

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-510671

(P2020-510671A)

(43) 公表日 令和2年4月9日(2020.4.9)

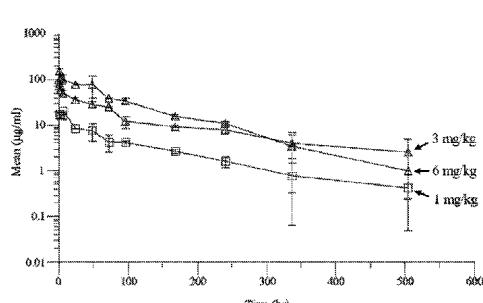
(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	E	4 C 076
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00	Z N A	4 C 084
A 61 P 1/04 (2006.01)	A 61 P 1/04		4 C 085
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 2 1	4 C 086
A 61 K 47/68 (2017.01)	A 61 K 39/395	T	4 H 045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 161 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2019-547665 (P2019-547665)	(71) 出願人	505314468 シアトル ジェネティックス, インコ ポレイテッド アメリカ合衆国 ワシントン 98021 , ボセル, エス. イー., 30ティ ーエイチ ドライブ - 21823
(86) (22) 出願日	平成30年3月2日 (2018.3.2)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	令和1年10月31日 (2019.10.31)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 國際出願番号	PCT/US2018/020562	(72) 発明者	ドランスフィールド, ダニエル ティー . アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 341, ハンソン, ジョージ ストリ ート 14
(87) 國際公開番号	W02018/160909		
(87) 國際公開日	平成30年9月7日 (2018.9.7)		
(31) 優先権主張番号	62/466,766		
(32) 優先日	平成29年3月3日 (2017.3.3)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	62/480,126		
(32) 優先日	平成29年3月31日 (2017.3.31)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54) 【発明の名称】グリカン相互作用化合物および使用の方法

(57) 【要約】

グリカン相互作用抗体を投与することを含むがんを処置する方法が提供される。所望の生物活性、バイオアベイラビリティおよび毒性レベルを達成するのに適している抗シリルTn抗原抗体ならびに関連組成物および製剤が含まれる。この抗体は、配列番号7および9からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と、配列番号8および10からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン(VL)とを含み得る。抗体は、抗体-薬物コンジュゲートであってもよい。

Fig. 2 Serum Antibody Concentrations Following Day 1 Administration



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗体を投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法であって、前記抗体が、約1mg/kg～約10mg/kgの用量で投与され、前記抗体が、約50時間～約200時間の終末相半減期を有し、前記抗体が、シアリルTn抗原(STn)に結合する、方法。

【請求項 2】

前記抗体が、
配列番号7および9からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と、
10

配列番号8および10からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン(VL)と

を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記抗体が、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗体が、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)にコンジュゲートされている、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体が、静脈内投与される、請求項1から4のいずれかに記載の方法。

20
【請求項 6】

結腸直腸がんを処置する方法であって、前記方法が、結腸直腸がんを有する対象に抗STn抗体を投与することを含み、前記抗STn抗体が、

配列番号7、9および11からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と、

配列番号8、10および12からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン(VL)と

を含む、方法。

【請求項 7】

前記結腸直腸がんが、セツキシマブ、パニツムマブ、ベバシズマブ、ラムシルマブ、トラスツズマブ、ポナチニブ、ソラフェニブ、5-フルオロウラシル、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、イリノテカン、パクリタキセルおよびオキサリプラチンのうちの少なくとも1つでの処置に対して抵抗性である、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗STn抗体が、ADCを含む、請求項6または7に記載の方法。

【請求項 9】

前記ADCが、少なくとも1つのコンジュゲートを含み、前記少なくとも1つのコンジュゲートが、アウリスタチン、メイタンシン、チューブリシン、ビンカアルカルトイド、ピロロベンゾジアゼピン二量体、カンプトテシン、デュオカルマイシン、アマニチン、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)阻害剤およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ(MEK)阻害剤のうちの1つまたは複数から選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記ADCが、1つまたは複数のポリマーを含み、前記1つまたは複数のポリマーが、前記抗STn抗体と前記少なくとも1つのコンジュゲートとを接続する、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

前記1つまたは複数のポリマーが、ポリ(エチレングルコール)(PEG)、ポリ(N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド)(ポリHPMA)、ポリ(-アミノ酸)、炭水化物ポリマー、グリコ多糖、糖脂質、グリココンジュゲート、ポリグリセロー

10

20

30

40

50

ル、ポリビニルアルコール、ポリ(アクリル酸)、ポリケタールおよびポリアセタールのうちの1つまたは複数を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記1つまたは複数のポリマーが、ポリ(1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール)(PHF)を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記抗STn抗体が、STnを発現する細胞を死滅させ、半数阻害濃度が約0.1nM～約50nMである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記抗STn抗体を投与することが、少なくとも1つの他の治療的処置と組み合わせて行われる、請求項6から13のいずれかに記載の方法。 10

【請求項15】

前記少なくとも1つの他の治療的処置が、標準ケア治療的処置を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記少なくとも1つの他の治療的処置が、セツキシマブ、パニツムマブ、ベバシズマブ、ラムシルマブ、トラスツズマブ、ポナチニブ、ソラフェニブ、5-フルオロウラシル、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、イリノテカン、パクリタキセルおよびオキサリプラチンのうちの1つまたは複数から選択される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記少なくとも1つの他の治療的処置が、少なくとも1つの細胞周期阻害剤の投与を含む、請求項14に記載の方法。 20

【請求項18】

前記少なくとも1つの細胞周期阻害剤が、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害剤である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記CDK阻害剤が、CDK4および/またはCDK6を阻害する、請求項18に記載の方法。 20

【請求項20】

前記CDK阻害剤が、パルボシクリブ、リボシクリブおよびアベマシクリブから選択される、請求項19に記載の方法。 30

【請求項21】

前記抗STn抗体が、前記少なくとも1つの他の治療的処置と同時に処置される、請求項11から20のいずれかに記載の方法。

【請求項22】

前記抗STn抗体が、前記少なくとも1つの他の治療的処置と逐次的に処理される、請求項11から20のいずれかに記載の方法。

【請求項23】

がんを処置する方法であって、前記方法が、がんを有する対象に抗STn抗体を投与することを含み、前記抗STn抗体が、 40

配列番号7、9および11からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と、

配列番号8、10および12からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン(VL)と

を含み、前記抗STn抗体を投与することが、少なくとも1つの細胞周期阻害剤と組み合わせて行われる、方法。

【請求項24】

前記少なくとも1つの細胞周期阻害剤が、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害剤である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

10

20

30

40

50

前記 C D K 阻害剤が、 C D K 4 および / または C D K 6 を阻害する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 C D K 阻害剤が、パルボシクリブ、リボシクリブおよびアベマシクリブから選択される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記抗 S T n 抗体が、前記少なくとも 1 つの細胞周期阻害剤と同時に投与される、請求項 2 3 から 2 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 8】

前記抗 S T n 抗体が、前記少なくとも 1 つの細胞周期阻害剤と逐次的に投与される、請求項 2 3 から 2 6 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 2 9】

a . 抗 S T n 抗体であって、

配列番号 7 、 9 および 11 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V H ;

配列番号 8 、 10 および 12 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する V L を含む抗 S T n 抗体と、

b . 1 つまたは複数の細胞傷害性薬剤と

を含む A D C 。

【請求項 3 0】

前記 1 つまたは複数の細胞傷害性薬剤が、アウリスタチン、メイタンシン、チューブリシン、ビンカアルカリド、ピロロベンゾジアゼピン二量体、カンプトテシン、デュオカルマイシン、アマニチン、 P I 3 K 阻害剤および M E K 阻害剤のうちの少なくとも 1 つから選択される、請求項 2 9 に記載の A D C 。 20

【請求項 3 1】

前記抗 S T n 抗体が、前記 1 つまたは複数の細胞傷害性薬剤にリンカーを介してコンjugate されている、請求項 2 9 または 3 0 に記載の A D C 。

【請求項 3 2】

前記抗 S T n 抗体と前記 1 つまたは複数の細胞傷害性薬剤とを接続する 1 つまたは複数のポリマーを含む、請求項 2 9 から 3 1 のいずれか一項に記載の A D C 。

【請求項 3 3】

前記 1 つまたは複数のポリマーが、 P E G 、ポリ H P M A 、ポリ (- アミノ酸) 、炭水化物ポリマー、グリコ多糖、糖脂質、グリココンジュゲート、ポリグリセロール、ポリビニルアルコール、ポリ (アクリル酸) 、ポリケタール、ポリアセタールおよびポリ (1 - ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール) (P H F) のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 3 2 に記載の A D C 。 30

【請求項 3 4】

前記 1 つまたは複数のポリマーが、 P H F を含む、請求項 3 3 に記載の A D C 。

【請求項 3 5】

前記 1 つまたは複数のポリマーが、前記抗 S T n 抗体にリンカーを介して結合されている、請求項 3 2 から 3 4 のいずれか一項に記載の A D C 。 40

【請求項 3 6】

前記 1 つまたは複数の細胞傷害性薬剤が、前記 1 つまたは複数のポリマーにリンカーを介して結合されている、請求項 3 2 から 3 4 のいずれか一項に記載の A D C 。

【請求項 3 7】

前記リンカーが、切断可能なリンカーである、請求項 3 1 、 3 5 または 3 6 のいずれか一項に記載の A D C 。

【請求項 3 8】

S T n を発現する少なくとも 1 つのがん細胞を有する対象におけるがんを処置する方法であって、請求項 2 9 から 3 7 のいずれかに記載の A D C を前記対象に投与することを含む、方法。 50

【請求項 3 9】

前記少なくとも 1 つのがん細胞が、卵巣がん細胞である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記少なくとも 1 つのがん細胞が、少なくとも 1 つの化学療法剤での処置に対して抵抗性である、請求項 3 8 または 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記少なくとも 1 つの化学療法剤が、シスプラチンである、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記 A D C が、約 0 . 1 m g / k g ~ 約 2 5 m g / k g の用量で投与される、請求項 3 8 から 4 1 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 4 3】

前記 A D C が、静脈内注射により投与される、請求項 3 8 から 4 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 4】

前記 A D C が、連日、週 1 回または月 1 回投与される、請求項 3 8 から 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 5】

A D C が、前記対象に投与され、前記 A D C が、

配列番号 7 を含む V H と、

配列番号 8 を含む V L と、 20

少なくとも 1 つのヒト I g G 定常領域と、

前記少なくとも 1 つのヒト I g G 定常領域にリンカーを介してコンジュゲートされている細胞傷害性コンジュゲートと

を含む、請求項 1 から 2 8 または 3 8 から 4 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 6】

前記少なくとも 1 つのヒト I g G 定常領域が、配列番号 1 5 および 1 6 のうちの 1 つまたは複数から選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記細胞傷害性コンジュゲートが、M M A E を含む、請求項 4 5 または 4 6 に記載の方法。 30

【請求項 4 8】

前記 A D C が、約 1 m g / k g ~ 約 6 m g / k g の用量で投与される、請求項 4 5 から 4 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 A D C が、静脈内ボーラス注射により投与される、請求項 4 5 から 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 A D C が、組成物の一部として投与され、前記組成物が、少なくとも 1 つの賦形剤を含む、請求項 4 5 から 4 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 1】

前記組成物が、約 0 . 1 m l / k g ~ 約 1 0 m l / k g の容量で投与される、請求項 5 0 に記載の方法。 40

【請求項 5 2】

前記組成物が、約 1 . 2 m l / k g の容量で投与される、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記組成物が、約 0 . 5 m g / m l ~ 約 1 0 m g / m l の A D C 濃度を含む、請求項 5 0 から 5 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 4】

前記 A D C が、約 2 日 ~ 約 8 日の見かけの終末相消失半減期を示す、請求項 4 5 から 5 3 のいずれかに記載の方法。 50

【請求項 5 5】

前記ADCが、約10ml/kg/日～約20ml/kg/日の見かけのクリアランス速度を示す、請求項45から54のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 6】

前記ADCが、定常状態で約50ml/kg～約100ml/kgの見かけの分布容積を示す、請求項45から55のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 7】

前記ADCが、約10μg/ml～約200μg/mlの最高観察濃度を示す、請求項45から56のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 8】

前記ADCが、約50日×μg/ml～約500日×μg/mlの、投与開始から定量可能な濃度が最後に観察されるまでの濃度対時間曲線下面積(AUC)を示す、請求項45から57のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

関連出願への相互参照

本出願は、2017年3月3日に出願された、GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USEと題する米国仮出願番号第62/466,766号、2017年3月31日に出願された、GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USEと題する米国仮出願番号62/480,126号、2017年4月18日に出願された、GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USEと題する米国仮出願番号第62/486,826号、2017年9月27日に出願された、GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USEと題する米国仮出願番号第62/563,718号、および2017年10月27日に出願された、GLYCAN-INTERACTING COMPOUNDS AND METHODS OF USEと題する米国仮出願番号第62/577,830号に基づく優先権を主張しており、これら出願の各々の内容は、それらの全体が参考として本明細書中に援用される。

【0002】**配列表**

本出願は、ASCII形式で電子的に提出している配列表を含み、この配列表は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。2018年3月2日に作成した前記ASCIIコピーは、2033_1030PCT_SL.txtという名であり、サイズは24,876バイトである。

【背景技術】**【0003】****背景**

異常グリコシル化は、癌腫によく見られる他の突然変異の一部に伴う。全癌腫の約80%は、短縮型グリカンであるTn抗原およびシアリル化形態のシアリルTn(STn)を発現すると推定されている。ほぼ例外なく、TnおよびSTnは、正常な健常組織では発現されない。さらに、非ヒト免疫原性シアル酸であるN-グリコシリノイラミン酸(Neu5Gc)は、乳がんなどの癌腫上にNeu5Gc-STn(GcSTn)の形態で差次的に発現されるようである。

【0004】

複数の異常グリコシル化形態が、ヒトがんにおいて記載されており、特定のグリカンが特定の腫瘍の標的化に適する細胞表面分子クラスとして同定されている(Cheever, M.A.ら、Clin Cancer Res.、2009年9月1日；15巻(17号)：5323～37頁)。例えば、ヒトがんの様々な種類(例えば、数ある中でも特に、膀胱、乳、子宮頸、結腸、

10

20

30

40

50

肺および卵巣がん)は、正常なヒト組織では稀である S T n 抗原の高度な発現を示す (Kahlen, P. ら、*Gastroenterology*、1998年12月；115巻(6号)：1395～404頁；Ohno, S. ら、*Anticancer Res.*、2006年11～12月；26巻(6A号)：4047～53頁)。加えて、腫瘍関連ムチン上の S T n の存在は、予後が不良であるがんに関係しており、それで、がん検出および標的療法のための魅力的なエピトープと見なされる (Cao, Y. ら、*Virchows Arch.*、1997年9月；431巻(3号)：159～66頁；Julien, S. ら、*Br J Cancer*、2009年6月2日；100巻(11号)：1746～54頁；Itzkowitz, S.H. ら、*Cancer*、1990年11月1日；66巻(9号)：1960～6頁；Motoo, Y. ら、*Oncology*、1991年；48巻(4号)：321～6頁；Kobayashi, H. ら、*J Clin Oncol.*、1992年1月；10巻(1号)：95～101頁)。
10 T n および S T n の形成は、活性 (activate) T シンターゼの形成に必要な分子シャペロンをコードする遺伝子 C o s m c の体細胞突然変異に関連している (Ju, T. ら、*Nature*、2005年10月27日；437巻(7063号)：1252頁；Ju, T. ら、*Cancer Res.*、2008年3月15日；68巻(6号)：1636～46頁)。それらの形成は、シリルトランスフェラーゼである S T 6 G a l N A c I の発現増加の結果として生じる場合もある (Ikehara, Y. ら、*Glycobiology*、1999年11月；9巻(11号)：1213～24頁；Brockhausen, I. ら、*Biol Chem.*、2001年2月；382巻(2号)：219～32頁)。 S T n の新規発現は、癌腫細胞をモジュレートし、悪性表現型を変化させ、より侵襲性の高い細胞挙動をもたらすことができる (Pinho, S. ら、*Cancer Lett.*、2007年5月8日；249巻(2号)：157～70頁)。 S T n は、悪性組織に高度に発現されるが、低レベルの発現は、健常ヒト細胞上にも見られる (Jass, J.R. ら、*J Pathol.*、1995年6月；176巻(2号)：143～9頁；Kirkeby, S. ら、*Arch Oral Biol.*、2010年11月；55巻(11号)：830～41頁)。単独での S T n は、がんの検出および治療の標的として注目を集めている (Cheever, M.A. ら、*Clin Cancer Res.*、2009年9月1日；15巻(17号)：5323～37頁)。 S T n は、がん幹細胞に関連するムチン中にも存在し (Engelmann ら、*Cancer research*、2008年、68巻、2419～2426頁)、 S T n は、免疫抑制に関与する (Carrascal, M.A. ら、*Molecular Oncology*、2014年、8巻(3号)：753～65頁)。

S T n の存在に加えて、他のグリコシル化変化が、がんに関して記載されている。それらの1つは、N e u 5 G c を伴う。N - アセチルノイラミン酸 (N e u 5 A c) および N e u 5 G c は、哺乳動物細胞表面の2つの主要シリアル酸である。N e u 5 A c および N e u 5 G c は、N e u 5 G c が、5番目の炭素に結合された化学基に付随する追加の酸素原子を含む点のみが異なる。機能性遺伝子の喪失のため、ヒトは、N e u 5 A c の形態のシリアル酸のみを合成することができ、N e u 5 G c の形態のシリアル酸を合成することはできない。しかし、N e u 5 G c は、赤身肉などの動物由来の食事供給源から代謝によってヒトに組み込まれ得る (Tangvoranuntakul, P. ら、*Proc Natl Acad Sci U SA.*、2003年10月14日；100巻(21号)：12045～50頁；Nguyen, D.H. ら、*J Immunol.*、2005年7月1日；175巻(1号)：228～36頁；米国特許第7,682,794号、米国特許第8,084,219号、米国特許出願公開第2012/0142903号、WO2010030666およびWO2010030666)。N e u 5 G c は、ヒト腫瘍の中で有意に存在量が多く (Higashi, H. ら、*Cancer Res.*、1985年8月；45巻(8号)：3796～802頁；Miyoshi I. ら、*Mol Immunol.*、1986年、23巻：631～638頁；Hirabayashi, Y. ら、*Jpn J Cancer Res.*、1987年、78巻：614～620頁；Kawachi, S. ら、*Int Arch Allergy Appl Immunol.*、1988年、85巻：381～383頁；Devine, P.L. ら、*Cancer Res.*、1991年、51巻：5826～5836頁；Malykh, Y.N. ら、*Biochimie*、2001年、83巻：623～634頁およびInoue, S. ら、2010年、*Glycobiology*、20巻(6号)：752～762頁)、正常なヒト組織内には著しく少なく、このことは、数十年にわたって見落とされてきた (Diaz, S.L. ら、*PLoS One*、2009年、4巻：e4241頁；Tangvoranuntakul, P. ら、*Proc Natl Acad Sci U SA*、2003年、100巻：12045～12050頁；Varki, A.
30
40
50

ら、Glycoconj J、2009年、26巻：231～245頁）。健常ヒト組織と比較してがん組織における食事由来Neu5Gcの代謝性蓄積の増加は、少なくとも次の3つの要因により説明される可能性が高い：競合する内在性Neu5Acの過小産生に伴う急速な増加、増殖因子により誘導されるマクロピノサイトーシス増強 (Dharmawardhane, S.ら、Mol Biol Cell、2000年10月；11巻(10号)：3341～52頁；Simonsen, A.ら、Curr Opin Cell Biol、2001年8月；13巻(4号)：485～92頁；Johannes, L.ら、Traffic、2002年7月；3巻(7号)：443～51頁；Amyere, M.ら、Int J Med Microbiol、2002年2月；291巻(6～7号)：487～94頁）、および低酸素によるリソソームシアル酸輸送体遺伝子シアリンの遺伝子発現の上方調節 (Yin, J.ら、Cancer Res、2006年3月15日；66巻(6号)：2937～45頁）。加えて、今までに試験されたすべてのヒトは、非ヒトNeu5Gcに対するポリクローナル抗体保有者を含み、このことにより非ヒトNeu5Gcは異種自己抗原の最初の例となる (Padler-Karavani, V.ら、Glycobiology、2008年10月；18巻(10号)：818～30頁；Varki, N.M.ら、Annu Rev Pathol、2011年；6巻：365～93頁）。悪性腫瘍における食事性Neu5Gcの蓄積は、抗Neu5Gc応答にさらされた際、低悪性度慢性炎症を誘導することにより腫瘍進行を助長することが明らかになった (Hedlund, M.ら、Proc Natl Acad Sci U S A.、2008年12月2日；105巻(48号)：18936～41頁）。したがって、ヒト腫瘍上のNeu5Gc含有グリカンエピトープは、薬物標的化の重要な可能性を示す。最近の研究は、がん患者における、Neu5Ac-STn (AcSTn)ではなく、Neu5Gc含有STn (GcSTn)に対する抗体の存在を示唆し、がん検出のための特異的バイオマーカーとしてのそれらの可能性を精査している (Padler-Karavani, V.ら、Cancer Res.、2011年5月1日；71巻(9号)：3352～63頁）。

疾患ならびに疾患細胞および組織に関連するグリカンを含む、グリカンに結合することができる治療用抗体に対する要求が、当技術分野に依然として存在する。さらに、そのような抗体を開発するためのよりよい方法、ならびに疾患細胞および組織を標的化するためのこれらの抗体の使用方法に対する要求が、依然として存在する。本開示は、関連化合物および方法を提供することにより、これらの要求を満たす。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第7,682,794号明細書

【特許文献2】米国特許第8,084,219号明細書

【特許文献3】米国特許出願公開第2012/0142903号明細書

【特許文献4】国際公開第2010030666号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Cheever, M.A.ら、Clin Cancer Res.、2009年9月1日；15巻(17号)：5323～37頁

【非特許文献2】Karlen, P.ら、Gastroenterology、1998年12月；115巻(6号)：1395～404頁

【非特許文献3】Ohno, S.ら、Anticancer Res.、2006年11～12月；26巻(6A号)：4047～53頁

【非特許文献4】Cao, Y.ら、VirchowsArch.、1997年9月；431巻(3号)：159～66頁

【非特許文献5】Julien, S.ら、Br J Cancer、2009年6月2日；100巻(11号)：1746～54頁

【非特許文献6】Itzkowitz, S.H.ら、Cancer、1990年11月1日；66巻(9号)：1960～6頁

【非特許文献7】Motoo, Y.ら、Oncology、1991年；48巻(4号)：321～6頁

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 8】Kobayashi, H. ら、*J Clin Oncol.*、1992年1月；10巻(1号)：95～101頁
- 【非特許文献 9】Ju, T. ら、*Nature*、2005年10月27日；437巻(7063号)：1252頁
- 【非特許文献 10】Ju, T. ら、*CancerRes.*、2008年3月15日；68巻(6号)：1636～46頁
- 【非特許文献 11】Ikehara, Y. ら、*Glycobiology*、1999年11月；9巻(11号)：1213～24頁
- 【非特許文献 12】Brockhausen, I. ら、*Biol Chem.*、2001年2月；382巻(2号)：219～32頁
- 【非特許文献 13】Pinho, S. ら、*Cancer Lett.*、2007年5月8日；249巻(2号)：157～70頁
- 【非特許文献 14】Jass, J.R. ら、*J Pathol.*、1995年6月；176巻(2号)：143～9頁
- 【非特許文献 15】Kirkeby, S. ら、*Arch Oral Biol.*、2010年11月；55巻(11号)：830～41頁
- 【非特許文献 16】Cheever, M.A. ら、*Clin Cancer Res.*、2009年9月1日；15巻(17号)：5323～37頁
- 【非特許文献 17】Engelmann ら、*Cancer research*、2008年、68巻、2419～2426頁
- 【非特許文献 18】Carrascal, M.A. ら、*Molecular Oncology*、2014年、8巻(3号)：753～65頁
- 【非特許文献 19】Tangvoranuntakul, P. ら、*Proc Natl Acad Sci U S A.*、2003年10月14日；100巻(21号)：12045～50頁
- 【非特許文献 20】Nguyen, D.H. ら、*J Immunol.*、2005年7月1日；175巻(1号)：228～36頁
- 【非特許文献 21】Higashi, H. ら、*Cancer Res.*、1985年8月；45巻(8号)：3796～802頁
- 【非特許文献 22】Miyoshi I. ら、*Mol Immunol.*、1986年、23巻：631～638頁
- 【非特許文献 23】Hirabayashi, Y. ら、*Jpn J Cancer Res.*、1987年、78巻：614～620頁
- 【非特許文献 24】Kawachi, S. ら、*Int Arch Allergy Appl Immunol.*、1988年、85巻：381～383頁
- 【非特許文献 25】Devine, P.L. ら、*Cancer Res.*、1991年、51巻：5826～5836頁
- 【非特許文献 26】Malykh, Y.N. ら、*Biochimie*、2001年、83巻：623～634頁
- 【非特許文献 27】Inoue, S. ら、2010年、*Glycobiology*、20巻(6号)：752～762頁
- 【非特許文献 28】Diaz, S.L. ら、*PLoS One*、2009年、4巻：e4241頁
- 【非特許文献 29】Tangvoranuntakul, P. ら、*Proc Natl Acad Sci U S A.*、2003年、100巻：12045～12050頁
- 【非特許文献 30】Varki, A. ら、*Glycoconj J*、2009年、26巻：231～245頁
- 【非特許文献 31】Dharmawardhane, S. ら、*Mol Biol Cell*、2000年10月；11巻(10号)：3341～52頁
- 【非特許文献 32】Simonsen, A. ら、*Curr Opin Cell Biol*、2001年8月；13巻(4号)：485～92頁
- 【非特許文献 33】Johannes, L. ら、*Traffic*、2002年7月；3巻(7号)：443～51頁

10

20

30

40

50

【非特許文献 3 4】Amyere, M.ら、Int J Med Microbiol、2002年2月；291巻(6～7号)：487～94頁

【非特許文献 3 5】Yin, J.ら、Cancer Res、2006年3月15日；66巻(6号)：2937～45頁

【非特許文献 3 6】Padler-Karavani, V.ら、Glycobiology、2008年10月；18巻(10号)：818～30頁

【非特許文献 3 7】Varki, N.M.ら、Annu Rev Pathol、2011年；6巻：365～93頁

【非特許文献 3 8】Hedlund, M.ら、Proc Natl Acad Sci U S A.、2008年12月2日；105巻(48号)：18936～41頁

10

【非特許文献 3 9】Padler-Karavani, V.ら、Cancer Res.、2011年5月1日；71巻(9号)：3352～63頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

一部の実施形態では、本開示は、抗体を投与することにより、対象におけるがんを処置する方法であって、抗体が、約1mg/kg～約10mg/kgの用量で投与され、抗体が、約50時間～約200時間の終末相半減期を有し、抗体が、シアリルTn抗原(STn)に結合する、方法を提供する。抗体は、配列番号7および9からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と、配列番号8および10からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン(VL)とを含み得る。抗体は、抗体-薬物コンジュゲートであってもよい。抗体は、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)にコンジュゲートされていることもある。抗体は、静脈内投与ができる。

20

【0008】

一部の実施形態では、本開示は、結腸直腸がんを有する対象に抗STn抗体を投与することによる、結腸直腸がんを処置する方法であって、抗STn抗体が、配列番号7、9および11からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と、配列番号8、10および12からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン(VL)とを含む、方法を提供する。結腸直腸がんは、セツキシマブ、パニツムマブ、ベバシズマブ、ラムシルマブ、トラスツズマブ、ポナチニブ、ソラフェニブ、5-フルオロウラシル、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、イリノテカン、パクリタキセルおよびオキサリプラチンのうちの少なくとも1つでの処置に対して抵抗性であってもよい。抗STn抗体は、抗体薬物コンジュゲート(ADC)を含み得る。ADCは、少なくとも1つのコンジュゲートを含むことがあり、この少なくとも1つのコンジュゲートは、アウリスタチン、メイタンシン、チューブリシン、ビンカアルカロイド、ピロロベンゾジアゼピン二量体、カンプトテシン、デュオカルマイシン、アマニチン、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)阻害剤およびマイトジエン活性化プロテインキナーゼキナーゼ(MEK)阻害剤のうちの1つまたは複数から選択される。ADCは、1つまたは複数のポリマーを含むことがあり、この1つまたは複数のポリマーが、抗STn抗体と少なくとも1つのコンジュゲートとを接続する。1つまたは複数のポリマーは、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、ポリ(N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド)(ポリHPMA)、ポリ(-アミノ酸)、炭水化物ポリマー、グリコ多糖(glycopolysaccharide)、糖脂質、グリココンジュゲート、ポリグリセロール、ポリビニルアルコール、ポリ(アクリル酸)、ポリケタールおよびポリアセタールのうちの1つまたは複数を含み得る。1つまたは複数のポリマーは、ポリ(1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール)(PHF)を含み得る。抗STn抗体は、STnを発現する細胞を死滅させることができ、半数阻害濃度(50%阻害濃度)が約0.1nM～約50nMである。

30

【0009】

抗STn抗体を投与することを、少なくとも1つの他の治療的処置と組み合わせて行う

40

50

ことができる。この、他の治療的処置は、標準ケア治療的処置を含み得る。この、他の治療的処置は、セツキシマブ、パニツムマブ、ベバシズマブ、ラムシリマブ、トラスツズマブ、ポナチニブ、ソラフェニブ、5-フルオロウラシル、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、イリノテカン、パクリタキセルおよびオキサリプラチンのうちの1つまたは複数から選択することができる。この、他の治療的処置は、少なくとも1つの細胞周期阻害剤の投与も含み得る。細胞周期阻害剤は、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害剤であってもよい。CDK阻害剤は、CDK4および/またはCDK6を阻害し得る。CDK阻害剤は、パルボシクリブ、リボシクリブおよびアベマシクリブから選択することができる。抗STn抗体はこの、他の治療的処置と同時に処置することができる。抗STn抗体はこの、他の治療的処置と逐次的に処置することができる。

10

【0010】

一部の実施形態では、本開示は、がんを処置する方法であって、前記方法が、がんを有する対象に抗STn抗体を投与することを含み、抗STn抗体が、配列番号7、9および11からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン(VH)と、配列番号8、10および12からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン(VL)とを含み、抗STn抗体を投与することが、少なくとも1つの細胞周期阻害剤と組み合わせて行われる、方法を提供する。細胞周期阻害剤は、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害剤であってもよい。CDK阻害剤は、CDK4および/またはCDK6を阻害し得る。CDK阻害剤は、パルボシクリブ、リボシクリブおよびアベマシクリブから選択することができる。抗STn抗体を細胞周期阻害剤と同時に投与することができる。抗STn抗体を細胞周期阻害剤と逐次的に投与することができる。

20

【0011】

一部の実施形態では、本開示は、配列番号7、9および11から選択されるアミノ酸配列を有するVH；配列番号8、10および12から選択されるアミノ酸配列を有するVLを有する抗STn抗体と、1つまたは複数の細胞傷害性薬剤とを含むADCを提供する。細胞傷害性薬剤は、アウリストチン、メイタンシン、チューブリシン、ビンカアルカロイド、ピロロベンゾジアゼピン二量体、カンプトテシン、デュオカルマイシン、アマニチン、PI3K阻害剤およびMEK阻害剤のうちの少なくとも1つから選択することができる。抗STn抗体は、1つまたは複数の細胞傷害性薬剤にリンカーを介してコンジュゲートされることもある。ADCは、抗STn抗体と1つまたは複数の細胞傷害性薬剤とを接続する1つまたは複数のポリマーを含み得る。1つまたは複数のポリマーは、PEG、ポリHPMA、ポリ(-アミノ酸)、炭水化物ポリマー、グリコ多糖、糖脂質、グリココンジュゲート、ポリグリセロール、ポリビニルアルコール、ポリ(アクリル酸)、ポリケタールおよびポリアセタールのうちの1つまたは複数を含み得る。1つまたは複数のポリマーは、PHFを含み得る。1つまたは複数のポリマーは、抗STn抗体にリンカーを介して結合されることもある。1つまたは複数の細胞傷害性薬剤は、1つまたは複数のポリマーにリンカーを介して結合されることもある。リンカーは、切断可能なリンカーであってもよい。

30

【0012】

一部の実施形態では、本開示は、STnを発現する少なくとも1つのがん細胞を有する対象におけるがんを処置する方法であって、本明細書に記載の抗STn抗体薬物コンジュゲートを投与することを含む方法を提供する。少なくとも1つのがん細胞は、卵巣がん細胞であってもよい。少なくとも1つのがん細胞が、少なくとも1つの化学療法剤での処置に対して抵抗性であってもよい。化学療法剤は、シスプラチンであってもよい。抗STn抗体薬物コンジュゲートは、約0.1mg/kg～約25mg/kgの用量で投与することができる。投与は、静脈内注射によるものであってもよい。抗STn抗体薬物コンジュゲートは、連日、週1回または月1回投与することができる。

40

【0013】

本開示の一部の方法は、ADCを対象に投与することによってがんを処置する方法であって、ADCが、配列番号7を含むVHと、配列番号8を含むVLと、少なくとも1つの

50

ヒト IgG 定常領域と、少なくとも 1 つのヒト IgG 定常領域にリンカーを介してコンジュゲートされている細胞傷害性コンジュゲートとを含む、方法を含む。少なくとも 1 つのヒト IgG 定常領域は、配列番号 15 および 16 のうちの 1 つまたは複数から選択することができる。細胞傷害性コンジュゲートは、MMAE を含み得る。ADC は、約 1 mg / kg ~ 約 6 mg / kg の用量で投与することができる。ADC は、静脈内ボーラス注射により投与することができる。ADC は、組成物の一部として投与することができ、この組成物は、少なくとも 1 つの賦形剤を含む。組成物は、約 0.1 ml / kg ~ 約 10 ml / kg の容量で投与することができる。組成物は、約 1.2 ml / kg の容量で投与することができる。組成物は、約 0.5 mg / ml ~ 約 10 mg / ml の ADC 濃度を含むことができる。ADC は、約 2 日 ~ 約 8 日の見かけの終末相消失半減期を示すことができる。ADC は、約 10 ml / kg / 日 ~ 約 20 ml / kg / 日の見かけのクリアランス速度を示すことができる。ADC は、定常状態で約 50 ml / kg ~ 約 100 ml / kg の見かけの分布容積を示すことができる。ADC は、約 10 µg / ml ~ 約 200 µg / ml の最高観察濃度を示すことができる。ADC は、約 50 日 × µg / ml ~ 約 500 日 × µg / ml の、投与開始から定量可能な濃度が最後に観察されるまでの濃度対時間曲線下面積 (AUC) を示すことができる。

10

【0014】

上述ならびに他の目的、特徴および利点は、添付の図面で例証されるように、本発明の特定の実施形態についての以下の説明から明らかになり、これらの図面では、同様の参照符号が、異なる図を通して同じ部分を指す。これらの図面は、必ずしも正確な縮尺でなく、それよりむしろ、本発明の様々な実施形態の原理を例証することに重点を置いている。

20

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図 1 A】図 1 A は、最も大きい楕円が、第 1 群抗体により認識される STn の特異的領域を示す、2,6-シアリル化 N-アセチルガラクトサミン (STn) を描示する模式図である。

20

【0016】

【図 1 B】図 1 B は、最も大きい楕円が、第 2 群抗体により認識される STn の特異的領域を示す、2,6-シアリル化 N-アセチルガラクトサミン (STn) を描示する模式図である。

30

【0017】

【図 1 C】図 1 C は、最も大きい楕円が、第 3 群抗体により認識される STn の特異的領域を示す、2,6-シアリル化 N-アセチルガラクトサミン (STn) を描示する模式図である。

【0018】

【図 1 D】図 1 D は、最も大きい楕円が、第 4 群抗体により認識される STn の特異的領域を示す、2,6-シアリル化 N-アセチルガラクトサミン (STn) を描示する模式図である。

30

【0019】

【図 2】図 2 は、カニクイザルにおける hSIA101-MMAE の初回投薬後の平均血清中抗体濃度を経時的に示すグラフである。

40

【0020】

【図 3】図 3 は、カニクイザルにおける hSIA101-MMAE の 2 回目の投薬（処置の 22 日目での）後の平均血清中抗体濃度を経時的に示すグラフである。

【0021】

【図 4】図 4 は、hSIA101-ADC での処置の過程にわたって患者由来異種移植片腫瘍体積を他の処置と比較して示す、一組のグラフである。上のパネルにおける腫瘍は、化学療法未実施の患者からの卵巣腫瘍から生じたものであり、下のパネルの腫瘍は、化学療法剤での処置を以前に受けたことがある患者からの卵巣腫瘍から生じたものである。

【発明を実施するための形態】

50

【0022】**序論**

本明細書によれば、グリカンと呼ばれる炭水化物基を含むエピトープに特異的な、またはそのようなエピトープと相互作用する抗体がある。本明細書に記載の一部のグリカン相互作用抗体は、バイオ医薬として使用することができる。他の実施形態は、そのようなグリカン相互作用抗体を生成する方法を提供する。

【0023】

本来、STnは、N-アセチルノイラミン酸(Neu5Ac)またはN-グリコリルノイラミン酸(Neu5Gc)でシアリル化され得る。本発明によるグリカン相互作用抗体は、あらゆるSTnを有するグリカン(汎STn抗体)、Neu5Acを特異的に含むSTn(AC-STn)を有するグリカン、またはNeu5Gcを特異的に含むSTn(Gc-STn)を有するグリカンに対する抗体であり得る。一部の実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体は、2,6-シアリル化N-アセチルガラクトサミン(STn)などの、がん関連グリカン抗原を標的とする。

10

【0024】

一部の実施形態では、本開示は、グリカン相互作用抗体を產生する方法を提供する。そのような方法は、STn(例えば、AC-STnおよび/またはGc-STn)を含む1つまたは複数の抗原に対する免疫応答を生じさせるためのマウスの使用を含み得る。本明細書で説明されるように、多数の方法を、マウス免疫化によって產生される結果として生じる抗体を操作するために利用することができる。そのような方法は、免疫するマウスの株および/または性を変えること、使用する抗原を変えること、抗原投与の際におよびハイブリドーマ融合開始前の免疫化の過程で含めるアジュバントの種類および用量を変えることを含み得る。

20

【0025】

一部の実施形態では、本開示は、グリカン相互作用抗体を使用してがんを処置する方法を提供する。そのような方法は、抗体薬物コンジュゲート(ADC)の使用を含み得る。ADCは、グリカン相互作用抗体に直接またはリンカーを介して結合されている細胞傷害性コンジュゲートを含み得る。グリカン相互作用抗体は、STnに結合することができる。一部の実施形態では、がんを処置する方法は、がん幹細胞を除去することを含む。一部の態様では、グリカン相互作用抗体を単独で使用することができる。他の態様では、グリカン相互作用抗体は、化学療法剤と組み合わせて使用される。グリカン相互作用抗体を、対象への投与のために1つまたは複数の賦形剤を含む組成物として調製することができる。組成物および投与経路は、有効な処置に必要なバイオアベイラビリティ、治療域および/または分布容積の達成に適した濃度ならびに用量で、グリカン相互作用抗体を提供することができる。

30

【0026】

本明細書で開示されるグリカン相互作用抗体の最適化、ヒト化およびコンジュゲート形態が、さらに提供される。加えて、本発明の抗体および/または方法を含むキット、アッセイならびに試薬が提示される。

40

定義**【0027】**

隣接(した、している)：本明細書で使用される場合、用語「隣接(した、している)」は、所与の実体と接している、隣り合っている、または所与の実体の隣にある、何かを指す。一部の実施形態では、「隣接残基」は、互いに連結されているグリカン鎖内の糖残基である。一部の実施形態では、「隣接グリカン」は、隣同士にあるグリカン鎖であって、直接接触しているか、緊密な近接内にあり、それら2つの間に別のグリカンがない、グリカン鎖である。

【0028】

組み合わせて投与される：本明細書で使用される場合、用語「組み合わせて投与される」または「組み合わせた投与」は、同じときにまたはある時間間隔内に投与される2つま

50

たはそれより多くの薬剤に、対象がある時点で両方に同時に曝露されるように、および／または患者に対する各薬剤の効果の重なりが存在し得るよう、対象が同時に曝露されることを意味する。一部の実施形態では、1つまたは複数の薬剤の少なくとも1用量は、1つまたは複数の他の薬剤の少なくとも1用量の約24時間、12時間、6時間、3時間、1時間、30分、15分、10分、5分または1分以内に投与される。一部の実施形態では、投与は、重なりのある投薬レジメンで行われる。本明細書で使用される場合、用語「投薬レジメン」は、時間的に間隔を空けた多数回の用量を指す。そのような用量は、定期的な間隔で行われることもあり、または投与中に1回もしくは複数回の中斷を含むこともある。一部の実施形態では、本明細書に記載されるような、1つまたは複数のグリカン相互作用抗体の個々の用量の投与は、コンビナトリアル（例えば、相乗的）効果が達成されるような互いに十分に近い間隔を設けたものである。

10

【0029】

アミノ酸：本明細書で使用される場合、用語「アミノ酸（単数）」および「アミノ酸（複数）」は、すべての天然に存在するL-アルファ-アミノ酸はもちろん、天然に存在しないアミノ酸も指す。アミノ酸は、次のような1文字表記または3文字表記のどちらかによって識別される：アスパラギン酸（A s p : D）、イソロイシン（I l e : I）、トレオニン（T h r : T）、ロイシン（L e u : L）、セリン（S e r : S）、チロシン（T y r : Y）、グルタミン酸（G l u : E）、フェニルアラニン（P h e : F）、プロリン（P r o : P）、ヒスチジン（H i s : H）、グリシン（G l y : G）、リシン（L y s : K）、アラニン（A l a : A）、アルギニン（A r g : R）、システイン（C y s : C）、トリプトファン（T r p : W）、バリン（V a l : V）、グルタミン（G l n : Q）、メチオニン（M e t : M）、アスパラギン（A s n : N）（ここでは、最初にアミノ酸、続いてカッコ内に3文字および1文字コードがそれぞれ記載されている）。

20

【0030】

動物：本明細書で使用される場合、用語「動物」は、動物界の任意のメンバーを指す。一部の実施形態では、「動物」は、任意の発育段階のヒトを指す。一部の実施形態では、「動物」は、任意の発育段階の非ヒト動物を指す。ある特定の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、靈長類、またはブタ）である。一部の実施形態では、動物としては、これらに限定されないが、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類および蠕虫が挙げられる。一部の実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子改変動物、またはクローンである。

30

【0031】

抗体：本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、具体的には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、少なくとも2つのインタクト抗体から形成された二重特異性抗体）、および所望の生物活性を示すことを条件にダイアボディなどの抗体断片を含むがこれらに限定されない、様々な実施形態を包含する。抗体は、主としてアミノ酸に基づく分子であるが、1つまたは複数の修飾、例えば、糖部分での修飾も含むことがある。

40

【0032】

抗体断片：本明細書で使用される場合、用語「抗体断片」は、インタクト抗体の一部分、好ましくは、その抗原結合領域を含む部分を指す。抗体断片の例としては、F a b、F a b'、F (a b')₂、およびF v断片；ダイアボディ；線状抗体；单鎖抗体分子；および抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。抗体のパパイン消化は、単一の抗原結合部位を各々が有する、「F a b」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片性断片を生じさせる。残留「F c」断片も生じさせ、この名称は、容易に結晶化するその能力を反映している。ペプシン処理は、F (a b')₂断片をもたらし、この断片は、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋することができる。グリカン相互作用抗体は、これらの断片の1つまたは複数を含み得る。本明細書の目的では、抗体は、重鎖および軽鎖可変ドメインならびにF c領域を含み得る。

50

【0033】

抗原結合領域：本明細書で使用される場合、用語「抗原結合領域」は、抗体、抗体断片または関連分子の、標的分子もしくはエピトープと直接相互作用する部分を指す。抗原結合領域は、抗体の F a b 領域におけるような、または s c F v では互いに連結されているような、可変ドメインペアを通常は含む。

【0034】

おおよそ：本明細書で使用される場合、用語「おおよそ」または「約」は、目的の 1 つまたは複数の値に適用されるとき、述べられている参考値と同様の値を指す。ある特定の実施形態では、用語「おおよそ」または「約」は、述べられている参考値の両方向（参考値より大きいまたは参考値より小さい）に 25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% またはそれ未満の範囲内に入る値の範囲を、そうでないと述べられない限り、または文脈からそうでないことが明らかでない限り、（そのような数が、可能な値の 100% を超えることになる場合を除き）指す。10

【0035】

と会合した（している）：本明細書で使用される場合、用語「と会合した（している）」、「コンジュゲートした（された、されている）」、「連結した（された、されている）」、「結合した（された、されている）」および「繫留した（された、されている）」は、2つまたはそれより多くの部分構造に関して使用されるとき、構造が使用される条件下、例えば生理条件下で、部分構造が物理的に会合した状態のままであるのに十分なほど安定している構造を形成するように、部分構造が、直接、またはリンカー剤として役立つ1つもしくは複数のさらなる部分構造を介して、互いに物理的に会合しているまたは接続されていることを意味する。「会合」は、厳密に直接共有化学結合によるものである必要はない。会合は、「会合している」実体が物理的に会合した状態のままであるのに十分なほど安定している、イオンもしくは水素結合またはハイブリダイゼーションに基づく接続状態も示唆し得る。20

【0036】

二機能性：本明細書で使用される場合、用語「二機能性」は、少なくとも2つの機能が可能である、または少なくとも2つの機能を維持する、任意の物質、分子または部分構造を指す。機能は、同じアウトカムに影響を及ぼすこともあり、または異なるアウトカムに影響を及ぼすこともある。機能を生じさせる構造は、同じであっても、異なっていてもよい。30

【0037】

生体分子：本明細書で使用される場合、用語「生体分子」は、アミノ酸に基づく、核酸に基づく、炭水化物に基づくまたは脂質に基づく任意の天然分子、およびこれに類するものである。

【0038】

二重特異性抗体：本明細書で使用される場合、用語「二重特異性抗体」は、2つの異なる抗原に結合することができる抗体を指す。そのような抗体は、少なくとも2つの異なる抗体からの領域を通常は含む。二重特異性抗体は、Riethmuller, G. 2012年、*Cancer Immunity*、12巻：12～18頁、Marvin, J.S.ら、2005年、*Acta Pharmacologica Sinica*、26巻(6号)：649～58頁、およびSchaefer, W.ら、2011年、*PNAS*、108巻(27号)：11187～92頁に記載されているもののいずれかを含むことができ、これらの参考文献の各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。40

【0039】

分枝：本明細書で使用される場合、用語「分枝」は、主な実体もしくはソースに連結されている、または主な実体もしくはソースから伸びる実体、部分構造または付属物を指す。一部の実施形態では、「分枝鎖」または「枝分かれ鎖」は、親鎖から伸びる1つまたは複数の残基（これに限定されないが、糖残基を含む）を含む。本明細書で使用される場合50

、「親鎖」は、枝分かれ鎖が連結されている、残基（これに限定されないが、糖残基を含む）の鎖を指すために使用される。複数の分枝を有するグリカンの場合、親鎖は、そのような分枝すべてが直接または間接的に結合されているソース鎖も指すことがある。ヘキソース残基の鎖を有する多糖の場合、親鎖連結は、通常は隣接残基の1番目の炭素と4番目の炭素間に存在するが、枝分かれ鎖は、枝分かれ残基の1番目の炭素と、分枝が伸びる親残基の3番目の炭素との間の連結によって、親鎖と結合されている。本明細書で使用される場合、用語「枝分かれ残基」は、枝分かれ鎖中の、親鎖に結合されている、残基を指す。

【0040】

がん幹細胞：本明細書で使用される場合、がん幹細胞（CSC）は、自己複製能力を有する腫瘍細胞のサブセットを指す。CSCは、多様な細胞型を再生することが可能であり得る。一部の場合には、これらの細胞は、腫瘍の外科的もしくは化学的処置によって除去することが困難または不可能である。

10

【0041】

化合物：本明細書で使用される場合、用語「化合物」は、異なる化学物質を指す。一部の実施形態では、特定の化合物は、1つもしくは複数の異性体または同位体形態（これに限定されないが、立体異性体、幾何異性体および同位体を含む）で存在し得る。一部の実施形態では、化合物は、1つだけのそのような形態で提供または利用される。一部の実施形態では、化合物は、2つまたはそれより多くのそのような形態の混合物（これに限定されないが、立体異性体のラセミ混合物を含む）として提供または利用される。一部の化合物が、異なるそのような形態で存在し、異なる性質および／または活性（これに限定されないが、生物活性を含む）を示すことは、当業者には理解される。そのような場合、本発明による使用のために化合物の特定の形態を選択または回避することは、当業者の通常技能の範囲内である。例えば、非対称的に置換された炭素原子を含有する化合物を、光学活性形態またはラセミ形態で単離することができる。光学活性出発物質から光学活性形態を調製する方法、例えば、ラセミ混合物の分割による方法、または立体選択的合成による方法は、当技術分野において公知である。

20

【0042】

環式または環化した（される、された）：本明細書で使用される場合、用語「環式」は、連続ループの存在を指す。環式分子は、環状である必要はなく、サブユニットの連続した鎖を形成するように繋がれてさえいれば十分である。

30

【0043】

シチジンーリン酸 - N - アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ：本明細書で使用される場合、用語「シチジンーリン酸 - N - アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ」または「CMAH」は、ヒトには非存在だが他の大部分の哺乳動物（これらに限定されないが、マウス、ブタおよびチンパンジーを含む）に存在する酵素であって、N - アセチルノイラミン酸からのN - グリコリルノイラミン酸の形成を触媒する酵素を指す。ヒトにおけるこの酵素の非存在は、CMAH転写物の未成熟終了および非機能性タンパク質の産生を生じさせる結果となるフレームシフト突然変異に起因する。

40

【0044】

細胞傷害性：本明細書で使用される場合：用語「細胞傷害性」は、細胞（例えば、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞））、細菌、ウイルス、真菌、原虫、寄生虫、ブリオン、またはこれらの組み合わせを死滅させる、またはそれらに対する傷害効果、毒性効果もしくは致命的効果を引き起こす、作用因子を指すために使用される。

【0045】

送達：本明細書で使用される場合、「送達」は、化合物、物質、実体、部分構造、カーゴまたはペイロードを所期の目的地に輸送する行為または方法を指す。

【0046】

送達剤：本明細書で使用される場合、「送達剤」は、化合物、物質、実体、部分構造、カーゴまたはペイロードのin vivo送達を、少なくともある程度、助長する任意の

50

物質を指す。

【0047】

検出可能な標識：本明細書で使用される場合、「検出可能な標識」は、別の実体に結合されている、組み込まれている、または別の実体と会合している、1つまたは複数のマークー、シグナルまたは部分構造であって、X線検査、蛍光、化学発光、酵素活性、吸光度およびこれらに類するものを含む、当技術分野において公知の方法によって容易に検出される、マークー、シグナルまたは部分構造を指す。検出可能な標識としては、放射性同位体、フルオロフォア、発色団、酵素、色素、金属イオン、リガンド、例えばビオチン、アビジン、ストレプトアビジンおよびハプテン、量子ドットならびにこれらに類するものが挙げられる。検出可能な標識は、それらが結合されている、組み込まれているまたは会合している実体のいずれの位置にあってもよい。例えば、検出可能な標識は、ペプチドもしくはタンパク質に結合されている、組み込まれている、またはペプチドもしくはタンパク質と会合している場合、アミノ酸、ペプチドもしくはタンパク質の中にあることもあり、またはNもしくはC末端に位置することもある。

10

【0048】

ディスプレイライブラリー：本明細書で使用される場合、用語「ディスプレイライブラリー」は、生体分子相互作用を同定するための科学的発見に使用されるツールを指す。バクテリオファージ、酵母およびリボソームの利用を含む、ディスプレイライブラリーの種々の変形形態が、存在する。いずれの場合も、所与のライブラリー内のタンパク質（本明細書では「ライブラリーメンバー」とも呼ばれる）は、タンパク質をコードする核酸に（物理的に、または宿主との会合によって）連結されている。標的分子をディスプレイライブラリーのメンバーとともにインキュベートしたとき、標的と結合する任意のライブラリーメンバーを単離することができ、結合タンパク質をコードする配列を、連結されている核酸の分析によって決定することができる。一部の実施形態では、ディスプレイライブラリーは、「ファージディスプレイライブラリー」であり、このディスプレイライブラリーは、バクテリオファージウイルス粒子（本明細書では「ファージ粒子」とも呼ばれる）で構成され、核酸がそのファージゲノムに組み込まれており、したがって、導入された核酸にコードされたタンパク質と融合しているウイルスコートタンパク質が産生される結果となる。そのような融合タンパク質は、組み立てられたファージ粒子の外面に「ディスプレイ」され、この外面で、それらは所与の標的と相互作用することができる。

20

【0049】

遠位の：本明細書で使用される場合、用語「遠位の」は、中心から遠くにある、または目的の地点もしくは領域から遠くにあることを意味する。

30

【0050】

改変された（される、されている）：本明細書で使用される場合、本発明の実施形態は、出発点である野生型またはネイティブ分子とは異なる特徴または性質を、構造的であるにせよ化学的であるにせよ有するように設計されている場合、「改変されている」。したがって、改変された薬剤または実体は、その設計および／または產生が人間の手による行為を含むものである。

40

【0051】

エピトープ：本明細書で使用される場合、「エピトープ」は、抗体を含むがこれらに限定されない免疫系の成分と相互作用することができる、分子の表面または領域を指す。一部の実施形態では、エピトープは、標的部位を含み得る。エピトープは、対応する抗体によって特異的に認識され、結合される、抗原上の領域、または2つもしくはそれより多くの抗原間の領域を含み得る。一部のエピトープは、1つまたは複数のグリカンに沿って1つまたは複数の糖残基を含み得る。そのようなエピトープは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または少なくとも10の糖残基を含み得る。エピトープは、実体間に1つまたは複数の相互作用領域も含み得る。一部の実施形態では、エピトープは、2つの糖残基間に、枝分かれ鎖と親鎖との間に、またはグリカンとタンパク質との間に、接合部を含み得る。

50

【0052】

エーテル結合：本明細書で使用される場合、「エーテル結合」は、2つの炭素原子の間に結合された酸素を含む化学結合を指す。一部の実施形態では、エーテル結合は、糖残基を他の実体に連結させ、他の実体には、グリカン鎖を形成するための他の糖残基が含まれるが、これに限定されない。そのような結合は、「グリコシド結合」または「グリコシド連結」とも呼ばれる。少なくとも1つの糖残基に関して、用語「連結（link）」および／または「連結（linkage）」は、グリコシド連結に言及するときにも本明細書では使用される。一部の実施形態では、連結は、タンパク質、脂質、リン脂質およびスフィンゴ脂質を含むがこれらに限定されない他の実体に、グリカンを連結させることができる。一部の実施形態では、糖残基をタンパク質に連結させることができ、これにより、通常は、糖残基とアミノ酸残基間の連結が形成される。そのようなアミノ酸残基としては、セリンおよびトレオニンが挙げられる。一部の実施形態では、エーテル結合は、結合形成に関与する炭化水素リンカーによってグリカンをグリカンアレイに連結させる。グリコシド連結は、それらの立体化学的性質が異なることもある。一部の実施形態では、エーテル結合の結合酸素と糖残基のシクロヘキサン環とのアルファ配向グリコシド連結（本明細書では「アルファ連結」とも呼ばれる）は、結果としてアキシアル配向となる。一部の実施形態では、エーテル結合の結合酸素と糖残基のシクロヘキサン環とのベータ配向グリコシド連結（本明細書では「ベータ連結」とも呼ばれる）は、結果としてエクアトリアル配向となる。

10

【0053】

20

発現：本明細書で使用される場合、核酸配列の「発現」は、次の事象のうちの1つまたは複数を指す：（1）DNA配列からの（例えば、転写による）RNA鑄型の產生、（2）RNA転写物の（例えば、スプライシング、編集、5'キャップ形成および／または3'末端プロセシングによる）プロセシング、（3）RNAのポリペプチドまたはタンパク質への翻訳；（4）ポリペプチドまたはタンパク質のフォールディング、ならびに（5）ポリペプチドまたはタンパク質の翻訳後修飾。

【0054】

特徴：本明細書で使用される場合、「特徴」は、特性、性質、または弁別要素を指す。

【0055】

30

製剤：本明細書で使用される場合、「製剤」は、処方に従って調製された材料または混合物であって、少なくとも1つの抗体、化合物、物質、実体、部分構造、カーゴまたはペイロードおよび送達剤、担体または賦形剤を含み得る、材料または混合物を指す。

【0056】

40

機能性（官能）：本明細書で使用される場合、「機能性」生体分子は、特徴付けられる性質および／または活性を示す構造を有する、ならびに特徴付けられる性質および／または活性を示す形態での、生物学的実体である。本明細書で使用される場合、「官能基」または「化学基」は、より大きい分子の一部である、原子または化学結合の特性基を指す。一部の実施形態では、官能基は、異なる分子に付隨し得るが、官能基がその一部である分子を問わず同様の化学反応に関与し得る。一般的な官能基としては、これらに限定されないが、カルボキシリ基（-COOH）、アセチル基（-COH）、アミノ基（-NH₂）、メチル基（-CH₃）、硫酸基（-SO₃H）およびアシル基が挙げられる。一部の実施形態では、分子への1つまたは複数の官能基の付加を、語尾に「～化（-ylated）」を付けて官能基名を修飾する用語、例えば、アセチル化（acetylated）、メチル化（methylated）および硫酸化（sulfated）を使用して伝えることがある。

【0057】

50

グリカン：本明細書で使用される場合、用語「グリカン」、「オリゴ糖」および「多糖」は、交換可能に使用され、本明細書では連結とも呼ばれるグリコシド結合によって通常は繋がれている糖モノマーで構成されているポリマーを指す。一部の実施形態では、用語「グリカン」、「オリゴ糖」および「多糖」は、グリココンジュゲート（例えば、糖タンパク質、糖脂質またはプロテオグリカン）の炭水化物部分を指すために使用され得る。

【0058】

グリカン鎖：本明細書で使用される場合、用語「グリカン鎖」は、2つまたはそれより多くの糖を含む糖ポリマーを指す。一部の実施形態では、グリカン鎖は、タンパク質上のセリンまたはトレオニン残基によってタンパク質に共有結合で連結されている。

【0059】

グリカンリッチ組成物：本明細書で使用される場合、用語「グリカンリッチ組成物」は、大きなパーセンテージのグリカンを含む混合物を指す。一部の実施形態では、グリカンリッチ組成物中のグリカンは、組成物の総重量の約1%～約10%、約5%～約15%、約20%～約40%、約30%～約50%、約60%～約80%、約70%～約90%、または少なくとも100%を構成し得る。

10

【0060】

グリコシド結合：本明細書で使用される場合、用語「グリコシド結合」は、炭化水素と別の化学基とで形成される共有結合を指す。一部の実施形態では、グリコシド結合は、1つの糖分子の還元末端と第2の糖分子または多糖鎖の非還元末端とで形成される。そのようなグリコシド結合は、繋がれている糖の間の酸素（またはエーテル結合）のため、O-グリコシド結合としても公知である。一部の実施形態では、2つの糖間のまたは糖とリンカー間のグリコシド結合もまた「連結」と呼ばれることがある。

【0061】

in vitro：本明細書で使用される場合、用語「*in vitro*」は、生物（例えば、動物、植物または微生物）内においてではなく、人工的環境で、例えば、試験管または反応容器内で、細胞培養で、ペトリ皿の中などで起こる事象を指す。

20

【0062】

in vivo：本明細書で使用される場合、用語「*in vivo*」は、生物（例えば、動物、植物もしくは微生物またはそれらの細胞もしくは組織）内で起こる事象を指す。

【0063】

単離された：本明細書で使用される場合、用語「単離された」は、「分離された」と同義語であるが、分離が人間の手で行われたという推測を伴う。一部の実施形態では、単離された物質または実体は、それが以前に（天然にであろうと、実験環境においてであろうと）会合していた成分の少なくとも一部から分離されたものである。単離された物質は、それらが会合していた物質を基準にして様々な純度レベルを有し得る。単離された物質および/または実体は、それらが最初に会合していた他の成分の少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、またはそれより高い%から分離されることもある。一部の実施形態では、単離された作用因子は、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%より高い、または約99%より高い純度である。本明細書で使用される場合、物質は、実質的に他の成分がない場合、「純粹」である。

30

【0064】

キット：本明細書で使用される場合、用語「キット」は、協働的目的およびそれらの使用説明書に適応する1つまたは複数の成分を含むセットを指す。

40

【0065】

ノックアウト：本明細書で使用される場合、用語「ノックアウト」は、人間の手が通常は関与するプロセスによって既存遺伝子が不活性化された生物を指す。ノックアウト生物において、不活性化された遺伝子は、「ノックアウトされた」と言われる。一部の実施形態では、ノックアウトされた遺伝子は、遺伝子へのヌクレオチド配列の挿入によって、または遺伝子全体を置き換えることによって不活性化され得る。

【0066】

リンカー：本明細書で使用される場合、「リンカー」は、2つもしくはそれより多くのドメイン、部分構造または実体を接続する部分構造を指す。一部の実施形態では、リンカーは、10、11、12、13、14、15個またはそれより多くの原子を含み得る。さらな

50

る実施形態では、リンカーは、原子群、例えば、10～1,000個の原子を含み得る。そのような原子または原子群は、これらに限定されないが、炭素、アミノ、アルキルアミノ、酸素、硫黄、スルホキシド、スルホニル、カルボニルおよびイミンを含み得る。一部の実施形態では、リンカーは、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み得る。一部の実施形態では、リンカーにより結合される部分構造は、これらに限定されないが、原子、化学基、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸塩基、糖、核酸、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質複合体、ペイロード（例えば、治療剤）またはマーク（これらに限定されないが、化学的、蛍光、放射性もしくは生物発光マークを含む）を含み得る。リンカーは、本明細書に記載されるように、任意の有用な目的のために、例えば、多量体またはコンジュゲートを形成するために、およびペイロードを投与するために、使用され得る。リンカーに組み込むことができる化学基の例としては、これらに限定されないが、アルキル、アルケニル、アルキニル、アミド、アミノ、エーテル、チオエーテル、エステル、アルキレン、ヘテロアルキレン、アリール、またはヘテロシクリルが挙げられ、これらの化学基の各々は、本明細書に記載されるように、必要に応じて置換されていてもよい。リンカーの例としては、これらに限定されないが、不飽和アルカン、ポリエチレンジリコール（例えば、エチレンまたはプロピレンジリコールモノマー単位、例えば、ジエチレンジリコール、ジプロピレンジリコール、トリエチレンジリコール、トリプロピレンジリコール、テトラエチレンジリコール、もしくはテトラエチレンジリコール）、およびデキストランポリマーが挙げられる。他の例としては、これらに限定されないが、リンカー内の切断可能な部分構造、例えば、還元剤もしくは光分解を使用して切断することができるジスルフィド結合（-S-S-）またはアゾ結合（-N=N-）などが挙げられる。選択的に切断可能な結合の非限定的な例としては、例えばトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）もしくは他の還元剤および/または光分解を使用して、切断され得るアミド結合、ならびに例えば酸性または塩基性加水分解により、切断され得るエステル結合が挙げられる。一部の実施形態では、リンカーは、グリカンを基板、例えばグリカンアレイにおける基板に連結させるために使用される炭水化物部分構造である。そのような炭水化物リンカーとしては、これらに限定されないが、-O-(CH₂)₂CH₂HN₂および-O-(CH₂)₃NHCOCH₂(OCH₂CH₂)₆NH₂が挙げられる。

【0067】

mRNA：本明細書で使用される場合、用語「mRNA」は、遺伝子転写および生成された転写物のプロセシングの結果として產生される、メッセンジャーRNAを指す。一部の実施形態では、細胞核から出たmRNAを細胞または一連の細胞から抽出し、分析して、所与の時間にまたは所与の一連の環境のもとで転写された遺伝子を判定することができる。

【0068】

ムチン：本明細書で使用される場合、用語「ムチン」は、重度にグリコシル化されているタンパク質のファミリーを指す。一部の実施形態では、ムチンは、頸下腺により產生され、唾液および粘液（mucous）中で見つけられる。

【0069】

ネガティブ選択：本明細書で使用される場合、用語「ネガティブ選択」は、ディスプレイライブラリーからのライブラリーメンバーの、標的抗原を含まない組成物の実体および/または成分に結合するそれらの能力に基づく、選択を指す。一部の実施形態では、ネガティブ選択は、標的と非特異的に結合する可能性のある要素を除去するためにポジティブ選択の前に使用される。

【0070】

オフターゲット：本明細書で使用される場合、「オフターゲット」は、任意の1つもしくは複数の標的、遺伝子または細胞転写物に対する任意の意図せぬ効果を指す。

【0071】

患者：本明細書で使用される場合、「患者」は、処置を求めるもしくは処置を必要とし

10

20

30

40

50

ている可能性がある対象、処置を必要とする対象、処置を受けている対象、処置を受けることになる対象、または訓練を受けた（例えば、免許を持つ）専門家による特定の疾患もしくは状態のケアを受けている対象を指す。

【0072】

ペプチド：本明細書で使用される場合、「ペプチド」は、50アミノ酸長未満もしくは50アミノ酸長である、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45もしくは50アミノ酸長である、タンパク質またはポリペプチドである。

【0073】

薬学的に許容される：語句「薬学的に許容される」は、本明細書では、正当な医学的判断の範囲内で、人間および動物の組織と接触して使用することに適しており、過度の毒性、刺激、アレルギー反応または他の問題もしくは合併症を伴わず、妥当な損益比に見合っている、化合物、材料、組成物および／あるいは剤形を指すために用いられる。

10

【0074】

薬学的に許容される賦形剤：語句「薬学的に許容される賦形剤」は、本明細書で使用される場合、医薬組成物中に存在する活性剤以外の任意の成分（例えば、本明細書に記載されるような成分）であって、患者において実質的に非毒性および非炎症性である性質を有する成分を指す。一部の実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、活性剤を懸濁または溶解することができるビヒクルである。賦形剤はとしては、例えば、粘着防止剤、抗酸化剤、結合剤、コーティング、圧縮助剤、崩壊剤、色素（染料）、皮膚軟化薬、乳化剤、フィラー（希釈剤）、成膜剤またはコーティング、着香剤、芳香剤、流動促進剤（流動増進剤）、滑沢剤、保存剤、印刷インク、吸収剤、懸濁剤または分散剤、甘味料、および水和水を挙げることができる。例示的賦形剤としては、これらに限定されないが、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム（二塩基性）、ステアリン酸カルシウム、クロスカルメロース、架橋ポリビニルピロリドン、クエン酸、クロスボビドン、システイン、エチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、マルチトール、マンニトール、メチオニン、メチルセルロース、メチルパラベン、微結晶性セルロース、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポビドン、アルファ化デンプン、プロピルパラベン、バルミチン酸レチニル、セラック、二酸化ケイ素、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クエン酸ナトリウム、デンブングリコール酸ナトリウム、ソルビトール、デンプン（トウモロコシ）、ステアリン酸、スクロース、タルク、二酸化チタン、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC、およびキシリトールが挙げられる。

20

【0075】

薬学的に許容される塩：本明細書に記載の化合物の薬学的に許容される塩は、酸または塩基部分構造が（例えば、遊離塩基と適切な有機酸の反応により生成されるような）その塩形態である、開示化合物の形態である。薬学的に許容される塩の例としては、これらに限定されないが、アミンなどの塩基性残基の無機または有機酸塩；カルボン酸などの酸性残基のアルカリまたは有機塩；およびこれらに類するものが挙げられる。代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重硫酸塩、ホウ酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプトン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプトン酸塩、ヘキサン酸塩、臭化水素酸塩、塩酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシ-エタンスルホン酸塩、ラクトビオン酸塩、乳酸塩、ラウリン酸塩、ラウリル硫酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オレイン酸、シウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ビバル酸塩、プロピオン酸塩、ステアリン酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、チオシアニ酸塩、トルエンスルホン酸塩、ウンデカン酸塩、吉草酸塩、およびこれらに類するものが挙げられる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類金属塩としては、ナトリウム、

30

40

50

リチウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムおよびこれらに類するもの、ならびにこれらに限定されないが、アンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、エチルアミンおよびこれらに類するものを含む、非毒性アンモニウム、第四級アンモニウムおよびアミンカチオンが挙げられる。薬学的に許容される塩は、例えば非毒性無機または有機酸からの、従来の非毒性塩を含む。一部の実施形態では、薬学的に許容される塩は、塩基性または酸性部分構造を含有する親化合物から従来の化学的方法により調製される。一般に、そのような塩は、遊離酸または塩基形態のこれらの化合物と化学量論量の適切な塩基または酸を、水中で、もしくは有機溶媒中で、またはこれら2つの混合物中で反応させることによって調製することができ、一般に、エーテル、酢酸エチル、エタノール、イソプロパノールまたはアセトニトリルのような非水性媒体が好ましい。適切な塩のリストは、Remington's Pharmaceutical Sciences、17版、Mack Publishing Company、Easton、Pa.、1985年、1418頁、Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use、P.H. StahlおよびC.G. Wermuth(編)、Wiley-VCH、2008年、ならびにBergeら、Journal of Pharmaceutical Science、66巻、1~19頁(1977年)において見出され、これらの参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。薬学的に許容される溶媒和物：用語「薬学的に許容される溶媒和物」は、本明細書で使用される場合、適切な溶媒の分子が結晶格子内に組み込まれている、化合物の結晶形態を指す。例えば、溶媒和物は、有機溶媒、水またはこれらの混合物を含む溶液からの結晶化、再結晶または沈殿によって調製することができる。適切な溶媒の例は、エタノール、水(例えば、一、二および三水和物)、N-メチルピロリドン(NMP)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、N,N'-ジメチルホルムアミド(DMF)、N,N'-ジメチルアセトアミド(DMAC)、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン(DMEU)、1,3-ジメチル-3,4,5,6-テトラヒドロ-2-(1H)-ピリミジノン(DMPU)、アセトニトリル(ACN)、プロピレングリコール、酢酸エチル、ベンジルアルコール、2-ピロリドン、安息香酸ベンジル、およびこれらに類するものである。水が溶媒である場合、溶媒和物は、「水和物」と呼ばれる。一部の実施形態では、溶媒和物に組み込まれる溶媒は、溶媒和物が(例えば、医薬組成物の単位剤形で)投与される生物に生理学的に許容される種類のまたはレベルでのものである。

【0076】

薬物動態：本明細書で使用される場合、「薬物動態」は、それが生存生物に投与された物質の運命の決定に関係する場合、分子または化合物の任意の1つもしくは複数の性質を指す。薬物動態は、吸収、分布、代謝および排泄の程度および速度を含む、いくつかの領域に分けられる。これは、一般に、ADMEと呼ばれ、ここで、(A)吸収は、血液循環に入る物質の過程であり、(D)分布は、体液および体組織全体にわたっての物質の分散または散在であり、(M)代謝(または体内変換)は、親化合物の娘代謝物への不可逆的変換であり、および(E)排泄(または排出)は、身体からの物質の排出を指す。稀に、一部の薬物は、体組織中に不可逆的に蓄積する。

【0077】

物理化学的：本明細書で使用される場合、「物理化学的」は、物理的および/もしくは化学的性質を意味する、または物理的および/もしくは化学的性質に関する。

【0078】

ポジティブ選択：本明細書で使用される場合、用語「ポジティブ選択」は、特有の実体の一群からの所与の実体の選択を指す。そのような実体およびそれらの群は、例えば、抗体であってもよい。一部の場合には、それらは、抗体断片であってもよく、または発現される抗体断片は、そのような断片(例えば、ディスプレイライブラリーからのライブラリーメンバー)を発現することができる作用因子と会合している。選択は、所望の標的またはエピトープと結合する選択された実体の能力に基づくこともある。一部の実施形態では、ポジティブ選択をファージディスプレイライブラリーとともに使用して、所望の標的と結合するscFvを発現するファージ粒子を同定することができる。他の実施形態では、

10

20

30

40

50

ポジティブ選択は、抗体プールの中からの抗体候補の選択を指すこともある。他の場合には、実体は、細胞であってもよく、細胞株であってもよく、またはハイブリドーマ選択中のクローンの選択の場合のようにクローンであってもよい。そのような場合、ポジティブ選択は、そのようなクローンにより産生された抗体の1つまたは複数の特徴（例えば、1つまたは複数の所望のエピトープに対する特異性）に基づくクローン選択を指すこともある。一部の場合には、ポジティブ選択法において望ましエピトープは、S T n（例えば、A c S T n および / または G c S T n）を含み得る。

【0079】

逆に、「ネガティブ選択」は、本明細書で使用される場合、ポジティブ選択について説明された同じ原理および例、しかし特有の実体の群からの望ましくない実体の除去に使用される顕著な特性を有する原理および例を含んだ。

10

【0080】

予防すること：本明細書で使用される場合、用語「予防すること」は、感染、疾患、障害および / もしくは状態の発生を部分的にまたは完全に遅延させること、特定の感染、疾患、障害および / もしくは状態の1つもしくは複数の症状、特徴または臨床兆候の発生を部分的にまたは完全に遅延させること、特定の感染、疾患、障害および / もしくは状態の1つもしくは複数の症状、特徴または兆候の発生を部分的にまたは完全に遅延させること、感染、特定の疾患、障害および / もしくは状態からの進行を部分的にまたは完全に遅延させること、ならびに / あるいは感染、疾患、障害および / もしくは状態に関連する病態を発現するリスクを低下させることを指す。

20

【0081】

プロドラッグ：本開示は、本明細書に記載の化合物のプロドラッグも含む。本明細書で使用される場合、「プロドラッグ」は、その物質、分子または実体が化学的または物理的变化を起こした後、治療薬として作用すると断言される形態である、任意の物質、分子または実体を指す。プロドラッグは、共有結合されていてもよく、または何らかの方法で隔離されてもよく、哺乳動物対象への投与前、投与時または投与後に、活性薬物部分構造を放出するかまたは活性薬物部分構造に変換される。プロドラッグは、化合物中に存在する官能基を、修飾部が常例的な操作でまたは in vivo で切断されて親化合物になるように、修飾することによって、調製することができる。プロドラッグは、ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリルまたはカルボキシル基が、哺乳動物対象に投与されたときに遊離ヒドロキシル、アミノ、スルフヒドリルまたはカルボキシル基をそれぞれ形成するように切断する任意の基と結合されている化合物を含む。プロドラッグの調製および使用は、T. Higuchi および V. Stella、「Pro-drugs as Novel Delivery Systems」、A.C.S. Symposium Series の 14巻において、および Bioreversible Carriers in Drug Design、Edward B. Roche 編、American Pharmaceutical Association and Pergamon Press、1987年ににおいて論じられており、これらの文献の両方は、それら全体が参考により本明細書に組み入れられる。

30

【0082】

近位の：本明細書で使用される場合、用語「近位の」は、中心により近く、または目的の地点もしくは領域により近くにある、を意味する。

40

【0083】

相互作用領域：本明細書で使用される場合、「相互作用領域」は、2つまたはそれより多くの実体のいずれかに沿った領域であって、そのような実体が相互作用または重複する領域を指す。一部の実施形態では、相互作用領域は、第2のグリカン鎖と接触するグリカン鎖に沿った1つまたは複数の糖残基を含み得る。一部の実施形態では、グリカン鎖は、同じ親鎖からの枝分かれ鎖である。一部の実施形態では、相互作用領域は、一方の鎖が枝分かれ鎖であり、第2の鎖が親鎖である、2本のグリカン鎖間に存在し得る。グリカン鎖の場合、相互作用領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または少なくとも10の糖残基を含み得る。一部の実施形態では、相互作用領域は、グリカンとタンパク質との間、またはグリカンと脂質との間にも存在し得る。

50

【0084】

残基：本明細書で使用される場合、用語「残基」は、ポリマーと会合しているまたは会合することができるモノマーを指す。一部の実施形態では、残基は、これらに限定されないが、グルコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸を含む、糖分子を含む。一部の実施形態では、残基は、アミノ酸を含む。

【0085】

試料：本明細書で使用される場合、用語「試料」は、供給源から採取される、および／または分析もしくはプロセシングのために提供される、アリコートあるいは部分を指す。一部の実施形態では、試料は、生物学的供給源、例えば、組織、細胞または構成部分（例えば、これらに限定されないが、血液、血漿、血清、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、羊水、臍帯血、尿、膣液および精液を含む、体液）からの試料（本明細書では「生体試料」とも呼ばれる）である。一部の実施形態では、試料は、例えば血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚の外部区域、呼吸器管、腸管および尿生殖器管、涙、唾液、乳、血液細胞、腫瘍、器官を含むがこれらに限定されない、生物全体またはその組織、細胞もしくは構成部分のサブセットまたはこれらの画分もしくは部分から調製された、ホモジネート、ライセートまたは抽出物であり得るか、あるいはそのようなホモジネート、ライセートまたは抽出物を含み得る。一部の実施形態では、試料は、タンパク質もしくは核酸分子などの細胞成分を含有し得る培地、例えば、栄養プロスまたはゲルを含む。一部の実施形態では、「一次」試料は、供給源のアリコートである。一部の実施形態では、一次試料は、分析または他の使用のための試料を調製するために1つまたは複数の処理（例えば、分離、精製など）ステップに付される。

10

20

30

【0086】

シアリル：本明細書で使用される場合、接頭語「シアリル」および用語「シアリル化」は、シアル酸を含む化合物を表す。

【0087】

単一単位用量：本明細書で使用される場合、「单一単位用量」は、1用量で／1回で／单一経路で／单一の接触時点、すなわち单一投与事象で、投与される任意の治療薬の用量である。一部の実施形態では、単一単位用量は、個別の剤形（例えば、錠剤、カプセル、パッチ、充填済み注射器、バイアルなど）として提供される。

【0088】

分割用量：本明細書で使用される場合、「分割用量」は、单一単位用量または総1日用量が2用量またはそれより多くの用量に分かれている状態である。

40

【0089】

安定した：本明細書で使用される場合、「安定した」は、反応混合物からの有用な純度への単離を乗り切るのに十分な頑強さがあり、好ましくは、有効な治療剤に製剤化することができる、化合物または実体を指す。

【0090】

安定化した（された、される）：本明細書で使用される場合、用語「安定させる」、「安定化した（された、される）」、「安定化（した、された）領域」は、安定にさせること、または安定になることを意味する。一部の実施形態では、安定性は、絶対値を基準にして測定される。一部の実施形態では、安定性は、参照化合物または実体を基準にして測定される。

【0091】

標準ケア：本明細書で使用される場合、語句「標準ケア」は、治療的処置の方法であって、そのような処置を提供する当業者の大部分により実施される方法と合致する方法を指す。

【0092】

対象：本明細書で使用される場合、用語「対象」または「患者」は、本発明による組成物が、例えば、実験、診断、予防および／または治療目的で、投与され得る、任意の生物を指す。典型的な対象としては、動物（例えば、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサ

50

ギ、非ヒト靈長類、およびヒト)ならびに／または植物が挙げられる。

【0093】

頸下腺：本明細書で使用される場合、用語「頸下腺 (submaxillary gland)」または「あご下腺 (submandibular gland)」は、口腔底のすぐ下に位置する粘液産生腺 (mucous-producing gland) を指す。これらの腺は、ムチンを产生することができ、一部の実施形態では、ムチン源として哺乳動物から抽出され得る。

【0094】

に罹患している：疾患、障害および／または状態「に罹患している」個体は、疾患、障害および／または状態であると診断されたか、あるいは疾患、障害および／または状態の1つもしくは複数の症状を提示する。

10

【0095】

罹患しやすい：疾患、障害および／または状態「に罹患しやすい」個体は、疾患、障害および／もしくは状態であると診断されていない、および／または疾患、障害および／もしくは状態を示さないことがあるが、疾患またはその症状を発症する傾向を有する。一部の実施形態では、疾患、障害および／または状態(例えば、がん)に罹患しやすい個体は、次のうちの1つまたは複数によって特徴付けられ得る：(1)疾患、障害および／または状態の発症に関連する遺伝子突然変異、(2)疾患、障害および／または状態の発症に関連する遺伝的多型、(3)疾患、障害および／もしくは状態に関連するタンパク質および／もしくは核酸の発現および／または活性の増加および／あるいは減少、(4)疾患、障害および／もしくは状態の発症に関連する習慣および／または生活様式、(5)疾患、障害および／または状態の家族歴、ならびに(6)疾患、障害および／もしくは状態の発症に関連する微生物への曝露および／またはそのような微生物による感染。一部の実施形態では、疾患、障害および／または状態に罹患しやすい個体は、疾患、障害および／または状態を発症することになる。一部の実施形態では、疾患、障害および／または状態に罹患しやすい個体は、疾患、障害および／または状態を発症することにならない。

20

【0096】

合成の：用語「合成の」は、人間の手によって產生された、調製されたおよび／または製造されたことを意味する。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドまたは他の分子の合成は、化学的であってもよく、または酵素的であってもよい。

30

【0097】

標的：本明細書で使用される場合、用語「標的」は、作用による影響を受ける物体または実体を指す。一部の実施形態では、標的は、抗原に特異的に結合する抗体を開発するために使用される抗原を指す。

【0098】

標的スクリーニング：本明細書で使用される場合、用語「標的スクリーニング」は、標的物質の、その物質の結合パートナーを同定するための、使用を指す。

【0099】

標的部位：本明細書で使用される場合、用語「標的部位」は、結合剤またはエフェクター分子(例えば、抗体)によって認識される、細胞、細胞外空間、組織、器官および／あるいは生物上または内の1つもしくは複数のグリカン、糖タンパク質、生体分子および／または生物学的構造上もしくは内の領域を指す。一部の実施形態では、グリカン標的部位は、1つの糖残基上に排他的に存在することもあり、2つもしくはそれより多くの残基によって形成されることもあり、またはグリカン成分と非グリカン成分の両方を含むこともある。一部の実施形態では、標的部位は、2つもしくはそれより多くのグリカンまたは糖タンパク質間で形成される。一部の実施形態では、標的部位は、同じグリカンの枝分かれ鎖間で、または1つもしくは複数の枝分かれ鎖と親鎖との間で形成される。

40

【0100】

被標的細胞：本明細書で使用される場合、「被標的細胞」は、目的の1つまたは複数の細胞のいずれかを指す。細胞は、*in vitro*、*in vivo*、*in situ*、または任意の生物の組織もしくは器官内で見つけることができる。生物は、動物、哺乳動

50

物、またはヒト（例えば、ヒト患者）であり得る。

【0101】

末端残基：本明細書で使用される場合、用語「末端残基」は、ポリマー鎖における最後の残基を指す。一部の実施形態では、末端残基は、多糖鎖の非還元末端に位置する糖残基である。

【0102】

治療的：本明細書で使用される場合、用語「治療的」は、疾患、障害または状態の治癒に関係する任意の物質または手順を指す。例えば、治療的処置は、疾患、障害または状態の治癒に関係する任意の処置を指す。

【0103】

治療剤：用語「治療剤」は、対象に投与されたとき、治療効果、診断効果および／もしくは予防効果がある、ならびに／または所望の生物学的および／もしくは薬理学的効果を発揮する、任意の物質を指す。

【0104】

治療有効量：本明細書で使用される場合、用語「治療有効量」は、感染、疾患、障害および／または状態に罹患しているまたは罹患しやすい対象に投与されたとき、感染、疾患、障害および／もしくは状態を処置するのに、感染、疾患、障害および／もしくは状態の症状を改善するのに、感染、疾患、障害および／もしくは状態を診断するのに、感染、疾患、障害および／もしくは状態を予防するのに、ならびに／または感染、疾患、障害および／もしくは状態の発生を遅延させるのに十分である、送達される薬剤（例えば、核酸、薬物、治療剤、診断剤、予防剤など）の量を意味する。一部の実施形態では、治療有効量は、単一用量で提供される。一部の実施形態では、治療有効量は、多数回の用量を含む投薬レジメンで投与される。一部の実施形態では、単位剤形が、そのような投薬レジメンの一部として投与されたときに有効である量を含む場合、特定の薬剤または実体の治療有効量を含むと考えることができることは、当業者には理解されるであろう。

10

20

30

40

50

【0105】

治療有効アウトカム：本明細書で使用される場合、用語「治療有効アウトカム」は、感染、疾患、障害および／または状態に罹患しているまたは罹患しやすい対象において、感染、疾患、障害および／もしくは状態を処置するのに、感染、疾患、障害および／もしくは状態の症状を改善するのに、感染、疾患、障害および／もしくは状態を診断するのに、感染、疾患、障害および／もしくは状態を予防するのに、ならびに／または感染、疾患、障害および／もしくは状態の発生を遅延させるのに十分であるアウトカムを意味する。

【0106】

総1日用量：本明細書で使用される場合、「総1日用量」は、24時間単位で与えられるまたは処方される量である。総1日用量は、単一単位用量として投与されることもある。

【0107】

トランスジェニック：本明細書で使用される場合、用語「トランスジェニック」は、生物の、生物ゲノム内に組み込まれた、その生物内には天然においては見られない、1つまたは複数の遺伝子を含む生物を指す。

【0108】

処置すること：本明細書で使用される場合、用語「処置すること」は、特定の感染、疾患、障害および／または状態の症状もしくは特徴の1つもしくは複数を部分的にまたは完全に軽減すること、治癒させること、寛解させること、改善すること、緩和すること、その発生を遅延させること、その進行を阻害すること、その重症度を低下させること、ならびに／あるいはその発生率を低下させることを指す。例えば、がんを「処置すること」は、腫瘍の生存、増殖および／または拡大を阻害することを指すこともある。処置は、疾患、障害および／もしくは状態の徴候を示さない対象に、ならびに／または疾患、障害および／もしくは状態の初期徴候のみを示す対象に、疾患、障害および／または状態に関連する病態を発症するリスクを低下させる目的で投与されることもある。

【 0 1 0 9 】

可変領域：本明細書で使用される場合、用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体間で配列が大幅に異なる特異的抗体ドメインであって、特定の抗体各々のその特定の抗原に対する結合および特異性に使用されるドメインを指す。

【 0 1 1 0 】

全 Ig G：本明細書で使用される場合、用語「全 Ig G」は、完全 Ig G 分子を指す。一部の実施形態では、全 Ig G 分子は、2 種またはそれより多くの他の生物において天然に見られる領域を含む。

【 0 1 1 1 】

野生型：本明細書で使用される場合、用語「野生型」は、天然ゲノムを含む（他の生物に由来する遺伝子がない）生物を指す。10

I . 化合物および組成物**【 0 1 1 2 】**

一部の実施形態では、本発明は、少なくとも 1 つのグリカン相互作用抗体を含む、化合物および組成物を提供する。グリカン中の单糖モノマーは、すべて同じであってもよく、または異なっていてもよい。一般的なモノマーとしては、これらに限定されないが、トリオース、テトロース、ペントース、グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、リキソース、アロース、アルトロース、マンノース、グロース、イドース (iodose)、リボース、マンノヘプツロース、セドヘプツロース、およびタロースが挙げられる。アミノ糖も、グリカン中のモノマーであり得る。そのような糖を含むグリカンは、本明細書ではアミノグリカンと呼ばれる。本明細書で使用される場合のアミノ糖は、ヒドロキシル基の代わりにアミン基を含む糖分子であり、または一部の実施形態ではそのような糖から誘導された糖である。アミノ糖の例としては、これらに限定されないが、グルコサミン、ガラクトサミン、N - アセチルグルコサミン、N - アセチルガラクトサミン、シアル酸（これらに限定されないが、N - アセチルノイラミン酸および N - グリコリルノイラミン酸を含む）、および L - ダウノサミンが挙げられる。20

【 0 1 1 3 】

本明細書で使用される場合、用語「グリカン相互作用抗体」は、グリカン部分構造と相互作用することができる抗体を指す。そのような抗体は、単独のグリカン部分構造と結合することもあり、複数のグリカン部分構造と結合することもあり、またはグリカン成分と非グリカン成分の両方を含むエピトープと結合することもある。非グリカン成分としては、これらに限定されないが、タンパク質、タンパク質関連部分構造（上記の翻訳後修飾部）、細胞、および細胞会合分子 / 構造を挙げることができる。グリカン相互作用抗体は、グリカンまたはグリカン会合分子もしくは実体と結合するために、グリカンまたはグリカン会合分子もしくは実体を変化させる、活性化する、阻害する、安定させる、分解するおよび / またはモジュレートするように、機能することができる。そうすることで、グリカン相互作用抗体は、姑息的であろうと、予防的であろうと、または継続処置用組成物としてであろうと、治療薬として機能することができる。一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、他の分子とのコンジュゲートまたは組合せを含み得る。一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、1 つまたは複数のアミノ糖を有するグリカンに対する抗体である。さらなる実施形態では、1 つまたは複数のアミノ糖は、シアル酸である。さらなる実施形態では、1 つまたは複数のシアル酸は、N - アセチルノイラミン酸および / または N - グリコリルノイラミン酸である。30

抗体**【 0 1 1 4 】**

グリカン相互作用抗体は、全抗体またはそれらの断片を含み得る。本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、これらに限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、少なくとも 2 つのインタクト抗体から形成される二重特異性抗体）、抗体コンジュゲート（これに限定されないが、抗体 - 薬物コンジュゲートを含む）、抗体変異体 [これらに限定されないが、抗体ミメティ

10

20

30

40

50

イック、キメラ抗体（例えば、1つより多くの種に由来するアミノ酸配列を有する抗体）、および合成変異体]、および抗体断片を含む、様々な形式を、それらが所望の生物活性（例えば、1つもしくは複数の標的に結合する、1つもしくは複数の標的を活性化する、阻害する、安定させる、分解するおよび/またはモジュレートする活性）を示すことを条件に、包含する。抗体は、主としてアミノ酸に基づく分子であるが、1つもしくは複数の翻訳後または合成的修飾を含むことがある。翻訳後修飾は、グリコシル化を含み得る。

【0115】

本明細書で使用される場合、用語「抗体断片」は、一部の場合には少なくとも1つの抗原結合領域を含む、インタクト抗体またはその融合タンパク質の一部分を指す。抗体断片の例としては、F_ab、F_ab'、F(a b')₂、Fv断片、単鎖可変断片(scfv)；ダイアボディ；トリ(ア)ボディ；線状抗体；単鎖抗体分子；および抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。抗体のパパイン消化は、单一の抗原結合部位を各々が有する、「F_ab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片を生じさせる。残留「Fc」断片も生じさせ、このFcの名称は、容易に結晶化するその能力を反映している。ペプシン処理は、F(a b')₂断片をもたらし、この断片は、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋することができる。グリカン相互作用抗体は、これらの断片の1つまたは複数を含むことがあり、例えば、全抗体の酵素的消化によって、または組換え発現によって、生成され得る。

10

【0116】

「ネイティブ抗体」は、通常、2本の同一の軽(L)鎖および2本の同一の重(H)鎖で構成されている約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。抗体重鎖および軽鎖をコードする遺伝子は公知であり、構成するセグメントは、各々、十分に特徴付けられ、記載されている(Matsuda, F.ら、1998年、The Journal of Experimental Medicine、188巻(11号)；2151～62頁、およびLi, A.ら、2004年、Blood、103巻(12号：4602～9頁、これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合により重鎖に連結されているが、ジスルフィド連結の数は、免疫グロブリンアイソタイプが異なれば重鎖によって変わる。各重鎖および軽鎖は、規則的な間隔で配置された鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一方の末端に可変ドメイン(V_H)を有し、それに続いて多数の定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端に可変ドメイン(V_L)を有し、その他方の末端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインとアラインしており、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインとアラインしている。

20

30

【0117】

本明細書で使用される場合、用語「可変ドメイン」は、抗体重鎖および軽鎖両方に見られる特異的抗体ドメインであって、抗体間で配列が大幅に異なり、特定の抗体各々のその特定の抗原に対する結合および特異性に使用される、ドメインを指す。可変ドメインは、超可変領域を含む。本明細書で使用される場合、用語「超可変領域」は、抗原結合に関与するアミノ酸残基を含む可変ドメイン内の領域を指す。超可変領域内に存在するアミノ酸は、抗体の抗原結合部位の一部となる相補性決定領域(CDR)の構造を決める。本明細書で使用される場合、用語「CDR」は、その標的抗原またはエピトープに相補的である構造を含む、抗体の領域を指す。抗原と相互作用しない、可変ドメインの他の部分は、フレームワーク(FW)領域と呼ばれる。抗原結合部位(antigen-binding site)(抗原結合性部位(antigen combining site)またはパラトープとしても公知)は、特定の抗原と相互作用するために必要なアミノ酸残基を含む。抗原結合部位を構成する正確な残基は、通常は、結合抗原との共結晶解析によって解明されるが、他の抗体との比較に基づくコンピュータによる評定も使用することができる(Strohl, W.R. Therapeutic Antibody Engineering, Woodhead Publishing, Philadelphia PA、2012年、第3章、47～54頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。CDRを構成する残基の判定は、Kabat [Wu, T.T.ら、1970年、JEM、132巻(2号)：211～50頁およびJohnson, G.ら、2000年、Nucleic Acids Res.、28巻(1号)：2

40

50

14～8頁、これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる]、Chothia [ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol.、196巻、901頁(1987年)、Chothiaら、Nature、342巻、877頁(1989年)ならびにAl-Lazikani, B.ら、1997年、J. Mol. Biol.、273巻(4号)：927～48頁、これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる]、Lefranc (Lefranc, M.P.ら、2005年、Immunome Res.、1巻：3頁) およびHonegger (Honegger, A.およびPluckthun, A.、2001年、J. Mol. Biol.、309巻(3号)：657～70頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)によって教示されたものを含むがこれらに限定されない、番号付けスキームの使用を含み得る。

【0118】

VHおよびVLドメインは、各々3つのCDRを有する。VL CDRは、可変ドメインポリペプチドに沿ってN末端からC末端へと進んだときに現れる順に、CDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3と本明細書では呼ばれる。VH CDRは、可変ドメインポリペプチドに沿ってN末端からC末端へと進んだときに現れる順に、CDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3と本明細書では呼ばれる。CDRの各々は、好適なカノニカル構造を有するが、例外として、CDR-H3は、抗体間の配列および長さに大きなばらつきがあり得るアミノ酸配列を含み、これに起因して抗原結合ドメインの三次元構造が多様になる(Nikoloudis, D.ら、2014年、PeerJ、2巻：e456頁)。一部の場合には、CDR-H3を関連抗体のパネル間で分析して、抗体多様性を評定することができる。CDR配列を決定する様々な方法が当技術分野において公知であり、それらの方法を応用して抗体配列を知ることができる(Strohl, W.R.、Therapeutic Antibody Engineering、Woodhead Publishing、Philadelphia PA、2012年、第3章、47～54頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

10

20

30

40

50

【0119】

本明細書で使用される場合、用語「Fv」は、完全抗原結合部位を形成するために必要とされる抗体上の最小限の断片を含む抗体断片を指す。これらの領域は、1つの重鎖可変領域ドメインと1つの軽鎖可変領域ドメインが密接に非共有結合的に会合している二量体からなる。Fv断片は、タンパク質切断によって生成され得るが、大いに不安定である。安定したFv断片を生成するための組換え法であって、通常は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に可動性リンカーを挿入[して、単鎖Fv(scfv)を形成]することによる、または重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとの間にジスルフィド架橋を導入することによる方法は、当技術分野において公知である(Strohl, W.R.、Therapeutic Antibody Engineering、Woodhead Publishing、Philadelphia PA、2012年、第3章、46～47頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

【0120】

いずれの脊椎動物種からの抗体「軽鎖」も、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパおよびラムダと呼ばれる2つの明確に異なるタイプの一方に割り当てることができる。それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、抗体を異なるクラスに割り当てることができる。インタクト抗体には、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMという5つの主要なクラスがあり、これらのいくつかは、さらに、サブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4、IgAおよびIgA2に分けることができる。

【0121】

本明細書で使用される場合、用語「単鎖Fv」または「scfv」は、VHおよびVL抗体ドメインの融合タンパク質であって、これらのドメイン同士が可動性ペプチドリンカーによって連結されて单一のポリペプチド鎖になっている、融合タンパク質を指す。一部の実施形態では、Fvポリペプチドリンカーは、scfvが、抗原結合に望ましい構造を形成することを可能にする。一部の実施形態では、scfvは、それらを表面メンバー(例えば、ファージコートタンパク質)と会合した状態で発現させ、所与の抗原に対する高親和性ペプチドの同定に使用することができる、ファージディスプレイ、酵母ディスプレ

イまたは他のディスプレイ法と併用される。

【0122】

用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を有する小さい抗体断片であって、同じペプチド鎖内に軽鎖可変ドメインV_Lに接続された重鎖可変ドメインV_Hを含む断片を指す。短すぎて同じ鎖上での2つのドメイン間の対合を可能にすることができないリンカーを使用することにより、ドメインを強制的に別の鎖の相補ドメインと対合させ、2つの抗原結合部位を作出する。ダイアボディは、例えば、E P 4 0 4 , 0 9 7、W O 9 3 / 1 1 1 6 1、およびHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：6444～6448頁（1993年）に、さらに十分に記載されており、これらの各々の内容はそれら全体が参考により本明細書に組み入れられる。

10

【0123】

用語「イントラボディ」は、それが産生される細胞から分泌されず、その代わりに1つまたは複数の細胞内タンパク質を標的とする、抗体の一形態を指す。イントラボディは、細胞内輸送、転写、翻訳、代謝プロセス、増殖シグナル伝達および細胞分裂を含むがこれらに限定されない、多数の細胞内プロセスに影響を与えるために使用され得る。一部の実施形態では、本発明の方法は、イントラボディに基づく治療を含み得る。一部のそのような実施形態では、本明細書で開示される可変ドメイン配列および／またはCDR配列を、イントラボディに基づく治療のための1つまたは複数の構築物に組み込みことができる。一部の場合には、本発明のイントラボディは、1つもしくは複数の糖化細胞内タンパク質を標的とすることでき、または1つもしくは複数の糖化細胞内タンパク質と代替タンパク質との相互作用をモジュレートすることができる。

20

【0124】

用語「キメラ抗原受容体」または「CAR」は、本明細書で使用される場合、免疫エフェクター細胞の表面に発現されるように改変されている人工受容体であって、そのような人工受容体と高い親和性で結合する実体を発現する細胞への免疫エフェクター細胞の特異的標的化をもたらす人工受容体を指す。抗体、抗体可変ドメインおよび／または抗体CDRの1つもしくは複数のセグメントを含むようにCARを設計することができ、したがって、そのようなCARが免疫エフェクター細胞上に発現されると、免疫エフェクター細胞は、CARの抗体部分によって認識されるあらゆる細胞に結合し、それらを排除する。一部の場合には、CARは、がん細胞に特異的に結合して、がん細胞の免疫調節型排除をもたらすように設計される。

30

【0125】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用される場合、実質的に同種の細胞（またはクローン）の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、モノクローナル抗体の產生中に生じ得る、一般に少量存在する、可能性のある変異体を除けば、同一であり、および／または同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対して作られる異なる抗体を通常は含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して作られる。

40

【0126】

修飾語「モノクローナル」は、実質的に同種の抗体集団から得られる場合の抗体の特徴を示し、この修飾語を、いずれかの特定の方法による抗体の產生を求めるものと見なすべきではない。本明細書におけるモノクローナル抗体は、重鎖および／または軽鎖の一部分が、特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であるが、鎖の残部が、別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同である、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、ならびにそのような抗体の断片を含む。

【0127】

非ヒト（例えば、ネズミ科動物）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの抗体からの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する、

50

マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト靈長類などの非ヒト種の抗体（ドナー抗体）からの超可変領域からの残基によって置き換えられている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ヒト化抗体は、ドナー抗体に見られるアミノ酸への1つもしくは複数のアミノ酸の逆戻りを含む、1つまたは複数の逆突然変異を含み得る。逆に言うと、ヒト化抗体に含まれるドナー抗体からの残基は、ヒトレシピエント抗体中に存在する残基と一致するように突然変異され得る。

【0128】

一部の実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体は、抗体ミメティックであり得る。用語「抗体ミメティック」は、抗体の機能または効果を模倣する分子であって、それらの分子標的と特異的にかつ高い親和性で結合する任意の分子を指す。一部の実施形態では、抗体ミメティックは、タンパク質足場としてフィブロネクチンII型ドメイン（Fn3）を組み込むように設計されたモノボディ（米国特許第6,673,901号、米国特許第6,348,584号）であり得る。一部の実施形態では、抗体ミメティックは、アフィボディ分子、アフィリン、アフィチン、アンチカリン、アビマー、DARPin、フィノマーならびにクニッツおよびドメインペプチドを含むがこれらに限定されない、当技術分野において公知のものであり得る。他の実施形態では、抗体ミメティックは、1つまたは複数の非ペプチド領域を含み得る。

10

【0129】

本明細書で使用される場合、用語「抗体変異体」は、ある抗体と構造、配列および／もしくは機能が似ているが、別の抗体またはネイティブ抗体と比較するとそれらのアミノ酸配列、組成物もしくは構造の点でいくつかの相違を含む、生体分子を指す。

20

抗体開発

【0130】

本発明のグリカン相互作用抗体は、本明細書に記載のものなどの抗原に結合するように開発される。本明細書で使用される場合、「抗原」は、生物の免疫応答を誘導または惹起する実体である。免疫応答は、外来実体の存在に対する生物の細胞、組織および／または器官の反応により特徴付けられる。そのような免疫応答によって、通常は、生物が、外来実体、例えば、抗原または抗原の一部分に対して1つまたは複数の抗体を產生することになる。一部の場合には、免疫化方法は、1つまたは複数の所望の免疫化アウトカムに基づいて変更され得る。ここで使用される場合、用語「免疫化アウトカム」は、免疫化についての1つまたは複数の所望の効果を指す。例としては、目的の標的に対する高い抗体力価および／または抗原特異性増大が挙げられる。

30

【0131】

本発明の抗原は、グリカン、グリココンジュゲート（これらに限定されないが、糖タンパク質および糖脂質を含む）、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質、または上述のもののいずれかを含むことができ、1つもしくは複数の別々のアジュバントまたは異種タンパク質とコンジュゲートあるいは複合体化されることもある。一部の実施形態では、本発明の方法に従って使用される抗原は、STnなどのシアリル化グリカンを含み得る。STnを有する抗原は、ムチンを含み得る。ムチンは、重度にグリコシリ化されているタンパク質のファミリーである。ムチンは、上皮細胞から起こる多くの腫瘍の成分である（Ishida, A. ら、2008年、Proteomics、8巻：3342～9頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。ムチンは、顎下腺によって高度に発現され、唾液および粘液中で、高レベルで見つけることができる。動物由来の顎下腺ムチンを免疫原性宿主において抗原として使用して抗STn抗体を生成することができる。異なる種からの顎下腺ムチンは、それらのSTn含有量がGcSTn形態と対比してAcSTnに関して異なる。ブタ顎下腺ムチン（PSM）は、GcSTnを特に多く含み、GcSTnが全STnの約90%を構成する。ウシ顎下腺ムチン（BSM）からのSTnは、GcSTnおよびAcSTnをほぼ等しいパーセンテージで含む。ヒツジ顎下腺ムチン（OSM）は、AcSTnを特に多く含み、AcSTnが全STnの約90%を構成する。一部の場合には、免疫化用に調製される溶液は、そのような免疫化の結果として生じる抗体の所望

40

50

の標的に依存して P S M、 B S M および O S M の 1 つまたは複数を含むように修飾され得る。 P S M は、 G c S T n に特異的である可能性がより高い免疫原性宿主において抗体を生成するための免疫化に使用され得る。 P S M は、 G c S T n で装飾されている、 N e u 5 G c 含有ムチン型の糖タンパク質を多く含む。 N e u 5 G c 含有量が多い現在公知の供給源には赤身肉があり、特に頸下腺は、 N e u 5 G c 前駆体を産生するための反応を触媒する C M A H 酵素である C M P - N e u 5 A c の高度発現のため、豊かな N e u 5 G c 源であると以前に記載された。一部の場合には、 P S M は、汎抗 N e u 5 G c 応答を防止して G c S T n に対するより特異的な免疫応答を誘導するために、使用され得る。 O S M は、 A c S T n に特異的である可能性がより高い免疫原性宿主において抗体を生成するための免疫化に使用され得る。

10

【 0 1 3 2 】

一実施形態では、本発明は、 G c S T n 特異的である、グリカン相互作用抗体を提供する。抗体は、 N e u 5 A c - S T n または T n に対する交差反応性をほとんど有さない。抗体は、 G c S T n に結合することができるが、 A c S T n に対する親和性が低下されている。

【 0 1 3 3 】

一部の実施形態では、抗原を免疫原性宿主における免疫化の前に酵素的消化に付して、結果として生じる免疫応答をモジュレートすることができる。一例を挙げれば、免疫化の前に、頸下腺ムチンをトリプシンまたはプロテイナーゼ K 酵素で処理することができる。そのような酵素の活性は、切断除去を助長することができ、それによって、非 S T n エピトープのパーセンテージおよび可変性を低下させることができる。グリカン部分構造は、それらが結合されているペプチドの領域を酵素的タンパク質分解から保護することができ、それによってインタクトを維持することができる。

20

【 0 1 3 4 】

免疫化の結果として生じる抗体力価は、そのような免疫化に使用される抗原のタイプおよび量に依存して異なる抗体レベルを有し得る。一部の場合には、ある特定の抗原は、免疫化での使用のために、予想力価に基づいて選択され得る。

30

【 0 1 3 5 】

本明細書で使用される場合、「アジュvant」は、他の薬剤の効果を修飾する薬理学的または免疫学的作用因子である。本発明によるアジュvantは、これらに限定されないが、化学組成物、生体分子、治療薬、および / または治療レジメンを含む。アジュvantとしては、フロイントアジュvant（完全および / もしくは不完全）、免疫刺激性オリゴヌクレオチド [例えば、 C p G オリゴデオキシヌクレオチド (O D N)] 、無機物含有組成物、細菌 A D P リボシリ化毒素、生体接着剤、粘膜接着剤、ミクロ粒子、脂質、リポソーム、ムラミルペプチド、 N - 酸化型ポリエチレン - ビペラジン誘導体、サポニンならびに / または免疫刺激複合体 (I S C O) を挙げることができる。一部の実施形態では、アジュvantは、水中油型エマルジョン（例えば、サブミクロン水中油型エマルジョン）を含み得る。本発明によるアジュvantはまた、米国特許出願公開第 2 0 1 2 0 0 2 7 8 1 3 号および / または米国特許第 8 5 0 6 9 6 6 号において開示されているもののいずれかを含むことができ、これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。

40

【 0 1 3 6 】

本発明の抗体は、当技術分野において公知の方法または本願に記載されるような方法により產生される、ポリクローナルまたはモノクローナルまたは組換え抗体であり得る。一部の実施形態では、本発明の抗体を、検出のために、当業者に公知の検出可能な標識で標識することができる。標識は、放射性同位体、蛍光化合物、化学発光化合物、酵素、もしくは酵素補因子、または当技術分野において公知の任意の他の標識であり得る。一部の態様では、所望の抗原と結合する抗体は、標識されず、一次抗体と特異的に結合する標識された二次抗体の結合によって検出され得る。

50

【 0 1 3 7 】

本発明の抗体（例えば、グリカン相互作用抗体）は、これらに限定されないが、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、単鎖抗体、F_ab断片、F(ab')断片、F_ab発現ライブラーにより產生される断片、抗イディオタイプ（抗IgD）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗IgD抗体を含む）、細胞内で作られる抗体（すなわち、イントラボディ）、および前述のもののいずれかのエピトープ結合断片を含む。本発明の抗体（例えば、グリカン相互作用抗体）は、鳥類および哺乳動物を含む、任意の動物由来のものであり得る。好ましくは、そのような抗体は、ヒト、ネズミ科動物（例えば、マウスおよびラット）、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマまたはニワトリ由来のものである。本発明の抗体は、単一特異性であることもあり、または多重特異性（例えば、二重特異性、三重特異性、もしくはそれより高い多重特異度のもの）であることもある。多重特異性抗体は、本発明の標的抗原の異なるエピトープに対して特異的であることもあり、または本発明の標的抗原、ならびに異種グリカン、ペプチドもしくは固体支持材料などの、異種エピトープの両方に対して、特異的であることもある。（例えば、WO 93/17715；WO 92/08802；WO 91/00360；WO 92/05793；Tutt, A.ら、Trispecific F(ab')3 derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells、J Immunol.、1991年7月1日；147巻（1号）：60～9頁；米国特許第4,474,893号、同第4,714,681号、同第4,925,648号、同第5,573,920号、同第5,601,819号；およびKostelnik, S.A.ら、Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers、J Immunol.、1992年3月1日；148巻（5号）：1547～53頁を参照されたい）。 10

【0138】

本開示のグリカン相互作用抗体は、モノクローナル抗体を開発するための当技術分野において公知の十分に確証されている方法を使用して調製することができる。一実施形態では、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を使用して調製される（Kohler, G.ら、Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity、Nature、1975年8月7日；256巻（5517号）：495～7頁）。ハイブリドーマ形成のために、まず、マウス、ハムスターまたは他の適切な宿主動物を、通常は、免疫剤（例えば、本発明の標的抗原）で免疫して、免疫剤と特異的に結合する抗体を產生するまたは產生することができるリンパ球を惹起する。あるいは、in vitroでリンパ球を免疫してもよい。次いで、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を使用してリンパ球を不死化細胞株と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, J.W.、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、Academic Press、1986年；59～1031頁）。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特に、齧歯動物、ウサギ、ウシおよびヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラットまたはマウス骨髄腫細胞株が利用される。ハイブリドーマ細胞は、融合していない不死化細胞の増殖または生存を阻害する1つもしくは複数の物質を好ましくは含有する適切な培養培地で培養することができる。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHprt）を欠いている場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを通常は含むことになり（「HAT培地」）、これらの物質が、HGPRT欠乏細胞の増殖を防止する。 20

【0139】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体產生細胞による抗体の安定した高レベルの発現を支援し、HAT培地などの培地に対して感受性である細胞株である。より好ましい不死化細胞株は、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center、San Diego、Calif. およびアメリカ合衆国細胞培養系統保存機関（American Type Culture Collection）、Manassas、Vaから入手することができる、ネズミ科動物骨髄腫系統である。ヒト骨髄腫およびマウス・ヒトヘテロ骨髄腫細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の產生について記載され 30

ている (Kozbor, Dら、A human hybrid myeloma for production of human monoclonal antibodies、J Immunol.、1984年12月；133巻(6号)：3001～5頁；Brodeur, B.ら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、Marcel Dekker, Inc.、New York、1987年；33巻：51～63頁)。

【0140】

一部の実施形態では、骨髄腫細胞を遺伝子操作に付すことがある。そのような操作を、本明細書に記載されるようなジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)突然変異誘発を使用して行ってもよい。あるいは、当技術分野において公知のトランスフェクション法を使用してもよい。NS0骨髄腫細胞または他のマウス骨髄腫細胞株を使用してもよい。例えば、Sp2/0-Ag14は、ハイブリドーマ開発のための代替細胞株であり得る。

10

【0141】

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)誘導遺伝子編集は、代替遺伝子ノックアウト法を提供する。TALENは、TALEエフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメインと融合させることによって生成された人工制限酵素である。ZFNに類似して、TALENは、エラープローンNHEJによって修復され得る二本鎖切断を所望の遺伝子座で誘導して、その切断部位での挿入／欠失をもたらす(Wood, A.J.ら、Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs、Science、2011年7月15日；333巻(6040号)：307頁)。Celllectis Bioresearch(Cambridge, MA)は、TALEN設計およびプラスミド構築サービスを提供している。次いで、ハイブリドーマ細胞を培養する培養培地をモノクローナル抗体の存在についてアッセイすることができる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって產生されたモノクローナル抗体の結合特異性(すなわち、特異的免疫反応性)は、免疫沈降法によって、またはin vitro結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)もしくは酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって判定される。そのような技術およびアッセイは、当業者には公知である。モノクローナル抗体の結合特異性は、例えば、スキヤッチャード分析によって判定することができる(Munson, P.J.ら、Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems、Anal Biochem.、1980年9月1日；107巻(1号)：220～39頁)。一部の場合には、所与の抗原の領域に対する抗体特異性を、抗体結合についてアッセイする前に、抗原の化学的修飾により特徴付けることもある。一例を挙げれば、過ヨウ素酸塩処理を使用して、シアル酸のC6側鎖を破壊してもよい。アッセイを過ヨウ素酸塩処理とともに、または過ヨウ素酸塩処理なしで行って、未処理試料における結合がシアル酸特異的であるか否かを明らかにすることができます。一部の場合には、9-O-アセチル化シアル酸を有する抗原を(例えば、0.1M NaOHでの)弱塩基処理に付して、9-O-アセチル基を破壊してもよい。アッセイを弱塩基処理とともに、または弱塩基処理なしで行って、未処理試料における結合がシアル酸の9-O-アセチル化に依存するか否かを明らかにすることができます。

20

【0142】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈手順によりサブクローンングし、標準的方法により増殖させることができる。このために適する培養培地としては、例えば、ダルベッコ変性イーグル培地またはRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を哺乳動物において腹水としてin vivoで増殖させることもできる。

30

【0143】

ハイブリドーマをクローニングするための代替方法は、ハイブリドーマクローンの選択および増殖を支援するための、メチルセルロースに基づく半固体培地と他の培地と試薬とを含有する、STEMCELL Technologies(Vancouver, BC, Canada)からのキット、例えば、CloneCell(商標)-HYキットにより提供されるものを含み得る。しかし、このキットの培地は、外因性のNeu5Gc組込み源をもたらすFCSを含有する。Cmah-/-ハイブリドーマにおける内在性Neu

40

50

5 Gc 合成機構は破壊されるが、一部の場合には培養培地から組み込まれる Neu5Gc が問題を引き起こすこともある (Bardor, M. ら、Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into humancells、J Biol Chem.、2005年、280巻：4228～4237頁)。そのような事例では、培養培地に Neu5Ac を補充して、代謝競合により Neu5Gc 組込みを排除することができる (Ghaderi, D. ら、Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins、Nat Biotechnol.、2010年、28巻：863～867頁)。

【0144】

サブクローニングによって分泌されたモノクローナル抗体は、培養培地または腹水液から従来の免疫グロブリン精製手順、例えば、プロテインA - セファロース、ヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析もしくはアフィニティーコロマトグラフィーなどによって、単離または精製することができる。

【0145】

別の実施形態では、本発明のモノクローナル抗体は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,816,567号に記載されているものなどの組換えDNA法によって作製することもできる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、ネズミ科動物抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）容易に単離およびシークエンシングすることができる。本発明のハイブリドーマ細胞は、好みのDNA源として役立つ。単離したら、DNAを発現ベクター内に配置することができ、次いで、そのベクターを宿主細胞にトランスフェクトする。組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を達成させるために、そうしなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞としては、これらに限定されないが、HEK293細胞、HEK293T細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、および骨髄腫細胞を挙げることができる。DNAはまた、例えば、相同ネズミ科動物配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列を置換すること（米国特許第4,816,567号）によって、または免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列のすべてまたは一部を共有結合で連結させることによって、修飾することもできる。そのような非免疫グロブリンポリペプチドで、本発明の抗体の定常ドメインを置換することができ、または本発明の抗体の1つの抗原結合性部位の可変ドメインを置換してキメラ二価抗体を作出することができる。

【0146】

一部の実施形態では、本発明の抗体（例えば、グリカン相互作用抗体）は、当業者に公知の様々な手順によって产生することができる。ポリクローナル抗体のin vivoでの产生のために、宿主動物、例えば、ウサギ、ラット、マウス、牛、ウマ、ロバ、ニワトリ、サル、ヒツジまたはヤギは、遊離抗原または担体にカップリングされた抗原のどちらかで、例えば腹腔内および／もしくは皮内注射によって、免疫される。一部の実施形態では、注射材料は、約100μgの抗原または担体タンパク質を含有するエマルジョンであり得る。一部の実施形態では、注射材料は、溶液中の非ヒト哺乳動物顆下腺ムチンなどのグリカンリッチ組成物を含み得る。宿主種に依存して、様々なアジュvantを使用して、免疫学的応答を増大させることもできる。アジュvantとしては、これらに限定されないが、フロイント（完全および不完全）、無機物ゲル、例えば水酸化アルミニウム、界面活性物質、例えばリゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、TITERMAX（登録商標）（CytRx Corp. Los Angeles, CA）、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびに潜在的に有用なヒトアジュvant、例えば、BCG（カルメットゲラン桿菌）およびcorynebacterium parvumが挙げられる。そのようなアジュvantは、当技術分野においても周知である。抗体の有用な力価を得るために数回の追加免疫注射が、例えば約2週間間隔で、必要であり得、抗体の力価は、例えば、固体表面に吸着させた

10

20

30

40

50

グリカンおよび／または遊離ペプチドを使用する E L I S A アッセイにより、検出することができる。免疫された動物からの血清中の抗体の力価は、抗体の選択により、例えば、当技術分野において周知の方法に従って固体支持体上に抗原を吸着させ、選択された抗体を溶離することにより、増大させることができる。

【 0 1 4 7 】

グリカン相互作用抗体、それらの変異体および断片は、ハイスループットの発見方法を使用して選択および産生することができる。一実施形態では、合成抗体、それらの変異体および断片を含むグリカン相互作用抗体は、ディスプレイライブラリーの使用により産生される。用語「ディスプレイ」は、本明細書で使用される場合、所与の宿主の表面でのタンパク質もしくはペプチドの発現または「ディスプレイ」を指す。用語「ライブラリー」は、本明細書で使用される場合、特有の c D N A 配列および／またはそれにコードされているタンパク質の収集物を指す。ライブラリーは、2 個ほども少ない特有の c D N A ~ 数千億の特有の c D N A を含有し得る。一部の実施形態では、合成抗体であるグリカン相互作用抗体は、抗体ディスプレイライブラリーまたは抗体断片ディスプレイライブラリーを使用して産生される。用語「抗体断片ディスプレイライブラリー」は、本明細書で使用される場合、各メンバーが、抗体の少なくとも 1 つの可変領域を含有する抗体断片をコードする、ディスプレイライブラリーを指す。そのような抗体断片は、好ましくは F a b 断片であるが、単鎖可変断片 (s c F v) などの他の抗体断片も企図される。F a b 抗体断片ライブラリーでは、コードされた各 F a b は、F a b 断片の相補性決定領域 (C D R) の可変ループに含有されているアミノ酸配列を除けば、同一であり得る。代替または追加の実施形態では、個々の V_H および／または V_L 領域内のアミノ酸配列も異なり得る。

10

20

30

【 0 1 4 8 】

ディスプレイライブラリーは、酵母、バクテリオファージ、細菌およびレトロウイルスを含むがこれらに限定されない、多数の可能な宿主で発現され得る。使用することができるさらなるディスプレイ技術としては、リボソームディスプレイ、マイクロビーズディスプレイおよびタンパク質 - D N A 連結手法が挙げられる。好ましい実施形態では、F a b ディスプレイライブラリーは、酵母に、またはバクテリオファージ（本明細書では「ファージ」もしくは「ファージ粒子」とも呼ばれる）に、発現される。発現されると、F a b は、ファージまたは酵母の表面を装飾し、そこでそれらは所与の抗原と相互作用することができる。グリカンを含む抗原または所望の標的からの他の抗原を使用して、その抗原に対しても高い親和性を有する抗体断片を発現するファージ粒子または酵母細胞を選択することができる。次いで、結合抗体断片の C D R をコードする D N A 配列を、結合粒子または細胞を使用してシークエンシングすることによって決定することができる。一実施形態では、ポジティブ選択が抗体の開発に使用される。一部の実施形態では、ネガティブ選択が抗体の開発に利用される。一部の実施形態では、ディスプレイライブラリーを使用して抗体を開発する際の複数の選択ラウンド中に、ポジティブ選択方法とネガティブ選択方法の両方が利用される。

【 0 1 4 9 】

酵母ディスプレイでは、Chao ら (Chao, G. ら、Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display、Nat Protoc.、2006 年：1巻 (2 号) : 755 ~ 68 頁) により記載されたように、異なる抗体断片をコードする c D N A が、それらが発現される酵母細胞に導入され、抗体断片が細胞表面に「ディスプレイ」される。酵母表面ディスプレイでは、発現される抗体断片は、酵母凝集素タンパク質である A g a 2 p を含むさらなるドメインを含有し得る。このドメインは、表面に発現される A g a 1 p とのジスルフィド結合形成によって抗体断片融合タンパク質を酵母細胞の外面に結合することができるようになる。その結果、特定の抗体断片で覆われた酵母細胞が得られる。抗体断片各々が特有の配列を有する、これらの抗体断片をコードする c D N A のディスプレイライブラリーが、最初に利用される。これらの融合タンパク質は、何百万もの酵母細胞の細胞表面に発現され、そこで、これらの融合タンパク質は、細胞とともにインキュベートされた所望の抗原性標的抗原と相互作用することができる。適切な抗体断片との結合が首尾

40

50

よく起こった後の効率的な細胞選別を可能にするために、標的抗原を化学基または磁性基で共有結合的にまたは別様に修飾することができる。回収は、磁気活性化細胞選別（M A C S）によってもよく、蛍光活性化細胞選別（F A C S）によってもよく、または当技術分野において公知の他の細胞選別方法によってもよい。酵母細胞の亜集団が選択されたら、対応するプラスミドを分析して、C D R配列を決定することができる。

【0150】

バクテリオファージディスプレイ技術は、f d、F 1 およびM 1 3 ビリオンを含むがこれらに限定されない、糸状ファージを通常は利用する。そのような菌株は、非溶解性であり、これにより、宿主の継続的増殖およびウイルス力価上昇が可能になる。本発明の抗体を作製するために使用することができるファージディスプレイ法の例としては、M i e r s c h ら (Miersch, S. ら、Synthetic antibodies: Concepts, potential and practical considerations, Methods、2012年8月；57巻(4号)：486～98頁)、B r a d b u r y ら (Bradbury, A.R. ら、Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies, NatBiotechnol.、2011年3月；29巻(3号)：245～54頁)、B r i n k m a n ら (Brinkmann, U. ら、Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments, J Immunol Methods、1995年5月11日；182巻(1号)：41～50頁)；A m e s ら (Ames, R.S. ら、Conversion of murine Fab isolated from a combinatorial phage display library to full length immunoglobulins, J Immunol Methods、1995年8月18日；184巻(2号)：177～86頁)；K e t t l e b o r o u g h ら (Kettleborough, C.A. ら、Isolation of tumorcell-specific single-chain Fv from immunized mice using phage-antibody libraries and the re-construction of whole antibodies from these antibodyfragments, Eur J Immunol.、1994年4月；24巻(4号)：952～8頁)；P e r s i c ら (Persic, L. ら、An integrated vector system for the eukaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries, Gene、1997年3月10日；187巻(1号)：9～18頁)；P C T出願番号P C T / G B 9 1 / 0 1 1 3 4 ; P C T公開W O 9 0 / 0 2 8 0 9 、W O 9 1 / 1 0 7 3 7 、W O 9 2 / 0 1 0 4 7 、W O 9 2 / 1 8 6 1 9 、W O 9 3 / 1 1 2 3 6 、W O 9 5 / 1 5 9 8 2 、W O 9 5 / 2 0 4 0 1 、ならびに米国特許第5,698,426号、同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,580,717号、同第5,427,908号、同第5,750,753号、同第5,821,047号、同第5,571,698号、同第5,427,908号、同第5,516,637号、同第5,780,225号、同第5,658,727号、同第5,733,743号および同第5,969,108号において開示されているものが挙げられ、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。バクテリオファージ上での抗体断片発現は、ウイルスコートタンパク質を発現する遺伝子に断片をコードするc D N Aを挿入することにより行うことができる。糸状バクテリオファージのウイルスコートは、一本鎖ゲノムによりコードされている5つのコートタンパク質で構成される。コートタンパク質p I I Iは、通常はN末端における、抗体断片発現に好ましいタンパク質である。抗体断片発現がp I I Iの機能を損なわせた場合、ウイルス機能を野生型p I I Iの共発現によって回復させることができるとはいえ、そのような発現は、ウイルスコート上に発現される抗体断片の数を低減させることになるが、標的抗原による抗体断片への接近を増進させることができる。あるいは、ウイルスおよび抗体断片タンパク質の発現を複数のプラスミドにコードさせてもよい。この方法を使用して、感染性プラスミドの全体的サイズを低下させることおよび形質転換効率を向上させることができる。

【0151】

上で説明したように、高親和性抗体または抗体断片（例えば、グリカン相互作用抗体）を発現する宿主の選択後、抗体または抗体断片からコード領域を単離し、それらを使用して全抗体（ヒト抗体を含む）または任意の他の所望の抗原結合断片を生成することができ、それらを、例えば下で詳細に説明するように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌をはじめとする任意の所望の宿主において発現させることができる。

10

20

30

40

50

【0152】

高親和性抗体をコードするDNA配列を、親和性成熟として公知のプロセスにおける追加の選択ラウンドのために突然変異させることができる。用語「親和性成熟」は、本明細書で使用される場合、抗体をコードするまたは抗体断片をコードするcDNA配列の突然変異および選択の逐次的ラウンドによって所与の抗原に対する親和性を増大させながら抗体を産生させる方法を指す。一部の場合には、このプロセスは、*in vitro*で行われる。これを遂行するために、エラーブローンPCRを使用してCDRコード配列の増幅を行って、点突然変異、領域突然変異、挿入突然変異および欠失突然変異を含むがこれらに限定されない、突然変異を含有する何百万ものコピーを産生させることができる。本明細書で使用される場合、用語「点突然変異」は、ヌクレオチド配列内の1つのヌクレオチドを異なるヌクレオチドに変化させる核酸突然変異を指す。本明細書で使用される場合、用語「領域突然変異」は、2つまたはそれより多くの連続するヌクレオチドを異なるヌクレオチドに変化させる核酸突然変異を指す。本明細書で使用される場合、用語「挿入突然変異」は、1つまたは複数のヌクレオチドをヌクレオチド配列に挿入する核酸突然変異を指す。本明細書で使用される場合、用語「欠失突然変異」は、1つまたは複数のヌクレオチドをヌクレオチド配列から除去する核酸突然変異を指す。挿入または欠失突然変異は、コドン全体の完全置換、または開始コドンの1つもしくは2つのヌクレオチドを変更することによるあるコドンの別のコドンへの変化を含み得る。

10

【0153】

CDRをコードするcDNA配列に対して突然変異誘発を行って、CDR重鎖および軽鎖領域に単一の突然変異を有する何百万もの突然変異体を作出することができる。別のアプローチでは、親和性を向上させる可能性が最も高いCDR残基のみにランダム突然変異を導入する。これらの新たに生成された突然変異誘発性ライブラリーを使用してプロセスを反復して、標的抗原に対する親和性がよりいっそう高い抗体断片をコードするクローニングについてスクリーニングすることができる。突然変異および選択の連続ラウンドは、親和性が漸増するクローニングの合成を促進する(Chao, G.ら、*Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display*、Nat Protoc.、2006年；1巻(2号)：755～68頁)。

20

【0154】

抗体ならびに抗体断片、例えばFabおよびscFvを産生するために使用することができる手法の例としては、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号；Mierschら(Miersch, S.ら、*Synthetic antibodies: Concepts, potential and practical considerations, Methods*、2012年8月；57巻(4号)：486～98頁)、Chaoら(Chao, G.ら、*Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display*、Nat Protoc.、2006年；1巻(2号)：755～68頁)、Hustonら(Huston, J.S.ら、*Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins*、Methods Enzymol.、1991年；203巻：46～88頁)；Shuら(Shu, L.ら、*Secretion of a single-gene-encoded immunoglobulin from myeloma cells*、Proc Natl Acad Sci U S A.、1993年9月1日；90巻(17号)：7995～9頁)；ならびにSkerraら(Skerra, A.ら、*Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*、Science、1988年5月20日；240巻(4855号)：1038～41頁)に記載されているものが挙げられ、これらの各々はその全体が参照によって本明細書に組み入れられている。

30

【0155】

ヒトにおける抗体(例えば、グリカン相互作用抗体)の*in vivo*使用、および*in vitro*検出アッセイを含む、いくつかの使用については、キメラ、ヒト化またはヒト抗体を使用することが好ましいこともある。キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子、例えば、ネズミ科動物モノクローナル免疫グロブリン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抗体である。キメラ抗体の产生方法は、当技術分野において公知である。(Morrison, S.L.、*Transfectedomas provide novel c*

40

50

himeric antibodies、Science、1985年9月20日；229巻(4719号)：1202～7頁；Gillies, S.D.ら、High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes、J Immunol Methods、1989年12月20日；125巻(1～2号)：191～202頁；ならびに米国特許第5,807,715号、同第4,816,567号および同第4,816,397号；これらは、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。

【0156】

ヒト化抗体は、所望の抗原と結合する非ヒト種からの抗体分子であって、非ヒト種からの1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)とヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域とを有する抗体分子である。多くの場合、ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基は、抗原結合を変更させる、好ましくは向上させるために、ドナー抗体のCDRおよびフレームワーク領域からの対応する残基で置換されている。これらのフレームワーク置換は、当技術分野において周知の方法により、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDR残基とフレームワーク残基の相互作用のモデリングにより、および特定の位置の通常とは異なるフレームワーク残基を同定するための配列比較により、同定される。（米国特許第5,693,762号および同第5,585,089号、Riechmann, L.ら、Reshaping human antibodies for therapy、Nature、1988年3月24日；332巻(6162号)：323～7頁、これらは、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。抗体は、当技術分野において公知の様々な手法を使用してヒト化することができ、そのような方法としては、例えば、CDRグラフティング(EP 239,400；PCT公開WO 91/09967；米国特許第5,225,539号、同第5,530,101号および同第5,585,089号)；ベニアリングまたは表面再形成(EP 592,106；EP 519,596；Padlan, E.A.、A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties、Mol Immunol.、1991年4～5月；28巻(4～5号)：489～98頁；Studnicka, G.M.ら、Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues、Protein Eng.、1994年6月；7巻(6号)：805～14頁；Roguska, M.A.ら、Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing、Proc Natl Acad Sci U S A.、1994年2月1日；91巻(3号)：969～73頁)；および鎖シャフリング(米国特許第5,565,332号)が挙げられ、これらの各々は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。本発明のヒト化抗体は、所望の結合特異性、補体依存性細胞傷害性、および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性などに合せて開発することができる。

【0157】

一部の場合には、ヒトフレームワークは、最高相同性レベルを有するヒトフレームワーク候補を見つけるためのドナー抗体配列とヒトフレームワーク配列のアラインメントにより選択される。一部の場合には、フレームワーク領域を1つより多くのヒトフレームワーク候補から選択することができる（例えば、フレームワーク領域1～3を1つの候補から選択することができ、フレームワーク領域4を代替候補から選択することができる）。一部の場合には、体細胞突然変異により作出される免疫原性エピトープを含むリスクを回避するために、ヒトコンセンサス配列からフレームワーク領域を選択することができる。コンセンサス配列は、多くの配列を比較して各位置に存在することが最も多い残基を採用することによって形成される配列である。一部の場合には、ヒトフレームワークをヒト生殖系列配列から選択することができる。これらは、データベース検索によって（例えば、NCBタンパク質データベースまたは他のデータベースを使用して）同定することができる。

【0158】

軽鎖および重鎖ヒトフレームワークを同じクローニングから選択してもよく、または異なるクローニングから選択してもよい。同じクローニングに由来する軽鎖および重鎖は、機能性である

10

20

30

40

50

結合部位を形成するように会合する尤度がより高いが、重鎖と軽鎖間の界面の保存性によって、一般に、異なるクローリンからの重鎖と軽鎖が会合することおよび機能性であることができる。ヒト軽鎖フレームワークとヒト重鎖フレームワークとの対合頻度は、例えば、Tillerら、2013年、MAbs、5巻(3号)：445～70頁において概説されており、この参考文献の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0159】

ヒト化中に失われる抗体親和性を向上または回復させるために、ヒト化抗体配列内の残基の「逆突然変異」を考慮してもよい。逆突然変異は、ヒト化中に、元の非ヒト抗体配列内に存在するものに戻るように変更される残基の変化を含む。逆突然変異の候補である残基は、例えば、カノニカル抗体構造に見られる標準立体構造との比較により、同定することができる(AI-Lazikaniら、1997年、J. Mol. Biol.、273巻：927～48頁を参考されたく、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。通常とは異なるカノニカル残基を同定し、逆突然変異の標的とすることができます。一部の場合には、逆突然変異の候補である残基は、「バーニア残基」であってもよく、「バーニア残基」は、CDRと接触している残基を指すために使用される用語である。これらの残基は、CDRの位置決めおよび立体構造、したがって、抗体親和性および/または特異性に、影響を及ぼす尤度がより高い(Strohl,W.R.、Therapeutic Antibody Engineering、Woodhead Publishing、Philadelphia PA、2012年、6章、117頁)。一部の場合には、経験的方法によって、ヒトフレームワーク領域を一定に保ち、ドナー抗体からのCDRを、結合を維持しながら、ヒトCDR領域に適合するように逆突然変異させる。

10

20

30

40

50

【0160】

外来タンパク質に対する免疫反応を回避または軽減するために、完全ヒト抗体(例えば、グリカン相互作用抗体)がヒト患者の治療的処置に特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用する上記の抗体ディスプレイ法をはじめとする当技術分野において公知の様々な方法によって作製することができる。米国特許第4,444,887号および同第4,716,111号；ならびにPCT公開WO98/46645、WO98/50433、WO98/24893、WO98/16654、WO96/34096、WO96/33735およびWO91/10741も参考されたく、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0161】

ヒト抗体(例えば、グリカン相互作用抗体)は、機能性内因性免疫グロブリンを発現する能力はないがヒト免疫グロブリンポリヌクレオチドを発現することができるトランスジェニックマウスを使用して、産生することもできる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリンポリヌクレオチド複合体を、マウス胚性幹細胞に、ランダムにまたは相同組換えにより導入することができる。あるいは、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域を、ヒト重鎖および軽鎖ポリヌクレオチドに加えてマウス胚性幹細胞に導入することができる。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリンポリヌクレオチドを、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座導入を用いて、別々にまたは同時に非機能性にすることができます。特に、J_H領域のホモ接合型欠失は、内因性抗体産生を防止する。修飾された胚性幹細胞を拡大させ、胚盤胞にマイクロインジェクトしてキメラマウスを産生させる。次いで、キメラマウスを飼育して、ヒト抗体を発現するホモ接合子孫を産生させる。選択された抗原、例えば、本発明のグリカン、グリコンジュゲートおよび/またはポリペプチドのすべてまたは一部分を用いて、通常の様式で、トランスジェニックマウスを免疫する。

【0162】

このようにして、そのような手法を使用して、有用なヒトIgG、IgA、IgM、IgDおよびIgE抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生する技術の大要については、LonbergおよびHuszár(Lonberg, N.ら、Human antibodies from transgenic mice、Int Rev Immunol.、1995年；13巻(1号)：65～93頁)を参考されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生する技術ならびにそのような抗体を産生するためのプロトコールの詳細な論述については、例えば、PCT公開WO9

8 / 2 4 8 9 3、W O 9 2 / 0 1 0 4 7、W O 9 6 / 3 4 0 9 6、W O 9 6 / 3 3 7 3 5、米国特許第5,413,923号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,569,825号、同第5,661,016号、同第5,545,806号、同第5,814,318号、同第5,885,793号、同第5,916,771号、同第5,939,598号、同第6,075,181号および同第6,114,598号を参照されたく、これらの各々は、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。加えて、Abgenix, Inc. (Fremont, Calif.)、Protein Design Labs, Inc. (Mountain View, Calif.) および Genpharm (San Jose, Calif.)などの会社は、上記技術に類似した技術を使用して、選択された抗原に対するヒト抗体を提供する業務を行うことができる。10

【0163】

本発明の抗体分子が、動物、細胞株により產生されたら、化学合成されたら、または組換え発現されたら、それを、免疫グロブリンまたはポリペプチド分子の精製のための当技術分野において公知の任意の方法によって、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、特に、特定の抗原に対する親和性によるもの、プロテインAクロマトグラフィー、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、較差溶解度によって、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準的な手法によって、精製する（すなわち、単離する）ことができる。加えて、本発明の抗体またはそれらの断片を、本明細書に記載のまたはそうでなければ当技術分野において公知の異種ポリペプチド配列と融合させて、精製を助長することができる。20

【0164】

抗体と標的またはリガンド（例えば、所与の抗体を生成するために使用される抗原）との親和性は、本明細書に記載されるような1つまたは複数の結合アッセイを使用して K_D によって測定することができる。所与の抗体に所望される応用に依存して、様々な K_D 値が望ましことがあり得る。高親和性抗体は、通常は、約 10^{-5} Mまたはそれ未満、例えば、約 10^{-6} Mもしくはそれ未満、約 10^{-7} Mもしくはそれ未満、約 10^{-8} Mもしくはそれ未満、約 10^{-9} Mもしくはそれ未満、約 10^{-10} Mもしくはそれ未満、約 10^{-11} Mもしくはそれ未満、または約 10^{-12} Mもしくはそれ未満の K_D で、リガンド結合を形成する。30

【0165】

一部の実施形態では、本発明の抗体を、それらの半数効果濃度または阻害濃度（それぞれ、EC₅₀またはIC₅₀）に従って特徴付けることができる。一部の場合には、この値は、抗体の最高濃度で観察される最大阻害の半分に等しいレベルで、STnを発現する細胞を阻害する（例えば、死滅させる、増殖を低減させる、および／または1つもしくは複数の細胞機能を低下させる）のに必要な抗体の濃度を表し得る。そのようなIC₅₀値は、約0.001 nM～約0.01 nM、約0.005 nM～約0.05 nM、約0.01 nM～約1 nM、約0.05 nM～約25 nM、約1 nM～約50 nM、約5 nM～約75 nM、約10 nM～約100 nM、約25 nM～約250 nM、約200 nM～約1000 nMのこともあり、または1000 nMより高いこともある。40

【0166】

一部の実施形態では、本開示で教示される抗体を、患者由来がん細胞および／またはがん幹細胞（CSC）を標的化するそれらの能力について試験することができる。そのような実施形態によれば、患者由来がん細胞をin vitroで培養することができ、本開示の抗体を使用してそのような細胞を標的化することができる。

【0167】

他の実施形態では、患者由来腫瘍細胞または腫瘍断片を使用して、患者由来異種移植片（PDX）腫瘍を产生させることができる。一部の場合には、組織構造として維持された原発性または転移性固形腫瘍を外科手術または生検手順により収集することができる。—50

部の場合には、悪性腹水または胸水から排出された流体を使用することができる。単独での、または一部の研究ではM A T R I G E L（登録商標）（Corning Life Sciences、Corning、NY）で被覆された、またはヒト線維芽細胞もしくは間葉系幹細胞と混合された、小片または単個細胞浮遊液として、腫瘍を移植することができる。移植の部位としては、マウスの背部（皮下移植）を挙げることができるが、原発腫瘍と同じ器官への移植は、1つの選択肢であり得る（同所移植、すなわち、脾臓、口腔、卵巣、乳腺脂肪体、脳など）。加えて、腫瘍の起源とは無関係に、一部のアプローチは、生着成功率を上昇させるための努力の一環としての腎被膜内への原発性腫瘍の移植を含み得る。異なる免疫抑制度を有する様々なマウス系統を、そのような研究で使用することができる。ホルモン感受性腫瘍についての一部の研究は、生着率を上昇させる目的でホルモン補充を使用し得る。一部の実施形態では、P D X 腫瘍を非肥満糖尿病／重症複合免疫不全（N O D / S C I D）マウスに生成させることができる。P D X 腫瘍を有するマウスに抗体を投与することができ、腫瘍体積に対する効果を分析することができる。一部の場合には、P D X 腫瘍を切除し、細胞解離に付し、得られた細胞を培養で増殖させることができる。これらの細胞を標的化する本開示の抗体の能力を、*in vitro*で評定することができる。

【0168】

抗体の調製は、モノクローナルであろうと、ポリクローナルであろうと、当技術分野において公知である。抗体の產生のための手法は、当技術分野において周知であり、例えば、HarlowおよびLane「Antibodies, A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988年、ならびにHarlowおよびLane「Using Antibodies: A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999年に記載されている。

標的

【0169】

本発明のグリカン相互作用抗体は、1つもしくは複数のグリカンあるいはグリカン会合またはグリカン関連標的と（可逆的にまたは不可逆的に）結合することによって、それらの効果を発揮することができる。一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、本明細書で教示される標的の任意の領域から調製することができる。一部の実施形態では、本発明の標的は、グリカンを含む。抗体を生成するために使用されるグリカンは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19または少なくとも20残基を有する糖の鎖を含み得る。抗体を生成するために使用される一部のグリカンは、約2残基～約5残基を含み得る。

【0170】

一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体標的抗原は、シアル酸を含む。N - アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）およびN - グリコリルノイラミン酸（Neu5Gc）は、哺乳動物細胞表面の主要シアル酸である。これらのうち、Neu5Acは、ヒトにおいて天然に産生される。Neu5Gcは、CMP - Neu5AcからのCMP - Neu5Gc産生に関与するシチジンオリゴ糖（CMP）- N - アセチルノイラミン酸ヒドロキシラーゼ（CMAH）遺伝子の突然変異のためヒトを除く、ほとんどの哺乳動物において天然に産生される。ヒトにおいてNeu5Gcは、実のところ免疫原性であり、ほぼすべてのヒトが抗Neu5Gc抗体を発現する。産生の欠如にもかかわらず、大部分のヒトシステムは、食事摂取に起因して多少のレベルのNeu5Gcを含む。これらの外来産物は、その後、ヒト糖タンパク質に組み込まれる。そのような糖タンパク質は、本発明の標的として企図される。

【0171】

本発明のグリカン標的抗原は、表1に収載されているものを含むが、それらに限定されない。使用される略号は、Glc - グルコース、Gal - ガラクトース、GlcNAc - N - アセチルグルコサミン、GalNAc - N - アセチルガラクトサミ

10

20

30

40

50

ン、GlcNAc α - 6 - スルホ - N - アセチルグルコサミン、KDN - 2 - ケト - 3 - デオキシ - D - グリセロ - D - ガラクトノノン酸、Neu5,9Ac2 - N - アセチル - 9 - O - アセチルノイラミン酸、Fuc - フコース、およびNeu5GcOME - 2 - O - メチル - N - グリコリルノイラミン酸を含む。O - グリコシド結合は、結合により繋がれている2残基間の相対化学量論組成を示す および を伴う収載されているグリカン中の各残基間に存在し、ここで、 α はアキシアル配向を示し、 β はエクアトリアル配向を示す。形式 \times , \times 中の および / または に続く数は、結合形成に関与する、接している残基の各々からの炭素の各々についての炭素数を示す。収載されているグリカンは、企図された個々のグリカン標的抗原の代表であるが、本発明は、上に提示されたグリカンが、提示されたもの以外の 配向型O - グリコシド結合と 配向型O - グリコシド結合の種々の組合せを含む、実施形態も含む。「R」は、グリカンがカップリングされ得る実体を表す。一部の実施形態では、Rは、グリカンがセリンまたはトレオニン残基に概して連結されている、タンパク質である。一部の実施形態では、Rは、グリカンを基板、例えば、グリカンアレイにおける基板に繋ぐために使用されるリンカー分子である。一部の実施形態では、Rは、- (CH₂)₂CH₂NH₂ または - (CH₂)₃NHCOCH₂(OCH₂CH₂)₆NH₂ の式を有するリンカーであり得る。一部の実施形態では、Rは、ビオチン、アルブミン、ProNH₂、-CH-、-OH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-H、ヒドリド、ヒドロキシ、アルコキシリ、酸素、炭素、硫黄、窒素、ポリアクリルアミド、リン、NH₂、ProNH₂=O(CH₂)₂CH₂NH₂、(OCH₂CH₂)₆NH₂、O(CH₂)₃NHCOCH₂(OCH₂CH₂)₆NH₂、蛍光標識2 - アミノベンズアミド(AB) および / または 2 - アミノ安息香酸(AA)、アルキルアミンを含有する2 - アミノベンズアミド類似体(AEAB)、アミノオキシ基、メチルアミノオキシ基、ヒドラジド基、アミノ脂質1,2 - ジヘキサデシル - s - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン(DHPE)、アミノオキシ(AO)官能化DHPE、ならびにグリコシリホスファチジルイノシトール(GPI)であり得る。Rの源または特質を限定する意図はないが、このRは、グリカン残基の物理的間隔に影響を与える構造を含み得る。一部の実施形態では、R基は、本明細書で提示されるR基の組合せ、例えば、ビオチン化ポリアクリルアミドを含み得る。一部の実施形態では、基礎となる基質と組み合わせてR基がグリカン残基間に影響を与える。

【表1-1】

表1.グリカン標的抗原

グリカン
GalNAc α -R
Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -R
Gal β 1,3GalNAc β -R
Gal β 1,3GlcNAc α -R
Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β -R

【表1 - 2】

Gal β 1,3GlcNAc β -R	
Gal β 1,4GlcNAc6S β -R	
Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Gal β 1,4Glc β -R	
KDN α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
KDN α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	10
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R	
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,6GalNAc α -R	
Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	20
Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β -R	30
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,3Gal β -R	
Neu5Ac α 2,6(KDN α 2,3)Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,6(Neu5Ac α 2,3)Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,6(Neu5Gc α 2,3)Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,6GalNAc α -R	
Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R	40
Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,6Gal β -R	
Neu5Ac α 2,8KDN α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	

【表1-3】

Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	10
Neu5Gc α 9Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Gc α 9Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Gc α 9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R	
Neu5Gc α 9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R	
Neu5Gc α 9Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R	
Neu5Gc α 9Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Neu5Gc α 9Ac α 2,3Gal β -R	
Neu5Gc α 9Ac α 2,6GalNAc α -R	
Neu5Gc α 9Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R	20
Neu5Gc α 9Ac α 2,6Gal β -R	
Neu5GcOMe α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GalNAc α -R	
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β -R	
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β -R	
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β -R	
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β -R	30
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β -R	
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Gc α 2,3Gal β -R	
Neu5Gc α 2,6GalNAc α -R	
Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β -R	
Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β -R	
Neu5Gc α 2,6Gal β -R	
Neu5Gc α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	40
Neu5Gc α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β -R	

【0172】

本発明のグリカン標的は、1つまたは複数の抗体認識領域を含み得る。本明細書で使用される場合、用語「抗体認識領域」は、分子の任意の部分上に位置する、結合している基上に位置する、またはグリカンと別の分子（これらに限定されないが、別のグリカン、タンパク質、膜、細胞表面構造、もしくは細胞外基質成分を含む）との相互作用領域上に位置する、セグメントを指す。一部の実施形態では、抗体認識領域は、鎖間標的部位に位置

し、ここで用語「鎖間」は、本ポリマー鎖内を意味する。鎖間標的部位は、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは少なくとも10残基、残基間の結合、または残基と結合の組合せを有する、抗体認識領域を含み得る。一部の実施形態では、抗体認識領域は、1つまたは複数のグリカン鎖の間の相互作用領域に位置する。そのような領域は、2、3、4または少なくとも5つのグリカン鎖の間にあり得る。

【0173】

一部の実施形態では、抗体認識領域は、共通の親鎖に接続されているグリカン分枝鎖の間の相互作用領域に位置する。一部の実施形態では、抗体認識領域は、グリカン分枝鎖と親鎖との間の相互作用領域に位置する。一部の実施形態では、抗体認識領域は、グリカンとタンパク質との間の相互作用領域に位置する。そのような相互作用領域は、グリカンとタンパク質との間に、これらに限定されないが共有結合、イオン結合、流体静力学的結合、疎水結合および水素結合を含む、化学結合を含み得る。一部の実施形態では、抗体認識領域は、グリカンと他の生体分子（これらに限定されないが、脂質および核酸を含む）との相互作用領域に位置する。そのような相互作用領域は、グリカンと生体分子との間に、これらに限定されないが共有結合、イオン結合、流体静力学的結合、疎水結合および水素結合を含む、化学結合を含み得る。

【0174】

一部の実施形態では、本発明のグリカン標的は、グリココンジュゲートの成分である。本明細書で使用される場合、用語「グリココンジュゲート」は、グリカン部分構造と繋がれている任意の実体を指す。一部の実施形態では、グリココンジュゲートは、糖脂質である。本明細書で使用される場合、用語「糖脂質」は、炭水化物部分構造が共有結合で結合されている脂質のクラスを指す。一部の実施形態では、糖脂質上に存在する炭水化物部分構造は、グリカンであり得る。一部の実施形態では、糖脂質の脂質成分は、セラミド部分構造を含む。本発明の標的として企図される糖脂質の例としては、これらに限定されないが、グリセロ糖脂質（これらに限定されないが、ガラクト脂質およびスルホ脂質を含む）、スフィンゴ糖脂質（これらに限定されないが、セレブロシド（例えば、ガラクトセレブロシド、グルコセレブロシドおよびスルファチド）、ガングリオシド、グロボシドおよびリンスフィンゴ糖脂質を含む）およびグリコシルホスファチジルイノシトールが挙げられる。細胞膜内に位置する場合、糖脂質のグリカン部分構造は、膜の細胞外側に位置し、そこで、それらは、他の細胞と、および細胞シグナル伝達リガンドと、相互作用することができる（Maccioni, H.J.ら、Organization of the synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex、FEBS Lett.、2011年6月6日：585巻（11号）：1691～8頁）。

【0175】

一部の実施形態では、本発明のグリココンジュゲート標的は、糖タンパク質および/またはプロテオグリカンである。糖タンパク質は、グリカンと共有結合している任意のタンパク質を指す。プロテオグリカンは、負電荷を有することが多いグリカンで重度にグリコシル化されているタンパク質のクラスである。この性質のため、プロテオグリカンは、非常に疎水性となり、結合組織の重要な成分となる。

がん関連標的

【0176】

一部の実施形態では、本発明の標的は、がん関連抗原またはエピトープである。本明細書で使用される場合、用語「がん関連」は、何らかの点で、がん、がん性細胞および/またはがん性組織と関連付けることができる実体を表すために使用される。グリカンを含む、多くのがん関連抗原またはエピトープが同定されており、これらの抗原およびエピトープは、腫瘍細胞と相関して発現される（Heimburg-Molinaro, J.ら、Cancer vaccines and carbohydrate epitopes、Vaccine、2011年11月8日；29巻（48号）：8802～26頁）。これらは、本明細書では「腫瘍関連糖鎖抗原」または「TACA」と呼ばれる。TACAは、これらに限定されないが、ムチン関連抗原[これらに限定されないが、Tn、シアリルTn(STn)およびThomsen-Friedenreich抗原を

10

20

30

40

50

含む]、血液型 Lewis 関連抗原 [これらに限定されないが、Lewis^Y (Le^Y)、Lewis^X (Le^X)、シアリル Lewis^X (SLe^X) およびシアリル Lewis^A (SLe^A) を含む]、スフィンゴ糖脂質関連抗原 [これらに限定されないが、G1abo H、ステージ特異的胎児抗原 - 3 (SSSEA-3)、およびシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質を含む]、ガングリオシド関連抗原 [これらに限定されないが、ガングリオシド GD2、GD3、GM2、フコシル GM1 および Neu5Gc GM3 を含む] およびポリシアル酸関連抗原を含む。そのような抗原の多くは、国際公開番号 WO 2015054600 に記載されており、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0177】

一部の実施形態では、本発明の TACA 標的は、Lewis 血液型抗原を含む。Lewis 血液型抗原は、1-3 連結または 1-4 連結により GlcNAc に連結されているフコース残基を含む。それらを糖脂質上でも糖タンパク質上でも見つけることができる。Lewis 血液型抗原は、これらの抗原の分泌者である個体の体液中で見つけることができる。赤血球上のそれらの出現は、赤血球による血清からの Lewis 抗原の吸収に起因する。

【0178】

一部の実施形態では、本発明の TACA 標的は、Le^Y を含む。Le^Y (CD174 としても公知) は、1,2 連結フコース残基はもちろん 1,3 連結フコース残基も有する Gal 1,4GlcNAc で構成され、したがって、Fuc (1,2)Gal (1,4)Fuc (1,3)GlcNAc エピトープとなる。Le^Y は、1,3 フコースを親鎖の GlcNAc 残基に結合する 1,3 フコシルトランスフェラーゼにより、H 抗原から合成される。Le^Y は、卵巣がん、乳がん、前立腺がん、結腸がん、肺がんおよび上皮がんを含むがこれらに限定されない、様々なかんで発現され得る。正常組織でのその発現レベルは低く、多くのがんで発現レベルが上昇されるため、Le^Y 抗原は、治療用抗体の魅力的な標的である。

【0179】

一部の実施形態では、本発明の TACA 標的は、Le^X を含む。Le^X は、エピトープ Gal 1,1-4 (Fuc 1-3)GlcNAc - R を含む。Le^X は、CD15 およびステージ特異的胎児抗原 - 1 (SSSEA-1) としても公知である。この抗原は、F9 奇形癌腫細胞での免疫化を受けたマウスから採取された血清に対して免疫反応性であると初めて認識された。Le^X は、胚発生の特定のステージと相關することも判明した。Le^X はまた、様々な組織にがんの存在下でも非存在下でも発現されるが、乳がんおよび卵巣がんでも Le^X を見つけることができ、これらのがんでは、がん性細胞によってしか発現されない。

【0180】

一部の実施形態では、本発明の TACA 標的は、SLe^A および / または SLe^X を含む。SLe^A および SLe^X は、それぞれ、構造 Neu5Ac 2-3Gal 1-3 (Fuc 1-4)GlcNAc - R および Neu5Ac 2-3Gal 1-4 (Fuc 1-3)GlcNAc - R で構成される。それらの発現は、がん細胞で上方調節される。血清中のこれらの抗原の存在は、悪性疾患および予後不良と相關する。SLe^X は、大抵はムチン末端エピトープとして見いだされる。SLe^X は、乳がん、卵巣がん、メラノーマ、結腸がん、肝がん、肺がんおよび前立腺がんをはじめとする多数の異なるがんで発現される。本発明の一部の実施形態では、SLe^A および SLe^X 標的は、Neu5Gc (本明細書では、それぞれ、GcSLe^A および GcSLe^X と呼ばれる) を含む。

【0181】

一部の場合には、本発明のがん関連標的は、ムチンを含み得る。Ishidaらは、MUC2 と樹状細胞 (抗腫瘍活性がある) の相互作用が、樹状細胞アポトーシスをもたらすことを実証している (Ishida, A. ら、2008 年、Proteomics、8 卷：3342～9 頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。一部の態様では、本発明は

、樹状細胞アポトーシスを防止して抗腫瘍活性を支援するための、抗ムチン抗体を提供した。

【0182】

一部の実施形態では、本発明のTACA標的は、糖脂質、および／または糖脂質上に存在するエピトープを含み、前記糖脂質は、スフィンゴ糖脂質を含むがこれに限定されない。スフィンゴ糖脂質は、セラミドヒドロキシル基によりグリカンに連結された、脂質セラミドを含む。細胞膜上で、スフィンゴ糖脂質は、「脂質ラフト」と呼ばれるクラスターを形成する。

【0183】

一部の実施形態では、本発明のTACA標的は、Glob Hを含む。Glob Hは、乳がん細胞において初めて同定されたがん関連スフィンゴ糖脂質である。Glob Hのグリカン部分は、Fuc (1-2)Gal (1-3)GalNAc (1-3)Gal (1-4)Gal (1-4)Galc (1)を含む。多数の正常上皮組織に見られるが、Glob Hは、小細胞肺、乳房、前立腺、肺、脾臓、胃、卵巣および子宮内膜腫瘍を含むがこれらに限定されない、多くの腫瘍組織に関連して同定されている。

【0184】

一部の実施形態では、本発明のがん関連スフィンゴ糖脂質標的は、ガングリオシドを含む。ガングリオシドは、1つまたは複数のシアル酸を有するスフィンゴ糖脂質である。ガングリオシド命名法に則って、Gは、ガングリオシドの略号として使用される。この略号の後に文字M、DまたはTが続き、これらの文字は、結合されているシアル酸残基の数（それぞれ、1、2または3）を指す。最後に、数字1、2または3は、薄層クロマトグラフィーにより分析されたとき各々が泳動する距離の順序を指すために、使用される（ここで、3は、最大の距離を移動し、これに2、そして1が続く）。ガングリオシドは、がん関連増殖および転移に関与することが公知であり、腫瘍細胞の細胞表面に発現され得る。腫瘍細胞上に発現されるガングリオシドとしては、これらに限定されないが、GD2、GD3、GM2およびフコシルGM1（本明細書ではFuc-GM1とも呼ばれる）を挙げることができる。本発明の一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、GD3に対する抗体である。GD3は、細胞増殖の調節因子である。一部の実施形態では、GD3に対する抗体は、細胞増殖および／または血管新生をモジュレートするために使用される。一部の実施形態では、GD3に対する抗体は、細胞接着をモジュレートするために使用される。一部の腫瘍細胞に付随しているGD3は、9-O-アセチル化シアル酸残基を含み得る（Mukherjee, K.ら、2008年、J Cell Biochem.、105巻：724～34頁、およびMukherjee, K.ら、2009年、Biol Chem.、390巻：325～35頁、これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。一部の場合には、本発明の抗体は、9-O-アセチル化シアル酸残基に対して選択的である。一部の抗体は、9-O-アセチル化GD3に対して特異的である。そのような抗体は、9-O-アセチル化GD3を発現する腫瘍細胞を標的化するために使用され得る。本発明の一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、GM2に対する抗体である。一部の実施形態では、GM2に対する抗体は、細胞間接触をモジュレートするために使用される。一部の実施形態では、本発明のガングリオシド標的は、Neu5Gcを含む。一部の実施形態では、そのような標的は、Neu5Gcを有するGM3変異体（本明細書ではGcGM3と呼ばれる）を含み得る。GcGM3のグリカン成分は、Neu5Gc 2-3Gal 1-4Galcである。GcGM3は、腫瘍細胞の公知成分である（Casadesus, A.V.ら、2013年、Glycoconj J.、30巻（7号）：687～99頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。

【0185】

一部の実施形態では、本発明のTACAは、少なくとも1つのNeu5Gc残基を含む。

組換え抗体

10

20

30

40

50

【0186】

本発明の組換え抗体（例えば、グリカン相互作用抗体）は、当技術分野において公知の標準的手法を使用して生成することができる。一部の実施形態では、組換え抗体は、抗グリカン抗体であり得る。さらなる抗体は、抗S T n 抗体（例えば、抗G c S T n または抗A c S T n 抗体）であり得る。本発明の組換え抗体は、本明細書に記載の方法に従って產生されたハイブリドーマ細胞由来抗体から得られる可変ドメインを使用して產生させることができる。抗体の重鎖および軽鎖可変領域cDNAは、標準的生化学的手法を使用して決定することができる。全RNAを抗体產生ハイブリドーマ細胞から抽出し、逆転写酵素（RT）ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によりcDNAに変換することができる。得られたcDNAを用いてPCR增幅を行って、可変領域遺伝子を増幅することができる。そのような増幅は、重鎖および軽鎖配列の増幅に特異的なプライマーの使用を含み得る。他の実施形態では、他の供給源から得た可変ドメインを使用して組換え抗体を產生させることができる。この產生は、抗原パニングに使用されるscFvライブラリーなどの、1つまたは複数の抗体断片ライブラリーから選択された可変ドメインの使用を含む。次いで、得られたPCR産物を、配列分析のためにプラスミドにサブクローニングすることができる。シーケンシングしたら、抗体コード配列を発現ベクター内に配置することができる。ヒト化のために、ヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列を使用して、相同ネズミ科動物配列を置換することができる。次いで、得られた構築物を大規模翻訳のために哺乳動物細胞に移入することができる。

10

抗Tn抗体

20

【0187】

一部の実施形態では、本発明の組換え抗体（例えば、グリカン相互作用抗体）は、抗Tn抗体であり得る。そのような抗体は、Tnを有する標的と結合することができる。抗Tn抗体は、Tnに対して特異的であることもあり、またはさらなる炭水化物残基を含むがこれに限定されない、他の部分構造に連結されたTnなどの、Tnの他の修飾形態に結合することもある。一部の場合には、抗Tn抗体は、抗シアリルTn抗体であり得る。そのような抗体は、Neu5Acを含むシアリル化Tn、および/またはNeu5Gcを含むシアリル化Tnと結合することができる。一部の抗Tn抗体は、Tn抗原のクラスターと特異的に結合することができる。

抗S T n 抗体

30

【0188】

一部の実施形態では、本発明の抗体（例えば、グリカン相互作用抗体）は、S T nと特異的に結合することができる。本発明の抗S T n抗体は、S T n抗原の特定の部分へのそれらの結合によって、および/またはG c S T nと対比してA c S T nに対するそれらの特異性によって、大別され得る。一部の場合には、本発明の抗S T n抗体は、第1群抗体である。本発明による「第1群」抗体は、A c S T nおよびG c S T nに結合することができる抗体である。そのような抗体は、広範なS T n構造と会合するそれらの能力のため、本明細書では汎S T n抗体と呼ばれることもある。一部の実施形態では、第1群抗体は、図1Aの最も大きい楕円により示されるS T nの部分と会合することができる。一部の場合には、本発明の抗S T n抗体は、第2群抗体である。「第2群」抗体は、本発明によれば、S T nに結合することができる抗体であって、セリンまたはトレオニンへのO連結を含む一部の関連構造にも結合することができる抗体である。一部の実施形態では、第2群抗体は、シアリル化ガラクトース残基を含むグリカンと会合することができる。一部の場合には、第2群抗体は、図1Bの最も大きい楕円により示されるS T nの部分と会合することができる。一部の第2群抗体は、G c S T nを有する構造よりA c S T nを有する構造と好んで結合する。さらなる抗S T n抗体は、第3群抗体であり得る。本明細書で言及される場合の「第3群」抗体は、S T nに結合することができるが、より広範な一連の関連構造にも結合し得る、抗体である。第2群抗体とは異なり、第3群抗体は、そのような構造がセリンまたはトレオニンにO連結している必要がない。一部の実施形態では、第3群抗体は、図1Cの最も大きい楕円により示されるS T nの部分と会合することができ

40

50

る。最後に、本発明の一部の抗 S T n 抗体は、第 4 群抗体である。本明細書において述べる場合、「第 4 群」抗体は、A c S T n と G c S T n の両方はもちろん非シアリル化 T n 抗原とも結合することができ、したがって、より広範な特異性を有する。一部の実施形態では、第 4 群抗体は、図 1 D の最も大きい楕円により示される S T n の部分と会合することができる。

【 0 1 8 9 】

一部の場合には、本発明の抗 S T n 抗体は、特定の抗原または細胞表面の S T n のクラスターと特異的に結合することができる。一部のそのような抗体は、S T n のクラスターにより形成されるエピトープを認識することができ、そのようなエピトープには、隣り合う S T n 構造間の接触領域を含むエピトープが含まれる。そのようなエピトープは、S T n 構造数が 2、3、4、5、6、7、8、9、10 またはそれより多くのクラスターにより形成され得る。10

【 0 1 9 0 】

一部の実施形態では、本開示の抗 S T n 抗体は、S T n を有する細胞タンパク質に結合するために使用され得る。そのような抗体は、S T n 発現によって非がん性細胞中の類似のタンパク質と区別することができる、がん細胞に付随している細胞タンパク質の標的化に有用であり得る。一部の場合には、そのようなタンパク質は、細胞表面タンパク質を含み得る。S T n を有するがん細胞表面タンパク質は、がん処置および / または診断中に抗 S T n 抗体により標的化され得る。S T n を有する細胞表面タンパク質は、質量分析を使用して、および / または免疫学的方法（例えば、F A C S 分析、免疫沈降法、免疫プロット法、E L I S A など）を使用して、同定することができる。一部の場合には、S T n を有する細胞タンパク質は、がん細胞マーカー、がん幹細胞マーカー、および / またはがん幹細胞シグナル伝達タンパク質を含み得る。一部の実施形態では、S T n を有する細胞タンパク質としては、これらに限定されないが、C D 4 4、C D 1 3 3、C D 1 1 7、インテグリン、ノッチおよびヘッジホッグを挙げることができる。20

抗体成分

【 0 1 9 1 】

一部の場合には、本発明の抗体またはそれらの抗原結合性断片は、本明細書で提供される可変ドメインおよび / または C D R アミノ酸配列を含み得る。一部の場合には、抗体は、国際公開番号 W O 2 0 1 7 0 8 3 5 8 2（この全内容は参照により本明細書に組み入れられる）において表 2 に提示されている可変ドメイン配列のいずれか、その公報において表 3 に提示されている C D R 配列のいずれか、その公報において表 4 に提示されている V H C D R 配列群のいずれか、その公報において表 5 に提示されている V L C D R 配列群のいずれか、その公報において表 6 に提示されている可変ドメインヌクレオチド配列のいずれか、もしくはその公報において表 1 1 に提示されているヒト化可変ドメイン配列のいずれかを含む、その公報において提示されている抗体または抗体断片配列のいずれかを含み得る。一部の抗体または抗原結合性断片は、少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または少なくとも 9 9 . 5 % の配列同一性を有する、そのような配列または変異体の異なる組み合わせを含み得る。一部の場合には、本発明の抗体または抗原結合性断片は、下記の表 2 に収載されている可変ドメイン配列の 1 つまたは複数を含み得る。提示されている軽鎖可変ドメインは、C 末端アルギニン残基を伴って発現されることもあり、または伴わずに発現されることもある。この残基は、通常は、軽鎖可変ドメインを軽鎖定常ドメインと連結させるものであり、軽鎖可変ドメインではなく軽鎖定常ドメインの一部として発現され得る。一部の場合には、抗体またはそれらの抗原結合性断片は、表 2 に収載されている可変ドメイン配列の 1 つまたは複数と約 5 0 % ~ 約 9 9 . 9 %（例えば、約 5 0 % ~ 約 6 0 %、約 5 5 % ~ 約 6 5 %、約 6 0 % ~ 約 7 0 %、約 6 5 % ~ 約 7 5 %、約 7 0 % ~ 約 8 0 %、約 7 5 % ~ 約 8 5 %、約 8 0 % ~ 約 9 0 %、約 8 5 % ~ 約 9 5 %、約 9 0 % ~ 約 9 9 . 50

9%、約95%～約99.9%、約97%、約97.5%、約98%、約98.5%、約99%、約99.5%、約99.6%、約99.7%または約99.8%）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。一部の場合には、本発明の抗体またはそれらの抗原結合性断片は、収載されている配列のいずれかの1つまたは複数の断片を有するアミノ酸配列を含み得る。

【表2】

表2.可変ドメイン配列

ドメイン	配列	配列番号
mSIA101 VH ドメイン	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQKPEQGLEWIGYFS PGNDDIKYNEKFGRKATLTADKSSSTAYMQLNSLSSDDSAVFCKRSLSTPY WGQGTLVTVSA	1
mSIA101 VL ドメイン	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNRGNHKNYLWYRQKPGPLPPKL LIYWASTRESGVPDFRTGSGSGTDFALTISSVQAEDLAVYYCQNDYTYPYTF GGGKLEIKR	2
mSIA102 VH ドメイン	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQKPEQGLEWIGYFS PGNDDIKYNEKFVKATLTADKSSSTAYMQLTSLEDSAVFCKRSYYGD WGQGTTLVSS	3
mSIA102 VL ドメイン	DIQMTQSPASLSVSVGETVITCRASENIYSHLAWYQQKQGKSPQLLVYGAT NLADGVPSRFSGSGSGTQFSLKIHSLOQSEDFGSYYCQHFWGAPFTFGSGTKLE IK	4
mSIA103 VH ドメイン	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQKPEQGLDWIGYIS PGNGDIKYNEKFKDKVTLTADKSSSTACMHLNSLTSEDSAVFCKRSLLALD YWQGTTLVSS	5
mSIA103 VL ドメイン	DIVMTQSHKFMSTSVDRLSITCKASQDVGTNIAWYQQKPGRSPKVLIYSAS TRHTGVPDFRTGSGSGTDFLTISNVQSEDLTDYFCQQYSSFPLTFGVGTVKLE LK	6
hSIA101 VH ドメイン	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGY FSPGNDIYNEKFGRVRTMTADKSSSTAYMELRSLRSDDTAVFCKRSLST PYWGQGTLVTVSS	7
hSIA101 VL ドメイン	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNHKNYLWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDFRTGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPYTFG QGTVKEIK	8
hSIA102 VH ドメイン	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWIGYF SPGNDDIKYNEKFKVRATLTADKSSSTAYMELRSLRSDDTAVFCKRSYYGD WGQGTLVTVSS	9
hSIA102 VL ドメイン	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASENIYSHLAWYQQKPGKAPKLLVYGAT NLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCQHFWGAPFTFGQGTVKVEI K	10
hSIA103 VH ドメイン	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIHWVRQAPGQGLEWMGY ISPGNGDIKYNEKFKDRVTMTADKSSSTAYMQLRSLRSDDTAVFCKRSLLA LDYWGGTTLVTVSS	11
hSIA103 VL ドメイン	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTNIAWYQQKPGKAPKVLVIYAST RHTGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYFCQQYSSFPLTFGQGTVKVEIK	12

【0192】

一部の場合には、本発明の抗体または抗原結合性断片は、表3に提示されているIgG配列のいずれかを含み得る。一部の場合には、抗体またはそれらの断片は、収載されている定常ドメイン配列の1つまたは複数と約50%～約99.9%（例えば、約50%～約60%、約55%～約65%、約60%～約70%、約65%～約75%、約70%～約80%、約75%～約85%、約80%～約90%、約85%～約95%、約90%～約99.9%、約95%～約99.9%、約97%、約97.5%、約98%、約98.5%、約99%、約99.5%、約99.6%、約99.7%または約99.8%）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。一部の場合には、本発明の抗体またはそれらの断片は、収載されている配列のいずれかの1つまたは複数の断片を有するアミノ酸配列を含み得る。

10

20

30

40

【表3】

表3. IgG定常ドメイン配列

ドメイン	配列	配列番号
ネズミ科動物 IgG2a重鎖 定常ドメイン 領域	AKTTAPS VYPLAPVC GDTTGS S VTLG CLVK GYF PEP VT LTWN SG SLSSGVHTPAVLQSDL YTLSSV TTS STWPSQSITCNVAHPASS TKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMIS LSPIVTCVV DVSEDDPDVQISWFVN NVEVHTAQ TQTHREDYNS TLRVVSA LPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGS VRAPQVYVLP PPEEMT KKQV TLTCMV TDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNT EPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVV HEGLHNHHTKSFSTPGK	13
ネズミ科動物 IgG2aカッパ 軽鎖 定常領域	RADAAPTVS IFPPSSEQ L TSGGASVVCFLNNFYPKDINV KWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT KDEYERHNSYTCE ATHKTSTSPIVKS FNRNEC	14
ヒトIgG1 重鎖 定常領域	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTPAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSLG TQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVV DVSHEDPEVKFNWYVGVEVHN A KTKPREE QYNSTYRVV S VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EW ESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	15
ヒトIgG1 軽鎖 定常領域	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASV VCLL NN FYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	16

【0193】

一部の実施形態では、本開示は、上記の抗体配列または関連変異体の1つもしくは複数を使用して產生された抗体断片を含む。そのような抗体断片は、s c F v、F a b 断片、または本明細書に記載のもののいずれかを含む任意の他の抗体断片を含み得る。

ヒト化抗体

【0194】

非ヒト（例えば、ネズミ科動物）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの抗体からの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト靈長類などの非ヒト種の抗体（ドナー抗体）からの超可変領域からの残基によって置き換えられている、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。

【0195】

ヒト定常領域を有する完全ヒト化抗体をコードする発現プラスミドの構築のために、抗体可変領域をコードするDNA配列を、発現ベクター（例えば、哺乳動物発現ベクタ-）の、上流プロモーター／エンハンサー、例えば、サイトメガロウイルス最／初期プロモーター／エンハンサー（CMV IE）、加えて、免疫グロブリンシグナル配列と、下流免疫グロブリン定常領域遺伝子との間に挿入することができる。その後、哺乳動物細胞へのトランスフェクションのためのDNA試料を調製することができる。

【0196】

細胞株の生成および完全ヒト化抗体の選択のために、重鎖プラスミドDNAと軽鎖プラスミドDNAのペアを発現用の細胞にトランスフェクトすることができる。一部の実施形態では、哺乳動物NS0細胞を使用することができる。ヒト化抗体を產生する細胞株を抗体の発現のために拡大することができ、それらの抗体を細胞培養培地から回収し、精製す

10

20

30

40

50

ることができる。

【0197】

一部の実施形態では、ヒト化抗体は、非ヒト種との交差反応性を有し得る。種間交差反応性により、異なる動物において様々な目的で抗体を使用することができる。例えば、交差反応性抗体を前臨床動物研究において使用して、抗体の有効性および／または毒性についての情報を得ることができる。非ヒト種としては、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、または非ヒト霊長類、例えばカニクイザルを挙げることができる。

IgG合成

【0198】

本明細書で提示される1つもしくは複数の可変ドメインおよび／またはCDRアミノ酸配列を含むIgG抗体（例えば、IgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4）（またはそれらの断片もしくは変異体）を、さらなる試験および／または製品開発のために合成することができる。そのような抗体を、IgG産生に適した発現ベクターへの、所望のアミノ酸配列をコードするcDNAの1つまたは複数のセグメントの挿入により、產生させることができる。発現ベクターは、哺乳動物細胞におけるIgG発現に適している哺乳動物発現ベクターを含み得る。IgGの哺乳動物発現は、產生される抗体が、哺乳動物タンパク質に特有の修飾（例えば、グリコシル化）を確実に含むように、ならびに／または抗体調製物が、細菌発現系からのタンパク質調製物中に存在し得るエンドトキシンおよび／もしくは他の夾雑物を確実に欠くように、行うことができる。

10

免疫原性宿主

【0199】

一部の実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体は、本明細書では「免疫原性宿主」と呼ばれる、免疫化のための宿主としての、非ヒト動物の使用によって開発することができる。一部の実施形態では、免疫原性宿主は、哺乳動物である。一部の実施形態では、免疫原性宿主は、トランスジェニックノックアウトマウスである。グリカン相互作用抗体の標的部位および／またはエピトープ標的を有する抗原を使用して免疫原性宿主と接触させて、免疫応答を刺激し、導入された抗原上に存在する標的部位および／またはエピトープ標的に特異的に結合する抗体を免疫原性宿主において產生させることができる。

20

【0200】

免疫化によって產生された抗体を、免疫原性宿主の血清から単離することができる。免疫原性宿主からの抗体產生細胞を使用して、所望の抗体を產生する細胞株を生成することもできる。一部の実施形態では、免疫原性宿主からの抗体および／または抗体產生細胞についてのスクリーニングを、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）および／またはグリカンアレイの使用によって行うことができる。

30

抗体の配列および構造分析および最適化

【0201】

一部の実施形態では、本発明の抗体を配列分析および／または構造分析に付すことができ、そのような分析で、それらの抗体は、抗体の化学的性質、親和性、特異性、タンパク質フォールディング、安定性、製造、発現および／または免疫原性（すなわち、そのような抗体で処置されている対象における免疫反応）に影響を与える特性について分析される。そのような分析は、同じまたは類似のエピトープと結合する抗体間の比較を含み得る。

40

【0202】

同じエピトープと結合する抗体の抗体配列を、軽鎖および／または重鎖配列の差異について分析することができる。そのような分析は、生殖系列配列および／またはCDR配列を含み得る。そのような分析から得た情報を使用して、保存アミノ酸残基；アミノ酸の保存セグメント；保存側鎖特性を有するアミノ酸位置；保存CDR長；および同じエピトープと結合する抗体間で保存される他の特徴を、同定する（および必要に応じて、修飾する、欠失させる、置き換える、または修復する）ことができる。この情報は、変異体を設計するために、または抗体親和性、特異性、タンパク質フォールディング、安定性、製造、

50

発現および／もしくは免疫原性を向上させるための抗体最適化手順の情報を得るために、使用することができる。

【0203】

配列分析は、類似性を同定するための、同じまたは類似のエピトープと結合する2つまたはそれより多くの抗体のアライメントを含み得る。そのような分析は、抗体領域（例えば、CDR、可変ドメイン、生殖系列配列）の配列および／または長さを比較し得る。アミノ酸挿入、アミノ酸欠失および置換を同定し、評定することができる。配列の違いを抗体親和性および／または特異性と比較することができる。

【0204】

一部の場合には、配列分析は、不対システインまたは不規則ジスルフィド；グリコシル化部位（例えば、N連結NXS/T部位）；酸切断部位、アミノ酸酸化部位、マウス生殖系列配列との一致性；アスパラギン脱アミド化部位；アスパラギン酸異性体化部位；N末端ピログルタミン酸形成部位；およびCDR中の易凝集性パッチ、のうちの1つもしくは複数を同定する（および必要に応じて、修飾する、欠失させる、置き換える、または修復する）ために、行われる。10

【0205】

一部の場合には、本発明は、本明細書で提示される抗体の配列分析情報に基づく変異体を提供する。本明細書で使用される場合、用語「配列分析情報に基づく変異体」は、抗体配列分析から導出された1つまたは複数の結論に基づいて修飾された抗体変異体を指す。一部の場合には、本発明の抗体を修飾して、抗体親和性、特異性、タンパク質フォールディング、安定性、製造、発現および／または免疫原性のうちの1つもしくは複数に対する修飾を含む抗体変異体を產生することができる。20

【0206】

一部の配列分析情報に基づく変異体は、1つまたは複数のCDR長修飾を含む。CDR長修飾抗体は、元の抗体配列を基準にして1つまたは複数のCDRに、1つまたは複数の付加されたまたは欠失されたアミノ酸を含み得る。一部の場合には、配列分析情報に基づく変異体は、1つまたは複数のCDRの、別の抗体（例えば、同じまたは類似のエピトープと結合する抗体）に由来する1つまたは複数のCDRでの、置換を含み得る。一部の場合には、配列分析情報に基づく変異体は、別の抗体（例えば、同じまたは類似のエピトープと結合する抗体）からの重鎖または軽鎖可変ドメインの置換を含み得る。配列分析情報に基づく変異体は、抗体を発現する1つまたは複数の生殖系列遺伝子に対する修飾を含み得る。そのような修飾は、点突然変異、領域突然変異、挿入突然変異または欠失突然変異を含み得る。一部の場合には、生殖系列遺伝子修飾は、ある公知の生殖系列遺伝子から別の生殖系列遺伝子にCDRを移動させるために行われる。配列分析情報に基づく変異体は、scFv、モノボディ、ダイアボディ、イントラボディ、CAR、抗体ミメティックなどを含むがこれらに限定されない、本明細書に記載の他の変異体を含み得る。30

【0207】

一部の実施形態では、配列および／または構造分析は、抗体断片ディスプレイライブラリー（これらに限定されないが、scFvライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、および酵母ディスプレイライブラリーを含む）の構築の情報を得るために使用することができる。一例を挙げれば、配列アライメントを行って、2つまたはそれより多くの抗体を共通の抗原またはエピトープとアラインすることができ、アラインされた抗体間で保存されている、またはアラインされた抗体間で可変性である、アミノ酸残基を同定することができる。そのような場合、ライブラリーメンバー間の可変性が、配列分析で同定された可変アミノ酸に主として限定されるように、抗体断片ディスプレイライブラリーを構築することができる。一部の場合には、そのようなライブラリーは、標的抗原（例えば、STn）もしくは標的抗原の特定のエピトープ（例えば、本明細書中の下記実施例1で説明されるような、第1、2、3および4群抗体により認識されるエピトープ）に対する親和性ならびに／または特異性が変更された変異体を同定するために使用することができる。40

【 0 2 0 8 】

一部の実施形態では、本発明の抗体を、1つまたは複数の不対システイン残基を除去するように、置き換えるように、または別様に消失させるように、修飾することができる。一部の場合には、不対システイン残基は、反応性であり得、一部の場合には、抗体親和性および／または特異性に影響を与える。したがって、本発明の一部の抗体は、不対システイン残基を消失させるように修飾されている。一部の場合には、そのような変異体は、修飾されたエピトープ特異性および／または親和性を有し得る。一部の場合には、不対システイン残基の修飾は、抗体フォールディングを変更させることができる。一部の場合には、これらの変異体は、1つまたは複数のシステイン残基の置換または欠失を含む。一部の場合には、これらの変異体は、不対システイン残基からの望ましくない効果を防止するまたは低減させるために、1つまたは複数の追加のアミノ酸残基（これらに限定されないが、1つもしくは複数のシステイン残基の付加を含む）を含む。一部の場合には、システイン残基は、疎水性側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニンまたはトリプトファン）で置き換えられる。

10

抗体試験および特徴付け**【 0 2 0 9 】**

本明細書に記載の抗体は、様々な方法を使用して試験するおよび／または特徴付けることができる。そのような方法を使用して、抗体親和性、特異性、および活性（例えば、細胞シグナル伝達経路の活性化もしくは阻害または他の細胞もしくは生物活性）を含むがこれらに限定されない、様々な特性を判定することができる。抗体試験は、毒性、治療効果、薬力学、薬物動態、吸收、沈着、代謝および排泄のうちの1つまたは複数についての *in vivo* での（例えば、動物および／またはヒト研究での）試験をさらに含み得る。動物での試験としては、これらに限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、靈長類（例えば、カニクイザル）、ヒツジ、ヤギ、ウマおよびウシでの試験を挙げることができる。

20

細胞ベースのアッセイ**【 0 2 1 0 】**

一部の実施形態では、本発明の抗体を、1つもしくは複数の細胞ベースのアッセイの使用によって試験するまたは特徴付けることができる。そのような細胞ベースのアッセイを、培養中の細胞を用いて *in vitro* で行うことができる。一部の場合には、細胞ベースのアッセイを、*in vivo* で行うことができる。細胞ベースの *in vivo* アッセイの例は、腫瘍細胞が宿主に注射されるまたは別様に導入される、腫瘍モデルを含む。

30

【 0 2 1 1 】

一部の場合には、細胞ベースのアッセイに使用される細胞は、本発明の1つもしくは複数の抗体により認識される1つまたは複数の標的グリカンを発現し得る。そのようなグリカンは、そのような細胞によって天然に発現されることもあり、または代替的に、細胞が、特定のアッセイを目的として所望される1つもしくは複数のグリカンを発現するように誘導されることもある。誘導発現は、グリコシリ化されたタンパク質もしくはグリコシリ化を調節する酵素の発現を上方調節する1つまたは複数の処理によるものであり得る。他の場合には、誘導発現は、1つもしくは複数のグリコシリ化されたタンパク質またはグリコシリ化の調節に関する1つもしくは複数の酵素の内因性発現のための1つもしくは複数の遺伝子または転写物の、トランスフェクション、形質導入あるいは他の形態の導入を含み得る。

40

【 0 2 1 2 】

一部の場合には、本明細書で使用される細胞ベースのアッセイは、がん細胞の使用を含み得る。多くのがん細胞株が、本発明の抗体を試験するための実験に利用可能である。そのような細胞は、標的グリカンを発現することもあり、または標的グリカンを発現するよう誘導されることもある。加えて、がん細胞株を使用して本発明の抗体を試験すること

50

ができる、この場合のがん細胞株は、がん幹細胞の代表である。がん幹細胞（CSC）細胞株は、培養で増殖させたがん細胞から（例えば、がん幹細胞に対して特異的なマーカーに基づいて選別することによって）単離または識別することができる。細胞ベースアッセイで使用される細胞株としては、これらに限定されないが、乳房、結腸、卵巣、リンパ球、骨髄および皮膚細胞株を挙げることができる。具体的な細胞株は、これらに限定されないが、SNU-16細胞、LS-174T細胞、MC38細胞、TOV-112D細胞、TOV-21G細胞、Jurkat E6.1細胞、K-562細胞、B16-F0細胞、B16-F10細胞、LS180細胞、COLO205細胞、TB4細胞、HT29細胞、 Panc1細胞、HPA-C細胞、HPA-FII細胞、RKO細胞、SW480細胞、およびSNU-C2A細胞を含み得る。

10

【0213】

一部の実施形態では、卵巣がん細胞株が使用され得る。そのような細胞株としては、これらに限定されないが、SKOV3、OVCA-R3、OV90およびA2870細胞株を挙げることができる。一部の場合には、CSC細胞を、これらの細胞株から、CD44および/またはCD133細胞マーカーを発現する細胞を単離することによって、単離することができる。

【0214】

OVCA-R3細胞は、進行性卵巣腺癌に罹患している患者から得た悪性腹水を使用して初めて樹立された（Hamilton, T.C.ら、1983年、Cancer Res.、43巻：5379～89頁）。がん幹細胞集団は、OVCA-R3細胞培養物から、CD44（細胞接着および遊走に関与する）、CD133およびCD117などの、特定の細胞表面マーカーに基づく選択によって、単離することができる（Liang, D.ら、2012年、BMC Cancer、12巻：201頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。OV90細胞は、同様にヒト腹水から得られた卵巣上皮がん細胞である（米国特許第5,710,038号を参照されたい）。OV-90細胞もまた、活性化されるとCD44を発現し得る（Meunier, L.ら、2010年、Transl Oncol.、3巻（4号）：230～8頁）。

20

グリカンアレイ

【0215】

一部の実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体は、グリカンアレイの使用によって開発することができる。本明細書で使用される場合、用語「グリカンアレイ」は、アレイ基板に連結された多数の異なるグリカンのいずれかと相互作用する作用因子を同定するために使用されるツールを指す。一部の実施形態では、グリカンアレイは、本明細書では「グリカンプローブ」と呼ばれる、多数の化学合成グリカンを含む。一部の実施形態では、グリカンアレイは、少なくとも2、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも350、少なくとも1000または少なくとも1500のグリカンプローブを含む。一部の実施形態では、所望される一連のグリカンプローブを提示するようにグリカンアレイをカスタマイズすることができる。一部の実施形態では、グリカンアレイをリンカー分子によりアレイ基板に結合させることができる。そのようなリンカーとしては、これらに限定されないが、-O(CH₂)₂CH₂)NH₂およびO(CH₂)₃NHCOCH₂(OC₂H₅CH₂)₆NH₂を含む、分子を含み得る。

30

【0216】

一部の実施形態では、グリカンアレイは、70より多くの化学合成グリカンを有し、これらの大部分が、Neu5Ac含有グリカンとNeu5Gc含有グリカンのペアとして提示される。グリカンプローブの一部の例としては、Neu5Ac--2-6-GalNAc(AcSTn)；Neu5Gc--2-6-GalNAc(GcSTn)；Neu5,9Ac2--2,6-GalNAc；Neu9Ac5Gc--2,6-GalNAc、およびGalNAc(Tn)を挙げることができる。当技術分野において公知の特異性を判定するためのアレイまたは他の方法を使用して、GcSTnと対比してAcST

40

50

nに対する抗体結合特異性を判定することができる。加えて、Oアセチル化STnへの抗体の結合プロファイルを判定することができる。STnにおけるOアセチル化の喪失はがんに関連するが、それは、がんに関連する発現が、抗体によるSTn認識増加と相関するからである(Ogata, S.ら、Tumor-associated sialylatedantigens are constitutively expressed in normal human colonic mucosa、Cancer Res.、1995年5月1日；55巻(9号)：1869～74頁)。一部の場合には、グリカンアレイを使用して、Tnと対比してSTnの認識を判定することができる。

抗体断片ディスプレイライブラリースクリーニング手法

【0217】

一部の実施形態では、本発明の抗体は、ハイスループットの発見方法を使用して產生および／または最適化することができる。そのような方法は、国際特許出願番号WO2014074532において開示されているディスプレイ手法のいずれか(例えば、ディスプレイライブラリースクリーニング手法)を含むことができ、この国際特許出願の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。一部の実施形態では、合成抗体を設計し、ディスプレイ技術(例えば、ファージディスプレイ技術)を使用して標的抗原をスクリーニングすることによりその合成抗体を選択または最適化することができる。ファージディスプレイライブラリーは、数百万から数十億のファージ粒子を含むことができ、これらの粒子の各々が、それらのウイルスコート上で特有の抗体断片を発現する。そのようなライブラリーは、目的の1つまたは複数の抗原に対してそれぞれ異なる親和性レベルを有する何百もの抗体断片を選択するために使用することができる可能性がある非常に多様な資料を提供することができる(McCaffertyら、1990年、Nature、348巻：552～4頁；Edwards, B.M.ら、2003年、JMB.、334巻：103～18頁；Schofield, D.ら、2007年、Genome Biol.、8巻、R254、およびPershad, K.ら、2010年、Protein Engineering Design and Selection、23巻：279～88頁；これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。多くの場合、そのようなライブラリー中に存在する抗体断片は、可動性リンカーにより繋がれたV_H抗体ドメインとV_L抗体ドメインの融合タンパク質を含むscFv抗体断片を含む。一部の場合には、scFvは、相補性決定領域(CDR)の可変ループをコードする特有の配列を除けば、同じ配列を含有し得る。一部の場合には、scFvは、ウイルスコートタンパク質(例えば、ウイルスpIIIコートタンパク質のN末端)に連結されている融合タンパク質として発現される。ウイルスコートへの複合体組込みの前に、V_L鎖とV_H鎖を周辺質において組立てるために別々に発現させてもよい。結合したファージから沈殿したライブラリーメンバーをシーケンシングして、所望のscFvをコードするcDNAを得ることができる。そのような配列を、組換え抗体产生のために抗体配列に直接組み込んでもよく、または突然変異させてin vitroでの親和性成熟によるさらなる最適化に用いてよい。

細胞傷害性抗体の開発

【0218】

一部の実施形態では、本発明の抗体は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)および／または抗体依存性細胞貪食(ADCP)を誘導する能力があり得る。ADCCは、細胞が免疫細胞攻撃の結果として溶解される免疫機構である。そのような免疫細胞としては、CD56+細胞、CD3-ナチュラルキラー(NK)細胞、単球および好中球を挙げることができる(Strohl, W.R.、Therapeutic Antibody Engineering、Woodhead Publishing、Philadelphia PA、2012年、第8章、186頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

【0219】

一部の場合には、本発明の抗体は、ADCCまたはADCPが抗体結合時に望ましいか否かに依存して、所与のアイソタイプを含むように改変することができる。例えば、そのような抗体は、Alderson, K.L.ら、J Biomed Biotechnol.、2011年、2011巻：379123頁)によって開示された方法のいずれかに従って、改変することができる。

10

20

30

40

50

マウス抗体の場合には、抗体の異なるアイソタイプのほうが、ADCを促進するのに有效である。例えば、IgG2aは、ADCCを誘導するのにIgG2bより有効である。マウスIgG2b抗体をはじめとする本発明の一部の抗体を再改変して、IgG2a抗体にすることができる。そのような再改変抗体のほうが、細胞会合抗原への結合時にADCを誘導するのに有効であり得る。一部の実施形態では、抗体は、ADCCおよび／もしくは補体依存性細胞傷害(CDC)生物活性を向上させるために、修飾すること、または1つもしくは複数の翻訳後修飾を導入することによって、再改変される。

【0220】

一部の実施形態では、本発明の方法に従って開発される抗体の可変領域をコードする遺伝子を、ヒトFc領域をコードする哺乳動物発現ベクターにクローニングすることができる。そのようなFc領域は、ヒトIgG1からのFc領域であり得る。IgG1Fc領域は、Fc - 受容体結合およびADCCを増強することが公知のアミノ酸突然変異を含み得る。

10

抗体薬物コンジュゲート

【0221】

一部の実施形態では、本発明の抗体は、抗体薬物コンジュゲート(ADC)治療への応用のために開発され得る。ADCは、1つまたは複数のカーゴ(例えば、治療剤)が[例えば、直接、またはリンカー(例えば、切断可能なリンカーもしくは切断不能リンカー)を介して]結合されている、抗体である。ADCは、1つまたは複数の標的細胞または組織への治療剤(例えば、薬物または細胞傷害性薬剤)の送達に有用である(Panowski, S.ら、2014年、mAbs 6巻：1号、34～45頁)。一部の場合には、ADCは、被標的細胞上の表面抗原と結合するように設計され得る。結合すると、抗体 - 抗原複合体全体が内在化され、細胞リソソームに指向され得る。その後、ADCは、分解されて、結合しているカーゴを放出することができる。カーゴが細胞傷害性薬剤である場合、標的細胞は、死滅させられることになり、または別様に無効にされることになる。細胞傷害性薬剤としては、これらに限定されないが、細胞骨格阻害剤[例えば、チューブリン重合阻害剤、およびキネシンスピンドルタンパク質(KSP)阻害剤]、DNA傷害剤(例えば、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、ならびにピロロベンゾジアゼピン二量体、例えばタリリンおよびテシリン)、トポイソメラーゼ阻害剤[例えば、カンプトテシン化合物または誘導体、例えば7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン(SN-38)およびエキサテカン誘導体DXd]、転写阻害剤(例えば、RNAポリメラーゼ阻害剤、例えばアマニチン)、ならびにキナーゼ阻害剤[例えば、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)阻害剤またはマイトジエン活性化プロテインキナーゼ(MEK)阻害剤]を挙げることができる。

20

【0222】

チューブリン重合阻害剤としては、それらに限定されないが、メイタンシン(例えば、エムタンシン[DM1]およびラブタンシン[DM4])、アウリストチン、チューブリシン、およびビンカアルカロイドまたはこれらの誘導体を挙げることができる。例示的アウリストチンとしては、アウリストチンE(ドラスタチン-10の誘導体としても公知)、アウリストチンEB(AEB)、アウリストチンEFP(AEFP)、モノメチルアウリストチンE(MMAE)、モノメチルアウリストチンF(MMAF)、アウリストチンFおよびドラスタチンが挙げられる。例示的チューブリシン化合物としては、天然に存在するチューブリシンA、B、C、D、E、F、G、H、I、UおよびV、ならびにチューブリシン類似体、例えば、プレチューブリシンD(PTb-D43)およびN¹⁻⁴-デスマセトキシチューブリシンH(Tb1)が挙げられる。例示的ビンカアルカロイドとしては、ビンクリスチン、ビンプラスチン、ビンデシン、およびナベルビン(ビノレルビン)が挙げられる。一部の実施形態では、細胞傷害性薬剤は、アウリストチン誘導体[例えば、1-アミノプロパン-2-イル-アウリストチンF、アウリストチンF-ヒドロキシプロピルアミド、アウリストチンF-プロピルアミド、アウリストチンFフェニレンジアミン(AFP)]；チューブリシン誘導体；ビンカアルカロイド誘導体[例えば、N-(3

30

40

50

- ヒドロキシプロピル) ピンデシン (H P V)]、ならびに米国特許第 8,524,214 号、同第 8,685,383 号、同第 8,808,679 号および同第 9,254,339 号、米国特許出願公開第 20150314008A1 号、同第 20160220696A1 号および同第 20160022829A1 号に記載されているもののいずれかを含むことができ、前記参考特許文献の各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0223】

一部の実施形態では、本発明の抗体 - 薬物コンジュゲート (ADC) は、抗体と治療剤を接続する 1 つまたは複数のポリマー担体 (例えば、抗体 - ポリマー - 薬物コンジュゲート) をさらに含み得る。本明細書で使用される場合、用語「ポリマー担体」は、1 つもしくは複数の治療剤および / または抗体に共有結合され得る、ポリマーあるいは修飾ポリマーを指す。ポリマー担体は、治療剤のための追加のコンジュゲーション部位、薬物対抗体比の上昇、および ADC の治療効果の増強をもたらすことができる。一部の実施形態では、本発明で使用されるポリマー担体は、水溶性および / または生分解性であり得る。そのようなポリマー担体としては、それらに限定されないが、ポリ(エチレングリコール) (PEG)、ポリ(N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド) (ポリHPMA)、ポリ(-アミノ酸) [例えば、ポリ(L-リシン)、ポリ(L-グルタミン酸)、およびポリ((N-ヒドロキシアルキル)グルタミン)]、炭水化物ポリマー [例えば、デキストリン、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、およびポリシアル酸]、グリコ多糖 (例えば、ホモ多糖、例えば、セルロース、アミロース、デキストラン、レパン、フコイダン、カラギナン、イヌリン、ペクチン、アミロペクチン、グリコーゲンおよびリクセナン (lixenan)、またはホモ多糖、例えば、アガロース、ヒルロナン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸、アルギン酸およびヘパリン)、糖脂質、グリココンジュゲート、ポリグリセロール、ポリビニルアルコール、ポリ(アクリル酸)、ポリケタールおよびポリアセタール [例えば、ポリ(1-ヒドロキシメチルエチレンヒドロキシメチルホルマール)、これは、PHF または FLEXIMER (登録商標) としても公知であり、米国特許第 5,811,510 号、同第 5,863,990 号および同第 5,958,398 号に記載されており、これらの特許文献の各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる]、ならびにこれらの誘導体、デンドリマー、コポリマーおよび混合物を挙げることができる。例えば、ポリマー担体は、ポリアセタール / ポリケタールのコポリマー (例えば、PHF)、ならびに親水性ポリマー、例えば、ポリアクリレート、ポリビニルポリマー、ポリエステル、ポリオルトエステル、ポリアミド、ポリペプチドおよびこれらの誘導体を含み得る。

【0224】

一部の実施形態では、治療剤は、本発明の抗体に、直接またはリンカーを介して結合されている (attached) (例えば、共有結合されている (covalently bonded))。一部の実施形態では、治療剤は、ポリマー担体に、直接またはリンカーを介して結合されており、ポリマー担体は、抗体に、直接またはリンカーを介して結合されている。一部の実施形態では、リンカーは、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメル酸、スペリン酸、アゼライン酸、セバシン酸、フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸、ジグリコール酸、酒石酸、グルタミン酸、フマル酸またはアスパラギン酸部分構造であって、これらの各々のアミド、イミドもしくは環式イミド誘導体を含み、各々が必要に応じて置換されている、部分構造を含み得る。例示的リンカーとしては、米国特許第 8,524,214 号、同第 8,685,383 号、同第 8,808,679 号、同第 9,254,339 号および / または同第 9,555,112 号において開示されているもののいずれかを挙げることができ、これらの参考特許文献の各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0225】

一部の実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーであり得る。切断可能なリンカーは、ADC からの治療剤の放出を可能にするために、ある特定の条件 (例えば、pH、

10

20

30

40

50

温度もしくは還元の変化)下で破断し得るか、または酵素(例えば、プロテアーゼおよびグルクロニダーゼ)により切断され得る。そのようなリンカーは、不安定な結合、例えば、エステル結合、アミド結合またはジスルフィド結合を含み得る。非限定的な切断可能なリンカーとしては、pH感受性リンカー(例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シス-アコニットアミド、チオエーテル、オルトエステル、アセタールまたはケタール);還元感受性リンカー[例えば、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシンイミジル(SPD P)、4-(2-ピリジルジチオ)ブタン酸N-スクシンイミジル(SPP)、S-アセチルチオ酢酸N-スクシンイミジル(SATA)およびN-スクシンイミジル-オキシカルボニル-アルファ-メチル-アルファ-(2-ピリジル-ジチオ)トルエンまたは4-(1-(ピリジン-2-イルジスルファニル)エチル)安息香酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル(SMPT)];光感受性リンカー;および酵素的に切断可能なリンカー[例えば、ペプチドリンカー、例えばバリン-シトルリン、バリン-シトルリン-p-アミノベンゾイルオキシカルボニル(vc-PAB)、マレイミドカプロイル-バリン-シトルリン-p-アミノベンゾイルオキシカルボニル(MC-vc-PAB);グルクロニダーゼによって切断可能なリンカー、例えばグルクロニド-MAB C;またはエステラーゼによって切断可能なリンカー]を挙げることができる。

10

20

30

40

50

【0226】

他の実施形態では、リンカーは、切断不能リンカーであり得る。切断不能リンカーは、切断可能なリンカーと比較してADCの血漿安定性を増大させ得る。例示的な切断不能リンカーとしては、マレイミドアルカンおよびマレイミドシクロヘキサン(MCC)が挙げられる。

【0227】

本発明の抗体-薬物コンジュゲート(ADC)は、当技術分野において公知の任意の方法を使用して調製することができる。例えば、抗体上の官能基と反応することができる官能基を含有するように、治療剤を修飾することができる。2つの官能基を反応させてコンジュゲートを形成することにより、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を調製することができる。一部の場合には、異なる化学的条件下で治療剤上の官能基および抗体上の官能基と反応することができる官能基を含有するように、ポリマー担体を修飾することができる。抗体、ポリマー担体、および治療剤を逐次的化学反応によって連結させて抗体-ポリマー-薬物コンジュゲートを形成することができる。抗体とのコンジュゲーションは、コンジュゲーション部位としてリシンまたはシステイン残基を利用し得る。一部の実施形態では、追加のリシンまたはシステイン残基を有するように抗体を改変することができる。このようなアプローチは、抗体構造(例えば、鎖間ジスルフィド結合)の破壊を回避し、抗体安定性および/または活性を維持することができる。

【0228】

本明細書に記載される場合の薬物対抗体比(DAR)は、抗体にコンジュゲートされている治療剤(例えば、薬物または細胞傷害性薬剤)の平均数である。一部の実施形態では、本発明のADCの薬物対抗体比は、少なくとも1:1、少なくとも2:1、少なくとも4:1、少なくとも6:1、少なくとも8:1、少なくとも10:1、少なくとも12:1、少なくとも15:1、少なくとも20:1または少なくとも25:1である。

【0229】

一部の実施形態では、本発明の抗体は、ADCとして開発されたとき、細胞死を促進するそれらの能力について試験することができる。細胞生存率アッセイを二次抗体-薬物コンジュゲートの存在および非存在下で行うことができる。次いで、強力な細胞増殖阻害を有する抗体を使用して、直接抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を設計することができる。細胞ベースの細胞傷害アッセイにおけるそのような二次抗体-薬物コンジュゲートの使用は、多くのADC候補の迅速なプレスクリーニングを可能にし得る。そのようなアッセイに基づいて、コンジュゲートされていない抗体候補は、1つまたは複数の細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされている二次抗体(本明細書では2°ADCと呼ばれる)の存在

下で細胞に直接付加される。高密度の被標的抗原を発現する細胞への抗体 / 2 ° A D C 複合体の内在化は、細胞内での用量依存性薬物放出を達成することができ、したがって、細胞傷害効果を引き起こして細胞（例えば、腫瘍細胞）を死滅させるが、低密度の被標的抗原を発現する細胞（例えば、正常細胞）に影響を与えない。

【 0 2 3 0 】

本発明の A D C は、がん細胞を標的化するように設計することができる。そのような A D C は、1つまたは複数の腫瘍関連糖鎖抗原（T A C A ）に対する抗体を含み得る。一部の場合には、本発明の A D C は、抗 S T n 抗体である。一部の実施形態では、A D C は、表 2 に提示されている可変ドメインの1つまたは複数を含む。そのような A D C は、表 3 に提示されているもののいずれかを含むがそれらに限定されない、少なくとも1つのヒト I g G 定常領域も含み得る。10

キメラ抗原受容体の開発

【 0 2 3 1 】

一部の実施形態では、本発明の抗体配列は、キメラ抗原受容体（C A R ）を開発するために使用され得る。C A R は、標的細胞（例えば、腫瘍細胞）の認識および死滅を助長する、免疫細胞上に発現される膜貫通型受容体である。C A R は、通常は3つの基本部分を含む。これらは、エクトドメイン（認識ドメインとしても公知）、膜貫通ドメイン、および細胞内（シグナル伝達）ドメインを含む。エクトドメインは、標的細胞上の細胞性抗原との結合を助長し、その一方で、細胞内ドメインは、結合した標的細胞の死滅を促進させるためのシグナル伝達機能を通常は含む。さらに、それらは、本明細書に記載の1つもしくは複数の抗体可変ドメインまたはその断片を伴う細胞外ドメインを有し得る。本発明のC A R は、膜貫通ドメインおよび細胞質側テールも含む。抗体、抗体可変ドメインおよび / または抗体 C D R の1つまたは複数のセグメントを含むようにC A R を設計することができ、したがって、そのようなC A R が免疫エフェクター細胞上に発現されると、免疫エフェクター細胞は、C A R の抗体部分によって認識されるあらゆる細胞に結合し、それらを排除する。20

【 0 2 3 2 】

C A R の特性としては、モノクローナル抗体の抗原に結合する性質を利用して非M H C 限定様式で、選択された標的にT細胞特異性および反応性を再指向させるそれらの能力が挙げられる。非M H C 限定抗原認識は、C A R を発現するT細胞に、抗原プロセシングに依存しない、したがって主要な腫瘍逃避機構を迂回する、抗原認識能力をもたらす。さらに、T細胞で発現されたとき、C A R は、有利なことに、内在性T細胞受容体（T C R ）アルファおよびベータ鎖と二量体を形成しない。30

【 0 2 3 3 】

腫瘍を標的化するように改変されたC A R は、1つまたは複数の腫瘍関連糖鎖抗原（T A C A ）に対する特異性を有し得る。一部の実施形態では、これらのC A R のエクトドメインは、1つもしくは複数の抗体可変ドメインまたはその断片を含み得る。一部の実施形態では、C A R は、T細胞で発現され、「C A R 改変T細胞」または「C A R - T 」と呼ばれることがある。1つまたは複数の抗体可変ドメインを有するC A R エクトドメインを用いて、C A R - T を改変することができる。40

キメラ抗原受容体の構造的特徴

【 0 2 3 4 】

遺伝子移入技術を用いて、T細胞を、それらの表面に抗体を安定的に発現するよう、したがって所望の抗原特異性を付与するように、改変することができる。キメラ抗原受容体（C A R ）は、特定の抗体の抗原認識ドメインを、T細胞を活性化する性質を有するC D 3 - ゼータ鎖またはF c R I タンパク質の細胞内ドメインと組み合わせて、単一のキメラ融合タンパク質にする。C A R 技術は、T細胞による標的細胞のM H C 非限定認識をもたらす。T細胞のM H C 限定の除去は、任意の患者における、ならびにまた、通常はそれぞれM H C クラスIまたはI I エピトープに限定されるC D 8 + T細胞とC D 4 + T細胞の両方における、これらの分子の使用を助長する。A b 結合領域の使用は、タンパク質

10

20

30

40

50

によってのみならず炭水化物および脂質によっても形成されるエピトープに対してT細胞が応答できるようにする。このキメラ受容体アプローチは、がんの免疫療法に特に適しており、MHC下方調節、共刺激分子の発現欠如、CTL抵抗性、およびT細胞抑制の誘導などの、腫瘍が免疫認識を回避する機構の多くを迂回することができ、CD8⁺CTLとCD4⁺T細胞の両方の使用が、最適な抗腫瘍効果のために最も組み合わせられる。このアプローチは、HIVなどのウイルスに加えて、多種多様な腫瘍抗原に適用可能であることが実証されている(Finneyら、J. Immunology、2004年、172巻：104～113頁)。

【0235】

キメラ抗原受容体は、内在性T細胞受容体のものに類似した様式でT細胞活性化を誘発することができるが、実際には、CAR技術の臨床応用は、キメラ抗原受容体T細胞の不適切なin vivo拡大によって妨げられてきた。例えば、第一世代CARは、それらのシグナル伝達ドメインとして、CD3またはFc受容体鎖の細胞質側領域を含んでいた。これらの第一世代CARは、卵巣がん、腎がん、リンパ腫および神経芽腫を有する患者において第I相臨床研究で試験され、若干の応答を誘導し、T細胞の細胞傷害性を有效地に再指向させるが、反復抗原曝露時にT細胞増殖および生存を可能にすることできることが判明した。第二世代CARの原形は、CD28とCD3の両方を包含する受容体を含み、第二世代CARは、B細胞悪性疾患および他のがんの処置のために試験された(Sadelainら、(2009年)Current Opinion in Immunology、21巻(2号)：215～223頁)。このようにして、CARは、異なる機能的性質を有する多種多様な受容体に急速に拡大している。

【0236】

つい最近、CAR媒介T細胞応答を共刺激ドメインの付加で向上させることができることが発見された。前臨床モデルにおいて、CD137(4-1BB)シグナル伝達ドメインの組入れは、単独のCD3-ゼータ鎖の組入れと比較して、キメラ抗原受容体の抗腫瘍活性およびin vivo存続性を有意に増大させることができた(Porterら、N. Engl. J. Med.、2011年、365巻：725～733頁)。

【0237】

したがって、本開示の一部の実施形態では、本発明の抗体配列は、キメラ抗原受容体(CAR)を開発するために使用され得る。一部の実施形態では、CARは、標的細胞(例えば、腫瘍細胞)の認識および死滅を助長する、免疫細胞上に発現される膜貫通型受容体である。

【0238】

多くのがんにおいて、標的にする腫瘍特異的抗原が同定されていないが、B細胞新生物におけるCD19は、魅力的な標的である。CD19の発現は、正常および悪性B細胞およびB細胞前駆体に限定される。抗CD19キメラ抗原受容体を発現する自己T細胞(CART19)での処置のパイロット臨床試験が、進行したp53欠損慢性リンパ性白血病(CLL)を有する患者において行われた。骨髄におけるCD19特異的免疫応答の発生は、キメラ抗原受容体T細胞の最大浸潤と同時に発生する、サイトカインの一時的放出および白血病細胞の消失によって、実証された。(Porterら、N. Engl. J. Med.、2011年、365巻：725～733頁)。

【0239】

CARのさらなる構造的特徴は、City of Hopeに帰属され、Michael Jensenという共通の発明者を有する、いくつかのPCT公開公報において開示されているもののいずれかを含み得る。例えば、PCT公開WO00/23573には、CD20に対して特異的な受容体を含む細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインと膜貫通ドメインとを有する細胞表面タンパク質を発現する、遺伝子改変されたCD20特異的再指向T細胞が記載されている。CD20⁺悪性疾患の細胞免疫療法のための、および任意の有害B細胞機能を抑止するための、そのような細胞の使用。一実施形態では、細胞表面タンパク質は、単鎖FvFc：受容体であり、ここで、Fvは、ペプチドにより

10

20

20

30

40

50

連結されている、CD20に対する单鎖モノクローナル抗体のVHおよびVL鎖を示し、Fcは、ヒトIgG1のヒンジ-CH2-CH3領域を表し、は、ヒトCD3のゼータ鎖の細胞内シグナル伝達ドメインを表す。キメラT細胞受容体を発現する再指向T細胞を、受容体をコードする裸のDNAを使用するエレクトロポレーションによって、作製する方法。同様に、PCT公開WO02/077029には、CD19に対して特異的である受容体を含む細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインと膜貫通ドメインとを有する細胞表面タンパク質を発現する、遺伝子改変されたCD19特異的再指向免疫細胞が記載されている。CD19⁺悪性疾患の細胞免疫療法のための、および任意の有害B細胞機能を抑制するための、そのような細胞の使用。一実施形態では、免疫細胞は、T細胞であり、細胞表面タンパク質は、scFvFc：受容体であり、ここで、Fvは、CD19に対する单鎖モノクローナル抗体のVHおよびVL鎖を示し、FcはIgG1の定常領域の少なくとも一部を表し、は、T細胞抗原受容体複合体ゼータ鎖（ヒトCD3のゼータ鎖）の細胞内シグナル伝達ドメインを表す。細胞外ドメインscFvFcと細胞内ドメインゼータは、CD4の膜貫通ドメインなどの膜貫通ドメインによって連結されている。キメラT細胞受容体を発現する再指向T細胞を、受容体をコードする裸のDNAを使用するエレクトロポレーションによって、作製する方法。これらのキメラ抗原受容体には、T細胞で発現されたときにモノクローナル抗体の特異性に基づいて抗原認識を再指向させる能力がある。腫瘍細胞表面エピトープに対する標的特異性を有するscFvFc：受容体の設計は、既存の抗腫瘍免疫に頼らないので、養子療法のための抗腫瘍免疫エフェクター細胞を生成するための概念的な戦略である。これらの受容体は、MHC非依存性様式で抗原に結合するという点で「万能」であり、したがって、1つの受容体構築物を使用して、抗原ポジティブ腫瘍を有する患者の集団を処置することができる。City of Hope PCT公開WO02/088334、WO2007/059298およびWO2010/065818には、細胞外ドメインを細胞表面に繋留することができる支持領域に連結されている可溶性受容体リガンドを含む細胞外ドメインと、膜貫通領域と、細胞内シグナル伝達ドメインとで構成されている、「ゼータカイン（zetakine）」が記載されている。ゼータカインは、Tリンパ球の表面で発現されたとき、受容体（この受容体に対して可溶性受容体リガンドが特異的である）を発現する特定の細胞にT細胞活性を指向させる。

【0240】

CARのさらなる特徴は、University of Texasに帰属され、Lawrence Cooperという共通の発明者を有する、2つのPCT公開公報において開示されているもののいずれかを含み得る。PCT公開番号WO2009/091826には、細胞内シグナル伝達ドメインと、膜貫通ドメインと、ヒトCD19結合領域を含む細胞外ドメインとを含む、ヒトCD19特異的キメラT細胞受容体（またはキメラ抗原受容体、CAR）ポリペプチド（hCD19CARと名付けられた）を含む組成物が記載されている。別の態様では、CD19結合領域は、Fab'2、Fab'、Fab、FvまたはscFvである。細胞内ドメインは、ヒトCD3の細胞内シグナル伝達ドメインを含むことができ、ヒトCD28細胞内セグメントをさらに含むことができる。ある特定の態様では、膜貫通ドメインはCD28膜貫通ドメインである。PCT公開番号WO2013/074916には、T細胞受容体および/またはHLAの発現を消失させよう遺伝子修飾されたCAR⁺T細胞を利用する免疫療法のための方法および組成物が記載されている。特定の実施形態では、T細胞受容体ネガティブおよび/またはHLAネガティブT細胞が、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用して生成される。同種異系健常ドナーからのCAR⁺T細胞は、移植片対宿主疾患（GVHD）を引き起こすことなく、任意の患者に投与することができ、がん、自己免疫および感染などの医学的状態の既成の処置のための万能試薬として作用する。

【0241】

アメリカ合衆国保健福祉省（U.S. Department of Health and Human Services）に帰属されたPCT公開WO2011/041093には、KDR-1121またはDC101

10

20

30

40

50

抗体の抗原結合ドメインと、細胞外ヒンジドメインと、T細胞受容体膜貫通ドメインと、細胞内T細胞受容体シグナル伝達ドメインとを含む抗血管内皮増殖因子受容体-2キメラ抗原受容体、およびがんの処置におけるそれらの使用が記載されている。

【0242】

PCT公開WO2012/079000およびWO2013/040557（これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）は、University of Pennsylvaniaに帰属され、Carl H. Juneという共通の発明者を共有するものであり、これらの公開公報には、抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、共刺激シグナル伝達領域と、CD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含むCAR、およびRNA CARがトランスフェクトされたT細胞を生成する方法が、それぞれ記載されている。10

【0243】

同じく、University of Pennsylvaniaに帰属され、Carl H. Juneという共通の発明者を共有する、PCT公開WO2013/126712には、リガンド非依存性でありかつ外因性サイトカインまたはフィーダー細胞の添加に依存しない培養で長期指數関数的拡大を示すT細胞の存続集団を生成するための、がんの処置に有用である組成物および方法が記載されている。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗cMet結合ドメインである。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗メソテリン結合ドメインである。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗CD19結合ドメインである。ヒンジドメインは、IgG4であり、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメインである。一部の実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、CD28シグナル伝達領域である。キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列を含むベクターであって、CARが、抗原結合ドメインと、ヒンジドメインと、膜貫通ドメインと、共刺激シグナル伝達ドメインと、CD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含む、ベクターも、提供される。20

【0244】

University of Pennsylvaniaに帰属されたPCT公開WO2014/039513には、細胞の細胞傷害活性を増強するための細胞内の1つまたは複数のジアシリグリセロールキナーゼ（DGK）アイソフォームを阻害するための組成物および方法が記載されている。細胞を養子T細胞移入に使用することができ、その細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように修飾されている。養子T細胞移入に使用されるT細胞中のDGKの阻害は、T細胞の細胞傷害活性を増大させ、それ故、がん、感染および免疫障害をはじめとする様々な状態の処置に使用され得る。30

【0245】

University of Pennsylvaniaに帰属されたPCT公開WO2014/055771には、卵巣がんを処置するための組成物および方法が記載されている。具体的には、この発明は、卵巣がんを処置するための、アルファ-葉酸受容体（FR-アルファ）結合ドメインとCD27共刺激ドメインとを有する遺伝子修飾T細胞の投与に関する。一実施形態では、FR-アルファ結合ドメインは、完全ヒトであり、それによって宿主免疫応答が防止されると述べられている。40

【0246】

一部の実施形態では、本発明のCARを、腫瘍を標的化するように改変することができる。そのようなCARは、1つまたは複数のTACAに対する特異性を有し得る。一部の場合には、これらのCARのエクトドメインは、本明細書で提示される1つもしくは複数の抗体可変ドメイン、またはその断片を含み得る。一部の実施形態では、本発明のCARは、T細胞で発現され、これらの細胞は、本明細書において「CAR改変T細胞」または「CAR-T」と呼ばれる。本明細書で提示される1つまたは複数の抗体可変ドメインを有するCARエクトドメインを用いて、CAR-Tを改変することができる。

多重特異性抗体

【0247】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本発明の抗体は、1つより多くのエピトープに結合することができる。本明細書で使用される場合、用語「マルティボディ」または「多重特異性抗体」は、2つまたはそれより多くの可変領域が異なるエピトープと結合する、抗体を指す。エピトープは、同じ標的上にあってもよく、または異なる標的上にあってもよい。ある特定の実施形態では、多重特異性抗体は、同じまたは異なる抗原上の2つの異なるエピトープを認識する「二重特異性抗体」である。

二重特異性抗体

【0248】

二重特異性抗体は、2つの異なる抗原に結合することができる。そのような抗体は、少なくとも2つの異なる抗体からの抗原結合領域を通常は含む。例えは、二重特異性モノクローナル抗体（BsMAb、BsAb）は、2つの異なるモノクローナル抗体の断片で構成されている人工タンパク質であり、それ故、BsAbは、2つの異なるタイプの抗原と結合することができる。この技術の1つの一般的な応用は、がん免疫療法においてであり、この場合、BsMAbは、細胞傷害性細胞（CD3のような受容体を使用する）、および破壊すべき腫瘍細胞のような標的と、同時に結合するように改変される。

10

【0249】

二重特異性抗体は、Riethmuller, G.、2012年、*Cancer Immunity*、12巻：12～18頁、Marvin, J.S.ら、2005年、*Acta Pharmacologica Sinica*、26巻（6号）：649～58頁、およびSchaefer, W.ら、2011年、*PNAS*、108巻（27号）：11187～92頁に記載されているもののいずれかを含むことができ、これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0250】

「三機能性二重特異性」抗体と呼ばれるBsMAbの新世代が、開発されている。これらは、2つの異なる抗体から1本ずつの、2本の重鎖と2本の軽鎖からなり、2つのFab領域（アーム）が2つの抗原に対して指向され、Fc領域（フット）が、2本の重鎖を含み、第3の結合部位を形成する。

20

【0251】

二重特異性抗体の可変ドメインの頂部を形成する2つのパラトープのうち、一方を標的抗原に対して、および他方をCD3のようなTリンパ球抗原に対して指向させることができる。三機能性抗体の場合、Fc領域は、マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞または樹状細胞のような、Fc受容体を発現する細胞とさらに結合することができる。要するに、被標的細胞は、免疫系の1つまたは2つの細胞に接続され、その後、そのまたはそれらの免疫系細胞によって破壊される。

30

【0252】

他のタイプの二重特異性抗体は、サイトカイン遊離に起因する短い半減期、免疫原性および副作用などの、ある特定の問題を克服するために設計されている。それらの抗体は、Fab領域のみからなる化学的に連結されたFabと、様々なタイプの二価および三価単鎖可変断片（scFv）とを含む（2つの抗体の可変ドメインを模倣する融合タンパク質）。これらのより新しい形式のうち最も進歩した形式は、Fcab抗原結合断片をFc定常領域の代わりに含有するように改変された抗体である、二重特異性T細胞誘導抗体（B1TE）およびmAb2である。

40

【0253】

二重特異性单鎖抗体Fv断片（Bs-scFv）は、がん細胞を死滅させるための使用に成功した。一部のヒトがんは、p53の機能的欠陥により引き起こされ、これらの欠陥は、野生型p53での遺伝子治療により回復される。Weisbartらは、生存結腸がん細胞に侵入し、細胞内p53に結合し、その野生型機能を標的とし、回復させる、二重特異性单鎖抗体の構築および発現を記載している（Weisbartら、Int. J. Oncol.、2004年10月；25巻（4号）：1113～8頁；およびWeisbartら、Int. J. Oncol.、2004年12月；25巻（6号）：1867～73頁）。これらの研究では、二重特異性单鎖抗体Fv断片（Bs-scFv）は、（i）生存細胞に侵入して核内に局在するmAb

50

b 3 E 10 の单鎖 Fv 断片、および (idi) p53 の C 末端に結合する非侵入抗体である mAb PAb421 の单鎖 Fv 断片から構築された。PAb421 結合は、SW480 ヒト結腸がん細胞のものを含む、一部の p53 突然変異体の野生型機能を回復させる。Bs-scFv は、SW480 細胞に侵入し、細胞傷害性であり、これは、突然変異体 p53 に対する活性を回復させることができることを示唆した。COS-7 細胞（野生型 p53 を有するサル腎細胞）は、PAb421 の p53 との結合を阻害する SV40 ラージ T 抗原の存在のため PAb421 に無応答性であるので、対照として役立った。Bs-scFv は、細胞傷害性ではないが、COS-7 細胞に侵入することによって p53 への結合に無関係の Bs-scFv の非特異的毒性を消失させた。単独での Fv 断片は、細胞傷害性でなく、これは、死滅が、p53 の形質導入に起因することを示した。PAb421

10

VH の CDR1 における单一突然変異は、Bs-scFv の p53 との結合を消失させ、細胞内侵入を変更させることなく SW480 細胞に対する細胞傷害性を抑止し、これらのことにより、細胞傷害性のための p53 への PAb421 結合の必要性がさらに裏付けられた (Weisbartら、Int. J. Oncol.、2004年10月；25巻(4号)：1113～8頁；および Weisbartら、Int. J. Oncol.、2004年12月；25巻(6号)：1867～73頁)。

【0254】

一部の実施形態では、本発明の抗体は、ダイアボディであり得る。ダイアボディは、機能性二重特異性单鎖抗体 (bscAb) である。これらの二価抗原結合分子は、scFv の非共有結合性二量体で構成され、組換え法を使用して哺乳動物細胞において産生させることができる（例えば、Mackら、Proc. Natl. Acad. Sci.、92巻：7021～7025頁、1995年を参照されたい）。臨床開発に入ったダイアボディは、ごく少数である。抗CEAキメラ抗体 cT84.66 のヨウ素123 標識ダイアボディバージョンが、Beckman Research Institute of the City of Hope の資金提供を受けた研究 (Clinical trials.gov NCT00647153) で結腸直腸がんの術前免疫シンチグラフィー検出のために評価された (Nelson, A. L.、MAbs、2010年、1月～2月；2巻(1号)：77～83頁)。

20

【0255】

分子遺伝学を使用して、2つのscFv をタンデムに改変して、リンクードメインにより隔てられた単一のポリペプチドにすることができる、このポリペプチドは、「タンデムscFv」(tascFv) と呼ばれる。tascFv は、細菌において産生されたとき難溶性であり、リフォールディングを必要とすること、またはそれらを哺乳動物細胞培養系で製造することができ、これにより、リフォールディングの必要を回避することができるが、結果的に収率不良となり得ることが、判明した。2つの異なるscFvについての遺伝子を有する tascFv の構築は、「二重特異性单鎖可変断片」(bis-scFv) を生じさせる。tascFv は、2つだけだが、民間企業により臨床開発されており、両方とも、Micromet による進行中の初期段階開発にある腫瘍学的適応症のための二重特異性薬剤であり、「二重特異性 T 細胞誘導抗体 (BiTE)」と記載されている。ブリナツモマブは、第2相にある B 細胞非ホジキンリンパ腫に対する T 細胞応答を強化する抗 CD19 / 抗 CD3 二重特異性 tascFv である。MT110 は、第1相にある 固形腫瘍に対する T 細胞応答を強化する抗 EP-CAM / 抗 CD3 二重特異性 tascFv である。二重特異性四価「TandAb」も、Affimed により研究されている (Nelson, A. L.、MAbs、2010年、1月～2月；2巻(1号)：77～83頁)。

30

【0256】

IgG のマキシボディ (Fc (CH2 - CH3 ドメイン) のアミノ末端に融合された二価 scFv) も、含まれる。

【0257】

二重特異性 T 細胞誘導 (BiTE) 抗体は、選択された標的細胞の溶解のために細胞傷害性 T 細胞と一時的に会合するように設計される。これらの抗体は、通常は、2つのscFv (T 細胞上の CD3 と結合するものと、破壊の標的となる細胞の表面の標的抗原と結

40

50

合するもの)を含む。一部の実施形態では、2つのscFvは、リンカーにより繋がれている。他の実施形態では、2つのscFvは、抗体上の異なる領域である。BiTE抗体の臨床活性は、ex vivoで拡大された自己T細胞であって、腫瘍組織が由来の、または特定のT細胞受容体がトランスフェクトされた、自己T細胞が、固形腫瘍の処置において治療可能性を示したという所見を裏付ける。これらの個人向けアプローチは、単独でのT細胞がかなりの治療活性を末期がんの場合でも有し得ることを証明するが、これらのアプローチを幅広く実施するのは厄介である。これは、腫瘍特異的T細胞クローニングの生成を助長する細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)抗体については異なり、がん細胞溶解のために患者のT細胞の大部分と直接会合する二重および三重特異性抗体についても異なる。T細胞誘導抗体によるヒトがん治療への全体的T細胞関与の可能性が活発に調査されている(Baeuerle PAら、Current Opinion in Molecular Therapeutics、2009年、11巻(1号):22~30頁、ならびにBaeuerle PAおよびReinhardt C、Cancer Res.、2009年、69巻(12号):4941~4頁、これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

10

【0258】

第三世代分子は、「小型化」抗体を含む。mAb小型化の最もよい例の1つは、Trubion Pharmaceuticalsからの小モジュラー免疫薬(SMIP)である。一価または二価であり得るこれらの分子は、1つのV_Lと、1つのV_H抗原結合ドメインと、1つまたは2つの定常「エフェクター」ドメインとを含有し、これらドメインすべてがリンカードメインにより接続されている、組換え单鎖分子である。おそらく、このような分子は、定常ドメインにより付与される免疫エフェクター機能を保持しながら、断片によって得られる組織または腫瘍侵入増加の利点をもたらし得る。少なくとも3つの「小型化」SMIPが臨床開発段階に入っている。Wyethと共同で開発された抗CD20 SMIPであるTRU-015は、最先端プロジェクトであり、関節リウマチ(RA)については第2相に進んでいる。全身性エリテマトーデス(erythrematosus)(SLE)およびB細胞リンパ腫に関する初期の試みは、結局中断された。TrubionおよびFacet Biotechnologyは、CLLおよび他のリンパ系新生物の処置のための抗CD37 SMIPであるTRU-016の開発を共同で進めており、このプロジェクトは第2相に達している。Wyethは、RA、SLEおよびことによると多発性硬化症を含む自己免疫疾患の処置のための抗CD20 SMIP SBI-087のライセンスを得たが、これらのプロジェクトは、臨床試験の最初期段階にとどまっている(Nelson, A.L.、MAbs、2010年、1月~2月；2巻(1号):77~83頁)。

20

【0259】

Gennmabは、ヒンジ領域がIgG4分子から除去された、彼らの「ユニボディ(unibody)」技術の応用を研究中である。IgG4分子は、不安定であり、軽鎖-重鎖ヘテロ二量体を互いに交換することができる一方で、ヒンジ領域の欠失が、重鎖-重鎖対合を完全に妨げ、その結果、非常に特異的な一価軽鎖/重鎖ヘテロ二量体となるが、Fc領域を保持してin vivo安定性および半減期延長を確保する。このような形状は、IgG4がFcRと相互作用しにくく、一価ユニボディが細胞内シグナル伝達複合体の形成を促進できないので、免疫活性化または発癌性増殖のリスクを最小にできる。しかし、これらの主張は、大部分が、臨床的証拠ではなく実験室レベルでの証拠によって裏付けられている。Biotech nolもまた、「コンパクト化された」100kDa抗HER2抗体である、「小型化」mAbであるCAB051を前臨床研究で開発中である(Nelson, A.L.、MAbs、2010年、1月~2月；2巻(1号):77~83頁)。

30

【0260】

单一抗原結合ドメインで構成される組換え治療剤も開発されているが、これらは、現在、臨床パイプラインの4%を占めるに過ぎない。これらの分子は、極めて小さく、分子量は、フルサイズのmAbについて観察される分子量のおおよそ10分の1である。AranaおよびDomantisは、ヒト免疫グロブリン軽鎖または重鎖の抗原結合ドメインで構成される分子を改変しているが、Aranaのみが、乾癬および関節リウマチの処置

40

50

のための第2相研究における臨床試験での候補である、抗TNF分子であるART-621を有する。Ab1y_nxは、ラクダおよびラマに見られる重鎖抗体の抗原結合可変重鎖領域(V_{HH})に由来する、軽鎖のない、「ナノボディ」を生産している。2つのAb1y_nx抗フォンヴィルブランド因子ナノボディが臨床開発段階に進んでおり、これらは、急性冠症候群のために経皮的冠動脈形成術を受ける患者の血栓症を予防するための静脈治療剤として第2相開発段階にあるALX-0081と、急性冠症候群を有する患者および血栓性血小板減少性紫斑病を有する患者両方を対象とした皮下投与のための第1相分子であるALX-0681とを含む(Nelson, A.L.、MAbs、2010年、1月～2月；2巻(1号)：77～83頁)。

多重特異性抗体の開発

10

【0261】

一部の実施形態では、本発明の抗体配列は、多重特異性抗体（例えば、二重特異性、三重特異性、またはそれより高い多重特異度のもの）を開発するために使用され得る。多重特異性抗体は、本発明の標的抗原の異なるエピトープに対して特異的であることもあり、または本発明の標的抗原に対しても、異種グリカン、ペプチドもしくは固体支持材料などの、異種エピトープに対しても、特異的であることもある。（例えば、WO 93/17715；WO 92/08802；WO 91/00360；WO 92/05793；Tutt, A.ら、Trispecific F(ab')₃ derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells、J. Immunol.、1991年7月1日；147巻(1号)：60～9頁；米国特許第4,474,893号、同第4,714,681号、同第4,925,648号、同第5,573,920号、同第5,601,819号；およびKostelny, S.A.ら、Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers、J. Immunol.、1992年3月1日；148巻(5号)：1547～53頁）；米国特許第5,932,448号を参照されたい。

20

【0262】

Memorial Sloan-Kettering Cancer CenterのPCT公開WO 2014144573において、二量体化能力のない多重特異性結合剤に比べて改善された性質を有する二量体多重特異性結合剤（例えば、抗体成分を含む融合タンパク質）を作製するための多量体化技術が、開示され、特許請求されている。

30

【0263】

Merck Patent GMBHのPCT公開WO 2014144357において、四価二重特異性抗体(Tet Bi Ab)、ならびにがんまたは免疫障害の診断のためのおよび処置のためのTet Bi Abの作製方法および使用方法が、開示され、特許請求されている。Tet Bi Abは、抗体のC末端に結合された第2の抗原特異性を有するFab断片の第2のペアを特徴とし、それ故、2つの抗原特異性の各々について二価である分子となる。この四価抗体は、共発現されるその同種Fab重鎖と会合しているFab軽鎖に抗体重鎖を共有結合で連結させることによる遺伝改変方法によって、生産される。

【0264】

IBC Pharmaceuticals, Inc.のPCT公開WO 2014028560において、T細胞抗原のための少なくとも1つの結合部位と疾患細胞または病原体上の抗原のための少なくとも1つの結合部位とを有する、疾患の処置のための、T細胞再指向性二重特異性抗体(bisAb)が、開示され、特許請求されている。好ましくは、このbisAbは、抗CD3×抗CD19二重特異性抗体であるが、他のT細胞抗原および/または疾患関連抗原に対する抗体を使用してもよい。この複合体は、がん、自己免疫疾患または炎症疾患などの疾患に関連する細胞のT細胞媒介性細胞傷害を誘導するために、エフェクターT細胞を標的化することができる。細胞傷害性免疫応答は、インターフェロン-、インターフェロン-βγ、インターフェロン-1、インターフェロン-2またはインターフェロン-3を含む、インターフェロンに基づく薬剤の併用投与によって増強される。

40

【0265】

50

Synimmune GMBHのPCT公開WO2013092001において、二重特異性抗体分子、ならびにその產生方法、その使用、および二重特異性抗体分子をコードする核酸分子が、開示され、特許請求されている。特に、免疫細胞の標的細胞限定活性化を媒介することができる抗体分子が提供されている。

【0266】

PCT公開WO2012007167において、腫瘍細胞の表面の少なくともグリコエピトープおよびerbBクラス受容体と特異的に結合し、それによってグリコエピトープと受容体を架橋させる多重特異性モジュラー抗体であって、NK細胞に依存せずに細胞溶解を果たすアポトーシス活性を有する抗体が、開示され、特許請求されている。

【0267】

PCT公開WO2012048332およびWO2013055404において、メディトープ、メディトープ結合抗体、メディトープ送達システム、ならびにメディトープについてのモノクローナル抗体フレームワーク結合面、およびそれらの使用方法が、開示され、特許請求されている。具体的には、2つの抗体結合ペプチドであるC-QFDLSTRRRLK-C（「cQFD」；前記公開公報における配列識別番号1；本明細書における配列番号17）およびC-QYNLSSRALK-C（「cQYN」；前記公開公報における配列識別番号2；本明細書における配列番号18）は、新規mAb結合性を有することが示された。「メディトープ」とも呼ばれるcQFDおよびcQYNは、抗EGFR mAbであるセツキシマブのFabフレームワーク領域と結合し、抗原に結合する相補性決定領域（CDR）とは結合しないことが、示された。Fabフレームワーク上の結合領域は、他のフレームワーク結合抗原、例えば、スーパー抗原StaphylococcalプロテインA（SpA）（Graillieら、2000年）およびPeptostreptococcus magnusプロテインL（PpL）（Graillieら、2001年）と異なる。したがって、開示されている1つの実施形態は、環式メディトープに結合する特有のネズミ科動物・ヒト抗体またはその機能性断片のフレームワーク領域を含む、フレームワーク結合面である。

【0268】

目的の例示的な特許および特許公開公報は、以下のものである：米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号および同第5,693,762号（すべて1995年6月7日出願）ならびに米国特許第6,180,370号は、すべて、Protein Design Labs, Inc.に帰属されており、これらには、1つまたは複数の相補性決定領域（CDR）と、ことによると、ドナー免疫グロブリンからの追加のアミノ酸および受容するヒト免疫グロブリンからのフレームワーク領域とを有するヒト化免疫グロブリンの產生方法および組成物が記載されている。各ヒト化免疫グロブリン鎖は、例えば、結合親和性に影響を及ぼすようにCDRと相互作用することができる、ドナー免疫グロブリンフレームワークからのアミノ酸、例えば、ドナー免疫グロブリン内のCDRに直接隣接している1つもしくは複数のアミノ酸、または分子モデリングにより予測して約3以内の1つもしくは複数のアミノ酸を、CDRに加えて通常は含むと、述べられている。様々な位置基準のいずれか1つまたはすべてを使用することにより重鎖および軽鎖を各々設計することができる。組み合わせてインタクト抗体にされたとき、この発明のヒト化免疫グロブリンは、ヒトにおいて実質的に非免疫源性であり、エピトープを含有するタンパク質または他の化合物などの抗原に対してドナー免疫グロブリンと実質的に同じ親和性を保持する、と述べられている。

【0269】

Universite Catholique De LouvainおよびBioTransplant, Inc.に帰属された米国特許第5,951,983号には、Tリンパ球に対するヒト化抗体が記載されている。HUM5400（EMBL受託X55400）と名付けられたヒトVカッパ遺伝子からのフレームワーク領域、およびヒト抗体クローンAmu5-3（GenBank受託番号U00562）からのフレームワーク領域が、前記特許文献に示されている。

10

20

30

30

40

50

【0270】

Creative Biomolecules, Inc. の米国特許第 5,091,513 号には、予め選択された抗原に対して親和性を有する合成タンパク質のファミリーが記載されている。タンパク質は、生合成抗体結合部位 (BABS) として挙動する領域を構成するアミノ酸の 1 つまたは複数の配列によって特徴付けられる。これらの部位は、1) 非共有結合的に会合しているもしくはジスルフィド結合されている合成 V_H および V_L 二量体、2) V_H および V_L がポリペプチドリンカーにより結合されている $V_H - V_L$ もしくは $V_L - V_H$ 単鎖、または 3) 個々の V_H もしくは V_L ドメインを含む。結合ドメインは、別々の免疫グロブリンに由来し得る、連結された CDR および FR 領域を含む。タンパク質は、例えば、酵素、毒素、結合部位、または固定化媒体もしくは放射性原子への結合部位として機能する、他のポリペプチド配列も含み得る。タンパク質を產生するための、抗体の *in vivo* 生成により惹起され得る任意の特異性を有する BABS を設計するための、およびその類似体を产生するための方法が、開示されている。

【0271】

Alcon Biomedical Research Unit, LLC の ESBATech の米国特許第 8,399,625 号には、抗体アクセプターフレームワーク、および特によく適している抗体アクセプターフレームワークを使用して非ヒト抗体、例えばウサギ抗体をグラフトする方法が、記載されている。

イントラボディ

【0272】

一部の実施形態では、本発明の抗体は、イントラボディであり得る。イントラボディは、それが産生される細胞から分泌されず、その代わりに 1 つまたは複数の細胞内タンパク質を標的とする、抗体の形態である。イントラボディは、細胞内に発現され、細胞内で機能し、イントラボディを使用して、細胞内輸送、転写、翻訳、代謝プロセス、増殖シグナル伝達および細胞分裂を含むがこれらに限定されない、多数の細胞プロセスに影響を与えることができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、イントラボディに基づく治療を含む。一部のそのような実施形態では、本明細書で開示される可変ドメイン配列および / または CDR 配列は、イントラボディに基づく治療のために 1 つまたは複数の構築物に組み込まれる。例えば、イントラボディは、1 つもしくは複数の糖化細胞内タンパク質を標的とすることができる、または 1 つもしくは複数の糖化細胞内タンパク質と代替タンパク質との相互作用をモジュレートすることができる。

【0273】

20 年よりもっと昔に、細胞内標的に対する細胞内抗体が初めて記載された (Biocca、Neuberger および Cattaneo、EMBO J、9 卷：101～108 頁、1990 年)。哺乳動物細胞の異なるコンパートメントにおけるイントラボディの細胞内発現によって、内在性分子の機能の遮断またはモジュレーションが可能になる (Biocca ら、EMBO J、9 卷：101～108 頁、1990 年；Colby ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、101 卷：17616～21 頁、2004 年)。イントラボディは、タンパク質フォールディング、タンパク質 - タンパク質、タンパク質 - DNA、タンパク質 - RNA 相互作用およびタンパク質修飾を変更させることができる。イントラボディは、表現型ノックアウトを誘導することができ、標的抗原との直接結合により、その細胞内輸送を方向転換することにより、またはその結合パートナーとの会合を阻害することにより、中和剤として機能することができる。イントラボディは、主として研究ツールとして利用されてきたが、ウイルス性病態、がんおよびミスフォーディング疾患のような、ヒト疾患の処置のための治療用分子として浮上している。組換え抗体の急成長バイオ市場は、より低い免疫性に加えて向上された結合特異性、安定性および可溶性を有するイントラボディを、治療におけるそれらの使用のために提供している (Biocca、Antibody Expression and ProductionCell Engineering、第 7 卷の抄録、2011 年、179～195 頁)。

【0274】

一部の実施形態では、イントラボディは、干渉 RNA (iRNA) より有利であり、例

10

20

30

40

50

えば、iRNAは、複数の非特異的効果を発揮することが示されているが、イントラボディは、標的抗原に対する高い特異性および親和性を有することが示されている。さらに、タンパク質として、イントラボディは、iRNAよりはるかに長い活性半減期を有する。したがって、細胞内標的分子の活性半減期が長い場合、iRNAによる遺伝子サイレンシングは、効果を生じさせるのに時間がかかり得るが、イントラボディ発現の効果は、ほぼ即座であり得る。最後に、他のものを温存しつつ、特定の標的分子のある特定の結合相互作用を遮断するように、イントラボディを設計することができる。

イントラボディの開発

【0275】

イントラボディは、多くの場合、組換え核酸分子から発現される单鎖可変断片(scfv)であり、細胞内に保持される(例えば、細胞質、小胞体または周辺質に保持される)ように改変される。イントラボディを使用して、例えば、イントラボディが結合するタンパク質の機能を除去することができる。イントラボディの発現を、イントラボディを含む核酸発現ベクターにおける誘導性プロモーターの使用によって、調節することもできる。イントラボディは、当技術分野において公知の方法、例えば、下記文献において開示され、概説されている方法を使用して、產生させることができる:(Marascoら、1993年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：7889～7893頁、Chenら、1994年、Hum. Gene Ther.、5巻：595～601頁、Chenら、1994年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91巻：5932～5936頁；Maciejewskiら、1995年、Nature Med.、1巻：667～673頁；Marasco、1995年、Immunotech、1巻：1～19頁；Mhashilkarら、1995年、EMBO J.、14巻：1542～51頁；Chenら、1996年、Hum. Gene Therap.、7巻：1515～1525頁；Marasco、Gene Ther.、4巻：11～15頁、1997年；RondonおよびMarasco、1997年、Annu. Rev. Microbiol.、51巻：257～283頁；Cohenら、1998年、Oncogene、17巻：2445～56頁；Probalら、1998年、J. Mol. Biol.、275巻：245～253頁；Cohenら、1998年、Oncogene、17巻：2445～2456頁；Hassanzadehら、1998年、FEBS Lett.、437巻：81～6頁；Richardsonら、1998年、Gene Ther.、5巻：635～44頁；OhageおよびSteipe、1999年、J. Mol. Biol.、291巻：1119～1128頁；Ohageら、1999年、J. Mol. Biol.、291巻：1129～1134頁；WirtzおよびSteipe、1999年、Protein Sci.、8巻：2245～2250頁；Zhuら、1999年、J. Immunol. Methods、231巻：207～222頁；Arafatら、2000年、Cancer Gene Ther.、7巻：1250～6頁；der Maurら、2002年、J. Biol. Chem.、277巻：45075～85頁；Mhashilkarら、2002年、Gene Ther.、9巻：307～19頁；およびWheelerら、2003年、FASEB J.、17巻：1733～5頁；ならびにこれらの文献に引用されている参考文献)。特に、CCR5イントラボディは、Steinbergerら、2000年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97巻：805～810頁)によって產生された。一般には、Marasco, WA、1998年、「Intrabodies: Basic Research and Clinical Gene Therapy Applications」、Springer : New Yorkを参照されたく、scfvの概説については、「The Pharmacology of Monoclonal Antibodies」、1994年、第113巻、RosenburgおよびMoore編、Springer-Verlag、New York、269～315頁におけるPluckthunを参照されたい。

【0276】

一部の実施形態では、抗体配列は、イントラボディを開発するために使用される。イントラボディは、細胞内に、單一ドメイン断片、例えば、単離されたVHおよびVLドメインとして、または单鎖可变断片(scfv)抗体として、組換え発現されることが多い。例えば、イントラボディは、可動性リンカーポリペプチドにより繋がれた重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとを含む单鎖抗体を形成するために、单一ポリペプチドとして発現されることが多い。イントラボディは、通常は、ジスルフィド結合を欠いており、それらの特異的結合活性によって標的遺伝子の発現または活性をモジュレートすることができる。单鎖抗体を、軽鎖定常領域に繋がれた单鎖可变領域の断片として、発現させることもで

10

20

30

40

50

きる。

【0277】

当技術分野において公知であるように、イントラボディを、そのNまたはC末端に細胞内輸送シグナルをコードする組換えポリヌクレオチドベクターに改変導入して、標的タンパク質が位置する細胞下コンパートメントにおける高濃度での発現を可能にことができる。例えば、小胞体(ER)に標的化されるイントラボディは、リーダーペプチドと、必要に応じてC末端ER保留シグナル、例えば、KDEL(配列番号23)アミノ酸モチーフとを組み込むように改変される。核内で活性を発揮するように意図されるイントラボディは、核内局在シグナルを含むように改変される。イントラボディを原形質膜のサイトゾル側に繋留するために、脂質部分構造が、イントラボディに繋がれる。イントラボディを、サイトゾルにおいて機能を発揮するように標的化することもできる。例えば、サイトゾルイントラボディは、サイトゾル内に因子を隔離することによってそれらの因子がそれらの天然の細胞内目的地に輸送されないようにするために使用される。10

【0278】

イントラボディの発現には、ある特定の技術的困難が伴う。特に、細胞内で新たに合成されたイントラボディのタンパク質立体構造フォールディングおよび構造安定性は、細胞内環境の還元条件による影響を受ける。ヒトの臨床治療には、細胞内でイントラボディの発現を達成するために使用されるトランスフェクトされた組換えDNAの適用をめぐる安定性の懸念がある。遺伝子操作に一般に使用される、ウイルスに基づく様々なベクターは、特に懸念される。したがって、このような問題を回避するための1つのアプローチは、scFv抗体にタンパク質形質導入ドメイン(PTD)を融合させて「細胞透過性」抗体または「トランスポボディ」を作出するアプローチである。トランスポボディは、タンパク質の形質導入ドメイン(PTD)が単鎖可変断片(scFv)抗体と融合されている細胞透過性抗体である(HengおよびCao、2005年、MedHypotheses、64巻：1105～8頁)。20

【0279】

標的遺伝子との相互作用に基づいて、イントラボディは、標的タンパク質機能をモジュレートし、ならびに/または標的タンパク質分解の加速および非生理的細胞下コンパートメント内への標的タンパク質の隔離などの機構により表現型の/機能のノックアウトを達成する。イントラボディにより媒介される遺伝子不活性化の他の機構、例えば、標的タンパク質上の触媒部位との結合、またはタンパク質-タンパク質、タンパク質-DNAもしくはタンパク質-RNA相互作用に関するエピトープとの結合は、イントラボディが指向されるエピトープに依存し得る。30

【0280】

一実施形態では、イントラボディは、核内に標的を捕捉することによって核内でその活性を防止するために使用される。核標的化シグナルは、所望の標的化を達成するために、そのようなイントラボディに改変導入される。そのようなイントラボディは、特定の標的ドメインと特異的に結合するように設計される。別の実施形態では、標的タンパク質と特異的に結合するサイトゾルイントラボディは、標的が核に到達することによって標的が核内でいかなる生物活性も発揮できないようにする(例えば、標的が他の因子と転写複合体を形成するのを防止する)ために使用される。40

【0281】

そのようなイントラボディの発現を特定の細胞に特異的に指向させるため、イントラボディの転写は、適切な腫瘍特異的プロモーターおよび/またはエンハンサーの調節性制御下に置かれる。イントラボディの発現を特異的に前立腺に標的化するために、例えば、PSAプロモーターおよび/またはプロモーター/エンハンサーを利用することができる(例えば、1999年7月6日に発行された米国特許第5,919,652号を参照されたい)。

【0282】

タンパク質の形質導入ドメイン(PTD)は、タンパク質が、非定型の分泌および内在

10

20

30

40

50

化経路によって、細胞膜を横断して転位してサイトゾル内に内在化されることを可能にする、短いペプチド配列である。細胞内に発現される従来のイントラボディに勝る多数の異なる利点を「トランスボディ」は有する。まず、「正しい」立体構造フォールディングおよびジスルフィド結合形成が、標的細胞内への導入前に起こり得る。より重要なこととして、細胞透過性抗体または「トランスボディ」の使用によって、細胞内でのイントラボディの発現が求められるヒト臨床治療への組換えDNA技術の直接応用をめぐる圧倒的な安全性および倫理上の懸念が回避されることになる。細胞内に導入された「トランスボディ」は、限られた活性半減期しか有さず、いかなる永久的遺伝的変更ももたらさない。これは、ヒト臨床療法へのトランスボディの応用に関するあらゆる安全性の懸念を和らげる事になる(HengおよびCao、2005年、MedHypotheses、64巻：1105～8頁)。

10

【0283】

イントラボディは、病的アイソフォームをはじめとするタンパク質の異なる立体構造を特異的に認識するそれらの事実上無限の能力のため、およびそれらを可能性のある凝集部位(細胞内部位と細胞外部位の両方)に標的化することができるため、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病およびプリオントン疾患を含む、ミスフォールディング疾患の処置の有望な治療剤である。これらの分子は、アミロイド形成タンパク質の凝集を防止することによりアミロイド形成タンパク質に対する中和剤として、および/またはタンパク質をその潜在的凝集部位から経路変更することにより細胞内輸送の分子シャンター(molecular shunter)として、機能することができる(Cardinale、およびBiocca、Curr. Mol. Med.、2008年、8巻：2～11頁)。

20

【0284】

細胞内抗体またはイントラボディを記載している例示的な特許公開公報は、以下に示すものであり、それらの各々は、その全体が参照により組み入れられる。

【0285】

Cattaneoらに与えられたPCT公開WO03014960および米国特許第7,608,453号には、細胞内抗体(ICS)の少なくとも1つのコンセンサス配列を同定する細胞内抗体捕捉技術方法であって、検証された細胞内抗体の配列を含むデータベース(VIDAデータベース)を構築し、検証された細胞内抗体の配列をKabatに従ってアラインするステップ；アラインされた抗体の位置の各々に特定のアミノ酸が出現する出現頻度を決定するステップ；70%～100%の範囲の出現頻度閾値(LPまたはコンセンサス閾値)を選択するステップ；特定のアミノ酸の出現頻度がLP値より大きいかまたはLP値に等しいアラインメントの位置を同定するステップ；および前記アラインメントの位置において最も出現頻度が高いアミノ酸を同定するステップを含む方法が、記載されている。

30

【0286】

PCT公開WO0054057、WO03077945、WO2004046185、WO2004046186、WO2004046187、WO2004046188、WO2004046189、米国特許出願公開第2005272107号、同第2005276800号、同第2005288492号、同第2010143939号、付与された米国特許第7,569,390号および同第7,897,347号ならびに付与された欧州特許EP1560853およびEP1166121(すべて、Medical Research Councilに帰属されており、発明者Cattaneoらを含む)には、細胞内細胞内単一ドメイン免疫グロブリン、および細胞内環境で標的と結合する免疫グロブリン単一ドメインの能力を判定する方法、ならびに細胞内抗体を生成する方法が、記載されている。

40

【0287】

Cattaneoが発明者として記名されている、S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superioreに帰属されたPCT公開WO0235237、米国特許出願公開第2003235850号および付与された欧州特許EP1328814には、細胞内抗原のエピトープのin vivoでの同定方法が記載さ

50

れている。

【0288】

Lay Line Genomics SPAに帰属された、Catteneoが発明者として記名されている、PCT公開WO2004046192および欧州特許EP1565558には、細胞内でのタンパク質リガンドxとタンパク質リガンドyとの相互作用を破壊および中和する細胞内抗体を単離する方法が記載されている。xとyとの相互作用ができる細胞内抗体を使用して、公知yリガンドと結合することができるタンパク質リガンドxを同定するための方法、および所与の細胞のタンパク質・タンパク質相互作用（インタラクトーム）の有意な割合に対する、または細胞内経路もしくはネットワークを構成するタンパク質相互作用に対する、一連の抗体断片の単離方法も、開示されている。10

【0289】

発明の名称が「Intrabody-mediated control of immune reactions」であり、Dana Farber Cancer Institute Inc. 発明者名MarascoおよびMhashilkarに帰属されている米国特許出願公開第2006034834およびPCT公開WO9914353は、例えば、細胞上の個々の免疫調節性受容体分子（IRM）もしくはIRMの複数のクラスを選択的に標的化することにより、免疫系の調節を変更する方法であって、細胞にIRMに対する細胞内発現抗体、すなわちイントラボディを形質導入することを含む方法に関する。好ましい実施形態では、イントラボディは、IRM、例えばMHC-1分子に対する单鎖抗体を含む。20

【0290】

Dana Farber Cancer Institute Inc. およびWhitehead Biomedical Instituteに帰属され、発明者Bradner、RahlおよびYoungが記名されているPCT公開WO2013033420には、プロモドメインタンパク質と免疫グロブリン（Ig）調節エレメントとの相互作用を阻害するのに有用である、およびIg遺伝子座との間で転座を起こす癌遺伝子の発現を下方調節するのに有用である、ならびにIg遺伝子座との間で転座を起こす癌遺伝子の発現増加によって特徴付けられるがん（例えば、血液学的悪性疾患）を処置するのに有用である方法および組成物が記載されている。イントラボディが一般的に記載されている。30

【0291】

University of Rochester Medical Centerに帰属され、発明の名称が「Methods of producing or identifying intrabodies in eukaryotic cells」であり、発明者Zauderer、WeiおよびSmithが記名されている、PCT公開WO02086096および米国特許出願公開第2003104402号には、三分子組換え法を使用する、真核細胞における細胞内免疫グロブリン分子および細胞内免疫グロブリンライブラリーの高効率発現方法が、記載されている。細胞内免疫グロブリン分子およびそれらの断片の選択およびスクリーニング方法、ならびに細胞内免疫グロブリン分子の产生、スクリーニングおよび選択用のキット、ならびにこれらの方法を使用して產生される細胞内免疫グロブリン分子および断片が、さらに提供されている。40

【0292】

Affinity Biosciences PTY LTDに帰属され、発明者Beasley、NivenおよびKiefeleが記名されている、PCT公開WO2013023251には、発現されたポリペプチドが高い安定性および可溶性を示す、抗体分子などのポリペプチド、およびそのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらのライブラリーが記載されている。特に、還元または細胞内環境で可溶性発現およびフォールディングを示す、対合したVLおよびVHドメインを含むポリペプチドが記載されており、ここでは、ヒトscFvライブラリーがスクリーニングされ、その結果、ヒト生殖系列配列と同一のフレームワーク領域を有し、scFv足場にグラフトされたCDR3の顕著な熱安定性および耐性も有する、可溶性scFv遺伝子が単離された。50

【0293】

Esbatech AGおよびUniversity of Zuerichに帰属され、発明者Ewert、Huber、HonningerおよびPlueckthunが記名されている、欧州特許出願EP2314622ならびにPCT公開WO03008451およびWO03097697には、ヒト可変ドメインの修飾が記載されており、非常に安定した可溶性の单鎖Fv(scFv)抗体断片の作出のためのフレームワークとして有用な組成物が提供されている。これらのフレームワークは、細胞内での性能のため選択されたものであり、したがって、安定性および可溶性が、抗体断片の性能、例えば、細胞の還元環境での抗体断片の性能の制限要因になる応用のためのscFv抗体断片またはscFv抗体ライブラリーの作出に理想的に適している。そのようなフレームワークは、可溶性および安定性向上を示す、高度に保存される残基およびコンセンサス配列を同定するために使用することもできる。

10

【0294】

発明の名称が「Systems devices and methods for intrabody targeted delivery and reloading of therapeutic agents」である、PCT公開WO02067849および米国特許出願公開第2004047891号には、イントラボディで標的化された分子送達のためのシステム、デバイスおよび方法が記載されている。より詳細には、一部の実施形態は、対象の組織領域への治療薬の、限局的に時宜を得た標的化送達を可能にする、再負荷可能な薬物送達システムに関する。

20

【0295】

Amgen Inc.に帰属され、発明者Zhou、ShenおよびMartinが記名されている、PCT公開WO2005063817および米国特許第7,884,054号には、イントラボディをはじめとする機能性抗体を同定する方法が記載されている。特に、ホモ二量体の各ポリペプチド鎖がFc領域、scFv、および細胞内局在配列を含む、ホモ二量体イントラボディが記載されている。細胞内局在配列は、イントラボディをERまたはゴルジに局在させることができる。必要に応じて、各ポリペプチド鎖は、1つより多くないscFvを含む。

【0296】

Permeon Biologics Inc.に帰属された、VogahnらによるPCT公開WO2013138795には、細胞内抗体および抗体様部分構造の送達のための細胞侵入組成物、ならびにそれら（本明細書では「AAM部分構造（複数）」または「AAM部分構造（単数）」と呼ばれる）を細胞内に送達するための方法が記載されている。理論に縛られないが、本開示は、AAM部分構造に、表面正電荷を有する細胞侵入ポリペプチド（本明細書では「Surf+侵入ポリペプチド」と呼ばれる）との複合体化により、AAM部分構造を細胞内に送達することができるという発見に、少なくとも一部は基づく。イントラフィリン（intraphilin）技術の一部の応用の例も提供されている。

30

【0297】

Pasteur Instituteに帰属されたPCT公開WO2010004432には、約50%が軽鎖を持たない抗体である、camelidae（ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマおよびアルパカ）からの免疫グロブリンが記載されている。これらの重鎖抗体は、VHH（複数可）、VHHドメイン（複数可）またはVHH抗体（複数可）と呼ばれる1つだけの单一可変ドメインにより、抗原と相互作用する。軽鎖の非存在にもかかわらず、これらのホモ二量体抗体は、それらの超可変領域を拡大することにより幅広い抗原結合レパートリーを示し、VHHドメインが細胞内標的に指向されている場合、in vitroではもちろんin vivoでもトランスポディおよび/またはイントラボディとして作用することができる。

40

【0298】

PCT公開WO2014106639には、細胞表現型を修飾することができるイントラボディを同定すること、およびイントラボディの直接または間接的細胞標的を同定する

50

ことにより、細胞表現型に関与する細胞標的を同定する方法が記載されている。特に、イントラボディ 3H2 - 1、3H2 - VH および 5H4 は、アレルギー刺激により誘発されるマスト細胞における脱颗粒反応を阻害することができ、さらに、イントラボディ 3H2 - 1 および 5H4 は、それぞれ、ABC F1 ファミリーおよび C120RF4 ファミリーのタンパク質を直接または間接的に標的化することができる。これらの ABC F1 および C120RF4 阻害剤は、治療において、特に、アレルギー状態および / または炎症性状態を処置するために有用であると述べられている。

【0299】

Urogensis Inc. に帰属された PCT 公開 WO 0140276 には、細胞内抗体（イントラボディ）を使用する STEAP（前立腺の 6 回膜貫通型上皮抗原）タンパク質の阻害の可能性が一般的に記載されている。10

【0300】

University of Manchester に帰属された PCT 公開 WO 02086505、ならびに発明者 Simon および Benton が記名されている米国特許出願公開第 2004115740 号には、イントラボディが好ましいと述べられている、標的分子の細胞内分析方法が記載されている。一実施形態では、CFP とカップリングされた抗 MUC1 イントラボディを発現することができるベクター（pScFv-ECFP と名付けられた）が記載されている。

【0301】

Gene Therapy Systems Inc. に帰属された PCT 公開 WO 03095641 および WO 0143778 には、細胞内タンパク質送達のための組成物および方法が記載されており、イントラボディが一般的に記載されている。20

【0302】

Selective Genetics Inc. に帰属された PCT 公開 WO 03086276 には、細胞内感染の処置のためのプラットフォーム技術が記載されている。この公開公報に記載されている組成物および方法は、感染に関連する細胞表面受容体 / 部分構造によって結合して内在化する連結されたリガンドを介して感染性細胞を標的化する非標的特異的ベクターを含む。ベクターは、標的細胞に内在化されると発現される外因性核酸配列を含む。ベクターと会合しているリガンドおよび核酸分子を変更して、異なる感染性因子を標的とするようにできる。加えて、本発明は、ベクターの内在化を指示することができ、かつウイルス侵入を遮断することができる、エピトープおよびリガンドを同定する方法を提供している。30

【0303】

Erasmus University に帰属された PCT 公開 WO 03062415 には、異種抗原ガラクトースである 1, 3 ガラクトースの産生の触媒を破壊する細胞内抗体をコードするポリヌクレオチド構築物、および / または PERV 粒子タンパク質などのレトロウイルスタンパク質と特異的に結合する細胞内抗体をコードするポリヌクレオチド構築物を含む、トランスジェニック生物が記載されている。トランスジェニック生物の細胞、組織および器官を異種移植に使用することができる。

【0304】

発明の名称が「Means for detecting protein conformation and applications thereof」である PCT 公開 WO 2004099775 には、立体構造タンパク質状態を特異的に検出するための立体構造特異的抗体としての scFv 断片の使用が記載されており、生存細胞 (living cells) において細胞内発現時に内在性タンパク質の挙動を追跡するセンサーとしての応用性があると述べられている。40

【0305】

Imclone Systems Inc. に帰属された PCT 公開 WO 2008070363 には、非受容体チロシンキナーゼの Tec ファミリーのメンバーである内皮および上皮チロシンキナーゼである、 Etk などの、細胞内タンパク質と、または細胞内タン

10

20

30

40

50

パク質の細胞内ドメインと結合する、單一ドメインイントラボディが記載されている。イントラボディまたはイントラボディを発現する核酸を投与することにより、患者における細胞内酵素を阻害して腫瘍を処置する方法も、提供されている。

【0306】

C o r n e l l R e s e a r c h F o u n d a t i o n I n c . に帰属されたPCT公開WO2009018438には、標的分子と結合するタンパク質をコードしており翻訳停滞配列とカップリングされているDNA分子を含む構築物を提供することによって、標的分子と結合し細胞内で機能するタンパク質を同定する方法が記載されている。宿主細胞を構築物で形質転換し、次いで、翻訳が停滞されたタンパク質と、このタンパク質をコードするmRNAと、リボソームとの複合体を宿主細胞内に形成するのに有効な条件下で培養する。複合体中のタンパク質は、正しくフォールディングされた活性形態であり、その複合体が細胞から回収される。この方法は、宿主細胞の代わりにリボソームを含有する無細胞抽出物調製物を用いて行うことができる。本発明は、標的分子と結合するタンパク質をコードするDNA分子と、このDNA分子とカップリングされているSecM翻訳停滞配列とを含む構築物にも関する。DNA分子およびSecM翻訳停滞配列は、これらのコードされたタンパク質の、細胞内での、正しくフォールディングされた活性形態での発現を可能にするために、これらの間に十分な距離をとってカップリングされている。イントラボディの使用が、一般的に記載されている。

10

【0307】

M o g a m B i o t e c h R e s e a r c h I n s t i t u t e に帰属されたPCT公開WO2014030780には、標的タンパク質および抗生物質耐性タンパク質がTatシグナル配列に連結されている遺伝子構築物を調製し、次いでE.coli内でこの構築物を発現させることによって、より高い可溶性および卓越した熱安定性を有する標的タンパク質、特に、ヒト生殖細胞由来する免疫グロブリン可変ドメイン（VHまたはVL）をスクリーニングするための、Tat会合タンパク質改変（Tat-associated protein engineering）（TAPe）と命名された方法が、記載されている。TAPe法によりスクリーニングされる、可溶性および卓越した熱安定性を有するヒトまたは改変VHおよびVLドメイン抗体ならびにヒトまたは改変VHおよびVLドメイン抗体足場も、開示されている。TAPe法によりスクリーニングされたヒトもしくは改変VHまたはVLドメイン抗体足場中のランダムCDR配列を含むライブラリー、その調製方法、そのライブラリーを使用することによりスクリーニングされた、標的タンパク質に対する結合能力を有するVHまたはVLドメイン抗体、およびそのドメイン抗体を含む医薬組成物も、提供されている。

20

30

【0308】

欧洲特許出願EP2422811には、細胞内エピトープと結合する抗体が記載されており、そのようなイントラボディは、抗原に特異的に結合することができる抗体の一部分であって、好ましくは、その分泌をコードする作動可能な配列を含有しない、したがって細胞内に残存する、抗体の一部分を少なくとも含む。一実施形態では、このイントラボディは、scFvを含む。scFvポリペプチドは、scFvが抗原結合に望ましい構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーをVHドメインとVLドメインとの間にさらに含む。イントラボディが、Epiph受容体の細胞質側ドメインと結合し、そのシグナル伝達（例えば、自己リン酸化）を防止する、具体的な実施形態も、記載されている。別の具体的な実施形態では、イントラボディは、B型エフリン（例えば、エフリンB1、エフリンB2またはエフリンB3）の細胞質側ドメインと結合する。

40

【0309】

PCT公開WO2011003896および欧洲特許出願EP2275442には、増殖細胞核抗原（PCNA）と特異的に結合するポリペプチドをコードする核酸分子を使用して作製された細胞内機能性PCNA-クロモボディが記載されている。1つまたは2つのフレームワーク領域に1つまたは複数のアミノ酸の保存的置換を含むそのようなポリペプチドの例としては、ポリペプチドのフレームワーク領域を含む、

50

【化1】

MANVQLNESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSDISPS

GAVKAYSDSVKGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVQSPRTRIPAPSS

QGTQVTVSS (配列番号 19) および

MANVQLNESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISPS

GAVKAYSDSVKGRFTISRDNAKNRLYLQMNSLTPEDTGEYFCTKVQSPRTRIPAPSS

QGTQVTVSS (配列番号 20)

が挙げられる。実施例において、フレームワーク領域、および P C N A の結合に関与する
C D R 領域が、決定されている。

【0310】

欧洲特許出願 E P 2 7 0 3 4 8 5 には、形質細胞または形質芽細胞を選択するための、
ならびに標的抗原特異的抗体および新規モノクローナル抗体を產生するための、方法が記載
されている。一実施形態では、細胞内免疫グロブリンを発現する細胞が同定された。

抗体被覆作用因子

【0311】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体または抗体断片は、抗体被覆作用因子を含む組成物を調製するために使用され得る。本明細書で使用される場合、用語「抗体被覆作用因子」は、1つもしくは複数の表面会合抗体または抗体断片を含む、任意の粒子、ナノ粒子、分子、タンパク質、融合タンパク質、脂質、リポソーム、細胞膜、細胞あるいは他の構造を指す。抗体被覆作用因子は、被覆に使用された抗体または抗体断片の特異性に基づいて1つもしくは複数のグリカン、タンパク質、細胞、組織および/または器官を標的とし得る。

【0312】

抗体被覆作用因子は、会合している、封入されている、または埋め込まれているカーゴを含み得る。カーゴは、検出可能な標識であってもよい。一部のカーゴは、1つまたは複数の治療剤を含み得る。そのような治療剤としては、これらに限定されないが、薬物、化学療法剤および細胞傷害性薬剤を挙げることができる。細胞傷害性薬剤を使用して、細胞を死滅させるまたは別様に無効にすることができる。細胞傷害性薬剤としては、これらに限定されないが、細胞骨格阻害剤 [例えば、チューブリン重合阻害剤、例えばメイタンシンまたはアウリスタチン (例えば、モノメチルアウリスタチン E [M M A E] およびモノメチルアウリスタチン F [M M A F]) 、およびキネシントスピンドルタンパク質 (K S P) 阻害剤] 、 D N A 傷害剤 (例えば、カリケアマイシン、デュオカルマイシン、ならびにピロロベンゾジアゼピン二量体、例えばタリリンおよびテシリリン) 、トポイソメラーゼ阻害剤 [例えば、カンプトテシン化合物または誘導体、例えば 7 - エチル - 10 - ヒドロキシカンプトテシン (S N - 3 8) およびエキサテカン誘導体 D X d] 、転写阻害剤 (例えば、 R N A ポリメラーゼ阻害剤、例えばアマニチン) 、ならびにキナーゼ阻害剤 [例えば、ホスホイノシチド 3 - キナーゼ (P I 3 K) 阻害剤またはマイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ (M E K) 阻害剤] を挙げができる。

【0313】

一部の実施形態では、抗体被覆作用因子は、本明細書に記載の1つもしくは複数の抗体または抗体断片で被覆されたナノ粒子を含み得る。そのような抗体被覆作用因子は、細胞会合グリカンを含むがこれらに限定されない、1つまたは複数のグリカンを標的とし得る。一部のそのような抗体被覆作用因子は、1つまたは複数の細胞傷害性薬剤を含む。

タンパク質および変異体

【0314】

本発明のグリカン相互作用抗体は、ポリペプチド全体、多数のポリペプチド、またはポリペプチドの断片として存在することがあり、これらは、1つもしくは複数の核酸、多数の核酸、前述のいずれかの核酸の断片または変異体によって独立してコードされ得る。本

10

20

30

40

50

明細書で使用される場合、「ポリペプチド」は、ほとんどの場合ペプチド結合により連結されている、アミノ酸残基(天然または非天然)のポリマーを意味する。この用語は、本明細書で使用される場合、任意のサイズ、構造または機能のタンパク質、ポリペプチドおよびペプチドを指す。一部の事例では、コードされるポリペプチドは、約50アミノ酸より小さく、その場合、ポリペプチドは、ペプチドと呼ばれる。ポリペプチドがペプチドである場合、このポリペプチドは、少なくとも約2、3、4または少なくとも5アミノ酸残基長であるであろう。したがって、ポリペプチドは、遺伝子産物、天然に存在するポリペプチド、合成ポリペプチド、前述のものの、ホモログ、オルソログ、パラログ、断片および他の等価物、変異体ならびに類似体を含む。ポリペプチドは、単一分子であってもよく、または複数の分子の複合体、例えば、二量体、三量体もしくは四量体であってもよい。ポリペプチドはまた、単鎖または多鎖ポリペプチドを含んでいてもよく、会合していてもよく、または連結されていてもよい。用語ポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学類似体である、アミノ酸ポリマーにも適用され得る。

10

【0315】

用語「ポリペプチド変異体」は、ネイティブまたは参照配列とはそれらのアミノ酸配列が異なる分子を指す。アミノ酸配列変異体は、ネイティブまたは参照配列と比較して、アミノ酸配列内のある特定の位置に置換、欠失および/または挿入を有し得る。通常、変異体は、ネイティブまたは参照配列に対して少なくとも約50%の同一性(相同性)を有するであろうし、好ましくは、ネイティブまたは参照配列と少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%同一(相同)であるであろう。

20

【0316】

一部の実施形態では、「変異体模倣物」が提供される。本明細書で使用される場合、用語「変異体模倣物」は、活性化配列を模倣するであろう1つまたは複数のアミノ酸を含有するものである。例えば、グルタメートは、ホスホロ-トレオニンおよび/またはホスホ-セリンの模倣物として役立ち得る。あるいは、変異体模倣物は、失活をもたらすこともあり、または模倣物を含有する不活性化産物をもたらすこともあり、例えば、フェニルアラニンは、チロシンの不活性化置換体として作用することができ、もしくはアラニンは、セリンの不活性化置換体として作用することができる。本発明のグリカン相互作用抗体のアミノ酸配列は、天然に存在するアミノ酸を含むことがあり、しかるが故に、タンパク質、ペプチド、ポリペプチドまたはこれらの断片と見なされることもある。

30

あるいは、グリカン相互作用抗体は、天然に存在するアミノ酸と天然に存在しないアミノ酸の両方を含むこともある。

【0317】

用語「アミノ酸配列変異体」は、ネイティブまたは出発配列と比較して、それらのアミノ酸配列に多少の差異がある分子を指す。アミノ酸配列変異体は、アミノ酸配列内のある特定の位置に置換、欠失および/または挿入を有し得る。「ネイティブ」または「出発」配列を野生型配列と混同してはならない。本明細書で使用される場合、ネイティブまたは出発配列は、それに対して比較を行うことができる元の分子を指す相対用語である。「ネイティブ」または「出発」配列もしくは分子は、野生型(自然界に見られるその配列)を表すこともあるが、野生型配列である必要はない。

40

【0318】

通常、変異体は、ネイティブ配列と比較して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、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%、少なくとも99.5%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%の配列同一性を有するであろう。「配列同一性」は、これがアミノ酸配列またはヌクレオチド配列に適用される場合、最大配列同一性パーセントを達成するように配列をアラインし、必要に応じてギャップおよび断片を考慮した後の、二次配列中の残基と同一である候補配列中の残基のパーセンテージと定義される。2つのポリマー配列の同一性パーセントの計算は、例えば、最適な比較

50

を目的とした 2 配列のアライメントにより行うことができる（例えば、最適なアライメントのために第 1 および第 2 のポリマー配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較のために非同一配列を無視することができる）。ある特定の実施形態では、比較を目的としてアラインされる配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または 100 % である。次いで、対応する位置の残基が比較される。第 1 の配列中の位置が、第 2 の配列中の対応する位置と同じ残基により占有されている場合には、これらの分子は、その位置で同一である。2 配列間の同一性パーセントは、2 配列の最適なアライメントのために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れて、それらの配列によって共有される同一位置の数の関数である。2 配列間の配列比較および同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して遂行することができる。例えば、2 ヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、Computational Molecular Biology、Lesk, A. M. 編、Oxford University Press、New York、1988 年；Biocomputing: Informatics and Genome Projects、Smith, D. W. 編、Academic Press、New York、1993 年；Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heijne, G.、Academic Press、1987 年；Computer Analysis of Sequence Data、Part I、Griffin, A. M. および Griffin, H. G. 編、Humana Press、New Jersey、1994 年；ならびに Sequence Analysis Primer、Gribskov, M. および Devereux, J. 編、M Stockton Press、New York、1991 年に記載されているものなどの方法を使用して決定することができ、これらの各々は、参照により本明細書に組み入れられる。例えば、2 ヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、PAM 120 残基質量表、12 のギャップ長ペナルティおよび 4 のギャップペナルティを使用して、ALIGN プログラム（バージョン 2.0）に組み込まれている Meyers および Miller (CABIOS、1989 年、4 卷：11～17 頁) のアルゴリズムを使用して決定することができる。あるいは、2 ヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、NWSeqapDNA.CMP 行列を使用する GCG ソフトウェアパッケージの GAP プログラムを使用して決定することができる。配列間の同一性パーセントを決定するために一般に利用される方法としては、これに限定されないが、参照により本明細書に組み入れられる、Carillo, H.、および Lipman, D.、SIAM J Applied Math.、48 卷：1073 頁（1988 年）において開示されているものが挙げられる。同一性を決定する手法は、公開されているコンピュータプログラムで体系化されている。2 配列間の相同を決定するための例示的コンピュータソフトウェアとしては、これらに限定されないが、GCG プログラムパッケージ、Devereux, J. ら、Nucleic Acids Research、12 卷（1 号）、387 頁（1984 年））、BLASTP、BLASTN および FASTA、Altschul, S. F. ら、J Molec. Biol.、215 卷、403 頁（1990 年））が挙げられる。

【0319】

「ホモログ」は、これがアミノ酸配列に適用される場合、第 2 の種の第 2 の配列に対して実質的同一性を有する他の種の対応する配列を意味する。

【0320】

「類似体」は、親ポリペプチドの性質を依然として維持する、1 つまたは複数のアミノ酸変更、例えば、アミノ酸残基の置換、付加または欠失の点で異なる、ポリペプチド変異体を含むように意図されている。

【0321】

本発明は、変異体および誘導体を含む、アミノ酸に基づくグリカン相互作用抗体のいくつかのタイプを企図している。これらは、置換、挿入、欠失および共有結合性変異体および誘導体を含む。しかるが故に、置換、挿入および / または付加、欠失および共有結合性修飾 (covalently modification) を含有する、グリカン相互作用抗体分子は、本発明の範囲内に含まれる。例えば、配列タグまたはアミノ酸、例えば 1 つもしくは複数のリシンを、本発明のペプチド配列に（例えば、N 末端または C 末端に）付加させることができる。配列タグは、ペプチド精製または局在化に使用することができる。リシンは、ペプチド

10

20

30

40

50

可溶性を上昇させるために、またはビオチン化を可能にするために、使用され得る。あるいは、ペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列のカルボキシおよびアミノ末端領域に位置するアミノ酸残基を必要に応じて欠失させ、それによって短縮型配列を得ることができる。あるいは、ある特定のアミノ酸（例えば、C末端またはN末端残基）は、配列の使用に依存して、例えば、可溶性であるまたは固体支持体に連結されている、より大きい配列の一部としての配列の発現のような使用に依存して、欠失されることもある。

【0322】

タンパク質に言及するときの「置換変異体」は、ネイティブまたは出発配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、同位置のその場所に異なるアミノ酸が挿入されたものである。置換は、單一であってもよく、この場合、分子内の1つだけのアミノ酸が置換されており、または複数であってもよく、この場合、同じ分子内の2つもしくはそれよりも多くのアミノ酸が置換されている。

10

【0323】

本明細書で使用される場合、用語「保存的アミノ酸置換」は、配列内に通常存在するアミノ酸の、同様のサイズ、電荷または極性の異なるアミノ酸での置換を指す。保存的置換の例としては、非極性（疎水性）残基、例えばイソロイシン、バリンおよびロイシンなどの、別の非極性残基の置換が挙げられる。同様に、保存的置換の例としては、ある極性（親水性）残基での別の残基の置換、例えば、アルギニンとリシン間の、グルタミンとアスパラギン間の、およびグリシンとセリン間の置換が挙げられる。加えて、塩基性残基、例えばリシン、アルギニンもしくはヒスチジンでの、別の残基の置換、またはある酸性残基、例えばアスパラギン酸もしくはグルタミン酸での、別の酸性残基の置換は、保存的置換のさらなる例である。非保存的置換の例としては、非極性（疎水性）アミノ酸残基、例えばイソロイシン、バリン、ロイシン、アラニン、メチオニンでの、極性（親水性）残基、例えばシステイン、グルタミン、グルタミン酸もしくはリシンの置換、および／または極性残基での非極性残基の置換が挙げられる。

20

【0324】

タンパク質に言及するときの「挿入変異体」は、ネイティブまたは出発配列内の特定の位置のアミノ酸に直接隣接している挿入された1つまたは複数のアミノ酸を有するものである。アミノ酸に「直接隣接している」は、アミノ酸のアルファ-カルボキシまたはアルファ-アミノ官能基のいずれかに接続されているという意味である。

30

【0325】

タンパク質に言及するときの「欠失変異体」は、ネイティブまたは出発アミノ酸配列中の1つもしくは複数のアミノ酸が除去されたものである。通常、欠失変異体は、分子の特定の領域の1つまたは複数のアミノ酸が欠失されているであろう。

【0326】

本明細書で使用される場合、用語「誘導体」は、用語「変異体」と同義語として使用され、参照分子または出発分子と比べて何かが修飾されているまたは変化している分子を指す。一部の実施形態では、誘導体は、有機タンパク質性または非タンパク質性誘導体化剤で修飾されており、翻訳後修飾を有する、ネイティブまたは出発タンパク質を含む。旧来、共有結合性修飾は、タンパク質の被標的アミノ酸残基を、選択された側鎖もしくは末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることにより、または選択された組換え宿主細胞において機能する翻訳後修飾機構を利用することにより、導入される。結果として得られる共有結合性誘導体は、生物活性に重要である、イムノアッセイに重要である、または組換え糖タンパク質のイムノアフィニティー精製のための抗タンパク質抗体の調製に重要である残基の同定を目的としたプログラムに有用である。そのような修飾は、当技術分野における通常技能の範囲内であり、過度の実験なしに行われる。

40

【0327】

ある特定の翻訳後修飾は、発現されたポリペプチドに対する組換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミルおよびアスパラギル残基は、翻訳後に脱アミド化されて対応するグルタミルおよびアルパルチル残基になることが多い。あるいは、これらの残基は、穩

50

やかな酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれかの形態が、本発明に従つて使用されるタンパク質中に存在することがある。

【0328】

他の翻訳後修飾としては、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖のアルファ-アミノ基のメチル化が挙げられる(T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 79~86頁(1983年))。

【0329】

共有結合性誘導体としては、特に、本発明のタンパク質が非タンパク質性ポリマーと共に結合している融合分子が挙げられる。非タンパク質性ポリマーは、通常、親水性合成ポリマー、すなわち、そうしなければ自然界には見られないポリマーである。しかし、自然界に存在するポリマーおよび組換えまたはin vitro法により產生されるポリマーは有用であり、自然界から単離されるポリマーも同様に有用である。親水性ポリビニルポリマー、例えば、ポリビニルアルコールおよびポリビニルピロリドンは、本発明の範囲に入る。ポリビニルアルキレンエーテル、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールは、特に有用である。タンパク質を、様々な非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンに、米国特許第4,640,835号、同第4,496,689号、同第4,301,144号、同第4,670,417号、同第4,791,192号または同第4,179,337号に示されている方法で、連結させることができる。

10

20

30

40

【0330】

タンパク質に言及するときの「特徴」は、分子についての異なるアミノ酸配列に基づく成分と定義される。本発明のタンパク質の特徴としては、表面顕現、局所立体構造形状、フォールディング、ループ、ハーフループ、ドメイン、ハーフドメイン、部位、末端、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。

【0331】

タンパク質に言及するときに本明細書で使用される場合の用語「表面顕現」は、タンパク質のペプチドに基づく成分であって、最外面に出現する成分を指す。

【0332】

タンパク質に言及するときに本明細書で使用される場合の用語「局所立体構造形状」は、タンパク質の画成可能な空間内に位置するタンパク質の、ペプチドに基づく構造の顕現を意味する。

【0333】

タンパク質に言及するときに本明細書で使用される場合の用語「フォールディング」は、エネルギー最小化時に得られるアミノ酸配列立体構造を意味する。フォールディングは、フォールディングプロセスの第2または第3レベルで存在し得る。第2レベルフォールディングの例としては、ベータシートおよびアルファヘリックスが挙げられる。第3レベルフォールディングの例としては、エネルギー力の凝集または分離に起因して形成されるドメインおよび領域が挙げられる。このようにして形成される領域としては、疎水性および親水性ポケット、ならびにこれらに類するものが挙げられる。

【0334】

本明細書で使用される場合の用語「ターン」は、この用語が、タンパク質立体構造に関する場合、ペプチドまたはペプチドの主鎖の方向を変更する、および1つ、2つ、3つまたはそれより多くのアミノ酸残基を含み得る、屈曲を意味する。

【0335】

タンパク質に言及するときに本明細書で使用される場合の用語「ループ」は、ペプチドまたはペプチドの主鎖の方向を逆転させる、および4つもしくはそれより多くのアミノ酸残基を含む、ペプチドまたはペプチドの構造的特徴を指す。Olivarらは、タンパク質ループの少なくとも5つのクラスを同定している(J. Mol Biol, 266巻(4

50

号) : 814 ~ 830 頁、1997 年)。

【0336】

タンパク質に言及するときに本明細書で使用される場合の用語「ハーフループ」は、それが由来するループの場合のアミノ酸残基数の少なくとも半分を有する、同定されたループの一部分を指す。ループが常に偶数のアミノ酸残基を含有するとは限らないことは理解される。したがって、ループが、奇数のアミノ酸を含有する場合、または奇数のアミノ酸を含むと同定される場合、奇数ループのハーフループは、ループの整数部分または次の整数部分(ループのアミノ酸数 / 2 + / - 0 . 5 のアミノ酸)を含むことになる。例えば、アミノ酸数 7 のループと同定されたループは、アミノ酸数 3 またはアミノ酸数 4 のハーフループを生じさせ得る(7 / 2 = 3 . 5 + / - 0 . 5 は、3 または 4 である)。

10

【0337】

タンパク質に言及するときに本明細書で使用される場合の用語「ドメイン」は、1つもしくは複数の同定可能な構造的または機能的特性あるいは性質(例えば、結合能、タンパク質・タンパク質相互作用部位として役立つこと)を有するポリペプチドのモチーフを指す。

【0338】

タンパク質に言及するときに本明細書で使用される場合の用語「ハーフドメイン」は、それが由来するドメインの場合のアミノ酸残基数の少なくとも半分を有する、同定されたドメインの一部分を意味する。ドメインが常に偶数のアミノ酸残基を含有するとは限らないことは理解される。したがって、ドメインが、奇数のアミノ酸を含有する場合、または奇数のアミノ酸を含むと同定される場合、奇数ドメインのハーフドメインは、ドメインの整数部分または次の整数部分(ドメインのアミノ酸数 / 2 + / - 0 . 5 のアミノ酸)を含むことになる。例えば、アミノ酸数 7 のドメインと同定されたドメインは、アミノ酸数 3 またはアミノ酸数 4 のハーフドメインを生じさせ得る(7 / 2 = 3 . 5 + / - 0 . 5 は、3 または 4 である)。サブドメインをドメインまたはハーフドメイン内で同定することができ、これらのサブドメインは、それらが由來したドメインもしくはハーフドメインにおいて同定される構造的または機能的性質のすべてに満たない構造的または機能的性質を有することも、理解される。本明細書におけるいずれのドメインタイプのアミノ酸もポリペプチドの主鎖に沿って連続している必要がない(すなわち、隣接していないアミノ酸が構造的に折り重なってドメイン、ハーフドメインまたはサブドメインになることもある)ことも、理解される。

20

【0339】

タンパク質に言及するときに本明細書で使用される場合の用語「部位」は、この用語がアミノ酸に基づく実施形態に関連する場合、「アミノ酸残基」および「アミノ酸側鎖」と同義語として使用される。部位は、本発明のポリペプチドに基づく分子中の修飾することができる、操作することができる、変更することができる、誘導体化することができる、もしくは変えることができるペプチドまたはポリペプチド内の位置を表す。

30

【0340】

本明細書で使用される場合、タンパク質に言及するときの用語「末端(複数)または末端(単数)」は、ペプチドまたはポリペプチドの端を指す。そのような端は、ペプチドまたはポリペプチドの最初または最後の部位のみに限定されず、末端領域内のさらなるアミノ酸も含み得る。本発明のポリペプチドに基づく分子は、N 末端(遊離アミノ基(NH₂)を有するアミノ酸で終わる)と C 末端(遊離カルボキシル基(COOH)を有するアミノ酸で終わる)の両方を有することで特徴付けられ得る。本発明のタンパク質は、一部の場合には、ジスルフィド結合によってまたは非共有結合力によってまとめられた(多量体、オリゴマー)複数のポリペプチド鎖で構成される。これらの種類のタンパク質は、複数の N および C 末端を有するであろう。あるいは、ポリペプチドが、ポリペプチドに基づかない部分構造、例えば有機コンジュゲート、で始まるまたは終わる場合もあるように、ポリペプチドの末端を修飾することができる。

40

【0341】

50

特徴のいずれかが本発明の分子の成分として同定または定義されたら、移動、交換、転化、欠失、ランダム化もしくは複製によるこれらの特徴のいくつかの操作および／または修飾のいずれかを行うことができる。さらに、特徴の操作が本発明の分子に対する修飾と同じ結果をもたらすこともあることは理解される。例えば、ドメインを欠失させることを含む操作は、完全長に満たない分子をコードするように核酸を修飾することと全く同じような分子長の変更をもたらすことになる。

【0342】

修飾および操作は、部位指向的突然変異誘発などの当技術分野において公知の方法により遂行することができる。次いで、得られた修飾分子を、*in vitro*または*in vivo*アッセイ、例えば、本明細書に記載のもの、もしくは当技術分野において公知の任意の他の適切なスクリーニングアッセイを使用して、活性について試験することができる。10

同位体変形形態

【0343】

本発明のグリカン相互作用抗体は、同位体である1つまたは複数の原子を含有することがある。本明細書で使用される場合、用語「同位体」は、1つまたは複数の追加の中性子を有する化学元素を指す。一実施形態では、本発明の化合物は、重水素化され得る。本明細書で使用される場合、用語「重水素化された（される、されている）」は、1つまたは複数の水素原子が重水素同位体に置き換えられた物質を指す。重水素同位体は、水素の同位体である。水素の核は、1つの陽子を含有するが、重水素核は、陽子と中性子の両方を含有する。グリカン相互作用抗体は、安定性などの化合物の物理的性質を変化させるために、または化合物を診断および実験応用に使用できるようにするために、重水素化され得る。20

コンジュゲートおよび組合せ

【0344】

本発明のグリカン相互作用抗体を1つもしくは複数の同種または異種分子と複合体化することができ、コンジュゲートさせることができ、あるいは組み合わせることができることが、本発明により企図される。本明細書で使用される場合、「同種分子」は、出発分子と比べて構造または機能の少なくとも1つが類似している分子を意味し、その一方で「異種分子」は、出発分子と構造または機能の少なくとも1つが異なるものである。したがって、構造的ホモログは、実質的に構造的に類似している分子である。これらは、同一である場合もある。さらなるホモログは、実質的に機能的に類似している分子である。これらは、同一である場合もある。30

【0345】

本発明のグリカン相互作用抗体は、コンジュゲートを含み得る。本発明のそのようなコンジュゲートは、天然に存在する物質あるいはリガンド、例えば、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、低密度リポタンパク質（LDL）、高密度リポタンパク質（HDL）、もしくはグロブリン）、炭水化物（例えば、デキストラン、ブルラン、キチン、キトサン、イヌリン、シクロデキストリンもしくはヒアルロン酸）、または脂質を含み得る。リガンドは、組換えまたは合成分子、例えば、合成ポリマー、例えば合成ポリアミノ酸、オリゴヌクレオチド（例えば、アプタマー）も含み得る。ポリアミノ酸の例は、ポリリシン（PLL）、ポリL-アスパラギン酸、ポリL-グルタミン酸、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリ(L-ラクチド-co-グリコリド)コポリマー、ジビニルエーテル-無水マレイン酸コポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミドコポリマー(HMPA)、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリウレタン、ポリ(2-エチルアクリル酸)(poly(2-ethylacrylic acid))、N-イソプロピルアクリルアミドポリマー、またはポリホスファジンを含む。ポリアミンの例としては、ポリエチレンイミン、ポリリシン(PLL)、スペルミン、スペルミジン、ポリアミン、プロトイドペプチド-ポリアミン、ペプチドミメティックポリアミン、デンドリマー-ポリアミン、アルギニン、アミジン、プロタミン、カチオン性脂質、40

10

20

30

40

50

カチオン性ポルフィリン、ポリアミンの第4級塩、またはアルファヘリックスペプチドが挙げられる。

【0346】

コンジュゲートは、標的指向性基、例えば、細胞もしくは組織を標的とする作用因子または基、例えば、腎細胞などの特定の細胞型と結合する、レクチン、糖タンパク質、脂質もしくはタンパク質、例えば抗体も、含むことができる。標的指向性基は、甲状腺刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、レクチン、糖タンパク質、サーファクタントタンパク質A、ムチン型糖鎖、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチル-ガラクトサミン、N-アセチル-グルコサミン多価マンノース、多価フコース、グリコシル化ポリアミノ酸、多価ガラクトース、トランスフェリン、ビスホスホン酸、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、脂質、コレステロール、ステロイド、胆汁酸、葉酸、ビタミンB12、ビオチン、RGDペプチド、RGDペプチドミメティックまたはアブタマーであってもよい。

10

【0347】

標的指向性基は、タンパク質、例えば、糖タンパク質、あるいはペプチド、例えば、コリガンドに対して特異的親和性を有する分子、または抗体、例えば、がん細胞、内皮細胞もしくは骨細胞などの特定の細胞型と結合する抗体であってもよい。標的指向性基は、ホルモンおよびホルモン受容体も含み得る。標的指向性基は、非ペプチド種、例えば、脂質、レクチン、炭水化物、ビタミン、補因子、多価ラクトース、多価ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン多価マンノース、多価フコース、またはアブタマーも含み得る。

20

【0348】

標的指向性基は、特異的受容体を標的とすることができる任意のリガンドであってもよい。例としては、限定ではないが、葉酸、GalNAc、ガラクトース、マンノース、マンノース-6P、アブタマー、インテグリン受容体リガンド、ケモカイン受容体リガンド、トランスフェリン、ビオチン、セロトニン受容体リガンド、PSMA、エンドセリン、GCP II、ソマトスタチン、LDLおよびHDLリガンドが挙げられる。特定の実施形態では、標的指向性基は、アブタマーである。アブタマーは、未修飾であってもよく、または本明細書において開示される修飾の任意の組合せを有してもよい。

30

【0349】

さらに他の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、細胞侵入性ポリペプチドに共有結合でコンジュゲートされている。細胞侵入性ペプチドは、シグナル配列も含み得る。本発明のコンジュゲートは、安定性の増大、細胞へのトランスフェクションの増加、および/または生体内分布の変更（例えば、特定の組織または細胞型に標的化されたもの）を有するように設計することができる。

【0350】

コンジュゲート部分構造は、排除のための標的を標識することまたは排除のための標的にフラグを付けることを可能にするために、グリカン相互作用抗体に付加されることもある。そのようなタグ付け/フラグ付け分子としては、これらに限定されないが、ユビキチン、蛍光分子、ヒトイソフルエンザ赤血球凝集素(hemagglutinin) (HA)、c-myc [配列EQKLISEEDL (配列番号21)]を有するヒト癌原遺伝子mycのアミノ酸数10のセグメント]、ヒスチジン(His)、フラグ [配列DYKDDDDK (配列番号22)]の短いペプチド]、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、V5(サルウイルスであるパラミクソウイルス5エピトープ)、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)およびジゴキシゲニンが挙げられる。

40

【0351】

一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体を疾患または状態の処置の際に互いにまたは他の分子と組み合わせることができる。

核酸

50

【0352】

本発明は、核酸分子を包含する。一部の実施形態では、核酸は、本発明の抗体（これらに限定されないが、抗体、抗体断片、イントラボディおよびキメラ受容体抗原を含む）をコードする。そのような核酸分子としては、限定ではないが、DNA分子、RNA分子、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、mRNA分子、ベクター、プラスミドおよび他の構築物が挙げられる。本明細書で使用される場合、用語「構築物」は、プラスミド、コスミド、自己複製ポリヌクレオチド分子あるいは直鎖状もしくは環式一本鎖もしくは二本鎖DNAまたはRNAポリヌクレオチド分子を含むがこれらに限定されない、任意の組換え核酸分子を指す。本発明は、グリカン相互作用抗体をコードする核酸分子を発現するようにプログラムまたは生成された細胞も包含する。そのような細胞は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、ウイルス送達およびこれらに類するものなどの使用によって生成することができる。本発明の構築物を用いて改変されるウイルスとしては、これらに限定されないが、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよびファージを挙げることができる。一部の場合には、本発明の核酸は、コドン最適化核酸を含む。コドン最適化核酸を生成する方法は、当技術分野において公知であり、これらに限定されないが、米国特許第5,786,464号および同第6,114,148号に記載されているものを含むことができ、これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。一部の実施形態では、核酸配列は、タンパク質発現を向上するために、または隠れたスプライス部位を除去するために、コドン最適化される。

10

I I . 方法および使用

20

治療薬

【0353】

本開示の方法は、これらに限定されないが、治療、診断、定量、バイオプロセシング、実験および/または研究目的で1つまたは複数のグリカン相互作用抗体を利用する方法を含む。そのようなグリカン相互作用抗体は、抗STn抗体を含み得る。

がん関連応用

【0354】

異常なグリコシリ化は、がん細胞形質転換の顕著な特徴である。複数の異常グリコシリ化形態が、ヒトがんにおいて記載されており、特定の腫瘍関連糖鎖抗原(TACA)が特定の腫瘍の標的化に適する細胞表面分子クラスとして同定されている(Cheever, M.A.ら、Clin Cancer Res.、2009年9月1日；15巻(17号)：5323～37頁)。TACA抗原発現は、乳がん、結腸がん、肺がん、膀胱がん、子宮頸がん、卵巣がん、胃がん、前立腺がんおよび肝臓がんを含むがこれらに限定されない、上皮がんにおいて見つかっている。TACA抗原発現は、卵黄嚢腫瘍および精上皮腫を含むがこれらに限定されない、胚性がんにおいて見つかっている。加えて、TACA抗原発現は、様々な組織の多くのメラノーマ、癌腫および白血病において見つかっている(Heimburg-Molinaroら、Vacciné.、2011年11月8日：29巻(48号)：8802～8826頁)。1つまたは複数のTACAを標的とする本発明の抗体は、本明細書では「抗TACA抗体」と呼ばれる。

30

【0355】

40

全癌腫の約80%が、短縮型グリカンであるTn抗原を発現すると推定されている。ほぼ例外なく、Tnおよびシアリル化型シアリルTn(STn)は、正常な健常組織では発現されない。さらに、非ヒト免疫原性シアリル酸であるN-グリコリルノイラミン酸(Neu5Gc)は、乳がんなどの癌腫上にNeu5Gc-STn(GcSTn)の形態で差次的に発現されるようである。

【0356】

50

複数の異常グリコシリ化形態が、ヒトがんにおいて記載されており、特定のグリカンを特定の腫瘍の標的化に適する細胞表面分子クラスとして同定されている(Cheever, M.A.ら、Clin Cancer Res.、2009年9月1日；15巻(17号)：5323～37頁)。例えば、ヒトがんの様々な種類(例えば、数ある中でも特に、膀胱、乳、子宮頸、結腸、

肺および卵巣がん)は、正常なヒト組織では稀である S T n 抗原の高度な発現を示す (Kahlen, P. ら、Gastroenterology.、1998年12月；115巻(6号)：1395～404頁；Ohno, S. ら、Anticancer Res.、2006年11～12月；26巻(6A号)：4047～53頁)。加えて、腫瘍関連マチン上の S T n の存在は、予後が不良であるがんに関係しており、それで、がん検出および標的療法のための魅力的なエピトープと見なされる (Cao, Y. ら、Virchows Arch.、1997年9月；431巻(3号)：159～66頁；Julien, S. ら、Br J Cancer.、2009年6月2日；100巻(11号)：1746～54頁；Itzkowitz, S.H. ら、Cancer.、1990年11月1日；66巻(9号)：1960～6頁；Motoo, Y. ら、Oncology.、1991年；48巻(4号)：321～6頁；Kobayashi, H. ら、J Clin Oncol.、1992年1月；10巻(1号)：95～101頁)。 T n および S T n の形成は、活性 (activate) T シンターゼの形成に必要な分子シャペロンをコードする遺伝子 C o s m c の体細胞突然変異に関連している (Ju, T. ら、Nature.、2005年10月27日；437巻(7063号)：1252頁；Ju, T. ら、Cancer Res.、2008年3月15日；68巻(6号)：1636～46頁)。それらの形成は、シアリルトランスフェラーゼである S T 6 G a 1 N A c I の発現増加の結果として生じる場合もある (Ikehara, Y. ら、Glycobiology.、1999年11月；9巻(11号)：1213～24頁；Brockhausen, I. ら、Biol Chem.、2001年2月；382巻(2号)：219～32頁)。 S T n の新規発現は、癌腫細胞をモジュレートし、悪性表現型を変化させ、より侵襲性の高い細胞挙動をもたらすことができる (Pinho, S. ら、Cancer Lett.、2007年5月8日；249巻(2号)：157～70頁)。 S T n は、悪性組織に高度に発現されるが、低レベルの発現は、健常ヒト細胞上にも見られる (Jass, J.R. ら、J Pathol.、1995年6月；176巻(2号)：143～9頁；Kirkeby, S. ら、Arch Oral Biol.、2010年11月；55巻(11号)：830～41頁)。単独での S T n は、がんの検出および治療の標的として注目を集めている (Cheever, M.A. ら、Clin Cancer Res.、2009年9月1日；15巻(17号)：5323～37頁)。

【0357】

S T n の存在に加えて、他のグリコシル化変化が、がんに関して記載されている。それらの1つは、N e u 5 G c を含む。N - アセチルノイラミン酸 (N e u 5 A c) および N e u 5 G c は、哺乳動物細胞表面の2つの主要シアル酸である。N e u 5 A c および N e u 5 G c は、N e u 5 G c が、5番目の炭素に結合された化学基に付随する追加の酸素原子を含む点のみが異なる。機能性遺伝子の喪失のため、ヒトは、N e u 5 A c の形態のシアル酸のみを合成することができ、N e u 5 G c の形態のシアル酸を合成することはできない。しかし、N e u 5 G c は、赤身肉などの動物由来の食事供給源から代謝によってヒトに組み込まれ得る (Tangvoranuntakul, P. ら、Proc Natl Acad Sci U SA.、2003年10月14日；100巻(21号)：12045～50頁；Nguyen, D.H. ら、J Immunol.、2005年7月1日；175巻(1号)：228～36頁；米国特許第7,682,794号、同第8,084,219号、米国特許出願公開第2012/0142903号、WO 2010030666およびWO 2010030666；それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。N e u 5 G c は、ヒト腫瘍間で有意に存在量が多く (Higashi, H. ら、Cancer Res.、1985年8月；45巻(8号)：3796～802頁；Miyoshi I. ら、Mol Immunol.、1986年、23巻：631～638頁；Hirabayashi, Y. ら、Jpn J Cancer Res.、1987年、78巻：614～620頁；Kawachi, S. ら、Int Arch Allergy Appl Immunol.、1988年、85巻：381～383頁；Devine, P.L. ら、Cancer Res.、1991年、51巻：5826～5836頁；Malykh, Y.N. ら、Biochimie.、2001年、83巻：623～634頁およびInoue, S. ら、2010年、Glycobiology.、20巻(6号)：752～762頁)、正常なヒト組織内には著しく少なく、このことは、数十年にわたって見落とされてきた (Diaz, S.L. ら、PLoS One.、2009年、4巻：e4241頁；Tangvoranuntakul, P. ら、Proc Natl Acad Sci U SA.、2003年、100巻：12045～12050頁；Varki, A. ら、Glycoconj J.、2009年、26巻：231～245頁)。健常ヒト組織と比較してがん組織における食事由来 N e u 5 G c の代謝

性蓄積の増加は、少なくとも次の3つの要因により説明される可能性が高い：競合する内在性Neu5Acの過小産生に伴う急速な増加、増殖因子により誘導されるマクロビノサイトーシスの増強 (Dharmawardhane, S.ら、*Mol Biol Cell.*、2000年10月；11巻(10号)：3341～52頁；Simonsen, A.ら、*Curr Opin Cell Biol.*、2001年8月；13巻(4号)：485～92頁；Johannes, L.ら、*Traffic.*、2002年7月；3巻(7号)：443～51頁；Amyere, M.ら、*Int J Med Microbiol.*、2002年2月；291巻(6～7号)：487～94頁)、および低酸素によるリソソームシアル酸輸送体遺伝子シアリンの遺伝子発現の上方調節 (Yin, J.ら、*Cancer Res.*、2006年3月15日；66巻(6号)：2937～45頁)。加えて、今までに試験されたすべてのヒトは、非ヒトNeu5Gcに対するポリクローナル抗体保有者を含み、このことにより非ヒトNeu5Gcは異種自己抗原の最初の例となる (Padler-Karavani, V.ら、*Glycobiology*、2008年10月；18巻(10号)：818～30頁；Varki, N.M.ら、*Annu Rev Pathol.*、2011年；6巻：365～93頁)。悪性腫瘍における食事性Neu5Gcの蓄積は、抗Neu5Gc応答にさらされた際、低悪性度慢性炎症を誘導することにより腫瘍進行を助長することが示された (Hedlund, M.ら、*Proc Natl Acad Sci U S A.*、2008年12月2日；105巻(48号)：18936～41頁)。したがって、ヒト腫瘍上のNeu5Gc含有グリカンエピトープは、薬物標的化の重要な可能性を表す。最近の研究は、がん患者における、Neu5Ac-STn (AcSTn)ではなく、Neu5Gc含有STn (GcSTn)に対する抗体の存在を示唆し、がん検出のための特異的バイオマーカーとしてのそれらの可能性を精査している (Padler-Karavani, V.ら、*Cancer Res.*、2011年5月1日；71巻(9号)：3352～63頁)。

【0358】

MUC1は、通常は広範にグリコシル化されるが腫瘍細胞ではグリコシル化不十分である、肝要な細胞表面糖タンパク質である。MUC1のわずかなグリコシル化が免疫原性抗原の曝露につながる。これらの曝露は、MUC1コアペプチド配列に沿っていることもあるし、またはコア糖鎖残基に沿っていることもある。これらのTACAは、これらに限定されないが、N-アセチルガラクトサミン(Tn)、シアリル(2,6)N-アセチルガラクトサミン(STn)およびガラクトース(1-3)N-アセチルガラクトサミン(Thomsen-Friedenreich抗原またはTFとしても公知)を含む。全癌腫の約80%は、MUC1のコア糖鎖間にTnを発現すると推定されており、STnは、ヒト癌腫細胞上に強く発現され、がん進行および転移と関連付けられている。ほぼ例外なく、TnおよびSTnは、正常な健常組織では発現されない。シアル酸は、STn上で顕著なエピトープを形成する。本発明は、異常なNeu5Gc-STn (GcSTn)グリカン発現が様々な癌腫に非常に特異的であるように見えるという事實をうまく利用する。

【0359】

MUC1の場合、STnへのNeu5Gcの組込みによって、腫瘍組織を処置するための抗体に基づく治療に魅力的な標的である部位である、腫瘍特異的標的が得られる。本発明の一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、Neu5Gcを含むMUC1発現がん細胞を標的とする。今までに、Neu5Gcは、結腸がん、網膜芽細胞腫組織、メラノーマ、乳がんおよび卵黄嚢腫瘍組織を含むがこれらに限定されない、多数のヒトがん組織からのグリココンジュゲートにおいて検出されている。本発明の一部の実施形態では、Neu5Gcを含むがん細胞の存在により特徴付けられるこれらの形態のがんおよびここで具体的に列挙されない他の形態のがんに対するグリカン相互作用抗体処置の方法が、企図される。

【0360】

グリカンを含むさらなる抗原が同定されており、これらの抗原は、がんと相関して発現される (Heimborg-Molinaro, J.ら、*Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. Vaccine*、2011年11月8日；29巻(48号)：8802～26頁)。これらの腫瘍関連糖鎖抗原は、これらに限定されないが、血液型Lewis関連抗原 [これらに限定され

10

20

30

40

50

ないが、Lewis^Y (Le^Y)、Lewis^X (Le^X)、シアリルLewis^X (SLe^X) およびシアリルLewis^A (SLe^A) を含む]、スフィンゴ糖脂質関連抗原 [これらに限定されないが、Globo H、ステージ特異的胎児抗原 - 3 (SSEA-3)、およびシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質を含む]、ガングリオシド関連抗原 [これらに限定されないが、ガングリオシドGD2、GD3、GM2、フコシルGM1 およびNeu5GcGM3を含む] およびポリシアル酸関連抗原を含む。

【0361】

一部の実施形態では、本発明の治療薬をLewis血液型抗原に指向させることができる。Lewis血液型抗原は、1-3連結または1-4連結によりGalNAcに連結されているフコース残基を含む。それらを糖脂質上でも糖タンパク質上でも見つけることができる。Lewis血液型抗原は、これらの抗原の分泌者である個体の体液中で見つけることができる。赤血球上のそれらの出現は、赤血球による血清からのLewis抗原の吸収に起因する。

10

【0362】

一部の実施形態では、本発明の治療薬をLe^Yに指向させることができる。Le^Y (CD174としても公知)は、1,2連結フコース残基はもちろん1,3連結フコース残基も含むGal 1,4GalNAcで構成され、したがって、Fuc(1,2)Gal(1,4)Fuc(1,3)GalNAcエピトープとなる。Le^Yは、1,3フコースを親鎖のGalNAc残基に結合する1,3フコシルトランスフェラーゼにより、H抗原から合成される。Le^Yは、卵巣がん、乳がん、前立腺がん、結腸がん、肺がんおよび上皮がんを含むがこれらに限定されない、様々なかんで発現され得る。正常組織でのその発現レベルは低く、多くのがんで発現レベルが上昇されるため、Le^Y抗原は、治療用抗体の魅力的な標的である。

20

【0363】

一部の実施形態では、本発明の治療薬をLe^Xに指向させることができる。Le^Xは、エピトープGal 1-4(Fuc 1-3)GalNAc-Rを含む。Le^Xは、CD15およびステージ特異的胎児抗原-1 (SSEA-1)としても公知である。この抗原は、F9奇形腫細胞での免疫化を受けたマウスから採取された血清に対して免疫反応性であると初めて認識された。Le^Xは、胚発生の特定のステージと相關することも判明した。Le^Xはまた、様々な組織にがんの存在下でも非存在下でも発現されるが、がん細胞によってしか発現されない乳がんおよび卵巣がんでもLe^Xを見つけることができる。

30

【0364】

一部の実施形態では、本発明の治療薬をSLe^Aおよび/またはSLe^Xに指向させることができる。SLe^AおよびSLe^Xは、それぞれ、構造 [Neu5Ac 2-3Gal 1 1-3(Fuc 1-4)GalNAc-R] および [Neu5Ac 2-3Gal 1 1-4(Fuc 1-3)GalNAc-R] を含む。それらの発現は、がん細胞で上方調節される。血清中のこれらの抗原の存在は、悪性疾患および予後不良と相關する。SLe^Xは、大抵はムチン末端エピトープとして見いだされる。SLe^Xは、乳がん、卵巣がん、メラノーマ、結腸がん、肝がん、肺がんおよび前立腺がんをはじめとする多数の異なるがんで発現される。本発明の一部の実施形態では、SLe^AおよびSLe^X標的は、Neu5Gcを含む(本明細書では、それぞれ、GcSLe^AおよびGcSLe^Xと呼ばれる)。

40

【0365】

一部の実施形態では、本発明の治療薬は、スフィンゴ糖脂質を含むがこれに限定されない、糖脂質、および/または糖脂質上に存在するエピトープに指向させることができる。スフィンゴ糖脂質は、セラミドヒドロキシリ基によりグリカンに連結された、脂質セラミドを含む。細胞膜上で、スフィンゴ糖脂質は、「脂質ラフト」と呼ばれるクラスターを形成する。

【0366】

一部の実施形態では、本発明の治療薬をGlobo Hに指向させることができる。G

50

l o b o H は、乳がん細胞において初めて同定されたがん関連スフィンゴ糖脂質である。G l o b o H のグリカン部分は、F u c (1 - 2) G a l (1 - 3) G a l N A c (1 - 3) G a l (1 - 4) G a l (1 - 4) G l c (1) を含む。多数の正常上皮組織に見られるが、G l o b o H は、小細胞肺、乳房、前立腺、肺、膵臓、胃、卵巣および子宮内膜腫瘍を含むがこれらに限定されない、多くの腫瘍組織に関連して同定されている。

【 0 3 6 7 】

一部の実施形態では、本発明の治療薬をガングリオシドに指向させることができる。ガングリオシドは、シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質である。ガングリオシド命名法に則って、G は、ガングリオシドの略号として使用される。この略号の後に文字 M、D または T が続き、これらの文字は、結合されているシアル酸残基の数（それぞれ、1、2 または 3）を指す。最後に、数字 1、2 または 3 が、薄層クロマトグラフィーにより分析されたとき各々が泳動する距離の順序を指すために、使用される（ここで、3 は、最大の距離を移動し、これに 2、そして 1 が続く）。ガングリオシドは、がん関連増殖および転移に関与することが公知であり、腫瘍細胞の細胞表面に発現される。腫瘍細胞上に発現されるガングリオシドとしては、これらに限定されないが、G D 2、G D 3、G M 2 およびフコシル G M 1（本明細書では F u c - G M 1 とも呼ばれる）が挙げられる。本発明の一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、G D 3 に対する抗体である。G D 3 は、細胞増殖の調節因子である。一部の実施形態では、G D 3 に対する抗体は、細胞増殖および / または血管新生をモジュレートするために使用される。一部の実施形態では、G D 3 に対する抗体は、細胞接着をモジュレートするために使用される。本発明の一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、G M 2 に対する抗体である。一部の実施形態では、G M 2 に対する抗体は、細胞間接触をモジュレートするために使用される。一部の実施形態では、本発明のガングリオシド標的は、N e u 5 G c を含む。一部の実施形態では、そのような標的は、N e u 5 G c を含む G M 3 変異体（本明細書では G c G M 3 と呼ばれる）を含み得る。G c G M 3 のグリカン成分は、N e u 5 G c 2 - 3 G a l 1 - 4 G l c である。G c G M 3 は、腫瘍細胞の公知成分である。

【 0 3 6 8 】

一部の実施形態では、本発明の抗 T A C A 抗体が標的とする T A C A は、これらに限定されないが、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 2 3 6 4 8 6 A 1 号、同第 2 0 1 3 / 0 1 0 8 6 2 4 A 1 号、同第 2 0 1 0 / 0 1 7 8 2 9 2 A 1 号、同第 2 0 1 0 / 0 1 0 4 5 7 2 A 1 号、同第 2 0 1 2 / 0 0 3 9 9 8 4 A 1 号、同第 2 0 0 9 / 0 1 9 6 9 1 6 A 1 号、および同第 2 0 0 9 / 0 0 4 1 8 3 6 A 1 号において挙げられているもののいずれかを含むことができ、これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【 0 3 6 9 】

本開示の方法は、本明細書に記載の抗体の 1 つまたは複数でがんを処置する方法を含む。そのような抗体は、表 2 に提示されている可変ドメインの 1 つまたは複数を含み得る。抗体は、表 3 に提示されている I g G 定常ドメインの 1 つまたは複数をさらに含み得る。抗体は、ヒト化抗体であってもよい。抗体は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない治療剤を含む抗体薬物コンジュゲートであってもよい。治療剤は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない、細胞傷害性薬剤であってもよい。細胞傷害性薬剤は、M M A E であってもよい。細胞傷害性薬剤は、リンカーにより抗体に繋がっていてもよい。

がんにおける S T n

【 0 3 7 0 】

免疫系は、自然免疫活性と適応免疫活性の両方を含む抗腫瘍細胞免疫活性を促進するための複数の機構を有する。本明細書で使用される場合、用語「抗腫瘍細胞免疫活性」は、腫瘍細胞を死滅させる、または腫瘍細胞の増殖（g r o w t h a n d / o r p r o l i f e r a t i o n ）を防止する、免疫系の任意の活性を指す。一部の場合には、抗腫瘍

10

20

30

40

50

免疫活性は、ナチュラルキラー（NK）細胞による認識および腫瘍細胞殺滅ならびにマクロファージによる貪食を含む。適応抗腫瘍免疫応答は、樹状細胞（DC）などの抗原提示細胞（APC）による腫瘍抗原取込みおよび提示を含み、この応答により、T細胞抗腫瘍活性がモジュレートされることになり、および／またはB細胞が拡大し、腫瘍特異的抗体を分泌することになる。腫瘍特異的抗体の腫瘍との結合は、腫瘍細胞死の抗体依存性細胞傷害（ADC）および補体依存性細胞傷害（CDC）機構をもたらすことができる。

【0371】

本明細書で使用される場合、用語「免疫抵抗性腫瘍細胞」は、抗腫瘍細胞免疫活性を低下させる、または抗腫瘍細胞免疫活性から逃れる、腫瘍細胞を指す。一部の研究は、腫瘍細胞表面でのまたは腫瘍細胞微小環境に分泌されたSTn（公知TACA）の発現が、抗腫瘍免疫活性の腫瘍細胞逃避を促進し得ることを示す。本明細書で使用される場合、用語「腫瘍細胞微小環境」は、腫瘍細胞に隣接しているまたは腫瘍細胞の周囲の任意の領域を指す。そのような領域としては、これらに限定されないが、腫瘍細胞間、腫瘍細胞と非腫瘍細胞間、液体の周囲、および細胞外基質の成分の周囲の領域が挙げられる。

10

【0372】

STnを含むシアリル化ムチンは腫瘍細胞のNK細胞標的化を低減させることができOgataによって実証された（Ogata, S.ら、1992年、*Canc. Res.*、52巻：4741～6頁、この内容はそれら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。この研究によつて、ヒツジ、ウシおよびブタ顎下腺ムチン（それぞれ、OSM、BSMおよびPSM）の存在は、細胞傷害性のほぼ100パーセント阻害をもたらすことが判明した（Ogataの表2を参照されたい）。Jandusらによるさらなる研究は、一部の腫瘍細胞が、NK細胞シグレック受容体と相互作用してNK阻害をもたらすことができるシアログリカンリガンドの発現に起因して、NKを免れることができることを実証している（Jandus, C.ら、2014年、*JCI*. pii : 65899、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。

20

【0373】

Todaによる研究は、STnがB細胞上のCD22受容体に結合してシグナル伝達の減少およびB細胞活性化の低下をもたらし得ることを実証している（Toda, M.ら、2008年、*Biochem Biophys Res Commun.*、372巻（1号）：45～50頁、この内容はそれら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。樹状細胞（DC）は、T細胞活性をモジュレートすることにより、適応免疫活性に影響を与えることができる。Carrascalによる研究によって、膀胱がん細胞によるSTn発現は、DCにおいて寛容を誘導して、T細胞において抗腫瘍細胞免疫活性を誘導するDCの能力を低下させることができCarrascal, MAら、2014年、*Mol Oncol.* pii:S1574-7891(14号)00047～7頁、この内容はそれら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。これらの研究により、STnポジティブ膀胱がん細胞と接触するDCが、低度にCD80、CD86、IL-12およびTNF- α を発現する免疫寛容原性発現プロファイルを提示することが明らかにされた。さらに、DCは、T細胞が、IFN- γ を低度に発現し、FoxP3を高度に発現するように、調節性T細胞をモジュレートすることができる。van Vlietなどによる他の研究は、マクロファージガラクトース型レクチン（MGL）のDC表面発現が、腫瘍組織へのそれらの細胞の標的化をもたらし得ることを示している（van Vliet, SJ.、2007年、Amsterdam: VrijeUniversiteit、1～232頁、およびvan Vliet, SJ.ら、2008年、*J Immunol.*、181巻（5号）：3148～55頁、Nollau, P.ら、2013年、*J Histochem Cytochem.*、61巻（3号）：199～205頁、これらの各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。MGL相互作用に起因して組織に到着したDCは、3つの方法のうちの1つでヘルパーT（Th）細胞に影響を及ぼし得る。DCは、T細胞寛容、T細胞免疫活性、またはエフェクターT細胞の下方調節を誘導することができる。MGLは、AcSSTnとGcSSTnの両方と結合することが示され、その親和性が綿密に分析された（Mortezaei, N.ら、2013年、*Glycobiology*、23巻（7号）：844～52頁、この内容はそれら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。

30

40

50

書に組み入れられる）。興味深いことに、腫瘍上でのMUC1発現は、T細胞寛容をもたらして腫瘍細胞を免疫根絶から保護することが示された。

【0374】

一部の実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体（これに限定されないが、抗STn抗体を含む）は、1つもしくは複数のTACAを発現する1つまたは複数の腫瘍細胞を含む対象を処置するために使用することができる。一部の場合には、本発明のグリカン相互作用抗体（これに限定されないが、抗STn抗体を含む）は、STnを発現する腫瘍細胞に対する抗腫瘍細胞免疫活性を増大させるために使用することができる。そのような抗体は、免疫抵抗性腫瘍細胞に対する適応免疫応答および/または自然免疫応答を増大させることができる。一部のグリカン相互作用抗体は、NK抗腫瘍細胞活性を増大させるために使用することができる。そのようなグリカン相互作用抗体は、一部の場合には、NK細胞上に発現されるグリカン受容体とがん細胞上または周囲組織内のSTnグリカンとの相互作用を遮断することができる。

10

【0375】

一部の実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体（これに限定されないが、抗STn抗体を含む）は、B細胞抗腫瘍細胞活性を増大させるために使用することができる。そのような抗体は、B細胞上のCD22受容体とがん細胞上または周囲組織内のSTnグリカンとの相互作用を低減させることができる。Sjobergらによる研究は、糖タンパク質上の2,6連結シアル酸の9-O-アセチル化が、B細胞CD22受容体とどのような糖タンパク質との相互作用も低減させたことを実証している（Sjoberg, E.R.ら、1994年、JCB、126巻（2号）：549～562頁）。Shiらによる別の研究は、ネズミ科動物赤白血病細胞上の9-O-アセチル化シアル酸残基レベルが高いほど、これらの細胞が補体媒介溶解の影響を受けやすくなることを明らかにしている（Shi, W-X.ら、1996年、J of Biol Chem.、271巻（49号）：31526～32頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。一部の実施形態では、本発明の抗STn抗体は、非9-O-アセチル化STnに選択的に結合することができ、全般的なSTn結合を低減させることができるが、腫瘍細胞増殖（growth and/or proliferation）を（例えば、B細胞抗腫瘍活性の増大、および補体媒介腫瘍細胞破壊の増加によって）低減させることができる。一部の実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体（これに限定されないが、抗STn抗体を含む）は、DC抗腫瘍活性を増大させるために使用することができる。そのような抗体は、腫瘍細胞に対するDC寛容を低下させるために使用することができる。DC寛容低下は、CD80、CD86、IL-12および/またはTNF-のDC発現を増加させることを含み得る。一部の場合には、DC抗腫瘍細胞活性は、T細胞抗腫瘍細胞活性の促進を含み得る。そのような抗体は、DC MGLとがん細胞上またはがん細胞周辺に発現されるグリカンとの結合を防止することができる。

20

【0376】

Ibrahimらによる研究は、内分泌治療に伴う高レベルの抗STn抗体が、転移性乳がんを有する女性において全生存期間および無増悪期間（TTP）を延長し得ることを示唆する（Ibrahim, N.K.ら、2013年、4巻（7号）：577～584頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。この研究では、抗STn抗体レベルが、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に連結されたSTnのワクチン接種後に上昇された。一部の実施形態では、本発明の抗STn抗体は、内分泌治療（例えば、タモキシフェンおよび/またはアロマターゼ阻害剤）と組み合わせて使用することができる。

30

【0377】

STn発現は、卵巣腫瘍細胞の転移能への寄与に関係づけられている。本開示の一部の方法に従って、抗STn抗体を使用して卵巣腫瘍細胞転移を低減させることができる。そのような方法は、転移の約1%～約15%、約5%～約25%、約10%～約50%、約20%～約60%、約30%～約70%、約40%～約80%、約50%～約90%、約

40

50

75%～約95%、または少なくとも95%の低減を含み得る。

【0378】

本開示の一部の方法は、S T n を発現する少なくとも1つのがん細胞を有する対象における、がんを本明細書に記載の抗体の1つまたは複数で処置する方法を含む。抗体は、S T n に結合することができる。そのような抗体は、表2に提示されている可変ドメインの1つまたは複数を含み得る。一部の抗体または抗原結合断片は、本明細書に記載の抗体配列の種々の組合せを含み得る。そのような抗体は、表3に提示されているIgG定常ドメインの1つまたは複数をさらに含み得る。抗体は、ヒト化抗体であってもよい。抗体は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない治療剤を含む抗体薬物コンジュゲートであってもよい。治療剤は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない、細胞傷害性薬剤であってもよい。細胞傷害性薬剤は、MMAEであってもよい。細胞傷害性薬剤は、リンカーにより抗体に繋がっていてもよい。

【0379】

一部の実施形態では、本開示は、S T n を発現する少なくとも1つのがん細胞を有しあつ白金難治性疾患を有する対象におけるがんを処置する方法を提供する。白金難治性疾患は、がんの処置を受ける全対象集団のあるパーセンテージが経験する、白金に基づく処置に対する抵抗性である。対象に抗S T n 抗体を投与することにより、対象を処置することができる。少なくとも1つのがん細胞は、卵巣がん細胞であってもよい。少なくとも1つのがん細胞は、シスプラチニンに対して抵抗性であってもよい。少なくとも1つのがん細胞は、腫瘍の一部であってもよい。

【0380】

白金難治性疾患有する対象におけるがんを処置するために使用される抗S T n 抗体は、ADCであってもよい。ADCは、細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされていてもよく、これは、本明細書で提示される形式のいずれかを含む。抗S T n 抗体は、約0.1mg/kg～約2.5mg/kgの用量で投与することができる。投与は、静脈内注射による投与であってもよい。投与は、これらに限定されないが、連日投与、週1回の投与、または月1回の投与を含み得る。

【0381】

一部の実施形態では、抗S T n 抗体処置は、対象の体液および/または組織中の検出可能なS T n レベルを低下させることができる。S T n は、タンパク質または他の担体と会合していてもよい。一部の場合には、血清中のS T n レベルが低下される。

治療標的としてのがん幹細胞

【0382】

がん幹細胞またはCSC(腫瘍始原細胞とも呼ばれる)は、原発性および転移性腫瘍の開始、増殖、播種および再発を駆動する異種がん性組織または腫瘍細胞集団中の細胞のサブセットであり(KarstenおよびGoletz、SpringerPlus、2013年、2巻、301頁)、腫瘍型に依存して全集団の様々な割合で存在し得る。CSCは、それらの自己複製能力および分化した子孫である非CSCを生じさせるそれらの能力により最終分化細胞と区別される(Guptaら、Nature medicine、2009年、15巻、1010～1012頁)。これらの性質は、正常幹細胞のものに似ている。正常幹細胞とCSC間のそのような差異は、治療に重要な意味を持つ。

【0383】

CSCをそれらの非CSC対応物と区別すると主張する細胞表面バイオマーカーが、どんどん同定されている(Medemaら、Nature cell biology、2013年、15巻、338～344頁；Zoller、Cancer、2011年、11巻、254～267頁)。これらのバイオマーカーは、これらに限定されないが、CD44、CD133、CD117、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼアイソフォーム1(ALDH1)を含み得る。これらの一部は、マウス腫瘍およびヒト細胞株の研究に由来するが、他のものは、原発性ヒト腫瘍試料を使用して検証されている。これらの1つである膜貫通CD44糖タンパク質、またはヒアルロナン受容体は、様々な腫瘍型の周知構成要素であり、つい最近、ヒトがんにおける真

のCSCマーカーとしても認められ、実際、最も頻繁に観察されているバイオマーカーである（Loboら、2007年、23巻、675～699頁）。

【0384】

CD44は、いくつかの変異体アイソフォームで存在し、これらは、完全長CD44遺伝子の20個のエクソンと19個のインtronの間で起こる選択的スプライシング事象により生成される（Williamsら、*Experimental biology and medicine*、2013年、238巻、324～338頁）。CSCの生得的な転移性および薬物抵抗性表現型への寄与におけるCD44およびその変異体の補助的役割を指摘する実験的証拠が増えてきており（Negiら、*Journal of drug targeting*、2012年、20巻、561～573頁）、この補助的役割は、一部は、細胞内シグナル伝達経路のモジュレーションに起因する（Williamsら、*Experimental biology and medicine*、2013年、238巻、324～338頁）。加えて、高いCD44細胞レベルを提示するトリプルネガティブ乳がんを有する患者が、そのようなレベルを提示するいくつかの他のがん型を有する患者とともに、予後不良およびより高い死亡率を有することは公知である（Negiら、*Journal of drug targeting*、2012年、20巻、561～573頁）。これらの観察は、CD44の標的化が、成熟がん細胞に加えてCSCを阻害または排除することによってがんを処置する手段をもたらすという考えを支持する。実際、CD44を標的とする非常に多くのアプローチが、成功度は様々だが、実験的に試みられてきた。これらは、コンジュゲートおよび非コンジュゲート抗体、ナノ担体薬物システムならびにヒアルロン酸コンジュゲート型薬物の使用を含む広範な技術を含む（Negiら、*Journal of drug targeting*、2012年、20巻、561～573頁）。しかし、いくつかの事例では、in vivo研究で毒性効果が観察された。これらの厄介な副作用は、被標的CSCおよび成熟腫瘍細胞の表面におけるその存在に加えて、大部分の脊椎動物細胞の膜上でのCD44および変異体の広範な出現（Naorら、*Seminars in cancer biology*、2008年、18巻、260～267頁）に起し得る。正常ヒト幹細胞の構成要素であるCD44タンパク質（Williamsら、*Experimental biology and medicine*、2013年、238巻、324～338頁）の標的化は、正常幹細胞機能も害し得る（Leth-Larsenら、*Molecular medicine*、2012年、18巻、1109～1121頁）。数多くの研究が、成熟腫瘍細胞上のCD44タンパク質のみならず、CSC上のCD44タンパク質も標的とすることが望ましいこと指摘しているが、このアプローチに伴う本質的問題は、正常幹細胞のみならず正常組織にも危害を加えない阻害剤を設計するうえで、いまだに難題である。

【0385】

CSC生物学に関係があるもう1つの周知の腫瘍抗原は、上皮ムチンMUC1であり、これは、腺癌の大多数に高レベルで、しかし正常上皮細胞には低レベルで、差次的に発現される、または正常上皮細胞には全く発現されない膜繫留膜糖タンパク質である。MUC1は、乳がん（Engelmannら、*Cancer research*、2008年、68巻、2419～2426頁）および肺がんを含む、様々な新生物上で、CSCバイオマーカーとして最近同定されたものであり、その発現は、高度の転移および予後不良と相関関係がある。CSCの構成要素として、MUC1は、細胞接着、増殖、生存およびシグナル伝達に関する機能を果たすことが示されており（Engelmannら、*Cancer research*、2008年、68巻、2419～2426頁）、そしてまたCD44と共に発現され得る（Leth-Larsenら、*Molecular medicine*、2012年、18巻、1109～1121頁）。がんにおいてMUC1を標的とする免疫治療アプローチが、主として成熟がん細胞療法との関連でだが、ワクチンおよび他のアプローチも使用して探究されて続けている（Julienら、*Biomolecules*、2012年、2巻、435～466頁；Acresら、*Expert review of vaccines*、2005年、4巻、493～502頁）。

【0386】

がん幹細胞は、転移部位で起こる、上皮から間葉への転換（EMT）（Guptaら、*Nature medicine*、2009年、15巻、1010～1012頁）、および/または逆に間葉から上皮への転換（MET）（Leth-Larsenら、*Molecular medicine*、2012年、18巻

、1109～1121頁）（非CSCがCSCを生じさせ得る、CSC可塑性とも呼ばれる）によって生成されるという仮説が立てられている。この発見は、がん性組織または腫瘍細胞集団におけるCSCと非CSCの両方を排除する必要性をさらに強調する。

【0387】

濃縮されたCSC集団を用いた最近の研究により、これらの細胞は、腫瘍の大部分とは異なり、比較的休眠しており、化学療法および放射線照射を含む多くのタイプの現行の治療法に対して優先的抵抗性であることが、明らかにされている（Leth-Larsenら、Molecular medicine、2012年、18巻、1109～1121頁）。このため、現行の治療戦略は、腫瘍の非CSC成分を標的としており、したがって、もっぱらCSCは、大部分が影響を受けずに残って、適切な合図に従って再出現して、原発部位で再発原発腫瘍を再形成するか、または遠位部位に播種し、コロニーを形成し、転移性疾患を生じさせるが、これが、がん死亡率の主原因である。10

【0388】

がん幹細胞の性質についての現時点での理解は、現行の実施がそうであるように腫瘍に存在する細胞の大部分を標的とする必要性のみならず、場合によっては完治をもたらすようにCSCコンパートメントも標的とする必要性を明らかに際立たせた。

【0389】

上で論じたように、腫瘍（CSCを含む）関連バイオマーカーに基づいて開発された戦略は、大部分のがんバイオマーカーが、正常幹細胞をはじめとする正常細胞にも存在するという、課題に直面している。CSCを排除するためにタンパク質バイオマーカーを標的とする治療は、正常幹細胞も標的とし得ることから、正常細胞も排除されることになる。20

CSCにおける腫瘍特異的グリカン

【0390】

Thomsen-nouveau（Tn）抗原（GalNAc-O-Ser/Thr）の出現を含む異常な形態のグリコシル化が、非常に多くのヒトがんにおいて記載されており、グリカンを特定の腫瘍標的化に適する全く新規の腫瘍関連糖鎖抗原クラスとして同定されている（Rabuら、Future oncology、2012年、8巻、943～960頁）。Tnのシアリル誘導体（STn）の形成は、Tn抗原への2,6連結にシアル酸を付加させるシアリルransフェラーゼST6GalNAc-Iによって媒介される。Tnのシアリル化は、さらなる糖付加を防止し、かくして、さらなるグリカン伸長部を短縮する（Schnitzlerら、Cancer metastasis reviews、2012年、31巻、501～518頁）。30

【0391】

正常成人ヒト組織におけるSTnの存在は稀であるが、STnは、数ある中でも特に卵巣がん、膀胱がん、乳房がん、子宮頸がん、結腸がんおよび肺がんを含む、様々なヒトがんに出現する（Ferreiraら、Molecular oncology、2013年、7巻、719～731頁；Kinneyら、Cancer、1997年、80巻、2240～2249頁）。さらに、腫瘍におけるSTnの存在は、転移性疾患、予後不良、および全生存期間縮小に関連しており（Ferreiraら、Molecular oncology、2013年、7巻、719～731頁；Kinneyら、Cancer、1997年、80巻、2240～2249頁）、したがって、STnは、がんの検出および治療の非常に魅力的な標的と考えられる。STnの末端位置にある2つの異なる形態のシアル酸-Neu5AcおよびNeu5Gc-が存在する。ヒトは、不活性CMP-Neu5Acヒドロキシラーゼ(CMAH)遺伝子のためにNeu5Gcを合成することができないので、ヒトではNeu5Acシアリル化形態が優勢である。しかし、Neu5Gcを多く含む食物の摂取によって、外来Neu5Gcがヒト細胞に、特に、癌腫のヒト細胞に組み込まれることになる。以前の研究は、固形腫瘍がシアル酸のNeu5Gc形態を取り込んで発現することを示している（Inoueら、Glycobiology、2010年、20巻、752～762頁；Malykhら、Biochimie、2001年、83巻、623～634頁；Padler-Karavaniら、Cancer research、2011年、71巻、3352～3363頁）。可能性のあるがん標的であるStnの両方のグリコアイソフォーム[Neu5Ac-STn(AcSTn)およびNeu5Gc-STn(GcSTn)]と結合するmAbは、汎40

S T n 抗体と称される。

【 0 3 9 2 】

S T n の蓄積は、 固形腫瘍において繰り返し観察される特異的な体細胞突然変異に関連しており、 活性 T シンターゼの形成に必要となる分子シャペロンであるコア 1 ベータ 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ特異的分子シャペロン (C O S M C) をコードする遺伝子の不活性化にも関連している (Juら、 Nature、 2 0 0 5 年、 4 3 7 卷、 1 2 5 頁) 。 T - シンターゼは、 G a l N A c 基質について S T 6 G a l N A c I と競合するため、 突然変異により不活性されると、 S T n 合成が上昇する結果となる。 加えて、 S T n の蓄積はまた、 S T 6 G a l N A c I の発現増加の結果として生じることもあり、 これが観察されることが多い (Brockhausenら、 Biological chemistry、 2 0 0 1 年、 3 8 2 卷、 2 1 9 ~ 2 3 2 頁 ; Ikebaraら、 Glycobiology、 1 9 9 9 年、 9 卷、 1 2 1 3 ~ 1 2 2 4 頁) 。 S T n の新規発現は、 癌腫細胞をモジュレートし、 悪性表現型を変化させ、 より侵襲性の高い細胞拳動をもたらし得る (Pinhoら、 Cancer letters、 2 0 0 7 年、 2 4 9 卷、 1 5 7 ~ 1 7 0 頁) 。 しかるが故に、 S T n は、 興味深いがんバイオマーカーおよび治療標的であるばかりでなく、 S T n 機能への干渉は、 有意な機能的、 抗転移的、 治療的恩恵がある、 興味をそそる可能性をもたらす。

【 0 3 9 3 】

細胞の糖タンパク質のグリコシル化が、 がんにおいて変更されることはあるが、 异常なグリコシル化は、 糖タンパク質と問題のグリカンの両方に対して選択的であるようである。 実際、 ヒト腫瘍 C S C では、 C D 4 4 および M U C 1 のみが、 S T n 抗原の主要な担体であり (Cazetら、 Breast cancer research: BCR、 2 0 1 0 年、 1 2 卷、 2 0 4 頁 ; Julienら、 Glycobiology、 2 0 0 6 年、 1 6 卷、 5 4 ~ 6 4 頁) 、 これは、 成熟腫瘍細胞のみならず C S C も標的とする選択的アプローチを即座に示唆する。 その一方で、 M U C 1 は、 一部の上皮細胞の正常表面構成要素であり、 その上皮細胞で M U C 1 はバリア機能を果たす。 腫瘍関連 M U C 1 は、 成熟がん細胞において観察されるのと同じように C S C 上での低グリコシル化およびシアリル化増加によって特徴付けられ、 S T n は、 C S C と成熟腫瘍細胞の両方の特異的マーカーのように見える (Curryら、 Journal of surgical oncology、 2 0 1 3 年、 1 0 7 卷、 7 1 3 ~ 7 2 2 頁) 。 M U C 1 の異常なオリゴ糖プロファイルは、 シアリル - L e ^a (C A 1 9 - 9 試験に使用された) 、 シアリル - L e ^x およびシアリル - T n (T A G - 7 2) などのネオマーカー、 ならびにがん細胞 (例えば、 C S C) における T n などの隠れたエピトープの発現を生じさせる。 加えて、 グリコシル化不十分のため、 ムチンのペプチドコアが露出され、 その結果、 コア内のエピトープ (正常組織由来 M U C 1 内では接近できない) が、 潜在的抗原としての役割を果たし得る。

【 0 3 9 4 】

S T n を標的とする臨床的アプローチは、 今までのところ、 もっぱら S T n ワクチンからなっている。 最先端の臨床候補は、 キーホールリンペットヘモシアニンとカップリングされた S T n からなる治療ワクチンである T heratope である。 i n v i v o でのマウス研究において、 T heratope での免疫化は、 強力な抗体応答を誘導し、 この抗体応答が、 注射された S T n 発現乳癌細胞の増殖の遅延を媒介することが示された (Julienら、 British journal of cancer、 2 0 0 9 年、 1 0 0 卷、 1 7 4 6 ~ 1 7 5 1 頁) 。 しかし、 T heratope は、 転移性乳がんの第 I I I 相臨床試験でその主要エンドポイントを満たすことができなかった。 T heratope 試験がその主要エンドポイントに合格しなかった理由の有力な仮説は、 患者集団が、 登録前に S T n 発現について評価されなかったということである。 乳がんにおける S T n 発現は、 患者間で非常に不均一であり、 研究および検出方法に依存して 2 5 % ~ 8 0 % の幅があるので、 S T n 発現を応答と相關させる能力の欠如が、 T heratope からの一切の恩恵を隠してしまった可能性がある。 重要なこととして、 ホルモン療法を受けている患者のサブセットは、 T heratope で処置されたとき、 単独でのホルモン療法と比較して、 全生存期間中央値の有意な 7 . 5 カ月延長を示し (Ibrahimら、 Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology、 2 0 0 4 年、 2 2 卷、 2 5 4 7 50

頁；およびMilesら、The oncologist、2011年、16巻、1092～1100頁）、これにより、特定の患者集団においてSTnを標的とする治療の可能性が確認された。加えて、免疫応答は、ワクチン接種を受けた患者間で大幅に異なることが多いので、ワクチンアプローチは、抗体力値を制御またはモジュレートする能力を欠いており、その結果、患者間で治療的抗体曝露量に大きな幅が生じる。とはいえ、Theratopeは、毒性がほとんど無く、忍容性良好であったので、がん治療のためにSTnを標的とすることの安全性は実証された。

【0395】

がん細胞におけるSTn発現の分子的基礎について益々進む理解は、任意の細胞表面タンパク質上にSTnを発現する細胞が、多くの（全てではないにせよ）他のO-グリコシリ化細胞表面タンパク質上にもSTnを発現することになることを強く示唆し、これにより、STnは、広範に分布するがんに関連する治療の優れた標的となる。したがって、STnポジティブがん細胞集団では、CSCが濃縮されている可能性がある。加えて、最近のデータは、STn発現の抑止は、がんの侵襲性を弱め、転移挙動を有意に低下させることを示している（Gillら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2013年、110巻、E3152～3161頁）。

がん処置としてCSCを標的とする抗STn抗体

【0396】

いくつかの抗STn抗体が当分野において記載されているが、一部は、STn抗原またはシアリル化アイソフォームに対する低い特異性を示す。例えば、市販のB72.3抗STn抗体は、STnのみならずTn抗原とも結合することが示されている（Bapat, S. A.、(2010年) Human ovarian cancer stem cells. Reproduction, 140巻、33～41頁）。STnを標的とするモノクローナル抗体(mAb)であって、抗体依存性細胞傷害（ADCC）および／もしくは補体依存性細胞傷害（CDC）を誘導するように改変された抗体、または細胞傷害性ペイロードとコンジュゲートされた抗体[例えば、抗体薬物コンジュゲート（ADC）]を利用できることは、STn発現腫瘍を有するがん患者に有意な治療的恩恵の可能性をもたらす。加えて、そのような抗体は、治療に応答する可能性が最も高い患者を前もって選択するためのコンパニオン診断の開発も可能にするであろう。

【0397】

STnは、CSC表面抗原の1つまたは複数の上に存在することが多く、それらが一緒に、CSCに関連する幹細胞性および化学療法抵抗性の性質を促進するように機能する。したがって、抗STn抗体は、直接的会合および／またはADCCによってCSCを直接死滅させる可能性ばかりでなく、多彩な細胞表面タンパク質と結合してCSC生存能、自己再生および複製に不可欠なそれらの関連機能に干渉する、独特な機会を提供する可能性もある、CSC関連がん標的剤をもたらす。

【0398】

本明細書での論述の通り、CSC上のSTnを標的とすることの根拠および利点は、以下を含み得る：(1)多くの腫瘍特異的短縮型糖タンパク質は、がんにおいてSTnを有する；(2)STnは、CSCと成熟腫瘍細胞の両方におけるCD44、MUC1および、可能性として、他の重要な細胞表面マーカー上に優先的に発現され、したがって、増殖状態に関係なく、単一の治療剤によるこれらの腫瘍成分両方の標的化を可能にする、独特的グリカン標的である；(3)STnは、卵巣がんなどのバイオマーカーであるCA-125の成分でもある；(4)STnは、卵巣CSCマーカーCD44の成分である。したがって、Tnに連結されたシアリル酸のNeu5AcおよびNeu5Gc形態両方を包含するエピトープを標的とする、汎STnネズミ科動物mAbの使用は、CSCおよび（共通のエピトープによって）非CSC腫瘍細胞と結合してこれらの細胞を死滅させることになるか、またはこれらの細胞の機能を損なわせることになる。

【0399】

一部の実施形態では、本発明は、ヒトCSCおよび成熟腫瘍細胞を特異的に排除するた

10

20

30

40

50

めの抗汎 S T n m A b を提供する。本発明の一態様では、抗 S T n 抗体は、特定の糖ペプチドでも担体タンパク質でもなく、検証された S T n グリカン自体を標的とすることになり、これは、C S C 腫瘍集団上と非 C S C 腫瘍集団上両方の C D 4 4 、 M U C 1 または他の S T n グリコシリ化マーカーと結合する幅広い可能性をもたらすはずである。

【 0 4 0 0 】

腫瘍関連 S T n の標的化の並外れた特異性を考えると、本発明は、正常成人幹細胞を含む正常組織を温存することができ、それによって卓越した治療域が可能になる。

【 0 4 0 1 】

本発明に従って、がん性組織および / または腫瘍細胞集団に含有されるがん幹細胞 (C S C) と成熟がん細胞の両方を排除することによりヒト新生物を根絶することを目的とする独特な免疫療法の解決策が、本明細書で提供される。この排除は、がん性組織および / または腫瘍細胞集団内に独自に存在する細胞表面シアリル化 T n 抗原 (S T n) 構造を、がん幹細胞に関連するそのような構造を含めて、標的とすることによって、もたらされる。

10

結腸直腸がん

【 0 4 0 2 】

結腸直腸がん (C R C) は、4 番目に高い発生率を有し、現在、米国のがん関連死の 3 番目に多い原因である。現在、患者の 20 % は、転移性疾患と診断され、C R C を有する患者のおよそ 50 % は、ゆくゆくは転移を発症することになる。転移性疾患と診断された者の 5 年生存率は、13 . 1 % である。転移性結腸がん (m C R C) を有する患者には、治療用抗体 (例えは、モノクローナル抗体) 、例えは、抗上皮増殖因子受容体 (E G F R) モノクローナル抗体 (例えは、セツキシマブおよびパニツムマブ) ならびに抗血管内皮増殖因子 (V E G F) モノクローナル抗体 (例えは、ベバシズマブおよびラムシルマブ) の使用が優先される。

20

【 0 4 0 3 】

S T n の発現は、C R C 患者試料の 83 . 4 % に存在すると報告されており、悪性度上昇および予後不良と相関関係がある。S T n 抗原は、成人正常結腸細胞に存在するが、in vivo で自然に発生しないプロセスである鹼化による O - アセチル基の除去後にしか検出することができない (Julienら、Biomolecules、2012年、2巻、435 ~ 466 頁)。それ故、C R C を処置するための治療標的として S T n を使用することができる。

30

【 0 4 0 4 】

一部の実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体は、C R C および / または m C R C を処置するために使用することができる。一部の場合には、そのようなグリカン相互作用抗体は、本明細書に記載のもののいずれかを含むがそれらに限定されない、抗 S T n 抗体である。C R C および / または m C R C を処置するために使用されるグリカン相互作用抗体は、細胞傷害性薬剤 (例えは、M M A E および M M A F) とコンジュゲートされていることもある。グリカン相互作用抗体は、化学療法剤 (例えは、フルオロピリミジン、オキサリプラチンおよび / もしくはイリノテカン) での治療ならびに / または治療用抗体 (例えは、セツキシマブ、パニツムマブ、ベバシズマブおよび / もしくはラムシルマブ) の治療などの、他の治療と組み合わせて使用することができる。一部の場合には、1つまたは複数の他の治療的処置に対して抵抗性である結腸直腸がんを処置するためにグリカン相互作用抗体を使用することができる。

40

【 0 4 0 5 】

一部の実施形態によれば、結腸直腸がんを処置するために使用されるグリカン相互作用抗体を、約 0 . 5 m g / k g ~ 約 20 m g / k g の用量で、投与することができる。例えは、抗体を、約 0 . 5 m g / k g ~ 約 2 m g / k g 、約 1 m g / k g ~ 約 5 m g / k g 、約 2 . 5 m g / k g ~ 約 10 m g / k g 、または約 5 m g / k g ~ 約 20 m g / k g の用量で、投与することができる。

卵巣がん

50

【0406】

一部の実施形態では、本開示の方法は、卵巣がんを処置する方法を含む。卵巣がんは、2013年に米国の女性が罹患した主要婦人科がんである。22, 240名の女性が診断され、14, 030名がこの疾患で死亡すると推定され、このため、卵巣がんは、米国において5番目に多い女性関連がん死亡原因および最も致死性の高い婦人科悪性疾患ということになる(Siegelら、Cancer statistics、2013年、CA: a cancer journal for clinicians、63巻、11～30頁)。この高い死亡率は、無症状の発病、末期段階の初期診断、この種類のがんの侵襲性、および治療的標的化可能な遺伝的变化の一般的欠如に起因し得る。現在の標準ケアは、腫瘍減量、その後のタキサンおよび白金に基づく化学療法である。この初期処置の結果、患者の約70%は、初期の臨床的完全奏効を達成するが、残念なことに、これらの患者の大多数が化学療法抵抗性疾患を再発することになる(Fosterら、Cancer letters、2013年、338巻、147～157頁；およびMcCannら、PloS one、2011年、6巻、e28077頁)。一つには、再発性疾患は、他のがん型と同様に、全腫瘍集団中のCSCの存在に原因があるとされている。実際、卵巣CSCは、化学療法および放射線療法に対して抵抗性であることが確認され、示されている(Burgos-Ojedaら、Cancer letters、2012年、322巻、1～7頁)。したがって、この場合もやはり他の形態のがんと同様に、がん性組織および／または腫瘍細胞集団中の成熟細胞とともにCSCを排除することが、再発性疾患を管理して理想的には治癒を果たすという最高の希望をもたらす。

10

【0407】

本発明の一部の実施形態では、抗STn抗体を使用して卵巣がんを処置する方法が提供される。方法は、卵巣がんを有するまたは有することが疑われる対象に抗STn抗体を投与することを含む。一部の実施形態では、がん性組織および／または腫瘍細胞集団に存在するものを含むがこれらに限定されない卵巣CSCを、卵巣がん処置の標的とすることができる。CD133は、推定的卵巣CSCマーカーのうち最も広く研究されているものであるが、上で論じたようにSTnの公知担体であるCD44が、卵巣がんと関連しており、卵巣CSCを同定するための一連のマーカーに含まれることは、認知されている(Zhangら、Cancer research、2008年、68巻、4311～4320頁；Fosterら、Cancer letters、2013年、338巻、147～157頁；およびZoller、Cancer、2011年、11巻、254～267頁)。さらに、STnは、周知卵巣がんバイオマーカーであるCA-125(MUC16)上はもちろんMUC1上にも発現され、最近では、血清中のこれらのSTn関連ムチンのレベルが、がん性卵巣疾患の良性卵巣疾患に対するさらなる差別化要因として使用されている。STnの血清中レベル上昇は、卵巣がん患者の約50%において発生し、より低い5年生存率と相關する(Kobayashiら、Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology、1991年、9巻、983～987頁；Kobayashiら、Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology、1992年、10巻、95～101頁；およびChenら、Journal of proteome research、2013年、12巻、1408～1418頁)。最後に、Vathipadiekalらは、ヒト原発性卵巣癌CSC集団と非CSC集団との間の差次の遺伝子発現の研究において、2つのコンパートメントからの細胞間でSTn生成シリルトランスフェラーゼST6GalNAc-Iの発現に差がないことを見いだした。

20

30

【0408】

一部の実施形態では、卵巣がんを有するまたは有することが疑われる対象に本明細書に記載の方法に従って抗STn抗体を投与することは、そのような対象におけるSTnポジティブ細胞の低減、および／あるいはそのような対象における1つもしくは複数の卵巣がん性組織または腫瘍細胞集団の低減につながる。一部の実施形態では、この低減は、約10%～約90%より高い%（例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、または少なくとも約90%）

40

50

の S T n ポジティブ細胞の減少を含み得る。

【 0 4 0 9 】

一部の実施形態では、本発明は、 C S C に関するがんを予防する、管理するまたは治癒させるための、 C S C を標的とする抗体を提供する。そのような抗体は、本明細書に記載のもののいずれかを含むがそれらに限定されない、抗 S T n 抗体を含み得る。さらなる抗 S T n 抗体としては、抗体 3 F 1 (S B H Sciences, Natick, MA) またはその誘導体を挙げることができ、この誘導体には、 3 F 1 からの C D R との組換え抗体、および / またはヒト化誘導体が含まれる。

【 0 4 1 0 】

一部の実施形態では、本発明の抗 S T n 抗体は、他の処置形態に対して抵抗性である卵巣がん幹細胞を標的化するために使用することができる。そのような処置は、化学療法を含み得る。本明細書で使用される場合、用語「化学療法」は、化学物質を使用する処置形態を指す。そのような化学物質は、本明細書では「化学療法剤」と呼ばれる。がんの処置の場合、化学療法剤は、がん細胞の増殖を緩徐化するまたは妨げる薬剤である。本明細書で使用される場合、用語「化学療法に抵抗性の (chemotherapy-resistant) 」または「化学療法抵抗性 (chemoresistant) 」は、化学療法処置による影響を受けないまたは化学療法処置に対してわずかな感受性しか有さない細胞を指すために使用される。そのような化学療法処置は、オラパリブ、カルボプラチニンおよび / またはパクリタキセルを含み得る。化学療法に抵抗性の卵巣がん幹細胞を標的とする方法は、化学療法処置後に起こる卵巣がん幹細胞における S T n 発現の変化を活用し得る。一部の場合には、化学療法に抵抗性の卵巣がん幹細胞は、化学療法処置前および / または後に S T n を発現する。一部の場合には、化学療法に抵抗性の卵巣がん幹細胞における細胞表面 S T n 発現は、化学療法処置後に増加され得る。オラパリブ、カルボプラチニンおよび / またはパクリタキセルでの化学療法処置後、一部の卵巣がん幹細胞は増殖し、その結果、オラパリブ、カルボプラチニンおよび / またはパクリタキセル抵抗性である S T n 発現がん細胞集団が生じ得る。一部の実施形態では、抗 S T n 抗体は、オラパリブ、カルボプラチニンおよび / またはパクリタキセル抵抗性細胞を標的化するために使用することができる。一部の場合には、これらの抵抗性細胞は、がん幹細胞である。一部の実施形態では、対象の抗 S T n 抗体処置を、オラパリブ、カルボプラチニンおよび / またはパクリタキセルでの対象の処置後に行うことができる。

【 0 4 1 1 】

したがって、本発明の方法は、卵巣がんを有する対象に抗 S T n 抗体を投与することによりがんを処置する方法を含み得る。抗 S T n 抗体を化学療法剤（例えば、オラパリブ、カルボプラチニンおよび / またはパクリタキセル）での処置前に投与してもよく、処置中に投与してもよく、または処置後に投与してもよい。抗 S T n 抗体は、化学療法剤（例えば、オラパリブ、カルボプラチニンおよび / またはパクリタキセル）の投与前、投与中および / または投与後に存在する S T n 発現卵巣がん幹細胞を標的とすることができます。抗 S T n 抗体は、配列番号 1 ~ 12 の 1 つまたは複数から選択されるアミノ酸配列を有する可変ドメインを含み得る。一部の実施形態では、抗 S T n 抗体は、抗体 - 薬物コンジュゲートである。そのような抗体薬物コンジュゲートは、細胞傷害性薬剤（例えば、モノメチルアウリストチン E ）を含み得る。抗 S T n 抗体で処置された対象におけるがん性組織は、 S T n ポジティブ細胞の低減を経験し得る。一部の実施形態では、この低減は、約 10 % ~ 約 90 % より高い % (例えば、少なくとも約 10 % 、少なくとも約 20 % 、少なくとも約 30 % 、少なくとも約 40 % 、少なくとも約 50 % 、少なくとも約 60 % 、少なくとも約 70 % 、少なくとも約 80 % 、少なくとも約 85 % 、または少なくとも約 90 %) の S T n ポジティブ細胞の減少を含み得る。抗体は、 C S C を標的とし得る。

【 0 4 1 2 】

一部の実施形態では、化学療法に抵抗性の 1 つまたは複数の卵巣がん幹細胞を有する対象を、 1 つまたは複数の化学療法剤（例えば、オラパリブ、カルボプラチニンおよび / またはパクリタキセル）での処置後に、本発明の抗 S T n 抗体で処置することができる。化学

10

20

30

40

50

療法剤処置後の抗 S T n 抗体処置は、腫瘍復活を防止し得る。腫瘍復活は、1つもしくは複数の腫瘍細胞または腫瘍のレベルが（過去のまたは現行の治療に起因して）低下された後の、1つもしくは複数の腫瘍細胞または腫瘍の発生である。

【 0 4 1 3 】

卵巣がんを処置する一部の方法では、本開示の抗 S T n 抗体は、幹細胞性および／または分化に起因する細胞シグナル伝達のモジュレーションと組み合わせて投与される。そのようなモジュレーターとしては、ノッチおよび／またはヘッジホッグシグナル伝達のモジュレーターを挙げることができる。

【 0 4 1 4 】

本開示の方法は、卵巣がんを有するまたは有することが疑われる対象から試料を採取するステップ、および試料中の S T n を検出し、 S T n が検出された場合には抗 S T n 抗体を対象に投与するステップにより、卵巣がんを処置する方法を含む。一部の実施形態では、試料は、細胞試料（例えば、がん性組織試料または腫瘍試料）である。細胞試料は、 B R C A 1 突然変異型細胞または非 B R C A 1 突然変異型細胞を含み得る。

10

【 0 4 1 5 】

対象試料における S T n 検出は、分子化合物の検出のための当技術分野において公知の任意の方法により行うことができる。そのような方法は、1つまたは複数の S T n 検出用抗体の使用を含み得る。 S T n 検出用抗体は、 S t n に結合することができる任意の抗体を含み得る。一部の S T n 検出方法としては、これらに限定されないが、質量分析、ウェスタンプロット法、フローサイトメトリー、免疫沈降法、および酵素結合免疫吸着アッセイ（ E L I Z A ）を挙げることができる。一部の実施形態では、タンパク質会合 S T n が検出される。

20

【 0 4 1 6 】

一部の実施形態では、検出される S T n は、卵巣がん幹細胞関連タンパク質と会合していることがある。本明細書で使用される場合、用語「卵巣がん幹細胞関連タンパク質」は、1つまたは複数の卵巣がん幹細胞に関連付けられる任意のタンパク質を指す。そのようなタンパク質としては、これらに限定されないが、細胞表面タンパク質、マーカー、細胞内タンパク質、転写因子、ならびに卵巣がん幹細胞の生存、増殖、複製および／または維持に影響を与える細胞シグナル伝達に関するタンパク質を挙げることができる。卵巣がん幹細胞関連タンパク質としては、これらに限定されないが、ノッチ、ヘッジホッグ、 M U C 1 、 C D 4 4 、 C D 1 1 7 、 C D 1 3 3 、およびインテグリンを挙げができる。

30

【 0 4 1 7 】

一部の実施形態では、本開示は、オラパリブおよび抗 S T n 抗体での併用処置を提供することを含む、卵巣がんを処置する方法を提供する。そのような方法は、オラパリブで対象を処置すること、その後、抗 S T n 抗体で対象を処置することを含み得る。一部の場合には、卵巣がんを処置する方法は、オラパリブでの処置に十分応答しない対象を同定するステップ、および抗 S T n 抗体を対象に投与するステップを含む。

【 0 4 1 8 】

本開示の方法は、地固めがん処置方法を含み得る。地固め処置は、持続的寛解を達成するために行われる処置である。典型的に、地固め処理は、毒性レベルを低く保ちながら腫瘍復活を防止するためにより低い化学療法用量を含む。地固めがん処置のための本開示の方法は、少なくとも1つの化学療法剤を投与することにより対象におけるがん細胞数を低減させるステップ、および抗 S T n 抗体を投与することにより対象におけるがん細胞の低減数または対象における1つもしくは複数のがん性組織中のがん細胞の低減数を維持する（またはその数をさらに低減させる）ステップを含み得る。一部の実施形態では、がんは、卵巣がんである。化学療法剤は、オラパリブ、カルボプラチニンおよび／またはパクリタキセルであり得る。一部の実施形態では、抗 S T n 抗体は、抗体薬物コンjugate (A D C) である。 A D C は、モノメチルアウリストチン E (M M A E) を含み得る。

40

50

【 0 4 1 9 】

一部の実施形態では、本開示の方法は、1つまたは複数の抗S T n抗体の投与によって卵巣腫瘍細胞を完全に根絶して永続性初期寛解を誘導することを含む。他の方法は、一部の場合には過度の毒性を伴わない、1つまたは複数の抗S T n抗体の投与による、ある期間の卵巣腫瘍復活の阻害を含む。そのような期間は、約1ヶ月～約18ヶ月、約1年～約5年、約2年～約10年であることもあり、または10年より長いこともある。

【 0 4 2 0 】

一部の場合には、本開示は、がんを処置する方法であって、対象から1つまたは複数の卵巣腫瘍細胞を単離するステップと、1つまたは複数の卵巣腫瘍細胞を用いて宿主（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ブタまたは靈長類）において異種移植腫瘍を生成するステップと、1つまたは複数の抗S T n抗体を宿主に投与するステップと、試験した1つまたは複数の抗S T n抗体のうちの少なくとも1つを選択して、治療用抗体として使用して、対象を処置するステップとを含む方法を提供する。抗S T n抗体は、宿主における腫瘍体積を低減させるその抗体の能力に基づいて選択することができる。

免疫関連標的**【 0 4 2 1 】**

一部の実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体は、免疫調節活性抗体であり得る。本明細書で使用される場合、免疫調節性抗体は、1つもしくは複数の免疫機能または経路を増強あるいは抑制する抗体である。

【 0 4 2 2 】

多くの細菌グリカンがシアル酸を含むことは公知である。一部の場合には、そのようなグリカンにより、細菌は、ヒトを含むがこれに限定されない、宿主の自然免疫系から逃れることができる。一例を挙げれば、細菌グリカンは、H因子認識によって代替補体経路活性化を阻害する。別の例では、細菌グリカンは、抗原性であり得る、基礎をなす残基を隠蔽する。一部の細菌グリカンは、ある特定のシアリル化部分構造を含む実体に対する免疫応答を減弱させる阻害性シアル酸結合Ig様レクチン（シグレック）の活性化によって細胞シグナル伝達事象に関与する（Chen, X.ら、*Advances in the biology and chemistry of sialic acids*. ACS Chem Biol.、2010年2月19日；5巻（2号）：163～76頁）。一部の実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体は、細菌グリカンに関する免疫合併症を処置するために使用することができる。

【 0 4 2 3 】

本明細書に記載されるようなNeu5Gcの外来性のため、一部のNeu5Gcグリカンは免疫原性であり、その結果、これらのグリカンを発現し得る細胞および他の実体の免疫関連破壊が生じることになる。そのような自己免疫破壊は、病原性であり得る。一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、Neu5Gcグリカンに関する自己免疫障害に罹患している患者を処置するために使用することができる。

【 0 4 2 4 】

一部の実施形態では、本発明の免疫調節性抗体は、T細胞媒介性免疫を促進または抑制するために使用することができる。そのような抗体は、T細胞上、T細胞関連タンパク質上、および/またはT細胞と相互作用する1つもしくは複数の他の細胞型上に存在する、1つあるいは複数のグリカンと相互作用することができる。T細胞媒介性免疫を増強する免疫調節性抗体は、がん細胞のT細胞媒介標的化を刺激するために使用することができる。

【 0 4 2 5 】

一部の腫瘍では、腫瘍関連マクロファージ（TAM）による浸潤が免疫抑制につながり、したがって、細胞の生存および増殖を促進することができる。これは、TAM上に存在する骨髄系C型レクチン受容体（CLR）と腫瘍関連ムチンとの相互作用によって起こる免疫抑制性細胞シグナル伝達に起因すると考えられる（Allavena, P.ら、*Clin Dev Immunol.*、2010年；2010巻；547179頁）。一部の実施形態では、1つまたは複数の腫瘍関連ムチンまたはTACAとの本発明の免疫調節性抗体の結合は、TAMにおける

10

20

30

40

50

る免疫抑制性細胞シグナル伝達を防止する。

獣医学応用

【0426】

本発明のグリカン相互作用抗体は、非ヒト脊椎動物のケアおよび処置を含む、獣医学的ケアの分野で利用することができるであろう。本明細書に記載の場合、用語「非ヒト脊椎動物」は、*Homo sapiens*を除くすべての脊椎動物を含み、これには野生種ならびに家畜化された種、例えば伴侶動物および家畜が含まれる。非ヒト脊椎動物は、哺乳動物、例えば、アルパカ、バンテン、バイソン、ラクダ、ネコ、ウシ、シカ、イヌ、ロバ、ガヤル、ヤギ、モルモット、ウシ、ラマ、ラバ、ブタ、ウサギ、トナカイ、ヒツジ、水牛、およびヤクを含む。家畜は、食品などの材料を生産するために、労働のために、ならびに纖維および化学薬品などの製品を得るために、農業環境で飼育される、家畜化された動物を含む。一般に、家畜は、農業上重要である可能性があるすべての哺乳動物、鳥類および魚類を含む。特に、四脚食肉用動物は、去勢雄牛、若い雌牛、牛、仔牛、雄牛、ウシ、ブタおよびヒツジを含む。

10

バイオプロセシング

【0427】

本発明の一部の実施形態では、遺伝子発現をモジュレートすることができるまたは產生されたグリカンのレベルおよび／もしくはタイプを変更することができる1つあるいは複数のグリカン相互作用抗体（例えば、抗体または融合タンパク質）と宿主細胞を接触させることにより、宿主細胞においてバイオ製品を產生する方法であって、そのようなモジュレーションまたは変更がバイオ製品の產生を増進させる、方法がある。本発明によれば、本発明のグリカン相互作用抗体の1つまたは複数を使用することによってバイオプロセシング方法を向上させることができる。1つまたは複数のグリカン相互作用抗体を補給する、置き換える、または加えることによっても、バイオプロセシング方法を向上させることができる。

20

診断薬

【0428】

一部の実施形態では、本発明の化合物および組成物を診断薬として使用することができる。一部の場合には、本発明の抗体は、標的抗原を発現する細胞、組織、器官などを同定、標識または染色するために使用することができる。さらなる実施形態では、本発明の抗体は、がん性細胞を有することが分かっているまたは疑われる組織を含む組織切片（すなわち、組織学的組織切片）中に存在するSTnを同定するために使用することができる。本発明の抗体のそのような使用方法は、一部の場合には、組織切片中のがん性細胞または腫瘍を同定するために使用することができる。組織切片は、乳房、結腸、脾臓、卵巣、脳、肝臓、腎臓、脾臓、肺、皮膚、胃、腸、食道または骨を含むがこれらに限定されない、任意の組織または器官からのものであり得る。

30

【0429】

一部の実施形態では、本発明の診断方法は、免疫組織化学的手法を使用する1つもしくは複数の細胞または組織の分析を含み得る。そのような方法は、本明細書に記載のグリカン相互作用抗体のいずれかの1つまたは複数の使用を含み得る。本発明の免疫組織化学的方法は、1つもしくは複数のグリコシリ化タンパク質または他のマーカーの存在および／あるいはレベルを判定するために組織切片を染色することを含み得る。組織切片は、対象腫瘍（例えば、患者腫瘍、および動物腫瘍、例えば動物モデル腫瘍）からのものであってもよい。組織切片は、ホルマリン固定または非固定新鮮凍結組織から得られることもある。一部の場合には、組織切片は、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織から得られる。本明細書に記載のグリカン相互作用抗体は、一次抗体として使用することができる。一次抗体は、組織切片と直接接觸させて標的エピトープと結合させるために使用される。一次抗体を、検出可能な標識と直接コンジュゲートさせてもよく、または二次抗体などの検出剤の使用によって検出してよい。一部の実施形態では、一次抗体または検出剤は、基質と反応させて可視生成物（例えば、沈殿）を生成するために使用することができ

40

50

る酵素を含む。そのような酵素としては、これらに限定されないが、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、およびカタラーゼを挙げることができる。

【0430】

本明細書に記載の抗 S T n 抗体を本開示の免疫組織化学的方法に従って使用して、組織または細胞中の S T n グリコシル化タンパク質を検出することができる。一部の場合には、これらの抗体は、腫瘍組織中の S T n のレベルを検出および／または判定するために使用される。そのような腫瘍組織は、腫瘍マイクロアレイに含まれている腫瘍組織を含み得る。適する腫瘍型としては、これらに限定されないが、乳房、結腸、卵巣、膵臓、皮膚、腸、肺および脳腫瘍が挙げられる。免疫組織化学的染色手法に使用される抗 S T n 抗体のレベルを変えて、可視染色を増加させること、またはバックグラウンド染色レベルを低下させることができる。一部の実施形態では、約 0 . 0 1 μ g / m l ~ 約 5 0 μ g / m l の抗体濃度が使用される。例えば、約 0 . 0 1 μ g / m l ~ 約 1 μ g / m l 、約 0 . 0 5 μ g / m l ~ 約 5 μ g / m l 、約 0 . 1 μ g / m l ~ 約 3 μ g / m l 、約 1 μ g / m l ~ 約 1 0 μ g / m l 、約 2 μ g / m l ~ 約 2 0 μ g / m l 、約 3 μ g / m l ~ 約 2 5 μ g / m l 、約 4 μ g / m l ~ 約 3 0 μ g / m l 、または約 5 μ g / m l ~ 約 5 0 μ g / m l の抗体濃度が使用され得る。

10

【0431】

一部の実施形態では、本発明の診断方法は、 S T n 連結糖タンパク質プロファイルを生成する方法を含む。本明細書で使用される場合、用語「 S T n 連結糖タンパク質プロファイル」は、試料中のもしくは対象における S T n 連結糖タンパク質のレベルおよび／または正体を示す一連の情報を指す。 S T n 連結糖タンパク質プロファイルを生成する方法は、対象から採取した試料を用いて行うことができる。そのような試料は、本明細書に記載のもののいずれかを含むがこれらに限定されない、生体試料であってよい。生体試料は、細胞試料であってもよい。一部の場合には、細胞試料は、少なくとも 1 つの腫瘍細胞を含み得る。一部の実施形態では、腫瘍細胞試料は、 B R C A 1 突然変異型腫瘍細胞または非 B R C A 1 突然変異型腫瘍細胞を含み得る。

20

【0432】

S T n 連結糖タンパク質プロファイルに含まれる糖タンパク質としては、これらに限定されないが、がん細胞マーカー、幹細胞マーカー、がん幹細胞マーカーおよび幹細胞関連タンパク質を挙げることができる。一部の実施形態では、 S T n 連結糖タンパク質プロファイルの一部として同定および／または定量される糖タンパク質としては、これらに限定されないが、 C D 4 4 、 C D 1 3 3 、 C D 1 1 7 、インテグリン、ノッチおよびヘッジホッグを挙げることができる。

30

【0433】

S T n 連結糖タンパク質プロファイル中の S T n 連結糖タンパク質のレベルおよび／または正体は、タンパク質を同定するおよび／またはタンパク質レベルを定量するための当技術分野において公知の任意の方法に従って判定することができる。一部の実施形態では、そのような方法としては、これらに限定されないが、質量分析、アレイ分析（例えば、抗体アレイまたはタンパク質アレイ）、ウェスタンプロット法、フローサイトメトリー、免疫沈降法、および E L I S A を挙げることができる。 S T n 連結糖タンパク質は、一部の場合には、分析前の試料から免疫沈降され得る。そのような免疫沈降法を、抗 S T n 抗体を使用して行うことができる。 S T n 連結糖タンパク質の免疫沈降に使用される抗 S T n 抗体は、当技術分野において公知のまたは本明細書に記載のもののいずれかを含み得る。一部の実施形態では、 S T n 糖タンパク質は、抗 S T n 抗体を使用して生体試料から免疫沈降され、次いで、質量分析を使用して同定および／または定量される。

40

【0434】

一部の実施形態では、がん処置は、 S T n 連結糖タンパク質プロファイル情報から情報を得る。従って、本開示は、がんを処置する方法であって、がん処置を必要とする対象から試料を採取するステップと、試料から S T n 連結糖タンパク質プロファイルを生成する

50

ステップと、S T n 連結糖タンパク質プロファイルから S T n グリコシル化タンパク質と結合するグリカン相互作用抗体を選択するステップと、グリカン相互作用抗体を対象に投与するステップとを含む方法を提供する。そのような方法に従って投与されるグリカン相互作用抗体は、本明細書で教示される 1 つもしくは複数の C D R または可変ドメインを含み得る。

【 0 4 3 5 】

一部の実施形態では、本開示の方法をコンパニオン診断として使用することができる。本明細書で使用される場合、用語「コンパニオン診断」は、その結果が対象の診断または処置に役立つアッセイを指す。コンパニオン診断は、患者の疾患、障害または状態の重症度レベルを層別化するのに有用であり得、この層別化によって、費用を削減するための、臨床試験の継続期間を短縮するための、安全性を増大させるための、および / または有効性を増大させるための、処置レジメンおよび用量のモジュレーションが可能になる。コンパニオン診断は、疾患、障害または状態の発症を予測するために、および予防的治療の処方に役立つように、使用することができる。一部のコンパニオン診断は、1 つまたは複数の臨床試験の対象を選択するために使用することができる。一部の場合には、コンパニオン診断アッセイは、特定の処置と連携して処置の最適化を助長することができる。

10

【 0 4 3 6 】

一部の実施形態では、本開示の方法は、がんに関連する疾患、障害および / または状態についてのコンパニオン診断として有用であり得る。本発明の一部のコンパニオン診断は、がんの 1 つもしくは複数の形態の重症度を予測および / または判定するのに有用であり得る。本発明の一部のコンパニオン診断は、がんの 1 つまたは複数の形態を発症するリスクにより対象を層別化するために使用することができる。本発明の一部のコンパニオン診断は、がん治療のための創薬を助長および促進するために使用することができる。

20

【 0 4 3 7 】

一部の実施形態では、本開示は、捕捉抗体および検出抗体の使用によって試料中の S T n を検出ならびに / または定量する方法を提供する。本明細書で使用される場合、「捕捉抗体」は、検出することができるような形で分析物に結合する抗体である。捕捉抗体は、表面または他の担体と会合していることもある。検出抗体は、分析物の存在または非存在の観測を助長する抗体である。一部の実施形態では、捕捉抗体と検出抗体の両方が S T n と結合する。そのような実施形態によれば、捕捉抗体および検出抗体は、異なる種に由来し得る。これにより、検出抗体のみを認識し、捕捉抗体の存在による影響を受けない、二次抗体の使用が可能になる。一部の実施形態では、捕捉抗体は、S T n と結合することができ、検出抗体は、結合した S T n のタンパク質または担体と結合することができる。試料中の S T n 検出に使用される捕捉抗体および検出抗体は、本明細書に提示される抗 S T n 抗体のいずれかのみならず市販の抗 S T n 抗体からも選択することができる。

30

S T n 発現修飾細胞

【 0 4 3 8 】

一部の実施形態では、本開示は、S T n レベルが変更された修飾細胞を提供する。そのような細胞は、様々な目的（例えば、実験、治療、抗体試験などの目的）に使用することができる。一部の場合には、本開示の方法は、1 つもしくは複数の細胞または組織における S T 6 G a 1 N A c I の発現を増進させる方法を含む。この方法は、細胞 S T n （例えば、表面で発現される S T n ）の発現が増加されている 1 つまたは複数の細胞の生成をもたらすことができる。例えば、S T 6 G a 1 N A c I 発現構築物を担持する 1 つまたは複数のベクターを導入することにより、S T 6 G a 1 N A c I の発現を増強することができる。そのような発現構築物は、天然 S T 6 G a 1 N A c I プロモーターを用いて、または遺伝子発現を増強するためのプロモーターを用いて、設計することができる。遺伝子発現の増強用に構成されたプロモーターは、構成的活性または過剰活性プロモーター要素を有し得る。一部の場合には、プロモーターは、誘導性遺伝子発現用に構成され得る。そのようなプロモーターは、プロモーターの誘導性エレメントを活性化する因子と接触したときに活性になることもあり、またはそのときには活性が上昇していることも

40

50

ある。S T n 発現構築物は、Julien, S. ら、2001年、Glycoconj J、18巻：883～93頁に記載されているような h S T 6 G a 1 N A c I p R c - C M V を含むことができ、前記参考文献の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。一部の実施形態では、発現構築物は、S T n 合成および／または発現に関与する他の因子をコードし得る。そのような因子としては、これらに限定されないが、T - シンターゼ、およびコア 1 ベータ 3 - ガラクトシルトランスフェラーゼ特異的分子シャペロン (C O S M C) を挙げることができる。一部の実施形態では、ほとんど S T n を発現しない細胞が、S T n 発現細胞に変換される。そのような細胞としては、これらに限定されないが、S K O V 3 細胞、B R C A 1 突然変異型細胞および非突然変異型 B R C A 1 細胞を挙げることができる。

10

【0439】

未修飾細胞と比べて S T n 発現が減少された修飾細胞も提供される。したがって、本開示の方法は、S T n 発現を抑制する方法を含む。そのような方法は、S T 6 G a 1 N A c I 発現を低減させることを含み得る。一部の実施形態では、そのような方法は、S T 6 G a 1 N A c I 発現を抑圧する 1 つまたは複数の核酸分子の投与を含み得る。そのような核酸分子としては、これらに限定されないが、阻害性 RNA (例えば、R N A i またはサイレンサー s i R N A) を挙げることができる。一部の実施形態では、S T n 合成および／または発現に関与する他の因子を低減させることができる。そのような因子としては、これらに限定されないが、T - シンターゼおよび C O S M C を挙げることができる。一部の実施形態では、S T n を天然に発現する細胞が、S T n 欠損細胞に変換される。そのような細胞としては、これらに限定されないが、O V C A R 3 細胞および O V C A R 4 細胞を挙げができる。

20

I I I . 医薬組成物

【0440】

一部の実施形態では、本開示は、医薬組成物を含む。そのような医薬組成物は、本開示の抗体および／または断片、そのような抗体に由来するペプチドまたはタンパク質を含み得る。医薬組成物をバイオアベイラビリティ、治療域および／または分布容積の 1 つもしくは複数によって特徴付けることができる。

バイオアベイラビリティ

30

【0441】

グリカン相互作用抗体は、本明細書に記載されるような送達／製剤化剤またはビヒクルを用いて組成物に製剤化されたとき、本明細書に記載されるような送達剤を欠いている組成物と比較してバイオアベイラビリティの上昇を示すことができる。本明細書で使用される場合、用語「バイオアベイラビリティ」は、哺乳動物に投与された所与の量のグリカン相互作用抗体の全身アベイラビリティを指す。バイオアベイラビリティは、未変形態の化合物の、動物へのその化合物の投与後の、曲線下面積 (A U C) または最大血清もしくは血漿濃度 (C_{m a x}) を測定することにより、評定することができる。A U C は、横座標 (X 軸) の時間に対して縦座標 (Y 軸) の化合物の血清または血漿濃度をプロットする曲線下面積の規定である。一般に、特定の化合物についての A U C は、当業者に公知の方法および参考により本明細書に組み入れられる G. S. Banker, Modern Pharmaceutics, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, 72巻、Marcel Dekker, New York, Inc., 1996 年に記載されているような方法を使用して、計算することができる。一部の実施形態では、A U C は、線形台形法と線形／線形補間を使用して計算される。A U C は、濃度をかけた時間の単位 (すなわち、時間の単位 × 質量の単位 / 容積の単位) で表すことができる。例えば、A U C は、日 × μ g / m l の単位で表すことができる。各濃度対時間曲線の終末消失相は、観察された 1 つまたは複数の最終濃度値を使用して同定することができる。終末消失相の傾きは、非重み付き濃度データで対数線形回帰を使用して決定することができる。

40

【0442】

C_{最大} 値は、投与後に達成される、対象の血清または血漿中の化合物の最大濃度である

50

。特定の化合物の C_{最大} 値は、当業者に公知の方法を使用して測定することができる。語句「バイオアベイラビリティを上昇させること」または「薬物動態を向上させること」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物において AUC、C_{最大}、または C_{最小} として測定されるグリカン相互作用抗体の全身アベイラビリティが、本明細書に記載されるような送達剤と併用投与されたとき、そのような併用投与が行われないときより高いことを意味する。一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体のバイオアベイラビリティを、少なくとも約 2 %、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、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 %、または約 100 % 上昇させることができる。
10

【0443】

一部の実施形態では、抗 S T n 抗体のバイオアベイラビリティは、医薬組成物投与後に判定され得る。抗 S T n 抗体は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない治療剤を含む抗体薬物コンジュゲートであってもよい。治療剤は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない、細胞傷害性薬剤であってもよい。細胞傷害性薬剤は、MMAE であってもよい。細胞傷害性薬剤は、リンカーにより抗体に繋がっていてもよい。本開示の医薬組成物は、抗 S T n 抗体を対象に提供するために使用することができ、その場合、抗 S T n 抗体は、約 1 μg / m l ~ 約 5 μg / m l、約 2 μg / m l ~ 約 10 μg / m l、約 3 μg / m l ~ 約 15 μg / m l、約 4 μg / m l ~ 約 20 μg / m l、約 5 μg / m l ~ 約 50 μg / m l、約 20 μg / m l ~ 約 100 μg / m l、約 50 μg / m l ~ 約 200 μg / m l、約 75 μg / m l ~ 約 150 μg / m l、または約 100 μg / m l ~ 約 500 μg / m l の C_{最大} を示す。本開示の医薬組成物は、抗 S T n 抗体を対象に提供するために使用することができ、その場合、抗 S T n 抗体は、約 1 日 × μg / m l ~ 約 5 日 × μg / m l、約 2 日 × μg / m l ~ 約 10 日 × μg / m l、約 5 日 × μg / m l ~ 約 50 日 × μg / m l、約 20 日 × μg / m l ~ 約 200 日 × μg / m l、約 100 日 × μg / m l ~ 約 500 日 × μg / m l、または約 250 日 × μg / m l ~ 約 1000 日 × μg / m l の AUC (投与開始から定量可能な濃度が最後に観察されるまで) を示す。
20

治療域

【0444】

グリカン相互作用抗体は、本明細書に記載されるような送達剤を用いて組成物に製剤化されたとき、本明細書に記載されるような送達剤を欠いている、投与されたグリカン相互作用抗体組成物の治療域と比較して、投与されたグリカン相互作用抗体組成物の治療域の増大を示すことができる。本明細書で使用される場合、「治療域」は、治療効果を惹起する確率が高い、血漿中濃度の範囲、または作用部位での治療活性物質レベルの範囲を指す。一部の実施形態では、本明細書に記載されるような送達剤と併用投与すると、グリカン相互作用抗体の治療域を、少なくとも約 2 %、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、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 %、または約 100 % 増大させることができる。
40

【0445】

一部の実施形態では、化合物半減期および / またはクリアランス速度が、治療域の指標としてモニターされ得る。本明細書で使用される場合、用語「半減期」または「t_{1/2}」は、所与のプロセスまたは化合物濃度が最終値の半分に達するまでにかかる時間を指す。「終末相消失半減期」または「終末相半減期」は、因子の血漿中濃度が、この因子の濃度が擬平衡に達した後に半分に減少するのに必要な時間を指す。濃度の低下が、消失に無
50

関係な 1 つまたは複数の因子（例えば、吸収速度もしくは分布速度）による影響を受ける可能性がある場合、観察される半減期は、「見かけの」半減期と呼ばれる。本明細書で使用される場合、用語「クリアランス速度」は、特定の化合物が生物システムまたは生体液から排除される速度を指す。この速度が、クリアランスに無関係な 1 つまたは複数の因子による影響を受ける可能性がある場合、クリアランス速度は、「見かけの」クリアランス速度と呼ばれる。

【 0 4 4 6 】

一部の実施形態では、抗 S T n 抗体の治療域は、医薬組成物投与後に判定され得る。抗 S T n 抗体は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない治療剤を含む抗体薬物コンジュゲートであってもよい。治療剤は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない、細胞傷害性薬剤であってもよい。細胞傷害性薬剤は、M M A E であってもよい。細胞傷害性薬剤は、リンカーにより抗体に繋がれてもよい。本開示の医薬組成物は、抗 S T n 抗体を対象に提供するために使用することができ、その場合、抗 S T n 抗体は、約 1 時間～約 10 時間、約 2 時間～約 12 時間、約 4 時間～約 24 時間、約 20 時間～約 30 時間、約 1 日～約 5 日、約 2 日～約 14 日、約 4 日～約 21 日、約 8 日～約 28 日の、または 28 日より長い見かけの終末相消失半減期を示す。一部の実施形態では、本開示の医薬組成物は、抗 S T n 抗体を対象に提供するために使用することができ、その場合、抗 S T n 抗体は、約 1 m l / k g / 日～約 10 m l / k g / 日、約 5 m l / k g / 日～約 20 m l / k g / 日、約 15 m l / k g / 日～約 50 m l / k g / 日の、または 50 m l / k g / 日より速い見かけのクリアランス速度を示す。
10

。

分布容積

【 0 4 4 7 】

グリカン相互作用抗体は、本明細書に記載されるような送達剤を用いて組成物に製剤化されたとき、本明細書に記載されるような送達剤を欠いている組成物と比べて向上された、例えば、低減された、または目標とされた、分布容積 ($V_{\text{分布}}$) を示すことができる。分布容積 ($V_{\text{分布}}$) は、体内の薬物の量を血液または血漿中の薬物の濃度と関連付ける。本明細書で使用される場合、用語「分布容積」は、血液または血漿中と同じ濃度で、体内に薬物の総量を含有するために必要とされる流体容積を指し、 $V_{\text{分布}}$ は、体内の薬物量 / 血液または血漿中の薬物濃度である。例えば、10 m g の用量および 10 m g / L の血漿中濃度の場合、分布容積は、1 リットルである。分布容積は、薬物が血管外組織に存在する程度を反映する。大きい分布容積は、血漿タンパク質結合と比較して組織成分と結合する化合物の傾向を反映する。臨床の場では、定常状態濃度を達成するための負荷用量を決定するために $V_{\text{分布}}$ を使用することができる。 V_{ss} は、定常領域での見かけの分布容積を指す。一部の実施形態では、本明細書に記載されるような送達剤と併用投与すると、グリカン相互作用抗体の分布容積を、少なくとも約 2 %、少なくとも約 5 %、少なくとも約 10 %、少なくとも約 15 %、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 % 減少させることができる。
20

【 0 4 4 8 】

一部の実施形態では、対象における抗 S T n 抗体の分布容積は、医薬組成物投与後に判定され得る。抗 S T n 抗体は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない治療剤を含む抗体薬物コンジュゲートであってもよい。治療剤は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない、細胞傷害性薬剤であってもよい。細胞傷害性薬剤は、M M A E であってもよい。細胞傷害性薬剤は、リンカーにより抗体に繋がれてもよい。本開示の医薬組成物は、抗 S T n 抗体を対象に提供するために使用することができ、その場合、抗 S T n 抗体は、約 1 m l / k g ～約 10 m l / k g、約 5 m l / k g ～約 50 m l / k g、約 20 m l / k g ～約 100 m l / k g、約 75 m l / k g ～約 150 m l / k g の、または 150 m l / k g より大きい見かけの V_{ss} を
30

40

50

示す。

【0449】

一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、1つもしくは複数の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて組成物および／または複合体を含む。医薬組成物は、必要に応じて、1つまたは複数の追加の活性物質、例えば、治療および／もしくは予防活性物質を含み得る。医薬剤の製剤化および／または製造に関する概論は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21版、Lippincott Williams & Wilkins、2005年（参照により本明細書に組み入れられる）において見つけることができる。

【0450】

一部の実施形態では、組成物は、ヒト、ヒト患者または対象に投与される。本開示の目的では、語句「活性成分」は、一般に、本明細書に記載されるように送達されるグリカン相互作用抗体を指す。

【0451】

本明細書で提供される医薬組成物の説明は、主として、ヒトへの投与に適している医薬組成物に関するが、そのような組成物が、一般に、任意の他の動物への、例えば、非ヒト動物、例えば非ヒト哺乳動物への投与に適していることは、当業者には理解されるであろう。ヒトへの投与に適する医薬組成物を、様々な動物への投与に適するものにするための修飾は、十分に理解されており、通常技能のある獣医薬理学者は、そのような修飾を、通常の、もしあればだが、実験だけで、設計および／または実施することができる。医薬組成物の投与が考えられる対象としては、これらに限定されないが、ヒトおよび／もしくは他の靈長類；ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウスおよび／もしくはラットなどの商業的に意義のある哺乳動物を含む、哺乳動物；ならびに／または家禽、ニワトリ、アヒル、ガチョウおよび／もしくはシチメンチョウなどの商業的に意義のある鳥類を含む、鳥類が挙げられる。

【0452】

本明細書に記載の医薬組成物の製剤は、薬理学技術分野において公知のまたは今後開発される任意の方法により調製することができる。一般に、そのような準備方法は、活性成分を賦形剤および／または1つもしくは複数の他の補助成分と会合させるステップ、そしてその後、必要に応じて、ならびに／あるいは所望される場合、産生物を分割、成形および／もしくは包装して、所望の単回または複数回用量単位にするステップを含む。

【0453】

本発明による医薬組成物は、1つの単一単位用量として、および／もしくは多数の単一単位用量として、調製すること、包装すること、ならびに／または大量に販売することができる。本明細書で使用される場合、「単位用量」は、所定量の活性成分を含む医薬組成物の個別量である。活性成分の量は、一般に、対象に投与されることになる活性成分の投薬量、および／またはそのような投薬量の便宜的な分数、例えば、そのような投薬量の2分の1もしくは3分の1などに等しい。

【0454】

本発明による医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤および／または任意の追加の成分の相対量は、処置される対象の正体、サイズおよび／または状態に依存して、さらに、組成物が投与される経路に依存して、変わることになる。例として、組成物は、0.1%～100%の間、例えば、5～50%の間、1～30%の間、5～80%の間、または少なくとも80%（w/w）活性成分を含有し得る。一実施形態では、活性成分は、がん細胞に対する抗体である。

製剤

【0455】

本発明のグリカン相互作用抗体は、（1）安定性を増大させるために、（2）細胞透過性を増大させるために、（3）徐放もしくは遅延放出（例えば、グリカン相互作用抗体の製剤からの）を可能にするために、および／または（4）生体内分布を変更する（例えば、グリカン相互作用抗体を特定の組織もしくは細胞型に標的化する）ために、1つまたは

10

20

30

40

50

複数の賦形剤を使用して製剤化することができる。旧来の賦形剤、例えば、任意のおよびすべての溶媒、分散媒、希釈剤または他の液体ビヒクル、分散または懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘または乳化剤、保存剤に加えて、本発明の製剤は、これらに限定されないが、リポソーム、脂質ナノ粒子、ポリマー、リポブレックス、コアシェル型ナノ粒子、ペプチド、タンパク質、グリカン相互作用抗体が（例えば、対象への移植のために）トランسفェクトされた細胞、およびこれらの組合せを含み得る。

賦形剤

【0456】

本明細書で使用される場合、用語「賦形剤」は、使用前に本発明の化合物および／または組成物と組み合わせる任意の物質を指す。一部の実施形態では、賦形剤は、不活性であり、主として、本発明の化合物および／もしくは組成物のための担体、希釈剤またはビヒクルとして使用される。医薬組成物を製剤化するための様々な賦形剤、および組成物を調製するための手法は、当技術分野において公知である（Remington: The Science and Practice of Pharmacy、21版、A. R. Gennaro、Lippincott, Williams & Wilkins、Baltimore、MD、2006年を参照されたく、参照により本明細書に組み入れられる）。

10

【0457】

従来の賦形剤媒体の使用は、本開示の範囲内であると考えられるが、ただし、任意の従来の賦形剤媒体が、物質またはその誘導体と不適合であり得る場合、例えば、何らかの望ましくない生物学的効果を生じさせることにより、または別様に医薬組成物の他のいずれかの成分と有害な形で相互作用することにより、不適合であり得る場合を除く。

20

【0458】

本明細書に記載の医薬組成物の製剤は、薬理学技術分野において公知のまたは今後開発される任意の方法により調製することができる。一般に、そのような準備方法は、活性成分を賦形剤および／または他の1つもしくは複数の補助成分と会合させるステップを含む。

20

【0459】

本開示による医薬組成物は、1つの単一単位用量として、および／または多数の単一単位用量として、調製すること、包装すること、および／または大量に販売することができる。

30

【0460】

本開示による医薬組成物中の活性成分、薬学的に許容される賦形剤および／または任意の追加の成分の相対量は、処置されることになる対象の正体、サイズおよび／または状態に依存して、さらに、組成物が投与される経路に依存して、変わり得る。

30

【0461】

一部の実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、純度少なくとも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100%である。一部の実施形態では、賦形剤は、ヒトでの使用および獣医学的使用が承認されている。一部の実施形態では、賦形剤は、アメリカ食品医薬品局（United States Food and Drug Administration）によって承認されている。一部の実施形態では、賦形剤は、医薬品グレードである。一部の実施形態では、賦形剤は、米国薬局方（U.S.P.）、欧洲薬局方（E.P.）、英国薬局方、および／または国際薬局方の基準を満たしている。

40

【0462】

医薬組成物の製造に使用される薬学的に許容される賦形剤としては、これらに限定されないが、不活性希釈剤、分散および／もしくは造粒剤、界面活性剤および／もしくは乳化剤、崩壊剤、結合剤、保存剤、緩衝剤、滑沢剤、ならびに／または油が挙げられる。そのような賦形剤を、必要に応じて、医薬組成物に含めることができる。

【0463】

例示的希釈剤としては、それらに限定されないが、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸ナトリウム、ラクトース、スクロース、セルロース、微結晶性セルロース、カオリン、

50

マンニトール、ソルビトール、イノシトール、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、トウモロコシデンプン、粉末糖など、および／またはこれらの組合せが挙げられる。

【0464】

例示的造粒および／または分散剤としては、それらに限定されないが、ジャガイモデンプン、トウモロコシデンプン、タピオカデンプン、デンブングリコール酸ナトリウム、粘土、アルギン酸、グーガム、シトラスパルプ、寒天、ベントナイト、セルロースおよび木材産物、天然海綿、カチオン交換樹脂、炭酸カルシウム、ケイ酸塩、炭酸ナトリウム、架橋ポリ(ビニルピロリドン)(クロスポビドン)、カルボキシメチルデンプンナトリウム(デンブングリコール酸ナトリウム)、カルボキシメチルセルロース、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム(クロスカルメロース)、メチルセルロース、アルファ化デンプン(スター^チ1500)、微結晶性デンプン、非水溶性デンプン、カルボキシメチセルロースカルシウム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム(V E E G U M(登録商標))、ラウリル硫酸ナトリウム、第4級アンモニウム化合物など、および／またはこれらの組合せが挙げられる。

10

【0465】

例示的界面活性剤および／または乳化剤としては、それらに限定されないが、天然乳化剤(例えば、アラビアゴム、寒天、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、コンドラックス(chondrux)、コレステロール、キサンタン、ペクチン、ゼラチン、卵黄、カゼイン、羊毛脂、コレステロール、ワックス、およびレシチン)、コロイド状粘土(例えば、ベントナイト[ケイ酸アルミニウム]およびV E E G U M(登録商標)[ケイ酸アルミニウムマグネシウム])、長鎖アミノ酸誘導体、高分子量アルコール(例えば、ステアリルアルコール、セチルアルコール、オレイルアルコール、モノステアリン酸トリアセチン、ジステアリン酸エチレングリコール、モノステアリン酸グリセリル、およびモノステアリン酸プロピレングリコール、ポリビニルアルコール)、カルボマー(例えば、カルボキシポリメチレン、ポリアクリル酸、アクリル酸ポリマー、およびカルボキシビニルポリマー)、カラギーナン、セルロース誘導体(例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、粉末セルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース)、ソルビタン脂肪酸エステル(例えば、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン[T W E E N(登録商標)20]、ポリオキシエチレンソルビタン[T W E E N n(登録商標)60]、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン[T W E E N(登録商標)80]、モノパルミチン酸ソルビタン[S P A N(登録商標)40]、モノステアリン酸ソルビタン[S p a n(登録商標)60]、トリステアリン酸ソルビタン[S p a n(登録商標)65]、モノオレイン酸グリセリル、モノオレイン酸ソルビタン[S P A N(登録商標)80]、ポリオキシエチレンエステル(例えば、モノステアリン酸ポリオキシエチレン[M Y R J(登録商標)45]、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエトキシル化ヒマシ油、ステアリン酸ポリオキシメチレン、およびS O L U T O L(登録商標))、スクロース脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル(例えば、C R E M O P H O R(登録商標))、ポリオキシエチレンエーテル(例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル[B R I J(登録商標)30])、ポリ(ビニルピロリドン)、モノラウリン酸ジエチレングリコール、オレイン酸トリエタノールアミン、オレイン酸ナトリウム、オレイン酸カリウム、オレイン酸エチル、オレイン酸、ラウリン酸エチル、ラウリル硫酸ナトリウム、P L U O R I N C(登録商標)F 6 8、P O L O X A M E R(登録商標)1 8 8、セトリモニウムプロミド、セチルピリジニウム塩化物、ベンザルコニウム塩化物、ドクサートナトリウムなど、ならびに／またはこれらの組合せが挙げられる。

20

【0466】

例示的結合剤としては、それらに限定されないが、デンプン(例えば、トウモロコシデンプンおよびデンプンペースト)；ゼラチン；糖(例えば、スクロース、グルコース、デキストロース、デキストリン、糖蜜、ラクトース、ラクチトール、マンニトール)；天然および合成ゴム(例えば、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、アイリッシュモスの抽

30

40

50

出物、パンワールゴム (panwar gum) 、ガティガム、サイリウムの粘液、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、微結晶性セルロース、酢酸セルロース、ポリ (ビニルピロリドン) 、ケイ酸アルミウニムマグネシウム (Veegum (登録商標)) 、およびカラマツアラボガラクタン (arabogalactan)) ; アルギン酸塩 ; ポリエチレンオキシド ; ポリエチレングリコール ; 無機カルシウム塩 ; ケイ酸 ; ポリメタクリレート ; ワックス ; 水 ; アルコールなど、ならびにこれらの組合せが挙げられる。

【0467】

例示的保存剤としては、これらに限定されないが、抗酸化剤、キレート剤、抗菌性保存剤、抗真菌性保存剤、アルコール保存剤、酸性保存剤、および / または他の保存剤を挙げることができる。例示的な抗酸化剤としては、これらに限定されないが、アルファトコフェロール、ascaルビン酸、パルミチン酸ascaルビル (ascorbyl palmitate) 、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、モノチオグリセロール、ピロ亜硫酸カリウム、プロピオン酸、没食子酸プロピル、ascaルビン酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、および / または亜硫酸ナトリウムが挙げられる。例示的キレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 、クエン酸一水和物、エデト酸二ナトリウム、エデト酸二カリウム、エデト酸、フマル酸、リンゴ酸、リン酸、エデト酸ナトリウム、酒石酸、および / またはエデト酸三ナトリウムが挙げられる。例示的抗菌性保存剤としては、これらに限定されないが、ベンザルコニウム塩化物、ベンゼトニウム塩化物、ベンジルアルコール、ブロノポール、セトリミド、セチルピリジニウム塩化物、クロルヘキシジン、クロロブタノール、クロロクレゾール、クロロキシレノール、クレゾール、エチルアルコール、グリセリン、ヘキセチジン、イミド尿素、フェノール、フェノキシエタノール、フェニルエチルアルコール、硝酸フェニル水銀、プロピレングリコール、および / またはチメロサールが挙げられる。例示的抗真菌性保存剤としては、これらに限定されないが、ブチルパラベン、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、安息香酸カリウム、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、および / またはソルビン酸が挙げられる。例示的アルコール保存剤としては、これらに限定されないが、エタノール、ポリエチレングリコール、フェノール、フェノール系化合物、ビスフェノール、クロロブタノール、ヒドロキシ安息香酸エステル、および / またはフェニルエチルアルコールが挙げられる。例示的酸性保存剤としては、これらに限定されないが、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンE、ベータカロテン、クエン酸、酢酸、デヒドロ酢酸、ascaルビン酸、ソルビン酸、および / またはフィチン酸が挙げられる。他の保存剤としては、これらに限定されないが、トコフェロール、酢酸トコフェロール、デテルオキシムメシレート (deteroxime mesylate) 、セトリミド、ブチルヒドロキシアニソール (BHA) 、ブチルヒドロキシトルエン (butylated hydroxytoluened) (BHT) 、エチレンジアミン、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) 、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SLES) 、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸カリウム、ピロ亜硫酸カリウム、GLYDANT PLUS (登録商標) 、PHENONIP (登録商標) 、メチルパラベン、GERMALL (登録商標) 115、GERMABEN (登録商標) II、NEOLONE (商標) 、KATHON (商標) 、および / またはEUXYL (登録商標) が挙げられる。

【0468】

例示的緩衝剤としては、それらに限定されないが、クエン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、リン酸緩衝溶液、塩化アンモニウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、グルビオン酸カルシウム、グルセプト酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、D-グルコン酸、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、プロパン酸、レブリン酸カルシウム、ペンタン酸、リン酸水素カルシウム、リン酸、リン酸三カルシウム、水酸化カルシウムリン酸塩、酢酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、カリウム混合物、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸カリウム混合物、酢酸ナトリウム

10

20

30

40

50

、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸ナトリウム混合物、トロメタミン、水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウム、アルギン酸、発熱物質不含水、等張生理食塩水、リングル液、エチルアルコールなど、および／またはこれらの組合せが挙げられる。

【0469】

例示的滑沢剤としては、それらに限定されないが、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、シリカ、タルク、麦芽、ベヘン酸グリセリル(glyceryl behanate)、硬化植物油、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、ロイシン、ラウリル硫酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムなど、およびこれらの組合せが挙げられる。

10

【0470】

例示的油としては、それらに限定されないが、アーモンド油、杏仁油、アボカド油、ババスト油、ベルガモット油、クロスグリ種子油、ルリヂサ油、ジュニパタール油、カモミール油、キャノーラ油、カラウェー油、カルナウバ油、ヒマシ油、桂皮油、カカオ脂、ヤシ油、タラ肝油、コーヒー油、トウモロコシ油、綿実油、エミュー油、ユーカリ油、月見草油、魚油、亜麻仁油、ゲラニオール、ゴード油、ブドウ種子油、ヘーゼルナッツ油、ヒッソブ油、ミリスチン酸イソプロピル、ホホバ油、ククイナッツ油、ラバンジン油、ラベンダー油、レモン油、アオモジ油、マカダミアナッツ(macadamia nut)油、ゼニアオイ油、マンゴー種子油、メドウフォーム種子油、ミンク油、ニクズク油、オリーブ油、オレンジ油、オレンジラフィー油、パーク油、パーク核油、桃仁油、ピーナッツ油、ケシ種子油、カボチャ種子油、菜種油、米糠油、ローズマリー油、ベニバナ油、ビャクダン油、サスクワナ(sasquana)油、セイバリー油、シーバックソーン油、ゴマ油、シアバター油、シリコーン油、ダイズ油、ヒマワリ油、チャノキ油、アザミ油、ツバキ油、ベチベル油、クルミ油、およびコムギ胚芽油が挙げられる。例示的油としては、これらに限定されないが、ステアリン酸ブチル、カプリル酸トリグリセリド、カプリン酸トリグリセリド、シクロメチコン、セバシン酸ジエチル、ジメチコン360、ミリスチン酸イソプロピル、鉛油、オクチルドデカノール、オレイルアルコール、シリコーン油および／またはこれらの組合せが挙げられる。

20

【0471】

製剤者の判断により、賦形剤、例えばカカオ脂および坐剤ワックス、着色剤、コーティング剤、甘味剤、着香および／または芳香剤が、組成物中に存在することもある。

30

【0472】

一部の実施形態では、本開示の抗体は、少なくとも1つの賦形剤を用いて製剤化される。抗体は、抗STn抗体であってもよい。抗体は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない治療剤を含む抗体薬物コンジュゲートであってもよい。治療剤は、本明細書で提示されるもののいずれかを含むがこれらに限定されない、細胞傷害性薬剤であってもよい。細胞傷害性薬剤は、MMAEであってもよい。細胞傷害性薬剤は、リンカーにより抗体に繋がっていてもよい。

ビヒクル

リポソーム、リポプレックスおよび脂質ナノ粒子

40

【0473】

本発明のグリカン相互作用抗体は、1つまたは複数のリポソーム、リポプレックスまたは脂質ナノ粒子を使用して製剤化することができる。一実施形態では、グリカン相互作用抗体を含む医薬組成物は、リポソームをさらに含む。リポソームは、1つまたは複数の脂質二重層を主として含み得る人工的に調製された小胞であって、栄養素および医薬製剤の投与用の送達ビヒクルとして使用され得る小胞である。リポソームは、種々のサイズのものであってよく、例えば、これらに限定されないが、直径が数百ナノメートルであり得、狭い水性の区画によって隔てられた一連の同心二重層を含有し得る、多層小胞(MLV)、直径が50nm未満であり得る小型単一セル小胞(small unicellular vesicle)(SUV)、および直径が50～500nmの間であり得る大型単層小胞(LUV)であって

50

もよい。リポソーム設計は、非健常組織へのリポソームの付着を向上させるために、もしくはこれに限定されないがエンドサイトーシスなどの事象を活性化するために、これらに限定されないがオプソニンまたはリガンドを含み得る。リポソームは、医薬製剤の送達を向上させるために、低または高 pH を含み得る。

【0474】

リポソームの形成は、物理化学的特性、例えば、これらに限定されないが、封入される医薬製剤およびリポソーム成分、脂質小胞が分散される媒体の性質、封入物質の有効濃度およびその潜在的毒性、小胞の適用中および／または送達中に関与する任意のさらなるプロセス、小胞の所期の応用に最適なサイズ、多分散性および有効期間、ならびに安全かつ効率的なリポソーム製品のバッチ間再現性および大量生産の可能性に、依存し得る。

10

【0475】

一実施形態では、そのような製剤を、それらが、*in vivo* で異なる細胞型に受動的にもしくは能動的に指向されるように構築することもでき、またはそのような製剤は、*in vivo* で異なる細胞型に受動的にもしくは能動的に指向されるように変更された組成物であってもよい。

【0476】

製剤を、限定されないが、葉酸塩、トランスフェリン、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) および抗体標的化アプローチによって例示されるような、それらの表面での異なるリガンドの発現によって、選択的に標的化することもできる。

20

【0477】

リポソーム、リポブレックスまたは脂質ナノ粒子は、グリカン相互作用抗体の有効性を向上させるために使用することができるが、これらの製剤が、グリカン相互作用抗体の細胞へのトランスフェクションを増加させることができることも可能であり得るからである。リポソーム、リポブレックスまたは脂質ナノ粒子は、グリカン相互作用抗体の安定性を増大させるために使用することもできる。

【0478】

抗体カーゴ用に特異的に製剤化されるリポソームは、Eppstein, D.A. ら、Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor、Proc Natl Acad Sci U S A.、1985年6月；82巻(11号)：3688～92頁)；Hwang, K.J. ら、Hepatic uptake and degradation of unilamellar sphingomyelin/cholesterol liposomes: a kinetic study、Proc Natl Acad Sci U S A.、1980年7月；77巻(7号)：4030～4頁)；米国特許第4,485,045号および米国特許第4,544,545号によって記載されたものなどの、当技術分野において公知の手法に従って調製される。循環時間が長いリポソームの產生は、米国特許第5,013,556号にも記載されている。

30

【0479】

本発明のグリカン相互作用抗体を含むリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびポリエチレンギリコールで誘導体化されたホスファチジルエタノールアミンなどの、脂質を利用する逆相蒸発法を使用して生成することもできる。規定された細孔経を有するフィルターが、所望の直径のリポソームを押し出すために使用される。別の実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体は、Martin, F.J. ら、Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposometargeting、J Biol Chem.、1982年1月10日；257巻(1号)：286～8頁)によって記載されているように、ジスルフィド交換によりリポソームの外面にコンジュゲートさせることができる。

40

ポリマーおよびナノ粒子

【0480】

本発明のグリカン相互作用抗体は、天然および／または合成ポリマーを使用して製剤化することができる。送達に使用することができるポリマーの非限定的な例としては、これらに限定されないが、DMRI / DOPE、ポロクサマー、キトサン、シクロデキストリ

50

ン、およびポリ(乳酸-co-グリコール酸)(PLGA)ポリマーが挙げられる。これらは、生分解性であり得る。

【0481】

ポリマー製剤は、グリカン相互作用抗体の(例えば、筋肉内または皮下注射後の)徐放または遅延放出を可能にし得る。グリカン相互作用抗体の放出プロファイル変更は、例えば、長期間にわたるグリカン相互作用抗体の放出をもたらすことができる。ポリマー製剤を、グリカン相互作用抗体の安定性を増大させるために使用することもできる。

【0482】

ポリマー製剤を、限定されないが、葉酸塩、トランスフェリン、およびN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)によって例示されるような、異なるリガンドの発現によって、選択的に標的化することもできる(Benoitら、Biomacromolecules、2011年12月卷:2708~2714頁;Rozemaら、Proc Natl Acad Sci U S A.、2007年、104卷:12982~12887頁;Davis、Mol Pharm.、2009年、6卷:659~668頁;Davis、Nature、2010年、464卷:1067~1070頁;その全体が参考により本明細書に組み入れられる)。

10

【0483】

本発明のグリカン相互作用抗体は、ポリマー、脂質および/または他の生分解性薬剤(例えば、これに限定されないが、リン酸カルシウム)の組合せを使用して、ナノ粒子として製剤化することもできる。成分を、コアシェル、ハイブリッドおよび/または多層構造に組み込んでナノ粒子の微調整を可能にすることができ、そのようにしてグリカン相互作用抗体送達を増進することができる。グリカン相互作用抗体は、自己組織化pH感受性ジブロックコポリマーであるポリ(2-(メタクリロイルオキシ)エチルホスホリルコリン)-block-(2-(ジイソプロピルアミノ)エチルメタクリレート)、(PMPG-PDPA)に基づく系を使用して、生理的pHで、ポリマーソームとしても公知の、ナノメートルサイズの小胞を形成することができる。これらのポリマーソームは、生細胞内での比較的高い抗体ペイロードを首尾よく送達することが示されている。(Massignaniら、Cellular delivery of antibodies:effective targeted subcellular imaging and new therapeutic tool、Nature Proceedings、2010年5月)。

20

【0484】

一実施形態では、PEG電荷転換ポリマー(Pitellaら、Biomaterials、2011年、32卷:3106~3114頁)を使用して、本発明のグリカン相互作用抗体を送達するためのナノ粒子を形成することができる。PEG電荷変換ポリマーは、酸性pHで切断されてポリカチオンになり、かくてエンドソーム脱出を増進することにより、PEG-ポリアニオンブロックコポリマーを改善することができる。

30

【0485】

加えて、コアシェル型ナノ粒子の使用は、カチオン性架橋ナノゲルコアおよび様々なシェルを合成するためのハイスループットアプローチに重点が置かれている(Siegwartら、Proc Natl Acad Sci U S A.、2011年、108卷:12996~13001頁)。ナノ粒子のコア成分とシェル成分両方の化学組成を変更することにより、ポリマーナノ粒子の複合体化、送達および内在化を正確に制御することができる。

40

【0486】

一実施形態では、ポリ(エチレン-co-酢酸ビニル)のマトリックスが、本発明のグリカン相互作用抗体を送達するために使用される。そのようなマトリックスは、Nature Biotechnology、10卷、1446~1449頁(1992年)に記載されている。

抗体製剤

【0487】

本発明のグリカン相互作用抗体を、静脈内投与または血管外投与用に製剤化することができる(Daughertyら、Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics、Adv Drug Deliv Rev.、2006年8月7日;58卷(5~6号):686~706頁、米国特許出願公開第2011/0135570号、これらの参考文献のすべては

50

、それら全体が本明細書に組み入れられる）。血管外投与経路は、これらに限定されないが、皮下投与、腹腔内投与、脳内投与、眼内投与、病巣内投与、局所投与および筋肉内投与を含み得る。

【0488】

抗体構造を、治療薬としてのそれらの有効性を向上させるように修飾することができる。向上は、これらに限定されないが、熱力学的安定性の向上、Fc受容体に結合する性質の低減、およびフォールディング効率の向上を含み得る。修飾は、これらに限定されないが、置換、グリコシル化、バルミトイ化およびタンパク質コンジュゲーションを含み得る。

【0489】

グリカン相互作用抗体は、抗体酸化を低減させるために抗酸化剤を用いて製剤化することができる。グリカン相互作用抗体は、タンパク質凝集を低減させるために添加剤を用いて製剤化することもできる。そのような添加剤は、これらに限定されないが、アルブミン、アミノ酸、糖、尿素、塩化グアニジニウム、多価アルコール、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコールおよびデキストラン）、界面活性剤（これらに限定されないが、ポリソルベート20およびポリソルベート80を含む）またはさらに他の抗体を含み得る。

【0490】

本発明のグリカン相互作用抗体を、抗体構造および機能に対する水の影響を低下させるように製剤化することができる。そのような製剤における抗体調製物を凍結乾燥させてもよい。凍結乾燥に付される製剤は、抗体構造を保護するおよび安定させるために、炭水化物またはポリオール化合物を含み得る。そのような化合物としては、これらに限定されないが、スクロース、トレハロースおよびマンニトールが挙げられる。

【0491】

本発明のグリカン相互作用抗体は、ポリマーを用いて製剤化することができる。一実施形態では、ポリマー製剤は、疎水性ポリマーを含有し得る。そのようなポリマーは、ポリラクチド-co-グリコリドを用いて水中油中固体カプセル化法によって製剤化されたマイクロスフェアであってもよい。エチレン-酢酸ビニルコポリマーを含むマイクロスフェアは、抗体送達用にも考えられ、送達部位での抗体放出の時間経過を延長するために使用され得る。別の実施形態では、ポリマーは、水性ゲルであってもよい。そのようなゲルは、例えば、カルボキシメチルセルロースを含み得る。水性ゲルは、ヒアルロン酸ヒドロゲルも含み得る。抗体をそのようなゲルにヒドラゾン連結によって共有結合で連結させることができ、これにより、中枢神経系の組織を含むがこれに限定されない、組織における持続的送達が可能になる。

ペプチドおよびタンパク質製剤

【0492】

本発明のグリカン相互作用抗体は、ペプチドおよび/またはタンパク質を用いて製剤化することができる。一実施形態では、ペプチド、例えば、これに限定されないが、細胞侵入ペプチド、ならびに細胞内送達を可能にするタンパク質およびペプチドを使用して、医薬製剤を送達することができる。本発明の医薬製剤とともに使用することができる細胞侵入ペプチドの非限定的な例としては、細胞内空間への送達を助長するポリカチオンに結合された細胞侵入ペプチド配列、例えば、HIV由来TATペプチド、ペネトラチン、トランスポータン、またはhCT由来細胞侵入ペプチドが挙げられる（例えば、Caronら、Mol. Ther.、3巻（3号）：310～8頁（2001年）；Langel、Cell-Penetrating Peptides: Processes and Applications (CRC Press, BocaRaton FL, 2002年)；El-Andaloussiら、Curr. Pharm. Des.、11巻（28号）：3597～611頁（2003年）；およびDeshayesら、Cell. Mol. Life Sci.、62巻（16号）：1839～49頁（2005年）を参照されたく、これらの参考文献のすべては、参照により本明細書に組み入れられる）。細胞内空間への組成物の送達を増進する細胞侵入剤、例えば、リポソームを含むように、組成物を製剤化することもできる。本発明のグリカン相互作用抗体を、これらに限定されないが、Aileron Therapeutics (Cambridge、

10

20

30

40

50

MA) および Permeon Biologics (Cambridge, MA) からのペプチドおよび / もしくはタンパク質などの、ペプチドならびに / またはタンパク質と複合化して、細胞内送達を可能にすることができる (Cronicanら、ACS Chem. Biol., 2010年、5巻：747～752頁；McNaughtonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009年、106巻：6111～6116頁；Sawyer、Chem Biol Drug Des., 2009年、73巻：3～6頁；VerdineおよびHilinski、Methods Enzymol., 2012年；503巻：3～33頁；これらのすべては、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

【0493】

一実施形態では、細胞侵入ポリペプチドは、第1のドメインおよび第2のドメインを含み得る。第1のドメインは、超荷電ポリペプチドを含み得る。第2のドメインは、タンパク質結合パートナーを含み得る。本明細書で使用される場合、「タンパク質結合パートナー」は、これらに限定されないが、抗体およびそれらの機能性断片、足場タンパク質、またはペプチドを含む。細胞侵入ポリペプチドは、タンパク質結合パートナーに対する細胞内結合パートナーをさらに含み得る。細胞侵入ポリペプチドは、グリカン相互作用抗体を導入することができる細胞から分泌され得ることもある。

【0494】

本発明の製剤内に、ペプチドまたはタンパク質を組み込んで、グリカン相互作用抗体による細胞トランスフェクションを増加させることができ、またはグリカン相互作用抗体の生体内分布を（例えば、特定の組織もしくは細胞型を標的化することにより）変更させることができる

細胞製剤

【0495】

本発明のグリカン相互作用抗体の細胞に基づく製剤は、細胞トランスフェクション（例えば、細胞担体における）を確実にするために、または組成物の生体内分布を（例えば、細胞担体を特定の組織もしくは細胞型に標的化することにより）変更させるために、使用することができる。

細胞移入方法

【0496】

ウイルス媒介型および非ウイルス媒介型手法を含む様々な方法が当技術分野において公知であり、細胞への核酸またはタンパク質、例えばグリカン相互作用抗体、の導入に適している。典型的な非ウイルス媒介型手法の例としては、これらに限定されないが、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム媒介型移入、ヌクレオフェクション、ソノポレーション、熱ショック、マグネットフェクション、リポソーム媒介型移入、マイクロインジェクション、マイクロプロジェクトイル媒介型移入（ナノ粒子）、カチオン性ポリマー媒介型移入（DEAE-デキストラン、ポリエチレンイミン、ポリエチレングリコール（PEG）およびこれらに類するもの）または細胞融合が挙げられる。

【0497】

ソノポレーション、すなわち細胞超音波処理、の手法は、細胞原形質膜の透過性を改良するための音波（例えば、超音波周波数）の使用である。ソノポレーション法は、当業者に公知であり、in vivoで核酸を送達するために使用される（YoonおよびPark、Expert Opin Drug Deliv., 2010年、7巻：321～330頁；PostemaおよびGilja、Curr Pharm Biotechnol., 2007年、8巻：355～361頁；Newman and Bettinger、Gene Ther., 2007年、14巻：465～475頁；これら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。ソノポレーション法は当技術分野において公知であり、例えば、細菌に関する場合は米国特許出願公開第20100196983号において、および他の細胞型に関する場合は例えば米国特許出願公開第20100009424号において教示されており、これらの特許文献の各々は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0498】

10

20

30

40

50

エレクトロポレーション手法も当技術分野において周知であり、核酸を *in vivo* および臨床的に送達するために使用される (Andreら、*Curr Gene Ther.*、2010年、10巻：267～280頁；Chiarellaら、*Curr Gene Ther.*、2010年、10巻：281～286頁；Hojman、*Curr Gene Ther.*、2010年、10巻：128～138頁；それら全体が参考により本明細書に組み入れられる)。一実施形態では、グリカン相互作用抗体をエレクトロポレーションにより送達することができる。

投与および送達

【0499】

本開示の組成物を当技術分野において公知の標準的方法または経路のいずれによって投与してもよい。

10

【0500】

本発明のグリカン相互作用抗体を、治療有効アウトカムをもたらす任意の経路で送達することができる。これらは、これらに限定されないが、腸、胃腸、硬膜外、経口、経皮、硬膜外（硬膜周辺）、脳内（大脳内へ）、脳室内（大脳脳室内へ）、皮膚上（皮膚上への塗布）、皮内（皮膚自体の中へ）、皮下（皮膚下）、経鼻投与（鼻経由で）、静脈内（静脈内へ）、動脈内（動脈内へ）、筋肉内（筋肉内へ）、心臓内（心臓内へ）、骨内注入（骨髄内へ）、髄腔内（脊椎官内へ）、腹腔内（腹腔内への注入または注射）、膀胱内注入、硝子体内、（目経由で）、陰茎海綿体内注射（陰茎基底内へ）、腔内投与、子宫内、羊膜外投与、経皮（全身への分布のための傷のない皮膚経由での拡散）、経粘膜（粘膜経由での拡散）、吸入（経鼻吸引）、舌下、唇の下、浣腸、点眼（結膜上へ）、または点耳を含む。具体的な実施形態では、組成物を、血液脳関門、血管バリアまたは他の上皮バリアを横断させる方法で投与することができる。本発明のグリカン相互作用抗体の非限定的な投与経路は、下で説明される。

20

非経口および注射剤投与

【0501】

経口および非経口投与のための液体剤形は、これらに限定されないが、薬学的に許容されるエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップおよび／またはエリキシルを含む。活性成分に加えて、液体剤形は、当技術分野において一般に使用されている不活性希釈剤、例えば、水もしくは他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1，3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、およびソルビタンの脂肪酸エステル、ならびにこれらの混合物などを含み得る。不活性希釈剤の他に、経口組成物は、アジュバント、例えば、湿潤剤、乳化および懸濁化剤、甘味剤、着色剤および／または芳香剤を含み得る。非経口投与についてのある特定の実施形態では、組成物は、可溶化剤、例えば、CREMOPHOR（登録商標）、アルコール、油、変性油、グリコール、ポリソルベート、シクロデキストリン、ポリマー、および／またはこれらの組合せと混合される。他の実施形態では、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤が含まれる。

30

【0502】

注射用調製物、例えば、滅菌注射用水性または油性懸濁液は、適切な分散剤、湿潤剤および／または懸濁化剤を使用して公知の技術に従って製剤化することができる。滅菌注射用調製物は、例えば1，3-ブタンジオール中の溶液のような、非毒性の非経口的に許容される希釈剤および／もしくは溶媒中の滅菌注射用溶液、懸濁液ならびに／またはエマルジョンであり得る。利用することができる許容されるビヒクルおよび溶媒には、水、リソゲル液、U.S.P.、および等張塩化ナトリウム溶液などがある。滅菌固定油は、溶媒または懸濁媒体として従来利用されている。このために、合成モノまたはジグリセリドをはじめとする任意の無菌固定油を利用することができる。オレイン酸などの脂肪酸を注射剤の調製に使用することができる。

40

50

【0503】

注射用製剤は、例えば、細菌保留フィルターによる濾過によって、および／あるいは使用前に滅菌水もしくは他の滅菌注射用媒体に溶解または分散させることができる滅菌固体組成物の形態の滅菌剤を点合することによって、滅菌することができる。

【0504】

活性成分の効果を延長するために、皮下または筋肉内注射からの活性成分の吸収を緩徐化することが望ましいことが多い。これは、難水溶性を有する結晶質または非晶質材料の懸濁液の使用によって果たすことができる。その場合、薬物の吸収速度は、その溶解速度に依存し、そしてまたこの溶解速度は、結晶サイズおよび結晶形に依存し得る。あるいは、非経口投与される薬物形の遅延吸収は、薬物を油性ビヒクル内に溶解するまたは懸濁させることにより果たされる。注射用デポー形は、ポリラクチド・ポリグリコリドなどの生分解性ポリマー中の薬物のマイクロカプセルマトリックスを形成することにより作製される。薬物のポリマーに対する比、および利用される特定のポリマーの特質に依存して、薬物放出速度を制御することができる。他の生分解性ポリマーの例としては、ポリ(オルトエステル)およびポリ(無水物)が挙げられる。デポー注射用製剤は、体組織と適合性であるリポソームまたはマイクロエマルジョンに薬物を封入することにより調製される。

10

【0505】

一部の実施形態では、本開示の組成物を静脈内投与することができる。投与は、静脈内ボーラス注射による投与であってもよい。

20

直腸および膣内投与

【0506】

直腸または膣内投与用の組成物は、通常は坐剤であり、坐剤は、周囲温度で固体であるが体温で液体であり、したがって、直腸もしくは膣腔内で融解して活性成分を放出する、適切な非刺激性賦形剤、例えば、カカオ脂、ポリエチレングリコールまたは坐剤ワックスと組成物を混合することにより調製することができる。

経口投与

【0507】

経口投用の固体剤形は、カプセル、錠剤、ピル、粉末および顆粒を含む。そのような固体剤形では、活性成分は、少なくとも1つの不活性の薬学的に許容される賦形剤、例えば、クエン酸ナトリウムもしくはリン酸二カルシウム、ならびに／または充填剤もしくは增量剤(例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトールおよびケイ酸)、結合剤(例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、スクロースおよびアラビアゴム)、保湿剤(例えば、グリセロール)、崩壊剤(例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモもしくはタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定のケイ酸塩、および炭酸ナトリウム)、溶解遅延剤(例えば、パラフィン)、吸收促進剤(例えば、第四級アンモニウム化合物)、潤滑剤(例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロール)、吸収剤(例えば、カオリンおよびベントナイト粘土)、および滑沢剤(例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム)、ならびにこれらの混合物と混合される。カプセル、錠剤およびピルの場合、剤形は、緩衝剤を含み得る。

30

局所または経皮投与

【0508】

本明細書に記載されるように、本発明のグリカン相互作用抗体を含有する組成物は、局所投与用に製剤化することができる。皮膚は、容易に接近できるので送達の理想的な標的部位であり得る。遺伝子発現を皮膚に限定することができる(これにより、非特異的毒性が回避される可能性がある)ばかりでなく、皮膚内の特定の層および細胞型に限定することもできる。

40

【0509】

送達された組成物の皮膚発現部位は、核酸送達経路に依存するであろう。グリカン相互

50

作用抗体を皮膚に送達するために、次の3つの経路が、一般に考えられる：(i)局所塗布（例えば、局所／局部処置および／または化粧途用のため）、(ii)皮内注射（例えば、局所／局部処置および／または化粧途用のため）、および(iii)全身送達（例えば、皮膚領域と外皮領域の両方を冒す皮膚病の治療のため）。グリカン相互作用抗体は、当技術分野において公知のいくつかの異なるアプローチによって皮膚に送達することができる。

【0510】

一実施形態では、本発明は、本発明の方法を適宜におよび／または有効に実施するための様々な包帯材（例えば、創傷被覆材）または絆創膏（ガーゼ付き絆創膏）を提供する。通常、包帯材または絆創膏は、使用者による対象への複数回の処置の実行を可能にするのに十分な量の、本明細書に記載の医薬組成物および／またはグリカン相互作用抗体を含み得る。

10

【0511】

一実施形態では、本発明は、1回より多くの注射で送達されるグリカン相互作用抗体を含む組成物を提供する。

【0512】

組成物の局所および／または経皮投与用の剤形としては、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、粉末、溶液、スプレー剤、吸入剤および／またはパッチを挙げることができる。一般に、活性成分は、滅菌条件下で、薬学的に許容される賦形剤ならびに／または必要に応じて必要な保存剤および／もしくは緩衝剤と混合される。

20

【0513】

加えて、本発明は身体への化合物の制御送達をもたらす追加利点を有することが多い、経皮パッチの使用を企図している。そのような剤形は、例えば、化合物を妥当な媒体に溶解するおよび／または懸濁させることにより、調製することができる。あるいは、または加えて、律速膜を設けることにより、ならびに／またはポリマーマトリックスおよび／もしくはゲルに化合物を分散させることにより、速度を制御することができる。

【0514】

局所投与に適する製剤としては、これらに限定されないが、液体ならびに／または半液体調製物、例えば、リニメント剤、ローション、水中油型および／もしくは油中水型エマルジョン、例えば、クリーム、軟膏および／もしくはペースト、ならびに／または溶液および／もしくは懸濁液が挙げられる。

30

【0515】

局所投与可能な製剤は、例えば、約1%～約10%（w/w）活性成分を含み得るが、活性成分の濃度は、溶媒への活性成分の溶解限度ほども高いこともある。局所投与用の製剤は、本明細書に記載のさらなる成分の1つまたは複数をさらに含み得る。

デポー投与

【0516】

本明細書に記載されるように、一部の実施形態では、本発明の組成物は、持続放出用のデポーに製剤化される。一般に、特定の器官または組織（「標的組織」）が、投与の標的となる。

40

【0517】

本発明の一部の態様では、グリカン相互作用抗体は、空間的には標的組織内にまたは標的組織の近位に保持される。1つまたは複数の標的組織（1つまたは複数の標的細胞を含む）と組成物を、組成物、特に、組成物のグリカン相互作用抗体成分が、標的組織内に実質的に保持されるように接触させることにより、組成物を哺乳動物対象の1つまたは複数の標的組織に提供する方法が提供され、前記実質的に保持されるとは、組成物の少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.99、または99.99%より多くが、標的組織内に保持されることを意味する。有利には、保持は、標的組織および／または細胞に入る組成物中に存在するグリカン相互作用抗体のレベルを測定することにより判定される。例えば、対

50

象に投与されたグリカン相互作用抗体の少なくとも 1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、85、90、95、96、97、98、99、99.9、99.99、または 99.99% より多くが、投与後のある期間に細胞内に存在する。例えば、哺乳動物対象への筋肉内注射は、1つまたは複数のグリカン相互作用抗体とトランスフェクション試薬とを含む水性組成物を使用して行われ、組成物の保持は、筋肉細胞内に存在するグリカン相互作用抗体のレベルを測定することにより判定される。

【0518】

本発明のある特定の態様は、標的組織（1つまたは複数の標的細胞を含有する）と組成物を、組成物が標的組織内に実質的に保持されるような条件下で接触させることにより、組成物を哺乳動物対象の標的組織に提供する方法に関する。組成物は、目的の効果を少なくとも1つの標的細胞において生じさせるために有効な量のグリカン相互作用抗体を含有する。組成物は、一般に、細胞侵入剤および薬学的に許容される担体を含有するが、「裸の」グリカン相互作用抗体（例えば、細胞侵入剤も他の薬剤も伴わないグリカン相互作用抗体）も考えられる。

10

【0519】

一部の実施形態では、組成物は、複数の異なるグリカン相互作用抗体を含み、これらのグリカン相互作用抗体の1つまたは1つより多くが目的のグリカンを標的とする。必要に応じて、組成物は、組成物の細胞内送達を補助するための細胞侵入剤も含有する。標的組織の所定の体積中に含有される細胞のかなりのパーセンテージにおいて（一般に、所定の体積に隣接するまたは標的組織に対して遠位にある組織内のグリカンを標的とすることなく）目的のグリカンを標的とするのに必要な組成物用量の決定も行われる。この決定の後、決定された用量を、哺乳動物対象の組織に導入することができる。

20

【0520】

一実施形態では、本発明は、1回より多くの注射でまたは分割用量注射により送達されるグリカン相互作用抗体を提供する。

経肺投与

【0521】

医薬組成物を、頸側口腔経由での経肺投与に適する製剤で調製、包装および／または販売することができる。そのような製剤は、さらに活性生物を含む乾燥粒子であって、約0.5 nm～約7 nmまたは約1 nm～約6 nmの範囲の直径を有する乾燥粒子を含み得る。このような組成物は、粉末を分散させるための噴射剤の流れを方向付けることができる乾燥粉末貯蔵部を含むデバイスを使用して、ならびに／または密閉容器内の低沸点噴射剤に溶解および／もしくは懸濁された活性成分を含むデバイスなどの自動噴射式溶媒／粉末分配容器を使用して投与するために、乾燥粉末形態であるのが適切である。そのような粉末は、重量で粒子の少なくとも98%が0.5 nmより大きい直径を有し、数で粒子の少なくとも95%が7 nm未満の直径を有する、粒子を含む。あるいは、重量で粒子の少なくとも95%は、1 nmより大きい直径を有し、数で粒子の少なくとも90%は、6 nm未満の直径を有する、粒子を含む。乾燥粉末組成物は、糖などの固体微粉末希釈剤を含むこともあり、適宜に単位用量形態で提供される。

30

【0522】

低沸点噴射剤は、一般に、大気圧で65°F未満の沸点を有する液体噴射剤を含む。一般に、噴射剤は、組成物の50%～99.9%（w/w）を構成し得、活性成分は、組成物の0.1%～20%（w/w）を構成し得る。噴射剤は、追加の成分、例えば、液体非イオン性および／もしくは固体アニオン性界面活性剤ならびに／または固体希釈剤（活性薬剤を含む粒子と同じ次数の粒径を有し得る）をさらに含むこともある。

40

【0523】

肺送達用に製剤化された医薬組成物は、溶液および／または懸濁液の液滴の形態で活性成分を提供することができる。そのような製剤は、活性成分を含む、必要に応じて無菌の、水溶液および／もしくは希薄アルコール溶液ならびに／または懸濁液として、調製、包装ならびに／または販売することができ、任意の噴霧および／または霧化デバイスを使用

50

して適宜に投与することができる。そのような製剤は、1つまたは複数のさらなる成分をさらに含むこともあり、そのような成分には、これらに限定されないが、着香剤、例えばサッカリンナトリウム、揮発油、緩衝剤、界面活性剤、および／または保存剤、例えばヒドロキシ安息香酸メチルが含まれる。この投与経路で提供される液滴は、約0.1nm～約200nmの範囲の平均直径を有し得る。

鼻腔内、経鼻および頬側投与

【0524】

本明細書に経肺送達に有用であると記載される製剤は、医薬組成物の鼻腔内送達に有用である。鼻腔内投与に適する別の製剤は、活性成分を含む粗粉末であって、約0.2μm～500μmの平均粒子を有する粗粉末である。そのような製剤は、嗅ぎ薬を摂取するやり方で、すなわち、鼻の近くに保持された粉末の容器からの鼻腔経由での迅速な吸入によって、投与される。

10

【0525】

経鼻投与に適する製剤は、例えば、約0.1% (w/w) ほども少量～100% (w/w) ほども多量の活性成分を含むことがあり、本明細書に記載のさらなる成分の1つまたは複数を含み得る。医薬組成物を頬側投与に適する製剤で調製、包装および／または販売することができる。そのような製剤は、例えば、従来の方法を使用して作製された錠剤および／またはトローチ剤の形態であってもよく、例えば、0.1%～20% (w/w) 活性成分であり得、残部は、経口溶解性および／または分解性組成物と、必要に応じて、本明細書に記載のさらなる成分の1つまたは複数とを含む。あるいは、頬側投与に適する製剤は、活性成分を含む粉末ならびに／またはエアロゾル化および／もしくは霧化された溶液および／もしくは懸濁液を含み得る。そのような粉末状の、エアロゾル化されたおよび／または霧化された製剤は、分散されたとき、約0.1nm～約200nmの範囲の平均粒径および／または液滴径を有し得、さらに、本明細書に記載の任意のさらなる成分の1つまたは複数を含み得る。

20

眼または耳投与

【0526】

医薬組成物を眼または耳投与に適する製剤で調製、包装および／または販売することができる。そのような製剤は、例えば、水性または油性液体賦形剤中の活性成分の0.1/1.0% (w/w) 溶液および／もしくは懸濁液を含む、例えば、点眼剤または点耳剤の形態であり得る。そのような点滴剤は、さらに、緩衝剤、塩、および／または本明細書に記載の任意のさらなる成分のうちの1つもしくは複数のその他のものを含み得る。有用である他の眼投与可能な製剤としては、微結晶形のおよび／またはリポソーム調製物中の活性成分を含むものが挙げられる。網膜下挿入物も投与の形態として使用され得る。

30

ペイロード投与

【0527】

本明細書に記載のグリカン相互作用抗体は、生物学的標的への物質（「ペイロード」）の送達、例えば、標的の検出のための検出可能な物質の送達、または治療剤もしくは診断剤の送達が所望される、多数の異なる状況で使用され得る。検出方法としては、これらに限定されないが、in vitroイメージング法とin vivoイメージング法両方のイメージング、例えば、免疫組織化学的検査、生物発光イメージング (BLI)、磁気共鳴画像法 (MRI)、陽電子放射断層撮影 (PET)、電子顕微鏡法、X線コンピュータ断層撮影、ラマンイメージング、光干渉断層撮影、吸収イメージング、サーマルイメージング、蛍光反射率イメージング、蛍光顕微鏡法、蛍光分子断層撮像、核磁気共鳴画像法、X線画像化、超音波イメージング、光音響イメージング、ラボアッセイ、またはタグ付け／染色／イメージングが必要とされる任意の状況でのものを挙げることができる。

40

【0528】

グリカン相互作用抗体を、リンカーとペイロードの両方を任意の有用な配向で含むように設計することができる。例えば、2つの末端を有するリンカーは、一方の末端をペイロードに、他方の末端をグリカン相互作用抗体に結合させるために使用される。本発明のグ

50

リカン相互作用抗体は、1つより多くのペイロード、および切断可能なリンカーを含むことができる。別の例では、グリカン相互作用抗体にリンカーを介して結合されていることもあります、蛍光標識されていることもある薬物を使用して、*in vivo*で、例えば細胞内で、薬物を追跡することができる。

【0529】

他の例としては、これに限定されないが、細胞への可逆的薬物送達におけるグリカン相互作用抗体の使用が挙げられる。

【0530】

本明細書に記載のグリカン相互作用抗体は、特定の細胞小器官へのペイロード、例えば、検出可能な薬剤または治療剤の細胞内標的化に使用することができる。加えて、本明細書に記載のグリカン相互作用抗体は、治療剤を、例えば生存動物における、組織または細胞に送達するために使用することができる。例えば、本明細書に記載のグリカン相互作用抗体は、化学療法剤を送達してがん細胞を死滅させるために使用することができる。リンカーよりによって治療剤に結合されているグリカン相互作用抗体は、メンバー透過を助長して、治療剤が細胞内に移動して細胞内標的に到達することを可能にすることができる。

10

【0531】

一部の実施形態では、ペイロードは、治療剤、例えば、細胞毒、放射性イオン、化学療法剤または他の治療剤であってもよい。細胞毒または細胞傷害性薬剤は、細胞にとって有害であり得る任意の薬剤を含む。例としては、それらに限定されないが、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニボシド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセンジオン(dihydroxyanthracenedione)、ミトキサンtron、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、メイタンシノイド、例えばメイタンシノール(その全体が本明細書に組み入れられる米国特許第5,208,020号を参照されたい)、ラケルマイシン(rachelmycin)(CC-1065、米国特許第5,475,092号、同第5,585,499号、および同第5,846,545号を参照されたく、これらの参考特許文献のすべては参照により本明細書に組み入れられる)、およびこれらの類似体またはホモログが挙げられる。放射性イオンとしては、これらに限定されないが、ヨウ素(例えば、ヨウ素125またはヨウ素131)、ストロンチウム89、リン、パラジウム、セシウム、イリジウム、リン酸、コバルト、イットリウム90、サマリウム153、およびプラセオジムが挙げられる。他の治療剤としては、これらに限定されないが、代謝拮抗薬(例えば、メトレキサート、6-メルカブトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン(5-fluorouracil decarbazine))、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテバ、クロラムブシリ、ラケルマイシン(CC-1065)、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、ロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン系薬剤(例えば、ダウノルビシン(旧名ダウノマイシン)およびドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(旧名アクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン(AMC))、ならびに抗有糸分裂剤(例えば、ビンクリスチン、ビンプラスチン、タキソールおよびメイタンシノイド)が挙げられる。本発明の抗STn抗体の場合、毒素のそのような抗STn抗体とのコンジュゲーションにより、腫瘍死滅を後押しすることができる。

20

【0532】

一部の実施形態では、ペイロードは、検出可能な薬剤、例えば、様々な有機小分子、無機化合物、ナノ粒子、酵素または酵素基質、蛍光物質、発光物質(例えば、ルミノール)、生物発光物質(例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリン)、化学発光物質、放射性物質(例えば、¹⁸F、⁶⁷Ga、^{81m}Kr、⁸²Rb、¹¹¹In、

30

40

50

1 2 3 I、1 3 3 X e、2 0 1 T 1、1 2 5 I、3 5 S、1 4 C、3 H、または^{9 9 m}Tc(例えば、過テクネチウム酸イオン(テクネチウム酸イオン(VII)、TcO₄⁻))、および造影剤(contrast agent)(例えば、金(例えば、金ナノ粒子)、ガドリニウム(例えば、キレート化Gd)、酸化鉄(例えば、超常磁性酸化鉄(SPIO)、単結晶酸化鉄ナノ粒子(MION)、および超小型超常磁性酸化鉄(USPIO))、マンガンキレート(例えばMn-DPDp)、硫酸バリウム、ヨード造影剤(contrast media)(イオヘキソール)、マイクロバブル、またはペルフルオロカーボン)であってもよい。そのような光学的に検出可能な標識としては、例えば、限定ではないが、4'-アセトアミド-4'-イソシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸;アクリジンおよび誘導体(例えば、アクリジンおよびアクリジンイソチオシアネート);5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS);4-アミノ-N-[3-ビニルスルホニル)フェニル]ナフタルイミド-3,5ジスルホネート;N-(4-アニリノ-1-ナフチル)マレイミド;アントラニルアミド;BODIPY;ブリリアントイエロー;クマリンおよび誘導体(例えば、クマリン、7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC、クマリン120)、および7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン(クマリン151))シアニン色素;シアノシン;4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(4',6-diaminidino-2-phenylindole)(DAPI);5',5"-ジブロモピロガロール-スルホンフタレン(5'5"-dibromopyrogallol-sulfonaphthalein)(ブロモピロガロールレッド);7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアナトフェニル)-4-メチルクマリン;ジエチレントリアミン五酢酸;4,4'-ジイソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸;5-[ジメチルアミノ]-ナフタレン-1-スルホニルクロリド(DNS、ダンシルクロリド);4-ジメチルアミノフェニルアゾフェニル-4'-イソチオシアネート(DABITC);エオシンおよび誘導体(例えば、エオシンおよびエオシンイソチオシアネート);エリスロシンおよび誘導体(例えば、エリスロシンBおよびエリスロシンイソチオシアネート);エチジウム;フルオレセインおよび誘導体(例えば、5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、5-(4,6-ジクロロトリアジン-2-イル)アミノフルオレセイン(DTAF)、2',7'-ジメトキシ-4',5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、X-ローダミン-5-(および-6)-イソチオシアネート(QFITCまたはXRITC)、およびフルオレスカミン);2-[2-[3-[1,3-ジヒドロ-1,1-ジメチル-3-(3-スルホプロピル)-2H-ベンゾ[e]インドール-2-イリデン]エチリデン]-2-[4-(エトキシカルボニル)-1-ピペラジニル]-1-シクロペンテン-1-イル]エテニル]-1,1-ジメチル-3-(3-スルホプロピル(sulfopropyl))-1H-ベンゾ[e]インドリウムヒドロキシド、分子内塩、n,n-ジエチルエタナミンを伴う(1:1)化合物(IR144);5-クロロ-2-[2-[3-[5-クロロ-3-エチル-2(3H)-ベンゾチアゾール-イリデン]エチリデン]-2-(ジフェニルアミノ)-1-シクロペンテン-1-イル]エテニル]-3-エチルベンゾチアゾリム過塩素酸塩(IR140);マラカイトグリーンイソチオシアン酸塩;4-メチルウンベリフェロンオルトクレゾールフタレン;ニトロチロシン;パラロサニリン;フェノールレッド;B-フィコエリトリン;o-フタルジアルデヒド;ピレンおよび誘導体(例えば、ピレン、酪酸ピレン、およびスクシンイミジル1-ピレン);酪酸塩量子ドット;リアクティブレッド4(CIBACRON(商標)ブリリアントレッド3B-A);ローダミンおよび誘導体(例えば、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、6-カルボキシローダミン(R6G)、リッサミンローダミンBスルホニルクロリド、ローダミン(rhodamine)(Rhod)、ローダミンB、ローダミン123、ローダミンXイソチオシアネート、スルホローダミンB、スルホローダミン101、スルホローダミン101の塩化スルホニル誘導体(テキサスレッド)、N,N,N',N'テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)、テトラメチルローダミン、およびテトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC));リボフラビン;ロソール酸;テル

10

20

30

40

50

ビウムキレート誘導体；シアニン - 3 (C y 3) ; シアニン - 5 (C y 5) ; シアニン - 5 . 5 (C y 5 . 5) 、シアニン - 7 (C y 7) ; I R D 7 0 0 ; I R D 8 0 0 ; A l e x a 6 4 7 ; L a J o l t a B l u e ; フタロシアニン；およびナフタロシアニンが挙げられる。

【 0 5 3 3 】

一部の実施形態では、検出可能な薬剤は、活性化すると検出可能になる検出不能前駆物質（例えば、蛍光性テトラジン - フルオロフォア構築物（例えば、テトラジン - B O D I P Y F L 、テトラジン - オレゴングリーン 4 8 8 、もしくはテトラジン - B O D I P Y T M R - X ）または酵素により活性化可能な発蛍光剤 [例えば、P R O S E N S E (登録商標) (V i s E n M e d i c a l)] であってもよい。酵素標識された組成物を使用することができる in vitro アッセイとして、これらに限定されないが、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) 、免疫沈降アッセイ、免疫蛍光法、酵素イムノアッセイ (E I A) 、ラジオイムノアッセイ (R I A) 、およびウェスタンプロット分析が挙げられる。

組合せ

【 0 5 3 4 】

グリカン相互作用抗体を、1つまたは複数の他の治療剤、予防剤、診断剤またはイメージング剤と組み合わせて使用することができる。「と組み合わせて」には、薬剤を同じ時に投与しなければならない、および / または送達のために一緒に製剤化しなければならないことを含意する意図はないが、これらの送達方法は本開示の範囲内である。組成物は、1つもしくは複数の他の所望される治療薬もしくは医療手順と同時に、そのような治療薬もしくは医療手順の前に、または後に、投与することができる。一般に、各薬剤は、その薬剤について定められた用量および / またはタイムスケジュールで投与されることになる。一部の実施形態では、本開示は、これらのバイオアベイラビリティを向上させること、これらの代謝を低減および / もしくは修飾すること、これらの排出を阻害すること、ならびに / またはこれらの体内分布を修飾することができる薬剤と組み合わせた、医薬組成物、予防用組成物、診断用組成物および / またはイメージング用組成物の送達を包含する。

【 0 5 3 5 】

一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体は、1つまたは複数のがん治療薬、例えば、化学療法剤、治療用抗体および / または細胞周期阻害剤と組み合わせて使用することができる。グリカン相互作用抗体処置をそのようながん治療薬と組み合わせることにより、有益な治療的性質、例えば、相乗的抗腫瘍活性を得ることができ、そのように組み合わせることをがんの処置に使用することができる。一部の場合には、そのような方法は、化学療法、抗体療法および / または細胞周期阻害剤処置に対して抵抗性であるがん細胞を標的化するために使用することができる。薬物抵抗性のがん細胞を標的化する方法は、化学療法、抗体療法および / または細胞周期阻害剤処置後に発生するがん細胞における S T n 発現の変化を利用することができる。一部の場合には、薬物抵抗性がん細胞は、処置前および / または後に S T n を発現する。一部の場合には、薬物抵抗性がん細胞における細胞表面 S T n 発現は、処置後に増加され得る。処置後、一部のがんは、増殖することがあり、その結果、使用されたがん治療薬に対して抵抗性である S T n 発現がん細胞の集団が生じることになる。一部の場合には、薬物抵抗性がん細胞は、がん幹細胞である。

【 0 5 3 6 】

したがって、本発明の方法は、1つまたは複数のがん治療薬の投与後に存在する S T n 発現がん細胞を標的化するために抗 S T n 抗体を対象に投与する方法を含み得る。そのような抗 S T n 抗体は、配列番号 1 ~ 1 2 のいずれかから選択されるアミノ酸配列を有する可変ドメインを含み得る。抗 S T n 抗体で処置された対象および / または対象におけるがん性組織は、S T n ポジティブ細胞の低減を経験し得る。一部の実施形態では、この低減は、約 1 0 % ~ 約 9 0 % より高い% (例えば、少なくとも 1 0 % 、少なくとも 2 0 % 、少なくとも 3 0 % 、少なくとも 4 0 % 、少なくとも 5 0 % 、少なくとも 6 0 % 、少なくとも

10

20

30

40

50

70%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%)のS T n ポジティブ細胞の減少を含み得る。

【0537】

一部の実施形態では、抗S T n 抗体と組み合わせて使用される化学療法剤は、これらに限定されないが、タキサン系薬剤(例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル)、白金系薬剤(例えば、シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン)、トポイソメラーゼ阻害剤(例えば、イリノテカン)、ヌクレオチド類似体(例えば、5-フルオロウラシルおよびゲムシタビン)、キナーゼ阻害剤[例えば、ポナチニブ(ICLUSIG(登録商標))およびソラフェニブ(NEXAVAR(登録商標))]、およびPARP阻害剤[例えば、オラパリブ(LYNPARZA(商標))]を含み得る。化学療法剤は、微小管機能、酵素機能またはDNA合成を阻害することを含むがこれらに限定されない機構によって、細胞死を引き起こすことまたは細胞増殖を防止することができる。
10

【0538】

一部の実施形態では、抗S T n 抗体と組み合わせて使用される治療用抗体は、がん細胞表面受容体を標的とする抗体を含み得る。そのような表面受容体は、細胞増殖および/または遊走に重要な細胞シグナル伝達経路に関与し得る。一部の場合には、表面受容体は、上皮増殖因子受容体(EGFR)、血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)、またはヒト上皮増殖因子受容体(HER)であり得る。これらの受容体または関連因子を標的とする抗体は、がん細胞増殖および/または遊走を阻害することができる。例示的抗EGFR抗体としては、セツキシマブ(ERBITUX(登録商標))およびパニツムマブ(VECTIBIX(登録商標))が挙げられる。例示的抗VEGF抗体としては、ベバシズマブ(AVASTIN(登録商標))およびラムシルマブ(CYRAMZA(登録商標))が挙げられる。例示的抗HER2抗体としては、トラスツズマブ(HERCEPTIN(登録商標))が挙げられる。これらの中で、セツキシマブ、パニツムマブ、ベバシズマブおよびラムシルマブは、結腸直腸がんを処置するためのFDA承認抗体である。
20

【0539】

一部の実施形態では、細胞周期阻害剤を抗S T n 抗体処置と組み合せ使用することができる。細胞周期阻害剤は、これらに限定されないが、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害剤、チェックポイントキナーゼ阻害剤、Polo様キナーゼ(PLK)阻害剤、およびAuroraキナーゼ阻害剤を含み得る。本明細書で使用される場合、用語「細胞周期阻害剤」は、細胞周期進行を緩徐化するまたは停止させる任意の薬剤を指す。細胞周期阻害剤は、細胞周期停止を種々のステージで誘導することができ、細胞死および/または増殖阻害をもたらすことができる。
30

【0540】

一部の実施形態では、細胞周期阻害剤は、CDK阻害剤であってもよい。サイクリン依存性キナーゼ(CDK)は、セリン/トレオニンキナーゼの群である。CDKおよびそれらのサイクリンパートナーは、細胞周期移行を駆動する肝要な調節酵素である。それらの中で、CDK4およびCDK6は、G0またはG1期からS期への移行の重要な駆動因子である。CDK4およびCDK6(本明細書ではCDK4/6と呼ばれる)は、組織特異的様式で発現される近縁ホモログである。CDK4/6は、サイクリンDと複合体を形成し、網膜芽細胞腫(Rb)タンパク質をリン酸化する。Rbリン酸化は、E2F転写因子のその抑制を減弱させ、この減弱より、DNA複製に必要なタンパク質をコードする遺伝子が転写されることになる。この転写により、細胞はS期に入ることが可能になり得る。S期への進行は、サイクリンE-CDK2およびサイクリンA-CDK2複合体により制御される。G2からM期への移行は、サイクリンパートナーであるサイクリンA2およびサイクリンBとの相互作用によってCDK1により調節される。CDK(一般にまたは特異的CDK)を標的とする治療薬は、細胞周期進行を遅らせることができ、細胞増殖を防止することができる。OttoおよびSicinski、Nat Rev Cancer.、2017年；17巻(2号)：93～115頁；ならびにAsgharら、Nat Rev Drug Discov.、2015年；14巻(2号)：130～146頁を参照されたく、これらの参考文献の内容は、それら全体が参
40

照により本明細書に組み入れられる。

【0541】

一部のケースでは、CDK阻害剤は、選択的CDK4/6阻害剤であってもよい。G1からSへの移行におけるCDK4/6のその役割のため、CDK4/6の阻害は、G1期で細胞周期停止を引き起こす。例示的CDK4/6阻害剤としては、これらに限定されないが、パルボシクリブ(Pfizer)、リボシクリブ(Novartis)、およびアベマシクリブ(Eli Lilly)が挙げられる。パルボシクリブ(PDO-0332991、IBRANCE(登録商標))は、進行(転移性)乳がんの処置に対する承認薬である(Finnら、Breast Cancer Res.、2009年；11巻(5号)：R77頁；Roccaら、Expert Opin Pharmacother.、2014年；15巻(3号)：407～20頁；米国特許第6,936,612号、同第7,863,278号、同第7,208,489号、および同第7,456,168号、これらの内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。パルボシクリブは、米国特許第7,345,171号において開示されている方法に従って調製することおよび特徴付けることができ、この特許文献の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。同様に、リボシクリブ(LEE011)も、高い作用強度でCDK4/6を選択的に阻害する。リボシクリブおよびリボシクリブの薬学的に許容される塩は、米国特許第8,685,980号および同第9,193,732号において詳述されている方法に従って調製することができ、これらの特許文献の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。アベマシクリブ(LY-2835219)は、CDK4およびCDK6のみならず、PIM1をはじめとする他のいくつかのキナーゼも阻害する(米国特許第7,855,211号、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)。アベマシクリブの早期活性は、肺がん、卵巣がんおよびメラノーマ患者において報告された(Shapiroら、ASCO Meeting abstracts、2013年；31巻：2500頁)。

10

20

30

【0542】

一部の場合には、CDK阻害剤は、汎CDK阻害剤であってもよい。そのような阻害剤は、いくつかのCDKを遮断して、種々のステージでの細胞周期停止、例えば、G1停止、G2停止、および/またはG2/M停止をもたらすことができる。例示的汎CDK阻害剤としては、これらに限定されないが、フラボピリドール(アルボシジブ)、ジナシクリブ(MK-7965)、R-ロスコビチン、AT7519、ミルシクリブ、TG02、CYC065およびRGB-286638が挙げられる。例えば、汎CDK阻害剤は、半合成フラボピリドール(例えば、米国特許第4,900,727号を参照されたい)またはフラボピリドールの類似体(例えば、米国特許第5,733,920号および同第5,849,733号を参照されたく、これらの特許文献の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる)であってもよい。別の例として、汎CDK阻害剤は、米国特許第7,119,200号において開示されているような、ジナシクリブ、またはその薬学的に許容される塩であってもよく、この特許文献の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0543】

一部の実施形態では、グリカン相互作用抗体と組み合わせて使用される細胞周期阻害剤は、チェックポイントキナーゼ阻害剤であってもよい。チェックポイントキナーゼ、例えば、CHK1、CHK2またはWEE1の阻害は、細胞周期チェックポイント(例えば、Sチェックポイント、G2/Mチェックポイントまたは有糸分裂スピンドル形成チェックポイント)を損なわせることができ、それによって、DNA損傷の存在下であっても細胞周期進行が可能になる。これは、「分裂期細胞死」として公知の機構によって有糸分裂中に細胞死を誘発し得る。例示的チェックポイントキナーゼ阻害剤としては、これらに限定されないが、MK-8776、プレキサセルチブ(LY2606368)、AZD1775、GDC-0575、およびViscontiら、J Exp Clin Cancer Res.、2016年；35巻；153頁に記載されているものが挙げられ、前記参考文献の内容はそれら全体が参照により本明細書に組み入れられる。

40

50

【0544】

一部の実施形態では、細胞周期阻害剤は、Polo様キナーゼ（PLK）阻害剤であってもよい。Polo様キナーゼ（PLK）は、細胞周期の調節性セリン／トレオニンキナーゼである。PLK1は、PLKファミリーのうち最も特徴付けられているメンバーであり、G2/M移行、スピンドル形成成熟、染色体分離、および有糸分裂終了などの、多くの調節事象に関与する極めて重要な有糸分裂プロテインキナーゼである。例示的PLK1阻害剤としては、これらに限定されないが、リゴサチブ（ON 01910.Na）、ボラセルチブ（BI 6727）、BI 2536、HMN-176、TKM-080301、NMS-P937、DAP-81、シクロパリン1（Cyclopalin1）、ZK-チアゾリジノン（TAL）、SBE13、COM-36、LFM-A13、サイトネミン、オルトマンニン、およびGSK461364Aが挙げられる（KumarおよびKim、BiomedRes Int.、2015年；2015巻；705745、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。

【0545】

一部の実施形態では、細胞周期阻害剤は、Auroraキナーゼ阻害剤であってもよい。Auroraキナーゼは、有糸分裂を忠実に経るために重要である高度に保存されるセリン／トレオニンキナーゼのファミリーを含む。Aurora Aは、中心体成熟、染色体整列、スピンドル形成、減数分裂成熟、および細胞質分裂を含む、様々な有糸分裂事象において非常に重要な役割を果たす。Aurora Bは、染色体パッセンジャー複合体の成分であり、染色体縮合および配向、ならびに細胞質分裂の適正な遂行に関与する。例示的Auroraキナーゼ阻害剤としては、バラセルチブ（barasertib）（AZD1152）、アリセリチブ（MLN8237）、ダヌセルチブ（PHA-739358）、ENMD-2076、AT9283、PF-03814735、およびAMG 900が挙げられる（BavetsiasおよびLinardopoulos、Front Oncol.、2015年；5巻：278頁、この内容は、それら全体が参照により本明細書に組み入れられる）。

投薬量

【0546】

本開示は、薬物送達科学の起こり得る進歩を考慮に入れて、任意の適切な経路による、治療的、薬学的、診断的またはイメージングのいずれかのためのグリカン相互作用抗体の送達を包含する。送達は、裸のものであってもよく、または製剤化されたものであってもよい。

裸の送達

【0547】

本発明のグリカン相互作用抗体を裸の形態で細胞、組織、器官または生物に送達することができる。本明細書で使用される場合、用語「裸の」は、トランスフェクションまたは透過性を促進する薬剤または修飾なしで送達されるグリカン相互作用抗体を指す。裸のグリカン相互作用抗体を、当技術分野において公知のおよび本明細書に記載の投与経路を使用して細胞、組織、器官および／または生物に送達することができる。裸の送達は、生理食塩水またはPBSなどの単純な緩衝液中の製剤化を含み得る。

製剤化された送達

【0548】

本発明のグリカン相互作用抗体は、本明細書に記載の方法を用いて製剤化することができる。製剤は、修飾されていてもよい、および／または未修飾であってもよい、グリカン相互作用抗体を含み得る。製剤は、これらに限定されないが、細胞侵入剤、薬学的に許容される担体、送達剤、生侵食性または生体適合性ポリマー、溶媒、および徐放送達デポーをさらに含み得る。製剤化されたグリカン相互作用抗体を、当技術分野において公知のおよび本明細書に記載の投与経路を使用して細胞に送達することができる。

【0549】

組成物もまた、直接漬けるまたは浸すことを含むがこれらに限定されない、当技術分野におけるいくつかの方法のいずれかで、カテーテル経由での、ゲル、粉末、軟膏、クリー

10

20

30

40

50

ム、ゲル、ローションおよび／または点滴剤による、組成物を被覆したまたは含浸させた布もしくは生分解性材料などの基材を使用すること、ならびにこれらに類することによる、器官または組織への直接送達のために、製剤化することができる。

投薬

【0550】

本発明は、それを必要とする対象に本発明による1つまたは複数のグリカン相互作用抗体を投与することを含む方法を提供する。グリカン相互作用抗体をコードする核酸、グリカン相互作用抗体を含むタンパク質もしくは複合体、またはこれらの医薬組成物、イメージング用組成物、診断用組成物もしくは予防用組成物を、疾患、障害および／または状態の予防、処置、診断またはイメージングに有効な任意の量および任意の投与経路を使用して、対象に投与することができる。必要とされる正確な量は、対象の種、年齢および一般的な状態、疾患の重症度、特定の組成物、その投与経路、その作用方法、ならびにこれらに類するものに依存して、対象によって変わることになる。本発明による組成物は、通常は、投与の容易さおよび投薬量の均一性のため、投薬単位剤形で製剤化される。しかし、本発明の組成物の全1日使用量が担当医によって正当な医学的判断の範囲内で決定されることは、理解されるであろう。任意の特定の患者のための具体的な治療有効用量レベル、予防有効用量レベル、または適切なイメージング用量レベルは、処置されることになる障害および障害の重症度；利用される具体的な化合物の活性；利用される具体的な組成物；患者の年齢、体重、総体的な健康、性別および食事；利用される具体的な化合物の投与の回数、投与経路、および排泄率；治療の継続期間；利用される具体的な化合物と組み合わせてまたは同時に使用される薬物；ならびに医学分野において周知の同様の因子を含む、様々な因子に依存することになる。10

【0551】

一部の実施形態では、本開示の化合物（例えば、抗S T n 抗体）を組成物の一部として投与することができ、この場合、組成物は、約0.01mg/ml～約1mg/ml、約0.1mg/ml～約5mg/ml、約0.5mg/ml～約10mg/ml、約2mg/ml～約20mg/ml、または約5mg/ml～約50mg/mlのそのような化合物の濃度を含む。20

【0552】

一部の実施形態では、組成物は、約0.01ml/kg～約1ml/kg、約0.2ml/kg～約1.2ml/kg、約0.05ml/kg～約2ml/kg、約0.1ml/kg～約3ml/kg、約0.5ml/kg～約5ml/kg、約2ml/kg～約10ml/kg、または約5ml/kg～約20ml/kgの、対象の体重当たりの容量で、投与することができる。投与は、静脈内投与（例えば、静脈内ボーラス注射）による投与であってもよい。30

【0553】

ある特定の実施形態では、本開示の化合物または組成物は、約0.0001mg/kg～約100mg/kg、約0.01mg/kg～約50mg/kg、約0.1mg/kg～約40mg/kg、約0.5mg/kg～約30mg/kg、約1mg/kg～約6mg/kg、約2mg/kg～約10mg/kg、約5mg/kg～約20mg/kg、または約10mg/kg～約200mg/kgの、対象の体重当たりの活性化合物（例えば、抗S T n 抗体または化学療法剤）の量を送達するのに十分な投薬レベルで投与することができる。所望の治療、診断、予防またはイメージング効果を得るために、投与を1日1回または複数回行ってもよい。1日3回、1日2回、1日1回、1日おき、3日ごとに、週1回、2週間ごと、3週間ごと、または4週間ごと、2カ月ごと、3カ月ごと、4カ月ごと、5カ月ごと、6カ月ごと、または年1回を含むがこれらに限定されない、任意の投薬スケジュールに従って、所望の投薬量を送達することができる。ある特定の実施形態では、複数回投与（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14回、またはそれより多回の投与）を使用して、所望の投薬量を送達することができる。40

。

10

20

30

40

50

【0554】

本発明によれば、グリカン相互作用抗体を分割用量レジメン投与することができる。本明細書で使用される場合、「分割用量」は、単一単位用量または総1日用量の2用量またはそれより多くの用量への分割、例えば、単一単位用量の2回またはそれより多い回数の投与である。本明細書で使用される場合、「単一単位用量」は、1用量で／1回で／単一经路で／单一の接觸時点、すなわち单一投与事象で、投与される任意の治療薬の用量である。本明細書で使用される場合、「総1日用量」は、24時間単位で与えられるまたは処方される量である。総1日用量を単一単位用量として投与してもよい。一実施形態では、本発明のグリカン相互作用抗体は、対象に分割用量で投与される。グリカン相互作用抗体は、緩衝液のみで製剤化されることもあり、または本明細書に記載の製剤中に存在することもある。本明細書に記載されるようなグリカン相互作用抗体を含む医薬組成物を、本明細書に記載の剤形、例えば、局所、鼻腔内、気管内、または注射用（例えば、静脈内、眼中、硝子体内、筋肉内、心臓内、腹腔内もしくは皮下）剤形に製剤化することができる。医薬剤の製剤化および／または製造に関する概論は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第21版、Lippincott WilliamsおよびWilkins、2005年（参照により本明細書に組み入れられる）において見つけることができる。

コーティングまたはシェル

【0555】

錠剤、糖衣錠、カプセル、ピルおよび顆粒の固体剤形は、腸溶コーティングおよび医薬製剤分野で周知の他のコーティングなどの、コーティングおよびシェルを用いて、調製することができる。これらの固体剤形は、必要に応じて乳白剤を含んでもよく、これらの固体剤形が腸管のある特定の部分でのみもしくその部分で優先的に活性成分を必要に応じて遅延様式で放出する組成のものであり得る。使用することができる埋没組成物の例としては、ポリマー物質およびワックスが挙げられる。同様のタイプの固体組成物を、ラクトースまたは乳糖ならびに高分子量ポリエチレングリコールおよびこれらに類するもののような賦形剤を使用して、ゼラチン製軟および硬カプセル中の充填剤として利用することができる。

I V . キットおよびデバイス

キット

【0556】

本明細書に記載の組成物のいずれかをキットに含めることができる。非限定的な例では、抗原分子を含む、グリカン相互作用抗体を生成するための試薬が、キットに含まれる。キットは、グリカン相互作用抗体を作出または合成するための試薬または説明書をさらに含むことができる。キットは、1つまたは複数の緩衝剤も含むことができる。本発明の他のキットは、グリカン相互作用抗体タンパク質または核酸アレイまたはライブラリーを作製するための成分を含むことができ、したがって、例えば固体支持体を含むことができる。

【0557】

一部の実施形態では、本開示は、1つまたは複数のグリカン相互作用抗体を含む、対象のスクリーニング、モニタリングおよび／または診断のためのキットを含む。そのようなキットを単独で使用してもよく、または1つもしくは複数の他のスクリーニング、モニタリングおよび／もしくは診断（例えば、コンパニオン診断）方法と組み合わせて使用してもよい。一部のキットは、緩衝剤、生物学的基準物質、二次抗体、検出試薬、および試料前処理のための（例えば、抗原回復、ブロッキングなどのための）組成物のうち1つまたは複数を含む。

【0558】

キットの成分は、水性媒体中または凍結乾燥形態のどちらかで包装され得る。キットの容器手段は、成分を入れることができる、好ましくは、適切に小分けすることができる、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、瓶、注射器または他の容器手段を一般に含むであろう。キット内に1つより多くの成分が存在する（標識試薬と標識が一緒に包装

され得る)場合、キットは、追加の成分を別々に入れることができる第2の、第3のまたは他の追加の容器も一般に含むであろう。キットは、無菌の、薬学的に許容される緩衝剤および/または他の希釈剤を収容するための第2の容器手段も含むことができる。しかし、成分の様々な組み合わせが1つのバイアルに含まれていることもある。本発明のキットはまた、グリカン相互作用抗体を収容するための手段、例えば、タンパク質、核酸および任意の他の試薬容器を、商業販売のために厳重に密封された状態で通常は含むであろう。そのような容器としては、所望のバイアルが保持される、射出成形および/またはプロー成形プラスチック容器を挙げることができる。

【0559】

キットの成分が1つおよび/または複数の溶液の状態で備えられる場合、溶液は、水溶液であり、滅菌水溶液が特に好ましい。しかし、キットの成分を乾燥粉末として備えることもできる。試薬および/または成分が乾燥粉末として備えられる場合、粉末を適する溶媒の添加により復元することができる。溶媒を別の容器手段に備えることができることも予想される。一部の実施形態では、標識色素が乾燥粉末として備えられる。10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900、1000マイクログラム、または少なくとも1000マイクログラム、または最大で10gの乾燥色素が、本発明のキットに備えられると考えられる。その場合、色素をDMSOなどの任意の適する溶媒に再懸濁させることができる。

【0560】

キットは、キット成分を利用するための説明書はもちろん、キットに含まれていない任意の他の試薬の使用についての説明書も含むことができる。説明書は、実行することができる変形形態を収載することができる。

デバイス

【0561】

本明細書に記載の組成物のいずれかをデバイスと組み合わせることができ、いずれかでデバイスを被覆することができ、またはいずれかをデバイスに埋め込むことができる。デバイスは、これらに限定されないが、歯科インプラント、ステント、骨代用品、人工関節、弁、ペースメーカー、または他の移植可能な治療用デバイスを含む。

V. 均等物および範囲

【0562】

当業者は、本明細書に記載の本発明による具体的な実施形態の多くの均等物に気付く、または日常的な程度の実験を使用してそのような均等物を突き止めることができるであろう。本発明の範囲は、上記の説明に限定されることを意図したものではなく、むしろ添付の特許請求の範囲に示されるとおりである。

【0563】

特許請求の範囲において、「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」などの冠詞は、相容れない指示がない限り、またはその他の解釈が文脈から明らかでない限り、1つまたは複数を意味し得る。ある群の1つまたは複数のメンバー間に「または」を含む請求項または説明は、相容れない指示がない限り、またはその他の解釈が文脈から明らかでない限り、群メンバーの1つ、1つより多く、またはすべてが、所与の製品またはプロセスに存在する、利用される、または別様に関連している場合に成立すると考えられる。本発明は、群の正確に1つのメンバーが、所与の製品またはプロセスに存在する、利用される、または別様に関連している実施形態を含む。本発明は、1つより多くの群メンバー、または群メンバー全体が、所与の製品またはプロセスに存在する、利用される、または別様に関連している実施形態を含む。

【0564】

用語「含むこと」は、開放的であることを意図した用語であり、追加の要素またはステップの包含を、要求しないが、許容する。したがって、用語「含むこと」が、本明細書で使用されるとき、用語「からなること」も包含され、開示される。

10

20

30

40

50

【 0 5 6 5 】

範囲が与えられる場合、端点が含まれる。さらに、別段の指示がない限り、またはその他の解釈が文脈および当業者の理解から明らかでない限り、範囲として表される値が、本発明の種々の実施形態に関して述べられている範囲内の、文脈による明確な別様の規定がない限りその範囲の下限の単位の 10 分の 1 までの、任意の特定の値または部分範囲をとることができることを、理解されたい。

【 0 5 6 6 】

加えて、先行技術の範囲に含まれる本発明のいずれの特定の実施形態も、請求項のいずれか 1 または複数から明示的に除外され得ることを理解されたい。そのような実施形態は、当業者に公知であると見なされるため、除外が本明細書に明示的に示されない場合であっても除外され得る。本発明の組成物の任意の特定の実施形態（例えば、任意の核酸またはそれにコードされているタンパク質；任意の産生方法；任意の使用方法など）を、先行技術の存在と関連しているか否かを問わず、あらゆる理由で、任意の 1 つまたは複数の請求項から除外することができる。

10

【 0 5 6 7 】

すべての引用出典、例えば、本明細書に引用される参考文献、公報、データベース、データベースエントリ、および技術は、引用が明確に述べられてない場合であっても、参照により本願に組み入れられる。引用出典と本願との記述が矛盾する場合、本願の記述が優先されるものとする。

20

【 0 5 6 8 】

セクションおよび表の見出しあは、限定的であることを意図したものではない。

【 実施例 】**【 0 5 6 9 】**

（実施例 1）

グリカンアレイ分析

最適化されたグリカンアレイを利用して、単一実験で複数のグリカンに対する抗体親和性および特異性を試験する。グリカンアレイは、化学合成され、明確に規定された、 71 のグリカンを含み、これらの大部分は Neu5Ac と Neu5Gc グリカンのペアである。アレイスライドは、購入したものであり（ArrayIt Corp, Sunnyvale, CA）、表 4 に収載するグリカンを含む。

30

【表4-1】

表4.アレイグリカン

グリカン ID番号	グリカン
1	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
2	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
3	Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
4	Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
5	Neu5Ac α 2,6GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
6	Neu5Gc α 2,6GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
7	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
8	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
9	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
10	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
11	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
12	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
13	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
14	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
15	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
16	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
17	Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
18	Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
19	Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
20	Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
21	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2

10

20

【表4-2】

22	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
23	Neu5,9Ac2 α 2,6GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
24	Neu5Gc9Ac α 2,6GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
25	Neu5Ac α 2,3Gal β O(CH2)2CH2NH2
26	Neu5Gc α 2,3Gal β O(CH2)2CH2NH2
27	Neu5Ac α 2,6Gal β O(CH2)2CH2NH2
28	Neu5Gc α 2,6Gal β O(CH2)2CH2NH2
29	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β O(CH2)2CH2NH2
30	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β O(CH2)2CH2NH2
31	Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β O(CH2)2CH2NH2
32	Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β O(CH2)2CH2NH2
33	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH2)2CH2NH2
34	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH2)2CH2NH2
35	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH2)2CH2NH2
36	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc β O(CH2)2CH2NH2
37	Neu5,9Ac2 α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
38	Neu5Gc9Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
39	Neu5,9Ac2 α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
40	Neu5Gc9Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
41	Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
42	Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
43	Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
45	Gal β 1,4GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
47	GalNAc α O(CH2)2CH2NH2
51	Gal β 1,3GalNAc β O(CH2)2CH2NH2
52	Gal β 1,3GlcNAc α O(CH2)2CH2NH2
53	Gal β 1,3GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
54	Gal β 1,4GlcNAc6S β O(CH2)2CH2NH2
55	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
56	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β O(CH2)2CH2NH2
57	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β O(CH2)2CH2NH2
58	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc6S β O(CH2)2CH2NH2
59	Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
60	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
61	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
62	Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β O(CH2)2CH2NH2
63	Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc6S β O(CH2)2CH2NH2
64	Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)3NHC(OCH2)2CH2NH2
65	Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)3NHC(OCH2)2CH2NH2
66	Neu5Ac α 2,6(Neu5Ac α 2,3)Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
67	Neu5Ac α 2,6(Neu5Gc α 2,3)Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
68	Neu5Ac α 2,6(KDN α 2,3)Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
69	Neu5Gc α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
70	KDN α 2,8Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
71	Neu5Ac α 2,8Kdn α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
72	Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
73	Neu5Ac α 2,8Neu5Gc α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
74	KDN α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
75	Neu5Gc α 2,8Neu5Gc α 2,3Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2
76	Neu5Ac α 2,8Neu5Ac α 2,6Gal β 1,4Glc β O(CH2)2CH2NH2

【0570】

15m1の2M Tris緩衝液(pH8)を0.9m1の16.6Mエタノールアミンおよび284.1m1の蒸留水と併せることにより、300m1のエポキシプロッキン

10

20

30

40

50

グ緩衝液を調製する。溶液をH C 1で最終p H 9 . 0にする。0 . 2 μ Mニトロセルロース膜を使用して溶液を濾過する。エポキシ緩衝溶液および1 Lの蒸留水を5 0 ℃に予温する。スライドガラスをスライドホルダーに配列し、加温されたエポキシプロッキング緩衝液が入っている染色槽に迅速に浸漬する。スライドをエポキシプロッキング緩衝液中で1時間、5 0 ℃で、断続的に振盪しながらインキュベートして、エポキシ結合部位を不活性化する。次に、スライドをすすぎ、1 % O V Aを含有するP B Sを用いて2 5 ℃で1時間プロッキングする。ポリクローナル抗体を含有する血清試料(1 : 1 0 0 0)または精製されたモノクローナル抗体を含有する血清試料(1 ug / mL)を、1 % O V Aを含有するP B Sで希釈し、1時間にわたって2 5 ℃でグリカンアレイに添加する。よく洗浄した後、グリカンマイクロアレイスライドをC y 3 コンジュゲート抗マウスI g G (J a c k s o n Immunoresearch、West Grove、PA)とともに1時間インキュベートすることにより抗体の結合を検出する。次いで、スライドをよく洗浄し、乾燥させ、G e n e p i x 4 0 0 0 Bスキヤナー(レーザー100%、ゲイン350、画素10 μm)でスキャンする。G e n e p i xソフトウェアを使用してスキャン画像から生データを抽出し、生データの分析を行う。抗体が、A c S T n分子とG c S T n分子の両方と結合するが、アレイ上のT nにもいづれの他のグリカンにも結合しないことを示した場合、これらの抗体をA c S T nおよびG c S T nに対して高特異的であると見なす。

10

【0 5 7 1】

アレイ分析に基づいて、抗体をアレイグリカン結合プロファイルに従って分類する。抗体がグリカン5、6、23および24と結合する場合、A c S T nおよびG c S T nに結合することができる「第1群」抗体として、抗体を分類する。そのような抗体は、多種多様なS T n構造および図1 Aの最も大きい楕円により示されるS T nの部分と会合することができるため、汎S T n抗体と呼ぶ。抗体がグリカン5、6、23、24、27および31と結合する場合、S T nに結合でき、セリンまたはトレオニンへのO連結を含む一部の関連構造にも結合できる、「第2群」抗体として、抗体を分類する。これらの抗体は、図1 Bの最も大きい楕円により示されるS T nの部分と会合すると考えられる。一部の第2群抗体は、G c S T nを有する構造よりA c S T nを有する構造と好んで結合する。抗体がグリカン5、6、23、24、17、3、19、37、27および31に結合する場合、抗体を「第3群」抗体(S T nに結合することができるが、一連のより幅広い関連構造にも結合することもある)として分類する。第2群抗体とは異なり、第3群抗体は、そのような構造がセリンまたはトレオニンにO連結している必要がない。第3群抗体は、図1 Cの最も大きい楕円により示されるS T nの部分と会合すると考えられる。最後に、抗体は、グリカン5、6、23、24および47と結合する場合、A c S T nとG c S T nの両方ならびに非シアリル化T n抗原と結合することができる(したがって、より広い特異性を有する)「第4群」抗体である。第4群抗体は、図1 Dの最も大きい楕円により示されるS T nの部分と会合すると考えられる。

20

30

(実施例2)

マウス抗S T n抗体の生成

40

【0 5 7 2】

ムチンでのネズミ科動物の免疫化によって、米国特許出願公開第2 0 1 6 / 0 1 3 0 3 5 6号(この内容はそれら全体が参照により本明細書に組み入れられる)に以前に記載されたようにして、得た抗S T nモノクローナル抗体からの可変ドメインを使用して、m S I A 1 0 1およびm S I A 1 0 2抗体を生成した。m S I A 1 0 3可変ドメイン配列は、3 F 1 I g G 1抗体(S B H B i o s c i e n c e s、N a t i c k、M A)から入手した。I g G 2 a発現ベクター構築物(抗体重鎖のためのプラスミドH 1 2 0 6および抗体軽鎖のためのプラスミドL 1 2 0 6、L a k e P h a r m a、B e l m o n t、C A)を、I g G 2 a定常領域の上流にm S I A 1 0 1、m S I A 1 0 2およびm S I A 1 0 3可変ドメインをコードするように修飾した。発現されたドメインの配列を表5に提示する。

50

【表5】

表5. IgG2a抗体生成に利用した配列

ドメイン	配列	配列番号
mSIA101 VH ドメイン	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQKPEQGLEWIGYFS PGNDDIKYNEKFRGKATLTADKSSTAYMQLNSLSSDDSAVFCKRSLSTPY WGQGTLLTVSA	1
mSIA101 VL ドメイン	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLRGHNKNLTWYRQKPGLPPKL LIYWASTRESGVPDFRTGSGSGTDFALTISSVQAEDLAVYYCQNDYTYPYTF GGGTKEIKR	2
mSIA102 VH ドメイン	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQKPEQGLEWIGYFS PGNDDIKYNEKFKVKATLTADKSSTAYMQLTSLSLEDASVFCKRSYYGD WGQGTLLTVSS	3
mSIA102 VL ドメイン	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSHLAWYQQKQGKSPQLLVYGAT NLADGVPSRFSGSGSGTQFSLKIHSLQSEDFGSYYCQHFWGAPFTFGSGTKLE IK	4
mSIA103 VH ドメイン	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVKQKPEQGLDWIGYIS PGNGDIKYNEKFSDKVTLTADKSSTACMHLNSLTSEDASVFCKRSLLALD YWQGQTLLTVSS	5
mSIA103 VL ドメイン	DIVMTQSHKFMSTSVDGRVSITCKASQDVGTNIAWYQQKPGRSVPVIYSAS TRHTGVPDFRTGSGSGTDFLTISNVQSEDLTDYFCQQYSSFPLFGVGTKLE LK	6
IgG2a 重鎖定常 ドメイン	AKTTAPSVDPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKP CPPCKCPAPNLLGGPSVIFPPKIKDVLMLISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF VNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HHHTTTSRTPGK	13
カッパ軽鎖 定常ドメイン	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVL NSWTQDSKDSTYSMSSTLTLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE C	14

【0573】

全重鎖アミノ酸配列をコードするプラスミド、および全軽鎖アミノ酸配列をコードするプラスミドを、細胞にトランスフェクトし、発現させて、成熟抗体を産生させた。

【0574】

IgG2a抗体を発現する安定した細胞株の生成のために、チャイニーズハムスター卵巣-K1(C H O - K 1)細胞にトランスフェクトした。37の加湿5% C O 2 インキュベーターにおいて、L-グルタミンを補充した既知組成培地(C D - C H O、I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C A)で、細胞を培養した。

【0575】

対数期で増殖中の浮遊C H O細胞およそ8千万個に、完全長重鎖および軽鎖をコードする80μgの全プラスミドをエレクトロポレーション(M a x C y t e)によってトランスフェクトした。24時間後、トランスフェクトされた細胞を抗体遺伝子の安定した組込みについて選択した。選択過程中に、細胞を遠心沈降させ、プールがその増殖速度および生存能を回復するまで2~3日ごとに新鮮な選択培地に再懸濁させた。細胞を、抗体発現構築物の増殖、力価および安定した組込みについてモニターした。倍加速度は、20時間であった。

【0576】

安定した細胞株を大規模産生用に培養し、10Lの培養物を産生させた。安定した細胞プール産生実験から回収した条件培地を、遠心分離、および0.2μm膜での濾過により清澄化した。プロテインAアフィニティクロマトグラフィーを使用して抗体を精製し、次いで、滅菌し、0.2μm膜フィルターを通すことにより微粒子を排除した。低エンドトキシン精製および濾過後、濃度を5mg/m Lに設定し、120mgの抗体を回収した。

10

20

30

40

50

【0577】

抗体 - 薬物コンジュゲート (ADC) を調製するために、抗体をモノメチルアウリストチン E (MMAE) とコンジュゲートさせた。このコンジュゲーションは、抗体をマレイミドカプロイル - バリン - シトルリン - p - アミノベンジルオキシカルボニル - モノメチルアウリストチン E (MC - vc - PAB - MMAE、本明細書では CL - MMAE と呼ぶ) と接触させることにより行った。結果として生じるコンジュゲーションは、抗体鎖間ジスルフィド結合を TCEP で還元し、次いで、薬物のマレイミド部分構造に連結させた場合、マレイミド - システインに基づくものである。

【0578】

コンジュゲートした抗体を Sephadex G50 カラムで脱塩して残留未反応毒素を除去し、次いで、150 mM NaCl を含有する 30 mM HEPES pH 7.7 で透析した。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) および疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) を使用して、薬物対抗体比 (DAR) を決定した。

(実施例 3)

マウス抗体および ADC の特徴付け

【0579】

マウス抗体を乳がん、結腸がんおよび卵巣がんモデルにおいて *in vitro* および *in vivo* 有効性について特徴付けた。抗体を使用して、表面に STn を発現する CRC 細胞株を同定した。5 つの CRC 細胞株を *in vitro* でインキュベートし、コンフルエンスまで増殖させた。抗 STn 抗体を使用してフローサイトメトリーにより STn 発現 % を判定した。培養 SW403、COLO205 および LS174T 細胞のおおよそ 30 ~ 70 % は (mSIA103 を使用して検出して) 表面に STn を自然に発現したが、HT29 および RKO は (hSIA101 を使用して検出して) それらの細胞表面に検出可能な STn をほとんどまたは全く有さなかった (表 6 を参照されたい)。

【表 6】

表 6. CRC 株における STn 発現

細胞株	STn 発現%
COLO205	67.7
LS174T	69.9
SW403	30.0
RKO	低度検出可能～検出不能
HT29	低度検出可能～検出不能

【0580】

さらに、CRC 細胞マイクロアレイ (TMA) (NBP2-30214; Novus Bio、Littleton, CO) を STn 発現について染色した。アレイは、ノイラミニダーゼ (シリダーゼ) 酵素処理をしたおよびしていない 59 のコアからなる。ノイラミニダーゼは、末端シアル酸を特異的に切断し、組織上に存在する STn 抗原を破壊する。TMA 上の 51 個の新生物コアのうち、45 個は、多少のポジティブ膜染色レベルを示し、45 個すべてに対する抗 STn mSIA103 での染色は、250 mU / mL のノイラミニダーゼでの処理で消失した。ビメンチン特異的抗体での染色には影響を与えたが、これは、mSIA103 抗 STn 抗体結合がシアル酸特異的であることを示唆する。正常結腸 (8 個のコア) に対する染色は、陰窩および表面粘液、ならびに静脈内投与された ADC 治療薬から保護されなければならない細胞の頂端側に、限定された。

【0581】

マウス抗体 - 薬物コンジュゲート (ADC) の *in vivo* 有効性を評価するために COLO205 細胞を使用して予備的な異種移植片研究を行った。COLO205 皮下異

10

20

30

40

50

種移植片モデルは、胸腺欠損ヌードマウスの右側腹部に細胞 5×10^6 個／マウスを注射することにより生成した。腫瘍が平均サイズ 180 mm^3 に達したら、処置を開始した。マウスに3週間にわたって1週間に1回、5mg/kgを投薬した。毒素を伴わない単独でのmSIA103と、mSIA103-CL-MMAEと、切断不能リンカーを使用してモノメチルアウリスタチンF(MMADF)とコンジュゲートさせたmSIA103と、ビヒクル対照とを、この研究で評価した。mSIA103-CL-MMAEは、他の3群と比較して有意な腫瘍増殖阻害を示し、処置対対照(T/C)比は44.5%であった(p=0.008)。

(実施例4)

ヒト化抗STn抗体の生成

10

【0582】

mSIA101、mSIA102およびmSIA103可変ドメインのヒト化バージョンを、「CDRグラフティング」と呼ばれるプロセスであるヒト生殖系列配列へのCDRへの組込みにより、調製した。得られた可変ドメインを使用して、ヒト化可変ドメインとヒトIgG1定常ドメインをコードする構築物を発現させることにより、ヒト化抗体hSIA101、hSIA102およびhSIA103を調製した。発現された抗体可変ドメインおよび定常ドメインの配列を表7に提示する。

【表7】

表7.ヒト化可変ドメイン

20

30

40

抗体	ドメイン	配列	配列番号
hSIA101	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIHWVRQAP GQGLEWMGYFSPGNDDIKYNEKFRGRVTMTADKSSSTAYM ELRSLRSDDTAVYFCKRSLSTPYWGQQGTLTVSS	7
hSIA101	VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNHKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQNNDYTYPYTFGQQGTKEIK	8
hSIA102	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDHAIHWVRQAP GQGLEWIGYFSPGNDDIKYNEKFVRATLTADKSSSTAYME LRSLRSDDTAVYFCKRSYYGDWGQQGTLTVSS	9
hSIA102	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENTYSHLAWYQQKPGK APKLLVYGATNLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFAT YYCQHFWGAPFTFGQQGTKEIK	10
hSIA103	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHAIHWVRQA PGQGLEWMGYISPNGDIDKYNEKFDRVTMTADKSSSTAYM QLRSLRSDDTAVYFCKRSLLALDYWGQQGTLTVSS	11
hSIA103	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTNIAWYQQKPGK APKVLVYSASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY FCQQYSSFPFTFGQQGTKEIK	12
ヒトIgG1	重鎖定常ドメイン	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKVKVEPKSCDKTHTCPGPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIASKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	15
ヒトIgG1	軽鎖定常ドメイン	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	16

【0583】

MMAEを伴うヒト化抗体-薬物コンジュゲート(ADC)の調製は、ネズミ科動物抗体に関して前に説明したのと同じ方法を利用して行った。

(実施例5)

ヒト化抗体の特徴付け

50

【0584】

上で説明したように調製したヒト化 IgG1 抗体を特性解析に付し、この特性解析は、MDA-MB-231-STn 細胞を用いるフローサイトメトリーに基づく結合分析と、BSM ELISA による結合分析と、グリカンアレイ分析とを含んだ。

【0585】

フローサイトメトリーに基づく結合研究では、抗体を 0 ~ 300 nM の濃度範囲にわたってスクリーニングして、トランスフェクションにより STn 発現を誘導したまたはしていない MDA-MB-231 細胞との結合を比較した。抗ヒト APC コンジュゲート二次抗体を使用して結合を判定し、生存細胞のみを（ヨウ化プロビジウムネガティブティングに基づいて）考慮した。1 試料当たり平均 5,000 事象を収集した。FlowJo ソフトウェア（Aland、OR）を使用してデータを分析し、結果として生じた APC 平均値および % APC を得た。これらのデータを対数変換し、次いで、非線形回帰モデルに当てはめて、用量応答曲線および半数効果濃度（EC₅₀）結合情報を得た。ヒトアイソタイプ IgG1 抗体を、アイソタイプネガティブ对照として使用した。上皮増殖因子受容体（LA22、EMD Millipore、Billerica、MA）を、ポジティブ对照として使用した。10

【0586】

BSM ELISA 分析のために、抗体をウシ頸下腺ムチン（BSM）被覆ウェルで 0 ~ 100 nM の濃度範囲にわたってスクリーニングした。ウェルのサブセットを抗体導入前に弱過ヨウ素酸塩溶液で処理して、末端シアル酸残基上の側鎖を除去した（STn 抗原を破壊する）。過ヨウ素酸塩処理したまたは過ヨウ素酸塩処理していないウェルの光学密度を判定し、対数変換し、次いで、非線形回帰モデルに当てはめて、用量応答曲線を得た。過ヨウ素酸塩で処理したウェルから得た光学密度値を、過ヨウ素酸塩で処理していないウェルから引いて、過ヨウ素酸塩感受性 STn 結合曲線および対応する EC₅₀ 値を得た。20

【0587】

グリカンアレイ分析を前に説明したように行い、これらの結果に基づいて抗体にはアレイグリカン結合プロファイルを割り当てた。

【0588】

フローサイトメトリー、ELISA およびグリカンアレイ分析からの結果を表 8 に提示する。30

【表 8】

表 8. 抗体の特徴付けの結果

クローン ID	MDA-MB-231-STn 細胞結合 [EC ₅₀ (nM)]	BSM ELISA [EC ₅₀ (nM)]	アレイグリカン 結合プロファイル
hSIA101	2.0	4.2	第 1 群
hSIA102	0.1	未判定	第 4 群
hSIA103	0.3	1.8	第 1 群

【0589】

試験したすべての抗体は、細胞会合 STn および BSM 会合 STn との結合を示した。ヒト IgG1 アイソタイプ対照（Southern Biotech、Birmingham、AL）では結合が観察されなかった。hSIA102 結合は、ELISA アッセイでは過ヨウ素酸塩感受性でなく、そのため、信頼できる EC₅₀ を BSM ELISA によって決定することができなかった。

（実施例 6）

ヒト化抗体 - 薬物コンジュゲートの分析

【0590】

hSIA101、hSIA102 および hSIA103 の MMAE コンジュゲート AD

10

20

30

40

50

Cバージョンを、MDA-MB-231細胞（親細胞、またはSTnの発現増強のためにトランスフェクトされた細胞）を使用してADC細胞傷害性アッセイで評定した。親細胞は、10%FBSと1×Pen/Strepと45μg/mLのゲンタマイシンとを補充したイーグル最小必須培地(EMEM)で増殖させた。STn陽性細胞は、抗生物質選択のために1mg/mLのG418を添加したことを探して同じ培地で増殖させた。上記の適切な培地を使用して96ウェルプレートに細胞（親細胞について細胞4,000個/ウェル、またはSTnポジティブ細胞について2,000個/ウェル）を別々に播種した。細胞を終夜増殖させた。16～20時間後、細胞を三重反復で様々な濃度(50nM～0.012nM)の試験抗体で72時間にわたって処理した。次いで、ADC CELLTITER-GLO（登録商標）発光細胞生存アッセイキット（Promega、Madison、WI）を使用して細胞を分析して、代謝活性細胞の指標である、存在するATPの量を判定した。このアッセイは、単一の試薬を使用し、これを血清補充培地中の培養細胞に直接添加する。この試薬は、細胞を溶解し、存在するATPの量に比例して発光シグナルを生じさせる。発光シグナルを分析し、使用して、STnポジティブ細胞を半最大レベルで死滅させるのに必要とした濃度に基づいて、使用した抗体ごとに半数阻害濃度(IC₅₀)値を計算した（表9を参照されたい）。

【表9】

表9.ヒト化ADC抗体についてのIC₅₀値

ヒト化抗体	IC ₅₀ (nM)
hSIA103	1.3
hSIA102	2.6
hSIA101	5.2

【0591】

試験したすべての抗体は、單一ナノモル範囲のIC₅₀値を示したが、これは、STn発現細胞を死滅させる各々の強力な能力を示す。

【0592】

培養にOVCAR3細胞を使用して、同様の研究を行った。5pM～約300nMのhSIA101-MMAEおよびhSIA102-MMAEの用量を使用し、その結果、hSIA101-MMAEについては29nMのIC₅₀値、およびhSIA102-MMAEについては15nMのIC₅₀値を得た。

（実施例7）

STnアッセイ

【0593】

対象試料中のSTnレベルを同定および定量するためのELISAアッセイを開発する。重度にシアリル化されたウシ顎下腺ムチン(BSM)を使用して、検量線を生成し、アッセイ最適化に役立てる。最初のアッセイでは、市販のマウス抗STn抗体[例えば、抗体3F1(SBH Sciences、Natick、MA)、抗体B72.3(Colcher, D.ら、1981年、PNAS.、78巻(5号):3199～203頁を参照されたい)、および抗体CC49(Muraro, R.ら、1988年、Cancer Res.、48巻:4588～96頁を参照されたい)]を使用してアッセイプレートを被覆し、試験することになる試料(BSMを添加した緩衝溶液または血清試料)中のBSMを捕捉する。ヒト化抗STn抗体(例えば、hSIA101、hSIA102およびhSIA103)を使用して、捕捉されたBSMを検出する。捕捉および検出に使用した抗体を2つの方法によって試験することによる方法である。第2の方法は、蛍光抗体標識の使用およびSTn発現細胞への曝露順序の変更による、競合的結合についてのフローサイトメトリーによる方法である。競合的に結合しない抗体ペアを、さらなるアッセイ開発に使用する。

【0594】

さらなるアッセイは、アッセイプレートに結合した抗STn抗体を捕捉抗体として利用

10

20

30

40

50

し、結合したタンパク質を検出するために種特異的検出抗体を利用する。例えば、ヒト抗 S T n m A b は、検出 m A b を直接標識（例えば、A l e x a - 4 8 8 、 H R P など）すれば、被覆用 m A b としても検出 m A b としても利用することができる。例えば、ネズミ科動物抗 S T n m A b は、検出 m A b を直接標識（例えば、A l e x a - 4 8 8 、 H R P など）すれば、被覆用 m A b としても検出 m A b としても利用することができる。マウス試料（例えば、本明細書に記載の異種移植片モデル研究から収集したもの）におけるおよびヒト試料（例えば、本明細書に記載するように得た血清試料）における S T n の検出を、ネズミ科動物検出抗体とヒト検出抗体の両方で評定する。

（実施例 8）

ヒト化抗 S T n 抗体での S T n アッセイ

10

【0595】

捕捉抗体としての m S I A 1 0 2 および検出抗体としての h S I A 1 0 2 または h S I A 1 0 3 を、対照検出抗体としてのヒトアイソタイプ I g G とともに使用して、S T n E L I S A アッセイを行った。1ミリリットル当たり5マイクログラム ($\mu\text{g}/\text{ml}$) の捕捉抗体の溶液を使用して、E L I S A アッセイプレートの表面を終夜被覆した。プレートを洗浄し、プロッキングした後、 $0 \text{nM} \sim 6 \times 10^{-8} \text{nM}$ の範囲のウシ頸下腺ムチン (B S M) 希釀系列で処理した。アッセイ表面に結合した B S M を、 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の検出抗体を使用して検出した。ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートを伴う抗ヒト抗体 ($0.08 \mu\text{g}/\text{ml}$) を使用して検出抗体に結合し、H R P 基質を使用して抗体 - 抗原複合体を検出した。結果は、ヒト化抗 S T n 抗体には結合した B S M を検出する能力があり、抗体結合についての半数効果濃度 (E C ₅₀) が h S I A 1 0 3 については $9 \times 10^{-9} \text{nM}$ および h S I A 1 0 1 については $2 \times 10^{-8} \text{nM}$ であることを示した。結合は、アイソタイプ対照検出抗体では観察されなかった。

20

（実施例 9）

薬物動態研究

【0596】

両方とも MMAE とコンジュゲートしている抗体 h S I A 1 0 1 および h S I A 1 0 2 を雌胸腺欠損マウスに $5 \text{mg}/\text{kg}$ (重量測定法で決定した投薬量) の用量で静脈内 (I V) 尾静脈注射投与によって投与して、抗体の終末相消失半減期を評価した。各群は、マウス 9 匹からなった。血液 (血清) を 1 、 4 、 8 、 2 4 、 4 8 、 7 2 、 1 6 8 、 3 3 6 および 6 7 2 時間の時点で採取し、使用して、抗体半減期を計算した。

30

【0597】

研究の終わりに、W I N N O N L I N (登録商標) ソフトウェア (P h a r s i g h t Corp. 、 M o u n t a i n V i e w 、 C A) を使用して、薬物動態 (P K) パラメーター評価を行った。曲線下面積 (A U C) は、初回用量の投与開始時から測定濃度を最後に定量化することができた投薬後の時点まで (A U C _{最後}) および研究開始から無限大時まで (A U C _{無限}) 評価した。最大観察血漿濃度 (C _{最大}) 、観察クリアランス (C L) 、終末相消失半減期 (H L) 、定常状態分布容積 (V _{s s}) および終末相分布容積 (V z) も判定した。P K パラメーターは、スパースサンプリングでのノンコンパートメント解析を使用して計算した。結果を表 10 に提示する。

40

【表 10】

表 10.PK パラメーター

抗体	C _{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	AUC _{最後} ($\text{日}^*\mu\text{g}/\text{ml}$)	AUC _{無限} ($\text{日}^*\mu\text{g}/\text{ml}$)	CL ($\text{ml}/\text{日}/\text{kg}$)	HL (日)	Vz (ml/kg)	V _{ss} (ml/kg)
hSIA101-MMAE	254	1050.00	1050.00	4.77	2.55	17.51	20.07
hSIA102-MMAE	285	1075.00	1079.17	4.63	3.77	25.16	23.57

【0598】

50

研究から、hSIA101-MMAEは2.55日の終末相消失半減期を有すると判定され、その一方で、hSIA102-MMAEは3.77日の終末相消失半減期を有すると判定された。これらの値は、他の抗体-薬物コンジュゲートについて報告された値に匹敵した（例えば、抗5T4抗体-薬物コンジュゲートについて3.5日の終末相消失半減期を報告している、Leal, M.ら、2015年、Bioconjugate Chem、26巻：2223～32頁を参照されたい）。

（実施例10）

STnを過剰発現する細胞株の生成

【0599】

Julienら（Julien, S.ら、2005年、Breast Cancer Res Treat.、90巻（1号）：77～84頁）によって記載されたように、STnを安定的に発現するように樹立がん細胞株を改変する。ST6GalNAc I発現構築物を送達するレンチウイルスベクター（hST6GalNAc I pRc-CMV）または対照（pRc-CMV空ベクター）を細胞に形質導入する。ジェネティシン418（G418、1mg/mL）を含有する培地で安定したトランスフェクションを選択する。限界希釈戦略を使用して抵抗性細胞を96ウェルプレートに播種し、3回サブクローニングして、安定したクローン株を得る。クローン株は、ST6GalNAc Iの様々な発現〔定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）分析により判定して〕を示す。追加のSTn（野生型細胞と比較して）を安定的に発現するOVCA-R3細胞株を、「OVCA-R3-STn」細胞と呼ぶ。抗STn抗体を使用するフローサイトメトリー分析を使用して、STnの発現成功を検証する。

10

20

（実施例11）

ST6GalNAc I発現が増強されたSKOV3細胞株の生成

【0600】

ST6GalNAc I発現構築物を送達するレンチウイルスベクター（hST6GalNAc I pRc-CMV）をSKOV3細胞に形質導入した。安定した細胞プールを生成し、ST6GalNAc Iの様々な発現を〔定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）分析により判定して〕有する6つのクローンを選択した（表11を参照されたい）。

【表11】

表11.選択されたクローンにおけるST6GalNAc Iの発現レベル

30

クローンID	ST6GalNAc I mRNA 発現レベル (対照に対する発現レベル倍数)
クローン7	165
クローン8	105
クローン10	15
クローン13	125
クローン15	20
クローン16	30

40

【0601】

クローン7、8および13は、非形質導入細胞株におけるレベルと比較したとき、最高ST6GalNAc I mRNAレベルを示した。

【0602】

STnを発現しないSKOV3クローン（野生型）、中レベルのSTnを発現するSKOV3クローン（クローン15）および高レベルのSTnを発現するSKOV3クローン（クローン13）を、抗STn抗体処理に対する感受性について試験した。細胞を培養し、2.5nM、5nM、10nM、50nMおよび100nMの濃度レベルでビヒクリ对照、hSIA101、hSIA101-MMAE、hSIA102またはhSIA102

50

- MMAE を用いて処理した。その後、細胞の生存率を MTT アッセイ (EMD Millipore、Billerica、MA) により測定した。高レベルの STn を発現する細胞ではすべての用量の hSIA101 - MMAE および hSIA102 - MMAE 処理で、ならびに中等度 STn 発現細胞では 2.5 nM より高い用量で、細胞生存率が低下した。中レベルの STn を発現する細胞ではすべての用量の hSIA101 - MMAE および hSIA102 - MMAE 処理で、ならびに中等度 STn 発現細胞では 5 nM より高い用量で、細胞生存率が低下した。STn を発現しない細胞では、hSIA101 - MMAE および hSIA102 - MMAE は、最高用量使用時を除いて、効果がほとんどなかった。これらの結果は、抗 STn 処理に対する細胞感受性が STn の発現レベルに依存することを示す。

10

(実施例 12)

OVCAR3 細胞株由来マウス異種移植片の in vivo 研究

【0603】

胸腺欠損ヌードマウス皮下異種移植片マウスモデルを、OVCAR3 ヒト卵巣がん細胞で生成した。動物をヒト化抗 STn ADC (1 mg / kg、2.5 mg / kg、5 mg / kg)、アイソタイプ ADC (1 mg / kg、5 mg / kg)、パクリタキセル (20 mg / kg) または単独でのビヒクルで処置した。ADC は、4 週間にわたって 1 週間に 1 回、静脈内投与した。パクリタキセルは、3 週間にわたって 1 週間に 1 回、腹腔内投与した。腫瘍体積および体重を、表 12 に示す日に測定した。ヒト化 ADC は、ビヒクルおよびアイソタイプ ADC 対照と比較して腫瘍体積を有意に低減させた（表 12 を参照されたい）が、総体重にはほとんど影響を与えたかった。このデータは、抗 STn ADC が、in vivo で毒性でなく、漿液性卵巣異種移植片体積を低下させるのに有効であることを示唆する。研究の終わりに、腫瘍組織を採取し、免疫組織化学的検査を使用して STn の発現について分析した。抗 STn ADC で処置したマウスからの腫瘍組織は、他の処置と比較して低減された STn 発現を示した。

20

【表12】

表12.腫瘍体積

処置	平均腫瘍体積(mm^3)									
	1 日目	4 日目	9 日目	12 日目	15 日目	18 日目	23 日目	26 日目	30 日目	31 日目
ビヒクル	161.8	242.8	373.5	539.1	678.4	803.1	987.1	1039.3	1175.6	1224.0
hSIA101- MMAE, 1 mg/kg	161.7	228.9	347.7	448.2	551.5	609.0	768.4	882.7	937.1	966.8
hSIA101- MMAE, 2.5 mg/kg	161.9	213.2	275.8	302.6	313.5	299.7	234.0	195.9	169.7	169.1
hSIA101- MMAE, 5 mg/kg	161.7	203.4	211.0	193.4	165.0	131.1	77.8	59.4	39.5	39.1
hSIA102- MMAE, 1 mg/kg	161.7	219.7	335.5	465.7	567.1	707.1	871.9	897.0	957.7	984.8
hSIA102- MMAE, 2.5 mg/kg	161.8	202.9	291.8	358.5	399.5	420.8	414.3	370.2	384.0	384.7
hSIA102- MMAE, 5 mg/kg	161.7	210.7	210.6	187.4	168.7	127.2	84.0	67.3	50.5	46.8
アイソタイプ -MMAE、 1mg/kg	161.1	222.1	312.6	368.8	423.1	468.3	510.6	472.5	531.4	548.2
アイソタイプ -MMAE、 5mg/kg	161.4	196.5	255.9	241.8	205.9	176.9	127.1	94.3	78.0	74.0
パクリタキセ ル、 20mg/kg	161.2	210.0	370.0	482.3	620.4	767.4	971.6	1133.0	1277.8	1385.2

(実施例13)

患者C RCC 試料におけるSTn 発現

【0604】

一次患者C RCC 試料を、hSIA101ならびに2つの市販の抗体B72.3およびC

10

20

30

40

50

C49を用いてフローサイトメトリーによって探索した。試験した10個すべての試料がSTnポジティブであった。結果を表13に提示する。この表では、%STnを生存CD45-/CD34-集団の%として表す。STn発現は、市販の抗体よりhSIA101でのほうが確実に確認されることが多かった。発現は3~47%ポジティブにわたり、転移性試料が最高ポジティブ細胞パーセントを示した。これは、抗STn抗体を利用して腫瘍試料中のSTn特異的集団を同定することができることを示唆する。

【表13-1】

表13.患者試料におけるSTn発現

試料	採取元組織	抗体	%STn+
160093-2	結腸	SIA201a	22.9
		B72.3	18.9
		CC49	17.1
160101-2	結腸	SIA201a	10
		B72.3	5.8
		CC49	5
160102-2	結腸	SIA201a	12.9
		B72.3	14.7
		CC49	11.4

10

20

【表13-2】

160115-2	結腸	SIA201a	5.4
		B72.3	13
		CC49	5.7
160127-2	結腸	SIA201a	4.2
		B72.3	14.4
		CC49	3.5
160149-1	結腸	SIA201a	22.7
		B72.3	10.5
		CC49	9.8
160151-1	結腸	SIA201a	19.6
		B72.3	6.8
		CC49	11.5
169068-1	結腸	SIA201a	10.9
		B72.3	7.4
		CC49	8.4
1601666	結腸	SIA201a	29.4
		B72.3	17.3
		CC49	20.6
160104-2	結腸から 肝臓へ転移	SIA201a	47.8
		B72.3	46.6
		CC49	39.4

10

20

30

(実施例14)

CRC株におけるin vitro毒性試験

【0605】

COLO205およびLS174T株の全細胞集団のおおよそ60~70%がSTnを発現することを示す予備的フローサイトメトリー分析に基づいて、in vitro試験を行って、抗STn抗体に基づく処置を試験する。マウスおよびヒト化抗STn MAAE ADCでの予備的結果を考慮して、実験を行って、結腸直腸がんに対する抗STn ADCの最適な毒素/リンカーを同定する。8つのCRC株(COLO205、LS174T、RKO、HT-29、LS180およびSW403)および様々なSTn発現レベルを有するSTn発現修飾細胞株[COLO205 STnノックダウン、LS174T STnノックダウン、RKO STn+(ST6GalNAc Iを過剰発現する)、およびHT-29 STn+(ST6GalNAc Iを過剰発現する)]の抵抗性を、アウリストチン(MMAEおよびMMAF)、メイタンシン(DM4およびDM1)、ピロロベンゾジアゼピン二量体(タリリンおよびテシリン)およびトポイソメラーゼ阻害剤(SN-38およびDXd)ならびに他の天然薬剤(デュオカルマイシンおよびアマニチン)を含む、一般的なADC毒素10種のパネルを用いて調査する。CRCの感受性を、標準ケア(イリノテカン、これはCPT-11としても公知)および単独でのビヒクリと比較して、半最大阻害(細胞傷害)濃度(IC₅₀)を得る。これを遂行するために、コンジュゲートしていない毒素を、様々な内因性STn発現レベルを有するCRC細胞株

40

50

、およびS T n レベルが増加しているか枯渇しているそれらの細胞株の誘導体において試験する。

【0606】

C O L O 2 0 5 およびL S 1 7 4 T 細胞におけるS T n 発現のノックダウンを、文献(例えは、Gaoら、Nat Med.、2 0 1 5 年 1 1 月；2 1 卷(1 1 号)：1 3 1 8 ~ 2 5 頁)に記載されている方法を使用してS T 6 G a l N A c I 指向性サイレンサー si R N A (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA) を用いて行う。対称的に、R K O およびH T - 2 9 細胞(検出可能なレベルのS T n をほとんどまたは全く発現しない)に、S T 6 G a l N A c I 発現構築物を送達するレンチウイルスベクターを形質導入して、上昇したレベルのS T n を発現するクローニング集団を得る。これらの改変細胞をフローサイトメトリーおよびウェスタンプロット分析により細胞表面でのS T n 発現についてモニターし、q R T - P C R を利用してS T 6 G a l N A c I m R N A レベルをモニターする。コンジュゲートしていない毒素をC R C 株に添加して、感受性を確立するためのインキュベーション後2 4 、4 8 、7 2 および9 6 時間の時点でI C ₅ ₀ 値を得る。C E L L T I T E R - G L O (登録商標) 発光細胞生存率アッセイキット(Promega、Madison、WI)を製造業者の指示に従って使用して、処理後の細胞生存率を評価する。望ましいA D C の性質を有する2 つの中性を、抗体コンジュゲーションおよびさらなる特徴付けに選択する。

10

(実施例15)

C R C モデルにおける抗S T n A D C の評価

20

【0607】

2 つの毒素を2 つの選択されたヒト化抗S T n 抗体にコンジュゲートさせ、結合アッセイを利用して、S T n 結合特異性が維持されることを保証する。結合アッセイ(フローサイトメトリーに基づくアッセイ、E L I S A、およびグリカンアレイ)は、前に説明したように行う。1 つのヒトアイソタイプI g G 1 抗体を2 つの毒素の各々と別々にコンジュゲートさせ、ネガティブ結合対照として利用する。E G F R (クローニングL A 2 2) およびC E A (クローニングC D 6 6 e) 抗体を、それぞれ、M D A - M B - 2 3 1 およびC R C 株との結合についてのポジティブ対照として利用する。

30

【0608】

抗S T n A D C を、上記の3 つのC R C 株においてi n v i t r o 有効性について試験する。抗S T n 1 + 毒素1 と、抗S T n 1 + 毒素2 と、抗S T n 2 + 毒素1 と、抗S T n 2 + 毒素2 と、アイソタイプ+ 毒素1 と、アイソタイプ+ 毒素2 と、標準ケアと、ビヒクルとを含む、合計8 つの条件を試験する。抗S T n A D C を、生存率アッセイおよび軟質塞天増殖アッセイをそれぞれ使用して細胞生存率およびコロニー形成に対するそれらの効果について評価する。生存率アッセイは、C E L L T I T E R - G L O (登録商標) 発光細胞生存率アッセイキット(Promega、Madison、WI)に従って行う。相対A D C 作用強度を、製造業者の説明書に従って計算して、生存率パーセントおよびI C ₅ ₀ 値を得る。コロニー形成アッセイを行い、この場合、細胞をメチルセルロースに基づく培地に加えて希釈し、3 7 で5 ~ 1 4 日間、A D C の存在下で増殖させる。コロニー数を計数し、比較する。両方のアッセイにおいて、ある範囲の抗S T n A D C 濃度を試験し、適用可能なI C ₅ ₀ 値を生成する。結果を、標準ケア化学療法対照およびアイソタイプA D C 対照と比較する。上位2 つのA D C を、I C ₅ ₀ データおよびコロニー形成情報に基づいて選択する。

40

【0609】

C R C 異種移植片T M A をS T n 発現について評価して、i n v i v o 研究のための2 つのS T n ポジティブC R C モデルを同定する。このアレイは、様々なステージ、サブタイプ、遺伝的バックグラウンドおよび処置応答性/抵抗性モデルを対象とする2 0 の特有のモデルからなる。S T n 発現は、免疫組織化学的検査(I H C)により評定する。T M A を2 つの抗S T n 抗体、アイソタイプ対照、および二次抗体のみで染色する。抗体を抗ヒトI g G ビオチン標識二次抗体とともにインキュベートし、次いで組織とともにイン

50

キュベートする、事前複合体化戦略を使用して、IHC検出を行う。染色を点数化して、新生物特異的膜染色を評定する。2つのCRC異種移植片モデルおよび1つの抗STnADCを、in vivo異種移植片研究に選択する。

【0610】

抗STnADC候補を、2つの細胞株および3つの用量濃度(1、2.5および5mg/kg)を使用する単剤、複数回薬物用量研究で、in vivo有効性について評価する。ヒトCRC STn発現細胞(すなわち、細胞 5×10^6 個 1:1(v/v)マトリゲル)のICR SCIDマウス(マウス約80匹)の右側腹部への皮下注射により、異種移植片マウスマodelを用意する。60匹のマウスが約 200mm^3 の平均腫瘍体積に達したら、それらのマウスを、ほぼ同等の群平均腫瘍サイズを有する6群(1群当たりマウスn=10)に無作為化する。これらの群に、抗STnADC(1、2.5もしくは5mg/kg)、アイソタイプADC対照(5mg/kg)、SOC(イリノテカン40mg/kg)またはビヒクル(DPBS)のいずれかを施す。以前の抗STnADC MMMAE PK研究に基づいて、4週間にわたって週1回、静脈内注射によって処置を投与する。腫瘍体積および体重を週2回測定し、ビヒクル対照群については腫瘍サイズがエンドポイント体積(1500mm^3)に達した場合、またはマウスが瀕死状態になった場合、個々のマウスを屠殺する。各群からのマウスを研究の最後にIHCおよびフローサイトメトリーによって腫瘍STn発現について評定する。

10

【0611】

これらの研究の結果に基づいて、毒素/リンカーをさらに最適化して、抗STnADCのin vivoおよびin vitro有効性を向上させる。

20

(実施例16)

CRC PDXモデルの選択

【0612】

ヒト化抗STn抗体を使用して患者由来腫瘍(PDX)細胞からのCRC腫瘍マイクロアレイ(TMA)をSTn発現について評定して、PDX研究のための応答性モデルを決定する。合計200を超えるコアを含有する、十分に特徴付けられた市販のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)PDX TMA(CrownBio, Santa Clara, CA)を、IHCによりSTn発現について評定する。これらのTMAは、AP24534[ボナチニブ、(RET阻害剤)]、セツキシマブ、ベバシズマブ(AVASTIN(登録商標))、トラスツズマブ(HERCEPTIN(登録商標))、ソラフェニブ、5-フルオロウラシル、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン、イリノテカンまたはパクリタキセルに対して抵抗性であるものを含む、複数の未治療および標準ケア抵抗性PDXモデルからなる。TMAを、コンジュゲートしていない抗STn抗体、アイソタイプ抗体、または二次抗体のみで染色する。IHCで分析したTMAすべてを、盲検様式で、抗体染色強度、出現頻度および局在について顕微鏡によって点数化する。STn発現とCRC進行との相関関係を調査し、モデル選択肢の情報を得るために使用する。

30

【0613】

IHCデータに基づき、10個のPDXを、抗STnADC候補でのin vitro試験に選択する。これら10個のPDXモデルを、前に説明した生存率アッセイおよびコロニー形成アッセイで細胞傷害性およびコロニー形成について評定する。アイソタイプADC対照、3つのSOC剤(単剤としてのイリノテカン、セツキシマブおよびベバシズマブ)およびビヒクル対照を、分析に含める。STn発現および抗STnADC in vitro応答に基づいて、3つのPDXモデル[1つの標準ケア(SOC)抵抗性PDXモデルを含む]をin vivo研究に選択する。

40

(実施例17)

単回用量PK研究

【0614】

in vivo研究の前に、抗STnADC候補を、単回用量in vivoマウス研究においてPKの性質について評価する。2つの用量レベル(2.5および5mg/kg

50

g) および 10 の時点（投薬の 0、1、4、8、24、48、72、168、336 および 672 時間後）をこの単回用量研究に利用する。処置群ごとに合計 9 匹のマウスと、ずらした採血を可能にするためのマウスの 3 つの部分群を含める。指定された時点で、マウスから採血し、血清を血清セパレーターチューブに収集する。血液を最低 30 分間放置して凝固させ、次いで、収集から 1 時間以内に遠心分離（10 分間、5°で 3500 rpm）により処理する。遠心分離後、血清を分離し、イムノアッセイに使用して、血清中に存在する抗 STn ADC を判定する。終末相消失半減期（HL）、曲線下面積（AUC）、最大観察血漿濃度（C 最大）、定常状態分布容積（Vss）および終末相分布容積（Vz）を決定する。PK パラメーターを使用して、in vivo PDX 研究に最適な投薬レジメンを決定する。

10

（実施例 18）

マウスの PDX モデルにおける in vivo 有効性の評価

【0615】

PDX TMA の免疫組織化学分析によって同定した 3 つの PDX モデルを使用して PDX マウス研究を行って、単剤療法としての抗 STn ADC 候補の in vivo 有効性を評価する。6 群（1 群当たりマウス 10 匹）に無作為化した PDX マウスに、1、2.5 または 5 mg / kg の抗 STn ADC、アイソタイプ ADC 対照（5 mg / kg）、SOC（イリノテカン（40 mg / kg）、セツキシマブ（10 mg / kg）もしくはベバシズマブ（10 mg / kg））または単独でのビヒクルを投与する。動物に 4 週間にわたって 1 週間に 1 回、投薬する。研究の最初と最後に IHC およびフローサイトメトリーによって STn 発現を調査する。

20

（実施例 19）

マウスの PDX モデルにおける併用処置

【0616】

抗 STn ADC 候補を、選択された PDX マウスモデルにおいて標準ケア（SOC）治療との同時処置または逐次的処置のいずれかでの併用治療について評価する。

【0617】

同時処置については、ビヒクルのみ、抗 STn ADC（1 mg / kg）、抗 STn ADC（5 mg / kg）、SOC のみ、SOC + ビヒクル、SOC + 抗 STn ADC（1 mg / kg）、SOC + 抗 STn ADC（5 mg / kg）、SOC + コンジュゲートしていない抗 STn（1 mg / kg）、および SOC + コンジュゲートしていない抗 STn（5 mg / kg）を含む、合計 9 の処置アームを、1 アーム当たりマウス 10 匹を用いて試験する。動物に 4 週間にわたって週 1 回、投薬する。研究の最初と最後に IHC およびフローサイトメトリーによって STn 腫瘍発現を調査する。

30

【0618】

逐次的処置については、マウスを最初に SOC で処置する。4 週間の処置後に、または元の腫瘍体積の < 25 % への腫瘍退縮中央値に従って、マウスを次の 6 つのアームに無作為化する：抗 STn ADC（1 mg / kg）、抗 STn ADC（5 mg / kg）、コンジュゲートしていない抗体（1 mg / kg）、コンジュゲートしていない抗体（5 mg / kg）、1 つのアイソタイプ ADC 対照、およびビヒクル対照。動物に 4 週間にわたって週 1 回、投薬する。研究の最初と最後に IHC およびフローサイトメトリーによって STn 腫瘍発現を調査する。

40

（実施例 20）

パイロット複数回用量毒性学研究

【0619】

カニクイザルにおいて複数回用量研究を行って、hSIA101-MMAE 投与に関する薬物動態特性および毒性を評定した。研究は、死亡率 / 罹患率、臨床観察、体重、食物摂取量、体温、局所刺激、眼科および臨床病理評定などの、生存中評定を含んだ。9 匹の雄動物（2 ~ 4 歳）を、表 14 に収載する処置群 1 つ当たりサル 3 匹で、これらの研究を利用した。

50

【表14】

表 14. 処置群

群	用量 (mg/kg)	用量容積 (ml/kg)	用量濃度 (mg/ml)	1群当たり の動物数
1	1	1.2	0.833	3
2	3	1.2	2.5	3
3	6	1.2	5	3

【0620】

すべての群に、静脈内ボーラス注射により、1日目に1回、22日目に再度、合計2回、投薬した。薬物動態研究用の血液試料は、1日目および22日目に、次のスケジュールを使用して採取した：投薬前(0)、次いで、投薬の1、3、6、24、48、72、96および168時間後。1日目の投薬についてのみ、投薬後240、336および504時間の時点で追加の血液試料を採取した。臨床病理評価(臨床化学、血液学および凝血)用の血液試料は、次のスケジュールを使用して採取した：投薬前(予備試験)、8日目、22日目(2回目の投薬前)、および29日日の安楽死前。臨床化学評価は、ナトリウム、クレアチニン、総タンパク質、カリウム、アルカリホスファターゼ、トリグリセリド、塩化物、アラニンアミノトランスフェラーゼ、総ビリルビン、カルシウム、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アルブミン、無機リン、グルコース、グロブリン、尿素窒素、コレステロール、およびアルブミン/グロブリン比の評価を含んだ。血液学評価は、ヘマトクリット、平均赤血球ヘモグロビン濃度、ヘモグロビン、網状赤血球数(絶対および相対)、血小板数、赤血球数、平均血小板容積、総白血球数、平均赤血球ヘモグロビン量、白血球百分率数(絶対および相対)、平均赤血球容積、および赤血球分布幅の評価を含んだ。K3-EDTAを抗凝血薬として使用した。凝血評価は、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の評価を含んだ。すべての群を29日目に安楽死させ、剖検のために器官を採取した。

【0621】

対象血液試料からの血清を、ヒトIgGレベルの薬物動態(PK)評価に使用した。Phoenix薬物動態ソフトウェア(Certara, USA)を使用し、静脈内ボーラス投与経路と合致するノンコンパートメントアプローチを使用して、PKパラメーターを推定した。すべてのパラメーターは、1日目および22日目からの血清中の個々のヒトIgG濃度から生成した。各用量投与の最後に対する名目試料採取時間を使用して、パラメーターを推定した。パラメーター推定を目的として、最初の2つの観察血清濃度に基づいて1日目のゼロ時間時の濃度を逆外挿した。定量不能と報告した濃度値は、非存在試料として処理した。

【0622】

初回投薬に関して得た血清中抗体濃度値を図2に提示し、2回目の投薬に関して得た値を図3に提示する。線形台形法と線形/線形補間を使用して、濃度対時間曲線下面積(AUC)を計算した。別々の時点で試験項目の定量可能な濃度が3つ未満であったPKプロファイルについては、AUCを計算しなかった。実行可能な場合、少なくとも最後の3つの観察濃度値を使用して、各濃度対時間曲線の終末消失相を同定した。非重み付き濃度データで対数線形回帰を使用して、終末消失相の傾きを決定した。平均値を標準偏差(SD;カッコ内)とともに表15および表16に提示する。C_{最大}は、投薬後に測定された最大観察濃度を指す。AUC_{最後}は、用量投与開始から、線形または線形/対数台形法を使用して定量可能な濃度が最後に観察されるまでの、濃度対時間曲線下面積を指す。AUC_{0~7日}は、同じものだが、7日目を超える面積を含まない場合を指す。AUC_{無限}は、無限大時間まで外挿した用量投与開始からの濃度対時間曲線下面積を指す。CLは、分析

10

20

30

40

50

した行列から抗体の見かけのクリアランス速度を指す。H Lは、見かけの終末相消失半減期を指す。V_{s s}は、定常状態での見かけの分布容積を指す。

【表15】

表15.初回投薬後に得たPKパラメーター

用量 (mg/kg)	C _{最大} (μg/ml); 平均 (SD)	AUC _{最後} (日 * μg/ml); 平均 (SD)	AUC _{0~7日} (日 * μg/ml); 平均 (SD)	AUC _{無限} (日 * μg/ml); 平均 (SD)	CL (ml/kg/日); 平均 (SD)	HL (日); 平均 (SD)	V _{ss} (ml/kg); 平均 (SD)
1	19.13 (1.78)	57.31 (7.5)	42.6 (0.96)	62.62 (7.81)	16.13 (1.96)	4.66 (1.43)	96.83 (17.29)
3	81.24 (11.17)	228.39 (25.02)	157.34 (4.94)	267.39 (56.39)	11.57 (2.52)	7.47 (3.91)	96.16 (30.64)
6	151.37 (20.97)	419.05 (50.18)	342.22 (32.58)	440.63 (28.26)	13.65 (0.86)	3.53 (0.51)	61.62 (10.98)

【表16】

表16.2回目の投薬後に得たPKパラメーター

用量 (mg/kg)	C _{最大} (μg/ml); 平均 (SD)	AUC _{最後} (日 * μg/ml); 平均 (SD)
1	22.16 (0.01)	41.59 (4.68)
3	75.27 (5.18)	145.48 (51.93)
6	117.23 (45.7)	172.36 (141.18)

【0623】

1日目に、ヒトIgGへの全身曝露の増加は、線形であり、用量比例を上回る軽度の傾向があるが、1~6mg/kg/用量の間では用量に比例した。22日目に、全身曝露量の増加は、1~6mg/kg/用量の間で非線形であった。1日目と22日目を比較したとき、用量レベルの増加に伴って増加するヒトIgGへの全身曝露量の減少が、AUC_(0~t)に関して、観察された。

【0624】

29日目まで生き残った動物を安樂死させ、剖検に付した。顕微鏡での評価が必要である組織を取り取り、規定通りに処理し、パラフィンに包埋し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した後、光学顕微鏡により評価した。

【0625】

被験物質に関する肉眼的所見は認められなかった。観察された肉眼的所見は、偶発的と考えられ、カニクイザルのこの系統および年齢に一般に見られる種類のものであり、ならびに/または対照および処置動物において同様の発生率のものであり、したがって、抗体投与には無関係と見なした。研究動物間で発生した体重減少も死亡もなく、評定したすべての器官にわたって肉眼的病変も観察されなかった。病理組織学的变化は、骨髓に限定さ

10

20

30

40

50

れたが、これは、MMAEに関連する効果である。細胞充実性のごく軽度から軽度の低下、および骨髄球系対赤芽球系比の軽度の低下が観察された。血液学パラメーターの変化（すなわち、若干の好中球減少）は、他のMMAE抗体薬物コンジュゲートと一致し、標的関連と見なさなかった。最後に、すべての臨床化学結果は、研究を通して正常のままであった。

(実施例21)

細胞株生成

【0626】

臨床グレードの抗体を産生するために、安定したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株を、GIBCO（登録商標）FREEDOM（登録商標）CHO-S（登録商標）キット（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA）に従って生成する。ヒト化抗STn抗体をコードする遺伝子を含有する構築物をCHO-S細胞にトランスフェクトする。安定したクローンを二相選択スキームに基づいて選択する。産生収率が高いクローンをさらなる特徴付けに選択する。安定した細胞株を、GLP毒性学試験および第I相臨床試験供給用の抗体の産生のための適正製造基準（GMP）施設に移送する。

10

(実施例22)

組織交差反応性研究

【0627】

組織交差反応性研究を行って、非臨床安全性試験に使用するヒトおよび関連種との結合プロファイル（オンターゲット結合とおよび可能性のあるオフターゲット結合の両方）を評定した。ヒト化抗STn抗体を正常ヒト、ラット、マウスおよびカニクイザル組織のパネルとの結合について調査した。1～3μg/mlの10個の正常凍結組織切片：心臓、脳、腎臓、胃、肺、小腸、結腸、肝臓、脾臓、脾臓および骨髄を用いて、研究を行った。ポジティブ対照は、STnポジティブがん細胞を含有するヒト脾臓新生物であり、ネガティブ対照は、同じ検査試料に含有されていた正常間質細胞であった。すべての正常組織にわたって染色は細胞質に限定された。一次抗体なしで、またはアイソタイプ対照IgGをネガティブ対照として使用して、追加の分析を行った。

20

【0628】

試験した3つの抗体の中で、hSIA101は、正常ヒト組織との最も低い交差反応性を有する。心血管、胃上皮細胞、小腸上皮細胞および脾臓血管の組織との中等度の結合活性が見られた。抗体が、カニクイザル（表17を参照されたい）およびラット（示さない）からの同様の組織型と交差反応することも判明した。表中、1+ = 弱い染色；2+ = 中等度の染色；3+ = 強い染色；4+ = 非常に強い染色；Neg = 染色なし；freq = 高頻度（細胞の75%～100%が染色）；occ = 中頻度（細胞の25%～50%が染色）；およびrareは、細胞の1～5%の染色を指す。

30

【表17】

表17.組織交差反応性研究結果

組織	ヒト	カニクイザル
心血管	2+rare(細胞質)	Neg
胃上皮細胞	2～3+freq(細胞質)	2～3+occ(細胞質)
胃血管	Neg	2+occ(細胞質)
肺上皮	Neg	2～3+ freq(細胞質)
小腸上皮細胞	2～4+freq(細胞質)	3～4+freq(細胞質)
結腸上皮細胞	1+freq(細胞質)	Neg
結腸血管	Neg	4+freq(細胞質)
脾臓血管	Neg	2～3+ freq(細胞質)
脾臓血管	2～3+ freq(細胞質)	Neg

40

【0629】

50

いずれの組織においても細胞膜に対する染色は観察されなかった。大脳、小脳、腎臓および肝臓は、染色されなかった。アイソタイプおよび二次のみの対照の分析は、染色を示さなかつたが、ポジティブ対照組織（膵臓新生物）だけは、hSIA101で強い膜染色を示した。

（実施例23）

卵巣PDX腫瘍モデルにおける抗STn抗体処置とシスプラチン処置との比較

【0630】

2名の異なる患者からのヒト患者由来卵巣がん腫瘍を使用する異種移植片腫瘍モデルにおいて、抗STn ADC候補を標準ケア（SOC）治療と比較した。患者試料が免疫組織化学染色によりSTnを発現することを前もって確認し、化学療法での処置を以前に受けていない（化学療法未実施の）患者のうちの1名からの腫瘍、および化学療法での処置を以前に受けた患者からの腫瘍を、胸腺欠損ヌード免疫不全マウスに移植した。腫瘍増殖に成功したマウスを選択し、それらのマウスに、抗体（用量5mg/kg）を週1回、IV注射により、シスプラチン（用量3mg/kg）を週1回腹腔内注射により（3用量に限定）、またはビヒクル対照を投与した。投与した抗体は、hSIA101、hSIA101-ADC（MMAEとコンジュゲートさせたもの）、またはMMAEとコンジュゲートさせたIgGアイソタイプ対照（アイソタイプ-ADC）を含んだ。化学療法未実施の腫瘍を有するマウスには4週間わたって抗体処置を施し、その一方で、化学療法抵抗性腫瘍を有するマウスには6週間にわたって抗体処置を施した。hSIA101-ADCまたはアイソタイプADCで処置したマウスにおける腫瘍体積を処置の終了後4～5週間にわたってモニターし、腫瘍退縮を評定した。

10

20

30

【0631】

シスプラチン感受性（図4、上のパネル）およびシスプラチン抵抗性（図4、下のパネル）腫瘍体積を経時的に測定した。hSIA101-ADC処置は、他の処置と比較して腫瘍体積の最も有効な低減を生じさせた。シスプラチン抵抗性細胞で生成された腫瘍は、シスプラチン処置と比較してhSIA101-ADC処置での処置によって有意に低減された（図4、下のパネル）。したがって、hSIA101-ADC処置を使用して、シスプラチン感受性腫瘍およびシスプラチン抵抗性腫瘍を有効に処置することができる。興味深いことに、hSIA101-ADCで処置した化学療法未実施マウスの75%は、処置の終了4週間後、完全に無腫瘍であり、その上、化学療法抵抗性腫瘍を有したマウスの75%において、hSIA101-ADC処置の終了の5週間後に50%より大きい腫瘍退縮が観察された。

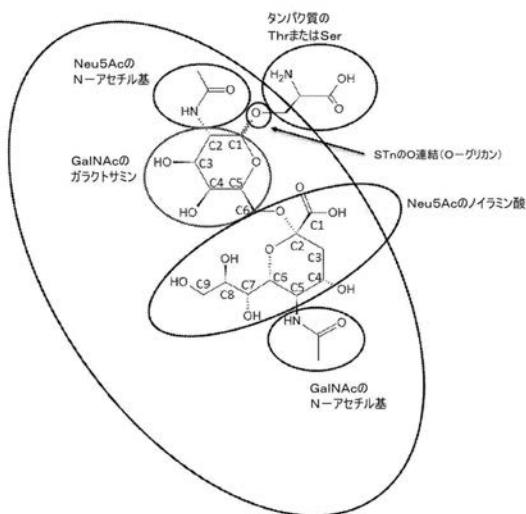
【図 1 A】

Fig. 1A

STn結合特異性

(第1群)

検出されたエピトープ(最も大きい楕円)



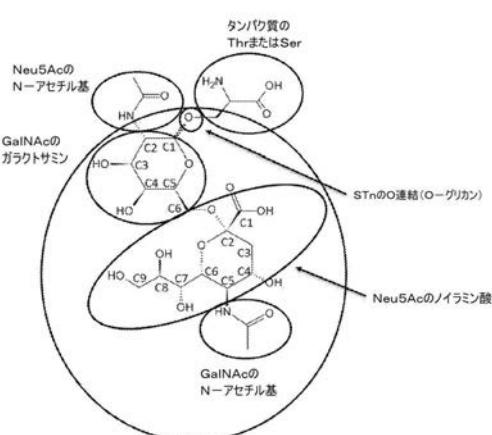
【図 1 B】

Fig. 1B

STn結合特異性

(第2群)

検出されたエピトープ(最も大きい楕円)



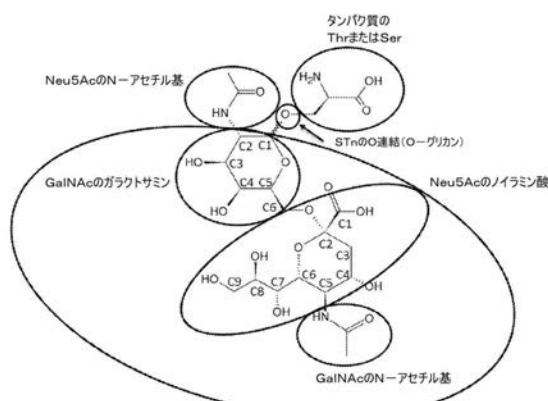
【図 1 C】

Fig. 1C

STn結合特異性

(第3群)

検出されたエピトープ(最も大きい楕円)



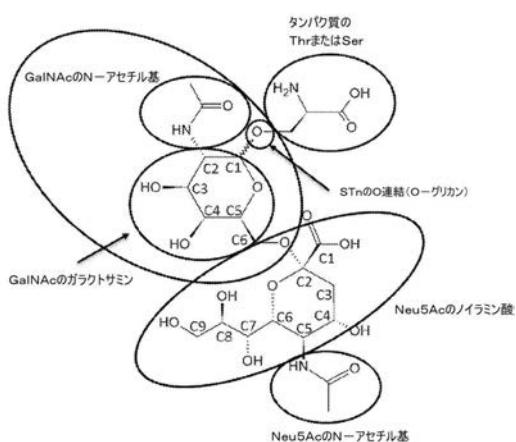
【図 1 D】

Fig. 1D

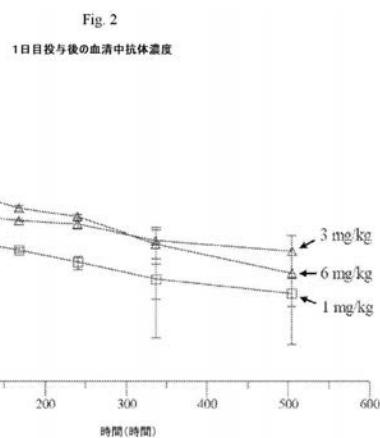
STn結合特異性

(第4群)

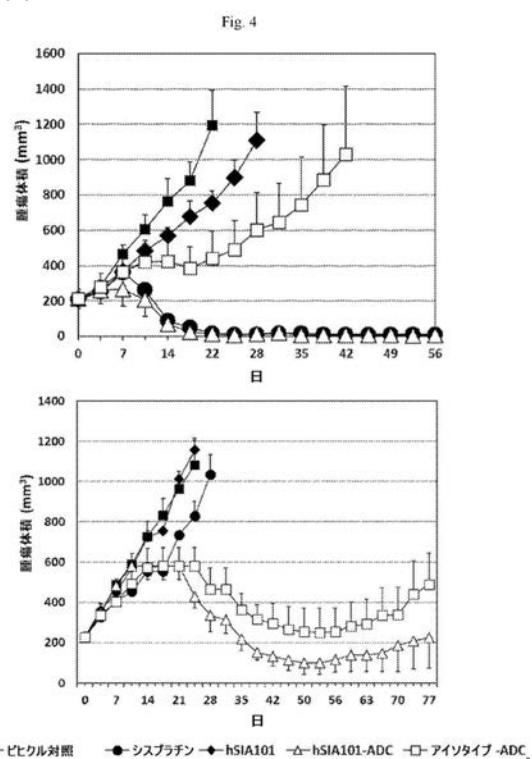
検出されたエピトープ(最も大きい楕円)



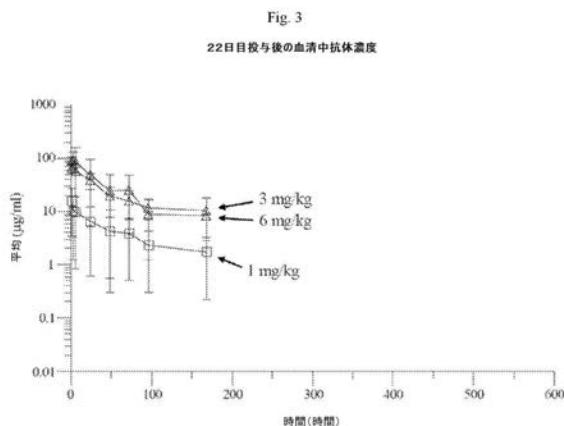
【図2】



【図4】



【図3】



【配列表】

2020510671000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US18/20562									
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</p> <p>IPC - A61K 39/395, 38/17; C07K 16/30, 16/46 (2018.01)</p> <p>CPC - A61K 39/395, 39/39558, 38/17, 38/1767; C07K 16/3076, 16/005, 16/46, 2317/622</p>											
<p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>											
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document</p>											
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document</p>											
<p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document</p>											
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y - A</td> <td>WO 2016/077526 A1 (SIAMAB THERAPEUTICS, INC.) May 19, 2016; abstract; paragraph [0010], [0014], [0016], [0033], [00174], [00176], [00226], [00441], [00483], [00492]</td> <td>1, 5/1 2-4, 5/2-4, 6, 7, 8/6-7, 9/8/6-7, 10/9/8/6-7, 11/10/9/8/6-7, 12/11/10/9/8/6-7, 13/12/11/10/9/8/6-7, 23-26, 27/23-26, 28/23-26, 29, 30, 31/29-30</td> </tr> <tr> <td>Y - A</td> <td>WO 2016/033284 A1 (ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.) March 3, 2016; paragraphs [0002], [00127], [00287]</td> <td>1, 5/1 2-4, 5/2-4, 6, 7, 8/6-7, 9/8/6-7, 10/9/8/6-7, 11/10/9/8/6-7, 12/11/10/9/8/6-7, 13/12/11/10/9/8/6-7, 23-26, 27/23-26, 28/23-26, 29, 30, 31/29-30</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y - A	WO 2016/077526 A1 (SIAMAB THERAPEUTICS, INC.) May 19, 2016; abstract; paragraph [0010], [0014], [0016], [0033], [00174], [00176], [00226], [00441], [00483], [00492]	1, 5/1 2-4, 5/2-4, 6, 7, 8/6-7, 9/8/6-7, 10/9/8/6-7, 11/10/9/8/6-7, 12/11/10/9/8/6-7, 13/12/11/10/9/8/6-7, 23-26, 27/23-26, 28/23-26, 29, 30, 31/29-30	Y - A	WO 2016/033284 A1 (ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.) March 3, 2016; paragraphs [0002], [00127], [00287]	1, 5/1 2-4, 5/2-4, 6, 7, 8/6-7, 9/8/6-7, 10/9/8/6-7, 11/10/9/8/6-7, 12/11/10/9/8/6-7, 13/12/11/10/9/8/6-7, 23-26, 27/23-26, 28/23-26, 29, 30, 31/29-30
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
Y - A	WO 2016/077526 A1 (SIAMAB THERAPEUTICS, INC.) May 19, 2016; abstract; paragraph [0010], [0014], [0016], [0033], [00174], [00176], [00226], [00441], [00483], [00492]	1, 5/1 2-4, 5/2-4, 6, 7, 8/6-7, 9/8/6-7, 10/9/8/6-7, 11/10/9/8/6-7, 12/11/10/9/8/6-7, 13/12/11/10/9/8/6-7, 23-26, 27/23-26, 28/23-26, 29, 30, 31/29-30									
Y - A	WO 2016/033284 A1 (ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.) March 3, 2016; paragraphs [0002], [00127], [00287]	1, 5/1 2-4, 5/2-4, 6, 7, 8/6-7, 9/8/6-7, 10/9/8/6-7, 11/10/9/8/6-7, 12/11/10/9/8/6-7, 13/12/11/10/9/8/6-7, 23-26, 27/23-26, 28/23-26, 29, 30, 31/29-30									
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>											
<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family</p>											
Date of the actual completion of the international search 11 June 2018 (11.06.2018)	Date of mailing of the international search report 27 JUN 2018										
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/20562

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008/0279847 A1 (HONG, HJ et al.) November 13, 2008; abstract; paragraphs [0001], [0080], [0088]; SEQ ID NO: 1	2-4, 5/2-4, 6, 7, 8/6-7, 9/8/6-7, 10/9/8/6-7, 11/10/9/8/6-7, 12/11/10/9/8/6-7, 13/12/11/10/9/8/6-7, 23-26, 27/23-26, 28/23-26, 29, 30, 31/29-30
A	US 2015/0368349 A1 (4-ANTIBODY AG et al.) December 24, 2015; abstract; paragraphs [0003], [0161], [0584], [0800]; SEQ D NO: 440	2-4, 5/2-4, 6, 7, 8/6-7, 9/8/6-7, 10/9/8/6-7, 11/10/9/8/6-7, 12/11/10/9/8/6-7, 13/12/11/10/9/8/6-7, 23-26, 27/23-26, 28/23-26, 29, 30, 31/29-30
P, X	WO 2017/083582 A1 (SIAMAB THERAPEUTICS, INC.) May 18, 2017; entire document	1-4, 5/1-4, 6, 7, 8/6-7, 9/8/6-7, 10/9/8/6-7, 11/10/9/8/6-7, 12/11/10/9/8/6-7, 13/12/11/10/9/8/6-7, 23-26, 27/23-26, 28/23-26, 29, 30, 31/29-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US18/20562
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 14-22, 32-58 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 		
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: ***Please See Within the Next Supplemental Box.***</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-13, 23-31; SEQ ID NOs: 7, 8 		
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US18/20562

-***-Continued from Box III: Lack of Unity of Invention-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-13, 23-31 and SEQ ID NOs: 7 and 8 are directed toward methods and compositions for treating cancer comprising administering an anti-STn antibody in combination with at least one cell cycle inhibitor or as a conjugate (ADC) comprising a cytotoxic agent.

The methods and compositions will be searched to the extent that they encompass a heavy chain variable domain (VH) encompassing SEQ ID NO: 7 (VH) and a light chain variable domain (VL) encompassing SEQ ID NO: 8 (VL). Applicant is invited to elect additional pair(s) of VH and VL sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO:, such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), to be searched. Additional pair(s) of VH and VL sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 5 (in-part), 6 (in-part), 7 (in-part), 8 (in-part), 9 (in-part), 10 (in-part), 11 (in-part), 12 (in-part), 13 (in-part), 23 (in-part) 24 (in-part), 25 (in-part), 26 (in-part), 27 (in-part), 28 (in-part), 29 (in-part), 30 (in-part) and 31 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 7 (VH) and SEQ ID NO: 8 (VL). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a VH sequence encompassing SEQ ID NO: 9 (VH) and a VL sequence encompassing SEQ ID NO: 10 (VL).

No technical features are shared between the polypeptide sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of: a method of treating cancer, in a subject comprising administering an antibody, wherein said antibody is administered at a dose of from about 1 mg/kg to about 10 mg/kg, wherein said antibody has a terminal half-life of from about 50 hours to about 200 hours, and wherein said antibody binds sialyl Tn antigen (STn); and further wherein the antibody is administered intravenously; further wherein said method comprises administering an anti-STn antibody to a subject with colorectal cancer, wherein said anti-STn antibody comprises: a heavy chain variable domain (VH) with a defined amino acid sequence and a light chain variable domain (VL) with a defined amino acid sequence; and further wherein administering said anti-STn antibody is carried out in combination with at least one cell cycle inhibitor; and an ADC comprising said anti-STn antibody and one or more cytotoxic agent; these shared technical features are previously disclosed by WO 2016/077526 A1 A1 to Siamab Therapeutics, Inc. (hereinafter 'Siamab') in view of WO 2016/033284 A1 to Oncomed Pharmaceuticals, Inc. (hereinafter 'Oncomed').

Siamab discloses a method of treating cancer in a subject (abstract; paragraph [0016]) comprising administering an antibody (paragraph [0016]), wherein said antibody is administered at a dose of from about 1 mg/kg to about 10 mg/kg (dosage of antibody between 1-25mg/kg; paragraph [00492]), and wherein said antibody binds sialyl Tn antigen (STn) (anti-STn antibody; paragraphs [0014], [00174], [00176]); and further wherein the antibody is administered intravenously (paragraph [00441]); and wherein said method comprises administering (paragraph [0016]) an anti-STn antibody (anti-STn antibody; paragraphs [0014], [00174], [00176]) to a subject with colorectal cancer (colon cancer; paragraph [0016]), wherein said anti-STn antibody comprises: a heavy chain variable domain (VH) with a defined amino acid sequence (paragraph [0010]) and a light chain variable domain (VL) with a defined amino acid sequence (paragraph [0010]); and further wherein administering said anti-STn antibody is carried out in combination (combination with chemotherapeutic agents paragraph [0033]) with at least one cell cycle inhibitor (anti-mitotic agents; paragraph [00483]); and an ADC (antibody conjugate; paragraph [00226]) comprising said anti-STn antibody and one or more cytotoxic agent (paragraph [00226]). Siamab does not disclose wherein said antibody has a terminal half-life of from about 50 hours to about 200 hours.

Oncomed discloses treating cancer (paragraph [0002]) with antibodies having a terminal half-life of from about 50 hours to about 200 hours (antibodies with a circulating half-life of at least 2 days to at least 2 weeks; paragraph [00287]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to have modified the disclosure of Siamab to provide wherein the antibody has a terminal half-life of from about 50 hours to about 200 hours, because the ability to provide antibodies for the treatment of cancer which have a terminal half-life of from about 50 hours to about 200 hours as disclosed by Oncomed would have motivated the skilled artisan to produce anti-STn antibodies as previously disclosed by Siamab which exhibit a terminal half-life of from 50 hours to about 200 hours.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the combination of the Siamab and Oncomed references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/05 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/05	
A 6 1 K 31/537 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 31/537	
A 6 1 K 38/12 (2006.01)	A 6 1 K 31/4745	
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 38/12	
A 6 1 K 47/58 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
A 6 1 K 47/59 (2017.01)	A 6 1 K 47/58	
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	A 6 1 K 47/59	
	C 0 7 K 16/30	

(31) 優先権主張番号 62/486,826

(32) 優先日 平成29年4月18日(2017.4.18)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/563,718

(32) 優先日 平成29年9月27日(2017.9.27)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31) 優先権主張番号 62/577,830

(32) 優先日 平成29年10月27日(2017.10.27)

(33) 優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81) 指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. プルロニック

(72) 発明者 ブレンダーガスト, ジリアン エム.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01754, メイナード, パーク ストリート 18

(72) 発明者 イーヴァロン, デイビッド エー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02171, ノース クインシー, ウエスト スクーンタム ストリート 95, アパートメント 1118

F ターム(参考) 4C076 BB13 CC16 CC27 EE09 EE13A EE23 EE30 EE41 EE59 FF68
 4C084 AA01 AA02 AA03 AA19 BA08 BA14 BA23 BA24 MA02 MA66
 NA05 NA10 ZA681 ZA682 ZB212 ZB261 ZB262 ZC202 ZC751
 4C085 AA13 AA14 AA21 AA25 AA26 BB11 CC21 EE01 EE03 GG02
 4C086 AA01 AA02 CB22 MA02 MA04 MA05 NA05 NA10 ZA66 ZB26
 ZC75
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 EA28 FA72 FA74

GA10 GA20 GA22 GA26