

(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2018-500930

(P2018-500930A)

(43) 公表日 平成30年1月18日(2018.1.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B064
C07K 16/30 (2006.01)	C07K 16/30 ZNA	4B065
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4C085
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4H045
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	
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2017-548330 (P2017-548330)	(71) 出願人	517195011
(86) (22) 出願日	平成27年12月4日 (2015.12.4)		アブルツォ・セラノスティックス・エッセ・エッレ・エッレ
(85) 翻訳文提出日	平成29年8月1日 (2017.8.1)		イタリア・66034・キエーティ・ラン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/078672		チャーノ・ヴィア・ガリバルディ・ヴィー
(87) 国際公開番号	W02016/087651		コ・17・ヌメロ・15
(87) 国際公開日	平成28年6月9日 (2016.6.9)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	CH2014A000032		弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成26年12月4日 (2014.12.4)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	イタリア (IT)		弁理士 実広 信哉
		(74) 代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ヒト化抗TROP-2モノクローナル抗体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、ヒト化抗Trop-2抗体並びにTrop-2分子の異なる領域を認識し、これに高い親和性で結合することができるその断片、誘導体及びコンジュゲートに関する。本発明はまた、ヒト病理、特に、がんの診断及び療法のためのそのような抗体及びその医薬組成物の使用も教示する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

Advanced Biotechnology Center (ABC)に番号PD 08021で寄託されたハイブリドーマにより産生される抗体2EF、又はAdvanced Biotechnology Center (ABC)に番号PD 08020で寄託されたハイブリドーマにより産生される抗体2G10と同じエピトープを認識し、それに結合する、ヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項 2】

ヒト抗体の少なくとも1つの重鎖若しくは少なくとも1つのヒトコンセンサスフレームワークに由来する可変ドメインフレームワーク領域及び/又はヒト抗体の少なくとも1つの軽鎖若しくは少なくとも1つのヒトコンセンサスフレームワークに由来する可変ドメインフレームワーク領域を含む、請求項1に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

10

【請求項 3】

ヒト抗体の重鎖若しくはヒトコンセンサスフレームワークが、前記抗体2EF若しくは前記抗体2G10の重鎖と少なくとも50%相同であり、及び/又は

ヒト抗体の軽鎖若しくはヒトコンセンサスフレームワークが、前記抗体2EF若しくは前記抗体2G10の軽鎖と少なくとも50%相同である、

請求項1又は2に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項 4】

前記可変ドメインフレームワーク領域において、少なくとも1個のアミノ酸が、マウス抗体の重鎖若しくはマウスコンセンサスフレームワークに由来するか、及び/又はマウス抗体の軽鎖若しくはマウスコンセンサスフレームワークに由来する対応する残基、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートと置換される、請求項2又は3に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

20

【請求項 5】

マウス抗体が請求項1に規定の抗体2EF若しくは抗体2G10であるか、及び/又はマウスコンセンサスフレームワークが請求項1に規定の抗体2EF若しくは抗体2G10に由来する、請求項4に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項 6】

アミノ酸置換が、ヒト抗体の成熟重鎖、より好ましくは、配列番号88の配列を有する前記成熟重鎖の11位及び/若しくは38位及び/若しくは40位及び/若しくは43位及び/若しくは44位及び/若しくは48位及び/若しくは68位及び/若しくは70位及び/若しくは72位、好ましくは38、44、48、68、70及び72位にあり、又は好ましくは、ヒト抗体の成熟重鎖、より好ましくは、配列番号89の配列を有する前記成熟重鎖の48、68、70及び72位にある、請求項4又は5に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

30

【請求項 7】

アミノ酸置換が、ヒト抗体の成熟重鎖、好ましくは、配列番号90の配列を有する前記成熟重鎖の27位及び/若しくは30位及び/若しくは37位及び/若しくは48位及び/若しくは49位及び/若しくは67位及び/若しくは68位及び/若しくは70位及び/若しくは72位、好ましくは、27、30、37、48、49、67、68、70及び72位、又は27、30、37、48、49、70及び72位にある、請求項4又は5に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

40

【請求項 8】

アミノ酸置換が、成熟軽鎖、好ましくは、配列番号91の配列を有するヒト抗体の前記成熟軽鎖の4位及び/若しくは53位及び/若しくは104位、好ましくは、4、53、及び104位にある、請求項4から7のいずれか一項に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項 9】

アミノ酸置換が、ヒト抗体の成熟軽鎖、好ましくは、配列番号92の配列を有する前記成熟軽鎖の2位及び/若しくは22位及び/若しくは42位及び/若しくは49位及び/若しくは64位及び/若しくは67位及び/若しくは72位及び/若しくは85位、好ましくは、2、49及び67位に

50

ある、請求項4から7のいずれか一項に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項10】

前記抗体2EF若しくは前記抗体2G10の少なくとも1つの重鎖相補性決定領域(CDRH)アミノ酸配列及び/又は前記抗体2EF若しくは前記抗体2G10の少なくとも1つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)アミノ酸配列を含む、請求項1から9のいずれか一項に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項11】

- 配列番号3若しくは配列番号9のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH3)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号2若しくは配列番号8のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH2)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号1若しくは配列番号7のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH1)アミノ酸配列

を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項12】

- 配列番号6若しくは配列番号12のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL3)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号5若しくは配列番号11のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL2)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号4若しくは配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL1)アミノ酸配列

を含む、請求項1から11のいずれか一項に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項13】

配列番号14、22、24、26、18、32若しくは34又はその断片からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖可変領域アミノ酸配列及び/又は配列番号16、28、30、20、36、38若しくは40又はその断片からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖可変領域アミノ酸配列、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートを含む、請求項1から12のいずれか一項に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項14】

配列番号26を含む重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号30を含む軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む、請求項1から13のいずれか一項に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項15】

配列番号32又は配列番号34を含む重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号40を含む軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む、請求項1から13のいずれか一項に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項16】

抗体がIgG1アイソタイプのものである、請求項1から15のいずれか一項に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項17】

請求項1から16のいずれか一項に記載のヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートをコードする核酸分子、又は前記核酸、若しくはその縮重配列とハイブリダイズする核酸分子。

【請求項18】

配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47及び49からなる群から選択される少なくとも1つの核酸配列を含む、請求項17に記載の核

10

20

30

40

50

酸分子。

【請求項 19】

請求項17若しくは18に記載の核酸を含む、又は請求項1から16のいずれか一項に記載のヒト化抗体又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートをコードする発現ベクター。

【請求項 20】

請求項1から16のいずれか一項に記載のヒト化抗体又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートを産生する宿主細胞。

【請求項 21】

請求項1から16のいずれか一項に記載の少なくとも1つのヒト化抗体又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート、又はその組合せを含む、又はそれからなる組合せ。

10

【請求項 22】

請求項1に規定の抗体2EFと同じエピトープを認識し、それに結合する少なくとも1つの抗体及び請求項1に規定の抗体2G10と同じエピトープを認識し、それに結合する1つの抗体を含む、又はそれからなる請求項21に記載の組合せ、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート。

【請求項 23】

請求項1から16のいずれか一項に記載の少なくとも1つのヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート、又は請求項21若しくは22に記載の組合せ並びに薬学的に許容される少なくとも1つの賦形剤及び/又はアジュバント及び/又は担体及び/又は希釈剤を含む医薬組成物。

20

【請求項 24】

医薬としての使用のため、好ましくは、腫瘍及び転移、より好ましくは、Trop-2を発現する腫瘍及び転移の防止及び/又は処置における使用のための、更により好ましくは、少なくとも1つの治療剤と組み合わせた、請求項1から16のいずれか一項に記載のヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート、又は請求項21若しくは22に記載の組合せ、又は請求項23に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

対象における腫瘍又は転移を診断するため、及び/又はそれを発症する危険性を評価するため、及び/又はそれを予後診断するため、及び/又はその進行をモニタリングするため、及び/又はその治療的処置の効能をモニタリングするため、及び/又はその治療的処置のスクリーニングのための *in vitro* 又は *ex vivo* の方法であって、

30

a) 請求項1から16のいずれか一項に記載のヒト化抗Trop-2モノクローナル抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート、又は請求項21若しくは22に記載の組合せを用いて、対象から単離された試料中のTrop-2発現細胞を検出する工程、

b) 適切な対照及び/又は参照に対して比較する工程を含む、方法。

【請求項 26】

腫瘍又は転移を診断するか、及び/又はそれを発症する危険性を評価するか、及び/又はそれを予後診断するため、及び/又はその進行をモニタリングするため、及び/又はその治療的処置の効能をモニタリングするため、及び/又はその治療的処置のスクリーニングのための方法における使用のための、請求項1から16のいずれか一項に記載のヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート、又は請求項21若しくは22に記載の組合せ。

40

【請求項 27】

請求項1から16のいずれか一項に記載の少なくとも1つのヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート、又は請求項21若しくは22に記載の組合せ、及び場合により、検出手段を含むキットであって、好ましくは、腫瘍及び転移の診断のためのものである、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、ヒト化抗Trop-2モノクローナル抗体並びにその断片、誘導体及びコンジュゲートに関する。特に、本発明は、高い効率でTrop-2分子の異なる領域を認識し、それに結合することができる、ヒト及びマウスの混合起源の配列を含むモノクローナル抗体に関する。そのような抗体又はその断片、誘導体及びコンジュゲートを含有する医薬組成物もまた、本発明の目的である。がんを含むヒト疾患の診断及び療法のためのそのような抗体並びにその断片、誘導体及びコンジュゲートの使用は、本発明の別の目的である。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

Trop-2(NCBI受託番号P09758.3)は、腫瘍関連カルシウムシグナル伝達因子2(TAGSTD-2)(Calabrese, Crescenziら、2001)とも呼ばれ、上皮細胞の表面上に発現されるI型膜貫通糖タンパク質(Alberti, Miottiら、1992)である。Trop-2タンパク質は、3つのドメイン:ジスルフィド架橋に關与する12個のシステイン及び4個のN-グリコシル化部位を含む248アミノ酸(aa)からなる細胞外ドメイン、23アミノ酸の膜貫通ドメイン、並びに26アミノ酸長であるC末端細胞内尾部に編成される。Trop-2の細胞外ドメインは、N末端に、EGF様ドメインに編成された、12個のシステインを含有する球形領域(P09758.3におけるaa 31~145)、次いで、サイログロブリンドメインを含有し、細胞間接着に關与する。球形領域の後ろには、システインを含まない領域(P09758.3においてはaa 146~274)があり、細胞外ドメインを膜貫通ドメインに接続する支持ステムであると考えられる(Linnenbach, Sengら、1993; Fornaro, Dell'Arcipreteら、1995)。

10

20

【 0 0 0 3 】

特に、ヒトTrop-2(NCBI受託番号P09758.3)のアミノ酸配列は、

【 化 1 】

```

1 margpglapp plrlpllllv laavtghtaa qdnctcptnk mtvcspdgpg grcqcralgs
61 gmavdcstlt skclllkarm sapknartlv rpsehalvdn dglydpdcdp egrfkarqcn
121 qtsvvcwvns vgvrrtdkgd lsrlrcdelvr thhilidlrh rptagafnhs dldaelrrlf
181 reryrlhpkf vaavhyeqpt iqielrqnts qkaagvdvig daayyferdi kgeslfqgrg
241 gldlrvrgep lqvrtliyy ldeippkfsm krltagliav ivvvvalva gmavlvitnr
301 rksgkykkve ikelgelrke psl

```

(配列番号87)

であり、前記領域のアミノ酸配列は、

Trop-2球形領域(EGF様ドメイン及びサイログロブリンドメイン;配列番号87のaa 31~145):

```

QDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRQCRCRALGSGMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLVRPSEHALVDNDGLYDPDCDP
EGRFKARQCNQTSVCWCVNSVGVRRTDKGDLSLRC

```

Trop-2ステム領域(配列番号87のaa 146~274):

```

DELVRTHHILIDLRRPTAGAFNHSDLDAELRRLFRERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQNTSQKAAGEVDIGDAAYY
FERDIKGESLFQGRGGLDLRVRGEPLQVERTLIYYLDEIPPKFSMKRLT

```

である。

【 0 0 0 4 】

細胞内尾部は、HIKEドメインを含有し、ホスファチジルイノシトール4-5-ビスリン酸(P-IP2)に結合することができる(Ciccarelli, Acciaritoら、2000)、セリン303にPKCリン酸化部位を含む(Basu, Goldenbergら、1995)。

40

【 0 0 0 5 】

Trop-2は、大多数のヒト癌腫において、メッセンジャーRNA(mRNA)レベルとタンパク質レベルとの両方で過剰発現される(Ali, Aloisiら、2013)。この過剰発現は、膵臓(Bosco, Antonsenら、2011)、胃(Muhlmann, Spizzoら、2009)、口腔(Fong, Moserら、2008)、結腸直腸(Ohmachi, Tanakaら、2006; Fang, Luら、2009)、卵巣(Bignotti, Todeschiniら、2010)、及び肺(Jiang, Gaoら、2013)のもの等の、がんにおける侵襲性の増大及び予後不良と関連する。様々な起源の実験的腫瘍におけるTrop-2の過剰発現は、発現のレベルに比例して、in vitroとin vivoの両方において、細胞増殖を刺激することができる。同様に

50

、特異的サイレンシング(si)RNAによるTrop-2発現の阻害は、増殖を阻害する。したがって、Trop-2は、がん細胞の増殖を誘導するのに必要かつ十分である。腫瘍増殖のためのこの刺激シグナルは、サイクリンD1及びERK/MEKシグナリング経路のTrop-2依存的活性化並びにCREB1、Jun、NF- κ B、Rb、STAT1及びSTAT3の活性化を介して動作する(Guerra, Trerotolaら、2013)。

【0006】

Trop-2に関する腫瘍関連突然変異は発見されていない。したがって、過剰発現されるTrop-2は、配列に関して野生型(wt)分子である。しかしながら、本発明の著者らは、腫瘍が、異なる翻訳後修飾と関連する、局在化が異なる異種型のTrop-2を含有することを最近示した(Ambrogi, Forniliら、2014)。著者らはまた、異なる型のTrop-2が反対の予後の影響を有することも示した。乳がんにおいては、特に、膜Trop-2は有害な予後因子であるが、細胞質Trop-2は良好な予後と関連する(Ambrogi, Forniliら、2014)。異種グリコシル化は、健康な組織/遠位部位と比較して、腫瘍及び周囲の組織においてより多くグリコシル化された形態の示差的発現を示す、Trop-2ホモログであるTrop-1/EpCAMについても記載されている(Pauli, Munzら、2003)。

10

【0007】

膜レベルでの過剰発現、腫瘍における機能的役割及び負の予測値は、Trop-2を抗がん免疫療法のための正当な標的にする。

【0008】

本発明の著者らは、WO2010089782及び(Ambrogi, Forniliら、2014)に記載されたTrop-2細胞外ドメインの異なる領域及び異なるグリコシル化状態に対して高い親和性を有し、それを特異的に指向する、同種であるマウス抗Trop-2モノクローナル抗体を開発した。これらの抗体、特に、Advanced Biotechnology Center - ICLC of Genoa (Italy)に番号PD 08021で寄託されたハイブリドーマにより産生される2EF抗体、及びAdvanced Biotechnology Center - ICLC of Genoaに番号PD 08020で寄託されたハイブリドーマにより産生される2G10抗体は、Trop-2の球形領域(配列番号87のaa 31~145;2EF抗体)又は「ステム」領域(配列番号87のaa 146~274、2G10抗体)を特異的かつ示差的に認識することができる。それらはTrop-2の異なる領域を認識するため、これらの抗体は標的への結合について競合せず、腫瘍細胞に結合することができる抗体の分子数が増加する。2EF抗体はまた、侵襲性の高い腫瘍と潜在的に関連する、標的の特定の型の翻訳後修飾に選択的に結合する(Ambrogi, Forniliら、2014)。これらの抗体は、免疫不全マウスに移植されたヒトがん細胞上で測定された場合、高いin vivo抗腫瘍活性を有し、この活性は2種の抗体を同時投与した場合、相乗的に増加する。したがって、2EF及び2G10抗体は、それらをこれまで記載された他の抗Trop-2よりも良好なものにする、組み合わせた抗がん治療的使用のための特異的特徴を有する((Fradet, Cordon-Cardoら、1984); WO2003074566、US2004001825、US2007212350、US2008131363; WO2008144891; US2012237518; CN102827282; WO2011145744; WO2013068946)。

20

30

【0009】

マウスモノクローナル抗体は、ヒトにおけるその使用についていくつかの制限があり、それらを治療的使用にとって不適当なものにしている。マウスIgGは、ヒト起源の抗体の血漿半減期(約3週間)よりもはるかに短い(数時間)血漿半減期を有する。マウス起源の分子は、ヒト免疫系によって認識され、ヒト抗マウス抗体(ヒト抗マウス抗体(HAMA))の産生を特徴とする免疫応答を誘発する。HAMAは、最初の投与後にマウス抗体を不活化し、除去する。更に、マウス抗体とHAMAとの複合体の形成は、重篤なアレルギー反応、更にはアナフィラキシーショックまでも引き起こし得る。これらの理由から、マウス抗体を、療法の経過中に反復投与のために使用することはできない。更に、ヒトとマウスの免疫系の違いのため、マウスFc部分は、補体を活性化し、免疫系の抗体依存的細胞性細胞傷害性(ADCC)を刺激する能力が低下しており、したがって、治療的使用を制限している(Khazaeli, Conryら、1994)。

40

【0010】

50

マウス起源のモノクローナル抗体のヒトにおける治療的使用に対するこの制限は、抗原と接触する表面の形成にとって重要である元の抗体のアミノ酸残基を保持しながら、マウス起源の抗体の配列の一部の、ヒト起源の配列との置き換えである、ヒト化プロセスによって克服することができる。様々なレベルのヒト化を、組換えDNA技術を適用することによって実行することができる。第1のレベルのヒト化は、マウス可変領域とヒト定常領域との融合である(Morrison, Johnsonら、1984)。得られるキメラ抗体は、マウスタンパク質の約33%を保持し、ヒトエフェクター媒介性細胞傷害性を刺激することができる(Liu, Robinsonら、1987)。しかしながら、再度、ヒト抗キメラ抗体(HACA)の産生と共に、キメラ抗体のマウスペプチド配列に対するヒト免疫応答があってもよい(Afif, Loftusら、2010)。この課題は、マウス抗体の可変領域の相補性決定領域(CDR)(典型的には、分子の5~10%)を、抗体のフレームワークを形成するヒト起源の配列上に「移植」する、ヒト化抗体の作出によって克服される。

10

【0011】

遺伝子操作のこれらの連続的段階は、ヒトにおける有害反応の可能性を次第に低下させるが、抗体特性に大幅に影響し得る。例えば、ヌクレオチド配列の新しい組合せが、新しい調節配列を作出するか、又はクリプティック調節配列、例えば、スプライシングシグナルを活性化する場合、組換え抗体をコードするcDNAの不安定性の課題があり得る。遭遇することが多い別の課題は、精製プロセスの過程中、又は患者への投与後に免疫グロブリン沈降をもたらす、化学的不安定性、例えば、抗体の可溶性の喪失である。更に、ヒト化プロセスに関して、通常は、抗体自身の治療効能に対する負の影響と共に、数桁規模の低下であり得る、標的に対する抗体の親和性の低下が存在する。これは、分子の三次元折り畳みの間に、マウスCDRによる抗体と抗原との接触表面の形成及び提示を改変するヒトフレームワークの導入に起因するものである。この課題を克服するために、フレームワーク配列を変化させ、数十億の可能な組合せのうち、標的に対する抗体の親和性に対する影響が最も大きいものを発見しようとする必要がある。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】WO2010089782

【特許文献2】WO2003074566

【特許文献3】US2004001825

【特許文献4】US2007212350

【特許文献5】US2008131363

【特許文献6】WO2008144891

【特許文献7】US2012237518

【特許文献8】CN102827282

【特許文献9】WO2011145744

【特許文献10】WO2013068946

【特許文献11】米国特許第4,676,980号

【特許文献12】米国特許第4,954,617号

30

40

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A. 編、1980

【非特許文献2】Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD、1991

【非特許文献3】Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、NIH Publication 91-3242、Bethesda MD (1991)、vols. 1~3

【非特許文献4】Chothia及びLesk、J. Mol. Biol. 196:901~917頁、1987

【非特許文献5】Almagro及びFransson、Front. Biosci. 13: 1619~1633頁、2008

【非特許文献6】Kindtら、Kuby Immunology、第6版、W.H. Freeman and Co.、91頁、200

50

7

- 【非特許文献7】Portolanoら、J. Immunol. 150:880～887頁、1993
 【非特許文献8】Clarksonら、Nature 352:624～628頁、1991
 【非特許文献9】Chenら、J. Mol. Biol. 293:865～881頁(1999)
 【非特許文献10】Flynnら、Science, 2015
 【非特許文献11】Weber AM, Pharmacol Ther. 2015
 【非特許文献12】Begg AC, Nat Rev Cancer. 2011
 【非特許文献13】Kelley MR, Future Oncol. 2014
 【非特許文献14】Ward A, Cancer Treat Rev. 2015
 【非特許文献15】Feng FY, Mol Cell. 2015
 【非特許文献16】Luら、Front. Med. 2013
 【非特許文献17】Neidle FEBS J, 2010
 【非特許文献18】Muller及びRodriguez, Expert Rev Clin Pharmacol. 2014
 【非特許文献19】Sissi及びPalumbo, Curr Pharm Des. 2014
 【非特許文献20】Salvatiら、NAR, 2015
 【非特許文献21】www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
 【非特許文献22】www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

20

マウスモノクローナル抗体の治療的制限を克服するために、本発明の著者らは、Trop-2分子の異なる領域及び異なる翻訳後修飾状態を高い効率で認識し、それに結合することができるヒト化抗Trop-2モノクローナル抗体を開発した。

【0015】

これは、マウス2G10及び2EF抗体中に標的化された変化を導入することからなる操作/最適化のラウンドを連続して実施することによって達成されたが、そのような変化は、当業界で公知の技術にただ基づくだけでは予測可能ではない。この目的のために、キメラCH-2EF及びCH-2G10抗体を最初に構築した後、初期にヒト化されたバージョン:Hu-2EF-4、Hu-2EF-5、Hu-2G10-1、Hu-2G10-2、Hu-2G10-3及びHu-2G10-4を構築した。しかしながら、これらの抗体は、これらの第1のヒト化バージョンの全てにおいて、負の特性:凝集体の形成及び可溶性の喪失(CH-2EF抗体について)と共に、化学的不安定性、並びにTrop-2に対する親和性の喪失を示した。その後、Trop-2に対する親和性を回復するために、他の新しいアミノ酸残基を、ヒトフレームワーク中で置き換えたが、前記アミノ酸は、数十億の異なる配列を有するコンビナトリアルライブラリーの作出及び分析を用いる必要がなく、抗体分子の構造及び三次元折り畳みの標準的でない予測によって同定された。これにより、著者らは、抗マウス抗体によって認識されず、Trop-2の細胞外ドメインの異なる領域及び翻訳後修飾の様々な形態を特異的に指向する、高い親和性を有するヒト化モノクローナル抗体(例えば、Hu-2EF-7、Hu-2G10-5及びHu-2G10-6)を取得することができた。そのような抗体は、診断及びヒト療法、特に、Trop-2を発現する腫瘍及び転移のin vivoでの診断及び防止及び処置において、単独で、又は組合せとして一緒に用いられる。

30

40

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、Trop-2の翻訳後修飾の異なる領域又は特定の形態を、高い効率で認識し、それに結合することができる、ヒト化抗Trop-2モノクローナル抗体、その断片、誘導体及びコンジュゲートを指し、そのような抗体は2EF及び2G10モノクローナル抗体から得られる。

【0017】

本発明による抗体は、それらが好ましくは、ヒト及びマウス配列の組合せを含み、マウス起源の配列が、重鎖(VH)及び軽鎖(VL)の可変領域中に、以下のアミノ酸配列:VH-CDR1:N YWIG(配列番号1)、VH-CDR2:DIYPGGGYTNYNEKFKG(配列番号2)、VH-CDR3:GTGGGDY(配列番号3

50

) (重鎖) 及びVL-CDR1:RASQSVSTSSYSYMH (配列番号4)、VL-CDR2 YASNLES (配列番号5)、VL-CDR3 QHSWEIPYT (配列番号6) (軽鎖) を含有する群; 又はVH-CDR1:SSYIS (配列番号7)、VH-CDR2:WIYAGTGGTSYNQKFTG (配列番号8)、VH-CDR3:HNPRYYAMDY (配列番号9) (重鎖) 及びVL-CDR1:ITSDIDDDMN (配列番号10)、VL-CDR2:EGNTLRP (配列番号11)、VL-CDR3:LQSDNLPYT (配列番号12) (軽鎖) を含有する群から選択される1つ、2つ又は3つ全部のCDRを含むことを特徴とする。

【0018】

したがって、本発明の目的は、Advanced Biotechnology Center (ABC) に番号PD 08021で寄託されたハイブリドーマにより産生される抗体2EF、又はAdvanced Biotechnology Center (ABC) に番号PD 08020で寄託されたハイブリドーマにより産生される抗体2G10と同じエピトープを認識し、それに結合する、ヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコン

10

【0019】

本発明による抗体は、抗Trop-2抗体である。

【0020】

本発明の態様において、前記ヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、ヒト抗体の少なくとも1つの重鎖若しくは少なくとも1つのヒトコンセンサスフレームワークに由来する可変ドメインフレームワーク領域及び/又はヒト抗体の少なくとも1つの軽鎖若しくは少なくとも1つのヒトコンセンサスフレームワークに由来する可変ドメインフレームワーク領域を含む。

【0021】

上で用いられた用語「由来する」は、ヒト抗体又はヒトコンセンサスフレームワークから誘導される可変ドメインフレームワーク領域と意図され得る。

20

【0022】

好ましくは、ヒト抗体の前記重鎖又はヒトコンセンサスフレームワークは、前記抗体2EF若しくは前記抗体2G10の重鎖と少なくとも50%相同であり、及び/又はヒト抗体の前記軽鎖又はヒトコンセンサスフレームワークは、前記抗体2EF若しくは前記抗体2G10の軽鎖と少なくとも50%相同である。

【0023】

より好ましくは、成熟型のヒト抗体の前記重鎖又はヒトコンセンサスフレームワークは、成熟型の前記抗体2EF若しくは前記抗体2G10の重鎖とアミノ酸レベルで少なくとも50%相同であり、及び/又は成熟型のヒト抗体の前記軽鎖又はヒトコンセンサスフレームワークは、成熟型の前記抗体2EF若しくは前記抗体2G10の軽鎖とアミノ酸レベルで少なくとも50%相同である。

30

【0024】

本発明の好ましい実施形態において、ヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、前記抗体2EF若しくは前記抗体2G10の少なくとも1つの重鎖相補性決定領域(CDRH)アミノ酸配列及び/又は前記抗体2EF若しくは前記抗体2G10の少なくとも1つの軽鎖相補性決定領域(CDRL)アミノ酸配列を含む。

【0025】

好ましくは、前記可変ドメインフレームワーク領域において、少なくとも1つのアミノ酸は、マウス抗体の重鎖若しくはマウスコンセンサスフレームワークに由来するか、及び/又はマウス抗体の軽鎖若しくはマウスコンセンサスフレームワークに由来する対応する残基、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートと置換される。

40

【0026】

好ましくは、前記マウス抗体は、上記で定義された抗体2EF若しくは抗体2G10であるか、及び/又は上記で定義された抗体2EF若しくは抗体2G10から誘導されるマウスコンセンサスフレームワークである。

【0027】

更に好ましい実施形態においては、重鎖可変領域のフレームワークは、配列番号88又は配列番号89のフレームワークに少なくとも50%の同一性を有し、軽鎖可変領域のフレーム

50

ワークは、配列番号91のフレームワークに少なくとも50%の同一性を有する。

【0028】

更に好ましい実施形態においては、重鎖可変領域のフレームワークは、配列番号90のフレームワークに少なくとも50%の同一性を有し、軽鎖可変領域のフレームワークは、配列番号92のフレームワークに少なくとも50%の同一性を有する。

【0029】

本発明の好ましい態様において、アミノ酸置換は、ヒト抗体の成熟重鎖、より好ましくは、配列番号88の配列を有する前記成熟重鎖の11及び/若しくは38及び/若しくは40及び/若しくは43及び/若しくは44及び/若しくは48及び/若しくは68及び/若しくは70及び/若しくは72位、好ましくは、38、44、48、68、70及び72位にあるか、又は好ましくは、ヒト抗体の成熟重鎖、より好ましくは、配列番号89の配列を有する前記成熟重鎖の48、68、70及び72位にある。

10

【0030】

好ましい実施形態においては、前記成熟重鎖は、配列番号93又は94のものを有する。

【0031】

好ましくは、上記置換は、以下の通りである：

Hu2EF VH4:

44位のR(ヒト)の代わりにG(マウス)

48位のM(ヒト)の代わりにI(マウス)

68位のV(ヒト)の代わりにA(マウス)

70位のI(ヒト)の代わりにL(マウス)

72位のR(ヒト)の代わりにA(マウス)；

20

Hu2EF VH5(アクセプター-VHと異なるヒトIgG):

48位のM(ヒト)の代わりにI(マウス)

68位のV(ヒト)の代わりにA(マウス)

70位のM(ヒト)の代わりにL(マウス)

72位のR(ヒト)の代わりにA(マウス)；

最終ヒト化抗体のために選択されるHu2EF VH4 R38K変異体=VH7:

38位のR(ヒト)の代わりにK(マウス)

44位のR(ヒト)の代わりにG(マウス)

48位のM(ヒト)の代わりにI(マウス)

68位のV(ヒト)の代わりにA(マウス)

70位のI(ヒト)の代わりにL(マウス)

72位のR(ヒト)の代わりにA(マウス)；

30

Hu2EF VH4 V11L変異体:

11位のV(ヒト)の代わりにL(マウス)

44位のR(ヒト)の代わりにG(マウス)

48位のM(ヒト)の代わりにI(マウス)

68位のV(ヒト)の代わりにA(マウス)

70位のI(ヒト)の代わりにL(マウス)

72位のR(ヒト)の代わりにA(マウス)；

40

Hu2EF VH4 A40R変異体:

40位のA(ヒト)の代わりにR(マウス)

44位のR(ヒト)の代わりにG(マウス)

48位のM(ヒト)の代わりにI(マウス)

68位のV(ヒト)の代わりにA(マウス)

70位のI(ヒト)の代わりにL(マウス)

72位のR(ヒト)の代わりにA(マウス)；

Hu2EF VH4 Q43H変異体:

43位のQ(ヒト)の代わりにH(マウス)

50

44位のR(ヒト)の代わりにG(マウス)
 48位のM(ヒト)の代わりにI(マウス)
 68位のV(ヒト)の代わりにA(マウス)
 70位のI(ヒト)の代わりにL(マウス)
 72位のR(ヒト)の代わりにA(マウス)。

【 0 0 3 2 】

本発明の更に好ましい態様において、アミノ酸置換は、ヒト抗体の成熟重鎖、好ましくは、配列番号90の配列を有する前記成熟重鎖の27及び/若しくは30及び/若しくは37及び/若しくは48及び/若しくは49及び/若しくは67及び/若しくは68及び/若しくは70及び/若しくは72位、好ましくは、27、30、37、48、49、67、68、70及び72位、又は27、30、37、48、49、70及び72位にある。 10

【 0 0 3 3 】

好ましい実施形態においては、前記成熟重鎖は、配列番号95の配列を有する。

【 0 0 3 4 】

好ましくは、上記置換は、以下の通りである：

Hu2G10 VH1:

27位のY(ヒト)の代わりにF(マウス)
 30位のT(ヒト)の代わりにS(マウス)
 37位のV(ヒト)の代わりにL(マウス)
 48位のM(ヒト)の代わりにI(マウス)
 49位のG(ヒト)の代わりにA(マウス)
 67位のR(ヒト)の代わりにK(マウス)
 68位のV(ヒト)の代わりにA(マウス)
 70位のI(ヒト)の代わりにL(マウス)
 72位のR(ヒト)の代わりにV(マウス)；

20

Hu2G10 VH2:

27位のY(ヒト)の代わりにF(マウス)
 30位のT(ヒト)の代わりにS(マウス)
 37位のV(ヒト)の代わりにL(マウス)
 48位のM(ヒト)の代わりにI(マウス)
 49位のG(ヒト)の代わりにA(マウス)
 70位のI(ヒト)の代わりにL(マウス)
 72位のR(ヒト)の代わりにV(マウス)。

30

【 0 0 3 5 】

好ましくは、アミノ酸置換は、成熟軽鎖、好ましくは、配列番号91の配列を有するヒト抗体の前記成熟軽鎖の、4及び/若しくは53及び/若しくは104位、好ましくは、4、53、及び104位にある。

【 0 0 3 6 】

好ましい実施形態においては、前記成熟軽鎖は、配列番号96の配列を有する。

【 0 0 3 7 】

好ましくは、上記置換は、以下の通りである：

Hu2EF VL1:

53位のY(ヒト)の代わりにK(マウス)；

最終ヒト化抗体のために選択されるHu2EF VL2:

4位のM(ヒト)の代わりにL(マウス)
 53位のY(ヒト)の代わりにK(マウス)
 104位のQ(ヒト)の代わりにG(マウス)。

40

【 0 0 3 8 】

別の好ましい実施形態においては、アミノ酸置換は、ヒト抗体の成熟軽鎖、好ましくは、配列番号92の配列を有する前記成熟軽鎖の、2及び/若しくは22及び/若しくは42及び/若 50

しくは49及び/若しくは64及び/若しくは67及び/若しくは72及び/若しくは85位、好ましくは、2、49及び67位にある。

【0039】

好ましい実施形態においては、前記成熟軽鎖は、配列番号97の配列を有する。

【0040】

好ましくは、上記置換は、以下の通りである：

Hu2G10 VL1:

49位のY(ヒト)の代わりにS(マウス)

67位のS(ヒト)の代わりにY(マウス);

Hu2G10 VL2:

49位のY(ヒト)の代わりにS(マウス);

Hu2G10 VL3(VL1 I2T変異体):

2位のI(ヒト)の代わりにT(マウス)

49位のY(ヒト)の代わりにS(マウス)

67位のS(ヒト)の代わりにY(マウス);

Hu2G10 VL1 T22R変異体

22位のT(ヒト)の代わりにR(マウス)

49位のY(ヒト)の代わりにS(マウス)

67位のS(ヒト)の代わりにY(マウス);

Hu2G10 VL1 K42E変異体

42位のK(ヒト)の代わりにE(マウス)

49位のY(ヒト)の代わりにS(マウス)

67位のS(ヒト)の代わりにY(マウス);

Hu2G10 VL1 G64S変異体

49位のY(ヒト)の代わりにS(マウス)

64位のG(ヒト)の代わりにS(マウス)

67位のS(ヒト)の代わりにY(マウス);

Hu2G10 VL1 T72V変異体

49位のY(ヒト)の代わりにS(マウス)

67位のS(ヒト)の代わりにY(マウス)

72位のT(ヒト)の代わりにV(マウス);

Hu2G10 VL1 T85D変異体

49位のY(ヒト)の代わりにS(マウス)

67位のS(ヒト)の代わりにY(マウス)

85位のT(ヒト)の代わりにD(マウス)。

【0041】

好ましくは、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、

- 配列番号3若しくは配列番号9のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH3)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号2若しくは配列番号8のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH2)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号1若しくは配列番号7のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH1)アミノ酸配列を含む。

【0042】

より好ましくは、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、

- 配列番号3のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH3)アミノ酸配列及び/又は

10

20

30

40

50

- 配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH2)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号1のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH1)アミノ酸配列を含む。

【0043】

より好ましくは、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、

- 配列番号9のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH3)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号8のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH2)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号7のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH1)アミノ酸配列を含む。

【0044】

好ましい実施形態においては、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、

- 配列番号6若しくは12のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL3)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号5若しくは11のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL2)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号4若しくは10のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL1)アミノ酸配列を含む。

【0045】

より好ましくは、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、

- 配列番号6のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL3)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号5のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL2)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号4のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL1)アミノ酸配列を含む。

【0046】

より好ましくは、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、

- 配列番号12のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL3)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号11のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL2)アミノ酸配列及び/又は

- 配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL1)アミノ酸配列を含む。

【0047】

好ましくは、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、配列番号1のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH1)アミノ酸配列及び配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH2)アミノ酸配列及び配列番号3のアミノ酸配列に少なくとも80%の

10

20

30

40

50

同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH3)アミノ酸配列を含む。

【0048】

好ましくは、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、配列番号7のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH1)アミノ酸配列及び配列番号8のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH2)アミノ酸配列及び配列番号9のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH3)アミノ酸配列を含む。

【0049】

好ましい実施形態においては、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、配列番号4のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL1)アミノ酸配列及び配列番号5のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL2)アミノ酸配列及び配列番号6のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL3)アミノ酸配列を更に含む。

10

【0050】

好ましい実施形態においては、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL1)アミノ酸配列及び配列番号11のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL2)アミノ酸配列及び配列番号12のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL3)アミノ酸配列を更に含む。

20

【0051】

本発明の更に好ましい実施形態においては、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、

配列番号9のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH3)アミノ酸配列並びに

配列番号8のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH2)アミノ酸配列、

配列番号7のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH1)アミノ酸配列、

配列番号12のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL3)アミノ酸配列、

30

配列番号11のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL2)アミノ酸配列、及び

配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL1)アミノ酸配列

からなる群から選択される少なくとも1つの相補性決定領域を含む。

【0052】

本発明の別の好ましい実施形態においては、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、

40

配列番号3のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH3)アミノ酸配列並びに

配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH2)アミノ酸配列、

配列番号1のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖相補性決定領域(CDRH1)アミノ酸配列、

配列番号6のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL3)アミノ酸配列、

配列番号5のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL2)アミノ酸配列、及び

50

配列番号4のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖相補性決定領域(CDRL1)アミノ酸配列

からなる群から選択される少なくとも1つの相補性決定領域を含む。

【0053】

更に好ましい実施形態においては、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、配列番号1に少なくとも80%の同一性を有するCDRH1アミノ酸配列、配列番号2に少なくとも80%の同一性を有するCDRH2アミノ酸配列、配列番号3に少なくとも80%の同一性を有するCDRH3アミノ酸配列、配列番号4に少なくとも80%の同一性を有するCDRL1アミノ酸配列、配列番号5に少なくとも80%の同一性を有するCDRL2アミノ酸配列及び配列番号6に少なくとも80%の同一性を有するCDRL3アミノ酸配列を含む。

10

【0054】

別の好ましい実施形態においては、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、配列番号7に少なくとも80%の同一性を有するCDRH1アミノ酸配列、配列番号8に少なくとも80%の同一性を有するCDRH2アミノ酸配列、配列番号9に少なくとも80%の同一性を有するCDRH3アミノ酸配列、配列番号10に少なくとも80%の同一性を有するCDRL1アミノ酸配列、配列番号11に少なくとも80%の同一性を有するCDRL2アミノ酸配列及び配列番号12に少なくとも80%の同一性を有するCDRL3アミノ酸配列を含む。

【0055】

好ましくは、本発明によるヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、配列番号14、22、24、26、18、32、若しくは34若しくはその断片からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖可変領域アミノ酸配列及び/又は配列番号16、28、30、20、36、38若しくは40若しくはその断片からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む。

20

【0056】

配列番号14、22、24又は26のアミノ酸配列の断片は、前記配列の断片aa 20~135であってもよい。

【0057】

配列番号18、32又は34のアミノ酸配列の断片は、前記配列の断片aa20~138であってもよい。

30

【0058】

配列番号20、36、38又は40のアミノ酸配列の断片は、前記配列の断片aa21~127であってもよい。

【0059】

配列番号16、28又は30のアミノ酸配列の断片は、前記配列の断片aa21~131であってもよい。

【0060】

好ましくは、本発明によるヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、以下の組合せによる、以下のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖可変領域アミノ酸配列及び以下のアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖可変領域アミノ酸配列：

40

配列番号14及び16、
配列番号14及び28、
配列番号14及び30、
配列番号22及び16、
配列番号22及び28、
配列番号22及び30、
配列番号24及び16、
配列番号24及び28、
配列番号24及び30、

50

配列番号26及び16、
 配列番号26及び28、
 配列番号26及び30、
 配列番号18及び20、
 配列番号18及び36、
 配列番号18及び38、
 配列番号18及び40、
 配列番号32及び20、
 配列番号32及び36、
 配列番号32及び38、
 配列番号32及び40、
 配列番号34及び20、
 配列番号34及び36、
 配列番号34及び38、
 配列番号34及び40
 を含む。

10

【0061】

本発明によるヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、好ましくは、配列番号26を含むアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号30を含むアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む。好ましくは、本発明によるヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、好ましくは、配列番号26を含む重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号30を含む軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む。

20

【0062】

本発明によるヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、好ましくは、配列番号32又は34を含むアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号40を含むアミノ酸配列に少なくとも80%の同一性を有する軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む。好ましくは、本発明によるヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、好ましくは、配列番号32又は配列番号34を含む重鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号40を含む軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む。好ましくは、上記で定義されたヒト化抗体又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートは、IgG1アイソタイプのものである。

30

【0063】

本発明の更なる目的は、上記で定義されたヒト化抗体又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートをコードする核酸分子、又は前記核酸分子とハイブリダイズする核酸分子、又はその縮重配列である。

【0064】

好ましくは、前記核酸分子は、配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49からなる群から選択される少なくとも1つの核酸配列を含む。

40

【0065】

本発明の別の目的は、上記で定義された核酸を含むか、又は上記で定義されたヒト化抗体又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートをコードする発現ベクターである。

【0066】

本発明の更なる目的は、上記で定義されたヒト化抗体又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート、上記で定義されたヒト化抗体、又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲート、又はその組合せのうち少なくとも1つを含むか、又はそれからなる組合せを産生する宿主細胞であり、好ましくは、前記組合せは、上記で定義された抗体2EFと同じエピトープを認識し、それに結合する少なくとも1つの抗体及び上記で定義された抗体2G10と同じエピトープを認識し、それに結合する1つの抗体、又はその断片、誘導体若しくはコ

50

ンジュゲートを含むか、又はそれからなる。より好ましくは、前記組合せは、Hu-2EF-7及びHu-2G10-5又はHu-2EF-7及びHu-2G10-6を含む。

【0067】

本発明の別の目的は、上記で定義された少なくとも1つのヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート、又は本発明による組合せと、薬学的に許容される少なくとも1つの賦形剤及び/又はアジュバント及び/又は担体及び/又は希釈剤とを含む医薬組成物である。

【0068】

本発明の更なる目的は、医薬としての使用のため、好ましくは、腫瘍及び転移、より好ましくは、Trop-2を発現する腫瘍及び転移の防止及び/又は処置における使用のための、上記で定義されたヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート又は組合せ、又は医薬組成物である。

10

【0069】

本発明の文脈において、腫瘍は、内皮、乳房、頭頸部、甲状腺、結腸直腸、胃、肺、卵巣、前立腺、膵臓、子宮頸部、腎臓及び膀胱(尿路上皮)腫瘍を含む。

【0070】

好ましい実施形態においては、ヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート、又は組合せ、又は医薬組成物は、少なくとも1つの治療剤との組合せ中にある。

【0071】

本発明の別の目的は、対象における腫瘍又は転移を生じる危険性を診断するか、及び/若しくは評価するか、及び/若しくはそれを予後診断するため、並びに/又はその進行をモニタリングするため、並びに/又はその治療的処置の効果をモニタリングするため、並びに/又はその治療的処置をスクリーニングするための *in vitro* 又は *ex vivo* での方法であって、

20

a) 対象から単離された試料中のTrop-2発現細胞を、本発明によるヒト化抗Trop-2モノクローナル抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート又は本発明による組合せを用いて検出するステップと、

b) 適切な対照及び/又は参照に関して比較するステップとを含む、方法である。

30

【0072】

本発明の別の目的は、腫瘍又は転移を生じる危険性を診断するか、及び/若しくは評価するか、及び/若しくはそれを予後診断するため、並びに/又はその進行をモニタリングするため、並びに/又はその治療的処置の有効性をモニタリングするため、並びに/又はその治療的処置をスクリーニングするための方法における使用のための、本発明によるヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート又は組合せである。

【0073】

本発明の更なる目的は、本発明による少なくとも1つのヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート、又は本発明による組合せと、場合により検出手段とを含み、好ましくは、腫瘍及び転移の診断のためのものである、キットである。

40

【0074】

抗体2EFを産生するハイブリドーマは、ブダペスト条約の下で、Advanced Biotechnology Center (ABC), Interlab Cell Line Collectionに、2008年8月27日に番号PD08021として寄託された(寄託情報:

微生物寄託番号: PD08021;

寄託施設名: Advanced Biotechnology Center (ABC) (「Centro di Biotecnologie Avanzate (CBA)」);

寄託施設住所: Interlab Cell Line Collection (Biotechnology Dept); Largo Rossana Benzi, 10, 16132 Genova, Italy;

寄託日: 2008年8月27日)。

50

【0075】

抗体2G10を産生するハイブリドーマは、ブダペスト条約の下で、Advanced Biotechnology Center (ABC), Interlab Cell Line Collectionに、2008年8月27日に番号PD08020として寄託された(寄託情報:

微生物寄託受託番号: PD08020;

寄託施設名: Advanced Biotechnology Center (ABC) ("Centro di Bitoecnologie Avanzate (CBA)");

寄託施設住所: Interlab Cell Line Collection (Biotechnology Dept); Largo Rossana Benzi, 10, 16132 Genova, Italy;

寄託日:2008年8月27日)。

10

【0076】

本発明はまた、親和性又は結合特異性をモジュレートするための記載されたCDRの突然変異体も含む。

【0077】

本発明はまた、標的の翻訳後修飾の異なる部分又は特定の形態に対する高い親和性を有し、それを指向する、ヒト化抗Trop-2モノクローナル抗体、又はその誘導体も提供し、そのような抗体は、ヒトにおいて免疫応答を誘導しないペプチドをコードするヒト免疫グロブリン(IgM、IgD、IgG、IgA、IgE)の配列と組み合わせた、上記で定義された重鎖及び軽鎖可変領域を含む。

【0078】

本発明の好ましい態様において、本明細書ではCh2EFと定義される、キメラ抗体Ch2EF-1 IgG1/ の産生のために、配列番号14(又は配列番号13のそのコード核酸)の重鎖(図1)及び配列番号16(又は配列番号15のそのコード核酸)の軽鎖(図2)の可変領域を、ヒト免疫グロブリン(Ig)の、それぞれ、ガンマ-1(G1)重鎖定常領域及びカッパ()軽鎖定常領域に連結した。本発明の別の態様においては、本明細書ではCh2G10と定義される、キメラ抗体Ch2G10-IgG1/ の産生のために、配列番号18(又は配列番号17のそのコード核酸)の重鎖(図3)及び配列番号20(又は配列番号19のそのコード核酸)の軽鎖(図4)の可変領域を、ヒトIgの、それぞれ、G1重鎖定常領域及び 軽鎖定常領域に連結した。

20

【0079】

好ましくは、本発明の抗体は、配列番号22、配列番号24、配列番号26からなる群から選択される(又は配列番号21、配列番号23、配列番号25からなる群から選択されるヌクレオチド配列によりコードされる)配列を含むVH領域(図5~図7)と共に、配列番号28、配列番号30からなる群から選択される(又は配列番号27及び配列番号29からなる群から選択されるヌクレオチド配列によりコードされる)配列を含むVL領域(図8~図9)を有するヒト化Hu2EF抗体、並びに配列番号32、配列番号34からなる群から選択される(又は配列番号31、配列番号33からなる群から選択されるヌクレオチド配列によりコードされる)配列を含むVH領域(図10~図11)と共に、配列番号36、配列番号38、配列番号40からなる群から選択される(又はそのヌクレオチド配列によりコードされる)(又は配列番号35配列番号37、配列番号39からなる群から選択されるヌクレオチド配列によりコードされる)配列を含むVL領域(図12~図14)を有するヒト化Hu2G10抗体である。

30

40

【0080】

簡潔にするために、本発明による好ましい抗体は、Hu2EF-7(配列番号26及び配列番号30を含む)、Hu2G10-5(配列番号32及び配列番号40を含む)並びにHu2G10-6(配列番号34及び配列番号40を含む)の名称で同定される。本発明はそのような抗体に焦点を合わせるが、本発明の例示として、当業者であれば、一度、本開示が与えられたら、他の類似抗体、及びその抗体断片、並びにこれらの類似抗体の抗体断片を、本発明の範囲内で産生及び使用することができることを理解できる。当業者であれば、そのような類似抗体を、合理的な量の実験によって産生することができる。

【0081】

更に好ましくは、抗体は、scFv、Fv断片、Fab断片、F(ab)2断片、マルチマー抗体、工

50

ピトーブ結合領域を含有するペプチド又はタンパク質分解断片である。

【0082】

本発明による抗体、又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲートは、好ましくは、配列番号42、配列番号46及び配列番号50からなる群から選択される配列を含むG1重鎖を含む。

【0083】

本発明による抗体、又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲートは、好ましくは、配列番号44及び配列番号48からなる群から選択される配列を含む 軽鎖を含む。

【0084】

好ましい態様において、本発明の抗体は、配列番号42のG1重鎖(図15)及び配列番号44の軽鎖(図16)を含む(例えば、Hu2EF-7)、又は配列番号46のG1重鎖(図17)及び配列番号48の軽鎖(図18)を含む(例えば、Hu2G10-5抗体)、又は配列番号50のG1重鎖(図19)及び配列番号48の軽鎖(図18)を含む(例えば、Hu2G10-6)ヒト化抗体である。

10

【0085】

本発明による抗体の断片は、Fv断片、Fab断片、F(ab)2断片、単鎖抗体、二官能性ハイブリッド抗体又はマルチマー抗体を含む。本発明により教示される抗体又は抗体断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲート又はキメラ分子又は免疫グロブリンは、IgM、IgD、IgG、IgA、又はIgEアイソタイプであるか、又はそれらから生じたものであってもよい。

【0086】

本発明による抗体及びその断片は、更なる分子(イムノコンジュゲート)を含有してもよい。そのような分子の非包括的一覧は、例えば、放射性アイソトープ、蛍光トレーサー、化学発光により検出することができる酵素、サイトカイン又は毒素、例えば、酵素活性を有し、細菌、真菌、植物又は動物起源の毒素、並びにそれらの断片を含む。

20

【0087】

本発明による抗体の誘導体は、定常領域が生物活性分子によって置き換えられる抗体であってもよい。生物活性分子の非包括的一覧は、例えば、アビジンファミリーのメンバー又は免疫エフェクターを産生することができる増殖因子、又は毒素、サイトカイン等の薬学的に活性な分子、又は治療効能を増加させることができる任意の他の分子を含む。

【0088】

本発明の目的は、本発明による抗体及びイムノコンジュゲート、その断片及び誘導体のみ、又は互いに、若しくは他の分子と組み合わせたもの、並びに1つ又は複数の賦形剤、アジュバント、ビヒクル及び/若しくは薬学的に許容される希釈剤と組み合わせたものを含む診断及び治療組成物でもある。

30

【0089】

本発明の更なる目的は、本発明による抗体及び免疫コンジュゲート、その断片及び誘導体、並びにそれらを含む組成物の診断及び療法における使用である。

【0090】

本発明の目的において、診断的使用を、非包括的な例として、患者におけるin vivoでの診断的画像化に適用することができる。

【0091】

本発明の別の目的において、診断及び療法を、例えば、Trop-2と関連する病状、好ましくは、腫瘍及びその転移に適用することができる。更に好ましくは、診断及び療法を、Trop-2を発現する腫瘍及びその転移に適用することができる。Trop-2を発現する腫瘍の非包括的一覧は、例えば、子宮内膜、乳房、頭頸部、結腸直腸、胃、肺、卵巣、前立腺、膵臓、子宮頸部、腎臓及び膀胱の腫瘍(尿路上皮癌)を含む。

40

【0092】

本発明の目的において、療法は、新生物疾患の経過において、又は腫瘍の外科的除去の後に、薬理的に許容される形態で、本発明による抗体又はその断片若しくは誘導体若しくは免疫コンジュゲートを、単独で、又は組み合わせて含有する医薬組成物を患者に投与することによって行われる。投与はまた、他の抗がん療法と同時に行ってもよく、静脈内

50

又は局所領域、例えば、腹腔内、胸膜内、膀胱内、肝動脈内、若しくは病変内(腫瘍内)、又は手術中等の全身投与であってもよく、医薬組成物を腫瘍塊の外科的切除によりできた空洞に直接的に入れる。本発明の目的において、療法は免疫療法である。本発明の別の目的においては、療法は放射線療法である。

【0093】

本発明による医薬組成物において、本発明による抗体又はその誘導体若しくはコンジュゲートを、他の抗がん薬と結合させてもよい。

【0094】

本発明による医薬組成物は、担体と組み合わせて、単独で、又は例えば、抗がん薬としての他の治療剤と一緒に、本発明による抗体又はその誘導体若しくはコンジュゲート若しくは断片を含んでもよい。本発明の特定の実施形態においては、担体剤は、リポソームである。

10

【0095】

医薬組成物は、好ましくは、静脈内又は局所領域投与、例えば、腹腔内、胸膜内、膀胱内、病変内(腫瘍内)投与、又は肝動脈を介する投与、又は医薬組成物を腫瘍の外科的除去後にできた空洞(cavity hat)に直接入れる手術内投与を含む、全身投与を許容する形態にある。

【0096】

本発明で使用される治療剤は、細胞の機能を阻害若しくは防止するか、及び/又は細胞自体の破壊を引き起こす物質と意図される、細胞傷害物質である抗がん薬であってもよい。細胞傷害物質は、放射性アイソトープ、化学療法剤、及び毒素、例えば、細菌、真菌、植物又は動物起源の酵素活性を備えた毒素、並びにそれらの断片を含む。化学療法剤は、がんの処置において有用な化学的化合物である。化学療法剤の例としては、限定されるものではないが、アドリマイシン、ドキソルピシン、5-フルオロウラシル、シトシン-アラビノシド(「Ara-C」)、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、タキソール、メトトレキサート、シスプラチン、メルファラン及び他の窒素マスタード、ビンブラスチン、プレオマイシン、エトポシド、イホスファミド、マイトマイシンC、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ビノレルビン、カルボプラチン、テニポシド、アミノプテリン、ダクチノマイシン、エスペラミシンが挙げられる。薬剤は、細胞間メディエーター、例えば、サイトカイン、例えば、限定されるものではないが、天然起源から来る、又は組換え細胞培養物に由来する、リンホカイン、モノカイン、ホルモン、増殖因子、インターフェロン、インターロイキン、並びに天然のサイトカインの生物活性等価物であってもよい。

20

30

【0097】

本発明による組成物は、有効量の上記で定義されたヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲートを含む。医薬組成物は、当業界では従来のものであり、当業者であれば、共通一般知識だけに基づいて作製することができる。好ましい実施形態においては、本発明による組成物は、静脈内投与における使用のためのものである。

【0098】

また、本発明の目的は、治療有効量の上記で定義されたヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲートを投与することを含む、腫瘍又は転移を処置するか、及び/又は防止する方法である。

40

【0099】

本発明の目的は、有効量の上記で定義されたヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲートを投与することを含む、Trop-2を減少させる、及び/又は阻害する方法である。

【0100】

本発明においては、CDRの配列中の1つ又は複数のアミノ酸を突然変異させることにより、開示されるCDRの突然変異体を生成することができる。CDR中に適切に配置された単一のアミノ酸置換は親和性を改善するのに十分なものであり得ることが公知である。特異的突然変異誘発を用いて、いくつかの免疫グロブリン産物の親和性を増加させることができる

50

。CDRを突然変異させることにより抗体の親和性を増加させる、又は低下させる(すなわち、モジュレートする)この方法は、共通知識である(例えば、Paul, W.E., 1993を参照されたい)。かくして、結合親和性又は特異性を増加させる、又は低下させる(すなわち、モジュレートする)ための本発明のCDRに対するアミノ酸の置換、欠失、又は付加も、本発明の範囲内にある。

【0101】

配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39のヌクレオチド配列は、キメラ又はヒト化2EF又は2G10の異なる型のVH及びVLに対応する。配列番号41、43、45、47、49のヌクレオチド配列は、ヒト化抗体Hu2EF-7、Hu-2G10-5又は-6の重鎖又は軽鎖の完全配列である。

10

【0102】

本発明によるヒト化抗体の断片、誘導体又はコンジュゲートの定義は、免疫エフェクターを刺激することができるアビジンファミリーのメンバー若しくは増殖因子を含む生物活性分子、又は毒素、サイトカインを含む薬理活性分子、又は治療効果を増大させることができる任意の他の分子、例えば、放射性アイソトープ、蛍光トレーサー、化学発光、サイトカイン又は細菌、真菌、植物若しくは動物起源の酵素活性毒素及びその断片を含む、毒素のための酵素とのイムノコンジュゲートを含有する、scFv、Fv断片、Fab断片、F(ab)₂断片、二官能性ハイブリッド抗体、マルチマー抗体、誘導体を含む。

【0103】

本発明の更なる目的は、上記の核酸を含む宿主細胞である。本発明による宿主細胞はまた、上記で定義された発現ベクターをトランスフェクトされた細胞も含む。

20

【0104】

本発明の更なる目的は、上記の抗体を産生する細胞を培養することと、細胞培養物から抗体を回収することを含む、本発明の上記されたヒト化抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲートを産生する方法である。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】Ch2EF VHのヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。アミノ酸残基は一文字コードで示される。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、Kabatら(Kabat, Wuら、1991)の定義によるものであり、下線付きである。

30

【図2】Ch2EF VLのヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図3】Ch2G10 VHのヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図4】Ch2G10 VLのヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(E)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

40

【図5】Hu2EF VH4のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図6】Hu2EF VH5のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図7】Hu2EF VH7のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図8】Hu2EF VL1のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド

50

配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図9】Hu2EF VL2のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図10】Hu2G10 VH1のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図11】Hu2G10 VH2のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図12】Hu2G10 VL1のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図13】Hu2G10 VL2のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図14】Hu2G10 VL3のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。

【図15】Hu2EF-7G1重鎖のコード領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。星印「*」は終止コドンを示す。

【図16】Hu2EF-7 軽鎖のコード領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。星印「*」は終止コドンを示す。

【図17】Hu2G10-5 G1重鎖のコード領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。星印「*」は終止コドンを示す。

【図18】Hu2G10-5及びHu2G10-6 軽鎖のコード領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。星印「*」は終止コドンを示す。

【図19】Hu2G10-6 G1重鎖のコード領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。星印「*」は終止コドンを示す。

【図20】SpeI及びHindIII部位(下線付き)がフランキングするCh2EF VH合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

【図21】NheI及びEcoRI部位(下線付き)がフランキングするCh2EF VL合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

【図22】pCh2EF、pCh2G10、pHu2EF-4、pHu2EF-5、pHu2EF-7、pHu2G10-1、pHu2G10-2、pHu2G10-3、pHu2G10-4、pHu2G10-5 e pHu2G10-6のために用いたベクター(集合的に発現ベクター)の構造の略図である。上のSalI部位から時計回りに進んで、プラスミドは、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)主要極初期プロモーター及びエンハンサー(CMVプロモーター)から始まる重鎖転写ユニットを含有する。CMVプロモーターに次いで、VHエクソン、介在イントロンと共にCH1、ヒンジ、CH2及びCH3エクソンを含むヒトG1重鎖定常領域を含有するゲノム配列、並びにCH3エクソンの後ろのポリアデニル化部位がある。重鎖遺伝子配列の後、軽鎖転写ユニットは、CMVプロモーターで始まり、次いで、VLエクソン及びヒト重鎖定常領域エクソン(CL)を、その前のイントロンの一部と共に含有するゲノム配列、並びにCLエクソンの後ろにポリアデニル化部位がある。次いで、軽鎖遺伝子に続いて、SV40初期プロモーター(SV40プロモーター)、大腸菌(E.coli)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(gpt)、及びSV40ポリアデニル化部位(SV40ポリ(A)部位)を含有

10

20

30

40

50

するセグメントがある。最後に、プラスミドは、細菌の複製起点(pUCori)及びベータ-ラクタマーゼ遺伝子(ベータラクタマーゼ)を含む、プラスミドpUC19の一部を含有する。pHu2EF-7の誘導体であるpHu2EF-7-puroにおいて、gpt遺伝子は、ピューロマイシン耐性のためにピューロマイシンN-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子で置き換えられる。

【図23】M17751における2EF VHのヒト化を示す図である。マウス2EF VH、2つの形態のヒト化2EF VH(Hu2EF VH4及びVH7)、並びにヒトアクセプターM17751.1のアミノ酸配列のアラインメントである。配列の上の数字は、Kabatら(Kabat, Wuら、1991)による位置を示す。CDR配列は2EF VH中で下線付きである。M1775.1 VH中のCDR残基は、図面では省略されている。Hu2EF VH4及びVH7中の下線付き残基は、抗原結合部位の形成にとって重要であると予測され、対応するマウス残基はこれらの位置で保持された。

10

【図24】L02325.1における2EF VHのヒト化を示す図である。マウス2EF VH、ヒト化2EF VH(Hu2EF VH5)、及びヒトアクセプターL02325.1配列のアミノ酸配列のアラインメントである。配列の上の数字は、Kabatら(Kabat, Wuら、1991)による位置を示す。CDR配列は2EF VH中で下線付きである。L02325.1 VH中のCDR残基は、図面では省略されている。Hu2EF VH5中の下線付き残基は、抗原結合部位の形成にとって重要であると予測され、対応するマウス残基はこれらの位置で保持された。

【図25】Z46622.1における2EF VLのヒト化を示す図である。マウス2EF VL、2つの形態のヒト化2EF VL(Hu2EF VL1及びVL2)、並びにヒトアクセプターZ46622.1のアミノ酸配列のアラインメントである。配列の上の数字は、Kabatら(Kabat, Wuら、1991)による位置を示す。CDR配列は2EFCDR中で下線付きである。Z46622.1 VL中のCDR残基は、図面では省略されている。Hu2EF VL1及びVL2中の下線付き残基は、抗原結合部位の形成にとって重要であると予測され、対応するマウス残基はこれらの位置で保持された。

20

【図26】SpeI及びHindIII部位(下線付き)がフランキングするHu2EF VH4合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

【図27】SpeI及びHindIII部位(下線付き)がフランキングするHu2EF VH5合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

30

【図28】NheI及びEcoRI部位(下線付き)がフランキングするHu2EF VL1合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

【図29】精製された2EF、Hu2EF-4及びHu2EF-5抗体の抗原への結合-ELISAアッセイを示す図である。ELISAプレートを、0.1 µg/ウェルのヒトTrop-2-Fc融合タンパク質(rhTrop2)で被覆した。5 µg/mlから出発して、その後、連続2倍希釈した様々な濃度で、各抗体を試験した。グラフは、試験した各抗体濃度(X軸)に対する吸光度(Y軸)を示す。

【図30】Trop-2に対する2EF、Hu2EF-4及びHu2EF-5抗体の相対的親和性-ELISAアッセイを示す図である。ビオチン化マウス2EF抗体のrhTrop-2への結合を、様々な濃度の未標識競合抗体(マウス2EF、Hu2EF-4又はHu2EF-5)の存在下で分析した。グラフは、試験した各競合抗体濃度(X軸)に対する吸光度(Y軸)を示す。

40

【図31】天然の内因性Trop-2に対する2EF、Hu2EF-5及びHu2EF-7抗体の相対的親和性-フローサイトメトリー分析を示す図である。Trop-2について陽性であるヒト結腸がんCOL0205細胞を、単独で(太線)、又は2.7 µg(9X、左)若しくは8.1 µg(27X、右)の未標識2EF(灰色のプロファイル)、Hu2EF-5(中央)若しくはHu2EF-7(下)競合抗体と予め混合した、Alexa488にコンジュゲートされた2EF抗体(2EF-488)0.3 µgと共にインキュベートした。点線は非染色陰性対照に対応する。

【図32】2EF、Hu2EF-4及びHu2EF-5精製抗体の抗原への結合-ELISAアッセイを示す図である。ELISAプレートを、0.01 µg/ウェルのrhTrop-2で被覆した。1 µg/mlから出発して、

50

その後、連続2倍希釈した様々な濃度で、各抗体を試験した。グラフは、試験した各抗体濃度(X軸)に対する吸収値(Y軸)を示す。

【図33】SpeI及びHindIII部位(下線付き)がフランキングするHu2EF VH7合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

【図34】NheI及びEcoRI部位(下線付き)がフランキングするHu2EF VL2合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

【図35】Ch2EF及びHu2EF-7精製抗体の抗原への結合-ELISAアッセイを示す図である。ELISAプレートを、0.01 µg/ウェルのrhTrop-2で被覆した。1 µg/mlから出発して、その後、連続2倍希釈した様々な濃度で、各抗体を試験した。グラフは、試験した各抗体濃度(X軸)に対する吸収値(Y軸)を示す。

【図36】精製されたHu2EF-7抗体のSDS PAGE分析を示す図である。抗体(5 µg/レーン)を、還元条件下、4~20%勾配のポリアクリルアミドゲル(カタログ番号NP0335、Life Technologies社)上でのSDS PAGEにより分析し、SimplyBlue Safestain(カタログ番号LC5925、Life Technologies社)で染色した。レーン1、SeeBluePlus2 Prestained Standard(カタログ番号LC5925、Life Technologies社);レーン2、CHO-K1-Hu2EF-7 2A2.2細胞から精製されたHu2EF-7;レーン3、YB2/0-Hu2EF-7 2D3細胞から精製されたHu2EF-7。

【図37】天然のTrop-2に対する2EF及びHu2EF-7抗体の相対的親和性-フローサイトメトリ分析を示す図である。Trop-2について陽性であるヒト結腸がんCOLO205細胞を、CHO-K1又はYB2/0細胞から精製された増大する濃度の未標識Hu2EF-7と予め混合した、FITC標識2EF抗体と共にインキュベートした。グラフは、試験した各競合抗体濃度(X軸)に対する平均蛍光値(Y軸)を示す。

【図38】本発明によるヒト化モノクローナル抗体によるTrop-2の特異的認識-フローサイトメトリによる分析を示す図である。(A)Trop-2を発現するベクター(左パネル)又は空のベクター(右パネル)をトランスフェクトされたヒト転移性結腸がんKM12SM細胞を、ヒト化抗Trop-2モノクローナル抗体Hu2EF-7と共にインキュベートした。Alexa-488フルオロフォアにコンジュゲートされたヤギ抗ヒト抗血清(ヤギ抗ヒトIgG 488カタログ番号A11013、Life Technologies社、Carlsbad, CA)とのその後のインキュベーション(太線)は、Hu2EF-7のTrop-2との結合(左パネル)及びTrop-2の非存在下での染色の非存在(右パネル)を示す。非染色陰性対照(細線)は、比較のために示される。(B)Trop-2を発現するヒト結腸がんHT29細胞(左パネル)又は乳がんMCF-7細胞(右パネル)を、それぞれ、ヒト化Hu-2EF-7及びHu-2G10-6抗Trop-2モノクローナル抗体と共にインキュベートした。Trop-2との結合は、Alexa-488にコンジュゲートされたヤギ抗ヒト抗血清とのその後のインキュベーションによって示された(太線)。対照的に、抗マウス488抗血清(ヤギ抗マウスIgG 488カタログ番号A11029、Life Technologies社)(点線)は、ヒト化抗体に結合せず、蛍光シグナルを産生せず、したがって、非染色陰性対照(細線)である。

【図39】SpeI及びHindIII部位(下線付き)がフランキングするCh2G10 VH合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

【図40】NheI及びEcoRI部位(下線付き)がフランキングするCh2G10 VL合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(E)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

【図41】X65888.1における2G10 VHのヒト化を示す図である。マウス2G10 VH、2つの形態のヒト化2G10 VH(Hu2G10 VH1及びVH2)、並びにヒトアクセプター-X65888.1のアミノ酸配列のアラインメントである。配列の上の数字は、Kabatら(Kabat, Wuら、1991)による位置

10

20

30

40

50

を示す。CDR配列は2G10 VH中で下線付きである。X65888.1 VH中のCDR残基は、図面では省略されている。Hu2G10 VH1及びVH2中での下線付き残基は、抗原結合部位の形成にとって重要であると予測され、対応するマウス残基はこれらの位置で保持された。

【図4 2】AY043146.1における2G10 VLのヒト化を示す図である。マウス2G10 VL、3つの形態のヒト化2G10 VL(Hu2G10 VL1、VL2及びVL3)、並びにヒトアクセプターAY043146.1のアミノ酸配列のアラインメントである。CDR配列は2G10 VL中で下線付きである。AY043146.1 VL中のCDR残基は、図面では省略されている。Hu2G10 VL1、VL2及びVL3中での下線付き残基は、抗原結合部位の形成にとって重要であると予測され、対応するマウス残基はこれらの位置で保持された。

【図4 3】SpeI及びHindIII部位(下線付き)がフランキングするHu2G10 VH1合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

10

【図4 4】SpeI及びHindIII部位(下線付き)がフランキングするHu2G10 VH2合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VHのN末端アミノ酸残基(Q)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

【図4 5】NheI及びEcoRI部位(下線付き)がフランキングするHu2G10 VL1合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

20

【図4 6】NheI及びEcoRI部位(下線付き)がフランキングするHu2G10 VL2合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

【図4 7】NheI及びEcoRI部位(下線付き)がフランキングするHu2G10 VL3合成遺伝子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。シグナルペプチド配列は斜体である。成熟VLのN末端アミノ酸残基(D)は、二重下線付きである。CDR配列は、下線付きである。コード領域の3'のイントロン配列は斜体である。

【図4 8】精製されたキメラ及びヒト化2G10抗体のSDS PAGE分析を示す図である。抗体(7.5 µg/レーン)を、還元条件下、4~20%勾配のポリアクリルアミドゲル上でのSDS PAGEにより分析し、SimplyBlue Safestainで染色した。レーン1、Ch2G10;レーン2、Hu2G10-5;レーン3、Hu2G10-6、レーンM:SeeBluePlus2 Prestained Standard。

30

【図4 9】Ch2G10 G1重鎖のコード領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。星印「*」は終止コドンを示す。

【図5 0】Ch2G10 軽鎖のコード領域のヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。星印「*」は終止コドンを示す。

【図5 1】Trop-2に対する2G10、Ch2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体の相対的親和性-ELISAアッセイを示す図である。ビオチン化マウス2G10抗体のrhTrop-2への結合を、様々な濃度の未標識競合抗体(Ch2G10、Hu2G10-5又はHu2G10-6)の存在下で分析した。グラフは、試験した各競合抗体濃度(X軸)に対する吸収値(Y軸)を示す。IC50値を、GraphPad Prismを用いて算出した。

40

【図5 2】天然のトランスフェクトされたTrop-2に対する2G10、Ch2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体の相対的親和性-フローサイトメトリー分析を示す図である。Trop-2を安定にトランスフェクトされたマウスMTE 4-14(Naquet、Lepesantら、1989)を、示されるように、単独で(太線)、又は0.9 µg(3X、左)、2.7 µg(9X、中央)又は8.1 µg(27X、右)の未標識2G10競合抗体(灰色のプロファイル)と予め混合した、Alexa 488にコンジュゲートされた0.3 µgの2G10抗体(2G10-488)と共にインキュベートした。点線は、非染色陰性対照に対応する。

【図5 3】天然の内因性Trop-2に対する2G10、Ch2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体の相対

50

的親和性-フローサイトメトリー分析を示す図である。Trop-2について陽性であるヒト乳がんMCF7細胞を、示されるように、単独で(太線)、又は0.9 μg (3X、左)、2.7 μg (9X、中央)又は8.1 μg (27X、右)の未標識競合抗体(灰色のプロファイル)と予め混合した、Alexa 488にコンジュゲートされた0.3 μg の2G10抗体(2G10-488)と共にインキュベートした。点線は、非染色陰性対照に対応する。

【図5 4】Hu2EF-7がサルTrop-2に結合することを示す図である。示されるような異なるサル種に由来するTrop-2抗原を発現するフロー選別されたCOS-7トランスフェクタントを、Alexa-488で標識されたHu2EF-7 MAbで染色した。陰性対照モックトランスフェクト細胞に関する蛍光シグナルの非存在によって結合特異性を確認した(上パネル)。Alexa Fluor-488口バ抗ヤギ(DAG) IgGに関して示されたAF650抗Trop-2ポリクローナル抗体(pAb)(R&D社)を、陽性対照として用いた。

10

【図5 5】Hu2G10-5がサルTrop-2に結合することを示す図である。示されるような異なるサル種に由来するTrop-2抗原を発現するフロー選別されたCOS-7トランスフェクタントを、Alexa-488で標識されたHu2G10-5 MAbで染色した。陰性対照モックトランスフェクト細胞に関する蛍光シグナルの非存在によって結合特異性を確認した(上パネル)。Alexa -488で標識された口バ抗ヤギ(DAG)二次抗体に関して示されたAF650抗Trop-2 pAb(R&D社)を、陽性対照として用いた。

【図5 6】2EF MAbを用いて評価されたMCF-7細胞中でのTrop-2発現を示す図である。フローサイトメトリー分析である。染色を、Alexa-488で標識された2EF抗体を用いて実施した。

20

【図5 7】Hu2EF-7 MAbに対するADCC応答を示す図である。MCF-7標的細胞を、Hu2EF-7 MAbの連続希釈液と共にインキュベートした後、改変Jurkatエフェクター細胞(Promega社)を添加した。E:T比は6:1であった。37 °Cで17時間インキュベートした後、Bio-Glo(商標)ルシフェラーゼアッセイ試薬(Promega社)を添加し、照度計を用いて発光を決定した。それぞれのデータ点につき3回反復して実施した。データを、4パラメーターロジスティック(4PL)非線形回帰モデルに適合させて、用量応答曲線を取得し、GraphPad Prismソフトウェアを用いてEC₅₀を算出した。エラーバーは±SEMである。

【図5 8】2G10 MAbを用いて評価されたMCF-7細胞中でのTrop-2発現を示す図である。フローサイトメトリー分析である。染色を、Alexa-488で標識された2G10抗体を用いて実施した。

30

【図5 9】Hu2G10-5 MAbに対するADCC応答を示す図である。MCF-7標的細胞を、Hu2G10-5 MAbの連続希釈液と共にインキュベートした後、改変Jurkatエフェクター細胞を添加した。E:T比は3:1であった。37 °Cで17時間インキュベートした後、Bio-Glo(商標)ルシフェラーゼアッセイ試薬(Promega社)を添加し、照度計を用いて発光を決定した。それぞれのデータ点につき3回反復して実施した。データを、4パラメーターロジスティック(4PL)非線形回帰モデルに適合させて、用量応答曲線を取得し、GraphPad Prismソフトウェアを用いてEC₅₀を算出した。エラーバーは±SEMである。

【図6 0】in vivoでの効能を示す図である。マウス2G10 MAb又はヒト化Hu2G10-5 MAbを用いる処置による、既に増殖している腫瘍である確立されたDU-145前立腺がん細胞株の増殖の阻害を示す。無関係の特異性を有する抗体(抗dansyl:白四角)で処置された腫瘍は、点線に対応する。それぞれの動物に、週に1回、800 μg の精製抗体をIP注射した。垂直の矢印は、1回目の処置を示す。エラーバーは±SEMである。

40

【発明を実施するための形態】

【0106】

本発明において、「少なくとも80%の同一性」とは、同一性が、参照配列に少なくとも80%又は少なくとも85%又は90%又は95%又は100%の配列同一性を有し得ることを意味する。

【0107】

本発明において、「少なくとも50%相同」とは、相同性が、参照配列に少なくとも50%又は少なくとも60%又は70%又は80%又は90%又は95%又は100%の配列相同性を有し得ることを意味する。

50

【0108】

好ましくは、上記の抗体又はその断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲートは、モノクローナル抗体又はキメラ若しくはヒト化、又は脱免疫化若しくは完全ヒト抗体である。

【0109】

本発明による抗Trop-2モノクローナル抗体又はその断片、誘導体若しくはコンジュゲートをコードする核酸分子を、遺伝子合成又はPCR増幅等の当業界で公知の技術を用いて生成することができる。核酸分子を、当業界で公知の組換えDNA技術を用いて、発現ベクター中にクローニングすることができる。本発明による抗Trop-2モノクローナル抗体又はその誘導体若しくはコンジュゲートの発現のためのベクターを、例えば、トランスフェクションにより、宿主細胞株中に挿入することができる。トランスフェクションの方法は公知であり、トランスフェクションのためのキットは商業的供給源(例えば、Stratagene社、La Jolla, CA)から購入することができる。本発明によるヒト化抗Trop-2モノクローナル抗体又はその誘導体若しくはコンジュゲートを安定に発現するトランスフェクタントを、当業界で公知の技術に従って選択することができる。次いで、これらのトランスフェクタントの様々なクローンを単離、培養し、それぞれのクローンの発現レベル(上清中に分泌される抗体又は誘導体の量)を、当業界で公知の技術に従って定量することができる。一例は、既知量のフルオロフォア標識抗体又は誘導体の存在下での、抗原を発現する細胞への競合的結合である;例えば、当業界で公知に技術によるフローサイトメトリーによって測定される蛍光シグナルは、問題のクローンにより産生される抗体又は誘導体の量に反比例する。このように、当業者であれば、その後の使用、例えば、薬物の生産にとって十分な量で抗体又はその誘導体を安定に産生する細胞株を取得することができ、そのような細胞株の生産能力を定量的に検証することができる。

10

20

【0110】

本発明による抗Trop-2モノクローナル抗体又はその誘導体若しくはコンジュゲートを産生する細胞を、当業界で公知の培地及び培養条件で増殖させて、産生を最大化することができる。当業者であれば、本発明によるTrop-2モノクローナル抗体又はその誘導体若しくはコンジュゲートを、公知のプロセス、例えば、プロテインAの、カラム中又は膜上に配置することができる新しい合成材料への結合を用いて精製することができ、前記精製はバッチ式又は連続式である。製造、精製及びその後の分析的制御は、ヒトにおける使用のための医薬の開発、製造及び制御の間に満たさなければならない要件に従って、当業界で公知の「製造管理及び品質管理に関する基準」(GMP)に従って行うことができる。

30

【0111】

機能的断片、又は生物活性分子(例えば、毒素)との、若しくは放射性アイソトープ、蛍光染料、化学発光により検出することができる酵素とのコンジュゲート等の、本発明による抗Trop-2モノクローナル抗体の誘導体を、当業界で公知の化学的手順又は遺伝子操作手順を用いて取得することができる。

【0112】

本発明による抗Trop-2モノクローナル抗体及びその誘導体若しくはコンジュゲート、特に、放射性アイソトープ又は蛍光若しくは化学発光レーザーとのコンジュゲートを、当業界で公知の技術及び手順を用いる患者の画像診断において用いることができる。in vivoで標的に結合するコンジュゲート化抗体により生成されるシグナルは、抗原局在化の特異的指標であり、当業界で公知の断層撮影機器により示し、定量することができる。

40

【0113】

本発明を実現する別の方法は、治療目的での、組み合わせた、又は個別の、本発明による抗Trop-2モノクローナル抗体又はその誘導体若しくはコンジュゲートの、例えば、新生物疾患であるTrop-2と関連する状態を有する患者への投与からなる。前記投与は、当業界で公知の方法による、全身性、例えば、静脈内、又は局所領域、例えば、腹腔内、胸膜内、膀胱内、肝動脈内、若しくは病変内(腫瘍内)、又は医薬組成物を腫瘍の外科的切除によりできた空洞に直接的に入れる手術中であってもよい。特に、抗マウス抗体応答を惹起しない、本発明による抗Trop-2モノクローナル抗体又はその誘導体若しくはコンジュゲート

50

の性質のおかげで、当業界の専門家であれば、療法を、経時的に反復される、複数回投与によって実行することができる。

【0114】

本発明の抗体の調製のためのプロセスは、当業者の技術の範囲内にあり、抗体の発現のためのベクターをトランスフェクトされた宿主細胞を培養することと、標準的な手順に従って抗体を単離することを含む。

【0115】

本発明の工業的態様に関心がある限り、本明細書に開示される抗体は、当該技術分野で通常に行われるように医薬組成物中で好適に製剤化される。

【0116】

本発明の抗体は、4個以下のアミノ酸、好ましくは、2個以下のアミノ酸の、1個又は複数のアミノ酸置換、欠失又は挿入を含有する上記で定義された少なくとも1つのCDRHを含んでもよい。本発明の抗体は、4個以下のアミノ酸、好ましくは、2個以下のアミノ酸の、1個又は複数のアミノ酸置換、欠失又は挿入を含有する上記で定義された少なくとも1つのCDRLを更に含んでもよい。

【0117】

腫瘍又は転移を処置又は防止するための方法は、それを必要とする患者に、有効量の上記で記載された少なくとも1つのヒト化抗体、その断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲートを投与することを含む。いくつかの態様において、本発明は、対象における腫瘍又は転移を処置又は防止するための方法であって、それを必要とする対象に、抗がん剤と同時に、又は連続的に、有効量の本発明の少なくとも1つのヒト化抗体、その断片若しくは誘導体若しくはコンジュゲートを投与することを含む、方法を含む。

【0118】

本発明は、治療有効量の本明細書に開示される抗体、約4.5～約6.5の範囲のpHを維持するバッファー、場合により、界面活性剤を含む製剤を提供する。

【0119】

製剤は、典型的には、約0.1mg/ml～約100mg/mlの活性成分濃度として、本明細書に開示される抗体、本発明の断片、誘導体又はコンジュゲートのためのものである。ある特定の実施形態においては、抗体、その組換え又は合成抗原結合断片の濃度は、約0.1mg/ml～1mg/ml、好ましくは、1mg/ml～10mg/ml、好ましくは、10～100mg/mlである。

【0120】

本明細書における目的のために、「医薬組成物」は、哺乳動物、特に、ヒトへの投与のために適合され、好適であるものである。かくして、組成物を用いて、哺乳動物における疾患又は障害を処置することができる。更に、組成物中の抗体は、その治療的使用を妨げ得る夾雑物がそれから分離されるように、1つ又は複数の精製又は単離ステップにかけられている。一般に、医薬組成物は、治療抗体及び薬学的に許容される担体又は希釈剤を含む。組成物は、通常、滅菌されており、凍結乾燥してもよい。医薬調製物は、以下により詳細に記載される。

【0121】

抗体/複数の抗体の治療製剤を、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で、所望の精製度を有する抗体と、場合による生理的に許容される担体、賦形剤又は安定剤(Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A.編、1980)とを混合することにより調製することができる。許容される担体、賦形剤、又は安定剤は、用いられる用量及び濃度でレシピエントに対して非毒性的であり、バッファー、酸化防止剤、保存剤、ペプチド、タンパク質、親水性ポリマー、EDTA等のキレート化剤、糖、ナトリウム等の塩形成性対抗イオン、金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体)、及び/又はTWEEN(登録商標)、PLURONICS(登録商標)若しくはポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含んでもよい。

【0122】

活性成分を、例えば、液滴形成技術により、又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、コロイド薬物送達系(例えば、リボソーム、アルブミンミク

10

20

30

40

50

ロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョン中の、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル中に捕捉することもできる。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A. 編、1980に開示されている。in vivoでの投与に用いられる製剤は、滅菌されていなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【0123】

別の実施形態においては、疾患の防止又は処置のために、本発明の抗体、断片、誘導体又はコンジュゲートの適切な用量は、処置される疾患の型、疾患の重症度及び経過、抗体が防止又は治療目的で投与されるかどうか、以前の療法、患者の病歴及び抗体に対する応答、並びに主治医の裁量に依存するであろう。抗体は、一時に、又は一連の処置にわたって、患者に好適に投与される。疾患の型及び重症度に応じて、約1 µg/kg ~ 15mg/kgの抗体又はその断片は、例えば、1回又は複数の別々の投与によるにしろ、連続的注入によるにしろ、患者への投与のための初期候補用量である。状態に応じて、数日以上にわたる反復投与については、疾患症状の所望の抑制が起こるまで処置が持続される。しかしながら、他の用量レジメンも有用であり得る。この療法の進行は、従来技術及びアッセイによって容易にモニタリングされる。

【0124】

抗体組成物を、適正な医療行為と一致する様式で製剤化、投薬及び投与すべきである。本発明の抗体/誘導体を、任意の適切な経路によって投与することができる。これは、(限定されるものではないが)腹腔内、筋肉内、静脈内、皮下、関節内、気管内、経口、経腸、非経口、鼻内又は皮膚投与を含む。好ましい投与様式は、静脈内経路である。この文脈における考慮のための因子は、処置される特定の障害、処置される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール、及び医師には公知の他の因子を含む。投与される抗体の「治療有効量」は、そのような考慮によって管理され、疾患又は障害を防止する、改善する、又は処置するのに必要な最少量である。抗体は、問題の障害を防止又は処置するために現在用いられる1つ又は複数の薬剤と共に製剤化される必要はないが、場合によってはそれと共に製剤化される。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害又は処置の型、及び上記で考察された他の因子に依存する。

【0125】

本明細書における用語「抗体」は、最も広い意味で用いられ、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異的抗体(例えば、二特異的抗体)、及びそれらが所望の抗原結合活性を示す限り、抗体断片を含む、様々な抗体構造を包含する。本明細書における用語「抗体」は、その組換え又は合成抗原結合断片を含む。

【0126】

「抗体断片」とは、インタクト抗体が結合する抗原に結合するインタクト抗体の一部を含むインタクト抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアボディ、線状抗体、単鎖抗体分子(例えば、scFv)、及び抗体断片から形成される多特異的抗体が挙げられる。

【0127】

本発明の抗体と関連する用語「コンジュゲート」は、抗腫瘍活性及び/若しくは細胞殺傷活性を有する物質(化合物等)又は様々なA鎖毒素、リボソーム不活化タンパク質、及びリボヌクレアーゼ等の細胞傷害剤とコンジュゲートした抗体(又はその断片);腫瘍を殺傷するための細胞機構を誘導するように設計された二特異的抗体(例えば、米国特許第4,676,980号及び第4,954,617号を参照されたい)を含む。

【0128】

それぞれの上記の抗体分子と、抗腫瘍活性及び/若しくは細胞殺傷活性を有する上記の物質とを別々に予め調製した後、それらを組み合わせる(イムノコンジュゲート)か、又は抗腫瘍活性及び/若しくは細胞殺傷活性を有するそのような物質として用いられるタンバ

10

20

30

40

50

ク質毒素を、遺伝子組換え技術に従って遺伝子上の抗体遺伝子にライゲートして、それを単一のタンパク質(融合タンパク質)(抗毒素)として発現することができるようにすることにより、コンジュゲートを形成させることができる。

【0129】

抗腫瘍活性を有する物質の例としては、ドキシソルピシン、カリケアミシン、マイトマイシンC、オーリスタチンE及び放射性アイソトープ(RI)が挙げられる。細胞殺傷活性を有する物質の例としては、サポリン、リシン、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素及び放射性アイソトープ(RI)が挙げられる。勿論、サポリン及びシュードモナス外毒素が好ましく用いられる。抗体-薬物コンジュゲートを製造するための方法は、限定されない。例えば、ジスルフィド結合又はヒドラゾン結合によって抗体を薬物にカップリングする方法が適用される。本発明の上記の抗TROP-2抗体は、TROP-2を発現する標的腫瘍細胞中への内在化活性に関して優れている。かくして、抗腫瘍活性及び細胞殺傷活性を有する物質を、本発明の抗TROP-2抗体と予め組み合わせることにより、そのような物質は腫瘍細胞上で直接かつ高度に選択的に作用することができるようになる。

10

【0130】

本発明の文脈において、Trop-2の発現を、当業者には公知の任意の方法を用いて評価することができる。

【0131】

更に、本発明において、上記の抗体-薬物コンジュゲートはまた、上記の抗体断片が抗体の代わりに用いられる抗体断片-薬物コンジュゲートも含む。

20

【0132】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいて参照抗体のその抗原への結合を30%以上遮断し、逆に、参照抗体が、競合アッセイにおいて抗体のその抗原への結合を30%以上遮断する抗体を指す。用語「キメラ」抗体とは、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の供給源又は種に由来するが、重鎖及び/又は軽鎖の残りの部分が異なる供給源又は種に由来する抗体を指す。

【0133】

抗体の「クラス」とは、その重鎖が有する定常ドメイン又は定常領域の型を指す。抗体の5つの主要なクラス:IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMが存在し、これらのうちのいくつかを、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2に更に分割することができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、[アルファ]、[デルタ]、[エプシロン]、[ガンマ]、及び[ミュー]と呼ばれる。

30

【0134】

本明細書における用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために用いられる。この用語は、天然配列のFc領域及び変異体Fc領域を含む。本明細書で別途特定されない限り、Fc領域又は定常領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD、1991に記載された、EU指数とも呼ばれる、EU番号付けシステムによるものである。

【0135】

「フレームワーク」又は「FR」とは、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは一般に、4個のFRドメイン:FR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。したがって、HVR及びFR配列は一般に、VH(又はVL)中に以下の配列で出現する: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

40

【0136】

用語「完全長抗体」、「インタクト抗体」及び「全抗体」は、本明細書では互換的に用いられ、天然の抗体構造と実質的に類似する構造を有する、又は本明細書で定義されるFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指す。

【0137】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」は、互換的に用いられ、

50

外因性核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含む。宿主細胞は、一次形質転換細胞及び継代回数に関係なくそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含む。子孫は、親細胞と核酸含量において完全に同一でなくてもよいが、突然変異を含有してもよい。元の形質転換細胞においてスクリーニング又は選択されたのと同じ機能又は生物活性を有する突然変異子孫は、本明細書に含まれる。

【0138】

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞により産生される、又はヒト抗体レパトリー若しくは他のヒト抗体コード配列を用いる非ヒト供給源に由来する抗体のものと一致するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、厳密に言えば非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

10

【0139】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループに由来する。一般に、配列のサブグループは、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、NIH Publication 91-3242、Bethesda MD (1991)、vols. 1~3に記載のようなサブグループである。

【0140】

「ヒト化」抗体とは、非ヒトHVRに由来するアミノ酸残基と、ヒトFRに由来するアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。ある特定の実施形態においては、ヒト化抗体は、全て、又は実質的に全てのHVR(例えば、CDR)が非ヒト抗体のものに対応し、全て、又は実質的に全てのFRがヒト抗体のものに対応する、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含む。ヒト化抗体は、場合により、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。「ヒト化形態」の抗体、例えば、非ヒト抗体は、ヒト化を受けた抗体を指す。

20

【0141】

本発明の文脈において、「ヒト化」抗体はまた、例えば、上記で定義されたCh2EF又はCh2G10抗体としてのキメラ抗体も含む。

【0142】

「脱免疫化」抗体は、T細胞刺激のための根本的な要件である、HLA結合の破壊に基づいて免疫原性が低下した抗体である。

30

【0143】

本明細書で用いられる用語「超可変領域」又は「HVR」とは、配列が超可変性であり、及び/又は構造的に定義されるループ(「超可変ループ」)を形成する抗体可変ドメインのそれぞれの領域を指す。一般に、天然の4鎖抗体は、6個のHVRを含み、3個はVH中にあり(H1、H2、H3)、3個はVL中にある(L1、L2、L3)。HVRは一般に、超可変ループに由来するか、及び/又は「相補性決定領域」(CDR)に由来するアミノ酸残基を含み、後者は最も高い配列可変性を有するか、及び/又は抗原認識に関与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26~32(L1)、50~52(L2)、91~96(L3)、26~32(H1)、53~55(H2)、及び96~101(H3)に存在する(Chothia及びLesk、J. Mol. Biol. 196:901~917頁、1987)。例示的なCDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3)は、L1のアミノ酸残基24~34、L2の50~56、L3の89~97、H1の31~35B、H2の50~65、及びH3の95~102に存在する(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD、1991)。VH中のCDR1を除いて、CDRは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRはまた、抗原と接触する残基である、「特異性決定残基」又は「SDR」も含む。SDRは、短縮-CDR、又はa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含まれる。例示的なa-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、及びa-CDR-H3)は、L1のアミノ酸残基31~34、L2の50~55、L3の89~96、H1の31~35B、H2の50~58、及びH3の95~102に存在する(Almagro及びFransson、Front. Biosci. 13: 1619~1633頁、2008を参照されたい)。別途指摘されない限り、可変ドメイン中のHVR残基

40

50

及び他の残基(例えば、FR残基)は、本明細書ではKabatらに従って番号付けられる。

【0144】

本明細書で用いられる用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を含む個々の抗体は、同一であり、及び/又は例えば、天然に存在する突然変異を含有する、若しくはモノクローナル抗体調製物の産生の際に生じる、可能な変異体抗体を除いて、同じエピトープに結合し、そのような変異体は、一般に、少量で存在する。典型的には、異なる決定基(エピトープ)を指向する異なる抗体を含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物のそれぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を指向する。かくして、修飾語句「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の
10
の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体を、限定されるものではないが、ハイブリドーマ方法、組換えDNA方法、ファージディスプレイ方法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含有するトランスジェニック動物を用いる方法等の、様々な技術によって作製することができ、そのような方法及びモノクローナル抗体を作製するための他の例示的な方法は、本明細書に記載される。

【0145】

用語「添付文書」は、治療剤製品の使用に関する適応、使用、用量、投与、組合せ療法、禁忌及び/又は警告に関する情報を含む、そのような治療剤製品の商業的包装物に慣用的に含まれる指示書を指すために用いられる。
20

【0146】

本発明の文脈において、用語「有する」とは、からなる、有する、本質的に有する、又は含むと意図され得る。

【0147】

用語「%相同」は、ポリペプチドが参照ポリペプチド配列に関してある特定のパーセンテージ同一性を有すると意図され得る。

【0148】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」又は「パーセント同一性」は、配列を整列させ、必要に応じて、ギャップを導入して、最大のパーセント配列同一性を達成した後、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮せずに、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定するためのアラインメントを、当業界における技術の範囲内にある様々な方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegaAlign(DNASTAR)ソフトウェア等の公共的に利用可能なコンピューターソフトウェアを用いて達成することができる。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するのに必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列を整列させるための適切なパラメーターを決定することができる。
30

【0149】

用語「医薬製剤」とは、その中に含まれる活性成分の生物活性を有効にするための形態にあり、製剤が投与される対象にとって許容不能に毒性的である更なる成分を含有しない調製物を指す。
40

【0150】

「薬学的に許容される担体」とは、対象に対して非毒性的である、活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、限定されるものではないが、バッファー、賦形剤、安定剤、又は保存剤が挙げられる。

【0151】

本発明による腫瘍の診断のための方法は、本発明の上記の抗hTROP-2抗体を、生体から収集された試料(本明細書では以後、生物試料と呼ぶ)と反応させることと、反応した抗体のシグナルを検出することを含むことを特徴とする。

【0152】

10

20

30

40

50

本発明の抗TROP-2抗体を、生物試料と反応させた後、反応した抗体のシグナルを検出して、腫瘍を検出する。得られた抗体シグナルを、生物試料中の抗原の量の指標として用いることができる。本発明の抗体を用いる腫瘍の検出において、まず、試験標的として用いられる組織切片又は血液等の、対象に由来する分析物として収集された生物試料を、抗原-抗体反応により本発明の抗体に結合させる。続いて、結合した抗体の量の測定結果に基づいて、生物試料中に含有される目的の抗原の量を測定する。この測定を、公知のイムノアッセイ方法に従って実行することができる。例えば、免疫沈降方法、免疫凝集方法、ラジオイムノアッセイ、免疫比濁法、ウェスタンブロット方法、フローサイトメトリー等を用いることができる。ラジオイムノアッセイにおいては、標識された抗体が使用され、かくして、抗体シグナルは、直接検出される標識抗体の量として表される。さもなければ、濃度又は抗体力価が既知であった抗体を、標準溶液として使用し、かくして、標的抗体のシグナルを相対値として表すことができる。すなわち、標準溶液と分析物との両方を、測定装置を用いて測定することができ、基準として用いられる標準溶液の値と比較した値として表すことができる。そのようなラジオイムノアッセイの例としては、ELISA方法、EI方法、RIA方法、蛍光イムノアッセイ(FIA)、及び発光イムノアッセイが挙げられる。これらのうち、ELISA方法は、それが単純で高感度である点で特に好ましい。

10

20

30

40

50

【0153】

本発明において、腫瘍の状態を、指標として上記の検出方法によって得られた検出結果を用いて評価又は診断することができる。例えば、検出結果が適切な対照又は参照を超える場合、腫瘍の状態は腫瘍陽性と定義され、検出結果が適切な対照又は参照未満である場合、それは腫瘍陰性と定義される。本明細書で用いられる用語「腫瘍の状態」は、腫瘍の発達の存在若しくは非存在、又はその進行度を意味する。かくして、腫瘍の状態の特定例は、腫瘍の発達の存在又は非存在、その進行度、悪性腫瘍の程度、転移の存在又は非存在、及び再発の存在又は非存在を含む。

【0154】

上記の評価において、評価される腫瘍の状態として、ただ1つの状態を、上記の例から選択するか、又は複数の例を組み合わせ、選択してもよい。腫瘍の存在又は非存在を、得られた検出結果に基づいて、境界として用いられる所定の標準値を参照して、腫瘍が発達していたかどうかを決定することによって評価することができる。悪性腫瘍の程度は、がんの進行度を示す指標として用いられる。検出結果に基づいて、標的腫瘍をある特定の疾患ステージに分類し、それを評価することができる。そうでなければ、初期のがんと進行がんを、互いに区別した後、それらを実行することができる。例えば、指標としての検出結果を用いて、初期がん又は進行がんとして標的腫瘍を決定することもできる。腫瘍の転移を、指標としての検出結果を用いて、新生物が初期病変の位置から遠い部位に出現したかどうかを決定することによって評価することができる。検出結果が、中間ステージ又は寛解後に、再び所定の標準値を超えたかどうかを決定することにより、再発を評価することができる。

【0155】

本発明の抗TROP-2抗体を、腫瘍を検出又は診断するためのキットの形態で提供することができる。本発明のキットは、標識物質、抗体又は標識抗体が固定された固相試薬等、並びに上記の抗体を含んでもよい。抗体を標識する標識物質は、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、化学発光化合物等で標識された物質を意味する。本発明のキットはまた、上記の構成要素に加えて、本発明の検出を実行するために用いられる他の試薬を含んでもよい。例えば、そのような標識物質が酵素標識物質である場合、本発明のキットは、酵素基質(発色基質等)、酵素基質溶解溶液、酵素反応停止溶液、分析物のために用いられる希釈剤等を含んでもよい。更に、本発明のキットは、様々な型のバッファー、滅菌水、様々な型の細胞培養容器、様々な型のリアクター(Eppendorfチューブ等)、ブロッキング剤(ウシ血清アルブミン(BSA)、スキムミルク、又はヤギ血清等の血清成分)、洗浄剤、界面活性剤、様々な型のプレート、アジ化ナトリウム等の防腐剤、実験操作マニュアル(指示書)等をも含んでもよい。本発明のキットを有効に用いて、本発明の上記の検出方法を実行するこ

とができる。本発明のキットは、場合により、上記で定義された抗体の量又は抗体の量の増加を、対照試料に由来する値と比較するために用いることができる対照手段を含む。値を、例えば、正常な対象又は正常な集団に由来する、既知の標準を参照して得ることができる。

【0156】

患者に関する用語「試料」は、生物起源の血液及び他の液体試料、生検標本又は組織培養物若しくはそれに由来する細胞及びその子孫等の固体組織試料を包含する。この定義は、試薬を用いる処理、洗浄、又はがん細胞等のある特定の細胞集団に関する富化等による、その調達後に任意の方法で操作された試料も含む。この定義はまた、特定の型の分子、例えば、核酸、ポリペプチド等について富化された試料も含む。用語「生物試料」は、臨床試料を包含し、外科的切除により得られた組織、生検により得られた組織、培養物中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、組織試料、臓器、骨髄、血液、血漿、血清等も含む。

10

【0157】

上記で定義された「検出手段」は、好ましくは、少なくとも1つの抗体、その機能的アナログ若しくは誘導体、又は酵素基質である。前記抗体、その機能的アナログ又は誘導体は、前記抗体に特異的である。

【0158】

好ましい実施形態においては、本発明のキットは、

- 前記抗体に特異的な固相接着抗体、
- リガンド特異的抗体複合体の検出手段

20

を含む。

【0159】

本発明によるキットは、バッファー、担体、マーカー等の通常の補助剤、及び/又は使用のための指示書を更に含んでもよい。

【0160】

本発明により教示される抗体又はその誘導体を、アフィニティークロマトグラフィーによる抗体精製を可能にする配列、単一の残基又は合成分子(タグ)に融合することができる。用いられるタグを、検出分子若しくは指示薬(例えば、放射性アイソトープ若しくは蛍光タグ)又は検出可能な基質修飾を触媒することができる酵素タグとして、両方とも検査室における診断的使用及び画像化のために用いることができる。用いることができる診断技術は、例えば、光学、共焦点、多光子及び電子顕微鏡、ELISA、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、放射性免疫技術並びに他の同様のものである。

30

【0161】

本発明で定義される抗体を、*in vivo*での腫瘍画像化を含む、Trop-2を発現する新生物の検出のための組成物の調製のために用いることができる。抗Trop-2抗体を、放射性アイソトープ又は蛍光トレーサー、例えば、量子ドット又は有機発色団又は化学発光により検出することができる酵素に連結することができる。標識された抗Trop-2抗体を起源とするシグナルは、TAC/PET等の現在用いられている先進装備の原理に従って、スキャナー又は断層撮影機器により検出可能である。

40

【0162】

本明細書で用いられる場合、「処置」(及び「処置する」又は「処置すること」等のその文法的変化形)は、処置される個体の自然の経過を変化させる試みにおける臨床的介入を指し、予防のために、又は臨床病理の経過の間に実施することができる。処置の望ましい効果としては、限定されるものではないが、疾患の発生又は再発の防止、症状の軽減、疾患の任意の直接又は間接の病理学的帰結の縮小、転移の防止、疾患進行速度の低下、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善が挙げられる。いくつかの実施形態においては、本発明の抗体は、疾患の発達を遅延させるか、又は疾患の進行を減速させるために用いられる。

【0163】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」とは、抗体の抗原への結合に關与する抗体重鎖

50

又は軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン(それぞれ、VH及びVL)は一般に、類似する構造を有し、それぞれのドメインは、4個の保存されたフレームワーク領域(FR)と3個の超可変領域(HVR、例えば、Kindtら、Kuby Immunology、第6版、W.H. Freeman and Co.、91頁、2007を参照されたい)を含む。抗原結合特異性を付与するには、単一のVH又はVLドメインで十分であり得る。更に、特定の抗原に結合する抗体を、抗原に結合する抗体に由来するVH又はVLドメインを用いて単離して、それぞれ、相補的なVL又はVHドメインのライブラリーをスクリーニングすることができる(例えば、Portolanoら、J. Immunol. 150:880~887頁、1993; Clarksonら、Nature 352:624~628頁、1991を参照されたい)。

【0164】

本明細書で用いられる用語「ベクター」とは、それが連結される別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター並びにそれが導入された宿主細胞のゲノム中に組み込まれるベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが作動可能に連結される核酸の発現を指令することができる。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。

【0165】

別の態様において、抗体又はその誘導体は、配列番号14、22、24、26、18、32及び34の群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。

【0166】

別の態様において、抗体又はその誘導体は、配列番号16、28、30、20、36、38及び40の群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)配列を含む。

【0167】

ある特定の実施形態においては、前記配列番号14、22、24、26、18、32、34又は16、28、30、20、36、38若しくは40に少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVH配列又はVL配列は、参照配列と比較して置換(例えば、保存的置換)、挿入、又は欠失を含有するが、その配列を含む抗Trop-2抗体は、上記で定義されたTrop-2領域に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態においては、置換、挿入、又は、欠失は、HVRの外側の領域(すなわち、FR)中に存在する。

【0168】

ある特定の実施形態においては、本発明の抗体又はその断片は、1000nM未満、100nM未満、10nM未満、1nM未満、0.1nM未満、0.01nM未満、又は0.001nM未満又はそれ以下、例えば、 $10^{-6}M \sim 10^{-12}M$ の解離定数(Kd)を有する。

【0169】

一実施形態においては、Kdは、以下のアッセイにより記載されるようにFab型の目的の抗体及びその抗原を用いて実施される放射標識抗原結合アッセイ(RIA)によって測定される。抗原に対するFabの溶液結合親和性は、滴定系列の未標識抗原の存在下で、Fabを最小濃度の(1)標識抗原と平衡化させた後、結合した抗原を、抗Fab抗体被覆プレートで捕捉することによって測定される(例えば、Chenら、J. Mol. Biol. 293:865~881頁(1999)を参照されたい)。

【0170】

好ましくは、本発明の医薬組成物は、少なくとも別の治療剤を更に含み、好ましくは、他の治療剤は、抗腫瘍剤、抗疼痛剤、制吐剤(アプレピタント、ホスアプレピタント、ドラセトロン、グラニセトロン、オンダンセトロン、パロノセトロン、トロピセトロン、又はラモセトロン、デキサメタゾン等)の群から選択される。

【0171】

好ましくは、他の治療剤は、ATR阻害剤、DDR阻害剤、HR阻害剤、テロメアを特異的に標的化する分子、好ましくは、G-四重鎖相互作用分子、テロメアで特異的にDNA損傷生成を引き起こす分子からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0172】

抗腫瘍剤として用いられる組成物は、化学療法剤又は放射性薬剤等の、抗体の活性を増強するか、又は処置におけるその活性若しくは使用を補完する他の薬剤を更に含有してもよい。そのような更なる因子及び/又は薬剤を、組成物中に含有させて、抗体との相乗効果をもたらすか、又は副作用を最小化することができる。更に、本発明の組成物の投与を、他の療法と同時に投与する、例えば、化学療法又は放射線療法レジメンと共に投与することができる。本明細書に記載の抗体を、疾患の処置のために他の組成物及び手順と組み合わせて用いることができる。例えば、腫瘍を、オリゴヌクレオチド療法と組み合わせて、外科手術、放射線療法、化学療法、又は免疫療法で従来通り処置した後、抗体を患者に投与して、微小転移の休眠を延長し、残存する原発腫瘍の増殖を安定化及び阻害することができる。好ましくは、他の治療剤は、ATR阻害剤、DDR阻害剤、HR阻害剤、テロメアを特異的に標的化するか、及び/又はテロメアで特異的にDNA損傷生成を引き起こす分子、好ましくは、G-四重鎖相互作用分子からなる群から選択される。

10

【0173】

本発明において、ATR阻害剤は、ATRのキナーゼ活性を阻害することができる低分子化合物であり、限定されるものではないが、VE-821(Vertex Pharmaceuticals社)、VE-822(Vertex Pharmaceuticals社)、AZ20(AstraZeneca社)、AZD6738(AstraZeneca社)を含む(Flynnら、Science, 2015; Weber AM, Pharmacol Ther. 2015に記載されており、全ての参考文献が参照により組み込まれる)。

20

【0174】

DDR阻害剤は、DNA損傷応答(DDR)として知られる細胞プロセスを損なうか、又は阻害することができる任意の化合物又は実験手法であり、限定されるものではないが、カフェイン、ウォルトマンニン、KU-55933、KU-60019、KU-559403、シサンドリンB、NU6027、NVP-BE2235を含む(Begg AC, Nat Rev Cancer. 2011; Weber AM, Pharmacol Ther. 2015; Kelley MR, Future Oncol. 2014に記載されており、全ての参考文献が参照により組み込まれる)。

【0175】

HR阻害剤は、相同組換え(HR)によるDNA修復として知られる細胞プロセスを損なうか、又は阻害することができる任意の化合物又は実験手法であり、限定されるものではないが、イニパリブ(SAR240550、BSI-201; Sanofi-Aventis社)、オラパリブ(AZD2281、KU-0069436; AstraZeneca社)、ニラパリブ(Tesaro社)、ルカパリブ(CO-338、AG-014699、PF-01367338; Pfizer社)、ベリパリブ(ABT-888; Abbott社)、AZD2461(AstraZeneca社)、BMN673(BioMarin Pharmaceutical社)、CEP-9722(Cephalon社)、E7016(Esai社)、INO-1001(Inotek Pharmaceuticals社)、MK-4827(Merck社)、メトキシアミン(Sigma Aldrich社)、RI-1、IBR2、B02、ハレナキノンを含む(Kelley MR, Future Oncol. 2014、Ward A, Cancer Treat Rev. 2015、Feng FY, Mol Cell. 2015に記載されており、全ての参考文献が参照により組み込まれる)。

30

【0176】

テロメアを特異的に標識化するか、及び/又はテロメアでのDNA損傷生成を引き起こす分子は、テロメアDNA内でのDNA損傷並びに/又はDDRシグナリング及び/若しくはDNA修復の活性化若しくは阻害を誘導する、テロメアと特異的又は優先的に相互作用する任意の化合物又は実験手法であり、限定されるものではないが、G四重鎖結合リガンド(例えば、BRACO-19、テロメスタチン、RHPS4、クアルフロキシシン、TMPyP4、AS1410)、トポイソメラーゼ阻害剤、シスプラチン、ヒドロキシウレアを含む(Luら、Front. Med. 2013; Neidle FEBS J、2010; Muller及びRodriguez, Expert Rev Clin Pharmacol. 2014; Sissi及びPalumbo, Curr Pharm Des. 2014、Salvatiら、NAR、2015に記載されており、全ての参考文献が参照により組み込まれる)。

40

【0177】

本発明の抗体と組み合わせて用いることができる他の分子は、アビトレキサート(メトトレキサート注射液)、アブラキサン(パクリタキセル注射液)、アドセトリス(ブレンツキ

50

シマブドチン注射液)、アドリアマイシン(ドキシソルピシン)、アドルシル注射液(5-FU (フルオロウラシル))、アフィニトール(エベロリムス)、アフィニトールジスパーズ(エベロリムス)、アリムタ(PEMETREXED)、アルケラン注射液(メルファラン注射液)、アルケラン錠剤(メルファラン)、アレジア(パミドロナート)、アリミデックス(アナストロゾール)、アロマシン(エキセメスタン)、アラノン(ネララビン)、アルゼラ(オフアツムマブ注射液)、アバスチン(ベバシズマブ)、ベキサール(トシツモマブ)、BiCNU (カルムスチン)、ブレノキサ(ブレオマイシン)、ボスリフ(ボスチニブ)、ブスルフェックス注射液(ブスルファン注射液)、カンパト(アレムツズマブ)、カンプトサル(イリノテカン)、カプレルサ(パンデタニブ)、カソデックス(ピカルタミド)、CeeNU(ロムスチン)、CeeNU用量パック(ロムスチン)、セルピジン(ダウノルピシン)、クロラル(クロファラビン注射液)、コメトリク(カボザンチニブ)、コスメゲン(ダクチノマイシン)、CytosarU(シタラビン)、サイトキサン(サイトキサン)、サイトキサン注射液(シクロホスファミド注射液)、ダコゲン(デシタピン)、DaunoXome(ダウノルピシン脂質複合体注射液)、デカドロン(デキサメタゾン)、DepoCyt(シタラビン脂質複合体注射液)、デキサメタゾンインテンソル(デキサメタゾン)、デクスパクターパーパック(デキサメタゾン)、ドセフレズ(ドセタキセル)、ドキシル(ドキシソルピシン脂質複合体注射液)、ドロキシア(ヒドロキシウレア)、DTIC(デカルバジン)、エリガード(ロイプロリド)、エレンス(エレンス(エビルピシン))、エロキサチン(エロキサチン(オキサリプラチン))、エルスパール(アスパラギナーゼ)、Emcyt(エストラムスチン)、アービタックス(セツキシマブ)、エリベッジ(ビスモデギブ)、エルウィナゼ(エルウィニア・クリサンテミ(Erwinia chrysanthemii)アスパラギナーゼ)、エチオール(アミホスチン)、エトボホス(エトボシド注射液)、エウレキシ(フルタミド)、ファレストン(トレミフェン)、ファスロデックス(フルベストラント)、フェマラ(レトロゾール)、フィルマゴン(デガレリックス注射液)、フルダラ(フルダラビン)、フォレックス(メトトレキサート注射液)、フォロチン(プララトレキサート注射液)、FUDR(FUDR(フロクスウリジン))、ゲムザール(ゲムシタピン)、ギロトリフ(アファチニブ)、グリーベック(イマチニブメシレート)、グリアデルウェーハー(カルムスチンウェーハー)、ハラベン(エリ布林注射液)、ハーセプチン(トラスツズマブ)、ヘキサレン(アルトレタミン)、ハイカムチン(トポテカン)、ハイカムチン(トポテカン)、ヒドレア(ヒドロキシウレア)、イクルーシグ(ポナチニブ)、イダマイシンPFS(イダルピシン)、イフェックス(イホスファミド)、インリタ(アキシチニブ)、イントロンAアルファb(インターフェロンアルファ-2a)、イレッサ(ゲフィチニブ)、イストダックス(ロミデプシン注射液)、イキセムブラ(イキサベピロン注射液)、ジャカフィ(ルキシロチニブ)、ジェブタナ(カバジタキセル注射液)、カドシラ(アド-トラスツズマブエムタンシン)、キプロリス(カルフィルゾミブ)、ロイケラン(クロラムブシル)、ロイキン(サルグラモスチム)、ロイスタチン(クラドリピン)、ルプロン(ロイプロリド)、ルプロンデポー(ロイプロリド)、ルプロンデポーPED(ロイプロリド)、リソドレン(ミトタン)、マルキボキット(ピンクリスチン脂質複合体注射液)、マツラン(プロカルバジン)、メゲース(メゲストロール)、メキニスト(トラメチニブ)、メスネックス(メスナ)、メスネックス(メスナ注射液)、メタストロン(塩化ストロンチウム-89)、メキサート(メトトレキサート注射液)、ムスタルゲン(メクロレタミン)、ムタマイシン(マイトマイシン)、マイレラン(ブスルファン)、マイロターグ(ゲムツズマブオゾガマイシン)、ナベルピン(ビノレルピン)、ネオサル注射液(シクロホスファミド注射液)、ノイラスタ(フィルグラスチム)、ノイボゲン(フィルグラスチム)、ネキサパール(ソラフェニブ)、ニランドロン(ニランドロン(ニルタミド))、ナイペント(ペントスタチン)、ノルバデックス(タモキシフェン)、ノバントロン(ミトキサントロン)、オンカスパール(ペガスパルガーゼ)、オンコピン(ピンクリスチン)、オンタック(デニロイキンジフチトックス)、オンキソール(パクリタキセル注射液)、パンレチン(アリトレチノイン)、パラプラチン(カルボプラチン)、ペルジェタ(ペルツズマブ注射液)、プラチノール(シスプラチン)、プラチノール(シスプラチン注射液)、プラチノールAQ(シスプラチン)、プラチノールAQ(シスプラチン注射液)、ポマリスト(ポマリドミド)、プレドニゾンインテンソル(プレドニゾン)、プロロイキン(アルデスロイキン)、プリネトール(メルカプトプリン)、レクラスト(ゾ

10

20

30

40

50

レンドロン酸)、レプリミド(レナリドミド)、リユーマトレックス(メトトレキサート)、リツキサ(リツキシマブ)、ロフェロンAアルファa(インターフェロンアルファ-2a)、ルベックス(ドキシソルピシン)、サンドスタチン(オクトレオチド)、サンドスタチンLARデポ(オクトレオチド)、ソルタモックス(タモキシフェン)、スプリセル(ダサチニブ)、ステラブレド(ブレドニゾン)、ステラブレドDS(ブレドニゾン)、スチバルガ(レゴラフェニブ)、スプレリンLA(ヒストレリンインプラント)、ステント(スニチニブ)、シラトロン(ペギンテルフェロンアルファ-2b注射液(シラントロン))、シンリボ(オマセタキシン注射液)、タブロイド(チオグアニン)、タフリナル(ダブラフェニブ)、タルセバ(エルロチニブ)、タルグレチンカプセル(ベキサロテン)、タシグナ(デカルバジン)、タキソール(パクリタキセル注射液)、タキソテール(ドセタキセル)、テモダール(テモゾロミド)、テモダール(テモゾロミド注射液)、テパジナ(チオテパ)、サロミド(サリドマイド)、テラCys BCG(BCG)、チオプレックス(チオテパ)、TICE BCG(BCG)、トボサール(エトボシド注射液)、トリセル(テムシロリムス)、トレアンダ(ベンダムスチン塩酸塩)、トレルスター(トリプロレリン注射液)、トレキサール(メトトレキサート)、トリセノックス(三酸化ヒ素)、タイケルブ(ラパチニブ)、バルスター(バルルピシン膀胱内)、バンタス(ヒストレリンインプラント)、ベクチピックス(パニツムマブ)、ベルバン(ピンブラスチン)、ベルケード(ボルテゾミブ)、ベペシド(エトボシド)、ベペシド(エトボシド注射液)、ベサノイド(トレチノイン)、ビダザ(アザシチジン)、ピンカサールPFS(ピンクリスチン)、ピンクレックス(ピンクリスチン)、ボトリエント(パゾパニブ)、ブモン(テニボシド)、ウェルコボリンIV(ロイコボリン注射液)、キサルコリ(クリゾチニブ)、キセロダ(カペシタピン)、イクスタンジ(エンザルタミド)、ヤーボイ(イピリムマブ注射液)、ザルトラップ(Ziv-アフリベルセプト注射液)、ザノサール(ストレプトゾシン)、ゼルボラフ(ベムラフェニブ)、ゼバリン(イブリツモマブチウキセタン)、ゾラデックス(ゴセレリン)、ゾリンザ(ポリノスタット)、ゾメタ(ゾレドロン酸)、ゾルトレス(エベロリムス)、ザイティガ(アピラテロン)、ニモツズマブ並びに免疫チェックポイント阻害剤、例えば、ニボルマブ、ペムブロリズマブ/MK-3475、ピジリズマブ及びPD-1を標的化するAMP-224;並びにPD-L1を標的化するBMS-935559、MED 14736、MPDL3280A及びMSB0010718C並びにイピリムマブ等のCTLA-4を標的化するものである。

10

20

30

40

50

【0178】

放射線療法は、病気を処置するための、放射線、通常はX線の使用を意味する。X線は1895年に発見され、それ以来、放射線は診断及び調査(X線)並びに処置(放射線療法)のために医学において用いられてきた。放射線療法は、X線、コバルト照射、電子、及びより稀には、プロトン等の他の粒子を用いる、外部放射線療法として体外に由来するものであってもよい。また、それは、がんを処置するために放射性金属又は液体(アイソトープ)を用いる、内部放射線療法として体内に由来するものであってもよい。

【0179】

更なる態様は、相乗的又は相加的利益のために、本明細書に記載の抗体を、他の抗がん療法と組み合わせることを含む。

【0180】

組合せを用いる処置のスケジュールは、抗体が、上記で同定されたいずれかの「パートナー」治療剤と同時に、その前に、及び/又はその後投与されるかを予見することができる。

【0181】

組合せ療法を、進行した疾患ステージのために用いることができるが、将来的には、アジュバント及びネオアジュバント設定において用いることもできる。

【0182】

本発明はここで、限定されるものではないが、その好ましい実施形態のいくつかに従って、同封の図面を特に参照しながら、実証的であるが、限定的ではない目的で、実証及び例示によって詳細に開示される。

【実施例】

【 0 1 8 3 】

(実施例1)

材料及び方法

1. キメラ2EF IgG1/ 抗体の構築

7.5% CO₂ インキュベーター中、37 °C で20%ウシ胎児血清 (FBS;HyClone社、Logan、UT) を含有するRPMI-1640培地中で、マウス2EFハイブリドーマ細胞 (PD 08021、AID-ICLC Genoa社) を増殖させた。TRIzol 試薬 (Life Technologies社、Carlsbad、CA) を供給業者のプロトコールに従って用いて、約10⁷個のハイブリドーマ細胞から全RNAを抽出した。SMARTer RA CE cDNA Amplification Kit (Clontech社、Mountain View、CA) を供給業者のプロトコールに従って用いて、オリゴdTプライムcDNAを合成した。Phusion DNAポリメラーゼ (New Engl and Biolabs社、Beverly、MA) 及び以下のプライマー:

2EF VHのためのフォワードプライマー:

- SMARTer RACE cDNA Amplification Kit中に提供されるユニバーサルプライマー-Aミックス

- 2EF-H5: 5'-TACACCTTCACTAACTACTGG-3' (配列番号51)

2EF VHのためのリバースプライマー:

- 2EF-H3: 5'-CCCAGTTCCTCTGCACAG-3' (配列番号52)

- MCG2b: 5'-GCCAGTGGATAGACTGATGG-3' (配列番号53)

2EF VLのためのフォワードプライマー:

- SMARTer RACE cDNA Amplification Kit中に提供されるユニバーサルプライマー-Aミックス

- 2EF-L5: 5'-AGCCAAAGTGTCAGTACATC-3' (配列番号54)

2EF VLのためのリバースプライマー:

- JNT319: 5'-CTCCCTCTAACACTCATTCTGTTGAAGC-3' (配列番号55)

- 2EF-L3: 5'-GAATCTCCCGACTGTGCTG-3' (配列番号56)

を用いるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、VH及びVL cDNAを増幅した。

【 0 1 8 4 】

増幅されたVH及びVL cDNAを、NucleoSpin Extraction II Kit (Macherey-Nagel社、Bethlehem、PA) を用いてゲル精製し、配列決定のためにpCR4Blunt-TOPOベクター (Life Technologies社) 中にクローニングした。可変領域のDNA配列決定を、Tocore (Menlo Park、CA) で行った。いくつかの重鎖及び軽鎖クローンを配列決定し、典型的なマウス重鎖及び軽鎖可変領域と相同なユニークな配列を同定した。

【 0 1 8 5 】

2EF VHをコードする遺伝子を、コード領域の3'末端のスプライドナーシグナル、断片の5'末端にSpeI部位、及び断片の3'末端のHindIII部位を含むエクソンとして合成した (配列番号57、図20)。

【 0 1 8 6 】

同様に、2EF VLをコードする遺伝子を、コード領域の3'末端のスプライドナーシグナル、断片の5'末端のNheI部位、及び断片の3'末端のEcoRI部位を含むエクソンとして合成した (図58、図21)。2EF VH及びVLエクソンのスプライドナーシグナルは、それぞれ、マウス生殖系列JH3及びJ₂配列に由来するモノであった。2EF VH及びVL遺伝子の合成を、GenScript USA社 (Piscataway、NJ) により行った。

【 0 1 8 7 】

キメラ2EF IgG1/ 抗体 (Ch2EF) の産生のためのヒト₂及びG1定常領域を担持する哺乳動物発現ベクターのSpeIとHindIII部位の間 (VHについて) 又はNheIとEcoRI部位の間 (VLについて) に、合成した2EF VH及びVLエクソンをクローニングした。得られる発現ベクター-pCh2EFの構造の略図を、図22に示す。pCh2EFベクターは、哺乳動物細胞中での選択のための大腸菌 (*Escherichia coli*) gpt遺伝子を担持する。

【 0 1 8 8 】

2. 2EF抗体のヒト化の一般的スキーム

	10
	20
	30
	40
	50

ヒト化2EF VH及びVLアミノ酸配列の設計を、以下のように実行した。最初に、特異的に開発された手法を用いて、マウス2EF可変領域の三次元分子モデルを構築した。次に、CDR構造の形成にとって重要なフレームワークアミノ酸残基を、分子モデルを用いて同定した。同時に、それぞれ、2EF VH及びVLに対する高い相同性を有するcDNA由来ヒトVH及びVLアミノ酸配列を選択した。最後に、CDR構造を維持するのに重要なフレームワークアミノ酸残基と一緒にCDR配列を、2EF VH及びVLから、対応する選択されたヒトフレームワーク配列中に移植した。

【0189】

3. ヒト化2EF VH及びVLの設計

マウス2EF VHフレームワークと相同なヒトVH配列を、GenBankデータベース内で検索し、NCBI受託番号M17751.1を有するヒトcDNAによりコードされるVH配列を、ヒト化のためのアクセプターとして選択した。2EF VHのCDR配列(配列番号1~3)を、最初にM17751.1 VHの対応する位置に移した。次に、三次元モデルがCDRとの有意な接触を示唆した、フレームワーク48、68、70及び72位(番号付けは、シグナルペプチドの除去後、VH成熟型の最初のアミノ酸から始まる)で、ヒトアミノ酸残基を、対応するマウス残基により置換した。更に、VH-VL境界の適切な形成にとって重要であり、かくして、抗原結合部位の構造に影響すると判断される44位のアミノ酸残基を、マウス2EF VH中の対応する残基により置き換える。得られるヒト化VH、Hu2EF VH4のアミノ酸配列(配列番号22)を、2EF(配列番号14)及びM17751.1 VH配列と共に、図23に示す。

【0190】

Hu2EF VH4に加えて、別のヒト化VH(Hu2EF VH5)を、NCBI受託番号L02325.1を有するヒトcDNAによりコードされるVH配列を用いて設計した。2EF VHのCDR配列を、最初にL02325.1 VHの対応する位置に移した。次に、2EF可変領域の三次元モデルがCDRとの有意な接触を示唆した、フレームワーク48、68、70及び72位で、ヒトアミノ酸残基を、対応するマウス残基により置換した。得られるヒト化VH、Hu2EF VH5のアミノ酸配列(配列番号24)を、2EF及びL02325.1 VH配列と共に、図24に示す。

【0191】

2EF VLフレームワーク配列との相同性検索に基づいて、NCBI受託番号Z46622.1を有するcDNAによりコードされるヒトV_L領域を、ヒト化のためのアクセプターとして選択した。2EF VLのCDR配列(配列番号4~6)を、最初にZ46622.1 VLの対応する位置に移した。次に、CDRとの有意な接触を作ると示された53位で、Z46622.1中のヒトアミノ酸残基を、2EF VLの対応するマウス残基と置換した。得られるヒト化VL、Hu2EF VL1のアミノ酸配列(配列番号28)を、2EF及びZ46622.1 VL配列と共に、図25に示す。

【0192】

4. ヒト化2EF VH及びVL遺伝子の構築

ヒト化VH4-Hu2EF(配列番号59、図26)、VH5-Hu2EF(配列番号60、図27)及びVL1-Hu2EF(配列番号61、図28)配列のそれぞれをコードする遺伝子を、シグナルペプチド、スプライスドナーシグナル、及び哺乳動物発現ベクター中へのその後のクローニングのための適切な制限酵素部位を含むエクソンとして設計した。各遺伝子のシグナルペプチド配列及びスプライスドナーシグナルは、pCh2EF中の対応するマウス2EF VH又はVL遺伝子に由来するものであった。

【0193】

VL1-Hu2EF遺伝子を、GenScript USA社により合成した。GenScript USA社でのカスタム合成、次いで、クリプティックシグナル配列を除去するための部位特異的突然変異誘発を用いる改変により、VH4-Hu2EF及びVH5-Hu2EFを構築した。SpeI及びHindIII(VHについて)又はNheI及びEcoRI(VLについて)で消化した後、これらの遺伝子を、ヒト化IgG1/ の産生のための哺乳動物発現ベクター中の対応する部位にサブクローニングした(図22)。結果として、2つの発現ベクターが構築された。第1の発現ベクターであるpHu2EF-4は、IgG1/VH4-Hu2EF及びVL1-Hu2EFを含有する、ヒト化Hu2EF-4抗体を発現する。第2のベクターであるpHu2EF-5は、VH5-Hu2EF及びVL1-Hu2EFを含有する、ヒト化Hu2EF-5抗体を発現する。

【 0 1 9 4 】

5. Ch2EF、Hu2EF-4及びHu2EF-5を産生するNS0安定トランスフェクタントの生成

Ch2EF、Hu2EF-4及びHu2EF-5を安定に産生する細胞株を得るために、それぞれ、発現ベクター-pCh2EF、pHu2EF-4及びpHu2EF-5を、マウスミエローマ細胞株NS0(European Collection of Animal Cell Cultures、Salisbury、Wiltshire、UK)の染色体中に導入した。NS0細胞を、7.5%CO₂インキュベーター中、37℃で10%FBSを含有するDME培地中で増殖させた。NS0への安定なトランスフェクションを、エレクトロポレーションによって実行した。トランスフェクションの前に、それぞれの発現ベクターを、FspIを用いて線状化した。約10⁷個の細胞に、10%FBSを含有するDME培地中に懸濁した、20 µgの線状化プラスミドをトランスフェクトし、いくつかの96ウェルプレート中に播種した。48h後、選択培地(10%FBS及びHT培地添加物-Sigma-Aldrich、0.25mg/mlキサンチン及び1 µg/mlミコフェノール酸を含有するDME培地)を加えた。選択の開始の約10日後に、培養上清を、サンドイッチELISAにより抗体産生についてアッセイした。典型的な実験では、マイクロタイタープレート(カタログ番号655001、Greiner Bio One社、Monroe、NC)を、100 µl/ウェルのPBS中の1/2,000希釈されたヤギ抗ヒトIgG Fc 鎖特異的pAb(Sigma-Aldrich社、St.Louis、MO)を用いて4℃で終夜被覆し、洗浄バッファー(0.05%Tween 20を含有するPBS)で洗浄し、室温で0.5h、200 µl/ウェルのブロックバッファー(2%スキムミルク及び0.05%Tween 20を含有するPBS)でブロックした。洗浄バッファーで洗浄した後、ELISAバッファー(1%スキムミルク及び0.025%Tween 20を含有するPBS)中に適切に希釈された100 µl/ウェルの試験試料を、ELISAプレートに加えた。適切なヒト又はヒト化IgG1/ モノクローナル抗体を、標準として用いた。室温で1h、ELISAプレートをインキュベートし、洗浄バッファーで洗浄した後、結合した抗体を、100 µl/ウェルの1/2,000希釈されたHRPコンジュゲート化ヤギ抗ヒト 鎖pAb(SouthernBiotech社、Birmingham、AL)を用いて検出した。室温で0.5hインキュベートし、洗浄バッファーで洗浄した後、100 µl/ウェルのABTS基質(AMRESCO社、Solon、OH)を添加することにより発色を開始させ、100 µl/ウェルの2%シュウ酸を用いて停止させた。吸光度を405nmで読み取った。

【 0 1 9 5 】

高レベルのCh2EF(NS0-Ch2EF 1E7)、Hu2EF-4(NS0-Hu2EF-4 1B9)及びHu2EF-5(NS0-Hu2EF-5 1A11)を産生するNS0安定トランスフェクタントを、ハイブリドーマSFM(Life Technologies社)を用いて無血清培地中での増殖に適合させた。これらのNS0安定トランスフェクタントの凍結された細胞ストックを、BamBanker(カタログ番号302-14681、WAKO Chemicals USA社、Richmond、VA)中で作製し、液体窒素中で保存した。これらの3つのNS0安定トランスフェクタントを、PCR Mycoplasma Detection Set (Takara Bio USA社、Madison、WI)を用いて試験したところ、マイコプラズマの存在について陰性であることがわかった。

【 0 1 9 6 】

NS0-Ch2EF 1E7、NS0-Hu2EF-4 1B9及びNS0-Hu2EF-5 1A11細胞中で産生される重鎖及び軽鎖の真正性を、cDNA配列決定により確認した。TRIzol試薬(Life Technologies社)を用いて、細胞から全RNAを抽出し、ProtoScript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit(New England Biolabs社)を用いて、供給業者のプロトコールに従ってオリゴdTプライムcDNAを合成した。G1重鎖のコード領域を、プライマーとしてのCMV2及びJNT098並びにPhusion DNAポリメラーゼを用いるPCRにより増幅した。PCR断片をゲル精製し、プライマーとしてCMV2、JNT082、JNT097及びJNT098を用いる配列決定にかけた。プライマー配列は以下の通りである：

CMV2 5'-GAACCGTCAGATCGCCTGGAGAC-3' (配列番号62)
 JNT026 5'-TGAAAGATGAGCTGGAGGAC-3' (配列番号63)
 JNT082 5'-CTTTCTTGTCACCTTGGTG-3' (配列番号64)
 JNT097 5'-GCTGTCTACAGTCCTCA-3' (配列番号65)
 JNT098 5'-ACGTGCCAAGCATCCTC-3' (配列番号66)

【 0 1 9 7 】

同様に、軽鎖のコード領域を、CMV2及びJNT026を用いて増幅した。ゲル精製したDNA

断片を、プライマーとしてCMV2及びJNT026を用いる配列決定にかけた。Ch2EF、Hu2EF-4及びHu2EF-5のそれぞれのVH及びVLのコード領域の得られたヌクレオチド配列は、pCh2EF、pHu2EF-4又はpHu2EF-5ベクター中の対応する配列と完全に一致していた。

【0198】

6. マウス2EF、Ch2EF、Hu2EF-4及びHu2EF-5抗体の精製

マウス2EFハイブリドーマ、並びにNS0-Ch2EF 1E7、NS0-Hu2EF-4 1B9及びNS0-Hu2EF-5 1A11細胞を、回転ボトル中のHybridoma SFM中で約 10^6 個/mlの密度まで増殖させ、SFM4MAb培地(HyClone社)に溶解した1/10容量の60mg/mlのUltrafiltered Soy Hydrolysate (Irvin Scientific社、Santa Ana, CA)を供給し、細胞の生存能力が50%未満になるまで更に増殖させた。遠心分離及び濾過の後、各細胞株の培養上清を、プロテインAセファロースカラム(HiTrapMabSelectSuRe、GE Healthcare社、Piscataway, NJ)上にロードした。カラムをPBSで洗浄した後、抗体を0.1Mグリシン-HCl(pH3.0)で溶出させた。1M Tris-HCl(pH8)で中和した後、溶出した抗体のバッファーを、透析によってPBSに交換した。280nmでの吸光度を測定することにより、抗体濃度を決定した($1\text{mg/ml}=1.40\text{OD}$)。収量は、500mlの培養上清から出発して、マウス2EFについては12.9mg、Ch2EFについては1.95mg、Hu2EF-4については9.3mg及びHu2EF-5については8.8mgであった。

10

【0199】

精製されたCh2EFは、4 でPBS中での保存の間に沈降物を急速に形成した。この現象は、新しく精製されたCh2EFに関しても繰り返し観察された。マウス2EF、Hu2EF-4及びHu2EF-5については、沈降の兆候は認められなかった。したがって、Ch2EFは、ヒト化2EF抗体の抗原結合を試験するための対照として精製の直後にのみ使用できなかった。

20

【0200】

7. Hu2EF-4及びHu2EF-5の抗原結合

精製されたHu2EF-4及びHu2EF-5のTrop-2抗原への結合を、ELISAにより試験した。マウス2EFを対照として用いた。典型的な実験においては、マイクロタイタープレートを、0.2M炭酸ナトリウムバッファー(pH9.4)中の $100\mu\text{l}$ /ウェルの $1\mu\text{g/ml}$ 組換えヒトTrop-2-Fc融合タンパク質(rhTrop2;カタログ番号650-T2-100、R&D Systems社、Minneapolis, MN)を用いて4 で終夜被覆し、洗浄バッファーで洗浄し、 $200\mu\text{l}$ /ウェルのブロックバッファーを用いて室温で30minブロックした後、洗浄バッファーで洗浄した。ELISAバッファー中に適切に希釈された精製された試験抗体($5\mu\text{g/ml}$ から出発して連続2倍希釈)を、 $100\mu\text{l}$ /ウェルでウェルに加え、室温で60minインキュベートした。洗浄バッファーで洗浄した後、 $100\mu\text{l}$ /ウェルの1/2,000希釈されたHRPコンジュゲート化ヤギ抗ヒト鎖pAb(Hu2EF-4及びHu2EF-5について)又はヤギ抗マウス鎖pAb(マウス2EFについて)を用いて、結合した抗体を検出した。発色及び吸光度の読取りを、上記のように実行した。図29に示されるように、これらの条件下でのHu2EF-4及びHu2EF-5のTrop2への結合は、マウス2EFのものと同様であった。

30

【0201】

また、Hu2EF-4及びHu2EF-5のTrop-2への結合を、競合的ELISAにより分析した。マイクロタイタープレートを、上記のようにrhTrop2を用いて4 で終夜被覆した。次いで、ELISAバッファー中の亜飽和濃度(200ng/ml)のビオチン化マウス2EFと様々な濃度の精製競合抗体(マウス2EF、Hu2EF-4及びHu2EF-5; $2\mu\text{g/ml}$ から出発して連続2倍希釈)との混合物 $100\mu\text{l}$ /ウェルを、室温で60minのインキュベーションのために添加した。次いで、ELISAプレートを洗浄バッファーで洗浄し、ELISAバッファー中の $1\mu\text{g/ml}$ のストレプトアビジンコンジュゲート化HRP $100\mu\text{l}$ と共に30minインキュベートし、洗浄バッファーで洗浄した。発色及び吸光度の読取りを、上記のように実行した。予想外にも、図30に示されるように、比較した場合、Hu2EF-4とHu2EF-5は両方とも、Trop-2への結合についてマウス2EFとあまり競合しなかった(ヒト化抗体の競合的結合の曲線と、マウス2EF抗体の曲線とを比較されたい)。

40

【0202】

また、天然のTrop-2抗原に対するHu2EF-4及びHu2EF-5の相対的親和性を、表面Trop-2を

50

発現する生きた腫瘍細胞上でのフローサイトメトリーにより測定される *in vivo*での競合的結合により分析した。約 3×10^5 個のヒト結腸がんColo205細胞を、単独で、又は200 μ lのSMバッファ(10%FBS及び0.01%NaN₃を含むPBS)中の増加する量(2.7 μ g又は8.1 μ g、それぞれ、9X及び27X過剰)の未標識競合抗体と組み合わせて、0.3 μ g/mlのAlexa-488標識マウス2EF(2EF-488)と共にインキュベートした。4 で20min後、細胞を5mlのSMで洗浄し、0.5 μ g/mlのヨウ化プロピジウムを含む500 μ lのSM中に再懸濁して、死細胞を識別した。次いで、以前に記載のように(Alberti, Nutiniら、1994)、フローサイトメトリー(FACScalibur、FACScan、Becton Dickinson社、Sunnyvale、CA)により蛍光を分析した(図31)。また、この実験において、ヒト化Hu2EF-5抗体は、Trop-2に対する親和性の有意な喪失を示した(図31の上のパネルと中央のパネルを比較されたい)。Hu2EF-4抗体についても同様の結果が得られた。

10

【0203】

これらのデータは、Hu2EF-4及びHu2EF-5抗体を生成するヒト化手順が、予想されたものと違って、Trop-2抗原に対する親和性の有意な喪失を引き起こすことを示していた。

【0204】

ヒト化Hu2EF-4及びHu2EF-5抗体のTrop-2への結合を、100 μ l/ウェルのrhTrop2の0.1 μ g/ml溶液で被覆されたマイクロタイタープレートを用いるELISAによって更に分析した。他の全ての手順は、上記のように実行した。この実験では、Lipofectamine 2000方法(Life Technologies社)によりトランスフェクトされたヒト胚性腎臓細胞株HEK293中で一過的に発現されるCh2EF及びHu2EF抗体を用いた。図32に、Ch2EF及びHu2EF-5の結合の結果を示す。プレートをより少量の抗原(1 μ g/mlの代わりに0.1 μ g/mlのrhTrop2)で被覆した場合、Hu2EF-5はCh2EFよりも弱くTrop-2に結合した。

20

【0205】

8. ヒト化2EF抗体の改変

ヒト化Hu2EF-4及びHu2EF-5抗体について検出されたTrop-2に対する親和性の喪失は、最初の試験の過程において考慮されなかったアミノ酸残基及び構造決定基を含有させることによる、2EF可変領域の三次元モデルのより綿密な分析を求めた。これらの分析により、非標準的な位置のアミノ酸残基が抗原結合部位の構造に予想外に影響し得る可能性が示唆された。特に、これは、2EF抗体の成熟VH中の11、38、40及び43位並びに成熟VL中の4及び104位について示された。これらの位置のそれぞれについて、ヒトアクセプター配列のアミノ酸残基を、部位特異的突然変異誘発によって対応するマウス残基により置換した(概説については図23及び図25を参照されたい)。得られたヒト化Hu2EF変異体は、以下のアミノ酸置換のうちの1つを担持するVH及びVL遺伝子を有する：VH中の11位でのValからLeuへの置換(VH-V11L)、VH中の38位でのArgからLysへの置換(VH-R38K)、VH中の40位でのAlaからArgへの置換(VH-A40R)、VH中の43位でのGlnからHisへの置換(VH-Q43H)、VL中の4位でのMetからLeuへの置換(VL-M4L)、及びVL中の104位でのGlnからGlyへの置換(VL-Q104G)。これらのヒト化VH(又はVL)変異体のそれぞれを、哺乳動物発現ベクター中で、上記で詳述されたクローニング戦略を用いて、非改変ヒト化VL(又はVH)遺伝子と組み合わせた(図22)。

30

【0206】

得られた6個の発現ベクターを、上記のようにHEK293細胞中に個別にトランスフェクトし、各トランスフェクタントにより産生される抗体を精製した。これらの一過的に発現される抗体のTrop-2抗原結合を、100 μ lの0.1 μ g/ml rhTrop-2で被覆されたマイクロタイタープレートを用いるELISAにより、すなわち、標的抗原に対するその親和性に基づいてヒト化抗体を識別するために以前に用いられていた条件下で分析した。4つのHu2EF VH変異体のうち、VH-R38KのみがTrop-2結合を部分的に改善した。R38K突然変異を担持するHu2EF VHを、Hu2EF-VH7(配列番号25~26;図7及び図23)と命名した。ヒト化VL遺伝子に関して、VL-M4LとVL-Q104Gは両方とも、Trop-2結合をわずかに改善した。これらの2つの突然変異を、Hu2EF VL1中で組み合わせて、Hu2EF VL2(配列番号29~30;図9及び図25)を生成した。

40

【0207】

かくして、Hu2EF VH7(配列番号67;図33)及びVL2(配列番号68;図34)遺伝子を担持する新

50

しいベクター-pHu2EF-7(図22)が構築された。更に、pHu2EF-7中のgpt遺伝子を、pHu2EF-7-puroの生成のために哺乳動物細胞中でのピューロマイシンに対する耐性のためのピューロマイシンN-アセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子によって置き換えた。pHu2EF-7ベクターを、Hu2EF VH7及びVL2領域を担持するヒト化2EF IgG1/抗体(Hu2EF-7)の一過的発現のために、上記のLipofectamine 2000を用いてHEK293細胞中にトランスフェクトした。対照として、pCh2EFもHEK293細胞中に一過的にトランスフェクトした。培養上清中のCh2EF及びHu2EF-7抗体を、100 µlの0.1 µg/mlのrhTrop-2で被覆されたマイクロタイタープレートを用いるELISAによって抗原結合について試験した。Ch2EF及びHu2EF-7は、Trop-2に対する非常に類似する結合を示し(図35)、これは、Hu2EF-7がマウス2EF抗体の抗原結合親和性を保持することを示唆している。

10

【0208】

9. Hu2EF-7の発現及び精製

Hu2EF-7の更なる分析のために、pHu2EF-7-puroを用いて、チャイニーズハムスター卵巣細胞株CHO-K1(ATCC、Manassas、VA)の安定なトランスフェクタントを生成した。CHO-K1細胞を、7.5%CO₂インキュベーター中、37 °CにてSFM4CHO培地(HyClone社)中で増殖させた。CHO-K1中への安定なトランスフェクションを、エレクトロポレーションにより実行した。トランスフェクションの前に、pHu2EF-7-puroを、FspIを用いて線状化した。約2.5x10⁶個の細胞に、20 µgの線状化プラスミドをトランスフェクトし、SFM4CHO培地中に懸濁し、高い効率でHu2EF-7抗体を産生し得る単一のクローンを単離するために、細胞の適切な希釈後、いくつかの96ウェルプレート中に播種した。48h後、10 µg/mlのピューロマイシンを、安定なトランスフェクタントの単離のために添加した。

20

【0209】

選択の開始の約10日後、トランスフェクタントの培養上清を、抗体産生についてアッセイした。Hu2EF-7の発現を、上記のようなサンドイッチELISAによって測定した。この方法で、高レベルのHu2EF-7を産生することができるCHO-K1トランスフェクタント(CHO-K1-Hu2EF-7 2A2.2)を単離した。細胞生存能力が50%未満になるまで、このクローンをSFM4CHO中で増殖させた。次いで、上記のようなプロテインAカラムを用いて、培養上清からHu2EF-7を精製した。これらの条件では、500mlのCHO-K1-Hu2EF-7 2A2.2上清からのHu2EF-7の収量は12.3mgであった。

【0210】

また、Hu2EF-7を産生するラットミエローマ細胞株YB2/0(ATCC、Manassas、VA)の安定なトランスフェクタントを、pHu2EF-7を用いて生成した。YB2/0細胞へのpHu2EF-7のエレクトロポレーション及びミコフェノール酸培地中での細胞の選択を、セクション5に記載のように実行した。高レベルのHu2EF-7を産生するYB2/0安定トランスフェクタント(YB2/0-Hu2EF-7 2D3)を、回転式ボトル中、2%FBSを含有するハイブリドーマ-SFM中で増殖させ、供給培地を供給し、セクション5に記載のように更に培養した。プロテインAカラムクロマトグラフィーにより、Hu2EF-7を精製した。収量は、500mlの培養上清から4.0mgであった。

30

【0211】

精製されたHu2EF-7抗体を、標準的な手順に従ってSDS-PAGEにより特徴付けた。還元的条件下での分析により、これらの抗体のそれぞれが約50kDaの分子量を有する重鎖と、約25kDaの分子量を有する軽鎖とを含むことが示された(図36)。

40

【0212】

CHO-K1-Hu2EF-7 2A2.2及びYB2/0-Hu2EF-7 2D3細胞中で産生された重鎖及び軽鎖の真正性を、セクション5に記載のcDNA配列決定によって確認した。Hu2EF-7重鎖及び軽鎖のそれぞれのコード領域の得られたcDNA配列は、pHu2EF-7中の対応する配列と完全に一致していた(図15及び図16)。

【0213】

10. Trop-2への結合に関するHu2EF-7の特徴付け

Hu2EF-7抗体のTrop-2への結合を、フローサイトメトリーによって特徴付けた。第1の実験において、約3x10⁵個のヒト結腸がんColo205細胞を、セクション7に記載のように、0.3

50

μg/mlのAlexa-488標識マウス2EF(2EF-488)と共に、単独で、又は過剰量の未標識競合抗体と組み合わせてインキュベートした(図31)。

【0214】

第2の実験において、約 5×10^5 個のColo205細胞を、3 μg/mlのFITC標識マウス2EFと共に、単独で、又は200 μlのSMバッファー中、40 μg/mlから出発して連続3倍希釈した様々な濃度の未標識Hu2EF-7競合抗体(2つの異なる宿主中で産生された)と組み合わせて、4で30min、インキュベートした。次いで細胞をセクション7に記載のように処理して、フローサイトメトリーによって分析した。各濃度の競合抗体に関する平均蛍光値を、図37に示す。図31及び図37のデータから、ヒト化Hu2EF-7抗体が、マウス2EF抗体と同様の様式でTrop-2に結合することを見ることができ、かくして、ヒト化プロセスがマウス2EF抗体のTrop-2結合に対する親和性及び特異性を実質的に保持することを示している。抗体産生のためにpHu2EF-7-puro及びpHu2EF-7をトランスフェクトされた2つの細胞株は、同様の結果をもたらした。

10

【0215】

Trop-2又は陰性対照としての空のベクターをトランスフェクトしたヒト結腸がん転移性KM12SM細胞を標的として用いるフローサイトメトリーによるストリンジентな分析を用いてTrop-2認識の特異性を確認し、Hu2EF-7及びAlexa 488にコンジュゲートされたヤギ抗ヒト抗血清を用いて染色した(図38A)。Trop-2を発現する細胞は抗体により染色されるが、Trop-2を含まない同一の細胞は蛍光シグナルをもたらさない。また、ヒト化プロセスから予想されるように、Hu2EF-7抗体は、抗マウス抗血清によって認識されない(図38B、左)。

20

【0216】

かくして、本発明の手法は、単独での、又は本発明者らがヒト化プロセスを以下に記載する2G10由来抗体等の、標的分子の異なる領域を特異的に認識する別のヒト化抗体と組み合わせた、診断及び療法における使用のための、Trop-2抗原の特異的領域に高い親和性で結合することができるヒト化Hu2EF抗体の産生に成功した。

【0217】

11. キメラ2G10 IgG1/ 抗体の構築

マウス2G10ハイブリドーマ細胞(PD 08020、AID-ICLC Genoa社)を、7.5%CO₂インキュベーター中、37で20%ウシ胎児血清を含有するRPMI-1640培地中で増殖させた。2G10ハイブリドーマにより産生される抗体のVH及びVLのcDNAを、以下のプライマー：

30

2G10 VHのためのフォワードプライマー：

- SMARTer RACE cDNA Amplification Kit中に提供されるUniversal Primer A Mix及びNested Universal Primer A;

2G10 VHのためのリバースプライマー：

- MCG2A: 5'-GCCAGTGGATAGACCGATGG-3' (配列番号69);

2G10 VLのためのフォワードプライマー：

- SMARTer RACE cDNA Amplification Kit中に提供されるUniversal Primer A Mix;

- 2G10-L5: 5'-ACCAGCACTGATATTGATG-3' (配列番号70);

2F10 VLのためのリバースプライマー：

40

- JNT319: 5'-CTCCCTCTAACACTCATTCTGTTGAAGC-3' (配列番号55);

- 2G10-L3: CGTGTACGGCAAGTTATCAC (配列番号71)

を用いて、セクション1に記載のTRIzol試薬を用いて抽出された全RNAから合成した。

【0218】

増幅されたVH及びVLを、セクション1に記載のように配列決定した。

【0219】

鋳型としての2G10 VH cDNA及び以下のプライマー：

フォワード: 5'-GCAACTAGTACCACCATGGAATGGAAGTGGGTC-3' (配列番号73) (SpeI部位に下線を付す);

リバース: 5'-GGGAAGCTTGAGAGGCCATTCTTACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGT-3' (配列番号74) (Hin

50

dIII部位に下線を付す)

を用いるPCRにより、スプライドナーシグナルを含むエクソン(配列番号72;図39)として、2G10 VHをコードする遺伝子を生成した。

【0220】

同様に、鋳型としての2G10 VL cDNA及び以下のプライマー:

フォワード:5'-GCTGCTAGCACCACCATGTTCTCACTAGCTCTTCTCC-3' (配列番号76)(NheI部位に下線を付す);

リバース:5'-CGAGAATTCTTTGGATTCTACTTACGTTTGATTTCCAGCTTGGTC-3' (配列番号77)(EcoRI部位に下線を付す)

を用いるPCRにより、スプライドナーシグナルを含むエクソン(配列番号75;図40)として、2G10 VLをコードする遺伝子を生成した。

【0221】

2G10 VH及びVLエクソンのスプライドナーシグナルは、それぞれ、マウス生殖系列JH4及びJ 1配列に由来するものであった。PCR増幅された断片をゲル精製し、配列の確認のためにpCR4Blunt-TOPOベクター中にクローニングした。正確な断片をSpeI及びHindIII(VHについて)又はNheI及びEcoRI(VLについて)で消化し、ゲル精製し、キメラ2G10 IgG1/抗体(Ch2G10)の産生のためにヒトG1及び定常領域を担持する哺乳動物発現ベクター中にクローニングした。得られる発現ベクター-pCh2G10の構造の略図を、図22に示す。

【0222】

12. 2G10抗体ヒト化の一般的スキーム

ヒト化2G10 VH及びVLアミノ酸配列の設計を、以下のように実行した。第1に、マウス2G10可変領域の三次元分子モデルを、特異的に開発された手法を用いて構築した。次に、CDR構造の形成にとって重要なフレームワークアミノ酸残基を、分子モデルを用いて同定した。同時に、それぞれ、2G10 VH及びVLに対して高い相同性を有するヒトVH及びVLアミノ酸配列を選択した。最後に、CDR配列を、CDR構造を維持するのに重要なフレームワークアミノ酸残基と一緒に、2G10 VH及びVLから、対応する選択されたヒトフレームワーク配列中に移植した。

【0223】

13. ヒト化2G10 VH及びVL遺伝子の設計

2G10 VHフレームワークと相同なヒトVH配列を、GenBankデータベース内で検索し、NCBI受託番号X65888.1を有するヒトcDNAによりコードされるVH配列を、ヒト化のためのアクセプターとして選択した(X65888.1-VH)。最初に、2G10 VHのCDR配列(配列番号7~9)を、X65888.1-VHの対応する位置に移した。次に、2G10可変領域の三次元モデルがCDRとの有意な接触を示唆した、フレームワーク位置27、30、37、48、49、67、68、70及び72(成熟型の最初のアミノ酸からの番号付け)で、ヒトアミノ酸残基を対応するマウス残基で置換した。得られたヒト化アミノ酸配列Hu2G10 VH1(配列番号32)を、2G10及びX65888.1-VH配列と共に、図41に示す。

【0224】

マウス2G10 VH中の67位のLys及び68位のAlaは、両方ともCDRの近くに位置し、CDR構造の形成にとって重要であると予測されたが、ヒトアクセプター-X65888.1-VH中のアミノ酸残基は、67位のArg及び68位のVal(図41)であり、分子特性及び構造について対応するマウス残基と類似する。したがって、潜在的な免疫原性を更に低下させるために、ヒトアクセプターのアミノ酸残基が67位及び68位、すなわち、それぞれ、Arg及びValで維持される第2のヒト化VH(Hu2G10 VH2)を設計した(配列番号34;図41)。

【0225】

2G10 VLフレームワーク配列とのGenBank相同性検索に基づいて、NCBI受託番号AY043146.1を有するcDNAによりコードされるヒトV 領域を、ヒト化のためのアクセプターとして選択した。2G10 VLのCDR配列を、最初にAY043146.1 VL(配列番号10~12)の対応する位置に移した。次に、2G10可変領域の三次元モデルがCDRとの有意な接触を示した49位及び67位で、ヒトアミノ酸残基を、マウス2G10 VLの対応する残基で置換した。得られたヒト化H

10

20

30

40

50

u2G10 VL1のアミノ酸配列(配列番号36)を、2G10及びAY043146.1 VL配列と共に、図42に示す。

【0226】

マウス2G10 VL中の67位のTyrは、CDR構造の形成にとって重要であると予測されたが、2G10可変領域の三次元モデルの更なる分析により、67位のこのTyrを、抗原結合に影響することなく、ヒトアクセプターAY043146.1 VL中の対応する位置に位置する残基であるSerと置き換えることができるという可能性が示唆された。したがって、潜在的な免疫原性を更に低下させるために、ヒトアクセプター配列中の67位のSerが維持される、第2のヒト化VL(Hu2G10 VL2)を、Hu2G10 VL1から設計した。

【0227】

14. ヒト化2G10 VH及びVL遺伝子の構築

Hu2G10 VH1、VH2、VL1及びVL2のそれぞれをコードする遺伝子を、それぞれ、シグナルペプチド、スプライスドナーシグナル、及び哺乳動物発現ベクター中へのその後のクローニングのための適切な制限酵素部位を含むエクソンとして設計した(図22)。それぞれの遺伝子のシグナルペプチド配列及びスプライスドナーシグナルは、pCh2G10(配列番号72; 図39)中の対応するマウス2G10 VH又はVL遺伝子に由来するものであった。

【0228】

Hu2G10 VH1、VH2、VL1及びVL2遺伝子(配列番号78~81; 図43~46)を、GenScriptによって合成した。SpeI及びHindIII(VHについて)又はNheI及びEcoRI(VLについて)で消化した後、これらの遺伝子を、ヒトIgG1/ の産生のための哺乳動物発現ベクター中の対応する部位にサブクローニングした(図22)。結果として、4つの発現ベクターが構築された。第1の発現ベクターであるpHu2G10-1は、VH1及びVL1を含有するヒト化2G10 IgG1/ 抗体(Hu2G10-1)を発現する。第2のベクターであるpHu2G10-2は、VH1及びVL2を含有するヒト化2G10抗体(Hu2G10-2)を発現する。第3のベクターであるpHu2G10-3は、Hu2G10 VH2及びVL1を含有するヒト化2G10抗体(Hu2G10-3)を発現する。第4のベクターであるpHu2G10-4は、Hu2G10 VH2及びVL2を含有するヒト化2G10抗体(Hu2G10-4)を発現する。

【0229】

15. キメラ及びヒト化2G10 IgG1/ 抗体の一過的発現及び特徴付け

発現ベクターpCh2G10、pHu2G10-1、pHu2G10-2、pHu2G10-3及びpHu2G10-4を、製造業者のプロトコールに従ってLipofectamine 2000試薬を用いて、ヒト胚性腎細胞株HEK293中に個別にトランスフェクトした。

【0230】

一過的に発現された抗体の発現レベルを、セクション5に記載のサンドイッチELISAにより測定した。精製された抗体のTrop-2結合を、記載のようなELISAにより試験した。

【0231】

Hu2G10-1及びHu2G10-3のTrop-2への結合は、Ch2G10のものよりもわずかに弱かったが、Hu2G10-2及びHu2G10-4の結合はCh2G10のものよりも実質的に低く、抗原結合部位の適切な形成にとってのVL中の67位のアミノ酸残基の重要性を示している。したがって、ヒト化2G10 VL及び/又はVHの設計を改善しなければならないと結論付けることができた。

【0232】

16. 更なるヒト化2G10 VL遺伝子の設計

2EFヒト化の間には既に見られたように、親和性の有意な喪失を回避するために、1回目のヒト化の間には考慮されなかったアミノ酸残基及び構造決定基を考慮に入れる、2G10可変領域の三次元モデルの更に詳細な分析が必要であった。これらの分析により、2G10 VL中の非標準位置2、22、42、64、72及び85のアミノ酸残基が抗原結合部位の構造に影響し得ることが示唆された。Hu2G10 VL1中のこれらの位置のそれぞれにおいて、ヒトアミノ酸残基を、部位特異的突然変異誘発によって対応するマウス残基で置換した。得られた変異体Hu2G10 VL1遺伝子は、以下のアミノ酸置換のうちの1つを担持する：2位でのIleからThrへの置換(I2T)、22位でのThrからArgへの置換(T22R)、42位でのLysからGluへの置換(K42E)、64位でのGlyからSerへの置換(G64S)、72位でのThrからValへの置換(T72V)及び85位での

10

20

30

40

50

ThrからAspへの置換(T85D)。これらのVL変異体のそれぞれを、Hu2G10 VH1と共に発現させるために、pHu2G10-1中に導入した。

【0233】

得られた6つの発現ベクターを、pCh2G10及びpHu2G10-1と共に、上記のようにHEK293細胞中に一過的にトランスフェクトした。一過的に発現された抗体のTrop-2への結合を、上記のようなELISAによって分析した。6つのHu2G10 VL1変異体のうち、I2TのみがTrop-2結合を実質的に改善した。したがって、Hu2G10 VL3(配列番号40)と改名された、Hu2G10 VL1-I2T変異体を、更なる特徴付けのために選択した。Hu2G10 VL1、VL2及びVL3に関するアミノ酸配列のアラインメントを、図42に示す。

【0234】

Hu2G10 VH1及びVL3遺伝子を担持する発現ベクター(配列番号82; 図47)を、pHu2G10-5と命名し、対応する抗体をHu2G10-5と命名した。Hu2G10 VL3遺伝子もpHu2G10-3中に導入した; Hu2G10 VH2及びVL3遺伝子を発現する、この新しいベクターをpHu2G10-6と命名し、対応する抗体をHu2G10-6と命名した。

【0235】

17. Ch2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6を産生するNS0安定トランスフェクタントの生成
発現ベクターpCh2G10、pHu2G10-5及びpHu2G10-6を、セクション5に記載されたマウスミエローマNS0細胞中に安定にトランスフェクトした。選択の開始の約10日後、それぞれのトランスフェクタントの培養上清を、上記のサンドイッチELISAによって抗体産生についてアッセイした。

【0236】

高レベルの対応する抗体を産生する、NS0-Ch2G10 1A6、NS0-Hu2G10-5 B8及びNS0-Hu2G10-6 C9安定トランスフェクタントを、Hybridoma SFM(Life Technologies社)を用いて無血清培地中での増殖に適合させた。更に、高レベルのHu2G10-5を産生する別のNS0安定トランスフェクタント(NS0-Hu2G10 C10)を、Hybridoma SFMに適合させた。これらのNS0安定トランスフェクタントの凍結細胞ストックを、BamBanker中で作製し、液体窒素中で保存した。

【0237】

NS0-Hu2G10-5 B8及びNS0-Hu2G10-6 C9を、PCR Mycoplasma Detection Set (Takara Bio USA社、Madison、WI)を用いて試験したところ、マイコプラズマの存在について陰性であることがわかった。

【0238】

18. Ch2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6の精製

上記のように生成された安定なNS0トランスフェクタントを、セクション6に記載されたように、無血清培地中での対応する抗体の産生のために用いた。抗体を、記載のようなプロテインA上でのアフィニティクロマトグラフィーによって上清から精製した。収量は、Ch2G10については3.4mg(1,000mlから)、Hu2G10-5については1.9mg(500mlから)及びHu2G10-6については18.2mg(500mlから)であった。

【0239】

精製されたCh2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体を、標準的な手順にしたがってSDS-PAGEにより特徴付けた。還元的条件下での分析により、これらの抗体がそれぞれ、約50kDaの分子量を有する重鎖と、約25kDaの分子量を有する軽鎖とを含むことが示された(図48)。それぞれの抗体の純度は、SDS-PAGEから見積もられた場合、95%より高かった。

【0240】

19. 重鎖及び軽鎖mRNAの分析

NS0-Ch2G10 1A6、NS0-Hu2G10-5 B8及びNS0-Hu2G10-6 C9細胞中で産生された重鎖及び軽鎖の真正性を、セクション5に記載されたcDNA配列決定により確認した。Ch2G10、Hu2G10-5、Hu2G10-6重鎖及び軽鎖のそれぞれのコード領域の、かくして得られた配列は、pCh2G10(配列番号83~86; 図49~図50)、pHu2G10-5(配列番号45~48; 図17~図18)及びpHu2G10-6(配列番号47~50; 図18~図19)ベクター中の対応する配列と完全に一致していた。

10

20

30

40

50

【0241】

20. Trop-2への結合に関するHu2G10-5及びHu2G10-6の特徴付け

精製されたHu2G10-5及びHu2G10-6抗体のTrop-2への結合を、ELISAバッファー、100 µl/ウェル中の、マウス2G10抗体(0.25 µg/ml)及びCh2G10又はHu2G10-5又はHu2G10-6競合抗体(20 µg/mlから出発して連続2倍希釈)の混合物を用いて、セクション7に記載のような競合的ELISAによりCh2G10のものと2回比較した。4 で終夜インキュベートし、洗浄バッファーで洗浄した後、ELISAプレートを、室温で60min、ELISAバッファー中に1/2,000希釈された100 µl/ウェルのHRPコンジュゲート化ヤギ抗マウス 鎖抗体(SouthernBiotech社)と共にインキュベートし、洗浄バッファーで洗浄した。発色及び吸光度測定を、上記のように実行した。それぞれの競合抗体のIC₅₀値を、GraphPad Prism (GraphPad Software社、San Diego, CA)を用いて算出した。データを図51に提示し、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体はTrop-2への結合についてCh2G10と同様に競合することを示す。

10

【0242】

また、精製されたCh2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体のTrop-2への結合を、天然の表面Trop-2(内因性又はトランスフェクトされたもの)を発現する生細胞を用いるフローサイトメトリーにより特徴付けた。Trop-2をトランスフェクトされた約3x10⁵個のマウスMTE4-14細胞、又はTrop-2を発現するヒト乳がんMCF7細胞を、単独で、又は記載のような増加する量の未標識競合抗体と予め混合した、Alexa 488とコンジュゲートした0.3 µgのマウス2G10抗体と共にインキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、記載のようにフローサイトメトリーにより分析した。染色プロファイルを、図52及び図53に示す。

20

【0243】

これらの分析の結果は、Trop-2抗原へのCh2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体の結合が、2G10抗体のものと類似することを示している。これは、ヒト化プロセスがマウス2G10抗体の抗原に対する「親和性及び特異性」を大部分保持していたことを示す。更に、ヒト化プロセスから予想されるように、ヒト化抗体は、抗マウス抗血清によって認識されない(図38B、右；同様の結果はHu2G10-5についても得られた)。

【0244】

(実施例2)

サルTrop-2へのMAbの結合

材料及び方法

細胞

サル線維芽細胞COS-7細胞を、10%FBS及び1%P/Sを含むDMEM培地中、37 °C及び5%CO₂で増殖させた。製造業者の指示書に従ってLipofectamine 2000(Invitrogen社)を用いてトランスフェクションを実施した。COS-7安定トランスフェクタントを、400 µg/mlのG418を用いて12日間選択した。

30

【0245】

プラスミド

霊長類Trop-2配列を、Genbank(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)から回収した。タンパク質配列を、Glustal Omegaマルチアラインメントプログラム(www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)を用いて整列させた。カニクイザル(マカカ・ファシクラリス(*Macaca fascicularis*))、ヒヒ(アヌビスヒヒ(*Papio anubis*))及びマーモセット(カリトリックス・ジャックス(*Callithrix jacchus*))のTROP2のORFを、GenScript社によって合成し、HindIIIとKpnI部位の間でp₁₀ EYFP哺乳動物発現ベクター中に挿入した。p₁₀ EYFPベクター(CMVプロモーター)は、EYFPコード配列の除去によりpEYFP-N1(Clontech社)から誘導されたものであった。全ての合成構築物を、配列検証した。

40

【0246】

フローサイトメトリー免疫蛍光分析及び細胞選別

細胞の分析及び選別を、FACSCalibur又はFACSCanto II及びFACSAria IIIフローサイトメーター/細胞選別装置(BD Biosciences社)を用いて、記載のように(Alberti、Nutiniら、1994)実施した。Alexa-488標識されたMAbで染色されたトランスフェクタントの検出を

50

改善するために、細胞自己蛍光の差し引き及び赤チャンネル中のAlexa-488染色細胞の置換を、記載のように実施した(Alberti、Parksら、1987；Alberti、Bucciら、1991)。

【0247】

抗体

ヒト化Hu2EF-7及びHu2G10-5 MAb並びにヤギAF650抗Trop-2 pAb(R&D Systems社)を、フローサイトメトリー分析のために用いた。T16抗Trop-2 MAb(Alberti及びHerzenberg 1988；Alberti、Miottiら、1992)を、Trop-2発現細胞のフローサイトメトリー選別のために用いた。一過的トランスフェクタントに対する予備試験により、T16 MAb及びAF650 pAbによるサルTrop-2抗原の同等の認識が示された。抗体をAlexa Fluor 488に直接コンジュゲートしたか、又は二次Alexa Fluor-488ロバ抗ヤギ(DAG)IgG(Invitrogen社)を用いて示した。

10

【0248】

結果

カニクイザル(マカカ・ファシクラリス)、ヒヒ(アヌビスヒヒ)及びマーモセット(カリトリックス・ジャックス)のTrop-2のための哺乳動物発現ベクターを、サル線維芽細胞COS-7細胞株にトランスフェクトした。ヒトTrop-2を陽性対照として含有させた。空のベクターを陰性対照として用いた。COS-7安定トランスフェクタントを取得し、記載のようなフローサイトメトリーによって、より高レベルのTrop-2発現のために富化した。サルTrop-2抗原へのHu2EF-7及びHu2G10-5 MAbの結合を、標的としてCOS-7トランスフェクタントを用いるフローサイトメトリーにより試験した。Hu2EF-7とHu2G10は両方とも、高い効率でサルTrop-2抗原に結合することができた(図54、図55)。対照COS-7/空ベクターは、結合を示さなかった。

20

【0249】

(実施例3)

エフェクターとしてのヒト細胞に関する、in vitroでのADCC

材料及び方法

細胞

操作されたJurkat細胞(エフェクター細胞)を、ADCC Reporter Bioassay、Core Kit (カタログ番号G7010、Promega社)の一部として購入し、製造業者のプロトコールに従って用いた。

30

【0250】

MCF7乳がん細胞株(標的細胞)を、10%FBS及び1%P/Sを含むRPMI培地中、37℃及び5%CO₂で増殖させた。

【0251】

ADCCアッセイ

アッセイを、製造業者のプロトコールに従って実施した。簡単に述べると、MCF7標的細胞(12500個の細胞/ウェル)を、白色の平底96ウェルアッセイプレート(カタログ番号655001、Corning社)中、10%FBS及び1%P/Sを含む100 µlのRPMI培地中に播種した。次の日、4 µgの精製されたHu2EF-7又は37.6 µgの精製されたHu2G10-5を、200 µlのADCCアッセイバッファー(L-グルタミン、4%低IgG FBSを含む96%RPMI 1640)中に希釈した；この出発濃度から、5倍連続希釈液を、ADCCアッセイバッファー中で調製した。完全な用量応答曲線を得ることができるため、これらのMAb濃度を予備実験において選択した。培地をアッセイプレートから除去し、25 µlのそれぞれのMAb希釈液をアッセイプレートの異なるウェルに添加し、増加する連続希釈液を列毎に配置した。3つの非クラスター化されたレプリカウェルを、それぞれのMAb希釈液について配置した。1シリーズのウェルはMAbを受けなかった(陰性対照)。60個の内側ウェルのみを用いて、周辺効果を回避した。次いで、Jurkatエフェクター細胞を各ウェルに添加した(25 µlのADCCアッセイバッファー中、75,000個の細胞/ウェル；エフェクターと標的細胞の比E:T=6:1)。37℃、5%CO₂で17時間後、プレートをRTで平衡化させ、75 µlのBio-Glo Luciferase Assay Reagent(カタログ番号G7941、Promega社)を各ウェルに添加し、5min後、Veritasマイクロプレートルミノメーター(Turner Bios

40

50

systems社)中、0.5sの積分時間でプレートを読み取った。発光値を、 $\text{Log}_{10}[\text{MAB濃度}]$ に対してプロットした。データを4パラメーターロジスティック(4PL)非線形回帰モデルに適合させて、用量応答曲線を得て、EC50をGraphPad Prismソフトウェアを用いて算出した。

【0252】

結果

ヒト化Hu2EF-7及びHu2G10-5 MAbのADCCを、エフェクター細胞としての、V158(高親和性)Fc R111a受容体及び蛍ルシフェラーゼの上流のNFAT応答エレメントを安定に発現するJurkat細胞を用いて測定した。ADCCは、ルシフェラーゼリポーター遺伝子の発現と共にNFAT経路の活性化を引き起こす；ルシフェラーゼ活性は、発光アッセイによって定量される。MCF7乳がん細胞を、標的細胞として用いた。MCF7は、対応する原発性ヒトがんにおいて観察される平均と一致するレベルでTrop-2を内因的に発現する(図55、図57)。異なる量の精製されたMAbを、白色96ウェルアッセイプレート中のMCF7標的細胞の単層に添加した(データ点のための3つの複製)。次いで、操作されたJurkatエフェクター細胞を、6:1のエフェクター細胞と標的細胞の比で添加した。ルシフェラーゼ発現を17時間後に定量した。発光値をMAb濃度に対してプロットし、完全な用量応答曲線を得た(図56、図58)。これらのアッセイ条件下でのHu2EF-MAbに関するEC50は52ng/ml(40~68ng/ml、95%信頼区間)であり、かくして、広く用いられている抗がん治療剤MABと同等であった。比較として、これらの同じアッセイ条件下でのMAb治療剤について報告された代表的なEC50は、トラスツズマブ/SK-BR-3標的細胞については10.0ng/ml、セツキシマブ/A431標的細胞については15.6ng/mlである。これらのアッセイ条件下でのHu2G10-5 MAbに関するEC50は、4.15 $\mu\text{g/ml}$ (2.96~5.83 $\mu\text{g/ml}$ 、95%信頼区間)であり、2つのヒト化抗Trop-2 MABは、標的細胞に対するADCC応答を惹起するその能力において大きく異なり、Hu2EF-7がHu2G10-5よりもはるかにより有効であることを示している。

10

20

【0253】

(実施例4)

ヒト化Hu2G10-5 MAbのin vivoでの抗腫瘍効能

Hu2G10-5 MABの腫瘍増殖阻害における効能を、マウス2G10のものと比較して、前立腺がんDU-145細胞(図60)上でアッセイした。

【0254】

腫瘍細胞株を、ヌードマウスに皮下的に注入した。マウスを、800 μg (合計)の示されたmAbで、週1回、既に増殖している(確立された)腫瘍から始めて、i.p.処置した。矢印は処置の開始を示す。

30

【0255】

ヒト化抗体は、in vivoで完全な抗腫瘍効能を保持する。

【0256】

(参考文献)

- Afif, W., E. V. Loftus, Jr., et al. (2010). "Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease." Am J Gastroenterol**105**(5): 1133-9.
- Alberti, S., C. Bucci, et al. (1991). "Immunofluorescence analysis in flow cytometry: better selection of antibody-labeled cells after fluorescence overcompensation in the red channel." J. Histochem. Cytochem.**39**(5): 701-6.
- Alberti, S. and L. A. Herzenberg (1988). "DNA methylation prevents transfection of genes for specific surface antigens." Proc. Natl. Acad. Sci. USA**85**: 8391-4. 10
- Alberti, S., S. Miotti, et al. (1992). "Biochemical characterization of Trop-2, a cell surface molecule expressed by human carcinomas: formal proof that the monoclonal antibodies T16 and MOv-16 recognize Trop-2." Hybridoma**11**: 539-5.
- Alberti, S., M. Nutini, et al. (1994). "DNA methylation prevents the amplification of TROP1, a tumor associated cell surface antigen gene." Proc. Natl. Acad. Sci. USA**91**: 5833-7. 20
- Alberti, S., D. R. Parks, et al. (1987). "A single laser method for subtraction of cell autofluorescence in flow cytometry." Cytometry**8**: 114-9.
- Ali, Z., A. L. Aloisi, et al. (2013). "Trop-2 recruits ADAM10 to signaling platforms as an activatory switch for cancer growth." submitted.
- Ambrogio, F., M. Fornili, et al. (2014). "Trop-2 is a determinant of breast cancer survival." PLoS One**9**(5): e96993.
- Basu, A., D. M. Goldenberg, et al. (1995). "The epithelial/carcinoma antigen EGP-1, recognized by monoclonal antibody RS7-3G11, is phosphorylated on serine 303." Int J Cancer**62**(4): 472-9. 30
- Bignotti, E., P. Todeschini, et al. (2010). "Trop-2 overexpression as an independent marker for poor overall survival in ovarian carcinoma patients." Eur J Cancer**46**(5): 944-53.
- Bosco, J. L., S. Antonsen, et al. (2011). "Metformin and incident breast cancer among diabetic women: a population-based case-control study in Denmark." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**20**(1): 101-11.
- Calabrese, G., C. Crescenzi, et al. (2001). "Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization." Cytogenet. Cell Genet.**92**(1-2): 164-5. 40
- Cicarelli, F., A. Acciarito, et al. (2000). "Large and diverse numbers of human diseases with HIKE mutations." Hum. Mol. Genet.**9**: 1001-7.

- Fang, Y. J., Z. H. Lu, et al. (2009). "Elevated expressions of MMP7, TROP2, and survivin are associated with survival, disease recurrence, and liver metastasis of colon cancer." *Int J Colorectal Dis***24**(8): 875-84.
- Fong, D., P. Moser, et al. (2008). "High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer." *Br J Cancer***99**(8): 1290-5.
- Fornaro, M., R. Dell'Arciprete, et al. (1995). "Cloning of the gene encoding TROP-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas." *Int. J. Cancer***62**: 610-8. 10
- Fradet, Y., C. Cordon-Cardo, et al. (1984). "Cell-surface antigens of human bladder cancer defined by mouse monoclonal antibodies." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA***81**: 224-228.
- Guerra, E., M. Trerotola, et al. (2013). "The Trop-2 signalling network in cancer growth." *Oncogene***32**: 1594-1600.
- Jiang, A., X. Gao, et al. (2013). "Expression and clinical significance of the Trop-2 gene in advanced non-small cell lung carcinoma." *Oncol Lett***6**(2): 375-380. 20
- Kabat, E. A., T. T. Wu, et al. (1991). *Sequences of Proteins of Immunological Interests*, Diane Pub Co.
- Khazaeli, M. B., R. M. Conry, et al. (1994). "Human immune response to monoclonal antibodies." *J Immunother Emphasis Tumor Immunol***15**(1): 42-52.
- Linnenbach, A. J., B. A. Seng, et al. (1993). "Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes." *Mol. Cell. Biol.***13**: 1507-1515.
- Liu, A. Y., R. R. Robinson, et al. (1987). "Production of a mouse-human chimeric monoclonal antibody to CD20 with potent Fc-dependent biologic activity." *J Immunol***139**(10): 3521-6. 30
- Morrison, S. L., M. J. Johnson, et al. (1984). "Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains." *Proc Natl Acad Sci U S A***81**(21): 6851-5.
- Muhlmann, G., G. Spizzo, et al. (2009). "TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma." *J Clin Pathol***62**(2): 152-8.
- Naquet, P., H. Lepesant, et al. (1989). "Establishment and characterization of mouse thymic epithelial cell lines." *Thymus***13**(3-4): 217-26. 40
- Ohmachi, T., F. Tanaka, et al. (2006). "Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer." *Clin Cancer Res***12**(10): 3057-63.
- Pauli, C., M. Munz, et al. (2003). "Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas." *Cancer Lett***193**(1): 25-32.

【 0 2 5 7 】

配列番号1は、2EF抗体の第1の重鎖CDR(CDRH1)のアミノ酸配列である。

配列番号2は、2EF抗体の第2の重鎖CDR(CDRH2)のアミノ酸配列である。

- 配列番号3は、2EF抗体の第3の重鎖CDR(CDRH3)のアミノ酸配列である。
- 配列番号4は、2EF抗体の第1の軽鎖CDR(CDRL1)のアミノ酸配列である。
- 配列番号5は、2EF抗体の第2の軽鎖CDR(CDRL2)のアミノ酸配列である。
- 配列番号6は、2EF抗体の第3の軽鎖CDR(CDRL3)のアミノ酸配列である。
- 配列番号7は、2G10抗体の第1の重鎖CDR(CDRH1)のアミノ酸配列である。
- 配列番号8は、2G10抗体の第2の重鎖CDR(CDRH2)のアミノ酸配列である。
- 配列番号9は、2G10抗体の第3の重鎖CDR(CDRH3)のアミノ酸配列である。
- 配列番号10は、2G10抗体の第1の軽鎖CDR(CDRL1)のアミノ酸配列である。
- 配列番号11は、2G10抗体の第2の軽鎖CDR(CDRL2)のアミノ酸配列である。
- 配列番号12は、2G10抗体の第3の軽鎖CDR(CDRL3)のアミノ酸配列である。 10
- 配列番号13は、キメラCh2EF抗体のVHのヌクレオチド配列である。
- 配列番号14は、キメラCh2EF抗体のVHのアミノ酸配列である。
- 配列番号15は、キメラCh2EF抗体のVLのヌクレオチド配列である。
- 配列番号16は、キメラCh2EF抗体のVLのアミノ酸配列である。
- 配列番号17は、キメラCh2G10抗体のVHのヌクレオチド配列である。
- 配列番号18は、キメラCh2G10抗体のVHのアミノ酸配列である。
- 配列番号19は、キメラCh2G10抗体のVLのヌクレオチド配列である。
- 配列番号20は、キメラCh2G10抗体のVLのアミノ酸配列である。
- 配列番号21は、ヒト化Hu2EF抗体のVHバージョン4(VH4)のヌクレオチド配列である。
- 配列番号22は、ヒト化Hu2EF抗体のVHバージョン4(VH4)のアミノ酸配列である。 20
- 配列番号23は、ヒト化Hu2EF抗体のVHバージョン5(VH5)のヌクレオチド配列である。
- 配列番号24は、ヒト化Hu2EF抗体のVHバージョン5(VH5)のアミノ酸配列である。
- 配列番号25は、ヒト化Hu2EF抗体のVHバージョン7(VH7)のヌクレオチド配列である。
- 配列番号26は、ヒト化Hu2EF抗体のVHバージョン7(VH7)のアミノ酸配列である。
- 配列番号27は、ヒト化Hu2EF抗体のVLバージョン1(VL1)のヌクレオチド配列である。
- 配列番号28は、ヒト化Hu2EF抗体のVLバージョン1(VL1)のアミノ酸配列である。
- 配列番号29は、ヒト化Hu2EF抗体のVLバージョン2(VL2)のヌクレオチド配列である。
- 配列番号30は、ヒト化Hu2EF抗体のVLバージョン2(VL2)のアミノ酸配列である。
- 配列番号31は、ヒト化Hu2G10抗体のVHバージョン1(VH1)のヌクレオチド配列である。
- 配列番号32は、ヒト化Hu2G10抗体のVHバージョン1(VH1)のアミノ酸配列である。 30
- 配列番号33は、ヒト化Hu2G10抗体のVHバージョン2(VH2)のヌクレオチド配列である。
- 配列番号34は、ヒト化Hu2G10抗体のVHバージョン2(VH2)のアミノ酸配列である。
- 配列番号35は、ヒト化Hu2G10抗体のVLバージョン1(VL1)のヌクレオチド配列である。
- 配列番号36は、ヒト化Hu2G10抗体のVLバージョン1(VL1)のアミノ酸配列である。
- 配列番号37は、ヒト化Hu2G10抗体のVLバージョン2(VL2)のヌクレオチド配列である。
- 配列番号38は、ヒト化Hu2G10抗体のVLバージョン2(VL2)のアミノ酸配列である。
- 配列番号39は、ヒト化Hu2G10抗体のVLバージョン3(VL3)のヌクレオチド配列である。
- 配列番号40は、ヒト化Hu2G10抗体のVLバージョン3(VL3)のアミノ酸配列である。
- 配列番号41は、ヒト化Hu2EF-7抗体のガンマ-1重鎖のコード領域のヌクレオチド配列である。 40
- 配列番号42は、ヒト化Hu2EF-7抗体のガンマ-1重鎖のアミノ酸配列である。
- 配列番号43は、ヒト化Hu2EF-7抗体のカッパ軽鎖のコード領域のヌクレオチド配列である。
- 配列番号44は、ヒト化Hu2EF-7抗体のカッパ軽鎖のアミノ酸配列である。
- 配列番号45は、ヒト化Hu2G10-5抗体のガンマ-1重鎖のコード領域のヌクレオチド配列である。
- 配列番号46は、ヒト化Hu2G10-5抗体のガンマ-1重鎖のアミノ酸配列である。
- 配列番号47は、ヒト化Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体のカッパ軽鎖のコード領域のヌクレオチド配列である。
- 配列番号48は、ヒト化Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体のカッパ軽鎖のコード領域のアミノ酸 50

配列である。

配列番号49は、ヒト化Hu2G10-6抗体のガンマ-1重鎖のコード領域のヌクレオチド配列である。

配列番号50は、ヒト化Hu2G10-6抗体のガンマ-1重鎖のコード領域のアミノ酸配列である。

配列番号51は、マウス2EF cDNAからの2EF VHのPCR増幅のためのフォワードプライマーである。

配列番号52は、マウス2EF cDNAからの2EF VHのPCR増幅のためのリバースプライマーである。

配列番号53は、マウス2EF cDNAからの2EF VHのPCR増幅のためのリバースプライマーである。

配列番号54は、マウス2EF cDNAからの2EF VLのPCR増幅のためのフォワードプライマーである。

配列番号55は、マウス2EF及び2G10 cDNAからの2EF及び2G10 VLのPCR増幅のためのリバースプライマーである。

配列番号56は、マウス2EF cDNAからの2EF VLのPCR増幅のためのリバースプライマーである。

配列番号57は、キメラCh2EF抗体のVHをコードする合成遺伝子である。

配列番号58は、キメラCh2EF抗体のVLをコードする合成遺伝子である。

配列番号59は、ヒト化Hu2EF抗体のVH4をコードする合成遺伝子である。

配列番号60は、ヒト化Hu2EF抗体のVH5をコードする合成遺伝子である。

配列番号61は、ヒト化Hu2EF抗体のVL1をコードする合成遺伝子である。

配列番号62は、対応する発現ベクター中のCh2EF、Hu2EF-4、Hu2EF-5、Hu2EF-7、Ch2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体のガンマ-1重鎖及びカッパ軽鎖のコード領域のPCR増幅及び配列決定のためのフォワードプライマーCMV2である。

配列番号63は、対応する発現ベクター中のCh2EF、Hu2EF-4、Hu2EF-5、Hu2EF-7、Ch2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体のカッパ軽鎖のコード領域のPCR増幅及び配列決定のためのリバースプライマーJNT026である。

配列番号64は、Ch2EF、Hu2EF-4、Hu2EF-5、Hu2EF-7、Ch2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体のガンマ-1重鎖の配列決定のためのプライマーJNT082である。

配列番号65は、Ch2EF、Hu2EF-4、Hu2EF-5、Hu2EF-7、Ch2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体のガンマ-1重鎖の配列決定のためのプライマーJNT097である。

配列番号66は、対応する発現ベクター中のCh2EF、Hu2EF-4、Hu2EF-5、Hu2EF-7、Ch2G10、Hu2G10-5及びHu2G10-6抗体のガンマ-1重鎖のコード領域のPCR増幅及び配列決定のためのリバースプライマーJNT098である。

配列番号67は、ヒト化Hu2EF-7抗体のVH7をコードする合成遺伝子である。

配列番号68は、ヒト化Hu2EF-7抗体のVL2をコードする合成遺伝子である。

配列番号69は、マウス2G10 cDNAからの2G10 VHのPCR増幅のためのリバースプライマーMCG2Aである。

配列番号70は、マウス2G10 cDNAからの2G10 VLのPCR増幅のためのフォワードプライマー2G10-L5である。

配列番号71は、マウス2G10 cDNAからの2G10 VLのPCR増幅のためのリバースプライマー2G10-L3である。

配列番号72は、キメラCh2G10抗体のVHをコードする合成遺伝子である。

配列番号73は、マウス2G10 cDNAからのVHのPCR増幅のためのフォワードプライマーである。

配列番号74は、マウス2G10 cDNAからのVHのPCR増幅のためのリバースプライマーである。

配列番号75は、キメラCh2G10抗体のVLをコードする合成遺伝子である。

配列番号76は、マウス2G10 cDNAからのVLのPCR増幅のためのフォワードプライマーであ

10

20

30

40

50

る。

配列番号77は、マウス2G10 cDNAからのVLのPCR増幅のためのリバースプライマーである

。

配列番号78は、ヒト化Hu2G10抗体のVH1をコードする合成遺伝子である。

配列番号79は、ヒト化Hu2G10抗体のVH2をコードする合成遺伝子である。

配列番号80は、ヒト化Hu2G10抗体のVL1をコードする合成遺伝子である。

配列番号81は、ヒト化Hu2G10抗体のVL2をコードする合成遺伝子である。

配列番号82は、ヒト化Hu2G10抗体のVL3をコードする合成遺伝子である。

配列番号83は、キメラCh2G10抗体のガンマ-1重鎖のコード領域のヌクレオチド配列である。

る。

配列番号84は、キメラCh2G10抗体のガンマ-1重鎖のアミノ酸配列である。

配列番号85は、キメラCh2G10抗体のカッパ軽鎖のコード領域のヌクレオチド配列である

。

配列番号86は、キメラCh2G10抗体のカッパ軽鎖のアミノ酸配列である。

配列番号87は、ヒトTrop-2のアミノ酸配列である。

配列番号88は、図23に示されるような成熟型のヒトVH M1775.1のアミノ酸配列である。

配列番号89は、図24に示されるような成熟型のヒトVH L02325.1のアミノ酸配列である

。

配列番号90は、図41に示されるような成熟型のヒトVH X65888.1のアミノ酸配列である

。

配列番号91は、図25に示されるような成熟型のヒトVL Z46622.1のアミノ酸配列である

。

配列番号92は、図42に示されるような成熟型のヒトVL AY043146.1のアミノ酸配列である

る。

配列番号93は、成熟型のヒトVH M1775.1のアミノ酸配列である。

配列番号94は、成熟型のヒトVH L02325.1のアミノ酸配列である。

配列番号95は、成熟型のヒトVH X65888.1のアミノ酸配列である。

配列番号96は、成熟型のヒトVL Z46622.1のアミノ酸配列である。

配列番号97は、成熟型のヒトVL AY043146.1のアミノ酸配列である。

10

20

【 図 2 8 】

SEQ ID NO:61 (nucleotide) SEQ ID NO:28 (aminoacid)

```

NheI
SCTAGCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTGSGGTGCTGCTCTGGGTCCA
  N E T D T L L L W V L L L W V P
GGTCCACTGGCGACATTTGATGACACAGTCTCTGACTCCCTGGCTGTCTCTGGGG
  G S T G D I V M T Q S P D S L A V S L G
GAGAGGCCACCATCAACTGCAGGCCAGCCAAAGTGTCAATACATCTAGCTATAGTTAT
  E R A T I N C R A S Q S V S T S S Y S Y
ATGCACTGGTACCAACAGAAACAGGACAGCCACCAACTCTCATCAAGTATGCATCC
  M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I K Y A S
AACCTGGAACTGGGGTCCCTGACAGATTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTCACC
  N L E S G V P D R F S G S G S G T D F T
CTCACCATCAGCTCCCTGGAGGCCAGGATGTGCAGTCTATTAATCTCAGCACAGTTGG
  L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q H S W
GAGATTCCTACACCTTGGACAGGGGACCAAGTGGAAATCAAACGTAAGTACTCTCT
  E I P Y T F G Q G T K L E I K
EcoRI
CAACGAAATC

```

Fig. 28

【 図 2 9 】

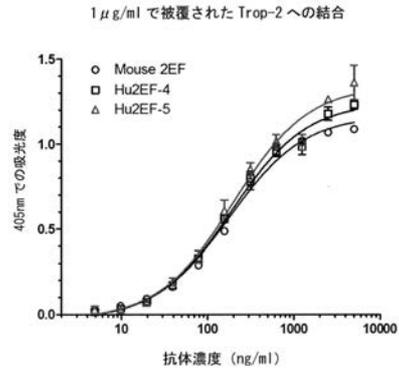


Fig. 29

【 図 3 0 】

Trop-2 へのビオチン化マウス 2EF の結合

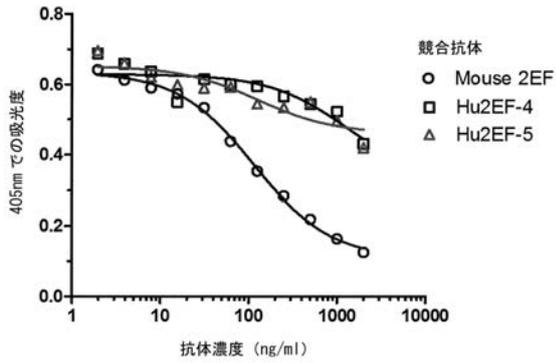


Fig. 30

【 図 3 1 】

競合的結合 - 結腸がんにおける天然 Trop-2

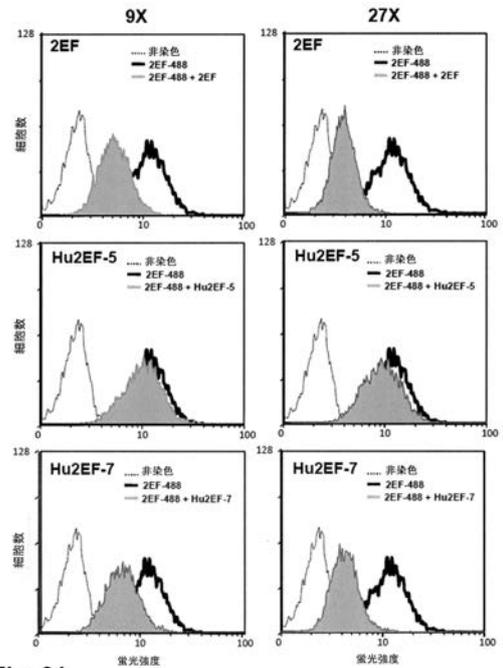


Fig. 31

【 図 3 2 】

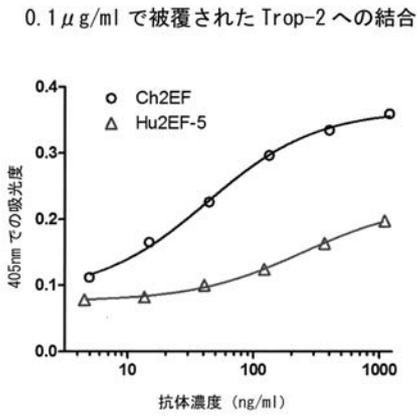


Fig. 32

【 図 3 3 】

SEQ ID NO:67 (nucleotide) SEQ ID NO:26(aminoacid)
 SpeI
 ACTAGTGGCCACCATGGAATGGAGCGGGTCTTTATCCTTCCTGTCAGTGCAGTGCAGGC
 M E W S G V F I F L L S V T A G
 GTCCACTCCCAAGTCCAGCTCGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCTTCA
 V H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S
 GTGAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAACTGAGTGGATCGGATGGGC
 V K V S C K A S G Y T F T N Y W I G W V
 AAACAGGCCCTTGGAGAGGGCTCGAGTGGATTGGAGATATTACCTGGAGGAGGCTAT
 X Q A P G Q G L E W I G D I Y P G G G Y
 ACTAATCAATGAGAAGTCAAGGCGAGGCCACACTGACTCCAGACATCCGCCAGC
 T N Y N E K F K G R A T L T A D T S A S
 ACAGGCTACATGGAGCTCAGCAGGCTGAGATCTGAGGCACACTGCCCTGTATTACTGTCA
 T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A
 AGAGGAAGTGGAGCGGAGACTACTGGGGCCAAAGGACCTGGTCACTGCTTCAGGT
 R G T G G G D Y W G Q G T L V T V S S
 HindIII
 GAGTCTTAATTCCTCCAGCTT

Fig. 33

【 図 3 4 】

SEQ ID NO:68 (nucleotide) SEQ ID NO:30 (aminoacid)
 NheI
 GCTAGCCACCATGGAAGACAGACACTCCTGCTGGGGTGGTCTGCTCTGGGTCCA
 M E T D T L L L W V L L L W V P
 GGCTCACTGGGACATTTGCTGACACAGTCTCCTGACTCCCTGGCTGTGCTCTGGGG
 G S T G P I V L T Q S P D S L A V S L G
 GAGAGGCCACCACTCACTGAGGCGCAGCCAAAGTGTGAGTACATCTAGCTATAGTAT
 E R A T I N C R A S Q S V S T S S Y S Y
 ATCCACTGGTACCAACAGAAACAGGACAGCCCAACTCCTCATCAAGTATCCATCC
 M H W Y Q Q K P G Q P P K L L I K Y A S
 AACCTGGAATCTGGGGTCCCTGACAGATTCACTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTACC
 N L E S G V P D R F S G S G S G T D F T
 CTACCATCAGTCCCTGCGAGGCCGAGGATGTGSCAGTCTATTACTGTCAGCAGATGG
 L T I S S L Q A E D V A V Y Y C Q H S W
 GAGATCCCTACACCTTGGAGGGCGGACCAAGCTGGAAATCAAGCTAAGTGTCTTCT
 E I P Y T F G G G T K L S I K
 EcoRI
 CAACGAATTC

Fig. 34

【 図 3 5 】

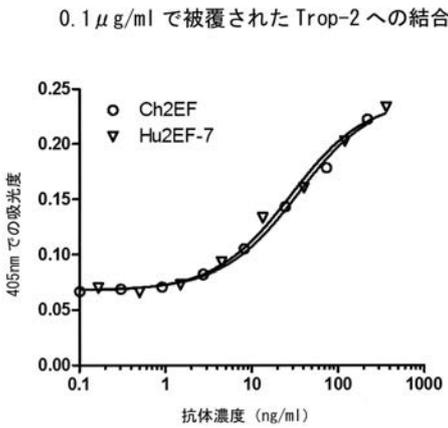


Fig. 35

【 図 3 6 】

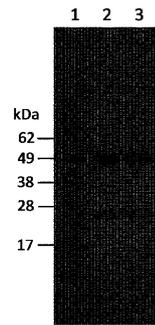


Fig. 36

【 図 5 4 】

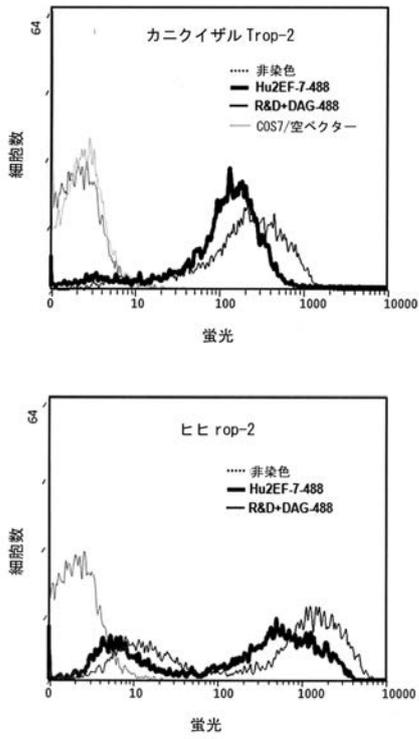


Fig. 54

【 図 5 5 】

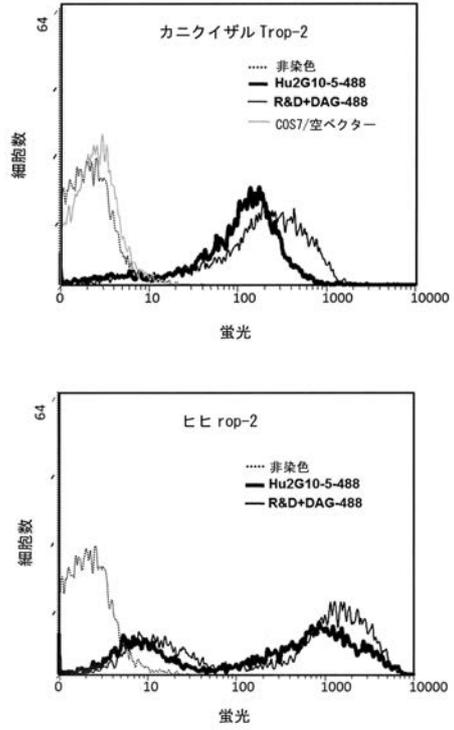


Fig. 55

【 図 5 6 】

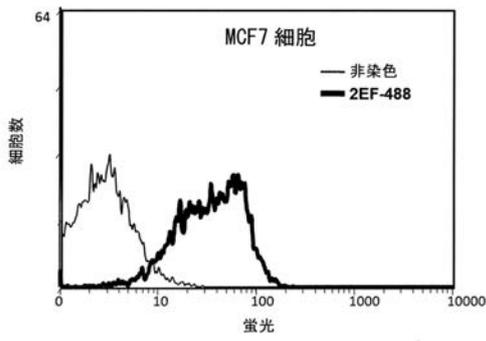


Fig. 56

【 図 5 7 】

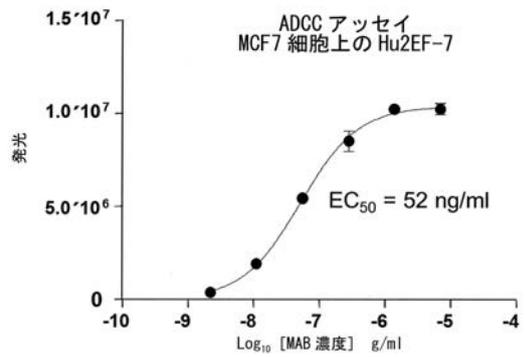


Fig. 57

【 図 5 8 】

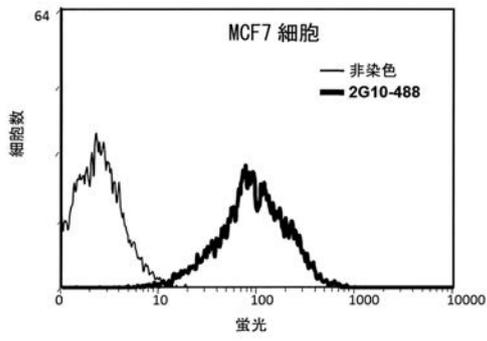


Fig. 58

【 図 5 9 】

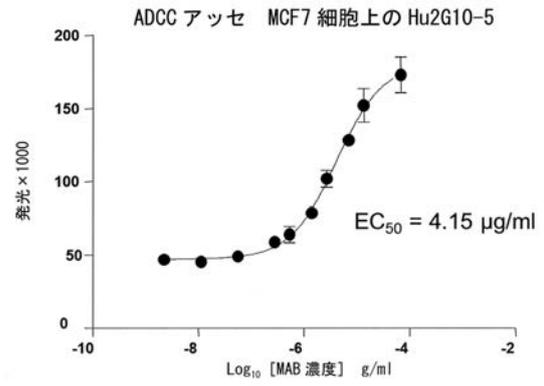


Fig. 59

【 図 6 0 】

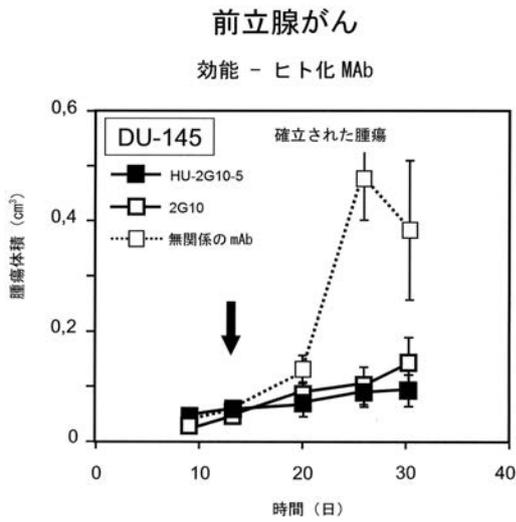


Fig. 60

【配列表】

2018500930000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2015/078672

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/078672

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/30 A61K39/395 A61P35/00 ADD.		
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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	W0 2010/089782 A1 (ALBERTI SAVERIO [IT]) 12 August 2010 (2010-08-12) page 19 - page 22 figures 6,7 CDRs seq.1-3 100% identity; sequences 8,10,12 page 10, line 11 - line 16 -----	1-13, 16-27 14,15
X	EP 2 799 452 A1 (LIVTECH INC [JP]) 5 November 2014 (2014-11-05) paragraph [0194] examples 32-50 ----- -/--	1,2,4, 16,17, 19-21, 23-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 4 March 2016		Date of mailing of the international search report 14/03/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Covone-van Hees, M

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/078672

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 594 589 A1 (UNIV SAPPORO MEDICAL [JP]; KYOWA HAKKO KIRIN CO LTD [JP]) 22 May 2013 (2013-05-22) the whole document -----	1,2,4, 16,17, 19-21, 23-27
X	T. M. CARDILLO ET AL: "Humanized Anti-Trop-2 IgG-SN-38 Conjugate for Effective Treatment of Diverse Epithelial Cancers: Preclinical Studies in Human Cancer Xenograft Models and Monkeys", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 17, no. 10, 3 March 2011 (2011-03-03), pages 3157-3169, XP055044596, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2939 the whole document -----	1,2,4, 16,17, 19-21, 23-27
X	RHODA RAJI ET AL: "Uterine and ovarian carcinosarcomas overexpressing Trop-2 are sensitive to hRS7, a humanized anti-Trop-2 antibody", JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON UK, vol. 30, no. 1, 10 November 2011 (2011-11-10), page 106, XP021114757, ISSN: 1756-9966, DOI: 10.1186/1756-9966-30-106 the whole document -----	1,2,4, 16,17, 19-21, 23-27
X	WO 2008/144891 A1 (ARIUS RES INC [CA]) 4 December 2008 (2008-12-04) examples -----	1,2,4, 16,17, 19-21, 23-27
X,P	WO 2015/047510 A1 (IMMUNOMEDICS INC [US]) 2 April 2015 (2015-04-02) examples -----	1,2,4, 16,17, 19-21, 23-27
A	EP 2 573 120 A1 (LIVTECH INC [JP]) 27 March 2013 (2013-03-27) the whole document ----- ----- -/--	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/078672

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p> GERSHONI JONATHAN M ET AL: "Epitope mapping - The first step in developing epitope-based vaccines", BIODRUGS: CLINICAL IMMUNOTHERAPEUTICS, BIOPHARMACEUTICALS AND GENE THERAPY, ADIS INTERNATIONAL, FR, vol. 21, no. 3, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 145-156, XP009103541, ISSN: 1173-8804, DOI: 10.2165/00063030-200721030-00002 the whole document ----- </p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/078672

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2010089782	A1	12-08-2010	AU 2009339664 A1	11-08-2011
			CA 2750038 A1	12-08-2010
			CN 102448492 A	09-05-2012
			EP 2393512 A1	14-12-2011
			JP 2012516887 A	26-07-2012
			US 2012052076 A1	01-03-2012
			WO 2010089782 A1	12-08-2010
EP 2799452	A1	05-11-2014	AU 2012341450 A1	08-05-2014
			CA 2855699 A1	30-05-2013
			CN 104114580 A	22-10-2014
			EA 201491006 A1	30-10-2014
			EP 2799452 A1	05-11-2014
			JP W02013077458 A1	27-04-2015
			KR 20140102677 A	22-08-2014
			US 2013344509 A1	26-12-2013
			WO 2013077458 A1	30-05-2013
EP 2594589	A1	22-05-2013	EP 2594589 A1	22-05-2013
			TW 201204387 A	01-02-2012
			US 2012237518 A1	20-09-2012
			WO 2011155579 A1	15-12-2011
WO 2008144891	A1	04-12-2008	AU 2008255528 A1	04-12-2008
			CA 2687586 A1	04-12-2008
			CN 101679526 A	24-03-2010
			CO 6140062 A2	19-03-2010
			CR 11127 A	29-12-2009
			EC SP099770 A	28-12-2009
			EP 2155791 A1	24-02-2010
			JP 2010528056 A	19-08-2010
			KR 20100003366 A	08-01-2010
			MA 31393 B1	03-05-2010
			US 2008131428 A1	05-06-2008
			WO 2008144891 A1	04-12-2008
			ZA 200908346 A	25-08-2010
WO 2015047510	A1	02-04-2015	CA 2920192 A1	02-04-2015
			WO 2015047510 A1	02-04-2015
EP 2573120	A1	27-03-2013	AU 2011255870 A1	17-01-2013
			CA 2798778 A1	24-11-2011
			CN 103228673 A	31-07-2013
			EA 201291260 A1	30-05-2013
			EA 201500219 A1	30-10-2015
			EA 201500220 A1	30-10-2015
			EP 2573120 A1	27-03-2013
			JP 5859434 B2	10-02-2016
			JP 2015221793 A	10-12-2015
			KR 20130038278 A	17-04-2013
			NZ 603455 A	30-01-2015
			NZ 702053 A	29-01-2016
			SG 185583 A1	28-12-2012
			SG 10201503904X A	29-06-2015
			US 2013089872 A1	11-04-2013
			US 2016053018 A1	25-02-2016
			WO 2011145744 A1	24-11-2011

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 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
	C 1 2 P 21/08	

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

(72) 発明者 エマヌエラ・グエツラ

イタリア・65012・ペスカーラ・チェパガッティ・ヴィア・エミリオ・カゼツラ・49

(72) 発明者 サヴェリオ・アルベルティ

イタリア・66034・キエーティ・ランチャーノ・ヴィアノチオ・17・ジ・カリバルディ・15

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC03 CC06 CC12 CC15 CC24 CD21 CE12
 DA01 DA14
 4B065 AA90X AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA03
 BA05 BA08 BB25 BB32 BB37 BC03 BC07 BD09 BD12 BD14
 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA14 AA15 CC23 DD62 EE01
 4H045 AA11 AA30 BA41 DA76 EA20 EA51 FA74 GA26 HA05 HA06