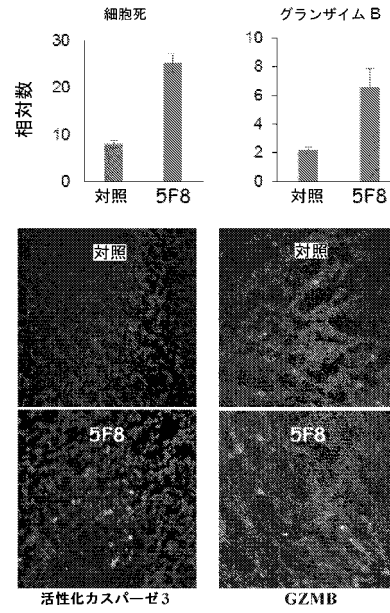
【図 8】



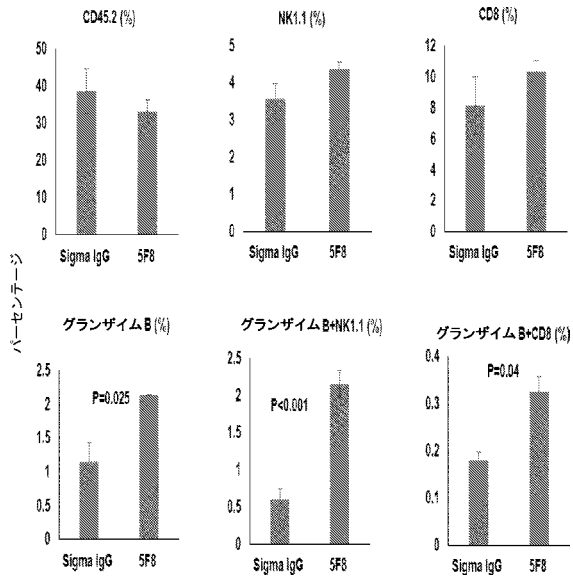
【図 9】



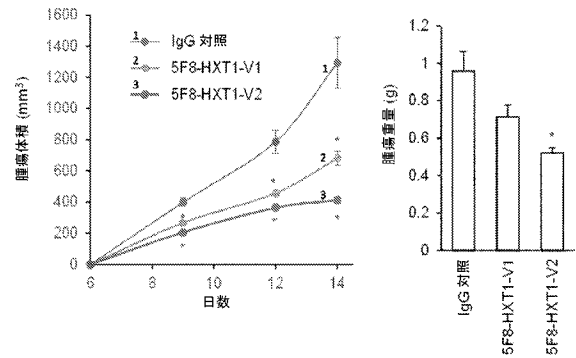
【図 10】



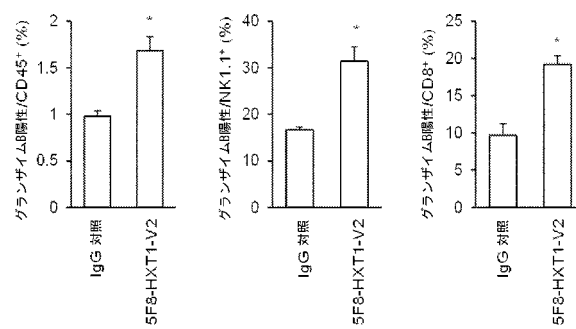
【図 11】



【図 12】

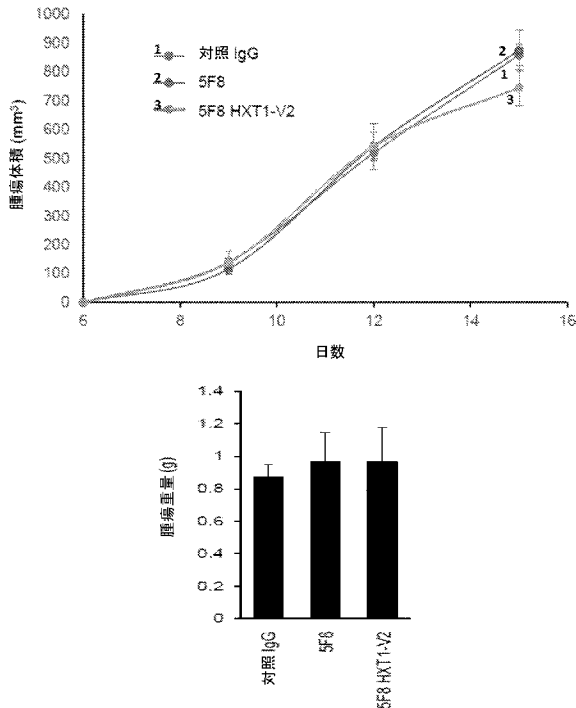


【図 13】

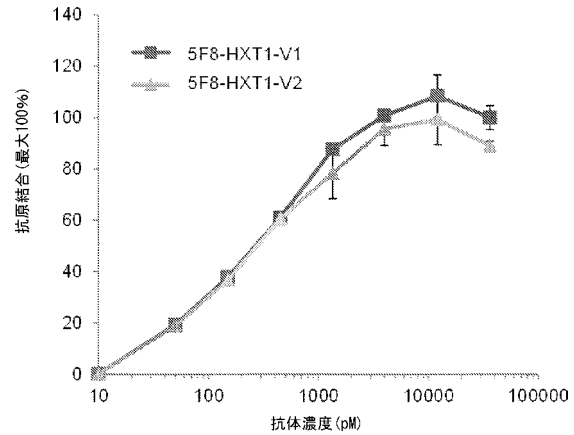


【図 14】

NSGマウスにおける移植腫瘍モデル



【図 15】



【図 16】

ヒト抗DKK2抗体のアミノ酸配列

抗体ヒト化はマウス抗DKK2 Y008-1-5F8モノクローナル抗体に基づいた:

(A) 5F8-HXT1-V1
 HC1 (IgG1), SEQ ID NO. 1
 QVQVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTNYWMNWVRQAPGQGLEWMGMHP
 SDSEIRLNQKFKGRVTLTVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRSYA
 MDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPE
 KSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALP
 APIETISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSFCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

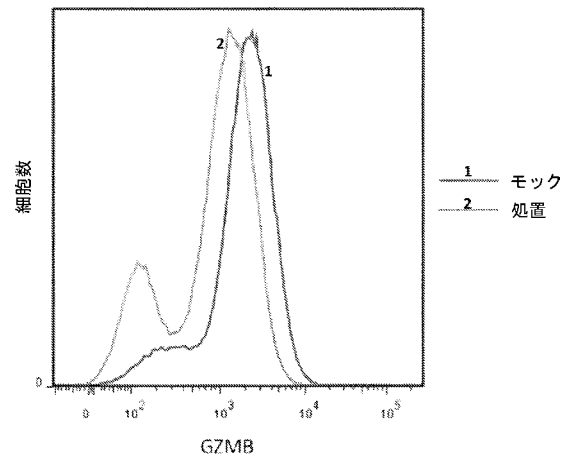
LC1 (K), SEQ ID NO. 2
 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNLSNPKNYLAWYQOKPGQPPKLLVYFA
 STRESGVDRFSGSGSGTDFTLTSSLAQEDVAVYFCQOHYITPLTFGGGTKEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPTKSFNRGEC

(B) 5F8-HXT1-V2
 HC2 (IgG1), SEQ ID NO. 2
 QVQVQSGSELKKPGASVKVSCKASGVITFTNYWMNWVRQAPGQGLEWMGMHP
 SDSEIRLNQKFKDRVTLTVDKSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRSYAM
 DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSC
 DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIE
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

LC1 (K), SEQ ID NO. 2
 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNLSNPKNYLAWYQOKPGQPPKLLVYFA
 STRESGVDRFSGSGSGTDFTLTSSLAQEDVAVYFCQOHYITPLTFGGGTKEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPTKSFNRGEC

注: 下線の付いた太字の残基は、5F8-HXT1の5F8-HXT1-V1と5F8-HXT1-V2との間で異なる残基を示している。灰色で強調した太字の残基は相補性決定領域 (CDR) を指している。

【図 17】



【図 18】

ヒトDKK2のアミノ酸配列, SEQ ID NO. 4

MAALMRKSDSSCCLLLAALVLMVSSQIGSSRAKLNSIKSSIIGETPGQAANRSAGM
 YQGLAFGGSKKGNLGAAYPCSSDKECEVGRYCHSPHQGSSACMVCRKKRCHR
 DGMCCPSTRCNNGICIPVETSLTPHIPALDGTIRHNRHGHYSNHDLGWQNLGRPH
 TKMSHHKHEGDPCLRSSDCIEGFCCARHFWTKICKPVLIHQGEVCTKQRKKGSHGLE
 IFQRCDCAKGLSCKVWKDATYSSKARLHVQKQI

上記のヒトDKK2配列に由来するヒト5F8エピトープのアミノ酸配列, SEQ ID NO. 5

KLNSIKSLGGETPG

【配列表】

2019503984000001.app

【 国際調査報告 】

PCT/US2016/057814 31.03.2017

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 47162-7073WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US16/57814	International filing date (day/month/year) 20 October 2016 (20.10.2016)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 28 October 2015 (28.10.2015)
Applicant YALE UNIVERSITY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6 bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box NdV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 16A-B
☐ as suggested by the applicant.
☒ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

PCT/US2016/057814 31.03.2017**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US16/57814

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

PCT/US2016/057814 31.03.2017**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US16/57814

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

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

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

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

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

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

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

-***Please see supplemental page-***

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.:
1-4, 5 (in-part), 6-16, 17 (in-part), 18-27, 28 (in-part) and 29-43; SEQ ID NO: 1

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.

PCT/US2016/057814 31.03.2017**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US16/57814

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/18, 16/22; A61K 39/395; A61P 35/00, 35/04; C12Q 1/68; G01N 33/68, 33/574 (2017.01) CPC - C07K 16/18, 16/22, 19/00; A61K 39/395, 39/3955; C12Q 1/6886; G01N 33/68, 33/57484, 33/57488 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) IPC:C07K 16/18, 16/22, 19/00; A61K 38/00, 38/16, 38/17, 39/395; A61P 35/00, 35/04; C12Q 1/68; G01N 33/68, 33/574 (2017.1). CPC:C07K 16/18, 16/22, 19/00; A61K 38/00, 38/16, 38/17, 38/1709, 39/395, 39/3955; C12Q 1/6886; G01N 33/68, 33/57484, 33/57488 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar; EBSCO; Lens.org; NCBI Terms: method, treat, cancer, administer, DK12, humanized, antibody, inhibit, adenomatous polyposis coli, mutation, neutralize, epitope		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	KR 20140136593A (UNIVERSITY OF ULSAN) 01 December 2014; abstract, Figure 3; page 2, 1st paragraph; page 5, 2nd paragraph; claim 8	41 - 1-29, 39/1, 39/13, 39/22, 39/26, 40/39/1, 40/39/13, 40/39/22, 40/39/26, 42-43
X - Y	WO 2012/103787 A1 (THE UNIVERSITY OF HONGKONG) 9 August 2012; paragraphs [0008], [00013], [00016], [00020], [00022], [00069], [000107]-[000108], [000118]	30, 32-33, 39/30, 40/39/30 31, 34-38, 39/31, 40/39/34
Y	US 2014/0170147 A1 (SHULOK, JR et al.) 19 June 2014; paragraphs [0011], [0030], [0037], [0042], [0047]-[0048], [0055]-[0057], [0061], [0119], [0126], [0251], [0261], [0263], [0403], [0410], [0535], [0550], [0544]	1-25, 28, 31, 34-38, 39/1, 39/13, 39/22, 39/34, 40/39/1, 40/39/13, 40/39/22, 40/39/34, 42-43
Y	US 2014/0314714 A1 (HONJO, T et al.) 23 October 2014; paragraph [0021]	9, 19, 24
Y	(GUO, C. et al.) Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present and Future. Advances in Cancer Research. 2013, Vol. 119; pages 421-475; page 2, 4th paragraph; page 6, 3rd paragraph; page 7, 2nd paragraph; page 11, 2nd-3rd paragraph; DOI: 10.1016/B978-0-12-407190-2.00007-1	26-29, 39/26, 40/39/26, 40/39/30
Y	WO 2012/103787 A1 (THE UNIVERSITY OF HONGKONG) 9 August 2012; paragraphs [0008], [00013], [00016], [00020], [00022], [00069], [000107]-[000108], and [000118]	30-38, 39/30, 39/34, 40/39/34
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 March 2017 (08.03.2017)		Date of mailing of the international search report 31 MAR 2017
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. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

PCT/US2016/057814 31.03.2017**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US16/57814

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 2014/0193427 A1 (AVEO PHARMACEUTICALS, INC.) 10 July 2014; paragraphs [0146], [0148]	5, 17, 28
A	US 2011/0305687 A1 (WENG, Z. et al.) 15 December 2011; paragraphs [0043], [0045]	5, 17, 28
A	(HIRATA, H. et al.) Wnt Antagonist Gene DKK2 Is Epigenetically Silenced and Inhibits Renal Cancer Progression through Apoptotic and Cell Cycle Pathways; Human Cancer Biology; 15 September 2009; Vol. 15, No. 18, pp. 5678-5687; doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0558	1-38, 39/1, 39/13, 39/22, 39/26, 39/30, 39/34, 40/39/1, 40/39/13, 40/33/22, 40/39/26, 40/39/30, 40/39/34, 41-43
P, X	WO 2016/004055 A1 (YALE UNIVERSITY) 7 January 2016; entire document	1-38, 39/1, 39/13, 39/22, 39/26, 39/30, 39/34, 40/39/1, 40/39/13, 40/33/22, 40/39/26, 40/39/30, 40/39/34, 41-43

PCT/US2016/057814 31.03.2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US16/57814

---Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking---

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.

Groups I+, Claims 1-43 and SEQ ID NO: 1 are directed toward methods and a composition and kit for diagnosing, and determining the efficacy of an anti-Dickkopf2 (anti-DKK2) antibody or fragment thereof comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 5.

The methods, compositions, and kit will be searched to the extent the antibody encompasses SEQ ID NO: 1 (first exemplary antibody sequence). Applicant is invited to elect additional antibody sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, to be searched. Additional antibody sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-4, 5 (in-part), 6-16, 17 (in-part), 18-27, 28 (in-part) and 29-43 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (antibody sequence). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be an antibody encompassing SEQ ID NO: 2 (first exemplary elected antibody sequence).

Groups I+ share the technical features including: a method of treating a cancer in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject an effective amount of a pharmaceutical composition comprising a humanized anti-Dickkopf2 (anti-DKK2) antibody or fragment thereof in a pharmaceutical acceptable carrier; a method for providing anti-tumor immunity and stimulating a T cell-mediated immune response to a cell population or tissue in a subject, the method comprising administering to the subject an effective amount of a humanized anti-Dickkopf2 (anti-DKK2) antibody or fragment thereof with a pharmaceutical acceptable carrier; a method of diagnosing a cancer or a predisposition for developing a cancer in a subject, the method comprising determining the expression level of a DKK2 gene in a biological sample from the subject, wherein an increase in the expression level of DKK2 in the biological sample from the subject as compared with the level of DKK2 expression in a control biological sample from a subject not having a cancer is an indication that the subject has a cancer or a predisposition for developing a cancer, and wherein when a cancer or a predisposition for developing a cancer is detected in a subject, a humanized anti-DKK2 antibody treatment is recommended for the subject; a method for determining the efficacy of a humanized anti-DKK2 antibody treatment for cancer in a subject in need thereof, the method comprising determining the expression level of Dickkopf2 (DKK2) gene in a biological sample from the subject, wherein an increase in the expression level of DKK2 in the biological sample from the subject as compared with the level of DKK2 expression in a control biological sample from a subject not having a cancer is an indication that the humanized anti-DKK2 antibody treatment is effective, and wherein when the humanized anti-DKK2 antibody treatment is determined to be effective, an additional treatment is recommended for the subject; a composition comprising a humanized anti-Dickkopf2 (anti-DKK2) antibody targeting a DKK2 epitope comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 5; and a kit for diagnosing a cancer or a predisposition for developing a cancer or a metastasis in a subject, the kit comprising a humanized anti-DKK2 antibody targeting a DKK2 epitope comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 5.

However, these shared technical features are previously disclosed by the article 'DKK2 Mediates Osteolysis, Invasiveness, and Metastatic Spread in Ewing Sarcoma' by Hauer et al. (hereinafter 'Hauer') in view of US 2014/0170147 A1 to Shulok et al. (hereinafter 'Shulok') and the document 'Internet Archive - Antigen' by Antibodies Online.com (hereinafter 'Antibodies Online') as further evidenced by Uniprot Accession Q9UBU2 (hereinafter 'Q9UBU2').

Hauer discloses a method of diagnosing a predisposition for developing a cancer in a subject (wherein overexpression of DKK2 in a subject is pro-metastatic (a method of diagnosing a predisposition for developing a cancer in a subject); abstract), the method comprising determining the expression level of a DKK2 gene in a biological sample from the subject (the method comprising determining the expression level of a DKK2 gene in Ewing sarcoma (a biological sample from the subject); abstract), wherein an increase in the expression level of DKK2 in the biological sample from the subject as compared with the level of DKK2 expression in a control biological sample from a subject not having a cancer is an indication that the subject has a predisposition for developing a cancer (wherein an increase in the expression level of DKK2 in the biological sample from the subject as compared with the level of DKK2 expression in a control biological sample from a subject not having a cancer is an indication that the subject has a predisposition for developing a cancer; abstract); a method for determining the efficacy of an anti-DKK2 treatment for cancer in a subject in need thereof (a method for determining the efficacy of an anti-DKK2 treatment for cancer in a subject in need thereof; abstract, Figure 2, legend), the method comprising determining the expression level of Dickkopf2 (DKK2) gene in a biological sample from the subject (the method comprising determining the expression level of Dickkopf2 (DKK2) gene in a biological sample from the subject; abstract), wherein an increase in the expression level of DKK2 in the biological sample from the subject as compared with the level of DKK2 expression in a control biological sample from a subject not having a cancer is an indication that the anti-DKK2 treatment is effective (wherein an increase in the expression level of DKK2 in the biological sample from the subject as compared with the level of DKK2 expression in a control biological sample from a subject not having a cancer is an indication that the anti-DKK2 treatment is effective; abstract, Figure 2, legend).

---Continued on Next Supplemental Page---

PCT/US2016/057814 31.03.2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/57814

-***-Continued from Previous Supplemental Box-***-

Hauer does not disclose a method of treating a cancer in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject an effective amount of a pharmaceutical composition comprising a humanized anti-Dickkopf2 (anti-DKK2) antibody or fragment thereof in a pharmaceutical acceptable carrier; a method for providing anti-tumor immunity and stimulating a T cell-mediated immune response to a cell population or tissue in a subject, the method comprising administering to the subject an effective amount of a humanized anti-Dickkopf2 (anti-DKK2) antibody or fragment thereof with a pharmaceutical acceptable carrier; wherein when a cancer or a predisposition for developing a cancer is detected in a subject, a humanized anti-DKK2 antibody treatment is recommended for the subject; a method for determining the efficacy of a humanized anti-DKK2 antibody treatment for cancer in a subject in need thereof, the method comprising determining the expression level of Dickkopf2 (DKK2) gene in a biological sample from the subject, wherein an increase in the expression level of DKK2 in the biological sample from the subject as compared with the level of DKK2 expression in a control biological sample from a subject not having a cancer is an indication that the humanized anti-DKK2 antibody treatment is effective, and wherein when the humanized anti-DKK2 antibody treatment is determined to be effective, an additional treatment is recommended for the subject; a composition comprising a humanized anti-Dickkopf2 (anti-DKK2) antibody targeting a DKK2 epitope comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 5; and a kit for diagnosing a cancer or a predisposition for developing a cancer or a metastasis in a subject, the kit comprising a humanized anti-DKK2 antibody targeting a DKK2 epitope comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 5.

Shulok discloses a method of treating a cancer in a subject in need thereof (a method of treating a cancer in a subject in need thereof; paragraph [0039]), the method comprising administering to the subject an effective amount of a pharmaceutical composition (the method comprising administering to the subject an effective amount of a pharmaceutical composition; paragraph [0039]) comprising a humanized (comprising a humanized; paragraph [0012]) anti-Dickkopf (anti-DKK) antibody or fragment thereof (anti-Dickkopf (anti-DKK) antibody or fragment thereof; paragraph [0011]) in a pharmaceutical acceptable carrier (in a pharmaceutical acceptable carrier; paragraph [0027]); a method for providing anti-tumor immunity and stimulating a T cell-mediated immune response (a method for treating a cancer, comprising administering an anti-Dickkopf antibody that induces ADCC or CDC activity (providing anti-tumor immunity and stimulating a T cell-mediated immune response); paragraphs [0039], [0106]) to a cell population or tissue in a subject (to a cell population or tissue in a subject; paragraph [0039]), the method comprising administering to the subject an effective amount (the method comprising administering to the subject an effective amount of a pharmaceutical composition; paragraph [0039]) comprising a humanized (comprising a humanized; paragraph [0012]) anti-Dickkopf (anti-DKK) antibody or fragment thereof (anti-Dickkopf (anti-DKK) antibody or fragment thereof; paragraph [0011]); a method for determining the efficacy of a humanized anti-DKK antibody treatment for cancer in a subject in need thereof (a method for determining the efficacy of a humanized anti-DKK antibody treatment for cancer in a subject in need thereof; paragraphs [0039], [0531], [0533]), the method comprising determining the expression level of Dickkopf (DKK) gene in a biological sample from the subject (the method comprising determining the expression level of Dickkopf (DKK) gene in a biological sample from the subject; paragraphs [0039], [0533]), wherein an increase in the expression level of DKK in the biological sample from the subject as compared with the level of DKK expression in a control biological sample from a subject not having a cancer is an indication that the humanized anti-DKK antibody treatment is effective (wherein an increase in the expression level of DKK in the biological sample from the subject as compared with the level of DKK expression in a control biological sample from a subject not having a cancer is an indication that the humanized anti-DKK antibody treatment is effective; paragraphs [0039], [0531], [0533]), and wherein when the humanized anti-DKK antibody treatment is determined to be effective, an additional treatment is recommended for the subject (wherein the anti-DKK antibody is combined with an additional anti-cancer therapeutic (wherein when the humanized anti-DKK antibody treatment is determined to be effective, an additional treatment is recommended for the subject); paragraphs [0048], [0053]); and a kit (a kit; paragraph [0061]) comprising a humanized anti-DKK antibody (comprising a humanized anti-DKK antibody; paragraphs [0012], [0061]).

Antibodies-Online discloses an anti-DDK2 antibody (an anti-DDK2 antibody; page 3/6) that targets an epitope comprising SEQ ID NO: 5 (targeted to Gly 44 (that targets an epitope comprising SEQ ID NO: 5); page 3/6; wherein Gly 44 of DDK2 is within SEQ ID NO: 5 (see reference sequence Q9UBU2, where SEQ ID NO: 1 is 100% identical to residues 34-48 of DKK2), and, absent evidence to the contrary, said antibody targets and binds to an epitope that comprises SEQ ID NO: 5).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Hauer to have used an anti-DKK2 antibody for diagnosis and treatment of a cancer expressing a Dickkopf protein, as disclosed by Shulok, and a kit for the diagnosis thereof including an anti-DKK2 antibody, in order to enable a person of ordinary skill in the art to determine the presence of a cancer potentially responsive to a DKK2 inhibitor, as disclosed by Hauer, in combination with one or more additional anti-cancer agents, as disclosed by Shulok, in order to effectively diagnose and treat the cancer in the subject, wherein the antibody bound to an epitope including SEQ ID NO: 5, as disclosed by Antibodies-Online, in order to target an epitope on the protein known to be bound by antibodies that would enable an effective immune response in order to provide anti-tumor immunity in the subject.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Hauer, Shulok, and Antibodies-Online references, unity of invention is lacking.

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 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00		
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	Z	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/04		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	M	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	A	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)		G 0 1 N 33/68		
C 1 2 N 15/13 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1	
		C 1 2 N 15/13		

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

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 ウー ディアンキン
アメリカ合衆国 0 6 4 1 0 コネチカット州 チェシャー グイナピア リッジ 2 9 8

(72) 発明者 チェン ボ
アメリカ合衆国 9 4 0 1 5 カリフォルニア州 デイリー シティ ヴェラーノ ドライブ 2 9 4

(72) 発明者 ウー ハイ
アメリカ合衆国 9 4 3 0 1 カリフォルニア州 パロ アルト ミドルフィールド ロード 2 3 4 2

F ターム(参考) 2G045 AA26 DA14 DA36 FB03 FB20
4B063 QA19 QQ08 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QR82 QS25 QX02
4C084 AA19 MA02 NA05 ZB092 ZB262 ZC412
4C085 AA03 AA14 BB11 CC23 EE01 EE03 GG01 GG08 GG10

【要約の続き】

ヒト化抗DKK2抗体のアミノ酸配列

抗体ヒト化はマウス抗DKK2 Y008-1-5F8モノクローナル抗体に基づいた:

(A) 5F8-HXT1-V1

HC1 (IgG1), SEQ ID NO: 1

QVQVQSGAAEVKKPGASVKVSCKASGYSTINYWMNWVRQAPGQGLEWMGMIHP
SDSETRLNQKFQGRVTLTVDKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRSYA
 MDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK

LC1 (κ), SEQ ID NO: 2

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLVYFA
STRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYITPLTFGGGTKVEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(B) 5F8-HXT1-V2

HC2 (IgG1), SEQ ID NO: 3

QVQVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYITINYWMNWVRQAPGQGLEWMGMIHP
SDSETRLNQKFKDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRLGLRSYAM
DYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

LC1 (κ), SEQ ID NO: 2

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLVYFA
STRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYITPLTFGGGTKVEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

注: 下線の付いた太字の残基は、5F8-HXT1の5F8-HXT1-V1と5F8-HXT1-V2との間で

異なる残基を示している。灰色で強調した太字の残基は相補性決定領域 (CDR) を指している。

专利名称(译)	人源化抗Dkk2抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2019503984A	公开(公告)日	2019-02-14
申请号	JP2018521955	申请日	2016-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
[标]发明人	ウーディアンキン チェンボ ウーハイ		
发明人	ウー ディアンキン チェン ボ ウー ハイ		
IPC分类号	A61K39/395 C12Q1/6886 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 A61K45/00 A61K39/00 A61P37/04 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/68 C12N15/13		
CPC分类号	A61K39/001102 A61K39/39558 A61K2039/505 A61K2039/507 A61P35/00 A61P35/04 C07K16/18 C07K16/2818 C07K2317/24 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/156 G01N33/574 G01N33/68 G01N2800/52 C07K2317/34 C07K2317/76		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.N C12Q1/6886.Z A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00.105 A61K45/00 A61K39/00.Z A61P37/04 G01N33/53.M G01N33/574.A G01N33/68 A61P43/00.121 C12N15/13		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB20 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/ /QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QX02 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/ZB092 4C084/ZB262 4C084/ZC412 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/ /GG10		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/247410 2015-10-28 US		
其他公开文献	JP2019503984A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及发现抑制Dickkopf2 (DKK2) 增加CD8 +细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 活性，减少肿瘤并因此抑制肿瘤发生的发现。因此，在本文所述的各种实施方案中，本发明的方法提供了一种通过向患者施用有效量的人源化抗DKK2抗体来治疗癌症的方法，以在受试者中提供抗肿瘤免疫力。刺激针对细胞群体或组织的T细胞介导的免疫应答的方法，方法，以及抑制受试者中的肿瘤的方法。此外，本发明包括用于诊断癌症或诊断易患癌症或转移的方法，以及用于确定免疫疗法治疗或癌症疫苗用于治疗癌症的方法。此外，本发明包括用于治疗癌症的药物组合物，以及用于执行上述方法的试剂盒。

Antibody humanization was based on mouse anti-DKK2 Y008-1-5F8 monoclonal antibody:

[illegible][illegible][illegible]

1.C1 (Kappa), SEQ ID NO: 2
DIVMTQSPDLSVSLGRATINCKSS[REDACTED]SLAWYQQKPGQPPKLLIVY[REDACTED]
[REDACTED]STRESGVPDRFSGCSGTDFTLT[REDACTED]QAEQVAVYPC[REDACTED]PGGIGTKVEIKRTV
AAPSVEYFPPDEQLKSGLASVYCLNNPYPREAAKQVQKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSFTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKFSNRGEC

Note: Residues in bold and underlined denote those different between 5F8-HXT1-V1 and 5F8-HXT1-V2 of 5F8-HXT1. Residues in bold and highlighted in grey refer to complementarity determining regions (CDRs).