

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5837567号
(P5837567)

(45) 発行日 平成27年12月24日 (2015. 12. 24)

(24) 登録日 平成27年11月13日 (2015. 11. 13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)
 C 0 7 K 16/32 (2006. 01)
 C 1 2 N 5/10 (2006. 01)
 G 0 1 N 33/53 (2006. 01)
 A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 0 7 K 16/32
 C 1 2 N 5/00 1 0 2
 G 0 1 N 33/53 D
 A 6 1 P 35/00

請求項の数 31 (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-501520 (P2013-501520)
 (86) (22) 出願日 平成23年3月25日 (2011. 3. 25)
 (65) 公表番号 特表2013-529061 (P2013-529061A)
 (43) 公表日 平成25年7月18日 (2013. 7. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/030025
 (87) 国際公開番号 W02011/119979
 (87) 国際公開日 平成23年9月29日 (2011. 9. 29)
 審査請求日 平成24年10月30日 (2012. 10. 30)
 (31) 優先権主張番号 61/317, 964
 (32) 優先日 平成22年3月26日 (2010. 3. 26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-11773

(73) 特許権者 500213834
 メモリアル スローン-ケタリング キャ
 ンサー センター
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6
 5, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1 2 7 5
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MUC 1 6 に対する抗体およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 0 6 によってコードされる可変重 (V H) 鎖配列、および配列番号 0 7 によってコードされる可変軽 (V L) 鎖配列を有する、抗体またはその抗原結合断片であって、MUC 1 6 外部ドメインポリペプチド 2 (配列番号 0 2) に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

前記抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、組換え抗体、組換え抗体の抗原結合断片、およびファージの表面にディスプレイされる抗体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記抗体はキメラ抗体である、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

第 1 の抗体の相補性決定領域をヒトフレームワークドメインの中に置き換えることによって作製されるヒト化抗体またはその抗原結合断片であって、該第 1 の抗体は、配列番号 0 6 によってコードされる可変重 (V H) 鎖配列、および配列番号 0 7 によってコードされる可変軽 (V L) 鎖配列を含み、該ヒト化抗体またはその抗原結合断片は、MUC 1 6 ポ

リペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合し、該MUC16ポリペプチドは、TLDRSSVLVDGYSPNRNE（配列番号02）である、ヒト化抗体またはその抗原結合断片。

【請求項6】

前記ヒト化抗体のフレームワークドメイン残基の実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリン配列のものであり、そして、1つまたは複数の該フレームワークドメイン残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられる、請求項5に記載の抗体。

【請求項7】

前記抗原結合断片が、Fab断片、F(ab')₂断片、およびFv断片からなる群から選択される、請求項1に記載の抗原結合断片。

10

【請求項8】

前記抗体またはその抗原結合断片が、細胞傷害性物質、または細胞傷害性物質のプロドラッグに共有結合により連結されている、請求項1～7のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項9】

前記抗体は、細胞内へ内部移行する、請求項5または6に記載のヒト化抗体またはその抗原結合断片。

【請求項10】

前記抗体は、グリコシル化MUC16細胞外ドメインへの特異的結合を欠く、請求項5または6に記載のヒト化抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項11】

(a) 請求項1～10のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片、および(b) 薬学的に許容され得るキャリアを含む組成物。

【請求項12】

請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片を産生する細胞。

【請求項13】

ハイブリドーマである、請求項12に記載の細胞。

【請求項14】

配列番号06によってコードされるVH鎖配列と、配列番号07によってコードされるVL鎖配列とを含む、一本鎖可変断片(scFv)であって、該scFvは、MUC16ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合し、該MUC16ポリペプチドは、TLDRSSVLVDGYSPNRNE（配列番号02）である、scFv。

30

【請求項15】

請求項14に記載のscFvを含むキメラ抗原受容体(CAR)。

【請求項16】

アミノ末端からカルボキシ末端の順に、ヒトCD8リーダーペプチド、配列番号06によってコードされるVH鎖配列および配列番号7によってコードされるVL鎖配列を含むscFv、ヒトCD8ヒンジドメイン、ヒトCD8膜貫通ドメイン、ならびにCD3シグナル伝達ドメインを含む、請求項15に記載のCAR。

【請求項17】

アミノ末端からカルボキシ末端の順に、(a) ヒトCD8リーダーペプチド、(b) 配列番号06によってコードされるVH鎖配列、スパーサーおよび配列番号7によってコードされるVL鎖配列を含むscFv、(c) ヒトCD8ヒンジドメイン、(d) ヒトCD8膜貫通ドメイン、ならびに(e) CD3シグナル伝達ドメインからなる、請求項15に記載のCAR。

40

【請求項18】

アミノ末端からカルボキシ末端の順に、ヒトCD8リーダーペプチド、配列番号06によってコードされるVH鎖配列および配列番号7によってコードされるVL鎖配列を含むscFv、ヒトCD28膜貫通ドメイン、ヒトCD28細胞内ドメイン、ならびにCD3シグナル伝達ドメインを含む、請求項15に記載のCAR。

50

【請求項 19】

アミノ末端からカルボキシ末端の順に、(a) ヒトCD8リーダーペプチド、(b) 配列番号06によってコードされるVH鎖配列、スパーサーおよび配列番号7によってコードされるVL鎖配列を含むscFv、(c) ヒトCD28膜貫通ドメイン、(d) ヒトCD28細胞内ドメイン、ならびに(e) CD3シグナル伝達ドメインからなる、請求項15に記載のCAR。

【請求項 20】

請求項15～19のいずれか一項に記載のCARを発現するT細胞。

【請求項 21】

MUC16が発現される癌を有する被験体を同定するための組成物であって、該組成物は、請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体の治療上有効量を含み、該組成物は該被験体に投与され、該組成物の存在および局在が該被験体において決定されるものであり、該抗体が標識されていることを特徴とする、組成物。

10

【請求項 22】

前記癌が、卵巣癌および乳癌からなる群から選択される、請求項21に記載の組成物。

【請求項 23】

請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体の、第1の被験体由来の第1の試料への結合を、被験体がMUC16が発現される癌を有する指標とするエキソピボの方法であって、

(a) 該第1の試料を、請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物と接触させる工程、および

20

(b) 該組成物が、該MUC16が発現される癌を欠く対照試料と比較して該第1の試料への増加したレベルの結合を有するか否かを決定する工程

を含む、方法。

【請求項 24】

前記癌が、卵巣癌および乳癌からなる群から選択される、請求項23に記載のエキソピボの方法。

【請求項 25】

前記決定が、免疫組織化学検査、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)、ウェスタンブロット、免疫沈降、およびX線画像化からなる群から選択される手段を用いて行われる、請求項23に記載のエキソピボの方法。

30

【請求項 26】

MUC16が発現される癌を処置するための組成物であって、治療上有効量の請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含む、組成物。

【請求項 27】

治療上有効量の請求項20に記載のT細胞を含む、MUC16が発現される癌を処置するための組成物。

【請求項 28】

前記癌が、卵巣癌および乳癌からなる群から選択される、請求項26に記載の組成物。

【請求項 29】

前記癌が卵巣癌である、請求項27に記載の組成物。

40

【請求項 30】

前記組成物が、被験体に対して腹腔内投与または静脈内投与される、請求項27に記載の組成物。

【請求項 31】

前記癌の1つまたは複数の症状の軽減が、前記組成物が投与された後に検出される、請求項26に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2010年3月16日に出願された同時係属中の米国仮特許出願第61/31

50

7, 964号への優先権を主張し、この米国仮特許出願はあらゆる目的のためにその全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

本発明は、米国公衆衛生局 (United States Public Health Service; US PHS) により授与された P O 1 - C A 5 2 4 7 7 - 1 6 の下、政府支援により成された。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

本発明は、ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片であって、そのポリペプチドが、a) M U C 1 6 外部ドメインポリペプチド、b) M U C 1 6 細胞質ドメインポリペプチド、および c) システインループポリペプチドを含有する M U C 1 6 細胞外ドメインポリペプチドから選択される、抗体およびその抗原結合断片に関する。本発明の抗体およびそれらを含む組成物は、癌などの M U C 1 6 が過剰発現している疾患についての診断的および治療的適用に有用である。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

細胞表面マーカーおよび脱落抗原 (shed antigen) は、いくつかの癌の診断に用いられる。例えば、O C 1 2 5 抗体によって認識される C A 1 2 5 抗原は、卵巣癌に発現する組織特異的な循環抗原である。C A 1 2 5 抗原は、L l o y d および Y i n によってクローニングされた M U C 1 6 遺伝子によってコードされる。その完全長遺伝子は、おもに様々な婦人科系の組織、特に新生物に存在する複合連結型 (complex tetramer) ムチンタンパク質を表す。O C 1 2 5 および他の関連抗体は、もっぱらその分子の切断部分に存在するグリコシル化依存性抗原と反応する。

【0005】

血清アッセイは、多くの上皮卵巣癌患者において循環 C A 1 2 5 抗原のレベルの上昇を検出することができ、卵巣細胞系 O V C A 4 3 3 を用いて引き出されたこの抗原は、O C 1 2 5 抗体によって認識される (1 ~ 2)。血清中の循環 C A 1 2 5 の検出は、卵巣癌患者および臨床試験の管理にとって有用なツールであることがわかっている (3 ~ 4)。しかしながら、C A 1 2 5 は、一般的な癌スクリーニングにとって十分感度が高いことも特異的であることもない (5 ~ 6)。V K 8 および M 1 1 を含む C A 1 2 5 に連結される様々な抗体は、その後、卵巣癌細胞上に存在することが明かにされている (7 ~ 9)。これらの抗体は、卵巣癌における血清アッセイおよび様々な他の研究を開発するために用いられているが、それらは、スクリーニングまたは組織送達に臨床的に用いるには重大な欠陥を有する。これらの抗体は、スクリーニングツールとして有用ではなく、またそれらは、切断後の近位の残留 M U C 1 6 タンパク質断片を検出することができない。このことにより、それらの診断的および治療的適用が制限されている。

【0006】

例えば、卵巣癌細胞抽出物に対して調製された O C 1 2 5、M 1 1、およびたいの他の抗体は、複合グリコシル化依存性抗原に向けられる。これらの抗原は、もっぱら M U C 1 6 の脱落部分に存在し、M U C 1 6 の近位部分の生物学的特徴をフォローするために用いることができず、そのグリコシル化パターンは組織間で実質的に異なり得るため、組織分布を正確には反映し得ない。O C 1 2 5 を含む M U C 1 6 反応性抗体の大部分は、もっぱらその分子の切断部分に存在するグリコシル化依存性抗原と反応するため、M U C 1 6 発現の真の分布は知られていない (21)。切断および C A 1 2 5 遊離後の残留 M U C 1 6 タンパク質断片の運命を追跡するのに利用可能な抗体は現在、存在しない。

【0007】

したがって、M U C 1 6 のペプチドバックボーンの配列に対して向けられ、かつ M U C 1 6 が発現し、および / または過剰発現している癌の診断および処置に有用である、抗体の同定が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、そのポリペプチドが、a) MUC16 外部ドメインポリペプチド、b) MUC16 細胞質ドメインポリペプチド、およびc) システインループポリペプチド：CQVSTFRSVPNRHHTGVDSL C (配列番号19) を含有するMUC16 細胞外ドメインポリペプチドの群から選択される、抗体またはその抗原結合断片を提供する。一実施形態において、抗体は細胞内へ内部移行する。MUC16 外部ドメインの特定の配列に本発明を限定するつもりはないが、一実施形態において、MUC16 外部ドメインポリペプチドは、ポリペプチド1：NFSPLARRVDRAIYEE (配列番号01) およびポリペプチド2：TLDRSSVLVDGYSPNRNE (配列番号02) の群から選択されるポリペプチドを含む。別の実施形態において、抗体は、グリコシル化MUC16 細胞外ドメインへの特異的結合を欠く。なおさらなる実施形態において、抗体は、MUC16 外部ドメインポリペプチドのポリペプチド2 (配列番号02) に特異的に結合し、その抗体は、配列番号06によってコードされる可変重鎖(V_H) および配列番号07によってコードされる可変軽鎖(V_L) を含む。なお別の代替の実施形態において、抗体は、MUC16 外部ドメインポリペプチドのポリペプチド2 (配列番号02) に特異的に結合し、その抗体は、配列番号04によってコードされる可変重鎖(V_H) および配列番号05によってコードされる可変軽鎖(V_L) を含む。さらなる実施形態において、抗体は、MUC16 外部ドメインポリペプチドのポリペプチド1 (配列番号01) に特異的に結合し、その抗体は、配列番号08によってコードされる可変重鎖(V_H) および配列番号09および配列番号10の少なくとも1つによってコードされる可変軽鎖(V_L) を含む。一実施形態において、MUC16 細胞質ドメインポリペプチドは、VTTRR RKKEGEYNVQ QQ (配列番号18) を含む。より好ましくは、非限定的に、MUC16 細胞質ドメインポリペプチドは、ポリペプチド3：CGVLVTTRRRKKEGEYNVQ QQ (配列番号03) を含む。代替の実施形態において、システインループポリペプチドを含有するMUC16 細胞外ドメインポリペプチドは、CQVSTFRSVPNRHHTGVDSL C (配列番号19) を含む。より好ましくは、非限定的に、MUC16 細胞外ドメインポリペプチドは、ポリペプチド4：KSYF SDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSL CNFSPL (配列番号15) を含む。なお別の代替の実施形態において、抗体は、MUC16 細胞外ドメインポリペプチドのポリペプチド4 (配列番号15) に特異的に結合し、その抗体は、配列番号11によってコードされる可変重鎖(V_H) および配列番号12によってコードされる可変軽鎖(V_L) を含む。さらなる代替の実施形態において、抗体は、キメラ抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、組換え抗体の抗原結合断片、ヒト化抗体、およびファージの表面にディスプレイされる抗体の群から選択される。別の実施形態において、抗原結合断片は、Fab断片、F(ab')₂断片、およびFv断片の群から選択される。代替の実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、細胞傷害性物質または細胞傷害性物質のプロドラッグに共有結合により連結される。好ましい実施形態において、抗体は、ハイブリドーマ細胞系によって産生されるモノクローナル抗体である。

【0009】

本発明はまた、ハイブリドーマ細胞系によって産生される単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、その抗体がポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合し、そのポリペプチドが、a) MUC16 外部ドメインポリペプチド、b) MUC16 細胞質ドメインポリペプチド、およびc) システインループポリペプチド：CQVSTFRSVPNRHHTGVDSL C (配列番号19) を含有するMUC16 細胞外ドメインポリペプチドの群から選択される、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。一実施形態において、MUC16 外部ドメインポリペプチドは、ポリペプチド1 (配列番号01) を含み、抗体は、9B11.20.16、10A2、2

10

20

30

40

50

F 4、2 3 D 3、3 0 B 1、および 3 1 B 2 の群から選択される。代替の実施形態において、M U C 1 6 外部ドメインポリペプチドは、ポリペプチド 2 (配列番号 0 2) を含み、抗体は、4 H 1 1 . 2 . 5、1 3 H 1、2 9 G 9、9 C 9 . 2 1 . 5 . 1 3、2 8 F 8、2 3 G 1 2、9 C 7 . 6、1 1 B 6、2 5 G 4、5 C 2 . 1 7、4 C 7、2 6 B 2、4 A 5 . 3 7、4 A 2、2 5 H 3、および 2 8 F 7 . 1 8 . 1 0 の群から選択される。なおさらなる実施形態において、M U C 1 6 細胞質ドメインポリペプチドは、ポリペプチド 3 : C G V L V T T R R R K K E G E Y N V Q Q Q (配列番号 0 3) を含み、抗体は、3 1 A 3 . 5 . 1、1 9 D 1、1 0 F 6、2 2 E 1 0、2 2 F 1、3 H 8、2 2 F 1 1、4 D 7、2 4 G 1 2、1 9 G 4、9 A 5、4 C 2、3 1 C 8、2 7 G 4、および 6 H 2 の群から選択される。別の代替の実施形態において、M U C 1 6 細胞外ドメインポリペプチドは、
ポリペプチド 4 : K S Y F S D C Q V S T F R S V P N R H H T G V D S L C N F S P L (配列番号 1 5) を含み、抗体は、2 4 B 3 および 9 C 7 の群から選択される。

10

【 0 0 1 0 】

本発明はさらに、(a) 本明細書に記載されている抗体またはその抗原結合断片のいずれか 1 つまたは複数、および (b) 薬学的に許容され得るキャリアを含む組成物を提供する。

【 0 0 1 1 】

a) M U C 1 6 外部ドメインポリペプチド、b) M U C 1 6 細胞質ドメインポリペプチド、および c) シス테인ループポリペプチド : C Q V S T F R S V P N R H H T G V D S L C (配列番号 1 9) を含有する M U C 1 6 細胞外ドメインポリペプチドの群から選択される、ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系もまた本発明によって提供される。

20

【 0 0 1 2 】

本発明はさらに、被験体において M U C 1 6 の過剰発現を含む疾患を検出するための方法であって、a) i) 被験体由来の試料および i i) 本明細書に記載されている抗体またはその抗原結合断片のいずれか 1 つまたは複数を供給する工程、b) 抗体のその抗原との特異的結合のための条件下で試料を抗体と接触させる工程、および c) 上記疾患を欠く対照試料と比較した、抗体の試料への結合のレベルの増加を検出し、それによって被験体において上記疾患を検出する工程を含む方法を提供する。一実施形態において、疾患は癌である。好ましい実施形態において、癌は、卵巣癌および乳癌の群から選択される。検出方法を限定するつもりはないが、一実施形態において、抗体の試料への結合を検出する方法は、免疫組織化学検査、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、蛍光活性化細胞ソーティング (F A C S)、ウェスタンブロット、免疫沈降、および / または X 線画像化である。

30

【 0 0 1 3 】

M U C 1 6 の過剰発現を含む疾患を処置するための方法であって、本明細書に記載されている抗体またはその抗原結合断片のいずれか 1 つまたは複数の治療上有効量を、上記疾患を有する被験体に投与する工程を含む方法もまた本明細書において提供される。一実施形態において、疾患は、卵巣癌および乳癌によって例示されるような癌である。

【 0 0 1 4 】

本発明はまた、M U C 1 6 ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、M U C 1 6 ポリペプチドが

40

【 0 0 1 5 】

【数 1】

- a) TLDRKSVFVDGYSQNRDD (配列番号 21), b) KSYFSDCQVLAFRSVSNNNNHTGVDSL CNFSPL (配列番号 22),
 c) SLYSNCRLASLRPKKNGTATGVNAICSYHQN (配列番号 23),
 d) KSYFSDCQVNNFRS (配列番号30), e) TLDRSSVLVDGYSQNRDD (配列番号31),
 および f) TLDRSSVLVDGYSQNRDD (配列番号31)

の群から選択される、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。一実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、組換え抗体、組換え抗体の抗原結合断片、ヒト化抗体、およびファージの表面にディスプレイされる抗体の群から選択される。好ましい実施形態において、抗体は、

【0016】

【数 2】

12B10-3G10, 10C4-3H5, 10C4-1F2, 10C4-2H8, 10C4-1G7, 17F2-3G5, 17F2-3F6, 17F2-2F9, 17F2-1E11, 12B10-3F7, 12B10-2F6, 12B10-2F10, 25E9-3, 25E9-5, 25E9-1, 25E9-16, 21B8-1H11, 21B8-3G6, 21B8-3H9, 21B8-1G8, 21E1-1E3, 21E1-1G9, 21E1-2G7, 21E1-3G12, 4H1-2E1, 4H1-2E3, 4H1-3E1, 4H1-3H3, 15A8-2E2, 15A8-2E10, 15A8-2E11, 15A8-3D2, 22B5-1F6, 22B5-3G9, 22B5-2G8, および 22B5-3F11.

の群から選択されたハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体である。特定の実施形態において、MUC16ポリペプチドは、TLDRKSVFVDGYSQNRDD (配列番号 21) であり、抗体は、ハイブリドーマ細胞 12B10-3G10 によって産生されるモノクローナル抗体など、可変重鎖 (V_H) 配列である配列番号 27、および可変軽鎖 (V_L) 配列である配列番号 29 を含む。代替の実施形態において、抗原結合断片は、Fab断片、F(ab')₂断片、およびFv断片の群から選択される。より好ましい実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、細胞傷害性物質および/または細胞傷害性物質のプロドラッグに共有結合により連結される。さらなる実施形態において、抗体は、ヒトMUC16 (配列番号 25) に特異的に結合する。別の実施形態において、抗体は細胞内へ内部移行する。代替の実施形態において、抗体は、グリコシル化MUC16細胞外ドメインへの特異的結合を欠く。

【0017】

本発明はまた、(a) 本発明の抗体および/またはその抗原結合断片のいずれか1つまたは複数、ならびに(b) 薬学的に許容され得るキャリアを含む組成物を提供する。

【0018】

本発明はさらに、MUC16ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を産生するハイブリドーマ細胞であって、MUC16ポリペプチドが

【0019】

【数 3】

- a) TLDRKSVFVDGYSQNRDD (配列番号 21), b) KSYFSDCQVLAFRSVSNNNNHTGVDSL CNFSPL (配列番号 22), c) SLYSNCRLASLRPKKNGTATGVNAICSYHQN (配列番号 23), d) KSYFSDCQVNNFRS (配列番号30), e) TLDRSSVLVDGYSQNRDD (配列番号31),
 および f) TLDRSSVLVDGYSQNRDD (配列番号31)

10

20

30

40

50

の群から選択される、ハイブリドーマ細胞を提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、MUC16ポリペプチドに特異的に結合する抗体の可変重鎖（ V_H ）配列および可変軽鎖（ V_L ）配列の少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドを含む単離されたヌクレオチド配列であって、MUC16ポリペプチドが

【 0 0 2 1 】

【数4】

a) TLDRKSVFVDGYSQNRDD（配列番号 21), b)

KSYFSDCQVLAFRSVSNNNNHTGVDSL CNFSPL（配列番号 22), c)

SLYSNCRLASLRPKKNGTATGVNAICSYHQN（配列番号 23), d) KSYFSDCQVNNFRS

(配列番号30), e) TLDRSSVLVDGYSQNRDD(配列番号31), および

f) TLDRSSVLVDGYSQNRDD（配列番号31)

10

の群から選択される、単離されたヌクレオチド配列を提供する。一実施形態において、MUC16ポリペプチドはTLDRKSVFVDGYSQNRDD（配列番号 21）であり、可変重鎖（ V_H ）配列をコードするポリヌクレオチドは配列番号 26 を含み、可変軽鎖（ V_L ）配列をコードするポリヌクレオチドは配列番号 28 を含む。

【 0 0 2 2 】

本発明はまた、

【 0 0 2 3 】

【数5】

a) TLDRKSVFVDGYSQNRDD（配列番号 21), b)

KSYFSDCQVLAFRSVSNNNNHTGVDSL CNFSPL（配列番号 22), c)

SLYSNCRLASLRPKKNGTATGVNAICSYHQN（配列番号 23), d) KSYFSDCQVNNFRS

(配列番号30), e) TLDRSSVLVDGYSQNRDD（配列番号31), および

f) TLDRSSVLVDGYSQNRDD（配列番号31)

20

の群から選択されるMUC16ポリペプチドの免疫学的有効量を被験体に投与する工程を含む、MUC16ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合する抗体を産生するための方法を提供する。

30

【 0 0 2 4 】

本発明はさらに、本発明の抗体および/またはその抗原結合断片のいずれか1つまたは複数の、MUC16ポリペプチドまたはその抗原性部分との特異的結合の、被験体由来の試料におけるレベルを決定する工程を含む、疾患を有するとして被験体を同定するための方法を提供する。一実施形態において、疾患は、卵巣癌および乳癌によって例示される癌である。別の実施形態において、方法は、対照試料と比較した、抗体の試料への結合のレベルの変化を検出する工程をさらに含む。必要に応じて、検出は、免疫組織化学検査、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）、ウェスタンブロット、免疫沈降、およびX線画像化の群から選択される。

40

【 0 0 2 5 】

本発明はまた、疾患の1つまたは複数の症状を軽減するための方法であって、本発明の抗体および/またはその抗原結合断片のいずれか1つまたは複数の治療上有効量を、それを必要とする被験体に投与する工程を含む方法を提供する。一実施形態において、疾患は、卵巣癌および乳癌によって例示される癌である。必要に応じて、方法は、投与工程後、疾患の1つまたは複数の症状の軽減を検出する工程をさらに含む。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

（項目1） MUC16ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合する単離され

50

た抗体またはその抗原結合断片であって、該MUC16ポリペプチドが
【数16】

- a) TLDRKSVFVDGYSQNRDD (配列番号 21)、
- b) KSYFSDCQVLAFRSVSNNNNHTGVDSL CNFSPL (配列番号 22)、および
- c) SLYSNCRLASLRPKKNGTATGVNAICSYHQN (配列番号 23)

からなる群から選択される、抗体またはその抗原結合断片。

(項目2) モノクローナル抗体、キメラ抗体、組換え抗体、組換え抗体の抗原結合断片、ヒト化抗体、およびファージの表面にディスプレイされる抗体からなる群から選択される、項目1に記載の抗体。

10

(項目3) モノクローナル抗体である、項目2に記載の抗体。

(項目4) 前記モノクローナル抗体が、

【数17】

12B10-3G10, 10C4-3H5, 10C4-1F2, 10C4-2H8, 10C4-1G7,
 17F2-3G5, 17F2-3F6, 17F2-2F9, 17F2-1E11, 12B10-3F7, 12B10-2F6, 12B10-2F10, 25E9-3,
 25E9-5, 25E9-1, 25E9-16, 21B8-1H11, 21B8-3G6, 21B8-3H9, 21B8-1G8, 21E1-1E3, 21E1-1G9,
 21E1-2G7, 21E1-3G12, 4H1-2E1, 4H1-2E3, 4H1-3E1, 4H1-3H3, 15A8-2E2, 15A8-2E10, 15A8-
 2E11, 15A8-3D2, 22B5-1F6, 22B5-3G9, 22B5-2G8, および 22B5-3F11

20

からなる群から選択されるハイブリドーマ細胞によって産生される、項目3に記載の抗体
。

(項目5) 前記MUC16ポリペプチドがTLDRKSVFVDGYSQNRDD (配列番号21) である、項目1に記載の抗体。

(項目6) 可変重鎖(V_H)配列である配列番号27および可変軽鎖(V_L)配列である配列番号29を含む、項目5に記載の抗体。

(項目7) ハイブリドーマ細胞12B10-3G10によって産生されるモノクローナル抗体である、項目6に記載の抗体。

(項目8) 前記抗原結合断片が、Fab断片、F(ab')₂断片、およびFv断片からなる群から選択される、項目1に記載の抗体。

30

(項目9) 前記抗体またはその抗原結合断片が、細胞傷害性物質、または細胞傷害性物質のプロドラッグに共有結合により連結されている、項目1に記載の抗体。

(項目10) ヒトMUC16 (配列番号25) に特異的に結合する、項目1に記載の抗体。

(項目11) 細胞内へ内部移行する、項目1に記載の抗体。

(項目12) グリコシル化MUC16細胞外ドメインへの特異的結合を欠く、項目1に記載の抗体。

(項目13) (a) 項目1に記載の抗体またはその抗原結合断片、および(b) 薬学的に許容され得るキャリアを含む組成物。

40

(項目14) MUC16ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を産生するハイブリドーマ細胞であって、該MUC16ポリペプチドが

【数18】

- a) TLDRKSVFVDGYSQNRDD (配列番号 21)、
- b) KSYFSDCQVLAFRSVSNNNNHTGVDSL CNFSPL (配列番号 22)、および
- c) SLYSNCRLASLRPKKNGTATGVNAICSYHQN (配列番号 23)

からなる群から選択される、ハイブリドーマ細胞。

50

(項目15) MUC16ポリペプチドに特異的に結合する抗体の可変重鎖(V_H)配列および可変軽鎖(V_L)配列のうちの少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドを含む単離されたヌクレオチド配列であって、該MUC16ポリペプチドが

【数19】

- a) TLDRKSVFVDGYSQNRDD (配列番号 21)、
- b) KSYFSDCQVLAFRSVSNNNNHTGVDSL CNFSPL (配列番号 22)、および
- c) SLYSNCRLASLRPKKNGTATGVNAICSYHQN (配列番号 23)

からなる群から選択される、ヌクレオチド配列。

10

(項目16) 前記MUC16ポリペプチドがTLDRKSVFVDGYSQNRDD (配列番号21)である、項目15に記載のヌクレオチド配列。

(項目17) 前記可変重鎖(V_H)配列をコードする前記ポリヌクレオチドが配列番号26を含み、かつ前記可変軽鎖(V_L)配列をコードする前記ポリヌクレオチドが配列番号28を含む、項目16に記載のヌクレオチド配列。

(項目18)

【数20】

- a) TLDRKSVFVDGYSQNRDD (配列番号 21)、
- b) KSYFSDCQVLAFRSVSNNNNHTGVDSL CNFSPL (配列番号 22)、および
- c) SLYSNCRLASLRPKKNGTATGVNAICSYHQN (配列番号 23)

20

からなる群から選択される、免疫学的有効量のMUC16ポリペプチドを被験体に投与する工程を含む、MUC16ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合する抗体を産生するための方法。

(項目19) 疾患を有するとして被験体を同定するための方法であって、項目1に記載の抗体の前記MUC16ポリペプチドまたは前記その抗原性部分との特異的結合の、該被験体由来の試料におけるレベルを決定する工程を含み、ここで、対照試料と比較して、該特異的結合のレベルの変化を検出することにより、疾患を有するとして該被験体を同定する、方法。

30

(項目20) 前記疾患が癌である、項目19に記載の方法。

(項目21) 前記癌が、卵巣癌および乳癌からなる群から選択される、項目20に記載の方法。

(項目22) 対照試料と比較して、前記抗体の前記試料への結合のレベルの変化を検出する工程をさらに含む、項目19に記載の方法。

(項目23) 前記検出が、免疫組織化学検査、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)、ウェスタンブロット、免疫沈降、およびX線画像化からなる群から選択される、項目19に記載の方法。

(項目24) 疾患の1つまたは複数の症状を軽減するための方法であって、治療上有効量の項目1に記載の抗体を、それを必要とする被験体に投与する工程を含む、方法。

40

(項目25) 前記疾患が癌である、項目24に記載の方法。

(項目26) 前記癌が、卵巣癌および乳癌からなる群から選択される、項目25に記載の方法。

(項目27) 前記投与する工程の後に前記疾患の1つまたは複数の症状の軽減を検出する工程をさらに含む、項目24に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】3つのMUC16カルボキシ末端ペプチドをMSKCC微量化学コア施設で合成した。ポリペプチド1は、推定の切断部位の近くにあり、ポリペプチド2は膜貫通部の前にあり、ポリペプチド3は、膜貫通部の内側にある内部ペプチドである。

50

【図2】OC125（左パネル）および4H11（右パネル）を用いた、高悪性度漿液性卵巣癌腫の比較染色の図である。

【図3】高悪性度漿液性卵巣癌腫の組織マイクロアレイにおけるOC125および4H11の免疫組織化学的スコア化の図である。膜および/または細胞質の染色のみが陽性とみなされた。スコア0：染色なし；スコア1：＜5%強いまたは弱い染色；スコア2：5～50%強いまたは弱い染色；スコア3：51～75%強いまたは51～100%弱い染色；スコア4：76～99%強い染色；およびスコア5：100%強い染色。図3A：OC125（スコア0）；図3B：OC125（スコア1）；図3C：OC125（スコア2）；図3D：OC125（スコア3）；図3E：OC125（スコア4）；図3F：OC125（スコア5）；図3G：4H11（スコア0）；図3H：4H11（スコア1）；図3I：4H11（スコア2）；図3J：4H11（スコア3）；図3K：4H11（スコア4）；図3L：4H11（スコア5）。

10

【図4】ウェスタンブロット分析の図である。図4A：GST-MUC16^{c114}融合タンパク質のモノクローナル抗体9C9.21.5.13および4H11.2.5でのウェスタンブロット分析。図4B：SKOV3-phrGFP-MUC16^{c334}およびSKOV3-phrGFP-MUC16^{c334}タンパク質抽出物のウェスタンブロット分析であり、モノクローナル抗体9C9.21.5.13および4H11.2.5で探索された。

【図5A-1】図5A：OVCA R3細胞におけるMUC16カルボキシ末端モノクローナル抗体結合親和性（パネルA～D）。

20

【図5A-2】図5A：OVCA R3細胞におけるMUC16カルボキシ末端モノクローナル抗体結合親和性（パネルA～D）。

【図5A-3】図5A：OVCA R3細胞におけるMUC16カルボキシ末端モノクローナル抗体結合親和性（パネルA～D）。

【図5A-4】図5A：OVCA R3細胞におけるMUC16カルボキシ末端モノクローナル抗体結合親和性（パネルA～D）。

【図5B】図5B：SKOV3-phrGFP-MUC16^{c334}安定形質移入細胞における放射標識4H11およびOC125モノクローナル抗体の内部移行。

【図6A】前立腺（2A、一致）、肺（2B、不一致）、乳房（2C、不一致）、および膵臓（2D、不一致）の癌を含有する組織マイクロアレイにおけるOC125および4H11モノクローナル抗体の比較染色強度を示す図である。

30

【図6B】前立腺（2A、一致）、肺（2B、不一致）、乳房（2C、不一致）、および膵臓（2D、不一致）の癌を含有する組織マイクロアレイにおけるOC125および4H11モノクローナル抗体の比較染色強度を示す図である。

【図6C】前立腺（2A、一致）、肺（2B、不一致）、乳房（2C、不一致）、および膵臓（2D、不一致）の癌を含有する組織マイクロアレイにおけるOC125および4H11モノクローナル抗体の比較染色強度を示す図である。

【図6D】前立腺（2A、一致）、肺（2B、不一致）、乳房（2C、不一致）、および膵臓（2D、不一致）の癌を含有する組織マイクロアレイにおけるOC125および4H11モノクローナル抗体の比較染色強度を示す図である。

40

【図7】材料および方法のセクションに記載されているようなFACS分析を、OVCA R3野生型、SKOV3-phrGFP-MUC16^{c114}およびSKOV3-phrGFP-MUC16^{c334}安定形質移入細胞系において市販の抗体およびMUC16カルボキシ末端モノクローナル抗体を用いて実施した。

【図8-1】抗体可変重鎖（V_H）および抗体可変軽鎖（V_L）をコードするヌクレオチド配列を示す図である。（A）4A5 V_H（配列番号04）、（B）4A5 V_L（配列番号05）、（C）4H11 V_H（配列番号06）、（D）4H11 V_L（配列番号07）、（E）9B11 V_H（配列番号08）、（F）9B11 V_{L A}（配列番号09）、（G）9B11 V_{L B}（配列番号10）、（H）24B3 V_H（配列番号11）、（I）24B3 V_L（配列番号12）。

50

【図8-2】抗体可変重鎖 (V_H) および抗体可変軽鎖 (V_L) をコードするヌクレオチド配列を示す図である。(A) 4A5 V_H (配列番号04)、(B) 4A5 V_L (配列番号05)、(C) 4H11 V_H (配列番号06)、(D) 4H11 V_L (配列番号07)、(E) 9B11 V_H (配列番号08)、(F) 9B11 V_L (配列番号09)、(G) 9B11 V_L (配列番号10)、(H) 24B3 V_H (配列番号11)、(I) 24B3 V_L (配列番号12)。

【図9-1】(A) ヒトMUC16 (GenBank NP_078966) (配列番号13)、(B) ポリペプチド1 (配列番号01)、(C) ポリペプチド2 (配列番号02)、(D) ポリペプチド3 (配列番号03)、(E) 膜貫通ドメイン (配列番号14)、(F) システインループポリペプチド (配列番号19) を含有するポリペプチド4 (配列番号15)。

10

【図9-2】(A) ヒトMUC16 (GenBank NP_078966) (配列番号13)、(B) ポリペプチド1 (配列番号01)、(C) ポリペプチド2 (配列番号02)、(D) ポリペプチド3 (配列番号03)、(E) 膜貫通ドメイン (配列番号14)、(F) システインループポリペプチド (配列番号19) を含有するポリペプチド4 (配列番号15)。

【図9-3】(A) ヒトMUC16 (GenBank NP_078966) (配列番号13)、(B) ポリペプチド1 (配列番号01)、(C) ポリペプチド2 (配列番号02)、(D) ポリペプチド3 (配列番号03)、(E) 膜貫通ドメイン (配列番号14)、(F) システインループポリペプチド (配列番号19) を含有するポリペプチド4 (配列番号15)。

20

【図9-4】(A) ヒトMUC16 (GenBank NP_078966) (配列番号13)、(B) ポリペプチド1 (配列番号01)、(C) ポリペプチド2 (配列番号02)、(D) ポリペプチド3 (配列番号03)、(E) 膜貫通ドメイン (配列番号14)、(F) システインループポリペプチド (配列番号19) を含有するポリペプチド4 (配列番号15)。

【図9-5】(A) ヒトMUC16 (GenBank NP_078966) (配列番号13)、(B) ポリペプチド1 (配列番号01)、(C) ポリペプチド2 (配列番号02)、(D) ポリペプチド3 (配列番号03)、(E) 膜貫通ドメイン (配列番号14)、(F) システインループポリペプチド (配列番号19) を含有するポリペプチド4 (配列番号15)。

30

【図9-6】(A) ヒトMUC16 (GenBank NP_078966) (配列番号13)、(B) ポリペプチド1 (配列番号01)、(C) ポリペプチド2 (配列番号02)、(D) ポリペプチド3 (配列番号03)、(E) 膜貫通ドメイン (配列番号14)、(F) システインループポリペプチド (配列番号19) を含有するポリペプチド4 (配列番号15)。

【図10】MUC16 構造の概略図である。

【図11】MUC-CD 標的化CARの設計およびインビトロ分析を示す図である。(A) 第1世代4H11z および第2世代4H11-28z のレトロウイルスベクターの概略図。4H11scFv: モノクローナル抗体4H11の重鎖可変領域 (V_H) および軽鎖可変領域 (V_L) 由来のMUC16 特異的scFv; CD8: CD8 ヒンジドメインおよび膜貫通ドメイン; CD28: CD28 膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメイン; 鎖: T細胞受容体 鎖細胞質シグナル伝達ドメイン; LTR: 長い末端反復配列; 黒色ボックス: CD8 リーダー配列; 灰色ボックス: (Gly₄ Ser)₃ リンカー; 矢印は転写の開始を示す。(B) 4H11z CAR または19z1 CAR のいずれかを発現するようにレトロウイルスで形質導入されたヒトT細胞のFACS分析。(C) 3T3 (MUC-CD/B7.1) AACP 上で4H11z⁺ T細胞は増殖するが、19z1⁺ T細胞は増殖しない。CAR⁺ を、3T3 (MUC-CD/B7.1) AACP 単層上で、6ウェルプレートの各ウェルあたり3×10⁶ 個のCAR⁺ T細胞で共培養した。トリパンブルー排除アッセイによって評価した2日目、4日目、および7日目に得られた

40

50

生存T細胞数と組み合わせで、CAR⁺画分についてのFACSにより評価したCAR⁺T細胞画分に対して標準化された、CAR⁺T細胞の増殖。

【図12】第1世代4H11z CARを発現するように改変されたT細胞の、第2世代の共刺激4H11-28z CARを発現するように改変されたT細胞とのインビトロ比較を示す図である。(A) CAR⁺T細胞を、B7.1を含む(右パネル)、または含まない(左パネル)MUC-CD単層上で共培養した。3×10⁶個のCAR⁺T細胞を、6ウェル組織培養プレートにおいてサイトカインを含まない培地中、AAPC単層上で共培養した。生存T細胞の総数を、トリパンブルー排除アッセイにより2日目、4日目、および7日目に評価した。3T3(MUC-CD)AAPCとの共培養により、4H11z⁺T細胞の場合と比較して、4H11-28z⁺T細胞は、著しく増殖した(* * p = 0.0023(4H11-28zと比較した4H11z))。対照的に、3T3(MUC-CD/B7.1)AAPC上で4H11z⁺T細胞と4H11-28z⁺T細胞の両方が同じように増殖した(p = 0.09(4H11-28zと比較した4H11z))。対照19-28z⁺T細胞は、3T3(MUC-CD)上(* * p = 0.0056(4H11zと比較した19-28z))、* * p = 0.0011(4H11-28zと比較した19-28z))で、または3T3(MUC-CD/B7.1)上(p = 0.0026(4H11zと比較した19-28z))、* * p = 0.0087(4H11-28zと比較した19-28z))で増殖しなかった。(B) 3T3(MUC-CD)AAPCとの共培養により、4H11-28z⁺T細胞はIL-2を分泌するが、4H11z⁺T細胞は分泌しない。3T3(MUC-CD)AAPC上での活性化後2日目における組織培養上清をサイトカイン分泌について分析した。4H11z⁺T細胞とは対照的に、4H11-28z⁺T細胞は、4H11-28z CARによって媒介されるT細胞共刺激と一致して、IL-2の分泌の増強を実証した。* * * p = 0.0008(4H11zと比較した19z1または19-28z)、* * p = 0.0026(4H11-28zと比較した19z1または19-28z)、* * p = 0.0046(4H11-28zと比較した4H11z)。さらに、4H11-28z⁺T細胞と4H11z⁺T細胞の両方が、IFN γ を分泌した。* p = 0.011(4H11-28zと比較した4H11z)。対照19z1および19-28z形質導入化T細胞はIL-2およびIFN γ のいずれも分泌しなかった。* * p = 0.0034(4H11zと比較した19z1)、* * p = 0.0036(4H11zと比較した19-28z)、* * * p = 0.0008(4H11-28zと比較した19-28z)。(C) 3T3(MUC-CD/B7.1)上での3サイクルの刺激後のCAR⁺T細胞の増殖。4H11z CARかまたは4H11-28z CARのいずれかを発現するように形質導入されたヒトT細胞は、3T3(MUC-CD/B7.1)AAPC上での2サイクルの刺激にわたって>2logの増殖を実証した。矢印は、AAPC上での1回目および2回目のサイクルの再刺激を示す。(D)それぞれの毎週のサイクルの刺激後に増加した4H11-28z⁺T細胞のCAR⁺T細胞画分のFACS分析。(I)最初の形質導入後のFACS、(II)AAPC上での1回目の刺激後7日目におけるFACS、(III)AAPC上での2回目の刺激後7日目におけるFACS。これらのデータは、3つの異なる健常ドナーT細胞集団を用いた3つの異なる実験の1つを代表しており、その3つの実験の全ては、類似した増殖およびサイトカイン分泌パターンを示した。

【図13】MUC-CD標的化T細胞は、特異的に増殖し、MUC-CD⁺腫瘍細胞を溶解する。(A)OV-CAR(MUC-CD)腫瘍細胞を標的にする4H11z⁺T細胞および4H11-28z⁺T細胞の細胞傷害性アッセイは、第1および第2世代のMUC-CD標的化CARを発現するように改変された健常ドナー由来のT細胞により媒介された効率的な細胞傷害性を実証している。第1および第2世代のCD19標的化19z1 CARおよび19-28z CARを発現するように改変された対照T細胞は、標的腫瘍細胞の有意な溶解を示さなかった。(B)4H11-28z CARを発現するように改変された健常ドナーT細胞は、対照19-28z CARを発現するように改変されたT細胞と比較して、原発性患者腹水由来MUC-CD⁺腫瘍細胞を同様に溶解する。このデ

10

20

30

40

50

ータは、類似した結果をもつ3人の卵巣癌腫患者由来の原発性腫瘍細胞を標的にする3つの実験のうちの(o r) 1つを代表する。(C) 末梢血から単離された自己T細胞は、4 H 1 1 - 2 8 z C A Rで改変された場合、対照1 9 - 2 8 z + 自己T細胞と比較して、自己M U C - C D + 腹水由来腫瘍細胞の有意な溶解を示す。これらのデータは、類似した結果をもつ3人の異なる卵巣癌腫患者由来のT細胞および自己腫瘍細胞を利用する3つの実験のうちの1つを代表する。(D) O V - C A R 3 (M U C - C D) 腫瘍細胞との共培養後のM U C - C D 標的化C F S E 標識T細胞の抗原特異的増殖。C F S E 標識C A R + T細胞を、M U C - C D 発現O V - C A R 3 腫瘍細胞と、1 : 1の比で5日間、共培養した。C F S E 標識T細胞の増殖をF A C Sによって評価し、4 H 1 1 z + T細胞および4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞の両方が効率的に増殖するが、対照1 9 - 2 8 z + T細胞は効率的に増殖しないことが実証された。(E) C F S Eの結果を、O V - C A R 3 (M U C - C D) 腫瘍細胞との共培養後2日目、4日目、および7日目に評価された絶対的T細胞数によってさらに確認した。(F) O V C A R 3 (M U C - C D) 細胞における4 - 1 B B Lの発現のF A C S分析。O V - C A R 3 (M U C - C D) 細胞を、抗ヒト4 - 1 B B L抗体(太線)またはアイソタイプ対照(細線)を用いて染色した。F A C S分析から、O V - C A R 3 (M U C - C D) 腫瘍細胞における4 - 1 B B Lの発現を実証した。さらなるF A C S分析は、共刺激リガンドB 7 . 1、B 7 . 2、またはO X - 4 0 Lの発現を明らかにすることはできなかった。

【図14】M U C - C D 標的化T細胞の第1世代および第2世代を用いた腹腔内処置後のO V - C A R 3 (M U C - C D) 腫瘍の根絶を示す図である。(A) 未処置のS C I D - B e i g eマウスにおけるO V - C A R 3 (M U C - C D) 腫瘍の腹腔内注射により、腹部膨満および結節性腹膜腫瘍が生じる。S C I D - B e i g eマウスに 3×10^6 個のO V - C A R 3 (M U C - C D) 細胞を腹腔内に注射した。O V - C A R 3 (M U C - C D) 腫瘍細胞の腹腔内注射後5週間目に、腫瘍を含まないマウス(左パネル)と比較して、膨満した腹部(中央パネル)によって証明されるように、マウスは腹水(a s c i t i e s)を生じた。死後の腹膜の可視化により、腹腔内の結節性腫瘍塊(矢印)が実証された(右パネル)。(B) 4 H 1 1 z + T細胞および4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞の腹腔内注射は、腫瘍進行を遅らせるか、または疾患を完全に根絶するかのいずれかである。M U C - C D 標的化T細胞の第1または第2世代で処置されたS C I D - B e i g eマウスのカプラン・マイヤー生存曲線。S C I D - B e i g eマウスに、1日目に 3×10^6 個のO V - C A R 3 (M U C - C D) 腫瘍細胞、続いて2日目に 3×10^7 個の4 H 1 1 z + T細胞または4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞を腹腔内に注入した。全ての未処置のマウスまたは対照1 9 z 1 + T細胞で処置されたマウスは、確立した腫瘍を発生し、50日目までに犠牲になった。対照的に、4 H 1 1 z + T細胞または4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞のいずれかで処置されたマウスの27%は、120日目まで、疾患の臨床的証拠を示さないままであった。* p = 0 . 0 1 (1 9 z 1と比較した4 H 1 1 z)、* * p = 0 . 0 0 2 3 (1 9 z 1と比較した4 H 1 1 - 2 8 z)、p = 0 . 6 3 (4 H 1 1 - 2 8 zと比較した4 H 1 1 z)。

【図15A】M U C - C D 標的化4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞は、全身性静脈内注入後、腹腔内のO V - C A R 3 (M U C - C D / G F P - F F L u c) 腫瘍へ首尾良く移動し、その結果、腹腔内に4 H 1 1 - 2 8 z + 処置された腫瘍担持マウスと比較して、同等に効率的な抗腫瘍効力を生じた。(A) 4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞を用いて腹腔内または静脈内に処置されたS C I D - B e i g eマウスのカプラン・マイヤー生存曲線。S C I D - B e i g eマウスに、 3×10^6 個のO V - C A R 3 (M U C - C D / G F P - F F L u c) 腫瘍細胞を腹腔内に注射し、続いて 3×10^7 個の4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞を静脈内かまたは腹腔内のいずれかに注入した。腫瘍根絶は、対照処置マウスと比較して、4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞の腹腔内または静脈内注入のどちらの後でも増強される。腹腔内および静脈内での4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞処置マウスの両方が、1 9 - 2 8 z + T細胞処置対照コホートと比較して、統計的に増強した生存を示した(それぞれ、* * * p < 0 . 0 0 0 1および* * p = 0 . 0 0 3 8)。逆に、腹腔内と静脈内の4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞

10

20

30

40

50

胞コホートの間での生存の差は、統計的に有意ではなかった ($p = 0.22$)。 (B) 代表的な対照 19 - 28 z + T細胞処置マウスにおける腫瘍進行のBLIと比較して、最終的進行性疾患を有する、腹腔内および静脈内での4H11 - 28 z + T細胞処置された代表的なマウスの、処置後の腫瘍進行のBLI。 (C) 全身性に注射されたCFSE染色4H11 - 28 z + T細胞は、進行性腹腔内OV - CAR3 (MUC - CD) 腫瘍へ移動する。進行性OV - CAR3 (MUC - CD) 腫瘍 (7日早く注射された) を有するSCID - Beigeマウスへの注入後1日目における静脈内注射されたCFSE標識19 - 28 z + 対照T細胞 (左パネル) および4H11 - 28 z + T細胞 (右パネル) の存在を、単一細胞OV - CAR3 (MUC - CD) 腫瘍懸濁物のFACS分析によって評価した場合、腹膜のOV - CAR3 (MUC - CD) 腫瘍内の4H11 - 28 z + T細胞の顕著な集団が明らかにされているが、対照19 - 28 z + T細胞は明らかにされない。

10

【図15B】MUC - CD標的化4H11 - 28 z + T細胞は、全身性静脈内注入後、腹腔内のOV - CAR3 (MUC - CD / GFP - FFLuc) 腫瘍へ首尾良く移動し、その結果、腹腔内に4H11 - 28 z + 処置された腫瘍担持マウスと比較して、同等に効率的な抗腫瘍効力を生じた。 (A) 4H11 - 28 z + T細胞を用いて腹腔内または静脈内に処置されたSCID - Beigeマウスのカプラン・マイヤー生存曲線。SCID - Beigeマウスに、 3×10^6 個のOV - CAR3 (MUC - CD / GFP - FFLuc) 腫瘍細胞を腹腔内に注射し、続いて 3×10^7 個の4H11 - 28 z + T細胞を静脈内かまたは腹腔内のいずれかに注入した。腫瘍根絶は、対照処置マウスと比較して、4H11 - 28 z + T細胞の腹腔内または静脈内注入のどちらの後でも増強される。腹腔内および静脈内での4H11 - 28 z + T細胞処置マウスの両方が、19 - 28 z + T細胞処置対照コホートと比較して、統計的に増強した生存を示した (それぞれ、*** $p < 0.001$ および** $p = 0.0038$)。逆に、腹腔内と静脈内の4H11 - 28 z + T細胞コホートの間での生存の差は、統計的に有意ではなかった ($p = 0.22$)。 (B) 代表的な対照19 - 28 z + T細胞処置マウスにおける腫瘍進行のBLIと比較して、最終的進行性疾患を有する、腹腔内および静脈内での4H11 - 28 z + T細胞処置された代表的なマウスの、処置後の腫瘍進行のBLI。 (C) 全身性に注射されたCFSE染色4H11 - 28 z + T細胞は、進行性腹腔内OV - CAR3 (MUC - CD) 腫瘍へ移動する。進行性OV - CAR3 (MUC - CD) 腫瘍 (7日早く注射された) を有するSCID - Beigeマウスへの注入後1日目における静脈内注射されたCFSE標識19 - 28 z + 対照T細胞 (左パネル) および4H11 - 28 z + T細胞 (右パネル) の存在を、単一細胞OV - CAR3 (MUC - CD) 腫瘍懸濁物のFACS分析によって評価した場合、腹膜のOV - CAR3 (MUC - CD) 腫瘍内の4H11 - 28 z + T細胞の顕著な集団が明らかにされているが、対照19 - 28 z + T細胞は明らかにされない。

20

30

【図15C】MUC - CD標的化4H11 - 28 z + T細胞は、全身性静脈内注入後、腹腔内のOV - CAR3 (MUC - CD / GFP - FFLuc) 腫瘍へ首尾良く移動し、その結果、腹腔内に4H11 - 28 z + 処置された腫瘍担持マウスと比較して、同等に効率的な抗腫瘍効力を生じた。 (A) 4H11 - 28 z + T細胞を用いて腹腔内または静脈内に処置されたSCID - Beigeマウスのカプラン・マイヤー生存曲線。SCID - Beigeマウスに、 3×10^6 個のOV - CAR3 (MUC - CD / GFP - FFLuc) 腫瘍細胞を腹腔内に注射し、続いて 3×10^7 個の4H11 - 28 z + T細胞を静脈内かまたは腹腔内のいずれかに注入した。腫瘍根絶は、対照処置マウスと比較して、4H11 - 28 z + T細胞の腹腔内または静脈内注入のどちらの後でも増強される。腹腔内および静脈内での4H11 - 28 z + T細胞処置マウスの両方が、19 - 28 z + T細胞処置対照コホートと比較して、統計的に増強した生存を示した (それぞれ、*** $p < 0.001$ および** $p = 0.0038$)。逆に、腹腔内と静脈内の4H11 - 28 z + T細胞コホートの間での生存の差は、統計的に有意ではなかった ($p = 0.22$)。 (B) 代表的な対照19 - 28 z + T細胞処置マウスにおける腫瘍進行のBLIと比較して、最終的進行性疾患を有する、腹腔内および静脈内での4H11 - 28 z + T細胞処置された代表的なマウスの、処置後の腫瘍進行のBLI。 (C) 全身性に注射されたCFSE染色4

40

50

H 1 1 - 2 8 z + T細胞は、進行性腹腔内OV - CAR (MUC - CD) 腫瘍へ移動する。進行性OV - CAR 3 (MUC - CD) 腫瘍 (7日早く注射された) を有するSCID - Beigeマウスへの注入後1日目における静脈内注射されたCFSE標識19 - 28 z + 対照T細胞 (左パネル) および4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞 (右パネル) の存在を、単一細胞OV - CAR 3 (MUC - CD) 腫瘍懸濁物のFACS分析によって評価した場合、腹膜のOV - CAR (MUC - CD) 腫瘍内の4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞の顕著な集団が明らかにされているが、対照19 - 28 z + T細胞は明らかにされない。

【図16A】SCID - Beigeマウスにおける進行性OV - CAR 3 (MUC - CD) 腫瘍の、4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞の腹腔内注入による根絶を示す図である。SCID - Beigeマウスに、 3×10^7 個の4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞での腹腔内処置の7日前に、 3×10^6 個のOV - CAR 3 (MUC - CD / GFP - FFLuc) 腫瘍細胞を腹腔内に注射した。(A) 代表的な19 - 28 z + T細胞処置対照マウスと比較して、再発した疾患 (中央の列) かまたは根絶した疾患 (下の列) のいずれかを有する、4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞処置マウスのBLI。(B) 4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞で腹腔内に処置された、進行性OV - CAR 3 (MUC - CD / GFP - FFLuc) 腫瘍を担持するSCID - Beigeマウスのカプラン・マイヤー生存曲線。全ての4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞処置マウスは、対照19 - 28 z + T細胞処置マウスと比較して、生存が増強し (* $p = 0.0011$)、120日目において25%の全体的な長期生存を有することが実証された。

【図16B】SCID - Beigeマウスにおける進行性OV - CAR 3 (MUC - CD) 腫瘍の、4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞の腹腔内注入による根絶を示す図である。SCID - Beigeマウスに、 3×10^7 個の4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞での腹腔内処置の7日前に、 3×10^6 個のOV - CAR 3 (MUC - CD / GFP - FFLuc) 腫瘍細胞を腹腔内に注射した。(A) 代表的な19 - 28 z + T細胞処置対照マウスと比較して、再発した疾患 (中央の列) かまたは根絶した疾患 (下の列) のいずれかを有する、4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞処置マウスのBLI。(B) 4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞で腹腔内に処置された、進行性OV - CAR 3 (MUC - CD / GFP - FFLuc) 腫瘍を担持するSCID - Beigeマウスのカプラン・マイヤー生存曲線。全ての4 H 1 1 - 2 8 z + T細胞処置マウスは、対照19 - 28 z + T細胞処置マウスと比較して、生存が増強し (* $p = 0.0011$)、120日目において25%の全体的な長期生存を有することが実証された。

【図17】CD8リーダー配列、CD3 鎖細胞内ドメイン配列、(G4S)3 セリン - グリシンリンカー配列、CD8膜貫通ドメイン配列、およびCD28膜貫通 + 細胞内ドメイン (- 停止) 配列を示す図である。

【図18 - 1】SFG__4H11z配列を示す図である。

【図18 - 2】SFG__4H11z配列を示す図である。

【図18 - 3】SFG__4H11z配列を示す図である。

【図18 - 4】SFG__4H11z配列を示す図である。

【図18 - 5】SFG__4H11z配列を示す図である。

【図19 - 1】SFG - 4H11 - 28z配列を示す図である。

【図19 - 2】SFG - 4H11 - 28z配列を示す図である。

【図19 - 3】SFG - 4H11 - 28z配列を示す図である。

【図19 - 4】SFG - 4H11 - 28z配列を示す図である。

【図19 - 5】SFG - 4H11 - 28z配列を示す図である。

【図19 - 6】SFG - 4H11 - 28z配列を示す図である。

【図20A】(A) マウスMUC16 - CDペプチド1 (配列番号21)、マウス第1のシステインループペプチド2 (配列番号22)、およびマウス第2のシステインループペプチド3 (配列番号23)。(B) マウスMUC16アミノ酸配列 (配列番号24) およびヒトMUC16アミノ酸配列 (配列番号25) のアラインメント。KLHとのより良い結合体化のために、ペプチド1およびペプチド3のN末端においてペプチド配列にシステ

10

20

30

40

50

インを付加した。

【図20B】(A)マウスMUC16-CDペプチド1(配列番号21)、マウス第1のシステインループペプチド2(配列番号22)、およびマウス第2のシステインループペプチド3(配列番号23)。(B)マウスMUC16アミノ酸配列(配列番号24)およびヒトMUC16アミノ酸配列(配列番号25)のアラインメント。KLHとのより良い結合体化のために、ペプチド1およびペプチド3のN末端においてペプチド配列にシステインを付加した。

【図21】1:10希釈のマウスMUC16モノクローナルの一次上清を用いてのID8抽出物を示す図である。

【図22】1:10希釈のマウスMUC16モノクローナルの一次上清を用いてのBR5-FVB1抽出物を示す図である。

【図23-1】ID8細胞抽出物に対する38個のハムスターのモノクローナル抗体上清を示すウェスタンブロットを示す図である。

【図23-2】ID8細胞抽出物に対する38個のハムスターのモノクローナル抗体上清を示すウェスタンブロットを示す図である。

【図24】(A)12B10-3G10-V_Hをコードするヌクレオチド配列(配列番号26)、(B)12B10-3G10-V_Hアミノ酸配列(配列番号27)、(C)12B10-3G10-V_Lをコードするヌクレオチド配列(配列番号28)(V_Lがクローニングのためのプライマーによって付加された任意選択のNotI部位を有することに留意されたい)、および(D)12B10-3G10-V_Lアミノ酸配列(配列番号29)。

【図25】ID8細胞系(マウス)、OVCA8細胞系(ヒト)、およびBR5-FVB1細胞系(マウス)に対して精製12B10-3G10モノクローナル抗体を用いたFACS分析を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

定義

本発明の理解を促すために、いくつかの用語を下記に定義する。

【0028】

本明細書に用いられる場合、用語「精製された」、「単離された」、およびその文法的相当語句は、非限定的に、10%から100%まで、20%から100%まで、30%から100%まで、40%から100%まで、50%から100%まで、60%から100%まで、70%から100%まで、80%から100%まで、および90%から100%までなどの、5%から100%までの任意の数値のパーセンテージの低減を含む、試料からの少なくとも1つの望ましくない成分(例えば、細胞、タンパク質、核酸配列、糖質など)の量の低減を指す。したがって、精製は、結果として、望ましい成分(細胞、タンパク質、核酸配列、糖質など)の量の「富化」、すなわち、増加を生じる。

【0029】

用語「抗体」は、免疫グロブリン(例えば、IgG、IgM、IgA、IgE、IgDなど)を指す。各抗体の基本的機能単位は、免疫グロブリン(Ig)モノマー(1つの免疫グロブリン(「Ig」)単位のみを含有する)である。ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびキメラ抗体はこの定義内に含まれる。

【0030】

抗体の変換部はそれの「Vドメイン」(「可変領域」とも呼ばれる)であり、定常部は、、、、、、、およびμ定常領域などのそれの「Cドメイン」(「定常領域」とも呼ばれる)である。「可変ドメイン」はまた、「Fv領域」とも呼ばれ、抗原への結合に最も重要な領域である。より具体的には、軽鎖(V_L)および重鎖(V_H)上にそれぞれ3つある可変ループが、抗原への結合に関与する。これらのループは、「相補性決定領域」、「CDR」、および「イディオタイプ」と呼ばれる。

【0031】

10

20

30

40

50

抗体の免疫グロブリン (I g) モノマーは、ジスルフィド架橋によって連結された 4 つのポリペプチド鎖： 2 つの軽鎖および 2 つの重鎖を含有する「 Y 」形の分子である。

【 0 0 3 2 】

軽鎖は、 () かカッパ () のいずれかとして分類される。軽鎖は、 2 つの連続的なドメイン： 1 つの定常ドメイン (「 C _L 」) および 1 つの変域ドメイン (「 V _L 」) を有する。変域ドメイン、 V _L は、抗体の各型において異なり、特定の抗原と結合する分子の活性部分である。軽鎖のおよその長さは、 2 1 1 ~ 2 1 7 個のアミノ酸である。

【 0 0 3 3 】

各重鎖は、 2 つの領域である、定常領域および変域領域を有する。 、 、 、 および μ と表される 5 つの型の哺乳類 I g 重鎖がある。存在する重鎖の型は、抗体のクラスを定義する；これらの鎖は、 I g A 抗体、 I g D 抗体、 I g E 抗体、 I g G 抗体、および I g M 抗体に、それぞれ見出される。別個の重鎖は、サイズおよび組成が異なる； および は約 4 5 0 個のアミノ酸を含有するが、 μ および は約 5 5 0 個のアミノ酸を有する。各重鎖は、 2 つの領域である、定常領域 (「 C _H 」) および変域領域 (「 V _H 」) を有する。定常領域 (C _H) は、同じアイソタイプの全ての抗体において同一であるが、異なるアイソタイプの抗体においては異なる。重鎖 、 、 および は、 3 つの直列型 (一列になった) I g ドメイン、および可動性を加えるためのヒンジ領域で構成される定常領域を有する。重鎖 μ および は、 4 つの免疫グロブリンドメインで構成される定常領域を有する。重鎖の変域領域 (V _H) は、異なる B 細胞によって産生される抗体において異なるが、単一の B 細胞または B 細胞クローンによって産生される全ての抗体については同じである。各重鎖の変域領域は、約 1 1 0 アミノ酸長である。

【 0 0 3 4 】

2 つの分子の結合 (例えば、抗体と抗原など) に関する場合の用語「特異的に結合する」および「特異的結合」は、その 2 つの分子の一方または両方における特定の構造の存在に依存する 2 つの分子の相互作用を指す。例えば、抗体が、分子上のエピトープ「 A 」に特異的である場合には、標識「 A 」およびその抗体を含有する反応物にエピトープ A を含有するタンパク質 (または遊離の非標識 A) が存在することにより、抗体に結合する標識 A の量を低下させる。

【 0 0 3 5 】

第 1 の分子 (例えば、抗体、ポリペプチド、糖タンパク質、核酸配列など) および第 2 の分子 (例えば、抗原、ポリペプチド、糖タンパク質、核酸配列など) との間の相互作用に関する場合の用語「結合する能力がある」とは、第 1 の分子が、適切な塩濃度、ならびに適切な温度および p H の存在下で第 2 の分子に結合することを意味する。分子を結合するための条件は、日常的方法および / または市販の方法を用いて決定されてもよい。

【 0 0 3 6 】

分子に関する場合の用語「抗原」、「免疫原」、「抗原性の」、「免疫原性の」、「抗原活性がある」、「免疫性の」、および「免疫学的に活性がある」は、特定の体液性免疫応答 (可溶性抗体応答を誘発することを含む) および / または細胞媒介性免疫応答 (C T L 応答を誘発することを含む) を誘導する能力がある任意の物質を指す。抗原性ペプチドは、好ましくは、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、およびより好ましくは、少なくとも 1 0 個のアミノ酸を含有する。抗体産生を誘発するために、一実施形態において、抗原は、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) に結合体化されてもよく、またはグルタチオン - S - 転移酵素 (G S T) に融合されてもよい。

【 0 0 3 7 】

抗体に結合する抗原に関する場合の「同種抗原 (c o g n a t e a n t i g e n) 」とは、その抗体に特異的に結合する能力がある抗原を指す。

【 0 0 3 8 】

一実施形態において、抗原はエピトープを含む。用語「エピトープ」および「抗原決定基」とは、分子相補性の結果として抗体の結合部位または T 細胞受容体と相互作用する、

10

20

30

40

50

抗原上の構造物を指す。エピトープは、抗体への結合について、それが由来する無傷の抗原と競合し得る。

【0039】

本明細書で用いられる場合、核酸配列またはタンパク質配列に関する場合の用語「部分」および「断片」とは、サイズが、それぞれ、2個の連続したヌクレオチドおよびアミノ酸から、それぞれ、1個のヌクレオチドおよび1個のアミノ酸を引いた全配列までの範囲であり得るその配列の一片を指す。

【0040】

本発明の方法から恩恵を受け得る「被験体」には、任意の多細胞動物、好ましくは哺乳類が挙げられる。哺乳類の被験体には、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ヒツジ、ウシ、反芻動物、ウサギ、ブタ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、鳥類などが挙げられる。したがって、哺乳類の被験体は、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、フェレット、およびチンチラによって例示される。本発明の組成物および方法はまた、疾患の「1つまたは複数の症状を軽減することを必要とする」、例えば、癌転移を低下させることを必要とし、および/または癌の1つもしくは複数の症状を軽減することを必要とする被験体にとって有用であり、その被験体には、疾患の1つもしくは複数の症状を示し、および/またはその症状を示すリスクがある被験体が挙げられる。例えば、被験体は、家族歴、遺伝因子、環境因子などに基づくリスクがあり得る。この用語は、疾患の動物モデルを含む。したがって、疾患を軽減し、および/または疾患の1つもしくは複数の症状を軽減することを必要とする被験体に、（疾患を軽減し、および/または疾患の1つもしくは複数の症状を軽減する）組成物を投与することは、組成物の予防的（すなわち、疾患および/または疾患の1つもしくは複数の症状が検出できる前の）投与および/または組成物の治療的（すなわち、疾患および/または疾患の1つもしくは複数の症状が検出できた後の）投与を含む。本発明の組成物および方法はまた、疾患に罹る素因がある、および/または疾患の1つもしくは複数の症状を現す素因がある被験体を指す、疾患（癌など）の「リスクがある」被験体にとって有用である。この素因は、遺伝的（例えば、遺伝性障害などの疾患の1つまたは複数の症状を現す特定の遺伝的傾向など）であってもよいし、または他の因子（例えば、環境条件、環境に存在する、発癌物質を含む有害な化合物への曝露など）によるものであってもよい。「リスクがある」被験体という用語は、「疾患を患う」被験体、すなわち、疾患の1つまたは複数の症状を経験中である被験体を含む。本発明がいかなる特定の徴候または症状にも限定されないものとする。したがって、本発明は、不顕性症状から末期の疾患まで任意の範囲の疾患を経験中である被験体であって、疾患に関連した徴候（例えば、徴候および症状）の少なくとも1つを示す被験体を包含する。

【0041】

「癌細胞」とは、以前に記載されているように（Pitotら、Fundamentals of Oncology、15-28（1978））、多段階の新生物進行の初期、中間期、または進行期に至る細胞を指す。これには、「前癌細胞」（すなわち、「過形成細胞および異形成細胞」）を含む、新生物進行の初期、中間期、および進行期における細胞、ならびに異形成細胞の新生物進行の進行期における新生物細胞が挙げられる。

【0042】

「転移性」癌細胞とは、原発癌部位（すなわち、癌細胞が正常細胞、過形成細胞、または異形成細胞から最初に形成された場所）から原発部位以外の部位へ移動している（translocated）癌細胞を指し、その原発部位以外の部位で、移動した癌細胞が留まり、増殖する。

【0043】

「癌」とは、卵巣癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、子宮頸癌、膵臓癌、結腸癌、胃癌、食道癌、口腔癌、舌癌、歯肉癌、皮膚癌（例えば、黒色腫、基底細胞癌腫、カポジ肉腫など）、筋肉癌、心臓癌、肝臓癌、気管支癌、軟骨癌、骨癌、精巣癌、腎臓癌、子宮内膜癌、子宮癌、膀胱癌、骨髄癌、リンパ腫癌、脾臓癌、胸腺癌、甲状腺癌、脳癌、ニューロン癌、中皮腫、胆嚢癌、眼癌（例えば、角膜の癌、ブドウ膜の癌、脈絡膜の癌、黄斑の癌、硝子

10

20

30

40

50

体液癌など)、関節癌(滑膜癌など)、神経膠芽腫、リンパ腫、および白血病などの、転移性であっても、転移性でなくてもよい複数の癌細胞を指す。

【0044】

本明細書で用いられる場合、「試料」および「検体」は、生物学的源、ならびに生体試料または環境試料と接触する試料採取デバイス(例えば、スワブ)から得られ、および/または由来する任意の組成物を含むように、それらの最も広い意味で用いられる。「生体試料」には、体液(尿、血液、血漿、糞便、脳脊髄液(CSF)、精液、痰、および唾液など)ならびに固形組織を含む、被験体から得られるものが挙げられる。生体試料にはまた、細胞(例えば、細胞系、組織から単離された細胞(単離された細胞は、組織からの単離後、培養されていても、培養されていなくてもよい)、組織学的分析および/または免疫組織化学的分析のために固定された細胞などの固定細胞)、組織(生検材料など)、細胞抽出物、組織抽出物、ならびに細胞および/または組織から単離された核酸(例えば、DNAおよびRNA)などが挙げられる。これらの例は例示であり、本発明に適用可能な試料型を限定するものとして解釈されるべきではない。

10

【0045】

関心対象となる細胞(癌細胞など)による「MUC16の過剰発現」とは、対照細胞(非癌性細胞、正常細胞など)と比較して、関心対象となる細胞によって発現するMUC16タンパク質および/またはmRNAのより高いレベルを指す。

【0046】

細胞に関する場合の「内部に取り込む」とは、細胞外媒体から細胞膜および/または細胞質へ入ることを指す。

20

【0047】

配列(例えば、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列)に関する場合の「グリコシル化された」とは、1つ以上のサッカライドに共有結合により連結されている配列を指す。

【0048】

「薬学的」組成物および「生理学的に耐えられ得る」組成物とは、薬学的分子、すなわち、被験体へまたは被験体上へ投与する能力があり、かつ被験体に投与された場合、例えば、有害反応またはアレルギー反応、めまい、胃の不調、毒性などの望ましくない作用を実質的に生じない分子を含有する組成物を指す。好ましくはまた、薬学的分子は、本発明の組成物の活性を実質的に低下させない。薬学的分子には、「希釈剤」(すなわち、「キャリア」)分子および賦形剤が挙げられる。

30

【0049】

分子の「免疫原的有効」量および「抗原的有効」量とは、特定の体液性免疫応答((可溶性抗体応答を誘発することを含む))および/または細胞媒介性免疫応答(細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答を誘発することを含む)を誘導する能力がある分子の量を、交換可能に指す。

【0050】

疾患を「処置する」とは、疾患の1つまたは複数の症状(客観的、主観的、病理学的、臨床的、不顕性など)を軽減することを指す。

【0051】

40

第2の試料に対して(または第2の被験体に対して)、第1の試料における(または第1の被験体における)任意の分子(例えば、アミノ酸配列および核酸配列、抗体など)、細胞、および/または現象(例えば、疾患症状、分子への結合、2つの分子の結合の特異性、2つの分子の結合の親和性、癌に対する特異性、癌に対する感度、結合の親和性、酵素活性など)のレベルに関する場合の用語「低下させる」、「阻害する」、「減弱させる」、「抑制する」、「減少させる」、および文法的相当語句(「より低い」、「より小さい」などを含む)とは、第1の試料における(または第1の被験体における)分子、細胞、および/または現象の量が、第2の試料において(または第2の被験体において)より、任意の技術分野容認の統計的解析方法を用いて統計的に有意である任意の量だけ低いことを意味する。一実施形態において、第1の試料における(または第1の被験体における

50

）分子、細胞、および／または現象の量が、第２の試料における（または第２の被験体における）同じ分子、細胞、および／または現象の量より、少なくとも１０％低く、少なくとも２５％低く、少なくとも５０％低く、少なくとも７５％低く、および／または少なくとも９０％低い。別の実施形態において、第１の試料における（または第１の被験体における）分子、細胞、および／または現象の量が、第２の試料における（または第２の被験体における）同じ分子、細胞、および／または現象の量より、非限定的に、１０％から１００％まで、２０％から１００％まで、３０％から１００％まで、４０％から１００％まで、５０％から１００％まで、６０％から１００％まで、７０％から１００％まで、８０％から１００％まで、および９０％から１００％まで低いなどの、５％から１００％までの任意の数値のパーセンテージだけ低い。一実施形態において、第１の被験体は、本発明の組成物および／または方法を用いて操作されている被験体によって例示されるが、それに限定されない。さらなる実施形態において、第２の被験体は、本発明の組成物および／または方法を用いて操作されていない被験体によって例示されるが、それに限定されない。代替の実施形態において、第２の被験体は、第１の被験体と比較して、異なる投与量で、および／または異なる持続期間で、および／または異なる投与経路を介して、本発明の組成物および／または方法を用いて操作されている被験体によって例示されるが、それに限定されない。一実施形態において、第１の被験体と第２の被験体は、本発明の組成物および／または方法の異なる投与計画（例えば、投与量、持続期間、投与経路など）の効果が１つの個体において決定されるように求められる場合など、同じ個体であってもよい。別の実施形態において、第１の被験体と第２の被験体は、臨床試験に参加している１つの個体と入院中の別の個体への本発明の組成物および／または方法の効果を比較する場合など、異なる個体であってもよい。

【００５２】

第２の試料に対して（または第２の被験体に対して）、第１の試料における（または第１の被験体における）任意の分子（例えば、アミノ酸配列および核酸配列、抗体など）、細胞、および／または現象（例えば、疾患症状、分子への結合、２つの分子の結合の特異性、２つの分子の結合の親和性、癌に対する特異性、癌に対する感度、結合の親和性、酵素活性など）のレベルに関する場合の用語「増加させる」、「上昇させる」、「上げる」、および文法的相当語句（「より高い」、「より大きい」などを含む）とは、第１の試料における（または第１の被験体における）分子、細胞、および／または現象の量が、第２の試料において（または第２の被験体において）より、任意の技術分野容認の統計的解析方法を用いて統計的に有意である任意の量だけ高いことを意味する。一実施形態において、第１の試料における（または第１の被験体における）分子、細胞、および／または現象の量が、第２の試料における（または第２の被験体における）同じ分子、細胞、および／または現象の量より、少なくとも１０％多く、少なくとも２５％多く、少なくとも５０％多く、少なくとも７５％多く、および／または少なくとも９０％多い。これには、非限定的に、第２の試料における（または第２の被験体における）同じ分子、細胞、および／または現象の量より、少なくとも１０％多く、少なくとも１５％多く、少なくとも２０％多く、少なくとも２５％多く、少なくとも３０％多く、少なくとも３５％多く、少なくとも４０％多く、少なくとも４５％多く、少なくとも５０％多く、少なくとも５５％多く、少なくとも６０％多く、少なくとも６５％多く、少なくとも７０％多く、少なくとも７５％多く、少なくとも８０％多く、少なくとも８５％多く、少なくとも９０％多く、および／または少なくとも９５％多い、第１の試料における（または第１の被験体における）分子、細胞、および／または現象の量が挙げられる。一実施形態において、第１の被験体は、本発明の組成物および／または方法を用いて操作されている被験体によって例示されるが、それに限定されない。さらなる実施形態において、第２の被験体は、本発明の組成物および／または方法を用いて操作されていない被験体によって例示されるが、それに限定されない。代替の実施形態において、第２の被験体は、第１の被験体と比較して、異なる投与量で、および／または異なる持続期間で、および／または異なる投与経路を介して、本発明の組成物および／または方法を用いて操作されている被験体によって例示されるが、

10

20

30

40

50

それに限定されない。一実施形態において、第1の被験体と第2の被験体は、本発明の組成物および/または方法の異なる投与計画（例えば、投与量、持続期間、投与経路など）の効果が1つの個体において決定されるように求められる場合など、同じ個体であってもよい。別の実施形態において、第1の被験体と第2の被験体は、臨床試験に参加している1つの個体と入院中の別の個体への本発明の組成物および/または方法の効果を比較する場合など、異なる個体であってもよい。

【0053】

任意の分子および/または現象のレベルに関する場合の用語「変化させる」および「変更する」とは、増加または減少を指す。

【0054】

本明細書における任意の数値的な範囲への言及は、その範囲によって包含されるそれぞれの数値（小数値および整数を含む）を含む。例として、非限定的に、本明細書における「少なくとも50」の範囲への言及は、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60などの整数および小数値50.1、50.2、50.3、50.4、50.5、50.6、50.7、50.8、50.9などを含む。さらなる例において、本明細書における「50未満」の範囲への言及は、整数49、48、47、46、45、44、43、42、41、40など、および小数値49.9、49.8、49.7、49.6、49.5、49.4、49.3、49.2、49.1、49.0などを含む。なお別の例において、本明細書における「5から10まで」の範囲への言及は、5、6、7、8、9、および10の各整数、ならびに5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9などの各小数値を含む。

【0055】

発明の説明

本発明は、ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片であって、そのポリペプチドが、a) MUC16外部ドメインポリペプチド、b) MUC16細胞質ドメインポリペプチド、およびc) システインループポリペプチドを含有するMUC16細胞外ドメインポリペプチドから選択される、抗体およびその抗原結合断片を提供する。本発明の抗体およびそれらを含有する組成物は、癌などのMUC16が過剰発現している疾患についての診断的および治療的適用に有用である。

【0056】

合成ペプチドを用いて、本発明者らは、推定の切断部位に対して近位にある、細胞によって保持されるMUC16のカルボキシ末端部分に対する新規の特異的抗体を産生させた。これらの抗体を、蛍光活性化細胞ソーティング分析、酵素結合免疫アッセイ、ウェスタンブロット分析、および免疫組織化学検査を用いて特徴づけた。選択されたモノクローナル抗体のそれぞれは、組換えGST-MUC16^{C114}タンパク質、およびMUC16を形質移入したSKOV3細胞系に対して反応性であった。3つの抗体、4H11、9C9、および4A5抗体は、形質移入したSKOV3細胞のウェスタンブロット分析および飽和結合研究によって高い親和性を実証し、抗体の内部移行を示した。新規抗体4H11に関して免疫組織化学的の陽性であることは、OC125と類似していたが、重要な違いがあり、それには、小葉乳癌およびわずかなパーセンテージのOC125陰性卵巣癌におけるびまん性の陽性が挙げられ、それは強くかつびまん性の4H11抗体結合を示した。

【0057】

本発明の組成物および方法は、診断的および治療的適用に、加えて、膜受容体輸送および細胞内事象などの生物学的研究に有用である。診断的適用には、例えば、免疫組織化学検査、X線画像化、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)、ウェスタンブロット、および/または免疫沈降検出を用いる癌の検出が挙げられる。

【0058】

本発明はさらに、(A) MUC16、(B) 先行技術の抗体、(C) 本発明の抗体、(

10

20

30

40

50

D) ハイブリドーマ細胞系、(E) 細胞傷害性物質および/またはプロドラッグに連結された本発明の抗体のコンジュゲート、(F) Muc 16 部分の検出および診断的適用、ならびに(G) 治療的適用の項目下で記載されている。

【0059】

A. MUC 16

「MUC 16」、「MUC - 16」、および「ムチン 16」とは交換可能に、連結型ムチンのファミリーの一部である I 型膜タンパク質を指す。Muc 16 の概略図は図 10 にあり、例示的なヒト Muc 16 アミノ酸配列(配列番号 13)は図 9A に示されている。マウス MUC 16 アミノ酸配列(配列番号 24)とヒト MUC 16 アミノ酸配列(配列番号 25)のアラインメントは図 20B に示されている。用語「1 型タンパク質」とは、細胞、およびウイルスなどの脂質二重層に少なくとも部分的に埋め込まれており、かつ細胞、およびウイルスなどの脂質二重層に埋め込まれた膜貫通ドメイン(TM)配列を含有する「膜タンパク質」を指す。TM ドメインの NH₂ 末端側のそのタンパク質の部分は、膜の外部側で露出しており、COOH 末端部分は細胞質側で露出している。

【0060】

最近、MUC 16 / CA 125 をコードする cDNA の配列が 2001 年に Yin および Lloyd によって記載され、2002 年に O'Brien によって完成された(10~12)。完全な MUC 16 タンパク質は、潜在的リン酸化部位を有する細胞質側尾部、膜貫通ドメイン、および見かけ上の切断部位に対して近位にある外部ドメインからなる様々な構成要素を有する。切断部位に対して遠位においては、遊離される外部のドメインが、それぞれが多くの潜在的グリコシル化部位を有する、156 個のアミノ酸の 16~20 個のタンデムリピートを含有する(11)。全体の反復配列構造(図 10)は、哺乳類にわたってよく保存されているが、その反復配列は、正確なアミノ酸組成において完全に同一というわけではない。

【0061】

MUC 16 タンパク質は、MUC 1 と MUC 4 の両方を含む、連結型ムチンのファミリーの一部である(13)。MUC 1 は、様々な組織に存在し、カテニン経路を介してシグナル伝達し、EGF 受容体と相互作用するようであり、薬物抵抗性を媒介し、そして癌遺伝子として作用することができる(14~17)。MUC 4 タンパク質もまた、様々な組織に発現しているが、胃腸管(gastrointestinal track)の新生物によく見られる(18~20)。対照的に、CA 125 抗原は、その分布がより限定されており、おもに、婦人科系の組織に存在し、ミューラー管新生物において過剰発現する(21)。しかしながら、OC 125 抗体によって認識される CA 125 抗原は、より大きい MUC 16 タンパク質のタンデムリピート領域に発現する、高度にグリコシル化された抗原である。この糖タンパク質は、典型的には、MUC 16 ペプチドバックボーンの細胞外ドメインにおける推定の切断部位から脱落する。

【0062】

したがって、「MUC 16」タンパク質は、(a)「細胞質ドメイン」、(b)「膜貫通ドメイン」、および(c)「細胞外ドメイン」を含有する。MUC 16 細胞外ドメインは、タンデムリピートの非グリコシル化外部ドメインと大きなグリコシル化外部ドメインとの間に切断部位を含有する。

【0063】

用語「細胞質ドメイン」、「細胞質側尾部」、および「CT」は、細胞、およびウイルスなどの脂質二重層の細胞質側にあるタンパク質配列およびその部分を指すように交換可能に用いられる。タンパク質の CT を決定するための方法は当技術分野において知られている(Elofsson ら、(2007) Annu. Rev. Biochem. 76: 125-140; Bernsel ら、(2005) Protein Science 14: 1723-1728)。

【0064】

用語「膜貫通ドメイン」および「TM」は、細胞、およびウイルスなどの脂質二重層に

10

20

30

40

50

かかるタンパク質配列およびその部分を指すように交換可能に用いられる。タンパク質の T M を決定するための方法は当技術分野において知られている (E l o f s s o n ら、(2 0 0 7) A n n u . R e v . B i o c h e m . 7 6 : 1 2 5 - 1 4 0 ; B e r n s e l ら、(2 0 0 5) P r o t e i n S c i e n c e 1 4 : 1 7 2 3 - 1 7 2 8)。

【 0 0 6 5 】

用語「外部ドメイン」および「細胞外ドメイン」は、膜タンパク質に関する場合、細胞、およびウイルスなどの脂質二重層の細胞外側で露出しているそのタンパク質の部分を指すように交換可能に用いられる。タンパク質の外部ドメインを決定するための方法は当技術分野において知られている (S i n g e r (1 9 9 0) A n n u . R e v . C e l l B i o l . 6 : 2 4 7 - 2 9 6、および H i g h ら、(1 9 9 3) J . C e l l B i o l . 1 2 1 : 7 4 3 - 7 5 0、および M c V e c t o r s o f t w a r e、O x f o r d M o l e c u l a r)。

10

【 0 0 6 6 】

図 9 の例示的な M u c 1 6 は、(a) 細胞内シグナル伝達機構と相互作用する、アミノ酸 1 4 4 7 6 から 1 4 5 0 7 まで: v t t r r r k k e g e y n v q q q c p g y y q s h l d l e d l q (配列番号 1 6) の「MUC 1 6 細胞質ドメイン」; (b) 原形質膜にかかる、アミノ酸 1 4 4 5 2 から 1 4 4 7 5 まで: f w a v i l i g l a g l l g v i t c l i c g v l (配列番号 1 4) の「MUC 1 6 膜貫通ドメイン」; および (c) タンデムリピートの非グリコシル化外部ドメインと大きなグリコシル化外部ドメインとの間に切断部位を含有する、アミノ酸 1 ~ 1 4 3 9 2 (配列番号 1 3) の「MUC 1 6 細胞外ドメイン」を含有する。「MUC 1 6 外部ドメイン」は、図 9 A の配列番号 1 3 のアミノ酸 1 4 3 9 4 から 1 4 4 5 1 まで: n f s p l a r r v d r v a i y e e f l r m t r n g t q l q n f t l d r s s v l v d g y s p n r n e p l t g n s d l p (配列番号 1 7) によって例示される。

20

【 0 0 6 7 】

例示的な MUC 1 6 外部ドメインは、ポリペプチド 1 (配列番号 1 3 のアミノ酸 1 4 3 9 4 から 1 4 4 1 0 までである、n f s p l a r r v d r v a i y e e (配列番号 0 1))、およびポリペプチド 2 (配列番号 1 3 のアミノ酸 1 4 4 2 5 から 1 4 4 4 2 までである、t l d r s s v l v d g y s p n r n e (配列番号 0 2)) の両方を含有し、それらに対して、本発明の例示的な抗体が産生された。ポリペプチド 3 : c g v l v t t r r r k k e g e y n v q q q (配列番号 0 3) は、配列番号 1 3 のアミノ酸 1 4 4 7 2 から 1 4 4 9 2 までであり、膜貫通ドメイン部分 (c g v l) および細胞質ドメイン部分 (v t t r r r k k e g e y n v q q q (配列番号 1 8)) の両方を含有する。したがって、C G V L は、それが膜貫通ドメインの一部であるので、配列番号 0 3 において任意選択である。

30

【 0 0 6 8 】

ポリペプチド 4 (k s y f s d c q v s t f r s v p n r h h t g v d s l c n f s p l (配列番号 1 5)) は、M u c 1 6 細胞外ドメインの非グリコシル化部分に位置し、配列番号 1 3 のアミノ酸 1 4 3 6 7 から 1 4 3 9 8 までであり、システインループポリペプチド: c q v s t f r s v p n r h h t g v d s l c (配列番号 1 3) を含有する。

40

【 0 0 6 9 】

B . 先行技術の抗体

MUC 1 6 / C A 1 2 5 抗原の発現は、長い間、婦人科系の組織と関連づけられてきた。「C A 1 2 5」、「C A - 1 2 5」、「切断された C A 1 2 5」、および「切断された C A - 1 2 5」は交換可能に、切断部位に対して遠位にある、連結型ムチン MUC 1 6 のグリコシル化外部ドメインを指す (P a y n e ら、米国特許第 7 , 2 0 2 , 3 4 6 号)。この遊離される外部のドメインは、それぞれが潜在的グリコシル化部位を有する、1 5 6 個のアミノ酸の 1 6 ~ 2 0 個のタンデムリピートを含有する。1 9 個のアミノ酸の見かけのシステインに基づいたジスルフィドループが、全ての反復配列に存在し、N 末端は、高

50

度にO-グリコシル化されているヘアブラシ構造を含有する(11)。推定サイズは、タンパク質部分について2.5MDであり、糖質を加えると、これは5MDまで増加し得る(10、26)。

【0070】

CA125は、一般的なスクリーニングツールとして用いられるのに十分な感度も特異性もないが、卵巣癌腫を有する患者をモニターするために日常的に用いられている。CA125を測定するために用いられる試験は、診断を目的として免疫組織化学的染色が日常的に実施されているように、抗体に基づいた検出方法である。MUC16に対する26個の抗体のエピトープ特異性は、International Society of Oncodevelopmental Biology and Medicine (ISOBM) TD-1 Workshopからの最初のレポートにおいて研究されており、22個の抗体の免疫組織化学への適用が、TD-1 Workshopからの2番目のレポートにおいて報告された(7、21)。既存の抗体は、OC125様、M11様、またはOV197様として分類され、既知の抗体の全てが、推定の切断部位に対して遠位にある、連結型ムチンMUC16の外部のドメイン内の反復するグリコシル化エレメント中のCA125エピトープを認識した。

【0071】

OC125を含むMUC16反応性抗体の大部分は、もっぱらその分子の切断部分に存在するグリコシル化依存性抗原と反応するため、MUC16発現の真の分布は知られていない(21)。切断およびCA125遊離後の残留MUC16タンパク質断片の運命を追跡するのに利用可能な抗体は現在、存在しない。

【0072】

C. 本発明の抗体

ヒトMUC16の生物学的特徴をより良く探求するために、本発明者らは、推定の切断部位に対して近位にある、MUC16-カルボキシ末端の細胞外部分に対するモノクローナル抗体、ならびに内部の細胞質ドメインに対する1つのモノクローナル抗体を誘導した。先行の抗体とは対照的に、これらは、MUC16のペプチドバックボーンに対して誘導され、複合糖タンパク質エピトープに向けられていない。これらのエピトープは、切断部位に対して近位にあるので、それらは、循環中に見出される可能性が低く、診断方法および治療的介入に新規な標的を提供する。本明細書におけるデータは、MUC16ペプチドバックボーンに対して発生した例示的な抗体の同定および特徴づけを実証している。

【0073】

本発明者らは、MUC16の切断されない、非グリコシル化のペプチドバックボーンに向けられる新規の抗体を開発している。これらは、4H11抗体および9C9抗体の両方によって例示され、それらは、MUC16の切断されない外部ドメイン内のペプチド配列と反応し、卵巣癌細胞系の表面で、およびヒト卵巣癌の外科標本由来のパラフィン固定組織において、検出可能である。抗体は、高親和性を示し、MUC16の外部ドメインに結合した場合、卵巣癌細胞によって内部へ容易に取り込まれる。これは、MUC16の近位の部分が、ムチンのより遠位の切断される部分から独立した生物学的特徴を有することを示唆する。それはまた、MUC16の近位の部分が、診断的および治療的介入に好都合の標的を提供し得ることを示唆する。MUC16のペプチドバックボーンを標的にすることにより、遺伝子操作された細胞、リポソーム、または本発明の抗体との結合体を含む抗体コンジュゲートに、特異性の高い組織送達をもたらす。

【0074】

抗体4H11によって例示される本発明の抗体は、免疫組織化学検査におけるツールとして有用である。本明細書におけるデータは、4H11が、高悪性度の漿液性卵巣癌腫に対して相対的に特異性があることを示している。浸潤性小葉乳癌腫は、主な例外であり、4H11によって検出された場合、広範囲のMUC16タンパク質を示す。乳房の小葉癌腫は、漿膜表面へ転移する性向によって特徴づけられる独特な生物学的特徴を有する(27)。MUC16は、メソテリンの同種結合パートナーであるため、これは、小葉癌につ

いて重要な意味を有し得る(28)。OC125と4H11についての不一致率はまた、4H11が卵巣癌腫のサブセットにおいて、OC125から独立した、追加の情報を提供する可能性があることを示唆する。OC125に関して陰性であるいくつかの腫瘍は、MUC16糖タンパク質の細胞質部分および細胞外部分を保持し、上記分子のそれらの部分は、悪性表現型において潜在的に重要なシグナル伝達に關与する可能性がある。

【0075】

したがって、一実施形態において、本発明は、ポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片であって、そのポリペプチドが、a) MUC16外部ドメインポリペプチド(NFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP(配列番号17)によって例示される)、b) MUC16細胞質ドメインポリペプチド(VTTRRRKKEGEYINVQQQ(配列番号18)によって例示され、それは、

【0076】

【数6】

CGVLVTTRRRKKEGEYINVQQQ (配列番号03) および

LVTTRRRKKEGEYINVQQQ (配列番号20)

のそれぞれの内に含有されている)、およびc) システインループポリペプチド:CQVSTFRSVPNRHHTGVDSLCL(配列番号19)を含有するMUC16細胞外ドメインポリペプチドによって例示される、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0077】

本発明の抗体の1つの利点は、抗体が細胞の内部へ移行することであり、それにより、疾患治療などの、細胞の内部への送達に適用するのに有用である。細胞によって内部移行する分子に関する場合、「内部移行する」とは、細胞膜の細胞外表面と接触している分子の、細胞膜を横切った、細胞膜の細胞内表面および/または細胞の細胞質への通過を指す。内部移行を決定するための方法は、本明細書に開示されており、それには、細胞の内部での放射標識分子の検出が挙げられる(図5B)。

【0078】

一実施形態において、本発明の抗体は、ポリペプチド1:NFSPLARRVDRVAIYEE(配列番号01)およびポリペプチド2:TLDRSSVLVDGYSPNRNE(配列番号02)からなる群から選択されるポリペプチドを含むMUC16外部ドメインポリペプチドに特異的に結合する。本明細書におけるデータは、本発明の抗体が、GST-MUC16^{C114}に特異的に結合することを示している(実施例2、表1A)。本発明の抗体の特異性は、GST-MUC16^{C114}精製タンパク質またはSKOV3-phrGFP-MUC16^{C114}細胞系の細胞溶解産物に結合しなかった先行技術の抗体(例えば、VK8抗体、M11抗体、およびOC125抗体)とは対照的である(実施例2、図2)。

【0079】

さらなる実施形態において、本発明の抗体は、Payneら、米国特許第7,202,346号に記載された切断されたCA-125によって例示される、グリコシル化MUC16細胞外ドメインへの特異的結合を欠く。

【0080】

本発明の抗体のV_L領域およびV_H領域の配列を限定するつもりはないが、一実施形態において、抗体は、MUC16外部ドメインポリペプチドのポリペプチド2(配列番号02)に特異的に結合し、その抗体は、配列番号06(すなわち、図8の抗体4H11可変重鎖(V_H)アミノ酸配列)によってコードされる可変重鎖(V_H)および配列番号07(すなわち、図8の抗体4H11可変軽鎖(V_L)アミノ酸配列)によってコードされる

10

20

30

40

50

可変軽鎖 (V_L) を含む。特定の実施形態において、抗体はキメラであり、 V_L 鎖および V_H 鎖の少なくとも1つが、ヒト免疫グロブリン定常領域と融合している。

【0081】

同様に、本発明の抗体の V_L 領域および V_H 領域の配列を限定するつもりはないが、一実施形態において、抗体は、MUC16 外部ドメインポリペプチドのポリペプチド2 (配列番号02) に特異的に結合し、その抗体は、配列番号04 (すなわち、図8の抗体4A5 可変重鎖 (V_H) ヌクレオチド配列) によってコードされる可変重鎖 (V_H) および配列番号05 (すなわち、図8の抗体4A5 可変軽鎖 (V_L) ヌクレオチド配列) によってコードされる可変軽鎖 (V_L) を含む。特定の実施形態において、抗体はキメラであり、 V_L 鎖および V_H 鎖の少なくとも1つが、ヒト免疫グロブリン定常領域と共有結合により連結されている。

10

【0082】

なおまた、本発明の抗体の V_L 領域および V_H 領域の配列を限定するつもりはないが、一実施形態において、抗体は、MUC16 外部ドメインポリペプチドのポリペプチド1 (配列番号01) に特異的に結合し、その抗体は、配列番号08 (すなわち、図8の抗体9B11 可変重鎖 (V_H) ヌクレオチド配列) によってコードされる可変重鎖 (V_H) および配列番号09 (すなわち、図8の抗体9B11 可変軽鎖 (V_{LA}) ヌクレオチド配列) および配列番号10 (すなわち、図8の抗体9B11 可変軽鎖 (V_{LB}) ヌクレオチド配列) の少なくとも1つによってコードされる可変軽鎖 (V_L) を含む。特定の実施形態において、抗体はキメラであり、 V_L 鎖および V_H 鎖の少なくとも1つが、ヒト免疫グロブリン定常領域と共有結合により連結されている。

20

【0083】

本発明の抗体が結合する抗原源を制限するつもりはないが、一実施形態において、MUC16 外部ドメインポリペプチドは、細胞によって発現する。本明細書におけるデータは、本発明の例示的な抗体が、p hr GFP - MUC16^{C114} を形質導入された SKOV3 細胞に結合することを示している (実施例2)。

【0084】

本発明の抗体が結合する抗原の配列を限定しないが、さらなる実施形態において、本発明の抗体は、VTTRR R K K E G E Y N V Q Q Q (配列番号18) を含む MUC16 細胞質ドメインポリペプチドに特異的に結合する。特定の実施形態において、MUC16 細胞質ドメインポリペプチドは、ポリペプチド3: C G V L V T T R R R K K E G E Y N V Q Q Q (配列番号03) を含む。いくつかの実施形態において、MUC16 細胞質ドメインポリペプチドは、細胞によって発現する。例えば、本明細書におけるデータは、本発明の例示的な抗体が、p hr GFP - MUC16^{C114} を形質導入された SKOV3 細胞に結合することを示している (実施例2)。特定の実施形態において、細胞は、抗体の細胞への内部移行を促進するために透過処理され、その結果、抗体はその細胞質抗原と接触する。

30

【0085】

なおまた、本発明の抗体が結合する抗原の配列を限定することなく、さらなる実施形態において、本発明の抗体は、システインループポリペプチド: C Q V S T F R S V P N R H H T G V D S L C (配列番号19) を含有する MUC16 細胞外ドメインポリペプチドに結合する。より好ましい実施形態において、MUC16 細胞外ドメインポリペプチドは、ポリペプチド4: K S Y F S D C Q V S T F R S V P N R H H T G V D S L C N F S P L (配列番号15) を含む。

40

【0086】

なおまた、本発明の抗体の V_L 領域および V_H 領域の配列を限定するつもりはないが、一実施形態において、抗体は、MUC16 細胞外ドメインポリペプチドのポリペプチド4 (配列番号15) に特異的に結合し、その抗体は、配列番号11 (すなわち、図8の抗体24B3 可変重鎖 (V_H) アミノ酸配列) によってコードされる可変重鎖 (V_H) および配列番号12 (すなわち、図8の抗体24B3 可変軽鎖 (V_L) アミノ酸配列) によって

50

コードされる可変軽鎖 (V_L) を含む。

【0087】

本発明は、キメラ抗体 (米国特許第7,662,387号参照)、モノクローナル抗体、組換え抗体、組換え抗体の抗原結合断片、ヒト化抗体、およびファージの表面にディスプレイされる抗体 (米国特許第7,202,346号) を企図する。特に、本発明は、抗体分子のイデオタイプ (「抗原結合領域」または「抗原結合断片」) を含有する抗体断片を企図する。例えば、そのような抗原結合断片には、Fab領域、F(ab')₂断片、pFc'断片、およびFab'断片が挙げられるが、それらに限定されない。

【0088】

「Fab領域」および「断片、抗原結合領域」は交換可能に、抗原を結合する場合に機能する免疫グロブリン「Y」の抗体アームの部分を目指す。Fab領域は、抗体の重鎖および軽鎖、それぞれ由来の1つの定常ドメインおよび1つの可変ドメインで構成される。所望の特異性をもつモノクローナルFab断片の迅速かつ簡単な同定を可能にするFab発現ライブラリーの構築のための方法は、当技術分野において知られている (Huseら、Science、246:1275-1281 (1989))。別の実施形態において、Fc断片およびFab断片は、免疫グロブリンモノマーを2つのFab断片およびFc断片へと切断する酵素パピンをを用いることによって生成することができる。酵素ペプシンは、ヒンジ領域より下を切断するので、「F(ab')₂断片」および「pFc断片」が形成される。F(ab')₂断片は、穏やかな還元によって2つの「Fab'断片」へと分裂することができる。

【0089】

本発明はまた、「一本鎖抗体」断片、すなわち、全抗体の可変領域または相補性決定領域 (CDR) の少なくとも1つを有し、かつ抗体の定常ドメインの一部または全部を欠損するアミノ酸配列を企図する。これらの定常ドメインは、抗原結合に必要なではないが、全抗体の構造の主要な部分を構成する。一本鎖抗体断片は、全抗体より小さく、それゆえに、全抗体より大きい毛細血管透過性を有し得、一本鎖抗体断片が局在化し、より効率的に抗原結合部位を標的に結合することを可能にする。また、抗体断片は、原核生物細胞において相対的にラージスケールで産生することができ、したがって、それらの生成を促進することができる。さらに、一本鎖抗体断片の相対的に小さいサイズにより、それらがレシピエントにおいて免疫応答を誘発する可能性を全抗体より低くさせる。一本鎖抗体の作製のための技術は知られている (米国特許第4,946,778号)。重鎖および軽鎖の可変領域は、一緒に融合して、「一本鎖可変断片」 (「scFv断片」) を形成することができ、それはFab断片のサイズの半分だけであり、それでもなお、親免疫グロブリンの元の特異性を保持する。

【0090】

「Fc領域」および「断片、結晶化可能領域」は交換可能に、免疫細胞活性を調節する役割を果たす免疫グロブリン「Y」の底部の部分を目指す。Fc領域は、抗体のクラスに依存して2つまたは3つの定常ドメインを与える2つの重鎖で構成される。特定のタンパク質に結合することによって、Fc領域は、各抗体が所定の抗原に対して適切な免疫応答を生じることを確実にする。Fc領域はまた、Fc受容体などの様々な細胞受容体、および補体タンパク質などの他の免疫分子に結合する。これを行うことによって、Fc領域は、オプソニン作用、細胞溶解、ならびにマスト細胞、好塩基球、および好酸球の脱顆粒を含む異なる生理学的効果を媒介する。実験設定において、Fc断片およびFab断片は、免疫グロブリンモノマーを酵素パピンで2つのFab断片およびFc断片へ切断することによって、実験室内で生成することができる。

【0091】

本発明は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を企図する。「ポリクローナル抗体」とは、複数種の単クローンのプラズマ細胞から産生された免疫グロブリンを指す；対照的に、「モノクローナル抗体」とは、単クローンのプラズマ細胞から産生された免疫グロブリンを指す。所望のポリペプチドに特異的であるポリクローナル抗体および

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体を作製するための一般的な方法が利用できる。モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の産生について、様々な宿主動物を、本発明における関心対象となる任意の分子に対応するペプチドの注射によって免疫することができ、その宿主動物には、ハムスター、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどが挙げられるが、それらに限定されない。モノクローナル抗体の調製について、細胞系の連続培養による抗体分子の産生を与える任意の技術を用いてもよい（例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY参照）。これらには、KoehlerおよびMilstein（KoehlerおよびMilstein、Nature、256:495-497（1975））によって最初に開発されたハイブリドーマ技術、無菌（germ-free）動物を用いて、PCT/US90/02545に記載されたものなどのテクノロジーを利用する技術、加えて、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（例えば、Kozborら、Immunol. Today、4:72（1983）参照）、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術（Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss, Inc.、77-96ページ（1985））が挙げられるが、それらに限定されない。本発明のいくつかの特定の好ましい実施形態において、本発明はモノクローナル抗体を提供する。

【0092】

キメラ抗体もまた企図される。本明細書に用いられる場合、用語「キメラ抗体」は、典型的には2つの異なる種の、2つの異なる抗体の部分を含む。例えば、Cabilllyらに対する米国特許第4,816,567号；Shoemakerらに対する米国特許第4,978,745号；Beaversらに対する米国特許第4,975,369号；およびBossらに対する米国特許第4,816,397号を参照されたい。キメラ抗体は、一価、二価、または多価免疫グロブリンを含む。一価キメラ抗体は、キメラL鎖とジスルフィド架橋を介して結合したキメラH鎖によって形成されるダイマー（HL）である。二価キメラ抗体は、少なくとも1つのジスルフィド架橋を介して結合した2つのHLダイマーによって形成されるテトラマー（H₂L₂）である。多価キメラ抗体もまた、例えば、凝集するHc領域（例えば、IgM H鎖）を用いることによって、作製することができる。

【0093】

本発明はまた、「ヒト化抗体」、すなわち、ヒト抗体定常領域に実質的に、または独占的に由来する定常領域、およびヒト以外の哺乳類由来の可変領域の配列に実質的に、または独占的に由来する可変領域を有するキメラ抗体を企図する。ヒト化抗体は、好ましくは、対応するヒト抗体領域に実質的に、または独占的に由来する、定常領域、および相補性（complement）決定領域（CDR）以外の可変領域、ならびにヒト以外の哺乳類に実質的に、または独占的に由来するCDRを有する。したがって、一実施形態において、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力（capacity）を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種の超可変領域（ドナー抗体）由来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。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に見出されない残基を含んでもよい。これらの改変は、一般的に、抗体のパフォーマンスをさらに精巧にするために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、超可変ループの全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、かつFR残基の全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリン配列のFR残基である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含む。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。ヒト化抗体は、ヒトハ

イブリドーマを用いること (Coteら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:2026-2030 (1983))、またはインビトロでヒトB細胞をEBVウイルスで形質転換することによること (Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77-96ページ (1985))を含む、当技術分野において知られた方法、例えば、Winterらに対する米国特許第5,225,539号を用いて作製されてもよい。追加の方法として、例えば、ヒト免疫グロブリン鎖遺伝子を含有し、かつヒト免疫グロブリン遺伝子によってコードされる様々なアイソタイプの抗体のレパートリーを作製するためにこれらの遺伝子を発現する能力があるトランスジェニック非ヒト動物の作製が挙げられる (米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号、および同第5,625,126号)。ヒト化抗体はまた、例えばマウス抗体の相補性決定領域をヒトフレームワークドメインの中に置き換えることによって作製されてもよい (PCT公開第WO92/22653号)。

【0094】

重要なことには、抗体をヒト化するための初期の方法は、非ヒト抗体の出発材料より低い親和性をもつ抗体を生じる場合が多かった。抗体をヒト化する、より最近のアプローチは、CDRに変更を加えることによってこの問題と取り組んでいる。参照により本明細書に組み入れられている、米国特許出願第20040162413号を参照されたい。いくつかの実施形態において、本発明のヒト化抗体は、ドナーのヘテロマー可変領域より同等またはより高い抗原結合親和性を有する最適化されたヘテロマー可変領域 (例えば、完全抗体である他の分子 (a full antibody other molecule) の部分であってもよいし、そうでなくてもよい) を含有し、上記ドナーのヘテロマー可変領域が3つのドナーの軽鎖CDRを含み、かつその最適化されたヘテロマー可変領域が、a) i) 4つの変化のないヒト生殖系列軽鎖フレームワーク領域、およびii) 3つの変化した軽鎖可変領域CDRを含む変化した軽鎖可変領域を含み、上記3つの変化した軽鎖可変領域CDRのうちの少なくとも1つがドナーの軽鎖CDR変異体であり、かつ上記ドナーの軽鎖CDR変異体が、上記3つのドナーの軽鎖CDRのうちの1つと比較してたった1つ、2つ、3つ、または4つの位置において異なるアミノ酸を含む (例えば、少なくとも1つのドナーの軽鎖CDR変異体は、1個、2個、3個、または4個のアミノ酸の違いを除いて、ドナーの軽鎖CDRのうちの1つと同一である)。

【0095】

ヒト抗体由来の定常領域に、または毒素に、または細胞傷害性効果をもつ分子に融合しているアミノ酸配列を含有するキメラ抗体は、当技術分野において知られている (例えば、米国特許第7,585,952号；同第7,227,002号；同第7,632,925号；同第7,501,123号；同第7,202,346号；同第6,333,410号；同第5,475,092号；同第5,585,499号；同第5,846,545号；同第7,202,346号；同第6,340,701号；同第6,372,738号；同第7,202,346号；同第5,846,545号；同第5,585,499号；同第5,475,092号；同第7,202,346号；同第7,662,387号；同第6,429,295号；同第7,666,425号；および同第5,057,313号)。

【0096】

特定の抗原に特異的である抗体を、当技術分野において知られた方法 (例えば、米国特許第7,202,346号) および本明細書に開示された方法を用いてスクリーニングしてもよい。例えば、抗体の産生において、所望の抗体のスクリーニングは、ラジオイムノアッセイ、ELISA (酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射線アッセイ、ゲル拡散沈降素反応 (gel diffusion precipitation reactions)、免疫拡散アッセイ、インサイチュイムノアッセイ (例えば、コロイド金標識、酵素標識、または放射性同位元素標識を用いる)、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ (例えば、ゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイなど

10

20

30

40

50

)、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、および免疫電気泳動アッセイなどによって達成することができる。

【0097】

一実施形態において、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することによって検出される。別の実施形態において、一次抗体は、一次抗体への二次抗体または試薬の結合を検出することによって検出される。さらなる実施形態において、二次抗体は標識される。イムノアッセイにおいて結合を検出するための多くの手段が当技術分野において知られており、それらは本発明の範囲内である。当技術分野においてよく知られているように、免疫原性ペプチドは、いかなる免疫プロトコルに用いられるキャリア分子も含まずに供給されるべきである。例えば、ペプチドがKLHに結合体化していたならば、スクリーニングアッセイにおいて、それをBSAに結合体化してもよいし、または直接、用いてもよい。

10

【0098】

一実施形態において、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞系によって産生されるモノクローナル抗体である。特定の実施形態において、モノクローナル抗体は、9B11.20.16、10A2、2F4、23D3、30B1、および31B2(表1および2)からなる群から選択される抗体によって例示されるように、ポリペプチド1(配列番号01)を含むMUC16外部ドメインポリペプチドに特異的に結合する。好ましい実施形態において、抗体は9B11である。

【0099】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、ポリペプチド2(配列番号02)を含むMUC16外部ドメインポリペプチドに特異的に結合し、その抗体は、4H11.2.5、13H1、29G9、9C9.21.5.13、28F8、23G12、9C7.6、11B6、25G4、5C2.17、4C7、26B2、4A5.37、4A2、25H3、および28F7.18.10(表1および2)によって例示される。好ましい実施形態において、抗体は、4H11.2.5、4A5.37、9C9.21.5.13、28F7.18.10、9C7.6、および5C2.17によって例示される。

20

【0100】

さらなる実施形態において、モノクローナル抗体は、ポリペプチド3:CGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQ(配列番号03)を含むMUC16細胞質ドメインポリペプチドに特異的に結合し、その抗体は、31A3.5.1、19D1、10F6、22E10、22F1、3H8、22F11、4D7、24G12、19G4、9A5、4C2、31C8、27G4、および6H2(表1および2)によって例示される。好ましい実施形態において、抗体は31A3.5.1である。

30

【0101】

別の実施形態において、モノクローナル抗体は、ポリペプチド4:KSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSLCNFSPL(配列番号15)を含むMUC16細胞外ドメインポリペプチドに特異的に結合し、その抗体は、24B3および9C7(表2)によって例示される。

【0102】

本発明の抗体およびそれらを(診断的および治療的の両方に)用いるための方法は疾患特異的である。「癌に対する特異性」(「癌特異性」と交換可能に用いられる)などの、疾患に対する方法および/または分子の「特異性」とは、正しく同定される陰性者(すなわち、疾患を有しない健康な個体)の割合(例えば、パーセンテージ、率など)、すなわち、疾患を有しないと正しく同定される健康な被験体のパーセンテージを指す。特異性を、以下の式に従って計算してもよい:

40

特異性 = 真の陰性者の数 / (真の陰性者の数 + 偽陽性者の数)

したがって、いくつかの実施形態において、本発明の組成物および/または方法は、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、8

50

2 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、および99 %などの51 %から100 %までの任意の数値を含む、50 %より高い「癌特異性」を有する。100 %特異性、すなわち、健康な群からの誰もが癌を有すると予測されないことが最も望ましいが、必要ではない。本明細書におけるデータは、本発明の癌特異性を実証している（表3）。

【0103】

代替の実施形態において、特異性は、「受診者動作特性（ROC）曲線」を用いることなどの二元分類試験のパフォーマンスの統計的尺度として（感度と共に）表される。いかなる試験についても、通常、特異性と感度の間にトレードオフがある。例えば、ヒト被験体の癌スクリーニング試験において、コストが高くかかるため、健康な人々が癌を有すると誤って同定される（低特異性）リスクを負うことは望ましくない。これらのコストは物理的（不必要なリスクを伴う手順）および財政的の両方である。このトレードオフは、ROC曲線を用いてグラフに表すことができる。「受診者動作特性曲線」および「ROC曲線」とは、真の陰性率（AKA1 - 特異性）に対する真の陽性率（AKA感度）のプロットを指す。試験の測定された結果は、x軸に表され、y軸は対照（例えば、健康な）被験体または症例（例えば、癌）被験体の数を表す。任意の所定のカットポイント（x軸に沿った各点）について、アッセイの感度および特異性を測定することができる。任意の所定のアッセイについての感度および特異性の範囲は、選択されたカットポイントに依存して、0 %から100 %までの範囲であり得る。このため、いくつかの好ましい実施形態において、アッセイの特異性および/または感度の標準尺度としてAUCが用いられる。ROC曲線プロットについての「曲線下面積」（「AUC」）は、分類子（classifier）が、無作為に選択された陽性の事例を無作為に選択された陰性の事例より高くランクづける確率と等しい。したがって、AUCは、症例（例えば、癌）被験体と対照（例えば、健康な）被験体の間を成功裏に識別する試験の能力の一般的な尺度である。偶然（random chance）は、0.5のAUCを生じる。それゆえに、一実施形態において、有用な試験は、好ましくは、0.55から1.00まで、0.60から1.00まで、0.65から1.00まで、0.70から1.00まで、0.75から1.00まで、0.80から1.00まで、0.85から1.00まで、0.90から1.00まで、0.95から1.00まで、および最も好ましくは1.00などの0.51から1.00までの任意の値を含む、0.50より大きいAUCを有する。0.50より大きいAUC値には、0.51、0.52、0.52、0.54、0.55、0.56、0.57、0.58、0.59、0.60、0.61、0.62、0.63、0.64、0.65、0.66、0.67、0.68、0.69、0.70、0.71、0.72、0.73、0.74、0.75、0.76、0.77、0.78、0.79、0.80、0.81、0.82、0.83、0.84、0.85、0.86、0.87、0.88、0.89、0.90、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、および0.99が挙げられる。

【0104】

本発明の抗体およびそれらを（診断的および治療的の両方に）用いるための方法は疾患の感度である。「癌に対する感度」（「癌の感度」と交換可能に用いられる）などの、疾患に対する方法および/または分子の「感度」とは、正しく同定される陽性者（すなわち、癌を有する個体）の割合（例えば、パーセンテージ、率など）（例えば、癌を有すると同定される癌をもつ人々のパーセンテージ）を指す。感度を、以下の式に従って計算してもよい：

感度 = 真の陽性者の数 / (真の陽性者の数 + 偽陰性者の数)

したがって、いくつかの実施形態において、本発明の組成物および/または方法は、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、8

10

20

30

40

50

2 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、および99 %などの51 %から100 %までの任意の数値を含む、50 %より高い「癌の感度」などの「疾患の感度」を有する。100 %の感度（すなわち、癌の群からの全被験体が癌を有すると予測されること）が最も望ましいが、それは必要ではない。

【0105】

代替の実施形態において、本発明の組成物および/または方法は、1 %、2 %、3 %、4 %、6 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 %、26 %、27 %、28 %、29 %、30 %、31 %、32 %、33 %、34 %、35 %、36 %、37 %、38 %、39 %、40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、および49 %などの0 %から50 %までの任意の数値を含む、50 %以下の「癌の感度」などの「疾患の感度」を有する。

10

【0106】

いくつかの実施形態において、特異性に関して上記で論じられているように、感度は、ROC曲線のAUCを用いることなどの二元分類試験のパフォーマンスの統計的尺度として（特異性と共に）表される。

【0107】

D．ハイブリドーマ細胞系

本発明の新規な抗体に加えて、本発明はまた、これらの抗体を産生するハイブリドーマ細胞系を提供する。「ハイブリドーマ細胞」とは、組織培養で成長するその能力について、および抗体鎖を合成しないことについて選択される、骨髄腫（B細胞癌）細胞と特定の抗体産生B細胞とを融合することによって産生される細胞系を指す。ハイブリドーマ細胞によって産生される抗体は、全く単一の特異性であり、それゆえ、（ポリクローナル抗体と対照的に）モノクローナル抗体である。

20

【0108】

特定の実施形態において、本発明は、a) MUC16外部ドメインポリペプチド（例えば、NFSPLAR RVDRAVAIYEE FLRMTRNGTQ LQNFTLDRSS VLV DGYSPNR NEPLTGNSDL P（配列番号17））、b) MUC16細胞質ドメインポリペプチド（例えば、VTTRR RKKEGEYNVQ QQ（配列番号18））、およびc) システインループポリペプチド：CQVSTFRSVPNRHHTGVDSL C（配列番号19））を含有するMUC16細胞外ドメインポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドまたはその抗原性部分に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系を提供する。MUC16ポリペプチド配列番号18は、LVTTTRR RKKEGEYNVQ QQ（配列番号20）内に含有される。したがって、配列番号20は、膜貫通ドメインアミノ酸（L）および細胞質ドメイン部分VTTRR RKKEGEYNVQ QQ（配列番号18）の両方を含有する、すなわち、Lは、それが膜貫通ドメインの一部であるため、任意選択である。MUC16ポリペプチド配列番号18はまた、CGVLVTTRR RKKEGEYNVQ QQ（配列番号03）内に含有される。したがって、配列番号03は、膜貫通ドメイン部分（CGVL）および細胞質ドメイン部分VTTRR RKKEGEYNVQ QQ（配列番号18）の両方を含有する、すなわち、CGVLは、それが膜貫通ドメインの一部であるため、任意選択である。

30

40

【0109】

E．細胞傷害性物質および/またはプロドラッグに連結された本発明の抗体のコンジュゲート

本発明はコンジュゲート抗体を企図する。「コンジュゲート」抗体とは、細胞傷害性物質および/または細胞傷害性物質のプロドラッグに共有結合により連結された本発明の抗体を指す。

【0110】

50

「細胞傷害性物質」とは、標的細胞の成長を低下させる能力、および／または標的細胞を死滅させる能力がある任意の作用物質を指す。「プロドラッグ」は、活性化工程に付されるまで細胞傷害性活性を実質的に欠く細胞傷害性物質の類似体を表す。活性化工程として、酵素切断、還元剤への曝露などの化学的活性化工程、または光分解などの物理的活性化工程を挙げることができる。

【0111】

本発明の抗体と細胞傷害性物質またはプロドラッグとの間の共有結合性連結には、ジスルフィド結合などの切断可能な連結を挙げることができ、それは、有利には、標的細胞の還元性環境内で共有結合性連結の切断を生じ得る。そのようなコンジュゲートは、腫瘍細胞特異的治療剤として有用である。

10

【0112】

一実施形態において、細胞傷害性物質は、低分子薬物である(Payneら、米国特許第7,202,346号)。別の実施形態において、細胞傷害性物質は、マイタンシノイド、マイタンシノイドの類似体、マイタンシノイドのプロドラッグ、またはマイタンシノイドの類似体のプロドラッグである(米国特許第6,333,410号;同第5,475,092号;同第5,585,499号;同第5,846,545号;同第7,202,346号)。別の実施形態において、細胞傷害性物質は、タキサン(米国特許第6,340,701号および同第6,372,738号および同第7,202,346号参照)またはCC-1065類似体(米国特許第5,846,545号;同第5,585,499号;同第5,475,092号、および同第7,202,346号参照)であってもよい。

20

【0113】

別の実施形態において、細胞傷害性物質は、アウリスタチン、DNA副溝結合剤、DNA副溝アルキル化剤、エンジン、デュオカルマイシン、マイタンシノイド、およびピンカアルカロイドによって例示される(米国特許第7,662,387号)。

【0114】

さらなる実施形態において、細胞傷害性物質は、抗チューブリン剤である(米国特許第7,662,387号)。さらに別の実施形態において、細胞傷害性物質は、ジメチルバリリン-バリリン-ドライソロイイン-ドラプロイン-フェニルアラニン-p-フェニレンジアミン(AFP)、ドバリリン-バリリン-ドライソロイイン-ドラプロイン-フェニルアラニン(MMAF)、およびモノメチルアウリスタチンE(MAE)によって例示される(米国特許第7,662,387号)。

30

【0115】

追加の実施形態において、毒性物質は、放射性同位元素が放射する放射線、免疫調節物質、レクチン、および毒素によって例示される(米国特許第6,429,295号)。特に、放射性同位元素が放射する放射線は、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、および ^{211}At からなる群から選択される放射体、または ^{186}Re および ^{90}Y からなる群から選択される放射体、または放射体 ^{131}I である(米国特許第7,666,425号)。

【0116】

代替の実施形態において、毒素は、リシン、リシンのA鎖、およびアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質によって例示される(米国特許第5,057,313号)。

40

【0117】

さらに別の実施形態において、細胞傷害性物質は、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、クロヘキシミド、ダウノマイシン、ドキソルビシン、クロラムブシル、トレニモン、フェニレンジアミンマスタード、アドリアマイシン、ブレオマイシン、シトシンアラビノシド、またはシクロホスファミドからなる群から選択される抗癌薬である(米国特許第5,057,133号)。

【0118】

F.Muc16部分の検出および診断的適用

本発明は、被験体においてMUC16の過剰発現を含む疾患を検出するための方法であ

50

って、a) i) 被験体由来の試料、および i i) 本発明の抗体のいずれか1つまたは複数
を供給する工程、b) 抗体のその同種抗原との特異的結合のための条件下で試料を抗体に
接触させる工程、ならびに c) 疾患を欠く対照試料と比較して抗体の試料への結合のレベ
ルの増加を検出し、それによって被験体において疾患を検出する工程を含む方法を提供す
る。抗体を用いて疾患を検出するための一般的な方法は当技術分野において知られている
(Payneら、米国特許第7,202,346号)。本発明の方法は、卵巣癌および乳
癌などの癌を検出するのに特に有用である。

【0119】

本発明の方法は、本発明の抗体のそれらの抗原への結合を検出するための特定のアプロ
ーチに限定されない。一実施形態において、本発明の抗体への結合を検出することは、典
型的には、放射性同位元素(例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、および/または ^{125}I)、
蛍光または化学発光化合物(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ロ
ーダミン、および/またはルシフェリン)、および/または酵素(例えば、アルカリフォ
スファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、および/または西洋ワサビペルオキシダーゼ)な
どの検出可能な部分で標識されている抗体を用いることを含む。

10

【0120】

抗体を検出可能な部分に結合体化するための方法は、当技術分野において知られている
(例えば、Hunterら、Nature 144:945(1962); Davidら
、Biochemistry 13:1014(1974); Painら、J. Immunol. Meth. 40:219(1981); および Nygren、J. Histochem. and Cytochem. 30:407(1982))。

20

【0121】

したがって、本発明の抗体を、免疫組織化学検査、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、
蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)、およびウェスタンブロットを含む、
競合結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイなど
のイムノアッセイに用いてもよい。

【0122】

例えば、免疫組織化学的検出に関して、本明細書におけるデータは、高悪性度の漿液性
卵巣癌腫、小葉癌(28)、およびOC125について陰性であり、かつMUC16糖タ
ンパク質の細胞質部分および細胞外部分を保持している卵巣癌腫のサブセットを検出する
のに抗体4H11が有用であることを実証している。

30

【0123】

本発明の抗体はまた、インビボのX線画像化に有用であり、放射線不透過性物質または
放射性同位元素などの検出可能な部分で標識された抗体が被験体に、好ましくは血流に投
与され、宿主における標識抗体の存在および位置がアッセイされる。この画像化技術は、
悪性腫瘍の病期診断および処置において有用である。

【0124】

本発明の抗体はさらに、アフィニティー精製剤として有用である。このプロセスにおい
て、抗体は、Sephadex樹脂または濾紙などの適切な支持体に、当技術分野において周知の方法を用いて、固定化されて、本発明の抗体に特異的に結合する抗原を含有する
分子を捕獲および精製する。

40

【0125】

G. 治療的適用

本発明は、MUC16の過剰発現を含む疾患を処置するための方法であって、上記疾患
を有する被験体に、本発明の抗体のいずれか1つまたは複数の治療上有効量を投与する工
程を含む方法を提供する。抗体を用いて疾患を処置するための一般的な方法は当技術分野
において知られている(Payneら、米国特許第7,202,346号)。本発明の方法は、卵巣癌および乳癌などの癌を処置するのに特に有用である。これらの方法はまた、
原発癌、転移癌、および再発癌に適用可能である。

【0126】

50

被験体に「投与すること」という用語は、分子を被験体に供給することを意味する。これは、当技術分野において知られた方法（例えば、Ericssonら、米国特許第6,632,979号；Furutaら、米国特許第6,905,839号；Jakobsenら、米国特許第6,238,878号；Simonら、米国特許第5,851,789号）を用いて行われてもよい。本発明の組成物は、予防的に（すなわち、疾患症状が観察される前に）、および／または治療的に（すなわち、疾患症状が観察された後に）投与されてもよい。投与はまた、1つまたは複数の疾患症状の発現と同時に（すなわち、同じ時点で、またはその間中）あってもよい。また、本発明の組成物は、別の型の薬物または治療手段（例えば、手術）の投与の前、それと同時に、および／またはその後に、投与されてもよい。本発明の組成物を投与する方法には、非限定的に、非経口、経口、腹腔内、鼻腔内、局所的、および舌下の形での投与が挙げられる。非経口の投与経路には、例えば、皮下、静脈内、筋肉内、胸骨内（intrasternal）の注射および注入の経路が挙げられる。

10

【0127】

一実施形態において、本発明の組成物は、リボソームとしての送達のための脂質を含む。そのような組成物を作製するための方法は、当技術分野において知られている（Borghoutsら、(2005) J Pept Sci 11、713-726；Changら、(2009) PLoS One 4、e4171；Faisalら、(2009) Vaccine 27、6537-6545；Huwyler et al.ら、(2008) Int J Nanomedicine 3、21-29；Songら、(2008) Int J Pharm 363、155-161；Voineaら、J Cell Mol Med 6、465-474）。

20

【0128】

癌を有する人間の抗体処置は当技術分野において知られており、例えば、米国特許第5,736,137号；同第6,333,410号；同第5,475,092号；同第5,585,499号；同第5,846,545号；同第7,202,346号；同第6,340,701号；同第6,372,738号；同第7,202,346号；同第5,846,545号；同第5,585,499号；同第5,475,092号；同第7,202,346号；同第7,662,387号；同第7,662,387号；同第6,429,295号；同第7,666,425号；同第5,057,313号にある。

30

【0129】

本発明の抗体は、薬学的に許容され得るキャリア、希釈剤、および／または賦形剤と共に投与されてもよい。適切なキャリア、希釈剤、および／または賦形剤の例として、(1) 約1mg/ml～25mg/mlのヒト血清アルブミンを含有するDulbeccoのリン酸緩衝食塩水、pH約7.4、(2) 0.9%の食塩水(0.9% w/v NaCl)、および(3) 5%(w/v)のデキストロースが挙げられる。

【0130】

本発明の抗体は、典型的には、治療的量で投与される。用語「治療的量」、「薬学的有効量」、「治療上有効量」、および「生物学的有効量」は、定量的か定性的かに関わらず、所望の結果を達成するのに十分である量を指すように、本明細書において交換可能に用いられる。特に、薬学的有効量は、疾患に関連している望ましくない作用（病理学的、臨床的、および生化学的など）の軽減、遅延、および／または除去をもたらす量である。例えば、「癌を軽減する治療的量」は、癌の1つまたは複数の症状を軽減し、遅らせ、および／または除去する量である。

40

【0131】

例えば、「治療的量」の特定の「投薬量」は、投与経路、処置される被験体のタイプ、および考慮される特定の被験体の身体特性に依存する。これらの因子、およびこの量を決定するためのそれらの因子の関係は、医学、獣医学、および他の関連分野の熟練従事者によく知られている。この量および投与方法は、最適な効力を達成するように調整することができるが、体重、食事、併用薬物療法、および他の因子のような因子に依存するもので

50

あり、そのことを当業者は認識している。投薬の量および頻度は、実質的に有害な作用を生じることなく、化合物の有効レベルを生むように選択される。

【0132】

凍結乾燥されているよりむしろ、水性剤形で存在する場合、抗体は、典型的には、約 0.1 mg/ml ~ 100 mg/ml の濃度で処方される。

【0133】

疾患の型および重症度に依存して、例えば、1回もしくは複数回の別々の投与によるか、または持続注入によるかに関わらず、患者体重の 1 kg あたり約 0.015 ~ 15 mg の抗体が、患者への投与のための初回候補投薬量である。数日間またはそれを超える期間にわたる反復投与については、状態に依存して、処置が、疾患症状の所望の抑制が起こるまで繰り返される。

10

【0134】

本発明の方法は、インビトロで、インビボで、またはエキソビボで実施することができる。

【実施例】

【0135】

以下の実施例は、本発明の特定の好ましい実施形態および態様を例証する役割を果たし、それらが本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【0136】

実施例 1

20

材料および方法

以下は、その後の実施例に用いられる例示的な材料および方法の簡単な記載である。

【0137】

細胞培養：

OVCAR3、SKOV3、およびA2780細胞系を、American Type Culture Collection (ATCC、Manassas、VA) から入手し、ATCC文献に従い、培養で維持した。MUC16 + 形質移入した細胞系の作製のために、MUC16 cDNAのカルボキシ末端部分を、Vitality phrGF Pベクター発現系 (Stratagene、La Jolla、CA) を用いて、緑色蛍光タンパク質融合タンパク質として導入した。それらのそれぞれの培地中にジェネティシン (G418、Invitrogen、Grand Island、NY) を用いて安定な細胞系を選択し、緑色蛍光タンパク質の発現によって単離した。安定なトランスフェクタントを、それぞれ、それらの培地中G418の存在下で日常的に維持した。MUC16^{c114}トランスフェクタントは、推定の切断部位からカルボキシ末端まで (アミノ酸1776 ~ 1890) のMUC16タンパク質の細胞表面発現を有する (12)。

30

【0138】

モノクローナル調製：

MUC16配列を用いて、MUC16^{c114}アミノ酸配列のエLEMENTをコードするペプチド配列をMemorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) 微量化学コア施設で合成した。本発明者らは、3つのポリペプチド (図1) を合成し、ポリペプチド1およびポリペプチド2を、KLHへのより良い結合体化のためにN末端においてシステインで修飾した。等濃度のKLH結合体化ペプチドを混合し、その後、5匹のBALB/cマウスへの免疫原として用いた。本発明者らは、ELISAによって、血清が個々のペプチドに対して最も高い反応性を示した、5匹のマウスのうちの1匹を選択し、MSKCCモノクローナル抗体コア施設は、融合を実施し、標準プロトコールを用いて抗体を選択した。融合から10日後、上清を選択し、個々の合成ペプチドに対するELISAにより、反応性についてスクリーニングした。

40

【0139】

ELISA：

個々のペプチドおよびGST-MUC16^{c114}融合タンパク質に対する抗体の陽

50

性を調べるために、E L I S A アッセイについての通例のコア施設プロトコールに従ってサンドイッチE L I S Aを実施した。

【0140】

F A C S 分析：

付着標的細胞を、0.05%のトリプシンおよび0.1%のEDTAによって取り出し、洗浄し、血球計算器によってカウントした。細胞を、複数個のE p p e n d o r f チューブへ、チューブあたり少なくとも $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 細胞で分配した。細胞を、1%F C S および0.025%アジ化ナトリウムを含有するリン酸緩衝食塩水(P B S) (F A C S 緩衝液)で洗浄した。内部のF A C S 染色のために、E p p e n d o r f チューブ内の細胞を、1:10に希釈したF A C S 透過処理溶液2 (B D B i o S c i e n c e s, S a n J o s e, C A) を用いて室温で10分間、透過処理し、その後、氷冷F A C S 緩衝液で2回、洗浄した。その後、それらを、氷上で30分間、 $1 \mu\text{g}$ /チューブのマウスM U C 1 6 モノクローナルの生物反応性上清を含まずに(二次抗体の対照として)か、またはそれを含んでかのいずれかでインキュベートした。表面F A C S 染色のために、細胞を、氷上で30分間、 $1 \mu\text{g}$ /チューブのマウスM U C 1 6 モノクローナル(9 B 1 1 . 2 0 . 1 6、9 C 9 . 2 1 . 5 . 1 3、および4 H 1 1 . 2 . 5)、マウス抗ヒトO C 1 2 5 (M 3 5 1 9)、マウス抗ヒトM 1 1 (M 3 5 2 0) (D a k o C y t o m a t i o n, D a k o N o r t h A m e r i c a I n c., C a r p i n t e r i a, C A)、またはV K 8 (M S K C C, N e w Y o r k, N Y の B e a t r i c e Y i n 博士およびK e n L l o y d 博士のご厚意により提供された)の生物反応性上清を含まずに(二次抗体の対照として)か、またはそれを含んでかのいずれかでインキュベートした。E p p e n d o r f チューブ内の細胞をまた、 $1 \mu\text{g}$ /チューブの非特異的アイソタイプ適合対照マウス抗体(M S K C C モノクローナルコア施設から入手された、I g G 1 モノクローナルについての1 3 C 4 およびI g G 2 b モノクローナルについての4 E 1 1)で表面染色し、氷上で30分間、インキュベートした。全ての細胞をF A C S 緩衝液で3回、洗浄した。細胞を、 $1 \mu\text{g}$ /チューブの二次抗体ヤギ抗マウスI g G 1 - P E またはI g G 2 b - P E と、氷上で30分間、インキュベートし、その後、F A C S 緩衝液で3回、洗浄した。細胞を、M S K C C フローサイトメトリーコア施設におけるF A C S C a l i b u r 機によって分析した。

【0141】

ウェスタンブロット分析：

安定な細胞系を、それらのそれぞれの培養培地を含む10cmのディッシュ中で培養し、5%CO₂、37℃で3日間、インキュベートした。それらを、氷冷P B S で2回、洗浄して、血清含有培地を除去した。付着細胞を、1~2mlの氷冷P B S で搔爬し、細胞を、E p p e n d o r f 遠心機において4℃で、E p p e n d o r f チューブ内に遠心沈殿させた。上清を捨て、細胞を、0.2mlの改変R i p a 溶解緩衝液(20mM T r i s - H C L ; p H 7 . 4 ; 150mM N a C l ; 1%N P - 4 0 ; 1mM N a 3 V O 4 ; 1mM P M S F ; 1mM D T T ; 10μg/mlロイペプチン; および10μg/mlアプロチニン)を用いて氷上で30分間、溶解させ、4℃で10分間、回転させた。可溶性溶液をチューブへと分離し、残渣のペレットを廃棄した。タンパク質濃度を、B i o - R a d タンパク質アッセイ(B i o R a d L a b o r a t o r i e s, H e r c u l e s, C A)を用いて測定した。等量のタンパク質(G S T - M U C 1 6 - C D 融合タンパク質または安定な細胞系抽出物)を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(S D S - P A G E)によって分離し、4℃の低温室においてB i o R a d 転写装置を用いてニトロセルロース膜へ転写した。膜を、0.1%T w e e n - 2 0 を含むP B S (P B S T)中3%ウシ血清アルブミン(B S A)で4℃、一晚、ブロッキングした。膜を、室温で1時間、一次抗体(1:1000希釈)で探索し、その後、P B S T で3回、洗浄した。その後、対応する二次抗体である、ヒツジ由来の抗マウスI g G 西洋ワサビペルオキシダーゼ(H R P)連結型全抗体(G E H e a l t h c a r e, U K)(1:5000希釈)を用いて、室温で1時間、膜を染色した。膜をP B S T で3回、

10

20

30

40

50

洗浄し、Western Lightning (登録商標) 化学発光試薬 (ECL、Perkin Elmer、Waltham、MA) を用いて、室温で1~5分間、発色させ、シグナルをKodak BioMax Film上に現像した。

【0142】

モノクローナル抗体に関する結合および内部移行の研究、ならびにOVCA R3およびSKOV3の安定なトランスフェクタント：

精製されたモノクローナル抗体を、ヨードゲン法を用いて ^{125}I で標識し、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製した(22)。飽和結合研究を、無傷OVCA R-3細胞の基質を用いて放射標識抗体で実施した。簡単に述べれば、10個の試験溶液を調製し(3連で)、それらは、総体積500 μL のPBS(0.2%BSA; pH7.4)中に漸増量の放射性ヨウ素標識抗体、300000~500000細胞を含有した。細胞を、ガラス繊維膜を通す急速濾過によって単離し、氷冷トリス緩衝食塩水で洗浄した。細胞を、加えられた総活性の標準物質と共に、ガンマカウンターにおいてカウントした。放射標識抗体の各濃度について、非特異的結合を、100nMの非修飾抗体の存在下で決定した。データを、最小二乗回帰法(Origin、Microcal、Software Inc.、Northampton、MA)で分析し、 K_d 値および B_{max} 値を決定し、スキャッチャード変換を実行した。

【0143】

抗体の細胞内部移行研究を、 ^{125}I -4H11モノクローナル抗体および ^{125}I -OC125モノクローナル抗体、ならびにSKOV3-phrGFP-MUC16 34 の安定な形質移入細胞を用いて実施した。簡単に述べれば、2mLの培地中の放射標識抗体(370MBq/mg、100kcpm)を、6ウェルプレートに蒔かれたSKOV3細胞に加えた。プレートを37℃で24時間までインキュベートした。様々な時点において、3つのウェルから培地を取り出し、細胞を2x2mL PBSで洗浄した。その後、細胞表面に結合した活性を、2x2mLの氷冷酸洗浄(100mM酢酸、100mMグリシン; pH3.0)でストリップし、収集した。その後、細胞を2x1mLの1M NaOHで溶解し、収集した。研究の終わりに、全ての試料を、加えられた放射活性の最初の量を表す標準物質と共に、ガンマカウンターでカウントした。全ての培地試料を、5%TCAの移動相を用いてITLC-SGによって分析し、結合していない ^{125}I を決定した。

【0144】

組織マイクロアレイ(TMA)：

組織マイクロアレイは、本発明者らの施設内で構築するか、または内部で入手できないならば、商業的研究所から購入するかのいずれかであった。簡単に述べれば、既存のパラフィン包埋組織のコア針生検を、いわゆるドナーブロックから入手し、その後、Kononenら、および続いてHedvatらによって改変された技術を用いることによって、レシピエントパラフィンアレイ「マスター」ブロックへ再配置した(23~24)。Becher Instruments Inc.(Sun Prairie、WI)製の手動で操作されるTissue Arrayer MTA-1を用いて、直径が0.6~1.0mmと測定された試料円形スポット(コア)を作製した。コアを、お互いから0.3~0.4mm離してアレイした。対照組織の層を、エッジ効果を避けるために実際の組織マイクロアレイの周りに戦略的に置いた。各組織マイクロアレイの特定の組成は、下記に描写されている。卵巣癌、前立腺癌、肺腺癌、膵臓の粘液性新生物、ならびに浸潤性腺管癌および浸潤性小葉乳癌腫についての組織マイクロアレイのスライドを、ホルマリン固定パラフィン包埋組織から4 μm 切片を切ることによって調製した。正常な成人および胎児の組織マイクロアレイを商業的供給源(Biomax、US)から入手した。OVCA R3細胞を陽性対照として用いた。

【0145】

免疫組織化学検査：

標準OC125(Ventana、Tuscon、AZ)および新規なモノクローナル

10

20

30

40

50

抗体の両方に関して組織マイクロアレイで免疫組織化学検査を実施した。組織マイクロアレイの切片を4ミクロンに切断し、Superfrost/Plus顕微鏡スライド(Fisher brand)上に置き、60°のオープンで少なくとも60分間、焼いた。その後、スライドを脱パラフィンし、蒸留水に水和させ、pH6.00におけるクエン酸緩衝液中に97で30分間、浸漬し、流水で2~5分間、洗浄し、蒸留水に希釈された3%過酸化水素中で5分間、インキュベートした。スライドを蒸留水で1分間、洗浄し、リン酸緩衝食塩水(PBS)、pH7.2の浴槽へ移し、各5分間で2回交換し、PBS中に希釈された0.05%BSA中に最低1分間、置いた。組織切片の周囲を乾燥させた後、正常血清を、2%BSA/PBS中に1:20希釈で添加し、湿度チャンパー内、室温で最低10分間、インキュベートした。その後、血清を、切片を乾燥させないように、吸い出し、1:1000の希釈度における約150ラムダの新規抗体を組織上に置いた。スライドを湿度チャンパー内、4で一晩(約15~18時間)、インキュベートした。一次抗体を、各10分間の3回のPBS交換を用いて洗い流した。二次抗体のVector laboratories(Burlingame, Ca)製のビオチン化 - マウスを、1%BSA/PBS中1:500希釈で添加し、湿度チャンパー内、室温で45~60分間、インキュベートした。上記のように再び、3回のPBS交換を用いて上記抗体を洗い流した。その後、スライドを、PBS中に希釈されたジアミノベンジジン(DAB)の浴槽へ5~15分間、移した。その後、スライドを水道水中で1分間、洗浄し、Harris改変ヘマトキシリン(Fisher)を用いて対比染色し、1%酸アルコールで脱色し、アンモニア水中で青色にし、各2分間のそれぞれが95%エタノール、100%エタノール、およびキシレンの3回の交換で脱水し、永久封入剤を用いてカバーガラスで覆った。

10

20

【0146】

免疫組織化学検査のスコア化：

OC125およびM11などの市販されている抗体は、複合グリコシル化依存性エピトープを標的にする。本発明者らの仮説は、グリコシル化は組織特異的であるということである；それゆえに、パラフィン固定組織におけるペプチド指向性抗体の利用を試験し、MUC16発現の存在率を調査することは重要であった。3つの候補抗体の4H11、9C9、および4A5を、OVCA3細胞系ペレットを用いて特徴づけた。その3つのうち、4H11抗体は、最小量のバックグラウンド染色をもち、複数の希釈度において最も強く、最もびまん性および一貫性が高い染色パターンを示し、したがって、それを、病理学コア施設においてヒト組織に用いるために最適化した。

30

【0147】

4H11を使用して、本発明者らは、高病期、高悪性度の漿液性卵巢癌腫からの組織マイクロアレイを用いて染色し、陽性をスコア化した(図2)。これらの腫瘍は、西側先進国において全卵巢癌腫の約80~85%に相当する(25)、卵巢癌の最も一般的な型であった。新規な抗体の特異性を試験するために、本発明者らはまた、前立腺、肺、乳房、および膵臓の癌の組織マイクロアレイを染色し、それらの染色強度をOC125モノクローナル抗体のものと比較した(図6A~D)。正常ヒト組織といくつかの交差反応性があるかどうかを決定するために、抗体をまた、正常なヒト成人および胎児TMAにおいて試験した。

40

【0148】

染色切片の全てが委託病理学者(KJP)によって再検査された。不定の染色があったコアのサブセットは、スコア化法における一貫性を確実にするために、二番目の病理学者(RAS)によって独立してスコア化された。細胞質染色および/または膜染色のみが陽性とみなされた。細胞の一部が膜染色を示したならば、それは部分的染色とみなされた。個々のコアにおける染色分布および強度の半定量的評価を提供するためにスコア化システムを工夫した。同時に、染色分布および強度をOC125と新規抗体との間で比較するのに有用であるようにそれを設計した。スコアは、以下の標準に従って、細胞のパーセンテージ、染色の強度およびパターンを組み入れた：スコア0：染色なし；スコア1：<5%

50

強いまたは弱い染色；スコア 2：5～50%強いまたは弱い染色；スコア 3：51～75%強いまたは51～100%弱い染色；スコア 4：76～99%強い染色；およびスコア 5：100%強い染色（図3）。病理学者はまず、OC125で染色された全ての組織マイクロアレイを再検査し、各コアをスコア化した。その後、OC125でのスコア化から1～数日後、前の結果を参照することなく、新規抗体で染色された同じコアをスコア化した。全てのスコア化が完了した後初めて、各コアについての染色間のスコア化の直接比較を行った。全ての非卵巣組織マイクロアレイについて同じプロセスを用いた。比較後、コア染色を、ポイント差に基づいて一致、不定、または不一致であると決定した。一致したコアは、0～1ポイントだけ異なり、不定のコアは2ポイントだけ異なり、不一致のコアは3～5ポイントだけ異なった。このルールの1つの例外は、1ポイントの差が0と1のスコアの間であったときであり、その場合、その差は不定とみなされた。これは、陰性症例を、まさに限局的に陽性の症例から正確に区別するためであった。

10

【0149】

実施例 2

抗MUC16モノクローナル抗体の生成および特徴づけ

個々のペプチドおよび組換えGST-MUC16^{C114}タンパク質の両方を用いるELISAに基づいたスクリーニングによって、MUC16指向性モノクローナル抗体を単離し、続いて、単一細胞クローンの連続サブクローニングを行った。

表1Aおよび1B：MUC16カルボキシ末端モノクローナル抗体の、GST-MUC16^{C114}に対する反応性を示すウェスタン分析、OVCA3野生型細胞におけるFACS分析

20

S分析

【0150】

【表 1】

表 1A

ELISA ハイブリ ドーマ 上清 (1:1)	ペプチド 1			ELISA ハイブリ ドーマ 上清 (1:1)	ペプチド 2			ELISA ハイブリ ドーマ 上清 (1:1)	ペプチド 3		
	(1:10) GST- MucCD ウェスタ ン+/-	(1:1) OVCAR3 FACS +/-	アイソ タイプ		(1:10) GST- MucCD ウェスタ ン+/-	(1:1) OVCAR3 FACS +/-	アイソタイプ		(1:10) GST- MucCD ウェスタ ン+/-	(1:1) OVCAR3 FACS +/-	アイソ タイプ
10A2	+	-	IgG1,IgM	13H1	弱い	-	IgG1	22E10	+	-	IgG2b
23D4	-	-	不明	28F8	+	+	IgG1,IgM	22F11	弱い	-	IgM
2F4	弱い	-	IgG1,IgM	11B6	-	-	IgM	19G4	弱い	-	IgG1,IgM
9B11	弱い	+/-	IgG1	4C7	+	-	IgG1	31A3	弱い	-	IgG1
23D3	弱い	+	IgG1,IgG2b	28F7	+	+	IgG1	4C2	+	-	IgG1,IgM
30B1	-	-	IgG1	9C7	+	+	IgG1	27G4	+	-	IgM
31B2	+	-	IgM	9C9	+	+	IgG1, IgG2b	19D1	+	-	IgG2b
				4H11	+	+	IgG2b, IgM	22F1	+	-	IgG2b,IgM
				4A2	-	-	IgG1	4D7	+	-	IgG3
				4A5	+	+	IgG1	9A5	-	-	IgM
				29G9	+	-	IgG1	31C8	-	-	IgG2b
				5C2	+	+	IgG1	6H2	弱い	-	IgG1,IgM
				23G12	-	-	IgG1,IgG2a	10F6	-	-	IgG1
				25G4	-	-	IgG1,IgM	3H8	+	-	IgG1,IgM
				26B2	+	+	IgG1,IgG2b,IgM	24G12	-	-	IgG1,IgM
				25H3	-	-	IgG1,IgM				

表 1B

ペプチド 1			ペプチド 2			ペプチド 3		
	OVCAR3 FACS +/-	アイソ タイプ		OVCAR3 FACS +/-	アイソタイプ		OVCAR3 FACS +/-	アイソ タイプ
9B11.20.16	+/-	IgG1	9C9.21.5.13	+	IgG2b	31A3.5.1	-	IgG1
			4H11.2.5	+	IgG2b			
			9C7.6	+	IgG1			
			5C2.17	+	IgG1			
			4A5.37	+	IgG1			
			28F7.18.10	+	IgG1			

表 2 : M U C 1 6 の例示的な部分に特異的な抗体

【 0 1 5 1 】

10

20

30

40

【表 2 - 1】

1. Muc16 ポリペプチド 1:

14394 14410 (MUC16 配列)
NFSPLARRVDRVAIYEE (配列番号 01) 17 aa

このペプチドに特異的であるマウスモノクローナル:

9B11.20.16 (IgG1)
10A2 (IgG1, IgM)
2F4 (IgG1, IgM)
23D3 (IgG1, IgG2b)
30B1 (IgG1)
31B2 (IgM)

10

2. Muc16 ポリペプチド 2:

14425 14442 (MUC16 配列)
TLDRSSVLVDGYSPNRNE (配列番号 02) 18 aa

このペプチドに特異的であるマウスモノクローナル:

4H11.2.5 (IgG2b) 13H1 (IgG1) 29G9 (IgG1)
9C9.21.5.13 (IgG2b) 28F8 (IgG1, IgM) 23G12 (IgG1, IgG2a)
9C7.6 (IgG1) 11B6 (IgM) 25G4 (IgG1, IgM)
5C2.17 (IgG1) 4C7 (IgG1) 26B2 (IgG1, IgG2b, IgM)
4A5.37 (IgG1) 4A2 (IgG1) 25H3 (IgG1, IgM)
28F7.18.10 (IgG1)

20

3. Muc16 ポリペプチド 3 (配列番号 03)

14472 14492 (MUC16 配列)
CGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQ 21 aa 30

このペプチドに特異的であるマウスモノクローナル:

31A3.5.1 (IgG1) 19D1 (IgG2b) 10F6 (IgG1)
22E10 (IgG2b) 22F1 (IgG2b, IgM) 3H8 (IgG1, IgM)
22F11 (IgM) 4D7 (IgG3) 24G12 (IgG1, IgM)
19G4 (IgG1, IgM) 9A5 (IgM)
4C2 (IgG1, IgM) 31C8 (IgG2b)
27G4 (IgM) 6H2 (IgG1, IgM)

40

14452 14475
FWAVILIGLAGLLGLITCLICGVL (配列番号 14) は膜貫通領域である 24 aa

4. システインループポリペプチド(配列番号19)を含有する Muc16 ポリペプチド 4 (配列番号15)

【 0 1 5 2 】

[illegible]

9C7 (IgM)

4F12	IgM κ	10	
6H6	IgM κ		
25C2	IgM κ		
6E8	IgM κ		
2A3	IgM、IgG1、IgG2b、 κ		
2G4	IgM、IgG1、 κ		
4C8	IgM、 κ		
2A6	IgG1 κ		
24G12	IgG1 κ		
15D5	IgG1 κ		20
6E2	IgM、IgG1、IgG3、IgG2a、 κ		
7E6	IgM、kappa、 λ		
7G11	IgM κ		
20C3	IgG1、IgG2b		
9A3	IgM κ		
15B6	IgM κ		
19D3	IgM κ		
5H8	IgM、IgG1、IgG2b、 κ	30	
24A12	IgM κ		
2D10	IgG3、IgM κ	40	
5B2	IgM、IgG3、IgG2b、IgG2a、IgG1、 κ		
8B6	IgG2a、IgG3、 κ		
5A11	IgM、 κ		
7D11	輕鎖 κ のみ		
9F10	IgM、 κ		
15D10	IgM、 κ		
18D2	IgM、 κ		
13A11	IgM、 κ		

【 0 1 5 3 】

【表 2 - 3】

1A9	IgM、 κ
3B2	IgM、 κ
24F6	IgM、 κ
24E4	IgM、 κ
5A1	IgG2a、IgM、 κ
7B9	IgM、 κ
22F4	IgM、 κ

10

同定されたモノクローナル抗体は表 1 A および表 2 に列挙されている。選択されたモノクローナル抗体のそれぞれは、GST - MUC16^{c114} に対して反応性であった。市販の MUC16 指向性抗体 (OC125、M11、または VK8) は、ELISA またはウェスタンブロッティングにおいて GST - MUC16^{c114} に結合しなかった。クローンを、OVCA R3 卵巣癌細胞に対する FACS において、および GST - MUC16^{c114} に対するウェスタンブロット分析において試験し (表 1 B)、選択された精製モノクローナル抗体を単離した。

20

【0154】

本発明者らは、OVCA R3 野生型および phrGFP - MUC16^{c114} を形質導入された SKOV3 細胞を用いて、選択された抗体を FACS 分析によって特徴づけた。選択されたモノクローナル抗体の全ては、両方の細胞系に結合し、一方、市販の VK8、M11、および OC125 抗体は OVCA R3 細胞に結合したが、SKOV3 - phrGFP - MUC16^{c114} 細胞系に結合しなかった。ポリペプチド 3 に対する抗体は、それが内部エピトープであるため、透過処理を必要とした (図 7)。

【0155】

GST - MUC16^{c114} 精製タンパク質を用いたウェスタンブロット分析は、4H11 および 9C9 抗体との強い結合を示したが (図 4 A)、他の選択された抗体は、より弱い結合を示した。SKOV3 - phrGFP - MUC16^{c114} トランスフェクタントもまた、4H11 および 9C9 抗体を用いたウェスタンブロット分析によって陽性であった (図 4 B)。前述同様に、市販の抗体は、GST - MUC16^{c114} 精製タンパク質または SKOV3 - phrGFP - MUC16^{c114} 細胞系の細胞溶解産物と相互作用しなかった。

30

【0156】

6 個のモノクローナル抗体の OVCA R3 MUC16 に対する結合を、親和性結合研究において調べた。多数の MUC16 結合部位を有する 3 つの抗体、9C7、5C2、および 28F7 は、これらの抗体の OVCA R3 細胞への非特異的結合と比較して、わずかなレベルの結合を示した。対照的に、4H11、9C9、および 4A5 モノクローナル抗体は、図 5 A に示されているように、高特異的な結合親和性を示し、OVCA R3 細胞の細胞表面エピトープに対して 6.8 ~ 8.6 nM の結合親和性であった。本発明者らはまた、細胞表面 MUC16 タンパク質に結合した抗体の内部移行を調べた。本発明者らは、4H11 エピトープを含む MUC16 のカルボキシ末端、および OC125 抗体と相互作用する単一の縮重タンデムリピート配列を有する形質移入 SKOV3 - phrGFP - MUC16^{c334} における内部移行を調べた。市販の抗体 OC125、M11、および VK8 は全て、この形質導入された細胞系の細胞表面に結合する。¹³¹I 標識 4H11 は、高レベルでの迅速な内部移行を示したが、¹³¹I 標識 OC125 抗体ははるかに低い速度で内部移行した (図 5 B)。

40

【0157】

50

実施例 3

免疫組織化学検査の結果：

高特異的結合親和性を示したため、抗体 9 C 9、4 A 5、および 4 H 1 1 を、O V C A R 3 細胞系を用いる免疫組織化学検査での有用性について特徴づけた。3 つのうち、4 H 1 1 抗体を、その他の 2 つの抗体と比較して、そのロバストで、高感度で、かつ特異的な染色パターンに基づいて、選択し、ヒト組織に用いるために最適化した。

【 0 1 5 8 】

A . 卵巣

4 0 人の患者由来の原発腫瘍、転移腫瘍、および再発腫瘍を表す 4 1 9 個のコアで構成される 2 つの高病期、高悪性度の漿液性卵巣癌腫組織マイクロアレイスライドを、O C 1 2 5 および 4 H 1 1 モノクローナル抗体の両方を用いて染色した (図 2)。O C 1 2 5 組織マイクロアレイは、3 ~ 5 染色を有する 2 7 9 個 (6 6 %) のコア、1 ~ 2 染色を有する 9 9 個 (2 4 %) のコア、および染色なしの 4 1 個 (1 0 %) のコアを示した。4 H 1 1 組織マイクロアレイは、3 ~ 5 染色を有する 2 3 6 個 (5 6 %)、1 ~ 2 染色を有する 9 1 個 (2 2 %)、および染色なしの 9 2 個 (2 2 %) を示した。その 2 つの抗体は、2 3 3 個 (5 6 %) のコアにおいて一致、1 6 1 個 (3 8 %) において不定、および 2 5 個 (6 %) において不一致であった。2 5 個の不一致のコアのうち、1 2 個 (不一致の症例の 4 8 %、全症例の 3 %) は、O C 1 2 5 より高い 4 H 1 1 の陽性を示した。9 個は、4 ポイントの差だけ不一致であり、3 個は 5 ポイントの差だけ不一致であった。不一致と不定のコアが合わせて、合計 1 8 6 個あり、そのうちの 4 8 個 (2 6 %) が、4 H 1 1 に関して O C 1 2 5 より高い染色を示した。4 H 1 1 および O C 1 2 5 の両方の染色パターンは細胞質および膜であったが、O C 1 2 5 の膜パターンは、症例の大部分において、4 H 1 1 より強くかつより良く画定された。不一致の症例から、他の症例より 4 H 1 1 のより高いレベルを実証された。

【 0 1 5 9 】

B . 乳癌

4 H 1 1 の抗体の特異性を試験するために、4 H 1 1 染色について、様々な他の組織もまた調べた。乳房 (患者の数は入手できなかった) の浸潤性腺管癌の 5 0 個のコアのうち、2 個 (4 %) のみが 4 以上の 4 H 1 1 染色のスコアを示し、O C 1 2 5 染色について 3 ~ 5 のスコアを有するものはなかった。O C 1 2 5 に関する染色パターンはほとんど頂端 / 管腔であり、いくらかの顆粒状細胞質染色があった。細胞質内管腔を有するいくつかの腫瘍もまた、O C 1 2 5 染色に反応した。4 H 1 1 は、膜を染色強化することなしに、よりびまん性の細胞質濃染 (b l u s h) を示した。

【 0 1 6 0 】

対照的に、浸潤性小葉乳癌腫組織マイクロアレイ (生存腫瘍を有する 1 7 9 個のコアで構成される、患者の数は入手できなかった) は、4 H 1 1 に関する高頻度の M U C 1 6 染色を生じた。この組織マイクロアレイにおいて、1 6 8 個 (9 4 %) のコアは、O C 1 2 5 についての染色を示さず、5 個 (3 %) は 1 ~ 2 染色を示し、6 個 (3 %) だけが 3 の染色強度を示した。4 H 1 1 染色は、分布パターンで異なり、4 9 個 (2 7 %) が染色なし、8 1 個 (4 5 %) が 1 ~ 2 染色を示し、4 9 個 (2 7 %) が 3 ~ 4 染色を示した。O C 1 2 5 も 4 H 1 1 も、5 の染色強度をもつコアはなかった。染色パターンは、O C 1 2 5 および 4 H 1 1 の両方について、細胞質、管腔 / 膜、管腔内の染色パターンであった。管腔内パターンは、両方の染色について強くかつ濃く、小葉癌腫において一般的に存在する細胞質内管腔を強調した。一致率は、3 4 % 一致、4 3 % 不定、および 2 3 % 不一致であった。不定と不一致の症例のうち、O C 1 2 5 が 4 H 1 1 より高いものはなかった。全ての 4 2 個の不一致の症例、および 7 7 個の不定の症例のうちの 7 6 個は、O C 1 2 5 より高い 4 H 1 1 を有した。インサイチュの良性の乳管および小葉癌腫において 4 H 1 1 について限局的な管腔染色もあった。

【 0 1 6 1 】

C . 肺、脾臓、および前立腺の腺癌

他の器官由来の腫瘍はどちらの抗体とも反応性ではなかった。肺腺癌 T M A は、生存腫瘍を含有する 8 6 人の患者由来の 2 3 7 個のコアを有した。膵臓 T M A において、膵管内乳頭粘液性新生物 (I P M N) および浸潤性膵管癌腫を含む膵臓粘液性腫瘍を含有する 2 1 人の患者由来の 9 2 個のコアがあった。前立腺癌 T M A において、1 6 9 個のコアがあった (患者の数は入手できなかった) 。これらの癌組織マイクロアレイのいずれも、O C 1 2 5 も 4 H 1 1 のどちらに対しても有意な結合を生じなかった。この情報は表 3 に要約されている。

表 3 . 組織マイクロアレイにおける 4 H 1 1 と比較した O C 1 2 5 の染色強度

【 0 1 6 2 】

【表 3】

部位	OC125対4H11染色強度スコア(%)					
	0		1-2		3-5	
	OC125	4H11	OC125	4H11	OC125	4H11
卵巣高悪性度漿液性	10	28	24	22	66	56
乳房浸潤性管	68	78	32	18	0	4
乳房浸潤性小葉	94	27	3	45	3	27
肺腺癌	63	77	24	18	13	5
膵臓粘液性新生物	98	88	2	10	0	2
前立腺腺癌	0	0	0	0	0	0

スコア 0 : 0 % 染色 ; 1 : < 5 % 強いまたは弱い染色 ; 2 : 5 ~ 5 0 % 強いまたは弱い染色 ; 3 : 5 1 ~ 7 5 % 強い染色、または 5 1 ~ 1 0 0 % 弱い染色 ; 4 : 7 6 ~ 9 9 % 強い染色 ; 5 : 1 0 0 % 強い染色

D . 正常組織

正常な成人の結腸、直腸、子宮頸外部 (e c t o c e r v i x) 、小腸、卵巣、肝臓、膵管、膵臓、腎臓、および皮膚において O C 1 2 5 または 4 H 1 1 での染色はなかった。O C 1 2 5 および 4 H 1 1 の両方が、子宮頸管内腺 (e n d o c e r v i c a l g l a n d) (O C 1 2 5 管腔、4 H 1 1 細胞質で弱い) 、食道腺 (管腔) 、気管支上皮 (O C 1 2 5 管腔、4 H 1 1 細胞質内顆粒) 、および胸腺小体 (細胞質) を染色した。4 H 1 1 は、胃腺の、特に陰窩において、細胞質内顆粒状パターンで、弱 ~ 中程度の染色を実証した。4 H 1 1 のみでの斑状細胞質内染色を示した他の器官は、前立腺、精巣の精細管、および膵臓の島細胞であった。膵島細胞における染色は特に強く、一貫していた。4 H 1 1 での肝臓、腎臓、および脳の非特異的染色もあった。O C 1 2 5 で染色され、かつ 4 H 1 1 で染色されなかった症例はなかった。

【 0 1 6 3 】

同様に、胎児心臓、胆嚢、結腸、小腸、肝臓、直腸、副腎、甲状腺、膵臓、皮膚、骨、精巣上体、脳、肺、筋肉、平滑筋、腎臓、眼、臍帯、および胎盤において O C 1 2 5 も 4 H 1 1 のどちらについても染色はなかった。O C 1 2 5 のみが、成体組織のものと類似したパターンで胸腺小体を染色した。4 H 1 1 は、胎児の膵内分泌細胞および子宮頸管内腺の両方を、それらの成人の対応物のものと類似したパターンで染色した。島細胞は、顆粒状細胞質パターンを示し、子宮頸管内腺は線状管腔パターンを示し、それは、成体組織における O C 1 2 5 パターンにより類似していた。

【 0 1 6 4 】

実施例 4

M U C 1 6 抗原に向けて遺伝的に標的化された T 細胞の養子移入後の S C I D - B e i g e マウスにおける確立した腹膜卵巣腫瘍の根絶の成功

目的 : 卵巣癌と診断されたほとんどの患者は、最終的には彼らの疾患で死亡する。このため、この悪性腫瘍の処置への新規なアプローチが必要とされている。腫瘍関連抗原へ標的化される、人工的 T 細胞受容体であるキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする遺伝子の導入によりエキソピボで遺伝子改変された、患者自身の T 細胞の養子移入は、卵巣癌の

処置に適用可能な癌治療への新規かつ有望なアプローチである。

【0165】

実験設計：本発明者らは、大多数の卵巢癌腫で高度に発現する抗原である、MUC-CDと名付けられたMUC16の保持される細胞外ドメインへ標的化されるいくつかのCARを作製している。本発明者らは、標的MUC-CD抗原を発現するように遺伝子改変されたNIH3T3線維芽細胞から作製された人工の抗原提示細胞(AAPC)上での共培養アッセイにより、ならびにヒトOV-CAR3(MUC-CD)卵巢腫瘍細胞系および原発性の患者の腫瘍細胞を利用する細胞傷害性アッセイにより、これらのCARを発現するようにレトロウイルスにより形質導入されたヒトT細胞のインビトロの生物学的特徴を調べる。最後に、本発明者らは、SCID-Beigeの同所性の異種OV-CAR3(MUC-CD)マウス腫瘍モデルにおいてMUC-CD標的化T細胞のインビボの抗腫瘍効力を評価する。

10

【0166】

この研究に用いられる例示的な配列は図17~19にある。

【0167】

結果：健常ドナーおよび卵巢癌患者の両方由来のCAR改変MUC-CD標的化T細胞は、ヒト卵巢細胞系ならびに原発卵巢癌腫細胞の両方に対して、効率的なインビトロの細胞溶解活性を示した。MUC-CD標的化T細胞は、3T3(MUC-CD/B7.1)AAPC上での複数回サイクルの共培養によってエキソビボでさらに増殖させてもよい。腹腔内ヒトOV-CAR3(MUC-CD)腫瘍を担持するSCID-Beigeマウスへ注入された増殖したMUC-CD標的化T細胞は、進行性疾患の状況においてさえも進行を遅らせるか、または腫瘍を完全に根絶するかのいずれかであった。

20

【0168】

結論：これらの有望な前臨床試験は、高リスクMUC-16⁺卵巢癌腫をもつ患者を処置する臨床実践場面における潜在的な治療的アプローチとして、MUC-CD標的化T細胞のさらなる研究を正当化している。

【0169】

序論

卵巢癌は、世界中で6番目に最も頻度の高い癌であり、女性における癌関連死亡原因の第7位である(1、2)。手術および化学療法による複数様式(multimodality)治療にも関わらず、卵巢癌腫を有するたいていの患者は、予後が良くない。このため、この疾患を処置するための代わりとなるアプローチが緊急に必要とされている。

30

【0170】

腫瘍細胞の表面に発現した抗原にエキソビボで遺伝子的に標的化された患者自身のT細胞の注入は、癌の養子免疫治療への有望な新規のアプローチであり、臨床実践場面において唯一、最近、真剣に探求されているものである。T細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)と名付けられた人工的T細胞受容体をコードする遺伝子のレトロウイルスによる導入により、腫瘍関連抗原を標的にするように遺伝子改変されてもよい。細胞傷害性を腫瘍細胞へ向ける人工的T細胞受容体を発現するためのT細胞の遺伝子改変は、癌細胞の免疫認識および排除を増強する手段を提示する。CARは、最も一般的には、TCR鎖細胞質シグナル伝達ドメインに融合した、膜貫通ドメイン(典型的には、CD8、CD28、OX-40、および4-1BB)に融合した、所定の腫瘍関連抗原を標的にするマウスモノクローナル抗体に由来する一本鎖断片長抗体(scFv)で構成される(3~13)。T細胞特異性を再プログラムするために用いられる場合、これらの融合受容体は、天然の抗原の認識を可能にする。T細胞によって発現した場合、生じた構築物は、標的にされた抗原との会合で、T細胞活性化、増殖、および標的細胞の溶解を誘導する。これらの融合受容体は、一次T細胞において機能的な抗原依存性共刺激シグナルを伝達し、刺激シグナル伝達のために内因性TCRおよびキメラ受容体の両方が会合した場合、持続性T細胞増殖を可能にする。今まで、CAR改変T細胞を利用する前臨床試験が、幅広い種類の悪性腫瘍において有望な結果を実証している(3、4、11、14~18)。最近になって、この

40

50

アプローチは、第一相試験の形で臨床的に調査されている（６、１９～２１）。これらの遺伝的アプローチは、癌細胞の免疫認識および排除を増強する手段を提供する。

【０１７１】

卵巣癌腫は、患者の長期予後が腫瘍に対する内因性免疫応答の程度および質によって著しく影響を及ぼされるという事実に基づいて、内因性免疫応答を誘導する能力がある比較的、免疫原性腫瘍であるように見える。具体的には、卵巣癌腫瘍微小環境内の内因性エフェクターＴ細胞の存在が、患者生存の長期化に直接的に相関することが実証づけられている（２２～２５）。対照的に、腫瘍内の免疫抑制性ＣＤ４⁺ＣＤ２５^{hi}制御Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）の数の増加は、それが次におそらく浸潤性エフェクターＴ細胞の抗腫瘍活性を無効にし、より短い患者生存と相関する（２６～２９）。実際、癌に対する内因性免疫応答が患者にとって有益であるのか有害であるのかを最終的に示すのは、腫瘍微小環境内のＴｒｅｇ対エフェクターＴ細胞の比率であることが明らかである（２４、２８）。この状況において、後で患者へ注入して戻される、腫瘍標的化エフェクターＴ細胞の集団をエクスピボで生成し、次に増殖させる能力は、次には、Ｔｒｅｇ対エフェクターＴ細胞比を、疾患を根絶するのにより有利なものへと傾け得る。

10

【０１７２】

ムチンは、細胞恒常性および上皮表面の保護にとって重要な生体分子である。卵巣癌におけるムチンの発現の変化は、診断、予後、および処置に活用される可能性がある（１）。ＭＵＣ１６は、たいていの卵巣癌腫に過剰発現する、そのようなムチンの１つであり、卵巣癌の検出および進行についての確立された代用血清マーカー（ＣＡ－１２５）である（３０～３３）。ＭＵＣ１６は、複数の反復配列からなる、ＣＡ－１２５と名付けられた、大きな切断され、遊離されるドメイン、ならびに残留する非反復の細胞外断片、膜貫通ドメイン、および細胞質側尾部を含む保持されるドメイン（ＭＵＣ－ＣＤ）で構成される高グリコシル化ムチンである（３４）。その抗原は、別の方法で、子宮、子宮内膜、ファロピウス管、卵巣、ならびに腹腔および胸腔の漿膜において低レベルで発現するのみであるため、ＭＵＣ１６は、免疫に基づいた治療にとって潜在的に魅力的な標的である。

20

【０１７３】

しかしながら、ＭＵＣ１６の細胞外ドメインの大部分が切断され、分泌されるという事実によって、卵巣癌腫における標的抗原としてのＭＵＣ１６の有用性は限定される。実際、今まで、ＭＵＣ１６に対する全ての報告されたモノクローナル抗体は、その糖タンパク質の大きな分泌されたＣＡ－１２５画分に存在するエピトープに結合し、その抗原の保持される細胞外画分（ＭＵＣ－ＣＤ）に結合することが知られているものはない（３５～３７）。その抗原のＭＵＣ－ＣＤ画分は、細胞表面に保持され、ＭＵＣ１６のこの部分に特異的なＴ細胞を発生させることは、養子細胞免疫治療のための標的としてのＭＵＣ１６の限界を大いに克服し得る。この目的を達成するために、本発明者らは、保持されるＭＵＣ－ＣＤ細胞外ドメインに特異的な一連のマウスモノクローナル抗体を以前に生成している（３８）。そのようなモノクローナル抗体の１つである４Ｈ１１を発現するハイブリドーマを利用して、本発明者らは、ＭＵＣ－ＣＤ抗原に特異的ないくつかのＣＡＲを構築することに成功している。この発明は、少なくとも鎖、シグナル伝達領域、および選択された標的と特異的に相互作用する結合エレメントで構成されるキメラＴ細胞受容体をコードする核酸、ならびに、鎖部分、シグナル伝達領域、および結合エレメントを含むキメラＴ細胞受容体を提供する。

30

40

【０１７４】

この報告書において、本発明者らは、これらのＭＵＣ－ＣＤ標的化ＣＡＲをヒトＴ細胞へ高効率的にレトロウイルスにより形質導入し、生じたＴ細胞が、インビトロでＭＵＣ－ＣＤ⁺腫瘍細胞を特異的に標的にして溶解し得ることを実証している。さらに、本発明者らは、ＭＵＣ－ＣＤおよび共刺激リガンドＢ７．１（ＣＤ８０）を発現するように遺伝子改変されたＮＩＨ（３Ｔ３）線維芽細胞上での反復した共培養によって、インビトロでの効率的なＭＵＣ－ＣＤ標的化Ｔ細胞増殖を実証している。改変Ｔ細胞の増殖の成功により、本発明者らが次に、確立した腹腔内ＭＵＣ－ＣＤ⁺ヒト卵巣腫瘍を担持する免疫無防備

50

状態の S C I D - B e i g e マウスにおけるインビボ研究を行うのに十分な T 細胞数を生成することが可能になった。意義深いことには、これらの研究において、本発明者らは、処置されていないマウスかまたは無関係の抗原に向けて標的化された C A R を担持する T 細胞で処置されたマウスのいずれかと比較した場合、直接的な腹腔内注射後ならびに静脈内注射後のどちらも、M U C - C D 標的化 T 細胞の著しい抗腫瘍効力を実証している。加えて、本発明者らは、癌患者由来の一次腹水由来卵巣癌腫細胞を標的にする 4 H 1 1 - 2 8 z + 患者の T 細胞および健常ドナーの T 細胞の有意な細胞傷害性を実証している。

【 0 1 7 5 】

本発明者らの知る限りでは、これは、M U C 1 6 抗原へ遺伝的に標的化された T 細胞が、インビトロまたはインビボのどちらでも M U C 1 6 + 腫瘍に対して著しい抗腫瘍効力を

10

【 0 1 7 6 】

材料および方法

細胞系および T 細胞

O V - C A R 3 腫瘍細胞系を、10% 熱不活化 F B S、非必須アミノ酸、H E P E S 緩衝液、ピルビン酸塩、および B M E (I n v i t r o g e n) を補充した R P M I 1 6 4 0 (I n v i t r o g e n、G r a n d I s l a n d、N Y) 中で培養した。P G 1 3 および g p g 2 9 レトロウイルスの産生細胞系を、10% F C S を補充した D M E M (I n v i t r o g e n) 中で培養し、以前に記載された (3) N I H - 3 T 3 人工の抗原提示細胞 (A A P C) を、10% 熱不活化ドナー仔ウシ血清を補充した D M E M 中で培養した。T 細胞を、B D V a c u t a i n e r C P T チューブ (B e c t o n D i c k i n s o n、F r a n k l i n L a k e s、N J) 中に、製造業者の指示に従って、I R B 承認プロトコール # 9 5 - 0 5 4 の下、健常ドナーの末梢血から採取した。全ての培地に、2 m m o l / L の L - グルタミン (I n v i t r o g e n)、1 0 0 ユニット / m L のペニシリン、および 1 0 0 μ g / m L のストレプトマイシン (I n v i t r o g e n) を補充した。T 細胞を、2 0 I U / m l の I L - 2 (N o v a r t i s P h a r m a c e u t i c a l s、E a s t H a n o v e r、N J) を補充した上記のような R P M I 1 6 4 0 で培養し、示される場合、培地に、1 0 n g / m L のインターロイキン 1 5 (R & D S y s t e m s、M i n n e a p o l i s、M N) を補充した。

20

30

【 0 1 7 7 】

患者腹水由来癌細胞の単離

原発性ヒト腹水由来癌細胞を、I R B 承認プロトコール # 9 7 - 1 3 4 の下、新たに診断された進行性漿液性卵巣癌腫の手術を受けた卵巣癌患者から入手した。腫瘍細胞を、患者の腹水から、室温で 1 0 分間の 6 0 0 g での遠心分離によって単離した。細胞を、1 × P B S で 1 回、洗浄し、将来の分析のために、1 0 % F B S を補充した R P M I 1 6 4 0 培地中で培養した。

【 0 1 7 8 】

M U C - C D 標的化 4 H 1 1 z および 4 H 1 1 - 2 8 z C A R の作製

40

4 H 1 1 モノクローナル抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、ハイブリドーマ細胞系 4 H 1 1 に由来した。4 H 1 1 R N A から作製した c D N A を利用して、本発明者らは、他のところで記載されているように、改変型プライマーを利用する R A C E P C R によって V_H コード領域を単離した (3 9、4 0)。V_L 鎖可変領域を、O r l a n d i らによって記載されているように改変型プライマーを利用する標準 P C R によってクローニングした (4 1、4 2)。生じた V_H および V_L 断片を、T o p o T A P C R 2 . 1 クローニングベクター (I n v i t r o g e n) へサブクローニングし、配列決定した。その後、V_H および V_L 断片を (G l y₄ S e r)₃ スペーサードメインにライゲーションし、4 H 1 1 s c F v を作製し、それをオーバーラップ P C R によってヒト C D 8 リーダーペプチド (C D 8 L) に融合した (9、4 1)。M U C - C D 標的化 4 H 1 1

50

CARを構築するために、CD8L-4H11 scFvのコード領域を、T細胞受容体CD3 シグナル伝達ドメインに融合した、ヒトCD8ヒンジドメインおよび膜貫通ドメインに融合し(4H11z CARが生成)、または代替としてCD28膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインに融合した(4H11-28z CARが生成)(3、9、43)。その後、生じたCAR構築物を、改変型MMLVレトロウイルスベクターSFGへサブクロニングした(44)。形質導入されたgpg29線維芽細胞由来のVSV-G偽型(pseudotyped)レトロウイルス上清を用いて、安定なPG13テナガザル白血病ウイルス(GalV)エンベロープ偽型レトロウイルス産生細胞系を構築した(41)。

【0179】

レトロウイルス遺伝子移入

単離された健常ドナー末梢血単核細胞(PBMC)に対し、レトロネクチン(retronectin)をコーティングした非組織培養プレート上で、2µg/mlの植物性血球凝集素(PHA)(Sigma.St.Louis,MO)で活性化し、レトロウイルスで形質導入した(45)。簡単に述べれば、6ウェル非組織培養プレート(BD Biosciences, San Jose, CA)をRetroNectin(RN)(Takara Biomedicals, Otsu, Japan)で、製造業者の指示に従って、コーティングした。PHA活性化から48時間後、1mlの補充されたRPMI培地中 1×10^6 個のT細胞のアリコートと、1mlのSFGレトロウイルス上清と共に、RNをコーティングしたプレートの各ウェルに入れた。T細胞を、毎日新鮮なレトロウイルス上清を加えながら、3日間連続して、毎日、30で1時間、2000gで遠心分離した(45)。7日目に遺伝子移入をFACSによって評価した。

【0180】

関連のNIH-3T3マウス線維芽細胞の人工の抗原提示細胞を作製するために、MUC-16抗原の保持される細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインをコードするMUC-CD構築物を、最初にSFGレトロウイルスベクターへサブクロニングした(SFG(MUC-CD))。SFG(MUC-CD)の野生型NIH-3T3線維芽細胞へのレトロウイルスによる形質導入を行なうことによって、3T3(MUC-CD)AAPCを作製し、一方、以前に確立した3T3(B7.1)線維芽細胞をレトロウイルスによる形質導入を行なうことによって、3T3(MUC-CD/B7.1)AAPCを作製した(41、46)。高度に富化された細胞系をFACSによって単離した。

【0181】

OV-CAR3(MUC-CD)細胞系およびOV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc)細胞系を作製するために、本発明者らは、WT OV-CAR3ヒト卵巣癌細胞系に、以前に記載されているような(47)SFG(GFP-FFLuc)および/または他のところで記載されているような(44)gpg29線維芽細胞由来のSFG(MUC-CD)VSV-G偽型レトロウイルスの上清を用いて、レトロウイルスによる形質導入を行なった。生じた腫瘍細胞を、OV-CAR3(MUC-CD)細胞系についてはMUC-CD発現のみか、またはOV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc)細胞系についてはMUC-CDとGFPの二重発現のいずれかをFACSによって分別した。FACSによるMUC-CD発現を、4H11モノクローナル抗体を用いて評価した。

【0182】

CAR⁺ヒトT細胞のインビトロ分析

刺激による増殖およびサイトカイン放出をインビトロで評価するために、形質導入されたT細胞を、6ウェル組織培養プレート(BD Biosciences)において、サイトカインを補充せずに10%FBSを補充したRPMI培地中、コンフルエントなNIH-3T3 AAPC上でレトロウイルスによる形質導入を行なった後7日間、共培養した。インビボ研究のための十分な数のCAR改変T細胞を生成するために、形質導入されたT細胞を、以前に記載されているように、20IU/mlのIL-2および10ng/ml

mLのIL-15を補充したRPMI培地中、B7.1 + AAPC (3T3 (MUC-CD/B7.1))上で共培養した(3、43)。患者T細胞を、ヒトCD3/CD28ビーズ(DYNAL(登録商標)、Invitrogen、Carlsbad、CA)を用いて、製造業者の指示に従い、活性化し、かつ増殖させた。

【0183】

CAR発現のウェスタンブロット分析

0.1 mol/LのDTT(Sigma)による還元条件下でのT細胞溶解産物のウェスタンブロット分析を、以前に記載されているように行った(46)。簡単に述べれば、形質導入されたT細胞を、PBS中で洗浄し、ミニコンプリートプロテアーゼインヒビターを用いて、製造業者の指示に従い(Roche Diagnostics、India napolis、IN)、放射免疫沈降アッセイ(RIPA)緩衝液(Boston BioProducts、Worcester、MA)中に再懸濁した。生じたタンパク質を、6×還元ローディング緩衝液(Boston BioProducts、Worcester、MA)の添加および100で10分間の加熱後、12%SDS-PAGEミニゲル(Bio-Rad、Hercules、CA)で分離した。その後、分離されたタンパク質を、Immobilon膜に転写し、抗ヒトCD3鎖モノクローナル抗体(BD Biosciences)を用いて探索した。抗体結合を、ヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化抗体でそのプロットを探索し、続いて、Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus(Perkin-Elmer Life Sciences、Boston、MA)を用いて製造業者の指示に従って、発光を検出した。

【0184】

細胞傷害性アッセイ

インビトロでの改変T細胞の細胞傷害性を、DELTA(登録商標)EuTDAアッセイ(PerkinElmer LAS, Inc、Boston、MA)を用い、製造業者の推奨に従って評価した。細胞傷害性を、示された比でのエフェクターT細胞対標的OV-CAR3(MUC-CD)細胞または原発腫瘍細胞(E:T)において2時間で評価した。これらのアッセイにおけるエフェクターT細胞はCD8⁺CAR⁺T細胞の数を表す。

【0185】

サイトカイン検出アッセイ

サイトカインアッセイを、Luminex IS 100システムを利用するIL-2およびIFNを検出するためのマルチプレックスHuman Cytokine Detectionアッセイ(Millipore Corporation、Billerica、MA)を用いて製造業者の仕様書に従って、実施した。サイトカイン濃度を、IS 2.3ソフトウェア(Luminex Corp.、Austin、TX)を用いて評価した。

【0186】

インビボのSCID-Beigeマウス腫瘍モデル

全てのインビボ研究において、8~12週齢のFOX CHASE C.B.-17(SCID-Beigeマウス)(Taconic、Hudson、NY)に最初、 3×10^6 個のOV-CAR3(MUC-CD)腫瘍細胞か、または生物発光画像化(BLI)研究のために、 3×10^6 個のOV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc)腫瘍細胞のいずれかを腹腔内に注射した。その後、 3×10^7 個のCAR⁺T細胞を、示されている通り、腫瘍注射後1日目または7日目に、腹腔内または静脈内に注射した。腹囲の増加、立毛、および刺激に対する応答の低下によって評価される苦痛(distress)についてマウスをモニターした。苦しんでいるマウスを安楽死させた。全てのマウス研究を、Institutional Animal Care and Use Committee承認プロトコル(#00-05-065)の関係において行った。

【0187】

SCID - BeigeマウスにおけるOVCA3 (MUC - CD / GFP - FLuc) 腫瘍細胞の生物発光画像化 (BLI)

BLIを、Living Imageソフトウェアを備えたXenogen IVIS画像化システム (Xenogen; Alameda, CA) を用いて実施した。簡単に述べれば、OVCA3 (MUC - CD / GFP - FLuc) 腫瘍を担持するマウスに、200 μ l のPBS中に懸濁されたD - ルシフェリン (150 mg / kg; Xenogen) を腹腔内に注射し、10分後、2%イソフルラン麻酔下で画像化した。画像収集を、25cmの視野において中間ビニングレベルで0.5分の露光時間で行った (3、43)。

【0188】

10

フローサイトメトリー

T細胞および腫瘍細胞の全てのフローサイトメトリー分析を、Cellquestソフトウェアを備えたFACSscanサイトメーター (BD Biosciences) を用いて実施した。T細胞を、CAR特異的ポリクローナルヤギAlexa Fluor 647抗体 (Molecular probes, Eugene, OR)、フィコエリトリン標識抗ヒトCD4、CD8、B7.1 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA)、B7.2 (Invitrogen, Camarillo, CA)、4-1BBL、およびOX40抗体 (Ancell Corporation, Bayport, MN) を用いて分析した。3T3 (MUC - CD) 細胞およびOVCA3 (MUC - CD) 細胞を、Alexa Fluor 647標識4H11抗体 (MSKCCモノクローナル抗体コア施設において作製および標識された) で染色した。

20

【0189】

CAR⁺T細胞のCFSE標識

CAR⁺T細胞を、CellTrace (商標) CFSE細胞増殖キットを用いて製造業者の推奨 (Molecular Probes, Eugene, OR) に従って、CFSEで染色した。CFSE標識T細胞の増殖を、FACSによって分析した。CFSE標識T細胞のインピボでの検出のために、卵巣腫瘍を40 μ mの細胞ストレーナー (BDFalcon, Franklin Lakes, NJ) を介して解離させ、抗体染色およびFACS分析の前に2%FBS / PBSで2回、洗浄した。

【0190】

30

統計

生存データを、GraphPad Prismソフトウェア (GraphPad Prism software, San Diego, CA) を用いる対数順位解析によって評価した。サイトカインデータを、スチューデント片側t検定によって解析した。

【0191】

結果

本発明者らは、MUC - CD抗原に特異的なモノクローナル抗体を産生する4H11ハイブリドーマを用いてMUC - CD抗原に対して標的とする第1世代 (4H11z) および第2世代 (4H11 - 28z) のCARをコードするSFGレトロウイルスベクターを構築している (図11A)。本発明者らは、鎖特異的抗体で探索される、生じたPG - 13レトロウイルス産生細胞 (SFG - 4H11zおよびSFG - 4H11 - 28z) のウェスタンブロット分析によって、適切なサイズのCARタンパク質の発現を確認した (データ未呈示)。

40

【0192】

第1世代4H11z CARの機能を評価するために、末梢血から単離された健常ドナーT細胞にレトロウイルスで形質導入して、4H11z CARおよび対照19z1 CARを発現させた (図11B)。3T3 (MUC - CD / B7.1) AACP上での共培養後の4H11z形質導入T細胞の増殖によって、4H11z CARの機能を評価した。結果は、19z1改変T細胞と比較して、4H11z形質導入T細胞の特異的増殖を実証している (図11C)。これらのデータは、MUC - CD抗原への4H11z CAR

50

媒介性特異的結合およびその後のT細胞活性化と一致している。

【0193】

たいていの悪性腫瘍は、共刺激リガンドを発現しないため、本発明者らは4H11z CARを、CD28の膜貫通ドメインおよび細胞質共刺激シグナル伝達ドメインを発現するようにさらに改変し、第2世代の4H11-28z CARを構築した(図11A)。ヒトT細胞によって発現した場合、4H11-28z CARが、鎖を介しての一次活性化シグナル(「シグナル1」と呼ばれる)ならびにCD28細胞質ドメインを介しての共刺激シグナル(「シグナル2」と呼ばれる)(それは、次に、外因性共刺激リガンドの非存在下で効率的なT細胞増殖を可能にする)の両方を生じる能力があるかどうかを評価するために、本発明者らは、外因性サイトカインの非存在下で、3T3(MUC-CD) AAPC上または3T3(MUC-CD/B7.1) AAPC上のいずれかでの共培養後のT細胞増殖を比較した。予想した通り、第2世代4H11-28z⁺T細胞は、3T3(MUC-CD) AAPCとの共培養で、4H11z⁺T細胞と比較して、著しく増殖した。対照的に、4H11z⁺T細胞および4H11-28z⁺T細胞は、3T3(MUC-CD/B7.1) AAPC上で同じように増殖した(図12A)。4H11-28z CARによって媒介される共刺激を、3T3(MUC-CD) AAPC上での共培養実験からの2日目の組織培養上清の分析によってさらに検証し、対照19z1⁺および19-28z⁺T細胞、ならびに第1世代4H11z⁺T細胞と比較して、IL-2(T細胞共刺激との関連において典型的に分泌されるサイトカイン)分泌の増強が実証された(図12B)。IFN γ の分泌は、4H11z⁺活性化T細胞と4H11-28z⁺活性化T細胞の間で同等であった。

【0194】

本発明者らは次に、外因性IL-2およびIL-15との関連において、3T3(MUC-CD/B7.1) AAPC上での共培養による毎週の再刺激後にMUC-CD標的化T細胞が増殖する能力を評価した(3)。4H11z⁺T細胞および4H11-28z⁺T細胞の両方が3週間にわたって2logより多く増殖した(図12C)。4H11-28zを形質導入されたT細胞をさらに、AAPC上での最初の活性化後7日間の、およびAAPC上でのその後の2回の共刺激後7日間の、CAR発現についてFACSによって分析し、CAR⁺T細胞画分の予想された富化が実証された(図12D)。増殖した4H11z⁺T細胞に関して同様のデータが生じた(データ未呈示)。

【0195】

OV-CAR3(MUC-CD)細胞および新鮮に単離された腹水由来卵巢腫瘍細胞との共培養後のMUC-CD標的化T細胞のインビトロの細胞傷害性および増殖

4H11z⁺T細胞および4H11-28z⁺T細胞のヒト卵巢癌腫瘍を標的にし、かつ溶解する能力を評価するために、本発明者らは、MUC-CD抗原を発現するように遺伝子改変されたヒトOV-CAR3細胞系を利用し、そのことにより、4H11が標的にするMUC-CD抗原を発現する臨床的卵巢腫瘍試料の大部分をより良く反映している(48)。本発明者らは、最初に、MUC-CD標的化T細胞による特異的な溶解を検証し、無関係の第1世代および第2世代のCD19標的化19z1 CARおよび19-28z CARを発現する対照T細胞と比較して、OV-CAR3(MUC-CD)腫瘍細胞を標的にする、4H11z CAR改変T細胞および4H11-28z CAR改変T細胞の類似した著しい細胞傷害活性が実証された(図13A)。4H11-28z CARを発現するように改変された健常ドナーT細胞は同様に、19-28z形質導入T細胞と比較して、新鮮に単離された腹水由来MUC-CD⁺卵巢癌腫細胞の溶解を示した(図13B)。さらに、4H11-28z CARを発現するように改変された患者の末梢血T細胞は同様に、対照19-28z CARを発現するように改変されたT細胞と比較して、同じ腹水試料由来の自己一次MUC-CD⁺腫瘍細胞を溶解した(図13C)。

【0196】

本発明者らはさらに、腫瘍との共培養後7日間にわたってのCFSE標識T細胞のFACSならびに絶対的T細胞数により評価する場合の、健常ドナー由来の4H11z⁺T細胞

胞および4H11-28z⁺T細胞のOV-CAR3(MUC-CD)上での共培養後に増殖する能力を評価した(図13Dおよび13E)。驚くべきことに、本発明者らは、4H11z⁺T細胞および4H11-28z⁺T細胞の両方が、OV-CAR3(MUC-CD)腫瘍細胞との共培養後、同等に十分に増殖し、この腫瘍細胞系の共刺激リガンドの発現によりT細胞を共刺激する能力を示唆した。この可能性に取り組むために、本発明者らはさらに、OV-CAR3(MUC-CD)腫瘍細胞のFACS分析を行い、共刺激4-1BBLリガンドは発現する(図13F)が、B7.1、B7.2、またはOX-40共刺激リガンドは発現しないことが実証された(データ未呈示)。

【0197】

SCID-BeigeマウスにおけるMUC-CD標的化T細胞のインビボ抗腫瘍活性
4H11z⁺T細胞および4H11-28z⁺T細胞のインビボの抗腫瘍活性を評価するために、本発明者らは次に、OV-CAR3(MUC-CD)腫瘍細胞のSCID-Beigeマウスへの腹腔内注射によって、同所性異種移植卵巣癌腫瘍モデルを作製した。未処置のままであった場合には、これらのマウスでは、腫瘍細胞注射後3週間までに、著しい腹水および複数の結節性腹膜腫瘍が発生した(図14A)。未処置の腫瘍を担持する全てのマウスは、腫瘍細胞注射後7週間までに苦痛の徴候により安楽死させなければならなかった。

【0198】

MUC-CD標的化T細胞のインビボ抗腫瘍効力を評価するために、SCID-Beigeマウスに、1日目にOV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc)腫瘍細胞を腹腔内に注射し、続いて2日目に、4H11z⁺T細胞または4H11-28z⁺T細胞を腹腔内に注射した。陰性対照として、腫瘍を担持するマウスを、処置しないか、または無関係のCD19標的化CARを発現するように改変されたT細胞で処置するかのいずれかであった。まとめると、本発明者らは、MUC-CD標的化T細胞で処置された全てのマウスの27%(3匹/11匹のマウス)が、腫瘍注射から120日間、疾患の臨床的証拠なしに生き続け、4H11z⁺T細胞および4H11-28z⁺T細胞で処置されたコホートと比較して、生存において統計的有意差はない(図14B)ことを見出した。対照的に、両方のMUC-CD標的化T細胞で処置されたコホートにおいては、未処置対照コホートおよび19z1⁺T細胞で処置された対照コホートと比較して、統計的に有意な生存の増強が実証された。

【0199】

全身性に注入されたMUC-CD標的化T細胞が腹腔内腫瘍にうまく輸送されるかどうかを評価するために、本発明者らは次に、腹腔内にOV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc)腫瘍を担持するSCID-Beigeマウスにおいて4H11-28z⁺T細胞の腹腔内注入を静脈内注入と比較した。腹腔内および静脈内4H11-28z⁺T細胞処置マウスの両方が、全体的な生存(図15A)ならびに腫瘍進行のBLI(図15B)によって評価した場合、未処置対照コホートまたは19-28z⁺T細胞で処置された対照コホートと比較して、統計的に生存の増強を示した。さらに、本発明者らは、腹腔内処置群と静脈内処置群との間での全体的な生存が対数順位解析によって統計的に等価であることを見出した。これらのデータは、静脈内注入された4H11-28z⁺T細胞の腹膜腫瘍への輸送の成功を意味している。本発明者らはさらに、解離されたOV-CAR3(MUC-CD)腫瘍の単細胞懸濁物のFACS分析により、静脈内注入されたCFSE標識4H11-28z⁺T細胞の腹膜への輸送を確認した(図15C)。

【0200】

十分確立したOV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc)腫瘍を担持するSCID-BeigeマウスにおけるMUC-CD標的化T細胞のインビボの抗腫瘍活性
4H11-28z⁺T細胞が、より臨床的に関連した腫瘍負荷量を根絶することができ
るかどうかをさらに評価するために、本発明者らは、養子T細胞治療の7日前に注射された、十分確立した腹腔内OV-CAR3(MUC-CD/GFP-FFLuc)腫瘍を担持するSCID-Beigeマウスを処置した。もう一度、本発明者らは、MUC-CD

10

20

30

40

50

標的化 T 細胞での治療が、全ての処置されたマウスにおいて B L I 顕性疾患を著しく根絶したことを見出し (図 1 6 A)、腫瘍細胞注入後 1 2 0 日間までの B L I 画像化 (未呈示) により評価した場合、8 匹の処置されたマウスのうち 5 匹が、最終的に、進行性疾患の再発をおこし、3 匹のマウスは疾患がないままであった (図 1 6 B)。これらのデータは、進行性疾患の状況においてさえも M U C - C D 標的化 T 細胞により媒介される強力な インビボ抗腫瘍活性を実証している。

【 0 2 0 1 】

考察

患者腫瘍試料の広範な分析に基づいて、卵巢癌腫は、比較的免疫原性腫瘍であるようにみえる。具体的には、研究者らは、手術および化学療法後の予後と、処置前の腫瘍試料における腫瘍浸潤性エフェクター T 細胞 (T I L) の量との間に直接的相関があることをそこに見出している (2 5、4 9、5 0)。さらに、別の研究者らが、治療後の予後と、腫瘍内の T r e g (それらは、次に、おそらく、腫瘍特異的エフェクター T I L の抗腫瘍機能を抑制する (2 6、2 8、5 1)) の処置前レベルとの間の逆相関を記載している。これらの所見のどちらも、最初の治療の前と後の両方での疾患進行の制御における、内因性エフェクター T 細胞の腫瘍に対する応答についての役割を意味し、卵巢癌腫が、卵巢腫瘍細胞抗原に対して標的化した自己 T 細胞の養子注入による死滅化に感受性が高い可能性があるという主張を強く支持している。

【 0 2 0 2 】

内因性エフェクター T I L が、推定される腫瘍特異的 T 細胞の 1 つの源であるが、養子 T 細胞治療への代替のアプローチは、自己末梢血 T 細胞を単離することであり、その T 細胞が、次に、腫瘍細胞抗原を標的にするようにエキソビボで遺伝子改変されてもよい。1 つのそのような遺伝的アプローチは、腫瘍に固有かまたは腫瘍によって過剰発現されるかのいずれかである表面露出抗原に対して標的化した C A R を患者 T 細胞にレトロウイルスにより形質導入することである。この目的を達成するために、他の悪性腫瘍においてこのアプローチを利用する有望な前臨床試験が最近、臨床実践場面に移されている (6、1 6、1 9、5 2)。同様に、本発明者らは、正常 B 細胞ならびにたいいていの B 細胞悪性腫瘍に発現した C D 1 9 抗原に対して標的化した C A R を以前に作製しており、再発した B 細胞慢性リンパ性白血病および急性リンパ芽球性白血病を有する患者を、C D 1 9 特異的 C A R を発現するように改変された自己 T 細胞で処置する臨床試験を現在、行っている (5 3)。

【 0 2 0 3 】

このアプローチの卵巢癌腫への適用は、腫瘍細胞表面に発現する適切な標的抗原の同定を必要とする。意義深いことには、他の研究者らが、前臨床実践場面および臨床実践場面の両方においてこのアプローチを研究している (4、1 1、5 4 ~ 5 7)。具体的には、いくつかのグループが、皮下ヒト卵巢癌腫細胞系腫瘍に対する顕著な抗腫瘍応答を、これらの腫瘍細胞系に過剰発現したメソテリンおよびルイス Y 抗原に特異的な C A R を発現する T 細胞の腫瘍内および / または静脈内注入後、免疫無防備状態のマウスにおいて実証している (5 6、5 8、5 9)。さらに、K e r s h a w らは、 - 葉酸受容体に特異的な C A R を発現するように改変された自己 T 細胞を用いて、再発した卵巢癌腫を有する患者を処置する第一相臨床試験の結果を最近、発表した (6)。この研究の著者らは、標的化 T 細胞での治療は耐容性がよいことを見出したが、時間経過での改変 T 細胞の持続性の悪さ、ならびに幾人かの処置された患者の血清中のまだ未決定の T 細胞阻害因子に関連した、これらの研究における抗腫瘍応答の不足を指摘した。

【 0 2 0 4 】

本発明者らの研究において、本発明者らは、大部分の卵巢癌腫で過剰発現する M U C - 1 6 糖タンパク質を標的にするように選択している (1、3 0、3 2、3 3)。養子 T 細胞治療のための標的抗原としての M U C - 1 6 の有用性は、この分子の細胞外部分の大部分が腫瘍細胞によって切断され、分泌され、C A - 1 2 5 腫瘍マーカーとして血清中で検出することができるという事実によって損なわれている。しかしながら、M U C - 1 6 の

この分泌された画分の切断後、腫瘍表面に保持される、MUC - CDと名付けられた、その糖タンパク質の残りの細胞外画分が残存し、それゆえに、免疫に基づいた治療にとって魅力的な標的である。この目的を達成するために、本発明者らは、MUC - CDに特異的なCARを構築するためにMUC - CD抗原に対して産生された一連のマウスハイブリドーマを利用した。これらのCARのうち、本発明者らは、4H11zと名付けられた4H11マウスハイブリドーマから産生されたCARを同定し、それは、ヒトT細胞において発現した場合、3T3(MUC - CD / B7.1)AAPC上での共培養後、AAPC単層の迅速な破壊、ならびに著しい改変T細胞増殖を生じた。意義深いことには、4H11抗体に対する抗原は、免疫組織化学検査により評価した場合、本発明者らの施設で処置された患者から得られた、処置前の卵巣癌腫の外科的腫瘍試料の大部分において高度に発現している(48)。

10

【0205】

最適なT細胞活性化は、一次T細胞受容体媒介性シグナルである「シグナル1」、加えて共刺激「シグナル2」の両方を必要とする。古典的には、この共刺激シグナルは、標的細胞上のB7.1(CD80)かまたはB7.2(CD86)のいずれかのT細胞共刺激受容体CD28とのライゲーションによって供給され得る。あるいは、共刺激は、標的細胞上の4-1BBまたはOX-40Lの、T細胞上のそれぞれの4-1BBまたはOX-40共刺激受容体とのライゲーションによって生じ得る(12、60、61)。たいていの腫瘍細胞が共刺激リガンドを発現しないため、本発明者らおよび他の研究者らは、共刺激受容体のCD28、4-1BB、および/またはOX40の細胞質シグナル伝達ドメインをさらに組み入れた第2世代CARが、外因性共刺激リガンドの非存在下で、同種抗原への結合により、シグナル1およびシグナル2の両方をT細胞へ供給する能力があるCARを生じることを見出している(7~10、12、13、15、16、62~65)。この目的を達成するために、本発明者らは、他のところで記載されているように、CD28の膜貫通および細胞質シグナル伝達ドメインを組み入れた、4H11z CAR由来の第2世代CARを構築した(3、9、43)。以前の研究と一致して、本発明者らは、得られた4H11-28z CARを発現するように形質導入されたT細胞が、外因性共刺激の非存在下で3T3(MUC - CD)線維芽細胞との共培養で効率的に増殖したが、第1世代の4H11z CARでは効率的に増殖せず、それは、シグナル1とシグナル2の両方をT細胞へ送達する4H11-28z CARの能力と一致しているということを見出した。この結論は、4H11-28z⁺T細胞が、第1世代4H11z CARを発現するように形質導入されたT細胞と比較して、3T3(MUC - CD)線維芽細胞上での共培養により、有意により高いレベルのIL-2(T細胞共刺激を示すサイトカイン)を分泌したという所見によってさらに支持される。

20

30

【0206】

本発明者らは次に、ヒト卵巣癌腫腫瘍細胞を標的にし、かつ溶解する4H11z⁺T細胞および4H11-28z⁺T細胞の能力を評価した。この目的を達成するために、本発明者らは、最初に、OV-CAR3ヒト卵巣癌細胞系を利用した。OV-CAR3腫瘍細胞系は4H11抗体に弱く結合するため、本発明者らはさらに、臨床的卵巣癌腫腫瘍検体の大部分が4H11 MUC - CD抗原を高度に発現する臨床実践場面をより良く模倣するために、MUC - CDを発現するようにその細胞系を遺伝子改変した(OV-CAR3(MUC - CD))(48)。本発明者らは、4H11zかまたは4H11-28zのいずれかを発現するように改変されたヒトT細胞が、インビトロでOV-CAR3(MUC - CD)腫瘍細胞を根絶することを実証し、驚くべきことに、4H11z⁺T細胞および4H11-28z⁺T細胞の両方が、インビトロで腫瘍との共培養後、増殖することを観察した。この予期しない4H11z⁺T細胞増殖の原因を明らかにするために、本発明者らはさらに、OV-CAR3(MUC - CD)腫瘍細胞が共刺激リガンドを発現するかどうかを評価し、この腫瘍細胞系が4-1BBを発現することを見出し、そこは、本発明者らの実験所見、ならびに様々な癌腫細胞系による4-1BB発現を実証する以前に発表された報告と一致した(66~68)。これらの所見の臨床的関連をさらに確認する

40

50

ために、本発明者らは、その後、健常ドナー同種異系 4 H 1 1 - 2 8 z ⁺ T 細胞ならびに、より一層著しく自己性の 4 H 1 1 - 2 8 z ⁺ 患者末梢血 T 細胞の両方による、未処置の卵巣癌腫から単離された原発腹水由来腫瘍細胞の特異的インビトロでの溶解を実証した。これらのデータは、自己 4 H 1 1 に基づいた C A R ⁺ T 細胞での処置が、将来の臨床適用において有望であるという主張を強く支持している。

【 0 2 0 7 】

本発明者らのインビトロでの所見のインビボでの関連性を評価するために、本発明者らは次に、S C I D - B e i g e マウスにおいてマウス同所性 O V - C A R 3 (M U C - C D) 腫瘍モデルを作製した。本発明者らは、マウスに、O V - C A R 3 (M U C - C D) 腫瘍細胞を腹腔内に注射し、次の日、4 H 1 1 z ⁺ T 細胞、4 H 1 1 - 2 8 z ⁺ T 細胞、および対照 1 9 z 1 ⁺ T 細胞を腹腔内に注入した。この処置のアプローチは、未処置のマウスまたは無関係の C D 1 9 抗原に対して標的化した対照 T 細胞で処置されたマウスと比較して、4 H 1 1 z ⁺ T 細胞で処置されたコホートおよび 4 H 1 1 - 2 8 z ⁺ T 細胞で処置されたコホートの両方において、有意であるが類似した腫瘍進行の遅延および長期生存を生じた。本発明者らは次に、同所性 O V - C A R 3 (M U C - C D / G F P - F F L u c) を担持するマウスの 4 H 1 1 - 2 8 z ⁺ T 細胞での腹腔内処置を静脈内処置と比較し、T 細胞の直接的な腹腔内注入または標的化 T 細胞の全身性静脈内注入のどちらに關しても、時間とともに、類似した、統計的に有意なマウスの生存を見出した。意義深いことには、処置後 1 日目までに静脈内処置されたマウスは、標的化 T 細胞の腹膜への上首尾の輸送を示した。これらのデータは、標的化 T 細胞での養子治療が、腹膜への直接的注入によって、または全身性静脈内注入を介してのどちらでも、等しく効力があり得ることを示唆している。これらの所見は、疾患の局所的再発ならびに腹膜以外の部位への転移性再発の両方を有する患者を処置することにおける、このアプローチの将来の臨床的潜在力をさらに支持している。

【 0 2 0 8 】

最後に、本発明者らは、改変 T 細胞の腹腔内注入を 7 日間、遅らせる（その場合、生物発光画像化により評価して、マウスはより大きい確立した腫瘍負荷量を有した）ことによって、より一層確立した疾患を根絶させる 4 H 1 1 - 2 8 z ⁺ T 細胞の能力を評価した。この実験状況は、この養子 T 細胞アプローチが利用されることになる最初の臨床実践場面をよりよく反映している。意義深いことには、著しく確立した疾患の状況にも関わらず、4 H 1 1 - 2 8 z ⁺ T 細胞は、より大きい腫瘍負荷量を溶解し、腫瘍の再発を遅らせ、かなりのパーセンテージのマウスにおいて、疾患を完全に根絶する能力を保持した。

【 0 2 0 9 】

本明細書に提示された研究において、本発明者らは、インビトロおよびインビボの両方の抗腫瘍活性を評価するために C D 4 ⁺ C A R ⁺ T 細胞と C D 8 ⁺ C A R ⁺ T 細胞の混合集団を一貫して利用している。このために、進行中の研究は、この S C I D - B e i g e O V - C A R 3 (M U C - C D) 腫瘍モデルでの疾患の根絶の成功における単離された C D 4 ⁺ C A R ⁺ T 細胞サブセットと C D 8 ⁺ C A R ⁺ T 細胞サブセットの役割に取り組む。これらの研究の結果は、この治療アプローチを臨床実践場面へ移行させることへの意味合いを含み得る。さらに、本発明者らは、提示された S C I D - B e i g e 腫瘍モデルに関連した限界を認める。すなわち、これは、免疫無防備状態のマウスにおける異種移植モデルである。このために、本発明者らの (o r) 研究室における進行中の研究は、無傷の免疫系という状況において M U C - C D 標的化 C A R 改変 T 細胞の生物学的特徴および抗腫瘍効力をより良く明確にするために、臨床的により一層関連性のある同系免疫適格性腫瘍モデルを作製することに焦点をおいている。

【 0 2 1 0 】

結論として、本明細書において、本発明者らは、M U C - 1 6 抗原の保持される M U C - C D 部分に対して標的化した遺伝子改変 T 細胞を用いた養子治療による、大多数の卵巣癌腫に過剰発現する抗原である、M U C - 1 6 を標的にすることの実行可能性を実証する最初の刊行されたデータを提示する。さらに、この報告は、卵巣癌の同所性の、臨床的に

関連したマウスモデルにおいてT細胞の効率的なターゲティングを実証する最初のものであり、改変T細胞の腹腔内注入および静脈内注入の両方による効力を実証している。最後に、これらのデータは、手術および化学療法での最初の治療後の遷延性または再発した卵巣癌腫を有する患者における第一相臨床試験の形をとる臨床実践場面へのこのアプローチのさらなる移行を支持している。

【0211】

実施例5

マウスおよびハムスターにおけるマウスMUC16モノクローナル抗体の産生

本発明者らは、モノクローナル抗体がマウスおよびハムスターにおいて生じるための、マウスMUC16ゲノムの3つの異なる領域を選択した。マウスMUC16の選択された領域は、ペプチド1（配列番号21、細胞質ドメインの外部領域）、ペプチド2（配列番号22、第1のシステインループ）、およびペプチド3（配列番号23、第2のシステインループ）であり（図20A）、そのヒトMUC16との比較は、図20Bに示されている。KLHとのより良い結合体化のために、ペプチド1（配列番号21）およびペプチド3（配列番号23）のN末端のペプチド配列にシステインを付加した。個々のペプチドを、Promegaキットを用いてKLHに結合体化した。これらの3つの結合体化されたペプチドをプールし、5匹のマウスおよび4匹のハムスターへ免疫した。1回の免疫ごとに3週間の間隔をあけて5回の免疫を施した。これらの動物由来の血清を、個々のペプチド（配列番号21、22、および23）との特異的な反応性についてELISAによって試験した。陽性選択された動物を1ヶ月間、休ませ、その後、プールされたペプチド免疫原（配列番号21、22、および23）で静脈内にブーストし、4日後、脾臓を採取した。脾細胞をハイブリドーマパートナーと混合し、様々なクローン密度でマイクロタイタープレートへ蒔いた。プレートを37℃、5%CO₂で10日間、培養し、その後、クローンを選択した。これらの選択されたクローンからの上清を、個々のペプチド（配列番号21、22、および23）との特異的な反応性についてELISAによって試験した。陽性クローンの上清を、2つのマウス細胞系（ID8およびBR5-FVB1）およびヒト細胞系（OVCA8-3）を用いるFACS、ウェスタンブロット、および画像化により試験した。

表4は、マウスMUC16ペプチド抗原ペプチド1（配列番号21）、ペプチド2（配列番号22）、およびペプチド3（配列番号23）に対するマウスおよびハムスターのモノクローナル抗体の概要を示す。非常に強い抗原応答は、ペプチド1（配列番号21）に関して見られた。

【0212】

10

20

30

【表 4】

表4

マウス MUC16		マウス mAbs	凍結したマウスモノクロー ナル抗体
ペプチド 1		46	16 (3-IgG1; 8-IgG2b; 1-IgM; 4-アイソタイプが不明)
ペプチド 2		0	0
ペプチド 3		6	6 (4-IgG1; 2-IgM)
ペプチド 1、2、3		0	0
ペプチド 1、2		0	0
ペプチド 2、3		0	0
ペプチドなし		0	0

動物はペプチド2
で静脈内に
ブーストされなか
った

10

20

マウス MUC16		ハムスター mAbs	凍結したハムスター モノクローナル抗体
ペプチド 1		69	21
ペプチド 2		6	6
ペプチド 3		7	7
ペプチド 1、2、3		2	1
ペプチド 1、2		1	1
ペプチド 2、3		1	0
ペプチドなし		10	2

30

40

ペプチド 1 (配列番号 2 1)、ペプチド 2 (配列番号 2 2)、およびペプチド 3 (配列番号 2 3) に対するマウスおよびハムスターのモノクローナル抗体の詳細は、それぞれ、表 5 および表 6 に列挙されている。

【 0 2 1 3 】

【表 5】

表 5

アイソ タイプ	ベ ンチ	融合物の ウェル	クローン 化	クローン			
-	1	01D01	成功なし				
-	1	09F07					
IgG 1	1	16A09					
-	1	21A07					
-	1	24G10					
IgG 1	1	10C04	はい	10C4-3H5	10C4-1F2	10C4-2H8	10C4-1G7
IgG 1	1	17F02	はい	17F2-3G5	17F2-3F6	17F2-2F9	17F2-1E11
IgG 2b	1	01A08	はい				
IgG 2b	1	01F08					
IgG 2b	1	12B10		12B10-3F7	12B10-3G10	12B10-2F6	12B10-2F10
IgG 2b	1	17H10					
IgG 2b	1	18D05					
IgG 2b	1	23B12					
IgG 2b	1	25E09		25E9-3	25E9-5	25E9-13	25E9-16
IgM	1	16F12					
IgG 1	3	04A06	成功なし				
IgG 1	3	05D01	成功なし				
IgG 1	3	21B08	はい				
IgG 1	3	21E01	はい				
IgM	3	08A02					
IgM	3	13E05					
IgM	3						

10

20

30

【 0 2 1 4 】

【表 6】

表 6

ハムスター モノクローナル 抗体	ペプチド	クローン化			
01H03					
02F02	1				
04E 4					
04G07	1				
04H01	3	4H1-2E1	4H1-2E3	4H1-3E1	4H1-3H3
06A08	1				
06F02	1				
07F08	3				
07H05	2				
09A05					
09E 1	3				
09F08	1				
09H10					
10G06	1				
10H11	1				
11B10	1				
12F09	2				
15A08	1	15A8- 2E2	15A8-2E10	15A8- 2E11	15A8-3D2
15H08	3				
19B05	1				
21H04	3				
22B05	2	22B5- 1F6	22B5-3G9	22B5- 2G8	22B5-3F11
22D11	3				
23G12	1				
25E 8	1				
27H09	3				
28B12	1&2&3				
28C12	2				
30H02	1				
31A11	2				
31C01	2				
33H06	1&2				
34F10	1				
34H05	1				
36C01	1				
36C11					
36E 4	1				
37E 10	1				
10H11	1				

ハムスター抗体 22B05 は、マウス（配列番号 22）およびまた対応するヒト配列（配列番号 15）を認識する。

【0215】

マウス ID 8 および BR 5 - FVB 1 細胞抽出物を用いるウェスタンブロット分析もま

10

20

30

40

50

た、それぞれ、図 2 1 および図 2 2 に示されているように、全ての選択されたモノクローナル抗体について実施した。

【 0 2 1 6 】

マウス M U C 1 6 モノクローナル抗体の中から、本発明者らは、さらなるスクリーニングのために 1 2 B 1 0 - 3 G 1 0 サブクローンのマウスモノクローナル抗体を選択した。同様に、ハムスターのモノクローナル抗体である、1 5 A 8 - 2 E 1 0、2 2 B 5 - 2 G 8、および 4 H 1 - 2 E 1 サブクローンをさらなるスクリーニングのために選択した。

【 0 2 1 7 】

I D 8 (マウス)、O V C A R - 3 (ヒト)、B R 5 - F V B 1 (マウス)細胞系、および受精後 1 3 . 5 日目の胚のパラフィン切片および凍結切片について免疫組織化学的分析を実施した。パラフィン切片または凍結切片を、マウス M U C 1 6 の初期発生を調べるために、マウス 1 2 B 1 0 モノクローナル抗体、ハムスター 1 5 A 8 モノクローナル抗体、ハムスター 2 2 B 5 モノクローナル抗体、およびハムスター 4 E 1 モノクローナル抗体で探索した (図 2 3)。

10

【 0 2 1 8 】

1 2 B 1 0 - 3 G 1 0 サブクローンを、一本鎖 F v 断片のためにさらに分析した。図 2 4 は、1 2 B 1 0 - 3 G 1 0 V_H および V_L の D N A 配列ならびにアミノ酸配列を示している。生物反応性上清および精製 1 2 B 1 0 - 3 G 1 0 を、動物研究および他の特徴づけ研究のために作製した。I D 8 細胞、O V C A R 3 細胞、および B R 5 - F V B 1 細胞に関して精製 1 2 B 1 0 - 3 G 1 0 を用いて、F A C S 分析を実施し、マウスおよびヒトの両方の M U C 1 6 外部ドメイン断片に対して 9 0 % を超える陽性を示した (図 2 5)。

20

【 0 2 1 9 】

明細書および実施例 1 ~ 3 で引用された文献

【 0 2 2 0 】

【 数 7 】

1. Bast RC, Jr., Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. J Clin Invest 1981;68(5):1331-7.
2. Bast RC, Jr., Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. N Engl J Med 1983;309(15):883-7.
3. Rustin GJ, Bast RC, Jr., Kelloff GJ, Barrett JC, Carter SK, Nisen PD, et al. Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer. Clin Cancer Res 2004;10(11):3919-26.
4. Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, Yu Y, Lu KH, Diamandis EP, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol 2005;99(2):267-77.
5. Bast RC, Jr., Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, et al. New tumor markers: CA125 and beyond. Int J Gynecol Cancer 2005;15 Suppl 3:274-81.
6. Moore RG, Maclaughlan S, Bast RC, Jr. Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol 2009.

30

40

【 0 2 2 1 】

【 数 8 】

7. Nustad K, Lebedin Y, Lloyd KO, Shigemasa K, de Bruijn HW, Jansson B, et al. Epitopes on CA 125 from cervical mucus and ascites fluid and characterization of six new antibodies. Third report from the ISOBM TD-1 workshop. *Tumour Biol* 2002;23(5):303-14.
8. Fendrick JL, Konishi I, Geary SM, Parmley TH, Quirk JG, Jr., O'Brien TJ. CA125 phosphorylation is associated with its secretion from the WISH human amnion cell line. *Tumour Biol* 1997;18(5):278-89.
9. Fendrick JL, Staley KA, Gee MK, McDougald SR, Quirk JG, Jr., O'Brien TJ. Characterization of CA 125 synthesized by the human epithelial amnion WISH cell line. *Tumour Biol* 1993;14(5):310-8. 10
10. O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Shigemasa K. The CA 125 gene: a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure. *Tumour Biol* 2002;23(3):154-69.
11. Yin BW, Dnistrian A, Lloyd KO. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int J Cancer* 2002;98(5):737-40.
12. Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem* 2001;276(29):27371-5. 20
13. Hollingsworth M, Swanson B. Mucins in Cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews: Cancer* 2004;4(1):45-60.
14. Huang L, Ren J, Chen D, Li Y, Kharbanda S, Kufe D. MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation. *Cancer Biol Ther* 2003;2(6):702-6.
15. Li Q, Ren J, Kufe D. Interaction of human MUC1 and beta-catenin is regulated by Lck and ZAP-70 in activated Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315(2):471-6. 30
16. Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu WH, Huang L, et al. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell* 2004;5(2):163-75.
17. Ren J, Bharti A, Raina D, Chen W, Ahmad R, Kufe D. MUC1 oncoprotein is targeted to mitochondria by heregulin-induced activation of c-Src and the molecular chaperone HSP90. *Oncogene* 2006;25(1):20-31.
18. Ramsauer VP, Pino V, Farooq A, Carothers Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL. Muc4-ErbB2 Complex Formation and Signaling in Polarized CACO-2 Epithelial Cells Indicate That Muc4 Acts as an Unorthodox Ligand for ErbB2. *Mol Biol Cell* 2006. 40
19. Bafna S, Singh AP, Moniaux N, Eudy JD, Meza JL, Batra SK. MUC4, a multifunctional transmembrane glycoprotein, induces oncogenic transformation of NIH3T3 mouse fibroblast cells. *Cancer Res* 2008;68(22):9231-8.

【数 9】

20. Ponnusamy MP, Singh AP, Jain M, Chakraborty S, Moniaux N, Batra SK. MUC4 activates HER2 signalling and enhances the motility of human ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 2008;99(3):520-6.
21. Nap M, Vitali A, Nustad K, Bast RC, Jr., O'Brien TJ, Nilsson O, et al. Immunohistochemical characterization of 22 monoclonal antibodies against the CA125 antigen: 2nd report from the ISOBM TD-1 Workshop. *Tumour Biol* 1996;17(6):325-31.
22. Markwell MA, Fox CF. Surface - specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1,3,4, 6-tetrachloro-3alpha,6alpha-diphenylglycouril. *Biochemistry* 1978;17:4807-4817. 10
23. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4(7):844-7.
24. Hedvat CV, Hegde A, Chaganti RS, Chen B, Qin J, Filippa DA, et al. Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. *Hum Pathol* 2002;33(10):968-74. 20
25. Soslow RA. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol* 2008;27(2):161-74.
26. O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Dennis RA, Santin AD, York L. The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol* 2001;22(6):348-66.
27. Harris M, Howell A, Chrissohou M, Swindell RI, Hudson M, Sellwood RA. A comparison of the metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma and infiltrating duct carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1984;50(1):23-30. 30
28. Kaneko O, Gong L, Zhang J, Hansen JK, Hassan R, Lee B, et al. A binding domain on mesothelin for CA125/MUC16. *J Biol Chem* 2009;284(6):3739-49.

実施例 4 で引用された文献

【0 2 2 3】

【数 1 0】

1. Singh AP, Senapati S, Ponnusamy MP, et al. Clinical potential of mucins in diagnosis, prognosis, and therapy of ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2008;9(11):1076-85.
2. Sun CC, Ramirez PT, Bodurka DC. Quality of life for patients with epithelial ovarian cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4(1):18-29. 40
3. Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med* 2003;9(3):279-86.

【0 2 2 4】

【 数 1 1 】

4. Hwu P, Yang JC, Cowherd R, et al. In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. *Cancer Res* 1995;55(15):3369-73.
5. Imai C, Mihara K, Andreansky M, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18(4):676-84.
6. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(20 Pt 1):6106-15.
7. Kochenderfer JN, Feldman SA, Zhao Y, et al. Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother* 2009;32(7):689-702. 10
8. Loskog A, Giandomenico V, Rossig C, Pule M, Dotti G, Brenner MK. Addition of the CD28 signaling domain to chimeric T-cell receptors enhances chimeric T-cell resistance to T regulatory cells. *Leukemia* 2006;20(10):1819-28.
9. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Riviere I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 2002;20(1):70-5.
10. Moeller M, Haynes NM, Trapani JA, et al. A functional role for CD28 costimulation in tumor recognition by single-chain receptor-modified T cells. *Cancer Gene Ther* 2004;11(5):371-9. 20
11. Parker LL, Do MT, Westwood JA, et al. Expansion and characterization of T cells transduced with a chimeric receptor against ovarian cancer. *Hum Gene Ther* 2000;11(17):2377-87.
12. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* 2009;21(2):215-23.
13. Stephan MT, Ponomarev V, Brentjens RJ, et al. T cell-encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection. *Nat Med* 2007;13(12):1440-9.
14. Daly T, Royal RE, Kershaw MH, et al. Recognition of human colon cancer by T cells transduced with a chimeric receptor gene. *Cancer Gene Ther* 2000;7(2):284-91. 30
15. Jensen MC, Cooper LJ, Wu AM, Forman SJ, Raubitschek A. Engineered CD20-specific primary human cytotoxic T lymphocytes for targeting B-cell malignancy. *Cytotherapy* 2003;5(2):131-8.
16. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 2008;14(11):1264-70.
17. Savoldo B, Rooney CM, Di Stasi A, et al. Epstein Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes expressing the anti-CD30zeta artificial chimeric T-cell receptor for immunotherapy of Hodgkin disease. *Blood* 2007;110(7):2620-30. 40

【 0 2 2 5 】

【 数 1 2 】

18. Wang G, Chopra RK, Royal RE, Yang JC, Rosenberg SA, Hwu P. A T cell-independent antitumor response in mice with bone marrow cells retrovirally transduced with an antibody/Fc-gamma chain chimeric receptor gene recognizing a human ovarian cancer antigen. *Nat Med* 1998;4(2):168-72.
19. Hollyman D, Stefanski J, Przybylowski M, et al. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J Immunother* 2009;32(2):169-80. 10
20. Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol* 2006;24(13):e20-2.
21. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 2008;112(6):2261-71.
22. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(9):3360-5. 20
23. Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58(3):449-59.
24. Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(51):18538-43. 30
25. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003;348(3):203-13.
26. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10(9):942-9.
27. Leffers N, Lambeck AJ, de Graeff P, et al. Survival of ovarian cancer patients overexpressing the tumour antigen p53 is diminished in case of MHC class I down-regulation. *Gynecol Oncol* 2008;110(3):365-73. 40
28. Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev* 2008;222:101-16.
29. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, et al. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(23):8326-31.

【 0 2 2 6 】

【 数 1 3 】

30. Badgwell D, Bast RC, Jr. Early detection of ovarian cancer. *Dis Markers* 2007;23(5-6):397-410.
31. Bast RC, Jr., Badgwell D, Lu Z, et al. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15 Suppl 3:274-81.
32. Fritsche HA, Bast RC. CA 125 in ovarian cancer: advances and controversy. *Clin Chem* 1998;44(7):1379-80.
33. Krivak TC, Tian C, Rose GS, Armstrong DK, Maxwell GL. A Gynecologic Oncology Group Study of serum CA-125 levels in patients with stage III optimally debulked ovarian cancer treated with intraperitoneal compared to intravenous chemotherapy: an analysis of patients enrolled in GOG 172. *Gynecol Oncol* 2009;115(1):81-5. 10
34. O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Dennis RA, Santin AD, York L. The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol* 2001;22(6):348-66.
35. Bellone S, Anfossi S, O'Brien TJ, et al. Generation of CA125-specific cytotoxic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2.1-positive healthy donors and patients with advanced ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200(1):75 e1-10. 20
36. Berek JS. Immunotherapy of ovarian cancer with antibodies: a focus on oregovomab. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4(7):1159-65.
37. O'Brien TJ, Tanimoto H, Konishi I, Gee M. More than 15 years of CA 125: what is known about the antigen, its structure and its function. *Int J Biol Markers* 1998;13(4):188-95.
38. Rao TD, Park KJ, Smith-Jones P, et al. Novel monoclonal antibodies against proximal (carboxy-terminal) portions of MUC16 (submitted to *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphometry*).
39. Wang Z, Raifu M, Howard M, et al. Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J Immunol Methods* 2000;233(1-2):167-77. 30
40. Doenecke A, Winnacker EL, Hallek M. Rapid amplification of cDNA ends (RACE) improves the PCR-based isolation of immunoglobulin variable region genes from murine and human lymphoma cells and cell lines. *Leukemia* 1997;11(10):1787-92.
41. Gong MC, Latouche JB, Krause A, Heston WD, Bander NH, Sadelain M. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. *Neoplasia* 1999;1(2):123-7. 40
42. Orlandi R, Gussow DH, Jones PT, Winter G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(10):3833-7.

【 0 2 2 7 】

【 数 1 4 】

43. Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin Cancer Res* 2007;13(18 Pt 1):5426-35.
44. Riviere I, Brose K, Mulligan RC. Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(15):6733-7.
45. Quintas-Cardama A, Yeh RK, Hollyman D, et al. Multifactorial optimization of gammaretroviral gene transfer into human T lymphocytes for clinical application. *Hum Gene Ther* 2007;18(12):1253-60. 10
46. Latouche JB, Sadelain M. Induction of human cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells. *Nat Biotechnol* 2000;18(4):405-9.
47. Santos EB, Yeh R, Lee J, et al. Sensitive in vivo imaging of T cells using a membrane-bound Gaussia princeps luciferase. *Nat Med* 2009;15(3):338-44.
48. Park KJ, Soslow R, Linkov I, Rao TD, D S. The extracellular portion of the MUC16 cytoplasmic domain is detectable in ovarian carcinomas using novel monoclonal antibody, 4H11. *Mod Pathol*, 2008; 21(1s):217A-218A. 20
49. Raspollini MR, Castiglione F, Rossi Degl'innocenti D, et al. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Oncol* 2005;16(4):590-6.
50. Tomsova M, Melichar B, Sedlakova I, Steiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2008;108(2):415-20.
51. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001;61(12):4766-72. 30
52. Lamers CH, Langeveld SC, Groot-van Ruijven CM, Debets R, Sleijfer S, Gratama JW. Gene-modified T cells for adoptive immunotherapy of renal cell cancer maintain transgene-specific immune functions in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56(12):1875-83.
53. Brentjens R, Hollyman D, Weiss M, et al. A Phase I trial for the treatment of chemo-refractory chronic lymphocytic leukemia with CD19-targeted autologous T cells. *Molecular Therapy* 2008;16:S15.
54. Barber A, Zhang T, DeMars LR, Conejo-Garcia J, Roby KF, Sentman CL. Chimeric NKG2D receptor-bearing T cells as immunotherapy for ovarian cancer. *Cancer Res* 2007;67(10):5003-8. 40

【 0 2 2 8 】

【数 1 5】

55. Barber A, Zhang T, Sentman CL. Immunotherapy with chimeric NKG2D receptors leads to long-term tumor-free survival and development of host antitumor immunity in murine ovarian cancer. *J Immunol* 2008;180(1):72-8.
56. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(9):3360-5.
57. Kershaw MH, Westwood JA, Hwu P. Dual-specific T cells combine proliferation and antitumor activity. *Nat Biotechnol* 2002;20(12):1221-7. 10
58. Hung CF, Wu TC, Monie A, Roden R. Antigen-specific immunotherapy of cervical and ovarian cancer. *Immunol Rev* 2008;222:43-69.
59. Westwood JA, Smyth MJ, Teng MW, et al. Adoptive transfer of T cells modified with a humanized chimeric receptor gene inhibits growth of Lewis-Y-expressing tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(52):19051-6.
60. Habib-Agahi M, Jaberipour M, Searle PF. 4-1BBL costimulation retrieves CD28 expression in activated T cells. *Cell Immunol* 2009;256(1-2):39-46. 20
61. Habib-Agahi M, Phan TT, Searle PF. Co-stimulation with 4-1BB ligand allows extended T-cell proliferation, synergizes with CD80/CD86 and can reactivate anergic T cells. *Int Immunol* 2007;19(12):1383-94.
62. Brentjens RJ, Sadelain M. Somatic cell engineering and the immunotherapy of leukemias and lymphomas. *Adv Pharmacol* 2004;51:347-70.
63. Finney HM, Akbar AN, Lawson AD. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol* 2004;172(1):104-13. 30
64. Sadelain M, Riviere I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer* 2003;3(1):35-45.
65. Wilkie S, Picco G, Foster J, et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immunol* 2008;180(7):4901-9.
66. Li Q, Ai J, Song Z, Liu J, Shan B. 4-1BB (CD137) ligand enhanced anti-tumor immune response against mouse forestomach carcinoma in vivo. *Cell Mol Immunol* 2008;5(5):379-84.
67. Salih HR, Kosowski SG, Haluska VF, et al. Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol* 2000;165(5):2903-10. 40
68. Wan YL, Zheng SS, Zhao ZC, Li MW, Jia CK, Zhang H. Expression of co-stimulator 4-1BB molecule in hepatocellular carcinoma and adjacent non-tumor liver tissue, and its possible role in tumor immunity. *World J Gastroenterol* 2004;10(2):195-9.

上記明細書において言及された、ありとあらゆる刊行物および特許は、全ての目的のために全体として参照により本明細書に組み入れられている。記載された本発明の方法および系の様々な改変およびバリエーションは、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者にとって明らかである。本発明は、特定の実施形態に関連して記載されている

が、主張されている本発明は、そのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではない。実際、当技術分野およびそれに関連した分野の当業者にとって明白である、本発明を実行するための記載された様式の様々な改変は、以下の特許請求の範囲の範囲内にあるものと意図されている。

【図 1】

切断部位近くのペプチド1

NFSPLARRVDRVAIYEE (配列番号 01)

膜貫通部前のペプチド2

TLDRSSVLVDGYSPNRNE (配列番号 02)

膜貫通部内のペプチド3

CGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQ (配列番号 03)

FIGURE 1

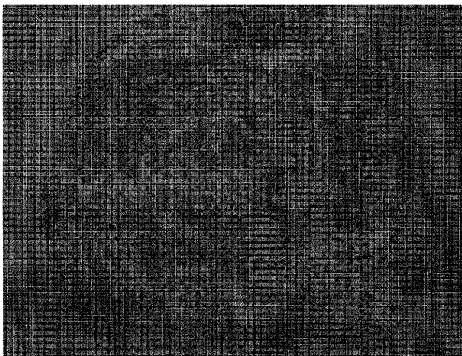
【図 3 A】

FIGURE 3A

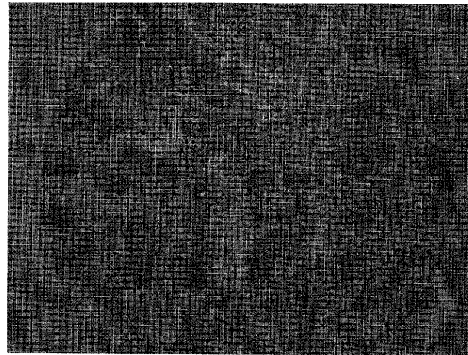
【図 3 B】

FIGURE 3B

【図 3 C】



FIGURE 3C

【図 3 D】



FIGURE 3D

【図 3 E】



FIGURE 3E

【図 3 F】



FIGURE 3F

【図 3 G】



FIGURE 3G

【図 3 H】

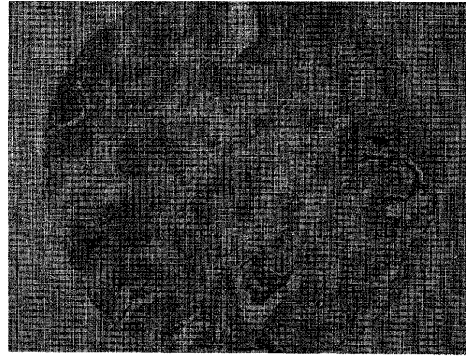


FIGURE 3H

【図 3 I】



FIGURE 3I

【図 3 J】



FIGURE 3J

【図 3 K】



FIGURE 3K

【図 3 L】



FIGURE 3L

【図 4 A】

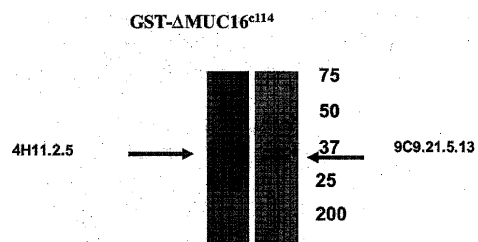


FIGURE 4A

【図 4 B】

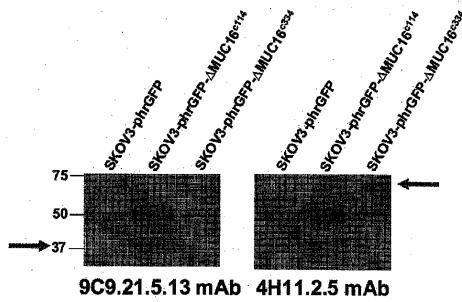


FIGURE 4B

【図 5 A - 1】

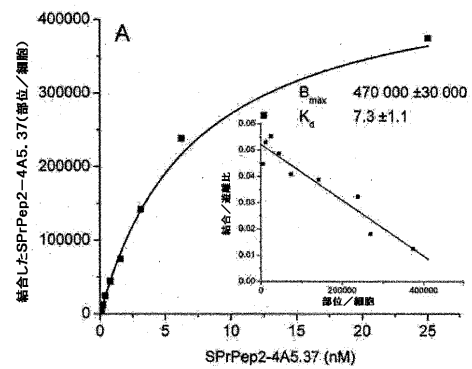


FIGURE 5A, パネル A

【図 5 A - 2】

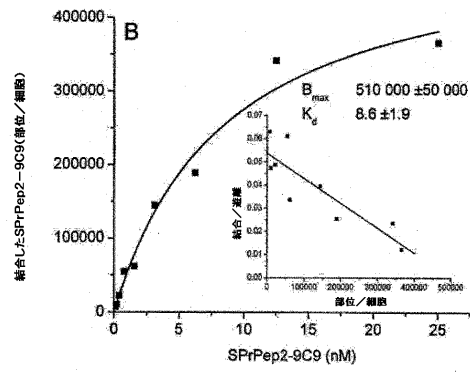


FIGURE 5A, パネル B

【図 5 A - 3】

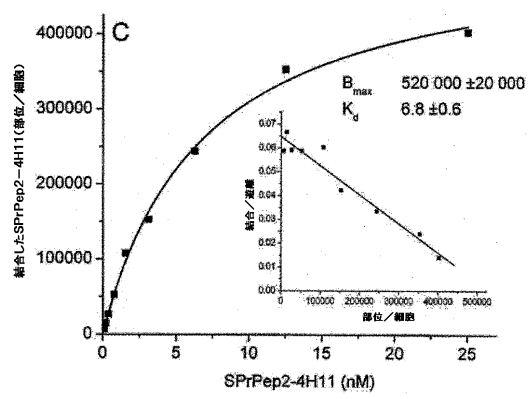


FIGURE 5A, パネル C

【図 5 A - 4】

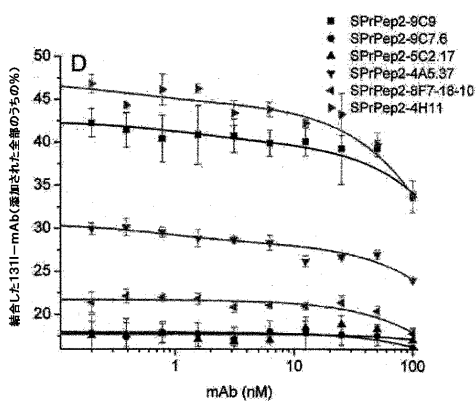


FIGURE 5A, パネル D

【図 5 B】

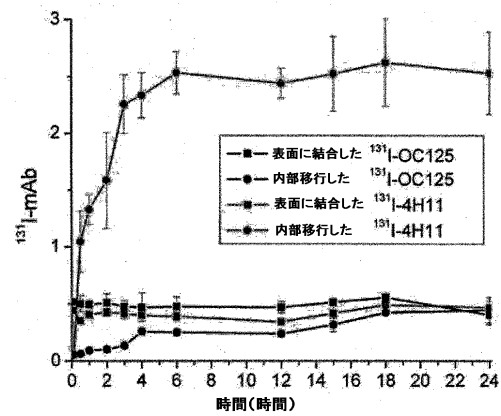


FIGURE 5B

【図 7 - 1】

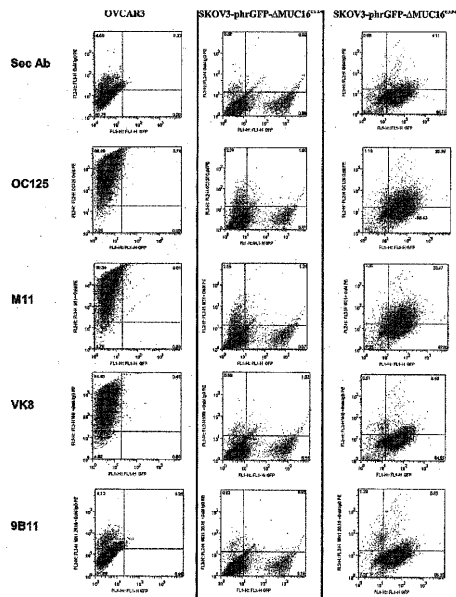


FIGURE 7, PAGE 1 OF 2

【図 7 - 2】

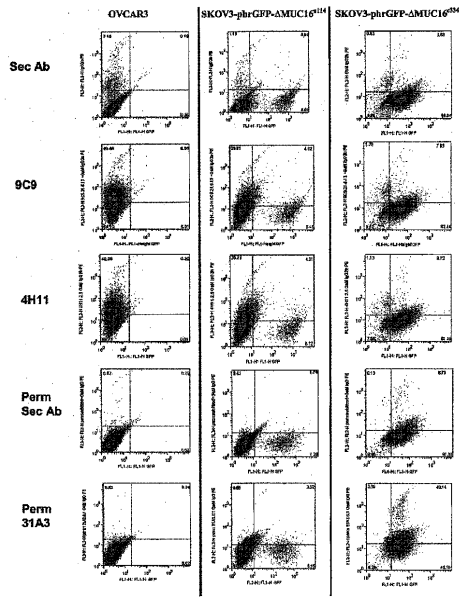


FIGURE 7, PAGE 2 OF 2

【図 8 - 1】

(A) 4A5 VH (配列番号 04)
gtgaagctggaggagtcaggggaggcttcgtgaagcctggagggtccctcaaaatctcctgtgcagctctggattcac
tttcaagaactatgcactgtcctgggttcgctgagtcaggagatgaggtggagtggtgcgaacattagcagtgctg
tggtttacattctctatctgcagctgtgcaggagcagattccatttccagagacaatgcgaagaacccctccactg
caaatgggagctgcaggtctggggacacggcattgtattctgtgaaggcaggatttggttaactacggtgattacta
tgctatggactactggggccaaggacacgggtcacgcgtctctcca

(B) 4A5 VL (配列番号 05)
gacattgagctcaccagtcctccatctcctggctgtgtcagcaggagagaaggtcactatgagctgcaaatccagtea
gagctcgtccacagtagaacccgaagaaacagcttggtctgtaccagcaaaaacaggacagctctcctgaactgctga
tctactgggcatccactggcaatctgggtccctgatcgtctccagcgagtggtatgggacagatttcaactctcacc
atcagcagctgtgcaggtgaagacctggcagtttattactgcccagcaatcttataatctactcagcttgggtctgggac
caagctggagatcaaacgg

(C) 4H11 VH (配列番号 06)
gtgaagctgcaggagtcaggggaggcttcgtgaagcctggagggtccctcaaaatctcctgtgcagctctggattcac
tttcaagtagctatgcactgtcctgggttcgctgagtcaggagatgaggtggagtggtgcgaacattagcagtgctg
tggtttacattctctatctgcagctgtgcaggagcagattccatttccagagacaatgcgaagaacccctgcagctg
caaatgggagctgtgaggtctggggacacggcattgtattctgtgaaggcaggatttggttaactacggtgattacta
tgctatggactactggggccaaggacacgggtcacgcgtctctcca

(D) 4H11 VL (配列番号 07)
gacattgagctcaccagtcctccatctcctggctgtgtcagcaggagagaaggtcactatgagctgcaaatccagtea
gagctcgtccacagtagaacccgaagaaacagcttggtctgtaccagcaaaaacaggacagctctcctgaactgctga
tctactgggcatccactaggcaatctgggtccctgatcgtctccagcgagtggtatgggacagatttcaactctcacc
atcagcagctgtgcaggtgaagacctggcagtttattactgcccagcaatcttataatctactcagcttgggtctgggac
caagctggagatcaaacgg

(E) 9B11 VH (配列番号 08)
gtgaagctggaggagtcaggggaggacttggtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagctctcgtgattcac
tttcaagtagctatccattgtcttgatttcgtcagactccagagagaaggttagagtggttcgcatcgtgagtggtg
gtgaggtatcactatccagagctgaaggcgcgttcacgtccacagagaaatgacaggaacacccctgtattgttta
atgagtagcttgaggtctgagagacacggcatttattgtggaagaggaacaggtattttgtgtggcaattgggg
ccaagggaacacggtcacgcgtctctcca

(F) 9B11 VL.A (配列番号 09)
gacattgagctcaccagtcctccatctcctggctgtgtcagcaggagagaaggtcactatgagctgcaaatccagtea
gagctcgtccacagtagaacccgaagaaacagcttggtctgtaccagcaaaaacaggacagctctcctgaactgctga
tctactgggcatccactaggcaatctgggtccctgatcgtctccagcgagtggtatgggacagatttcaactctcacc
atcagcagctgtgcaggtgaagacctggcagtttattactgcccagcaatcttataatctactcagcttgggtctgggac
caagctggagatcaaacgg

(G) 9B11 VL.B (配列番号 10)
gacattgagctcaccagtcctccatctcctggctgtgtcagcaggagagaaggtcactatgagctgcaaatccagtea
gagctcgtccacagtagaacccgaagaaacagcttggtctgtaccagcaaaaacaggacagctctcctgaactgctga
tctactgggcatccactaggcaatctgggtccctgatcgtctccagcgagtggtatgggacagatttcaactctcacc
aaggttcacagctgtcgtgagcttcgttgagggaacacagctggagatcaaacgg

FIGURE 8 (1 of 2)

【図 8 - 2】

(H) 24B3-VH (配列番号 11)
gaggtgaagctgagagagtcaggacctggaactggtgaagcctggggcttcagtgagatattcctgcaaggcttctggtta
ctcattttactggctacttttatgactggtggaagcagacccatggaaagagccttgagtggaattggacgtattatcctt
acaattggtgctactttctcaaatcagaagttcacgggcaaggccacaaatgactgtagacaaattccttaccacagccac
atggagctcctcgagcctgacattcgagactctgcaactcttatatttggtgaaagggaattactacgcccctttgattta
ctggggccaaggacacacgggtcacgcgtctctctca

(I) 24B3-VL (配列番号 12)
gacattgagctcaccagtcctccatcttctctgctgcattctcctgaagaacacactactattatgcaaggcaagtaa
gacatttagcaaatatttagcctggttcaaaaagaaactgggaaactaataagctctttatctactctggatccactt
tgcaattctggaattccatcaaggttcagtgaggcagtgatctgtgacagatttcaactctcaccatcagtagcctggagcct
gaagattttgcaattgtattactgtcaacagcataatgaatcccggtggacgttgcgtggaggacacagctggagatca
acggcgccgcgca

FIGURE 8 (2 of 2)

【図 9 - 1】

(A) H-MUCIN-16(GenBank NP_078966)(配列番号13)

```

1  mlkpsglpgs  ssptrslmtg  srstkatpem  dsqglgtatls  pktatgaivv  tehtlpfts
61  dktlaasptss  vvgrrtltqslg  vmasalpest  srgmthsegr  tpslspgqv  gtpernypa
121  smvsqslsnp  trtsstegnf  tkeasttytl  vettsagpvte  kytvptetst  tegdsctet
181  dtryipvkitt  spmktfadst  askenapvpm  tpaettvtlds  htgptrnpsf  gtlvysfild
241  epkgtpnsarg  epnklllslst  tgyfsspsap  gsagharist  saplssasav  ldnkistei
301  fsgqsltspl  spgvpearas  tmpnsaifps  mlsnaetsa  ervrstissl  gtpeistkq
361  aetiltfhaf  aetmdipsth  iaktlasewl  gspgtlgtts  tsaltttaps  ttlvseent
421  hhstsgkete  gtlntemtpl  etsapgeese  mtatlvpitlg  fttldskirs  psqvssashp
481  relrttgsta  grqsasstaah  gssdliratt  sstksaaswt  sstaagqfae  pqhtqvwet
541  psmkterppa  stavaapitt  svpsvsvsgf  tlktastkgi  wleetsadtl  igeatagpt
601  hqfavptgis  mtggsstgrs  qgtthlltra  tassetsadl  tlatngvpsv  vspavakta
661  gsspgggtkp  sytmvsevip  eteslgesaf  regtslgltp  lntrhpfssp  epdeaghtk
721  stsiplssa  svledkvsat  stfshhkats  sittgtpeis  ktktpssavl  smtlenaa
781  spervrnats  plthpspsge  etagsvltls  tsaeetdspn  ihtgtltlse  sseepstls
841  pevsgvktff  tsgeeteets  npavsgpsts  vsrvrtllas  tevptvfpf  tsvtpshel
901  mdtwptrasq  fseshlvsel  ratsstevtn  stgsalpkis  hltgtatmaq  tnrdt.fnds
961  apqsetwpet  sprfkltgls  attvtstacs  slsatvmvke  fctspatsme  asairepat
1021  ilttettnpg  gsmavastni  pigkgyiteg  rldtshlpg  tctassetsmd  fctmakesvs
1081  svspsgsmda  agestpgtrs  qfvdtdfadd  yhltereiti  prdgtssalt  pmdtchpp
1141  pdpgsarstw  lgllsepsps  ptpkvmtsst  fctgrvrttm  imdtvetsw  nmpnlpst
1201  ltpsnipstg  aigkaltvpl  ldtspactsl  aseggltpls  ttypestnts  ihlgahase
1261  spstikltma  svvkpgsytp  ltfpsieith  hvstarmays  sgsspentap  sstntgatw
1321  pttvitttdp  kdcseagvst  phavrtlrtr  enhpktesat  paaysgspki  gssnltsp
1381  tkawittdtt  ehstqllytk  laekssgfet  gsapgvsvrv  iptspgtiss  tlieltadvp
1441  elvlpaspe  ttitlpmatv  latslteema  stldissps  spmstfaifp  pmstphel
1501  kseadtsair  ndtettldgh  lglsrlgrtp  dlrtvptlpl  ttwtvsvieh  stqagddtl
1561  kmcpthvtsq  lkdtstlfpas  aspsahltevy  pelgtqgrss  seattfwkps  tldt.sreie
1621  gptnigtstg  ndntttgssg  sgvtlgiabl  pigtaspact  stnmalerrs  statvemag
1681  kmllvtasap  svlssaeete  gvttdaskgss  prlntgkss  lasslepay
1741  egsgmstsis  ltsaptpdv  effigstfwt  kevttvmtsd  ikssasartes  ssatlmtsa
1801  gsestntgke  lktasmlpss  ioltslnapn  tldtdlshg  vssasagtl  tssasagtl
1861  cdslntgvt  raerlengsd  tpskalsmgn  sthtamtyte  keevsssihp  rptcsappa
1921  tltstspgnr  tkagtlvps  ipseevistg  itsgpdlina  pmthspitp  tivwtstgt
1981  eqgstqthlv  ssekvsvtq  stpyvnavav  saasphensv  sgssstsepy  pssaeleld
2041  cisrnnats  wldvltlpsl  ttvptstlsp  ealesghsv  spssttttf  flsaasagtl
2101  akgrmpetet  hggpntaast  lntdasstvg  lsetpvgsai  ssevpplmai  ttradvsgl
2161  aestanpslg  tassagtklt  tdislptses  lvsfrmmakp  tvwsilplsh  pntntvsei
2221  vnsagpppls  tvasdvldtp  sdgaeslptv  fsespagdev  ttishfpekt  tthfrtias
2281  cheltserpt  igadstlser  adgastpss  itlgertit  saaptstspv  ltsafetes
2341  vsldnettkv  tsdildarkl  nelpdssas  sdlinstias  stmdvktkas  iapstisgm
2401  asssplfss  drpqvptett  entatsepsv  sentysldgg  snvggtptsl  pttfithvp
2461  tsallawss  pvrtfstms  tdaasgenp  ssnsvtvsr  apgtwtsvgs  ttdlpamgf
2521  ktspageahs  llastiepat  afthlssaav  vtgsaatsea  sltttseska  ihsepgtpt

```

FIGURE 9 (page 1 of 6)

【図 9 - 2】

```

2581  ptsganwets  atpeallvvt  etadttltsk  ilvtdtilfs  tvstppsckf  stgtlsgas
2641  ptllpdpai  pitateptes  latofdstpl  vtiasdntg  vpetltlms  tngdalvl
2701  tvnpsdrisp  gitigqvtes  plhpsestps  kivarnttyt  egasitvalst  tsgtltgsl
2761  fsgssenset  talvdassgl  erasvmlpt  sgsgmasggl  irsggtatgt  tkfalslpl
2821  mmpgevtams  eittnrllat  tctapkgipv  ktpasagell  tprvasasps  kafasltta
2881  pcwipgslt  tfefseavpel  dtksaalpvt  gqslntpds  dastassels  ksepknpra
2941  mmtatkaisa  ssaftgtgtf  tpegsaaspm  agheprvpts  tgdgpryase  smsydpdsk
3001  saamtatela  sklttlfstg  qaarcgssas  pislsteket  sflsptasts  rktsalfgp
3061  maropnlihv  lqtsaltlsp  tatlmsqee  peltssqgt  aaseggtatf  qltftpspe
3121  ptallvvasp  teptarrkss  petwassiv  paktslvett  dgltvttikm  ssqaagns
3181  wpapaetgs  spagtpgsp  emsttlkms  skepsispet  stvtrnaspk  tpevtvyme
3241  tvepvtlqst  algsagtsis  hlptgttst  ksptenmlat  ervslsppg  eawtlnlyg
3301  pggrtqlsat  msvsvlespt  arsltgtqgg  kspeltvett  gmfesmwhgs  tsggtgdth
3361  slstsenile  dptvpsnsv  sltdskkhkt  etwvsttaip  stvlnnkims  acqgtssrv
3421  eaysstssws  dtgsgditl  gaspdvntlt  yitstaqtts  lvlspsgdg  itslcnpsg
3481  ktssasvsts  psiglettra  nvsavksdia  ptaghlgts  spaevildv  ttatpgis
3541  titmtgtnei  sttctpnpev  mstmtdstpt  exrtteteht  stwsstaad  swtvdmts
3601  lkvarspgti  stmhstfla  steldsmst  phgrtrivgt  slvtpsdas  avktetesd
3661  rtlepsedtta  stpistferv  qrmisvdpv  ltswtvpest  eadypvsmv  ttdhasakt
3721  pntplstflf  dslstldwt  grslsatat  tsagpgatt  qeltletnis  patgqlpfs
3781  ghitsavtpa  amarssgvtf  srpdtckka  eqstgtlpt  tsahgqvr  saatlldvi
3841  htaktptdat  qrggtaltt  aaratsdwn  ekeaktspap  witemmssps  edtkvets
3901  ssvrlrntlt  dinlesgtts  spswkspye  ripaesstt  kaimpsnt  vettgtvts
3961  ehastetipa  hsaaskltp  vvtstrega  ivemsttwp  estraktrep  sflitldt
4021  spymdstest  qeliespss  taiktpqrte  itssktwss  flaqmrsasp  apseairl
4081  nfpamtesgg  milamgtsp  gatslsapl  dsaatswtg  tplattpvt  ysektlfs
4141  gpdagtaspp  pveetssas  slvphatts  psmilttsg  hspastpvt  svfltegt
4201  gktdmrisi  legptlppn  latsagaels  tyeaaradka  lhaadstpa  nmeatasey
4261  pigphtkpek  atcplvtshi  mgdtisvte  fgasestte  svssvngv  eratagssv
4321  atetstvih  vsagdatth  tktgtfssg  tsiasphgt  cstnfctfs  tnpstslm
4381  essgvtittg  tpgtgaatg  pylldstpm  yltpetplav  dmfngsekt  lksekgpdl
4441  wtsppsvae  sypsaltpfl  vrtipatt  lqggstssy  satcvltsq  vkttdmlnt
4501  mepntspgn  lmpneilla  tlaattidet  ihspinkav  nmgtassah  lhtlpses
4561  pstatsspmv  asmgdalas  isapgesttd  ilegeptss  agkrasatlg  emmsttesn
4621  ilsnvsvgai  teatkmevps  fdatfippt  gatkfpdls  tkmndvsgp  pmtiatht
4681  tpgtsgagts  kiplaldst  letsagtpv  vtsgfahsk  tlammdvsg  vtgntppfq
4741  easspsqap  vlvtlpsv  aftpqwhs  svpmsstet  eslvtkagky  dslavtva
4801  pgsmantld  iavtsaatt  ietthpsint  vtrnvgtts  afeshstps  ypepkyts
4861  nvststmedt  tirsipkps  ktrtetetst  ktrtetetst  sieqetast  etitvpyke
4921  tgattsevt  dvtssstsf  pgpdtgtv  distetnt  stepimkwa  eitittgtg
4981  hgastgtft  mdpenttpa  ghiasathgf  gldvtdtms  rpgdvvats  ppsvdkss
5041  sflsepmat  tpelisset  edklespsst  lltsglykit  dlirtrlep  tsalpnfs
5101  skdlatekd  skdtkeifps  inteentka  nngshesap  aladestpa  tqmwittt
5161  gdpapstmp  vhgssettni  kreptyfltp  rlrstetase  ssfptdtsfi  lskvptgti

```

FIGURE 9 (page 2 of 6)

【図 9 - 3】

```

5221  evsetgvnas  skistpdhdk  stvppdtftg  eiprvftssi  ktksaemt  tqasppesa
5281  hstlpldst  tlesgghthk  vtggfysev  ttlmngmpgn  vswmttpvpe  etssvsslm
5341  spamtaspv  sstapsqis  aplyvtaltp  gttsepsvst  gttsepsvst  apnllsitt
5401  erpatykda  tteaamhht  ntavntvgt  gsgksgssv  ladeatskat  plmststsl
5461  dtvstetp  isgtngitge  tstaasprlr  eestsektas  tteatlafey  vptgaitga
5521  teissstps  slddlrtpl  pdistgmtr  lftspimtk  aemtvtgtt  tpgatggg
5581  pwtetltf  gdhthvsg  fphseittlr  srtgpdvsm  ttpvweats  gfsalmepm
5641  sspvstaspt  esipssplv  talltsvlv  ttnvltgt  eptvsspn  septgerlt
5701  ykdtatseam  hasmhtntg  anvgtsiagh  esgsavpads  htakatsep  itfmgdts
5761  ststpaft  rigtstaslt  iglrdtrts  eentvrtts  tvlsevptt  tteavrtv
5821  tsertisgk  dhaskmyps  tctirrlst  pfvtgstema  itnrgtpigt  isqatltld
5881  sstaswegth  spvtqrfphs  eettmstst  kgvswgpps  veetassps  vplpaitah
5941  alyavsvsgs  sstgdmklt  ltrgrrkld  mldthselvt  selpsaesfs  geiltseas
6001  netihfse  taetnmgtnt  amkhkhsa  ihsgpeghtp  pkvtgsmmed  aivstetpg
6061  petknvlds  tptlpelke  dastalvmmst  teentvfvsv  aldaatevsv  aevttydyt
6121  mpaasgtks  pdiaspess  hmsapllis  thktiatqgt  pgtvslggl  tldstiat
6181  agtpsartgd  fvdasetvmm  ndndndvlt  spfaeeans  lsgapllvt  tsepvptat
6241  gehastslvs  vtsvpttla  kitdmtdnle  pvtrepnrl  nlatseatt  dthmhpi
6301  tavanvgts  spnefyfvs  pdedpkyats  avvitstsgd  sivistsmrs  samkkiese
6361  tflifrlre  tsatqkiss  adrtsvfda  ftaatevsv  telsterts  iggtelkpt
6421  pdestsvtm  lsfagltks  eertiatqgt  phratsggt  twdtaitaq  agthsamth
6481  faqlidstlt  srpeyisep  eppsvetks  ssllslpai  tpspsvptl  pesrpsvp
6541  ltslptsglv  ktdmlaava  eipnlgtas  hkiptseidi  kdtekmypst  niavntvgt
6601  tseksyessv  payseppkt  spmvtstfnr  dtivstmpg  sseitrieme  sflalahl
6661  gtsstgdpiv  steksavlhk  ltgtatetst  tevasststs  ipgdhates  pdiatvpl
6721  lpslsgites  smmtiirtg  pglstsggt  ftdtpttas  ragthsmatp  ephsemtt
6781  mmkdpeilsw  tipsieikts  fssalmepa  mappvstsl  pkihtpmp  msalltpsl
6841  mtdtltgsp  eptstapnll  sstshelitt  dedttaeam  hpstataatn  vettsagsg
6901  qsvladse  ktakatpmt  atmghttvt  smsvssetk  ikreastyt  pglrtsls
6961  nasfstdsi  vlsevpgtt  aevsvrtvs  agrtaipga  qstvlpeist  rtmrlfas
7021  mtessamti  ptgtgsgst  sqdltltds  ttksgakths  tltqrfhase  mttlmzrgp
7081  dmswgspsl  enpslpsll  slpattsgpp  isstlpvtis  sspilpvtll  stspvtttd
7141  lhtepelyts  sppklshsd  erlttgkdt  nteavhpatn  taasnveips  gshespsa
7201  adsetskats  pmfistgdtd  ctvaistphf  letstrikgs  isslapklre  tgsavetsa
7261  ietavslsev  sigatteidr  tevtssrts  isgsaestml  peistrtkii  kfptspila
7321  asemittkt  spgstsest  ftdtsttpts  lvithatmtg  rlpheittl  vsrgagdv
7381  psalpreets  pssqslisa  midespvast  lpasessasa  svstllpgg  kvktcvlda
7441  aepstasps  lsetveila  tsevttdtek  ihpfentavt  kvgtssghe  sspavpds
7501  tktatsemt  isimgdntv  ltpalstent  kigsepassl  trlrlets  eetelatea
7561  tvlskvstga  tvevstrel  afertsmasg  eqstmsgdls  igtiprias  avltesakm
7621  ittdgtpees  tlestinait  atpawweth  sviggtfph  emttsmrgp  gsvtseapn
7681  vketstpsp  lsipavtph  pvstflah  ppslptvatt  ltsagatttd  igtatset
7741  sssslstts  helittkydt  ahtavhpt  ssgykgssv  ladespmot  ladespmot
7801  stmgdcsvlt  stpaflettr  iqtelasslt  pglreesge  gtssgtkmat  vlskvptga

```

FIGURE 9 (page 3 of 6)

【図 9 - 4】

```

7861  teiskdvts  igpgagstis  pdistrtvsw  fetspvmtes  aietmnthts  plgattggt
7921  lldstetst  tmthetiasg  fshagmtlm  rrgpdedvsm  sppllektrp  sflsmkts
7981  tpsvsvstl  pesiasapl  vtalltsgla  ktdlmlhks  eptvnsapan  satsveila
8041  sevttdtek  hpsnrtvtd  vgtsssghe  tsfvladsgt  skvtsmpvit  stmedtssv
8101  stpfgfetr  iqteptsslt  lgrlktasse  gtalatemt  ghvsvptgt  aeavrtvt
8161  srtstasgfa  qltvspetst  etitrlpts  imtesaemi  ktgtdppgst  pesthvdv
8221  ttpnwveths  vtvgrfshs  mtlvrsrgp  dmlwpsqssv  eetssasll  slpattaps
8281  vstlvdfpd  asalptvll  ngplvitt  mgrisrepts  stslnestls  erlttldt
8341  dtedmgpth  tavtnvrt  aghesqssv  adsetpkats  pmgttytng  tsavtied
8401  feteriqiep  tsaltsglre  tsserissa  tegstvlsev  psgattevr  tevisrrgt
8461  mstgdfdis  pdisteatr  latspimtes  aeatietgt  spgatsegt  tldstttf
8521  agthstasg  fshsemtlm  srtgpdvvp  slpveeas  vssslsppam  tsteftlt
8581  eisassphvp  talltlgvpk  ttdmlrtse  petsspnls  stasaelias  evtkdreki
8641  psentpvv  gtviykhlp  ssyladlvt  kptspmat  tlgntsvsts  tpaipetmm
8701  qstsltagl  reistsqts  satersasls  gmatgtatkv  srttealsir  tatpgpags
8761  ispeisteti  tristpltt  gsaemtlt  tghesagsg  tftldssra  swpghsaa
8821  hrshpgmtt  pmsrgpedvs  wpsrpsvekt  spgsalvsls  avtspplse  tpeesshs
8881  lrvtlftvp  mmkttdmld  slepvtst  smmtdsdel  atskatmete  aiglenta
8941  tqmgtisarg  efysyppgl  epkvtsppv  tsettkdivs  ttipasseit  riemestst
9001  tptpretas  qeishatks  tvpykaltsa  tiedamtqvm  sssrgpspd  stmgadist
9061  vitrltapi  ktestemtt  tpgpggats  rgtltdtst  tfmgthsta  aggfshagm
9121  almartpgdv  pwlshpvee  asaaefals  pmtasspys  stlpdshss  slpvtallt
9181  glvktellg  tseepetsap  pnlstasai  laitevttd  eklemntv  sgythesps
9241  vladvstka  tssmgitypt  gdnvltst  afadsrtgt  ksklsltpgl  metasieet
9301  satekatvls  svptgattv  srteaiaerr  taipgagat  masdtameti  tristplr
9361  estdmatk  tpgsgatg  tftldssst  swpgthaat  qrfqsvvtt  pmsrgpedv
9421  wpalavekn  sppsalsvss  svtpsplys  tpgsahssap  vptstfts  mmkatdml
9481  elepetstap  nmmtsdsl  aakattete  aihfentaa  shvettaste  elysaspfi
9541  eptkvispv  tssairdnm  stmpgsggi  trieiesame  ltpglretr  agditaste
9601  stvlykmpg  atpevstev  mpsrtai  pagstmsldi  sdevvrtst  spimtesae
9661  tittgtgysl  atsqtvlplg  tsmflegth  tsmagglshs  emtlnmrgp  eslswtsp
9721  vetrasssl  tsllptsls  pvstltdss  psplpvtal  ilpvlktt  vldtssskt
9781  ssspnlsst  veipateim  tdekthps  ntavakvrs  savhshssv  ladasetit
9841  psmgitsavd  dtvftsnpa  fsetripte  ptfeltpgfr  etatseets  itetsavly
9901  vptasttvs  mteimsnri  hipdsdgst  spdiitevt  rlssssmme  stgmtittg
9961  spgtagtst  ltlattapl  arthstvpr  flhsemtlm  xsrpsnpas  salfvsgt
10021  ssllslpvt  tpsvstslp  qslpsessfv  tlltpgmwk  ttdctegpt  alsplngt
10081  veillaasev  tdekthps  smavntvgt  sghelyssv  shseepkat  yvgtppssm
10141  etsstmpa  nfettgfeae  pfshltgtr  knmtdlsts  vtpntpsp  gmthlsgl
10201  tdtstasks  spdwppasy  teipvdiit  fnaespits  tgitstpsr  fmsvteit
10261  hstldlpsa  etistgvmp  aleaamtsfa  tvgvrais  sgspfrtes  pgpdlatst
10321  aslpsstpv  pfssstftt  dsetipalhe  itssatpvt  vdtalgtss  ttegrlvmm
10381  lldstsgpr  tssspildtr  mteaveltg  tsaygvpls  trlrdtdgm  ehiklpin
10441  ahrgtirpvk  gpgtstspas  pkglhtggtk  rmetttalk  tttalkts  rallttsvy

```

FIGURE 9 (page 4 of 6)

【 図 9 - 5 】

10501	ptglitlptg	smqmgstqst	bmmtitvly	fdpvdpttss	latslsagep	salprtpfss
10561	fnresstasv	lyvsasgaers	pviqltdvss	seppdtaswv	lphaetsvpt	sktptfss
10621	tdwtvstas	shgadvsyai	ptnlpseld	altplvtlsv	tdtstfptl	tksphetst
10681	etlthvpaet	asttptlptn	fhshdetdss	stlptagaet	asaalptmss	pgaedlsvt
10741	vtasgtddrm	ltnlpgpget	epktialsvt	hpeaqtsaii	ptstispaivs	lvtlsmvts
10801	akaatttnra	ltnagpepat	valvtlvpag	tpvtvpwtas	ifhskadett	pemtthssv
10861	asavptptv	stevpgvvt	lvtsaravia	tdtptliltl	gepettepsma	thshgeaas
10921	ptlptptvtp	pgvvtlsvts	aravattvts	ltlfselgep	tpmtasghg	teagavsvt
10981	lpepgvmvts	lyvasarvts	tdtptlilep	gepettepsma	thshgeaasv	vtlpsvgep
11041	vtvslvtssss	tsvsaetpl	lspegeltv	psmatshgae	asaavpvtv	spgvsygvv
11101	lvtsarvats	tdtptliltss	sepettpssma	thshgeaass	vltpsvgep	mvvtlsvts
11161	avsttvtlpt	tissdetpvt	tslvtshsak	mlsaipeltv	aptvgvlvts	lvtsagset
11221	afsnltvstl	qetldvssia	hpgtseasvv	ptlvtvsgcp	fnslitvstg	aeasstlptv
11281	trshsheld	tmptvtape	aeassaaltv	ispigvvtlv	vltsvsgdr	saftptvpe
11341	phesatavss	lvtpvattst	vrpttptysh	seepdtpsia	tpsgaadett	fpitlvtsp
11401	pmtmvsqvt	sgdtasitp	tlcssegep	tdtftfssye	thssaaip	lvpsggaek
11461	talvissgdt	sttfttflte	lypettaai	qlphaiaent	mvvpttkpfs	hakatdtlv
11521	atsipgepas	savattitlv	dmeldvtal	psagtdattf	ftlleepey	petattwtl
11581	paetstvtss	tlpnfhgrts	tdapemvtp	gvdrsvgvp	tltpisspgv	vtvtsqvssa
11641	dstaaitpl	pepgetpata	ssathpgtgt	gvtpvtvtp	asepdmasv	vlthpgtat
11701	vtstssfsst	sepdatpma	tsrtpssaa	vltpisgag	emvtsgeat	gaattstvt
11761	lthspmpet	tallsthrpt	etaktfpast	vfpvgsaeta	altlirpaet	staltptgv
11821	asltlvtgt	srldleptas	gvssakapt	stphgptesl	mlptelsltp	lletdglia
11881	ssaetastt	lvtlsvpas	pllaasattv	kpqvtswnv	etspavtsv	ppesvart
11941	tdtltlpsm	ptppktahge	gvspetlrlt	tmveatnalt	tgastptvakt	ttfntfng
12001	lftlptlpsm	stlaseavts	steynhsrt	stssynrry	tpaststptv	spfggstst
12061	spisstaatt	pfmwptflnt	ltlnlveed	mhgrgkfn	aterelgll	klfrmsnl
12121	ylvsgclras	lrpekdsatt	advacthrp	ddpjdglrle	lywelnent	ngidgelgv
12181	ldnslnyvng	ftrssampt	atpgtvtvd	gvsttgsasp	aptagpllm	pfntfint
12241	lygeedmrt	garkfntmes	vlglkltdv	kntsvaplys	gctrlrltr	kdgaaetv
12301	icthrdlpss	pgnlrnelqv	elselkndie	elgpytdlm	alvnyghft	svsststst
12361	tsvdlrtlsg	tpssalspt	maagpllvn	ltlnftnlnt	lyedmgthp	rkfnterv
12421	gllglp:fk	tavpyslga	rltslrskd	vgastgdaic	hldltdkspg	lnrrelrye
12481	sgltnglkel	qpyldnslv	lyvngftrs	pvastgspt	cvldlgtast	fselpapata
12541	plvlvltfn	ltlnlkyeed	mhprgskfn	tervtvgtl	gmfkntsvg	ldnslgrnt
12601	lrsekdgaa	gvdaictlrl	dkpsgvdr	lyqlswslgt	ngikdelgpy	lymalyvlt
12661	fhvtpwptts	spgtvtdt	gsstpslps	pttagpllv	ftlnfntlnt	kyeedhnp
12721	srkfnrtv	lgllgmfk	ntsvpyslga	ctrlrlrsek	kgastgdaiv	cthrldkps
12781	gvdrlygev	lsqtlnglke	lpgytdlms	lyvnyghft	sapntstpsv	stvdltsgt
12841	pslpsptssa	gpllvpfltn	ltlnlgyee	dmnhgskrf	ntervtvg	lgmfknts
12901	lyglslgrlt	llrpeknag	tgmdaishr	ldkpsglrnl	qyqlswslgt	thgklgelv
12961	tdlslnyvng	gfrthssvap	tsptgtvtd	lgtgstpsl	psptvaelv	vplntfnti
13021	nlgyedmrt	psgrkfnct	rvlsglgl	fknsyegvl	sgclrlsrls	ekdgatgv
13081	acthlnhpg	spglrdgely	vlsglmgnt	kelgpytdl	nlvnyghft	rsqlltntv

【 図 9 - 6 】

13141	wstwdldgts	pevpspevt	dtgpllvrf	lfnltlnlyq	eennmghgr	kfnitevst
13201	gilkpikflp	avsplyagcr	lttlrpkedg	vatrdvaidct	hrpdpkpgl	drgqyvel
13261	gkthtsteilg	pytlrdlrey	vmgfctrasv	ptatpgetvt	vpgtsetps	alpspatgt
13321	vlplftnlte	ityldeedm	zrgpkrctf	tervqglml	pikfntasv	lysegcrtl
13381	rpkedgaatr	vdavochtrp	pkspgldrer	lwmksqglth	gltelgpytl	dhrslvnyh
13441	thgssmttr	ptcdstmhla	trtpasleag	pasapllvl	finetlryn	reemhvvh
13501	erkfnrtetr	lqglrlrvfr	ntsvqglyps	ctrlrlrpkc	dgatkvdaai	ctyprdkgs
13561	ldgrelqyve	lqstheiste	lqpytdlrds	lvynfgtrsv	svpttspjst	ptvdigtg
13621	pvskppppaa	apllvlftin	ftntnlryee	mkgpgrskrf	ntervylgl	lrsalfkts
13681	gpylrvpgrt	lrpkedgta	zvgdaicth	ndqpsgrldr	elywelsqg	thaitelgt
13741	adldslfslr	gfhtrsevt	tdtptgtyvt	lgastcpasl	gssasahl	lflntflrt
13801	ntnrmfmg	gsfnrtftrv	vglglrlpf	lgnkswglyps	fgrrllae	kdeagatvd
13861	cthrpddp	gkthtsteilg	lqglrlrvfr	svlmgvfrg	slvymvfrg	svpvtsgt
13921	vseepfltr	ftntnlrymd	mkgpplskfn	lntnvmghll	lntnvmghll	lntnvmghll
13981	lrvkngaeat	rvldcltyq	plsgpldgl	grfhelagc	hgtrclgpye	ldkdsalyn
14041	ynegppdegd	ttkptakptl	pllseattm	gyhklhtcl	ftsnalzycl	dmkgseatf
14101	etgvtqhlrl	pfqfkgssm	pfyqlqglis	lrpkedgaat	gdvttctyph	dvgpddli
14161	gtywelsqlt	hgkvtyglfy	ldrdsflsf	ypamlrsls	eygfnhynf	wlmsndpt
14221	seytllrdl	qbtvtllqyg	slghdfrfc	lntnvmtdsv	lvtvkalfas	ndlslvqg
14281	fldkltlnaf	hwlgstgyvl	dhivhtemss	vypvtssast	ghfylnftl	nlpsydgda
14341	pgttnytnsr	miedanlgl	frmskisyg	sdccqvtfr	vppnrhtgvd	alncsflpa
14401	rvdrvayve	flmrtmgtr	lqntldetrs	vlvdygpyrh	ntntgnsld	pfwafllg
14461	<u>glglvlgitel</u>	<u>lqglvltvtr</u>	<u>rkxegeynvq</u>	<u>qccqyqyph</u>	<u>ldledlg</u>	

(B) ペプチド 1

14394 14410
nfsplar rvdrrvaiyee (配列番号 01)

(C) ペプチド 2

14425 14442
tldrss vlvdgyspnr ne (配列番号 02)

(D) ペプチド 3

14472 14492
cgvlvttrr rkkegeynvq qq (配列番号 03)

(E) 膜貫通領域:

14452 14475
fwaviligl agllgvitcl icgvl (配列番号 14)

(F) システインループペプチドを含有するペプチド

14367 ksyf sdcqvstfrs vprnhhtgvd slcnfsp1 (配列番号15) 14398

FIGURE 9 (page 5 of 6)

FIGURE 9 (page 6 of 6)

【 図 1 0 】

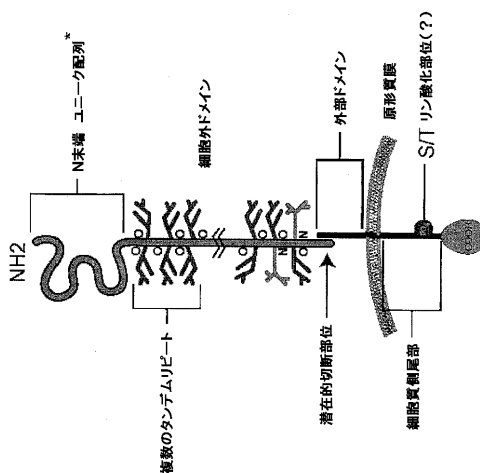


Figure 10

【 図 1 1 】

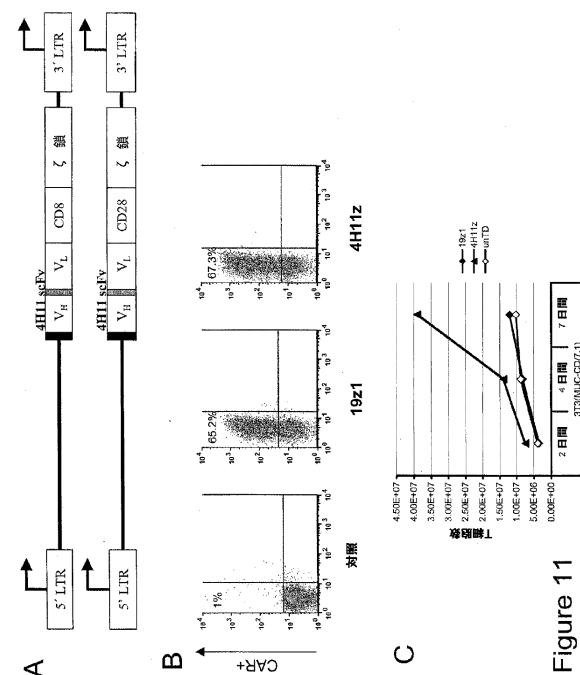


Figure 11

【図 12】

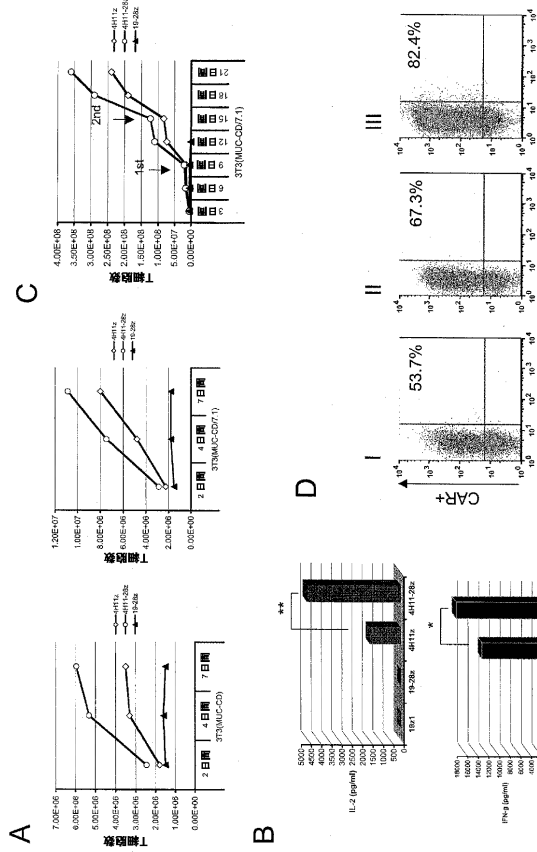


Figure 12

【図 15 A】

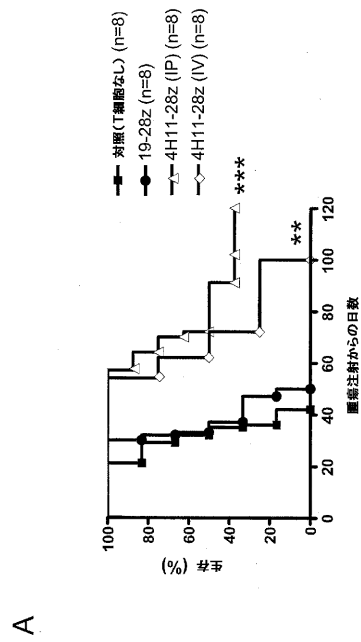


Figure 15 (1 of 3)

【図 13】

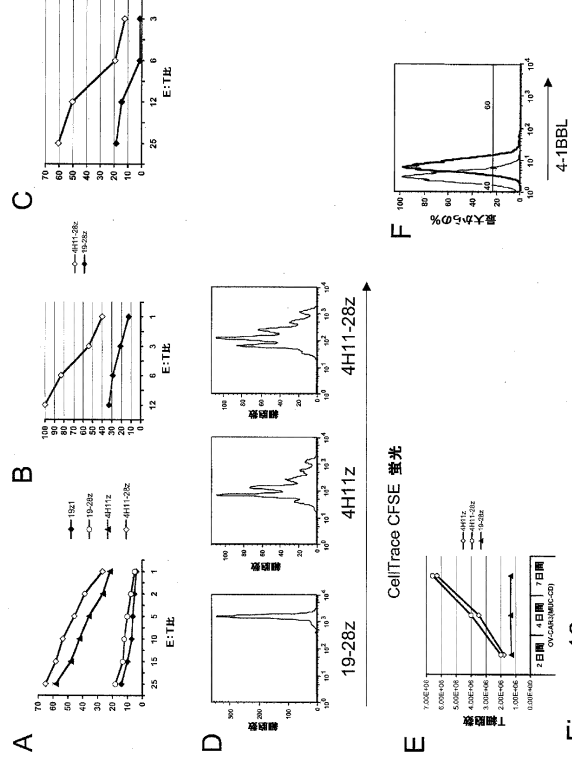


Figure 13

【図 15 C】

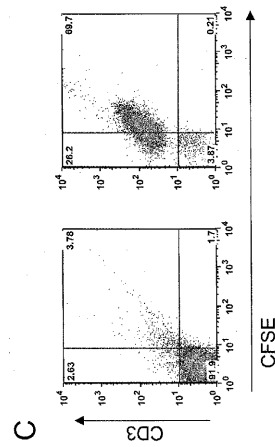


Figure 15 (3 of 3)

【 図 1 9 - 6 】



Figure 19 (6 of 6)

【 図 2 0 A 】

Figure 20A

1. マウスMUC16-CDペプチド1(配列番号21)

TLDRKSVFVDGYSQNRDD 19 AA

2. マウス第1のシステインループペプチド2(配列番号22)

KSYFSDGQVLAFRSVSNNNHTGVDSLGNFSPL 33 AA

- ### 3. マウス第2のシステインループペプチド3(配列番号23)

SLYSN⁹RLASLRPKKNGTATGVNAI¹⁸SYHQN 32 AA

【 図 2 0 B 】

Figure 20B

マウスMUC16アミノ酸配列(配列番号24)およびヒトMUC16アミノ酸配列(配列番号25)のアラインメント

[illegible]

【 図 2 4 】

Figure 24

- A. 12B10. 3G10-VHをコードするヌクレオチド配列(配列番号26)

GAGGTGAGCTCGAGGAGCAACAGCTGGAGCATTGTCGACGCTAAAGGATCATTTGAAACTCTGATGTCGCCGCTCT
GTTTTCACCTCTCAATACCTTGTCCGCTGCACCTGGTCTCGCCGAGGCTCGAGGAAGGCTCATGAAATGGGTGTCTGCG
ATAAGAGCTAAAGTGGAATATTGACAACTATTGTCGGATCTCGAGGAAGACAGATTACACCTCTCCGAAGAT
GATTACAGAGAGCTCTCTATCTGCAAAAGAACACCTGAAATCTGAGGACACAGCATATATTACTGTGTGAGA
CGGGTGATCAACACGGGGGCTTCTCTATGGGSCCAGGAGACCAAGCTGAGGCTCTCTCA

- A. 12B10. 3G10-VHアミノ酸配列(配列番号27)

EVKLEESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFTYAVHWVRQAPGKGMWVARIRSKSGNYAT
YYADSVKDRFTISRNDQSMLYLQMNKLTEDTAIYYCVRAGNGAFPYWGQGTITVSS

- B. 12B10. 3G10-VLをコードするヌクレオチド配列(配列番号28)**

VLはクローニングのためのプライマーにより付加された任意選択のNotI部位を有することに留意のこと。

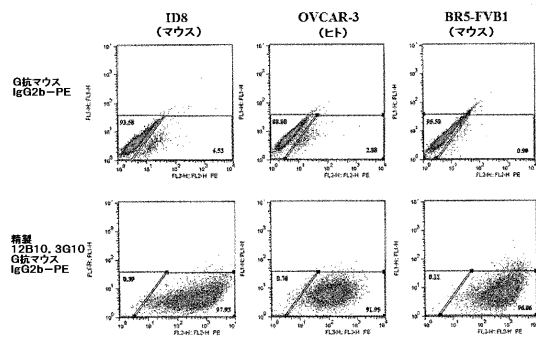
GACATTTGAGCTCACCAGCTTCATCTCCTACTCTCTGCATCTCTGGGAGGCAGAGTCACCATCAGTTGCAAGGCT
AGCCAAGATATTAGAAGTNTATAGCTTGGTACCAACACAAGCCTGGAAAACCTCCTGCAGTACTCATACATTC
ACATCTACATTCACAGACAGCATCCCATCAGAGTTCAGTGGAGCTGGGTCTGGGAGAGACTATTCTTCAGCATC
CCAAAGCTGGGAGTCTGAGATATTGCCAATTTATTTGTCACAGTATGATAGTCTGTACACGTTCCGAGGGGGG
ACCGACTGGAGATCAAACGGGCGGCGCA

- C. 12B10. 3G10-VLアミノ酸配列(配列番号29)

DIETQSPSSLSASLGGRVTITCKASQDIKKYIAWYQHKGKTPRLIIHFTSTLQTGIPS
RFSGRGSGRDYSFSISNLESEDATYYCLQYDSLYTFFGGGKLEIKRAAA

【図 25】

Figure 25



【図2】

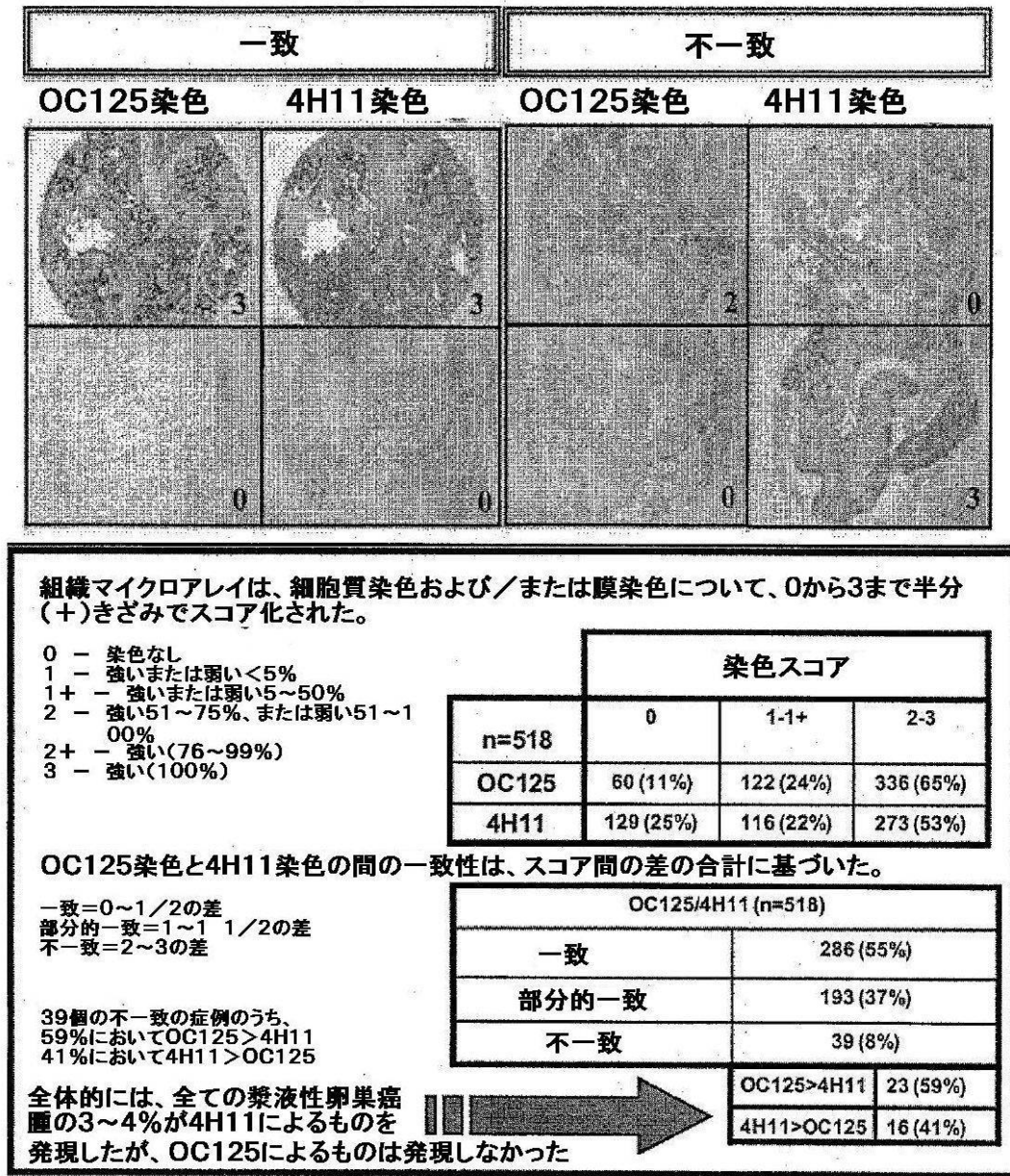
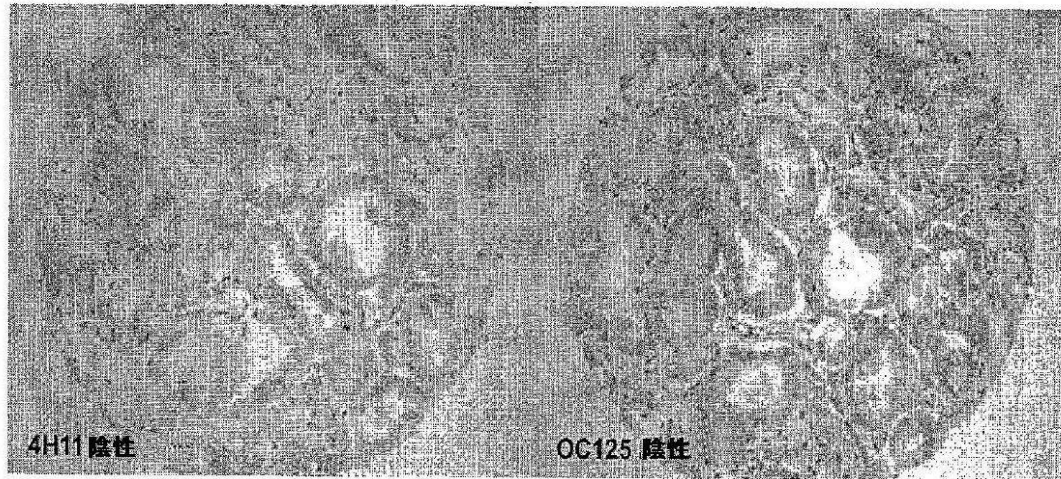
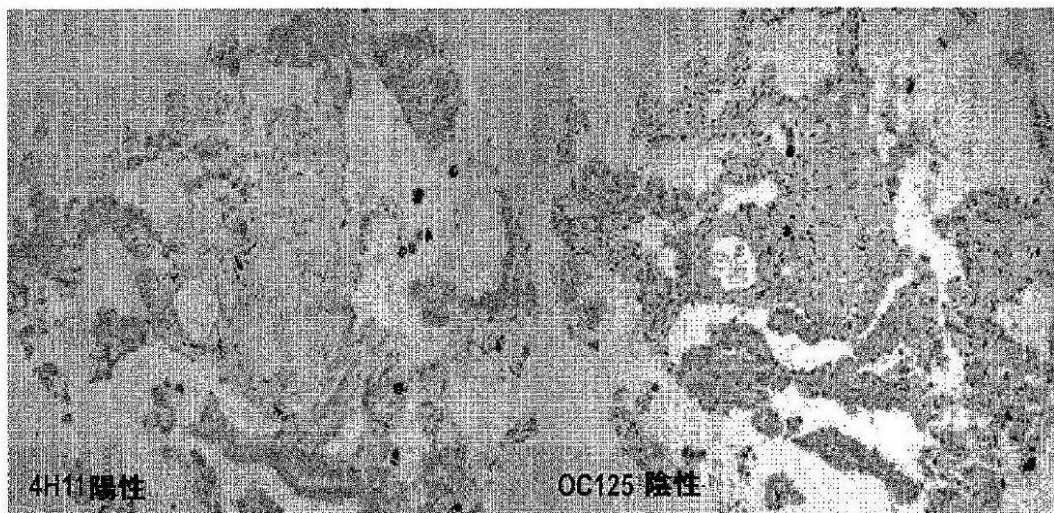


FIGURE 2

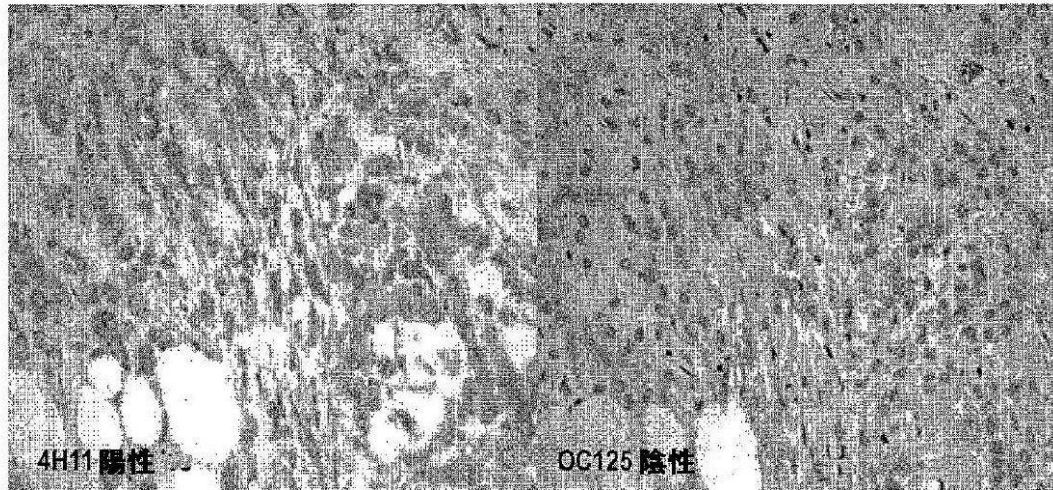
【図 6 A】

**FIGURE 6A**

【図 6 B】

**FIGURE 6B**

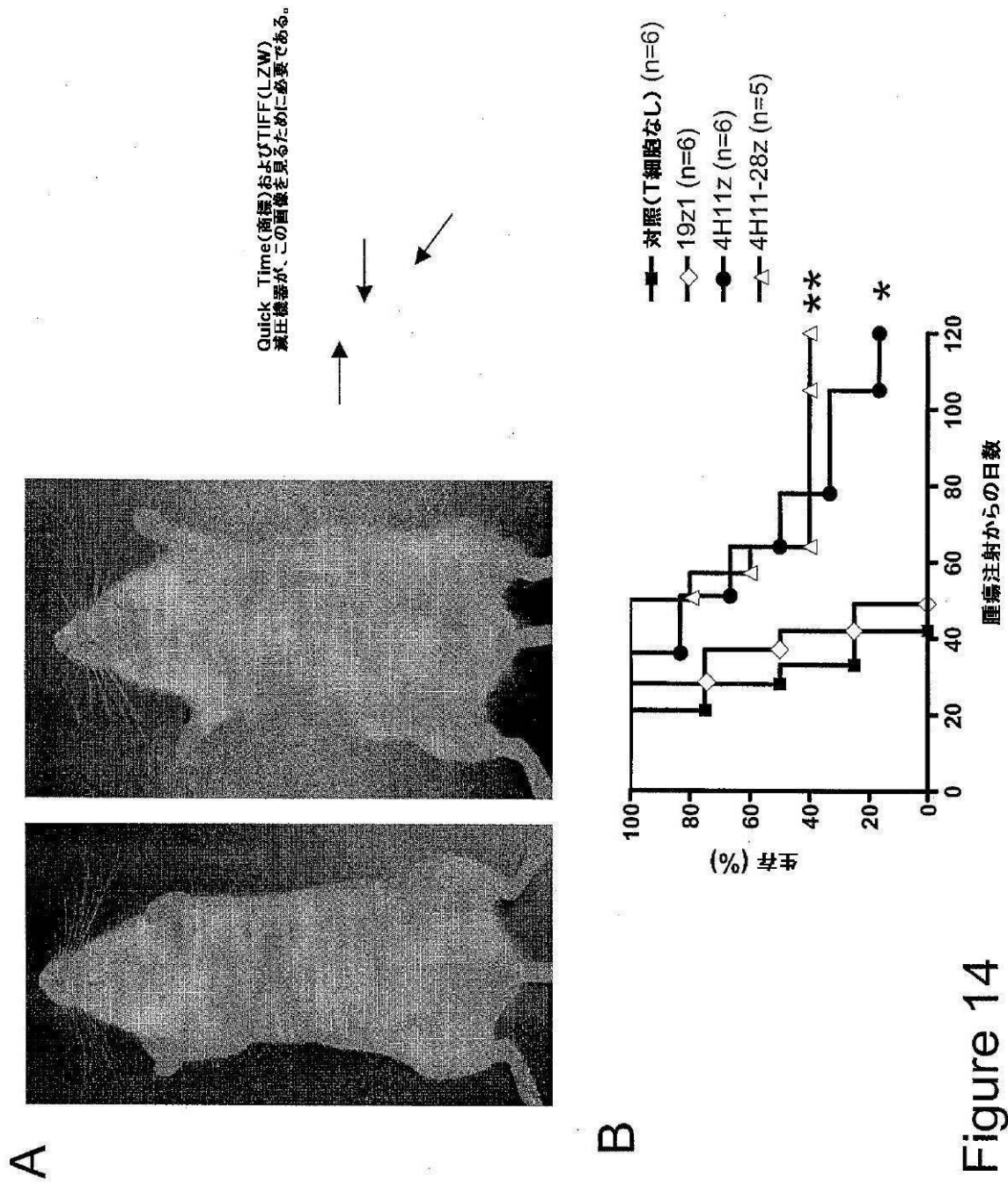
【図 6 C】

**FIGURE 6C**

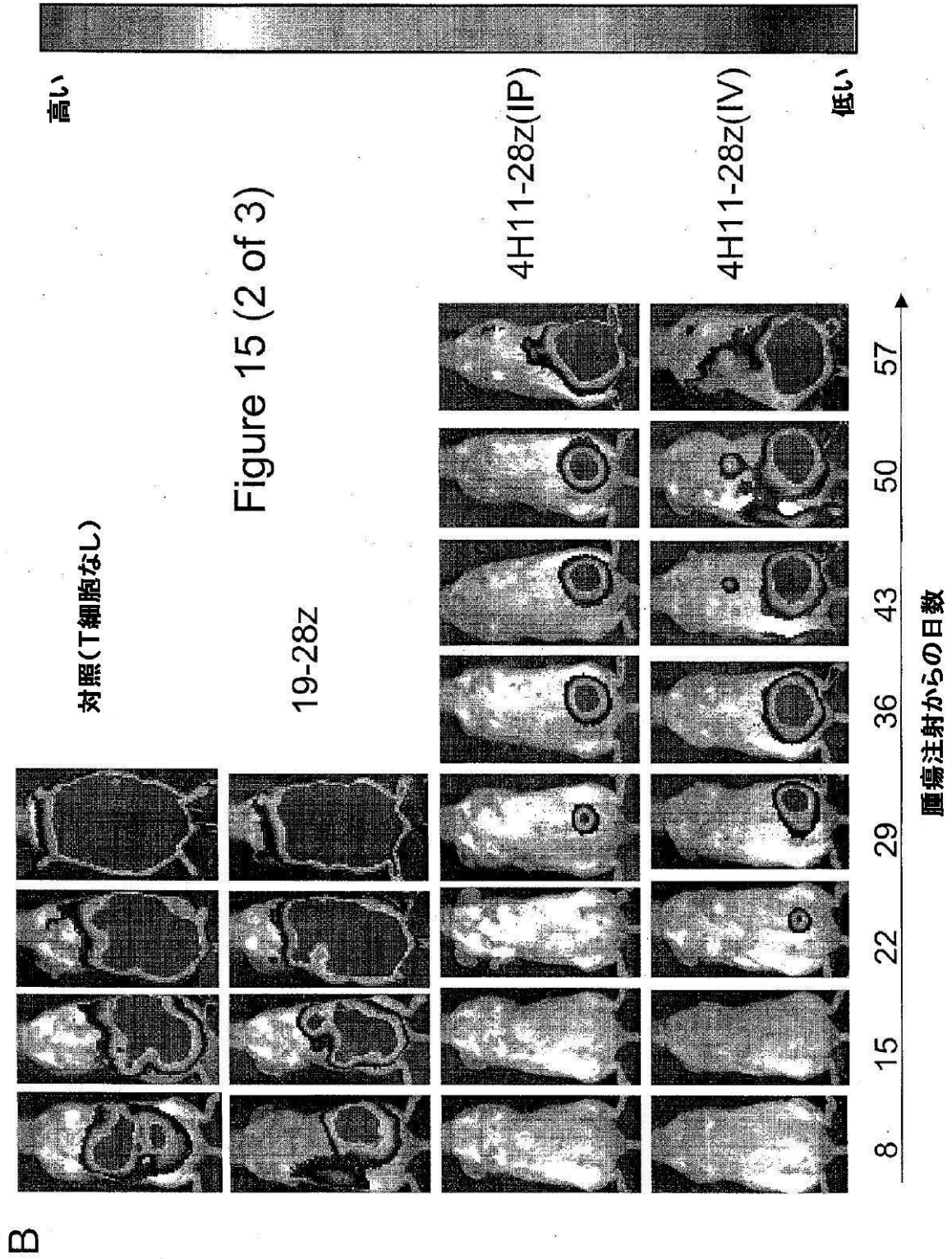
【図 6 D】

**FIGURE 6D**

【図 14】



【図 15 B】



【図 16 A】

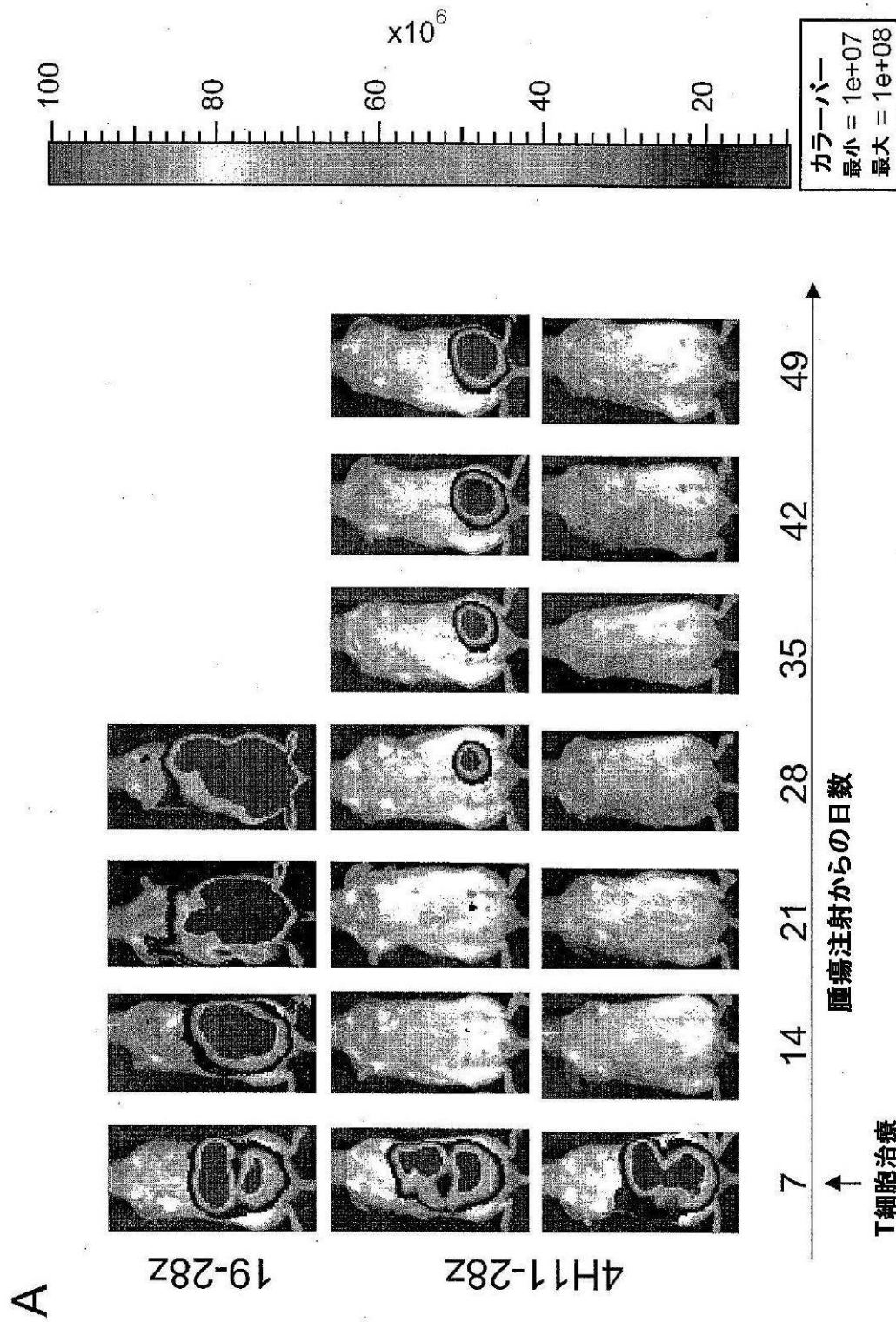
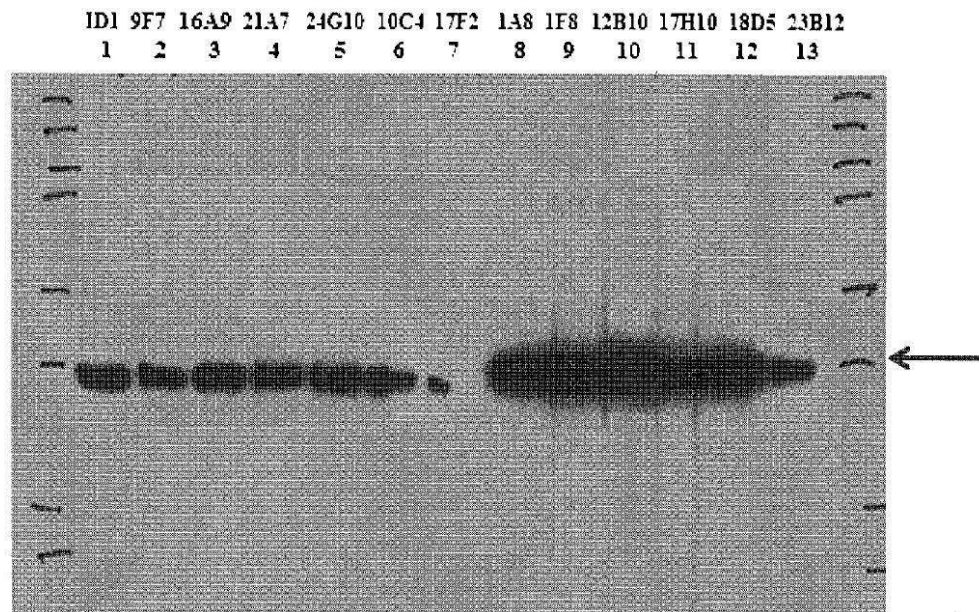


Figure 16 (1 of 2)

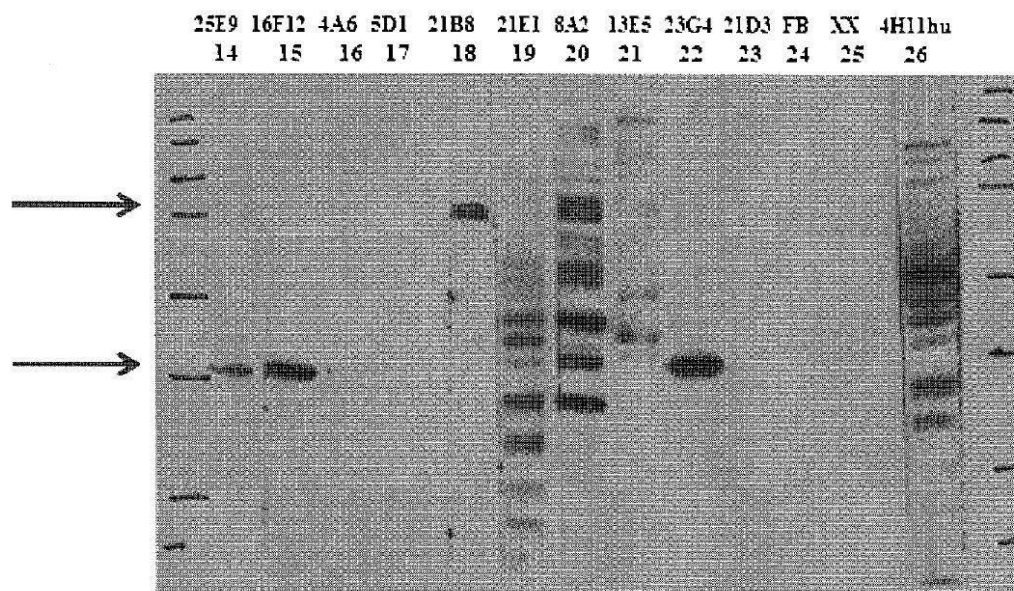
【図 21】

Figure 21

マウスMUC16 CD ペプチド1

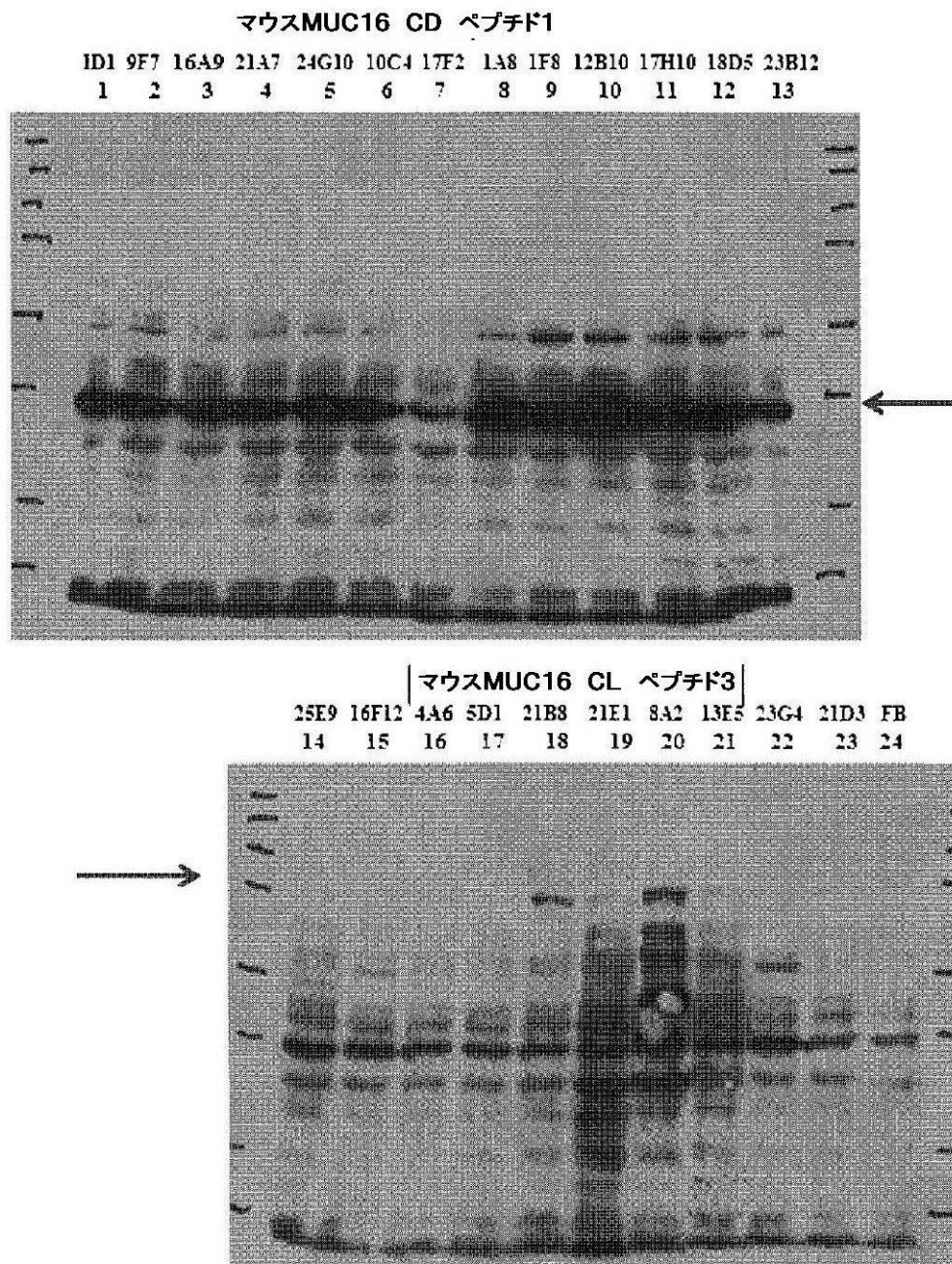


マウスMUC16 CL ペプチド3



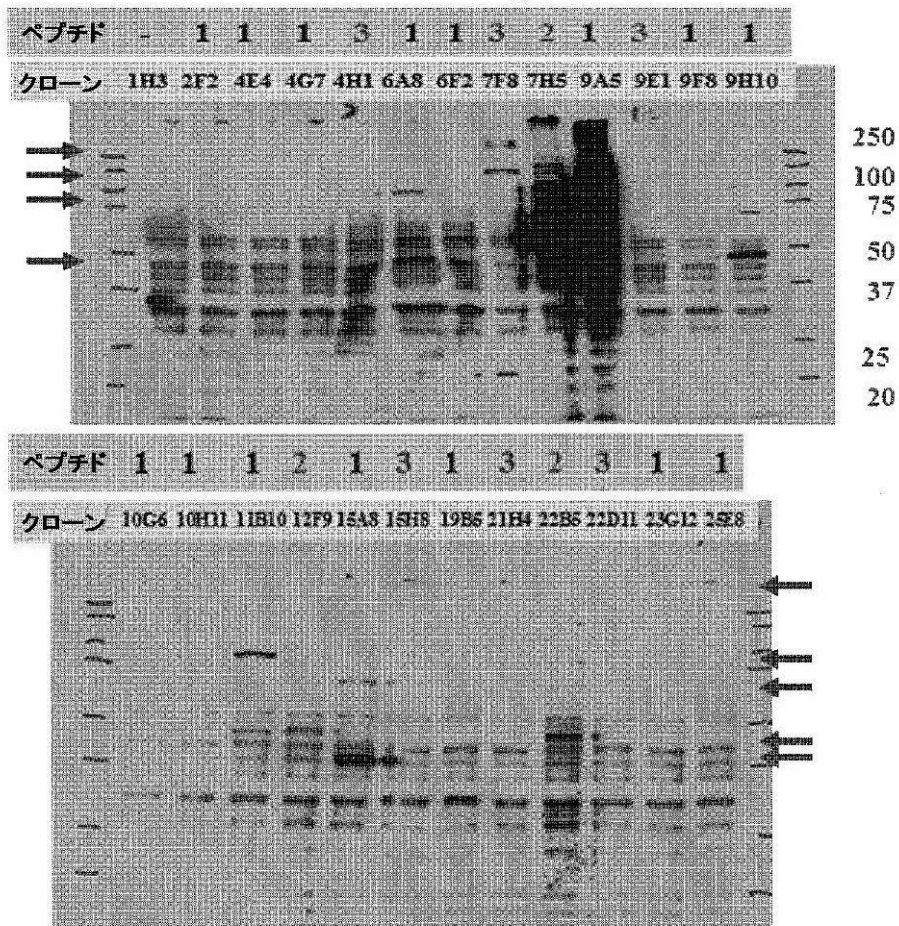
【図 22】

Figure 22

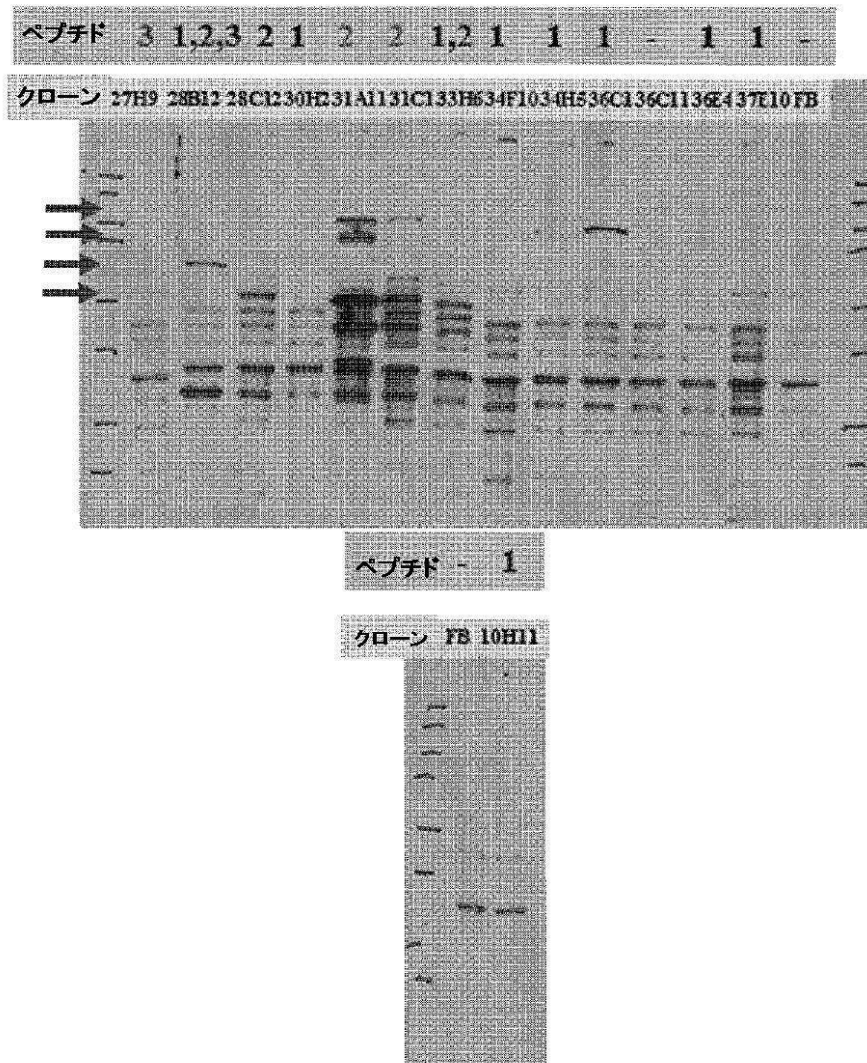


【図 23 - 1】

Figure 23



【図 23 - 2】



【配列表】

0005837567000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 15/00 (2006.01)

A 6 1 P 15/00

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

T

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

G 0 1 N 33/574

A

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

(72)発明者 スプリッグス, デイビッド

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5 , ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1 2 3 3
, 2 2 シー

(72)発明者 タピ, ダルマラオ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 1 3 6 4 , ベイサイド, ベル ブールバード, 5 6 - 3
4

審査官 山本 晋也

(56)参考文献 特表 2 0 0 6 - 5 0 2 1 1 0 (J P , A)

Davis et al , The International Journal of Biochemistry & Cell Biology , 2 0 0 7 年 , Vol
. 39 , p. 1943-1954

Rao et al , Appl Immunohistichem Mol Morphol , 2 0 1 0 年 1 0 月 , Vol. 18, No. 5

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

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

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

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