

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成28年6月23日(2016.6.23)

【公表番号】特表2015-517982(P2015-517982A)

【公表日】平成27年6月25日(2015.6.25)

【年通号数】公開・登録公報2015-041

【出願番号】特願2014-560096(P2014-560096)

【国際特許分類】

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 K 9/127 (2006.01)

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

G 0 1 N 33/531 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 16/28 Z N A

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 9/127

G 0 1 N 33/574 D

G 0 1 N 33/531 A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 21/08

【手続補正書】

【提出日】平成28年5月6日(2016.5.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

上皮細胞接着分子(EpCAM、配列番号1)のEGF様ドメインIIに位置する配列KPEGALQNNDGLYDPDCDE(配列番号63)中のエプトープに対する特異的結合親和性を有する、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項2】

前記EpCAMのEGF様ドメインIIにおいてアミノ酸位95のチロシン(Y<sub>95</sub>)、アミノ酸位96のアスパラギン酸(D<sub>96</sub>)、又は前記チロシン(Y<sub>95</sub>)及び前記アスパラギン酸(D<sub>96</sub>)の両方が変異している場合に、前記結合親和性が喪失されることを特徴とする、請求項1に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項3】

(a)(i)配列番号4を含む相補性決定領域1(CDR1)、

(ii)配列番号5を含む相補性決定領域2(CDR2)、及び

(iii)配列番号6を含む相補性決定領域3(CDR3)を有する重鎖可変領域、並びに

- (b) (i) 配列番号7を含むCDR1、
  - (ii) 配列番号8を含むCDR2、及び
  - (iii) 配列番号9を含むCDR3を有する軽鎖可変領域、
- を含む請求項1に記載の抗体又は結合断片。

【請求項4】

前記結合断片が前記抗体のFv断片を含む、請求項1に記載の抗体又は結合断片。

【請求項5】

前記結合断片が前記抗体のFab断片を含む、請求項1に記載の抗体又は結合断片。

【請求項6】

前記抗体又は抗原結合断片がヒト化されている、請求項1から5のいずれかに記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項7】

前記重鎖可変領域が配列番号24のアミノ酸配列を有し、前記軽鎖可変領域が配列番号25のアミノ酸配列を有する、請求項6に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項8】

(a) 配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号3のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、又は配列番号24のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号25のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、並びに

(b) 前記重鎖可変領域及び前記軽鎖可変領域を結合するリンカーペプチドを含む、単離された一本鎖可変断片。

【請求項9】

癌細胞及び/又は腫瘍開始細胞の増殖の阻害を必要とする対象における前記癌細胞及び/又は腫瘍開始細胞の増殖を阻害する組成物であって、

前記組成物は、

(a) 請求項1、2、3、4、5又は8に記載の抗体又は抗原結合断片、及び

(b) 薬学的に許容される担体、  
を含み、

前記癌細胞及び/又は腫瘍開始細胞はEpCAMを発現する、組成物。

【請求項10】

in vitroにおいてEpCAMを発現する癌細胞を検出及び/又は診断する方法であって、

(a) 細胞又は組織試料を患者から取得する工程、

(b) 前記細胞又は組織試料を、請求項1に記載の抗体又は結合断片と接触させる工程、

(c) 前記抗体又は結合断片と、前記細胞又は組織試料と、の結合をアッセイする工程、及び

(d) 前記結合を正常対照と比較することにより、EpCAMを発現する前記癌細胞が対象内に存在するか否かを決定する工程、

を含む方法。

【請求項11】

前記抗体又は抗原結合断片が、

(a) 配列番号24のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号25のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、又は

(b) 配列番号2のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号3のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、

請求項9に記載の癌細胞及び/又は腫瘍開始細胞の増殖を阻害する組成物。

【請求項12】

前記抗体又は抗原結合断片がヒト化されている、請求項9に記載の癌細胞及び/又は腫瘍開始細胞の増殖を阻害する組成物。

【請求項13】

前記癌細胞が口腔癌細胞、鼻咽頭癌細胞、結腸直腸癌細胞、及び卵巢癌細胞からなる群より選択される、請求項9に記載の癌細胞及び/又は腫瘍開始細胞の増殖を阻害する組成物。

## 【請求項 1 4】

検出可能な化合物若しくは酵素により標識されている、又はリボソーム中に封入されている、請求項1、2、3、4、5又は8に記載の抗体又は抗原結合断片。

## 【請求項 1 5】

- (a) 請求項6に記載の単離抗体又は抗原結合断片、  
(b) 抗癌剤、及び  
(c) 薬学的に許容される担体、  
を含む組成物。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 2】

【図 2】OCAb9-1の標的タンパク質の同定を示す図である。(A)は、免疫アフィニティークロマトグラフィーによるOCAb9-1の標的タンパク質の精製を示す。レーン1は分子量マーカー、レーン2はOCAb9-1標識アフィニティークラムによる精製タンパク質、レーン3はOCAb9-1標識アフィニティークラムによる精製タンパク質のウェスタンブロット解析である。39kDaのタンパク質(星印)を精製してLC/MS/MS分析に供した。(B)は、Swiss-ProtデータベースによるOCAb9-1の標的タンパク質の確認を示す。全長ヒトTACSTD1(EpCAM)はアミノ酸ポリペプチド314個(配列番号1)を含有していた。強調表示した配列は、LC/MS/MSによりヒットしたペプチドを示す。(C)は、SAS溶解物をOCAb9-1抗体により免疫沈降させ、続いてウサギ抗EpCAM mAb(1144-1)抗体、EpAb3-5抗体、及びEpAb4-1抗体によるブロットに供した結果を示す。(D)は、EpCAM shRNAプラスミド2つ(shEpCAM1及びshEpCAM2)をSAS細胞株にそれぞれトランスフェクションした後、各株の全RNAを抽出してQRT-PCR解析により検査した結果を示す。shEpCAM1及びshEpCAM2はいずれも、トランスフェクション後のSAS株においてEpCAM mRNAの発現に対し明らかな抑制効果を有していた。測定はクローン細胞の混合試料について行い、各点は平均値±SEM(n=3)を表す。\*\*\*はP<0.001を示す。(E)は、対照及びEpCAMをノックダウンしたSAS細胞への抗OCAb9-1 mAbの結合を評価したウェスタンブロット解析、(F)は同フローサイトメトリー解析を示す。

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 8】

【図 8 A - B】EpAb2-6特異的B細胞におけるエピトープの同定を示す図である。(A)は、野生型のEGF-Ⅰドメイン配列番号62(Q54A/N55A)又はEGF-Ⅱドメイン配列番号63(Q89A/N90A、D92A/G93A、L94A/Y95A、L94A、Y95A、又はD96A)におけるアミノ酸を変更して構築した、種々のEpCAM変異を示す。(B)は、HEK293細胞において発現させた種々のEpCAM変異体を示す。細胞タンパク質の抽出後、種々のEpCAM変異体に対するEpAb2-6抗体及びEpAb3-5抗体の反応性をウェスタンブロッティングにより試験した。(A)に示すEGF-Ⅱの配列に表すようにY95及びD96を置換したところ、EpAb2-6 mAbの結合活性が著しく減少した。

## 【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 9】

【図19】EpAb2-6により選択された、ファージディスプレイされたペプチドの配列(配列番号64-73)のアライメントを示す図である。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0086

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0086】

EpAb2-6特異的B細胞エпитープの同定

EpAb2-6特異的抗体に対する反応性が高く、正常マウスIgGにおける抗体に対する反応性が低い免疫陽性ファージクローン18個(PC-26、-11、-29、-3、-4、-18、-12、-1、-19、-27、-35、-21、-37、-20、-2、-7、-8、又は-44)を増幅させ、シーケンシングに用いるファージDNAを単離した。選択されたファージクローンの挿入ヌクレオチドの塩基配列を決定したところ、いずれのクローンも36nt(翻訳後は12aa残基、それぞれ、配列番号64-72)を含有することがわかった(図19)。MacDNASISソフトウェアを使用してペプチド配列(配列番号64-72)のアライメントを作成し、EpAb2-6抗体のエピトープ及び結合モチーフを分析した。ヒトEpCAM(EGF-I)の第1のEGF様リピート(aa 27~59)又はヒトEpCAM(EGF-II)の第2のEGF様リピート(aa 66~135)を含む配列をコードするcDNAを、PCRにより増幅させた。オーバーラップPCR及びPCRに基づく部位特異的変異誘発により、図8A及び図8Bに示す変異をEGF-Iドメイン又はEGF-IIドメインの野生型に導入した。ウェスタンブロッティングにより、変異型EpCAM変異体に対するEpAb2-6抗体又はEpAb3-5抗体の反応性を試験した。個々のEpCAM変異体に対する各EpAb2-6抗体の結合(図8B)を研究し、野生型EpCAM分子に対する結合と比較した。EGF-IIドメインのY95位又はD96位におけるアミノ酸変異により相対的結合活性が顕著に減少したことから、Y95及びD96は抗体結合に「必須」の残基であると考えられる。図8に、EpCAMのEGF様ドメインIの配列VGAQNTVIC(配列番号62)及び同EGF様ドメインIIの配列KPEGALQNNDGLYDPDCDE(配列番号63)を示す。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2015517982000001.app