



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119213128 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 27

(21) 申请号 202280095855.X

(22) 申请日 2022.09.28

(30) 优先权数据

2022-036463 2022.03.09 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/036260 2022.09.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/171009 JA 2023.09.14

(71) 申请人 株式会社丘阿德

地址 日本

申请人 国立大学法人北海道大学

国立大学法人东海国立大学机构

(72) 发明人 道下真弘 近藤亨 寺仓精太郎

尾崎正英 清井仁

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 曾祯 段承恩

(51) Int.Cl.

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 5/078 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

权利要求书2页 说明书40页

序列表(电子公布) 附图30页

(54) 发明名称

与Eva1蛋白质结合的人源化抗体或其功能性片段、抗体药物缀合物和嵌合抗原受体

(57) 摘要

与人来源的Eva1蛋白质结合的人源化抗体或其功能性片段、包含该人源化抗体或其功能性片段的抗体药物缀合物、或者包含与人来源的Eva1蛋白质结合的抗体或其功能性片段的嵌合抗原受体。

1. 与人来源的Eva1蛋白质结合的人源化抗体或其功能性片段,具有轻链可变区和重链可变区,

所述轻链可变区包含:分别包含序列号1所记载的氨基酸序列、由Val-Thr-Ser组成的氨基酸序列和序列号3所记载的氨基酸序列的互补决定区1~3,

所述重链可变区包含:分别包含序列号4~6所记载的氨基酸序列的互补决定区1~3。

2. 根据权利要求1所述的人源化抗体或其功能性片段,

所述轻链可变区包含:选自序列号7~10所记载的氨基酸序列、相对于序列号7~10所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号7~10所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列,

所述重链可变区包含:选自序列号13~16所记载的氨基酸序列、相对于序列号13~16所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13~16所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的人源化抗体或其功能性片段,

所述轻链可变区包含:选自序列号7所记载的氨基酸序列、相对于序列号7所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号7所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列,

所述重链可变区包含:选自序列号13所记载的氨基酸序列、相对于序列号13所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列。

4. 抗体药物缀合物,是权利要求1~3中的任一项所述的抗体或其功能性片段、与药物结合而成的。

5. 药物组合物,包含权利要求4所述的抗体药物缀合物。

6. 嵌合抗原受体,包含与人来源的Eva1蛋白质结合的区域、跨膜区域和细胞内信号区域。

7. 根据权利要求6所述的嵌合抗原受体,所述与人来源的Eva1蛋白质结合的区域是包含权利要求1~3中的任一项所述的抗体或其功能性片段的区域。

8. 权利要求6所述的嵌合抗原受体,所述与人来源的Eva1蛋白质结合的区域包含从氨基末端侧开始依次由轻链可变区、连接物、重链可变区结合而成的单链可变区片段,

所述轻链可变区

包含:分别包含序列号1所记载的氨基酸序列、由Val-Thr-Ser组成的氨基酸序列和序列号3所记载的氨基酸序列的互补决定区1~3,

并且包含选自序列号7所记载的氨基酸序列、相对于序列号7所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号7所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列,

所述重链可变区

包含:分别包含序列号4~6所记载的氨基酸序列的互补决定区1~3,

并且包含选自序列号13所记载的氨基酸序列、相对于序列号13所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列。

9.根据权利要求6~8中的任一项所述的嵌合抗原受体,所述与人来源的Eva1蛋白质结合的区域、与所述跨膜区域通过由10~300个氨基酸组成的间隔物而结合。

10.根据权利要求6~9中的任一项所述的嵌合抗原受体,所述细胞内信号区域包含CD79A细胞内区域和CD40细胞内区域。

11.编码权利要求6~10中的任一项所述的嵌合抗原受体的核苷酸。

12.包含权利要求11所述的核苷酸的载体。

13.表达权利要求6~10中的任一项所述的嵌合抗原受体的细胞。

14.根据权利要求13所述的细胞,是免疫细胞。

15.包含权利要求13或14所述的细胞的药物组合物。

与Eva1蛋白质结合的人源化抗体或其功能性片段、抗体药物 缀合物和嵌合抗原受体

技术领域

[0001] 本发明涉及与人来源的Eva1蛋白质(人Eva1)结合的人源化抗体或其功能性片段。本发明还涉及包含该人源化抗体或其功能性片段的抗体药物缀合物。进而,本发明涉及包含与人Eva1结合的抗体或其功能性片段的嵌合抗原受体。

背景技术

[0002] 癌与冠状动脉疾病一同是发达国家的主要死因,其比例有逐年增加的趋势。因此,希望迅速开发癌的根本疗法。在癌的根本疗法的开发中,癌干细胞的存在近年来受到重视。癌干细胞虽然仅存在于癌的组织极小一部分中,但被认为通过反复自我复制、进一步分化而成为创造出大多数癌细胞的本源。另外显示,在具有这样强的肿瘤形成能力的同时,癌干细胞对化疗、放疗具有强的耐受能力。因此,即使通过化疗、放疗而癌组织中的大部分癌细胞能够死亡,也由于癌干细胞残存,从而发生癌的复发、转移等。然而,如果能够以癌干细胞作为目标使其也死亡,则可以期待实现对癌的转移、复发等的防止也有用的治疗法的开发。

[0003] 鉴于该状况,本发明者们作为在神经胶质瘤及其癌干细胞中高表达的蛋白质成功地鉴定了Eva1蛋白质。进而搞清楚了,该Eva1蛋白质的表达与神经胶质瘤的恶性度相关,在神经胶质瘤患者的生存率与该患者来源的神经胶质瘤中的Eva1基因的表达之间有强的相关。另外也发现,Eva1基因的功能的抑制在神经胶质瘤细胞的增殖能力、肿瘤形成能力和组织浸润能力、以及神经胶质瘤干细胞的肿瘤块形成能力的抑制中是有效的(专利文献1)。

[0004] 另外,在癌中,该神经胶质瘤在这数十年间以手术为基本以放疗和化疗为辅助疗法的治疗基本没变,特别是对中枢神经系统组织中的恶性神经胶质瘤中恶性度最高的多形性胶质母细胞瘤(GBM, glioblastoma multiforme),未发现有效的疗法。进而,作为针对恶性神经胶质瘤的标准治疗药使用了替莫唑胺,但发明者们确认了即使对有效血中浓度的数倍的替莫唑胺,神经胶质瘤干细胞也是非敏感性的。另外,暴露于这样的化疗剂的癌细胞不限于神经胶质瘤,大多产生针对化疗剂的耐性,对其他多种化疗剂也同样产生交差耐性。进而,化疗剂大多对正常细胞也带来细胞伤害,为了降低这样的副作用,化疗剂的用量或用法多数情况下受到制约。

[0005] 由该现状出发,近年作为抗癌剂的抗体的利用受到关注,其重要性逐渐被认识到。例如,如果是以癌特异性抗原为目标的抗体,则推定所施与的抗体聚集于癌组织,因而可以期待利用抗体依赖性细胞毒(ADCC)活性、补体依赖性细胞毒(CDC)活性的、经由免疫系统的对癌细胞的攻击。

[0006] 另外,通过对抗体预先结合细胞毒性物质、放射性核种等药剂(采取所谓抗体药物缀合物(ADC)的方式),从而能够将所结合的药剂高效地送达肿瘤部位。由此,使向其他组织的药剂送达量减少,进而可以预见副作用的减轻。

[0007] 另外,在癌特异性抗原具有诱导细胞死亡的活性的情况下通过施与具有拮抗活性的抗体,另外,在癌特异性抗原参与细胞的增殖和生存的情况下通过施与具有中和活性的

抗体,从而可以利用肿瘤特异性抗体的聚集和抗体的活性,期待癌的增殖停止或退缩。

[0008] 进而,通过施与表达整合有抗体的可变区的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR-T),还可以期待该细胞对目标抗原阳性癌细胞进行HLA非依赖性的激活,诱导细胞死亡。

[0009] 由这样的特性,考虑抗体适合作为抗癌剂的应用,本发明者们也以创造出以上述Eva1作为目标的抗体药物作为目的而制作出高亲和性抗人Eva1小鼠抗体,显示了其有效性(专利文献2)。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1:国际公开第2012/043747号

[0013] 专利文献2:国际公开第2017/022668号

发明内容

[0014] 发明要解决的课题

[0015] 本发明以提供对癌的治疗等有用的抗体或其功能性片段、或包含该抗体或其功能性片段的缀合物作为目的。

[0016] 用于解决课题的手段

[0017] 本发明者们尝试将抗人Eva1小鼠抗体(专利文献2所记载的、B2E5-48小鼠抗体)人源化,将人源化了的轻链可变区4种(H1~H4)和重链可变区4种(L1~L4)组合,制作了16种人源化抗体。其结果成功地获得了对Eva1蛋白质的结合亲和性高、另外产生能力(抗体效价)高的人源化抗体(H2-L2、H2-L4、H3-L4等组合)。

[0018] 另外,制作了整合有抗人Eva1抗体的可变区的嵌合抗原受体(CAR),评价了其有效性。其结果是,表达该CAR的T细胞(CAR-T)显示响应人Eva1的激活(细胞因子产生)和细胞增殖。进而搞清楚了,对Eva1蛋白质表达肿瘤细胞显示细胞毒活性。

[0019] 另外,在整合有B2E5-48小鼠抗体的可变区的CAR中,改变包含该可变区的抗原结合性区域与跨膜区域之间的间隔物长度而进行评价,结果搞清楚了,在将表达该CAR的T细胞在IL-2不存在下培养的情况下,所述间隔物长度为232个氨基酸的CAR-T在细胞增殖和细胞因子产生中最优异。另一方面,在IL-2存在下培养的情况下,具有由15个氨基酸组成的间隔物的CAR-T的细胞增殖最好。

[0020] 进而另外发现,在整合有上述人源化抗体的可变区的CAR中,从响应人Eva1的激活和细胞增殖等观点出发,L2-H2的组合最有用。进而,关于抗原识别部位为L2-H2的CAR-T,尝试了各种细胞内结构域,评价了由它们的差别造成的反应性的差异,结果搞清楚了,在细胞增殖中,具有4-1BB、CD79A/CD40的细胞内结构域的CAR优异。另外,对荷癌模型施与所述CAR-T(L2-H2 hEva1-CAR-T),确认了其抗肿瘤活性和安全性。

[0021] 另外,制作包含上述人源化抗体的抗体药物缀合物(ADC),评价了其有效性。其结果确认了该ADC对神经胶质瘤、胰癌、胃癌这样的各种肿瘤的抗肿瘤活性。另一方面,没有发现对所施与的生物体的坏影响(体重的减少、生存时间的缩短等)。

[0022] 本发明是基于上述研究结果的,更具体地提供以下的方案。

[0023] <1>与人来源的Eva1蛋白质结合的人源化抗体或其功能性片段,具有轻链可变区和重链可变区,

[0024] 所述轻链可变区包含:分别包含序列号1所记载的氨基酸序列、由Val-Thr-Ser组成的氨基酸序列和序列号3所记载的氨基酸序列的互补决定区1~3,

[0025] 所述重链可变区包含:分别包含序列号4~6所记载的氨基酸序列的互补决定区1~3。

[0026] <2><1>所述的人源化抗体或其功能性片段,

[0027] 所述轻链可变区包含:选自序列号7~10所记载的氨基酸序列、相对于序列号7~10所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号7~10所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列,

[0028] 所述重链可变区包含:选自序列号13~16所记载的氨基酸序列、相对于序列号13~16所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13~16所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列。

[0029] <3>根据<1>所述的人源化抗体或其功能性片段,

[0030] 所述轻链可变区包含:选自序列号7所记载的氨基酸序列、相对于序列号7所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号7所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列,

[0031] 所述重链可变区包含:选自序列号13所记载的氨基酸序列、相对于序列号13所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列。

[0032] <4>抗体药物缀合物,是<1>~<3>中的任一项所述的抗体或其功能性片段、与药物结合而成的。

[0033] <5>药物组合物,包含<4>所述的抗体药物缀合物。

[0034] <6>嵌合抗原受体,包含与人来源的Eva1蛋白质结合的区域、跨膜区域和细胞内信号区域。

[0035] <7>根据<6>所述的嵌合抗原受体,所述与人来源的Eva1蛋白质结合的区域是包含<1>~<3>中的任一项所述的抗体或其功能性片段的区域。

[0036] <8>根据<6>所述的嵌合抗原受体,所述与人来源的Eva1蛋白质结合的区域包含从氨基末端侧开始依次由轻链可变区、连接物、重链可变区结合而成的单链可变区片段,所述轻链可变区

[0037] 包含:分别包含序列号1所记载的氨基酸序列、由Val-Thr-Ser组成的氨基酸序列和序列号3所记载的氨基酸序列的互补决定区1~3,并且

[0038] 包含选自序列号7所记载的氨基酸序列、相对于序列号7所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号7所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列,

[0039] 所述重链可变区

[0040] 包含:分别包含序列号4~6所记载的氨基酸序列的互补决定区1~3,并且

[0041] 包含选自序列号13所记载的氨基酸序列、相对于序列号13所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列。

[0042] <9>根据<6>~<8>中的任一项所述的嵌合抗原受体,所述与人来源的Eva1蛋白质结合的区域、与所述跨膜区域通过由10~300个氨基酸组成的间隔物而结合。

[0043] <10>根据<6>~<9>中的任一项所述的嵌合抗原受体,所述细胞内信号区域包含CD79A细胞内区域和CD40细胞内区域。

[0044] <11>编码<6>~<10>中的任一项所述的嵌合抗原受体的核苷酸。

[0045] <12>包含<11>所述的核苷酸的载体。

[0046] <13>表达<6>~<10>中的任一项所述的嵌合抗原受体的细胞。

[0047] <14>根据<13>所述的细胞,是免疫细胞。

[0048] <15>药物组合物,包含<13>或<14>所述的细胞。

[0049] 此外,各序列号所记载的序列如下。

[0050] 表1

[0051]

序列号	序列的名称
1	轻链的CDR1(人源化B2E5-48)
2	轻链的CDR2(人源化B2E5-48)
3	轻链的CDR3(人源化B2E5-48)
4	重链的CDR1(人源化B2E5-48)
5	重链的CDR2(人源化B2E5-48)
6	重链的CDR3(人源化B2E5-48)
7	轻链2的可变区(人源化B2E5-48)
8	轻链4的可变区(人源化B2E5-48)
9	轻链1的可变区(人源化B2E5-48)
10	轻链3的可变区(人源化B2E5-48)
11	轻链2的可变区(人源化B2E5-48) cDNA
12	轻链4的可变区(人源化B2E5-48) cDNA
13	重链2的可变区(人源化B2E5-48)
14	重链4的可变区(人源化B2E5-48)
15	重链1的可变区(人源化B2E5-48)
16	重链3的可变区(人源化B2E5-48)
17	重链2的可变区(人源化B2E5-48) cDNA
18	重链3的可变区(人源化B2E5-48) cDNA

[0052] 表2

[0053]

序列号	序列的名称
19	信号肽和轻链的可变区(B2E5-48) cDNA
20	信号肽和轻链的可变区(B2E5-48)
21	轻链的可变区(B2E5-48)
22	轻链的CDR1(B2E5-48)

23	轻链的CDR2 (B2E5-48)
24	轻链的CDR3 (B2E5-48)
25	信号肽和重链的可变区 (B2E5-48) cDNA
26	信号肽和重链的可变区 (B2E5-48)
27	重链的可变区 (B2E5-48)
28	重链的CDR1 (B2E5-48)
29	重链的CDR2 (B2E5-48)
30	重链的CDR3 (B2E5-48)
31	信号肽和轻链的可变区 (C3) cDNA
32	信号肽和轻链的可变区 (C3)
33	轻链的可变区 (C3)
34	轻链的CDR1 (C3)
35	轻链的CDR2 (C3)
36	轻链的CDR3 (C3)
37	信号肽和重链的可变区 (C3) cDNA
38	信号肽和重链的可变区 (C3)
39	重链的可变区 (C3)
40	重链的CDR1 (C3)
41	重链的CDR2 (C3)
42	重链的CDR3 (C3)
43	轻链的可变区 (A5D11-10) cDNA
44	轻链的可变区 (A5D11-10)
45	轻链的CDR1 (A5D11-10)
46	轻链的CDR2 (A5D11-10)
47	轻链的CDR3 (A5D11-10)
48	重链的可变区 (A5D11-10) cDNA
49	重链的可变区 (A5D11-10)
50	重链的CDR1 (A5D11-10)
51	重链的CDR2 (A5D11-10)
52	重链的CDR3 (A5D11-10)
53	hEva1 cDNA
54	hEva1
55	mEva1 cDNA
56	mEva1

[0054] 表3

[0055]

序列号	序列的名称
57	B2E5-48 CAR cDNA
58	B2E5-48CAR
59	铰链区:15aa

60	铰链区:30aa
61	铰链区:60aa
62	铰链区:125aa
63	铰链区:232aa
64	4-1BB IC
65	CD79A IC
66	CD40 IC

[0056] 此外,如表1所示,序列号2是指轻链的CDR2(人源化B2E5-48)的氨基酸序列(从N末端开始依次由缬氨酸-苏氨酸-丝氨酸组成氨基酸序列)(也请参照表7)。然而,该序列为少于4个(3个)氨基酸的序列,因而在序列表中被作为被主动跳过的序列”处理。

[0057] 发明的效果

[0058] 根据本发明,通过以人Eva1作为目标,能够治疗或预防癌等。

附图说明

[0059] 图1是显示正常人血液细胞中的人Eva1的表达分析结果的直方图。

[0060] 图2A是显示各种肿瘤细胞中的人Eva1的表达分析结果的直方图。

[0061] 图2B是显示肝内胆管癌病例(样本1~3)中的人Eva1的表达分析结果的直方图。

[0062] 图3A是显示使用了抗Eva1抗体序列的嵌合抗原受体(Eva1-CAR)的概要的图。

[0063] 图3B是显示Eva1-CAR表达T细胞(Eva1-CAR-T)的制作日程安排的概要的图。

[0064] 图3C是显示以tEGFR的表达为指标的筛选(tEGFR selection)之前的Eva1-CAR基因的导入效率的分析结果的点图。

[0065] 图3D是显示tEGFR selection之前的Eva1-CAR基因的导入效率的分析结果的点图。图中,点分别表示导入了所述Eva1-CAR基因的细胞的来源(5名健康人)。粗线表示平均值,须表示标准误差。

[0066] 图3E是显示Eva1-CAR-T对各种肿瘤细胞的细胞因子(IFN- γ)产生的分析结果的图。图中,横轴中每个导入的Eva1-CAR从左开始依次显示对CFPAC-1、NCI-H1975、HuCCT-1、MCF7、HepG2、Huh7、OVTOKO、T98G、PA1的结果。

[0067] 图3F是显示Eva1-CAR中的6种长度不同的间隔物的概要的图。此外,图3F中显示的“H00”~“H232”的标号与图3G~3M中的它们对应。

[0068] 图3G是显示tEGFR selection之前的Eva1-CAR基因的导入效率的分析结果的点图。图中,点分别表示导入了所述Eva1-CAR基因的细胞的来源(5名健康人)。粗线表示平均值,须表示标准误差。

[0069] 图3H是显示tEGFR selection之后的Eva1-CAR基因的导入效率的分析结果的点图。图中,点分别表示导入了所述Eva1-CAR基因的细胞的来源(5名健康人)。粗线表示平均值,须表示标准误差。

[0070] 图3I是显示Eva1-CAR-T对各种肿瘤细胞的细胞因子产生的分析结果的图。图中,左侧的图中显示IFN- γ 产生的分析结果,右侧的图中显示IL-2产生的分析结果。每个导入的Eva1-CAR从左开始依次显示对HuCCT-1、CFPAC-1、HepG2、OVTOKO的结果。

[0071] 图3J是显示在IL-2不存在下抗原刺激之后Eva1-CAR-T的扩增效率的图。图中,横

轴显示开始抗原刺激(与Eva1阳性的HuCCT-1共培养)之后的天数。纵轴显示Eva1-CAR-T的细胞数。

[0072] 图3K是显示在IL-2不存在下抗原刺激之后的Eva1-CAR-T的扩增效率的图。图中,横轴显示所导入的CAR的种类。纵轴显示Eva1-CAR-T的细胞数。

[0073] 图3L是显示在IL-2存在下抗原刺激之后的Eva1-CAR-T的扩增效率的图。图中,横轴显示开始抗原刺激(与Eva1阳性的HuCCT-1共培养)之后的天数。纵轴显示Eva1-CAR-T的细胞数。

[0074] 图3M是显示在IL-2存在下抗原刺激之后Eva1-CAR-T的扩增效率的图。图中,横轴显示导入的CAR的种类。纵轴显示Eva1-CAR-T的细胞数。

[0075] 图4A是显示tEGFR selection之前的、使用了抗Eva1人源化抗体序列的Eva1-CAR(hEva1-CAR)基因的导入效率的分析结果的点图。图中,点分别表示导入了所述hEva1-CAR基因的细胞的来源(4名健康人)。须表示标准误差,夹在须中的正中的线表示平均值。

[0076] 图4B是显示tEGFR selection之后的hEva1-CAR-T的扩增效率的分析结果的点图。图中,点分别表示导入了所述hEva1-CAR基因的细胞的来源(4名健康人)。须表示标准误差,夹在须中的正中的线表示平均值。

[0077] 图4C是显示hEva1-CAR-T对各种肿瘤细胞的IFN- γ 产生的分析结果的图。每个导入的Eva1-CAR从左开始依次显示对HuCCT-1、CFPAC-1、HepG2、OVTOK0的结果。

[0078] 图4D是显示hEva1-CAR-T对各种肿瘤细胞的IL-2产生的分析结果的图。每个导入的Eva1-CAR从左开始依次显示对HuCCT-1、CFPAC-1、HepG2、OVTOK0的结果。

[0079] 图4E是显示抗原刺激之后hEva1-CAR-T的扩增效率的图。图中,左侧显示IL-2不存在下的结果,右侧显示IL-2存在下的结果。各图中,横轴表示开始抗原刺激(与Eva1阳性的HuCCT-1共培养)之后的天数。纵轴表示hEva1-CAR-T的细胞数。

[0080] 图4F是显示细胞内结构域和间隔物长度不同的6种hEva1-CAR-T(抗原识别部位:L2H2)的概要的图。

[0081] 图4G是显示tEGFR selection之前的、hEva1-CAR基因的导入效率的分析结果的点图。图中,点分别表示导入了所述hEva1-CAR基因的细胞的来源(5名健康人)。正中的线表示平均值。横轴中的“28”、“41”和“79”表示各CAR所具有的细胞内结构域分别为“CD28IC”、“4-1BBIC”和“CD79A/CD40IC”。另外,“-S”和“-L”分别表示间隔物为图4F所示的“H15”和“H232”。

[0082] 图4H是显示hEva1-CAR-T对各种肿瘤细胞的IFN- γ 产生的分析结果的图。每个导入的Eva1-CAR从左开始依次显示对OVTOK0、CFPAC-1、HepG2、HuCCT、MCF7的结果。横轴中的“28”、“41”和“79”表示各CAR所具有的细胞内结构域分别为“CD28IC”、“4-1BBIC”和“CD79A/CD40IC”。另外,“-S”和“-L”分别表示间隔物为图4F所示的“H15”和“H232”。

[0083] 图4I是显示hEva1-CAR-T对各种肿瘤细胞的IL-2产生的分析结果的图。每个导入的Eva1-CAR从左开始依次显示对OVTOK0、CFPAC-1、HepG2、HuCCT、MCF7的结果。横轴中的“28”、“41”和“79”表示各CAR所具有的细胞内结构域分别为“CD28IC”、“4-1BBIC”和“CD79A/CD40IC”。另外,“-S”和“-L”分别表示间隔物为图4F所示的“H15”和“H232”。

[0084] 图4J是显示抗原刺激之后hEva1-CAR-T的扩增效率的图。图中,左侧的图显示IL-2不存在下的结果,右侧的图显示IL-2存在下的结果。各图中,横轴显示开始抗原刺激(与

Eva1阳性的HuCCT-1共培养)之后的天数。纵轴显示hEva1-CAR-T的细胞数。另外,凡例中的“28”、“41”和“79”表示各CAR所具有的细胞内结构域分别为“CD28IC”、“4-1BBIC”和“CD79A/CD40IC”。另外,“-S”和“-L”分别表示间隔物为图4F所示的“H15”和“H232”。

[0085] 图4K是显示hEva1-CAR-T与Eva1阳性骨髓瘤细胞(RPMI-8226)的共培养试验的结果的图。图中,左侧的图中显示由供者2的外周血制作的hEva1-CAR-T的结果,右侧的图中显示由供者3的外周血制作的hEva1-CAR-T的结果。各图的纵轴中显示肿瘤细胞在全部细胞中所占的比例。横轴中显示开始共培养之后的时间。另外,凡例中的“28”、“41”和“79”表示各CAR所具有的细胞内结构域分别为“CD28IC”、“4-1BBIC”和“CD79A/CD40IC”。另外,“s”和“L”分别表示间隔物为图4F所示的“H15”和“H232”。

[0086] 图4L是显示将hEva1-CAR-T与经⁵¹Cr标记的各种肿瘤细胞株共培养,分析细胞毒活性而得的结果的图。图中,纵轴中显示基于培养上清中⁵¹Cr释放量的被伤害的细胞的比例。横轴中将各种肿瘤细胞株与Eva1的表达是阴性还是阳性合并显示。另外,凡例中的“41”和“79”表示各CAR所具有的细胞内结构域分别为“4-1BBIC”和“CD79A/CD40IC”。另外,“S”和“L”分别表示间隔物为图4F所示的“H15”和“H232”。

[0087] 图4M是显示基于图4L中所示的结果,分析各种肿瘤细胞株中的人Eva1的表达量、与对各种肿瘤细胞株的hEva1-CAR-T的细胞毒活性的相关性而得的结果的图。图中,纵轴中显示基于培养上清中⁵¹Cr释放量的被伤害的细胞的比例。横轴中显示各种肿瘤细胞株中的通过使用了抗人Eva1抗体的流式细胞术分析而得的平均荧光强度(MFI),这与Eva1表达量相关。另外,凡例中的“41”和“79”表示各CAR所具有的细胞内结构域分别为“4-1BBIC”和“CD79A/CD40IC”。另外,“S”和“L”分别表示间隔物为图4F所示的“H15”和“H232”。

[0088] 图4N是显示将由来源于2名不同的供者(供者A、供者B)的外周血制作的L2H2hEva1-CAR-T,导入到搭载了已经导入有萤火虫萤光素酶基因的人肺腺癌细胞株(H1975)的小鼠中,将该CAR-T的抗肿瘤活性通过生物发光成像进行分析而得的结果的图。作为L2H2hEva1-CAR,使用了将抗原识别部位(L2H2)、与跨膜/细胞内结构域(包含4-1BB或CD79A/CD40的结构域)用短的间隔物(图中用“短铰链”标示,图4F中所示的“H15”)连接而成的。作为对照,也制作了tEGFR导入细胞(仅基因导入了tEGFR的模拟CAR-T细胞)的施与例并进行了分析。另外,图中的“Day”表示施与CAR-T之后的天数。此外,在跨膜/细胞内结构域包含4-1BB的L2H2 hEva1-CAR-T的施与例的“Day 14”中少了2只,这是因为由于实验技术的问题而死亡了。另外,发射光谱在图4P和4R中也被应用。

[0089] 图4O是显示将由来源于2名不同的供者(供者A、供者B)的外周血制作的L2H2hEva1-CAR-T,导入到搭载了已经导入有萤火虫萤光素酶基因的人胰癌细胞株(CFPAC1)的小鼠中,将该CAR-T的抗肿瘤活性通过生物发光成像进行分析而得的结果的图。作为L2H2hEva1-CAR,使用了将抗原识别部位(L2H2)、与跨膜/细胞内结构域(包含4-1BB或CD79A/CD40的结构域)用短铰链连接而得的。作为对照,也制作了tEGFR导入细胞的施与例并进行了分析。另外,图中的“Day”表示施与CAR-T之后的天数。发射光谱在图4P和4R中也被应用。

[0090] 图4P是显示将由来源于2名不同的供者(供者A、供者B)的外周血制作的L2H2hEva1-CAR-T,导入到搭载了已经导入有萤火虫萤光素酶基因的人胰癌细胞株(CFPAC1)或人肺腺癌细胞株(H1975)的小鼠中,将该CAR-T的抗肿瘤活性通过生物发光成像

进行分析而得的结果的图。作为L2H2 hEva1-CAR,使用了将抗原识别部位(L2H2)、与跨膜/细胞内结构域(包含4-1BB或CD79A/CD40的结构域)用短铰链连接而得的。作为对照,也制作了tEGFR导入细胞的施与例并进行了分析。另外,图中的“Day”表示施与CAR-T之后的天数。发射光谱在图4P和4R中也被应用。

[0091] 图4Q是显示将由来源于2名不同的供者(供者A、供者B)的外周血制作的L2H2hEva1-CAR-T,导入到搭载了已经导入有萤火虫萤光素酶基因的人胰腺癌细胞株(CFPAC1)或人肺腺癌细胞株(H1975)的小鼠中,将该CAR-T的抗肿瘤活性通过生物发光成像经时地进行分析而得的结果(发光强度)的图。作为L2H2 hEva1-CAR,使用了将抗原识别部位(L2H2)、与跨膜/细胞内结构域(包含4-1BB或CD79A/CD40的结构域)用短铰链连接而得的。作为对照,也制作了tEGFR导入细胞的施与例并进行了分析。

[0092] 图4R是显示将由来源于供者C的外周血制作的L2H2 hEva1-CAR-T,导入到搭载了已经导入有萤火虫萤光素酶基因的人胆管癌细胞株(HuCCCT细胞)的小鼠中,将该CAR-T的抗肿瘤活性通过生物发光成像进行分析而得的结果的图。作为L2H2 hEva1-CAR,使用了将抗原识别部位(L2H2)、与跨膜/细胞内结构域(包含4-1BB或CD79A/CD40的结构域)用短铰链连接而得的。作为对照,也制作了tEGFR导入细胞的施与例并进行了分析。另外,图中的“Day”表示施与CAR-T之后的天数。

[0093] 图4S是显示将由来源于供者C的外周血制作的L2H2 hEva1-CAR-T,导入到搭载了已经导入有萤火虫萤光素酶基因的人胆管癌细胞株(HuCCCT细胞)中进行分析而得的结果的图。作为L2H2 hEva1-CAR,使用了将抗原识别部位(L2H2)、与跨膜/细胞内结构域(包含4-1BB或CD79A/CD40的结构域)用短铰链连接而得的。作为对照,也制作了tEGFR导入细胞的施与例并进行了分析。另外,图中,左侧的图显示将所述CAR-T的抗肿瘤活性通过生物发光成像经时地进行分析而得的结果(发光强度)。右侧的图显示将施与了所述CAR-T的荷癌小鼠中的肿瘤体积经时地进行分析而得的结果。

[0094] 图5是显示包含抗人Eva1人源化抗体的抗体药物缀合物(B2E5-ADC)的制造工序的概要的图。

[0095] 图6A是显示B2E5-ADC对神经胶质瘤(hGIC E6,hGIC E16)的细胞毒实验的结果的图。

[0096] 图中,各图的纵轴显示肿瘤细胞的生存率,横轴显示ADC或抗体向培养基中的添加浓度。

[0097] 图6B是显示B2E5-ADC对胰癌(BxPC3)的细胞毒实验的结果的图。图中,各图的纵轴显示反映肿瘤细胞中的伤害的程度的吸光度。横轴显示ADC或药剂(DM1)向培养基中的添加浓度。

[0098] 图6C是显示B2E5-ADC对胃癌(MKN74)的细胞毒实验的结果的图。图中,各图的纵轴显示肿瘤细胞的生存率。横轴显示ADC或抗体向培养基中的添加浓度。

[0099] 图7是显示B2E5-ADC对小鼠的毒性试验的结果的图。更具体地,是对野生型(C57BL/6)或裸小鼠(SKN/slcr),通过尾静脉(静脉注射)或腰椎穿刺(鞘内注射)单次施与B2E5-ADC(100、33、10 μ g),显示这些小鼠中的体重的经时变化的图。图中,圆、三角、四方分别表述1个小鼠个体的数据。

具体实施方式

[0100] <抗Eva1抗体>

[0101] 本发明涉及与人来源的Eva1蛋白质(人Eva1)结合的抗体或其功能性片段。

[0102] 本发明中,“Eva(Epithelial V-like antigen,表皮V样抗原)1”是一次跨膜型的细胞膜蛋白质,是参与被称为MPZL2(Myelin protein Zero-like 2,髓鞘蛋白零样蛋白2)的细胞骨架系统的分子。如果是人来源的Eva1,则典型地为由序列号54所记载的氨基酸序列组成的蛋白质(由序列号53所记载的核苷酸序列编码的蛋白质)。然而,基因的DNA序列通过突变等在自然界(即,非人工地)突变,由其编码的蛋白质的氨基酸序列也随之被改变。因此,本发明所涉及的“Eva1蛋白质”不限于由所述典型的氨基酸序列组成的蛋白质,也包含这样的天然突变体。

[0103] 本发明中的“抗体”包含免疫球蛋白的全部的类和亚类。“抗体”包含多克隆抗体、单克隆抗体。“多克隆抗体”是包含针对不同的表位的不同的抗体的抗体制备物。另外所谓“单克隆抗体”,是指实质上由均一的抗体的集团获得的抗体。与多克隆抗体对照地,单克隆抗体是识别抗原上的单一决定簇的抗体。本发明的抗体优选为单克隆抗体。本发明的抗体是由自然环境的成分分离、和/或回收的(即,分离的)抗体。

[0104] 本发明的抗体对人Eva1的反应性作为KD(解离常数)值优选为 10^{-6} 以下,更优选为 6×10^{-7} 以下。所谓“反应性”,是指对作为抗原的人Eva1的结合亲和性和/或特异性。该反应性只要是本领域技术人员,就能够通过免疫学方法来评价,例如,如后述的实施例所示,可以通过利用表面等离子体共振法的分析作为KD值求出。另外,本发明的抗体除了与人Eva1蛋白质结合的抗体以外,还可以是与其他动物来源的Eva1蛋白质(例如,小鼠Eva1蛋白质(典型为由序列号56所记载的氨基酸序列组成的蛋白质、由序列号55所记载的核苷酸序列编码的蛋白质))结合的抗体。

[0105] 本发明的抗体可以具有选自ADCC活性和CDC活性中的至少1种细胞毒活性,也可以具有ADCC活性和CDC活性双方。

[0106] 在本发明中,所谓“ADCC活性(抗体依赖性细胞毒活性)”,是指抗体与目标细胞的细胞表面抗原结合时,效应物细胞(NK细胞、单核细胞等免疫细胞)进一步与该抗体的Fc区域结合,从而该细胞被激活,与此伴随释放因子杀伤目标细胞的活性。另一方面,所谓“CDC活性(补体依赖性细胞毒活性)”,是指抗体与目标细胞结合则补体系统激活,其结果溶解目标细胞的活性。

[0107] 另外,本发明的抗体优选为以 $0.01\mu\text{g/mL}$ 对表达人Eva1的目标细胞具有ADCC活性的抗体。本发明的抗体是否具有这样的ADCC活性,例如,可以通过专利文献2的实施例所记载的方法来测定,更具体地,在以表达人Eva1的Daudi细胞作为目标细胞,以其细胞溶解率评价ADCC活性的情况下,使用 $0.01\mu\text{g/mL}$ 的本发明的抗体时的ADCC活性优选细胞溶解率为30%以上,更优选为50%以上,进一步优选为70%以上。

[0108] 另外,本发明的抗体优选为以 $0.30\mu\text{g/mL}$ 、更优选以 $0.01\mu\text{g/mL}$ 对表达人Eva1的目标细胞具有CDC活性的抗体。本发明的抗体是否具有CDC活性,例如,可以通过专利文献2的实施例所记载的方法测定,更具体地,在以表达人Eva1的Daudi细胞作为目标细胞、以其细胞溶解率评价CDC活性的情况下,使用 $0.30\mu\text{g/mL}$ 的本发明的抗Eva1抗体时的CDC活性优选细胞溶解率为20%以上,更优选为40%以上,进一步优选为60以上,更优选为80%以上。

[0109] 本发明的抗体还可以具有抗肿瘤活性。在本发明中,所谓“抗肿瘤活性”,是指抑制癌细胞的增殖的活性、诱导癌细胞的死亡的活性和抑制癌细胞的转移的活性中的至少任一活性。抗肿瘤活性例如,可以通过使用了专利文献2的实施例所记载那样的荷癌模型(接种了B16黑色素瘤细胞的小鼠等)的分析来评价。更具体地,将B16黑色素瘤细胞静脉内施与小鼠等之后,从其翌日或数周后开始,每天或隔几天静脉内施与抗Eva1抗体等。然后,通过计测在肺中形成的B16黑色素瘤细胞的集落数,从而能够评价体内的抗癌活性。作为阴性对照,可以施与具有同一同种型的对照抗体,另外也可以施与PBS等。然后,在抗Eva1抗体施与组中的集落形成数少于阴性对照施与组中的集落形成数的情况(以阴性对照施与组中的集落形成数作为100%时,优选为60%以下、更优选为40%以下、进一步优选为20%以下、更优选为10%以下)下,可以判定该抗Eva1抗体具有抗肿瘤活性。

[0110] 本发明的抗体只要具有针对人Eva1的反应性即可,对其来源、种类、形状等不特别限定。具体包含非人动物来源的抗体(例如,小鼠抗体、兔抗体、大鼠抗体、骆驼抗体)、人来源的抗体、嵌合抗体、人源化抗体。

[0111] 本发明中作为“非人动物来源的抗体”,可列举例如,专利文献2中公开的、保持以下那样的可变区的针对人Eva1的抗体。

[0112] (a) 保持包含序列号27所记载的氨基酸序列的重链可变区、和包含序列号21所记载的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。

[0113] (b) 保持包含序列号39所记载的氨基酸序列的重链可变区、和包含序列号33所记载的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。

[0114] (c) 保持包含序列号49所记载的氨基酸序列的重链可变区、和包含序列号44所记载的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。

[0115] 进而,本发明涉及例如,保持以下那样的CDR的针对人Eva1的抗体。

[0116] (a) 保持由包含序列号27所记载的氨基酸序列的重链可变区确定的重链CDR1~3、和由包含序列号21所记载的氨基酸序列的轻链可变区确定的轻链CDR1~3的抗体。

[0117] (b) 保持由包含序列号39所记载的氨基酸序列的重链可变区确定的重链CDR1~3、和由包含序列号33所记载的氨基酸序列的轻链可变区确定的轻链CDR1~3的抗体。

[0118] (c) 保持由包含序列号49所记载的氨基酸序列的重链可变区确定的重链CDR1~3、和由包含序列号44所记载的氨基酸序列的轻链可变区确定的轻链CDR1~3的抗体。

[0119] 此外,关于该抗体,作为基于可变区的氨基酸序列确定CDR的方法不特别限制,可列举例如,Chothia、IMGT、Kabat、Aho等公知的编号方案,更具体地,作为通过Chothia编号法确定的例子,可列举保持以下那样的CDR的针对人Eva1的抗体。

[0120] (a-1) 保持序列号28~30所记载的氨基酸序列分别作为重链CDR1~3、并且保持序列号22~24所记载的氨基酸序列分别作为轻链CDR1~3的抗体。

[0121] (b) 保持序列号40~42所记载的氨基酸序列分别作为重链CDR1~3、并且保持序列号34~36所记载的氨基酸序列分别作为轻链CDR1~3的抗体。

[0122] (c) 保持序列号50~52所记载的氨基酸序列分别作为重链CDR1~3、并且保持序列号45~47所记载的氨基酸序列分别作为轻链CDR1~3的抗体。

[0123] 另外,作为通过IMGT编号法确定的例子,可列举保持以下那样的CDR的针对人Eva1的抗体。

[0124] (a-2) 保持序列号4~6所记载的氨基酸序列分别作为重链CDR1~3、并且保持序列号1所记载的氨基酸序列、由Val-Thr-Ser组成的氨基酸序列和序列号3所记载的氨基酸序列分别作为轻链CDR1~3的抗体。

[0125] 另外,本发明中,不仅包含这样的保持由特定氨基酸序列组成的可变区和/或CDR的抗体,还包含不减少所期望的活性(针对抗原的反应性等)、其氨基酸序列被修饰了的抗体。这样的氨基酸序列突变体例如,可以通过对编码上述的可变区等的DNA的突变导入、或通过肽合成为来制作。这样的修饰包含例如,抗体的氨基酸序列内的残基的替换、缺失、添加和/或插入。关于抗体的氨基酸序列被改变的部位,只要与改变之前的抗体具有同等的活性,就可以是抗体的重链或轻链的恒定区,另外,也可以是可变区(框架区(FR)和CDR)。认为除CDR以外的氨基酸的改变对与抗原的反应性的影响相对少,但现在,改变CDR的氨基酸而筛选对抗原的亲合性提高了的抗体的方法也是公知的(PNAS,102:8466-8471(2005)、Protein Engineering,Design&Selection,21:485-493(2008)、国际公开第2002/051870号、J.Biol.Chem.,280:24880-24887(2005)、Protein Engineering,Design&Selection,21:345-351(2008)、MAbs.Mar-Apr;6(2):437-45(2014))。另外,现在,通过利用整合计算化学系统等(例如,Molecular Operating Environment、加拿大CCG公司制)也能够建模对抗原的亲合性提高了的抗体(例如,参照<http://www.rsi.co.jp/kagaku/cs/ccg/products/application/protein.html>)。进而,如Protein Eng Des Sel.2010Aug;23(8):643-51所记载的那样,已知重链可变区的CDR1和轻链可变区的CDR3不参与对抗原的亲合性的例子。另外同样地,Molecular Immunology 44:1075-1084(2007)中报告了大部分抗体中轻链可变区的CDR2不参与对抗原的亲合性。这样,在抗体对抗原的亲合性中,即使不需要重链可变区和轻链可变区的各个CDR1~3的全部,也可以发挥同等的活性。实际上在Biochem Biophys Res Commun.2003Jul 18;307(1):198-205、J Mol Biol.2004Jul 9;340(3):525-42、J Mol Biol.2003Aug 29;331(5):1109-20中,报告了通过保持原抗体的至少1个CDR而对抗原的亲合性被维持的例子。

[0126] 另外,关于本发明的抗体,在可变区被改变的氨基酸数优选为10氨基酸以内、更优选为5氨基酸以内、进一步优选为3氨基酸以内(例如,2氨基酸以内、1氨基酸)。进而,从对与抗原的反应性的影响少这样的观点考虑,该改变优选全部对CDR以外、即FR施行。另外,CDR中被改变的氨基酸数优选为5氨基酸以内、更优选为3氨基酸以内(例如,2氨基酸以内、1氨基酸)。

[0127] 氨基酸的改变优选为保守的替换。本发明中所谓“保守的替换”是指用具有化学上同样的侧链的其他氨基酸残基替换。具有化学上同样的侧链的氨基酸残基的组在本发明所属的技术领域是被熟知的。例如,可以以酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸)、碱性氨基酸(赖氨酸/精氨酸/组氨酸)、在中性氨基酸中具有烃链的氨基酸(甘氨酸/丙氨酸/缬氨酸/亮氨酸/异亮氨酸/脯氨酸)、具有羟基的氨基酸(丝氨酸/苏氨酸)、含硫氨基酸(半胱氨酸/甲硫氨酸)、具有酰胺基的氨基酸(天冬酰胺/谷氨酰胺)、具有亚氨基的氨基酸(脯氨酸)、具有芳香基的氨基酸(苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸)分类。

[0128] 另外,改变之后氨基酸序列,只要是保持包含与由上述的特定氨基酸序列组成的可变区在氨基酸序列水平上具有80%以上的同源性的氨基酸序列的可变区的抗体也具有与改变之前的抗体同等的活性,就包含在本发明的抗体中。作为该同源性,为至少80%即

可,优选为85%以上、更优选为90%以上、进一步优选为95%以上(例如,96%以上、97%以上、98%以上、99%以上)。另外,序列的同源性可以利用BLASTP(氨基酸水平)的程序(Altschul et al. J. Mol. Biol., 215:403-410, 1990)来确定。该程序基于Karlin和Altschul的算法BLAST(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877, 1993)。在通过BLASTP分析氨基酸序列的情况下,参数为例如score=50、wordlength=3。另外,在使用Gapped BLAST程序分析氨基酸序列时,可以以Altschul等(Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997)记载的方式进行。在使用BLAST和Gapped BLAST程序时,使用各程序的默认参数。这些分析方法的具体方法是公知的。

[0129] 另外,作为“具有同等的活性”,是指例如,对抗原的反应性与对象抗体(例如,专利文献2所记载的B2E5-48小鼠抗体)为同等(例如,70%以上、优选为80%以上、更优选为90%以上)。

[0130] 另外,本发明的抗体的改变为例如,使糖基化位点的数或位置变化等的抗体的翻译后加工的改变。由此,例如,可以提高抗体的ADCC活性。所谓抗体的糖基化,典型地为N-结合或O-结合。抗体的糖基化较大地依赖于为了表达抗体而使用的宿主细胞。糖基化图谱的改变可以通过与糖生产有关的特定酶的导入或缺失等公知的方法来进行(日本特开2008-113663号公报、美国专利第5047335号、美国专利第5510261号、美国专利第5278299号、国际公开第99/54342号)。进而,本发明中为了增加抗体的稳定性等目的,也可以通过将被脱酰胺化的氨基酸或与被脱酰胺化的氨基酸相邻的氨基酸替换成其他氨基酸,从而抑制脱酰胺化。另外,也可以将谷氨酸替换成其他氨基酸,来增加抗体的稳定性。本发明提供这样被稳定化了的抗体。

[0131] 本发明中所谓“嵌合抗体”,是某种抗体的可变区与同其异种的抗体的恒定区连接而成的抗体。嵌合抗体例如可以如下获得:将抗原免疫小鼠,由该小鼠单克隆抗体的基因切下与抗原结合的抗体可变部分(可变区),与人骨髓来源的抗体恒定部(恒定区)基因结合,将其整合到表达载体并导入宿主使其产生,从而获得(例如,日本特开平8-280387号公报、美国专利第4816397号公报、美国专利第4816567号公报、美国专利第5807715号公报)。

[0132] 嵌合抗体的恒定区通常使用人来源的抗体的恒定区。例如重链可以利用C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C μ 、C δ 、C α 1、C α 2、和C ϵ 作为恒定区。另外轻链可以使用C κ 、C λ 作为恒定区。这些恒定区的氨基酸序列、以及编码它们的碱基序列是公知的。另外,为了改善抗体自身的稳定性、或抗体的产生稳定性,可以将人来源的抗体恒定区中的1个或数个氨基酸替换、缺失、添加和/或插入。

[0133] 本发明中作为“人源化抗体”,是将非人动物来源的抗体的CDR的基因序列移植(CDR移植)到人来源的抗体基因而得的抗体,其制作方法是重叠延伸PCR等公知的(例如,欧洲专利申请公开第239400号说明书、欧洲专利申请公开第125023号说明书、国际公开第90/07861号、国际公开第96/02576号)。抗体的可变区通常由被4个FR夹着的3个CDR构成。CDR是实质上确定了抗体的结合特异性的区域。CDR的氨基酸序列富于多样性,但另一方面,构成FR的氨基酸序列多在具有不同的结合特异性的抗体之间显示高同源性。因此,一般认为,通过CDR的移植可以将某抗体的结合特异性移植到其他抗体。另外,从CDR的功能的维持的观点考虑,在非人来源CDR向人FR的移植中,选择与该非人动物来源的FR同源性高的人FR。即,CDR内的氨基酸不仅识别抗原,也与位于CDR的附近的FR的氨基酸配位,参与CDR的环结构的

维持,因此优选利用由与应移植的CDR相邻的FR的氨基酸序列同源性高的氨基酸序列组成的人FR。

[0134] 与非人动物来源的FR同源性高的公知的人FR的检索例如,可以利用能够在互联网利用的对抗体专门化的检索系统 (<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>) 来进行。可以以与这样得到的人FR的序列一致的方式,在非人来源的抗体的CDR以外的序列中导入突变。或者,在能够获得编码通过检索而得的人FR的氨基酸序列的基因 (cDNA) 的情况下,可以在其序列中导入非人来源CDR。突变的导入等可以使用核酸合成、定点诱变等该领域公知的技术来进行。

[0135] 定性或定量地测定并评价这样制作的人源化抗体对抗原的结合活性,从而可以适合地选择经由CDR连接时该CDR形成良好的抗原结合部位那样的人来源的抗体的FR。另外也可以根据需要,按照Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856等所记载的方法,通过以人源化抗体的CDR形成适当的抗原结合部位的方式替换FR的氨基酸残基,进一步测定并评价该替换了氨基酸的突变型抗体对抗原的结合活性,从而选择具有所期望的性质的突变FR序列。

[0136] 本发明中,作为“人源化抗体”,可列举例如,具有分别包含序列号1所记载的氨基酸序列、由Val-Thr-Ser组成的氨基酸序列和序列号3所记载的氨基酸序列的CDR的轻链可变区、和分别包含序列号4~6所记载的氨基酸序列的CDR1~3的重链可变区、且与人来源的Eva1蛋白质结合的人源化抗体。

[0137] 更具体地,如后述的实施例所示,可列举

[0138] 轻链可变区包含选自序列号7~10所记载的氨基酸序列、相对于序列号7~10所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号7~10所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列,

[0139] 重链可变区包含选自序列号13~16所记载的氨基酸序列、相对于序列号13~16所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13~16所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列的人源化抗体。

[0140] 此外,关于可变区的改变和同源性等,如“非人动物来源的抗体”中所说明的那样,优选在本发明的人源化抗体中,CDR的序列不改变、轻链可变区CDR1~3以及重链可变区CDR1~3的序列分别特定为序列号1所记载的氨基酸序列、由Val-Thr-Ser组成的氨基酸序列和序列号3所记载的氨基酸序列以及序列号4~6所记载的氨基酸序列。

[0141] 另外,在该人源化抗体中,如后述的实施例所示,从对抗原的反应性更高这样的观点考虑,优选列举

[0142] (H2-L2) 轻链可变区包含选自序列号7所记载的氨基酸序列、相对于序列号7所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号7所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列、

[0143] 重链可变区包含选自序列号13所记载的氨基酸序列、相对于序列号13所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13所记载的氨基酸序列的至

少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列的人源化抗体，

[0144] (H1-L4)轻链可变区包含选自序列号8所记载的氨基酸序列、相对于序列号8所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号8所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列、

[0145] 重链可变区包含选自序列号15所记载的氨基酸序列、相对于序列号15所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号15所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列的人源化抗体，

[0146] (H2-L3)轻链可变区包含选自序列号10所记载的氨基酸序列、相对于序列号10所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号10所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列、

[0147] 重链可变区包含选自序列号13所记载的氨基酸序列、相对于序列号13所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列的人源化抗体，

[0148] (H2-L4)轻链可变区包含选自序列号8所记载的氨基酸序列、相对于序列号8所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号8所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列、

[0149] 重链可变区包含选自序列号13所记载的氨基酸序列、相对于序列号13所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列的人源化抗体

[0150] 作为合适的例子。

[0151] 另外，也考虑产生能力高，可列举

[0152] (H2-L2)轻链可变区包含选自序列号7所记载的氨基酸序列、相对于序列号7所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号7所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列、

[0153] 重链可变区包含选自序列号13所记载的氨基酸序列、相对于序列号13所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列的人源化抗体，

[0154] (H2-L4)轻链可变区包含选自序列号8所记载的氨基酸序列、相对于序列号8所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号8所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨

基酸序列、

[0155] 重链可变区包含选自序列号13所记载的氨基酸序列、相对于序列号13所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号13所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列的人源化抗体、

[0156] (H3-L4)轻链可变区包含选自序列号8所记载的氨基酸序列、相对于序列号8所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号8所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列的1种氨基酸序列、

[0157] 重链可变区包含选自序列号16所记载的氨基酸序列、相对于序列号16所记载的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、以及在序列号16所记载的氨基酸序列的至少任一者中替换、缺失、添加和/或插入1个或数个氨基酸而得的氨基酸序列中的1种氨基酸序列的人源化抗体

[0158] 作为合适的例子。

[0159] 进而,作为本发明的抗体,也可以采取对保持包含上述的特定氨基酸序列或其改造体的可变区或CDR的抗体,在与人Eva1的结合中竞争的抗体的方式。换言之,也可以采取与保持包含上述的特定氨基酸序列或其改造体的可变区或CDR的抗体显示反应性的表位结合的抗体的方式。

[0160] 本发明中所谓“表位”,是指存在于抗原中的抗原决定簇、即抗体中的抗原结合结构域所结合的抗原上的部位。因此,本发明中的表位既可以是由在氨基酸的一级序列中连续的多个氨基酸组成的多肽(线状表位),也可以是在氨基酸的一级序列中不相邻的氨基酸通过肽或蛋白质的折叠等三维结构而来到附近从而形成的多肽(不连续表位、构象表位)。另外,作为该表位,典型地由至少3个(例如4个)、最普通为至少5个(例如,6~20个、7~15个、8~10个)氨基酸组成。

[0161] 另外,在得到了抗体的情况下,只要是本领域技术人员,就能够特定该抗体显示反应性的抗原上的肽区域(表位),来制作与该肽区域结合的各种抗体。进而,二个抗体是否与相同或立体上聚合的表位结合,可以通过竞争测定法来确定。

[0162] 本发明中抗体的作为“功能性片段”,是指作为抗体的一部分(部分片段)、且与人Eva1显示反应性的片段。具体地,可列举Fab、Fab'、F(ab')₂、可变区片段(Fv)、二硫键Fv、单链可变区片段(单链Fv、scFv)、sc(Fv)₂、双特异性抗体、多特异性抗体、和它们的聚合物等。

[0163] 这里所谓“Fab”,是指由1条轻链和重链的一部分组成的免疫球蛋白的一价抗原结合片段。可以通过抗体的木瓜蛋白酶消化、另外可以通过重组方法获得。“Fab'”包含抗体的铰链区的1个或更多半胱氨酸,并且通过在重链CH1结构域的羧基末端的仅几个残基的添加而与Fab不同。所谓“F(ab')₂”,是指由双方轻链和双方重链的部分组成的免疫球蛋白的二价抗原结合片段。

[0164] “可变区片段(Fv)”是具有完全的抗原识别和结合部位的最小的抗体片段。Fv是重链可变区和轻链可变区通过非共价键强地连接而成的二聚物。“单链可变区片段(单链Fv、scFv)”包含抗体的重链可变区和轻链可变区,这些区域存在于单一多肽链。“sc(Fv)₂”是将2个重链可变区和2个轻链可变区用连接物等结合而制成单链的片段。所谓“双特异性抗体”

是具有二个抗原结合部位的小的抗体片段,该片段在同一多肽链中包含与轻链可变区结合的重链可变区,各区域与别的链的互补区形成对。“多特异性抗体”是对至少2个不同的抗原具有结合特异性的单克隆抗体。例如,可以通过二个重链具有不同的特异性的二个免疫球蛋白重链/轻链对的同时表达来制备。

[0165] 本发明的抗体可以通过杂交瘤法来制作,另外可以通过重组DNA法来制作。作为杂交瘤法,代表性地可列举Kohler和Milstein的方法(Kohler&Milstein,Nature,256:495(1975))。在该方法中的细胞融合工序中使用的抗体产生细胞是被抗原(人Eva1、其部分肽、在它们上融合了Fc蛋白质等的蛋白质、或表达它们的细胞等)免疫了的动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猴、山羊)的脾脏细胞、淋巴结细胞、外周血白细胞等。可以使用使抗原在培养基中对从未被免疫的动物预先分离的上述的细胞或淋巴细胞等作用而获得的抗体产生细胞。作为骨髓瘤细胞可以使用公知的各种细胞株。抗体产生细胞和骨髓瘤细胞只要它们能够融合,就也可以是不同的动物种起源的,但优选为相同动物种起源的。杂交瘤例如,通过由被抗原免疫的小鼠得到的脾脏细胞、与小鼠骨髓瘤细胞之间的细胞融合而产生,然后通过筛选而能够获得产生对人Eva1特异性的单克隆抗体的杂交瘤。针对人Eva1的单克隆抗体可以通过培养杂交瘤而获得,另外,可以由施与了杂交瘤的哺乳动物的腹水获得。

[0166] 重组DNA法是从杂交瘤、B细胞等克隆编码上述本发明的抗体的DNA,整合到适当的载体中,将其导入宿主细胞(例如,HEK细胞等的哺乳类细胞株、大肠菌、酵母细胞、昆虫细胞、植物细胞等)中,使本发明的抗体作为重组抗体产生的方法(例如,P.J.Delves, Antibody Production:Essential Techniques,1997WILEY、P.Shepherd and C.Dean Monoclonal Antibodies,2000OXFORD UNIVERSITY PRESS、Vandamme A.M.et al., Eur.J.Biochem.192:767-775(1990))。在编码本发明的抗体的DNA的表达中,可以将编码重链或轻链的DNA分别整合到表达载体中转化宿主细胞,也可以将编码重链和轻链的DNA整合到单一表达载体中转化宿主细胞(参照国际公开第94/11523号公报)。本发明的抗体可以培养上述宿主细胞,从宿主细胞内或培养液分离/纯化,以实质上纯粹且均一的形态获得。抗体的分离/纯化可以使用在通常的多肽纯化中使用的方法。如果使用转基因动物制作技术制作整合有抗体基因的转基因动物(牛、山羊、绵羊、猪等),则也可以由该转基因动物的乳汁大量获得来源于抗体基因的单克隆抗体。

[0167] 本发明也可以提供编码上述本发明的抗体的DNA,包含该DNA的载体,保持该DNA的宿主细胞,以及包括培养该宿主细胞、回收抗体的抗体的生产方法。

[0168] <抗体药物缀合物>

[0169] 如后述的实施例所示,作为本发明的抗体的目标的人Eva1在各种癌中表达。另外,本发明的抗体(特别是人源化抗体)作为ADC也是有用的。由此,本发明可以采取本发明的抗体(特别是人源化抗体)或其功能性片段与药物结合而成的抗体药物缀合物(ADC)的方式。

[0170] 在本发明的ADC中,可以与抗体结合的“药物”不特别限制,可列举例如,本技术领域公知的细胞毒性物质。作为“细胞毒性物质”,可列举抗癌剂,例如伊立替康(CPT-11)、伊立替康的代谢产物SN-38(10-羟基-7-乙基喜树碱)、阿霉素、紫杉醇、5-氟尿嘧啶、尼莫司汀、雷莫司汀(ラミニスチン)、替莫唑胺等烷基化剂、吉西他滨、羟基脲等代谢拮抗剂、依托泊苷、长春新碱等植物生物碱、丝裂霉素、博来霉素等抗癌性抗生素、顺铂等白金制剂、索拉非尼、厄洛替尼等分子靶标剂、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、6-硫鸟嘌呤、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、异

环磷酰胺、白消安、MMAE (一甲基澳瑞他汀E)、DM1 (美登素)、卡奇霉素。作为细胞毒性物质,也可列举放射性同位素,例如, ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{10}B 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 。作为细胞毒性物质,可以是使细胞毒活性发挥功能的感光性物质,更具体地为通过光照射而被激活、从而其自身变为显示细胞毒性(细胞毒性)的形式的物质,另外也可以是产生细胞毒性物质(细胞毒性物质)的物质。可列举例如,二氢卟吩(chlorins)、二氢卟吩e6、卟吩姆钠、他拉泊芬钠、维替泊芬、和它们的前体和衍生物。另外,作为细胞毒性物质,可列举毒性肽,例如,皂草毒蛋白、蓖麻毒蛋白、志贺氏毒素等核糖体失活蛋白质(RIP)。

[0171] 另外,抗体与细胞毒性物质的结合也可以通过该技术领域公知的方法进行,可以是直接结合和间接结合的任意。例如,作为直接结合,可以利用共价键。作为间接结合,可以利用介由连接物的结合。

[0172] 本发明中优选抗体与细胞毒性物质介由连接物而结合。通过介由连接物而2个分子结合,从而能够减弱细胞毒性物质的抗原性,在对对象的施与中优选。关于连接物的一般技术在例如Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996; Harris, J.M. and Zalipsky, S. 编, Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS Symposium Series, 1997; Veronese, F. and Harris, J.M. 编, Peptide and protein PEGylation. Advanced Drug Delivery Review 54(4), 2002中记载。

[0173] 另外,连接物不仅包含直链状的连接物(2价连接物),也包含支链状的连接物(3价以上的连接物)。直链状连接物在其一端具有细胞毒性物质,在另一端具有抗体。支链状连接物通常在其各支链(各链)具有细胞毒性物质、在另一端具有抗体。作为该连接物,可列举例如,N-琥珀酸亚胺基-4-(马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸酯(SMCC)、磺基琥珀酸亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)、N-琥珀酸亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰胺己酸酯)(LC-SMCC)、N-琥珀酸亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酸亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、4-马来酰亚胺丁酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(GMBS)、3-马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、m-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α -马来酰亚胺乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酸亚胺基-6-(β -马来酰亚胺丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、N-琥珀酸亚胺基-4-(p-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)、N-(p-马来酰亚胺苯基)异氰酸酯(PMPI)、6-马来酰亚胺己酰(MC)、马来酰亚胺丙酰(MP)、p-氨基苄氧羰基(PAB)、N-琥珀酸亚胺基-4-(2-吡啶硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酸亚胺基(4-碘乙酰)氨基苯甲酸酯(SIAB)、缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)和丙氨酸-苯丙氨酸(ala-phe)等肽连接物。

[0174] 介由连接物将抗体与细胞毒性物质结合的技术在本技术领域是公知的。例如,抗体与连接物的结合为共价键或非共价键(离子键、疏水键等),优选为共价键。该结合在将本发明的缀合物施与对象的情况下,优选为在血液中细胞毒性物质不易游离的结合。作为这样的结合,可列举马来酰亚胺基与巯基的键、卤代酯与巯基反应而得的键、羧基与氨基的酰胺键、巯基与巯基的二硫键、由氨基与醛基产生的席夫碱、巯基与羧酸的硫酯键、羟基与羧基的酯键、氨基与方酸衍生物(例如二甲基方酸)产生的键、二烯醛基与氨基的键等。作为这样的结合的具体例,可列举存在于连接物的一端的马来酰亚胺基与抗体上的半胱氨酸残基所含的巯基的结合、存在于连接物的一端的琥珀酰亚胺基与抗体上的赖氨酸残基所含的氨基的脱水替换结合(例如,国际公开第2008/096760号)、存在于连接物的一端的氨基与抗体

上的天冬氨酸或谷氨酸所含的羧酸的脱水缩合结合(使用例如WSCDI)等。关于抗体与连接物的结合的具体方法,例如,请参照国际公开第2010/055950号。

[0175] 另一方面,抗体或连接物与细胞毒性物质的结合为共价键或非共价键(离子键、疏水键等),优选为共价键。特别是在将本发明的缀合物施与对象的情况下,该结合优选为在血液中细胞毒性物质不易游离的结合。从这样的观点考虑,抗体或连接物与细胞毒性物质的结合虽然不限定,但优选为酯键、氨基甲酸酯键、碳酸酯键、硫代氨基甲酸酯键,更优选为酯键。

[0176] 在本发明的ADC中,关于每1分子抗体的细胞毒性物质的结合数(药物结合数),考虑其有效性、安全性,以其为一定数的方式规定反应的原料/试剂的使用量等反应条件而实施。然而,与低分子化合物的化学反应不同,作为结合了不同的数的药物的混合物得到是通常的。对1分子抗体的药物的结合数作为平均值、即平均药物结合数特定、标示。因此,在本申请说明书中只要没有特别指明,药物的结合数是指平均值。

[0177] 每1分子抗体的药物结合数可以通过调整所使用的还原剂的种类及其浓度、相对于抗体的连接物和药物的浓度(摩尔过剩率等)、以及结合反应中的温度或时间来控制。作为“还原剂”,只要能够使抗体中的二硫键还原地开裂而生成介由上述巯基的结合就不特别限制,可列举例如,二硫苏糖醇(DTT、DL-DTT)、2-巯基乙醇、巯基乙醇、TCEP。

[0178] 本发明中,每1抗体的药物平均结合数不特别限制,例如为1~10个,优选为3~8个,更优选为3~5个。此外,每1分子抗体的药物结合数如后述的实施例所示,可以通过测定作为细胞毒性物质(例如,DM1)的吸收峰中的吸光度和抗体的吸收峰的280nm的吸光度,将各自对彼此的吸收峰的影响加权而建立联立方程式进行计算,求出抗体和细胞毒性物质的浓度,确定分子数的比,从而求出。另外,也可以使用DTNB等将巯基比色定量的试剂求出。

[0179] 另外,本发明的ADC有时通过放置在大气中、或再结晶,从而吸附水分、附着吸附水、形成水和物,这样的包含水的化合物和盐也包含在本发明中。

[0180] 构成本发明的ADC的原子的1种以上也可以含有原子同位素的非天然比例。作为原子同位素,可列举例如, ^2H 、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{14}C 。另外,本发明的ADC可以在生物成像技术等中检测。因此,也可以结合标记物质。标记物质根据所使用的检测方法等的种类而适宜选择,可列举例如,放射性标记物质、荧光性标记物质、顺磁性标记物质、超顺磁性标记物质、酶标记物质。另外,这样的标记物质与ADC的结合可以是直接的,也可以是间接的。作为间接的结合,可列举介由结合有标记物质的二抗、结合有标记物质的聚合物(蛋白A、蛋白B等)的结合。

[0181] 更具体地,作为标记ADC的放射性同位元素,可以利用正电子释放核种。例如,可以用 ^{64}Cu 、 ^{18}F 、 ^{55}Co 、 ^{66}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 和 ^{124}I 这样的正电子释放核种标记抗体。利用这些正电子释放核种的ADC的标记可以利用公知的方法(Nucl Med Biol.1999;26(8):943-50.、JNucl Med.2013;54(11):1869-75.等)。另外,经正电子释放核种标记的ADC在施与对象之后,通过PET(正离子发射体层摄影装置)体外测量从该放射性核种放射的放射线,用计算机体层摄影的方法转换为图像。这样,可以追踪施与到对象的ADC向目标部位的送达、聚集等。

[0182] <嵌合抗原受体>

[0183] 如后述的实施例所示,作为本发明的抗体的目标的人Eva1在各种癌中表达。另外,本发明的抗体的可变区在嵌合抗原受体(CAR)和表达其的T细胞(所谓CAR-T)中是有用的。于是,本发明也可以采取包含与人来源的Eva1蛋白质结合的区域、跨膜区域和细胞内信号

区域的CAR的方式。

[0184] 本发明中,“嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptor:CAR)”是指成为细胞外区域与人来源的Eva1蛋白质结合的区域、跨膜区域和细胞内信号区域依次从N末端侧开始配置、直接或间接地连接而成的嵌合蛋白质。

[0185] 本发明中,“与人来源的Eva1蛋白质结合的区域(抗原结合性区域)”例如,可以使用上述的抗体或其功能性片段,但通常CAR使用scFv。

[0186] “scFv”如上所述,是单克隆抗体(免疫球蛋白)的轻链可变区与重链可变区介由连接物连接而成的结构体,保持着与抗原的结合能力。作为scFv中的N末端侧的顺序,可以是轻链可变区、连接物、重链可变区,另外也可以是重链可变区、连接物、轻链可变区,但优选为前者。

[0187] 作为scFv中的“连接物”,例如可以使用肽连接物。连接物的长度不特别限定。例如,可以使用氨基酸数为5~25个的连接物。连接物的长度优选为8~25氨基酸、进一步优选为15~20氨基酸。作为肽连接物的合适的例子,可列举由甘氨酸或由甘氨酸与丝氨酸组成的(GGS连接物、GS连接物、GGG连接物等)。另外,也可以列举由序列号58所记载的134~151位的18氨基酸组成的连接物作为合适的例子。作为构成这些连接物的氨基酸的甘氨酸和丝氨酸,具有其自身的尺寸小、在连接物内不易形成高级结构这样的优点。

[0188] 作为成为scFv的基础的单克隆抗体,不特别限制,但可列举例如,上述的非人动物来源的抗体、人抗体、人源化抗体。另外,作为合适的例子也如上所述,但如后述的实施例所示,从适应人Eva1的激活和细胞增殖等观点考虑,优选上述(H2-L2)的组合,进一步从N末端侧起L2、连接物、H2依次连接而成的scFv。

[0189] 本发明中“跨膜区域”只要是具有贯穿细胞膜的功能、能够将CAR锚定在细胞膜上的多肽就不特别限制。作为成为承担跨膜区域的多肽的来源的蛋白质,可列举例如,CD28、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、4-1BB、CD45、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、GITR、T细胞受体的 α 链和 β 链。

[0190] 本发明中“细胞内信号区域”是CAR被配置于细胞膜上时被配置在细胞内的区域,是能够转导免疫细胞的效应物功能的发挥所需的信号,即在抗原结合性区域与抗原(人Eva1)结合时能够转导免疫细胞的激活所需的信号(所谓初级信号)的区域。作为这样的细胞内信号区域,一般有:仅具有T细胞受体(TCR)和CD3复合物这样的激活信号转导结构域(第1代CAR)、除了激活信号转导结构域还具有共刺激分子来源的共刺激信号转导结构域(例如,CD28或4-1BB的细胞内结构域)的(第2代CAR)、除了激活信号转导结构域还具有多个共刺激信号转导结构域(例如,CD28和4-1BB的细胞内结构域)的(第3代CAR)。另外,可列举本发明者们从前开发的包含CD79A细胞内区域和CD40细胞内区域的细胞内信号区域(参照Mol Ther2021Sep 1;29(9):2677-2690.)。

[0191] “细胞内信号区域”如上所述,只要能够转导初级信号即可,可以使用参与该信号的蛋白质的激活信号转导结构域。已知免疫受体激活酪氨酸模体(immunoreceptor tyrosine-based activation motif:ITAM)参与初级信号转导。作为具有ITAM的蛋白质,可列举例如,CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、DAP10、DAP12。

[0192] 另外,如上所述,另外如后述的实施例所示,“包含CD79A细胞内区域和CD40细胞内

区域的细胞内信号区域”，也适合在本发明中作为该细胞内信号区域使用。这种情况下，CD79A细胞内结构域与CD40细胞内结构域的配置关系不特别限制，N末端侧为CD79A细胞内区域的方式、和N末端侧为CD40细胞内区域的情况的任意者都可以采用。该配置关系优选为前者。CD79A细胞内区域和CD40细胞内区域优选直接连接、或者介由连接物连接。连接物只要NF κ B信号激活作用没有显著受损就不特别限制，是任意的。作为连接物，优选为由甘氨酸或由甘氨酸与丝氨酸构成的连接物（GGG连接物、GS连接物、GGG连接物等）。连接物的长度不特别限定，例如为1~20氨基酸、优选为1~10氨基酸、更优选为1~5氨基酸。

[0193] 本发明中包含CAR的细胞内信号区域的数不限于1，也可以包含多个细胞内信号区域（例如，可以包含1~5个、1~3个、或1个或2个信号转导因子）。这种情况下，所包含的多个细胞内信号区域可以相同，也可以不同。

[0194] 本发明的CAR除了上述的抗原结合区域、跨膜区域和细胞内信号区域，还可以包含其他结构域。作为其他结构域的例子，可列举共刺激转导区域、间隔物序列、信号肽等，但不限于这些。

[0195] 已知在T细胞上表达的共刺激分子，通过与在抗原呈递细胞上表达的各共刺激分子特异性的配体的结合，向细胞内转导共刺激信号，辅助T细胞的激活（二次信号转导）。本发明中所谓“共刺激转导区域”，是指参与这样的共刺激分子的共刺激信号转导的细胞内结构域。作为共刺激分子的例子，可列举CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、ICOS、CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD154等。本发明的CAR可以包含这些共刺激分子的共刺激转导区域。

[0196] 本发明的CAR可以包含的共刺激转导区域的数不限于1个，也可以是多个。本发明的CAR可以包含共刺激转导区域例如1~5个、1~3个、或1个或2个。在本发明的CAR包含多个共刺激信号转导域的情况下，该域可以相同，另外也可以不同。

[0197] 本发明中“间隔物”是指连接各区域等之间的序列，只要不抑制各区域的功能就不特别限制，另外其氨基酸数也不特别限制，通常为1~500氨基酸、优选为5~300氨基酸、进一步优选为10~100氨基酸。

[0198] 特别是在本发明的CAR中，抗原结合性区域与跨膜区域优选直接连接或介由比较短的间隔物连接。抗原结合性区域与跨膜区域之间的间隔物的构成氨基酸数例如为1~400，优选为10~300。另外，如后述的实施例所示，将表达本发明的CAR的细胞在IL-2不存在下培养的情况下，从细胞增殖和细胞因子产生的观点考虑，所述构成氨基酸更优选为150~300，进一步优选为200~250。另一方面，将表达本发明的CAR的细胞在IL-2存在下培养的情况下，所述构成氨基酸更优选为10~30。

[0199] 间隔物的序列不特别限定，例如，可以使用IgG、优选为人IgG（例如亚型IgG1、IgG4）的铰链部或其一部分、铰链部与CH2的一部分、或在跨膜结构域中利用的因子（例如CD28）的一部分等序列作为间隔物。此外，通过利用铰链部或其一部分序列，可以期待构成富于柔软性的间隔物。作为该间隔物，具体可列举由序列号59、60、61、62或62（序列号58所记载的268~499位）所记载的氨基酸序列组成的间隔物。

[0200] 本发明中“信号肽”是指用于促进CAR的分泌、或用于指示向细胞膜的定位的肽，也称为前导序列。信号肽通常可以与抗原结合区域的N末端直接或间接地结合。另外信号肽也可以任意地在细胞加工和CAR向细胞膜的定位中被从抗原结合区域切割。作为该信号肽的例子，可列举人GM-CSF受体、T细胞受体的 α 链和 β 链、CD8 α 、CD8 β 、CD3 ζ 、CD28、CD3 ϵ 、CD45、

CD4、CD5、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、GITR等信号肽。

[0201] 以上,对于本发明的CAR中的各区域等的例子进行了说明,但关于这些区域等的具体氨基酸序列,只要是本领域技术人员就能够检索公知的文献、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 等数据库而适宜获得。进而,如上述表3等所示,在本申请的序列列表中也公开了具体的序列。另外,不限于这样的典型的氨基酸序列(例如,NCBI参考序列),本发明所涉及的区域等只要维持着该区域所承担的功能,也可以包含相对于这些典型的氨基酸序列的改造体、同源体。另外,该改造体、同源体相对于典型的氨基酸序列具有通常高的同源性。高的同源性通常为60%以上、优选为70%以上、更优选为80%以上、进一步优选为90%以上(例如,95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上)。

[0202] 另外,本发明的CAR可以是由1种多肽组成的分子,也可以是由2种以上的多肽的复合物组成的分子。另外,本发明的CAR可以是由多肽或其复合物构成的分子,也可以是在多肽或其复合物连接其他物质(例如,荧光物质、放射性物质、无机粒子等)而成的分子。

[0203] 本发明的CAR可以被化学修饰。构成本发明的CAR的多肽的C末端可以是羧基(-COOH)、羧酸酯(-COO-)、酰胺(-CONH₂)或酯(-COOR)的任意。这里作为酯中的R,可以使用例如,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基等C1-6烷基;例如,环戊基、环己基等C3-8环烷基;例如,苯基、 α -萘基等C6-12芳基;例如,苄基、苯乙基等的苯基-C1-2烷基; α -萘基甲基等 α -萘基-C1-2烷基等C7-14芳烷基;新戊酰基氧基甲基等。构成本发明的CAR的多肽可以除C末端以外的羧基(或羧酸酯)被酰胺化或酯化。作为这时的酯,可以使用例如上述的C末端的酯等。进而,构成本发明的CAR的多肽也可以包含N末端的氨基酸残基的氨基被保护基(例如,甲酰基、乙酰基等C1-6烷酰基等C1-6酰基等)保护的多肽、能够在生物体内被切割而生成的N末端的谷氨酰胺残基经谷氨酰胺化而得的多肽、分子内的氨基酸的侧链上的取代基(例如-OH、-SH、氨基、咪唑基、吡啶基、胍基等)被适当的保护基(例如,甲酰基、乙酰基等C1-6烷酰基等C1-6酰基等)保护了的多肽。

[0204] 另外,本发明的CAR可以具有其他功能性蛋白质。作为其他功能性蛋白质不特别限制,可以根据想要赋予本发明的CAR的功能而适宜选择。例如,作为为了使CAR的纯化和检测容易的目的而使用的功能性蛋白质,可列举Myc标签、His标签、HA标签、FLAG标签(注册商标、Sigma-Aldrich社)、荧光蛋白质标签(GFP等)等。

[0205] 本发明的嵌合抗原受体也可以是与酸或碱的药理学上容许的盐的形态。盐只要是药理学上容许的盐就不特别限定,可以采用酸性盐、碱性盐的任意。例如,作为酸性盐的例子,可列举盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐等无机酸盐;乙酸盐、丙酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、柠檬酸盐、甲磺酸盐、对甲苯磺酸盐等有机酸盐;天冬氨酸盐、谷氨酸盐等氨基酸盐等。另外,作为碱性盐的例子,可列举钠盐、钾盐等碱金属盐;钙盐、镁盐等碱土金属盐等。

[0206] 本发明的嵌合抗原受体可以是溶剂合物的形态。溶剂只要是药理学上容许的就不特别限定,可列举例如水、乙醇、甘油、乙酸等。

[0207] 此外,到目前为止有若干利用了CAR的实验、临床研究等报告(例如,Rossig C, et al. *Mol Ther* 10:5-18, 2004; Dotti G, et al. *Hum Gene Ther* 20:1229-1239, 2009; Ngo MC, et al. *Hum Mol Genet* 20(R1):R93-99, 2011; Ahmed N, et al. *Mol Ther* 17:1779-

1787,2009;Pule MA,et al.Nat Med 14:1264-1270,2008;Louis CU,et al.Blood 118:6050-6056,2011;Kochenderfer JN,et al.Blood 116:4099-4102,2010;Kochenderfer JN,et al.Blood 119:2709-2720,2012;Porter DL,et al.N Engl J Med 365:725-733,2011;Kalos M,et al.Sci Transl Med 3:95ra73,2011;Brentjens RJ,et al.Blood 118:4817-4828,2011;Brentjens RJ,et al.SciTransl Med 5:177ra38,2013),可以参考这些报告构建本发明的CAR。另外,在后述的实施例中也显示了具体的序列等,因而可以参考这些构建本发明的CAR。

[0208] <编码嵌合抗原受体的核苷酸>

[0209] 本发明提供编码本发明的CAR的多核苷酸。关于编码scFV等抗原结合区域的核苷酸序列的信息,也可以制作识别目标抗原的单克隆抗体,通过埃德曼法等公知的方法确定该单克隆抗体的氨基酸序列,基于该氨基酸序列而获得。此外,关于上述的人源化抗体等,本申请的序列表中也公开了具体的序列。另外,也可以通过分析产生该单克隆抗体的杂交瘤的核苷酸序列来获得。

[0210] 另外,编码包括抗原结合性区域在内的本发明的CAR中的各区域等的具体核苷酸序列,只要是本领域技术人员,就也能够检索公知的文献、NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)等数据库而适宜获得。进而,编码上述区域等的核苷酸序列不限于公知的,只要是编码上述各区域等的核苷酸序列都可以使用。根据基因编码的简并,与1个氨基酸对应的密码子存在多个。因此,编码相同氨基酸序列的核苷酸序列存在多种。本发明的多核苷酸的核苷酸序列只要编码本发明的CAR,就可以是通过基因编码的简并而产生的多个核苷酸序列的任意。进一步另外,为了将表达CAR的细胞中的表达最优化,在编码本发明的CAR中的各区域等的核苷酸序列中,为了编码氨基酸而选择的密码子可以被改造。

[0211] 并且,只要是本领域技术人员,就能够基于这样的核苷酸序列信息,使用化学合成的方法(亚磷酰胺法等)、利用PCR扩增的方法等公知的技术,制作编码各区域等的多核苷酸。进而,可以通过将这样获得的编码各区域等的多核苷酸直接连接或经由间隔物连接,从而获得编码本发明的CAR的多核苷酸。此外,编码各区域等的多核苷酸的连接如后述的实施例所示,例如,可以使用重叠延伸PCR法(overlap extension PCR)等公知的方法。

[0212] <包含编码嵌合抗原受体的多核苷酸的载体>

[0213] 本发明提供包含上述的多核苷酸的载体。作为本发明的载体既可以是直链状也可以是环状,可列举例如,病毒载体、质粒载体、附加体载体、人工染色体载体、转座子载体。

[0214] 作为病毒载体,可列举例如,慢病毒等反转录病毒载体、仙台病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、疱疹病毒载体、牛痘病毒载体、痘病毒载体、脊髓灰质炎病毒载体、シロビス病毒载体、弹状病毒载体、副粘病毒载体、正粘病毒载体。

[0215] 作为质粒载体,可列举例如,pcDNA3.1、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo等动物细胞表达用质粒载体。

[0216] 附加体载体是能够在染色体外自主复制的载体。使用附加体载体的具体的手段是公知的(参照Yu等、Science、2009年、324,797-801页)。作为附加体载体,可列举例如,包含来源于EBV、SV40等的自主复制所需的序列作为载体要素的载体。作为自主复制所需的载体要素,具体为复制起点、和编码与复制起点结合而控制复制的蛋白质的基因,例如,对于EBV

可列举复制起点oriP和EBNA-1基因,对于SV40可列举复制起点ori和SV40LT基因。

[0217] 作为人工染色体载体,可列举例如,YAC(Yeast artificial chromosome,酵母人工染色体)载体、BAC(Bacterial artificial chromosome,细菌人工染色体)载体、PAC(P1-derived artificial chromosome,P1衍生的人工染色体)载体。

[0218] 在这些载体中,从即使对增殖缓慢的细胞也能容易地高效率导入基因、另外稳定表达株的建立容易这样的观点考虑,优选反转录病毒载体。

[0219] 本发明的载体中除了编码上述的CAR的多核苷酸以外,还可以包含启动子、增强子、多聚A添加信号、终止子等的表达控制序列、复制起点、编码与复制起点结合而控制复制的蛋白质的核苷酸序列、编码其他蛋白质的核苷酸等。

[0220] 编码上述的CAR的多核苷酸、编码后述的其他蛋白质的核苷酸通过在启动子的下游以能够工作的方式配置,从而能够高效率地转录各多核苷酸。作为该“启动子”,可列举例如,CMV(巨细胞病毒)启动子、SR α 启动子、SV40早期启动子、反转录病毒的LTR、RSV(劳氏肉瘤病毒)启动子、HSV-TK(单纯疱疹病毒胸苷激酶)启动子、EF1 α 启动子、金属硫蛋白启动子、热休克启动子等。

[0221] 作为“编码其他蛋白质的核苷酸”,可列举例如,编码荧光蛋白质基因、报告物基因、药剂耐性基因等标志物基因、参与细胞因子等T细胞激活的分子的基因等。另外,例如,通过使用编码IRES、2A肽序列(例如,Thosea asigna来源的2A肽(T2A))的DNA等,所述其他蛋白质能够与上述的CAR一起在多顺反子中表达。

[0222] 进而,为了在施与了表达CAR的细胞的对象(癌患者等)的体内,适宜诱导所施与的CAR表达细胞的凋亡,本发明的载体可以包含自杀基因作为“编码其他蛋白质的核苷酸”。作为自杀基因,可列举例如,单纯疱疹病毒的胸苷激酶(HSV-TK)、诱导性胱天蛋白酶9(inducible caspase9:iCasp9)。另外,作为激活该基因的功能的药剂,对HSV-TK可列举更昔洛韦,对iCasp9可列举作为二聚体诱导化合物(chemical induction of dimerization:CID)的AP1903等(参照Cooper LJ.等、Cytotherapy.2006;8(2):105-17页、Jensen M.C.等、Biol Blood Marrow Transplant.2010Sep;16(9):1245-56页、JonesBS.、Front Pharmacol.2014Nov 27;5:254.、Minagawa K.、Pharmaceuticals(Basel).2015May 8;8(2):230-49页、Bole-Richard E.、Front Pharmacol.2015Aug 25;6:174)。

[0223] <表达嵌合抗原受体的细胞>

[0224] 本发明提供表达本发明的CAR的细胞。本发明的细胞可以通过将上述的编码本发明的CAR的多核苷酸或载体导入细胞来获得。

[0225] 本发明的多核苷酸或载体被导入的“细胞”优选为哺乳动物来源的细胞,可以使用例如,人来源的细胞、或啮齿类(小鼠、大鼠等)、牛、绵羊、马、犬、猪、猴等非人哺乳动物来源的细胞。细胞的种类不特别限定,可以使用从血液、骨髓液等体液、脾脏、胸腺、淋巴结等组织、肿瘤、癌性腹水等采取的细胞等。作为优选的例子,可列举免疫细胞作为CAR表达用细胞。

[0226] 作为“免疫细胞”,可列举CD4阳性CD8阴性T细胞、CD4阴性CD8阳性T细胞、由iPS细胞制备的T细胞、 $\alpha\beta$ -T细胞、 $\gamma\delta$ -T细胞、NK细胞、NKT细胞等。只要包含如上所述的淋巴细胞或前体细胞,就可以使用各种各样的细胞集团。从外周血采取的PBMC(外周血单核细胞)是优选的免疫细胞之一。即,在优选的一个方案中,对PBMC进行基因导入操作。PBMC可以按照

或依照常规方法制备。

[0227] 优选在本发明的多核苷酸的导入之前预先激活CAR表达用细胞。例如,可以用抗CD3抗体和抗CD28抗体刺激,激活CAR表达用细胞。更具体地,可以通过用以抗CD3抗体和抗CD28抗体涂敷了培养面的培养容器(例如培养皿)进行培养,从而施加利用抗CD3抗体和抗CD28抗体的刺激。也可以利用涂覆了抗CD3抗体和抗CD28抗体的磁珠(例如,VERITAS社提供的Dynabeads T-Activator CD3/CD28)进行该刺激。

[0228] 为了提高细胞的生存率/增殖率,优选在激活处理时,使用添加了T细胞增殖因子的培养液。作为T细胞增殖因子使用IL-2、IL-15、IL-7等。IL-2、IL-15、IL-7等T细胞增殖因子可以按照常规方法制备。另外,也可以利用市售品。并不排除人以外的动物种的T细胞增殖因子的使用,但通常T细胞增殖因子使用人来源的(也可以是重组体)。

[0229] 典型地,为了其应用(对对象的施与),使本发明的多核苷酸导入之后细胞(本发明的多核苷酸导入淋巴细胞)增殖。例如,使用添加有T细胞增殖因子的培养液培养本发明的多核苷酸导入淋巴细胞(根据需要传代培养)。除了该培养之外,也可以进行与CAR表达用细胞的激活的情况下同样的处理(再激活)。

[0230] 此外,本发明的细胞的培养中可以使用添加了血清(人血清、胎牛血清等)的培养基,但通过采用无血清培养基,能够制备具有临床应用时的安全性高、且不易发生由血清批次之间的差异造成的培养效率不同这样的优点的细胞。在使用血清的情况下,优选使用自身血清,即从受到本发明的细胞的施与的对象采取的血清。

[0231] 另外,本发明的细胞也可以是抑制过度的免疫反应等的蛋白质(免疫检查点物质等)的功能被抑制了的细胞。作为该蛋白质,可列举例如,Programmed Death 1(PD1)、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5等)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14或CD270)、KIR、A2aR、MHC I类、MHC II类、GAL9。

[0232] 另外,为了使异体移植容易,本发明的细胞也可以是内源性的TCR、HLA等蛋白质的功能被抑制了的细胞。

[0233] 作为抑制蛋白质的功能的方法,可列举以编码所述蛋白质的基因作为目标的敲除法、使用与所述基因的转录产物互补的dsRNA(双链RNA、例如siRNA)的方法、使用与该转录产物互补的反义RNA的方法、使用具有使所述转录产物特异性地开裂的核酶活性的RNA的方法。另外,作为利用位点特异性的核酸酶(例如,锌指核酸酶(ZFN)、转录激活样效应物核酸酶(TALEN)、CRISPR-Cas9等DNA双链切割酶)改造目标基因的方法的基因组编辑法也适合为了抑制所述物质的功能而使用。

[0234] 作为将本发明的多核苷酸或载体导入细胞的方法,可列举脂质体转染法、显微注射法、磷酸钙法、DEAE-右旋糖酐法、电穿孔法、基因枪法等。另外,在本发明的载体是反转录病毒载体的情况下,可以基于载体所具有的LTR序列和包装信号序列选择适当的包装细胞,使用该包装细胞制备反转录病毒粒子。作为包装细胞,可列举例如,PG13、PA317、GP+E-86、GP+envAm-12、Psi-Crip。另外,也可以使用转染效率高的293细胞、293T细胞作为包装细胞。

[0235] 另外,将本发明的多核苷酸或载体导入细胞之后,该细胞的CAR的表达可以通过流式细胞术、RT-PCR、RNA印迹、蛋白质印迹、ELISA、荧光免疫染色等公知的方法来确认。

[0236] <药物组合物>

[0237] 本发明也提供与Eva1蛋白质有关的疾病(例如,癌)的治疗或预防的方法,包括将本发明的抗体、以表达ADC或CAR的细胞(以下也仅称为“本发明的抗体等”)作为有效成分的药物组合物(例如,抗癌剂)、以及本发明的抗体等的治疗上或预防上的有效量施与对象的工序。

[0238] 与作为本发明的抗体的目标的Eva1蛋白质有关的疾病只要是Eva1蛋白质的表达参与其发病、症状的发展、恶化等的疾病即可,可列举例如,癌。

[0239] 另外,作为成为本发明的抗体的目标的“癌”只要至少表达人Eva1即可,只要该蛋白质表达,则可以是实体瘤,也可以是白血病、淋巴瘤等。更具体地,可列举神经胶质瘤(由神经干细胞、神经前体细胞和神经胶质细胞发生的肿瘤,例如,多形性胶质母细胞瘤(GBM)、星形细胞瘤(astrocytoma)、髓母细胞瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、脉络丛乳头状瘤,特别是间变性星形细胞瘤、间变性少突星形细胞瘤、间变性少突神经胶质瘤)、胰癌、胃癌、食道癌、大肠癌、胆管癌、肝细胞癌、乳癌、肺癌、肾癌、尿路上皮癌、睾丸癌、前列腺癌、头颈癌、甲状腺癌、皮肤癌、子宫颈癌、子宫体癌、卵巢癌、血管瘤、肌肉瘤、骨髓瘤、浆细胞瘤、黑色素瘤(黑素瘤)。另外,这样的癌可以是原发性的,也可以是转移性的,进而,本发明所涉及的癌也包括癌干细胞。

[0240] 本发明的“药物组合物”除了本发明的抗体等之外,可以包含药理学上容许的其他成分。作为这样的其他成分,可列举例如,担载体、乳化剂、湿润剂、pH缓冲化剂、培养基、赋形剂、崩解剂、缓冲剂、等渗剂、悬浮剂、增溶剂、无痛化剂、稳定剂、保存剂、防腐剂。更具体地,作为药理学上容许的其他成分,在注射剂等液状制剂的情况下,可列举水溶液(生理盐水、注射用水、磷酸盐缓冲液、葡萄糖水溶液、甘油水溶液等)、氢氧化铝等作为例子。另外,冷冻干燥了的制剂的情况下,可列举糖(甘露糖醇、乳糖、蔗糖等)、白蛋白等作为例子,但不限于这些。进而,本发明的药物组合物可以是能够在上述成分施与之前被混合那样的试剂盒的形态。另外,在作为注射剂使用的情况下,可以是被导入到了注射器的形态。

[0241] 本发明的药物组合物作为有效成分,可以仅包含本发明的抗体等,也可以包含该抗体等和至少一种其他抗癌剂。另外,本发明的抗体等也可以与其他抗癌剂一起施与,由此可以增强抗肿瘤效果。以这样的目的被使用的其他抗癌剂可以与本发明的抗体等同时、分别、或者连续地施与对象,也可以改变各自的施与间隔而施与。作为这样的“抗癌剂”,可列举例如,免疫检查点抑制剂(抗PD-1抗体等)、吉西他滨、S-1、厄洛替尼、5-FU、替莫唑胺、甲酰四氢叶酸、伊立替康(CPT-11)、奥沙利铂、白蛋白紫杉醇、卡铂、紫杉醇、培美曲塞、索拉非尼、长春花碱、LH-RH类似物(亮丙瑞林、戈舍瑞林等)、雌莫司汀/磷酸盐、雌激素拮抗药(他莫昔芬、雷洛昔芬等)、芳香化酶抑制剂(阿那曲唑、来曲唑、依西美坦等)、国际公开第2003/038043号所记载的药剂,只要是具有抗肿瘤活性的药剂就不限定。进而,在包含本发明的细胞的药物组合物的情况下,作为其他成分,为了细胞的保护而可以包含二甲基亚砜(DMSO)、血清白蛋白等,为了阻止细菌的混入而可以包含抗生素等。进一步另外,为了细胞的激活、增殖或分化诱导等,可以包含细胞因子、生长因子、类固醇等T细胞激活因子、维生素类、免疫激活剂、免疫检查点抑制剂,另外,可以将本发明的细胞与这些其他成分联用。

[0242] 药物组合物的施与方法根据所施与的物质的种类、组成物的方式、对象的年龄、体重、性别、健康状态等不同而不同,可以通过非经口施与(例如,静脉施与、动脉施与、局部施与)、经口施与的任一施与经路施与。优选的施与方法为非经口施与,更优选为静脉施与。另

外,也可以不通过全身施与,而是进行局部施与。作为局部施与,可以例示对作为目标的组织、脏器、器官的直接注入。

[0243] 药物组合物的施与量可以根据对象的年龄、体重、性别、健康状态、症状的发展的程度和所施与的药物组合物的成分而变动。另外,施与日程安排也可以根据这些条件适宜调整,除了单回施与之外,也可以连续或定期地多次施与,一般地,在将抗体静脉内施与的情况下,成人每1kg体重为1天0.1~1000mg、优选为1~100mg。另外,在施与ADC的情况下,以所含有的药物量换算,成人每1kg体重为1天0.001~1000mg、优选为0.01~100mg。作为这些抗体或ADC的施与次数,例如,可以以1次、或1天~1年1次的间隔(例如,每1周、每10~30天、每1个月、每3~6个月、每半年、每1年)多次施与。

[0244] 另外,作为细胞的施与量,在1次施与中,作为成人每1kg体重的施与细胞的个数,可以为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{10}$ 个(优选为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$ 个、更优选为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 个)。作为施与间隔,可以为例如,每1周、每10~30天、每1个月、每3~6个月、每半年、每1年等。另外,本发明的细胞能够在施与对象的体内自主地增殖,所以可以是仅1次的施与。另外,可以施与后检测体内的本发明的细胞数,根据其结果确定施与时间。

[0245] 此外,在治疗对象为脑的情况下,血脑屏障(BBB)的存在经常成为问题。然而,患有多形性胶质母细胞瘤(GBM)等的人在发生了血管新生的脑肿瘤内血管中并不形成在正常脑中的BBB,因此可以将所述抗体通过静脉注射等送达GBM。

[0246] 另外,即使在BBB发挥功能的情况下,也可以回避BBB而施与本发明的抗体。可列举例如,通过定位脑手术方法插入插管等,通过该插管直接施与神经胶质瘤等的方法。另外,可列举将包含本发明的抗体的药物递送系统埋入脑内的方法(Gill et al., Nature Med. 9:589-595(2003)等)。进一步包括利用包含编码本发明的抗体的基因的载体转染跨过BBB的神经元(美国专利申请公开第2003/0083299号等)。

[0247] 另外,除了上述回避BBB的方法之外,还可以利用使本发明的抗体含有于或结合于脑屏障透过物质而施与的方法。作为脑屏障透过物质,可列举例如,结合于与BBB的血管内皮上的受体结合的抗体结合片段的脂质体(美国专利申请公开第20020025313号等)、低密度脂蛋白粒子(美国专利申请公开第20040204354号等)、载脂蛋白E(美国专利申请公开第20040131692号等)、转铁蛋白(美国专利申请公开第2003/0129186号等)、由狂犬病病毒来源的29个氨基酸组成的糖蛋白质(参照Kumar等、Nature、2007年7月5日、448卷、39~43页)。

[0248] 进而,通过控制受体或通道的活性来施与本发明的抗体,也能够使该抗体通过BBB而递送到神经胶质瘤等。作为该方法,可列举例如,使用糖皮质激素阻断药使血脑屏障的透过性增加(美国专利申请公开第2002/0065259号、美国专利申请公开第2003/0162695号、美国专利申请公开第2005/0124533号等)、激活钾通道(美国专利申请公开第2005/0089473号等)、抑制ABC药物转运蛋白(美国专利申请公开第2003/0073713号等)、将本发明的抗体阳离子化(美国专利第5,004,697号等)。

[0249] 以上,以神经胶质瘤等脑中疾病作为对象进行说明,但该疾病中的本发明的抗体的施与方法不限于这些,另外,对于其他疾病,与上述脑中的疾病同样地,只要是本领域技术人员就能够根据该疾病适宜选择公知的方法,使本发明的抗体作用于患部。

[0250] 本发明中,作为施与本发明的抗体等的“对象”,可列举例如,患有上述的癌等的人、有上述的癌等复发风险的人、有患上上述的癌等的风险的人。另外本发明中,所谓“治疗”,

包括缓和癌等的目标疾病的特征性症状或伴随症状(轻症化)、阻止或延迟症状的恶化等。所谓“预防”,是指防止或延迟疾病(障害)或其症状的发病、表达、复发,或者降低发病、表达、复发的危险性。

[0251] 实施例

[0252] 以下,基于实施例更具体地说明本发明,但本发明不限于以下实施例。

[0253] <实施例1>抗人Eva1人源化抗体

[0254] 尝试了将抗人Eva1小鼠抗体(专利文献2所记载的B2E5-48小鼠抗体)使用以下所示的材料和方法进行人源化。此外,该抗体的轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)的氨基酸序列分别如序列号21和27所示。

[0255] (材料和方法)

[0256] 1.1可变区的分析和CDR的鉴定

[0257] 使用IMGT Domain Gap Align工具(<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>),特定B2E5-48小鼠抗体的可变区中的CDR,分析了最一致的生殖细胞序列。

[0258] 1.2分子建模

[0259] 对于VL和VH,基于与已知的抗体的晶体结构的同源性,使用Absolute Antibody社内的软件构建分子模型。图像使用PyMol制成。

[0260] 1.3有风险的序列分析

[0261] 关于抗体的序列,基于公开的蛋白质的模体分析特定的风险。分析使用通过Microsoft Excel构建的系统(Absolute Antibody Sequence Liability Tool)来进行。在该软件中,基于下述表所示的模体来评价风险。此外,在下述表中,X表示除脯氨酸以外的任意氨基酸。

[0262] 表4

[0263]

风险	责任	模体
高	糖基化	NXS or NXT
	游离半胱氨酸	C
	脱酰胺化	NG, NS or QG
	异构化	DG, DP or DS
中	脱酰胺化	NH
	水解	NP
	裂解	TS, KK, RK or KR
	转谷氨酰胺酶	LLQG
	整联蛋白结合	RGD or KGD
	塑料结合	FHENSEP or WXXW

[0264] 1.4基因合成和克隆

[0265] 如后述表6所示,设计了合计4条人源化重链和4条人源化轻链。将它们分别各自合成,克隆到人IgG1重链表达载体和人κ轻链表达载体中。转染时进行被人源化的序列的尽可能的组合,制作了合计16种人源化抗体。除此之外,作为对照,制作了嵌合型人IgG1(将

B2E5-48小鼠抗体的恒定区替换为人IgG1型的恒定区的产物)。

[0266] 更具体地,编码重链可变区和轻链可变区的DNA序列,以能够克隆到Absolute Antibody社制克隆载体、表达载体中的方式,在5'末端和3'末端追加适当的限制性酶识别部位而进行了设计。进而,这些DNA序列考虑人细胞中的表达而将密码子进行了最优化。基于这些序列,化学合成之后,克隆到适当的种和类型的Absolute Antibody社制载体中。此外,序列的正确性使用DNASTAR Lasergene软件分析原始数据,通过桑格尔测序进行了确认。进行了该确认之后,进行适当尺寸的质粒DNA准备,制备了转染所需的充分量的高品质DNA。

[0267] 1.5表达和纯化

[0268] 将HEK293T细胞传代至最适合暂时性转染的阶段。将重链和轻链表达用载体导入该细胞,培养了6天。将培养物以4000rpm离心分离,回收这些培养上清,用0.22M的过滤器进行过滤。第一阶段的纯化通过蛋白A亲和层析,用柠檬酸pH3.0的缓冲液溶出之后,用0.5MTris,pH9.0中和。溶出的蛋白质使用脱盐柱缓冲液交换成PBS。抗体浓度通过UV分光法测定,根据需要进行了浓缩。另外,所述嵌合型人IgG1不仅在HEK293T细胞、也在CHO细胞中使其表达而制备。

[0269] 1.6抗体分析学

[0270] 抗体的纯度利用SDS-PAGE和HPLC确定。SEC-HPLC利用Agilent 1100系列的装置,使用适当的尺寸排除柱(SEC)实施。抗体的表达效价利用蛋白A HPLC测定。

[0271] 1.7表面等离子体共振分析

[0272] 将人源化抗体等的解离常数和结合常数用表面等离子体共振(SPR、制品名:BiaCore T200(GE healthcare社制))进行了分析。

[0273] 具体地,首先,在CM5芯片上通过氨基偶联法固定化人IgG捕捉抗体。该固定化在参比单元和活动单元双方进行。然后,使用以下的测定条件,通过单循环法进行了抗Eva1抗体与hEva1的动力学分析。

[0274] 测定条件

[0275] /Sample compartment temperature:10°C

[0276] /Running buffer:HBS-EP+buffer,pH7.4

[0277] /Capturing molecule:HumanIgG抗体,参比&活动单元

[0278] /Ligand:各种抗体5nM,仅活动单元

[0279] /Analyte:hEva1-mouse Fc1,5,25,125,250nM,参比&活动单元

[0280] /Regeneration buffer:3M MgCl₂,参比&活动单元

[0281] /将空白 (Analyte零浓度) 3循环

[0282] 另外,循环条件如下述表所示。

[0283] 表5

[0284]

Startup	Flow path	Contact time	Flow rate	Others
Capture	Second	60 sec	10 μ L/min	Stabilization 60 sec
Sample	Both	120 sec	30 μ L/min	Dissociation time 60 sec
Regeneration	Both	60 sec	30 μ L/min	
Sample	Flow path	Contact time	Flow rate	
Capture	Second	60 sec	10 μ L/min	Stabilization 60 sec
Sample	Both	120 sec	30 μ L/min	Dissociation time 400 sec
Regeneration	Both	60 sec	30 μ L/min	

[0285] 以下显示使用以上的材料和方法获得的结果。

[0286] (结果)

[0287] 2.1序列分析

[0288] 将B2E5-48小鼠抗体的VH和VL的序列用IGMT Gap Align工具执行,与已知的全部抗体生殖细胞的序列比较而进行了分析。其结果未图示,但这些序列是最接近小鼠的序列,特别是VH是最接近IGHV1-53家族的序列,VL是最接近IGKV4-68的序列。另外,CDR使用IMGT的定义进行了分配。

[0289] 2.2生殖细胞系列的选择

[0290] 将VH和VL的序列与Absolute Antibody社的关于人生殖细胞系列的数据库比对而进行了分析。将其结果作为用于人源化的框架而选择出的生殖细胞系列示于下述表6。该表中,分别显示作为人源化的框架而选择出的重链和轻链的生殖细胞系列、与起初的小鼠的VH和VL的同源性(%)。

[0291] 表6

[0292]

	种系 ID	%一致性
重链	IGHV1-46*01	67.7
	IGHV7-4-1*02	60.4
轻链	IGKV3-11*01	66.3
	IGKV1-9*01	63.8

[0293] 2.4CDR移植聚合

[0294] 将VH和VL的序列用CDR移植算法进行分析,移植到选择了B2E5-48小鼠抗体的CDR的人生殖细胞系列中。CDR主要被定义为参与与抗原的结合,但位于被称为框架区的区域的外侧的氨基酸也可能直接参与结合、或发挥使CDR正确配置的作用。于是,为了维持结合性,使用结构诱导法确定了将框架区的氨基酸中的哪个氨基酸作为小鼠来源(最初)的氨基酸残留。将其结果生成的序列的概要示于表7。此外,该表中,序列中划了下划线的序列表示为各可变区中的CDR。

[0295] 表7

[0296]

ID	序列名 人生殖系列	序列	序列号:	与人抗体的 同源性
	cAb4053-VH 小鼠 -	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMH WVKLRPGQGFEWIGEINPTNGGTDYNEKFQRKATLT VDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTIYTTALDYWG QGTTLVSS	27	67.7%
H1	cAb4054-VH 人源化的 IGHV1-46*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMH WVRQAPGQGGEWIGEINPTNGGTDYNEKFQGRVTLT VDKSSSTAYMELSSLRSED TAVYYCTIYTTALDYWG QGTLVTSS	15	84.4%
H2	cAb4058-VH 人源化的 IGHV1-46*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMH WVRQAPGQGGEWIMGEINPTNGGTDYNEKFQGRVT MTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTIYTTALDY WGQGLVTSS	13	87.5%
H3	cAb4062-VH 人源化的 IGHV7-4-1*02	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMH WVRQAPGQGGEWIGEINPTNGGTDYNEGFTGRFVLS VDKSSSTAYLQISSLKAED TAVYYCTIYTTALDYWGQ GTLVTSS	16	82.3%
H4	cAb4066-VH 人源化的 IGHV7-4-1*02	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMH WVRQAPGQGGEWIMGEINPTNGGTDYNEGFTGRFVF SVDKSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCTIYTTALDYWG QGTLVTSS	14	85.4%
	cAb4053-VL 小鼠 -	QIVLTQSPALMSASPGERVTLTCSASSSVGYMYWY QQKPGSSPKPWIVYVTSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGAGTKLEIK	21	66.3%
L1	cAb4054-VL 人源化的 IGKV3-11*01	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYMYWYQ QKPGQAPRPLIYVTSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLT ISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIK	9	84.2%
L2	cAb4055-VL 人源化的 IGKV3-11*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYMYWYQ QKPGQAPRPLIYVTSNRATGIPARFSGSGSGTDYTLT ISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIK	7	87.4%
L3	cAb4056-VL 人源化的 IGKV1-9*01	QIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASSSVGYMYWYQ QKPGKAPKPLIYVTSNLASGVPSRFSGSGSGTEYTL TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIK	10	83.0%
L4	cAb4057-VL 人源化的 IGKV1-9*01	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASSSVGYMYWYQ QKPGKAPKPLIYVTSNLASGVPSRFSGSGSGTEYTL TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGQGTKLEIK	8	83.2%

[0297] 2.5有风险的序列分析

[0298] 为了确认人源化后的序列中没有非常不期望的序列上的风险(问题),将最初的小鼠抗体的序列与人源化后的序列代入到Absolute Antibody Sequence Liability Tool。

[0299] 其结果是,作为表4所示中风险最高的序列的糖基化模体和游离半胱氨酸在所述小鼠抗体和人源化抗体中均没有检测到。另一方面,确认了脱酰胺化、异构化的模体在这些抗体中存在。然而,这些模体虽然如表4所示被认为高风险,但在通常抗体中常见。另外,基于这些模体的修饰虽然可能在制造时引起混乱,但大多数情况下可以通过管理方法来消除。进而,如果必要,也可以通过突变导入来除去这些模体。另外,对于有中风险和低风险的序列从获得更完全的抗体这样的观点考虑进行了检测,但基本没有被报告过在抗体的制造工序中引起问题。由此判定,所述小鼠抗体和人源化抗体的序列没有特别问题。

[0300] 3. 抗体的制造和分析

[0301] 如上所述,尝试了16种人源化抗体的制造。其结果其中6种完全没有在上清中检测到抗体(H1-L1、H1-L2、H1-L3、H2-L1、H3-L1、H4-L1),另外,其他3种(H2-L3、H3-L3、H4-L2)上清中的抗体浓度(下述Titer(mg/L))也显著低。考虑这些没有形成正常的抗体、没有被充分分泌到培养上清中。

[0302] 表8

[0303]

	效价(mg/L)	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(M)$
嵌合抗体(CHO)	-	1.901×10^4	8.447×10^{-3}	4.449×10^{-7}
嵌合抗体(293T)	60	1.964×10^4	9.470×10^{-3}	4.822×10^{-7}
H1-L4	63	1.747×10^4	9.313×10^{-3}	5.331×10^{-7}
H2-L2	75	1.972×10^4	9.201×10^{-3}	4.666×10^{-7}
H2-L3	3	2.071×10^4	8.858×10^{-3}	4.277×10^{-7}
H2-L4	75	1.720×10^4	9.101×10^{-3}	5.291×10^{-7}
H3-L2	50	1.677×10^4	1.320×10^{-2}	7.871×10^{-7}
H3-L3	13	1.501×10^4	1.253×10^{-2}	8.348×10^{-7}
H3-L4	94	1.580×10^4	1.380×10^{-2}	8.734×10^{-7}
H4-L2	3	1.898×10^4	1.457×10^{-2}	7.677×10^{-7}
H4-L3	38	1.548×10^4	1.357×10^{-2}	8.766×10^{-7}
H4-L4	31	1.534×10^4	1.525×10^{-2}	9.941×10^{-7}

[0304] 另外,通过SPR法分析了抗体的结合亲和性,结果如上述表所示,平均解离常数(K_D)均为 10^{-7} 级别。特别是在人源化抗体中,H2-L2、H1-L4、H2-L3、H2-L4与嵌合抗体(HEK293T细胞产)为同程度。另外,也考虑了上述抗体浓度后提示,H2-L2、H2-L4、H3-L4在后述的抗体用途中是有用的。

[0305] <参考例>人Eva1蛋白质的表达

[0306] (正常人血液细胞中的Eva1蛋白质表达的分析)

[0307] 为了分析抗Eva1抗体在医药用途中的有用性,首先为了分析后述的嵌合抗原受体(CAR)中的有用性而评价了成为CAR表达的场所的各种血液细胞中的Eva1蛋白质的表达。

[0308] 具体地,使健常人外周血溶血(BD FACS Lysing Solution),然后对CD4、CD8、CD19、中性粒细胞(由scatter plot gate)、单核细胞(由scatter plot gate)染色,同时用小鼠抗人Eva1抗体和二抗染色,用流式细胞术进行了分析。

[0309] 其结果如图1所示,在CD4、CD8 T淋巴细胞、CD19B淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞的全部中没有发现Eva1蛋白质的表达。由此提示,表达以Eva1蛋白质作为抗原的CAR的血液细胞不以该细胞作为目标的概率高。

[0310] (肿瘤中的Eva1蛋白质表达的分析)

[0311] 接着,评价各种肿瘤中的Eva1蛋白质的表达。具体地,首先,将各种肿瘤细胞株从培养瓶剥离制成细胞悬浮液,然后与上述(正常人血液细胞中的Eva1蛋白质表达的分析)所记载的方法同样将Eva1蛋白质染色。

[0312] 其结果如图2A所示,虽然在OVTOKO、PA-1和T98G中未确认表达,但在除此以外的各种各样的肿瘤细胞株确认了Eva1蛋白质的表达。

[0313] 另外,也进行了肝内胆管癌病例的手术标本分离细胞中的Eva1蛋白质表达的分析。具体地,由肝内胆管癌的手术标本采集肿瘤部分制备了细胞悬浮液(MACS Tumor Dissociation Kit,human,Miltenyi Biotec)。进一步使用Tumor cell isolation kit和human,Miltenyi Biotec纯化肿瘤细胞,与上述同样地染色Eva1蛋白质,进行了流式细胞术分析。

[0314] 其结果如图2B所示,在肝内胆管癌3例中3例中,Eva1为阳性。

[0315] <实施例2>使用了小鼠抗Eva1抗体序列的嵌合抗原受体

[0316] (使用了抗人Eva1小鼠抗体序列的Eva1-CAR的制作)

[0317] 接着,为了分析以Eva1蛋白质作为目标的嵌合抗原受体(CAR)的有用性,制作了这样的CAR。具体地,如图3A所示,使用抗人Eva1小鼠抗体(上述B2E5-48小鼠抗体)的VL和VH构建了单链抗体。然后,制作VL-连接物-VH和VH-连接物-VL,分别介由15aa的短间隔物结构域(由序列号58所记载的268~282位的氨基酸或序列号59所记载的氨基酸序列组成)或者232aa的长间隔物结构域(由序列号58所记载的268~499位的氨基酸或序列号63所记载的氨基酸序列组成)将CD28跨膜区域(CD28TM)、CD28细胞内结构域(CD28IC)、CD3zeta连接而构建了CAR分子。

[0318] 进而,将不具有细胞内结构域的EGFR(truncated EGFR,tEGFR)结合于T2A序列之后。这作为1条mRNA被转录,然后在翻译之后在T2A序列被切开为CAR和tEGFR分子,以1:1的数分布。tEGFR可以用作基因导入标志物和在被基因导入了的细胞的选择中使用。

[0319] 具体地,Eva1-CAR(从N末端侧开始的可变区的顺序为VL、VH,具有所述长间隔物结构域)采取下述表9所示的构成。

[0322] (使用了抗人Eva1小鼠抗体序列的Eva1-CAR-T的制作)

[0323] 接着,如图3B所示,在第0天从健康人供者进行采血,使用CD8微珠(Miltenyi Biotec)纯化CD8阳性细胞。然后,使用CD3/CD28珠(Invitrogen)以T细胞:珠=1:3的比率混合,激活T细胞。第3天使用能够基因导入编码所述CAR分子的序列的反转录病毒进行了基因导入(反转录病毒的构建与Mol Ther 2021Sep 1;29(9):2677-2690.所记载的方法同样地进行)。具体地,涂覆有retronectin的板上滴加反转录病毒,以2100rpm旋转120min。然后将板用PBS洗涤之后,接种经刺激的CD8+T细胞,以800rpm旋转2min。第4天从涂覆有retronectin的板使其移动到通常的培养皿。第7天回收细胞,添加生物素化的EGFR抗体(西妥昔单抗),然后使用MACS抗生物素珠纯化tEGFR阳性细胞。纯化后的细胞在第7天至第10天继续连续培养。第10天将细胞计数,并保存。一部分在第10天再次使用CD3/CD28珠进行刺激在第17-20天进行实验。

[0324] 此外,以下中基因导入方案使用同一方法。另外,在第1,4,7,10,13,16,(19)天加入/重组IL-2 50U/ml而进行了培养。

[0325] (使用了抗人Eva1小鼠抗体序列的Eva1-CAR-T基因的导入效率)

[0326] 将这样进行了的、第7天中的基因导入效率示于图3C和3D。在图3C中,关于LH-S(使用了VL-VH的CAR中的间隔物较短的)、HL-S(使用了VH-VL的CAR中的间隔物较短的)和LH-L(使用了VL-VH的CAR中的间隔物较短的)和HL-L(使用了VH-VL的CAR中的间隔物较长的),显示代表性绘图(纵轴的EGFR表示用生物素化西妥昔单抗一次染色、然后用链霉亲和素-PE二次染色。进行了基因导入的细胞)。另外,图3D中显示使用5名健康人供者来源细胞进行了同样的实验的结果。如图3C和3D所示,间隔物长的一方基因导入效率高。

[0327] (使用了抗人Eva1小鼠抗体序列的Eva1-CAR-T的细胞因子产生能力)

[0328] 接着,分析使用了抗人Eva1小鼠抗体序列的Eva1-CAR-T的细胞因子产生能力。具体地,将如上所述制作的CAR-T培养至第17天,将该细胞与各种主要细胞株以1:1共培养,在6小时的共培养之后,进行固定/细胞内染色(BD cytofix/cytoperm buffer)并用IFN-gamma(IFN- γ)染色。将所得的结果示于图3E。

[0329] 如图3E所示,在仅基因导入了EGFR的仿制T细胞中未见IFN-gamma产生,但在Eva1-CAR-T中观察到IFN-gamma产生。任意Eva1-CAR-T中都对Eva1阴性细胞株未见IFN-gamma产生,对Eva1阳性细胞株观察到IFN-gamma产生,能够确认Eva1-CAR-T的抗原特异性。间隔物较长的相比于较短的观察到更强的IFN-gamma产生。

[0330] (Eva1-CAR-T的间隔物长度的最优化)

[0331] 如图3F所示,制作了具有6种不同的长度的间隔物区域的小鼠抗体来源Eva1-CAR-T。间隔物长度为0aa、15aa(序列号59)、30aa(序列号60)、60aa(序列号61)、125aa(序列号62)、232aa(序列号63)。15aa与先前实验中的短版本相同,232aa与先前实验中的长版本相同。将其整合到质粒中,同样地制作反转录病毒,与上述方法同样地对CD8阳性细胞进行了基因导入。

[0332] (6种不同的间隔物长度的Eva1-CAR-T的制作中的基因导入效率)

[0333] 将这样进行了的、第7天中的基因导入效率(EGFR染色)示于图3G。其结果表明,间隔物长度为30aa、125aa、232aa的3个CAR相比于其他3种基因导入效率更高(n=5)。

[0334] (6种不同的间隔物长度的Eva1-CAR-T的扩增效率(CD3/CD28珠刺激))

[0335] 进而,将对所述Eva1-CAR-T施加连续CD3/CD28珠刺激、继续培养至第17天时的扩增倍率示于图3H。其结果利用CD3/CD28珠刺激的扩增效率无差异(n=5)。

[0336] (6种不同的间隔物长度的Eva1-CAR-T的细胞因子产生能力)

[0337] 使用所述第17天的Eva1-CAR-T进行了实验。具体地,与肿瘤细胞株以1:1共培养,6小时后通过上述同样的方法将细胞固定/染色,通过流式细胞术评价了细胞内IFN- γ 、IL-2。将所得的结果示于图3I。在该图中显示CD8阳性细胞中IFN- γ 、IL-2为阳性的比例。

[0338] 如图3I所示,使用间隔物长度30aa、125aa、232aa的3个Eva1CAR-T细胞显示了优异的细胞因子产生,其中具有232aa的间隔物的Eva1CAR-T细胞显示最优异的细胞因子产生能力。

[0339] (6种不同的间隔物长度的Eva1-CAR-T的扩增效率(Eva1刺激、无IL-2))

[0340] 对Eva1阳性的HuCCT-1进行100Gy的放射线照射,与CAR-T以1:1进行共培养,分析了它们的扩增效率。将所得的结果示于图3J和3K。图3J中显示各个时系列中的扩增效率。图3K中作图了第4天中的扩增倍率。如图3J和3K所示,在使用间隔物长度15aa、30aa、232aa的情况下,细胞扩增良好(n=5、由不同的5名供者来源外周血制作CAR-T)。

[0341] (6种不同的间隔物长度的Eva1-CAR-T的扩增效率(Eva1刺激、有IL-2))

[0342] 与所述同样地,对Eva1阳性的HuCCT-1进行100Gy的放射线照射,与CAR-T细胞以1:1进行了共培养。然后在第1、4、7天每3天1次添加IL-2 50U/ml而进行了培养。将所得的结果示于图3L和3M。图3L中显示各个时系列中的扩增效率。在图3M中作图了第18天的扩增倍率。如图3L和3M所示,在使用间隔物长度15aa、30aa、232aa的情况下,确认了细胞扩增良好的倾向(n=5、由不同的5名供者来源外周血制作CAR-T)。

[0343] <实施例3>使用了抗人Eva1人源化抗体序列的嵌合抗原受体

[0344] (使用了抗Eva1人源化抗体序列的人源化Eva1-CAR-T(hEva1CAR-T)的制作)

[0345] 接着,使用上述的人源化抗体序列制作了合计6种Eva1CAR-T。具体地,关于L2-连接物-H(L2H2)、H2-连接物-L2(H2L2)、L4-连接物-H(L4H2)、H2-连接物-L4(H2L4)、L4-连接物-H3(L4H3)、H3-连接物-L4(H3L4)6种,分别设计了具有232aa的间隔物的CAR。然后,将编码这些CAR的DNA分别整合到质粒,与上述同样地制作反转录病毒,进行了基因导入。

[0346] (使用了6种抗人Eva1人源化抗体的hEva1-CAR-T的制作中的基因导入效率)

[0347] 将这样进行了的、第7天中的基因导入效率(EGFR染色)示于图4A。如该图所示,表明在使用L2H2、L4H3的情况下,与其他4种相比基因导入效率更高(n=4、由不同的4名供者来源外周血制作CAR-T)。

[0348] (使用了6种抗Eva1人源化抗体的hEva1-CAR-T的扩增效率(CD3/CD28珠刺激))

[0349] 将上述制作的hEva1CAR-T在连续CD3/CD28珠刺激下继续培养到第17天时的扩增倍率示于图4B。如该图所示,在利用CD3/CD28珠刺激的扩增效率中,使用了L2H2、H2L2、H2L4的情况下,比其他3种更良好(n=5、由不同的5名供者来源外周血制作CAR-T)。

[0350] (使用了6种抗Eva1人源化抗体的hEva1-CAR-T的细胞因子产生能力)

[0351] 使用第17天的hEva1-CAR-T进行了实验。具体地,与肿瘤细胞株以1:1共培养,6小时后与上述同样地将细胞固定/染色,用流式细胞术评价了细胞内IFN- γ 、IL-2。将所得的结果示于图4C和4D。这些图中显示了CD8阳性细胞中各细胞因子为阳性的比例。如图4C和

4D所示,各个hEva1-CAR-T逐个未见大的差异,但在使用了L2H2的CAR-T中,针对Eva1阴性细胞株OVTOKO的细胞因子产生最低。

[0352] (使用了6种抗Eva1人源化抗体的hEva1-CAR-T的扩增效率(Eva1刺激))

[0353] 与上述同样地,对Eva1阳性的HuCCT-1进行100Gy的放射线照射,与hEva1CAR-T细胞以1:1进行了共培养。将所得的结果示于图4E。该图中,左侧显示IL-2不存在下的培养结果,右侧显示在第1、4、7天每3天1次添加IL-2 50U/ml而培养的结果。如图4E所示,均是使用了L2H2的CAR-T显示了最良好的刺激后扩增(n=5、由不同的5名供者来源外周血制作CAR-T)。

[0354] (L2H2 hEva1-CAR-T的细胞内结构域的研究)

[0355] 如上,关于使用了人源化抗体的CAR,使用了L2H2的CAR-T在抗原特异性和细胞增殖方面优异。另外,如实施例2所示,关于使用了小鼠来源抗体的CAR,在IL-2不存在下的培养中,间隔物长度为232aa的CAR-T在细胞增殖和细胞因子产生方面最好。另一方面,在IL-2存在下的培养中,具有15aa的间隔物的CAR-T的细胞增殖最好。

[0356] 于是接着,如图4F中所示,制作了经由由L2H2组成的单链可变区(scFv)和2个间隔物长度的间隔物(S:短间隔物,L:长间隔物)将3种细胞内结构域(CD28IC,4-1BBIC,CD79A/CD40IC)连接而成的6种CAR-T。

[0357] (6种hEva1-CAR-T的制作中的基因导入效率)

[0358] 在上述6种CAR-T制作中,将第7天中的基因导入效率(EGFR染色)示于图4G。如该图所示,在4-1BB-L、CD79A/CD40-L的情况下基因导入效率高。另外与上述同样地,与短间隔物(S)相比,具有长间隔物(L)的CAR的基因导入效率更高在这里也再现了(n=5、由不同的5名供者来源外周血制作CAR-T)。

[0359] (6种L2H2 hEva1-CAR-T的细胞因子产生能力)

[0360] 使用上述第17天的hEva1-CAR-T进行了实验。具体地,与肿瘤细胞株以1:1共培养,在4小时后与上述同样地将细胞固定/染色,用流式细胞术评价了细胞内IFN- γ 、IL-2。将所得的结果示于图4H和4I。这些图中显示了CD8阳性细胞中各细胞因子为阳性的比例。如图4H和4I所示,各个hEva1-CAR-T逐个未见大的差异,但与短间隔物相比,具有长间隔物的CAR的细胞因子产生能力更高在这里也再现了(n=5、由不同的5名供者来源外周血制作CAR-T)。

[0361] (6种L2H2 Eva1-CAR-T的刺激后扩增效率(Eva1刺激))

[0362] 与上述同样地对Eva1阳性的HuCCT-1进行100Gy的放射线照射,与hEva1-CAR-T以1:1进行了共培养。将所得的结果示于图4J。该图中,左侧显示IL-2不存在下的培养结果,右侧显示在第1、4、7天每3天1次添加IL-2 50U/ml进行了培养的结果。如图4J所示,均是4-1BB、CD79A/CD40的短、长都显示基本同等好的结果(n=5、由不同的5名供者来源外周血制作CAR-T)。

[0363] (使用6种L2H2 hEva1-CAR-T的共培养试验)

[0364] 将L2H2 hEva1-CAR-T与未放射线照射的RPMI-8226(Myeloma cell line)以E:T比=1:16进行了共培养。将RPMI-8226用CellTrace Violet标记之后开始培养,使得能够判别RPMI8226与CAR-T。在培养开始48小时、72小时、96小时后采集一部分使用流式细胞术进行了分析。将所得的结果示于图4K。该图中显示肿瘤细胞在全部细胞中所占的比例。此外,

tEGFR是仅基因导入了tEGFR的模拟CAR-T细胞,因此肿瘤细胞持续增加。未见各个细胞内结构域的明显差异。

[0365] (使用了6种L2H2 hEva1CAR-T的细胞毒试验(铬释放试验))

[0366] 将L2H2 hEva1-CAR-T与经⁵¹Cr标记的各种肿瘤细胞株共培养4小时,通过测定释放到上清中的⁵¹Cr来调查被伤害的细胞的比例(铬释放试验)。E:T比为10:1、3:1、1:1。将所得的结果示于图4L和4M。如图4L所示,对被视为Eva1阳性的细胞株,确认了由hEva1-CAR-T产生的有意义的伤害活性。此外,未确认到由各个细胞内结构域造成的明确差异。另外,如图4M所示,如果横轴取各细胞株的Eva1-MFI,则可见与MFI的相关。

[0367] 如上,关于抗原识别部位为L2H2的hEva1-CAR-T,评价了由细胞内结构域的差异造成的反应性差异。体外确认了细胞增殖、细胞因子释放、细胞毒活性的结果可知,在细胞增殖方面,具有4-1BB、CD79A/CD40的细胞内结构域的CAR优异。

[0368] (使用了荷瘤模型的、利用hEva1-CAR-T的抗肿瘤活性的评价)

[0369] 使用由2名不同的供者来源外周血制作的L2H2 hEva1-CAR-T,评价了抗癌效果。具体地,如下进行。

[0370] 对7周龄的NOG小鼠(NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Sug/ShiJic),将分别导入有 1×10^6 个萤火虫萤光素酶基因的CFPAC1细胞(人胰癌细胞株)或H1975(人肺腺癌细胞株)进行腹腔内接种。2周后,通过将 2×10^6 个tEGFR导入细胞(仅基因导入了tEGFR的模拟CAR-T细胞、对照)或L2H2 hEva1-CAR-T经由尾静脉进行静脉内施与,从而评价该CAR-T的抗肿瘤活性。在该评价中,为了评价肿瘤的发展,使用IVIS spectrum系统实施了生物发光成像(BLI)。将所得的结果示于图4N~4Q。另外并行地实施了体重测定。

[0371] 另外,使用由来源于与上述使用的2人不同的别的供者的外周血制作的L2H2hEva1-CAR-T,也评价了对胆管癌的抗癌效果。

[0372] 具体地,首先,对7周龄的NOG小鼠将 2×10^6 个萤火虫萤光素酶基因导入HuCCT细胞(人胆管癌细胞株)进行了皮下移植。2周后,测定肿瘤直径和体重之后,将 2×10^6 个或 5×10^6 个tEGFR导入细胞(对照)或L2H2 hEva1-CAR-T经由尾静脉进行静脉内施与,从而与上述同样地以BLI作为指标,评价了该CAR-T的抗肿瘤活性。肿瘤体积使用游标卡尺测定皮下肿瘤的长径和短径,通过“肿瘤的长径 $\times$ 短径 $\times$ 短径 $\times$ 1/2”计算出。将所得的结果示于图4R和4S。另外并行地也实施了体重测定。

[0373] 此外,对上述任意荷瘤模型的施与例中,作为L2H2 hEva1-CAR,使用了将抗原识别部位(L2H2)与跨膜/细胞内结构域(包含4-1BB或CD79A/CD40的结构域)用上述短间隔物连接而成的。另外,表达该CAR的T细胞通过与上述同样的方法制作,在图3B中的第10天不进行利用珠的再刺激,将培养基替换成细胞保存液(Cell banker),在液氮中保存。将该冷冻CAR-T融解并培养一晚培养后,用珠进行再刺激,在珠刺激1周后,如上所述施与至荷瘤小鼠。

[0374] 如由图4N~4S所示的结果表明的那样,对胰癌、肺癌、胆管癌的任意都确认了L2H2hEva1-CAR-T的抗癌效果。另外,虽未图示,但在施与期间中的各小鼠的体重变化中无异常和显著的差异,没有确认对施与对象的坏影响。

[0375] <实施例3> 包含抗人Eva1人源化抗体的抗体药物缀合物

[0376] 使用上述的人源化B2E5-48抗体H2-L2(以下也称为B2E5-H2-L2),制造了抗体药物

缀合物(ADC)。

[0377] 具体地,首先,使用pcDNA3.4,制作了B2E5-H2表达用载体TPG986和B2E5-H2表达用载体TPG987。分别导入E.coli JM109使其表达,使用NucleoBond Xtra Midi Kit (MACHEREY-NAGEL)进行了纯化。

[0378] 接着,使用所述载体和ExpiFectamine CHO Transfection System,在ExpiCHO细胞中使B2E5-H2-L2暂时地表达。然后,将所得的培养上清通入蛋白A柱,使抗体吸附。在低pH使其溶出后中和,接着用Capto adhere纯化后,进行了超滤。此外,对于所得的抗体,确认了分子量、序列、对Eva1的结合能力。

[0379] 接着,如图5所示,使B2E5-H2-L2与连接物(SMCC)反应,对该抗体导入MCC基。然后,使该连接物与DM1反应。

[0380] 具体地,首先,将上述制备的B2E5-H2-L2的溶剂缓冲液交换成PBS6.5/EDTA。接下来在室温添加SMCC(1.84mg)的DMSO溶液(0.40mL;相对于抗体一分子约相当于5.1当量),将反应溶液的抗体浓度调整为20mg/mL并使用管/旋转器在室温使其反应2小时。将该反应液纯化,获得了被SMCC诱导化的抗体。

[0381] 接着,在室温在上述溶液中添加PBS6.5/EDTA(2.56mL)和N2-脱乙酰-N2-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(4.67mg;DM1、Journal of Medicinal Chemistry、2006年、49卷、14号、4392项)的DMA(二甲基甲酰胺)溶液(0.93mL;相对于被SMCC诱导化恶抗体一分子约相当于5.8当量),将反应溶液的抗体浓度调整为10mg/mL并使用管/旋转器在室温反应16.5小时,纯化,获得含有目的化合物的溶液。接下来,纯化除去多余的成分之后,以9.0g/L的浓度在6%蔗糖、0.02%Tween20、10mM琥珀酸钠溶液(pH5.0)中保存。

[0382] 然后,确认了ADC的分子量、序列、对Eva1的结合能力、药物抗体比(DAR)等。此外,DAR通过测定作为DM1的吸收峰的252nm的吸光度和作为抗体的吸收峰的280nm的吸光度,加权各自对彼此吸收峰的影响而建立联立方程式进行计算,由此求出抗体和DM1的浓度,确定分子数的比,从而求得。结果上述制作的ADC中的DAR为3.8。

[0383] <实施例4>抗体药物缀合物的抗肿瘤活性

[0384] 如下评价了上述制备的包含抗人Eva1人源化抗体的ADC(B2E5-ADC)的抗肿瘤活性。

[0385] (B2E5-ADC对神经胶质瘤的细胞毒实验)

[0386] 96孔盘中接种每1孔1000个细胞的人神经胶质瘤干细胞(hGIC)。接着,将进行了2倍连续稀释的B2E5-H2-L2、B2E5-ADC或Kadcyla(恩美曲妥珠单抗)以100 μ l/孔添加。在37 $^{\circ}$ C的CO₂孵育箱内培养3天。然后,在各孔中添加5 μ l的MTT(5mg/ml、和光纯药),在37 $^{\circ}$ C的CO₂孵育箱内培养2小时。将培养液丢弃后,添加90 μ l的DMSO,将细胞溶解后使用ベンチマーク(Bio-Rad)测定了吸光度(570nm)。将所得的结果示于图6A。

[0387] 此外,作为阳性对照(100%),使用抗体不存在下的孔中的测定值。另外,作为阴性对照(0%),使用在抗体不存在下的孔中添加5 μ l的1%TritonX100而得的测定值。

[0388] (B2E5-ADC对胰腺的细胞毒实验)

[0389] 将通过胰蛋白酶处理而从培养皿回收的胰腺细胞株(BxPC3)稀释成 5×10^4 个细胞/mL,在96孔板的各孔中分别接种100 μ L,在CO₂孵育箱内(37 $^{\circ}$ C、CO₂浓度5%)培养了24小时。用抽吸器吸引培养基(RPMI-1640、Wako187-02705、10%FBS),将新鲜的培养基在各孔中

各加入900 μ L。将DM1和B2E5-ADC分别用PBS稀释(DM1:3800nM $\sim$ 0.93nM、B2E5-ADC:1000nM $\sim$ 0.24nM),将各10 μ L加入到BxPC3中。在CO₂孵育箱内培养48小时后,使用Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST(同仁化学),测定从死细胞释放的LDH。将所得的结果示于图6B。

[0390] (B2E5-ADC对胃癌的细胞毒实验)

[0391] 对用10cm细胞培养皿培养而得的胃癌细胞株(MKN74),加入含有酚红的2.5g/L-胰蛋白酶/1mmol/L-EDTA溶液[ナカラ イテスク32777-15]1mL,在37 $^{\circ}$ C放置5分钟后,加入培养基3mL,回收得到15mL离心沉降管中。以1200rpm离心5分钟,用抽吸器吸引培养基,加入新的培养基再悬浮。使用锥虫蓝数出每1 μ L的细胞数,调整成30000个细胞/mL。

[0392] 在96孔培养板中各接种100 μ L(3000个细胞/孔),在CO₂孵育箱内培养了24小时。用抽吸器吸引培养基,将新鲜的培养基在各孔中加入各90 μ L。使用PBS将B2E5-H2-L2和B2E5-ADC分别连续稀释(6.5 μ g/mL $\sim$),在各孔中加入各10 μ L,在CO₂孵育箱内培养72小时。然后,将活细胞测定试剂[ナカラ イテスク07553-44]在各孔加入10 μ L,在CO₂孵育箱内培养3小时后,测定450nm的吸光度。基于测定结果用ImageJ进行拟合制成图,评价了B2E5-ADC对胃癌的细胞毒性。将所得的结果示于图6C。

[0393] (B2E5-ADC单次施与小鼠毒性试验)

[0394] 对9 $\sim$ 10周龄的C57BL/6雄小鼠(日本クレア)或10周龄的雄裸小鼠(SKN/slcr、日本SLC)通过尾静脉或腰椎穿刺单次施与B2E5-ADC(100、33、10 μ g)(对于各施与浓度准备3个个体),经时地测定了体重。将所得的结果示于图7。

[0395] (使用了B2E5-ADC的实验结果的总结)

[0396] 如图6A所示,B2E5-ADC浓度依赖性地对hGIC显示伤害活性。另一方面,B2E5-H2-L2和Kadcyla未确认对hGIC的伤害活性。进而,如图6B和6C所示,不仅对所述神经胶质瘤,对胰腺癌和胃癌也确认了B2E5-ADC的抗肿瘤活性。

[0397] 另一方面,进行对B2E5-ADC的小鼠的毒性试验的结果如图7所示,未观察到B2E5-ADC施与对小鼠的影响,确认了施与后1个月以上的生存。

[0398] 产业可利用可能性

[0399] 如以上说明那样,根据本发明,通过以人Eva1作为目标,能够实现高的抗肿瘤活性。于是,本发明作为用于治疗或预防癌的药剂等有用。

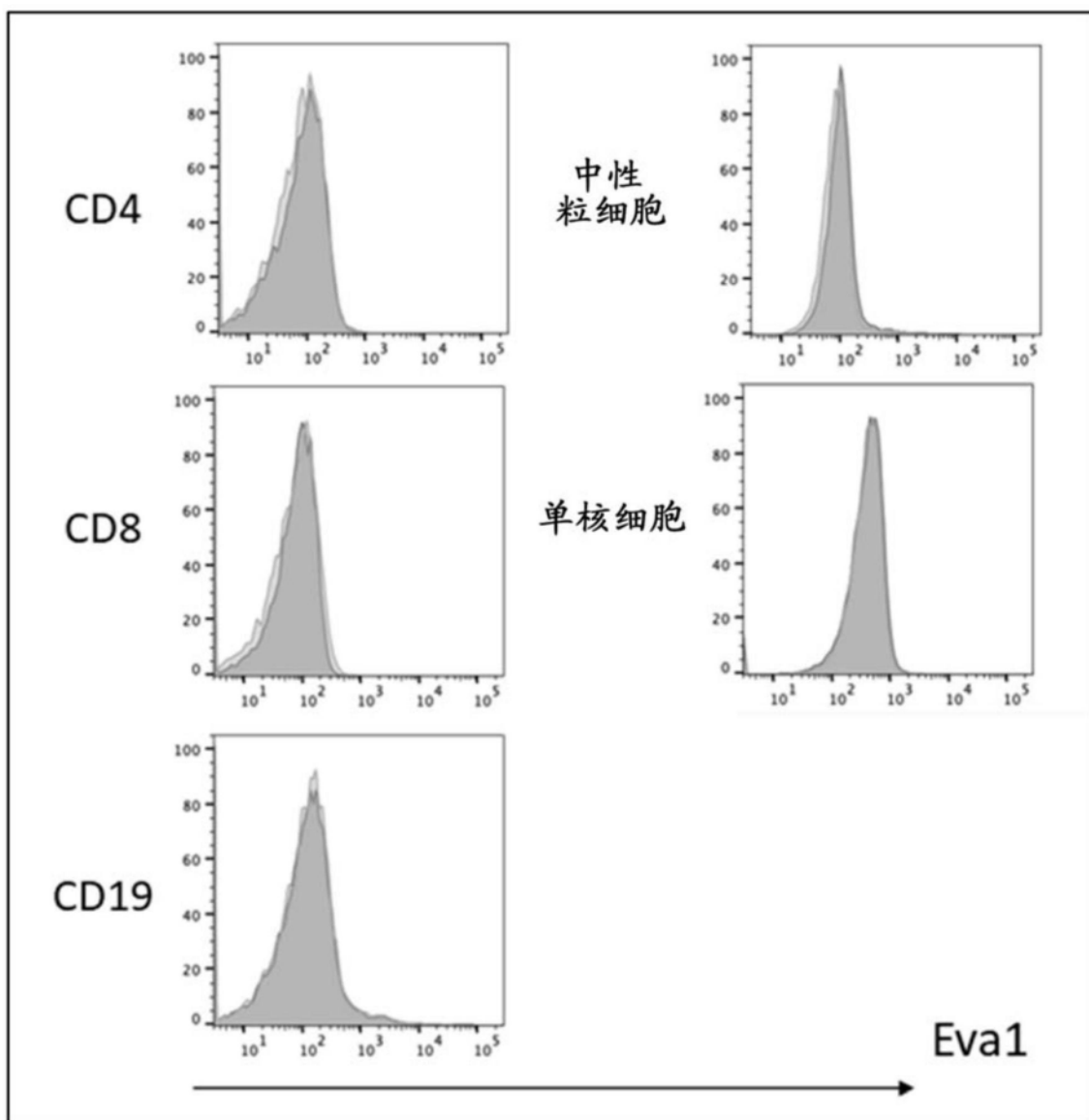


图1

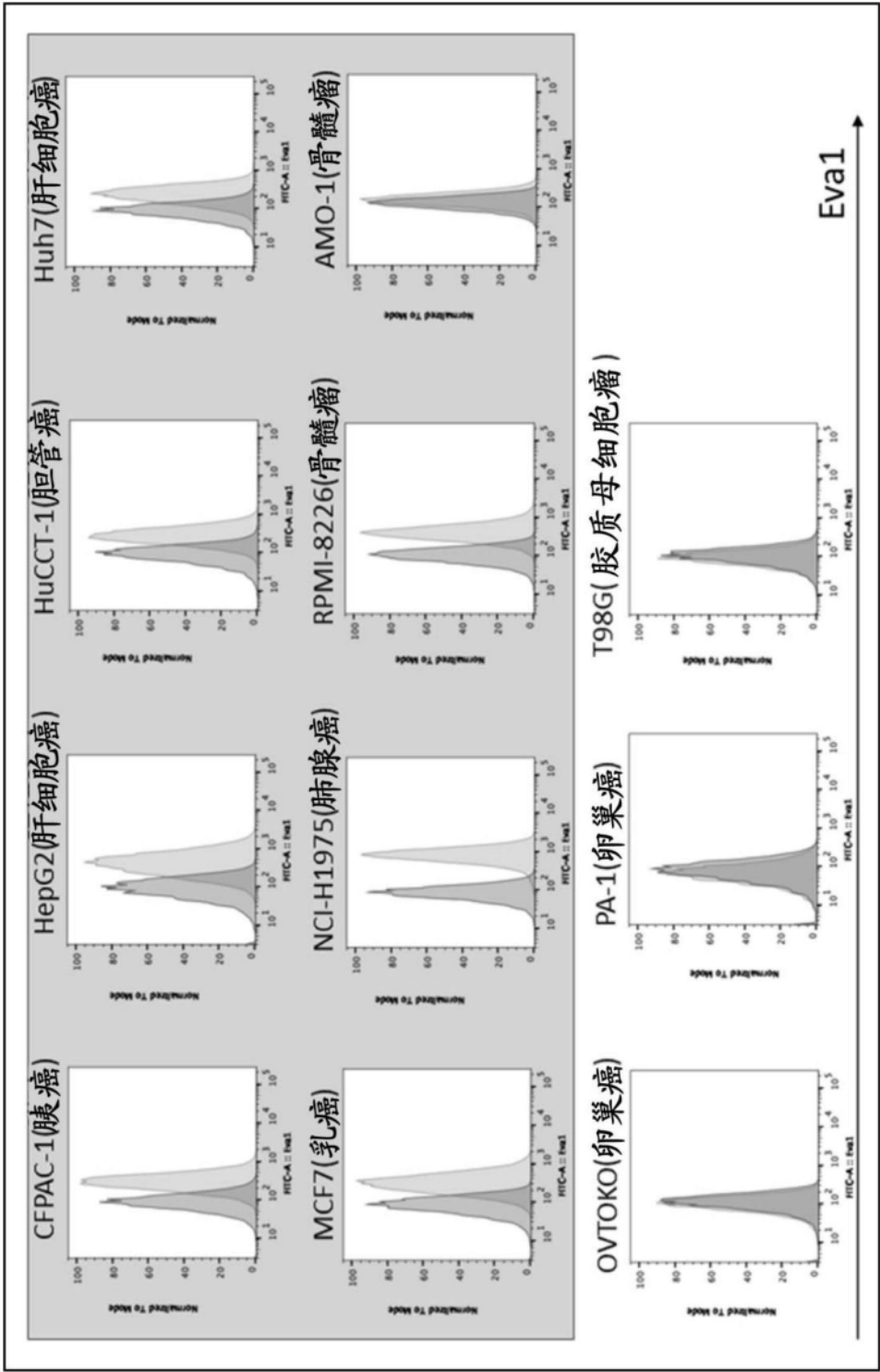


图2A

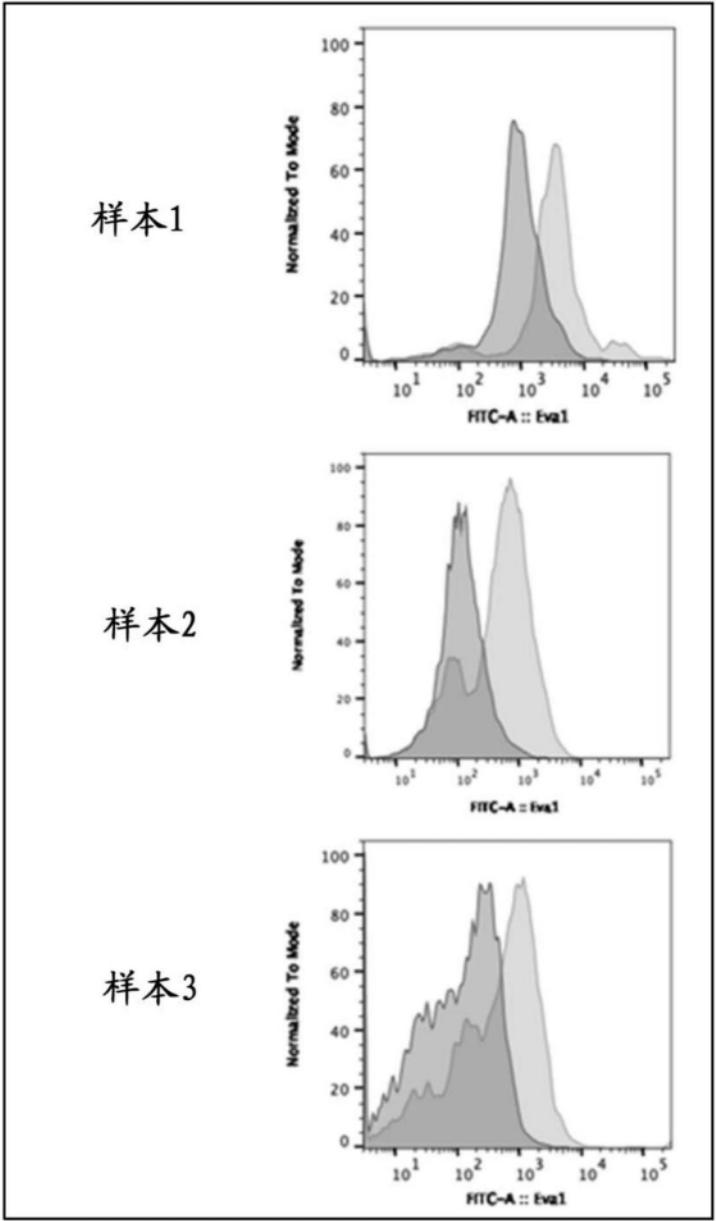


图2B

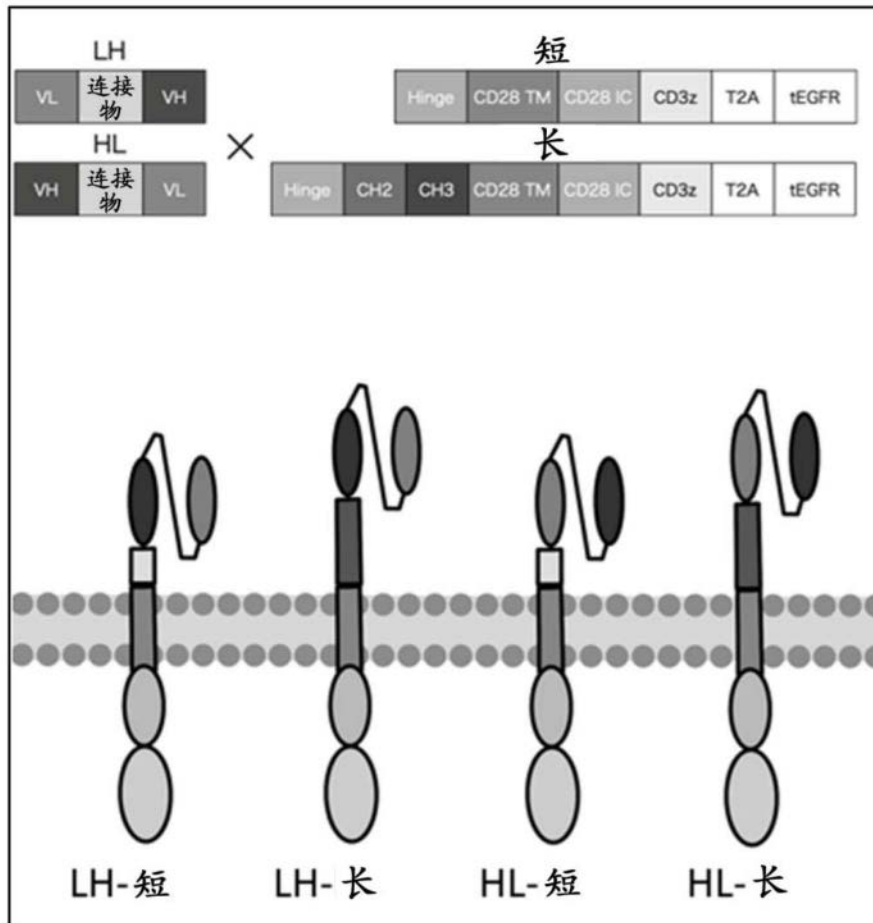


图3A

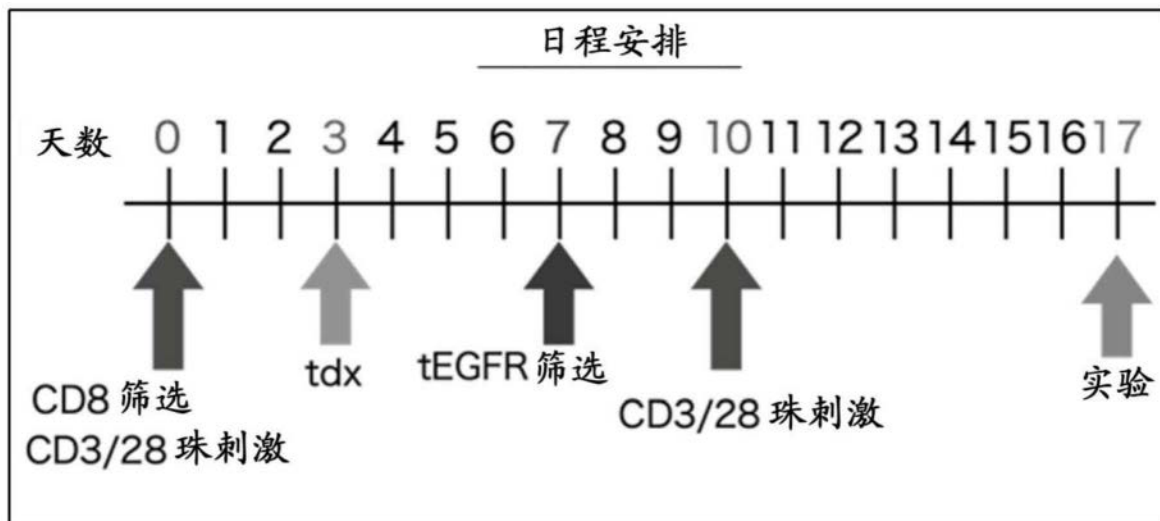


图3B

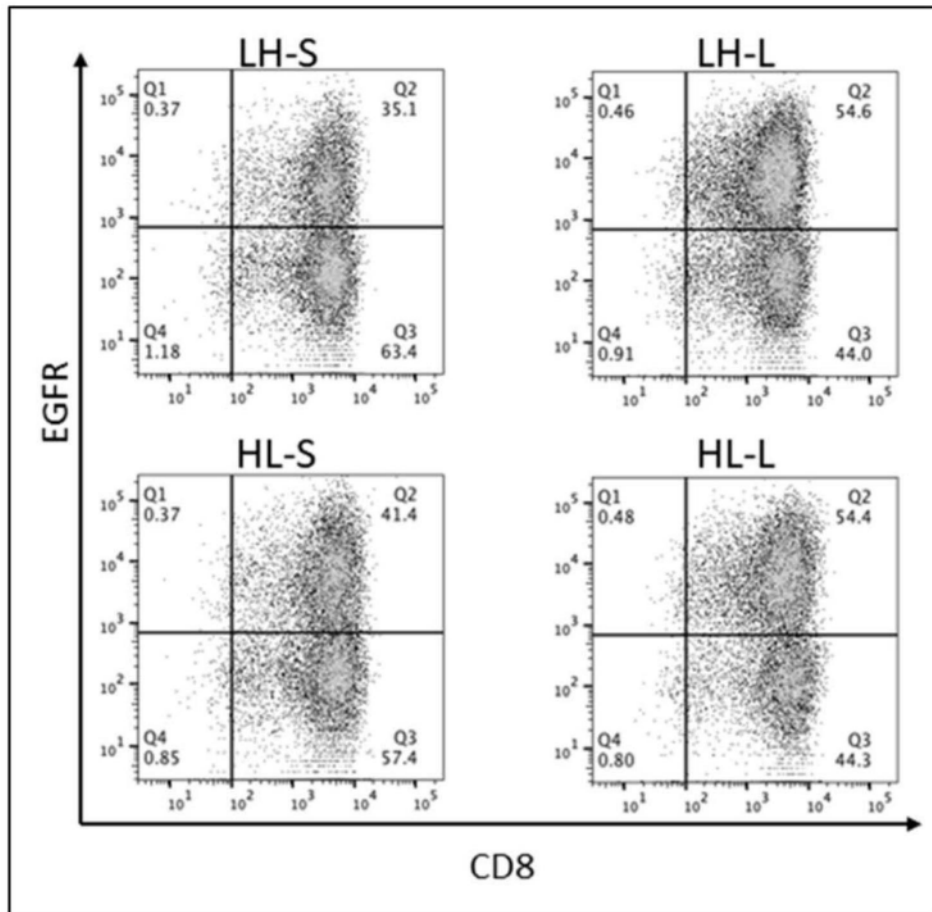


图3C

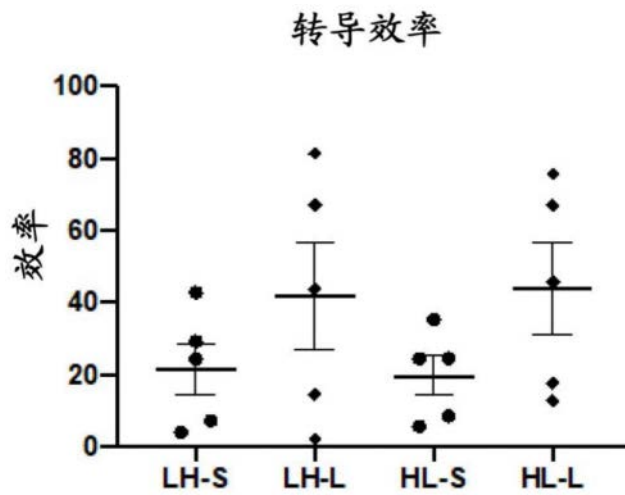


图3D

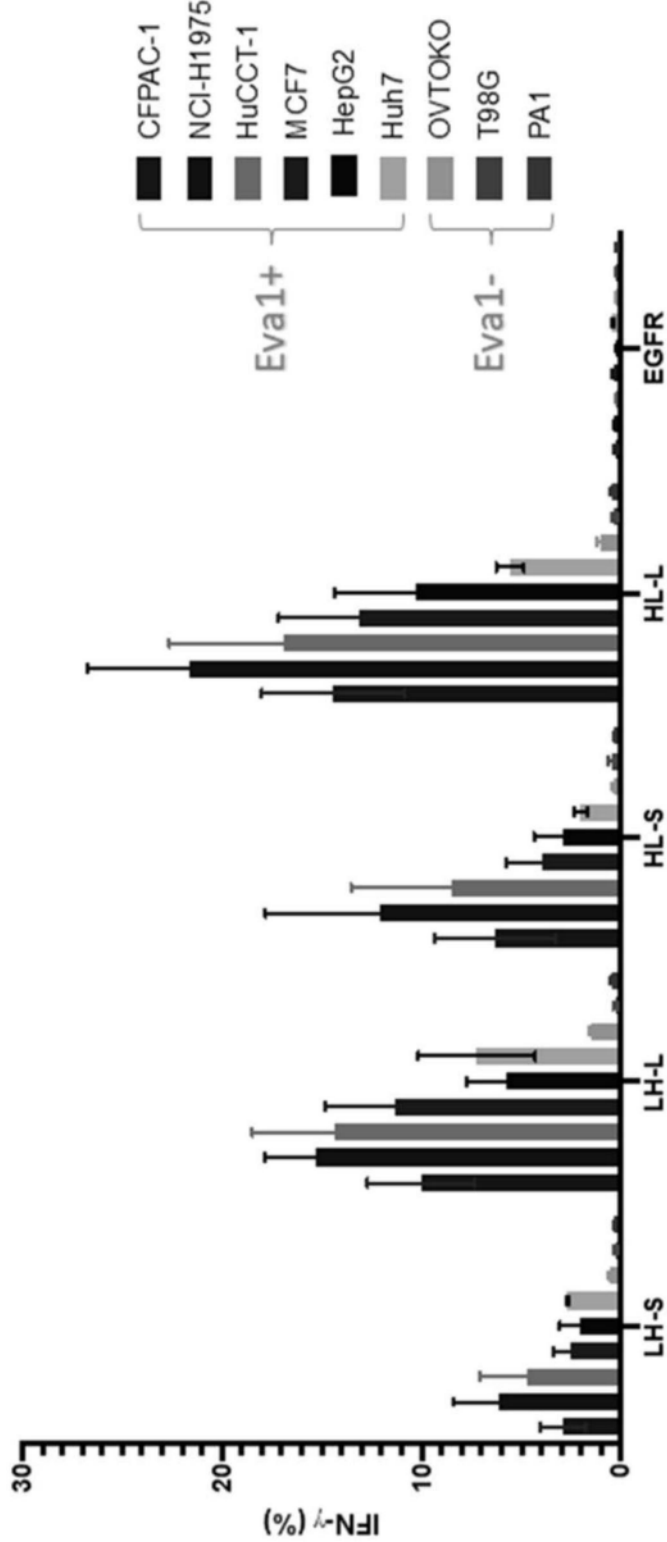


图3E

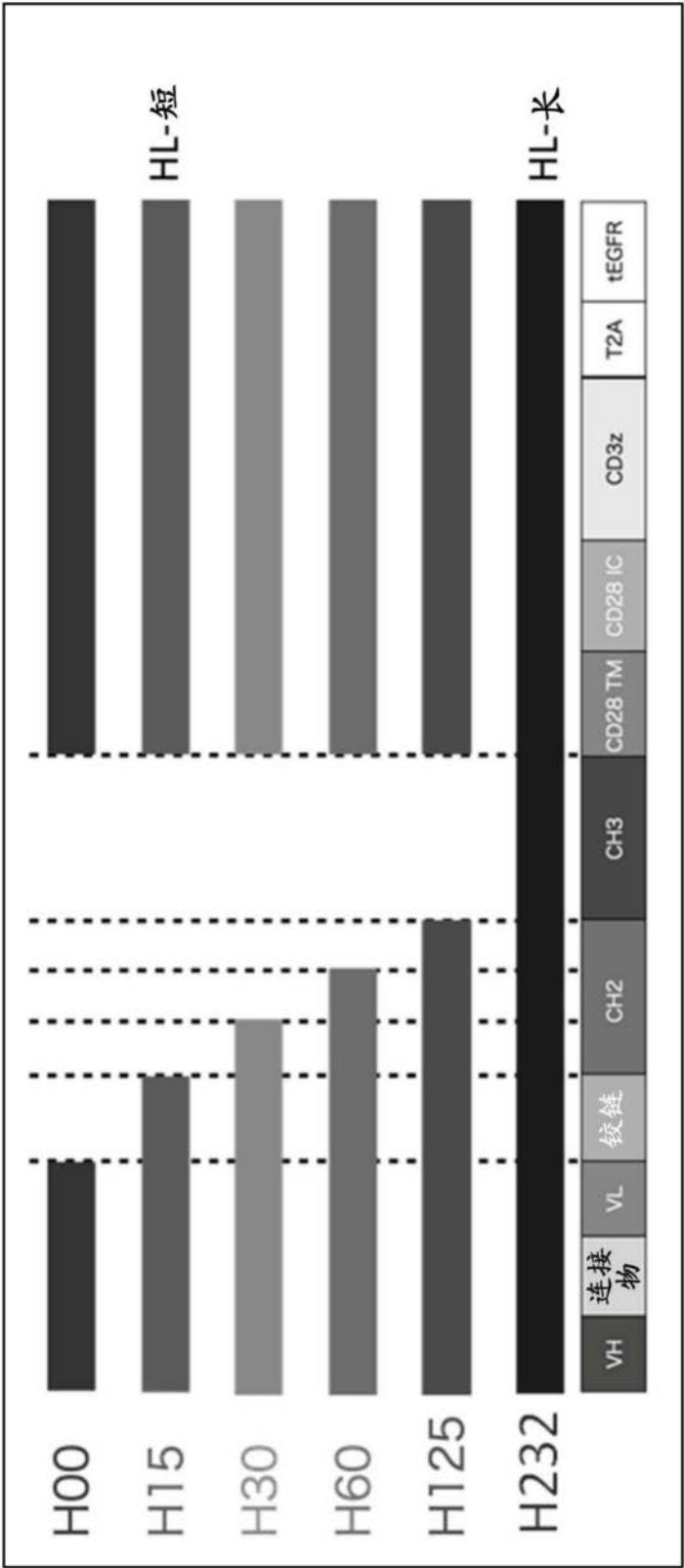


图3F

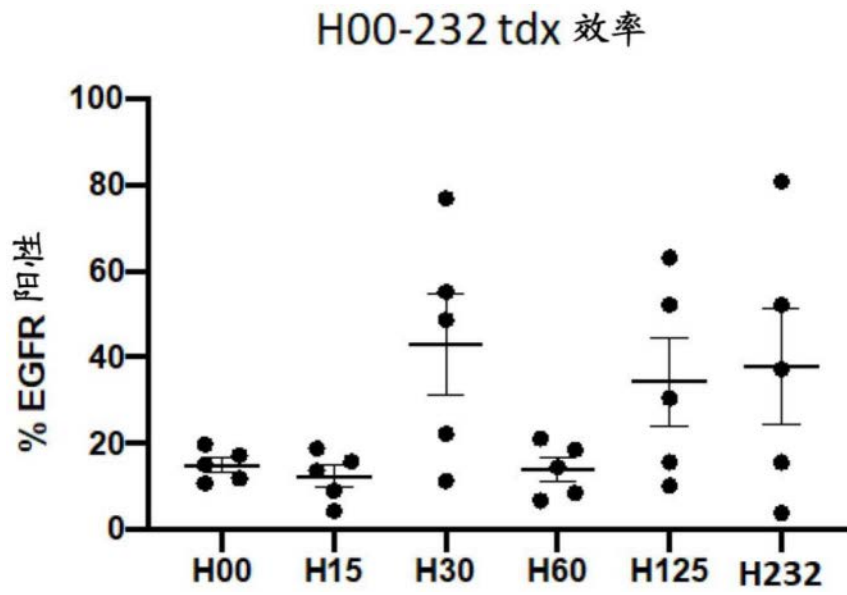


图3G

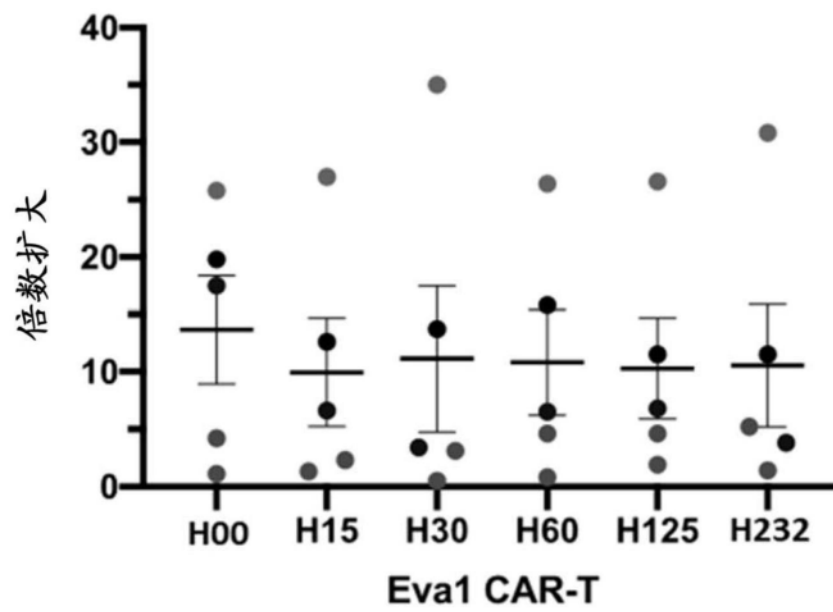


图3H

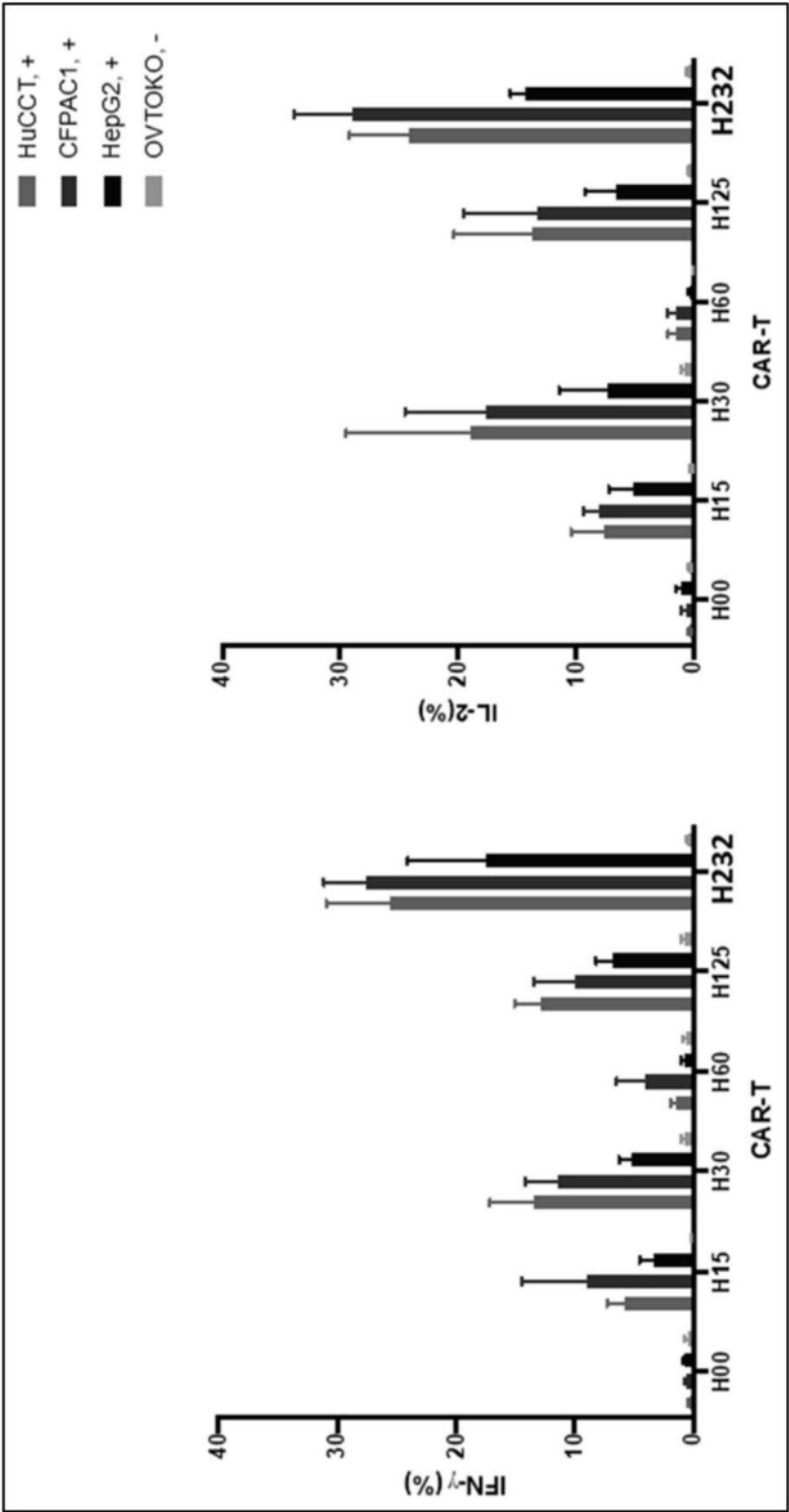


图3I

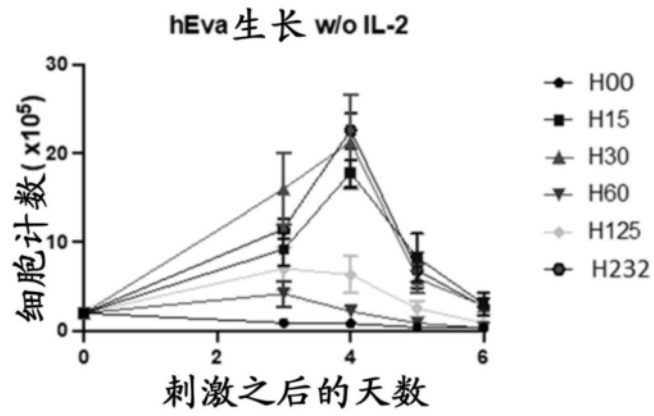


图3J

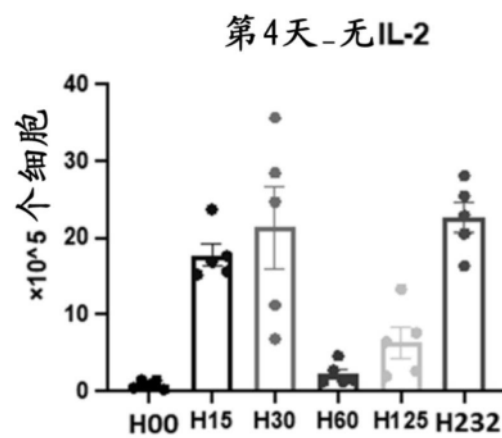


图3K

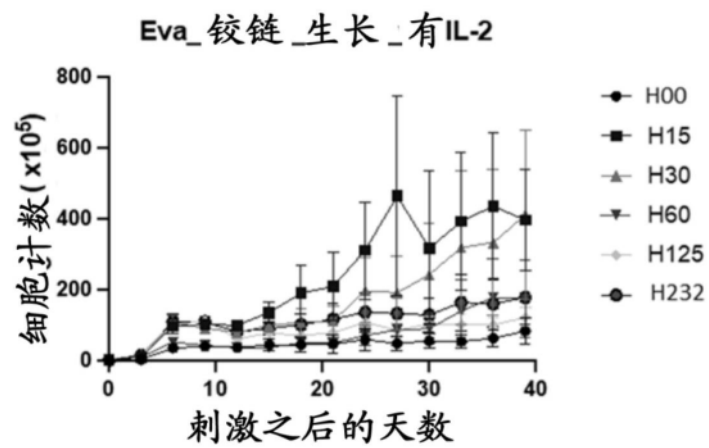


图3L

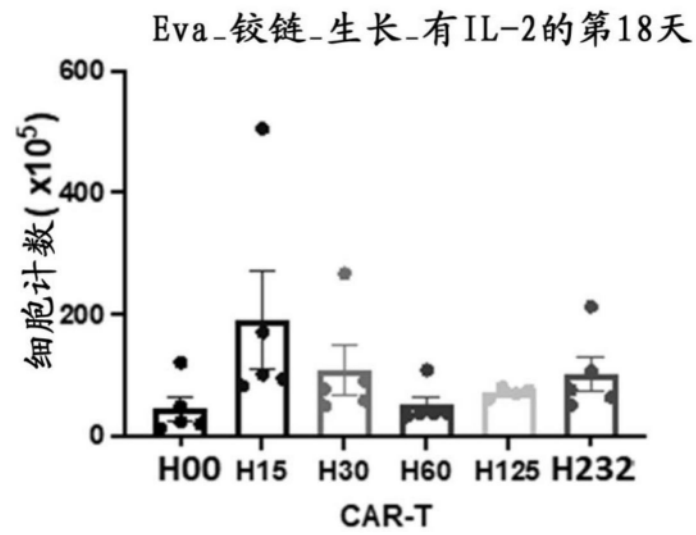


图3M

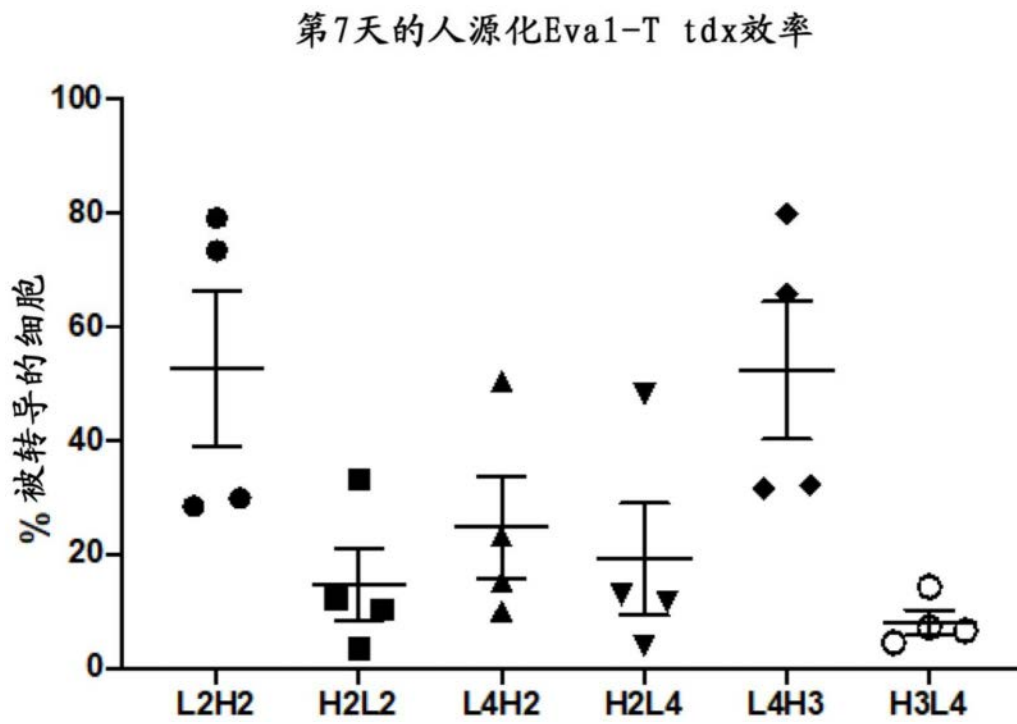


图4A

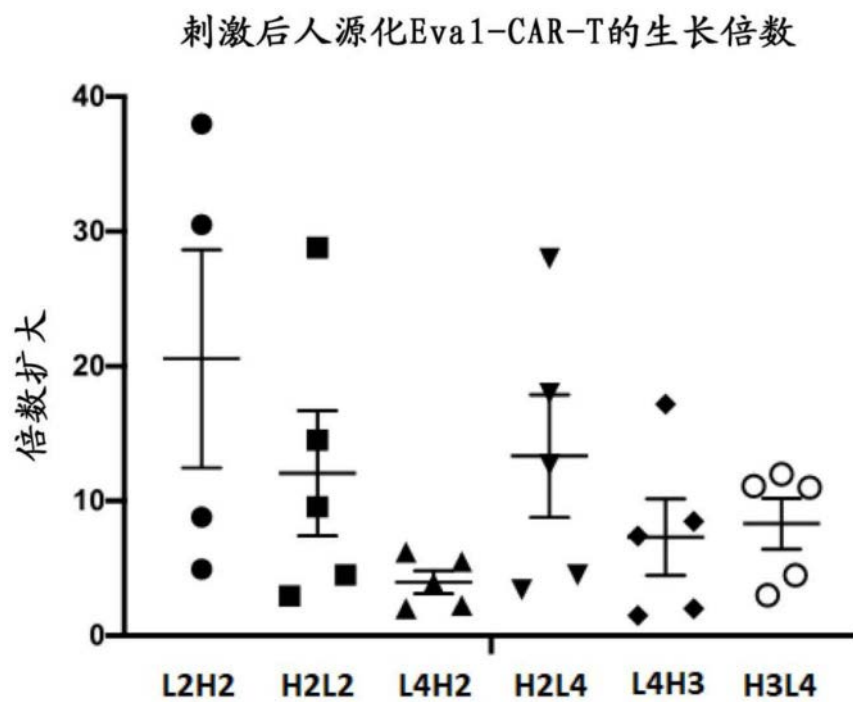


图4B

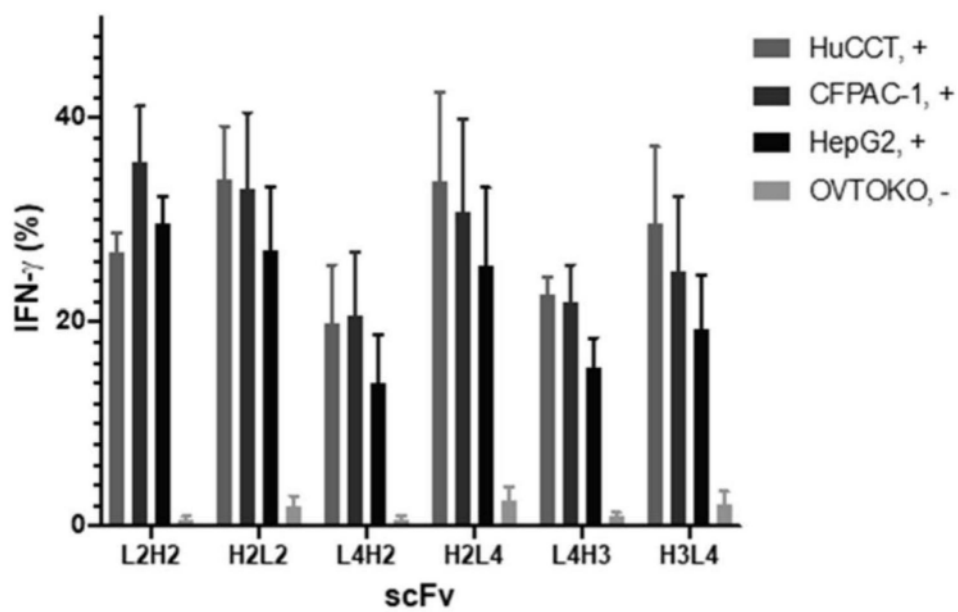


图4C

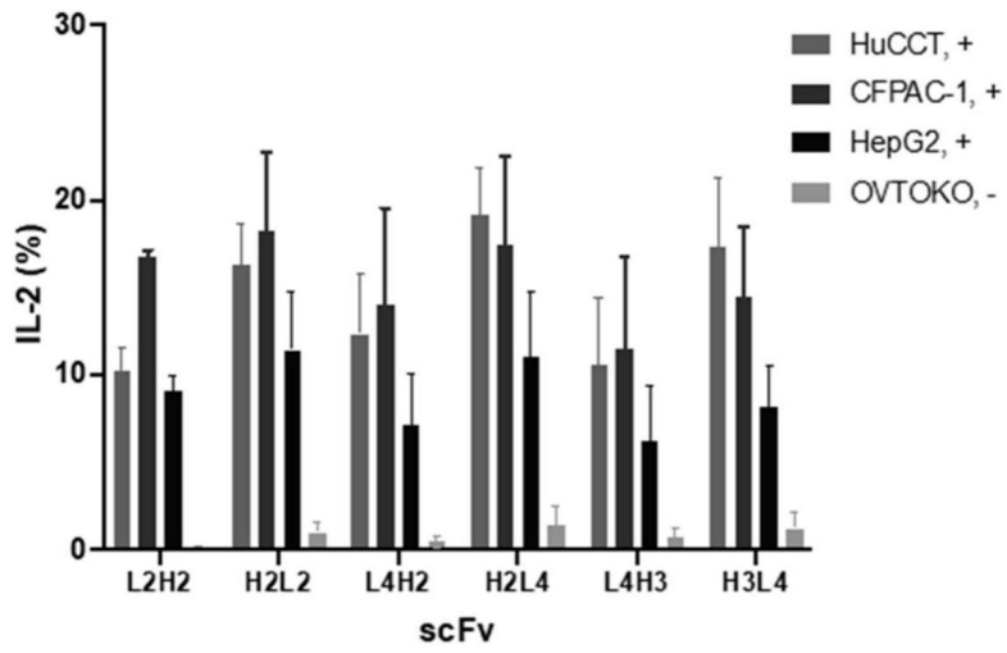


图4D

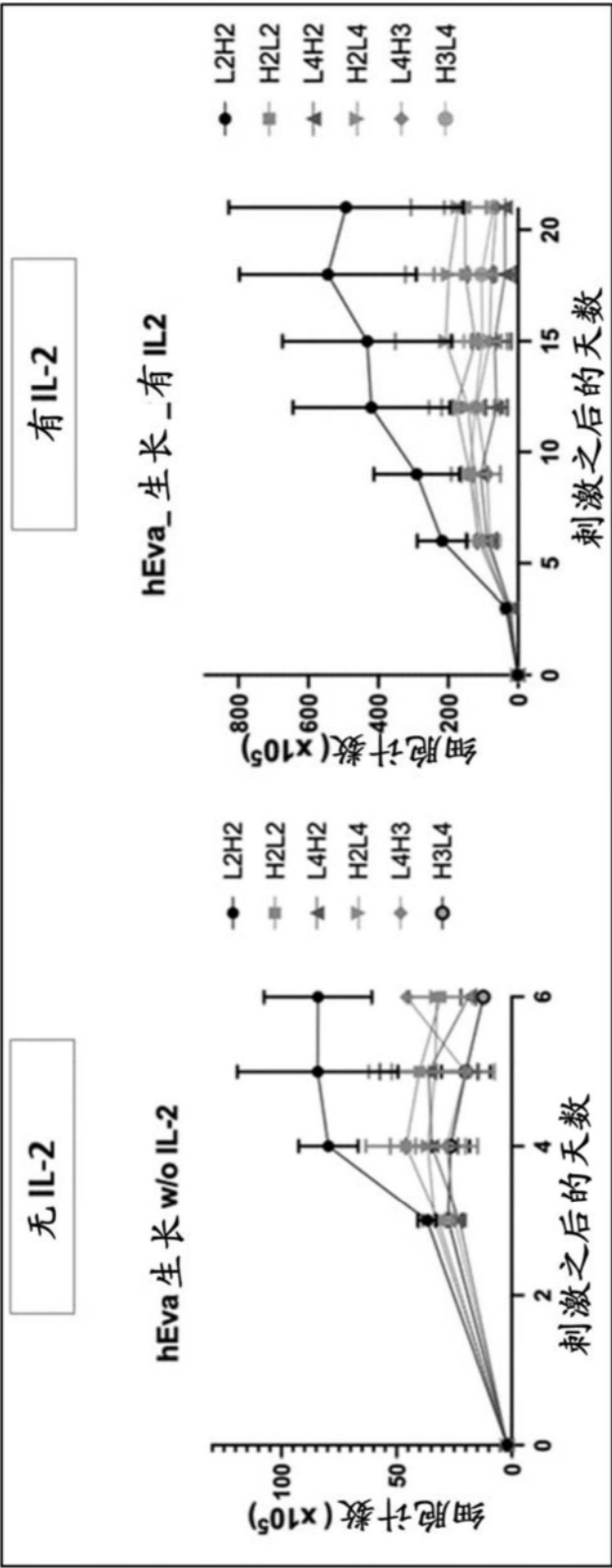


图4E

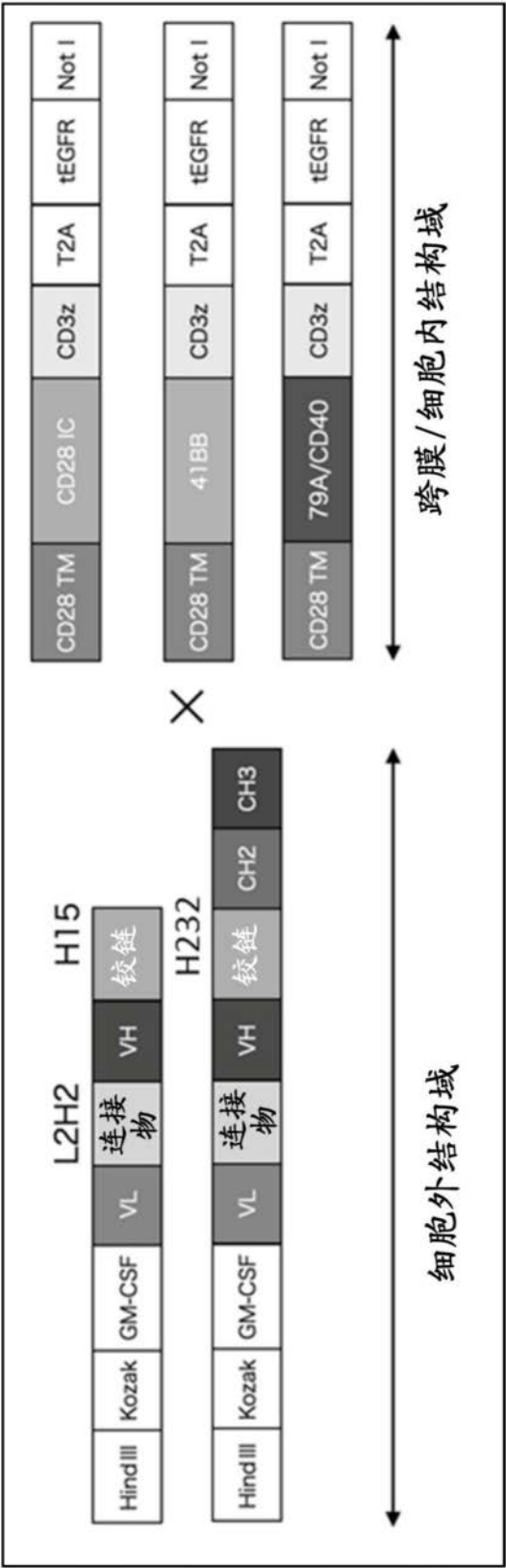


图4F

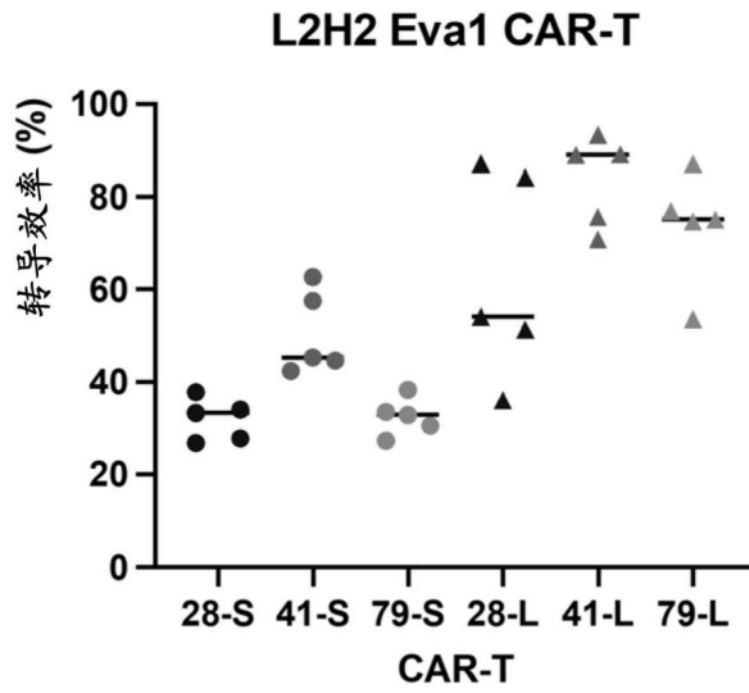


图4G

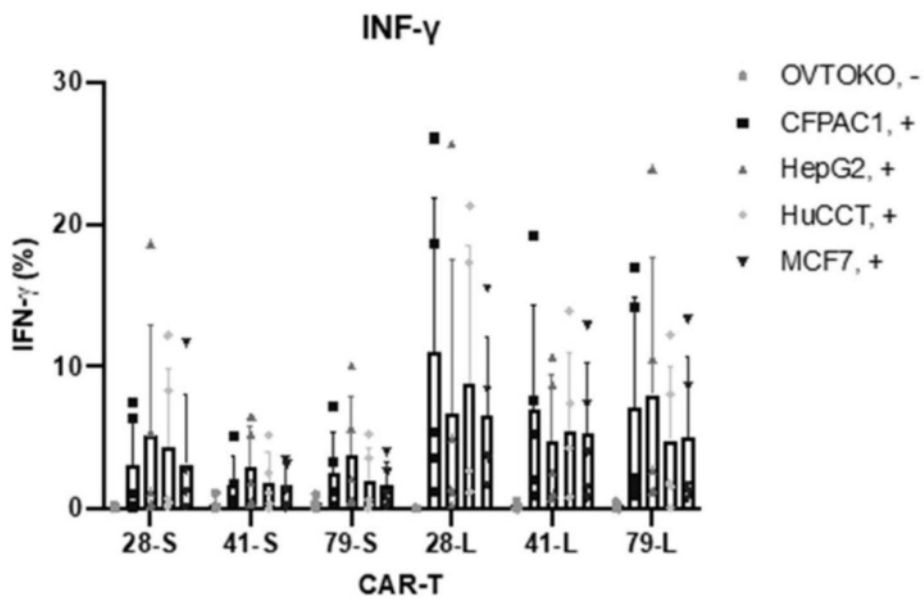


图4H

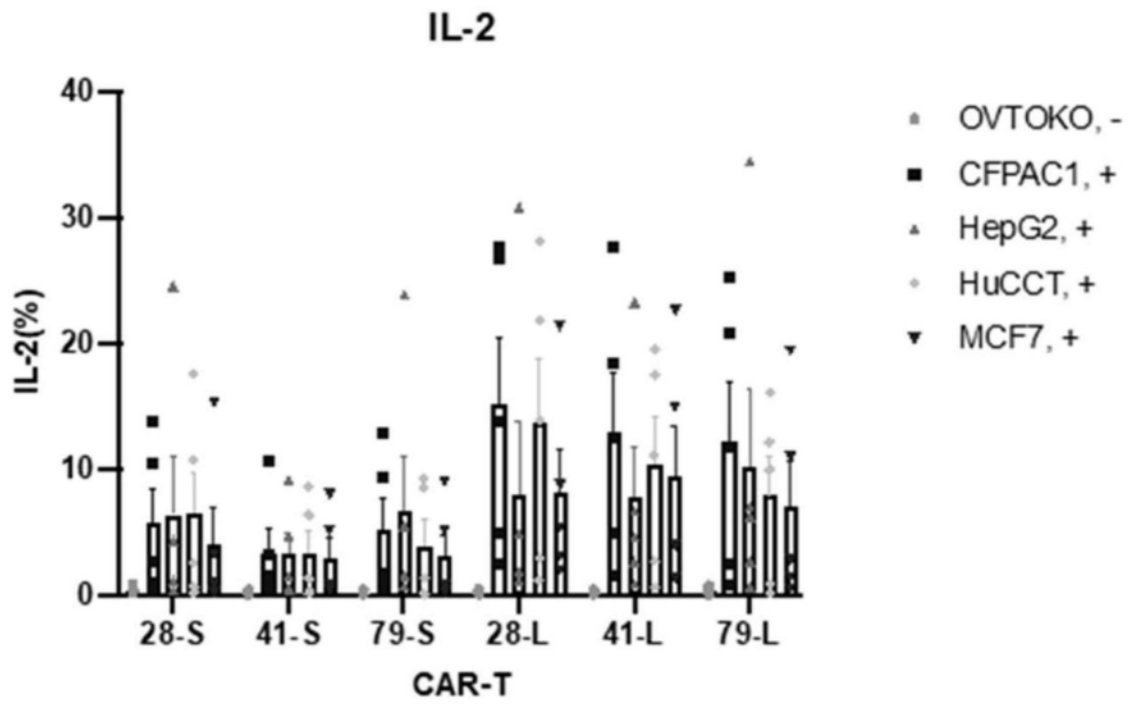


图4I

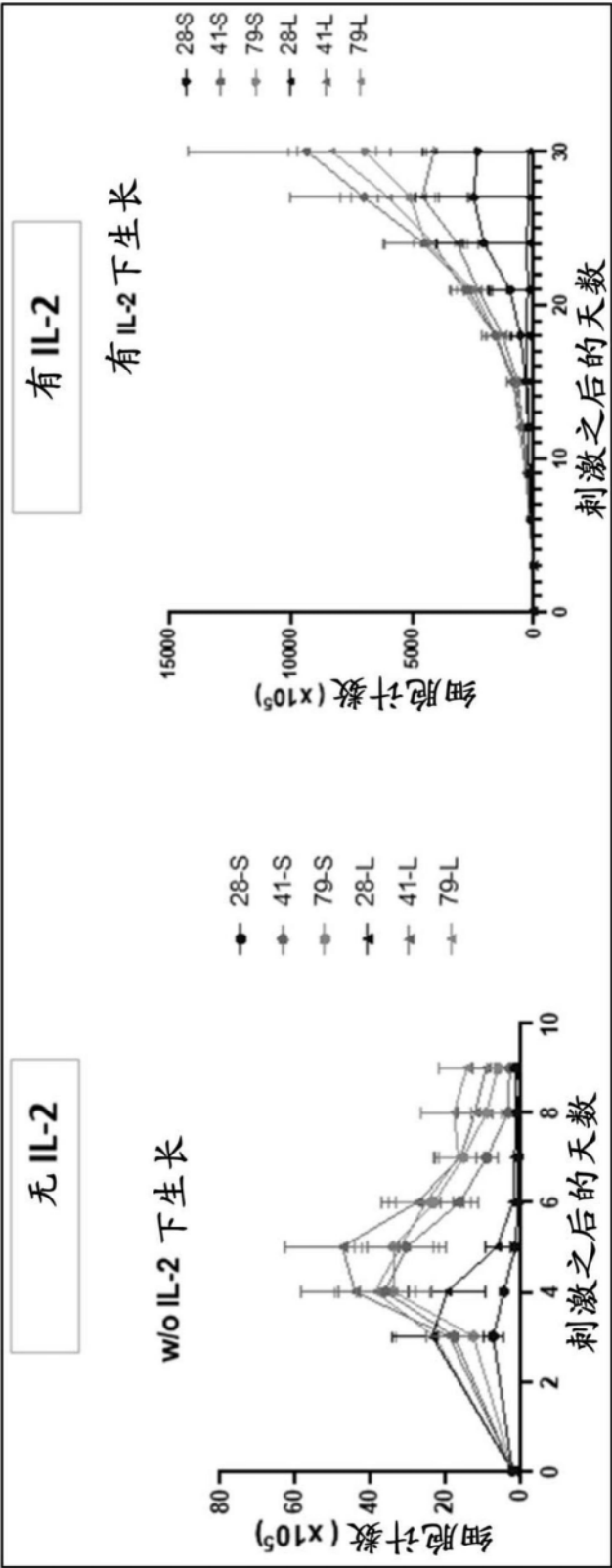


图4J

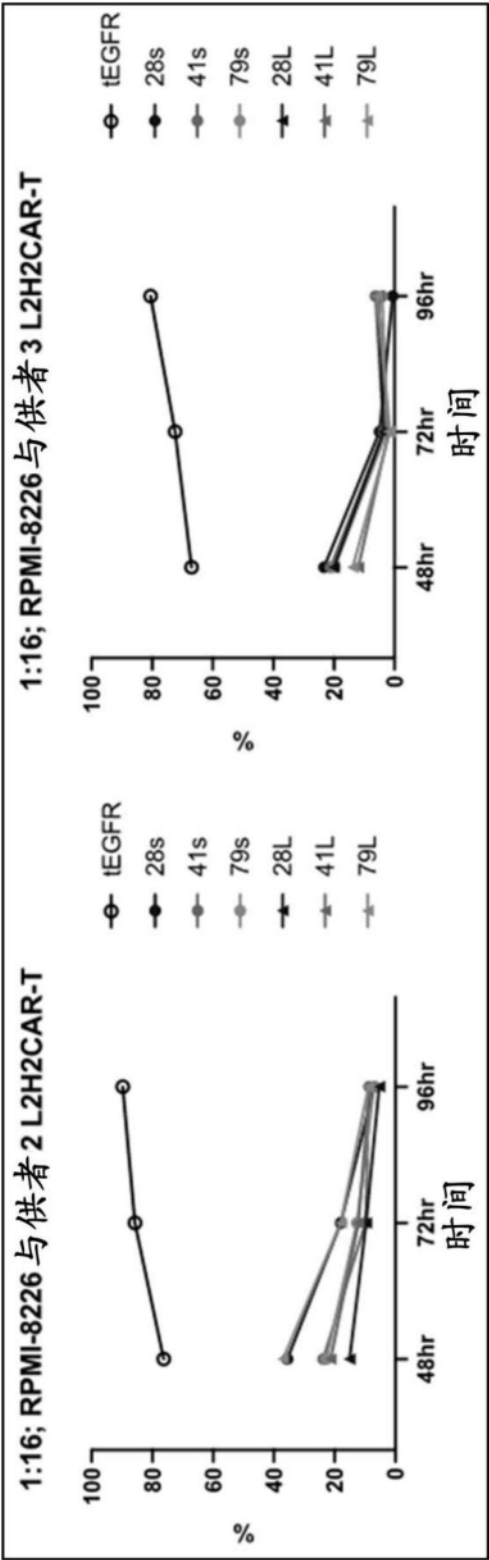


图4K

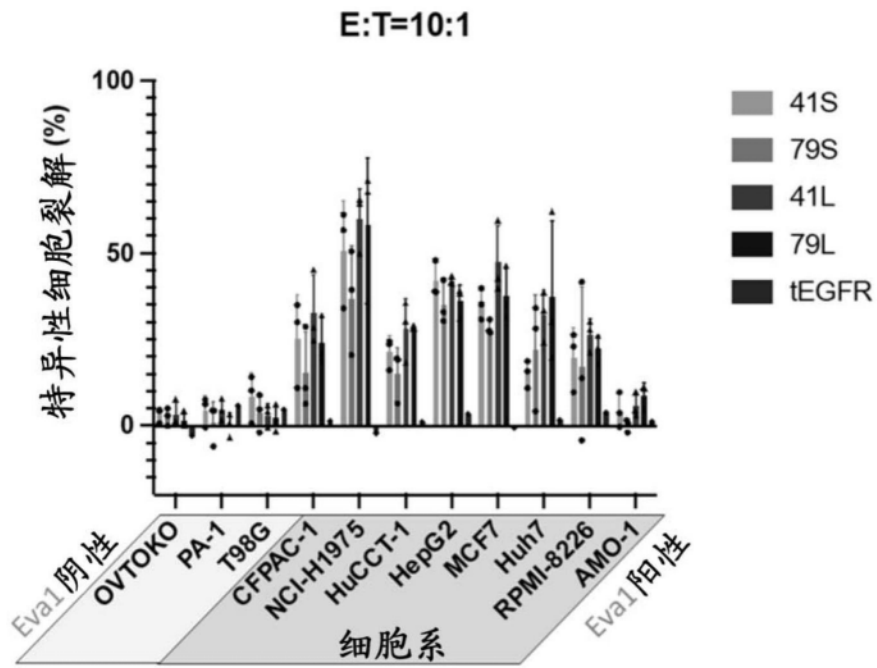


图4L

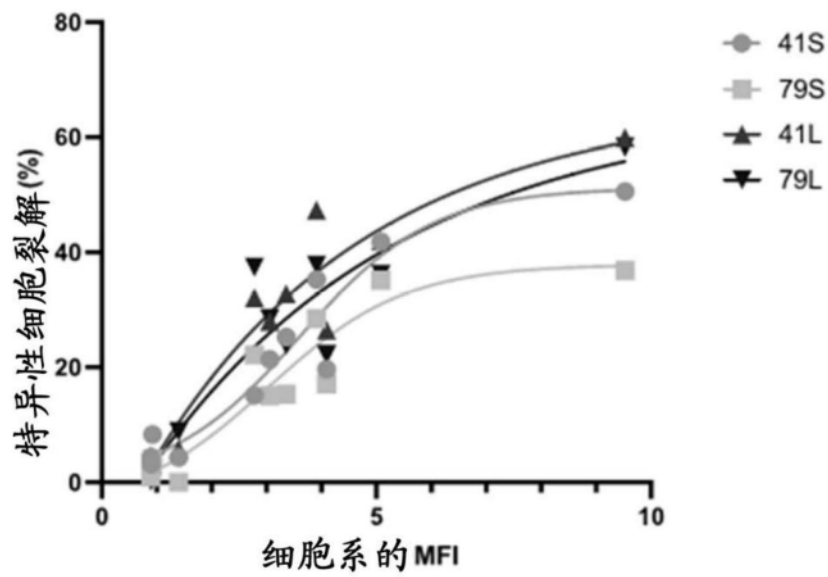


图4M

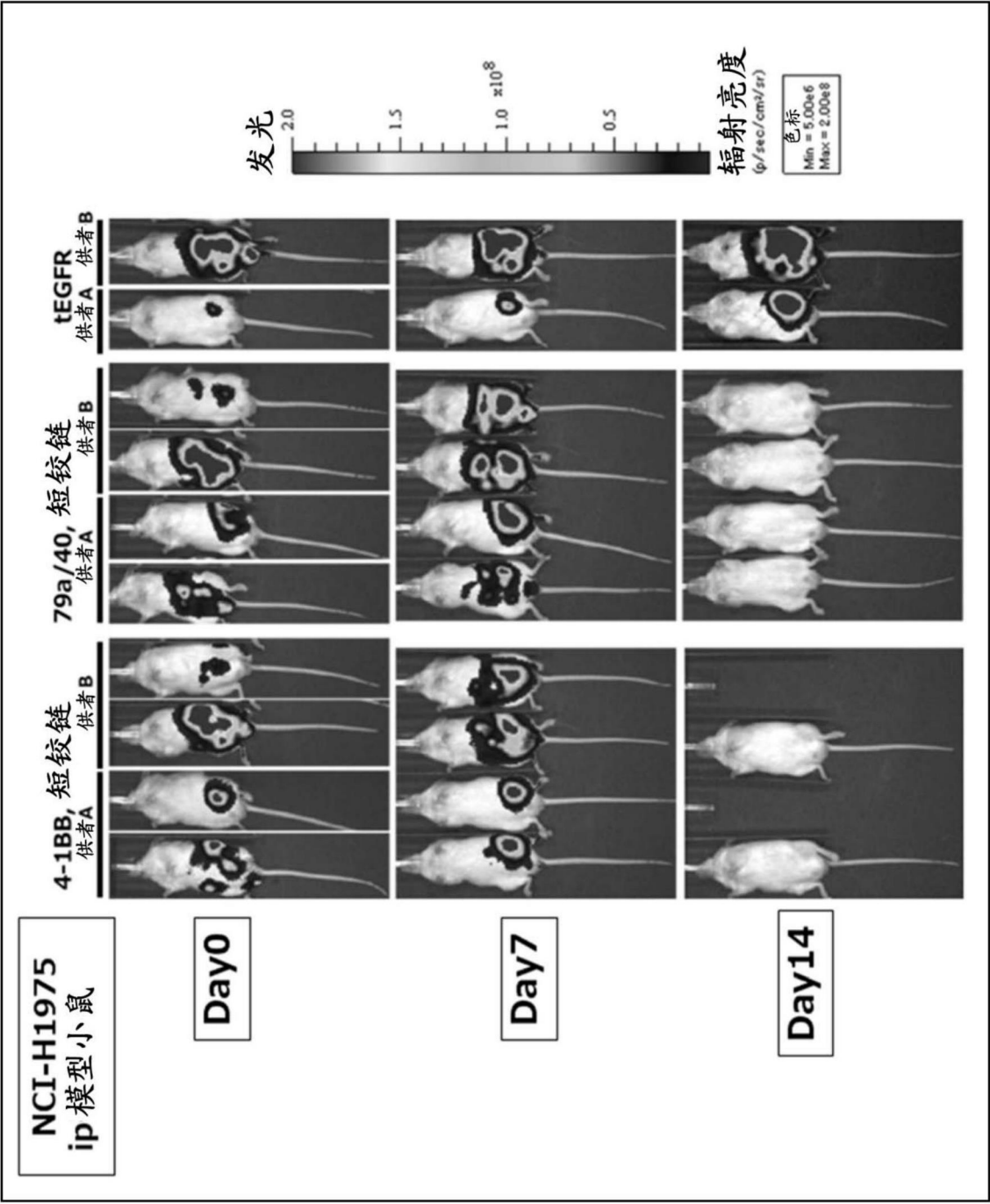


图4N

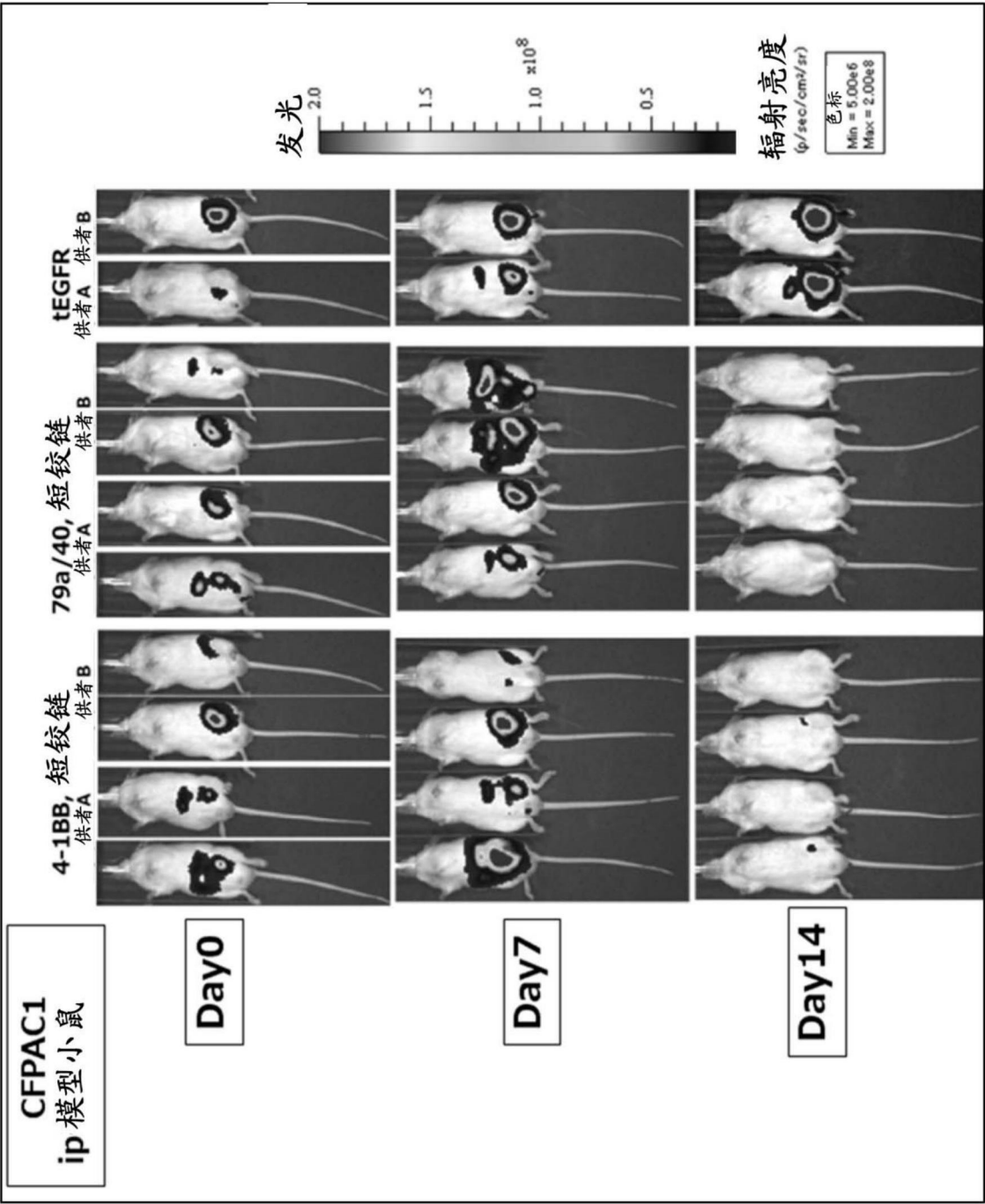


图40

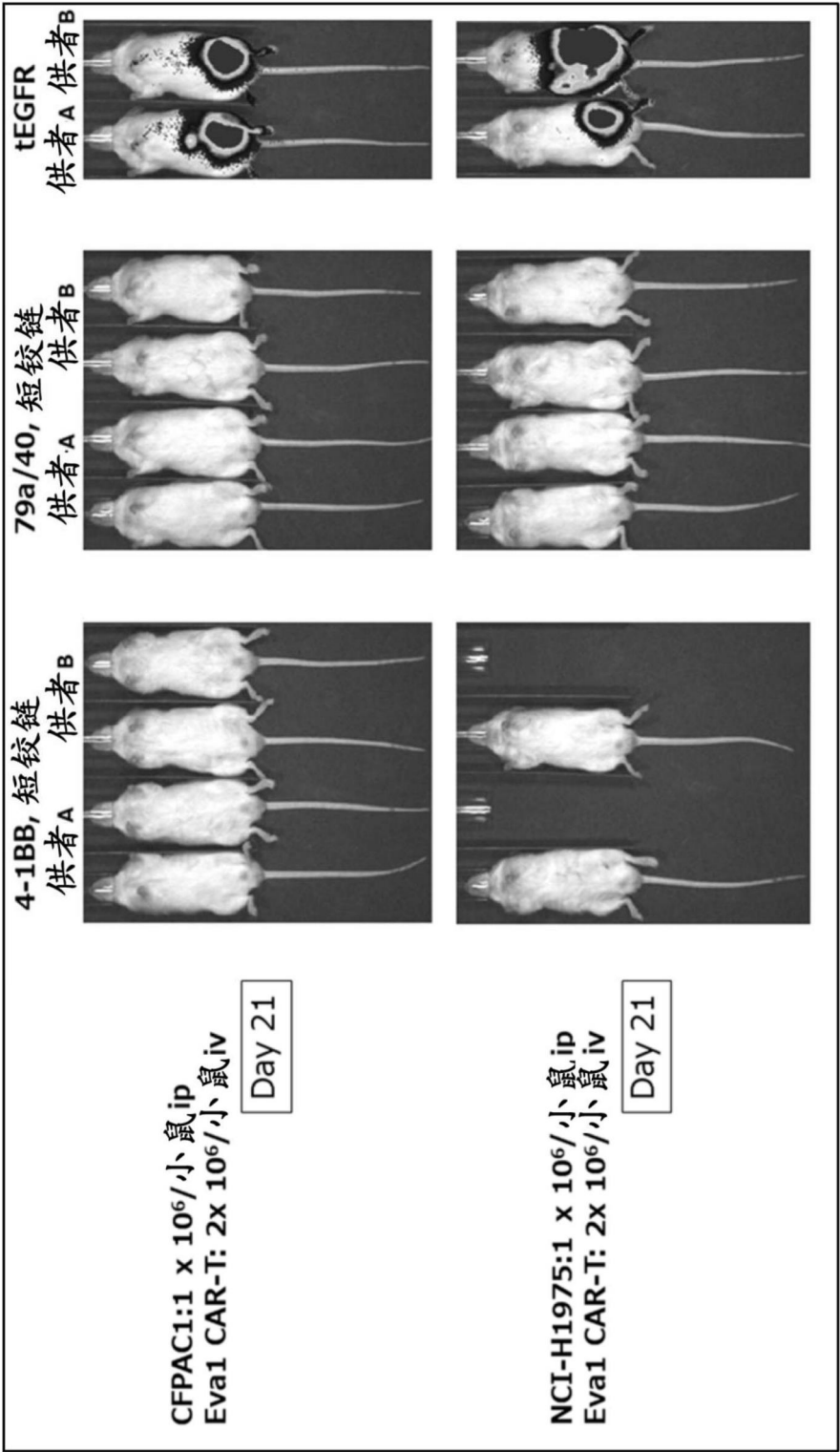


图4P

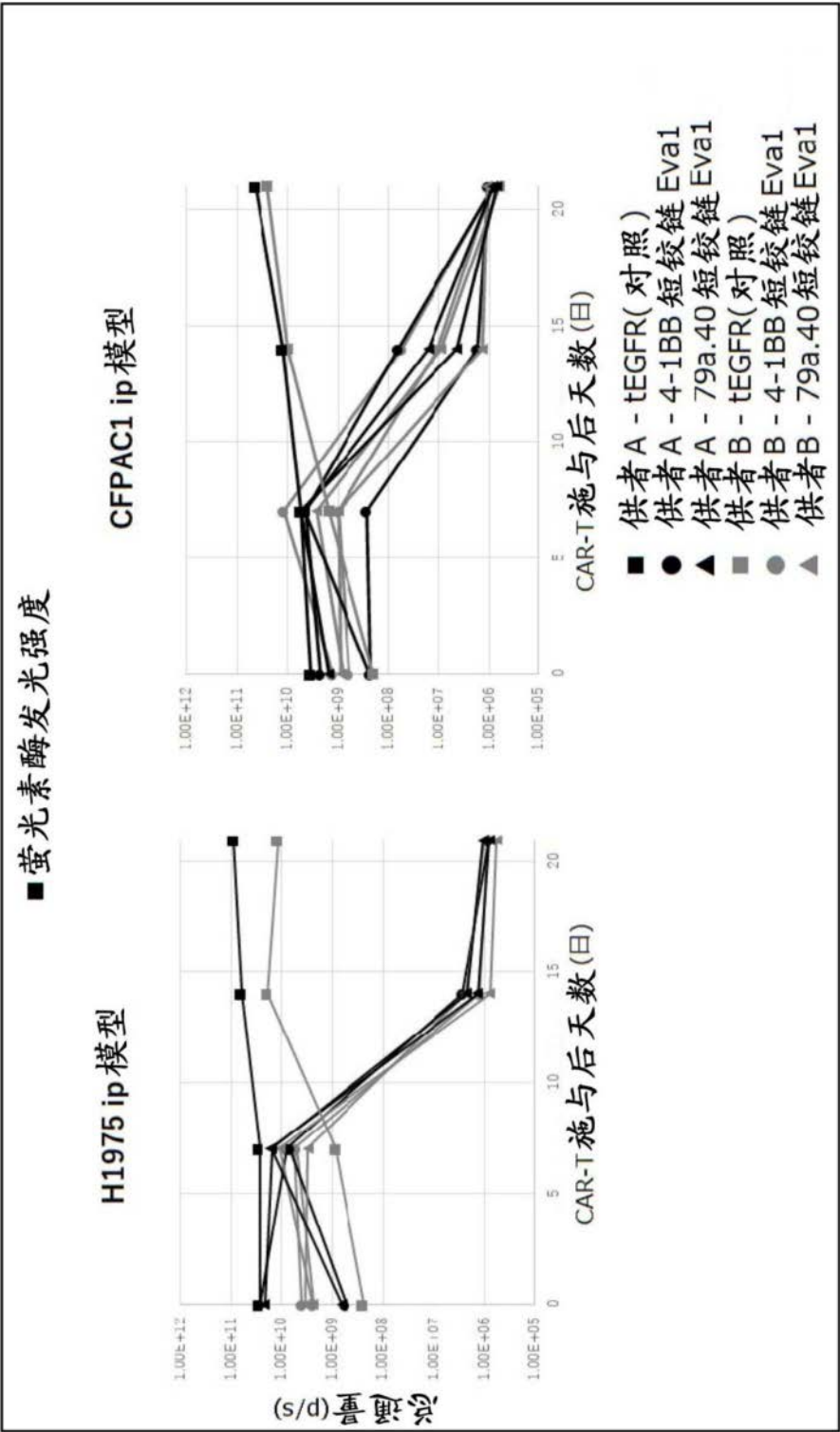


图4Q

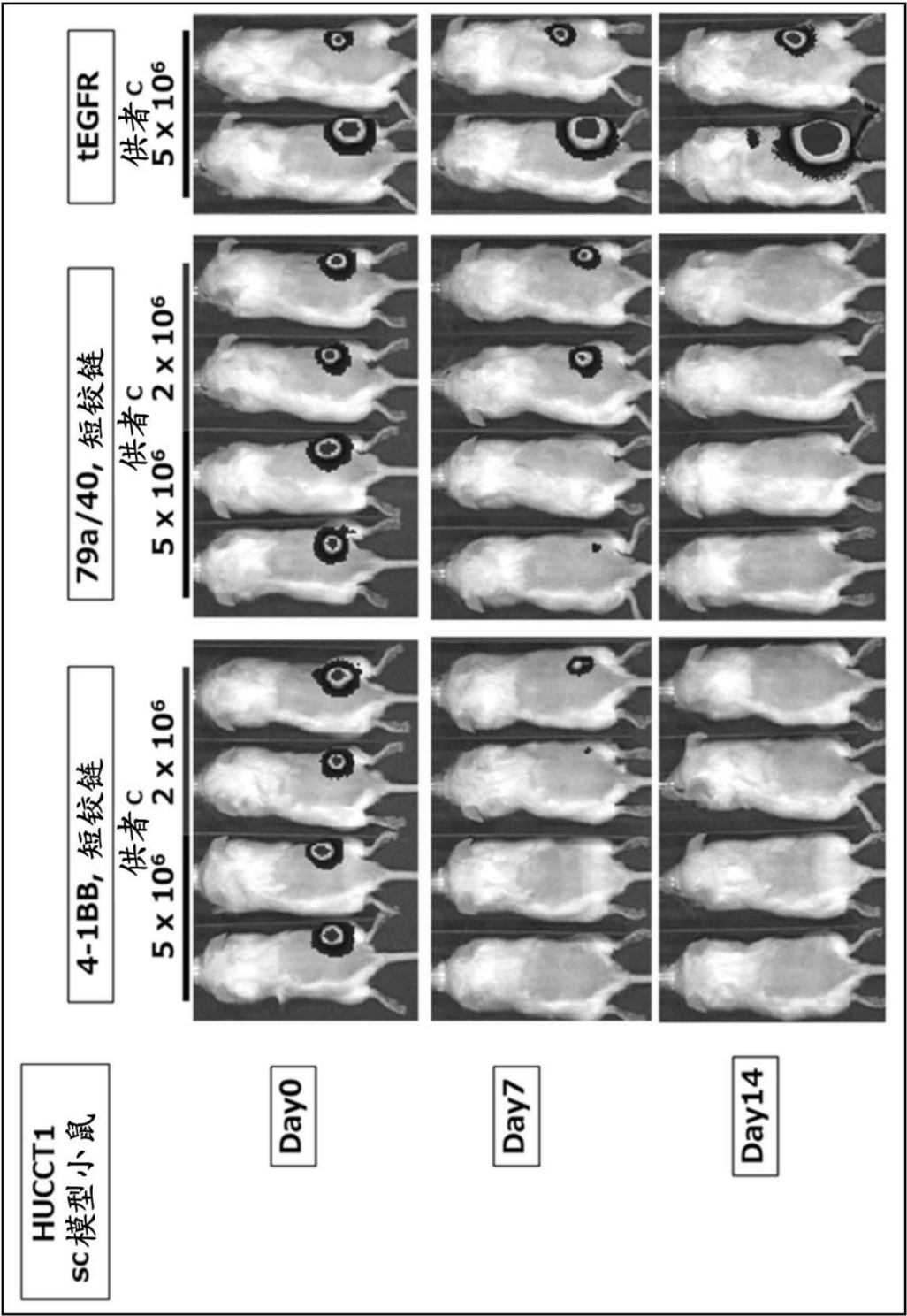


图4R

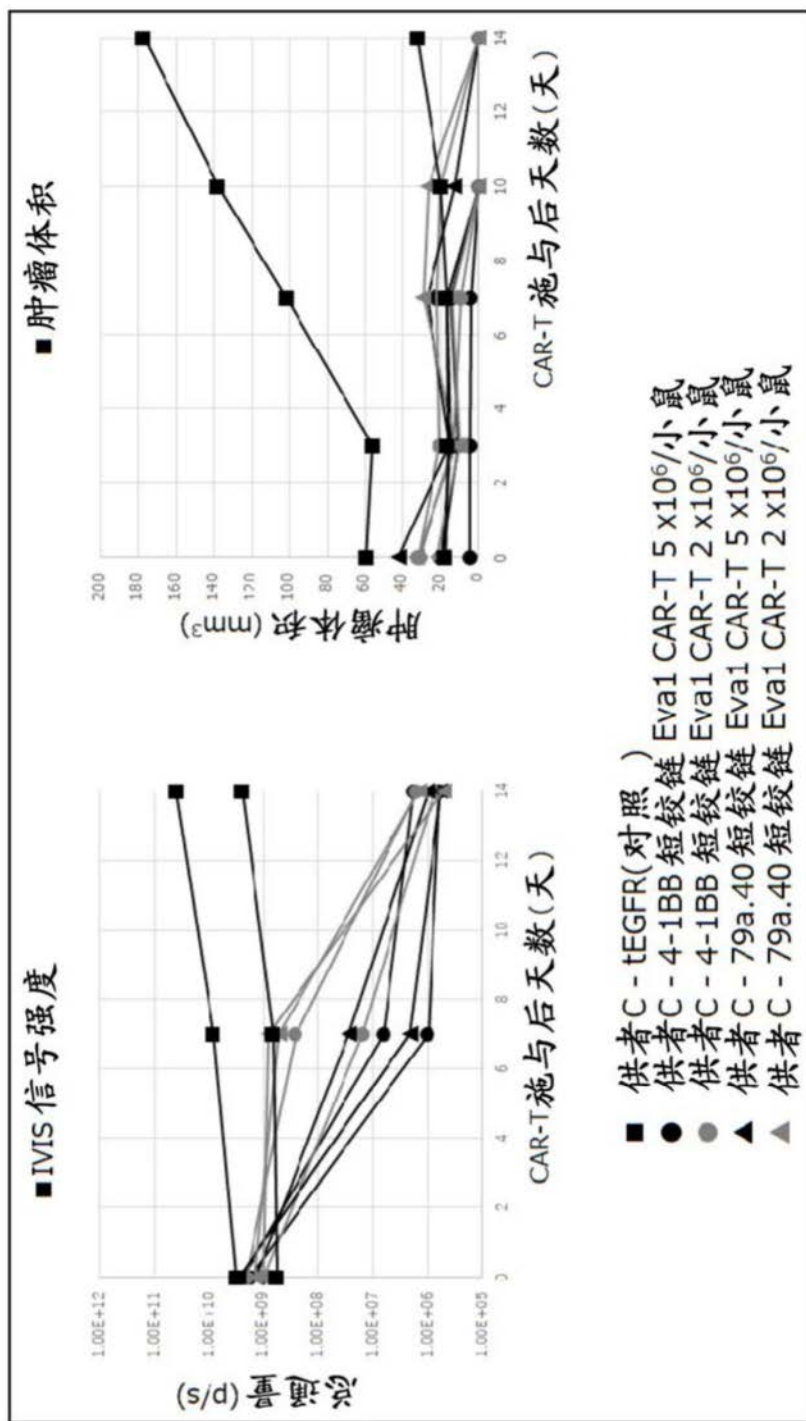


图4S

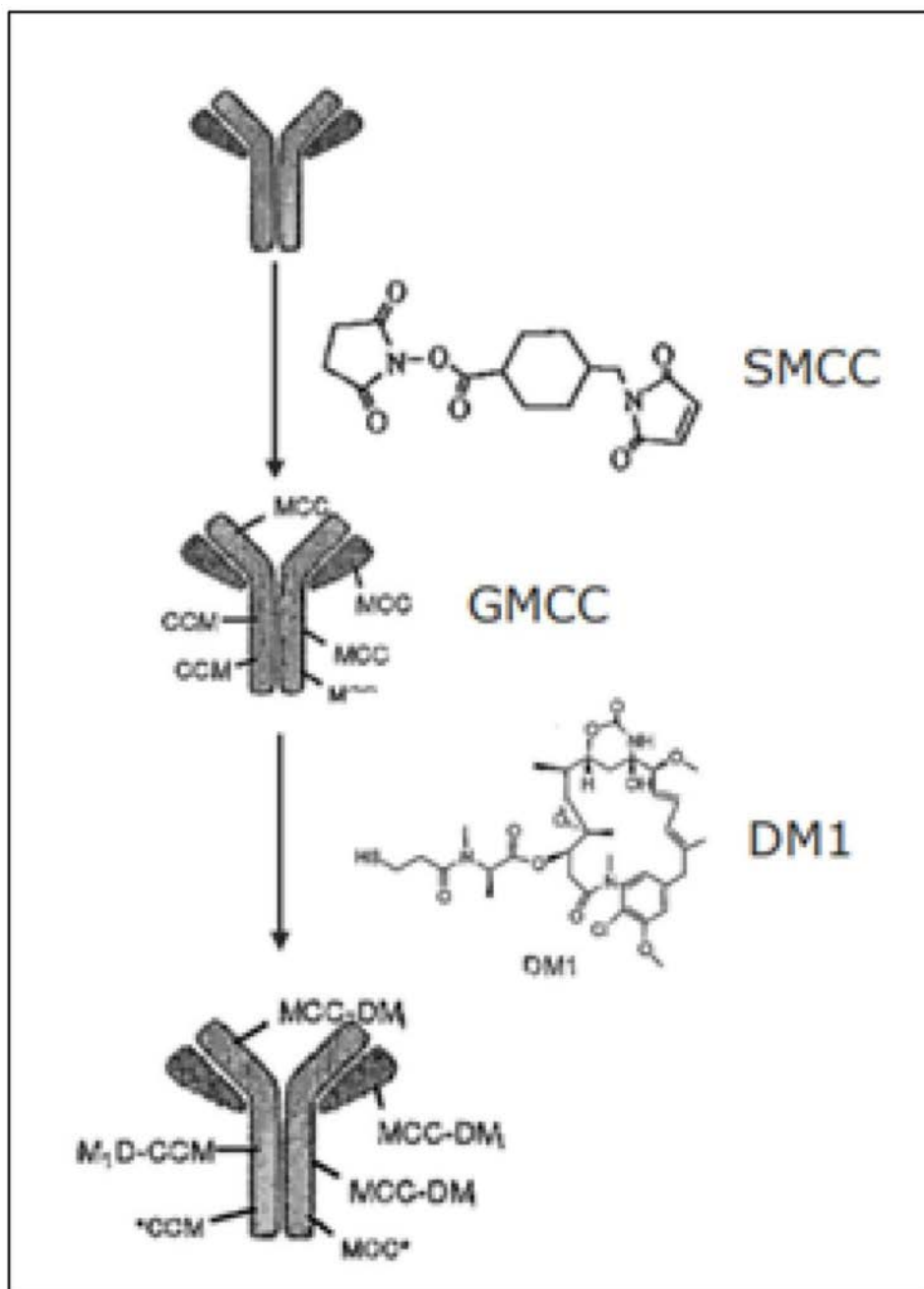


图5

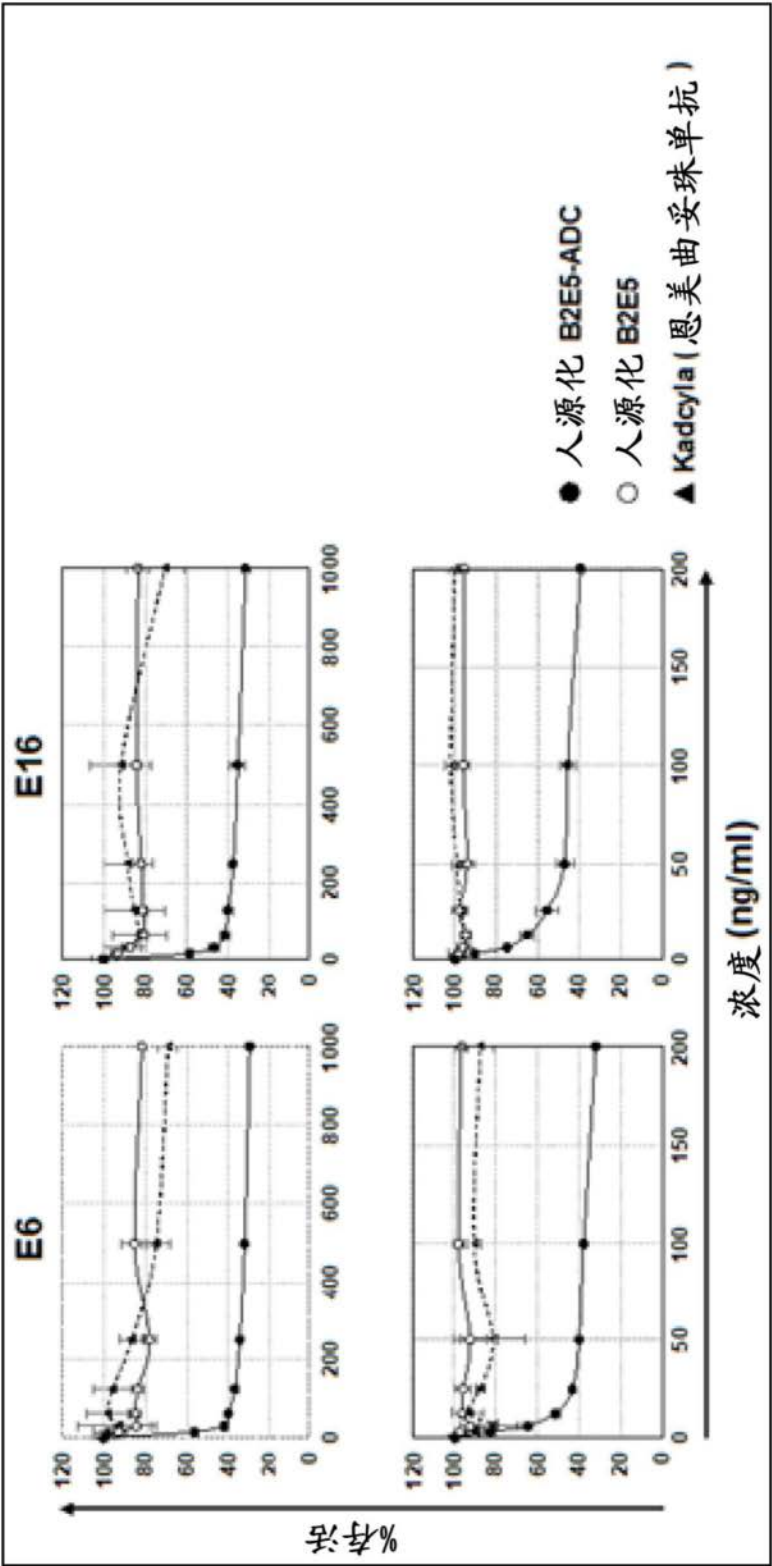


图6A

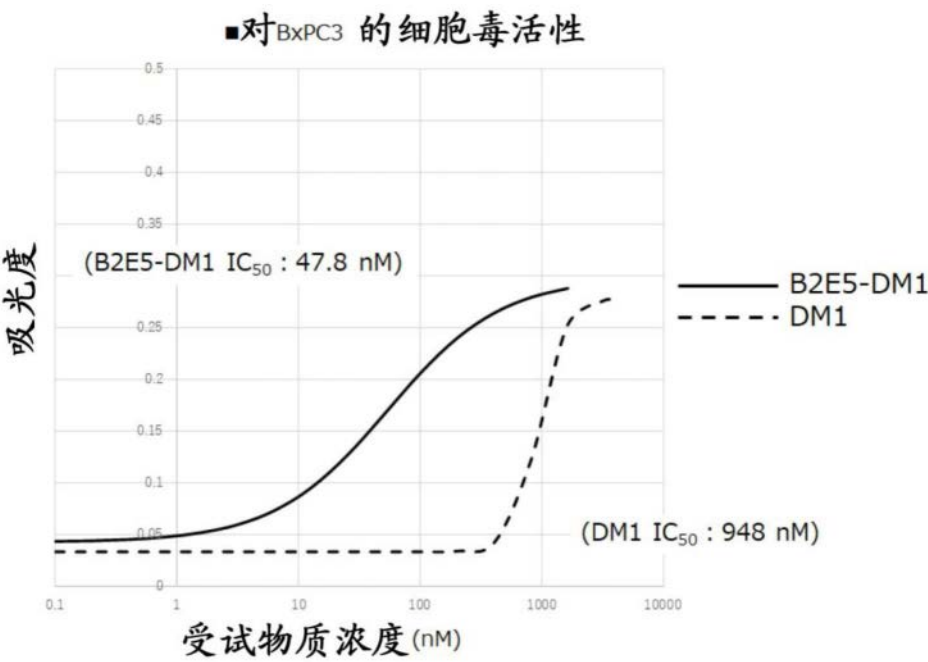


图6B

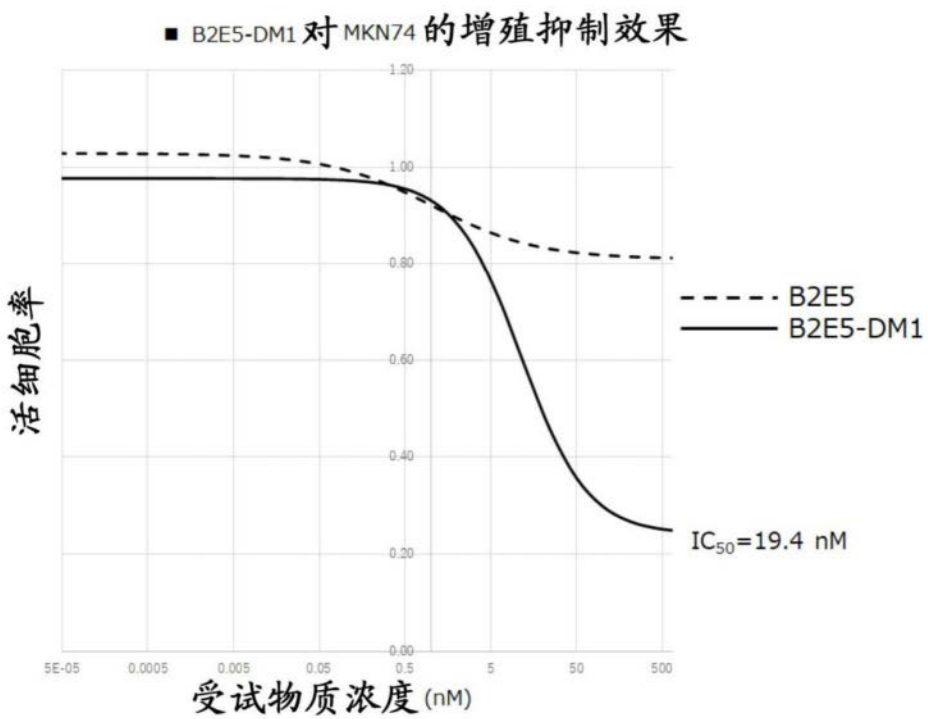


图6C

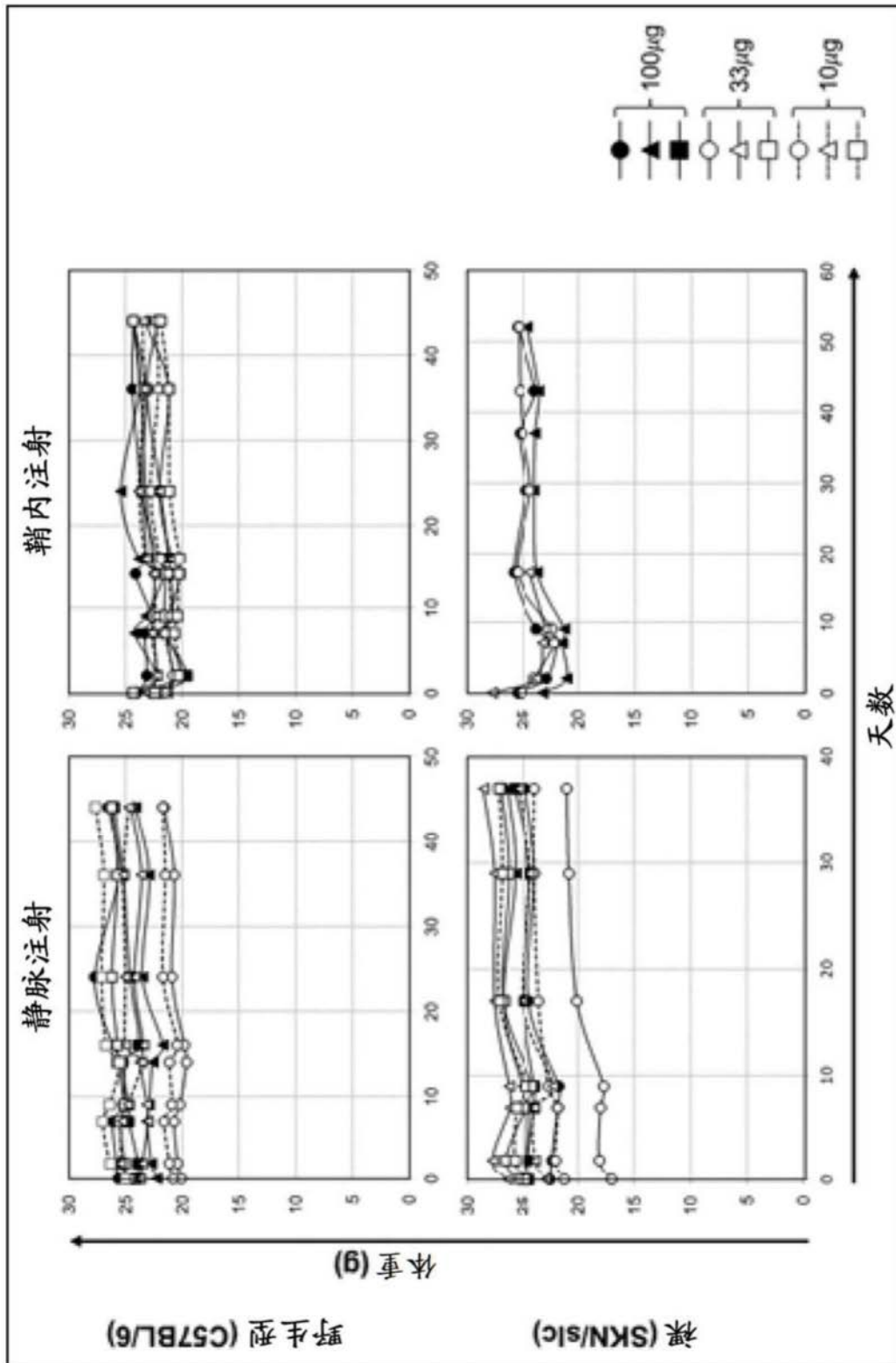


图7