

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6163502号
(P6163502)

(45) 発行日 平成29年7月12日(2017.7.12)

(24) 登録日 平成29年6月23日(2017.6.23)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 Z N A
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 T
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00
A61K 9/127 (2006.01)	A61K 9/127

請求項の数 15 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-560096 (P2014-560096)	(73) 特許権者	596118493 アカデミア シニカ ACADEMIA SINICA 台灣, タイペイ 11529, ナンカン, アカデミア ロード 128, セクション 2 128 Sec 2, Academia Road, Nankang, Taipei 11529 TW
(86) (22) 出願日	平成25年3月1日(2013.3.1)	(74) 代理人	110001139 S K 特許業務法人
(65) 公表番号	特表2015-517982 (P2015-517982A)	(74) 代理人	100130328 弁理士 奥野 彰彦
(43) 公表日	平成27年6月25日(2015.6.25)	(74) 代理人	100130672 弁理士 伊藤 寛之
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/028667		
(87) 國際公開番号	W02013/131001		
(87) 國際公開日	平成25年9月6日(2013.9.6)		
審査請求日	平成28年2月29日(2016.2.29)		
(31) 優先権主張番号	61/606,220		
(32) 優先日	平成24年3月2日(2012.3.2)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗上皮細胞接着分子(EpCAM)抗体及びその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (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、

を含む単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であって、

前記モノクローナル抗体又は抗原結合断片は、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KPEGALQNNNDGLYDPDCDE(配列番号63)中のエピトープに対する特異的結合親和性を有し、癌細胞のアポトーシスを誘導する特性を示す単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項2】

前記抗原結合断片が前記抗体のFv断片を含む、請求項1に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項3】

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

【請求項4】

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に記載の抗体又は抗原結合断片。

。

20

【請求項 5】

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4に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 6】

(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ベプチドを含む、単離された一本鎖可変断片であって、

前記一本鎖可変断片は、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) 中のエピトープに対する特異的結合親和性を有し、癌細胞のアポトーシスを誘導する特性を示す、単離された一本鎖可変断片。 10

【請求項 7】

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又は4に記載の単離モノクローナル抗体若しくは抗原結合断片又は請求項6に記載の単離された一本鎖可変断片、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。 20

【請求項 8】

*in vitro*においてEpCAMを発現する癌細胞を検出する方法であって、

(a) 対象からの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、

(b) 前記抗体又は抗原結合断片と、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

(c) 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前記対象内に存在するか否かを決定する工程、

を含む方法。 30

【請求項 9】

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7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 10】

前記抗体又は抗原結合断片又は単離された一本鎖可変断片がヒト化されている、請求項7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。 40

【請求項 11】

前記癌細胞が口腔癌細胞、鼻咽頭癌細胞、結腸直腸癌細胞、及び卵巣癌細胞からなる群より選択される、請求項7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】

検出可能な化合物若しくは酵素により標識されている、又はリポソーム中に封入されている、請求項1、2、3若しくは4に記載の抗体又は抗原結合断片又は請求項6に記載の単離された一本鎖可変断片。

【請求項 13】

(a) 請求項4に記載の単離抗体又は抗原結合断片、

(b) 抗癌剤、及び

50

(c) 薬学的に許容される担体、
を含む組成物。

【請求項 14】

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(但し、ヒトを除く)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ための、請求項1、2、3若しくは4に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片又は請求項6に記載の単離された一本鎖可変断片の使用であって、

前記抗体又は抗原結合断片又は単離された一本鎖可変断片がヒト化されている、使用。

【請求項 15】

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医薬品の製造における、請求項1、2、3若しくは4に記載の単離モノクローナル抗体又は抗原結合断片又は請求項6に記載の単離された一本鎖可変断片の使用であって、

前記抗体又は抗原結合断片又は単離された一本鎖可変断片がヒト化されている、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して抗癌剤に関し、より具体的には、癌の治療、診断、及びイメージングのための抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) は、世界の先進国において6番目に多い悪性腫瘍である。また、頭頸部癌の中では口腔扁平上皮癌 (OSCC) が最も多い。頭頸部癌は、その診断、局所管理、及び化学療法が著しく改善されているにもかかわらず、30年を超えての長期生存率に顕著な増加は見られていない。口腔癌の総死亡率は、現代の医療をもってしても約50%と依然として高い。したがって、危険度の高い前癌病変を予防、早期診断、及び治療することにより、HNSCCに関連する死亡率の低減に貢献できる。

【発明の概要】

【0003】

一態様において、本発明は、上皮細胞接着分子 (EpCAM、配列番号1) のEGF様ドメインIに位置する配列KPEGALQNNNDGLYDPDCDE (配列番号63) 中のエピトープに対する特異的結合親和性を有する、精製若しくは単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0004】

本発明の一実施形態において、上記抗体又は抗原結合断片は、EpCAMの上記EGF様ドメインIIにおいてアミノ酸位95のチロシン (Y)、又はアミノ酸位96のアスパラギン酸 (D)、又は上記Y及び上記Dが変異している (又は置換変異を有する) 場合に、上記結合親和性を喪失することを特徴とする。

【0005】

本発明の別の実施形態において、上記抗体又は抗原結合断片は、

(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。

【0006】

本発明の別の実施形態において、上記結合断片は上記抗体のFv断片を含む。あるいは、上記結合断片は、上記抗体のFab断片を含んでもよい。

【0007】

本発明の別の実施形態において、上記抗体はヒト化モノクローナル抗体である。

【0008】

10

20

30

40

50

本発明の別の実施形態において、上記重鎖可変領域は配列番号24のアミノ酸配列を有し、上記軽鎖可変領域は配列番号25のアミノ酸配列を有する。

【0009】

別の態様において、本発明は、

(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) 上記重鎖可変領域及び上記軽鎖可変領域を結合するリンカーペプチドを含む、精製又は単離された一本鎖可変断片に関する。

【0010】

10

さらに別の態様において、本発明は、

(a) 配列番号1のアミノ酸配列を有する上皮細胞接着分子 (EpCAM) に対して特異的結合親和性を有し、

(b) EpCAMを発現する癌細胞に対して特異的結合親和性を有し、上記癌細胞は口腔癌細胞、鼻咽頭癌細胞、結腸直腸癌細胞、及び卵巣癌細胞からなる群より選択され、且つ

(c) ヒト臍静脈内皮細胞及び正常鼻粘膜上皮に対して結合親和性を有さないことを特徴とする、

単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0011】

20

本発明の一実施形態において、上記抗体又は抗原結合断片は、上記癌細胞のアポトーシスを誘導且つ/又は *in vivo* における上記癌細胞の増殖を阻害することを特徴とする。

【0012】

本発明の別の実施形態において、上記抗体又は抗原結合断片は、EpCAMのEGF様ドメインIIに位置する配列KPEGALQNNNDGLYDPDCDE (配列番号63) 中のエピトープに対する特異的結合親和性を呈する。

【0013】

本発明の別の実施形態において、上記抗体又は抗原結合断片は、検出可能な化合物若しくは酵素により標識されている、又はリポソーム中に封入されている。

【0014】

30

本発明の別の実施形態において、上記抗体又は抗原結合断片は、

(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

(b) 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を含む。

【0015】

さらに別の態様において、本発明は、(a) 上記単離抗体又はその抗原結合断片、(b) 抗癌剤、及び(c) 薬学的に許容される担体、を含む組成物に関する。

【0016】

40

さらに別の態様において、本発明は、癌細胞及び/又は腫瘍開始細胞の増殖を阻害する方法であって、(a) 上記抗体又はその抗原結合断片、及び(b) 薬学的に許容される担体、を含む組成物をこれを必要とする対象に投与することを含み、上記癌細胞及び/又は腫瘍開始細胞はEpCAMを発現する、方法に関する。

【0017】

本発明の一実施形態において、ヒト化抗体又は抗原結合断片が対象に投与される。上記癌細胞は、口腔癌細胞、鼻咽頭癌細胞、結腸直腸癌細胞、及び卵巣癌細胞からなる群より選択されてもよい。

【0018】

また別の態様において、本発明は、EpCAMを発現する癌を検出及び/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、

50

- (b) 上記細胞又は組織試料を上記抗体又は結合断片と接触させる工程、
- (c) 上記抗体又は結合断片と上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) 上記結合を正常対照と比較することにより、EpCAMを発現する癌が対象内に存在するか否かを決定する工程を含む方法に関する。

【0019】

上記態様及び他の態様を、好ましい実施形態及び下記図面について以下記載することにより明らかに示すが、上記態様及び他の態様は、本開示内容の新規概念の思想及び範囲内において変形及び改変し得る。

【0020】

付属の図面は本発明の1つ以上の実施形態を例示するものであり、その説明文と共に本発明の原理を説明する。いずれの図面においても、同一実施形態の同一又は類似要素を指す場合には同一参考番号を可能な限り使用する。

10

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】種々の癌細胞株に対するOCAb9-1の結合活性を示す図である。(A)は、種々の癌細胞株におけるOCAb9-1の結合活性のELISA分析を示す。対照としてNM-IgGを使用した。(B)は、口腔癌(SAS)、鼻咽頭癌(NPC)、肺癌(H441及びH520)、結腸直腸癌(HCT116、SW620、及びCOLO205)、卵巣癌(SKOV-3)、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)、及び正常鼻粘膜上皮(NNM)に対するOCAb9-1 mAbのウェスタンプロット解析を示す。(C)は、ヒト組織アレイにおける抗EpCAM mAb(OCAb9-1)の免疫組織化学的染色を示す。パラフィン包埋した切片をOCAb9-1と共にインキュベートし、口腔、乳房、結腸、卵巣、脾臓、及び子宮を含む種々のヒト癌組織並びにその対応する正常組織におけるEpCAMの発現を検出した。茶に染色された箇所はEpCAMであり、青に染色された箇所はバックグラウンドとして染色されたヘマトキシリンである。細胞画像の倍率は200倍とした。

20

【0022】

【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標識アフィニティカラムによる精製タンパク質、レーン3はOCAb9-1標識アフィニティカラムによる精製タンパク質のウェスタンプロット解析である。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抗体によるプ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。測定はクローニング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プロット解析、(F)は同フローサイトメトリー解析を示す。

30

【0023】

【図3】抗EpCAM mAbの特徴の決定を示す図である。OCAb9-1及びEpAb mAbはヒト癌細胞株を認識した。SAS細胞、HCT116細胞、及びNNM細胞をOCAb9-1及びEpAb mAbと共にインキュベートした。抗EpCAM mAbの結合活性をフローサイトメトリーにより測定した。(A)は免疫蛍光染色、(B)はウェスタンプロッティングを示す。(C)SAS細胞及び(D)HCT116細胞をEpAb2-6(0~20 μg/ml)により6時間処置し、フローサイトメトリーを行い、Annexin V-FITC及びPIによる二重染色を用いて細胞死を測定した。Annexin V-FITCにより、早期段階(6時間)において盛んにアポトーシスを受けた細胞の細胞全体に対する割合を決定

40

50

した。ヨウ化プロピジウム(PI)により、生細胞と死細胞とを区別した。

【0024】

【図4】EpCAM shRNA及びEpAb2-6による、*in vitro*外及び*in vivo*における癌細胞増殖の阻害を示す図である。EpCAM shRNA(shEpCAM)により、SAS細胞におけるEpCAMの発現がノックダウンされた。対照として、LKO shRNAベクター(対照shRNA)を単独で使用した。(A)は、EpCAMの下方調節による、SAS細胞の細胞増殖の阻害を示す。MTTアッセイにより細胞の生存を調べた。**はp<0.01、***はp<0.001を示す。(B)～(D)は、*in vitro*における腫瘍細胞の(B)コロニー形成、(C)遊走、及び(D)浸潤の、EpCAM抑制による阻害を示す。(E)は、EpCAMの抑制による、*in vivo*における腫瘍増殖の減少を示す。SAS由来の腫瘍異種移植片を有するNOD/SCIDマウスをEpAb2-6 mAb(10mg/kg)又はPBSで処置し、腫瘍体積を測定した(n=6)(データは平均±SDで示し、p値はt試験により解析した)。エラーバーは±SDを表す。*はP<0.05を示す。(F)はKaplan-Meier生存曲線であり、PBSにより処置した場合に比べてEpAb2-6により処置したマウス(各群においてn=6)の生存期間が伸びたことを示す。

10

【0025】

【図5A～5D】EpAb2-6により腫瘍球体の形成が減少したことを示す図である。フローサイトメトリー及びヨウ化プロピジウム(PI)染色から、EpAb2-6が(A)HCT116及び(B)腫瘍球体(HCT116球体)において低二倍体DNAの含有量を増加させることができた。(C)は、EpAb2-6による腫瘍球体形成の減少を示す。(D)は、HCT116球体細胞をEpAb2-6により6日間処置し、腫瘍球体数を計数した結果を示す。

20

【0026】

【図6】EpAb2-6単独又はEpAb2-6とIFLとの併用がHCT116担腫瘍マウスに及ぼす効果を示す図である。(A)は、HCT116由来の結腸癌を有するマウスにEpAb2-6、IFL、EpAb2-6とIFLとの組み合わせ、及びPBSを投与した結果を示す。各群における腫瘍の大きさを測定した(各群につきn=6)。点は平均を、バーはSDを示す。(B)は、各群における体重を示す。(C)は、処置終了時に測定した腫瘍重量を示す。(D)は、(C)に示す分析の代表的な画像を示す。*はp<0.05を示し、有意差があることを表す。

【0027】

【図7】EpCAMに対するヒト化抗体の創出を示す図である。(A)は、EpAb2-6のCDRをヒトIgG1主鎖にグラフトすることにより作成したヒト化EpAb2-6(hEpAb2-6)を示す。ヒト癌細胞株に対するhEpAb2-6の結合活性を示す。(B)はSAS細胞に対する、(C)はCCD-1112Sk細胞に対する、mEpAb2-6及びhEpAb2-6の結合活性を測定したELISAの結果を示す。陰性対照として、正常マウスIgG(NM-IgG)及び正常ヒトIgG(ヒトIgG)を使用した。(D)は、NNM細胞、SAS細胞、及びHCT116細胞に対するmEpAb2-6及びhEpAb2-6のウェスタンプロット解析を示す。(E)はSAS細胞、(F)はHCT116細胞を、hEpAb2-6(0～20μg/ml)により6時間処置し、フローサイトメトリーを行い、Annexin V-FITC及びPIによる二重染色を用いて細胞死を測定した結果を示す。

30

【0028】

【図8A～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プロット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。

40

【0029】

【図9】EpCAMの上昇が腫瘍細胞の腫瘍開始能及び自己複製能に関連することを示す図である。EpCAMの上昇を、スフェロイド及びアノイキス抵抗性腫瘍細胞において調べた。(A)は、スフェロイド、アノイキス抵抗性、及び接着性HCT116細胞における形態変化の明視

50

野像を示す。上記細胞におけるEpCAMの発現を調べた、(B)はリアルタイムqPCR分析(左)、(C)はフローサイトメトリー解析の結果を示す。(D)は、分取したEpCAM高発現細胞及びEpCAM低発現細胞によるスフェロイド形成を3回計数した結果を示す。EpCAM高発現細胞及びEpCAM低発現細胞による腫瘍球体の代表的な画像を示す。(E)は、マウスのスフェロイド及び接着性HCT116細胞における腫瘍開始能力の評価を示す。腫瘍発生率及び腫瘍体積を35日間にわたって監視した。(F)は、HE染色した腫瘍切片の組織学的解析を示す((上)ネズミにおいて浸潤の最前面が近傍の骨格筋の間に浸潤している、(下)組織浸潤ではなく、膨張する腫瘍が明確な境界を有する様子がわかる)。

【0030】

【図10】EpCAMが癌細胞における初期化遺伝子(c-MYC、OCT4、NANOG、及びSOX2)の発現及び自己複製を上方調節することを示す図である。(A)は、スフェロイド腫瘍細胞におけるEpCAM及び初期化遺伝子発現の増加を示す。スフェロイド及び接着性HCT116細胞におけるEpCAM、c-Myc、Oct4、Nanog、及びSox2の発現をリアルタイムqPCR(上左)、ウェスタンプロット(上右)、及び免疫蛍光染色(下)により分析した結果を示す。(B)は、EpCAM高発現及びEpCAM低発現HCT116細胞における遺伝子発現をリアルタイムqPCRにより分析した結果を示す。(C)は、HEK293細胞におけるEpCAMの異所性発現、及び初期化遺伝子の発現を、リアルタイムqPCRにより分析した結果を示す。(D)は、EpCAMをノックダウンしたHep3B細胞及びHCT116細胞におけるEpCAM、c-Myc、Oct4、Nanog、及びSox2のmRNAレベルをリアルタイムqPCRにより分析した結果を示す。(E)は、EpCAMの抑制による、Hep3B細胞及びHCT116細胞における腫瘍球体形成の減少を示す。バーの長さは50 μmである。(F)は、腫瘍球体におけるEpCAMのノックダウンによる、in vitroにおける自己複製能への影響を示す。実験手順を上部に示す。**はp<0.01を示し、有意差があることを表す。(G)は、in vivoにおける限界希釈アッセイの結果であり、腫瘍球体におけるEpCAMのノックダウンが腫瘍開始性能を阻害することが示される。*はp<0.01を示し、ログランク検定により分析した。

【0031】

【図11】EpCAMの発現がEMTの進行及び腫瘍形成に関連することを示す図である。(A)は、EpCAMをノックダウンしたHep3B細胞及びHCT116細胞におけるE-カドヘリン(E-cad)、サイトケラチン18(CK18)、及びビメンチン(Vim)の免疫蛍光染色を示す。(B)は、EpCAMをノックダウンしたHep3B細胞及びHCT116細胞におけるEMT遺伝子発現をリアルタイムqPCR(左)及びウェスタンプロット(右)により分析した結果を示す。(C)は、分取したEpCAM高発現細胞及びEpCAM低発現細胞におけるEMT遺伝子発現をリアルタイムqPCRにより分析した結果を示す。(D)及び(E)は、in vitroにおける腫瘍細胞の(D)浸潤及び(E)コロニー形成の、EpCAMの抑制による阻害を示す。(F)は、EpCAMの抑制による、in vivoでの腫瘍増殖の減少を示す。HCT/LKO shRNA細胞及びHCT/EpCAM shRNA細胞2×10⁶個をNOD/SCIDマウスに皮下注射し、腫瘍体積を3日毎に測定し(左)、実験終了時に腫瘍重量を測定した(右)(n=6)。(G)は、腫瘍抽出に由来するRNAをリアルタイムqPCRにより分析した結果を示す(データは平均±SDで示し、p値はt試験により解析した)。

【0032】

【図12】自己複製及びEMT遺伝子の調節にEpICDが関連することを示す図である。(A)はレーザー共焦点免疫蛍光画像であり、DAPT(50 μM)の存在下又は非存在下におけるHCT116細胞中のEpICD細胞内局在化を示す。バーの長さは10 μmである。(B)は、293T/EpCAM-v5細胞において、DAPT処理に続くEpICDの切断をウェスタンプロットにより解析した結果を示すものであり、各タンパク質試料はEpICD抗体又はv5抗体を用いてプロットに供した(黒矢印はEpICDの切断を示す)。(C)～(E)は、(C)EMT遺伝子の発現、(D)腫瘍浸潤、及び(E)腫瘍球体形成の、DAPTによる阻害を示す。(F)は、EpCAMの過剰発現による、c-Myc、Oct4、Nanog、及びSox2の転写活性の上方調節を示す。ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を評価した。(G)は、EpCAMにより誘導されるc-Myc、Oct4、Nanog、及びSox2の転写活性の、DAPTによる阻害を示す。(H)は、EpICDによる初期化遺伝子の転写活性化の誘導を示す。(I)～(J)は、HCT116細胞及びNNM細胞のc-MYC遺伝子、

10

20

30

40

50

OCT4遺伝子、NANOG遺伝子、及びSOX2遺伝子における、EpICDのDNA占有率を分析したクロマチン免疫沈降（ChIP）の結果を示す。**はp<0.01を示し、有意差があることを表す。

【0033】

【図13】EpCAMシグナル伝達の活性化におけるトランスデューサーとして働くEpEXの作用を示す図である。（A）は、293TトランスフェクタントにおけるEpEX₂₉₁及び全長EpCAMタンパク質の発現を調べたウェスタンプロットティング分析を示す。（B）は、c-Myc、Nanog、Oct4、及びSox2のプロモーター活性の、EpEXによる誘導を示す。（左）は細胞をpEpEX291によりトランスフェクションしたもの、（右）は細胞に可溶性EpEX（sEpEX 2 μg/ml）を添加したものである。c-Myc、Nanog、Oct4、及びSox2のレポーター活性をルシフェラーゼアッセイにより評価した。対照処置にはBSAを使用した。（C）は、EpCAM発現細胞におけるEpEXの細胞外遊離を示す。HCT116細胞における培養上清（sup.）中のEpEX遊離レベルを免疫沈降及びウェスタンプロットティング分析により調べた。（D）は、HCT/LKO shRNA細胞由来及びHCT/EpCAM shRNA細胞由来の培養上清におけるEpEXの同定を示す。（E）は、HC116細胞をDAPT（50 μM）、TAPI（40 μM）、又はその両者（D/T）により24時間処理し、培養上清をEpEX抗体により免疫沈降させ、全細胞溶解物（WCL）を抗EpEX抗体（中段）又は抗EpICD抗体（下段）と共にウェスタンプロットティングに供した結果を示す。黒矢印は可溶性EpICD、灰色矢印はEpICD中間体を指す。（F）は、HCT116細胞を、（左）pEpEX291-v5（0.5、2 μg）により72時間トランスフェクション、又は（右）sEpEX（2.5、5 μg/ml）により処理した後、培養上清及び細胞溶解物を上述のようにウェスタンプロットにより分析した結果を示す。

10

20

【0034】

【図14】EpCAM（EpICD）と自己複製遺伝子発現及び癌悪性度との相関関係を示す図である。（A）は、ヒト結腸直腸癌（HCRC）、近傍正常粘膜、及び正常結腸組織におけるEpEX及びEpICDの細胞内局在化を示す免疫蛍光画像である。代表的な画像として、EpEX（緑）及びEpICD（赤）を別々に示す画像（上段）、合成画像（中段）、及び各画像の特定領域（点線内）を拡大した画像（下段）を示す。矢印は、核（HCRC）内及び膜内において、EpEX（近傍正常粘膜）と共に局在化しているEpICDの細胞内局在化を示す。ヒト結腸癌組織マイクロアレイを用いたEpICDタンパク質の発現を免疫組織化学分析により調べた。代表的な画像として、（B）は無作為に拡大した局所図面であり、（C）は、正常組織及びグレードの異なる腫瘍におけるEpICDの発現を示す箱ひげ図である。P値はt試験により解析した。図14Dは、膜（M）、サイトゾル（C）、及び核（N）において発現するEpICDの細胞内局在化を示す図である。右画像は、左画像内で四角で囲んだ領域を拡大して示す局所図である。人間の結腸癌患者42人におけるEpCAM、c-Myc、Nanog、Oct4、及びSox2のmRNAの発現レベルをqPCR分析により調べた。（E）は、EpCAMと初期化遺伝子との相関関係をSpearman分析により評価した結果を示す。

30

【0035】

【図15】癌細胞に対するmAbの主要な特徴の概要を示す。

【0036】

【図16】抗EpCAM mAbの主要な特徴の概要を示す。

【0037】

【図17】EpAb2-6のV_Hドメイン及びV_Lドメインのアミノ酸配列を示す図である。

40

【0038】

【図18】抗EpCAM mAbの速度定数及び結合親和性を示す図である。

【0039】

【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。

【発明の詳細な説明】

【0040】

定義

特に定義しなければ、本明細書中で使用する科学技術用語はいずれも、本発明が属する

50

分野の当業者が一般的に理解する意味と同一の意味を有する。矛盾がある場合には、定義を含む本発明の記載に従う。

【0041】

本明細書中において、用語「くらい」、「約」、又は「およそ」は、所与の値又は範囲の前後20パーセント、好ましくは10パーセント、より好ましくは5パーセントの範囲を概して意味するものとする。本明細書中の数値はおよその値であり、明白な記載がない場合には上記用語「くらい」、「約」、又は「およそ」の持つ意味が暗示され得る。

【0042】

略語

mAbはモノクローナル抗体、NNMは正常鼻粘膜、FACSはフローサイトメトリー分析、ELISAは酵素結合免疫吸着剤アッセイ、EMTは上皮間葉転換、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ChIPはクロマチン免疫沈降、GAPDHはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、HUVECはヒト臍静脈内皮細胞、IHCは免疫組織化学、CDRは相補性決定領域を示す。

10

【0043】

本明細書中において、用語「製剤」は一般的に、調製及び製造されたもの、特に調製された物質を意味するものとする。

【0044】

本明細書中において、用語「抗体」は、免疫グロブリン（Ig）分子、又は特定の抗原に特異的に結合する能力を有する免疫グロブリン分子断片を意味する。Igモノマーは、ポリペプチド鎖4本からなる「Y」型分子であり、上記4本のうち同一重鎖2本と同一軽鎖2本とがジスルフィド結合により結合している。例えば、上記Yの腕部分は抗原に結合する部位を含み、そのため特定の外来物を認識する。抗体の上記領域をFab（抗原結合断片）領域と呼ぶ。

20

【0045】

本明細書中において、用語「抗体」は、全長抗体分子だけでなく、抗原結合能力を保持する抗体分子断片をも意味する。このような断片は当技術分野において公知であり、*in vitro*及び*in vivo*のいずれにおいても度々使用される。用語「抗体」は、全長免疫グロブリン分子だけでなく、既知の活性断片F(ab')₂、Fab、Fv、及びFd等の抗原結合活性断片をも意味する。

30

【0046】

抗原結合断片（Fab断片）は、抗原に結合する抗体上の領域であり、重鎖及び軽鎖の各々の定常ドメイン1つ及び可変ドメイン1つから構成される。上記2つの可変ドメインがその特異抗原のエピトープに結合する。Fc断片及びFab断片は研究室において作成できる。免疫グロブリンモノマーを酵素ペプシンにより切断し、Fab断片2つ及びFc断片1つを得ることができる。酵素ペプシンによりヒンジ領域の下で切断し、F(ab')₂断片及びpFc'断片を形成する。酵素IdeS（化膿連鎖球菌由来の免疫グロブリン分解酵素、商品名FabRICATOR（商標））は、中性pHにおいて配列特異的にIgGを切断する。F(ab')₂断片を穏やかに還元することにより、Fab'断片2つに分けることができる。

【0047】

抗体の可変ドメインはF_v領域と称され、抗原への結合における最も重要な領域である。

40

【0048】

「Fv断片」は、重鎖及び軽鎖の可変性部分から構成される活性抗体断片（Fv）である。「Fv断片」は、重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）が強い非共有結合性相互作用により1つに保持されたものである。したがって、各Fv断片は抗原結合部位1つを完全な状態で含有し、抗体分子由来の最小の活性断片である。

【0049】

重鎖及び軽鎖の可変領域は互いに融合して一本鎖可変断片（scFv）を形成でき、この一本鎖可変断片は大きさがFab断片の半分と小さいが、親である免疫グロブリンの元々の特異性を保持する。

【0050】

50

報告によれば、「完全」ヒト抗体を用いることによって、ヒト化抗体及びキメラ抗体により生じる副作用の一部を回避し得る。成功が確認されているアプローチが2つある。ファージディスプレイにより作成された抗体、及びヒト抗体により近い抗体を產生するよう遺伝子操作されたマウス、の2つである。ファージディスプレイを使用して、可変性抗体ドメインを纖維状ファージ抗体上に発現させることができる。

【0051】

哺乳動物抗体の非CDR領域が同種又は異種の特異的抗体の類似領域により置き換わっても元の抗体のエピトープ特異性が保持され得ることが、当技術分野において確立されている。このことが最も明白に示されるのは、非ヒトCDRをヒトFR領域及び/又はFc/pFc'領域に共有結合的に結合させて機能的抗体を作成するという「ヒト化」抗体の創出、及びその使用においてである。例えば、PCT国際公報第W092/04381号には、ネズミFR領域の少なくとも一部がヒト由来のFR領域により置き換わったヒト化ネズミRSV抗体の作成及び使用が教示される。抗原結合能力を有する全長抗体の断片を含むこのような抗体は、「キメラ」抗体と称されることが多い。このようなキメラ抗体は、上記抗体のFR領域の一部又は全てが他の相同ヒトFR領域により置き換わった形で作成され得る。

10

【0052】

非ヒト(たとえばネズミ)抗体のヒト化形態とは、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、又はその断片(抗体のFv、Fab、Fab'、F(ab')₂、又は他の抗原結合サブ配列等)である。ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)において、レシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット又はウサギ等の非ヒト種(ドナー抗体)のCDRに由来する残基により置き換わったものも、ヒト化抗体に含まれる。ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が対応非ヒト残基により置き換わっている場合もある。ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもインポートCDR又はフレームワーク配列にも含まれない残基をさらに含んでもよい。ヒト化抗体は一般的に、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインの全てを実質的に含み得、この場合、全ての又は実質的に全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、且つ全ての又は実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である。最適には、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部をさらに含み得る[Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

20

【0053】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は当技術分野において公知である。一般的に、ヒト化抗体には、ヒトではない供給源に由来するアミノ酸残基が1つ以上導入されている。これらの非ヒトアミノ酸残基は「インポート」残基と称されることが多く、典型的には「インポート」可変ドメインからのものである。ヒト化は本質的に、Winter及び共同作業者による方法[Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)]に従って実行され、齧歯類のCDR又はCDR配列をヒト抗体の対応配列により置換して実施される。したがって、このような「ヒト化」抗体はキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)であり、実質的には、ヒト可変ドメイン完全体より小さいその一部が、非ヒト種に由来する対応配列により置換されたものである。実際には、典型的なヒト化抗体は、CDR残基の一部及び恐らくFR残基の一部が齧歯類抗体の類似部位に由来する残基により置換されたヒト抗体である。

30

【0054】

また、ヒト抗体の作成は、当技術分野において公知の、ファージディスプレイライブライアリを含む種々の技術により実施することもできる。Coleら及びBoernerらの技術を利用してヒトモノクローナル抗体を調製することもできる[Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985) and Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]。また、ヒト抗体の作成は、内因性免疫グロブリン遺伝子が一部

40

50

又は完全に不活性化されているマウス等の遺伝子組み換え動物にヒト免疫グロブリン座を導入することによっても実施できる。この課題に際してヒト抗体の作成に着目すれば、遺伝子再構成、集合、及び抗体レパートリーを含む全ての面においてヒトにおける場合と密に類似している。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号、第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、及び第5,661,016号に記載される。このような完全ヒト又はヒト化モノクローナル抗体は、抗体自身に対する免疫反応を誘発しないため特に有用であり得る。米国特許第7,622,113号を参照、その内容全体は参考として本明細書に組み込む。

【0055】

抗体は標識されていてもよく、また固体担体に固定されていてもよい。本明細書中の用語「標識」は、直接又は間接的に抗体に結合して「標識」抗体を生じる、検出可能な化合物又は組成物を指す。標識は、それ自身で検出可能であってもよく（例えば放射性同位体標識又は蛍光標識）、あるいは酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的変質を触媒するものであってもよい。

10

【実施例】

【0056】

本発明の実施形態による器具、機器、方法、及びそれらに関連する結果を以下に例示するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。例示中、閲覧者に都合のよいように見出し又は小見出しが使用される場合があるが、これらは本発明の範囲を限定するものではないことに注意されたい。本明細書中において提案され開示される特定の理論は、特定の行動理論又は行動方法とは無関係に本発明が本発明に従って実施される限り、その理論の是非にかかわらず本発明の範囲を限定するものではない。

20

【0057】

材料及び方法

細胞株及び培養

以下のヒト細胞株を使用した。口腔癌（FaDu及びSAS）、鼻咽頭癌（NPC039）、卵巣癌（SKOV-3）、肺癌（CL1-5、H441、及びH520）、膵臓癌（MIA PaCa-2）、結腸直腸癌（COL 0 205、HCT116、及びSW620）、肝細胞癌（Hep3B及びMahlavu）、腎細胞癌（A498）、前立腺癌（PC3）、CCD-1112Sk（ヒト正常包皮）、及び正常鼻粘膜上皮（NNM）の初代培養株。NPCは本研究室において確立したものを用いた（Lin et al. (1993) "Characterization of seven newly established nasopharyngeal carcinoma cell lines" Lab. Invest. 68, 7 16-727）。MahlavuはMichael Hsiao博士（Genomic Research Center、中央研究院（Academia Sinica））の厚意により入手した。正常鼻粘膜上皮（NNM）の初代培養株は鼻茸患者の外科手術から入手した（Lee et al., (2007) "Effect of Epstein-Barr virus infection on global gene expression in nasopharyngeal carcinoma" Funct. Integr. Genomics 7, 79-93）。ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）は購入し（Lonza, Walkersville, MD）、EB M-2培地（Lonza, Walkersville, MD）において増殖させた。ヒト口腔癌細胞株SASはJCRB（Japanese Collection of Research Bioresources）（東京、日本）から入手した。細胞は、5%CO₂中、37°Cにおいて、10%FBS添加ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中で培養した。Pan-Chyr Yang博士の提供による肺腺癌細胞株（CL1-5）（Chu et al., (1997) "Selection of invasive and metastatic subpopulations from a human lung adenocarcinoma cell line" Am J Respir Cell Mol Biol. 17, 353-60）は、10%FBS添加RPMI培地において培養した。他の細胞株はATCCから購入し、5%又は10%ウシ胎児血清（FBS）添加ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中、37°Cにおいて、5%CO₂含有加湿インキュベーター内で培養した。これらの細胞をATCCのプロトコールに従って培養し、蘇生後の継代培養は6か月未満とした。FaDu（咽頭癌）。

30

【0058】

モノクローナル抗体の作成及びIgGの精製

SAS細胞及びEpCAM抗原に対するモノクローナル抗体を、標準的な方法を若干改変した手順により作成した（Wu et al. (2003). "Identification of a dengue virus type 2 (DE

40

50

N-2) serotype-specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal serum samples using an epitope-based peptide antigen" J. Gen. Virol. 84, 2771-2779 ; Liu et al. (2011) "Molecular mimicry of human endothelial cell antigen by auto antibodies to nonstructural protein 1 of dengue virus" J. Biol. Chem. 286, 9726-36)。簡潔には、雌BALB/cJマウスに対し、SASによる腹腔内免疫を3週間間隔にて4回実施した。最終追加免疫後4日目に、免疫化マウスの脾臓から脾細胞を採取し、50%ポリエチレングリコール (GIBCO, CA, USA) を使用してNS1/1-Ag4-1骨髄腫細胞と融合させた。ヒポキサンチン-アミノブテリン-チミジン (HAT) (SIGMA (商標), St. Louis, MO) 及びハイブリドーマクローニング因子 (ICN, Aurora, Ohio) を添加したDMEM中に融合細胞を懸濁し、続いて96ウェルプレートに蒔いた。SAS陽性だがNNM陰性である上記ハイブリドーマを、続いて限界希釈によりサブクローニングし、液体窒素中で保存した。プリスタン初回免疫BALB/cJマウスから腹水を得、mAbをタンパク質Gセファロース4Gゲル (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA) により精製した。

【 0 0 5 9 】

ELISA

96ウェルプレート (Corning Costar, St. Louis, MO) にSAS (口腔癌) 細胞、NPC細胞、HCT116 (結腸癌) 細胞、SKOV3細胞 (卵巣癌細胞株) 、NNM細胞、及びHUVEC細胞を播種した。プレートを2%パラホルムアルデヒドにより固定し、1%ウシ血清アルブミンによりブロッキングした。プレートにOCAb9-1を添加して1時間インキュベートした。続いて0.1% (w/v) TWEEN (登録商標) 20 (PBST_{0.1}) 含有PBSによりプレートを洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) と共にさらに1時間インキュベートした。洗浄後、基質溶液o-フェニレンジアミン二塩酸塩 (SIGMA (商標)) と共にプレートをインキュベートした。3N HClを添加することにより反応を停止させ、マイクロプレートリーダーにより490nmにおいてプレートを読み取った。

【 0 0 6 0 】

フローサイトメトリー

0.25%トリプシン-EDTA (1mM) (INVITROGEN (登録商標)) を使用してSAS、HCT116、及びNNMを1~3分間にわたり分離させた。細胞を蛍光標識細胞分取バッファー (1%ウシ胎児血清含有PBS) により洗浄した後、OCAb9-1及びEpAb mAb (0.00001~1 μg/mlの範囲に希釈) と共に蛍光標識細胞分取バッファー中で、1時間、4°Cでインキュベートした。二次抗体としてフィコエリトリン標識ヤギ抗マウスIgG (250倍希釈、Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA)) を使用し、30分間にわたって4°Cにおいて実施した。最終洗浄後、細胞を1%FBS含有PBS中に再懸濁し、フローサイトメトリー (BD, San Jose, CA) により分析した。

【 0 0 6 1 】

免疫蛍光染色

カバースリップ上で培養した細胞をパラホルムアルデヒド中に固定し、洗浄し、続いて1%ウシ血清アルブミン含有PBS中において10分間ブロッキングした。室温において、1%ウシ血清アルブミン中の一次抗体と共に細胞をインキュベートした。1時間インキュベートした後、細胞を洗浄し、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) ヤギ抗マウス抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 、Alexafluor488ヤギ抗マウス抗体 (INVITROGEN (登録商標)) 、又はAlexaflour568ヤギ抗ウサギ抗体 (INVITROGEN (登録商標)) と共にインキュベートした。4'、6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) を添加して核の対比染色を実施した。

【 0 0 6 2 】

免疫組織化学的アッセイ

マウス又はヒト組織アレイ (Pantomics Inc., San Francisco, CA) 由来の腫瘍組織を抗体と共に、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体と共にインキュベートした。上記切片をジアミノベンジジンと共に最終インキュベートし、ヘマトキシリノにより対比染色した。ヒト結腸癌組織マイクロアレイ及び15個の主要型癌組織アッセイ (

10

20

30

40

50

TMA BC05011及びTMA MTU391)を、BIOMAX(登録商標)から購入した。EpICDの発現をHist oQuestソフトウェア(TissueGnostics, Vienna, Austria)を使用して定量した。AQuestソフトウェア(TissueGnostics, Vienna, Austria)により、調整フィルター、カメラ、及び電動ステージ(Marzhauser Wetzlar, Germany)を用いて、標準化自動取得を実行した。イメージサイトメトリーに際し、全ての画像をTissue-Faxsソフトウェア(TissueGno stics, Vienna, Austria)を使用して取得した。

【0063】

標的タンパク質の同定

プロテアーゼインヒビターカクテル錠(Roche, Indianapolis, IN)を添加した溶解バッファー(50mM Tris-HCl、pH7.4、150mM NaCl、1%NP-40)により、SAS細胞を溶解させた。上清をOCAb9-1結合タンパク質Gセファロース(GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA)に供した。洗浄後、OCAb9-1に結合したタンパク質を溶出バッファー(0.2Mグリシン、pH2.5、150mM NaCl、及び1%NP-40)により溶出させ、溶出液をpH9.1の1M Tris-HClにより中和した(Liu et al., 2011)。溶出液をSDS-PAGEにより分離した。目的とするバンドをゲルから切り出し、25mM重炭酸アンモニウム(ABC)中50mMジチオエリスリトール(DTE)によりpH8.5において1時間にわたって37°Cで還元し、ABC中100mMヨードアセトアミド(IAA)により1時間にわたって室温においてアルキル化した。ABC中50%アセトニトリルにより洗浄後、ゲルを100%アセトニトリル中に浸漬し、0.02 μgトリプシンと共に16時間にわたって37°Cにおいてインキュベートした。消化されたペプチドを5%TFA中50%アセトニトリルにより抽出し、Concentrator(Eppendorf, Hamburg, Germany)を使用して濃縮した。試料を、中央研究院Proteomics and Structural Biology Researchのコア施設(Core Facility)においてLC-MS/MS配列決定により分析した。

【0064】

免疫沈降及びウェスタンプロット解析

プロテアーゼインヒビターミックス錠(Roche, Indianapolis, IN)を添加したRIPAバッファー(0.01Mリン酸ナトリウム(pH7.2)、150mM NaCl、2mM EDTA、50mM NaF、1%Nonidet P-40、1%デオキシコール酸ナトリウム、及び0.1%SDS)により細胞を抽出し、20,000gにおいて30分間にわたって4°Cで遠心分離した。抗EpCAM抗体を使用して上清の免疫沈降を実施した。HRP標識二次抗体(Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA)を使用し、高感度化学発光試薬(ECL)(Thermo Scientific, Rockford, IL)を使用してシグナルを展開させた。

【0065】

アポトーシスアッセイ

細胞を別個に播種し、mAb 0~20 μg/mlにより6時間処置した。アポトーシス細胞をAnnexin V-FITC及びPIにより検出し、フローサイトメーター(BD immunocytometry systems, San Jose, CA)により分析した。早期アポトーシスをAnnexin V-FITCアポトーシス検出キットII(BD Pharmingen, La Jolla, CA)により測定した。アポトーシス核をヨウ化プロピジウム(PI)染色により検出した。

【0066】

抗腫瘍効力分析用動物モデル

SAS由来の口腔癌異種移植片(75mm³以下)を有するSCIDマウスの尾静脈に、EpAb2-6又は同体積のPBSを静脈注射した。処置は、尾静脈注射により10mg/kgで1週間に2回、4週連続で投与し、総用量を80mg/kgとした。腫瘍をノギスにより週2回測定し、薬剤毒性の症状である体重減少に関しマウスを定期的に観察した。腫瘍体積を長さ×(幅)²×0.52で計算した。併用療法腫瘍モデルとして、HCT116由来の結腸癌異種移植片(50mm³以下)を有するSCIDマウスを、処置計画(EpAb2-6、IFL、EpAb2-6+IFL、及びPBS対照)に基づいて4群に分けた。EpAb2-6単独群のマウスにはEpAb2-6単独処置を、用量20mg/kgを尾静脈から週2回4週(毎週×4)にわたり静脈内(i.v.)注射することにより適用した。IFL単独群には、IFL(25mg/kg 5-FU + 10mg/kgロイコボリン + 10mg/kgイリノテカン)を、上記と同様に静脈内(i.v.)注射により週2回4週間(毎週×4)にわたり投与した。併用処置群

には、IFL処置の24時間前にEpAb2-6を投与し、他の二つの群と同一の投薬サイクルにてEpAb2-6及びIFLの双方を与えた。EpAb2-6及びIFLの併用は、既に報告されている方法 (Azrank RG et al. (2004) "Therapeutic synergy between irinotecan and 5-fluorouracil against human tumor xenografts" Clin Cancer Res. 10, 1121-9; Kim et al. (2010) "Dendritic cell vaccine in addition to FOLFIRI regimen improve antitumor effects through the inhibition of immunosuppressive cells in murine colorectal cancer model" Vaccine 28, 7787-7796) を改変して用いた。

【 0 0 6 7 】

抗EpCAM抗体のクローニング及びCDR配列

ハイブリドーマ細胞からTRIzol試薬 (INVITROGEN (登録商標)) を使用して全RNAを抽出し、NucleoTrap mRNA Mini Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG.) を用いてmRNAを単離した。精製されたmRNAを、ThermoScript RT-PCR system (INVITROGEN (登録商標)) により、プライマーとしてオリゴ(dT)を使用して逆転写した。種々のプライマーセットを用いたPCRにより、cDNA産物から可変性重鎖ドメイン及び可変性軽鎖ドメイン (V_H 及び V_L) を增幅させた。PCR産物をTA Kit (Promega, Madison, WI) を使用してクローニングし、DNA配列決定により V_H 配列及び V_L 配列を決定した。配列解析にはSoftware Vector NTI (InforMax) を使用した。カバットデータベースの配列及びImMunoGeneTicsデータベース (Lefranc et al. (2009) "IMGT, the international ImMunoGeneTics information system" Nucleic Acids Res. 37, D1006-12) のアライメントと比較することにより、これらの配列からフレームワーク領域 (FR) 及び相補性決定領域 (CDR) を解析した。

10

【 0 0 6 8 】

ヒト化EpAb2-6の構築及び発現

ヒト化EpAb2-6 V_H を、受託番号DI164282の遺伝子に由来する変更FR1～FR4、及びEpAb2-6 V_H のCDR1～CDR3から構成した。ヒト化EpAb2-6 V_L を、受託番号GM882764の遺伝子に由来する変更FR及びEpAb2-6 V_L のCDRから構成した。得られた V_H を、シグナルペプチド及びヒトIgG1定常領域と共に変更発現ベクターpcDNA3.1 (INVITROGEN (登録商標)) にクローニングした。得られた V_L を変更発現ベクターpSecTag (INVITROGEN (登録商標)) にクローニングした。 V_H プラスミド及び V_L プラスミドをCHO-K1細胞にコトランスフェクションし、G418及びピューロマイシンにより2～3週間かけて選択した。形質転換された細胞を96ウェルプレートにおいて限界希釈した。2週間後、McCoy's 5A培地 (SIGMA-ALDRICH (登録商標)) において安定なクローンからヒト化抗体を生成し、ELISAにより同定した。ヒト化抗体をCELLline AD 1000 (INTEGRA Biosciences, Switzerland) により、製造元の推奨に従って生成した。

20

【 0 0 6 9 】

ファージディスプレイバイオパニング

ファージディスプレイバイオパニングを、既に報告されている方法 (Wu, et al., 2003; Liu, et al., 2011) に従って実行した。簡潔には、ELISAプレートをmAb 100 μ g/mlによりコートした。続いて、mAb 100 μ g/mlの試料をウェルに添加し、4°Cにおいて6時間インキュベートした。洗浄及びブロッキング後、ファージディスプレイされたペプチドライブラー (New England BioLabs, Inc.) をファージが 4×10^{10} pfuとなるよう希釈し、50分間にわたって室温においてインキュベートした。洗浄後、結合したファージを0.2Mグリシン/HCl (pH2.2) 100mlにより溶出させ、1M Tris/HCl (pH9.1) 15mlにより中和した。溶出させたファージを、以降の選択工程のためにER2738 (New England Biolabs, Inc. MA, USA) において増幅させた。LB/IPTG/X-Galプレートにおいてファージを滴定した。第2回及び第3回のバイオパニングは第1回と同一のプロトコールによりを行い、但しバイオパニングに際して添加する増幅ファージは 2×10^{11} pfuとした。

30

【 0 0 7 0 】

EpCAM変異体によるEpAb2-6エピトープの同定

組み換え発現プラスミドpcDNA (商標) 3.1/V5-Hisを使用してEpCAM変異体を作成した。種々のEpCAM変異体の作成は、pcDNA (商標) 3.1/V5-Hisを鋳型とする部位特異的変異誘発

40

50

により実施した。*pfu ultra DNA polymerase* (Merck) を使用してPCRを実行し、全ての変異体コンストラクトをシークエンシングにより確認した。6ウェルプレート中において80%～90%コンフルエントとしたHEK293細胞を、種々のEpCAMのプラスミドによりトランスフェクションした。トランスフェクションを2日間行った後、PBSにより細胞を洗浄した。プロテアーゼインヒビターミックス錠を添加したRIPAバッファーにより細胞を抽出し、20,000gにおいて30分間4°Cで遠心分離した。野生型及び変異型組み換えタンパク質を、一次抗体 (EpAb2-6又はEpAb3-5) 1 μg/ml、続いてHRP標識二次抗体 (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA) と共にインキュベートすることにより染色した。高感度化学発光試薬 (ECL) (Thermo Scientific, Rockford, IL) を用いてシグナルを展開した。

【0071】

10

表面プラズモン共鳴

ネズミ抗体及びヒト化抗体の親和性を、表面プラズモン共鳴 (BIAcore T100, Biacore, Inc) により調べた。EpCAM抗原をSeries S Sensor Chip CM5 (Biacore, Inc) に固定し、注入を流速10 μl/分において実施した。mAbをHBS-EP⁺バッファー (Biacore, Inc) 中に希釈し、注入を流速50 μl/分において1.5分間にわたって実施し、5分間かけて分離させた。各mAbを注入する前に10mMグリシンHCl及び0.2M NaCl (pH2.5) を注入することにより表面を再生した。BIAevaluationソフトウェアを用いglobal fit 1:1 binding modelによりデータを分析した。

【0072】

20

RNA抽出及び定量的リアルタイムRT-PCR

ULTRASPEC RNA isolation reagent (Biotecx Laboratories, Houston, TX) を使用して、全RNAを細胞株から調製した。Super-Script III RNaseH-reverse transcriptase (INVITROGEN (登録商標), Carlsbad, CA) を使用し、製造元の指導書に従ってcDNAを逆転写した。表1に、クローニング及び定量RT-PCRに使用したフォワードプライマー及びリバースプライマーを列記する。定量RT-PCRはLightCycler480 System (Roche Applied Science) により実施した。各試料の遺伝子発現レベルを、同一試料のGAPDH発現レベルにより標準化した。反応は3回実施し、S.D.値を計算した。

【0073】

【表1】

アッセイ	遺伝子	配列(5'→3')	
Q-RT-PCR プライマー	<i>EpCAM</i>	F: CTCCACGTGCTGGTGTGT (配列番号 26) R: TGTTTTAGTTCAATGATGATCCAGTA (配列番号 27)	
	<i>c-Myc</i>	F: AAACACAAACTGAAACAGCTAC (配列番号 28) R: ATTGAGGCAGTTACATTATGG (配列番号 29)	
	<i>Nanog</i>	F: ATGCCTCACACGGAGACTGT (配列番号 30) R: AGGGCTGTCCTGAATAAGCA (配列番号 31)	
	<i>Sox2</i>	F: TATTGAAATCAGTCTGCCAG (配列番号 32) R: ATGTACCTGTTATAAGGATGATATTAGT (配列番号 33)	10
	<i>Oct4</i>	F: AGCAAAACCCGGAGGAGT (配列番号 34) R: CCACATCGGCCTGTGTATATC (配列番号 35)	
	<i>E-カドヘリン</i>	F: GGAACATATGAAAAGTGGGCTTG (配列番号 36) R: AAATTGCCAGGCTCAATGAC (配列番号 37)	
	<i>ビメンチン</i>	F: GTTTCCCTAAACCGCTAGG (配列番号 38) R: AGCGAGAGTGGCAGAGGA (配列番号 39)	
	<i>Snail</i>	F: CTTCGGCTCCAGGAGAGTC (配列番号 40) R: TTCCCACGTGTCCTCATCTGAC (配列番号 41)	
	<i>Slug</i>	F: TGGTTGCTTCAAGGACACAT (配列番号 42) R: GTTGCAGTGAGGGCAAGAA (配列番号 43)	
	<i>GAPDH</i>	F: CTTCACCAACCATGGAGGAGGC (配列番号 44) R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG (配列番号 45)	20
ChIP プライマー	<i>18s rRNA</i>	F: GCAATTATTCCCCATGAACG (配列番号 46) R: GGGACTTAATCAACGCAAGC (配列番号 47)	
	<i>c-Myc</i>	F: GCCTCGATGATTATACTCAC (配列番号 48) R: AAACAGAGTAAGAGAGCCG (配列番号 49)	
	<i>Nanog</i>	F: TCTTCAGGTTCTGTTGCTCG (配列番号 50) R: GTTAATCCCGTCTACCACTCTC (配列番号 51)	
	<i>Sox2</i>	F: GGATAAACATTGTACTGGGAAGGGACA (配列番号 52) R: CAAAGTTCTTTATTGTATGTGAGCA (配列番号 53)	30
	<i>Oct4</i>	F: CGCCTCGAGTGGGAACCTGGAGGATGGCAAG (配列番号 54) R: TATAAGCTTGGGAAGGAAGGCGCCCCAAG (配列番号 55)	
クローニング プライマー	<i>GAPDH</i>	F: TCCAAGCGTGAAGGGT (配列番号 56) R: GAAGGGACTGAGATTGGC (配列番号 57)	
	<i>EpEX</i>	F: TATAAGCTTACCATGGCGCCCCCGC (配列番号 58) R: CGCCTCGAGAATAACCAGCACAA (配列番号 59)	40
	<i>EpCAM</i>	F: GATAAGCTT ATGGCGCCCCCGCAGGTC (配列番号 60) R: GATCTCGAGTGCATTGAGTTCCCTATGCATCTCACC (配列番号 61)	

【0074】

スフェロイドアッセイ

スフェロイド形成にあたり、培養細胞を分離して単一細胞とした。細胞 5×10^3 個をウルトラロー・6ウェルプレート (CORNING (商標)) に6日間にわたって播種し、B27 (INVITROGEN (登録商標))、EGF (10ng/ml)、及びFGF (25ng/ml) を添加したDMEM/F12中に1週間に2回保持した。顕微鏡により球体を計数した。血清による分化誘導アッセイにあたり、10%FBS含有DMEMを添加したマトリゲル被覆プレートにおいて腫瘍球体を7日間培養することにより、分化を誘導した。

【0075】

プラスミド構築

全長ヒトEpCAMを、v5及び6xHisによりタグ付けしたpcDNA3.1ベクター中にクローニングした。まず、pEpEX₂₉₁ (EpCAMの細胞外ドメイン及び膜貫通ドメインから構成される) 及

びpEpICDプラスミドをpcDNA3.1-EpCAMから構築した。c-MYC (-1224/+47、転写開始部位に関連)、OCT4 (-2616/+1)、及びNANOG (-1590/+250)のPCR断片をpGL4.1プラスミド(Pr omega)に挿入することにより、ルシフェラーゼレポーター活性を構築した。EpCAM (pLKO-shEpCAM)の小ヘアピンRNAをコードするレンチウイルス及び対照プラスミドpLKO-AS1を、RNAiコア機関(アカデミア・シニカ)から取得した。

【0076】

レンチウイルス感染

PolyJETトランスフェクションキット(SigmaGen Laboratories)を用い、パッケージングプラスミド(pCMV-R8.91)、エンベロープ(pMDG)、及びヘアピンpLKO-RNAiベクターにより、HEK293Tパッケージング細胞をコトランスフェクションした。トランスフェクション終了後48時間経過して、ウイルスを含有する上清を採取し、ポリブレン(8 μg/ml)を含有する新しい培地と混合して、標的細胞と共にさらに48時間インキュベートすることにより感染させた。形質導入された細胞を、ピューロマイシン(4 μg/ml)により4日間にわたって選択した。

10

【0077】

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

細胞をプレートに播種し、PolyJETを使用して、pcDNA3.1発現ベクター、EpCAM発現ベクター、EpICD発現ベクター、又はEpEX発現ベクター(各400ng)、及びpGL4-Oct4-Luc発現プラスミド、Nanog-Luc発現プラスミド、Sox2-Luc発現プラスミド、又はc-Myc-Luc発現プラスミド(各100ng)により、24時間にわたってコトランスフェクションを実施した。プロモーター活性をDul-Gloルシフェラーゼキット(Promega)により測定し、内部対照としてpRL-TK(20ng)を用いたコトランスフェクションによりトランスフェクション効率を標準化した。

20

【0078】

コロニー形成及び浸潤アッセイ

コロニー形成アッセイにあたり、6ウェルプレートに細胞を密度 5×10^3 個となるよう10日間播種し、続いて固定して、クリスタルバイオレットにより染色した。浸潤アッセイにあたり、マトリゲル(BD Biosciences)被覆されたトランスウェルインサート(transwell insert)(8-μm polycarbonate Nucleopore filter, Corning)に室温において30分間かけて細胞(1×10^5)を播種し、純粋な再構成基底膜を形成した。24時間インキュベートした後、メタノールにより10分間にわたって細胞を固定し、続いて、浸潤を受けていない細胞を綿棒により除去した。浸潤を受けた細胞をDAPI染色により観察し、倒立蛍光顕微鏡検査(Zeiss)により画像化して、ImageJソフトウェアにより定量化した。

30

【0079】

統計的分析

データはいずれも、独立実験を少なくとも3回行うことにより取得した。値は平均±SDにより表す。各実験の試験条件における個々の対照との差異の有意性は、特記しない限りスチューデントt検定により計算した。*p値<0.05、**p値<0.01、又は***p値<0.001である際に、有意差があるとみなした。ログランク検定により生存率を分析した。スピアマン分析により相関係数を調べた。

40

【0080】

結果

口腔癌細胞を認識するmAbの作成及びその特徴の決定

口腔癌に対するモノクローナル抗体の作成にあたり、BALB/cJマウスにSAS細胞を注射した。8,000個を超えるハイブリドーマクローンをスクリーニングし、SAS細胞に対する反応性が高い12個のクローンを選択した(図15)。細胞のELISA及びウェスタンプロット解析から、OCAb9-1はいくつかのヒト癌細胞を特異的に認識するが、NNM細胞又はHUVEC細胞等の正常細胞は認識しないことが示された(図1)。種々のヒト癌組織アレイを使用してさらに実験したところ、OCAb9-1は由来の異なるヒト癌組織を特異的に認識できるが正常組織は認識しないことが示された(図1C)。

50

【0081】

標的分子の同定にあたり、SAS細胞の溶解物を調製し、OCAb9-1標識免疫アフィニティーカロマトグラフィーにより精製した。銀染色及びウェスタンプロットティングにより、OCAb9-1が分子量39kDaの標的タンパク質を認識することが示された（図2A）。LC-MS/MSによりタンパク質同定を実施したところ、OCAb9-1の標的タンパク質はヒトEpCAMであることがわかった（図2B）。免疫沈降及びウェスタンプロットティングを市販の抗EpCAM抗体1144-1（それぞれ、Santa Cruz Biotech及びEpitomics）を使用して平行して実施することにより、EpCAMに対するOCAb9-1の特異性を確認した（図2C）。OCAb9-1を用いたウェスタンプロットティング（図2E）及びFACS（図2F）により、shRNAによるEpCAMのノックダウン後にシグナルが顕著に減少したことが示され（図2D）、従ってOCAb9-1がEpCAMを特異的に認識することが確認された（図2）。

【0082】

OCAb9-1は癌細胞のアポトーシスを誘導できない。そのため、治療用抗体創出を目的として、SAS細胞からEpCAMタンパク質を精製し、EpCAMを認識するmAbを新たに5つ作成した（図16）。細胞のELISA、ウェスタンプロット、及びFACS分析から、これらのmAbは癌細胞株（SAS、NPC039、HCT116、及びSKOV3）に対し強い検出シグナルを呈するが正常細胞株（HUVEC及びNNM）には結合親和性を示さないことがわかった（図16）。FACS（データ記載なし）、免疫蛍光分析（図3A）、及びウェスタンプロットティング（図3B）から、これらのmAbはSAS細胞及びHCT116細胞に対し極めて高い細胞表面結合活性を示すがNNM細胞には反応しないことがわかった。これらのmAbの重鎖及び軽鎖における3つの相補性決定領域（CDR）を図17に示す。これらのmAbはいずれも、EpCAMに対して非常に高い親和性を有し、その速度定数は 10^{-9} ~ 10^{-13} の範囲である（図18）。とりわけ、新たに作成した5つのmAbの1つであるEpAb2-6は、SAS細胞株及びHCT116細胞株を使用した場合に癌細胞のアポトーシスを誘導できた（図3C及び図3D）。

【0083】

in vitro及びin vivoにおける癌細胞増殖の阻害

腫瘍形成におけるEpCAMの機能的役割を評価するため、SAS細胞におけるEpCAMの遺伝子発現をEpCAM shRNAによりノックダウンした。EpCAMがノックダウンされると、増殖率（図4A）、コロニー形成（図4B）、遊走（図4C）、及び浸潤能力（図4D）が有意に減少した。EpCAMのノックダウンが癌細胞の増殖に影響を及ぼし且つin vitroにおける癌細胞のアポトーシスを誘導したことから、in vivoにおいて腫瘍の増殖を直接阻害する用途にEpAb2-6を使用できるか否かを調査した。口腔癌異種移植片を確立し、EpAb2-6又は対照PBSにより処置した。EpAb2-6により処置した腫瘍の体積は、2つの対照の体積と比較して減少した。対照PBS群の腫瘍はEpAb2-6群の腫瘍のそれぞれ1.5倍であった（n=6、*はp < 0.05、図4E）。抗体の治療効力をさらに特徴づけるため、EpAb2-6及びPBSによる処置後の担腫瘍マウスの生存率を比較した。EpAb2-6及びPBSによる処置後の担腫瘍マウスの総生存率の中央値は、それぞれ71日間及び48日間であった（図4F）。EpAb2-6処置により、腫瘍球体の形成が効果的に抑制され（図5C）、腫瘍及び腫瘍球体細胞の双方において低二倍体DNAの含有が促進された（図5A及び図5B）。これらの実験から、EpAb2-6がEpCAMを標的とすることによって、腫瘍球体の形成及び腫瘍の増殖が阻害され、担腫瘍マウスの寿命が長くなることが示された。

【0084】

ヒト結腸癌異種移植片におけるEpAb2-6及びIFLの併用

EpAb2-6及びIFLの併用による治療効力を評価するため、HCT116（ 3×10^6 細胞）をNOD/SCIDマウスに注射した。HCT116異種移植片（ 50mm^3 以下）を有するNOD/SCIDマウスに、EpAb2-6（20mg/kg）及びIFL（5-FU 25mg/kg + ロイコボリン10mg/kg + イリノテカン10mg/kg）の両方を週2回、全8回にわたって静脈内注射した。EpAb2-6及びIFLの両方により処置したマウスの腫瘍は、IFL単独により処置したマウスの腫瘍より小さいことがわかった（*はp < 0.05）（図6A）。IFL群における腫瘍の大きさは徐々に増加し、25日目にはEpAb2-6 + IFLの場合の1.6倍となった。EpAb2-6 + IFL群及びIFL群において、処置期間中に有意な体

重変化はなかった（図6B）。処置終了時、IFLにより処置したマウスの最終平均腫瘍重量は0.23gであり、EpAb2-6 + IFLにより処置したマウスでは0.146g、PBSバッファーを注射したマウスでは0.952gであった（図6C及び図6D）。

【 0 0 8 5 】

ヒト化EpAb2-6（hEpAb2-6）の創出

EpAb2-6は親和性が高く、癌細胞のアポトーシス誘導に対し活性が高いことから、治療用抗体として使用できる可能性が示唆された。ヒト化mAbを創出するため、ハイブリドーマ細胞株由来のEpAb2-6 mAbのV_H及びV_Lセグメントについて塩基配列を決定した（図17）。EpAb2-6のCDRをヒトIgG1骨格にグラフトし、ヒト化EpAb2-6（hEpAb2-6）を作成した（図7A）。hEpAb2-6をCHO-K1細胞において発現させ、培養上清から精製した。ネズミEpAb2-6（mEpAb2-6）の特異性を維持するhEpAb2-6はSAS癌細胞及びHCT116癌細胞の両方を認識したがCCD-1112Sk正常細胞は認識しなかった。細胞のELISA及びウェスタンプロッティングから、hEpAb2-6が高い結合活性を有することがさらに示された（図7B～図7D）。EpCAMに対するEpAb2-6及びhEpAb2-6の親和性を表面プラズモン共鳴により分析したところ、それぞれ0.3491nM及び0.6773nMであることがわかった（図18）。さらに、SAS細胞株及びHCT116細胞株を使用したin vitroにおける研究から、hEpAb2-6が癌細胞のアポトーシスを誘導することがわかった（図7E及び図7F）。以上の結果からヒト化EpAb2-6はEpCAMに対する高い結合親和性を有することが明らかとなり、このことから、癌療法における治療用抗体として、又は腫瘍標的ドラッグデリバリーにおいて、またイメージングにおいて使用し得ることが示唆される。

10

20

【 0 0 8 6 】

EpAb2-6特異的B細胞エピトープの同定

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。ウェスタンプ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KPEGALQNNNDGLYDPDCDE（配列番号63）を示す。

30

【 0 0 8 7 】

EpCAMの上昇と腫瘍開始特性との関連

腫瘍開始細胞は独立して付着することができる。そのため、HCT116結腸癌細胞を二通りの足場非依存性培養、腫瘍球体の形成、及びアノイキス抵抗性選択において選択した（図9A）。興味深いことに、EpCAM mRNAの発現は、接着培養と比較してアノイキス抵抗性細胞（4倍）及びスフェロイド細胞（12倍）の双方において上昇した（図9B右）。フローサイドメトリー分析から、細胞表面のEpCAMは、接着細胞の場合と比較してスフェロイド形成において4倍に（図9C）、アノイキス抵抗性細胞において2倍に（データ記載なし）増加することがわかった。同様に、EpCAMの発現が、接着細胞の場合（69%存在）と比較して、球体形成ヘパトーマHep3B細胞（98%存在）において45%上昇した。この上昇は、分化条件下におけるスフェロイドの再付着後には減少することが観察された。さらに、TIC（腫瘍開

40

50

始細胞)に対するマーカーであるCD133が球体形成Hep3B細胞において4倍増加し、分化後には減少することが確認された(データ記載なし)。また、EpCAMを豊富に含むHCT116細胞亜集団が顕著な球体形成能を示した(図9D)。接着細胞及び球体形成細胞についてその腫瘍形成能を比較したところ、球体由来のHCT116細胞が優れた腫瘍開始性能を示すことが示された(図9E)。スフェロイド由来の腫瘍異種移植片がいずれもより強い自己複製特性を呈することも見い出した(図9F)。このことから、EpCAM発現の上昇が腫瘍開始性能に関与し得ることが示唆される。

【0088】

EpCAMによる初期化遺伝子発現及び腫瘍開始能の調節

定量PCR、ウェスタンプロットティング、及び免疫蛍光分析から一貫して、スフェロイド細胞においてEpCAM及び初期化遺伝子(c-Myc、Oct4、Nanog、及びSox2)の発現がいずれも上方調節されることが示された(図10A)。EpCAMを豊富に含むHCT116細胞においても同様の結果が観察された(図10B)。EpCAMが初期化遺伝子発現を調節できるか否かを調査する目的で、EpCAM構成型発現ベクターをHEK293細胞にトランスフェクションした。定量PCR分析から、EpCAMの過剰発現がc-Myc、Oct4、Nanog、及びSox2のmRNAレベルの上昇を誘導することが示された(図10C)。これとは対照的に、Hep3B細胞及びHCT116細胞の双方において、レンチウイルス介在性shRNAによりEpCAMをノックダウンすると、EpCAM、c-Myc、Oct4、Nanog、及びSox2のmRNA発現が失われた(図10D)。さらに、EpCAMのサイレンシングによりHep3B球体及びHCT116球体の数及び大きさがいずれも減少したことから、腫瘍球体形成能力に対するEpCAMの効果が確認された(図10E)。腫瘍細胞の自己複製能に対するEpCAMの重要性をさらに評価するため、HCT116球体の分離及び再生を3回繰り返し、続いてEpCAMのサイレンシングを実施した。その結果、EpCAM shRNAチャレンジ後、継代培養において、球体の再生能力が大幅に減少することが示された(図10F)。また、*in vivo*における段階希釈されたHCT116スフェロイドの移植から、腫瘍球体においてEpCAMをノックダウンすると潜在的腫瘍開始能力が有意に妨害され腫瘍の潜伏が効果的に抑制されることが明らかとなった(図10G)。総じて、これらのデータから、EpCAMが初期化遺伝子発現の調節及び自己複製能の維持において必須であることが示された。

【0089】

EpCAMによるEMTの進行及び腫瘍形成の調節

上皮間葉転換(EMT)により、腫瘍細胞の幹細胞特性の獲得が可能となることが示された(Mani et al., 2008)。そこで、EMTの進行がEpCAMにより制御されるか否かの調査を試みた。免疫蛍光分析から、EpCAMノックダウン後におけるEMTマーカーの変化(上皮マーカーE-カドヘリン、及びサイトケラチン18の上方調節)及び間葉マーカーの変化(ビメンチンの下方調節)が示された(図11A)。リアルタイムPCRのデータから、ベクター単独で処置した細胞の場合と比較して、EpCAMノックダウン細胞においてmRNAレベル及びタンパク質濃度の双方がE-カドヘリンの場合に増加し、ビメンチンの場合に減少したことが認められた(図11B)。snail及びslug等の他のEMT調節転写因子についても、EpCAMノックダウン細胞、及びEpCAM低発現細胞の双方において同様に減少した(図11B及び図11C)。腫瘍形成能に対するEpCAMの効果を評価したところ、EpCAMを抑制した結果として、*in vitro*における浸潤能力及びコロニー形成能力が低減されたことが明らかとなった(図11D及び図11E)。また、EpCAMの抑制により、*in vivo*における異種移植片の腫瘍の増殖が阻害された(図11F)。原発性腫瘍抽出物に由来するRNA試料により、ベクター単独の場合と比較して、EpCAMノックダウン腫瘍細胞においてEpCAM、初期化遺伝子(c-Myc、Oct4、Nanog、及びSox2)、及び間葉マーカー(ビメンチン及びsnail)の発現が有意に減少することが示された(図11G)。これらのデータから、EpCAMがEMTの進行及び腫瘍形成の調節に関与することが示された。

【0090】

タンパク質分解によるEpICDの切断とEpCAMのシグナル伝達調節との関連

EpCAMの構造には細胞外ドメイン(EpEx)、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメイン(EpICD)が含まれる。EpExは上皮増殖因子様ドメイン2つ及び低システイン領域から構成され

10

20

30

40

50

、EpICDはアミノ酸26個からなる短い鎖から構成される。初期化遺伝子の調節及び腫瘍形成性に対するEpICDの効果を検査した。レーザー共焦点画像から、可溶性EpICDシグナルがHCT116細胞の細胞質及び核の双方において検出されたが(図12A)、これに対しDAPT(-セクレターゼ阻害剤)存在下においては、この現象は生じない代わりにEpICDの大部分が膜結合EpEXとの共局在化を示す(図12A)ことがわかった。また、可溶性EpICDの発現は、接着性腫瘍切片においてよりもスフェロイド由来の腫瘍切片において多かった。ウェスタンプロット解析から、293T/EpCAM-v5細胞において分子量40kDaのメジャーなバンド(EpCAM-v5)及び10kDa未満のマイナーバンド(EpICD-v5)が確認されたが、可溶性EpICD-v5(10kDa)の発現はDAPT処理により減少した(図12B)。DAPT処理によりビメンチン、snail、及びslugの発現が抑制され(図12C)、これに伴って腫瘍の浸潤性及び球体形成能力が減少した(図12D及び図12E)。EpICDが介在する初期化遺伝子に対する転写調節をさらに分析するにあたり、EpCAM又はEpICDをc-MYC、OCT4、NANOG、及びSOX2の暫定調節領域と共にコトランスクレクションしたところ、EpCAM及びEpICDの双方により上記4つの遺伝子の転写活性が上方調節された(図12F及び図12H)。しかし、EpCAMに誘導された上記活性化はDAPTの存在により阻止された(図12G)。また、クロマチン免疫沈降アッセイから、EpICDの存在がHCT116細胞のc-MYCプロモーター(エクソン1ではなく近位上流領域)、OCT4プロモーター(遠位上流領域)、NANOGプロモーター(上流領域)、及びSOX2プロモーター(下流領域)において認められたが(図12I及び図12J)、この現象は、EpCAMをほとんど発現していない正常鼻粘膜細胞(NNM)においては見られなかった(データ記載なし)。

【0091】

10

EpCAMの細胞外ドメインの、EpCAMのシグナル伝達における活性化剤としての働き

EpCAMの細胞外ドメイン、及び膜貫通ドメインを含有するEpICD切断型ベクター(EpEX_{291-v5})をさらに構築し(図13A)、初期化遺伝子発現の制御におけるEpICDの重要性を確認した。予想外にも、EpEX_{291-v5}と共にHCT116細胞をトランスクレクションした場合においてもc-MYC、OCT4、NANOG、及びSOX2のレポーター活性が誘導された。可溶性EpEX(sEpEX)により処置した場合にも同様の結果が観察され(図13B)、このことから、EpCAMの細胞外ドメインの分断又は遊離がEpCAMのシグナル伝達の調整において役割を果たし得ることが示唆される。この仮説を試験する目的で、EpCAMの細胞外ドメインに対する抗体と共にHCT116細胞の培養上清を免疫沈降させた。その結果、EpEXの遊離の増加が血清存在下において確認された(図13C)。さらに、EpCAMノックダウン細胞においてEpEXの遊離の減少が確認された(図13D)。また、DAPT(-セクレターゼ阻害剤)、TAPI(TNF-α変換酵素阻害剤)、又はその両方により処理すると、EpEXの遊離が生じず、またEpICDの切断も阻害された。しかし、膜結合EpCAMはこれらの処置による影響を受けなかった(図13E)。HCT116細胞においてEpEX_{291-v5}を強制発現させた結果、培養上清中におけるEpEXの離脱が増加し、EpEX_{291-v5}トランスクレクタント及びsEpEX処置細胞の双方においてEpICDの切断及びビメンチンの発現の誘導が認められた(図13F)。また、ヒト結腸癌検体を免疫蛍光分析に供したところ、核内で可溶性EpICDを発現する一部の腫瘍細胞が膜EpEX検出シグナルを失っているのに対し、他の腫瘍細胞又はその近傍の粘膜細胞に関してはその細胞膜中においてEpICD及びEpEXが完全に共局在化されていることが明らかとなった。正常結腸組織においてはEpEX及びEpICDいずれの発現も減少した(図14A)。

20

【0092】

30

ヒト結腸癌におけるEpCAM/EpICDの発現と初期化因子との相関関係

EpCAM及びEpICDの発現と初期化因子及び腫瘍悪性度との関係についてさらに分析した。その結果、正常結腸組織の場合と比較して、癌性結腸組織においてEpICDの発現が増加することが示された。癌におけるEpICDの発現レベルは腫瘍グレードと関連を有するようであったが、統計的有意な差異はなかった(図14B及び図14C)。また、核においてEpICDを発現する一部の腫瘍組織(49例のうち24例)において、EpICDを発現する領域は全領域中で相当に小さいことも見い出した。シグナルの大部分はサイトゾル区画又は膜区画において検出され(図14D)、このことから、EpICDの核移行は動的な一過性の調節であることが示唆される。EpCAMにおけるmRNAレベルをさらに評価し、このmRNAレベルと、42例の結腸

40

50

癌パネルから取得した上記4つの初期化因子との相関関係をさらに評価したところ、EpCAMの発現と相関関係にあるのはc-MYC（係数=0.501、中程度の相関関係）、NANOG（係数=0.513、中程度の相関関係）、及びOCT4（係数=0.244、重要な相関関係はない）であることが示された（図14E）。

【0093】

結論として、EpCAM及び幹細胞性遺伝子の共発現がTICにおいて上昇することが示された。EpCAMは、初期化因子（c-Myc、Oct4、Nanog、及びSox2）の発現及びEMTの発現を共に上方調節する。EpCAMのEpEX及びEpICDへのタンパク質分解は、EpCAMのシグナル伝達の調整において重要な役割を果たしていた。EpICDの核移行により初期化遺伝子の発現が調節され、一方、細胞外におけるEpEXの遊離によりEpICDの更なる活性化が誘発される。EpCAMの抑制又はEpICD切断の阻止により、*in vitro*及び*in vivo*の双方において浸潤性、増殖、及び自己複製能が低減される。この結果は、EpCAMの過剰発現により腫瘍開始及び腫瘍進行の促進が助長されることを示す。EpCAM mAbを、癌の診断及び予後並びに癌を対象とする療法及びイメージングに使用できる。

10

【0094】

EpCAM、又は上皮特異抗原（ESA）は、上皮が形質転換された新生組織形成を同定する際の癌特異抗原である。EpCAMの過剰発現は転移性腫瘍細胞、薬剤耐性腫瘍細胞、及び循環腫瘍細胞に関連し、これらはいずれもTICの特徴である。CD44⁺/CD24⁻をEpCAMと併用したイムノアッセイ染色により、膵臓癌、卵巣癌、肝臓癌、及び結腸直腸癌におけるTICの同定に成功した研究がいくつある。それらのデータから、EpCAMの上方調節が腫瘍球体の培養において確認されたことが示され、このことから腫瘍の開始、増殖、及び浸潤におけるその影響が大きいことが示されるが、EpCAMのノックダウン後には自己複製及び開始能が阻害された。一方、腫瘍細胞におけるEpCAMの機能喪失によりクローンの増殖、浸潤、及び腫瘍形成が抑制された。また、EpCAMの発現増加が腫瘍グレードに関連していることがわかり、このことから、腫瘍の進行においてEpCAMが重要な役割を果たしていることが示される。

20

【0095】

腫瘍の形成におけるEpCAM及びTICの関連については数多く報告されているが、TIC中のEpCAMによる調節を受ける遺伝的特性がどのようなものであるかは未だ明確になっていない。上記遺伝子のレシプロケイションとTICとを関連づける直接的な証拠が未だ十分でないからである。本発明者らのデータから、腫瘍球体及び球体由来の異種移植片においてc-Myc、Oct4、Nanog、及びSox2が存在する場合にEpCAM発現の上昇及び持続が認められた。EpCAMによるその作用の獲得又は喪失は上記遺伝子の産生に直接影響を及ぼし、ルシフェラーゼアッセイにより上記遺伝子がEpCAMに調節されることが確認された。さらに、癌組織mRNAアレイのデータから、EpCAMの発現がc-Myc、Oct4、Nanog、及びSox2と相関関係にあることが確認された。総じて、これらのデータから、EpCAMによる初期化因子の直接的な調節が腫瘍開始を促進し得ることが示された。

30

【0096】

幹細胞性遺伝子に加えて上皮間葉転換の促進もまた、EpCAMが介在する腫瘍の進行に「関連」し得る。本発明者らのデータによれば、EpCAMを過剰発現する細胞においてsnail、slug、及びビメンチンの上方調節及びE-カドヘリンの下方調節の双方が認められた。逆に、EpCAMのノックダウン又はDAPTの添加により、EpICDの遊離が阻止はされたが、snail、slug、及びビメンチンのmRNAレベルが抑制され、これに伴って腫瘍浸潤が減少した。

40

【0097】

EpICDは、TNF-α変換酵素（TACE）及び-セクレターゼ（プレセニリン2、PS2）によるタンパク質分解、続いてFHL2及びTcf/Lef1による調節を受ける。培養腫瘍細胞、球体由来腫瘍異種移植片、及びヒト結腸癌において一貫して、細胞質及び核の両方における可溶性EpICDの蓄積が認められることを見い出した。クロマチン免疫沈降及びルシフェラーゼアッセイから、EpICDが初期化遺伝子に結合し且つ初期化遺伝子をトランス活性化することが示された。-セクレターゼ阻害剤により処理したところEpICDの切断及び核移行が阻止

50

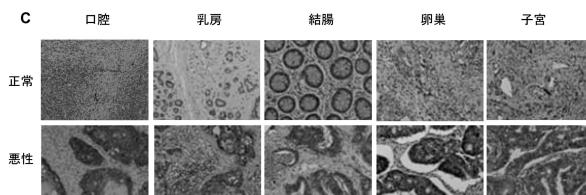
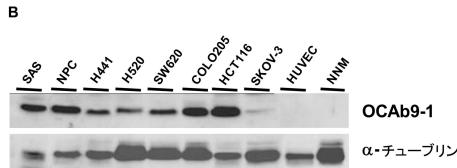
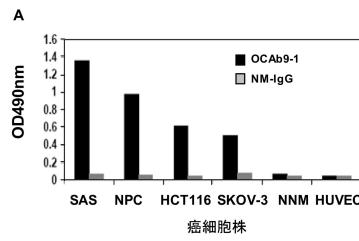
され、これに伴って初期化因子及びEMT遺伝子の発現が抑制され、したがって腫瘍の自己複製及び浸潤が阻害された。しかし、細胞質又は核内における可溶性EpICDの発現は全腫瘍細胞において均一ではなく、このことから、EpICDの切断は動的なプロセスであり得ることが示唆された。本発明者らは、EpICDに加えてEpEXの遊離がEpCAMのシグナル伝達事象を誘発し得ることを明らかにした。上清中におけるEpEXの遊離は血清濃度に応じて増加し、DAPT又はTAPIのいずれかを添加するとEpEX及びEpICDの遊離が阻止された。また、sEpEX処置又はpEpEXによるトランスフェクションによりEpICDの切断及び初期化遺伝子活性化の誘導が促進され、このことから、EpEXの切断によりEpCAMのシグナル伝達が開始され得、またその遊離によりEpCAMの活性化がさらに誘発され得ることが示唆された。

【0098】

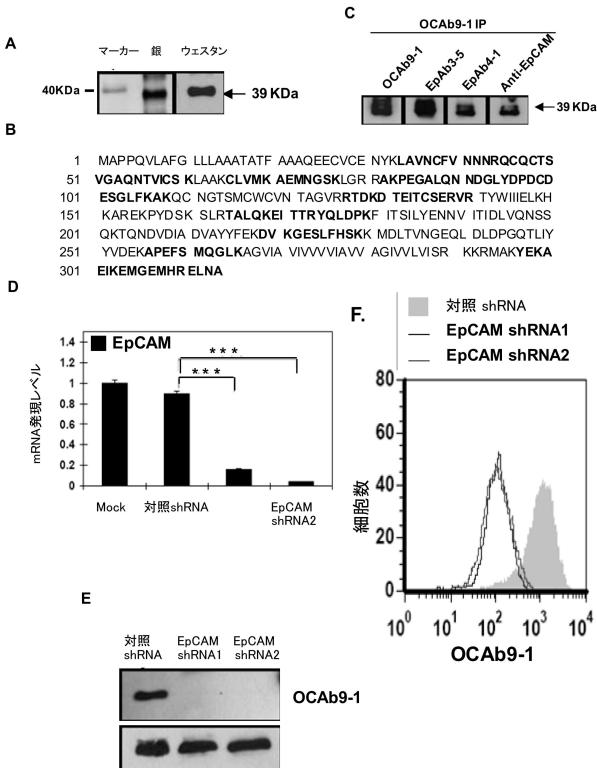
10

本発明は、EpCAMに対する結合親和性が非常に大きい新規EpCAM mAbに関し、この新規EpCAM mAbは有効な腫瘍阻害活性を有するため、その治療的意義を期待し得る。総じて、本発明者らは、EpCAM、特にEpICDの増加により幹細胞性遺伝子の発現及びEMTプロセスが上方調節されてTICにおける腫瘍形成が促進されることに対し、包括的な証拠を示す。さらに、EpEXの遊離はオートクライン効果又はパラクライン効果を介してEpCAMのシグナル伝達事象を誘発し得る。したがって、処置又は検出に使用されるEpCAM及び/又はEpEXに対する阻害剤又は抗体の創出及び適用は、腫瘍及びTICの根絶に有用であり、また腫瘍を対象とするイメージングに際しても有用である。

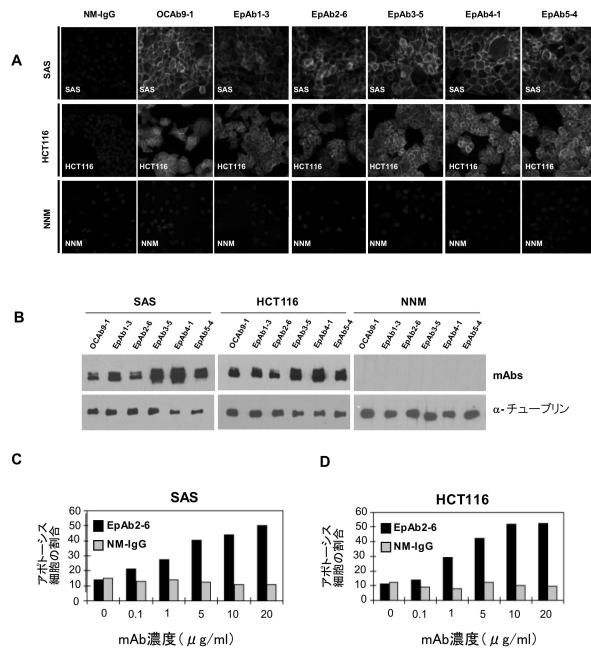
【図1】



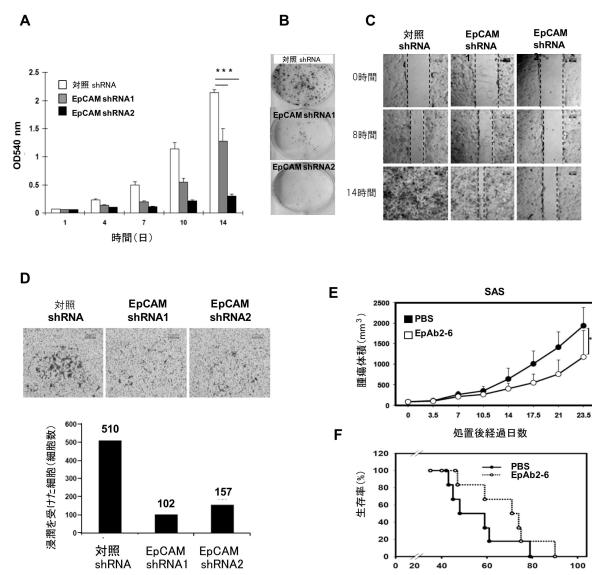
【図2】



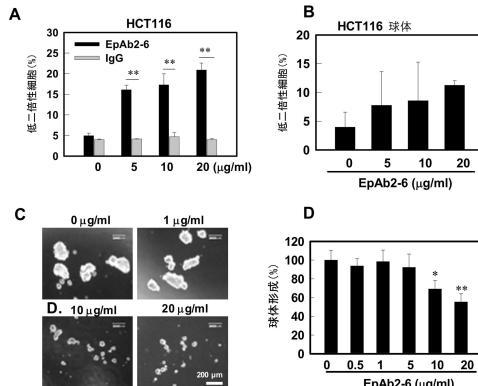
【図3】



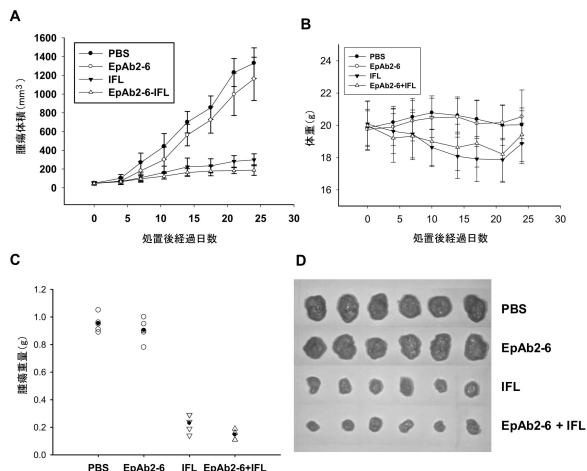
【図4】



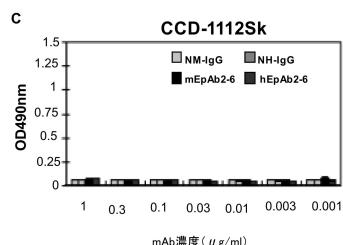
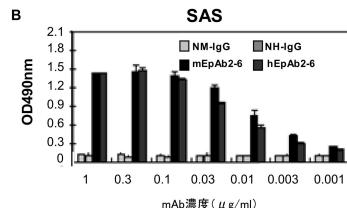
【図5 A - 5 D】



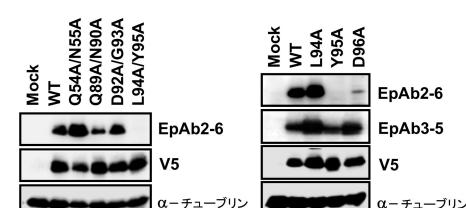
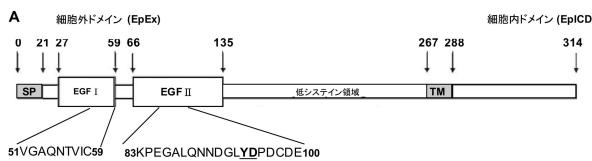
【図6】



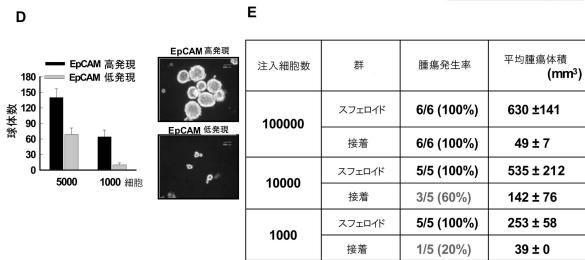
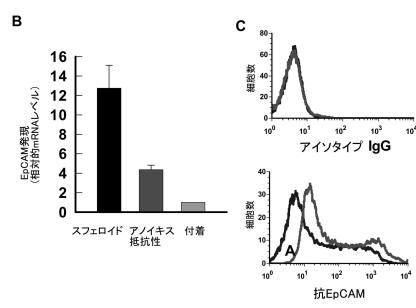
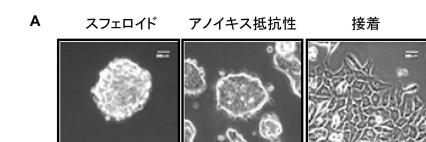
【圖 7】



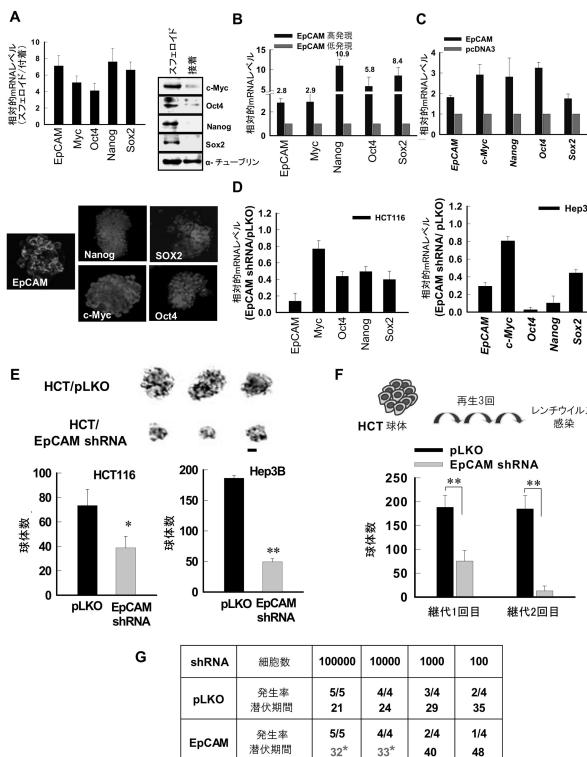
【図8A-B】



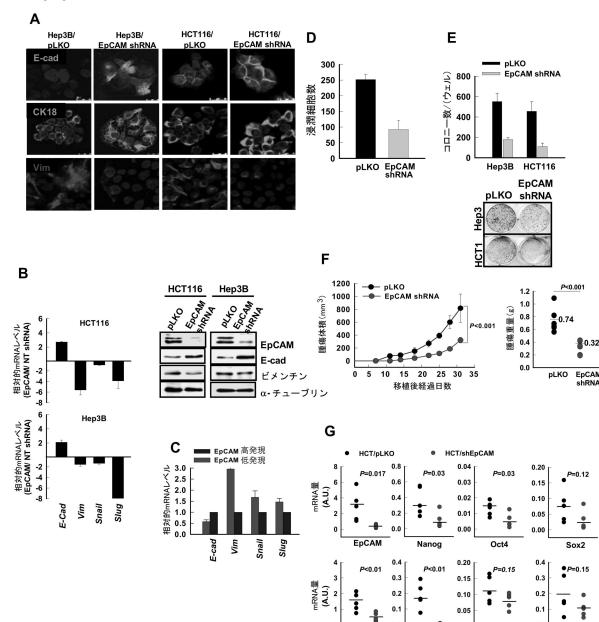
(9)



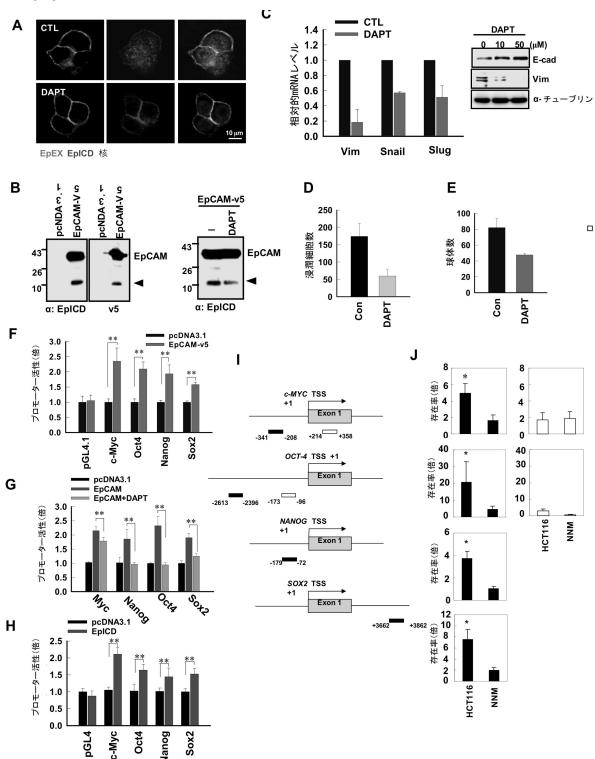
【 义 1 0 】



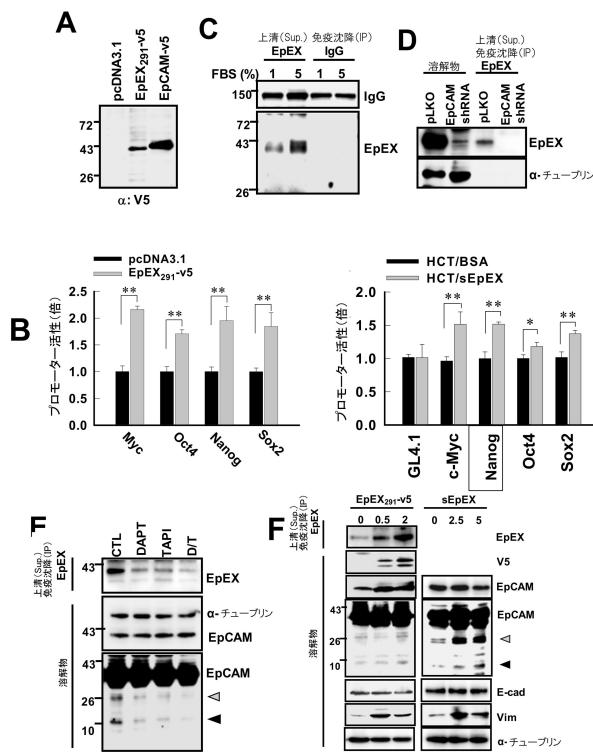
【図11】



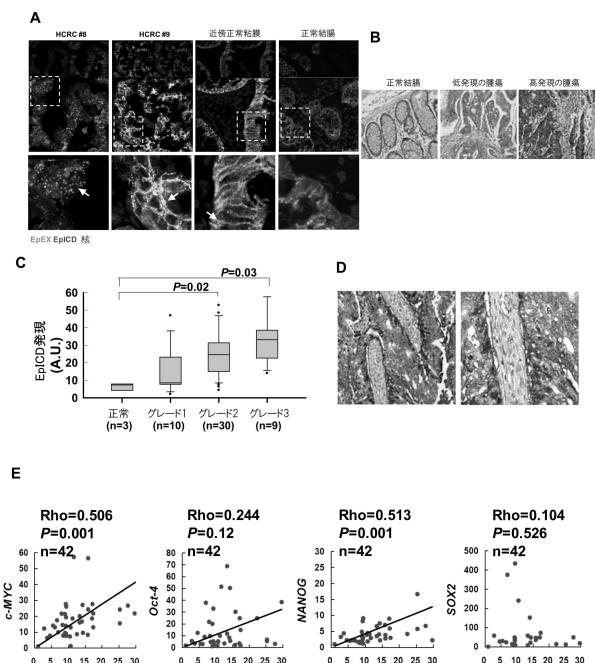
【図12】



【図13】



【図14】



【図15】

mAb クローン	ELISA	WB	プロ-		細胞株												
			サイト	タイプ	SAS	NPC	HCT116	MaHa	PaCa	CL1-5	PC3	HTB10	A498	SKOV3	U2OS	HUV	NN
OCAb1-1	+	+	IgM	X	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	M
OCAb2-6	+	+	IgG2a, κ		+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCAb3-3	+	+	IgG1, κ		+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCAb4-10	+	+	IgG1, κ		+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCAb5-5	+	+	IgG2a, κ		+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCAb6-1	+	-	IgG2a, κ		+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCAb7-1	+	+	IgG1, κ		++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCAb8-6	+	-	IgG1, κ		++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCAb9-1	+	+	IgG1, κ		++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCAb11-3	+	-	IgG1, κ		+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OCAb12-1	+	-	IgG1, 2a		+++	++/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

省略形について、+は結合を表し(+++はOD490nm>1.5, ++はOD490nm=1~1.5, +はOD490nm=0.5~1, +/-はOD490nm=0.2~0.5, -は結合なしを表す(OD490nm<0.2))。

【図17】

EpAb2-6のV _H 及びV _L ドメインのアミノ酸配列									
V _H ドメイン(配列番号2)					FW1	CDR1	FW2	CDR2	
EVQLVESGP ¹ ELKKPG ² ETVKISCKAS					(配列番号10)	YV ³ TDY ⁴ SMH	WVKQAPG ⁵ GKLWMGW	INTE ⁶ TGEP	
EpAb2-6 (配列番号10)					FW3	CDR3	FW4	CDR2	
TFAADF ⁷ KGRF ⁸ AFSLETSARTTYLQINNLKNEDTATYFCAR					TAVY	WGQQTSLT ¹³ VSS	(配列番号11)	FW4	フレギー
EpAb2-6 (配列番号12)					V _L	YF ¹⁴ YI ¹⁵ YF ¹⁶	(配列番号12)	V _H 9	
V _L ドメイン(配列番号3)					FW1	CDR1	FW2	CDR2	
DIQLTQPSL ¹⁷ SLSA ¹⁸ SLGERVSLTC					RASQ ¹⁹ EVS ²⁰ LSL	WLUQKPD ²¹ TIKRLIY	ATSTLDS		
EpAb2-6 (配列番号14)					(配列番号14)	(配列番号15)	(配列番号16)		
FW3					CDR3	FW4	CDR2		
GVPK ²⁷ RF ²⁸ SGRS ²⁹ GS ³⁰ DS ³¹ TS ³² LE ³³ ED ³⁴ ADYYC					LOVASY ³⁵ PWT	FGGGT ³⁶ LE ³⁷ KRADA ³⁸ APTVS	(配列番号17)	V _H 9	
EpAb2-6 (配列番号16)					(配列番号16)	(配列番号17)	(配列番号18)		

V_Hドメイン及びV_Lドメインの間にについて相補性決定領域1~3(CDR1~3)及びフレームワーク領域1~4(FW1~4)を示す。

V_Hドメインアミノ酸をVBASEデータベース上に並び替列させた。

【図16】

抗EpCAM mAbの主要な特徴の概要																		
細胞株																		
mAb クローン	ELISA	WB	プロ-	サイト	タイプ	SAS	NPC	HCT116	SKOV3	HUVEC	NN	M	OCAb9-1	EpAb1-3	EpAb2-6	EpAb3-5	EpAb4-1	EpAb5-4
OCAb9-1	+	+	+	IgG1, κ		++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EpAb1-3	+	+	+	IgG1, κ		++	+	+	+/−	+	-	-	-	-	-	-	-	-
EpAb2-6	+	+	+	IgG2a, κ		+++	++	+	+	+/−	-	-	-	-	-	-	-	-
EpAb3-5	+	+	+	IgG2b, κ		+++	++	+	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-
EpAb4-1	+	+	+	IgG1, κ		++	++	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EpAb5-4	+	+	+	IgG1, κ		++	+	+	+/−	+	-	-	-	-	-	-	-	-

省略形について、+は結合を表し(+++はOD490nm>1.5, ++はOD490nm=1~1.5, +はOD490nm=0.5~1, +/-はOD490nm=0.2~0.5, -は結合なしを表す(OD490nm<0.2))。

【図18】

mAb クローン	K _d (M)	K _{on} (M ⁻¹ S ⁻¹)	K _{off} (S ⁻¹)
OCAb9-1	7.168 × 10 ⁻¹¹	3.284 × 10 ⁶	2.354 × 10 ⁻⁴
EpAb1-3	1.833 × 10 ⁻⁹	1.849 × 10 ⁵	3.389 × 10 ⁻⁴
EpAb2-6	3.491 × 10 ⁻¹⁰	4.007 × 10 ⁵	1.399 × 10 ⁻⁴
EpAb3-5	≤4.66 × 10 ⁻¹³	2.961 × 10 ⁶	1.38 × 10 ⁻⁶
EpAb4-1	1.228 × 10 ⁻¹²	2.865 × 10 ⁵	3.519 × 10 ⁻⁷
EpAb5-4	2.431 × 10 ⁻¹⁰	6.221 × 10 ⁵	1.513 × 10 ⁻⁴
hEpAb2-6	6.773 × 10 ⁻¹⁰	3.756 × 10 ⁵	2.544 × 10 ⁻⁴

K_d及びK_{off}を、SRPによりBIAcoreにおいて精製mAbを使用して測定し、K_dをBIAevaluationソフトウェアにより計算した。

【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のアライメント																	
クローン																	
ファージ配列																	
PC-26	H	G	T	Q	M	T	W	W	D	P	D	L					
PC-11,-29					M	Q	G	K	D	W	M	D	L	S	P	T	
PC-3,-4,-18	S	T	Q	M	S	Y	R	D	Q	D	L	Y					
PC-12	V	P	M	S	R	P	E	W	N	D	L	Y					
PC-1,-19,-27,-35	V	P	V	G	R	L	D	F	I	D	L	Y					
PC-21,-37	T	Q	K	M	D	A	H	D	L	Y	P	V					
PC-20	F	Q	V	G	D	L	Y	D	H	M	W	N					
PC-2,-7,-8	W	Q	N	V	E	Y	D	M	R	E	W	I					
PC-44	V	T	P	Q	A	K	D	W	Y	T	L	Y					
EpCAM ₈₃₋₁₀₀	K	P	E	G	A	L	Q	N	N	D	G	L	Y	D	P	D	C

※太字はコンセンサスアミノ酸を示す。

【配列表】

0006163502000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 D
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08

(72)発明者 ウー, ハン チュン
 台湾 105 タイペイ シティ, ソンシャン ディストリクト, シンドン ストリート, レーン
 66, ナンバー 12, 5エフ

(72)発明者 リヤオ, メイ イン
 台湾 106 タイペイ シティ, ダーアン ディストリクト, ルーズベルト ロード, セクショ
 ン 4, レーン 119, ナンバー 38, 7エフ

(72)発明者 リン, チェン ウェイ
 台湾 115 タイペイ, ナンカン ディストリクト, チエンフー ロード 177, 11エフ

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 米国特許出願公開第2007/0243201(US, A1)

特表2001-519824 (JP, A)
 国際公開第2011/079283 (WO, A1)
 国際公開第2010/142990 (WO, A1)
 特開2011-193728 (JP, A)
 特表2004-533248 (JP, A)
 国際公開第2010/007724 (WO, A1)
 特表2010-523096 (JP, A)
 国際公開第2011/032296 (WO, A1)
 MOSOLITS S. et al, Cancer Immunol. Immunother., 51(2002), p.209-218

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 16 / 2 8
 C 0 7 K 16 / 4 6
 A 6 1 K 9 / 1 2 7
 A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
 A 6 1 P 3 5 / 0 0
 G 0 1 N 3 3 / 5 7 4
 C 1 2 N 1 5 / 0 9
 C 1 2 P 2 1 / 0 8
 UniProt/GenSeq
 PubMed
 JST Plus/JMED Plus/JST7580 (JDreamIII)
 Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPI DS
 (STN)