

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7325045号
(P7325045)

(45)発行日 令和5年8月14日(2023.8.14)

(24)登録日 令和5年8月3日(2023.8.3)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

請求項の数 14 (全71頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-567512(P2019-567512)	(73)特許権者	519312016 カイロス セラピューティクス, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 バージニア 2 0 1 0 9 マナッサス, ディスカバリー プールバード 9 5 0 1, スイート 1 2 0
(86)(22)出願日	平成30年2月27日(2018.2.27)	(73)特許権者	398044754 ユニバーシティ オブ ジョージア リサーチ ファウンデーション, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ジョージア 3 0 6 0 2 アセス, ディーダブリュ ブルックス ドライブ (番地なし)
(65)公表番号	特表2020-515286(P2020-515286 A)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(43)公表日	令和2年5月28日(2020.5.28)		
(86)国際出願番号	PCT/US2018/020050		
(87)国際公開番号	WO2018/157169		
(87)国際公開日	平成30年8月30日(2018.8.30)		
審査請求日	令和3年1月22日(2021.1.22)		
(31)優先権主張番号	62/463,868		
(32)優先日	平成29年2月27日(2017.2.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌を処置する抗体コンストラクトおよび方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト C E A C A M 6 に結合する単離されたヒト化抗体であって、配列番号 1 3 ~ 1 7 のうちの 1 つのアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 ~ 2 0 のうちの 1 つのアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離されたヒト化抗体。

【請求項 2】

前記抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、C D R グラフト抗体、F a b、F a b'、F (a b ') 2、F v、ジスルフィド結合 F v、s c F v ダイアボディ、多重特異性抗体、二重特異性 T 細胞エンゲージャー、または二重特異性抗体 (b i s p e c i f i c a n t i b o d y) である、請求項 1 に記載の単離された抗体。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の単離された抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の単離された抗体をコードするポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の発現ベクターを含む、単離された宿主細胞。

【請求項 6】

癌または肺炎の処置において使用するための組成物であって、請求項 1 に記載の単離された抗体をコードするポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 7】

前記癌が、膵癌、肺癌、非小細胞肺癌、結腸癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、慢性骨髄性白血病、急性Bリンパ球性白血病、肝癌、または前立腺癌である、請求項6に記載の使用のための組成物。

【請求項8】

癌または膵炎の処置において使用するための、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記癌が、膵癌、肺癌、非小細胞肺癌、結腸癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、慢性骨髄性白血病、急性Bリンパ球性白血病、肝癌、または前立腺癌である、請求項8に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項10】

前記抗体が、ヒト免疫グロブリン定常領域と少なくとも95%同一である定常領域を含む、請求項1に記載の単離された抗体。

【請求項11】

前記抗体が、ヒトVH1-18*01生殖系列によってコードされるヒトフレームワーク配列、およびヒトVK1-39*01生殖系列によってコードされるヒトフレームワーク配列を含む、請求項1に記載の単離された抗体。

【請求項12】

CEACAM6上のグリコペプチドを含む少なくとも1つのエピトープに結合する、請求項1に記載の単離された抗体。

【請求項13】

前記重鎖可変領域が配列番号29~31のうちの1つの配列を有するポリヌクレオチド配列によってコードされ、前記軽鎖可変領域が配列番号34~36のうちの1つの配列を有するポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1に記載の単離された抗体。

【請求項14】

ヒト化抗CEACAM6抗体の産生を可能にする条件下で、請求項5に記載の宿主細胞を培養すること、および培養物から前記抗体を回収することを含む、ヒト化抗CEACAM6抗体を産生するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出され、その全体が参照により本明細書に援用される配列表を含む。2018年2月27日に作成された当該ASCIIコピーはG6527-00300__SL.txtと名付けられ、大きさは74,291バイトである。

【背景技術】

【0002】

抗体は、十分に確立された治療法である。当初、マウス抗体は治療薬として使用されていたが、その有用性はマウス特異的配列に対するヒトの免疫応答によって妨げられていた。この応答は、マウス特異的配列がヒト配列に置き換えられたヒト化抗体の使用により改善された。後の修正には、抗体-薬物結合体(ADC)を形成する毒性分子の共有結合、2価抗体を形成する2つの異なる結合部位、ならびに抗原に対する1つの結合部位およびT細胞上のCD3分子へのその他の結合部位を有する切断型抗体が含まれる(二重特異的T細胞エンゲージャーまたはBITE抗体)。抗体結合部位は、トランスフェクトした細胞が所望の抗原を認識することができるT細胞およびナチュラルキラー(NK)細胞またはナチュラルキラーT(NKT)細胞などの他の免疫細胞内へ導入することができるキメラ抗原受容体(CAR)を形成するために使用されてきた。このアプローチは、免疫認識を回避するよう腫瘍が修飾することができる主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の認識を必要としない免疫受容体をトランスフェクトされた細胞に持たせる。その上、標的にされた癌細胞と抗体を結合させると、トランスフェクトされた細胞(T細胞、NKまたはNKT)は、活性化され、それらの殺滅能力が増強される。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

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

【0004】

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- a . 配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、

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

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R は、配列番号 1 3 ~ 1 7 および配列番号 2 1 ~ 2 5 から選択される配列を有する重鎖を含むことができる。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R は、配列番号 1 8 ~ 2 0 および配列番号 2 6 ~ 2 8 から選択される配列を有する軽鎖を含むことができる。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R は、配列番号 1 3 ~ 1 7 から選択される配列を有する重鎖と、配列番号 1 8 ~ 2 0 から選択される配列を有する軽鎖とを含むことができる。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R は、配列番号 2 1 ~ 2 5 から選択される配列を有する重鎖と、配列番号 2 6 ~ 2 8 から選択される配列を有する軽鎖とを含むことができる。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、または C A R は、C D R に含まれない配列において保存的置換を含むことができる。

10

【 0 0 0 5 】

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

20

【 0 0 0 6 】

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

【 0 0 0 7 】

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

30

【 0 0 0 8 】

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

【 0 0 0 9 】

一態様において、本明細書に記載される単離された抗体、その抗原結合部分、C A R、または B i T E をコードする核酸が、本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、この核酸は、配列番号 2 9 ~ 4 4 から選択される配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、この核酸は c D N A であり得る。

40

【 0 0 1 0 】

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

50

ができる。

【0011】

一態様において、癌を処置することを必要とする対象において癌を処置する方法であつて、本明細書に記載される細胞を対象に投与することを含む、方法が明細書に記載される。一態様において、癌を処置することを必要とする対象において癌を処置する方法であつて、本明細書に記載される核酸を対象に投与することを含み、対象のT細胞が、核酸によってコードされるポリペプチドを発現する、方法が本明細書に記載される。いくつかの実施形態において、癌は、膵癌、肺癌、非小細胞肺癌、結腸癌、乳癌、肝癌、および前立腺癌からなる群から選択することができる。

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

【図面の簡単な説明】

【0012】

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

【0013】

【図1】プロテインA精製PTA-2357ヒト化バリエーション抗体のクーマシーブルー染色したSDS-PAGEゲルを図示している。試料をNuPage4~12%ビス-トリスゲル(Invitrogenカタログ番号NP0322BOX)上にロードし、200Vで30分間泳動した。製造元が推奨するようにゲルを調製および泳動した。レーンは以下に示すとおりであった：レーン1：PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas; Waltham, MA, #SM1811) レーン2：1.0 μg PTA-2357キメラIgG1抗体 レーン3：1.0 μg PTA-2357VH1/VK2 IgG1抗体 レーン4：1.0 μg PTA-2357VH2/VK2 IgG1抗体 レーン5：1.0 μg PTA-2357VH2/VK3 IgG1抗体 レーン6：1.0 μg PTA-2357VH3/VK2 IgG1抗体 レーン7：1.0 μg PTA-2357VH4/VK2 IgG1抗体。

【図2】プロテインA精製PTA-2358ヒト化バリエーション抗体のクーマシーブルー染色SDS-PAGEゲルを図示している。試料は、NuPage4~12%ビス-トリスゲル(Invitrogen, Grand Island, NY; カタログ番号NP0322BOX)上にロードし、200Vで30分間泳動した。製造元が推奨するようにゲルを調製および泳動した。レーンは以下に示すとおりであった：レーン1：PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas #SM1811) レーン2：1.0 μg PTA-2358キメラIgG1抗体 レーン3：1.0 μg PTA-2358VH1/VK1 IgG1抗体 レーン4：1.0 μg PTA-

A - 2358 VH2 / VK1 IgG1 抗体レーン5 : 1.0 μ g PTA - 2358 VH2 / VK2 IgG1 抗体レーン6 : 1.0 μ g PTA - 2358 VH3 / VK1 IgG1 抗体レーン7 : 1.0 μ g PTA - 2358 VH4 / VK1 IgG1 抗体レーン8 : 1.0 μ g PTA - 2358 VH4 / VK2 IgG1 抗体レーン9 : 1.0 μ g PTA - 2358 VH5 / VK1 IgG1 抗体レーン10 : 1.0 μ g PTA - 2358 VH5 / VK2 IgG1 抗体。

【図3A】小細胞肺癌(CSCLC)細胞に結合しているNS0由来ヒト化バリエーション抗体を用いた競合アッセイおよびフローサイトメトリー分析を示す。さまざまな濃度の各ヒト化抗体を固定濃度のマウス抗体(0.1 μ g/ml PTA - 2357または0.3 μ g/ml PTA - 2358)と混合し、CSCLC細胞とともにインキュベートした。FITC結合ヤギ抗マウスFcを介して結合を検出した。データは、正規化された%陽性事象としてプロットした(R2においてゲート処理)。(図3A)PTA - 2357はヒト化抗体をリードする。(図3B)および(図3C)PTA - 2358はヒト化抗体をリードする。

10

【図3B】同上。

【図3C】同上。

【図4-1】PTA - 2357の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VHバリエーション1を示す。

【図4-2】同上。

【図5-1】PTA - 2357の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VHバリエーション2を示す。

20

【図5-2】同上。

【図6-1】PTA - 2357の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VHバリエーション3を示す。

【図6-2】同上。

【図7-1】PTA - 2357の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VHバリエーション4を示す。

【図7-2】同上。

【図8-1】PTA - 2357の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VHバリエーション5を示す。

30

【図8-2】同上。

【図9-1】PTA - 2357の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VKバリエーション1を示す。

【図9-2】同上。

【図10-1】PTA - 2357の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VKバリエーション2を示す。

【図10-2】同上。

【図11-1】PTA - 2357の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VKバリエーション3を示す。

【図11-2】同上。

40

【図12-1】PTA - 2358の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VHバリエーション1を示す。

【図12-2】同上。

【図13-1】PTA - 2358の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VHバリエーション2を示す。

【図13-2】同上。

【図14-1】PTA - 2358の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VHバリエーション3を示す。

【図14-2】同上。

【図15-1】PTA - 2358の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VHバリエーション4を示す。

50

ント4を示す。

【図15-2】同上。

【図16-1】PTA-2358の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VHバリエーション5を示す。

【図16-2】同上。

【図17-1】PTA-2358の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VKバリエーション1を示す。

【図17-2】同上。

【図18-1】PTA-2358の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VKバリエーション2を示す。

【図18-2】同上。

【図19-1】PTA-2358の可変重鎖ヌクレオチドおよびアミノ酸配列VKバリエーション3を示す。

【図19-2】同上。

【図20】HTK29細胞から成長した腫瘍球がMAb109による結合を示すことを実証している。HT29ヒト大腸癌細胞を幹細胞培養培地で10日間成長させ、腫瘍球（癌幹細胞で濃縮）を形成した。親および腫瘍球をウエスタンブロット法のために収集した。上、抗CEACAM6ポリペプチド抗体（対照；クローン9A6（Santa Cruz #sc.59899）を用いたSDS PAGE後の総HT29細胞ライセートおよび腫瘍球（および陽性対照としてCEACAM6を発現するCapan1細胞ライセート）のブロット法；下、10日間成長したHT29細胞ライセートまたは腫瘍球の2つのタンパク質濃度（25mgおよび35mg）をSDS PAGEに供し、MAb109またはベータアクチンでブロットした。

【図21】PNGアゼF処理後の膵癌細胞株BxPC3TCLに対するMAb109の反応性を分析するイムノブロットの結果を示す。

【図22】癌胎児性抗原（CEA）ファミリーの構造を示す。

【図23】CEACAM6の構造、CEACAM6のアミノ酸配列、およびこのアミノ酸配列内の12の潜在的なN結合型グリコシル化部位を示す。

【図24】C6f1-pFUSEコンストラクト（配列番号51）を示す。

【図25】HEK-293細胞がMAb109グリコエピトープを合成する生合成機構を含んでいることを示すイムノブロット法の実験結果を示す。

【図26】種々のグリコシダーゼを用いたHEK野生型C6f1の処理を示すイムノブロット法の実験結果を示す。

【図27】HEK Lec1細胞内で発現したCEACAM6フラグメント1グリカンを示す。

【図28】HEK Lec1細胞内で発現したMAb109エピトープがEndoH耐性であることを示すイムノブロット法の実験結果を示す。

【図29】EndoH処理後にHEK Lec1細胞内で発現したCEACAM6フラグメント1グリカンを示す。

【図30】CEACAM5（配列番号55）CEACAM6（配列番号56）およびCEACAM8（配列番号57）についてのC末端の配列アラインメントを示す。

【図31】C6f1の³⁰⁰QAH³⁰²から³⁰⁰HTT₃₀₂への特定部位の変異誘発がMAb109の反応性を消失させることを示すイムノブロット法の実験結果を示す。

【図32】CEACAM8の3つのアミノ酸が変異すると、MAb109グリコエピトープが発現することを示すイムノブロット法の実験結果を示す。

【図33】CEACAM6エピトープのグリコシル化部位の下流のCEACAM8アミノ酸の変異がMAb109エピトープの発現をもたらすことを示すイムノブロット法の実験結果を示す。

【図34】C6f1中の各N結合型シークオンの欠失（N-Q）（配列番号51）の効果を示すイムノブロット法の実験結果を示す。

10

20

30

40

50

【図35】たった1個のA s n X S e r / T h r シークオンの変異がM A b 1 0 9 結合活性を除去することを示す構造分析を示す(配列番号51)。

【図36】配列番号51における追加の変異を要約する。

【図37】300~318ペプチドセグメントの変異およびM A b 1 0 9 結合の測定値を要約する。

【図38】合成ペプチド(配列番号102)および合成グリコペプチド(配列番号102)が30マイクロモル濃度でM A b 1 0 9 結合を阻害しなかったことを示す実験結果を要約する。

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

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

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

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

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

【発明を実施するための形態】

【0014】

癌細胞、例えば肺癌細胞、結腸癌細胞、または膵癌細胞に存在する抗原に特異的に結合する抗体および関連ポリペプチドが本明細書に記載される。抗原、C E A C A M 6 (C D 6 6 c 、 「分化クラスター66c」、癌胎児性抗原関連細胞接着分子6、C E A L 、 およびN C A としても既知)は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通糖タンパク質である。例示的なC E A C A M 6 アミノ酸配列は、G e n B a n k N P _ 0 0 2 4 7 4 . 4 であり得る。C E A C A M 6 をコードする例示的なm R N A 配列は、G e n B a n k N M _ 0 0 2 4 8 3 . 6 であり得る。C E A C A M 6 に特異的に結合する例示的な抗体は、マウス抗体M A b 1 0 9 であり得る。いくつかの実施形態において、C E A C A M 6 に特異的に結合する例示的なヒト化抗体は、マウスモノクローナル抗体M A b 1 0 9 に基づくことができる。このような抗体およびポリペプチドは、例えば、癌の診断、予後、および/または処置を可能にすることができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される技術は、二重特異性T細胞エンゲージャー(B I T E)抗体に関する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される技術は、癌についてのキメラ抗原受容体(C A R)およびC A R - T 療法に関する。

【0015】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される技術は、癌細胞表面抗原などの抗原を結合する抗体の抗原結合部分と、結合する同じ抗体の別の抗原結合部分を含む抗体および/またはポリペプチドに関する。「二重特異性T細胞エンゲージャー」または「B I T E」は、免疫エフェクター細胞上の癌抗原と活性化抗原とを同時に結合する抗体を称する。本明細書で使用する場合、「二重特異性T細胞エンゲージャー」または「B I T E」は、免疫エフェクター細胞上の癌抗原と活性化抗原とを同時に結合する抗体を称する。本明細書で使用する場合、「キメラ抗原受容体」または「C A R」は、細胞シグナル伝達ドメインおよび/または細胞活性化ドメインに連結した抗原結合ドメイン(抗体の抗原結合部分(例えば、s c F V))を含む人工的に構築された複合ポリペプチドを称する。いくつかの実施形態において、細胞シグナル伝達ドメインは、T細胞シグナル伝達ドメインであり得る。いくつかの実施形態において、細胞活性化ドメインはT細胞活性化ドメインであり得る。C A R は、T細胞および他の免疫細胞の特異性および反応性を、選択された標的へとM H C に制限されない様式で向け直し、モノクローナル抗体の抗原結合特性を利用する。M H C に制限されない抗原認識は、C A R を発現するT細胞に、抗原プロセシン

10

20

30

40

50

グとは無関係に抗原を認識する能力を付与し、したがって、腫瘍回避の主要な機序を迂回する。その上、T細胞内発現させると、CARは有利なことに、内在性T細胞受容体(TCR)アルファ鎖およびベータ鎖と二量体化しない。最も一般的には、CARの細胞外結合ドメインは、マウスまたはヒト化モノクローナル抗体の可変重および軽領域の融合に由来する単鎖可変フラグメント(scFv)から構成される。あるいは、Fabに由来するscFvを(例えば、Fabライブラリーから得られる抗体の代わりに)使用してもよく、種々の実施形態において、このscFvは膜貫通ドメインに、次いで細胞内シグナル伝達ドメインに融合する。「第1世代」CARには、抗原結合の際にCD3ゼータシグナルを単に提供するものが含まれる。「第2世代」CARには、共刺激(例えば、CD28またはCD137)および活性化(CD3Qの両方を提供するものが含まれる。「第3世代」のCARには、複数の共刺激(例えば、CD28およびCD137)および活性化(CO3Q)を提供するものが含まれる。種々の実施形態において、CARは、抗原に対して高い親和性または結合力を有するように選択される。CARのさらなる詳細は、例えば、これらの各々が全体として参照により本明細書に援用されるMaus et al. *Blood* 2014 123:2624-35、Reardon et al. *Neuro-Oncology* 2014 16:1441-1458、Hoyos et al. *Hematologica* 2012 97:1622、Byrd et al. *J Clin Oncol* 2014 32:3039-47、Maher et al. *Cancer Res* 2009 69:4559-4562、およびTamada et al. *Clin Cancer Res* 2012 18:6436-6445において認めることができる。

10

20

【0016】

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

30

【0017】

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

- a. 配列番号4または10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
- b. 配列番号5または11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、
- c. 配列番号6または12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、
- d. 配列番号1または7のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
- e. 配列番号2または8のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および
- f. 配列番号3または9のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3からなる群から選択される1つ以上の重鎖および軽鎖相補性決定領域(CDR)を含む、単離された抗体、その抗

40

50

原結合部分、またはキメラ抗原受容体（CAR）が本明細書に記載される。

【0018】

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

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

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

- a．配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
- b．配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、および
- c．配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む。

10

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

- a．配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
- b．配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および
- c．配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む。

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

- a．配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
- b．配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および
- c．配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む。

20

【0019】

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

- a．配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
- b．配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、
- c．配列番号6のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、
- d．配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
- e．配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および
- f．配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む。

30

【0020】

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

- a．配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
- b．配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、
- c．配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、
- d．配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
- e．配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および
- f．配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む。

40

【0021】

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはCARは、配列番号13～17および配列番号21～25から選択される配列を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはCARは、配列番号18～20および配列番号26～28から選択される配列を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはCARは、配列番号13～17から選択される配列を有する重鎖と、配列番号18～20から選択される配列を有する軽鎖とを含む。いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはCARは、配列番号21～25から選択される配列を有する重鎖と、配列番号26～28から選択される配列を有する軽鎖とを含む。いくつかの実施形態において

50

、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、C D Rに含まれない配列において保存的置換を含む。

【0022】

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

10

【0023】

いくつかの実施形態において、単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rは、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、C D Rグラフト抗体、ヒト化抗体、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、ジスルフィド結合F v、s c F v、単ドメイン抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体、二重特異性抗体 (d u a l s p e c i f i c a n t i b o d y)、抗イデオタイプ抗体、および二重特異性抗体 (b i s p e c i f i c a n t i b o d y) からなる群から選択される。

【0024】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体の抗原結合部分を含む二重特異性T細胞エンゲージャー (B i T E (商標)) が、本明細書に記載される。B i T Eは、2つの異なる結合部位 (例えば、2つのアーム = 2つの異なる結合部位) を有するm o a bの構造である。通常、1つの部位 (例えば、アーム) は腫瘍抗原に向けられ、他の部位 (例えば、アーム) はC D 3抗原に向けられる。したがって、B i T Eは、各々がアームまたは結合部位に寄与している2つのモノクローナル抗体のキメラとして考えることができる。B i T Eが結合すると、腫瘍細胞とT細胞との間を架橋している。B i T E分子は、少なくとも2つのs c F vドメインを含むことができ、それらの各々は異なるエピートープ特異性を有する。B i T E分子は、1) いかなるT細胞とも、および2) 腫瘍細胞の殺滅を向け直す特異的な抗原発現腫瘍細胞とも関与する。いくつかの実施形態において、いかなるT細胞へも関与する、例えば、いかなるT細胞にも結合するs c F vドメインは、抗C D 3 s c F vであり得る。B i T Eの非限定例は、プリナツモマブである。B i T Eは、当技術分野で、例えば、O b e r s t e t a l . m A b s 2 0 1 4 6 : 1 5 7 1 - 1 5 8 4、Z i m m e r m a n e t a l . I n t e r n a t i o n a l I m m u n o l o g y 2 0 1 4 2 7 : 3 1 - 3 7、およびW i c k r a m a s i n g h e D i s c o v M e d 2 0 1 3 1 6 : 1 4 9 - 1 5 2においてさらに記載され、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に援用される。

20

30

【0025】

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

40

【0026】

本明細書に記載される抗体、その抗原結合フラグメント、またはC A Rが配列番号1 ~ 1 2の配列と同一ではない少なくとも1つのC D Rを含む実施形態において、その少なくとも1つのC D Rのアミノ酸配列は当業者に周知の方法によって選択することができる。例えば、F u j i i , 2 0 0 4 , “ A n t i b o d y a f f i n i t y m a t u r a t i o n b y r a n d o m m u t a g e n e s i s ” i n M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y : A n t i b o d y E n g i n e e r i n g 2 4 8 : 3 4 5 - 3 4 9 (その全体が参照により本明細書に援用される) は、特に図2および第3 . 3節において、関心対象の何らかのC D Rについてのライブラリーを作成する方法につい

50

て記載している。これにより、当業者は、本明細書に記載される特定のCDR配列の保存的置換バリエーションを含む代替CDRを同定することができ、このことは、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合フラグメント中に存在するときに、癌細胞表面抗原を結合することになる抗原またはその抗原結合フラグメントを結果的に生じることになる。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、癌細胞に特異的に結合することができる。Fuji et al.において記載される方法によって、当業者は、既知の重鎖フラグメントと組み合わせるとき所望の結合挙動を付与することになる軽鎖配列についてスクリーニングすることもでき、その逆もまた同様である。

【0027】

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

10

【0028】

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

20

30

【0029】

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

【0030】

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

40

【0031】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、またはCARをコードする核酸は、ベクターによって含める。本明細書に記載される態様のいくつかにおいて、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCAR、またはその何らかのモジュールをコードする核酸配列は、ベクターに操作可能に連結される。「

50

ベクター」という用語は、本明細書で使用する場合、宿主細胞への送達のためにまたは異なる宿主細胞間の移動のために設計された核酸コンストラクトを称する。本明細書で使用する場合、ベクターはウイルス性または非ウイルス性であり得る。「ベクター」という用語は、適切な制御要素と関連しているときに複製することができ、遺伝子配列を細胞に移動させることができる何らかの遺伝要素を包含する。ベクターには、クローン形成ベクター、発現ベクター、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、ピリオンなどを含むことができるが、これらに限定されない。

【0032】

本明細書で使用する場合、「発現ベクター」という用語は、ベクター上の転写調節配列に連結された配列からのRNAまたはポリペプチドの発現を指示するベクターを称する。10
発現した配列はしばしば、細胞にとって異種性となるが、必ずしもそうではない。発現ベクターは、追加の要素を含むことがあり、例えば、発現ベクターは、2つの複製システムを有することがあり、したがってそのことが2つの生物において、例えば発現のためのヒト細胞において、ならびにクローン形成および増幅のための原核生物宿主において維持することができる。「発現」という用語は、RNAおよびタンパク質を産生すること、ならびに適宜、タンパク質を分泌することに関与する細胞過程を称し、適用可能な場合、例えば、転写、転写プロセッシング、翻訳ならびにタンパク質の折りたたみ、修飾およびプロセッシングを含むがこれらに限定されない。「発現産物」には、遺伝子から転写されたRNA、および遺伝子から転写されたmRNAの翻訳により得られたポリペプチドが含まれる。20
「遺伝子」という用語は、適切な調節配列に操作可能に連結されたときにインビトロまたはインビボでRNAへ転写された核酸配列(DNA)を意味する。遺伝子は、コードする領域の前後の領域、例えば5'非翻訳(5'UTR)または「リーダー」配列と、3'UTRまたは「トレーラー」配列、および個々のコードするセグメント(エクソン)間の介在配列(イントロン)を含むことがあり、または含まないことがある。

【0033】

本明細書で使用する場合、「ウイルスベクター」という用語は、ウイルス起源の少なくとも1つの要素を含み、ウイルスベクター粒子にパッケージ化されることになる能力を有する核酸ベクターコンストラクトを称する。ウイルスベクターは、非必須ウイルス遺伝子の代わりに、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、またはCARをコードする核酸を含むことができる。ベクターおよび/または粒子は、インビトロまたはインビボのいずれかで何らかの核酸を細胞内に移入させる目的で利用してもよい。多数の形態のウイルスベクターが当技術分野で既知である。30

【0034】

「組換えベクター」が意味するのは、異種核酸配列を含むベクター、またはインビボで発現することができる「導入遺伝子」である。本明細書に記載されるベクターは、いくつかの実施形態において、他の適切な組成物および療法と組み合わせることができることは理解されるべきである。いくつかの実施形態において、ベクターはエピソーム性である。適切なエピソームベクターの使用は、対象における関心対象のヌクレオチドを高コピー数の染色体外DNA中に維持する手段を提供し、それにより染色体組込みの潜在的な影響を排除する。40

【0035】

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

【0036】

いくつかの実施形態では、細胞は免疫細胞である。本明細書で使用する場合、「免疫細胞」は、免疫応答において役割を担っている細胞を称する。免疫細胞は造血起源であり、B細胞およびT細胞などのリンパ球；ナチュラルキラー細胞；単球、マクロファージ、好50

酸球、マスト細胞、好塩基球、および顆粒球などの骨髄細胞が含まれる。いくつかの実施形態において、細胞はT細胞；NK細胞；NK T細胞；B細胞またはT細胞などのリンパ球であり、いくつかの実施形態において、細胞は、単球、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球、または顆粒球などの骨髄細胞である。

【0037】

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

10

【0038】

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

20

30

40

【0039】

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

【0040】

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

50

よび/または滅菌容器に関する。

【0041】

本明細書で使用する場合、「治療有効量」、「有効量」または「有効用量」という句は、腫瘍または悪性腫瘍の処置、予防、または管理において治療上または審美上の利益を提供する量、例えば、腫瘍または悪性腫瘍の少なくとも1つの症状、兆候、またはマーカーの統計的に有意な低下を提供する量を称する。治療有効量の決定は十分に、当業者の能力の範囲内である。概して、治療有効量は、対象の病歴、年齢、容態、および性別、ならびに対象の医学的容態の重症度および種類、ならびに他の薬学的に活性のある薬剤の投与とともに変えることができる。

【0042】

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

【0043】

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

【0044】

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

【0045】

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

10

20

30

40

50

solid nucleic acid lipid particles」(Zimmermann, T.S., et al (2006) Nature 441: 111 - 114)、カルジオリピン (Chien, P.Y., et al (2005) Cancer Gene Ther. 12: 321 - 328、Pal, A., et al (2005) Int J. Oncol. 26: 1087 - 1091)、ポリエチレンイミン (Bonnet M.E., et al (2008) Pharm. Res. Aug 16 (印刷に先立つ電子公開)、Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659)、Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチド (Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3: 472 - 487)、およびポリアミドアミン (Tomalia, D.A., et al (2007) Biochem. Soc. Trans. 35: 61 - 67、Yoo, H., et al (1999) Pharm. Res. 16: 1799 - 1804) が挙げられる。いくつかの実施形態において、核酸は、全身投与のためにシクロデキストリンとの複合体を形成する。核酸およびシクロデキストリンの投与のための方法および医薬組成物は、その全体が参照により本明細書に援用される米国特許第 7, 427, 605 号において認めることができる。核酸の的を絞った送達は、例えば、それらの各々が全体として参照により本明細書に援用される Ikeda and Taira Pharmaceutical Res 2006 23: 1631 - 1640、Soutschek et al., Nature 2004 432: 173 - 8 および Lorenze et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 14, 4975 - 4977 (2004) において説明される。例として、核酸は、免疫細胞上に発現する受容体のリガンド、例えば TCR を含むリポソーム内に阻害剤を封入することによって免疫細胞を標的とすることができる。いくつかの実施形態において、リポソームは、免疫細胞に特異的なアプタマーを含むことができる。

【0046】

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

【0047】

癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系の癌、乳癌、腹膜の癌、子宮頸癌、絨毛癌、大腸癌、結合組織癌、消化器系の癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌 (胃腸癌を含む)、膠芽腫 (GBM)、肝癌、肝細胞癌、上皮内腫瘍、腎癌 (kidney cancer) または腎癌 (renal cancer)、喉頭癌、白血病、肝癌、肺癌 (例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および扁平上皮癌)、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、黒色腫、骨髄腫、神経芽腫、口腔癌 (例えば、唇、舌、口、および咽頭)、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系の癌、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌または子宮内膜癌、尿路系の癌、外陰腫瘍、ならびに他の癌腫および肉腫、ならびに B 細胞リンパ腫 (軽度悪性 / 濾胞性非ホジキンリンパ腫 (NHL)、小リンパ球性 (SL) NHL、中悪性度 / 濾胞性 NHL、中悪性度びまん性 NHL、高度悪性免疫芽球性 NHL、高度悪性リンパ芽球性 NHL、高度悪性小非分割細胞性 NHL、巨大腫瘍病変 NHL、マントル細胞リンパ腫、AIDS 関連リンパ腫、およびワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症を含む)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、有

毛細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病、および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症、浮腫（脳腫瘍と関係するものなど）、およびメーグス症候群と関連する異常な血管増殖が挙げられるが、これらに限定されない。

【0048】

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

10

【0049】

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

20

30

【0050】

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

【0051】

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

40

【0052】

本明細書で使用する場合、「処置する」、「処置」、「処置すること」、または「寛解」は、疾患、障害または医学的容態に関して使用するとき、目的が、症状または容態の進

50

行または重症度を逆転させること、緩和すること、寛解させること、抑制すること、遅延させること、または停止させることである容態のための治療処置を称する。「処置すること」という用語は、容態の少なくとも1つの副作用または症状を軽減または緩和することを含む。1つ以上の症状または臨床マーカーが低減した場合、処置は概して「有効」である。あるいは、容態の進行が低減または一時停止した場合、処置は「有効」である。すなわち、「処置」には、症状またはマーカーの改善だけでなく、処置の非存在下で予想されるであろう症状の進行または悪化の休止または少なくとも遅延も含まれる。有益なまたは所望の臨床結果には、1つ以上の症状の緩和、欠陥の程度の減少、腫瘍または悪性腫瘍の安定した（すなわち悪化していない）状態、腫瘍成長および/または転移の遅滞または遅延、ならびに処置の非存在下で予想される寿命と比較した寿命の延長が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で使用する場合、「投与する」という用語は、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCAR、または抗体、その抗原結合部分、もしくはCARをコードする核酸、または本明細書に記載されるこのような試薬を含む細胞の、所望の部位で薬剤の少なくとも部分的な局在化を結果的に生じる方法または経路によって対象内へ配置することを称する。本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、もしくはCAR、または抗体、その抗原結合部分、もしくはCARをコードする核酸、または本明細書に開示の本明細書に記載されるこのような試薬を含む細胞を含む医薬組成物を、対象における有効な処置を結果的に生じる何らかの適切な経路によって投与することができる。

10

【0053】

20

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

30

【0054】

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

40

【0055】

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

【0056】

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

50

かの実施形態において、用量は1日当たり約 $5 \mu\text{g} / \text{m}^2$ であり得る。いくつかの実施形態において、用量は1日当たり約 $15 \mu\text{g} / \text{m}^2$ であり得る。いくつかの実施形態において、用量は1日当たり約 $60 \mu\text{g} / \text{m}^2$ であり得る。

【0057】

いくつかの実施形態（本明細書に記載される細胞を投与するとき）において、投薬量は体重 1kg 当たり約 1×10^5 個細胞～約 1×10^8 個細胞であり得る。いくつかの実施形態において、投薬量は、体重 1kg 当たり約 1×10^6 個細胞～約 1×10^7 個細胞であり得る。いくつかの実施形態において、投薬量は、体重 1kg 当たり約 1×10^6 個細胞であり得る。いくつかの実施形態において、1用量の細胞を投与することができる。いくつかの実施形態において、細胞の投与は、例えば、1回、2回、またはそれより多数回繰り返すことができる。いくつかの実施形態において、細胞の投与は、例えば、毎日、毎週、または毎月ペースで投与することができる。

10

【0058】

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

【0059】

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

20

【0060】

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

30

40

【0061】

いくつかの実施形態において、用量は、約 1mg ～約 2000mg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 3mg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 10mg であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 30mg であり

50

得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 1 0 0 0 m g であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、約 2 0 0 0 m g であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、毎日静脈内注入により与えられる約 3 m g であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、毎日静脈内注入により与えられる約 1 0 m g であり得る。いくつかの実施形態において、用量は、週 3 回の静脈内注入により与えられる約 3 0 m g であり得る。

【 0 0 6 2 】

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

【 0 0 6 3 】

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

【 0 0 6 4 】

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

【 0 0 6 5 】

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

【 0 0 6 6 】

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

【 0 0 6 7 】

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

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用する場合、「化学療法」または「化学療法薬」という用語は、異常な細胞成長を特徴とする疾患の処置において治療上の有用性を有する何らかの化学薬を称する。このような疾患には、腫瘍、新生物および癌、ならびに過形成の成長を特徴とする疾患が含まれる。本明細書で使用する化学療法薬は、化学薬および生物薬の両方を包含する。これらの薬剤は、癌細胞が持続的な生存のために依存する細胞活動を阻害するように機能する。化学療法薬のカテゴリーには、アルキル化薬/アルカロイド薬、代謝拮抗薬、ホル

10

20

30

40

50

モンまたはホルモン類似体、および種々の抗新生物薬が含まれる。これらの薬剤のすべてではないにしても、ほとんどは癌細胞に直接毒性があり、免疫刺激を必要としない。一実施形態において、化学療法薬は、固形腫瘍などの新生物を処置する上で使用する薬剤である。一実施形態において、化学療法薬は放射性分子である。当業者は、使用する化学療法薬を容易に特定することができる（例えば、Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition, Perry et al., Chemotherapy, Ch. 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2nd Edition, 2000 Churchill Livingstone, Inc, Baltzer L, Berkery R (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2nd ed. St. Louis, Mosby - Year Book, 1995, Fischer D S, Knobf M F, Durivage H J (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby - Year Book, 1993を参照されたい）。本明細書に記載される二重特異性および多重特異性ポリペプチド薬は、追加の化学療法薬と併用することができる。

【0069】

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

10

20

30

40

50

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

【0070】

本明細書で使用する「細胞障害性薬」という用語は、細胞の機能を阻害もしくは防止し、および/または細胞の破壊を引き起こす物質を称する。この用語は、放射性同位体（例えば、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、およびLuの放射性同位体）、化学療法薬、およびそのフラグメントおよび/またはバリエーションを含む細菌、真菌、植物または動物の起源の小分子毒素または酵素活性のある毒素などの毒素を含むよう企図される。

【0071】

「放射線療法」の意味するところは、正常に機能する能力または細胞を完全に破壊する能力を制限するように、細胞に十分な損傷を誘導する定向性ガンマ線またはベータ線の使

10

20

30

40

50

用である。処置の投薬量および持続期間を決定するために、当技術分野で既知の多くの方法があることは認められるであろう。典型的な処置は、1回の投与として与えられ、典型的な投薬量は1日当たり10～200単位（グレイ）の範囲である。

【0072】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法は、追加の免疫療法を対象に投与することをさらに含むことができる。本明細書で使用する場合、「免疫療法」は、患者自身の免疫系を誘導して腫瘍と戦うように設計された治療戦略の多様なセットを称し、表在性膀胱癌のための膀胱内BCG免疫療法、悪性黒色腫および腎細胞癌などに対する特異的な免疫応答を生じるワクチン、患者由来の樹状細胞に前立腺酸ホスファターゼペプチドを負荷して、前立腺由来細胞に対する特異的免疫応答を誘導する、前立腺癌のためのSipuleucel-Tの使用、1つ以上の免疫細胞型を刺激するサイトカイン、成長因子および/またはシグナル伝達分子（例えば、インターロイキン）の投与、患者への再導入に先立ち、腫瘍抗原に特異的なリンパ球および/または樹状細胞のエクスピボ増殖および/または刺激、イミキモド、養子細胞移入、ならびに/あるいは例えば、国際特許公開第WO2003/063792号および米国特許第8,329,660号において説明される方法が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、免疫療法はNK応答を刺激する。いくつかの実施形態において、免疫療法は養子細胞移入アプローチである。

10

【0073】

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

20

【0074】

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

30

【0075】

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

40

【0076】

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

【0077】

「低下する」、「低減した」、「低減」、または「阻害する/抑制する」という用語はすべて、統計的に有意な量の低下を意味するために本明細書で使用される。いくつかの実施形態において、「低減する」、「低減」または「低下する」または「阻害する/抑制す

50

る」は典型的には、参照レベル（例えば、所与の処置のない状態）と比較して少なくとも10%の低下を意味し、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、またはそれより大きな低下を含むことができる。本明細書で使用する場合、「低減」または「阻害/抑制」は、参照レベルと比較した場合の完全な阻害/抑制または低減を包含しない。「完全な阻害/抑制」とは、参照レベルと比較して100%の阻害/抑制である。低下は、好ましくは、所与の障害のない個体についての正常範囲内として許容されるレベルまで低くあることができる。

10

【0078】

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

20

【0079】

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

30

【0080】

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

40

【0081】

本明細書で使用する場合、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、隣接する残基のアルファ-アミノ基とカルボキシ基との間のペプチド結合によって互いに接続された一連のアミノ酸残基を示すために本明細書で相互交換可能に使用される。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、その大きさまたは機能に関係なく、修飾アミノ酸（例えば、リン酸化、糖化、グリコシル化など）およびアミノ酸類似体を含むアミノ酸のポリマーを称する。「タンパク質」および「ポリペプチド」は比較的大きなポリペプチドに関してしばしば使用されるのに対し、「ペプチド」という用語は小さなポリペプチドに関してしばしば使用されるが、当技術分野におけるこれらの用語の使用は一部分が一致する。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、遺伝子産物およびその

50

フラグメントを称するとき、本明細書で相互互換可能に使用される。したがって、例示的なポリペプチドまたはタンパク質には、遺伝子産物、天然に存在するタンパク質、ホモログ、オルソログ、パラログ、フラグメントならびに上述の他の等価物、バリエーション、フラグメント、および類似体が含まれる。

【0082】

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

10

【0083】

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

20

【0084】

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

30

【0085】

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

40

【0086】

本明細書で使用する場合、「エピトープ」は、連続したアミノ酸、またはタンパク質の三次折り畳みによって並置された非連続アミノ酸の両方に由来するポリペプチド上に形成することができる。連続するアミノ酸から形成されたエピトープは典型的には、変性溶媒への曝露の際に保持されるが、三次折り畳みによって形成されたエピトープは典型的には、変性溶媒による処理の際に喪失される。エピトープは、典型的には、独特な空間的立体配座において少なくとも3個、より通常は少なくとも5個、約9個、または約8~10個のアミノ酸を含む。「エピトープ」には、免疫グロブリンVH/VL対によって従来通り

50

結合した構造単位が含まれる。エピトープは、抗体についての最小結合部位を定義し、したがって抗体の特異性の標的を表す。単ドメイン抗体の場合、エピトープは、単離における可変ドメインによって結合した構造の単位を表す。「抗原決定基」および「エピトープ」も、本明細書で相互交換可能に使用することができる。ある特定の実施形態において、エピトープ決定基には、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニルなどの分子の化学活性のある表面の分類が含まれ、ある特定の実施形態において、特定の三次元構造特徴、および/または特定の電荷特徴を有し得る。

【0087】

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

【0088】

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

【0089】

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

【0090】

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

10

20

30

40

50

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

【0091】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性のある部分、すなわち、抗原を免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子を称する。この用語は、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖からなる抗体、ならびに全長抗体およびその抗原結合部分を含む種々の形態も称し、例えば、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDRグラフト抗体、ヒト化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド結合Fv、scFv、単一ドメイン抗体(dAb)、ダイアボディ、多重特異性抗体、二重特異性抗体(dual specific antibody)、抗イディオタイプ抗体、二重特異性抗体(bispecific antibody)、その機能的に活性のあるエピトープ結合フラグメント、二機能性ハイブリッド抗体(例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))および一本鎖(例えば、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883 (1988)およびBird et al., Science 242, 423-426 (1988))(これらは参照により本明細書に援用される)。(概して、Hood et al., Immunology, Benjamin, N.Y., 2ND ed. (1984)、Harlow and Lane, Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)およびHunkapiller and Hood, Nature, 323, 15-16 (1986)を参照されたく、これらは参照により本明細書に援用される)。

【0092】

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

【0093】

本明細書で使用する場合、「CDR」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を称する。重鎖および軽鎖の可変領域の各々には3つのCDRがあり、可変領域の各々に

ついてCDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれる。これらのCDRの正確な境界は、異なる系によって異なって定義されてきた。Kabatによる系(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)および(1991))は、抗体のいかなる可変領域へも適用可能な明白な残基番号付け系を提供するだけでなく、3つのCDRを定義する正確な残基境界も提供する。これらのCDRは、Kabat CDRと称されることがある。Kabat CDRと重複するCDRを定義する他の境界は、Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995))ならびにMacCallum (J Mol Biol 1262(5):732-45 (1996))ならびにChothia (J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)およびNature 342:877-883 (1989))によって説明されてきた。さらに他のCDR境界の定義は、先の系のうちの1つに厳密に従うことはできないものの、それにもかかわらずKabat CDRと重複することになるが、特定の残基または残基の群、さらにはCDR全体が抗原結合に有意に影響することがないという予測または実験上の発見に鑑みて、短縮または延長する可能性がある。本明細書で使用方法は、これらの系のいずれかによって定義されるCDRを利用してよいが、好ましい実施形態は、Kabat定義のCDRを使用する。

【0094】

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

【0095】

10

20

30

40

50

さらに、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、またはCARは、該抗体または抗体部分と1つ以上のさらなるタンパク質またはペプチドとの共有結合または非共有結合によって形成される、より大きな免疫接着分子の一部であってもよい。このような免疫接着分子に関連しているのは、四量体scFv分子を調製するためのストレプトアビジンコア領域の使用(Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93 - 101)、ならびに二価およびビオチン化scFv分子を生成するためのシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチジニル、例えば、ヘキサヒスチジニルタグ(配列番号45として開示の「ヘキサヒスチジニルタグ」)の使用(Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 10471058)である。

10

【0096】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗体、その抗原結合部分、またはCARは、免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDRグラフト抗体、ヒト化抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ジスルフィド結合Fv、scFv、単ドメイン抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体、二重特異性抗体(dual specific antibody)、抗イデオタイプ抗体、二重特異性抗体(bispecific antibody)、およびこれらの機能的に活性のあるエピトープ結合フラグメントであり得る。

【0097】

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

20

【0098】

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

30

【0099】

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

【0100】

アミノ酸は、これらの側鎖の特性の類似性によって分類することができる(A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73 - 75, Worth Publishers, New York (1975)): (1) 非極性: Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M)、(2) 非帯電極性: Gly(G)、Ser(S)、Thr(t)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(n)、Gln(Q)、(3) 酸性: Asp(D)、Glu(E)、(4) 塩基性: Lys(K)、Arg(R)、His(H)。

40

【0101】

あるいは、天然に存在する残基は、一般的な側鎖特性に基づいて複数の群に分けること

50

ができる：(1)疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile、(2)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、(3)酸性：Asp、Glu、(4)塩基性：His、Lys、Arg、(5)鎖の向きに影響を与える残基：Gly、Pro、(6)芳香族：Trp、Tyr、Phe。非保守的な置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを必要とすることになる。

【0102】

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

10

【0103】

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

20

【0104】

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

30

【0105】

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

40

【0106】

天然アミノ酸配列の変更は、当業者に既知の多くの技術のうちのいずれかによって達成することができる。変異は、例えば、天然の配列のフラグメントへのライゲーションを可能にする制限部位に隣接する変異配列を含有するオリゴヌクレオチドを合成することによって、特定の遺伝子座に導入することができる。ライゲーションに続いて、得られた再構築された配列は、所望のアミノ酸の挿入、置換、または欠失を有する類似体をコードする。あるいは、特定オリゴヌクレオチドの部位特異的変異誘発手順を採用して、必要とされる置換、欠失、または挿入によって変更した特定のコドンに有する変更したヌクレオチド

50

配列を提供することができる。このような変更を行うための技術は非常に十分に確立されており、例えば、それらの全体が参照により本明細書に援用される Walder et al. (Gene 42:133, 1986)、Bauer et al. (Gene 37:73, 1985)、Craink (BioTechniques, January 1985, 12-19)、Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981)、ならびに米国特許第 4,518,584 号および同第 4,737,462 号によって開示されているものを含む。

【0107】

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

10

【0108】

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

20

【0109】

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

【0110】

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

30

40

50

【0111】

「キメラ抗体」という用語は、ヒト定常領域に連結されたマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種由来の重鎖および軽鎖の可変領域の配列と別の種の定常領域配列とを含有する抗体を称する。ヒト化抗体は、ヒト抗体（アクセプター抗体と呼ばれる）に実質的に由来する可変領域フレームワーク残基と、非ヒト抗体、例えばマウス抗体（ドナー免疫グロブリンと称される）に実質的に由来する相補性決定領域を有する。それらの全体が参照により本明細書に援用される Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:10029-10033 (1989) および WO90/07861、米国特許第5,693,762号、米国特許第5,693,761号、米国特許第5,585,089号、米国特許第5,530,101号および Winter, 米国特許第5,225,539号を参照されたい。定常領域（複数可）も、存在する場合、ヒト免疫グロブリンに実質的または完全に由来する。ヒト可変ドメインは、通常、そのフレームワーク配列が CDR の由来する（マウス）可変領域ドメインと高度の配列同一性を呈するヒト抗体から選択される。重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク残基は、同じまたは異なるヒト抗体配列の領域に実質的に類似していてもよい。ヒト抗体配列は、天然に存在するヒト抗体の配列であっても、いくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であってもよい。その全体が参照により本明細書に援用される Carter et al., WO92/22653 を参照されたい。

10

【0112】

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

20

【0113】

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

30

【0114】

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

40

【0115】

抗体のアミノ酸配列バリエーションをコードする核酸分子は、当技術分野で既知の種々の方法によって調製される。これらの方法には、オリゴヌクレオチド媒介（または特定部位の）変異誘発、PCR 変異誘発、および以前に調製されたバリエーションまたは当抗体の非バリエーション版のカセット変異誘発が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載される少なくとも1つの抗体、部分またはポリペプチドをコードする核酸配列は、ライゲーションのための平滑末端化したまたは千鳥末端化した末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適宜の粘着末端の充填、望ましくない結合を回避するためのアルカリホス

50

ファクターゼ処理、および適切なりガーゼとのライゲーションを含む従来技術に従ってベクターDNAを用いて組換えることができる。このような操作のための技術は、例えば、Maniatis et al., Molecular Cloning, Lab. Manual (Cold Spring Harbor Lab. Press, NY, 1982および1989)、およびAusubel, 1987, 1993によって開示されており、モノクローナル抗体分子、その抗原結合領域、またはCARをコードする核酸配列を構築するために使用することができる。

【0116】

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

【0117】

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

【0118】

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

【0119】

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

10

20

30

40

50

び異なる種の宿主細胞間でベクターを「シャトル輸送することができることが望ましいかどうかが含まれる。

【0120】

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

10

20

【0121】

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

【0122】

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

30

【0123】

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

40

【0124】

いくつかの実施形態において、抗体、その抗原結合フラグメント、CAR、もしくはキメラH鎖およびL鎖、またはこれらの部分をコードする融合遺伝子は、次いで、レシピエント細胞を同時トランスフェクトするために使用される別個の発現ベクターにおいて集合する。各ベクターは、細菌系での選択のために設計された第1の選択可能遺伝子、および真核生物系での選択のために設計された第2の選択可能遺伝子という2つの選択可能遺伝

50

子を含有することができ、各ベクターは異なる対の遺伝子を有する。この戦略は結果として、細菌系における融合遺伝子の産生を最初に指示し、増幅を可能にするベクターを生じる。細菌宿主内でそのように産生および増幅された遺伝子は、その後、真核細胞を同時トランスフェクトするために使用され、所望のトランスフェクトされた遺伝子を運ぶ同時トランスフェクトされた細胞の選択を可能にする。細菌系における使用のための選択可能な遺伝子の非限定例は、アンピシリンに対する耐性を付与する遺伝子、およびクロラムフェニコールに対する耐性を付与する遺伝子である。真核生物のトランスフェクタントにおける使用のための選択可能な遺伝子には、キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (gpt と指定) および Tn5 由来のホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (neo と指定) が含まれる。あるいは、キメラH鎖およびL鎖をコードする融合遺伝子を同じ発現ベクター上で集合させることができる。

10

【0125】

発現ベクター、むき出しの mRNA またはむき出しの DNA のトランスフェクションおよび本明細書に記載されるキメラ、ヒト化、または複合ヒト抗体の産生のために、レシピエント細胞株は骨髄腫細胞であり得る。骨髄腫細胞は、トランスフェクトした免疫グロブリン遺伝子によってコードされる免疫グロブリンを合成、集合、分泌することができ、免疫グロブリンのグリコシル化についての機序を備えている。例えば、いくつかの実施形態において、レシピエント細胞は組換え Ig 産生骨髄腫細胞 SP2/0 (ATCC # CRL 8287) である。SP2/0 細胞は、トランスフェクトされた遺伝子によってコードされた免疫グロブリンのみを産生する。骨髄腫細胞は、培養液中でまたはマウスの腹腔内で成長することができ、そこで分泌された免疫グロブリンは腹水から得ることができる。他の適切なレシピエント細胞には、ヒトもしくは非ヒト起源の B リンパ球、ヒトもしくは非ヒト起源のハイブリドーマ細胞、または種間ヘテロハイブリドーマ細胞などのリンパ系細胞が含まれる。

20

【0126】

本明細書に記載されるキメラ、ヒト化、もしくは複合ヒト抗体コンストラクト、抗体、その抗原結合部分、および/または CAR を運ぶ発現ベクターまたはむき出しの mRNA またはむき出しの DNA は、形質転換、トランスフェクション、コンジュゲーション、原形質体融合、リン酸カルシウム沈殿、およびジエチルアミノエチル (DEAE) デキストランなどのポリカチオンの適用などの生化学的手段、ならびに電気穿孔法、直接的な微量注射、およびマイクロプロジェクタイトルボンパードメントなどの機械的手段を含む種々の適切な手段のうちいずれかによって、適切な宿主細胞内へ導入することができる。当業者に既知のような Johnston et al., 240 Science 1538 (1988)。

30

【0127】

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

40

【0128】

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

50

【0129】

さらに、マウスまたは他の種由来の遺伝子、適切な生物活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と一緒に適切な抗原特異性の抗体分子スプライシングすることによる、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術（それらの全体が参照により本明細書に援用される Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855 (1984)、Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984)、Takeda et al., Nature 314: 452-454 (1985) を参照されたい) を使用することができる。キメラ抗体とは、マウスモノクローナル抗体に由来する可変領域と、ヒト免疫グロブリン定常領域とを有するもの、例えばヒト化抗体など、異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。

10

【0130】

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

【0131】

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

20

30

【0132】

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

40

【0133】

いくつかの実施形態において、生物試料は、血液、血清、血漿、尿、糞便、または生検試料であり得る。いくつかの実施形態において、第 1 の抗体は、固体支持体、例えば、ポリスチレンもしくはポリカーボネートのマイクロウェルもしくはディップスティックなどの固体マトリックス、膜、またはガラス支持体（例えば、ガラススライド）の上に固定することができる。ある特定の実施形態において、第 2 の抗体は、酵素、色素、放射性核種、発光基、蛍光基またはビオチンなどの検出可能なレポーター部分または標識を含有する

50

ことができる。複合体に結合したままの第2の抗体の量は、特定の検出可能なレポーター部分または標識に適切な方法を使用して測定することができる。放射性基については、シンチレーション計数またはオートラジオグラフィ法が概して適切である。分光法を使用して、色素（例えば、酵素反応の比色生成物を含む）、発光基、および蛍光基を検出することができる。ピオチンは、異なるレポーター基（通常は放射性基または蛍光基または酵素）に連結したアビジンまたはストレプトアビジンを使用して検出することができる。酵素レポーター基は概して、基質の添加（概して特定の期間）によって検出した後、反応生成物を分光分析、分光測光または他の分析によって検出することができる。標準物質および標準添加物を使用して、試料中の抗原のレベルを決定することができる。

【0134】

10

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

【0135】

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

【0136】

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

20

【0137】

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

【0138】

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

30

【0139】

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

【0140】

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

40

【0141】

細胞生物学および分子生物学における一般的な用語の定義は、Merck Research Laboratoriesによって刊行された“The Merck Manual of Diagnosis and Therapy”, 19th Edition, 2006 (ISBN 0-911910-19-0)、Blackwell Science Lt

50

d. によって刊行された Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, 1994 (ISBN 0-632-02182-9)、Jones & Bartlett Publishing によって刊行された Benjamin Lewin, Genes X, 2009 (ISBN-10: 0763766321)、VCH Publishers, Inc. によって刊行された Kendrew et al. (eds.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 1995 (ISBN 1-56081-569-8) および Current Protocols in Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan et al., eds. において認めることができる。

10

【0142】

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

20

30

【0143】

他の用語は、本明細書において、本発明の種々の態様の説明内で定義する。

【0144】

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

40

【0145】

本開示の実施形態の説明は、網羅的であること、または本開示を開示された正確な形態に制限するよう意図するものではない。本開示の具体的な実施形態および本開示のための

50

実施例が、説明目的のために本明細書に記載されているが、種々の等価の変更は、関連技術分野の当業者が認識することになるように、本開示の範囲内で可能である。例えば、方法のステップまたは機能は所与の順序で提示されるが、代替の実施形態は異なる順序で機能を実行してもよく、または機能が実質的に同時に実行されてもよい。本明細書で提供される開示の教示は、適宜、他の手順または方法に適用することができる。本明細書に記載される種々の実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することができる。本開示の態様は、必要な場合、先の参考文献および出願の組成、機能および概念を採用して、本開示のなおさらなる実施形態を提供するように変更することができる。その上、生物学的機能的等価性の考慮により、種類または量における生物学的または化学的作用に影響を与えることなく、タンパク質構造にいくつかの変更を行うことができる。これらのおよび他の変更は、発明を実施するための形態に鑑みて本開示に対して行うことができる。このような変更はすべて、添付の特許請求の範囲内に含まれるよう意図されている。

10

【0146】

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

【0147】

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

20

【実施例】

【0148】

実施例 1

ヒト化抗体可変領域配列の設計

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

30

【0149】

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

40

【0150】

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

50

【0151】

ヒト化可変領域のクローニングおよび発現

すべてのVHおよびVK領域の遺伝子を、アニールし、ライゲートし、PCR増幅した一連の重複するオリゴヌクレオチドを用いて合成して、完全長の合成V領域を得た。次に、集合したバリエーションを、それぞれIgG1重鎖およびカッパ軽鎖のための発現ベクターpANTVhG1およびpANTVk (Antitope) 内へと直接クローン形成した。

【0152】

PTA-2357およびPTA-2358について、ヒト化重鎖および軽鎖のすべての組み合わせ(すなわち、各抗体について合計15組)を、電気穿孔法を介してNS0細胞に安定してトランスフェクトした。各組み合わせについて、電気穿孔した細胞を5x96ウェルの組織培養プレート内に分配し、200nMメトトレキサート(Sigma #M8407)を使用して選択した。各コンストラクトについてのメトトレキサート耐性コロニーを含有するウェルを試料採取し、IgG1発現レベルを検査し、最適な発現株を選択し、T175フラスコへと連続的に増殖させ、液体窒素下で凍結させた。15組すべてについて抗体を発現する細胞株を作製した。

10

【0153】

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

20

【0154】

NCI-H187古典的小細胞肺癌細胞へのバリエーション抗体の結合

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

30

【0155】

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

40

【0156】

細胞を2回洗浄し、 $175 \mu l$ の最終容量のFACS緩衝液中で再懸濁し、FACSチューブに移した。蛍光をフローサイトメトリーで測定し、データ曲線は正規化した%陽性事象(R2においてゲート処理)としてプロットした。曲線から各抗体についてのIC50値を決定し、検査抗体の結果をキメラ抗体の結果で除することによって、相対的なIC50

50

値を計算した。(表1および2を参照されたい)。

【0157】

P T A - 2 3 5 7およびP T A - 2 3 5 8についてのリードヒト化バリエーションを選択し(表3を参照されたい)、安定してトランスフェクトしたN S 0細胞から精製した材料を使用して、濃度範囲を広げて、競合フローサイトメトリーアッセイ(一過性材料について説明)において再検査した(図3A~3Cを参照されたい)。図3(a)は、表4に要約した相対的なI C₅₀値を有するP T A - 2 3 5 7リードについての結合曲線を示す。選択したリードはすべて、キメラ抗体の1.5倍以内に結合する。図3(b)および(c)は、これもまた表4に要約した相対的なI C₅₀値を有するP T A - 2 3 5 8リードについての結合曲線を示す。選択したリードはすべて、キメラ抗体の3倍以内に結合し、2つを除くすべてが1.5倍以内に結合する。

10

【0158】

考察

C D Rグラフト結合技術を使用して構築された、N C I - H 1 8 7細胞に特異的なヒト化抗体を本明細書に記載される。ヒト化抗体は、単一のヒト生殖系列フレームワーク配列をテンプレートとして使用して、マウスC D RおよびC D Rの正しい立体配座に重要であると特定したいいくつかの追加のフレームワーク残基を組み込んで構築した。バリエーションは、ヒト配列に組み込まれるマウス残基の数を最小限にするように設計した。P T A - 2 3 5 7およびP T A - 2 3 5 8の両方について、15個の候補ヒト化抗体を最初にN C I - H 1 8 7細胞への結合について検査した。表4は、本明細書に記載されるアッセイにおいて特に良好な性能を有するP T A - 2 3 5 7抗体の5つのバリエーションおよびP T A - 2 3 5 8抗体の8つのバリエーションを示す。

20

【表1】

表1:キメラP T A - 2 3 5 7と比較したP T A - 2 3 5 7 C H O - K 1由来ヒト化抗体バリエーションの相対的なI C₅₀値

		重鎖バリエーション				
		VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
軽	VK1	>3	>3	>3	>3	>3
鎖	VK2	1.2	1.36	1.57	1.5	2.43
バリエーション	VK3	2.0	0.82	1.64	2.06	>3

30

【表2】

表2:キメラP T A - 2 3 5 8と比較したP T A - 2 3 5 8 C H O - K 1由来ヒト化抗体バリエーションの相対的なI C₅₀値

		重鎖バリエーション				
		VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
軽	VK1	1.09	1.28	1.09	1.48	1.69
鎖	VK2	2.38	1.29	1.81	1.68	1.68
バリエーション	VK3	2.68	>3	2.43	>3	>3

40

50

【表 3】

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

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

10

【表 4】

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

20

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

30

40

50

【表 5】

表 5 : CDR

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

10

20

【表 6】

表 6 :

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

30

40

【0159】

実施例 2

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

50

【0160】

CD66cおよび大腸幹細胞集団。Gemeiらは、CD66cが大腸癌幹細胞(CSC)のマーカであるが、正常な幹細胞集団では発現しないことを実証した。彼らは以下を実証した：

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

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

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

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

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

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

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

【0161】

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

【0162】

CD66cおよび大腸癌幹細胞

多くの腫瘍のバルク集団における発現に加えて、CD66cはCSCの重要なマーカーであり、CEACAM6の発現は腫瘍細胞のCSC特性を伝えることさえできる。Haraguchiらは、種々の消化管腫瘍細胞株由来のサイドポピュレーション(SP)細胞を特徴付けた。SP表現型は、Hoechst 33342などの蛍光色素を排出する高レベルのABCトランスポーターが原因であり、種々の正常および悪性組織の幹細胞集団に対応することが示されてきた。これらの腫瘍株におけるSP集団のマーカーを特定するために、彼らは、オリゴヌクレオチドマイクロアレイを使用してヒト肝細胞癌HuH7細胞のSPと非SPとの間で差次的に発現する遺伝子を分析した。彼らは、CD66cを非SP細胞と比較してSP集団において最も差次的に上方調節された遺伝子として同定した。

【0163】

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

【0164】

癌幹細胞におけるCD66cの役割についての特に強力な証拠は、大腸癌において実証されてきた。Ilantziらは、ヒト大腸細胞株におけるCD66cの過剰発現が細胞分極の喪失を誘導し、その分化能を阻害し、ヌードマウスにおけるその腫瘍形成能を上昇させることを発見した。Gemeiらは、CD66cが大腸CSCのマーカーであるが

10

20

30

40

50

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

10

【0165】

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

20

【0166】

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

30

【0167】

参考文献

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

40

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

【0168】

実施例3

材料および方法

50

C6f1フラグメント - C6f1と呼ばれるCEACAM6の570ヌクレオチドフラグメントを、EcoRI制限部位を含有する順方向プライマーおよびBglII制限部位を含有する逆方向プライマーを使用してPCR増幅した。PCR産物を1%アガロースゲル上で泳動し、生成物の大きさを確認し、製造元の指示によってQiagenゲル抽出キットを使用して所望の大きさのバンドを切り出して精製した。次に、PCR産物を、Promega製のEcoRIおよびBglIIの両酵素を1uL含有する20uL反応液中で37で一晚、制限酵素で消化した。生成物を再度1%アガロースゲル上で泳動して、生成物の大きさを確認し、ゲルから切り出し、Qiagenゲル抽出キットを使用して精製した。EcoRIおよびBglIIを用いて以前に処理されたpFUSEベクターへのフラグメントのライゲーションは、製造元の指示によってNEB T4 DNAリガーゼを使用して実施した。結果として得られたプラスミドをTop10FコンピテントE.coliへと形質転換し、ゼオシンを含有する寒天プレート上に播種した。単一のコロニーを選択し、5mL培養液中で増殖させ、Qiagenミニプレップキットを使用してプラスミドを精製した。DNA配列は、アガロースゲル上での大きさおよびヌクレオチド配列決定の両方によって検証した。

10

【0169】

C6f1フラグメントの精製 - Biologic DuoFlowクロマトグラフィーシステムを使用して、C6f1の精製を行った。20mMリン酸ナトリウムpH7.0結合/洗浄緩衝液(緩衝液A)および100mMクエン酸pH3.0緩衝液(緩衝液B)と組み合わせたGE Healthcare HiTrap HPプロテインAカラムを使用して、上清からC6f1を精製した。プロテインAカラムを使用したC6f1精製についてのプロトコルを以下の表1に列挙する。画分は、緩衝液Bで溶離まで5mLごとに採取し、その後、プロトコルの完了まで2.5mLごとに収集した。

20

【0170】

表7. プロテインAカラムによるC6F1精製のためのプロトコル

プロテインAカラムの各画分20マイクロリットルをポリアクリルアミドゲル上で泳動し、PVDFに転写し、MAb109を使用してプロットして、MAb109反応性C6f1を含有する画分を同定した。次に、反応性画分をプールし、Amicon Ultra Ultracel 30kDa遠心フィルターを使用して濃縮した後、25mM MES pH6.5で30mLの容積にした。次に、試料をBiologic DuoFlowクロマトグラフィーシステムに負荷し、25mM MES pH6.5(緩衝液A)および1M NaCl(緩衝液B)含有25mM MES pH6.5を使用するGE Healthcare HiTrap Qffカラムを用いてさらに精製/濃縮した。Qffカラムを使用したC6f1精製/濃縮のためのプロトコルを以下の表2に列挙する。画分は、緩衝液Bでの溶離まで5mLごとに採取し、その後、プロトコルの完了まで2mLごとに収集した。

30

【表7】

ステップ番号	緩衝液または試料	百分率または勾配	流量 (mL/分)	合計ステップ時間 (分)
1	緩衝液A	100%	5	50
2	試料の負荷/注入	100%	5	150
3	緩衝液A	100%	5	50
4	緩衝液B	100%	5	25
5	緩衝液A	100%	5	50

40

【0171】

表8. Qffカラムを使用したC6f1精製/濃縮のためのプロトコル

Qffカラム由来の各画分20マイクロリットルをポリアクリルアミドゲル上で泳動し、PVDFに転写し、MAb109を使用してプロットして、MAb109反応性C6f

50

1を含有する画分を同定した。次に、反応性画分を一緒にプールし、Amicon Ultra 30 KDa遠心フィルターおよびMilliQ水へと交換した緩衝液を使用して濃縮した。容積が1 mL未満に一旦濃縮されたら、精製したC6f1を微量遠心管に入れ、速度真空装置において完全に乾燥させた。最終試料は、所望の容積のmilliQ中で再懸濁し、使用するまで-20で保存した。

【表8】

ステップ番号	緩衝液または試料	百分率または勾配	流量 (mL/分)	合計ステップ時間 (分)
1	緩衝液A	100%	1	10
2	試料の負荷/注入	100%	1	30
3	緩衝液A	100%	1	10
4	線形勾配 (A~B)	勾配	1	20
5	緩衝液A	100%	1	20

【0172】

HEK Lec1懸濁細胞内でのC6f1の発現 - 細胞を増殖させ、トランスフェクション時までEx-Cell/Freestyle培地の50:50混合物中で維持した。トランスフェクション時に、細胞を遠心分離によって収集し、Freestyle(商標)293培地のみの中に 2.5×10^6 細胞/mLの細胞密度で再懸濁する。次に、Freestyle(商標)293培地中でDNAおよびポリエチレンイミン(PEI)をそれぞれ $2.5 \mu\text{g/mL}$ および $0.5 \mu\text{g/mL}$ の終濃度で使用して細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後24時間、細胞をFreestyle(商標)293培地中で維持した。24時間後、バルプロ酸(VPA)含有Ex-CellまたはESF培地を添加して培養物を1:1に希釈して、 2.2 mM の終濃度にした。次に、CO₂インキュベーター内のプラットフォーム振盪器上で5日間、組換え糖タンパク質産生のために培養物を維持した。5日後、培養物を遠心分離して、所望のC6f1糖タンパク質を含有する懸濁培地から細胞を分離した。さらに、細胞培養培地を $0.42 \mu\text{m}$ 真空フィルターに通した後、プロテインAカラムを備えたBioRadクロマトグラフィシステムを使用して精製した。

【0173】

MAb109結合活性: 100 ng の精製C6f1を、真空マニホールドを使用してPVDF膜上での各反応について三つ組でスポット処理した。TBS-T含有5%ミルク溶液中で膜を4で一晩ブロックした。ストックMAb109($0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$)をブロッキング溶液で1:3000に $0.03 \text{ ng}/\mu\text{L}$ の終濃度まで希釈した後、各競合剤を添加して、室温で30分間インキュベートした。次に、抗体/競合溶液をC6f1スポット処理したストリップとともに室温で1時間インキュベートした。1時間後、ストリップをTBS-Tで3回、各洗浄で5分間洗浄した。二次抗体は、1:5000に希釈され、室温で30分間インキュベートされたSanta Cruz抗マウスIgG HRPとした。製造元の指示によって、3回のTBS-T洗浄を繰り返した後、Perkin-Elmer Western Lightening Plus-ECLを添加した。プロットは、X線フィルムに10分間露光した後、現像した。現像後、フィルムを走査し、ImageJソフトウェアを使用して濃度測定を実施した。

【0174】

CEACAM6フラグメント/変異体のクローン形成および発現 - C6f1のフラグメントのPCRクローン形成は、C6f1-pFUSEをテンプレートとして使用して、製造元の指示によってQiagen製のHotStarTaq DNAポリメラーゼを使用して実施した。pFUSEベクターへのクローン形成を促進するために、順方向および逆方向PCRプライマーをそれぞれEcoRIおよびBglII制限部位を使用して設計し

た。プライマー配列は次のとおりである。I g 1 F : G A A T T C A A A G C C C T C C A T C T C C A G C、I g 1 R : A G A T C T A T T C A G G G T G A C T G G G T C、I g 2 F : G A A T T C A G A T G G C C C C A C C A T T T G G、I g 2 R : A G A T C T G G T G A C T G T G G T C C T A T T、ペプチド3 F : G A A T T C A C T G C A G C T G T C C A A T G G C、およびペプチド3 R ; A G A T C T T T T G A C G C T G A G T A G A G T。PCR産物は、Promega制限酵素を使用して形質転換したE c o R IおよびB g l I Iで制限酵素で制限酵素消化し、エタノール/クロロホルム沈殿させ、製造元の指示によってNEB T 4 DNAリガーゼを使用して調製したp F U S Eベクターへとライゲートした。T o p 1 0 Fコンピテント細胞を形質転換し、ゼオシンを含有する寒天プレート上に播種した。いくつかのクローンを選択し、成長させ、プラスミド調製した後、E c o R IおよびB g l I Iによる制限酵素消化、ならびにDNA配列決定を使用して挿入物を検証した。

10

【0175】

C 6 f 1およびC 8 f 1の特定部位の変異誘発は、Stratagene QuickChange特定部位の変異誘発キットを製造元のプロトコルによって使用して実施した。C 6 f 1の³⁰⁰Q A H³⁰²から³⁰⁰H T T³⁰²へのおよびC 8 f 1の³⁰⁰H T T³⁰²から³⁰⁰Q A H³⁰²への両方についてのプライマーは、C 6 f 1の³⁰⁰H T T³⁰²順方向 : G C G G A T C C T A T A T G T G C C A C A C C A C T A A C T C A G C C A C T G G C C T Cおよび逆方向 : G A G G C C A G T G G C T G A G T T A G T G G T G T G G C A C A T A T A G G A T C C G Cとした。C 8 f 1の³⁰⁰Q A H³⁰²順方向 : G G A T C C T A T G C C T G C C A A G C C C A T A A C T C A G C C A C T G G Cおよび逆方向 : G C C A G T G G C T G A G T T A T G G G C T T G G C A G G C A T A G G A T C C。X L - 1ブルーコンピテント細胞を使用してPCR産物を形質転換し、ゼオシンを含有する寒天プレート上に播種した。いくつかのクローンを選択し、成長させ、プラスミドを調製した後、E c o R IおよびB g l I Iによる制限酵素消化、ならびにDNA配列決定を使用して挿入物を検証した。

20

【0176】

実施例4

M A b 1 0 9エピトープの特徴付け。

本発明者らは、酵素処理を使用して、M A b 1 0 9によって認識されたエピトープを特徴付けた。M A b 1 0 9は、ヒト膵臓腺癌(P D A Cセル(c e l))1株であるN結合型グリカン質のB x P C 3細胞と反応することを示してきた。の全細胞溶解物は、M A b 1 0 9を用いたイムノプロット法によって分析されたものである。図21の左側のパネルに示すように、M A b 1 0 9は、85kDのおよその分子量を有するポリペプチドと反応した。ヒトN結合型グリカンを除去するグリコシル化塩基であるP N GアーゼF(ペプチド : N - グリコシダーゼF)で可溶化物を処理すると、M A b 1 0 9の反応性が消失した。イムノプロットしたものを市販の抗C E A C A M 6ポリペプチド抗体で探索すると、約45kDのポリペプチドを検出した(右側のパネル)。分子量の移行は、ポリペプチド上のNグリカンの除去と一致していた。これらのデータは、M A b 1 0 9エピトープが脊椎動物のN結合型グリカンを加水分解するP N GアーゼFによるC E A C A M 6の処理に感受性があることを示した。

30

40

【0177】

図22に示すように、C E A C A M 6はC E Aファミリーのメンバーである。M A b 1 0 9はC E A C A M 5および6と反応しますが、C E A C A M 8とは反応しない。C E A C A M 6はC E A C A M 5よりも非常に小さく、それゆえ、M A b 1 0 9によって認識されるエピトープは、これら2つのタンパク質に共通する配列とは関連していない。図23に示すように、C E A C A M 6は、3つのドメインであるV、C 1、およびC 2を、12個の潜在的なN結合型構造とともに含有する。

【0178】

VドメインをコードするcDNA配列をC 1およびC 2ドメインのcDNA配列から除

50

去し、先に説明したように p F U S E ベクターへと部分クローン形成した。このベクター内のタンパク質の領域は、C 6 f 1 と称することになる。図 2 5 に示すように、ベクターを H E K - 2 9 3 細胞内で発現させると、S D S - P A G E 後に M A b 1 0 9 を使用したイムノブロット法により予測される分子量である糖タンパク質を生成した。C 6 f 1 1 0 9 エピトープは、P N G アーゼ F に感受性があった。C E A C A M 6 ポリペプチドに対する市販の抗体を使用すると、このエピトープは予想通りイムノブロット法後に残存していたが、処理したタンパク質の分子量は低減し、このことは、P N G アーゼ F による C 6 f 1 上での N - グリカンの除去と一致していた。

【 0 1 7 9 】

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

【 0 1 8 0 】

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

【 0 1 8 1 】

実施例 5

M A b 1 0 9 エピトープの特徴付け：変異誘発分析。

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

【 0 1 8 2 】

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

【 0 1 8 3 】

C 6 f 1 上の他の場所にある N 結合型構造が M A b 結合に関与することができるかどうかを判定するために、9 個の N 結合型シークオンの各々を順番に変異させた。図 3 4 に示

すように、N309がN309Aに変異したとき、MAb結合は存在せず、このシークオンのグリカンのみが関与していたことを示した。

【0184】

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

10

【0185】

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

20

【0186】

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

30

【0187】

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

40

【0188】

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

50

【0189】

これらのデータは、M A b 1 0 9 の結合には、N 3 0 9 に付着した最少で単一の G 1 c N A c 残基を必要とするかもしれず、また、近くに他の残基も必要とするかもしれないことを示唆した。この結合は、還元およびアルキル化ならびに S D S - P A G E、次いで P V D F 上でのウエスタンブロット法の後のグリコペプチドが M A b 1 0 9 結合活性を示すので、二次ペプチド構造（ジスルフィド）を必要とするようには見えない。さらに、C 2 9 9 A および 2 5 9 A のいずれかの変異は結果的に M A b 結合の喪失を生じるので、これらのシステイン間のジスルフィド架橋は、エピトープの生合成のために存在しなければならない。そのため、ニトロセルロース上での生合成および / または M A b 1 0 9 の結合には以下が必要と思われる：ジスルフィド架橋 C 2 5 9 - C 2 9 9、N 3 0 9 上での G 1 c N A c、Q 3 0 0 および H 3 0 2、ならびに S 3 0 4

10

【0190】

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

20

【0191】

実施例 6

膵癌試料における M a b 1 0 9 エピトープの検出。

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

30

【0192】

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

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

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

g . 配列番号 4 または 1 0 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、

h . 配列番号 5 または 1 1 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2、

i . 配列番号 6 または 1 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3、

j . 配列番号 1 または 7 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、

k . 配列番号 2 または 8 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2、および

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

(項目 2)

40

50

以下の軽鎖相補性決定領域（CDR）：

- d．配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
- e．配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、および
- f．配列番号6のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む、項目1に記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはCAR。

（項目3）

以下の軽鎖相補性決定領域（CDR）：

- d．配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
- e．配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、および
- f．配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を含む、項目1に記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはCAR。

10

（項目4）

以下の重鎖相補性決定領域（CDR）：

- a．配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
- b．配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および
- c．配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む、項目1～3のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはCAR。

（項目5）

以下の重鎖相補性決定領域（CDR）：

- a．配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
- b．配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および
- c．配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む、項目1～3のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはCAR。

20

（項目6）

以下の相補性決定領域（CDR）：

- g．配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
- h．配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、
- i．配列番号6のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、
- j．配列番号1のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
- k．配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および
- l．配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む、項目1～5のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはCAR。

30

（項目7）

以下の相補性決定領域（CDR）：

- g．配列番号10のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
- h．配列番号11のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、
- i．配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、
- j．配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
- k．配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および
- l．配列番号9のアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を含む、項目1～5のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはCAR。

40

（項目8）

配列番号13～17および2125から選択される配列を有する重鎖を含む、項目1～7のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはCAR。

（項目9）

配列番号18～20および配列番号26～28から選択される配列を有する軽鎖を含む、項目1～8のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはCAR。

（項目10）

配列番号13～17から選択される配列を有する重鎖と、配列番号18～20から選択される配列を有する軽鎖とを含む、項目1～9のいずれかに記載の単離された抗体、その

50

抗原結合部分、またはC A R。

(項目11)

配列番号21～25から選択される配列を有する重鎖と、配列番号26～28から選択される配列を有する軽鎖とを含む、項目1～9のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A R。

(項目12)

C D Rに含まれない配列中に保存的置換をさらに含む、項目1～11のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A R。

(項目13)

前記抗体またはポリペプチドが、

免疫グロブリン分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、C D Rグラフト抗体、ヒト化抗体、F a b、F a b'、F (a b')²、F v、ジスルフィド結合F v、s c F v、単ドメイン抗体、ダイアボディ、多重特異性抗体、二重特異性抗体 (d u a l s p e c i f i c a n t i b o d y)、抗イデオタイプ抗体、二重特異性抗体 (b i s p e c i f i c a n t i b o d y)、および二重特異性T細胞エンゲージャー (B i T E) からなる群から選択される、項目1～12のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A R。

(項目14)

前記単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rが、癌細胞の表面上にある抗原に特異的に結合する、項目1～13のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A R。

(項目15)

前記単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A Rが、癌幹細胞の表面上にある抗原に特異的に結合し、正常な腸細胞に特異的に結合しない、項目1～13のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、またはC A R。

(項目16)

2つの結合部位を含む二重特異性T細胞エンゲージャー (B i T E) であって、第1の結合部位が項目1～15のいずれかに記載の抗原結合部分を含み、第2の結合部位が、T細胞に特異的に結合する抗体の抗原結合部分を含む、二重特異性T細胞エンゲージャー (B i T E)。

(項目17)

T細胞に特異的に結合する抗体の前記抗原結合部分が、抗体の抗C D 3抗原結合部分である、項目16に記載の二重特異性T細胞エンゲージャー (B i T E)。

(項目18)

少なくとも1つの抗原結合部分がs c F vである、項目16～17のいずれかに記載の二重特異性T細胞エンゲージャー (B i T E)。

(項目19)

項目1～18のいずれかに記載の単離された抗体、その抗原結合部分、C A R、またはB i T Eと、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

(項目20)

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

(項目21)

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

(項目22)

前記核酸がc D N Aである、項目20～21のいずれかに記載の核酸。

(項目23)

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

10

20

30

40

50

(項目 2 4)前記細胞が免疫細胞である、項目 2 3 に記載の細胞。(項目 2 5)前記細胞が、T 細胞、NK 細胞、およびNK T 細胞からなる群から選択される、項目 2 4 に記載の細胞。(項目 2 6)前記単離された抗体、その抗原結合部分、またはCAR が細胞表面上で発現する、項目 2 3 ~ 2 5 のいずれかに記載の細胞。(項目 2 7)癌を処置することを必要とする対象において癌を処置する方法であって、項目 2 3 ~ 2 6 のいずれかに記載の細胞を前記対象に投与することを含む、方法。(項目 2 8)癌を処置することを必要とする対象における癌を処置する方法であって、項目 2 0 ~ 2 2 に記載の核酸を前記対象に投与することを含み、前記対象のT細胞は、前記核酸によってコードされた前記ポリペプチドを発現させる、方法。(項目 2 9)前記癌が膵癌、肺癌、非小細胞肺癌、結腸癌、乳癌、肝癌、および前立腺癌からなる群から選択される、項目 2 7 ~ 2 8 のいずれかに記載の方法。(項目 3 0)患者由来の生体試料中のCEACAM6を検出する方法であって、a) 前記患者由来の前記生体試料を、糖ペプチドを含む第1のエピトープに特異的に結合する第1の抗体と接触させて、前記第1の抗体と前記CEACAM6との間に第1の複合体を形成すること、b) 前記第1の複合体を、第2のエピトープに特異的に結合する第2の抗体であって、前記第1のエピトープおよび前記第2のエピトープが異なっている、第2の抗体と接触させて、第2の複合体を形成することであって、前記第2の複合体が、前記第1の抗体と、CEACAM6と、第2の抗体とを含む、形成すること、c) 前記第2の複合体を検出し、それによりCEACAM6を検出すること、を含む、方法。(項目 3 1)前記生体試料が、血清、血液、または血漿試料を含む、項目 3 0 に記載の方法。(項目 3 2)前記第1のエピトープが配列番号51またはそのフラグメントを含む、項目30に記載の方法。(項目 3 3)前記第1のエピトープが配列番号101またはそのフラグメントを含む、項目32に記載の方法。(項目 3 4)前記第1のエピトープが配列番号77またはそのフラグメントを含む、項目32に記載の方法。(項目 3 5)前記第2の抗体が、検出可能な標識を含む、項目30に記載の方法。(項目 3 6)前記検出可能な標識が、ビオチン基、酵素、色素、発光基、および蛍光基からなる群から選択される、項目35に記載の方法。(項目 3 7)前記第1の抗体が固体支持体上に固定されている、項目30に記載の方法。(項目 3 8)

10

20

30

40

50

前記第1の抗体がヒト化抗体である、項目30に記載の方法。

(項目39)

前記ヒト化抗体が項目1~13のいずれか1項に記載のヒト化抗体である、項目38に記載の方法。

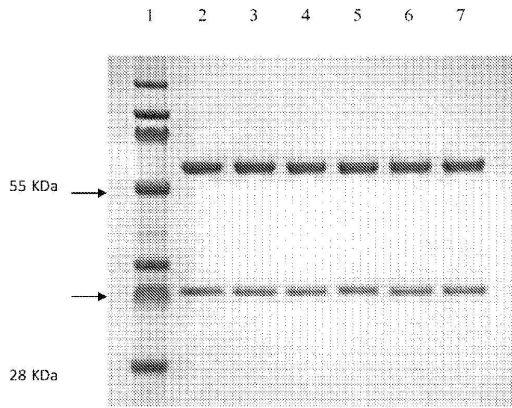
(項目40)

前記患者が膵癌に罹患しているかまたは膵癌の危険性がある、項目30に記載の方法。

【図面】

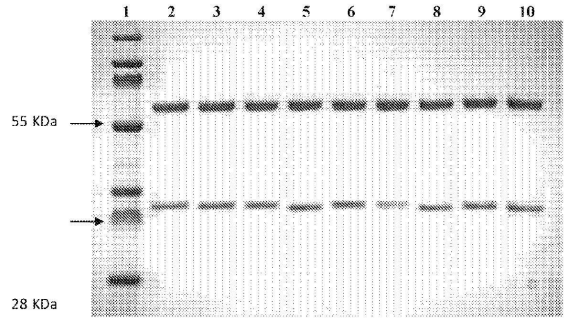
【図1】

【図1】



【図2】

【図2】

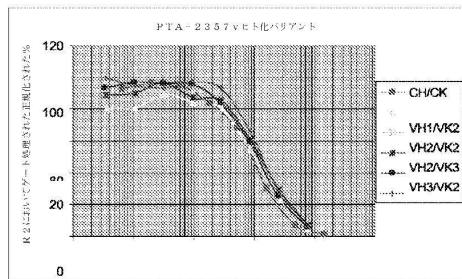


10

20

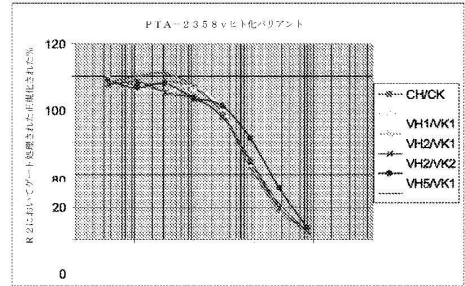
【図3A】

【図3A】



【図3B】

【図3B】



30

40

50

【 図 15 - 2 】

【 図 15 】 (続前)

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

K&A+1に500Rの定数は10ナントク量(標準)が、CDR3ナントク量は10ナントク量(標準)と異なる。そのほか、変異は変異位置に示されている。変異は斜線で示されている。

【 図 16 - 2 】

【 図 16 】 (続き)

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

K&A+1に500Rの定数は10ナントク量(標準)が、CDR3ナントク量は10ナントク量(標準)と異なる。そのほか、変異は変異位置に示されている。変異は斜線で示されている。

【 図 16 - 1 】

【 図 16 】

PTA-2358R可変領域ナントク量(標準) (変異番号1) およびE/A(変異番号2) 配列(ナントク量)

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

PTA-2358R可変領域ナントク量(標準) (変異番号1) およびE/A(変異番号2) 配列(ナントク量)

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TGGACTTGGTGTGAGCACTCTGAGCGCCGACCACTGTGAGACTCTCTCA
 M R W V X Q A E W Q G L E W I G W I D P S R P D T S C A P K F Q G R
 40 50 60

PTA-2358R可変領域ナントク量(標準) (変異番号1) およびE/A(変異番号2) 配列(ナントク量)

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGCCTATGACTGTGAGCACTCTGAGCGCCGACCACTGTGAGACTCTCTCA
 A T F T A D T S F S T A Y M S L S K L R S D T A V Y Y C N A P Y
 70 80 90

【 図 17 - 1 】

【 図 17 】

PTA-2358R可変領域ナントク量(標準) (変異番号1) およびE/A(変異番号2) 配列(ナントク量)

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GAGTTAGCTGTGAGCACTCTGAGCGCCGACCACTGTGAGACTCTCTCA
 D I V L T Q S P D S L A V S L G F R A T I N C R A S X S Y S A S G
 10 20 27 A B C D

PTA-2358R可変領域ナントク量(標準) (変異番号1) およびE/A(変異番号2) 配列(ナントク量)

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 TGGACTTGGTGTGAGCACTCTGAGCGCCGACCACTGTGAGACTCTCTCA
 K S P L M W Y Q K P G Q D D K L L I V L A S N L Z S G V P D P F S
 30 40 50

PTA-2358R可変領域ナントク量(標準) (変異番号1) およびE/A(変異番号2) 配列(ナントク量)

G S G S G T D P T L W I S S L Q E E D V A T Y Y C Q R S R S L K F
 70 80 90 94 96

【 17 - 2】

【 17】 (続き)

310 320 330
 TTCGGTCAGGCGCCAGCTCGAAATCCAA
 F G G S T K L E I K
 100 106 A

KaRaLiはCDKの阻害剤及びタンパク質阻害剤は、CDKヌクレオチドはタンパク質阻害剤と類似している。元のペプチドの配列から変化したアミノ酸を太字で強調している。

【 18 - 2】

【 18】 (続き)

310 320 330
 TTCGGTCAGGCGCCAGCTCGAAATCCAA
 F G G S T K L E I K
 100 106 A

KaRaLiはCDKの阻害剤及びタンパク質阻害剤は、CDKヌクレオチドはタンパク質阻害剤と類似している。元のペプチドの配列から変化したアミノ酸を太字で強調している。

【 18 - 1】

【 18】

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GACATTGCTGACACAGTCTCTGACTCTTTAGCTTATCTTGGGGGAGGCGCACATCAACTGCAGGKCGAAGAAATTCAGGKCFACCTGGCTGGCT
 D I V L T Q S P D S L A V S L G R R A T I S C R A S K S V S A S P
 10 20 27 A H C D

PTA-2558可変領域ヌクレオチド (配列番号43) およびPFL (配列番号27) 配列番号97アン12

【 19 - 1】

【 19】

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GACATTGCTGACACAGTCTCTGACTCTTTAGCTTATCTTGGGGGAGGCGCACATCAACTGCAGGKCGAAGAAATTCAGGKCFACCTGGCTGGCT
 D I V L T Q S P D S L A V S L G R R A T I S C R A S K S V S A S P
 10 20 27 A B C D

PTA-2558可変領域ヌクレオチド (配列番号44) およびPFL (配列番号8) 配列番号97アン13

【 図 1 9 - 2 】

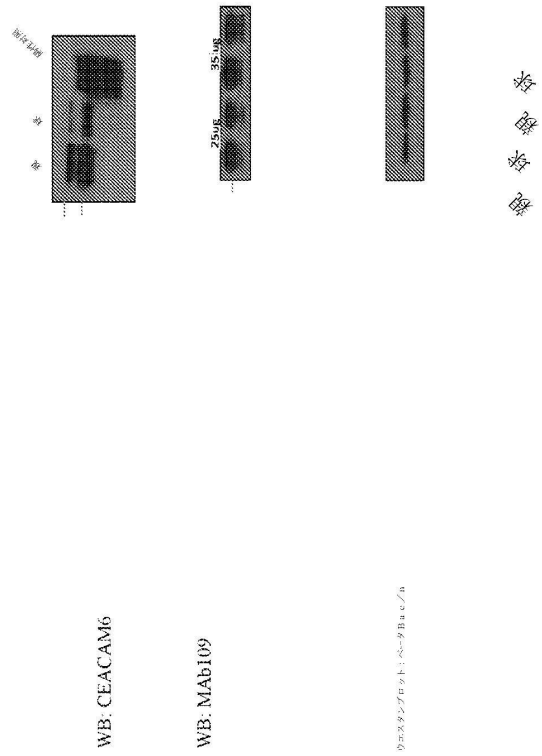
【 図 1 9 】 (続 き)

310 320 330
 TTTCGGTCAAGGCGACCAAGCTCGGAAATCCAAA
 E G Q G T K L L E I K
 100 106 A

【 注 】 K b a i によるCDNの塩基配列は、CDNデータベースに登録されている。K b a iによるCDNの塩基配列は、CDNデータベースに登録されている。K b a iによるCDNの塩基配列は、CDNデータベースに登録されている。

【 図 2 0 】

【 図 2 0 】



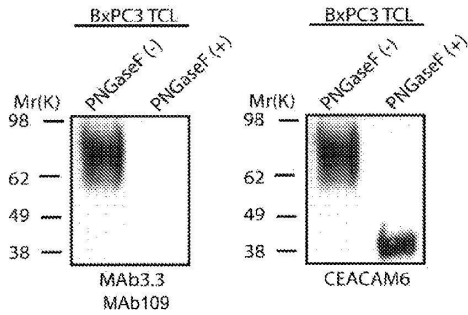
10

20

【 図 2 1 】

【 図 2 1 】

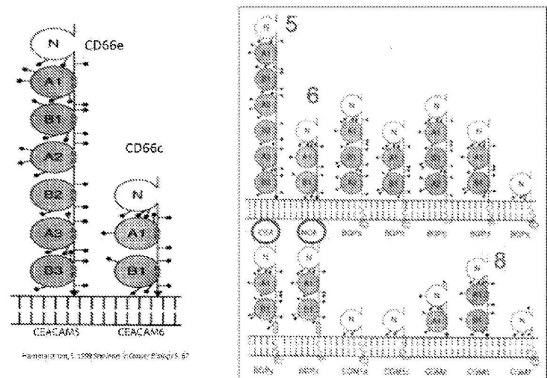
MAb109は、PNGase F反応性によって示されるように、N結合型グリコタンパク質と反応する



【 図 2 2 】

【 図 2 2 】

糖鎖発現抑制 (CEA) プレパレート



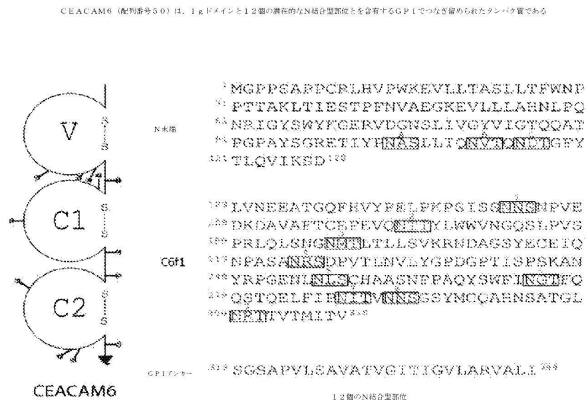
30

40

50

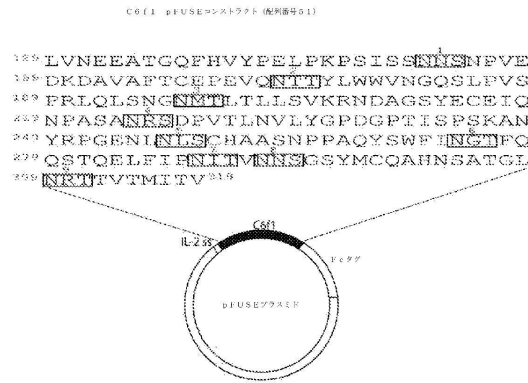
【図 2 3】

【図 2 3】



【図 2 4】

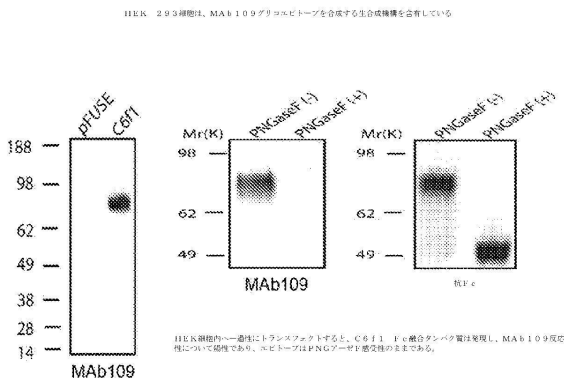
【図 2 4】



10

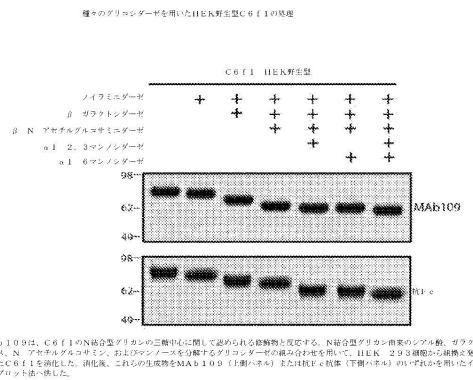
【図 2 5】

【図 2 5】



【図 2 6】

【図 2 6】



20

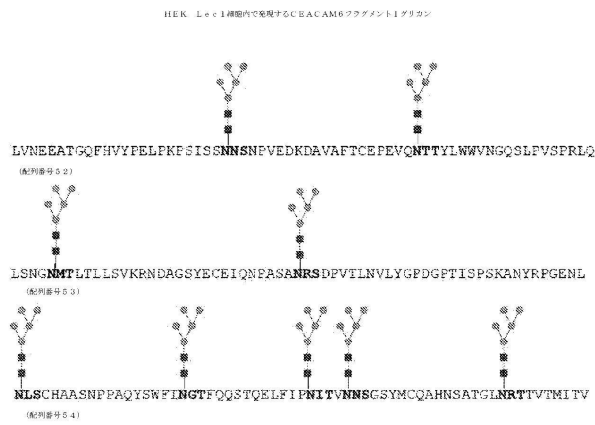
30

40

50

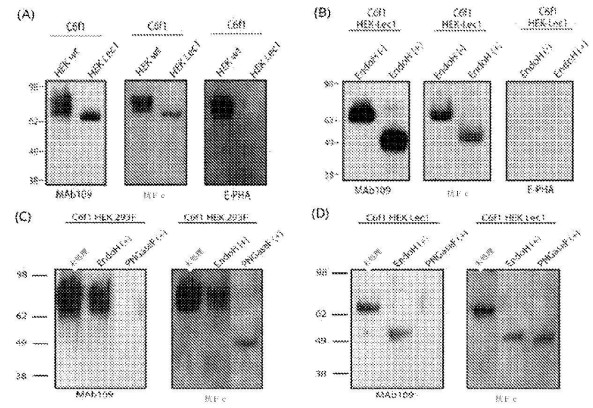
【 27 】

【 27 】



【 28 】

【 28 】

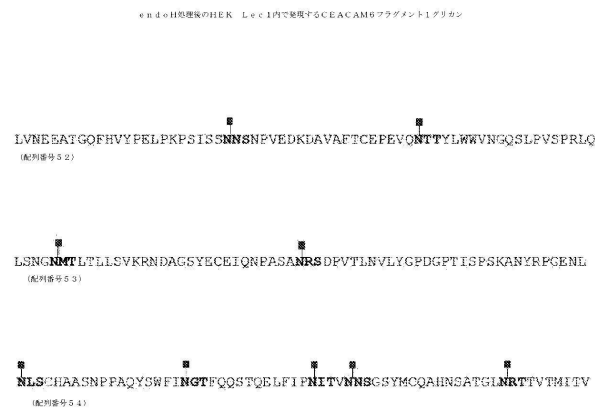


HEK Lec1細胞内で発現するMAb109抗体による、EndoM1阻害による。 (A) HEK Lec1細胞 (w/o) 24時間 HEK Lec1細胞内において細胞を感染したC61 (1)のフラグメント (D) MAb109抗体による、E PHASの存在によって阻害されるような、24時間 HEK Lec1細胞内においてEndoM1阻害による。 (C) HEK Lec1細胞 (w/o) MAb109抗体による、EndoM1阻害による。 (D) MAb109抗体による、HEK Lec1細胞内においてC61の糖タンパク質に反応するEndoM1による阻害に相対する阻害を示す。

10

【 29 】

【 29 】

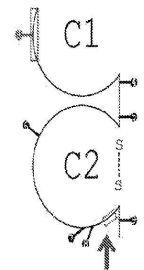


【 30 】

【 30 】

CEACAM5 (配列番号55)、6 (配列番号56)、22108 (配列番号57) におけるC末端の配列アラインメント

CEACAM5	152	LSNCGNMTLTLTFFVYVYVNSASNYKCEIQ	278
CEACAM6	153	LQLSNCGNMTLTLTLLSVKRNNDAGSYECEIQ	238
CEACAM6	154	LQLSNCGNMTLTLTLLSVKRNNDAGSYECEIQ	238
CEACAM5	219	NEVSARRRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTS	305
CEACAM6	219	NEASANRSDSVILNVLYGPDAPTISPSKAN	278
CEACAM6	221	NEASANRSDSVILNVLYGPDAPTISPSDTY	278
CEACAM5	248	YRSCENLNLSCHAASNPPAQYSWVNGTFO	278
CEACAM6	244	YRPGENLNLSCHAASNPPAQYCFVYVNGTFO	305
CEACAM6	245	YHAGVNLNLSCHAASNPPAQYSWVNGTFO	278
CEACAM5	273	QSTQLEFIPNITVNNSSGYMCQAHNSATGL	304
CEACAM6	273	QSTQLEFIPNITVNNSSGYMCQAHNSATGL	278
CEACAM6	271	CYTKLFIPLITKNSGYSACEITNSATGR	305
CEACAM5	307	NRRTVVTITV	310
CEACAM6	307	NRRTVVTITV	278
CEACAM6	309	NRRTVVTITV	271



20

30

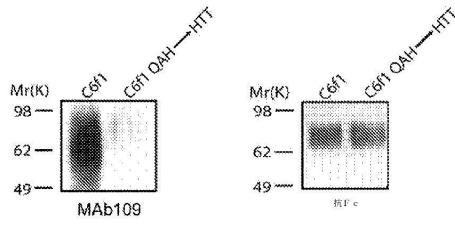
40

50

【 図 3 1 】

【 図 3 1 】

C6f11の特定部位の変異誘発
QAH*→**HTT**は、MAb109反応性を消失させる

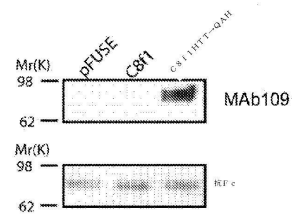


- C E A C A M 6 配列由来の3つのアミノ酸をC E A C A M 8 配列へ変異させた。
- M A b 1 0 9 の反応性が本質的に消失した。(フィルムの一機露光通過)

【 図 3 2 】

【 図 3 2 】

C E A C A M 8 の3個のアミノ酸を変異させると、M A b 1 0 9 グラホエピトープは発現する



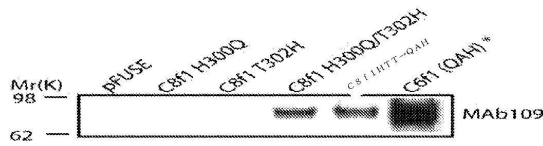
- C E A C A M 8 は、グラホエピトープ発現に必要なN結合型部位を含有しているが、HEK-293細胞内で一過性に発現させると、N結合型部位を産生しない。
- C E A C A M 8、HTTからQAHへのアミノ酸300→302の変異は、M A b 1 0 9 グラホエピトープに対する陽性反応性をもたらす

10

【 図 3 3 】

【 図 3 3 】

C E A C A M 6 エピトープグリコシル化部位の下流のC E A C A M 8 アミノ酸の変異は、M A b 1 0 9 エピトープ発現をもたらし



【 図 3 4 】

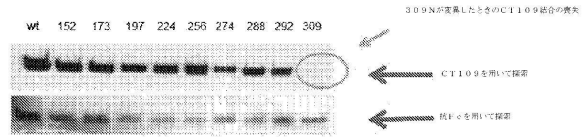
【 図 3 4 】

C 6 f 1 1 に対する各N結合型サブオンの欠失 (N-0) (配列番号511)

```

129 LVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNHSNPVE (N152)
159 DKDAVAFTCEPEVQNTTYLWVWVNGQLPVS (N173)
189 PRLQLSNGNHTLLLSVKRNDAGSYECEIQ (N197)
219 NPASANRSDPVTLNVLVYGGDPTISPSKAN (N224)
249 YRPGENLNLSCHAASNPPAQYSWFINGTFQ (N256...N274)
279 QSTQELFIPNFTVNNNGSYMCAHNSATGL (N288...N292)
309 NRTVTMTIV (N309)

```



20

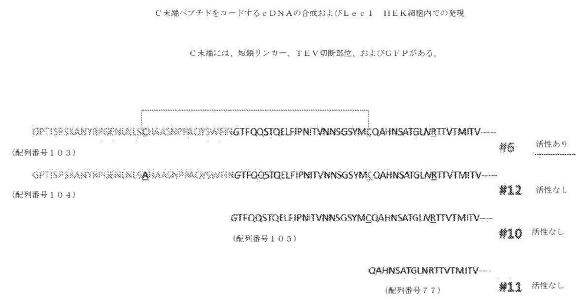
30

40

50

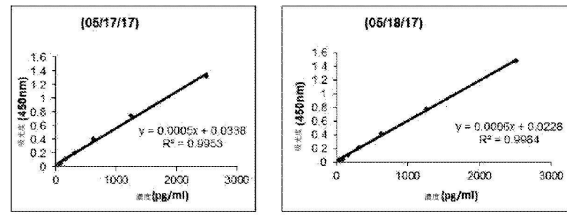
【 39 】

【図39】



【 40 】

【図40】



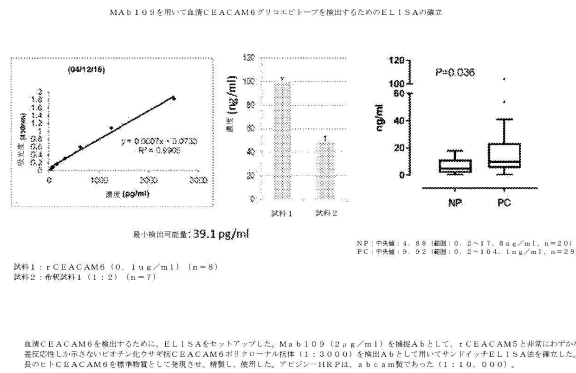
血清にCEACAM6を検出するために、ELISAをセットアップした。Mab109 (2 µg/ml) を検体Aとして、rCEACAM5と非反応性抗体が交差反応性しか示さないヒトオナチン化チロシンCEACAM6ポリクローナル抗体 (1:3000) を検体Bとして用いてサンドイッチELISAを確立した。全長のヒトCEACAM6を標準物質として発現させ、精製し、使用した。アジジン-HRPは、abcam製であった (1:10,000)。

本結果をこれらの標準曲線に基づいて計算した。正常血清および標準曲線 (40 ng/ml以下のTgen製) を検体試験材料と一緒にセットアップし、対照として使用した。
 正常血清: 1.0 および 0.5 ng/ml
 標準曲線: 1.24, 3.4 および 14.6, 0.4 ng/ml

10

【 41 】

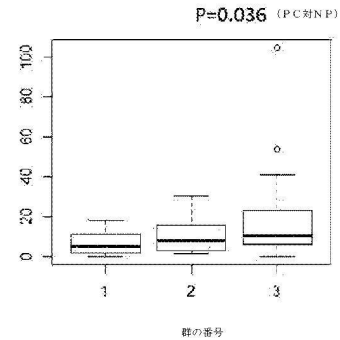
【図41】



【 42 】

【図42】

初回の検査 (2016年4月15日および2016年4月27日)



1. NP: 中央値: 4.88 (範囲: 0.2~17.8 ng/ml, n=20)
 2. CP: 中央値: 7.79 (範囲: 1.21~30.5 ng/ml, n=8)
 3. PC: 中央値: 9.92 (範囲: 0.2~104.1 ng/ml, n=29)

NP: 非腫患者、CP: 慢性肺炎、PC: 慢性肺癌

20

30

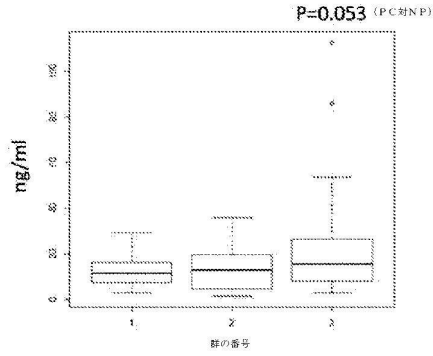
40

50

【 図 4 3 】

【図43】

第2回の検査（全試料2016年5月27日）



1. NP：中央値：11.4（範囲：2.90～29.5ng/ml、n=20）
 2. CP：中央値：13.0（範囲：1.4～36.0ng/ml、n=19）
 3. PC：中央値：15.5（範囲：2.90～113.0ng/ml、n=29）

NP：非腫患者、CP：慢性肺炎、PC：慢性肺癌

10

【配列表】

0007325045000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/04 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/17 (2015.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/18 (2006.01)
 A 6 1 P 1/04 (2006.01)
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 15/00 (2006.01)
 A 6 1 P 13/08 (2006.01)
 C 0 7 K 16/30 (2006.01)
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 Q 1/04
 A 6 1 K 39/395 E
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 39/395 G
 A 6 1 K 39/395 U
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 35/17
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 43/00 1 0 5
 A 6 1 P 1/18
 A 6 1 P 1/04
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 15/00
 A 6 1 P 13/08
 C 0 7 K 16/30
 G 0 1 N 33/53 D

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ピアース, ジェイ. マイケル

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

(72)発明者 ゲルバー, コハヴァ

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

審査官 上村 直子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 5 0 8 9 9 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 8 4 2 0 7 (W O , A 1)

Cancer Research, 1987年, Vol 47, No 18, pp.4782-4787

Dolezal SJ, A unique glycan is a specific marker for pancreatic adenocarcinoma, University of Georgia Theses and Dissertations, 2015年, 1-129, https://getd.libs.uga.edu/pdfs/dolezal_samuel_j_201505_phd、<https://hdl.handle.net/10724/32702>

Cancer Research, 2015年, Vol 75 No 15 Suppl 1, Abstract 2485

Glycoconjugate Journal, 2015年, Vol 32, No 5, p.316, Abstract 321

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

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

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 P 2 1 / 0 8

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

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

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q