

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5886299号
(P5886299)

(45) 発行日 平成28年3月16日(2016.3.16)

(24) 登録日 平成28年2月19日(2016.2.19)

(51) Int.Cl.	F I
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 ZNA
C07K 16/32 (2006.01)	C07K 16/32
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 C
A61K 51/00 (2006.01)	A61K 39/395 D
A61P 35/00 (2006.01)	A61K 39/395 L

請求項の数 24 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-532795 (P2013-532795)	(73) 特許権者	506074392
(86) (22) 出願日	平成23年5月25日(2011.5.25)		ザ・ユニバーシティ・オブ・ノース・カロライナ・アット・シャーロット
(65) 公表番号	特表2013-544503 (P2013-544503A)		THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHARLOTTE
(43) 公表日	平成25年12月19日(2013.12.19)		アメリカ合衆国28223ノースカロライナ州シャーロット、ユニバーシティ・シティ・ブルバード9201番
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/037972	(74) 代理人	100110249
(87) 国際公開番号	W02012/047317		弁理士 下田 昭
(87) 国際公開日	平成24年4月12日(2012.4.12)	(72) 発明者	ピンク ムカージー
審査請求日	平成25年8月7日(2013.8.7)		アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 28173、ワックスホー、ワンダリングウェイ ドライブ 804
(31) 優先権主張番号	12/924,952		最終頁に続く
(32) 優先日	平成22年10月8日(2010.10.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
微生物の受託番号	ATCC PTA-11550		
前置審査			

(54) 【発明の名称】 腫瘍特異的抗体及びその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

モノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)を有する、ポリクローナル又はモノクローナルである単離された抗体又はその断片であって、該抗体又はその断片が、配列番号5から成る又は配列番号4から成る核酸によりコードされる重鎖可変領域、及び配列番号7から成る又は配列番号6から成る核酸によりコードされる軽鎖可変領域を有する抗体又はその断片。

【請求項2】

前記抗体が、2010年12月16日にATCC(American Type Culture Collection)に受託番号PTA-11550として寄託されたハイブリドーマ細胞株TAB-004により産生されたモノクローナル抗体である、請求項1に記載の単離された抗体又はその断片。

【請求項3】

前記モノクローナル抗体TAB-004のCDRが、配列番号8から成る重鎖CDR1、配列番号9から成る重鎖CDR2、配列番号10から成る重鎖CDR3、配列番号11から成る軽鎖CDR1、配列番号12から成る軽鎖CDR2、及び配列番号13から成る軽鎖CDR3から成る、請求項1に記載の単離された抗体又はその断片。

【請求項4】

請求項1に記載の単離された抗体又はその断片及び医薬的に許容された担体から成る、患者の腫瘍を治療するための又は患者の腫瘍の成長を抑制するための組成物。

【請求項5】

10

20

請求項 1 に記載の単離された抗体又はその断片を含む、患者の腫瘍を治療するための又は患者の腫瘍の成長を抑制するための組成物。

【請求項 6】

前記抗体又はその断片が活性剤に接合した請求項 5 に記載の組成物であって、該活性剤が、放射性分子、放射性核種、増感剤分子、イメージング剤、放射性同位体、毒素、細胞毒、抗血管新生剤、抗腫瘍剤、化学療法剤、免疫調節剤、サイトカイン、レポーター基、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される組成物。

【請求項 7】

前記活性剤が、放射性同位体であって、該放射性同位体が、 ^{10}B 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 及び ^3H から成る群から選択される請求項 6 に記載の組成物。

10

【請求項 8】

前記活性剤が、免疫調節剤であって、該免疫調節剤が、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) 阻害剤、EP2/EP4受容体アンタゴニスト、シクロオキシゲナーゼ阻害剤及び樹状細胞活性剤から成る群から選択される請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) 阻害剤が1-メチル-DL-トリプトファン (1 MT) であり、前記シクロオキシゲナーゼ阻害剤がインドメタシンであり、前記樹状細胞活性剤がCpGオリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) である請求項 8 に記載の組成物。

20

【請求項 10】

請求項 1 に記載の単離された抗体又はその断片及びその使用方法についての説明書から成るキット。

【請求項 11】

活性剤の腫瘍細胞への標的送達に使用するための送達ビヒクルであって、該送達ビヒクルが、請求項 1 に記載の単離された抗体又はその断片から成る標的薬剤から成り、該活性剤が、放射性分子、放射性核種、増感剤分子、イメージング剤、放射性同位体、毒素、細胞毒、抗血管新生剤、抗腫瘍剤、化学療法剤、免疫調節剤、サイトカイン、レポーター基、又はそれらの組み合わせ、から成る送達ビヒクル。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の抗体又はその断片を産生する単離された細胞。

30

【請求項 13】

請求項 1 に記載の抗体を産生するハイブリドーマであって、ブダペスト条約の条項の下で、2010年12月16日に ATCC (American Type Culture Collection) に受託番号 PTA-11550 として寄託されたハイブリドーマ細胞株であるハイブリドーマ。

【請求項 14】

生物学的試料中のモノクローナル抗体 TAB-004 が結合するエピトープの存在を検出するための方法であって、

(a) この生物学的試料を、請求項 1 に記載の単離された抗体又はその断片に接触させる段階、及び

40

(b) この生物学的試料中のモノクローナル抗体 TAB-004 が結合するエピトープの存在を検出する段階

から成る方法。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の単離された抗体又はその断片が、ムチン (MUC1) ポリペプチド、K-ras ポリペプチド又は変異 K-ras ポリペプチド上に存在するエピトープに結合する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の抗体又はその断片を製造する方法であって、

(a) 請求項 12 に記載の単離された細胞又は請求項 13 に記載のハイブリドーマを、こ

50

の抗体又はその断片が発現するような条件下で培養する段階、及び

(b) この細胞又はこのハイブリドーマから、及び/又はこの細胞若しくはこのハイブリドーマが増殖するような環境から、この抗体又はその断片を回収する段階から成る方法。

【請求項 17】

がん幹細胞を精製するための方法であって、

(a) がん幹細胞を含むことが疑われる細胞集団(ヒト生体内にある細胞集団を除く。)を提供する段階;

(b) モノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)を有する抗体又はその断片であって、配列番号5から成る又は配列番号4から成る核酸によりコードされる重鎖可変領域、及び配列番号7から成る又は配列番号6から成る核酸によりコードされる軽鎖可変領域を有する抗体又はその断片に結合する該細胞の部分集団を特定する段階、及び

(c) 該部分集団を精製する段階から成る方法。

【請求項 18】

前記細胞集団が、腫瘍及び/又はがんを有する患者から単離された循環細胞から成る請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記特定段階の前及び/又は前記精製段階の後で、更に、前記細胞集団から細胞系陽性(lin^+)細胞を除去する段階を含む請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

活性剤の標的を、患者の循環がん幹細胞(ヒト生体内にあるものを除く。)にする方法であって、該循環がん幹細胞を、活性剤に抱合した、モノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)を有する抗体又はその断片であって、配列番号5から成る又は配列番号4から成る核酸によりコードされる重鎖可変領域、及び配列番号7から成る又は配列番号6から成る核酸によりコードされる軽鎖可変領域を有する抗体又はその断片を含む組成物と接触させる段階から成る方法。

【請求項 21】

前記活性剤が、治療剤、化学療法剤、毒素、放射性治療剤又はこれらの組み合わせから成る請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記治療剤が免疫調節剤から成り、該免疫調節剤が、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)阻害剤、EP2/EP4受容体アンタゴニスト、シクロオキシゲナーゼ阻害剤及び樹状細胞活性剤から成る群から選択される請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)阻害剤が1-メチル-DL-トリプトファン(1MT)であり、前記シクロオキシゲナーゼ阻害剤がインドメタシンであり、前記樹状細胞活性剤がCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)である請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

配列番号4及び6から成る核酸配列又は配列番号5及び7をコードする核酸配列を有する発現ベクターであって、該発現ベクターを適当な宿主に導入した場合に、請求項1に記載の抗体又はその断片が該宿主により発現するように、核酸配列が連結されている発現ベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、腫瘍の中に存在する抗原に結合する、単離された抗体又はその断片若しくは誘導体及びその使用方法に関する。いくつかの実施態様では、本発明は、上皮ムチンフ

10

20

30

40

50

アミリーメンバーMUC1に結合する、単離された抗体又はその断片若しくは誘導体、並びに循環腫瘍細胞(CTC)及びがん幹細胞(CSC)を含むがこれに限定されない腫瘍及び腫瘍細胞を検出し、標的にし、及び治療するために、これを用いる方法に関する。

なお、この特許出願は、2009年10月8日に出願した米国仮特許出願第61/249,634号の優先権を主張する2010年10月8日に出願した米国特許出願第12/924,952号の一部継続出願である。これら各出願の開示内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

本開示に関連付けられた配列表は、2011年5月25日に作成された21キロバイトASCIIテキストファイルとして、1276_5PCT_ST25.txtと題して、受理官庁としての米国特許商標庁に提出された。EFS-Webを介して提出されたこの配列表はその全体が本明細書に参考として組み込まれる。

10

【背景技術】

【0002】

膵癌は、癌関連死の、男性では肺癌、大腸癌及び前立腺癌に続く4番目の、女性では肺癌、乳癌、大腸癌及び卵巣癌に続く5番目の主要な原因である。患者は通常、進行した疾患を呈し、それは治療を困難にする。手術が唯一の根治療法であり、離れた臓器への転移の有無に関わらず、なお局所的な癌の再発が患者の80%以上で起こっている。より良い治療法の試みは、この病気の予後を改善するために必要である。

悪性形質転換は、しばしば腫瘍細胞内の種々のポリペプチドの発現の変化につながる。例えば、特定のムチンとK-ras腫瘍遺伝子が変異したポリペプチドは、膵管腺癌(以下、「PDA」という。)の90%で過剰発現しており、治療的介入のための標的となっている。しかし、今日まで、これらのポリペプチドを標的とするワクチンは臨床的に特に成功していない。ワクチンは、おそらく、少なくとも部分的に、腫瘍が免疫認識と殺害とを避ける方法に適應するため、長期免疫記憶を生成するには成功していない。免疫寛容を調節することができるいくつかの薬剤が、臨床的に試験されているが、おそらく、腫瘍部位に到達する薬剤の量が不十分のため、及び/又は薬剤が正常細胞に結合すること等による望ましくない副作用を有するため、わずかな応答しか有していない。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

さらに、患者の原疾患を治療することだけでなく、転移の発生を防止することが、腫瘍学における主要な課題となっている。転移性疾患は、腫瘍幹細胞又は癌幹細胞と呼ばれる発癌性細胞が、原発腫瘍部位から他のサイトへ移動する結果生じると考えられており、ここでは、発癌性細胞がそのサイトに侵入し、新たな腫瘍を形成する(Bonnet & Dick, 1997; Reyaら2001; Al-Hajjら2003; Pardalら2003; Dontuら2004; Singhら2004; Brabletzら2005)を参照のこと)。その結果、彼らは患者の中に存在しているであろうこれらの細胞を識別し、排除することができることは有益である。

30

従って、腫瘍とそれに由来する細胞を検出し、標的とし、及び治療するための新たな組成物及び方法の必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0004】

以下、本発明のいくつかの実施態様を示し、そして多くの場合、これらの実施態様の改変や置換を示し、これらは、多数かつ多様な実施態様の単なる例示にすぎない。与えられた実施態様の1つ又は複数の代表的な特徴についての以下の記載も、同様に、例示にすぎない。このような実施態様には、特定の特徴が記載されている場合もあり記載されていない場合もあるが、このような特徴は、明示されているか否かにかかわらず、本発明の他の実施態様に適用することができる。また、過度の繰り返しを避けるために、以下、このような特徴のすべての可能な組み合わせを記載したものではありません。

40

【0005】

様々な実施態様において、本発明は以下を提供する：

ムチン1(MUC1)及び/又は上皮性腫瘍に存在する変異K-ras遺伝子のポリペ

50

プチドに特異的に結合する抗体、並びにその断片及び誘導体。

本発明の単離された抗体をコードする単離された核酸及び/又はその部分配列。

脾腫瘍、卵巣腫瘍、乳房腫瘍、大腸腫瘍、及びこれらに由来する転移病巣を含む、上皮性腫瘍のような腫瘍に特異的に結合するモノクローナル抗体のような抗体、及び/又はペプチド、その断片及び/又は誘導体。

MUC1ポリペプチド及び/又は変異K-ras^{G12D}ポリペプチド内に存在するエピトープ、いくつかの実施態様では、ヒトMUC1ポリペプチド内に存在するエピトープに特異的に結合する抗体並びにその断片及び誘導体。いくつかの実施態様では、このエピトープは配列番号1~3のいずれか内に存在する。

腫瘍関連抗原としてマウスモデルからのタンパク質溶解物を使用して作成された、MUC1(いくつかの実施態様では、ヒトMUC1)及び/又は変異K-ras^{G12D}に特異的に結合する抗体並びにその断片及び誘導体。

【0006】

エフェクター及び/又は免疫調節剤に結合した抗体並びにその断片及び誘導体から成るキメラ分子であって、この抗体、並びにその断片及び誘導体は、MUC1ポリペプチド及び/又は変異K-rasポリペプチド内に存在するエピトープに特異的に結合する。

いくつかの実施態様では、このエフェクターは、エピトープタグ、二次抗体(又はその断片又は誘導体)、ラベル、細胞毒素、リポソーム、放射性核種、薬物、プロドラッグ、及びキレートからなる群から選択され、さらにこの免疫調節剤は表3に示す薬剤から選択される。

例えば、表3に示す免疫調節剤である免疫調節剤に結合した抗体並びにその断片及び誘導体。

診断薬に結合した抗体、並びにその断片及び誘導体。

1つ又は複数の薬学的に許容される担体及び/又は賦形剤を含む組成物として調製された抗体、並びにその断片及び誘導体。

【0007】

免疫応答を誘導する方法。いくつかの実施態様では、抗体、その断片及び/又は誘導体、及び/又はここに開示された組成物を、ヒトのような、しかしこれに限定されない患者に導入することから成る、免疫応答を誘導する方法。

MUC1ポリペプチド及び/又は変異K-rasポリペプチドに特異的に結合する検出可能な標識に結合した抗体、並びにその断片及び誘導体を、ヒトのような、しかしこれに限定されない患者に導入することから成る、癌細胞を検出するための方法。

MUC1ポリペプチド、変異K-ras^{G12D}、又はこれら両方に特異的に結合する、モノクローナル抗体のような、しかしこれに限定されない、本発明の抗体、その断片及び/又は誘導体を産生するハイブリドーマ細胞。

本発明の抗体、並びにその断片及び誘導体と、1又はそれ以上の薬学的に許容される担体及び/又は賦形剤から成り、任意にさらに1又はそれ以上の免疫調節剤を含有する上皮癌に対するワクチン。

【0008】

特に、いくつかの実施態様では、本発明は、モノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)を有する単離された抗体又はその断片若しくは誘導体を提供する。いくつかの実施態様では、この単離された抗体又はその断片若しくは誘導体は、ポリクローナルである。いくつかの実施態様では、この単離された抗体又はその断片若しくは誘導体は、モノクローナルである。いくつかの実施態様では、この単離された抗体又はその断片若しくは誘導体は、ヒトである又はヒト化されている。いくつかの実施態様では、この単離された抗体又はその断片若しくは誘導体は、(a) 2010年12月16日にATCC(American Type Culture Collection)、アメリカ合衆国バージニア州20110-2209、マナサス、ユニバーシティプールバード10801、に受託番号PTA-11550として寄託されたハイブリドーマ細胞株TAB-004により産生されたモノクローナル抗体、(b) キメラ抗体又はその断片若しくは誘導体、(c) ヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体、(d)

10

20

30

40

50

ヒト抗体又はその断片若しくは誘導体、(e) 単鎖抗体又はその断片もしくはその誘導体、及び(f) Fab断片からなる群から選択され、該キメラ抗体、該ヒト化抗体、該ヒト抗体、該単鎖抗体又は該Fab断片は、モノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)を有する。この単離された抗体又はその断片若しくは誘導体のいくつかの実施態様では、このCDRは、(i)配列番号8から成る重鎖CDR1、(ii)配列番号9から成る重鎖CDR2、(iii)配列番号10から成る重鎖CDR3、(iv)配列番号11から成る軽鎖CDR1、(v)配列番号12から成る軽鎖CDR2、及び(vi)配列番号13から成る軽鎖CDR3の1又はそれ以上から成る。この単離された抗体又はその断片若しくは誘導体のいくつかの実施態様では、この重鎖可変領域は、配列番号5から成る又は配列番号4から成る核酸によりコードされ、及び/又はこの軽鎖可変領域は、配列番号7から成る又は配列番号6から成る核酸によりコードされる。

10

【0009】

本発明は、また、ここに開示される抗体又はその断片若しくは誘導体及び1又はそれ以上の医薬的に許容された担体及び/又は賦形剤から成る組成物を提供する。いくつかの実施態様では、この1又はそれ以上の医薬的に許容された担体及び/又は賦形剤はヒトでの使用が許容される。

本発明は、また、活性剤に抱合したここに開示される抗体又はその断片若しくは誘導体から成る組成物を提供する。いくつかの実施態様では、この活性剤は、放射性分子、放射性核種、増感剤分子、イメージング剤、放射性同位体、毒素、細胞毒、抗血管新生剤、抗腫瘍剤、化学療法剤、免疫調節剤、サイトカイン、レポーター基、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される。いくつかの実施態様では、この放射性同位体元素は、 ^{10}B 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 及び ^3H から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、この前記免疫調節薬は、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)阻害剤、必要に応じて1-メチル-DL-トリプトファン(1MT)；EP2/EP4受容体アンタゴニスト；シクロオキシゲナーゼ阻害剤、必要に応じてインドメタシン；及び樹状細胞活性剤、必要に応じてCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)から成る群から選択される。

20

【0010】

本発明はまた、単離された抗体又はその断片若しくは誘導体から成るキットを提供する。いくつかの実施態様では、このキットはこの単離された抗体又はその断片若しくは誘導体の使用方法についての説明書を含む。

30

本発明はまた、活性剤の腫瘍細胞への標的送達に使用するための送達ビヒクルを提供する。いくつかの実施態様では、この送達ビヒクルは、単離された抗体又はその断片若しくは誘導体から成る1又はそれ以上の標的薬剤から成る。いくつかの実施態様では、この活性剤は、放射性分子、放射性核種、増感剤分子、イメージング剤、放射性同位体、毒素、細胞毒、抗血管新生剤、抗腫瘍剤、化学療法剤、免疫調節剤、サイトカイン、レポーター基、又はそれらの組み合わせ、から成る。

本発明はまた、この抗体又はその断片若しくは誘導体を産生する単離された細胞を提供する。いくつかの実施態様では、この単離された細胞は、本発明の抗体を産生するハイブリドーマである。いくつかの実施態様では、このハイブリドーマは、ブダペスト条約の条項の下で、2010年12月16日にATCC(American Type Culture Collection)、アメリカ合衆国バージニア州20110-2209、マナサス、ユニバーシティブールバード10801、に受託番号PTA-11550として寄託されたハイブリドーマ細胞株である。

40

【0011】

本発明はまた、生物学的試料中のモノクローナル抗体TAB-004が結合するエピトープの存在を検出するための方法を提供する。いくつかの実施態様では、この方法は、(a)この生物学的試料を、1又はそれ以上の本発明の単離された抗体又はその断片若しくは誘導体に接触させる段階、及び(b)この生物学的試料中のモノクローナル抗体TAB-004が結合

50

するエピトープの存在を検出する段階から成る。いくつかの実施態様では、この単離された抗体又はその断片若しくは誘導体は、ムチン(MUC1)ポリペプチド内に存在する上に存在するエピトープ又はK-rasポリペプチド、必要に応じて変異K-rasポリペプチド内に存在する上に存在するエピトープに結合する。

本発明はまた、抗体又はその断片若しくは誘導体を製造する方法を提供する。いくつかの実施態様では、この方法は、(a)本発明の単離された細胞又は本発明のハイブリドーマを、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体が発現するような条件下で培養する段階、及び

(b)この細胞若しくはこのハイブリドーマから及び/又はこの細胞若しくはこのハイブリドーマが増殖する環境から、この抗体又はその断片若しくは誘導体を回収する段階から成る。

10

【0012】

本発明はまた、患者の腫瘍及び/又はがん細胞を検出する方法を提供する。いくつかの実施態様では、この方法は、(a)患者の又は患者から単離した生物学的試料を、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体が、この生物学的試料中に存在する、存在したとして、腫瘍及び/又はがん細胞上に存在するエピトープに結合するに十分な条件下で、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体に接触させる段階、及び(b)本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体がこのエピトープに結合することを検出する段階から成り、検出することがこの患者に腫瘍及び/又はがん細胞が存在していることの指標になる。いくつかの実施態様では、この腫瘍及び/又はがん細胞は、膵臓、乳房、卵巣、大腸又は直腸、及び/又はこれらから派生した転移細胞の腫瘍であって、必要に応じてMUC1、変異K-ras又はこれら両方を発現する。いくつかの実施態様では、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体は、常磁性イオン、放射性イオン及び蛍光性イオンから成る群から選択される造影剤を含む検出可能な標識に結合している。いくつかの実施態様では、この前記放射性造影剤は、 α -放射体、ポジترون-放射体及びX線-放射体からなる群から選択される。いくつかの実施態様では、この放射性造影剤は、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}Br 、 ^{81}Rb / $^{81\text{m}}\text{KR}$ 、 $^{87\text{m}}\text{Sr}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{132}I 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Pb 及び ^{206}Bi から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、この生物学的試料は血液サンプル又はそれから誘導される部分である。

20

30

【0013】

本発明はまた、患者の腫瘍を治療するための方法を提供する。いくつかの実施態様では、この方法は、この患者に、活性剤と抱合した本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体から成る組成物を投与することから成り、この活性剤がこの腫瘍に接触することにより腫瘍を治療することになる。いくつかの実施態様では、この活性剤は、治療剤、必要に応じて化学療法剤、毒素、放射性治療剤又はそれらの組み合わせをから成る。いくつかの実施態様では、この化学療法剤は、抗腫瘍薬、サイトカイン、代謝拮抗剤、アルキル化剤、ホルモン、メトトレキサート、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、シトシンアラビノシド、エトポシド、5-フルオロウラシル、メルファラン、クロラムブシル、ナイトロジェンマスタード、シクロホスファミド、シスプラチン、ビンデシン、ピンカアルカロイド、マイトマイシン、プレオマイシン、プロチオニン、マクロモマイシン、1,4-ベンゾキノ誘導体、トレニモン、ステロイド、アミノプテリン、アントラサイクリン、デメコルシン、エトポシド、ミトラマイシン、ドキシソルピシン、ダウノマイシン、ピンブラスチン、ネオカルチノスタチン、マクロマイシン(macromycin)、 α -アマニチン、及びそれらの組合せから成る群から選択される。いくつかの実施態様では、この毒素は、ラッセル蛇毒、活性化第IX因子、活性化第X因子、トロンビン、ホスホリパーゼC、コブラ毒因子、リシン、リシンA鎖、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、ウシ隣リボヌクレアーゼ、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク、アブリン、アブリンA鎖、ゲロニン、サポリン、メデッシン(modeccin)、ビスキュミン、ボルケンシン、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される。いくつかの実施態様では、この放射線治療薬は、 ^{47}Sc 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y

40

50

0 Y、1 0 9 P d、1 2 3 I、1 2 5 I、1 3 1 I、1 8 6 R e、1 8 8 R e、1 9 9 A u、2 1 1 A t、2 1 2 P b、2 1 2 B i、3 2 P、3 3 P、7 1 G e、7 7 A s、1 0 3 P b、1 0 5 R h、1 1 1 A g、1 1 9 S b、1 2 1 S n、1 3 1 C s、1 4 3 P r、1 6 1 T b、1 7 7 L u、1 9 1 O s、1 9 3 m P t 及び 1 9 7 H g から成る群から選択される。

【0014】

本発明はまた、患者における腫瘍の成長を抑制するための方法を提供する。いくつかの実施態様では、この方法は、有効量のモノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)を有する単離された抗体又はその断片若しくは誘導体を、腫瘍を有する患者に投与することをから成る。いくつかの実施態様では、この腫瘍は、膵臓、乳房、卵巣、大腸又は直腸、及び/又はこれらから派生した転移細胞の腫瘍であって、必要に応じてMUC1、変異K-ras又はこれら両方を発現する。いくつかの実施態様では、このモノクローナル抗体TAB-004のCDRは、配列番号8から成る重鎖CDR1、配列番号9から成る重鎖CDR2、配列番号10から成る重鎖CDR3、配列番号11から成る軽鎖CDR1、配列番号12から成る軽鎖CDR2、及び配列番号13から成る軽鎖CDR3の1又ははそれ以上から成る。いくつかの実施態様では、この重鎖可変領域は、配列番号5から成る又は配列番号4から成る核酸によりコードされ、及び/又はこの軽鎖可変領域は、配列番号7から成る又は配列番号6から成る核酸によりコードされる。

【0015】

本明細書に開示される治療方法に関して、いくつかの実施態様では、この方法は、更に、患者に1又はそれ以上の追加の抗腫瘍治療を施すことを含む。いくつかの実施態様では、この1又はそれ以上の追加の抗腫瘍治療は、放射線治療、化学療法、追加免疫療法、抗炎症療法、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施態様では、この抗炎症療法は、患者にシクロオキシゲナーゼ阻害剤、必要に応じてシクロオキシゲナーゼ-2-特異的阻害剤を投与することから成る。いくつかの実施態様では、この1又はそれ以上の追加の抗腫瘍治療は、患者に、ゲムシタピン(4-アミノ-1-(2-デオキシ-2,2-ジフルオロ-D-エリスロ-ペントフラノシル)ピリミジン-2(1H)-オン-2,2-ジフルオロ-2-デオキシシチジン)及びセレコキシブ(4-[5-(4-メチルフェニル)-3-(トリフルオロメチル)ピラゾール-1-イル]ベンゼンスルホンアミド)、又はこれら的一方若しくは両方の薬学的に許容される塩を投与することから成る。

【0016】

本発明はまた、がん幹細胞を精製するための方法を提供する。いくつかの実施態様では、この方法は、(a)がん幹細胞を含むことが疑われる細胞集団を提供する段階；(b)モノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)を有する抗体又はその断片若しくは誘導体に結合する該細胞の部分集団を特定する段階、及び(c)該部分集団を精製する段階から成る。いくつかの実施態様では、この細胞集団は、腫瘍及び/又はがんを有する患者から単離された循環細胞から成る。いくつかの実施態様では、この方法は、この特定段階の前及び/又はこの精製段階の後で、更に、この細胞集団から細胞系陽性(lin^+)細胞を除去する段階を含む。

【0017】

本発明はまた、活性剤を、患者の循環がん幹細胞を標的にする方法を提供する。いくつかの実施態様では、この方法は、この循環がん幹細胞を、モノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)を有する抗体又はその断片若しくは誘導体及び1又はそれ以上の活性剤から成る組成物と接触させる段階から成り、必要に応じてこの1又はそれ以上の活性剤が、治療剤、必要に応じて化学療法剤、毒素、放射性治療剤又はこれらの組み合わせから成る。いくつかの実施態様では、この治療剤は免疫調節剤から成り、必要に応じてこの免疫調節がインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)阻害剤、必要に応じて1-メチル-DL-トリプトファン(1MT)、EP2/EP4受容体拮抗薬、及び樹状細胞活性化剤、必要に応じてCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)から成る群から選択される。

【0018】

10

20

30

40

50

本発明はまた、以前にがんの治療を受けた患者におけるがんの再発を予知するための方法を提供する。いくつかの実施態様では、この方法は、(a) がんを有する患者から循環細胞を含む生物学的サンプルを単離する段階、(b) 該生物学的サンプルを、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体が、該生物学的サンプル中に存在する、存在したとして、腫瘍及び/又はがん上に存在するエピトープと結合するに十分な条件下で、該抗体又はその断片若しくは誘導体と接触させる段階、及び(c) 該生物学的サンプル中の、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体に結合する1又はそれ以上の循環細胞を特定する段階から成り、それによって該患者のがんの再発が予知される。いくつかの実施態様では、この生物学的サンプルは、血液サンプル、リンパサンプル又はそれらの部分から成る。いくつかの実施態様では、このがんは、膵臓がん又は乳がんである。いくつかの実施態様では、この前記抗体又はその断片若しくは誘導体は、2010年12月16日にATCC (American Type Culture Collection)、アメリカ合衆国バージニア州 20110-2209、マナサス、ユニバーシティブールバード 10801、に受託番号PTA-11550として寄託されたハイブリドーマ細胞株TAB-004により産生されたモノクローナル抗体、キメラ抗体又はその断片若しくは誘導体、ヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体、ヒト抗体又はその断片若しくは誘導体、単鎖抗体又はその断片もしくはその誘導体、及びFab断片からなる群から選択され、該キメラ抗体、該ヒト化抗体、該ヒト抗体、該単鎖抗体又は該Fab断片は、モノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)を有する。いくつかの実施態様では、このモノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)は、以下のアミノ酸配列を有する。即ち、配列番号8から成る重鎖CDR1、配列番号9から成る重鎖CDR2、配列番号10から成る重鎖CDR3、配列番号11から成る軽鎖CDR1、配列番号12から成る軽鎖CDR2及び配列番号13から成る軽鎖CDR3から成る。いくつかの実施態様では、この重鎖可変領域は、配列番号5から成る又は配列番号4から成る核酸によりコードされ、及び/又はこの軽鎖可変領域は、配列番号7から成る又は配列番号6から成る核酸によりコードされる。

【0019】

本発明はまた、患者におけるがんの進行を予知するための方法を提供する。いくつかの実施態様では、この方法は、がんを有する患者から循環細胞を含む生物学的サンプルを単離する段階、該生物学的サンプルを、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体が、該生物学的サンプル中に存在する、存在したとして、腫瘍及び/又はがん上に存在するエピトープと結合するに十分な条件下で、該抗体又はその断片若しくは誘導体と接触させる段階、及び該生物学的サンプル中の、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体に結合する1又はそれ以上の循環細胞を特定する段階から成り、それによって該患者のがんの再発が予知される。いくつかの実施態様では、この生物学的サンプルは、血液サンプル、リンパサンプル又はそれらの部分から成る。いくつかの実施態様では、このがんは、膵臓がん又は乳がんである。いくつかの実施態様では、この抗体又はその断片若しくは誘導体は、2010年12月16日にATCC (American Type Culture Collection)、アメリカ合衆国バージニア州 20110-2209、マナサス、ユニバーシティブールバード 10801、に受託番号PTA-11550として寄託されたハイブリドーマ細胞株TAB-004により産生されたモノクローナル抗体、キメラ抗体又はその断片若しくは誘導体、ヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体、ヒト抗体又はその断片若しくは誘導体、単鎖抗体又はその断片もしくはその誘導体、及びFab断片からなる群から選択され、該キメラ抗体、該ヒト化抗体、該ヒト抗体、該単鎖抗体又は該Fab断片は、モノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)を有する。いくつかの実施態様では、このモノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)は、以下のアミノ酸配列を有する。即ち、配列番号8から成る重鎖CDR1、配列番号9から成る重鎖CDR2、配列番号10から成る重鎖CDR3、配列番号11から成る軽鎖CDR1、配列番号12から成る軽鎖CDR2及び配列番号13から成る軽鎖CDR3から成る。いくつかの実施態様では、この重鎖可変領域は、配列番号5から成る又は配列番号4から成る核酸によりコードされ、及び/又はこの軽鎖可変領域は、配列番号7から成る又は配列番号6から成る核酸によりコードされる。いく

10

20

30

40

50

つかの実施態様では、このがんの進行は、患者におけるがんの転移から成る。

【0020】

本発明はまた、配列番号4及び6のいずれかから成る又は配列番号5及び7～13にいずれかをコードする単離された核酸分子を提供する。いくつかの実施態様では、この単離された核酸分子は、ベクター、いくつかの実施態様では、発現ベクター内に存在する。いくつかの実施態様では、この単離された核酸分子は、発現ベクター内に存在し、該発現ベクターを適当な宿主に導入した場合に、配列番号5及び7～13の一つ又はそれ以上を有する抗体又はその断片若しくは誘導体が該宿主により発現するように、抗体の部分配列をコードする1又はそれ以上の追加の塩基配列に作動可能なように連結されている、発現ベクター内に存在する。

10

従って、本発明の一つの目的は、腫瘍内に存在する抗原に結合する単離された抗体並びにその断片及び誘導体を提供することである。

上述した本発明の目的は、ここに開示された組成物及び方法によって全体的又は部分的に達成され、その他の目的は、最も良くここに記載された添付の図面と関連して行われる説明が進むにつれて明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1A及び1Bは、本発明の典型的な抗体の、ヒト及びマウス膵臓腫瘍への特異的な結合を表す一連の顕微鏡写真を表す。パネルにおける濃い染色は試料中の細胞に対する典型的な抗体の陽性の結合を示す。図1Aは、ステージ0（負対照としての正常膵臓組織）及びステージ2～4のヒト腫瘍に対する典型的な抗体の結合を表す一連の顕微鏡写真である。図1Bは、ヒトMUC1導入遺伝子及びK-ras^{G21D}変異を持つ6、16、26及び34週齢のトランスジェニックマウスの膵臓に存在する自然発生腫瘍に対する本発明の典型的な抗体の結合を示す一連の顕微鏡写真である。

20

【図2】本発明の典型的な抗体の、ヒト乳房腫瘍組織に対する特異的な結合（図2A及び2B）、及び隣接した正常乳房組織に対する非結合性（図2C）を示す一連の顕微鏡写真を示す。

【図3】膵臓の至る所にCreリコンビナーゼを発現し、また変異K-ras腫瘍遺伝子ポリペプチド、及びヒトMUC1ポリペプチドを発現する三重トランスジェニックマウス株作成のための方法を示す（左上部パネル）。このマウスに、膵臓腺癌を発生させ、この腺癌の細胞を、初発腫瘍細胞株KCM（下部パネル）の作成に用いた。本発明の典型的な抗体（図において「TAB」として、明細書において「TAB-004」として表示される）の単独又はCpGオリゴデオキシヌクレオチド（CpG ODN）に対する抱合型での結合を試験するために、このKCM細胞株を用いた。非抱合型及び抱合型抗体の両者が、同等の親和性でKCM膵臓細胞株と結合することが分かった（右上部パネル）。

30

【図4】本発明の典型的な抗体（TAB-004）が、ナチュラルキラー細胞（NK）の細胞毒性を促進し、標的腫瘍細胞を殺すことを示すグラフを示す。この抗体とCpG ODNとの抱合体はこの効果を更に促進し、従って、この典型的な抗体はin vivo抗腫瘍免疫応答を促進することができる。図4Aの折れ線グラフは、この典型的な抗体TAB-004が、対照（TAB-004抗体なし）と比較して、様々なE:T比（作動因子（NK細胞）：標的の比）において、KCM腫瘍細胞の特異的な溶解を促進することを示す。図4Bの棒グラフは、この典型的な抗体TAB-004のCpG ODNへの抱合体が、様々なE:T比において、非抱合型抗体と比較して、腫瘍細胞の特異的な溶解をさらに促進することを示す。

40

【図5】本発明の典型的な抗体（TAB-004）及びこの抱合体が、MUC1トランスジェニック（MUC1 Tg）マウスにおいて樹立したKCM腫瘍の腫瘍体積を減少させる活性を検査するためにデザインした実験結果を示す。図5Aは、リン酸緩衝液（PBS）単独（負対照；白正方形）、CpG ODN単独（*）、非抱合型TAB-004抗体（白丸）、又はTAB-004-CpG ODN抱合体（黒丸）で処理したマウスにおいて測定した腫瘍体積（デジタルノギスでmm測定）を示す折れ線グラフである。図5Bは、最終処理がなされた後、19日及び27日でのマウスにおける腫瘍体積の変化を示す棒グラフである。注目すべきことは、最終処理後19

50

日及び27日において、TAB-004-CpG ODN処理のマウスにおける腫瘍体積は、対照マウス（即ち、PBS単独、CpG ODN単独、又はTAB-004単独）と比較して、増加しなかったことである。p<0.5 PBS単独（負対照；白棒）；CpG ODN単独（右上がりストライプ棒）；非抱合型TAB-004抗体（深い右上がりストライプ棒）；TAB-004-CpG ODN抱合型（左上がりストライプ棒）。

【図6】本発明の典型的な構成物及びその典型的な使用法の図式的描写を示す。ADCC - 抗体依存性細胞介在性細胞毒性；CDC - 補体依存性細胞毒性；ADEPT - 抗体指令性酵素前駆薬治療。

【図7】蛍光細胞分析分離装置（FACS）によるCD133+（図7A）対CD24+/CD44+/EpCAM+（図7B）細胞の区分けの頻度分布図（ヒストグラム）、及び本明細書で開示したTAB-004抗体がこれらの細胞に結合する程度を示す。各パネルの左トレースは、負対照抗体を用いた区分けに対応し、右トレースは、TAB-004抗体を用いた区分けに対応する。

【図8】TAB-004抗体及びCXCケモカイン受容体4（CXCR4）に対する抗体を用いた、TAB-004抗体の、膵臓腫瘍（「腫瘍1」で示す）及び隣接する正常組織（「正常」で示す）への結合を示すFACS散乱プロットを示す。「MUC1」はTAB-004抗体を示し、「CXCR4」は抗CXCR4抗体を示し、「FL1-H」は蛍光染色1高（フルオレッセイン - FITC）を示し、「FL2-H」は蛍光染色2高（フィコエリトリン - PE）を示し、「SSC-H」は側方散乱高を示し、「FSC-H」は前方散乱高を示し、「FLH-4」は蛍光染色4 - 高（アロフィコシアニン - APC）を示す。図8Aは、抗体不在下の細胞分布を示す散乱プロットを示す。図8Bは、アイソタイプ対照で染色した細胞の分布を示す散乱プロットを示す。図8Cは、CXCR4抗体で染色した場合と、TAB-004抗体で染色した場合の、正常組織中の細胞の分布を示す一連の散乱プロットを示す。図8Dは、CXCR4抗体で染色した場合と、TAB-004抗体で染色した場合の、膵臓腺癌組織中の細胞の分布を示す一連の散乱プロットを示す。

【図9】膵臓癌患者の循環腫瘍細胞を検出する上で、本発明のTAB-004抗体が、標準的EpCAM抗体より優れていることを示す一連のFACSプロットを示す。非染色細胞（左の最も黒い線）；EpCAM-PE（0.1 mg/ml）染色細胞（鼠色線）；TAB-004-PE（0.1 mg/ml）染色細胞（右の最も黒い線）；TAB-004-PE（0.02mg/ml）染色細胞（薄い灰色線）；TAB-004-PE（0.04 mg/ml）染色細胞（中間灰色線）。「-PE」は、区分けする目的でフィコエリトリンで標識した抗体を示す。図9Aにおいて、PANC1（膵臓癌細胞株）をTAB-004-PE抗体により検出した。図9B及び9Cにおいて、2人の患者（それぞれ、「患者1」及び「患者2」で示す）の血液中の循環腫瘍細胞をTAB-004-PE抗体（図9Bの右側の最も濃い黒線及び図9Cの右側の最も濃い黒線及び淡灰色線を参照）により検出したが、現在使用されているEpCAM-PE抗体（図9B及び9Cの淡灰色線を参照）では検出されなかった。

【図10】酵素免疫測定（EIA）を用いた血漿中の癌細胞検出における、TAB-004の性能とCA15-3抗原に対する特異的な抗体の性能の比較を示す棒グラフである。白色矩形はTAB-004抗体を示し、斜線矩形はCA15-3を示す。破線はTAB-004正常カットオフを示し、点線はCA15-3正常カットオフを示す。

【図11】膵臓癌患者の血漿に放出されたMUC1のレベルを疾病ステージの関数として検出するための酵素免疫測定（EIA）における、TAB-004の性能とCA15-3の性能とを比較した棒グラフである。白色矩形はTAB-004抗体を示し、斜線矩形はCA15-3を示す。

【0022】

配列表の簡単な説明

配列番号1は、ヒトMUC1遺伝子産物のアミノ酸配列であり、GENBANK(R) アクセシオン番号AAA60019に対応する。

配列番号2は、ヒトのK-ras癌遺伝子産物のアミノ酸配列であり、GENBANK(R) アクセシオン番号NP_004976に対応する。

配列番号3は、本明細書で開示したTAB-004抗体が、ELISA測定において結合可能なペプチドのアミノ酸配列であり、このペプチドは、TAB-004抗体が特異的に結合するエピトープを含む。

配列番号4と5は、それぞれ、本明細書に開示されたTAB-004抗体の重鎖の塩基配列及

10

20

30

40

50

びそれがコードするアミノ酸配列である。

配列番号6と7は、それぞれ、本明細書に開示されたTAB-004抗体の軽鎖の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列である。

配列番号8～10は、本明細書に開示されたTAB-004抗体の重鎖のCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列である。

配列番号11～13は、本明細書に開示されたTAB-004抗体の軽鎖のCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

以下、本発明は添付の図面及び実施例を参照しながらより完全に説明されます。そこでは、本発明の代表的な実施態様が示されます。しかし、本発明は、これらとは異なる形態で具体化することが可能であり、本明細書に記載された実施態様に限定されるように解釈されるべきではありません。むしろ、これらの実施態様は、この開示が完全なものとなり、当業者に十分に本発明の範囲を伝えるように提供される。

【0024】

I. 定義

本明細書において使用される用語は、特定の実施態様を説明する目的のためだけのものであり、本発明を限定するものではない。

以下の用語は、当該技術分野の当業者によってよく理解されると考えられるが、以下の定義は、本発明の説明を容易にするために記載されている。

ここで使用されるすべての技術用語及び科学用語は、以下で他のように定義されない限り、当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を持つことが意図されています。ここで用いられる技術への言及は、当業者にとって明らかであろうこれらの技術の変更又は同等の技術の置換を含め、当業界で一般的に理解されるような技術を指すものとする。

本発明に記載する際に、多くの技術と段階が開示されることは理解されるであろう。これらの各々は個々に利点を有しており、それぞれはまた、他の開示された技術の一つ以上の、又はいくつかのケースではすべてのと併せて使用することができる。

従って、明確にするために、以下の記載では、不要なやり方で個々の段階の可能なすべての組み合わせを繰り返すことはしません。それにもかかわらず、このような組み合わせはここに開示され請求される本発明の範囲内に完全にあることを理解した上で、明細書及び特許請求の範囲は読まれるべきです。

【0025】

長年の特許法の規則に従って、用語「a(一つの)」、「an(一つの)」及び「the(その)」は、特許性請求の範囲を含むこの出願で使用する場合、「1つ又はそれ以上」を意味します。例えば、「一つの抗体」という用語は、1つ又はそれ以上の抗体を意味し、複数の同じ抗体を含みます。同様に、「少なくとも1つ」という用語は、一つの実在を意味し、例えば、その実在の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、又はそれ以上を意味し、1～100及び100以上の全数字を含むが、これには限定されなない。

特に断らない限り、成分、反応条件など明細書及び特許請求の範囲で用いられる量を表すすべての数字は、全ての場合、「約」という用語により変更されたものとして理解される。

質量、重量、時間、体積、濃度、又は割合などの測定可能な量に関して用いられるこの「約」という用語は、その特定の量の、いくつかの実施態様では±20%のばらつき、いくつかの実施態様では±10%のばらつき、いくつかの実施態様では±5%のばらつき、いくつかの実施態様では±1%のばらつき、いくつかの実施態様では±0.5%のばらつき、いくつかの実施態様では±0.1%のばらつきを意味し、このようなばらつきは、開示された方法及び又は開示された組成物を実施するために適当である。従って、反対に示されない限り、本明細書及び特許請求の範囲に記載された数値パラメータは、本発明によって得ようとする所望の特性に応じて変化し得る近似値である。

本明細書で使用される「及び/又は」は、実在をリストする文脈で使用される場合には、単独又は組み合わせで存在する実在のことをいう。従って、例えば、「A、B、C、及び/又はD」は、個別のA、B、C、及びDが含まれるが、また、A、B、C、及びDのいずれか並びにすべての組み合わせ及びサブコンビネーションが含まれる。

【0026】

「から成る(comprising)」、「含む(containing)」又は「で特徴づけられる(characterized by)」は、包括的又はオープンエンドであり、追加的な、列挙されていない要素及び/又は方法の段階を排除するものではない。「から成る(comprising)」は、名付けられた要素及び/又は段階が存在することを意味する用語ですが、他の要素及び/又は段階が追加されても、まだ関連した発明の範囲内に入ることをいう。

10

本明細書において用いられる「のみから成る(consisting of)」という用語は、具体的に列挙されていない任意の要素、工程、又は成分を除外することのことをいう。この「のみから成る(consisting of)」という用語が、プレアンプルに続かないで、クレームの本体に用いられた場合、そこに記載された要素のみに限定され、他の要素は、クレーム全体から除外されることに、注意されたい。

「consisting essentially of(本質的に、から成る)」は、請求範囲を、明記した材料又は段階に限定して、さらに請求範囲の発明事項の基本的及び新規の特徴に実質的に影響しない材料又は段階を限定する。例えば、「医薬組成物が、本質的に薬学的活性剤又は複数の薬学的活性剤から成る」との記載は、この薬学的活性剤(複数可)は、その医薬組成物に存在する唯一の薬学的活性剤(複数可)であることのことをいう。しかし、担体、賦形剤及び/又はその他の非活性薬剤が、その医薬組成物中に存在してもよいことに注意されたい。

20

「comprising(から成る)」、「consisting of(のみから成る)」及び「consisting essentially of(本質的に、から成る)」に関して、これらの3種の用語の1種が本明細書で用いられた時、本発明は、他の2種の用語のいずれかの使用を含めることができる。例えば、いくつかの実施態様において、本発明が、抗体から成る組成物であるとする。当業者は、この開示を見た後で、開示された発明は、開示された発明の抗体のみから成る組成物と同様に、本質的に開示された発明の抗体から成るものと理解するであろう。

【0027】

本明細書で使用される「患者」は、任意の無脊椎動物や脊椎動物種の構成員のことをいう。従って、「患者」という用語は、いくつかの実施態様で、動物界(Animalia)の任意の構成員を包含することが意図されるが、脊索動物門(phylum Chordata)(例えば、Osteichthyes(硬骨魚)、両生類(両生類)、爬虫(爬虫類)、鳥類(鳥)及び哺乳類(哺乳動物)、並びにこれらに包含されるすべての目及びファミリー。)に限定されるものではない。

30

本発明の組成物及び方法は、温血脊椎動物のために特に有用である。従って、いくつかの実施態様において、本発明は、哺乳類や鳥類に関する。特に、絶滅の危機にあるため重要な哺乳類(例えば、シベリアトラなど)、経済的に重要な哺乳類(例えば、人により消費されるために農場で育てられた動物)及び/又はヒトにとって社会的に重要な哺乳類(例えば、ペットとして又は動物園で飼育される動物)、具体的には、ヒト以外の肉食動物(例えば、猫や犬など)、豚(ブタ(pigs)、飼い豚(hogs)、イノシシ)、反芻動物(例えば、畜牛、雄牛、羊、キリン、シカ、ヤギ、バイソン、らくだ)、げっ歯類(マウス、ラット、ウサギなど)、有袋類、及び馬と同様に、ヒト及び他の霊長類などの哺乳類に由来する及び/又はこれらに使用するための組成物及び方法が提供される。また、開示される方法及び組成物を、絶滅の危機に瀕している鳥、動物園で飼育されている鳥及び家禽を含む鳥、特に、家畜化された家禽、これらはヒトにとって経済的に重要であり、例えば、七面鳥、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ホロホロ鳥などの食用の飼鳥類に使用することが提供される。従って、また、開示される方法及び組成物を、家畜化された豚(ブタ(pigs)及び飼い豚(hogs)、反芻動物、馬、家禽などを含む、しかしこれらに限定されない家畜に使用することが提供される。

40

50

【 0 0 2 8 】

同様に、本明細書に開示されるすべての遺伝子、遺伝子名、及び遺伝子産物は、本明細書に開示される組成物及び方法が適用できるホモログ及び/又は如何なる種からのオルソログに相当することが意図される。従って、これらの用語は、ヒト及びマウス由来の遺伝子や遺伝子産物に限定されるものではない。特定の種に由来する遺伝子又は遺伝子産物が開示されている場合、この開示は例示のみを目的とするものであって、それがはっきりと表示された状況が示されない限り、制限として解釈されるべきではない。従って、例えば、GENBANK(R) アクセション番号AAA60019及びNP_004976で表される遺伝子について、開示されたヒトのアミノ酸配列は、他の哺乳動物、魚類、両生類、爬虫類、鳥類を含むが、これらに限定されない他の動物由来の相同遺伝子及び遺伝子産物を包含することが意図される。また、対応するGENBANK(R) エントリー（即ち、それぞれJ05582.1及びNM_004985）に開示される塩基配列を含むが、これに限定されない、開示されるアミノ酸配列をコードする如何なる及び全ての塩基配列が包含される。

10

【 0 0 2 9 】

「癌（がん）」及び「腫瘍」は、本明細書において互換的に使用され、患者の任意の組織の初期及び転移後の充実性腫瘍及び悪性腫瘍の両方を意味することができ、この任意の組織には、胸；結腸；直腸；肺；中咽頭；下咽頭；食道；胃；脾臓；肝臓；胆嚢；胆管；小腸；腎臓、膀胱、尿路上皮を含む尿路；子宮頸部、子宮、卵巣（例えば、絨毛癌と妊娠性絨毛性疾患）などの女性生殖管；前立腺、精嚢、精巣及び生殖細胞腫瘍を含む男性生殖管；甲状腺、副腎、下垂体を含む内分泌腺；皮膚（例えば；血管腫及び黒色腫）、骨又は軟部組織；血管（例えば、カポジ肉腫）；脳、神経、目及び髄膜（例えば、星状細胞腫、神経膠腫、膠芽腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽腫、神経鞘及び髄膜腫）が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で用いる「癌（がん）」及び「腫瘍」は、また、多細胞腫瘍だけでなく、個々の腫瘍又は前新生物の細胞を意味することを意図する。いくつかの実施態様では、癌又は腫瘍は、悪性腫瘍を含むがこれに限定されない上皮組織の癌又は腫瘍を含む。いくつかの実施態様では、腫瘍は腺癌であり、いくつかの実施態様では、この腺癌は脾臓、胸、卵巣、大腸又は直腸、及び/又はそれに由来する転移細胞の腺癌である。

20

【 0 0 3 0 】

本明細書で分子に関連して使用される文脈では、「エフェクター」は、その活性が細胞に輸送すること及び又は細胞に局在化することが望まれる如何なる分子又は分子の組み合わせのことをいう。エフェクターは、標識、細胞毒素、酵素、成長因子、転写因子、ドラッグ等を含むが、これらに限定されない。

30

本明細書で免疫系の細胞に関連して使用される文脈では、「エフェクター」は、刺激に対する免疫応答に伴って特定の機能を発揮するように誘導されうる免疫系細胞のことをいう。代表的なエフェクター細胞には、ナチュラルキラー（NK）細胞と細胞傷害性T細胞（Tc細胞）が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用される「発現ベクター」は、適当な宿主中で特定の塩基配列の発現を指導することのできるDNA配列を意味し、終結シグナルに作動可能に連結された目的の塩基配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む。発現ベクターは、また、典型的にはその塩基配列の適切な翻訳に必要な配列を含む。目的の塩基配列を含むこの構成体は、キメラであってもよい。この構成体は、また、異形の発現に有用な組換え形態を自然に引き起こす又はそのような形態で得られるものであってもよい。いくつかの実施態様では、この発現ベクターは、ここに開示する本発明の単離された核酸分子から成り、いくつかの実施態様では、それは、配列番号4及び6の塩基、又は配列番号5及び7～13をコードする塩基のいずれかから成る。いくつかの実施態様では、発現ベクター内に存在するこの単離された核酸分子は、この発現ベクターを適当な宿主に導入した場合に、配列番号5及び7～13の一つ又はそれ以上を有する抗体又はその断片若しくは誘導体が該宿主により発現するように、抗体の部分配列をコードする1又はそれ以上の追加の塩基配列に作動可能

40

50

なように連結される。

【0032】

本明細書で使用される「ハイブリドーマ」は、実験室で、抗体産生リンパ球と非抗体産生癌細胞（通常、ミエローマ又はリンパ腫）を融合して作られる細胞又は細胞株のことをいう。当業者によく知られているように、ハイブリドーマは増殖し、特異的なモノクローナル抗体を連続的に生成することができる。ハイブリドーマを生成する方法は当該分野で公知である（例えば、Harlow & Lane、1988を参照）。

本明細書で使用される「作動可能なように連結される」及び「作動可能に連結される」とは、ヌクレオチド配列の転写が、転写調節要素によって制御され、規制されるような方法で、コードするヌクレオチド配列（例えば、コードする配列又はオープンリーディングフレーム）に接続されている転写調節要素（例えば、プロモーター配列、転写ターミネーター配列など、但しこれらに限定されない）に関する。同様に、ヌクレオチド配列は、それが作動可能に連結されているプロモーターの「転写制御」の下にあると言われます。作動可能なようにプロモーター領域に連結するための技術は、当該分野で公知である。

本明細書で使用される「プロドラッグ」は、活性化段階になるまである薬物の生物学的活性（例えば、細胞傷害活性）を実質的に欠くその薬物（例えば、細胞傷害活性）の類似体及び/又は前駆体のことをいう。活性化段階は、酵素的切断、還元剤への暴露などの化学的活性化、及び/又は光分解などの物理的活性化などを含む。いくつかの実施態様では、活性化は、患者の身体中で、生体内で（インビボで）起こる。

【0033】

II. 抗体並びにその断片及びその誘導体、並びにその製造方法

IIA. 一般的説明

いくつかの実施態様では、本発明は、MUC1ポリペプチド内に存在する抗原のような、しかしこれに限定されない、腫瘍内に存在する抗原に結合する抗体並びにその断片及び誘導体提供する。

本明細書で使用される「抗体（単数）」及び「抗体（複数）」は、免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子の断片によって実質的にコードされる1又はそれ以上のポリペプチドから成るタンパク質のことをいう。免疫グロブリン遺伝子は、通常、カッパ（ κ ）、ラムダ（ λ ）、アルファ（ α ）、ガンマ（ γ ）、デルタ（ δ ）、イプシロン（ ϵ ）及びミュー（ μ ）不変領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は κ 又は λ のいずれかに分類される。哺乳類では、重鎖は μ 、 γ 、 α 、 δ 、 ϵ のいずれかに分類され、それぞれ免疫グロブリンクラスIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEを規定する。他の種は、他の軽鎖及び重鎖の遺伝子を持ち（例えば、ある種の鳥類は、IgYと呼ばれるものを産生し、これは鶏がその卵の卵黄に保持する免疫グロブリンタイプである。）も、これも同様に本発明に包含される。いくつかの実施態様では、「抗体」は、ムチン（MUC1）ポリペプチド及び/又はK-rasポリペプチドを含む、しかしこれらに限定されない腫瘍抗原上に存在するエピトープに特異的に結合する抗体のことをいう。いくつかの実施態様では、「抗体」は、配列番号1～3のいずれかに存在するエピトープに特異的に結合する抗体のことをいう。

【0034】

典型的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、四量体を含むことが知られている。各四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一のペアで構成され、各ペアは、1つの「軽鎖」（平均分子量：約25キログルトン（kDa））及び1つの「重鎖」（平均分子量：約50～70 kDa）を有する。このポリペプチド鎖の2つの同一のペアは、重鎖領域内に存在するジスルフィド結合による二量体の形で共に保持される。各鎖のN末端は、抗原認識（しばしば「パラトープ」という。）を主につかさどる約100～110個又はそれ以上のアミノ酸の可変領域を規定する。可変軽鎖（ V_L ）及び可変重鎖（ V_H ）は、それぞれ、これらの軽鎖及び重鎖のことをいう。

【0035】

抗体は、典型的には無傷の（intact）免疫グロブリンとして、又は様々なペプチダーゼ

10

20

30

40

50

で消化することにより製造されうる十分に特徴付けられた多数の断片として存在する。例えば、パインによる抗体分子の消化は、抗体をジスルフィド結合のN末端位置で特異的に切断する。これにより、3つの断片ができる。即ち、軽鎖及び重鎖のN末端を持つ2つの同一の「Fab」断片、及びジスルフィド結合により共に保持される重鎖のC末端を含む「Fc」断片。一方、ペプシンは、ヒンジ領域のジスルフィド結合の抗体のC末端を消化し、ジスルフィド結合で結合されたFab断片の二量体である「F(ab')₂」断片として知られる断片を生成する。このF(ab')₂断片は、穏やかな条件下で還元され、ヒンジ領域のジスルフィド結合を破壊し、それによりF(ab')₂二量体を2つのFabモノマーに変換する。このFabモノマーは、本質的にヒンジ領域の一部を有するFab断片である（他の抗体断片の詳細な説明については、例えば、ポール、1993を参照）。これらの様々な断片に関しては、Fab、F(ab')₂及びFab'断片は、少なくとも1つの無傷の抗原結合領域（パラトープ）を含み、そのため、抗原に結合することができる。

10

様々な抗体断片は、無傷の抗体の消化の観点から規定されているが、当業者は、これらの様々な断片（Fab'断片を含むがこれらに限定されない）は、化学的に又は組換えDNA方法を用いて、新たに(de novo)合成されることができると認識している。従って、また、本明細書で使用する「抗体」は、抗体全体の改変及び/又は組換えDNA方法を用いて新たに合成されることにより産生された抗体断片を含む。いくつかの実施態様では、用語「抗体」は、少なくとも1つの抗原結合領域（パラトープ）を有する断片を含む。

【0036】

抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであってもよい。本明細書において用いられる「ポリクローナル」は、複数の抗体の所定の集合として共に存在し、別の抗体産生細胞（例えば、B細胞）に由来する複数の抗体のことをいう。典型的なポリクローナル抗体は、特定の抗原に結合し、ある動物がその抗原に免疫反応した後にその動物の血液中に見られる抗体を含むが、これに限定されるものではない。しかし、抗体のポリクローナル製剤はまた、少なくとも非同一の2つの抗体を混合することにより人為的に調製することができることが理解される。従って、ポリクローナル抗体は、典型的には、所定の抗原の同一及び/又は異なるエピトープ（しばしば「抗原決定基」又は単に「決定基」と呼ばれる）に結合する異なる抗体を含む。

20

【0037】

本明細書において用いられる「モノクローナル」は、単一の抗体種及び/又は単一の抗体種の実質的に均質な集団のことをいう。別の言い方をすれば、「モノクローナル」は、自然に生じる可能性のある少量存在しうる突然変異を除いて、その抗体が特異性と親和性において同一である個々の抗体の集団のことをいう。典型的には、モノクローナル抗体（mAb又はmoAb）は、単一のB細胞又はその子孫細胞によって生成される（但し、本発明は、本明細書に開示される分子生物学的手法により製造される「モノクローナル」抗体を包含するが）。モノクローナル抗体（mAb又はmoAb）は、高度に特異的であり、典型的には、一つの抗原部位に結合する。さらに、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、所定のモノクローナル抗体（mAb）は、典型的には、その抗原の一つのエピトープに結合する。

30

モノクローナル抗体（mAb）は、その特異性に加えて、他の抗体を含むことなく合成されうるという点で、いくつかの目的のために有利である。しかし、「モノクローナル」という修飾語は、任意の特定の方法によるその抗体の産生を必要とするものとして解釈されるべきではない。例えば、いくつかの実施態様では、本発明のモノクローナル抗体（mAb）は、最初にKohlerら1975によって最初に開示されたハイブリドーマ法を用いて調製され、いくつかの実施態様では、原核生物又は真核生物の細胞内で組換えDNA法を用いて作られる（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい。この全体の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。）。モノクローナル抗体（mAb）は、また、例えば、Clacksonら1991及びMarksら1991に記載された技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離されうる。

40

【0038】

50

本発明の抗体、断片及び誘導体は、また、キメラ抗体を含んでもよい。本明細書において用いられる「キメラ」及びその文法的変形は、ある種の抗体の不変領域に実質的に又は排他的に由来する不変領域と、別の種の抗体の可変領域の配列に実質的に又は排他的に由来する可変領域とを有する抗体誘導体のことをいう。

可変領域は、ある抗体が、抗原上のエピトープを選択的に認識し、かつこのエピトープに特異的に結合することを可能にする。具体的には、抗体のV_LドメインとV_Hドメイン、又はこれらの可変ドメイン内の相補性決定領域(CDR)のサブセットは、3次元の抗原結合部位を規定する可変領域を形成するために組み合わせられる。この4次抗体構造は、抗体の各アームの末端に存在する抗原結合部位を形成する。具体的には、この抗原結合部位は、V_L及びV_H鎖のそれぞれ上の3つのCDRによって規定される。いくつかの例として(例えば、ラクダ科の動物種に由来する、又はラクダ免疫グロブリンに基づいて設計された、特定の免疫グロブリン分子)、ある完全な免疫グロブリン分子は、軽鎖のない重鎖のみから成る(例えば、Hamers-Castermanら1993)。

【0039】

自然に発生する抗体では、各抗原結合領域に6つのCDRが存在し、それらは短く非連続的なアミノ酸配列であり、抗体が水性環境における3次元構造を想定しているように、この抗原結合領域を形成するように配置されている。この抗原結合領域のアミノ酸の残部は、「フレームワーク」領域と呼ばれ、より少ない分子間変動を示す。このフレームワーク領域は、主としてβ-シート構造を採り、そのCDRはループを形成し、β-シート構造に結合するか、又はいくつかのケースでβ-シート構造の一部を形成している。従って、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合性相互作用によって、CDRを正しい向きに位置決めする足場を形成するように機能する。この位置決めされたCDRにより形成された抗原結合領域は、免疫反応性抗原上のエピトープに対して相補的な面を規定する。この相補的な面は、その抗体が対になるエピトープに非共有結合することを促進する。このCDRから成るアミノ酸、及びフレームワーク領域は、正確に規定されているため、当業者は、所定の重鎖又は軽鎖可変領域について、これらを容易に特定することができる(例えば、Chothiaの&Lesk,1987、Kabatら1991、Martin,1996、Johnson & Wo,2000を参照されたい。)

【0040】

特定の種類のキメラ抗体は、「ヒト化」抗体であり、例えば、マウス抗体のCDRをヒト抗体のCDRに置き換えることにより製造される(例えば、PCT国際公開WO 1992/22653参照)。従って、いくつかの実施態様では、ヒト化抗体は、ヒト抗体の対応する領域に実質的に又は排他的に由来する不変領域及びCDR以外の可変領域を有し、ヒト以外の哺乳動物に実質的に又は排他的に由来するCDRを有する。

【0041】

本発明の抗体、断片及び誘導体は、また、単鎖抗体及び単鎖抗体断片であってもよい。単鎖抗体断片は、ここに記載された可変領域及び/又はCDRの少なくとも一つを有するアミノ酸配列を含み、これらの抗体の不変領域の全体又は一部を欠く。これらの不変領域は、抗原結合のために必要ではないが、抗体全体の構造の主要な部分を構成する。

単鎖抗体断片は、不変領域の全体又は一部を含む抗体の使用に関連したいくつかの問題を克服することができる。例えば、単鎖抗体断片は、生体分子と重鎖不変領域の間の望ましくない相互作用、及び/又はこの他の望ましくない生物学的活性がない傾向があります。さらに、単鎖抗体断片は、抗体全体よりもかなり小さく、従って、抗体全体よりも毛細血管透過性が大きいという特徴を持ち、これは、単鎖抗体断片が、より効果的に、抗原結合部位を標的にして、局在し、結合することを可能にする。また、抗体断片は、原核細胞では比較的大規模に製造されることができ、そのため、その生産を促進する。さらに、単鎖抗体断片の比較的小さなサイズは、抗体全体よりも、受容者における免疫応答を誘発する可能性が低い。本発明の単鎖抗体断片としては、単鎖断片可変(scFv)抗体及びタンデムdi-scFv、タンデムtri-scFv、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニ抗体、及びミニボディー等のその誘導体を含むが、これらに限定されない。

【0042】

10

20

30

40

50

Fv断片は、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖のN末端の可変断片に相当する。Fv断片は、Fab断片よりもその2つの鎖の低い相互作用エネルギーを持つように見える。V_L及びV_Hドメインの結合を安定させるために、それらは、ペプチド(Birdら1988、Hustonら1988)、ジスルフィド結合(例えば、Glockshuberら1990)、及び/又は「穴の中のノブ(knob in hole)」突然変異(例えば、Zhuら1997)に連結されてもよい。単鎖断片可変(scFv)断片は、当業者に自明の方法で作製することができる(Whitlowら1991、Hustonら1993)。

単鎖断片可変(scFv)を、大腸菌などの細菌細胞又は真核細胞内で製造することができる。scFvの潜在的な一つの欠点は、それが一価であることであり、それは、多価結合により親和性を増加させることを妨げ、かつ半減期が短いことです。これらの問題を解消するための試みとして、追加のC-末端システインを含むscFvから、化学結合(Adamsら1993、McCartyら1995)や対になっていないC-末端システイン残基を含むscFvの自発的部位特異的二量化(例えば、Kipriyanovら1995)により作られる二価(scFv)₂がある。

【0043】

あるいは、scFvを、ペプチドリッカーを3~12残基に短縮することにより、「ダイアポディ」を形成することができる(例えば、Holigerら1993)。このリンカーを更に短縮することにより、scFvの三量体(「トリアポディ」、Korttら1997)や四量体(「テトラポディ」、Le Gallら1999)を形成することができる。タンパク質二量体化モチーフと遺伝子融合することにより、二価のscFv分子を構築して、「ミニ抗体」(例えば、Packら1992)及び「ミニポディー」(例えば、Huら1996)

を形成することができる。scFv-scFvのタンデム((scFv)₂)を、第3のペプチドリッカーにより2つのscFvユニットを連結して製造することができる(例えば、Kuruczら1995)。

【0044】

二重特異性ダイアポディーは、短いリンカーにより別の抗体のV_Lドメインを連結したある抗体のV_Hドメインから成る二本単鎖融合産物の非共有結合により製造することができる(例えば、Kipriyanovら1998)。このような二重特異性ダイアポディーの安定性を、上記のジスルフィド架橋又は「穴の中のノブ(knob in hole)」突然変異の導入によって、又は2つのハイブリッドscFv断片がペプチドリッカーによって結合している単鎖ダイアポディ(scDb)を形成することによって、向上させることができる(例えば、Kontermannら1999)。

四価の二重特異性分子は、scFv断片を、ヒンジ領域を介して、IgG分子のCH₃ドメイン又はFab断片に融合させることにより、作ることができる(例えば、Colomaら1997)。あるいは、四価の二重特異性分子は、二重特異性単鎖ダイアポディを融合することによって作ることができる(例えば、Altら1999)。また、より小さい四価二重特異性分子を、ヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフを含むリンカーを有するscFv-scFvのタンデム(例えば、Mullerら、1998を参照DIBIのミニ抗体)又は4つの抗体可変領域(V_LとV_H)を含む単鎖分子のいずれかを、分子内のペアリングを防止する方向で、二量体化することにより形成することができる(タンデムダイアポディ、例えば、Kipriyanovら1999)。

二重特異性F(ab')₂断片を、Fab'断片の化学結合により、又はロイシンジッパーを介するヘテロ二量化により、形成することができる(Shalabyら1992、Kostelnyら1992)。また、分離されたV_LドメインとV_Hドメインも有効である(米国特許第6172197号、第6248516号及び第6291158号)。

【0045】

本発明はまた、本発明の抗体の機能的等価物を含む。本明細書で使用される「機能的等価物」は、抗体に対していうように、所定の抗体の結合特性に匹敵する結合特性を有する分子のことをいう。いくつかの実施態様では、キメラ抗体、ヒト化抗体、及び単鎖抗体、ならびにそれらの断片は、それらの基礎となっている、対応する抗体の機能的等価物とみなされる。いくつかの実施態様では、本発明は、本明細書に開示されるTAB-004モノクローナル抗体の機能的等価物を提供する。

機能的等価物はまた、本発明の抗体の可変又は超可変領域のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。本明細書で使用される核酸及び/又はア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列に関して、「実質的に同一」とは、Pearson & Lipman, 1998に従ったFASTA検索方法によって決定され、いくつかの実施態様では、少なくとも80%、いくつかの実施態様では、少なくとも85%、いくつかの実施態様では、少なくとも90%、いくつかの実施態様では、少なくとも91%、いくつかの実施態様では、少なくとも92%、いくつかの実施態様では、少なくとも93%、いくつかの実施態様では、少なくとも94%、いくつかの実施態様では、少なくとも95%、いくつかの実施態様では、少なくとも96%、いくつかの実施態様では、少なくとも97%、いくつかの実施態様では、少なくとも98%、いくつかの実施態様では、約99%、他の核酸及び/又はアミノ酸配列と同一である配列のことをいう。いくつかの実施態様では、同一性パーセントの計算は、本発明の抗体の核酸及び/又はアミノ酸配列の全長にわたって行われる。

10

【0046】

いくつかの実施態様では、塩基配列の機能的等価物は、同一のアミノ酸配列をコードする配列である（すなわち、1又はそれ以上の機能的に等価なコドンを含む。）。機能的に等価なコドンの一覧を表1に示す。

【表1】

機能的に等価なコドン	
アミノ酸	コドン
アラニン (Ala 又は A)	GCA; GCC; GCG; GCU
システイン (Cys 又は C)	UGC; UGU
アスパラギン酸 (Asp 又は D)	GAC; GAU
グルタミン酸 (Glu 又は E)	GAA; GAG
フェニルアラニン (Phe 又は F)	UUC; UUU
グリシン (Gly 又は G)	GGA; GGC; GGG; GGU
ヒスチジン (His 又は H)	CAC; CAU
イソロイシン (Ile 又は I)	AUA; AUC; AUU
リシン (Lys 又は K)	AAA; AAG
メチオニン (Met 又は M)	AUG
アスパラギン (Asn 又は N)	AAC; AAU
プロリン (Pro 又は P)	CCA; CCC; CCG; CCU
グルタミン (Gln 又は Q)	CAA; CAG
トレオニン (Thr 又は T)	ACA; ACC; ACG; ACU
バリン (Val 又は V)	GUA; GUC; GUG; GUU
トリプトファン (Trp 又は W)	UGG
チロシン (Tyr 又は Y)	UAC; UAU
ロイシン (Leu 又は L)	UUA; UUG; CUA; CUC; CUG; CUU
アルギニン (Arg 又は R)	AGA; AGG; CGA; CGC; CGG; CGU
セリン (Ser 又は S)	ACG; AGU; UCA; UCC; UCG; UCU

20

30

【0047】

いくつかの実施態様では、所定のアミノ酸配列の機能的等価物は、1又はそれ以上の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸である。保存的アミノ酸置換とは、同じクラスの別のアミノ酸の代わりにあるアミノ酸を用いることをいう（例えば、グリシンの代わりにバリンを用い、又はリジンの代わりにアルギニンを用いる）。プロウログアニリン及び/又はプロウログアニリン断片と機能的に同等なポリペプチドを、当業者に公知の技術によって、それをコードする核酸にランダム突然変異誘発を用いて製造することができる。しかし、このようなポリペプチドは、部位特異的突然変異誘発によって生成される（再度、当業者に公知の技術を使用して）。これらのポリペプチドは、機能性を増加させたりする機能が低下したりすることができる。

40

【0048】

50

機能的等価物はまた、本発明の抗体全体と同じ又は同等の結合特性を有する抗体の断片を含んでもよい。このような断片は、Fab断片の一方又は両方、 $F(ab')_2$ 断片、 $F(ab')$ 断片、Fv断片、又は少なくとも1つの抗原結合領域を含む他の断片を含んでもよい。いくつかの実施態様では、この抗体断片は、本発明の抗体全体の6つの全てのCDR（例えば、配列番号8-13のそれぞれを含むCDRから成る）を含む。但し、3つ、4つ、又は5つのCDRを含むように、このような全ての領域を含まない断片もまたここに規定する機能的等価物とすることができる。

さらに、機能的等価物は、免疫グロブリンの以下のクラス（即ち、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE、及びそのサブクラス、並びに、非哺乳動物患者（例えば、鶏などの鳥類に対するIGY）に適当な他のサブクラス）のいずれかの構成員であるか又はこの構成員と組み合わせることができる。

10

機能的等価物はまた、本発明の抗体全体と同じ又は同等の結合特性を有することを条件として、アプタマー及び他の非抗体分子を含む。

【0049】

いくつかの実施態様では、この抗体、その断片及びその誘導体は、ハイブリドーマ細胞株ATCC番号PTA-11550により産生されたモノクローナル抗体TAB-004、ならびにキメラ抗体又はその断片若しくは誘導体、ヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体、単鎖抗体又はその断片若しくは誘導体、そのFab断片、その $F(ab')$ 断片、そのFv断片、及びFab'断片から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、本発明の抗体、その断片及びその誘導体は、モノクローナル抗体TAB-004の結合特性を持つ。いくつかの実施態様では、本発明の抗体、その断片及びその誘導体は、モノクローナル抗体TAB-004の結合特性の少なくとも一部、いくつかのケースではその全てを持つ。いくつかの実施態様では、本発明の抗体、その断片及びその誘導体は、配列番号1～3のいずれかに存在する、いくつかの実施態様では、配列番号3に存在する、エピトープに結合する。

20

【0050】

本明細書において用いられる「TAB-004」は、「TAB-004」で表されるハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体（mAb）のことをいい、これは、2010年12月6日にATCC（American Type Culture Collection）、アメリカ合衆国バージニア州20110-2209、マナサス、ユニバーシティブールバード10801、に受託番号PTA-11550として寄託された。TAB-004は、ヒトムチン1（MUC1）ポリペプチド上に存在するエピトープに結合することが見出されたIgGアイソタイプのモノクローナル抗体（mAb）である。より詳細には、いくつかの実施態様では、TAB-004は、配列番号3に存在するエピトープに結合することができる。TAB-004自体は、配列番号8～13に開示されたCDR配列を含む。

30

【0051】

本明細書において用いられる「MUC1」は、次のように定義される分子のことをいう。MUC1は上皮ムチンファミリーの分子の一つである。MUC1は多くの上皮癌に広く発現しており、異常にグリコシル化され、非悪性細胞により発現されるものと比べて構造的及び抗原的に異なる（例えば、Barratt-Boyes, 1996; Priceら1998; Petersonら1991）。MUC1の主な形態は、多数の20アミノ酸タンデムリピート、膜貫通領域及び細胞質尾部を持つ、大きく高い免疫原性細胞のムチン様領域から成る高分子量分子である（例えば、Quinら2000; McGuckenら1995; Dongら1997）。

40

MUC1は、乳癌と膵臓を含むほとんどの上皮癌で、過剰発現し、異常にグリコシル化されている。乳房及び膵臓の腺癌は、MUC1を過剰発現するだけでなく、MUC1を循環させる。高MUC1血清レベルは、進行性の病気に関連付けられる。抗原内で発現されるエピトープが複雑かつ不均一性であるため、MUC1は、予測バイオマーカーとして開発されてきた。癌組織によって合成されるMUC1は、通常、異常なオリゴ糖プロファイルを示し、シアリル-LEA（CA19-9の試験で評価）、シアリルLex、及びシアリルTn（TAG-72）、並びにTnのような潜在性エピトープなどのネオマーカーの発現を引き起こす。

【0052】

50

また、低グリコシル化のため、このムチンのペプチドコアは、正常組織由来のMUC1内ではアクセスできないコア内のエピトープが潜在的なバイオマーカーとして機能するように、コア内のエピトープを露出させる。そのため、正常組織と悪性組織の違いは、悪性組織に対して高い特異性を示す明瞭なエピトープを提供することができる。現在、これらのエピトープのなかのいくつか用いた試験法が、CA15-3 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, United States of America)、CA 27-29 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, New York, United States of America)及びCA19-9 (Panomics Inc, Redwood City, California, United States of America)を含め、患者管理に使用するために商業形態で提供されている。これまでのところ、いずれも表2に示すように、おそらく、少なくとも部分的には、低い特異性のため、特別の診断価値を有するとは証明されていない。

10

【0053】
【表2】

様々な組織におけるMUC1の過剰発現を査定するために採用された評価*		
評価	MUC1が過剰発現している癌	MUC1が過剰発現している非癌状態
CA 15-5	乳、肺、卵巣、子宮内膜、膀胱、膵臓、胃腸	肝疾患（肝硬変、肝炎）、狼瘡、類肉腫、結核、非癌性乳房病変
CA 19-9	膵臓、結腸直腸、肝臓、胃及び胆管ツリー癌	胆管膵炎、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、胆管の炎症又は閉塞
CA 27-29	乳房、結腸、胃、肝臓、肺、膵臓、卵巣、前立腺癌	卵巣嚢胞、肝臓及び腎臓疾患、非癌性の乳房疾患

20

* Perkins ら2002から

最近、膵臓癌に対して高い感度と特異性を有するため、PAM4として知られている別のMUC1抗体の膵臓癌の診断での使用が注目されているが、乳癌及び卵巣癌などの他の上皮癌に対しては感度と特異性は高く無い(Goldら2007)。

【0054】

正常な上皮組織では、MUC1は細胞の先端領域に局在している。悪性形質転換の結果、遺伝子増幅及び/又は転写活性化の増大によりMUC1は増加し、細胞表面のMUC1の分布はもはや先端領域に限定されない(Bieche & Lidereau, 1997)。MUC1の機能はまだ解明を待っている状態だが、MUC1の高い細胞質発現は、乳癌及び/又は卵巣癌患者の予後不良に関連付けられている。

30

MUC1はまた、細胞接着、細胞シグナリング、及び免疫応答に役割を果たすことが実証されている(Quinら2000; McGuckenら1995; Dongら1997; Hendersonら1998)。ヒトのMUC1遺伝子産物のアミノ酸配列の非限定的な例としては、配列番号1に示されている。他の種のMUC1遺伝子産物の塩基配列及びアミノ酸配列には、GENBANK(R) アクセション番号 AAA39755、Q02496、及びNP_038633 (マウス)、NP_036734 (ラット)、NP_001181906 (イヌ)、AAO63589 (ブタ)、及びNP_776540 (ウシ)等がある。

さらに、TAB-004がK-rasポリペプチドに結合し、特に、変異K-rasのポリペプチドに結合することが測定された。本明細書において用いられる「K-ras」は、K-ras癌遺伝子及びその遺伝子産物のことをいう(Kahnら1987参照)。典型的なK-ras遺伝子産物は、GenBank(R)アクセション番号NP_004976に対応する配列番号2として開示されたものを含むが、これに限定されないヒトK-ras遺伝子産物である。

40

【0055】

本明細書において用いられる「K-ras」は、またK-rasの変異形態を包含する。本明細書において用いられる「変異K-ras」、「変異K-rasポリペプチド」及び「変異K-rasタンパク質」は、互換的に使用され、配列番号2と比較して少なくとも一つのK-ras変異を含むK-rasポリペプチドのことをいう。いくつかの実施態様では、変異K-rasポリペプチドは、その成熟ポリペプチドの12又は13番目のアミノ酸(すなわち、この成熟ポリペプチドは配列番号2の1番目のメチオニンを含まないので、配列番号2の13又は14番目のア

50

ミノ酸)の変異を含む。いくつかの実施態様では、変異K-rasのポリペプチドは、グリシン-12のセリンへの変異(以下「G12S」という。)、G12V、G12D、G12A、G12C、G13A、及びG13Dのなかから選択される突然変異から成る。本願発明の抗体が部分的に結合する変異K-ras^{G12D}ポリペプチドの代表例は、配列番号2に示され、カーンの論文に記載されている(Kahnら1987)。いくつかの実施態様では、本発明の抗体、その断片及びその誘導体は、G12D変異を含むK-rasポリペプチド(以下、「変異K-rasG12D」又は「K-ras^{G12D}」という。)の一部に結合する。追加の例示的な変異K-rasのポリペプチドとしては、対立遺伝子変異体、スプライス変異体、誘導変異体、置換変異体、欠失変異体、挿入変異体、融合ポリペプチド、オルソログ、及び種間相同体を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、変異K-rasのポリペプチドは、C-又はN-末端に1又はそれ以上の追加の残基を含むことができる。この追加の残基には、リーダー配列残基、標的残基、アミノ末端メチオニン残基、リジン残基、タグ残基、及び/又は融合タンパク質残基が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0056】

II B . 本発明の抗体、その断片、及び/又はその誘導体から成る組成物

本発明はまた、ここに開示した抗体、その断片及び/又はその誘導体から成る組成物を提供する。本発明の例示的な組成とその例示的使用法の概略図を図6に示す。

いくつかの実施態様では、本発明の組成物は、本明細書に開示される抗体、その断片、及び/又はその誘導体と、1又はそれ以上の薬学的に許容される担体及び/又は賦形剤を含む。いくつかの実施態様では、この担体及び/又は賦形剤は、ヒトでの使用を薬学的に許容されたものである。適当な調合物は、抗酸化剤、緩衝液、静菌、殺菌性抗生物質、及び意図している受容者の体液と等浸透圧の調合物にする溶質を含むことのできる水性及び非水性の無菌注射液、並びに懸濁剤及び増粘剤を含むことのできる水性及び非水性滅菌懸濁液を含む。この調合物は、例えば、密封アンプル及びバイアルのような、単位用量又は複数用量の容器に入れて提供することができ、かつ凍結又は凍結乾燥(凍結乾燥)状態で保存することができ、使用する直前に、注射用水のような滅菌液体担体の添加のみを必要とする。いくつかの例示的な成分は、いくつかの実施態様では0.1~10 mg/mlの範囲、いくつかの実施態様では約2.0 mg/mlの範囲の、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、及び/又は、いくつかの実施態様では10~100 mg/mlの範囲、いくつかの実施態様では約30 mg/mlの範囲の、マンニトール又は他の糖類、及び/又はリン酸緩衝食塩水(PBS)である。また、問題の調合物の種類を考慮して当該技術分野で通常使われる他のいかなる薬剤をも使用することができる。

20

30

【0057】

本発明の組成物はまた、活性剤を含んでもよく、この活性剤は治療部分、診断部分、及び/又は生物学的活性成分を含む。本明細書において用いられる「活性剤」は、患者に治療上の利点を提供し、本発明の組成物が蓄積する細胞又は組織を可視化できるようにし、本発明の抗体、その断片及び誘導体が結合するエピトープを検知できるようにし、及び/又はこれらの活性を促進するような本発明の組成物の成分のことをいう。いくつかの実施態様では、本発明の活性剤は、放射性分子(放射性核種及び放射性同位元素を含むが、これらに限定されない)、増感剤分子、イメージング剤又は他の検出可能な薬剤、毒素、細胞毒、抗血管新生剤、抗腫瘍剤、化学療法剤、免疫調節剤、サイトカイン、レポーター基、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される。これらのカテゴリは、相互に排他的であることを意図していないと理解されたい。例えば、ある放射性分子は化学療法剤でもあり、ある免疫調節剤はサイトカインでもある等。

40

【0058】

いくつかの実施態様では、活性剤は化学療法剤から成る。様々な化学療法剤は、当業者に公知であり、以下のものを含むがこれらに限定されない: ナイトロジェンマスタード(例えば、クロラムブシル、シクロホスファミド、イソファミド(Isosfamide)、メクロレタミン、メルファラン、ウラシルマスタード)、アジリジン(例えば、チオテパ)、メタン

50

ロムスチン、ストレプトゾシン)、白金錯体(例えば、シスプラチン、カルボプラチン)、及び生体内還元アルキル化剤(例えば、マイトマイシンC、プロカルバジン)などのアルキル化剤;DNA鎖破壊剤(例えば、ブレオマイシン);DNAトポイソメラーゼI阻害剤(例えば、カンプトテシン及び10-ヒドロキシカンプトテシンを含むがこれらに限定されないその誘導体)、DNAトポイソメラーゼII阻害剤(例えば、アムサクリン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトキサントロン、エトポシド、テニポシド、ポドフィロトキシン);DNAマイナーグループ結合剤(例えば、プリカマイシン);葉酸拮抗薬などの抗代謝産物(例えば、メトトレキサート及びトリメトレキサート)、ピリミジン拮抗剤(例、フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、CB3717、アザシチジン、シタラビン、フロクスウリジン)、プリンアンタゴニスト(例えば、メルカプトプリン、6-チオグアニン、フルダラビン、ペントスタチン)、糖修飾類似体(例えば、シクトラビン、フルダラビン)、及びリボヌクレオチド還元酵素阻害剤(例えば、ヒドロキシウレア);チューブリン相互作用剤(tubulin intractable agent)(例えば、ビンクリスチン、ピンブラスチン、パクリタキセル);副腎皮質ホルモン(adrenal corticosteroid)(例えば、プレドニゾン、デキサメタゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン);エストロゲン及び関連化合物(例えば、エチニルエストラジオール、ジエチルステルベストロール、クロロトリアニセン、ジエネストロール)、プロゲスチン(例えば、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、メドロキシプロゲステロン、メゲステロール)、アンドロゲン(例えば、テストステロン、プロピオン酸テストステロン、フルオキシメステロン、メチルテストステロン)、黄体形成(Leutinizing)ホルモン放出ホルモン剤及び/又は性腺刺激ホルモン放出ホルモン拮抗薬(例えば、酢酸リュープロリド、酢酸ゴセレリン)、抗エストロゲン剤(例えば、タモキシフェン)、抗アンドロゲン剤(例えば、フルタミド)、及び抗副腎剤(例えば、ミトタン、アミノグルテチミド)。などのホルモン遮断剤。他の化学療法剤としては、タキソール、レチノイン酸及びその誘導体(例えば、13-シス-レチノイン酸、オールトランスレチノイン酸、及び9-シス-レチノイン酸)、スルファチアゾール、マイトマイシンC、ミコフェノール酸、スルファジメトキシン、及びゲムシタピン(4-アミノ-1-(2-デオキシ-2,2-ジフルオロ-β-D-エリスロ-ペントフラノシル)ピリミジン-2(1H)-オン-2,2'-ジフルオロ-2'-デオキシシチジン)等があるが、これらに限定されない

10

20

【0059】

いくつかの実施態様では、活性剤は抗血管新生剤から成る。様々な抗血管新生剤は、当業者に公知であり、血管内皮増殖因子(VEGF)ファミリーとその受容体(例えば、ペバシズマブやその他の抗血管内皮増殖因子(VEGF)抗体)の阻害剤及び/又はアンタゴニスト、並びにニューロピリン-1アンタゴニストを含むがこれらに限定されない。

30

【0060】

いくつかの実施態様では、本発明の組成物は、付加的なアジュバント及び/又は免疫調節剤と共に使用することができる。本明細書において用いられる「免疫調節剤(immune modulating agent又はimmunomodulating agent)」は、免疫応答を調節することのできる分子のことをいう。典型的な免疫調節剤は、サイトカイン(サイトカインIFN-、IFN-、IL-2、IL-4、IL-6、TNF、及び免疫細胞に影響を及ぼすその他のサイトカインを含むがこれらに限定されない)、樹状細胞活性剤として機能するCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)(Rothenfusserら2002)、及び表3に記載された免疫調節剤を含むがこれらに限定されない。

40

【0061】

【表3】

典型的免疫調節剤*	
標的	調節剤
インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO)	1MT; MTH-Trp
アルギナーゼ (ARG)	ABH; BEC
誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)	L-NMMA
ARG/iNOS	NCX-4016
COX-2	セレコキシブ、ロフェコキシブ
EP2/EP4	CP-533536
TGFβRI	SB-505124; SD-505124; LY580276
JAK/STAT	JSI-124; CPA-7
VEGFR1/FLT1	SU5416; AG-013736
CCR4	IC-487892
CXCR4	AMD3100
CCR2	INCB3344

* Muller & Scherle, 2006とその引用文献を参照されたい。MTH-TRP：メチルチオヒダントイン-トリプトファン； ABH：2(S)-アミノ-6-ボロノヘキサン酸； BEC：S-(2-ボロノエチル)-L-システイン； L-NMMA：L-N^G-モノメチルアルギニン； NCX-4016：ニトロアスピリン； Emanueliら2004参照； CP-533536：Cameronら2009参照； SB-505124：DeCosta Byfieldら2004参照； SD-505124：Muller & Scherle, 2006参照； LY580276：Sawyerら2004参照； JSI-124：Blaskovich, 2003参照； CPA-7：Littlefieldら2008参照； SU5416：Fongら1999参照； AG-013736（アキシチニブ）：Rugoら2005参照； IC-487892：ICOS Corp., Bothell, Washington, United States of America； AMD3100：Donzellaら1998参照。

【0062】

治療への応用については、治療有効量の本発明の組成物を患者に投与する。「治療有効量」とは、測定可能な生物学的な腫瘍応答（免疫賦活、抗血管新生応答、細胞傷害性応答、腫瘍退縮、及び/又は腫瘍成長阻害が挙げられるが、これらに限定されない。）を作りだすのに十分な化合物の量である。本発明の組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、特定の患者に所望の治療応答を達成するのに有効な活性剤の量を投与するように変化させることができる。選択された投与量レベルは、組成物の活性、処方、投与経路、他の薬や治療法との組み合わせ、腫瘍の大きさと寿命、及び治療対象の患者の健康状態と治療歴などの様々な要因に依存するであろう。本発明のいくつかの実施態様では、最小限の量が投与され、そして用量制限毒性が存在しない場合に投与量を上げる。治療上有効な投与量の決定と調整並びにいつ又はどうやってこのような調製を行うかについては、医学分野の当業者に公知である。

【0063】

診断への応用については、本発明の組成物の検出可能な量が患者に投与される。本明細書において組成物について用いられる「検出可能な量」は、組成物の存在がインビボ又はインビトロで決定することができるような組成物の投与量のことをいう。検出可能な量は、標識されている組成物の化学的性質、検出可能な標識、標識法、イメージング法及びそれに関連するパラメータ、患者における標識された薬物の代謝、標識の安定性（放射性核種標識の半減期を含むがこれらに限定されない）、その化合物の投与後からイメージング前までの時間、投与経路、患者の体調や治療歴、腫瘍又は疑いのある腫瘍の大きさと寿命を含むがこれに限定されない様々な要因によって異なります。従って、検出可能な量は、特定の応用に合わせて変わりうるし、また調整することができる。本発明の研究の後、このような検出可能な量を決定することは、当業者の技術範囲内である。

【0064】

本明細書において用いられる「検出可能な部分」、「検出可能な標識（又はラベル）」及び「検出可能な薬剤」は、抗体又はその断片若しくは誘導体に添加することができる任意の部分により検出することができ、インビトロ及び/又はインビボで抗体又はその断片

若しくは誘導体の検出を可能にする如何なる分子のことをいう。代表的な検出可能な部分としては、いくつかの実施態様では、発色団、蛍光部分、酵素、抗原、特異的な反応性を有する基、化学発光部分、及び電気化学的に検出可能な部分等があるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様では、抗体はビオチン化される。

【0065】

いくつかの実施態様では、検出可能な部分はフルオロフォアから成る。フルオロフォアの抱合が、インビボ（例えば、患者への投与後）又はインビトロのいずれかで検出可能な化合物をもたらし、その抗体又はその断片若しくは誘導体はそのエピトープに結合することを妨げない限り、任意のフルオロフォアを本発明の組成物で用いることができる。代表的なフルオロフォアは、以下のものを含むがこれらに限定されない：7-ジメチルアミノクマリン-3-カルボン酸、塩化ダンシル、ニトロベンゾジアゾールアミン（NBD）、ダブル塩化物、桂皮酸、フルオレセインカルボン酸、ナイルブルー、テトラメチルカルボキシローダミン、テトラエチルスルホローダミン、5-カルボキシ-X-ローダミン（5-ROX）、及び6-カルボキシ-X-ローダミン（6-ROX）。これらの代表的なフルオロフォアは単なる例示であることが理解されるべきで、これら以外のフルオロフォアを使用することもできる。例えば、Alexa Fluor(R)色素シリーズは、少なくとも19種類の異なる発光スペクトルで特徴づけられる異なる色素を含む。これらの色素は、Alexa Fluor(R)350、405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、635、647、660、680、700、750（インビトロgen Corp., Carlsbad, California, United States of Americaから入手可能）を含み、どの色素を用いるかの選択は、当業者が本明細書を考慮した後で以下の基準に従って行うことができる。この基準として、特定のAlexa Fluor(R)の化学組成、複数の検出可能な部分を用いるかどうか、それぞれの発光スペクトル、採用する検出技術などがあるが、これらに限定されない。

【0066】

いくつかの実施態様では、検出可能な部分はシアニン色素から成る。本発明の抗体、その断片及び/又はその誘導体に抱合することのできるシアニン色素の非限定的な例としては、コハク酸イミドエステルCy5、Cy5.5、及びCy7（Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, United States of Americaにより提供）が挙げられる。

いくつかの実施態様では、検出可能な部分は近赤外（NIR）色素から成る。本発明の抗体、その断片及び/又はその誘導体に抱合することのできる近赤外（NIR）色素の非限定的な例としては、NIR641、NIR664、NIT7000、及びNIT782が挙げられる。

いくつかの実施態様では、ビオチン化抗体は、アビジン又はストレプトアビジン基を含む二次抗体を用いて検出され、Cy3、Cy5、Cy7及びインビトロGEN(R)（Carlsbad, California, United States of America）から入手可能なAlexa Fluor(R)シリーズのいずれかの蛍光標識を含むがこれらに限定されない蛍光標識に抱合する。いくつかの実施態様では、この抗体又はその断片若しくは誘導体は、直接蛍光標識で標識され、この抗体に結合する細胞は、蛍光活性化細胞の選別により分離される。追加の検出戦略は、当業者に知られている。

【0067】

診断への応用（検出用途及びイメージング用途を含むがこれらに限定されない）については、本発明の抗体は、検出可能な部分で標識することができる。検出可能な部分は、直接的又は間接的に、検出可能なシグナルを生成することができる任意のものであってよい。例えば、検出可能な部分は、次のような放射性同位体であってもよい。³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²⁵I、又は¹³¹I；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、又はルシフェリンを含むがこれらに限定されない蛍光又は化学発光化合物；アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、又は西洋ワサビペルオキシダーゼを含むがこれらに限定されない酵素であってもよい。

【0068】

本発明はさらに、腫瘍サンプル又は生検材料をインビトロで評価する、腫瘍を診断するための方法を提供する。いくつかの実施態様では、本発明の標的リガンドは、蛍光標識、

10

20

30

40

50

エピトープタグ、又は放射性標識などの検出可能な標識から成り、以下これらを簡単に記載する。

【 0 0 6 9 】

蛍光 任意の検出可能な蛍光色素を使用することができ、この蛍光色素として以下のものが挙げられるがこれらに限定されない：フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、LUOR X(R)、Alexa Fluor(R)、オレゴングリーン(R)、テトラメチルローダミン(TMR)、X-ローダミン(ROX)、テキサスレッド(R)、BODIPY(R)630/650、及びCy5 (Amersham Pharmacia Biotech of Piscataway, New Jersey, United States of America, 又はMolecular Probes Inc. of Eugene, Oregon, United States of Americaから入手可能)。

蛍光標識は、使用する特定の標識に合った発光及び吸収スペクトルを用いて直接検出することができる。共通の研究設備が蛍光のインピット検出のために開発された。この設備として、GSI Lumonics (Watertown, Massachusetts, United States of America) 及び Genetic MicroSystems Inc. (Woburn, Massachusetts, United States of America)から入手可能な設備が挙げられる。このような商用システムの大部分は、いくつかの形態の、光電子増倍管検出装置を備えたスキャン技術を使用する。蛍光サンプルの分析検討のための基準はAlexayら1996の論文に要約されている。

【 0 0 7 0 】

エピトープタグの検出 エピトープラベルを使用する場合は、エピトープを検出するために、エピトープに結合するタンパク質又は化合物を用いることができる。代表的なエピトープのラベルは、ビオチンであり、これは、例えば、アビジン-FITCのようなアビジン抱合フルオロフォアの結合によって検出することができる。代替として、このラベルは、アビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)ストレプトアビジン抱合体の結合と、これに続くHRP酵素産物の比色検出により、検出することができる。比色又は発光産物/複合体の形成は、それぞれ分光光度計又は照度計を用いて測定できる。

【 0 0 7 1 】

オートラジオグラフィ検出 放射性標識(例えば、 ^{131}I 又は $^{99\text{m}}\text{Tc}$)の検出は、当業者に知られているように、従来のオートラジオグラフィ又はホスホイメージャを用いて行うことができる。好ましいオートラジオグラフィ法では、輝尽性発光イメージングプレート(Fuji Medical Systems of Stamford, Connecticut, United States of America)を用いる。簡単に言えば、輝尽性発光は、スキャン中にレーザーにより刺激後に照射された燐プレートから放出される光の量である。このプレートの発光応答は、その活性に比例する(Amemiyaら1988; Hallahanら2001a)。

検出可能な部分に抗体を抱合させるために、任意の当技術分野で公知の方法を使用できる(Hunterら1962; Davidら1974; Painら1981; 及び Nygren, 1982. 参照)。

【 0 0 7 2 】

薬物担体 本発明の組成物は、薬剤の製造と管理を容易にするために、更に薬物担体を含んでもよい。任意の適切な薬物送達ビヒクル又は担体を使用でき、以下のものが挙げられるがこれらに限定されない：遺伝子治療ベクター(例えば、ウイルスベクター又はプラスミド)、マイクロスフェア又はナノスフェアなどのマイクロカプセル(Manomeら1994; Hallahanら2001b; Saltzman & Fung, 1997)、ペプチド(米国特許第6127339号及び同第5574172号)、グリコサミノグリカン(米国特許第6106866号)、脂肪酸(米国特許第5994392号)、脂肪乳剤(米国特許第5651991号)、脂質又は脂質誘導體(米国特許第5786387号)、コラーゲン(米国特許第5922356号)、多糖類又はその誘導體(米国特許第5688931号)、ナノ懸濁液(米国特許第5858410号)、高分子ミセル又は抱合体(Goldmanら1997; 米国特許第4551482号、同第5714166号、同第5510103号、同第5490840号、及び同第5855900号)、及びポリソーム(米国特許第5922545号)。

【 0 0 7 3 】

ターゲティングリガンドの抱合 抗体又はその断片若しくは誘導體を、当技術分野で公知の方法を用いて、薬物や薬物担体に結合してもよい。その方法として以下が挙げられるがこれらに限定されない：カルボジイミド抱合、エステル化、過ヨウ素酸ナトリウムの酸

10

20

30

40

50

化に続く還元的アルキル化、及びグルタルアルデヒド架橋(Goldmanら1997; Cheng,1996; Neriら1997; Nabel,1997; Parkら1997; Pasqualiniら1997; Bauminger & Wilchek,1980; 米国特許第6071890号; 及びEP特許第0439095号参照)。

【0074】

投与 本発明の組成物の投与に適した方法としては、血管内、皮下、筋肉内及び腫瘍内投与が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの実施態様では、血管内投与が用いられる。本明細書において用いられる「血管内投与」及び「血管内供給」は、組成物を患者の血管網へ直接投与することをいう。組成物の血管内投与のために用いることができる技術は、当業者によく知られており、静脈内投与及び動脈内投与が挙げられるがこれらに限定されない。血管内投与のための任意のサイトや任意の方法が、組成物が投与される被験者の種に少なくとも部分的に依存することは理解されたい。肺経路へ組成物を送達するために、組成物をエアロゾル又は粗いスプレーとして投与することができる。

10

【0075】

III. 生体試料中のエピトープを検出するための方法

本発明の抗体及び/又はその断片及び/又はその誘導体はまた、インビボイメージングに有用であり、放射線不透過剤及び/又は放射性同位元素として検出可能な部分で標識された抗体が、いくつかの実施態様では静脈内投与を介して、患者に投与され、患者中のこの標識化された抗体の存在とその位置が分析される。このイメージング技術は、悪性腫瘍の病期分類と治療に有用である。

従って、いくつかの実施態様において、本発明の組成物は、インビボで検出することができる標識を含む。本明細書においてイメージング又は検出方法を説明するために用いられる「インビボ」は、シンチグラフィ法、磁気共鳴イメージング、超音波、又は蛍光(これらは以下に簡単に説明される。)などの一般的非侵襲的な方法のことをいう。この「非侵襲的な方法」は、インビボイメージングを容易にするために造影剤の投与を用いる方法を排除するものではない。

20

いくつかの実施態様では、この検出可能な部分は、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体、上記の治療薬、診断薬、薬物担体、又はこれらの組み合わせと結合又はその他の方法で結びつけてよい。患者への標識組成物の投与に続いて、結合のための十分な時間の後、この組成物の生体内分布を可視化することができる。この「結合のための十分な時間」は、標識された薬剤を放射線誘導標的分子に結合させる時間のことをいう。

30

【0076】

シンチグラフィイメージング シンチグラフィイメージング法として、SPECT(シングルフォトンエミッションCT)、PET(陽電子放射断層撮影)、ガンマカメライメージング、及び直線スキャニングが挙げられる。ガンマカメラ及び直線スキャナーは、単一の平面で放射能を検出する器具である。ほとんどのSPECTシステムは、分析の対象である患者を中心に回転する1又はそれ以上のガンマカメラを使用し、複数の次元の放射能を統合することに基づく。PETシステムも複数の次元の放射能を検出するリング内の一連の検出器で構成される。本発明の検出方法及び/又はイメージング方法を行うために適したイメージング装置、及びそれを用いるための指示書は、商業的供給源から容易に入手可能である。PETとSPECTシステムはいずれもADAC of Milpitas, California, United States of America, 及びSiemens of Hoffman Estates, Illinois, United States of America. より提供されている。また、共通のソースのフォーカスを持つコリメート構造を備えた複数のセンサを含む放射性イメージングデバイスなどの、シンチグラフィイメージングのための関連機器を用いてもよい。

40

シンチグラフィイメージングを用いる場合には、検出可能な標識は、放射性核種の標識を含む。いくつかの実施態様では、放射性核種は、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{65}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}Br 、 ^{80}mBr 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{126}I 、 ^{131}I 、 ^{133}I 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Re}$ 、 ^{105}Re 、 ^{101}Re 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{165}Tm 、 1

50

^{67}Tm 、 ^{168}Tm 、及びこれらから誘導される窒化物又は酸化物の形態から成る群から選択される。いくつかの実施態様では、放射性核種は ^{131}I 又は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ から成る。

【0077】

本発明の方法に従って使用されるような、分子の放射性核種標識のための方法は、当技術分野で公知である。例えば、標的分子を、放射性同位元素がそれに直接結合することができるように誘導することができる (Yooら1997)。あるいは、抱合を可能にするためにリンカーを付加することができる。代表リンカーとして、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) - イソチオシアネート、スクシンイミジル6ヒドラジニウムニコチン酸塩酸塩 (SHNH)、及びヘキサメチルプロペンアミノキシムが挙げられる (HMPAO; Chattopadhyayら2001; Sagiuchiら2001; 及び米国特許第6024938号)。付加の方法は米国特許第6080384号、Hnatowichら1996及びTavitianら1998に記載されている。

標識部分が放射性核種である場合、放射線分解による損傷を防止又は最小限に抑えるために、アスコルビン酸、ゲンチシン酸、又は他の適切な酸化防止剤などの安定剤を、標識された標的分子を含む組成物に添加することができる。

【0078】

磁気共鳴イメージング (MRI) 磁気共鳴イメージング技術は、特有の化学的環境下における水プロトンの相対的緩和率に基づいてイメージを作成する。本明細書において用いられる「磁気共鳴イメージング」は、コンベンション磁気共鳴イメージング、磁化転送イメージング (MTI)、プロトン磁気共鳴分光法 (MRS)、拡散強調イメージング (DWI) 及び機能的MRイメージング (fMRI; Rovarisら2001; Pomper & Port, 2000; 及びこれらに含まれる引用文献を参照) などの、磁気ソース技術のことをいう。

磁気ソースイメージングのための造影剤としては、常磁性又は超常磁性イオン、鉄酸化物粒子 (Weisslederら1992; Shenら1993) 及び水溶性造影剤が挙げられるが、これらに限定されない。常磁性及び超常磁性イオンは、鉄、銅、マンガン、クロム、エルビウム、ユウロピウム、ジスプロシウム、ホルミウム、ガドリニウムを含む金属から成る群から選択されることができる。好ましい金属は、鉄、マンガン、ガドリニウムであり、最も好ましいのはガドリニウムである。

診断ラベル分野の当業者は、金属イオンがキレート部分により結合し、それを、本発明の方法に従って、治療剤に抱合させることができることを認識している。例えば、ガドリニウムイオンは、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) によってキレート化される。ランタニドイオンはテトラアザシクロドデカン化合物によってキレート化される。米国特許第5738837号及び同第5707605号を参照されたい。代替として、造影剤は、リポソームで運搬される (Schwendener, 1992)。

磁気ソースを使用して誘導されたイメージは、超伝導量子干渉素子磁束計 (SQUID, Quantum Design, San Diego, California, United States of America、から指示書と共に入試可能である; また、米国特許第573883号も参照されたい。) を用いて得られることができる。

【0079】

超音波 腫瘍を含む標的組織の定量的及び構造情報を得るために、超音波イメージングを使用することができる。気体の微小気泡 (マイクロバブル) のような造影剤の投与は、超音波検査中の標的組織の可視化を向上させることができる。いくつかの実施態様では、この造影剤は、例えば、ここに開示される薬剤送達を誘導するためのペプチドを用いることにより (例えば、放射線誘導薬物送達)、対象の標的組織を選択的に標的とすることができる。インピボで微小気泡を提供するための代表的な薬剤としては、ガスを充填した親油性又は脂質の気泡が挙げられるがこれに限定されない (米国特許第6245318号、同第6231834号、同第6221018号及び同第5088499号)。更に、ガス又は液体を、患者に送達して微小気泡の放出を容易にする、多孔質無機粒子に閉じ込められることができる (米国特許第6254852号及び同第5147631号)。

【0080】

本発明での使用に適する気体、液体、及びこれらの組み合わせとしては、空気；窒素；酸素；二酸化炭素；水素；亜酸化窒素；ヘリウム、アルゴン、キセノン又はクリプトンなどの不活性ガス；六フッ化硫黄、二フッ化十硫黄、又は五フッ化トリフロロメチル硫黄などのフッ化硫黄；六フッ化セレン；テトラメチルシランのような任意にハロゲン化されたシラン；低分子量炭化水素（例えば、7個までの炭素原子を含む）、例えば、メタン、エタン、プロパン、ブタン又はペンタン等のアルカン、シクロブタン又はシクロペンタン等のシクロアルカン、プロペン又はブテン等のアルケン、又はアセチレンなどのアルキン；エーテル；ケトン；エステル；ハロゲン化低分子量炭化水素原子（例えば、7個までの炭素原子を含む）；又はこれらの任意の混合物が挙げられる。ハロゲン化炭化水素ガスは、長寿命を示すことができ、従って、いくつかの応用には好ましい。このグループの代表的なガスとして、デカフルオロブタン、オクタフルオロシクロブタン、デカフルオロイソブタン、オクタフルオロプロパン、オクタフルオロシクロプロパン、ドデカフルオロペンタン、ドデカフルオロシクロペンタン、ドデカフルオロイソペンタン、パーフルオロペンタン、パーフルオロシクロヘキサン、パーフルオロイソヘキサン、六フッ化硫黄、及びパーフルオロオクタン、パーフルオロノナン、任意に臭素化されたパーフルオロデカンが挙げられる。

10

親油性の気泡に標的リガンドを付加することは、標準的なタンパク質 - ポリマー又はタンパク質 - 脂質の付加方法に従って化学架橋剤を介して行うことができる（例えば、カルボジイミド（EDC）又はチオプロピオネート（SPDP）を介して）。ターゲティング効率を向上させるために、大きなガス充填気泡を、分枝又は直鎖の合成ポリマー（米国特許第6245318号）などの柔軟性スパーサーアームを使用して、標的リガンドに結合することができる。コーティング、吸着、成層、又は粒子の外表面を標的リガンドと反応させることにより、標的リガンドを多孔質無機粒子に付着させることができる（米国特許第6254852号）。

20

超音波装置及び超音波データセットを得るための技術的な方法の説明はCoatney2001やLees, 2001及びそこに記載された引用文献を参照されたい。

【0081】

蛍光イメージング 非侵襲的イメージング法は、蛍光標識の検出から成ることができる。親油性成分から成る薬剤（治療薬、診断薬、ベクター、又は薬物担体）を、インビボでのイメージングに適している様々な親油性染料のいずれかで標識することができる（Herdiaら1991；Ragnarsonら1992；Fraser, 1996参照）。代表的な標識としては、カルボシアニン、アミンスチリル染料、好ましくは長鎖ジアルキルカルボシアニン（例えば、Molecular Probes Inc. of Eugene, Oregon, United States of Americaから入手可能なDiI, DiO, 及びDiD）及びジアルキルアミノスチリル染料が挙げられるが、これらに限定されない。親油性の蛍光標識は、当業者に公知の方法を用いて組み込むことができる。例えば、VYBRANT(R)細胞ラベリング溶液は、培養細胞を他の親油性成分で標識するのに有効である（Molecular Probes Inc. of Eugene, Oregon, United States of America）。

30

蛍光標識はまた、Cy5.5及びCy5(Amersham of Arlington Heights, Illinois, United States of Americaから入手可能)、IRD41及びIRD700(Li-Cor, Inc. of Lincoln, Nebraskaから入手可能)、NIR-1(Dejindo of Kumamoto, Japanから入手可能)、LaJollaブルー(Diatron of Miami, Florida, United States of Americaから入手可能、Lichaら2000；Weisslederら1999；Vinogradovら1996参照)を含む、スルホンシアニン色素から成ってもよい。

40

更に、蛍光標識は、例えば、テルビウム及びユーロピウムのキレート（米国特許第5928627号）等のランタノイドイオン由来の有機キレートを含むことができる。このような標識は、そこに記載されているように、共役又は共有結合で薬剤にリンクすることができる。

蛍光標識のインビボ検出のために、使用する特定の標識に合った発光及び吸収スペクトルを使用して画像（イメージ）が作成される。この画像は、例えば、拡散光分光法により、可視化することができる。追加の方法及びイメージングシステムは、米国特許第5865754号、同第6083486号及び同第6246901号その他に記載されている。

【0082】

50

IV. 腫瘍を検出する方法及び腫瘍を治療する方法

いくつかの実施態様では、本発明の抗体、その断片及び/又はその誘導体は、腫瘍のインビボイメージングのために使用され、放射線不透剤、放射性同位元素、又は他の造影剤等のイメージング部分で標識された本発明の組成物を患者に投与し、患者中の検出可能に標識された組成物の存在と位置を測定する。このイメージング技術は、悪性腫瘍の病期分類と治療に有用でありうる。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、核磁気共鳴、放射線、又は当技術分野で公知の他の検出方法によって、患者でインサイチュで検出可能な任意の部分で標識される。

このように、本発明はまた、患者において腫瘍を検出するための方法を提供する。いくつかの実施態様において、本明細書に開示の方法は、(a)患者に、検出可能な標識と抱合した本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体から成る組成物を投与すること、及び(b)その検出可能な標識を検出し、それによって腫瘍を検出すること、から成る。いくつかの実施態様では、この腫瘍は、膵臓、乳房、卵巣、大腸又は直腸、及び/又はこれらから派生した転移細胞の腫瘍であって、必要に応じてMUC1、変異K-ras又はこれら両方を発現する。

【0083】

本発明のいくつかの実施態様では、検出可能な標識は、上記で詳細に述べたものを含むがこれに限定されない、常磁性イオン、放射性イオン及び蛍光性イオンから成る群から選択されるイメージング剤から成る。上記の開示の観点から、放射性造影剤は、例えば、
- 放射体、ポジトロン - 放射体、X線 - 放射体及びその他の検出方法に使用可能な薬剤であつてもよい。

代表的な放射性イメージング剤としては、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}Br 、 ^{81}Rb / $^{81\text{m}}\text{KR}$ 、 $^{87\text{m}}\text{Sr}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{132}I 、 ^{197}Hg 、 ^{203}Pb 及び ^{206}Bi が挙げられるが、本発明は、これらの放射性同位体のみに限られるものではない。

【0084】

本発明はまた、腫瘍を治療するための方法を提供する。いくつかの実施態様において、この方法は、患者に、活性剤に抱合した本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体を含む組成物を投与することから成り、それにより、活性剤が腫瘍に接触して、腫瘍を治療する。典型的な活性剤は、本明細書に開示され、治療剤、必要に応じて化学療法剤、毒素、放射性治療剤及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

例えば、本発明の組成物は、化学療法剤に抱合した抗体又はその断片若しくは誘導体から成つてもよい。いくつかの実施態様では、この化学療法剤は、抗腫瘍薬、サイトカイン、代謝拮抗剤、アルキル化剤、ホルモン、メトトレキサート、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、シトシンアラビノシド、エトポシド、5-フルオロウラシル、メルファラン、クロラムブシル、ナイトロジェンマスタード、シクロホスファミド、シスプラチン、ビンデシン、ピンカルカロイド、マイトマイシン、プレオマイシン、プロチオニン、マクロモマイシン、1,4-ベンゾキノ誘導体、トレニモン、ステロイド、アミノプテリン、アントラサイクリン、デメコルシン、エトポシド、ミトラマイシン、ドキシソルピシン、ダウノマイシン、ピンブラスチン、ネオカルチノスタチン、マクロマイシン(macromycin)、
- アマニチン、及びそれらの組合せから選択される。

【0085】

さらに、本発明の組成物は、毒素に抱合した抗体又はその断片若しくは誘導体から成つてもよい。典型的な毒素としては、ラッセル蛇毒、活性化第IX因子、活性化第X因子、トロンピン、ホスホリパーゼC、コブラ毒因子、リシン、リシンA鎖、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、ウシ隣リボヌクレアーゼ、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク、アブリン、アブリンA鎖、ゲロニン、サポリン、メデッシン(modeccin)、ビスキュミン、ボルケンシン、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

本発明の組成物はまた、放射線治療剤に抱合した抗体又はその断片若しくは誘導体から

10

20

30

40

50

成ってもよい。典型的な放射線治療剤としては、 ^{47}Sc 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{109}Pd 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{71}Ge 、 ^{77}As 、 ^{103}Pb 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{119}Sb 、 ^{121}Sn 、 ^{131}Cs 、 ^{143}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{177}Lu 、 ^{191}Os 、 $^{193\text{m}}\text{Pt}$ 及び ^{197}Hg が挙げられるが、これらに限定されない。

【0086】

本発明はまた、患者における腫瘍の成長を抑制するための方法を提供する。いくつかの実施態様では、この方法は、有効量の本願発明の抗体又はその断片若しくは誘導体を、腫瘍を有する患者に投与することをから成る。いくつかの実施態様では、この抗体又はその断片若しくは誘導体は、配列番号1～3のいずれか内に存在するエピトープに結合する。いくつかの実施態様では、この腫瘍は、脾臓、乳房、卵巣、大腸又は直腸、及び/又はこれらから派生した転移細胞の腫瘍であって、いくつかの実施態様では、MUC1、変異K-ras又はこれら両方を発現する。

本発明はまた、併用療法の一部として、ここに開示した組成物及び方法を含む。このように、本発明は、いくつかの実施態様では、患者に1又はそれ以上の追加の抗腫瘍治療を施すことを含む。典型的な抗腫瘍治療はとして、放射線治療、化学療法、追加免疫療法、抗炎症療法、及びこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

例えば、抗炎症療法は、患者に非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)を投与することから成ってもよいが、これに限定されない。典型的な非ステロイド性抗炎症薬としては、シクロオキシゲナーゼ阻害剤(例えば、インドメタシン)、特にセレコキシブ及びロフェコキシブのような、しかしこれに限定されない、シクロオキシゲナーゼ-2特異的阻害剤、が挙げられるが、これに限定されない。

併用療法はまた、患者に、ゲムシタピン(4-アミノ-1-(2-デオキシ-2,2-ジフルオロ-D-エリスロ-ペントフラノシル)ピリミジン-2(1H)-オン-2,2'-ジフルオロ-2'-デオキシシチジン)、セレコキシブ(4-[5-(4-メチルフェニル)-3-(トリフルオロメチル)ピラゾール-1-イル]ベンゼンスルホンアミド)、又はこれらの薬学的に許容される塩を投与すること等の、しかしこれらに限定されない1又はそれ以上の追加の抗腫瘍治療を施すことを含んでもよい。

併用療法はまた、本発明の組成物のいずれかを投与する前、その最中、及び/又はその後、患者に電離放射線を照射することを含んでもよい。

【0087】

治療への応用のために、本発明の抗体、その断片、その誘導体、及び/又はその抱合体を、例えば、その薬学的に許容される投与形態で、患者に投与することができる。これらは、一塊として又は一定の期間にわたる連続注入により静脈内に投与することができ、また筋肉内、皮下、関節内、関節滑液嚢内、髄腔内、経口、局所、又は吸入経路により投与することができる。この抗体及び/又はその抱合体はまた、必要に応じて、全身又は局所の治療効果を発揮するために、腫瘍内腫瘍周囲、病巣内、又は病変部周囲の経路に投与することができる。

適当な薬学的に許容される担体、希釈剤、及び/又は賦形剤はよく知られており、臨床的状況保証として当業者により採用されてもよい。適切な担体、希釈剤、及び/又は賦形剤の例としては、(1)ダルベッコのリン酸緩衝食塩液、pH約7.4、約1mg/ml～25mg/mlのヒト血清アルブミンを含む、(2)0.9%生理食塩水(0.9%(w/v)NaCl)、(3)5%(w/v)デキストロースが挙げられる。

凍結乾燥されているのではなく水性の剤形で存在する場合、この抗体は、典型的には、約0.1 mg/ml～100 mg/mlの濃度で、この範囲外の広範囲の変量が許容されるが、処方される。

処方及び投与形態に関する更なるガイダンスについては、米国特許第5,326,902号、同第5,234,933号；国際公開WO 1993/25521；Gennaro, 1990；Goodmanら1996；Berkowら1997；Speightら1997；Duchら1998；Ebadi, 1998；Katzung, 2001；Gennaro, 2003を参照され

10

20

30

40

50

たい。

【0088】

本発明の組成物及び方法は、インビトロ、インビボ、又はエックスビボで行うことができる。

本発明の組成物及び方法は、スクリーニング及び/又はMUC1若しくは変異K-rasの発現が上昇している癌の治療に使用することができる。このような癌の例としては、卵巣癌、乳癌、肺癌、膵臓、前立腺が挙げられるが、これらに限定されない。

病気の治療のために、本発明の抗体、その断片、その誘導体及び/又はその抱合体の適切な用量は、治療すべき疾患のタイプ、その疾患の重症度及び経過、この抗体及び/又はその抱合体が予防目的か又は治療目的で投与されているのかどうか、以前の治療経過、患者の臨床履歴及び抗体及び/又は抱合体への応答、並びに主治医の裁量に依存してもよい。本発明の抗体及び/又は抱合体は、一度に又はいくつかの若しくは多くの治療の過程で患者に投与してもよい。

10

【0089】

V. 腫瘍細胞とがん幹細胞を検出し、精製し、標的とする方法

本発明はまた、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体を用いて、患者に存在する又は患者から単離された腫瘍細胞、がん細胞又はこれらの両方を検出し、精製し、又は標的とする方法を提供する。いくつかの実施態様では、本発明は、癌を過去に持っていた又は現在持っている患者から単離された生物学的サンプル中の腫瘍細胞、がん細胞又はこれらの両方への、抗体又はその断片若しくは誘導体の結合を検出することにより、腫瘍細胞、がん細胞又はこれらの両方を検出する方法を提供する。この目的のために、検出可能な標識を採用したここに開示の組成物を用いることができる。

20

さらに、本発明は、癌幹細胞を精製するための方法を提供する。いくつかの実施態様において、本発明の方法は、(a)がん幹細胞を含むことが疑われる細胞集団を提供する段階、(b)(配列番号1)~3のいずれか内に存在するエピトープに結合する抗体又はその断片若しくは誘導体に結合するこの細胞の部分集団を特定する段階、及び(c)この部分集団を精製する段階から成る。精製方法について、いくつかの実施態様では、この細胞集団は、がんを有する患者から単離された循環細胞から成る。

【0090】

いくつかの実施態様では、この方法は、更に、この特定段階の前にこの細胞集団から細胞系陽性(lin^+)細胞を除去する段階を含む、又はこの精製された部分集団から細胞系陽性(lin^+)細胞を除去する段階を含む。細胞集団から細胞系陽性(lin^+)細胞を除去するための方法は、当技術分野で知られている。典型的な方法は次のとおりである：

30

単一細胞懸濁液を、患者から単離するか(例えば、血液、リンパ液、骨髄穿刺液などから)、又は組織から調製する。組織の場合、癌幹細胞の疑いのある組織(例えば、膵臓腺癌組織)からの切片を、機械的にホモジナイズし、37°Cで30分間コラゲナーゼIV及びDNaseで消化してもよい。腫瘍からの全血液及び単一細胞懸濁液を、Miltenyi Biotec社(Bergisch Gladbach, Germany)が販売するいくつかの種特異的細胞系除去(lineage cell depletion)キットの中のいずれかを用いて、細胞系除去(lineage cell depletion)にかける。これは、その細胞懸濁液から、細胞系抗原(CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123及びCD235a)を発現する細胞を除去する。その後、細胞系陰性亜集団から、フローサイトメトリーにより、例えば、モノクローナルTAB-004抗体を用いてMUC1を発現している細胞をスクリーニングすることができる。その様々な選択の段階は任意の順序で実行することができることを理解されたい。必要に応じて、幹細胞マーカーCD133(AC133)及び/又はCD24⁺/CD44⁺に対する抗体を用いてもよい。

40

【0091】

本発明はまた、活性剤を、患者の循環がん幹細胞を標的にする方法を提供する。いくつかの実施態様では、本発明の方法は、このがん幹細胞(任意に、循環がん幹細胞)を、本願発明の抗体又はその断片若しくは誘導体及び活性剤から成る組成物と接触させる段階から成る。この組成物は、癌幹細胞にこの活性剤を送達する。

50

ここに開示された活性剤のいずれも、本明細書に開示される組成物及び方法を採用することにより、癌幹細胞を標的とすることができる。いくつかの態様では、この活性剤は、治療剤、化学療法剤、毒素、放射性治療剤、又はそれらの組み合わせから成る。

例えば、いくつかの実施態様では、この治療剤は、免疫調節剤から成り、いくつかの実施態様では、この免疫調節は、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) 阻害剤 (例えば、1-メチル-DL-トリプトファン (1MT))、EP2/EP4受容体拮抗薬、CXCR4拮抗薬、血管内皮増殖因子受容体1アンタゴニスト、TGF R1アンタゴニスト、及び樹状細胞活性化剤野中の1又はそれ以上である。これらの免疫調節剤の非限定的な例は、上記の表3に示されている。

【0092】

10

VI. 患者における癌の再発及び/又は進行を予知するための方法

2010年の時点で、乳癌と膵臓癌は、癌関連死のそれぞれ3番目と4番目の主要な原因です。乳癌は女性の間で最も一般的に診断される癌です。一方、膵臓癌はあまり一般的ではないが、すべての癌の中で最悪の予後を持つ。膵臓癌の不十分な診断は、初期診断をしないことにより引き起こされ、その結果、より深刻な段階に進んでからこの疾患を診断することになる。マンモグラフィは乳がんの早期発見を顕著に改善したが、この欠点を改善するものではない。乳癌の20%は見逃されており、偽陽性の結果が出ると、不安を引き起こし、高価な追加診断を受けることになる。マンモグラフィ検診における特異性の欠如は、良性腫瘍の過剰診断と不必要な治療に導くことになる。

もう一つの懸念は、原発腫瘍が患者の遠隔部位へ転移することであり、この転移の存在は、通常予後不良に関係し、患者に施される治療の経過に大きな影響を与える。転移を検出するために用いることができる現在の方法としては、コンピュータ断層撮影 (CT)、陽電子放射断層撮影法 (PET) スキャン、磁気共鳴イメージング法 (MRI) などがある。これらの治療法は高価であり、個々人に潜在的に危険であり、特異性と感度を欠き、一般的に微小転移を検出することができない。

20

特定の薬物療法を適切に調整するためには、患者における再発のモニタリングが必要である。この目的のために、CA19-9、CA15-3及びCA27-29等の、しかしこれらに限定されない腫瘍抗原に対する血液に基づく検査を採用することができる。しかし、これらの検査はまた、がん以外の条件として、しばしば特異性を欠くので、これら及び他の推定腫瘍関連抗原の上昇に導くことになる可能性がある。これらのマーカーの発現レベルは、十分に癌が進行中である癌の初期段階で、症状が現れる前に癌を検知するためには、不適當に高い。初期段階でがんを検出するだけでなく、微小転移と再発を検出する手法の開発は、膵臓がんや乳がんの患者の結果を改善するために有益である。

30

【0093】

VI A. 癌の再発を予知するための方法

いくつかの実施態様では、本発明はまた、患者における癌の再発を予知するための方法を提供する。いくつかの実施態様では、本発明の方法は、(a) がんを有する患者から循環細胞を含む生物学的サンプルを単離する段階、(b) この生物学的サンプルを、1又はそれ以上の本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体と接触させる段階、及び(c) この生物学的サンプル中の、1又はそれ以上の本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体に結合する1又はそれ以上の循環細胞を特定する段階から成り、それによってこの患者のがんの再発が予知される。これらの方法に関して、この本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体に結合する循環細胞を特定したことは、患者が以前にこのような循環細胞に対して陰性であった場合に、患者の癌の再発の可能性を示す。いくつかの実施態様において、本発明の1又はそれ以上の抗体又はその断片若しくは誘導体に結合する循環細胞の存在は、このような循環細胞に対して陰性である患者が、転移性疾患の危険度が増した状態にあることを示す。

40

【0094】

VI B. 癌の進行を予知するための方法

本発明はまた、患者における癌の進行を予知するための方法を提供する。いくつかの実

50

施態様では、この方法は、がんを有する患者から循環細胞を含む生物学的サンプルを単離する段階、この生物学的サンプルを、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体が、この生物学的サンプル中に存在する、存在したとして、腫瘍及び/又はがん上に存在するエピトープと結合するに十分な条件下で、この抗体又はその断片若しくは誘導体と接触させる段階、及びこの生物学的サンプル中の、この抗体又はその断片若しくは誘導体に結合する1又はそれ以上の循環細胞を特定する段階から成り、それによってこの患者のがんの再発が予知される。いくつかの実施態様では、この生物学的サンプルは、血液サンプル、リンパサンプル又はそれらの部分から成る。いくつかの実施態様では、このがんは、膵臓がん又は乳がんである。

いくつかの実施態様において、この抗体は、ブダペスト条約の条項の下で、2010年12月16日にATCC (American Type Culture Collection)、アメリカ合衆国バージニア州20110-2209、マナサス、ユニバーシティブルーバード10801、に受託番号PTA-11550として寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生されたモノクローナル抗体である。いくつかの実施態様では、その断片又は誘導体は、キメラ抗体又はその断片若しくは誘導体、ヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体、ヒト抗体又はその断片若しくは誘導体、単鎖抗体又はその断片もしくはその誘導体、及びFab断片からなる群から選択され、該キメラ抗体、該ヒト化抗体、該ヒト抗体、該単鎖抗体又は該Fab断片が、モノクローナル抗体TAB-004の相補性決定領域(CDR)を有する。いくつかの実施態様では、この相補性決定領域(CDR)は、配列番号8から成る重鎖CDR1、配列番号9から成る重鎖CDR2、配列番号10から成る重鎖CDR3、配列番号11から成る軽鎖CDR1、配列番号12から成る軽鎖CDR2及び配列番号13から成る軽鎖CDR3から成る。

本明細書で使用される「癌の進行を予知する」とは、ある時点で癌疾患の指標を評価し、これをそれ以前の時点で採取した癌疾患の指標と比較し、この比較を、患者の癌の進行の指標とすることである。いくつかの実施態様では、このがんの進行は、患者におけるがんの転移から成る。

【0095】

このように、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体を、癌患者の血液又は他の生物学的サンプル中の循環腫瘍細胞(CTC)の存在を検出するために用いることができ、CTCの存在を転移性疾患や予後不良の可能性の重要な指標とすることができる。現在、CELLS EARCH(R)システム(Veridex, LLC, Raritan, New Jersey, United States of America)が、転移性乳癌、大腸癌及び前立腺癌患者におけるCTCを測定するために米国食品医薬品局(FDA)によって認可された唯一の方法です。このシステムは、CTCの中の上皮細胞表面マーカーEpCAMの検出に基づく。転移性乳がんでは、第一線の治療を開始する前にCTCを検出することが、進行なしに生存すること及び全体の生存を高度に予測することであることが示されている。基準時の血液7.5 mlあたりのCTCが5よりも大きい患者は、CTCが5よりも小さい患者に比べて、第1回追跡時(4週間後)に予後が悪化した(Cristofanilliら2005)。同様に、膵臓癌で、血液7.5 mlあたりのCTCが1よりも大きいことは、予後不良と相関していた(Kuriharaら2008)。

しかし、CTCの実際の転移病巣を形成する能力には疑問に残る。侵襲的な表現型を有する腫瘍細胞は、上皮間葉移行(EMT)と呼ばれる変換プロセスにおいていくつかの上皮抗原を失うので、EpCAM発現のCTCは、現在、最小限の転移を予測する。実際には、微小転移による低EpCAM発現が報告されており、EpCAMに対する抗体を用いてCTCを単離しようとする試みはこれまで成功していない。MUC1発現細胞は、高い転移能を持っており、MUC1がCTC上で発現されることが見出されているので、TAB-004抗体を含むがこれに限定されない本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体は、EpCAM発現CTCを検出するという試みに基づく多くの方法と比べて、信頼性が高く改善された転移の予測因子となりうる。

【0096】

VII. 他の用途

また、本発明の抗体を、競合結合アッセイ、直接及び間接サンドイッチアッセイ、並び

10

20

30

40

50

に免疫沈降アッセイ等の、但しこれらに限定されない様々なアッセイ方法に用いることができる(Zola,1987、Harlow & Lane,1988参照)。

本発明の抗体はまた、アフィニティー精製剤として有用である。このプロセスでは、1又はそれ以上の抗体は、当該分野で周知の方法を用いて適切な支持体(セファデックス樹脂又はろ紙等、但しこれらに限定されない)上に固定される(Harlow & Lane, 1988参照)。

【実施例】

【0097】

以下の実施例は、例示的な実施態様を提供する。本開示と当業者の一般的なレベルを考慮すると、当業者は、以下の実施例は単に例示であって、ここに開示する本発明の範囲から逸脱することなく、多数の変更、修正、及び改変を行うことができることを理解するであろう。

【0098】

実施例1

ヒトMUC1を発現する膵臓腺癌マウスの作成

ヒトMUC1を発現し、膵臓線癌を発生させる三重トランスジェニックマウス株の作成法を図3に示す。要約すると、発生過程及び成体の膵臓の至る所にCreリコンビナーゼを発現するP48^{Cre/+}マウス(Kawaguchiら2002)を、LSL-Kras^{G12D/+}マウスと掛け合わせる。このLSL-Kras^{G12D/+}マウスには、転写的に不活性だが、Creを発現する細胞内で活性化される、K-ras^{G12D/+}対立遺伝子が導入されている(Jackson et al., 2001;Kawaguchi et al., 2002)。P48^{Cre/+}及びLSL-Kras^{G12D/+}の両者に対して陽性である子孫(以下「PDAマウス」という。)を、ヒトMUC1導入遺伝子を担うトランスジェニックマウス株(MUC1.Tg)と交配させ、異型接合体として維持する(図3参照)。MUC1.Tgマウスは、ヒトMUC1を発現し、B-及びT-細胞コンパートメント寛容性を示し、導入遺伝子によりコードされるタンパク質による免疫に対して抵抗性がある(Rowseら1998)。これらのマウスにおいて、ヒトMUC1導入遺伝子は、それ自身のプロモーターにより転写されるので、この発現レベルは、組織特異的であり、特有である。単純な上皮組織の管腔側における低レベル発現、及び腫瘍における発現上昇が観察された。

P48^{Cre/+}、LSL-Kras^{G12D/+}、及びヒトMUC1に対して陽性のマウス(以下「PDA.MUC1.Tgマウス」という。)は、これらの3種の導入遺伝子を担う。PDA x MUC1.Tgの全マウスは、PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2, PanIN-3及び腺癌を含む異なるステージの膵臓上皮内腫瘍(PanINs)を発生させた(Tinder et al., 2008; Mukherjee et al., 2009)。様々な年齢のPDA x MUC1.Tg膵臓からの代表的な切片を図1Bに示す。これらのマウスの約80%は、26週令までに、及び約100%が、34週令までに腺癌を発生させた。

【0099】

ヒトMUC1及び変異K-ras^{G12D}腫瘍抗原を発現する、PDA.MUC1.Tgマウス(図3)から、タンパク質溶解液を調整し、三重トランスジェニックマウスに発現した腫瘍関連抗原に対する抗血清を作成した。要約すると、5mgのタンパク質溶解液を不完全Freundアジュバント(IFA)と混合し、Balb/cマウスの免疫化に用いた。免疫化マウスからの膵臓細胞と骨髄腫細胞の融合によりハイブリドーマを作成し、TAB-004抗体を、ハイブリドーマのスクリーニング(篩い分け)から同定した。このモノクローナル抗体は、IgGアイソタイプであると分かった。精製した抗体は腫瘍関連グリコシル化MUC1と結合した。

エピトープスクリーニングにより、本発明のTAB-004モノクローナル抗体(mAb)は、配列番号3内に存在するエピトープと結合することが分かった。この抗体は、ヒト膵臓(図1B)、ヒト乳房(図2A及び2B)から分離した腫瘍組織と強く反応するが、正常膵臓又は正常乳房組織に対して容易に検知できるほど結合しなかった(図1A及び2C参照)。

興味深いことに、TAB-004抗体は変異K-rasと交差反応し、K-ras変異を発現する腫瘍組織はこの抗体により陽性の染色を示すが、ヒトMUC1には陽性の染色を示さなかった。転移性全病変は陽性の反応性を示し、及びTAB-004は、変異K-rasポリペプチド内に存在するエ

10

20

30

40

50

ピトープを結合できるようであった。

【 0 1 0 0 】

実施例 2

腫瘍細胞のFACSによる区分け

蛍光細胞分析分離装置 (FACS) を用いて、様々な試料についてTAB-004抗体を検定し、異なる環境及び異なる条件下で存在する腫瘍細胞への結合活性及び区分け能を調べた。

第 1 の実験において、TAB-004抗体を、純化したCD133⁺及びCD24⁺/CD44⁺/EpCAM⁺細胞集団の細胞の染色に用いた。膵臓腺癌からの切片を機械的にホモジナイズし、30分、37℃ でコラゲナーゼIV及びDNaseにより消化した。この腫瘍からの全血液及び単一細胞懸濁液を、Lineage Cell Depletion Kit (成熟した造血系列細胞枯渇キット、Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, Catalogue No. 130-092-211)を用いて、造血系列細胞を枯渇させ、これにより、細胞懸濁液より、造血細胞系列抗原: CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123及びCD235aを発現する細胞を除いた。膵臓癌の患者からの血液試料又は腫瘍試料からの造血系細胞陰性 (lin⁻) 細胞を、フローサイトメーターを用いて、TAB-004抗体、及び次の膵臓幹細胞マーカーCD133(AC133)又はCD24⁺/CD44⁺を用いてMUC1を発現する細胞を篩い分けた。

図 7 A 及び 7 B は、蛍光細胞分析分離装置 (FACS) によるCD133⁺ (図 7 A) 及びCD24⁺/CD44⁺/EpCAM⁺ (図 7 B) 細胞の区分けの頻度分布図 (ヒストグラム)、及びTAB-004抗体がこれらの細胞に結合する度合いを示す。各パネルの左トレースは、負対照抗体を用いた区分けに対応し、右トレースは、TAB-004抗体を用いた区分けに対応する。

次に、TAB-004抗体を用いて、膵臓腫瘍組織から分離した正常及び膵臓腫瘍細胞中のMUC1発現、及びCXCR4 (癌細胞を含む細胞の移動性に関係するポリペプチド) の発現を比較するためにFACS解析を行った。結果を図 8 に示す。

図 8 において、CXCR4抗体染色と比べたTAB-004抗体染色による、隣接する膵臓腺癌組織 (図 8 D) と比べた組織学的に正常な隣接膵臓組織 (図 8 C) における細胞の分布を比較した。見て分かるように、MUC1又はCXCR4に対して陽性の細胞は、組織学的に正常な膵臓組織より、膵臓腺癌組織により多い。図 8 A 及び 8 B は、負対照の結果を示す (図 8 A - 抗体無し; 図 8 B - アイソタイプ対照抗体)

【 0 1 0 1 】

最後に、TAB-004抗体を、現在上皮癌検出のために使用されている、EpCAM抗体と比較した。

図 9 は、膵臓癌患者内の循環腫瘍細胞の検出において標準的EpCAM抗体と比べてTAB-004抗体が優れていることを示す一連のFACSプロットを示す。

第 1 に、正常対照個人からの全血液に 700 cc の血液あたり、250 個のPANC1膵臓癌細胞株を加え、PANC1細胞をTAB-004抗体を用いて染色した。EpCAM抗体に対応する濃い灰色線に対応する中間灰色線と、0.1 mg/ml から 0.004 mg/ml の範囲の 3 種類の異なるTAB-004抗体濃度に対応する、右側の最も濃い黒線、淡灰色線を比較すると、これら 4 種類の条件で、これらの調整物におけるPANC1細胞を良く検出した。

次に、TAB-004抗体及びEpCAM抗体について、2人の患者 (それぞれ、「患者 1」及び「患者 2」で示す) のそれぞれからの血液中の循環腫瘍細胞を検出する活性を検定した。図 9 B 及び 9 C に示すように、患者血液中の循環腫瘍細胞を検出する上で、TAB-004抗体及びEpCAM抗体の間には明確な識別できる差異があった。特に、TAB-004-PE抗体は (図 9 B の右側の最も濃い黒線及び図 9 C の右側の最も濃い黒線及び淡灰色線を参照) は患者の血液中のこれら循環腫瘍細胞を検出できるが、EpCAM-PE抗体 (図 9 B 及び 9 C の濃い灰色線を参照) は、検出できず、このことはこれらの目的のために、TAB-004抗体は、現在使用されているEpCAM抗体より遙かに優れていることを示唆する。

【 0 1 0 2 】

実施例 3

TAB-004抱合体の調整

本発明のTAB-004抗体を、1 - メチル - DL - トリプトファン (1MT)、インドレアミン 2

、3-デオキシゲナーゼ (IDO) 阻害剤 (EP2/EP4受容体拮抗物質)、及び樹状細胞活性化因子として働くCpGオリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) (Rotheusserら、2002) と抱合した。ここでは、CpG ODNと抱合したTAB-004抗体の機能的役割に関するデータを提供するが、本発明の抗体及び抱合体の機能を限定するものではない。

TAB-004抗体単独又はCpG ODNとの抱合体は、三重トランスジェニックPDA.MUC1.Tgマウスから作成した腫瘍細胞株 (本明細書では、「KCM細胞株」という。図3参照) と結合した。出願人は特定の操作理論に囚われることを望まないが、この抗体は、ナチュラルキラー細胞 (NK細胞) を活性化し、CpG ODNとの抱合体はさらに、YAC細胞及びKCM細胞株のような標的に対するNK細胞の溶細胞活性を促進した (図4参照)。

【0103】

実施例 4

TAB-004-CpG ODN抱合体のin vivo抗腫瘍活性

樹立した三重トランスジェニックマウスPDA.MUC1.Tgマウスに発生したKCM膵臓癌細胞株を10匹のマウスに注入した。図5A及び5Bに、処理群、処理計画及び投与量を描写した。要約すると、 3×10^6 KCM腫瘍細胞を、第0日にマウス (n=10) の脇腹領域の皮下に注入した。4、10及び16日目に、各マウスに50 µgのTAB-004-CpG ODN抱合体を (アジュヴァント無しに) 腫瘍内に投与した。比較のために、同量の抗体を、抗体単独群 (非抱合TAB-004) に投与した。20日目に殺マウスを行い腫瘍を回収した。

図5に示すように、抱合体型抗体による処理は、樹立した腫瘍の増殖を完全に止め、完全な根絶をもたらした。このデータによると、TAB-004-CpG ODN抱合体で処理されたマウスには、処理終了後に、腫瘍の増殖が見られない (図5参照)。このことは、TAB-004-CpG ODN抱合体を、上皮性癌、特に膵臓癌のような、但しこれらに限定されない、癌のためのワクチンとして使用できることを裏付ける。

【0104】

実施例 5

抗体クローニング、組み替え抗体産生、抗原結合確認と相補性決定領域 (CDR) の配列決定

TAB-004抗体のMUC1への結合活性を確認し、CDRのアミノ酸配列を決定するために、ハイブリドーマ細胞株ATCC-No. PTA-11550から全RNAを抽出し、免疫グロブリン重鎖及び軽鎖特異的プライマーセット、及びQIAGEN(R)OneStep RT-PCR Kitを用いて、逆転写PCR (RT-PCR) を行った。各群のために、変異領域のリーダー配列を変換する縮重順方向プライマー混合物を用いて、多数の重鎖及び軽鎖RT-PCR反応を行った。順方向プライマーを異なる濃度で用いたが、逆方向プライマー (重鎖及び軽鎖遺伝子の定常域に位置) は、反応あたり50 ngであった。以下のRT-PCR条件を用いた：

逆転写：50 で30分

初期PCR活性化段階：95 で15分

サイクリング：94 で25秒；

54 で30秒；

72 で30秒を20サイクル；

最終的伸長：72 で10分。

次に、第2ラウンドのセミネステッド (semi-nested) PCRを用いた。順方向プライマーは第1ラウンド RT-PCRと同一であるが、各プライマー量は、上記のRT-PCR条件の2倍である。重鎖配列に特異的なセミネステッド逆方向プライマーは反応あたり100 ngを用いた。

用いたPCR条件は、以下の通りである：

初期変成段階：95 で5分

サイクリング：95 で25秒；

57 で30秒；

68 で30秒を25サイクル；

最終的伸長：68 で10分。

10

20

30

40

50

PCR終了後、PCR産物の試料をアガロースゲル上で分離して、産物を可視化した。いくつかの重鎖及び軽鎖PCR産物のサブクローニングをおこない、重鎖及び軽鎖の可変領域の配列を調べた。得られた塩基配列及びこれによりコードされたアミノ酸配列を配列番号4～7に示す。またこれから推定されるCDRsのアミノ酸配列を表4にまとめた。

【0105】

【表4】

TAB-004モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖のCDRのアミノ酸配列

IgG鎖	CDR1配列	CDR2配列	CDR3配列
重鎖	GYTFTNYW (配列番号8)	INPSSGYT (配列番号9)	STYYGDYLPY (配列番号10)
軽鎖	QDIVYGNGNTY (配列番号11)	KVS (配列番号12)	FQGSHPYPT (配列番号13)

10

【0106】

次に、ハイブリドーマ細胞株ATCC No. PTA-11550から単離した全RNAの他のRT-PCR増幅遺伝子、及び本明細書に説明したようにその後の第2ラウンドのセミネステッドPCRにより、組み換え抗体を作成した。増幅した重鎖配列及び軽鎖配列を、個別にプラスミド抗体発現ベクター中にサブクローン化した。

次にプラスミドをCHO細胞に導入し、ヒトIgG1骨格を有する組み替えIgGを作成した。遺伝子導入したCHO細胞の上清について、96穴ELISAフォーマットを用いて、抗原結合について検定した。上清中の組み替えIgGの濃度は非常に低かった(即ち、約10 ng/ml)が、いくつかの上清試料は、非常に強い結合を示した。上清中の抗体濃度が比較的低いとすると、ELISAの結果は、組み替え抗体の活性は高いことを示す。

20

組み替え抗体プラスミドの挿入物の配列をDNA配列決定により決めた。全て、単一重鎖配列及び単一軽鎖配列対応した。重鎖及び軽鎖の可変領域ヌクレオチド、及びアミノ酸配列を決定し、及びこれから推定されるCDR配列を配列番号8～13に示す。

【0107】

実施例6

乳癌及び膵臓癌における、TAB-004抗体と他の腫瘍抗原に基づく検出手段の性能比較

血液ベースの現在入手可能な臨床的検定として使用される腫瘍抗原として、乳癌に対するCA 15-3及びCA 27-29;及び膵臓癌に対するCA 19-9がある。非癌条件又は良性疾患の場合、これらの腫瘍抗原のレベルは高く、従って癌の正確な検出のための手段としてこれらの腫瘍抗原に対する抗体利用の可能性を引き下げる。この低特異性の結果として、これらの抗体による検定は顕著な診断的価値を証明するに至っていない。

30

この目的のために、患者の血漿中に放出されたMUC1の濃度を検知するTAB-004の活性を、血漿試料中の腫瘍抗原に対する上記抗体の性能と比較した。血行中に放出されたMUC1を捕獲し、濃度を検知するために、TAB-004抗体を用いて、酵素免疫測定(EIA)を最適化した。要約すると、96穴ELISAプレートに50 µg/mlのPBS中の100 µlのTAB-004抗体を塗布し、4で一晚インキュベートした。インキュベーション後、過剰な捕獲用のTAB-004抗体をプレートから除いた。非特異的結合を避けるために、このプレートを200 µlのPBS中1%の粉乳でブロックし、4で1時間インキュベートした。ELISAプレート洗浄器を用いて、このプレートを、0.05%(v/v) TWEEN(r)-20を含む250 µl PBSで良く洗った(3回)。MUC1 TRから調整した25-merポリペプチドを用いたMUC1標準液を0~2000 U/mlの範囲で調整した。この検定用血漿をPBS中0.1% ミルク中に1:2及び1:10希釈し、100 µlを3組ずつ適当なウェルに加え、このプレートを37で2時間インキュベートした。

40

【0108】

その後、プレートを洗浄し、100 µlのポリクローナルウサギ抗MUC1抗体(Genway)を、PBS中0.1%ミルクで1:300,000希釈して各ウェルに加え、このプレートを37で1時間インキュベートした。このポリクローナル抗体をウェルから洗い出し、西洋わさびペルオキシダーゼ-標識ヤギ抗ウサギIgGをPBS中0.1%ミルク1:1000希釈して加え、1時間37

50

でインキュベートした。このプレートを洗浄後、100 μ lのペルオキシダーゼ基質 (TMB) を含む溶液をウェルに加え、プレートを暗室で30分間、室温でインキュベートした。25 μ lの4.0 N硫酸を加えて、この反応を停止させ、SPECTRA-MAX 250 分光光度計を用いて450 nmの波長で光学密度を測った。未知の試料の濃度を測定するために回帰分析を用いて標準曲線を作成した。

MUC1の初期標準試料に基づき任意単位 (U) /mlを選んだ。50~800 units/ml のMUC1抗原は比例領域であった。装置及び技術者によるバラツキを保証するために、正常及び異常試料を含めることで、検定内部及び検定間の変動をコントロールした、また検定に用いた試薬は期待通りに働いた。

乳癌試料に対するTAB-004 EIA 評価を、CA15-3 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, United States of America) の評価と比較した。EIA測定を用いて、乳癌に対するCA27-29 (Bayer Diagnostics, Tarrytown NY) との比較、及び膵臓癌試料に対するCA19-9 (Panomics Inc, Redwood City, California, United States of America) との比較もまた行った。入手可能なEIAと比較したTAB-004 EIAの感度及び特異性を検定するために統計解析を行った。

36名乳癌患者、24名前立腺癌患者、4名膵臓癌患者、13名食道癌患者、12名正常対照者、3名膵炎患者及び1名糖尿病患者 (CA15-3, CA27-29, 及びCA19-9抗原の存在を検定する測定を用いて、膵炎及び糖尿病は、擬陽性として検知されたことで知られる2種の病気) からの血漿を用いたTAB-004 EIAを行った。検定した大部分の癌試料は後期段階の癌からであった。

正常患者 (n=12) に対する予備的データより、<40 U/mlのカットオフ値 (病体識別値) を得た。平均偏差値及び標準偏差値として、それぞれ、17.42 及び7.07 units/ml 血漿を得た (図10参照)。本研究中、正常として、40 units/ml 血漿以下の値を用いることとした。正規分布を仮定すると、これは、集団の99.8%以上に及んだ。我々の予備的データにおいて、たった12試料しかないとすれば、人為的に標準偏差を膨らませる可能性がある。我々は、本研究の一部としてカットオフ値を改善する計画をした。

【0109】

このカットオフ値<40U/mlにおいて、健康人又は膵炎のヒト血漿はいずれも陽性ではなく、癌試料からの血漿は>40U/mlであった (図10参照)。CA15-3抗原を検知するために計画された測定と比較してTAB-004 EIA測定は、正常ボランティアからの血漿中と比べて乳癌患者からの血漿中の当該腫瘍抗原 (MUC1) を、より高い特異性及びより高感度で検出する上で優れていることをこのデータは示す。TAB-004について擬陽性は無かったが、12名の正常人の内5名は、CA15-3ベースの測定では擬陽性をもたらした (片側検定を用いて、 $p=0.031$; <31U/mlは、CA15-3ベースの測定に対する発表されたカットオフ値である)。TAB-004に対しては、全ての癌患者の血漿は陽性であったが、CA15-3 (<31 U/ml) では、36名血漿試料中3試料が擬陰性であった。全体として、乳癌患者において、TAB-004検定とCA15-3検定を比較した時、癌患者からの血漿と正常人の血漿との間の差異は、TAB-004においてより大であった。CA15-3検定を用いた場合、正常人と癌患者の血漿間でかなりの重なりがあったが、TAB-004検定を用いると、重なりはなかった (図10参照)。

疾病ステージを測るためのTAB-004抗体の性能を更に評価するために、TAB-004 EIAを、n=5のステージ0, 2, 3 及び4の膵臓癌患者からの血漿試料を用いて行った。図11から、TAB-004及びCA15-3測定間の平均差異は全4名癌患者のステージに対して統計的に有意であることが分かった (ステージ0, $p=0.049$; ステージ2, $p=0.008$; ステージ3, $p=0.017$; ステージ4, $p=0.008$)。TAB-004測定は、全20試料に対して、CA15-3より高い値を提供した。さらに、TAB-004測定レベルは、CA15-3測定 (この測定ではステージ0, 2 及び3の間の差異を予測できなかった) とは異なり、腫瘍ステージに依存し、疾患進行に従い増加した ($p<0.0001$)。ステージ2及びステージ3の全患者のTAB-004測定値は、正常範囲以上を示すが、CA15-3測定では2/10のみが正常以上であったので、図10で見出された正常範囲 (<40U/ml) に集まるステージを比較して、TAB-004は、ステージ2及び3を診断する上でCA15-3と比較して優れていることが明らかである。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 0 】

実施例 7

移動性MUC1のレベルと疾患進行及び再発との相関性

TAB-004を用いて、疾患の再発及び進行の正確な予想可能性を評価した。ステージII及びIII/IV乳癌のn=100患者から血漿を治療前、及び標準的治療終了後6、12及び18ヶ月後について評価した。この群の再発については、24ヶ月後評価した。ステージ2、3、及び4のn=50膵臓癌患者からの血漿を、治療前、標準的治療終了後3、6、9及び12ヶ月後について評価した。

【 0 1 1 1 】

試料収集

血漿を日常の追跡検査来院時に集めた。疾患ステージを病理学的評価により確認し、再発を標準的画像技術により確認した。膵臓癌患者に投与された全ての化学治療薬又は補助の治療を詳述するデータベースを保存した。

乳癌に関しては、再発率は膵臓癌と比較して一般的に遙かに低く、従って、(乳癌患者)より少数(統計的に正当づけられる数)の膵臓癌患者を利用した。標準的追跡検査来院時機が異なるので、血漿を収集する時間も乳癌と膵臓癌の間でまた異なった。

膵臓癌患者に関しては、ステージ3及び4患者は、一般的に6ヶ月から1年以上ほとんど生存せず、従って診断後の高死亡率のために、再度の試料収集のために治療終了を待つことができない。試料は、患者が治療を受けている間に収集した。手術を受けた患者に対して、試料を手術前、及び治療計画に拘わらず、手術後3、6、9及び12ヶ月後収集した。切除不能癌の患者に対して、試料を診断前、及び治療計画に拘わらず、診断後3、6、9、12ヶ月後収集した。大多数の患者は、1年以内に再発することが予測されるので、実験を12ヶ月で停止した。乳癌患者に対して、ステージIII/IV患者のみ、一般的に2年以内の再発が予測される。しかしながら、比較のためにステージII患者も含めた。血漿を治療前、及び治療終了後6、12及び18ヶ月後収集した。

【 0 1 1 2 】

解析及び統計

TAB-004測定により、乳癌患者の再発及び/又は死亡の予想可能性を定めるために解析を行った。患者を、研究過程に再発した群及び再発しなかった群の、2群に分けた。受診者動作特性(Receiver Operating Curves, ROC)を作成し、再発を予想するためのTAB-004のナチュラルカットポイントがあるかどうか決めた。解析において、再発を伴う患者に対して、再発以前のTAB-004レベルを用いたが、再発していない患者に対しては、最終TAB-004値を用いた。例えば、再発が15ヶ月で生ずるならば、12ヶ月のTAB-004レベルを用いる。従属変数(結果)として再発までの時間についてのCox比例ハザードモデルを用いた。このCoxモデルは、追跡不能及び打ち切りデータを正しく説明する多変数過程である。年齢、癌ステージ、及び癌悪性度、及びTAB-004値を独立変数として入れた。もしROCが再発を予測するためにナチュラルカットポイントを決めるならば、モデルにおけるTAB-004の実際の値を二分法の(カットオフ値の上又は下)変数に置き換えて、別なCoxモデルを実行する。TAB-004変数は統計的に有意なp-値を持つので、患者年齢、癌ステージ、及び腫瘍悪性度を揃えた場合、TAB-004は再発の独立変数である事が分かる。従属変数としての再発又は死亡までの時間を用いて、以前の一連の解析を繰り返す。ステージ0、I及びIIの癌患者に対して、この同じ方法を用いて、ステージIII/IV(転移性)癌になる時間を予測する。

この一連の解析を、また膵臓癌患者からのデータを用いて行う。膵臓癌の死亡率は非常に高いので、再発までの時間又はステージIV疾患への時間を予測する場合、Coxモデルでの係数の安定した見積もりは、困難であり得る。従って、研究期間の間に、癌再発、又はステージ2又は3からステージ4の転移性癌への進行の症例はほとんど無いであろう。

【 0 1 1 3 】

実施例 8

TAB-004陽性CTCのレベルと疾患予後及びTAB-004血漿レベルとの相関、及びTAB-004抗体を

10

20

30

40

50

用いて分離したCTC細胞とEpCAM抗体を用いて分離したCTC細胞とのCTC細胞の数及び転移能の比較

循環腫瘍細胞（CTC）を、血流中の腫瘍細胞と定義する。現在、転移性乳癌、結腸癌、及び前立腺癌患者のCTCを測定するために、Veridex CELLSEARCH(R)システムが唯一のFDA認可の方法である。このシステムを用いて、膵臓癌患者のCTCが、CTC<1及び生存率の間の相関性を示した。興味あることに、この研究において、CTCの存在が、血清中の腫瘍抗原CA19-9レベルの増加と相関することが分かり、このことは、腫瘍抗原の血清レベルを用いて、循環腫瘍細胞を予測できることを示す。転移性乳癌患者において、<5 CTCが、進行性のない生存及び全体としての生存の独立変数であることが分かった。さらに、転移性乳癌患者のCTCレベルは、現在の画像法より、より早期の、より再現性のある、疾患状態の目安である。

10

CTC評価のために認知された方法は、血液からEpCAM発現細胞の分離を必要とし、その後、上皮性特異的サイトケラチン染色、適切な核染色の存在及び白血球特異的CD45不在を条件として、これらの細胞をCTCと確認することを必要とする。この方法の注意点は、EpCAM発現細胞の制約である。遊走性という表現形質を得た細胞は、上皮性の特性を失い、また表現型的に高悪性度の腫瘍進行に関係する細胞であることを示す、間葉性特徴を得る、ということが研究により示唆されている。従って、見かけ上、CTCのEpCAM分離は、間葉性表現型質を進行させている - 最も活性なCTCを"逃す"ことになるようである。

乳房及び膵臓初発及び転移性腫瘍の両者は、TAB-004抗体により認識される、高レベルの腫瘍関連MUC1を発現する。従って、これらの患者におけるCTCは、TAB-004抗体により認識されるべきである。予備的実験において、TAB-004抗体を用いて、MUC1レベルを評価した。第1に、ヒト膵臓癌細胞株であるPANC1細胞を加えた7.5 mlの血液試料（ヒト試料と同様に）を用いて、MUC1発現CTCを測定するために、Veridex CELLSEARCH(R)システムを用いることができるかどうか試験した。約90%のCTC（EpCAM+細胞）がMUC1を発現した。さらに、患者試料を集め、TAB-004は、約33%から100%の効率でCTCを認識することが分かった。従って、TAB-004抗体の使用は、正確に膵臓及び乳癌患者の微少転移を検出することが明らかである。

20

【0114】

本明細書に開示した本発明の様々な詳細な点が、本発明の範囲から逸脱することなく変更可能であることは理解されるであろう。さらに、上記の記載は、単に本発明を例証することのみを目的とするものであって、本発明を制限する目的のためのものではない。

30

【0115】

参考文献

本明細書で参照された参考文献と同様に、特許、特許出願及び刊行物、科学雑誌の記事、及びデータベースエントリ（例えば、GENBANK(R)データベースのエントリとその中に利用可能なすべての注釈）を含むがこれらに限定されない、下記に列記された全ての参考文献は、方法、技法、及び/又はそこで用いられる組成物を教示するために、補充し、説明し、背景を提供する範囲において、その全体が参考として本明細書に組み込まれる。

【0116】

Adams et al. (1993) Cancer Res 53:4026-4034.

40

Alexay et al. (1996) The PCT International Society of Optical Engineering 2705/63.

Al-Hajj et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:3983-3988.

Alt et al. (1999) FEBS Lett 454:90-94.

Amemiya et al. (1988) Topics Curr Chem 147:121-144.

Barratt-Boyes (1996) Cancer Immunol Immunother 43:142-151.

Basu et al. (2006) J Immunol 177:2391-2402.

Bauminger & Wilchek (1980) Meth Enzymol 70:151-159.

Berkow et al. (1997) The Merck Manual of Medical Information, Home ed. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, New Jersey, United States of America.

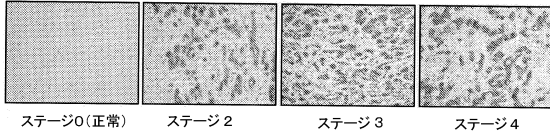
50

- Bieche & Lidereau (1997) *Cancer Genetics and Cytogenetics* 98:75-80.
- Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426.
- Blaskovich et al. (2003) *Cancer Res* 63:1270-1279.
- Bonnet & Dick (1997) *Nat Med* 3:730-737.
- Brabletz et al. (2005) *Nat Rev Cancer* 5:744-749.
- Cameron et al. (2009) *Bioorg Med Chem Lett* 19:2075-2078.
- Chattopadhyay et al. (2001) *Nucl Med Biol* 28:741-744.
- Cheng (1996) *Hum Gene Ther* 7:275-282.
- Chothia & Lesk (1987) *J Mol Biol* 196:901-917.
- Cristofanilli et al. (2005) *J Clin Oncol* 23:1420-1430. 10
- Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628.
- Coatney (2001) *Ilar J* 42:233-247.
- Coloma et al. (1997) *Nature Biotechnol* 15:159-163.
- David et al. (1974) *Biochemistry* 13:1014.
- DeCosta Byfield et al. (2004) *Mol Pharmacol* 65:744-752.
- Dong et al. (1997) *J Pathology* 183:311-317.
- Dontu et al. (2004) *Breast Cancer Res* 6:R605-615.
- Donzella et al. (1998) *Nat Med* 4:72-77.
- Duch et al. (1998) *Toxicol. Lett.* 100-101:255-263.
- Ebadi (1998) *CRC Desk Reference of Clinical Pharmacology*. CRC Press, Boca Raton, 20
Florida, United States of America.
- Emanuelli et al. (2004) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2082-2087.
- European Patent No 0 439 095.
- Fong et al. (1999) *Cancer Res* 59:99-106.
- Fraser (1996) *Meth Cell Biol* 51:147-160.
- GENBANK(R) Accession Nos. AAA39755; AAA60019; AA063589; J055821; NM_004985.3; NP_001181906; NP_004976; NP_036734; NP_038633; P_776540; Q02496.
- Gennaro (1990) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pennsylvania, United States of America.
- Gennaro (ed.) (2003) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th edition Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America. 30
- Glockshuber et al. (1990) *Biochemistry* 29:1362-1367.
- Gold et al. (2007) *Clin Cancer Res* 13:7380-7387.
- Goldman et al. (1997) *Cancer Res* 57:1447-1451.
- Goodman et al. (1996) *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed. McGraw-Hill Health Professions Division, New York, New York, United States of America.
- Hallahan et al. (2001a) *Am J Clin Oncol* 24:473-480.
- Hallahan et al. (2001b) *J Control Release* 74:183-191. 40
- Hamers-Casterman et al. (1993) *Nature* 363:446-448.
- Harlow & Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, United States of America).
- Heijnen et al. (1997) *J Immunol* 159:5629-5639.
- Henderson et al. (1998) *J Immunother* 21:247-256.
- Heredia et al. (1991) *J Neurosci Meth* 36:17-25.
- Hingorani et al. (2003) *Cancer Cell* 4:437-450.
- Hnatowich et al. (1996) *J Pharmacol Exp Ther* 276:326-334.
- Holliger et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-6448.
- Holliger et al. (1999) *Cancer Res* 59:2909-2916. 50

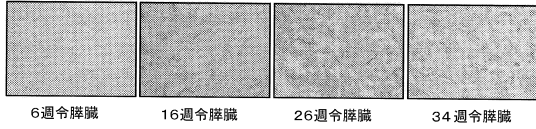
- Hu et al. (1996) *Cancer Res* 56:3055-3061.
- Hunter et al. (1962) *Nature* 144:945.
- Huston et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879-5883.
- Huston et al. (1993) *Int Rev Immunol* 10:195-217.
- Jackson et al. (2001) *Genes Dev* 15:3243-3248.
- Johnson & Wu (2000) *Nucleic Acids Res* 28:214-218.
- Kabat et al. (1991) (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*. NIH Publication No. 91-3242.
- Kahn et al. (1987) *Anticancer Res* 7:639-652.
- Kahnet al. (1987) *Anticancer Res* 7(4A):639- 652. 10
- Katzung (2001) *Basic & Clinical Pharmacology*, 8th ed., Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Pub. Division, New York, New York, United States of America.
- Kawaguchi et al. (2002) *Nat Genet* 32:128-134.
- Kipriyanov et al. (1995) *Cell Biophys* 26:187-204.
- Kipriyanov et al. (1998), *Int J Cancer* 77:763-772.
- Kipriyanov et al. (1999) *J Mol Biol* 293:41-56.
- Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495.
- Kontermann et al. (1999) *J Immunol Meth* 226:179-188.
- Kortt et al. (1997) *Protein Eng* 10:423-433.
- Kostelny et al. (1992), *J Immunol* 148:1547-1553. 20
- Kurihara et al. (2008) *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 15:189-195.
- Kurucz et al. (1995) *J Immunol* 154:4576-4582.
- Le Gall et al. (1999) *FEBS Lett* 453:164-168.
- Lees (2001) *Semin Ultrasound CT MR* 22:85-105.
- Licha et al. (2000) *Photochem Photobiol* 72:392-398.
- Littlefield et al. (2008) *Inorg Chem* 47:2798-2804.
- Manome et al. (1994) *Cancer Res* 54:5408-5413.
- Marks et al. (1991) *J Mol Biol* 222:581-597.
- Martin (1996) *Proteins* 25:130-133.
- McCartney et al. (1995) *Protein Eng* 8:301-314. 30
- McGucken et al. (1995) *Human Pathology* 26: 432-439.
- Mukherjee et al. (2000) *J Immunol* 165:3451-3460.
- Mukherjee et al. (2007) *Vaccine* 25:1607-1618.
- Mukherjee et al. (2009) *J Immunol* 182:216-224.
- Muller & Scherle (2006) *Nature Rev Can* 6:613-625.
- Muller et al. (1998) *FEBS Lett* 432:45-49.
- Nabel (1997) *Vectors for Gene Therapy In Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, New York, New York, United States of America.
- Neri et al. (1997) *Nat Biotechnol* 15:1271-1275.
- Nygren (1982) *J Histochem Cytochem* 30:407. 40
- Pack et al. (1992) *Biochemistry* 31:1579-1584.
- Pain et al. (1981) *J Immunol Meth* 40:219).
- Pardal et al. (2003) *Nat Rev Cancer* 3:895-902.
- Park et al. (1997) *Adv Pharmacol* 40:399-435.
- Pasqualini et al. (1997) *Nat Biotechnol* 15:542-546.
- Paul (1993) *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York, New York, United States of America.
- PCT International Patent Application Publication Nos. WO 1992/22653; WO 1993/255 21.
- Pearson & Lipman (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2444-2448. 50

- Perkins et al. (2003) *Am Fam Physician* 68:1075-1082.
- Peterson et al. (1991) in *Breast Epithelial Antigens*, (Ceriani, ed), Plenum Press, New York, New York, United States of America, pages 55-68.
- Pomper & Port (2000) *Magn Reson Imaging Clin N Am* 8:691-713.
- Price et al. (1998) *Tumor Biology* 19:1 20.
- Quin et al. (2000) *Int J Cancer* 87:499-506.
- Ragnarson et al. (1992) *Histochemistry* 97:329-333.
- Reya et al. (2001) *Nature* 414:105-111.
- Rothenfusser et al. (2002) *Human Immunology* 63:1111-1119.
- Rovaris et al. (2001) *J Neurol Sci* 186 Suppl 1:S3-9. 10
- Rowse et al. (1998) *Cancer Res* 58:315-321.
- Rugo et al. (2005) *J Clin Oncol* 23:5474-5483.
- Sagiuchi et al. (2001) *Ann Nucl Med* 15:267-270.
- Saltzman & Fung (1997) *Adv Drug Deliv Rev* 26:209-230.
- Sambrook & Russell (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, United States of America.
- Sawyer et al. (2004) *Bioorg Med Chem Lett* 14:3581-3584.
- Schwendener (1992) *Chimia* 46:69-77.
- Shalaby et al. (1992) *J Exp Med* 175:217-225. 20
- Sharkey et al. (2003) *Cancer Res* 63:354-363.
- Sharkey et al. (2003) *Clin Cancer Res* 9:3897S-3913S.
- Shen et al. (1993) *Magn Reson Med* 29:599-604.
- Speight et al. (1997) *Avery's Drug Treatment: A Guide to the Properties, Choice, Therapeutic Use and Economic Value of Drugs in Disease Management*, 4th ed., Adis International, Auckland, New Zealand.
- Singh et al. (2004) *Nature* 432:396-401.
- Tavitian et al. (1998) *Nat Med* 4:467-471.
- Tinder et al. (2008) *J Immunol* 181:3116-3125.
- 米国特許第4,551,482号；同第4,816,567号；同第5,088,499号；同第5,147,631号；同第5,234,933号；同第5,326,902号；同第5,490,840号；同第5,510,103号；同第5,574,172号；同第5,651,991号；同第5,688,931号；同第5,707,605号；同第5,714,166号；同第5,738,837号；同第5,786,387号；同第5,855,900号；同第5,858,410号；同第5,865,754号；同第5,922,356号；同第5,922,545号；同第5,928,627号；同第5,994,392号；同第6,024,938号；同第6,071,890号；同第6,080,384号；同第6,083,486号；同第6,106,866号；同第6,127,339号；同第6,172,197号；同第6,221,018号；同第6,231,834号；同第6,245,318号；同第6,246,901号；同第6,248,516号；同第6,254,852号；同第6,291,158号；同第6,548,643号；同第7,183,388号。 30
- Vinogradov et al. (1996) *Biophys J* 70:1609-1617.
- Weissleder et al. (1992) *Magn Reson Q* 8:55-63. 40
- Weissleder et al. (1999) *Nat Biotechnol* 17:375-378.
- Whitlow et al. (1991) *Methods companion Methods Enzymol* 2:97-105.
- Yoo et al. (1997) *J Nucl Med* 38:294-300.
- Zhu et al. (1997) *Protein Sci* 6:781-788.
- Zola (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, United States of America, pp 147-158.

【図 1 A】



【図 1 B】



【図 2 A】

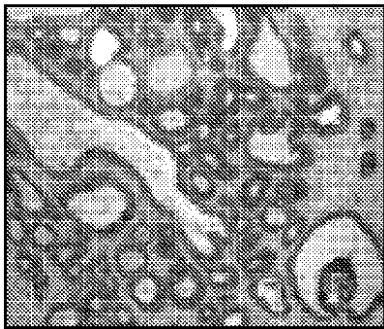


FIG. 2A

【図 2 B】

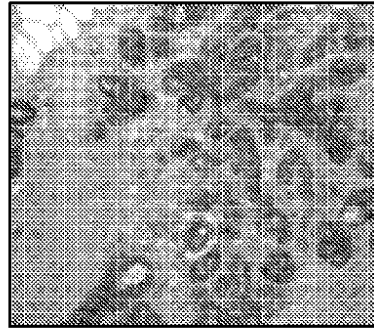


FIG. 2B

【図 2 C】

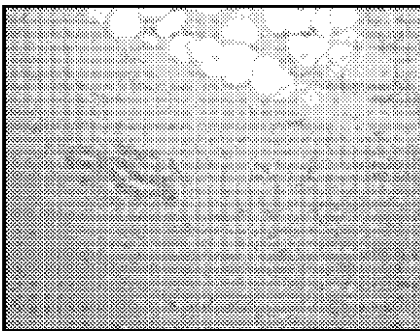
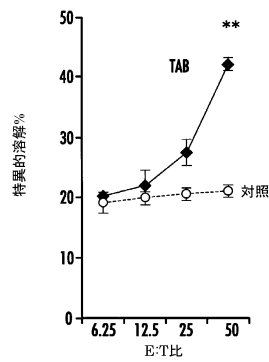
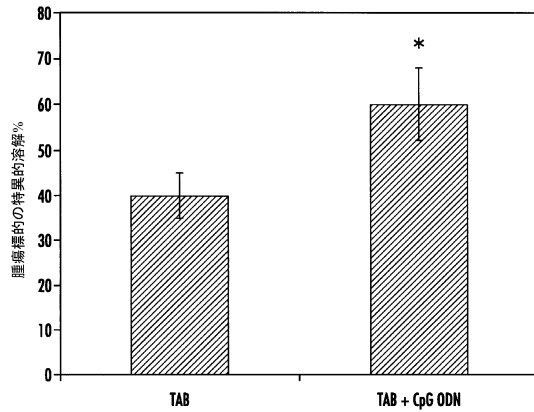


FIG. 2C

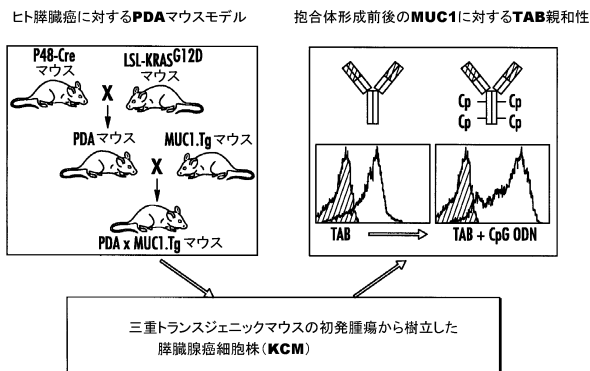
【図 4 A】



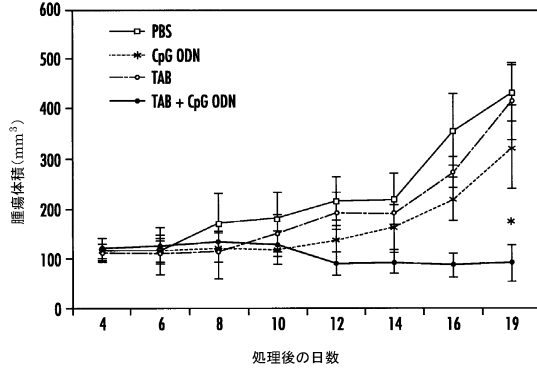
【図 4 B】



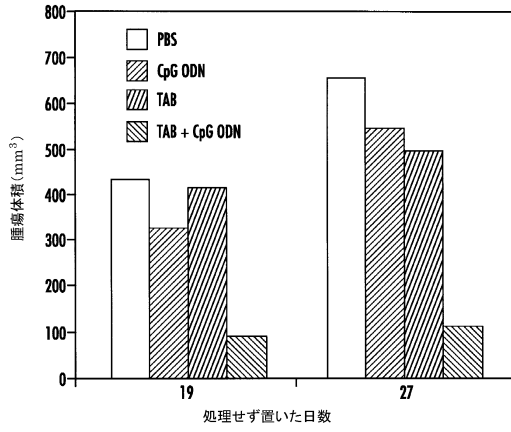
【図 3】



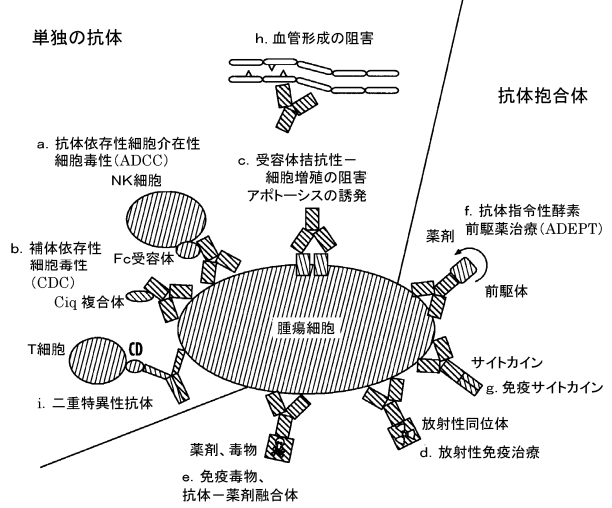
【 図 5 A 】



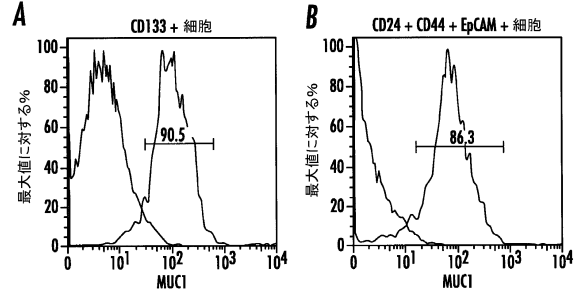
【 図 5 B 】



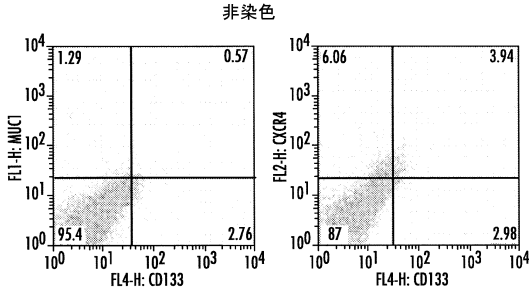
【 図 6 】



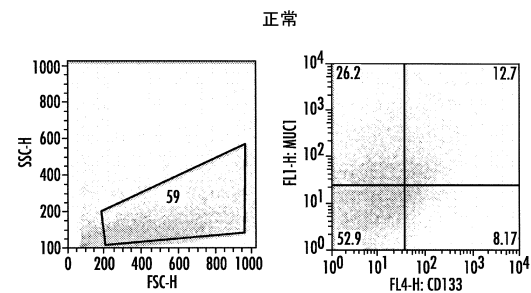
【 図 7 】



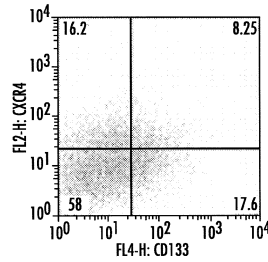
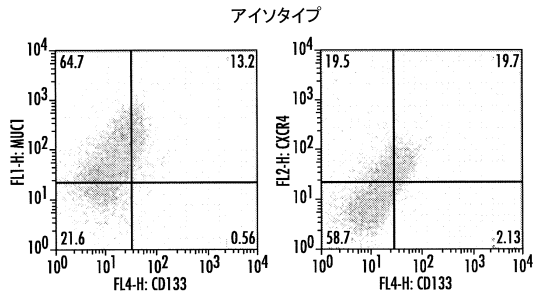
【 図 8 A 】



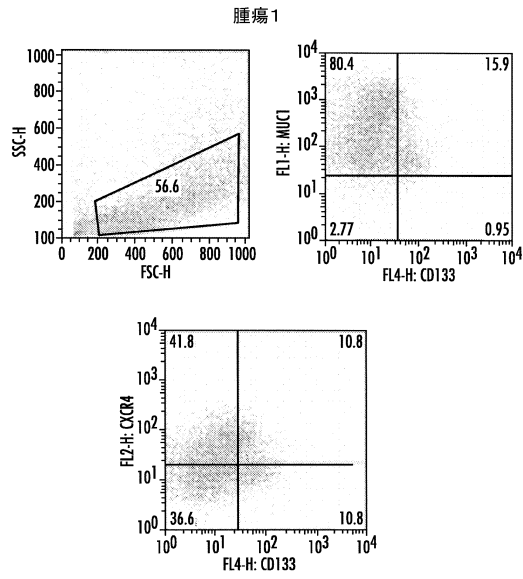
【 図 8 C 】



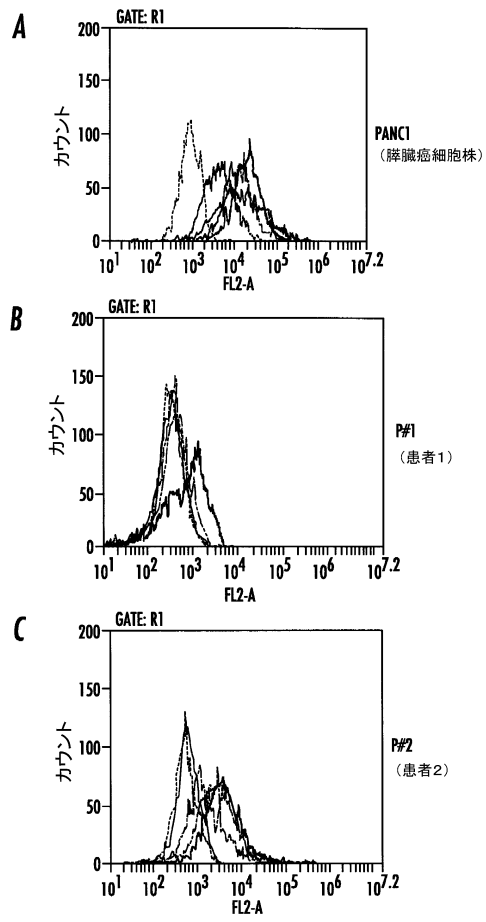
【 図 8 B 】



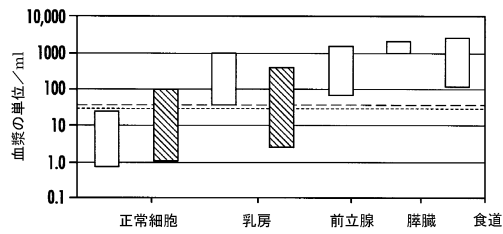
【 図 8 D 】



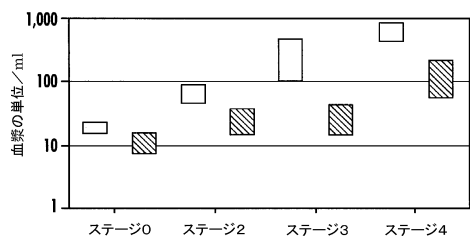
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【配列表】

0005886299000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	A 6 1 K	43/00
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	A 6 1 K	49/02 A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	A 6 1 K	49/02 C
C 1 2 N	5/20	(2006.01)	A 6 1 K	49/02 B
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
			C 1 2 N	5/20
			G 0 1 N	33/53 V
			G 0 1 N	33/574 D
			C 1 2 P	21/08
			C 1 2 N	15/00 A
			C 1 2 N	15/00 C

審査官 北村 悠美子

- (56)参考文献 国際公開第2010/050528(WO, A1)
 特表2010-505775(JP, A)
 国際公開第2008/070171(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	肿瘤特异性抗体及其用途		
公开(公告)号	JP5886299B2	公开(公告)日	2016-03-16
申请号	JP2013532795	申请日	2011-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学夏洛特分校		
申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学夏洛特分校		
当前申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学夏洛特分校		
[标]发明人	ピンクムカージー		
发明人	ピンク ムカージー		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/32 A61K39/395 A61K51/00 A61P35/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/20 G01N33/53 G01N33/574 C12P21/08 C12N15/09 C12N15/02		
CPC分类号	C07K16/3092 A61K31/415 A61K31/7068 A61K31/7088 A61K39/39558 A61K45/06 A61K47/6803 A61K47/6849 A61K47/6851 A61K47/6859 A61K49/0002 A61K2039/505 C07K16/2821 C07K16/30 C07K2317/10 C07K2317/14 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/565 C07K2317/73 G01N33/57438 G01N33/6893		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C07K16/32 A61K39/395.C A61K39/395.D A61K39/395.L A61K39/395.N A61K43/00 A61K49/02.A A61K49/02.C A61K49/02.B A61P35/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/20 G01N33/53.V G01N33/574.D C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.C		
代理人(译)	下田 昭		
优先权	12/924952 2010-10-08 US		
其他公开文献	JP2013544503A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 一种分离的抗体，其与肿瘤抗原及其片段及其衍生物结合。还公开了包含抗体及其片段和衍生物的组合物和递送剂，产生它们的细胞，其制备方法，使用它们的方法，转移细胞和/或由其衍生的肿瘤和/或提供了用于检测，靶向和/或治疗肿瘤干细胞的方法和用于预测患者中癌症复发的方法。【选择图】无	(21) 出願番号	特願2013-532795 (P2013-532795)	(73) 特許権者	506074392	
	(66) (22) 出願日	平成23年5月25日 (2011. 5. 25)		ザ・ユニバーシティ・オブ・ノース・カロライナ・アット・シャーロット	
	(65) 公表番号	特表2013-544503 (P2013-544503A)		THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHARLOTTE	
	(43) 公表日	平成25年12月19日 (2013. 12. 19)		アメリカ合衆国28223ノースカロライナ州シャーロット、ユニバーシティ・シティ・プールバード9201番	
	(86) 国際出願番号	PCT/US2011/037972			
	(87) 国際公開番号	W02012/047317			
	(87) 国際公開日	平成24年4月12日 (2012. 4. 12)			
	審査請求日	平成25年8月7日 (2013. 8. 7)			
	(31) 優先権主張番号	12/924, 952		(74) 代理人	100110249
	(32) 優先日	平成22年10月8日 (2010. 10. 8)		弁理士 下田 昭	
	(33) 優先権主張国	米国 (US)		(72) 発明者	ピンク ムカージー
	微生物の受託番号	ATCC PTA-11550			アメリカ合衆国、ノースカロライナ州 28173、ワックスホー、ワンダリング ウェイ ドライブ 804
	前置審査				最終頁に続く