

(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2020-515286

(P2020-515286A)

(43) 公表日 令和2年5月28日 (2020.5.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-567512 (P2019-567512)	(71) 出願人	519312016
(86) (22) 出願日	平成30年2月27日 (2018.2.27)		カイロス セラピューティクス, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	令和1年10月25日 (2019.10.25)		アメリカ合衆国 バージニア 20110
(86) 国際出願番号	PCT/US2018/020050		, マナッサス, ユニバーシティ プールバード 10900
(87) 国際公開番号	W02018/157169	(71) 出願人	398044754
(87) 国際公開日	平成30年8月30日 (2018.8.30)		ユニバーシティ オブ ジョージア リサーチ ファウンデーション, インコーポレイテッド
(31) 優先権主張番号	62/463,868		アメリカ合衆国 ジョージア 30602
(32) 優先日	平成29年2月27日 (2017.2.27)		, アセンス, ディーダブリュー ブルックス ドライブ (番地なし)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌を処置する抗体コンストラクトおよび方法

(57) 【要約】

本明細書では、C E A C A M 6 に特異的に結合する抗体および関連ポリペプチドが提供される。抗体および/またはポリペプチドは、二重特異性 T 細胞エンゲージャーとして構成することができる。抗体および/またはポリペプチドは、キメラ抗原受容体として構成することもできる。本明細書で提供される抗体および関連ポリペプチドを使用した、癌、例えば膀胱癌の検出および処置の方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された抗体、その抗原結合部分、またはキメラ抗原受容体（CAR）であって、

- g．配列番号 4 または 10 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1、
- h．配列番号 5 または 11 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2、
- i．配列番号 6 または 12 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3、
- j．配列番号 1 または 7 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1、
- k．配列番号 2 または 8 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2、および

l．配列番号 3 または 9 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3 からなる群から選択される 1 つ以上の重鎖および軽鎖相補性決定領域（CDR）を含む、単離された抗体、その抗原結合部分、またはキメラ抗原受容体（CAR）。 10

【請求項 2】

以下の軽鎖相補性決定領域（CDR）：

- d．配列番号 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1、
- e．配列番号 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2、および
- f．配列番号 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3 を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または CAR。

【請求項 3】

以下の軽鎖相補性決定領域（CDR）：

- d．配列番号 10 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1、 20
- e．配列番号 11 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2、および
- f．配列番号 12 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3 を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または CAR。

【請求項 4】

以下の重鎖相補性決定領域（CDR）：

- a．配列番号 1 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1、
- b．配列番号 2 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2、および
- c．配列番号 3 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3 を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または CAR。 30

【請求項 5】

以下の重鎖相補性決定領域（CDR）：

- a．配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1、
- b．配列番号 8 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2、および
- c．配列番号 9 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3 を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または CAR。 30

【請求項 6】

以下の相補性決定領域（CDR）：

- g．配列番号 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1、
- h．配列番号 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2、
- i．配列番号 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3、 40
- j．配列番号 1 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1、
- k．配列番号 2 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 2、および
- l．配列番号 3 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 3 を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または CAR。

【請求項 7】

以下の相補性決定領域（CDR）：

- g．配列番号 10 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 1、
- h．配列番号 11 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 2、
- i．配列番号 12 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR 3、
- j．配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR 1、 50

k . 配列番号 8 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2、および

l . 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R。

【請求項 8】

配列番号 1 3 ~ 1 7 および 2 1 2 5 から選択される配列を有する重鎖を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R。

【請求項 9】

配列番号 1 8 ~ 2 0 および配列番号 2 6 ~ 2 8 から選択される配列を有する軽鎖を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R。

【請求項 1 0】

配列番号 1 3 ~ 1 7 から選択される配列を有する重鎖と、配列番号 1 8 ~ 2 0 から選択される配列を有する軽鎖とを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R。

【請求項 1 1】

配列番号 2 1 ~ 2 5 から選択される配列を有する重鎖と、配列番号 2 6 ~ 2 8 から選択される配列を有する軽鎖とを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R。

【請求項 1 2】

C D R に含まれない配列中に保存的置換をさらに含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R。

【請求項 1 3】

前記抗体またはポリペプチドが、

免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、C D R グラフト抗体、ヒト化抗体、F a b、F a b'、F (a b') 2、F v、ジスルフィド結合 F v、s c F v、単一ドメイン抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体、二重特異性抗体 (d u a l s p e c i f i c a n t i b o d y)、抗イディオタイプ抗体、二重特異性抗体 (b i s p e c i f i c a n t i b o d y)、および二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E) からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R。

【請求項 1 4】

前記単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R が、癌細胞の表面上にある抗原に特異的に結合する、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R。

【請求項 1 5】

前記単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R が、癌幹細胞の表面上にある抗原に特異的に結合し、正常な腸細胞に特異的に結合しない、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R。

【請求項 1 6】

2 つの結合部位を含む二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E) であって、第 1 の結合部位が請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の抗原結合部分を含み、第 2 の結合部位が、T 細胞に特異的に結合する抗体の抗原結合部分を含む、二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E)。

【請求項 1 7】

T 細胞に特異的に結合する抗体の前記抗原結合部分が、抗体の抗 C D 3 抗原結合部分である、請求項 1 6 に記載の二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E)。

【請求項 1 8】

少なくとも 1 つの抗原結合部分が s c F v である、請求項 1 6 ~ 1 7 のいずれかに記載の二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E)。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 8 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、C A R、また

10

20

30

40

50

は B i T E と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、C A R、または B i T E をコードする、核酸。

【請求項 21】

前記核酸配列のうちの 1 つ以上が、配列番号 29 ~ 44 から選択される配列を含む、請求項 20 に記載の核酸。

【請求項 22】

前記核酸が c D N A である、請求項 20 ~ 21 のいずれかに記載の核酸。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、C A R、または B i T E を含む、細胞。

【請求項 24】

前記細胞が免疫細胞である、請求項 23 に記載の細胞。

【請求項 25】

前記細胞が、

T 細胞、NK 細胞、および NK T 細胞からなる群から選択される、請求項 24 に記載の細胞。

【請求項 26】

前記単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R が細胞表面上で発現する、請求項 23 ~ 25 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 27】

癌を処置することを必要とする対象において癌を処置する方法であって、請求項 23 ~ 26 のいずれかに記載の細胞を前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 28】

癌を処置することを必要とする対象における癌を処置する方法であって、請求項 20 ~ 22 に記載の核酸を前記対象に投与することを含み、前記対象の T 細胞は、前記核酸によってコードされた前記ポリペプチドを発現させる、方法。

【請求項 29】

前記癌が

膵癌、肺癌、非小細胞肺癌、結腸癌、乳癌、肝癌、および前立腺癌からなる群から選択される、請求項 27 ~ 28 のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

患者由来の生体試料中の C E A C A M 6 を検出する方法であって、

a) 前記患者由来の前記生体試料を、糖ペプチドを含む第 1 のエピトープに特異的に結合する第 1 の抗体と接触させて、前記第 1 の抗体と前記 C E A C A M 6 との間に第 1 の複合体を形成すること、

b) 前記第 1 の複合体を、第 2 のエピトープに特異的に結合する第 2 の抗体であって、前記第 1 のエピトープおよび前記第 2 のエピトープが異なっている、第 2 の抗体と接触させて、第 2 の複合体を形成することであって、前記第 2 の複合体が、前記第 1 の抗体と、C E A C A M 6 と、第 2 の抗体とを含む、形成すること、

c) 前記第 2 の複合体を検出し、それにより C E A C A M 6 を検出すること、を含む、方法。

【請求項 31】

前記生体試料が、血清、血液、または血漿試料を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記第 1 のエピトープが配列番号 51 またはそのフラグメントを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記第 1 のエピトープが配列番号 101 またはそのフラグメントを含む、請求項 32 に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 3 4】

前記第 1 のエピトープが配列番号 7 7 またはそのフラグメントを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記第 2 の抗体が、検出可能な標識を含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記検出可能な標識が、ビオチン基、酵素、色素、発光基、および蛍光基からなる群から選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記第 1 の抗体が固体支持体上に固定されている、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記第 1 の抗体がヒト化抗体である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記ヒト化抗体が請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載のヒト化抗体である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記患者が膵癌に罹患しているかまたは膵癌の危険性がある、請求項 3 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

配列表

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出され、その全体が参照により本明細書に援用される配列表を含む。2 0 1 8 年 2 月 2 7 日に作成された当該 A S C I I コピーは G 6 5 2 7 - 0 0 3 0 0 _ _ S L . t x t と名付けられ、大きさは 7 4 , 2 9 1 バイトである。

【背景技術】

【0 0 0 2】

抗体は、十分に確立された治療法である。当初、マウス抗体は治療薬として使用されていたが、その有用性はマウス特異的配列に対するヒトの免疫応答によって妨げられていた。この応答は、マウス特異的配列がヒト配列に置き換えられたヒト化抗体の使用により改善された。後の修正には、抗体 - 薬物結合体 (A D C) を形成する毒性分子の共有結合、2 価抗体を形成する 2 つの異なる結合部位、ならびに抗原に対する 1 つの結合部位および T 細胞上の C D 3 分子へのその他の結合部位を有する切断型抗体が含まれる (二重特異的 T 細胞エンゲージャーまたは B I T E 抗体)。抗体結合部位は、トランスフェクトした細胞が所望の抗原を認識することができる T 細胞およびナチュラルキラー (N K) 細胞またはナチュラルキラー T (N K T) 細胞などの他の免疫細胞内へ導入することができるキメラ抗原受容体 (C A R) を形成するために使用されてきた。このアプローチは、免疫認識を回避するよう腫瘍が修飾することができる主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) の認識を必要としない免疫受容体をトランスフェクトされた細胞に持たせる。その上、標的にされた癌細胞と抗体を結合させると、トランスフェクトされた細胞 (T 細胞、N K または N K T) は、活性化され、それらの殺滅能力が増強される。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 3】

癌細胞の表面上に存在する抗原に特異的に結合する抗体試薬、例えば、ヒト化抗体、B I T E および C A R が本明細書に記載される。T 細胞によって発現するとき、このような C A R は、免疫系による癌細胞の認識および標的化を可能にする。したがって、癌の処置におけるこれらの修飾抗体および C A R - T 療法の使用に関する組成物および方法が本明細書に提供される。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 4 】

一態様において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはキメラ抗原受容体（C A R）であって、この抗体、その抗原結合部分、またはC A Rが、

- a．配列番号4または10のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、
- b．配列番号5または11のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 2、
- c．配列番号6または12のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 3、
- d．配列番号1または7のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、
- e．配列番号2または8のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 2、および

f．配列番号3または9のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 3からなる群から選択される1つ以上の重鎖および軽鎖相補性決定領域（C D R）を含む、単離された抗体、その抗原結合部分、またはキメラ抗原受容体（C A R）が本明細書に記載される。

10

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、軽鎖相補性決定領域（C D R）：

- a．配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、
- b．配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 2、および
- c．配列番号6のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 3を含むことができる。

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、軽鎖相補性決定領域（C D R）：

- a．配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、
- b．配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 2、および
- c．配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 3を含むことができる。

20

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、重鎖相補性決定領域（C D R）：

- a．配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、
- b．配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 2、および
- c．配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 3を含むことができる。

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、重鎖相補性決定領域（C D R）：

- d．配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、
- e．配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 2、および
- f．配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 3を含むことができる。

30

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、相補性決定領域（C D R）：

- a．配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、
- b．配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 2、
- c．配列番号6のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 3、
- d．配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、
- e．配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 2、および
- f．配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 3を含むことができる。

いくつかの態様において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、相補性決定領域（C D R）：

40

- a．配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、
- b．配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 2、
- c．配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 3、
- d．配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、
- e．配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 2、および
- f．配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 3を含むことができる。

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、配列番号13～17および配列番号21～25から選択される配列を有する重鎖を含むことができる。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC

50

A R は、配列番号 18 ~ 20 および配列番号 26 ~ 28 から選択される配列を有する軽鎖を含むことができる。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R は、配列番号 13 ~ 17 から選択される配列を有する重鎖と、配列番号 18 ~ 20 から選択される配列を有する軽鎖とを含むことができる。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R は、配列番号 21 ~ 25 から選択される配列を有する重鎖と、配列番号 26 ~ 28 から選択される配列を有する軽鎖とを含むことができる。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R は、C D R に含まれない配列において保存的置換を含むことができる。

【0005】

いくつかの実施形態において、抗体またはポリペプチドは、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、C D R グラフト抗体、ヒト化抗体、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、ジスルフィド結合 F v、s c F v、単ドメイン抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体、二重特異性抗体 (d u a l s p e c i f i c a n t i b o d y)、抗イディオタイプ抗体、二重特異性抗体 (b i s p e c i f i c a n t i b o d y)、および二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E) からなる群から選択することができる。

10

【0006】

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R は、癌細胞の表面上にある抗原に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R は、癌幹細胞の表面上にある抗原に特異的に結合することができ、正常な腸細胞に特異的に結合しない。

20

【0007】

一態様において、2つの結合部位を含む二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E) であって、第 1 の結合部位が本明細書に記載される抗原結合部分を含み、第 2 の結合部位が T 細胞に特異的に結合する抗体の抗原結合部分を含む、二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E) が。いくつかの実施形態において、T 細胞に特異的に結合する抗体の抗原結合部分は、抗体の抗 C D 3 抗原結合部分であり得る。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの抗原結合部分は s c F v であり得る。

【0008】

一態様において、本明細書に記載される単離された抗体、その抗原結合部分、C A R、または B i T E と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が、本明細書に記載される。

30

【0009】

一態様において、本明細書に記載される単離された抗体、その抗原結合部分、C A R、または B i T E をコードする核酸が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、この核酸は、配列番号 29 ~ 44 から選択される配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、この核酸は c D N A であり得る。

【0010】

一態様において、本明細書に記載される単離された抗体、その抗原結合部分、C A R、または B i T E を含む細胞が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、この細胞は免疫細胞であり得る。いくつかの実施形態において、この細胞は、T 細胞、N K 細胞、および N K T 細胞からなる群から選択することができる。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R は、細胞表面上に発現することができる。

40

【0011】

一態様において、癌を処置することを必要とする対象において癌を処置する方法であって、本明細書に記載される細胞を対象に投与することを含む、方法が明細書に記載される。一態様において、癌を処置することを必要とする対象において癌を処置する方法であって、本明細書に記載される核酸を対象に投与することを含み、対象の T 細胞が、核酸によってコードされるポリペプチドを発現する、方法が本明細書に記載される。いくつかの実

50

施形態において、癌は、膵癌、肺癌、非小細胞肺癌、結腸癌、乳癌、肝癌、および前立腺癌からなる群から選択することができる。

患者からの生物学的試料中のCEACAM6を検出する方法も提供される。本方法は、患者由来の生体試料を、糖ペプチドを含む第1のエピトープに特異的に結合する第1の抗体と接触させて、第1の抗体とCEACAM6との間に第1の複合体を形成することと、第1の複合体を、第2のエピトープに特異的に結合する第2の抗体であって、第1のエピトープおよび第2のエピトープが異なっている、第2の抗体と接触させて、第2の複合体を形成することであって、第2の複合体が第1の抗体と、CEACAM6と、第2の抗体とを含む、形成することと、第2の複合体を検出し、それによりCEACAM6を検出することと、を含むことができる。生体試料は、血清、血液、または血漿試料であり得る。第1のエピトープは、配列番号51もしくはそのフラグメント、配列番号101もしくはそのフラグメント、または配列番号77もしくはそのフラグメントを含むことができる。第2の抗体は、検出可能な標識を含むことができる。検出可能な標識は、ビオチン基、酵素、色素、発光基、および蛍光基からなる群から選択することができる。いくつかの実施形態において、第1の抗体は、固体支持体上に固定することができる。第1の抗体は、ヒト化抗体であり得る。ヒト化抗体は、配列番号1～28のいずれかのアミノ酸配列であり得る。患者は、膵癌に罹患している患者、または膵癌の危険性がある患者であり得る。いくつかの実施形態において、患者は膵炎に罹患している患者であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0012】

本特許ファイルまたは出願ファイルには、カラーで作成された少なくとも1つの図面が含まれている。カラー図面（複数可）を含む本特許または特許出願公開の複製物は、請求および所要の料金の支払いに応じて、特許庁によって提供されることになる。

【0013】

【図1】プロテインA精製PTA-2357ヒト化バリエーション抗体のクーマシーブルー染色したSDS-PAGEゲルを図示している。試料をNuPage4～12%ビス-トリスゲル（Invitrogenカタログ番号NP0322BOX）上にロードし、200Vで30分間泳動した。製造元が推奨するようにゲルを調製および泳動した。レーンは以下に示すとおりであった：レーン1：PageRuler Plus Prestained Protein Ladder（Fermentas；Waltham，MA、#SM1811）レーン2：1.0μg PTA-2357キメラIgG1抗体レーン3：1.0μg PTA-2357VH1/VK2IgG1抗体レーン4：1.0μg PTA-2357VH2/VK2IgG1抗体レーン5：1.0μg PTA-2357VH2/VK3IgG1抗体レーン6：1.0μg PTA-2357VH3/VK2IgG1抗体レーン7：1.0μg PTA-2357VH4/VK2IgG1抗体。

【図2】プロテインA精製PTA-2358ヒト化バリエーション抗体のクーマシーブルー染色SDS-PAGEゲルを図示している。試料は、NuPage4～12%ビス-トリスゲル（Invitrogen、Grand Island，NY；カタログ番号NP0322BOX）上にロードし、200Vで30分間泳動した。製造元が推奨するようにゲルを調製および泳動した。レーンは以下に示すとおりであった：レーン1：PageRuler Plus Prestained Protein Ladder（Fermentas #SM1811）レーン2：1.0μg PTA-2358キメラIgG1抗体レーン3：1.0μg PTA-2358VH1/VK1IgG1抗体レーン4：1.0μg PTA-2358VH2/VK1IgG1抗体レーン5：1.0μg PTA-2358VH2/VK2IgG1抗体レーン6：1.0μg PTA-2358VH3/VK1IgG1抗体レーン7：1.0μg PTA-2358VH4/VK1IgG1抗体レーン8：1.0μg PTA-2358VH4/VK2IgG1抗体レーン9：1.0μg PTA-2358VH5/VK1IgG1抗体レーン10：1.0μg PTA-2358VH5/VK2IgG1抗体。

【図3A】小細胞肺癌（CSCLC）細胞に結合しているNS0由来ヒト化バリエーション抗

体を用いた競合アッセイおよびフローサイトメトリー分析を示す。さまざまな濃度の各ヒト化抗体を固定濃度のマウス抗体 ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ P T A - 2 3 5 7 または $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ P T A - 2 3 5 8) と混合し、C S C L C 細胞とともにインキュベートした。F I T C 結合ヤギ抗マウス F c を介して結合を検出した。データは、正規化された % 陽性事象としてプロットした (R 2 においてゲート処理)。(図 3 A) P T A - 2 3 5 7 はヒト化抗体をリードする。(図 3 B) および (図 3 C) P T A - 2 3 5 8 はヒト化抗体をリードする。

【図 3 B】同上。

【図 3 C】同上。

【図 4 - 1】P T A - 2 3 5 7 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V H バリエーション 1 を示す。 10

【図 4 - 2】同上。

【図 5 - 1】P T A - 2 3 5 7 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V H バリエーション 2 を示す。

【図 5 - 2】同上。

【図 6 - 1】P T A - 2 3 5 7 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V H バリエーション 3 を示す。

【図 6 - 2】同上。

【図 7 - 1】P T A - 2 3 5 7 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V H バリエーション 4 を示す。 20

【図 7 - 2】同上。

【図 8 - 1】P T A - 2 3 5 7 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V H バリエーション 5 を示す。

【図 8 - 2】同上。

【図 9 - 1】P T A - 2 3 5 7 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V K バリエーション 1 を示す。

【図 9 - 2】同上。

【図 10 - 1】P T A - 2 3 5 7 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V K バリエーション 2 を示す。

【図 10 - 2】同上。 30

【図 11 - 1】P T A - 2 3 5 7 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V K バリエーション 3 を示す。

【図 11 - 2】同上。

【図 12 - 1】P T A - 2 3 5 8 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V H バリエーション 1 を示す。

【図 12 - 2】同上。

【図 13 - 1】P T A - 2 3 5 8 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V H バリエーション 2 を示す。

【図 13 - 2】同上。

【図 14 - 1】P T A - 2 3 5 8 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V H バリエーション 3 を示す。 40

【図 14 - 2】同上。

【図 15 - 1】P T A - 2 3 5 8 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V H バリエーション 4 を示す。

【図 15 - 2】同上。

【図 16 - 1】P T A - 2 3 5 8 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V H バリエーション 5 を示す。

【図 16 - 2】同上。

【図 17 - 1】P T A - 2 3 5 8 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V K バリエーション 1 を示す。 50

- 【図 17 - 2】同上。
- 【図 18 - 1】PTA - 2358 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V K バリエーション 2 を示す。
- 【図 18 - 2】同上。
- 【図 19 - 1】PTA - 2358 の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列 V K バリエーション 3 を示す。
- 【図 19 - 2】同上。
- 【図 20】HTK29 細胞から成長した腫瘍球が MA b 109 による結合を示すことを実証している。HT29 ヒト大腸癌細胞を幹細胞培養培地で 10 日間成長させ、腫瘍球（癌幹細胞で濃縮）を形成した。親および腫瘍球をウエスタンブロット法のために収集した。上、抗 CEACAM6 ポリペプチド抗体（対照；クローン 9A6（Santa Cruz # sc. 59899）を用いた SDS PAGE 後の総 HT29 細胞ライセートおよび腫瘍球（および陽性対照として CEACAM6 を発現する Capan1 細胞ライセート）のブロット法；下、10 日間成長した HT29 細胞ライセートまたは腫瘍球の 2 つのタンパク質濃度（25 mg および 35 mg）を SDS PAGE に供し、MA b 109 またはベータアクチンでブロットした。
- 【図 21】PNG アーゼ F 処理後の脾癌細胞株 B x PC3 T C L に対する MA b 109 の反応性を分析するイムノブロットの結果を示す。
- 【図 22】癌胎児性抗原（CEA）ファミリーの構造を示す。
- 【図 23】CEACAM6 の構造、CEACAM6 のアミノ酸配列、およびこのアミノ酸配列内の 12 の潜在的な N 結合型グリコシル化部位を示す。
- 【図 24】C6f1 - pFUSE コンストラクト（配列番号 51）を示す。
- 【図 25】HEK - 293 細胞が MA b 109 グリコエピトープを合成する生合成機構を含んでいることを示すイムノブロット法の実験結果を示す。
- 【図 26】種々のグリコシダーゼを用いた HEK 野生型 C6f1 の処理を示すイムノブロット法の実験結果を示す。
- 【図 27】HEK Lec1 細胞内で発現した CEACAM6 フラグメント 1 グリカンを示す。
- 【図 28】HEK Lec1 細胞内で発現した MA b 109 エピトープが Endo H 耐性であることを示すイムノブロット法の実験結果を示す。
- 【図 29】Endo H 処理後に HEK Lec1 細胞内で発現した CEACAM6 フラグメント 1 グリカンを示す。
- 【図 30】CEACAM5（配列番号 55）CEACAM6（配列番号 56）および CEACAM8（配列番号 57）についての C 末端の配列アラインメントを示す。
- 【図 31】C6f1 の ³⁰⁰QAH³⁰² から ³⁰⁰HTT₃₀₂ への特定部位の変異誘発が MA b 109 の反応性を消失させることを示すイムノブロット法の実験結果を示す。
- 【図 32】CEACAM8 の 3 つのアミノ酸が変異すると、MA b 109 グリコエピトープが発現することを示すイムノブロット法の実験結果を示す。
- 【図 33】CEACAM6 エピトープのグリコシル化部位の下流の CEACAM8 アミノ酸の変異が MA b 109 エピトープの発現をもたらすことを示すイムノブロット法の実験結果を示す。
- 【図 34】C6f1 中の各 N 結合型シークオンの欠失（N → Q）（配列番号 51）の効果を示すイムノブロット法の実験結果を示す。
- 【図 35】たった 1 個の AsnXSer / Thr シークオンの変異が MA b 109 結合活性を除去することを示す構造分析を示す（配列番号 51）。
- 【図 36】配列番号 51 における追加の変異を要約する。
- 【図 37】300 ~ 318 ペプチドセグメントの変異および MA b 109 結合の測定値を要約する。
- 【図 38】合成ペプチド（配列番号 102）および合成グリコペプチド（配列番号 102）が 30 マイクロモル濃度で MA b 109 結合を阻害しなかったことを示す実験結果を要

約する。

【図 39】M A b 1 0 9 結合活性に対する C 末端ペプチドの効果を示す実験結果を要約する。

【図 40】ヒト血清中の C E A C A M 6 の検出のための E L I S A の結果を示す。

【図 41】M A b 1 0 9 を用いたヒト血清中の C E A C A M 6 グリコエピトープの検出のための E L I S A の結果を示す。

【図 42】非罹患患者、慢性膵炎患者、および膵癌患者の第 1 のセットの血清中の M A b 1 0 9 を使用した、C E A C A M 6 グリコエピトープの検出のための E L I S A の結果を示す。

【図 43】非罹患患者、慢性膵炎患者、および膵癌患者の第 2 のセットの血清中の M A b 1 0 9 を使用した、C E A C A M 6 グリコエピトープの検出のための E L I S A の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

癌細胞、例えば肺癌細胞、結腸癌細胞、または膵癌細胞に存在する抗原に特異的に結合する抗体および関連ポリペプチドが本明細書に記載される。抗原、C E A C A M 6 (C D 6 6 c 、 「 分 化 ク ラ ス タ ー 6 6 c 」 、 癌 胎 児 性 抗 原 関 連 細 胞 接 着 分 子 6 、 C E A L 、 お よ び N C A と し て も 既 知) は 、 免 疫 グ ロ ブ リ ン ス ー パ ー フ ァ ミ リ ー に 属 する 膜 貫 通 糖 タ ン パ ク 質 である。例示的な C E A C A M 6 アミノ酸配列は、G e n B a n k N P _ 0 0 2 4 7 4 . 4 であり得る。C E A C A M 6 をコードする例示的な m R N A 配列は、G e n B a n k N M _ 0 0 2 4 8 3 . 6 であり得る。C E A C A M 6 に特異的に結合する例示的な抗体は、マウス抗体 M A b 1 0 9 であり得る。いくつかの実施形態において、C E A C A M 6 に特異的に結合する例示的なヒト化抗体は、マウスモノクローナル抗体 M A b 1 0 9 に基づくことができる。このような抗体およびポリペプチドは、例えば、癌の診断、予後、および / または処置を可能にすることができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される技術は、二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B I T E) 抗体に関する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される技術は、癌についてのキメラ抗原受容体 (C A R) および C A R - T 療法に関する。

【0015】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される技術は、癌細胞表面抗原などの抗原を結合する抗体の抗原結合部分と、結合する同じ抗体の別の抗原結合部分とを含む抗体および / またはポリペプチドに関する。「二重特異性 T 細胞エンゲージャー」または「B I T E」は、免疫エフェクター細胞上の癌抗原と活性化抗原とを同時に結合する抗体を称する。本明細書で使用する場合、「二重特異性 T 細胞エンゲージャー」または「B I T E」は、免疫エフェクター細胞上の癌抗原と活性化抗原とを同時に結合する抗体を称する。本明細書で使用する場合、「キメラ抗原受容体」または「C A R」は、細胞シグナル伝達ドメインおよび / または細胞活性化ドメインに連結した抗原結合ドメイン (抗体の抗原結合部分 (例えば、s c F V)) を含む人工的に構築された複合ポリペプチドを称する。いくつかの実施形態において、細胞シグナル伝達ドメインは、T 細胞シグナル伝達ドメインであり得る。いくつかの実施形態において、細胞活性化ドメインは T 細胞活性化ドメインであり得る。C A R は、T 細胞および他の免疫細胞の特異性および反応性を、選択された標的へと M H C に制限されない様式で向け直し、モノクローナル抗体の抗原結合特性を利用する。M H C に制限されない抗原認識は、C A R を発現する T 細胞に、抗原プロセッシングとは無関係に抗原を認識する能力を付与し、したがって、腫瘍回避の主要な機序を迂回する。その上、T 細胞内発現させると、C A R は有利なことに、内在性 T 細胞受容体 (T C R) アルファ鎖およびベータ鎖と二量体化しない。最も一般的には、C A R の細胞外結合ドメインは、マウスまたはヒト化モノクローナル抗体の可変重および軽領域の融合に由来する単鎖可変フラグメント (s c F v) から構成される。あるいは、F a b に由来する s c F v を (例えば、F a b ライブラリーから得られる抗体の代わりに) 使用してもよく、種々の実施形態において、この s c F v は膜貫通ドメインに、次いで細胞内シグナル伝

10

20

30

40

50

達ドメインに融合する。「第1世代」CARには、抗原結合の際にCD3ゼータシグナルを単に提供するものが含まれる。「第2世代」CARには、共刺激（例えば、CD28またはCD137）および活性化（CD3Qの両方を提供するものが含まれる。「第3世代」のCARには、複数の共刺激（例えば、CD28およびCD137）および活性化（CO3Q）を提供するものが含まれる。種々の実施形態において、CARは、抗原に対して高い親和性または結合力を有するように選択される。CARのさらなる詳細は、例えば、これらの各々が全体として参照により本明細書に援用されるMaus et al. Blood 2014 123:2624-35、Reardon et al. Neuro-Oncology 2014 16:1441-1458、Hoyos et al. Haematologica 2012 97:1622、Byrd et al. J Clin Oncol 2014 32:3039-47、Maher et al. Cancer Res 2009 69:4559-4562、およびTamada et al. Clin Cancer Res 2012 18:6436-6445において認めることができる。

10

20

30

【0016】

「癌細胞」は、インビボ、エクシビボ、または組織培養のいずれかにおける、新たな遺伝材料の取り込みを必ずしも包含しない自然発生的なまたは誘導された表現型の変化を有する癌性細胞、前癌細胞、または形質転換細胞である。形質転換は、形質転換ウイルスを用いた感染および新たなゲノム核酸の取り込み、または外来性核酸の取り込みから生じる可能性があるが、自然発生的に、または発癌物質への曝露後に生じることもでき、それにより内在性遺伝子を変異させることができる。形質転換/癌は、例えば、形態学的変化、細胞の不死化、異常な成長制御、病巣形成、足場への非依存性、悪性、接触阻害の喪失および成長の密度制限、成長因子または血清への非依存性、腫瘍特異的マーカー、侵襲性または転移、ならびにヌードマウスなどの適切な動物宿主における腫瘍成長と関連している。例えば、Freshney, CULTURE ANIMAL CELLS: MANUAL BASIC TECH. (3rd ed., 1994)を参照されたい。本明細書で使用する場合、「癌」という用語は、身体の器官および系の正常な機能を妨げる細胞の制御されていない成長を称する。癌または腫瘍に罹患している対象は、対象の体内に存在する客観的に測定可能な癌細胞を有する対象である。この定義には、良性および悪性の癌、ならびに休止状態の腫瘍または微小転移が含まれる。元の場所から移動し、重要な器官に播種する癌は、最終的に、影響を受けた器官の機能劣化を経て対象の死亡をもたらす可能性がある。

【0017】

一態様において、癌細胞の表面上の抗原に特異的に結合する単離された抗体、その抗原結合部分、またはキメラ抗原受容体（CAR）であって、この抗体、その抗原結合部分、またはCARが、

- a. 配列番号4または10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
- b. 配列番号5または11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、
- c. 配列番号6または12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、
- d. 配列番号1または7のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
- e. 配列番号2または8のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および
- f. 配列番号3または9のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3からなる群から選択される1つ以上の重鎖および軽鎖相補性決定領域（CDR）を含む、単離された抗体、その抗原結合部分、またはキメラ抗原受容体（CAR）が本明細書に記載される。

40

【0018】

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはCARは、軽鎖相補性決定領域（CDR）：

- a. 配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
- b. 配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、および
- c. 配列番号6のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む。

50

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、軽鎖相補性決定領域（C D R）：

- a．配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、
- b．配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 2、および
- c．配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 3を含む。

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、重鎖相補性決定領域（C D R）：

- a．配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、
- b．配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 2、および
- c．配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 3を含む。

10

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、重鎖相補性決定領域（C D R）：

- a．配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、
- b．配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 2、および
- c．配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 3を含む。

【0019】

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、相補性決定領域（C D R）：

- a．配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、
- b．配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 2、
- c．配列番号6のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 3、
- d．配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、
- e．配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 2、および
- f．配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 3を含む。

20

【0020】

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、相補性決定領域（C D R）：

- a．配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、
- b．配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 2、
- c．配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 3、
- d．配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、
- e．配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 2、および
- f．配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 3を含む。

30

【0021】

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、配列番号13～17および配列番号21～25から選択される配列を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、配列番号18～20および配列番号26～28から選択される配列を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、配列番号13～17から選択される配列を有する重鎖と、配列番号18～20から選択される配列を有する軽鎖とを含む。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、配列番号21～25から選択される配列を有する重鎖と、配列番号26～28から選択される配列を有する軽鎖とを含む。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、C D Rに含まれない配列において保存的置換を含む。

40

【0022】

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、癌細胞の表面上の抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、例えば、正常細胞への結合と比較して、癌細胞の表面上の抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、単離された抗体、そ

50

の抗原結合部分、またはCARは、癌幹細胞の表面上の抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはCARは、癌幹細胞の表面上の抗原に特異的に結合し、正常な腸細胞に特異的に結合しない。

【0023】

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはCARは、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDRグラフト抗体、ヒト化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド結合Fv、scFv、単ドメイン抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体、二重特異性抗体(dual specific antibody)、抗イディオタイプ抗体、および二重特異性抗体(bispecific antibody)からなる群から選択される。

10

【0024】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体の抗原結合部分を含む二重特異性T細胞エンゲージャー(BiTE(商標))が、本明細書に記載される。BiTEは、2つの異なる結合部位(例えば、2つのアーム=2つの異なる結合部位)を有するmoabの構造である。通常、1つの部位(例えば、アーム)は腫瘍抗原に向けられ、他の部位(例えば、アーム)はCD3抗原に向けられる。したがって、BiTEは、各々がアームまたは結合部位に寄与している2つのモノクローナル抗体のキメラとして考えることができる。BiTEが結合すると、腫瘍細胞とT細胞との間を架橋している。BiTE分子は、少なくとも2つのscFvドメインを含むことができ、それらの各々は異なるエピートブ特異性を有する。BiTE分子は、1)いかなるT細胞とも、および2)腫瘍細胞の殺滅に向け直す特異的な抗原発現腫瘍細胞とも関与する。いくつかの実施形態において、いかなるT細胞へも関与する、例えば、いかなるT細胞にも結合するscFvドメインは、抗CD3scFvであり得る。BiTEの非限定例は、プリナツモマブである。BiTEは、当技術分野で、例えば、Oberst et al. mAbs 2014 6:1571-1584、Zimmerman et al. International Immunology 2014 27:31-37、およびWickramasinghe Discov Med 2013 16:149-152においてさらに記載され、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に援用される。

20

【0025】

いくつかの実施形態において、抗体、その抗原結合フラグメント、および/またはCARは、単離されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、抗体、その抗原結合フラグメント、および/またはCARは、精製されたポリペプチドである。いくつかの実施形態において、抗体、その抗原結合フラグメント、および/またはCARは、操作されたポリペプチドである。

30

【0026】

本明細書に記載される抗体、その抗原結合フラグメント、またはCARが配列番号1~12の配列と同一ではない少なくとも1つのCDRを含む実施形態において、その少なくとも1つのCDRのアミノ酸配列は当業者に周知の方法によって選択することができる。例えば、Fujii, 2004, "Antibody affinity maturation by random mutagenesis" in Methods in Molecular Biology: Antibody Engineering 248:345-349(その全体が参照により本明細書に援用される)は、特に図2および第3.3節において、関心対象の何らかのCDRについてのライブラリーを作成する方法について記載している。これにより、当業者は、本明細書に記載される特定のCDR配列の保存的置換バリエーションを含む代替CDRを同定することができ、このことは、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメント中に存在するときに、癌細胞表面抗原を結合することになる抗原またはその抗原結合フラグメントを結果的に生じることになる。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、癌細胞に特異的に結合することができる。Fujii et al.において記載される方法によって、当業者は、既知の重鎖フラグメントと組み合わせるとき所望の結合挙動を付与するこ

40

50

とになる軽鎖配列についてスクリーニングすることもでき、その逆もまた同様である。

【0027】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、および／またはCARは、抗体-薬剤複合体に含めることができる。薬剤は、例えば、本明細書の他所に記載される化学療法分子であり得る。いくつかの実施形態において、抗体および／またはその抗原結合部分ならびに化学療法薬は、互いに直接複合体形成ならびに／または結合することができ、例えば、抗体-薬剤複合体であり得る。いくつかの実施形態において、結合は、例えば、水素結合、静電相互作用、またはファンデルワールス相互作用による非共有結合であり得るが、結合はまた、共有結合であってもよい。「複合体形成された」の意味するところは、少なくとも2つの分子の共有結合である。

10

【0028】

抗体-薬剤複合体における使用のためのリンカー、および抗体-薬物複合体を作製する方法は、当技術分野で既知であり、本明細書に記載される組成物に適合させることができる。例示的な抗体-薬剤複合体には、抗体およびMMAEが、パラアミノ安息香酸スパーサーであるバリンおよびシトルリンを含むカテプシン開裂可能なリンカーによって連結された、4-メルカプト吉草酸およびモモメチルオーリスチンE(MMAE)複合体(例えば、ブレンツキシマブMMAEおよびグレンバツムマブMMAE)を介して抗体およびメルタンシンが結合しているメルタンシン複合体(例えば、ピバツズマブメルタンシン、カンツズマブメルタンシン、およびロルボツズマブメルタンシン)と、マレイミドおよびカプロン酸付着基とを含むことができるが、これらに限定されない。適切なリンカー技術を含む抗体-薬剤複合体のさらなる考察は、例えば、これらの各々がその全体として参照により本明細書に援用される“Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins”Ed. Phillips, Gail Lewis, Humana Press; 2013、Zolot et al. Nature Reviews Drug Discovery 2013 12: 259-260、およびDucry and Stump. Bioconjugate Chem 2010 21: 5-13において認めることができる。

20

【0029】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される技術は、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、またはCARをコードする核酸に関する。いくつかの実施形態において、核酸は、配列番号29~44から選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸は、cDNAである。

30

【0030】

本明細書で使用する場合、「核酸」または「核酸配列」という用語は、リボ核酸、デオキシリボ核酸またはそれらの類似体のポリマー分子組込み単位を称する。核酸は、一本鎖でも二本鎖でもよい。一本鎖核酸は、変性した二本鎖DNAの一本鎖核酸であり得る。いくつかの実施形態において、核酸は、cDNA、例えばイントロンを欠失している核酸であり得る。

【0031】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、またはCARをコードする核酸は、ベクターによって含める。本明細書に記載される態様のいくつかにおいて、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCAR、またはその何らかのモジュールをコードする核酸配列は、ベクターに操作可能に連結される。「ベクター」という用語は、本明細書で使用する場合、宿主細胞への送達のためにまたは異なる宿主細胞間の移動のために設計された核酸コンストラクトを称する。本明細書で使用する場合、ベクターはウイルス性または非ウイルス性であり得る。「ベクター」という用語は、適切な制御要素と関連しているときに複製することができ、遺伝子配列を細胞に移動させることができる何らかの遺伝要素を包含する。ベクターには、クローン形成ベクター、発現ベクター、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ピリオンなどを含むことができるが、これらに限定されない。

40

50

【0032】

本明細書で使用する場合、「発現ベクター」という用語は、ベクター上の転写調節配列に連結された配列からのRNAまたはポリペプチドの発現を指示するベクターを称する。発現した配列はしばしば、細胞にとって異種性となるが、必ずしもそうではない。発現ベクターは、追加の要素を含むことがあり、例えば、発現ベクターは、2つの複製システムを有することがあり、したがってそのことが2つの生物において、例えば発現のためのヒト細胞において、ならびにクローン形成および増幅のための原核生物宿主において維持することができる。「発現」という用語は、RNAおよびタンパク質を産生すること、ならびに適宜、タンパク質を分泌することに関与する細胞過程を称し、適用可能な場合、例えば、転写、転写プロセッシング、翻訳ならびにタンパク質の折りたたみ、修飾およびプロセッシングを含むがこれらに限定されない。「発現産物」には、遺伝子から転写されたRNA、および遺伝子から転写されたmRNAの翻訳により得られたポリペプチドが含まれる。「遺伝子」という用語は、適切な調節配列に操作可能に連結されたときにインビトロまたはインビボでRNAへ転写された核酸配列(DNA)を意味する。遺伝子は、コードする領域の前後の領域、例えば5'非翻訳(5'UTR)または「リーダー」配列と、3'UTRまたは「トレーラー」配列、および個々のコードするセグメント(エクソン)間の介在配列(イントロン)を含むことがあり、または含まないことがある。

10

【0033】

本明細書で使用する場合、「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも1つの要素を含み、ウイルスベクター粒子にパッケージ化されることになる能力を有する核酸ベクターコンストラクトを称する。ウイルスベクターは、非必須ウイルス遺伝子の代わりに、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、またはCARをコードする核酸を含むことができる。ベクターおよび/または粒子は、インビトロまたはインビボのいずれかで何らかの核酸を細胞内に移入させる目的で利用してもよい。多数の形態のウイルスベクターが当技術分野で既知である。

20

【0034】

「組換えベクター」が意味するのは、異種核酸配列を含むベクター、またはインビボで発現することができる「導入遺伝子」である。本明細書に記載されるベクターは、いくつかの実施形態において、他の適切な組成物および療法と組み合わせることができることは理解されるべきである。いくつかの実施形態において、ベクターはエピソード性である。適切なエピソードベクターの使用は、対象における関心対象のヌクレオチドを高コピー数の染色体外DNA中に維持する手段を提供し、それにより染色体組込みの潜在的な影響を排除する。

30

【0035】

一態様において、本明細書に記載される単離された抗体、その抗原結合部分、またはCARを含む細胞が本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される単離された抗体、その抗原結合部分、またはCARは、細胞表面上で発現する。いくつかの実施形態において、細胞は、本明細書に記載される単離された抗体、その抗原結合部分、またはCARをコードする核酸を含む。

【0036】

いくつかの実施形態では、細胞は免疫細胞である。本明細書で使用する場合、「免疫細胞」は、免疫応答において役割を担っている細胞を称する。免疫細胞は造血起源であり、B細胞およびT細胞などのリンパ球；ナチュラルキラー細胞；単球、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球、および顆粒球などの骨髄細胞が含まれる。いくつかの実施形態において、細胞はT細胞；NK細胞；NKT細胞；B細胞またはT細胞などのリンパ球であり、いくつかの実施形態において、細胞は、単球、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球、または顆粒球などの骨髄細胞である。

40

【0037】

本明細書に記載される技術の態様は、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCAR、または本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCAR

50

をコードする核酸、または本明細書に記載される細胞を含む組成物に関する。いくつかの実施形態において、組成物は医薬組成物である。本明細書で使用する場合、「医薬組成物」という用語は、製薬産業における使用が承認された薬学的に許容される担体と組み合わせた活性薬を称する。「薬学的に許容される」という句は、健全な医学的判断の範囲内で、ヒトおよび動物の組織と接触させて使用するのに適した、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答、またはその他の問題もしくは合併症のない、妥当な利益／危険比に見合った化合物、材料、組成物、および／または剤形を称するために本明細書で採用される。

【0038】

中に溶解または分散した有効成分を含有する薬理学的組成物の調製は、当技術分野で十分に理解されており、製剤に基づいて限定される必要はない。典型的には、このような組成物は、液状溶剤または懸濁剤のいずれかとして注射可能なものとして調製されるが、液剤または懸濁剤に適した固体形態を溶液中で使用前に調製することもできる。調製物は、乳化することもできるか、またはリポソーム組成物として提示することもできる。有効成分は、薬学的に許容され、有効成分と適合性がある賦形剤と、本明細書に記載される治療方法での使用に適した量で混合することができる。適切な賦形剤は、例えば、水、塩類溶液、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびこれらの組み合わせである。さらに、所望の場合、組成物は、有効成分の有効性を強化または維持する湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤などの少量の補助物質を含有することができる。本明細書に記載される治療用組成物は、成分の薬学的に許容される塩を中に含むことができる。薬学的に許容される塩には、例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸で形成された酸付加塩（ポリペプチドの遊離アミノ基で形成）が含まれる。遊離カルボキシル基を用いて形成される塩は、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から得ることもできる。生理学的に許容される担体は、当技術分野で周知である。例示的な液体担体は、有効成分および水に加えて材料を含んでいない、または生理学的pH値のリン酸ナトリウム、生理学的塩類溶液、またはリン酸緩衝塩類溶液など、その両方などの緩衝液を含んでいる滅菌水溶液である。なおさらに、水性担体は、複数の緩衝塩、ならびに塩化ナトリウムおよび塩化カリウム、デキストロース、ポリエチレングリコールおよび他の溶質などの塩を含むことができる。液体組成物は、水に加えて、および水を除外するように、液相を含むこともできる。このような追加の液相の例次的なは、グリセリン、綿実油などの植物油、および水油エマルションである。特定の障害または容態の処置において有効であることになる本発明で使用する活性薬の量は、障害または容態の性質に依存することになり、標準的な臨床技術により決定することができる。

【0039】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCARを含む、または本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCARをコードする核酸を含む組成物は、凍結乾燥物であり得る。

【0040】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される技術は、治療有効量の本明細書に記載される組成物を含む注射器に関する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される技術は、治療有効量の本明細書に記載される組成物を含む容器、例えば、バッグおよび／または滅菌容器に関する。

【0041】

本明細書で使用する場合、「治療有効量」、「有効量」または「有効用量」という句は、腫瘍または悪性腫瘍の処置、予防、または管理において治療上または審美上の利益を提供する量、例えば、腫瘍または悪性腫瘍の少なくとも1つの症状、兆候、またはマーカーの統計的に有意な低下を提供する量を称する。治療有効量の決定は十分に、当業者の能力の範囲内である。概して、治療有効量は、対象の病歴、年齢、容態、および性別、ならびに

10

20

30

40

50

対象の医学的容態の重症度および種類、ならびに他の薬学的に活性のある薬剤の投与とともに変えることができる。

【0042】

一態様において、本明細書に記載される技術は、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCAR、または本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCARをコードする核酸を対象に投与することを含む方法に関する。いくつかの実施形態において、対象は、癌および/または悪性腫瘍の処置の必要にある。いくつかの実施形態において、対象は、膀胱癌、肺癌、非小細胞肺癌、結腸癌、乳癌、肝癌、および前立腺癌の処置の必要にある。

【0043】

いくつかの実施形態において、本方法は、対象を処置する方法である。いくつかの実施形態において、本方法は、対象における癌を処置する方法である。

【0044】

一態様において、癌を処置することを必要とする対象において癌を処置する方法であり、本方法は、本明細書に記載される細胞、例えば、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、またはCARを含む細胞を投与することを含む。いくつかの実施形態において、細胞は免疫細胞である。

【0045】

一態様において、癌を処置することを必要とする対象において癌を処置する方法であり、本方法は、本明細書に記載される核酸（例えば、抗体、その抗原結合部分、またはCARをコードする核酸）を対象に投与することを含み、ここで、対象の免疫細胞は、核酸によってコードされるポリペプチドを発現させる。いくつかの実施形態において、免疫細胞はT細胞である。核酸は、例えば、細胞型特異的プロモーターおよび/または所望の細胞型に選択的に結合する組成物の使用によって、特定の細胞型を標的とすることができる。例えば、アプタマーへの核酸の結合は、的を絞った送達を可能にすることができる（McNamara, J.O., et al (2006) Nat. Biotechnol. 24: 1005 - 1015）。代替的な実施形態において、核酸は、ナノ粒子、デンドリマー、ポリマー、リポソーム、またはカチオン性送達システムなどの薬物送達システムを使用して送達することができる。正に帯電したカチオン性送達システムは、核酸分子（負に帯電）の結合を促進し、また負に帯電した細胞膜における相互作用を増強して、細胞による核酸の効率的な取り込みを可能にする。カチオン性脂質、デンドリマー、またはポリマーは、核酸に結合するか、または核酸を封入するベシクルもしくはミセルを形成するよう誘導されるかが可能である（例えば、Kim S.H., et al (2008) Journal of Controlled Release 129 (2): 107 - 116を参照されたい）。小胞またはミセルの形成は、全身投与されたときの核酸の分解をさらに防止する。カチオン阻害性核酸複合体を作製および投与する方法は、十分に当業者の能力の範囲内である（例えば、それらの全体が参照により本明細書に援用されるSorensen, D.R., et al (2003) J. Mol. Biol. 327: 761 - 766、Verma, U.N., et al (2003) Clin. Cancer Res. 9: 1291 - 1300、Arnold, A.S. et al (2007) J. Hypertens. 25: 197 - 205を参照されたい）。核酸の全身送達に有用な薬物送達システムのいくつかの非限定的な例としては、DOTAP（Sorensen, D.R., et al (2003)、上述、Verma, U.N., et al (2003)、上述）、オリゴフェクタミン、「solid nucleic acid lipid particles」（Zimmermann, T.S., et al (2006) Nature 441: 111 - 114）、カルジオリピン（Chien, P.Y., et al (2005) Cancer Gene Ther. 12: 321 - 328、Pal, A., et al (2005) Int. J. Oncol. 26: 1087 - 1091）、ポリエチレンイミン（Bonnet M.E., et al (2008) Pharm. Res. Aug 16（印刷に先立つ電子公開）、Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol.

10

20

30

40

50

1.71659)、Arg-Gly-Asp(RGD)ペプチド(Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3: 472-487)、およびポリアミドアミン(Tomalia, D.A., et al (2007) Biochem. Soc. Trans. 35: 61-67、Yoo, H., et al (1999) Pharm. Res. 16: 1799-1804)が挙げられる。いくつかの実施形態において、核酸は、全身投与のためにシクロデキストリンとの複合体を形成する。核酸およびシクロデキストリンの投与のための方法および医薬組成物は、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許第7,427,605号において認めることができる。核酸的のを絞った送達は、例えば、それらの各々が全体として参照により本明細書に援用される Ikeda and Taira Pharmaceutical Res 2006 23: 1631-1640、Soutschek et al., Nature 2004 432: 173-8およびLorenze et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 14, 4975-4977 (2004)において説明される。例として、核酸は、免疫細胞上に発現する受容体のリガンド、例えばTCRを含むリボソーム内に阻害剤を封入することによって免疫細胞を標的とすることができる。いくつかの実施形態において、リボソームは、免疫細胞に特異的なアプタマーを含むことができる。

10

20

30

40

50

【0046】

本明細書で使用する「腫瘍」は、身体の器官および系の正常な機能を妨げる制御されていない細胞腫瘍成長を称する。「癌」および「悪性腫瘍」という用語は、転移性である腫瘍、すなわち、浸潤性となり、元の腫瘍部位から遠隔の組織内に腫瘍成長を播種する腫瘍を称する。癌または腫瘍に罹患している対象とは、対象の体内に存在する客観的に測定可能な癌細胞を有する対象である。この定義には、良性腫瘍および悪性癌、ならびに潜在的に休眠している腫瘍または微小転移が含まれる。元の場所から移動し、他の重要な器官に播種する癌は、最終的に、影響を受けた器官の機能的な悪化を経て対象の死亡をもたらす可能性がある。白血病などの造血系の癌は、対象における正常な造血区画を打ち負かす可能性があり、それにより、最終的に死亡を引き起こす造血不全(貧血、血小板減少症および好中球減少症の形態における)をもたらす。

【0047】

癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系の癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、大腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌(胃腸癌を含む)、膠芽腫(GBM)、肝癌、肝細胞癌、上皮内腫瘍、腎癌(kidney cancer)または腎癌(renal cancer)、喉頭癌、白血病、肝癌、肺癌(例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および扁平上皮癌)、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌(例えば、唇、舌、口、および咽頭)、卵巣癌、脾癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系の癌、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌または子宮内膜癌、尿路系の癌、外陰腫瘍、ならびに他の癌腫および肉腫、ならびにB細胞リンパ腫(軽度悪性/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)、小リンパ球性(SL)NHL、中悪性度/濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高度悪性免疫芽球性NHL、高度悪性リンパ芽球性NHL、高度悪性小非分割細胞性NHL、巨大腫瘤病変NHL、マントル細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、およびワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症を含む)、慢性リンパ性白血病(CLL)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、有毛細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病、および移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)、ならびに母斑症、浮腫(脳腫瘍と関係するものなど)、およびメーグス症候群と関連する異常な血管増殖が挙げられるが、これらに限定されない。

【0048】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法は、CAR-T療法などのCAR免疫細胞療法に関する。CAR-T療法および関連する療法は、標的となる細胞型(例えば、癌細胞)に特異的に結合して対象を処置するCARを発現する免疫細胞(例えば

、T細胞)の養子細胞移入に関する。いくつかの実施形態において、療法の一部として投与される細胞は、対象にとって自家性であり得る。いくつかの実施形態において、療法の一部として投与される細胞は、対象にとって自家性ではない。いくつかの実施形態において、細胞は、CARを発現するように操作および/または遺伝子改変される。CAR-T療法のさらなる考察は、例えば、これらの各々が全体として参照により本明細書に援用されるMaus et al. Blood 2014 123:2624-35、Reardon et al. Neuro-Oncology 2014 16:1441-1458、Hoyos et al. Haematologica 2012 97:1622、Byrd et al. J Clin Oncol 2014 32:3039-47、Maher et al. Cancer Res 2009 69:4559-4562、およびTamada et al. Clin Cancer Res 2012 18:6436-6445において認めることができる。

【0049】

本明細書で使用する場合、「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物は霊長類、齧歯類、飼育動物または狩猟用動物などの脊椎動物である。霊長類には、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えば、アカゲザルなどが含まれる。齧歯類には、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ、およびハムスターが含まれる。飼育動物および狩猟用動物には、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、スイギュウ、ネコ種、例えば、飼い猫、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、鳥類、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、魚類、例えば、マス、ナマズおよびサーモンが含まれる。患者または対象には、上述の何らかの部分セット、例えば、上述のすべてが含まれるが、ヒト、霊長類または齧歯類などの1つ以上の群または種は除外される。ある特定の実施形態において、対象は、哺乳類動物、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。「患者」、「個体」、および「対象」という用語は、本明細書では相互交換可能に使用される。

【0050】

好ましくは、対象は、哺乳類動物である。哺乳類動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得るが、これらの例に限定されない。例えば、種々の癌の動物モデルを表す対象として、例えば、ヒト以外の哺乳類動物を有利に使用することができる。さらに、本明細書に記載される方法は、飼育動物および/またはペットを処置するために使用することができる。対象は、雄性でも雌性でもかまわない。

【0051】

対象は、処置を必要とする容態(例えば、癌)またはこのような容態と関連する1つ以上の合併症に苦しんでいるまたは罹患しているものとして以前に診断されたかまたは同定されたものであり得るが、必要に応じて、容態または容態と関連する1つ以上の合併症のための処置を以前に受ける必要はなかった。あるいは、対象は、処置を必要とする容態またはこのような容態と関連する1つ以上の合併症に罹患していると以前に診断されたことがない対象でもあり得る。例えば、対象は、容態に対する1つ以上の危険因子もしくは容態と関連する1つ以上の合併症を呈するもの、または危険因子を呈さない対象であり得る。特定の容態のための処置の「必要のある対象」は、その容態に罹患している、その容態に罹患していると診断された、またはその容態を発症する危険性がある対象であり得る。

【0052】

本明細書で使用する場合、「処置する」、「処置」、「処置すること」、または「寛解」は、疾患、障害または医学的容態に関して使用するとき、目的が、症状または容態の進行または重症度を逆転させること、緩和すること、寛解させること、抑制すること、遅延させること、または停止させることである容態のための治療処置を称する。「処置すること」という用語は、容態の少なくとも1つの副作用または症状を軽減または緩和することを含む。1つ以上の症状または臨床マーカーが低減した場合、処置は概して「有効」である。あるいは、容態の進行が低減または一時停止した場合、処置は「有効」である。すなわち、「処置」には、症状またはマーカーの改善だけでなく、処置の非存在下で予想されるであろう症状の進行または悪化の休止または少なくとも遅延も含まれる。有益なまたは

所望の臨床結果には、1つ以上の症状の緩和、欠陥の程度の減少、腫瘍または悪性腫瘍の安定した（すなわち悪化していない）状態、腫瘍成長および/または転移の遅滞または遅延、ならびに処置の非存在下で予想される寿命と比較した寿命の延長が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で使用する場合、「投与する」という用語は、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCAR、または抗体、その抗原結合部分、もしくはCARをコードする核酸、または本明細書に記載されるこのような試薬を含む細胞の、所望の部位で薬剤の少なくとも部分的な局在化を結果的に生じる方法または経路によって対象内へ配置することを称する。本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCAR、または抗体、その抗原結合部分、もしくはCARをコードする核酸、または本明細書に開示の本明細書に記載されるこのような試薬を含む細胞を含む医薬組成物を、対象における有効な処置を結果的に生じる何らかの適切な経路によって投与することができる。

10

【0053】

薬剤の投薬量範囲は効力に依存し、所望の効果、例えば、腫瘍成長の遅延または腫瘍の大きさの縮小を生じるのに十分な量を包含する。投薬量は、容認できない有害な副作用を引き起こすほど大きくあるべきではない。概して、投薬量は、患者の年齢、容態、および性別によって異なり、当業者によって決定することができる。何らかの合併症の場合には、投薬量は個々の医師によって調整することもできる。いくつかの実施形態において、投薬量は、0.001 mg / 体重 kg ~ 0.5 mg / 体重 kg の範囲である。いくつかの実施形態において、用量範囲は、5 μg / 体重 kg ~ 100 μg / 体重 kg である。あるいは、用量範囲は、血清レベルを1 μg / mL ~ 1000 μg / mL に維持するように用量設定されてもよい。全身投与については、対象に、例えば、0.1 mg / kg、0.5 mg / kg、1.0 mg / kg、2.0 mg / kg、2.5 mg / kg、5 mg / kg、10 mg / kg、15 mg / kg、20 mg / kg、25 mg / kg、30 mg / kg、40 mg / kg、50 mg / kg、またはそれより多量などの治療量が投与され得る。

20

【0054】

いくつかの実施形態において（例えば、抗体薬剤複合体を投与するとき）、用量は約2 mg / kg ~ 約15 mg / kg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は約2 mg / kg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は約4 mg / kg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は約5 mg / kg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は約6 mg / kg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は約8 mg / kg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は約10 mg / kg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は約15 mg / kg であり得る。

30

【0055】

いくつかの実施形態（例えば、抗体またはその抗原結合部分を投与するとき）において、用量は約100 mg / m² ~ 約700 mg / m² であり得る。いくつかの実施形態において、用量は約250 mg / m² であり得る。いくつかの実施形態において、用量は約375 mg / m² であり得る。いくつかの実施形態において、用量は約400 mg / m² であり得る。いくつかの実施形態において、用量は約500 mg / m² であり得る。

40

【0056】

いくつかの実施形態（例えば、BiTEを投与するとき）において、用量は、1日当たり約0.5 ~ 約90 μg / m² であり得る。いくつかの実施形態（例えば、BiTEを投与するとき）において、用量は、1日当たり約5 ~ 約60 μg / m² であり得る。いくつかの実施形態において、用量は1日当たり約5 μg / m² であり得る。いくつかの実施形態において、用量は1日当たり約15 μg / m² であり得る。いくつかの実施形態において、用量は1日当たり約60 μg / m² であり得る。

【0057】

いくつかの実施形態（本明細書に記載される細胞を投与するとき）において、投薬量は体重1 kg 当たり約1 × 10⁵ 個細胞 ~ 約1 × 10⁸ 個細胞であり得る。いくつかの実施形態において、投薬量は、体重1 kg 当たり約1 × 10⁶ 個細胞 ~ 約1 × 10⁷ 個細胞で

50

あり得る。いくつかの実施形態において、投薬量は、体重 1 kg 当たり約 1×10^6 個細胞であり得る。いくつかの実施形態において、1 用量の細胞を投与することができる。いくつかの実施形態において、細胞の投与は、例えば、1 回、2 回、またはそれより多数回繰り返すことができる。いくつかの実施形態において、細胞の投与は、例えば、毎日、毎週、または毎月ペースで投与することができる。

【0058】

先に列挙した用量の投与は、繰り返すことができる。いくつかの実施形態において、用量は、1 日に 1 回、または 1 日に複数回、例えば、1 日に 3 回与えられるが、これに限定されない。いくつかの実施形態において、先に列挙した用量は、数週間または数か月間、毎日投与される。処置期間は、対象の臨床上的進展および療法に対する応答性に依存する。

10

【0059】

いくつかの実施形態において、用量は静脈内投与することができる。いくつかの実施形態において、静脈内投与は、約 10 分～約 3 時間の時間にわたって生じる注入であり得る。いくつかの実施形態において、静脈内投与は、約 30 分～約 90 分の時間にわたって生じる注入であり得る。

【0060】

いくつかの実施形態において、用量は、ほぼ毎週投与することができる。いくつかの実施形態において、用量は、毎週投与することができる。いくつかの実施形態において、用量は、約 12 週間～約 18 週間にわたって毎週投与することができる。いくつかの実施形態において、用量は、約 2 週間ごとに投与することができる。いくつかの実施形態において、用量は、約 3 週間ごとに投与することができる。いくつかの実施形態において、用量は、約 2 週間ごとに投与される約 2 mg/kg～約 15 mg/kg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 3 週間ごとに投与される約 2 mg/kg～約 15 mg/kg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 2 週間ごとに静脈内投与される約 2 mg/kg～約 15 mg/kg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 3 週間ごとに静脈内投与される約 2 mg/kg～約 15 mg/kg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、ほぼ毎週静脈内投与される約 200 mg/m²～約 400 mg/m² であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 2 週間ごとに静脈内投与される約 200 mg/m²～約 400 mg/m² であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 3 週間ごとに静脈内投与される約 200 mg/m²～約 400 mg/m² であり得る。いくつかの実施形態において、合計で約 2～約 10 回の用量が投与される。いくつかの実施形態において、合計 4 回の用量が投与される。いくつかの実施形態において、合計 5 回の用量が投与される。いくつかの実施形態において、合計 6 回の用量が投与される。いくつかの実施形態において、合計 7 回の用量が投与される。いくつかの実施形態において、合計 8 回の用量が投与される。いくつかの実施形態において、投与は合計約 4 週間～約 12 週間行われる。いくつかの実施形態において、投与は合計約 6 週間行われる。いくつかの実施形態において、投与は合計約 8 週間行われる。いくつかの実施形態において、投与は合計約 12 週間行われる。いくつかの実施形態において、初回用量は、その後の用量よりも約 1.5～約 2.5 倍多くすることができる。

20

30

40

【0061】

いくつかの実施形態において、用量は、約 1 mg～約 2000 mg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 3 mg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 10 mg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 30 mg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 1000 mg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 2000 mg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、毎日静脈内注入により与えられる約 3 mg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、毎日静脈内注入により与えられる約 10 mg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、週 3 回の静脈内注入により与えられる約 30 mg であり得る。

【0062】

50

治療有効量とは、腫瘍の大きさ、腫瘍の成長などにおいて統計的に有意で測定可能な変化を生じるのに十分である薬剤の量である（有効性の測定を、後で本明細書に記載される）。このような有効量は、臨床試験および動物研究において評価することができる。

【0063】

薬剤は、経時的に注射によってまたは徐々に注入することによって静脈内投与することができる。所定の経路に適切な製剤を考慮して、例えば、本明細書に記載される方法および組成物において有用な薬剤は、静脈内、鼻腔内、吸入、腹腔内、筋肉内、皮下、共振器内に投与することができ、ペリスタ手段によって、所望の場合、または当業者によって既知の他の手段によって送達することができる。本明細書で使用する化合物は、癌に罹患している患者に経口、静脈内または筋肉内投与することが好ましい。腫瘍塊への直接的な局所投与も特に考えられる。

10

【0064】

少なくとも1つの薬剤を含有する治療用組成物は、例えば、単位用量で従来通りに投与することができる。「単位用量」という用語は、治療用組成物に関して使用されるとき、対象のための単位投薬量として適切な物理的に分散した単位を称し、各単位は、必要な生理学的に許容される希釈剤、すなわち、担体、またはビヒクルと関係する所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性材料を含有する。

【0065】

組成物は、投薬量製剤に適合する様式で、治療有効量で投与される。投与されることになる量およびタイミングは、処置されることになる対象、有効成分を利用する対象の系の能力、および所望の治療効果の程度に依存する。

20

【0066】

投与されるのに必要な有効成分の正確な量は、開業医の判断に依存し、各個人に特有である。しかしながら、全身適用に適した投薬量範囲は、本明細書に開示されており、投与経路に依存する。投与に適切な制度もさまざまであるが、初回の投与と、それに続くその後の注射または他の投与による1時間以上の間隔での反復投与が典型的である。あるいは、インビボ療法のために指定された範囲内に血中濃度を維持するのに十分な連続静脈内注入が考えられる。

【0067】

いくつかの実施形態において、方法は、併用療法の一部として、本明細書に記載される医薬組成物を1つ以上の追加の化学療法薬、生物製剤、薬剤、または処置とともに投与することをさらに含む。いくつかのこのような実施形態において、化学療法薬生物製剤、薬剤、または処置は、放射線療法、手術、ゲムシタビン、シスプラスチン、パクリタキセル、カルボプラチン、ボルテゾミブ、AMG 479、ボリノスタット、リツキシマブ、テモゾロミド、ラパマイシン、ABT-737、PI-103、ならびにイピリムマブ、トレメリムマブ、ニボルマブ、およびペンプロリズマブを含むがこれらに限定されないチェックポイント阻害剤からなる群から選択される。

30

【0068】

本明細書で使用する場合、「化学療法」または「化学療法薬」という用語は、異常な細胞成長を特徴とする疾患の処置において治療上の有用性を有する何らかの化学薬を称する。このような疾患には、腫瘍、新生物および癌、ならびに過形成の成長を特徴とする疾患が含まれる。本明細書で使用する化学療法薬は、化学薬および生物薬の両方を包含する。これらの薬剤は、癌細胞が持続的な生存のために依存する細胞活動を阻害するように機能する。化学療法薬のカテゴリーには、アルキル化薬/アルカロイド薬、代謝拮抗薬、ホルモンまたはホルモン類似体、および種々の抗新生物薬が含まれる。これらの薬剤のすべてではないにしても、ほとんどは癌細胞に直接毒性があり、免疫刺激を必要としない。一実施形態において、化学療法薬は、固形腫瘍などの新生物を処置する上で使用する薬剤である。一実施形態において、化学療法薬は放射性分子である。当業者は、使用する化学療法薬を容易に特定することができる（例えば、Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Ha

40

50

r r i s o n ' s P r i n c i p l e s o f I n t e r n a l M e d i c i n e , 1 4 t h e d i t i o n 、 P e r r y e t a l . , C h e m o t h e r a p y , C h . 1 7 i n A b e l o f f , C l i n i c a l O n c o l o g y 2 n d E d i t i o n , 2 0 0 0 C h u r c h i l l L i v i n g s t o n e , I n c . B a l t z e r L , B e r k e r y R (e d s) : O n c o l o g y P o c k e t G u i d e t o C h e m o t h e r a p y , 2 n d e d . S t . L o u i s , M o s b y - Y e a r B o o k , 1 9 9 5 、 F i s c h e r D S , K n o b f M F , D u r i v a g e H J (e d s) : T h e C a n c e r C h e m o t h e r a p y H a n d b o o k , 4 t h e d . S t . L o u i s , M o s b y - Y e a r B o o k , 1 9 9 3 を参照されたい)。本明細書に記載される二重特異性および多重特異性ポリペプチド薬は、追加の化学療法薬と併用することができる。

10

【0069】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態において、方法は、本明細書に記載される医薬組成物を投与される対象に1つ以上の化学療法薬を投与することをさらに含む。化学療法薬の非限定例としては、チオテパおよびCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミドなどのアルキル化薬；ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファンなどのアルキルスルホナート；ベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、およびウレドパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチルローロメラミンを含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン；アセトゲニン（特にブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）；プリオスタチン；カリストアチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エロイテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノボエンピキン、フェネスチリン、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などのナイトロジェンマスタード；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、およびラニムヌスチンなどのニトロソ尿素；エンジイン抗生物質などの抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシガンマ1IおよびカリケアマイシンオメガI1（例えば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186（1994）を参照されたい）；ジネミシンAを含むジネミシン；クロドロナートなどのビスホスホナート；エスペラミシン；ならびにネオカルチノスタチンクロモフォアおよび関連する発色タンパク質エンジイン抗生物質発色団）；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシニス、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN（登録商標）ドキソルピシン（モルホリノ-ドキソルピシン、シアノモルホリノ-ドキソルピシン、2-ピロリノ-ドキソルピシンおよびデオキシドキソルピシンを含む）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、ミトマイシンC、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、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなどのミトマイシン；メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）などの代謝拮抗薬；デノブテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのピリミジン類似体；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、フロクスウリジンなどのピリミジン類似体；カルステロン、ドロモスタノロンプロビオナート、エピチオスタノール

20

30

40

50

、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎抗体；フロリン酸などの葉酸増し液；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；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート；デホファミン（*deffamine*）；デメコルシン；ジアジコン；エルホルミチン；エリブチニウムアセタート；エボチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；マイタンシンおよびアンサミトシンなどのメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モビダンモール；ニトラレリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）多糖複合体（*JHS Natural Products*，オレゴン州ユージーン市）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT-2毒素、ベラクラリンA、ロリジンAおよびアングジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；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、TAXOL（登録商標）パクリタキセル（*Bristol-Myers Squibb Oncology*，ニュージャージー州プリンストン地区）、ABRAXANE（登録商標）*Cremophor*非含有のアルブミン操作したパクリタキセルのナノ粒子製剤（*American Pharmaceutical Partners*，イリノイ州シャンバーグ村）、およびTAXOTERE（登録商標）ドキシタキセル（*Rhone-Poulenc Rorer*，フランス共和国アントニー市）；クロランブシル；GEMZAR（登録商標）ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチンなどの白金類似体；ビンブラスチン；白金；エトボシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；NAVELBINE（登録商標）ビノレルビン；ノバントロン；テニボシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロナート；イリノテカン（*Camptosar*，CPT-11）（5-FUおよびロイコボリンを用いたイリノテカンの処置投与計画を含む）；トポイソメラーゼ阻害薬RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸などのレチノイド；カペシタピン；コンプレタスタチン；ロイコボリン（LV）；オキサリプラチン処置投与計画（FOLFOLX）を含むオキサリプラチン；ラバチニブ（*Tykerb*（登録商標））；細胞増殖を低減させるPKC-アルファ、Raf、H-Ras、EGFR（例えば、エルロチニブ（*Tarceva*（登録商標）））およびVEGF-Aの阻害薬、ならびに先のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を挙げることができる。

【0070】

本明細書で使用する「細胞障害性薬」という用語は、細胞の機能を阻害もしくは防止し、および／または細胞の破壊を引き起こす物質を称する。この用語は、放射性同位体（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、およびLuの放射性同位体）、化学療法薬、およびそのフラグメントおよび／またはバリエーションを含む細菌、真菌、植物または動物の起源の小分子毒素または酵素活性のある毒素などの毒素を含むよう企図される。

【0071】

「放射線療法」の意味するところは、正常に機能する能力または細胞を完全に破壊する能力を制限するように、細胞に十分な損傷を誘導する定向性ガンマ線またはベータ線の使用である。処置の投薬量および持続期間を決定するために、当技術分野で既知の多くの方法があることは認められるであろう。典型的な処置は、1回の投与として与えられ、典型的な投薬量は1日当たり10～200単位（グレイ）の範囲である。

【0072】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法は、追加の免疫療法を対象に投与することをさらに含むことができる。本明細書で使用する場合、「免疫療法」は、患

者自身の免疫系を誘導して腫瘍と戦うように設計された治療戦略の多様なセットを称し、表在性膀胱癌のための膀胱内BCG免疫療法、悪性黒色腫および腎細胞癌などに対する特異的な免疫応答を生じるワクチン、患者由来の樹状細胞に前立腺酸ホスファターゼペプチドを負荷して、前立腺由来細胞に対する特異的な免疫応答を誘導する、前立腺癌のための Sipuleucel-T の使用、1つ以上の免疫細胞型を刺激するサイトカイン、成長因子および/またはシグナル伝達分子（例えば、インターロイキン）の投与、患者への再導入に先立ち、腫瘍抗原に特異的なリンパ球および/または樹状細胞のエキスビボ増殖および/または刺激、イミキモド、養子細胞移入、ならびに/あるいは例えば、国際特許公開第 WO 2003/063792 号および米国特許第 8,329,660 号において説明される方法が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、免疫療法は NK 応答を刺激する。いくつかの実施形態において、免疫療法は養子細胞移入アプローチである。

10

【0073】

癌に対する所与の処置の有効性は、熟練した臨床医によって判断することができる。しかしながら、例えば、腫瘍の兆候または症状のいずれか1つもしくはすべてが有益な様式で変化するか、または他の臨床上認められる症状が、例えば、本明細書に記載される薬剤を用いた処置後の少なくとも10%改善されるかもしくはさらに寛解する場合、処置は、当用語が本明細書で使用される場合、「有効な処置」とみなされる。有効性は、入院または医学的介入の必要性によって評価されるように、個体が悪化不全である（すなわち、疾患の進行が停止している）ことによって測定することもできる。これらの指標を測定する方法は、当業者に既知であり、および/または本明細書に記載されている。

20

【0074】

疾患の処置に有効な量は、それを必要とする哺乳類動物に投与されたときに、当疾患に対して当用語が本明細書で定義されるような有効な処置を結果的にもたらすのに十分である量を意味する。薬剤の有効性は、例えば、癌の物理的指標、例えば、腫瘍の大きさ、腫瘍質量、腫瘍密度、血管新生、腫瘍成長率などを評価することによって判断することができる。

【0075】

便宜上、明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲において使用するいくつかの用語および句の意味を以下に提供する。特に断りのない限り、または文脈から暗黙的でない限り、次の用語および句には、以下で提供される意味が含まれる。本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ制限されるため、本定義は、特定の実施形態を説明する上で支援するために提供されるのであって、特許請求される本発明を制限するものではない。特に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。当技術における用語の使用と本明細書で提供されるその定義との間に明らかな矛盾がある場合、本明細書内で提供される定義が勝るものとする。

30

【0076】

便宜上、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲において採用されるある特定の用語をここにまとめる。

40

【0077】

「低下する」、「低減した」、「低減」、または「阻害する/抑制する」という用語はすべて、統計的に有意な量の低下を意味するために本明細書で使用される。いくつかの実施形態において、「低減する」、「低減」または「低下する」または「阻害する/抑制する」は典型的には、参照レベル（例えば、所与の処置のない状態）と比較して少なくとも10%の低下を意味し、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも

50

約 99%、またはそれより大きな低下を含むことができる。本明細書で使用する場合、「低減」または「阻害/抑制」は、参照レベルと比較した場合の完全な阻害/抑制または低減を包含しない。「完全な阻害/抑制」とは、参照レベルと比較して 100% の阻害/抑制である。低下は、好ましくは、所与の障害のない個体についての正常範囲内として許容されるレベルまで低くあることができる。

【0078】

「上昇した」、「上昇」、「増強する」、または「活性化する」はすべて、統計的に有意な量の上昇を意味するために本明細書で使用する。いくつかの実施形態において、「上昇した」、「上昇」、「増強する」、または「活性化する」という用語は、参照レベルと比較して 100% の上昇もしくは 10 ~ 100% の何らかの上昇を含む、参照レベルと比較して少なくとも 10% の上昇、例えば、対照と比較して少なくとも約 20%、もしくは少なくとも約 30%、もしくは少なくとも約 40%、もしくは少なくとも約 50%、もしくは少なくとも約 60%、もしくは少なくとも約 70%、もしくは少なくとも約 80%、もしくは少なくとも約 90%、もしくは最大 100% の上昇、あるいは参照レベルと比較して少なくとも約 2 倍、もしくは少なくとも約 3 倍、もしくは少なくとも約 4 倍、もしくは少なくとも約 5 倍もしくは少なくとも約 10 倍の上昇、または 2 倍 ~ 10 倍以上の何らかのもしくはそれより大きな上昇を意味することができる。マーカーまたは症状の脈絡において、「上昇」とは、このようなレベルにおける統計的に有意な上昇である。

10

【0079】

本明細書で使用する場合、「対象」は、ヒトまたは動物を意味する。通常、動物とは、霊長類、齧歯類、飼育動物または狩猟用動物などの脊椎動物である。霊長類には、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えば、アカゲザルが含まれる。齧歯類には、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ、およびハムスターが含まれる。飼育動物および狩猟用動物には、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、スイギュウ、ネコ種、例えば、飼い猫、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、鳥類、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、魚類、例えば、マス、ナマズおよびサーモンが含まれる。いくつかの実施形態において、対象は、哺乳類、例えば、霊長類、例えばヒトである。「個体」、「患者」および「対象」という用語は、本明細書では相互交換可能に使用される。

20

【0080】

好ましくは、対象は哺乳類である。哺乳類は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳類は、癌の動物モデルを表す対象として有利に使用することができる。対象は、雄性でも雌性でもかまわない。

30

【0081】

本明細書で使用する場合、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、隣接する残基のアルファ-アミノ基とカルボキシ基との間のペプチド結合によって互いに接続された一連のアミノ酸残基を示すために本明細書で相互交換可能に使用される。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、その大きさまたは機能に関係なく、修飾アミノ酸（例えば、リン酸化、糖化、グリコシル化など）およびアミノ酸類似体を含むアミノ酸のポリマーを称する。「タンパク質」および「ポリペプチド」は比較的大きなポリペプチドに関してしばしば使用されるのに対し、「ペプチド」という用語は小さなポリペプチドに関してしばしば使用されるが、当技術分野におけるこれらの用語の使用は一部分が一致する。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、遺伝子産物およびそのフラグメントを称するとき、本明細書で相互交換可能に使用される。したがって、例示的なポリペプチドまたはタンパク質には、遺伝子産物、天然に存在するタンパク質、ホモログ、オルソログ、パラログ、フラグメントならびに上述の他の等価物、バリエーション、フラグメント、および類似体が含まれる。

40

【0082】

本明細書で 사용되는場合、「核酸」または「核酸配列」という用語は、リボ核酸、デ

50

オキシリボ核酸またはその類似体の単位を組み込んだ何らかの分子、好ましくはポリマー分子を称する。核酸は一本鎖でも二本鎖でもよい。一本鎖核酸は、変性二本鎖DNAの1本の核酸鎖であり得る。あるいは、いかなる二本鎖DNAにも由来しない一本鎖核酸であってもよい。一態様において、核酸はDNAであり得る。別の態様では、核酸はRNAであり得る。適切な核酸分子は、ゲノムDNAまたはcDNAを含むDNAである。他の適切な核酸分子は、mRNAを含むRNAである。

【0083】

本明細書で使用する「単離された」または「部分的に精製された」という用語は、核酸またはポリペプチドの場合、天然源において認められる核酸もしくはポリペプチドとともに存在する、および/または細胞が発現するとき、もしくは分泌されたポリペプチドの場合には分泌されるときに、核酸もしくはポリペプチドとともに存在するであろう、少なくとも1つの他の成分（例えば、核酸またはポリペプチド）から分離された核酸またはポリペプチドを称する。化学的に合成された核酸もしくはポリペプチドまたはインビトロでの転写/翻訳を用いて合成されたものは「単離された」とみなされる。「精製された」または「実質的に精製された」という用語は、例えば、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれより多量を含む、単離された核酸またはポリペプチドの少なくとも95重量%である当核酸またはポリペプチドを称する。

10

【0084】

本明細書で使用する場合、「操作された」とは、人間の手によって操作された態様を称する。例えば、抗体、その抗原結合部分、またはCARは、抗体、その抗原結合部分、またはCARの配列が人間の手によって操作されて、天然に存在する場合の抗体の配列とは異なるとき、「操作された」とみなされる。通常の慣行であり、当業者に理解されているように、実際の操作が先行する実体に対して行われたとしても、操作されたポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの後代およびコピーは典型的にはなおも、「操作された」と称される。

20

【0085】

「Kabattの番号付け」、「Kabattの定義」、および「Kabatt標識」という用語は、本明細書では相互互換可能に使用される。当技術分野で認識されているこれらの用語は、Kabatt et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391および/またはKabatt, E. A., et al. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242において説明されるような、抗体またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域における他のアミノ酸残基よりも可変性の高い（すなわち、超可変性である）アミノ酸残基を番号付けするシステムを称する。

30

【0086】

本明細書で使用する場合、「エピトープ」は、連続したアミノ酸、またはタンパク質の三次折り畳みによって並置された非連続アミノ酸の両方に由来するポリペプチド上に形成することができる。連続するアミノ酸から形成されたエピトープは典型的には、変性溶媒への曝露の際に保持されるが、三次折り畳みによって形成されたエピトープは典型的には、変性溶媒による処理の際に喪失される。エピトープは、典型的には、独特な空間的立体配座において少なくとも3個、より通常は少なくとも5個、約9個、または約8~10個のアミノ酸を含む。「エピトープ」には、免疫グロブリンVH/VL対によって従来通り結合した構造単位が含まれる。エピトープは、抗体についての最小結合部位を定義し、したがって抗体の特異性の標的を表す。単ドメイン抗体の場合、エピトープは、単離における可変ドメインによって結合した構造の単位を表す。「抗原決定基」および「エピトープ」も、本明細書で相互交換可能に使用することができる。ある特定の実施形態において、エピトープ決定基には、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニルなどの分子の化学活性のある表面の分類が含まれ、ある特定の実施形態において、特定の三次元構造

40

50

特徴、および／または特定の電荷特徴を有し得る。

【0087】

「結合力」とは、抗原結合分子（本明細書に記載される抗体またはその抗体フラグメントなど）と適切な抗原との間の結合強度の尺度である。結合力は、抗原決定基と抗原結合分子上の抗原決定基の抗原結合部位との間の親和性、および抗原結合分子上に存在する適切な結合部位の数の両者と関連している。典型的には、抗原結合タンパク質（本明細書に記載される抗体または抗体の一部など）は、 $10^{-7} \sim 10^{-12}$ モル／リットル以下、または $10^{-8} \sim 10^{-12}$ モル／リットルの解離定数（ K_D で（すなわち、 $10^{-7} \sim 10^{-12}$ リットル／モルまたは $10^{-8} \sim 10^{-12}$ リットル／モルなど、 $10^{-5} \sim 10^{-12}$ リットル／モルの会合定数（ K_A ）で）、これらの同種のまたは特異的な抗原に結合することになる。 10^{-4} モル／リットルを超えるいかなる K_D 値（または 10^{-4} M^{-1} を下回るいかなる K_A 値）も、非特異的結合を示すと概して考えられる。意味のある（例えば、特異的）と考えられる生物学的相互作用についての K_D は典型的には、 10^{-10} M （ 0.1 nM ） $\sim 10^{-5} \text{ M}$ （ 10000 nM ）の範囲にある。相互作用が強いほど、その K_D は低くなる。例えば、本明細書に記載される抗体またはその部分にある結合部位は、 200 nM 未満などの 500 nM 未満、または 500 pM 未満などの 10 nM 未満の親和性で所望の抗原に結合することになる。抗原または抗原決定基への抗原結合タンパク質の特異的結合は、例えば、スキャッチャード分析ならびに／または放射性免疫検定（ RIA ）、酵素免疫測定法（ EIA ）およびサンドイッチ競合アッセイならびに当技術分野でそれ自体既知のこれらの異なる変法などの競合結合アッセイを含むそれ自体既知の何らかの適切な様式と、本明細書で言及されている他の技術とで測定することができる。

【0088】

したがって、本明細書で使用する場合、「選択的に結合する」または「特異的に結合する」は、癌細胞の細胞表面上に存在する抗原などの標的に、本明細書に記載されるペプチド（例えば、抗体、 CAR またはその一部）が、 $K_D 10^{-5} \text{ M}$ （ 10000 nM ）またはそれ未満、例えば、 10^{-6} M 、 10^{-7} M 、 10^{-8} M 、 10^{-9} M 、 10^{-10} M 、 10^{-11} M 、 10^{-12} M 、またはそれ未満で結合する能力を称する。特異的結合は、例えば、ポリペプチド薬の親和性および結合力、ならびにポリペプチド薬の濃度によって影響を受けることができる。当業者は、適切な細胞結合アッセイにおけるポリペプチド薬の用量設定などの何らかの適切な方法を使用して、本明細書に記載されるポリペプチド薬が標的を選択的に結合する適切な条件を決定することができる。標的に特異的に結合したポリペプチドは、非類似の競合因子によって置き換えられることはない。ある特定の実施形態において、抗体、その抗原結合部分、または CAR は、タンパク質および／または高分子の複雑な混合物中の標的抗原を優先的に認識するとき、抗原を特異的に結合するといわれている。

【0089】

いくつかの実施形態において、癌細胞に特異的に結合する試薬は、非癌細胞と比較して癌細胞に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、癌細胞に特異的に結合する試薬は、同じ細胞型の非癌性細胞と比較して癌細胞に特異的に結合する。

【0090】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、および／または CAR は、 10^{-5} M （ 10000 nM ）またはそれ未満、例えば 10^{-6} M 、 10^{-7} M 、 10^{-8} M 、 10^{-9} M 、 10^{-10} M 、 10^{-11} M 、 10^{-12} M 、またはそれ未満の解離定数（ K_D ）で癌細胞に結合する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、および／または CAR は、約 $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-6} \text{ M}$ の解離定数（ K_D ）で癌細胞に結合する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、および／または CAR は、約 $10^{-6} \text{ M} \sim 10^{-7} \text{ M}$ の解離定数（ K_D ）で癌細胞に結合する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、および／または CAR は、約 $10^{-7} \text{ M} \sim 10^{-8} \text{ M}$ の解離定数（ K_D ）で癌細胞に結合する。いくつかの実施形態において、本明細書

に記載される抗体、その抗原結合部分、および／またはCARは、約 10^{-8} M ~ 10^{-9} Mの解離定数(KD)で癌細胞に結合する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、および／またはCARは、約 10^{-9} M ~ 10^{-10} Mの解離定数(KD)で癌細胞に結合する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、および／またはCARは、約 10^{-10} M ~ 10^{-11} Mの解離定数(KD)で癌細胞に結合する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、および／またはCARは、約 10^{-11} M ~ 10^{-12} Mの解離定数(KD)で癌細胞に結合する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、および／またはCARは、 10^{-12} M未満の解離定数(KD)で癌細胞に結合する。

10

【0091】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性のある部分、すなわち、抗原を免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子を称する。この用語は、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖からなる抗体、ならびに全長抗体およびその抗原結合部分を含む種々の形態も称し、例えば、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDRグラフト抗体、ヒト化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド結合Fv、scFv、単ドメイン抗体(dAb)、ダイアボディ、多重特異性抗体、二重特異性抗体(dual specific antibody)、抗イディオタイプ抗体、二重特異性抗体(bispecific antibody)、その機能的に活性のあるエピトープ結合フラグメント、二機能性ハイブリッド抗体(例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))および一本鎖(例えば、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883 (1988)およびBird et al., Science 242, 423-426 (1988))(これらは参照により本明細書に援用される)。(概して、Hood et al., Immunology, Benjamin, N.Y., 2ND ed. (1984)、Harlow and Lane, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)およびHunkapiller and Hood, Nature, 323, 15-16 (1986)を参照されたく、これらは参照により本明細書に援用される)。

20

30

【0092】

各重鎖は、該重鎖の可変領域(本明細書ではHCVRまたはVHと略記)および該重鎖の定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメインCH1、CH2、およびCH3からなる。各軽鎖は、該軽鎖の可変領域(本明細書ではLCVRまたはVLと略記)および該軽鎖の定常領域からなる。軽鎖定常領域はCLドメインからなる。VH領域およびVL領域は、相補性決定領域(CDR)と称される超可変領域へとさらに分割され、フレームワーク領域(FR)と称される保存領域が散在していてもよい。したがって、各VH領域およびVL領域は、N末端からC末端へ次のFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で配置された3つのCDRおよび4つのFRからなる。この構造は、当業者に周知である。

40

【0093】

本明細書で使用する場合、「CDR」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を称する。重鎖および軽鎖の可変領域の各々には3つのCDRがあり、可変領域の各々についてCDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれる。これらのCDRの正確な境界は、異なる系によって異なって定義されてきた。Kabatsによる系(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)および(1991))は、抗体のいかなる可変領域へも適用可能な明白な残基番号付け系を提供するだけでなく、3つのCDRを定

50

義する正確な残基境界も提供する。これらのCDRは、Kabat CDRと称されることがある。Kabat CDRと重複するCDRを定義する他の境界は、Padlan (FASEB J. 9: 133 - 139 (1995)) ならびにMacCallum (J Mol Biol 262 (5): 732 - 45 (1996)) ならびにChothia (J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987)) およびNature 342: 877 - 883 (1989)) によって説明されてきた。さらに他のCDR境界の定義は、先の系のうちの1つに厳密に従うことはできないものの、それにもかかわらずKabat CDRと重複することになるが、特定の残基または残基の群、さらにはCDR全体が抗原結合に有意に影響することがないという予測または実験上の発見に鑑みて、短縮または延長する可能性がある。本明細書で使用方法は、これらの系のいずれかによって定義されるCDRを利用してもよいが、好ましい実施形態は、Kabat定義のCDRを使用する。

10

【0094】

本明細書で相互交換可能に使用する、抗体の「抗原結合フラグメント」または「抗原結合部分」という用語は、本明細書に記載される抗体の1つ以上のフラグメントを称し、該フラグメントは、本明細書で先に定義した結合親和性をなおも有する。完全抗体のフラグメントは、抗体の抗原結合機能を実行できることが示されてきた。抗体の「抗原結合部分」という用語に従って、結合フラグメントの例としては、(i) Fabフラグメント、すなわちVL、VH、CLおよびCH1ドメインから構成される一価のフラグメント、(ii) F(ab')₂フラグメント、すなわち、ジスルフィド架橋を介してヒンジ領域において互いに連結した2つのFabフラグメントを含む二価のフラグメント、(iii) VHおよびCH1ドメインから構成されるFdフラグメント、(iv) 抗体の単一のアームのFLおよびVHドメインから構成されるFvフラグメント、ならびに(v) VHドメインまたはVH、CH1、CH2、DH3、もしくはVH、CH2、CH3(dAb)からなるdAbフラグメント(Ward et al., (1989) Nature 341: 544 - 546)、またはVLドメインのみを含む単一ドメイン抗体も標的エピトープへ特異的に結合することも示されてきた)。Fvフラグメントの2つのドメイン、すなわちVLおよびVHは、別個の遺伝子によってコードされているが、これらはさらに合成リンカー、例えば、ポリ-G4Sアミノ酸配列(配列番号46として開示の「G4S」、ならびにVLおよびVH領域が一価の分子(単鎖Fv(ScFv))として既知)を形成するために結合する単一のタンパク質鎖として調製することができる組換え法を用いて互いにさらに連結されてもよい(例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423 - 426、およびHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883を参照されたい)。抗体の「抗原結合部分」という用語は、このような単鎖抗体を含むことも意図している。「ダイアボディ」などの他の形態の単鎖抗体も同様に本明細書に含まれる。ダイアボディは、VHおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖上で発現する二価の二重特異性抗体だが、同じ鎖の上で結合することができる2つのドメインには短過ぎるリンカーを使用し、それにより、該ドメインを異なる鎖の相補性ドメインと対形成させて、2つの抗原結合部位を形成する(例えば、Holliger, R., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448、Poljak, R. J., et al., (1994) Structure 2: 1121 - 1123を参照されたい)。免疫グロブリン定常ドメインは、重鎖または軽鎖の定常ドメインを称する。ヒトIgG重鎖および軽鎖定常ドメインのアミノ酸配列は、当技術分野で既知である。

20

30

40

【0095】

さらに、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、またはCARは、該抗体または抗体部分と1つ以上のさらなるタンパク質またはペプチドとの共有結合または非共有結合によって形成される、より大きな免疫接着分子の一部であってもよい。このような免疫接着分子に関連しているのは、四量体scFv分子を調製するためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanov, S. M., et al., (1995) Huma

50

n Antibodies and Hybridomas 6:93-101)、ならびに二価およびピオチン化 s c F v 分子を生成するためのシステイン残基、マーカーペプチドおよび C 末端ポリヒスチジニル、例えば、ヘキサヒチジニルタグ (配列番号 45 として開示の「ヘキサヒスチジニルタグ」) の使用 (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058) である。

【0096】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、または C A R は、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、C D R グラフト抗体、ヒト化抗体、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、ジスルフィド結合 F v、s c F v、単一ドメイン抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体、二重特異性抗体 (d u a l s p e c i f i c a n t i b o d y)、抗イディオタイプ抗体、二重特異性抗体 (b i s p e c i f i c a n t i b o d y)、およびこれらの機能的に活性のあるエピトープ結合フラグメントであり得る。

10

【0097】

アミノ酸配列に関して、当業者は、コードされた配列中の単一のアミノ酸またはわずかな割合のアミノ酸を変更する核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の配列への個々の置換、欠失または付加が「保存的に修飾されたバリエーション」であり、この変更が結果的に、アミノ酸の化学的に類似のアミノ酸との置換を生じ、標的抗原 (例えば、癌細胞上に存在するエピトープ) を特異的に結合する能力を保持することを認識することになる。このような保存的に修飾されたバリエーションは、本開示と一致する多型バリエーション、種間ホモログ、および対立遺伝子に加えられ、除外されない。

20

【0098】

いくつかの実施形態において、抗体試薬の保存的に修飾されたバリエーションは、C D R 以外の変化を含むことができ、例えば、抗体試薬の保存的に修飾されたバリエーションは、配列番号 1 ~ 12 のうちの 1 つ以上の配列を有する C D R を含むことができる。

【0099】

所与のアミノ酸は、類似の物理化学的特徴を有する残基によって置き換えることができ、例えば、ある脂肪族残基を別のものに (I l e、V a l、L e u、または A l a を互いになど)、置換すること、またはある極性残基の別のものへの置換 (L y s - A r g 間、G l u - A s p 間、または G l n - A s n 間) によって置き換えることができる。他のこのような保存的置換、例えば、類似の疎水性特徴を有する領域全体の置換は周知である。保存的アミノ酸置換を含むポリペプチドは、天然または参照ポリペプチドの所望の活性、例えば、抗原結合活性および特異性が保持されていることを確認するために、本明細書に記載されるアッセイのいずれか 1 つにおいて検査することができる。

30

【0100】

アミノ酸は、これらの側鎖の特性の類似性によって分類することができる (A . L . L e h n i n g e r , i n B i o c h e m i s t r y , s e c o n d e d . , p p . 73-75, W o r t h P u b l i s h e r s , N e w Y o r k (1975)) : (1) 非極性: A l a (A)、V a l (V)、L e u (L)、I l e (I)、P r o (P)、P h e (F)、T r p (W)、M e t (M)、(2) 非帯電極性: G l y (G)、S e r (S)、T h r (t)、C y s (C)、T y r (Y)、A s n (n)、G l n (Q)、(3) 酸性: A s p (D)、G l u (E)、(4) 塩基性: L y s (K)、A r g (R)、H i s (H)。

40

【0101】

あるいは、天然に存在する残基は、一般的な側鎖特性に基づいて複数の群に分けることができる: (1) 疎水性: N o l ーロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、(2) 中性親水性: C y s、S e r、T h r、A s n、G l n、(3) 酸性: A s p、G l u、(4) 塩基性: H i s、L y s、A r g、(5) 鎖の向きに影響を与える残基: G l y、P r o、(6) 芳香族: T r p、T y r、P h e。非保守的な置換は、これらのクラスの中の 1 つのメンバーを別のクラスと交換することを必要とすることになる。

50

【0102】

特定の保守的置換には、例えば、AlaからGlyもしくはSerへ、ArgからLysへ、AsnからGlnへもしくはHへ、AspからGluへ、CysからSerへ、GlnからAsnへ、GluからAspへ、GlyからAlaもしくはProへ、HisからAsnもしくはGlnへ、IleからLeuもしくはValへ、LeuからIleもしくはValへ、LysからArg、Gln、もしくはGluへ、MetからLeu、Tyr、もしくはIleへ、PheからMet、LeuもしくはTyrへ、SerからThrへ、ThrからSerへ、TrpからTyrへ、TyrからTrpへ、および/またはPheからVal、Ile、もしくはLeuへを含む。

【0103】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、および/またはCARは、本明細書に記載される配列のバリエーション、例えば、抗体ポリペプチドの保守的置換のバリエーションであり得る。いくつかの実施形態において、バリエーションは、保守的に修飾されたバリエーションである。保守的置換のバリエーションは、例えば、天然のヌクレオチド配列の変異によって得ることができる。本明細書で称される「バリエーション」とは、天然または参照ポリペプチドと実質的に相同であるが、1つまたは複数の欠失、挿入または置換のために天然または参照ポリペプチドとは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。バリエーションポリペプチドをコードするDNA配列は、天然または参照DNA配列と比較したとき、ヌクレオチドの1つ以上の付加、欠失、または置換を含むが、活性、例えば、関連する標的ポリペプチド、例えば癌細胞表面エピトープに対して、抗原特異的結合活性を保持するバリエーションタンパク質またはそのフラグメントをコードする配列を包含する。広範な種々のPCRベースの部位特異的変異誘発アプローチも当該技術分野で既知であり、当業者によって適用することができる。

【0104】

置換バリエーションの例としては、CDRの配列を変えない、例えば、V_HまたはV_Lドメインにおけるアミノ酸の保守的置換が挙げられる。CDRに含まれない配列における保守的置換は、野生型のまたは天然に存在する配列、例えば、抗体配列のヒトまたはマウスのフレームワークおよび/または定常領域に対する置換であり得る。

【0105】

バリエーションのアミノ酸またはDNAの配列は、天然または参照配列と好ましくは少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれより高く同一である。天然配列と変異配列との間の相同性の程度（同一性百分率）は、例えば、ワールドワイドウェブ上でこの目的のために一般的に使用される自由に利用可能なコンピュータプログラム（例えば、デフォルト設定のBLASTpまたはBLASTn）を使用して2つの配列を比較することによって決定することができる。

【0106】

天然アミノ酸配列の変更は、当業者に既知の多くの技術のうちのいずれかによって達成することができる。変異は、例えば、天然の配列のフラグメントへのライゲーションを可能にする制限部位に隣接する変異配列を含有するオリゴヌクレオチドを合成することによって、特定の遺伝子座に導入することができる。ライゲーションに続いて、得られた再構築された配列は、所望のアミノ酸の挿入、置換、または欠失を有する類似体をコードする。あるいは、特定オリゴヌクレオチドの部位特異的変異誘発手順を採用して、必要とされる置換、欠失、または挿入によって変更した特定のコドンに有する変更したヌクレオチド配列を提供することができる。このような変更を行うための技術は非常に十分に確立されており、例えば、それらの全体が参照により本明細書に援用されるWalder et al. (Gene 42: 133, 1986)、Bauer et al. (Gene 37: 73, 1985)、Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19)、Smith et al. (Genetic Engineering in

10

20

30

40

50

g: Principles and Methods, Plenum Press, 1981)、ならびに米国特許第4,518,584号および同第4,737,462号によって開示されているものを含む。

【0107】

ポリペプチドの適切な立体配座を維持することに関与しないいかなるシステイン残基も、概してセリンで置換して、分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を防ぐことができる。逆に、システイン結合(複数可)をポリペプチドに付加して、その安定性を改善したり、オリゴマー化を促進したりすることができる。

【0108】

本明細書に開示する抗体は、本明細書に開示するV_HまたはV_L領域のいずれか1つ、例えば配列番号1~28のいずれか1つを含むことができる。V_HまたはV_L領域が配列番号1~28のいずれか1つと少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれより高く同一であるアミノ酸を含む抗体も考えられる。

10

【0109】

いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合部分は完全ヒト抗体である。いくつかの態様において、抗体、その抗原結合部分、またはCARは、ヒト化抗体または抗体試薬である。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合部分、またはCARは、キメラ抗体または抗体試薬である。いくつかの態様において、抗体、その抗原結合部分、またはCARは、組換えポリペプチドである。

20

【0110】

「ヒト抗体」という用語は、可変領域および定常領域が、例えば、Kabata et al. (Kabata, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい)によって説明されるように、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に対応するまたはこれに由来する抗体を称する。しかしながら、ヒト抗体は、例えば、CDRにおいて、特にCDR3において、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基を含有している可能性がある(例えば、インビトロでランダムにもしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入された変異)。本明細書に記載される組換えヒト抗体は可変領域を有しており、ヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に由来する定常領域を含有することもある(Kabata, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい)。しかしながら、特定の実施形態によると、このような組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発(または、ヒトIg配列のためにトランスジェニックである動物を使用する場合、体細胞のインビボ変異誘発)に供されるため、組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列のV_HおよびV_L配列に関連または由来するものの、ヒト抗体生殖系列レパートリー内にインビボで天然には存在しない配列である。特定の実施形態によると、この種の組換え抗体は、選択的変異誘発または復帰変異またはその両方の結果である。好ましくは、変異誘発は、親抗体よりも大きな標的への親和性、および/または親抗体よりも小さな非標的構造への親和性をもたらす。

30

40

【0111】

「キメラ抗体」という用語は、ヒト定常領域に連結されたマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種由来の重鎖および軽鎖の可変領域の配列と別の種の定常領域配列とを含有する抗体を称する。ヒト化抗体は、ヒト抗体(アクセプター抗体と呼ばれる

50

）に実質的に由来する可変領域フレームワーク残基と、非ヒト抗体、例えばマウス抗体（ドナー免疫グロブリンと称される）に実質的に由来する相補性決定領域を有する。それらの全体が参照により本明細書に援用される Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86: 10029-10033 (1989) および WO 90/07861、米国特許第 5,693,762 号、米国特許第 5,693,761 号、米国特許第 5,585,089 号、米国特許第 5,530,101 号および Winter, 米国特許第 5,225,539 号を参照されたい。定常領域（複数可）も、存在する場合、ヒト免疫グロブリンに実質的または完全に由来する。ヒト可変ドメインは、通常、そのフレームワーク配列が CDR の由来する（マウス）可変領域ドメインと高度の配列同一性を呈するヒト抗体から選択される。重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク残基は、同じかまたは異なるヒト抗体配列の領域に実質的に類似していてもよい。ヒト抗体配列は、天然に存在するヒト抗体の配列であっても、いくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であってもよい。その全体が参照により本明細書に援用される Carter et al., WO 92/22653 を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0112】

本明細書で使用する場合、「ヒト化抗体」という用語は、ヒトフレームワーク、非ヒト抗体由来の少なくとも 1 つの相補性決定領域（CDR）を含む抗体（またはその抗原結合部分）を称し、その中で存在するいかなる定常領域も、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一である、すなわち、少なくとも約 85 ~ 90 %、好ましくは少なくとも 95 % 同一である。その故に、おそらく CDR を除く、ヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、1 つ以上の天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。

【0113】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体試薬（例えば、抗体または CAR）は、天然の生体分子ではない。例えば、ヒト起源の抗原に対して惹起されたマウス抗体は、人間の介入および操作、例えば、人間によって実行される製造工程のない自然においては生じないであろう。キメラ抗体も、例えば、複数の種から得られ、組換え分子内へと集合した配列を含むという点で、天然の生体分子ではない。ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるヒト抗体試薬は天然の生体分子ではなく、例えば、ヒト抗原に対して向かった完全ヒト抗体は、自然界で負の選択を受けるであろうし、ヒトの体内では天然では認められない。

【0114】

従来より、モノクローナル抗体は、マウスハイブリドーマ株の天然分子として産生されてきた。その技術に加えて、本明細書に記載される方法および組成物は、モノクローナル抗体の組換え DNA 発現を用意する。これにより、選択された宿主種において、ヒト化抗体ならびに一連の抗体誘導体および融合タンパク質の産生が可能となる。細菌、酵母、トランスジェニック動物、およびニワトリ卵における抗体の産生も、ハイブリドーマ系産生系の代替である。トランスジェニック動物の主な利点は、再生可能源由来の潜在的な高い収量である。

【0115】

抗体のアミノ酸配列バリエーションをコードする核酸分子は、当技術分野で既知の種々の方法によって調製される。これらの方法には、オリゴヌクレオチド媒介（または特定部位の）変異誘発、PCR 変異誘発、および以前に調製されたバリエーションまたは当抗体の非バリエーション版のカセット変異誘発が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載される少なくとも 1 つの抗体、部分またはポリペプチドをコードする核酸配列は、ライゲーションのための平滑末端化したまたは千鳥末端化した末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適宜の粘着末端の充填、望ましくない結合を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および適切なリガーゼとのライゲーションを含む従来技術に従ってベクター DNA を用いて組換えることができる。このような操作のための技術は、例えば、Maniatis et al., Molecular Cloning, Lab. Manual (Cold Spring Harbor Lab. Press, NY, 1982

および 1989)、および Ausubel, 1987, 1993 によって開示されており、モノクローナル抗体分子、その抗原結合領域、または CAR をコードする核酸配列を構築するために使用することができる。

【0116】

DNA などの核酸分子は、転写および翻訳調節情報を含むヌクレオチド配列を含み、このような配列がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に「操作可能に連結されて」いる場合、ポリペプチドを「発現することができる」といわれる。操作可能な連結は、調節 DNA 配列および発現することになっている DNA 配列が、回復可能な量のペプチドまたは抗体部分として遺伝子発現を可能にするような方法で接続された連結である。遺伝子発現に必要とされる調節領域の正確な性質は、類似の技術分野において周知であるように、生物ごとに異なることがある。例えば、Sambrook et al., 1989、Ausubel et al., 1987 - 1993 を参照されたい。

10

【0117】

したがって、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、または CAR の発現は、原核細胞または真核細胞のいずれかで起こり得る。適切な宿主には、酵母、昆虫、真菌、鳥類および哺乳類の細胞をインビボもしくはインサイツのいずれかで含む細菌もしくは真核生物の宿主、または哺乳類、昆虫、鳥類もしくは酵母の起源の宿主細胞が含まれる。哺乳類細胞または組織は、ヒト、霊長類、ハムスター、ウサギ、齧歯類、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、イヌまたはネコの起源であり得るが、いずれかの他の哺乳類細胞を使用してもよい。さらに、例えば、酵母ユビキチン加水分解酵素系の使用により、ユビキチン - 膜貫通ポリペプチド融合タンパク質のインビボでの合成を達成することができる。そのように産生された融合タンパク質は、インビボで加工されるか、またはインビトロで精製および加工され、特定のアミノ末端配列を有する本明細書に記載される抗体またはその部分の合成を可能にする。その上、直接的な酵母（または細菌）発現における開始コドン由来メチオニン残基の保持と関係する問題を回避することができる。Sabin et al., 7 Bio/Technol. 705 (1989)、Miller et al., 7 Bio/Technol. 698 (1989)。酵母がグルコース富化培地中で成長するときに大量に産生される解糖系酵素をコードする活発に発現する遺伝子からプロモーターおよび終結要素を組み込んだ一連の酵母遺伝子発現系のいずれかを利用して、本明細書に記載される組換え抗体、その抗原結合部分、または CAR を得ることができる。既知の解糖系遺伝子は、非常に効率的な転写制御シグナルも提供することができる。例えば、ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子のプロモーターおよび終結因子シグナルを利用することができる。

20

30

【0118】

昆虫における本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、または CAR の産生を達成することができる。例えば、昆虫宿主に、当業者に既知の方法によって膜貫通ポリペプチドを発現させるように操作したバキュロウイルスを感染させることによってである。Ausubel et al., 1987, 1993 を参照されたい。

【0119】

いくつかの実施形態では、導入されたヌクレオチド配列は、レシピエント宿主において自律複製可能なプラスミドまたはウイルスベクターへと組み込まれる。広範な種々のベクターのいずれかをこの目的のために採用することができ、当ベクターは当業者に既知であり、利用可能である。例えば、Ausubel et al., 1987, 1993 を参照されたい。特定のプラスミドまたはウイルスベクターを選択する上での重要な因子には、ベクターを含むレシピエント細胞が当ベクターを含まないレシピエント細胞から認識および選択され得る簡便さ、特定の宿主において所望であるベクターのコピー数、および異なる種の宿主細胞間でベクターを「シャトル輸送することができることが望ましいかどうかが含まれる。

40

【0120】

当技術分野で既知の例となる原核生物ベクターには、例えば、E. coli において複

50

製可能なプラスミドなどのプラスミドが含まれる。抗体、その抗原結合部分、またはCARをコードするcDNAの発現に有用な他の遺伝子発現要素には、SV40初期プロモーターなどのウイルス転写プロモーターおよびエンハンサー要素が含まれるが、これらに限定されない。(Okayama et al., 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983))、ラウス肉腫ウイルスLTR (Gorman et al., 79 PNAS 6777 (1982))、およびモロニー Maus 白血病ウイルスLTR (Grosschedl et al., 41 Cell 885 (1985))、(b) SV40後期領域に由来するものなどの、スプライス領域およびポリアデニル化部位 (Okayama et al., 1983)、ならびに(c) SV40などにおけるポリアデニル化部位 (Okayama et al., 1983)。免疫グロブリンcDNA遺伝子は、発現要素としてSV40初期プロモーターおよびそのエンハンサー、マウス免疫グロブリンH鎖プロモーターエンハンサー、SV40後期領域mRNAスプライシング、ウサギS-グロビン介在配列、免疫グロブリンおよびウサギS-グロビンポリアデニル化部位、ならびにSV40ポリアデニル化要素を使用して、Liu et al. (後述) およびWeidle et al., 51 Gene 21 (1987) によって説明されているように発現させることができる。

10

20

30

40

50

【0121】

一部がcDNA、一部がゲノムDNAから構成される免疫グロブリン遺伝子については (Whittle et al., 1 Protein Engin. 499 (1987))、転写プロモーターはヒトサイトメガロウイルスであり得、プロモーターエンハンサーはサイトメガロウイルスおよびマウス/ヒト免疫グロブリンであり得、mRNAスプライシングおよびポリアデニル化領域は天然の染色体免疫グロブリン配列であり得る。

【0122】

いくつかの実施形態において、齧歯類細胞におけるcDNA遺伝子の発現については、転写プロモーターはウイルスLTR配列であり、転写プロモーターエンハンサーはマウス免疫グロブリン重鎖エンハンサーおよびウイルスLTRエンハンサーのいずれかまたは両方であり、スプライス領域は31bpより大きなイントロンを含有しており、ポリアデニル化および転写終結領域は、合成されている免疫グロブリン鎖に対応する天然の染色体配列に由来する。他の実施形態において、他のタンパク質をコードするcDNA配列を先に列挙した発現要素と組み合わせて、哺乳類細胞における当タンパク質の発現を達成する。

【0123】

各融合遺伝子は、発現ベクター内で集合することができ、または発現ベクター内へ挿入することができる。あるいは、発現ベクターを使用せずにmRNAまたはDNAを使用することができる(「むき出しのmRNA」または「むき出しのDNA」)。次いで、キメラ免疫グロブリン鎖遺伝子産物を発現することができるレシピエント細胞に、抗体、その抗原結合部分、もしくはCAR、またはキメラH鎖もしくはキメラL鎖をコードする遺伝子を単独でトランスフェクトするか、あるいはキメラH鎖遺伝子およびキメラL鎖遺伝子を同時トランスフェクトする。トランスフェクトしたレシピエント細胞は、組み込まれた遺伝子の発現を可能にする条件下で培養され、発現した免疫グロブリン鎖または未処置の抗体もしくはフラグメントが培養物から回収される。

【0124】

いくつかの実施形態において、抗体、その抗原結合フラグメント、CAR、もしくはキメラH鎖およびL鎖、またはこれらの部分をコードする融合遺伝子は、次いで、レシピエント細胞を同時トランスフェクトするために使用される別個の発現ベクターにおいて集合する。各ベクターは、細菌系での選択のために設計された第1の選択可能遺伝子、および真核生物系での選択のために設計された第2の選択可能遺伝子という2つの選択可能遺伝子を含有することができ、各ベクターは異なる対の遺伝子を有する。この戦略は結果として、細菌系における融合遺伝子の産生を最初に指示し、増幅を可能にするベクターを生じる。細菌宿主内でそのように産生および増幅された遺伝子は、その後、真核細胞を同時トランスフェクトするために使用され、所望のトランスフェクトされた遺伝子を運ぶ同時ト

ランスフェクトされた細胞の選択を可能にする。細菌系における使用のための選択可能な遺伝子の非限定例は、アンピシリンに対する耐性を付与する遺伝子、およびクロラムフェニコールに対する耐性を付与する遺伝子である。真核生物のトランスフェクタントにおける使用のための選択可能な遺伝子には、キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (g p t と指定) および T n 5 由来のホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (n e o と指定) が含まれる。あるいは、キメラ H 鎖および L 鎖をコードする融合遺伝子と同じ発現ベクター上で集合させることができる。

【0125】

発現ベクター、むき出しの mRNA またはむき出しの DNA のトランスフェクションおよび本明細書に記載されるキメラ、ヒト化、または複合ヒト抗体の産生のために、レシピエント細胞株は骨髓腫細胞であり得る。骨髓腫細胞は、トランスフェクトした免疫グロブリン遺伝子によってコードされる免疫グロブリンを合成、集合、分泌することができ、免疫グロブリンのグリコシル化についての機序を備えている。例えば、いくつかの実施形態において、レシピエント細胞は組換え I g 産生骨髓腫細胞 S P 2 / 0 (A T C C # C R L 8 2 8 7) である。S P 2 / 0 細胞は、トランスフェクトされた遺伝子によってコードされた免疫グロブリンのみを産生する。骨髓腫細胞は、培養液中でまたはマウスの腹腔内で成長することができ、そこで分泌された免疫グロブリンは腹水から得ることができる。他の適切なレシピエント細胞には、ヒトもしくは非ヒト起源の B リンパ球、ヒトもしくは非ヒト起源のハイブリドーマ細胞、または種間ヘテロハイブリドーマ細胞などのリンパ系細胞が含まれる。

10

20

【0126】

本明細書に記載されるキメラ、ヒト化、もしくは複合ヒト抗体コンストラクト、抗体、その抗原結合部分、および / または C A R を運ぶ発現ベクターまたはむき出しの mRNA またはむき出しの DNA は、形質転換、トランスフェクション、コンジュゲーション、原形質体融合、リン酸カルシウム沈殿、およびジエチルアミノエチル (D E A E) デキストランなどのポリカチオンの適用などの生化学的手段、ならびに電気穿孔法、直接的な微量注射、およびマイクロプロジェクトイルボンバードメントなどの機械的手段を含む種々の適切な手段のうちのいずれかによって、適切な宿主細胞内へ導入することができる。当業者に既知のような J o h n s t o n e t a l . , 2 4 0 S c i e n c e 1 5 3 8 (1 9 8 8) 。

30

【0127】

いくつかの態様において、ヒト化抗体の軽鎖をコードする第 1 の発現ベクター、およびヒト化抗体の重鎖をコードする第 2 の発現ベクターで形質転換された宿主を、各鎖が発現するような条件下維持することと、このように発現した鎖の集合によって形成されたヒト化抗体を単離することを含む工程によって調製されるヒト化抗体の産生のための方法およびシステムが本明細書で提供される。第 1 および第 2 の発現ベクターは、同じベクターとすることができる。本明細書では、ヒト化抗体の軽鎖または重鎖をコードする DNA 配列、該 DNA 配列を組み込んだ発現ベクター、および該発現ベクターで形質転換した宿主も提供される。

40

【0128】

通常、ヒト化抗体およびヒト抗体バリエーションにおける C D R 領域は実質的に同一であり、より通常は、それらが由来するマウスまたはヒトの抗体内の対応する C D R 領域と同一である。通常は望ましくないが、結果として生じるヒト化免疫グロブリンまたはヒト抗体バリエーションの結合親和性にかんがりの影響を与えることなく、C D R 残基の 1 つ以上の保存的アミノ酸置換を行うことが時々可能である。時折、C D R 領域の置換は、結合親和性を増強することができる。

【0129】

さらに、マウスまたは他の種由来の遺伝子、適切な生物活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と一緒に適切な抗原特異性の抗体分子スプライシングすることによる、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術 (それらの全体が参照により本明細書に援用される M o r

50

risson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851 - 855 (1984)、Neuberger et al., Nature 312: 604 - 608 (1984)、Takeda et al., Nature 314: 452 - 454 (1985)を参照されたい)を使用することができる。キメラ抗体とは、マウスモノクローナル抗体に由来する可変領域と、ヒト免疫グロブリン定常領域とを有するもの、例えばヒト化抗体など、異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。

【0130】

キメラ抗体の可変セグメントは、典型的には、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部に連結されている。ヒト定常領域DNA配列は、不死化B細胞など、種々のヒト細胞から周知の手順に従って単離することができる(そのすべての内容が参照により本明細書に援用されるWO 87/02671)。抗体は、軽鎖および重鎖のいずれの定常領域も含有することができる。重鎖定常領域には、CH1、ヒンジ、CH2、CH3、および時にはCH4領域を含むことができる。治療目的のために、CH2ドメインを欠失させまたは省略することができる。

【0131】

さらに、本明細書に記載されるように、ヒトにおける療法のために、機能的活性を維持しながら、潜在的な免疫原性を低下させるように組換えヒト化抗体をさらに最適化することができる。この点において、機能的活性は、本明細書に記載される組換え抗体、その抗原結合部分、またはCARと関係する1つ以上の既知の機能的活性を示すことができるポリペプチドを意味する。このような機能的活性には、癌細胞への結合および/または抗癌活性が含まれる。さらに、機能的活性を有するポリペプチドは、例えば、用量の依存性の有無の下での生物学的アッセイなどの特定のアッセイにおいて測定されるように、成熟型を含む、本明細書に記載される参照抗体、その抗原結合部分、またはCARの活性と同様であるが必ずしも同一ではない活性を呈することを意味する。用量依存性が存在する場合、参照抗体、その抗原結合部分、またはCARのものと同一である必要はなく、むしろ本明細書に記載される参照抗体、その抗原結合フラグメント、および/またはCARのものと実質的に類似している必要がある(すなわち、候補ポリペプチドは、本明細書に記載される抗体、抗原結合フラグメント、および/またはCARに対してより高い活性、または約25倍以下、約10倍以下、または約3倍以下の低い活性を呈することになる)。

【0132】

本明細書に開示する材料および方法は、患者由来の生物試料中のCEACAM6を検出するために概してかつ種々に有用である。いくつかの実施形態において、検出ステップは、患者由来の生物試料を、グリコペプチドを含む第1のエピトープに特異的に結合する第1の抗体と接触させて、第1の抗体とCEACAM6との間に第1の複合体を形成することと、続いて、第1の複合体を、第2のエピトープに特異的に結合する第2の抗体であって、第1および第2のエピトープが異なっている、第2の抗体と接触させて、第2の複合体を形成することと、第2の複合体が、第1の抗体、CEACAM6、および第2の抗体を含む、形成することと、次いで、第2の複合体を検出し、それによりCEACAM6を検出することと、を含むことができる。

【0133】

いくつかの実施形態において、生物試料は、血液、血清、血漿、尿、糞便、または生検試料であり得る。いくつかの実施形態において、第1の抗体は、固体支持体、例えば、ポリスチレンもしくはポリカーボネートのマイクロウェルもしくはディップスティックなどの固体マトリックス、膜、またはガラス支持体(例えば、ガラススライド)の上に固定することができる。ある特定の実施形態において、第2の抗体は、酵素、色素、放射性核種、発光基、蛍光基またはビオチンなどの検出可能なレポーター部分または標識を含有することができる。複合体に結合したままの第2の抗体の量は、特定の検出可能なレポーター部分または標識に適切な方法を使用して測定することができる。放射性基については、シンチレーション計数またはオートラジオグラフィ法が概して適切である。分光法を使用して、色素(例えば、酵素反応の比色生成物を含む)、発光基、および蛍光基を検出する

10

20

30

40

50

ことができる。ピオチンは、異なるレポーター基（通常は放射性基または蛍光基または酵素）に連結したアビジンまたはストレプトアビジンを使用して検出することができる。酵素レポーター基は概して、基質の添加（概して特定の期間）によって検出した後、反応生成物を分光分析、分光測光または他の分析によって検出することができる。標準物質および標準添加物を使用して、試料中の抗原のレベルを決定することができる。

【0134】

本明細書で使用する場合、「投与すること」という用語は、所望の部位での薬剤の少なくとも部分的な送達を結果的にもたらす方法または経路による、本明細書に開示する化合物の、対象内への配置を称する。本明細書に開示する化合物を含む医薬組成物は、対象において有効な処置を結果的にもたらす何らかの適切な経路によって投与することができる。

10

【0135】

「統計的に有意な」または「有意に」という用語は、統計的有意性を称し、概して2標準偏差（2SD）以上の差を意味する。

【0136】

操作実施例または他所で示す場合を除き、本明細書で使用する成分の量または反応条件を表すすべての数字は、すべての場合において「約」という用語によって修飾されると理解すべきである。「約」という用語は、百分率と共に使用するとき、平均±1%を意味し得る。

【0137】

本明細書で使用する場合、「を含んでいる」または「を含む」という用語は、方法または組成物に必須であるが、必須であろうとそうでなかりと、非特定の要素の包含に対して開かれている組成物、方法、およびそれらの個々の構成要素（複数可）に関して使用される。

20

【0138】

「からなる」という用語は、本明細書に記載される組成物、方法、およびこれらの個々の構成要素を称し、それらは、実施形態の該説明において列挙されていないいかなる要素も除外する。

【0139】

本明細書で使用する場合、「本質的に～からなる」という用語は、所与の実施形態に必要とされる要素を称する。この用語は、該実施形態の基本的および新規のまたは機能的な特徴（複数可）に実質的に影響を与えない要素の存在を可能にする。

30

【0140】

「a」、「an」、および「the」という単数形の用語には、文脈からそうでないことが明確に示されていない限り、複数の指示物が含まれる。同様に、「または」という語は、文脈からそうでないことが明確に示されていない限り、「および」を含むことが意図される。本明細書に記載されるものと類似または同等の方法および材料は、本開示の実施または検査において使用することができるが、適切な方法および材料を以下に記載される。「例えば（e.g.）」という略語は、ラテン語の～の目的のための例として（exempli gratia）に由来し、非限定例を示すために本明細書で使用する。したがって、「例えば（e.g.）」という略語は「例えば（for example）」という用語と同義である。

40

【0141】

細胞生物学および分子生物学における一般的な用語の定義は、Merck Research Laboratoriesによって刊行された“The Merck Manual of Diagnosis and Therapy”, 19th Edition, 2006 (ISBN 0-911910-19-0)、Blackwell Science Ltd.によって刊行されたRobert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, 1994 (ISBN 0-632-02182-9)、Jones & Bartle

50

tt Publishingによって刊行されたBenjamin Lewin, Genes X, 2009 (ISBN-10: 0763766321)、VCH Publishers, Inc.によって刊行されたKendrew et al. (eds.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 1995 (ISBN1-56081-569-8)およびCurrent Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan et al., eds.において認めることができる。

【0142】

特に明記しない限り、本発明は、例えば、それらの全体が参照により本明細書にすべて援用されるSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012)、Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1995)、またはMethods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol. 152, S.L. Berger and A.R. Kimmel Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987)、Current Protocols in Protein Science (CPS) (John E. Coligan, et al., ed., John Wiley and Sons, Inc.)、Current Protocols in Cell Biology (PCB) (Juan S. Bonifacino et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.)、およびCulture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998)において説明されるように、標準的な手順を用いて実施した。

【0143】

他の用語は、本明細書において、本発明の種々の態様の説明内で定義する。

【0144】

参考文献、発行済み特許、公開済み特許出願、および同時継続中の特許出願を含む、本出願のいたるところで引用されたすべての特許およびその他の公開物は、例えば、本明細書に記載される技術に関連して使用され得るこのような公開物において説明された方法論を説明および開示する目的のために、参照により本明細書で明らかに援用される。これらの公開物は、本出願の出願日に先立って該公開物の開示のみのために提供される。この点に関して、先行発明によって、または何らかの他の理由のために、本発明者らがこのような開示に先行する権利を与えられないことを認めるものとして解釈されるべきではない。日付に関するすべての陳述またはこれらの文書の内容に関する表現は、出願者が利用可能な情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確性に関するいかなる承認も構成するものではない。

【0145】

本開示の実施形態の説明は、網羅的であること、または本開示を開示された正確な形態に制限するよう意図するものではない。本開示の具体的な実施形態および本開示のための実施例が、説明目的のために本明細書に記載されているが、種々の等価の改変は、関連技術分野の当業者が認識することになるように、本開示の範囲内で可能である。例えば、方法のステップまたは機能は所与の順序で提示されるが、代替の実施形態は異なる順序で機

能を実行してもよく、または機能が実質的に同時に実行されてもよい。本明細書で提供される開示の教示は、適宜、他の手順または方法に適用することができる。本明細書に記載される種々の実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することができる。本開示の態様は、必要な場合、先の参考文献および出願の組成、機能および概念を採用して、本開示のなおもさらなる実施形態を提供するように改変することができる。その上、生物学的機能的等価性の考慮により、種類または量における生物学的または化学的作用に影響を与えることなく、タンパク質構造にいくつかの変更を行うことができる。これらのおよび他の変更は、発明を実施するための形態に鑑みて本開示に対して行うことができる。このような改変はすべて、添付の特許請求の範囲内に含まれるよう意図されている。

【0146】

10

上述の実施形態のいずれかの具体的な要素は、他の実施形態の要素に対して組み合わせたり置換したりすることができる。さらに、本開示のある特定の実施形態と関係した利点をこれらの実施形態の文脈で説明してきたが、他の実施形態もこのような利点を呈することがあり、およびすべての実施形態が本開示の範囲内に収まるようこのような利点を必ずしも呈する必要はない。

【0147】

本明細書に記載される技術は、次の実施例によってさらに説明され、該実施例は、さらに限定しているものと決して解釈されるべきではない。

【実施例】

【0148】

20

実施例 1

ヒト化抗体可変領域配列の設計

P T A - 2 3 5 7 および P T A - 2 3 5 8 V 領域の構造モデルを、S w i s s - P D B を使用して作成し、分析して、抗体の結合特性に不可欠である可能性が高いマウス V 領域の重要なアミノ酸を特定した。C D R 内に含有される残基 (K a b a t および C h o t h i a の両定義を使用) は、多くのフレームワーク残基とともに重要であると見なされた。P T A - 2 3 5 7 および P T A - 2 3 5 8 の V H および V K 配列はいずれも、典型的なフレームワーク残基を含有し (図 4 ~ 1 9 を参照されたい) 、特に抗体が決定的な位置における非常に共通した配列立体配座を有する V H においてそうであり、例えば、K a b a t 残基 4 5 ~ 4 9 (P T A - 2 3 5 7 および P T A - 2 3 5 8 の両方について L E W I G (配列番号 4 7)) ならびに P T A - 2 3 5 7 について 9 0 ~ 9 4 (Y Y C A R (配列番号 4 8)) および P T A - 2 3 5 8 について Y Y C N A (配列番号 4 9)) である。P T A - 2 3 5 7 および P T A - 2 3 5 8 の C D R モチーフは、多くのマウス抗体に匹敵する。

30

【0149】

P T A - 2 3 5 7 のヒト化について、ヒト V H 1 - 1 8 * 0 1 生殖系列フレームワークを重鎖のためのテンプレートとして選択し、V K 1 - 3 9 * 0 1 生殖系列フレームワークを軽鎖のためのテンプレートとして選択した (両方ともマウス V H および V K に対して 6 2 % の同一性) 。 P T A - 2 3 5 8 のヒト化について、ヒト V H 1 - f * 0 1 生殖系列フレームワークを重鎖のためのテンプレートとして選択し、V K 7 - 3 * 0 1 生殖系列フレームワークを軽鎖のためのテンプレートとして選択した (それぞれマウス V H および V K と 6 4 % および 7 7 % の同一性) 。両方の抗体について、多くのマウスフレームワーク残基が C D R の立体配座に重要であると特定され、これらの多様な数がバリエーションに含まれていた。

40

【0150】

P T A - 2 3 5 7 のヒト化について、5 つの V H バリエーションおよび 3 つの V K バリエーションを設計し、同様に、P T A - 2 3 5 8 については、5 つの V H および 3 つの V K バリエーションを設計した (図 4 ~ 1 9 を参照されたい) 。

【0151】

ヒト化可変領域のクローニングおよび発現

すべての V H および V K 領域の遺伝子を、アニールし、ライゲートし、P C R 増幅した

50

一連の重複するオリゴヌクレオチドを用いて合成して、完全長の合成V領域を得た。次に、集合したバリエーションを、それぞれIgG1重鎖およびカッパ軽鎖のための発現ベクターpANTVhG1およびpANTVk (Antitope) 内へと直接クローン形成した。

【0152】

PTA-2357およびPTA-2358について、ヒト化重鎖および軽鎖のすべての組み合わせ（すなわち、各抗体について合計15組）を、電気穿孔法を介してNS0細胞に安定してトランスフェクトした。各組み合わせについて、電気穿孔した細胞を5×96ウェルの組織培養プレート内に分配し、200nMメトトレキサート (Sigma #M8407) を使用して選択した。各コンストラクトについてのメトトレキサート耐性コロニーを含有するウェルを試料採取し、IgG1発現レベルを検査し、最適な発現株を選択し、T175フラスコへと連続的に増殖させ、液体窒素下で凍結させた。15組すべてについて抗体を発現する細胞株を作製した。

10

【0153】

さらに、初回評価を提供するために、Lipofectamine 2000 (Invitrogen #11668) を使用して、CHO-K1細胞にPTA-2357およびPTA-2358の両方についてのヒト化重鎖および軽鎖のすべての組を一過性にトランスフェクトした。トランスフェクションの96時間後、抗体精製のために細胞培地を収集した。簡潔には、安定しかつ一過性のトランスフェクション由来のヒト化抗体バリエーションを、1mlのプロテインAセファロースカラム (GE Healthcare #11-0034-93) 上で細胞培養上清から精製し、予測されるアミノ酸配列に基づいた吸光係数 $E_c(0.1\%)$ を用いて OD_{280nm} によって定量した。PTA-2357およびPTA-2358についての $E_c(0.1\%)$ 値はそれぞれ、1.40および1.44である。

20

【0154】

NCI-H187古典的小細胞肺癌細胞へのバリエーション抗体の結合

NCI-H187古典的小細胞肺癌細胞 (ATCC番号: CRL-5804) に対するPTA-2357およびPTA-2358抗体のCHO-K1に一過性に発現したヒト化バリエーションの結合を、競合アッセイおよびその後のフローサイトメトリー分析により評価した。NCI-H187細胞を収穫し、冷PBS中で洗浄し、細胞解離緩衝液 (Gibco #13151-014) 中で再懸濁し、次いで70ミクロンの細胞ストレーナー (BD Biosciences #352350) で濾過して多細胞凝集体をばらばらにした。細胞を冷FACS緩衝液 (1% FBS / 0.01% アジ化ナトリウム / PBS) 中へ入れて 4×10^6 細胞/mlに希釈し、氷上で維持した。

30

【0155】

各バリエーション-2357およびバリエーション-2358抗体 ($8 \mu g/ml - 0.296 \mu g/ml$) の希釈系列を、V底96ウェルプレート (Corning #3894) 中で $50 \mu l$ /ウェルで一定濃度の関連マウス参照抗体 ($0.1 \mu g/ml$ PTA-2357または $0.3 \mu g/ml$ PTA-2358) と事前に混合した。 $50 \mu l$ の細胞懸濁液を各ウェルに添加して、 $0.05 \mu g/ml$ または $0.15 \mu g/ml$ のマウス参照抗体中 $4 \mu g/ml \sim 0.148 \mu g/ml$ の最終濃度範囲を得た。プレートを4で1時間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液で洗浄し、 $100 \mu l$ の二次抗体 (Sigma #F2772、ヤギ抗マウスIgG (Fc特異的) FITC結合) 中で再懸濁し、4で1時間インキュベートした。

40

【0156】

細胞を2回洗浄し、 $175 \mu l$ の最終容量のFACS緩衝液中で再懸濁し、FACSチューブに移した。蛍光をフローサイトメトリーで測定し、データ曲線は正規化した%陽性事象 (R2においてゲート処理) としてプロットした。曲線から各抗体についての IC_{50} 値を決定し、検査抗体の結果をキメラ抗体の結果で除することによって、相対的な IC_{50} 値を計算した。(表1および2を参照されたい)。

50

【 0 1 5 7 】

P T A - 2 3 5 7 および P T A - 2 3 5 8 についてのリードヒト化バリエーションを選択し（表 3 を参照されたい）、安定してトランスフェクトした N S 0 細胞から精製した材料を使用して、濃度範囲を広げて、競合フローサイトメトリーアッセイ（一過性材料について説明）において再検査した（図 3 A ~ 3 C を参照されたい）。図 3（a）は、表 4 に要約した相対的な IC_{50} 値を有する P T A - 2 3 5 7 リードについての結合曲線を示す。選択したリードはすべて、キメラ抗体の 1 . 5 倍以内に結合する。図 3（b）および（c）は、これもまた表 4 に要約した相対的な IC_{50} を有する P T A - 2 3 5 8 リードについての結合曲線を示す。選択したリードはすべて、キメラ抗体の 3 倍以内に結合し、2 つを除くすべてが 1 . 5 倍以内に結合する。

10

【 0 1 5 8 】

考察

C D R グラフト結合技術を使用して構築された、N C I - H 1 8 7 細胞に特異的なヒト化抗体を本明細書に記載される。ヒト化抗体は、単一のヒト生殖系列フレームワーク配列をテンプレートとして使用して、マウス C D R および C D R の正しい立体配座に重要であると特定したいくつかの追加のフレームワーク残基を組み込んで構築した。バリエーションは、ヒト配列に組み込まれるマウス残基の数を最小限にするように設計した。P T A - 2 3 5 7 および P T A - 2 3 5 8 の両方について、1 5 個の候補ヒト化抗体を最初に N C I - H 1 8 7 細胞への結合について検査した。表 4 は、本明細書に記載されるアッセイにおいて特に良好な性能を有する P T A - 2 3 5 7 抗体の 5 つのバリエーションおよび P T A - 2 3 5 8 抗体の 8 つのバリエーションを示す。

20

【表 1】

表 1：キメラ P T A - 2 3 5 7 と比較した P T A - 2 3 5 7 C H O - K 1 由来ヒト化抗体バリエーションの相対的な IC_{50} 値

		重鎖バリエーション				
		VH 1	VH 2	VH 3	VH 4	VH 5
軽	VK 1	> 3	> 3	> 3	> 3	> 3
鎖	VK 2	1 . 2	1 . 3 6	1 . 5 7	1 . 5	2 . 4 3
バリエーション	VK 3	2 . 0	0 . 8 2	1 . 6 4	2 . 0 6	> 3

30

【表 2】

表 2：キメラ P T A - 2 3 5 8 と比較した P T A - 2 3 5 8 C H O - K 1 由来ヒト化抗体バリエーションの相対的な IC_{50} 値

		重鎖バリエーション				
		VH 1	VH 2	VH 3	VH 4	VH 5
軽	VK 1	1 . 0 9	1 . 2 8	1 . 0 9	1 . 4 8	1 . 6 9
鎖	VK 2	2 . 3 8	1 . 2 9	1 . 8 1	1 . 6 8	1 . 6 8
バリエーション	VK 3	2 . 6 8	> 3	2 . 4 3	> 3	> 3

40

【表 3】

表 3：一過性にトランスフェクトした CHO-K1 細胞から精製された材料から得られた結合データに基づいて選択した PTA-2357 および PTA-2358 リードヒト化バリエントヒト化バリエント

リードバリエント	
PTA-2357	PTA-2358
VH1/VK2	VH1/VK1
VH2/VK2	VH2/VK1
VH2/VK3	VH2/VK2
VH3/VK2	VH3/VK1
VH4/VK2	VH4/VK1
	VH4/VK2
	VH5/VK1
	VH5/VK2

10

【表 4】

表 4：関連するキメラ抗体と比較した PTA-2357 および PTA-2358 NS0 由来のヒト化抗体バリエントの相対的な IC₅₀ 値

20

PTA-2357 のリードバリエント		PTA-2358 のリードバリエント	
バリエント	相対的な IC ₅₀	バリエント	相対的な IC ₅₀
VH1/VK2	1.06	VH1/VK1	1.11
VH2/VK2	1.16	VH2/VK1	1.03
VH2/VK3	1.23	VH2/VK2	1.03
VH3/VK2	1.06	VH3/VK1	1.12
VH4/VK2	1.34	VH4/VK1	2.65
		VH4/VK2	1.49
		VH5/VK1	1.65
		VH5/VK2	1.11

30

【表 5】

表5：CDR

鎖の同一性	CDRの同一性	配列	配列番号
PTA-2357重鎖	CDR1	DYTIH	1
	CDR2	HISTYSGNTNNNQKFKG	2
	CDR3	GDYYGSFYKFEY	3
PTA-2357軽鎖	CDR1	GASENIYGALN	4
	CDR2	GATNLAD	5
	CDR3	QNVLSIPYT	6
PTA-2358重鎖	CDR1	DYYMH	7
	CDR2	WIDPGNGDTECAPKFQG	8
	CDR3	PYYSGSSHFDY	9
PTA-2358軽鎖	CDR1	RASKSVSASGYSFLH	10
	CDR2	LASNLES	11
	CDR3	QHSRELRT	12

10

【表 6】

20

表6：

鎖のバリエーション	配列番号	以下の配列番号の配列を有するCDRを含む
PTA-2357VHバリエーション1	13	1-3
PTA-2357VHバリエーション2	14	1-3
PTA-2357VHバリエーション3	15	1-3
PTA-2357VHバリエーション4	16	1-3
PTA-2357VHバリエーション5	17	1-3
PTA-2357VKバリエーション1	18	4-6
PTA-2357VKバリエーション2	19	4-6
PTA-2357VKバリエーション3	20	4-6
PTA-2358VHバリエーション1	21	7-9
PTA-2358VHバリエーション2	22	7-9
PTA-2358VHバリエーション3	23	7-9
PTA-2358VHバリエーション4	24	7-9
PTA-2358VHバリエーション5	25	7-9
PTA-2358VKバリエーション1	26	10-12
PTA-2358VKバリエーション2	27	10-12
PTA-2358VKバリエーション3	28	10-12

30

40

【0159】

実施例 2

正常細胞上のCD66cとの交差反応なしに癌幹細胞(CSC)上のCD66cの標的化を可能にする、悪性形質転換中に独特に発現する癌特異的グリカンエピトープに対するモノクローナル抗体の開発が本明細書に記載される。

【0160】

CD66cおよび大腸幹細胞集団。Gemelliらは、CD66cが大腸癌幹細胞(CS

50

C)のマーカーであるが、正常な幹細胞集団では発現しないことを実証した。彼らは以下を実証した：

(a)CD66cは大腸癌において多量に発現するが、隣接する正常組織においては発現していない、

(b)CD66cの発現は、病変の悪性度による勾配に従っており、正常組織から腺腫へ、および腺腫から癌腫へと上昇した。

(c)その発現が患者の予後および生存と相関することが実証されてきた検証済みのCSCマーカーであるCD133(Li, Z. 2013. CD133: a stem cell biomarker and beyond. Exp Hematol Oncol. 2:17. 25. PMID: 23815814)を使用して、正常組織由来のCD133陽性細胞がほぼ完全にCD66c陰性であるのに対し、腫瘍由来のCD133陽性細胞がすべてCD66c陽性であることを実証した、

(d)CD66c^明細胞(フローサイトメトリーによって測定)は、大腸腫瘍細胞の肝転移で有意に増加した、

(e)CD66c^明細胞は、原発患者の腫瘍から成長した結腸球体において富んでいた、

(f)大腸癌患者由来のCD66c^明細胞のみがNOD/SCIDマウスにおける巨視的腫瘍を形成したのに対し、CD66c^純細胞は形成しなかった、ならびに

(g)ヒトCaco.2細胞株(高CD66c発現株)におけるSiRNAからCD66cへは、対照細胞による頑強な腫瘍形成にもかかわらず、NOD. SCIDマウスにおいてインビトロでの増殖を低減させ、アポトーシスおよび壊死を増大させ、腫瘍形成を予防する。

【0161】

これらのデータは、腫瘍形成に重要な新規大腸CSC抗原としてのCD66cが、CD133などの他のマーカーとは異なり、正常大腸幹細胞では存在しないかまたは非常に低いレベルで発現することを検証した。

【0162】

CD66cおよび大腸癌幹細胞

多くの腫瘍のバルク集団における発現に加えて、CD66cはCSCの重要なマーカーであり、CEACAM6の発現は腫瘍細胞のCSC特性を伝えることさえできる。Haraguchiらは、種々の消化管腫瘍細胞株由来のサイドポピュレーション(SP)細胞を特徴付けた。SP表現型は、Hoechst33342などの蛍光色素を排出する高レベルのABCトランスポーターが原因であり、種々の正常および悪性組織の幹細胞集団に対応することが示されてきた。これらの腫瘍株におけるSP集団のマーカーを特定するために、彼らは、オリゴヌクレオチドマイクロアレイを使用してヒト肝細胞癌HuH7細胞のSPと非SPとの間で差次的に発現する遺伝子を分析した。彼らは、CD66cを非SP細胞と比較してSP集団において最も差次的に上方調節された遺伝子として同定した。

【0163】

Chenらは、膵癌細胞におけるCD66cレベルの上昇が、上皮間葉転換(EMT)、インビトロでの移動および浸潤、インビボでの転移を促進したのに対し、shRNA仲介性CD66cノックダウンは逆の効果を有することを示した。EMTは、CSCを生成する1つの機序であると考えられており、膵臓への転移において重要な役割を担っていることが示されてきた。それゆえ、EMTを促進することにより、CD66cは癌幹細胞の特性を直接誘導することができる。

【0164】

癌幹細胞におけるCD66cの役割についての特に強力な証拠は、大腸癌において実証されてきた。Ilantzisらは、ヒト大腸細胞株におけるCD66cの過剰発現が細胞分極の喪失を誘導し、その分化能を阻害し、ヌードマウスにおけるその腫瘍形成能を上昇させることを発見した。Gemeiらは、CD66cが大腸CSCのマーカーであるが、正常な腸幹細胞のマーカーではないという直接的な証拠を提供した。これらの著者は、

10

20

30

40

50

正常な組織および癌組織における検証された幹細胞マーカーであるCD133とCD66cとの間の相関関係を検討した。驚くべきことに、彼らは、CD66cが、幹細胞集団が存在する正常な陰窩の基底ではなく、成熟細胞が脱落した頂点でのみ発現し、対照的に、CD66cが癌組織の陰窩全体に発現することを発見した。さらに、CD66cおよびCD133の発現は正常組織では相互に排他的ですが、大腸腫瘍では共発現する。これらのデータは、CSCとその正常幹細胞対応部分との間に非常にわずかな文書化された分子レベルの差があるため、驚くべきである。癌幹細胞の十分に実証された多くのマーカー（例えば、CD133、CD44、ALDH1A1、LGR5など）も、正常な幹細胞の対応物を単離するために使用される。対照的に、CD66cは、正常な幹細胞集団には存在しない独特なCSCマーカーである。

10

【0165】

正常な幹細胞および癌幹細胞は、大腸癌において特に十分に説明されてきており、この2つを区別する薬剤および生物製剤を特定するための優れたシステムとなっている。先に記載のように、正常条件下では、大腸幹細胞集団は解剖学的に限定されており、陰窩に制限される。腸内の細胞は代謝回転が絶え間なく、幹細胞は陰窩を上って絨毛に移動し、次いで除去される一過性の増幅細胞を形成する。このプロセスは、R.spondinsのための受容体であり、およびWntシグナル伝達受容体複合体の一部であるLgr5マーカーを有する陰窩の基底にある細胞によって駆動される。近年のデータは、この集団が、以前は腸幹細胞集団を表すと考えられていた陰窩の基底から+4の位置に静止集団も生じさせることを示している。CD133、CD44、Adlefluoormarkerと同様に、およびCEACAM6とは異なり、Lrg5は、正常な幹細胞集団および大腸癌幹細胞集団の両方を標識する。

20

【0166】

細胞表面マーカーを使用して大腸CSCを特定する代替案は、スフェロイドアッセイのような機能アッセイを使用することである。スフェロイドアッセイは、CSCが、より分化した腫瘍細胞ではなく、無血清培地でスフェロイドを形成するという観察を使用している。予備試験において、本発明者らは、コロスフェアアッセイを使用して、コロスフェアがモノクローナル抗体109.12によって検出される抗原を発現しているかどうかを判定した。モノクローナル抗体109.12によって検出される抗原は、結腸球体において発現している（図20）。抗原はバルク腫瘍細胞集団においても発現するので、抗原の量はバルク集団に比べて結腸球体においては濃縮されない。それゆえ、これらのデータは、モノクローナル抗体109.12抗原が大腸癌幹細胞集団において発現しているという初めての証拠を表している。

30

【0167】

参考文献

Fessart et al. "Three-dimensional culture model to distinguish normal from malignant human bronchial epithelial cells." Eur Respir J. 2013 42:1245-56.

Witt Hamer Philip C. De, et. al. "Quantification of Viability in Organotypic Multicellular Spheroids of Human Malignant Glioma using Lactate Dehydrogenase Activity: A Rapid and Reliable Automated Assay" Journal of Histochemistry and Cytochemistry 2005 53:23-24.

40

【0168】

実施例3

材料および方法

C6f1フラグメント - C6f1と呼ばれるCEACAM6の570ヌクレオチドフラ

50

グメントを、E c o R I 制限部位を含有する順方向プライマーおよび B g l I I 制限部位を含有する逆方向プライマーを使用して P C R 増幅した。P C R 産物を 1 % アガロースゲル上で泳動し、生成物の大きさを確認し、製造元の指示によって Q i a g e n ゲル抽出キットを使用して所望の大きさのバンドを切り出して精製した。次に、P C R 産物を、P r o m e g a 製の E c o R I および B g l I I の両酵素を 1 u L 含有する 2 0 u L 反応液中で 3 7 °C で一晩、制限酵素で消化した。生成物を再度 1 % アガロースゲル上で泳動して、生成物の大きさを確認し、ゲルから切り出し、Q i a g e n ゲル抽出キットを使用して精製した。E c o R I および B g l I I を用いて以前に処理された p F U S E ベクターへのフラグメントのライゲーションは、製造元の指示によって N E B T 4 D N A リガーゼを使用して実施した。結果として得られたプラスミドを T o p 1 0 F コンピテント E . c o l i へと形質転換し、ゼオシンを含有する寒天プレート上に播種した。単一のコロニーを選択し、5 m L 培養液中で増殖させ、Q i a g e n ミニプレップキットを使用してプラスミドを精製した。D N A 配列は、アガロースゲル上での大きさおよびヌクレオチド配列決定の両方によって検証した。

【 0 1 6 9 】

C 6 f 1 フラグメントの精製 - B i o l o g i c D u o F l o w クロマトグラフィーシステムを使用して、C 6 f 1 の精製を行った。2 0 m M リン酸ナトリウム p H 7 . 0 結合 / 洗浄緩衝液 (緩衝液 A) および 1 0 0 m M クエン酸 p H 3 . 0 緩衝液 (緩衝液 B) と組み合わせた G E H e a l t h c a r e H i T r a p H P プロテイン A カラムを使用して、上清から C 6 f 1 を精製した。プロテイン A カラムを使用した C 6 f 1 精製についてのプロトコルを以下の表 1 に列挙する。画分は、緩衝液 B で溶離まで 5 m L ごとに採取し、その後、プロトコルの完了まで 2 . 5 m L ごとに収集した。

【 0 1 7 0 】

表 7 . プロテイン A カラムによる C 6 F 1 精製のためのプロトコル

プロテイン A カラムの各画分 2 0 マイクロリットルをポリアクリルアミドゲル上で泳動し、P V D F に転写し、M A b 1 0 9 を使用してプロットして、M A b 1 0 9 反応性 C 6 f 1 を含有する画分を同定した。次に、反応性画分をプールし、A m i c o n U l t r a U l t r a c e l 3 0 K D a 遠心フィルターを使用して濃縮した後、2 5 m M M E S p H 6 . 5 で 3 0 m L の容積にした。次に、試料を B i o l o g i c D u o F l o w クロマトグラフィーシステムに負荷し、2 5 m M M E S p H 6 . 5 (緩衝液 A) および 1 M N a C l (緩衝液 B) 含有 2 5 m M M E S p H 6 . 5 を使用する G E H e a l t h c a r e H i T r a p Q f f カラムを用いてさらに精製 / 濃縮した。Q f f カラムを使用した C 6 f 1 精製 / 濃縮のためのプロトコルを以下の表 2 に列挙する。画分は、緩衝液 B での溶離まで 5 m L ごとに採取し、その後、プロトコルの完了まで 2 m L ごとに収集した。

【 表 7 】

ステップ番号	緩衝液または試料	百分率または勾配	流量 (m L / 分)	合計ステップ時間 (分)
1	緩衝液 A	1 0 0 %	5	5 0
2	試料の負荷 / 注入	1 0 0 %	5	1 5 0
3	緩衝液 A	1 0 0 %	5	5 0
4	緩衝液 B	1 0 0 %	5	2 5
5	緩衝液 A	1 0 0 %	5	5 0

【 0 1 7 1 】

表 8 . Q f f カラムを使用した C 6 f 1 精製 / 濃縮のためのプロトコル

Q f f カラム由来の各画分 2 0 マイクロリットルをポリアクリルアミドゲル上で泳動し、P V D F に転写し、M A b 1 0 9 を使用してプロットして、M A b 1 0 9 反応性 C 6 f 1 を含有する画分を同定した。次に、反応性画分を一緒にプールし、A m i c o n U l

t r a c e l 3 0 K D a 遠心フィルターおよび M i l l i Q 水へと交換した緩衝液を使用して濃縮した。容積が 1 m L 未満に一旦濃縮されたら、精製した C 6 f 1 を微量遠心管に入れ、速度真空装置において完全に乾燥させた。最終試料は、所望の容積の m i l l i Q 中で再懸濁し、使用するまで - 2 0 で保存した。

【表 8】

ステップ番号	緩衝液または試料	百分率または勾配	流量 (m L / 分)	合計ステップ時間 (分)
1	緩衝液 A	1 0 0 %	1	1 0
2	試料の負荷 / 注入	1 0 0 %	1	3 0
3	緩衝液 A	1 0 0 %	1	1 0
4	線形勾配 (A ~ B)	勾配	1	2 0
5	緩衝液 A	1 0 0 %	1	2 0

10

【 0 1 7 2 】

H E K L e c 1 懸濁細胞内での C 6 f 1 の発現 - 細胞を増殖させ、トランスフェクション時まで E x - C e l l / F r e e s t y l e 培地の 5 0 : 5 0 混合物中で維持した。トランスフェクション時に、細胞を遠心分離によって収集し、F r e e s t y l e (商標) 2 9 3 培地のみの中に 2.5×10^6 細胞 / m L の細胞密度で再懸濁する。次に、F r e e s t y l e (商標) 2 9 3 培地中で DNA およびポリエチレンイミン (P E I) をそれぞれ $2.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ および $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ の終濃度で使用して細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後 2 4 時間、細胞を F r e e s t y l e (商標) 2 9 3 培地中で維持した。2 4 時間後、パルプロ酸 (V P A) 含有 E x - C e l l または E S F 培地を添加して培養物を 1 : 1 に希釈して、 2.2 mM の終濃度にした。次に、C O ₂ インキュベーター内のプラットフォーム振盪器上で 5 日間、組換え糖タンパク質産生のために培養物を維持した。5 日後、培養物を遠心分離して、所望の C 6 f 1 糖タンパク質を含有する懸濁培地から細胞を分離した。さらに、細胞培養培地を $0.42 \mu\text{m}$ 真空フィルターに通した後、プロテイン A カラムを備えた B i o R a d クロマトグラフィーシステムを使用して精製した。

20

【 0 1 7 3 】

M A b 1 0 9 結合活性 : 100 ng の精製 C 6 f 1 を、真空マニホールドを使用して P V D F 膜上での各反応について三つ組でスポット処理した。T B S - T 含有 5 % ミルク溶液中で膜を 4 で一晩ブロックした。ストック M A b 1 0 9 ($0.1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$) をブロッキング溶液で 1 : 3 0 0 0 に $0.03 \text{ ng} / \mu\text{L}$ の終濃度まで希釈した後、各競合剤を添加して、室温で 3 0 分間インキュベートした。次に、抗体 / 競合溶液を C 6 f 1 スポット処理したストリップとともに室温で 1 時間インキュベートした。1 時間後、ストリップを T B S - T で 3 回、各洗浄で 5 分間洗浄した。二次抗体は、1 : 5 0 0 0 に希釈され、室温で 3 0 分間インキュベートされた S a n t a C r u z 抗マウス I g G H R P とした。製造元の指示によって、3 回の T B S - T 洗浄を繰り返した後、P e r k i n - E l m e r W e s t e r n L i g h t e n i n g P l u s - E C L を添加した。プロットは、X 線フィルムに 1 0 分間露光した後、現像した。現像後、フィルムを走査し、I m a g e J ソフトウェアを使用して濃度測定を実施した。

30

40

【 0 1 7 4 】

C E A C A M 6 フラグメント / 変異体のクローン形成および発現 - C 6 f 1 のフラグメントの P C R クローン形成は、C 6 f 1 - p F U S E をテンプレートとして使用して、製造元の指示によって Q i a g e n 製の H o t S t a r T a q DNA ポリメラーゼを使用して実施した。p F U S E ベクターへのクローン形成を促進するために、順方向および逆方向 P C R プライマーをそれぞれ E c o R I および B l g I I 制限部位を使用して設計した。プライマー配列は次のとおりである。I g 1 F : G A A T T C A A A G C C C T C C A T C T C C A G C 、 I g 1 R : A G A T C T A T T C A G G G T G A C T G G G T C 、

50

I g 2 F : G A A T T C A G A T G G C C C C A C C A T T T G G、I g 2 R : A G A T C T G G T G A C T G T G G T C C T A T T、ペプチド3 F : G A A T T C A C T G C A G C T G T C C A A T G G C、およびペプチド3 R ; A G A T C T T T T G A C G C T G A G T A G A G T。PCR産物は、Promega制限酵素を使用して形質転換したEcoRIおよびBglIIで制限酵素で制限酵素消化し、エタノール/クロロホルム沈殿させ、製造元の指示によってNEB T4 DNAリガーゼを使用して調製したpFUSEベクターへとライゲートした。Top10Fコンピテント細胞を形質転換し、ゼオシンを含有する寒天プレート上に播種した。いくつかのクローンを選択し、成長させ、プラスミド調製した後、EcoRIおよびBglIIによる制限酵素消化、ならびにDNA配列決定を使用して挿入物を検証した。

10

【0175】

C6f1およびC8f1の特定部位の変異誘発は、Stratagene QuickChange特定部位の変異誘発キットを製造元のプロトコルによって使用して実施した。C6f1の³⁰⁰QAH³⁰²から³⁰⁰HTT³⁰²へのおよびC8f1の³⁰⁰HTT³⁰²から³⁰⁰QAH³⁰²への両方についてのプライマーは、C6f1の³⁰⁰HTT³⁰²順方向: GCGGATCCTATATGTGCGCACACCACTAACTCAGCCACTGGCCCTCおよび逆方向: GAGGCCAGTGGCTGAGTTAGTGGTGTGGCACATATAGGATCCGCとした。C8f1の³⁰⁰QAH³⁰²順方向: GGATCCTATGCGCTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTGGGCおよび逆方向: GCCAGTGGCTGAGTTATGGGCTTTGGCAGGCATAGGATCC。XL-1ブルーコンピテント細胞を使用してPCR産物を形質転換し、ゼオシンを含有する寒天プレート上に播種した。いくつかのクローンを選択し、成長させ、プラスミドを調製した後、EcoRIおよびBglIIによる制限酵素消化、ならびにDNA配列決定を使用して挿入物を検証した。

20

【0176】

実施例4

MAb109エピトープの特徴付け。

本発明者らは、酵素処理を使用して、MAb109によって認識されたエピトープを特徴付けた。MAb109は、ヒト膵臓腺癌(PDACセル(ce1))1株であるN結合型グリカン質のBxPC3細胞と反応することを示してきた。の全細胞溶解物は、MAb109を用いたイムノブロット法によって分析されたものである。図21の左側のパネルに示すように、MAb109は、85kDのおよその分子量を有するポリペプチドと反応した。ヒトN結合型グリカン除去するグリコシル化塩基であるPNGアゼF(ペプチド: N-グリコシダーゼF)で可溶化物を処理すると、MAb109の反応性が消失した。イムノブロットしたものを市販の抗CEACAM6ポリペプチド抗体で探索すると、約45kDのポリペプチドを検出した(右側のパネル)。分子量の移行は、ポリペプチド上のNグリカンの除去と一致していた。これらのデータは、MAb109エピトープが脊椎動物のN結合型グリカン加水分解するPNGアゼFによるCEACAM6の処理に感受性があることを示した。

30

【0177】

図22に示すように、CEACAM6はCEAファミリーのメンバーである。MAb109はCEACAM5および6と反応しますが、CEACAM8とは反応しない。CEACAM6はCEACAM5よりも非常に小さく、それゆえ、MAb109によって認識されるエピトープは、これら2つのタンパク質に共通する配列とは関連していない。図23に示すように、CEACAM6は、3つのドメインであるV、C1、およびC2を、12個の潜在的なN結合型構造とともに含有する。

40

【0178】

VドメインをコードするcDNA配列をC1およびC2ドメインのcDNA配列から除去し、先に説明したようにpFUSEベクターへと部分クローン形成した。このベクター内のタンパク質の領域は、C6f1と称することになる。図25に示すように、ベクター

50

を H E K - 2 9 3 細胞内で発現させると、S D S - P A G E 後に M A b 1 0 9 を使用したイムノブロット法により予測される分子量である糖タンパク質を生成した。C 6 f 1 1 0 9 エピトープは、P N G アーゼ F に感受性があった。C E A C A M 6 ポリペプチドに対する市販の抗体を使用すると、このエピトープは予想通りイムノブロット法後に残存していたが、処理したタンパク質の分子量は低減し、このことは、P N G アーゼ F による C 6 f 1 上での N - グリカンの除去と一致していた。

【 0 1 7 9 】

種々のグリコシダーゼを用いた H E K 細胞由来の C 6 f 1 の処理は、図 2 6 に示すように、M A b 1 0 9 結合の喪失を結果として生じなかった。C 6 f 1 は、N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I 活性を欠いた変異体 H E K 細胞 (L e c 1 H E K) 内で発現したが、その結果、完全に加工されず、本質的にマンノースおよび N - アセチルグルコサミン (M a n および G l c N A c) を含有する N - グリカンを生じ、主として M a n 5 G l c N A c 2 である。これらの N - グリカンは、エンドベータ - ガラクトシダーゼ F および H の両方のグリコシダーゼに対して感受性がある。M A b 1 0 9 は、L e c 1 H E K において発現した C 6 f 1 への強い結合を示した。当エピトープは、P N G アーゼ F 処理に対して感受性があるままである。C 6 f 1 L e c 1 上の N - グリカンは、E n d o F 処理には感受性があるが、M A b 1 0 9 は依然として当 N - グリカンに結合する。したがって、当エピトープは、拡張した N - グリカン構造に依存するようには見えなかった。L e c 1 H E K 細胞内で発現した C E A C A M 6 フラグメント 1 N - グリカンを図 2 7 に示す。

10

20

【 0 1 8 0 】

図 2 8 に示すように、L e c 1 C 6 f 1 をエンド - ベータ - ガラクトシダーゼ F または H で処理すると、結果的に M a n 5 G l c N A c 2 の加水分解が生じ、当タンパク質に付着した単一の G l c N A c が残る。E n d o H 処理後に L e c 1 H E K 細胞内で発現した C E A C A M 6 フラグメント 1 N - グリカンを図 2 9 に示す。

【 0 1 8 1 】

実施例 5

M A b 1 0 9 エピトープの特徴付け：変異誘発分析。

C E A C A M 5、C E A C A M 6、および C E A C A M 8 の C 末端アミノ酸配列のアライメントアライメントを図 3 0 に示す。C E A C A M 5 および C E A C A M 6 は、M A b 1 0 9 によって認識されるエピトープを発現し、C E A C A M 8 は認識しない。配列間の主な違いは、C 6 f 1 配列のアミノ酸 3 0 0 の領域にあった。C E A C A M 5 および C E A C A M 6 の両方は、セグメント Q A H を含んでいた。C E A C A M 8 における対応するセグメントは H T T であった。

30

【 0 1 8 2 】

先に説明したように、本発明者らは、この領域に関して特定部位の変異誘発を実施した。この実験の結果を図 3 1 に示す。C 6 f 1 の Q A H が H T T に変更された変異誘発実験により、M A b 1 0 9 による結合が排除された。C 6 f 1 の Q A H が H T T に変更された変異誘発実験により、M A b 1 0 9 による結合が排除された。逆に、図 3 2 に示すように、C E A C A M 8 の H T T が Q A H に変更された変異誘発実験は結果として、M A b 1 0 9 の結合を生じた。C E A C A M 8 の H 3 0 0 Q または T 3 0 2 H のいずれかを変更しても、M A b 1 0 9 結合が陽性にならなかった。しかしながら、C E A C A M 8 の H 3 0 0 Q および T 3 0 2 H (A 3 0 1 T ではない) の両方を変更すると、図 3 3 に示すような結合における結果を生じた。これらの実験は、M A b 1 0 9 結合またはエピトープの生合成のいずれかに H 3 0 0 および T 3 0 2 が必要とされることを示唆した。

40

【 0 1 8 3 】

C 6 f 1 上の他の場所にある N 結合型構造が M A b 結合に関与することができるかどうかを判定するために、9 個の N 結合型シークオンの各々を順番に変異させた。図 3 4 に示すように、N 3 0 9 が N 3 0 9 A に変異したとき、M A b 結合は存在せず、このシークオンのグリカンのみが関与していたことを示した。

50

【0184】

図35は、QAH領域に対するN309の位置を示す。これらは両方ともC2領域にある。C6f1のシステインがベータ-メルカプトエタノール処理によって還元され、続いてヨードアセトアミドで還元的アルキル化されて再結合を遮断し、結果的に生じる糖タンパク質をSDS-PAGEおよびMAb109を使用したウエスタンブロット法に供し、抗体はまだ結合していた。まとめると、これらのデータは、二次タンパク質構造がMAb109結合に関与する可能性は低いことを示唆したが、エピトープの生合成に関与することができた。Q300からV318付近で、C6f1の一部としてペプチドセグメントについて追加の変異誘発実験を実施した。結果を図36に示す。

【0185】

MAb109結合に及ぼす変異の影響を、ドットブロットアッセイを使用してさらに分析した。天然C6f1をニトロセルロース上にスポット処理し、乾燥後、ニトロセルロースをBSA溶液でブロッキングし、洗浄した。MAb109を変異型C6f1と2時間ブレインキュベートし、この溶液をドットブロットに適用する。2時間後、ニトロセルロースを洗浄し、ホスファターゼ結合ヤギ抗マウス抗体で探索して、ドットブロットへのMAb109の結合を検出した。変異型C6f1が活性ありの場合、変異型C6f1は、MAb109の結合について効率的に競合し、活性のないC6f1は、MAb109結合と競合しない。これらの実験の結果を図37に要約する。特定の残基は、緑色、赤色、または橙色で示す。緑色は、このアミノ酸の変化がMAb109結合活性を保持するC6f1を産生したことを意味する。赤色は、このアミノ酸の変化がMAb109結合活性を喪失するC6f1を生成したことを意味する。橙色は、このアミノ酸の変化がMAb109結合活性のすべてではなくほとんどを喪失するC6f1を産生したことを意味する。

【0186】

ペプチドおよびグリコペプチド合成技術を使用して、Q300からR326へのペプチドおよびN309において単一のGlcNAc残基を有する同じペプチドをMAb結合について検査した。これらの配列を図38に示す。ペプチドQ300からR326へは、(P融合ベクター内で)Fcに融合したC6f1がトリプシンで処理されたときに生成されるトリプシン消化性ペプチドであるため、V318のC末端にさらなる8個のアミノ酸を付加した。30nマイクロモル濃度の濃度では、いずれのペプチドもMAb結合を阻害しなかった。この結果は、N309に単一のGlcNAcを有するQ300からR326へだけがエピトープに含有されていないことを示唆した。

【0187】

MAb109が結合するC末端の最小グリコペプチドを簡素化するために、合成cDNAを合成して発現ベクター内へ挿入し、HEK-T細胞内で発現させた。TEV切断部位、その切断部位へのTEVの容易な接近を可能にする短鎖リンカー、Hisタグ、およびGFPをコードする配列を、最終的なV318の下流に挿入した。図39に示すように、グリコペプチド#6は、HEK細胞内で発現するとき、アフィニティー精製すると、MAb結合活性を示した。しかしながら、N末端に27個のアミノ酸を欠くグリコペプチド#10は活性がなかった。グリコペプチド#8であるQ300-V318は不活性であり、合成グリコペプチドの結果と一致した。グリコペプチド#6と#7との間の主な違いは、#7がC259を含有していないことであり、このことは概して、C299とジスルフィド結合を形成する。

【0188】

C299A含有の変異体C6f1も活性がなかった(先を参照されたい)。まとめると、これらの結果は、C259とC299との間に自然に形成されるジスルフィドループがMAb109エピトープの生合成に必要とされることを示唆する。次に、C259A変異を導入し、このグリコペプチドを発現させて、この仮説を検証した。C259A変異を有する#6グリコペプチド配列は不活性であった。

【0189】

これらのデータは、MAb109の結合には、N309に付着した最少で単一のGlc

10

20

30

40

50

N A c 残基を必要とするかもしれず、また、近くに他の残基も必要とするかもしれないことを示唆した。この結合は、還元およびアルキル化ならびに S D S - P A G E、次いで P V D F 上でのウエスタンブロット法の後のグリコペプチドが M A b 1 0 9 結合活性を示すので、二次ペプチド構造（ジスルフィド）を必要とするようには見えない。さらに、C 2 9 9 A および 2 5 9 A のいずれかの変異は結果的に M A b 結合の喪失を生じるので、これらのシステイン間のジスルフィド架橋は、エピトープの生合成のために存在しなければならない。そのため、ニトロセルロース上での生合成および / または M A b 1 0 9 の結合には以下が必要と思われる：ジスルフィド架橋 C 2 5 9 - C 2 9 9、N 3 0 9 上での G 1 c N A c、Q 3 0 0 および H 3 0 2、ならびに S 3 0 4

【 0 1 9 0 】

10

M A b 1 0 9 は、ベータ - メルカプトエタノールおよびヨードアセトアミド反応、次いで S D S - P A G E による変性およびニトロセルロース膜への転写の後、グリコペプチドおよび C 6 f 1 に結合しているので、M a b 1 0 9 結合はジスルフィド架橋 C 2 5 9 - C 2 9 9 を必要としない。しかし、変異および切断実験により、このジスルフィド架橋はエピトープ発現にとって必要とされるように思われる。N 3 0 9 上の G 1 c N A c 含有の合成グリコペプチド Q 3 0 0 から R 3 2 6 へは M A b 1 0 9 によって結合されなかったので、M A b 1 0 9 エピトープの一部である G 1 c N A c - N 3 0 9 に加えてグリコペプチドの修飾がなければならず、この修飾は、ジスルフィド架橋 C 2 5 9 - C 2 9 9 を必要としない。

【 0 1 9 1 】

20

実施例 6

膵癌試料における M a b 1 0 9 エピトープの検出。

E L I S A ウェル上にコーティングされた M A b 1 0 9 を使用して膵癌血清および非罹患対照血清由来の血清からエピトープを捕捉する捕捉 E L I S A アッセイを開発した。図 4 0 に示すように、市販のポリクローナル抗体を使用して、捕捉された C E A C A M 6 を検出した。正常な血清および複製されたアッセイにおける C E A C A M 6 のレベルは 1 . 0 および 3 . 5 n g / m L であった。膵癌患者由来の血清中の C E A C A M 6 のレベルは、1 5 4 . 3 4 および 1 4 6 . 6 4 n g / m L であった。

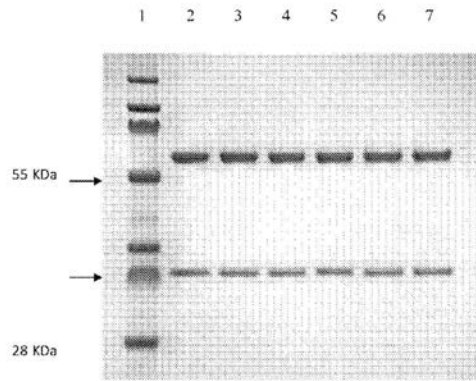
【 0 1 9 2 】

30

捕捉 E L I S A アッセイを使用して、試料のより大きなコホートにおいて M a b 1 0 9 によって認識される C E A C A M 6 エピトープを検出した。図 4 1 に示すように、膵癌患者由来の血清と非罹患血清において M a b 1 0 9 によって認識される C E A C A M 6 エピトープのレベル間には統計的に有意な差があった ($p = 0 . 0 3 6$)。図 4 2 および 4 3 は、慢性膵炎、膵癌に苦しんでいる患者、および非罹患対照に由来する血清中の M a b 1 0 9 によって認識された C E A C A M 6 エピトープのレベルを比較する E L I S A の結果を示す。

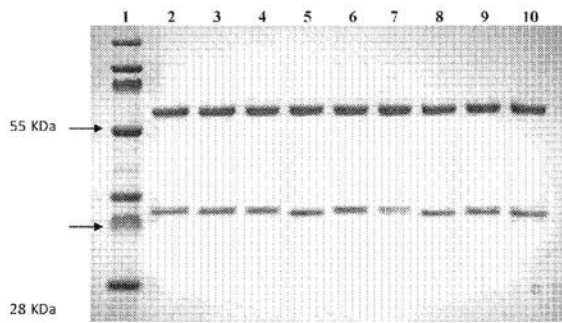
【図 1】

【図 1】



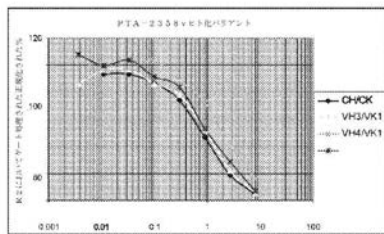
【図 2】

【図 2】



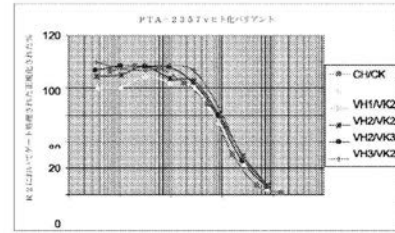
【図 3 C】

【図 3 C】



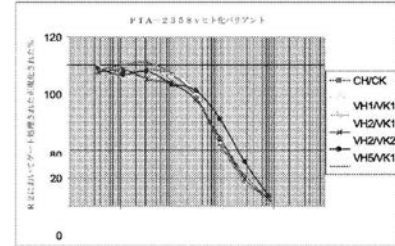
【図 3 A】

【図 3 A】



【図 3 B】

【図 3 B】



【図 4 - 1】

【図 4】

PTA-2357 vtrB mutant (GenBank accession number: J01072) (GenBank accession number: J01072) (GenBank accession number: J01072)

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500

2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600

2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900

2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100

3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300

3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400

3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500

3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700

3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800

3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000

4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100

4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200

4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300

4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400

4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500

4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600

4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700

4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800

4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900

4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000

5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100

5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200

5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300

5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400

5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500

5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600

5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700

5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800

5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900

5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000

6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100

6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200

6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300

6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400

6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500

6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600

6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700

6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800

6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900

6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000

7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100

7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200

7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300

7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400

7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500

7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600

7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700

7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800

7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900

7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000

8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100

8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200

8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300

8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400

8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500

8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600

8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700

8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800

8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900

8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000

9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100

9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200

9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300

9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400

9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500

9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600

9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700

9710 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800

9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890 9900

9910 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000

【 1 2 - 2】

【 1 2】 (続き)

310 320 330 340 350 360
 EAATCGGATGATGACACTTTTAACTATGGGGCGAAGGCAACATGTGACAGTCTCTCA
 Y S G S R F D Y W G Q G T T V T V S S
 100 A B C 110

K a b a によるCDRの定数は、CDR-S1とS2の平均値を用いて算出されている。他のペプチドシーケンスも同様で算出されている。

【 1 3 - 2】

【 1 3】 (続き)

310 320 330 340 350 360
 EAATCGGATGATGACACTTTTAACTATGGGGCGAAGGCAACATGTGACAGTCTCTCA
 Y S G S R F D Y W G Q G T T V T V S S
 100 A B C 110

K a b a によるCDRの定数は、CDR-S1とS2の平均値を用いて算出されている。他のペプチドシーケンスも同様で算出されている。

【 1 3 - 1】

【 1 3】

PTA-23584変異体(ペプチド) (配列番号3.8) (JL0771/株) (発酵番号2.2) (株)NHU(17)アムト2

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGGTTGAGTGTGACACTTTTAACTATGGGGCGAAGGCAACATGTGACAGTCTCTCA
 E V Q L V Q S G A E V R K P G A S V K L S C T A S G F N I K D Y Y
 10 20 30

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TACACTGGTGTGACACTTTTAACTATGGGGCGAAGGCAACATGTGACAGTCTCTCA
 M H N V R Q A P Q G L E N I G W I D P Q N G D E R G A P F Q R
 40 50 60

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGGCACTTGTGACACTTTTAACTATGGGGCGAAGGCAACATGTGACAGTCTCTCA
 A T L T A D T S I N T A Y L E L D N L R S D T A V Y Y C N A F Y
 70 80 90

【 1 4 - 1】

【 1 4】

PTA-23584変異体(ペプチド) (配列番号3.9) (JL0771/株) (発酵番号2.3) (株)NHU(17)アムト3

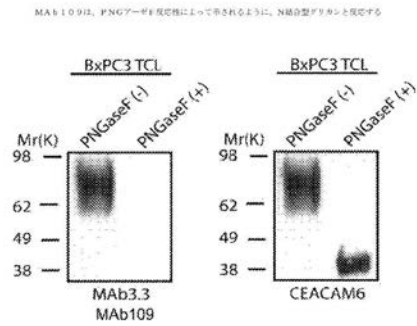
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGGTTGAGTGTGACACTTTTAACTATGGGGCGAAGGCAACATGTGACAGTCTCTCA
 E V Q L V Q S G A E V R K P G A S V K L S C T A S G F N I K D Y Y
 10 20 30

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TACACTGGTGTGACACTTTTAACTATGGGGCGAAGGCAACATGTGACAGTCTCTCA
 M H N V R Q A P Q G L E N I G W I D P Q N G D E R G A P F Q R
 40 50 60

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGGCACTTGTGACACTTTTAACTATGGGGCGAAGGCAACATGTGACAGTCTCTCA
 A T L T A D T S I N T A Y L E L D N L R S D T A V Y Y C N A F Y
 70 80 90

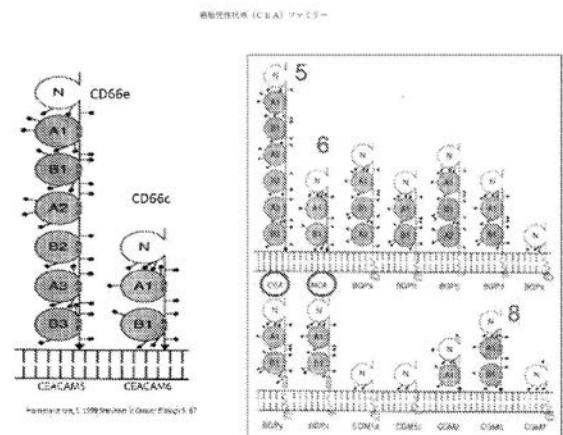
【図 2 1】

【図 2 1】



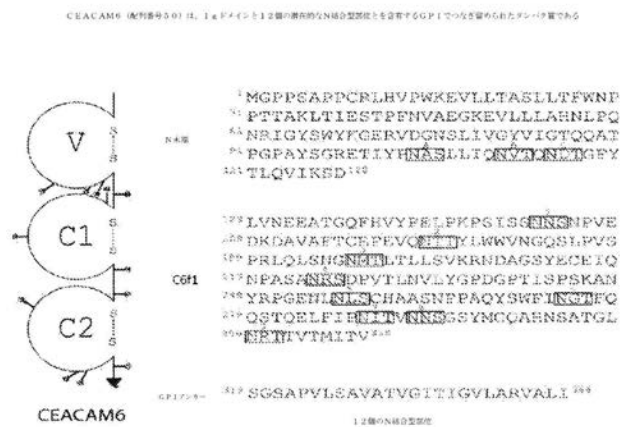
【図 2 2】

【図 2 2】



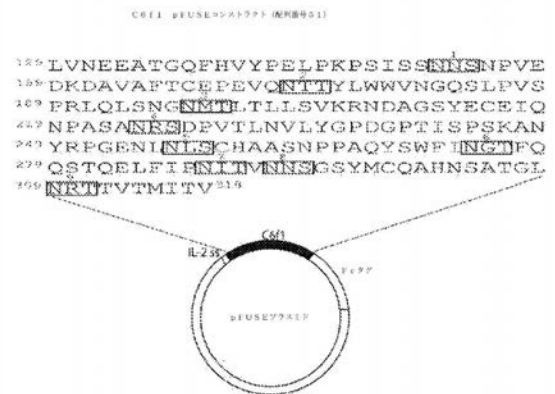
【図 2 3】

【図 2 3】



【図 2 4】

【図 2 4】



【図 29】

【図 29】

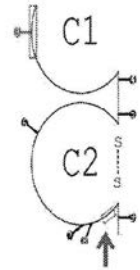
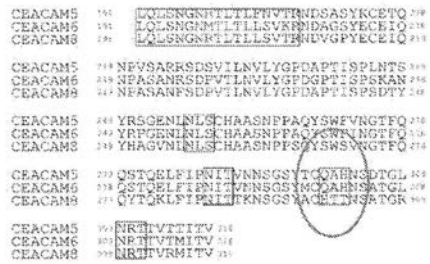
* 64位H型置換後のHEK-293T細胞内で発現するCEACAM6フラグメント1グラブ



【図 30】

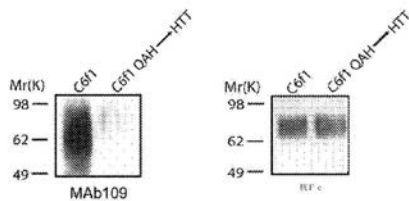
【図 30】

CEACAM5 (配列番号55)、6 (配列番号56)、および8 (配列番号57) におけるC64位の配列アラインメント



【図 31】

【図 31】

C611の特定部位の変異誘発
HTTQAHTTTTHTTTTは、MAb109反応性を消失させる

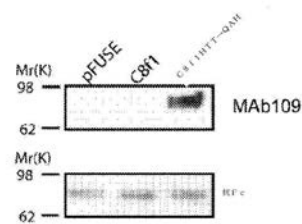
● CEACAM6配列由来の3つのアミノ酸をCEACAM8配列へ変異させた。

● MAb109の反応性が本質的に消失した。(フィルムの一側露光通過)

【図 32】

【図 32】

CEACAM8の3個のアミノ酸を変異させると、MAb109グロブリン化反応は発現する



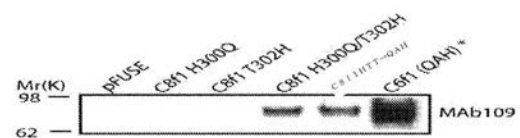
● CEACAM8は、グロブリン化反応に必要なN結合型糖鎖を含有しているが、HEK-293細胞内で一過性に発現すると、N結合型糖鎖は発現しない。

● CEACAM8、HTTからQAHへのアミノ酸300～302の変異は、MAb109グロブリン化反応に対する陽性反応をもたらす

【図 33】

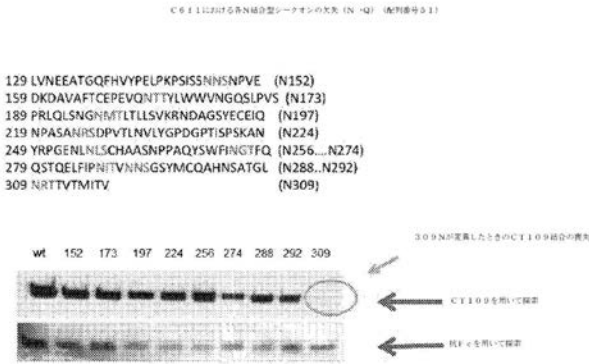
【図 33】

CEACAM6スベーターグロブリン化部位の下流のCEACAM8アミノ酸の変異は、MAb109スベーター発現をもたらす



【図 3 4】

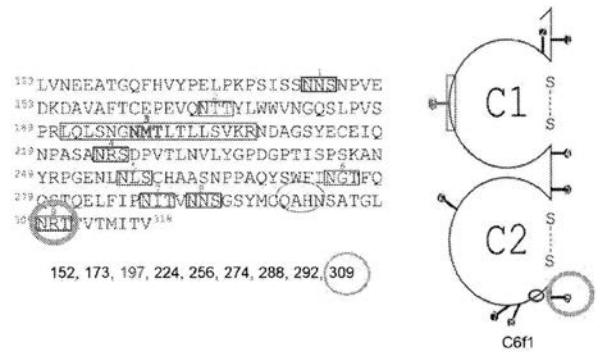
【図 3 4】



【図 3 5】

【図 3 5】

たった1個のAsn309/Ser311/Thr311シークエンスの変更が、MAb109結合活性を除去する (配列番号51)



【図 3 6】

【図 3 6】



【図 3 8】

【図 3 8】



【図 3 9】

【図 3 9】

C6f1ペプチドをコードするcDNAの合成およびLeu111 E1E2領域内での発現

C6f1には、阻害タンパク質、または阻害剤は、おしりがない。



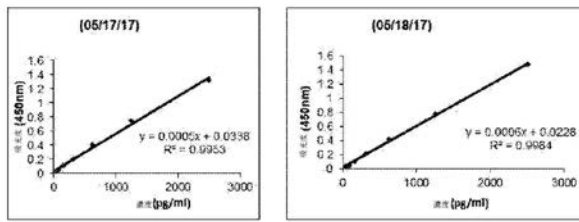
【図 3 7】

【図 3 7】



【図 40】

【図 40】



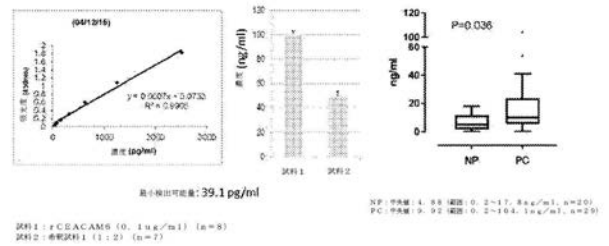
血清CEACAM6を抽出するために、ELISAをセットアップした。Mab109 (2 µg/ml) を検出抗体として、rCEACAM5と希釈にわずかな交差反応性しか示さないヒト化マウス抗CEACAM6ポリクローナル抗体 (1:3000) を検出抗体として用いてサンドイッチELISA法を確立した。全長のヒトCEACAM6を標準物質として使用させ、精製し、使用した。アビジン-HRPは、abc法製であった (1:10, 0.001)。

本結果をこれらの標準曲線に基づいて計算した。正常血清および腫瘍血清 (5 ng/ml以下のpg/ml) を臨床試験試料と一緒にセットアップし、分析として使用した。
正常血清: 1, 0.01 ± 0.33, 5 ng/ml
腫瘍血清: 1.54, 3.43 ± 0.91, 4.6, 6.4 ng/ml

【図 41】

【図 41】

Mab109を用いて血清CEACAM6ポリクローナル抗体を抽出するためのELISAの確立



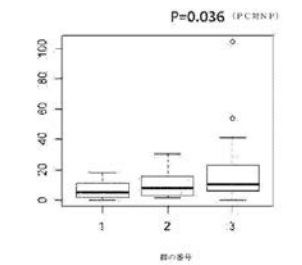
検出抗体抽出量: 39.1 pg/ml
検出1: rCEACAM5 (0, 1 ng/ml) (n=8)
検出2: 希釈検出1 (1:2) (n=7)

血清CEACAM6を抽出するために、ELISAをセットアップした。Mab109 (2 µg/ml) を検出抗体として、rCEACAM5と希釈にわずかな交差反応性しか示さないヒト化マウス抗CEACAM6ポリクローナル抗体 (1:3000) を検出抗体として用いてサンドイッチELISA法を確立した。全長のヒトCEACAM6を標準物質として使用させ、精製し、使用した。アビジン-HRPは、abc法製であった (1:10, 0.001)。

【図 42】

【図 42】

初期の検査 (2016年4月15日および2016年4月27日)



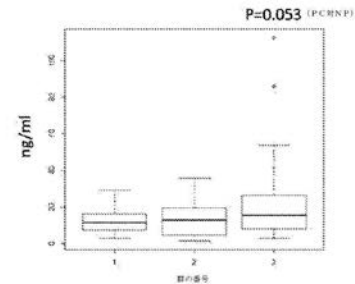
1. NP: 中央値: 4, 8.8 (範囲: 0, 2~17, 8 ng/ml, n=20)
2. CP: 中央値: 7, 7.9 (範囲: 1, 21~30, 5 ng/ml, n=8)
3. PC: 中央値: 9, 9.2 (範囲: 0, 2~10.4, 1 ng/ml, n=29)

NP: 非癌患者, CP: 慢性肝炎, PC: 慢性肝硬

【図 43】

【図 43】

第2回の検査 (全試料2016年5月27日)



1. NP: 中央値: 11, 4 (範囲: 2, 90~29, 5 ng/ml, n=20)
2. CP: 中央値: 13, 0 (範囲: 1, 4~36, 0 ng/ml, n=19)
3. PC: 中央値: 15, 5 (範囲: 2, 90~119, 0 ng/ml, n=29)

NP: 非癌患者, CP: 慢性肝炎, PC: 慢性肝硬

【手続補正書】

【提出日】令和1年11月27日(2019.11.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2020515286000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2018/020050
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i, C07K 16/30(2006.01)i, C12N 5/0783(2010.01)i, G01N 33/574(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/28; A61P 35/00; A61K 51/10; C07K 16/30; C12N 5/0783; G01N 33/574		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: CEACAM6, antibody, CDR, cancer, detection, glycopeptide, epitope		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE, O.-J. et al., "CEACAM6 as detected by the AP11 antibody is a marker notable for mucin-producing adenocarcinomas" Virchows Arch, 2015, Vol. 466, pp. 151-159 See abstract; page 152-155; figures 4-5; and table 1.	30,31,35-38,40
A		1-5,32-34
Y	NCBI, Genbank accession no. EAW5706.1 (23 March 2015) See ORIGIN.	30,31,35-38,40
Y	HONG, K. P. et al., "Therapeutic effect of anti CEACAM6 monoclonal antibody against lung adenocarcinoma by enhancing anoikis sensitivity" Biomaterials, 2015, Vol. 67, pp. 32-41 See abstract; pages 33-34; and figures 1-2.	30,31,35-38
A	US 2013-0272958 A1 (ZHANG, J. et al.) 17 October 2013 See the whole document.	1-5,30-38,40
A	WO 2016-150899 A2 (BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT et al.) 29 September 2016 See the whole document.	1-5,30-38,40
☐ 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 07 June 2018 (07.06.2018)		Date of mailing of the international search report 07 June 2018 (07.06.2018)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer KAM, Yoo Lim  Telephone No. +82-42-481-3516

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/020050

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.: 27-29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 27-29 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☒ Claims Nos.: 17,21,24,25
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:
Claims 17, 21 and 24-25 refer to one of claims which are not drafted in accordance with PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: 6-16,18-20,22,23,26-29,39
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:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2018/020050

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013-0272958 A1	17/10/2013	CA 2813133 A1 EP 2621955 A1 EP 2621955 B1 US 9066986 B2 WO 2012-040824 A1	05/04/2012 07/08/2013 17/01/2018 30/06/2015 05/04/2012
WO 2016-150899 A2	29/09/2016	AU 2016-236270 A1 CA 2980390 A1 CN 107743495 A EP 3274370 A2 KR 10-2017-0128567 A WO 2016-150899 A3	12/10/2017 29/09/2016 27/02/2018 31/01/2018 22/11/2017 17/11/2016

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 C 0 8 7
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	39/395	G
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 K	35/17	Z
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	13/08 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 P	15/00	
		A 6 1 P	13/08	
		G 0 1 N	33/53	D
		C 1 2 P	21/08	

(81)指定国・地域 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, JO, JP, KE, KG, KH, 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

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ピアース, ジェイ. マイケル

アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 6 0 5, アセンズ, ガーランド ヒル ドライブ 2 2 5

(72)発明者 ゲルバー, コハヴァ

アメリカ合衆国 バージニア 2 0 1 8 1, ノークスビル, サルキー ラン コート 1 4 6
4 5

F ターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS07 QS33

QX01

4B064 AG27 CA19 CC24 DA05 DA14

4B065 AA92X AA92Y AA94X AA94Y AB01 AC14 BA01 CA25 CA44 CA46

4C084 AA13 NA14 ZB021 ZB212 ZB261

4C085	AA13	AA14	AA15	AA16	BB01	BB31	BB41	BB43	BB50	CC02
	CC22	CC23	DD62	EE01						
4C087	AA01	AA02	BB37	BB65	CA04	CA12	NA14	ZA59	ZA66	ZA68
	ZA81	ZB02	ZB26							
4H045	AA11	AA20	AA30	BA41	BA50	CA40	DA76	EA28	EA51	FA74

专利名称(译)	抗体构建物和治疗癌症的方法		
公开(公告)号	JP2020515286A	公开(公告)日	2020-05-28
申请号	JP2019567512	申请日	2018-02-27
申请(专利权)人(译)	佐治亚州研究基金会，公司大学		
发明人	ピアース, ジェイ. マイケル ゲルバー, コハヴァ		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/30 C07K16/46 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/04 A61K39/395 A61K48/00 A61K35/17 A61P35/00 A61P43/00 A61P1/18 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P15/00 A61P13/08 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/2803 C07K16/3023 C07K16/303 C07K16/3046 C07K2317/24 C07K2317/34 C07K2317/92 G01N33/57438 G01N33/57473 G01N2333/70596		
FI分类号	C12N15/13 C07K16/30.ZNA C07K16/46 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/04 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K39/395.G A61K39/395.U A61K48/00 A61K35/17.Z A61P35/00 A61P43/00.105 A61P1/18 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P15/00 A61P13/08 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS07 4B063/QS33 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB021 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/BB65 4C087/CA04 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA68 4C087/ZA81 4C087/ZB02 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/463868 2017-02-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供了特异性结合CEACAM6的抗体和相关多肽。抗体和/或多肽可以被配置为双特异性T细胞衔接子。抗体和/或多肽还可以被配置为嵌合抗原受体。还提供了使用本文提供的抗体和相关多肽来检测和治疗癌症，例如胰腺癌的方法。

(51) Int. Cl.		F 1		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13				4 B 0 6 3
C O 7 K 16/30 (2006. 01)	C O 7 K 16/30		Z N A		4 B 0 6 4
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46				4 B 0 6 5
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28				4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15				4 C 0 8 5
審査請求 未請求		予備審査請求 未請求		(全 74 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号		特願2019-567512 (P2019-567512)		(71) 出願人 519312016	
(86) (22) 出願日		平成30年2月27日 (2018. 2. 27)		カイロス セラピューティクス、 インコーポレイテッド	
(85) 翻訳文提出日		令和1年10月25日 (2019. 10. 25)		アメリカ合衆国 バージニア 2 0 1 1 0	
(86) 国際出願番号		PCT/US2018/020050		、 マナッサス、 ユニバーシティ プールバード 1 0 9 0 0	
(87) 国際公開番号		W02018/157169		(71) 出願人 398044754	
(87) 国際公開日		平成30年8月30日 (2018. 8. 30)		ユニバーシティー オブ ジョージア リサーチ ファウンデーション、 インコーポレイテッド	
(31) 優先権主張番号		62/463, 868		アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 6 0 2	
(32) 優先日		平成29年2月27日 (2017. 2. 27)		、 アセンス、 ディーダブリュー ブルックス ドライブ (番地なし)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関		米国 (US)		(74) 代理人 100078282	
				弁理士 山本 秀策	
				最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 癌を処置する抗体コンストラクトおよび方法					

(54) 【発明の名称】 癌を処置する抗体コンストラクトおよび方法