

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-529281

(P2012-529281A)

(43) 公表日 平成24年11月22日 (2012.11.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 16/28 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 92 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-514538 (P2012-514538)	(71) 出願人	509268749
(86) (22) 出願日	平成22年6月9日 (2010.6.9)		アフィテック リサーチ エイエス
(85) 翻訳文提出日	平成24年2月6日 (2012.2.6)		ノルウェー, エヌー0349 オスロ,
(86) 国際出願番号	PCT/GB2010/050969		ガウスタダリー 21, オスロ リ
(87) 国際公開番号	W02010/142990		サーチ パーク
(87) 国際公開日	平成22年12月16日 (2010.12.16)	(74) 代理人	110001070
(31) 優先権主張番号	0909904.5		特許業務法人 S S I N P A T
(32) 優先日	平成21年6月9日 (2009.6.9)	(72) 発明者	シコータス ガンナーソン, ラヴィニア
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		ディアナ
(31) 優先権主張番号	61/185,387		ノルウェー エヌー0281 オスロ,
(32) 優先日	平成21年6月9日 (2009.6.9)		ティングストヴェイエ 17エー
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	パウス, デイドゥリク
			ノルウェー エヌー0785 オスロ,
			オルヴ アウクルスト ヴェイ 4ビー
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗 E p C A M 抗体

## (57) 【要約】

上皮細胞接着分子 (E p C A M) に結合し、E p C A M に結合する既知の抗体に対して特定の利点、例えば、本発明の抗体は良好な親和性、良好な交差反応プロファイル、ならびに優れた A D C C および C D C C 活性を示す、抗体を開示する。特定の重鎖および軽鎖 C D R を含む抗体を開示する。本発明は、よって、特に癌の治療における、これらの抗体およびその全使用に関する。本発明は、よって、癌治療のための新しい抗体ベースの組成物、方法、併用プロトコルを提供する。新しい抗 E p C A M 抗体を使用した有利な免疫抱合体組成物および方法も提供する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

E p C A M に結合し、3つの C D R を含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つの C D R を含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含む抗体であって、前記重鎖可変領域は、  
 ( c ) 配列番号7のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する V H C D R 3 であって、前記実質的に相同な配列は、所与の C D R 配列と比較して、1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換を含有する配列であるか、または前記実質的に相同な配列は、所与の C D R 配列の保存アミノ酸置換を含有する配列である、V H C D R 3 を含む、抗体。

## 【請求項 2】

10

前記重鎖可変領域 C D R の1つ以上は、  
 ( a ) 配列番号5のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する可変重鎖 ( V H ) C D R 1、および  
 ( b ) 配列番号6のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する V H C D R 2 から成る群より選択され、

前記実質的に相同な配列は、所与の C D R 配列と比較して、1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換を含有する配列であるか、または前記実質的に相同な配列は、所与の C D R 配列の保存アミノ酸置換を含有する配列である、請求項1に記載の抗体。

## 【請求項 3】

20

前記軽鎖可変領域 C D R の1つ以上は、  
 ( d ) 配列番号8のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する可変軽鎖 ( V L ) C D R 1、  
 ( e ) G A S T X<sub>5</sub> A X<sub>7</sub> (配列番号37) のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有し、X<sub>5</sub>およびX<sub>7</sub>は、任意のアミノ酸であり得る V L C D R 2、および  
 ( f ) Q X<sub>2</sub> Y N X<sub>5</sub> W P P X<sub>9</sub> X<sub>10</sub> T (配列番号89) のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有し、X<sub>2</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub>、およびX<sub>10</sub>は、任意のアミノ酸であり得る V L C D R 3 から成る群より選択され、

30

前記実質的に相同な配列は、所与の C D R 配列と比較して、1つ、2つ、または3つのアミノ酸置換を含有する配列であるか、または前記実質的に相同な配列は、所与の C D R 配列の保存アミノ酸置換を含有する配列である、請求項1または請求項2に記載の抗体。

## 【請求項 4】

前記 ( e ) の V L C D R 2 において、  
 X<sub>5</sub> は、R もしくは T、好ましくは T であり、かつ / または  
 X<sub>7</sub> は、T もしくは S、好ましくは S であり、かつ / あるいは

前記 ( f ) の V L C D R 3 において、  
 X<sub>2</sub> は、Q もしくは H もしくは K、好ましくは Q であり、  
 X<sub>5</sub> は、N もしくは D、好ましくは N であり、  
 X<sub>9</sub> は、G もしくは T もしくは S もしくは M もしくは A、好ましくは A であり、かつ / または  
 X<sub>10</sub> は、F もしくは W もしくは Y、好ましくは Y である、請求項3に記載の抗体。

40

## 【請求項 5】

前記 ( e ) の V L C D R 2 は、配列番号9もしくは配列番号29のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有し、かつ / あるいは前記 ( f ) の V L C D R 3 は、配列番号10、30、43、56、69、もしくは82のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する、請求項3または請求項4に記載の抗体。

## 【請求項 6】

前記重鎖 C D R ドメイン ( a )、( b )、および ( c ) のそれぞれのうちの1つ、なら

50

びに / または前記軽鎖 C D R ドメイン ( d )、( e )、および ( f ) のそれぞれのうちの1つを含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 7】

前記3つの軽鎖可変領域 C D R は、配列番号8、9、および10、または配列番号8、29、および30、または配列番号8、29、および43、または配列番号8、29、および56、または配列番号8、29、および69、または配列番号8、29、および82、あるいはそれらに実質的に相同な配列である、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 8】

前記重鎖可変領域は、配列番号3のアミノ酸配列、またはそれに少なくとも70%、80%、90%、95%、または98%の配列同一性を有する配列を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 9】

前記軽鎖可変領域は、配列番号4、27、40、53、66、もしくは79のアミノ酸配列、またはそれに少なくとも70%、80%、90%、95%、もしくは98%の配列同一性を有する配列を含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 10】

前記抗体は、配列番号21、36、49、62、75、もしくは88のアミノ酸配列、またはそれに少なくとも70%、80%、90%、95%、もしくは98%の配列同一性を有する配列を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 11】

前記抗体は、ヒトおよびサル双方の E p C A M に結合することが可能である、請求項1～10のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 12】

配列番号5のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、配列番号6のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、配列番号7のアミノ酸配列を有する V H C D R 3、配列番号8のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、配列番号9のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、および配列番号10のアミノ酸配列を有する V L C D R 3を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の抗体、または前記抗体と E p C A M への結合において競合することができる抗体。

【請求項 13】

前記抗体は、完全ヒト抗体である、請求項1～12のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 14】

前記抗体は、抗体重鎖定常領域および / または抗体軽鎖定常領域の全てもしくは一部を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 15】

前記抗体は I g G 抗体である、請求項14に記載の抗体。

【請求項 16】

前記抗体は、配列番号24のアミノ酸配列、またはそれに少なくとも70%、80%、90%、95%、もしくは98%の配列同一性を有する配列を含む重鎖と、配列番号25、51、64、もしくは77のアミノ酸配列、またはそれに少なくとも70%、80%、90%、95%、もしくは98%の配列同一性を有する配列を含む軽鎖とを含む、請求項14または請求項15に記載の抗体。

【請求項 17】

前記抗体は、抗体の抗原結合断片である、請求項1～16のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項 18】

前記抗体の前記抗原結合断片は、F a b'、F a b、F ( a b' )<sub>2</sub>、単ドメイン抗体、T a n d A b s ダイマー、F v、s c F v、d s F v、d s - s c F v、F d、直鎖状抗体、ミニボディ [minibody]、二特異性抗体 [diabody]、二重特異性抗体断片 [bispecific antibody fragment]、バイボディ [bibody]、トリボディ [tribody]、s c - 二特異性抗体 [sc-diabody]、カップ (ラムダ) ボディ、B i T E、D V D - I g、S I P、S M I P、D A R T、または1つ以上の C D R を含む小抗体模倣物 [small antibody mimetic] である、請求項17に記載の抗体。

10

20

30

40

50

## 【請求項 19】

少なくとも第2の診断剤または治療剤に結合させた請求項1～18のいずれか1項の抗体を含む免疫抱合体。

## 【請求項 20】

前記抗体は、放射線治療剤、化学療法剤、抗血管新生剤、アポトーシス誘発剤、抗チューブリン剤、抗細胞もしくは細胞障害性薬物、ステロイド、サイトカイン、ケモカイン、ATPase阻害剤、別の抗体、または血液凝固剤に結合される、請求項19に記載の免疫抱合体。

## 【請求項 21】

前記抗体は別の抗体に結合され、前記免疫抱合体は二重特異性抗体または二特異性抗体を含む、請求項20に記載の免疫抱合体。

10

## 【請求項 22】

請求項1～21のいずれか1項に記載の抗体を含む結合タンパク質。

## 【請求項 23】

少なくとも、請求項1～18のいずれか1項に記載の第1の抗体またはその免疫抱合体を含む組成物。

## 【請求項 24】

前記組成物は、薬学的に許容される組成物である、請求項23に記載の組成物。

## 【請求項 25】

前記組成物は、少なくとも第2の治療剤をさらに含む、請求項23または請求項24に記載の組成物。

20

## 【請求項 26】

請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列領域を含む核酸分子。

## 【請求項 27】

前記ヌクレオチド配列領域は、配列番号1のヌクレオチド配列、および任意に配列番号2、26、39、52、65、もしくは78のヌクレオチド配列、またはそれらに少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む、請求項26に記載の核酸分子。

## 【請求項 28】

請求項26または請求項27に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

30

## 【請求項 29】

請求項26もしくは請求項27に記載の核酸分子、または請求項28に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞またはウイルス。

## 【請求項 30】

少なくとも第1の容器に、

- (a) 請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体、
- (b) 請求項19～21のいずれか1項に記載の免疫抱合体、
- (c) 請求項23～25のいずれか1項に記載の組成物、
- (d) 請求項26または請求項27に記載の核酸分子、
- (e) 請求項28に記載の発現ベクター、
- (f) 請求項29に記載の宿主細胞、または、
- (g) 請求項29に記載のウイルス

40

を含むキット。

## 【請求項 31】

抗体を産生する方法であって、

- (a) 前記コードされた抗体を発現するのに効果的な条件下で、請求項26もしくは請求項27に記載の核酸分子、または請求項28に記載の発現ベクターを含む宿主細胞を培養することと、
- (b) 前記宿主細胞から前記発現した抗体を得ることとを含む方法。

50

## 【請求項 3 2】

E p C A Mに結合する方法であって、E p C A Mを含む組成物を、請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体、またはその免疫抱合体と接触させることを含む方法。

## 【請求項 3 3】

E p C A Mを検出する方法であって、E p C A M / 抗体複合体の形成を可能にするのに効果的な条件下で、E p C A Mを含有すると疑われる組成物を、請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体、またはその免疫抱合体と接触させることと、そのように形成された前記複合体を検出することと、を含む方法。

## 【請求項 3 4】

動物における癌を診断する方法であって、

10

( a ) E p C A M / 抗体複合体の形成を可能にするのに効果的な条件下で、動物、または前記動物から採取した試験試料を、請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体、またはその免疫抱合体と接触させることを含む方法。

## 【請求項 3 5】

前記方法は、

( b ) 前記試験試料中の抗体 - 抗原複合体の存在、および / または量、および / または位置を測定するか、または検出すること、ならびに、

任意に、

( c ) 前記試験試料中の抗体 - 抗原複合体の前記存在および / または量を対照と比較すること、をさらに含む、請求項34に記載の方法。

20

## 【請求項 3 6】

癌を治療する方法であって、動物に請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体、またはその免疫抱合体を、前記動物の癌を治療するのに効果的な量で投与することを含む方法。

## 【請求項 3 7】

第2の治療剤を前記動物に投与することをさらに含む、請求項36に記載の方法。

## 【請求項 3 8】

前記動物はヒト対象である、請求項34～37のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

療法、撮像、または診断に使用するための、請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体またはその免疫抱合体。

30

## 【請求項 4 0】

癌の療法、撮像、または診断に使用するための、請求項39に記載の抗体または免疫抱合体。

## 【請求項 4 1】

前記癌の治療のための薬剤の製造において、請求項1～18のいずれか1項に記載の抗体またはその免疫抱合体の使用。

## 【請求項 4 2】

前記癌は、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膀胱癌、胆嚢癌、膵臓癌、肺癌、胃組織もしくは内臓の癌、好ましくは胃癌もしくは食道癌、肝臓癌、好ましくは肝細胞癌、腎臓癌、好ましくは腎細胞癌、皮膚腫瘍、頭頸部癌、好ましくは膠腫、唇癌、口癌、膣癌、および子宮頸部癌からなる群より選択される、請求項39もしくは請求項40の抗体もしくは免疫抱合体、または請求項36～38のいずれか1項に記載の方法、または請求項41に記載の使用。

40

## 【請求項 4 3】

第2の治療剤の使用をさらに含む、請求項39もしくは請求項40もしくは請求項42の抗体もしくは免疫抱合体、または請求項36～38のいずれか1項に記載の方法、または請求項41に記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

50

本発明は、上皮細胞接着分子 (E p C A M) に結合する結合タンパク質、およびその全使用に関する。特に、本発明は、E p C A M に結合する抗体または抗体断片、および癌の治療を含むその使用の方法に関する。

【背景技術】

【0002】

2000年、推定2200万人が全世界で癌に罹患し、620万人の死亡がこのクラスの疾患によるものであった。毎年、1000万を超える新しい症例があり、この推定は、今後15年間で50%増えると予測されている (WHO、World Cancer Report. Bernard W. Stewart and Paul Kleihues, eds. IARC Press, Lyon, 2003)。全死亡人口の約13%が癌によるものである。American Cancer Society" 米国癌学会によると、2007年に、世界で760万人が癌により死亡した。

【0003】

最も一般的な現在の癌治療は、一般に、侵襲性外科手術、放射線療法、および化学療法に限られており、これらの全ては、重度の副作用の可能性、非特異的毒性、ならびに/または個人の身体像および/もしくは生活の質に対する変化による心的外傷のいずれかをもたらす。癌は、化学療法に対して不応性になり、さらなる治療オプションおよび成功の可能性を低減する可能性がある。乳癌等の比較的治療成功率の高い一部の癌は、発現率も非常に高く、よって、主な死亡率の原因である。

【0004】

現在の治療は、それらの有効性の欠如により、ならびに/またはそれらが高い罹患率、および重度の副作用を有するためのいずれかにより、患者の必要性と一致しない、より多くの癌の例が存在する。よって、より安全な有効性プロファイルを有する癌治療の必要性は明らかである。

【0005】

現在の多くの癌治療の不十分な原因の1つは、患部組織および細胞に対するそれらの選択性の欠如である。外科的切除は、常に、「安全域」として、明らかに正常な組織の除去を伴い、これは罹患率および合併症のリスクを増加する可能性がある。また、常に、腫瘍細胞が散在する場合があります、患部内臓または組織の機能を維持する、もしくは回復させる可能性がある健康な組織の一部も除去する。放射線および化学療法は、それらの非特異的な作用様式により、多くの正常な細胞を殺滅するか、または損傷する。これは、重度の吐き気、体重損失および体力の減少、毛髪脱落等の重篤な副作用をもたらし、また後の人生において二次性の癌を発症するリスクを増加させる。癌細胞に対してより大きい選択性を有する治療は、正常な細胞を損傷せずに残し、よって、成果、副作用プロファイル、および生活の質を向上する。

【0006】

癌治療の選択性は、癌細胞上にのみ、もしくはその大半に存在する分子に特異的であるか、または癌細胞上に高レベルで存在する、もしくは癌細胞で過剰発現する抗体を使用することにより、改善することができる。よって、癌を含む種々の疾患の、例えば、抗体を含む免疫療法治療は、現在、非常に活発な研究および開発領域であり、良好な治療計画の実現に関して、非常に有望である。そのような抗体は、免疫系を調節し、患者自身の免疫系による癌の認識および破壊を強化するために使用することができる。

【0007】

現在までに試験された大半の抗体は、マウスモノクローナル抗体、時折、分子操作による「ヒト化」の形態で、既知の癌マーカーに対して産生されてきた。残念なことに、これらの抗体は、ヒト患者の免疫系によって外来タンパク質として認識されるマウスタンパク質である。免疫応答および抗体反応を確実にすることは、有効性の損失、または副作用をもたらす可能性がある。

【0008】

E p C A M (C D 326) は、E G P - 2、17 - 1 A、H E A 125、M K - 1、G A 733 - 2、

10

20

30

40

50

EGP34、KSA、TROP-1、ESA、TACSTD1、およびKS1/4とも称され、最初に識別された腫瘍関連抗原のうちの1つである。EpCAM抗原は、カドヘリン、セレクチン、またはインテグリン等の接着分子の主なファミリーのいずれの構成要素でないという点で独特である。26aaのみが細胞質に面する、314アミノ酸(aa)のI型膜タンパク質である。EpCAMは、カドヘリン媒介細胞-細胞接触に干渉する同種親和性細胞接着分子として機能すると仮定されてきた。EpCAMは、c-myc、サイクリンA、およびEを上方制御し、細胞周期を促進し、細胞増殖を強化する(Munzら, 2004, *Oncogene* 23:5748-58)。

#### 【0009】

EpCAMは、異なる起源のヒト癌上に大量に、かつ均一に発現する(Wentら, 2006, *Br J Cancer* 94:128-35)。前立腺癌および子宮頸部上皮肉腫瘍の免疫組織化学試験は、疾患が進行し、増殖するにつれて、EpCAMの発現が増加し得ることを示した。この明らかな過剰発現は、浸潤性乳癌および卵巣癌を有する患者において報告され、低無病生存率および全般的な生存率の強力な判断材料であった(Spizzora, 2004, *Breast Cancer Res Treat* 86:207-13, Spizzora, 2006, *Gynecol Oncol* 103:483-8)。EpCAM過剰発現と疾患の進行との間の同様の相関関係は、胆嚢癌に罹患している患者においても観察され得る(Vargara, 2004, *Clin Cancer Res* 10:3131-6)。加えて、EpCAMは、結腸癌、乳癌、膵臓癌、および前立腺癌から単離された、癌開始細胞または癌肝細胞において過剰発現する(O'Brienら, 2007, *Nature* 445:106-10, Marhabaら, 2008, *Curr Mol Med* 8:784-804)。これらのデータは、頻度の高いヒトの癌の治療を標的とする免疫治療としての、EpCAMの潜在的な有用性を見事に強調する。

#### 【0010】

EpCAMは、癌対象免疫療法用に検証された標的でもある。この点において、これらのうちのいくつかは種々の理由により臨床試験において機能しなかったことに留意すべきだが、EpCAMに対する多数の抗体が免疫療法に使用されている。これらのEpCAM抗体は、裸抗体、免疫毒素、および二重または三重特異性抗体を含む、多数の形式を取る(Baeuerle and Gires, *Br J Cancer*, 2007, 96:417-423)。

#### 【0011】

二重特異性抗体のアプローチ(例えば、MT110抗体についてはMicromet、およびカツマキソマブ(Removab(登録商標))についてはTrion Pharmaにより使用されるような)は、いくつかの利点がある一方で、単一特異性形式、すなわち、1つの抗体特異性のみが存在する形式で治療効果を有することができる抗体の開発もまた、非常に望ましい。同様に、二重または三重特異性抗体の作用メカニズムは、基本的に、単一特異性形式と異なるため、直接的な比較は単純に不可能であるか、または適切ではない。

#### 【0012】

臨床試験で使用されてきたEpCAM抗体の別の形式は、免疫毒素形式(例えば、Proxinium(商標)/Vicinium(商標)についてはViventiaにより使用されるような)、すなわち、抗体部分が毒素分子に抱合され、腫瘍細胞の殺滅をもたらす形式である。Proxinium(商標)/Vicinium(商標)は、ヒト化scFv(MOC31由来)とシュードモナス外毒素との融合タンパク質である(DiPaoloら, 2003, *Clin Cancer Res* 9:2837-48)。この抗体は、臨床においていくつかの有望な結果を示したが、免疫原性の副作用により、全身投与は不可能であり、腫瘍部位への直接/局所投与が必要とされる。同じく、免疫毒素の作用メカニズムは、基本的に、裸抗体と異なるため、直接的な比較は、あまり可能ではないか、または適切ではない。

#### 【0013】

10

20

30

40

50

現在臨床試験中の最も効果的な裸形式の抗E p C A M抗体は、M T 201 ( アデカツムマブ、M i c r o m e t , I n c . により開発され、M e r c k S e r o n o にライセンス譲渡された ) であり、これは完全ヒトI g G 1モノクローナル抗体である。この抗体は、前立腺癌および転移性乳癌における第I相および第II相臨床試験において、いくつかの有望な結果を示し、今までのいくつかの他の裸E p C A M抗体 (例えば、I N G - 1、X o m a , I n c . の高親和性ヒト操作されたI g G 1) の場合と異なり、患者は、膵炎の徴候を示さなかった。他の試験された抗E p C A M抗体は、臨床的な欠点を示した。例えば、良性の安全プロファイルを有するにも関わらず、エドレコロマブ ( 17 - 1 A、P a n o r e x ( 登録商標 ) ) は、境界域の臨床活性しか示さず、ヒト抗マウス抗体 ( H A M A ) 反応により、急速に中和される。M O C 31 ( V i v e n t i a により使用されているヒト化型 ) は、大規模に研究された別の抗E p C A M抗体であり、マウス可変ドメインおよびヒト定常ドメインを有するキメラ抗体である。

10

#### 【発明の概要】

##### 【 0 0 1 4 】

E p C A Mは、広範な正常上皮上に発現するため、高親和性抗E p C A M M A b I N G - 1に見られる、E p C A M特異的免疫毒素 ( P r o x i n i u m ( 商標 ) / V i c i n i u m ( 商標 ) ) および三機能抗体 ( R e m o v a b ( 登録商標 ) ) の全身性非耐容性、ならびに急性膵炎は、正常なE p C A M発現組織の側副損傷と一致するように思われる。一方、エドレコロマブ ( P a n o r e x ( 登録商標 ) ) およびアデカツムマブ ( M T 201 ) は、耐容性が優れているように思われ、大半の正常なE p C A M発現組織を無視するように見える。よって、抗E p C A M抗体の治療能は明らかであり、課題は、当該分野において公知の特性、特に現在の明白な先導治療薬であるM T 201に対して、代替的な、または改善された特性を示す抗E p C A M抗体を開発することである。

20

##### 【 0 0 1 5 】

本発明は、E p C A Mに結合する抗体を識別し、従来の抗体、特に、上述のM T 201およびM O C 31に対して改善された特性を示す。例えば、本発明の抗体は、良好な親和性、良好な交差反応プロファイル、ならびに優れたA D C CおよびC D C C活性を示す。加えて、好ましくは、そのような抗体は、完全ヒトタンパク質のため、患者の免疫系に完全に適合する。本発明の抗体は、診断的もしくは治療的使用 ( 特に、癌について ) のために、または他の抗体を操作する、もしくは標的抗原、二重特異性抗体等のE p C A M、免疫毒素、または抗体 - 薬物抱合体 ( A D C ) において分子を結合するための基礎として使用することができる。

30

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【 0 0 1 6 】

【図 1】図1は、クローン3 - 17 I の s c F v 形態の重鎖 ( V H ) および軽鎖 ( V L ) 可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。S c F v 遺伝子は、N c o / N o t I 部位を介してp H O G 21プラスミドベクター ( 3 . 7 K b ) の中にクローン化された。開始遺伝子クローン化 ( N c o I、H i n d I I I、M l u I、およびN o t I ) に使用された制限部位は下線付きである。V HとV Lとの間のリンカー配列はイタリック体で示される。

40

【図 2】図2は、天然にE p C A M<sup>+</sup> K a t o I I I 細胞株に結合する3 - 17 I I g G、M O C 31 I g G、およびM T 201 I g Gのフローサイトメトリー分析を示す。抗緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) 抗体は、陰性対照として使用される。M F I = 中間蛍光強度。

【図 3 A . 3 B . 3 C】図3 A、3 Bおよび3 Cは、非還元および還元条件下でヒト ( H u ) およびカニクイザル ( C y ) のE p C A M - F c 変種に結合する3 - 17 I I g G ( 図3 A )、M T 201 I g G ( 図3 B )、およびM O C 31 I g G ( 図3 C ) のウェスタンブロット結合分析を示す。M = 分子量マーカー。

【図 4 A . 4 B . 4 C】図4 A、4 Bおよび4 Cは、ヒトおよびカニクイザルのE p C A M - F c 変種に対する3 - 17 I I g G ( 図4 A )、M T 201 I g G ( 図4 B )、およびM O C 31 I g G ( 図4 C ) のE L I S A 結合分析を示す。M A X I - S o r b プレート、1

50



$\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でヒトおよびカニクイザルのE p C A M - F cでコーティングした。抗体は、133 n M ~ 32 f Mの2倍希釈で添加された。

【図5A・5B】図5Aおよび5Bは、組み換えヒトE p C A M抗原(図5A)、または組み換えカニクイザルE p C A M抗原(図5B)に結合する3 - 17 I I g GのB I A c o r e分析を示す。示される結合曲線は、7.8、3.9、2.0、0.98、0.49、および0.24 n Mの3 - 17 I I g G濃度に対応する。

【図6A・6B・6C】図6A、6Bおよび6Cは、3 - 17 I I g Gが、ヒトP B M Cの存在下で、M D A - M B - 453(図6A)、M D A - M B - 231(図6B)、およびB T - 474(図6C)細胞において、A D C Cを誘発することを示す。さらに、これらのデータは、3 - 17 I I gが陽性対照抗体であるM T 201 I I g Gに対して優れたA D C C活性を保有

10

することを実証する。

【図7A・7B】図7Aおよび7Bは、3 - 17 I I g Gがヒト血清の存在下、細胞株のK A T O I I I(図7A)およびM T - 3(図7B)において、C D Cを誘発することを示す。さらに、これらのデータは、C D Cの誘発において、陽性対照抗体であるM T 201 I I g Gに対する3 - 17 I I g Gの優位性を明らかに実証する。

【図8】図8は、s c F v発現ベクターを示す。図8Aは、s c F v発現ベクターであるp H O G 21を示す。A p R(アンピシリン耐性遺伝子)、C o l E 1(D N A複製元)、f I I G(ファージf1の遺伝子間領域)、c - m y c(モノクローナル抗体の9E10により認識されるエピトープをコードする配列)、H i s<sub>6</sub>(6つのヒスチジン残基をコードする配列)、p e l B(細菌のペクチン酸リアーゼの単一ペプチドをコードする配列)、P / O(野生型l a cプロモーターオペレーター)。図8Bは、C末端コード領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

20

【図9】図9は、ヒトE p C A M - F cに対する12 - C 15 I g G、16 - G 5 I g G、および17 - C 20 I g GのE L I S A結合分析を示す。M A X I - S o r bプレートを、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のヒトE p C A M - F cでコーティングした。抗体は、133 n M ~ 65 p Mの2倍希釈で添加された。

【図10A・10B】図10Aおよび10Bは、ヒトE p C A M - F c(図10A)、およびカニクイザルE p C A M - F c(図10B)に対する、3 - 17 I s c F v、7 - F 17 s c F v、17 - C 20 s c F v、および24 - G 6 s c F vのE L I S A結合分析を示す。M A X I - S o r bプレートを、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のヒトまたはカニクイザルのE p C A M - F cでコーティングした。抗体は、667 n M ~ 3.2 n Mの2倍希釈で添加された。

30

【発明を実施するための形態】

【0017】

E p C A M、相補性決定領域(C D R)を含むそれらのV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインに結合する本発明の抗体分子のアミノ酸ならびに/またはD N A配列は、本明細書に列挙される種々の配列番号に記載される。本明細書に記載される全ての特異的抗体は、それらのV<sub>H</sub>ドメインにおいて同一のC D Rを有するが、それらのV<sub>L</sub>ドメインにおいて僅かに異なるC D Rを有する。

【0018】

一実施形態において、本発明は、配列番号5のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、重鎖(V<sub>H</sub>)C D R1ドメインを含むE p C A Mに結合する抗体を提供する。

40

【0019】

代替的に、または加えて、本発明の実施形態において、E p C A Mに結合する抗体は、配列番号6のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、重鎖(V<sub>H</sub>)C D R2ドメインを含む。

【0020】

代替的に、または加えて、本発明の実施形態において、E p C A Mに結合する抗体は、配列番号7のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、重鎖(V<sub>H</sub>)C D R3ドメインを含む。抗体のC D R3ドメインは、抗原結合に特に重要であることが多いた

50

め、配列番号7に基づくそのようなVH CDR3ドメインの存在は、本発明の抗体において、特に好ましい。実際、そのような配列は、本明細書に記載される全ての特異的抗体に存在する。

【0021】

代替的に、または加えて、本発明の実施形態において、E p C A Mに結合する抗体は、配列番号8のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、軽鎖(V L) C D R 1ドメインを含む。

【0022】

代替的に、または加えて、本発明の実施形態において、E p C A Mに結合する抗体は、配列番号9のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、軽鎖(V L) C D R 2ドメインを含む。本発明の代替的な実施形態において、抗体は、配列番号29のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、軽鎖(V L) C D R 2ドメインを含む。

10

【0023】

代替的に、または加えて、本発明の実施形態において、E p C A Mに結合する抗体は、配列番号10のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、軽鎖(V L) C D R 3ドメインを含む。本発明の代替的な実施形態において、抗体は、配列番号30、配列番号43、配列番号56、配列番号69、もしくは配列番号82のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を含む、軽鎖(V L) C D R 3ドメインを含む。

【0024】

よって、特定の実施形態において、本発明は、1つ以上の重鎖C D Rドメインを含むE p C A Mに結合する抗体を提供し、重鎖C D Rドメインは、

20

- (a) 配列番号5のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、重鎖C D R 1ドメイン、
- (b) 配列番号6のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、重鎖C D R 2ドメイン、および
- (c) 配列番号7のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、重鎖C D R 3ドメインから成る群より選択される。

【0025】

特定の実施形態において、本発明は、1つ以上の軽鎖C D Rドメインを含むE p C A Mに結合する抗体も提供し、軽鎖C D Rドメインは、

30

- (a) 配列番号8のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、軽鎖C D R 1ドメイン、
- (b) 配列番号9もしくは配列番号29のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を含む、軽鎖C D R 2ドメイン、および
- (c) 配列番号10、配列番号30、配列番号43、配列番号56、配列番号69、もしくは配列番号82、またはそれらに実質的に相同な配列を含む軽鎖C D R 3ドメインから成る群より選択される。

【0026】

特定の好ましい実施形態において、E p C A Mに結合する抗体は、

40

- (a) 配列番号7のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む、重鎖C D R 3、および
- (b) 配列番号10、配列番号30、配列番号43、配列番号56、配列番号69、もしくは配列番号82、またはそれらに実質的に相同な配列を含む軽鎖C D R 3の双方を含む。

【0027】

より好ましくは、配列番号5のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖C D R 1ドメイン、および/または配列番号8のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む軽鎖C D R 1ドメイン、および/または配列番号6のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖C D R 2ドメイン、および/または配列番号9もしくは配列番号29のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を含む軽鎖C D

50

R2ドメインも存在する。

【0028】

好ましい一実施形態において、配列番号5のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖CDR1、配列番号6のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含むCDR2、および配列番号7のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含むCDR3は、個別に、または組み合わせで存在する。

【0029】

また別の好ましい実施形態において、配列番号8のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む軽鎖CDR1、配列番号9もしくは配列番号29のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を含むCDR2、および配列番号10、配列番号30、配列番号43、配列番号56、配列番号69、もしくは配列番号82のアミノ酸配列、もしくはそれらに実質的に相同な配列を含むCDR3は、個別に、または組み合わせで存在する。

10

【0030】

あるいは、特定の実施形態において、本発明は、配列番号7のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖CDR3ドメイン、および/または配列番号10、配列番号30、配列番号43、配列番号56、配列番号69、もしくは配列番号82、またはそれらに実質的に相同な配列を含む軽鎖CDR3ドメインを含む、EpCAMに結合する抗体を提供する。

前記抗体は、任意に、

配列番号6のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖CDR2ドメイン、および/または配列番号9もしくは配列番号29のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を含む軽鎖CDR2ドメインをさらに含む、ならびに/あるいは

20

配列番号5のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖CDR1ドメイン、および/または

配列番号8のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む軽鎖CDR1ドメインをさらに含む。

【0031】

あるいは、特定の実施形態において、本発明は、配列番号6のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖CDR2ドメイン、および/または配列番号9もしくは配列番号29のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を含む軽鎖CDR2ドメインを含む、EpCAMに結合する抗体を提供する。

30

前記抗体は、任意に、

配列番号7のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖CDR3ドメイン、および/または配列番号10、配列番号30、配列番号43、配列番号56、配列番号69、もしくは配列番号82のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を含む軽鎖CDR3ドメインをさらに含む、ならびに/あるいは

配列番号5のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖CDR1ドメイン、および/または

配列番号8のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を含む軽鎖CDR1ドメインをさらに含む。

40

【0032】

あるいは、特定の実施形態において、本発明は、配列番号5のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖CDR1ドメイン、および/または配列番号8のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む軽鎖CDR1ドメインを含む、EpCAMに結合する抗体を提供する。

前記抗体は、任意に、

配列番号7のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖CDR3ドメイン、および/または配列番号10、配列番号30、配列番号43、配列番号56、配列番号69、もしくは配列番号82のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を含む軽鎖CDR

50

3ドメインをさらに含む、ならびに／あるいは

配列番号6のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含む重鎖CDR2ドメイン、および／または

配列番号もしくは配列番号29のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を含む軽鎖CDR2ドメインをさらに含む。

【0033】

本発明の特定の好ましい抗体は、配列番号5、6、7、8、9、および10、または前述の配列番号のうちのいずれか1つに実質的に相同な配列から成る群より選択されるCDRのうちの1つ以上を含む。他の好ましいCDRは、配列番号29（VL CDR2において）、および配列番号30、43、56、69、および82（VL CDR3において）から成る群より選択される。

10

【0034】

他の特定の好ましい抗体は、配列番号5、6、もしくは7、または前述の配列番号のうちのいずれか1つに実質的に相同な配列の重鎖CDRのうちの2つ以上を含む。特に好ましい結合分子は、配列番号5、6、および7、または前述の配列番号のうちのいずれか1つに実質的に相同な配列（すなわち、前述の重鎖CDR1、およびCDR2、およびCDR3、またはそれらに実質的に相同な配列のそれぞれのうちの1つ）の重鎖CDRのうちの3つを含む。

【0035】

特定の好ましい抗体は、配列番号8（VL CDR1において）、9、もしくは29（VL CDR2において）、または10、30、43、56、69、もしくは82（VL CDR3において）、または前述の配列番号のうちのいずれか1つに実質的に相同な配列の軽鎖CDRのうちの2つ以上を含む。特に好ましい結合分子は、配列番号8（VL CDR1において）、9、もしくは29（VL CDR2において）、10、30、43、56、69、もしくは82（VL CDR3において）、または前述の配列番号のうちのいずれか1つに実質的に相同な配列（すなわち、前述の軽鎖CDR1、およびCDR2、およびCDR3、またはそれらに実質的に相同な配列のそれぞれのうちの1つ）の軽鎖CDRのうちの3つを含む。

20

【0036】

特定のより具体的に好ましい抗体は、配列番号8（VL CDR1において）、9もしくは29（VL CDR2において）、または10、30、43、56、69、もしくは82（VL CDR3において）、またはそれらの配列のいずれか1つに実質的に相同な配列（すなわち、前述の軽鎖CDR1、およびCDR2、およびCDR3、またはそれらに実質的に相同な配列のそれぞれのうちの1つ）の軽鎖CDRのうちの3つ、ならびに配列番号5、6、もしくは7、またはそれらの配列のいずれか1つに実質的に相同な配列（すなわち、前述の重鎖CDR1、およびCDR2、およびCDR3、またはそれらに実質的に相同な配列のそれぞれのうちの1つ）の重鎖CDRのうちの3つを含む。

30

【0037】

特定の特に好ましい抗体は、  
配列番号5の重鎖CDR1ドメイン、  
配列番号6の重鎖CDR2ドメイン、および  
配列番号7の重鎖CDR3ドメイン、  
または前述の配列のいずれか1つに実質的に相同な配列を含む、  
ならびに／あるいは  
配列番号8の軽鎖CDR1ドメイン、  
配列番号9の軽鎖CDR2ドメイン、および  
配列番号10の軽鎖CDR3ドメイン、  
または前述の配列のいずれか1つに実質的に相同な配列を含む。

40

【0038】

代替的な好ましい軽鎖CDRの組み合わせは、配列番号8（VL CDR1において）、および配列番号29（VL CDR2において）、および配列番号30、もしくは配列番号43

50

、もしくは配列番号56、もしくは配列番号69、もしくは配列番号82 (V L C D R 3において)、または前述の配列のいずれか1つに実質的に相同な配列である。

【0039】

さらなる実施形態において、本発明は、E p C A Mに結合し、3つのC D Rを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのC D Rを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含む抗体を提供し、上記重鎖可変領域は、

(c) 配列番号7のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有するV H C D R 3を含む。

【0040】

さらなる実施形態において、本発明は、E p C A Mに結合し、3つのC D Rを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのC D Rを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含む抗体を提供し、上記重鎖可変領域は、

(a) 配列番号5のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同である配列を有するV H C D R 1、

(b) 配列番号6のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同である配列を有するV H C D R 2、および

(c) 配列番号7のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有するV H C D R 3を含む。

【0041】

本実施形態の好ましい態様において、上記軽鎖可変領域C D Rの1つ以上は、

(d) 配列番号8のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する可変軽鎖 (V L) C D R 1、

(e) 配列番号9もしくは配列番号29のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同である配列を有するV L C D R 2、および

(f) 配列番号10、配列番号30、配列番号43、配列番号56、配列番号69、もしくは配列番号82、またはそれらに実質的に相同な配列を有するV L C D R 3から成る群より選択される。

【0042】

本実施形態のさらに好ましい態様において、上記軽鎖可変領域C D Rのうちの2つは、

(d) 配列番号8のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する可変軽鎖 (V L) C D R 1、

(e) 配列番号9もしくは配列番号29のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同である配列を有するV L C D R 2、および

(f) 配列番号10、配列番号30、配列番号43、配列番号56、配列番号69、もしくは配列番号82、またはそれらに実質的に相同な配列を有するV L C D R 3から成る群より選択される。

【0043】

本実施形態のまたさらに好ましい態様において、上記軽鎖可変領域C D Rのうちの3つは、

(d) 配列番号8のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する可変軽鎖 (V L) C D R 1、

(e) 配列番号9もしくは配列番号29のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同である配列を有するV L C D R 2、および

(f) 配列番号10、配列番号30、配列番号43、配列番号56、配列番号69、もしくは配列番号82、またはそれらに実質的に相同な配列を有するV L C D R 3から成る群より選択される。

【0044】

さらなる実施形態において、本発明は、E p C A Mに結合し、3つのC D Rを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのC D Rを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含む抗体を提供し、上記軽鎖可変領域は、

( i ) 配列番号8のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する可変軽鎖 ( V L ) C D R 1、

( i i ) 配列番号9もしくは配列番号29のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同である配列を有する V L C D R 2、および

( i i i ) 配列番号10、配列番号30、配列番号43、配列番号56、配列番号69、もしくは配列番号82、またはそれらに実質的に相同な配列を有する V L C D R 3を含む。

【 0 0 4 5 】

本実施形態の好ましい態様において、上記重鎖可変領域 C D R の1つ以上は、

( i ) 配列番号5のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同である配列を有する V H C D R 1、

( i i ) 配列番号6のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同である配列を有する V H C D R 2、および

( i i i ) 配列番号7のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する V H C D R 3から成る群より選択される。

【 0 0 4 6 】

本実施形態のさらに好ましい態様において、上記重鎖可変領域 C D R のうちの2つは、

( i ) 配列番号5のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同である配列を有する V H C D R 1、

( i i ) 配列番号6のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同である配列を有する V H C D R 2、および

( i i i ) 配列番号7のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する V H C D R 3から成る群より選択される。

【 0 0 4 7 】

本実施形態のまたさらに好ましい態様において、上記重鎖可変領域 C D R のうちの3つは、

( i ) 配列番号5のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同である配列を有する V H C D R 1、

( i i ) 配列番号6のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同である配列を有する V H C D R 2、および

配列番号7のアミノ酸配列、またはそれに実質的に相同な配列を有する V H C D R 3から成る群より選択される。

【 0 0 4 8 】

本発明の特定のさらに好ましい実施形態は、 E p C A M に結合し、

配列番号5、6、もしくは7、または配列番号5、6、もしくは7のうちの1つ以上に実質的に相同な配列の重鎖 C D R のうちの1つ、2つもしくは3つを含む V H ドメイン、および / または

配列番号8 ( V L C D R 1 において )、9もしくは29 ( V L C D R 2 において )、または10、30、43、56、69、もしくは82 ( V L C D R 3 において )、またはそれらの配列のうちの1つ以上に実質的に相同な配列の軽鎖 C D R の1つ、2つもしくは3つを含む、 V L ドメインを含む抗体を提供する。

【 0 0 4 9 】

特に好ましい V H ドメインは、配列番号5、6、および7、または配列番号5、6、もしくは7のうちの1つ以上に実質的に相同な配列の重鎖 C D R ( すなわち、 C D R 1、 C D R 2、および C D R 3、またはそれらに実質的に相同な配列のそれぞれのうちの1つ ) のうちの3つを含む。

【 0 0 5 0 】

特に好ましい V L ドメインは、配列番号8 ( V L C D R 1 において )、9もしくは29 ( V L C D R 2 において )、または10、30、43、56、69、もしくは82 ( V L C D R 3 において )、またはこれらの配列のうちの1つ以上に実質的に相同な配列の軽鎖 C D R ( すなわち、 C D R 1、 C D R 2、および C D R 3、またはそれらに実質的に相同な配列のそれぞ

10

20

30

40

50

れのうちの1つ)のうちの3つを含む。

【0051】

本発明のより具体的に好ましい実施形態は、E p C A Mに結合し、配列番号5、6、および7の3つの重鎖C D Rを含むV Hドメイン、ならびに3つの軽鎖C D Rを含むV Lドメインを含む抗体を提供する。好ましい実施形態において、軽鎖C D Rのうちの1つ、2つ、または3つは、配列番号8、9、および10に定義される通りである。それらに実質的に相同な配列も含まれる。

【0052】

代替的なV Lドメインにおいて、軽鎖C D Rのうちの1つ、2つ、または3つは、配列番号8、29および30、8、29および43、8、29および56、8、29、および69、ならびに8、29および82に定義される通りである。それらに実質的に相同な配列も含まれる。

10

【0053】

本発明の特定の好ましい実施形態は、配列番号3のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を含むV Hドメイン、および/または配列番号4、27、40、53、66、もしくは79のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を含むV Lドメインを含む、E p C A Mに結合する抗体を提供する。

【0054】

さらに好ましい実施形態は、配列番号3のアミノ酸配列を含むV Hドメイン、および3つの軽鎖C D Rを含むV Lドメインを含む、E p C A Mに結合する抗体を提供する。好ましくは、上記V Lドメインは、配列番号4、27、40、53、66、または79のアミノ酸配列を含む。

20

【0055】

本発明の他の実施形態は、E p C A Mに結合し、配列番号8、9、および10の3つの軽鎖C D Rを含むV Lドメイン、および3つの重鎖C D Rを含むV Hドメインを含む抗体を提供する。好ましい実施形態において、重鎖C D Rのうちの1つ、2つ、または3つは、配列番号5、6、および7に定義される通りである。

【0056】

さらなる好ましい実施形態は、配列番号4、27、40、53、66、または79のアミノ酸配列を有するV Lドメイン、および3つの重鎖C D Rを含むV Hドメインを含む、E p C A Mに結合する抗体を提供する。好ましくは、上記V Hドメインは、配列番号3のアミノ酸配列を有する。

30

【0057】

またさらなる実施形態において、本発明は、配列番号21のアミノ酸配列を含む(上記抗体は、本明細書において3-17I S c F vとも称される)、もしくはE p C A Mに結合するその断片、またはそれに実質的に相同な配列を含む、E p C A Mに結合する抗体を提供する。

【0058】

本発明の他の抗体は、配列番号36のアミノ酸配列(上記抗体は、本明細書において、7-F17 s c F vとも称される)、配列番号49(上記抗体は、本明細書において、12-C15 s c F vとも称される)、配列番号62(上記抗体は本明細書において、16-G5 s c F vとも称される)、配列番号75(上記抗体は、本明細書において、17-C20 s c F vとも称される)、および配列番号88(上記抗体は、本明細書において、24-G6 s c F vとも称される)のアミノ酸配列を含むか、もしくはE p C A Mに結合するその断片、またはそれらに実質的に相同な配列を含む。

40

【0059】

本発明は、図1に示される一本鎖形態であるモノクローナル抗体3-17I(配列番号21および配列番号20)、ならびに実施例1および表1に記載される完全長I g G形態により例示される。3-17I抗体は、配列番号3のV Hドメイン、および配列番号4のV Lドメインを含む。3-17I抗体のC D Rドメイン、V H、およびV Lドメインを表1および図1に示す

50

。これらのCDRドメイン、またはVHおよびVLドメイン（もしくはそれらに実質的に相同な配列）を含む抗体は、本発明の好ましい態様である。

【0060】

本発明の他の例示的な抗体は、7 - F17、12 - C15、16 - G5、17 - C20、および24 - G6である。7 - F17抗体は、配列番号3のVHドメイン、および配列番号27のVLドメインを含む。12 - C15抗体は、配列番号3のVHドメイン、および配列番号40のVLドメインを含む。16 - G5抗体は、配列番号3のVHドメイン、および配列番号53のVLドメインを含む。17 - C20抗体は、配列番号3のVHドメイン、および配列番号66のVLドメインを含む。24 - G6抗体は、配列番号3のVHドメイン、および配列番号79のVLドメインを含む。よって、これらの抗体は、3 - 17Iと同じ重鎖を有するが、それぞれ、表2、3、4、5、および6に示される配列の異なる軽鎖を有する。これらのCDRドメイン、またはVHおよびVLドメイン（もしくはそれらに実質的に相同な配列）を含む抗体は、本発明の好ましい態様である。

10

【0061】

本発明の好ましい実施形態は、配列番号21（アミノ酸）に示される3 - 17I抗体のscFv形態であり、これは、好ましくは、配列番号20（核酸）によりコードされる。本発明の別の実施形態は、配列番号36（アミノ酸）に示される7 - F17抗体のscFv形態であり、これは、好ましくは、配列番号35（核酸）によりコードされる。本発明の別の実施形態は、配列番号49（アミノ酸）に示される12 - C15抗体のscFv形態であり、これは、好ましくは、配列番号48（核酸）によりコードされる。本発明の別の実施形態は、配列番号62（アミノ酸）に示される16 - G5抗体のscFv形態であり、これは、好ましくは、配列番号61（核酸）によりコードされる。本発明の別の実施形態は、配列番号75（アミノ酸）に示される17 - C20抗体のscFv形態であり、これは、好ましくは、配列番号74（核酸）によりコードされる。本発明の別の実施形態は、配列番号88（アミノ酸）に示される24 - G6抗体のscFv形態であり、これは、好ましくは、配列番号87（核酸）によりコードされる。

20

【0062】

本発明の別の好ましい実施形態は、好ましくは配列番号22（核酸）によりコードされる、配列番号24（アミノ酸）に示される重鎖と、好ましくは配列番号23（核酸）によりコードされる、配列番号25（アミノ酸）に示される軽鎖の、完全長IgG形態の3 - 17I抗体である。完全長IgG形態の7 - F17、12 - C15、16 - G5、17 - C20、および24 - G6抗体も、好ましい実施形態である。

30

【0063】

よって、本発明の好ましい抗体は、3 - 17IのVHおよびVLドメインを含む、すなわち、配列番号3および配列番号4、またはそれらに実質的に相同な配列を含む。他の好ましい抗体は、7 - F17、12 - C15、16 - G5、17 - C20、および24 - G6のVHおよびVLドメイン、またはそれらに実質的に相同な配列を含む。

【0064】

本明細書に記載される本発明の実施形態の全てにおいて、VL CDR2ドメインは、G A S T X<sub>5</sub> A X<sub>7</sub>（配列番号37）のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を有する、または含み、X<sub>5</sub>およびX<sub>7</sub>は、任意のアミノ酸であり得る。これらの実施形態において、X<sub>5</sub>は、RもしくはT、好ましくはTであり得る。X<sub>7</sub>は、TもしくはS、好ましくはSであり得る。よって、好ましいVL CDR2は、G A S T R / T A T / S（配列番号38）のアミノ酸配列を有する、または含む。表7も参照のこと。

40

【0065】

本明細書に記載される本発明の実施形態の全てにおいて、VL CDR3ドメインは、Q X<sub>2</sub> Y N X<sub>5</sub> W P P X<sub>9</sub> X<sub>10</sub> T（配列番号89）のアミノ酸配列、またはそれらに実質的に相同な配列を有する、または含み、X<sub>2</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>9</sub>、およびX<sub>10</sub>は、任意のアミノ酸であり得る。これらの実施形態において、X<sub>2</sub>は、Q、もしくはH、もし

50



くはK、好ましくはQであり得る。X<sub>5</sub>は、NもしくはD、好ましくはNであり得る。X<sub>9</sub>は、GもしくはT、もしくはS、もしくはM、もしくはA、好ましくはAであり得る。X<sub>10</sub>は、FもしくはW、もしくはY、好ましくはYであり得る。よって、好ましいV L C D R 3は、Q Q / H / K Y N N / D W P P G / T / S / M / A F / W / Y T (配列番号90)のアミノ酸配列を有する、または含む。表7を参照のこと。

#### 【0066】

実質的に相同な配列の特定の例は、開示されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%同一性を有する配列である。

#### 【0067】

特定の実施形態において、E p C A Mに結合する本発明の抗体は、配列番号4、27、40、53、66、もしくは79のアミノ酸配列に対して少なくとも約70%もしくは75%、より好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%もしくは95%、最も好ましくは少なくとも約97%、98%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性のアミノ酸配列領域を含む、少なくとも1つの軽鎖可変領域、および/または配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも約70%もしくは75%、より好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%もしくは95%、最も好ましくは少なくとも約97%、98%、もしくは99%のアミノ酸配列同一性のアミノ酸配列領域を含む、少なくとも1つの重鎖可変領域を含む。

#### 【0068】

実質的に相同な配列の他の好ましい例は、開示されるアミノ酸配列の保存アミノ酸置換を含有する配列である。

#### 【0069】

実質的に相同な配列の他の好ましい例は、開示されるC D R領域のうちの1つ以上において、1つ、2つ、または3つ、好ましくは1つまたは2つの変更されたアミノ酸を含有する配列である。そのような変更は、保存もしくは非保存アミノ酸置換、またはそれらの混合であってもよい。

#### 【0070】

全てのそのような実施形態において、好ましい変更は、保存アミノ酸置換である。

#### 【0071】

全ての実施形態において、実質的に相同な配列を含有する抗体は、E p C A Mを結合する能力を維持し、好ましくは、本明細書に記載される他の特性のうちの1つ以上、例えば、少なくともヒトE p C A M、好ましくはヒトおよびサル、のE p C A Mに結合する能力を維持する。

#### 【0072】

本発明の他の実施形態は、E p C A Mに結合し、本発明の抗体、本発明のV HもしくはV Lドメイン、または本発明のC D Rのうちの1つ以上を含む、結合タンパク質を提供する。好ましい実施形態において、そのような結合タンパク質は抗体である。そのような結合タンパク質に使用するためのV H、V L、およびC D Rドメインの好ましい組み合わせは、本明細書の別の箇所で説明される。

#### 【0073】

本発明の好ましい抗体は、3つのC D Rを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのC D Rを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含む。これらのC D Rの例示的な、好ましい配列は、本明細書に記載される。

#### 【0074】

本明細書に使用される、「E p C A M」という簡潔な用語は、特に記載のない限り、または科学的用語により明確にされない限り、上皮細胞接着分子を意味する。E p C A Mは、E G P - 2、17 - 1A、H E A 125、M K - 1、G A 733 - 2、E G P 34、K S A、T R O P - 1、E S A、T A C S T D 1、またはK S 1 / 4とも称される場合がある。

#### 【0075】

E p C A Mは、哺乳類種にわたって保存されるため、「E p C A M」は、E p C A Mの

10

20

30

40

50

任意の形態を指す場合もある (Trzpisら, 2008, Transgenic Res 17: 229 - 238)。本発明の抗体または抗体断片は、よって、例えば、ヒト、サル (例えば、カニクイザル)、ウシ (ウシ属)、マウス、ラット、ハムスター、フェレット、モルモット、および/またはウサギの E p C A M に結合してもよい。好ましくは、本発明の抗体または抗体断片は、少なくともヒト E p C A M に結合する。特定の好ましい実施形態において、本発明の抗体または抗体断片は、少なくともヒトおよびサル (例えば、カニクイザル) の E p C A M に結合する。特定の好ましい実施形態において、本発明の抗体または抗体断片は、少なくともヒトおよびマウスの E p C A M に結合する。特定の好ましい実施形態において、本発明の抗体または抗体断片は、少なくともヒト、サル、およびマウスの E p C A M に結合する。E p C A M は、遊離型 E p C A M、例えば、組み換えされた、または精製された E p C A M であるか、または例えば、細胞の表面上に天然形態で存在し得る。 10

【0076】

本発明の抗体または結合タンパク質は、E p C A M の断片、特に細胞外ドメインを含む、もしくはそれから成る断片にも結合することができる、または E p C A M もしくは E p C A M の断片を含む実体に結合することができる。実際、本発明の抗体のエピトープは、E p C A M の細胞外ドメインに位置する。

【0077】

本発明の抗体もしくは抗体断片に関して、本明細書に使用される、「E p C A M に結合する」または「抗 E p C A M」という用語は、以下のうちの1つ以上、好ましくは以下のうちの2つ以上、最も好ましくは以下の全てが可能である抗体または抗体断片を意味する 20

(a) 遊離 E p C A M、例えば、E L I S A アッセイもしくは B I A c o r e アッセイにより評価される、固体支持体上で、例えば、組み換えにより発現する E p C A M に結合する、

(b) 例えば、非還元条件下で、ウェスタンブロットにおいて、E p C A M への結合により評価される、立体構造的依存性 (例えば、非線形) E p C A M エピトープに結合する、

(c) 例えば、フローサイトメトリーまたは免疫組織化学検査により評価される、細胞の表面上に発現する E p C A M に結合する、

(d) 少なくともヒト E p C A M、より好ましくは、ヒトおよびサルの E p C A M、またはヒトおよびマウスの E p C A M、最も好ましくは、ヒト、サル、およびマウスの E p C A M に結合する、 30

(e) 本明細書の別の箇所でも説明される、10 n M 以下、好ましくは 5 n M 以下、より好ましくは 3 n M 以下、または 2 n M 以下、最も好ましくは 1 n M 以下の結合親和性 (K d) でヒト E p C A M に結合する、

(f) 本明細書の別の箇所でも説明される、同様の親和性で、例えば、10 n M 以下、好ましくは 5 n M 以下、より好ましくは 3 n M 以下、または 2 n M 以下、例えば、1 n M 以下の K d で、ヒトおよびサルの E p C A M、またはヒトおよびマウスの E p C A M に結合する。

【0078】

本発明の好ましい抗体、または抗体断片は、以下のうちの1つ以上、好ましくは以下のうちの2つ以上、最も好ましくは以下の機能特性の全ても可能である： 40

(g) 腫瘍を有する動物への投与により、腫瘍に局在される、

(h) 本明細書の別の箇所に記載される、腫瘍細胞の A D C C を誘発する、

(i) 本明細書の別の箇所に記載される、腫瘍細胞の C D C を誘発する、

(j) i n v i v o で、抗腫瘍作用を誘発する。

【0079】

これらの好ましい特性についてのさらなる情報は、本明細書の別の箇所に記載される。他の好ましい特性は、本発明の抗体が投与された時の、i n v i v o での有意な毒性の不在、および i n v i v o での有意な他の副作用、例えば、他の抗 E p C A M 抗体で観察された、例えば、膵炎または正常組織に対する他の側副損傷等の副作用の不在を含む。 50

本発明の抗体は、また E p C A M の機能も阻害する、もしくは有意に低下させる、または E p C A M のその天然リガンドとの相互作用も防止する、もしくは低下させる。本発明の抗体の別の好ましい（しかし、必須ではない）特性は、単一特異性形式、すなわち、1つの抗体特異性のみが存在する形式で、治療効果を有する能力である。

【0080】

したがって、本発明を考慮すると、様々な抗 E p C A M 抗体が作製され、癌の治療を含む、種々の実施形態において使用することができる。

【0081】

本願全体を通して使用される、「a」および「an」という用語は、上限が後に特に記載される場合を除き、「少なくとも1つ」、「少なくとも第1」、「1つ以上」、または「複数」の参照構成要素もしくはステップを意味するという意味で使用される。したがって、本明細書に使用される、「抗体」は、「少なくとも第1の抗体」を意味する。本開示を考慮すると、操作可能な限度およびパラメータの組み合わせは、任意の単一製剤の量と同様に、当業者に公知である。

【0082】

本発明の好ましい実施形態は、本発明の少なくとも1つの抗 E p C A M 抗体、またはその抗原結合断片を含む。

【0083】

本明細書に定義される、本発明の抗体、またはその一部、もしくはその断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子、またはそれらに実質的に相同な核酸分子は、またさらに本発明の態様を形成する。好ましい核酸分子は、配列番号21に提示されるアミノ酸配列をコードする配列（好ましくは、配列番号20によりコードされる）を含む。他の好ましい核酸分子は、配列番号36に提示されるアミノ酸配列をコードする配列（好ましくは、配列番号35によりコードされる）、または配列番号49に提示されるアミノ酸配列をコードする配列（好ましくは、配列番号48によりコードされる）、または配列番号62に提示されるアミノ酸配列をコードする配列（好ましくは、配列番号61によりコードされる）、または配列番号75に提示されるアミノ酸配列をコードする配列（好ましくは、配列番号74によりコードされる）、または配列番号88に提示されるアミノ酸配列をコードする配列（好ましくは、配列番号87によりコードされる）を含む。他の好ましい核酸分子は、配列番号24のアミノ酸配列を有する重鎖をコードする配列（好ましくは、配列番号22によりコードされる）を含む、および/または配列番号25のアミノ酸配列を有する軽鎖（好ましくは、配列番号23によりコードされる）、もしくは配列番号51のアミノ酸配列を有する軽鎖（好ましくは、配列番号50によりコードされる）、もしくは配列番号64のアミノ酸配列を有する軽鎖（好ましくは、配列番号63によりコードされる）、もしくは配列番号77のアミノ酸配列を有する軽鎖（好ましくは、配列番号76によりコードされる）をコードする配列を含む。

【0084】

他の好ましい核酸分子は、本発明の抗体の I g G 形態、例えば、実施例1に記載されるもの、またはマウスキメラ形態をコードする配列を含む。

【0085】

上に示す通り、本発明により包含される他の核酸分子は、本発明のヒト抗体の一部もしくは断片をコードするもの、例えば、抗体の重鎖をコードするもの（例えば、配列番号22等の、配列番号24をコードするもの）、または抗体の軽鎖をコードするもの（例えば、配列番号23等の、配列番号25をコードするもの）である。他の好ましい核酸分子は、本発明の抗体の V H 領域をコードするもの（例えば、配列番号1等の、配列番号3をコードするもの）である。他の好ましい核酸分子は、本発明の抗体の V L 領域をコードするもの（例えば、配列番号2等の配列番号4をコードするもの、配列番号26等の配列番号27をコードするもの、配列番号39等の配列番号40をコードするもの、配列番号52等の配列番号53をコードするもの、配列番号65等の配列番号66をコードするもの、または配列番号78等の配列番号79をコードするもの）である。

【0086】

よって、本明細書に定義される、本発明の抗体の断片、またはそれに実質的に相同な配列、またはそのような断片をコードする配列を含む核酸分子は、またさらに本発明の態様を形成する。

【0087】

高親和性抗 E p C A M 抗体は、悪性組織と正常組織を識別することができないため、非耐容性毒性プロファイルを有すると、一般的に考えられている。したがって、治療域は、エドレコロマブおよび M T 201 等の低親和性抗体についてのみ存在し得る。一方、低親和性抗体は、腫瘍根絶において、比較的、低い有効性を有する。例えば、M i r c r o m e t のウェブサイトによれば、アデカツムマブ ( M T 201 ) は、転移性乳癌および前立腺癌の治療の第 I I 相試験において、単一製剤としての主要評価項目を欠く ( すなわち、第 24 週で、25% の臨床利益率 ) 。

【0088】

本発明の抗体は、I g G 形式である時、独特な E p C A M 結合親和性の特色を有する。平衡で算出された親和性 (  $K_D$  ) は高く見えるが ( 約  $1 \text{ nM}$  ) 、速度論の構成要素 ( オン率およびオフ率 ) は、親和性に対して異なって寄与する。本発明の抗体は、標的細胞の迅速な認識および結合を決定する、非常に高いオン率 ( ほぼ  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ) 、そして同時に、細胞表面上で 3 ~ 4 分の半減期を有する迅速な抗体解離を決定する、比較的高いオフ率 (  $10^{-2} - 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ) を有する。この独特の結合プロファイルは、高い抗腫瘍有効性の低毒性プロファイルとの組み合わせをもたらす可能性がある。この速度論プロファイルは、従来の技術において示されるものとははっきりと異なり、i n v i v o で使用される時、抗体の異なる ( および優れた可能性がある ) 薬物動態をもたらす可能性がある。

【0089】

オン率、および特にオフ率を決定する任意の適切な方法を使用することができる。しかしながら、好ましくは、速度定数は、B I A c o r e T 100 モデルの 1 : 1 結合モデル ( 例えば、ラングミュア結合モデル ) 等の、市販の結合モデルソフトウェアを使用することにより、i n v i t r o において、一定濃度の固定された抗原 ( E p C A M ) に対して、種々の濃度の試験抗体を試験することにより決定される。適切なアッセイは、例示目的のため、実施例 3 に記載される。好ましくは、定数は、固体支持体、例えば、B I A c o r e チップ上に抗原 ( E p C A M ) を固定し、抗体の抗原への結合を評価することにより決定される。好ましくは、結合親和性は、他の温度、例えば、室温、例えば 25 の温度で評価されてもよいが、37 ( 例えば、体温 ) で評価される。

【0090】

代替的に、E p C A M 陽性細胞の表面上のオフ率および抗体半減期は、細胞表面維持アッセイを実施することにより決定することができる ( A d a m s ら , 1998 , B r J C a n c e r 77 : 1405 - 12、L e G a l l ら , 1999 , F E B S L e t t 453 : 164 - 8 ) 。後者の方法は、治療条件下のヒト患者における実状態をより適切に模倣することを可能にする。

【0091】

本発明の抗体は、I g G 形式である時、E p C A M に対して比較的高い結合親和性を有する、すなわち、 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$  または  $1 \times 10^{-9} \text{ M}$  以下の範囲の  $K_d$  を有する。よって、本発明の抗体は、I g G 形式である時、E p C A M ( 好ましくはヒト E p C A M ) に対して、20 n M、15 n M、もしくは 10 n M 未満、より好ましくは 10、9.5、9、8.5、8、7.5、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、もしくは 0.1 n M 未満の  $K_d$  に相当する結合親和性を有する。しかしながら、本明細書の別の箇所に記載される、適切な機能特性を有するならば、高い  $K_d$  を有する抗体が、本発明において同等に使用され得る。

【0092】

$K_d$  を決定する任意の適切な方法が使用され得る。しかしながら、好ましくは、 $K_d$  は、例えば、ラインウィーバーパーク法を使用して、または好ましくは、B I A c o r e T 100 モデルの 1 : 1 結合モデル ( 例えば、ラングミュア結合モデル ) 等の、市販の結合モ

デルソフトウェアを使用することにより、飽和曲線を確立するために、*in vitro*において種々の濃度の固定された抗原（E p C A M）に対して、種々の濃度の試験抗体を試験することにより決定される。よって、B I A c o r e アッセイは、K d を測定するために好ましく、適切なアッセイは、例示目的のため、実施例3に記載される。好ましくは、K d は、固体支持体、例えば、B I A c o r e チップ上に抗原（E p C A M）、好ましくは遊離抗原、例えば、E p C A M の細胞外ドメインを含む遊離 E p C A M または分子を固定し、抗体の抗原への結合を評価することにより決定される。好ましくは、結合親和性は、他の温度、例えば、室温、例えば25 の温度で評価されてもよいが、37 （例えば、体温）で評価される。好ましくは、抗体の I g G 形態は、結合親和性を決定するために使用される。

10

#### 【0093】

本明細書の別の箇所で説明される、本発明の好ましい抗体は、ヒト E p C A M およびサル E p C A M の双方に結合する。種間、特にヒトと前臨床動物モデルとして一般に使用される種との間のそのような交差反応性は、前臨床試験から臨床使用へのより効率的な転換を可能にするため、重要な利点である。例えば、使用される特定の動物モデルに存在する天然の E p C A M と交差反応する抗体を有することは、このモデルにおける結果がヒト患者における状態を反映する可能性が高く、それによって、例えば、行われる投与のより正確な評価、および任意の潜在的な関連する、もしくは問題のある副作用を識別する可能性を高めることができることを意味する。抗体がサルおよびヒトの双方の E p C A M に対して類似する親和性を有する場合、これは特にそうである。

20

#### 【0094】

例えば、本発明の抗体のヒト E p C A M およびサル E p C A M の双方に結合する能力は、そのような抗体が、治療の有害な副作用を評価し、適切な容認される用量を見つけるために、前臨床毒性試験において試験され得ることを意味する。

#### 【0095】

加えて、ヒト E p C A M およびマウス E p C A M の双方に結合する能力は、マウスモデル、例えば、免疫応答性マウスを使用するマウス同系モデルにおいて、本発明のそのような抗体により示される結果が、ヒト対象における抗体の活性の典型である可能性が高いことを意味する。抗体がマウスおよびヒトの双方の E p C A M に対して類似する親和性を有する場合、これは特にそうである。この理由は、ヒト E p C A M に結合できるが、マウス E p C A M に結合できない抗体が、マウスモデルにおいて、ヒト腫瘍細胞により発現される E p C A M に結合するが、内因性マウス E p C A M に結合することができないためである。これは、確かに、腫瘍および内因性 E p C A M により発現される E p C A M が存在するであろうヒト患者における状態と異なる。

30

#### 【0096】

そのような状態に欠点があるとすれば、ヒト E p C A M に結合するが、マウス E p C A M に結合しない、または著しく低い親和性で結合する抗体は、易感染性マウス（例えば、ヌードもしくは S C I D マウス）のヒト腫瘍異種移植モデルにおいて、良好に機能するかもしれないが、これは、より多くの E p C A M が存在するヒト系において、類似する性能に反映されないかもしれないことである。つまり、ヒト E p C A M に結合できるが、マウス E p C A M に結合できない抗体によるマウス異種移植系で見られた抗腫瘍作用は、臨床の現実性より良く見えるかもしれない。逆に、ヒトおよびマウスの双方の E p C A M に結合できる抗体を用いて作業する場合、これは、マウスモデル系に存在する全ての形態の E p C A M に結合し、抗体がヒトに投入される時の状態のより典型である可能性がある。抗体がマウスおよびヒトの双方の E p C A M に対して類似する親和性を有する場合、これは特にそうである。

40

#### 【0097】

本発明の3 - 17 I 抗体（および本発明の他の好ましい抗体）により示される、サルおよびヒトの E p C A M に対する類似する親和性は、従来の抗体である M O C 31（ヒト E p C A M よりサル E p C A M に対して、非常に低い親和性を有する）に対して、明らかに有利

50

であり、サル E p C A M に対して検出可能な結合を示さない M T 201 に対しても有利である。

【 0 0 9 8 】

よって、本発明の好ましい抗体は、例えば、本明細書に記載される、類似する親和性で、または類似するオン率もしくはオフ率で、ヒトおよびサルの E p C A M、またはヒトおよびマウスの E p C A M に結合する。

【 0 0 9 9 】

「類似する親和性」、「類似するオン率」、または「類似するオフ率」とは、ヒト E p C A M、および他の関心の種（例えば、サルまたはマウス）のうちの1つ以上についての、抗体の必要に応じた結合親和性、オン率、またはオフ率が、比較可能である、例えば、20以下の相違の因数であるという意味でもある。より好ましくは、結合親和性間の相違は、15未満の因数、より好ましくは10未満の因数、より好ましくは5、4、3、または2未満の因数である。

10

【 0 1 0 0 】

本発明の抗体は、分析された公知の抗 E p C A M 抗体に対する異なるエピトープに結合する可能性があると考えられる。確かに、ヒト E p C A M 上の M O C 31 エピトープは、E p C A M を還元条件に曝した後でも存在するため、エピトープは、M O C 31 抗体のエピトープと異なるように見え、一方、本発明の好ましい抗体である 3 - 17 I のエピトープは、そのような条件下で、明らかに破壊される（実施例3を参照）。加えて、本発明の抗体、例えば、3 - 17 I により認識されたエピトープは、M T 201 抗体により認識されたエピトープと異なる場合があるようである。結果は、3 - 17 I 抗体（および本発明の他の抗体）が、ヒトおよびサルの双方の E p C A M に結合し、一方、ヒト E p C A M にのみ結合する M T 201 抗体は、これの間接的証拠であることを示す。

20

【 0 1 0 1 】

よって、本発明のまたさらなる実施形態は、抗体、好ましくは単離された抗体、より好ましくは、ヒト抗体を提供し、これは、E p C A M の細胞外ドメインのエピトープに結合し、E p C A M への結合において、本明細書に記載される 3 - 17 I 抗体（すなわち、配列番号4の V L、および配列番号3の V H を含む抗体）と競合する能力、または 3 - 17 I と同じ C D R を含む抗体、すなわち、配列番号8、9、および10の V H C D R 配列と、配列番号5、6、および7の V H C D R 配列とを含む抗体と競合する能力を有する。7 - F 17、12 - C 15、16 - G 5、17 - C 20、または24 - G 6 抗体と E p C A M への結合において競合する抗体も、好ましい。

30

【 0 1 0 2 】

同じエピトープ / 抗原への結合は、当該分野において周知の、説明される方法、例えば、結合アッセイ、例えば、競合阻害アッセイを使用することにより容易に試験することができる。よって、当業者は、結合アッセイが、本発明の抗体および抗体断片と同じ結合特異性を有する、他の抗体および抗体断片を識別するために使用することができることを理解するだろう。以下に記載するように、競合結合アッセイは、そのような他の抗体を見出すために使用することができる。以下に記載される方法は、単に、適切な競合アッセイの実施例の1つである。当業者は、他の適切な方法および変形を認識するであろう。

40

【 0 1 0 3 】

フローサイトメトリーを使用して競合アッセイを実施する前に、少量の試験される抗体を、例えば、ビオチン化により標識するべきである。一定の数の腫瘍細胞、例えば、乳癌細胞に対する最大下結合を付与する、ビオチン化産物の機能（細胞結合特性の維持）および本発明のビオチン化抗体（A b 1）の最低濃度を決定する。総数  $10^6$  細胞を、指数関数的に成長する培養物から採取し、種々の抗体濃度で、4 で1時間、インキュベートする。細胞を洗浄し、4 でさらに1時間、適切な検出抗体とともにインキュベートする。洗浄後、細胞をフローサイトメトリーで分析する。各試験抗体において、抗体濃度に対して中央蛍光強度（M F I）をプロットすることによって、データから飽和曲線を作製した。

【 0 1 0 4 】

50

競合アッセイにおいて、腫瘍細胞、例えば乳癌細胞を上述のように調製し、一定濃度の標識（ビオチン化）抗体（bio - Ab1）と増加濃度の非標識競合抗体との混合物を用いて、二つ組で処理する。一定濃度は、上で決定された一定数の腫瘍細胞に対して適切な蛍光シグナルを生成する、抗体の最低濃度である。理想的には、nMでのこの一定濃度は、平衡（ $K_D$ ）での、処理された抗体の親和性を下回るべきである。この場合、記載される方法は、競合抗体の親和性を推定するために使用することができる（Schodina and Kranz, 1993, J Biol Chem 268: 25722 - 7）。抗体混合物は、4で1時間、標的細胞とインキュベートされる。細胞を洗浄し、ビオチン化抗体の細胞結合を、FITC標識されたストレプトアビジンとともにインキュベートすることにより、明らかにする。各試験試料（bio - Ab1 + Ab2）の中央蛍光読み取りから背景蛍光（PBS - 5% FCS）を取り去った後、以下の式に従い、各Ab2濃度「c」の阻害のパーセントを算出する。

【0105】

$$\text{阻害 \%} = (1 - \text{MFI}^{\text{bio-Ab1+Ab2 "c"}} / \text{MFI}^{\text{bio-Ab1}}) \times 100$$

が計算される。

【0106】

阻害パーセントを対照値と比較し、対照阻害パーセントと統計的に有意な相違を有する阻害パーセントは、試験抗体が同じエピトープ / 抗原に結合することができることを示す。好ましくは、統計的に有意な相違は、 $< 0.05$ の確率値である。統計的有意を決定する適切な方法は、当該分野において周知であり、十分に説明されており、これらのいずれかを使用することができる。好ましくは、試験抗体は、EpCAMに結合する本発明の抗体の量を、少なくとも約95%減少させる。

【0107】

好ましくは、そのような抗体は、本明細書の別の箇所で定義される、他の結合および機能特性のうちの1つ以上、例えば、上記の特徴（a）～（j）を有する。

【0108】

本発明の抗体は、EpCAMに結合する。よって、本発明の抗体または結合タンパク質は、in vivoまたはin vitroにおいて、EpCAMを検出するために使用することができる。EpCAMは腫瘍細胞上で過剰発現するため、本発明の抗体または結合タンパク質は、in vivoまたはin vitroにおいて、腫瘍細胞を検出するために使用することができる。加えて、抗体の腫瘍細胞に局在する能力は、本発明の抗体が、腫瘍細胞が存在する身体部位を標的とすることができることを意味し、よって、抗体は標的部位で作用することができる。例えば、抗体は、例えば、ADCCもしくはCDCを活性化する、または誘発することによって、抗腫瘍作用自体を、すなわち、裸抗体として誘発する場合がある。裸Abとして作用するこの能力は、非常に有利である。代替的に、または加えて、抗体は、さらなる治療分子、例えば、本明細書に記載される毒素または他の抗癌分子に抱合されることによって、抗腫瘍作用を誘発することができる。

【0109】

本発明の抗体は、好ましくは、in vitroにおいて、腫瘍細胞、例えば、EpCAMを発現する腫瘍細胞、例えば、乳癌細胞または胃癌細胞のADCCを誘発する能力を有する。ADCCの適切なin vitro試験は、実施例4に記載される。よって、本発明の抗体は、例えば、ヒトPBMCの存在下で、in vitroにおいて、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の腫瘍細胞の殺滅をもたらす可能性がある。そのような試験またはアッセイに使用することができる適切な腫瘍細胞の例は、実施例4に提供されるが、一般に、EpCAMを発現する任意の腫瘍細胞を使用することができる。例えば、本発明の3-17I抗体は、ヒトPBMCの存在下で、in vitroにおいて、少なくとも30%、40%、50%、または60%の乳癌細胞株であるBT-474の殺滅、ヒトPBMCの存在下で、in vitroにおいて、少なくとも30%、40%、50%、60%、または70%の乳癌細胞株であるMDA-MB-453の殺滅、およびヒトPBMCの存在下で、in vitroにおいて、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、

10

20

30

40

50

80%、または90%の乳癌細胞株であるMDA-MB-231の殺滅をもたらす能力を有することを示した。そのような殺滅のレベルは、本発明の抗体において好ましい。そのような殺滅のレベルは、臨床試験の過程にある現在最も優れた抗EpCAM抗体（すなわち、MT201）において観察されるものより有意に高く、実施例4を参照のこと。

#### 【0110】

本発明の抗体は、好ましくは、そのようなADCCレベルを達成するために必要な低濃度の抗体に関して、特に有力であることも示す。同様に、適切な*in vitro*試験は、実施例4に記載される。よって、*in vitro*における腫瘍細胞、例えば、乳癌細胞の半最大細胞溶解（EC<sub>50</sub>）に必要な抗体濃度は、好ましくは、30 ng/ml、25 ng/ml、20 ng/ml、15 ng/ml、10 ng/ml、5 ng/ml、2 ng/ml、1 ng/ml、0.5 ng/ml、または0.25 ng/ml未満、または0.20 ng/ml、もしくは0.15 ng/mlである。例えば、本発明の3-17I抗体は、MDA-MB-453細胞において0.08 ng/ml程度、B7474細胞において0.12 ng/ml、およびMDA-MB-231細胞において15 ng/mlのEC<sub>50</sub>を有することを示し、その全ては、MT201の平行実験において測定されたEC<sub>50</sub>値より有意に低い。同様に、これらの結果は、本発明の好ましい抗体が、従来の抗体であるMT201に対して明らかに優れていることを示す。

#### 【0111】

本発明の抗体は、好ましくは、*in vitro*において、腫瘍細胞、例えば、EpCAMを発現する腫瘍細胞、例えば、乳癌細胞または胃癌細胞のCDCを誘発する能力を有する。CDCについての適切な*in vitro*試験は、実施例4に記載される。よって、本発明の抗体は、例えば、ヒト血清の存在下で、*in vitro*において、少なくとも70%、80%、90%、95%、または最大100%までの腫瘍細胞の殺滅をもたらす可能性がある。そのような試験またはアッセイに使用することができる適切な腫瘍細胞の例は、実施例4に提供されるが、一般に、EpCAMを発現する任意の腫瘍細胞を使用することができる。例えば、本発明の3-17I抗体は、ヒト血清の存在下の*in vitro*において、少なくとも70%、80%、90%、または95%の乳癌細胞株であるMT-3の殺滅をもたらす能力を有することを示し、実際には、ほぼ100%の殺滅を示し、また、ヒト血清の存在下の*in vitro*において、少なくとも70%、80%、90%、または95%の胃癌細胞株であるKATOIIIの殺滅をもたらす能力を示し、実際には、これも、ほぼ100%の殺滅を示した。そのような殺滅のレベルは、本発明の抗体において好ましく、臨床試験の過程にある現在最も優れた抗EpCAM抗体（すなわち、MT201）において観察されるものと比較可能であり、実施例4を参照のこと。

#### 【0112】

本発明の抗体は、好ましくは、そのようなCDCレベルを達成するために必要な低濃度の抗体に関して、特に有力であることも示す。同様に、適切な*in vitro*試験は、実施例4に記載される。よって、*in vitro*において、腫瘍細胞、例えば、EpCAMを発現する腫瘍細胞、例えば、乳癌細胞または胃癌細胞の半最大細胞溶解（EC<sub>50</sub>）に必要とされる抗体濃度は、好ましくは、60 ng/ml、50 ng/ml、40 ng/ml、30 ng/ml、25 ng/ml、20 ng/ml、15 ng/ml、10 ng/ml、5 ng/ml、2 ng/ml、1 ng/ml、0.75 ng/ml、0.5 ng/ml、0.4 ng/ml、または0.3 ng/ml未満である。例えば、本発明の3-17I抗体は、KATOIII細胞において0.28 ng/ml程度、およびMT-3細胞において0.38 ng/mlのEC<sub>50</sub>を有することを示し、その全ては、MT201の平行実験において測定されたEC<sub>50</sub>値より有意に低い。再び、これらの結果は、本発明の好ましい抗体が、従来の抗体であるMT201に対して明らかに優れていることを示す。

#### 【0113】

よって、本発明の抗体は、少なくとも従来の抗体であるMT201に対して改善されたATCCおよびCDC活性を示し、これは、この点において、特に有効であると認識される。そのような効果は、本発明の抗体が、腫瘍細胞と戦うための患者の免疫系を動員するために使用され得る（すなわち、さらなる活性剤を必要とせずに、治療上有用であり得る）



ことを実証する。そのような高レベルに、およびそのような高効力でA T C Cを誘発する能力は、明らかに有利な特性である。

【0114】

よって、本発明の好ましい抗体は、A D C Cおよび/またはC D Cを誘発する能力を有する。A D C Cおよび/またはC D C活性は、in vivoまたはin vitroでアッセイすることが可能である。

【0115】

よって、本発明の好ましい抗体は、抗腫瘍活性を示す。そのような抗腫瘍活性は、in vivoまたはin vitroでアッセイすることが可能である。

【0116】

本発明の抗体は、好ましくは、腫瘍細胞、例えば、乳癌細胞の成長を阻害する能力を有する。上記阻害は、in vivoまたはin vitroで実証されてもよい。

【0117】

好ましくは、上記の能力および特性は、適切な対照レベルと比較される時、測定可能なレベルまたは有意なレベルで、より好ましくは、統計的に有意なレベルで観察される。適切な有意なレベルは、本明細書の別の箇所で説明される。より好ましくは、上記の能力および特性の1つ以上は、従来の抗体において観察される能力と比較される時、測定可能に良い、またはより好ましくは有意に良いレベルで観察される。

【0118】

抗体によっては、それらが結合する細胞の中に取り込まれることが可能である。よって、本発明のいくつかの実施形態において、抗体は内部に取り込まれることが可能である。この特性は、抗体分子に結合する任意の他の製剤が抗体分子によって取り込まれるはずであるため、免疫抱合体における使用において、特に有利である。他の実施形態において、有意な取り込みは見られない。

【0119】

以下の本発明に記載の組成物、免疫抱合体、製薬、組合物、カクテル、キット、第1および第2の治療使用、ならびに全ての方法の説明において、「抗体」および「免疫抱合体」という用語、または抗原結合領域もしくはその断片は、特に記載のない限り、または科学的用語により明確にされない限り、様々な抗E p C A M抗体、ならびに特定の3 - 17 I、7 - F 17、12 - C 15、16 - G 5、17 - C 20、または24 - G 6抗体を指す。

【0120】

本明細書に使用される、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含むヒト抗原結合ドメインを含む、任意の免疫学的な結合剤または分子を広範に指す。重鎖の定常ドメインの種類により、全抗体は、5つの主要クラスである、I g A、I g D、I g E、I g G、およびI g Mのうちの1つに割り当てられ、本発明の抗体は、これらのクラスのうちの任意の1つであり得る。これらのうちのいくつかは、さらにI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4等のサブクラス、またはアイソタイプに分類される。免疫グロブリンの異なるクラスに相当する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、および $\mu$ と称される。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および3次元構成は周知である。

【0121】

一般に、抗原結合領域以外の全抗体が、本発明において使用される場合、I g Gおよび/またはI g Mは、生理学的状態において最も一般的な抗体であり、また研究室で最も容易に作製されるため、好ましい。しかしながら、いくつかの実施形態において、I g A抗体が好ましい。

【0122】

哺乳類の抗体の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列、およびそれらの可変ドメインのフレームワーク領域のいくつかのアミノ酸に基づき、2つの明確に異なる種類である、カッパ(  $\kappa$  )およびラムダ(  $\lambda$  )のうちの1つに割り当てられる。本発明の抗体において、 $\kappa$  または  $\lambda$  軽鎖定常領域の使用に対して、基本的に優先性はない。

10

20

30

40

50

## 【0123】

当業者により理解されるように、「抗体」という用語により包含される免疫学的結合試薬は、全抗体、二量体、三量体、および多量体抗体、二重特性抗体、キメラ抗体、組み換えおよび改変抗体、ならびにそれらの断片を含む、全てのヒト抗体、およびそれらの抗原結合断片に及ぶ。

## 【0124】

よって、「抗体」という用語は、抗原結合領域を有する任意の抗体様分子を指し、本用語は、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $F(ab')_2$ 等の抗原結合ドメイン、単ドメイン抗体 ( $DABs$ )、 $TandAbs$  ダイマー、 $Fv$ 、 $scFv$  (単鎖 $Fv$ )、 $dsFv$ 、 $ds-scFv$ 、 $Fd$ 、直鎖状抗体、ミニボディ、二特異性抗体、二重等異性抗体断片、パイボディ ( $body$ )、トリボディ ( $tribody$ ) (それぞれ、 $scFv-Fab$  融合、二重特異性、または三重特異性)、 $sc$ -二特異性抗体、カップ ( $\lambda$ ) ボディ ( $scFv-CL$  融合)、 $BITE$  (二重特異性T細胞係合物、T細胞を誘引するための  $scFv-scFv$  タンデム型)、 $DVD-Ig$  (双対変数ドメイン抗体、二重特異性形式)、 $SIP$  (小免疫タンパク質、ミニボディの一種)、 $SMIP$  (「小モジュール免疫薬」)  $scFv-Fc$  ダイマー、 $DART$  ( $ds$  安定化二特異性抗体「二重親和性再標的化」)、1つ以上のCDRを含む小抗体模倣物等を含む抗体断片を含む。

10

## 【0125】

種々の抗体ベースの構造体および断片を調製し、使用するための技法は、当該分野において周知である ( $Kabat$ ら, 1991を参照、明確に、参照により本明細書に組み込まれる)。特に、二特異性抗体は、第EP404,097号および第WO93/11161号にさらに記載され、一方、直鎖状抗体は  $Zapata$ ら (1995) にさらに記載される。

20

## 【0126】

抗体は、従来の技法を使用して断片化することができる。例えば、 $F(ab')_2$ 断片は、抗体をペプシンで処理することにより生成することができる。ジスルフィド架橋を還元するために、得られた  $F(ab')_2$ 断片を処理し、 $Fab'$ 断片を産生することができる。パイン消化は、 $Fab$ 断片の形成をもたらすことができる。 $Fab$ 、 $Fab'$ 、および  $F(ab')_2$ 、 $scFv$ 、 $Fv$ 、 $dsFv$ 、 $Fd$ 、 $dAbs$ 、 $TandAbs$ 、 $ds-scFv$ 、ダイマー、ミニボディ、二特異性抗体、二重特性抗体断片、ならびに他の断片は、組み換えによる技法によって合成されるか、または化学的に合成することもできる。抗体断片を産生するための技法は、当該分野において周知であり、十分に説明されている。例えば、 $Beckman$ ら, 2006、 $Holliger & Hudson$ , 2005、 $Lee Gall$ ら, 2004、 $Reff & Heard$ , 2001、 $Reiter$ ら, 1996、および  $Young$ ら, 1995のそれぞれは、有効な抗体断片の産生をさらに説明し、それを可能にする。

30

## 【0127】

抗体または抗体断片は、天然に産生されるか、または完全に、または部分的に合成により産生することができる。よって、抗体は、任意の適切な供給源、例えば、組み換え供給源からであり得る、および/または遺伝子導入動物、もしくは遺伝子導入植物において、または  $IgY$ 技法を使用することにより、卵子において産生され得る。よって、抗体分子は、 $in vitro$ または  $in vivo$ において産生することができる。

40

## 【0128】

好ましくは、抗体または抗体断片は、3つのCDRドメインを含む抗体軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) と、3つのCDRドメインを含む抗体重鎖可変領域 ( $V_H$ ) とを含む。上記  $V_L$  および  $V_H$  は、一般に、抗原結合部位を形成する。

## 【0129】

「 $Fv$ 」断片は、完全な抗原認識および結合部位を含有する、最小限の抗体断片である。この領域は、密接した、非共有結合会合で、1つの重鎖と、1つの軽鎖の可変ドメインのダイマーを有する。各可変ドメインの3つの高度可変領域 (CDR) が相互作用して、 $V_H-V_L$ ダイマーの表面上の抗原結合部位を画定するのは、この構成においてである。集合

50

的に、6つの高度可変領域（CDR）は、抗原結合特異性を抗体に付与する。

【0130】

しかしながら、抗体の軽鎖可変ドメインからの3つのCDRと、重鎖可変ドメインからの3つのCDRの存在は、抗原結合に必ずしも必要ではないことは、当該分野において十分に説明されている。よって、上記の古典的な抗体断片より小さい構築物は、有効であることが知られている。

【0131】

例えば、ラクダ抗体（Hammers - Castermanら、1993、Arbabi Ghahroudiら、1997）は、広範な抗原結合レパートリーを有するが、軽鎖に欠けている。また、VHドメインのみ（Wardら1、1989、Davies and Riechmann、1995）またはVLドメインのみ（van den Beuckenら、2001）を含む単一ドメイン抗体による結果は、これらのドメインが許容可能な高い親和性で抗原に結合できることを示す。よって、3つのCDRは、効果的に、抗原を結合することができる。

10

【0132】

単一CDR、または2つのCDRが効果的に抗原を結合することも知られている。第1の実施例として、VH CDR3領域がGFP等の異種タンパク質の中に挿入され、異種タンパク質に抗原結合能を付与することによって例証されるように、単一CDRは、異種タンパク質の中に挿入され、異種タンパク質に抗原結合能を付与することができる（Kissら、2006、Nicaisseら、2004）。

20

【0133】

2つのCDRが効果的に抗原に結合し、親抗体によって保有されるより優れた特性をさらに付与することができることは、さらに公知である。例えば、親抗体からの2つのCDR（VH CDR1およびVL CDR3領域）は、親分子の抗原認識特性を維持するが、腫瘍に浸透する能力に優れていることが示された（Qiuら、2007）。天然の親抗体に類似する様式でCDRを配向するように、適切なリンカー配列とこれらのCDRドメイン（例えば、VH FR2から）を結合することは、さらに良好な抗原認識を産生した。したがって、親抗体に見られる立体構造を保持するように、適切なフレームワーク領域を用いて配向される2つのCDRドメイン（好ましくは、VHドメインから1つとVLドメインから1つ、より好ましくは、2つのCDRドメインのうちの1つがCDR3ドメインである）を含む抗原結合抗体模倣物を構築することが可能であることは、当該分野において公知である。

30

【0134】

よって、本発明の好ましい抗体は、6つのCDR領域（軽鎖から3つ、および重鎖から3つ）を含み得るが、6つのCDR領域より少ない、または1つもしくは2つ程度のCDR領域の抗体も、本明細書により包含される。加えて、重鎖または軽鎖のみからのCDRを有する抗体も含まれる。

【0135】

EpCAMに結合する本発明の好ましい抗体は、3つのCDRを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、上記重鎖可変領域は、

40

（c）配列番号7のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を有するVH CDR3、または

（a）配列番号5のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を有する可変重鎖（VH）CDR1、

（b）配列番号6のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を有するVH CDR2、および

（c）配列番号7のアミノ酸配列、もしくはそれに実質的に相同な配列を有するVH CDR3を含む。

【0136】

50

本明細書において、3 - 17 I、7 - F 17、12 - C 15、16 - G 5、17 - C 20、および24 - G 6の6つの抗体クローン为例証し、それらの全ては、E p C A Mに結合し、それらの全ては、同じ重鎖C D Rドメイン(a)、(b)、および(c)を共有する。同じ重鎖C D Rドメインを有し、E p C A Mに結合する7つの他の抗体クローンも識別された。よって、これらの重鎖C D Rドメインは、E p C A M結合に重要であると考えられる。抗体のC D R 3ドメインは、抗原特異性に特に重要であることが多いため、配列番号7に基づくそのようなV H C D R 3ドメインの存在は、本発明の抗体において特に好ましい。

#### 【0137】

特定の重鎖C D R領域と組み合わせて使用するための、好ましい軽鎖C D R領域は、本明細書の別の箇所に記載される。しかしながら、本発明の重鎖可変領域と組み合わせて使用するための3つのC D Rを含む他の軽鎖可変領域も含まれる。本発明の重鎖可変領域と組み合わせて使用することができ、E p C A Mの結合する抗体を生じる適切な軽鎖可変領域は、当業者によって容易に識別され得る。

10

#### 【0138】

例えば、本発明の重鎖可変領域は、単一軽鎖可変領域、または軽鎖可変領域のレパートリーと組み合わせることができ、E p C A Mへの結合について試験される抗体をもたらす。

#### 【0139】

所望する場合、本発明の好ましい軽鎖可変領域と組み合わせて使用するための代替的な重鎖可変領域を識別するために、類似する方法を使用することができる。

20

#### 【0140】

特定の実施形態において、抗体または抗体断片は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g E、I g M、またはI g D定常領域等の重鎖定常領域の全て、または一部を含む。好ましくは、重鎖定常領域は、I g G 1重鎖定常領域、またはその一部である。さらに、抗体または抗体断片は、カッパ軽鎖定常領域、もしくはラムダ軽鎖定常領域の全て、または一部、あるいはその一部を含むことができる。そのような定常領域の全て、または一部は、天然に産生されるか、または完全に、もしくは部分的に合成であり得る。そのような定常領域における適切な配列は、当該分野において周知であり、十分に説明されている。重鎖および軽鎖からの定常領域の完全な補体が、本発明の抗体に含まれる場合、そのような抗体は、通常、本明細書において、「完全長」抗体、または「全」抗体と称される。

30

#### 【0141】

F c領域を含有する抗体は、特定の使用、特に、F c領域がA D C CおよびC D C等のエフェクター機能を媒介する、i n v i v oにおける治療の使用に好ましい。

#### 【0142】

アミノ酸または核酸配列に関連して本明細書に使用される、「実質的に相同」という用語は、開示されるアミノ酸または核酸配列に対して、少なくとも70%もしくは75%、好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列を含む。本発明の実質的に相同な配列は、よって、本発明の配列に対する単一もしくは複数の塩基、またはアミノ酸改変(付加、置換、挿入、または欠失)を含む。アミノ酸レベルでの、好ましい実質的に相同な配列は、本発明の配列を構成するフレームワーク領域のうちの1つ以上、および/またはC D Rのうちの1つ以上で、最大5、例えば、1、2、3、4、もしくは5のみ、好ましくは1、2、もしくは3、より好ましくは、1もしくは2の改変されたアミノ酸を含有する。上記改変は、保存もしくは非保存アミノ酸であり得る。好ましくは、上記改変は、保存アミノ酸置換である。特定の残基がXとして定義され、そして実質的に相同な配列が言及される本発明の実施形態において、実質的に相同な配列のアミノ酸置換は、X残基以外の残基、例えば、X残基以外の1つ、2つ、または3つの残基に位置するか、または置換は、X残基、例えば、1つ、2つ、または3つのX残基に位置し得る。

40

#### 【0143】

50

実質的に相同な核酸配列は、少なくとも適度に厳密なハイブリッド形成条件下で、開示される核酸配列（またはそれらの相補的配列）とハイブリッド形成する、例えば、本発明の軽鎖もしくは重鎖のCDR、本発明の軽鎖もしくは重鎖の可変領域、または本発明の抗体（もしくはそれらの相補的配列とハイブリッド形成する）のうちの1つ以上をコードするヌクレオチドとハイブリッド形成するヌクレオチド配列も含む。

#### 【0144】

「実質的に相同」という用語は、実質的に同じ方式で、本発明のタンパク質または核酸分子と実質的に同じ機能を行う、本発明のアミノ酸およびヌクレオチドの配列の修飾物または化学的同等物も含む。例えば、任意の実質的に相同な抗体（またはそれをコードする実質的に相同な核酸）は、上述のように、E p C A Mに結合する能力を維持するはずである。好ましくは、任意の実質的に相同な抗体は、例えば、本明細書の別の箇所に定義されるような抗体の機能的能力、例えば、少なくともヒトおよびサル（*h*）のE p C A Mに結合する能力を維持するべきである。好ましくは、任意の実質的に相同な抗体は、問題の抗体によって認識されるE p C A Mの同じエピトープ、例えば、本明細書に記載される、本発明のCDRドメイン、または本発明のVHおよびVLのドメインによって認識される同じエピトープに特異的に結合する能力を維持するべきである。同じエピトープ/抗原に結合することは、当該分野において周知の、十分に説明される方法、例えば、結合アッセイ、例えば、競合アッセイを使用することにより容易に試験することができる。他の機能特性の維持も、当該分野において周知の、十分に説明される方法により、容易に試験することができる。

10

20

#### 【0145】

よって、結合アッセイは、「実質的に相同」な抗体が本発明の抗体および抗体断片と同じ結合特異性を有するかを試験するために使用することができ、例えば、E L I S AアッセイまたはB I A c o r eアッセイは、そのような「実質的に相同」な抗体がE p C A Mに結合できるかを確立するために容易に使用することができることを、当業者は理解するだろう。以下に概説するように、競合結合アッセイは、「実質的に相同」な抗体が、本発明の抗体によって認識される、実質的に同じE p C A Mのエピトープに特異的に結合する能力を維持する、または本発明の種々の抗体（例えば、3-17I）の1つ以上と競合する能力を有するかを試験するために使用することができる。以下に記載する方法は、単に、適切な競合アッセイの一実施例である。当業者は、他の適切な方法および変形を認識しているだろう。

30

#### 【0146】

例示的な競合アッセイは、種々の濃度の試験抗体（例えば、実質的に相同な抗体）の存在下で、本発明の種々の有効濃度の抗体のE p C A Mへの結合を評価することも含む。そのため、試験抗体により誘発された結合の阻害量を評価することができる。増加濃度で本発明の抗体への競合の増加を示す（すなわち、試験抗体の増加濃度が、E p C A Mに結合する本発明の抗体の量において、対応する減少をもたらす）試験抗体は、実質的に同じエピトープに結合する証拠である。好ましくは、試験抗体は、E p C A Mに結合する本発明の抗体の量を有意に減少させる。好ましくは、試験抗体は、E p C A Mに結合する本発明の抗体の量を、少なくとも約95%減少させる。E L I S Aおよびフローサイトメトリーアッセイは、そのような競合アッセイにおける結合の阻害を評価するのに適切であるが、他の適切な技法も当業者に周知であろう。

40

#### 【0147】

本発明のタンパク質の実質的に相同な配列は、これに限定されないが、保存アミノ酸置換、または例えば、異なるリンカー配列が使用されるFv抗体、または抗原の結合に起因しないタグ配列もしくは他の構成要素が付加される抗体、例えば、抗体のVH、VLもしくはCDRに影響を及ぼさない改変、または1つのタイプもしくは形式の抗体分子または断片から、別のタイプもしくは形式の抗体分子または断片への改変（例えば、FabからscFvへの変換またはその逆）、または抗体分子の特定のクラスもしくはサブクラスの抗体分子への変換（例えば、抗体分子のIgGまたはそのサブクラス、例えば、IgG1

50

または I g G3への変換)を含む。

【0148】

本明細書に使用される、「保存アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似する側鎖を有する別のアミノ酸残基と置換されるものである。類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野において定義されており、塩基側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、グリシン、システイン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 $\gamma$ -分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。

10

【0149】

相同性は、任意の従来の方法によって評価することが可能である。しかしながら、配列間の相同性の程度を決定するための、配列の多重アライメントを行うコンピュータプログラム、例えば、Clustal W (Thompsonら、1994)は、有用である。所望する場合、Clustal Wアルゴリズムは、配列のうちの1つの全長の少なくとも50%がアライメントに含まれる、2つの配列間で最高位の一致が得られるように、BLOSUM62スコアマトリクス (Henikoff and Henikoff, 1992)、ならびに10のギャップ開始ペナルティーおよび0.1のギャップ伸長ペナルティーとともに使用することができる。配列を整合するために使用され得る他の方法は、最高位の一致が2つの配列間で得られ、同一アミノ酸の数が2つの配列間で決定されるように、Smith and Waterman (1981)により改訂されたNeedleman and Wunsch (1970)のアライメント法である。2つのアミノ酸配列間でパーセント同一性を算出するための他の方法は、一般に、当該分野において認識されており、例えば、Carillo and Lipton (1988)によって説明されるもの、およびComputational Molecular Biology, Lesk, ed. Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projectsによって説明されるものを含む。

20

【0150】

一般に、コンピュータプログラムは、そのような計算のために利用される。ALIGN (Myers and Miller, 1988)、FASTA (Pearson and Lipman, 1988; Pearson, 1990)、およびギャップBLAST (Altschulら、1997)、BLASTP、BLASTN、またはGCG (Devereuxら、1984)等の配列の対を比較し、整合するプログラムも、本目的において有用である。さらに、欧州バイオインフォマティクス研究所 (European Bioinformatics institute) のDaliサーバは、タンパク質配列の構造ベースのアライメントを提供している (Holm, 1993、1995、1998)。

30

【0151】

基準点を提供する目的において、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相同性を有する本発明に従う配列、配列同一性等は、デフォルトパラメータを用いたALIGNプログラム（例えば、GENESTREAMネットワークサーバ、IGH, Montpellier, Franceのインターネット上で利用可能）を使用して決定することが可能である。

40

【0152】

「少なくとも適度に厳密なハイブリッド形成条件」とは、溶液中の2つの相補的核酸分子間の選択的なハイブリッド形成を促進する条件が選択されるという意味である。ハイブリッド形成は、核酸配列分子の全て、または一部に生じる可能性がある。ハイブリッド形成部分は、通常、長さが少なくとも15（例えば、20、25、30、40、または50）ヌクレオチドである。核酸の二重鎖またはハイブリッドの安定性は、ナトリウム含有緩衝剤が、ナト

50

リウムイオン濃度、および温度の関数 ( $T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% (G + C) - 600 / l)$ 、または類似する方程式) である  $T_m$  により決定されることを、当業者は認識するだろう。したがって、ハイブリッド安定性を決定する洗浄条件のパラメータは、ナトリウムイオン濃度および温度である。既知の核酸分子と類似するが、同一ではない分子を識別するために、1% のミスマッチは、 $T_m$  において約1 の減少をもたらすと想定され得る。例えば、>95% 同一性を有する核酸分子が求められる場合、最終洗浄温度を約5 減少させる。これらの判断に基づき、当業者は、適切なハイブリッド形成条件を容易に選択することができるだろう。好ましい実施形態において、厳密なハイブリッド形成条件が選択される。例として、厳密なハイブリッド形成を実現するために、以下の条件を利用する：上の方程式に基づき、5×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) / 5×デンハート溶液 / 1.0% のSDS で、 $T_m - 5$  でハイブリッド形成した後、60 で0.2×のSSC / 0.1% のSDS で洗浄した。適度に厳密なハイブリッド形成条件は、42 で、3×SSCの洗浄ステップを含む。さらなる例として、「ハイブリッド形成される」配列は、非厳密性の条件下 (例えば、室温で、6×SSC、50%ホルムアルデヒド) で結合 (ハイブリッド形成) し、厳密性の低い条件下 (例えば、室温で2×SSC、より好ましくは、42 で2×SSC)、もしくは厳密性の高い条件下 (例えば、65 で2×SSC) (SSC = 0.15MのNaCl、0.015Mのクエン酸ナトリウム、pH7.2) で洗浄されるそれらの配列である。

10

#### 【0153】

しかしながら、同等の厳密性が、別の緩衝剤、塩類、および温度で実現され得ることを理解する。ハイブリッド形成条件に関するさらなるガイダンスは、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6、および Sambrookら, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol. 3において見出すことができる。

20

#### 【0154】

一般的に、厳密性の高い条件下でハイブリッド形成される配列が好ましく、またコードが縮退しなければ、厳密性の高い条件下でハイブリッド形成するであろう配列も好ましい。

30

#### 【0155】

他の好ましい実施形態において、3-17I、7-F17、12-C15、16-G5、17-C20、または24-G6等の、元の抗EpCAM抗体と比較して、強化された、または優れた特性を有する第2世代抗体を提供する。例えば、第2世代抗体は、異なる結合親和性または優れた速度定数 (例えば、オン率および/またはオフ率)、優れた交差反応プロファイル、腫瘍細胞を標的とする優れた能力、例えば、改善されたADCCもしくはCDCを誘発する能力、またはin vivoにおける改善された腫瘍の治療、または高産生レベルを有する可能性がある。

#### 【0156】

有効な第2世代抗体を識別するための比較は、例えば、本明細書または当該分野においてに詳細に記載される種々のアッセイのうちの1つ以上を使用することにより、容易に実施され、定量化される。3-17I抗体 (または抗体7-F17、12-C15、16-G5、17-C20、または24-G6) により例示される、本発明の抗EpCAM抗体と比較して、強化された生物学的特性、または少なくとも約2倍、5倍、10倍、20倍、好ましくは少なくとも50倍の活性を有する第2世代抗体は、本発明により包含される。

40

#### 【0157】

本発明の抗体、結合タンパク質、および核酸分子は、ヒトもしくは動物の体内、またはヒトもしくは動物の身体に由来する組織試料内の原位置で存在し得る、任意のそのような構成要素と区別されるため、一般に、「単離された」または「精製された」分子である。しかしながら、配列は、ヒトもしくは動物の身体に認められる配列に対応するか、また

50

はそれに実質的に相同であり得る。よって、核酸分子または配列およびタンパク質またはポリペプチド、例えば、抗体に関して本明細書に使用される、「単離される」または「精製される」という用語は、それらの天然環境から単離される、精製される、または実質的に含まれない、例えば、ヒトもしくは動物の身体から単離される、または精製される（実際、天然に生じる場合）時の、そのような分子を指すか、または技術的プロセスより產生された時の、すなわち、組み換え、および合成により產生された分子を含む、そのような分子を指す。

【0158】

よって、核酸分子に関連して使用される時、そのような用語は、他の核酸／遺伝子、またはポリペプチド等と自然に会合する物質を実質的に含まない核酸を指す場合がある。これらの用語は、組み換えDNA技法により產生される時、細胞物質または培養培地を実質的に含まない、または科学的に合成される時、化学的な前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない核酸も指す場合がある。単離された、または精製された核酸は、核酸が由来する核酸を天然に隣接する配列（すなわち、核酸の5'端および3'端に位置する配列）、または例えば、遺伝子組み換えにより核酸を隣接するように作製された配列（例えば、タグ配列、または治療価値をもたない配列）を実質的に含まない場合もある。

10

【0159】

よって、軽鎖CDR1、2、および3、重鎖CDR1、2、および3、軽鎖可変領域、重鎖可変領域、ならびに完全長抗体を含む本発明の結合タンパク質もしくは抗体等の、タンパク質またはポリペプチド分子に関して使用される時、「単離された」または「精製された」という用語は、通常、それが由来する供給源からの細胞物質またはタンパク質を実質的に含まないタンパク質を指す。特に、タンパク質がヒトまたは動物に投与されるいくつかの実施形態において、そのような単離された、または精製されたタンパク質は、組み換え技法により產生された時の培養培地、または化学的に合成された時の化学的な前駆体もしくは化学物質を実質的に含まない。そのような単離された、または精製されたタンパク質は、単離された核酸分子について、上述のもの等の、隣接配列を含まない場合もある。

20

【0160】

本明細書に使用される、「核酸配列」または「核酸分子」という用語は、自然に生じる塩基、糖類、および糖間（骨格）連結から成る、ヌクレオシドまたはヌクレオチドのモノマーの配列を指す。本用語は、非天然モノマー、もしくはその一部を含む、修飾された、または置換された配列も含む。本発明の核酸配列は、デオキシリボ核酸配列（DNA）、またはリボ核酸配列（RNA）であり得、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン、およびウラシルを含む、自然に生じる塩基を含み得る。本配列は、修飾された塩基を含む場合もある。そのような修飾された塩基の例としては、アザおよびデアザのアデニン、グアニン、シトシン、チミジン、およびウラシル、ならびにキサンチンおよびハイポキサンチンを含む。核酸分子は、二重鎖または一本鎖であり得る。核酸分子は、完全に、もしくは部分的に、合成または組み換えであり得る。

30

【0161】

好ましい実施形態において、本発明の抗体は、ヒト抗体、より好ましくは完全ヒト抗体である。この点において、ヒト抗体は、一般に、ヒトの治療における使用において、少なくとも3つの潜在的な利点を有する。第1に、ヒト免疫系は、外来性として抗体を認識すべきではない。第2に、ヒト循環における半減期は、自然に生じるヒト抗体と類似し、用量の少ない、低頻度の投与を可能にする。第3に、エフェクタータンパク質がヒトであるため、例えば、補体依存性細胞障害（CDC）または抗体依存性細胞障害（ADCC）により、標的細胞をより効率的に破壊するために、ヒト免疫系の他の部分と良好に相互作用するだろう。

40

【0162】

しかしながら、ヒト抗体は、一般に、これらの利点を示すように認識されるが、それらを良好なヒト治療の候補になるように、十分に高い親和性および適切な特性を有するヒト抗体の開発は、決して容易ではないことは公知である。したがって、当該分野では、今で

50



も、安全かつ効果的なヒトの治療用の抗 E p C A M に欠いており、そのような製剤の開発に対する課題を伴う。

【 0 1 6 3 】

抗体分子および結合タンパク質に関連して本明細書に使用される、「ヒト」という用語は、第1に、ヒトレパートリーから単離された、もしくはそれに由来する、またはヒト、例えば、ヒト生殖系列もしくは体細胞に認められる配列に由来する、もしくはそれに対応する、可変領域（例えば、 $V_H$ 、 $V_L$ 、 $CDR$ 、または $FR$ 領域）、ならびに任意に、定常抗体領域を有する抗体および結合タンパク質を指す。3 - 17 I 抗体（および7 - F 17、12 - C 15、16 - G 5、17 - C 20、または24 - G 6抗体）は、可変領域がヒトレパートリーから単離された、そのようなヒト抗体分子の例である。

10

【 0 1 6 4 】

本発明の「ヒト」抗体および結合タンパク質は、ヒト配列によりコードされないアミノ酸残基、例えば、ランダムに導入された変異、または *in vitro* における部位特異的変異、例えば、*in vitro* クローン化またはPCRにより導入された変異を含む。そのような変異の特定の例は、少数の抗体または結合タンパク質の残基、例えば、最大5つ、例えば、5つ、4つ、3つ、2つ、もしくは1つの抗体または結合タンパク質の残基、好ましくは、例えば、最大5つ、例えば、抗体または結合タンパク質の $CDR$ のうちの1つ以上を構成する5つ、4つ、3つ、2つ、もしくは1つの残基において、保存置換または他の変異を含む変異である。そのような「ヒト」抗体の特定の例は、潜在的に免疫原性部位の量を減少させるために、標準的な修飾法に曝された抗体および可変領域を含む。

20

【 0 1 6 5 】

よって、本発明の「ヒト」抗体は、ヒトにおいて認められる配列に由来する、および関連する配列を含むが、これは、*in vivo* におけるヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然に存在しない可能性がある。加えて、本発明のヒト抗体および結合タンパク質は、ヒト配列から識別されるヒトコンセンサス配列、またはヒト配列に実質的に相同な配列を含むタンパク質を含む。

【 0 1 6 6 】

加えて、本発明のヒト抗体および結合タンパク質は、それら自身がヒト抗体分子において組み合わせで認められる $V_H$ 、 $V_L$ 、 $CDR$ 、または $FR$ 領域の組み合わせに限定されない。よって、本発明のヒト抗体および結合タンパク質は、ヒトにおいて必ずしも天然に存在しないそのような領域の組み合わせを含む、またはそれに対応することができる。

30

【 0 1 6 7 】

好ましい実施形態において、ヒト抗体は、完全ヒト抗体である。本明細書に使用される、「完全ヒト」抗体とは、実質的にヒト以外の抗体配列、または任意のヒト以外の抗体配列を含まずに、上に定義される「ヒト」可変領域ドメインおよび/または $CDR$ を含む抗体である。例えば、「実質的にヒト以外の抗体配列を含まない」ヒト可変領域ドメインおよび/または $CDR$ を含む抗体は、最大5つ、例えば、約5つ、4つ、3つ、2つ、または1つのアミノ酸が、ヒト抗体配列によってコードされないアミノ酸である、抗体、ドメイン、および/または $CDR$ である。よって、「完全ヒト」抗体は、「ヒト化」抗体と区別され、これは、特定のアミノ酸がヒト抗体に通常存在するアミノ酸とより良好に対応するように変更された、実質的にヒト以外の可変領域ドメイン、例えば、マウス可変領域ドメインに基づく。

40

【 0 1 6 8 】

本発明の「完全ヒト」抗体は、単一鎖抗体である等の、任意の他の実質的な抗体配列を含まない、ヒト可変領域ドメインおよび/または $CDR$ であり得る。代替的に、本発明の「完全ヒト」抗体は、1つ以上のヒト抗体定常領域と一体となる、またはそれに操作可能に結合される、ヒト可変領域ドメインおよび/または $CDR$ であり得る。特定の好ましい完全ヒト抗体は、IgG定常領域の完全補体を伴うIgG抗体である。

【 0 1 6 9 】

他の実施形態において、本発明の「ヒト」抗体は、一部がヒトのキメラ抗体である。本

50

明細書に記載される、「一部がヒトのキメラ」抗体とは、ヒト以外の種、例えばラットもしくはマウスの定常領域の全て、または一部に操作可能に結合される、またはその上にグラフトされる「ヒト」可変領域ドメインおよび／もしくはCDRを含む抗体である。そのような一部がヒトのキメラ抗体は、例えば、前臨床試験において使用される場合があり、定常領域は、好ましくは、前臨床検査において使用される動物と同じ種である。これらの一部がヒトのキメラ抗体は、例えば、*ex vivo*の診断においても使用され得、ヒト以外の種の定常領域は、抗体検出のためのさらなる選択股を提供する場合がある。

#### 【0170】

本明細書に使用される、「断片」という用語は、生物学的関連の断片、例えば、抗原結合に起因する、例えば、抗原結合部位の一部を形成する、および／またはEpCAM抗原の機能の阻害もしくは低下に起因する断片を指す。特定の好ましい断片は、本発明の抗体の重鎖可変領域( $V_H$ ドメイン)および／または軽鎖可変領域( $V_L$ ドメイン)を含む。他の好ましい断片は、本発明の抗体の重鎖CDRの(もしくは本発明の $V_H$ ドメインの)うちの1つ以上、または本発明の抗体の軽鎖CDRの(もしくは本発明の $V_L$ ドメインの)うちの1つ以上を含む。特定の好ましい断片は、長さが少なくとも5つのアミノ酸であり、少なくとも1つのCDR領域、好ましくはCDR3領域、より好ましくは重鎖CDR3領域を含む。

10

#### 【0171】

本発明の抗体が定義される配列のいずれかの断片を含む(例えば、配列番号21、36、49、62、75、または88の断片を含む)、例えば、本発明の $V_H$ および／もしくは $V_L$ ドメインを含む抗体である、または本発明の1つ以上のCDRを含む抗体もしくは結合タンパク質である本発明の実施形態において、これらの領域／ドメインは、一般に、各領域／ドメインがその生物学的機能を実施することができ、かつ抗原結合に寄与することが維持されるように、抗体または結合タンパク質内で分離される。よって、 $V_H$ および $V_L$ ドメインは、好ましくは、適切な足場配列／リンカー配列によって分離され、CDRは、好ましくは、自然に生じる抗体および／または有効な操作された抗体に認められるもの等の、適切なフレームワーク領域によって分離される。よって、本発明の $V_H$ 、 $V_L$ 、および個々のCDR配列は、好ましくは、抗原結合を可能にするように、適切なフレームワークまたは足場内に提供されるか、または組み込まれる。そのようなフレームワーク配列または領域は、適切な足場を形成するのに適切に、自然に生じるフレームワーク領域であるFR1、FR2、FR3、および／もしくはFR4に対応するか、または例えば、種々の自然に生じるフレームワーク領域を比較することによって識別されるコンセンサスフレームワーク領域に対応する場合がある。代替的に、非抗体足場またはフレームワーク、例えば、T細胞レセプターフレームワークを使用することができる。

20

30

#### 【0172】

フレームワーク領域に使用することができる適切な配列は、当該分野において周知であり、十分に説明されており、これらのいずれかを使用することができる。フレームワーク領域に好ましい配列は、本発明の $V_H$ および／または $V_L$ ドメインを構成するフレームワーク領域のうちの1つ以上(すなわち、1、2、3、または4)、すなわち、配列番号21、36、49、62、75、もしくは88、または表1~6に開示されるフレームワーク領域、またはそれらに実質的に相同なフレームワーク領域のうちの1つ以上、特に、抗原特異性の保持を可能にするフレームワーク領域、例えば、実質的に同じ、または同じ3D構造の抗体をもたらすフレームワーク領域である。特定の好ましい実施形態において、必要に応じて、可変軽鎖(配列番号15、16、17、および18)および／または可変重鎖(配列番号11、12、13、および14)の4つ全て、配列番号21(表1にも示される)のFR領域、またはそれらに実質的に相同なFR領域は、本発明の抗体に認められる。可変軽鎖フレームワーク領域の他の好ましい組み合わせは、表2~6に示される。

40

#### 【0173】

加えて、本発明の好ましい抗体は、本発明の $V_H$ 、 $V_L$ 、またはCDRから構成されるが、本発明の抗体は、本明細書に概説される本発明の抗体のEpCAM結合特性または抗E

50

p C A M特性がまだ存在するならば、本発明ではない他の $V_H$ 、 $V_L$ 、またはC D Rと組み合わせて、本発明の1つ以上の $V_H$ 、 $V_L$ 、またはC D Rも包含することに留意するべきである。

【0174】

本明細書に使用される、「重鎖相補性決定領域」(「重鎖C D R」)という用語は、抗体分子の重鎖可変領域( $V_H$ ドメイン)内の超可変性の領域を指す。重鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端までの重鎖C D R1、重鎖C D R2、および重鎖C D R3と称される、3つのC D Rを有する。重鎖可変領域は、4つのフレームワーク領域(アミノ末端からカルボキシ末端までのF R1、F R2、F R3、およびF R4)も有する。これらのフレームワーク領域は、C D Rを分離する。

10

【0175】

本明細書に使用される、「重鎖可変領域」( $V_H$ ドメイン)という用語は、抗体分子の重鎖の可変領域を指す。

【0176】

本明細書に使用される、「軽鎖相補性決定領域」(「軽鎖C D R」)という用語は、抗体分子の軽鎖可変領域( $V_L$ ドメイン)内の超可変性の領域を指す。軽鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端までの軽鎖C D R1、軽鎖C D R2、および軽鎖C D R3と称される、3つのC D Rを有する。軽鎖可変領域は、4つのフレームワーク領域(アミノ末端からカルボキシ末端までのF R1、F R2、F R3、およびF R4)も有する。これらのフレームワーク領域は、C D Rを分離する。

20

【0177】

本明細書に使用される、「軽鎖可変領域」( $V_L$ ドメイン)という用語は、抗体分子の軽鎖の可変領域を指す。

【0178】

C D Rの位置を定義するために、必要に応じて、本明細書は、K a b a t命名法に従うことに留意するべきである(K a b a tら、1991、具体的に、参照により本明細書に組み込まれる)。

【0179】

当業者は、軽鎖および重鎖C D R、軽鎖および重鎖の可変領域、抗体、抗体断片、ならびに免疫抱合体等の、本発明のタンパク質およびポリペプチドが、当該分野において周知の、十分に説明されるいくつかの方式のいずれかにより調製され得るが、最も好ましくは組み換え法を使用して調製されることを理解するだろう。

30

【0180】

本発明の抗体の軽鎖および重鎖の可変領域をコードする核酸断片は、適切な方法、例えば、クローン化、または合成によって得られるか、またはそれによって産生され得る。そのような配列は、例えば、当該分野において周知の、十分に説明された方法を使用して、例えば、ヒト生殖細胞遺伝子からの適切な配列をクローン化した後、生殖細胞配列に任意の必要な修飾を行い、本発明の配列を得ることにより、調製することができる。この完全配列は、次いで、さらなるクローン化および操作、例えば、適切な発現ベクターの中にクローン化するための、適切な制限部位を含有するプライマーを用いて、P C Rにより増幅することができる。1つの可変領域につき5~7の重複プライマーが、通常、十分であり、これによって、この技法を非常に効率的で正確なものにする。

40

【0181】

本発明の抗体の軽鎖および重鎖可変領域をコードする核酸断片が得られたら、これらの断片は、例えば、可変領域断片を、適切な定常領域ドメインを有する完全長抗体分子に、または例えば、F a b断片、s c F v断片等の、本明細書の別の箇所に記載される抗体断片の特定の形式に変換するために、標準的な組み換えD N A法によりさらに操作することができる。通常、またはこのさらなる操作手順の一部として、本発明の抗体分子をコードする核酸断片は、一般に、本発明の抗体の産生を促進するために、適切な発現ベクターの中に組み込まれる。

50

## 【0182】

可能な発現ベクターは、ベクターが使用される宿主細胞に適合するならば、コスミド、プラスミド、または修飾されたウイルス（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルス）を含むが、これらに限定されない。発現ベクターが「宿主細胞の形質転換に適切」であるとは、発現ベクターが、本発明の核酸分子、および核酸分子に操作可能に連結される、発現のために使用される宿主細胞に基づき選択された制御配列を含むことを意味する。操作可能に連結とは、核酸が核酸の発現を可能にする様式で、制御配列に連結されることを意味することが意図される。

## 【0183】

本発明は、したがって、本発明の核酸分子、またはその断片、および本発明の核酸分子によりコードされるタンパク質配列の転写および翻訳に必要な制御配列を含有する、組み換え発現ベクターに関する。

10

## 【0184】

適切な制御配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳類、または昆虫の遺伝子を含む、種々の供給源に由来し得る（例えば、Goeddel, 1990に記載される制御配列を参照）。適切な制御配列の選択は、以下に記載されるように選択される宿主細胞に依存し、当業者によって、容易に達成され得る。そのような制御配列の例としては、翻訳開始シグナルを含む、転写プロモーターおよびエンハンサーまたはRNAポリメラーゼ結合配列、リボソーム結合配列が挙げられる。加えて、選択される宿主細胞、および利用されるベクターにより、複製元、さらなるDNA制限部位、エンハンサー、および転写の誘導能を付与する配列等の、他の配列が発現ベクターの中に組み込まれ得る。

20

## 【0185】

本発明の組み換え発現ベクターは、本発明の組み換え分子を用いて形質転換または形質移入された、宿主細胞の選択を促進する選択マーカー遺伝子も含有する場合がある。選択マーカー遺伝子の例は、特定の薬物に耐性を付与するネオマイシンおよびハイグロマイシン、 $\beta$ -ガラクトシターゼ、クロラムフェニコロールアセチルトランスフェラーゼ、ホタルのルシフェラーゼ、または好ましくはIgGのFc部等の免疫グロブリンもしくはその一部等の、タンパク質をコードする遺伝子である。選択マーカー遺伝子の転写は、 $\beta$ -ガラクトシターゼ、クロラムフェニコロールアセチルトランスフェラーゼ、またはホタルのルシフェラーゼ等の、選択マーカータンパク質の濃度の変化により監視される。選択マーカー遺伝子がネオマイシン等の抗生物質耐性を付与するタンパク質をコードする場合、形質転換細胞は、G418を用いて選択することができる。選択マーカー遺伝子を組み込まれた細胞は生存し、一方、他の細胞は死滅する。これは、本発明の組み換え発現ベクターの発現の可視化する、およびアッセイする、特に、発現および表現型の変異の作用を決定することを可能にする。選択マーカーは、関心の核酸とは別のベクター上に導入することができることを理解するだろう。

30

## 【0186】

組み換え発現ベクターは、組み換えタンパク質の発現の増加、組み換えタンパク質の溶解性の増加を提供し、親和性精製におけるリガンドとして作用する（例えば、精製および/または識別を可能にする適切な「タグ」、例えば、Hisタグもしくはmycタグが存在し得る）ことにより、標的組み換えタンパク質の精製に役立つ融合部分をコードする遺伝子も含有する場合がある。例えば、タンパク質分解性切断部位は、標的組み換えタンパク質に付加され、融合タンパク質の精製後、融合部分からの組み換えタンパク質の分離を可能にする。典型的な融合発現ベクターは、それぞれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを組み換えタンパク質に融合する、pGEX（Amrad Corp., Melbourne, Australia）、pMal（New England Biolabs, Beverly, MA）、およびpRIT5（Pharmacia, Piscataway, NJ）を含む。

40

## 【0187】

組み換え発現ベクターは、宿主細胞に導入され、形質転換された宿主細胞を産生するこ

50

とができる。「～で形質転換された」、「～を形質移入された」、「形質転換」、および「形質移入」という用語は、当該分野における多くの可能な技法のうちの1つにより、核酸（例えばベクター）の細胞への導入を包含することが意図される。本明細書に使用される、「形質転換された宿主細胞」という用語は、本発明の組み換え発現ベクターで形質転換されたグリコシル化ができる細胞も含むことが意図される。原核生物細胞は、例えば、エレクトロポレーションまたはカルシウム - 塩化物媒介形質転換により、核酸で形質転換することができる。例えば、核酸は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈法、DEAE - デキストラン媒介形質移入、リポフェクション法、エレクトロポレーション、または微量注入法等の、従来の技法を介して、哺乳類細胞に導入することができる。形質転換および形質移入宿主細胞に適切な方法は、Sambrookら、1989、および他の研究教本に見出すことができる。

10

#### 【0188】

適切な宿主細胞は、広範な真核生物宿主細胞および原核生物細胞を含む。例えば、本発明のタンパク質は、酵母細胞または哺乳類細胞において発現させることができる。他の適切な宿主細胞は、Goeddel, 1990に見出すことができる。加えて、本発明のタンパク質は、大腸菌等の原核生物細胞において発現させることができる（Zhangら、2004）。

#### 【0189】

本発明を実行するのに適切な酵母および真菌宿主細胞は、出芽酵母、ピキア属もしくはクリベロマイセス、および種々の種類のコウジカビ属を含むが、これらに限定されない。酵母である出芽酵母で発現させるためのベクターの例としては、YepSec1（Baldariら、1987）、pMFa（Kurjan and Herskowitz, 1982）、pJRY88（Schultzら、1987）、およびpYES2（Invitrogen Corporation, San Diego, CA）が挙げられる。酵母および真菌の形質転換のプロトコルは、当業者に周知である（Hinnenら、1978、Itoら、1983、およびCullenら1987を参照）。

20

#### 【0190】

本発明を実行するのに適した哺乳類細胞は、特に、COS（例えば、ATCC No. CRL1650または1651）、BHK（例えば、ATCC No. CRL6281）、CHO（ATCC No. CCL61）、HeLa（例えば、ATCC No. CCL2）、293（ATCC No. 1573）、NS-1細胞、NS0（ATCC CRL-11177）、HEK-293（ヒト腎臓、ATCC番号CRL-11268）、およびPer.C6（登録商標）（Crucell, Leiden, Netherlandsを含む。哺乳類細胞において発現を導くための適切な発現ベクターは、プロモーター（例えば、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびサルウイルス40等のウイルス性物質に由来する）、ならびに他の転写および翻訳制御配列を含む。哺乳類発現ベクターの例としては、pCDM8（Seed, B., 1987）およびpMT2PC（Kaufmanら、1987）が挙げられる。

30

#### 【0191】

本明細書に提供される教示を考えると、プロモーター、ターミネーター、および適切な型の発現ベクターを、植物、鳥類、および昆虫細胞に導入するための方法も、容易に達成することができる。例えば、一実施形態内で、本発明のタンパク質は、植物細胞から発現され得る（アグロバクテリウムリゾゲネスベクターの使用を概説するSinkarら、1987を参照、また特にPAPS2022、PAPS2023、およびPAPS2034を含む、植物細胞の発現ベクターの使用を説明するZambryskiら、1984も参照）。

40

#### 【0192】

本発明を実行するための適切な昆虫細胞は、カイコ、イラクサギンウワバ、またはスボドプテラ種からの細胞および細胞株を含む。培養された昆虫細胞（SF9細胞）におけるタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターは、pAcシリーズ（Smithら、1983）およびpVLシリーズ（Luckow and Summers 1989）を含む。本発明の組み換えタンパク質の発現に適切ないくつかのバキュロウイルス - 昆虫細胞

50

発現系は、P C T / U S / 02442に記載される。

【0193】

代替的に、本発明のタンパク質は、ラット、ウサギ、ヒツジ、およびブタ等のヒト以外の遺伝子導入動物において発現させることもできる（Hammerら、1985、Palmiterら、1983、Brinsterら、1985、Palmiter and Brinster 1985、および米国特許第4,736,866号）。

【0194】

本発明のタンパク質は、固相合成法（Merrifield（1964）、Frischeら、1996）または均一溶液中での合成（Houbenweyl, 1987）等のタンパク質の化学において周知の技法を使用して、化学合成により調製もされ得る。

10

【0195】

タンパク質等の他の分子に抱合される本発明の抗体およびタンパク質を含む、N末端またはC末端融合タンパク質は、組み換え技法による融合によって調製することができる。得られた融合タンパク質は、本明細書に記載される選択されたタンパク質、もしくはマーカータンパク質、またはタグタンパク質に融合された本発明の抗体、またはタンパク質を含有する。本発明の抗体およびタンパク質は、公知の技法により、他のタンパク質にも抱合され得る。例えば、タンパク質は、第WO90/10457号に記載される、ヘテロ二機能性チオール含有リンカー、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリドイルジチオ-プロピオン酸塩)またはN-スクシンイミジル-5チオ酢酸塩を使用して結合され得る。融合タンパク質または抱合体を調製するために使用され得るタンパク質の例としては、免疫グロブリン、ホルモン、成長因子、レクチン、インスリン、低密度リポタンパク質、グルカゴン、エンドルフィン、トランスフェリン、ボンベシン、アシアロ糖タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、赤血球凝集素（HA）、および切断型mycが挙げられる。

20

【0196】

第1の抗EpCAM抗体核酸セグメントの調製様式に関係なく、さらなる適切な抗体核酸セグメントは、標準的な分子生物学技法により容易に調製され得る。任意の変種、変異体、または第2世代抗EpCAM抗体核酸セグメントが本発明の使用に適切であることを確認するために、核酸セグメントは、本発明に従う抗EpCAM抗体の発現を確認するために試験される。好ましくは、変種、変異体、または第2世代核酸セグメントは、標準的なハイブリッド形成条件下、より好ましくは標準的な厳密なハイブリッド形成条件下で、ハイブリッド形成を確認するためにも試験されるだろう。例示的な適切なハイブリッド形成条件は、約50℃で、約7%のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、約0.5MのNaPO<sub>4</sub>、約1mMのEDTAでのハイブリッド形成、および約42℃で、約1%のSDSでの洗浄を含む。

30

【0197】

種々の抗体は容易に調製され得るが、本発明の治療方法は、患者において、治療有効量の本発明の少なくとも第1の抗EpCAM抗体を発現する、少なくとも第1の核酸セグメントまたは分子を動物または患者に提供することにより行うことができる「抗EpCAM抗体を発現する核酸セグメントまたは分子」は、一般に、少なくとも発現構築物または発現ベクターの形態であり、ウイルス内、もしくは組み換え宿主細胞内に含まれる発現構築物または発現ベクターの形態であり得る。本発明の好ましい遺伝子療法ベクターは、一般に、組み換えレトロウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、アデノウイルス、アデノ会合ウイルス（AAV）、サイトメガロウイルス（CMV）等内に含まれる等の、ウイルスベクターである。

40

【0198】

またさらなる態様は、本発明の核酸セグメントまたは分子のうちの1つ以上を含む、発現構築物もしくは発現ベクターを提供する。好ましくは、発現構築物または発現ベクターは、組み換え体である。好ましくは、上記構築物またはベクターは、本発明の核酸分子によりコードされるタンパク質配列の転写および翻訳に必要な制御配列をさらに含む。

50

## 【0199】

またさらなる態様は、本発明の1つ以上の発現構築物または発現ベクターを含む、宿主細胞またはウイルスを提供する。本発明の核酸分子のうちの1つ以上を含む、宿主細胞またはウイルスも提供する。本発明の抗体を発現する宿主細胞またはウイルスは、またさらなる態様を形成する。

## 【0200】

本発明のまたさらなる態様は、本発明の宿主細胞を培養するステップを含む、本発明の抗体を産生する方法を提供する。好ましい方法は、(i)コードされた抗体またはタンパク質の発現に適した条件下で、組み換え発現ベクターのうちの1つ以上、または本発明の核酸配列のうちの1つ以上を含む宿主細胞を培養する、および任意に、(ii)宿主細胞から、または成長培地/上澄みから、抗体もしくはタンパク質を単離する、または得るステップを含む。そのような産生方法は、抗体もしくはタンパク質産物の精製、および/または抗体もしくは産物を、薬学的に許容される担体もしくは賦形剤等の、少なくとも1つのさらなる組成物を含む組成物に製剤化するステップも含む場合がある。

## 【0201】

本発明の抗体またはタンパク質が2つ以上のポリペプチド鎖(例えば、Fab断片等の特定の断片)で構成される時の実施形態において、全てのポリペプチドは、好ましくは、同じ、または異なる発現ベクターのいずれかから宿主細胞中に発現し、そのため、完全タンパク質、例えば、本発明の結合タンパク質は、宿主細胞中で構築され、そこから単離または精製され得る。

## 【0202】

本発明の抗体は、EpCAMに結合するさらなる抗体を産生するためにも使用され得る。そのような使用は、例えば、新しい抗体を形成するために、親抗体のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、置換、または挿入を含み、上記親抗体は、本明細書の別の箇所で定義される本発明の抗体のうちの1つであり、得られた新しい抗体を試験して、EpCAMに結合する抗体を識別する。そのような方法は、全てがEpCAMに結合するそれらの能力について試験され得る、複数の新しい抗体を形成するために使用することができる。好ましくは、1つ以上のアミノ酸の上記付加、欠失、置換、または挿入は、CDRドメインのうちの1つ以上で起こる。

## 【0203】

親抗体に対するそのような修飾または変異は、当該分野において周知の、十分に説明された技法を使用する任意の適切な様式で、例えば、ランダムもしくは定方向変異誘発の方法を実行することにより実行することができる。定方向変異誘発が使用される場合、変異誘発に適切な残基を識別するための戦略の1つは、結合タンパク質-抗原複合体、例えば、Ab-Ag複合体の結晶構造の分解能を利用して、抗原結合に関与する主な残基を識別する(Davies and Cohen, 1996)。続いて、これらの残基は、相互作用を強化するために変異され得る。代替的に、1つ以上のアミノ酸残基は、単純に、定方向変異誘発、および評価されるEpCAMへの結合に対する作用の標的とされ得る。

## 【0204】

ランダム変異誘発は、例えば、エラープローンPCR、鎖混合、または変異誘発物である大腸菌株による等の、任意の適切な方式で実行され得る。

## 【0205】

よって、本発明のV<sub>H</sub>ドメインの1つ以上は、任意の適切な供給源からの単一V<sub>L</sub>ドメインまたはV<sub>L</sub>ドメインのレパートリーと組み合わせられ、得られた新しい抗体は、EpCAMに特異的である抗体を識別するために試験され得る。逆に、本発明のV<sub>L</sub>ドメインの1つ以上は、任意の適切な供給源からの単一V<sub>H</sub>ドメインまたはV<sub>H</sub>ドメインのレパートリーと組み合わせられ、得られた新しい抗体は、EpCAMに結合する抗体を識別するために試験され得る。

## 【0206】

同様に、本発明のV<sub>H</sub>および/もしくはV<sub>L</sub>ドメインのうちの1つ以上、または好ましく

は、3つ全てのCDRは、必要に応じて、単一V<sub>H</sub>および/もしくはV<sub>L</sub>ドメイン、またはV<sub>H</sub>および/もしくはV<sub>L</sub>ドメインのレパートリーの中にグラフトされ、得られた新しい抗体は、EpCAMに結合する抗体を識別するために試験され得る。

#### 【0207】

軽鎖および/または重鎖のCDR、特にCDR3の標的変異は、抗体の親和性を増加するのに有効な技法であることが示され、好ましい。好ましくは、CDR3の3~4つのアミノ酸のブロック、または「ホットスポット」と呼ばれる特定の領域が、変異誘発の標的とされる。

#### 【0208】

「ホットスポット」は、体細胞超変異が*in vivo*（および以下Neuberger and Milstein, 1995）で起こる配列である。ホットスポット配列は、特定のコドンにおいてコンセンサヌクレオチド配列として定義され得る。コンセンサス配列は、テラヌクレオチド、RGYWであり、Rは、AもしくはGのいずれかであり得、Yは、CもしくはTであり得、Wは、AもしくはTのいずれかであり得る（Neuberger and Milstein, 1995）。加えて、ヌクレオチドAGYによりコードされるセリン残基は、潜在的なホットスポット配列に対応するTCNによりコードされるものに対して、可変ドメインのCDR領域に優性に存在する（Wagnerら, 1995）。

#### 【0209】

よって、本発明の各抗体の重鎖および軽鎖のCDRのヌクレオチド配列は、ホットスポット配列およびAGYコドンの存在についてスキャンされ得る。次いで、軽鎖および重鎖のCDR領域の識別されたホットスポットは、任意に、International ImmunoGenetics データベース（IMGT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>）を使用して、重鎖および軽鎖の胚の配列と比較される（Daviesら, 1990）。生殖系列と一致する配列は、体細胞変異が起こらなかったことを示し、よって、*in vivo*で生じる体細胞事象を模倣するランダム変異が導入され得るか、または代替的に、部位特異的変異誘発が、例えば、ホットスポットおよび/またはAGYコドンで実行され得る。逆に、異なる配列は、いくつかの体細胞変異が既に起こったことを示す。*in vivo*での体細胞変異が最適であったかどうかは未定である。

#### 【0210】

変異に好ましいホットスポットは、露出アミノ酸をコードするもの、および好ましくは、抗原結合部位の一部を形成するアミノ酸をコードするものである。他の変異に好ましいホットスポットは、非保存アミノ酸をコードするものである。CDR内に埋没された、または保存されたアミノ酸をコードするホットスポットは、好ましくは、変異誘発されない。これらの残基は、通常、全体的な構造に重要であり、これらは埋没されているため、抗原と相互作用する可能性は低い。

#### 【0211】

アミノ酸およびタンパク質ドメインの上述の操作を実行する方法は、当業者に周知である。例えば、上記操作は、得られる発現したタンパク質のアミノ酸配列が同時に適切な方式で修飾されるように、適切な結合タンパク質およびそのドメインをコードする核酸分子が修飾される核酸レベルで、遺伝子組み換えにより都合よく実行することができる。

#### 【0212】

これらの方法により産生された新しい抗体は、好ましくは、改善された機能特性、例えば、親抗体よりEpCAMに対して高い、または強化された親和性（または少なくとも同等の親和性）を有し、本明細書の別の箇所に記載される、本明細書の抗体と同じ方式で処理され、使用され得る（たとえば、組成物等における治療、診断）。代替的に、または加えて、新しい抗体は、本明細書の別の箇所に記載される、1つ以上の他の改善された機能特性を有する。

#### 【0213】

これらの方法により産生された、得られた、または得ることができる新しい抗体は、本

10

20

30

40

50



発明のまたさらなる態様を形成する。

【0214】

E p C A Mに結合する1つ以上の抗体の能力を試験することは、任意の適切な方法により実行することができ、これは当該分野において周知であり、十分に説明されている。E p C A M試料、例えば、種々の種からの組み換えE p C A Mは、商業的に入手可能（例えば、R & D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA）であるか、または当該分野において入手可能なE p C A M分子の配列情報（実施例を参照）から容易に生成することができ、これらは、例えば、E L I S A、B I A c o r e等の従来の方法により、結合をアッセイするために容易に使用することができ、これは、例えば、E p C A Mが固体支持体に結合され、抗体のそれに結合する能力が標準的な技法により測定される。代替的に、E p C A Mへの結合は、ウェスタンブロット法により評価することができる。E p C A Mの細胞外ドメインを含むE p C A M試料は、理想的には、これらの目的のために使用される。

10

【0215】

代替的に、高レベルのE p C A Mを発現する（例えば、K a t o I I I等の胃癌株、M T - 3、B T 474、M D A - M B - 453、およびM D A - M B - 231等の乳癌細胞株）、または高レベルのE p C A Mを発現するように操作された細胞は、例えば、フローサイトメトリーまたはI H Cを使用して、E p C A Mに結合する抗体について評価するために使用することができる。

【0216】

適切なE L I S A、ウェスタンブロット法、およびB I A c o r eアッセイは、実施例において説明される。アッセイにおいて、抗体のE p C A M、例えば、特定の種のE p C A Mに結合する能力は、一般に、適切な対照、例えば、E p C A Mに結合しない抗体と比較して、E p C A Mへの測定可能な、そして好ましくは有意な結合を示す抗体の能力を指す。E p C A M、例えば、特定の種のE p C A Mに結合しないと考えられる抗体において、一般に、そのような抗体は、例えば、適切な対照、例えば、E p C A Mに結合しない抗体より測定不可能な、または有意に高くない、または異ならないレベルでの、E p C A Mへの有意でない、または検出不可能な、または測定不可能な結合を示す。

20

【0217】

本明細書に言及される任意の統計的分析において、好ましくは、適切な対照に対する統計的に有意な相違は、 $<0.1$ 、好ましくは $<0.05$ 、より好ましくは $<0.01$ の確率値を有する。統計的有意性を決定するための適切な方法は、当該分野において周知であり、十分に説明されており、これらのいずれかを使用することができる。

30

【0218】

本発明は、本発明の少なくとも1つの抗体、または抗体断片を含む組成物をさらに提供し、任意に、希釈剤を含む。そのような組成物は、薬学的に許容される組成物、または研究試験において使用するための組成物であり得る。薬学的組成物に関して、これらは、好ましくは、静脈内投与、またはさらに皮下投与等の、非経口投与用に製剤化され得る。

【0219】

本発明は、数多くの、本発明のヒト抗体、および抗体断片の方法および使用を提供する。全ての方法に関して、「a」および「an」という用語は、特に記載のない限り、記載される方法において、「少なくとも1つ」、「少なくとも第1」、「1つ以上」、または「複数」のステップを意味するように使用される。これは、治療方法における投与ステップに特に適切である。よって、異なる用量が本発明に利用されるだけでなく、異なる数の用量、例えば、注入は、最大複数注入まで使用することができ、それを含む。併用療法は、抗E p C A M治療抗体の投与前、その投与後、またはその投与中に使用、投与され得る。

40

【0220】

重要な生物学的意味合いを有する、本発明の抗体または免疫複合体の種々の有用な i n v i t r oにおける方法および使用を提供する。第1に、E p C A Mを含む（またはE p C A Mを含むと思われる）組成物を、本発明の少なくとも第1の抗E p C A M抗体、ま

50

たはその抗原結合断片と効果的に接触させることを一般に含む、E p C A Mに結合する方法、および使用を提供する。本発明の抗体、またはその免疫抱合体は、よって、結合アッセイに使用することができる。よって、適切に有用な結合アッセイは、免疫プロット法、ウェスタンプロット法、ドットプロット法、R I A、E L I S A、免疫組織化学法、蛍光活性化組織分類法 ( F A C S )、免疫沈降法、親和性クロマトグラフィー等の、当該分野において通常利用されるものを含む。

【 0 2 2 1 】

E p C A M / 抗体複合体の形成を可能にし、そのように形成された複合体を検出するのに効果的な条件下で、E p C A Mを含有すると思われる組成物を、本発明の少なくとも第1の抗体、または免疫抱合体、またはその抗原結合断片と接触させることを一般に含む、E p C A Mを検出する方法、およびそれにおける使用を提供する。生物学的試料に関連して、例えば、腫瘍の診断、およびそれに基づく診断キットに使用され得る検出方法および使用も提供する。

10

【 0 2 2 2 】

本発明の方法および使用は、特に、E p C A Mに関連する任意の疾患もしくは状態、またはE p C A Mが生物学的役割、例えば、E p C A Mの存在もしくは過剰発現、または例えば、E p C A M活性の阻害が有利であるかもしれない、E p C A Mの異常な活性に関連する疾患を有する、もしくはそれを発症する恐れのある動物および患者に使用することが意図される。好ましい例は、癌もしくは細胞癌、好ましくは、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、卵巣癌、膀胱癌、胆嚢癌、膵臓癌、肺癌、胃組織もしくは内臓 (例えば、胃、食道) 癌、肝臓癌 (例えば、肝細胞癌)、腎臓癌 (例えば、腎細胞癌)、皮膚新生物、頭頸部癌 ( 膠腫 )、唇癌、口癌、膣癌および子宮頸部癌から成る群より選択される1つ以上の癌もしくは細胞癌である。本明細書において、「腫瘍」への任意の言及は、「癌」または「細胞癌」も指す。原発腫瘍からの転移を減少させることができるため、転移性癌も治療することができる。特に、術後に患者に残った、いわゆる微小残存病変 ( M R D ) は、抗 E p C A M抗体を用いた免疫治療に適している。

20

【 0 2 2 3 】

検出可能なレベル、好ましくは高度に検出可能なレベルのE p C A M発現を示す腫瘍を有する患者は、本発明の抗 E p C A M抗体を用いた治療に特に適切である可能性がある。加えて、非常に高レベルのH e r - 2を発現しない、よって、ハーセプチン療法の理想的な候補ではない腫瘍を有する患者は、そのような抗 E p C A M療法に特に適している場合がある。腫瘍は、当該分野において周知の適切な方法により、発現レベルについて試験され得る。

30

【 0 2 2 4 】

よって、本発明は、そのような疾患を有する動物、または患者に治療有効量の本発明の抗 E p C A M抗体、またはそのような抗 E p C A M抗体の抗原結合断片もしくは免疫抱合体を投与することを含む、上に定義される疾患を治療する方法、およびそれにおける使用をさらに提供する。

【 0 2 2 5 】

本発明のまたさらなる態様は、治療法、撮像、および診断に使用するための組成物、または薬剤の製造における、本発明の抗体、またはそのような抗体の抗原結合断片もしくは免疫抱合体の使用を提供する。

40

【 0 2 2 6 】

またさらなる態様は、療法、診断、または撮像において使用するための、本発明の抗体、またはそのような抗体の抗原結合断片もしくは免疫抱合体を提供する。

【 0 2 2 7 】

加えて、本発明は、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤、担体、希釈剤、緩衝剤、または安定剤を有する、本発明の抗体、またはそのような抗体の抗原結合断片もしくは免疫抱合体を含む組成物を提供する。

【 0 2 2 8 】

50

本明細書に記載される *in vivo* における方法は、一般に、哺乳類において実行される。例えば、ヒト、および任意の家畜、飼育、または研究室動物の、任意の哺乳類を治療することが可能である。特定の例としては、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウシ、およびサルが挙げられる。しかしながら、好ましくは、哺乳類はヒトである。

【0229】

よって、本明細書に使用される、「動物」または「患者」という用語は、例えば、ヒトおよび任意の家畜、飼育、または研究室動物の、任意の哺乳類を含む。特定の例としては、マウス、ラット、ブタ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウサギ、ウシ、およびサルが挙げられる。しかしながら、好ましくは、動物または患者は、ヒト対象である。

10

【0230】

本発明は、非抱合型または裸抗体およびその断片を使用する抗癌方法、ならびに本発明の抗体またはその抗原結合断片が治療剤または診断剤に操作可能に結合される、免疫抱合体を使用する癌標的方法の双方を関連付ける。特に記載のない限り、または科学的用語により明確にされない限り、本明細書に使用される、「抗体およびその断片」という用語は、したがって、「非抱合型もしくは裸」抗体または断片を意味し、これは、別の製剤、特に治療剤または診断剤に結合されない。これらの定義は、単に例として、抗体の生物学的な半減期、親和性、または他の特性を改善するような修飾、または抗体と他のエフェクターとの組み合わせ等の、抗体の修飾を排除しない。

20

【0231】

本発明の抗癌治療方法および使用は、非抱合型もしくは裸抗体および免疫抱合体の双方の使用も包含する。免疫抱合体ベースの抗癌治療方法において、本発明の抗体、またはその抗原結合断片は、好ましくは、第2の抗癌剤（抗 E p C A M 抗体自体、第1の抗癌剤である）に操作可能に結合される。結合された抗癌剤は、直接的または間接的に抗癌作用を有するものであり得る。

【0232】

前述の治療方法および使用は、一般に、薬理学的に有効な組成物の動物または患者への、経皮的、筋肉内、静脈内注射等の全身的投与を含む。しかしながら、治療剤が腫瘍部位または複数の部位に局在化される、任意の投与形態が容認される。したがって、他の適切な送達経路は、経口、鼻腔、または呼吸および局所を含む。

30

【0233】

本明細書に使用される、「投与」とは、療法、例えば、抗腫瘍作用を及ぼすのに効果的な量および時間期間での、抗 E p C A M 抗体療法の提供または送達を意味する。タンパク質様治療法の受動的投与は、ある程度、その単純性および再現性のため、一般に、好ましい。

【0234】

しかしながら、本明細書において、「投与」という用語は、本発明の抗 E p C A M 抗体が腫瘍に送達されるか、または提供される任意の、および全ての手段を指すのに使用される。したがって、「投与」は、腫瘍への送達をもたらすの効果的な様式で、本発明の抗 E p C A M 抗体を産生する細胞の提供を含む。そのような実施形態において、選択的透過膜、構造、または埋め込み型デバイス、一般に、療法を中止するために除去できるものに、細胞を製剤化またはパッケージすることが望ましい。これは、用量を密接に監視し、制御することができる非侵襲性方法を意味するため、本発明の外來性抗 E p C A M 抗体は、それでも一般に、好ましい。

40

【0235】

本発明の治療方法および使用は、腫瘍の近くでのそれらの発現、または腫瘍へのそれらの局在化をもたらすのに効果的な様式で、本発明の抗 E p C A M 抗体をコードする核酸の提供にも及ぶ。患者の細胞の *ex vivo* 操作を含む、裸 D N A 送達、組み換え遺伝子およびベクター、細胞ベースの送達等の、任意の遺伝子療法の技法を利用することができる。

50

## 【0236】

本発明の抗 E p C A M 抗体は、腫瘍に他の治療剤または診断剤を送達するために使用することもできる。そのような実施形態において、他の治療剤または診断剤は、一般に、本発明の抗 E p C A M 抗体に操作可能に結合される。

## 【0237】

本明細書に使用される、「療法」または「治療」という用語は、予防的療法を含み、これは、疾患の防止をもたらす場合がある。「療法」および「治療」という用語は、疾患との戦いまたはその治癒を含むが、疾患またはそれに関連する徴候のうちの1つ以上を制御する、減少させる、または軽減することを含む。本発明の抗体は、例えば、E p C A M レベルが変更される疾患における予測用途にも使用され得る。よって、本発明の抗体は、癌を予知するために使用することができる。

10

## 【0238】

本発明に使用される「治療有効量」とは、動物または患者に投与した時、腫瘍細胞の少なくとも一部を特異的に殺滅させる、腫瘍細胞の少なくとも一部においてアポトーシスを特異的に誘発する、腫瘍の少なくとも一部において壊死を特異的に誘発する、および/または腫瘍の退縮もしくは寛解を誘発するのに効果的な本発明の抗 E p C A M 抗体、またはその免疫複合体の量である。そのような作用は、好ましくは、正常で健康な組織において、細胞への結合をほとんど、もしくは全く示さない、またはそれをほとんど、もしくは全く殺滅せずに、かつ動物または患者の正常で健康な組織に無視できる、もしくは管理しやすい副作用を及ぼす一方で、達成される。

20

## 【0239】

殺滅もしくはアポトーシスの誘発、または腫瘍細胞の壊死の誘発、または腫瘍の退縮もしくは寛解の誘発に関して本明細書に使用される、「優先的に」および「特異的に」という用語は、よって、本発明の抗 E p C A M 抗体またはその免疫複合体が、実質的に腫瘍部位に限定され、実質的に動物または対象の正常で健康な組織において破壊および/または組織壊死をもたらすまでに及ばない腫瘍破壊および/または腫瘍壊死を達成するように機能することを意味する。したがって、健康な細胞および組織の構造および機能は、本発明の実践により実質的に損なわれないままである。

## 【0240】

本発明の抗 E p C A M 抗体または治療複合体は、好ましくは、1つ以上の放射線治療剤、化学療法剤、抗血管新生剤、アポトーシス誘発剤、抗チューブリン剤、抗細胞もしくは細胞障害剤、ステロイド、サイトカイン、ケモカイン、A T P a s e 阻害剤、別の抗体（例えば、二重特異性抗体または二特異性抗体）、または血液凝固剤（凝固因子）に連結される。

30

## 【0241】

よって、本発明は、抗 E p C A M 抗体が少なくとも他の1つの治療剤または診断剤に操作可能に結合される、種々の複合された抗体およびその断片を提供する。「免疫複合体」という用語は、抗体の別の効果的な製剤との操作会合を定義するように広範に使用され、単に任意の種類の操作会合を指すように意図されず、特に化学的「複合」に限定されない。組み換え融合タンパク質は、特に想定される。送達薬剤または標的製剤が標的に結合することができ、治療剤または診断剤が送達時に十分に機能的であれば、結合様式は適切である。

40

## 【0242】

抗体上の炭水化物部分を介した製剤の結合も想定される。O 連結型および N 連結型の双方のグリコシル化は、抗体に自然に生じる。組み換え抗体は、所望する場合、さらなるグリコシル化部位を再作製または作製するように修飾することができ、これは、単純に、適切なアミノ酸配列（X は P r o ではない、A s n - X - S e r、A s n - X - T h r、S e r、または T h r 等）を抗体の一次配列中に操作することにより達成される。

## 【0243】

本発明の抗 E p C A M 抗体または治療複合体で使用するための現在の好ましい製剤、な

50

らびに関連する方法および使用は、抗体の作用を補足する、または強化するもの、および/または特定の腫瘍型もしくは患者について選択されるものである。「抗体の作用を補足する、または強化する治療剤」は、放射線治療剤、化学療法剤、抗血管新生剤、アポトーシス誘発剤、抗チューブリン剤、抗細胞もしくは細胞障害剤、ステロイド、凝固剤、サイトカイン、ケモカイン、ATPase阻害剤、別の抗体（例えば、二重特異性抗体または二特異性抗体）を含み、それらのうちの任意の1つ以上は、それと使用するのに好ましい。

【0244】

現在の好ましい抗血管新生剤は、アンジオスタチン、エンドスタチン、アンジオポエチン、バスキュロスタチン、カンスタチン(canstatin)、およびマスピンのうちのいずれか1つを含む。

10

【0245】

本明細書に使用される、「抗チューブリン剤」とは、細胞有糸分裂を阻害する、好ましくは、細胞有糸分裂に必要なチューブリン活性、好ましくはチューブリン重合もしくは脱重合を直接的または間接的に阻害する、任意の製剤、薬物、プロドラッグ、またはそれらの組み合わせを意味する。現在の好ましい抗チューブリン剤は、コルヒチン、タキソール、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、およびコンプレスタチンのうちの1つ以上を含む。

【0246】

好ましい製剤の本発明の抗EpCAM抗体との結合または会合により「免疫抱合体」を得、そのような免疫抱合体は、強化された、およびさらには相乗的な抗腫瘍特性を有することが多い。

20

【0247】

例えば、アウリスタチン、カリケアマイシンマイタンシノイド、またはアルキル化剤を用いた抗体-薬物抱合体(ADC)も、本発明の使用に適切である。

【0248】

抗細胞もしくは細胞障害剤の使用は、本発明の抗EpCAM抗体「免疫毒素」をもたらす、一方、凝固因子の使用は、本発明の抗EpCAM抗体「コアグリガンド(coaguligands)」をもたらす。

【0249】

1つ以上の放射線治療剤、化学療法剤、抗血管新生剤、アポトーシス誘発剤、抗チューブリン剤、抗細胞もしくは細胞障害剤、ステロイド、サイトカイン、ケモカイン、ATPase阻害剤、別の抗体（例えば、二重特異性抗体または二特異性抗体）、および凝固因子の組み合わせ等の、少なくとも2つの治療剤の使用も想定される。

30

【0250】

特定の用途において、本発明の抗EpCAM抗体治療は、細胞の成長もしくは細胞分裂を殺滅する、または抑制する能力を有する細胞障害剤、細胞分裂阻害剤、または抗細胞剤に操作可能に結合される。適切な抗細胞剤は、化学療法剤、ならびに細胞毒および細胞分裂阻害剤を含む。細胞分裂阻害剤は、好ましくは、細胞が細胞サイクルを中止するように、一般に、標的細胞の自然な細胞サイクルを妨害するものである。

40

【0251】

例示的な化学療法剤としては、ステロイド等のホルモン、サイトカイン、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサート、またはアミノプテリン等の抗代謝物、アントラサイクリン、マイトマイシンC、ピンカルカロイド、抗生物質、デメコルチン、エトポシド、ミトラマイシン、ならびにクロラムブシルおよびメルファラン等の抗腫瘍アルキル化剤等が挙げられる。特定の好ましい抗細胞剤は、ダウノルビシン、ドキソルビシン/アドリアマイシン等のDNA合成阻害剤である。概して、タキソール/パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、ゲムシタビン、コンプレスタチン、およびドキソルビシン/アドリアマイシンは、現在の好ましい抗癌剤である。

【0252】

50

現在のサイトカインおよびケモカインの好ましい薬剤は、IL-2、IL-12、TNF- $\alpha$ 、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、IFN- $\beta$ 、IFN- $\alpha$ 、GM-CSF、およびLEC (肝臓発現ケモカイン) である。現在、サリチリハラミド (salicylilhalamide)、コンカナマイシン、またはパフィロマイシン等のV型ATPase阻害剤も、プシンベリン、ペデリン、イルシニアスタチンA等のタンパク質合成阻害剤であるため、好ましい。

#### 【0253】

特定の治療用途において、毒素部分は、他の候補剤と比較して、大半の毒素の細胞殺滅作用を送達する能力が非常に大きいため、好ましい。したがって、本発明の抗EpCAM抗体構築物における特定の好ましい抗細胞剤は、植物、真菌、または細菌由来の毒素である。例示的な毒素は、エピドフィロトキシン、細菌外毒素もしくは細菌外毒素の脂質A部分、サボリンもしくはゲロニン等のリボソーム不活性タンパク質、 $\alpha$ -サルシン、アスペルギリン、レストリクトシン、胎盤リボヌクレアーゼ等のリボヌクレアーゼ、ジフテリア毒素、およびシュードモナス外毒素を含む。現在の好ましい例は、リシン、ゲロニン、アブリン、ジフテリア、シュードモナス、および百日咳毒素である。

10

#### 【0254】

特定の好ましい毒素は、リシンA鎖等のA鎖毒素である。最も好ましい毒素部分は、「脱グリコシル化A鎖」(dgA)と呼ばれる、炭水化物残基を修飾、または除去するように処理されたリシンA鎖であることが多い。脱グリコシル化リシンA鎖は、その極端な効力、長い半減期のため、およびそれを臨床グレードおよび規模に製造することが経済的に実現可能であるため、好ましい。組み換えおよび/または切断されたリシンA鎖も使用され得る。

20

#### 【0255】

本発明の抗EpCAM抗体治療は、凝固、すなわち血液凝固を促進することが可能である成分を含んでもよい。ここで、標的抗体は、例えば、別の抗体を介して、直接的または間接的に凝固を刺激する因子に直接的または間接的に連結され得る。

#### 【0256】

そのような使用に好ましい凝固因子は、VII因子を活性する能力が欠損している切断されたTF (tTF)、二量体、三量体、重量体/多量体TF、および変異TF等の組織因子(TF)ならびにTF誘導体である。他の適切な凝固因子は、II/Ia因子、VII/VIIa因子、IX/Xa因子、およびX/Xa因子等のビタミンK依存性血液凝固薬、GlA修飾を欠損するビタミンK依存性凝固因子、ラッセルクサリヘビ毒液X因子活性化因子、トロンボキサンA<sub>2</sub>およびトロンボキサンA<sub>2</sub>合成酵素等の血小板活性化化合物、ならびに2-抗プラスミン等の線維素溶解阻害剤を含む。一般に、現在、切断された組織因子(tTF)が好ましい。

30

#### 【0257】

免疫抱合体および免疫毒素の調製は、一般に、当該分野において周知である(例えば、米国特許第4,340,535号を参照)。以下の特許のそれぞれは、免疫毒素生成、精製、および使用に関して、本教示をまたさらに補足する目的で、参照により本明細書にさらに組み込まれる: 米国特許第6,004,554号、第5,855,866号、第5,965,132号、第5,776,427号、第5,863,538号、第5,660,827号、および第6,051,230号。

40

#### 【0258】

種々の化学療法剤および他の薬理的製剤も本発明の抗EpCAM抗体治療に適切に抱合され得る。抗体に抱合された例示的な抗悪性腫瘍剤は、ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサート、およびビンブラスチンを含む。さらに、ネオカルチノスタチン、マクロマイシン、トレニモン、 $\alpha$ -アマニチン等の他の製剤の結合が説明されている(例えば、米国特許第5,660,827号、第5,855,866号、および第5,965,132号を参照; それぞれ、本明細書に組み込まれる)。

#### 【0259】

コアグリガンドの調製も容易に実践される。1つ以上の凝固因子の本発明の抗EpCAM

50

M抗体との操作会合は、免疫毒素について上述されるもの等の、直接連結であり得る。代替的に、操作会合は、抗体が凝固因子に結合する第2の結合領域、好ましくは、抗体または抗体の抗原結合部位に操作可能に結合される等の、間接的結合であり得る。凝固因子は、その機能的凝固部位と異なる部位、特に共有結合連結が分子を結合するために使用される部位で、本発明の抗 E p C A M 抗体に結合されるべきである。

【0260】

二重特異性または三重特異性の抗体も、本発明の方法に利用することができる。そのような抗体において、1つのアームは E p C A M に結合し、かつ、本発明の抗体である。二重特異性または三重特異性の抗体の他のアームにおける特異性の好ましい例のいくつかは、腫瘍血管新生を遮断するための、抗 - C D 3、 - C D 16、 - C D 28、 - N K G 2 D、N K p 30、N K p 44、N K p 46、または抗 - V E G F である。二重特性抗体を調製するための方法は、当該分野において周知であり、十分に説明されている。

10

【0261】

免疫抱合体、免疫毒素、およびコアグリガンダの調製において、組み換え発現を利用することができる。選択された本発明の抗 E p C A M 抗体をコードする核酸配列、および治療剤、毒素または血液凝固剤を発現ベクターのフレーム内に結合する。よって、組み換え発現は、核酸の翻訳をもたらし、所望の免疫抱合体を得る。化学架橋剤およびアビジンビオチン架橋も、治療剤を本発明の抗 E p C A M 抗体に結合する場合がある。

【0262】

本発明の組成物および方法は、他の治療学および診断学と併用して使用することができる。生物学的製剤、好ましくは、本発明に従う抗 E p C A M 抗体と「組み合わせる」使用するための診断剤または治療剤に関して、「組み合わせる」という用語は、様々な実施形態を網羅するために簡潔に使用される。よって、「組み合わせる」という用語は、特に記載のない限り、または科学的用語により明確にされない限り、種々の形式の組み合わせられた組成物、製薬、カクテル、キット、方法、ならびに第1および第2の薬剤使用に適用される。

20

【0263】

本発明「組み合わせられた」実施形態は、よって、例えば、本発明の抗 E p C A M が裸抗体であり、それに操作可能に結合されない製剤または治療剤と組み合わせる使用を含む。そのような場合において、製剤または治療剤は、非標的または標的形態で使用され得る。「非標的形態」において、製剤、特に治療剤は、一般に、当該分野におけるこれらの標準的な使用に従い使用される。「標的形態」において、製剤は、一般に、製剤または治療剤を血管新生疾患部位または腫瘍に送達する、個別の抗体または標的領域に操作可能に結合される。診断剤および治療剤の双方のそのような標的形態の生物学的製剤の使用も、当該分野において極めて標準的である。

30

【0264】

本発明の他の「組み合わせられた」実施形態において、本発明の抗 E p C A M 抗体は、抗体が、それ自身、製剤または治療剤と操作可能に会合する、または組み合わせられる、免疫抱合体である。操作結合は、本明細書に記載され、また当該分野において公知である、直接的または間接的結合の全ての形態を含む。

40

【0265】

特に、治療剤と併用した本発明の抗 E p C A M 抗体に関して、「組み合わせられた」使用は、組み合わせられた組成物、製薬、カクテル、キット、方法、ならびに第1および第2の薬剤使用も含み、治療剤はプロドラッグの形態である。そのような実施形態において、プロドラッグを薬物の機能的な形態に変換することができる活性化成分は、同様に、本発明の抗 E p C A M 抗体と操作可能に会合され得る。

【0266】

特定の好ましい実施形態において、治療組成物、組合物、製薬、カクテル、キット、方法、ならびに第1および第2の薬剤使用は、「プロドラッグ併用」である。当業者により理解されるように、「プロドラッグ併用」という用語は、特に記載のない限り、本発明の抗

50

体がプロドラッグを活性薬物に変換することができる組成物に操作可能に結合されることを意味し、抗体がそのプロドラッグ自体に結合されることではない。しかしながら、本発明のプロドラッグ実施形態がプロドラッグ併用として使用される必要は要求されない。したがって、プロドラッグは、A D E P Tおよび他の形態を含む、当該分野において使用される任意の様式で使用され得る。

【0267】

よって、組み合わされた組成物、製薬、カクテル、キット、方法、ならびに第1および第2の薬剤使用が記載される場合、好ましくは診断剤に関して、より好ましくは治療剤に関して、併用は、裸抗体および免疫抱合体である抗 E p C A M 抗体を含み、いくつかの抱合型または非抱合型形態において、ある形態の抗体およびある形態の生物学的製剤、診断剤または治療剤の全体的な提供が達成される限り、本発明の i n v i v o 実施形態の実践は、裸抗体または免疫抱合体、および生物学的製剤、診断剤、または治療剤の投与前、同時投与、または連続投与を含む。

10

【0268】

腫瘍に対する本発明の作用の前述および他の説明は、操作、結合される製剤の種類等の組み合わせ形式を簡潔に説明するためである。この説明的アプローチは、本発明の抗 E p C A M 抗体の有益な特性の過小評価または過度の単純化のいずれかとして解釈されるべきではない。したがって、そのような抗体自体は抗腫瘍特性を有し、そのような抗体の免疫抱合体はそれらの特性を維持し、それらを結合された製剤の特性と組み合わせ、さらに抗体と任意の結合された製剤の組み合わせられた作用は、通常強化される、および/または拡大されることを理解する。

20

【0269】

したがって、本発明は、任意に、少なくとも第1の組成物または容器に、治療有効量の少なくとも第1の本発明の抗 E p C A M 抗体、またはそのような抗 E p C A M 抗体の抗原結合断片もしくは免疫抱合体、ならびに治療有効量の少なくとも第2の生物学的製剤、成分、または系を含む、組成物、薬学的組成物、治療キット、および医薬カクテルを提供する。

【0270】

「少なくとも第2の生物学的製剤、成分、または系」とは、治療剤もしくは診断剤、または成分もしくは系であることが多いが、それである必要はない。例えば、少なくとも第2の生物学的製剤、成分、または系は、抗体を修飾する、および/または他の製剤を抗体に結合するための成分を含む場合がある。特定の好ましい第2の生物学的製剤、成分、または系は、プロドラッグ、またはプロドラッグを作製し使用するための成分であり、プロドラッグ自体を作製するための成分、および本発明の抗体をそのようなプロドラッグまたは A D E P T 実施形態において機能するように適応させるための成分を含む。

30

【0271】

治療剤または診断剤が少なくとも第2の生物学的製剤、成分、または系を含む場合、そのような治療剤および/または診断剤は、通常、癌の治療または診断に関連して使用するためのものである。

【0272】

40

よって、特定の実施形態において、「少なくとも第2の抗癌剤」は、治療キットまたはカクテルに含まれる。「少なくとも第2の抗癌剤」という用語は、本発明の抗 E p C A M 抗体が第1の抗癌剤であることに関して選択される。本発明の抗体は、よって、化学療法剤、放射線治療剤、サイトカイン、抗血管新生剤、アポトーシス誘発剤、または抗癌免疫毒素もしくはコアグリガンドと組み合わされる場合があり、そのいくつかの例は、本明細書の別の箇所に記載される。

【0273】

他の例示的な抗癌剤は、例えば、ネオマイシン、ポドフィロトキシン、T N F -  $\alpha$ 拮抗剤、カルシウムイオノフォア、カルシウム流動誘発剤、およびそれらの任意の誘導体またはプロドラッグを含む。現在の好ましい抗チューブリン剤は、コルヒチン、タキ

50



ソール、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシン、およびコンプレスタチン、またはそれらの誘導体もしくはプロドラッグを含む。

【0274】

本発明の組成物、キット、および/または薬剤に関して、組み合わせられた有効量の治療剤は、単一容器もしくは容器手段内に含まれるか、または個別の容器もしくは容器手段内に含まれ得る。カクテルは、一般に、混合使用のため、一緒に混合される。静脈内投与用に製剤化された製剤が好まれることが多い。撮像成分も含まれ得る。キットは、少なくとも第1の抗体、および含まれる1つ以上の他の生物学的製剤を使用するための説明書も含む。

【0275】

一般的に、少なくとも第2の抗癌剤（または任意の他の第2の製剤）は、単一薬学的組成物から、またはほぼ同時に投与される2つの薬学的組成物から等の、本発明の抗EpCAM抗体と実質的に同時に、動物または患者に投与され得る。

【0276】

代替的に、少なくとも第2の抗癌剤（または任意の他の第2の製剤）は、本発明の抗EpCAM抗体の投与と逐次的時間で、動物または患者に投与され得る。本明細書に使用される、「逐次的時間」とは、「時差的」を意味し、そのため、少なくとも第2の抗癌剤は、本発明の抗EpCAM抗体の投与と異なる時間で、動物または患者に投与される。一般に、2つの製剤は、2つの製剤がそれらのそれぞれの治療効果を発揮できるように、効果的に間隔をあけた時間で投与される、すなわち、これらは「生物学的に効果的な時間間隔」で投与される。少なくとも第2の抗癌剤（または他の第2の製剤）は、本発明の抗EpCAM抗体前の生物学的に効果的な時間で、またはその治療剤後の生物学的に効果的な時間で、動物または患者に投与され得る。

【0277】

したがって、本発明は、腫瘍を有する動物または患者を治療するための方法を提供し、  
(a) 動物または患者を、実質的に腫瘍量を低減する第1の治療に曝すことと、  
(b) 実質的に、少なくとも第1の本発明の抗EpCAM抗体、その抗原結合断片、またはその免疫抱合体を投与することとを含み、任意に、抗体または断片は、第2の治療剤と操作可能に会合される。

【0278】

好ましい第1の治療は、外科的切除および化学療法介入を含む。

【0279】

特定の他の実施形態において、本発明の抗体および免疫抱合体は、1つ以上の診断剤、通常、癌の診断剤に関連して使用するための診断剤と組み合わせられ得る。よって、様々な診断組成物、キット、および方法が本発明内に含まれる。

【0280】

またさらなる態様は、本明細書に定義される、適切な量の本発明の抗体または他のタンパク質を対象に投与することと、対象における本発明の抗体または他のタンパク質の存在、および/または量、および/または位置を検出することを含む、対象の診断方法または撮像方法である。

【0281】

上述の使用および方法に従う撮像または診断に適切な疾患は、本明細書の別の箇所に記載される、任意の疾患、好ましくは任意の癌を含む。

【0282】

一実施形態において、本発明は、疾患、例えば、動物における癌を診断する方法を提供し、

(a) 上記動物から採取した試験試料を本発明の抗体、またはその免疫抱合体と接触させるステップを含む。

【0283】

さらなる実施形態において、本発明は、疾患、例えば、動物における癌を診断する方法

10

20

30

40

50

を提供し、

(a) 上記動物から採取した試験試料を本発明の抗体、またはその免疫複合体と接触させるステップと、

(b) 試験試料における抗体 - 抗原複合体の存在、および / もしくは量、および / もしくは位置を測定する、または検出するステップと、任意に、

(c) 試験試料における抗体 - 抗原複合体の存在、および / または量を対照と比較するステップとを含む。

#### 【0284】

上記の方法において、上記接触ステップは、抗体 - 抗原複合体の形成を可能にする条件下で実行される。適切な条件は、当業者により容易に判断され得る。

#### 【0285】

上記の方法において、適切な試験試料、例えば、疾患に罹患したと思われる生検細胞、組織もしくは臓器、または組織学的切片が使用され得る。

#### 【0286】

特定の上記方法において、試験試料における任意の量の抗体 - 抗原複合体の存在は、疾患の存在を示すだろう。好ましくは、陽性診断が行われるために、試験試料における抗体 - 抗原複合体の量は、適切な対照試料に認められる量より多い、または増加している、好ましくは有意に多い、または増加している。より好ましくは、有意に多いまたは増加したレベルは、統計的に有意であり、好ましくは  $< 0.05$  の確率値を有する。統計的有意性を決定する適切な方法は、当該分野において周知であり、十分に説明されており、それらのいずれかを使用することができる。

#### 【0287】

適切な対照試料は、当業者により容易に選択され得、例えば、特定の疾患の診断の場合、適切な対照はその疾患を有さない対象からの試料である。適切な対照「値」も、例えば、当該分野において公知の正常な対象についての範囲を参照することにより、毎回の検査で、対照「試料」を行うことなく、容易に決定することができる。

#### 【0288】

診断または撮像用途に使用するために、本発明の抗体は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$  等の放射線不透過もしくは放射線同位元素、放射性放射体（例えば、 $^{125}\text{I}$ 、または  $^{131}\text{I}$  放射体）、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン等の蛍光（フルオロフォア）または化学発光（発色団）、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシターゼ、もしくは西洋わさびペルオキシダーゼ等の酵素、撮像剤、または金属イオン、または特定の同族の検出可能部分に結合することにより検出できるビオチン等の化学部分、例えば、標識されたアビジン / ストレプトアビジン等の検出可能なマーカーで標識され得る。標識を抗体または抗体断片等の結合タンパク質に結合する方法は、当該分野において周知である。そのような検出可能マーカーは、試験試料における結合タンパク質 - 抗原複合体の存在、量、または位置を検証することを可能にする。

#### 【0289】

*in vivo* 使用に好ましい検出可能なマーカーは、ビスマス (III)、金 (III)、ランタン (III)、もしくは鉛 (II) 等の X 線検出可能化合物、銅<sup>67</sup>、ガリウム<sup>67</sup>、ガリウム<sup>68</sup>、インジウム<sup>111</sup>、インジウム<sup>113</sup>、ヨウ素<sup>123</sup>、ヨウ素<sup>125</sup>、ヨウ素<sup>131</sup>、水銀<sup>197</sup>、水銀<sup>203</sup>、レニウム<sup>186</sup>、レニウム<sup>188</sup>、ルビジウム<sup>97</sup>、ルビジウム<sup>103</sup>、テクネチウム<sup>99m</sup>、もしくはイットリウム<sup>90</sup>等の放射性イオン、コバルト (II)、銅 (II)、クロム (III)、ジスプロシウム (III)、エルビウム (III)、ガドリニウム (III)、ホルミウム (III)、鉄 (II)、鉄 (III)、マンガン (II)、ネオジウム (III)、ニッケル (II)、サマリウム (III)、テルビウム (III)、バナジウム (II)、もしくはイッテルビウム (III) 等の核磁気スピン共鳴アイソトープ、またはローダミンもしくはフルオレセインを含む

本発明は、検出可能なシグナルを直接的または間接的に産生する標識に結合される、本発明の抗体を含む診断剤または撮像剤も含む。適切な標識は、本発明の別の箇所に記載さ

10

20

30

40

50

れる。

【0290】

癌治療は、

(a) 本発明の抗 E p C A M 抗体に操作可能に結合された診断剤を含む、腫瘍を有する動物または患者に診断量の少なくとも第1の検出可能な標識された本発明の抗 E p C A M 抗体を投与し、それによって、腫瘍の検出可能な画像を形成することにより、腫瘍の画像を形成することと、

(b) 実質的に、同じ動物または患者に治療的に最適な量の少なくとも本発明の第1の裸抗 E p C A M 抗体、またはそのような抗体を使用する治療剤 - 抗体構築物を投与し、それによって、抗腫瘍作用をもたらすことによって行うことができる。

10

【0291】

本発明は、本発明の抗体、免疫抱合体、もしくは組成物のうちの1つ以上、または本発明の抗体をコードする核酸分子のうちの1つ以上、または本発明の核酸配列を含む1つ以上の組み換え発現ベクター、または本発明の組み換え発現ベクターもしくは核酸配列を含む、1つ以上の宿主細胞またはウイルスを含むキットをさらに含む。好ましくは、上記キットは、本明細書に記載される方法および使用、例えば、本明細書に記載される治療方法、診断方法、または撮像方法に使用するためであるか、または本明細書に記載される *in vitro* アッセイまたは方法に使用するためである。そのようなキットの抗体は、好ましくは、本明細書の別の箇所に記載される抗体抱合体であってもよく、例えば、検出可能な部分に抱合されるか、または免疫抱合体であってもよい。好ましくは、上記キットは、例えば、診断における、キット成分の使用説明書を含む。好ましくは、上記キットは、本明細書の別の箇所に記載される疾患、例えば、癌を診断するため、または治療するためのものであり、任意に、そのような疾患を診断するための、または治療するためのキットの使用説明書を含む。

20

【0292】

本明細書に定義される本発明の抗体は、*in vitro* または *in vivo* 用途およびアッセイの分子ツールとしても使用することができる。抗体は抗原結合部位を有するため、これらは特定の結合対の構成要素として機能することができ、これらの分子は特定の結合対構成要素が必要とされる任意のアッセイにおいて使用することができる。

【0293】

よって、本発明のまたさらなる態様は、本明細書に定義される、本明細書の抗体を含む試薬、および例えば、*in vitro* または *in vivo* のアッセイにおける分子ツールとしてのそのような抗体の使用を提供する。

30

【0294】

【表 1 - 1】

(表 1-1)		
表 1		
配列 番号	説明	配列
3-17I scFv		
1	VH ドメイン (nt)	<p> CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC  TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA  CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT  GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT  TGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCA  CGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG  CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG  TGCGAGAGGCCTTCTATGGAACCTACTGGGGCCAGGGAACCC  TGGTCACCGTCTCCTCA </p> <p>図 1 を参照</p>
2	VL ドメイン (nt)	<p> GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCT  CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAG  TGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCC  AGGCTCCCAGGCTCATCATCTATGGTGCATCCACCACGGCC  TCTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGCCAGTGGGTCTGGGAC  AGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTT  TGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCGGC  GTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA </p> <p>図 1 を参照</p>
3	VH ドメイン (aa)	<p> QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG  QGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL  RSED TAVYYCARGLLWNYWGQGLVTVSS </p> <p>図 1 を参照</p>

【 0 2 9 5 】

【表 1 - 2】

(表 1-2)		
表 1		
配列 番号	説明	配列
4	VL ドメイン(aa)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIYGASTTASGIPARFSASGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYCQ QYNNWPPAYTFGQGKLEIK  図 1 を参照
5	重鎖 CDR1	SYAIS
6	重鎖 CDR2	GIPIFGTANYAQKFQG
7	重鎖 CDR3	GLLWNY
8	軽鎖 CDR1	RASQSVSSNLA
9	軽鎖 CDR2	GASTTAS
10	軽鎖 CDR3	QQYNNWPPAYT
11	重鎖 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
12	重鎖 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
13	重鎖 FR3	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCAR
14	重鎖 FR4	WGQGTLLTVSS
15	軽鎖 FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
16	軽鎖 FR2	WYQQKPGQAPRLIY
17	軽鎖 FR3	GIPARFSASGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYC
18	軽鎖 FR4	FGQGKLEIK
19	リンカー	KLSGSASAPKLEEGERFSEARV

【 0 2 9 6 】

10

20

30

【表 1 - 3】

(表 1-3)		
表 1		
配列 番号	説明	配列
20	全 scFv クロー ン(nt)	<p> CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC  TGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA  CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT  GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT  TGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA  CGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG  CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG  TGCGAGAGGCCTTCTATGGAACCTACTGGGGCCAGGGAACCC  TGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCC  CCAAAACCTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGA  AATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCC  AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT  GTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA  GGCTCCCAGGCTCATCATCTATGGTGCATCCACCACGGCCT  CTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGCCAGTGGGTCTGGGACA  GACTTCACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTT  GCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCGGC  GTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA </p> <p>図 1 を参照</p>
21	全 scFv クロー ン(aa)	<p> QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPG  QGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL  RSED TAVYYCARGLLWNYWGQGLVTVSSKLSGSASAPKLEE  GEFSEARVEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW  YQQKPGQAPRLIYGASTTASGIPARFSASGSGTDFTLTISLQS  EDFAVYYCQQYNNWPPAYTFGQGTKLEIK </p> <p>図 1 を参照</p>

10

20

30

40

【表 1 - 4】

(表 1-4)		
表 1		
配列 番号	説明	配列
3-17I 完全長 IgG		
22	IgG 重鎖(nt)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGGCCTTCTATGGAAGTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGTGTCTCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AAACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTG GGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAA

10

20

30

40

【表 1 - 5】

(表 1-5)		
表 1		
配列 番号	説明	配列
23	IgG 軽鎖(nt)	GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCATCATCTATGGTGCATCCACCACGGC CTCTGGTATCCCAGCCAGGTTCA GTGCCAGTGGGTCTGGGA CAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGAT TTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCG GCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACG AACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCT GAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGG TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

10

20

【 0 2 9 9 】

30



【表 1 - 6】

(表 1-6)		
表 1		
配列 番号	説明	配列
24	IgG 重鎖(aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDVAVYYCARGLLWNYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
25	IgG 軽鎖(aa)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIYGASTTASGIPARFSASGSGTDFTLTISLQSEDAVYYCQ QYNNWPPAYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

【 0 3 0 0 】

【表 2 - 1】

(表 2-1)		
表 2		
配列 番号	説明	配列
7-F17 scFv		
26	VL ドメイン(nt)	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGC CACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGA CAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGAT TTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCG GGGTTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
27	VL ドメイン (aa)	ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQYNNWPPGFTFGPGTKVDIK
8 また は 28	軽鎖 CDR1	RASQSVSSNLA
29	軽鎖 CDR2	GASTRAT
30	軽鎖 CDR3	QQYNNWPPGFT
31	軽鎖 FR1	ETTLTQSPATLSVSPGERATLSC
32	軽鎖 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
33	軽鎖 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
34	軽鎖 FR4	FGPGTKVDIK

10

20

30

【 0 3 0 1 】

【表 2 - 2】

(表 2-2)		
表 2		
配列 番号	説明	配列
35	全 scFv クロー ン(nt)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TCGAGAGGGCCTTCTATGGAACCTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCC CCAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGA AACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGCAAACCTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCA CTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GAGTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTT GCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCGGG GTTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
36	全 scFv クロー ン(aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDIAVYYCARGLLWNYWGQGLVTVSSKLSGSASAPKLEE GEFSEARVETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSE DFAVYYCQQYNWPPGFTFGPGTKVDIK

抗体 7-F17 の重鎖配列 (ヌクレオチドおよびアミノ酸) (VHドメイン、重鎖CDR1、重鎖CDR2、重鎖CDR3、重鎖FR1、重鎖FR2、重鎖FR3、および重鎖FR4)、およびリンカー配列は、表 1 に提示される配列と同一である。

【 0 3 0 2 】

【表 3 - 1】

(表 3-1)		
表 3		
配列 番号	説明	配列
12-C15 scFv		
39	VL ドメイン(nt)	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGC CACTGGTATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGA CAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGAT TTTGCAGTTTATTACTGTCAGCACTATAATGACTGGCCTCCC ACGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
40	VL ドメイン(aa)	ETTLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAVYYC QHYNDWPPTWTFGQGTKLEIK

10

20

【 0 3 0 3 】

【表 3 - 2】

(表 3-2)		
表 3		
配列 番号	説明	配列
8, 28 ま たは 41	軽鎖 CDR1	RASQSVSSNLA
29 また は 42	軽鎖 CDR2	GASTRAT
43	軽鎖 CDR3	QHYNDWPPTWT
44	軽鎖 FR1	ETTLTQSPATLSLSPGERATLSC
32 また は 45	軽鎖 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
33 また は 46	軽鎖 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAVYYC
18 また は 47	軽鎖 FR4	FGQGTKLEIK

30

40

【 0 3 0 4 】

50

【表 3 - 3】

(表 3-3)		
表 3		
配列 番号	説明	配列
48	全 scFv クロー ン(nt)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGGCCTTCTATGGAACTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCC CCAAAACCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGA AACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCA CTGGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTT GCAGTTTATTACTGTCAGCACTATAATGACTGGCCTCCCACG TGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

10

20

30

【 0 3 0 5 】

【表 3 - 4】

(表 3-4)		
表 3		
配列 番号	説明	配列
49	全 scFv クロー ン(aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSED TAVYYCARGLLWNYWGQGLTVTVSSKLSGSASAPKLEE GEFSEARVETTLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSE DFAVYYCQHYNDWPPTWTFGQGTKLEIK

40

【 0 3 0 6 】

50

【表 3 - 5】

(表 3-5)		
表 3		
配列 番号	説明	配列
12-C15 完全長 IgG		
50	IgG 軽鎖(nt)	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGC CACTGGTATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGA CAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGAT TTTGCAGTTTATTACTGTCAGCACTATAATGACTGGCCTCCC ACGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
51	IgG 軽鎖(aa)	ETTLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYC QHYNDWPPTWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗体 12-C15 (VHドメイン、重鎖CDR1、重鎖CDR2、重鎖CDR3、重鎖FR1、重鎖FR2、重鎖FR3、重鎖FR4、およびIgG重鎖) の重鎖配列 (ヌクレオチドおよびアミノ酸)、およびリンカー配列は、表 1 に提示される配列と同一である。

【 0 3 0 7 】

【表 4 - 1】

(表 4-1)		
表 4		
配列 番号	説明	配列
16-G5 scFv		
52	VL ドメイン(nt)	GATATTGTGATGACTCAGACTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGC CACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGA CAGAGTTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGAT TTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCG TCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
53	VL ドメイン (aa)	DIVMTQTPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYNNWPPSWTFGQGTKVEIK
8, 28, 41 または 54	軽鎖 CDR1	RASQSVSSNLA
29, 42 ま たは 55	軽鎖 CDR2	GASTRAT
56	軽鎖 CDR3	QQYNNWPPSWT
57	軽鎖 FR1	DIVMTQTPATLSVSPGERATLSC
32, 45 ま たは 58	軽鎖 FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
33, 46 ま たは 59	軽鎖 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
60	軽鎖 FR4	FGQGTKVEIK

10

20

30

40

【 0 3 0 8 】

【表 4 - 2】

(表 4-2)		
表 4		
配列 番号	説明	配列
61	全 scFv クロー ン(nt)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TCGGAGAGGCCTTCTATGGAACACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCC CCAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGA TATTGTGATGACTCAGACTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCA CTGGTATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACA GAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTT GCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCGTCG TGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
62	全 scFv クロー ン(aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSED TAVYYCARGLLWNYWGQGLVTVSSKLSGSASAPKLEE GEFSEARVDIVMTQTPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNWPPSWTFGQGTKVEIK



【表 4 - 3】

(表 4-3)		
表 4		
配列 番号	説明	配列
16-G5 完全長 IgG		
63	IgG 軽鎖(nt)	GATATTGTGATGACTCAGACTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGC CACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGA CAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGAT TTTGCAGTTTATTACTGTCTAGCAGTATAATAACTGGCCTCCG TCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
64	IgG 軽鎖(aa)	DIVMTQTPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYC QQYNNWPPSWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗体 16-G5 (VHドメイン、重鎖CDR1、重鎖CDR2、重鎖CDR3、重鎖FR1、重鎖FR2、重鎖FR3、重鎖FR4、およびIgG重鎖)の重鎖配列(ヌクレオチドおよびアミノ酸)およびリンカー配列は、表1に提示される配列と同一である。

【表 5 - 1】

(表 5-1)		
表 5		
配列 番号	説明	配列
17-C20 scFv		
65	VL ドメイン(nt)	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGC CACTGGTATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGA CAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGAT TTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCG ATGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
66	VL ドメイン(aa)	ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYNNWPPMYTFGQGTKVEIK
8, 28, 41, 54 また は 67	軽鎖 CDR1	RASQSVSSNLA
29, 42, 55 また は 68	軽鎖 CDR2	GASTRAT
69	軽鎖 CDR3	QQYNNWPPMYT
31 また は 70	軽鎖 FR1	ETTLTQSPATLSVSPGERATLSC
32, 45, 58 また は 71	軽鎖 FR2	WYQQKPGQAPRLIY
33, 46, 59 また は 72	軽鎖 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
60 また は 73	軽鎖 FR4	FGQGTKVEIK

10

20

30

40

【 0 3 1 1 】

【表 5 - 2】

(表 5-2)		
表 5		
配列 番号	説明	配列
74	全 scFv クロー ン(nt)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TCGGAGAGGCCTTCTATGGAACCTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCC CAAAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGA AACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCA CTGGTATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GAGTTCACCTCTACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTT GCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCGATG TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
75	全 scFv クロー ン(aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDVAVYYCARGLLWNYWGQGLVTVSSKLSGSASAPKLEE GEFSEARVETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSE DFAVYYCQQYNNWPPMYTFGQGTKVEIK

【表 5 - 3】

(表 5-3)		
表 5		
配列 番号	説明	配列
17-C20 完全長 IgG		
76	IgG 軽鎖(nt)	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGC CACTGGTATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGA CAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGAT TTTGCAGTTTATTACTGTCTAGCAGTATAATAACTGGCCTCCG ATGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAAATCAAACG AACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCT GAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGG TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
77	IgG 軽鎖(aa)	ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQYNNWPPMYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC

抗体 17-C20 (VHドメイン、重鎖CDR1、重鎖CDR2、重鎖CDR3、重鎖FR1、重鎖FR2、重鎖FR3、重鎖FR4、およびIgG重鎖)の重鎖配列(ヌクレオチドおよびアミノ酸)およびリンカー配列は、表1に提示される配列と同一である。

【表 6 - 1】

(表 6-1)		
表 6		
配列 番号	説明	配列
24-G6 scFv		
78	VL ドメイン (nt)	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTC TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGC CACTGGTATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGA CAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGAT TTTGCAGTTTATTACTGTTCAGAAAGTATAATAACTGGCCTCCG GCCTTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
79	VL ドメイン (aa)	ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QKYNWPPAFTFGPGTKVDIK
8, 28, 41, 54, 67 または 80	軽鎖 CDR1	RASQSVSSNLA
29, 42, 55, 68 または 81	軽鎖 CDR2	GASTRAT
82	軽鎖 CDR3	QKYNWPPAFT
31, 70 または 83	軽鎖 FR1	ETTLTQSPATLSVSPGERATLSC
32, 45, 58, 71 または 84	軽鎖 FR2	WYQQKPGQAPRLIY

【表 6 - 2】

(表 6-2)		
表 6		
配列 番号	説明	配列
33, 46, 59, 72 ま たは 85	軽鎖 FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAVYYC
34 また は 86	軽鎖 FR4	FGPGTKVDIK
87	全 scFv クロー ン(nt)	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCA CCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCAGAGAGGCCTTCTATGGAAGTACTGGGGCCAGGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCAAAGCTTTCAGGGAGTGCATCCGCC CCAAAACCTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAAGCACGCGTAGA AACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCC AGGGGAAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCA CTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GAGTTCACCTCTACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTT GCAGTTTATTACTGTCAGAAGTATAATAACTGGCCTCCGGC CTTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
88	全 scFv クロー ン(aa)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGHPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSEDVAVYYCARGLLWNYWGQGLTVTVSSKLSGSASAPKLEE GEFSEARVETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSE DAVYYCQKYNWPPAFTFGPGTKVDIK

抗体 24-G6 (VHドメイン、重鎖CDR1、重鎖CDR2、重鎖CDR3、重鎖FR1、重鎖FR2、重鎖FR3、および重鎖FR4) の重鎖配列 (ヌクレオチドおよびアミノ酸)、およびリンカー配列は、表 1 に提示される配列と同一である。

【 0 3 1 5 】

【表 7】

(表 7)		
表 7		
配列番号	説明	配列
37	VL CDR2	G A S T X <sub>5</sub> A X <sub>7</sub>
38	VL CDR2	G A S T R/T A T/S
89	VL CDR3	Q X <sub>2</sub> Y N X <sub>5</sub> W P P X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> T
90	VL CDR3	Q Q/H/K Y N N/D W P P G/T/S/M/A F/W/Y T

10

## 【実施例】

## 【0316】

本発明は、図を参照して、以下の非限定的な実施例においてより詳細に説明される。

20

## 【0317】

## 実施例1：新規抗体

癌治療として使用することができるさらなる腫瘍特異的抗体の必要性を考慮して、H T 29等の結腸癌細胞株を特異的に認識するヒト抗体が識別された。抗体は、特異的にE p C A Mに結合することができる。抗体の単鎖形態を、c - m y cおよび6 x H i s タグエピトープを含有するp H O G 21プラスミドにクローン化した(図8)。T G 1細菌を形質転換し、I P T G誘発によりs c F vを発現させた。精製されたs c F vの結合は、E a s y c y t eフローサイトメーターを使用して、フローサイトメトリーにより確認された。

## 【0318】

## 配列決定

30

クローンを産生する抗体の重鎖および軽鎖のヌクレオチド配列を配列決定した。抗体は、3 - 17 I ( s c F v )と表される。3 - 17 I ( s c F v )の軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列とアミノ酸配列を図1および表1に示す。3 - 17 Iの軽鎖および重鎖のC D R領域を表1に示す。

## 【0319】

この抗体のI g G形態も作製された。I g G形態はI g G 1イソ型であり、2本の重鎖と2本の軽鎖とを含む。各重鎖は、配列番号3のV HドメインおよびI g G 1定常領域を含む。各軽鎖は、配列番号4のV Lドメインおよびカッパ軽鎖定常領域を含む。抗体のI g G形態の成分は、L a r s N o r d e r h a u gら、J I M 204 ( 1997 ) 77 - 87により発表されたベクターに基づき、本引用に記載される方法を使用して、ベクター中にクローン化された。ベクターは、標準的なC M Vプロモーターを含有する。I g G リーダー配列( m g w s c i i l f l v a t a t g v h s )を各ベクターに導入した。V HおよびV Lドメインは、それぞれ、P C Rにより導入されたB s m IおよびB S i W I部位中に、ヒトI g G 1およびカッパ遺伝子のゲノムコピー(イントロン+エクソン)を含有する別個のベクター中にクローン化された。I g G 1ベクターはハイグロマイシン耐性遺伝子を含

40

## 【0320】

3 - 17 I I g G 抗体の完全な重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を以下に示す。

50

## 【 0 3 2 1 】

3 - 17 I I g G 重鎖 (アミノ酸配列) (配列番号24)

## 【 0 3 2 2 】

## 【 化 1 】

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQA  
PGQGLEWMGGI IPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAY  
MELSSLRSED TAVYYCARGLLWNYWGQGT LVT VSSASTKG  
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV  
NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ  
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLS  
LSPGK

10

定常領域は太字イタリック体である。

## 【 0 3 2 3 】

3 - 17 I I g G 軽鎖 (アミノ酸配列) (配列番号25)

20

## 【 0 3 2 4 】

## 【 化 2 】

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKP  
GQAPRLIIYGASTTASGIPARFSASGSGTDFTLTISLQS  
EDFAVYYCQQYNNWPPAYTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN  
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH  
QGLSSPVTKSFNRGEC

30

定常領域は太字イタリック体である。

## 【 0 3 2 5 】

E p C A M に結合し、3 - 17 I と同一の重鎖配列であるが、異なる軽鎖配列を有する、12の関連する抗体も識別された。これらの関連する抗体のうちの5つ (7 - F 17、12 - C 15、16 - G 5、17 - C 20、および24 - G 6) の配列を表2~6に提示する。

## 【 0 3 2 6 】

実施例2: 3 - 17 I I g G の K a t o I I I 細胞への結合

3 - 17 I I g G の E p C A M 陽性細胞への結合を分析するために、フローサイトメトリ分析を実施した。陽性対照として、抗 E p C A M キメラ (マウス可変 / ヒト定常ドメイン) および、完全ヒト抗体である M O C 31 および M T 201 を、それぞれ使用した。

40

## 【 0 3 2 7 】

M T 201 I g G および M O C 31 I g G 抗体の完全な重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を以下に示す。定常領域は太字イタリック体である。

## 【 0 3 2 8 】

M T 201 I g G 重鎖 (アミノ酸配列)

## 【 0 3 2 9 】



## 【化3】

EVQLLES GGGV VQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA  
PGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY  
LQMNSLR AEDTAVYYCAKDMGWGSGWRPYYYYGMDVWGQG  
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF  
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP  
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP  
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSPGK

10

## 【0330】

MT201 IgG 軽鎖 (アミノ酸配列)

## 【0331】

## 【化4】

ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSIS SYLNWYQQKP  
GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS  
SLQPEDSATYYCQQSYDIPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG  
LSSPVTKSFNRGEC

20

## 【0332】

これらの配列は、MT201のアミノ酸配位列から推定され、第WO98/46645号および R  
aumら, Cancer Immunol Immunother (2001) 50:141-150  
に示されるように、HD69とも称される。

## 【0333】

30

MO C31 IgG 重鎖 (アミノ酸配列)

## 【0334】

## 【化5】

QVKLQQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQA  
PGKGLKWMGWINTYTGESTYADDFKGRFAFSLETSASAA  
YLQINNLKNEDTATYFCARFAIKGDYWGQGTTVTVSSASTK  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN  
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGK

40

## 【0335】

MO C31 IgG 軽鎖 (アミノ酸配列)

## 【0336】

## 【化 6】

DIVLTQSPFSNPVTLGTSASISCRSTKSLLSNGITYLYW  
YLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSSSGSGTDFTLRI  
SRVEAEDVGVYYCAQNLEIPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE  
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## 【0337】

これらの配列は、Beiboerら, Journal of Molecular B  
iology, 296巻, 2000年2月25日発行, 833 - 849ページに示されるように、MOC  
31アミノ酸配列から推定された。

## 【0338】

抗緑色蛍光タンパク質 (GFP) 抗体を陰性の対照として使用した。フローサイトメ  
リー用に、Kato III 細胞 (ATCC 番号 (胃癌、ATCC 番号 HTB - 103)) を  
標準的な条件下で成長させ、培養フラスコから採取し、PBS で2回洗浄し、0.2%のB  
SA および0.09%のNaN<sub>3</sub>を含むPBS中に再懸濁し、最後に、ウェル当り1×10<sup>5</sup>細胞  
で、V字形の96ウェルプレート (Greiner Bio-One, Frickenha  
usen, Germany) に分配した。細胞を400×gで5分間遠心分離した後、4 で4  
5分間、50μLの各異なる抗体希釈 (全ての希釈剤は0.2%のBSAおよび0.09%のNa  
N<sub>3</sub>を含むPBSで作製された) とともにインキュベートした。0.2%のBSAおよび0.  
09%のNaN<sub>3</sub>を含むPBS中で洗浄した後、細胞を10μg/mLのRPE 抱合ヤギ抗ヒ  
トIgG (AbD Serotec, Düsseldorf, Germany) を用いて、3  
0分間、4 で染色した。染色した細胞を洗浄し、0.2%のBSAおよび0.09%のNaN<sub>3</sub>を  
含む200μLのPBSに再懸濁し、Easy Cytometer (Guava  
Technologies, Hayward, CA, USA) 上で分析するために、U  
字形96ウェルプレート (Corning, Schiphol-Rijk, The Net  
herlands) に移した。図2に示される結果は、抗体3-17IがMOC31と比較可能  
な親和性で、天然のEpCAM<sup>+</sup>Kato III細胞株と特異的に相互作用することを明  
らかに実証する。逆に、抗体MT201は、EpCAM陽性Kato III細胞への非常に  
弱い結合を実証した。

## 【0339】

実施例3: 3-17I IgGの結合特徴

3-17IのEpCAMに結合する能力を決定するために、ウェスタンブロット法、EL  
ISA、およびBIACoreアッセイを実施した。

## 【0340】

ウェスタンブロット分析

抗体3-17I、MT201、およびMOC31のヒトおよびカニクイザルのEpCAMへの結  
合特異性および交差反応性を分析するために、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミ  
ドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロット分析を、還元条件および  
非還元条件下で実施した。全ての抗体はIgG形態であり、過渡的に形質移入されたHE  
K-293細胞において産生された。次いで、抗体をプロテインAセファロース (GE H  
ealthcare, Uppsala, Sweden) 上で精製した後、2つの連続して  
連結されたサイズ排除カラムのSuperdex 200およびSuperdex 75上で  
分画した。得られたIgG調製物は、>95%純度の単量体であるように思われた。組み換  
えヒトおよびカニクイザルのEpCAM抗原もHEK-293細胞において産生され、プロ  
テインAセファロースカラム上で、1ステップで精製された。抗原調製物の決定された純  
度は、90%を上回った。双方のEpCAM構築物は、IgG1からのヒトFc領域に融合  
したEpCAMの細胞外ドメインから成る。

## 【0341】

ヒト E p C A M 配列は、N C B I データベースの N P - 002345 から、カニクイザルは C S 611076 から算出された。ヒト E p C A M / F c 融合物およびカニクイザル E p C A M / F c 融合物のアミノ酸配列を以下に示す。

【 0 3 4 2 】

【 化 7 】

アミノ酸配列ーヒト E p C A M / F c 融合物

MAPPOVLAFGLLLAAATATFAAAQEECVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAA

----- シグナルペプチド ----- ヒト EPCAM 配列開始

KCLVMKAEMNGSKLGRRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTCWCVNTAGVVRTD

KDTEITCSERVRTYWI I IELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITSILYENNVIT

IDLVQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSHKMDLTVNGEQDLDPGQTLIYYVDEKA

ヒト EPCAM 配列

PEFSMQGLKAAADKTHITCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

--- 終了 ---|----- ヒト IgG1 Fc 配列開始

VKENWYVDGVEVHNAKIKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI

SKAKGQPREPQVYITLPPSRDELITKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD

DGSFFLYSKLITVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ヒト IgG1 Fc 配列終了---|

10

20

【 0 3 4 3 】

【 化 8 】

アミノ酸配列ーカニクイザル E p C A M / F c 融合物

MAPPOVLAFGLLLAAATATFAAAQKECVCENYKLAVNCFVNDNGQCQCTSIGAQNTVLC SKLAA

----- シグナルペプチド ----- Cy EPCAM 配列開始

KCLVMKAEMNGSKLGRRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSTCWCVNTAGVVRTD

KDTEITCSERVRTYWI I IELKHKAREKPYDVQSLRTALEEAIKTRYQLDPKFITNILEYEDNVIT

IDLVQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLFHSHKMDLRVNGEQDLDPGQTLIYYVDEKA

PEFSMQGLKAAAADKTHITCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTILMISRTPEVTCVVVDVSHEDP

--- 終了 ---|---|----- ヒト IgG1 Fc 配列開始

EVKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT

ISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELITKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD

SDGSFFLYSKLITVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ヒト IgG1 Fc 配列終了---|

30

40

【 0 3 4 4 】

組み換えヒトおよびカニクイザルの E p C A M - F c 抗原の試料は、S D S - P A A ゲル (1 μ g / ウェル) 上に充填される前に還元されたか、または非還元されたかのいずれかであった。試料を二組で行った。エレクトロブロット後、膜を P B S (遮断溶液) 中の 5% のスキムミルクパウダー (M e r c k 製品番号 1 . 15363 . 0500) で 1 時間遮断した。次いで、膜を、遮断溶液中に希釈された 1 μ g / m l の濃度で、I g G s 3 - 17 I (図 3 A)、M T 201 (図 3 B)、または M O C 31 (図 3 C) とともにインキュベートした。膜結合 I g G を検出するために、フィルタを遮断溶液に 1 : 5000 に希釈したヤギ抗ヒトカップ H

50

R P抗体 (Southern Biotech、カタログ番号2060 - 05) とともに1時間インキュベートした。

【0345】

全インキュベーションの間に、膜をPBS - T (0.05%のTween - 20で補充されたPBS ; Medicago #09 - 9410 - 100) で3回、5分間洗浄した。全てのインキュベーションは、特に指定されない限り、1時間、室温で実施された。

【0346】

製造者の推奨に従い希釈されたDAB (Thermo Scientific #1856090) 基質を使用して、ウェスタンブロットを展開した。

【0347】

対照において、SDS - PAAゲルをクマシーインスタントブルー (Expedeon #ISB01L) で染色し、EpCAM変種の負荷量を検証した。膜への良好な移動は、ヤギ抗ヒトIgG - HRP抱合体 (Southern Biotechカタログ番号2040 - 05) を伴う膜上でのEpCAM - Fcの検出およびDAB染色 (データ示さず) により検証された。EpCAM - Fcの予測されたサイズは、非還元、および還元条件下で、それぞれ約110 kDaおよび55 kDaであった。

【0348】

ウェスタンブロット分析は、抗体3 - 17Iが、非還元条件下で、ヒトおよびカニクイザルのEpCAMの双方に等しく良好に結合したことを実証した。逆に、3 - 17I IgGの還元された任意のEpCAM抗原への結合は観察されなかった。抗体MOC31は、異なる抗原結合パターンを実証した。3 - 17I IgGと異なり、非還元および還元条件下の双方で、ヒトEpCAMに結合した。カニクイザルの抗原でも確認されたが、非還元条件下のみであった。加えて、カニクイザルの抗原染色の弱いバンド強度は、ヒト抗原よりカニクイザルEpCAMへの結合が弱いことを示した。抗体MT201 IgGは、非還元条件下で、ヒトEpCAMに結合したことを実証したのみであった。本抗体のカニクイザル抗原への結合は検出されなかった。

【0349】

これらの結果は、MOC31およびMT201の双方が、ヒトEpCAM上で3 - 17Iと異なるエピトープに結合することを示す。この痕跡は、3 - 17IおよびMOC - 31と比較した時に、特に強い。

【0350】

ELISAおよび交差反応性

3 - 17I、MT201、およびMOC31のヒトおよびカニクイザルのEpCAMへの特異性および親和性を決定するために、一連のELISA実験を実施した。IgG1形式の全ての抗体、ならびにヒトおよびカニクイザルのEpCAM抗原を、前述に示すように産生し、精製した (実施例1および実施例2、ならびに実施例3の始めを参照)。

【0351】

抗体クローン12 - C15 IgG、16 - G5 IgG、および17 - C20 IgGのヒトEpCAMに対する特異性をELISA実験において決定した。ヒトおよびカニクイザルのEpCAMに対する、scFv形式の抗体クローン7 - F17、17 - C20、および24 - G6の特異性および親和性は、ELISA実験において決定された。

【0352】

IgG形式の抗体のELISAにおいて、MAXI - sorbプレートを、4で一晩、PBS中で、1  $\mu$ g / ml (ウェル当り100  $\mu$ l) のヒトもしくはカニクイザルのEpCAM - Fcでコーティングした。プレートを2時間、3%のBSAを含むPBSで遮断した。試験されたIgGは、133 nM ~ 32 fMの2倍希釈で添加され、1時間、室温でインキュベートされた。結合IgGの検出のため、ヤギ抗ヒトカップハRP抗体 (Southern Biotech、カタログ番号2060 - 05) を遮断溶液に1 : 5000希釈で添加し、1時間、室温でインキュベートした。

【0353】

10

20

30

40

50

s c F v 形式の抗体の E L I S A において、M A X I - s o r b プレート、4 晩、P B S 中で、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$  ( ウェル当り  $100 \mu\text{l}$  ) のヒトもしくはカニクイザルの E p C A M - F c でコーティングした。プレートを2時間、P B S 中4%のスィムミルク ( M e r c k 製品番号 1 . 15363 . 0500 ) で遮断した。試験された s c F v は、 $667 \text{ nM} \sim 3 . 2 \text{ nM}$  の2倍希釈で添加され、1時間、室温で、 $0 . 125 \mu\text{g}$  のマウス抗 c M y c I g G ( クローン 9 E 10 D i a t e c ) とともにインキュベートされた。結合 s c F v の検出のため、ウサギ抗マウス - H R P 抗体 ( D a k o 、カタログ番号 P 0260 ) を遮断溶液に1 : 300 希釈で添加し、1時間、室温でインキュベートした。

#### 【 0 3 5 4 】

全てのインキュベーション間で、プレートを P B S - T ( 0 . 05% の T w e e n - 20、M e d i c a g o # 09 - 9410 - 100 ) で3回洗浄した。全てのインキュベーションは、特に指定されない限り、1時間、室温で実施された。

10

#### 【 0 3 5 5 】

I g G 形式の抗体の E L I S A は、1 - ステップ A B T S キット ( T h e r m o S c i e n t i f i c p r o d # 37615 )、および25分のインキュベーション時間を使用して展開された。吸光度は、S L T S P E C T R A プレートリーダー上で測定された。ソフトウェア P r i s m ( G r a p h P a d , S a n D i e g o , C A ) は、回収された E L I S A データ上の1現場モデルの非線形適合を使用して親和性を推定するために使用された。

20

#### 【 0 3 5 6 】

s c F v 形式の抗体の E L I S A は、T M B 基質キット ( T h e r m o S c i e n t i f i c , p r o d # 34021 ) および10分のインキュベーション時間を使用して展開された。H <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> を添加することにより反応を停止させた。吸光度は、S L T S P E C T R A プレートリーダー上で測定された。ソフトウェア P r i s m ( G r a p h P a d , S a n D i e g o , C A ) は、回収された E L I S A データ上の1現場モデルの非線形適合を使用して親和性を推定するために使用された。

#### 【 0 3 5 7 】

結論：

E L I S A データは、3 - 17 I I g G のヒトおよびカニクイザルの E p C A M の双方への同等に良好な結合を実証した ( 図4A )。逆に、M O C 31 抗体は、ヒトおよびカニクイザルの抗原に対して、顕著に異なる結合パターンを示し ( 図4C )、よって、カニクイザル E p C A M に対して非常に低い親和性を示した。興味深いことに、抗体 M T 201 は、ヒト E p C A M に対して比較的弱い結合のみを示し、この抗体のカニクイザル抗原への結合は、検出されなかった ( 図4B )。

30

#### 【 0 3 5 8 】

抗体クローン 12 - C 15、16 - G 5、および17 - C 20 の I g G 形式も、ヒト E p C A M に結合した ( 図9 )。抗体クローン 7 - F 17、17 - C 20、および24 - G 6 の s c F v 形式は、ヒトおよびカニクイザルの E p C A M に結合し、ヒトおよびカニクイザルの双方の E p C A M に対する s c F v 形式の 3 - 17 I の親和性と比較可能であった、ヒトおよびカニクイザルの E p C A M の双方に対する親和性を示した ( 図10A および図10B )。

40

#### 【 0 3 5 9 】

親和性

3 - 17 I のヒトおよびカニクイザルの E p C A M への結合は、B I A c o r e T 100 ( B I A c o r e , I n c , P i s c a t a w a y , N J ) の表面プラスモン共鳴 ( S P R ) を使用して分析された。ヒト F c ( I g G 1 ) に融合したヒトまたはカニクイザルの E p C A M の細胞外ドメインは、100 R U の密度で、C M 5 チップ ( B I A c o r e , I n c , P i s c a t a w a y , N J ) に結合された。流速  $50 \mu\text{l} / \text{分}$ 、37 で、標準的な技法を使用して、S P R 試験を実施した。データは、B I A c o r e ソフトウェアの1 : 1 ラングミュア結合モデルを使用して分析された。

#### 【 0 3 6 0 】

50

動態分析からの結果は、3 - 17 I I g G がほぼ同じオン率 ( $k_{on}$ ) およびオフ率 ( $k_{off}$ ) 値で、ヒトおよびカニクイザルの E p C A M に結合し、よって、1 n M に近い平衡定数 ( $K_D$ ) を提供することを実証した (図5A および図5B ならびに表8を参照)。

【0361】

【表8】

表8. B I A c o r e における3-17 I I g G のヒトおよびカニクイザルの E p C A M への結合の動態分析

	$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{off}$ (1/s)	$K_D$ (M)
EpCAM, ヒト	$3.0 \times 10^7$	0.030	$1.0 \times 10^{-9}$
EpCAM, カニクイザル	$2.5 \times 10^7$	0.023	$9.3 \times 10^{-10}$

10

【0362】

よって、B I A c o r e 分析により測定されるように、ヒトおよびサルの双方の E p C A M への結合に対する本発明の3 - 17 I I g G 抗体の結合親和性は、約1 n M である。B I A c o r e により測定されるように、ヒト E p C A M に対する M O C 31 I g G の結合親和性は、類似する、すなわち、 $K_D = 3$  n M であるように、当該分野において説明される (R o o v e r s ら, 1998, B r i t . J . C a n c e r , 78 : 1407 - 1416)。しかしながら、上の E L I S A データに見られるように、サル E p C A M に対する M O C 31 I g G の結合親和性は、3 - 17 I より非常に低い。B I A c o r e により測定されるように、ヒト E p C A M に対する M T 201 I g G の結合親和性は、非常に低い、すなわち、 $K_D = 17$  5 n M であるように、当該分野において説明される (N a u n d o r f ら, 2002, I n t . J . C a n c e r , 100 : 101 - 110)。

20

【0363】

実施例4: 3 - 17 I I g G は A D C C および C D C を媒介する

3 - 17 I I g G の A D C C および / または C D C を介して標的細胞死滅を媒介する能力を決定するために、機能アッセイを実施した。これらの試験からの結果は、3 - 17 I I g G が A D C C および C D C を媒介することを示す。加えて、これらのデータは、A D C C および C D C の双方の誘発において、M T 201 I g G に対する3 - 17 I I g G の優位性を明らかに示す。

【0364】

A D C C (抗体依存性細胞障害)

30

3 - 17 I I g G の A D C C を誘発する能力は、E p C A M の面密度において100倍を超える様々な相違を網羅する、3つの異なる乳癌細胞株である M D A - M B - 231、M D A - 453、および B T - 474 を使用して分析された (P r a n g ら, 2005)。これら全ての細胞株上で A D C C を誘発することが P r a n g らによって報告されたため、M T 201 I g G が陽性対照抗体として使用された。M D A - M B - 453 (乳房乳腺、A T C C 番号 H T B - 131)、M D A - M B - 231 (乳房乳腺、A T C C 番号 H T B - 26)、および B T - 474 (乳房乳腺、A T C C 番号 H T B - 20) 細胞株は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C , R o c k v i l l e , M D) から得た。

【0365】

M D A - M B - 453 および B T - 474 細胞は R P M I - 1640 培養培地で維持され、M D A - M B - 231 細胞は、ライボピッツ培養培地で維持された。全ての培地は、10% のウシ対胎仔血清 (F C S)、ペニシリン、およびストレプトマイシンで補充された。全ての細胞培地および補充物は、P A A (P a s c h i n g , A u s t r i a) から得た。標準条件下で培養された標的細胞は、T r y p s i n - E D T A により採取され、遠心分離により沈降され、R P M I - 1640 培養培地に2回再懸濁された。 $2.5 \times 10^6$  細胞を含有する1 m l をカルセイン - A M (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C a l i f o r n i a) を用いて10  $\mu$  M の最終濃度に混合した後、垂直回転ホイール上 (7 r p m) で、37 で30分間インキュベートした。細胞を10% の F C S を含む R P M I - 1640 で3回洗浄し、細胞密度を1 m l 当り  $3 \times 10^5$  に調節した。

40

【0366】

50

F i c o l l - H y p a q u e 勾配遠心分離により、抹消血単核細胞 ( P B M C ) を健康なボランティア1人の血液から調製した。単離した P B M C を 10 % の F C S を含む R P M I - 1640 で洗浄し、1 m l 当り  $6 \times 10^6$  細胞で再懸濁した。50  $\mu$  l の各標的細胞懸濁液およびエフェクター細胞懸濁液を 96 - ウェルマイクロタイタープレートの同じウェルに添加して、20 : 1 のエフェクター ( E ) : 標的 ( T ) 細胞 ( E : T ) の割合にする。

#### 【 0 3 6 7 】

抗体希釈は、各濃度において四組で 20  $\mu$  l の容量で添加された。ついで、マイクロタイタープレートを 37 ° で 4 時間インキュベートし、3 時間 45 分後に 20  $\mu$  l の 0 . 9 % の T r i t o n X - 100 をウェルのいくつかに添加し、標的細胞の完全な溶解を達成した。次いで、各試料の 100  $\mu$  l の上澄みを黒色のマイクロタイタープレートに移動し、蛍光 ( 励起 : 488 n m 、発光 : 518 n m ) を T E C A N M 200 プレートリーダーで分析した。抗体を含まない試料の蛍光強度を、他の全ての試料の強度から引いた。抗体を含む試料の溶解のパーセントは、トリトン X - 100 で処理した後、100 % の細胞溶解の試料の蛍光強度に基づき推定された。用量反応曲線は、ソフトウェア P r i s m ( G r a p h P a d , S a n D i e g o , C A , U S A ) の 3 パラメータ適合モデルを使用して、非線形回帰分析により作製された。

#### 【 0 3 6 8 】

図 6 A 、 6 B 、 および 6 C に示される結果は、3 - 17 I I g G が、ヒト P B M C の存在下で、3 つ全ての細胞株 M D A - M B - 453 ( 図 6 A ) 、 M D A - M B - 231 ( 図 6 B ) 、 および B T - 474 ( 図 6 C ) において A D C C を誘発したことを明らかに実証する。E C <sub>50</sub> 値は、これらの細胞株において、それぞれ、0 . 08 n g / m l 、 15 n g / m l 、 および 0 . 12 n g / m l であると推定された。達成された最大殺滅は、それぞれ、75 % 、 92 % 、 および 61 % であった。対照の抗体 M T 201 は、非常に劣る A D C C 活性を実証し、M D A - M B - 453 および B T - 474 細胞株において、それぞれ、7 n g / m l および 382 n g / m l の E C <sub>50</sub> 値、ならびに 56 % および 33 % の最大殺滅であった。最も低い E p C A M 発現レベルの M D A - M B - 231 細胞の殺滅は、抗体 M T 201 において観察されなかった。これらのデータは、A D C C の誘発において、M T 201 I g G に対する 3 - 17 I I g G の優位性を明らかに示す。

#### 【 0 3 6 9 】

C D C ( 補体依存性細胞障害 )

3 - 17 I I g G の補体依存性細胞障害 ( C D C ) を誘発する能力は、2 つの細胞株 K A T O I I I および M T - 3 を使用して分析された。3 つの関連する抗体クローン 12 - C 15 I g G 、 16 - G 5 I g G 、 および 17 - C 20 I g G も、K A T O I I I 細胞株を使用して、C D C を誘発するそれらの能力について試験された。M T 201 I g G は、これらの細胞株上で C D C を誘発することが P r a n g ら ( 2005 ) によって報告されたため、陽性対照抗体として使用された。K A T O I I I ( 胃癌、A T C C 番号 H T B - 103 ) および M T - 3 ( 乳癌、D S M Z 番号 A C C 403 ) 細胞株は、それぞれ、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n ( A T C C , R o c k v i l l e , M D ) および D S M Z ( B r a u n s c h w e i g , G e r m a n y ) から得た。K A T O I I I および M T - 3 細胞は、それぞれ、20 % および 10 % のウシ胎仔血清を添加した R P M I - 1640 培養培地で維持された。全ての培地をペニシリンおよびストレプトマイシンで補充した。全ての細胞培地および補充物は、P A A ( P a s c h i n g , A u s t r i a ) から得た。

#### 【 0 3 7 0 】

標準条件下で培養された標的細胞は、遠心分離により沈降され、R P M I - 1640 培養培地に 2 回再懸濁された。12 . 5  $\times 10^6$  細胞を含有する 5 m l をカルセイン - A M ( I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C a l i f o r n i a ) と混合し、10  $\mu$  M の最終濃度にした後、垂直回転ホイール上 ( 7 r p m ) で、37 ° で 30 分間インキュベートした。細胞を 10 % の熱不活性ウシ胎仔血清 ( h i F C S ) を含む R P M I - 1640 で 3 回洗浄し、細胞密度を  $4 \times 10^6$  / m l に調節した。25  $\mu$  l の標的細胞の懸濁液を、10 % の h i F C S を含む R P

M I - 1640中の25  $\mu$  l のヒト血清および50  $\mu$  l の抗体希釈液と混合した。3 - 17 I I g G抗体を使用する実験において、ウェルの最終抗体濃度は、0.8 ng / ml ~ 50  $\mu$  g / ml の範囲であった。抗体クローン12 - C 15 I g G、16 - G 5 I g G、および17 - C 20 I g Gを使用する実験において、ウェルの最終抗体濃度は、0.19  $\mu$  g / ml ~ 1.5  $\mu$  g / ml の範囲であった。四組でアッセイを実施した。20  $\mu$  l の0.9%のトリトン X - 100をいくつかのウェルに添加して、標的細胞の完全な溶解を達成し、次いで、プレートに37 で1時間インキュベートした。10%のh i F C Sを含む100  $\mu$  l のR P M I - 1640をウェルに添加し、容量を増加させ、次いで、細胞を遠心分離により沈殿させた。100  $\mu$  l の上澄みを黒色のマイクロタイタープレートに移し、蛍光（励起：488 nm、発光：518 nm）を、T E C A N M 200プレートリーダーを使用して分析した。抗体を含まない試料の10 10 蛍光強度を、他の全ての試料の強度から引いた。抗体を含む試料の溶解のパーセントは、トリトン X - 100で処理した後、100%の細胞溶解の試料の蛍光強度に基づき推定された。用量反応曲線は、ソフトウェアP r i s m ( G r a p h P a d , S a n D i e g o , C A , U S A ) の3パラメータ適合モデルを使用して、非線形回帰分析により作成された。

#### 【 0 3 7 1 】

図7Aおよび図7Bに示される結果は、3 - 17 I I g Gが、ヒト血清の存在下、細胞株K A T O I I I ( 図7A ) およびM T - 3 ( 図7B ) においてC D Cを誘発したことを明らかに実証する。C D C活性は、K A T O I I I細胞株の抗体クローン12 - C 15 I g G、16 - G 5 I g G、および17 - C 20 I g Gにおいても実証された。

#### 【 0 3 7 2 】

双方の抗体3 - 17 I I g GおよびM T 201は、補体によって標的細胞の100%溶解を誘発することができたが、殺滅作用は、顕著に異なる抗体濃度で達成された。3 - 17 I I g GのE C <sub>50</sub>値は、K A T O I I IおよびM T - 3において、それぞれ0.28 ng / ml および0.38 ng / ml であると推定されたが、対照抗体のM T 201は、250倍高い濃度でのC D Cを示し、同じ2つの細胞株において、それぞれ、76 ng / ml および89 ng / ml のE C <sub>50</sub>値であった。これらのデータは、C D Cの誘発において、M T 201 I g Gに対する3 - 17 I I g Gの優位性を明らかに示す。

#### 【 0 3 7 3 】

##### 参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載されるものに対して補助的な例示の手順または他の詳細を提供する限り、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

Altschul, Madden, Schaffer, Zhang, Zhang, Miller, Lipman, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997.

Arbabi-Ghahroudi, Desmyter, Wyns, Hamers, Muyldermans, "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies", FEB S Lett., 414:521-526, 1997.

Baeverle and Gires, BJC, 96: 417-423, 2007.

Baldari, Murray, Ghiara, Cesareni, Galeotti, "A Novel Leader Peptide Which Allows Efficient Secretion of a Fragment of Human Interleukin 1 Beta in Saccharomyces Cerevisiae", EMBO J., 6:229-234, 1987

Beckman, Weiner and Davis, "Antibody Constructs in Cancer Therapy", Cancer, 109(2):170-179, 2006.

Brinster, Chen, Trumbauer, Yagle, Palmiter, "Factors Affecting the Efficiency of Introducing Foreign DNA into Mice by Microinjecting Eggs", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(13):4438-4442, 1985.

Carillo and Lipton, "The Multiple Sequence Alignment Problem in Biology", SIAM J. Applied Math., 48:1073, 1988.

Cullen, Gray, Wilson, Hayenga, Lamsa, Rey, Norton, Berka, "Controlled Expression and Secretion of Bovine Chymosin in Aspergillus Nidulans", BioTechnology, 5:369

10

20

30

40

50



, 1987.

Davies and Cohen, "Interactions of protein antigens with antibodies," *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7-12, 1996.

Davies, Padlan, Sheriff, "Antibody-antigen complexes," *Annu. Rev. Biochem.* 59:439-473, 1990.

Davies and Riechmann, "Antibody VH domains as small recognition units", *Biotechnology (NY)*, 13:475-479, 1995.

Devereux, Haeberli, Smithies, "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the VAX", *Nucleic Acids Res.*, 12:387, 1984.

Di Paolo S, "A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity", *Clin Cancer Res* 9: 2837-48, 2003. 10

Frische, Meldal, Werdelin, Mouritsen, Jensen, Galli-Stampino, Bock, "Multiple Column Synthesis of a Library of T-Cell Stimulating Tn-Antigenic Glycopeptide Analogues for the Molecular Characterization of T-Cell-Glycan Specificity", *J. Pept. Sci.*, 2(4): 212-22, 1996.

Goeddel, "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990.

Hamers-Casterman and Atarhouch, "Naturally Occurring antibodies Devoid of Light Chains", *Nature*, 363(6428):446-448, 1993. 20

Hammer, Pursel, Rexroad, Wall, Bolt, Ebert, Palmiter, Brinster, "Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection", *Nature*, 315:680-683, 1985.

Henikoff and Henikoff, "Amino acid Substitution Matrices from Protein Blocks", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915 - 10919, 1992.

Hinnen, Hicks, Fink, "Transformation of Yeast", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1929, 1978.

Holliger and Hudson, "Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains", *Nature Biotechnology*, 23(9):1126-1136, 2005.

Holm, "Dali: a Network Tool for Protein Structure Comparison", *Trends in Biochemical Sciences*, 20:478-480, 1995. 30

Holm, "Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices", *J. Mol. Biol.*, 233:123-38, 1993

Holm, "Touring Protein Fold Space With Dali/FSSP", *Nucleic Acid Res.*, 26:316-9, 1998.

Ito, Fukuda, Murata, Kimura, "Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations", *J. Bacteriol.*, 153:163-168, 1983.

Kabat, Wu, Perry, Gottesman, Foeller, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669, 1991.

Kaufman, Murtha, Davies, "Translational Efficiency of Polycistronic Mrnas and Their Utilization to Express Heterologous Genes in Mammalian Cells", *EMBO J.*, 6:187-195, 1987. 40

Kiss, Fisher, Pesavento, Dai, Valero, Ovecka, Nolan, Phipps, Velappan, Chasteen, Martinez, Waldo, Pavlik, Bradbury, "Antibody binding loop insertions as diversity elements", *Nucleic Acids Research*, 34(19):e132, 2006.

Kurjan and Herskowitz, "Structure of a Yeast Pheromone Gene (MF<sub>1</sub>): a Putative -Factor Precursor Contains Four Tandem Copies of mature -Factor", *Cell*, 30:933-943, 1982.

Le Gall, Reusch, Little and Kipriyanov, "Effect of Linker Sequences Between the Antibody Variable Domains on the Formation, Stability and Biological Activity of 50

- a Bispecific Tandem Diabody", *Protein Engineering, Design & Selection*, 17(4):357-366, 2004.
- Luckow and Summers, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus Expression Vectors", *Virology*, 170:31-39, 1989.
- Marhaba<sup>5</sup>, "CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers", *Curr Mol Med* 8: 784-804, 2008.
- Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis 1. Synthesis of a Tetrapeptide", *J. Am. Chem. Assoc.*, 85:2149-2154, 1964.
- Munz<sup>5</sup>, "The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation", *Oncogene* 23: 5748-58, 2004. 10
- Myers and Miller, "Optical Alignments in Linear Space", *CABIOS*, 4:11-17, 1988.
- Needleman and Wunsch, "A General Method Applicable to the Search For Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins", *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970.
- Neuberger and Milstein, "Somatic hypermutation," *Curr. Opin. Immunol.*, 7:248-254, 1995.
- Nicaise, Valerio-Lepiniec, Minard, Desmadril, "Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold", *Protein Sci.*, 13: 1882-1891, 2004.
- O'Brien<sup>5</sup>, "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice", *Nature* 445: 106-10, 2007. 20
- Palmiter and Brinster, "Transgenic Mice", *Cell*, 41:343-345, 1985.
- Palmiter, Norstedt, Gelinas, Hammer, Brinster, "Metallothionein-Human GH Fusion Genes Stimulate Growth of Mice", *Science*, 222:809-814, 1983.
- Pearson and Lipman, "Improved tools for biological sequence analysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444-2448, 1988.
- Pearson, "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA", *Methods in Enzymology*, 183:63-98, 1990.
- Prang, Preithner, Brischwein, Goster, Woppel, Muller, Steiger, Peters, Baeuerle, da Silva, "Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines", *Br J Cancer*, 92(2):342-349, 2005. 30
- Qiu, Wang, Cai, Wang, Yue, "Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting", *Nature Biotechnology*, 25(8): 921-929, 2007.
- Reff and Heard, "A Review of Modifications to Recombinant Antibodies: Attempt to Increase Efficacy in Oncology Applications", *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 40:25-35, 2001.
- Reiter, Ulrich Brinkmann, Lee and Pastan, "Engineering Antibody Fv Fragments for Cancer Detection and Therapy: Disulfide-Stabilized Fv Fragments", *Nature Biotechnology*, 14:1239-1245, 1996. 40
- Schultz, Tanner, Hofmann, Emini, Condra, Jones, Kieff, Ellis, "Expression and Secretion in Yeast of a 400-Kda Envelope Glycoprotein Derived from Epstein-Barr Virus", *Gene*, 54:113-123, 1987.
- Seed, "an LFA-3 Cdna Encodes a Phospholipid-Linked Membrane Protein Homologous to its Receptor CD2", *Nature*, 329:840, 1987.
- Sinkar, White, Gordon, "Molecular Biology of Ri-Plasmid a Review", *J. Biosci (Bangalore)*, 11:47-58, 1987.
- Smith and Waterman, "Comparison of Biosequences", *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981.
- Smith, Summers, Fraser, "Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected With Baculovirus Expression Vector", *Mol. Cell Biol.*, 3:2156-2165, 1983. 50

- Spizzo R, "High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer", *Breast Cancer Res Treat* 86: 207-13, 2004.
- Spizzo R, "Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer", *Gynecol Oncol* 103: 483-8, 2006.
- Thompson, Higgins, Gibson, "CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994.
- van den Beucken, Neer, Sablon, Desmet, Celis, Hoogenboom, Hufton, "Building novel binding ligands to B7.1 and B7.2 based on human antibody single variable light chain domains", *J. Mol. Biol.*, 310:591-601, 2001. 10
- Varga R, "Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival", *Clin Cancer Res* 10: 3131-6, 2004.
- Wagner, Milstein, Neuberger, "Codon bias targets mutation," *Nature*, 376:732, 1995.
- Ward, Gussow, Griffiths, Jones, Winter, "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escherichia Coli*", *Nature*, 341(6242):544-546, 1989.
- Went R, "Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers", *Br J Cancer* 94: 128-35, 2006. 20
- Young, MacKenzie, Narang, Oomen and Baenziger, "Thermal Stabilization of a Single-Chain Fv Antibody Fragment by Introduction of a Disulphide Bond", *FEBS Letters*, 16396(377):135-139, 1995.
- Zambryski, Herrera-Estreila, DeBlock, Van Montagu, Schell "Genetic Engineering, Principles and Methods", Hollaender and Setlow (eds.), Vol. VI, pp. 253-278, Plenum Press, New York, 1984.
- Zapata, Ridgway, Mordenti, Osaka, Wong, Bennett, Carter, "Engineering Linear F(Ab')<sub>2</sub> Fragments For Efficient Production in *Escherichia Coli* and Enhanced Antiproliferative Activity", *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062, 1995. 30
- Zhang, Gildersleeve, Yang, Xu, Loo, Uryu, Wong, Schultz, "A New Strategy for the Synthesis of Glycoproteins", *Science*, 303(5656): 371-373, 2004.

# 【配列表フリーテキスト】

## 【 0 3 7 4 】

配列番号 1 9 : リンカー

配列番号 3 7 :

コンセンサス配列

Xaaはいずれのアミノ酸であってもよい

Xaaはいずれのアミノ酸であってもよい

配列番号 3 8 :

コンセンサス配列

Xaaはいずれのアミノ酸であってもよい

Xaaはいずれのアミノ酸であってもよい

配列番号 8 9 :

コンセンサス配列

Xaaはいずれのアミノ酸であってもよい

Xaaはいずれのアミノ酸であってもよい

Xaaはいずれのアミノ酸であってもよい

Xaaはいずれのアミノ酸であってもよい

配列番号 9 0 :

40

50

## コンセンサス配列

XaaはGlnまたはHisまたはLysであってよい

XaaはAsnまたはAspであってよい

XaaはGlyまたはThrまたはSerまたはmetまたはAlaであってよい

XaaはPheまたはTrpまたはTyrであってよい

配列番号 9 2 : MT201 IgG軽鎖

配列番号 9 3 : MOC31 IgG重鎖

配列番号 9 4 : MOC31 IgG軽鎖

配列番号 9 5 : ヒト EpCAM/Fc 融合物

配列番号 9 6 : カニクイザル EpCAM/Fc 融合物

配列番号 9 7 : 制限部位を有する scFV 3-17I

10

## 【図 1】

scFv 3-17I ナクレオチド配列

CCATGGCCAGGTCACGCTGGTCAGCTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGT  
 Neol |-----V<sub>H</sub> 開始 (配列番号 20 開始)

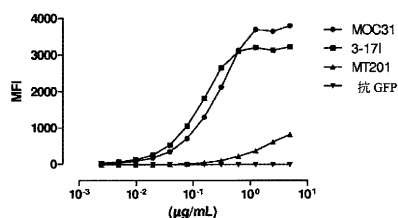
GAAAGTCTCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGA  
 CAGGCCCTCGGACAAGGCTTGGATGGATGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAA  
 ACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGC  
 CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGC  
 CTTCTATGGAAGTCTGAGGGCCAGGGAACCTGGTCAACCTCTCTCAAGCTTTCAGGGA  
 GTGCATCCGCCCAAACTTGAAGAAGGTGAATTTTCAGAGCACCCCTTGAAGATTGTAAAT  
 開始 リンカー 終了 V<sub>H</sub> 開始  
 GACACAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTCTCCAGGGGAAGAGCCACCTCTCTCTGACAGG  
 GCCAGTCAGAGTGTAGCAGCACTTAGCCTGTGATCCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA  
 GGCTCATCTCTATGTCATCCACACGCGCTCTGATATCCAGCCAGGTTCACTGACAG  
 TGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCACTT  
 TATTACTGTCAGCAGTATAAATAGTGGCCCTCCGGCTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGC  
 TGGAGATCAAAGCGCCCGC (配列番号 20 終了)

-----V<sub>L</sub> 終了 ----- NotI

scFv 3-17I アミノ酸配列

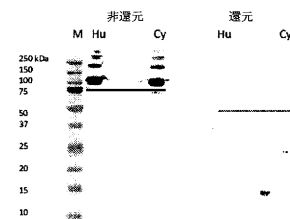
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTSSYALISWVRQAPQGLENMGIIPIFGTANYAQK  
 |-----V<sub>H</sub> 開始 (配列番号 21 開始)  
 FQGRVTITADESTSTAYMELSSLSAEDTAVYYCARGLLWNYWGQTLVTVSSKLSGSASAPKL  
 EGEFSEARUEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSNLAWYQQKPGQAPRLIITYGAST  
 ---リンカー--- |-----V<sub>L</sub> 開始  
 TASGIPARFSASGSGTDFTLTISSLQSGDFAVYYCQQYNHNPAYTFGQGTKLEIK  
 (配列番号 21 終了) V<sub>L</sub> 終了 -----

## 【図 2】



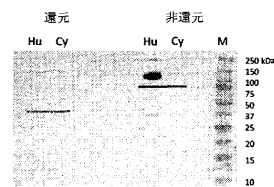
## 【図 3 A】

3-17I IgG



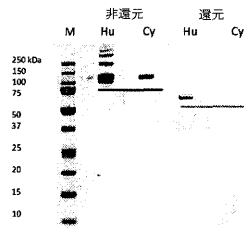
## 【図 3 B】

MT201 IgG

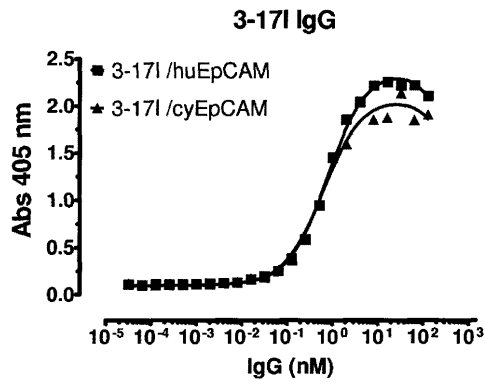


【図 3 C】

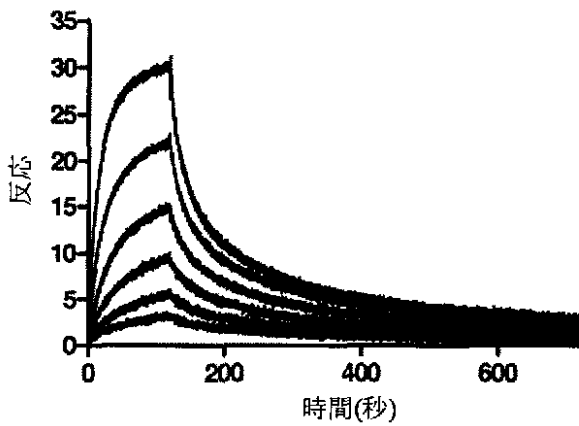
MOC31 IgG



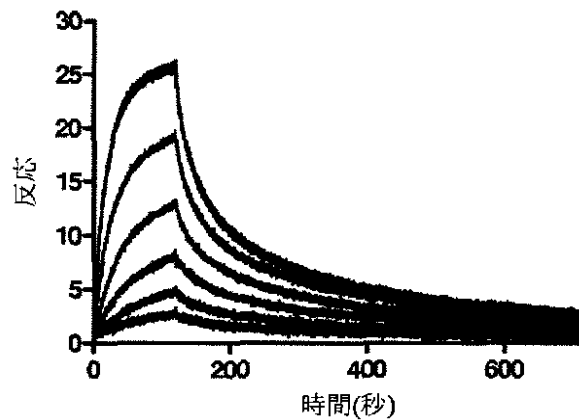
【図 4 A】



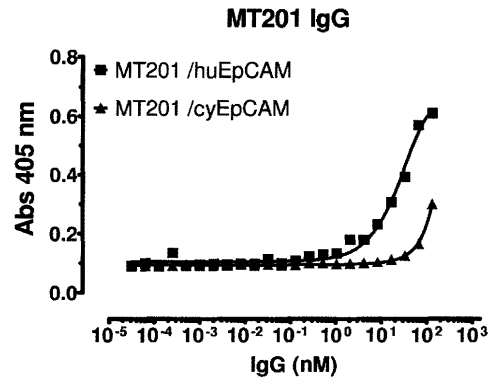
【図 5 A】



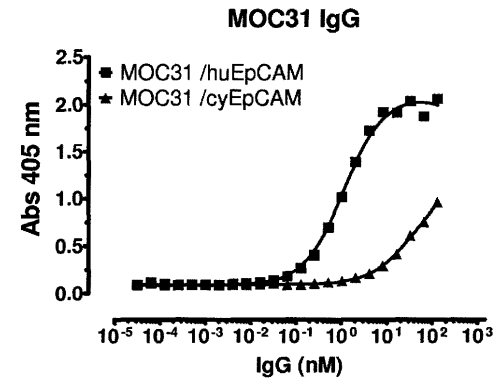
【図 5 B】



【図 4 B】

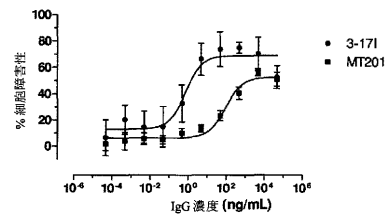


【図 4 C】



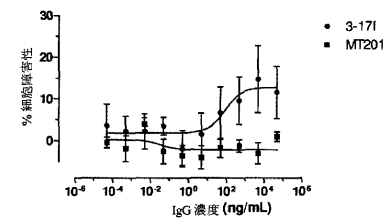
【図 6 A】

細胞株: MDA-MB-453



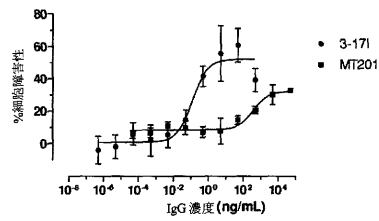
【図 6 B】

細胞株: MDA-MB-231



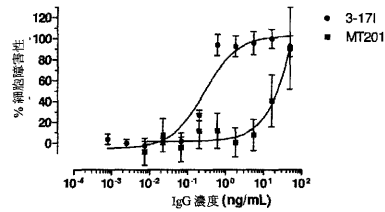
## 【図 6 C】

細胞株: BT-474



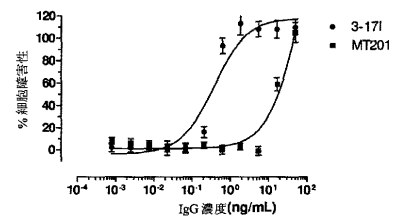
## 【図 7 A】

細胞株: KATO III

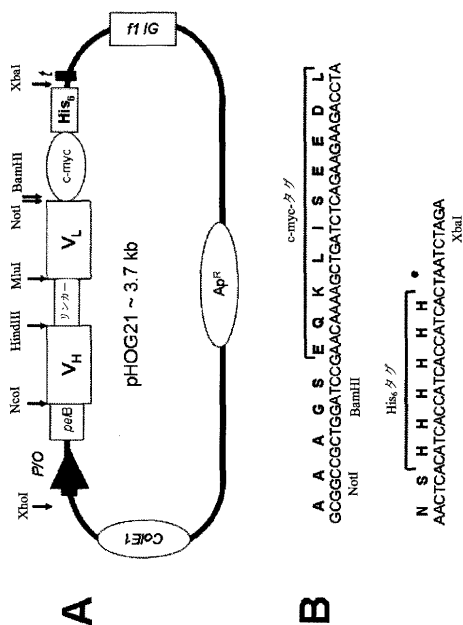


## 【図 7 B】

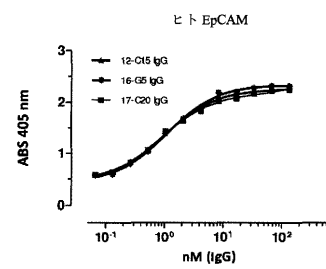
細胞株: MT-3



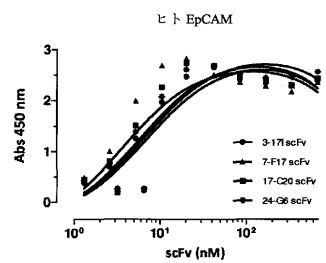
## 【図 8】



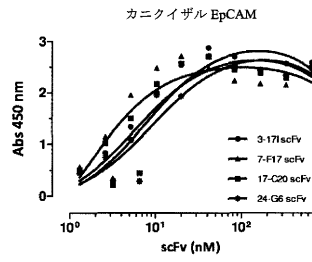
## 【図 9】



## 【図 10 A】



## 【図 10 B】



## 【配列表】

2012529281000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2010/050969

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/30 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7 227 002 B1 (KUFER PETER [DE] ET AL) 5 June 2007 (2007-06-05) whole document, in particular fig. 6-7; Seq ID No. 142 and 144	1-11, 13-43
X	LUTTERBUESE PETRA ET AL: "Exchanging human Fc gamma 1 with murine Fc gamma 2a highly potentiates anti-tumor activity of anti-EpCAM antibody adecatumumab in a syngeneic mouse lung metastasis model" CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY, vol. 56, no. 4, April 2007 (2007-04), pages 459-468, XP019489782 ISSN: 0340-7004 the whole document	1-11, 13-43
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  24 September 2010		Date of mailing of the international search report  04/10/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5816 Patanlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Bernhardt, Wiebke



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2010/050969

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PRANG N ET AL: "Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines" BRITISH JOURNAL OF CANCER, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 92, no. 2, 31 January 2005 (2005-01-31), pages 342-349, XP002437689 ISSN: 0007-0920 abstract; figures</p>	1-11, 13-43
X	<p>RAUM T ET AL: "Anti-self antibodies selected from a human IgD heavy chain repertoire: A novel approach to generate therapeutic human antibodies against tumor-associated differentiation antigens" CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY, SPRINGER-VERLAG, BERLIN, DE LNKD-DOI:10.1007/PL00006684, vol. 50, no. 3, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 141-150, XP002301913 ISSN: 0340-7004 while documents, in particular figure 1</p>	1-11, 13-43
X	<p>BEIBOER S H W ET AL: "Guided selection of a pan carcinoma specific antibody reveals similar binding characteristics yet structural divergence between the original murine antibody and its human equivalent" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1006/JMBI.2000.3512, vol. 296, no. 3, 25 February 2000 (2000-02-25), pages 833-849, XP004461580 ISSN: 0022-2836 abstract, figures</p>	1-11, 13-43
A	<p>PAOLO DI C ET AL: "A RECOMBINANT IMMUNOTOXIN DERIVED FROM A HUMANIZED EPITHELIAL CELL ADHESION MOLECULE-SPECIFIC SINGLE-CHAIN ANTIBODY FRAGMENT HAS POTENT AND SELECTIVE ANTITUMOR ACTIVITY" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 9, no. 7, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 2837-2848, XP001203425 ISSN: 1078-0432 the whole document</p>	1-43

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2010/050969

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding"</p> <p>IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL LNKD-DOI:10.1016/S1380-2933(96)00045-0, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292</p> <p>ISSN: 1380-2933</p> <p>* abstract</p>	1-43
A	<p>KIRMAN IRENA ET AL: "Drug evaluation: adecatumumab, an engineered human anti-EpCAM antibody"</p> <p>CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS, CURRENT DRUGS, LONDON, GB, vol. 9, no. 2, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 190-196, XP009138518</p> <p>ISSN: 1464-8431</p> <p>the whole document</p>	1-43

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2010/050969

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 7227002	B1	05-06-2007	AT 200679 T 15-05-2001
		AU 742045 B2 13-12-2001	
		BR 9809391 A 13-06-2000	
		CA 2286879 A1 22-10-1998	
		CN 1252076 A 03-05-2000	
		CU 23268 A3 14-03-2008	
		CZ 9903614 A3 12-04-2000	
		DE 69800716 D1 23-05-2001	
		DE 69800716 T2 20-09-2001	
		DK 0970126 T3 13-08-2001	
		WO 9846645 A2 22-10-1998	
		EP 0970126 A2 12-01-2000	
		ES 2172149 T3 16-09-2002	
		GR 3036229 T3 31-10-2001	
		HK 1026911 A1 02-08-2002	
		HU 0100794 A2 28-06-2001	
		IL 132062 A 11-02-2007	
		JP 3876002 B2 31-01-2007	
		JP 2001519824 T 23-10-2001	
		KR 20050052549 A 02-06-2005	
		NO 994983 A 07-12-1999	
		PL 344190 A1 08-10-2001	
		PT 970126 E 30-10-2001	
		RU 2224766 C2 27-02-2004	
		SI 970126 T1 31-08-2001	
		TR 9902553 T2 21-03-2000	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード ( 参考 )
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
<b>C 1 2 N 7/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/00	
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	
<b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
	G 0 1 N 33/574 A	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, S E, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, I L, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ , OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 カールソン , ジェニー マルガレタ  
ノルウェー エヌ - 0 4 5 4 オスロ , ウルレヴァルスヴェイエン 5 6 シー

(72)発明者 グリエブ , レンコ アルバート  
ノルウェー エヌ - 3 4 7 0 スレンメスタッド , オダルスヴェイエン 3 1 ビー

(72)発明者 キプリジャノヴ , セルゲジュ ミチャイロヴィク  
ノルウェー エヌ - 0 7 6 8 オスロ , ホヴセテルヴェイエン 9 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA01 GA11 HA01  
4B064 AG27 CA01 CA12 CA19 CC24 DA05 DA14  
4B065 AA90Y AA95X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44  
4C085 AA13 AA14 BB31 DD62 EE01  
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA28 EA51 FA74