

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6746845号  
(P6746845)

(45) 発行日 令和2年8月26日(2020.8.26)

(24) 登録日 令和2年8月11日(2020.8.11)

(51) Int.Cl.	F 1	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 Z N A D
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/04
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 N

請求項の数 17 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-549500 (P2017-549500)
(86) (22) 出願日	平成28年4月22日 (2016.4.22)
(65) 公表番号	特表2018-517888 (P2018-517888A)
(43) 公表日	平成30年7月5日 (2018.7.5)
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/028765
(87) 國際公開番号	W02016/172427
(87) 國際公開日	平成28年10月27日 (2016.10.27)
審査請求日	平成31年3月4日 (2019.3.4)
(31) 優先権主張番号	62/151,169
(32) 優先日	平成27年4月22日 (2015.4.22)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者	504149971 イミュー・メディクス、インコーポレイテッド I M M U N O M E D I C S, I N C. アメリカ合衆国ニュージャージー州、モリス、プレインズ、アメリカン、ロード、300
(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(74) 代理人	100162352 弁理士 酒巻 順一郎
(74) 代理人	100123995 弁理士 野田 雅一
(74) 代理人	100165526 弁理士 阿部 寛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】循環T R O P - 2 陽性癌細胞の単離、検出、診断及び／または特徴付け

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- T r o p - 2 + 循環腫瘍細胞 ( C T C ) を検出する方法であって、  
 a ) T r o p - 2 + 癌を有する疑いのある対象由来の血液に、抗 T r o p - 2 抗体またはその抗原結合性断片を露出させることと、  
 b ) 前記抗 T r o p - 2 抗体またはその断片を、前記 T r o p - 2 + 循環腫瘍細胞に結合させることと、  
 c ) 前記抗 T r o p - 2 抗体またはその断片に結合した前記 C T C を検出することを含み、

抗 T r o p - 2 抗体が利用される唯一の抗腫瘍関連抗原捕捉抗体であり、

更に、腫瘍関連抗原に結合する第 2 の抗体またはその抗原結合性断片に前記 C T C を露出させることを含み、ここで前記第 2 の抗体またはその断片は、放射性同位体、色素、造影剤、発光剤、化学発光剤、蛍光剤、及び増強剤からなる群から選択される少なくとも 1 つの診断剤に結合され、

前記抗 T r o p - 2 抗体が R S 7 抗体であり、前記第 2 の抗体が、R S 7 とは異なるエピトープに結合する抗 T r o p - 2 抗体である、方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、更に、前記 C T C を濃縮または単離することを含む方法。

## 【請求項 3】

10

20

請求項 1 又は 2 に記載の方法であって、前記抗 Trop - 2 抗体またはその断片が磁性ナノ粒子に結合される方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、更に、磁場を用いて前記磁性ナノ粒子に結合した CT C を正常細胞から分離することを含む、方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法であって、前記抗 Trop - 2 抗体またはその断片が、軽鎖 CDR 配列の CDR1 (KASQDVSIAVA、配列番号 1)、CDR2 (SASYRYT、配列番号 2)、及び CDR3 (QQHYITPLT、配列番号 3)、並びに重鎖 CDR 配列の CDR1 (NYGMN、配列番号 4)、CDR2 (WINTY 10 TGEPPTYTDDFKG、配列番号 5) 及び CDR3 (GGFGSSYWYFDV、配列番号 6) を含む R S 7 抗体である方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法であって、前記抗 Trop - 2 抗体が、マウス R S 7、h R S 7、M A B 6 5 0、K 5 - 7 0、K 5 - 1 0 7、K 5 - 1 1 6 - 2 - 1、T 6 - 1 6、T 5 - 8 6、B R 1 1 0、A R 4 7 A 6 . 4 . 2、3 E 9、6 G 1 1、7 E 6、1 5 E 2、1 8 B 1、P D 0 8 0 1 9、P D 0 8 0 2 0、P D 0 8 0 2 1、7 7 2 2 0、K M 4 0 9 7、K M 4 5 9 0、A 1、A 4、1 6 2 - 2 5 . 3、1 6 2 - 4 6 . 2、および P r 1 E 1 1 からなる群から選択される、方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法であって、前記抗 Trop - 2 抗体が、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である、方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法であって、前記抗 Trop - 2 抗体が、放射性同位元素、色素、造影剤、発光剤、化学発光剤、蛍光剤、及び増強剤からなる群から選択される少なくとも 1 つの診断剤に結合される、方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法であって、前記 CTC が、蛍光顕微鏡法、FISH (蛍光 in - situ ハイブリダイゼーション)、免疫組織化学、FACS (蛍光活性化された細胞の選別)、フローサイトメトリー、マイクロ流体アッセイ、及び RT - PCR からなる群から選択される方法により検出される、方法。 30

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法であって、更に、蛍光標識抗体により、上皮癌マーカーについて前記 CTC を分析することを含む、方法。

【請求項 11】

請求項 1\_0 に記載の方法であって、前記 CTC が、FISH (蛍光インサイチューハイブリダイゼーション) により上皮癌マーカーについて分析される、方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 1\_1 のいずれか一項に記載の方法であって、更に、RT - PCR により上皮癌マーカーについて CTC を分析することを含む、方法。 40

【請求項 13】

請求項 1 ~ 1\_2 のいずれか一項に記載の方法であって、前記 Trop - 2<sup>+</sup> 癌が、膵臓癌、トリプルネガティブ乳癌、転移性結腸直腸癌、HER<sup>+</sup>、ER<sup>+</sup>、プロゲステロン<sup>+</sup> 乳癌、転移性非小細胞肺癌 (NSCLC)、転移性膵臓癌、転移性食道癌、転移性尿路上皮癌、転移性腎細胞癌、転移性胃癌、転移性前立腺癌及び転移性小細胞肺癌を含む転移性 Trop - 2 陽性癌からなる群から選択される、方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 1\_3 のいずれか一項に記載の方法であって、前記抗 Trop - 2 抗体またはその断片が、エクスピボで血液試料に露出される、方法。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 1\_3 のいずれか一項に記載の方法であって、前記抗 Trop - 2 抗体またはその断片が、インビボで血液試料に露出される、方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 1\_5 のいずれか一項に記載の方法であって、Trop - 2<sup>+</sup> CTC の存在は転移性癌のための診断に役立つ、方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 1\_6 のいずれか一項に記載の方法であって、前記対象がヒト対象である、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願

本出願は、2015年4月22日に出願された米国仮特許出願第 62/151,169 号の 35 USC 119(e) に基づく利益を主張し、その文全体を参照により本明細書に援用する。

【0002】

配列表

本出願は、EFS-Web を介して ASCI I フォーマットで提出された、その全体が参考により本明細書に援用される配列表を含んでいる。2016年4月21日に作成された当該 ASCI I コピーは、IMM359W01\_SL.txt と称され、またサイズは 44,906 バイトである。

20

【0003】

発明の分野

本発明は、好ましくは循環系由来の Trop - 2<sup>+</sup> 癌細胞を単離し、検出し、診断し、及び / または特徴付けるための方法及び組成物に関する。当該方法及び組成物は抗 Trop - 2 抗体を利用するものであり、当該抗体は 1 倍、2 倍または多倍であってよい。好ましい実施形態において、抗 Trop - 2 抗体は当該アッセイで利用される唯一の抗 TAA (腫瘍関連抗原) 捕捉抗体であり、これは Trop - 2 以外には TAA に対する抗体混合物の使用を含まない。別の実施形態において、当該捕捉抗体は、抗 Trop - 2 抗体または断片及び異なる TAA に対する第 2 の抗体または断片を含む二重特異性抗体であってよい。より好ましくは、当該抗体は、齧歯類類抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体もしくはヒト抗体、またはその抗原結合断片である。癌細胞における Trop - 2 の発現は既知の技術を用いて評価することができ、これにはフローサイトメトリーまたは免疫組織化学により検出される抗 Trop - 2 抗体の結合、及び定量的 RT-PCR を含むが、これらに限定されない。循環腫瘍細胞 (CTC) を単離及び / または検出するために開発された自動システム及び装置を、特許請求の範囲に記載された方法を実施することにおいて利用することができ、これには MagSweeper 装置 (Illumina, Inc., San Diego, CA)、LIQUIDBIOSY (登録商標) システム (Cynvenio Biosystems, Inc., Westlake Village, CA)、CELLSEARCH (登録商標) システム (Veridex LLC, Raritan, NJ)、GILUPI CELLCOLLECTOR (商標) (GILUPI GmbH, Potsdam, Germany)、APOSTREAM (登録商標) システム (Apocell, Houston, TX)、ONCOCEE (登録商標) マイクロ流体プラットフォーム (BioCept Laboratories, San Diego, CA)、VerIFAST System (Casavant et al., 2013, Lab Chip 13:391-6; 2014, Lab Chip 14:99-105) または ISOFLUX (商標) システム (Fluxion, South San Francisco, CA) が含まれるが、これらに限定されない。最も好ましくは、抗 Trop - 2 抗体は、軽鎖 CDR 配列の CDR1 (KASQDVSIAVA、配列番号 1)、CDR2 (SASYRYT、配列番号 2)、及び CDR3 (QQHYITPLT、配列番号 3)

30

または QQLYITPLT、配列番号 4) を含む。また、抗 Trop - 2 抗体は、重鎖 CDR 配列の CDR1 (VYDQQHIVRLA、配列番号 1)、CDR2 (SASYRYT、配列番号 2)、及び CDR3 (QQHYITPLT、配列番号 3) を含む。

40

50

)、並びに重鎖 C D R 配列の C D R 1 ( N Y G M N 、配列番号 4 )、 C D R 2 ( W I N T Y T G E P T Y T D D F K G 、配列番号 5 ) 及び C D R 3 ( G G F G S S Y W Y F D V 、配列番号 6 ) を含むマウス抗体、キメラ抗体またはヒト化 R S 7 ( h R S 7 ) 抗体である。しかし、別の実施形態では、以下に述べるように、他の既知の抗 T r o p - 2 抗体を利用することができます。本方法及び組成物は、種々の転移性 T r o p - 2 発現癌、例えば乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌）、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、肺癌、前立腺癌、結腸癌、直腸癌、胃癌、食道癌、膀胱癌、腎臓癌、肺臓癌、甲状腺癌、上皮癌、及び頭頸部癌の濃縮、単離、検出、診断及び／または特徴付けのために適用可能である。抗 T r o p - 2 抗体は、1 以上の標識された検出抗体と組み合わせて利用されてよく、または少なくとも 1 つの診断薬との結合によって直接標識されてもよい。或いは、二重特異性抗体は、 T r o p - 2 についての 1 つの結合部位、及び標的とすることが可能な構築物（典型的には少なくとも 1 つの診断薬で標識された小さなペプチド）上のハプテンについての別の結合部位を含み得る。ある特定の代替実施形態においては、 T r o p - 2 <sup>+</sup> C T C の検出の後に、抗 T r o p - 2 抗体またはその断片を用いて、 T r o p - 2 <sup>+</sup> 癌の治療的処置を行ってよい。好ましくは、この抗体または断片は、少なくとも 1 つの治療剤、例えば抗体、抗体断片、薬物、毒素、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、アポトーシス促進剤、抗血管新生剤、ホウ素化合物、光活性剤もしくは色素または放射性同位体へ複合体化される。より好ましくは、当該治療剤は S N - 3 8 または P 2 P D O X である。  
10

#### 【背景技術】

##### 【 0 0 0 4 】

###### 関連技術

T r o p - 2 ( ヒト栄養膜細胞表面マーカー ) は、正常細胞及び悪性栄養膜細胞において最初に同定された細胞表面糖タンパク質である ( L i p i n s k i et al . , 1 9 8 1 , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A 7 8 : 5 1 4 7 - 5 0 ) 。 T r o p - 2 は、殆どのヒト癌、特に上皮癌及び腺癌において高度に発現される一方、正常組織においては発現が低く制限されると報告されている（例えば、 C u b a s et al . , 2 0 1 0 , M o l e c . C a n c e r 9 : 2 5 3 ; S t e p a n et al . , 2 0 1 1 , J . H i s t o c h e m . C y t o c h e m . 5 9 : 7 0 1 - 1 0 ; V a r u g h e s e et al . , 2 0 1 1 , A m . J . O b s t . G y n . 2 0 5 : 5 6 7 e - e 7 参照）。 T r o p - 2 の発現は、転移、腫瘍の攻撃性増加及び患者の生存低下と関連する ( C u b a s et al . , 2 0 1 0 ; V a r u g h e s e et al . , 2 0 1 1 ) 。 T r o p - 2 の病原性効果は、 E R K 1 / 2 MAPK 経路によって少なくとも部分的に媒介されている ( C u b a s et al . , 2 0 1 0 ) 。  
20  
30

##### 【 0 0 0 5 】

腫瘍進行の早期において、癌細胞が循環系に低濃度で見出され得ることが提案されている（例えば、 K r i s h n a m u r t h y et al . , 2 0 1 3 , C a n c e r M e d i c i n e 2 : 2 2 6 - 3 3 ; A l i x - P a n a b i e r e s & P a n t e l , 2 0 1 3 , C l i n . C h e m . 5 0 : 1 1 0 - 1 8 ; W a n g et al . , F e b . 2 4 , 2 0 1 5 , I n t . J . C l i n . O n c o l , E p u b a h e a d o f p r i n t を参照されたい）。血液試料採取の比較的非侵襲的性質に起因して、疾患初期の癌診断を促進するため、並びに腫瘍進行、疾患予後及び／または薬物療法に対する応答性の予測因子として、 C T C の単離及び検出に大きな関心が寄せられている（例えば、 A l i x - P a n a b i e r e s & P a n t e l , 2 0 1 3 , C l i n . C h e m . 5 0 : 1 1 0 - 1 8 ; W i n e r - J o n e s et al . , 2 0 1 4 , P L o S O n e 9 : e 8 6 7 1 7 ; 米国特許出願公開番号 2 0 1 4 / 0 3 5 7 6 5 9 参照）。

  
40

##### 【 0 0 0 6 】

循環腫瘍細胞を単離及び／または検出するための種々の技術及び装置が開発されている。この分野に関する幾つかの総説が最近発表されている（例えば、 A l i x - P a n a b i e r e s & P a n t e l , 2 0 1 3 , C l i n . C h e m . 5 0 : 1 1 0 - 1 8 ;  
50

Joosse et al., 2014, EMBO Mol. Med. 7: 1 - 11; Truini et al., 2014, Front. Oncol. 4: 242 を参照されたい)。この技術には、一般に腫瘍細胞上に発現された抗原に対する捕捉抗体、並びに磁性ナノ粒子、マイクロ流体デバイス、濾過、磁気分離、遠心分離、フローサイトメトリー及び／または細胞選別デバイス(例えば、細胞分離デバイス)を用いた、CTCの濃縮及び／または単離が含まれている(例えば、Krishnamurthy et al., 2013, Cancer Medicine 2: 226 - 33; Alix-Panabieres & Pantel, 2013, Clin. Chem. 50: 110 - 18; Joosse et al., 2014, EMBO Mol. Med. 7: 1 - 11; Truini et al., 2014, Front. Oncol. 4: 242; Powell et al., 2012, PLoS ONE 7:e33788; Winer-Jones et al., 2014, PLoS One 9:e86717; Gupta et al., 2012, Biomicrofluidics 6: 24133; Saucedo-Zeni et al., 2012, Int. J. Oncol. 41: 1241 - 50; Harb et al., 2013, Transl. Oncol. 6: 528 - 38)。次いで、濃縮または単離されたCTCは、以下で更に述べるように、種々の既知の方法を用いて分析され得る。CTCの分離及び検出に使用されているシステムまたは装置には、CELLSEARCH(登録商標)システム(例えば、Truini et al., 2014, Front. Oncol. 4: 242)、MagSweeper装置(例えば、Powell et al., 2012, PLoS ONE 7:e33788)、LIQUIDBIOPSY(登録商標)システム(Winer-Jones et al., 2014, PLoS One 9:e86717)、APOSTREAM(登録商標)システム(例えば、Gupta et al., 2012, Biomicrofluidics 6: 24133)、GILUPI CELLCOLLECTOR(商標)(例えば、Saucedo-Zeni et al., 2012, Int. J. Oncol. 41: 1241 - 50)及びISOFLUX(商標)システム(Harb et al., 2013, Transl. Oncol. 6: 528 - 38)が含まれる。

#### 【0007】

今まで、CTC検出のための唯一のFDA承認技術には、CELLSEARCH(登録商標)プラットフォーム(Veridex LLC, Raritan, NJ)が含まれるが、これはCTCsを捕捉するために、磁性ナノ粒子に付着した抗EpCAM抗体を利用する。結合された細胞の検出は、サイトケラチン(CK)及びCD45に対する蛍光標識抗体を用いて生じる。磁性粒子に結合された蛍光標識細胞を強い磁場を用いて分離し、デジタル蛍光顕微鏡で計数する。CELLSEARCH(登録商標)システムは、転移性乳癌、前立腺癌及び結腸直腸癌の検出についてFDA承認を受けている。

#### 【0008】

殆どのCTC検出システムは、抗EpCAM捕捉抗体の使用に焦点を当てている(例えば、Truini et al., 2014, Front. Oncol. 4: 242; Powell et al., 2012, PLoS ONE 7:e33788; Alix-Panabieres & Pantel, 2013, Clin. Chem. 50: 110 - 18; Lin et al., 2013, Biosens Bioelectronics 40: 63 - 67; Wang et al., Feb. 24, 2015, Int. J. Clin. Oncol. Epub. 印刷前; Magbanua et al., 2015, Clin. Cancer Res. 21: 1098 - 105; Harb et al., 2013, Transl. Oncol. 6: 528 - 38を参照されたい)。しかしながら、全ての転移性腫瘍がEpCAMを発現するわけではない(例えば、Mikola jczyzky et al., 2011, J. Oncol. 2011: 252361; Pecot et al., 2011, Cancer Discovery 1: 580 - 86; Gupta et al., 2012, Biomicrofluidics 6: 24133参照)。EpCAM陰性のCTCを単離し、検出するための代替スキーム、例

えばTAAに対する抗体の組み合わせ使用を利用する試みがなされている。転移性循環腫瘍細胞の回収を増加させる試みにおいて、10種もの異なるTAAに対する抗体が利用されている(例えば、Mikolajczyk et al., 2011, J. Oncol. 2011: 252361; Pecot et al., 2011, Cancer Discovery 1: 580-86; Krishnamurthy et al., 2013, Cancer Medicine 2: 226-33; Winer-Jones et al., 2014, PLoS One 9: e86717参照)。

#### 【0009】

このようなアプローチには欠点が存在し、それには多くの異なる抗体の調製及び使用、並びにそれらの磁性ナノ粒子への結合、マイクロ流体装置もしくは他の分離技術、並びに広範囲の抗腫瘍抗体を使用するときの正常細胞集団に対する潜在的交差反応性が含まれる。当該技術においては、広範囲の腫瘍で発現される単一のTAAに対する抗体を使用して、CTCを単離、検出、診断及び/または特徴付けするための改良された方法が必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【0010】

種々の実施形態において、本発明は、抗TROP-2抗体及び/またはその抗原結合性断片を使用する、TROP-2陽性の循環腫瘍細胞(CTC)の濃縮、分離、検出、診断及び/または特徴付けに関する。抗Trop-2抗体は、循環系から腫瘍細胞を濃縮及び/または単離するために使用し得る。結合されたCTCは、以下に詳細に説明するよう、様々な既知の技術及び/または装置によって検出され得る。単離されたCTCのバイオマーカーを検出するための任意の既知の方法、例えば、FISH、FACS、蛍光顕微鏡検査、蛍光検出、フローサイトメトリー、免疫組織化学、マイクロチップベースのシステム、RT-PCR、ELISA、または癌細胞の存在を検出するための当技術分野で知られた任意の他の技術を利用することができる。

#### 【0011】

特定の実施形態において、当該抗Trop-2抗体は、軽鎖CDR配列のCDR1(KASQDVSIAVA、配列番号1)；CDR2(SASYRYT、配列番号2)；及びCDR3(QQHYITPLT、配列番号3)、並びに重鎖CDR配列のCDR1(NYGMN、配列番号4)；CDR2(WINTYTGEPTYTDDFKG、配列番号5)；及びCDR3(GGFSSSYWYFDV、配列番号6)を備えた、マウス、キメラまたはヒト化のRS7抗体であり得る(例えば、参照により本明細書に援用する米国特許第7,238,785号の図及び実施例の節を参照されたい)。しかし、以下で述べるように、他の抗Trop-2抗体が知られており、且つ使用することができる。

#### 【0012】

当該抗Trop-2抗体部分は、モノクローナル抗体、抗原結合性抗体断片、二重特異性抗体もしくは多価抗体、または他の抗体に基づく分子であってよい。当該抗体は、種々のアイソタイプ、好ましくはヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4、より好ましくはヒトIgG1のヒンジ及び定常領域配列を含むものであることができる。抗体またはその断片は、van der Neut Kolfschoten et al.(Science 2007; 317: 1554-1557)に記載されるように、齧歯類、キメラ、ヒト化またはヒトの抗体、並びにその変形体、例えば半IgG4抗体であることができる。より好ましくは、当該抗体またはその断片は、G1m3、G1m3, 1、G1m3, 2またはG1m3, 1, 2のような特定のアロタイプに属するヒト定常領域配列を含むように設計または選択されてよい。より好ましくは、当該アロタイプは、nG1m1、G1m3、nG1m1, 2及びKm3アロタイプからなる群から選択される。

#### 【0013】

CTCを捕捉するために二重特異性抗体が使用される場合、当該抗体は、少なくとも1つの抗Trop-2抗体またはその断片、及び異なるTAAに対する少なくとも1つの抗体またはその断片を含み得る。例示的TAAには、炭酸脱水素酵素IX、CCL19、C

10

20

30

40

50

C L 2 1、C S A p、C D 1、C D 1 a、C D 2、C D 3、C D 4、C D 5、C D 8、C D 1 1 A、C D 1 4、C D 1 5、C D 1 6、C D 1 8、C D 1 9、I G F - 1 R、C D 2 0、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 3、C D 2 5、C D 2 9、C D 3 0、C D 3 2 b、C D 3 3、C D 3 7、C D 3 8、C D 4 0、C D 4 0 L、C D 4 5、C D 4 6、C D 5 2、C D 5 4、C D 5 5、C D 5 9、C D 6 4、C D 6 6 a - e、C D 6 7、C D 7 0、C D 7 4、C D 7 9 a、C D 8 0、C D 8 3、C D 9 5、C D 1 2 6、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D 1 4 7、C D 1 5 4、C X C R 4、C X C R 7、C X C L 1 2、H I F - 1 - 、A F P、P S M A、C E A C A M 5、C E A C A M - 6、c - m e t、B 7、フィブロネクチンのE D - B、ファクターH、F H L - 1、F l t - 3、葉酸受容体、G R O B、H M G B - 1、低酸素誘導因子(H I F)、インスリン様成長因子-1(I L G F - 1)、  
10 I F N - 、I F N - 、I F N - 、I L - 2、I L - 4 R、I L - 6 R、I L - 1 3 R、I L - 1 5 R、I L - 1 7 R、I L - 1 8 R、I L - 6、I L - 8、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 7、I L - 1 8、I L - 2 5、I P - 1 0、M A G E、m C R P、M C P - 1、M I P - 1 A、M I P - 1 B、M I F、M U C 1、M U C 2、M U C 3、M U C 4、M U C 5 a c、N C A - 9 5、N C A - 9 0、I a、E G P - 1、E G P - 2、H L A - D R、テネイシン、L e(y)、R A N T E S、T 1 0 1、T A C、T n 抗原、トムソン-フリーデンライヒ抗原、腫瘍壊死抗原、T N F - 、T R A I L 受容体(R 1 及びR 2)、V E G F R、E G F R、P 1 G F、補体因子C 3、C 3 a、C 3 b、C 5 aまたはC 5 を含み得る。好ましくは、T A A は、C E A C A M 5、M U C 5 a c、C D 7 4、H L A - D R、C S A p、A F P(アルファ-フェトプロテイン)、H E R 2、ビメンチン、E G F R、I G F - 1 R、P D - L 1 及びP D - L 2 からなる群から選択される。  
20 【0 0 1 4】

検出された腫瘍はT r o p - 2陽性であるので、抗T r o p - 2抗体、例えば抗T r o p - 2抗体-薬物複合体(A D C)で治療することができる。抗T r o p - 2抗体は、最初は、C T CにおけるT r o p - 2の発現または遺伝子コピー数を検出及び/または定量するために使用され得る。そのような分析は、治療用抗T r o p - 2抗体に対する応答を予測し、治療に対する腫瘍の応答をモニターするために使用し得る。以下に述べるように、抗T r o p - 2抗体の免疫複合体は、化学療法剤のような何れか既知の治療剤を含み得る。癌治療のために使用されるいくつかの細胞傷害性薬物が当技術において周知であり、そのような既知の薬物の何れもが対象とする抗体に複合化され得る。好ましい実施形態において、抗体に複合化した薬物はカンプトテシンまたはアントラサイクリン、最も好ましくはS N - 3 8 または2-ピロリノドキソルビシン(2-P D o x)のプロドラッグ形態である(例えば、それら各々の図面及び実施例の節を参照により本明細書に援用する米国特許第8,877,202号及び同第8,750,496号を参照されたい)。抗T r o p - 2抗体または抗体断片に複合化させるべき薬物には、アントラサイクリン、カンプトテシン、チューブリン阻害剤、メイタンシノイド、カリケアマイシン、アウリストチン、ナイトロジエンマスターード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホネート、ニトロソ尿素、トリアゼン、葉酸アナログ、タキサン、C O X - 2阻害剤、ピリミジン類似体、プリン類似体、抗生物質、酵素阻害剤、エピポドフィロトキシン、白金配位錯体、ビンカアルカロイド、置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、ホルモン拮抗剤、代謝拮抗剤、アルカリ化剤、抗有糸分裂剤、抗血管新生剤、チロシンキナーゼ阻害剤、m T O R 阻害剤、熱ショックタンパク質(H S P 9 0)阻害剤、プロテアソーム阻害剤、及びH D A C 阻害剤、アポトーシス促進剤、及びそれらの組み合わせが含まれる。  
30 【0 0 1 5】

抗T r o p - 2抗体は、T r o p - 2発現癌、例えば乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、肺癌、前立腺癌、結腸癌、直腸癌、胃癌、食道癌、膀胱癌、腎臓癌、脾臓癌、甲状腺癌、上皮癌または頭頸部癌の検出、診断、特徴付け及び/または治療のために使用されるものである。本方法及び組成物は、特に、転移性結腸直腸癌、トリプルネガティブ乳癌、H E R +、E R +、プロゲステロン+乳癌、転移性非小細胞肺癌(N S C L C)、転移性小細胞(S C L C)、転移性脾臓癌、転移性腎細胞癌、転移性胃癌、転移性食道癌、転  
40 50

移性尿路上皮癌または転移性前立腺癌の検出、診断、特徴付け及び／または治療のために使用されるものである。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】FISHによるTrop-2コピー数の解析。MCF-7(Trop-2陽性)細胞をFISHにより解析した。Trop-2コピー数は、抗Trop-2特異的プローブ及び抗染色体-1特異的プローブ(Empire Genomics, Buffalo, NY)を用いて決定した。

【図2】FISHによるTrop-2コピー数の解析。A549(Trop-2陰性)細胞をFISHにより解析した。Trop-2コピー数は、抗Trop-2特異的プローブ及び抗染色体-1特異的プローブ(Empire Genomics, Buffalo, NY)を用いて決定した。  
10

【図3】FISHによるトポイソメラーゼIコピー数の解析。MCF-7細胞をFISHにより解析した。トポイソメラーゼI(TOP1)コピー数は、抗TOP1特異的プローブ及び抗染色体20特異的プローブ(ABNOVA(登録商標), Taipei, Taiwan)を用いて決定した。

【図4】FISHによるトポイソメラーゼIコピー数の解析。A549細胞をFISHにより解析した。トポイソメラーゼI(TOP1)コピー数は、抗TOP1特異的プローブ及び抗染色体20特異的プローブ(ABNOVA(登録商標), Taipei, Taiwan)を用いて決定した。  
20

【発明を実施するための形態】

【0017】

定義

別途特定しない限り、「a」または「an」は1以上を意味する。

【0018】

本明細書で使用する場合、「約」はプラスまたはマイナス10%を意味する。例えば、「約100」は、90～110の間の任意の数を含む。

【0019】

本明細書に記載の抗体は、全長(即ち、天然に存在するか、または正常な免疫グロブリン遺伝子断片組換えプロセスにより形成される)の免疫グロブリン分子(例えば、IgG抗体)、または抗体断片のような免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な(即ち、特異的に結合する)部分を指す。  
30

【0020】

抗体断片は、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv、sFv等のような、抗体の一部である。抗体断片はまた、以下で述べるように、單一ドメイン抗体及びIgG4半分子を含み得る。構造にかかわらず、抗体断片は、全長抗体が認識するのと同じ抗原と結合する。「抗体断片」の用語にはまた、重鎖及び軽鎖の可変領域からなる「Fv」断片、及び軽鎖及び重鎖可変領域がペプチドリンクアセチル化により接続される組換え一本鎖ポリペプチド分子(「scFvタンパク質」)が含まれうる

【0021】

キメラ抗体は、1つの種、好ましくは齧歯類抗体の相補性決定領域(CDR)を含む可変ドメインを含む一方、当該抗体分子の定常ドメインは、ヒト抗体のそれに由来する組換えタンパク質である。獣医学的適用については、当該キメラ抗体の定常ドメインは、ネコまたはイヌのような他の種のものから誘導され得る。  
40

【0022】

ヒト化抗体は、或る種に由来する抗体、例えば齧歯類抗体からのCDRが、齧歯類抗体の重鎖及び軽鎖可変ドメインから、ヒト重鎖及び軽鎖可変ドメイン(例えば、フレームワーク領域配列)の中に移される組換えタンパク質である。当該抗体分子の定常ドメインは、ヒト抗体の定常ドメインに由来する。ある特定の実施形態では、親(齧歯類)抗体由來の限定された数のフレームワーク領域アミノ酸残基を、ヒト抗体フレームワーク領域配列  
50

の中に置換することができる。

**【0023】**

ヒト抗体は、例えば抗原チャレンジに応答して特異的ヒト抗体を產生するように「操作された」、トランスジェニックマウスから得られる抗体である。この技術では、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子座のエレメントを、内因性マウス重鎖及び軽鎖遺伝子座の標的化された攪乱を含む胚性幹細胞株由来のマウス株に導入する。当該トランスジェニックマウスは、特定の抗原について特異的なヒト抗体を合成することができ、当該マウスを用いてヒト抗体を分泌するハイブリドーマを作製することができる。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得る方法は、Green et al., Nature Genet. 7: 13 (1994)、Lonberg et al., Nature 368: 856 (1994)、及びTaylor et al., Int. Immun. 6: 579 (1994)によって記載されている。完全なヒト抗体はまた、遺伝子または染色体トランスフェクション法、ならびにファージディスプレイ技術によって構築することができ、これらの技術は何れも当該技術において知られている。例えば、免疫化されていないドナー由来の免疫グロブリン可変ドメイン遺伝子レパートリーからの、ヒト抗体及びその断片のインビトロでの製造について、McCafferty et al., Nature 348: 552-553 (1990)を参照されたい。この技術では、抗体可変ドメイン遺伝子を、インフレームで纖維状バクテリオファージの主または副コートタンパク質遺伝子の何れかにクローニングし、ファージ粒子の表面上に機能性抗体断片として提示する。当該纖維状粒子はファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、当該抗体の機能的特性に基づく選択もまた、それら特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をもたらす。このようにして、ファージはB細胞の幾つかの性質を模倣する。ファージディスプレイは種々の形式で実行することができ、概説については、例えば、Johnson and Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3: 5564-571 (1993)を参照されたい。ヒト抗体は、インビトロで活性化されたB細胞によっても生成され得る。米国特許第5,567,610号及び同第5,229,275号を参照されたく、その実施例の節を参考により本明細書に援用する。10  
20

**【0024】**

「診断剤」は、疾患の診断に有用な原子、分子または化合物である。有用な診断剤には、放射性同位体、染料、造影剤、発光剤、化学発光剤、蛍光性の化合物もしくは分子、及び増強剤（例えば、常磁性イオン）が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、この診断剤は、放射性同位元素、増強剤、及び蛍光化合物からなる群から選択される。30

**【0025】**

治療剤は、抗体部分と別個に、同時にまたは連続して投与されるか、または抗体部分、すなわち抗体または抗体断片、またはサブ断片に複合体化される、病気の治療のために有用な化合物、分子または原子である。治療剤の例には、抗体、抗体断片、薬物、毒素、又クレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、アポトーシス促進剤、抗血管新生剤、ホウ素化合物、光活性剤または色素、及び放射性同位体が含まれる。使用される治療剤については、以下で更に詳細に説明する。40

**【0026】**

免疫複合体は、少なくとも1つの治療剤及び／または診断剤に複合体化された抗体、抗体断片または融合タンパク質である。

**【0027】**

多重特異性抗体は、構造が異なる少なくとも2つの標的、例えば、2つの異なる抗原、同じ抗原上の2つの異なるエピトープ、またはハプテン及び／または抗原もしくはエピトープに同時に結合できる抗体である。多重特異性多価抗体は、2以上の結合部位を有し、且つこれら結合部位が異なる特異性を有する構築物である。

**【0028】**

二重特異性抗体は、2つの異なる標的に同時に結合できる抗体である。二重特異性抗体（bsAb）及び二重特異性抗体断片（bsFab）は、例えば腫瘍関連抗原に特異的に50

結合する少なくとも1つのアーム、及び治療剤または診断剤を有する標的とすることができる複合体に特異的に結合する少なくとも1つの他のアームを有し得る。種々の二重特異性融合タンパク質を、分子工学を用いて作製できる。

#### 【0029】

##### 抗Trop-2抗体

CTCの単離及び/または検出のための主題の方法及び組成物は、Trop-2に結合する少なくとも1つの抗体またはその断片を利用するものであり、これには齧歯類抗体、キメラ抗体、ヒト抗体またはヒト化抗体が含まれる。特定の好ましい実施形態において、抗Trop-2抗体は、ヒト化RS7抗体(例えば、その全体を本明細書の一部として得援用する米国特許第7,238,785号参照)であることができ、これは軽鎖CDR配列のCDR1(KASQDVSIAVA、SEQ(配列番号1))；CDR2(SASYRYT、配列番号2)；及びCDR3(QQHYITPLT、配列番号3)、並びに重鎖CDR配列のCDR1(NYGMN、配列番号4)；CDR2(WINTYTGEPTYTDDFKG、配列番号5)；及びCDR3(GGFGSYYWYFDV、配列番号6)を備えている。10

#### 【0030】

RS7抗体は、ヒト原発扁平上皮細胞肺癌の粗製膜調製物に対して産生されたマウスIgG<sub>1</sub>であった(Stein et al., Cancer Res. 50: 1330, 1990)。RS7抗体は、クラスター13として特徴付けられる46~48kDa糖タンパク質を認識する(Stein et al., Int. J. Cancer Suppl. 8: 98-102, 1994)。当該抗原はEGP-1(上皮糖蛋白質-1)と命名されたが、Trop-2とも称される。20

#### 【0031】

Trop-2はI型膜貫通タンパク質であり、ヒト細胞(Fornaro et al., Int. J. Cancer 1995; 62: 610-8)及びマウス細胞(Sewedy et al., Int. J. Cancer 1998; 75: 324-30)からクローニングされている。腫瘍関連カルシウムシグナルransデューサとしてのその役割(Ripani et al., Int. J. Cancer 1998; 76: 671-6)に加えて、ヒトTrop-2の発現は腫瘍形成及び結腸癌の侵襲に必要であり、これはTrop-2の細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体によって効果的に低減され得ることが示された(Wang et al., Mol. Cancer Ther. 2008; 7: 280-5)。Trop-2は、大多数のヒト腫瘍及び癌の動物モデルにおいて高度に発現されている(McDougall et al., 2015, Dev. Dyn. 244: 99-109)。30

#### 【0032】

固形癌のマーカーとしてのTrop-2の有用性(Cubasら、Biophys Acta 2009; 1796: 309-14)は、乳癌(Huang et al., Clin Cancer Res 2005; 11: 4357-64)、結腸直腸癌(Ohmachi et al., Clin Cancer Res 2006; 12: 3057-63; Fang et al., Int J Colorectal Dis 2009; 24: 875-84)及び口腔扁平上皮細胞(Fong et al., Modern Pathol 2008; 21: 186-91)における、Trop-2の過剰発現の臨床的意義を実証する更なる報告によって証明される。高レベルのTrop-2を発現する前立腺基底細胞が、インピトロ及びインピボの幹細胞活性について濃縮されるとの最新の証拠は、特に注目に値する(Goldstein et al., Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 20882-7)。40

#### 【0033】

フローサイトメトリー及び免疫組織化学的染色研究により、RS7 MAbは、種々の腫瘍型上の抗原を検出し、正常ヒト組織への結合は限定されることが示された(Stein50

n et al., 1990)。Trop-2は、肺、胃、膀胱、乳房、卵巣、子宮及び前立腺の癌のような癌種によって主に発現される。動物モデルにおいて放射性標識マウスRS7 MAbを用いた局在化及び治療の研究は、腫瘍標的化及び治療効果を実証している(Steinら、1990; Steinら、1991)。動物モデルにおける薬物に複合体化されたRS7 MAbもまた、ヒト癌異種移植片の標的化及び治療効果を示している(Cardillo et al., Clinical Cancer Res., 17:3157-69, 2011))。

#### 【0034】

肺、乳房、膀胱、卵巣、子宮、胃及び前立腺に由来する腫瘍において、強いRS7染色が実証されている(Stein et al., Int. J. Cancer 55:938, 1993)。肺癌症例は、扁平上皮癌及び腺癌の両方を含んでいた(Stein et al., Int. J. Cancer 55:938, 1993)。両方の細胞型が強く染色され、RS7抗体は肺の非小細胞癌腫の組織学的分類を区別しないことが示された。

#### 【0035】

hRS7抗体が好ましいが、他の抗Trop-2抗体が既知、及び/または公に利用可能であり、別の実施形態では本発明の方法及び組成物において利用され得る。ヒト化抗体またはヒト抗体が低い免疫原性のために望ましいが、別の実施形態においては、キメラ抗体が使用され得る一方、齧歯類MAbはインビトロ及びエクスピボ研究において有用であり得る。以下で述べるように、抗体のヒト化方法は当技術において周知であり、入手可能なマウスまたはキメラ抗体をヒト化形態に変換するために利用することができる。

#### 【0036】

抗Trop-2抗体はいくつかの供給源から市販されており、これにはLS-C126418、LS-C178765、LS-C126416、LS-C126417(LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA); 10428-MM01、10428-MM02、10428-R001、10428-R030(Sino Biological Inc., Beijing, China); MR54(eBioscience, San Diego, CA); sc-376181、sc-376746、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA); MM0588-49D6(Novus Biologicals, Littleton, CO); ab79976及びab89928(ABCAM(登録商標)、Cambridge, MA)が含まれる。

#### 【0037】

他の抗Trop-2抗体が特許文献に開示されている。例えば、米国公開番号2013/0089872は、日本国筑波の国際特許微生物寄託機関に寄託された抗Trop-2抗体K5-70(受託番号FERM BP-11251)、K5-107(受託番号FERM BP-11252)、K5-116-2-1(受託番号FERM BP-11253)、T6-16(受託番号FERM BP-11346)、T5-86(受託番号FERM BP-11254)を開示している。米国特許第5,840,854号は、抗Trop-2モノクローナル抗体BR110(ATCC番号HB11698)を開示した。米国特許第7,420,040号は、IDAC(カナダ国際寄託機関、Winnipeg, Canada)に受託番号141205-05として寄託された、ハイブリドーマ細胞株AR47A6.4.2により產生された抗Trop-2抗体を開示した。米国特許第7,420,041号は、受託番号141205-03としてIDACに寄託されたハイブリドーマ細胞株AR52A301.5により產生された抗Trop-2抗体を開示した。米国公開番号2013/0122020は、抗Trop-2抗体3E9, 6G11, 7E6, 15E2, 18B1を開示している。代表的な抗体をコードするハイブリドーマを、受託番号PTA-12871及びPTA-12872でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に寄託した。米国特許第8,715,662号は、受託番号PD08019, PD08020及びPD08021で、AID-ICLC(Genoa,

10

20

30

40

50

I t a l y ) に寄託されたハイブリドーマにより產生される抗 T r o p - 2 抗体を開示している。米国出願公開番号 2 0 1 2 0 2 3 7 5 1 8 は、抗 T r o p - 2 抗体 7 7 2 2 0 、 K M 4 0 9 7 及び K M 4 5 9 0 を開示する。米国特許第 8 , 3 0 9 , 0 9 4 号 ( W y e t h ) は、配列表により同定される抗体 A 1 及び A 3 を開示する。この段落において上記で引用した各特許または特許出願の実施例部分は、本明細書の一部として本願に援用される。非特許文献については、 L i p i n s k i et al . ( 1 9 8 1 、 P r o c N a t l . A c a d S c i U S A , 7 8 : 5 1 4 7 - 5 0 ) は、抗 T r o p - 2 抗体 1 6 2 - 2 5 . 3 及び 1 6 2 - 4 6 . 2 を開示した。より最近になって、 P r l E 1 1 抗 T r o p - 2 抗体は、 T r o p - 2 上の独特のエピトープを認識することが報告された ( I k e d a et al . , B i o c h e m B i o p h y s R e s C o m m 4 5 8 : 8 7 7 - 8 2 ) 。 10

#### 【 0 0 3 8 】

多くの抗 T r o p - 2 抗体が当該技術において既知であり、及び / または公に利用可能である。以下述べるように、既知の抗原に対する抗体を調製するための方法は、当技術においては日常的なものあった。ヒト T r o p - 2 タンパク質の配列も当技術において知られていた ( 例えば、 G e n B a n k 受託番号 C A A 5 4 8 0 1 . 1 参照 ) 。ヒト化抗体、ヒト抗体またはキメラ抗体を產生するための方法もまた知られていた。当該技術における一般的な知識に照らして、本開示を読む当業者は、抗 T r o p - 2 抗体の属を作製し、使用することができたであろう。 20

#### 【 0 0 3 9 】

上記で述べた先行研究は何れも、 T r o p - 2 陽性 C T C を単離または検出するために、抗 T r o p - 2 抗体を使用することの開示を含んでいなかった。 T r o p - 2 陽性 C T C を濃縮、単離、検出、診断及び / または特徴付けるための組成物及び方法の必要性が存在している。

#### 【 0 0 4 0 】

##### 循環腫瘍細胞の単離及び検出

抗 T r o p - 2 抗体は、 C T C の単離及び検出のための何れか既知の技術を使用して、 T r o p - 2 陽性 C T C を濃縮、単離、検出及び / または診断するために利用することができる。多くのシステムが開発され、 C T C 検出のために商業的に入手可能である。多くは特異的な抗 E p C A M 抗体を使用して開発されたが、その代わりに、抗 T r o p - 2 抗体を利用するように組成及び方法を改変することができる。従って、 T r o p - 2 陽性 C T C の単離及び検出は、そのような既知のシステム、または細胞単離及び検出の更に伝統的な方法を用いて実施することができる。そのような既知の技術の非限定的な例を以下に説明する。 30

#### 【 0 0 4 1 】

本発明は、親和性に基づく濃縮ステップを伴って、並びに M A I N T R A C ( 登録商標 ) ( P a c h m a n n et al . , 2 0 0 5 、 B r e a s t C a n c e r R e s , 7 : R 9 7 5 ) のような、濃縮ステップを伴わない方法と共に使用することができる。親和性に基づく濃縮のための磁気素子を使用する方法には、 C E L L S E A R C H ( 登録商標 ) システム ( V e r i d e x ) 、 L I Q U I D B I O P S Y ( 登録商標 ) プラットフォーム ( C y n v e n i o B i o s y s t e m s ) 及び Mag S w e e p e r 素子 ( T a l a s a z et al . , P N A S , 2 0 0 9 , 1 0 6 : 3 9 7 0 ) が含まれる。親和性に基づく濃縮のために磁気素子を使用しない方法には、 C T C チップ ( S t o t t et al . , 2 0 1 0 , S c i T r a n s l M e d , 2 : 2 5 r a 2 3 ) 、 H B チップ ( S t o t t et al . , 2 0 1 0 , P N A S , 1 0 7 : 1 8 3 9 2 ) 、 N a n o V e l c r o チップ ( L u et al . , 2 0 1 3 , M e t h o d s , 6 4 : 1 4 4 ) 、 G E D I マイクロ素子 ( K i r b y et al . , 2 0 1 2 , P L o S O N E , 7 : e 3 5 9 7 6 ) 、及び B i o c e p t の O N C O C E E ( 商標 ) 技術 ( P e c o t et al . , 2 0 1 1 , C a n c e r D i s c o v , 1 : 5 8 0 ) のような種々の製造されたマイクロ流体素子が含まれる。 40 50

## 【0042】

非小細胞肺癌患者及び小細胞肺癌患者におけるCTC検出のための、FDAに承認されたCELLSEARCH(登録商標)システムの使用が、Truini et al.(2014, Front Oncol 4: 242)において述べられている。末梢血の試料7.5mLを、抗EpCAM抗体で被覆した磁性鉄ナノ粒子と混合する。強い磁場を用いて、EpCAM陽性細胞をEpCAM陰性細胞から分離する。結合したCTCの検出は、細胞核のDAPI(4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール)蛍光標識と共に、蛍光標識された抗CK及び抗CD45抗体を用いて行った。CTCは、蛍光検出によってCK陽性、CD45陰性及びDAPI陽性として同定された。

## 【0043】

Ver1FASTシステムを、非小細胞肺癌(NSCLC)における循環腫瘍細胞(CTC)の診断及び薬力学的分析に使用した(Casavant et al., 2013, Lab Chip 13: 391-6; 2014, Lab Chip 14: 99-105)。Ver1FASTプラットフォームは、微小スケールでの重力に対する表面張力の相対的優位性を利用して、非混和相を並べてロードする。これは、隣接するチャンバ内の水フィールド及び油フィールドをピンで繋ぎ、2つの水性ウェルの間に仮想フィルターを作成する(Casavant et al., 2013, Lab Chip 13: 391-6)。結合した抗体または他の標的化部分を備えた常磁性粒子(PMP)を使用して、特定の細胞集団を標的とし、油性障壁の単純な横断を介して複雑なバックグラウンドから単離することができる。NSCLCの例では、ストレプトアビシンをDYNABEADS(登録商標)、FLOWCOMP(商標)PMP(Life Technologies, USA)に複合体化し、ビオチン化抗EpCAM抗体を用いて細胞を捕捉した。手持ち式の磁石を使用して、PMPに結合したCTCを水性チャンバ間で移動させた。収集されたCTCは、PMP解放バッファー(DYNABEADS(登録商標))を用いて解放され、またEpCAM、EGFRまたは転写終結因子(HTF-1)について染色された。

## 【0044】

Ver1FASTプラットフォームは、微孔質膜を水性チャンバに一体化して、細胞移動または遠心分離を必要とせずに複数の流体移動を可能にする。マクロスケール技術と比較して高い精度を可能にする物理的特性スケールを用いれば、このような微小流体技術は、最小の試料損失でCTCを捕捉し、評価するために十分に適合されている。Ver1FASTプラットフォームは、NSCLC患者の血液からCTCを効果的に捕捉した。

## 【0045】

GILUPI CELLCOLLECTOR(商標)(Saucedo-Zenith et al., 2012, Int J Oncol 41: 1241-50)は、キメラ抗EpCAM抗体でコーティングされた官能化医療用セルジンガー案内ワイヤー(FSMW)に基づいている。この案内ワイヤは、EDC及びNHSで活性化されたポリカルボキシレートヒドロゲル層で官能化されて、抗体の共有結合が可能とされている。この抗体被覆されたFSMWを、標準静脈カニューレを介して30分間、乳癌またはNSCLC肺癌患者の肘静脈に挿入した。案内ワイヤへの細胞の結合後、EpCAM及び/またはサイトケラチンの免疫細胞化学的染色及び核染色によってCTCを同定した。蛍光標識は、Axio Camデジタルカメラシステム及びAxioVision 4.6ソフトウェアを備えた、Axio Imager.A1m顕微鏡(Zeiss, Jena, Germany)を用いて解析された。当該FSMWシステムは、遠隔転移が未だ診断されていない初期の癌患者を含む24人の患者のうち22人から、EpCAM陽性CTCを濃縮することができた。健康なボランティアではCTCは検出されなかった。FSMWシステムの利点は、CELLSEARCH(登録商標)システムのような別の方法を使用して処理され得るエクスピボ血液試料の量によって制限されることである。30分間の露出中にFSMWと接触した推定血液量は、1.5~3リットルであった。

## 【0046】

10

20

30

40

50

MagSweeper装置（例えば、Powell et al., 2012, PLoS ONE 7:e33788）は、CTC検出のための抗体被覆磁気粒子を利用する別のシステムである。9ミリリットルの全血を、B e r E P 4抗E p C A M抗体でコーティングされた4.5 μMのD Y N A B E A D S（登録商標）（Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY）を用いて、室温で1時間、エクスピボで混合した。P B Sで希釈した後、D Y N A B E A D S（登録商標）に結合した細胞を、スイーピング磁気装置（MagSweeper, Powell et al., 2012の図1参照）によって捕捉した。非特異的に結合した白血球及びR B Cを放出した制御された剪断力を用いて、2サイクルの補色-洗浄-放出を行った。捕獲された細胞を新鮮な緩衝液中に解放し、A xi oオブザーバA 1倒立顕微鏡（Zeiss）を用いて検査した。チップに基づく高処理量q R T - P C Rによる87遺伝子の発現解析に先立って、単一のCTCを手動で吸引し、凍結保存した。

#### 【0047】

Gupta et al. (2012, Biomicrofluidics 6:24133)は、CTCの収集及び分析のためのA P O S T R E A M（商標）誘電泳動装置の使用について述べた。CTCを捕捉するために、誘電泳動（D E P）技術を用いてマイクロ流体流チャンバが使用される（図1、Gupta et al., 2012参照）。当該システムは、フロースルーフ分離及び末梢血からのCTCの濃縮のために、連続モードで操作することができる。D E Pは、形態学的特性及び電気伝導度の差から生じる異なる細胞型の周波数依存的誘電特性を利用して、異なる生物物理学的特性を有する細胞を分類する。これらの差異は、マイクロ流体流チャンバ内において、CTC及び正常細胞の異なる周波数依存的移動をもたらす。45~85 kHzの範囲のAC周波数で、癌細胞は正（引力）のD E P力を受け、これにより当該細胞は電極面に向かって移動し、チャンバを通る流体力学的流れから離れる。同じ周波数において、正常細胞は負（斥力）のD E P力を受け、これは当該細胞を流体力学的な流速プロファイルへ、及びチャンバの外へと移動させる。収集ポートを用いて、分離されたCTCを更なる分析のために取り出す。最初の最適化研究のために、培養された癌細胞を正常血液単核細胞に添加し、70%以上の効率で回収した。Guptaによって開示されたA P O S T R E A M（商標）システムは捕捉抗体を使用しないが、本発明の抗Trop-2抗体は、CTC分離の効率を高め、及び/または单離されたCTCの分離後の特徴付けのために潜在的に利用され得る。

#### 【0048】

Winer-Jones et al. (2014, PLoS One 9:e86717)は、CTCsの分離及び特性決定のための、L I Q U I D B I O P S Y（登録商標）システムの使用を述べた。このL I Q U I D B I O P S Y（登録商標）システムは、捕捉剤として抗E p C A M抗体と組み合わせて、フローセルを通る高処理量シースフロー微小流体技術を使用する。ビオチン化された抗E p C A Mを、ストレプトアビジン被覆したI M A G（商標）ビーズ（BD, Franklin Lakes, NJ）に結合させ、C F S EまたはF I T Cで標識した添加された腫瘍細胞を含む血液試料と混合した。正常な有核細胞をD A P Iで標識した。抗体結合後、ガラススライドに取り付けたCTCフローセル上で当該血液試料を処理した。外部磁場を用いてガラス表面上の磁気ビーズに結合されたCTCを捕捉し、正常細胞を含む層流からそれらを分離する。エクリプス（E c l i p s e）E 80 i蛍光顕微鏡（Nikon Instruments, Melville, NY）を用いて、捕捉された細胞を計数した。

#### 【0049】

当業者であれば、これらのシステムの何れも、またはCTCの濃縮及び/または单離のための何れの他の既知のシステムも、CTCの濃縮、单離、検出及び/または特徴付けのために、本抗Trop-2抗体と共に使用してよいことを理解するであろう。抗Trop-2捕獲抗体が利用される場合、結合されたCTCは、異なるTrop-2エピトープに対する、または他の既知の腫瘍関連抗原に対する標識抗体を使用して、検出及び/または特徴付けすることができ、これには炭酸脱水素酵素IX、C C L 1 9、C C L 2 1、C S

10

20

30

40

50

A p、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、IGF-1R、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1-、AFP、PSMA、CEACAM5、CEACAM-6、c-met、B7、フィブロネクチンのED-B、ファクターH、FHL-1、Flt-3、葉酸受容体、GROB、HMGB-1、低酸素誘導因子(HIF)、インスリン様成長因子-1(ILGF-1)、IFN- $\gamma$ 、IL-1、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、IP-10、MAGE、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、NCA-95、NCA-90、Ia、EGP-1、EGP-2、HLA-DR、テネイシン、Le(y)、RANTES、T101、TAC、Tn抗原、トムソン-フリーデンライヒ抗原、腫瘍壞死抗原、TNF- $\alpha$ 、TRAIL受容体(R1及びR2)、VEGFR、EGFR、P1GF、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、及びC5が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0050】

10

## 抗体の調製

実質的に任意の標的抗原、例えばTrapp-2に対するモノクローナル抗体を調製するための技術は、当技術分野で周知である。例えば、Kohler and Milstein, Nature 256:495(1975)、及びColigan et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, pages 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991)を参照されたい。簡単に言えば、モノクローナル抗体は、抗原を含む組成物をマウスに注射すること、脾臓を除去してBリンパ球を得ること、当該Bリンパ球をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを產生すること、当該ハイブリドーマをクローンングすること、当該抗原に対する抗体を产生する陽性クローンを選択すること、当該抗原に対する抗体を产生するクローンを培養すること、及び当該ハイブリドーマ培養物から当該抗体を単離することによって得ることができる。

## 【0051】

30

MAbは、十分に確立された種々の技術によって、ハイブリドーマ培養物から単離及び精製することができる。そのような単離技術には、プロテインAまたはプロテインGセファロースによるアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、及びイオン交換クロマトグラフィーが含まれる。例えば、Coliganの2.7.1~2.7.12頁及び2.9.1~2.9.3頁を参照されたい。また、Baines et al.「免疫グロブリンG(IgG)の精製」、Methods in MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, 79~104頁(The Human Press, Inc. 1992)も参照されたい。

40

## 【0052】

免疫原に対する抗体の最初の生成の後、当該抗体は配列決定され、続いて組換え技術により調製され得る。マウス抗体及び抗体断片のヒト化及びキメラ化は、以下に述べるように、当業者に周知である。

## 【0053】

50

## キメラ抗体

キメラ抗体は、ヒト抗体の可変領域が、例えば、マウス抗体の相補性決定領域(CDR)を含むマウス抗体の可変領域により置換されている組換えタンパク質である。キメラ抗体は、対象に投与された場合に減少した免疫原性及び増大した安定性を示す。マウス免疫

グロブリン可変ドメインをクローニングするための一般的な技術は、例えば、Orlandi et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 63: 833 (1989) に開示されている。キメラ抗体を構築する技術は、当業者に周知である。一例として、Leung et al., Hybridoma 13: 469 (1994) は、抗CD22モノクローナル抗体であるマウスLL2のV<sub>H</sub>ドメインをコードするDNA配列を、それぞれヒトV<sub>H</sub>及びIgG<sub>1</sub>定常領域ドメインと組み合わせることによってLL2キメラを製造した。

#### 【0054】

##### ヒト化抗体

ヒト化Mabを產生する技術は、当技術分野で周知である（例えば、Jones et al., Nature 321: 522 (1986), Riechmann et al., Nature 332: 323 (1988), Verhoeven et al., Science 239: 1534 (1988), Carter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992), Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437 (1992), 及びSinger et al., J. Immun. 150: 2844 (1993) を参照されたい）。キメラまたはマウスモノクローナル抗体は、マウス免疫グロブリンにおける重鎖及び軽鎖の可変鎖由来マウスCDRを、ヒト抗体の対応する可変ドメインに移植することによってヒト化され得る。キメラモノクローナル抗体中のマウスフレームワーク領域（FR）もまた、ヒトFR配列で置換される。マウスCDRをヒトFRに単に移植するだけで、しばしば抗体親和性の低下または消失が生じるので、マウス抗体の本来の親和性を回復させるために追加の修飾が必要となる可能性がある。これは、そのエピトープに対して良好な結合親和性を有する抗体を得るために、FR領域中の1以上のヒト残基をそのマウス対応物で置換することにより達成できる。例えば、Tempest et al., Biotechnology 9: 266 (1991) 及びVerhoeven et al., Science 239: 1534 (1988) を参照されたい。好ましい置換残基には、CDR残基側鎖の1, 2または3オングストローム以内に位置するか、CDR配列に隣接して位置するか、またはCDR残基と相互作用すると予測されるFR残基が含まれる。

#### 【0055】

##### ヒト抗体

コンビナトリアルアプローチ、またはヒト免疫グロブリン遺伝子座において形質転換されたトランスジェニック動物の何れかを用いて、完全なヒト抗体を產生する方法は当技術において知られている（例えば、Mancini et al., 2004, New Microbiol. 27: 315~28; Conrad and Scheiller, 2005, Comb. Chem. High Throughput Screen. 8: 117~26; Brekke and Loset, 2003, Curr. Opin. Pharmacol. 3: 544~50）。完全ヒト抗体はまた、遺伝子または染色体トランسفエクション法、ならびにファージディスプレイ技術によっても構築することができ、これらの技術は何れも当該技術において知られている。例えば、McCaafferty et al., Nature 348: 552~553 (1990) を参照されたい。抗体が、例えばTrop-2陽性癌の検出後の腫瘍療法においてインビボで利用される場合、このような完全ヒト抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体よりも副作用が更に少なく、本質的に内因性のヒト抗体としてインビボで機能することが期待される。

#### 【0056】

1つの代替法では、ファージディスプレイ技術を用いて、ヒト抗体を生成させることができる（例えば、Dantas-Barbosa et al., 2005, Genet. Mol. Res. 4: 126~40）。ヒト抗体は、正常なヒトまたは癌等の特定の疾患状態を示すヒトから生成され得る（Dantas-Barbosa et al., 2005）。罹患した個体からヒト抗体を構築する利点は、循環抗体レパートリーが疾患関連抗原に対する抗体に偏っている可能性がある点である。

10

20

30

40

50

## 【0057】

この方法の1つの非限定的な例において、Dantas-Barbosa et al. (2005)は、骨肉腫患者由来のヒトFab抗体断片のファージディスプレイライブリーやを構築した。一般に、総RNAは循環血液リンパ球から得られた（同上）。組換えFabをμ、及び鎖抗体レパートリーからクローニングし、ファージディスプレイライブリーやに挿入した（同上）。RNAをcDNAに変換し、重鎖及び軽鎖免疫グロブリン配列に対する特異的プライマーを用いてFab・cDNAライブリーやを作製するためには使用した（Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581~97）。ライブリーやの構築は、Andriis-Widhopf et al. (2000, In: Phage Display Laboratory Manual, Barbas et al. (eds), 1<sup>st</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY pp. 9.1~9.22)に従って実施した。最終Fab断片を制限エンドヌクレアーゼで消化し、バクテリオファージゲノムに挿入して、ファージディスプレイライブリーやを作製した。このようなライブリーやは、当該技術で知られた標準的なファージディスプレイ法によってスクリーニングすることができる。ファージディスプレイは、様々な形式で実施することができる。それらの概説については、例えば、Johnson and Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3: 5564~571 (1993)を参照されたい。

## 【0058】

ヒト抗体は、インビトロで活性化されたB細胞によっても生成され得る。その全体をする米国特許第5,567,610号及び第5,229,275号を参照されたい（参照により本明細書に援用）。当業者は、これらの技術が例示的であり、ヒト抗体または抗体断片を作製及びスクリーニングするための何れか既知の方法を利用できることを理解するであろう。

## 【0059】

別の代替法では、ヒト抗体を産生するように遺伝子操作されたトランスジェニック動物を、標準的な免疫化プロトコールを使用して、実質上任意の免疫原性標的に対する抗体を生成させるために使用することができる。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得る方法は、Green et al., Nature Genet. 7: 13 (1994), Lonberg et al., Nature 368: 856 (1994), 及びTaylor et al., Int. Immun. 6: 579 (1994)によって開示されている。このような系の非限定的な例は、Abgenix (Fremont, CA) から提供されるXenoMouse (登録商標)（例えば、されるGreen et al., 1999, J. Immunol. Methods 231: 11~23、参照により本明細書に援用）である。XenoMouse (登録商標) 及び類似の動物ではマウス抗体遺伝子が不活性化され、機能的なヒト抗体遺伝子により置換される一方、残りのマウス免疫系は無傷のままである。

## 【0060】

XenoMouse (登録商標) は、生殖系列構成のYAC (酵母人工染色体) で形質転換されたが、当該YACはアクセサリー遺伝子及び調節配列と共に、可変領域配列の大部分を含んだヒトIgH及びIgカッパ遺伝子座の部分を含んでいる。ヒト可変領域レパートリーは、既知の技術によりハイブリドーマへとプロセシングし得る抗体産生B細胞を生成するために使用できる。標的抗原で免疫化されたXenoMouse (登録商標) は、正常な免疫応答によってヒト抗体を産生し、当該抗体は上記の標準的技術により採取及び/または製造し得る。XenoMouse (登録商標) の種々の株が利用可能であり、それぞれが異なるクラスの抗体を産生できる。遺伝子導入で作製されたヒト抗体は治療可能性を有することが示されており、正常なヒト抗体の薬物動態学的特性を保持している (Green et al., 1999)。特許請求の範囲に記載の組成物及び方法は、XenoMouse (登録商標) システムの使用に限定されず、ヒト抗体を産生するよう

10

20

30

40

50

遺伝子操作された任意のトランスジェニック動物を利用し得ることを、当業者は理解するであろう。

### 【0061】

#### 既知の抗体及び標的抗原

上述のように、ある特定の代替実施形態において、抗 Trop - 2 抗体は、循環 Trop - 2 陽性腫瘍細胞の検出後に、Trop - 2 発現癌を治療するために使用される。幾つかの実施形態において、標的癌は、腫瘍療法の標的とされ得る 1 以上の追加の腫瘍関連抗原 (TAA) を発現し得る。癌の治療のために使用され得る特定の抗体には、LL1 (抗 CD74)、LL2 もしくは RFB4 (抗 CD22)、ベルツズマブ (hA20、抗 CD20)、リツキシマブ (抗 CD20)、及びオビヌツズマブ (GA101、抗 CD20)、ランプロリズマブ (抗 PD - 1 受容体)、ニボルマブ (抗 PD - 1 受容体)、イピリムマブ (抗 CTLA - 4)、RS7 (抗上皮糖タンパク質 - 1 (EGP - 1、Trop - 2 としても知られる))、PAM4 もしくは KC4 (両方とも抗ムチン)、MN - 14 (抗癌胎児性抗原 (CEA、CD66e または CEACAM5 としても知られる))、MN - 15 もしくは MN - 3 (抗 CEACAM6)、Mu - 9 (抗結腸特異的抗原 - p)、Imm - 31 (抗アルファフェトプロテイン)、R1 (抗 IgF - 1R)、A19 (抗 CD19)、TAG72 (例えば CC49)、Tn、J591 もしくは HuJ591 (抗 PSMA (前立腺特異的膜抗原))、AB - PG1 - XG1 - 026 (抗 PSMA 二量体)、D2 / B (抗 PSMA)、G250 (抗炭酸脱水素酵素 IX · MAb)、L243 (抗 HLA - DR)、アレムツズマブ (抗 CD52)、ベバシツマブ (抗 VEGF)、セツキシマブ (抗 EGFR)、ゲムツズマブ (抗 CD33)、イブリツモマブ · チウキセタン (ibritumomab tiuxetan : 抗 CD20)；パニツムマブ (抗 EGFR)；トシツモマブ (抗 CD20)；PAM4 (別名クリバツズマブ、抗ムチン) 及びトラスツズマブ (抗 Erbb2) が含まれるが、これらに限定されない。このような抗体は当該技術において知られている（例えば、米国特許番号 5,686,072; 5,874,540; 6,107,090; 6,183,744; 6,306,393; 6,653,104; 6,730,300; 6,899,864; 6,926,893; 6,962,702; 7,074,403; 7,230,084; 7,238,785; 7,238,786; 7,256,004; 7,282,567; 7,300,655; 7,312,318; 7,585,491; 7,612,180; 7,642,239；及び米国特許出願公開番号 20050271671; 20060193865; 20060210475; 20070087001：これらの各々の実施例部分を参照により本明細書に援用する）。使用される特定の既知抗体には、hPAM4 (米国特許第 7,282,567 号)、hA20 (米国特許第 7,251,164 号)、hA19 (米国特許第 7,109,304 号)、hIMMU - 31 (米国特許第 7,300,655 号)、hLL1 (米国特許第 7,312,318 号)、hLL2 (米国特許第 7,074,403 号)、hMu - 9 (米国特許第 7,387,773 号)、hL243 (米国特許第 7,612,180 号)、hMN - 14 (米国特許第 6,676,924 号)、hMN - 15 (米国特許第 7,541,440 号)、hR1 (米国特許出願第 12/772,645 号)、hRS7 (米国特許第 7,238,785 号)、hMN - 3 (米国特許第 7,541,440 号)、AB - PG1 - XG1 - 026 (ATCC PTA - 4405 及び PTA - 4406 として寄託された米国特許出願第 11/983,372 号)、及び D2 / B (WO 2009/130575) が含まれ、各引用された特許または出願のテキストは、図及び実施例の部分に関して参照により本明細書に援用する。

### 【0062】

使用される代替の抗体には、アブシキシマブ (抗糖タンパク質 IIb / IIa)、アレムツズマブ (抗 CD52)、ベバシズマブ (抗 VEGF)、セツキシマブ (抗 EGFR)、ゲムツズマブ (抗 CD33)、イブリツモマブ (抗 CD20)、パニツムマブ (抗 EGFR)、リツキシマブ (抗 CD20)、トシツモマブ (抗 CD20)、トラスツズマブ (抗 Erbb2)、ラムプロリズマブ (抗 PD - 1 受容体)、ニボルマブ (抗 PD - 1 受

10

20

30

40

50

容体)、イピリムマブ(抗CTLA4)、アバゴボマブ(抗CA125)、アデカツムマブ(抗EpCAM)、アトリツマブ(抗IL-6受容体)、ベナラリズマブ(抗CD125)、オビヌツズマブ(GA101、抗CD20)、CC49(抗TAG-72)、AB-PG1-XG1-026(抗PSMA、ATCCPTA-4405及びPTA-4406として寄託された米国特許出願第11/983,372号)、D2/B(抗PSMA, WO2009/130575)、トチリズマブ(抗IL-6受容体)、バシリキシマブ(抗CD25)、ダクリズマブ(抗CD25)、エファリズマブ(anti-CD11a)、GA101(抗CD20; Glycart Roche)、ムロモナブCD3(抗CD3受容体)、ナタリズマブ(抗4インテグリン)、オマリズマブ(抗IgE)、CDP571のような抗TNF-抗体(Ofei et al., 2011, Diabetes 45: 881-85)、MTNFAI、M2TNFAI、M3TNFAI、M3TNFABI、M302B、M303(Thermo Scientific, Rockford, IL)、インフリキシマブ(Centocor, Malvern, PA)、セルトリズマブpegol(UCB, Brussels, Belgium)、抗CD40L(UCB, Brussels, Belgium)、アダリムマブ(Abbott, Abbott Park, IL)、及びベンリスタ(Human Genome Sciences)が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0063】

標的とされ得る他の有用な腫瘍関連抗原には、炭酸脱水酵素IX、B7、CCL19、CCL21、CSAp、HER-2/neu、BrE3、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20(例えば、C2B8、hA20、1F5·Mabs)、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD47、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CEACAM5、CEACAM6、CTLA-4、アルファフェトプロテイン(AFP)、VEGF(例えば、AVASTIN(登録商標)、フィブロネクチンのスプライス変異体)、ED-Bフィブロネクチン(例えば、L19)、EGP-1(Trop-2)、EGP-2(例えば、17-1A)、EGF受容体(ErbB1)(例えば、ERBITUX(登録商標))、ErbB2、ErbB3、ファクターH、FHL-1、Flt-3、葉酸受容体、Ga733, GRO-、HMGB-1、低酸素誘導因子(HIF)、HM1.24、HER-2/neu、ヒストンH2B、ヒストンH3、ヒストンH4、インスリン様増殖因子(ILGF)、IFN-、IFN-、IFN-、IFN-、IL-2R、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-25、IP-10、IGF-1R、Ia、HM1.24、ガングリオシド、HCG、L243が結合するHLA-DR抗原、CD66抗原、即ち、CD66a-dまたはその組み合わせ、MAGE、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、マクロファージ遊走阻害因子(MIF)、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5ac、胎盤成長因子(P1GF)、PSA(前立腺特異的抗原)、PSMA、PAM4抗原、PD-1受容体、PD-L1、NCA-95、NCA-90、A3、A33、Ep-CAM、KS-1、Le(y)、メソテリン、S100、テネイシン、TAC、Tn抗原、トーマス-フリーデンライヒ抗原、腫瘍壊死抗原、腫瘍血管新生抗原、TNF-、TRAIL受容体(R1及びR2)、Trop-2、VEGFR、RANTES、T101、並びに癌幹細胞抗原、補体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、及び癌遺伝子産物が含まれる。

#### 【0064】

より治療抵抗性の前駆体悪性細胞集団とみなされる癌幹細胞(Hill and Perris, J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99: 1435-40) 50

は、特定の癌で標的とされ得る抗原、例えば、前立腺癌 (Maitland et al., Ernst Schering Found. Sympos. Proc. 2006; 5: 155-79)、非小細胞肺癌 (Donnenberg et al., J. Control Release 2007; 123(3): 385-91)、及びグリア芽細胞腫 (Beier et al., Cancer Res. 2007; 67(9): 4010-5) における CD133、並びに結腸直腸癌 ((Dalerbaer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(24): 10158-63)、胰癌 (Li et al., Cancer Res. 2007; 67(3): 1030-7)、頭頸部扁平上皮癌 (Prince et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(3): 973-8) における CD44 を有する。乳癌治療のための別の有用な標的は、Taylor et al. によって記載された LIV-1 抗原である (Biochem. J. 2003; 375: 51-9)。

## 【0065】

チェックポイント阻害剤抗体は、癌治療において使用されている。免疫チェックポイントは、自己寛容を維持し、末梢組織損傷を最小限に抑えるために免疫系応答の程度を調節することに関与する、免疫系における阻害経路を指す。しかしながら、腫瘍細胞も、免疫系チェックポイントを活性化して、腫瘍組織に対する免疫応答の有効性を減少させることもできる。細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (CTLA4、CD152 としても知られる)、プログラム細胞死タンパク質 1 (PD1、CD279 としても知られる)、プログラム細胞死リガンド 1 (PD-L1、CD274 としても知られている)、およびプログラム細胞死リガンド 2 (PD-L2) (Latchman et al., 2001, Nat Immunol 2: 261-8) に対する例示的チェックポイント阻害剤抗体は、疾患細胞、組織または病原体に対する免疫応答の有効性を増強するために、1 以上の他の薬剤と組み合わせて使用されてよい。例示的な抗 PD1 抗体には、ランブロリズマブ (MK-3475、MERCK)、ニボルマブ (BMS-936558、BRISTOL-MYERS SQUIBB)、AMP-224 (MERCK) 及びピジリズマブ (CT-011、CURETECH LTD) が含まれる。抗 PD1 抗体は、例えば、ABCAM (登録商標) (AB137132)、BIOLegend (登録商標) (EH12.2H7、RMP1-14) 及び AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (J105、J166、MIH4) から商業的に入手可能である。例示的な抗 PD-L1 抗体には、MDX-1105 (MEDAREX)、MEDI4736 (MEDIMMUNE)、MPDL3280A (GENENTECH) 及び BMS-936559 (BRISTOL-MYERS SQUIBB) が含まれる。抗 PD-L1 抗体はまた、例えば、AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (MIH1) から商業的に入手可能である。例示的な抗 CTLA4 抗体には、イピリムマブ (Bristol-Myers Squibb) 及びトレメリムマブ (PFIZER) が含まれる。抗 PD1 抗体は、例えば ABCAM (登録商標) (AB134090)、SINO BIOLOGICAL INC. (11159-H03H、11159-H08H) 及び サーモサイエンティフィックピアス (PA5-29572、PA5-23972、PA5-26465、MA1-12205、MA1-35914) から商業的に入手可能である。イピリムマブは、最近、転移性黒色腫の治療のための FDA 承認を受けている (Wada et al., 2013, J Transl Med 11: 89)。

## 【0066】

マクロファージ遊走阻害因子 (MIF) は、自然免疫及び適応免疫及びアポトーシスの重要な調節因子である。CD74 は MIF の内因性受容体であることが報告されている (Leng et al., 2003, J Exp Med 197: 1467-76)。MIF 媒介細胞内経路に対する拮抗剤である抗 CD74 抗体の治療効果は、広範囲の病状、例えば膀胱、前立腺、乳房、肺及び結腸の癌の治療のために使用し得る (例えば、Meyer-Siegler et al., 2004, BMC Cancer 12: 34; Shachar & Haran, 2011, Leuk Lymphoma 52: 150)

446-54)。ミラツズマブ(hLL1)は、MIF媒介性疾患を治療するための治療的使用の例示的抗CD74抗体である。

#### 【0067】

種々の他の抗体の使用が当該技術において知られている(例えば、米国特許第5,686,072号；同第5,874,540号；同第6,107,090号；同第6,183,744号；同第6,306,393号；同第6,653,104号；同第6,730,300号；同第6,899,864号；同第6,926,893号；同第6,962,702号；同第7,074,403号；同第7,230,084号；同第7,238,785号；同第7,238,786号；同第7,256,004号；同第7,282,567号；同第7,300,655号；同第7,312,318号；同第7,585,491号；同第7,612,180号；同第7,642,239号、及び米国出願公開番号20060193865：それらの各々を参照により本明細書に援用する)。

#### 【0068】

使用する抗体は、広範囲の既知の供給源から商業的に入手することができる。例えば、種々の抗体を分泌するハイブリドーマ株を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC, Manassas, VA)から入手可能である。腫瘍関連抗原を含む様々な疾患標的に対する多数の抗体がATCCに寄託されており、及び/または可変領域配列を公表しており、本願特許請求の範囲に記載の方法及び組成物において使用するために利用可能である。例えば、米国特許番号7,312,318号；同第7,282,567号；同第7,151,164号；同第7,074,403号；同第7,060,802号；同第7,056,509号；同第7,049,060号；同第7,045,132号；同第7,041,803号；同第7,041,802号；同第7,041,293号；同第7,038,018号；同第7,037,498号；同第7,012,133号；同第7,001,598号；同第6,998,468号；同第6,994,976号；同第6,994,852号；同第6,989,241号；同第6,974,863号；同第6,965,018号；同第6,964,854号；同第6,962,981号；同第6,962,813号；同第6,956,107号；同第6,951,924号；同第6,949,244号；同第6,946,129号；同第6,943,020号；同第6,939,547号；同第6,921,645号；同第6,921,645号；同第6,921,533号；同第6,919,433号；同第6,919,078号；同第6,916,475号；同第6,905,681号；同第6,899,879号；同第6,893,625号；同第6,887,468号；同第6,887,466号；同第6,884,594号；同第6,881,405号；同第6,878,812号；同第6,875,580号；同第6,872,568号；同第6,867,006号；同第6,864,062号；同第6,861,511号；同第6,861,227号；同第6,861,226号；同第6,838,282号；同第6,835,549号；同第6,835,370号；同第6,824,780号；同第6,824,778号；同第6,812,206号；同第6,793,924号；同第6,783,758号；同第6,770,450号；同第6,767,711号；同第6,764,688号；同第6,764,681号；同第6,764,679号；同第6,743,898号；同第6,733,981号；同第6,730,307号；同第6,720,155号；同第6,716,966号；同第6,709,653号；同第6,693,176号；同第6,692,908号；同第6,689,607号；同第6,689,362号；同第6,689,355号；同第6,682,737号；同第6,682,736号；同第6,682,734号；同第6,673,344号；同第6,653,104号；同第6,652,852号；同第6,635,482号；同第6,630,144号；同第6,610,833号；同第6,610,294号；同第6,605,441号；同第6,605,279号；同第6,596,852号；同第6,592,868号；同第6,576,745号；同第6,572号；同第856号；同第6,566,076号；同第6,562,618号；同第6,545,130号；同第6,544,749号；同第6,534,058号；同第6,528,625号；

10

20

30

40

50

同第6, 528, 269号；同第6, 521, 227号；同第6, 518, 404号；同第6, 511, 665号；同第6, 491, 915号；同第6, 488, 930号；同第6, 482, 598号；同第6, 482, 408号；同第6, 479, 247号；同第6, 468, 531号；同第6, 468, 529号；同第6, 465, 173号；同第6, 461, 823号；同第6, 458, 356号；同第6, 455, 044号；同第6, 455, 040号；同第6, 451, 310号；同第6, 444, 206号；同第6, 441, 143号；同第6, 432, 404号；同第6, 432, 402号；同第6, 419, 928号；同第6, 413, 726号；同第6, 406, 694号；同第6, 403, 770号；同第6, 403, 091号；同第6, 395, 276号；同第6, 395, 274号；同第6, 387, 350号；同第6, 383, 759号；同第6, 383, 484号；同第6, 376, 654号；同第6, 372, 215号；同第6, 359, 126号；同第6, 355, 481号；同第6, 355, 444号；同第6, 355, 245号；同第6, 355, 244号；同第6, 346, 246号；同第6, 344, 198号；同第6, 340, 571号；同第6, 340, 459号；同第6, 331, 175号；同第6, 306, 393号；同第6, 254, 868号；同第6, 187, 287号；同第6, 183, 744号；同第6, 129, 914号；同第6, 120, 767号；同第6, 096, 289号；同第6, 077, 499号；同第5, 922, 302号；同第5, 874, 540号；同第5, 814, 440号；同第5, 798, 229号；同第5, 789, 554号；同第5, 776, 456号；同第5, 736, 119号；同第5, 716, 595号；同第5, 677, 136号；同第5, 587, 459号；同第5, 443, 953号；同第5, 525, 338を参照されたい。これらは例示的なものに過ぎず、多種多様な他の抗体及びそれらのハイブリドーマが当該技術において知られている。当業者は、殆どの疾患関連抗原に対する抗体配列または抗体分泌ハイブリドーマが、関心のある選択された疾患関連標的にに対する抗体についての、ATCC、NCBI及び/またはUSPTOデータベースの簡単な検索によって入手できることを理解するであろう。クローニングされた抗体の抗原結合性ドメインは、当技術において周知の標準技術を使用して増幅され、切除され、発現ベクターに連結され、適応された宿主細胞にトランスフェクトされ、タンパク質産生のために使用され得る。

## 【0069】

## 抗体アロタイプ

治療用抗体の免疫原性は、注入反応のリスク増大及び治療応答の持続時間低下に関連する(Baert et al., 2003, N Engl J Med 348:602-08)。治療用抗体が宿主において免疫応答を誘導する程度は、抗体のアロタイプによって部分的に決定され得る(Stickler et al., 2011, Genes and Immunity 12:213-21)。抗体アロタイプは、抗体の定常領域配列における特定の位置でのアミノ酸配列変化に関連する。重鎖型定常領域を含むIgG抗体のアロタイプをGmアロタイプと命名する(1976, J Immunol 117:1056-59)。

## 【0070】

一般的のIgG1ヒト抗体について、最も一般的なアロタイプはG1m1である(Stickler et al., 2011, Genes and Immunity 12:213-21)。しかし、G1m3アロタイプも白人でも頻繁に発生する(Stickler et al., 2011)。G1m1抗体は、G1m3患者のような非G1m1(nG1m1)レシピエントに投与したときに免疫応答を誘導する傾向のあるアロタイプ配列を含むことが報告されている(Stickler et al., 2011)。非G1m1アロタイプ抗体は、G1m1患者に投与したときに免疫原性ではない(Stickler et al., 2011)。

## 【0071】

ヒトG1m1アロタイプは、重鎖IgG1のCH3配列中に、Kabat位置356でアミノ酸アスパラギン酸、及びKabat位置358でロイシンを含んでいる。当該nG

10

20

30

30

40

50

1 m 1 アロタイプは、Kabat 位置 356 にグルタミン酸及び Kabat 位置 358 にメチオニンのアミノ酸を含む。G1m1 及び nG1m1 アロタイプの両者は、Kabat 位置 357 にグルタミン酸残基を含み、これらアロタイプは DEL 及び EEM アロタイプと呼ばれることがある。G1m1 及び nG1m1 アロタイプ抗体の重鎖定常領域配列の非限定的な例を、例示的抗体リツキシマブ（配列番号 7）及びベルツズマブ（配列番号 8）について以下に示す。

## 【化1】

リツキシマブ重鎖可変領域配列（配列番号 7）

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T  
 10  
 V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L  
 G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K A E P K S C D K T H T C P P C P A  
 P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E  
 D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T  
 V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E  
 P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S  
 N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N  
 20  
 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

ベルツズマブ重鎖可変領域（配列番号 8）

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T  
 V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L  
 G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A  
 P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E  
 D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T  
 V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E  
 P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S  
 N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N  
 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K  
 30

## 【0072】

Jeffreys 及び Lefranc (2009, mAbs 1:1 - 7) は、IgG アロタイプに特徴的な配列変異及び免疫原性に対するそれらの効果を検討した。彼らは、G1m1 7 アロタイプにおける Kabat 位置 214 のリシン残基と比較して、G1m3 アロタイプは、Kabat 位置 214 のアルギニン残基により特徴づけられると報告した。nG1m1, 2 アロタイプは、Kabat 位置 356 のグルタミン酸、Kabat 位置 358 のメチオニン、及び Kabat 位置 431 のアラニンによって特徴付けされた。G1m1, 2 アロタイプは、Kabat 位置 356 のアスパラギン酸、Kabat 位置 358 のロイシン、及び Kabat 位置 431 のグリシンによって特徴づけられた。Jeffreys 及び Lefranc (2009) は、重鎖定常領域配列変異体に加えてカッパ軽鎖定常領域のアロタイプ変異体を報告したが、Km1 アロタイプは Kabat 位置 153 のバリンおよび Kabat 位置 191 のロイシンを特徴とし、Km1, 2 アロタイプは Kabat 位置 153 のアラニン及び Kabat 位置 191 のロイシンを特徴とし、また Km3 アロタイプは Kabat 位置 153 のアラニンおよび Kabat 位置 191 のバリンを特徴とする。

10

20

30

40

50

## 【0073】

治療用抗体に関して、ベルツズマブ及びリツキシマブは、それぞれCD20に対するヒト化及びキメラIgG1抗体であり、広範な血液悪性腫瘍及び/または自己免疫疾患の治療に使用される。表1は、リツキシマブ対ベルツズマブのアロタイプ配列を比較している。表1に示すように、リツキシマブ(G1m17,1)はDELアロタイプIgG1であり、Kabat位置214(重鎖CH1)において、ベルツズマブのアルギニンに対するリツキシマブのリジンの追加の配列変異を有する。ベルツズマブは、リツキシマブよりも対象において免疫原性が低いことが報告されており(例えば、Morchhauser et al., 2009, J Clin Oncol 27:3346-53; Goldenberg et al., 2009, Blood 113:1062-70; Robak & Robak, 2011, Biodev Drugs 25:13-25参照)、これはヒト化抗体とキメラ抗体の間の相違に起因する効果である。しかしながら、EEMおよびDELアロタイプの間のアロタイプにおける相違はまた、ベルツズマブの低い免疫原性の原因でもある可能性が高い。

## 【表1】

表1. リツキシマブ vs. ベルツズマブのアロタイプ

	重鎖位置及び関連アロタイプ					
	完全アロタイプ	214(アロタイプ)	356/358(アロタイプ)	431(アロタイプ)		
リツキシマブ	G1m17,1	K	17	D/L	1	A
ベルツズマブ	G1m3	R	3	E/M	-	A

## 【0074】

nG1m1遺伝子型の個体における治療用抗体の免疫原性を低下させるためには、Kabat214のアルギニンを特徴とするG1m3アロタイプ、Kabat位置356のグルタミン酸、Kabat位置358のメチオニン、及びKabat位置431のアラニンを特徴とするnG1m1,2ヌルアロタイプに対応する抗体のアロタイプを選択することが望ましい。驚くべきことに、長期間に亘るG1m3抗体の皮下投与は、有意な免疫応答をもたらさないことが見出された。別の実施形態では、G1m3アロタイプと共にヒトIgG4重鎖は、Kabat214におけるアルギニン、Kabat356におけるグルタミン酸、Kabat359におけるメチオニン、Kabat431におけるアラニンを有する。免疫原性は、少なくとも部分的にそれらの位置における残基に関連するように見えるので、治療用抗体のためのヒトIgG4重鎖定常領域配列の使用もまた好ましい実施形態である。G1m3・IgG1抗体とIgG4抗体との組み合わせもまた、治療的投与のためのものであり得る。

## 【0075】

## ナノボディ

ナノボディは、サイズが約12~15kDa(約110アミノ酸長)の單一ドメイン抗体である。ナノボディは、フルサイズ抗体と同様に標的抗原に選択的に結合することができ、抗原に対して同様の親和性を有する。しかしながら、そのサイズが遙かに小さいため、固形腫瘍へのより良好な浸透が可能である可能性がある。より小さいサイズはまた、ナノボディの安定性に寄与し、これはフルサイズの抗体よりも極端なpH及び温度に対してより耐性である(Van Der Linden et al., 1999, Biochim Biophys Act 1431:37-46)。單一ドメイン抗体は、元々は、ラクダ科動物(ラクダ、アルパカ、ラマ)が軽鎖を持たない完全に機能的な抗体を有するとの発見(例えば、Hamsen et al., 2007, Appl Microbiol Biotechnol 77:13-22)に続いて開発された。重鎖抗体は、単一可変ドメイン( $V_{HH}$ )及び2つの定常ドメイン( $C_H2$ 及び $C_H3$ )からなっている。抗体と同様に、ナノボディは、多価及び/または二重特異性の構築物として開発及び使用され得る。癌及び他の疾患における潜在的な臨床的用途を有する、IL-6R、VWF、TNF、RSV、RANKL、IL-17A&F、及びIgEのような種々の標的

10

20

30

40

50

抗原を標的とするヒト化形態のナノボディ（例えば A B L Y N X（登録商標）、G h e n t、ベルギー）が商業的開発の最中である。（例えば、S a e r e n s et al . , 2 0 0 8 , C u r r O p i n P h a r m a c o l 8 : 6 0 0 - 8 ; M u y l d e r m a n s , 2 0 1 3 , A n n R e v B i o c h e m 8 2 : 7 7 5 - 9 7 ; I b a n e z et al . , 2 0 1 1 , J I n f e c t D i s 2 0 3 : 1 0 6 3 - 7 2 ）。

#### 【 0 0 7 6 】

ナノボディの血漿半減期は、フルサイズの抗体の血漿半減期よりも短く、除去経路は主に腎経路によるものである。それらは F c 領域を欠くので、補体依存性細胞傷害性を示さない。

10

#### 【 0 0 7 7 】

ナノボディは、ラクダ、ラマ、アルパカまたはサメを標的抗原で免疫し、m R N A を単離し、ライブラリーへとクローニングし、抗原結合性についてスクリーニングすることによって製造ができる。ナノボディ配列は、標準技術によってヒト化されてよい（例えば、J o n e s et al . , 1 9 8 6 , N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 , R i e c h m a n n et al . , 1 9 8 8 , N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 V e r h o e y e n et al . , 1 9 8 8 , S c i e n c e 2 3 9 : 1 5 3 4 , C a r t e r et al . , 1 9 9 2 , P r o c . N a t ' l A c a d . S c i . U S A 8 9 : 4 2 8 5 , S a n d h u , 1 9 9 2 , C r i t . R e v . B i o t e c h . 1 2 : 4 3 7 , S i n g e r et al . , 1 9 9 3 , J . I m m u n . 1 5 0 : 2 8 4 4 ）。ヒト化は、ラクダ科動物とヒト F R 配列との間の高い相同意性のため、比較的簡単である。

20

#### 【 0 0 7 8 】

様々な実施形態において、主題の抗体は、標的癌細胞に複合診断薬を標的送達するためのナノボディを含み得る。使用するナノボディは、例えば、米国特許第7,807,162号；同第7,939,277号；同第8,188,223号；同第8,217,140号；同第8,372,398号；同第8,557,965号；同第8,623,361号及び同第8,629,244号に開示されており、これら各々の実施例の節を参照により本明細書に援用する）。

#### 【 0 0 7 9 】

##### 抗体断片

30

抗体断片は、F ( a b ' )<sub>2</sub>、F a b ' 、F ( a b )<sub>2</sub>、F a b 、F v 、s F v 、s c F v のような、抗体の抗原結合性部分である。特異的エピトープを認識する抗体断片は、既知の技術によって生成できる。例えば、F ( a b ' )<sub>2</sub> 断片は、抗体分子のペプシン消化によって製造し得る。これら及び他の方法は、例えば、G o l d e n b e r g によって、米国特許第4,036,945号及び同第4,331,647号及びそれに含まれる参考文献に記載されている。また、N i s o n o f f et al . , A r c h B i o c h e m . B i o p h y s . 8 9 : 2 3 0 ( 1 9 6 0 ) ; P o r t e r , B i o c h e m . J . 7 3 : 1 1 9 ( 1 9 5 9 ) , E d e l m a n et al . , i n M E T H O D S I N E N Z Y M O L O G Y V O L . 1 , p a g e 4 2 2 ( A c a d e m i c P r e s s 1 9 6 7 ) , a n d C o l i g a n a t p a g e s 2 . 8 . 1 - 2 . 8 . 1 0 および 2 . 1 0 . - 2 . 1 0 . 4 を参照されたい。或いは、望ましい特異性を備えたモノクローナル F a b ' 断片の迅速かつ容易な同定を可能にするために、F a b ' 発現ライブラリーを構築することができる（H u s e et al . , 1 9 8 9 , S c i e n c e , 2 4 6 : 1 2 7 4 - 1 2 8 1 ）。

40

#### 【 0 0 8 0 】

一本鎖 F v 分子 ( s c F v ) は、V L ドメイン及びV H ドメインを備えている。V L 及びV H ドメインは会合して標的結合部位を形成する。これらの2つのドメインは、ペプチドリンカー ( L ) によって更に共有結合される。s c F v 分子は、V L ドメインがs c F v 分子のN末端部分であればV L - L - V H 、またはV H ドメインがs c F v 分子のN末端部分であればV H - L - V L の何れかで表される。s c F v 分子を作製し、適切なペプ

50

チドリンカーを設計するための方法は、米国特許第4,704,692号、米国特許第4,946,778号、R.Raag及びM.Whitlowの「一本鎖Fvs」、FAS EB Vol 9:73-80(1995)、並びにRE Bird及びBW Walk er、一本鎖抗体可変領域、TIBTECH、Vol 9:132-137(1991)に記載されている。

#### 【0081】

他の抗体断片、例えば單一ドメイン抗体断片が当該技術において知られており、特許請求の範囲に記載の構築物において使用することができる。單一ドメイン抗体(VHH)は、例えば、ラクダ、アルパカまたはラマから、標準的な免疫技術によって得ることができる。(例えば、Muyldermands et al., TIBS 26:230-235, 2001; Yau et al., J Immunol Methods 281: 161-75, 2003; Maass et al., J Immunol Methods 324: 13-25, 2007を参照されたい)。VHHは強力な抗原結合能力を有し、従来のVH-VL対には接近できない新規エピトープと相互作用することができる。(Muyldermands et al., 2001)。アルパカ血清IgGは、約50%のラクダ重鎖のみのIgG抗体(HCAb)を含む(Maass et al., 2007)。アルパカは、TNF-αのような既知の抗原で免疫され、標的抗原に結合して中和するVHHを単離することができる(Maass et al., 2007)。事实上全てのアルパカVHHコード配列を増幅するPCRプライマーが同定されており、これは当該技術において周知の標準的なバイオパンニング技術(Maassら、2007)により、アルパカVHHファージディスプレイライブラリーを構築するために使用することができる。

#### 【0082】

抗体断片は、全長抗体のタンパク質加水分解によって、または大腸菌またはその断片をコードするDNAを別の宿主中で発現させることによっても調製できる。抗体断片は、従来の方法による全長抗体のペプシン消化またはパパイン消化によって得ることができる。例えば、抗体断片は、ペプシンによる抗体の酵素的切断により產生され、F(ab')<sub>2</sub>で示される約100kD断片を提供することができる。この断片は、ジスルフィド結合の切断から生じるスルフヒドリル基のためのチオール還元剤、及び場合によってはプロッキング基を用いて更に切断されて、約50kDのFab'一価断片を生成することができる。或いは、パパインを用いる酵素的切断によって、2つの一価Fab断片及びFc断片が直接製造される。

#### 【0083】

当該断片が完全な抗体によって認識される抗原に結合する限り、一価の軽鎖-重鎖断片を形成するための重鎖の分離、断片の更なる切断、または他の酵素的、化学的もしくは遺伝子的技術のような、抗体を切断する他の方法もまた使用することができる。

#### 【0084】

##### 抗体クローニング及び产生のための一般的な技術

キメラまたはヒト化抗体の製造のような種々の技術は、抗体のクローニング及び構築の手順を含み得る。対象となる抗体の抗原結合性V<sub>K</sub>(可変軽鎖)及びV<sub>H</sub>(可変重鎖)配列は、RT-PCR、5'-RACE及びcDNAライブラリースクリーニングのような、種々の分子クローニング手順によって得ることができる。マウスMAbを発現する細胞由来のMAbにおけるV遺伝子は、PCR増幅によってクローニングされ、配列決定することができる。それらの真正性を確認するために、クローン化されたV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>遺伝子は、Orlandi et al. (Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 86:3833(1989))が記載したように、細胞培養においてキメラAbとして発現することができる。次いで、V遺伝子配列に基づき、Leung et al. (Mol.Immunol., 32:1413(1995))が記載したようにして、ヒト化MAbを設計及び構築することができる。

#### 【0085】

10

20

30

40

50

cDNAは、一般的な分子クローニング技術により、マウスマAbを產生する任意の既知ハイブリドーマ株またはトランスフェクトされた細胞株から調製できる(Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> Ed (1989))。MabのV配列は、プライマーVK1B ACK及びVK1FOR(Orlandi et al., 1989)またはLeung et al.(Biotechniques, 15: 286 (1993))により記載された延長プライマー組を使用して増幅され得る。V<sub>H</sub>配列は、プライマー対VH1BA CK/VH1FOR(Orlandi et al., 1989)またはLeung et al.(Hybridoma, 13: 469 (1994))により記載された、マウスIgGの定常領域にアニーリングするプライマーを用いて増幅することができる。ヒト化V遺伝子は、長いオリゴヌクレオチド鋳型合成と、Leung et al.(Mol. Immunol., 32: 1413 (1995))に記載されたPCR増幅の組み合わせにより構築することができる。  
10

#### 【0086】

VのPCR産物は、Igプロモーター、シグナルペプチド配列及び便利な制限部位を含む病期分類ベクター、例えばpBR327に基づく病期分類ベクターVKpBR等にサブクローニングすることができる。V<sub>H</sub>のPCR産物は、pBluecriptに基づくVHpBSのような同様の病期ベクターにサブクローニングすることができる。プロモーター及びシグナルペプチド配列と共にV<sub>K</sub>及びV<sub>H</sub>配列を含む発現カセットを、VKpBR及びVHpBSから切り出して、pKh及びpG1gのような適切な発現ベクターにライゲーションすることができる(Leung et al., Hybridoma, 13: 469 (1994))。当該発現ベクターは、適切な細胞に同時トランスフェクトすることができ、上清液が、キメラ、ヒト化またはヒトMabの產生についてモニターされる。或いは、V<sub>K</sub>及びV<sub>H</sub>発現カセットを切り出して、Gillies et al.(J. Immunol. Methods 125: 191 (1989))により記載され、またLosman et al.(Cancer, 80: 2660 (1997))にも示されているように、pdHL2のような単一の発現ベクター中にサブクローニングすることができる。  
20

#### 【0087】

代替実施形態において、発現ベクターは、トランスフェクション、増殖及び無血清培地中での発現に予め適合させた、宿主細胞にトランスフェクトすることができる。例示的な細胞系としては、Sp/EEE、Sp/ESF及びSp/ESF-X細胞株が挙げられる(例えば、米国特許第7,531,327号;第7,537,930号及び第7,608,425号を参照されたい;各々の実施例の節を参照により本明細書に援用する)。これらの例示的な細胞株は、変異体Bc1-EEE遺伝子をトランスフェクトされ、メソトレキセートに露出させてトランスフェクトされた遺伝子配列を増幅し、タンパク質発現のために血清フリーの細胞株に適合された、Sp2/0骨髄腫細胞株に基づいている  
30

#### 【0088】

##### 二重特異性及び多重特異性抗体

ある特定の代替実施形態では、抗Trop-2抗体またはその断片を、例えばハプテン結合性抗体またはその断片、例えば抗HSGまたは抗In-DTPA抗体と同時投与することができる。そのような二重特異性抗体は、インビボでTrop-2陽性腫瘍に対して診断剤及び/または治療剤を投与するための、プレターゲッティング技術において使用することができる。他の実施形態において、二重特異性抗体または多重特異性抗体は、抗癌療法のために直接的に利用され得る。  
40

#### 【0089】

例えば、米国特許第7,405,320号に開示されているように、二重特異性または多重特異性抗体を產生するための多数の方法が知られており、その実施例の節を参照により本明細書に援用する。二重特異性抗体は、それぞれが異なる抗原部位を認識するモノクローナル抗体を產生する2つの異なるハイブリドーマの融合を含んだ、クアドローマ法に  
50

よって產生され得る (Millsstein and Cuello, Nature, 1983; 305: 537 - 540)。

#### 【0090】

二重特異性抗体を作製するための別な方法は、2つの異なるモノクローナル抗体を化学的に繋ぎ合せるために、ヘテロ二官能性クロスリンカーを使用する (Staerz et al., Nature, 1985; 314: 628 - 631; Perez et al., Nature, 1985; 316: 354 - 356)。二重特異性抗体はまた、2つの親モノクローナル抗体の各々をそれぞれ半分の分子に還元し、次いでこれを混合し、再酸化させてハイブリッド構造を得ることにより產生することができる (Staerz and Bevan, Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83: 1453 - 1457)。他の方法には、レトロウイルス由来のシャトルベクターを介して、それぞれの親ハイブリドーマに異なる選択マーカーを遺伝子導入し、その後にこれら親を融合することにより、ハイブリッドハイブリドーマの生成効率を改善すること (De Monte, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1990, 87: 2941 - 2945)；または異なる抗体の重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子を含んだ発現プラスミドによる、ハイブリドーマ細胞株のトランスフェクションが含まれる。10

#### 【0091】

同系の  $V_H$  及び  $V_L$  ドメインは、上で述べたように、適切な組成及び長さ（通常は12アミノ酸残基より多い）のペプチドリンカーを用いて結合させて、一本鎖  $Fv$  ( $sCFv$ ) を形成することができる。ペプチドリンカーの長さを12アミノ酸残基未満に減少させることは、同じ鎖上の  $V_H$  及び  $V_L$  ドメインの対形成を妨げ、 $V_H$  及び  $V_L$  ドメインと他の鎖上の相補的ドメインとの対形成を強制し、機能的多量体の形成をもたらす。20 3 ~ 12 個のアミノ酸残基のリンカーで連結された  $V_H$  及び  $V_L$  ドメインのポリペプチド鎖は、主に二量体（ダイアボディーと呼ばれる）を形成する。アミノ酸残基が0 ~ 2 のリンカーでは、三量体（トリアボディーと呼ばれる）及び四量体（テトラボディーと呼ばれる）が有利であるが、オリゴマー化の正確なパターンは、リンカーの長さに加えて、 $V$  ドメインの組成並びに向き ( $V_H$  - リンカー -  $V_L$  または  $V_L$  - リンカー -  $V_H$ ) に依存するようと思える。

#### 【0092】

多重特異性抗体または二重特異性抗体を作製するためのこれらの技術は、低収率、精製の必要性、低い安定性または技術の労働集約性の点で様々な困難を示す。より最近では、以下で更に詳細に説明する「ドック - アンド - ロック（登録商標）」（DNL（登録商標））として知られる技術が、実質的に任意の所望の抗体、抗体断片及び他のエフェクター分子の組み合わせを生成させるために利用されている。二重特異性または多重特異性の抗体を作製するための当該技術において既知の何れの技術も、本願の特許請求の範囲に記載されている方法の実施において利用することができる。30

#### 【0093】

「ドック - アンド - ロック（登録商標）」（DNL（登録商標））

二重特異性または多重特異性の抗体または構築物は、D O C K - A N D - L O C K（登録商標）技術（例えば、米国特許第7,550,143号；第7,521,056号；第7,534,866；第7,527,787号、及び第7,666,400号参照、各々の実施例の節を参照により本明細書に援用する）を用いて製造することができる。一般に、この技術は、cAMP依存性プロテインキナーゼ（PKA）の調節（R）サブユニットの二量体化およびドッキングドメイン（DDD）配列と、様々なAKAPタンパク質の何れかに由来するアンカードメイン（AD）配列の間に生じる特異的かつ高親和性の結合相互作用を利用する（Baillie et al., FEBS Letters. 2005; 579: 3264. Wong and Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 959）。DDD及びADペプチドは、任意のタンパク質、ペプチドまたは他の分子に対して、好ましくはADまたはDDD配列を含む融合タンパク質として結合され得る。DDD配列は自発的に二量体化してAD配列に結合するので4050

、この技術は、D D D または A D 配列に結合され得る何れかの選択された分子間での複合体の形成を可能にする。

#### 【0094】

標準的な D N L (登録商標) 複合体は、1つの A D 連結分子に結合した2つの D D D 連結分子を有する三量体を含むが、複合体構造の変化により二量体、三量体、四量体、五量体、六量体及び他の多量体の形成が可能になる。幾つかの実施形態において、D N L (登録商標) 複合体は、同じ抗原決定基または2以上の異なる抗原に結合する2以上の抗体、抗体断片または融合タンパク質を含み得る。D N L (登録商標) 複合体はまた、1以上の他のエフェクター、例えばタンパク質、ペプチド、免疫調節剤、サイトカイン、インターロイキン、インターフェロン、結合タンパク質、ペプチドリガンド、キャリアタンパク質、毒素、オンコナーゼ等のリボヌクレアーゼ、s i R N A 等の阻害性オリゴヌクレオチド、抗原もしくは異種抗原、P E G のようなポリマー、酵素、治療剤、ホルモン、細胞傷害剤、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、または何れか他の分子もしくは凝集体を含み得る。  
10

#### 【0095】

P K A は、R サブユニットへのセカンドメッセンジャー c A M P の結合によって誘発される、最も研究されたシグナル伝達経路の1つにおいて中心的役割を果たすものであり、1968年にウサギ骨格筋から最初に単離された (Walsh et al., J. Biol. Chem. 1968; 243: 3763)。ホロ酵素の構造は、R サブユニットによって不活性形態に保持された2つの触媒サブユニットからなる (Taylor, J. Biol. Chem. 1989; 264: 8443)。P K A のアイソザイムは2つのタイプのR サブユニット (R I 及びR I I ) で見出され、各タイプは アイソフォーム及びアイソフォームを有する (Scott, Pharmacol. Ther. 1991; 50: 123)。従って、P K A 調節サブユニットの4つのアイソフォームは、R I 、R I 、R I I 及びR I I である。R サブユニットは、安定な二量体としてのみ単離されており、二量体化ドメインは、R I I の最初の44アミノ末端残基からなることが示されている (Newton et al., Nat. Struct. Biol. 1999; 6: 222)。後述するように、他の調節サブユニットのアミノ酸配列の同様の部分は、二量体化及びドッキングに関与し、それぞれ、調節サブユニットのN末端近傍に位置する。R サブユニットへのc A M P の結合は、セリン / スレオニンキナーゼ活性の広いスペクトルのための活性触媒サブユニットの解放を導き、これはA K A Pとのそのドッキングを介したP K A の区画化を通して、選択された基質へと向けられる (Scott et al., J. Biol. Chem. 1990; 265: 21561)。  
20  
30

#### 【0096】

最初のA K A P である微小管関連タンパク質 - 2 が1984年に特徴付けられて以来 (Lohmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81: 6723)、細胞膜、アクチン細胞骨格、核、ミトコンドリア、及び小胞体を含むサブ細胞部位に位置する50以上のA K A P が、酵母からヒトに及ぶ種において多様な構造で同定されている (Wong and Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5: 959)。P K A に対するA K A P のA D は、14 ~ 18 残基の両親媒性ヘリックスである (Carr et al., J. Biol. Chem. 1991; 266: 14188)。A D のアミノ酸配列は個々のA K A P 間でかなり異なり、R I I 二量体について、2 ~ 90 nM に亘る結合親和性が報告されている (Alt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100: 4445)。A K A P は二量体R サブユニットにのみ結合する。ヒトR I I について、A D は23個のアミノ末端残基により形成される疎水性表面に結合する (Coll edge and Scott, Trends Cell Biol. 1999; 6: 216)。従って、ヒトR I I の二量体化ドメイン及びA K A P 結合ドメインは両方とも、同じN末端44アミノ酸配列内に位置し (Newton et al., Nat. Struct. Biol. 1999; 6: 222; Newton et al., EMBO 40  
50

J . 2 0 0 1 ; 2 0 : 1 6 5 1 ) 、これは本明細書では D D D と呼ばれる。

#### 【 0 0 9 7 】

我々は、ヒト P K A 調節サブユニットの D D D 及び A K A P の A D を、以下では A 及び B と称する任意の 2 つのエンティティを非共有結合複合体にドッキングするために、優れたリンカーモジュール対として利用できるプラットフォーム技術を開発したが、これはジスルフィド結合の形成を促進する戦略的位置での D D D 及び A D の両方へのシステイン残基の導入を介して、 D N L ( 登録商標 ) 複合体に更にロックされ得る。このアプローチの一般的な方法論は以下の通りである。エンティティ A は、 D D D 配列を A の前駆体に連結することによって構成され、その結果、以下では a と称する第 1 の成分が得られる。 D D D 配列は二量体の自発的形成に影響を及ぼすので、 A は a<sub>2</sub> で構成されるであろう。エンティティ B は、 A D 配列を B の前駆体に連結することにより構築され、以下では b と称する第 2 の成分が得られる。 a<sub>2</sub> に含まれる D D D の二量体モチーフは、 b に含まれる A D 配列に結合するためのドッキング部位を生成して、 a<sub>2</sub> b で構成される 2 元三量体複合体を形成するための a<sub>2</sub> と b の容易な会合を促進するであろう。この結合事象は不可逆的とされ、その後の反応がジスルフィド架橋を介して二つのエンティティ を共有結合的に固定するが、これは有効な局所濃度の原理に基づいて非常に効率的に起こるであろう。何故なら、最初の結合相互作用が D D D 及び A D の両方に置かれた反応性チオール基を接近させて ( Chmura et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . U S A . 2 0 0 1 ; 9 8 : 8 4 8 0 ) 、部位特異的に連結させるはずだからである。リンカー、アダプターモジュール及び前駆体の様々な組み合わせを使用して、異なる化学量論の多種多様な D N L ( 登録商標 ) 構築物を作製及び使用することができる ( 例えば、米国特許第 7 , 5 5 0 , 1 4 3 号 ; 同第 7 , 5 2 1 , 0 5 6 号 ; 同第 7 , 5 3 4 , 8 6 6 号 ; 同第 7 , 5 2 7 , 7 8 7 号 ; および同第 7 , 6 6 6 , 4 0 0 号参照 ) 。 10

#### 【 0 0 9 8 】

D D D 及び A D を 2 つの前駆体の官能基から離間させて結合することにより、そのような部位特異的な連結が、 2 つの前駆体の元々の活性を保存することもまた期待される。このアプローチは本質的にモジュラーであり、ペプチド、タンパク質、抗体、抗体断片、及び広範囲の活性を備えた他のエフェクター部分を含む広範囲の物質を、部位特異的かつ共有結合的に連結するために適用することができる。以下に記載する A D 及び D D D 複合体エフェクターを構築する融合タンパク質法を利用して、実質的に任意のタンパク質またはペプチドを D N L ( 登録商標 ) 構築物に組み込むことができる。しかし、この技術は限定的なものではなく、他の結合方法を利用してもよい。 20

#### 【 0 0 9 9 】

融合タンパク質を作製するための様々な方法が知られており、目的の融合タンパク質をコードする合成二本鎖核酸を生成するための核酸合成、ハイブリダイゼーション及び / または増幅が含まれる。そのような二本鎖核酸は、標準的な分子生物学的技術により、融合タンパク質の產生のための発現ベクターに挿入することができる ( 例えば、 Sambrook et al . , Molecular Cloning , A Laboratory manual , 2<sup>nd</sup> Ed , 1989 参照 ) 。そのような好ましい実施形態において、 A D 及び / または D D D 部分は、エフェクタータンパク質またはペプチドの N 末端または C 末端の何れかに結合され得る。しかし、エフェクター部分の化学的性質及び当該エフェクター部分の生理学的活性に関与する部分に応じて、 A D または D D D 部分のエフェクター部分への結合部位が変化し得ることを当業者は理解するであろう。種々のエフェクター部分の部位特異的結合は、当技術分野で公知の技術を使用して、例えば、二価の架橋試薬および / または他の化学的複合体化技術を使用して行うことができる。 30

#### 【 0 1 0 0 】

A D 及び D D D 部分における構造 - 機能の関係

異なるタイプの D N L ( 登録商標 ) 構築物について、異なる A D または D D D 配列を利用することができる。例示的な D D D 及び A D 配列を以下に示す。

S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号9)

D D D 2

C G H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L  
R E A R A (配列番号10)

A D 1

Q I E Y L A K Q I V D N A I Q Q A (配列番号11)

A D 2

C G Q I E Y L A K Q I V D N A I Q Q A G C (配列番号12)

【0101】

10

D D D 1 及び D D D 2 が、プロテインキナーゼAのヒト R I I アイソフォームにおける D D D 配列に基づくことを当業者は理解するであろう。しかしながら、代替実施形態において、D D D 及び A D 部分は、以下の D D D 3 、 D D D 3 C 及び A D 3 に例示されるように、プロテインキナーゼAにおけるヒト R I 形態の D D D 配列及び対応する A K A P 配列に基づき得る。

D D D 3

S L R E C E L Y V Q K H N I Q A L L K D S I V Q L C T A R P E R P M A F L R E Y  
F E R L E K E E A K (配列番号13)

D D D 3 C

M S C G G S L R E C E L Y V Q K H N I Q A L L K D S I V Q L C T A R P E R P M A  
F L R E Y F E R L E K E E A K (配列番号14)

A D 3

C G F E E L A W K I A K M I W S D V F Q Q G C (配列番号15)

【0102】

他の代替実施形態において、A D 及び / または D D D 部分の他の配列変異体を、D N L (登録商標) 複合体の構築に利用することができる。例えば、P K A R I 、 R I I 、 R I 及び R I I の D D D 部分に対応する、ヒト P K A D D D 配列の僅か4つの変異体が存在する。R I I D D D 配列は、上記で開示した D D D 1 及び D D D 2 の基礎である。4つのヒト P K A D D D 配列を以下に示す。当該 D D D 配列は、R I I の1~44残基、R I I の1~44残基、R I の12~61残基及びR I の13~66残基を表す。( D D D 1 の配列は、ヒト P K A R I I · D D D 部分から僅かに改変されていることに留意されたい)。

30

P K A R I

S L R E C E L Y V Q K H N I Q A L L K D V S I V Q L C T A R P E R P M A F L R E  
Y F E K L E K E E A K (配列番号16)

P K A R I

S L K G C E L Y V Q L H G I Q Q V L K D C I V H L C I S K P E R P M K F L R E H  
F E K L E K E E N R Q I L A (配列番号17)

P K A R I I

S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V G Q Q P P D L V D F A V E Y F T R L R E  
A R R Q (配列番号18)

40

P K A R I I

S I E I P A G L T E L L Q G F T V E V L R H Q P A D L L E F A L Q H F T R L Q Q  
E N E R (配列番号19)

【0103】

A D 及び D D D ドメインの構造 - 機能の関係が研究の主題となっている(例えば、B u r n s - Hamuro et al., 2005, Protein Sci 14: 2982-92; Carr et al., 2001, J Biol Chem 276: 17332-38; Alto et al., 2003, Proc Natl Acad Sci USA 100: 4445-50; Hundsrucker et al., 2005)

06, Biochem J 396: 297 - 306; Stokka et al., 2006, Biochem J 400: 493 - 499; Gold et al., 2006, Mol Cell 24: 383 - 395; Kinderman et al., 2006, Mol Cell 24: 397 - 408、その各々の全体のテキストを参照により本明細書に援用する)。

#### 【0104】

例えば、Kinderman et al. (2006, Mol Cell 24: 397 - 408) は、AD-DDD結合相互作用の結晶構造を調べ、ヒトDDD配列は二量体形成またはAKAP結合の何れかにおいて重要な、下記の配列番号9に下線を付した保存されたアミノ酸残基を含んでいると結論した。(Kinderman et al., 2006の図1を参照されたい。参照により本明細書に援用)。当業者は、DDD配列の配列変異体を設計する際に、保存的アミノ酸置換が下線で囲まれた残基のいずれかを変化させることは望ましくない一方、二量体化及びAKAP結合に重要ではない残基については保存的アミノ酸置換がなされ得ることを理解するであろう。

#### 【化2】

**SHIQIPPGLTELQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA** (配列番号9)

#### 【0105】

以下で更に詳細に述べるように、保存的アミノ酸置換は、一般的な20種類のL-アミノ酸のそれぞれについて特徴付けられている。従って、Kinderman (2006) 及び保存的アミノ酸置換のデータに基づいて、配列番号9に基づく可能性のある代替DDD配列を表2に示す。表2を考案する際に、高度に保存的なアミノ酸置換のみが考慮された。例えば、荷電残基は同じ電荷の残基のみで置換され、小さな側鎖を有する残基は同様のサイズの残基で置換され、ヒドロキシル側鎖は他のヒドロキシルでのみ置換される等であった。アミノ酸二次構造に対するプロリンの固有の効果のために、プロリンの代わりに置換される他の残基は存在しなかった。限定された数のそのような可能性のある代替DDDの部分配列を、以下の配列番号20～配列番号39に示す。当業者であれば、標準技術によって、例えば市販のペプチド合成機または周知の部位特異的突然変異誘発技術を用いて、DDD部分の属内の殆ど無制限の数の代替種が構築され得ることを理解するであろう。AD部分結合に対するアミノ酸置換の効果はまた、例えばAlt o et al. (2003, Proc Natl Acad Sci USA 100: 4445 - 50) に記載された標準的な結合アッセイにより容易に決定できる。

#### 【表2】

表2. DDD1 (配列番号9)における保存的アミノ酸置換。配列番号94として開示されるコンセンサス配列

S	H	I	Q	I	P	P	G	<u>L</u>	T	E	<u>L</u>	<u>L</u>	Q	G	<u>Y</u>	T	V	E	<u>V</u>	<u>L</u>	R
T	K		N				A	S	D				N	A		S	D			K	

Q	Q	P	P	D	<u>L</u>	<u>V</u>	E	F	A	<u>V</u>	E	<u>Y</u>	F	T	R	<u>L</u>	R	E	A	R	A
N	N			E			D		I	D			S	K		K	D	L	I	V	

THIQIPPGLTELQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (配列番号20)

10

20

30

40

50

S K I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号21)  
S R I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号22)  
S H I N I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号23)  
S H I Q I P P A L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号24)  
S H I Q I P P G L S E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号25) 10  
S H I Q I P P G L T D L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号26)  
S H I Q I P P G L T E L L N G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号27)  
S H I Q I P P G L T E L L Q A Y T V E V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号28)  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y S V E V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号29)  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V D V L R Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号30) 20  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L K Q Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号31)  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R N Q P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号32)  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q N P P D L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号33)  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P E L V E F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号34)  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V D F A V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号35) 30  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F L V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号36)  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F I V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号37)  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F V V E Y F T R L R  
E A R A (配列番号38)  
S H I Q I P P G L T E L L Q G Y T V E V L R Q Q P P D L V E F A V D Y F T R L R  
E A R A (配列番号39)

## 【0106】

A l t o e t a l . ( 2 0 0 3 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A 40  
100 : 4445 - 50 ) は、種々のAKAPタンパク質におけるAD配列のバイオインフォマティクス解析を行って、DDDに対する0.4nMの結合定数をもったAKAP - IS (配列番号11)と称するRII選択的AD配列を設計した。当該AKAP - IS配列は、PKAへのAKAP結合のペプチドアンタゴニストとして設計された。置換がDDへの結合を減少させる傾向のあるAKAP - IS配列中の残基は、以下の配列番号11において下線が付されている。当業者は、AD配列の配列変異体を設計する際に、DD結合にあまり重要ではない残基について保存的アミノ酸置換を行うことができる一方で、下線を付した残基の何れかを変えることは回避するのが望ましいことを理解するであろう。表3は、上記表2のDDD1 (配列番号16)について示されたものと同様の、AKAP - IS (AD1、配列番号19)の配列における潜在的な保存的アミノ酸置換を示す 50

。

## 【0107】

限定された数のそのような可能性のある代替 A D 部分配列を、以下の配列番号 4 0 ~ 配列番号 5 7 に示す。ここでもまた、A l t o e t a l . ( 2 0 0 3 ) のデータに基づいて、可能な A D 部分配列の属内の非常に多数の種が、当業者によって作製され、試験され、使用され得るであろう ( 2 0 0 3 ) 。なお、A l t o ( 2 0 0 3 ) の図 2 は、実際の結合実験に基づき、D D D 部分への結合活性を保持しながら作製し得るさらに多数の可能性のあるアミノ酸置換を示していることに留意されたい。

## 【化 3】

AKAP - I S

10

QIEYLAKQIVDNAIQQA (配列番号 1 1)

## 【表 3】

表 3. AD 1 (配列番号 1 1) における保存的アミノ酸置換。配列番号 9 5 として開示されたコンセンサス配列。

Q	I	E	Y	L	A	K	Q	I	V	D	N	A	I	Q	Q	A
N	L	D	F	I		R	N			E	Q			N	N	L
V			T	V												I
			S													V

20

N I E Y L A K Q I V D N A I Q Q A (配列番号 4 0 )

Q L E Y L A K Q I V D N A I Q Q A (配列番号 4 1 )

Q V E Y L A K Q I V D N A I Q Q A (配列番号 4 2 )

Q I D Y L A K Q I V D N A I Q Q A (配列番号 4 3 )

Q I E F L A K Q I V D N A I Q Q A (配列番号 4 4 )

Q I E T L A K Q I V D N A I Q Q A (配列番号 4 5 )

Q I E S L A K Q I V D N A I Q Q A (配列番号 4 6 )

Q I E Y I A K Q I V D N A I Q Q A (配列番号 4 7 )

Q I E Y V A K Q I V D N A I Q Q A (配列番号 4 8 )

Q I E Y L A R Q I V D N A I Q Q A (配列番号 4 9 )

Q I E Y L A K N I V D N A I Q Q A (配列番号 5 0 )

Q I E Y L A K Q I V E N A I Q Q A (配列番号 5 1 )

Q I E Y L A K Q I V D Q A I Q Q A (配列番号 5 2 )

Q I E Y L A K Q I V D N A I N Q A (配列番号 5 3 )

Q I E Y L A K Q I V D N A I Q N A (配列番号 5 4 )

Q I E Y L A K Q I V D N A I Q Q L (配列番号 5 5 )

Q I E Y L A K Q I V D N A I Q Q I (配列番号 5 6 )

Q I E Y L A K Q I V D N A I Q Q V (配列番号 5 7 )

30

## 【0108】

G o l d e t a l . ( 2 0 0 6 , M o l C e l l 2 4 : 3 8 3 - 9 5 ) は、結晶学及びペプチドスクリーニングを利用して、P K A の R I I アイソフォームについて、R I アイソフォームと比較して 5 桁高い選択性を示す S u p e r A K A P - I S 配列 ( 配列番号 5 8 ) を開発した。下線を付した残基は、R I I の D D D 部分への結合を増加させた、A K A P - I S 配列に対するアミノ酸置換の位置を示す。この配列では、N 末端 Q

40

50

残基は残基番号 4 として付番され、C 末端 A 残基は残基番号 20 である。残基が R I I に対する親和性に影響を及ぼすことができる残基は、残基 8、11、15、16、18、19、20 であった (Gold et al., 2006)。ある特定の代替実施形態において、SuperAKAP-IS 配列は、DNL (登録商標) 構築物を調製するために AKAP-IS AD 部分の配列を置換してよい。AKAP-IS AD 配列を置換し得る他の代替配列を、配列番号 59 ~ 61 に示す。AKAP-IS 配列に対する置換には下線が付されている。配列番号 12 に示す AD2 配列と同様に、当該 AD 部分もまた、附加的な N 末端残基のシステイン及びグリシン、並びに C 末端残基のグリシン及びシステインを含み得ることが予想される。

## 【化4】

SuperAKAP-IS

10

**QIEYYVAKQIVDYAIHQA** (配列番号 58)

代替AKAP配列

**QIEYKAKQIVDHAIHQA** (配列番号 59)**QIEYHAKQIVDHAIHQA** (配列番号 60)**QIEYVAKQIVDHAIHQA** (配列番号 61)

20

## 【0109】

Goldらの図2は、以下に示す様々なAKAPタンパク質由来の追加のDDD結合配列を開示した。

&lt; RII特異的AKAP &gt;

AKAP-KL

PLEYQAGLLVQNAIQQA (配列番号 62)

AKAP79

LLIETASSLVKNAIQLSI (配列番号 63)

AKAP-Lbc

30

LIEEAASRIVDAVIEQVK (配列番号 64)

&lt; RII特異的AKAP &gt;

AKAPce

ALYQFADRFSELVISEAL (配列番号 65)

RIAD

LEQVANQLADQIIKEAT (配列番号 66)

PV38

FEELAWKIAKMIWSDVF (配列番号 67)

&lt;二重特異性AKAP &gt;

AKAP7

40

ELVRLSKRLVENAVLKAV (配列番号 68)

MAP2D

TAEEV SARIVQVVTAEAV (配列番号 69)

DAKAP1

QIKQAAFQLISQVILEAT (配列番号 70)

DAKAP2

LAWKIAKMI VSDVMQQ (配列番号 71)

## 【0110】

Stockka et al. (2006, Biochem J 400: 493 - 99)

) も、配列番号 72 ~ 74 に示される、PKA に結合する AKAP のペプチド競合物を開

50

発した。当該ペプチドアンタゴニストは、Ht31（配列番号72）、RIAD（配列番号73）及びPV-38（配列番号74）と命名された。Ht-31ペプチドは、PKAのRIIアイソフォームに対してより大きな親和性を示したが、RIAD及びPV-38は、RIに対してより高い親和性を示した。

Ht31

D L I E E A A S R I V D A V I E Q V K A A G A Y (配列番号72)

RIAD

L E Q Y A N Q L A D Q I I K E A T E (配列番号73)

PV-38

F E E L A W K I A K M I W S D V F Q Q C (配列番号74)

10

【0111】

Hundsrucker et al. (2006, Biochem J 396: 297-306)は、PKAのRII形態のDDDに対して0.4nMという低い結合定数をもった、PKAに対するAKAP結合のため更に別のペプチド競合剤を開発した。種々のAKAPアンタゴニストペプチドの配列が、下記の表4に再現されるHundsrucker et al. の表1に提供されている。AKAPISは、合成RIIサブユニット結合性ペプチドを表す。他の全てのペプチドは、示されたAKAPのRII結合性ドメインに由来する。

【表4】

表4. AKAPペプチド配列

20

ペプチド配列

AKAPIS	QIEYLAKQIVDNAIQQA (配列番号:11)	
AKAPIS-P	QIEYLAKQIPDNAIQQA (配列番号:75)	
Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAAG (配列番号:76)	
Ht31-P	KGADLIEEAASRIPDAPIEQVKAAAG (配列番号:77)	
AKAP7δ-wt-pep	PEDAEVLRLSKRLVENAVLKAVQQY (配列番号:78)	
AKAP7δ-L304T-pep	PEDAEVLRTSKRLVENAVLKAVQQY (配列番号:79)	30
AKAP7δ-L308D-pep	PEDAEVLRLSKRDVENAVLKAVQQY (配列番号:80)	
AKAP7δ-P-pep	PEDAEVLRLSKRLPENAVLKAVQQY (配列番号:81)	
AKAP7δ-PP-pep	PEDAEVLRLSKRLPENAPLKAVQQY (配列番号:82)	
AKAP7δ-L314E-pep	PEDAEVLRLSKRLVENAVEKAVQQY (配列番号:83)	
AKAP1-pep	EEGLDRNEEIKRAAFQIIISQVISEA (配列番号:84)	
AKAP2-pep	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ (配列番号:85)	
AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL (配列番号:86)	40
AKAP9-pep	LEKQYQEQLEEEVAKVIVSMSIAFA (配列番号:87)	
AKAP10-pep	NTDEAQEEELAWKIAKMIIVSDIMQQA (配列番号:88)	
AKAP11-pep	VNLDDKKAVLAEKIVAEAIEKAEREL (配列番号:89)	
AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNIIQTAVDQF (配列番号:90)	
AKAP14-pep	TQDKNYEDELTVQUALVEDVINYA (配列番号:91)	
Rab32-pep	ETSAKDNNINIEEAARFLVEKILVNH (配列番号:92)	

【0112】

50

異なるAKAPタンパク質のADドメイン間で高度に保存された残基を、AKAP-I S配列（配列番号11）に関して下線を付して示す。この残基はAlto et al. (2003)によって観察されたものと同じであり、C末端アラニン残基の付加を伴う。（するHundsrucker et al. (2006)の図4を参照されたい。参照により本明細書に援用）。RII-DDD配列に対して特に高い親和性を有するペプチドアンタゴニストの配列は、AKAP-1S、AKAP7-wt-pep、AKAP7-L304T-pepおよびAKAP7-L308D-pepのものであった。

## 【化5】

AKAP-1S

**QIEYLAKQIVDNAIQQA** (配列番号11)

10

## 【0113】

Carr et al. (2001, J Biol Chem 276:17332-38)は、ヒト及び非ヒトタンパク質由来の異なるAKAP結合性DDD配列間の配列相同意の程度を調べ、異なるDDD部分の間で最も高度に保存されていると思われるDDD配列中の残基を同定した。これらは、配列番号9のヒトPKA RII-DDD配列に対して下線を付すことにより示される。特に保存された残基は更にイタリック体で示される。この残基は、AKAPタンパク質への結合にとって重要であることがKinderman et al. (2006)によって示唆された残基と重複するが、同一ではない。当業者は、DDDの配列変異体を設計する際に、最も保存された残基（イタリック体）を変更することを避けることが最も好ましく、また保存された残基（下線を付したもの）を変更することを避けるのが好ましいのに対して、下線も付されず且つイタリックにもされない残基については保存されたアミノ酸置換が考慮されることを理解するであろう。

20

## 【化6】

**SHIQIPPGLTELQGYTVEVLRQOPPDLVFAVEYFTRLREARA** (配列番号9)

## 【0114】

Carr et al. (2001)のデータに基づいて、DDD1（配列番号9）配列についての保存的アミノ酸置換の改変されたセットが、表5に示されている。この減少したセットの置換配列であさえも、過度の実験をすることなく、当業者によって製造、試験及び使用され得る、65,000を超える可能性な代替DDD部分配列が存在する。当業者は、表2及び表3について上記で開示したような、そのような代替DDDアミノ酸配列を容易に誘導することができるであろう。

30

## 【表5】

表5. DDD1（配列番号9）における保存的アミノ酸置換。配列番号96として開示されたコンセンサス配列。

S	H	I	Q	I	P	P	G	L	T	E	L	L	Q	G	Y	T	V	E	V	L	R
T			N					S									I L A				

40

Q	Q	P	P	D	L	V	E	F	A	V	E	Y	F	T	R	L	R	E	A	R	A
N										I L A	D		S	K		K		L I V		L I V	

50

## 【0115】

当業者は、D D D または A D アミノ酸配列におけるこれら及び他のアミノ酸置換は、当該分野で標準的で且フルーチンの実験に過ぎない技術を用いて A D または D D D 部分の属内の代替種を產生するために利用し得ることを理解するであろう。

## 【0116】

## 代替 D N L (登録商標) 構造

ある特定の代替的実施形態において、D N L (登録商標) 構築物は代替的に構築された抗体または抗体断片を用いて形成され得るものであり、ここでは A D 部分が重鎖上における F c の C 末端の代わりに、カッパ軽鎖の C 末端 (C<sub>k</sub>) に結合し得る。代替的に形成された D N L (登録商標) 構築物は、2012年6月1日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 654,310 号、2012年6月20日に出願された第 61 / 662,086 号、2012年7月19日に出願された第 61 / 673,553 号、2012年8月13日に出願された第 61 / 682,531 号に記載されており、それら各々は、参照により本明細書に援用する。軽鎖複合体化 D N L (登録商標) 構築物は、インビトロでの向上した F c - エフェクター機能活性及び改善された薬物動態、インビボでの安定性及び抗リンパ腫活性を示す (Rossi et al., 2013, Bioconjug Chem 24 : 63 - 71)。

## 【0117】

C<sub>k</sub> 複合体化 D N L (登録商標) 構築物は、米国仮特許出願第 61 / 654,310 号、第 61 / 662,086 号、第 61 / 673,553 号、及び第 61 / 682,531 号に開示されているようにして調製することができる。簡単に言えば、C<sub>k</sub> - A D 2 - I g G を組換え技術により作製し、それにより A D 2 ペプチドを 軽鎖の C 末端に融合させた。C<sub>k</sub> の天然の C 末端は、C<sub>H</sub> 1 へのジスルフィド架橋を形成するシステイン残基なので、16 アミノ酸残基の「ヒンジ」リンカーを用いて、A D 2 を C<sub>k</sub> - V<sub>H</sub> 1 ディスルフィド架橋から離間させた。C<sub>k</sub> - A D 2 - I g G - ベルツズマブ及び C<sub>k</sub> - A D 2 - I g G - エプラツズマブの哺乳類発現ベクターは、相同性の C<sub>H</sub> 3 - A D 2 - I g G モジュールの発現のために以前に使用された p d H L 2 ベクターを用いて構築された。V<sub>K</sub> / C<sub>K</sub> イントロン内の B a m H I 制限部位から C K イントロンの X h o I 制限部位に亘る p d H L 2 ベクター配列を含み、且つヒンジリンカーのためのコード配列 (E F P K P S T P P G S S G G A P、配列番号 93) 及び A D 2 が、C<sub>k</sub> のコード配列の 3' 末端にインフレームで挿入された状態で、2208 塩基対のスクレオチド配列が合成された。この合成配列を、B a m H I 及び X h o I 制限部位を介して、ベルツズマブ及びエプラツズマブのための I g G - p d H L 2 発現ベクター中に挿入した。S p E S F X - 10 を用いた産生クローニングの作製は、C<sub>H</sub> 3 - A D 2 - I g G モジュールについて記載したように行つた。C<sub>k</sub> - A D 2 - I g G - ベツズマブおよび C<sub>k</sub> - A D 2 - I g G - エプラツズマブは、バッヂローラボトル培養で安定にトランスフェクトされた産生クローニングにより産生され、M a b S e l e c t (G E H e a l t h c a r e) プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを用いて上清から 1 段階で精製された。

## 【0118】

22 - (20) - (20) について以前に記載された同じ D N L (登録商標) プロセス (Rossi et al., 2009, Blood 113 : 6161 - 71) に従つて、C<sub>k</sub> - A D 2 - I g G - エプラツズマブを、C<sub>H</sub> 1 - D D D 2 - F a b - ベルツズマブ、即ち、ベルツズマブから誘導された F a b ベースのモジュールと複合体化させて、b s H e x A b 22 \* - (20) - (20) を生じさせ、ここで 22 \* はエプラツズマブの C k - A D 2 モジュールを示し、各々の (20) はベルツズマブ F a b の安定化された二量体を象徴している。22 \* - (20) - (20) の特性を、類似の粗製及び分子サイズを有するが、アーキテクチャが異なる 22 - (20) - (20) 、即ち C<sub>H</sub> 3 - A D 2 - I g G - エプラツズマブを含む相同性 F c - b s H e x A b のそれと比較した。

## 【0119】

10

20

30

40

50

20 - 2 bについて以前に記載された同じDNL(登録商標)プロセス(Rossi et al., 2009, Blood 114: 3864 - 71)に従って、C<sub>k</sub>-AD2-IgG-ベルツズマブを、IFN-2b-DDD2、即ち、DDD2ペプチドがそのC末端で融合されたIFN-2bのモジュールと複合体化して、各軽鎖に融合された二量体IFN-2bを有するベルツズママブを含む20\*-2bを生成させた。20\*-2bの特性を、相同性Fc-IgG-IFNである20-2bのそれと比較した。

#### 【0120】

bshexAb及びIgG-IFNaの各々を、MabSelectアフィニティーカロマトグラフィーによりDNL(登録商標)反応混合物から単離した。2つのC<sub>k</sub>由来のプロトタイプ、即ち、エプラツズマブ(抗CD22)及びベルツズマブの4つのFab(抗CD20)を含む抗CD22/CD20二重特異性六価抗体、並びにベルツズマブ及びインターフェロン-2bの4つの分子を含むCD20ターゲッティング免疫サイトカインは、インビトロでの増強されたFcエフェクター機能、並びにそれらのFc由来の対応物と比較して改善された薬物動態、インビボでの安定性及び抗リンパ腫活性を示した。  
10

#### 【0121】

##### アミノ酸置換

別の実施形態において、開示される方法及び組成物は、1以上の置換アミノ酸残基を有するタンパク質またはペプチドの製造及び使用を含み得る。例えば、DNL(登録商標)構築物を作製するために使用されるDDD及び/またはAD配列は、上で述べたようにして改変され得る。  
20

#### 【0122】

当業者は、一般に、アミノ酸置換は典型的には、アミノ酸が比較的類似の性質の別のアミノ酸で置換されること(即ち、保存的アミノ酸置換)を含むことを認識するであろう。種々のアミノ酸の特性、並びにタンパク質の構造及び機能に対するアミノ酸置換の効果は、当該技術における広範な研究及び知識の主題となっている。

#### 【0123】

例えば、アミノ酸の疎水性指数を考慮することができる(Kyte & Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157: 105 - 132)。アミノ酸の相対的な疎水性特性は、結果として生じるタンパク質の二次構造に寄与し、これは次にタンパク質と他の分子との相互作用を決定する。各アミノ酸には、その疎水性及び電荷特性(Kyte & Doolittle, 1982)に基づいてハイドロパシー指数が割り当てられており、これらはイソロイシン(+4.5); バリン(+4.2); ロイシン(+3.8); フェニルアラニン(+2.8); システイン/シスチン(+2.5); メチオニン(+1.9); アラニン(+1.8); グリシン(-0.4); スレオニン(-0.7); セリン(-0.8); トリプトファン(-0.9); チロシン(-1.3); プロリン(-1.6); ヒスチジン(-3.2); グルタミン酸(-3.5); グルタミン(-3.5)アスパラギン酸(-3.5); アスパラギン(-3.5); リシン(-3.9); 及びアルギニン(-4.5)である。保存的置換を行う場合、疎水性指数が±2以内であるアミノ酸の使用が好ましく、±1以内がより好ましく、±0.5以内が更に好ましい。  
30

#### 【0124】

アミノ酸置換は、アミノ酸残基の親水性も考慮に入れることがある(例えば、米国特許第4,554,101号)。アミノ酸残基には親水性値が割り当てられる: 即ち、アルギニン(+3.0); リジン(+3.0); アスパラギン酸(+3.0); グルタミン酸(+3.0); セリン(+0.3); アスパラギン(+0.2); グルタミン(+0.2); グリシン(0); スレオニン(-0.4); プロリン(-0.5±1); アラニン(-0.5); ヒスチジン(-0.5); システイン(-1.0); メチオニン(-1.3); バリン(-1.5); ロイシン(-1.8); イソロイシン(-1.8); チロシン(-2.3); フェニルアラニン(-2.5); トリプトファン(-3.4)である。アミノ酸置換は、同様の親水性を有する他のアミノ酸との置換が好ましい。  
40

#### 【0125】

10

20

30

40

50

他の考察には、アミノ酸側鎖のサイズが含まれる。例えば、グリシンまたはセリンのようなコンパクトな側鎖を有するアミノ酸を、トリプトファンまたはチロシンのような嵩高い側鎖を有するアミノ酸と置換することは、一般的には好ましくないであろう。タンパク質二次構造に対する種々のアミノ酸残基の効果もまた検討事項である。経験的研究を通じて、タンパク質ドメインがアルファ-螺旋、ベータ-シートまたは逆方向の二次構造をとる傾向に及ぼす異なるアミノ酸残基の効果が決定されており、当該技術において既知である（例えば、Chou & Fasman, 1974, Biochemistry, 13: 222-245; 1978, Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276; 1979, Biophys. J., 26: 367-384 参照）。

## 【0126】

10

このような考察及び広範な実験的研究に基づいて、保存的アミノ酸置換の表が構築されており、当該技術において知られている。例えば：アルギニン及びリジン；グルタミン酸及びアスパラギン酸；セリン及びスレオニン；グルタミン及びアスパラギン；バリン、ロイシン及びイソロイシンが挙げられる。或いは：Ala (A)、Leu、Ile、Val；Arg (R)、Gln、Asn、Lys；Asn (N) His、Asp、Lys、Arg、Gln；Asp (D) Asn、Glu；Cys (C)、Ala、Ser；Gln (Q)、Glu、Asn；Glu (E)、Gln、Asp；Gly (G)、Ala；His (H)、Asn、Gln、Lys、Arg；Ile (I)、Val、Met、Ala、Phe、Leu；Leu (L)、Val、Met、Ala、Phe、Ile；Lys (K)、Gln、Asn、Arg；Met (M)、Phe、Ile、Leu；Phe (F)、Leu、Val、Ile、Ala、Tyr；Pro (P)、Ala；Ser (S)、Thr；Thr (T)、Ser；Trp (W)、Phe、Tyr；Tyr (Y)、Trp、Phe、Thr、Ser；Val (V)、Ile、Leu、Met、Phe、Alaである。

## 【0127】

20

アミノ酸置換に関する他の検討事項には、残基がタンパク質の内部に位置するか、または溶媒に露出されるか否かが含まれる。内部残基について、保存的置換には、Asp 及び Asn；Ser 及び Thr；Ser 及び Ala；Thr 及び Ala；Ala 及び Gly；Ile 及び Val；Val 及び Leu；Leu 及び Ile；Leu 及び Met；Phe 及び Tyr；Tyr 及び Trp が含まれるであろう（例えば、PROWL website at rockefeller.edu 参照）。溶媒に露出される残基の場合、保存的置換には、Asp 及び Asn；Asp 及び Gln；Glu 及び Gln；Glu 及び Ala；Gly 及び Asn；Ala 及び Pro；Ala 及び Gly；Ala 及び Ser；Ala 及び Lys；Ser 及び Thr；Lys 及び Arg；Val 及び Leu；Leu 及び Ile；Ile 及び Val；Phe 及び Tyr (Id) が含まれるであろう。アミノ酸置換の選択を助けるために様々なマトリックス、例えば PAM 250 スコアリングマトリックス、Dayhoff マトリックス、Grantham マトリックス、McLachlan マトリックス、Doolittle マトリックス、Henikoff マトリックス、Miyata マトリックス、Fitch マトリックス、Jones マトリックス、Rao マトリックス、Levin マトリックスおよび Risler マトリックス (Idem.) が構築されている。

30

## 【0128】

40

アミノ酸置換を決定する際には、分子間または分子内結合、例えば正に帶電した残基（例えば、His、Arg、Lys）と負に荷電した残基（例えば、Asp、Glu）の間のイオン結合（塩橋）、または近くのシステイン残基間のジスルフィド結合の形成が考慮され得る。

## 【0129】

50

コードされたタンパク質配列中の任意の他のアミノ酸を、任意の他のアミノ酸に置換する方法は周知で、且つ当業者にとっては、例えば、部位特異的突然変異誘発の技術による、またはアミノ酸置換をコードするオリゴヌクレオチドの合成及び組み立て、並びに発現ベクター構築物中へのスプライシングによるルーチンの実験の問題である。

## 【0130】

## プレターゲティング

二重特異性抗体または多重特異性抗体は、プレターゲッティング技術において有用であり得る。この場合、1以上の診断薬及び／または治療薬を、1以上のハプテンを含む標的化可能な構築物に複合体化させることができる。当該ハプテンは、腫瘍関連抗原または他の疾患関連抗原にも結合する二重特異性または多重特異性抗体の少なくとも1つのアームによって認識される。この場合、当該治療剤は、当該標的化可能な構築物の結合を介して当該抗体に間接的に結合する。このプロセスは、プレターゲッティングと称される。

## 【0131】

プレターゲティングは、本来、直接ターゲッティング抗体の遅い血液クリアランスを解決するために開発された多段階プロセスであり、骨髄のような正常組織に対する望ましくない毒性に寄与する。プレターゲッティングでは、治療剤が、血液から数分以内に除去される小さな送達分子（標的化可能な構築物）に結合される。標的化可能な構築物及び標的抗原への結合部位を有する二重特異性または多重特異性のプレターゲッティング抗体が最初に投与され、遊離抗体が循環系から除去され、次いで標的化可能な構築物が投与される。

10

## 【0132】

プレターゲッティングの方法は、例えば、Goodwin et al., 米国特許第4,863,713号; Goodwin et al., J. Nucl. Med. 29: 226, 1988; Hnatowich et al., J. Nucl. Med. 28: 1294, 1987; Oehr et al., J. Nucl. Med. 29: 728, 1988; Klibanov et al., J. Nucl. Med. 29: 1951, 1988; Sinitsyn et al., J. Nucl. Med. 30: 66, 1989; Kalofonos et al., J. Nucl. Med. 31: 1791, 1990; Schechter et al., Int. J. Cancer 48: 167, 1991; Paganelli et al., Cancer Res. 51: 5960, 1991; Paganelli et al., Nucl. Med. Commun. 12: 211, 1991; 米国特許第5,256,395号; Stickney et al., Cancer Res. 51: 6650, 1991; Yuan et al., Cancer Res. 51: 3119, 1991; 米国特許第6,077,499号; 同第7,011,812号; 同第7,300,644号; 同第7,074,405号; 同第6,962,702号; 同第7,387,772号; 同第7,052,872号; 同第7,138,103号; 同第6,090,381号; 同第6,472,511号; 同第6,962,702号; および同第6,962,702号に記載されており、これらの各々を参照により本明細書に援用する。

20

## 【0133】

対象の疾患または障害を診断または治療するプレターゲティング方法は、(1)当該対象に二重特異性抗体または抗体断片を投与すること；(2)必要に応じて、当該対象にクリアリング組成物を投与し、当該組成物が当該抗体を循環系から除去すること可能にすること；および(3)当該対象に、1以上のキレート化または化学的に結合された治療剤または診断剤を含有する標的化可能な構築物を投与することによって提供される。

30

## 【0134】

## 標的化可能な構築物

ある特定の実施形態において、プレターゲッティングに使用するための1以上の治療剤または診断剤で標識された標的化可能な構築物ペプチドは、標的化可能な構築物ペプチドのための1以上の結合部位、及び疾患または状態に関連する標的抗原のための1以上の結合部位を備えた二重特異性抗体に結合するように選択することができる。二重特異性抗体はプレターゲッティング技術において使用することができ、ここでは抗体が最初に対象に投与され得る。二重特異性抗体が標的抗原に結合するために、及び未結合の抗体が循環系から消失するために、十分な時間が許容され得る。次に、標識されたペプチドのような標

40

50

的化可能な構築物を対象に投与し、当該二重特異性抗体に結合させ、罹患した細胞または組織に局在させることができる。

#### 【0135】

このような標的化可能な構築物は多様な構造のものであってよく、またプレターゲッティング法および二重特異性抗体（b s A b）または多重特異性抗体において使用される場合、標的化可能な構築物に高親和性で結合する抗体または断片の利用可能性のためだけでなく、迅速なインビオクリアランスのために選択される。疎水性物質は強い免疫応答を誘発するのに最良であるのに対して、親水性物質は迅速なインビオクリアランスのために好ましい。従って、疎水性および親水性の間のバランスが確立される。これは部分的には、親水性キレート剤を使用して、多くの有機部分の固有の疎水性を相殺するとによって達成できる。また、反対の溶液特性を有する標的化可能な構築物のサブユニット、例えば、幾つかは疎水性で且ついくつかは親水性であるアミノ酸を含むペプチドが選択され得る。10

#### 【0136】

僅か2個のアミノ酸残基、好ましくは2～10個の残基を有するペプチドを使用することができ、またキレート剤のような他の部分に結合することもできる。当該リンカーは、好ましくは50,000ダルトン未満、有利には約20,000ダルトン未満、10,000ダルトン未満または5,000ダルトン未満の分子量を有する低分子複合体とすべきである。より普通には、当該標的化可能な構築物ペプチドは、例えば二重特異性抗体に結合するための4以上の残基及び1以上のハプテンを有する。例示的なハプテンには、In-DTPA（インジウム-ジエチレントリアミン五酢酸）またはHSG（ヒスタミンスクシニルグリシン）が含まれ得る。標的化可能な構築物はまた、1以上のキレート化部分、例えばDOTA（1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸）、NOTA（1,4,7-トリアザ-シクロノナン-1,4,7-三酢酸）、ETA（p-プロモアセトアミド-ベンジル-テトラエチルアミン四酢酸）、NETA（[2-(4,7-ビスカルボキシメチル[1,4,7]トリアザシクロノナン-1-イル-エチル)-2-カルボニルメチル-アミノ]酢酸）、または他の既知のキレート化部分を含むことができる。当該キレート化部分は、例えば、治療用及び/または診断用の放射性核種、常磁性イオンまたは造影剤を結合するために使用されてよい。20

#### 【0137】

当該標的化可能な構築物はまた、インビオでのペプチドの安定性を増大させるために、骨格構造中に非天然アミノ酸、例えばD-アミノ酸を含んでもよい。代替実施形態では、他の骨格構造、例えば非天然アミノ酸（例えばD-アミノ酸）またはペプトイドから構築されたものを使用することができる。30

#### 【0138】

標的化可能な構築物として使用されるペプチドは、固相支持体及び反復した直交脱保護及び連結の標準的技術を用いて、自動ペプチド合成機上で簡便に合成される。ペプチド中の遊離アミノ基は、後でキレート化部分または他の薬剤を複合化するために使用され、Boc基等の標準的な保護基でロックされるのが有利であり、またN末端残基は血清安定性を高めるためにアセチル化される。そのような保護基は当業者に周知である。Greene and Wuts Protective Groups in Organic Synthesis, 1999 (John Wiley and Sons, N.Y.)を参照されたい。ペプチドが二重特異性抗体系内における後での使用のために調製される場合、それらはインビオでのカルボキシペプチダーゼ活性を阻害するために、樹脂から切断されて対応するC末端アミドを生成させるのが有利である。40

#### 【0139】

当該抗体は、二重特異性抗体によるプレターゲッティングが使用される場合、標的組織によって產生される抗原、または当該組織に付随した抗原のための第1の結合部位、及び当該標的化可能な構築物上のハプテンのための第2の結合部位を含むであろう。例示的なハプテンとしては、HSG及びIn-DTPAが含まれるが、これらに限定されない。HSGハプテンに対して產生された抗体は既知であり（例えば、679抗体）、適切な二重50

特異性抗体に容易に組み込むことができる（例えば、米国特許第6,962,702号、第7,138,103号及び第7,300,644号の実施例の節を参照されたい）。しかしながら、他のハプテン及びこれに結合する抗体は、In-DTPA及び734抗体（例えば、その実施例の節を本明細の一部として援用する米国特許第7,534,431号）のように、当該技術において既知であり、且つ使用することができる。

#### 【0140】

##### 免疫複合体

様々な実施形態は、1以上の診断薬または治療薬に結合した抗Trop-2抗体またはその抗原結合性断片を備えた免疫複合体の使用を含み得る。幾つかの実施形態において、薬物または他の作用物質は、担体部分を介して抗体またはその断片に結合され得る。担体部分は、例えば還元されたSH基及び/または炭水化物側鎖に結合することができる。担体成分は、ジスルフィド結合形成を介して、還元された抗体成分のヒンジ領域に結合することができる。或いは、このような薬剤は、N-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD<sub>P</sub>)のようなヘテロ二官能性架橋剤を用いて結合させることができる(Yu et al., Int. J. Cancer 56: 244 (1994))。そのような複合体化のための一般的な技術は、当技術において周知である。例えば、Wong, CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC Press 1991); Upeslacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al. (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)を参照されたい。或いは、担体部分は、抗体のFc領域における糖鎖部分を介して結合させることができる。

#### 【0141】

抗体の糖鎖部分を介して抗体に官能基を結合させる方法は、当業者に周知である。例えば、Shih et al., Int. J. Cancer 41: 832 (1988); Shih et al., Int. J. Cancer 46: 1101 (1990); and Shih et al., その実施例の節を参照により本明細書に援用する、米国特許第5,057,313号を参照されたい。一般的な方法は、酸化された糖鎖部分を有する抗体を、少なくとも1つの遊離アミン官能基を有する担体ポリマーと反応させることを含んでいる。この反応は、初期のシップ塩基(イミン)結合をもたらし、これは第2級アミンへの還元によって安定化されて、最終的な複合体を形成することができる。

#### 【0142】

抗体成分が抗体断片である場合、Fc領域は存在しない可能性がある。しかし、全長抗体または抗体断片の軽鎖可変領域に糖鎖部分を導入することが可能である。例えば、Leung et al., J. Immunol. 154: 5919 (1995); その実施例の節を参照により本明細書に援用する米国特許第5,443,953号及び同第6,254,868号を参照されたい。この操作された糖鎖部分は、治療薬または診断薬を結合するために使用される。

#### 【0143】

ターゲティング分子に担体部分を結合させる別 の方法は、クリックケミストリー反応の使用を含んでいる。クリックケミストリーのアプローチは、もともと小さなサブユニットをモジュール方式で結合することによって、複雑な物質を迅速に生成する方法として着想された（例えば、Kolb et al., 2004, Angew Chem Int

10

20

30

40

50

Ed 40 : 3004 - 31 ; Evans, 2007 Aust J Chem 60 : 384 - 95 を参照されたい)。クリックケミストリー反応の様々な形態は、例えばヒュスゲン 1 , 3 - 双極子環化付加銅触媒反応 (Tornoe ら、2002、J 有機 CHEM 67 : 3057 から 64 ) のように当該技術において既知であり、これは屡々「クリック反応」と称される。他の選択肢には、ディールス - アルダー (Dieels - Alder) のような環状付加反応、求核置換反応 (特に、エポキシ及びアジリジン化合物のような小さな歪み環)、尿素化合物のカルボニル化学形成、及びチオール - イン反応におけるアルキンのような炭素 - 炭素二重結合を含む反応が含まれる。

## 【0144】

アジドアルキンのヒュスゲン環状付加反応は、第 1 の分子に結合した末端アルキン基の反応を触媒するために、還元剤の存在下で銅触媒を使用する。アジド部分を含む第 2 の分子の存在下において、当該アジドは活性化されたアルキンと反応して 1 , 4 - 二置換 1 , 2 , 3 - トリアゾールを形成する。この銅触媒反応は室温で起こり、十分に特異的なので、反応生成物の精製は必要とされないことが多い (Rostovstev et al. , 2002, Angew Chem Int Ed 41 : 2596; Tornoe et al. , 2002, J Org Chem 67 : 3057.)。アジド官能基及びアルキン官能基は、水性媒体中の生体分子に対して概ね不活性であり、複雑な溶液中で反応を起こすことを可能にする。形成されたトリアゾールは化学的に安定であり、酵素的開裂を受けず、生物学的系においてクリックケミストリー生成物を非常に安定にする。銅触媒は生細胞に対して有毒であるが、銅ベースのクリック化学反応は免疫複合体形成のためにインピトロで使用され得る。

## 【0145】

生体分子の共有結合修飾のために、銅を用いないクリック反応が提案されている (See, e.g., Agard et al. , 2004, J Am Chem Soc 126 : 15046 - 47 参照)。銅を用いない反応は、銅触媒の代わりに環歪を使用して、[3 + 2] アジド - アルキン環状付加反応を促進する (同上)。例えば、シクロオクチンは、内部アルキン結合を含む 8 炭素環構造である。閉環構造は、アセチレンの実質的な結合角変形を誘発し、これはアジド基と高度に反応してトリアゾールを形成する。従って、シクロオクチン誘導体は、銅を用いないクリック反応に使用することができる (同上)

## 【0146】

歪みで促進されるアルキン - ニトロン環状付加を含んだ、別のタイプの銅フリーのクリック反応が、Ning et al. (2010, Angew Chem Int Ed 49 : 3065 - 68) によって報告された。シクロオクチン反応の元々の遅い速度に対処するために、電子吸引基が三重結合に隣接して結合されている (同上)。そのような置換シクロオクチンの例には、ニフッ素化シクロオクチン、4 - ジベンゾシクロオクチノール及びアザシクロオクチンが含まれる (同上)。別の銅フリー反応には、N - アルキル化イソキサゾリンを与えるための、歪みで促進されるアルキン - ニトロン環状付加が含まれる (同上)。この反応は、例外的に速い反応速度論を有すると報告され、またペプチドおよびタンパク質の部位特異的修飾のためのワンポット 3 段階プロトコールで使用された (同上)。ニトロンは、適切なアルデヒドと N - メチルヒドロキシルアミンとの縮合によって調製され、また環状付加反応は、アセトニトリルと水の混合物中で生じた (同上)。これら及び他の既知のクリックケミストリー反応を使用して、担体部分をインピトロで抗体に結合させることができる。

## 【0147】

Agard et al. (2004, J Am Chem Soc 126 : 15046 - 47) は、過アセチル化 N - アジドアセチルマンノーサミンの存在下で CHO 細胞において発現された組換え糖タンパク質が、糖タンパク質の糖鎖中の対応する N - アジドアセチルシアル酸の生物学的取り込みをもたらすことを実証した。当該アジド誘導体化された糖タンパク質は、ビオチン化されたシクロオクチンと特異的に反応してビオチン化糖

10

20

30

40

50

タンパク質を形成するが、アジド部分を有さない対照糖タンパク質は未標識のままである（同上）。Laughlin et al. (2008, Science 320: 664 - 667) は、過アセチル化N-アジドアセチルガラクトサミンと共にインキュベートしたゼブラフィッシュ胚において、細胞表面グリカンを代謝的に標識するために同様の技術を使用した。当該アジド誘導体化されたグリカンは、ジフルオロシクロオクチン (DIFO) 試薬と反応して、インビボでグリカンを視覚化することができた。

#### 【0148】

ディールス・アルダー反応は、分子のインビボ標識にも使用されている。Rossin et al. (2010, Angew Chem Int Ed 49: 3375 - 78) は、トランス-シクロオクテン (TCO) 反応性部分を有する腫瘍局在化した抗T AG72 (CC49) 抗体と、<sup>111</sup>In 標識されたテトラジンDOTA 誘導体との間の、インビボでの収率 52% を報告した。TCO 標識された CC49 抗体を、結腸癌異種移植片を有するマウスに投与し、1 日後に <sup>111</sup>In 標識されたテトラジンプローブを注射した（同上）。放射線標識プローブ注射の 3 時間後には、生存マウスの SPECT 撮像により示されたように、放射性標識プローブと腫瘍局在化抗体との反応は腫瘍における顕著な放射能局在化をもたらし、腫瘍対筋肉比は 13 : 1 であった（同上）。この結果により、TCO およびテトラジン標識された分子のインビボ化学反応が確認された。

#### 【0149】

標識部分の生物学的組み込みを用いる抗体標識技術は、米国特許第 6,953,675 号（その実施例の節を参照により本明細書に援用する）に更に開示されている。そのような「改善された (landscaped)」抗体は、グリコシル化部位に反応性ケトン基を有するように調製された。この方法は、CH1 または V<sub>k</sub> ドメイン中の 1 以上の N-グリコシル化部位を有する抗体をコードする発現ベクターをトランスフェクトされた細胞を、糖または糖前駆体のケトン誘導体を含む培養培地中の発現させることを含んでいた。ケトン誘導体化された糖類または前駆体には、N-レブリノイルマンノーサミン及び N-レブリノイルフコースが含まれる。当該改善された抗体は、その後、標識されたターゲッティング分子を形成するために、ヒドラジド、ヒドラジン、ヒドロキシルアミノまたはチオセミカルバジドのようなケトン反応性部分を含む物質と反応された。当該改善された抗体に結合される例示的物質には、DPTA のようなキレート化剤、ドキソルビシン - デキストラン及びアシリル - ヒドラジド含有ペプチドのような大きな薬物分子が含まれる。当該改善技術はケトン部分を含む抗体を製造することに限定されず、ニトロン、アジドまたはシクロオクチンのようなクリックケミストリー反応性基を、抗体または他の生物学的分子に導入するために使用することができる。

#### 【0150】

クリックケミストリー反応の改変は、インビトロまたはインビボでの使用に適している。反応性ターゲッティング分子は、化学的複合体化または生物学的組み込みの何れかによって形成され得る。抗体または抗体断片のような標的化分子は、アジド部分、置換シクロオクチンもしくはアルキン基、またはニトロン部分で活性化され得る。当該ターゲッティング分子がアジド基またはニトロン基を含む場合、対応する標的化可能な構築物は置換シクロオクチンまたはアルキン基を含むであろうし、逆もまた同様である。そのような活性化分子は、上記で述べたように、生きた細胞における代謝的取り込みによって作製され得る。

#### 【0151】

或いは、このような部分を生体分子に化学的に複合体化させる方法は当技術において周知であり、斯かる既知の方法何れかを利用することができます。免疫複合体形成の一般的な方法は、例えば、米国特許第 4,699,784 号；同第 4,824,659；同第 5,525,338；同第 5,677,427；同第 5,697,902；同第 5,716,595；同第 6,071,490；同第 6,187,284；同第 6,306,393；同第 6,548,275；同第 6,653,104 号；同第 6,962,702；同第 7,033,572；同第 7,147,856；同第及び 7,259,240 に開示され

10

20

30

40

50

ており、各々の実施例の節を参照により本明細書に援用する。

### 【0152】

#### 診断剤

診断剤は、検出抗体を標識するために、またはCTCを直接標識するために使用され得る任意の検出可能な物質を含むことができ、好ましくは、放射性核種、放射線造影剤、常磁性イオン、金属、蛍光標識、化学発光標識、超音波造影剤及び光活性剤からなる群から選択される。そのような診断薬は周知であり、斯かる既知の診断薬の何れをも使用することができる。診断剤の非限定的な例には、<sup>1 1 0</sup>I n、<sup>1 1 1</sup>I n、<sup>1 7 7</sup>L u、<sup>1 8</sup>F、<sup>5 2</sup>F e、<sup>6 2</sup>C u、<sup>6 4</sup>C u、<sup>6 7</sup>C u、<sup>6 7</sup>G a、<sup>6 8</sup>G a、<sup>8 6</sup>Y、<sup>9 0</sup>Y、<sup>8</sup>Z r、<sup>9 4</sup>mT c、<sup>9 4</sup>T c、<sup>9 9</sup>mT c、<sup>1 2 0</sup>I、<sup>1 2 3</sup>I、<sup>1 2 4</sup>I、<sup>1 2 5</sup>I、<sup>1 3 1</sup>I、<sup>1 5 4</sup>-<sup>1 5 8</sup>G d、<sup>3 2</sup>P、<sup>1 1</sup>C、<sup>1 3</sup>N、<sup>1 5</sup>O、<sup>1 8 6</sup>R e、<sup>1 8</sup>R e、<sup>5 1</sup>M n、<sup>5 2</sup>mM n、<sup>5 5</sup>C o、<sup>7 2</sup>A s、<sup>7 5</sup>B r、<sup>7 6</sup>B r、<sup>8 2</sup>mR b、<sup>8 3</sup>S r、または他のガンマ放出体、ベータ放出体もしくはポジトロン放出体のような放射性核種が含まれ得る。使用される常磁性イオンには、クロム(I II)、マンガン(I II)、鉄(I II)、鉄(I I)、コバルト(I I)、ニッケル(I I)、銅(I I)、ネオジム(I III)、サマリウム(I III)、イッテルビウム(I III)、ガドリニウム(I III)、バナジウム(I I)、テルビウム(I III)、ジスプロシウム(I III)、ホルミウム(I III)またはエルビウム(I III)が含まれ得る。金属造影剤には、ランタン(I III)、金(I III)、鉛(I I)またはビスマス(I III)が含まれ得る。  
超音波造影剤には、ガス充填リポソームのようなリポソームが含まれ得る。放射線不透過性診断薬は、化合物、バリウム化合物、ガリウム化合物、及びタリウム化合物から選択することができる。

### 【0153】

ある特定の実施形態において、蛍光プローブは、D Y L I G H T(登録商標)色素(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)であり得る。D Y L I G H T(登録商標)染料シリーズは極性が強く(親水性)、水性バッファーに適合し、光安定性があり、高い蛍光強度を示す。それらは、広いpH範囲にわたって高い蛍光性を維持し、種々の用途に好ましい。しかし、当業者は、様々な蛍光染料が知られ、及び/または市販されており、利用可能であることを理解するであろう。他の蛍光剤には、これらに限定されるものではないが、塩化ダンシル、ローダミンイソチオシアネート、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、アミノアクリジン、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY - FL、BODIPY - R 6G、BODIPY - TMR、BODIPY - TRX、5'-カルボキシ-4'，5'-ジクロロ-2'，7'-ジメトキシフルオレセイン、5'-カルボキシフルオレセイン、5'-カルボキシリードミン、6'-カルボキシリードミン、6'-カルボキシテトラメチルアミノ、カスケード青、Cy 2、Cy 3、Cy 5，6'-FAM、塩化ダンシル、フルオレセイン、HEX、6'-JOE、NBD(7'-ニトロベンズ-2'-オキサ-1',3'-ジアゾール)、オレゴン緑488、オレゴン緑500、オレゴン緑514、パシフィック青、フタル酸、テレフタル酸、イソフタル酸、クレシルファスト紫、クレシル青紫、ブリリアントクレシル青、パラアミノ安息香酸、エリスロシン、フタロシアニン、アゾメチン、シアニン、キサンチン、スクシニルフルオレセイン、希土類金属クリプテート、ユーロピウム・トリスピリジンジアミン、ユーロピウムクリプテートもしくはキレート、ジアミン、ジシアニン、LaJol 11a青色素、アロピコシアニン、アロコシアニンB、フィコシアニンC、フィコシアニンR、チアミン、フィコエリトロシアニン、フィコエリトリンR、REG、ローダミン緑、ローダミンイソチオシアネート、ローダミン赤、ROX、TAMRA、TET、TRIT(テトラメチルローダミンイソチオール)、テトラメチルローダミン、およびテキサス赤が含まれる(例えば、米国特許第5,800,992号、同第6,319,668号を参照されたい)。これら及び他の発光標識は、Molecular Probes(Eugene, Oreg.)及びEMD Biosciences(San Diego, C 50

a l i f . )などの商業的供給源から得ることができる。

**【0154】**

使用される化学発光標識には、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩または、シュウ酸エステルが含まれ得る。

**【0155】**

治療剤

多種多様な治療試薬を、抗Trop-2または他の抗TAA抗体と同時にまたは順次投与することができる。或いは、このような薬剤、例えば、薬物、毒素、オリゴスクレオチド、免疫調節剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、酵素阻害剤、放射性核種、血管新生阻害剤等は、抗体に複合体化することができる。治療剤には、例えば、ビンカアルカリオイド等の細胞毒性薬物、ドキソルビシン等のアントラサイクリン、2-PDoxもしくはpro-2-PDox、ゲムシタбин、エピポドフィロトキシン、タキサン、代謝拮抗剤、アルキル化剤、抗生素質、SN-38、COX-2阻害剤、抗有糸分裂剤、抗血管新生剤及びアポトーシス促進剤、特にドキソルビシン、メソトレキセート、タキソール、CPT-11、カンプトテカン、プロテオソーム阻害剤、mTOR阻害剤、HDAC阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤—および他のものが含まれる。他の有用な抗癌細胞毒性薬には、ナイトロジェンマスター、アルキルスルホネート、ニトロソウレア、トリアゼン、葉酸類似体、COX-2阻害剤、代謝拮抗剤、ピリミジン類似体、プリン類似体、白金配位錯体、mTOR阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、プロテオソーム阻害剤、HDAC阻害剤、カンプトテシン、ホルモン等が含まれる。適切な細胞傷害剤は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995)、およびGOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THE RAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)、並びにこれらの改訂版を含む刊行物に記載されている。実験薬物等の他の適切な細胞毒性物質は、当業者に既知である。好ましい実施形態において、カンプトテシンおよびSN-38のような関連化合物の複合体は、抗Trop-2抗体または他の抗TAA抗体に複合体化され得る。別の好ましい実施形態において、ゲムシタбинは、SN-38-hRS7および/または<sup>90</sup>Y-hPAM4と複合体化させて対象に投与される。

**【0156】**

毒素は、動物起源、植物起源または微生物起源のものであることができる。使用する毒素としては、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ(RNアーゼ)、DNアーゼI、ブドウ球菌エンテロトキシンA、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、オンコナーゼ、ゲロニン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素及びシュードモナス内毒素が挙げられる。例えば、Pastan et al., Cell 47:641 (1986), Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994), Sharkey and Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 56:226 (2006)を参照されたい。使用に適した追加の毒素が当業者に知られており、米国特許第6,077,499号に開示されている。その実施例の節を、参照により本明細書に援用する。

**【0157】**

本明細書中で使用する場合、「免疫調節物質」の用語には、サイトカイン、リンホカイン、モノカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子(CSF)、インターフェロン(IFN)、副甲状腺ホルモン、チロキシン、インスリン、プロインスリン、リラキシン、プロリラキシン、卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、黄体形成ホルモン(LH)、肝臓成長因子、プロスタグランジン、線維芽細胞成長因子、プロラクチン、胎盤ラクトゲン、OBタンパク質、トランスフォーミング増殖因子(TGF)、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、インスリン様成長因子(IGF)。

、エリスロポエチン、トロンボポエチン、腫瘍壞死因子(TNF)、TNF-<sub>α</sub>、TNF-<sub>β</sub>、ミュラー管阻害物質、マウスゴナンドトロピン関連ペプチド、インヒビン、阿口便、血管内皮成長因子、インテグリン、インターロイキン(IL)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターフェロン-<sub>α</sub>、インターフェロン-<sub>β</sub>、インターフェロン-<sub>γ</sub>、インターフェロン-<sub>δ</sub>、S1因子、IL-1、IL-1<sub>α</sub>、IL-1<sub>β</sub>、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21及びIL-25、LIF、キット-リガンド、FLT-3、アンギオスタチン、トロンボスponジン、エンドスタチン、及びリンホトキシン等が含まれる。

10

### 【0158】

特に有用な治療用放射性核種には、<sup>111</sup>In、<sup>177</sup>Lu、<sup>212</sup>Bi、<sup>213</sup>Bi、<sup>211</sup>At、<sup>62</sup>Cu、<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>90</sup>Y、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>47</sup>Sc、<sup>111</sup>Ag、<sup>67</sup>Ga、<sup>142</sup>Pr、<sup>153</sup>Sm、<sup>161</sup>Tb、<sup>166</sup>Dy、<sup>166</sup>Ho、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>189</sup>Re、<sup>212</sup>Pb、<sup>223</sup>Ra、<sup>225</sup>Ac、<sup>59</sup>Fe、<sup>75</sup>Se、<sup>77</sup>As、<sup>89</sup>Sr、<sup>99</sup>Mo、<sup>105</sup>Rh、<sup>109</sup>Pd、<sup>143</sup>Pr、<sup>149</sup>Pm、<sup>169</sup>Er、<sup>194</sup>Ir、<sup>198</sup>Au、<sup>199</sup>Au、<sup>227</sup>Th、および<sup>211</sup>Pbが含まれるが、これらに限定されない。治療用放射性核種は、好ましくは、オージェ放射体については20~6,000keVの範囲、好ましくは60~200keV、ベータ放射体については100~2500keV、アルファ放射体については4,000~6,000keVの崩壊エネルギーを有する。有用なベータ粒子放出核種の最大崩壊エネルギーは、好ましくは20~5,000keV、より好ましくは100~4,000keV、最も好ましくは500~2,500keVである。オージェ放出粒子で実質的に崩壊する放射性核種もまた好ましい。例えば、Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m、およびIr-192である。有用なベータ粒子放出核種の崩壊エネルギーは、好ましくは1,000keV未満、より好ましくは100keV未満、最も好ましくは70keV未満である。粒子の生成により実質的に崩壊する放射性核種もまた好ましい。このような放射性核種には、Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213、Fm-255、およびTh-227が含まれるが、これらに限定されない。有用なアルファ粒子放出放射性核種の崩壊エネルギーは、好ましくは2,000~10,000keV、より好ましくは3,000~8,000keV、最も好ましくは4,000~7,000keVである。

20

### 【0159】

例えば、高エネルギー粒子を放出する<sup>90</sup>Yは、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)を用いて、より好ましくはDOTAを用いて、抗体、抗体フラグメントまたは融合タンパク質に結合させることができる。抗体または標的化可能な構築物に<sup>90</sup>Yを複合化させる方法は、当該技術において既知であり、任意のそのような既知の方法を使用することができる。(例えば、その実施例の節を参照により本明細書に援用する、米国特許第7,259,249号を参照されたい。また、Linden et al., Clin Cancer Res. 11:5215-22, 2005; Sharkey et al., J Nucl Med. 46:620-33, 2005; Sharkey et al., J Nucl Med. 44:2000-18, 2003も参照されたい)。

30

### 【0160】

追加の可能性のある治療用放射性同位体には、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>75</sup>Br、<sup>198</sup>Au、<sup>224</sup>Ac、<sup>126</sup>I、<sup>133</sup>I、<sup>77</sup>Br、<sup>113m</sup>In、<sup>95</sup>Ru、<sup>97</sup>Ru、<sup>103</sup>Ru、<sup>105</sup>Ru、<sup>107</sup>Hg、<sup>203</sup>Hg、<sup>121m</sup>Te、<sup>122m</sup>Te、<sup>125m</sup>Te、<sup>165</sup>Tm、<sup>167</sup>Tm、<sup>168</sup>Tm、<sup>197</sup>Pt、<sup>109</sup>Pd、<sup>105</sup>Rh、<sup>142</sup>Pr、<sup>143</sup>Pr、<sup>161</sup>Tb、<sup>166</sup>Ho、<sup>199</sup>Au、<sup>57</sup>Co、<sup>55</sup>

40

50

<sup>8</sup> Co、<sup>51</sup> Cr、<sup>59</sup> Fe、<sup>75</sup> Se、<sup>201</sup> Tl、<sup>225</sup> Ac、<sup>76</sup> Br、および<sup>1</sup> <sup>69</sup> Yb等が含まれる。

#### 【0161】

別の実施形態において、放射線増感剤は、裸のまたは複合体化された抗体または抗体断片と組み合わせて使用することができる。例えば、放射線増感剤は、放射性標識された抗体または抗体断片と組み合わせて使用することができる。放射標識された抗体または抗体断片単独での治療と比較した場合、放射性増感剤の添加は効力を増強することができる。放射線増感剤は、DM Goldenberg(編)、CANCER THERAPY WITH RADIOLABELED ANTIBODIES, CRC Press(1995)に記載されている。この技術で使用される他の典型的な放射線増感剤には、ゲムシタビン、5-フルオロウラシル、及びシスプラチニンが含まれ、様々な癌の治療における外部照射と組み合わせて使用されている。10

#### 【0162】

熱中性子活性化療法のためのホウ素付加物担持担体を有する抗体またはその断片は、通常、同様の影響を受ける。しかし、中性子照射を行う前に、非ターゲッティング免疫複合体が消失するまで待つことが有利であろう。クリアランスは、抗癌抗体に結合する抗イデオタイプ抗体を用いて加速することができる。この一般原則の説明については、米国特許第4,624,846号を参照されたい。例えば、カルボランのようなホウ素付加物を抗体に結合させることができる。カルボランは、当技術分野で周知のように、ペンダント側鎖上のカルボキシル官能基を用いて調製することができる。アミノデキストランのような担体へのカルボランの結合は、カルボランにおけるカルボキシル基の活性化及び担体上のアミンとの縮合によって達成することができる。次に、当該中間複合体を抗体に複合体化させる。当該抗体複合体の投与後に、ホウ素付加物は熱中性子照射により活性化されて、アルファ放出により崩壊する放射性原子に変換され、毒性の高い短距離効果を生じる。20

#### 【0163】

##### 製剤及び投与

治療用抗体をインピボで投与する場合、適切な投与経路には、経口、非経口、直腸、経粘膜、腸内投与、髄内、髄腔内、直接的な脳室内、静脈内、硝子体内、腔内、腹腔内、腫瘍内注射が含まれるが、これ等に限定されない。好ましい投与経路は非経口、より好ましくは静脈内投与である。或いは、化合物を全身的ではなく局所的に、例えば、固形腫瘍または血液腫瘍への化合物の直接注射により投与することができる。30

#### 【0164】

抗体は、医薬的に有用な組成物を調製するための既知の方法に従って製剤化することができ、その際、抗体は医薬的に適切な賦形剤との混合物中で組み合わされる。滅菌リン酸緩衝生理食塩水は、医薬的に適切な賦形剤の一例である。他の適切な賦形剤は、当業者に周知である。例えば、Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition(Lea & Febiger 1990), 及びGennaro (ed.), REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition(Mack Publishing Company 1990), 並びにそれらの改訂版を参照されたい。40

#### 【0165】

好ましい実施形態において、当該抗体は、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES); N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸(ADA); N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES); 4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エタンスルホン酸(HEPES); 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES); 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS); 3-(N-モルホリニル)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸(MOPS-O); ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)[Pipes]からなる群から選択される緩衝液を用いて、グッドの生物学的緩衝液(pH 6~7)中に処方される。50

より好ましい緩衝液は、MESまたはMOPSであり、好ましくは20～100mM、より好ましくは約25mMの濃度である。最も好ましいのは25mM・MES、pH6.5である。当該製剤は、賦形剤として25mMトレハロース及び0.01%v/vポリソルベート80を更に含むことができ、添加された賦形剤の結果として最終緩衝液濃度は22.25mMに改変される。好ましい保存方法は、-20～2の温度範囲で保存された複合体の凍結乾燥製剤であり、最も好ましい保存は2～8である。

#### 【0166】

当該抗体は、例えば、ボーラス注射、低速輸液または連続注入を介した静脈内投与のために製剤化できる。好ましくは、本発明の抗体は、約4時間未満の期間にわたって、より好ましくは約3時間未満の期間にわたって注入される。例えば、最初の25～50mgを30分以内、好ましくは15分以内に注入し、残りを次の2～3時間にわたって注入することができる。注射用製剤は、単位剤形、例えばアンプルまたは複数用量容器中において、防腐剤を加えて提供することができる。当該組成物は、油性または水性の賦形剤中の懸濁液、溶液またはエマルジョンのような形態をとることができ、また懸濁剤、安定化剤及び/または分散剤のような処方剤を含有することができる。或いは、活性成分は、使用前に適切な賦形剤（例えば、発熱物質を含まない滅菌水）と共に構成するための粉末形態であることができる。

#### 【0167】

更なる医薬的方法を使用して、治療用複合体の作用持続時間を制御することができる。制御放出調製物は、抗体を複合体化または吸着させるためのポリマーの使用を介して調製することができる。例えば、生体適合性ポリマーには、ポリ(エチレン-co-酢酸ビニル)のマトリックスと、ステアリン酸二量体およびセバシン酸のポリ酸無水物コポリマーのマトリックスが含まれる。Sherwood et al., Bio/Technology 10:1446 (1992)を参照されたい。そのようなマトリックスからの抗体放出速度は、抗体の分子量、マトリックス内の抗体の量、及び分散した粒子のサイズに依存する。Saltzman et al., Biophys. J. 55:163 (1989); Sherwood et al., 上掲。他の固体剤形は、Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5th Edition (Lea & Febiger 1990)、及びGennaro(編)、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition (Mack Publishing Company 1990)及びその改訂版に記載されている。

#### 【0168】

一般に、ヒトについて投与される抗体の投与量は、患者の年齢、体重、身長、性別、一般的な医学的状態及び以前の病歴などの因子に応じて変化する。単回の静脈内注入として約0.3mg/kg～5mg/kgの範囲の抗体投与量をレシピエントに与えることが望ましくあり得るが、より低いか、またはより高い用量もまた状況に応じて投与され得る。例えば、70kgの患者の場合、0.3～5mg/kgの投与量は、1.7mの患者の場合、21～350mgまたは12～206mg/m<sup>2</sup>である。この投与量は、必要に応じて、例えば、1週間に1回を2～10週間、1週間に1回を8週間、または1週間に1回を4週間、繰り返すことができる。また、維持療法の必要に応じて、数か月間隔週、または数か月の間毎月または四半期毎のように、より少ない頻度で投与することもできる。好ましい投与量には、0.3mg/kg、0.5mg/kg、0.7mg/kg、1.0mg/kg、1.2mg/kg、1.5mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、3.0mg/kg、3.5mg/kg、4.0mg/kg、4.5mg/kg及び5.0mg/kgが含まれる。より好ましい投与量は、毎週投与については0.6mg/kgであり、より少ない投与頻度の場合には1.2mg/kgである。0.3～5mg/kgの範囲の任意の量を使用することができる。この投与量が、好ましくは、1週間に1回、複数回投与される。主に血液毒性に関連した毒性副作用及びそれからの回復に依存する用量頻度で、4週間、より好ましくは8週間、より好ましくは16週間以上の最小投与計画

10

20

30

40

50

を使用することができる。この投与計画は、( i ) 毎週；( i i ) 隔週；( i i i ) 1週間の治療後に2，3または4週間の休薬；( i v ) 2週間の治療後に1，2，3または4週間の休薬；( v ) 3週間の治療後に1，2，3，4または5週間の休薬；( v i ) 4週間の治療後に1，2，3，4または5週間の休薬；( v i i ) 5週間の治療後に1，2，3，4または5週間の休薬；および( v i i i ) 毎月からなる群から選択されるサイクルに基づいて、週に1回または2回の投与を含んでよい。当該サイクルは、2，4，6，8，10、または12回以上繰り返されてよい。

#### 【 0 1 6 9 】

或いは、抗体は2週間または3週間毎に1回の投薬として投与することができ、合計で少なくとも3回の投薬を繰り返す。または、4週間から6週間毎に2回投与され得る。この投薬量は、1週間おきに、または更に少ない頻度で投与され得るので、患者は何れかの薬物関連毒性から回復することができる。或いは、投薬計画は、2～3か月間にについて2～3週間毎に減少させることができる。投薬スケジュールは、任意に、他の間隔で繰り返すことができ、用量は、投薬量及びスケジュールの適切な調整を伴って、様々な非経口経路によって与えられ得る。

10

#### 【 0 1 7 0 】

本明細書に記載され且つ特許請求される方法及び組成物は、悪性または前悪性状態を治療し、また新生物または悪性状態（上記で述べた疾患が含まれるが、それらに限定されない）への進行を防止するために使用することができる。そのような使用は、前述の新形成または癌への進行が既知または疑われる状態、特に過形成、異形成、または最も特別には形成異常からなる非新生物細胞増殖が起こっている状態においてその必要性が指示される（このような異常な増殖状態の検討については、Robbins and Angel, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68 - 79 (1976) を参照されたい）。

20

#### 【 0 1 7 1 】

異形成はしばしば癌の先駆けであることが多く、主に上皮に見られる。これは、非新生物細胞増殖の最も無秩序な形態であり、個々の細胞の均一性及び細胞の構造的配向の喪失を含んでいる。異形成は、慢性的な刺激または炎症が存在する場合に特徴的に生じる。好みの実施形態において、本発明の方法は、癌、特に上に列挙したものの成長、進行及び/または転移を阻害するために使用される。

30

#### 【 0 1 7 2 】

##### キット

種々の実施形態は、患者においてTrop-2陽性CTCを検出するのに適した構成要素を含むキットに関する。例示的キットは、本明細書に記載の少なくとも1つの抗Trop-2抗体を含み得る。ある特定の実施形態において、抗体は、少なくとも1つの診断薬に複合体化され得る。別の実施形態では、Trop-2陽性CTCに結合する第2の抗体を含めることができる。当該第2の抗体は、Trop-2の異なるエピトープまたは異なるTAAに結合し、少なくとも1つの診断薬で標識することができる。ある特定の実施形態において、抗Trop-2抗体またはその抗原結合性断片は、抗体の滅菌液体製剤または凍結乾燥調製物を含有するプレフィルドシリンジまたはプレフィルドバイアルの形態で提供され得る（例えば、Kivitz et al., Clin. Ther. 2006, 28: 1619 - 29）。

40

#### 【 0 1 7 3 】

当該キットの構成要素は一緒に包装されてもよく、または2つ以上の容器の中に分離されてもよい。幾つかの実施形態において、当該容器は、再構成に適した組成物の滅菌凍結乾燥製剤を含むバイアルであってよい。キットはまた、他の試薬の再構成及び/または希釈に適した1以上の緩衝液を含み得る。使用され得る他の容器には、パウチ、トレイ、ポックス、チューブなどが含まれるが、これらに限定されない。キットの構成要素は、容器内で無菌的に包装し、維持することができる。含まれ得る別の構成要素は、キットの使用説明書である。

50

## 【実施例】

## 【0174】

以下の実施例は、本発明の実施形態を例示するものであり、特許請求の範囲に対する限定ではない。

## 【0175】

## 実施例1．抗Trop-2抗体の細胞結合アッセイ

ヒトTrop-2に対する2つの異なるマウスモノクローナル抗体が得られた。最初のもの、162-46.2が、ローラーボトルで増殖させたハイブリドーマ(ATCC、HB-187)から精製された。第2の抗体であるMAB650は、R&Dシステムズ(Minneapolis, MN)から購入した。結合の比較のために、Trop-2陽性ヒト胃癌のNCI-N87を標的として使用した。結合アッセイの前日に、細胞(1.5×10<sup>5</sup>/ウェル)を96ウェルプレートに播種した。翌朝、162-46.2、MAB650、及びマウスRS7(0.03~66nM)(図示せず)を用いて、用量/応答曲線を作成した。これらの一次抗体を細胞と共に1.5時間4℃でインキュベートした。ウェルを洗浄し、抗マウスHRP二次抗体を全てのウェルに4℃で1時間加えた。ウェルを再度洗浄し、続いて発光基質を添加する。Envisionプレートリーダーを用いてプレートを読み取り、値を相対発光単位として報告する。

## 【0176】

3つの抗体は全て、RS7については0.57nm、MAB650については162-46.2及び0.49nm(図示せず)の同様のK<sub>D</sub>値を有していた。しかし、162-46.2及びMAB650の最大結合(B<sub>max</sub>)をRS7と比較すると、それらはそれぞれ25%及び50%減少し(RS7についてはB<sub>max</sub> 11, 250、162-46.2については8, 471、及びMAB650については6, 018)、RS7と比較して異なる結合特性を示した(図示せず)。

## 【0177】

## 実施例2．血液試料の採取及び保存。

10人の健常なドナー及び20人の転移性乳癌患者それぞれから、10mLの血液試料を採取し、CELLSAVE(商標)防腐チューブ(Jassen Diagnostics LLC, Raritan, NJ)に分注する。試料を室温で保存し、採血から72時間以内に処理する(Allard et al., 2004, Clin Cancer Res, 10: 6897)。或いは、10mLの血液試料をCYTOCHEX(登録商標)採血管(Streck, Omaha, NE)に引き込み、室温で維持し、7日以内に処理する(Ng et al., 2012 J Immunol Methods, 385: 79)。血液はまた、10mLのK2EDTA VACUTAINER(登録商標)(BD, Waltham, MA)の中に抜き取り、採血の4時間以内にLIQUIDBIOPSYS(登録商標)固定剤(Cynvenio Biosystems, Westlake Village, CA)で固定し、室温で保存し、固定の96時間以内に処理することができる。

## 【0178】

## 実施例3．健康なドナー由来の血液試料中の癌細胞の添加。

何れも高レベルのTrop-2を発現するSK-BR-3細胞及びBxPC-3細胞を、それらの指定培地で培養し、トリプシンを用いて回収する。得られた細胞懸濁液の生存率及び細胞数を、Guava EASYCYTE(商標)フローサイトメーターによって評価する。当該細胞懸濁液は、生存率が90%を超える場合にのみ使用される。正常血清に添加された細胞の数は、mL当たり1~100である。中程度のレベルのTrop-2を発現する癌細胞、例えばMCF-7、LoVo、及びLS174T、低レベルのTrop-2を発現する癌細胞、例えばHT-29、またはTrop-2について陰性である癌細胞、例えばA549及びH460はまた、血液試料に添加するために使用することができる。

## 【0179】

実施例4. 添加された血液試料からの、磁気装置を用いた上皮癌細胞の単離。

上皮癌細胞を添加した血液試料を、ビオチン化トリFab・hRS7（上記のDNL（登録商標）技術により調製されたビオチン-E1/3）及びストレプトアビシンで被覆した強膜流体（FF-SV）と共にインキュベートして、上皮細胞を免疫磁気的に濃縮する。簡単に言えば、既知数の添加されたBxPC-3またはSK-BR-3を含有する7.5mLの血液試料を6mLの緩衝液と混合し、800×gで10分間遠心分離する。血漿及び緩衝液層を除去した後、ビオチン-E1/3及びFF-SVを添加し、1時間インキュベートする。続いて、磁気分離した後、未標識細胞を標識細胞から除去する。その後、ビオチン-E1/3で標識された細胞を、更なる洗浄及び遠心分離でFF-SVから脱離させ、DAPI、PE-抗CK18及びAPC-抗CD45で標識した後にフローサイトメトリーによって分析する。CD45を欠失し且つサイトケラチン（CK8、CK18、CK19）を発現しない有核細胞は、一般にCTCsと定義される（Swaby & Cristofanilli, 2011, BMC Medicine, 9:43）。 10

#### 【0180】

実施例5. 磁気装置を使用しない、添加された血液試料からの上皮癌細胞の単離。

Stott et al. (2010, PNAS, 107: 18392) に記載されているように、上皮癌細胞を添加した血液試料を、アビシンで化学修飾した微小渦発生ヘリンボーンチップ（HP-Chip）中でビオチン-E1/3と共にインキュベートするか、或いは、より好ましくは、ビオチン-E1/3と1時間インキュベートした後、Lu et al. (2013, Methods, 64: 144) が記載するようにして、ストレプトアビシンで官能化したNanoVelcroチップに添加する。未結合細胞を洗い流した後、実施例3に記載したようにして、結合した細胞をCTCについて分析する。 20

#### 【0181】

実施例6. 予め濃縮しない添加された血液試料からの上皮癌細胞の検出。

BxPC-3を添加した血液試料中の赤血球を塩化アンモニウムで溶解し、遠心分離する。細胞ペレットを回収し、FITC標識したE1/3と共にインキュベートする。次いで、懸濁液中の生細胞をポリリジン処理スライドに塗布し、レーザースキャニングサイトメーターで分析する（Pachmann et al., 2005, Breast Cancer Res, 7: R975）。或いは、赤血球の溶解後に集めた細胞ペレットを、FITC標識アビシンの存在下に、ビオチン化E1/3及び1つ以上の他のビオチン化DNL（登録商標）複合体を含むカクテルと共にインキュベートする。次いで懸濁液中の生細胞をレーザー走査サイトメーターで分析する。 30

#### 【0182】

実施例7. Trop-2及びEGFRの両方を標的とする二重特異性構築物を用いた、添加された血液試料からの上皮癌細胞の検出

高レベルのTrop-2及びEGFRを発現するBxPC-3細胞を添加した血液試料を、実施例4に記載したように、（E1）-225と命名されたビオチン化二重特異性Tri-Fab、及びストレプトアビシンでコーティングされた磁性流体（FF-SV）と共にインキュベートする。（E1）-225は、CH1-DDD2-Fab-hRS7をCH1-AD2-Fab-c225に結合させて、それぞれTrop-2及びEGFRに対する二価及び一価の結合を与えることにより生成される。单一特異性のhRS7またはc225（セツキシマブ）のみを使用した濃縮と比較した場合、二重特異性（E1）-225は、CD45陽性白血球の汚染が少なく、血液試料中に添加されたBxPC-3をより多く捕捉することができる。 40

#### 【0183】

実施例8. LIQUID BIOPSY（登録商標）システムを用いたTrop-2<sup>+</sup>CTCの検出

リキッドバイオプシー（登録商標）装置（カタログ番号A28188）、リキッドバイオプシー（登録商標）血液採取キット（カタログ番号A28171）及びリキッドバイオプシー試薬及び消耗品キット（カタログ番号A28186、A28187）を、Life 50

Technologies, Thermo Fisher (グランドアイランド、NY) から入手した。リキッドバイオプシー (登録商標) キットには、血液試料を処理するためのバッファー、試薬、バイアル、溶出チューブ、及びフローセルのほか、試料の未冷蔵出荷 (96時間窓) を可能にする全血試料の安定化プロトコールが含まれている。

#### 【0184】

ヒト化RS7 (hRS7) モノクローナル抗体 (サシツズマブ) は、試薬及び消耗品 (Reagents and Consumables) キットと共に提供される、プロトコール及び試薬を用いてビオチン化される。ビオチニル化hRS7 (サシツズマブ) を、試薬及び消耗品キットと共に提供される抗EpCAMビオチン化抗体の代わりに使用する。或いは、抗TROP-2ビオチン化抗体 (カタログ番号BAF650, R&D Systems, Minneapolis, MN) を抗EpCAMの代わりに使用する。10

#### 【0185】

固形腫瘍を有する患者の血液からの循環腫瘍細胞を、抗TROP-2ビオチン化抗体、並びに上記器具及び試薬を用いて、製造業者の指示に従って単離する。単離した腫瘍細胞をスライドから解放させ、実施例3に記載したように、DAPI、PE-抗CK18、及びAPC-抗CD45で標識した後、フローサイトメトリーにより確認する。第2の血液検体からの解放細胞を培養し、生きた細胞のコロニーを得、これをEmpire Genomics (Buffalo, NY) から入手可能な特異的プローブを用いて、Trop-2及び染色体-1のコピー数についてISHにより単離及び分析する。図1及び図2は、MCF-7 (Trop-2陽性) 細胞及びA549 (Trop-2陰性) 細胞で得られた代表的な結果であり、Trop-2遺伝子の3コピー及び2コピーをそれぞれ示している。加えて、トポイソメラーゼI (TOP1) 及び染色体20のコピー数もまた、Abnova (Taipei, Taiwan) により提供された特異的プローブを用いて決定され、記録される。図3及び図4は、MCF-7及びA549細胞において得られた代表的な結果であり、それぞれTOP1遺伝子の7コピー及び3コピーを示している。Trop-2及びTOP1のコピー数の同時検出及び定量は、TOP1をも発現する癌細胞の決定を可能にし、これは何れの患者の腫瘍が、イリノテカンのようなTOP1阻害薬療法に対して特に応答性または耐性であるかを示すであろう。これは、Trop-2発現癌細胞を標的とし、そのような細胞に選択的にSN-38を送達するサシツズマブ・ゴビテカン (IMMU-132) を用いる場合に特に有用である。血液試料からの腫瘍細胞の回収を、抗Trop-2・hRS7抗体を用いて、当該キットと共に提供される抗EpCAM抗体に対して比較する。驚くべきことに、CTCの回収率は、抗Trop-2抗体を用いる場合の方が抗EpCAM抗体よりも高い。20

#### 【0186】

実施例9. IMAG (商標) 磁性粒子を用いたTrop-2<sup>+</sup>CTCの単離  
精製マウス抗ヒトTrop-2抗体を、BD Pharmingen (San Jose, CA) から購入したクローン162-46から調製する。この抗Trop-2抗体を、実施例7に記載されるようにしてビオチン化する。IMAG (商標) 磁性粒子 (ストレプトアビジン粒子プラス-D M) 及びBD IMAG (商標) 細胞分離磁石は、BD Biosciences (San Jose, CA) から購入する。K2 EDTA (カタログ番号366643) でスプレーコートされた10mLのプラスチック製全血チューブもまたBDから購入する。30

#### 【0187】

CTCの分離及び分析のために、10mLの血液試料を肺癌患者から採取し、K2 EDTAチューブに保存する。単核細胞を、Ficoll-Hypaque溶液を用いた密度勾配遠心分離によって得る。Ficoll-HypaqueからのCTCの陽性選択のためのプロトコールは、BD技術データシート・ストレプトアビジン粒子プラス-D M材料番号: 557812に開示されている通りである。BD IMAG (商標) 磁石上で最終洗浄ステップの後、解放された細胞を緩衝液に再懸濁させる。

#### 【0188】

50

50

50

50

50

細胞を、蛍光標識抗サイトケラチン、蛍光標識されたアフィニティー精製ヤギ抗T R O P - 2、D A P I 及び / または抗C D 4 5で染色する。その後、捕捉された細胞の免疫蛍光画像を撮り、続いて蛍光強度及び細胞形態学に基づく包括的なコンピュータ支援分析を行う。捕捉された細胞の免疫蛍光画像が得られ、続いて蛍光強度及び細胞形態に基づく包括的なコンピュータ支援分析が行われる。

#### 【0189】

実施例10. T r o p - 2<sup>+</sup> C T C の検出及び転移性 T r o p - 2 発現癌の治療

C E L L S E A R C H (登録商標)システム及び循環腫瘍細胞キットを、V e r i d e x L L C (Raritan, N J )から入手する。N S C L C が疑われる65歳の男性から7.5mLの血液試料を採取し、C e l l S a v e チューブ (V e r i d e x L L C )中に保存する。抗T r o p - 2 · h R S 7 抗体を、C E L L S E A R C H (登録商標)キットと共に提供される抗E p C A M 抗体の代わりに用いる。血液試料を、抗T r o p - 2 抗体に複合体化させた磁性ナノ粒子と混合する。細胞を蛍光標識抗C D 4 5 及び抗C K 抗体で染色し、細胞核をD A P I 核色素で蛍光標識する。強力な磁場をC E L L S E A R C H (登録商標)システムで生成させ、磁気ナノ粒子に結合した細胞を分離するために使用し、次いで、上記実施例7に記載したようにして、T r o p - 2 のコピー数を決定するためにF I S H により分析する。結果は、1細胞当たり4コピーのT r o p - 2 を備えた循環T r o p - 2<sup>+</sup>腫瘍細胞の存在を示す。C T C におけるT r o p - 2 の高いコピー数の存在は、当該患者が抗T r o p - 2 抗体による治療のための良好な候補であることを示す。

10

20

#### 【0190】

更なる臨床検査は、ステージI I I B · N S C L C (扁平上皮細胞癌)の存在を示す。7000cGy · X R T と協働したカポプラチニン / エトボシド(3か月)の初期治療は、10か月間持続する応答をもたらす。その後、患者はタルセバ維持療法を開始し、これを、腰椎椎弓切除術を受けることに加えてI M M U - 1 3 2 (h R S 7 - C L 2 A - S N - 3 8 ) 試験の対象となるまで継続する。患者はタルセバの5か月後にI M M U - 1 3 2 の初回投与を受け、当時、彼は多量の胸水を伴って右肺に5.6cmの病変を示す。最初のC T で主標的病変が3.2cmに減少したことが示される2カ月後に、患者は6回目の投与を完了する。T r o p - 2<sup>+</sup> C T C の定期的なアッセイは、I M M U - 1 3 2 による処置後にC T C 数の実質的な減少を示す。

30

#### 【0191】

この実施例は、個々の患者の血液中のT r o p - 2<sup>+</sup> C T C をアッセイし、及び / またはC T C におけるT r o p - 2 コピー数を決定することによって、I M M U - 1 3 2 または別の治療用抗T r o p - 2 抗体での治療に応答する患者を選別することの可能性を示す。この実施例は更に、抗T r o p - 2 に基づく療法の有効性の指標として、T r o p - 2<sup>+</sup> C T C の相対的レベルをモニタリングする可能性を示す。好ましくは、限定されるものではないが、完全応答(C R )、部分応答(P R )及び / または安定疾患(S D )を含む陽性応答を示す患者は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%のレベルでのT r o p - 2<sup>+</sup> C T C のレベル低下を示すであろう。当該治療が高度に有効であり、且つ完全な応答をもたらす場合、T r o p - 2 における100%の減少が観察され得る。

40

#### 【0192】

実施例11. V e r I F A S T システムを用いたT r o p - 2<sup>+</sup> C T C の単離及び検出  
C a s a v a n t e t a l . (2013、L a b C h i p 1 3 : 3 9 1 - 6 ;  
2014, L a b C h i p 1 4 : 9 9 - 1 0 5 )において開示されたV e r I F A S T システムを用いて、T N B C におけるT r o p - 2 + C T C を検出する。7.5mLの血液試料を、T N B C が疑われる一連の患者または対照の正常個体から採取し、C e l l S a v e チューブ (V e r i d e x L L C )の中に保存する。ビオチン化抗T r o p - 2 · h R S 7 抗体を、C a s a v a n t e t a l . (2013、L a b C h i p

50

13 : 391 - 6)に開示されたようにして調製する。当該血液試料を、ビオチン化抗Trōp-2抗体及びストレプトアビジンに複合体化されたPMP(Casavantら、2013、Lab Chip 13 : 391 - 6)と混合し、CTCを、Ver1FAS-Tプラットフォーム及び手持ち型磁石を用いて分離する。細胞を腫瘍マーカーについて染色し、細胞核をDAPI核色素で蛍光標識する。その結果は、TNBCを持つ個体の血液試料中における循環Trōp-2<sup>+</sup>腫瘍細胞の存在を示す。

#### 【0193】

実施例12. SN-38に複合体化されたhRS7抗体を含むIMMU-132抗Trōp-2ADCを用いた臨床試験

##### 概要

10

本実施例は、IMMU-132(サシツズマブ・ゴビベカン)、即ち、pH感受性リンカーによりSN-38に複合体化された内在化ヒト化hRS7抗Trōp-2抗体の抗体-薬物複合体(ADC)を用いた、第I相臨床試験及び進行中の拡大第II相試験の結果を報告する(平均薬物-抗体比=7.6)。Trōp-2は、を伴って、多くのヒト癌腫によって、高い密度(約1×10<sup>5</sup>)、頻度及び特異性で発現され、限定された正常組織発現を示すI型膜貫通の、カルシウム形質導入タンパク質である。Capan-1ヒト臍臓腫瘍異種移植片を有するヌードマウスでの前臨床試験により、IMMU-132は、最大耐容性のイリノテカン療法(示されていない)から誘導されるよりも、136倍多いSN-38を腫瘍に送達できることが明らかになった。

#### 【0194】

20

本実施例は、複数の以前の治療(幾つかはトポイソメラーゼI / II阻害薬を含む)に失敗した25人の患者(pts)の初期第I相試験を報告するものであり、また進行中の拡大第II相試験は、小細胞肺癌及び非小細胞肺癌(それぞれSCLC、NSCLC)、トリプルネガティブ乳癌(TNBC)、肺臓癌(PDC)、食道癌及び他の癌を含む69人の患者について報告するものである。

#### 【0195】

以下で詳細に考察するように、Trōp-2は血清中では検出されなかつたが、殆どの記録された腫瘍において強く発現された(2<sup>+</sup>)。3+3試験設計において、IMMU-132は、反復する21日サイクルにおいて第1日及び第8日に、8mg/kg/用量で開始し、次いで用量を制限する好中球減少症の前に、12及び18mg/kgで与えられた。最小限の遅延で累積治療を最適化するために、第II相は8及び10mg/kgに焦点を当てている(それぞれ、n=30及び14)。この時点で関連するAEを報告している49人の患者では、好中球減少 G3が28%(4%G4)で発生した。これらの患者の最も一般的な非血液毒性は、疲労(55% ; G3=9%)、恶心(53% ; G3=0%)、下痢(47% ; G3=9%)、脱毛症40%、及び嘔吐(32% ; G3=2%)となっている。ホモ接合性のUGT1A1\*28/\*28が6人の患者に認められ、そのうち2人は血液学的毒性及びGI毒性がより重篤であった。当該第I相及び当該拡大相では、最良応答についてRECIST/CTにより評価可能な48人の患者(PDCを除く)が現時点で存在する。CRC(N=1)、TNBC(N=2)、SCLC(N=2)、NSCLC(N=1)、及び食道癌(N=1)の患者を含む7例の患者(15%)、更に別の27人(56%)が安定した疾患(SD)を有し、合計38人(79%)が疾患反応を示した。13人のCTで評価可能なPDC患者(62%)のうち8人はSDを有し、その前の最後の治療での8.0週間に比べて、12.7週間の進行時間(TTP)中央値を有していた。残りの48人の患者のTTPは12.6+週(範囲6.0~51.4週)である。血漿CEA及びCA19-9は応答性と相關した。抗hRS7抗体または抗SN-38抗体は、数か月にわたって投与されたにもかかわらず検出されなかつた。複合体は3日以内に血清から除去され、これはSN-38の50%が毎日放出され、SN-38より100倍も高い濃度でイリノテカンを与えられた患者で報告されたインビボの動物研究と一致した。これらの結果は、hRS7-SN-38含有ADCが、管理可能な下痢及び好中球減

30

40

50

少を伴って、転移性固形癌において治療的に活性であることを示している。

**【0196】**

**薬物動態学**

2つのELISA法を用いて、IgG（抗hRS7イディオタイプ抗体での捕捉）及び完全な複合体（抗-RS-38 IgG / 抗hRS7イディオタイプ抗体を備えたプローブでの捕捉）のクリアランスを測定した。SN-38をHPLCで測定した。複合体からのSN-38の徐放を反映して、全IMMU-132画分（インタクトコンジュゲート）は、IgG（図示せず）よりも速く消失した。SN-38（非結合及び総）のHPLC測定は、血清中のSN-38の>95%がIgGに結合したことを示した。低濃度のSN-38Gは、IgGに結合したSN-38がグルコロニド化から保護されることを示唆している。複合体およびSN-38についてのHPLCのELISA比較は、両方の重複を明らかにし、ELISAがSN-38クリアランスをモニターするための代用であることを示唆している。10

**【0197】**

投薬計画及び患者調査の要約を表6に示す。

**【表6】**

表6. 臨床試験パラメータ

投薬計画	1週間に1回を2週間、21日毎に8サイクルまで投与する。当初の登録では、G2以上の治療関連の毒性があれば、計画された用量は遅延され且つ低減された；G3以上の毒性の場合のみ、プロトコルは用量の遅延および低減へと修正された。 <span style="float: right;">20</span>
投薬レベルのコホート	8, 12, 18 mg/kg；その後、10 mg/kgの中間用量レベルにまで低減された。
コホートのサイズ	標準の第I相[3+3]設計。拡大相では選択された癌の15人の患者を含める。
DLT	G4 ANC 7日以上；G3以上の任意の持続時間のG3発熱性好中球減少症；G4以上のP1t5日；G4のHgb；等級4N/V/D 任意の持続時間/G3のN/V/D 48時間超；G3以上の注入関連反応；関連の≥G3非血液毒性。 <span style="float: right;">30</span>
最大の許容可能用量(MAD)	2/6以上の患者が第1回の21-dサイクル（遅延または低減なし）またはG3以上の毒性に耐える最大用量。
患者	転移性結腸直腸癌、肺腺癌、胃癌、食道癌、肺癌(NSCLC、SCLC) (NSCLC、SCLC)、トリプルネガティブ乳房癌(TNBC)、前立腺癌、卵巣癌、腎臓癌、膀胱癌、頭頸部癌、肝細胞癌。転移性癌の標準治療計画後の難治性/再発性。イリノテカントを含む以前の治療は、登録に必要ではない。5cm超の嵩高い病変はなし。 主要な手術は4週間以上、放射線療法または化学療法計画は2週間以上経なければならぬ。ギルバート病または既知のCNS転移性疾患は除外される。 <span style="float: right;">40</span>

**【0198】**

**臨床試験の現状**

以前の3つの治療法の中央値を有する種々の転移性癌を有する合計69人の患者（第I

50

相における 25 人の患者を含む ) が報告された。 8 人の患者は臨床的進行を有し、 C T 評価の前に離脱した。 13 人の C T 評価可能な膵臓癌患者が別々に報告された。 P D C 患者の中央値 T T P ( 進行までの時間 ) は、以前の最後の治療についての中央値 8 週間の T T P と比較して、 11.9 週 ( 範囲 2 ~ 21.4 週 ) であった。

#### 【 0199 】

多様な癌を有する合計 48 人の患者は、少なくとも 1 回の C T 評価を有しており、当該評価から最良反応 ( 示さず ) 及び進行までの時間 ( T T P ; 示さず ) が決定された。 T N B C ( トリプルネガティブ乳癌 ) の評価可能な 8 人の患者の最良反応データを要約すると、 2 人の P R ( 部分応答 ) 、 4 人の S D ( 安定した疾患 ) 及び 2 人の P D ( 疾患進行 ) であり、 6 / 8 ( 75% ) の合計応答 [ P R + S D ] であった。 S C L C ( 小細胞肺癌 ) では、 4 人の評価可能な患者のうち、 2 人の P R 、 0 人の S D 及び 2 人の P D であり、 2 / 4 ( 50% ) の合計応答であった。 C R C ( 結腸直腸癌 ) では、 18 人の評価可能な患者のうち、 1 人の P R 、 11 人の S D および 6 人の P D であり、 12 / 18 ( 67% ) の合計応答であった。食道癌では、 4 人の評価可能な患者のうち、 1 人の P R 、 2 人の S D および 1 人の P D であり、 3 / 4 ( 75% ) の合計応答であった。 N S C L C ( 非小細胞肺癌 ) では、 5 人の評価可能な患者のうち、 1 人の P R 、 3 人の S D 、 1 人の P D であり、 4 / 5 ( 80% ) の合計応答であった。治療された全患者に亘って、 48 人の評価可能な患者のうち、 7 人の P R 、 27 人の S D 、及び 14 人の P D であり、 34 / 48 ( 71% ) の合計応答であった。これらの結果は、抗 T R O P - 2 A D C ( h R S 7 - S N - 38 ) が、ヒト患者の広範囲の固体腫瘍に対して有意な臨床効果を示したことを見証している。10

#### 【 0200 】

報告された治療の副作用 ( 有害事象 ) を表 7 に要約する。 h R S 7 - S N - 38 の治療効果は、許容可能な低レベルの有害な副作用を示す A D C 投与量で達成された。これと比較して、イリノテカイン ( 125 mg / m<sup>2</sup> 、週 4 回、 Q 6 W ) の投与を受けた患者は、遙かに高い有害作用の発生を示し、 38 % が等級 3 / 4 の下痢、 31 % が好中球減少症、及び 8 % が好中球減少性発熱 / 感染であった。20

## 【表7】

表7. IMMU-132についての関連有害事象リスト、8または $10\text{mg}/\text{kg}$ の開始用量、基準：5%超について等級3～4の有害事象、または何等かの等級3または4の有害事象（N=123人の患者）

	等級3	等級4
好中球減少	22 (18%)	7 (6%)
熱性好中球減少症	3 (2%)	2 (2%)
下痢	4 (3%)	0
貧血	7 (6%)	0
疲労	6 (5%)	0
嘔吐	2 (2%)	0
WBCの減少	2 (2%)	0
リンパ球の減少	2 (2%)	0
アステニア	1 (1%)	0
めまい	1 (1%)	0
尿路感染	1 (1%)	0
脱毛症	--	--

## 【0201】

用量減少に関するデータも要約する。 $8\text{mg}/\text{kg}$ の用量で開始した76人の患者のうち、12人（16%）について用量を低減した。 $10\text{mg}/\text{kg}$ の開始用量の33人の患者のうち、5人（15%）について用量を低減した。 $12\text{mg}/\text{kg}$ の開始用量の9人の患者のうち、6人（67%）について用量を低減した。 $18\text{mg}/\text{kg}$ の開始用量の3人の患者のうち、3人（100%）について用量を低減した。我々は、8及び $10\text{mg}/\text{kg}$ では用量の低減は少ししかなく、治療的レベルのADCにおいては軽度の、予測可能で且つ管理可能な毒性プロファイルを反映していると結論付ける。現在、148人の患者から425の血清試料が分析されており、反復投与後でさえもIMMU-132に対する抗体応答の証拠は検出されておらず、一部の患者では20回を超えてADCの投与を受けている。

## 【0202】

今までに治療されたTNBCを有する評価可能な46人の患者（第I相及び第II相）のうち、客観的応答が12人の患者（26%）に見られ、疾患抑制は34人の患者（74%）に見られ、臨床的利益比[C R + P R + (SD 6か月)]は46%、臨床的利益比[C R + P R + (SD 4か月)]は63%に見られた。

## 【0203】

今までに治療されたNSCLC患者19人のうち、客観的応答が6人の患者（32%）に見られ、疾患抑制は14人の患者（74%）に見られ、臨床的利益比[C R + P R + (SD 4か月)]は59%に見られた。

## 【0204】

今までに治療されたSCLC患者20人のうち、客観的応答が6人の患者（30%）に見られ、疾患抑制は11人の患者（55%）に見られ、臨床的利益比[C R + P R + (SD 6か月)]は37%に見られ、臨床的利益比[C R + P R + (SD 4か月)]は50%

55%に見られた。

#### 【0205】

現在までに治療されたEAC患者16人のうち、客観的応答が2人の患者(13%)に見られ、疾患抑制は9人の患者(56%)に見られ、臨床的利益比[C R + P R + (S D 4か月)]は44%に見られた。

#### 【0206】

抗Trop-2 ADCに対する例示的な部分応答は、CTデータ(図示せず)によって確認された。CRCにおける典型的なPRとして、CRCで最初に診断された62歳の女性は原発性半結腸切除術を受けた。4ヶ月後、肝転移の肝切除術を受け、FOLFOXで7ヶ月及び5FUで1ヶ月の治療を受けた。彼女は、主に肝臓に複数の病変を示し(免疫組織学による3+Trop-2)、初回診断の約1年後に8mg/kgの開始用量でHRSG-SN-38試験に入った。彼女の最初のCT評価では、PRが達成され、標的病変が37%減少した(図示せず)。患者は治療を続け、治療の10ヶ月後には65%の最大減少を達成し(図示せず)、CEAは3ヶ月後に進む前に781ng/mLから26.5ng/mLへと減少した。10

#### 【0207】

NSCLCにおける典型的なPRとして、65歳の男性はIIB期のNSCLC(扁平細胞)と診断された。7000cGyのXRTと協働したカポプラチニン/エトポシド(3ヶ月)の最初の治療は、10ヶ月の持続する応答を生じた。彼はその後、タルセバ維持療法を開始し、腰椎椎弓切除術を受けることに加えてIMMU-132試験が考慮されるまで、彼はこれを続けた。彼は、タルセバの5ヶ月後にIMMU-132の初回投与を受けたが、当時、彼は右肺に多量の胸水を伴う5.6cmの病変を示した。彼は、2ヶ月後に6回目の投与を完了したが、その時、最初のCTにより原発標的病変が3.2cmに縮小したことが示された(図示せず)。20

#### 【0208】

SCLCにおける典型的なPRとして、65歳の女性が低分化SCLCと診断された。応答がなく2ヶ月後に終了したカルボプラチニン/エトポシド(Topo-I阻害剤)に続いて、これも応答なしで2ヶ月後に終了したトポテカン(Topo-I阻害剤)を受けた後、彼女は局所XRT(3000cGy)を受け、これは1ヶ月後に終了した。しかし、翌月にまで進行が続いた。患者は翌月にIMMU-132(12mg/kg; 6.8mg/kgに減少; Trop-2発現3+)を開始し、IMMU-132の2ヶ月後に、主肺病変の実質的な減少を含めて、標的病変が38%縮小した(示さず)。患者は12回の投薬を受けた後、3ヶ月後で進行した。30

#### 【0209】

これらの結果は、抗Trop-2 ADCが、以前の複数の治療の後に失敗または進行した患者においてさえ有効であることを実証する点で重要である。

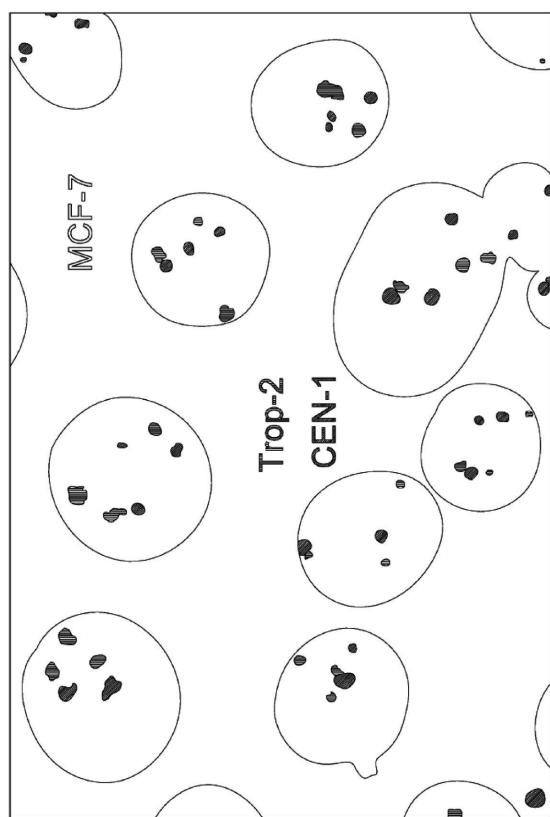
#### 【0210】

結論として、使用された用量では、主要な毒性は、管理可能な好中球減少症であり、等級3の毒性は少ししかなかった。IMMU-132は、トポイソメラーゼI阻害剤療法に対する再発の病歴を持った患者を含めて、トリプルネガティブ乳癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、大腸癌及び食道癌の再発/難治性患者における活性(PRと耐久性のあるSD)の証拠を示した。これらの結果は、既存の療法に対して耐性である広範囲の癌において抗Trop-2 ADCの有効性を示す。40

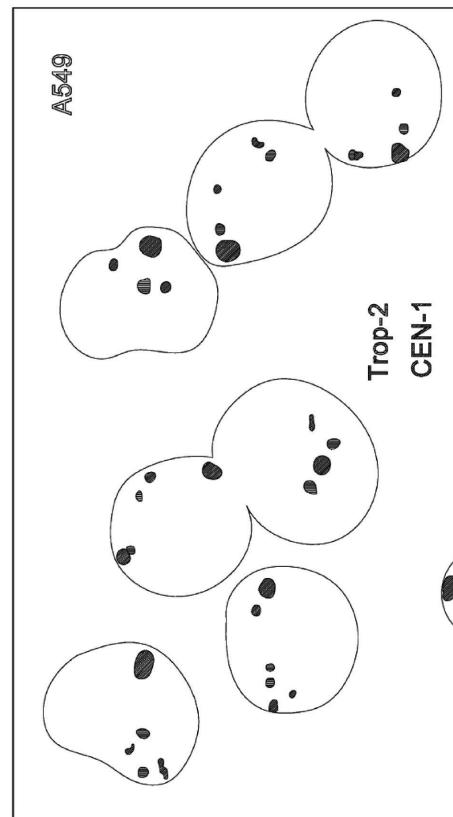
#### 【0211】

本発明の生成物、組成物、方法及びプロセスに対して種々の変更及び変形がなされ得ることは、当業者に明らかであろう。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲及びその均等の範囲内にある限り、そのような変更及び変形を包含することが意図されている。

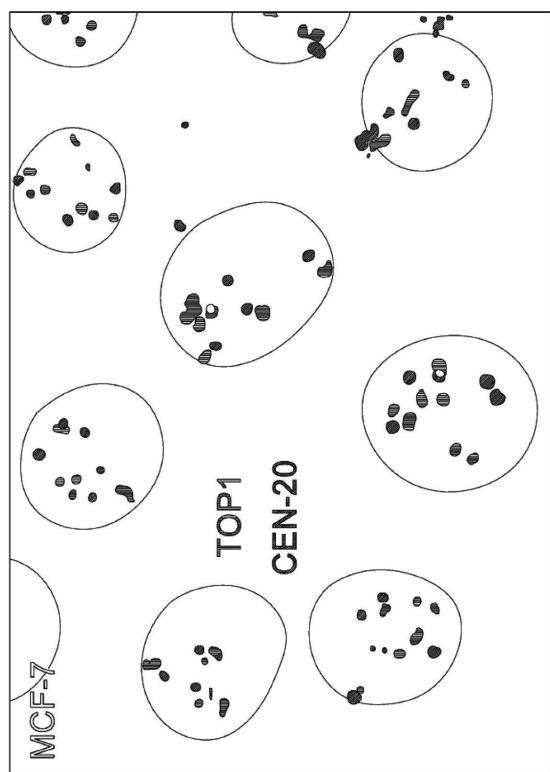
【図1】



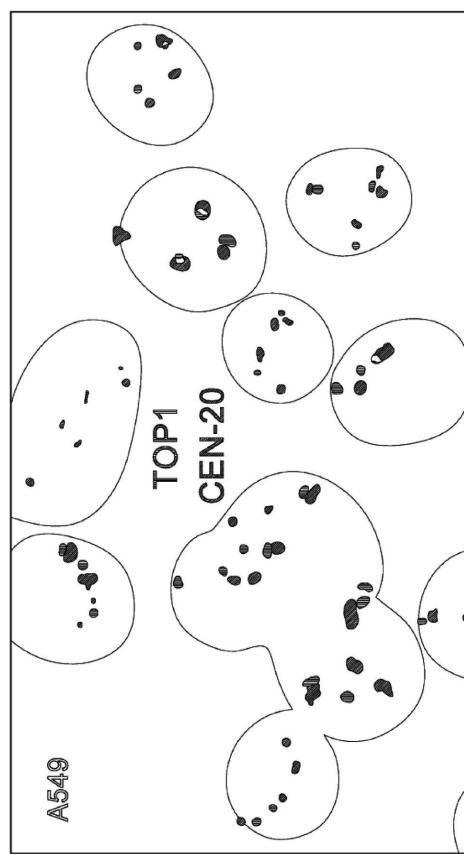
【図2】



【図3】



【図4】



【配列表】

0006746845000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K	31/4745	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	31/704	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/537	(2006.01)	A 6 1 K	31/4745	
A 6 1 K	31/7034	(2006.01)	A 6 1 K	31/704	
A 6 1 K	31/513	(2006.01)	A 6 1 K	31/537	
A 6 1 K	31/517	(2006.01)	A 6 1 K	31/7034	
A 6 1 K	31/4184	(2006.01)	A 6 1 K	31/513	
A 6 1 K	38/06	(2006.01)	A 6 1 K	31/517	
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	A 6 1 K	31/4184	
G 0 1 N	33/536	(2006.01)	A 6 1 K	38/06	
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04	
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
C 0 7 K	16/40	(2006.01)	G 0 1 N	33/536	B
			G 0 1 N	33/536	D
			G 0 1 N	33/543	5 4 1 A
			C 0 7 K	16/30	
			C 0 7 K	16/46	
			C 0 7 K	16/40	

(72)発明者 ゴールデンバーグ , デイヴィッド エム .

アメリカ合衆国 , ニュー ジャージー州 , モリス プレインズ , アメリカン ロード 30  
0

(72)発明者 ハンセン , ハンス ジェイ .

アメリカ合衆国 , ニュー ジャージー州 , モリス プレインズ , アメリカン ロード 30  
0

(72)発明者 チアン , チエン - シン

アメリカ合衆国 , ニュー ジャージー州 , モリス プレインズ , アメリカン ロード 30  
0

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特表2012-522217 (JP, A)

特表2009-539097 (JP, A)

国際公開第2015/028489 (WO, A1)

国際公開第2015/002975 (WO, A1)

特表2016-536330 (JP, A)

特表2011-515109 (JP, A)

国際公開第2015/047510 (WO, A1)

特表2007-525642 (JP, A)

特表2012-503483 (JP, A)

中国特許出願公開第101363046 (CN, A)

High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer , British Journal of Cancer , 2008年 , 99 , 1290-1295

Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells , Journal of Oncology , 2011年 , 2011 , 252361

Multimarker Analysis of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Metastatic Bre

st Cancer , Breast Care , 2 0 1 2 年 , 7 , 7-12

Detection and Isolation of Circulating Tumor Cells in Urologic Cancers , Neoplasia , 2 0 0 4 年 , 6 , 4 , 302-309

Gene Copy Number Analysis by Fluorescence In Situ Hybridization , Methods: A Companion to Methods in Enzymology , 1 9 9 6 年 , 9 , 113-121

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3

A 6 1 K 3 1 / 4 1 8 4

A 6 1 K 3 1 / 4 7 4 5

A 6 1 K 3 1 / 5 1 3

A 6 1 K 3 1 / 5 1 7

A 6 1 K 3 1 / 5 3 7

A 6 1 K 3 1 / 7 0 3 4

A 6 1 K 3 1 / 7 0 4

A 6 1 K 3 8 / 0 6

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 4

C 1 2 Q 1 / 0 4

G 0 1 N 3 3 / 5 3 6

G 0 1 N 3 3 / 5 4 3

C 0 7 K 1 6 / 3 0

C 0 7 K 1 6 / 4 0

C 0 7 K 1 6 / 4 6

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

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