

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5631733号  
(P5631733)

(45) 発行日 平成26年11月26日(2014.11.26)

(24) 登録日 平成26年10月17日(2014.10.17)

(51) Int. Cl.	F 1		
<b>C 1 2 N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>C O 7 K 16/44</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 K 16/44	
<b>C 1 2 N 15/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	C
<b>C 1 2 N 1/15</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	
<b>C 1 2 N 1/19</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	

請求項の数 28 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-501503 (P2010-501503)  
 (86) (22) 出願日 平成20年4月2日(2008.4.2)  
 (65) 公表番号 特表2010-523096 (P2010-523096A)  
 (43) 公表日 平成22年7月15日(2010.7.15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/053913  
 (87) 国際公開番号 W02008/122551  
 (87) 国際公開日 平成20年10月16日(2008.10.16)  
 審査請求日 平成23年4月1日(2011.4.1)  
 (31) 優先権主張番号 07105628.7  
 (32) 優先日 平成19年4月4日(2007.4.4)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

微生物の受託番号 ABC PD 06004

(73) 特許権者 591043248  
 シグマータウ・インドゥストリエ・ファル  
 マチュウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル  
 ・アチオニ  
 SIGMA-TAU INDUSTRIE  
 FARMACEUTICHE RIUN  
 ITE SOCIETA PER AZI  
 ONI  
 イタリア00144ローマ、ピアレ・シャ  
 ケスペアレ47番  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗EpCAM抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 抗体重鎖の可変領域が、配列番号2、配列番号4および配列番号6の配列を有する3つの相補性決定領域(CDR)の全てをこの順で含むこと； および

(b) 抗体軽鎖の可変領域が、配列番号8、配列番号10および配列番号12の配列を有する3つの相補性決定領域(CDR)の全てをこの順で含むこと

を特徴とする、抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメント。

【請求項2】

EpCam発現腫瘍の成長を完全におよび永久に阻害できる、請求項1に記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメント。

【請求項3】

モノクローナル抗体である、請求項2記載の抗EpCAM抗体。

【請求項4】

番号PD06004として、ブタペスト条約に従って先端生物学センター(the Advanced Bio technology Center, Genoa, Italy)に寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生される、請求項3記載の抗EpCAM抗体。

【請求項5】

scFv、Fvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab)<sub>2</sub>フラグメント、多重結合の抗体、エピトープ結合領域を含有するペプチドまたはタンパク質分解性フラグメントである、請求項1または2に記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメント。

## 【請求項 6】

キメラであるか、別のタンパク質と融合しているか、または薬剤もしくはマーカーと結合している、請求項 1 または 2 に記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメント。

## 【請求項 7】

キメラ抗体が、マウス-ヒトキメラ抗体である、請求項 6 記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメント。

## 【請求項 8】

抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメントと融合している別のタンパク質が、サイトカイン、アビジンファミリーのタンパク質、ビオチン、標識ビオチンまたは別のエフェクタータンパク質である、請求項 6 記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメント。

10

## 【請求項 9】

ヒト化抗体である、請求項 1 または 2 に記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメント。

## 【請求項 10】

請求項1-9のいずれかに記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメントをコードしている核酸もしくはその縮重配列からなる核酸。

## 【請求項 11】

配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11の配列の少なくとも1つを含む、請求項10記載の核酸。

20

## 【請求項 12】

請求項10または11のいずれかに記載の核酸を含む、発現ベクター。

## 【請求項 13】

請求項12記載の発現ベクターで形質転換した宿主細胞。

## 【請求項 14】

請求項1~3のいずれかに記載の抗EpCAM抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞株。

## 【請求項 15】

番号PD06004として、ブタペスト条約に従って先端生物学センター(the Advanced Bio technology Center, Genoa, Italy)に寄託された、請求項14に記載のハイブリドーマ細胞株。

30

## 【請求項 16】

請求項1~9のいずれかに記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメントを含む医薬組成物。

## 【請求項 17】

腫瘍の治療のための、請求項16の医薬組成物。

## 【請求項 18】

該腫瘍が、大腸癌腫、乳癌腫、胃癌腫、卵巣癌腫、膀胱癌腫および肺癌腫からなる群から選択される、請求項17の医薬組成物。

## 【請求項 19】

請求項1~9のいずれかに記載の有効量の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメント、および医薬上許容し得る担体または希釈剤を含む、医薬組成物。

40

## 【請求項 20】

放射免疫治療のための、請求項19の医薬組成物。

## 【請求項 21】

同じ単位用量中に、または別個に、少なくとも別の腫瘍特異的抗体を含む、請求項19または20に記載の医薬組成物。

## 【請求項 22】

該腫瘍特異的抗体が、請求項1~9の抗体とは異なるEpCAM 抗体である、請求項21記載の医薬組成物。

50

## 【請求項 2 3】

請求項1~9のいずれかに記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメントを含む診断用組成物。

## 【請求項 2 4】

腫瘍の診断のための、請求項23の組成物。

## 【請求項 2 5】

イン・ピボでの腫瘍診断のための、請求項24の組成物。

## 【請求項 2 6】

イン・ピボでの腫瘍診断のための注射可能な可溶性形態である、請求項25に記載の組成物。

10

## 【請求項 2 7】

サンプル中の、請求項1~9のいずれかに記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメントに結合できる抗原を免疫検出する方法であって、該サンプルを請求項1~9のいずれかに記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメントと適切な条件でインキュベートして、抗原-抗体複合体を形成させる過程、および該抗原-抗体複合体を検出する過程を含む、方法。

## 【請求項 2 8】

請求項1~9のいずれかに記載の抗EpCAM抗体またはその抗原結合性のフラグメント、および抗原-抗体複合体の検出手段を含む、請求項27記載の方法のための診断用キット。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明の分野

本発明は、抗ヒトEpCAMモノクローナル抗体およびその機能誘導体、それらを得るための方法および材料、EpCAMを発現する腫瘍を診断および処置するための該抗体の使用および医薬分野で使用するために好適な該抗体を含む材料に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

本発明の背景

該腫瘍部位で過剰発現した抗原を選択的に認識出来る抗体による腫瘍組織の標的化は、抗腫瘍免疫治療の全ての目標である。腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー1、TROP-1、GA733-2等としても知られる上皮細胞接着因子(EpCAM、swiss prot no. P16422)は、カルシウム独立性の同種親和性細胞付着と関係がある単層上皮上の基底外膜で発現したI型膜貫通糖タンパク質である。細胞外ドメインは、上皮成長因子様の反復配列、続くサイログロブリン反復配列およびシステイン貧領域から構成され、一方細胞内ドメインは、26個のアミノ酸長であり、アクチン細胞骨格に結合するためのアクチンに対する2つの結合部位が存在する(Winter MJ et al. 2003)。最近、多数の大腸、胃、前立腺および肺腫瘍試料について得られた免疫組織化学結果を報告したWentと共同研究者(2006)らにより確認されたように、大部分のヒト悪性腫瘍からの細胞はEpCAMを強く過剰発現する。EpCAM過剰発現細胞は、増殖性および悪性表現型(Winter et al., 2003)の発生と相関する正常細胞から分離する傾向がある。これらのデータに基づいて、免疫治療のためにEpCAMを標的とする可能性を探求した。

30

40

## 【0003】

EpCAM陽性細胞に対して、いくつかの抗体依存性の細胞障害性(ADCC)を有するネズミIgG 2a抗体、即ちエドレコロマブ(Edrecolomab)は、臨床使用としてドイツで承認され、根治目的で手術を受けた結腸直腸または膵臓癌腫を有する患者の処置に用いられた。デュークスC結腸直腸癌患者におけるエドレコロマブ処置後の最小限の残存疾患の7年の追跡結果から、32%の死亡率の低下を示し、再発率において23%まで低下を示した(Riethmuller G et al., 1998; Weiner LM et al., 1993)。しかし、臨床試験の全体的な結果から、その制限された抗腫瘍効力(Punt CJ, et al., 2002)および他の活性化化学療法化合物を備えたア

50

ジュバントを意図する新規臨床試験の促進の理由から、単剤療法としてのこの薬物の中止をもたらした(Frodin JE et al., 2002)。

【 0 0 0 4 】

この標的に対する他の抗体は、前臨床または臨床背景において使用されている。MT-201 (アダカツムマブ; Adecatumumab)は、EpCAMに対して中程度の親和性を有する完全なヒトモノクローナルIgG1抗体である(Naundorf S et al., 2002)。その効力を、大腸癌細胞株HT-29を用いてヌードマウス異種移植モデルにて示した(Naundorf S et al., 2002)。多様な腫瘍細胞株に対するイン・ビトロ試験は、MT201がADCCおよび補体依存性細胞障害性(CDC)により標的細胞溶解を媒介することを示した(Prang N et al., 2005)。この抗体は、現在ホルモン難治性前立腺癌の処置について臨床開発中である(Obernedder R et al., 2006)

10

【 0 0 0 5 】

ING-1は、EpCAM陽性細胞を標的とする高親和性ヒト改変モノクローナル抗体である。進行性腺癌に罹患した患者、標準治療に難治性の患者でのフェーズI臨床試験使用されており、この研究データから、腫瘍細胞に対して高い細胞障害性でありながらEpCAMに対して高親和性を有する抗体は、急速な臓器毒性損傷を誘発できるため、全身投与についてはその治療ウィンドウを制限することが示唆された(De Bono JS et al., 2004)。免疫治療の効力についての抗体親和性の関連性に対して様々な意見がある。Veldersら(1998)は、EpCAMに対して様々な親和性を有する2つの抗体の比較により得られたように、ADCCに対する抗体親和性および抗原密度の影響に対するイン・ビトロのデータを提示した。この研究から得たデータから、該高親和性抗体は、低い抗原発現レベルにて、あるいは同程度の結合レベルにて、より高い効力にて細胞殺傷を媒介できたことが明らかになった。標的抗原発現の不均一性は全ての腫瘍の共通の特徴であり、該高親和性抗体の使用は臨床結果を改善することが出来た。高親和性抗EpCAM抗体の治療用途に関わるこの潜在的な全身投与の毒性効果は、所定の時間で循環抗体を排除するために追跡過程を包含する前標的化方法により低下されるかもしれない。あるいは、高親和性抗EpCAM抗体の使用は、局部-局所処置に限定されるかもしれない。

20

【 0 0 0 6 】

ストレプトアビジン融合タンパク質として遺伝的に構築されたEpCAM抗原に特異的なヒト化一本鎖Fv抗体フラグメント、すなわち NR-LU-10 は、前標的化放射免疫治療または放射免疫誘導手術のために開発された。前臨床データから、NR-LU-10の後に投与した90Y-DOTA-ビオチン(800  $\mu$ Ci)の単回用量により、定着した皮下のヒト小細胞の肺または大腸癌の異種移植を有するマウスが治癒したことが示された(Goshorn S et al., 2001)。Burak WE Jr ら(2001)による第二の報告において、標識したNR-LU-10 Fab の使用は、10人の患者のうち7人において、腫瘍局在性を明らかにするために手術中に探索する際に有用であり、こうして標的化剤としてのその能力が確認された。

30

【 0 0 0 7 】

いくつかの病変においてモノクローナル抗体の臨床的成功にもかかわらず、固形腫瘍の免疫治療は、未だ不満足な点が残っている。前標的化抗体誘導放射免疫治療(PAGRIT<sup>登録商標</sup>)は、腫瘍中に限定かつ増幅された放射性同位体を蓄積できる複数処置方法である。第一過程として使用される抗腫瘍モノクローナル抗体の特異性および親和性は、処置効力に必須である。

40

【 0 0 0 8 】

我々は、低度におよび高度に抗原を発現するヒトの異種移植された腫瘍の両方において、ST2146 抗テネイシンモノクローナル抗体の例外的に高く、かつ特異的な蓄積を報告した(De Santis et al., Clinical Cancer Research, p.2191, 1 April 2006)。

【 0 0 0 9 】

EP 0 496 074(G. Paganelli et al)の教示を基にして、腫瘍の全身および局部-局所処置のためのこの3つの過程の前標的化方法を開発した(Cremonesi M. et al., Eur. J. Nucl. Med. 26 (2).-110- 120、1999 ; Paganelli G. et al., Eur. J. Nucl. Med. 26 (4) :

50

348-357, 1999; Paganelli G., et al.. Cancer Biother. & Radiopharm. 16(3) : 22-235, 2001)。

【 0 0 1 0 】

該3つの過程の前標的化方法についての他の引用文献は、WO 94/04702およびUS 5,578,287である。

【 0 0 1 1 】

該3つの過程の前標的化方法は、非特異的なバックグラウンドを減少させるために、静脈内の、ビオチン化抗テネイシンモノクローナル抗体、ストレプトアビジンおよび<sup>90</sup>Y-標識ビオチンの連続投与と、ストレプトアビジンおよび<sup>90</sup>Y-標識ビオチン各々の前にアビジンおよびビオチン化アルブミンの2つの追跡投与を基にしている。

10

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 2 】

医薬分野においては、癌診断および治療、例えばPAGRIT方法等に有用な別の改良された抗EpCAM抗体についての必要性がある。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

発明の要旨

本発明は、別の成分および診断薬を含有し得る抗体および抗体フラグメント、これらの抗体および抗体フラグメントを含有する組成物、それらを含有する診断用および治療用組成物、治療および診断におけるそれらの使用ならびにこれらの抗体および抗体フラグメントの作成方法に関する。

20

【 0 0 1 4 】

本発明の目的は、抗EpCAM抗体またはその機能誘導体であり、ここで該抗体重鎖の可変領域が、配列番号2、配列番号4または配列番号6から選択された配列を有する相補性決定領域(CDR)の少なくとも1つを含む。

【 0 0 1 5 】

好ましくは、抗体重鎖の可変領域は、配列番号2、配列番号4または配列番号6の配列を有する相補性決定領域(CDR)の少なくとも2つを含む。

【 0 0 1 6 】

さらに好ましくは、該抗体重鎖の可変領域が、配列番号2、配列番号4および配列番号6の配列を有する3つの相補性決定領域(CDR)の全てを含む。

30

【 0 0 1 7 】

本発明の別の目的は、抗EpCAM抗体またはその機能誘導体であり、ここで該抗体軽鎖の可変領域が、配列番号8、配列番号10または配列番号12の配列を有する相補性決定領域(CDR)の少なくとも1つを含む。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、該抗体軽鎖の可変領域が、配列番号8、配列番号10または配列番号12の配列を有する相補性決定領域(CDR)の少なくとも2つを含む。

【 0 0 1 9 】

より好ましくは、該抗体軽鎖の可変領域が、配列番号8、配列番号10および配列番号12の配列を有する3つの相補性決定領域(CDR)の全てを含む。

40

【 0 0 2 0 】

本発明の別の目的は、配列番号2、配列番号4または配列番号6の配列の少なくとも1つの、2つまたは全てを含んでいる重鎖の可変領域、および配列番号8、配列番号10または配列番号12の配列の少なくとも1つ、2つまたは全てを含んでいる軽鎖の可変領域を有する抗EpCAM抗体またはその機能性誘導体である。

好ましくは、本発明に記載の抗EpCAM抗体またはその機能性誘導体は、EpCam発現腫瘍の成長を完全にかつ永続的に阻害出来る。

【 0 0 2 1 】

50



ン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン、例えば濾胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)および黄体形成ホルモン(LH)；肝臓成長因子；繊維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子；ミューラー管抑制物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンプオエチン(TPO)；神経成長因子、例えばNGF；血小板成長因子；形質転換成長因子(TGF)；インスリン様成長因子-Iおよび-II；エリスロポエチン(EPO)；骨誘導因子；インターフェロン、例えば、インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$  および $\gamma$ 、コロニー刺激因子(CSF)；顆粒球-マクロファージ-C-SF (GM-CSF)；および顆粒球-CSF(G-CSF)；インターロイキン(IL)、例えば、IL-1、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12；腫瘍壊死因子；ならびにLIFおよび幹細胞因子(kit-ligand)(KL)を含めた他のポリペプチド因子。本明細書で使用したとおり、用語サイトカインには、天然起源由来または組換え細胞培養由来のタンパク質および天然配列のサイトカインの生物学的に活性な等価物が包含される。

10

## 【0026】

診断のために、本発明の抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体またはイムノグロブリン生成物は、抗体と直接的または間接的にコンジュゲートされ得る標識（例えば検出可能な化合物または組成物）に結合されてもよい。該標識は、それ自身により検出可能であり得るか(例えば、放射性同位体標識または蛍光標識)、または酵素標識の場合には検出可能である基質化合物または組成物の化学変化を触媒し得る。

## 【0027】

より好ましくは、抗体がヒトまたはヒト化抗体である。

20

## 【0028】

それ故に、本発明は、抗体または抗体フラグメントまたはキメラ抗体(例えば、マウス-ヒトキメラまたは分子様サイトカインとの融合タンパク質、アビジンファミリーのタンパク質または別のエフェクタータンパク質等)またはEpCAMに特異的に結合するイムノグロブリン分子を提供する。本発明は、ST3232/10の可変軽鎖のCDRおよび/またはST3232/10の可変重鎖のCDRの少なくとも1つを含む抗体または抗体フラグメントまたはキメラ抗体またはイムノグロブリン分子を提供する。本発明の抗体または抗体フラグメントまたはキメラ抗体またはイムノグロブリン分子は、抗体、Fvフラグメント、Fabフラグメント、F(ab)<sub>2</sub>フラグメント、一本鎖抗体または多重結合抗体であり得る。本発明の抗体または抗体フラグメントまたはキメラ抗体またはイムノグロブリン分子は、IgM、IgD、IgG、IgAまたはIgEアイソトープであってもよく、またはそれらから得られてもよい。

30

## 【0029】

本発明の別の目的は、該抗体の組換え誘導体である。特に、好ましい組換え誘導体は、ネズミ定常領域がヒト対応物(Ferrer C. et al., 1996)により置換された誘導体、またはネズミ定常領域が生物学的に活性部分、例えばアビジンファミリーのメンバー等(Peniche t ML et al., 1999)、腫瘍指向性免疫学的エフェクター(例えば、G-CSF、GM-CSF等)に有用な成長因子により置換された誘導体、またはネズミ定常領域が医薬的活性部分、例えば、毒素、スーパー抗原、サイトカインまたは抗腫瘍治療効力を増強する場合に有用なその他のタンパク質等により置換された誘導体(Di Massimo A. M. et al., 1997; Parente D. et al., 1997)である。

40

## 【0030】

該組換え誘導体を得るための方法は、当業者にはよく知られている。

## 【0031】

本発明の別の目的は、該抗体のコンジュゲート誘導体である。

## 【0032】

特に、好ましいコンジュゲート誘導体とは、生物学的に活性部分が従来方法により抗体と結合されたものである。生物学的に活性部分の例示は、アビジンファミリーのメンバー、腫瘍指向免疫学的エフェクター(例えば、G-CSF、GM-CSF等)を刺激するのに有用な成長因子、医薬的活性部分、例えば毒素、スーパー抗原、サイトカインまたは抗腫瘍治療効率

50

を増強するのに有用なその他のタンパク質、抗腫瘍薬、放射性同位体である。

【0033】

本発明に従って、モノクローナル抗ヒトEpCAMまたはそのフラグメントの組換え誘導体またはコンジュゲートも「誘導体」として示される。

本発明の最も特に好ましい実施態様において、抗体およびフラグメント以外に、その誘導体もビオチン化される。

【0034】

本発明のさらなる目的は、本発明の抗体またはその機能誘導体をコードしているか、上記核酸とハイブリダイズするか、またはその縮重配列を含んでいる核酸である。

【0035】

好ましくは、該核酸は、下記配列の少なくとも1つ:配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9および配列番号11を含む。

【0036】

別の実施態様は、本発明の抗体または抗体フラグメントまたはキメラ抗体またはイムノグロブリン分子産物をコードしている精製核酸分子に関する。本発明のイムノグロブリン生成物をコードしている核酸分子は、従来技術を使用して作成し得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド合成機を用いて合成され、本発明のイムノグロブリン生成物をコードする機能的読み取り枠を形成するように一緒に連結され得る。該核酸分子は、合成されてから、核酸ベクターにクローニングされ得る。核酸ベクター、例えばプラスミド、コスミド、ファージミド、酵母プラスミド、ファージベクター、TIプラスミド等は、当業者には既知である。該ベクターは発現ベクターであってよい。発現ベクターおよび発現系は、Stratagene (La Jolla, CA)などの販売元から購入できる。

【0037】

本発明の別の目的は、本発明の核酸を含む発現ベクターである。

【0038】

本発明の別の目的は、本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞である。

【0039】

該細胞は、トランスフェクションにより作成され得る。トランスフェクション方法は知られており、原核生物および真核生物細胞のトランスフェクション用のキットは、市販供給源(例えば、Stratagene、La Jolla、CA)から購入できる。

【0040】

本発明の別の目的は、本発明の抗EpCAM抗体を産生するハイブリドーマ細胞株である。好ましくは、ハイブリドーマ細胞株は、番号PD06004として、ブタペスト条約に従って先端生物学センター(the Advanced Biotechnology Center, Genoa, Italy)に寄託されたハイブリドーマ cST3232/10である。

【0041】

モノクローナル抗体の製造方法は、当業者の技術範囲内にあり、標準的方法に従って上記ハイブリドーマ細胞株を培養すること、および抗体を単離することをも含む。

【0042】

本発明の隠された目的は、本発明の抗EpCAM抗体の医薬品としての使用である。好ましくは、抗腫瘍医薬品としての使用である。より好ましくは、該腫瘍は、次の群から選択される:大腸癌腫、乳癌腫、胃癌腫、卵巣癌腫、膀胱癌腫または肺癌腫。本発明の別の実施態様は、腫瘍性障害を有する患者を処置する方法に関するもので、該方法は本発明の抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体またはイムノグロブリン生成物または本発明の核酸を該患者に投与することを含む。癌のための免疫治療方法は知られている。例えば、Old、L. J. immunotherapy for Cancer、Scientific American、September 1996を参照されたい。該抗体を、ビオチンと連結して、全身投与の起こり得る毒性効果を防止するために、追跡剤(chasing agent)、例えばアビジンを用いて循環から排除できる。

【0043】

本明細書で開示したことは、罹患ヒト対象の固形組織臓器(例えば大腸)から最初に固形

10

20

30

40

50

腫瘍を除去し、次いで該患者に、治療上有効量において固形腫瘍の細胞に選択的に毒性である抗腫瘍剤、例えば本発明の抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体またはイムノグロブリン生成物(例えば、EpCAMに結合する抗体)を投与することを含む固形腫瘍(例えば、EpCAMを発現するもの)を処置する方法である。本発明の実施態様において、投与過程は、切除腔中に抗腫瘍剤を堆積させることによって行われる。

【0044】

本発明の別の目的は、有効量の本発明の抗体またはその誘導体および医薬上許容可能な担体または希釈剤を含む医薬組成物である。好ましくは、本発明の医薬組成物は、放射免疫治療用である。医薬組成物は、この分野では一般的であり、一般的な知識を基にして当業者により作成され得る。医薬組成物の例示は、本発明に記載の引用文献に示される。同じものを診断用キットに適用する。Paganeliらによる前記論文およびEP 0 496 074に開示されたように、腫瘍の放射免疫治療のためのキットにおいて特に好ましい。

10

【0045】

少なくとも1つの医薬上許容し得る賦形剤および/またはビヒクルとの混合物中で抗体および/またはそのフラグメントおよび/または組換え誘導体および/またはコンジュゲートを含む医薬組成物は本発明の範囲に含まれる。

【0046】

本発明のさらに別の態様は、腫瘍の放射免疫治療のための医薬品であり、これは、EpCAMを発現する腫瘍を有する患者に投与され、そして該モノクローナル抗体またはタンパク質分解性フラグメント、またはその誘導体を含むものである。好ましい実施態様において、該モノクローナル抗体またはタンパク質分解性フラグメントまたはその誘導体は、ビオチン化される。特に好ましい実施態様においては、該医薬品は、放射免疫治療に適切であって、特に技術者に記述されたように、例えばEP 0 496 074、Paganeliら(1999)および米国特許番号5,968,405の3過程の前標的化方法を実施するために適切である。後者の態様において、本発明の医薬品はキット形態で存在し、該キットは、composed of 4つのバイアルから構成される、この中で最初のバイアルは、ビオチン化抗体またはそのフラグメントまたは誘導体を含み、第二のバイアルはアビジンを含み、第三のバイアルはビオチン化アルブミンを含み、第四のバイアルは、放射性標識ビオチンまたはビオチン誘導体を含んでいる。このような種類のキットは、Paganeliら(1999)により提供される。アビジンは、アビジン、ストレプトアビジン、PEG-アビジンまたはPEG-ストレプトアビジン、ジまたはポリアビジンまたはジまたはポリストレプトアビジン野生型または脱グリコシル化型である。放射性標識ビオチンは、例えばEP 0 496 074に開示されたような放射性核種であり、好ましくは<sup>90</sup>Yビオチン誘導体は、例えばWO 02/066075に開示される。この種のキットは、Paganeliら(1999)に開示される。好ましくは、バイアルはヒト注射に好適である。

20

30

【0047】

好ましくは、該組成物は、同じ単位用量中、または別々に、少なくとも別の腫瘍特異的抗体を含む。好ましくは、該腫瘍特異的抗体は、発明の抗体とは異なるEpCAM抗体である。別の実施態様は、本発明の抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体またはイムノグロブリン生成物を含む治療用組成物に関する。本発明のイムノグロブリン産物は、抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体またはイムノグロブリン生成物および医薬上許容可能な担体または希釈剤を含む組成物の形態で提供される。該治療用組成物は、哺乳動物(例えばヒト)における疾患の処置に使用されてもよい。本発明はまた、治療上有効量の本発明の抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体またはイムノグロブリン生成物を該哺乳動物に投与することを含む哺乳動物を処置する方法を提供するものであり、ここで該哺乳動物は、抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体またはイムノグロブリン生成物による処置を必要とする障害、例えば癌を有する。

40

【0048】

本発明の別の目的は、診断の際に使用するための本発明の抗EpCAM抗体である。好ましくは、抗腫瘍診断である。より好ましくは、イン・ビボでの抗腫瘍診断である。障害の検

50

出または診断には、該抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体またはイムノグロブリン生成物とEpCAM抗原との間に複合体が形成できる条件下で、本発明の抗体、抗体フラグメント、キメラ抗体またはイムノグロブリン生成物を用いて患者由来の組織サンプルを標的化し、そして該複合体の形成を決定する過程を含み得る。本発明の抗体は、免疫学的または生物学的診断技術の様々なタイプに用い得る。例えば、診断技術には、(1)蛍光抗体または化学染色方法の使用、ここでモノクローナル抗体は、モノクローナル抗体と抗原との間の結合の存在を視覚的に観察出来るように蛍光染料等の染料で標識される、(2)酵素-抗体方法、蛍光染料に代えて酵素を使用して該モノクローナル抗体を標識する、(3) ELISA方法、タンパク質-標識二次抗体を使用して、抗原等の量を測定する、(4)放射性イムノアッセイ方法、ここで該モノクローナル抗体がアイソトープで標識される、そして(5) 抗原-抗体反応により生じる凝集反応を利用する免疫沈殿方法、が含まれる。

10

**【 0 0 4 9 】**

さらに診断技術には、タンパク質が、電気泳動により分画され、モノクローナル抗体により検出される、ウェスタンブロット方法が含まれる。該ウェスタンブロット方法は、モノクローナル抗体に関して、抗原タンパク質をコードしているポリヌクレオチドを直接クローニングする場合に有利である。ウェスタンブロット方法には、多様な改変が含まれ、例えば、ウェスタン方法、サザンウェスタン方法、ノーザンウェスタン方法、およびウェスタンウェスタン方法である。

**【 0 0 5 0 】**

本発明の別の実施態様において、抗体およびそのフラグメントは、さらに追加のマーカ-および/または診断薬を含有できる。本発明が指向する該マーカ-および/または診断薬は、当業者には十分に知られている。本発明の好ましい実施態様に従って、該抗体またはそのタンパク質分解性フラグメントはビオチン化される。

20

**【 0 0 5 1 】**

本発明の別の目的は、イン・ピボでの本発明の抗EpCAM抗体を含む腫瘍診断薬のための注射可能な可溶性組成物である。

**【 0 0 5 2 】**

本発明の別の目的は、適切な条件下でサンプルと請求項1~14に記載の抗体またはその誘導体とをインキュベートして、抗原-抗体複合体とする過程、および抗原-抗体複合体を検出する過程を含み、サンプル中で本発明の抗体またはその誘導体に結合できる抗原を免疫検出する方法である。

30

**【 0 0 5 3 】**

本発明の別の目的は、請求項30に記載した方法のための診断用キットであって、これは請求項1~14に記載の抗体またはその誘導体および抗原-抗体複合体検出手段を含む。

**【 0 0 5 4 】**

本発明の別の実施態様において、治療用キットにおいて、ビオチン化抗体は、他のEpCAM-特異的抗体と組合せられる。あるいは、ビオチン化抗体が、他の腫瘍特異的抗体と組み合わせられる。キットの種類に関する一般的な教示は、EP 0 496 074、Paganeliら(1999)および米国特許番号5,968,405において提供される。

**【 0 0 5 5 】**

特に、本発明は、所望により、3つの過程の前標的化方法のための治療用キットにおいて使用するのに好適な、ビオチン化抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体、緩衝液および試薬を含んでいる複数区画を含有する容器も含む。

40

**【 0 0 5 6 】**

本発明の別の目的は、診断手段の調製、EpCAMを発現する疾患の検出、特にイン・ピボで腫瘍をイメージングのための、該モノクローナル抗体またはフラグメント、またはその組換え誘導体またはコンジュゲートまたはそのビオチン化誘導体の使用である。

**【 0 0 5 7 】**

ST3232/10は、下記実施例にて詳細に示されたとおり、対応するハイブリドーマ細胞クローンcST3232/10から得られる。

50

## 【 0 0 5 8 】

本発明の産業的態様が関与している限り、開示された本明細書の抗体は、この技術分野において通常なされる医薬組成物または診断上のキットに好適に処方される。

## 【 0 0 5 9 】

本発明は、下記図を参照して非限定的な例示により、下記に詳細に開示される。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 6 0 】

【 図 1 】 図1：タンパク質 A カラム(MabSelect SuRe, GE Healthcare)で精製したcST3232/10の回収物の4-12% BisTris SDS-PAGE (Precast, Invitrogen, USA)。レーン1-3: 非還元条件下で精製したST3232/10 Mab ; レーン4-6: 還元条件下で精製したST3232/10 Mab。泳動緩衝液 1x MES。コマジープルーによるゲル染色(Simplie Blu, Invitrogen, USA)。

【 図 2 】 図2：精製したST3232/10のTSGK3000 カラムでのゲル濾過、PBS(pH 7)で行う。時間(分)を横軸にて示し、縦軸にてミリ吸光度の単位(mAU)を示す。

【 図 3 】 図3：抗EpCAM抗体のFACS特異性試験。ST3232/10または他のコントロール抗体(M104、HT29/26 および T16)を、自然にはEpCAMを発現しないネズミ線維肉腫L細胞と共にインキュベートし(1 $\mu$ g/10<sup>6</sup> 細胞、1時間4 )、ヒトTROP-1分子(パネルA-C)、ヒトTROP2分子(パネルD-F)または外来タンパク質を導入しないエンブティ-ベクター(パネルG-I)を用いてトランスフェクトした。二次PE-コンジュゲート抗体(BD, USA)を、製造者指示書に従って使用し、細胞死亡率を7-AAD (FACS Calibur, BD Biosciences, USA)を用いる染色により評価した。ST3232/10は、TROP-1 陽性細胞(パネルA)にて陽性を、そして野生型L細胞またはTROP2分子(パネルGおよびD、各々)によりトランスフェクトした細胞にて陰性を示した。同様の結果を、他のEpCAM特異的抗体で観察した(パネルB、E、H: M104 ; C、I: HT29/26)。T16 抗体をTROP2-L 細胞(パネルF)にて陽性コントロールとして使用した。

【 図 4 】 図 4：MCF7 乳癌細胞株でAlexa488とコンジュゲートしたST3232/10の共焦点顕微鏡。MCF7 細胞を、15x15 mm カバースリップ上におき、30分間室温でPBS/4% パラホルムアルデヒドにおけるインキュベーションにより48時間後に固定した。次いで、細胞を透過処理し、抗体で染色し、いくつかの領域を共焦点顕微鏡により分析した。該Alexa488-ST3232 コンジュゲートは、細胞-細胞の境界で最高強度を有する染色の予測パターン、および単離パッチの染色を示す。単離パッチの2つの例を、パネルAおよびBで報告した。

【 図 5 】 図 5：ST3232/10の免疫反応活性およびHT29 大腸癌細胞株で発現した抗原に対するモノクローナル抗体HT29/26 抗EpCAM。データを、光学密度(OD、405 nmで測定)、HT29 大腸癌腫とインキュベートした2つの抗体( $\mu$ g/ml、対数スケール、X軸)の濃度増加時の変動(直線スケール、Y軸)として示した。

【 図 6 】 図 6：CM5 センサーチップ上に固定したEpCAM 分子の細胞外ドメインへのST3232/10 結合の速度論的分析およびパラメーター。パネルA: 時間(分、X軸)およびリゾナンユニット(RU、Y軸)の関数としてのMab 注入濃度(500、250、62.5、15.6および7.8 nM)のセンサーグラム。パネルB: the BiaEvaluation softwareにおいて二価モデルをデータフィットのために使用した; 観察した曲線と期待した曲線との間のRUの相違を示す残差(residual)は、各時点(X軸)についてのグラフ(Y軸)を示した。速度定数は次のとおりである:  $ka_1 = 7.75E+04 \pm 297$ 、 $kd_1 = 7.20E-05 \pm 8.48E-06$ 、 $K_D = 9.3E-10$ 、 $\chi^2 = 1.97$ 。

【 図 7 】 図 7: ヒト腫瘍および正常組織に対するST3232/10の反応性。例として、大腸および肺癌腫に対する免疫組織化学的結果(パネルAおよびC、各々)を、その正常な対応物(パネルBおよびD、各々)とを比較して示した。ヒト腫瘍組織は、褐色に強く染色される。

【 図 8 】 図 8: エドレコロマブ[Panorex (登録商標)]との比較における、ヌードマウスでの同種移植およびST3232/10による処置。ヒト Trop-1を用いてトランスフェクトしたネズミ線維肉腫細胞株(L/Trop-1)またはトランスフェクトしていない(L/ベクター)ネズミ線維肉腫細胞株を、ヌードマウスに皮下注射した。接種日に、該動物をST3232/10(L/ベクター+ST3232およびL/Trop-1+ST3232)、エドレコロマブ(L/Trop-1+Panorex)または非処理ネズミIgG(L/ベクターおよびL/Trop-1)(200  $\mu$ g)で処理した。別に3回の投与を、矢印に示したように、7、15および22日目に行った。腫瘍進行を50日まで追跡した。

【図9】図9: M104 抗体との比較における、ヌードマウスの異種移植およびST3232/10による処置。Trop-1をネイティブに発現するヒト大腸癌腫細胞株 KM12-SMを、ヌードマウスに皮下移植した。ST3232/10 (ST3232群)、M104(M104 群)またはビヒクル(コントロール群)(200 µg)により、一週間に一回にて4回の処理を、接種の日から開始して行った。腫瘍進行を30日まで追跡した。

【発明を実施するための形態】

【0061】

方法

ハイブリドーマ細胞

EpCAMに対する新規ハイブリドーマ細胞クローンを生成するために、Balb/cマウスを、ヒトEpCAM分子(NCBI RefSeq NM\_002354)により安定に形質転換したLネズミ線維肉腫細胞株(Alberti S et al., 1988)を用いて免疫化した。免疫マウス由来の脾細胞を、標準方法により(Cianfriglia M. et al., 1986)、Sp2/OAg14骨髄腫細胞と融合させ、そして該ハイブリドーマ集団を、EpCAM、例えばHT29を発現する腫瘍細胞株に対する細胞フローメトリーによりスクリーニングした。EpCAM 特異的ハイブリドーマを、FCS含有培地中で2回、そしてタンパク質不含培地(Animal Derived Component Free Midium HyClone, HyQRPerbio)中で4回の限界希釈によりクローニングした。4回目の限界希釈のクローニングから得た陽性クローンを、cST3232と名付け、ミニバイオリアクター中で培養した。cST3232 細胞株の安定性は98.65%であった。そのため、陽性クローンであるcST3232/10を選択し、さらなる生育のために増殖させた。

【0062】

抗体

ST3232/10は、市販キット(Roche, Germany)により決定したようなIgG1/k アイソタイプのマウスIgMグロブリンである。軽鎖可変領域を、M.Sassanoら(1994)に記載したとおり抗体の定常領域にアニーリングする2つのプライマー(5' -TGTC AAGAGCTTCAACAGGA-3' (配列番号: 13)、5' -AAGATGGATACAGTTGGTGC-3' (配列番号: 14))を用いて環状cDNAから増幅させた。

【0063】

重鎖可変領域を、M. Sassano ら(1994)に記載のような抗体定常領域にアニーリングするオリゴヌクレオチドマウス 1CH1 5' -ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCAG-3' (配列番号: 15) およびオリゴヌクレオチドマウス 1CH3 5' -GCACAACCACCATACTGAGAAG-3' (配列番号: 16)のプライマーを用いて環状cDNAから増幅させた。

【0064】

PCRを、下記条件を用いて行った: 94 °Cで40秒、62 °Cで40秒、72 °Cで1分間。30サイクル。

【0065】

増幅したフラグメントを、TAクローニング・キット・デュアルプロモーター PCR II (Invitrogen, #K2050-01)を用いて、PCR IIクローニングベクターに直接クローニングした。

軽鎖を含有する9つのクローンおよび 重鎖可変領域を含有する7つのクローンを配列決定した。配列決定を、MWG Biotech, Germanyで行った。両方の鎖を配列決定した。多義性は見出されなかった。

【0066】

SDS-PAGE 分析

抗体を、4-12%のグラジエントのBis-Tris NuPAGE上で、泳動緩衝液として1x MESを用いて泳動させ、非還元条件および還元条件下でコマジー溶液を用いて染色した(全ての試薬は, Invitrogen, USAから得る)。

【0067】

クロマトグラフプロファイル

ST3232/10を、流速1ml/分にて泳動緩衝液としてPBS + Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%を用いてTSGK3000 カラム(Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Germany)で行った。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 8 】

細胞トランスフェクション

Trop-1またはTrop-2を用いるトランスフェクションを、Alberti Sら(1988)に従って行った。

## 【 0 0 6 9 】

FACS分析

細胞の表面上のネイティブTrop-1分子に結合するST3232/10抗体を、ヒト細胞株のパネルでのフローサイトメトリーにより分析した。該反応を、約 $3 \times 10^5$ 細胞/ウェルを用いる2過程において、V底の96ウェルプレート中で行った。細胞懸濁液を、最初にST3232/10抗体(1 $\mu$ g/ウェル)を用いて、次いで二次PE-コンジュゲート抗マウス抗体(2 $\mu$ l)(550589, BD Pharmingen, Erembodegem, Belgium)を用いてインキュベートした。細胞を、各過程について30分間4 でインキュベートし、1% FCSを含有するPBSで洗浄した。最終洗浄の後に、細胞を、回収するためにPBSに再懸濁し、専用ソフトウェア(BD Biosciences, Erembodegem, Belgium)とFACSアレイ機器を用いて分析した。他のTrop1、Trop2または無関係抗体をコントロールとして使用し、7-AAD(BD Biosciences, Erembodegem, Belgium)を、生体染色のためにサンプル(5  $\mu$ l/ $10^6$ 細胞)に添加した。

10

## 【 0 0 7 0 】

共焦点顕微鏡

乳癌細胞株MCF7を、Alexafluor-488 標識ST3232/10により標識し、共焦点顕微鏡により分析した。MCF7細胞を、15x15 mm カバースリップ上におき、30分間室温でPBS/4% パラホルムアルデヒド中でインキュベーションにより48時間後に固定した。30分間室温にて0.05% サポニンを含むSM (PBS中10% 血清)中で透過化した後、一次抗体(1 $\mu$ g ST3232-Alexa488 / スライド)を、SM+サポニン中で30分間室温にてインキュベートした。SM中3回洗浄の後、カバースリップを共焦点顕微鏡の観察のために載せた。

20

## 【 0 0 7 1 】

細胞 ELISA

96ウェルプレートを、まず30分37 で1xPBS、10% FCS(200 $\mu$ l/ウェル)でブロッキングし、次いで100 $\mu$ lの総容量において、250000細胞/ウェル+一次抗体を用いて播種した。プレートを、1時間37 でインキュベートし、次いで2000rpmで数秒間の遠心分離により、1xPBS、1% FCSを用いて3回洗浄した。抗マウスIgGアルカリフォスファターゼコンジュゲート(Sigma A2429、1/1000希釈)を、一次抗体-細胞複合体に添加し、1時間室温でインキュベートし、次いで5回洗浄した後に、pNpp基質(Sigma A3496)(200 $\mu$ l)を各ウェルに添加し、30分間37 でインキュベートした。該プレートを、最終的に遠心分離し、上清(170 $\mu$ l)を新規プレートに移して、405nmでELISA分光光度計(SEAC Sirio S)により読み取った。

30

## 【 0 0 7 2 】

表面プラズモン共鳴

EpCAMについてのST3232/10の親和性を、CM5チップ上で、市販購入し得るキメラ融合タンパク質Fc-EpCAM細胞外ドメイン(R&D、USA)を固定して表面プラズモン共鳴(SPR, Biacore x, Biacore, Uppsala, Sweden)により評価した。500-7.8 nMの濃度範囲内でST3232/10を注入することによって得られる曲線を、二価モデル(Biaevaluation software, v. 3.1、Biacore, Uppsala, Sweden)により評価した。

40

## 【 0 0 7 3 】

免疫組織化学

TRISTAR Technology laboratories (USA)から、35の肺癌切片および10の正常の肺(cod. # 49561006)、35の大腸-結腸癌および10の正常な大腸-結腸(cod. # 49561004)、35の卵巣癌および10の正常な卵巣(cod. # 49561006)の凍結切片および正常組織を有するスライド(cod. # 49561001)を、選択的試験のために利用した。ST3232/10を、ブロッキング溶液(PBS+正常なウマ血清2.5%)中に5 $\mu$ g/mLに希釈した。アイソタイプが一致するネガティブコントロールを、試験切片と同濃度にてレプリカスライド上で試験した。

50

## 【 0 0 7 4 】

スライドを、製造者指示書に従って処理し、抗体結合が、Vectastain ABC Elite Kit cod. PK6102 Kit (Vector Laboratories) の使用により明らかとなった。組織の水和後に、内性ペルオキシダーゼの停止を、0.3% 水素ペルオキシダーゼ溶液中に5分間スライドを浸漬により行った。PBS中で5分x3回の洗浄およびPBS+2.5%ウマ正常血清を用いる試験切片のブロッキングの後に、ブロッキング溶液で5 $\mu$ g/mLにて希釈した一次抗体を、2時間室温で添加えた。PBSにて3回洗浄した後、スライドを、二次ヤギ抗マウスビオチンコンジュゲート抗体と共に30分間インキュベートし、次いでアビジン-ビオチン複合体ペルオキシダーゼを用いて30分間インキュベートした。さらなる洗浄後、スライドを、Vector (登録商標) DAB/Ni 基質キット (Cat. SK-4100) にて新規DAB溶液中で2分間インキュベートし、反応を水道水で停止した。対比染色を、メイヤーズヘマトキシリンに10秒間の浸漬により行った。最終的に、スライドを、75%、80%、95%および100%のエタノールで各々1分間脱水し、キシレンで清浄し、取り外せないように合成包埋剤で標本とし、顕微鏡により観察した。

10

## 【 0 0 7 5 】

イン・ビボのモデル:ヌード無胸腺マウスでの同種移植

Trop-1(L/Trop-1)で形質転換したか、またはヒトTrop-1で形質転換していない(L/ベクター)ネズミL線維肉腫細胞株を、ヌード無胸腺マウス(10匹の動物/グループ)の3つのグループに皮下注射した。接種日に、該動物を、ST3232/10(200 $\mu$ g)(L/ベクター+ST3232およびL/Trop-1+ST3232)、エドレコロマブ(L/Trop-1+Panorex)または無関係ネズミIgG(L/ベクターおよびL/Trop-1)により処理した。別に3回の投与を、矢印に示したように、7、15および22日に行った。全てのグループにおいて、腫瘍成長を、50日までカリパス測定により評価した。

20

## 【 0 0 7 6 】

イン・ビボのモデル:ヒト結腸直腸細胞株の異種移植

Trop-1をネイティブ発現するヒト大腸癌腫細胞株 KM12-SMを、ヌードマウスに皮下移植した。ST3232/10(ST3232グループ)、M104(M104グループ)またはビヒクル(コントロールグループ)(200 $\mu$ g)を用いて、一週間に一回、4回の処置を、接種開始日から開始して行った。腫瘍進行を30日まで追跡した。

30

## 【 0 0 7 7 】

## 結果

ST3232/10の可変重鎖(VH)相補性決定領域の配列、および可変軽鎖(VL)相補性決定領域の配列を表 I に示した。

表 I : ST3232/10抗体のVHおよびVL相補性決定領域の配列

## 【表1】

	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	
<b>可変重鎖</b>			
CDR1	AGCGGTTATTACTGGAAC (配列番号 1)	S G Y Y W N (配列番号 2)	
CDR2	TATATAAGTTACGACGGTAGGAATAAGTACA ACCCATATCTCAAAAAT (配列番号 3)	Y I S Y D G R N K Y N P Y L K N (配列番号 4)	
CDR3	GCCCTCGGGGGGATTACGATGCTTTGGACT GC (配列番号 5)	A L G G D Y D A L D C (配列番号 6)	10
<b>可変軽鎖</b>			
CDR1	AAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGA GTCTGTAAACAGTAGAAGTCAAAAAGAACTA CTTGACC (配列番号 7)	K V T M S C K S S Q S L L N S R S Q K N Y L T (配列番号 8)	
CDR2	TGGGCATCCACTAGGGAATCT (配列番号 9)	W A S T R E S (配列番号 10)	
CDR3	CAGAATGATTATATTTATCCGCTCACG (配列番号 11)	Q N D Y I Y P L T (配列番号 12)	20

## 【0078】

ST3232/10は、SDS-PAGE分析およびクロマトグラフ・プロファイル(図1および2)により示したように、軽鎖および重鎖組成物について均一であることが証明された。実際に、抗体を、泳動緩衝液として1x MESを含む4-12%グラジエントBis-Tris NuPAGE上で3回泳動させ、非還元条件(レーン1-3)下にコマジー溶液(全ての試薬はInvitrogen、USAから得る)で染色した期待分子量(150 KDa)のバンドを示した。還元条件下(レーン4-6)では、重鎖(50 KDa)および軽鎖(25 KDa)に対応する2つのバンドのみが可視化され、そのため他の夾雑物が存在しないことが示された。この知見を、TSGK3000 カラムで行ったST3232/10から溶出した一つの均一なピークが観察されるクロマトグラフプロファイルにより確認した(図2)。

30

## 【0079】

EpCAM ファミリーメンバーに対する ST3232/10 特異性を、EpCAM(TROP-1)または高モログ分子TROP2を用いてトランスフェクトした、該抗原を発現しないネズミ細胞株でのFACS分析により評価した。図3に示したように、ST3232/10は、Trop-1 陽性細胞(パネル A)のみと反応し、Trop-1の負細胞、例えばL細胞(パネル G)またはL-Trop2 細胞(パネルD)とは反応しなかったため、EpCAMに対して特異的である。同様の結果を、他のEpCAM特異抗体(パネルB、E、H: M104; C、I: HT29/26)で観察した。T16抗体を、TROP2-L 細胞(パネルF)において陽性コントロールとして使用した。

40

## 【0080】

さらに、ST3232/10は、他のEpCAM抗体、例えばM104(Klein C.E. et al., 1990)と同等の結合活性を有する。ネイティブ抗原のその効率的認識は、EpCAM分子の様々なレベルが観察された(表II)癌細胞株のパネルに対する細胞蛍光試験により示されている。

## 【0081】

表II: ST3232/10またはM104抗TROP-1抗体を用いる多様な起源の腫瘍細胞株のパネルに対して得られたFACS結果

【表2】

細胞系(ATCC 番号)	腫瘍の型	ST3232/10	M104
HT 29 (HTB-38)	結腸癌	++++	++++
LoVo (CCL-229)	"	++++	++++
COLO320DMF	"	nd	-
SW 620 (CCL-227)	"	++++	++++
CACO-2 (HTB-37)	"	++++	++++
LS 174T (CL-188)	"	++++	++++
KB 3-1 (Dr. Cianfriglia, ISS, Italyのご好意により提供)	咽喉上皮癌 (nasopharyngeal ca.)	++++	++++
SKBR-3 (HTB-30)	乳癌	++++	nd
MDA-MB-231 (HTB-26)	"	+++	nd
MDA-MB-468 (HTB-132)	"	+	nd
MCF10-2A (CRL-10781)	"	+++	nd
MCF7 (HTB-22)	"	+++	+++
SKOV-3 (HTB-77)	卵巣癌	+	nd
NIH:OVCAR3 (HTB-161)	"	++++	++++
IGROV-1 (Tumor National Inst., Italy)	"	-	-
SKMEL28 (HTB-72)	黒色腫	-	nd
U-118 MG (HTB-15)	グリア芽腫	-	nd

++++ 100% 陽性、 +++ >90% 陽性、 ++ > 50% 陽性、  
+ > 20%陽性、 +/- < 15% 陽性、 - 陰性、 nd = 測定せず

## 【0082】

乳癌細胞株 MCF7 を、Alexafluor-488 標識 ST3232/10 により染色し、共焦点顕微鏡 (図4)により分析した。Alexa488-ST3232/10 コンジュゲートは、細胞-細胞の境界で最高強度での染色および単離パッチの染色に関する予測パターンを示した(2つの例示を図4AおよびBに示した)。

## 【0083】

ST3232/10の免疫反応性を、他の利用可能な抗EpCAM抗体と比較して、EpCAMをネイティブに発現する腫瘍細胞株での細胞-ELISAにより評価するか、またはヒト転写物で形質転換した。例示として、ST3232/10およびHT29/26(Klein CE et al., 1990)抗EpCAM抗体のHT29ヒト大腸癌腫細胞株に対する細胞-ELISAを図5に示した。ST3232/10は、用量依存様式にてHT29細胞上で天然に発現したEpCAMを結合できる。このアッセイにおいて、HT29/26は、他の抗体の挙動のように(データは示していない)、EpCAMをST3232/10よりも高い親和性にて結合することが判った。

## 【0084】

EpCAMについてのST3232/10の親和性を、表面プラズモン共鳴(SPR)により評価した。500-7.8 nMの濃度範囲のST3232/10を注射して得られた曲線を、二価モデル(図6A)により評価し、実験(図6B)で記録した $\chi^2$ (1.97)および最高RU値(140)の残差<10%により確認したと

おり、良質な一致を示した。ST3232/10の $K_D$ は、 $9.3E-10$  ( $k_{on} = 7.75E+04 \pm 297$ ;  $k_{off} = 7.2E-05 \pm 8.48E-06$ )となった。EpCAMに対するST3232/10の親和性は、エドレコロマブにより提示されたSPR評価した親和性( $K_D$   $2.55E-07$ 、Naundorf et al., 2002)よりも274倍高いが、文献において既知の他の抗-Trop-1抗体については親和性情報は利用できない。

【0085】

ST3232/10の内在化に関して、抗体をEpCAM発現細胞株と4 でインキュベートし、次いで37 で30-120分間の時間範囲内に複合体を形成させることによりFACS試験を行った。4 でのコントロールサンプルに関して、37 でインキュベートしたサンプルの陽性細胞の%または平均蛍光強度においての差は観察されなかった(表III)、すなわちEpCAM/抗体複合体の内在化がないことが示された。

【0086】

表III: LoVo 細胞株中のST3232/10の内在化の評価

【表3】

	陽性 %	MFI
4°C (コントロール)	98.5	3959
37°Cで30'	99.2	4182
37°Cで60'	98.1	4092
37°Cで120'	98.2	4149

【0087】

ST3232/10の選択性を、いくつかの固形腫瘍および正常組織に関する代表的な組織マイクロアレイ組織切片上で免疫組織化学により調べた。結果を表IVおよびVに要約し、その例示を図7に示した。

【0088】

表IV: 腫瘍に対するST3232/10の反応性

【表4】

	症例番号	陽性 (%)
肺	32	19 (59.3%)
大腸	34	32 (94.1%)
卵巣	35	31 (88.6%)
試験した組織の総数	101	82 (81.2%)

表V: 正常組織に対するST3232/10の反応性

【表5】

	症例番号	陽性 (%)
肺	8	1 (12.5%)
大腸	8	5 (62.5%)
卵巣	8	0 (0%)
試験した組織の総数	24	6 (25.0%)

高発生率固形癌型(表IV)の低温保持腫瘍スライドを、組織型が一致した正常な臓器(表V)から得たスライドと比較して評価した。ST3232/10は、大部分の大腸(94.1%)および卵巣(88.6%)癌腫の試験サンプルおよび多数の肺(59.3%)癌腫スライドに結合できる。癌細胞に対するST3232/10の選択性は、88.6%の腫瘍サンプルはST3232に対して陽性であったが正常組織は該抗体と反応しなかった卵巣試験片に対して非常に高いものであったが。さらに、ST3232/10は、他の腫瘍型では、より高い発生率にて反応し、正常細胞に比して癌により強く染色する。大腸および肺腫瘍と正常組織に対する選択性は図7に示され、EpCAMを過剰発現する腫瘍組織に対する明白な陽性反応および正常組織の陰性染色を示す。

10

【0089】

2つの異なる動物モデルを、腫瘍細胞成長に対するイン・ビボでの抗体活性を調べるために使用した。最初の実験において、ヌード無胸腺マウス(10匹の動物/グループ)の3つのグループを、ネズミ線維肉腫 L-hTrop-1 細胞株を用いて皮下移植(s.c.)し、そして接種日から開始して4週間の間、一週間に一回(200 μg/マウス)、ST3232/10、エドレコロマブまたは無関係ネズミIgGを用いて処理した。EpCAMによりトランスフェクトしなかったL細胞を2つの別のグループに移植し、該動物をST3232/10またはコントロール抗体で処理した。図8に示したように、EpCAMを発現する腫瘍(L/Trop)は、トランスフェクトされなかった腫瘍(L/ベクターまたはL/ベクター + ST3232)と比べて、より迅速に進行した。さらに、ST3232/10は、完全にかつ永続的にEpCAMを発現する腫瘍の増殖を阻害し、EpCAM 陰性腫瘍の増殖に干渉しなかった。一方、エドレコロマブ(Panorex)も、EpCAMを発現する腫瘍の増殖を変化させた。しかし、エドレコロマブ処置が中止されると、該腫瘍は急速に増殖した。

20

【0090】

ヒト結腸直腸細胞株であるKM12SMを用いて異種移植したヌードマウスの第二の動物モデルを使用して、前記の結果を拡張および確認した。該マウスを、前記実験(表VI、図9)と同じ用量およびスケジュールにて、ST3232/10、ネズミIgGおよび別の抗EpCAM抗体であるM104により処理した。表VIに示したように、ST3232/10処置グループ(56%)における腫瘍の割合は、他の2グループ(90-100%)よりも低かった。

30

【0091】

表VI：腫瘍担持率

【表6】

	腫瘍担持率(%)
コントロール	100
M104	90
ST3232/10	56

40

さらに、図9に示したように、ST3232/10は、他のグループと比較して、腫瘍増殖を低下させ、そして腫瘍発生についての潜時を増大させた。これらの結果は、標的分子に対して単純に結合する以外にST3232/10の直接的な治療効果に関する仮説を支持するものであった。

【0092】

引用文献

Alberti S et al., 1988, PNAS 85: 8391-8394

Burak WE Jr et al., 2001, Tumori 87: 142-146

50

Cianfriglia M. et al., 1986, Methods Enzymol. 121: 193210  
 De Bono JS et al., 2004, Clin Cancer Res 10: 7555-7565  
 Di Massimo A.M. et al., 1997, Br J Cancer 75: 822-828  
 Ferrer C. et al., 1996, J. Biotechnol. 52: 51-60  
 Frodin JE et al., 2002, Hybrid Hybridomics 21: 99-101  
 Goshorn S et al., 2001, Cancer Biot Radiopharm 16: 109-123  
 Klein CE et al., 1990, J Invest Dermatol 95: 74-82.  
 Naundorf S et al., 2002, Int J Cancer 100: 101-110  
 Oberneder R et al., 2006, Eur J Cancer 42: 2530-8  
 Old, LJ , 1996, Sci Am 275: 136-143. 10  
 Paganelli et al., 1999, Eur J Nucl Med 26: 348-357  
 Parente D. et al., 1997, Anticancer Research 17: 4073-4074  
 Paul, W. E., Fundamental Immunology, Raven Press, NY, N.Y. 1993, chapter 23  
 Penichet ML. et al., 1999, J. Immunol., 163: 4421-4426  
 Prang N et al., 2005, Br J Cancer 92: 342-9  
 Punt CJ et al., 2002, Lancet 360: 671-7  
 Riethmuller G et al., 1998, J Clin Oncol 16: 1788-1794  
 Sassano et al., 1994, Nucleic Acids Res 22: 1768-1769  
 Spizzo G et al., 2004, Breast Cancer Res Treat 86: 207-213  
 Velders et al., 1998, Br J Cancer 78: 478-483 20  
 Weiner LM et al., 1993, J Immunother 13: 110-116  
 Went et al., 2006, Br J Cancer, 94: 128-35  
 Winter MJ et al., 2003, AJP 163: 2139-2148

【 図 1 】

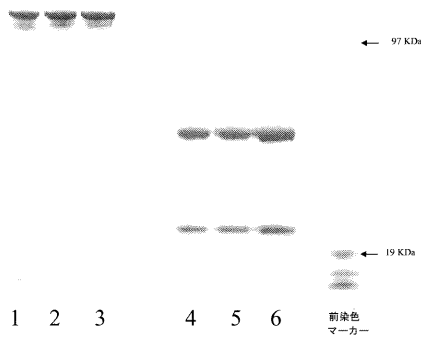


Fig. 1

【 図 2 】

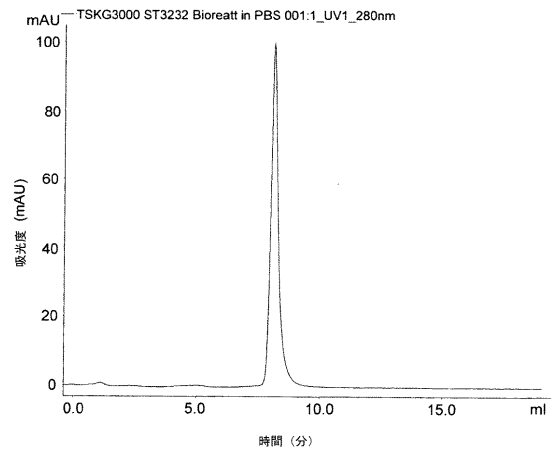


Fig. 2

【 図 3 】

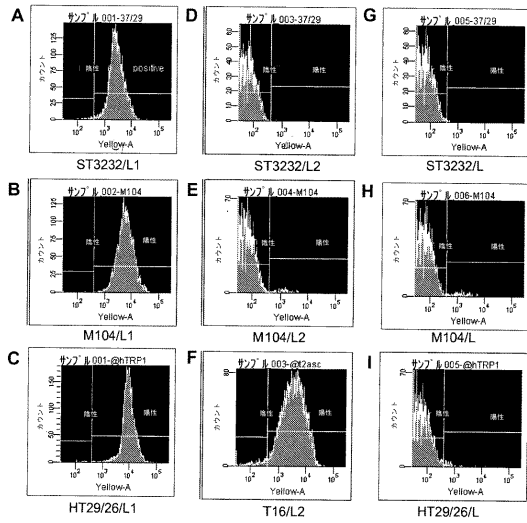
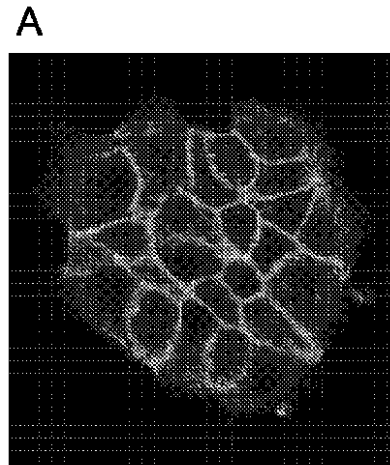
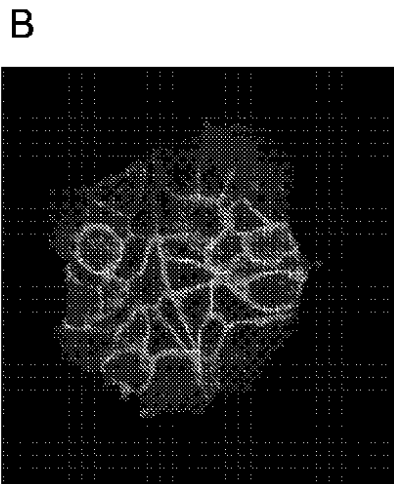


Fig. 3

【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



【 図 5 】

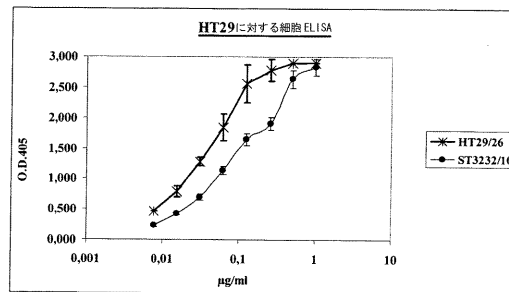


Fig. 5

【 図 6 】

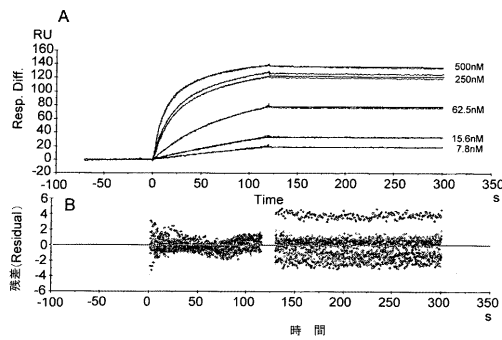


Fig. 6

【 図 7 】

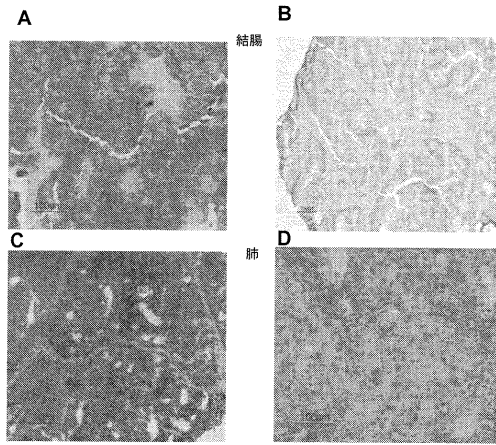


Fig. 7

【 図 8 】

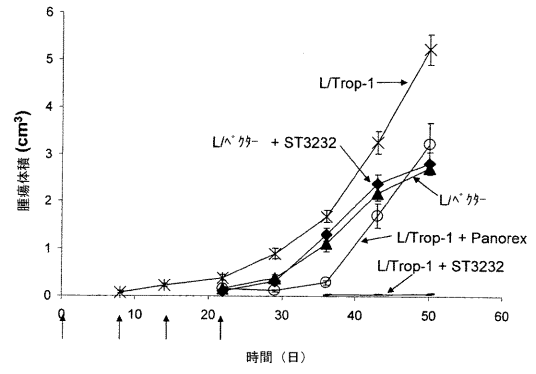


Fig. 8

【 図 9 】

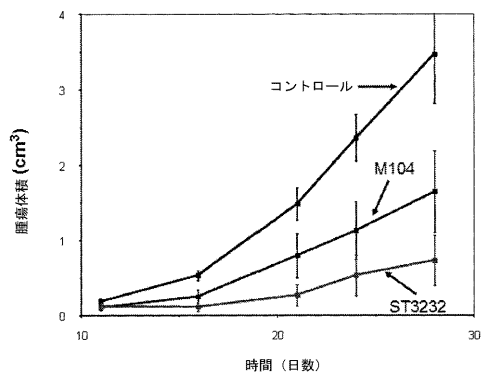


Fig. 9

【配列表】

0005631733000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 2
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 E
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
		G 0 1 N	33/53 V
		C 1 2 P	21/08

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(72)発明者 アンナ・マリア・アナスターシ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ポメツィア (ローマ)、ヴィア・ポンティーナ・キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ - タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

(72)発明者 フィオレッタ・ペトロンツェッリ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ポメツィア (ローマ)、ヴィア・ポンティーナ・キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ - タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

(72)発明者 リタ・デ・サンティス

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 ポメツィア (ローマ)、ヴィア・ポンティーナ・キロメトロ 3 0 , 4 0 0、シグマ - タウ・インドゥストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

(72)発明者 サヴェリオ・アルベルティ

イタリア、イ - 6 6 0 3 4 ランチャーノ (キエーティ)、ヴィア・ガリバルディ・ヴィーコ 1 7 番、ヌメロ 1 5

審査官 小暮 道明

(56)参考文献 FROEDIN JAN-ERIK, HYBRIDOMA AND HYBRIDOMICS, 2 0 0 2 年 4 月, V21 N2, P99-101  
Int. J. Cancer, 2002, V100, P101-110

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 /

C 0 7 K

C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

专利名称(译)	抗EpCAM抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP5631733B2</a>	公开(公告)日	2014-11-26
申请号	JP2010501503	申请日	2008-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	希格马托制药工业公司		
申请(专利权)人(译)	西格玛 - 头Indusutorie医药崔宇智科Riunite , Soshietta佩尔 - Achioni		
当前申请(专利权)人(译)	西格玛 - 头Indusutorie医药崔宇智科Riunite , Soshietta佩尔 - Achioni		
[标]发明人	アンナマリアアナスターシ フィオレッタペトロンツェリ リタデサンティス サヴェリオアルベルティ		
发明人	アンナ・マリア・アナスターシ フィオレッタ・ペトロンツェリ リタ・デ・サンティス サヴェリオ・アルベルティ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/44 C12N15/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P35/00 A61K39/395 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K39/39558 C07K16/30 C07K2317/77		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C07K16/44 C12N15/00.C C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.102 A61P35/00 A61K39/395.E A61K39/395.T G01N33/53.V C12P21/08		
代理人(译)	田中, 三夫 山崎 宏		
优先权	2007105628 2007-04-04 EP		
其他公开文献	JP2010523096A JP2010523096A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

名为ST3232 / 10的海洋来源的抗EpCAM抗体表现出适合治疗和诊断应用的性质。它显示对天然抗原的高亲和力和良好的肿瘤选择性。

【表2】

細胞系(ATCC 番号)	腫瘍の型	ST3232/10	M104
HT 29 (HTB-38)	結腸癌	+++	+++
LoVo (CCL-229)	"	+++	+++
COL0320DMF	"	nd	-
SW 620 (CCL-227)	"	+++	+++
CACO-2 (HTB-37)	"	+++	+++
LS 174T (CL-188)	"	+++	+++
KB 3-1 (Dr. Gianfriglia, ISS, Italyのご好意により提供)	咽喉上皮癌 (nasopharyngeal ca.)	+++	+++
SKBR-3 (HTB-30)	乳癌	+++	nd
MDA-MB-231 (HTB-26)	"	+++	nd
MDA-MB-468 (HTB-132)	"	+	nd
MCF10-2A (CRL-10781)	"	+++	nd
MCF7 (HTB-22)	"	+++	+++
SKOV-3 (HTB-77)	卵巣癌	+	nd
NIH:OVCAR3 (HTB-161)	"	+++	+++
IGROV-1 (Tumor National Inst., Italy)	"	-	-
SKMEL28 (HTB-72)	黒色腫	-	nd
U-118 MG (HTB-15)	グリア芽腫	-	nd

+++ 100% 陽性、 +++ >90% 陽性、 ++ > 50% 陽性、