

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6831836号
(P6831836)

(45) 発行日 令和3年2月17日(2021.2.17)

(24) 登録日 令和3年2月2日(2021.2.2)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15 E
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/19

請求項の数 20 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-511627 (P2018-511627)
(86) (22) 出願日	平成28年9月6日(2016.9.6)
(65) 公表番号	特表2018-529672 (P2018-529672A)
(43) 公表日	平成30年10月11日(2018.10.11)
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/050391
(87) 國際公開番号	W02017/041092
(87) 國際公開日	平成29年3月9日(2017.3.9)
審査請求日	令和1年9月5日(2019.9.5)
(31) 優先権主張番号	62/214, 242
(32) 優先日	平成27年9月4日(2015.9.4)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	504206056 ヘルス リサーチ インコーポレイテッド HEALTH RESEARCH, INC. アメリカ合衆国 ニューヨーク州 142 63 バッファロー エルム アンド カ ールトン ストリーツ
(74) 代理人	110000475 特許業務法人みのり特許事務所
(72) 発明者	フェンスター・メイカー, ロバート, エイ. アメリカ合衆国、ニューヨーク州 142 28、アムハースト、ノース ロッキング ハム ウェイ 273

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌治療のための抗-サバイビン抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体においてサバイビン-発現腫瘍を治療するために、サバイビン-発現腫瘍を有する個体に投与される組成物であって、

重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有する、サバイビンに特異的な抗体を含み、
ここで、

a) 前記重鎖可変領域が、配列番号7の配列を含むV H C D R 1、配列番号8の配列を含むV H C D R 2、及び配列番号9の配列を含むV H C D R 3を含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号10の配列を含むV L C D R 1、配列番号11の配列を含むV L C D R 2、及び配列番号12の配列を含むV L C D R 3を含む、

又は

b) 前記重鎖可変領域が、配列番号13の配列を含むV H C D R 1、配列番号14の配列を含むV H C D R 2、及び配列番号15の配列を含むV H C D R 3を含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号16の配列を含むV L C D R 1、配列番号17の配列を含むV L C D R 2、及び配列番号18の配列を含むV L C D R 3を含む組成物。

【請求項 2】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、二重特異性抗体又は多特異性抗体である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

10

20

前記抗体が、アイソタイプ Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig M、Ig A、Ig D 又は Ig E を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記抗体が、アイソタイプ Ig G 2 b 又は Ig G 1 を有する、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記重鎖可変領域が、配列番号 19 に少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号 20 に少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記重鎖可変領域が、配列番号 21 に少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号 22 に少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

サバイビンに特異的に結合する単離モノクローナル抗体であって、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含んでおり、

a) 前記重鎖可変領域が、配列番号 7 の配列を含む VH CDR 1、配列番号 8 の配列を含む VH CDR 2、及び配列番号 9 の配列を含む VH CDR 3 を含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号 10 の配列を含む VL CDR 1、配列番号 11 の配列を含む VL CDR 2、及び配列番号 12 の配列を含む VL CDR 3 を含む、

又は

b) 前記重鎖可変領域が、配列番号 13 の配列を含む VH CDR 1、配列番号 14 の配列を含む VH CDR 2、及び配列番号 15 の配列を含む VH CDR 3 を含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号 16 の配列を含む VL CDR 1、配列番号 17 の配列を含む VL CDR 2、及び配列番号 18 の配列を含む VL CDR 3 を含むモノクローナル抗体。

【請求項 8】

前記重鎖可変領域が、配列番号 19 に少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号 20 に少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

前記重鎖可変領域が、配列番号 21 に少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号 22 に少なくとも 90 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、单鎖抗体、二重特異性抗体又は多特異性抗体である、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 11】

前記抗体が、アイソタイプ Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig M、Ig A、Ig D 又は Ig E を有する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 12】

前記抗体が、アイソタイプ Ig G 2 b 又は Ig G 1 を有する、請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 13】

請求項 7 に記載の抗体及び薬学的に許容されるキャリアを含む、医薬組成物。

【請求項 14】

請求項 7 に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

【請求項 15】

前記モノクローナル抗体が、アイソタイプ Ig G 2 b 又は Ig G 1 である、請求項 14 に記載のハイブリドーマ細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

請求項 7 に記載の a) の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列が導入されている、形質転換細胞。

【請求項 17】

請求項 7 に記載の b) の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列が導入されている、形質転換細胞。

【請求項 18】

請求項 7 に記載の抗体を含むキメラ抗原受容体。

【請求項 19】

前記抗体が単鎖抗体である、請求項 18 に記載のキメラ抗原受容体。

10

【請求項 20】

請求項 18 に記載のキメラ抗原受容体を有する、単離された形質転換 T 細胞。

【発明の詳細な説明】**【関連出願の相互参照】****【0001】**

この出願は、2015年9月4日に提出された米国仮出願第62/214,242号に基づく優先権を主張し、その開示は参照により本明細書中に包含される。

【背景技術】**【0002】**

サバイビンは、アポトーシス抑制物質のファミリーに属する細胞内タンパク質である。サバイビンは細胞分裂を調節する紡錘体装置と協調して働く。それは、細胞周期のG2/M期の間に特定の細胞で発現され、細胞周期進行のこの期の間に紡錘体微小管形成中心に結合する。サバイビンは、細胞周期を調節するため、およびアポトーシス細胞死を抑制するため、複数の異なる細胞部位で重要な役割を果たす。それは多くの異なる種類の癌細胞で頻繁に発現するが、正常な成人組織ではまれにしか発現しない。サバイビンペプチド配列は、ワクチン接種戦略を立てるために使用してきた。いくつかの種類の癌を有する患者の生存は改善したが、特に診断時に進行疾患有する患者については課題が残っている。このように、癌と戦うためのさらなる戦略を開発する需要がなお存続している。

20

【発明の概要】**【0003】**

30

本開示は、サバイビン発現細胞を含む腫瘍を治療するための組成物及び方法を提供する。本開示は、単離抗体(モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体、それらのフラグメント及び変異体を含む)、前記抗体を含む組成物、前記抗体又はその一部又はその変異体をコードする核酸分子、前記核酸分子を含むベクター、前記抗体及び/又は核酸分子を含む細胞、1種以上の抗体又は核酸分子を含むキット、腫瘍の増殖を抑制するために、前記抗体又は核酸分子、あるいは前記抗体又は核酸分子を含む細胞を使用する方法を提供する。

【0004】

一面では、本開示は、サバイビンの一以上のエピトープに対して特異的に反応する単離抗体(ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体(mAb)であってもよい)を提供する。前記抗体は、サバイビンのペプチド又はその変異体の投与に反応して產生されてもよい。例えば、抗体は、ペプチド(9~23アミノ酸長で、且つコア配列 QMFFCF(配列番号 3)を含む)に反応して產生されることができる。

40

【0005】

この開示の抗体は、配列番号 7 に示される配列を有する相補性決定領域(CDR)1、配列番号 8 に示される配列を有するCDR2、及び配列番号 9 に示される配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域(VH)と、配列番号 10 に示される配列を有するCDR1、配列番号 11 に示される配列を有するCDR2、及び配列番号 12 に示される配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域(VL)とを含むモノクローナル抗体であってもよく；あるいは、配列番号 13 に示される配列を有するCDR1、配列番号 14 に示される配列を有するCDR2、及び配列番号 15 に示される

50

配列を有するCDR3を含むVHと、配列番号16に示される配列を有するCDR1、配列番号17に示される配列を有するCDR2、及び配列番号18に示される配列を有するCDR3を含むVLとを含むモノクローナル抗体であってもよい。

【0006】

本開示の抗体は、キメラ抗体であっても、ヒト抗体であっても、ヒト化抗体であってもよい。キメラ抗体又はヒト化抗体では、重鎖及び/又は軽鎖のある部分は、ある1つの種から得られた配列と同一であるか相同性を有し得る一方、他の部分は別の種から得られた配列と同一であるか相同性を有し得る。例えば、マウスのモノクローナル抗体を単離するか、生成し、その後、これらの抗体(又はそれから導き出した配列情報)の一部を、キメラ抗体又はヒト化抗体を產生するために使用してもよい。例えば、マウスを1種以上のサバイビンペプチドで免疫化し、その後腹水サンプルを採取してもよい。モノクローナル抗体および対応するハイブリドーマ細胞株のパネルを開発するために、前記サンプルをスクリーニングし、選択することができる。その後、モノクローナル抗体から得られた部分又は配列を、キメラ抗体又はヒト化抗体を產生するために使用することができる。本開示の抗体は、抗体フラグメント、単鎖抗体、二重特異性又は多特異性の抗体であってもよい。

10

【0007】

本開示は、前記抗体(mAbを含む)配列の一部又は全てをコードする配列を含む核酸分子を提供する。本開示は、前記核酸分子を含む細胞も提供する。

【0008】

本開示は、治療を必要とする個体の腫瘍を治療する方法を提供し、当該方法は、前記個体に、サバイビン(例えばヒトサバイビンなど)に特異的な1以上の中等の抗体を含む組成物を投与することを含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、GL261グリオーマを有するC57BL/6マウスにおける頭蓋内グリオーマモデルに対する、抗-サバイビンモノクローナル抗体の効果を表す。マウスは、腫瘍移植後、抗-サバイビン抗体を7日に1回投与された。生存率は、時間の関数として示される。IgGは、通常のマウス非特異的IgGである。コントロールは、未治療の腫瘍移植マウスである。

【0010】

30

【図2】図2は、GL261グリオーマを有するC57BL/6マウスにおける皮下腫瘍モデルに対する、抗-サバイビンポリクローナル及びモノクローナル抗体の効果を表す。マウスは、腫瘍移植後、7日に1回、表示の治療を受けた。SurVaxMは、サバイビンワクチンである；抗-サバイビン血清(抗体)は、活性サバイビンワクチン又はサバイビンペプチドを投与された非担癌マウスから得た。コントロールは、未治療の腫瘍移植マウスである。

【0011】

【図3】図3は、GL261グリオーマを有するC57BL/6マウスにおける皮下腫瘍モデルに対する、抗-サバイビンポリクローナル抗体の効果を表す。マウスは、腫瘍移植後、7日に1回、表示の治療を受けた。SurVaxMは、サバイビンワクチンである；抗-サバイビン血清(抗体)は、活性SurVaxMワクチンを投与された非担癌マウスから得た。マウスは50日まで経過観察された。

40

【0012】

【図4】図4は、ヌード(免疫不全)マウスにおけるB16マウスマラノーマに対する2つのモノクローナル抗体の効果を表す。腫瘍体積は、非特異的IgG、mAb 2C2、及びmAb H30を投与されたグループについて示される。各点は、一匹の動物を表す。

【0013】

【図5】図5は、C57BL/6(免疫正常)マウスにおけるB16マウスマラノーマに対する2つのモノクローナル抗体の効果を表す。腫瘍体積は、非特異的IgG、mAb 2C2、及びmAb H30を投与されたグループについて示される。各点は、一匹の動物を表す。

【0014】

50

[図6] 図6は、ヌード(免疫不全)マウスにおけるB16マウスマラノーマに対する2つのモノクローナル抗体の効果を、時間の関数として表す。腫瘍体積は、非特異的IgG、mAb 2C2、及びmAb H30を投与されたグループについて示される。

【0015】

[図7] 図7は、C57Bl/6(免疫正常)マウスにおけるB16マウスマラノーマに対する2つのモノクローナル抗体の効果を、時間の関数として表す。腫瘍体積は、非特異的IgG、mAb 2C2、及びmAb H30を投与されたグループについて示される。

【0016】

[図8] 図8は、ヌード(免疫不全)マウスにおけるGL261マウスマグリオーマに対する2つのモノクローナル抗体の効果を表す。腫瘍体積は、コントロール(未治療)、非特異的IgG、mAb 2C2、及びmAb H30を投与されたグループについて示される。各点は、一匹の動物を表す。

10

【0017】

[図9] 図9は、C57Bl/6(免疫正常)マウスにおけるGL261マウスマグリオーマに対する2つのモノクローナル抗体の効果を表す。腫瘍体積は、コントロール、非特異的IgG、mAb 2C2、及びmAb H30を投与されたグループについて示される。各点は、一匹の動物を表す。

【0018】

[図10] 図10は、C57Bl/6(免疫正常)マウスにおけるGL261マウスマグリオーマに対する2つのモノクローナル抗体の効果を、時間の関数として表す。腫瘍体積は、コントロール、非特異的IgG、mAb 2C2、及びmAb H30を投与されたグループについて示される。

20

【0019】

[図11] 図11は、ヌード(免疫不全)マウスにおけるGL261マウスマグリオーマに対する2つのモノクローナル抗体の効果を、時間の関数として表す。腫瘍体積は、コントロール、非特異的IgG、mAb 2C2、及びmAb H30を投与されたグループについて示される。

【0020】

[図12] 図12は、サバイビンワクチン(配列番号4)を投与された患者における総IgGの産生を表す。データは8人の患者について示される。血清ELISA研究は、野生型サバイビンペプチド(アミノ酸53-67[配列番号27])に対する血清IgG反応性の進行性の増加を示す。

【0021】

30

[図13] 図13は、サバイビンワクチン(配列番号4)を投与された患者におけるサバイビン特異的IgGの産生を表す。データは8人の患者について示される。血清ELISA研究は、変異サバイビンペプチド(アミノ酸53-67/M57[配列番号4])に対する血清IgG反応性の進行性の増加を示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本開示は、サバイビンペプチド-ワクチン接種マウスから得た抗血清及び精製したサバイビンに対するマウスモノクローナル抗体が、動物モデルにおいて腫瘍の増殖を有意に抑制するという我々の知見に基づいている。サバイビンは、細胞によって分泌されず、又は細胞表面に提示されない(MHCクラスI提示関連を除いて)と考えられている細胞内タンパク質であるため、これは驚くべきことである。このように、抗体-媒介性(受動性)サバイビン免疫療法は、有効であるとは予測されていなかった。しかしながら、我々はそれが有効であることを発見した。

40

【0023】

この開示は、単離された抗体及びそのフラグメント、抗体又はそのフラグメントをコードする単離された核酸分子、抗体又はそのフラグメントを产生する細胞、抗体又はそのフラグメントをコードする核酸を含むベクター又は細胞、前述のいずれかを含む組成物、前述のいずれかを製造する方法、及び、前記抗体及びそのフラグメントを使用する方法、又は癌(例えば、サバイビン-発現腫瘍を伴うもの)の治療において、前記抗体及びそのフラグメント、又は核酸分子を使用する方法を提供する。

50

【0024】

この出願の配列表の説明は、以下の通りである。

【0025】

配列番号1は、ヒトサバイシンの23アミノ酸長のフラグメントを表すアミノ酸配列である。

【0026】

配列番号2は、1つのアミノ酸変異を有する、配列番号1の変異体である。

【0027】

配列番号3は、配列番号2の6アミノ酸長のフラグメントである。

【0028】

配列番号4は、配列番号2の15アミノ酸長のフラグメントであって、配列番号3の配列を含む。

10

【0029】

配列番号5は、配列番号2の10アミノ酸長のフラグメントであって、配列番号3の配列を含む。

【0030】

配列番号6は、配列番号2の9アミノ酸長のフラグメントであって、配列番号3の配列を含む。

【0031】

配列番号7は、mAb 2C2E7のVH CDR1のアミノ酸配列である。

20

【0032】

配列番号8は、mAb 2C2E7のVH CDR2のアミノ酸配列である。

【0033】

配列番号9は、mAb 2C2E7のVH CDR3のアミノ酸配列である。

【0034】

配列番号10は、mAb 2C2E7のVL CDR1のアミノ酸配列である。

【0035】

配列番号11は、mAb 2C2E7のVL CDR2のアミノ酸配列である。

【0036】

配列番号12は、mAb 2C2E7のVL CDR3のアミノ酸配列である。

30

【0037】

配列番号13は、mAb 30H3D2のVH CDR1のアミノ酸配列である。

【0038】

配列番号14は、mAb 30H3D2のVH CDR2のアミノ酸配列である。

【0039】

配列番号15は、mAb 30H3D2のVH CDR3のアミノ酸配列である。

【0040】

配列番号16は、mAb 30H3D2のVL CDR1のアミノ酸配列である。

【0041】

配列番号17は、mAb 30H3D2のVL CDR2のアミノ酸配列である。

40

【0042】

配列番号18は、mAb 30H3D2のVL CDR3のアミノ酸配列である。

【0043】

配列番号19は、mAb 2C2E7の重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【0044】

配列番号20は、mAb 2C2E7の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【0045】

配列番号21は、mAb 30H3D2の重鎖可変領域のアミノ酸配列である。

【0046】

配列番号22は、mAb 30H3D2の軽鎖可変領域のアミノ酸配列である。

50

【0047】

配列番号23は、2C2E7の重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列である(それは、配列番号19のアミノ酸配列をコードする)。

【0048】

配列番号24は、2C2E7の軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列である(それは、配列番号20のアミノ酸配列をコードする)。

【0049】

配列番号25は、30H3D2の重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列である(それは、配列番号21のアミノ酸配列をコードする)。

【0050】

配列番号26は、30H3D2の軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列である(それは、配列番号22のアミノ酸配列をコードする)。

【0051】

配列番号27は、ヒトサバイビンの15アミノ酸長のフラグメントである。

【0052】

ワクチンは、抗-サバイビン癌免疫療法を促進させる一つの方法を提供するが、抗体を用いる受動免疫療法を使用する利点は複数ある。例えば、ヒト化モノクローナル抗体は、1) HLA-制限を受けない(ペプチドワクチンとは異なって)、2) 腫瘍によって著しく免疫システムが損なわれた患者において癌細胞に対する即効作用を潜在的に有し得る、3) 投与可能である(doseable)、及び、4) 代替の又は補完的な作用機序を活用するために、ワクチン又は他の薬物又は治療(例えば、放射線療法など)と併用できる。上記利点の一以上は、一般的mAb(キメラ抗体、ヒト抗体及びヒト化抗体を含む)にも当てはまる。

【0053】

本明細書で使用される「サバイビンペプチド」(単数又は複数)という用語は、全長サバイビンのフラグメントを意味し、これには、野生型サバイビン(例えば、ヒトサバイビン)と反応する抗体を作成できるペプチドの変異体が含まれる。本明細書で使用される「抗-サバイビン抗体」という用語は、サバイビン又は1種以上のサバイビンペプチド(その変異体を含む)に対して作成された抗体を意味する。

【0054】

一面では、本開示は、サバイビンの一以上のエピトープに対して反応性を示す、抗体又はそのフラグメント(ヒト抗体、ヒト化抗体又はキメラ抗体を含む)を含む組成物を提供する。適切なサバイビンエピトープ又はその変異体の例は、米国特許第7,943,138及び8,580,269に挙げられており、その開示は参照により本明細書に包含される。本開示の組成物は、ヒトサバイビン内の配列と同一のペプチド又はその変異体であるペプチド(例えば、少なくとも95%同一)の投与に反応して產生された抗体を含む。例えば、抗体は、以下のサバイビン配列の一部 ENEPDLAQCFFCFKELEGWEPDD(配列番号1)の変異体であるペプチドの投与後、個体において產生され、及び個体から単離されてもよい。前記変異体は、ENEPDLAQMFFCFKELEGWEPDD(配列番号2 - 配列番号1の第9位のCをMに変更)であってもよい。投与されるペプチドは、配列番号2の9~23(その間の全ての整数を含む)の連続アミノ酸であって、そのペプチドがコア配列 QMFFCF(配列番号3)を含むものであってもよい。代表的なサバイビンペプチドとして、DLAQMFCCFKELEGW(配列番号4)、AQMFCCFKEL(配列番号5)、及びQMFFCFKEL(配列番号6)が挙げられる。単離抗体又はそのフラグメントは、修飾無しで使用されてもよく、あるいは、それらは、例えば、本明細書に記載されるキメラ抗体又はヒト化抗体あるいは様々なフラグメントを產生するなどのために操作されてもよい。一実施形態では、ペプチド DLAQMFFCFKELEGW(配列番号4)に対して反応性であるヒト化抗体又はそのフラグメントが產生される。

【0055】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、全抗体分子、全長免疫グロブリン分子、例えば自然発生の全長免疫グロブリン分子、又は免疫グロブリン遺伝子断片リコンビナトリアルプロセスによって形成された全長免疫グロブリン分子、及び抗体フラグメントを包

10

20

30

40

50

含する。抗体フラグメントは、少なくとも1つの抗体-抗原結合サイトを含むフラグメントであってもよい。抗体フラグメントは、例えば、サバイビンに、又はモチーフ DLAQCFF CCFKELEGW(配列番号27)を含むそのフラグメントに特異的結合を示すことができる。用語「抗体」には、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性(例えば、二重特異性)抗体、組換抗体、ヒト抗体、キメラ抗体及びヒト化抗体が含まれ得る。用語「抗体」には、組換で発現された抗原結合性タンパク質、及び抗原結合性合成ペプチドも含まれ得る。さらに、用語「抗体」には、ミニボディ、及び二重特異性抗体が含まれ、その全ては、好ましくはサバイビン又はそのフラグメント、特にヒトサバイビンに特異的結合性を示す。本明細書で使用される「抗体」という用語は、インビボで製造された免疫グロブリン、及びインピトロで製造された免疫グロブリン(例えば、ハイブリドーマなどによって)も含まれ得る。本開示の抗体は、例えば、アセチル化、ホルミル化、アミド化、リン酸化、又はポリエチレンギリコール化(ペグ化)、及び糖鎖付加によって修飾されてもよい。本明細書で使用される「抗体」という用語は、本明細書に開示される全ての抗体を包含することを意図している。例えば、用語「抗体」は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、又はヒト化抗体、又はその抗原(すなわち、サバイビン)結合性フラグメントを指すことができる。

【0056】

サバイビンペプチドの投与は、ポリクローナル抗体の產生のために使用することができる。例えば、適切な動物に、1種以上のサバイビンペプチドを投与し、血清を採取することができる。さらに、ヒト抗-サバイビン抗体-発現細胞を、サバイビン又はサバイビンペプチドをワクチン接種した免疫化動物又は患者から(例えば、臨床治験に参加している個体から)単離することができる。患者サンプルから得たIgG+メモリーB細胞を増やし、IgG-分泌細胞に分化するよう誘導することができ、IgG-分泌細胞を、高親和性標的(サバイビンペプチド)結合性についてスクリーニングすることができる。前記細胞を、ハイブリドーマを作成するために使用することも可能である。抗体遺伝子の可変領域を、PIPE法を利用するRT-PCR(Dodev TS et al. (2014) *Scientific Reports* 4, 5885. doi:10.1038/srep058853)によって、単離細胞からクローニングできる。組換ヒト、ヒト化又はキメラmAbを、これらの分子から構築することができ、発現させ、機能性及び結合親和性アッセイにおいて、及び抗腫瘍活性についてスクリーニングすることができる。この関連で、我々は、臨床研究において複数の患者で特異抗体をELISAにより検出することができた。サンプルは、後の使用のために(メモリーB細胞を単離するための)冷凍することができる。

【0057】

本開示の抗体は、完全な免疫グロブリン分子(ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体など)であってもよく、あるいはその抗原結合性フラグメントであってもよく、Fab、F(ab')、F(ab')2、Fv、dAb、Fd、CDRフラグメント、単鎖抗体(scFv)、二価単鎖抗体、単鎖ファージ抗体、二重特異性抗体、ナノボディなどが挙げられるが、これらに限定されない。抗体のフラグメントは、合成的に製造されてもよく、又は無傷の免疫グロブリンの酵素的又は化学的切断によって製造されてもよく、あるいは、組換えDNA技術によって遺伝子改変されてもよい。これらの技術は当該分野で周知である。

【0058】

一実施形態では、本開示は、単離された抗体を提供する。「単離された」という用語は、抗体又はそのフラグメントが、その自然環境から分離された及び/又は回収されたことを意味する。その自然環境から抗体を単離することにより、その自然環境内に通常は存在する他の活性物質(例えば、他のタンパク質)によって干渉されずにその抗体を使用できるようになる。

【0059】

一実施形態では、本開示は、サバイビン又はサバイビンペプチドをラクダ科の動物に導入することによりラクダ科の動物によって製造される単ードメイン抗体又はナノボディを生成すること及び単離することを提供する。ナノボディは、一般的に重鎖抗体であり、それゆえ重鎖ホモ二量体を含み、抗体軽鎖を含まない。これらの抗体は、一般的に、单一の

10

20

30

40

50

可変領域と2つの定常領域(CH2及びCH3)を含む。

【0060】

本開示の抗体は、ヒト又は非ヒト動物から得てもよい。多くの動物では、無傷の免疫グロブリンは、2本の重鎖と2本の軽鎖を有する。軽鎖のそれぞれは、ジスルフィド結合によって重鎖に共有結合している。2本の重鎖は、別のジスルフィド結合によって互いに結合している。軽鎖は、一般的に、一つの可変領域(VL)と一つの定常領域(CL)を有する。重鎖も、一つの可変領域(VH)を有し得る。前記可変領域は、複数の相補性決定領域(CDR)を含んでいる。重鎖は、さらに、3つ又は4つの定常領域(CH1、CH2、CH3、及びCH4)を有し得る。定常領域の違いにより、様々なアイソタイプ(IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMなど)がもたらされる。

10

【0061】

CDRは、抗原のエピトープへの結合を主に担う。各鎖のCDRは、通常、CDR1、CDR2、及びCDR3と称され(N-末端から順に番号が付される)、通常、特定のCDRが位置する鎖によって特定される。それゆえ、 V_H CDR3(又はVH-CDR3)は、それが確認される抗体の重鎖の可変領域に位置し、他方、 V_L CDR1(又はVL-CDR1)は、それが確認される抗体の軽鎖の可変領域のCDR1である。サバイビン又はサバイビンペプチドに結合する抗体は、例えば、特異的な V_H 領域及び V_L 領域配列、すなわち特異的なCDR配列を有する。異なる特異性(すなわち、異なる抗原のための異なる結合部位)を有する抗体は、異なるCDRを有する。

【0062】

本明細書で使用される V_H 又はVHという用語は、免疫グロブリンの重鎖の可変領域を指し、Fv、scFv、dsFv又はFabの重鎖を含み、 V_L 又はVLという用語は、免疫グロブリンの軽鎖の可変領域を指し、Fv、scFv、dsFv又はFabの軽鎖を含む。

20

【0063】

「モノクローナル抗体」という用語は、Bリンパ球の單一クローンによって、又は單一抗体の軽鎖及び/又は重鎖遺伝子がトランスフェクトされた細胞によって産生された抗体を指す。モノクローナル抗体は、当業者に既知の方法によって、例えば、骨髄腫細胞と免疫脾臓細胞の融合によりハイブリッド抗体-形成細胞を作ることによって、製造される。例えば、マウス(あるいは他の適切な動物)を、1種以上のサバイビンペプチドで免疫化することができ、その後腹水サンプルを採取することができる。モノクローナル抗体及び対応するハイブリドーマ細胞株のパネルを開発するために、このサンプルをスクリーニングし、選抜することができる。マウスの(あるいは他の)モノクローナル抗体は、所望により単離されあるいは産生され、及びその後にヒト化されてもよい。

30

【0064】

本開示の抗体は、どのクラスの抗体であってもよい。例えば、本開示の抗体は、抗体アイソタイプIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD又はIgEであってもよい。例えば、抗体はIgG2bであってもよい。本明細書で使用される「アイソタイプ」という用語は、特に、重鎖定常領域の遺伝子によってコードされる抗体の種類(例えば、IgGなど)を指すことができる。ヒトの免疫グロブリン定常領域の配列は当該分野で既知であり、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)、米国国立医学図書館などの公開データベースから利用可能である。

40

【0065】

「キメラ抗体」という用語は、ある種(例えば、ヒト)由来のフレームワーク残基と、サバイビンに特異的に結合する別の種、例えばマウス抗体由来のCDR(一般的に、抗原結合をもたらす)を有する抗体を指す。キメラ抗体において、重鎖及び/又は軽鎖のいくつかの部分は、ある種由来の配列と同一であっても相同性であってもよく、他の部分は別の種由来の配列と同一であっても相同性であってもよい。キメラ抗体は、一般的に、免疫原性の低下と安定性の増加を示す。マウスの免疫グロブリン可変領域をクローニングする技術は当該分野において既知である(例えば「Orlandi et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 86: 3833 (1989)」及び「Leung et al., Hybridoma 13:469 (1994)」等を参照)。キメラ抗体の例として、ヒト以外の動物(例えば、マウス、ラット、又はニワトリ)由来の抗体の軽鎖

50

又は重鎖の可変領域をコードするポリヌクレオチドが、ヒト抗体由来の軽鎖又は重鎖の定常領域をコードするポリヌクレオチドと連結して、キメラ抗体をコードするポリヌクレオチド(DNAなど)を形成することができる。キメラ抗体の例として、配列番号19と20を含むもの、及び配列番号20と21を含むものが挙げられる。

【0066】

「ヒト」抗体(「完全ヒト」抗体とも呼ばれる)は、ヒトのフレームワーク領域と、単一の又は異なるヒト免疫グロブリンのCDRを全て含む抗体である。このように、一つのヒト抗体のフレームワークを、異なるヒト抗体由来のCDRを含ませるために操作することができる。ヒト抗体を製造する方法は、当該分野で既知である(例えば「Mancini et al., 2004, New Microbiol. 27:315-28; Conrad」及び「Scheller, 2005, Comb. Chem. High Throughput Screen. 8:117-26」などを参照)。

【0067】

「ヒト化抗体」は、一般的に、非ヒトであるソースからヒト抗体に移入された(すなわち、ヒト抗体に導入された)アミノ酸残基を一以上有するヒト抗体である。例えば、ヒト化抗体は、げっ歯類、ラビット、イヌ、ヤギ、又はウマなどの種に由来する抗体のCDRが、ヒトの重及び軽可変領域に移入されている組換えタンパク質である。抗体分子の定常領域(フレームワーク領域とも呼ばれる)は、一般に、ヒト抗体のものと同じである。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれることがあり、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれることがある。例えば、ヒト化免疫グロブリンにおいて、全てのCDRがドナー免疫グロブリンに由来していてもよい。定常領域は、常に存在する必要はないが、もし存在する場合、それらは、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85～90%、例えば約95%以上同一であってもよい。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリン又は抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワーク由来のアミノ酸による限られた数の置換を有していてもよい。ヒト化又は他のモノクローナル抗体は、抗原結合又は他の免疫グロブリンの機能に実質的に影響しない、さらなる保存的アミノ酸置換を有していてもよい。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子工学により構築することができる(例えば、米国特許第5,585,089号及び米国公開公報第2010/0196266号参照)。例えば、マウスのモノクローナル抗体を単離するか作成し、その後ヒト化してもよい。ヒト化抗体の例として、配列番号7～12の配列を有するCDRを含むもの、及び配列番号13～18の配列を有するCDRを含むものが挙げられる。

【0068】

抗体フラグメントは、酵素消化によって製造することができる。例えば、抗体のパパイン消化により、「Fab」フラグメントと呼ばれる2つの同一の抗原結合性フラグメントと、1つの「Fc」フラグメントが生じる。Fabフラグメントは、完全なL鎖と、H鎖の可変領域ドメイン(VH)と、一つの重鎖の第一の定常領域とを含む。各Fabフラグメントは、抗原結合に関して一価である(すなわち、単一の抗原結合サイトを有する)。抗体のペプシン処理は、単一の大きな $F(ab')_2$ フラグメントを生じさせ、これは、ジスルフィドで連結された2つのFabフラグメントにおおむね相当し、二価の抗原結合活性を有し、抗原を架橋する能力を有する。「Fv」は、完全抗原-認識及び-結合サイトを含む最少の抗体フラグメントであり、「sFv」又は「scFv」と略される単鎖(一本鎖)Fvも、抗体フラグメントであり、連結され一つのポリペプチド鎖となったVH及びVL抗体ドメインを含む。「二重特異性抗体(diabody)」という用語は、Vドメインの鎖内(intra-chain)ではなく鎖間(inter-chain)ペアリングが達成されるように、VHとVLドメインの間に短いリンカー(複数)を有するsFvフラグメント(複数)を作成することによって(結果として二価のフラグメント、すなわち2つの抗原結合サイトを有するフラグメントになる)調製される小さな抗体フラグメントを指す。單一ドメイン抗体(sdAb)は、単一の単量体の可変抗体ドメインを有する抗体フラグメントである。ScAbは、ラクダ科の動物でみられる重鎖抗体から作成できる。抗体フラグメントは、単一の可変領域であってもよく、単一のCDRからなる又は単一のCDRを含むペプチドであってもよい。単鎖抗体は、リンカーにより互いに直線的に連結された重鎖可変

10

20

30

40

50

領域と軽鎖可変領域を有する。単鎖抗体をコードするポリヌクレオチド(DNA等)は、重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、リンカーをコードするポリヌクレオチド(典型的には、10～20ヌクレオチド)、及び軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを結合することによって製造することができ、前記重鎖可変領域と軽鎖可変領域は両方ともヒト抗体に由来するものである。

【0069】

本発明の抗体は、二重特異性又は多特異性であってもよい。二重特異性抗体(diabody)は、抗原の少なくとも2つの異なるエピトープ(例えば、サバイビンの2つの異なるエピトープ)に結合特異性を有する抗体である。例えば、二重特異性抗体をコードするポリヌクレオチド(DNA等)は、例えば、重鎖可変領域Aをコードするポリヌクレオチド、軽鎖可変領域Bをコードするポリヌクレオチド、重鎖可変領域Bをコードするポリヌクレオチド、及び軽鎖可変領域Aをコードするポリヌクレオチドを順に連結することによって、製造できる。好ましくは、前記重鎖可変領域と軽鎖可変領域は両方ともヒト抗体に由来するものである。

10

【0070】

本開示は、配列番号1～29に示す配列の変異体を提供する。例えば、変異体は、配列番号1～27に開示された配列と、90%以上、95%以上、98%以上又は、99%以上の配列相同性を有していてもよい。

【0071】

本開示は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するよう形質導入されたT細胞を提供する。本開示のCAR分子は、サバイビンに対する抗体の特異性と、T細胞受容体-活性化細胞内領域を組み合わせて、特異的抗-サバイビンを示す、それゆえ、抗-腫瘍細胞性免疫活性を示すキメラタンパク質を生じる。CAR分子は、重鎖及び軽鎖可変領域の一以上のCDRを含んでもよい。この開示は、さらに、CARを安定に発現するために遺伝的に変更されたT細胞を提供する。CARを発現するT細胞は、本明細書において、CAR T細胞又はCAR変更T細胞と呼ばれる。例えば、T細胞は、特異抗体(例えば、本明細書に記載するモノクローナル抗体)のサバイビン認識領域と、CD3-ゼータ鎖の細胞内領域とを組み合わせて、単一のキメラタンパク質を構成するCARを安定に発現するために、遺伝的に変更されてもよい。

20

【0072】

一例として、この開示は、サバイビン(ヒトサバイビンであってもよい)に特異的に結合する、モノクローナル抗体(単離モノクローナル抗体であってもよい)を提供する。一例として、2C2と名付けられたmAb、及びH30(又は30H3)と名付けられたmAbが提供される。最終的な抗体配列決定及びIgG精製のために使用されたmAb 2C2のサブクローニングは、2C2E7と命名され、最終的な抗体配列決定及びIgG精製のために使用されたmAb H30のサブクローニングは、30H3D2と命名された。抗体は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む。重鎖可変領域は、VH CDR1、VH CDR2およびVH CDR3を含み、軽鎖可変領域は、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含む。一例として、VH CDR1はアミノ酸配列 TYGMS(配列番号7)を有し、VH CDR2はアミノ酸配列 WINPYSGVPTYAVDFKG(配列番号8)を有し、VH CDR3はアミノ酸配列 YY(配列番号9)を有し；VL CDR1はアミノ酸配列 SASSSISYMH(配列番号10)を有し、VL CDR2はアミノ酸配列 DTSKLAS(配列番号11)を有し、VL CDR3はアミノ酸配列 HQRSSHHT(配列番号12)を有する。別の例として、VH CDR1はアミノ酸配列 SYGMS(配列番号13)を有し、VH CDR2はアミノ酸配列 TISSGGSHTYYPDPSVRG(配列番号14)を有し、VH CDR3はアミノ酸配列 HPIYYYISSYAMDY(配列番号15)を有し；VL CDR1はアミノ酸配列 RSSQLVHSTGNTYLH(配列番号16)を有し、VL CDR2はアミノ酸配列 KVSNRFS(配列番号17)を有し、VL CDR3はアミノ酸配列 SQSTHVPPT(配列番号18)を有する。

30

【0073】

本開示の抗体は、配列番号7, 8, 9に示す配列とは異なる1又は2のアミノ酸を含むVH CDRを有する、及び/又は配列番号10, 11, 12に示す配列とは異なる1又は2のアミノ酸を含むVL CDRを有する抗体であってもよい。本開示の抗体は、配列番号13, 14, 15に示す配列とは異なる1又は2のアミノ酸を含むVH CDRを有する、及び/又は配

40

50

列番号 16, 17, 18 に示す配列とは異なる 1 又は 2 のアミノ酸を含む VL CDR を有する抗体であってもよい。

【 0 0 7 4 】

本開示の抗体は、その重鎖可変領域が、配列番号 19 の配列を含み、その軽鎖可変領域が配列番号 20 の配列を含む抗体であってもよい。配列番号 19 の配列において、アミノ酸 1 ~ 19 はリーダー配列を表し、アミノ酸 20 ~ 49 はフレームワーク領域(FR)1を示し、アミノ酸 50 ~ 54 はCDR1を表し、アミノ酸 55 ~ 68 はFR2を表し、アミノ酸 69 ~ 85 はCDR2を表し、アミノ酸 86 ~ 117 はFR3を表し、アミノ酸 118 ~ 126 はCDR3を表し、及びアミノ酸 127 ~ 137 はFR4を表す。配列番号 20 の配列において、アミノ酸 1 ~ 22 はリーダー配列を表し、アミノ酸 23 ~ 45 はFR1を示し、アミノ酸 46 ~ 55 はCDR1を表し、アミノ酸 56 ~ 70 はFR2を表し、アミノ酸 71 ~ 77 はCDR2を表し、アミノ酸 78 ~ 109 はFR3を表し、アミノ酸 110 ~ 117 はCDR3を表し、及びアミノ酸 118 ~ 127 はFR4を表す。

【 0 0 7 5 】

本開示の抗体は、その重鎖可変領域が、配列番号 21 の配列を含み、その軽鎖可変領域が配列番号 22 の配列を含む抗体であってもよい。配列番号 21 の配列において、アミノ酸 1 ~ 19 はリーダー配列を表し、アミノ酸 20 ~ 49 はFR1を示し、アミノ酸 50 ~ 54 はCDR1を表し、アミノ酸 55 ~ 68 はFR2を表し、アミノ酸 69 ~ 85 はCDR2を表し、アミノ酸 86 ~ 117 はFR3を表し、アミノ酸 118 ~ 131 はCDR3を表し、及びアミノ酸 132 ~ 142 はFR4を表す。配列番号 22 の配列において、アミノ酸 1 ~ 19 はリーダー配列を表し、アミノ酸 20 ~ 42 はFR1を示し、アミノ酸 43 ~ 58 はCDR1を表し、アミノ酸 59 ~ 73 はFR2を表し、アミノ酸 74 ~ 80 はCDR2を表し、アミノ酸 81 ~ 112 はFR3を表し、アミノ酸 113 ~ 121 はCDR3を表し、及びアミノ酸 122 ~ 131 はFR4を表す。

【 0 0 7 6 】

本開示の抗体は、配列番号 19 の配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 20 の配列を含む軽鎖可変領域とを有する抗体、又はその変異体(90 ~ 99 % の配列相同性を有する)であってもよい。本開示の抗体は、配列番号 21 の配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 22 の配列を含む軽鎖可変領域とを有する抗体、又はその変異体(90 ~ 99 % の配列相同性を有する)であってもよい。抗体は、前記リーダー配列を除く(すなわち、アミノ酸 1 ~ 19 を除く)配列番号 19 の配列を含む重鎖可変領域、及び / 又は前記リーダー配列を除く(すなわち、アミノ酸 1 ~ 22 を除く)配列番号 20 の配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体、又はその変異体(90 ~ 99 % の配列相同性を有する)であってもよい。本開示の抗体は、前記リーダー配列を除く(すなわち、アミノ酸 1 ~ 19 を除く)配列番号 21 の配列を含む重鎖可変領域、及び / 又は前記リーダー配列を除く(すなわち、アミノ酸 1 ~ 19 を除く)配列番号 22 の配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体、又はその変異体(90 ~ 99 % の配列相同性を有する)であってもよい。

【 0 0 7 7 】

本開示の抗体は、配列番号 19 と少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % 同一である配列を有し、配列番号 7 の配列を有する CDR1、配列番号 8 の配列を有する CDR2、配列番号 9 の配列を有する CDR3 を含む重鎖可変領域、及び / 又は、配列番号 20 と少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % 同一である配列を有し、配列番号 10 の配列を有する CDR1、配列番号 11 の配列を有する CDR2、配列番号 12 の配列を有する CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む抗体であってもよい。

【 0 0 7 8 】

本開示の抗体は、配列番号 21 と少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % 同一である配列を有し、配列番号 13 の配列を有する CDR1、配列番号 14 の配列を有する CDR2、配列番号 15 の配列を有する CDR3 を含む重鎖可変領域、及び / 又は、配列番号 20 と少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % 同一である配列を有し、配列番号 16 の配列を有する CDR1、配列番号 17 の配列を有する CDR2、配列番号 18 の配列を有する CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む抗体であってもよい。

10

20

30

40

50

3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %又は9 9 %同一である配列を有し、配列番号1 6の配列を有するCDR1、配列番号1 7の配列を有するCDR2、配列番号1 8の配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域を含む抗体であってもよい。

【 0 0 7 9 】

本開示の抗体は、配列番号7，8及び9の配列をそれぞれ有するCDR1、CDR2、及びCDR3を含む重鎖可変領域、及び、配列番号10，11及び12の配列をそれぞれ有するCDR1、CDR2、及びCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、又は、配列番号13，14及び15の配列をそれぞれ有するCDR1、CDR2、及びCDR3を含む重鎖可変領域、及び、配列番号16，17及び18の配列をそれぞれ有するCDR1、CDR2、及びCDR3を含む軽鎖可変領域を含むキメラ抗体、ヒト抗体又はヒト化抗体であってもよい。

10

【 0 0 8 0 】

本開示は、サバイビン特異抗体の重鎖可変領域の全て又は一部をコードする単離されたヌクレオチド配列も提供する。例えば、本開示は、配列番号2 3又は2 5の配列を含む単離核酸分子を提供する。本開示の単離ヌクレオチド分子は、サバイビン特異抗体の軽鎖可変領域の全て又は一部をコードしてもよい。例えば、単離核酸分子は、配列番号2 4又は2 6の配列を含むことができる。核酸分子の変異体は、重鎖可変領域について配列番号2 3又は2 5の配列、又は軽鎖可変領域について配列番号2 4又は2 6の配列と、少なくとも9 0 %～少なくとも9 9 %の同一性を有することができる。

【 0 0 8 1 】

本開示は、サバイビンのエピトープを認識する一以上のCDRをコードする配列(例えば、配列番号7～1 8をコードする配列など)を含むか、あるいは当該配列からなる単離された核酸分子も提供する。核酸分子は、配列番号7～1 8の配列のいずれかからなってもよく、あるいは核酸分子は、配列番号7～1 8の一以上の配列を含み、且つ別の1～5 0のヌクレオチド(通常前記配列に隣接している)をさらに含んでもよい。

20

【 0 0 8 2 】

本開示は、本明細書で提供される抗体(mAbを含む)又はそのサバイビン結合性フラグメントをコードする発現ベクター又は他のポリヌクレオチド配列を含む細胞を提供する。mAb又はそのサバイビン結合性フラグメントをコードするヌクレオチド配列は、任意の適切な発現ベクター(その多くは、当該分野において既知である、及び/又は市販されている)を使用して発現することができる。ベクターは、核酸配列、例えば、ホスト細胞内でそれを複製可能にする複製起点など、を一般に含む。ベクターは、選択マーカー遺伝子も含むことができる。重鎖及び軽鎖は、一つの発現ベクター、例えばプラスミドで発現させることができ、又は重鎖及び軽鎖は、同じ細胞内で異なるプラスミドで発現させることができ、その後発現した重鎖及び軽鎖が通常のmAb構造を形成してもよい。mAb又はそのサバイビン結合性フラグメントは、本開示の利益を考慮して、従来の技術を用いて単離及び/又は精製することができる。

30

【 0 0 8 3 】

単離されたモノクローナル抗体又はそのフラグメントは、酵素タグ、蛍光性タグ又は放射性タグを用いるなどして、標識されてもよく、又は、例えば毒素などのエフェクター分子に抱合させることができる。

40

【 0 0 8 4 】

本開示は、抗体又はそのフラグメント、及び薬学的に適切なキャリアを含む医薬組成物を提供する。適切なキャリアとして、使用する用量及び濃度でレシピエントに無毒な賦形剤、又は安定剤が挙げられ、且つ、バッファー、例えば酢酸、Tris、リン酸、クエン酸及び他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンなどの抗酸化剤；防腐剤、例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチルパラベン又はプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペントノール；及びm-クレゾール；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン；グルコ

50

ース、マンノース又はデキストリンなどの单糖類、二糖類、及び他の炭水化物、キレート剤、例えばEDTA；等張化剤(tonicifier)、例えばトレハロース及び塩化ナトリウム；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；界面活性剤、例えば、ポリソルベート；塩形成対イオン、例えばナトリウム；及び／又は非イオン性界面活性剤、例えば、Tween又はポリエチレングリコール(PEG)が挙げられる。この医薬組成物は、他の治療薬を含むことができる。

【0085】

本開示の組成物は、1種類のモノクローナル抗体又は2種類以上のモノクローナル抗体を含んでもよい。本開示の組成物は、1種以上の抗体、又はそのフラグメントあるいは変異体を含んでもよい。組成物は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を含んでもよい。組成物は、抗体の1又は複数のサブタイプを含んでもよい。例えば、組成物は、IgG又はIgMの混合物、あるいはIgG1、IgG2、及びIgG2bの1又は複数の混合物を含んでもよい。本開示の組成物は、抗体を唯一の有効成分として含んでもよく、ここで前記抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体又はそれらの組み合わせであってもよい。「有効成分」とは、その成分が腫瘍増殖を抑制することによって抗腫瘍効果を有することを意味する。

【0086】

本開示の医薬組成物は、1種以上の抗体を、0.1 mg/ml～100 mg/ml、1 mg/ml～10 mg/ml、1 mg/ml～50 mg/ml、1 mg/ml～100 mg/ml、10 mg/ml～100 mg/ml、又は50 mg/ml～100 mg/mlの濃度範囲で(各抗体又は全抗体の濃度)で含むことができる。例えば、本開示の医薬組成物は、抗体を、少なくとも又は約0.1 mg/ml、少なくとも又は約1 mg/ml、少なくとも又は約5 mg/ml、少なくとも又は約10 mg/ml、少なくとも又は約50 mg/ml、少なくとも又は約100 mg/ml含むことができる。

【0087】

本開示の組成物は、当該分野で既知の常法によって投与することができる。例えば、抗体又はそのフラグメントを含む組成物は、静脈内、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、局所的あるいは吸入経路を介して、又は、脳内あるいは髄腔内対流強化送達(intra-spinal convection-enhanced delivery)又は直接腫瘍内注射によって投与することができる。前記抗体は、標的部位に(例えば、腫瘍又は腫瘍内に)非経口的に直接投与されてもよい。前記組成物は、単回投与として、又は複数回投与として導入されてもよく、及びある期間にわたって連続的に導入されてもよい。一実施形態では、前記組成物は、ある期間(少なくとも2日)の間、例えば2～30日の期間(及びその間の全ての期間)、毎日投与されてもよい。一実施形態では、それは7～10日間毎日投与される。あるいはそれは、所望の間隔(例えば、2, 3, 4, 5日ごと等)で投与されてもよい。

【0088】

本発明の方法で採用される特定の投与計画の形式及び特徴は、投与経路及び他の周知の変動要素(例えば、個体の大きさ及び疾患の段階)によって影響を受けることが当業者によって認識されるであろう。さらに、前記組成物は、治療を必要とする個体に投与するために単位投与形態の形で提供することができる。抗体は、投与前に元に戻される(再構築される)凍結乾燥の形で提供することができる。再構築用媒体として、無菌の0.9%生理食塩水又は適切な生理学的バッファーあるいは水、又は投与前にタンパク質を再構築するために当該分野で既知の他の溶液が使用できる。

【0089】

本開示は、治療の必要がある個体に投与するために使用できるキットも提供する。キットは、例えば、1種以上の抗体(凍結乾燥形態であってもよい)、任意で、再構築用媒体、及び投与説明書を含むことができる。キットは、単一用量又は複数の用量を含むことができる。

【0090】

本開示は、腫瘍(サバイビン-発現細胞を含む腫瘍など)を治療する方法を提供する。そ

10

20

30

40

50

のような腫瘍は、本明細書で「サバイビン-発現腫瘍」と称されることがある。「治療」という用語は、治療されている特定の状態の存在に付随する一以上の症状又は特徴の減少を指す。治療は、必ずしも、完全寛解を意味せず、再発又は再燃を防止することを意味しない。例えば、本開示は、腫瘍の大きさを減少する、又は腫瘍の増殖を停止する、又は腫瘍(サバイビン-発現細胞を含む腫瘍など)の増殖率を減少する、又は腫瘍を有している個体に付随する他の任意の症状を減少する(これらの全ては「治療」とみなされる)ための方法を提供し、当該方法は、治療の必要がある個体に、本明細書に記載されている抗体又はそのフラグメントを含む組成物を、治療的有効量で投与することを含む。一実施形態では、前記方法は受動免疫方法である。

【0091】

10

本発明の組成物によって治療できる腫瘍の例として、グリオーマ、神経膠芽腫、髓芽腫、多発性骨髄腫、メラノーマ、髄膜腫、乳腺癌、卵巣癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫、結腸癌、膀胱癌、肝癌、腎癌、肉腫などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0092】

本発明の方法は、ワクチンとしてのサバイビンペプチドの使用と組み合わせて行うことができる。本発明の組成物は他の治療の前に、同時に、または後に投与することができる。

【0093】

一態様において、本開示は、サバイビンの一つ又は複数のエピトープに対して反応性である単離抗体を含む組成物を提供し、前記単離抗体又はその抗原結合性フラグメントは、サバイビンの一つ又は複数のエピトープに結合する。前記抗体は、配列 ENEPDLAQMFFCFKELEGWEPDD(配列番号2)を有するペプチド、又はそのフラグメント(例えば、配列番号4の)の投与に反応して產生されてもよく、前記フラグメントは、配列番号2の9～23の(その間の全ての整数を含む)連續アミノ酸を有し、且つ、前記ペプチドはコア配列 QMFFCF(配列番号3)を含む。前記組成物に含まれる抗体(单数又は複数)は、サバイビンペプチドの投与に反応して產生された単離抗体(单数又は複数)のみであってもよい。前記組成物は、他のタンパク質、例えばキャリアタンパク質を含んでいてもよい。前記抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体又はヒト化抗体であってもよい。前記抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、あるいは、单鎖抗体、又は多特異性抗体であってもよい。

20

【0094】

30

特定の抗原に対する抗体の反応性は、例えば、ELISAなどの常法によって測定することができる。反応性は結合親和性の指標である。結合親和性は、抗原/抗体解離速度または競合的ラジオイムノアッセイなどによっても測定できる。抗原に対する抗体の特異的結合は、それが高い親和性で抗原と結合し、無関係の抗原に特異的に結合しないことを意味する。

【0095】

一態様において、本開示は、治療の必要な個体に、配列 ENEPDLAQMFFCFKELEGWEPDD(配列番号2)を有するペプチド、又はそのフラグメント(例えば、配列番号4)の投与に反応して產生された1種以上の抗体を含む組成物を治療的有効量で投与することを含む受動免疫法を提供し、前記フラグメントは、配列番号2の9～23(その間の全ての整数を含む)連續アミノ酸を有し、且つ、前記ペプチドはコア配列 QMFFCF(配列番号3)を含み、抗体は被検体(ヒト又は非ヒト)から単離されたものであり、それらはハイブリドーマ上清中で產生された、又はハイブリドーマ上清から得られたものでも、あるいは単離抗体の配列を使用して設計された抗体であってもよい。

40

【0096】

以下の実施例は、説明のために提供され、限定を意図していない。

【実施例1】

【0097】

この実施例は、腫瘍増殖に対する抗-サバイビン抗体の効果を実証する動物実験を説明する。

50

【0098】

マウスを免疫化するため、DLAQMFDCFKELEGW-キー ホールリンペットヘモシアニン(KLH)(SurVaxM)(SVN53-67/M57-KLH)(配列番号4)を投与する。マウスに、100 µgのペプチドを皮下注射した。7日に1度、28日の期間にわたって繰り返しマウスを免疫化した。最後の免疫化の2週間後に、マウスを、CO₂窒息により安樂死させ、心穿刺により血液を採取した。血液を凝血させ、10,000 × gで遠心分離して、澄んだ血清を調製した。腫瘍移植モデルにおいてマウスを受動免疫するためにサバイビン抗血清を使用した。

【0099】

腫瘍増殖に対する抗-サバイビン抗体の有効性を証明するために、頭蓋内皮下腫瘍モデルを使用した。頭蓋内研究には、解剖参照ポイントとして、ブレグマ頭蓋縫合に対し、1mm前方、2mm側方、深さ3mmに位置する頭蓋内穿孔を通じて進入させた26ゲージ針により1 × 10⁵のGL261グリオーマ細胞を移植した、C57BL/6マウスを麻酔して使用した。3日後、マウスを無作為にグループ分けし、10 µgの抗-サバイビン抗体又はコントロール用の10 µgの通常のIgGを注射した。抗体を、合計で20日間に4用量となるように、5日ごとに投与した。マウスについて、腫瘍増殖の指標として神経障害の兆候を追跡し、定められた基準に従って屠殺した。データは生存率で表され、カプラン・マイヤープロットで示される(p < 0.0001)。

【0100】

23ゲージ皮内針により右側腹部皮下に1 × 10⁶のGL261 グリオーマ細胞を移植することにより皮下腫瘍モデルを確立した。直径約2mmに達するまで、7日間腫瘍を増殖させた。その後7日目に、マウスに、100 µgのSurVaxM(SVN53-67/M57-KLH)サバイビンワクチン；又は50 µlの抗-サバイビン抗体をマウス血清の形で投与した(前記血清は、SurVaxMサバイビンワクチン、又はサバイビンに対し反応性のモノクローナル抗体を接種された非担癌のプールされたマウスから得たSurVaxM又は10 µgのmAb(抗体)をあらかじめ投与されたマウスから得た)。7日ごと・4用量で28日間に渡って処置を繰り返した。腫瘍は毎日測定し、式「V = XY2/2」を使用して体積を算出した。マウスは60日間追跡された。データを、併合した腫瘍体積(図1)及び個々の腫瘍進行(図2)で示す(p < 0.0001)。SurVaxMワクチンとは、そのペプチドが配列 DLAQMFFCFKELEGW(配列番号4)を有するワクチンを指す。

【0101】

これらの研究の結果は次の通りであった。図1に示すように、腫瘍移植後、7日に1回抗-サバイビン抗体を投与された、GL261グリオーマを有する頭蓋内グリオーマモデルC57BL/6マウスでは、抗-サバイビン抗体を投与されたマウスは、コントロールより有意に長く生存した。使用したIgGは、正常マウスの非特異的IgGである。図2は、GL261グリオーマを有するC57BL/6マウスの皮下腫瘍モデルを示す。マウスは、腫瘍移植後、7日に1回、表示する処置を受けた。頭蓋内研究と同様に、精製mAb又は抗血清のどちらかを受けたマウスは、コントロールより有意に小さい腫瘍を有し、活性ワクチン自体によって観察された抗腫瘍効果に匹敵した。図3は、GL261グリオーマを有するC57BL/6マウスの皮下腫瘍モデルを示す。マウスは、腫瘍移植後、7日に1回、表示する処置を受けた。SurVaxMはサバイビンワクチンである；抗-サバイビン血清(抗体)は、活性SurVaxMワクチンを受けた非担癌プールマウスから得た。データは、50日間にわたるそれぞれの腫瘍増殖を示す(1グループあたりn = 4)。

【0102】

これらのデータは、サバイビン抗体の投与が、腫瘍体積の減少と生存期間の延長に有効であることを実証する。

【実施例2】

【0103】

この実験は、モノクローナル抗体の產生と、腫瘍増殖を抑止する抗体の有効性を説明する。

【0104】

方法：

10

20

30

40

50

【0105】

細胞株と培養条件 :

GL261マウスグリオーマ細胞株とB16f1マウスマラノーマ細胞株を、100mm組織培養プレート上で、10%ウシ胎児血清、5000単位ペニシリン/ストレプトマイシン、50 μMの2-メルカプトエタノール、25mMのHEPES、及び1×非必須アミノ酸を含む完全ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)にて、37℃にて5%CO₂で、1週間に2~3回培地を交換しながら、成長させた。

【0106】

ペプチド :

ペプチド合成は、Fmoc化学と固相支持樹脂(Genscript, Piscataway, NJ)を使用して行った。各ペプチドは、使用するまで-20℃で貯蔵され、DMSOで希釈された。抗原配列1: DLAQMFFCFKELEGW(配列番号4)；抗原配列2: DLAQCFFCFKELEGW(配列番号27)；免疫原:ペプチド(Lot: 614429-1)-KLHコンジュゲート

10

【0107】

抗体産生のためのマウスの免疫化

10匹のマウスを、抗体産生のラウンドごとに使用した。5匹のBalb/cマウスと5匹のC57Bl/6マウスを、抗原1(SVN53-67/M57)に対して反応性の抗血清を産生するために使用した。マウスを免疫源:ペプチド-KLHコンジュゲート(SVN53-67/M57-KLH)で免疫化した。血清サンプルは、4ラウンドの免疫化後に得た。間接ELISA分析によりサバイビン反応性抗血清を確認した上で、陽性試験マウスを、ハイブリドーマ産生のために選択した。SP2/0骨髄腫細胞に融合させた各反応性マウス由来の細胞を用いて、複数のハイブリドーマ細胞株を産生した。これらの細胞株のうち2つのサブクローニングを、さらに単離して特性評価した。

20

【0108】

抗体反応性のための間接的ELISA

96ウェルELISAプレートを、被覆抗原A:(SVN53-67/M57)DLAQMFVCFKELEGW(配列番号4)又は被覆抗原B:(野生型SVN53-67)DLAQCFVCFKELEGW(配列番号27)を含むリン酸緩衝食塩水(pH 7.4)で被覆した(1 μg/mL、100 μL/ウェル)。マウスの抗血清又はハイブリドーマ細胞培養上清を、被覆プレートに、100ul/ウェル適用し、インキュベートした。二次抗体:ペルオキシダーゼ-AffiniPureヤギ抗-マウスIgG、Fc をその後添加し、標準的な検出を行った。

30

【0109】

ハイブリドーマ配列決定 :

TRIzol(登録商標)試薬(Ambion, Cat. No.:15596-026)の技術マニュアルに従って、ハイブリドーマ細胞から全RNAを単離した。アガロースゲル電気泳動によって全RNAを分析した。アイソタイプ特異的アンチセンスプライマー、又はPrimeScriptTM 1st Strand cDNA合成キット(Takara, Cat. No.:6110A)の技術マニュアルによる一般的なプライマーを使用して、全RNAをcDNAに逆転写した。VHとVLの抗体フラグメントは、GenScriptのRACEの標準的な操作手順に従って増幅した。増幅した抗体フラグメントを別々に、標準的な分子クローニング手順を使用して、標準クローニングベクターにクローニングした。正確なサイズのインサートを有するクローニングベクターにクローニングした。正確なサイズのインサートを有するクローニングベクターにクローニングした。正確なサイズのインサートを有する5つ以上の單一コロニーを、各抗体フラグメントのために配列決定した。正確なVH及びVLインサートサイズを有する5つの單一コロニーを、配列決定に回した。5つの異なるクローニングベクターにVH及びVL遺伝子はほぼ同一であった。コンセンサス配列は、産生された抗体の配列であると考えられる。

40

【0110】

患者血清の抗体測定

患者血清を採取し-80℃で貯蔵した。澄んだ血清の連続希釈物を、プレコートELISAプレート(Flat Bottom, Nunc)上の未コンジュゲート・サバイビンペプチド、遊離KLH、及びランダムペプチド(20 μg/mL、1 μg/ウェル)に、三つ組で適用した。サンプルを4で

50

一晩インキュベートし、洗浄した(PBS、1% BSA)。HRPコンジュゲート抗-ヒトIgG検出抗体(Bio-Rad)を、25にて1時間添加した。プレートを4回洗浄し、TMB比色溶液(Biolegend)を室温で添加し、15分間発色させ、Bio-Rad自動プレートリーダーで読み取った(450nm)。

【0111】

腫瘍増殖研究のためのマウスの免疫化

マウスにおける概念の検証研究は、100μLの抗-SVN53-67/M57ハイブリドーマ上清又は10μgの精製モノクローナル抗体を用いて行った。マウスに対して、まず、マウスGL261グリオーマ細胞又はB16f1マウスマエラノーマ細胞を、頭蓋内か皮下のどちらかに移植した。腫瘍移植後4日目に、マウスに、週に1回、最大で5週間、抗体の腹腔内注射を繰り返し行い、腫瘍の増殖を追跡した。

【0112】

脳内GL261腫瘍細胞注射と生存分析：

オスのC57BL/6マウス(Charles River, Horsham, PA)を、イソフルランガスで麻酔し、定位固定ヘッドフレーム(David Kopf Instruments, Tujunga, CA)で固定した。正中頭皮に切り込みを作り、プレグマを特定した。深部前頭白質内に細胞を移植するために、定位座標を測定した(プレグマに対して、2.0 mm側方で、1.2 mm前方)。この位置に穿頭孔を開け、2.5μLのDMEMに懸濁させた 1×10^5 のGL261細胞を、固定された25ゲージ針を有するハミルトンシリンジによって、硬膜に対して3.0 mmの深さに注射した。注射は、1μL/分で行われた。針を引き抜き、切り込みを縫合した。カプラン・マイヤー生存プロットを描き、生存期間中央値を、全グループについて決定した。1グループあたりn = 8マウス

【0113】

皮下腫瘍増殖研究：

2×10^7 のGL261細胞又は 1×10^6 のB16f1細胞を100μLのPBSに懸濁させた液を、オスのC57BL/6(免疫正常)マウス(Charles River, Horsham, PA)、及びヌード(免疫不全)NCr-*nu/nu*マウス(Charles River, Horsham, PA)の剪毛した右側腹部皮下に注射した。腫瘍増殖は毎日ノギスで測定し、体積は式 $V = (a \cdot (b^2))/2$ によって算出した(式中、Vは体積であり、aとbは腫瘍の垂直径である)。データは、経時的な腫瘍増殖及び比較平均腫瘍体積として表される。提示された様々な研究において、1グループあたり、n = 4, 5または10のマウス

【0114】

結果：

【0115】

ハイブリドーマを産生するために、配列番号4の改变サバイビンペプチドを使用した。10匹のマウスに、配列番号4のペプチドを含む15μg/mlのペプチドワクチンを投与した。これらのうち、9匹のマウスが、抗-サバイビン価を呈した。複数のハイブリドーマ系統を作製し、これらは、配列番号4のペプチド及びサバイビンペプチド DLAQCFFCFKELEGW(配列番号27)(当該配列はヒトサバイビンの一部と同一である)に対して反応性の抗体を産生した。さらなる特性評価を行う為、ハイブリドーマの中から、特に2つを選択した。これらは、2C2及び30H3と名付けられた。これらのハイブリドーマから、それぞれ一つのクローニーをさらに特性評価した。これらは、それぞれ、2C2E7及び30H3D2と名付けられた。2C2E7はアイソタイプIgG2bを有することが判明し、30H3D2はアイソタイプIgG1を有することが判明した。従って、正確な重鎖及び軽鎖可変領域インサートサイズを有する2, 3の單一コロニーが配列決定された。これらの配列は、ほぼ同一であることが判明し、コンセンサス配列が作成された。mAb 2C2E7の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のコンセンサスアミノ酸配列を、配列番号19及び20にそれぞれ示す。mAb 30H3D2の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のコンセンサスアミノ酸配列を、配列番号21及び22にそれぞれ示す。配列番号19, 20, 21及び22のアミノ酸配列に対応するスクレオチド配列を、配列番号23, 24, 25及び26にそれぞれ示す。

【0116】

10

20

30

40

50

抗体2C2E7の重鎖可変領域のコンセンサスアミノ酸配列を以下に示す：

MGWLWNLLFLMAAAQSAQAIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTTYGMSWVKQAPGRGLKWMGWINPYSGVPTYA
VDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARGGRRGDFGYWGQGTTLVSS(配列番号19)

【0117】

抗体2C2E7の軽鎖可変領域のコンセンサスアミノ酸配列を以下に示す：

MDFQVQIFSFLISASVILSSGQIGLTQSPAIMASPGEKVTMTCSSSISYMHWYQQKPGTSPKTWYDTSKLASGVP
ARFSGSGSGTYSLSITSSMEAEDAATYYCHQRSSHHTFGGGTKLEIK(配列番号20)

【0118】

抗体30H3D2の重鎖可変領域のコンセンサスアミノ酸配列を以下に示す：

MNFGLSLIFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAACSGFTFSSYGMSWVRLTPDKRLEWVATISGGSHYY
DSVRGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHPIYYYISSYAMDYWGQGTSVTVSS(配列番号21) 10

【0119】

抗体30H3D2の軽鎖可変領域のコンセンサスアミノ酸配列を以下に示す：

MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQLSVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
GVPDRFGGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCQSSTHVPPTFGGGTKLEIK(配列番号22)

【0120】

配列番号19に示すmAb 2C2E7の重鎖可変領域のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を以下に示す：

ATGGGTTGGCTGTGAACTTGCTATTCTGATGGCAGCTGCCAAAGTGCCCAAGCACAGATCCAGTTGGTACAATCTGG
ACCTGAGCTGAAGAACGCTGGAGAGACAGTCAGATCTCTGCAAGGCTCTGGTATACTTCACACCTATGGAATGA 20
GCTGGGTGAAACAGGCTCCAGGAAGGGTTAAAGTGGATGGCTGGATAAACCCCTACTCTGGAGTGCAACATATGCT
GTTGACTTCAAGGGACGGTTGCCTCTCTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTCAGATCAACAAACCTCAAAAA
TGAGGACACGGCTACATATTCTGTGCAAGAGGGAGGGCGGAGGGGGACTTGGCTACTGGGCCAAGGCACCACTCTCA
CAGTCTCCTCA(配列番号23)

【0121】

配列番号20に示すmAb 2C2E7の軽鎖可変領域のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を以下に示す：

ATGGATTTCAGGTGCAGATTTCAAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATACTGTCCAGCGGACAAATTGGTCTCAC
CCAGTCTCCAGCAATCATGTCATCTCCAGGGAGAAGGTCAACATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAGTTACA
TGCATTGGTACAGCAGAACGCCAGGCACCTCCCCAAAACATGGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCT 30
GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGCTGGGACCTCTTATTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTA
TTACTGCCATCAGCGGAGTAGTCACCACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA(配列番号24)

【0122】

配列番号21に示すmAb 30H3D2の重鎖可変領域のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を以下に示す：

ATGAACCTCGGGCTCAGCTTGATTTCCCTGCCCTTATTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
GGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGCCCTGAAACTCTCTGTCAGCCTCTGGATTCACTTCAGTAGCTATGGCATGT
CTTGGGTTGCCCTGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGCTGCACCATAGCAGTGGTAGTCACACCTACTATCCA
GACAGTGTGAGGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTC
TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACACCCAATTATTACTACATTAGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGTC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA(配列番号25) 40

【0123】

配列番号22に示すmAb 30H3D2の軽鎖可変領域のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を以下に示す：

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACCCAAACTCC
ACTCTCCCTGCCCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTGCAAGATCTAGTCAGAGCCTTGACACAGTACTGGAA
ACACCTATTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCAAAGCTCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATTCT
GGGTCCCAGACAGGTTGGCTGGAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT
GGGAGTTATTCTGCTCTAAAGTACACATGTTCCCTCCGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA(配列番
号26) 50

【0124】

動物を免疫化するために使用したペプチド(配列番号4)に対する、及びヒトサバイビン由来の配列(配列番号27)に対する結合について、抗体を試験した。15 ng/mLの抗体濃度の2C2E7は、配列番号4の改変サバイビンペプチドに(OD 1.019)、及び配列番号27の野生型サバイビンペプチドに(OD 0.891)結合するのに十分であった。シグナル：プランクの比が>2:1である最大希釈における2C2E7の力価は、1:512,000であり、高親和性抗体で予測されるものと一致する。さらに、31 ng/mLの抗体濃度の30H3D2は、配列番号4の改変サバイビンペプチドに(OD 1.021)、及び配列番号27の野生型サバイビンペプチドに(OD 0.874)結合するのに十分であった。シグナル：プランクの比が>2:1である最大希釈における30H3の力価は、1:512,000であり、高親和性抗体で予測されるものと一致する。

10

【0125】

抗体は、その後動物モデルにおいて、腫瘍の増殖に対する作用を決定するために使用された。動物モデルは、実施例1で使用したものと同一である。結果を図4～11に示す。2C2及びH30抗-サバイビン抗体の研究は、皮下マウス腫瘍モデルで行った。マウスに、移植腫瘍を定着させ、その後、30日の期間にわたり、5～7日ごとに、2C2、H30又は非特異的IgGを用いた治療を始めた。2つのホストマウス系統を使用し、NCr-nu/nu(ヌード)を図4, 6, 8, 10に、C57B1/6マウスを図5, 7, 9, 11に示す。ヌードマウスは、免疫不全モデルを表し、このモデルでは、抗体の活性は、免疫系のサポートなしで、標的への直接抗体結合に特に依存すると予想される。C57B1/6マウスは、免疫正常モデルを表し、その抗体は、マクロファージ、樹状細胞及びT細胞などの免疫学的サポート機構のさらなる関与から利益を得る可能性がある。B16メラノーマ(図4～7)及びGL261グリオーマ細胞(図8～11)は、2C2又はH30抗体で治療された際、C57B1/6(免疫正常)モデルにおいてその増殖が阻害されること(図5, 7)及び、ヌード(免疫不全)モデルでも、程度はより低いもののその増殖が阻害される(図4, 6)ことを示した。この観察は、ヌードマウスにおける免疫サポートの欠如によっても完全には抑止されない(図4, 6, 8, 10)、C57B1/6マウスにおける強い免疫介在性抗体依存性の応答を示す(図5, 7, 9, 11)。免疫不全モデル(図4, 6, 8, 10)における、抗体-依存性増殖阻害の持続性は、免疫系に依存しない又は直接増殖抑制性の抗体成分それ自体が加わったことを強く示唆する。ロズウェルパーク癌研究所におけるSurVaxM(SVN53-67/M57-KLH)配列番号4の第I相臨床試験(FDA承認済/I171010)に登録されたグリオーマ患者は、臨床試験プロトコル期間の間、SurVaxMペプチドに予想外の抗体応答を生じることが観察された。本明細書に示される8人の患者は、配列番号27のアミノ酸からなる野生型サバイビンペプチド、及び配列番号4のアミノ酸からなる改変サバイビンペプチド(15のアミノ酸からなる免疫ペプチド配列にも含まれている)の両方に交差反応性である、反応性の抗血清を生じた。これらの抗体は、治療目的のために使用することができる。

20

【0126】

本開示内容を、特定の実施形態及び実施例を使用して説明してきたが、通常の修正は当業者にとって自明であり、そのような修正は、本開示及び特許請求の範囲内であることが意図されている。

30

【図1】

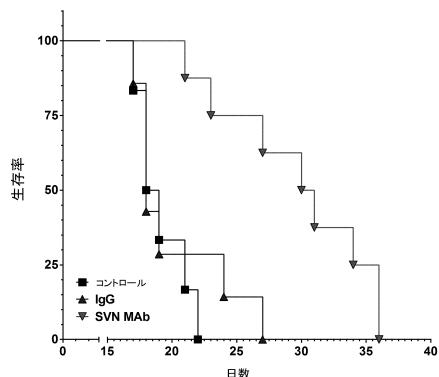


Figure 1

【図2】

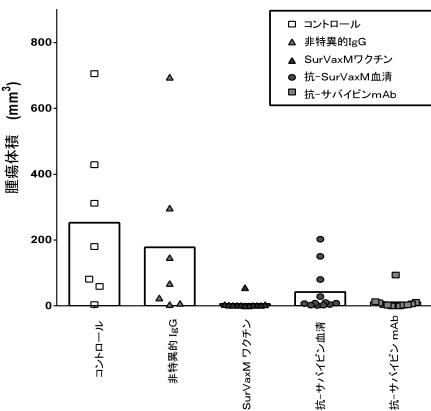


Figure 2

【図3】

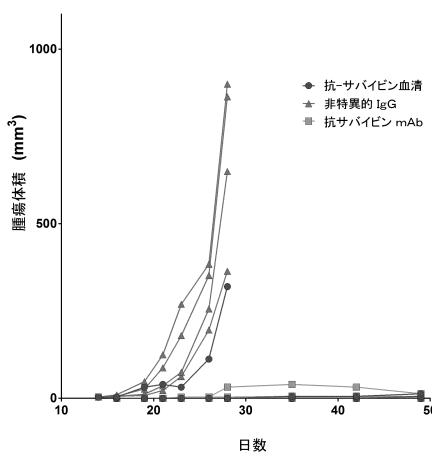


Figure 3

【図4】

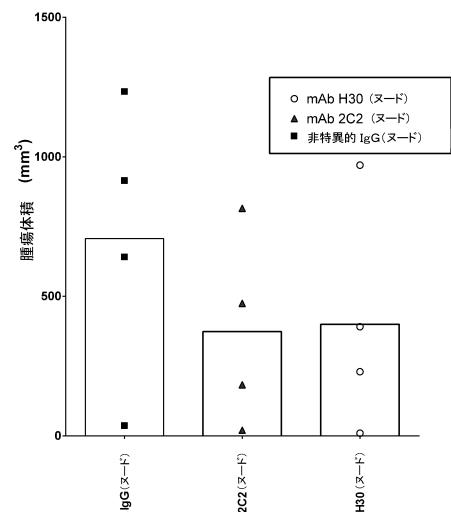
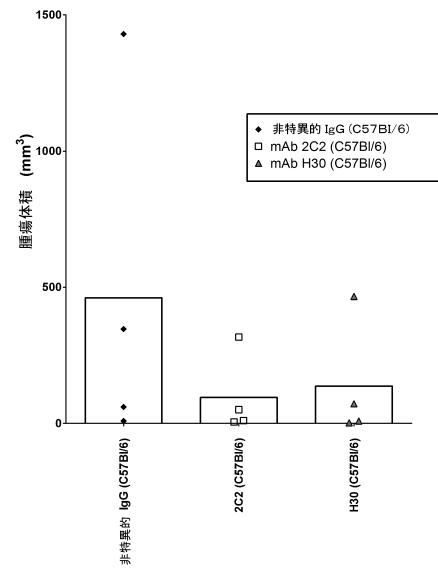


Figure 4

【図5】



【図6】

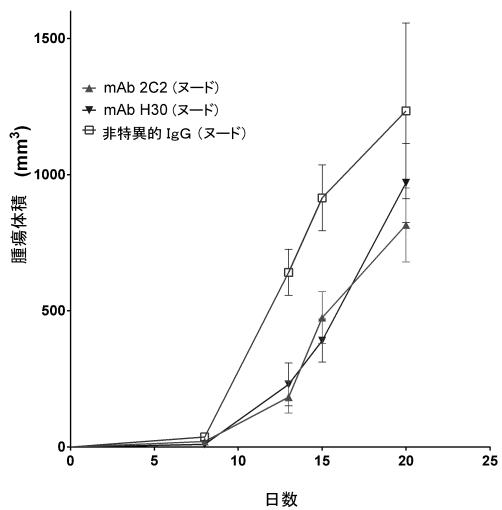


Figure 6

Figure 5

【図7】

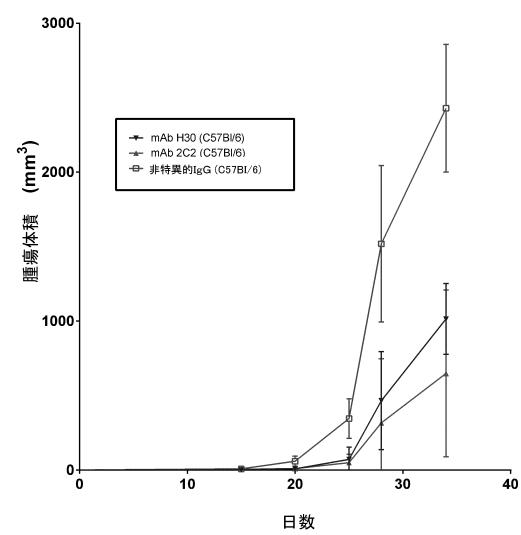


Figure 7

【図8】

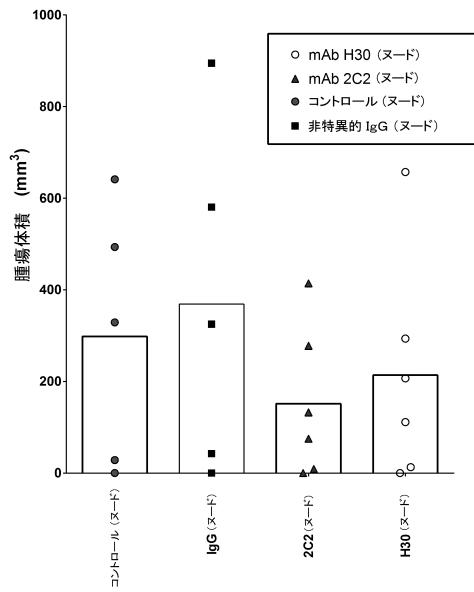


Figure 8

【図9】

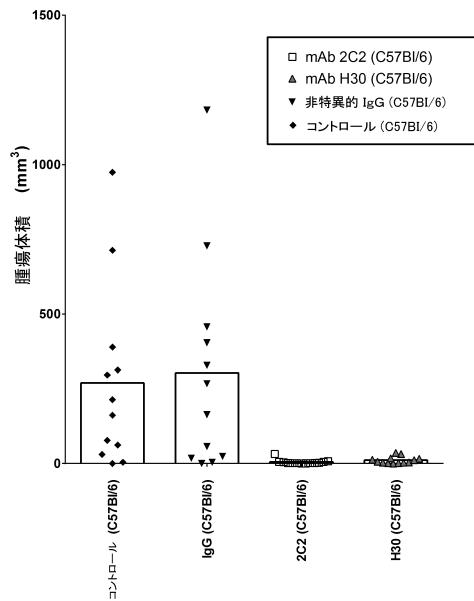


Figure 9

【図10】

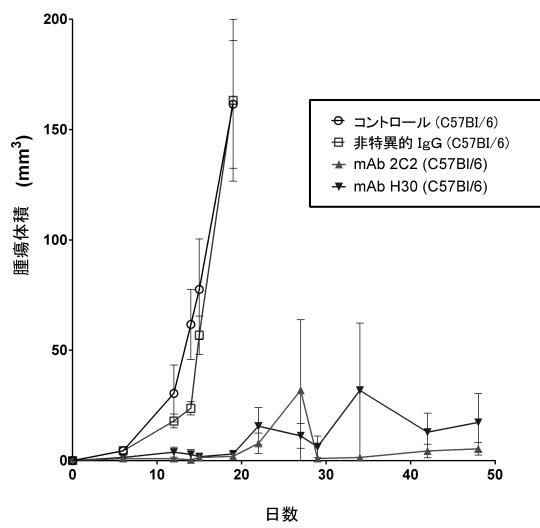


Figure 10

【図11】

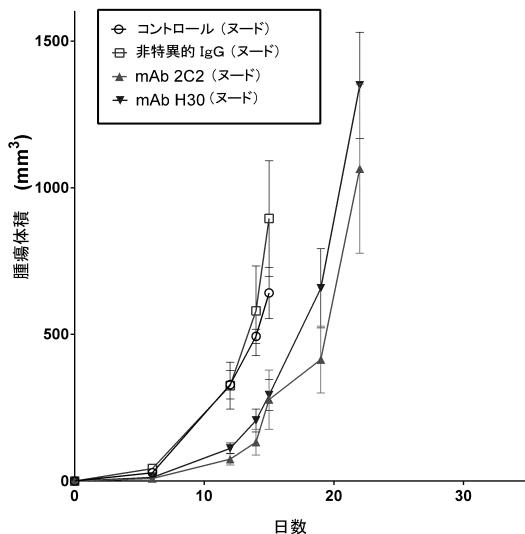


Figure 11

【図12】

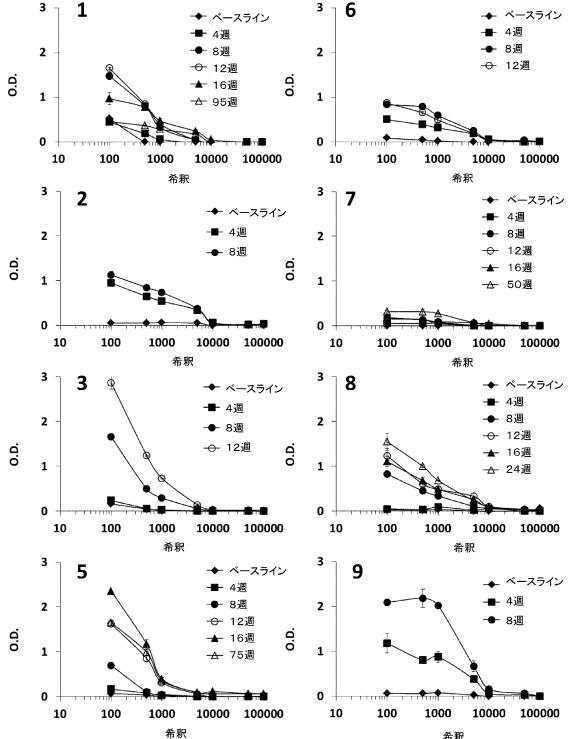


Figure 12

【図 1 3】

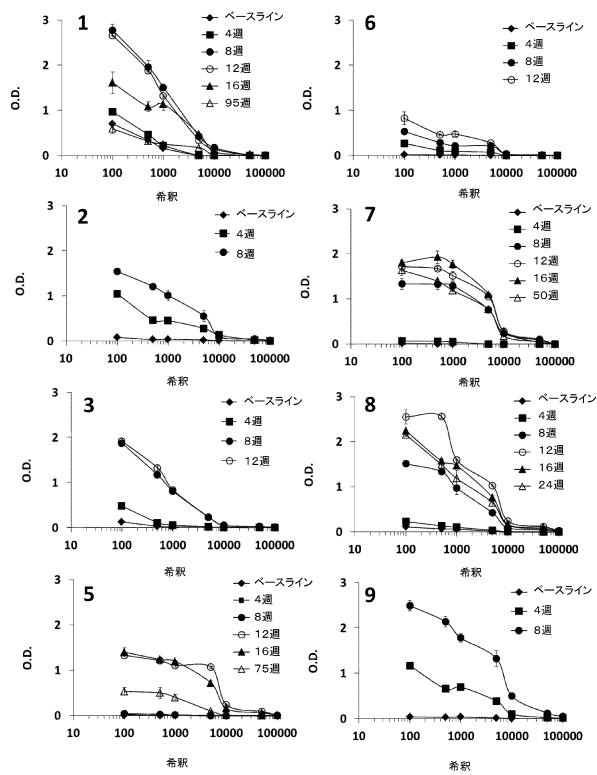


Figure 13

【配列表】

0006831836000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/16	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 1 2 N 5/16
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 0 7 K 16/00
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N 15/13
C 1 2 N	15/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
			C 1 2 N 15/08 1 0 0

(72)発明者 シーシールスキー,マイケル,ジェイ
アメリカ合衆国、ニューヨーク州 14127、オーチャード パーク、サイレント メドウ レ
ーン 8

審査官 大島 彰公

(56)参考文献 特表2008-515385 (JP, A)
米国特許出願公開第2014/0234350 (US, A1)
米国特許出願公開第2011/0136743 (US, A1)
米国特許出願公開第2009/0286312 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 61 K、A 61 P、C 07 K、C 12 N、
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
Capulus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)