

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7366755号

(P7366755)

(45)発行日 令和5年10月23日(2023.10.23)

(24)登録日 令和5年10月13日(2023.10.13)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/40 (2006.01)

C 0 7 K 16/40

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 K 47/68 (2017.01)

A 6 1 K 39/395

T

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 47/68

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 15 (全64頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-566107(P2019-566107)

(86)(22)出願日 平成30年5月30日(2018.5.30)

(65)公表番号 特表2020-522488(P2020-522488
A)

(43)公表日 令和2年7月30日(2020.7.30)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/035071

(87)国際公開番号 WO2018/222675

(87)国際公開日 平成30年12月6日(2018.12.6)

審査請求日 令和3年5月25日(2021.5.25)

(31)優先権主張番号 62/512,372

(32)優先日 平成29年5月30日(2017.5.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 512213332

ザ ボード オブ リージェンツ オブ ザ

ユニヴァーシティ オブ オクラホマ

アメリカ合衆国, 7 3 0 1 9 オクラホ

マ州, ノーマン, ルーム 1 1 9, パリ

ントン オーヴァル 6 6 0

(74)代理人 110000958

弁理士法人インテクト国際特許事務所

(74)代理人 100120237

弁理士 石橋 良規

(72)発明者 ホウチェン, コートニー, ダブリュー .

アメリカ合衆国, 7 3 0 3 4 オクラホ

マ州, エドモンド, サークル ベンド シ

ーティー . 1 3 1 6

(72)発明者 ウェイガント, ネイサニール

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗ダブルコルチン様キナーゼ1抗体および使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列番号：17、18、および19にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域、VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含む重鎖可変領域、

ならびに、配列番号：20、21、および22にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含む軽鎖可変領域

または、

(b) 配列番号：27、28、および29にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域、VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含む重鎖可変領域、

ならびに、配列番号：30、31、および32にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含む軽鎖可変領域、

を含む抗体またはその抗原結合部分であって、

ここで、前記抗体またはその抗原結合部分は、配列番号：1に示されるアミノ酸配列を有するダブルコルチン様キナーゼ1(DCLK1)アイソフォーム2に、または、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を有するDCLK1アイソフォーム4に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合部分。

10

20

【請求項 2】

前記抗体またはその抗原結合部分の解離定数 (K D) が約 10^{-9} M 未満である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3】

前記抗体またはその抗原結合部分がマウス、キメラ、またはヒト化である、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 4】

前記 (a) の重鎖可変領域が配列番号 : 14 に示されるアミノ酸配列を含み、前記 (a) の軽鎖可変領域が配列番号 : 16 に示されるアミノ酸配列を含み ; および、前記 (b) の重鎖可変領域が配列番号 : 24 に示されるアミノ酸配列を含み、前記 (b) の軽鎖可変領域が配列番号 : 26 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合部分。

10

【請求項 5】

前記 (a) の重鎖可変領域が配列番号 : 14 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記 (a) の軽鎖可変領域が配列番号 : 16 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み ; および、前記 (b) の重鎖可変領域が配列番号 : 24 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記 (b) の軽鎖可変領域が配列番号 : 26 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合部分。

20

【請求項 6】

前記抗原結合部分が、s c F v、ジ - s c F v、F a b、F a b'、F (a b' ₂)、F (a b) ₂、ジスルフィド結合 F v、ダイアボディ、またはミニボディである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 7】

前記抗体またはその抗原結合部分が、I g G 定常ドメインおよび I g A 定常ドメインを含む群から選択される少なくとも 1 つの定常ドメインを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 8】

前記抗体またはその抗原結合部分が、配列番号 : 10 に示されるアミノ酸配列を含む D C L K 1 のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合部分。

30

【請求項 9】

前記抗体またはその抗原結合部分が、治療薬または診断薬に結合している、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 10】

前記抗体またはその抗原結合部分がインビボで腫瘍細胞の増殖に対して阻害活性を有し、前記腫瘍細胞が腫瘍幹細胞、肺腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞、腎腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、食道腫瘍細胞、小腸腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、および直腸腫瘍細胞を含む群から選択される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合部分。

40

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合部分、および、少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 12】

腫瘍幹細胞転移癌、肺癌、乳癌、膵臓癌、腎臓癌、食道癌、胃癌、小腸癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮癌、および、卵巣癌から選択される疾患または状態の治療に使用するためである、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合部分をコードする、単

50

離されたポリヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照 / 参照文による組み込み

本出願は、米国特許法 119 条 (e) に基づき、2017 年 5 月 30 日に出願された米国出願番号 62 / 512, 372 の優先権を主張するものであり、その全体は参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究または開発に関する声明

該当なし。

【背景技術】

【0003】

腎細胞癌 (RCC) は、世界で 8 番目に多い癌であり、米国では、男性の全悪性腫瘍のほぼ 7 %、女性では 4 % を占めていた。注目すべきは、RCC 患者のほぼ 48 % が癌の局所的な広がりまたは遠隔転移を示しており、高い死亡率となっている。さらに、外科的摘出後の患者の 40 % に再発の強い傾向がある。厄介なことには、RCC は化学療法と放射線に対する強い抵抗性のため、非常に難治性の腫瘍である。現在、標的治療には免疫療法と受容体チロシンキナーゼ (RTK) および mTOR 阻害剤が含まれる。但し、これらは完全な治療効果をもたらさないため、患者の転帰を改善するには RCC の分子および細胞ドライバのさらなる研究が必要である。

20

【0004】

腎細胞癌は、低成長、低酸素の微小環境、ならびに薬物療法および放射線療法に対する深刻な耐性を特徴とする。これらの特徴は、腫瘍幹細胞または幹様細胞の存在と整合する。以前の研究結果では、消化管腫瘍幹細胞 (TSC) マーカーダブルコルチン様キナーゼ 1 (DCLK1) が RCC で後成的な調節不全と過剰発現を示した。さらに、RCC 細胞株における DCLK1 の標的化されたダウンレギュレーションは、腫瘍形成および転移の分子および機能的特徴の著しい減少をもたらしている。

30

【0005】

診察時に転移性疾患と診断された患者のかなりの割合および再発の傾向は、腫瘍内不均一性および RCC における上皮間葉転換 (EMT) の強い特徴の存在により説明することが可能である。フォン・ヒッペル・リンドウ (Von Hippel Lindau) (VHL) 腫瘍抑制遺伝子の不活性化は、低酸素誘導性転写因子 (HIF) のプロテアソーム分解を妨げることにより、RCC 腫瘍形成において重要な役割を果たす。HIF は低酸素症への応答に関与しており、これが今度は腫瘍幹細胞 (TSC) のサポート環境を提供する。TSC は、RCC の重要な特徴である EMT 表現型と治療抵抗性を付与することが知られている。これらの知見は、RCC の発生と進行が腫瘍幹細胞または幹様細胞と密接に関連している可能性があることを示唆している。

40

【0006】

DCLK1 は、カルモジュリン依存性キナーゼファミリーの一員であり、結腸、膵臓、肝臓、および食道を含む多くの癌で発現している。DCLK1 は TSC 特異的マーカーであり、癌の発生、EMT、および胃腸腫瘍の進行と高度に相関している。非消化管腫瘍の腫瘍形成における DCLK1 の役割の研究は限られている。しかし、最近、RCC 腫瘍で DCLK1 の後成的な調節不全および遺伝子やタンパク質レベルでの過剰発現が報告されている (Weygantらの "DCLK1 is a broadly dysregulated target against epithelial-mesenchymal

50

transition, focal adhesion, and stemness in clear cell renal carcinoma.” (DCLK1は、明細胞腎癌における上皮間葉転換、焦点接着、および幹細胞性に対して広く調節不全の標的である)、Oncotarget、6(4):2193-205(2015))。DCLK1は、アルファとベータと呼ばれる2つのプロモーターからの4つの主要なヒトアイソフォームで構成されている。これらのアイソフォームが癌において異なる機能と発現レベルを有することを示す証拠がある。すべてのアイソフォームには、共有のキナーゼドメインと自己リン酸化領域がある。アルファプロモーターは、異なるC末端領域を有する2つのダブルコルチン結合82kDaアイソフォーム(1および2)を生成する。ベータプロモーターは、2つの短縮された主にキナーゼドメイン52kDaアイソフォーム(3および4)を生成するが、C末端領域は同等であるが異なっている。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】Weygantらの“DCLK1 is a broadly dysregulated target against epithelial-mesenchymal transition, focal adhesion, and stemness in clear cell renal carcinoma.” Oncotarget、6(4):2193-205(2015))

【0008】

20

この特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含むこの特許または特許出願刊行物のコピーは、要求および必要な料金の支払いに応じて特許庁によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、CBT-15モノクローナル抗体(A、G、およびX)が精製DCLK1アイソフォーム4タンパク質を検出することを実証するウェスタンブロットを示す。

【図2】図2は、CBT-15モノクローナル抗体(mAB)が、細胞外DCLK1アイソフォーム4を選択的に検出し(上の線)、細胞内DCLK1アイソフォーム1に非選択的に結合することを実証するELISAの結果を示す(下の線)。

30

【図3】図3は、CBT-15モノクローナル抗体が細胞外DCLK1を発現するAsPC-1ヒト膵臓細胞の小さな亜集団を検出することを実証する蛍光活性化細胞選別(FACS)分析プロットを示す。

【図4】図4は、Caki-2ヒト腎癌細胞におけるDCLK1アイソフォーム2の過剰発現が微小管に局在し、マーカーの低酸素誘導性転写因子-1(HIF-1)、アルデヒドデヒドロゲナーゼ1A1(ALDH1A1)、およびビメンチンタンパク質の発現のアップレギュレーションをもたらすことを示す。

【図5】図5は、DCLK1アイソフォーム2が過剰発現されると、HIF-1 mRNAもCaki-2ヒト腎癌細胞で過剰発現されることを示すグラフである。

【図6】図6は、DCLK1アイソフォーム2の過剰発現がCaki-2細胞増殖の有意な増加をもたらすことを示すグラフである。

40

【図7】図7は、DCLK1アイソフォーム2の過剰発現がCaki-2細胞周期状態を変更しないことを示すプロットである。

【図8A】図8Aは、ACHNヒト腎癌細胞のサブセットがDCLK1アイソフォーム2または4に陽性であり、別のサブセットがALDHに陽性であり、細胞集団の少数のサブセット(0.5%)が両方のマーカーに陽性であることを示すプロットである。

【図8B】図8Bは、Caki-2ヒト腎癌細胞のサブセットがDCLK1アイソフォーム2または4に陽性であり、別のサブセットがALDH(アルデヒドデヒドロゲナーゼ)に陽性であり、細胞集団の少数のサブセット(1.5%)が両方のマーカーに陽性であることを示す。

50

【図 9】図 9 は、C a k i - 2 ヒト腎癌細胞における D C L K 1 アイソフォーム 2 の過剰発現が、A L D H + 細胞集団の増加をもたらすことを示すプロットである。

【図 10】図 10 は、D C L K 1 アイソフォーム 2 または 4 が、A C H N ヒト腎癌細胞の細胞外で発現されることを示す。

【図 11】図 11 は、細胞外 D C L K 1 アイソフォーム 2 または 4 を有する A C H N ヒト腎癌細胞が、細胞外 D C L K 1 アイソフォーム 2 または 4 を有しないものよりもスフェロイドをよりよく形成できることを示すグラフである。

【図 12】図 12 は、C a k i - 2 ヒト腎癌細胞における D C L K 1 タンパク質ノックダウンのプロット確認である。

【図 13】図 13 は、D C L K 1 ノックダウン後、C a k i - 2 ヒト腎癌細胞がスフェロイドを形成する能力が著しく損なわれることを示している。

【図 14】図 14 は、D C L K 1 アイソフォーム 2 を過剰発現する C a k i - 2 ヒト腎癌細胞のスニチニブ前処理が、スフェロイドを形成する細胞の能力にわずかな影響しか与えないことをグラフで示している。

【図 15】図 15 は、対照または D C L K 1 アイソフォーム 2 過剰発現 C a k i - 2 スフェロイドの代表的な顕微鏡画像を示す。

【図 16】図 16 は、D C L K 1 アイソフォーム 2 過剰発現 C a k i - 2 細胞がスニチニブに耐性であることを示すグラフである。

【図 17】図 17 は、D C L K 1 アイソフォーム 2 過剰発現 C a k i - 2 細胞がソラフェニブに対して耐性ではないことを示すグラフである。

【図 18】図 18 は、抗 D C L K 1 s i R N A (s i D C L K 1) およびスクランブル配列 s i R N A (s i S C R) による D C L K 1 のダウンレギュレーションが、C a k i - 2 および A C H N ヒト腎癌細胞におけるスニチニブに対する感作をもたらすことを示すグラフである。

【図 19】図 19 は、D C L K 1 抗 D C L K 1 s i R N A (s i D C L K 1) およびスクランブル配列 s i R N A (s i S C R) のダウンレギュレーションが、C a k i - 2 および A C H N ヒト腎癌細胞におけるソラフェニブに対する感作をもたらすことを示している。

【図 20】図 20 は、プログラム細胞死リガンド 1 (P D - L 1) の発現が、患者の腫瘍組織の腎癌ステージに関連していることを示すグラフである。

【図 21】図 21 は、D C L K 1 発現が、患者由来の腎癌組織における細胞膜 P D - L 1 の発現と関連していることを示している。

【図 22】図 22 は、C a k i - 2 ヒト腎癌細胞における D C L K 1 アイソフォーム 2 の過剰発現が、免疫チェックポイントマーカー P D - L 1 および細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A 4) の過剰発現をもたらすことを示すプロットである。

【図 23】図 23 は、D C L K 1 s i R N A または C B T - 1 5 A 抗体が C a k i - 2 および A C H N ヒト腎癌細胞の P D - L 1 発現を部分的にダウンレギュレートすることを示す一連のウェスタンブロットである。

【図 24 A】図 24 A は、C B T - 1 5 A m A B 治療が A C H N 腎細胞癌 (R C C) 細胞をカスパーゼ - 3 / 7 活性によって測定される末梢血単核細胞 (P B M C) 媒介アポトーシスに感作することを示している。

【図 24 B】図 24 B は、C B T - 1 5 G m A B および C B T - 1 5 X m A B が、カスパーゼ - 3 / 7 活性により測定される膀胱癌細胞におけるインビトロでの免疫細胞媒介細胞殺傷を増加させることを示すグラフである。

【図 25】図 25 は、マウスにおける A C H N ヒト腎腫瘍異種移植片成長に対する C B T - 1 5 A m A B の阻害効果を実証する ($p < 0.03$)。グラフは、経時的な腫瘍体積の成長を示す。下のパネルは、腫瘍体積を測定するために使用された摘出された腎腫瘍異種移植片の写真を示す。C B T - 1 5 A m A B は、腫瘍の成長を大幅に減少させた。

【図 26】図 26 は、図 25 の摘出された腫瘍の腫瘍体積を示す ($p < 0.001$)。

【図 27】図 27 は、図 25 の摘出された腫瘍の腫瘍塊を示す ($p < 0.001$)。

10

20

30

40

50

【図 28】図 28 は、マウスにおける膵臓癌 SW 1990 腫瘍異種移植片の成長に対する CBT - 15G mAB の阻害効果を実証している ($p < 0.0001$)。グラフは、経時的な腫瘍体積の成長を示している。下のパネルは、摘出された腎腫瘍異種移植片の写真を示す。CBT - 15G mAB は、腫瘍の成長を大幅に減少させた。

【図 29】図 29 は、図 28 の摘出された腫瘍の腫瘍体積を示す ($p < 0.001$)。

【図 30】図 30 は、図 28 の摘出された腫瘍の腫瘍塊を示す ($p < 0.054$)。

【図 31】図 31 は、マウスにおける膵臓癌 SW 1990 腫瘍異種移植片の成長に対するキメラ CBT - 15X mAB の阻害効果を実証している ($p < 0.005$)。グラフは、経時的な腫瘍体積の成長を示している。下のパネルは、摘出された腎腫瘍異種移植片の写真を示す。CBT - 15X mAB は、腫瘍の成長を大幅に減少させた。

10

【図 32】図 32 は、図 31 の摘出された腫瘍の腫瘍体積を示すグラフである ($p < 0.05$)。

【図 33】図 33 は、図 31 の摘出された腫瘍の腫瘍塊を示すグラフである ($p < 0.05$)。

【図 34】図 34 は、マウスにおける膵臓癌 AsPC - 1 腫瘍異種移植片の成長に対するキメラ CBT - 15X mAB の阻害効果を実証している ($p < 0.005$)。グラフは、経時的な腫瘍体積の成長を示している。下のパネルは、摘出された腎腫瘍異種移植片の写真を示す。CBT - 15X mAB は、腫瘍の成長を大幅に減少させた。

【図 35】図 35 は、図 34 の摘出された腫瘍の腫瘍体積を示す ($p < 0.05$)。

【図 36】図 36 は、図 34 の摘出された腫瘍の腫瘍塊を示す ($p < 0.05$)。

20

【発明を実施するための形態】

【0010】

本開示は、ヒト DCLK1 タンパク質に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片、そのような抗体およびその抗原結合断片を発現するハイブリドーマまたは他の細胞株、ならびにそのような抗体およびその抗原結合断片をコードする核酸を含む核酸、ベクター、および宿主細胞に関する。少なくとも特定の非限定的な実施形態では、前記抗体またはその抗原結合断片は、DCLK1 アイソフォーム 2 (配列番号: 1) または DCLK1 アイソフォーム 4 (配列番号: 2) 内のエピトープに特異的に結合する。特定の (しかし非限定的な) 実施形態では、前記アイソフォーム 2 または 4 のエピトープは、配列番号: 3 ~ 12 のアミノ酸配列、より具体的には (但し、限定するものではない) 配列番号: 10 を含む。開示された抗体およびその抗原結合断片は、例えば (限定するものではないが) DCLK1 を発現する癌の治療および診断、ならびに DCLK1 タンパク質および DCLK1 タンパク質を発現する細胞の検出に使用することができる。DCLK1 は、RCC などの特定の癌の発生の要因であるだけではない; 本明細書で実証されるように、DCLK1 は、DCLK1 を発現する癌の治療のための治療標的でもある。そのような癌の例には、胃腸癌 (すなわち、結腸、直腸、腸、胃、食道)、乳癌、肺癌、腎癌、膵臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮癌、および卵巣癌が含まれるが、これらに限定されない。したがって、本開示は、特定の非限定的な実施形態において、そのような癌に苦しむ対象を治療する方法に関する。

30

【0011】

40

例示的な説明、実施例、および結果によって本開示の様々な実施形態をさらに詳細に説明する前に、本開示の化合物、組成物、および方法は、特定の実施形態および以下の説明に記載されている例示の詳細にその適用が限定されないことを理解されたい。本明細書で提供される説明は、例示のみを目的とするものであり、限定的な意味で解釈されることを意図するものではない。したがって、本明細書で使用される言語は、可能な限り最も広い範囲および意味が与えられることを意図しており、実施形態および実施例は、網羅的ではなく例示的である。また、本明細書で使用される語法および用語は、説明のみを目的とするものであり、そうと示されない限り、限定と見なされるべきではないことを理解されたい。さらに、以下の詳細な説明では、本開示のより完全な理解を提供するために、多くの具体的な詳細が示されている。しかしながら、これらの具体的な詳細なしで本開示を実施

50

できることは、当業者には明らかであろう。他の例では、説明の不必要な複雑化を避けるために、当業者に周知の特徴は詳細には説明されていない。当業者に明らかなすべての代替、置換、修飾、および均等物が本開示の範囲内に含まれることが意図される。本明細書に開示される化合物、組成物、および方法、ならびにその用途および使用のすべては、本開示に照らして過度の実験を行うことなく作成および実施される。したがって、本開示の化合物、組成物、および方法を特定の実施形態により説明してきたが、前記化合物、組成物、および方法に、そして本明細書に記載の方法の工程または工程の順序において、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、変更を適用できることは当業者には明らかであろう。

【0012】

すべての特許、公開された特許出願、および本明細書で言及されたまたは本出願の任意の部分で参照された公開論文を含む非特許刊行物は、あたかもそれぞれ個々の特許または刊行物が参照により具体的かつ個別的に組み込まれることが示されているのと同程度に、その全体が参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

【0013】

本明細書中で他に規定されない限り、本開示に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈によって別途要求されない限り、単数形の使用は複数形を含み、複数形の使用は単数形を含むものとする。本明細書で使用される場合、「単一」という特定の用語は、「1つ」に限定される。

【0014】

本開示の方法、化合物および組成物に従って使用される場合、以下の用語は、別途指示がない限り、以下の意味を有すると理解されるべきである。

【0015】

特許請求の範囲および/または明細書において、「含む (comprising)」という用語と併せて使用される場合、単語「a」または「an」の使用は、「1つ」を意味し得るが、それはまた、「1つ以上」、「少なくとも1つ」、「1つまたは1つより多い」の意味と一致する。特許請求の範囲において、用語「または」は、代替物のみを指すと明示的に示されない限り、または代替物が相互に排他的である場合を除き、「および/または」を意味するために使用されるが、本開示は、代替物のみ、および「および/または」を指す定義を支持する。用語「少なくとも1つ」の使用は、1だけでなく、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、100、またはそれらに含まれる任意の整数を含むがこれらに限定されない、1より大きい任意の数量を含むと理解されるであろう。用語「少なくとも1つ」という用語は、それが付けられている用語に応じて、100または1000またはそれ以上まで拡張することができ、加えて、100/1000の量は、より高度な限定はまた満足のいく結果を生み出す可能性があるため、限定的であると見なされるべきではない。加えて、用語「X、YおよびZの少なくとも1つ」の使用は、Xのみ、YのみおよびZのみ、ならびにX、YおよびZの任意の組み合わせを含むと理解される。

【0016】

本明細書中で使用される場合、すべての数値または範囲は、文脈上別途明示しない限り、その範囲内の値および整数の分数ならびにその範囲内の整数の分数を含む。よって、説明のため、1~10などの数値範囲への言及は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、ならびに1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等を含む。したがって、1~50の範囲への言及は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20等最大50まで(50を含む)、ならびに1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5等を含む。一連の範囲への言及は、系列内の様々な範囲の境界の値を組み合わせる範囲を含む。よって、一連の範囲の説明のために、例えば1~10、10~20、20~30、30~40、40~50、50~60、60~75、75~100、100~150、15

10

20

30

40

50

0 ~ 200、200 ~ 250、250 ~ 300、300 ~ 400、400 ~ 500、500 ~ 750、750 ~ 1,000の一連の範囲の言及は、例えば1 ~ 20、10 ~ 50、50 ~ 100、100 ~ 500および500 ~ 1,000の範囲を含む。より大きい(より多い)またはより小さい整数への言及には、それぞれ言及数値より大きいまたは小さい数値が含まれる。したがって、例えば、100未満への言及には、99、98、97などが含まれ、1に至るまで続く。10未満には9、8、7などが含まれ、1まで続く。

【0017】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、単語「含む(comprising)」(および含む(comprising)の任意の形、例えば「含む(comprise)」および「含む(comprises)」)、「有する(having)」(および「有する(having)」の任意の形、例えば「有する(have)」および「有する(has)」)、「含む(including)」(および「含む(including)」の任意の形、例えば「含む(includes)」および「含む(include)」または「含有する(containing)」(および「含有する(contains)」および「含有する(contain)」)は、包括的であるかまたは制約がなく、引用されていない、さらなる要素または方法工程を除外しない。

【0018】

本明細書で使用される用語「またはそれらの組み合わせ」とは、その用語に先行する列挙された項目のすべての順列および組み合わせを指す。例えば、「A、B、C、またはそれらの組み合わせ」は、A、B、C、AB、AC、BCまたはABCのうちの少なくとも1つを含み、特定の文脈で順序が重要である場合は、BA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BACまたはCABも含むことが意図される。この例を続けると、BB、AA、AA、AAB、BBC、AABABCC、CBBAAA、CABABBなどの1つ以上の項目または用語の繰り返しを含有する組み合わせが明確に含まれる。当業者であれば、文脈から明らかでない限り、典型的には、任意の組み合わせにおける項目または用語の数に制限はないことを理解するであろう。

【0019】

本出願を通して、用語「約(about)」は、ある値が組成物、組成物を投与するために使用される方法に関する誤差の固有の変動、または試験対象間に存在する変動を含むことを示すために使用される。本明細書で使用される場合、修飾語「約」または「ほぼ(approximately)」という修飾語は、正確な値、量、程度、方向または他の修飾された特性もしくは値を含むことを意図しているが、測定誤差、製造公差、様々な部品もしくは構成要素に加わる応力、観測者の誤差、磨耗および引き裂き、ならびにそれらの組み合わせも含むことを意図する。用語「約」または「ほぼ」は、量、一時的な持続時間などの測定可能な値を指すときに本明細書で使用される場合、例えば特定の値からの $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、または $\pm 5\%$ 、または $\pm 1\%$ 、または $\pm 0.1\%$ の変動を、本開示方法を実施するために適切であるように、かつ当業者に理解されるように、包含することを意味する。本明細書で使用される場合、用語「実質的に(substantially)」とは、続いて記載される事象もしくは状況が完全に起こること、または続いて記載される事象もしくは状況が大いに生じることを意味する。例えば、用語「実質的に」とは、続いて記載される事象もしくは状況が、少なくとも90%の確率で、または少なくとも95%の確率で、または少なくとも98%の確率で生じることを意味する。

【0020】

本明細書で使用される場合、「1つの実施形態(one embodiment)」または「ある実施形態(an embodiment)」へのいずれかの言及は、実施形態に関連して記載される特定の要素、特徴、構造または特性が少なくとも1つの実施形態に含まれ、他の実施形態に含まれ得ることを意味する。本明細書の様々な箇所における「実施形態では」という句の出現は、必ずしもすべてが同じ実施形態を言及するものではなく、必ずしも単一のまたは特定の実施形態に限定されるものでもない。さらに、1つ以上の

10

20

30

40

50

実施形態または実施例へのすべての言及は、特許請求の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【 0 0 2 1 】

用語「薬学的に許容される」とは、合理的な利益／リスク比に見合った毒性、刺激および／またはアレルギー反応などの過度の有害な副作用なしに、ヒトおよび／または動物への投与に適した化合物および組成物を指す。本開示の化合物または複合体は、化合物または複合体の溶解性、送達可能性、分散性、安定性および／または立体構造の完全性を改善し得る担体、ビヒクルおよび希釈剤を含む１つ以上の薬学的に許容される賦形剤と組み合わせることができる。

【 0 0 2 2 】

「生物学的に活性な」とは、活性剤がその生理学的効果をどのように有するかに関係なく、生物体の生理学的系を修飾する活性剤の能力を意味する。

【 0 0 2 3 】

本明細書中で使用される場合、「純粋な」または「実質的に純粋な」とは、対象種が存在する優勢な種（すなわち、モル基準で、その組成物中の他の対象種よりも豊富である）であることを意味し、特に、実質的に精製された画分は、対象種が存在するすべての高分子種の少なくとも約５０パーセント（モル基準で）を含む組成物である。一般に、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在するすべての高分子種の約８０％超、より具体的には約８５％超、約９０％超、約９５％超、または約９９％超を含む。用語「純粋な」または「実質的に純粋な」はまた、対象種が少なくとも６０％（w/w）純粋、または少なくとも

【 0 0 2 4 】

動物または対象の、この用語の範囲および意味での非制限的な例には、イヌ、ネコ、ラット、マウス、モルモット、チンチラ、ウマ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、動物園の動物、旧世界猿および新世界猿、非ヒト霊長類およびヒトが含まれる。

【 0 0 2 5 】

「処置」とは、治療的処置を指す。「予防」とは、予防的または防止的処置対策、または状態または疾患の発症を減少させることを指す。用語「処置する」とは、治療目的および／または予防のために組成物を対象に投与することを指す。

【 0 0 2 6 】

用語「治療用組成物」および「医薬組成物」とは、当該分野で公知であるかまたは本明細書で意図される任意の方法によって対象に投与され得る活性剤含有組成物を指し、ここで組成物の投与は、本明細書の他の箇所に記載されている治療効果をもたらす。さらに、本開示の組成物は、当該技術分野で周知の製剤技術を使用して、遅延放出、制御放出、延長放出および／または持続放出を提供するように設計することができる。

【 0 0 2 7 】

用語「有効量」とは、本開示の方法で使用されるとき、妥当な利益／リスク比に見合った過度の有害な副作用（実質的な毒性、刺激およびアレルギー反応など）なしに、対象において検出可能な治療または処置効果を示すのに十分な活性薬剤の量を指す。対象の有効量は、対象の種類、大きさ、および健康状態、処置される状態の性質および重症度、投与方法、処置の持続時間、併用療法の性質（存在する場合）、使用される具体的な製剤などに依拠する。したがって、正確な有効量を事前に特定することはできない。しかしながら、所与の状況に対する有効量は、本明細書で提供する情報に基づいて日常的な実験を用いて、当業者によって決定されてよい。

【 0 0 2 8 】

用語「軽減する」は、対象の状態、疾患またはその兆候の検出可能または測定可能な改善を意味する。検出可能または測定可能な改善には、状態もしくは疾患の発生、頻度、重症度、進行もしくは持続期間における主観的または客観的な減少、低減、阻害、抑制、制限もしくは制御、または兆候もしくは根底にあるもしくは疾患の結果の改善、または疾患の好転が含まれる。効果的な治療結果は、疾患または状態の発生、頻度、重症度、進行もしくは持続期間、または対象における疾患または状態の結果を改善、減少、低減、阻害、抑制、制限、制御または予防する「治療効果」または「利益」をもたらすことができる。

【 0 0 2 9 】

状態または疾患の安定化などの悪化の減少または低減も良好な処置結果である。したがって、治療上の利益は、疾患もしくは状態の完全な摘出または好転である必要はなく、疾患もしくは状態に関連する有害な兆候、合併症、結果または根本的原因のいずれか1つ、大部分またはすべての完全な摘出または好転である。よって、状態もしくは疾患の発生、頻度、重症度、進行、もしくは持続期間における部分的な減少、低減、阻害、抑制、制限、制御または予防などの漸進的な改善があるとき（例えば安定化）、短期間または長期間（時間、日、週、月など）にわたって満足のいく評価項目が達成され得る。状態または疾患の潜在的な治療上の利益または改善を提供する治療などの方法または使用の有効性は、様々な方法および試験アッセイによって確認することができる。

【 0 0 3 0 】

用語 D C L K 1 アイソフォーム 2 および D C L K 1 アイソフォーム 4 は、 R e f S e q N M _ 0 0 1 3 3 0 0 7 2 . 1 (アイソフォーム 2) および N M _ 0 0 1 1 9 5 4 1 6 . 1 (アイソフォーム 4) で表される転写物配列から生成されるポリペプチドアイソフォームを指す。 D C L K 1 アイソフォーム 2 は、アミノ酸配列の配列番号： 1 を有するものとしてさらに定義され（表 1 ）、 D C L K 1 アイソフォーム 4 は、アミノ酸配列の配列番号： 2 を有するものとしてさらに定義される（表 2 ）。

【表 1】

表1 DCLK1アイソフォーム2のアミノ酸配列

MSFGRDMELEHFDERDKAQRYSRGSRVNGLPSPTHSAHCSFYRTRTLQTL
SSEKKAKKVRFYRNGDRYFKGIVYAI SPDRFRSFEALLADLTRTLSDNVNL
PQGVRTTYTIDGLKKISSLDQLVEGESYVCGSIEPFKKLEYTKNVNPNWSV
NVKTTSASRAVSSLATAKGSPSEVRENKDFIRPKLVTIIRSGVKPRKAVRILL
NKKTAHSFEQVLTIDITDAIKLD SGVVKRLYTL DGKQVMCLQDFFGDDIFI
ACGPEKFRYQDDFLDSEECRVVKSTSYTKIASSRRSTTKSPGPSRRSKSPA
STSSVNGTPGSQLSTPRSGKSPSPSPTSPGSLRKQRSSQHGGSSSTSLASTKVC
SSMDENDGPGEVSEEGFQIPATITERYKVGRITIGDGNFAVVKECVERSTARE
YALKIIKKSKCRGKEHMIQNEVSILRRVKHPNIVLLIEEMDVPTELYLVMELV
KGGDLFDAITSTNKYTERDASGMLYNLASAIKYLHSLNIVHRDIKPENLLVY
EHQDGSKSLKLGDFGLATIVDGPLYTVCGTPTYVAPEIIAETGYGLKVDIWA
GVITYILLCGFPFRGSGDDQEVLFQILMGQVDFPSPYWDNVSDSAKELITM
MLLVDVDQRFSAVQVLEHPWVNDDGLPENEHQLSVAGKIKKHFNTPGPKPNS
TAAGVSVIATTALDKERQVFRRRRNQDVRSRYKAQPAPPELNSESEDYSPSSS
ETVRSPNSPF

10

20

30

40

50

【表 2】

表2 DCLKアイソフォーム4のアミノ酸配列

MLELIEVNGTPGSQLSTPRSGKSPSPSPTSPGSLRKQRSSQHGGSSSTSLA
 STKVCSSMDENDGPGEEVSEEGFQIPATTTERYKVGRTIGDGNFAVVKE
 CVERSTAREYALKIHKSKCRGKEHMIQNEVSILRRVKHPNIVLLIEEMD
 VPTELYLVMELVKGGDLFDAITSTNKYTERDASGMLYNLASAIKYLHS
 LNIVHRDIKPENLLVYEHQDGSKSLKLGDFGLATIVDGPLYTVCGTPTY
 VAPEIIAETGYGLKVDIWAAGVITYILLCGFPFRGSGDDQEVLFQILM
 GQVDFPSPYWDNVSDSAKELITMMLLVDDVDQRFSAVQVLEHPWVNDD
 GLPENEHQLSVAGKIKKHFNTPGPKPNSTAAGVSVIATTALDKERQVFR
 RRNQDVRSSRYKAQPAPPELNSESEDYSPSSSETVRSPNSPF

10

【0031】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、無傷の「全長」抗体ならびにそのDCLK1結合断片（本明細書では、抗原結合断片、抗原結合部分、結合断片、または結合部分とも呼ばれる）の両方を指すことができる。本明細書で使用する「抗体」という用語には、合成抗体、モノクローナル抗体、組換え産生抗体、細胞内発現抗体、多重特異性抗体（二重特異性抗体を含む）、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、軽および重鎖可変領域がペプチドリンカーによって連結されている組換え単一鎖ポリペプチド分子、すなわち、単鎖Fv（scFv）断片、二価scFv（bi-scFv）、三価scFv（tri-scFv）、Fab断片、Fab'断片、F(ab')断片、F(ab)₂断片、F(ab)₂断片、ジスルフィド結合Fv（sdFv）（二重特異性sdFvsを含む）、および抗イディオタイプ（抗Id）抗体、ダイアボディ、dAb断片、ナノボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、線状抗体、単離されたCDR、および上記のいずれかのエピトープ結合断片を含むが、これらに限定されない。構造に関係なく、抗体断片は無傷の抗体によって認識される同じ抗原と結合する。例えば、抗DCLK1抗体断片は、DCLK1のエピトープと結合する。断片は、組換えDNA技術または無傷の免疫グロブリンの酵素的または化学的分離によって生成できる。

20

【0032】

本明細書で提供されるいくつかの実施形態の抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、または抗体断片から形成される多重特異性抗体などのより高い多重特異性であってもよい。「抗体」という用語には、ダイアボディ（ホモダイマーFv断片）またはミニボディ（VL-VH-CH3）、二重特異性抗体なども含まれる。二重特異性または二機能性抗体は、2つの異なる重/軽鎖の対と2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。多重特異性抗体は、ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であり得るか、またはポリペプチドならびに異種ポリペプチドまたは固相担持材などの異種エピトープの両方に特異的であり得る。組換え法または合成リンカーを使用して抗体断片を結合することにより産生される単鎖抗体も本開示に含まれる（例えば、国際特許出願公開93/17715号；92/08802号；91/00360号；および92/05793号；ならびに米国特許第4,474,893号；4,714,681号；4,925,648号；5,573,920号；および5,601,819号を参照）。

30

40

【0033】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、集団を含む個々の抗体は、少量存在する可能性のある自然発生突然変異を除いて同一である抗体を指す。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られるという抗体の特性を示し、特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本開示に従って使用されるDCLK1アイソフォーム2および4に対するモノクローナル抗体は、Kohlerらによって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製することができる（Nature、25

50

6 : 4 9 5 (1 9 7 5))、または組換えDNA法によって作成することができる(例えば、米国特許第4,816,567号を参照)。

【0034】

本明細書に記載の組成物、製剤、および方法は、モノクローナル抗体を含んでもよい。特定の抗原に対するげっ歯類モノクローナル抗体は、当業者に知られている方法によって得ることができる(例えば、KohlerおよびMilsteinの前掲文献、およびColiganら(編者)のCurrent Protocols in Immunology、Vol. 1、頁2.5.1-2.6.7(John Wiley & Sons 1991)を参照)。マウス免疫グロブリン可変ドメインをクローニングするための一般的な技術は、例えば、Orlandiら(Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、86:3833(1989))の刊行物に開示されている。

10

【0035】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定および分離および/または回収された抗体、および/または組換え生産された抗体を指す。「精製抗体」とは、通常、その産生または精製から生じる干渉タンパク質および他の混入物質の純度が少なくとも50% w/wの抗体であるが、モノクローナル抗体が過剰な薬学的に許容される1つ以上の担体またはその使用を促進することを目的とした1つ以上のその他の手段と組み合わせられる可能性を排除しない。干渉タンパク質および他の混入物質には、例えば、抗体が単離または組換えにより産生される細胞の細胞成分が含まれる場合がある。モノクローナル抗体は、生産または精製からの干渉タンパク質および混入物質の純度が少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99% w/wである。マウス、キメラ、およびヒト化抗体を含む本明細書に記載の抗体は、単離および/または精製された形態で提供され得る。

20

【0036】

「治療薬」は、疾患の処置に有用な原子、分子、または化合物である。治療薬の例としては、抗体、抗体断片、薬物、サイトカインまたはケモカイン阻害剤、プロアポトーシス剤、チロシンキナーゼ阻害剤、毒素、酵素、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、RNAi、キレート剤、ホウ素化合物、光活性剤、色素、放射性同位元素が挙げられるが、これらに限定されない。

【0037】

「診断薬」は、疾患の診断に有用な原子、分子、または化合物である。有用な診断薬には、放射性同位体、色素、造影剤、蛍光化合物または分子、および増強剤(例えば、常磁性イオン)が含まれるが、これらに限定されない。特定の(しかし非限定的な)実施形態では、診断薬は、放射性同位体、増強剤、および蛍光化合物を含む群から選択される。

30

【0038】

「免疫複合体」または「抗体-薬物複合体」は、原子、分子、またはより高次の構造(例えば、リボソームを有する)、治療薬、または診断薬との抗体の複合体である。本明細書で使用する「抗体」という用語は、無傷の抗体、およびDCLK1結合断片の両方を指し、これらは治療薬(例えば、細胞障害性または細胞増殖抑制薬)または診断薬に結合する。

40

【0039】

本明細書で使用する場合、「抗体融合タンパク質」という用語は、抗体または抗体断片が同じまたは異なる抗体または抗体断片などの別のタンパク質またはペプチドに結合している組換えにより産生された抗原結合分子である。融合タンパク質は、単一の抗体成分、異なる抗体成分の多価または多重特異性の組み合わせ、または同じ抗体成分の複数のコピーを含んでもよい。融合タンパク質は、抗体または抗体断片および治療薬をさらに含んでもよい。

【0040】

基本的な抗体構造ユニットは、サブユニットの4量体である。各4量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一の対を含み、各対は1つの「軽」鎖(約25 kDa)と1つの「重」鎖

50

(約50～70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に関与する以下に記載される相補性決定領域と呼ばれる部分を含む、約100から120またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。この可変領域は、切断可能なシグナルペプチドにリンクして最初に発現する。シグナルペプチドのない可変領域は、成熟可変領域と呼ばれることもある。したがって、例えば、「軽鎖成熟可変領域」は、軽鎖シグナルペプチドのない軽鎖可変領域を意味する。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主に担う定常領域を規定する。

【0041】

軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかに分類される。重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンに分類され、それぞれ抗体のアイソタイプをIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEとして定義する。軽鎖と重鎖内では、可変領域と定常領域は約12以上のアミノ酸の「J」領域で結合され、重鎖は約10以上のアミノ酸の「D」領域も含む(一般的に、Fundamental Immunology (Paul, W., 編、第2編、Raven Press, N.Y., 1989、Ch. 7を参照)。

【0042】

各軽鎖/重鎖対の成熟可変領域は、抗体結合部位を形成する。よって、無傷抗体は2つの結合部位を有する。二機能性または二重特異性抗体の場合を除き、2つの結合部位は同じである。鎖はすべて、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域により結合された、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)の同じ一般構造を呈する。各対の2本の鎖からのCDRは、フレームワーク領域により整合され、特定のエピトープへの結合を可能にする。N末端からC末端まで、軽および重鎖の両方は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabata, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md, 1987 および1991)、またはChothiaおよびLesk (J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothiaら, Nature 342:878-883 (1989))の定義に従う。Kabataはまた、異なる重鎖間または異なる軽鎖間での対応する残基には同じ番号が割り当てられる、広く使用されている番号付け法(Kabataの番号付け)も提供する。

【0043】

特定の非限定的な実施形態において、本開示の抗体またはその抗原結合部分は、少なくとも1つの重鎖可変領域および/または少なくとも1つの軽鎖可変領域を含む。重鎖可変領域(または軽鎖可変領域)は、次の順序でアミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのCDRと4つのフレームワーク領域(FR)を含み得る: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

【0044】

用語「エピトープ」は、抗体が結合する抗原における部位を指す。エピトープは、隣接するアミノ酸、または1つ以上のタンパク質の三次折り畳みによって並置される隣接しないアミノ酸から形成することができる。隣接するアミノ酸から形成されたエピトープは、変性溶媒への曝露の際、通常保持されるのに対して、三次折り畳みによって形成されたエピトープは、変性溶媒による処理の際、通常失われる。エピトープは通常、独特の空間立体構造にて少なくとも3個、さらに通常少なくとも5個または8～10個のアミノ酸を含む。エピトープの空間立体構造を決定する方法には、例えば、X線結晶学および二次元核磁気共鳴が挙げられる。例えば、Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, 編集(1996)を参照のこと。

【0045】

また、特定のアミノ酸が置換、欠失、または付加された抗体またはその抗原結合部分も本開示の範囲内である。これらの交替は、ペプチドの生物学的特性、例えば結合活性など

10

20

30

40

50

(但し、これに限定されない)に実質的な影響を与えない。例えば、抗体は、抗原への結合を改善するなどのために、フレームワーク領域でアミノ酸置換を有する場合がある。別の例では、選択された少数のアクセプターフレームワーク残基を対応するドナーアミノ酸で置き換えることができる。ドナーフレームワークは、成熟または生殖系列のヒト抗体フレームワーク配列またはコンセンサス配列であり得る。表現型的にサイレントなアミノ酸置換を行う方法に関するガイダンスは、以下で提供される：Bowieら(Science、247:1306-1310(1990))；Cunninghamら(Science、244:1081-1085(1989))；Ausubel(編集)(Current Protocols in Molecular Biology、John WileyおよびSons、Inc.(1994))；Maniatisら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.(1989))；Pearson(Methods Mol. Biol. 243:307-31(1994))；およびGonnetら(Science、256:1443-45(1992))。

【0046】

アミノ酸置換を保存的または非保存的として分類するために、アミノ酸は以下のように1つの非限定的な実施形態に分類される：グループI(疎水性側鎖)：met、ala、val、leu、ile；グループII(中性親水性側鎖)：cys、ser、thr；グループIII(酸性側鎖)：asp、glu；グループIV(塩基性側鎖)：asn、gln、his、lys、arg；グループV(鎖の向きに影響する残基)：gly、pro；およびグループVI(芳香族側鎖)：trp、tyr、phe。保存的置換には、同じグループ内のアミノ酸間の置換が含まれる。非保存的置換は、これらのグループの1つのメンバーを別のグループのメンバーと交換することを意味する。

【0047】

保存的アミノ酸置換の表が構築されており、当該技術分野で知られている。他の実施形態において、交換可能なアミノ酸の例には、以下が含まれるが、これらに限定されない：アルギニンとリジン；グルタミン酸とアスパラギン酸；セリンとスレオニン；グルタミンとアスパラギン；そしてバリンとロイシンとイソロイシン。他の非限定的な実施形態では、以下の置換を行うことができる：leu、ile、またはvalによるAla(A)の置換；gln、asn、またはlysによるArg(R)の置換；his、asp、lys、arg、またはglnによるAsn(N)の置換；asnまたはgluによるAsp(D)の置換；alaまたはserによるCys(C)の置換；gluまたはasnによるGln(Q)の置換；glnまたはaspによるGlu(E)の置換；alaによるGly(G)の置換；asn、gln、lys、またはargによるHis(H)の置換；val、met、ala、phe、またはleuによるIle(I)の置換；val、met、ala、phe、またはileによるLeu(L)の置換；gln、asn、またはargによるLys(K)の置換；phe、ile、またはleuによるMet(M)の置換；leu、val、ile、ala、またはtyrによるPhe(F)の置換；alaによるPro(P)の置換；thrによるSer(S)の置換；serによるThr(T)の置換；pheまたはtyrによるTrp(W)の置換；trp、phe、thr、またはserによるTyr(Y)の置換；ile、leu、met、phe、またはalaによるVal(V)の置換。

【0048】

アミノ酸置換に関する他の考慮事項には、残基がタンパク質の内部に位置するか、溶媒に(すなわち外部に)曝されるかどうかが含まれる。内部残基の場合、保存的置換には、例えば、AspとAsn；SerとThr；SerとAla；ThrとAla；AlaとGly；IleとVal；ValとLeu；LeuとIle；LeuとMet；PheとTyr；そしてTyrとTrpを含む。溶媒に曝された残基の場合、保存的置換には、例えば、AspとAsn；AspとGlu；GluとGln；GluとAla；GlyとA

10

20

30

40

50

s n ; A l a と P r o ; A l a と G l y ; A l a と S e r ; A l a と L y s ; S e r と T h r ; L y s と A r g ; V a l と L e u ; L e u と I l e ; I l e と V a l ; そして P h e と T y r との置換が挙げられる。

【 0 0 4 9 】

配列の同一性の割合は、K a b a t の番号付け規則により最大限に整列された抗体配列を用いて決定することができる。整列後、特定の抗体領域（例えば、重または軽鎖の成熟可変領域全体）を参照抗体の同じ領域と比較した場合、対象と参照抗体領域間のパーセント配列同一性は、対象と参照抗体領域の両方で同じアミノ酸が占める位置の数を、ギャップをカウントせずに 2 つの領域の整列位置の総数で割ったものに、1 0 0 を掛けて百分率に変換する。

【 0 0 5 0 】

1 つ以上の列挙された要素を「含む」組成物または方法は、具体的に列挙されていない他の要素を含み得る。例えば、抗体を含む組成物は、抗体を単独でまたは他の成分と組み合わせ含んでもよい。「薬学的に許容される塩」という語句は、抗 D C L K 1 抗体、またはその結合断片、もしくは複合体、または抗 D C L K 1 抗体とともに投与される薬剤の薬学的に許容される有機または無機塩を指す。塩の例としては、硫酸、クエン酸、酢酸、シュウ酸、化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸、重硫酸、リン酸、酸性リン酸、イソニコチン酸、乳酸、サリチル酸、酸性クエン酸、酒石酸、オレイン酸、タンニン酸、パントテン酸、重酒石酸、アスコルビン酸、コハク酸、マレイン酸、ゲンチジン酸、フマル酸、グルコン酸、グロクロン酸、糖酸、蟻酸、安息香酸、グルタミン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸、およびパモ酸（すなわち、1 , 1 ' - メチレン - ビス (2 - ヒドロキシ - 3 - ナフトエート) ）塩が含まれる。薬学的に許容される塩は、他の分子、例えば酢酸イオン、コハク酸イオンまたは他の対イオン（但し、これらに限定されない）を包含してもよい。対イオンは、親化合物上の電荷を安定化する任意の有機または無機の部分でもよい。さらに、薬学的に許容される塩は、その構造内に複数の荷電原子を有してもよい。複数の荷電原子が薬学的に許容される塩の一部である場合は、複数の対イオンを有することができる。したがって、薬学的に許容される塩は、1 つ以上の荷電原子および / または 1 つ以上の対イオンを有することができる。

【 0 0 5 1 】

キメラ抗体は、異なる部分が別の動物種に由来する分子である。例えば、抗体は、マウス m A b に由来する可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域を含んでもよい。キメラ抗体は、組換え DNA 技術によって製造できる。例えば、M o r r i s o n らの P r o c N a t l A c a d S c i . 8 1 : 6 8 5 1 - 6 8 5 5 (1 9 8 4) を参照のこと。例えば、マウス（または他の種）モノクローナル抗体分子をコードする遺伝子を制限酵素で消化して、マウス F c をコードする領域を除去し、ヒト F c 定常領域をコードする遺伝子の同等部分を置換する。キメラ抗体はまた、マウス可変領域をコードする DNA を、ヒト定常領域をコードする DNA に連結できる組換え DNA 技術によって作成することができる。例えば、国際特許公開 8 7 / 0 0 2 6 7 1 号および 8 6 / 0 1 5 3 3 号、ならびに米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号を参照されたい。

【 0 0 5 2 】

キメラ抗体は、ある種に由来する抗体、例えばげっ歯類抗体またはウサギ抗体の相補性決定領域（C D R）を含む可変ドメインを含む組換えタンパク質であり、抗体分子の定常ドメインは一般にヒト抗体のものに由来する。獣医学用途では、キメラ抗体の定常ドメインは、ネコ、イヌ、またはウマなどの他の種の定常ドメインに由来してもよいが、これらに限定されない。

【 0 0 5 3 】

キメラ抗体は、例えば、キメラ抗体の可変ドメイン中のマウスフレームワーク配列（F R）の配列を 1 つ以上の異なるヒト F R 配列で置き換えることによりヒト化することができる。具体的には、マウス C D R は、マウス免疫グロブリンの重および軽鎖からヒト抗体の対応する可変ドメインに転写される。単純にマウス C D R をヒト F R に転写すると抗体

10

20

30

40

50

親和性が低下する可能性があるため、マウス抗体の元の親和性を回復するために、さらなる修飾が必要になる場合がある。これは、FR領域の1つ以上のヒト残基をマウスの対応物で置換して、DCLK1エピトープに対する結合親和性が強化された抗体を取得することで実現できる（例えば、TempestらのBiotechnology、9：266（1991）およびVerhoeyenらのScience、239：1534（1988）を参照のこと）。ヒト化抗体を産生するための技術は、例えば、Jonesら（Nature、321：522（1986））Riechmannら（Nature、332：323（1988））、Verhoeyenら（Science、239：1534（1988））、Carterら（Proc.Nat'l Acad.Sci.USA、89：4285（1992））、Sandhu（Crit.Rev.Biotech.12：437（1992））、およびSingerら（J.Immun.150：2844（1993））によって開示されている。

10

【0054】

上述のように、抗体の軽または重鎖可変領域は、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる3つの超可変領域によって中断されたフレームワーク領域からなる。非限定的な実施形態において、ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1つ、2つ、またはすべてのCDRおよびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する非ヒト種由来の抗体分子である。

【0055】

ヒト化抗体は、非ヒト「ドナー」抗体由来の可変重鎖CDRおよび可変軽鎖CDRがヒト「アクセプター」抗体配列に接合されている遺伝子操作抗体である（例えば、米国特許第5,530,101号；第5,585,089号；第5,225,539号；第6,407,213号；第5,859,205号；および第6,881,557号を参照）。アクセプター抗体配列は、例えば、成熟ヒト抗体配列、そのような配列の複合物、ヒト抗体配列のコンセンサス配列、または生殖系列領域配列であり得る。したがって、ヒト化抗体は、非ヒトドナー抗体および可変領域フレームワーク配列および存在する場合は完全にまたは実質的にヒト抗体配列に由来する定常領域由来の、いくつかまたはすべてのCDRを完全にまたは実質的に有する抗体である。同様に、ヒト化重鎖は、ドナー抗体重鎖から完全にまたは実質的に由来する少なくとも1つ、2つ、通常3つすべてのCDRと、重鎖可変領域フレームワーク配列と、存在する場合には、ヒト重鎖可変領域フレームワークと定常領域配列から実質的に由来する重鎖定常領域とを有する。同様に、ヒト化軽鎖は、ドナー抗体軽鎖から完全にまたは実質的に由来する少なくとも1つ、2つ、通常3つすべてのCDRと、軽鎖可変領域フレームワーク配列と、存在する場合には、ヒト軽鎖可変領域フレームワークと定常領域配列から実質的に由来する軽鎖定常領域とを有する。ナノボディとdAb以外に、ヒト化抗体にはヒト化重鎖とヒト化軽鎖を含む。

20

30

【0056】

上述のように、ヒト化抗体は、抗原結合に直接関与しない可変領域のフレームワーク配列をヒト可変領域からの同等の配列で置き換えることにより生成することができる。それらの方法には、重または軽鎖の少なくとも一方からの可変領域のすべてまたは一部をコードする核酸配列を単離、操作、および発現することが含まれる。そのような核酸の供給源は、例えば本明細書に記載されるように、DCLK1アイソフォーム2または4に対する抗体を産生するハイブリドーマから得ることができる。次いで、ヒト化抗体またはその断片をコードする組換えDNAを適切な発現ベクターにクローニングすることができる。抗体の軽鎖または重鎖の可変領域は、3つの超可変領域（CDR）によって中断されたフレームワーク領域で構成されている。非限定的な実施形態において、ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1つ、2つ、またはすべてのCDRおよびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する非ヒト種由来の抗体分子である。

40

【0057】

ヒト化抗体は、抗原結合に直接関与しない可変領域のフレームワーク配列をヒト可変領域からの同等の配列で置き換えることにより生成することができる。それらの方法には、重または軽鎖の少なくとも一方からの可変領域のすべてまたは一部をコードする核酸配列

50

を単離、操作、および発現することが含まれる。そのような核酸の供給源は当業者に周知であり、例えば、本明細書に記載されるように、例えばDCLK1アイソフォーム2または4に対する抗体を産生するハイブリドーマから得ることができる。次いで、ヒト化抗体またはその断片をコードする組換えDNAを適切な発現ベクターにクローニングすることができる。

【0058】

本開示のヒト化抗体は、当該分野で公知の方法によって産生することができる。例えば、ひとたび非ヒト（例えばマウス）抗体が得られたら、可変領域の配列を決定し、CDRおよびフレームワーク残基の位置を決定することができる。例えば、Kabatら(Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991))；およびChothiaら(J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987))を参照のこと)。軽および重鎖可変領域は、必要に応じて、対応する定常領域に連結することができる。CDR接合抗体分子は、CDR移植またはCDR置換により生成することができる。免疫グロブリン鎖の1つ、2つ、またはすべてのCDRを置き換えることができる。例えば、特定の抗体のすべてのCDRは、非ヒト動物（例えば、本明細書に示される（但し、これに限定されない）CDRなどのマウス）の少なくとも一部に由来する場合があり、またはCDRの一部のみが置き換えられる場合がある。DCLK1アイソフォーム2または4に対する抗体の特異的かつ高い結合親和性に必要なCDRのみを保持する必要がある。

【0059】

完全なヒト抗体は、トランスジェニック非ヒト動物から得ることができる（例えば、Mendezら(Nature Genetics, 15: 146-156, 1997)；および米国特許第5,633,425号を参照）。コンビナトリアルアプローチまたはヒト免疫グロブリン遺伝子座で形質転換されたトランスジェニック動物のいずれかを使用して完全ヒト抗体を産生する方法は、当該技術分野で知られている（例えば、Manciniら(New Microbiol., 27: 315-28 (2004))；ConradおよびScheller(Comb. Chem. High Throughput Screen., 8: 117-26 (2005))；およびBrekkeおよびLoiset(Curr. Opin. Pharmacol., 3: 544-50 (2003))）。そのような完全ヒト抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体よりさらに少ない副作用を示し、本質的に内因性のヒト抗体としてインビボで機能すると予想される。特定の非限定的な実施形態において、特許請求された方法および手順は、そのような技術によって産生されるヒト抗体を利用し得る。

【0060】

ヒト化抗体またはヒト抗体中のCDRは、対応する残基(Kabatにより定義された)の少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%が、それぞれのCDRで同一であるとき、非ヒト抗体中の対応するCDRに「実質的に由来する」または「実質的に同一」である。いくつかの非限定的な実施形態では、ヒト化抗体またはヒト抗体のCDRは、任意のCDRにおけるたった1つ、2つ、または3つだけの保存的アミノ酸置換があるとき、非ヒト抗体の対応するCDRに実質的に由来するか、実質的に同一である。抗体鎖の可変領域フレームワーク配列または抗体鎖の定常領域は、対応する残基の少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または約100%(Kabat番号付けで定義)が同一であるとき、それぞれ「実質的に」ヒト可変領域フレームワーク配列またはヒト定常領域に由来する。ヒト化抗体は多くの場合、非ヒト（例：マウスまたはウサギ）抗体の6つすべてのCDR（例：Kabatで定義）を組み込んでいるが、すべての非ヒトCDR未満（例えば、少な

くとも2つ、3つ、4つ、または5つ)で作成することもできる。

【0061】

本開示のヒト化抗体は、当該分野で公知の方法によって産生され得る。例えば、ひとたび非ヒト(例えばマウス)抗体が得られたら、可変領域の配列を決定し、CDRとフレームワーク残基の位置を決定することができる(Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interest、Fifth Edition、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242(1991)); Chothiaら(J. Mol. Biol.、196:901-917(1987))。軽および重鎖可変領域は、任意に、対応する定常領域に連結され得る。CDR接合抗体分子は、CDR移植またはCDR置換により生成され得る。免疫グロブリン鎖の1つ、2つ、またはすべてのCDRを置き換えることができる。例えば、特定の抗体のすべてのCDRは、非ヒト動物(例えば、本明細書に示される(しかしこれに限定されない)CDRなどのマウス)の少なくとも一部に由来するか、またはCDRの一部のみが置換され得る。DCLK1アイソフォーム2または4に対する抗体の特異的かつ高い結合親和性に必要なCDRのみを保持する必要がある。

10

【0062】

特定の非限定的な実施形態において、本開示は重鎖可変領域が少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%の本明細書に開示される重鎖可変配列との同一性、および軽鎖可変領域が少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%の本明細書に開示される軽鎖可変配列との同一性を有するCDRを含む抗DCLK1抗体を提供する。いくつかの態様では、前記抗体はヒト化抗体であり、重鎖可変フレームワーク領域に少なくとも1つのマウス復帰変異がある。他の態様において、前記抗体は、ヒト化抗体であり、軽鎖可変フレームワーク領域に少なくとも1つのマウス復帰突然変異が存在する。

20

30

【0063】

さらに、本開示は、ヒト化重鎖可変領域が、本明細書に開示される重鎖可変配列のCDRに対して、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%の配列同一性、およびヒト化軽鎖可変領域が、本明細書に開示される軽鎖可変配列のCDRに対して、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%の配列同一性を有するCDRを含む、抗体を提供する。

40

【0064】

50

ヒト化抗体の重および軽鎖可変領域は、例えば、ヒト抗体アイソタイプ I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 に対するヒト定常領域の少なくとも一部に連結することができる。軽鎖定常領域は、ラムダまたはカッパである。抗体は、例えば（限定ではなく）、2つの軽鎖と2つの重鎖を別々の重鎖、軽鎖として、F a b、F a b'、F (a b')₂、および F v として含む4量体として、または、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインがスパーサーを介して連結されている単鎖抗体として発現される。I g G（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）、I g M、I g A（I g A 1、I g A 2）、I g D、または I g E を含む（但し、これらに限定されない）抗体アイソタイプは、すべて本開示に含まれる。前記抗体またはその抗原結合部分は、哺乳動物（例えば、マウス、ウサギ、ヒト）抗体またはその抗原結合部分でもよい。

10

【0065】

ヒト化またはキメラ抗体は、典型的には組換え発現により産生される。組換えポリヌクレオチド構築物は、典型的には天然に関連するまたは異種のプロモーター領域を含む、抗体鎖のコード配列に作動可能に連結された発現制御配列を含む。この発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトできるベクターの真核生物プロモーター系であり得る。ベクターが適切な宿主に組み込まれると、宿主はヌクレオチド配列の高レベル発現、および交差反応性抗体の収集と精製に適した条件下で維持される。

【0066】

哺乳動物細胞は、免疫グロブリンまたはその断片をコードするヌクレオチドセグメントを発現するための宿主として使用され得る（例えば、Winnacker、From Genes to Clones、VCH Publishers、NY、1987を参照）。無傷の異種タンパク質を分泌することができる多くの適切な宿主細胞株が当該技術分野で開発されており、CHO細胞株（例えばDG44）、様々なCOS細胞株、HeLa細胞、HEK293細胞、L細胞、ならびにSp2/0およびNS0を含む非抗体産生骨髓腫が含まれるが、これらに限定されない。特定の（しかし非限定的な）実施形態では、細胞は非ヒトである。これらの細胞の発現ベクターには、複製開始点、プロモーター、エンハンサーなど（但し、これらに限定されない）の発現制御配列（例えば、QueenらのImmunol. Rev.、89:49（1986））、およびリボソーム結合部位、RNAプライス部位、ポリアデニル化部位、転写ターミネーター配列など（但し、これらに限定されない）の必要な処理情報部位が含まれ得る。発現制御配列の例には、内因性遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、またはウシパピローマウイルスに由来するプロモーターが含まれるが、これらに限定されない（例えば、CoらのJ. Immunol.、148:1149（1992）を参照）。

20

30

【0067】

DCLK1タンパク質に対するヒト抗体は、以下に記載される種々の技術により提供することができる。発現したら、HPLC精製、カラムクロマトグラフィー、およびゲル電気泳動を含むがこれらに限定されない、当該技術分野の標準手順に従って抗体を精製することができる。ヒト抗体を産生するための方法には、米国特許第4,634,664号；第4,634,666号；第5,877,397号；第5,874,299号；第5,814,318号；第5,789,650号；第5,770,429号；第5,661,016号；第5,633,425号；第5,625,126号；第5,569,825号；第5,545,806号；第5,877,218号；第5,871,907号；第5,858,657号；第5,837,242号；第5,733,743号；および第5,565,332号；ならびに国際特許出願公開番号91/17271；92/01047号；および93/12227号に示された方法が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0068】

本開示はまた、DCLK1タンパク質に特異的に結合する本抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸を包含する。前記核酸を細胞内で発現させて、ここに開示されている抗体またはその抗原結合部分を生成することができる。本開示の単離された核酸は、例えば（限定するものではないが）、配列番号：3～12、14、16～22、24、および

50

26 ~ 32のうちの少なくとも1つに対して、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%相同性であるペプチドをコードする配列を含む。

【0069】

本抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸は、適切な発現系で発現可能な発現ベクターに導入され、その後、発現された抗体またはその抗原結合部分の単離または精製を行うことができる。場合により、本抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸は、無細胞翻訳系で翻訳されることができる（例えば、米国特許第4,816,567号を参照）。

10

【0070】

抗DCLK1抗体またはその抗原結合部分は、所望の抗体の軽鎖および重鎖（またはそのCDR部分）をコードするDNAで形質転換された宿主細胞によって産生することができる。標準的な手法を使用して、これらの培養上清および/または細胞から抗体を単離および精製できる。例えば、抗体の軽鎖、重鎖、またはその両方をコードするDNAで宿主細胞を形質転換することができる組換えDNA技術を使用して、結合に必要な軽いと重鎖のいずれかまたは両方、例えば定常領域をコードするDNAの一部またはすべてを除去することもできる。

20

【0071】

本核酸は、原核細胞および真核細胞、例えば細菌細胞（例えば大腸菌）、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を含む様々な適切な細胞で発現させることができる。多くの哺乳動物細胞株が当該技術分野で知られており、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（ATCC）から入手可能な不死化細胞株が含まれるが、これらに限定されない。細胞の非限定的な例には、サル腎細胞（COS、例えばCOS-1、COS-7）、HEK293、ベビーハムスター腎臓（BHK、BHK21など）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）、NS0、PerC6、BSC-1、ヒト肝細胞癌細胞（Hep G2など）、SP2/0、HeLa、Madin-Darbyウシ腎臓（MDBK）細胞、骨髓腫細胞、およびリンパ腫細胞の、親細胞、誘導体および/または操作された変異体を含むがこれらに限定されない哺乳類起源または哺乳類様特性のすべての細胞株が含まれる。遺伝子組み換えされた変異体には、例えば、限定するものではないが、グリカンプロファイルの改変誘導体および/または部位特異的組込み部位の誘導体が含まれる。

30

【0072】

本開示はまた、本明細書に記載の核酸を含む細胞を提供する。前記細胞は、ハイブリドーマまたは形質転換体であってもよい。細胞型の例は上記で説明されている。

【0073】

キメラ抗体またはヒト化抗体の産生などの様々な技術は、抗体のクローニングおよび構築の手順を含むことができる。目的の抗体の抗原結合V_L（可変軽鎖）およびV_H（可変重鎖）配列は、RT-PCR、5'-RACE、およびcDNAライブラリーのスクリーニングなど（但し、これらに限定されない）の種々の分子クローニング手順によって取得できる。マウス抗体を発現する細胞由来の抗体のV_LおよびV_H遺伝子は、PCR増幅によりクローニングし、配列決定することができる。それらの真正性を確認するために、クローン化されたV_LおよびV_H遺伝子は、細胞培養においてキメラ抗体として発現することができる（限定するものではないが、例えば、Orlandiら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86:3833（1989））を参照のこと）。次いで、ヒト化抗体は、V_LおよびV_H遺伝子配列に基づいて、限定するものではないが、LeungらのMol. Immunol.、32:1413（1995）に記載されているように設計および構築することができる。

40

50

【 0 0 7 4 】

本開示はさらに、本明細書に記載のヒト化重および軽鎖のいずれかをコードする核酸を提供する。通常、前記核酸は成熟した重と軽鎖に融合したシグナルペプチドもコードする。核酸上のコード配列は、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終結シグナルなど（これらに限定するものではない）のコード配列の発現を保証するために調節配列と作動可能に連結することができる。さらなる実施形態における本開示は、重および軽鎖をコードする核酸を含むベクター、およびそのようなベクターで形質転換された宿主細胞を含む。前記核酸は、例えば（限定するものではないが）、固相合成または重複オリゴヌクレオチドのPCRによって合成することができる。重および軽鎖をコードする核酸は、例えば、発現ベクター内で1つの連続した核酸として結合することができるか、または別々であり、例えばそれぞれ独自の発現ベクターにクローン化することができる。

10

【 0 0 7 5 】

1つの非限定的な実施形態において、本開示は、配列番号：14または配列番号：24のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。この単離されたポリヌクレオチドは、ヒトIgG重鎖定常領域（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4）をさらにコードすることができる。1つの非限定的な実施形態では、IgG定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含む。本開示はまた、配列番号：14または配列番号：24のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域をコードする前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、およびさらにその発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。いくつかの非限定的な実施形態では、宿主細胞は哺乳動物宿主細胞、例えばCHO細胞である。

20

【 0 0 7 6 】

別の非限定的な実施形態では、本開示は、配列番号：16または配列番号：26のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。この単離されたポリヌクレオチドは、ヒトIgG軽鎖定常領域、例えばカッパ定常領域をさらにコードすることができる。カッパ定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含んでもよい。本開示はまた、配列番号：16または配列番号：26のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域をコードする前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、およびさらにその発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。いくつかの非限定的な実施形態では、前記宿主細胞は哺乳動物宿主細胞、例えばCHO細胞である。

30

【 0 0 7 7 】

1つの非限定的な実施形態において、本開示は、配列番号：14または配列番号：24のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域をコードする単離された重鎖ポリヌクレオチド、および配列番号：16または配列番号：26のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域をコードする単離された軽鎖ポリヌクレオチドを提供する。重鎖ポリヌクレオチドは、ヒトIgG重鎖定常領域（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4）をさらにコードすることができる。1つの非限定的な実施形態では、IgG定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含む。軽鎖ポリヌクレオチドは、ヒトIgG軽鎖定常領域、例えばカッパ定常領域をさらにコードすることができる。IgG定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含んでもよい。カッパ定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含んでもよい。本開示はまた、配列番号：14または配列番号：24のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域、および配列番号：16または配列番号：26のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域をコードする前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。本開示は、前記発現ベクターを含む宿主細胞も提供する。いくつかの非限定的な実施形態では、前記宿主細胞は哺乳動物宿主細胞、例えばCHO細胞である。

40

【 0 0 7 8 】

1つの非限定的な実施形態において、本開示は、配列番号：17、18、および19のうちの1つ以上の、または配列番号：27、28、および29のうちの1つ以上のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。この単離されたポリヌクレオチドは、ヒトIgG重鎖定常領域（例えば、IgG1、IgG

50

2、I g G 3、またはI g G 4)をさらにコードすることができる。1つの非限定的な実施形態では、前記I g G定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含む。本開示は、前記重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、さらに、その発現ベクターを含む宿主細胞も提供する。いくつかの非限定的な実施形態では、前記宿主細胞は哺乳動物宿主細胞、例えばCHO細胞である。

【0079】

別の非限定的な実施形態では、本開示は、配列番号：20、21、および22のうちの1つ以上の、または配列番号：30、31、および32のうちの1つ以上のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。この単離されたポリヌクレオチドは、ヒトI g G軽鎖定常領域、例えばカッパ定常領域をさらにコードすることができる。前記カッパ定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含んでもよい。本開示はまた、前記軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、さらにその発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。いくつかの非限定的な実施形態では、前記宿主細胞は、哺乳動物宿主細胞、例えばCHO細胞である。

【0080】

1つの非限定的な実施形態において、本開示は、配列番号：17、18、および19のうちの1つ以上を含む抗体重鎖可変領域をコードする単離された重鎖ポリヌクレオチド、ならびに配列番号：20、21、および22のうちの1つ以上を含む抗体軽鎖可変領域をコードする単離された軽鎖ポリヌクレオチドを提供する。前記重鎖ポリヌクレオチドは、ヒトI g G重鎖定常領域(例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4)をさらにコードすることができる。1つの非限定的な実施形態では、前記I g G定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含む。前記軽鎖ポリヌクレオチドは、ヒトI g G軽鎖定常領域、例えばカッパ定常領域をさらにコードすることができる。前記I g G定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含んでもよい。前記カッパ定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含んでもよい。本開示はまた、配列番号：17、18、および19のうちの1つ以上を含む重鎖可変領域をコードする前記ポリヌクレオチド、および配列番号：20、21、および22のうちの1つ以上を含む抗体軽鎖可変領域をコードする単離された軽鎖ポリヌクレオチドを含む発現ベクターも提供する。本開示は、前記発現ベクターを含む宿主細胞も提供する。いくつかの非限定的な実施形態では、前記宿主細胞は哺乳動物宿主細胞、例えばCHO細胞である。

【0081】

1つの非限定的な実施形態において、本開示は、配列番号：27、28、および29のうちの1つ以上を含む抗体重鎖可変領域をコードする単離された重鎖ポリヌクレオチド、ならびに配列番号：30、31、および32のうちの1つ以上を含む抗体軽鎖可変領域をコードする単離された軽鎖ポリヌクレオチドを提供する。前記重鎖ポリヌクレオチドは、ヒトI g G重鎖定常領域(例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4)をさらにコードすることができる。1つの非限定的な実施形態では、前記I g G定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含む。前記軽鎖ポリヌクレオチドは、ヒトI g G軽鎖定常領域、例えばカッパ定常領域をさらにコードすることができる。前記I g G定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含んでもよい。前記カッパ定常領域のアミノ酸配列は、1つ以上の置換を含んでもよい。本開示はまた、配列番号：27、28、および29のうちの1つ以上を含む重鎖可変領域をコードする前記ポリヌクレオチド、および配列番号：30、31、および32のうちの1つ以上を含む抗体軽鎖可変領域をコードする単離された軽鎖ポリヌクレオチドを含む発現ベクターも提供する。本開示は、前記発現ベクターを含む宿主細胞も提供する。いくつかの非限定的な実施形態では、前記宿主細胞は哺乳動物宿主細胞、例えばCHO細胞である。

【0082】

特定の非限定的な実施形態では、本抗体またはその抗原結合部分は、当該技術分野で周知の固相手順(限定されるものではないが、固相ペプチド合成など)によって合成することができる：Solid Phase Peptide Synthesis：A Pra

10

20

30

40

50

critical Approach by E. Atherton and R. C. Sheppard, published by IRL at Oxford University Press (1989); Methods in Molecular Biology, Vol. 35: Peptide Synthesis Protocols (ed. M. W. Pennington and B. M. Dunn), chapter 7. Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984); G. Barany and R. B. Merrifield, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, editors E. Gross and J. Meienhofer, Vol. 1 and Vol. 2, Academic Press, New York, (1980), pp. 3 - 254; および M. Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin (1984)。

【0083】

本開示は、DCLK1アイソフォーム2または4に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を作製する方法を提供する。例えば、非ヒト動物は、DCLK1アイソフォーム2または4（これに限定されないが、配列番号：3～12の1つ以上の少なくとも一部など）の一部を含む組成物で免疫化され、その後、特異的抗体が動物から単離される。この方法は、DCLK1アイソフォーム2または4の抗原部分への抗体の結合を評価することをさらに含むことができる。

【0084】

特定のエピトープを認識する抗体断片は、既知の技術により生成することができる。抗体断片は、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、および本明細書に記載の、または当該技術分野で意図される他の断片など（しかしこれらに限定されない）の抗体の抗原結合部分である。他の抗体断片には、抗体分子のペプシン消化によって生成できるF(ab')₂断片と、F(ab')₂のジスルフィド架橋を還元することによって生成できるFab'断片（しかし、これらに限定されない）が含まれる。あるいは、Fab'発現ライブラリーを構築して、所望の特異性を有するモノクローナルFab'断片を迅速かつ簡単に同定できる。特定の非限定的な実施形態において、前記抗体断片は、scFv断片ではない断片であり得る。

【0085】

単鎖Fv分子(scFv)は、VLドメインとVHドメインを含む。これらのVLおよびVHドメインは、結合して標的結合部位を形成する。これらの2つのドメインは、ペプチドリinker(L)によってさらに共有結合されている。scFv分子を作製し、適切なペプチドリinkerを設計する方法は、当該技術分野で知られており、例えば、米国特許第4,704,692号および第4,946,778号に開示されている方法を含むが、これらに限定されない。抗体断片は、既知の方法、例えば（限定ではないが）米国特許第4,036,945号および第4,331,647号に開示されている方法により調製することができる。

【0086】

CDRは、抗体が結合するエピトープに構造的に相補的であり、可変領域の残りの部分よりも可変性が高い抗体の可変領域のセグメントである。したがって、CDRは超可変領域と呼ばれることもある。可変領域は3つのCDRで構成されている。目的の抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することにより、CDRペプチドを取得できる。

【0087】

抗体断片の別の形態は、単鎖抗体と呼ばれることもある単ドメイン抗体(dAb)である。単ドメイン抗体を産生する技術は、当該技術分野で周知である（例えば、限定するものではないが、CossinsらのProtein Expression and Purification、51:253-59(2007); ShuntaoらのMolec. Immunol.、43:1912-19(2006); およびTanhaらの

J. Biol. Chem., 276:24774-780(2001)を参照)。

【0088】

特定の非限定的な実施形態では、抗体のFc部分(しかし、これに限定されない)などの抗体の配列は、血清中の半減期(これに限定されないが)などの複合体の生理学的特性を最適化するために変更され得る。タンパク質中のアミノ酸配列を置換する方法としては、部位特異的突然変異(例えば、これに限定されないが、Sambrookら、Molecular Cloning, A laboratory manual、第2版、1989)などが当該技術分野で広く知られている。特定の非限定的な実施形態では、前記変異はFc配列における1つ以上のグリコシル化部位の付加または除去を伴ってもよい(例えば、限定ではないが、米国特許第6,254,868号を参照)。

10

【0089】

現在開示されている抗体またはその抗原結合断片は、約 10^{-6} M未満、約 10^{-7} M未満、約 10^{-8} M未満、約 10^{-9} M未満、約 10^{-10} M未満、約 10^{-11} M未満、または約 10^{-12} M未満のDCLK1アイソフォーム2または4に対する特異的結合 K_D を有する。前記特異的結合は、その大きさにおいて検出可能に高く、少なくとも1つの無関係な標的に対して生じる非特異的結合と区別できる。例えば(限定するものではないが)、前記の現在開示されている抗体またはその抗原結合断片は、約 10^{-6} M未満、約 10^{-7} M未満、約 10^{-8} M未満、約 10^{-9} M未満、約 10^{-10} M未満、約 10^{-11} M未満、または約 10^{-12} M未満の配列番号:10を含むエピトープへの特異的結合 K_D を有する。

20

【0090】

現在開示されている抗DCLK1抗体およびその結合断片は、治療薬および/または診断薬に誘導体化または連結、例えば結合させて、抗体-薬物複合体(ADC)を形成することができる。例えば、抗体は、限定するものではないが、他の抗体、抗体断片、検出可能な薬剤、細胞傷害性薬剤、医薬品、別の分子(ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグなど)との結合を媒介できるタンパク質またはペプチド、アミノ酸リンカー、スペーサー、ブリッジ、シグナル配列、免疫原性キャリア、またはタンパク質精製に有用なリガンド(これらに限定されないが、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ、ブドウ球菌プロテインAなど)などの1つ以上の他の分子実体への共有結合または非共有相互作用により、直接的または間接的に機能的に結合することができる。タンパク質を誘導体化(または標識化)できる有用な検出可能な薬剤には、蛍光化合物、種々の酵素、補欠分子族、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が含まれるが、これらに限定されない。非限定的な例示的な蛍光検出可能な薬剤には、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、およびフィコエリトリンが含まれる。タンパク質または抗体は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ペータガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼ(但し、これらに限定されない)などの検出可能な酵素で誘導体化することもできる。タンパク質は、補欠分子族(ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどであるが、これらに限定されない)で誘導体化することもできる。

30

【0091】

抗体への結合に特に適切な(しかし非限定的な)部分は、細胞障害性薬(例えば、化学療法剤)、プロドラッグ変換酵素、放射性同位体または放射性化合物(限定されるものではない)などの放射性核種、免疫調節剤、抗血管新生剤、プロアポトーシス剤、サイトカイン、ケモカイン、薬物、ホルモン、siRNA、酵素、成長因子、プロドラッグ、オリゴヌクレオチド、プロアポトーシス剤、干渉RNA、光活性治療薬、チロシンキナーゼ阻害剤、ブルトン型キナーゼ阻害剤、スフィンゴシン阻害剤、細胞障害性薬、または毒素(これらの部分はまとめて治療薬または薬物と呼ばれる)である。例えば(但し、限定ではない)、抗DCLK1抗体は、化学療法剤または毒素などの細胞障害性薬(例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素、またはジフテリア毒素)などの細胞増殖抑制剤または細胞破壊剤に結合させることができる。細胞障害性薬の有用なクラスの例には、DNA副溝

40

50

結合剤、DNAアルキル化剤、およびチューブリン阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。例示的な細胞障害性薬には、アウリスタチン、カンプトテシン、デュオカルマイシン、エトボシド、メイタンシンおよびメイタンシノイド（例えば、DM1およびDM4）、タキサン、ベンゾジアゼピン（例えば、ピロロ[1,4]ベンゾジアゼピン（PBD）、インドリノベンゾジアゼピン、およびオキサゾリジノベンゾジアゼピン）、およびピンカアルカロイドが含まれるが、これらに限定されない。治療薬をタンパク質、特に抗体に結合させる技術はよく知られている（例えば、Carter、PJおよびSenter PDの“Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy”、Cancer J.、14(3):154-169(2008)を参照）。

【0092】

放射性核種の例には、 ^{111}In 、 ^{111}At 、 ^{177}Lu 、 ^{211}Bi 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{152}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{161}Ho 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{58}Co 、 $^{80\text{m}}\text{Br}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{103\text{m}}\text{Rh}$ 、 ^{109}Pt 、 ^{119}Sb 、 ^{125}I 、 $^{189\text{m}}\text{Os}$ 、 ^{192}Ir 、 ^{219}Rn 、 ^{215}Po 、 ^{221}Fr 、 ^{255}Fm 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{77}Br 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{227}Th 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{197}Pt 、 ^{109}Pd 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{76}Br 、および ^{169}Yb が含まれるが、これらに限定されない。

【0093】

診断薬の例には、放射性核種、造影剤、蛍光剤、化学発光剤、生物発光剤、常磁性イオン、酵素、および光活性診断剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0094】

診断用放射性核種の例には、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{32}F 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{51}Mn 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{55}Co 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 $^{82\text{m}}\text{Rb}$ 、 ^{83}Sr 、またはその他のガンマ放射体、ベータ放射体、もしくはポジトロン放射体が含まれるが、これらに限定されない。

【0095】

常磁性イオンの例には、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)、およびエルビウム(III)。が含まれるが、これらに限定されない。

【0096】

蛍光標識診断薬の例には、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、およびフルオレスカミン；またはルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、およびシュウ酸エステルを含む群から選択される化学発光標識化合物；またはルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリンを含む群から選択される生物発光化合物が含まれるが、これらに限定されない。

【0097】

上述のように、特定の非限定的な実施形態において、抗体またはその断片は、1つ以上の治療薬および/または診断薬と組み合わせて使用され得る。薬剤が、皮下、筋肉内、または経皮投与により投与される抗体またはその断片に付着している場合、非細胞障害性薬

10

20

30

40

50

のみが考慮される。非細胞障害性薬には、免疫調節剤、サイトカイン（およびその阻害剤）、ケモカイン（およびその阻害剤）、チロシンキナーゼ阻害剤、成長因子、ホルモンおよび特定の酵素（すなわち、局所壊死を誘発しないもの）が含まれるが、これらに限定されない。薬剤が皮下、筋肉内、または経皮抗体製剤の前、同時、または後のいずれかに同時投与される場合、細胞障害性薬が利用され得る。薬剤は、二次抗体またはその断片との免疫複合体として投与されてもよく、またはフリーの薬剤として投与されてもよい。以下の考察は、細胞障害性薬と非細胞障害性薬の両方に適用される。

【0098】

結合（または別個に送達）できる治療薬の例には、5 - フルオロウラシル、アブリジン、アザリピン、アナストロゾール、アントラサイクリン、ベンダムスチン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、ブリオスタチン - 1、ブスルファン、カリケアマイシン、カンプトテシン、カルボプラチン、10 - ヒドロキシカンプトテシン、カルムスチン、セレコキシブ、クロラムブシル、シスプラチナム、Cox - 2 阻害剤、CPT - 11 SN - 38、カルボプラチン、クラドリピン、カンプトテカン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ドセタキセル、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、2 - ピロリノドキソルビシン（2P - DOX）、プロ - 2P - DOX、シアノモルホリノドキソルビシン、ドキソルビシングルクロニド、エピルビシングルクロニド、エストラムスチン、エピポドフィロトキシン、エストロゲン受容体結合剤、エトポシド（VP16）、エトポシドグルクロニド、リン酸エトポシド、フロクスウリジン（FudR）、3', 5' - O - ジオレオイル - FudR（FudR - dO）、フルダラビン、フルタミド、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、L - アスパラギナーゼ、レノリダミド、ロイコボリン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、6 - メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトタン、ナベルピン、ニトロソウレア、プリコマイシン、プロカルバジン、パクリタキセル、ペントスタチン、PSI - 341、ラロキシフェン、セムスチン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、パクリタキセル、テマゾロマイド、トランスプラチナ、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、テニポシド、トポテカン、ウラシルマスタード、ビノレルビン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ピンカアルカロイド、チロホスチン、カネルチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、レフルノミド、ニロチニブ、パゾパニブ、セマキシニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、スーテント、パタラニブ、PCI - 32765（イブルチニブ）、PCI - 45292、GDC - 0834、LFM - A13、およびRN486が含まれるが、これらに限定されない。

【0099】

毒素の例には、リシン、アブリン、アルファ毒素、サポリン、リボヌクレアーゼ（RNase；例えば、オンコナーゼ）、DNase I、ブドウ球菌エンテロトキシン - A、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素、および緑膿菌内毒素が含まれるが、これらに限定されない。

【0100】

免疫調節剤には、サイトカイン、幹細胞成長因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子（CSF）、インターフェロン（IFN）、エリスロポエチン、トロンボポエチン、およびそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。特に有用なのは、腫瘍壊死因子（TNF）などのリンホトキシン（但し、これに限定されない）；インターロイキン（IL）などの造血因子（但し、これに限定されない）；顆粒球コロニー刺激因子（G - CSF）または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM - CSF）など（但し、これらに限定されない）のコロニー刺激因子；インターフェロン - 、 - 、 - 、または - などのインターフェロン（但し、これらに限定されない）；および「S1因子」（但し、これに限定されない）と呼ばれるものなどの幹細胞成長因子（但し、これに限定されない）が挙げられる。サイトカインには、ヒト成長ホルモン、N - メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンなど（但し、これらに限定されない）；副甲状腺

10

20

30

40

50

腺ホルモン；サイロキシン；インスリン；プロインスリン；リラキシン；プロレラキシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体形成ホルモン（LH）などの糖タンパク質ホルモン（但し、これらに限定されない）；肝成長因子；プロスタグランジン；線維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；OBタンパク質；瘍壊死因子 - および - ；ミュー管抑制物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF - などの神経成長因子（但し、これに限定されない）；血小板成長因子；TGF - およびTGF - など（但し、これらに限定されない）の形質転換成長因子（TGF）；インスリン様成長因子 - Iおよび - II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン - 、 - 、 - 、および - などのインターフェロン；マクロファージ - CSF（M-CSF）（但し、これに限定されない）などのコロニー刺激因子（CSF）；IL - 1、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12、IL - 13、IL - 14、IL - 15、IL - 16、IL - 17、IL - 18、IL - 21、IL - 23、およびIL - 25など（但し、これらに限定されない）のインターロイキン（IL）；白血病抑制因子（LIF）；キット - リガンドまたはFLT - 3リガンド；アンギオスタチン；トロンボスポンジン；エンドスタチン；腫瘍壊死因子；およびリンホトキシンが含まれる。使用されるケモカインとしては、RANTES、MCAF、MIP1 - 、MIP1 - 、およびIP - 10が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0101】

20

特定の非限定的な実施形態において、治療用放射性核種は、Auger放射体の場合、60～200keV；ベータ放射体の場合は、100～2,500keV；アルファ放射体の場合は4,000～6,000keVの範囲など（但しこれらに限定されない）の20～6,000keVの範囲の崩壊エネルギーを有する。有用なベータ粒子放出核種の最大崩壊エネルギーは、20～5,000keV；100～4,000keV；または500～2,500keVであるが、これに限定されない。また、Co - 58、Ga - 67、Br - 80m、Tc - 99m、Rh - 103m、Pt - 109、In - 111、Sb - 119、I - 125、Ho - 161、Os - 189m、およびIr - 192など（但し、これらに）限定されない）のAuger放出粒子で実質的に崩壊する放射性核種も含まれる。有用なベータ粒子を放出する放射性核種の崩壊エネルギーは、（例えば、限定ではないが）<1,000keV、<100keV、または<70keVである。また、アルファ粒子の生成で実質的に崩壊する放射性核種も含まれる。このような放射性核種には、Dy - 152、At - 211、Bi - 212、Ra - 223、Rn - 219、Po - 215、Bi - 211、Ac - 225、Fr - 221、At - 217、Bi - 213、Th - 227、およびFm - 255が挙げられる。有用なアルファ粒子放出放射性核種の崩壊エネルギーには、以下が含まれる（但し、これらに限定されない）：2,000～10,000keV；3,000～8,000keV；または4,000～7,000keV。

30

【0102】

特定の非限定的な実施形態では、治療薬（例えば、細胞障害性薬）は、抗体から分離／切断されない限り、その活性を低下させる方法（但し、限定するものではないが、加水分解、抗体の分解、または切断剤により）でプロドラッグとして抗体に結合することができる。そのような治療薬は、切断可能なリンカー（但し、これに限定されない）などのリンカーを介して抗体に付着させることができる。1つの非限定的な実施形態において、切断可能なリンカーは、DCLK1発現癌細胞の細胞内環境における切断に対して感受性であるが、細胞外環境に対して実質的に感受性ではないため、複合体がDCLK1発現癌細胞（例えば、エンドソーム内、または、例えば、pH感受性もしくはプロテアーゼ感受性のおかげで、リソソーム環境またはカベオラ環境内で）により内在化されると抗体から切断される。治療薬は、切断不可能なリンカーで抗体に付着させることもできる。示されているように、リンカーは切断可能なユニットを含んでもよい。いくつかのこのような実施形態では、切断可能ユニットの構造および／または配列は、標的部位（例えば、標的細胞）

40

50

に存在する酵素の作用により切断されるように選択される。他の非限定的な実施形態では、pH（例えば、酸または塩基に不安定）、温度、または照射（例えば、光に不安定）の変化により切断可能な切断可能ユニットも使用することが可能である。

【0103】

いくつかの非限定的な実施形態において、前記切断可能なユニットは、1つのアミノ酸またはアミノ酸の連続配列を含み得る。前記アミノ酸配列は、酵素の標的基質であり得る。いくつかの態様において、前記切断可能なユニットはペプチドユニットであり、少なくとも2アミノ酸長である。切断剤には、カテプシンBおよびDならびにプラスミンを含むことができる（例えば、DubowchikおよびWalkerのPharm. Therapeutics、83:67-123（1999）を参照）。最も典型的なのは、DCLK1発現細胞に存在する酵素により切断可能な切断可能ユニット、すなわち酵素切断可能なリンカーである。したがって、リンカーは、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼ（但し、これらに限定されない）を含む細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断することができる。例えば、癌性組織で高度に発現されるチオール依存性プロテアーゼカテプシン-Bにより切断可能なリンカーを使用することができる（例えば、Phe-Leuペプチド、Val-シトルリンペプチド、またはVal-Alaペプチドを含むリンカー）。

10

【0104】

いくつかの非限定的な実施形態では、前記リンカーは、追加の機能ユニット、例えば、自壊性スペーサーユニットまたは非自壊性スペーサーユニットを介して治療薬に結合される切断可能なユニットを含む。非自壊性スペーサーユニットは、抗体薬物複合体からの切断可能なユニット（例えば、アミノ酸）の切断後、スペーサーユニットの一部またはすべてが薬物ユニットに結合したままのものである。薬物を遊離させるために、標的細胞内で独立した加水分解反応が起こり、薬物からスペーサーユニットが切断される。自壊性スペーサーユニットを使用すると、別個の加水分解ステップを必要とせずに薬物が放出される。リンカーが切断可能ユニットおよび1個または複数の自壊性基を含む非限定的な実施形態では、切断可能ユニットは酵素の作用によって切断可能であり、切断可能ユニットの切断後、1個または複数の自壊性基は、治療薬を放出する。いくつかの非限定的な実施形態では、リンカーの切断可能なユニットは、一端で治療薬に直接または間接的に結合され、他端で抗体に直接または間接的に結合される。いくつかのそのような実施形態では、切断可能なユニットは、一端で治療薬に直接または間接的に（例えば、自壊性または非自壊性スペーサーユニットを介して）治療薬に結合され、他端でストレッチャーユニットを介して抗体に結合される。ストレッチャーユニットは、抗体を薬物および/または薬物リンカーの残りの部分に連結する。1つの非限定的な実施形態において、抗体と薬物または薬物リンカーの残りの部分との間の接続は、マレイミド基を介するものであり、例えば、マレイミドカプロイルリンカーを介する（これに限定されない）。いくつかの非限定的な実施形態において、抗体は、ジスルフィド、例えば、ジスルフィド結合メイタンシノイド複合体SPDB-DM4またはSPP-DM1を介して薬物に結合される。

20

30

【0105】

抗体とリンカーとの間の結合は、チオエーテル結合、ジスルフィド結合、アミド結合、またはエステル結合を介するなど（但し、これらに限定されない）、いくつかの異なる経路を介して行うことができる。1つの非限定的な実施形態において、抗DCLK1抗体とリンカーとの間の結合は、抗体のシステイン残基のチオール基とリンカーのマレイミド基との間で形成される。いくつかの非限定的な実施形態では、抗体の鎖間結合は、リンカーの官能基との反応の前に遊離チオール基に変換される。いくつかの非限定的な実施形態では、システイン残基が抗体の重鎖または軽鎖に導入され、リンカーと反応する。抗体の重鎖または軽鎖における置換によるシステイン挿入の位置には、米国特許出願公開第2007/0092940号および国際特許出願公開第2008/070593号に記載されているものが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0106】

50

いくつかの非限定的な実施形態では、抗体 - 薬物複合体は、式： $Mab - (LU - D)_n$ を有し、 Mab は抗 $CDL K 1$ 抗体であり、 LU はリンカーユニットであり、 D は薬物ユニット（すなわち、治療薬または診断薬）である。下付き文字 n の範囲は、例えば、 $1 \sim 20$ （つまり、 $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19$ 、または 20 ）であるか（但し、これらに限定されない）、またはそれ以上である。そのような複合体は、リンカーを介して少なくとも1つの薬物に共有結合した抗 $CDL K 1$ 抗体を含む。前記 LU は、一端が抗体に結合され、他端が薬物分子に接続されている。当業者は、いくつかの態様では、下付き文字 n が単一の抗体上の薬物リンカーの数を表すことを理解するであろう。他の態様においては、 n は、抗体あたりの薬物リンカー分子の平均数、例えば、反応混合物または組成物（例えば、医薬組成物）中の抗体あたりの薬物リンカーの平均数を表し、整数または非整数の値である。したがって、いくつかの態様では、組成物（例えば、医薬組成物）について、 n は組成物中の抗体 - 薬物複合体の平均薬物負荷を表し、 n は $1 \sim 20$ の範囲である。いくつかの非限定的な実施形態において、本開示は、式： $Mab - (LU)_n$ を有する抗体 - リンカー複合体を提供し、ここで、 Mab は抗 $CDL K 1$ 抗体であり、 LU は薬物を抗体に連結するためのリンカーユニットである。下付き文字 n の範囲は、例えば、 $1 \sim 20$ （つまり、 $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19$ 、または 20 ）、またはそれ以上である。そのような複合体は、1つ以上のリンカーに共有結合した抗 $CDL K 1$ 抗体を含み、ここで前記リンカーユニットは一端が抗体に結合され、薬物分子に結合するための遊離端を有する。いくつかの非限定的な実施形態では、 n は抗体あたり約 $1 \sim$ 約 18 個の薬物である。いくつかの非限定的な実施形態では、 n は 1 である。いくつかの非限定的な実施形態では、 n は 2 である。いくつかの非限定的な実施形態では、 n は抗体あたり約 $2 \sim$ 約 12 個の薬物である。いくつかの非限定的な実施形態では、 n は、抗体あたり約 $2 \sim$ 約 10 の範囲、約 $2 \sim$ 約 8 の範囲、約 $2 \sim$ 約 6 の範囲、約 $2 \sim$ 約 5 の範囲、約 $2 \sim$ 約 4 の範囲、または約 $2 \sim$ 約 3 の範囲である。

【0107】

特定の非限定的な実施形態では、治療薬および/または診断薬を抗体またはその断片に共有結合させて、免疫複合体を形成することができる。いくつかの非限定的な実施形態では、治療薬および/または診断薬は、担体部分を介して抗体またはその断片に結合させることができる。担体部分は、例えば（限定するものではないが）還元 SH 基および/または炭水化物側鎖に結合していてもよい。担体部分は、ジスルフィド結合の形成を介して、還元された抗体成分のヒンジ領域に付着させることができる。あるいは、そのような薬剤は、 N -スクシニル $3 - (2 - \text{ピリジルジチオ})$ プロピオネートなど（限定するものではない）のヘテロ二官能性架橋剤を使用して付着させることができる（例えば、*Yura, Int. J. Cancer, 56:244 (1994)*）。そのような結合のための一般的な技術は、当該技術分野で周知である；例えば、*Wong, Chemistry Of Protein Conjugation And Cross-Linking (CRC Press, 1991)*；*Upeslaciš, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal Antibodies: Principles And Applications, Birch (編集), 187-230頁 (Wiley-Liss, Inc., 1995)*；および *Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering And Clinical Application, Ritter (編集), 60-84頁 (Cambridge University Press, 1995)* を参照されたい。あるいは、担体部分は、抗体の Fc 領域の炭水化物部分を介して結合することができる。

【0108】

抗体炭水化物部分を介して官能基を抗体に結合させる方法は、当業者に周知である；例

えば、Shihら、Int. J. Cancer、41:832(1988); Shihら、Int. J. Cancer、46:1101(1990); および米国特許第5,057,313号を参照されたい。一般的な方法は、酸化された炭水化物部分を有する抗体を、少なくとも1つの遊離アミン官能基を有する担体ポリマーと反応させることを含む。この反応により、最初のシッフ塩基(イミン)結合が生じ、これは2級アミンへの還元により安定化されて最終的な複合体を形成する。

【0109】

そのような部分の生体分子への化学的結合の他の方法は、当該技術分野で周知であり、任意のそのような公知の方法を利用して、本開示に従って機能する抗体複合体を形成することができる。そのような免疫複合体形成の方法は、例えば、(しかし、限定するものではないが)米国特許第4,699,784号;第4,824,659号;第5,525,338号;第5,677,427号;第5,697,902号;第5,716,595号;第6,071,490号;第6,187,284号;第6,306,393号;第6,548,275号;第6,653,104号;第6,962,702号;第7,033,572号;第7,147,856号;および第7,259,240号に開示されている。

【0110】

抗体-薬物複合体の例としては、アウリスタチンベースの抗体-薬物複合体、すなわち、治療薬成分がアウリスタチン型薬物である複合体が含まれるが、これに限定されない。アウリスタチンはチューブリンに結合し、微小管の動態や核および細胞の分裂を妨害し、抗癌活性を有することが示されている。典型的には、アウリスタチンベースの抗体-薬物複合体は、アウリスタチン薬物と抗DCLK1抗体の間にリンカーを含む。アウリスタチンは、リンカーへの結合に適した任意の位置で抗DCLK1抗体に結合させることができる。上記のように、前記リンカーは、例えば、切断可能なリンカー(例えば、ペプチドリリンカー)または非切断可能なリンカー(例えば、抗体の分解により放出されるリンカー)であり得る。アウリスタチンは、アウリスタチンEまたはその誘導体であり得る。アウリスタチンは、例えば、(限定ではないが)アウリスタチンEとケト酸との間で形成されるエステルである。例えば、アウリスタチンEをパラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応させて、それぞれAEBおよびAEVBを生成することができる。他の典型的なアウリスタチンには、MMAF(モノメチルアウリスタチンF)およびMMAE(モノメチルアウリスタチンE)が含まれるが、これらに限定されない。例示的なアウリスタチンの合成および構造は、米国特許第7,659,241号;第7,498,298号;第7,968,687号、ならびに米国特許出願公開第2009/0111756号および第2009/0018086号に記載されている。

【0111】

本抗体またはその抗原結合部分は、哺乳動物対象への送達のための組成物に製剤化することができる。組成物は、単独で投与することができ、および/または薬学的に許容されるビヒクルまたは賦形剤と混合することができる。適切なビヒクルは、例えば(限定ではないが)水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組み合わせである。加えて、前記ビヒクルは、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、またはアジュバントなど(但し、これらに限定されない)の補助物質を少量含むことができる。本開示の組成物は、薬理学的薬剤、サイトカイン、または他の生物学的応答調節剤などの補助物質も含むことができるが、これらに限定されない。

【0112】

さらに、組成物は、中性形態または塩形態のいずれかの組成物に製剤化することができる。薬学的に許容される塩には、酸付加塩(活性ポリペプチドの遊離アミノ基で形成される)(但し、これに限定されない)が含まれ、無機酸、例えば塩酸もしくはリン酸、または有機酸、例えば酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などを用いて形成される。遊離カルボキシル基から形成される塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、ならびにイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、およびプロカインなどの有機塩基

10

20

30

40

50

から誘導することもできる。

【0113】

組成物は、対象の年齢、体重、および状態、使用される特定の組成物、ならびに投与経路に適切なスケジュールおよび期間にわたって、単回投与治療または複数回投与治療で投与することができる。非限定的な一実施形態では、本開示による組成物の単回用量が投与される。他の非限定的な実施形態では、複数の用量が投与される。投与の頻度は、様々な要因、例えば症状の重症度、望ましい免疫保護の程度、または組成物が予防目的または治療目的で使用されるかどうかに応じて変えることができる。例えば、特定の非限定的な実施形態では、組成物は、月に1回、月に2回、月に3回、隔週、週に1回、週に2回、週に3回、週に4回、週に5回、週に6回、隔日、毎日、1日2回毎日、または1日3回毎日、投与される。処置の期間（すなわち、組成物が投与される期間）は、様々な要因のいずれか、例えば被験者の反応に応じて変わり得る。例えば、組成物は、約1日から約1週間、約2週間から約4週間、約1ヶ月から約2ヶ月、約2ヶ月から約4ヶ月、約4ヶ月から約6ヶ月、約6ヶ月から約8ヶ月、約8ヶ月から約1年、約1年から約2年、または約2年から約4年、またはそれ以上の範囲の期間にわたって投与することができる。

10

【0114】

組成物を薬学的に許容される担体（賦形剤）と組み合わせて、薬理的組成物を形成することができる。薬学的に許容される担体は、例えば、限定するものではないが、医薬組成物の吸収またはクリアランス速度を安定化または増加または減少させるように作用する生理学的に許容される化合物を含むことができる。生理学的に許容される化合物には、例えば、限定されるものではないが、グルコース、スクロース、デキストランなどの炭水化物；アスコルビン酸やグルタチオンなどの酸化防止剤；キレート剤；低分子量タンパク質；界面活性剤；リポソームキャリア；賦形剤；または他の安定剤および/または緩衝液が含まれる。他の生理学的に許容される化合物には、湿潤剤、乳化剤、分散剤、または防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0115】

経口投与される場合、本組成物は消化から保護され得る。これは、抗体またはその抗原結合部分を組成物と複合体化して酸性加水分解および酵素加水分解に耐性にするか、または抗体またはその抗原結合部分を米国特許第5,391,377号に示されているようなリポソームなど（但し、限定するものではない）の適切な耐性のある担体にパッケージングすることによって達成される。

30

【0116】

経粘膜投与または経皮投与の場合、浸透されるバリアに適切な浸透剤を製剤に使用することができる。そのような浸透剤は一般に当該技術分野で知られており、例えば、経粘膜投与の場合、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体が含まれる。さらに、浸透を促進するために界面活性剤を使用できる。経粘膜投与には、鼻スプレーまたは座薬を使用することができる。局所経皮投与の場合、薬剤は軟膏、クリーム、膏薬、粉末、およびゲルに製剤化される。経皮送達システムには、（例えば、限定ではないが）パッチを含めることもできる。本組成物はまた、持続送達または持続放出機構で投与することができる。例えば、ペプチドの持続送達が可能な生分解性マイクロスフェアもしくはカプセルまたは他の生分解性ポリマーの立体構造を本明細書に含めることができる。

40

【0117】

本組成物は、吸入の場合、乾燥粉末エアロゾル、液体送達システム、エアジェットネブライザー、噴射システムなど（これらに限定されない）を含む当該技術分野で知られている任意のシステムを使用して送達することができる。例えば（限定するものではないが）、医薬製剤はエアロゾルまたはミストの形で投与することができる。エアロゾル投与の場合、製剤は界面活性剤および噴射剤とともに細かく分割された形で供給することができる。別の態様では、製剤を呼吸器組織に送達するためのデバイス、製剤が気化する吸入器である。他の液体送達システムには、エアジェットネブライザーが含まれる（但し、これに限定されない）。

50

【 0 1 1 8 】

抗体または抗体の抗原結合部分は、単独で、または（限定されないが）全身的、局部的、または局所的などの当該技術分野で公知の任意の手段により医薬組成物として送達され得る；すなわち、動脈内、クモ膜下腔内（IT）、静脈内（IV）、非経口、胸腔内、局部、経口、または局所、皮下、気管内（例えば、エアロゾルにより）あるいは経粘膜（頬、膀胱、膣、子宮、直腸、鼻の粘膜）投与される。

【 0 1 1 9 】

一態様では、組成物または核酸、抗体もしくはその断片を含む医薬製剤は、米国特許第 6, 110, 490 号；第 6, 096, 716 号；第 5, 283, 185 号；および第 5, 279, 833 号に示されるようなりポソームなどの（但し、これに限定されない）脂質単層内または脂質二重層内に組み込まれる。他の態様では、本開示の非限定的な実施形態は、ポリペプチドまたは核酸がリポソームの単層または二重層の表面に付着している製剤を含む。リポソームおよびリポソーム製剤は、標準的な方法に従って調製することができ、また、米国特許第 4, 235, 871 号；第 4, 501, 728 号；および第 4, 837, 028 号に開示されているものなど（但し、これらに限定されない）、当該技術分野で周知である。

【 0 1 2 0 】

一態様において、組成物はインプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤など（しかし、これらに限定されない）、身体からの急速な排出から抗体またはその断片を保護する担体とともに調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸など（但し、これらに限定されない）の生分解性の生体適合性ポリマーを使用できる。そのような製剤の調製方法は、当業者には明らかであろう。

【 0 1 2 1 】

対象の抗体およびその断片は、一般に、1 つ以上の薬学的に適切な賦形剤、界面活性剤、ポリオール、緩衝液、塩、アミノ酸、もしくは追加の成分、またはこれらの何らかの組み合わせを含む組成物を得るために製剤化することができる。これは、薬学的に有用な用量を調製するための既知の方法によって達成することができ、それにより、活性化化合物は 1 つ以上の薬学的に適切な賦形剤との混合物に組み合わせられる。無菌のリン酸緩衝生理食塩水は、薬学的に適切な賦形剤の 1 つの非限定的な例である。

【 0 1 2 2 】

本明細書に記載の組成物の投与経路の非限定的な例には、例えば、皮下、筋肉内、または経皮送達による非経口注射が含まれる。非経口投与の他の形態には、静脈内、動脈内、リンパ内、クモ膜下腔内、眼内、脳内、または腔内注射が含まれるが、これらに限定されない。非経口投与では、組成物は、薬学的に許容される賦形剤と組み合わせ、溶液、懸濁液、またはエマルジョンなど（但し、これらに限定されない）の注射可能な単位剤形に製剤化される。そのような賦形剤は、本質的に無毒で非治療的である。そのような賦形剤の非限定的な例には、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、およびハंकス液が含まれる。固定油およびオレイン酸エチルなど（但し、これらに限定されない）の非水性賦形剤も使用され得る。別の非限定的な賦形剤は、生理食塩水中の 5 % デキストロースである。賦形剤には、緩衝剤や防腐剤などの等張性や化学的安定性を高める物質などの少量の添加物が含まれる場合があるが、これらに限定されない。

【 0 1 2 3 】

抗体を含む製剤化された組成物は、（例えば、限定するものではないが）皮下、筋肉内、または経皮投与に使用することができる。組成物は、防腐剤を加えた単位剤形、例えばアンプルまたは複数回投与容器で提供することができる。組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、または乳液などの形態をとることもでき、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤などの製剤化剤を含むことができる。あるいは、組成物は、使用前に適切な媒体、例えば、発熱物質を含まない滅菌水で構成するための粉末形態とすることができる。

【 0 1 2 4 】

組成物は溶液で投与することができる。その製剤は、リン酸塩、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン - HCl、またはクエン酸塩など（但し、これらに限定されない）の適切な薬学的に許容される緩衝液を含む溶液中にあってもよい。緩衝液の濃度は 1 ~ 100 mM の範囲である必要がある。製剤化された溶液は、50 ~ 150 mM の濃度の塩化ナトリウムまたは塩化カリウムなどの塩を含んでもよいが、これらに限定されない。マンニトール、トレハロース、ソルビトール、グリセロール、アルブミン、グロブリン、界面活性剤、ゼラチン、プロタミン、またはプロタミン塩など（但し、これらに限定されない）の有効量の安定化剤を含むことも可能である。

【 0 1 2 5 】

抗 DCLK1 抗体、または抗 DCLK1 抗体 - 薬物複合体など（但し、これらに限定されない）の抗体またはその抗原結合部分の治療的または予防的有効量の例示的で非限定的な範囲（例えば、複合体化された薬物がアウリスタチンである場合）、被験者の体重の約 0.001 mg / kg から被験者の体重の約 100 mg / kg の範囲、例えば、限定されないが、0.1 mg / kg から約 50 mg / kg、約 0.1 mg / kg から約 50 mg / kg の範囲、約 0.1 mg / kg から約 40 mg / kg の範囲、約 1 mg / kg から約 30 mg / kg の範囲、約 1 mg / kg から約 20 mg / kg の範囲、約 2 mg / kg から約 30 mg / kg の範囲、約 2 mg / kg から約 20 mg / kg の範囲、約 2 mg / kg から約 15 mg / kg の範囲、約 2 mg / kg から約 12 mg / kg の範囲、約 2 mg / kg から約 10 mg / kg の範囲、約 3 mg / kg から約 30 mg / kg の範囲、約 3 mg / kg から約 20 mg / kg の範囲、約 3 mg / kg から約 15 mg / kg の範囲、約 3 mg / kg から約 12 mg / kg の範囲、もしくは約 3 mg / kg から約 10 mg / kg の範囲、または固定用量として約 10 mg から約 1500 mg の範囲を含む。

【 0 1 2 6 】

組成物は、有効量の本抗体またはその抗原結合部分（またはその複合体）を含むように製剤化され、その量は治療される動物および治療される状態に依存する。特定の非限定的な実施形態において、本抗体またはその抗原結合部分（またはその薬物複合体）は、約 0.001 mg から約 10 g、約 0.01 mg から約 10 g、約 0.1 mg から約 10 g、約 1 mg から約 10 g、約 1 mg から約 9 g、約 1 mg から約 8 g、約 1 mg から約 7 g、約 1 mg から約 6 g、約 1 mg から約 5 g、約 10 mg から約 10 g、約 50 mg から約 5 g、約 50 mg から約 5 g、約 50 mg から約 2 g、約 0.05 µg から約 1.5 mg、約 10 µg から約 1 mg のタンパク質、約 30 µg から約 500 µg、約 40 µg から約 300 µg、約 0.1 µg から約 200 mg、約 0.1 µg から約 5 µg、約 5 µg から約 10 µg、約 10 µg から約 25 µg、約 25 µg から約 50 µg、約 50 µg から約 100 µg、約 100 µg から約 500 µg、約 500 µg から約 1 mg、または約 1 mg から約 2 mg の範囲の用量で投与される。任意の特定の被験者の特定の用量レベルは、特定のペプチドの活性、年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食事、投与時間、投与経路、排泄の割合、薬物の組み合わせ、および治療を受けている特定の疾患の重症度などの様々な要因に依存するが、これらに限定されない。

【 0 1 2 7 】

ヒトに対する投与抗体の用量は、患者の年齢、体重、身長、性別、一般的な病状、および以前の病歴など（但し、これらに限定されない）の要因に応じて変わる。特定の非限定的な実施形態では、レシピエントには、単回注入または単回もしくは複数回の注射として、約 1 mg から約 1000 mg の範囲の抗体または抗体断片（またはその薬物複合体）の用量が提供されるが、より低いまたはより高い用量も投与され得る。特定の非限定的な実施形態では、用量は、典型的な成人の体表面積 1 平方メートルあたり約 25 mg から約 100 mg の範囲の抗体（またはその断片もしくは複合体）であり、より低いまたはより高い用量もまた投与され得る。ヒト被験体に投与し得る抗体の用量の非限定的な例には、より高いまたはより低い用量が使用されてもよいが、1 ~ 500 mg、1 ~ 70 mg、または 1 ~ 20 mg がさらに挙げられる。必要に応じて、例えば（但し、これに限定されない

10

20

30

40

50

）、４～１０週間は週に１回、８週間は週に１回、４週間は週に１回、投薬を繰り返すことが可能である。また、数ヶ月間は隔週など（但し、これに限定されない）、より少ない頻度で投与してもよいし、あるいは週に２回または連続注入など、より頻繁に投与することも可能である。

【０１２８】

いくつかの非限定的な実施形態において、本明細書に記載の任意の程度で癌細胞または癌幹細胞の増殖を阻害するのに十分な抗ＤＣＬＫ１抗体またはその結合断片（もしくはその薬物複合体）の有効量は、約１ｎＭ、約５ｎＭ、約１０ｎＭ、約２５ｎＭ、約５０ｎＭ、約７５ｎＭ、約１００ｎＭ、約１５０ｎＭ、約２００ｎＭ、約２５０ｎＭ、約３００ｎＭ、約３５０ｎＭ、約４００ｎＭ、約５００ｎＭ、約５５０ｎＭ、約６００ｎＭ、約７００ｎＭ、約８００ｎＭ、約９００ｎＭ、約１μＭ、約２μＭ、約３μＭ、約４μＭ、約５μＭ、約６μＭ、約７μＭ、約８μＭ、約９μＭ、約１０μＭ、約１５μＭ、約２０μＭ、約２５μＭ、約３０μＭ、約３５μＭ、約４０μＭ、約４５μＭ、約５０μＭ、約６０μＭ、約７０μＭ、約７５μＭ、約８０μＭ、約９０μＭ、約１００μＭ、約１２５μＭ、約１５０μＭ、約１７５μＭ、約２００μＭ、約２５０μＭ、約３００μＭ、約３５０μＭ、約４００μＭ、約５００μＭ、約６００μＭ、約７００μＭ、約７５０μＭ、約８００μＭ、約９００μＭ、約１ｍＭ、約２ｍＭ、約３ｍＭ、約４ｍＭ、約５ｍＭ、約６ｍＭ、約７ｍＭ、約８ｍＭ、約９ｍＭ、約１０ｍＭ、約１１ｍＭ、約１２ｍＭ、約１３ｍＭ、約１４ｍＭ、約１５ｍＭ、約２０ｍＭ、約２５ｍＭ、約３０ｍＭ、約３５ｍＭ、約４０ｍＭ、約４５ｍＭ、約５０ｍＭ、約５５ｍＭ、約６０ｍＭ、約６５ｍＭ、約７０ｍＭ、約７５ｍＭ、約８０ｍＭ、約８５ｍＭ、約９０ｍＭ、約９５ｍＭ、約１００ｍＭ、約１１０ｍＭ、約１２０ｍＭ、約１３０ｍＭ、約１４０ｍＭ、約１５０ｍＭ、約１６０ｍＭ、約１７０ｍＭ、約１８０ｍＭ、約１９０ｍＭ、約２００ｍＭ、約２５０ｍＭ、約３００ｍＭ、約４００ｍＭ、約５００ｍＭ、約６００ｍＭ、約７００ｍＭ、約８００ｍＭ、約９００ｍＭ、約１０００ｍＭ、約１Ｍ、約１．１Ｍ、約１．２Ｍ、約１．３Ｍ、約１．４Ｍ、約１．５Ｍ、約１．６Ｍ、約１．７Ｍ、約１．８Ｍ、約１．９Ｍ、約２Ｍ、約３Ｍ、約４Ｍ、約５Ｍ、約６Ｍ、約７Ｍ、約８Ｍ、約９Ｍ、約１０Ｍ、約１５Ｍ、約２０Ｍ、約２５Ｍ、約３０Ｍ、約３５Ｍ、約４０Ｍ、約４５Ｍ、約５０Ｍ、約７５Ｍ、約１００Ｍ、または範囲の終点としての前記２つの濃度を含む、前述の濃度のいずれか２つの間の任意の範囲、もしくは前述の濃度のいずれか２つの間の任意の数字である。

【０１２９】

いくつかの非限定的な方法において、患者は、例えば、１、２、３、または４週間ごとに抗体またはその結合断片（または抗体薬物複合体）を投与される。その用量は、他の要因の中でも、投与頻度、患者の状態、前の処置に対する反応（もしあれば）、処置が予防的または治療的であるかどうか、および障害が急性か慢性かによって異なる。

【０１３０】

例えば、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、クモ膜下腔内、腹腔内、局所、鼻腔内、または筋肉内投与を行うことができるが、これらに限定されない。投与は腫瘍に直接局在化させることもできる。静脈内投与または皮下投与による全身循環への投与が一般的である。静脈内投与は、例えば（限定ではないが）３０～９０分など（但し、これに限定されない）の期間にわたる注入によるか、または単回ボラス注射によることができる。

【０１３１】

投与の頻度は、他の要因の中でも特に、循環中の抗体または抗体－薬物複合体の半減期、患者の状態、および投与経路に依存する。前記頻度は、毎日、毎週、毎月、四半期ごと、または患者の状態の変化や処置中の癌の進行に応じて不規則な間隔で行うことができる。静脈内投与の例示的（しかし非限定的）頻度は、継続的な処置コースにわたって週に２回と四半期に１回の間であるが、より頻繁な、またはより少ない投薬も可能である。静脈内投与のための他の例示的な（しかし非限定的な）頻度は、継続的な処置コースにわたって週に１回または月に１回の間であるが、より頻繁またはより少ない投与も可能である。

皮下投与の場合、例示的（但し非限定的）な投与頻度は、毎日から毎月であるが、より頻繁またはより少ない投与も可能である。

【 0 1 3 2 】

投与される投薬の回数は、癌の性質（例えば、急性または慢性症状を呈するかどうか）および治療に対する障害の応答に依存する。急性疾患または慢性疾患の急性増悪の場合、1～10回の投与で十分である。場合によっては分割された形の単回ボース投与で、急性疾患または慢性疾患の急性増悪に十分な場合もある。急性障害または急性増悪の再発に対して治療を繰り返すことができる。慢性疾患の場合、抗体は、毎週、2週間ごと、毎月、四半期ごと（但し、限定されない）、半年ごと、少なくとも1、5、または10年、または患者の生涯などの定期的な間隔で投与できる。

10

【 0 1 3 3 】

特定の非限定的な実施形態において、非経口投与のための医薬組成物は、無菌であり、実質的に等張であり、GMP条件下で製造される。医薬組成物は、単位投与形態（すなわち、単回投与の用量）で提供することができる。医薬組成物は、1つ以上の生理学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、または補助剤を使用して製剤化することができる。前記製剤は、選択した投与経路に依存する。注射の場合、抗体は、ハネクス液、リンゲル液、生理食塩水または酢酸緩衝液など（但し、これらに限定されない）の生理学的に適合性のある緩衝液などの水溶液で製剤化できる（注射部位の不快感を軽減するため）。前記溶液は、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤などの製剤化剤を含むことができる。あるいは、抗体は、使用前に適切な媒体、例えば、発熱物質を含まない滅菌水で構成するための凍結乾燥形態とすることができる。液体製剤中の抗体の濃度は、例えば（限定するものではないが）0.01～10mg/ml、例えば1.0mg/mlである。

20

【 0 1 3 4 】

上記のように、本開示の抗体またはその結合断片による処置は、化学療法、放射線、幹細胞治療、手術、または処置される障害に対して有効な他の処置と組み合わせることができる。DCLK1に対するヒト化抗体とともに投与できる他の薬剤の有用な種類には、例えば（但し、これらに限定されないが）、癌細胞に発現する他の受容体に対する抗体、抗チューブリン薬（例えばアウリスタチン）、DNA副溝結合剤（例えば、PBD）、DNA複製阻害剤、アルキル化剤（例えば、シスプラチン、モノ（プラチナム）、ビス（プラチナム）および三核白金錯体およびカルボプラチンなどの白金錯体）、アントラサイクリン、抗生物質、葉酸代謝拮抗剤、代謝拮抗剤、化学療法増感剤、デュオカルマイシン、エトポシド、フッ素化ピリミジン、イオノフォア、レキシトロブシン、ニトロソ尿素、プラチノール、プレフォーミング化合物、プリン代謝拮抗剤、ピューロマイシン、放射線増感剤、ステロイド、タキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、ピンカアルカロイドなどが挙げられる。

30

【 0 1 3 5 】

いくつかの非限定的な実施形態では、抗体は、本明細書に記載の可変重鎖配列および/または可変軽鎖配列と少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または約100%同一である。いくつかの非限定的な実施形態では、抗体またはその抗体断片は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、

40

50

98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、または118個の残基の長さにわたって上記の可変重鎖配列および可変軽鎖配列と100%同一である配列を含む。

【0136】

特定の非限定的な実施形態では、2つのアミノ酸配列（または2つの核酸配列）の同一性の割合は、例えば、最適な比較目的のために配列を整列させること（例えば、ギャップを第一の配列に導入できる）により決定できる。次に、対応する位置のアミノ酸またはヌクレオチドが比較され、2つの配列間の同一性の割合は、配列が共有する同一位置の数の関数である（すなわち、同一性% = (同一位置の数 / 位置の合計数) × 100）。2つの配列の実際の比較は、例えば数学的アルゴリズムを使用するなど、よく知られた方法で実行できる。そのような数学的アルゴリズムの特定の非限定的な例は、Karlinらにより記載されている（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:5873-5877（1993））。そのようなアルゴリズムは、Schafferら（Nucleic Acids Res.、29:2994-3005（2001））に記載されているように、BLASTNおよびBLASTXプログラム（バージョン2.2）に組み込まれている。BLASTおよびギャップ付きBLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータ（例えば、BLASTN）を使用することができる。1つの非限定的な実施形態では、検索されるデータベースは非冗長（NR）データベースであり、配列比較のためのパラメータは、フィルターなし；10の期待値；ワードサイズ3；マトリックスBLOSUM62；およびギャップコスト：11の存在と1のエクステンションに設定することができる。

【0137】

いくつかの非限定的な実施形態はまた、本明細書で産生および記載されるCBT-15AおよびCBT-15Gと呼ばれる、可変軽（VL）ドメインおよび/またはその可変重（VH）ドメインにおいて1つ以上のアミノ酸残基置換を含む抗DCLK-1抗体のいずれか1つを含む上記抗体の変異体を包含する。いくつかの非限定的な実施形態はまた、1つ以上のVL CDRおよび/または1つ以上のVH CDRにおいて1つ以上のさらなるアミノ酸残基置換を有する上記抗体の変異体も包含する。本明細書に記載のVHドメイン、VH CDR、VLドメイン、および/またはVL CDRに置換を導入することにより生成される抗体またはその結合断片は、例えば、DCLK1に結合する能力について、in vitroおよびin vivoで試験することができる（例えば、限定するものではないが、ELISAおよびBIACoreを含む免疫アッセイによって）。

【0138】

本開示はまた、DCLK1アイソフォーム2および4に特異的に結合する本開示の抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸を包含する。前記核酸は、細胞内で発現して本開示の抗体またはその抗原結合部分を産生する。例えば、本開示の単離された核酸は、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または約100%本明細書に開示されるアミノ酸配列と同一であるペプチドをコードする配列を含む。本抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸を、適切な発現系で発現可能な発現ベクターに導入し、その後、発現した抗体またはその抗原結合部分を単離または精製することができる。場合により、本抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸は、米国特許第4,816,567号に開示されている系など（但し、これに限定されない）の無細胞翻訳系で翻訳することができる。

【0139】

10

20

30

40

50

抗 D C L K 1 抗体またはその抗原結合部分は、所望の抗体の軽および重鎖（またはその C D R 部分）をコードする D N A で形質転換された宿主細胞によって産生することができる。標準的な手法を使用して、これらの培養上清および／または細胞から抗体を単離、精製できる。例えば、抗体の軽鎖、重鎖、またはその両方をコードする D N A で宿主細胞を形質転換することが可能である。組換え D N A 技術を使用して、結合に必要なない軽鎖と重鎖のいずれかまたは両方、例えば、定常領域をコードする D N A の一部またはすべてを除去してもよい。

【 0 1 4 0 】

本明細書で使用する「癌幹細胞（複数可）」という用語は、広範囲にまたは無期限に増殖し、癌内の癌細胞の大部分を生じさせることができる細胞を指す。いくつかの態様では、癌細胞の大部分は、特定の癌の癌細胞の大部分を占める。限定ではなく例示の目的であるが、癌幹細胞は、腫瘍の創始細胞または癌塊の大部分を構成する癌細胞の前駆細胞となり得る。いくつかの態様では、癌幹細胞は、細胞へのさらなる突然変異または外因性細胞増殖誘導剤もしくは発癌剤の導入がない場合、免疫不全個体に組み込まれたときに分裂して 1 つ以上の腫瘍を形成する細胞を指す。いくつかの態様において、癌幹細胞は分裂して、さらなる癌幹細胞や最終分化癌細胞または癌組織を生じる。

【 0 1 4 1 】

癌細胞の増殖の阻止に関して使用される場合、「有効量」という用語は、癌細胞の増殖をある程度減少させるのに十分な抗 D C L K 1 抗体の量を指す。当該分野で公知の任意のアッセイを使用して、癌細胞増殖を測定することができる。例えば、癌細胞の増殖は、コロニー数、総細胞数、または細胞集団、コロニーもしくは腫瘍の体積／サイズによって測定できる。いくつかの非限定的な実施形態において、癌細胞増殖は、腫瘍様塊増殖アッセイにより測定することができる。癌幹細胞の増殖の阻止に関して使用される「有効量」という用語は、癌幹細胞の増殖をある程度まで減少させるのに十分な抗 D C L K 1 抗体の量を指す。当該分野で公知の任意のアッセイを使用して、癌幹細胞増殖を測定することができる。例えば、癌幹細胞の増殖は、コロニー数、総細胞数、または細胞集団もしくはコロニーの体積／サイズによって測定できる。いくつかの非限定的な実施形態において、癌幹細胞の増殖は、腫瘍様塊アッセイにより測定することができる。

【 0 1 4 2 】

特定の非限定的な実施形態において、有効量の抗 D C L K 1 抗体またはその結合断片は、癌細胞、癌幹細胞集団、または腫瘍様塊の増殖において、あるいは細胞または腫瘍の増殖の他の適切な尺度において、少なくとも約 5 %、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 1 5 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または約 1 0 0 % の減少で測定されるように、または前述の数値のいずれかの間にある割合で癌細胞もしくは癌幹細胞の増殖を阻止することができる。

【 0 1 4 3 】

例えば、いくつかの非限定的な実施形態では、有効量の抗 D C L K 1 抗体またはその結合断片は、癌細胞もしくは癌幹細胞の集団または腫瘍様塊の増殖において、または他の適切な尺度において、少なくとも約 5 % ～ 約 9 5 %、少なくとも約 5 % ～ 約 7 5 %、少なくとも約 5 % ～ 約 5 0 %、少なくとも約 1 0 % ～ 約 9 5 %、少なくとも約 1 0 % ～ 約 7 5 %、少なくとも約 1 0 % ～ 約 5 0 %、少なくとも約 1 0 % ～ 約 2 5 %、少なくとも約 2 0 % ～ 約 9 5 %、少なくとも約 2 0 % ～ 約 8 0 %、少なくとも約 2 0 % ～ 約 6 0 %、少なくとも約 2 0 % ～ 約 5 0 %、少なくとも約 2 5 % ～ 約 9 0 %、少なくとも約 2 5 % ～ 約 7 5 %、または少なくとも約 3 0 % ～ 約 5 0 % の減少によって測定されるように、癌細胞または癌幹細胞の増殖を阻止することができる。

【 0 1 4 4 】

他の非限定的な実施形態において、有効量の抗 D C L K 1 抗体またはその結合断片は、癌細胞もしくは癌幹細胞集団または腫瘍様塊の増殖において、少なくとも約 1 . 1、少な

10

20

30

40

50

くとも約 1.2、少なくとも約 1.3、少なくとも約 1.4、少なくとも約 1.5、少なくとも約 1.6、少なくとも約 1.7、少なくとも約 1.8、少なくとも約 1.9、少なくとも約 2.0、少なくとも約 2.1、少なくとも約 2.2、少なくとも約 2.3、少なくとも約 2.4、少なくとも約 2.5、少なくとも約 2.6、少なくとも約 2.7、少なくとも約 2.8、少なくとも約 2.9、少なくとも約 3.0、少なくとも約 3.5、少なくとも約 4.0、少なくとも約 4.5、少なくとも約 5、少なくとも約 10、少なくとも約 25、少なくとも約 50、少なくとも約 75、少なくとも約 100、少なくとも約 200、少なくとも約 500、または少なくとも約 1000 倍の減少あるいは上記の数値のいずれかの間の倍数減少で測定されるように、癌細胞または癌幹細胞の増殖を阻止または阻害することができる。

10

【0145】

いくつかの非限定的な実施形態において、阻害された細胞は、結腸直腸腫瘍細胞（すなわち、結腸、直腸、腸、または胃の腫瘍細胞）、乳癌細胞、肺癌細胞、腎癌細胞、または膵臓癌細胞を含むがこれらに限定されない腫瘍細胞である。いくつかの非限定的な実施形態において、腫瘍細胞は、高レベルの DCLK1 タンパク質を発現することができる。いくつかの非限定的な実施形態において、本明細書で提供される抗 DCLK1 抗体またはその結合断片は、例えば、癌細胞または癌幹細胞の数および/または頻度を減らすことにより、腫瘍細胞の増殖を阻害する（しかし、限定するものではない）。

【0146】

本開示のいくつかの非限定的な実施形態は、本明細書で提供される治療有効量の抗 DCLK1 抗体またはその結合断片を投与することにより、そのような癌を有する対象を治療する方法を含む。いくつかの非限定的な実施形態では、癌は、膵臓癌、結腸直腸癌、肺癌、腎癌、およびトリプルネガティブ乳癌などの乳癌から選択される。

20

【0147】

いくつかの非限定的な実施形態は、本明細書で提供される治療有効量の抗 DCLK1 抗体またはその結合断片を、少なくとも 1 つのさらなる治療薬と組み合わせて、そのような治療を必要とする対象に投与することを含む疾患を治療する方法を含む。治療薬は、直接的に、または本明細書の他の場所で議論されるリンカーを介して、抗体またはその結合断片に結合されてもよい。いくつかの非限定的な実施形態では、さらなる治療薬は化学療法薬を含む。いくつかの非限定的な実施形態では、さらなる治療薬には生物学的薬剤を含む。いくつかの非限定的な実施形態は、化学療法剤および生物学的薬剤と組み合わせて、本明細書で提供される抗 DCLK1 抗体またはその結合断片を投与することを含む。本明細書で提供される方法のいくつかの非限定的な実施形態は、腫瘍または癌における DCLK1 タンパク質発現のレベルを決定することを含む。

30

【0148】

本明細書で提供される方法のいくつかの非限定的な実施形態は、本明細書で提供される抗 DCLK1 抗体またはその結合断片で治療する対象を識別することを含む。いくつかの非限定的な実施形態は、正常組織における同じ DCLK1 タンパク質の発現と比較して、DCLK1 の発現レベルの上昇を含む腫瘍または循環細胞を対象が有するかどうかを判定することを含む。いくつかの非限定的な実施形態は、腫瘍または循環細胞の DCLK1 発現レベルが上昇している場合、処置対象に選択することを含む。

40

【0149】

本明細書で提供されるいくつかの非限定的な実施形態はキットを含む。いくつかの非限定的な実施形態において、キットは、（限定されないが）ヒト化抗体またはそのヒト化結合断片などの、本明細書に記載または他の方法で考慮される抗体またはその結合断片のいずれかを含むことができる。いくつかの非限定的な実施形態では、抗体またはその結合断片は凍結乾燥されている。いくつかの非限定的な実施形態では、抗体またはその結合断片は、水溶液または本明細書に記載の他の担体中にある。いくつかの非限定的な実施形態において、キットは、抗体の投与用薬学的担体を含む。いくつかの非限定的な実施形態では、キットは化学療法剤も含む。本開示の特定の非限定的な実施形態は、治療または診断に

50

適した構成要素を含むキットを含む。例示的なキットは、本明細書に記載の少なくとも1つの抗DCLK1抗体またはその結合断片を含むことが可能である。いくつかの非限定的な実施形態には、注射によりキット構成要素を送達することができる装置、例えば皮下注射用の注射器が含まれてもよい。経皮投与が使用される場合、いくつかの非限定的な実施形態では、中空マイクロニードル送達装置などの送達装置がキットに含まれてもよい。例示的な経皮送達装置は、限定するものではないが、中空の微細構造経皮システム（例えば、3M会社）などが当該技術分野で知られており、そして、任意のそのような既知の装置を使用してもよい。キットの成分は、一緒にパッケージ化することも、2つ以上の容器に分けることもできる。いくつかの非限定的な実施形態では、容器は再構成に適した組成物の滅菌凍結乾燥製剤を含むバイアルであってもよい。キットには、他の試薬の再構成および/または希釈に適した1つ以上の緩衝剤も含む場合がある。あるいは、前記抗体または断片は、液体製剤として送達および保存され得る。使用できる他の容器には、ポーチ、トレイ、ボックス、チューブなどが含まれるが、これらに限定されない。キットの構成要素は、容器内で無菌的に包装および維持することが可能である。含めることができる他の成分は、特定の疾患または状態の処置またはその診断のためのキットの使用説明書である。

【0150】

実験

【0151】

DCLK1に対する抗DCLK1抗体またはその抗原結合断片、そのような抗体またはその抗原結合断片を発現するハイブリドーマまたは他の細胞株、そのような抗体および結合断片をコードする核酸、前記核酸を含むベクターおよび宿主細胞、ならびにそのような抗体および抗原結合断片で癌幹細胞の増殖を阻止する方法に関する実施形態を一般的に説明してきたが、さらなる理解は、例示のみの目的で提供され、限定することを意図しない特定の具体例を参照することにより得ることができる。

【0152】

方法

【0153】

ヒトDCLK1アイソフォーム2のcDNA配列の構築

【0154】

DCLK1アイソフォーム2構築物については、5'-ScaIおよび3'-EcoRI制限酵素消化部位を含む364bpのgBlock合成DNA(IDT)を利用した。このgBlockには、アイソフォーム2と共有されるヒトDCLK1アイソフォーム1配列の一部と、固有のDCLK1アイソフォーム2のC末端配列(NCBI参照配列: XM_005266592.2)も含まれる。DCLK1アイソフォーム1およびgBlockを含むベクターをEcoRIおよびScaIで消化した。消化されたベクターとgBlock断片の両方をゲル精製し、消化されたベクターと合成DNA断片を連結することにより、DCLK1アイソフォーム2を構築した。連結されたcDNA産物は自動配列決定法により確認された。次に、DCLK1アイソフォーム2ベクターを、前述したレンチウイルス構築物にさらに構築した(Weygantらの“Small molecule kinase inhibitor LRRK2-IN-1 demonstrates potent activity against colorectal and pancreatic cancer through inhibition of doublecortin-like kinase 1.”, Molecular cancer (小分子キナーゼ阻害剤LRRK2-IN-1は、ダブルコルチン様キナーゼ1の阻害により、結腸直腸癌および膵臓癌に対して強力な活性を示す)“、Molecular cancer、13(1):103(2014)。RCC細胞株Caki-2に、ヒトDCLK1のcDNA配列を含むレンチウイルスを感染させ、DCLK1アイソフォーム2/long-(caki2-dsRed-DCLK1)またはコントロール(caki2-dsRed)として赤色蛍光タンパク質(RFP)cDNAを過剰発現させ、ピューロマイシンによる100%発現を選定した。

10

20

30

40

50

【0155】

細胞培養

【0156】

Caki-2およびACHNヒト明細胞腎癌細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) から直接得られ、形態、核型分析、およびPCRにより試験および認証して、種間および種内汚染を排除した。細胞は10%ウシ胎児血清(FBS)(Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイス)を含むRPMI培地で37℃、5%CO₂で培養した。

【0157】

DCLK1のsiRNA媒介ノックダウン

10

【0158】

10⁵個のCaki-2またはACHN細胞を6cm皿に播種し、一晚付着させた。Lipofectamine 3000 (Invitrogen、Carlsbad、CA) は、ヒトDCLK1コード領域(sicDCLK; Santa Cruz Biotechnology、Inc.、Dallas、TX; sc-45618)を標的とする25nMの商業的に検証されたsiRNA、または既知の遺伝子と一致しない25nMスクランブル配列(sisCR)と複合体化した。形質転換の72時間後、RNAとタンパク質を収集してノックダウンを確認した。

【0159】

定量的リアルタイムRT-PCR

20

【0160】

製造業者の使用説明書に従って、TRI REAGENT (登録商標) (Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイス市) を使用して細胞から全RNAを単離した。SUPERSCRIPT (登録商標) II 逆転写酵素 (Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド市) およびランダムヘキサヌクレオチドプライマーを使用して、逆転写を実施した。次に、相補的DNAを使用し、SYBR Green (Molecular Probes、オレゴン州ユージーン市) を用いて、iCycler IQ5 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories、Inc.、カリフォルニア州ハーキュリーズ市) でリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実行した。特定の転写産物を検出するために、遺伝子特異的プライマーとJUMPSTART (登録商標) Taq DNAポリメラーゼ (Sigma-Aldrich、ミズーリ州セントルイス市) を使用した。 - アクチンを使用して閾値を正規化し、mRNAの定量的変化をコントロールに対する倍率変化として評価した。スチューデントのt検定を使用して統計的有意性を判定した。

30

【0161】

ウェスタンブロッティング

【0162】

ACHNまたはCAKI2細胞からの溶解物をウェスタンブロット分析にかけた。総タンパク質の濃度は、BCAタンパク質アッセイ(Pierce、Rockford、IL)で決定した。タンパク質溶解物40μgを4%~20%SDSポリアクリルアミドゲルでサイズ分離し、PVDF膜に転写した。前記膜を1%カゼインで30分間ブロックし、一次抗体 - DCLK1 (ABCAM、UK; ab31704)、HIF-1 (ABCAM、ab2185)、Vimentin (Santa Cruz Biotechnology、Inc.、Dallas、TX; SC-7557)、ALDH1A1 (ABCAM、ab52492)、および - アクチン (ABCAM、ab8226) を用いて4で一晩プローブした。次に、前記膜をTBSTで3回洗浄し、光から保護された室温で30分間、種に適した二次抗体(cw800結合体)でプローブした。最後に、LI-COR Odyssey Infrared Imagerを使用してタンパク質を検出し、必要に応じてImage Studio Lite (LI-COR Biosciences、ネブラスカ州リンカーン市) で密度の定量化を行った。

40

50

【0163】

増殖 / 薬物耐性アッセイ

【0164】

細胞 (5000 個 / ウェル) を 96 ウェル組織培養プレートに四重に播種した。前記細胞は、媒体として DMSO を含むソラフェニブ、スニチニブ、エベロリムス、またはテムシロリムスの存在下、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.20、および 0.10 μ の濃度 (すなわち、媒体を含むソラフェニブまたはスニチニブの場合) で、または 300、150、75、37.5、18.8、9.38、4.69、2.34、1.17、0.59、0.29 μ M の濃度 (すなわち、媒体を含むエベロリムスまたはテムシロリムスの場合) で培養された。インキュベーションの 48 または 72 時間後、10 μ L の MTT (R & D Systems、ミネソタ州ミネアポリス市) を各ウェルに加え、細胞を 37 で 4 時間インキュベートした。暗い結晶の沈殿物が見えるようになったら、266 mM の NH_4OH を含む 50 μ L の DMSO をウェルに加えた。沈殿した MTT 結晶を完全に溶解するために、プレートを低速のシェーカーに 1 分間置き、マイクロプレートリーダーを使用して各ウェルの OD₅₇₀ を読み取った。最後に、その結果を平均し、DMSO (媒体) 対照処理ウェルに対して正規化した。

10

【0165】

2D コロニー形成アッセイ

【0166】

細胞 (100 個 / ウェル) を、10% FBS および DMSO または 0.5 もしくは 5 μ M のスニチニブのいずれかを含む新鮮な細胞培養培地を有する 6 ウェルプレートに播種した。72 時間の処理後、培地を更新し、前記細胞を 9 ~ 15 日間増殖させた。コロニー形成期間の後、皿を PBS で洗浄し、氷酢酸 / メタノール溶液 (1 : 3) で固定した。固定後、0.5% クリスタルバイオレットを使用してコロニーを染色し、水道水で穏やかに洗浄することで過剰な染色を除去した。乾燥後、コロニーを 1 cm^2 のグリッドを使用して立体顕微鏡でカウントした。4 分円からの 4 つの正方形を各プレートでカウントした。相対的なコロニー形成を得るために、各細胞株について結果を DMSO に標準化した。次に、染色されたコロニーを画像化して、Image J (国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダ市) を使用して分析した。

20

30

【0167】

3D コロニー形成アッセイ

【0168】

減少した成長因子マトリゲル (コーニング社、ニューヨーク州コーニング市) を、RPMI 培地を含む細胞懸濁液と混合 (体積 1 : 1) した。前記混合物 100 μ L を、50 細胞 / ウェルの密度で 96 ウェルプレートにピペットで入れた。マトリゲル固化後、10% ウシ胎児血清を含む 50 μ L の RPMI 培地を各ウェルに加えた。次に、前記プレートを 5% CO_2 下、37 でインキュベートした。培地は週に一度更新され、コロニー形成について細胞を監視した。薬物応答については、72 時間の薬物処理後、細胞をトリプシン処理し、上記のプロトコルに従って播種し、培地を上記のように更新した。前記細胞を 10 ~ 15 日間増殖させて、15 個を超える細胞からなると定義されるコロニーを形成させ、プレートを PBS で洗浄し、ホルマリンで固定した。その後、各ウェルのコロニーを手動でカウントした。

40

【0169】

フローサイトメトリー

【0170】

細胞周期状態を評価するために、細胞をトリプシン処理し、4 で遠心分離し、冷 PBS で洗浄し、その後氷上で 70% エタノールに 2 時間超、固定した。固定後、前記細胞は PBS で再度洗浄し、ヨウ化プロピジウム (50 μ g / ml) でインキュベートし、リボヌクレアーゼ A で処理した。DCLK1 の発現を分析する別の実験では、細胞をトリプシ

50

ン処理し、遠心分離し、洗浄し、5 μ Lの活性化ALDEFLUOR（商標）（Stem cell Technologies Inc.、マサチューセッツ州ケンブリッジ市）、およびそれぞれの蛍光色素と結合した5 μ Lの抗DCLK1抗体を添加し、37℃で60分間インキュベートした。インキュベーション後、前記細胞をALDEFLUOR（商標）緩衝液（Stem cell Technologies Inc.）で洗浄した。データはFACSCALIBUR（商標）（BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ市）で収集され、ModFit LTまたはFlowing Softwareで分析した。ALDHの発現レベルを分析するために、5 mlの特定のALDH阻害剤ジエチルアミノベンズアルデヒド（95%エタノール原液中、DEABを1.5 mM）を陰性対照として使用し、あるいは使用することなく、細胞をALDH基質、BAA（Bodipy - アミノアセトアルデヒド）（50 mg 乾燥試薬）を含むALDEFLUOR（商標）アッセイバッファーに再懸濁した。37℃で60分間インキュベートした後、FACSCALIBUR（商標）（BD Biosciences）によりデータを収集した。DCLK1細胞外ドメインベースの細胞選別では、細胞をトリプシン処理し、上記のように洗浄した。洗浄後、細胞を氷上で蛍光色素と結合した抗DCLK1抗体で60分間インキュベートし、FACSARIA（商標）IIIセルソーター（BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ市）を使用して選別した。選別された細胞は氷上に保持され、ECMに直接播種された。

10

【0171】

モノクローナル抗体

20

【0172】

上記のように、DCLK1は、アルファおよびベータと呼ばれる2つのプロモーターから生成された4つの異なるヒト主要アイソフォームを含む。すべてのアイソフォームには、共有のキナーゼドメインと自己リン酸化領域がある。アルファプロモーターは、異なるC末端領域を有する2つのダブルコルチン結合82 kDaのアイソフォームを生成する。ベータプロモーターは、同等の異なるC末端領域を有する2つの短縮された主にキナーゼドメイン52 kDaのアイソフォームを生成する。配列解析と相同性モデリングを使用して、アイソフォーム2および4の共有細胞外C末端領域が特定され、この領域に対する免疫原の一組が複数の抗体を生成するために調製された。免疫原の配列を表3に示す。

【0173】

30

免疫原配列をKLHに連結して、KLH連結ペプチドを形成した。Balb/cマウスにこれらのKLH結合ペプチドを皮下注射し、4週間後に追加免疫した。免疫したマウスの脾臓を追加免疫後に除去し、骨髄腫細胞と融合させた。クローンは、選択のために特定のペプチドおよび精製されたDCLK1タンパク質に対するELISAによってスクリーニングされた。

40

50

【表 3】

表3抗体生成のためのDCLK1アイソフォーム2
および4のC末端領域からのペプチド免疫原

免疫原番号	アミノ酸配列	配列番号
1	RRRNQDVRSRYKAQ	3
2	ELNSESEDYSPS	4
3	DVRSRYKAQPA	5
4	PELNSESEDYSPSSS	6
5	RSRYKAQPAPPELNS	7
6	DVRSRYKAQPAPPE	8
7	RYKAQPAPPELNSES	9
8	DYSPSSSETVRSPNSPF	10
9	EDYSPSSSETVRSPN	11
10	ESEDYSPSSSETVR	12

【0174】

このスクリーニング工程から生成されたモノクローナル抗体は、免疫グロブリンA種（CBT-15A）と免疫グロブリンG2種（CBT-15G）を含んでいた。得られた抗体の精製後、DCLK1に対するそれらの親和性をDCLK1アイソフォーム4精製タンパク質に対するウェスタンブロッティングにより確認した（図1）。DCLK1アイソフォーム4とDCLK1アイソフォーム1の精製タンパク質の両方で行ったELISAは、免疫原番号8（配列番号：10）から生じたCBT-15モノクローナル抗体が、DCLK1アイソフォーム1に存在する非細胞外ドメインに比べて、DCLK1アイソフォーム4に存在するDCLK1細胞外ドメインに対して高度に選択的であることを示した（図2）。細胞外DCLK1に結合するこれらの抗体の能力は、FACS選別実験でさらに明らかになった。生きているAsPC-1ヒト膵臓癌細胞は、アイソタイプコントロール、CBT-15A抗体、またはCBT-15A抗体に加えて、非透過性条件下、氷上において10μg/mLの中和ペプチドで染色された。FACS選別は、CBT-15Aが、癌幹細胞様特性を有することが以前に示されたこの膵臓癌細胞株の生きた細胞外DCLK1+集団を選別できることを実証した（図3）。同時に、これらの知見は、細胞外DCLK1のC末端の免疫原番号8（配列番号：10）に対して生じたモノクローナル抗体が、インビトロでこのドメインを選択的に標的化することを実証した。

【0175】

細胞外DCLK1に結合するCBT-15 mABの能力を確認した後、CBT-15Gのキメラ変異株（本明細書ではCBT-15Xと呼ぶキメラ）を分泌する細胞株を以下のように調製した：

【0176】

1. RNAは、CBT-15G抗体を分泌するモノクローナルハイブリドーマ細胞から精製された。

【0177】

2. マウス重鎖定常領域および軽鎖カップ定常領域の最終可変領域の下流のプライマーを使用してcDNAを作成し、CBT-15Gの重鎖および軽鎖可変cDNAならびにアミノ酸配列を特定した（下記を参照）。

【0178】

3. 各RT反応は、可能性のあるすべての再配列を増幅するために、縮退プライマーセット（USBIO、11904-10A）を使用したPCRにかけられた。

【0179】

4. ヒト/マウス IgG キメラ抗体を作製するために、上記反応からの PCR 断片を pFUSEss-CH Ig-hG1 に挿入して DCLK1 重鎖を発現させ、pFUSEss-CL Ig-hK に挿入して DCLK1 軽鎖カッパを発現させた。

【0180】

DCLK1 に対する CBT-15X キメラの保持された特異的結合親和性は、DCLK1 精製タンパク質に対するウェスタンブロットにより確認された (図1)。

【0181】

インビトロ PBMC キリングアッセイ

【0182】

ACHN 細胞を 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 5×10^4 個、播種し、37 で一晩付着させた。CBT-15 mAB またはアイソタイプ対照 mAB を $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 4 重に ACHN ウェルに加え、37 で 72 時間インキュベートした。mAB 処理後、培地を交換し、 1.25×10^5 の初代ヒト PBMC 細胞 (ATCC) を ACHN 細胞と 72 時間、共インキュベートした。最後に、アポトーシスの代用測定手段として、製造元のプロトコルに従って、発光性 CASPASEGLO (登録商標) 3/7 活性アッセイ (Promega、ウィスコンシン州マディソン市) を実施した。

10

【0183】

異種移植腫瘍の研究

【0184】

ACHN 細胞 (5×10^5) を、無胸腺雄のヌードマウスの脇腹に皮下注射し、腫瘍が平均体積 100 mm^3 に達するまで増殖させた。この体積に達したら、CBT-15 mAB またはアイソタイプ対照の mAB を隔週 $25 \text{ mg}/\text{kg}$ で腹腔内に送達し、腫瘍体積測定を 1 日おきに行った。各注射日にキャリパーで水平および垂直の腫瘍径を測定し、腫瘍体積 = $0.5 \times \text{長さ} \times \text{幅}^2$ の式を使用して腫瘍体積を計算した。注射期間の終わりに、CO₂ 室息によりマウスが殺され、腫瘍が摘出され、秤量し、測定された。すべての動物実験は、オクラホマ大学健康科学センターの施設内動物管理使用委員会 (オクラホマ州オクラホマ市) によって定められた基準に従って行われた。

20

【0185】

免疫組織化学

【0186】

免疫組織化学は、市販の腎癌マイクロアレイ (US Biomax, Inc., メリーランド州ロックビル市; KD2085) を使用して、PD-L1 および DCLK1 について前述したように実施した。染色結果は経験豊富な臨床病理学者によって定量化された。

30

【0187】

統計分析

【0188】

すべての統計分析は、SPSS Statistics 19、Graphpad Prism 6.0、および Microsoft Excel を使用して実行された。一元配置分散分析とスチューデントの T 検定を使用して、統計的有意性を判定した。すべての分析で、 $p < 0.05$ は統計的に有意であると見なした。

40

【0189】

結果

【0190】

以下の CBT-15A の軽鎖および重鎖可変 cDNA およびアミノ酸配列を決定した：

【0191】

CBT-15A の重鎖可変 cDNA 配列：

【0192】

GACGTGAAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAAGCTTGGAAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA
TTCACCTTTCAGTAGCTATTACATGTCTTG GGTTCGCCAG

50

ACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTATA
GTAATG GTGGTAGCACCTACTATCCAGACACTGTGAAGG
GCCGATTTCACCATCTCCAGAGAC AATGCCAAGAACACCC
TGTAACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGC
CTTGTAATTA CTGTGCAAGACATGGGGGTAACTACTGGTAC
TTCGATGTCTGGGGGCGC AGGGACCACGGTCAACCGTCTCC
TCA (配列番号：13)。

【0193】

CBT-15Aの重鎖可変アミノ酸配列：

【0194】

DVKLVESGGGLVKLGGS LKLSCAASGFTFSSYYMSWVRQ
TPEKRLELVAAI NSNGGSTYYPD TVKGRFTISRDN AKNT
LYLQMS SLKSEDTALYYCARHGGNYWYFDV WGAGTTVTV
SS (配列番号：14)。

【0195】

CBT-15Aの軽鎖可変cDNA配列：

【0196】

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTG
TCAGTTGGAGA GAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGT
CAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAA AGAACTACTTG
GCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGC
TGATT TACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTG
ATCGCTTTCACAGGCAGTGGATCT GGGACAGATTTCACTC
TCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA
TTACTGT CAGCAATATTATAGCTATCCGTACACGTTCGGA
GGGGGGGACCAAGCTGG AAATAAAA (配列番号：15)。

【0197】

CBT-15Aの軽鎖可変アミノ酸配列：

【0198】

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQS LLYSSNQKNYL
AWYQQKPGQSPK LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF
LTIS SVKAEDLAVYYCQQYYSPYTFGGG TKL EIK (配列番
号：16)。

【0199】

CBT-15Aの重鎖可変相補性決定領域 (VH CDR)：

【0200】

VH CDR1：GFTFSSYY (配列番号：17)。

【0201】

VH CDR2：INSNGGST (配列番号：18)。

【0202】

VH CDR3：ARHGGNYWYFDV (配列番号：19)。

【0203】

CBT-15Aの軽鎖可変相補性決定領域 (VL CDR)：

【0204】

VL CDR1：QS LLYSSNQKNY (配列番号：20)。

【0205】

VL CDR2：WAS (配列番号：21)。

【0206】

VL CDR3：QQYYSPYT (配列番号：22)。

【0207】

10

20

30

40

50

C B T - 1 5 G の重鎖および軽鎖の可変 c D N A およびアミノ酸配列も決定された。

【 0 2 0 8 】

C B T - 1 5 G の重鎖可変 c D N A 配列：

【 0 2 0 9 】

G A G G T C C A G C T G C A G C A G T C T G G G A C T G C G C T G G C A A G G
C C T G G G G C T T C C G T G A A G A T G T C C T G C A A G G C T T C T G G C
T A C A G C T T T A C C A G C T A C T G G A T G C A C T G G G T A A A A C A G
A G G C C T G G A C A G G G T C T A G A A T G G A T T G G T G C T A T T T A T C
C T G G A A A A A G T G A T A C T A G C T A C A A C C A G A A G T T C A A G G
G C A A G G C C A A A C T G A C T G C A G T C A C A T C C G C C A G C A C T G
C C T A C A T G G A G C T C A G C A G C C T G A C A A A T G A G G A C T C T G
C G G T C T A T T A C T G T A C A A G A T A T G G T A A G G G T G C T A T G G A
C T A C T G G G G T C A A G G A A C C T C A G T C A C C G T C T C C T C A (配
列番号：23)。

10

【 0 2 1 0 】

C B T - 1 5 G の重鎖可変アミノ酸配列：

【 0 2 1 1 】

E V Q L Q Q S G T A L A R P G A S V K M S C K A S G Y S F T S Y W M H W V K Q
R P G Q G L E W I G A I Y P G K S D T S Y N Q K F K G K A K L T A V T S A S T
A Y M E L S S L T N E D S A V Y Y C T R Y G K G A M D Y W G Q G T S V T V S S
(配列番号：24)。

20

【 0 2 1 2 】

C B T - 1 5 G の軽鎖可変 c D N A 配列：

【 0 2 1 3 】

G A C A T T G T G C T G A C C C A A T C T C A C A A A T T C A T G T C C A C A
T C A G T A G G A G A C A G G G T C A C C A T C A C C T G C A A G G C C A G T
C A G G A T G T G A A T A C T G C T G T A G C C T G G T A T C A A A A A A A
C C A G G G C A A T C T C C T A A A C T G C T G A T T T A C T G G G C A T C C A
C C C G G C T C A C T G G A G T C C C T G A T C G C T T C A C A G G C A G T G
G A T C T G G G A C A G A T T A T A C T C T C A C C A T C A G C A G T G T G C
A G G C T G A A G A C C T G G C A C T T T A T T A C T G T C A G C A A C A T T A
T A G T A C T C C G T A C A C G T T C G G A G G G G G G A C C A A G C T G G A
A A T A A A A (配列番号：25)。

30

【 0 2 1 4 】

C B T - 1 5 G の軽鎖可変アミノ酸配列：

【 0 2 1 5 】

D I V L T Q S H K F M S T S V G D R V T I T C K A S Q D V N T A V A W Y Q K K
P G Q S P K L L I Y W A S T R L T G V P D R F T G S G S G T D Y T L T I S S V
Q A E D L A L Y Y C Q Q H Y S T P Y T F G G G T K L E I K (配列番号：26)。

【 0 2 1 6 】

C B T - 1 5 G の重鎖可変相補性決定領域 (V H C D R)：

【 0 2 1 7 】

V H C D R 1：S Y W M H (配列番号：27)。

【 0 2 1 8 】

V H C D R 2：A I Y P G K S D T S Y N Q K F K G (配列番号：28)。

【 0 2 1 9 】

V H C D R 3：Y G K G A M D Y (配列番号：29)。

【 0 2 2 0 】

C B T - 1 5 G の軽鎖可変相補性決定領域 (V L C D R)：

【 0 2 2 1 】

50

V L C D R 1 : K A S Q D V N T A V A (配列番号 : 3 0) 。

【 0 2 2 2 】

V L C D R 2 : W A S T R L T (配列番号 : 3 1) 。

【 0 2 2 3 】

V L C D R 3 : Q Q H Y S T P Y T (配列番号 : 3 2) 。

【 0 2 2 4 】

したがって、いくつかの非限定的な実施形態では、本開示で提供される抗 D C L K 1 抗体は、G F T F S S Y Y (配列番号 : 1 7) を含む可変重鎖 C D R 1、I N S N G G S T を含む可変重鎖 C D R 2 (配列番号 : 1 8)、および A R H G G N Y W Y F D V (配列番号 : 1 9) を含む可変重鎖 C D R 3 を含む。いくつかの非限定的な実施形態において、本明細書で提供される抗 D C L K 1 抗体は、Q S L L Y S S N Q K N Y を含む可変軽鎖 C D R 1 (配列番号 : 2 0)、W A S を含む可変軽鎖 C D R 2 (配列番号 : 2 1)、および Q Q Y Y S Y P Y T (配列番号 : 2 2) を含む可変軽鎖 C D R 3 を含む。いくつかの非限定的な実施形態において、C D R 配列の 1、2、3、4、5、または 6 個は、1、2、または 3 個のアミノ酸置換を含む。いくつかの非限定的な実施形態では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

10

【 0 2 2 5 】

いくつかの非限定的な実施形態では、本明細書で提供される抗 D C L K 1 抗体は、S Y W M H (配列番号 : 2 7) を含む可変重鎖 C D R 1、A I Y P G K S D T S Y N Q K F K G (配列番号 : 2 8) を含む可変重鎖 C D R 2、および Y G K G A M D Y を含む可変重鎖 C D R 3 (配列番号 : 2 9) を含む。いくつかの非限定的な実施形態では、本明細書で提供される抗 D C L K 1 抗体は、K A S Q D V N T A V A (配列番号 : 3 0) を含む可変軽鎖 C D R 1、W A S T R L T を含む可変軽鎖 C D R 2 (配列番号 : 3 1)、および Q Q H Y S T P Y T を含む可変軽鎖 C D R 3 (配列番号 : 3 2) を含む。いくつかの非限定的な実施形態において、C D R 配列の 1、2、3、4、5、または 6 個は、1、2、または 3 個のアミノ酸置換を含む。いくつかの非限定的な実施形態では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

20

【 0 2 2 6 】

いくつかの非限定的な実施形態では、本明細書で提供される抗 D C L K 1 抗体は、本明細書に記載される特定の重鎖可変領域の配列 (例えば、配列番号 : 1 4 または配列番号 : 2 4) に対して少なくとも 8 0 % または少なくとも 9 0 % の配列同一性 (または本明細書に開示される他の % 同一性) を有する重鎖可変領域、および / または本明細書に記載される特定の軽鎖可変領域の配列 (例えば、配列番号 : 1 6 または配列番号 : 2 6) に対して少なくとも 8 0 % または少なくとも 9 0 % の配列同一性 (または本明細書に開示される他の % 同一性) を有する軽鎖可変領域を含む抗体またはその結合断片を含む。

30

【 0 2 2 7 】

D C L K 1 の過剰発現は、幹細胞性をサポートするマーカーの発現を促進する。

【 0 2 2 8 】

腎癌進行における D C L K 1 の役割を評価するために、D C L K 1 (アイソフォーム 2 ; D C L K 1 - l o n g -) は、レンチウイルス感染 (C a k i - 2 - d s R e d - D C L K 1) を介して C a k i - 2 R C C 細胞で過剰発現された。過剰発現はリアルタイム P C R およびウェスタンブロット法により確認され、ベクターコントロール感染細胞と比較して D C L K 1 m R N A レベルが 5 倍を超えて増加し、タンパク質発現が同等に増加することが明らかになった (C a k i - 2 - d s R e d ; 図 4 ~ 図 5)。D C L K 1 のアルファプロモーター駆動アイソフォームには、ダブルコルチン微小管結合ドメインがあり、細胞周期の調節に重要な微小管をしばしば伴う (L i n らの “ D C A M K L 1 e n c o d e s a p r o t e i n k i n a s e w i t h h o m o l o g y t o d o u b l e c o r t i n t h a t r e g u l a t e s m i c r o t u b u l e p o l y m e r i z a t i o n ” (D C A M K L 1 は、微小管重合を調節するダブルコルチンと相同性のあるプロテインキナーゼをコードする)、J . N e u r o s c i . , 2 0 (2 4) :

40

50

9152-61(2000))。蛍光顕微鏡検査により、dsRedタグ付きDCLK1過剰発現細胞における微小管/細胞骨格関連発現が明らかになった(図4)。

【0229】

以前の研究によれば、間葉系マーカーであるビメンチンは、RCC患者の全生存期間を予測することが可能である。さらに、本発明者らは、以前にDCLK1の標的化ノックダウンがRCCにおけるビメンチンの発現を劇的に減少させることを実証した。これらの以前の知見と一致して、DCLK1の過剰発現はビメンチンタンパク質の発現を誘発した(図4)。HIF-1は、腎癌の発生と幹細胞性に関与し、上皮細胞と間葉細胞の両方でヒストン脱アセチル化酵素3(HDAC3)の活性化を介してEMTを媒介し、嫌気性解糖を促進することで癌幹細胞の生成を維持する。以前、本発明者らは、DCLK1が低酸素下で誘導され、siRNA媒介DCLK1ノックダウンがHIF-1発現を減少させることを示した。本研究において、HIF-1 mRNAおよびタンパク質は、DCLK1の過剰発現により上方制御されることが示された(図4~図5)。アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH/ALDH1A1)は、患者の腫瘍原性の増加と無再発および全生存期間の減少に関連する数少ない推定RCC幹細胞マーカーの1つである。また、ALDHの高い活性は、食道、乳房、卵巣などを含む複数の腫瘍タイプの浸潤性と転移能の増加、およびウィルムス腫瘍の薬剤耐性を予測する。本発明者らは、RCCにおけるDCLK1ノックダウンがALDHの発現を有意に減少させることを以前に実証した。これらの知見と一致して、ALDHタンパク質発現は、DCLK1を過剰発現するCaki-2細胞で有意に上方制御され(図4)、ALDHがRCCにおける重要なDCLK1エフェクタータンパク質となり得ることを実証した。

【0230】

DCLK1過剰発現は、RCC増殖を増加させるが、細胞周期動態には影響を及ぼさない。

【0231】

以前の研究は、細胞増殖におけるDCLK1発現および他の腫瘍における細胞周期動態に直接関係していた(Weygantらの“Small molecule kinase inhibitor LRRK2-IN-1 demonstrates potent activity against colorectal and pancreatic cancer through inhibition of doublecortin-like kinase 1.”(小分子キナーゼ阻害剤LRRK2-IN-1は、ダブルコルチン様キナーゼ1の阻害を通じて結腸直腸および膵臓癌に対する強力な活性を実証する)、Molecular cancer, 13:103(2014);およびSurebanらの“XMD8-92 inhibits pancreatic tumor xenograft growth via a DCLK1-dependent mechanism.”(XMD8-92はDCLK1依存性メカニズムを介して膵臓腫瘍異種移植片の成長を阻害する)、Cancer letters, 351(1):151-61(2014))。DCLK1の過剰発現がRCCの増殖に影響するかどうかを判断するために、Caki2-dsRed-DCLK1およびCaki2-dsRed細胞を4重に播種し、24時間付着および増殖させた。MTTの取り込みは、DCLK1の過剰発現が、Caki-2細胞株における増殖を有意に増加させたことを実証した($P < 0.038$)(図6)。過剰発現がRCC細胞周期動態に何らかの影響を与えたかどうかを判断するために、FACSベースの細胞周期分析を実施した。対照細胞とDCLK1過剰発現細胞との間に顕著な変化は見られなかった(図7)。これらの知見は、RCCでの以前の研究と一致する細胞増殖におけるDCLK1の役割を裏付けている(Weygantらの“DCLK1 is a broadly dysregulated target against epithelial-mesenchymal transition, focal adhesion, and stemness in clear cell renal carcinoma.”(DCLK1は、明細胞腎癌における上皮間葉転換、焦点接着、および幹細胞性に対する広く調節不全の標的である。))、Oncotarget,

10

20

30

40

50

(4) : 2 1 9 3 - 2 0 5 (2 0 1 5)) 。

【 0 2 3 2 】

R C C における D C L K 1 の上方制御は、A L D H 癌幹細胞マーカーの過剰発現をもたらす。

【 0 2 3 3 】

R C C における A L D H の重要性および A L D H 発現の D C L K 1 駆動調節に関する知見を考慮して、これらのタンパク質間の関係を F A C S により評価した。A L D E F L U O R (登録商標) 試薬 (S t e m c e l l T e c h n o l o g i e s I n c . 、マサチューセッツ州ケンブリッジ市) および D C L K 1 抗体を使用して、A L D H + 細胞の大部分 (A C H N で 7 3 . 7 3 % 、 C a k i - 2 で 5 5 . 1 2 %) および D C L K 1 + 細胞のはるかに少ない割合 (A C H N で 7 . 4 7 % 、 C a k i - 2 で 1 7 . 8 7 %) 、 C a k i - 2 (1 . 5 1 %) および A C H N (0 . 5 4 %) が見られただけでなく、一部の二重陽性集団が A L D H / D C L K 1 の両方の細胞株で見られた (図 8 A ~ 図 8 B) 。さらに F A C S 分析により、C a k i - 2 細胞での D C L K 1 の過剰発現により A L D H + 細胞の数が約 7 % 増加したことが示された (図 9) 。これらの知見は、腎癌細胞株における A L D H / D C L K 1 + + 細胞の小さな亜集団の存在を実証し、D C L K 1 を A L D H 発現と A L D H + 細胞の増殖の両方に結び付ける。

10

【 0 2 3 4 】

A C H N R C C 系統は、クローン形成能が増加した細胞外 D C L K 1 + 亜集団を含む。

【 0 2 3 5 】

癌幹細胞または癌幹様細胞の細胞外マーカーは、標的療法の開発に非常に望ましい。F A C S 実験で観察された D C L K 1 + 細胞の少数の亜集団の一部は、細胞外 D C L K 1 を発現する可能性があるかと仮定した。この仮説を評価するために、D C L K 1 の細胞外ドメインを標的とするフルオロフォア結合一次抗体と非特異的染色の細胞を除外するフルオロフォア結合アイソタイプコントロールを使用した F A C S により、A C H N 細胞株から非透過性条件下で D C L K 1 + 細胞を選別した (図 1 0) 。F A C S に続いて、三次元コロニー形成アッセイのために細胞を細胞外マトリックスに直ちに播種した。2 週間の増殖の後、A C H N - D C L K 1 + 細胞は、A C H N - D C L K 1 - 細胞と比較して有意に多くのスフェロイド (> 2 5 %) を形成した (図 1 1) 。この知見は、クローン原性能力が強化された R C C 細胞の集団に細胞外 D C L K 1 が存在することを実証し、R C C 幹細胞性をサポートし、R C C 幹細胞マーカーとして D C L K 1 が果たす役割の証拠を提供する。

20

30

【 0 2 3 6 】

D C L K 1 発現は腎癌細胞の機能的幹細胞性を調節する。

【 0 2 3 7 】

薬物治療に反応したスフェロイドおよびコロニー形成能は、幹細胞または幹様細胞の明確な特徴である。D C L K 1 を s i R N A で標的化すると、R C C での 3 次元コロニー形成が阻害されることが以前に報告されている。これらの知見を展開するために、C a k i - 2 細胞株における D C L K 1 発現が、D C L K 1 に対する特定の s i R N A (s i D C L K 1) または 7 2 時間標的なしのスクランブル配列 s i R N A (s i S C R) を使用してノックダウンされた。D C L K 1 ノックダウンの成功を確認した後 (図 1 2) 、前記細胞を 0 . 5 μ M スニチニブで 7 2 時間処理し、トリパンプルー排除により生存率を評価した。次いで、前記細胞を成長因子が減少したマトリゲルに播種して、薬物処置後のコロニー形成能を評価した。s i S C R と比較して、s i D C L K 1 で処理した C a k i - 2 細胞 (図 1 3) で形成されたスフェロイド数の > 5 0 % の減少が 2 週間のコロニー形成後に観察された。R C C の機能的幹細胞性における D C L K 1 の役割をさらに評価するために、上記のように未処理または D M S O または 0 . 5 μ M スニチニブで 7 2 時間処理した C a k i - 2 - d s R e d - D C L K 1 および C a k i 2 - d s R e d 細胞を用いて、3 次元コロニー形成アッセイを実施した。2 週間の増殖後、3 つのグループすべてで D C L K 1 過剰発現細胞から形成されたコロニーの数が劇的に増加した (図 1 4) 。スフェロイド領域を評価するために前述した画像処理技術 (W e y g a n t らの “ D C L K 1 i s a

40

50

broadly dysregulated target against epithelial-mesenchymal transition, focal adhesion, and stemness in clear cell renal carcinoma.” (DCLK1は、明細胞腎癌における上皮間葉転換、焦点接着、および幹細胞性に対して広く調節不全の標的である)、Oncotarget、6(4):2193-205(2015))を使用して、三次元コロニーの平均サイズの有意な増加がDCLK1過剰発現細胞で見られた(図15)。未処理のスフェロイドの免疫染色により、Caki-2-dsRed-DCLK1細胞から形成されたコロニーでALDHが強く発現していることが明らかになったが、以前のFAC研究で予測されたように、Caki-2-dsRedコントロール細胞から形成されたコロニーでは微弱から低レベルの発現であった。これらの知見は共に、DCLK1がRCC足場非依存性の増殖、コロニー形成、および自己複製能力の重要な調節因子であることを示している。さらに、これらの知見は、RCCでの幹様細胞のマーカーおよびレギュレーターとしてのDCLK1の役割を裏付けている。

【0238】

DCLK1は、FDA承認RTKおよびmTOR阻害剤に対するRCC細胞の応答を調節する。

【0239】

RCCでの血管内皮成長因子(VEGF)およびその受容体の高レベルの発現は、その高度な血管の性質を支持し、VEGFおよびその受容体を治療標的にする。現在、受容体チロシンキナーゼ(RTK)の小分子阻害剤であるスニチニブとソラフェニブは、進行したRCCに対してFDAによって承認されている。本発明者らは、DCLK1がRCCでのRTK阻害剤への応答を調節する重要な因子である可能性を示唆する予備的証拠を以前に示した(Weygantらの“DCLK1 is a broadly dysregulated target against epithelial-mesenchymal transition, focal adhesion, and stemness in clear cell renal carcinoma.”(DCLK1は、明細胞腎癌における上皮間葉転換、焦点接着、および幹細胞性に対して広く調節不全の標的である)、Oncotarget、6(4):2193-205(2015))。幹細胞性と標的療法への反応との密接な関係、および患者の生存におけるその重要性を考慮して、このプロセスにおけるDCLK1の役割がさらに研究された。DCLK1を過剰発現するCaki-2細胞を96ウェルプレートに播種し、一晩付着させた後、スニチニブまたはソラフェニブの濃度を上げて処理した。次に、相対細胞生存率をMTTアッセイで評価した。DCLK1の過剰発現は、Caki-2細胞のスニチニブに対する感受性を有意に低下させることが判明したが(図16)、dsRedベクター対照細胞と比較してソラフェニブに対する有意な耐性を誘発しなかった(図17)。対照的に、72時間25nMのsiDCLK1で前処理されたACHNおよびCaki-2細胞は、siSCR対照と比較してスニチニブおよびソラフェニブの両方に対して著しく感作された(図18~図19)。

【0240】

細胞内セリン/トレオニンキナーゼmTORは、広範な経路に関与しており、細胞代謝および癌進行において重要な役割を果たす。エベロリムスやテムシロリムスなどのいくつかのmTOR阻害剤は、進行腎癌を含む一部の癌の治療薬として承認されている。DCLK1の発現はRTK阻害剤に応答して細胞の生存を調節するため、DCLK1の過剰発現がRCCをmTOR阻害剤に対して脱感作するかどうかを調べた。上記と同じプロトコルに従って、Caki-2細胞でのDCLK1の過剰発現は、エベロリムスおよびテムシロリムスに対する感受性を著しく低下させることが分かった。これらの結果は、DCLK1がRCCのFDA承認の主要な阻害剤に対する耐性を調節し、高レベルのDCLK1を発現するRCCがスニチニブよりもソラフェニブの影響を受けやすいことを示している。最後に、これらの知見は、DCLK1を標的にすることにより、現在承認されている薬物に対するRCC患者の反応が改善されることを示している。

【0241】

DCLK1およびPD-L1はRCC腫瘍で共発現される。

【0242】

プログラム細胞死リガンド-1 (PD-L1/CD274) は、腎臓癌を含む様々な腫瘍の細胞表面で発現されることが知られている免疫チェックポイントマーカーである。その発現は、腫瘍特異的T細胞上の受容体であるプログラム細胞死-1 (PD-1) に結合することにより免疫応答を負に調節し、細胞アポトーシスを引き起こし、活性化T細胞によって誘導される細胞溶解から腫瘍細胞を免れさせる。腎臓癌は化学療法と放射線療法にあまり反応しないが、PD-L1/PD-1相互作用を含む免疫療法および免疫チェックポイント戦略に焦点を当てた研究は、有望な結果を示している (Sznolらの“Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer.” (進行ヒト癌におけるPD-1およびB7-H1 (PD-L1) に対するアンタゴニスト抗体)、Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research (臨床的癌研究: 米国癌研究協会の公式ジャーナル)、19 (5): 1021-34 (2013); Pardoll DMの“The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.” (癌免疫療法における免疫チェックポイントの封鎖)、Nature reviews Cancer, 12 (4): 252-64 (2012); Brahmerらの“Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer.” (進行癌患者における抗PD-L1抗体の安全性と活性)、The New England Journal of Medicine, 366 (26): 2455-65 (2012); およびTopalianらの“Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity.” (PD-1/B7-H1 (PD-L1) 経路を標的にして抗腫瘍免疫を活性化する)、Current Opinion in Immunology, 24 (2): 207-12 (2012))。DCLK1とPD-L1がRCCで共発現しているかどうかを判断するために、高密度組織マイクロアレイを使用して免疫組織化学を実施し、その結果を経験豊富な病理学者が定量化した。PD-L1は、DCLK1について以前に報告されたものと同様の病期依存的な様式でRCCにおいて強く上方制御された (図20)。さらに、膜に局在したPD-L1を有する腫瘍は、細胞質PD-L1を有する腫瘍と比較して有意に高いDCLK1発現レベルを示した (図21)。

【0243】

DCLK1を標的とすることは、RCC細胞における免疫チェックポイントを阻害し、PBMC駆動性アポトーシスの増加をもたらす。

【0244】

組織マイクロアレイデータ、免疫チェックポイントと癌幹細胞との間の仮定されたリンク、および免疫チェックポイントをDCLK1によってサポートされるEMT表現型にリンクする新たなデータを考慮して、標的DCLK1ノックダウンがRCCを免疫療法に感作されるかどうかを評価した。これらの実験において、DCLK1の過剰発現は、Caki-2細胞でPD-L1を>2倍、CTLA4を>1.5倍、上方制御した (図22)。対照的に、25 nMのsiRNAまたは100 µg/mLのモノクローナル抗体CBT-15Aの72時間処理でDCLK1を標的化すると、PD-L1のタンパク質レベル発現が有意に減少した (図23) が、ACHNおよびCaki-2 RCC細胞では、CTLA4には影響しなかった (データは示していない)。

【0245】

これらの知見の機能的関連性をさらに評価するために、ACHN腎癌細胞およびAsPC-1膵臓癌細胞を96ウェルに播種し、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性アッセイに供し

た。簡単に説明すると、アイソタイプコントロールまたはC B T - 1 5 モノクローナル抗体のいずれかで48時間前処理した後、 10^4 個の癌細胞を各ウェルに播種した。次いで、ヒト末梢血単球を各ウェルに 10^5 個の細胞で播種し、72時間共培養した。72時間後、アポトーシスを評価するためにC A S P A C E G L O (登録商標) 3 / 7 活性アッセイ (P r o m e g a、ウィスコンシン州マディソン市) を実施した。対照処置療と比較して、カスパーゼ - 3 / 7 活性は、C B T - 1 5 A 処置療腎癌細胞およびC B T - 1 5 G 処置膵臓癌細胞で有意に増加し、C B T - 1 5 X 処置膵臓癌細胞でも増加した (図24A ~ 図24B)。これらの知見は、D C L K 1 を標的とするモノクローナル抗体が腎癌および膵臓癌に対する免疫療法として利用される可能性を示した。

【0246】

C B T - 1 5 D C L K 1 標的化抗体は、癌に対する免疫療法として使用することができる。

【0247】

C B T - 1 5 モノクローナル抗体の有効性を実証するために、腫瘍異種移植片をヒト腎腺癌 (A C H N) およびヒト膵臓腺癌 (S W 1 9 9 0 およびA s P C - 1) 細胞株から確立した。 0.5×10^6 細胞を8週齢の無胸腺ヌードマウスの脇腹に注射し、生成した腫瘍を 100mm^3 の平均体積まで増殖させた。この体積に達したら、C B T - 1 5 またはアイソタイプコントロールm A B を隔週で 25mg/kg 送達した。腫瘍体積の測定は、ほぼ1日おきに行った。注射開始から4週間後に、動物を殺処分し、腫瘍を摘出し、測定し、秤量した。

【0248】

C B T - 1 5 A m A b での治療は、アイソタイプm A B と比較して腎臓癌A C H N 異種移植片の成長を強く阻害した (図25; $p < 0.03$)。これは、治療終了時に摘出腫瘍体積 (図26; $p < 0.001$) および重量 (図27; $p < 0.01$) を測定することにより確認された。C B T - 1 5 A m A b は、摘出された腫瘍体積と腫瘍重量の有意な減少を引き起こした。これらの知見は、腎癌に対するD C L K 1 標的薬剤の強力なインビボ効力を初めて実証したものである。

【0249】

C B T - 1 5 G m A b での処置は、膵臓癌S W 1 9 9 0 異種移植片腫瘍形成を強く阻害し、摘出腫瘍体積の有意な減少および腫瘍重量の減少をもたらした (図28 ~ 図30)。

【0250】

C B T - 1 5 X m A b での処置は、膵臓癌S W 1 9 9 0 異種移植片腫瘍形成を強く阻害し、摘出腫瘍体積の有意な減少および腫瘍重量の減少をもたらした (図31 ~ 図33)。

【0251】

C B T - 1 5 X m A b での処置は、膵臓癌A s P C - 1 異種移植片腫瘍形成を強力に阻害し、摘出された腫瘍体積の有意な減少および腫瘍重量の減少をもたらした (図34 ~ 図36)。

【0252】

これらの知見は、細胞外D C L K 1 を標的とするモノクローナル抗体が、D C L K 1 アイソフォーム2および4を発現する腎癌および膵臓癌など (但し、これらに限定されない) の癌に対して非常に有効であることを実証している、

【0253】

腎癌は侵襲性が高く、生存率が低く、癌幹細胞の特徴と密接に関連している。腎細胞癌の特徴は、低成長、低酸素の微小環境、薬物および放射線療法に対する圧倒的な抵抗性である。これらの特徴は、腫瘍幹または幹様細胞の存在と一致している。本発明者らは最近、腫瘍幹細胞特異的マーカーであるD C L K 1 が明細胞腎細胞癌 (R C C) で後成的に調節不全および過剰発現され、そのダウンレギュレーションがこの疾患の転移 / 浸潤、焦点接着、および幹細胞性を阻害することを報告した。本開示はこれらの知見を広げ、D C L K 1 が機能的幹細胞性を媒介し、F D A 承認薬への耐性をもたらし、A L D H R C C 腫瘍幹細胞マーカーに連結すること、およびその細胞外発現がR C C におけるクローン原性

10

20

30

40

50

能力を強化した細胞をマークすることを実証している。さらに、DCLK1は免疫チェックポイントマーカーCTLA4およびPD-L1の発現を媒介することが示されており、新規DCLK1を標的とするモノクローナル抗体(CBT-15AおよびCBT-15G)による治療は、RCC細胞を免疫細胞媒介アポトーシスに感作させることができる。最後に、CBT-15 mAbは、RCC異種移植片の腫瘍形成を強力に抑制し、RCCのDCLK1を標的とする最初の生体内証拠を提示する。

【0254】

上記の説明から、本開示の様々な実施形態において、それらの真の精神から逸脱することなく様々な改変および変更を行うことができることが理解されるであろう。本明細書で提供される説明は、例示の目的のみを意図しており、特に示されている場合を除き、限定的な意味で解釈されることを意図していない。したがって、本開示は、特定の非限定的な実施形態に関連して本明細書で説明しており、その態様がより完全に理解され認識されるが、本開示がこれらの特定の実施形態に限定されることを意図するものではない。それどころか、すべての代替物、改変物、および均等物が、本明細書で定義される本開示の範囲内に含まれることが意図される。したがって、特定の実施形態を含む上記の実施例は、本開示の実施を例示するのに役立ち、示された詳細は例示的なものであり、特定の実施形態のみの例示的な説明の目的のためであり、手順、ならびに本発明の概念の原理および概念的側面の有用かつ容易に理解される説明であると考えられるものを提供するという理由で提示される。本開示の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の様々な成分および組成物の製剤、本明細書に記載の方法、または本明細書に記載の方法の工程または工程の順序に変更を加えることができる。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

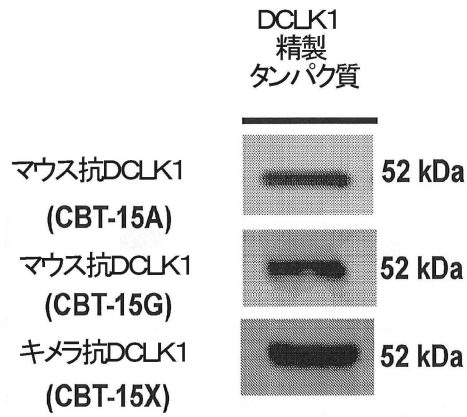


図 1

【図 2】

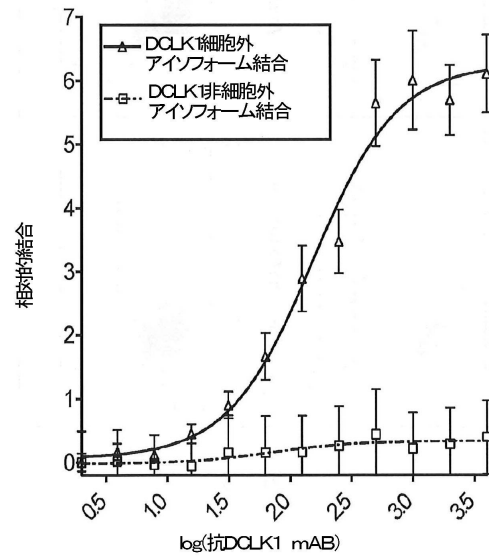


図 2

【図 3】

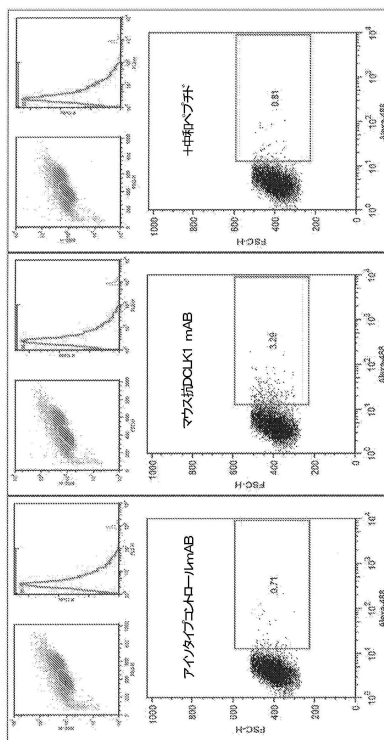


図 3

【図 4】

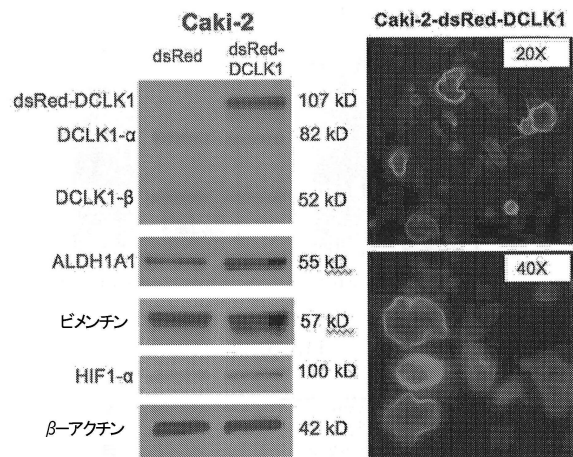


図 4

10

20

30

40

50

【図 5】

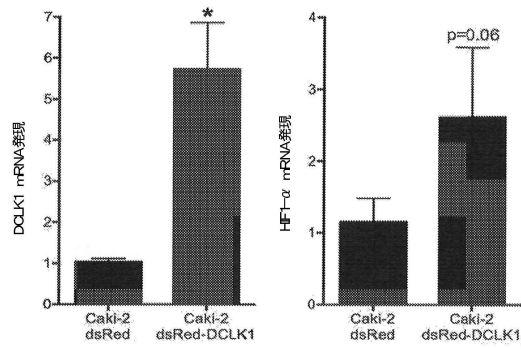


図 5

【図 6】

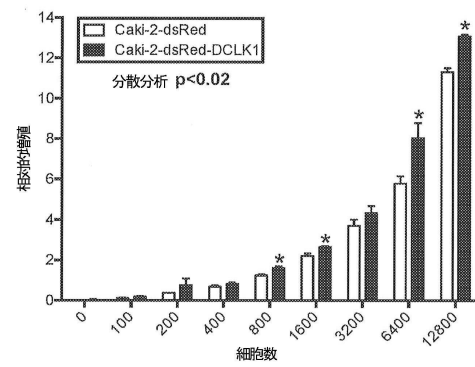


図 6

【図 7】

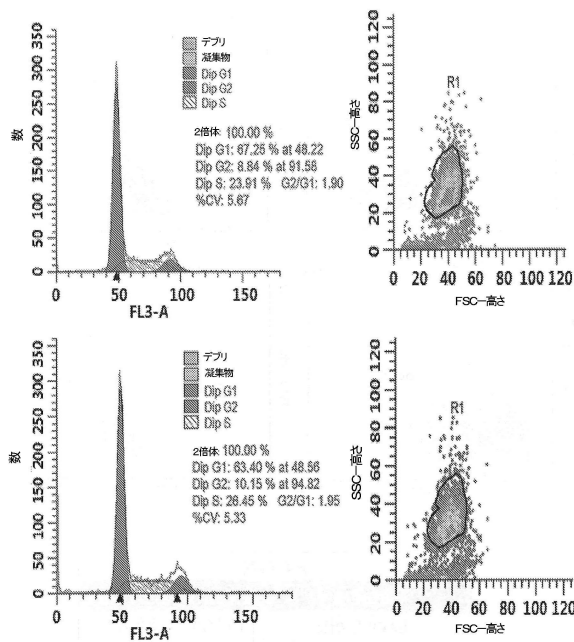
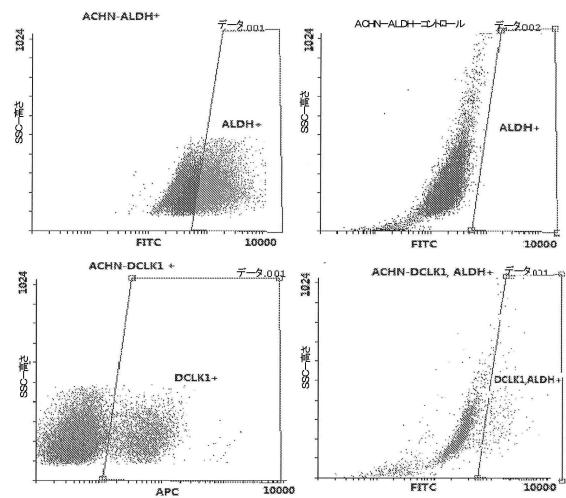


図 7

【図 8 A】



ACHN		
種類	事象	% 事象
生細胞	17164	85.82
ALDH+	14746	73.73
DCLK1+	1493	7.47
ALDH/DCLK1++	107	0.54

図 8A

10

20

30

40

50

【図 8 B】

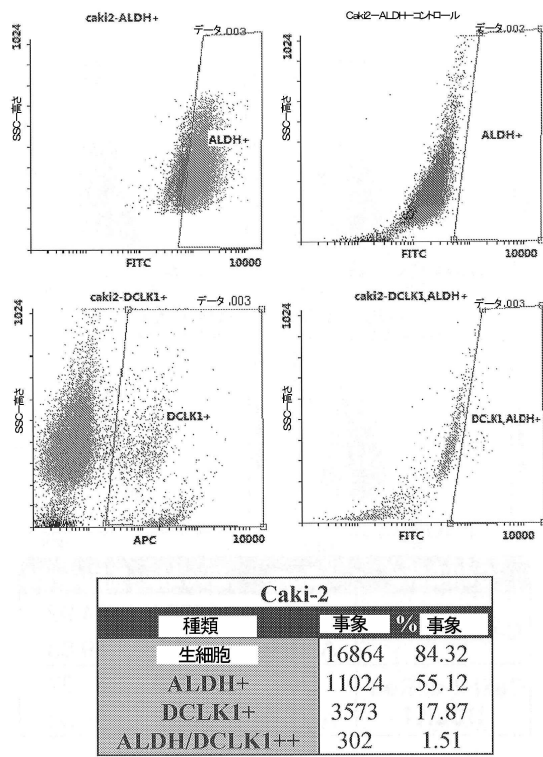


図 8B

【図 9】

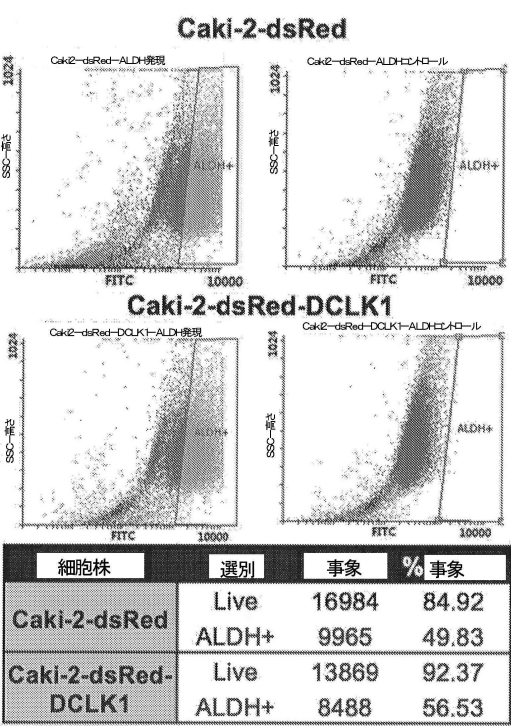


図 9

【図 10】

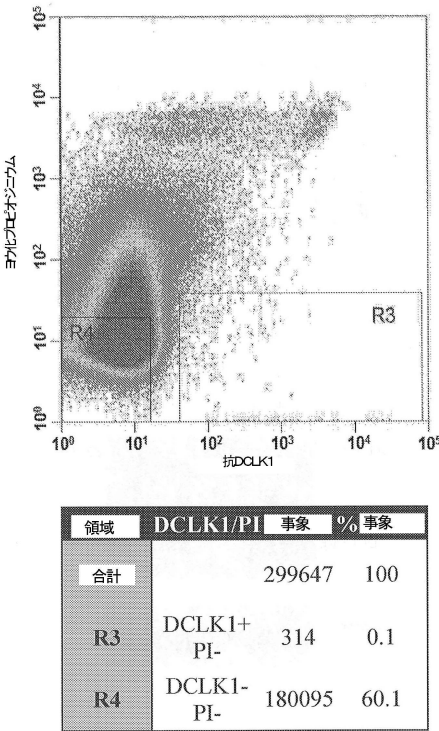


図 10

【図 11】

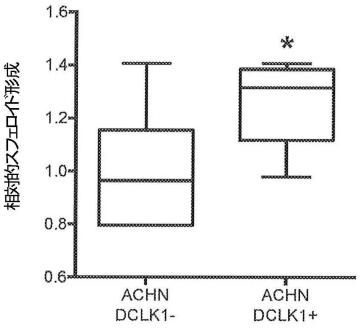


図 11

10

20

30

40

50

【 図 1 2 】

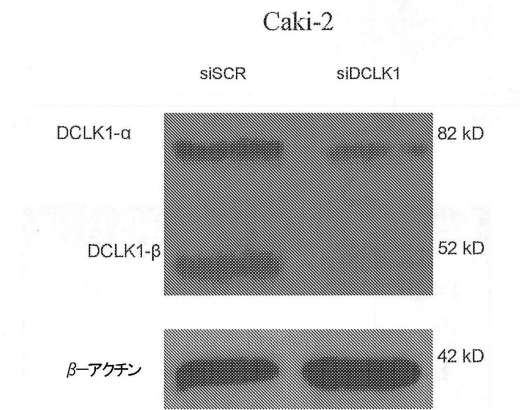
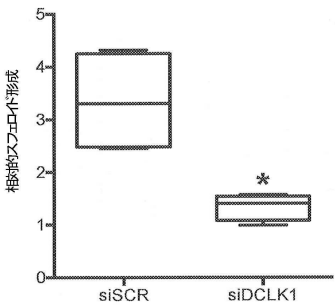


図 12

【 図 1 3 】



10

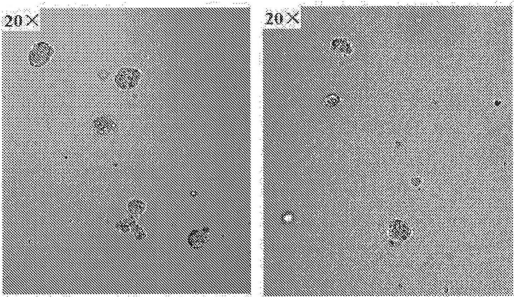


図 13

20

【 図 1 4 】

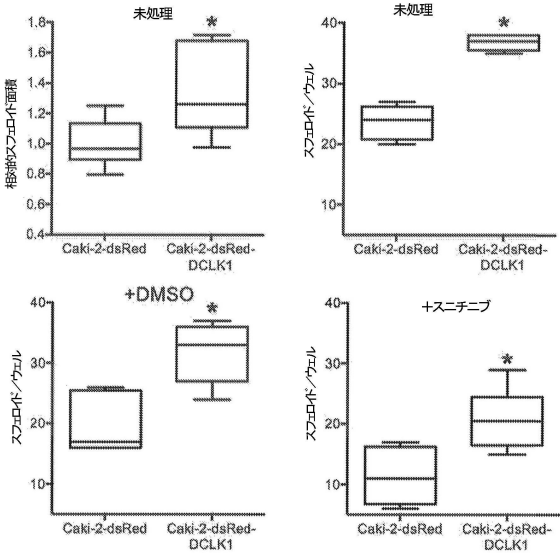


図 14

【 図 1 5 】

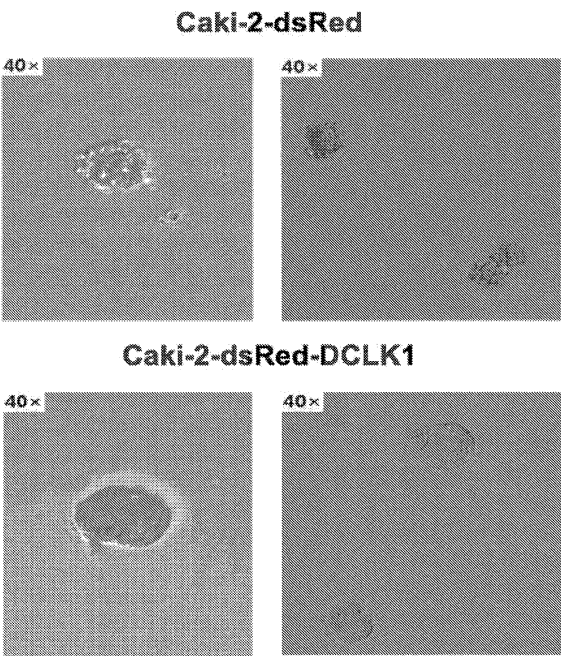


図 15

30

40

【図 16】

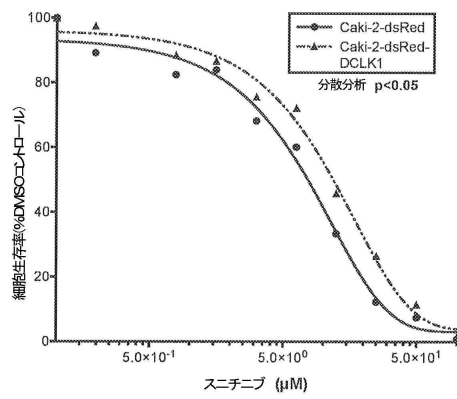


図 16

【図 17】

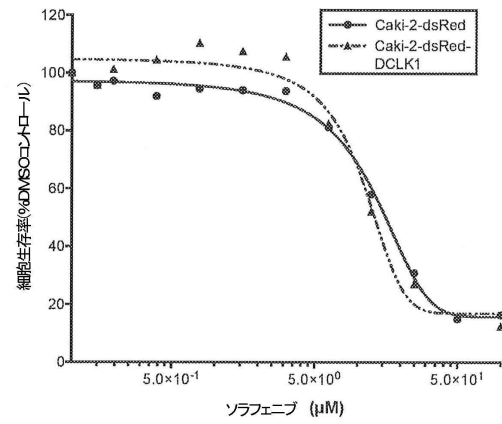


図 17

【図 18】

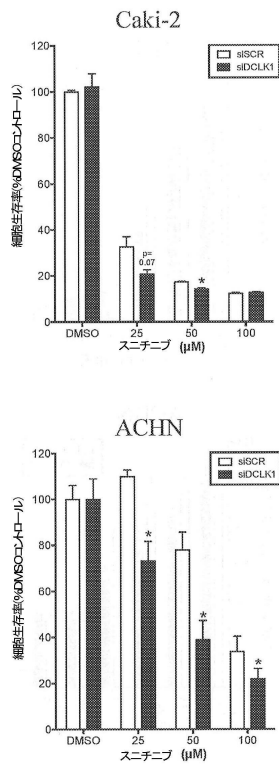


図 18

【図 19】

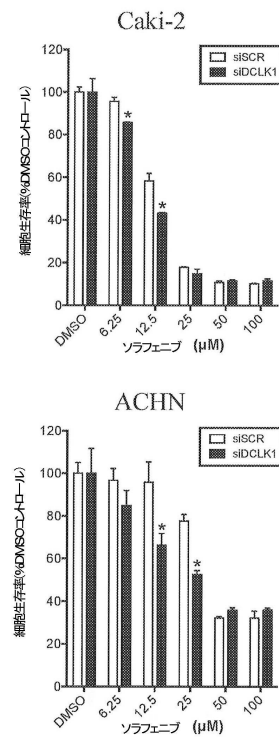


図 19

10

20

30

40

50

【図 2 0】

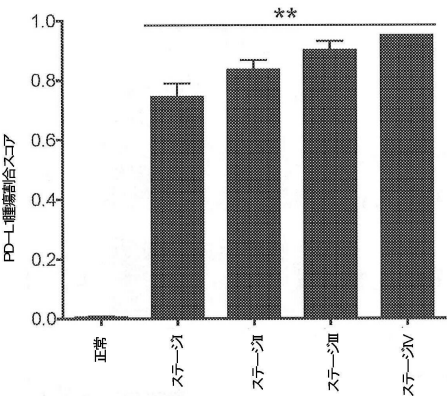


図 20

【図 2 1】

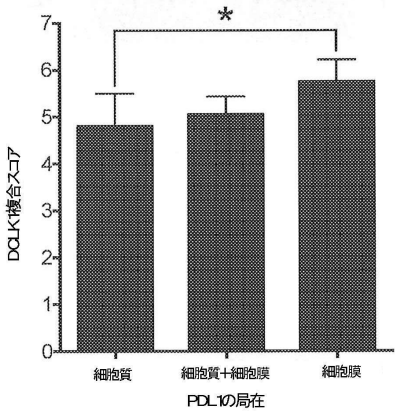


図 21

【図 2 2】

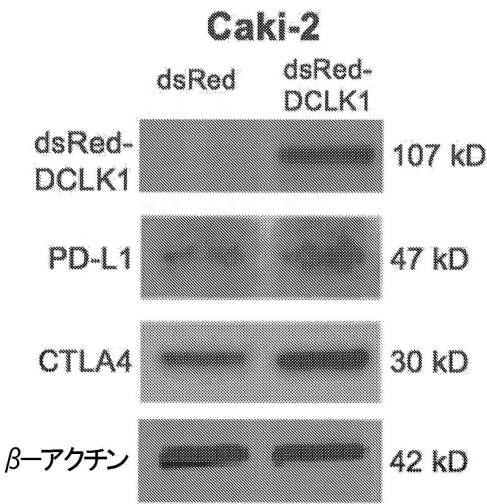


図 22

【図 2 3】

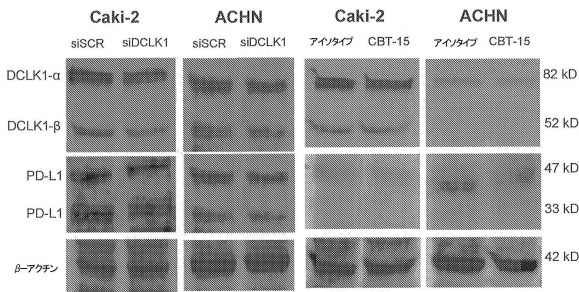


図 23

10

20

30

40

50

【図 24 A】

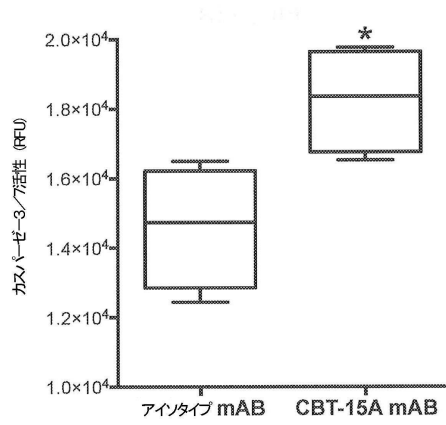


図 24A

【図 24 B】

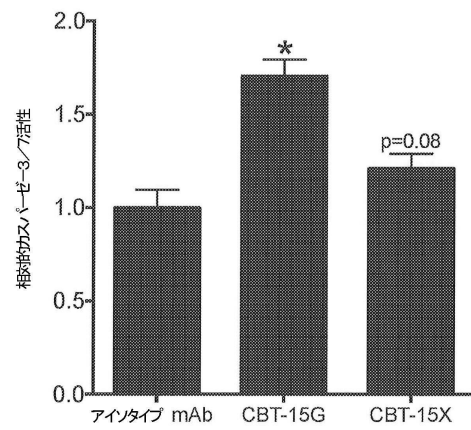


図 24B

【図 25】

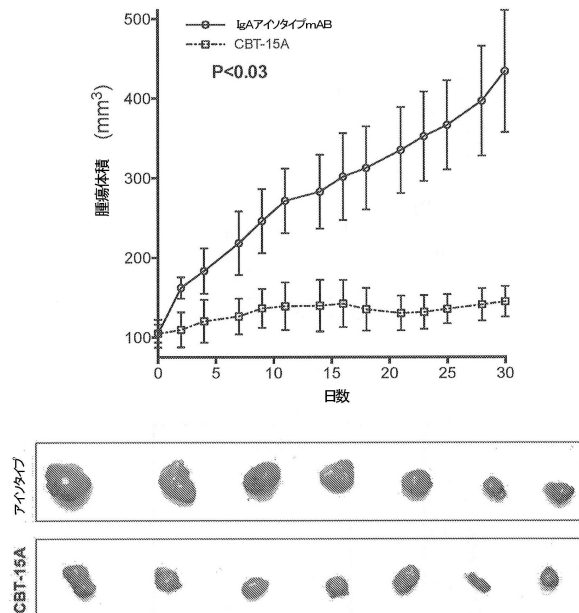


図 25

【図 26】

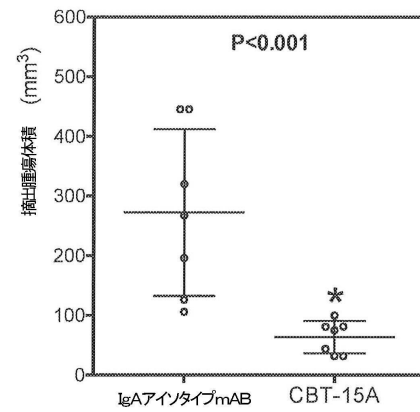


図 26

10

20

30

40

50

【図 27】

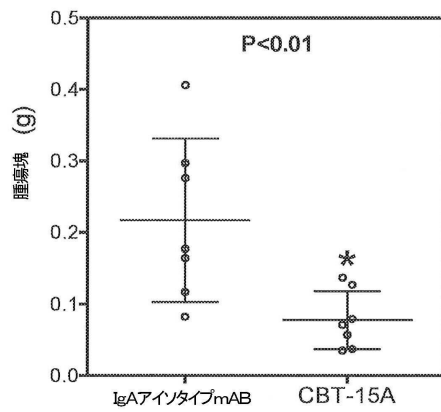


図 27

【図 28】

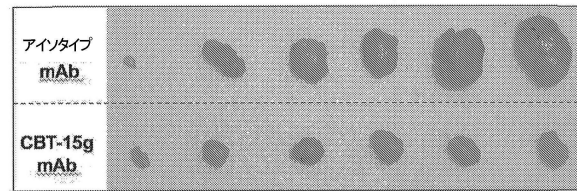
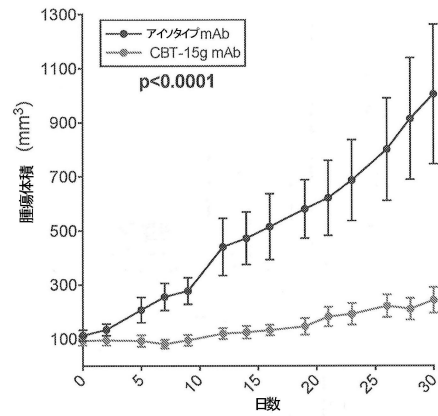


図 28

【図 29】

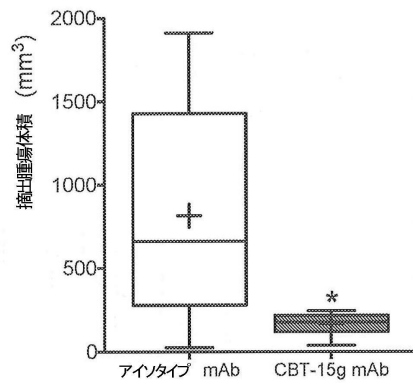


図 29

【図 30】

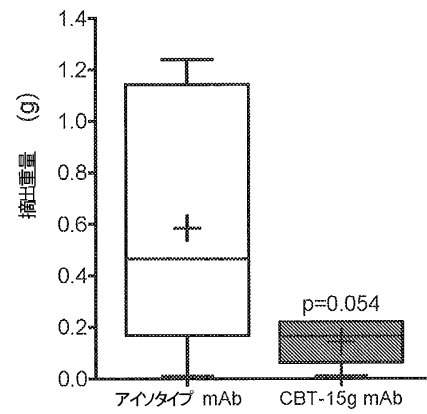


図 30

10

20

30

40

50

【図 3 1】

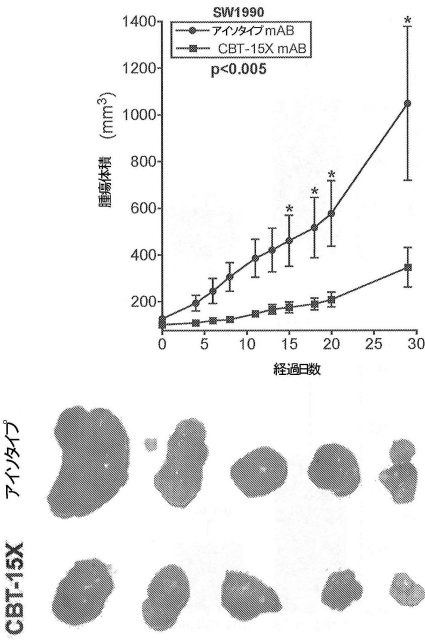


図 31

【図 3 2】

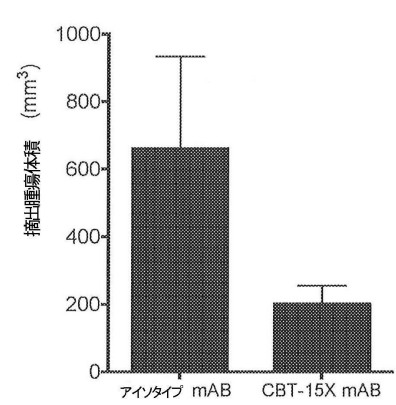


図 32

10

20

【図 3 3】

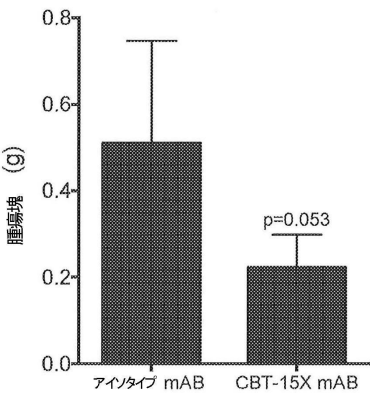


図 33

【図 3 4】

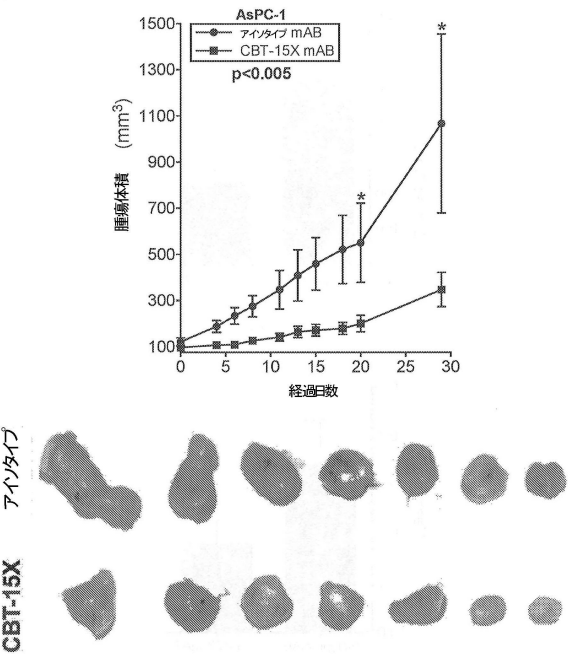


図 34

30

40

50

【 図 3 5 】

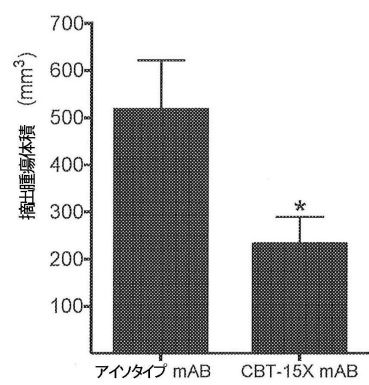


図 35

【 図 3 6 】

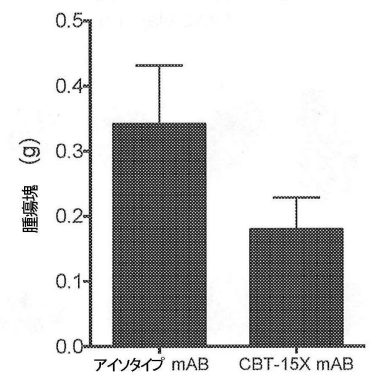


図 36

10

【 配 列 表 】

0007366755000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
			G 0 1 N	33/574	A

- (72)発明者 アメリカ合衆国, 7 3 0 6 4 オクラホマ州, ムスタング, エヌ. ゲロニモ ウェイ 7 0 8
ク, ドングフェング
- (72)発明者 アメリカ合衆国, 7 3 0 3 4 オクラホマ州, エドモンド, フォックス ヒル テラス 3 3 3 4
メイ, ランダー
- (72)発明者 アメリカ合衆国, 7 3 1 1 8 オクラホマ州, オクラホマ シティー, エヌダブリュー 3 2 エヌデ
ィ ストリート 1 0 0 4
- (72)発明者 チャンドレイクサン, パーササラシー
- (72)発明者 アメリカ合衆国, 7 3 0 1 2 オクラホマ州, エドモンド, ブリッドリングトン ドライヴ 1 8 2
0 1
- (72)発明者 ベリー, ウィリアム, エル.
- (72)発明者 アメリカ合衆国, 7 3 0 1 2 オクラホマ州, エドモンド, エヌダブリュー 1 9 6 ティエイッチ
ストリート 1 8 0 4

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 5 6 9 7 2 (U S , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

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

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

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d