

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-104409

(P2018-104409A)

(43) 公開日 平成30年7月5日(2018.7.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/40 (2006.01)</b>	C07K 16/40	ZNA 2G045
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00	A 4B064
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C07K 16/46	4C084
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395	N 4C085
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61K 39/395	T 4H045

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 109 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-223676 (P2017-223676)	(71) 出願人	516324537
(22) 出願日	平成29年11月21日 (2017.11.21)		アッヴィ・ステムセントリックス・エルエルシー
(62) 分割の表示	特願2013-554656 (P2013-554656) の分割		アメリカ合衆国イリノイ州60064-6400, ノース・シカゴ, ノース・ワウキガン・ロード 1
原出願日	平成24年2月17日 (2012.2.17)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	61/444, 614		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成23年2月18日 (2011.2.18)	(74) 代理人	100118902
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 修
(31) 優先権主張番号	PCT/US2011/050451	(74) 代理人	100106208
(32) 優先日	平成23年9月2日 (2011.9.2)		弁理士 宮前 徹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規モジュレーターと使用の方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 過剰増殖性障害とその拡張、再発、再燃、又は転移を予防、治療、又は改善する組成物及びその使用方法の提供。

【解決手段】 新生物障害の治療、診断、又は予防のためのプロテインキナーゼ7 (PTK7) モジュレーター (抗PTK7抗体及び融合構築体が含まれる) の使用に関する。特に、腫瘍始原細胞頻度の低下を含んでなる、悪性腫瘍の免疫療法的治療への、そのようなPTK7モジュレーターの使用。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

単離された P T K 7 モジュレーター。

**【請求項 2】**

P T K 7 モジュレーターが P T K 7 アンタゴニストを含む、請求項 1 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

**【請求項 3】**

P T K 7 モジュレーターが抗体又はその免疫反応性断片を含む、請求項 1 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

**【請求項 4】**

抗体又はその免疫反応性断片がモノクローナル抗体を含む、請求項 3 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

**【請求項 5】**

モノクローナル抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体からなる群より選択される、請求項 4 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

**【請求項 6】**

前記モノクローナル抗体が中和抗体を含む、請求項 4 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

**【請求項 7】**

前記モノクローナル抗体が内在化抗体を含む、請求項 4 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

**【請求項 8】**

前記モノクローナル抗体が、アイソフォーム a、アイソフォーム b、アイソフォーム c、及びアイソフォーム d からなる群より選択される P T K 7 アイソフォームと会合する抗体を含む、請求項 4 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

**【請求項 9】**

前記モノクローナル抗体がアイソフォーム a と会合する抗体を含む、請求項 8 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

**【請求項 10】**

前記モノクローナル抗体が 3 つの相補性決定領域を有する軽鎖可変領域と 3 つの相補性決定領域を有する重鎖可変領域とを含み、ここで重鎖及び軽鎖の相補性決定領域は、図面 6 A 及び図面 6 B に示す相補性決定領域を含む、請求項 9 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

**【請求項 11】**

前記モノクローナル抗体が軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、ここで前記軽鎖可変領域は、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 48、配列番号 50、配列番号 52、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 58、及び配列番号 60 に示されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、そしてここで前記重鎖可変領域は、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 53、配列番号 55、配列番号 57、配列番号 59、及び配列番号 61 に示されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

**【請求項 12】**

細胞傷害剤をさらに含んでなる、請求項 10 又は 11 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

請求項 10 又は 11 に記載の単離された P T K 7 モジュレーターの P T K 7 への結合を少なくとも約 40% 阻害する競合抗体を含んでなる、単離された P T K 7 モジュレーター。

## 【請求項 14】

請求項 11 に記載のアミノ酸重鎖可変領域又はアミノ酸軽鎖可変領域をコードする核酸。

## 【請求項 15】

請求項 14 に記載の核酸を含んでなるベクター。

## 【請求項 16】

配列番号 3 に示されるアミノ酸配列又はその断片を含んでなる、請求項 1 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

## 【請求項 17】

P T K 7 モジュレーターが免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部をさらに含む、請求項 16 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

## 【請求項 18】

モジュレーターが、それを必要とする被検者への投与時に腫瘍始原細胞の頻度を低下させる、請求項 1 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

## 【請求項 19】

頻度の低下が、腫瘍始原細胞について濃縮することが知られている腫瘍細胞表面マーカーのフローサイトメトリー分析を使用して決定される、請求項 18 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

## 【請求項 20】

頻度の低下が、腫瘍始原細胞について濃縮することが知られている腫瘍細胞表面マーカーの免疫組織化学検出を使用して決定される、請求項 18 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

## 【請求項 21】

前記腫瘍始原細胞が腫瘍永続化細胞を含む、請求項 18 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

## 【請求項 22】

細胞傷害剤をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

## 【請求項 23】

請求項 1 に記載の単離された P T K 7 モジュレーターを含んでなる医薬組成物。

## 【請求項 24】

前記単離された P T K 7 モジュレーターがモノクローナル抗体を含む、請求項 23 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 25】

前記モノクローナル抗体がヒト化抗体を含む、請求項 24 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 26】

前記ヒト化抗体が、h S C 6 . 23、h S C 6 . 24、h S C 6 . 41、及び h S C 6 . 58 からなる群より選択される抗体を含む、請求項 25 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 27】

前記 P T K 7 モジュレーターが汎 P T K 7 モジュレーターを含む、請求項 1 に記載の単離された P T K 7 モジュレーター。

## 【請求項 28】

治療有効量の P T K 7 モジュレーターを、それを必要とする被検者へ投与することを含んでなる、P T K 7 関連障害を治療する方法。

## 【請求項 29】

前記 P T K 7 モジュレーターが P T K 7 アンタゴニストを含む、請求項 28 に記載の方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 30】

前記 PTK7 モジュレーターが抗体又はその免疫反応性断片を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

抗体又はその免疫反応性断片がモノクローナル抗体を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

モノクローナル抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体からなる群より選択される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記モノクローナル抗体が軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、ここで前記軽鎖可変領域は、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 48、配列番号 50、配列番号 52、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 58、及び配列番号 60 に示されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、そしてここで前記重鎖可変領域は、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 53、配列番号 55、配列番号 57、配列番号 59、及び配列番号 61 に示されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 60% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 32 に記載の方法。

10

20

【請求項 34】

前記モノクローナル抗体がヒト化抗体である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記モノクローナル抗体が中和抗体を含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 36】

前記モノクローナル抗体が内在化抗体を含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 37】

前記内在化抗体が細胞傷害剤を含む、請求項 36 に記載の方法。

30

【請求項 38】

前記 PTK7 関連障害が過剰増殖性障害を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 39】

前記過剰増殖性障害が新生物障害を含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記新生物障害が固形腫瘍を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

新生物障害が、副腎癌、膀胱癌、子宮頸部癌、子宮内膜癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、結直腸癌、膵臓癌、前立腺癌、又は乳癌を含む、請求項 40 に記載の方法。

40

【請求項 42】

前記新生物障害が血液系腫瘍を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 43】

前記血液系腫瘍が白血病又はリンパ腫を含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記新生物障害に罹患している被検者が、腫瘍始原細胞を含んでなる腫瘍を明示する、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 45】

腫瘍始原細胞の頻度を前記被検者において低下させる工程をさらに含んでなる、請求項 44 に記載の方法。

50

## 【請求項 4 6】

頻度の低下が、腫瘍始原細胞について濃縮することが知られている腫瘍細胞表面マーカーのフローサイトメトリー分析、又は腫瘍始原細胞について濃縮することが知られている腫瘍細胞表面マーカーの免疫組織化学検出を使用して決定される、請求項 4 5 に記載の方法。

## 【請求項 4 7】

頻度の低下が、*in vitro* 又は *in vivo* の限界希釈分析を使用して決定される、請求項 4 5 に記載の方法。

## 【請求項 4 8】

頻度の低下が、生きたヒト腫瘍細胞の免疫不全マウス中への移植を含んでなる *in vivo* 限界希釈分析を使用して決定される、請求項 4 7 に記載の方法。 10

## 【請求項 4 9】

*in vivo* 限界希釈分析を使用して決定される頻度の低下が、ポアソン分布統計を使用する腫瘍始原細胞頻度の定量を含む、請求項 4 8 に記載の方法。

## 【請求項 5 0】

頻度の低下が、生きたヒト腫瘍細胞の *in vitro* コロニー支持条件中への限界希釈沈着を含んでなる *in vitro* 限界希釈分析を使用して決定される、請求項 4 7 に記載の方法。

## 【請求項 5 1】

*in vivo* 限界希釈分析を使用して決定される頻度の低下が、ポアソン分布統計を使用する腫瘍始原細胞頻度の定量を含む、請求項 5 0 に記載の方法。 20

## 【請求項 5 2】

抗癌剤を投与する工程をさらに含んでなる、請求項 2 8 に記載の方法。

## 【請求項 5 3】

前記 P T K 7 モジュレーターが配列番号 3 に示されるアミノ酸配列又はその断片を含む、請求項 2 8 に記載の方法。

## 【請求項 5 4】

前記 P T K 7 モジュレーターが汎 P T K 7 モジュレーターを含む、請求項 2 8 に記載の方法。

## 【請求項 5 5】

腫瘍始原細胞の頻度を、それを必要とする被検者において低下させる方法であって、前記被検者へ P T K 7 モジュレーターを投与する工程を含んでなる、前記方法。 30

## 【請求項 5 6】

腫瘍始原細胞が腫瘍永続化細胞を含む、請求項 5 5 に記載の方法。

## 【請求項 5 7】

前記腫瘍永続化細胞が C D 4 4<sup>+</sup>細胞又は C D 1 3 3<sup>+</sup>細胞である、請求項 5 6 に記載の方法。

## 【請求項 5 8】

前記 P T K 7 モジュレーターが抗体を含む、請求項 5 5 に記載の方法。

## 【請求項 5 9】

前記抗体がモノクローナル抗体を含む、請求項 5 8 に記載の方法。 40

## 【請求項 6 0】

前記モノクローナル抗体が細胞傷害剤をさらに含む、請求項 5 9 に記載の方法。

## 【請求項 6 1】

被検者が、副腎癌、膀胱癌、子宮頸部癌、子宮内膜癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、結直腸癌、膵臓癌、前立腺癌、及び乳癌からなる群より選択される新生物障害に罹患している、請求項 5 5 に記載の方法。

## 【請求項 6 2】

腫瘍始原細胞の頻度が少なくとも 1 0 % 低下する、請求項 5 5 に記載の方法。

## 【請求項 6 3】

頻度の低下が、腫瘍始原細胞について濃縮することが知られている腫瘍細胞表面マーカー 50

ーのフローサイトメトリー分析、又は腫瘍始原細胞について濃縮することが知られている腫瘍細胞表面マーカーの免疫組織化学検出を使用して決定される、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 4】

血液系腫瘍に罹患している被検者へ P T K 7 モジュレーターを投与する工程を含んでなる、前記被検者を治療する方法。

【請求項 6 5】

前記 P T K 7 モジュレーターがモノクローナル抗体を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

P T K 7 モジュレーターを被検者へ投与する工程を含んでなる、被検者における腫瘍を抗癌剤での治療のために増感させる方法。

10

【請求項 6 7】

前記 P T K 7 モジュレーターが抗体を含む、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記腫瘍が固形腫瘍である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記抗癌剤が化学療法剤を含む、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記抗癌剤が免疫療法剤を含む、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 7 1】

過剰増殖性障害を、それを必要とする被検者において診断する方法であって：  
前記被検者より組織試料を入手する工程；  
該組織試料を少なくとも 1 つの P T K 7 モジュレーターと接触させる工程；及び  
該試料と会合した P T K 7 モジュレーターを検出又は定量する工程を含んでなる、前記方法。

20

【請求項 7 2】

P T K 7 モジュレーターがモノクローナル抗体を含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

抗体がレポーターと機能可能的に会合している、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

P T K 7 モジュレーターを含んでなる容器 (receptacle) と P T K 7 関連障害を治療又は診断するのに前記 P T K 7 モジュレーターを使用するための指示書 (instructional materials) とを含んでなる、P T K 7 関連障害を診断するか又は治療するのに有用な製造品。

30

【請求項 7 5】

前記 P T K 7 モジュレーターがモノクローナル抗体である、請求項 7 4 に記載の製造品。

【請求項 7 6】

容器が読取り可能プレートを含む、請求項 7 4 に記載の製造品。

【請求項 7 7】

少なくとも 1 つの内蔵 P T K 7 モジュレーターの治療有効量を投与する工程を含んでなる、新生物障害に罹患している被検者を治療する方法。

40

【請求項 7 8】

前記 P T K 7 モジュレーターが抗体を含む、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記抗体がモノクローナル抗体を含む、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

モノクローナル抗体が細胞傷害剤をさらに含む、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

抗癌剤を投与する工程をさらに含んでなる、請求項 8 0 に記載の方法。

50

- 【請求項 8 2】  
少なくとも 1 つの中和 P T K 7 モジュレーターの治療有効量を投与する工程を含んでなる、新生物障害に罹患している被検者を治療する方法。
- 【請求項 8 3】  
前記 P T K 7 モジュレーターが抗体を含む、請求項 8 2 に記載の方法。
- 【請求項 8 4】  
前記抗体がモノクローナル抗体を含む、請求項 8 3 に記載の方法。
- 【請求項 8 5】  
前記モノクローナル抗体がヒト化抗体を含む、請求項 8 4 に記載の方法。
- 【請求項 8 6】 10  
前記ヒト化抗体が細胞傷害剤をさらに含む、請求項 8 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 7】  
新生物障害が、副腎癌、膀胱癌、子宮頸部癌、子宮内膜癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、結直腸癌、膵臓癌、前立腺癌、及び乳癌からなる群より選択される、請求項 8 2 に記載の方法。
- 【請求項 8 8】  
腫瘍始原細胞を P T K 7 モジュレーターと接触させる工程を含んでなる、前記腫瘍始原細胞の集団を同定する、単離する、分画する、又は濃縮する方法。
- 【請求項 8 9】 20  
前記 P T K 7 モジュレーターが抗体を含む、請求項 8 8 に記載の方法。
- 【請求項 9 0】  
ヒト化抗体を含んでなる P T K 7 モジュレーターであって、前記ヒト化抗体は軽鎖可変領域と重鎖可変領域とを含み、ここで前記軽鎖可変領域は、配列番号 6 2、配列番号 6 4、配列番号 6 6、及び配列番号 6 8 に示されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 6 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、そしてここで前記重鎖可変領域は、配列番号 6 3、配列番号 6 5、配列番号 6 7、及び配列番号 6 9 に示されるアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 6 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、前記 P T K 7 モジュレーター。
- 【請求項 9 1】 30  
医薬有効量の P T K 7 モジュレーターを投与する工程を含んでなる、転移を阻害するか又は予防することを、それを必要とする被検者においてする方法。
- 【請求項 9 2】  
被検者が P T K 7 モジュレーターの投与の前又は後に腫瘍減量術を受ける、請求項 9 1 に記載の方法。
- 【請求項 9 3】  
前記腫瘍減量術が少なくとも 1 つの抗癌剤の投与を含む、請求項 9 2 に記載の方法。
- 【請求項 9 4】  
医薬有効量の P T K 7 モジュレーターを投与する工程を含んでなる、維持療法を、それを必要とする被検者に実施する方法。
- 【請求項 9 5】 40  
前記被検者が P T K 7 モジュレーターの投与に先立って新生物障害について治療された、請求項 9 4 に記載の方法。
- 【請求項 9 6】  
P T K 7 モジュレーターを投与する工程を含んでなる、過剰増殖性障害に罹患している被検者において腫瘍始原細胞を枯渇する方法。
- 【請求項 9 7】  
P T K 7 モジュレーターを投与する工程を含んでなる、P T K 7 関連障害の *in vivo* での診断、検出、又はモニタリングを、それを必要とする被検者においてする方法。
- 【請求項 9 8】 50  
循環腫瘍細胞を P T K 7 モジュレーターと接触させる工程を含んでなる、P T K 7 関連

障害の診断、検出、又はモニタリングを、それを必要とする被検者においてする方法。

【請求項 99】

前記接触させる工程が *in vivo* で生じる、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 100】

前記接触させる工程が *in vitro* で生じる、請求項 98 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照される特許出願

【001】 本出願は、そのそれぞれがその全体において参照により本明細書に組み込まれる、米国仮特許出願シリアル番号：61/444,614 (2011年2月18日出願) 及び特許協力条約 (PCT) 番号：PCT/US2011/050451 (2011年9月2日出願) に対する優先権を主張する。

10

【0002】

配列表

【002】 本出願は、EFS-WebよりASCII形式で提出されて、その全体において参照により本明細書に組み込まれる「配列表」を含有する。2012年1月26日に作成された前記ASCIIコピーは、112304PCT.txtと指定されて、サイズは、163,049バイトである。

【0003】

技術分野

【003】 本出願は、新規組成物と、過剰増殖性障害とその拡張、再発 (recurrence)、再燃 (relapse)、又は転移を予防、治療、又は改善することにおけるそれらの使用の方法に概して関する。広い側面において、本発明は、新生物障害の治療、診断、又は予防のためのプロテインキナーゼ7 (PTK7) モジュレーター (抗PTK7抗体及び融合構築体が含まれる) の使用に関する。本発明の特に好ましい態様は、腫瘍始原細胞頻度の低下を含んでなる、悪性腫瘍の免疫療法的治療への、そのようなPTK7モジュレーターの使用を提供する。

20

【背景技術】

【0004】

【004】 幹細胞及び前駆細胞の分化と細胞増殖は、器官形成の間の組織成長とすべての生存生物の生涯の間でのほとんどの組織の細胞の置換及び修復とを支援するように協奏的に作用する、正常な進行プロセスである。分化と増殖の決定は、多くの場合、細胞運命の決定と組織構造とを維持するように均衡している数多くの因子及びシグナルによって制御される。正常な組織構造は、通常、細胞分裂と組織成熟化とを調節する微小環境の合図へ応答する細胞によって維持される。従って、細胞の増殖及び分化が正常に起こるのは、損傷を受けた細胞又は瀕死の細胞の置換のために、又は成長のために必要な場合だけである。残念ながら、例えば、様々なシグナル伝達性化学物質の過少又は過剰、改変した微小環境の存在、遺伝子の突然変異、又はこれらの何らかの組合せが含まれる無数の要因より、細胞の増殖及び/又は分化の破綻が生じ得る。正常な細胞の増殖及び/又は分化が妨害されるか又は何らかの様式で破綻すると、それは、癌のような過剰増殖性障害が含まれる様々な疾患又は障害をもたらす可能性がある。

30

40

【0005】

【005】 癌への慣用の治療法には、化学療法、放射線療法、外科手術、免疫療法 (例、生物学的応答調節物質、ワクチン、又は標的化治療剤)、又はこれらの組合せが含まれる。悲しむべきことに、このような慣用の治療法に対して、ずっと多くの癌が非応答性であるか又はほとんど応答せず、患者には治療選択肢がほとんど残っていない。例えば、ある患者では、ある種の癌が遺伝子変異を示して、選択された療法が一般には有効であるにも拘らず、それらを非応答性にする。さらに、癌の種類によっては、外科手術のようなくつかの利用可能な療法が有効な代替法でない場合もある。現行の標準的な治療薬剤に内在

50

する限界が特に明らかになるのは、すでにいくつかの治療法を経験してその後で癌が再燃した患者への治療を試みる時である。そのような症例では、失敗した療法レジメンとそれにより生じる患者の悪化が難治性の腫瘍の原因となる場合があり、その腫瘍は、最終的に治癒不能であることが明らかとなる、相対的に進行性の疾患として多くの場合現れる。ここ数年にわたって癌の診断及び治療には多大な改善があったものの、既存の療法では再燃、腫瘍の再発及び転移を防ぐことができないために、多くの固形腫瘍で全生存率はほとんど変化していない。従って、より標的化されて強力な療法を開発することが依然として挑戦課題なのである。

#### 【0006】

[006] 1つの有望な研究領域は、多くの癌の根底にあるように思われる腫瘍形成性の「種」細胞を狙撃する標的化治療剤の使用に関連する。そのために、ほとんどの固形組織は、その組織の大多数を含む分化した細胞種を産生する、成体の組織常在性の幹細胞集団を含有することが今日知られている。これらの組織に生じる腫瘍は、同様に、幹細胞からも発生する細胞の異種集団からなるが、それらの全体的な増殖性及び組織化は著しく異なる。腫瘍細胞の大多数には限られた増殖能力しかないことがますます認知されているが、癌細胞の少数集団（通常、癌幹細胞（cancer stem cell）又はCSCとして知られる）は、広汎に自己再生する独占的な能力を有しており、それにより固有の腫瘍再始動能を可能にしている。より具体的には、この癌幹細胞仮説は、それぞれの腫瘍の内部に、無限の自己再生が可能であって、腫瘍前駆細胞とその後の最終分化腫瘍細胞への分化の結果としてその複製能力が進行的に制限される腫瘍細胞を産生することが可能である別個の細胞（即ち、CSC）の亜集団が（ほぼ0.1～10%）存在することを提唱する。

#### 【0007】

[007] 近年、これらのCSC（腫瘍永続化細胞（tumor perpetuating cell）又はTPCとしても知られる）が従来化学療法剤又は放射線に対してより抵抗性であって、それにより標準的な臨床治療法の後にも存続して、後に難治性腫瘍、続発性腫瘍の増殖を促して転移を助長する可能性があることがより明白になっている。この点に関して言えば、癌幹細胞は、様々な新生物の転移及び浸潤ポテンシャルを促進する可能性があるとしてきた。さらに、ますます増える証拠は、器官形成及び/又は正常な組織常在型幹細胞の自己再生を調節する経路がCSCでは調節解除又は改変されていて、自己再生する癌細胞の不断の拡張と腫瘍形成をもたらされることを示唆する。一般論としては、Al-Hajj et al., 2004, PMID: 15378087; 及びDalerba et al., 2007, PMID: 17548814 を参照のこと（このそれぞれは、その全体において参照により本明細書に組み込まれる）。このように、従来の治療法だけでなくより最近の標的化治療法の有効性も、これらの多様な治療法に直面しても癌を永続化することが可能である抵抗性癌細胞の存在及び/又は出現によって制限されているようである。Huff et al., European Journal of Cancer 42: 1293-1297 (2006) 及び Zhou et al., Nature Reviews Drug Discovery 8: 806-823 (2009)（このそれぞれは、その全体において参照により本明細書に組み込まれる）。このような観察事実は、従来の腫瘍減量剤（debulking agent）では、固形腫瘍に罹患している場合の患者生存を実質的に高めることが常にできないことによって、そして腫瘍が増殖、再発、及び転移する方法についてのますます洗練された理解の進展を通して追認されている。従って、新生物障害を治療するための最新の戦略では、患者再燃をもたらす腫瘍の再発又は転移の可能性を減らすように、腫瘍永続化細胞を消失させる、枯渇する、沈静化する、又はその分化を促進することの重要性が認められてきた。

#### 【0008】

[008] そのような戦略を開発するための努力では、ヒトの原発性固形腫瘍標本を免疫不全マウスに排他的に移植して継代する、非従来型異種移植片（NTX）モデルに関連する最近の研究が取り込まれている。数多くの癌において、そのような技術により、異種の腫瘍を産生してその増殖を無限に促進する独自の能力がある細胞の亜集団の存在が確かめられている。先に仮定されたように、NTXモデルでの研究では、同定された腫瘍細胞のCSC亜集団が化学療法や放射線のような腫瘍減量レジメン（debulking regimen）に対

10

20

30

40

50

してより抵抗性であるらしいことが確認され、臨床応答率と全生存率の間の不一致を説明する可能性がある。さらに、CSC研究におけるNTXモデルの利用は、腫瘍の再発及び転移に重大な影響を及ぼすことによって患者生存率を改善するCSC標的化療法をもたらした。進展が見られた一方で、原発性及び/又は異種移植片腫瘍組織を取り扱うことに付随する固有の技術上の難題は、CSCの同一性及び分化能を特徴付けるための実験基盤の不足と相俟って、重大な挑戦課題を提起する。それで、癌幹細胞に選択的に標的指向して、過剰増殖性障害の治療、予防、及び/又は管理に使用し得る、診断、予防、又は治療用の化合物又は方法を開発することへの実質的なニーズが依然として存在するのである。

【発明の概要】

【0009】

[009] 本発明は、上記及び他の目的のために、広義には、PTK7関連障害(例、過剰増殖性障害又は新生物障害)の治療に使用し得る方法、化合物、組成物、及び製造品へ向けられる。そのために、本発明は、腫瘍細胞又は癌幹細胞に効果的に標的指向して、多種多様な悪性腫瘍に罹患している患者を治療するために使用し得る、新規プロテインチロシンキナーゼ7(又はPTK7)モジュレーターを提供する。本明細書においてより詳しく考察されるように、現在、数種のPTK7アイソフォームが知られていて、開示モジュレーターは、好ましくは、その1以上を含むか又はそれと関連する。さらに、ある態様において、開示されるPTK7モジュレーターは、PTK7ポリペプチド又は遺伝子(又は、それらの断片)を認識する、それと競合する、それに作動する、それと拮抗する、それと相互作用する、結合する、又は会合して、1以上の生理学的経路に対するPTK7タンパク質の影響を調節する、調整する、改変させる、変化させる、又は修飾するどの分子も含んでよい。このように、広義において、本発明は、単離されたPTK7モジュレーターとその使用へ概して向けられる。好ましい態様において、本発明は、より具体的には、抗体(即ち、PTK7の少なくとも1つのアイソフォームと免疫選択的に結合、反応、又は会合する抗体)を含んでなる単離PTK7モジュレーターへ向けられる。さらに、下記に広汎に考察されるように、そのようなモジュレーターは、増殖性障害の予防、診断、又は治療に有用な医薬組成物を提供するために使用し得る。

【0010】

[010] 本発明の選択態様において、PTK7モジュレーターは、PTK7ポリペプチド又はその断片を、単離型でも、他の部分との融合型又は会合型(例、Fc-PTK7、PEG-PTK7、又は標的化部分と会合したPTK7)でも含んでよい。他の選択態様において、PTK7モジュレーターは、PTK7アンタゴニストを含んでよく、それは、本出願の目的のためには、PTK7を認識する、それと競合する、相互作用する、結合する、又は会合して、腫瘍始原細胞が含まれる新生物細胞を中和する、消失させる、低下させる、増感させる、再プログラム化する、その増殖を阻害又は制御するどんな構築体又は化合物も意味すると理解される。好ましい態様において、本発明のPTK7モジュレーターは、新生物細胞を増やす、維持する、拡大する、増殖させる、又は他の方法でその生存、再発、再生、及び/又は転移を促進する腫瘍始原細胞の能力を沈静化する、中和する、低下させる、減少させる、除去する、緩和する、減衰させる、再プログラム化する、消失させる、又は他の方法で阻害することが意外にも見出された、抗PTK7抗体又はその断片若しくは誘導体を含む。特に好ましい態様において、この抗体又は免疫反応性断片は、1以上の抗癌剤(例、細胞傷害剤)と会合しても、それへコンジュゲートしてもよい。

【0011】

[011] 選択態様において、適合可能なPTK7モジュレーターは、軽鎖可変領域と重鎖可変領域を有する抗体を含んでよく、ここで前記軽鎖可変領域は、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号52、配列番号54、配列番号56、配列番号58、及び配列番号60に示されるようなアミノ酸配列からなる群より

10

20

30

40

50

選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、そしてここで前記重鎖可変領域は、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号59、及び配列番号61に示されるようなアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0012】

[012] 当然ながら、本開示に照らして、当業者は、上述した重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のそれぞれに関連するCDRを容易に同定して、それらCDRを使用して、過度の実験をせずに、キメラ抗体、ヒト化抗体、又はCDR移植抗体を工学処理するか又は作製することができよう。このように、選択態様において、本発明は、図面6A又は図面6Bに示される可変領域配列由来の1以上のCDRを含んでなる抗PTK7抗体へ向けられる。好ましい態様において、このような抗体は、モノクローナル抗体を含み、そしてなおより好ましい態様において、キメラ抗体、CDR移植抗体、又はヒト化抗体を含む。下記により詳しく考察するように、なお他の態様は、1以上の細胞傷害剤とコンジュゲート又は会合したそのような抗体を含む。

10

【0013】

[013] 従って、他の態様において、本発明は、hSC6.23、hSC6.24、hSC6.41、及びhSC6.58からなる群より選択されるヒト化PTK7モジュレーターを含む。なお他の態様は、ヒト化抗体を含んでなるPTK7モジュレーターへ向けられ、ここで前記ヒト化抗体は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域を含み、ここで前記軽鎖可変領域は、配列番号62、配列番号64、配列番号66、及び配列番号68に示されるようなアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、そしてここで前記重鎖可変領域は、配列番号63、配列番号65、配列番号67、及び配列番号69に示されるようなアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0014】

[014] 先に示したように、本発明の1つの側面は、癌幹細胞とPTK7ポリペプチドの予期せぬ関連を含む。このように、ある他の態様において、本発明は、被検者への投与時に腫瘍始原細胞の頻度を低下させるPTK7モジュレーターを含む。好ましくは、頻度の低下は、*in vitro* 又は *in vivo* の限界希釈分析を使用して決定される。特に好ましい態様において、そのような分析は、生きたヒト腫瘍細胞の免疫不全マウス中への移植を含んでなる *in vivo* 限界希釈分析を使用して実施してよい。あるいは、限界希釈分析は、生きたヒト腫瘍細胞の *in vitro* コロニー支持条件 (colony supporting condition) 中への限界希釈沈着 (limiting dilution deposition) を含んでなる *in vitro* 限界希釈分析を使用して実施してよい。いずれの場合でも、頻度の低下の分析、計算、又は定量は、好ましくは、正確な数的処理を提供するポアソン分布統計の使用を含むであろう。そのような定量法が好ましい一方で、望まれる数値を提供するには、フローサイトメトリー又は免疫組織化学のような、他のさほど労働集約的ではない方法論も使用してよく、従って、それも本発明の範囲内にあるものと明白に考慮されると理解されよう。そのような場合、頻度の低下は、腫瘍始原細胞について濃縮することが知られている腫瘍細胞表面マーカーのフローサイトメトリー分析又は免疫組織化学検出を使用して決定してよい。

30

40

【0015】

[015] そのように、別の好ましい態様において、本発明は、治療有効量のPTK7モジュレーターをその必要な被検者へ投与することによって腫瘍始原細胞の頻度を低下させることを含んでなる、PTK7関連障害を治療する方法を含む。好ましくは、PTK7関連障害は、新生物障害を含む。ここでも、腫瘍始原細胞頻度の低下は、好ましくは、*in vitro* 又は *in vivo* の限界希釈分析を使用して決定されるであろう。

50

## 【 0 0 1 6 】

[016] この点に関して言えば、本発明は、少なくとも一部は、様々な新生物の病因に  
関与している腫瘍永続化細胞（即ち、癌幹細胞）と P T K 7 免疫原が関連するという発見  
に基づくものと認識されるであろう。より具体的には、本出願は、意外にも、様々な例示  
の P T K 7 モジューレーターの投与が腫瘍始原細胞による腫瘍形成性のシグナル伝達に媒介  
する、それを低下させる、阻害する、又は消失させる（即ち、腫瘍始原細胞の頻度を低下  
させる）ことができることを証明する。この低下したシグナル伝達は、腫瘍始原細胞の除  
去、中和、低下、消失、再プログラム化、又は沈静化によっても、又は腫瘍細胞形態を変  
化させること（例、分化誘導、ニッチ破壊）によっても、腫瘍形成性、腫瘍の維持、拡張  
、及び/又は転移及び再発を阻害することによる P T K 7 関連障害のより有効な治療を次  
々に可能にする。

10

## 【 0 0 1 7 】

[017] 上述した癌幹細胞との関連以外に、P T K 7 アイソフォームには、血管新生、  
内皮細胞の遊走、及び発癌に結び付けられてきた特定の発生シグナルカスケード（即ち、  
W n t シグナル伝達経路）に関与し得るという証拠がある。本明細書に記載の新規 P T K  
7 モジューレーターを使用してそのような細胞相互作用に介入すると、1 より多い機序（即  
ち、腫瘍始原細胞の低下と発癌経路シグナル伝達の破綻）によって相加又は相乗効果をも  
たらして、障害を改善又は治療する可能性がある。なお他の好ましい態様は、細胞表面 P  
T K 7 の細胞内在化を利用して、モジューレーター媒介性の抗癌剤を送達する場合がある。  
この点に関して言えば、本発明は、どの特別な作用機序にも制限されず、むしろ P T K 7  
関連障害（様々な新生物が含まれる）を治療するための開示モジューレーターの広汎な使用  
が含まれると理解されよう。

20

## 【 0 0 1 8 】

[018] このように、本発明の他の面は、腫瘍始原細胞を沈静化する一方で同時に発癌  
生存経路を潜在的に妨害する、開示モジューレーターの能力を利用する。このような多重活  
性 P T K 7 モジューレーター（例、P T K 7 アンタゴニスト）は、標準治療の抗癌剤又は腫  
瘍減量剤と組み合わせて使用されるときに特に有効であることが判明するかもしれない。  
従って、本発明の好ましい態様は、初期治療に続く維持療法の中の抗転移剤として開示モ  
ジューレーターを使用することを含む。加えて、2 以上の P T K 7 アンタゴニスト（例、P  
T K 7 上の 2 つの別々のエピトープへ特異的に結合する抗体）を、本教示に従って組み合  
わせて使用してよい。さらに、下記にやや詳しく考察するように、本発明の P T K 7 モジ  
ューレーターは、コンジュゲート状態でも非コンジュゲート状態でも使用してよくて、多様  
な化学品又は生物学的抗癌剤との組合せにおいて増感剤として使用してもよい。

30

## 【 0 0 1 9 】

[019] 従って、本発明の別の好ましい態様は、P T K 7 モジューレーターを被検者へ投  
与する工程を含んでなる、抗癌剤での治療のために前記被検者において腫瘍を増感させる  
方法を含む。他の態様は、P T K 7 モジューレーターをその必要な被検者へ投与する工程を  
含んでなる、治療後の転移を低下させる方法を含む。本発明の特に好ましい側面において  
、P T K 7 モジューレーターは、in vitro 又は in vivo の限界希釈分析を使用して決定さ  
れるように、腫瘍始原細胞頻度の低下を特異的にもたす。

40

## 【 0 0 2 0 】

[020] 本発明のより一般的に好ましい態様は、P T K 7 関連障害を治療することの必  
要な被検者へ P T K 7 モジューレーターを投与する工程を含んでなる、前記被検者において  
それを治療する方法を含む。特に好ましい態様において、P T K 7 モジューレーターは、抗  
癌剤と会合（例えば、コンジュゲート）している。なお他の態様において、P T K 7 モジ  
ューレーターは、上記細胞の表面の上又は付近での P T K 7 との会合又は結合に続いて内在  
化する。さらに、本発明の有益な側面（シグナル伝達経路の破綻と付帯的な利益が含まれ  
る）は、被検者の腫瘍組織が正常隣接組織と比較して上昇レベルの P T K 7 を明示しても  
、低下又は抑圧レベルの P T K 7 を明示しても、達成され得る。

## 【 0 0 2 1 】

50

[021] なお別の側面において、本発明は、少なくとも1つの内在化PTK7モジュレーターの治療有効量を投与する工程を含んでなる、新生物障害に罹患している被検者を治療する方法を含む。好ましい態様は、内在化抗体モジュレーターの投与を含み、ここでは、他の選択抗体において、内在化抗体モジュレーターは、細胞傷害剤とコンジュゲートしているか又は会合している。

【0022】

[022] 他の態様は、少なくとも1つの枯渇性PTK7モジュレーターの治療有効量を投与する工程を含んでなる、PTK7関連障害に罹患している被検者を治療する方法へ向けられる。

【0023】

[023] なお別の態様において、本発明は、腫瘍量の少なくとも一部を取り除くように設計された初期手順（例、化学療法、放射線、又は外科手術）に続く時間帯にわたって、開示されるエフェクター又はモジュレーターが投与される、維持療法の方法を提供する。このような療法レジメンは、数週の期間、数ヶ月の期間、又は数年の期間にもわたって投与してよく、ここでPTK7モジュレーターは、転移及び/又は腫瘍再発を阻むように予防的に作用し得る。なお他の態様において、開示モジュレーターは、転移、腫瘍の持続又は再発を防ぐか又は遅らせるために、既知の腫瘍減量レジメンと連携して投与してよい。

【0024】

[024] 本発明のPTK7モジュレーターは、PTK7の単一アイソフォーム又はこのタンパク質の選択される少数のアイソフォーム（即ち、スプライス変異体によって提供される）と反応するように製造又は選択してよく、又は逆に、いくつか又はすべてのPTK7アイソフォーム（現在、5種が同定されている）と反応又は会合する汎PTK7モジュレーターを含んでよいとさらに理解される。より具体的には、本明細書に開示されるように、抗体のような好ましいモジュレーターが単一のスプライス変異体によって明示されるドメインと（例えば、特定のエクソン連結部で）、又は多数又はすべてのPTK7アイソフォーム全体で保存されているIgドメインと反応するように、それらを産生して選択することができる。このことは、TICではあるアイソフォームが選択的に発現される場合があるので、腫瘍形成細胞頻度の選択的な低下、及び/又は癌幹細胞集団の枯渇をもたらすための療法上の標的としてそれが役立つ可能性があるという点で、本発明に関連して重要である。

【0025】

[025] 従って、ある選択態様において、本発明は、汎PTK7モジュレーターを含む。他の選択態様において、本発明は、1以上のスプライス変異体又はアイソフォームと免疫特異的に会合するPTK7モジュレーターを含む。好ましくは、このスプライス変異体は、アイソフォームa、アイソフォームb、アイソフォームc、及びアイソフォームdからなる群より選択され得る。なお他の態様において、本発明は、治療有効量の汎PTK7モジュレーターを投与することを含んでなる、その必要な被検者を治療する方法を含む。なお他の態様は、1以上のアイソフォームと免疫特異的に会合するPTK7モジュレーターの治療有効量を投与することを含んでなる、その必要な被検者を治療する方法を含む。

【0026】

[026] 上記に考察した療法上の使用にとどまらず、本発明のモジュレーターは、PTK7関連障害、及び、特に過剰増殖性障害を診断するために使用し得ることも理解されよう。いくつかの態様において、該モジュレーターは、被検者へ投与されて、*in vivo* で検出又はモニターされ得る。当業者は、このようなモジュレーターを、下記に開示するようなマーカー又はレポーターで標識するか又はそれと会合させて、いくつかの標準技術（例、MRI、CATスキャン、PETスキャン、等）のいずれも使用して検出し得ることを理解されよう。

【0027】

[027] このように、いくつかの態様において、本発明は、PTK7モジュレーターを投与する工程を含んでなる、PTK7関連障害を*in vivo* で診断、検出、又はモニター

10

20

30

40

50

することの必要な被検者においてそれをする方法を含む。

【0028】

[028] 他の例において、該モジュレーターは、当該技術分野で認められた手順を使用する *in vitro* 診断の場で使用してよい。このように、好ましい態様は、過剰増殖性障害を診断することの必要な被検者においてそれを診断する方法を含み、該方法は：

- a. 前記被検者より組織試料を入手する工程；
- b. 該組織試料を少なくとも1つのPTK7モジュレーターと接触させる工程；及び
- c. 該試料と会合したPTK7モジュレーターを検出又は定量する工程を含んでなる。

【0029】

[029] このような方法は、本出願と併せて容易に理解し得て、自動プレートリーダー、専用レポーター系、等のような一般に利用可能な市販技術を使用して、容易に実施し得る。選択態様において、PTK7モジュレーターは、試料中に存在する腫瘍永続化細胞と会合する。他の好ましい態様において、検出又は定量の工程は、腫瘍始原細胞頻度の低下とその検出を含む。さらに、限界希釈分析は、上記においてすでに述べたように実施してよくて、好ましくは、頻度の低下に関する正確な数的処理をもたらすために、ポアソン分布統計の使用を利用する。

10

【0030】

[030] 同じように、本発明はまた、癌のようなPTK7関連障害の診断及びモニタリングに有用であるキットを提供する。このために、本発明は、好ましくは、PTK7モジュレーターを含んでなる容器 (receptacle) とPTK7関連障害を治療又は診断するのに前記PTK7モジュレーターを使用するための指示書 (instructional materials) とを含んでなる、PTK7関連障害を診断するか又は治療するのに有用な製造品を提供する。

20

【0031】

[031] 本発明の他の好ましい態様はまた、フローサイトメトリー分析、蛍光活性化細胞選別 (FACS)、又はレーザー媒介分画法のような方法を介して腫瘍始原細胞の集団又は亜集団を同定、単離、分画、又は濃縮するのに有用な道具としての開示モジュレーターの特性を利用する。

【0032】

[032] このように、本発明の別の好ましい態様は、腫瘍始原細胞をPTK7モジュレーターと接触させる工程を含んでなる、前記腫瘍始原細胞の集団を同定、単離、分画、又は濃縮する方法へ向けられる。

30

【0033】

[033] 上述のことは、概要であるので、必要上、簡略化、一般化、及び詳細の省略を含有する；従って、当業者は、この概要が説明にすぎず、限定的であることを決して企図しないと理解されよう。本明細書に記載する方法、組成物、及び/又はデバイスの他の側面、特徴、及び利点、及び/又は他の主題は、本明細書で説明する教示において明らかになろう。この概要を提供するのは、選択される概念を単純化された形式で紹介するためであって、それについては「発明を実施するための形態」において以下でさらに記載する。この概要は、特許請求される主題の重要な特徴又は本質的な特徴を特定することを企図するものでも、特許請求される主題の範囲を決定するときの一助として使用することを企図するものでもない。

40

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1-1】 [034] 図面1A~Cは、それぞれ、ヒトPTK7をコードする核酸配列 (配列番号1)、例示のヒトPTK7変異体のアミノ酸配列 (配列番号2) を図示して、図面1Cは、4種の代表的なPTK7のアイソフォームの並置され且つ記号表記された配列 (配列番号3~6) を図示し、ここで図面1Aの下線部分は、PTK7-1オープンリーディングフレームを表し、図面1Bの下線部分は、本明細書に定義されるようなPTK7の細胞外ドメインを示して、図面1Cは、NCBIでの遺伝子データベースに報告されるようなヒトPTK7タンパク質の4種の知られた例示アイソフォームのタンパク質並置を

50

示し(タンパク質アクセッション:アイソフォーム a = NP\_\_002812、アイソフォーム b = NP\_\_690619;アイソフォーム c = NP\_\_690620;アイソフォーム d = NP\_\_690621)、ここで図面 1 C は、モチーフペプチド、「G x G x F G x V」、「H R D L x x x N」、及び「S D V W S x G」をそれぞれ配列番号 1 1、1 2、及び 1 3 として開示する。

【図 1 - 2】[034] 図面 1 A ~ C は、それぞれ、ヒト P T K 7 をコードする核酸配列(配列番号 1)、例示のヒト P T K 7 変異体のアミノ酸配列(配列番号 2)を図示して、図面 1 C は、4 種の代表的な P T K 7 のアイソフォームの並置され且つ記号表記された配列(配列番号 3 ~ 6)を図示し、ここで図面 1 A の下線部分は、P T K 7 - 1 オープンリーディングフレームを表し、図面 1 B の下線部分は、本明細書に定義されるような P T K 7 の細胞外ドメインを示して、図面 1 C は、N C B I での遺伝子データベースに報告されるようなヒト P T K 7 タンパク質の 4 種の知られた例示アイソフォームのタンパク質並置を示し(タンパク質アクセッション:アイソフォーム a = NP\_\_002812、アイソフォーム b = NP\_\_690619;アイソフォーム c = NP\_\_690620;アイソフォーム d = NP\_\_690621)、ここで図面 1 C は、モチーフペプチド、「G x G x F G x V」、「H R D L x x x N」、及び「S D V W S x G」をそれぞれ配列番号 1 1、1 2、及び 1 3 として開示する。

10

【図 1 - 3】[034] 図面 1 A ~ C は、それぞれ、ヒト P T K 7 をコードする核酸配列(配列番号 1)、例示のヒト P T K 7 変異体のアミノ酸配列(配列番号 2)を図示して、図面 1 C は、4 種の代表的な P T K 7 のアイソフォームの並置され且つ記号表記された配列(配列番号 3 ~ 6)を図示し、ここで図面 1 A の下線部分は、P T K 7 - 1 オープンリーディングフレームを表し、図面 1 B の下線部分は、本明細書に定義されるような P T K 7 の細胞外ドメインを示して、図面 1 C は、N C B I での遺伝子データベースに報告されるようなヒト P T K 7 タンパク質の 4 種の知られた例示アイソフォームのタンパク質並置を示し(タンパク質アクセッション:アイソフォーム a = NP\_\_002812、アイソフォーム b = NP\_\_690619;アイソフォーム c = NP\_\_690620;アイソフォーム d = NP\_\_690621)、ここで図面 1 C は、モチーフペプチド、「G x G x F G x V」、「H R D L x x x N」、及び「S D V W S x G」をそれぞれ配列番号 1 1、1 2、及び 1 3 として開示する。

20

【図 1 - 4】[034] 図面 1 A ~ C は、それぞれ、ヒト P T K 7 をコードする核酸配列(配列番号 1)、例示のヒト P T K 7 変異体のアミノ酸配列(配列番号 2)を図示して、図面 1 C は、4 種の代表的な P T K 7 のアイソフォームの並置され且つ記号表記された配列(配列番号 3 ~ 6)を図示し、ここで図面 1 A の下線部分は、P T K 7 - 1 オープンリーディングフレームを表し、図面 1 B の下線部分は、本明細書に定義されるような P T K 7 の細胞外ドメインを示して、図面 1 C は、N C B I での遺伝子データベースに報告されるようなヒト P T K 7 タンパク質の 4 種の知られた例示アイソフォームのタンパク質並置を示し(タンパク質アクセッション:アイソフォーム a = NP\_\_002812、アイソフォーム b = NP\_\_690619;アイソフォーム c = NP\_\_690620;アイソフォーム d = NP\_\_690621)、ここで図面 1 C は、モチーフペプチド、「G x G x F G x V」、「H R D L x x x N」、及び「S D V W S x G」をそれぞれ配列番号 1 1、1 2、及び 1 3 として開示する。

30

40

【図 1 - 5】[034] 図面 1 A ~ C は、それぞれ、ヒト P T K 7 をコードする核酸配列(配列番号 1)、例示のヒト P T K 7 変異体のアミノ酸配列(配列番号 2)を図示して、図面 1 C は、4 種の代表的な P T K 7 のアイソフォームの並置され且つ記号表記された配列(配列番号 3 ~ 6)を図示し、ここで図面 1 A の下線部分は、P T K 7 - 1 オープンリーディングフレームを表し、図面 1 B の下線部分は、本明細書に定義されるような P T K 7 の細胞外ドメインを示して、図面 1 C は、N C B I での遺伝子データベースに報告されるようなヒト P T K 7 タンパク質の 4 種の知られた例示アイソフォームのタンパク質並置を示し(タンパク質アクセッション:アイソフォーム a = NP\_\_002812、アイソフォーム b = NP\_\_690619;アイソフォーム c = NP\_\_690620;アイソフォーム

50

d = NP\_\_690621)、ここで図面1Cは、モチーフペプチド、「G×G×FG×V」、「HRDLxxxN」、及び「SDVWS×G」をそれぞれ配列番号11、12、及び13として開示する。

【図2】[035] 図面2は、結直腸腫瘍標本全体の垂集合より入手した、高度に濃縮された腫瘍始原細胞(TProg)、腫瘍永続化細胞(TPC)、及び非腫瘍形成細胞(NTG)の集団の全トランスクリプトーム(transcriptome)配列決定法を使用して測定した、未処置(-)及びイリノテカン処置(+ )マウス中のPTK7の遺伝子発現レベルを図示するグラフ表示である。

【図3】[036] 図面3は、定量的RT-PCRを使用して測定した、3種の異なる非従来型異種移植片(NTX)の結直腸又は膵臓腫瘍細胞株の1つを担うマウスより入手して非腫瘍形成(NTG)濃縮細胞集団に対して正規化した、高度に濃縮された腫瘍始原細胞(TProg)集団と腫瘍永続化細胞(TPC)集団中のヒトPTK7の相対的な遺伝子発現レベルを示すグラフ表示である。

【図4】[037] 図面4A及び4Bは、ステージI~IVの疾患の患者由来の全結直腸腫瘍標本においてRT-PCRを使用して測定したヒトPTK7の相対的な遺伝子発現レベルを、正常な結腸及び直腸組織中の発現の平均に対して正規化して(図面4A)、又は正常隣接組織と比べて(図面4B)示すグラフ表示である。

【図5】[038] 図面5A及び5Bは、18種の異なる固形腫瘍型の1つを担う患者由来の全腫瘍標本(灰色のドット)又は比較したNAT(白色のドット)においてRT-PCRによって測定した、ヒトPTK7遺伝子の相対的又は絶対的な遺伝子発現レベルをそれぞれ示すグラフ表示である。

【図6-1】[039] 図面6A及び6Bは、本明細書の「実施例」に記載のように単離、クローン化、及び工学処理したいいくつかのマウス及びヒト化例示PTK7モジュレーターの重鎖及び軽鎖の変領域の連続アミノ酸配列を表形式で提供する。

【図6-2】[039] 図面6A及び6Bは、本明細書の「実施例」に記載のように単離、クローン化、及び工学処理したいいくつかのマウス及びヒト化例示PTK7モジュレーターの重鎖及び軽鎖の変領域の連続アミノ酸配列を表形式で提供する。

【図7-1】[040] 図面7A~7Eは、例示PTK7モジュレーターの物理化学特性をグラフ及び表の表示で提供し、ここで図面7Aは、マウス及びヒトのPTK7に関するあるモジュレーターの結合特性を図示し、図面7Bは、選択モジュレーターの親和性、ピニング、及び交差反応性のデータを提供し、図面7C及び7Dは、選択したマウスモジュレーターとそのヒト化対照物の比較結合特性を示し、そして図面7Eは、ヒトPTK7とそのマウス相同分子種に関する選択モジュレーターの結合親和性を提供する。

【図7-2】[040] 図面7A~7Eは、例示PTK7モジュレーターの物理化学特性をグラフ及び表の表示で提供し、ここで図面7Aは、マウス及びヒトのPTK7に関するあるモジュレーターの結合特性を図示し、図面7Bは、選択モジュレーターの親和性、ピニング、及び交差反応性のデータを提供し、図面7C及び7Dは、選択したマウスモジュレーターとそのヒト化対照物の比較結合特性を示し、そして図面7Eは、ヒトPTK7とそのマウス相同分子種に関する選択モジュレーターの結合親和性を提供する。

【図7-3】[040] 図面7A~7Eは、例示PTK7モジュレーターの物理化学特性をグラフ及び表の表示で提供し、ここで図面7Aは、マウス及びヒトのPTK7に関するあるモジュレーターの結合特性を図示し、図面7Bは、選択モジュレーターの親和性、ピニング、及び交差反応性のデータを提供し、図面7C及び7Dは、選択したマウスモジュレーターとそのヒト化対照物の比較結合特性を示し、そして図面7Eは、ヒトPTK7とそのマウス相同分子種に関する選択モジュレーターの結合親和性を提供する。

【図8-1】[041] 図面8A~8Gは、本発明による様々なPTK7構築体を図示し、ここで図面8A~8Fは、Ig-PTK7-ECD構築体の形態での6種のPTK7モジュレーター変異体のアミノ酸配列を提供し、ここでは、各構築体の細胞外ドメイン部分が変化していて、図面8Gは、PTK7の細胞外部分の7個のIgドメインを、いくつかのPTK7モジュレーターのELISA由来結合領域(括弧によって示される)とともに概

10

20

30

40

50

略的に図解する。

【図 8 - 2】[041] 図面 8 A ~ 8 G は、本発明による様々な P T K 7 構築体を図示し、ここで図面 8 A ~ 8 F は、I g - P T K 7 - E C D 構築体の形態での 6 種の P T K 7 モジューレーター変異体のアミノ酸配列を提供し、ここでは、各構築体の細胞外ドメイン部分が変化していて、図面 8 G は、P T K 7 の細胞外部分の 7 個の I g ドメインを、いくつかの P T K 7 モジューレーターの E L I S A 由来結合領域（括弧によって示される）とともに概略的に図解する。

【図 8 - 3】[041] 図面 8 A ~ 8 G は、本発明による様々な P T K 7 構築体を図示し、ここで図面 8 A ~ 8 F は、I g - P T K 7 - E C D 構築体の形態での 6 種の P T K 7 モジューレーター変異体のアミノ酸配列を提供し、ここでは、各構築体の細胞外ドメイン部分が変化していて、図面 8 G は、P T K 7 の細胞外部分の 7 個の I g ドメインを、いくつかの P T K 7 モジューレーターの E L I S A 由来結合領域（括弧によって示される）とともに概略的に図解する。

【図 9 - 1】[042] 図面 9 A ~ 9 E は、異なる腫瘍溶解液と N T X 試料における P T K 7 タンパク質の発現レベルを例証し、ここで図面 9 A ~ 9 D は、様々な腫瘍及び病期についての腫瘍溶解液レベルを正常隣接組織対照と比較して図示して、図面 9 E は、ヒトの非従来型異種移植片の選択モジューレーターでの染色を例証するヒストグラムを提供し、ここでは対照染色（灰色）を非腫瘍形成細胞集団（破線）と推定癌幹細胞集団（実線）での染色に比較した。

【図 9 - 2】[042] 図面 9 A ~ 9 E は、異なる腫瘍溶解液と N T X 試料における P T K 7 タンパク質の発現レベルを例証し、ここで図面 9 A ~ 9 D は、様々な腫瘍及び病期についての腫瘍溶解液レベルを正常隣接組織対照と比較して図示して、図面 9 E は、ヒトの非従来型異種移植片の選択モジューレーターでの染色を例証するヒストグラムを提供し、ここでは対照染色（灰色）を非腫瘍形成細胞集団（破線）と推定癌幹細胞集団（実線）での染色に比較した。

【図 9 - 3】[042] 図面 9 A ~ 9 E は、異なる腫瘍溶解液と N T X 試料における P T K 7 タンパク質の発現レベルを例証し、ここで図面 9 A ~ 9 D は、様々な腫瘍及び病期についての腫瘍溶解液レベルを正常隣接組織対照と比較して図示して、図面 9 E は、ヒトの非従来型異種移植片の選択モジューレーターでの染色を例証するヒストグラムを提供し、ここでは対照染色（灰色）を非腫瘍形成細胞集団（破線）と推定癌幹細胞集団（実線）での染色に比較した。

【図 10 - 1】[043] 図面 10 A ~ 10 E は、本発明の選択モジューレーターが細胞表面上での P T K 7 との結合時に内在化する能力を例証し、ここで図面 10 C は、例示モジューレーター（即ち、図面 10 C 中で H 10 と呼称される S C 6 . 10 . 2）に関連した蛍光シフトを示して、図面 10 A 及び 10 B は、対照を表し、図面 10 D は、ハイブリドーマ上清由来の例示モジューレーターについて、精製対照（H 2 . 3 5、H 10 . 2、及び H 2 5 . 1 とそれぞれ呼称される、S C 6 . 2 . 3 5、S C 6 . 10 . 2、及び S C 6 . 2 5 . 1）と比較して内在化をスクリーニングし得ることを証明して、図面 10 E は、様々なモジューレーターの内在化の程度を例証し（各データ点は、別々のモジューレーターを表す）、ここで破線は、バックグラウンドカットオフを示して、y 軸には、結合イベントに回答した細胞によって内在化される P T K 7 分子の数をプロットする。

【図 10 - 2】[043] 図面 10 A ~ 10 E は、本発明の選択モジューレーターが細胞表面上での P T K 7 との結合時に内在化する能力を例証し、ここで図面 10 C は、例示モジューレーター（即ち、図面 10 C 中で H 10 と呼称される S C 6 . 10 . 2）に関連した蛍光シフトを示して、図面 10 A 及び 10 B は、対照を表し、図面 10 D は、ハイブリドーマ上清由来の例示モジューレーターについて、精製対照（H 2 . 3 5、H 10 . 2、及び H 2 5 . 1 とそれぞれ呼称される、S C 6 . 2 . 3 5、S C 6 . 10 . 2、及び S C 6 . 2 5 . 1）と比較して内在化をスクリーニングし得ることを証明して、図面 10 E は、様々なモジューレーターの内在化の程度を例証し（各データ点は、別々のモジューレーターを表す）、ここで破線は、バックグラウンドカットオフを示して、y 軸には、結合イベントに回答

10

20

30

40

50

した細胞によって内在化される P T K 7 分子の数をプロットする。

【図 10 - 3】[043] 図面 10 A ~ 10 E は、本発明の選択モジュレーターが細胞表面上での P T K 7 との結合時に内在化する能力を例証し、ここで図面 10 C は、例示モジュレーター（即ち、図面 10 C 中で H 10 と呼称される S C 6 . 10 . 2）に関連した蛍光シフトを示して、図面 10 A 及び 10 B は、対照を表し、図面 10 D は、ハイブリドーマ上清由来の例示モジュレーターについて、精製対照（H 2 . 35、H 10 . 2、及び H 25 . 1 とそれぞれ呼称される、S C 6 . 2 . 35、S C 6 . 10 . 2、及び S C 6 . 25 . 1）と比較して内在化をスクリーニングし得ることを証明して、図面 10 E は、様々なモジュレーターの内在化の程度を例証し（各データ点は、別々のモジュレーターを表す）、ここで破線は、バックグラウンドカットオフを示して、y 軸には、結合イベントに応答した細胞によって内在化される P T K 7 分子の数をプロットする。

10

【図 11 - 1】[044] 図面 11 A ~ 11 D は、細胞傷害剤の送達に免疫特異的に媒介して細胞殺傷を促進する、開示モジュレーターの能力を例証し、ここで図面 11 A は、P T K 7 を発現している細胞へ細胞傷害性ペイロードを指向させる標的化部分としての 3 種の例示モジュレーター（H 2 . 35、H 10 . 2、及び H 25 . 3 とそれぞれ呼称される、S C 6 . 2 . 35、S C 6 . 10 . 2、及び S C 6 . 25 . 3）の使用を図示して、ここで図面 11 B ~ 11 D は、3 種の別個の細胞株を消失させる、4 種の追加の例示モジュレーターの能力を例証する（ここでは、それぞれの図面において、下方傾斜曲線により、内在化毒素を介した細胞殺傷が示唆される）。

【図 11 - 2】[044] 図面 11 A ~ 11 D は、細胞傷害剤の送達に免疫特異的に媒介して細胞殺傷を促進する、開示モジュレーターの能力を例証し、ここで図面 11 A は、P T K 7 を発現している細胞へ細胞傷害性ペイロードを指向させる標的化部分としての 3 種の例示モジュレーター（H 2 . 35、H 10 . 2、及び H 25 . 3 とそれぞれ呼称される、S C 6 . 2 . 35、S C 6 . 10 . 2、及び S C 6 . 25 . 3）の使用を図示して、ここで図面 11 B ~ 11 D は、3 種の別個の細胞株を消失させる、4 種の追加の例示モジュレーターの能力を例証する（ここでは、それぞれの図面において、下方傾斜曲線により、内在化毒素を介した細胞殺傷が示唆される）。

20

【図 12】[045] 図面 12 は、細胞傷害剤の送達に免疫特異的に媒介して、それにより様々な N T X 腫瘍細胞株における腫瘍細胞生存度を低下させる、3 種の例示 P T K 7 モジュレーターの能力を証拠付ける。

30

【図 13】[046] 図面 13 A ~ 13 C は、腫瘍永続化細胞の頻度を低下させて、その腫瘍形成ポテンシャルを阻害する、開示モジュレーターの能力を示唆して、ここで図面 13 A 及び 13 B は、細胞傷害剤のモジュレーター（即ち、S C 6 . H 2 と表示される S C 6 . 2 . 35）媒介送達が 2 種の別個の N T X 乳癌細胞集団の生存度に影響することを示唆して、図面 13 C は、処理した細胞株の腫瘍形成性が、免疫不全マウスへの移植時に低下することを図示する。

【図 14】[047] 図面 14 は、細胞傷害剤の P T K 7 発現細胞への免疫特異的な送達及び内在化に効果的に媒介する、本発明の例示のヒト化 P T K 7 モジュレーターの能力を証明する。

40

【発明を実施するための形態】

【0035】

#### I . 序論

[048] 本発明は、多くの異なる形態で具現化され得るが、本明細書に開示するのは、本発明の諸原理を具体化する、本発明の例示の具体的態様である。例証される具体的態様に本発明が限定されないことが強調されるべきである。さらに、本明細書に使用するどのセクション見出しも、編成上の目的のみのためであって、記載される主題を限定するものと解釈してはならない。

【0036】

[049] 先に述べたように、驚くべきことに、P T K 7（様々なアイソフォームが含まれる）の発現が新生物増殖と過剰増殖性障害に関連していること、そしてそのようなりガ

50

ンドが関連疾患の治療に利用し得る有用な腫瘍マーカーを提供することが見出された。より具体的には、本明細書に開示するようなPTK7モジュレーターが、有利にも、その必要な被検者における新生物障害の診断、セラグノーシス(theragnosis)、治療、又は予防に使用し得ることが発見された。従って、本発明の好ましい態様について、特に癌幹細胞と開示モジュレーターとのその相互作用の文脈で、以下に広汎に考察するが、当業者は、本発明の範囲がそのような例示態様によって限定されないことを理解されよう。むしろ、本発明と付帯の特許請求項は、どの特別な作用機序にも、特異的に標的化される腫瘍成分にも拘ることなく、PTK7モジュレーターと、新生物障害又は過剰増殖性障害が含まれる、多様なPTK7関連障害又はPTK7媒介障害の診断、セラグノーシス、治療、又は予防におけるそれらの使用へ概括的かつ明白に向けられる。

10

#### 【0037】

[050] さらに、様々な先行技術の開示とは対照的に、本発明は、一般的なプロテインチロシンキナーゼモジュレーターではなく、PTK7の様々なアイソフォームの免疫特異的モジュレーターへ主に向けられる。即ち、プロテインチロシンキナーゼ受容体の群が数種の障害との関連が広く示唆されて、概して治療的介入の標的とされてきたのに対し、PTK7特異的モジュレーターはこれまでさほど注意を惹いてこなかった。これは、一部は、この群の特別な成員のどの特異的な拮抗作用もキナーゼの余剰性により代償される可能性があるので、全般的なPTK活性への干渉(特に、保存されたキナーゼドメインと相互作用する低分子での干渉)のほうが治療上の視点からはより有効であるという信念の結果であろう。さらに、PTK7は、治療標的としてのその利用を落胆させた可能性がある、不活性キナーゼドメイン(又は偽キナーゼドメイン)を含むと報告されてきた。

20

#### 【0038】

[051] 逆に、本発明は、PTK7の1以上のアイソフォームと選好的に反応して治療上の利益を提供する、免疫特異的モジュレーターの使用を含む。上記に少し考察したように、ある態様では、単一のPTK7アイソフォームと会合するように本発明のモジュレーターを産生及び選択してよく、一方、他の態様では、選択したモジュレーターがPTK7の1より多いアイソフォーム又はすべての認知されたアイソフォームと反応してよい。この後者の態様において、本発明は、1より多いPTK7アイソフォームと会合又は反応して、それによって1種より多いPTK7媒介経路の静止を可能にし得る予期せぬ相加又は相乗効果を提供するモジュレーターを含み得る。

30

#### 【0039】

[052] より一般的には、本出願において証明されるように、開示される免疫特異的PTK7モジュレーターは、効果的に、腫瘍形成細胞に標的指向して、それを消失させるか又は他の方法で無能力にして、PTK7関連障害(例、新生物)を治療するために使用することができる。本明細書に使用するように、PTK7関連障害は、この疾患又は障害の経過又は病因の間のPTK7発現の表現型の異常によって注目、診断、又は確定されるあらゆる障害又は疾患(増殖性障害が含まれる)を意味するとみなされよう。この点に関して言えば、表現型の異常は、例えば、PTK7発現レベルの上昇又は下降、ある定義可能な細胞集団上での異常なPTK7発現、又は細胞の生命環の不適切な相又は段階での異常なPTK7発現を含み得る。

40

#### 【0040】

[053] 直前に考察した一般的な関連とは別に、本発明者は、選択した腫瘍始原細胞(TIC)とPTK7の間のこれまで知られていなかった表現型的な関連をさらに発見した。この点に関して言えば、選択したTICでは、正常組織及び非腫瘍形成細胞(NTG)(一緒に固形腫瘍のほとんどを含む)と比べるときに、上昇レベルのPTK7が発現されることが見出された。このように、PTK7アイソフォームは、腫瘍関連マーカー(又は抗原又は免疫原)を含んで、細胞表面上又は腫瘍微小環境中のこのタンパク質の改変レベルの故に、TICと関連新生物との検出及び抑制に有効な薬剤を提供することが見出された。より具体的には、PTK7モジュレーターは、このタンパク質と会合、結合、又は反応する免疫反応性のアンタゴニスト及び抗体を含めて、腫瘍始原細胞の頻度を有効に低下

50

させて、それ故に、腫瘍始原細胞を消失させ、枯渇し、無能化し、低下させ、その分化を促進し、あるいは他の方法で、これらの腫瘍始原細胞の患者の中での潜伏能力、及び/又は腫瘍の増殖、転移、又は再発を促すことを続ける能力を排除するか又は制限するのに有用であることがさらに発見された。下記により詳しく考察するように、T I C腫瘍細胞の亜集団は、腫瘍永続化細胞(T P C)と高増殖性腫瘍始原細胞(T P r o g)の両方からなる。

【0041】

[054] 上記の発見に鑑みて、当業者は、さらに本発明がP T K 7モジュレーターと腫瘍始原細胞の頻度を低下させることにおけるそれらの使用を提供することを理解されよう。以下に広汎に考察するように、本発明のP T K 7モジュレーターは、P T K 7又はその遺伝子を認識する、それと反応する、競合する、拮抗する、相互作用する、結合する、それを作動させる、又はそれと会合するどの化合物も概括的に含む。これらの相互作用によって、P T K 7モジュレーターは、それにより腫瘍始原細胞の頻度を低下させるか又は適度にする。本明細書に開示する例示のモジュレーターは、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド、又はポリペプチドを含む。ある好ましい態様において、選択されるモジュレーターは、P T K 7に対する抗体又はその免疫反応性断片若しくは誘導体を含む。そのような抗体は、本質的に拮抗性でも作動性でもよく、場合により、細胞傷害剤とコンジュゲートしても会合してもよい。他の態様において、本発明内のモジュレーターは、P T K 7アイソフォーム又はその反応性断片を含んでなるP T K 7構築体を含む。そのような構築体は、融合タンパク質を含んでよくて、免疫グロブリン又は生物学的応答調節物質のような他のポリペプチド由来の反応性ドメインを含めることができることが理解されよう。なお他の側面において、P T K 7モジュレーターは、所望の効果をゲノムレベルで発揮する核酸アセンブリーを含む。本教示と適合可能な更なる他のモジュレーターについては、下記に詳しく考察する。

【0042】

[055] どの形態のモジュレーターが最終的に選択されたとしても、それは、被検者への導入に先立って、好ましくは、単離及び精製された状態にある。この点に関して、「単離されたP T K 7モジュレーター」は、広義に解釈されて、標準の薬務に従って、望まれない混在物質(生物学的又は他の)が実質的に存在しない状態で該モジュレーターを含んでなるあらゆる調製物又は組成物を意味するように解釈されよう。以下にやや詳しく考察するように、上記の調製物は、当該技術分野で認められた様々な技術を使用して、所望のように精製及び製剤化してよい。当然ながら、そのような単離調製物は、最終製品の市販、製造、又は療法上の側面を改善して医薬組成物を提供するために所望されるように、不活性成分又は有効成分とともに意図的に製剤化又は複合化してよいと理解される。

【0043】

I I . P T K 7の生理学

[056] 結腸癌キナーゼ4(C C K 4)としても知られるプロテインチロシンキナーゼ(P T K 7)は、元は正常ヒトメラニン産生細胞よりクローン化されて(Lee et al., Oncogene 8(12), 1993)、別に結腸癌組織よりクローン化された(Mossie et al., Oncogene 11(10), 1995)、受容体チロシンキナーゼである。P T K 7遺伝子は、6 p 2 1 . 1 - p 1 2 . 2に位置している。精巢c D N Aより、ヒトP T K 7の5種のスプライスアイソフォームがクローン化された(Jung, Ji et al., Biochim Biophys Acta 1579, 2002)。これらアイソフォームの互いに対する比存在度は、精巢と肝細胞癌の間でも、結腸癌系の間でも異なるが、これらアイソフォームの機能上の意義は、あるとしても、不明である。バイオインフォマティクス解析は、マウスでは選択的にスプライスされたm R N Aより可溶性のP t k 7アイソフォームが発現される可能性があることを示唆した(Forrest, Taylor et al., Genome Biol 7, 2006)。本出願の目的では、「P T K 7」及び「C C K 4」という用語が可換的に使用されてよく、文脈の制約によって他に指定されなければ、ヒトP T K 7のスプライス変異体、アイソフォーム、相同分子種、及び相同体を含めてよいことが理解されよう。この用語はまた、P T K 7タンパク質モジュレーター(例えば、抗

10

20

30

40

50

体又は免疫反応性断片)が特異的に結合し得るエピトープを含有する、PTK7のネイティブ型又は変異型のあらゆる誘導體若しくは断片も意味することがさらに理解されよう。

【0044】

[057] 全長PTK7タンパク質は、674個のアミノ酸の細胞外ドメイン(ECD)に続いて、短いTM(膜貫通)拡がり部分と345個のアミノ酸細胞質ドメインがある、I型膜貫通タンパク質である。ヒトPTK7の例示アイソフォーム(即ち、転写変異体PTK7-1)の完全な核酸配列は、Genbankアクセッション番号:NM\_002821を有して、図面1A(配列番号1)に表される。同様に、PTK7-1タンパク質の全長の例示アミノ酸配列を図面1B(配列番号2)に示す。配列番号2のPTK7タンパク質が、配列番号1の下線を施した核酸配列の翻訳産物(即ち、配列番号3に示すアイソフォームa)とは、図面1Bにおいて93位に点突然変異(L→P)がある点で異なることに留意されたい。アイソフォームに関して言えば、図面1Cは、Genbankに報告されるような、PTK7の4種の例示アイソフォーム(タンパク質アクセッション:アイソフォームa=NP\_002812,配列番号3;アイソフォームb=NP\_690619,配列番号5;アイソフォームc=NP\_690620,配列番号6;アイソフォームd=NP\_690621,配列番号4)のアミノ酸配列を注釈付きで並置したものを示す。先に示した配列についてすでに述べたように、アイソフォームaは、図面1Aに示すPTK7変異体1由来のオープンリーディングフレームの翻訳産物に対応して、これらのアイソフォームの中で最も長い。他のスプライスアイソフォームは、示すように、アイソフォームaに対して様々なIgcamドメインが欠落している細胞外ドメインをコードする。すべてのアイソフォームが同じ細胞内ドメインをコードする。このタンパク質セリン/チロシンキナーゼの触媒ドメインにおいて保存されたサブモチーフを、そのキナーゼドメインを不活性にすると考えられるPTK7タンパク質中の変化(例えば、サブドメインI及びVII中の変化)の注釈と同様に、PTK7並置の下に示す。

10

20

【0045】

[058] いずれにしても、成熟した全長PTK7 ECDは、7個の免疫グロブリン様ドメインを含むが、一方、図面1Cに示すように、様々なスプライス変異体は、それらのECD構造が異なるPTK7アイソフォームをコードする。いずれのアイソフォームも、一般的なチロシンキナーゼの群に見出されるものと実質的に相同な細胞質ドメインを含有する。しかしながら、PTK7は、検出可能なチロシンキナーゼ活性を欠くので、様々な保存キナーゼサブドメインにおけるいくつかのアミノ酸変化がATPの結合不全をもたらす、偽キナーゼのサブファミリーに属する(Kroiheer et al. Bioessays 23(1), 2001)。具体的には、PTK7では、ATPの非転移可能リン酸との直接的な相互作用と、これらリン酸の架橋となるMg<sup>2+</sup>補因子のキレート形成が妨害されるように、サブドメインI及びVII中のキー残基が改変している(Hanks et al., Methods Enzymol 200, 1991)。

30

【0046】

[059] 本発明と適合可能なPTK7ポリペプチドは、「成熟」タンパク質の形態であっても、融合タンパク質のようなより大きいタンパク質の一部であってもよいことがさらに理解される。分泌又はリーダー配列、プレ、プロ、又はプレプロタンパク質配列、又は親和性タグ(例えば、限定なしに、多重ヒスチジン残基、FLAGタグ、HAタグ、又はmycタグ)のような、精製に役立つ配列を含有する、追加のアミノ酸配列を含めることは、しばしば有利である。組換え産生の際に安定性を提供し得る追加配列も使用してよい。そのような配列は、切断可能な配列を追加配列又はその一部として取込むことによって、必要に応じて除去してもよい。このように、本明細書において定義されるようなPTK7ポリペプチドは、他のポリペプチドが含まれる付属部分へ融合した構築体を含んでよい。このような追加配列と親和性タグは、当該技術分野でよく知られていて、標準の生化学技術を使用して産生してよい。

40

【0047】

[060] PTK7機能の生物学的意義は、そのキナーゼドメインが不活性であるにもか

50

かわらず、ヒドラからショウジョウバエ、ニワトリ、及びヒトに至るまで保存された相同分子種（そのいずれも、配列解析によって、キナーゼ活性を欠くと予測されている）の存在より推量することができる（Kroither et al., 2001）。ヘリックス - ヘリックス会合の傾向に関連する特異的 T M ドメインが高度に保存されていることと、そして R T K が典型的にはリガンド結合（engagement）に応答して二量体化するという事実に基づいて、T M ドメインには、P T K 7 二量体化に媒介する可能性があることが示唆された（Kroither et al., 2001）。後の研究では、P T K 7 T M ドメインが選好的な自己会合を促進しないことが示唆された（Kobus et al., *Biochemistry* 44(5), 2005）が、他の R T K の T M ドメイン又はシグナル伝達複合体の成員とのヘテロマー相互作用が除外されたわけではなかった。故に、P T K 7 偽キナーゼドメインそれ自体には、シグナルを直接伝達することは期待されないが、それは、シグナル伝達経路中の他の分子の支持構造（scaffold）として作用するか、又は他のチロシンキナーゼ（複数）を動員する可能性がある（Kroither et al., 2001）。

10

## 【 0 0 4 8 】

[061] ヒト P T K 7 は、成人結腸中では発現されないものの、それは、胎児結腸と多様な結腸癌由来細胞株（Mossie et al. 上掲, 1995）、並びに転移性結直腸癌（Saha et al., *Science* 294(5545) 2001）において発現されている。P T K 7 を発現すると報告されている他の正常組織及び細胞には、肺、甲状腺、及び卵巣（Mossie, Jallal et al. 1995）、C D 4 + 胸腺移出 T 細胞（Haines et al., *J Exp Med* 206(2) 2009）、及び正常骨髄系前駆細胞、及び C D 3 4 + C D 3 8 - 骨髄細胞（Prebet et al., *Blood* 116(13), 2010）が含まれる。癌性組織に関して言えば、P T K 7 発現は、結腸癌細胞（Mossie et al. 1995）；A M L 試料（Muller-Tidow, et al. *Clin Cancer Res* 10(4), 2004）；C D 3 4 - プレ T A L L 細胞（Shangguan et al., *J Proteome Res* 7(5) 2008）、及び胃癌（Gorringe et al., *Genes Chromosomes Cancer* 42(3), 2005）にも見出されてきた。興味深いことに、元は正常メラニン産生細胞よりクローン化されたのにもかかわらず、P T K 7 は、転移性メラノーマでは失われていると報告された（Easty et al., *Int J Cancer* 71(6), 1997）。P T K 7 は、染色体 6 p 2 1 の欠損を含有するある種の乳癌においても失われているらしい（Piao et al., *Genes Chromosomes Cancer* 30(2), 2001）が、乳癌細胞株での発現は、一定していない（Su et al., *J Cancer* 1 2010）。P T K 7 は、肺腺癌においても発現されていて、これらの腫瘍では、より好ましい予後とより強い発現レベルが相関していた（Endoh et al., *J Clin Oncol* 22(5) 2004）。骨肉腫における 6 p 1 2 - p 2 1 領域の増幅の精密マッピングは、q R T - P C R によって定量されるように、遺伝子コピー数の増加が必ずしも P T K 7 の過剰発現をもたらさないことを示した（Lu et al., *Mol Cancer Res* 6(6), 2008）。

20

30

## 【 0 0 4 9 】

[062] P T K 7 の単数又は複数のリガンドについては知られていないが、P T K 7 は、多様な生体シグナル伝達経路及び発生プロセスと結び付けられてきた。このタンパク質の免疫グロブリン様の E C D ドメイン構造は、それが細胞 - 細胞の接触及び接着の参画因子又はセンサーである可能性を示唆する。P T K 7 のショウジョウバエ相同分子種である O T K は、軸索誘導の間のセマフォリンシグナル伝達の潜在的な補助受容体としてのプレキシンと関連付けられてきた（Winberg et al., *Neuron* 32(1), 2001）。最近、アフリカツメガエルにおいてプレキシン A 1 と P T K 7 の間の相互作用が証明された（Wagner et al., *Biochem Biophys Res Commun* 402(2) 2010）が、ニワトリの P T K 7 の相同分子種である K L G は、ヒヨコの心臓形態形成に重要な複合体においてプレキシン A 1 及び S e m a 6 D と相互作用することが示された（Totofuku et al., *Genes Dev* 18(4), 2004）。可溶性 P T K 7 ( s P T K 7 ) を使用して、V E G F 誘導血管新生、並びに、ヒト内皮細胞の *in vitro* 管腔形成、遊走、及び浸潤における P T K 7 の役割が示された（Shin et al., *Biochem Biophys Res Commun* 371(4), 2008）。マウス P T K 7 はまた、アクチン細胞骨格再構成と細胞遊走が必要とされる、表皮創傷治癒プロセスへ関連付けられた（Caddy et al., *Dev Cell* 19(1), 2010）。

40

50

## 【 0 0 5 0 】

[063] 特定のシグナル伝達カスケードに関して言えば、P T K 7 は、発生に重要な様々な W n t シグナル伝達経路の構成因子であるらしい (Puppo et al., EMBO Rep 12(1), 2010)。P t k 7 のヌル突然変異又は重度に低形質の突然変異を発現するマウスは、周産期に死亡して、平面内細胞極性 (P C P) 経路における P T K 7 の役割と一致した表現型を示す (Lu et al., Nature 430(6995), 2004)。同様に、E C D に 3 個のアミノ酸挿入がある突然変異体の P T K 7 タンパク質を含有する c h u z h o i マウスは、P C P 欠損性の表現型を示す (Paudyal, Damrau et al., 2010)。マウスの P T K 7 は、V a n g l 2 (Lu et al., 2004)、C e l s r 1 (Paudyal, Damrau et al., 2010)、S c r b 1、及び G r h l 3 (Caddy et al., 2010) が含まれる他の P C P 遺伝子と遺伝的に相互作用することが示された。膜型 - I マトリックスメタロプロテナーゼ I (M T 1 - M M P) は、P T K 7 を切断して可溶性 P T K 7 (即ち、s P T K 7) を放出するが、ゼブラフィッシュでは、M T 1 - M M P 活性と s P T K 7 産生の均衡の調節不全が収斂伸長の欠損をもたらす。これも、P C P 経路における P T K 7 の役割と一致している (Golubkov et al., J Biol Chem 285(46), 2010)。アフリカツメガエルにおいて、P T K 7 は、非標準 W n t シグナル伝達経路における d s h と W n t 受容体 f z 7 との複合体中に見出された (Shnitsar et al., Development 135(24), 2008) が、P T K 7 と - カテニンの間の相互作用は、マウス細胞中の標準 W n t シグナル伝達によって動的に影響を受ける可能性があることが示された (Puppo et al., 2010)。追加的に、P T K 7 プロモーター中の保存された T C F / L E F 転写因子結合部位は、それが W n t 応答遺伝子であることを示唆して、ある種の結直腸癌では、W n t 経路シグナル伝達がしばしば調節不全になっているので、これらの腫瘍における P T K 7 の上方調節を説明する可能性がある (Kato, Int J Mol Med 20(3), 2007)。

10

20

## 【 0 0 5 1 】

[064] 癌性組織内では、上記に記載した W n t 経路を調節することへのその潜在可能性に加えて、P T K は、H C T 1 1 6 結腸癌細胞株において、好増殖及び抗アポトーシスのシグナルを伝えるようである。なぜなら、R N A i 媒介性の P T K 7 のノックダウンによって、その表現型が逆転される可能性があるからである (Meng et al., PLoS One 5(11), 2010)。P T K 7 の抗アポトーシスシグナルは、A M L 芽球におけるアントラサイクリン媒介性の細胞殺傷への抵抗性を付与したが、それは、可溶性 P T K 7 - F c タンパク質を使用して、逆転させることができた (Prebet et al., 2010)。特定の癌細胞による P T K 7 の過剰発現は、P T K 7 へ結合してその後内在化されるアダプターを使用する、培養中の T - A L L 細胞へのダウノルピシンの標的送達への戦略に利用されたことがある (Xiao et al., Chemistry 14(6), 2008)。

30

## 【 0 0 5 2 】

[065] 上述した特徴に加えて、本開示は、P T K 7 の発現が様々な腫瘍始原細胞集団において上昇していることを証明する。このことは、バルク腫瘍中の非腫瘍形成細胞の少なくともいくつかにおける P T K 7 の同時の上方調節と並んで、P T K 7 媒介性のリガンド - 受容体相互作用が腫瘍の増殖、新生血管形成、及び / 又は腫瘍転移に連結する細胞シグナル伝達カスケードの引き金になり得る可能性を提起する。どの特別な理論にも束縛されることを望まずに言えば、本発明の P T K 7 モジュレーター (特に、拮抗性又は中和性の態様) は、少なくとも一部は、腫瘍始原細胞頻度を低下させるか又は消失させることによって作用して、それにより従来の標準治療レジメン (例、イリノテカン) とは異なる方法で、又は免疫療法的なシグナル伝達、又は P T K 7 発現細胞を殺傷することが可能なペイロードを送達することを介して、腫瘍の増殖又は生存に干渉すると考えられる。例えば、P T K 7 に拮抗することによる癌幹細胞活性の低下には、増殖性の細胞を消失させる化学療法レジメンに対抗して細胞増殖を単に促進すること、又は腫瘍始原細胞の自己再生 (即ち、無限の増殖と多能性の維持) 能力が失われるようにその分化を誘導することを含めてよい。あるいは、好ましい態様では、P T K 7 発現細胞への細胞傷害性 T 細胞の動員、又は抗 P T K 7 抗体へコンジュゲートした、内在化することができる強力な毒素の送達に

40

50

よって、TPCを選択的に殺傷することができる。

【0053】

III. 腫瘍永続化細胞

[066] 先行技術の教示とは対照的に、本発明は、腫瘍始原細胞、そして特に腫瘍永続化細胞に標的指向して、それによって新生物障害の治療、管理、又は予防を促進するのに特に有用であるPTK7モジュレーターを提供する。より具体的には、先に示したように、驚くべきことに、特定の腫瘍細胞亜集団は、PTK7を発現して、癌幹細胞の自己再生と細胞の生存に重要なモルフォゲンシグナル伝達の局在化調整を変化させる可能性があることが見出された。このように、好ましい態様では、PTK7のモジュレーターを本教示に従って使用して、腫瘍始原細胞頻度を低下させて、それによって過剰増殖性疾患の治療又は管理を促進することができる。

10

【0054】

[067] 本明細書に使用するように、腫瘍始原細胞(TIC)という用語には、腫瘍永続化細胞(TPC; 即ち、癌幹細胞又はCSC)と高増殖性腫瘍始原細胞(TProgと呼ばれる)がともに含まれて、これらは一緒に、バルク腫瘍又は塊の独自の亜集団(即ち、0.1~40%)を概ね含む。本開示の目的では、腫瘍永続化細胞及び癌幹細胞又は新生物幹細胞という用語は、同等であって、本明細書において可換的に使用してよい。逆に、TPCは、腫瘍内部に存在する腫瘍細胞の組成を完全に再現し得て、少数の単離細胞の連続移植(マウスを介した2回以上の継代)によって証明されるような無制限の自己再生能力を有する点で、TProgとは異なる。下記により詳しく考察するように、適正な細胞表面マーカーを使用する蛍光活性化細胞選別(FACS)は、少なくとも一部は、単一の細胞と細胞の塊(即ち、ダブレット等)を識別するその能力の故に、高度に濃縮した細胞亜集団(例えば、99.5%より高い純度)を単離するのに信頼し得る方法である。そのような技術を使用して、少ない細胞数の高度精製TProg細胞が免疫不全マウスへ移植されるときに、それらが一次移植体中の腫瘍増殖を促すことができることが示された。しかしながら、精製されたTPC亜集団とは異なり、TProg産生腫瘍は、表現型の細胞異種性において親腫瘍を完全には反映せず、後続の移植体において連続した腫瘍形成を再始動させることで明らかに非効率である。対照的に、TPC亜集団は、親腫瘍の細胞異種性を完全に再構成して、連続的に単離及び移植されるときに、腫瘍を効率的に始動させることができる。このように、当業者は、いずれも一次移植体において腫瘍を産生し得ても、TPCとTProgの間には明確な違いがあって、それは、少ない細胞数での連続移植時に異種な腫瘍増殖を永続的に促進するTPC独自の能力であることを認められよう。TPCの特性決定をするための他の通常のアプローチは、形態学と、細胞表面マーカー、転写プロファイル、及び薬物応答の検証に関連するが、マーカーの発現は、培養条件と*in vitro*での細胞株の継代で変化する場合がある。

20

30

【0055】

[068] 従って、本発明の目的では、腫瘍永続化細胞は、正常組織において細胞の階層構造を支える正常幹細胞と同様に、好ましくは、多系統分化の能力を維持しながら無限に自己再生するその能力によって定義される。このように、腫瘍永続化細胞は、腫瘍形成性子孫(即ち、腫瘍始原細胞: TPC及びTProg)と非腫瘍形成性(NTG)子孫とともに産生することが可能である。本明細書に使用するように、非腫瘍形成細胞(NTG)とは、腫瘍始原細胞より生じるが、それ自体では自己再生する能力も腫瘍を含む異種な系統の腫瘍細胞を産生する能力も有さない、腫瘍細胞を意味する。実験的には、NTG細胞は、過剰の細胞数で移植されるときでも、マウスにおいて腫瘍を再現可能的に形成することができない。

40

【0056】

[069] 示したように、TProgは、マウス中で腫瘍を産生するその限られた能力により、腫瘍始原細胞(又はTIC)としても分類される。TProgは、TPCの子孫であって、典型的には、有限回の非自己再生性の細胞分裂が可能である。さらに、TProg細胞は、初期腫瘍始原細胞(ETP)と後期腫瘍始原細胞(LTP)へさらに分割され

50

る場合があり、このそれぞれは、表現型（例、細胞表面マーカー）と腫瘍細胞構造を再現する能力の差によって識別され得る。そのような技術上の差異にも拘らず、ETPとLTPはともに、少ない細胞数で移植されるときに腫瘍を連続的に再構成することが概ね不可能であって、典型的には、親腫瘍の異種性を反映しないという点で、TPCとは機能的に異なる。上述の差異にも拘らず、様々なTProg集団が、稀な場合に、通常は幹細胞に起因する自己再生能力を獲得して、それ自体でTPC（又はCSC）になることが可能であることも示されてきた。いずれにしても、一人の患者の典型的な腫瘍塊には、両方の種類の腫瘍始原細胞が現れる可能性があって、本明細書に開示するモジュレーターでの治療の影響を受ける。即ち、開示される組成物は、腫瘍に表れる特別な態様又は混在に拘らず、このようなPTK7陽性腫瘍始原細胞の頻度を低下させるか又はその化学療法感受性を変化させるのに概ね有効である。

10

## 【0057】

[070] 本発明の文脈では、TPCは、TProg（ETPとLTPの両方）、NTG細胞、及び腫瘍のバルクを含む腫瘍浸潤性非TPC由来細胞（例、線維芽細胞/間質細胞、内皮及び造血細胞）より腫瘍形成性であって、相対的により不活動性であって、より化学療法抵抗性であることが多い。慣用の療法及びレジメンが、大部分は、腫瘍を減量させるとともに迅速に増殖中の細胞を攻撃するように設計されてきたとすれば、TPCは、慣用の療法及びレジメンに対して、より速く増殖中のTProgや他のバルク腫瘍細胞集団よりも抵抗性になる可能性がある。さらに、TPCは、慣用の療法に対してそれらを相対的に化学療法抵抗性にする、多剤耐性輸送体の発現増加、DNA修復機序の増強、及び抗

20

## 【0058】

[071] 上述した先行技術の治療法の多くと異なり、本発明の新規組成物は、好ましくは、選択したモジュレーターの形態又は特定の標的（例、遺伝物質、PTK7抗体、又はリガンド融合構築体）に拘らず、被検者への投与時に、腫瘍始原細胞の頻度を低下させる。上記に注目したように、腫瘍始原細胞頻度の低下は、a)腫瘍始原細胞の消失、枯渇、増感、沈静化、又は阻害；b)腫瘍始原細胞の増殖、拡張、又は再発を制御すること；c)腫瘍始原細胞の始動、伝播、維持、又は増殖を妨害すること；又はd)他の方法で、腫瘍形成細胞の生存、再生、及び/又は転移を妨げる結果として起こり得る。いくつかの態様において、腫瘍始原細胞の頻度の低下は、1以上の生理学的経路における変化の結果として起こる。この経路の変化は、腫瘍始原細胞の低下又は消失によっても、それらの潜在能力（例、分化誘導、ニッチ破壊）を変化させるか又は、腫瘍環境又は他の細胞に対して影響を及ぼすそれらの能力に他の方法で干渉することによっても、腫瘍形成、腫瘍維持、及び/又は転移と再発を阻害することによって、PTK7関連障害のより有効な治療を可能にする。

30

## 【0059】

[072] このような腫瘍始原細胞の頻度の低下を評価するために使用し得る方法には、in vitro 又は in vivo のいずれかの限界希釈分析があり、好ましくは、ポアソン分布統計を使用する計数、又は in vivo で腫瘍を産生する能力の有無といった、既定義の決定的な事象の頻度を評価することをそれに続ける。そのような限界希釈分析は、腫瘍始原細胞頻度の低下を計算する好ましい方法であるが、他のさほど厳密でない方法も、やや正確ではないとしても、所望の数値を有効に決定するために使用し得て、本明細書の教示と全く適合可能である。このように、当業者によって理解されるように、頻度値の低下をよく知られたフローサイトメトリー又は免疫組織化学の手段により決定することも可能である。上述のすべての方法に関しては、例えば、そのそれぞれがその全体において参照により本明細書に組み込まれる、Dylla et al. 2008, PMID: PMC2413402 及び Hoey et al. 20

40

50

09, PMID: 19664991 を参照のこと。

【 0 0 6 0 】

[073] 限界希釈分析に関して言えば、コロニー形成を助長する *in vitro* 増殖条件の中へ分画又は未分画いずれかのヒト腫瘍細胞（例えば、それぞれ、処置済み及び未処置の腫瘍に由来する）を沈着させることによって、腫瘍始原細胞頻度の *in vitro* 計数を達成することができる。この方法では、コロニーの単純なカウンティング及び特性決定によっても、また例えば、系列希釈液のプレート中へのヒト腫瘍細胞の沈着と、各ウェルについてコロニー形成が陽性又は陰性かをプレート培養後少なくとも10日間採点することからなる分析によっても、コロニー形成細胞を計数することができる。腫瘍始原細胞頻度を決定するその能力が概してより正確である、*in vivo* の限界希釈実験又は分析には、未処置対照又は処置条件のいずれかに由来のヒト腫瘍細胞を、例えば免疫不全マウスの中へ系列希釈液で移植した後で、各マウスについて腫瘍形成が陽性又は陰性かを移植後少なくとも60日間採点することが含まれる。*in vitro* 又は *in vivo* での限界希釈分析による細胞頻度値の導出は、好ましくは、陽性及び陰性事象の既知頻度へポアソン分布統計を適用して、それにより陽性事象（この場合は、それぞれ、コロニー又は腫瘍の形成）の定義を満たす事象の頻度を提供することによって行う。

10

【 0 0 6 1 】

[074] 腫瘍始原細胞頻度を計算するために使用し得る、本発明と適合可能な他の方法に関して言えば、ごく普通の方法は、定量可能なフローサイトメトリー技術と免疫組織化学染色手順を含む。直前に記載した限界希釈分析技術ほど正確ではないが、これらの手順は、ずっと労働集約的ではなくて、妥当な数値を相対的に短い時間枠で提供する。このように、当業者は、腫瘍始原細胞について濃縮することが知られている、当該技術分野で認められた細胞表面タンパク質（例えば、下記の実施例1で説明するような、潜在的に適合可能なマーカー）と結合する1以上の抗体又は試薬を利用して、それによって様々な試料由来のTICレベルを測定する、フローサイトメトリー細胞表面マーカープロフィール決定法を使用し得ることが理解されよう。なお別の適合可能な方法において、当業者は、これらの細胞を区別すると考えられる細胞表面タンパク質へ結合することが可能である1以上の抗体又は試薬を使用する免疫組織化学によって、TIC頻度を *in situ* で（例えば、組織切片において）計数することができよう。

20

【 0 0 6 2 】

[075] 従って、上記に参照した方法のいずれを使用しても、本明細書の教示に従って、開示されるPTK7モジュレーター（細胞傷害剤へコンジュゲートしたものを含めて）によって提供されるTIC（又はその中のTPC）の頻度の低下を定量することが可能である。いくつかの事例において、本発明の化合物は、TICの頻度を（消失、分化誘導、ニッチ破壊、沈静化、等が含まれる、上記に注目した多様な機序によって）10%、15%、20%、25%、30%、又は35%も低下させる場合がある。他の態様において、TICの頻度の低下は、約40%、45%、50%、55%、60%、又は65%のオーダーであり得る。ある態様において、開示される化合物は、TICの頻度を、70%、75%、80%、85%、90%、又は95%も低下させる場合がある。当然ながら、TICの頻度のどの低下も、新生物の腫瘍形成性、永続性、再発、及び攻撃性の対応する低下をもたらす可能性があるとして理解されよう。

30

40

【 0 0 6 3 】

I V . P T K 7 モジュレーター

[076] いずれにしても、本発明は、いくつかのPTK7関連悪性腫瘍のいずれも含まれる様々な障害の診断、診断・治療、治療、及び/又は予防のためのPTK7モジュレーター（PTK7アンタゴニストが含まれる）の使用へ向けられる。開示モジュレーターは、単独で使用しても、化学療法剤又は免疫療法剤（例、治療用抗体）又は生物学的応答調節物質のような多種多様な抗癌化合物と一緒に使用してもよい。他の選択態様では、2以上の別々のPTK7モジュレーターを組み合わせ使用して増強された抗新生物効果をもたらしても、それを使用して多重特異性の構築体を作製してもよい。

50

## 【 0 0 6 4 】

[077] ある態様において、本発明の P T K 7 モジュレーターは、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド、又はポリペプチドを含む。なおより好ましくは、当該モジュレーターは、可溶性 P T K 7 ( s P T K 7 )、又はその形態、変異体、誘導体又は断片を含み、それには、例えば、P T K 7 融合構築体 ( 例、P T K 7 - F c 、 P T K 7 - 標的化部分、等 ) 又は P T K 7 - コンジュゲート ( 例、P T K 7 - P E G 、 P T K 7 - 細胞傷害剤、P T K 7 - b r m、等 ) が含まれる。また、他の態様において、P T K 7 モジュレーターは、抗体又はその免疫反応性断片若しくは誘導体を含むと理解される。特に好ましい態様において、本発明のモジュレーターは、中和抗体又はその誘導体若しくは断片を含む。他の態様において、P T K 7 モジュレーターは、内在化抗体 ( i n t e r n a l i z i n g a n t i b o d y ) 又はその断片を含んでよい。なお他の態様において、P T K 7 モジュレーターは、枯渇性抗体又はその断片を含んでよい。さらに、上述した融合構築体に関して言えば、これらの抗体モジュレーターは、選択される細胞傷害剤、ポリマー、生物学的応答調節物質 ( B R M )、等とコンジュゲートする、連結する、又は他の方法で会合して、様々な ( そして任意選択的に、多数の ) 作用機序で、指向される免疫療法を提供することができる。上記に述べたように、そのような抗体は、汎 P T K 7 抗体であって 2 以上の P T K 7 アイソフォームと会合しても、単一のアイソフォームと選択的に反応する免疫特異抗体であってもよい。なお他の態様において、当該モジュレーターは、遺伝子レベルで機能し得て、アンチセンス構築体、s i R N A、マイクロ R N A、等といった化合物を含んでよい。

10

20

## 【 0 0 6 5 】

[078] 開示される P T K 7 モジュレーターは、選択される経路に作動するか又は拮抗すること、又は、例えば、P T K 7 モジュレーターの形態、あらゆる会合ペイロード、又は投薬及び送達法に依存して、特定の細胞を消失させることが含まれる多様な機序を介して、腫瘍細胞 ( 特に T P C ) 及び / 又は関連する新生物を枯渇する、沈静化する、中和する、消失させる、又はその増殖、伝播、又は生存を阻害し得ることがさらに理解されよう。従って、本明細書に開示する好ましい態様は、腫瘍永続化細胞のような特定の腫瘍細胞亜集団の枯渇、阻害、又は沈静化へ向けられるが、そのような態様は、単に例示であって、いかなる意味でも限定的ではないことが強調されなければならない。むしろ、付帯の特許請求項において説明されるように、本発明は、如何なる特別な機序にも標的腫瘍細胞集団にも拘りなく、P T K 7 モジュレーターと、様々な P T K 7 関連過剰増殖性障害の治療、管理、又は予防におけるそれらの使用へ概括的に向けられる。

30

## 【 0 0 6 6 】

[079] 同じ意味において、本発明の開示態様は、P T K 7 と会合する 1 以上の P T K 7 アンタゴニストを含んでよい。そのために、本発明の P T K 7 アンタゴニストは、P T K 7 タンパク質又はその断片を認識する、それと反応する、結合する、複合する、競合する、会合する、又は他の方法で相互反応して、腫瘍始原細胞又は他の新生物細胞 ( バルク腫瘍又は N T G 細胞が含まれる ) を消失させる、沈静化する、低下させる、阻害する、妨害する、束縛する、又は制御する、如何なるリガンド、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質、抗体、又は免疫学的に活性なその断片若しくは誘導体も含んでよいと理解されよう。選択される態様において、P T K 7 モジュレーターは、P T K 7 アンタゴニストを含む。

40

## 【 0 0 6 7 】

[080] 本明細書に使用するように、アンタゴニストは、特別又は特定のタンパク質の活性 ( 受容体のリガンドへの結合、又は酵素の基質との相互作用が含まれる ) を中和する、遮断する、阻害する、廃絶する、低下させる、又はそれに干渉することが可能な分子を意味する。より一般的には、本発明のアンタゴニストは、抗体とその抗原結合性断片若しくは誘導体、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖、オリゴ糖、核酸、アンチセンス構築体、s i R N A、m i R N A、生体有機分子、ペプチド模倣体、薬剤とその代謝産物、転写及び翻訳制御配列、等を含んでよい。アンタゴニストには

50

、該タンパク質へ特異的に結合して、それによってその基質標的へのその結合を隔離する、低分子阻害剤、融合タンパク質、受容体の分子及び誘導体、該タンパク質のアンタゴニスト変異体、該タンパク質へ指向されるアンチセンス分子、RNAアプタマー、並びに該タンパク質に対するリボザイムも含めてよい。

【0068】

[081] 本明細書に使用するように、そして2以上の分子又は化合物へ適用されるように、「認識する」又は「会合する」という用語は、それによって一方の分子が他方の分子に対して影響を及ぼす、共有結合的又は非共有結合的、両分子の反応、結合、特異結合、複合、相互作用、接続、連結、一体化、合体、合併、又は接合を意味するものとする。

【0069】

[082] さらに、本明細書の実施例において証明するように、ヒトPTK7のモジュレーターには、ある事例において、ヒト以外の種(例、マウス)由来のPTK7と交差反応し得るものがある。他の事例において、例示のモジュレーターは、ヒトPTK7の1以上のアイソフォームに特異的であり得、他の種由来のPTK7相同分子種との交差反応性を示さない。当然ながら、本明細書の教示に一致して、そのような態様は、単一の種由来の2以上のアイソフォームと会合する汎PTK7抗体、又は単一のアイソフォームと排他的に会合する抗体を含んでよい。

【0070】

[083] いずれにしても、そして下記により詳しく考察するように、当業者は、開示モジュレーターをコンジュゲート形態でも非コンジュゲート形態でも使用してよいことを理解されよう。即ち、当該モジュレーターは、医薬活性化合物、生物学的応答調節物質、抗癌剤、細胞傷害剤又は細胞増殖抑制剤、診断部分、又は生体適合可能な修飾剤と(例えば、共有結合的又は非共有結合的に)会合又はコンジュゲートしてよい。この点について言えば、そのようなコンジュゲートは、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、核酸分子、低分子、模倣剤、合成薬、無機分子、有機分子、及び放射性核種を含んでよいと理解されよう。さらに、本明細書で示したように、選択したコンジュゲートは、そのコンジュゲーションに影響を及ぼすのに使用される方法に少なくとも一部は依存して、PTK7モジュレーターへ様々なモル比で共有結合的又は非共有結合的に連結してよい。

【0071】

V. 抗体

a. 概説

[084] 先に述べたように、本発明の特に好ましい態様は、PTK7モジュレーターを、PTK7の1以上のアイソフォームと選好的に会合する抗体の形態で含む。抗体という用語は最も広義に使用されて、具体的には、合成抗体、モノクローナル抗体、オリゴクローナル又はポリクローナル抗体、マルチクローナル抗体、組換え産生抗体、細胞内抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体、一価抗体、多価抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体(CDR-grafted antibody)、霊長類化抗体、Fab断片、F(ab')断片、単鎖FvFc(s c F v F c)、単鎖Fvs(s c F v)、抗イデオタイプ(抗Id)抗体、及び(所望される生理活性、即ち、免疫特異的又は免疫選好的なPTK7の会合又は結合を示す限りにおいて)他のあらゆる免疫学的に活性な抗体断片を網羅する。より広義において、本発明の抗体には、免疫グロブリン分子と免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片(即ち、抗原結合部位を含有する分子)が含まれて、ここでこれらの断片は、限定されないが、Fc領域又はその断片が含まれる、別の免疫グロブリンドメインへ融合してもしなくてもよい。さらに、本明細書においてより詳しく概説されるように、抗体(複数及び複数)という用語には、具体的には、下記に記載のようなFc変異体が含まれ、完全長の抗体と、Fc領域又はその断片を含んでなり、少なくとも1つのアミノ酸残基修飾を含んでもよく、そして免疫グロブリンの免疫学的に活性な断片へ融合してもよい、変異体Fc融合体が含まれる。

【0072】

10

20

30

40

50

[085] 下記により詳しく考察するように、抗体又は免疫グロブリンという一般用語は、生化学的に、そしてその重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依って識別することができて、適正なクラスへ容易に帰属させることができる、5種の別個の抗体のクラスを含む。史的な理由のために、インタクト抗体の主要クラスは、I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mと呼ばれる。ヒトでは、I g G及びI g Aのクラスが、構造とある種の生化学的特性に依って、認知されたサブクラス(アイソタイプ)、即ち、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、及びI g A 2へさらに分類され得る。ヒトのI g Gアイソタイプは、血清中のその豊富さの順で命名されて、I g G 1が最も豊富であることが理解されよう。

【0073】

[086] 全5種の抗体クラス(即ち、I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g M)とすべてのアイソタイプ(即ち、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、及びI g A 2)、並びにその変異体が本発明の範囲内にあるが、I g Gクラスの免疫グロブリンを含んでなる好ましい態様について、単に例証の目的のために、やや詳しく考察する。しかしながら、そのような開示は、本発明を実施する例示の組成物及び方法について単に例証するのであって、本発明の範囲又は付帯の特許請求項を決して限定するものではないことを理解されたい。

【0074】

[087] この点に関して言えば、ヒトI g G免疫グロブリンは、分子量がほぼ23,000ダルトンの2つの同一の軽いポリペプチド鎖と、分子量がアイソタイプに依存して53,000~70,000である2つの同一の重鎖を含む。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、対応するギリシャ語の小文字、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$ 、及び $\nu$ によってそれぞれ示される。どの脊椎動物種由来の抗体の軽鎖も、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ( $\kappa$ )及びラムダ( $\lambda$ )と呼ばれる、2つの明らかに別個の型の1つへ帰属させることができる。当業者は、異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造と三次元配置がよく知られていることを理解されよう。

【0075】

[088] この4本の鎖は、ジスルフィド結合によってY配置で結合して、ここで軽鎖は、重鎖の外側にあつて、Yの開口部より始まって、可変領域を通して続いて、Yの両端へ至る。それぞれの軽鎖が重鎖へ1つの共有ジスルフィド結合によって連結するのに対し、ヒンジ領域にある2つのジスルフィド連結は、重鎖を結合する。それぞれの重鎖及び軽鎖はまた、一定間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有するが、その数は、I g Gのアイソタイプに基づいて変動し得る。

【0076】

[089] それぞれの重鎖は、一端に可変ドメイン( $V_H$ )を有し、いくつかの定常ドメインがこれに続く。それぞれの軽鎖は、一端に可変ドメイン( $V_L$ )を、そしてその他端に定常ドメインを有し;軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第一定常ドメインと並置して、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと並置している。この点に関して言えば、軽鎖の可変ドメイン( $V_L$ )と重鎖の可変ドメイン( $V_H$ )の両方の部分が抗原認識と特異性を決定すると理解される。一方、軽鎖の定常ドメイン( $C_L$ )と重鎖の定常ドメイン( $C_H$  1、 $C_H$  2、又は $C_H$  3)は、分泌、経胎盤移動性、循環半減期、補体結合、等といった重要な生物学的特性を付与して制御する。転換によって、定常領域ドメインの番号付けは、それらが抗体の抗原結合部位又はアミノ末端からより離れるにつれて増加する。このように、抗体のアミノ又はN末端は、可変領域を含み、カルボキシ又はC末端は、定常領域を含む。このように、 $C_H$  3ドメインと $C_L$ ドメインは、それぞれ重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端を実際に含む。

【0077】

[090] 「可変」という用語は、可変ドメインのある部分が免疫グロブリン間の配列において広範囲に異なっていて、これらのホットスポットが特別な抗体の結合及び特異性の特徴を概ね決定するという事実に関連する。これらの超可変部位は、軽鎖可変ドメインと

10

20

30

40

50

重鎖可変ドメインの両方において、相補性決定領域（CDR）として知られる、それぞれ3つのセグメントにおいて出現する。CDRの近傍にある可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。より具体的には、天然に存在する単量体のIgG抗体において、抗体の各アームに存在するこの6つのCDRは、抗体が水性環境においてその三次元構造をとるときに、抗原結合部位を形成するように特異的に定位される、アミノ酸の短い不連続配列である。

【0078】

[091] 重鎖及び軽鎖の可変ドメインの残りを含んでなるフレームワーク領域は、アミノ酸配列において、より少ない分子間変動性を示す。むしろ、フレームワーク領域は、概ねシートコンホメーションを採って、CDRは、このシート構造に連結して、ある場合はその一部となるループを形成する。このように、これらのフレームワーク領域は、6つのCDRを非共有結合性の鎖間相互作用によって正確な配向で定位することをもたらす骨格を形成するように作用する。この定位されたCDRによって形成される抗原結合部位は、免疫反応性抗原上のエピトープに対して相補的な表面を決定する。この相補的な表面は、免疫反応性抗原エピトープに対する抗体の非共有結合を促進する。CDRの位置及び組成は、本明細書に提供される定義を使用して、当業者によって容易に確定され得ると理解されよう。

10

【0079】

[092] 下記により詳しく考察するように、有効な抗体を提供するために、標準の組換え及び発現技術を使用して、重鎖及び軽鎖の可変領域の全部又は一部を再結合又は工学処理してよい。即ち、第一抗体（又はそのあらゆる部分）由来の重鎖又は軽鎖可変領域を、第二抗体由来の重鎖又は軽鎖可変領域のどの選択される部分とも混合して適合させてよい。例えば、1つの態様では、第一抗体の3つの軽鎖CDRを含んでなる軽鎖可変領域全体を、第二抗体の3つの重鎖CDRを含んでなる重鎖可変領域全体と対合させて、機能可能な（operative）抗体を提供することができる。さらに、他の態様では、様々な抗体に由来する個々の重鎖及び軽鎖CDRを混合して適合させて、最適化された特徴を有する所望の抗体を提供することができる。このように、例示の抗体は、第一抗体由来の3つの軽鎖CDR、第二抗体由来の2つの重鎖CDR、及び第三抗体由来の第三の重鎖CDRを含んでよい。

20

【0080】

[093] より具体的には、本発明の文脈では、図面6A又は図面6Bに示されるマウス可変領域アミノ酸配列に由来する、開示される重鎖及び軽鎖CDRのいずれも、本明細書の教示に従ってこの方法で再配置させて、最適化された抗PTK7（例、抗hPTK7）抗体を提供し得ることが理解されよう。即ち、図面6Aに示される連続した軽鎖可変領域アミノ酸配列（配列番号20～60、偶数番号）又は図面6Bに示される連続した重鎖可変領域アミノ酸配列（配列番号21～61、奇数番号）に由来するCDRの1以上を、PTK7モジュレーターに、そして特に好ましい態様では、1以上のPTK7アイソフォームと免疫特異的に会合するCDR移植又はヒト化抗体に取り込むことができる。図面6A及び6Bには、そのようなヒト化モジュレーターの軽鎖可変領域アミノ酸配列（配列番号62～68、偶数番号）及び重鎖可変領域アミノ酸配列（配列番号63～69、奇数番号）の例も示される。まとめると、これらの新規アミノ酸配列は、本発明に準拠した、21種のマウスと4種のヒト化の例示モジュレーターを図示する。さらに、本出願に付帯する配列表には、図面6A及び6Bに示す21種の例示マウスモジュレーターと4種のヒト化モジュレーターのそれぞれに対応する核酸配列（配列番号120～169）が含まれる。

30

40

【0081】

[094] いずれにしても、相補性決定領域の残基番号は、Kabat et al. (1991, NIH 公開公報 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.) のそのように定義され得て、具体的には、軽鎖可変ドメイン中の残基24～34（CDR1）、50～56（CDR2）及び89～97（CDR3）と重鎖可変ドメイン中の31～35（CDR1）、50～65（CDR2）及び95～102（CDR3）である。CDR

50

は、抗体ごとにかなり変動する（そして、定義上、カバット（Kabat）コンセンサス配列との相同性を示さない）ことに留意されたい。フレームワーク残基の最大の並置には、しばしば、Fv領域に使用するために、スペーサー残基をこの番号付けシステムに挿入することが求められる。加えて、ある個別残基の同一性は、どの所与のカバット部位番号でも、種間又は対立遺伝子の多様性により、抗体鎖ごとに変動する場合がある。Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342, pp.877-883 (1989)、MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)、及び S. Dubel（監修）「治療用抗体の手引き（Handbook of Therapeutic Antibodies）」（第3版）WILEY-VCH Verlag GmbH and Co.(2007)も参照のこと。ここでその定義には、互いに対して比較するときのアミノ酸残基の重なり又は重集合が含まれる。上述した参考文献のそれぞれは、その全体において参照により本明細書に組み込まれて、上記に引用した参考文献のそれぞれによって定義されるような結合領域又はCDRを含むアミノ酸残基を比較のために下記に示す。

10

【0082】

【表1】

CDRの諸定義

	Kabat <sup>1</sup>	Chothia <sup>2</sup>	MacCallum <sup>3</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	30-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	53-55	47-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	96-101	93-101
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	30-36
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	46-55
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-96

20

<sup>1</sup>残基番号付けは、Kabat et al., 上掲の命名法に従う。

<sup>2</sup>残基番号付けは、Chothia et al., 上掲の命名法に従う。

<sup>3</sup>残基番号付けは、MacCallum et al., 上掲の命名法に従う。

30

【0083】

[095] 本明細書に考察されるように、当業者は、図面6A又は6Bに示すそれぞれの各重鎖及び軽鎖配列について、Kabat et al., Chothia et al., 又は MacCallum et al. によって定義されるようにCDRを容易に定義、同定、導出、及び/又は列挙することができよう。従って、本発明の範囲内には、すべてのそのような命名法によって定義されるCDRを含んでなる主題のCDR及び抗体が明白に含まれる。より概括的に言えば、「可変領域CDRアミノ酸残基」という用語には、上記に示したようななどの配列又は構造ベースの方法を使用しても同定されるようなCDR中のアミノ酸が含まれる。

【0084】

[096] 本明細書に使用するように、「可変領域フレームワーク（FR）アミノ酸残基」という用語は、Ig鎖のフレームワーク領域中のアミノ酸に言及する。本明細書に使用する「フレームワーク領域」又は「FR領域」という用語には、可変領域の一部であるが、CDRの一部ではない（例えば、CDRのカバット定義を使用する）アミノ酸残基が含まれる。故に、可変領域フレームワークは、長さが約100～120個の間のアミノ酸の不連続配列であるが、CDRの外側のアミノ酸だけが含まれる。

40

【0085】

[097] 重鎖可変領域の具体例では、そして Kabat et al. によって定義されるようなCDRでは、フレームワーク領域1がアミノ酸1～30を囲む可変領域のドメインに対応し；フレームワーク領域2がアミノ酸36～49を囲む可変領域のドメインに対応し；フレームワーク領域3がアミノ酸66～94を囲む可変領域のドメインに対応して、フレ

50

ムワーク領域4がアミノ酸103～可変領域の末端までの可変領域のドメインに対応する。軽鎖のフレームワーク領域も、軽鎖可変領域CDRのそれぞれによって同様に分離している。同様に、Chothia et al. によるCDRの定義(例、CDR-L1 23～34、CDR-L2 50～56、CDR-L3 89～97; CDR-H1 26～32、CDR-H2 50～58、CDR-H3 95～102)又はMcCallum et al. によるCDRの定義を使用すると、フレームワーク領域の境界は、上記に記載のようなそれぞれのCDR末端によって分離される。

【0086】

[098] 上述した構造上の考慮事項を銘記して、当業者は、本発明の抗体が、いくつかの機能的な態様のいずれも含んでよいことを理解されよう。この点に関して言えば、適合可能な抗体は、被検者において所望される生理学的応答をもたらす、どの免疫反応性抗体(この用語は、本明細書において定義される)も含んでよい。開示される抗体のいずれも本教示に従って使用してよいが、本発明のある態様は、キメラ、ヒト化、又はヒトモノクローナル抗体、又はそれらの免疫反応性断片を含む。なお他の態様は、例えば、同種の(homogeneous)又は異種の(heterogeneous)多量体構築体、Fc変異体、及びコンジュゲートされたか又はグリコシル化により改変された抗体を含んでよい。さらに、そのような配置が相互に排他的ではないこと、そして適合可能な個々の抗体が本明細書に開示される機能的な側面の1以上を含んでよいことが理解されよう。例えば、適合可能な抗体は、ヒト化可変領域がある一本鎖の二重特異性抗体(diabody)、又はグリコシル化パターンを変化させて血清半減期を調節するFc修飾がある、完全にヒトの完全長IgG3抗体を含んでよい。当業者には、他の例示態様が容易に明らかであって、本発明の範囲内にあるものとして容易に識別可能であり得る。

10

20

【0087】

b. 抗体作製

[099] よく知られていて、本明細書の「実施例」に示されるように、本明細書の教示に従った抗体を提供するには、ウサギ、マウス、ラット、等が含まれる様々な宿主動物に接種して、これを使用してよい。免疫学的応答を高めるために使用し得る、当該技術分野で知られたアジュバントには、接種される種に依存して、限定されないが、フロイント(完全及び不完全)アジュバント、水酸化アルミニウムのような鉱物ゲル剤、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、スカシ貝ヘモシアニン、ジニトロフェノールのような界面活性物質、並びにBCG(カルメット・ゲラン桿菌)及びコリネバクテリウム・パルブム(corynebacterium parvum)のような、潜在的に有用なヒトアジュバントが含まれる。このようなアジュバントは、抗原を局所の貯蔵部位(deposit)に隔離することによってその速やかな拡散からそれを防ぐ場合もあれば、マクロファージにとって走化性である因子や免疫系の他の成分を分泌するように宿主を刺激する物質を含有する場合もある。好ましくは、ポリペプチドを投与するならば、免疫化のスケジュールは、該ポリペプチドの2回以上の投与が数週にわたって行われることを伴う。

30

【0088】

[0100] 選択されるアイソフォーム及び/又はペプチド、又は所望のタンパク質を発現する生細胞又は細胞調製物を含み得るPTK7免疫原(例、可溶性PTK7又はsPTK7)での動物の免疫化の後で、その動物より、当該技術分野で公知の技術を使用して、抗体及び/又は抗体産生細胞を入手することができる。いくつかの態様では、動物を出血させるか又は犠牲にすることによってポリクローナル抗PTK7抗体含有血清を入手する。この血清は、動物より入手した形態で研究目的に使用しても、あるいは、この抗PTK7抗体を部分的又は完全に精製して、免疫グロブリン画分又は同種の抗体調製物を提供してもよい。

40

【0089】

c. モノクローナル抗体

[0101] 本発明のある側面と併せてポリクローナル抗体を使用してよいが、好ましい態様は、PTK7反応性モノクローナル抗体の使用を含む。本明細書に使用するように、「

50

モノクローナル抗体」又は「mAb」という用語は、実質的に同種の抗体の集団より得られる抗体を意味し、即ち、この集団を含んでなる個々の抗体は、微量で存在し得る可能な突然変異（例、天然に存在する突然変異）以外は、同一である。このように、「モノクローナル」という修飾語は、別々の抗体の混合物ではないという抗体の特徴を示して、どの種類の抗体と併せて使用してもよい。ある態様において、そのようなモノクローナル抗体には、PTK7と結合又は会合するポリペプチド配列を含んでなる抗体が含まれて、ここでPTK7結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列からの単一の標的結合ポリペプチド配列の選択が含まれる方法によって入手される。

#### 【0090】

[0102] 好ましい態様では、免疫化した動物より単離した細胞より抗体産生細胞株を調製する。免疫化の後で、その動物を犠牲にして、付帯の「実施例」に示すような、当該技術分野で周知の手段によって、リンパ節及び/又は脾臓B細胞を不死化する。細胞を不死化する方法には、限定されないが、それらを発癌遺伝子でトランスフェクトすること、それらを発癌ウイルスに感染させて不死化細胞を選別する条件の下でそれらを培養すること、それらを発癌性化合物又は変異原性化合物へ処すること、それらを不死化細胞（例、骨髄腫細胞）と融合すること、及び腫瘍抑制遺伝子を不活性化することが含まれる。骨髄腫細胞との融合を使用する場合、骨髄腫細胞は、好ましくは、免疫グロブリンポリペプチドを分泌しない（非分泌細胞株）。下記の「実施例」に示すように、PTK7（選択されるアイソフォームが含まれる）又はその免疫反応性部分を使用して、不死化細胞をスクリーニングしてよい。好ましい態様において、最初のスクリーニングは、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）又はラジオイムノアッセイを使用して実施する。

#### 【0091】

[0103] より一般的には、ハイブリドーマ、組換え技術、ファージディスプレイ技術、酵母ライブラリー、トランスジェニック動物（例、Xenomouse（登録商標）又はHuMab Mouse（登録商標））、又はこれらの何らかの組み合わせが含まれる、当該技術分野で公知の多種多様な技術を使用して、本発明に一致した別々のモノクローナル抗体を製造することができる。例えば、上記に概括的に記載されて、Harlow et al. 「抗体：実験マニュアル（Antibodies: A Laboratory Manual）」（コールドスプリングハーバーラボラトリー出版局、第2版、1988）；「モノクローナル抗体とT細胞ハイブリドーマ（Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas）」（エルセヴィエ、ニューヨーク、1981）中、Hammerling, et al., 563-681（このそれぞれは、本明細書に組み込まれる）においてより詳しく教示されるようなハイブリドーマ技術を使用して、モノクローナル抗体を製造することができる。開示されるプロトコルを使用して、好ましくは、関連の抗原とアジュバントの多数の皮下又は腹腔内注射によって、抗体を哺乳動物中で産生する。先に考察したように、この免疫化は、活性化された脾臓細胞又はリンパ球からの抗原反応性抗体（免疫化動物がトランスジェニックであれば、完全にヒトのものであり得る）の産生を含む免疫応答を概ね誘発する。生じる抗体は、この動物の血清より採取してポリクローナル調製物を提供し得るが、一般的には、脾臓、リンパ節、又は末梢血より個々のリンパ球を単離して、モノクローナル抗体の同種調製物を提供することがより望ましい。最も典型的には、脾臓よりリンパ球を入手して不死化して、ハイブリドーマを提供する。

#### 【0092】

[0104] 例えば、上記に記載のように、この選択法は、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、又は組換えDNAクローンのプールのような複数のクローンからのユニークなクローンの選択であり得る。例えば、標的への親和性を高める、標的結合配列をヒト化する、細胞培養中でのその産生を改善する、そのin vivoでの免疫原性を低下させる、多重特異性抗体を創出する、等のために選択したPTK7結合配列をさらに改変することができること、そしてその改変した標的結合配列を含んでなる抗体も本発明のモノクローナル抗体であることが理解されるべきである。異なる決定基（エピトープ）に対して指向された別々の抗体が典型的には含まれるポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物のそれぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一決定基に対して

10

20

30

40

50

指向される。その特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、典型的には、交差反応性であり得る他の免疫グロブリンがそこに混在していない点で有利である。

【0093】

d. キメラ抗体

[0105] 別の態様において、本発明の抗体は、少なくとも2つの異なる種又は型の抗体からの共有結合したタンパク質セグメントに由来するキメラ抗体を含んでよい。本明細書に使用するように、「キメラ抗体」という用語は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特別な種に由来するか又は特別な抗体クラス又はサブクラスに属する抗体中の対応配列と同一又は相同である一方で、この鎖(複数)の残りは、別の種に由来するか又は別の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体、並びにそのような抗体の断片(それらが所望される生理活性を示す限りにおいて)の中の対応配列と同一又は相同である構築体へ向けられると理解されよう(米国特許第4,816,567号; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984))。1つの例示態様において、本明細書の教示に従うキメラ抗体は、マウスのV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>アミノ酸配列とヒトの供給源に由来する定常領域を含んでよい。他の適合可能な態様において、本発明のキメラ抗体は、下記に記載のようなCDR移植抗体又はヒト化抗体を含んでよい。

10

【0094】

[0106] 一般的に言えば、キメラ抗体を作製する目標は、企図される被検者種からのアミノ酸の数が最大化されたキメラを創出することである。1つの例は、CDR移植抗体であって、ここでこの抗体は、特別な種に由来するか又は特別な抗体クラス又はサブクラスに属する1以上の相補性決定領域(CDR)を含む一方で、この抗体鎖(複数)の残りは、別の種に由来するか又は別の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体中の対応配列と同一又は相同である。ヒトにおける使用のためには、齧歯動物の抗体からの可変領域又は選択CDRをしばしばヒト抗体の中へ移植して、ヒト抗体の天然に存在する可変領域又はCDRに置き換える。これらの構築体は、一般的には、最強のモジュレーター機能(例、CDC、ADCC、等)を提供する一方で、この抗体に対する被検者による望まれない免疫応答を低下させるという利点を有する。

20

【0095】

e. ヒト化抗体

[0107] CDR移植抗体に似ているのがヒト化抗体である。一般的に言えば、ヒト化抗体は、初めは非ヒト動物において作製されたモノクローナル抗体より産生する。本明細書に使用するように、非ヒト(例、マウス)抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含有するキメラ抗体である。1つの態様において、ヒト化抗体は、レシピエント抗体のCDRからの残基が、所望される特異性、親和性、及び/又は能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト霊長動物のような非ヒト種(ドナー抗体)のCDRからの残基に置き換わっている、ヒト免疫グロブリン(レシピエント又はアクセプター抗体)である。

30

【0096】

[0108] 一般的に言えば、抗体のヒト化は、ドナー抗体とレシピエント抗体の両方の配列相同性及びカノニカル構造の分析を含む。選択態様において、レシピエント抗体は、コンセンサス配列を含む場合がある。ヒトのコンセンサスフレームワークを創出するには、いくつかのヒト重鎖又は軽鎖アミノ酸配列からのフレームワークを並置して、コンセンサスアミノ酸配列を同定してよい。さらに、多くの事例では、ヒト免疫グロブリンの可変ドメイン中の1以上のフレームワーク残基を、ドナー抗体からの対応する非ヒト残基によって置き換える。これらのフレームワーク置換は、当該技術分野で周知の方法によって(例えば、CDR残基とフレームワーク残基の相互作用をモデル化して、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定すること、及び特別な位置での異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較によって)確認される。このような置換は、移植CDR(複数)の適正な三次元配置を維持するのに役立ち、フレームワーク置換のない類似の構築体に優って親和性をしばしば改善する。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体やドナー抗体に見

40

50

出されない残基を含んでよい。これらの修飾を施して、既知の技術を使用して抗体性能をさらに洗練させることができる。

【0097】

[0109] CDR移植抗体とヒト化抗体については、例えば、米国特許第6,180,370号、5,693,762号、5,693,761号、5,585,089号、及び5,530,101号に記載されている。概して言えば、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、そして典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、ここでそのCDRのすべて又は実質的にすべては、非ヒト免疫グロブリンのそれに対応して、フレームワーク領域のすべて又は実質的にすべては、ヒト免疫グロブリン配列のそれである。ヒト化抗体はまた、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれである、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部を含んでもよい。さらなる詳細については、例えば、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); 及び Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992) を参照のこと。また、例えば、Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); 及び、米国特許第6,982,321号及び7,087,409号を参照のこと。なお別の方法は、ヒューマニアリング(humaneering)と呼ばれて、例えば、U.S. 2005/0008625に記載されている。本出願の目的では、「ヒト化抗体」という用語には、フレームワーク置換が無いかほとんど無いCDR移植抗体(即ち、1以上の移植非ヒトCDRを含んでなるヒト抗体)が明白に含まれるものとする。

10

20

【0098】

[0110] 追加的に言えば、非ヒト抗PTK7抗体はまた、WO98/52976及びWO00/34317に開示される方法による、ヒトT細胞エピトープの特異的除去又は脱免疫化によって修飾してよい。簡潔に言えば、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域についてMHCクラスIIへ結合するペプチドを解析することができて;これらのペプチドは、潜在的なT細胞エピトープ(WO98/52976及びWO00/34317において定義されるような)を代表する。潜在的なT細胞エピトープの検出には、ペプチドスレディング(peptide threading)と呼ばれるコンピュータモデリングアプローチを適用し得て、加えて、WO98/52976及びWO00/34317に記載のように、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>配列に存在するモチーフを求めて、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベースを検索することができる。これらのモチーフは、18種の主要MHCクラスII DRアロタイプのいずれへも結合して、それにより潜在的なT細胞エピトープを構成する。検出された潜在的なT細胞エピトープは、可変領域中の少数のアミノ酸残基を置換することによるか又は単一アミノ酸置換によって消失させることができる。可能な限り、保守的な置換がなされる。しばしば、絶対的ではないが、ヒト生殖細胞株抗体配列中のある位置に共通のアミノ酸を使用してよい。脱免疫化の変化を確認した後で、突然変異誘発又は他の合成法(例、de novo 合成、カセット置換、等)によって、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>をコードする核酸を構築することができる。突然変異誘発した可変配列をヒト定常領域へ融合させてもよい。

30

【0099】

[0111] 選択態様では、ヒト化抗体可変領域残基の少なくとも60%、65%、70%、75%、又は80%が親のフレームワーク領域(FR)及びCDR配列の残基に対応する。他の態様では、ヒト化抗体残基の少なくとも85%又は90%が親のフレームワーク領域(FR)及びCDR配列の残基に対応する。さらに好ましい態様では、ヒト化抗体残基の95%より多くが親のフレームワーク領域(FR)及びCDR配列の残基に対応する。

40

【0100】

[0112] ヒト化抗体は、本明細書に記載のような通常の分子生物学及び生体分子工学の技術を使用して製造することができる。これらの方法には、重鎖又は軽鎖の少なくとも1つに由来する免疫グロブリンFv可変領域の全部又は一部をコードする核酸配列を単離すること、操作すること、及び発現させることが含まれる。そのような核酸の供給源は、当

50

業者に周知であり、例えば、上記に記載のような、予め決定された標的に対する抗体又は免疫反応性断片を産生するハイブリドーマ、真核細胞、又はファージより、生殖細胞株免疫グロブリン遺伝子より、又は合成構築体より入手し得る。次いで、ヒト化抗体をコードする組換えDNAを適正な発現ベクターの中へクローン化することができる。

#### 【0101】

[0113] ヒト生殖細胞株配列は、例えば、Tomlinson, I. A. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798; Cook, G. P. et al. (1995) Immunol. Today 16: 237-242; Chothia, D. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227: 799-817; 及び Tomlinson et al. (1995) EMBOJ 14: 4628-4638 に開示されている。V B A S Eディレクトリは、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的なディレクトリを提供する (Retter et al., (2005) Nuc Acid Res 33: 671-674 を参照のこと)。これらの配列は、ヒト配列の (例えば、フレームワーク領域及びCDRのための) 供給源として使用することができる。本明細書に説明するように、コンセンサスヒトフレームワーク領域も、例えば、米国特許第6,300,064号に記載のように、使用することができる。

10

#### 【0102】

##### f. ヒト抗体

[0114] 上述した抗体に加えて、当業者は、本発明の抗体が完全ヒト抗体を含み得ることを理解されよう。本出願の目的では、「ヒト抗体」という用語は、ヒトによって産生される、及び/又は本明細書に開示するようなヒト抗体を作製するための技術のいずれも使用して作製された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を保有する抗体を含む。このヒト抗体の定義では、具体的には、非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体が排除される。

20

#### 【0103】

[0115] 当該技術分野で公知の様々な技術を使用して、ヒト抗体を産生することができる。上記に述べたように、ファージディスプレイ技術を使用して、本教示に準拠した免疫活性の結合領域を提供することができる。このように、本発明のある態様は、(好ましくは、ヒト)抗体のライブラリーをファージ上で合成する工程、このライブラリーについて選択されるPTK7又はその抗体結合部分でスクリーニングする工程、PTK7へ結合するファージを単離する工程、及びこのファージより免疫反応性断片を入手する工程を含んでなる、抗PTK7抗体又はその抗原結合部分を産生するための方法を提供する。例を挙げると、ファージディスプレイ技術における使用のための抗体ライブラリーを作製するための1つの方法は、ヒト又は非ヒトの免疫グロブリン遺伝子座を含んでなる非ヒト動物を、選択したPTK7又はその抗原性部分で免疫化して、免疫応答を創出する工程、免疫化した動物より抗体産生細胞を抽出する工程; この抽出した細胞より、本発明の抗体の重鎖及び軽鎖をコードするRNAを単離する工程、このRNAを逆転写してcDNAを産生する工程、プライマーを使用してこのcDNAを増幅する工程、及びこのcDNAを、抗体がファージ上で発現されるように、ファージディスプレイベクターへ挿入する工程を含む。より具体的には、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインをコードするDNAをscFvリンカーと共にPCRによって組換えて、ファージミドベクター(例、pCANTAB6又はpComb3HSS)へクローン化する。次いで、このベクターは、大腸菌(E. coli)中へ電気穿孔させてよく、次いでこの大腸菌にヘルパーファージを感染させる。これらの方法で使用されるファージは、典型的には、fd及びM13が含まれる繊維状ファージであって、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインは、通常、ファージ遺伝子III又は遺伝子VIIの一方へ組換え的に融合される。

30

40

#### 【0104】

[0116] 上記のように製造した組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって、本発明の組換えヒト抗PTK7抗体を単離することができる。好ましい態様において、該ライブラリーは、B細胞より単離したmRNAより製造されるヒトのV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>cDNAを使用して産生される、scFvファージディスプレイライブラリーである。当該技術分野では、このようなライブラリーを製造してスクリーニングす

50

る方法が周知であり、ファージディスプレイライブラリーを産生するためのキットが市販されている（例えば、ファルマシア社の組換えファージ抗体システム（Recombinant Phage Antibody System）、カタログ番号：27-9400-01；及び、StratageneのSurfZAP<sup>TM</sup>ファージディスプレイキット、カタログ番号：240612）。抗体ディスプレイライブラリーを産生してスクリーニングするのに使用し得る他の方法及び試薬も存在する（例えば、米国特許第5,223,409号；PCT公開公報番号：WO92/18619、WO91/17271、WO92/20791、WO92/15679、WO93/01288、WO92/01047、WO92/09690；Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991)；Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992)；Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989)；McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990)；Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993)；Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)；Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)；Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992)；Garrad et al., *Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991)；Hoogenboom et al., *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137 (1991)；及びBarbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991)を参照のこと）。

10

#### 【0105】

[0117] ナイブライブラリー（天然又は合成のいずれか）によって産生される抗体は、中等度の親和性（約 $10^6 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ の $K_d$ ）であり得るが、当該技術分野で記載されるような二次ライブラリーより構築して再選択することによって、親和性成熟も *in vitro* で模倣することができる。例えば、Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)の方法において、又はGram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 3576-3580 (1992)の方法において、エラーを起こしやすい（error-prone）ポリメラーゼ（Leung et al., *Technique*, 1: 11-15 (1989)に報告されている）を使用することによって、突然変異を *in vitro* で無作為に導入することができる。追加的に言えば、例えば、選択した個々のFvクローンにおいて、対象のCDRが含まれるランダム配列を担うプライマーでPCRを使用して1以上のCDRを無作為に突然変異させて、より高親和性のクローンをスクリーニングすることによって、親和性成熟を実施することができる。WO9607754は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域中に突然変異誘発を引き起こして、軽鎖遺伝子のライブラリーを創出するための方法について記載した。別の有効なアプローチは、Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992)に記載のように、ファージディスプレイによって選択される $V_H$ 又は $V_L$ ドメインを、非免疫化ドナーより得られる天然に存在するVドメイン変異体のレパートリーと組換えて、数回の鎖リシャッフリング（chain reshuffling）においてより高い親和性をスクリーニングすることである。この技術により、解離定数： $K_d$ （ $k_{off} / k_{on}$ ）が約 $10^{-9} \text{ M}$ 以下である抗体及び抗体断片の産生が可能になる。

20

30

#### 【0106】

[0118] 結合対をその表面に発現する真核細胞（例、酵母）を含んでなるライブラリーを使用して同様の手順を利用し得ることがさらに理解されよう。ファージディスプレイ技術と同様に、この真核細胞ライブラリーを対象の抗原（即ち、PTK7）に対してスクリーニングして、候補結合対を発現する細胞を単離してクローン化する。ライブラリー内容を最適にすることと反応性結合対の親和性成熟のために種々の工程を講じてよい。例えば、米国特許第7,700,302号及び米国仮特許出願シリアル番号：12/404,059を参照のこと。1つの態様において、ヒト抗体は、ファージライブラリーより選択されて、ここでそのファージライブラリーは、ヒト抗体を発現する（Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996)；Sheets et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6157-6162 (1998)；Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991)；Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)）。他の態様では、酵母のような真核細胞において産生されるコンビナトリアル抗体ライブラリーよりヒト結合対を単離してよい。例えば、米国特許第7,700,302号を参照のこと。このような技術は、有利にも、多数の候補モ

40

50

ジュレーターのスクリーニングを可能にして、候補配列の相対的に容易な操作（例えば、親和性成熟又は組換えシャッフリング（recombinant shuffling）による）を提供する。

【0107】

[0119] ヒト抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物（例えば、内因性の免疫グロブリン遺伝子が一部又は完全に不活性化されたマウス）の中へ導入することによって作製することができる。抗原チャレンジすると、ヒト抗体産生が観測されて、これは、遺伝子再編成、アSEMBリー、及び抗体レパートリーを含めて、ヒトで見られるものとすべての点で酷似している。このアプローチについては、例えば、米国特許第5,545,807号；5,545,806号；5,569,825号；5,625,126号；5,633,425号；5,661,016号に記載され、ゼノマウス（Xenomouse）（登録商標）技術に関しては、以下の科学文献とともに米国特許第6,075,181号及び6,150,584号に記載されている：Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)。あるいは、ヒト抗体は、標的抗原に対して指向された抗体を産生するヒトBリンパ球の不活化により産生してよい（このようなBリンパ球は、新生物障害に罹患している個体より回収してもよく、*in vitro* で免疫化してもよい）。例えば、Cole et al. 「モノクローナル抗体と癌療法（Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy）」 Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.* 147 (1): 86-95 (1991); 及び米国特許第5,750,373号を参照のこと。

10

20

【0108】

V I . 抗体の特徴

[0120] 当該抗体モジュレーターをどのように入手したとしても、またそれが上述した形態（例、ヒト化、ヒト、等）のいずれを採るとしても、開示モジュレーターの好ましい態様は、様々な特徴を示す可能性がある。この点に関して言えば、抗PTK7抗体産生細胞（例、ハイブリドーマ又は酵母コロニー）を、例えば、活発な増殖、高い抗体産生、及び（下記により詳しく考察するような）望ましい抗体特徴が含まれる望ましい特徴について選択し、クローン化して、さらにスクリーニングしてよい。ハイブリドーマは、同系遺伝子の動物、免疫系を欠損している動物（例、ヌードマウス）において *in vivo* で、又は細胞培養において *in vitro* で拡充させることができる。そのそれぞれが別々の抗体種を産生するハイブリドーマ及び/又はコロニーを選択する、クローン化する、及び拡充させる方法は、当業者に周知である。

30

【0109】

a . 中和抗体

[0121] 特に好ましい態様において、本発明のモジュレーターは、中和抗体又はその誘導体若しくは断片を含む。「中和抗体」又は「中和アンタゴニスト」という用語は、PTK7へ結合するか又はそれと相互作用してリガンドのその結合相手への結合又は会合を防ぎ、それによってこれら分子の相互作用より生じるはずの生体応答（例、リン酸化又はVEGF誘発性の血管新生）を妨害する抗体又はアンタゴニストを意味する。抗体又はその免疫学的に機能的な断片若しくは誘導体の結合と特異性について評価する場合、抗体又は断片がリガンドのその結合相手又は基質への結合を実質的に阻害するのは、例えば、選択基質のリン酸化（Shin et al., *Biochem and Biophys Res Com.* Vol. 371:4）によるか又は *in vitro* 競合結合アッセイで測定されるように、過剰の抗体が標的分子へ結合する結合相手の量を少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、又は99%以上低下させるときである。例えば、PTK7に対する抗体の場合、中和抗体又はアンタゴニストは、好ましくは、特定の基質に関するPTK7のリン酸化能力を少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、又は99%以上減少させる。この減少した活性は、当該技術分野で認められた技術を使用して直接測定しても、そのような低

40

50

下が血管新生のような二次活性に及ぼす影響によって測定してもよいと理解されよう。

【0110】

b. 内在化抗体

[0122] PTK7又はその選択されるアイソフォームが可溶型で存在し得ることを示す証拠はあるが、少なくともある種のPTK7は、細胞表面と会合したままの状態にあることにより開示モジュレーターの内在化を可能にするようである。従って、本発明の抗PTK7抗体は、PTK7を発現する細胞によって、少なくともある程度は、内在化され得る。例えば、腫瘍始原細胞の表面上のPTK7へ結合する抗PTK7抗体は、腫瘍始原細胞によって内在化され得る。特に好ましい態様では、そのような抗PTK7抗体を、内在化と同時に該細胞を殺傷する細胞傷害性部分のような抗癌剤と会合させるか又はそれへコン

10

【0111】

[0123] 本明細書に使用するよう、内在化する抗PTK7抗体とは、哺乳動物細胞と会合したPTK7への結合時にその細胞によって取り込まれるものである。この内在化抗体には、抗体断片、ヒト又はヒト化抗体、及び抗体コンジュゲートが含まれる。内在化は、*in vitro*でも*in vivo*でも起こり得る。療法上の応用では、内在化が*in vivo*で起こり得る。内在化される抗体分子の数は、PTK7発現細胞、特にPTK7発現腫瘍始原細胞を殺傷するのに十分又は充分であり得る。抗体又は抗体コンジュゲートの効力に依っては、いくつかの事例において、抗体が結合する標的細胞を殺傷するのに、該細胞への単一の抗体分子の取込みで十分である。例えば、ある毒素は、殺傷においてきわめて強力であるので、腫瘍細胞を殺傷するには、抗体へコンジュゲートした毒素の1分子の内在化で十分である。抗PTK7抗体が哺乳動物細胞上のPTK7への結合時に内在化されるかどうかは、下記の実施例(例、実施例12及び13)に記載されるものが含まれる様々なアッセイによって決定することができる。抗体が細胞中へ内在化されるかどうかを検出する方法については、その全体において参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,619,068号にも記載されている。

20

【0112】

c. 枯渇性抗体

[0124] 他の好ましい態様において、本発明のモジュレーターは、枯渇性抗体又はその誘導体若しくは断片を含む。「枯渇性抗体」という用語は、細胞表面の上又は近くにあるPTK7へ結合するか又はそれと会合して、該細胞の死滅、無能化、又は消失を(例えば、補体依存性細胞傷害又は抗体依存性細胞傷害によって)誘発する、促進する、又は引き起こす抗体又は断片を意味する。下記により詳しく考察するいくつかの態様において、選択した枯渇性抗体は、細胞傷害剤へ会合又はコンジュゲートされる。好ましくは、枯渇性抗体は、ある一定の細胞集団において、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、又は99%の腫瘍永続化細胞を除去する、無能化する、消失させる、又は殺傷することができよう。いくつかの態様において、この細胞集団は、濃縮、分画、精製、又は単離された腫瘍永続化細胞を含んでよい。他の態様において、この細胞集団は、腫瘍永続化細胞を含む腫瘍試料全体又は異種の腫瘍抽出物を含んでよい。当業者は、下記の実施例(例、実施例13及び14)に記載の

30

40

【0113】

d. エピトープ結合

[0125] 開示される抗PTK7抗体は、選択された標的(複数)によって提示される別々のエピトープ又は決定基と会合するか又はそれへ結合するとさらに理解されよう。本明細書に使用するよう、「エピトープ」という用語は、特別の抗体によって認識されて特異的に結合されることが可能な標的抗原のその部分を意味する。抗原がPTK7のようなポリペプチドである場合、エピトープは、連続したアミノ酸からも、タンパク質の三次元フォールディングによって並列される不連続アミノ酸からも形成され得る。連続したアミ

50

ノ酸より形成されるエピトープがタンパク質の変性時にも典型的には保持されるのに対し、三次元フォールディングによって形成されるエピトープは、タンパク質の変性時に典型的には失われる。エピトープには、典型的には、少なくとも3個、そしてより通常は、少なくとも5又は8～10個のアミノ酸が独自の空間コンホメーションに含まれる。より具体的には、当業者は、エピトープという用語には、免疫グロブリン又はT細胞受容体へ特異結合するか又は他の方法で分子と相互作用することが可能などのタンパク質決定基も含まれると理解されよう。エピトープの決定基は、一般的には、アミノ酸又は炭水化物又は糖側鎖のような分子の化学的に活性な表面配置 (grouping) からなり、一般的には、特異的な三次元構造上の特性、並びに特異的な荷電特性を有する。追加的に言えば、エピトープは、線状でも高次構造状でもよい。線状エピトープでは、該タンパク質と相互作用分子 (抗体のような) の間の相互作用点のすべてが該タンパク質の一次アミノ酸配列に沿って線状に生じる。高次構造状エピトープでは、相互反応の点が、直線的には互いに分離しているタンパク質上のアミノ酸残基の全域で生じる。

10

20

30

40

50

#### 【0114】

[0126] 抗原上の所望のエピトープが決定されたならば、例えば、本発明に記載の技術を使用して、該エピトープを含んでなるペプチドで免疫化することによって、そのエピトープに対する抗体を産生することが可能である。あるいは、この探索プロセスの間に、抗体の産生及び特性決定によって、望ましいエピトープに関する情報を解明することができる。次いで、この情報より、同じエピトープへ結合する抗体を競合的にスクリーニングすることが可能である。このことを達成するアプローチは、競合試験を実施して、互いに競合的に結合する抗体 (即ち、この抗体は、抗原への結合に関して競合する) を見出すことである。WO 03/48731には、それらの交差競合性に基づいて抗体をビンニングする (binning) ためのハイスループット法が記載されている。

#### 【0115】

[0127] 本明細書に使用するように、「ビンニング (binning)」という用語は、それらの抗原結合特性に基づいて抗体を群分けするための方法を意味する。ビンの割当ては、試験した抗体の観測された結合パターンがどのくらい異なるかに依存して、やや恣意的である。このように、この技術は、本発明の抗体を分類するのに有用なツールであるが、そのピンは、必ずしも直にエピトープと相関するものではないので、エピトープ結合についてのそのような初めの決定は、本明細書に記載のような当該技術分野で認められた他の方法論によってさらに確かめるべきである。

#### 【0116】

[0128] この注意事項に留意して、選択した一次抗体 (又はその断片) が同じエピトープへ結合するかどうか、又は結合に関して二次抗体と交差競合するかどうかを、当該技術分野で公知であり、且つ本明細書の実施例において説明される方法を使用することによって決定することができる。1つの態様では、本発明の一次抗体を飽和条件の下でPTK7へ結合させることが可能であり、次いでPTK7へ結合する二次抗体の能力を測定する。この試験抗体が一次の抗PTK7抗体と同時にPTK7へ結合することが可能であれば、その二次抗体は、一次抗体と異なるエピトープへ結合する。しかしながら、二次抗体が同時にPTK7へ結合することができなければ、二次抗体は、同じエピトープ、一部重なるエピトープ、又は一次抗体が結合するエピトープのごく近傍にあるエピトープへ結合する。当該技術分野で公知であり、下記の実施例において詳述されるように、所望のデータは、固相の直接又は間接ラジオイムノアッセイ (RIA)、固相の直接又は間接酵素イムノアッセイ (EIA)、サンドイッチ競合アッセイ、Biacore<sup>TM</sup> システム (即ち、表面プラズモン共鳴法 - GE Healthcare)、ForteBio (登録商標) Analyzer (即ち、バイオレイヤー干渉法 - ForteBio 社)、又はフローサイトメトリー法を使用して入手することができる。本明細書に使用する「表面プラズモン共鳴法」という用語は、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化の検出による、リアルタイムの生体特異的な相互作用の分析を可能にする光学現象に関連する。特に好ましい態様において、この分析は、下記の実施例において証明されるように、Biacore又はF

orteBio機器を使用して実施する。

【0117】

[0129] 抗体の文脈において使用される場合の「競合する」という用語は、試験下の抗体又は免疫学的に機能的な断片が共通抗原に対する参照抗体の特異結合を防ぐか又は阻害するアッセイにおいて決定されるような、抗体間の競合を意味する。典型的には、そのようなアッセイは、上記抗体のいずれかを担う固体表面又は細胞へ結合する精製抗原、非標識の被検免疫グロブリン、及び標識された参照免疫グロブリンの使用を伴う。競合阻害は、被検免疫グロブリンの存在下でこの固体表面又は細胞へ結合する標識の量を定量することによって測定する。通常、この被検免疫グロブリンは、過剰に存在する。競合アッセイによって同定される抗体（競合抗体）には、参照抗体と同じエピトープへ結合する抗体と、参照抗体が結合するエピトープに対して立体障害が起こるほど十分近傍にある隣接エピトープへ結合する抗体が含まれる。競合結合を決定するための方法に関する追加の詳細を本明細書の実施例に提供する。通常、競合抗体が過剰に存在する場合、それは、参照抗体の共通抗原への特異結合を少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、又は75%阻害する。ある事例では、結合が少なくとも80%、85%、90%、95%、又は97%以上阻害される。

10

【0118】

[0130] エピトープ特異性以外に、開示される抗体は、いくつかの異なる物理特性（例えば、結合親和性、融点（ $T_m$ ）、及び等電点が含まれる）を使用して、特性決定してよい。

20

【0119】

e. 結合親和性

[0131] この点に関して言えば、本発明には、選択されるPTK7に対して（又は、汎抗体の場合は、1種より多いPTK7に対して）高い結合親和性を有する抗体の使用がさらに含まれる。本発明の抗体がその標的抗原へ特異的に結合すると言われるのは、解離定数： $K_d$  ( $k_{off}/k_{on}$ ) が  $10^{-8}$  Mであるときである。この抗体は、 $K_d$  が  $5 \times 10^{-9}$  Mであるときには高い親和性で、そして $K_d$  が  $5 \times 10^{-10}$  Mであるときはきわめて高い親和性で抗原へ特異的に結合する。本発明の1つの態様において、該抗体は、 $10^{-9}$  M以下の $K_d$ と約 $1 \times 10^{-4}$  /秒のオフ速度を有する。本発明の1つの態様において、オフ速度は、 $< 1 \times 10^{-5}$  /秒である。本発明の他の態様において、該抗体は、PTK7へ約 $10^{-8}$  Mと $10^{-10}$  Mの間の $K_d$ で結合して、なお別の態様において、それは、 $2 \times 10^{-10}$  M以下の $K_d$ で結合する。本発明のなお他の選択される態様は、 $10^{-2}$  M未満、 $5 \times 10^{-2}$  M未満、 $10^{-3}$  M未満、 $5 \times 10^{-3}$  M未満、 $10^{-4}$  M未満、 $5 \times 10^{-4}$  M未満、 $10^{-5}$  M未満、 $5 \times 10^{-5}$  M未満、 $10^{-6}$  M未満、 $5 \times 10^{-6}$  M未満、 $10^{-7}$  M未満、 $5 \times 10^{-7}$  M未満、 $10^{-8}$  M未満、 $5 \times 10^{-8}$  M未満、 $10^{-9}$  M未満、 $5 \times 10^{-9}$  M未満、 $10^{-10}$  M未満、 $5 \times 10^{-10}$  M未満、 $10^{-11}$  M未満、 $5 \times 10^{-11}$  M未満、 $10^{-12}$  M未満、 $5 \times 10^{-12}$  M未満、 $10^{-13}$  M未満、 $5 \times 10^{-13}$  M未満、 $10^{-14}$  M未満、 $5 \times 10^{-14}$  M未満、 $10^{-15}$  M未満、又は $5 \times 10^{-15}$  M未満の解離定数又は $K_d$  ( $k_{off}/k_{on}$ ) を有する抗体を含む。

30

40

【0120】

[0132] 具体的態様において、PTK7へ免疫特異的に結合する本発明の抗体は、少なくとも $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、又は少なくとも $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の会合速度定数又は $k_{on}$ 速度（PTK7 (Ab) + 抗原 (Ag)  $\rightarrow$  Ab-Ag) を有する。

【0121】

[0133] 別の態様において、PTK7へ免疫特異的に結合する本発明の抗体は、 $10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 未満

50

、 $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 、又は $10^{-10} \text{ s}^{-1}$ 未満の解離速度定数又は $k_{off}$ 速度 ( $PTK7(Ab) + \text{抗原}(Ag)^{k_{off}}$   $Ab - Ag$ ) を有する。

#### 【0122】

[0134] 本発明の他の選択態様において、抗PTK7抗体は、少なくとも $10^2 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^3 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^4 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^5 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^6 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^7 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^8 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^9 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{13} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{14} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも $10^{15} \text{ M}^{-1}$ 、又は少なくとも $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ の親和定数又は $K_a (k_{on} / k_{off})$ を有する。

10

#### 【0123】

##### f. 等電点

20

[0135] 上述した結合特性に加えて、抗PTK7抗体とその断片は、すべてのポリペプチドのように、一般的にはポリペプチドが実効電荷を担わないときのpHとして定義される、等電点(pI)を有する。当該技術分野では、溶液のpHがタンパク質の等電点(pI)に等しい場合、典型的には該タンパク質の溶解度が最低になることが知られている。故に、抗体中のイオン化可能な残基の数と位置を改変してpIを調整することによって溶解度を最適化することが可能である。例えば、ポリペプチドのpIは、適正なアミノ酸置換を施すことによって(例えば、アラニンのような非電荷残基にリジンのような荷電アミノ酸を代用することによって)操作することができる。どの特別な理論にも束縛されることを望まずに言えば、抗体のpIの変化をもたらす前記抗体のアミノ酸置換は、該抗体の溶解度及び/又は安定性を改善する場合がある。当業者は、ある特別な抗体が所望のpIを達成するのにどのアミノ酸置換が最も適正であるかを理解されよう。

30

#### 【0124】

[0136] タンパク質のpIは、限定されないが、等電点電気泳動と様々なコンピュータアルゴリズムが含まれる多様な方法によって決定することができる(例えば、Bjellqvist et al., 1993, Electrophoresis 14: 1023を参照のこと)。1つの態様において、本発明の抗PTK7抗体のpIは、約6.5、約7.0、約7.5、約8.0、約8.5、又は約9.0の間かそれより高い。別の態様において、本発明の抗PTK7抗体のpIは、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、又は9.0の間かそれより高い。なお別の態様において、本発明の抗体のpIの改変をもたらす置換は、PTK7へのその結合親和性を有意には減少させない。下記により詳しく考察するように、具体的には、Fc Rへの結合の改変をもたらすFc領域の置換(複数)は、pIの変化ももたらす場合があると考慮される。好ましい態様では、所望されるFc R結合の改変とpIの所望されるあらゆる変化をもとに有効にするように、Fc領域の置換(複数)が具体的に選択される。本明細書に使用するように、pI値は、優勢な荷電形状のpIとして定義される。

40

#### 【0125】

##### g. 熱安定性

[0137] 抗体のFabドメインのTmは、抗体の熱安定性の良好な指標であり得、さらに貯蔵寿命の指標となり得ることがさらに理解されよう。Tmは、所与のドメイン又は配列の50%アンフォールディングの温度に他ならない。Tmが低いほどより多くの凝集/より少ない安定性を示すのに対し、Tmが高いほど、より少ない凝集/より大きな安定性

50

を示す。従って、より高い $T_m$ を有する抗体又はその断片若しくは誘導体が好ましい。さらに、当該技術分野で認められた技術を使用して、抗PTK7抗体又はそのドメインの組成を改変して、分子安定性を高めるか又は最適化することが可能である。例えば、米国特許第7,960,142号を参照のこと。このように、1つの態様において、選択した抗体のFabドメインは、少なくとも50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、又は120より高い $T_m$ 値を有する。別の態様において、抗体のFabドメインは、少なくとも約50、約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約105、約110、約115又は約120より高い $T_m$ 値を有する。当該技術分野で知られたどの標準法も使用して、例えば、示差走査熱量測定（例えば、いずれも参照により本明細書に組み込まれる、Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 78: 394-404; Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 79: 2150-2154を参照のこと）によって、タンパク質ドメイン（例、Fabドメイン）の熱融解温度（ $T_m$ ）を測定することができる。

10

#### 【0126】

##### VII. PTK7モジュレーターの断片及び誘導体

[0138] 本発明の薬剤が、インタクト融合構築体、抗体、断片、又は誘導体のいずれを含むとしても、選択したモジュレーターは、PTK7と反応する、結合する、組み合わせる、複合する、接続する、付着する、一緒になる、相互作用する、又は他の方法で会合して、それによって所望の抗新生物効果をもたらす。当業者は、抗PTK7抗体を含んでなるモジュレーターが該抗体上で発現される1以上の結合部位を介してPTK7と相互作用するか又は会合することを理解されよう。より具体的には、本明細書に使用するように、「結合部位」という用語は、対象の標的分子（例、酵素、抗原、リガンド、受容体、基質、又は阻害剤）へ選択的に結合することの原因となるポリペプチドの領域を含む。結合ドメインは、少なくとも1つの結合部位を含む（例えば、インタクトIgG抗体は、2つの結合ドメインと2つの結合部位を有するものである）。例示の結合ドメインには、抗体の可変ドメイン、リガンドの受容体結合ドメイン、受容体のリガンド結合ドメイン、又は酵素ドメインが含まれる。本発明の目的では、PTK7の典型的な活性領域は、（例えば、Fc-PTK7融合構築体の一部として）基質の結合部位を含み得るか又はリン酸化を促進し得る。

20

30

#### 【0127】

##### a. 断片

[0139] 本発明を実施するのに、どの形態のモジュレーター（例、キメラ、ヒト化、等）を選択しても、その免疫反応性断片は、本明細書の教示に従って使用し得ると理解されよう。最も広義において、「抗体断片」という用語は、インタクト抗体（例、天然に存在する免疫グロブリン）の少なくとも一部を含む。より具体的には、「断片」という用語は、インタクト又は完全な抗体又は抗体鎖より少ないアミノ酸残基を含んでなる抗体又は抗体鎖（又は、Fc融合体の場合はPTK7分子）の一部又は部分を意味する。「抗原結合断片」という用語は、抗原と結合するか又はインタクト抗体と（即ち、それらが導かれたインタクト抗体と）抗原結合（即ち、特異結合）について競合する、免疫グロブリン又は抗体のポリペプチド断片を意味する。本明細書に使用するように、「抗体分子の断片」という用語には、抗体の抗原結合断片、例えば、抗体軽鎖（ $V_L$ ）、抗体重鎖（ $V_H$ ）、単鎖抗体（scFv）、 $F(ab')$ <sub>2</sub>断片、Fab断片、Fd断片、Fv断片、単ドメイン抗体断片、二重特異性抗体、線状抗体、単鎖抗体分子、及び抗体断片より生成される多重特異性抗体が含まれる。同様に、PTK7の活性断片は、PTK7基質又は受容体と相互作用してインタクトPTK7のそれと似た様式でそれらを修飾する（例えば、リン酸化-やや低い効率であるかもしれないが）その能力を保持するPTK7分子の一部を含む。

40

#### 【0128】

[0140] 当業者は、インタクト又は完全なモジュレーター（例、抗体又は抗体鎖）の化学的又は酵素的処理によるか又は組換え手段によって断片を入手し得ることを理解されよ

50

う。この点に関して言えば、インタクト抗体の消化の点から様々な抗体断片が規定されるが、当業者は、そのような断片を化学的に、又は組換えDNAの方法論を使用することによって de novo 合成し得ることを理解されよう。このように、本明細書に使用する抗体という用語には、抗体全体の修飾によって産生されるか又は組換えDNAの方法論を使用して de novo 合成される抗体又はその断片若しくは誘導体が明白に含まれる。

#### 【0129】

[0141] より具体的には、抗体のパパイン消化は、それぞれに単一の抗原結合部位がある、Fab断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片と、残余のFc断片（この名称は、容易に結晶するその能力を反映する）を産生する。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有して、依然として抗原と交差結合することが可能であるF(ab')<sub>2</sub>断片を生じる。Fab断片はまた、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常ドメイン（C<sub>H</sub>1）を含有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1以上のシステインが含まれる重鎖C<sub>H</sub>1ドメインのカルボキシ末端での数個の残基の付加によって、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、本明細書において、定常ドメインのシステイン残基（複数）が少なくとも1つのフリーチオール基を担うFab'の明示である。F(ab')<sub>2</sub>抗体断片は、元来、その間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として産生された。抗体断片の他の化学的カップリングについても知られている。他の抗体断片のより詳しい記載については、例えば「基礎免疫学（Fundamental Immunology）」W. E. Paul（監修）レイブン・プレス、ニューヨーク（1999）を参照のこと。

10

#### 【0130】

[0142] Fv断片が完全な抗原認識及び結合部位を含有する抗体断片であることがさらに理解されよう。この領域は、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインが緊密に会合した（これは、天然では、例えばscFvでは、共有結合性であり得る）二量体からなる。それぞれの可変ドメインの3つのCDRが相互作用して、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二量体の表面に抗原結合部位を規定するのは、この配置においてである。この6つのCDR又はその亜集合は、集合的に、抗体へ抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなる、Fvの半分）でも、通常は完全な結合部位より低い親和性であるものの、抗原を認識して結合する能力を有する。

20

#### 【0131】

[0143] 他の態様において、抗体断片は、例えば、Fc領域を含んで、FcRn結合、抗体半減期調節、ADCC機能、及び補体結合といった、インタクト抗体中に存在しているときのFc領域に普通は関連する生体機能の少なくとも1つを保持するものである。1つの態様において、抗体断片は、インタクト抗体に実質的に類似したin vivo半減期を有する一価抗体である。例えば、そのような抗体断片は、その断片へin vivo安定性を付与することが可能なFc配列へ連結した抗原結合アームを含む場合がある。

30

#### 【0132】

##### b. 誘導体

[0144] 別の態様では、本発明のモジュレーターが一価でも多価（例、二価、三価、等）でもよいことがさらに理解されよう。本明細書に使用するように、「結合価」という用語は、抗体と会合する潜在的な標的（即ち、PTK7）結合部位の数を意味する。それぞれの標的結合部位は、1つの標的分子、又は標的分子上の特定の位置又は座へ特異的に結合する。本発明の抗体が1より多い標的結合部位を含む（多価）とき、それぞれの標的結合部位は、同じ分子か又は異なる分子へ特異的に結合し得る（例えば、異なるリガンド又は異なる抗原へ、又は同じ抗原上の異なるエピトープ又は位置へ結合し得る）。本発明の目的では、主題の抗体は、好ましくは、ヒトPTK7に特異的な少なくとも1つの結合部位を有する。1つの態様において、本発明の抗体は、その分子のそれぞれの結合部位が単一のPTK7の位置又はエピトープへ特異的に結合するという点で一価であろう。他の態様において、該抗体は、それらが1より多い結合部位と、単一より多い位置又はエピトープと特異的に会合する異なる結合部位を含むという点で多価であろう。そのような場合は、選択したPTK7ポリペプチド又はスプライス変異体に多重エピトープが存在し得るか

40

50

、又はPTK7上に単一エピトープが存在し得る一方で、別の分子又は表面上に第二の異なるエピトープが存在し得る。例えば、米国特許第2009/0130105号を参照のこと。

#### 【0133】

[0145] 上記に述べたように、多価抗体は、所望の標的分子の異なるエピトープへ免疫特異的に結合しても、標的分子だけでなく、異種ポリペプチドのような異種エピトープ又は固体支持材料へも免疫特異的に結合してよい。抗PTK7抗体の好ましい態様は、2つの抗原だけに結合する（即ち、二重特異性抗体）が、本発明には、三重特異性抗体のような追加の特異性がある抗体も含まれる。二重特異性抗体の例には、限定なしに、一方のアームがPTK7へ対して指向されて、他のアームが他のあらゆる抗原（例、モジュレーター細胞マーカー）に対して指向されるものが含まれる。当該技術分野では、二重特異性抗体を作製するための方法が知られている。完全長の二重特異性抗体の従来的な産生は、2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づき、ここでこの2つの鎖は、異なる特異性を有する（Millstein et al., 1983, Nature, 305: 537-539）。他のより洗練された適合可能な多重特異性構築体とそれらの製造の方法は、米国特許第2009/0155255号に説明されている。

10

#### 【0134】

[0146] なお他の態様では、所望の結合特異性（抗体 - 抗原結合部位）のある抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列へ融合する。この融合は、好ましくは、ヒンジ、 $C_H2$ 、及び/又は $C_H3$ 領域の少なくとも一部を含んでなる、免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。1つの例では、軽鎖結合に必要な部位を含有する第一重鎖定常領域（ $C_H1$ ）がその融合物の少なくとも1つに存在する。免疫グロブリン重鎖融合物と、所望されるならば、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクター中へ挿入して、好適な宿主生物へ同時トランスフェクトする。これにより、構築体中で使用される3つのポリペプチド鎖の同等でない割合が最適な収量をもたらす場合の態様において、この3つのポリペプチド断片の相互比率を調整するのに大きな柔軟性が得られる。しかしながら、等しい割合の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収量をもたらす場合、又はこの割合が特に重要でないときは、2個又は全3個のポリペプチド鎖のコーディング配列を1つの発現ベクターに挿入することが可能である。

20

#### 【0135】

[0147] このアプローチの1つの態様において、二重特異性抗体は、第一の結合特異性が一方のアームにあるハイブリッド免疫グロブリン重鎖（例、PTK7）と、他のアーム中のハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対（第二の結合特異性を提供する）からなる。この不斉構造は、二重特異性分子の片方だけに免疫グロブリン軽鎖が存在することで容易な分離法がもたらされるので、望まれない免疫グロブリン鎖の組合せからの所望の二重特異性化合物の分離を促進することが見出された。このアプローチは、WO94/04690に開示されている。二重特異性抗体を産生することのさらなる詳細には、例えば、Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology, 121: 210 を参照のこと。WO96/27011に記載される別のアプローチによれば、抗体分子の対を工学処理して、組換え細胞培養より回収されるヘテロ二量体の百分率を最大にすることができる。好ましいインターフェイスは、抗体定常ドメインの $C_H3$ ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第一抗体分子のインターフェイス由来の1以上の小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例、チロシン又はトリプトファン）に置き換える。大きなアミノ酸側鎖をより小さなもの（例、アラニン又はスレオニン）に置き換えることによって、第二抗体分子のインターフェイス上に、大きな側鎖（複数）と同一又は類似の大きさの代償性空洞（compensatory cavities）が創出される。これにより、ホモ二量体のような他の望まれない最終産物に優ってヘテロ二量体の収量を高めるための機序が提供される。

30

40

#### 【0136】

[0148] 二重特異性抗体には、架橋連結又はヘテロコンジュゲートの抗体も含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲート中の抗体の一方をアビジンへ、他方をビオチンへカップリ

50

ングすることができる。そのような抗体は、例えば、免疫系細胞を望まれない細胞へ標的化すること（米国特許第4,676,980号）、及びHIV感染の治療（WO91/00360、WO92/200373、及びEP03089）に提唱されてきた。ヘテロコンジュゲート抗体は、どの簡便な架橋連結法を使用しても作製してよい。当該技術分野では好適な架橋連結剤が周知であり、いくつかの架橋連結技術とともに、米国特許第4,676,980号に開示されている。

【0137】

V I I I . P T K 7モジュレーター - 定常領域の修飾

a . F c領域及びF c受容体

[0149] 上記に示した、開示モジュレーター（例、Fc-PTK7又は抗PTK7抗体）の可変又は結合領域に対する様々な修飾、置換、付加、又は削除に加えて、当業者は、本発明の選択態様が定常領域（即ち、Fc領域）の置換又は修飾も含み得ることを理解されよう。より具体的には、本発明のPTK7モジュレーターは、限定されないが、改変した薬物動態、増加した血清半減期、増加した結合親和性、低下した免疫原性、増加した産生、改変したFcリガンド結合、増強又は低下したADCC又はCDC活性、改変したグリコシル化及び/又はジスルフィド結合、及び変化した結合特異性が含まれる、好ましい特徴のある化合物をもたらす1以上の追加のアミノ酸残基置換、突然変異及び/又は修飾をとりわけ含有し得ると考慮される。この点に関して言えば、これらのFc変異体を有利にも使用して、開示モジュレーターの有効な抗新生物特性を高めることができると理解されよう。

10

20

【0138】

[0150] 本明細書の「Fc領域」という用語は、ネイティブ配列のFc領域と変異体のFc領域が含まれる、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を規定するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変動し得るが、ヒトのIgG重鎖Fc領域は、通常、Cys226位のアミノ酸残基から、又はPro230からそのカルボキシル末端まで広がるように定義される。Fc領域のC末端リジン（EU番号方式によれば残基447）は、例えば、抗体の産生又は精製の際に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組換え的に工学処理することによって除去してよい。従って、インタクト抗体の組成物は、すべてのK447残基が除去された抗体集団、K447残基が除去されていない抗体集団、及びK447残基が有る抗体と無い抗体の混合物を有する抗体集団を含んでよい。機能的なFc領域は、ネイティブ配列Fc領域のエフェクター機能を保有する。例示のエフェクター機能には、C1q結合；CDC；Fc受容体結合；ADCC；食作用；細胞表面受容体（例、B細胞受容体；BCR）の下方調節、等が含まれる。そのようなエフェクター機能には、概して、Fc領域が結合ドメイン（例、抗体可変ドメイン）と結び付くことが求められて、例えば、本明細書の諸定義において開示されるような様々なアッセイを使用して、評価することができる。

30

【0139】

[0151] Fc受容体又はFcRは、抗体のFc領域へ結合する受容体を言い表す。いくつかの態様では、FcRがネイティブなヒトFcRである。いくつかの態様では、FcRがIgG抗体（受容体）へ結合するものであって、FcRI、FcRII、及びFcRIIIサブクラスの受容体が含まれて、それら受容体の対立遺伝子変異体と選択的にスプライスされた形態が含まれる。FcRI受容体には、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる同様のアミノ酸配列を有する、FcRIIA（活性化受容体）とFcRIIB（阻害性受容体）が含まれる。活性化受容体のFcRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体のチロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を含有する。阻害性受容体のFcRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体のチロシンベースの阻害モチーフ（ITIM）を含有する（例えば、Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997) を参照のこと）。FcRsについては、例えば、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991) ; Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994) ; 及び de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) に概説されている。他のFcRも、

40

50

将来同定されるものを含めて、本明細書の F c R という用語に含まれる。F c 受容体又は F c R という用語には、ある事例では、母体 I g G の胎児への輸送 (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) 及び Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)) と免疫グロブリンのホメオスタシスの調節の原因となる新生児受容体、F c R n も含まれる。F c R n への結合を測定する方法が知られている (例えば、Ghetie and Ward., Immunol. Today 18(12) :592-598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7): 637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.) を参照のこと)。

#### 【0140】

##### b. F c 機能

[0152] 本明細書に使用するように、補体依存性細胞傷害及び C D C は、補体の存在下での標的細胞の溶解を意味する。この補体活性化経路は、補体系の第一成分 (C 1 q) が、例えば、コグネイト抗原と複合した分子、抗体へ結合することによって始動される。補体活性化を評価するには、例えば、Gazzano-Santoro et al., 1996, J. Immunol. Methods, 202: 163 に記載のような C D C アッセイを実施することができる。

#### 【0141】

[0153] さらに、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害又は A D C C は、ある種の細胞傷害性細胞 (例、ナチュラルキラー (NK) 細胞、好中球、及びマクロファージ) に存在する F c 受容体 (F c R) 上へ結合する分泌型 I g によって、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原を担う標的細胞へ特異的に結合して、その後この標的細胞を細胞毒素で殺傷することが可能になる、細胞傷害の形態を意味する。標的へ指向される特異的な高親和性 I g G 抗体は、細胞傷害性細胞を装備して、そのような殺傷に絶対的に必要とされる。標的細胞の溶解は細胞外であり、直接的な細胞 - 細胞の接触を必要として、補体は関与しない。

#### 【0142】

[0154] F c R 結合親和性又は A D C C 活性が改変された P T K 7 モジュレーター変異体とは、親抗体又は非修飾抗体と、又はネイティブ配列の F c 領域を含んでなるモジュレーターと比較して増強又は減少した F c R 結合活性及び / 又は A D C C 活性を有するものである。F c R への増加した結合を示すモジュレーター変異体は、親抗体又は非修飾抗体、又はネイティブ配列の F c 領域を含んでなるモジュレーターに優る親和性で少なくとも 1 つの F c R へ結合する。F c R への減少した結合を示す変異体は、親抗体又は非修飾抗体、又はネイティブ配列の F c 領域を含んでなるモジュレーターに劣る親和性で少なくとも 1 つの F c R へ結合する。F c R への減少した結合を示すそのような変異体は、F c R に対する結合性をほとんど又は認められるほどに保有しない。例えば、当該技術分野で周知の技術によって決定されるように、ネイティブ配列の I g G F c 領域に比較して、例えば、F c R に対する 0 ~ 20 % の結合性を保有する。

#### 【0143】

[0155] F c R n に関しては、本発明の抗体はまた、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、5 日より大きい、10 日より大きい、15 日より大きい、好ましくは 20 日より大きい、25 日より大きい、30 日より大きい、35 日より大きい、40 日より大きい、45 日より大きい、2 ヶ月より大きい、3 ヶ月より大きい、4 ヶ月より大きい、又は 5 ヶ月より大きい半減期 (例、血清半減期) をもたらず、定常領域への修飾がある F c 変異体を含むか又はそれに含まれる。本発明の抗体 (又は F c 含有分子) の増加した半減期は、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、該哺乳動物中の前記抗体又は抗体断片のより高い血清力価をもたらして、それによって前記抗体又は抗体断片の投与の頻度を低下させる、及び / 又は投与される前記抗体又は抗体断片の濃度を低下させる。増加した in vivo 半減期を有する抗体は、当業者に知られた技術によって産生することができる。例えば、in vivo 半減期が増加した抗体は、F c ドメインと F c R n 受容体の間の相互作用に關与するものとして同定されたアミノ酸残基を修飾すること (例えば、置換すること、欠失させること、又は付加すること) によって産生することができる (例えば、国際特許公開公報番号：

10

20

30

40

50

WO 97 / 3 4 6 3 1 ; WO 0 4 / 0 2 9 2 0 7 ; 米国特許第 6 , 7 3 7 , 0 5 6 号及び米国特許第 2 0 0 3 / 0 1 9 0 3 1 1 号を参照のこと)。ヒト F c R n への *in vivo* の結合とヒト F c R n 高親和性結合ポリペプチドの血清半減期については、例えば、ヒト F c R n を発現するトランスジェニックマウス又はトランスフェクトされたヒト細胞株において、又は変異体 F c 領域があるポリペプチドが投与された霊長動物においてアッセイすることができる。WO 2 0 0 0 / 4 2 0 7 2 は、F c R n への結合が改善又は減少した抗体変異体について記載する。例えば、Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001) も参照のこと。

#### 【 0 1 4 4 】

##### c . グリコシル化修飾

[0156] なお他の態様では、本発明の抗体のグリコシル化の様式又は組成が修飾される。より具体的には、本発明の好ましい態様は、1以上の工学処理された糖型、即ち、F c 領域を含んでなる分子へ共有結合的に付加される、改変したグリコシル化様式又は改変した炭水化物組成を含んでよい。工学処理された糖型は、限定されないが、エフェクター機能を増強又は低下させること、抗体の標的抗原への親和性を高めること、又は抗体の産生を促進することが含まれる、多様な目的に有用であり得る。低下したエフェクター機能が所望される事例では、その分子が非グリコシル化型で発現されるように工学処理し得ることが理解されよう。そのような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1以上の部位を改変することによって達成することができる。即ち、1以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の消失をもたらすことによってその部位でのグリコシル化を消失させる、1以上のアミノ酸置換を行うことができる(例えば、米国特許第 5 , 7 1 4 , 3 5 0 号及び 6 , 3 5 0 , 8 6 1 号を参照のこと)。逆に、1以上の追加のグリコシル化部位において工学処理することによって、F c 含有分子へエフェクター機能の増強又は結合の改善を付与することができる。

#### 【 0 1 4 5 】

[0157] 追加的に、あるいはまた、フコシル残基の量が低下した低フコシル化抗体又は二分する G l c N A c 構造が増加した抗体といった、改変したグリコシル化組成を有する F c 変異体も作製することができる。これらの、そして同様の改変したグリコシル化様式は、抗体の A D C C 能力を高めることが証明されてきた。工学処理される糖型は、当業者に公知の如何なる方法によっても、例えば、工学処理されたか又は変異体の発現株を使用することによって、1以上の酵素(例えば N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I I ( G n T I 1 1 ) ) での同時発現によって、F c 領域を含んでなる分子を様々な生物又は様々な生物由来の細胞株において発現させることによって、又は F c 領域を含んでなる分子が発現された後で炭水化物(複数)を修飾することによって産生してよい。例えば、Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1、並びに欧州特許番号: E P 1 , 1 7 6 , 1 9 5 ; P C T 公開公報: W O 0 3 / 0 3 5 8 3 5 ; W O 9 9 / 5 4 3 4 2、Umana et al, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473、米国特許第 6 , 6 0 2 , 6 8 4 号; 米国仮特許出願シリアル番号: 1 0 / 2 7 7 , 3 7 0 ; 1 0 / 1 1 3 , 9 2 9 ; P C T W O 0 0 / 6 1 7 3 9 A 1 ; P C T W O 0 1 / 2 9 2 2 4 6 A 1 ; P C T W O 0 2 / 3 1 1 1 4 0 A 1 ; P C T W O 0 2 / 3 0 9 5 4 A 1 ; P o t i l l e g e n t <sup>T M</sup> 技術 (Biowa 社); G l y c o M A b <sup>T M</sup> グリコシル化工学技術 (GLYCART biotechnology AG); W O 0 0 0 6 1 7 3 9 ; E A 0 1 2 2 9 1 2 5 ; 米国特許第 2 0 0 3 / 0 1 1 5 6 1 4 号; Okazaki et al., 2004, JM B, 336: 1239-49 を参照のこと。

#### 【 0 1 4 6 】

##### I X . モジュレーター発現

##### a . 概論

[0158] 慣用の手順を使用して(例えば、抗体重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子へ特異

10

20

30

40

50

的に結合することが可能であるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、所望のPTK7モジュレーターをコードするDNAを容易に単離して配列決定することができる。単離されてサブクローン化されたハイブリドーマ細胞(又はファージ若しくは酵母由来のコロニー)は、そのモジュレーターが抗体であれば、そのようなDNAの好ましい供給源として役立つ場合がある。所望されるならば、この核酸を本明細書に記載のようにさらに操作して、融合タンパク質、又はキメラ、ヒト化、又は完全ヒト抗体が含まれる薬剤を創出することができる。より具体的には、単離DNA(修飾されている場合がある)を使用して、米国特許第7,709,611号に記載のような製造抗体のために、定常及び可変領域の配列をクローン化することができる。

#### 【0147】

[0159] この例示の方法には、選択した細胞からのRNAの抽出、cDNAへの変換、及び抗体特異プライマーを使用するPCRによる増幅を伴う。好適なプライマーは、当該技術分野で周知であり、また本明細書において例示されるように、数多くの市販供給源より容易に入手可能である。コンビナトリアルライブラリーのスクリーニングによって単離される組換えヒト又は非ヒト抗体を発現するには、この抗体をコードするDNAを組換え発現ベクターへクローン化して、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌が含まれる宿主細胞へ導入することが理解されよう。なお他の態様において、モジュレーターは、他の方法では所望の構築体を産生しない、サルCOS細胞、NS0細胞、チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞へ導入されてそれによって発現される。下記により詳しく考察するように、臨床及び市販の融合構築体又は免疫グロブリンの供給をもたらすには、所望のモジュレーターを発現する形質転換細胞を相対的に多い量で増殖させることができる。

#### 【0148】

[0160] PTK7モジュレーターの所望の部分をコードする核酸が、ファージディスプレイ技術、酵母ライブラリー、ハイブリドーマベースの技術より、合成的に、又は市販の供給源より入手されるか又はそれらに由来するかに拘らず、本発明には、融合タンパク質と抗PTK7抗体又はその抗原結合断片若しくは誘導体が含まれるPTK7モジュレーターをコードする核酸分子及び配列が明白に含まれると理解されるべきである。さらに本発明には、高いストリンジェンシーの下で、またあるいは、中間的又はより低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件(例えば、下記に定義するような)の下で、本発明のモジュレーター又はその断片若しくは変異体をコードするポリヌクレオチド配列を有する核酸へ相補的なポリヌクレオチドへハイブリダイズする核酸又は核酸分子(例、ポリヌクレオチド)が含まれる。本明細書に使用する「核酸分子」又は「単離された核酸分子」という用語には、少なくともDNA分子とRNA分子が含まれると企図される。核酸分子は、一本鎖でも二本鎖でもよいが、好ましくは、二本鎖DNAである。さらに、本発明は、そのようなモジュレーターコード化ポリヌクレオチドを取り込むどの担体又は構築体も含み、限定なしに、ベクター、プラスミド、宿主細胞、コスミド、又はウイルス構築体が含まれる。

#### 【0149】

[0161] 「単離された核酸」という用語は、その核酸が(i)例えばポリメラーゼ鎖反応(PCR)によって*in vitro*で増幅された、(ii)クローニングによって組換え的に産生された、(iii)例えば、切断とゲル電気泳動分画化によって精製された、又は(iv)例えば化学合成によって合成されたことを意味する。単離核酸とは、組換えDNA技術による操作によって利用可能である核酸である。

#### 【0150】

[0162] より具体的には、本発明の抗体の一方又は両方の鎖、又はその断片、誘導体、ムテイン、又は変異体が含まれるモジュレーターをコードする核酸、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用に十分なポリヌクレオチド、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを同定する、分析する、突然変異させる、又は増幅するためのPCRプライマー又は配列決定プライマー、ポリヌクレオチドの発現を阻害するためのアンチセンス核酸

10

20

30

40

50

、及び上記の相補性配列も提供される。この核酸はどの長さでもあり得る。それらは、例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、750、1,000、1,500、3,000、5,000又はそれより多いヌクレオチドの長さであり得る、及び/又は1以上の追加配列(例えば、調節配列)を含み得る、及び/又はより大きな核酸(例えば、ベクター)の一部であり得る。これらの核酸は、一本鎖でも二本鎖でもよくて、RNA及び/又はDNAヌクレオチドとその人工的な変異体(例、ペプチド核酸)を含み得る。抗体又はその免疫反応性断片若しくは誘導体が含まれる、本発明のモジュレーターをコードする核酸は、好ましくは、上記に記載のように単離されている。

10

## 【0151】

b. ハイブリダイゼーションと同定

[0163] 示したように、本発明は、他の核酸へ特別なハイブリダイゼーション条件の下でハイブリダイズする核酸をさらに提供する。当該技術分野では、核酸をハイブリダイズさせる方法が周知である。例えば、「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、ニューヨーク(1989)、6.3.1-6.3.6を参照のこと。本出願の目的では、中等度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が、5x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)、0.5% SDS、1.0mM EDTA(pH 8.0)を含有するプレ洗浄溶液、約50%ホルムアミド、6xSSCのハイブリダイゼーション緩衝液と55のハイブリダイゼーション温度(又は、約50%ホルムアミドを含有するもののような他の同様のハイブリダイゼーション溶液を42のハイブリダイゼーション温度で)と、0.5xSSC、0.1% SDS中で60の洗浄条件を使用する。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件では、6xSSC中45でハイブリダイズさせることに、0.1xSSC、0.2% SDS中68での1回以上の洗浄を続ける。さらに、当業者は、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄の条件を操作して、互いに少なくとも65、70、75、80、85、90、95、98、又は99%同一であるヌクレオチド配列を含んでなる核酸が典型的には互いにハイブリダイズしたままであるように、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを増加又は減少させることができる。より一般的には、本開示の目的では、「核酸配列に関して実質的に同一である」という用語は、参照の核酸配列に対して少なくとも約85%、又は90%、又は95%、又は97%の配列同一性を示すヌクレオチドの配列として解釈され得る。

20

30

## 【0152】

[0164] ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を及ぼす基本のパラメータと好適な条件を設計するための手引きについては、例えば、Sambrook, Fritsch, and Maniatis(1989)「分子クローニング:実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」:コールドスプリングハーバーラボラトリー出版局、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、第9章及び11章;及び「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」(1995) Ausubel et al.(監修)ジョン・ウィリー・アンド・サンズ社、セクション2.10及び6.3-6.4)によって示されて、例えば、核酸の長さ及び/又は塩基組成に基づいて、当業者によって容易に決定され得る。

40

## 【0153】

[0165] 本発明によれば、核酸が単独で存在しても、相同又は異種であり得る、他の核酸との組合せにおいて存在してもよいことがさらに理解されよう。好ましい態様において、核酸は、前記核酸に関して相同又は異種であり得る発現制御配列へ機能的に連結している。この文脈において、相同という用語は、核酸が発現制御配列へ本来的に機能的に連結していることを意味し、異種という用語は、核酸が発現制御配列へ本来的には機能的に連結していないことを意味する。

## 【0154】

c. 発現

50

[0166] RNA及び/又はタンパク質又はペプチドを発現する核酸のような核酸と発現制御配列は、前記核酸の発現又は転写が前記発現制御配列の制御下又は影響下にあるような様式でそれらが互いに共有結合的に連結しているならば、互いに機能的に連結している。その核酸が機能的なタンパク質へ翻訳されるならば、発現制御配列機能はコーディング配列へ機能的に連結していて、前記発現制御配列の誘導は、コーディング配列のフレームシフトを引き起こすことも、前記コーディング配列が所望のタンパク質又はペプチドへ翻訳され得ないことも無く、前記核酸の転写をもたらす。

【0155】

[0167] 「発現制御配列」という用語は、本発明のプロモーターによれば、リボソーム結合部位、エンハンサー、及び遺伝子の転写又はmRNAの翻訳を調節する他の制御要素を含む。本発明の特別な態様において、発現制御配列は、調節することができる。発現制御配列の正確な構造は、その種又は細胞型に応じて変動し得るが、一般的に言えば、TATAボックス、キャップ配列、CAAT配列、等といった、転写と翻訳の開始にそれぞれ関与する5'非転写配列と5'及び3'非翻訳配列を含む。より具体的には、5'非転写発現制御配列は、機能的に連結した核酸の転写制御のためのプロモーター配列が含まれるプロモーター領域を含む。発現制御配列はまた、エンハンサー配列又は上流アクチベータ配列も含み得る。

【0156】

[0168] 本発明によれば、「プロモーター」又は「プロモーター領域」という用語は、発現される核酸配列の上流(5')に位置して、RNAポリメラーゼに認識及び結合部位を提供することによって該配列の発現を制御する核酸配列に関する。プロモーター領域には、遺伝子の転写の調節に関与するさらなる因子のためのさらなる認識及び結合部位が含まれ得る。プロモーターは、原核生物又は真核生物の遺伝子の転写を制御し得る。さらに、プロモーターは、誘導可能であり得、誘導剤に応答して転写を開始してもよく、又は転写が誘導剤によって制御されない場合は、構成的であってもよい。誘導可能プロモーターの制御下にある遺伝子は、誘導剤が存在しなければ、発現されないか又はわずかな程度しか発現されない。誘導剤の存在下では、その遺伝子にスイッチが入るか、又は転写のレベルが増加する。このことは、概して、特定の転写因子の結合によって媒介される。

【0157】

[0169] 本発明により好ましいプロモーターには、SP6、T3、及びT7ポリメラーゼのプロモーター、ヒトU6 RNAプロモーター、CMVプロモーター、及びこれらの人工的なハイブリッドプロモーター(例、CMV)[ここでは、例えば、ヒトGAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロヒドロゲナーゼ)のような他の細胞タンパク質の遺伝子のプロモーターの一部又は諸部分へその一部又は諸部分が融合する]が含まれて、追加のイントロン(複数)が含まれるか又は含まれない。

【0158】

[0170] 本発明によれば、「発現」という用語は、その最も一般的な意味で使用されて、RNAの産生又はRNA及びタンパク質/ペプチドの産生を含む。それは、核酸の部分的な発現も含む。さらに、発現は、一過的に行われても安定的に行われてもよい。

【0159】

[0171] 好ましい態様において、本発明による核酸分子は、適宜(該核酸の発現を制御する)プロモーターとともに、ベクター中に存在する。「ベクター」という用語は、本明細書において、その最も一般的な意味で使用されて、核酸が例えば原核細胞及び/又は真核細胞の中へ導入されて、適宜、ゲノムの中へ組み込まれることを可能にする、前記核酸のどの媒介担体も含む。この種のベクターは、好ましくは、細胞中で複製及び/又は発現される。ベクターは、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージ、又はウイルスゲノムを含んでよい。本明細書に使用する「プラスミド」という用語は、一般的には、染色体DNAから独立して複製することができる、染色体外遺伝物質の構築体、通常は、環状DNA二重鎖に関する。

【0160】

[0172] 本発明を実施する場合、分子生物学、微生物学、及び組換えDNA技術中の多くの慣用技術を使用してもよいと理解されよう。そのような慣用技術は、本明細書に定義されるようなベクター、宿主細胞、及び組換え方法に関する。これらの技術は周知であり、例えば、Berger and Kimmel「酵素学の方法 (Methods in Enzymology)」第152巻、「分子クローニング技術の手引き (Guide to Molecular Cloning Techniques)」、アカデミックプレス社 (カリフォルニア州サンディエゴ) ; Sambrook et al.「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning - A Laboratory Manual)」第3版、1-3巻、ワールドスプリングハーバーラボラトリー、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (2000)、及び「分子生物学の最新プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」F. M. Ausubel et al. (監修) 上掲、に説明されている。例えば、細胞の単離及び培養のために (例えば、後続の核酸又はタンパク質の単離のために) 有用な他の参考文献には、Freshney (1994)「動物細胞の培養、基本技術マニュアル (Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique)」第3版、Wiley-Liss, ニューヨークとその中の引用参考文献 ; Payne et al. (1992)「植物細胞及び組織の液体系培養 (Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems)」ジョン・ウィリー・アンド・サンズ社、ニューヨーク州ニューヨーク ; Gamborg and Phillips (監修) (1995)「植物細胞、組織、及び器官の培養 ; 基本法のスプリングー・ラボ・マニュアル (Plant Cell and Tissue Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual)」Springer-Verlag (ベルリン - ハイデルベルグ - ニューヨーク)、及び Atlas and Parks (監修)「微生物培地ハンドブック (The Handbook of Microbiological Media)」(1993)CRCプレス (フロリダ州ボカラトン) が含まれる。核酸を作製する方法 (例えば、*in vitro* 増幅、細胞からの精製、又は化学合成によって)、核酸を操作する方法 (例えば、制限酵素消化、ライゲーション、等による部位特異的突然変異誘発)、及び核酸を操作して作製するのに有用な様々なベクター、細胞株、等についても、上記の参考文献に記載されている。加えて、本質的には、どのポリヌクレオチド (例えば、標識化又はビオチニル化ポリヌクレオチドが含まれる) も、多様な市販供給源のいずれかより、カスタム又は標準注文することができる。

#### 【0161】

[0173] このように、1つの側面において、本発明は、本発明の抗体又はその部分の組換え発現を可能にする組換え宿主細胞を提供する。そのような組換え宿主細胞中での発現によって産生される抗体を本明細書では組換え抗体と呼ぶ。本発明はまた、そのような宿主細胞の子孫細胞と、それによって産生される抗体を提供する。

#### 【0162】

[0174] 本明細書に使用する「組換え宿主細胞 (又は単に、宿主細胞)」という用語は、組換え発現ベクターが導入された細胞を意味する。組換え宿主細胞と宿主細胞は、特別な被検細胞だけでなくそのような細胞の子孫も意味すると理解されるべきである。後継の世代では、突然変異又は環境上の影響により、ある何らかの修飾が起こり得るので、そのような子孫は、実際には親細胞と同一ではないかもしれないが、それでも本明細書に使用される「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。そのような細胞は、本発明による、上記に記載のようなベクターを含んでよい。

#### 【0163】

[0175] 別の側面において、本発明は、本明細書に記載のような抗体又はその部分を作製するための方法を提供する。1つの態様によれば、前記方法は、上記に記載のようなベクターでトランスフェクトされたか又は形質転換された細胞を培養することと、抗体又はその部分を回収することを含む。

#### 【0164】

[0176] 上記に示したように、本発明の抗体 (又はその断片若しくは変異体) の発現は、好ましくは、所望の抗PTK7抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクター (複数) を含む。当業者に周知の方法を使用して、抗体コーディング配列と適正な転写及び翻訳制御シグナルを含んでなる発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、*in vitro* 組換えDNA技術、合成技術、及び *in vivo* 遺伝子組換えが

含まれる。このように、本発明の態様は、本発明の抗PTK7抗体（例、全抗体、抗体の重鎖又は軽鎖、抗体の重鎖若しくは軽鎖可変ドメイン、又はその部分、又は重鎖若しくは軽鎖のCDR、単鎖Fv、又はこれらの断片若しくは変異体）をコードするヌクレオチド配列をプロモーターへ機能可能的に連結して含んでなる複製可能なベクターを提供する。好ましい態様では、そのようなベクターに、抗体分子の重鎖（又はその断片）をコードするヌクレオチド配列、抗体の軽鎖（又はその断片）又は重鎖と軽鎖の両方をコードするヌクレオチド配列が含まれてよい。

#### 【0165】

[0177] 本発明のヌクレオチドが本明細書の教示に従って単離されて修飾されたならば、それらを使用して、抗PTK7抗体又はその断片が含まれる、選択したモジュレーターを産生することができる。

10

#### 【0166】

##### X. モジュレーターの産生及び精製

[0178] 当該技術分野で認められた分子生物学技術と現行のタンパク質発現の方法論を使用して、所望のモジュレーターの実質的な量を産生することができる。より具体的には、上記に記載のように入手されて工学処理される抗体のようなモジュレーターをコードする核酸分子を、様々な種類の宿主細胞を含んでなる、周知の市販されているタンパク質産生系へ組み込んで、所望の医薬品の前臨床量、臨床量、又は市販量を提供することができる。好ましい態様において、モジュレーターをコードする核酸分子は、選択した宿主細胞中への効率的な組込みと所望されるPTK7モジュレーターの後続の高い発現レベルをもたらすベクター又は発現ベクターの中へ工学処理されると理解されよう。

20

#### 【0167】

[0179] 好ましくは、PTK7モジュレーターをコードする核酸分子とこれらの核酸分子を含んでなるベクターを好適な哺乳動物、植物、細菌、又は酵母の宿主細胞のトランスフェクションに使用することができるが、モジュレーターの産生には、原核細胞株も使用し得ることが理解されよう。トランスフェクションは、ポリヌクレオチドを宿主細胞へ導入することで知られたどの方法によってもよい。当該技術分野では、異種ポリヌクレオチドの哺乳動物細胞への導入の方法が周知であり、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリプレックス媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチド（複数）のリポソーム被包化、及びDNAの核中への直接的なマイクロインジェクションが含まれる。加えて、核酸分子を哺乳動物細胞中へウイルスベクターによって導入してよい。当該技術分野では、哺乳動物細胞を形質転換する方法が周知である。例えば、米国特許第4,399,216号、4,912,040号、4,740,461号、及び4,959,455号を参照のこと。さらに、当該技術分野では、植物細胞を形質転換する方法が周知であり、例えば、アグロバクテリウム媒介形質転換、生物銃（biolistic）形質転換、直接注入、エレクトロポレーション、及びウイルス形質転換が含まれる。当該技術分野では、細菌細胞や酵母細胞を形質転換する方法も周知である。

30

#### 【0168】

[0180] さらに、宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター、例えば、重鎖由来ポリペプチドをコードする第一ベクターと軽鎖由来ポリペプチドをコードする第二ベクターで同時トランスフェクトしてよい。この2つのベクターは、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの実質的に等しい発現を可能にする、同一の選択可能マーカ含有し得る。あるいは、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの両方をコードして、それらを発現することが可能である単一ベクターを使用してよい。そのような状況では、軽鎖は、好ましくは、重鎖の手前に配置されて、過度の有害な遊離重鎖を回避する。重鎖及び軽鎖のコーディング配列は、cDNA又はゲノムDNAを含んでよい。

40

#### 【0169】

##### a. 宿主発現系

[0181] 多くが市販されている、多様な宿主発現ベクター系は、本明細書の教示に適合

50

可能であって、本発明のモジュレーターを発現するために使用し得る。そのような宿主発現系は、対象のコーディング配列が発現されて後に精製される媒体を意味するが、適正なヌクレオチドコーディング配列で形質転換されるか又はトランスフェクトされる場合は、本発明の分子を *in situ* で発現し得る細胞も意味する。そのような系には、限定されないが、モジュレーターコーディング配列を含有する、組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA、又はコスミド DNA 発現ベクターで形質転換された細菌（例、大腸菌、枯草菌、ストレプトマイセス）のような微生物；モジュレーターコーディング配列を含有する組換え酵母発現ベクターでトランスフェクトされた酵母（例、サッカロミセス属、ピキア属）；モジュレーターコーディング配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例、バキュロウイルス）で感染された昆虫細胞株；モジュレーターコーディング配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）で感染されたか又はそれを含有する組換えプラスミド発現ベクター（例、Ti プラスミド）でトランスフェクトされた植物細胞株（例、タバコ属、アラビドプシス属、アオウキクサ、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモ、等）；又は哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター（例、メタロチオネインプロモーター）又は哺乳動物ウイルス由来のプロモーター（例、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーター）を含有する組換え発現構築体を収容する哺乳動物細胞株（例、COS、CHO、BHK、293、3T3 細胞）が含まれる。

#### 【0170】

[0182] 細菌系では、有利にも、発現される分子のために企図される使用に依存して、いくつかの発現ベクターを選択することができる。例えば、モジュレーターの医薬組成物の産生のために、大量のそのようなタンパク質を産生すべき場合は、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベル発現を指令するベクターが望ましいかもしれない。そのようなベクターには、限定されないが、大腸菌発現ベクター pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2: 1791 (1983)) [ここでは、融合タンパク質を産生するように、コーディング配列を該ベクターの中へ lacZ コーディング領域と正しいフレームで個別に連結 (ligate) し得る]；pIN ベクター (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109 (1985))；Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509 (1989))、等が含まれる。pGEX ベクターも、グルタチオン 5 - トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として異種ポリペプチドを発現するのに使用してよい。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であって、溶解した細胞より、マトリックスグルタチオンアガロースビーズへの吸着及び結合に続く、遊離グルタチオンの存在下での溶出によって容易に精製することができる。pGEX ベクターは、クローン化された標的遺伝子産物が GST 部分より放出され得るように、トロンピン又は第 Xa 因子プロテアーゼ切断部位が含まれるように設計されている。

#### 【0171】

[0183] 昆虫系では、異種遺伝子を発現するためのベクターとして、Autographa californica (キンウワバ科) 核多角体ウイルス (AcNPV) を使用してよい。このウイルスは、ヨトウガ (Spodoptera frugiperda) 細胞中で増殖する。コーディング配列は、このウイルスの非本質的な領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）へ個別にクローン化して、AcNPV プロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に配置してよい。

#### 【0172】

[0184] 哺乳動物の宿主細胞では、所望のヌクレオチド配列を導入するのに、いくつかのウイルスベースの発現系を使用してよい。発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、対象のコーディング配列は、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体（例えば、後期プロモーター及び 3 部分 (tripartite) リーダー配列）へ連結してよい。次いで、このキメラ遺伝子を、*in vitro* 又は *in vivo* の組換えによって、アデノウイルスゲノムに挿入してよい。ウイルスゲノムの非本質領域（例えば、領域 E1 又は E3）での挿入は、被感染宿主において生存可能でその分子を発現することが可能である組換えウイルスをもたらす（例えば、Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359 (1984) を参

照のこと)。挿入されたコーディング配列の効率的な翻訳には、特定の始動シグナルが求められる場合もある。これらのシグナルには、A T G 開始コドンと隣接配列が含まれる。さらに、開始コドンは、挿入物全体の翻訳を確実にするために、所望のコーディング配列のリーディングフレームと同調していなければならない。これら外因性の翻訳制御シグナルと開始コドンは、天然と合成ともに、多様な起源のものであり得る。発現の効率は、適正な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター、等の包含によって増強することができる(例えば、Bittner et al., *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987) を参照のこと)。このように、当該技術分野では、発現用の宿主として利用し得る適合可能な哺乳動物細胞株が周知であり、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(A T C C)より入手可能な多くの不死化細胞株が含まれる。これらには、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞、N S 0細胞、S P 2細胞、H E K - 2 9 3 T細胞、293 Freestyle細胞(Life Technologies)、N I H - 3 T 3細胞、H e L a細胞、ベビーハムスター腎臓(B H K)細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞(C O S)、ヒト肝細胞癌細胞(例、H e p G 2)、A 5 4 9細胞、及びいくつかの他の細胞株が含まれる。

10

## 【0173】

[0185] 組換えタンパク質の長期の高収量産生には、安定した発現が好ましい。従って、当該技術分野で認められた標準技術を使用して、選択されるモジュレーターを安定的に発現する細胞株を設計することができる。ウイルスの複製起点を含有する発現ベクターを使用することよりむしろ、宿主細胞は、適正な発現制御要素(例、プロモーター、エンハンサー配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、等)と選択可能マーカーによって制御されるDNAで形質転換することができる。異種DNAの導入に続いて、工学処理された細胞を濃縮培地においてそのまま1~2日間増殖してよく、次いで選択培地へスイッチさせる。組換えプラスミド中の選択可能マーカーは、この選択に対する抵抗性を付与して、細胞がプラスミドをその染色体中へ安定的に組み込んで、増殖して細胞株を形成することを可能にし、次いでこれをクローン化して細胞株へ拡大することができる。この方法は、有利にも、上記分子を発現する細胞株を設計するために使用し得る。このような設計された細胞株は、該分子と直接的又は間接的に相互作用する組成物のスクリーニング及び評価において特に有用であり得る。

20

## 【0174】

[0186] 当該技術分野では、いくつかの選択系が周知であり、限定されないが、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(Wigler et al., *Cell* 11:223 (1977))、ヒポキサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202 (1992))、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy et al., *Cell* 22:8 17 (1980))の遺伝子がそれぞれt k -、h g p r t -、又はa p r t -の細胞中で利用され得る系を含めて、使用することができる。また、代謝拮抗薬への抵抗性を以下の遺伝子の選択についての基礎として使用することができる:メトトレキサートに対する抵抗性を付与する、d h f r (Wigler et al., *Natl. Acad. Sci. US A* 77:357 (1980); O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981)); ミコフェノール酸に対する抵抗性を付与する、g p t (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981)); アミノグリコシドG - 4 1 8に対する抵抗性を付与する、n e o (Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tols toshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:9 26-932 (1993); 及びMorgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217 (1993); TIB TECH 11(5):155-2 15 (May, 1993)); 並びに、ヒグロマイシンに対する抵抗性を付与する、h y g r o (Santerre et al., *Gene* 30:147 (1984))。所望の組換えクローンを選択するには、当該技術分野で一般に公知の組換えDNA技術の方法を定型的に適用してよくて、そのような方法については、例えば、Ausubel et al. (監修)「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」ジョン・ウィリー・アンド・サンズ(1993); Kriegler, 「遺伝子の移入及び発現: 実験マニュアル(Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual)」ストックトン・プレス、ニューヨーク(

30

40

50

1990) ; 及び、Dracopoli et al. ( 監修) 「ヒト遺伝学の最新プロトコール ( Current Protocols in Human Genetics ) 」 ジョン・ウィリー・アンド・サンズ、ニューヨーク ( 1994 ) 中12及び13章 ; Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981) に記載されている。安定した高収量細胞株を確立する1つの特に好ましい方法は、ある条件の下で発現を高めるのに効率的なアプローチを提供するグルタミンシンテターゼ遺伝子発現系 ( GS系 ) を含むと理解されよう。このGS系については、そのそれぞれが参照により本明細書に組み込まれる、EP特許 : 0 2 1 6 8 4 6、0 2 5 6 0 5 5、0 3 2 3 9 9 7、及び0 3 3 8 8 4 1に関連して、その全体又は一部が考察されている。

#### 【 0 1 7 5 】

[0187] 加えて、挿入された配列の発現を調節するか又はその遺伝子産物を所望される特定の形式で修飾及び処理する宿主細胞株を選択してよい。タンパク質産物のそのような修飾 ( 例、グリコシル化 ) 及びプロセッシング ( 例、切断 ) は、該タンパク質の機能及び/又は精製に重要であり得る。異なる宿主細胞は、翻訳後プロセッシングとタンパク質及び遺伝子産物の修飾に特徴的で特異的な機序を有する。当該技術分野で公知であるように、適正な細胞株又は宿主系を選択して、発現されるポリペプチドの望まれる修飾及びプロセッシングを確実にすることができる。このために、本発明における使用には、一次転写物の適切なプロセッシング、グリコシル化、及び遺伝子産物のリン酸化のための細胞機構を保有する真核宿主細胞が特に有効である。従って、特に、好ましい哺乳動物宿主細胞には、限定されないが、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、NS0、MDCK、293、3T3、W138、並びに、例えば、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、及びT47Dのような乳癌細胞株と、例えば、CRL7030及びHsS78Bstのような正常な乳腺細胞株が含まれる。モジュレーターと選択される産生系に依って、当業者は、モジュレーターの効率的な発現に適正な宿主細胞を容易に選択して最適化することができる。

#### 【 0 1 7 6 】

##### b . 化学合成

[0188] 上述した宿主細胞株以外に、本発明のモジュレーターは、当該技術分野で公知の技術を使用して、化学的に合成し得ることが理解されよう ( 例えば、Creighton (1983) 「タンパク質 : 構造及び分子の諸原理 ( Proteins: Structures and Molecular Principles ) 」 W. H. フリーマン社、ニューヨーク、及び Hunkapiller, M., et al. (1984) Nature 310: 105-111 を参照のこと ) 。例えば、本発明のポリペプチド断片に対応するペプチドをペプチド合成機の使用によって合成することができる。さらに、所望されるならば、ポリペプチド配列中への代用物又は付加物として非典型型アミノ酸又は化学アミノ酸類似体を導入することができる。非典型型アミノ酸には、限定されないが、通常のアミノ酸のD-異性体、2, 4-ジアミノ酪酸、 $\alpha$ -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、g-Abu、e-Ahx、6-アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、ザルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、b-アラニン、フルオロ-アミノ酸、b-メチルアミノ酸、Ca-メチルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸のようなデザイナーアミノ酸、並びにアミノ酸類似体全般が含まれる。さらに、アミノ酸は、D ( 右旋性 ) でもL ( 左旋性 ) でもよい。

#### 【 0 1 7 7 】

##### c . トランスジェニック系

[0189] 本発明のPTK7モジュレーターはまた、対象の免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖配列 ( 又は、その断片若しくは誘導体若しくは変異体 ) についてトランスジェニックである哺乳動物又は植物の産生と、所望の化合物の回収可能形態での産生により、トランスジェニックに産生することができる。哺乳動物中でのトランスジェニック産生に関連して、抗PTK7抗体は、例えば、ヤギ、ウシ、又は他の哺乳動物において産生されて、その乳より回収することができる。例えば、米国特許第5, 827, 690号、5, 756,

687号、5,750,172号、及び5,741,957号を参照のこと。いくつかの態様では、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む非ヒトトランスジェニック動物を上記に記載のようにPTK7又はその免疫原性部分で免疫化する。抗体を植物中で作製する方法については、例えば、米国特許第6,046,037号及び5,959,177号に記載されている。

#### 【0178】

[0190] 本明細書の教示に従って、本発明のPTK7モジュレーターをコードする1以上の核酸分子を動物又は植物の中へ標準トランスジェニック技術によって導入することによって、非ヒトのトランスジェニック動物又は植物を産生することができる。Hoganと米国特許第6,417,429号を参照のこと。トランスジェニック動物を作製するのに使用されるトランスジェニック細胞は、胚性幹細胞でも、体細胞でも、受精卵でもよい。トランスジェニック非ヒト生物は、キメラ、非キメラの異型接合体と非キメラの同型接合体であり得る。例えば、Hogan et al.「マウス胚の操作法：実験マニュアル (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual)」第2版、コールドスプリングハーバー出版局(1999)；Jackson et al.「マウスの遺伝学とトランスジェニック技術：実践アプローチ (Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach)」オックスフォード大学出版局(2000)；及びPinkert「トランスジェニック動物技術：実験手引き (Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook)」アカデミックプレス(1999)を参照のこと。いくつかの態様において、トランスジェニック非ヒト動物は、例えば、対象の重鎖及び/又は軽鎖をコードする標的化構築体による、標的指向された破壊及び置換を有する。1つの態様において、トランスジェニック動物は、PTK7へ特異的に結合する重鎖及び軽鎖をコードする核酸分子を含んで発現する。抗PTK7抗体は、どのトランスジェニック動物でも作製してよいが、特に好ましい態様において、非ヒト動物は、マウス、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、又はウマである。さらなる態様において、非ヒトトランスジェニック動物は、所望の医薬品を血液、乳、尿、唾液、涙液、粘液、及び他の体液において発現して、それは、当該技術分野で認められた精製技術を使用して、容易に入手することができる。

#### 【0179】

[0191] 異なる細胞株によるか又はトランスジェニック動物において発現されるモジュレーター(抗体が含まれる)は、互いに異なるグリコシル化様式を有する可能性がある。しかしながら、本発明で提供される核酸分子によってコードされるか又は本発明で提供されるアミノ酸配列を含んでなるすべてのモジュレーターが、該分子のグリコシル化状態に拘らず、そしてより一般的には、翻訳後修飾(複数)の存在又は非存在に拘らず、本発明の一部である。加えて、本発明には、翻訳の間又は後に差示的に修飾される(例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/ブロック基による誘導化、タンパク分解的切断、抗体分子又は他の細胞リガンドへの連結、等により)モジュレーターが含まれる。数多くの化学修飾のいずれも、限定されないが、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、 $\text{NaBH}_4$ による特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、酸化、還元、ツニカマイシンの存在下での代謝合成、等が含まれる既知の技術によって行ってよい。様々な翻訳後修飾も本発明に含まれて、例えば、N連結又はO連結した炭水化物鎖、N末端又はC末端のプロセッシング、アミノ酸骨格への化学部分の付加、N連結又はO連結した炭水化物鎖の化学修飾、並びに原核宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加又は削除が含まれる。さらに、本文と下記の「実施例」において説明するように、該ポリペプチドはまた、そのモジュレーターの検出及び単離を可能にする、酵素、蛍光、放射性同位体、又は親和性の標識のような、検出可能な標識で修飾してよい。

#### 【0180】

##### d. 精製

[0192] 本明細書に開示する組換え発現技術又は他の技術のいずれによっても本発明のモジュレーターを産生したならば、それは、免疫グロブリンの精製について当該技術分野

10

20

30

40

50

で公知の如何なる方法によって精製してもよく、又はより一般的には、タンパク質の精製についての如何なる他の標準技術によって精製してもよい。この点に関して言えば、モジュレーターは、単離することができる。本明細書に使用するように、単離 P T K 7 モジュレーターとは、同定されて、その本来の環境の成分より分離及び / 又は回収されたものである。その本来の環境の混在成分は、該ポリペプチドの診断又は療法上の使用に干渉し得る物質であって、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性若しくは非タンパク質性の溶質が含まれる場合がある。単離モジュレーターには、該ポリペプチドの本来環境の少なくとも 1 つの成分も存在していないという理由から、組換え細胞内の *in situ* モジュレーターが含まれる。

#### 【 0 1 8 1 】

[0193] 組換え技術を使用する場合、P T K 7 モジュレーター（例えば、抗 P T K 7 抗体又はその誘導体若しくは断片）は、細胞内で、又は細胞周辺腔で産生され得るか、その培地へ直接分泌され得る。所望の分子が細胞内で産生されるならば、第一の工程として、粒子状の残渣（宿主細胞又は溶出断片）を例えば、遠心分離又は限外濾過によって除去することができる。例えば、Carter, et al., *Bio/Technology* 10: 163 (1992) は、大腸菌の細胞周辺腔へ分泌される抗体を単離する手順について説明する。簡潔に言えば、細胞ペーストを酢酸ナトリウム（pH 3.5）、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）の存在下で約 30 分にわたり融解する。遠心分離によって細胞残渣を取り除くことができる。抗体が培地中へ分泌される場合、一般的には、そのような発現系からの上清を市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、アミコン（Amicon）又はミリポア（Millipore）ペリコン（Pellicon）限外濾過ユニットを使用して初めに濃縮する。上記工程のいずれでも、タンパク質加水分解を防ぐために PMSF のようなプロテアーゼ阻害剤を含めてよくて、偶発的な汚染体の増殖を防ぐために抗生物質を含めてよい。

#### 【 0 1 8 2 】

[0194] 細胞より調製したモジュレーター（例、fc-P T K 7 又は抗 P T K 7 抗体）組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及び親和性クロマトグラフィーを使用して精製することができて、親和性クロマトグラフィーは、好ましい精製技術である。親和性リガンドとしてのプロテイン A の適格性は、選択した構築体に存在するあらゆる免疫グロブリン Fc ドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテイン A を使用して、ヒトの I g G 1、I g G 2、又は I g G 4 重鎖に基づいた抗体を精製することができる（Lindmark, et al., *J Immunol Meth* 62:1 (1983)）。すべてのマウスアイソタイプとヒト I g G 3 には、プロテイン G が推奨されている（Guss, et al., *EMBO J* 5:1567 (1986)）。親和性リガンドが付着するマトリックスは、多くの場合、ほぼアガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。制御された細孔ガラス又はポリ（スチレンジビニル）ベンゼンのような機械的に安定なマトリックスは、アガロースで達成され得るものより速い流速とより短い処理時間を可能にする。抗体が C<sub>H</sub>3 ドメインを含む場合は、Bakerbond ABX<sup>TM</sup> 樹脂（J. T. Baker；ニュージャージー州フィリップスバーグ）が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画化、エタノール沈殿、逆相 HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン樹脂でのセファロースクロマトグラフィー（ポリアスパラギン酸カラムのような）、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿といった、タンパク質精製の他の技術も、回収すべき抗体に依って利用可能である。特に好ましい態様において、本発明のモジュレーターは、少なくとも一部は、プロテイン A 若しくはプロテイン G 親和性クロマトグラフィーを使用して精製される。

#### 【 0 1 8 3 】

##### X I . コンジュゲートされた P T K 7 モジュレーター

[0195] 本明細書の教示に従って本発明のモジュレーターを精製したならば、それらは、医薬活性部分又は診断部分、又は生体適合性の修飾剤と連結、融合、コンジュゲートさせる（例えば、共有結合的又は非共有結合的に）、又は他の方法で会合させることができる。本明細書に使用するように、「コンジュゲート（conjugate）」という用語は概括的

10

20

30

40

50

に使用されて、会合の方法に拘らず、開示モジュレーターと会合するあらゆる分子を意味するものとする。この点に関して言えば、そのようなコンジュゲートは、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ポリマー、核酸分子、低分子、模倣薬剤、合成薬、無機分子、有機分子、及び放射性同位体を含んでよいと理解されよう。さらに、上記に示したように、選択したコンジュゲートは、モジュレーターへ共有結合的又は非共有結合的に連結してよく、少なくとも一部は、このコンジュゲーションを有効にするために使用される方法に依存して、様々なモル比を示し得る。

#### 【0184】

[0196] 好ましい態様において、本発明のモジュレーターは、選択される特徴を付与するタンパク質、ポリペプチド、又はペプチド（例、生体毒素、バイオマーカー、精製タグ、等）とコンジュゲート又は会合し得ることが明らかであろう。より一般的には、選択態様において、本発明には、異種のタンパク質又はポリペプチドへ組換え的に融合されるか又は化学的にコンジュゲートされる（共有結合と非共有結合の両方のコンジュゲーションが含まれる）モジュレーター又はその断片の使用が含まれ、ここで該ポリペプチドは、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、又は少なくとも100のアミノ酸を含む。この構築体は、必ずしも直接的に連結している必要はないが、リンカー配列を介して生じ得る。例えば、抗体を使用して、特別な細胞表面受容体に特異的な抗体へ本発明のモジュレーターを融合又はコンジュゲートさせることによって、PTK7を発現する特別な細胞種へ異種ポリペプチドを *in vitro* 又は *in vivo* のいずれかで標的指向することができる。さらに、異種ポリペプチドへ融合又はコンジュゲートしたモジュレーターはまた、*in vitro* イムノアッセイに使用し得て、当該技術分野で知られた精製の方法論と適合可能であり得る。例えば、国際特許公開公報番号：WO93/21232；欧州特許番号：EP439,095；Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39: 91-99；米国特許第5,474,981号；Gillies et al., 1992, PNAS 89: 1428-1432；及び Fell et al., 1991, J. Immunol. 146: 2446-2452 を参照のこと。

#### 【0185】

##### a. 生体適合性の修飾剤

[0197] 好ましい態様において、本発明のモジュレーターは、モジュレーター特徴を所望のように調整、改変、改善、又は加減するために使用し得る、生体適合性の修飾剤とコンジュゲートさせるか又は他の方法で会合させることができる。例えば、市販のポリエチレングリコール（PEG）又は同様の生体適合性ポリマーといった、相対的に分子量が高いポリマー分子を付着させることによって、*in vivo* 半減期が増加した抗体又は融合構築体を産生することができる。当業者は、該抗体へ特異的な特性を付与する（例えば、半減期を設計することができる）ように選択することが可能である、多くの異なる分子量及び分子配置でPEGを入手し得ることを理解されよう。PEGは、多機能性リンカーを伴うか又は伴わずに、前記抗体又は抗体断片のN若しくはC末端へのPEGの部位特異的なコンジュゲーションによるか、又はリジン残基上に存在する - アミノ基を介して、モジュレーター又は抗体断片若しくは誘導体へ付着させることができる。生理活性の損失をほとんどもたらさない、線状又は分岐鎖ポリマーの誘導体化を使用してよい。コンジュゲーションの度合いは、SDS-PAGE及び質量分析法によって密接にモニターして、PEG分子の抗体分子への最適なコンジュゲーションを確実にすることができる。未反応のPEGは、例えば、サイズ排除又はイオン交換クロマトグラフィーによって抗体-PEGコンジュゲートより分離することができる。同様の方法で、開示モジュレーターをアルブミンへコンジュゲートさせて、抗体又は抗体断片を *in vivo* でより安定にするか又はより長い *in vivo* 半減期を持たせることができる。この技術は、当該技術分野で周知であり、例えば、国際特許公開公報番号：WO93/15199、WO93/15200、及びWO01/77137；及び欧州特許第0413,622号を参照のこと。当業者には、他の生体適合性コンジュゲートが明らかであって、本明細書の教示に従って容易に確定することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 8 6 】

## b . 診断剤又は検出剤

[0198] 他の好ましい態様では、本発明のモジュレーター又はその断片若しくは誘導体を、診断又は検出可能な薬剤、生体分子であり得るマーカー又はレポーター（例、ペプチド又はヌクレオチド）、低分子、フルオロフォア、又は放射性同位体へコンジュゲートする。標識化モジュレーターは、過剰増殖性障害の発症又は進行をモニターするのに、又は開示モジュレーターが含まれる特別な療法の効力を決定するか又は治療の将来経過を判定するための臨床検査手技（即ち、診断・治療）の一部として有用であり得る。そのようなマーカー又はレポーターは、選択したモジュレーターを精製すること、TICを分離又は単離すること、又は前臨床手順又は毒性試験においても有用であり得る。

10

## 【 0 1 8 7 】

[0199] そのような診断及び検出は、限定されないが、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼを含んでなる様々な酵素；限定されないが、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンのような補欠分子族；限定されないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、又はフィコエリトリンのような蛍光物質；限定されないが、ルミノールのような発光物質；限定されないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンのような生物発光物質；限定されないが、ヨウ素（ $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ 、）、炭素（ $^{14}\text{C}$ ）、イオウ（ $^{35}\text{S}$ ）、トリチウム（ $^3\text{H}$ ）、インジウム（ $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、）、及びテクネチウム（ $^{99}\text{Tc}$ ）、タリウム（ $^{201}\text{Tl}$ ）、ガリウム（ $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ ）、パラジウム（ $^{103}\text{Pd}$ ）、モリブデン（ $^{99}\text{Mo}$ ）、キセノン（ $^{133}\text{Xe}$ ）、フッ素（ $^{18}\text{F}$ ）、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{68}\text{Ge}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{65}\text{Zn}$ 、 $^{85}\text{Sr}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{54}\text{Mn}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{113}\text{Sn}$ 、及び $^{117}\text{Tl}$ のような放射活性物質；様々な陽電子放射断層撮影法に使用する陽電子放射金属、非放射性常磁性金属イオン、及び放射標識化されるか又は特定の放射性同位体へコンジュゲートされる分子が含まれる、検出可能な物質へ当該モジュレーターをカップリングすることによって達成することができる。そのような態様において、当該技術分野では、適正な検出の方法論が周知であり、数多くの市販供給源より容易に入手可能である。

20

30

## 【 0 1 8 8 】

[0200] 上記に示したように、他の態様において、当該モジュレーター又はその断片は、ペプチド又はフルオロフォアのようなマーカー配列へ融合させて、免疫組織化学又はFACのような精製又は診断の手順を促進することができる。好ましい態様において、マーカーアミノ酸配列は、中でも、その多くが市販されている、pQEベクター（Qiagen社）において提供されるタグのような、ヘキサヒスチジンペプチド（配列番号7）である。Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824 に記載されるように、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製をもたらす。精製に有用な他のペプチドタグには、限定されないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質（Wilson et al., 1984, Cell 37:767）に由来するエピトープに対応する、ヘマグルチニン「HA」タグと「flag（フラッグ）」タグ（米国特許第4,703,004号）が含まれる。

40

## 【 0 1 8 9 】

## c . 治療薬の部分

[0201] 先に述べたように、当該モジュレーター又はその断片若しくは誘導体はまた、抗癌剤、細胞毒素又は細胞傷害剤（例、細胞増殖抑制剤又は細胞致死剤）、治療薬剤、又は放射活性金属イオン（例、 $\alpha$ -放出体）のような治療薬部分へコンジュゲート、連結、又は融合させるか又は他の方法で会合させてよい。本明細書に使用するように、細

50

胞毒素又は細胞傷害剤には、細胞に有害であって、細胞の増殖又は生存を阻害し得るあらゆる薬剤又は治療薬部分が含まれる。例には、バクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシン、DM-1a及びDM-4 (Immunogen社)のようなメイタンシノイド類、ジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、エピルピシン、及びシクロホスファミドとこれらの類似体又は相同体が含まれる。追加の細胞毒素は、モノメチルアウリスタチンE (MMAE) 及びモノメチルアウリスタチンF (MMAF) (Seattle Genetics社)が含まれるアウリスタチン類、 $\alpha$ -アマンチン、 $\beta$ -アマンチン、 $\gamma$ -アマンチン又は $\delta$ -アマンチン (Heidelberg Pharma AG)のようなアマンチン類、デュオカマイシン誘導体 (Syntarga, B. V.)のようなDNA副溝結合剤、及び修飾されたピロロベンゾジアピン二量体 (PBD、Spirogen社)を含む。さらに、1つの態様において、本発明のPTK7モジュレーターは、抗CD3結合分子と会合して細胞傷害性T細胞を動員して、それらを腫瘍始原細胞へ標的指向させることができる (BiTE技術; 例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Fuhrmann, S. et al. AACR年次会合抄録番号: 5625 (2010)を参照のこと)。

10

## 【0190】

[0202] 追加の適合可能な治療薬部分は、限定されないが、代謝拮抗薬 (例、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、ダカルバジン)、アルキル化剤 (例、メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン (BCNU) 及びロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、及びシスジクロロジアミン白金 (II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン類 (例、ダウノルピシン (かつてのダウノマイシン) 及びドキシソルピシン)、抗生物質 (例、ダクチノマイシン (かつてのアクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン (AMC))、及び抗有糸分裂剤 (例、ビンクラスチン及びビンブラスチン) が含まれる細胞傷害剤を含む。治療薬部分のより広汎なリストは、そのそれぞれが参照により本明細書に組み込まれる、PCT公開公報: WO03/075957及び米国特許第2009/0155255号に見出すことができる。

20

30

## 【0191】

[0203] 選択したモジュレーターはまた、放射活性物質、又は放射金属イオンをコンジュゲートするのに有用な大環状キレート剤といった治療薬部分へコンジュゲートすることができる (放射活性物質の例については、上記を参照のこと)。ある態様において、大環状キレート剤は、リンカー分子を介して抗体へ付けることができる、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸 (DOTA) である。当該技術分野では、このようなリンカー分子が普通に知られていて、Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4: 2483; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10: 553; 及び Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26: 943 に記載されている。

40

## 【0192】

[0204] 本発明のこの側面と適合可能であり得る例示の放射性同位体には、限定されないが、ヨウ素 ( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、炭素 ( $^{14}\text{C}$ )、銅 ( $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ )、イオウ ( $^{35}\text{S}$ )、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、インジウム ( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、ビスマス ( $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ )、テクネチウム ( $^{99}\text{Tc}$ )、タリウム ( $^{201}\text{Tl}$ )、ガリウム ( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、パラジウム ( $^{103}\text{Pd}$ )、モリブデン ( $^{99}\text{Mo}$ )、キセノン ( $^{133}\text{Xe}$ )、フッ素 ( $^{18}\text{F}$ )、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{68}\text{Ge}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{65}\text{Zn}$ 、 $^{85}\text{Sr}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{54}\text{Mn}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Tl}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ 、

50

<sup>76</sup>Br、及び<sup>211</sup>Atが含まれる。他の放射性核種（特に、<sup>60</sup>Co、<sup>4</sup>He、<sup>000</sup>keVのエネルギー範囲にあるもの）も、診断剤及び治療剤として利用可能である。治療される状態と望まれる治療プロフィールに依存して、当業者は、開示モジュレーターとの使用に適した放射性同位体を容易に選択することができる。

### 【0193】

[0205] 本発明のPTK7モジュレーターはまた、所与の生体応答を変化させる治療薬部分又は薬物（例、生物学的応答調節物質又はBRM）へコンジュゲートさせてよい。即ち、本発明に適合可能な治療薬剤又は治療成分は、典型的な化学治療薬剤に限定されると解釈してはならない。例えば、特に好ましい態様において、薬物部分は、所望の生理活性を保有する、タンパク質又はポリペプチド又はその断片であってよい。そのようなタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、オンコナーゼ（Onconaze）（又は別の細胞傷害性RNアーゼ）、シュードモナス外毒素、コレラ毒素、又はジフテリア毒素のような毒素；腫瘍壊死因子、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベータ、アポトーシス誘発剤（例、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、AIM-1（国際特許公開公報番号：WO97/33899を参照のこと）、AIM-2（国際特許公開公報番号：WO97/34911を参照のこと）、Fasリガンド（Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 6: 1567）、及びVEGI（国際特許公開公報番号：WO99/23105を参照のこと）、血栓形成剤又は抗血管新生剤（例、アンジオスタチン又はエンドスタチン）のようなタンパク質；又は、例えば、リンホカイン（例、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、及び顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」））、又は成長因子（例、成長ホルモン（「GH」））のような生物学的応答調節物質を含めてよい。上記に説明したように、当該技術分野では、モジュレーターをポリペプチド部分へ融合又はコンジュゲートさせる方法が知られている。先に開示した主題の参考文献に加えて、例えば、そのそれぞれが参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,336,603号；5,622,929号；5,359,046号；5,349,053号；5,447,851号、及び5,112,946号；EP307,434；EP367,166；PCT公開公報：WO96/04388及びWO91/06570；Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88: 10535；Zheng et al., 1995, J Immunol 154: 5590；及びVil et al., 1992, PNAS USA 89: 11337を参照のこと。ある部分とモジュレーターの会合は、必ずしも直接的である必要はなくて、リンカー配列を介して生じてよい。当該技術分野では、そのようなリンカー分子が一般に公知であり、そのそれぞれが参照により本明細書に組み込まれる、Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res 4:2483；Peterson et al., 1999, Bioconjug Chem 10: 553；Zimmerman et al., 1999, Nucl Med Biol 26: 943；Garnett, 2002, Adv Drug Deliv Rev 53: 171に記載されている。

### 【0194】

[0206] より一般的には、治療薬部分又は細胞傷害剤をモジュレーターへコンジュゲートさせるための技術が周知である。限定されないが、アルデヒド/シッフ連結、スルフィドリル連結、酸不安定連結、cis-アコチニル連結、ヒドラゾン連結、酵素分解可能連結（一般的には、Garnett, 2002, Adv Drug Deliv Rev 53: 171を参照のこと）が含まれる、当該技術分野で認められたどの方法によっても、モジュレーターへ種々の部分をコンジュゲートさせることができる。また、例えば、「モノクローナル抗体と癌療法（Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy）」Reisfeld et al.（監修）中、Amon et al.「癌療法における薬物の免疫標的化のためのモノクローナル抗体（Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy）」、243-56頁（Alan R. Liss社、1985）；「制御された薬物送達（Controlled Drug Delivery）第2版」Robinson et al.（監修）中、Hellstrom et al.「薬物送達用の抗体（Antibodies For Drug Delivery）」623-53頁（マーセル・デッカー社、1987）；「モノクローナル抗体 '84：生物学及び臨床上の応用（Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications）」Pinch

era et al. (監修) 中、Thorpe 「癌療法における細胞傷害剤の抗体担体：概説 (Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)」475-506頁 (1985) ; 「癌の検出及び療法用のモノクローナル抗体 (Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy)」Baldwin et al. (監修) 中、「放射標識化抗体の癌療法における療法上の使用の分析、結果、及び将来展望 (Analysis, Results And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)」303-16頁 (アカデミック・プレス、1985)、及び Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62: 119 を参照のこと。好ましい態様では、治療薬部分又は細胞傷害剤へコンジュゲートした P T K 7 モジュレーターを細胞表面と会合した P T K 7 分子への結合時に細胞によって内在化させて、それによって治療薬ペイロードを送達することができる。

10

【0195】

X I I . 診断薬とスクリーニングa . 診断

[0207] 示したように、本発明は、過剰増殖性障害を検出する、診断する、又はモニターするための *in vitro* 又は *in vivo* の方法と、T P C が含まれる腫瘍形成細胞を同定するために患者由来の細胞についてスクリーニングする方法を提供する。そのような方法には、患者又は患者より入手した試料を本明細書に記載のような選択した P T K 7 モジュレーターと接触させて、試料中の結合型又は遊離 P T K 7 への該モジュレーターの会合の存在又は非存在、又はそのレベルを検出することを含んでなる、癌の治療又はその進行のモニタリングのために癌を有する個体を同定することが含まれる。該モジュレーターが抗体又はその免疫学的に活性な断片を含む場合、試料中の特別な P T K 7 との会合は、該試料が腫瘍永続化細胞 (例、癌幹細胞) を含有し得る可能性があることを示し、癌を有する個体が本明細書に記載のような P T K 7 モジュレーターで効果的に治療され得ることを示唆する。この方法は、対照への結合のレベルを比較する工程をさらに含んでよい。逆に、選択したモジュレーターが F c - P T K 7 である場合、試料との接触時に、選択したプロテインキナーゼ 7 の結合特性を (*in vivo* 又は *in vitro* で直接的又は間接的に) 利用してモニターして、所望の情報を得ることができる。当該技術分野では、本明細書の教示と適合可能な他の診断又はセラグノーシスの方法が周知であり、専用のレポーティング系のような市販の材料を使用して、実践することができる。

20

【0196】

[0208] 特に好ましい態様では、本発明のモジュレーターを使用して、患者試料 (例、血漿又は血液) 中の P T K 7 レベルを検出して定量することができ、次いでそれを使用して、過剰増殖性障害が含まれる P T K 7 関連障害を検出、診断、又はモニターすることができる。関連した態様では、本発明のモジュレーターを使用して、循環性の腫瘍細胞を *in vivo* 又は *in vitro* で検出、モニター、及び/又は定量することができる (例えば、参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 1 2 / 0 1 2 8 8 0 1 を参照のこと)。なお他の好ましい態様において、循環性の腫瘍細胞は、癌幹細胞を含み得る。

30

【0197】

[0209] 例示の適合可能なアッセイ方法には、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、競合結合アッセイ、蛍光イムノアッセイ、イムノプロットアッセイ、ウェスタンブロット分析、フローサイトメトリーアッセイ、及び E L I S A アッセイが含まれる。より一般的には、生体試料中の P T K 7 の検出、又は P T K 7 の酵素的活性 (又はその阻害) の測定は、当該技術分野で公知の如何なるアッセイを使用しても達成してよい。適合可能な *in vivo* セラグノーシス又は診断は、磁気共鳴造影法 (M R I)、コンピュータ断層撮影法 (例、C A T スキャン)、ポジトロン断層撮影法 (例、P E T スキャン)、X 線撮影法、超音波法、等のような、当該技術分野で認められた造影又はモニタリング技術を含んでよい。当業者には、障害の病因、病理学的症状、又は臨床進行に基づいて、適正な検出、モニタリング、又は造影技術 (市販の供給源をしばしば含んでなる) を認識して実行することが容易に可能であろう。

40

【0198】

50

[0210] 別の態様において、本発明は、癌の進行及び/又は発病を *in vivo* で分析する方法を提供する。別の態様において、癌の進行及び/又は発病の *in vivo* 分析は、腫瘍進行の程度を決定することを含む。別の態様において、分析は、腫瘍の同定を含む。別の態様では、腫瘍進行の分析を原発性腫瘍について実施する。別の態様では、当業者に公知であるような癌の種類に依存して、分析を経時的に実施する。別の態様では、原発性腫瘍の転移細胞を起源とする続発性腫瘍のさらなる分析を *in vivo* で分析する。別の態様では、続発性腫瘍の大きさと形状を分析する。いくつかの態様では、さらなる体外 (*ex vivo*) 分析を実施する。

#### 【0199】

[0211] 別の態様において、本発明は、細胞転移を決定すること又は循環性の腫瘍細胞を検出してそのレベル定量することを含めて、癌の進行及び/又は発病を *in vivo* で分析する方法を提供する。なお別の態様において、細胞転移の分析は、原発性腫瘍から断続している部位での細胞の進行性増殖の決定を含む。別の態様において、細胞転移分析の部位は、新生物拡散の経路を含む。いくつかの態様では、細胞が血管系構造、リンパ管を介して、体腔内で、又はこれらの組合せで分散することができる。別の態様では、細胞遊走、播種、滲出、増殖、又はこれらの組合せの観点で細胞転移分析を実施する。

10

#### 【0200】

[0212] ある実施例では、被検者又は被検者由来試料中の腫瘍形成細胞について、開示モジュレーターを療法又はレジメンに先立って使用して評価又は特性決定して、ベースラインを確定することができる。他の実施例において、試料は、治療された被検者に由来する。いくつかの実施例では、被検者が治療を始めるか又は終わってから少なくとも約1、2、4、6、7、8、10、12、14、15、16、18、20、30、60、90日、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、又は12ヶ月以上後で該被検者より試料を採取する。ある実施例では、ある回数 of 投薬後に (例えば、2、5、10、20、30又はそれ以上の回数の治療薬の投薬後に) 腫瘍形成細胞について評価するか又は特性決定する。他の実施例では、1以上の療法を受けてから1週、2週、1ヶ月、2ヶ月、1年、2年、3年、4年、又はそれ以上の後で腫瘍形成細胞について特性決定するか又は評価する。

20

#### 【0201】

[0213] 別の側面において、そして下記により詳しく考察するように、本発明は、過剰増殖性障害を検出する、モニターする、又は診断する、そのような障害を有する個体について可能な治療を確定する、又は患者における障害の進行 (又は退縮) をモニターするためのキットを提供し、ここで該キットは、本明細書に記載のようなモジュレーターと、試料に対する該モジュレーターの影響を検出するための試薬を含む。

30

#### 【0202】

##### b. スクリーニング

[0214] 当該PTK7モジュレーターとそれを含んでなる細胞、培養物、集団、並びに組成物 (それらの子孫が含まれる) はまた、PTK7 (例えば、そのポリペプチド又は遺伝成分) と相互作用することによって腫瘍始原細胞又はその子孫の機能又は活性に影響を及ぼす化合物又は薬剤 (例、薬物) をスクリーニングするか又は同定するために使用することができる。故に、本発明は、PTK7又はその基質と会合することによって腫瘍始原細胞又はその子孫の機能又は活性に影響を及ぼし得る化合物又は薬剤の評価又は同定のためのシステム及び方法をさらに提供する。そのような化合物及び薬剤は、例えば、過剰増殖性障害の治療についてスクリーニングされる薬物候補であり得る。1つの態様において、システム又は方法は、PTK7を明示する腫瘍始原細胞と化合物又は薬剤 (例、薬物) を含み、ここで該細胞と化合物又は薬剤 (例、薬物) は、互いに接触している。

40

#### 【0203】

[0215] さらに本発明は、腫瘍始原細胞又は子孫細胞の活性又は機能を変化させることについて、PTK7モジュレーター又は薬剤及び化合物をスクリーニングして同定する方法を提供する。1つの態様では、試験薬剤又は化合物と腫瘍始原細胞又はその子孫を接触させること; 及び、この試験薬剤又は化合物がPTK7と会合した腫瘍始原細胞の活性又

50

は機能を調節するかどうかを決定することが方法に含まれる。

【0204】

[0216] 集団内のそのような腫瘍始原細胞又はその子孫の P T K 7 関連活性又は機能を調節する試験薬剤又は化合物により、試験薬剤又は化合物を活性剤として同定する。調節され得る例示の活性又は機能には、腫瘍始原細胞又はその子孫の細胞形態の変化、マーカーの発現、分化又は脱分化、成熟化、増殖、生存能力、アポトーシス、又は細胞死が含まれる。

【0205】

[0217] 「接触させること」は、細胞又は細胞培養物、又は方法工程又は治療と関連して使用される場合、組成物（例、P T K 7 会合細胞又は細胞培養物）と別の参照実体（referenced entity）との間の直接的又は間接的な相互作用を意味する。直接的な相互作用の特別な例は、物理的な相互作用である。間接的な相互作用の特別な例は、組成物が中間分子に作用して、次いでそれが参照実体（例、細胞又は細胞培養物）に作用する。

10

【0206】

[0218] 本発明のこの側面において、「調節する」は、本発明の腫瘍始原細胞又は子孫細胞の特別な側面（例、転移又は増殖）に関連していることが判明した細胞の活性又は機能に対する効果を検出することに適合可能な様式で、腫瘍始原細胞又は子孫細胞の活性又は機能に影響を及ぼすことを示す。例示の活性及び機能には、限定されないが、計量し得る形態、発生マーカー、分化、増殖、生存能力、細胞呼吸、ミトコンドリア活性、膜完全性、又はある状態に関連したマーカーの発現が含まれる。従って、化合物又は薬剤（例、候補医薬品）について、該化合物又は薬剤と腫瘍始原細胞又は子孫細胞を接触させて、本明細書に開示されるか又は当業者に公知であるような腫瘍始原細胞又は子孫細胞の活性又は機能のあらゆる調節を測定することによって、そのような細胞又は子孫細胞に対するその効果を評価することができる。

20

【0207】

[0219] 薬剤及び化合物についてスクリーニングして同定する方法には、ハイスループットスクリーニングに適したものが含まれて、それには、任意選択的に所定の位置又はアドレスに定位又は配置された細胞のアレイ（例、マイクロアレイ）が含まれる。ハイスループットのロボット又はマニュアル操作法では、化学的な相互作用を精査して、多くの遺伝子の発現レベルを短い時間帯で定量することができる。分子シグナル（例、フルオロフォア）と、情報をごく高速で処理する自動分析を利用する技術が開発されてきた（例えば、Pinhasov et al., Comb. Chem. High Throughput Screen. 7: 133 (2004) を参照のこと）。例えば、特定遺伝子の情報を提供する一方で、何千もの遺伝子の相互作用を同時に精査するためのマイクロアレイ技術が広汎に利用されてきた（例えば、Mocellin and Rossi, Adv. Exp. Med. Biol. 593: 19 (2007) を参照のこと）。

30

【0208】

[0220] そのようなスクリーニング方法（例、ハイスループット）では、活性のある薬剤及び化合物を迅速かつ効率的に同定することができる。例えば、潜在的に療法性の分子を同定するために、培養皿、試験管、フラスコ、ローラーボトル又はプレート（例えば、8、16、32、64、96、384、及び1536穴のマルチウェルプレート又はディッシュのような、単一のマルチウェルプレート又はディッシュ）に、任意選択的に所定の位置で、細胞を定位又は配置する（予め播く）ことができる。スクリーニングされ得るライブラリーには、例えば、低分子ライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、完全ヒト抗体酵母ディスプレイライブラリー（Adimab, LLC）、s i R N A ライブラリー、及びアデノウイルストランスフェクションベクターが含まれる。

40

【0209】

X I I I . 医薬調製物と療法使用

a . 製剤と投与経路

[0221] モジュレーターの状態、並びに任意選択のコンジュゲート、企図される送達形式、治療又はモニターされる疾患、及び他の数多くの変数に依存して、本発明の組成物は

50

、当該技術分野で認められた技術を使用して、所望されるように製剤化してよい。即ち、本発明の様々な態様では、PTK7モジュレーターを含んでなる組成物を多種多様な医薬的に許容される担体とともに製剤化する（例えば、Gennaro「レミントン：調剤の科学と実践：事実と比較（Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons）」Drugfacts Plus, 第20版（2003）；Ansel et al.「医薬剤形と薬物送達系（Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems）」第7版、Lippencott Williams and Wilkins（監修）（2004）；Kibbe et al.「医薬賦形剤の手引き（Handbook of Pharmaceutical Excipients）」第3版、Pharmaceutical Press（2000）を参照のこと）。媒体、アジュバント、及び希釈剤が含まれる、様々な医薬的に許容される担体が数多くの市販供給源より容易に利用可能である。さらに、pH調整剤及び緩衝剤、張度調整剤、安定化剤、湿潤剤、等のような、医薬的に許容される補助物質の取り合わせも利用可能である。ある非限定的な例示の担体には、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、及びこれらの組合せが含まれる。

10

## 【0210】

[0222] より具体的には、いくつかの態様において、本発明の治療組成物は、そのまま投与しても、最少量の追加成分とともに投与してもよいと理解されよう。逆に、本発明のPTK7モジュレーターは、当該技術分野で周知の相対的に不活性な物質であって、該モジュレーターの投与を促進するか又は作用部位への送達について医薬的に最適化された調製物への活性化化合物の加工処理を補佐する賦形剤及び補助剤を含んでなる、好適な医薬的に許容される担体を含むように任意に製剤化してもよい。例えば、賦形剤は、形態又は堅さを与えるか又は希釈剤として作用して、モジュレーターの薬物動態を改善することができる。好適な賦形剤には、限定されないが、安定化剤、湿潤及び乳化剤、浸透性を変化させるための塩類、被包化剤、緩衝液、及び皮膚浸透エンハンサーが含まれる。

20

## 【0211】

[0223] 全身投与用の開示モジュレーターは、経腸、非経口、又は局所投与用に製剤化することができる。実際、有効成分の全身投与を達成するには、全3種類の製剤を同時に使用してよい。非経口及び非腸管外の薬物送達用の賦形剤並びに製剤については、「レミントン、調剤の科学及び実践（Remington, The Science and Practice of Pharmacy）」第20版、マック・パブリッシング（2000）に説明されている。非経口投与に適した製剤には、水溶性の活性化化合物、例えば、水溶性塩の水溶液剤が含まれる。加えて、油性の注射懸濁液剤に適正のような活性化化合物の懸濁液剤も投与し得る。好適な脂溶性の溶媒又は媒体には、脂肪油剤、例えば、ゴマ油、又は合成脂肪酸エステル類、例えば、オレイン酸エチル又はトリグリセリドが含まれる。水性注射懸濁液剤は、該懸濁液剤の粘度を高める物質を含むことで、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、及び/又はデキストランが含まれる。懸濁液剤は、安定化剤を含むともよい。また、リポソーム剤を使用して、細胞中への送達のために薬剤を被包化することができる。

30

## 【0212】

[0224] 経腸投与に適した製剤には、硬又は軟ゼラチンカプセル剤、丸剤、錠剤（被覆錠剤が含まれる）、エリキシル剤、懸濁液剤、シロップ剤、又は吸入剤とこれらの制御放出形態が含まれる。

40

## 【0213】

[0225] 一般に、PTK7モジュレーターを含んでなる本発明の化合物及び組成物は、その必要な被検者へ、限定されないが、経口、静脈内、動脈内、皮下、非経口、鼻腔内、筋肉内、心臓内、心室内、気管内、頬内、直腸、腹腔内、皮内、局所、経皮、及び鞘内が含まれる様々な経路によって、また他の様式では、移植又は吸入によって *in vivo* で投与され得る。主題の組成物は、調製物へ固体、半固体、液体、又は気体の形態で製剤化し得て；限定されないが、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、溶液剤、坐剤、浣腸剤、注射剤、吸入剤、及びエアゾール剤が含まれる。企図される適用と療法レジメンに従って、適正な製剤と投与経路を選択してよい。

## 【0214】

50

## b. 投与量

[0226] 同様に、特別な投与レジメン（即ち、用量、時機、及び反復）は、特別な個体とその個体の治療歴に依存するものである。投与量の決定には、薬物動態（例、半減期、クリアランス速度、等）のような経験的な考慮事項が寄与する。投与の頻度は、療法の経過にわたって決定して調整してよくて、腫瘍始原細胞が含まれる過剰増殖性細胞又は新生物細胞の数を低下させること、そのような新生物細胞の低下を維持すること、新生物細胞の増殖を低下させること、又は転移の発現を遅らせることに基づく。あるいは、主題の治療組成物の持続した連続放出製剤が適正であり得る。上記に述べたように、当該技術分野では、持続放出を達成するための様々な製剤及びデバイスが知られている。

### 【0215】

[0227] 治療上の視点から、当該医薬組成物は、特定の適応症の治療又は予防に有効な量で投与される。治療有効量は、典型的には、治療される被検者の体重、彼又は彼女の身体又は健康状態、治療すべき状態の広がり、又は治療される被検者の年齢に依存する。一般に、本発明のPTK7モジュレーターは、投薬につき約 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ （体重）～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ （体重）の範囲の量で投与してよい。ある態様において、本発明のPTK7モジュレーターは、投薬につき、約 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ （体重）～約 $5\text{mg}/\text{kg}$ （体重）の範囲の量で投与してよい。ある他の態様において、本発明のPTK7モジュレーターは、投薬につき、約 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ （体重）～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ （体重）の範囲の量で投与してよい。本発明のPTK7モジュレーターは、投薬につき、約 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ （体重）～約 $20\text{mg}/\text{kg}$ （体重）の範囲の量で投与してもよい。さらに、本発明のPTK7モジュレーターは、投薬につき、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ （体重）～約 $20\text{mg}/\text{kg}$ （体重）の範囲の量で投与してもよい。ある態様において、本発明の化合物は、少なくとも約 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ （体重）、少なくとも約 $250\mu\text{g}/\text{kg}$ （体重）、少なくとも約 $750\mu\text{g}/\text{kg}$ （体重）、少なくとも約 $3\text{mg}/\text{kg}$ （体重）、少なくとも約 $5\text{mg}/\text{kg}$ （体重）、少なくとも約 $10\text{mg}/\text{kg}$ （体重）の用量で提供される。

### 【0216】

[0228] 他の投薬レジメンは、その全体において参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,744,877号に開示されるような体表面積（BSA）計算値に基づいてよい。当該技術分野で周知であるように、BSAは、患者の身長及び体重を使用して計算して、彼又は彼女の身体の表面積によって表されるような被検者のサイズの尺度を提供する。BSAを使用する、本発明の選択態様において、モジュレーターは、 $10\text{mg}/\text{m}^2$ ～ $800\text{mg}/\text{m}^2$ の投与量で投与してよい。他の好ましい態様において、該モジュレーターは、 $50\text{mg}/\text{m}^2$ ～ $500\text{mg}/\text{m}^2$ の投与量で、そしてなおより好ましくは、 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $150\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $250\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $350\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 、又は $450\text{mg}/\text{m}^2$ の投与量で投与される。当然ながら、投与量をどのように計算するかには拘らず、選択された時間帯にわたって多数の投与量を投与して、個々の投与より実質的に高い絶対的な投与量を提供してよい。

### 【0217】

[0229] いずれにしても、当該PTK7モジュレーターは、好ましくは、その必要な被検者へ必要に応じて投与される。投与頻度の決定は、担当医のような当業者によって、治療される状態、治療される被検者の年齢、治療される状態の重症度、治療される被検者の全般的な健康状態、等の考慮事項に基づいてなされてよい。一般的には、PTK7モジュレーターの有効量が被検者へ1回以上投与される。より具体的には、該モジュレーターの有効量が被検者へ1ヶ月に1回、1ヶ月に1回より多く、又は1ヶ月に1回より少なく投与される。ある態様において、PTK7モジュレーターの有効量は、少なくとも1ヶ月、少なくとも6ヶ月、又は少なくとも1年の期間の間を含めて、数回投与してよい。なお他の態様では、開示モジュレーターの投与の間に、数日（2、3、4、5、6又は7日）、数週（1、2、3、4、5、6、7又は8週）、又は数ヶ月（1、2、3、4、5、6、7又は8ヶ月）が経過してよい。

10

20

30

40

50

## 【0218】

[0230] 開示される治療組成物の投与量及びレジメンはまた、1回以上の投与（複数）を受けてきた個体において、経験的に決定することができる。例えば、本明細書に記載のように製造した治療組成物の漸増する投与量を個体へ与えてよい。選択した組成物の効力を評価するために、特定の疾患、障害、又は状態のマーカーを先に記載のように追跡することができる。個体が癌を有する態様において、これらには、触診又は目視観察による腫瘍サイズの直接的な測定、X線又は他の造影技術による腫瘍サイズの間接的な測定；直接的な腫瘍生検と腫瘍試料の顕微鏡検査によって評価されるような改善；間接的な腫瘍マーカー（例、前立腺癌のPSA）又は本明細書に記載の方法によって同定される抗原の測定、疼痛又は麻痺の減少；言語能力、視覚、呼吸、又は腫瘍に関連した他の無能力の改善；食欲増加；又は承認された検査法によって測定されるような生活の質の増加、又は生存の延長化が含まれる。当業者には、その個体、新生物状態の種類、新生物状態の段階、その新生物状態が個体中の他の部位へ転移し始めたかどうか、及び使用されているこれまでの治療薬と併用治療薬に依って、投与量が変動するものであることが明らかであろう。

10

## 【0219】

## c. 組合せ療法

[0231] 本発明によって考慮される組合せ療法は、望まれない新生物細胞増殖（例、内皮細胞）を減少させるか又は阻害すること、癌の発生を減少させること、癌の再発を減少させるか又は予防すること、又は癌の広がり又は転移を減少させるか又は予防することに特に有用であり得る。そのような場合、本発明の化合物は、腫瘍塊（例、NTG細胞）を支援して永続化させるTPCを除去することによって増感剤又は化学増感剤として機能し得て、現行の標準治療の腫瘍減量剤又は抗癌剤のより有効な使用を可能にし得る。即ち、PTK7モジュレーターと1以上の抗癌剤を含んでなる組合せ療法を使用して、定着した癌を減衰させる（例えば、存在する癌細胞の数を減少させる、及び/又は腫瘍負荷を減少させる）、又は癌の少なくとも1つの徴候又は副作用を改善することができる。このように、組合せ療法は、PTK7モジュレーターと1以上の抗癌剤（限定されないが、細胞傷害剤、細胞増殖抑制剤、化学療法剤、標的化抗癌剤、生物学的応答調節物質、免疫療法剤、癌ワクチン、抗血管新生剤、サイトカイン、ホルモン療法、放射線療法、及び抗転移剤が含まれる）の投与に関連する。

20

## 【0220】

[0232] 本発明の方法によれば、組み合わせた結果がそれぞれの治療法（例、抗PTK7抗体と抗癌剤）を別々に実施するとき観測される効果の相加である必要はない。少なくとも相加的な効果が一般的には望ましいが、単一療法の1つに優る増加された抗腫瘍効果が有益である。さらに、本発明は、組合せ治療が相乗効果を明示することを求めない。しかしながら、当業者は、好ましい態様を含むある選択した組合せでは、相乗作用が観測され得ることを理解されよう。

30

## 【0221】

[0233] 本発明による組合せ療法を實踐するには、1以上の抗癌剤と組合せたPTK7モジュレーター（例、抗PTK7抗体）を、その必要な被検者へ抗癌活性を該被検者内でもたらずのに有効な様式で投与してよい。PTK7モジュレーターと抗癌剤は、それらの組合わされた存在と腫瘍環境中でのそれらの組合わされた作用を所望されるようにもたらずのに有効な量と有効な時間帯で提供される。この目標を達成するために、PTK7モジュレーターと抗癌剤は、単一組成物において、又は同じか又は異なる投与経路を使用する2以上の別個の組成物として、被検者へ同時に投与してよい。

40

## 【0222】

[0234] あるいは、当該モジュレーターは、例えば、数分～数週に及ぶ間隔で、抗癌剤の治療に先行又は後続してよい。抗癌剤と抗体が被検者へ別々に適用されるある態様において、それぞれの送達の時機の間時間帯は、抗癌剤とモジュレーターが腫瘍に対して組合せ効果を発揮することができるようなものである。特別な態様では、抗癌剤とPTK7モジュレーターの両方が互いから約5分～約2週以内に投与されると考慮される。

50

## 【0223】

[0235] なお他の態様では、モジュレーターと抗癌剤の投与の間に、数日（2、3、4、5、6又は7日）、数週（1、2、3、4、5、6、7又は8週）、又は数ヶ月（1、2、3、4、5、6、7又は8ヶ月）が経過してよい。PTK7モジュレーターと1以上の抗癌剤（組合せ療法）は、1回、2回、又は少なくとも該状態が治療、緩和、又は治癒されるまでの時間帯で投与してよい。好ましくは、組合せ療法は、数回投与される。組合せ療法は、1日3回～6ヶ月ごとに1回投与してよい。投与することは、1日3回、1日2回、1日1回、2日ごとに1回、3日ごとに1回、週1回、2週ごとに1回、1ヶ月ごとに1回、2ヶ月ごとに1回、3ヶ月ごとに1回、6ヶ月ごとに1回のようなスケジュールであっても、ミニポンプより連続的に投与してもよい。先に示したように、組合せ療法は、経口、粘膜、頬内、鼻腔内、吸入可能、静脈内、皮下、筋肉内、腸管外、腫瘍内、又は局所の経路より投与してよい。組合せ療法は、腫瘍の部位より離れた部位で投与してよい。組合せ療法は、一般的には、腫瘍が存在する限りにおいて、その組合せ療法により、腫瘍又は癌が増殖を止めるか又はその重量又は体積が減少することを引き起こす前提で、投与される。

10

## 【0224】

[0236] 1つの態様では、PTK7モジュレーターを1以上の抗癌剤と組合せて、その必要な被検者へ短い治療サイクルの間投与する。この抗体での治療の継続期間は、使用する特別な抗癌剤に従って変動してよい。本発明はまた、不連続な投与、又は数回の部分投与へ分割される1日用量を考慮する。当業者には、特別な抗癌剤に適正な治療時間が評価されて、本発明は、それぞれの抗癌剤に最適な治療スケジュールの継続的な評価を考慮する。

20

## 【0225】

[0237] 本発明は、組合せ療法が投与される間の少なくとも1回のサイクル、好ましくは、1回より多いサイクルを考慮する。当業者には、1回のサイクルに適正な時間帯が評価されて、サイクルの全数とサイクル間の間隔も評価されよう。本発明は、それぞれのモジュレーター及び抗癌剤に最適な治療スケジュールの継続的な評価を考慮する。さらに、本発明はまた、抗PTK7抗体又は抗癌剤のいずれか一方の1回より多い投与を提供する。モジュレーターと抗癌剤は、可換的に、隔日又は隔週で投与してよい；又は連続した抗体治療を与えて、抗癌剤療法1回以上の治療を続けてよい。いずれにしても、当業者によって理解されるように、化学療法剤の適正な用量は、一般的には、臨床療法においてすでに利用されてきた用量に近いものであって、ここでこの化学療法剤は、単独で、又は他の化学療法剤と組み合わせて投与される。

30

## 【0226】

[0238] 別の好ましい態様において、本発明のPTK7モジュレーターは、腫瘍疾患の初期症状に続く腫瘍再発の見込みを低下又は消失させるために、維持療法で使用されてよい。好ましくは、該障害は、治療が済んで、患者が無症候性又は寛解状態にあるように、最初の腫瘍塊は、消失、低下、又は他の様式で改善している。このような時間に、標準の診断手順を使用して疾患の徴候がほとんど又は全くないとしても、被検者へ開示モジュレーターの医薬有効量を1回以上投与してよい。いくつかの態様において、エフェクターは、ある時間帯にわたり規則的なスケジュールで投与される。例えば、PTK7モジュレーターは、毎週、毎2週、毎月、毎6週、毎2ヶ月、毎3ヶ月、毎6ヶ月、又は毎年で投与することができる。本明細書の教示があれば、当業者は、疾患再発の潜在可能性を低下するのに好ましい投与量及び投薬レジメンを容易に決定することができよう。さらに、そのような治療は、患者の応答と臨床及び診断の諸変数に依って、数週、数ヶ月、数年の期間、又は無期限でも続けることができる。

40

## 【0227】

[0239] なお別の好ましい態様において、本発明のモジュレーターは、腫瘍減量術（debulking procedure）に続く腫瘍転移の可能性を防ぐか又は抑えるために予防的に使用してよい。本開示に使用されるように、腫瘍減量術は概括的に定義されて、腫瘍又は腫瘍増

50

殖を消失、低下、治療、又は改善するあらゆる手順、技術、又は方法を意味する。例示の腫瘍減量術には、限定されないが、外科手術、放射線治療（即ち、ビーム放射線）、化学療法、又は除去が含まれる。本開示に照らして当業者によって容易に決定される適正な時間で、臨床及び診断、又はセラグノーシスの手順によって示唆されるように、腫瘍転移を抑えるためにPTK7モジュレーターを投与してよい。当該モジュレーターは、標準的な技術を使用して決定されるように、医薬的に有効な投与量で1回以上投与してよい。好ましくは、投薬レジメンには、それを必要に応じて変更することを可能にする、適正な診断又はモニタリング技術が付随するものである。

#### 【0228】

##### d. 抗癌剤

[0240] 本明細書に使用するように、「抗癌剤」という用語は、癌のような細胞増殖性障害を治療するために使用し得るあらゆる薬剤を意味して、細胞傷害剤、細胞増殖抑制剤、抗血管新生剤、腫瘍減量剤、化学療法剤、放射線療法と放射線療法剤、標的化抗癌剤、生物学的応答調節物質、抗体、及び免疫療法剤が含まれる。上記に考察したような選択態様では、抗癌剤がコンジュゲートを含んでよくて、投与に先立ってモジュレーターと会合させてよいと理解されよう。

#### 【0229】

[0241] 細胞傷害剤という用語は、細胞の機能を減少させるか又は阻害する、及び/又は細胞の破壊を引き起こす物質を意味し、即ち、その物質は、細胞にとって有害である。典型的には、この物質は、生物に由来する天然に存在する分子である。細胞傷害剤の例には、限定されないが、細菌（例、ジフテリア毒素、シュードモナス内毒素及び外毒素、ブドウ球菌エンテロトキシンA）、真菌（例、 $\alpha$ -サクリン、レストリクトシン）、植物（例、アプリン、リシン、モデッシン、ビスクミン、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サポリン、ゲロニン、モモリジン、トリコサンチン、麦毒、アレウリテス・フォーディ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、フィトラッカ・アメリカーナ（*Phytolacca Americana*）タンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、モモルディカ・チャランチア（*Momordica charantia*）阻害剤、クルシン、クロチン、サポナリア・オフィシナリス（*saponaria officinalis*）阻害剤、ゲロニン、ミテゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、ネオマイシン、及びトリコテセン類）、又は動物（例、細胞外膜R Nアーゼのような細胞傷害性R Nアーゼ；DNアーゼI）の低分子毒素又は酵素活性毒素が含まれて、これらの断片及び/又は変異体が含まれる。

#### 【0230】

[0242] 化学療法剤は、癌細胞の成長、増殖、及び/又は生存を非特異的に減少させるか又は阻害する化学化合物（例、細胞傷害性又は細胞増殖抑制性の薬剤）を意味する。そのような化学薬剤は、多くの場合、細胞の増殖又は分裂に必要な細胞内プロセスへ指向されるので、概して速やかに増殖して分裂する癌性細胞に対して特に有効である。例えば、ピンクリスチンは、微小管を脱重合させて、それにより細胞が有糸分裂に入ることを阻害する。一般に、化学療法剤には、癌性細胞、又は癌性になるか又は腫瘍形成性の子孫（例、TIC）を産生する可能性がある細胞を阻害するか又は阻害するように設計されたあらゆる化学薬剤を含めることができる。そのような薬剤は、多くの場合、組合せて（例えば、CHOP処方において）投与され、そして多くの場合、最も効果的である。

#### 【0231】

[0243] 本発明のモジュレーターと組み合わせて（又はそれへコンジュゲートして）使用され得る抗癌剤の例には、限定されないが、アルキル化剤、アルキルスルホネート、アジリジン、エチレンイミン及びメチルアメラミン、アセトゲニン、カンプトテシン、プリオスタチン、カリスタチン、CC-1065、クリプトフィシン、ドラスタチン、デュオカマイシン、エレウテロピン、パンクラチスタチン、サルコディクチン、スポンジスタチン、ナイトロジェンマスタード、抗生物質、エネジイン抗生物質、ダイネマイシン、ビスホスホネート類、エスペラマイシン、色素タンパク質-エネジイン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、プレオマ

10

20

30

40

50

イシソ類、カクチノマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、アドリアマイシン (Adriamycin) (登録商標) ドキソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン類、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン類、ペブレオマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、キュエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗薬、葉酸類似体、プリン類似体、アンドロゲン類、抗副腎薬、フロリン酸のような葉酸リプレニッシャー、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレプリン酸、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル、ピサントレン、エダトラキセート、デフォファミン、デメコルシン、ジアジコン、エルフォルニチン、酢酸エリプチニウム、エポチロン、エトグルシド、硝酸ガリウム、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダニン、メイタンシノイド類、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダンモール、ニトラエリン、ペントスタチン、フェナメット、ピラルピシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2 - エチルヒドラジド、プロカバルジン、PSK (登録商標) 多糖複合体 (JHS Natural Products, オレゴン州ユージーン)、ラゾキサシン；リゾキサシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テニユアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類 (特に、T - 2 毒素、ベラキュリンA、ロリジンA、及びアングイジン)；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド (「Ara - C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド類、クロラムブシル；ジェムザール (Gemzar) (登録商標) ゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；白金類似体、ピンプラスチン；白金；エトポシド (VP - 16)；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ナベルピン (NAVELBINE) (登録商標) ビノレルピン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン (Camptosar, CPT - 11)、トポイソメラーゼ阻害剤：RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン (DMFO)；レチノイド類；カペシタピン；コンプレタスタチン；ロイコボリン (LV)；オキサリプラチン；細胞増殖を抑制する、PKC - 、Raf、H - Ras、EGFR、及びVEGF - Aの阻害剤と、上記のいずれもの医薬的に許容される塩、酸、又は誘導体が含まれる。この定義にまた含まれるのは、抗エストロゲン剤と選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM)、酵素アロマターゼ [副腎中でのエストロゲン産生を調節する] を阻害するアロマターゼ阻害剤、及び抗アンドロゲン剤のような、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように作用する抗ホルモン剤；並びに、トロキサシタピン (1, 3 - ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド；VEGF発現阻害剤及びHER2発現阻害剤のようなりボザイム；ワクチン類、プロロイキン (PROLEUKIN) (登録商標) rIL - 2；ラルトテカン (LURTOTECAN) (登録商標) トポイソメラーゼ1阻害剤；アバレリクス (ABARELIX) (登録商標) rmRH；ビノレルピン及びエスペラマイシン類、及び上記のいずれもの医薬的に許容される塩、酸、又は誘導体である。他の態様は、限定されないが、リツキシマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ・オゾガマイシン、アレムツズマブ、イブリツモマブ・チウキセタン、トシツモマブ、ベパシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、オフアツムマブ、イピリムマブ、及びブレンツキシマブ・ベドチンが含まれる、癌療法について承認された抗体のような免疫療法剤の使用を含む。当業者は、本明細書の教示と適合可能である追加の抗癌剤を容易に同定することができよう。

#### 【0232】

##### e . 放射線療法

[0244] 本発明はまた、放射線療法 (即ち、線照射、X線、UV照射、マイクロ波、電子放出、等といった、DNA損傷を腫瘍細胞内で局所的に誘発するためのあらゆる機序) とPTK7モジュレーターの組合せを提供する。腫瘍細胞へ指向された放射性同位体の

送達を使用する組合せ療法も考慮されて、標的指向された抗癌剤又は他の標的化手段と共に使用してよい。典型的には、放射線療法は、約1～約2週の時間帯にわたりパルスで投与される。放射線療法は、頭頸部癌を有する被検者へ約6～7週の間投与することができる。放射線療法は、単一用量として投与してもよく、多数回の連続用量として投与してもよい。

### 【0233】

#### f. 新生物状態

[0245] 単独で、又は抗癌剤又は放射線療法との組合せのいずれで投与しても、本発明のPTK7モジュレーターは、良性又は悪性の腫瘍（例、腎癌、肝臓癌、腎臓癌、膀胱癌、乳癌、胃癌、卵巣癌、結直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、甲状腺癌、肝細胞癌；肉腫；膠芽腫；及び様々な頭頸部腫瘍）；白血病とリンパ系悪性腫瘍；神経細胞、神経膠細胞、星状細胞、視床下部、及び他の腺、マクロファージ、上皮、間質、及び割腔の障害のような他の障害；並びに、炎症性障害、血管新生障害、免疫障害、及び病原体によって引き起こされる障害が含まれ得る、患者又は被検者の新生物状態を全般的に治療するのに特に有用である。本発明の治療組成物及び方法での治療に特に好ましい標的は、固形腫瘍を含んでなる新生物状態である。他の好ましい態様において、本発明のモジュレーターは、血液悪性腫瘍の診断、予防、又は治療に使用してよい。本明細書に使用するように、この用語は、明白に、あらゆる哺乳動物種を含むとみなされるが、好ましくは、治療される被検者又は患者はヒトであろう。

10

### 【0234】

[0246] より具体的には、本発明による治療へ処せられる新生物状態は、限定されないが、副腎腫瘍、AIDS関連癌、胞巣状軟部肉腫、星状細胞腫瘍、膀胱癌（扁平上皮癌と移行上皮癌）、骨癌（アダマンチノーム、脈瘤性骨嚢胞、骨軟骨腫、骨肉腫）、脳及び脊髄の癌、転移性脳腫瘍、乳癌、頸動脈小体腫瘍、子宮頸癌、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞癌、淡明細胞癌、結腸癌、結直腸癌、皮膚良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣腫、ユーイング腫瘍、骨外性粘液型軟骨肉腫、骨性線維形成不全症（fibrogenesis imperfecta ossium）、線維性骨異形成症、胆嚢及び胆管癌、妊娠性絨毛疾患、生殖細胞腫瘍、頭頸部癌、島細胞腫瘍、カポシ肉腫、腎臓癌（腎芽腫、乳頭状腎細胞癌）、白血病、脂肪腫/良性脂肪様腫瘍、脂肪肉腫/悪性脂肪様腫瘍、肝臓癌（肝芽腫、肝細胞癌）、リンパ腫、肺癌（小細胞癌、腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、等）、髄芽腫、メラノーマ、髄膜腫、多発性内分泌新生物、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽腫、神経内分泌腫瘍、卵巣癌、膵臓癌、乳頭状甲状腺癌、副甲状腺腫瘍、小児癌、末梢神経鞘腫瘍、褐色細胞腫、下垂体腫瘍、前立腺癌、後ブドウ膜黒色腫、稀な血液系障害、腎転移癌、横紋筋肉腫様腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚癌、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、胃癌、滑膜肉腫、精巣癌、胸腺癌、胸腺腫、甲状腺転移癌、及び子宮癌（子宮頸癌、子宮内膜癌、及び平滑筋腫）が含まれる群より選択され得る。ある好ましい態様において、癌性細胞は、限定されないが、乳癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌、膵臓癌、結腸癌、前立腺癌、肉腫、腎転移癌、甲状腺転移癌、及び淡明細胞癌が含まれる固形腫瘍の群より選択される。

20

30

### 【0235】

[0247] 血液系腫瘍に関しては、本発明の化合物及び方法は、低悪性度/NHL濾胞細胞リンパ腫（FCC）、マントル細胞リンパ腫（MCL）、びまん性大細胞リンパ腫（DLCL）、小リンパ球性（SL）NHL、中悪性度/濾胞NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽球性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度非分割型小細胞NHL、巨大腫瘍疾患NHL、ワルデンストローム・マクログロブリン血症、リンパ形質細胞様リンパ腫（LPL）、マントル細胞リンパ腫（MCL）、濾胞性リンパ腫（FL）、びまん性大細胞リンパ腫（DLCL）、パーキットリンパ腫（BL）、AIDS関連リンパ腫、単球性B細胞リンパ腫、血管性免疫芽細胞性リンパ腺症、小リンパ球性、濾胞性、びまん性大細胞、びまん性小分割型細胞、大細胞免疫芽球性リンパ芽腫、小細胞、非分割型、パーキット及び非パーキット、濾胞性、大細胞優勢型；濾胞性、小分割細胞優勢型

40

50

；及び、濾胞性、小分割型細胞及び大細胞混合型のリンパ腫が含まれる多様なB細胞リンパ腫を治療するのに特に有効であり得る。「癌：腫瘍学の原理と実践（CANCER：PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY）」第2巻：2131-2145（DeVita et al（監修）、第5版、1997）中 Gaidono et al.「リンパ腫（Lymphomas）」を参照のこと。当業者には、上記のリンパ腫が、多くの場合、分類体系の変更によって異なる名称を有するであろうことと、異なる名称下に分類されるリンパ腫を有する患者も本発明の組合せ療法レジメンより利益を得る可能性があることとが明らかにはずである。

#### 【0236】

[0248] なお他の好ましい態様において、当該PTK7モジュレーターは、慢性リンパ球性白血病（CLL又はB-CLL）又は急性骨髄白血病（AML）のような白血病が含まれる、ある種の骨髄性及び血液系腫瘍を効果的に治療するために使用し得る。このような白血病は、50歳以降で発症率が増加し始めて60代後半にピークに達する、主に高齢者の疾患である。CLLは、一般的には、新生物性の末梢血リンパ球の増殖を伴う。CLLの臨床知見には、リンパ球増加症、リンパ腺症、巨脾症、貧血、及び血小板減少症が伴う。AMLは、急性骨髄性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性顆粒球性白血病、及び急性非リンパ球性白血病とも呼ばれる。AMLの根底にある病態生理は、骨髄細胞のごく初期の発生における成熟停止からなる。いずれの障害の症例においても、治療レジメンは、当業者により、本開示に照らして、臨床的に受容された手技を使用して容易に導くことができる。

10

#### 【0237】

[0249] 本発明はまた、良性又は前癌性の腫瘍を提示する被検者の防止的又は予防的な治療を提供する。どの特別な種類の腫瘍又は新生物障害も、本発明を使用する治療より除外されるべきであるとは考えられない。しかしながら、腫瘍細胞の種類は、二次的な治療薬剤、特に、化学療法剤と標的化抗癌剤と組み合わせた本発明の使用に関連する場合がある。

20

#### 【0238】

[0250] 本発明のなお他の好ましい態様は、固形腫瘍に罹患している被検者を治療するためのPTK7モジュレーターの使用を含む。そのような被検者では、これら固形腫瘍の多くが、開示されるエフェクターでの治療に対して特に敏感にさせ得る様々な遺伝子変異を示す組織を含む。例えば、結直腸癌の患者では、KRAS、APC、CTNNB1、及びCDH1の突然変異がかなり共通している。さらに、上記の突然変異がある腫瘍に罹患している患者は、通常、現行の療法に対して最も難治性である；特に、KRAS突然変異のある患者でそうである。KRAS活性化突然変異（典型的には、単一のアミノ酸置換をもたらす）はまた、肺腺癌、粘液腺腫、及び膵臓の腺管癌が含まれる、他の治療困難な悪性腫瘍において関連が示唆されている。

30

#### 【0239】

[0251] 現在、結直腸癌患者が例えばEGFR又はVEGF阻害性の薬物へ応答するかどうかの最も信頼し得る予測は、ある種のKRAS「活性化」突然変異を検査することである。結直腸癌の35～45%でKRASが突然変異しており、腫瘍が突然変異KRASを発現している患者は、これらの薬物に対して十分に応答しない。例えば、KRASの突然変異から、結直腸癌におけるパニツムマブ及びツキシマブ療法に対する応答の不足が予測される（Lievre et al. Cancer Res 66: 3992-5; Karapetis et al. NEJM 359: 1757-1765）。結直腸癌患者のほぼ85%でAPC遺伝子に突然変異があつて（Markowitz & Bertagnolli. NEJM 361: 2449-60）、家族性大腸腺腫症と結直腸癌の患者では、800より多いAPC突然変異が特性決定されてきた。これら突然変異の大多数が、E-カテニンの破壊に媒介する機能能力が低下した、末端切断型のAPCタンパク質をもたらす。E-カテニン遺伝子、CTNNB1中の突然変異はまた、該タンパク質の増加した安定化をもたらし得て、いくつかの発癌転写プログラムの細胞核輸入と後続の活性化をもたらすが、これは、突然変異したAPCがE-カテニン破壊に適正に媒介し得ないこと（正常な細胞増殖及び分化のプログラムを阻止するために必要とされる）より生じる発癌の機序でもある

40

50

。

## 【0240】

[0252] CDH1 (E-カドヘリン) 発現の喪失は、結直腸癌において一般に発生する更なる別の事象であり、多くの場合、この疾患のより進行した段階で観察される。E-カドヘリンは、上皮層中の細胞を繋げて組織化する接着構造の中心的なメンバーである。通常、E-カドヘリンは、 $\beta$ -カテニン (CTNNB1) を形質膜で物理的に捕捉するので、結直腸癌におけるE-カドヘリン発現の喪失は、 $\beta$ -カテニンの核への局在化と $\beta$ -カテニン/WNT経路の転写活性化をもたらす。異常な $\beta$ -カテニン/WNTシグナル伝達は、発癌にとって中核的であって、核内の $\beta$ -カテニンは、癌の幹細胞性との関連が示唆されてきた (Schmalhofer et al., 2009 PMID 19153669)。E-カドヘリンは、上皮細胞中のPTK7リガンドの既知の結合相手である、EphA2の発現及び機能に必要とされる (Dodge Zantek et al., 1999 PMID 10511313; Orsulic S and Kemler R, 2000 PMID 10769210)。PTK7リガンドへ結合して受容体結合と作動するか又はそれに拮抗するモジュレーターを使用することは、発癌促進プロセスを変化させる、妨害する、又は逆転させる可能性がある。あるいは、PTK7モジュレーターは、PTK7モジュレーターの結合選好性に基づいて、PTK7相互作用が異常な腫瘍細胞へ選好的に結合する可能性がある。従って、上記に言及した遺伝形質を担う担癌患者は、上述したPTK7モジュレーターでの治療より利益を得る可能性がある。

10

## 【0241】

## XIV. 製造品

[0253] PTK7モジュレーターの1以上の用量を含んでなる1以上の容器を含んでなる、医薬パック及びキットも提供される。ある態様では、単位投与量が提供され、ここで該単位投与量は、例えば、抗PTK7抗体を1以上の追加薬剤の有り無しで含んでなる所定量の組成物を含有する。他の態様では、そのような単位投与量が単回使用の注射用充填済みシリンジにおいて供給される。なお他の態様において、単位投与量に含有される組成物は、生理食塩水、ショ糖、等；リン酸塩、等のような緩衝液を含んでよい；及び/又は、安定して有効なpH範囲内で製剤化してよい。あるいは、ある態様において、当該組成物は、適正な液体、例えば、無菌水の添加時に復元され得る凍結乾燥散剤として提供してよい。ある好ましい態様において、当該組成物は、タンパク質凝集を阻害する1以上の物質 (限定されないが、ショ糖及びアルギニンが含まれる) を含む。その容器 (複数) 上にあるか又はそれに付随したどのラベルも、封入される組成物が第一選択の疾患状態を診断又は治療するために使用されることを示す。

20

30

## 【0242】

[0254] 本発明はまた、PTK7モジュレーターの単用量又は多用量の投与単位と、任意選択的に、1以上の抗癌剤をもたらすためのキットを提供する。当該キットは、容器と、その容器の上にあるか又はそれに付随したラベル又は添付文書を含む。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、等が含まれる。容器は、ガラス又はプラスチックのような多様な材料より生成され得る。容器は、該状態を治療するのに有効である組成物を保持して、無菌のアクセスポートを有してよい (例えば、容器は、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい)。そのようなキットは、一般に、好適な容器中に、PTK7モジュレーターの医薬的に許容される製剤を含有して、同じか又は異なる容器に1以上の抗癌剤を含有してもよい。当該キットはまた、診断又は組合せ療法のいずれかのために、他の医薬的に許容される製剤を含有してよい。例えば、本発明のPTK7モジュレーターに加えて、そのようなキットは、化学療法薬又は放射線療法薬；抗血管新生薬剤；抗転移剤；標的化抗癌剤；細胞傷害剤；及び/又は他の抗癌剤といった幅広い抗癌剤のどの1以上も含有してよい。そのようなキットはまた、抗癌剤又は診断剤とPTK7モジュレーターをコンジュゲートするのに適正な試薬を提供し得る (例えば、その全体において参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,422,379号を参照のこと)。

40

## 【0243】

50

[0255] より具体的には、当該キットは、PTK7モジュレーターを追加成分の有り無しで含有する単一容器を有しても、所望される各薬剤で別個の容器を有してもよい。組み合わせられた治療剤がコンジュゲーションのために提供される場合、単一の溶液剤を、モル濃度が等しい組合せで、又はある成分を他の成分より過剰な状態でプレ混合してよい。あるいは、このキットのPTK7モジュレーターとどの任意選択の抗癌剤も、患者への投与に先立って、別個の容器内で別々に維持されてよい。当該キットはまた、無菌の医薬的に許容される緩衝液、又は注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)、リンゲル液、及びデキストロス溶液のような他の希釈剤を含有するための第二/第三の容器手段を含んでよい。

#### 【0244】

[0256] 当該キットの成分が1以上の液体溶液剤で提供される場合、この液体溶液剤は、好ましくは、水溶液剤であって、無菌水溶液剤が特に好ましい。しかしながら、当該キットの成分は、乾燥散剤(複数)として提供してよい。試薬又は成分が乾燥散剤として提供される場合、この散剤は、好適な溶媒の添加によって復元することができる。この溶媒も、別の容器で提供されてよいことが想定される。

#### 【0245】

[0257] 上記に簡潔に示したように、当該キットはまた、当該抗体とある任意選択の成分を動物又は患者へ投与するための手段(例えば、それより該薬剤が動物へ注射又は導入され得るか又は身体の患部へ適用され得る、1以上の針又はシリンジ、さらにまた点眼器、ピペット、又は他のそのような器具)を含有してよい。本発明のキットには、典型的には、バイアル又はそのようなものと他の成分を市販用に厳重密封して含有するための手段(例えば、所望のバイアルと他の器具がその中へ配置されて保持される、注入又は吹込み成形されたプラスチック容器のような)も含まれる。どのラベル又は添付文書も、当該PTK7モジュレーター組成物が癌(例えば、結直腸癌)を治療するために使用されることを示す。

#### 【0246】

[0258] 他の好ましい態様において、本発明のモジュレーターは、増殖性障害の診断又は治療に有用な診断又は治療デバイスと一緒に使用しても、それらを含んでもよい。例えば、1つの好ましい態様において、本発明の化合物及び組成物は、増殖性障害の病因又は顕現に關与する細胞又はマーカー化合物について検出する、モニターする、定量する、又はプロファイリングするために使用し得るある種の診断デバイス又は機器と組み合わせる。特に好ましい態様において、そのデバイスは、循環性の腫瘍細胞について *in vivo* 又は *in vitro* のいずれかで検出する、モニターする、及び/又は定量するために使用され得る(例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO2012/0128801を参照のこと)。なお他の好ましい態様では、そして上記に考察されるように、循環性の腫瘍細胞は、癌幹細胞を含み得る。

#### 【0247】

##### XV. 研究試薬

[0259] 本発明の他の好ましい態様はまた、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別(FACS)、磁気活性化細胞選別(MACS)、又はレーザー媒介分画法のような方法を介して腫瘍始原細胞の集団又は亜集団を同定、単離、分画、又は濃縮するのに有用な道具としての開示モジュレーターの利用する。当業者は、癌幹細胞が含まれるTICの特性決定及び操作に適合可能なくつかの技術において当該モジュレーターが使用され得ることを理解されよう(例えば、そのそれぞれがその全体において参照により本明細書に組み込まれる、米国仮特許出願シリアル番号: 12/686,359、12/669,136、及び12/757,649を参照のこと)。

#### 【0248】

##### XVI. その他

[0260] 本明細書において他に定義されなければ、本発明に関連して使用される科学及び技術用語は、当業者によって通常理解される意味を有するものとする。さらに、文脈に

10

20

30

40

50

よって他に求められなければ、単数形の用語には複数が含まれて、複数形の用語には単数が含まれる。より具体的には、本明細書と付帯の特許請求項において使用されるように、単数形の冠詞（「a」「an」及び「the」）には、文脈が明らかに他のことを示さなければ、複数の指示語が含まれる。このように、例えば、「タンパク質（a protein）」への言及には、複数のタンパク質が含まれ；「細胞（a cell）」への言及には、細胞の混合物が含まれる、といった具合である。加えて、本明細書と付帯の特許請求項において提供される範囲には、両方の終点とその終点間のすべての点が含まれる。故に、2.0～3.0の範囲には、2.0、3.0と2.0と3.0の間のすべての点が含まれる。

【0249】

[0261] 一般的に言えば、本明細書に記載される細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、並びにタンパク質及び核酸の化学及びハイブリダイゼーションと関連して使用される命名法とその技術は、当該技術分野で周知であり、一般に使用されるものである。本発明の方法及び技術は、他に示さなければ、当該技術分野で周知の、本明細書を通して引用されて考察される様々な概説とより専門的な参考文献に記載されるような慣用の方法に従って概ね実施される。例えば、Sambrook J. & Russell D. 「分子クローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」第3版、コールドスプリングハーバーラボラトリー出版局、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（2000）；Ausubel et al. 「分子生物学の簡略プロトコール：分子生物学の最新プロトコールからの方法の要約（A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology）」Wiley, John & Sons 社（2002）；Harlow and Lane 「抗体の使用法：実験マニュアル（Using Antibodies: A Laboratory Manual）」コールドスプリングハーバーラボラトリー出版局、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（1998）；及び、Coligan et al. 「タンパク質科学の簡略プロトコール（Short Protocols in Protein Science）」Wiley, John & Sons 社（2003）を参照のこと。酵素反応と精製技術は、当該技術分野で通常実施されているか又は本明細書に記載のように、製造業者の仕様に従って実施する。本明細書に記載のような分析化学、合成有機化学、並びに医化学及び製薬化学に関連して使用される命名法とその実験手順及び技術は、当該技術分野で周知であり、一般に使用されるものである。

【0250】

[0262] 本明細書内で開示又は引用されるすべての参考文献又は文書は、限定なしに、その全体において参照により本明細書に組み込まれる。さらに、本明細書に使用されるどのセクション見出しも、編成上の目的のみのためであって、記載される主題を限定するものと解釈してはならない。

【実施例】

【0251】

[0263] このように、上記で一般的に記載された本発明は、以下の実施例を参照して、より容易に理解されよう。これらは、例証のために提供されるのであって、本発明を限定することを企図するものではない。これらの実施例は、下記の実験が実施されるすべての実験又は唯一の実験であることを表明するものではない。他に示さなければ、割合は、重量割合であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏（ ）であり、そして圧力は大気圧か又は大気圧付近である。

【0252】

実施例 1

[0264] 腫瘍始原細胞集団の濃縮

癌患者の中に存在するような固形腫瘍の細胞異種性について特性決定し、特別な表現型マーカーを使用して腫瘍永続化細胞（TPC；即ち、癌幹細胞：CSC）の同一性を解明して、臨床意義のある療法標的を同定するために、当該技術分野で認められた技術を使用して大きな非従来型異種移植片（NTX）腫瘍バンクを開発して維持した。多数の別個の腫瘍細胞株を含んでなるNTX腫瘍バンクを、免疫不全マウスにおいて、当初は多様な固形悪性腫瘍に罹患している数多くの癌患者より得られた異種の腫瘍細胞を多数回にわたっ

10

20

30

40

50

て継代することを通じて、増殖させた。明確に定義された系統を有する多数の別個の初期継代 N T X 腫瘍細胞株が継続して利用可能であることで、この細胞株より精製された細胞の再現可能で反復性の特性決定を可能にするような T P C の同定及び単離が大いに促進される。より具体的には、単離又は精製された T P C は、その細胞の起源となった患者腫瘍試料を反復するマウスにおいて、表現型でも形態学的にも異種の腫瘍を産生するそれらの能力に従って、レトロスペクティブに極めて正確に特徴付けられる。このように、単離細胞の小集団を使用して完全に異種の腫瘍をマウスにおいて産生する能力は、その単離細胞が T P C を含むという事実を強く示唆する。そのような研究において、最小限に継代された N T X 細胞株の使用は、*in vivo* 実験を大いに単純化して、容易に証明可能な結果を提供する。さらに、初期継代 N T X 腫瘍はまた、イリノテカン（即ち、Campptosar（登録商標））のような治療薬剤に反応して、腫瘍増殖、現行療法への抵抗性、及び腫瘍再発を推進する根源的な機序への臨床的に関連性のある見識を提供する。

#### 【0253】

[0265] N T X 腫瘍細胞株が確立されたので、構成要素の腫瘍細胞表現型についてフローサイトメトリーを使用して分析して、腫瘍始原細胞（T I C）について特性決定し、単離、精製、又は濃縮して、そのような集団内の T P C 及び T P r o g 細胞を分離又は分析するために使用され得る別々のマーカーを同定した。この点に関して、本発明者は、タンパク質の発現に基づいた細胞の迅速な特性決定と潜在的に有用なマーカーの同時同定をもたらす、専用のプロテオミックベースプラットフォーム（即ち、PhenoPrint<sup>T M</sup> Array）を利用した。PhenoPrint Array は、その多くが市販供給源より入手されて、96 ウェルプレートに配置された、数百もの別々の結合分子を含んでなる専用のプロテオミックプラットフォームであって、ここで各ウェルは、フィコエリトリン蛍光チャネル中の別個の抗体とプレート全体で各ウェルに配置された異なる蛍光色素の多数の追加抗体を含有する。これにより、非フィコエリトリンチャネルを介して関連細胞を迅速に包含させ、又は非関連細胞を除外することを通じて、選択した腫瘍細胞の亜集団における対象の抗原の発現レベルの決定が可能になる。この PhenoPrint Array を当該技術分野周知の組織解離、移植、及び幹細胞の技術（Al-Hajj et al., 2004, Dalerba et al., 2007 及び Dylla et al., 2008, いずれも上掲、このそれぞれは、その全体において参照により本明細書に組み込まれる）と組み合わせ使用した場合、関連マーカーを効果的に同定した後で、特異的なヒト腫瘍細胞亜集団をきわめて効率的に単離及び移植することが可能であった。

#### 【0254】

[0266] 従って、重度の免疫不全マウス中のヒト腫瘍について一般になされているように様々な N T X 腫瘍細胞株を確立したらすぐに、 $800 \sim 2,000 \text{ mm}^3$  に達した時点でマウスより腫瘍を切除して、当該技術分野で認められた酵素消化技術（例えば、本明細書に取り込まれる、米国特許第 2007/0292414 号を参照のこと）を使用して、この細胞を単一細胞懸濁液へ解離させた。これらの懸濁液より PhenoPrint Array を使用して得られたデータは、細胞ごとのベースで、絶対的（各細胞あたり）と相対的（集団中の他の細胞に対する）の両方の表面タンパク質発現を提供し、細胞集団のより複雑な特性決定及び層別化をもたらした。より具体的には、PhenoPrint Array の使用は、N T G バルク腫瘍細胞及び腫瘍間質より T I C 又は T P C をあらかじめ識別するタンパク質又はマーカーの迅速な同定を可能にして、N T X 腫瘍モデルから分離されるときに、特異的な細胞表面タンパク質の異なるレベルを発現する腫瘍細胞亜集団の相対的に迅速な特性決定を提供した。特に、腫瘍細胞集団全体で異種に発現されるタンパク質により、ある特別なタンパク質又はマーカーの発現レベルが高いか又は低い、独自の高度精製された腫瘍細胞亜集団の単離と免疫不全マウスへの移植が可能になり、それによって、ある亜集団又は別の亜集団において T P C が濃縮されたかどうかの評価が促進される。

#### 【0255】

[0267] 「濃縮する」という用語は、細胞を単離することと同義的に使用されて、ある種類の細胞の収率（画分）が出発又は最初の細胞集団と比較して、他の種類の細胞の画分に対して増加していることを意味する。好ましくは、「濃縮すること」は、ある細胞集団

10

20

30

40

50

中の1種類の細胞の百分率を、出発の細胞集団と比較して、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、又は50%より多く高めることを意味する。

【0256】

[0268] 本明細書に使用するように、細胞又は組織の文脈において、マーカーは、ある特別な細胞、細胞集団、又は組織と同定可能なほどに関連しているか又はその中又は上に特異的に見出される化学的又は生物学的な実体（疾患又は障害に影響を受けている組織又は細胞集団の中又は上で同定されるものも含まれる）の形式のあらゆる特徴を意味する。はっきり明示されるように、マーカーは、本質的に、形態学的、機能的、又は生化学的であり得る。好ましい態様において、マーカーは、特定の細胞種（例、TPC）によるか又はある条件下の細胞（例えば、細胞周期の特別な時点にある細胞、又は特別なニッチにある細胞）によって差示的又は選好的に発現される細胞表面抗原である。好ましくは、そのようなマーカーは、タンパク質であり、そして好ましくは、当該技術分野で公知であるような抗体、アダプター、又は他の結合分子のエピトープを保有する。しかしながら、マーカーは、細胞の表面又はその内部に見出されるどの分子からもなってよく、限定されないが、タンパク質（ペプチド及びポリペプチド）、脂質、多糖、核酸、及びステロイドが含まれる。形態学的マーカーの特徴又は形質の例には、限定されないが、形状、大きさ、及び「核」対「細胞質」比が含まれる。機能的マーカーの特徴又は形質の例には、限定されないが、特別な基質へ付着する能力、特別な色素を取り込むか又は排除する能力（例えば、限定されないが、脂溶性色素の排除）、特別な条件下で遊走する能力、及び特別な系譜に沿って分化する能力が含まれる。マーカーはまた、レポーター遺伝子より発現されるタンパク質であり得て、例えば、レポーター遺伝子をコードする核酸配列の細胞への導入とその転写の結果として該細胞によって発現されるレポーター遺伝子は、マーカーとして使用し得るレポータータンパク質の産生をもたらす。マーカーとして使用し得るこのようなレポーター遺伝子は、例えば、限定されないが、蛍光タンパク質酵素、呈色性（chromogenic）タンパク質、耐性遺伝子、等である。

10

20

【0257】

[0269] 関連した意味において、「マーカー表現型」という用語は、組織、細胞、又は細胞集団（例、安定したTPC表現型）の文脈において、特別な細胞又は細胞集団を（例えば、FACSによって）特性決定する、同定する、分離する、単離する、又は濃縮するために使用し得るあらゆるマーカー又はマーカーの組合せを意味する。具体的態様において、マーカー表現型は、細胞表面マーカーの組合せの発現を検出又は同定することによって決定され得る細胞表面表現型である。

30

【0258】

[0270] 当業者は、数多くのマーカー（又はそれらの非存在）が癌幹細胞の様々な集団と関連付けられて、腫瘍細胞垂集団を単離するか又は特性決定するのに使用されてきたことを認めよう。この点に関して言えば、例示の癌幹細胞マーカーは、OCT4、Nano g、STAT3、EPCAM、CD24、CD34、NB84、TrkA、GD2、CD133、CD20、CD56、CD29、B7H3、CD46、トランスフェリン受容体、JAM3、カルボキシペプチダーゼM、ADAM9、オンコスタチンM、Lgr5、Lgr6、CD324、CD325、ネスチン、Sox1、Bmi-1、eas h1、eas h2、mf2、yy1、smarcA3、smarc kA5、smarcD3、smarcE1、mllt3、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT5A、WNT10B、WNT16、AXIN1、BCL9、MYC、(TCF4)SLC7A8、IL1RAP、TEM8、TMPRSS4、MUC16、GPRC5B、SLC6A14、SLC4A11、PPAP2C、CAV1、CAV2、PTPN3、EPHA1、EPHA2、SLC1A1、CX3CL1、ADORA2A、MPZL1、FLJ10052、C4.4A、EDG3、RARRES1、TMEPAI、PTS、CEACAM6、NID2、STEAP、ABCA3、CRIM1、IL1R1、OPN3、DAF、MUC1、MCP、CPD、NMA、ADAM9、GJA1、SLC19A2、A

40

50

BCA1、PCDH7、ADCY9、SLC39A1、NPC1、ENPP1、N33、GPNMB、LY6E、CELSR1、LRP3、C20orf52、TMEPAI、FLVCR、PCDHA10、GPR54、TGFB3、SEMA4B、PCDHB2、ABCG2、CD166、AFP、BMP-4、 $\alpha$ -カテニン、CD2、CD3、CD9、CD14、CD31、CD38、CD44、CD45、CD74、CD90、CXCR4、デコリン、EGFR、CD105、CD64、CD16、CD16a、CD16b、GLI1、GLI2、CD49b、及びCD49fを含む。例えば、そのそれぞれが参照により本明細書に組み込まれる、Schulenburg et al., 2010, PMID: 20185329、米国特許第7,632,678号、及び米国特許公開公報番号: 2007/0292414、2008/0175870、2010/0275280、2010/0162416、及び2011/0020221を参照のこと。上記に記載の PhenoPrint Array には、これらマーカーのいくつかが含まれていたことを理解されたい。

10

## 【0259】

【0271】 同様に、ある腫瘍型の癌幹細胞に関連した細胞表面表現型の非限定的な例には、 $CD44^{hi}CD24^{low}$ 、 $ALDH^{+}$ 、 $CD133^{+}$ 、 $CD123^{+}$ 、 $CD34^{+}CD38^{-}$ 、 $CD44^{+}CD24^{-}$ 、 $CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{-}$ 、 $CD133^{+}CD34^{+}CD10^{-}CD19^{-}$ 、 $CD138^{-}CD34^{-}CD19^{+}$ 、 $CD133^{+}RC2^{+}$ 、 $CD44^{+}CD24^{+}CD133^{+}$ 、 $CD44^{+}CD24^{+}ESA^{+}$ 、 $CD271^{+}$ 、 $ABC5^{+}$ 、並びに、当該技術分野で公知である他の癌幹細胞表面表現型が含まれる。例えば、そのそれぞれがその全体において参照により本明細書に組み込まれる、Schulenburg et al., 2010、上掲、Visvader et al., 2008, PMID: 18784658 及び米国特許公開公報番号: 2008/0138313を参照のこと。当業者は、直前に例示したようなマーカー表現型を標準のフローサイトメトリー分析及び細胞選別技術と併せて使用して、TIC及び/又はTPC細胞又は細胞集団をさらなる分析のために特性決定する、単離する、精製する、又は濃縮することができることを理解されよう。本発明に関連して興味深い、CD46、CD324、及び任意選択的にCD66cは、多くのヒト結直腸（「CR」）、乳房（「BR」）、非小細胞肺（NSCLC）、小細胞肺（SCLC）、膵臓（「PA」）、前立腺（「PR」）、腎臓（「KDY」）、メラノーマ（「Mel」）、卵巣（「OV」）、及び頭頸部癌（「HN」）の腫瘍細胞の表面で、分析される腫瘍標本が原発性の患者腫瘍標本であるか又は患者由来のNTX腫瘍であるかに拘らず、高度に、又は異種に発現されている。

20

30

## 【0260】

【0272】 陰性発現（即ち、「-」）の細胞とは、本明細書において、対象の他のタンパク質を蛍光放射の追加チャンネルにおいて標識する完全な抗体染色カクテルの存在下に蛍光のチャンネル中のアイソタイプ対照抗体で観測される発現の95パーセント以下を発現する細胞として定義される。当業者は、陰性事象を明確化するためのこの手順が「蛍光マイナス1」又は「FMO」染色と呼ばれることを理解されよう。本明細書では、上記に記載したFMO染色手順を使用してアイソタイプ対照抗体で観測される発現の95パーセントより大きい発現がある細胞を「陽性」（即ち「+」）と定義する。本明細書で明確にされるように、概括的に「陽性」と定義される様々な細胞の集団がある。第一に、低い発現（即ち「lo」）の細胞とは、観測される発現が、アイソタイプ対照抗体でのFMO染色を使用して決定される95パーセントより高く、上記に記載のFMO染色手順を使用してアイソタイプ対照抗体で観測される発現の95パーセントの1標準偏差内にある細胞として一般的に定義される。「高い」発現（即ち「hi」）の細胞とは、観測される発現が、アイソタイプ対照抗体でのFMO染色を使用して決定される95パーセントより高く、上記に記載のFMO染色手順を使用してアイソタイプ対照抗体で観測される発現の95パーセントより1標準偏差だけ大きい細胞として定義され得る。他の態様では、好ましくは、99パーセントを陰性及び陽性のFMO染色の間の境界点として使用してよく、特に好ましい態様において、このパーセントは、99%より大きくてよい。

40

50

## 【0261】

[0273] 結直腸癌患者由来のいくつかのNTX腫瘍全体の発現の強度及び異種性に基づいて結直腸腫瘍抗原を速やかに同定して順位付ける上記に記載のような技術を使用して、候補のTPC抗原について、「腫瘍」対「正常隣接組織」の比較によってさらに評価してから、少なくとも一部は、悪性腫瘍細胞中の特別な抗原の上方又は下方調節に基づいて選択した。さらに、完全に異種な腫瘍をマウス中へ移植する能力を高めるその能力（即ち、腫瘍形成能力）に関して多様な細胞表面マーカーについて体系的に分析して、その後これらのマーカーを組み合わせることで、この方法の解明が実質的に向上して、移植時に全ての腫瘍産生能力を専ら含有する、高く濃縮された区別可能な腫瘍細胞亜集団（即ち、腫瘍始原細胞）を同定して特性決定するように蛍光活性化細胞選別（FACS）技術を独自設計する能力も向上した。

10

## 【0262】

[0274] 繰り返すと、腫瘍始原細胞（TIC）又は腫瘍形成（TG）細胞という用語には、腫瘍永続化細胞（TPC；即ち、癌幹細胞）と高増殖性腫瘍始原細胞（TProg）が共に含まれ、これらは一緒に、バルク腫瘍又は塊の独自の亜集団（即ち、0.1～25%）を概して含み；その特徴は、上記に定義されている。この形式で特性決定される腫瘍細胞の大部分はこの腫瘍形成能力を欠失しているため、非腫瘍形成性（NTG）と特性決定され得る。驚くべきことに、専用のPhenoPrint Arrayを使用して同定されたほとんどの個別マーカーは、標準FACSプロトコールを使用すると、結直腸腫瘍中の腫瘍始原細胞集団を濃縮する能力を証明しなかったが、個別マーカーの組合せを使用すれば、腫瘍始原細胞の2つの亜集団：TPCとTProgを同定し得ることが観測された。当業者は、TPCとTProgの間の明確な違いが、いずれも一次移植体において始動する腫瘍であるが、低い細胞数での連続移植時にも腫瘍増殖を永続的に促進するTPCの能力であることを認めよう。さらに、TPCとTProgをとともに濃縮するために組み合わせで使用されるマーカー/タンパク質は、腫瘍形成細胞を濃縮するために同様に使用し得る明確化された細胞表面マーカー又は酵素活性を有するものもあるが、本発明者による発見以前には、どの組織又は新生物中でもそのような活性を含有する細胞に関連していることが知られていなかった（Dylla et al 2008, 上掲）。下記に説明するように、次いで、上記に言及した細胞表面マーカーの組合せを使用して単離した特定の腫瘍細胞亜集団を、全トランスクリプトームの次世代配列決定法を使用して分析して、差示的に発現される遺伝子を同定して特性決定した。

20

30

## 【0263】

## 実施例 2

## 濃縮された腫瘍始原細胞集団からのRNA試料の単離と分析

[0275] 確立された結直腸NTX細胞株：SCRX-CR4を実施例1に記載のように継代して、免疫不全マウスにおいて腫瘍を始動させるために使用した。平均腫瘍負荷が約300mm<sup>3</sup>に達したならば、このマウスを無作為化して、15mg/kgのイリノテカン、25mg/kgのゲムシタピン、又は媒体対照（PBS）で週2回、安楽死に先立つ少なくとも20日の期間の間、処理した。次いで、腫瘍を取り出して、切除したばかりの結直腸NTX腫瘍より、TPC、TProg、及びNTG細胞をそれぞれ単離して、同様に、実施例1で説明した技術を概ね使用して、脾臓NTX腫瘍よりTG細胞とNTG細胞を単離した。より具体的には、FACSによって細胞集団を単離して、すぐにペレット状にして、Qiagen RLTplus RNA溶解緩衝液（Qiagen社）に溶解させた。次いで、この溶解物を使用するまで-80で保存した。融解させてすぐに、Qiagen RNeasy 単離キット（Qiagen社）をベンダーの説明書に従って使用して全RNAを抽出して、ベンダーのプロトコールと推奨される機器設定を再び使用して、Nanodrop（Thermo Scientific）とBioanalyzer 2100（Agilent Technologies）で定量した。生じる全RNA調製物は、遺伝子の配列決定及び解析に適していた。

40

## 【0264】

[0276] 媒体又は化学療法剤で処理されたマウスより上記に記載のように単離したそれ

50

それぞれの細胞集団より入手した全RNA試料を、Applied Biosystems SOLiD 3.0 (オリゴライゲーション/検出による配列決定法)次世代配列決定プラットフォーム (Life Technologies) を使用する全トランスクリプトーム配列決定用に、各試料につき5 ngの全RNAから開始して、調製した。SOLiD プラットフォームによって作成されたデータより、ヒトゲノム由来の34,609の遺伝子へマッピングして、いくつかの試料において、PTK7を検出することができた。

#### 【0265】

[0277] 一般的には、SOLiD3 次世代配列決定プラットフォームは、ビーズへ連結したクローン増幅RNA/DNA断片の並列した配列決定を可能にする。次いで、色素標識化オリゴヌクレオチドでのライゲーションによる配列決定を使用して、試料中に存在する各断片の50塩基読み取りを5000万より多い読み取りの全数で作成し、ゲノム中のタンパク質のmRNA転写物レベル発現のずっとより正確な表示を作成する。SOLiD3 プラットフォームは、読み取りカバー率 (ゲノム位置へ独自にマッピングされる読み取り) だけに基づいて、発現だけでなく、SNP、既知及び未知の選択的スプライシング事象、及び潜在的に新しいエクソンの発見を捉えることができる。このように、この次世代プラットフォームの使用は、転写物レベルでの発現の差異だけでなく、発現されるmRNA転写物の特定のスプライス変異体の差異又は選好性の決定を可能にした。さらに、Applied Biosystems からの改良された全トランスクリプトームプロトコールを使用する SOLiD3 プラットフォームでの分析には、増幅前にほぼ5 ngの出発材料だけを必要とした。このことが重要であるのは、選別された細胞集団では、例えば、TPC細胞の亜集合がNTG又はバルク腫瘍よりごくわずかな数しかないので、そこからの全RNAの抽出がごく少量の使用可能な出発材料しかもたらさないからである。

#### 【0266】

[0278] SOLiD3 プラットフォームからの同一2回試行の配列決定データを正規化して変換して、標準的な業界手法のように倍率比を計算した。図面2に見られるようにそれぞれのSCRx-CR4腫瘍細胞亜集団において、PTK7遺伝子発現レベル (エクソンへマッピングされる百万あたりの読み取り値; RPM\_エクソンとして表される) を測定した。このデータの解析は、担体又はイリノテカン処理マウスにおいて、それぞれ、PTK7が転写物レベルでNTG集団に対して2~4倍、そしてTProg集団に対して50~200%上方調節されていることを示した。

#### 【0267】

[0279] 上記に詳述した観測事実は、PTK7の発現がTPC集団において概ね上昇していることを示して、PTK7が腫瘍形成性と腫瘍維持において重要な役割を担うことにより、免疫療法アプローチへの興味深い標的を構成する可能性があることを示唆する。

#### 【0268】

##### 実施例3

##### 濃縮された腫瘍始原細胞集団中のPTK7のリアルタイムPCR分析

[0280] 結直腸癌ではTProg及びNTG細胞に対してTPC集団において、そして膵臓癌ではNTG細胞に対してTGにおいて、全トランスクリプトーム配列決定によって観測された、差示的なPTK7発現を検証するために、TaqMan (登録商標) 定量的リアルタイムPCRを使用して、上記に示したような様々なNTX系より単離したそれぞれの細胞集団中の遺伝子発現レベルを測定した。そのようなリアルタイムPCR分析は、特別な対象の遺伝子に特異的なプライマー及びプローブのセットを使用する別々の標的の遺伝子発現レベルのより直接的で迅速な測定を可能にすると理解されよう。TaqMan (登録商標) リアルタイム定量的PCRをApplied Biosystems 7900HT Machine (Life Technologies) で実施して、これを使用して多数の患者由来NTX系細胞集団と対応する対照におけるPTK7とPTK7遺伝子発現を測定した。さらに、この分析は、TaqMan Systemと共に供給される説明書において特定されるように、そして市販のPTK7及びPTK7プライマー/プローブセット (Life Technologies) を使用して行った。

#### 【0269】

【0281】 図面3に見られるように、2種の別個の結直腸NTX腫瘍系（SCRx - CR4及びCR5）と膵臓腫瘍系（SCRx - PA3）より単離したNTG及びTPC集団を使用して、遺伝子発現の定量的リアルタイムPCRインターロゲーション（interrogation）を実施した。TProg細胞集団も分離して、SCRx - CR4について分析した。図面3に示すデータは、PTK7遺伝子発現が、同じ腫瘍由来のNTG細胞に対して比較するとき、結直腸TPCにおいて2倍より多く上昇していることを示す。PTK7は、イリノテカンでの処理を受けているマウスのTPCにおいて、そして膵臓腫瘍（例、SCRx - PA3）のTIC細胞集団においても、2倍より多く上昇していた。リアルタイム定量的PCRのより広く認められた方法論を使用する、結直腸と膵臓の両方の患者由来NTX腫瘍からのNTG細胞対照と比較した、NTX TPC調製物における上昇したPTK7発現の観測事実より、先の実施例のSOLiD3全トランスクリプトーム配列決定データがより高感度であることが確認される。このような知見は、腫瘍形成性、治療への抵抗性、及び再発の根底にあるPTK7発現レベルと細胞の間で観測される関連性をさらに裏付ける。

10

## 【0270】

## 実施例4

## 未分画結直腸腫瘍標本におけるPTK7の発現

【0281】 PTK7遺伝子発現が結直腸腫瘍由来のTPC集団において同じ腫瘍由来のTProg及びNTG細胞と比較するとき上昇していることがわかったという事実を照らして、上昇したPTK7発現が未分画結直腸腫瘍試料においても正常隣接組織（NAT）に対して検出可能であるかどうかを判定する実験を行った。PTK7の腫瘍中の発現が正常組織標本（NL）中のレベルといかに比較されるかを判定するための測定も行った。

20

## 【0271】

【0283】 より具体的には、当該技術分野で公知の技術を使用して、異なる病期での110の結直腸患者腫瘍標本、正常隣接組織、及び48の正常組織を含有するカスタム Tumor Scan qPCR（Origene Technologies）384ウェルアレイを設計して製作した。実施例3において詳述した手順と、同一のPTK7特異プライマー/プローブセットを使用して、カスタムプレートのウェルにおいてTaqMan（登録商標）リアルタイム定量的PCRを実施した。

## 【0272】

【0284】 図面4A及び4Bは、発現データの結果を正常な結腸及び直腸組織における平均の発現に対して正規化したグラフ形式で示す。より特別には、図面4Aは、この疾患の様々な病期（I～IV）での110名の結直腸癌患者より入手した168の組織標本（このうち35の組織標本は、結直腸癌患者由来の正常隣接組織（NL）である）と他の部位由来の48の正常組織（NL組織）を使用して作成したデータを要約する。このプロットでは、それぞれの組織標本/患者からのデータを点によって表して、X軸上で区切られた各集団の幾何平均値が線として表される。同様に、図面4Bは、この疾患の様々な病期（I～IV）での腫瘍（T）又は正常隣接組織（N）より入手した、24のマッチした結直腸患者標本からのデータを含む。ここで、プロットしたデータは、試料ごとのベースで提示されて、個々の患者由来のそれぞれの腫瘍と正常隣接組織の間に関連がある。PTK7の発現は、マッチした「腫瘍」対「正常隣接組織」の大多数で明らかにより高く、病期3及び4における差示的な発現は、統計学的有意差（ $n = 4$ 、 $P = 0.037$ ）に達する。

30

40

## 【0273】

【0285】 図面4Aと図面4Bはともに、提示した全4つの病期において、PTK7遺伝子の発現レベルが結直腸腫瘍の大多数において、そして正常隣接組織に対してマッチした腫瘍標本において上昇していることを示す。さらに、平均のPTK7遺伝子発現は、結直腸癌のどの病期でも、評価したほとんどの正常組織に対して上昇しているように見える（図面4A）。上記の結果は、PTK7発現が結直腸癌において増加していること、そしてPTK7発現が結直腸TPCと膵臓TICにおいて最大であるという上記の観測事実と併

50

せた場合に、P T K 7を発現する癌幹細胞の療法標的化が癌患者に対して治療利益をもたらす可能性があることを示唆する。

【0274】

実施例5

例示の腫瘍試料におけるP T K 7の差示的な発現

[0286] 追加の結直腸癌患者の腫瘍試料と18の他の異なる固形腫瘍型のうち1つを診断された患者からの腫瘍標本におけるP T K 7遺伝子発現についてさらに評価するために、実施例4に記載のようにカスタム製作されたT i s s u e S c a n q P C R (Origen e Technologies) 384ウェルアレイを使用して、T a q m a n (登録商標) q R T - P C Rを実施した。この測定の結果は、図面5A及び5Bに提示されて、P T K 7の遺伝子発現がいくつかの固形腫瘍型において有意に上昇していることを示す。

10

【0275】

[0287] この点に関して、図面5A及び5Bは、18の異なる固形腫瘍型の1つがある患者由来の全腫瘍標本(灰色の点)又はマッチした正常隣接組織(N A T; 白色の点)中のヒトP T K 7の相対的な遺伝子発現レベルと絶対的な遺伝子発現レベルをそれぞれ示す。図面5Aでは、分析した各腫瘍型についてN A T中の平均した遺伝子発現に対してデータを正規化している。図面5Bでは、P T K 7の絶対的な発現について様々な組織/腫瘍において評価して、このデータを、定量的リアルタイムP C Rによる指数的増幅に達するのに必要とされるサイクルの数(C t)としてプロットした。増幅しなかった標本には45のC t値を割り当てたが、これは、この実験プロトコールでの最終増幅サイクルを表す。各点は、個別の組織標本を表して、その平均値を実線として表す。

20

【0276】

[0288] このカスタム組立て OriGene TissueScan Array を使用すると、結直腸癌と診断された患者の大多数と、副腎癌、子宮内膜癌、食道癌、肝臓癌、甲状腺癌、及び膀胱癌と診断されたほとんどの患者がその腫瘍においてN A Tに対して有意に多いP T K 7遺伝子発現を有することが観測され、これらの腫瘍における腫瘍形成及び/又は腫瘍進行にP T K 7が何らかの役割を担う可能性があることを示唆した。また、肺癌及び前立腺癌患者の垂集合では、N A Tに対してP T K 7発現が上昇していた。また上記の試験から明らかであったのは、P T K 7遺伝子発現がほとんどのN A T試料において概して中等度であったことであり; 最も高い発現は、乳房、子宮頸部、卵巣、膵臓、精巣、及び膀胱において観測された。再び、上記のデータは、選択した過剰増殖性障害を示す患者の腫瘍形成性又は腫瘍永続性に関して、上昇したP T K 7発現がその指標になって、手掛かりとなる(d i s p o s i t i v e)可能性があることを示唆する。

30

【0277】

実施例6

P T K 7免疫原の構築及び発現

[0289] 本発明によるある種のP T K 7モジュレーターを産生して特性決定するために、2つの形態のP T K 7免疫原を構築して発現させた。初めに、市販の発現ベクター、p C M V 6 - X L 4 - P T K 7を OriGene 社より購入した。全長O R Fの配列(図面1Aの下線部分)を確定してから、P C Rによって、p C D H - E F 1 - M C S - T 2 A - G F P レンチウイルスベクター(System Biosciences)のE c o R I部位とN o t I部位の中へサブクローン化した。このレンチウイルスベクターは、T 2 Aリボソームスキップペプチドへ融合した全長P T K 7タンパク質とG F P選択可能マーカを発現して、形質導入された細胞中での多シストロン発現を可能にする。このレンチウイルスベクターを使用して、標準プロトコールに従って、293T細胞又はB A L B / c 3 T 3細胞へ形質導入した。加えて、p C M V 6 - X L 4 - P T K 7を使用して、ポリエチレンイミンを使用する細胞のトランスフェクションから48時間後に、293T細胞の表面上でP T K 7タンパク質を一過的に発現させた。P T K 7過剰発現細胞より、分画遠心分離法を使用して、細胞膜調製物を入手した。

40

【0278】

50

[0290] 他の事例では、可溶性PTK7免疫原を調製して、このタンパク質の細胞外ドメイン(ECD)(図面1において下線を施したアミノ酸によって示される配列によってコードされる)をコードする、PTK7 cDNAの部分が挿入されたpEE12.4発現ベクター(Lonza AG)を使用して発現させた。第一の例では、ECD断片を、IgKリーダー配列の下流、そして8xHisエピトープタグ(配列番号8)の上流で正しいフレームでサブクローン化した。CHO-KSV細胞の一過性トランスフェクションによって、可溶性Hisタグ付きPTK7 ECD免疫原を産生して、この分泌されたタンパク質を、Ni-NTA樹脂と標準法(Qiagen社)を使用して、細胞上清より精製した。上述したPTK7-ECD-His構築体、血漿調製物、及び上記に記載のトランスフェクトされた細胞に加えて、Fc-PTK7-ECD構築体も産生して発現させた。この方法は、高忠実度のKOD Hot Start DNAポリメラーゼ(EMD Chemicals)を使用する、図面1Bに示すECD断片のPCR増幅によって開始した。このPCR反応に使用するフォワードプライマーは、PTK7配列:GCCATTGTCCTTCAACAAGCAGCC(配列番号9)を有して、5' HindIII制限部位と(産物の培養上清への分泌用の)マウスIgG シグナルペプチド/リーダー配列も含まれた。上記構築体を増幅するために使用したリバースプライマーは、PTK7配列:CTGGATCACTCTTGTAAGGGGGAG(配列番号10)を有して、合成済み遺伝子(DNA 2.0社)として注文される、ヒトIgG2 Fcタンパク質の上流でのクローニングを可能にする5' DraIII及びBglII制限部位が含まれた。

#### 【0279】

[0291] 次いで、増幅又はサブクローン化された産物を、HindIII及びEcoRI制限部位を使用して、最終の発現ベクターpEE12.4(Lonza AG)の中へ移動させ、DNA配列決定法によって忠実度確かめた。CHO-S又は293Tいずれかの懸濁細胞中へプラスミドを一過的にトランスフェクトして、Hisタグ付きタンパク質用のニッケル親和性カラム又はFc融合産物用のプロテインAカラムのいずれかによって精製した。この産物を、Superdex200カラム(GE Healthcare)をリン酸緩衝化生理食塩水(PBS, pH7.2)において使用するサイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製して、精製した融合タンパク質を、ブラッドフォード法(Bradford, 1976: PMID 942051)を使用して定量した。

#### 【0280】

##### 実施例7

hPTK7免疫原を使用する、抗PTK7抗体の産生

[0292] 本明細書の教示に従って、先の実施例において示したように作製した、全長のhPTK7、hPTK7-His、又はhPTK7-Fcを過剰発現するBALB/3T3細胞又はHEK293細胞それぞれでの接種により、マウスの抗体の形態でのPTK7モジュレーターを産生した。この点に関して言えば、3系統の雌性マウス(各3匹: Balb/c、CD-1、FVB)を上述のPTK7免疫原の調製物で免疫化した。いずれのマウスも、それぞれの場合に等量のTiterMAX(登録商標)又はアルムアジュバントで乳化した、10µgの選択したPTK7構築体又は $1 \times 10^6$ 個の細胞で、足蹠(footpad)の経路より免疫化した。

#### 【0281】

[0293] FACSアッセイ又は固相ELISAアッセイのいずれかを使用して、マウス血清について、ヒトPTK7に特異的なマウスIgG抗体をスクリーニングした。ELISAでは、プレートを、PBS中0.01~1µg/mLに及ぶ異なる濃度のPTK7-Hisで一晩コートした。0.02%(v/v)Tween20を含有するPBSで洗浄後、このウェルをPBS中3%(w/v)BSA又はPBS中2% FCS、200µL/ウェルで、室温で1時間ブロックした。50µL/ウェルでのマウス血清希釈液を、PTK7-Hisコート化プレート上で、室温で1時間インキュベートした。このプレートを洗浄してから、3% BSA-PBS又はPBS中2% FCSで10,000倍希釈した50µL/ウェルのHRP標識化ヤギ抗マウスIgGとともに、室温で1時間インキ

ュベートした。このプレートを洗浄して、100  $\mu$ L / ウェルの T M B 基質溶液 (Thermo Scientific 34028) を室温で 15 分間加えた。最後に、等量の 2 M  $H_2SO_4$  を加えて基質発色を止めて、分光光度計によって O D 450 で分析した。

#### 【0282】

[0294] 示したように、マウス血清について、GFP で同時形質導入したヒト P T K 7 を過剰発現する細胞に対しても、FACS によって抗 P T K 7 抗体を試験した。簡潔に言えば、ウェルに付き  $1 \times 10^5$  個の B A L B / 3 T 3 細胞をヒト P T K 7 と GFP で形質導入して、P B S / 2 % F C S で 100 倍希釈した 100  $\mu$ L のマウス血清とともに 30 分間インキュベートした。細胞を P B S / 2 % F C S で洗浄してから、各試料につき 50  $\mu$ L の DyeLight 649 標識化ヤギ抗マウス I g G、Fc 断片特異的二次抗体 (B S / 2 % F C S で 200 倍希釈) とともにインキュベートした。15 分のインキュベーションの後で、細胞を P B S / 2 % F C S で 2 回洗浄して、D A P I 入りの P B S / 2 % F C S に再懸濁させて、FACS によって分析した。

10

#### 【0283】

[0295] 血清陽性の免疫化マウスを犠牲にして、漏出するリンパ節 ( 拡げれば、膝窩及び鼠蹊部 ) を切り出して、抗体産生細胞の供給源として使用した。B 細胞 (  $3.75 \times 10^6$  個の細胞 ) の単一細胞懸濁液を非分泌型 P 3 x 6 3 A g 8 . 6 5 3 骨髓腫細胞 (ATCC #CRL-1580) と 1 : 1 の比で電気融合によって融合した。細胞電気融合は、BTX Hybrimmune System 又は ECM2001 ( いずれも、BTX Harvard Apparatus ) を製造業者の説明書に従って使用して実施した。電気融合に続いて、アザセリン (Azaserine) (シグマ # A 9 6 6 6 ) を補充したハイブリドーマ選択培地 [ 15 % 胎仔クローン I 血清 (Hyclone) 、 10 % B M C o n d i m e d (Roche Applied Sciences) 、 1 m M ピルビン酸ナトリウム、 4 m M L - グルタミン、 100 I U ペニシリン - ストレプトマイシン、 50  $\mu$ M 2 - メルカプトエタノール、及び 100  $\mu$ M ヒポキサンチンを含む D M E M (Cellgro カタログ番号 : 15-017-CM) 培地 ] に再懸濁させた。第一の融合では、細胞を平底マイクロタイタープレートに  $2 \times 10^4$  個 / ウェルで播いた後で、選択 H A T 培地 (シグマ、CRL P-7185) にて 2 週間のインキュベーションを続けた。第二の融合では、融合後 4 つの T 2 2 5 フラスコに 90 m l 選択培地 / フラスコで細胞を播いた。次いで、このフラスコを、5 %  $CO_2$  及び 95 % 空気を含有する 37  $^{\circ}C$  加湿インキュベーターに 6 ~ 7 日間入れた。

20

30

#### 【0284】

[0296] 増殖後、T 2 2 5 中の第二融合物由来の細胞を含んでなるライブラリーを、FACS Aria I 細胞ソーターを使用して分別して、Falcon 96 ウェル U 底プレート ( いずれも BD Biosciences ) においてウェルあたり 1 細胞でプレート培養する。残存する未使用のどのハイブリドーマライブラリー細胞も、必要ならば、将来の試験のために凍結した。次いで、選択したハイブリドーマを、15 % 胎仔クローン I 血清 (Hyclone) 、 10 % B M C o n d i m e d (Roche Applied Sciences) 、 1 m M ピルビン酸ナトリウム、 4 m M L - グルタミン、 100 I U ペニシリン - ストレプトマイシン、 50  $\mu$ M 2 - メルカプトエタノール、及び 100  $\mu$ M ヒポキサンチンを含む 200  $\mu$ L の培養基において増殖させた。いずれの融合物についても 96 ウェルプレート中で 10 ~ 14 日の増殖後、各ウェルからの上清について、E L I S A 又は F A C S アッセイを使用して、マウス P T K 7 に反応性の抗体をアッセイした。

40

#### 【0285】

[0297] 簡潔に言えば、96 ウェルプレート (VWR, 610744) を、炭酸ナトリウム緩衝液中 1  $\mu$ g / m L のマウス P T K 7 - H i s で、4  $^{\circ}C$  で一晩コートした。このプレートを洗浄して、2 % F C S - P B S で、37  $^{\circ}C$  で 1 時間ブロックして、すぐに使用するか又は 4  $^{\circ}C$  に保存した。そのプレート上で非希釈ハイブリドーマ上清を室温で 1 時間インキュベートした。このプレートを洗浄して、1 % B S A - P B S で 10 , 000 倍希釈した H R P 標識化ヤギ抗マウス I g G で、室温で 1 時間プローブした。上記に記載のような基質溶液とのインキュベーションに続いて、このプレートを O D 450 で読み取った。

50

## 【0286】

[0298] マウス免疫グロブリンを分泌している増殖陽性ハイブリドーマウエルについても、上記の記載に似たFACSアッセイを使用して、ヒトPTK7の特異性をスクリーニングした。簡潔に言えば、ヒトPTK7とGFPで形質導入した、ウエルにつき $1 \times 10^5$ 個のBALB/3T3細胞を $25 \sim 100 \mu\text{l}$ のハイブリドーマ上清とともに30分間インキュベートした。細胞をPBS/2% FCSで2回洗浄してから、試料あたり $50 \mu\text{l}$ のDyeLight 649 標識化ヤギ抗マウスIgG、Fc断片特異的二次抗体(PBS/2% FCSで200倍希釈)とともにインキュベートした。15分のインキュベーションの後で細胞をPBS/2% FCSで2回洗浄して、DAPI(Life Technologies)入りのPBS/2% FCSに再懸濁させて、FACSによって分析した。第二の融合では、生じるPTK7特異的クローンのハイブリドーマを増やして、CS-10凍結培地(Biolife Solutions)に冷凍保存して、液体窒素に保存した。

10

## 【0287】

[0299] 第一融合物では、選択された抗原陽性ウエルに対して、限界希釈プレーティングを使用してサブクロニングを実施した。プレートについて、単一コロニー増殖の存在を目視検査してから、単一コロニーからの上清について、上記に記載のような抗原特異的ELISA及びFACS確認によってスクリーニングした。生じるクローン集団を増やして、凍結培地(90% FBS, 10% DMSO)において冷凍保存して、液体窒素に保存した。

20

## 【0288】

[0300] 第一融合物では、陽性ウエルからのPTK7分泌ハイブリドーマ(20分でのOD $405 > 0.75$ で4つのヒット)をさらなる特性決定のために選択した。

## 【0289】

[0301] 48プレート(4608ウエル)にわたって播いた第二融合物は、数百のヒットでほぼ65%のクローニング効率をもたらした。選択したクローンは、ヒトPTK7に免疫特異的である数十のマウス抗体をもたらして、そのいくつかはマウスPTK7とも交差反応した。

## 【0290】

## 実施例8

## PTK7モジュレーターの配列決定及びヒト化

30

## 8(a) 配列決定:

[0302] 上述したことに基づいて、固定化したヒトPTK7へ結合するいくつかの例示の別個のモノクローナル抗体と、マウスPTK7と見かけ上高い親和性で交差反応する抗体を配列決定とさらなる分析のために選択した。図面6A及び6B中の表形式に示すように、実施例7において作製した選択モノクローナル抗体からの軽鎖可変領域(図面6A)及び重鎖可変領域(図面6B)の配列分析により、その多くが新規の相補性決定領域を有して、しばしば新規のVDJ再配列を示すことが確認された。図面6A及び6Bに示す相補性決定領域は、Chothia et al. 上掲に従って定義されていることに留意されたい。

## 【0291】

[0303] より具体的には、図面6Aは、抗PTK7抗体由来の21種の新規マウス軽鎖可変領域(配列番号20~60、偶数番号)と代表的なマウス軽鎖由来の4種のヒト化軽鎖可変領域(配列番号62~68、偶数番号)の連続アミノ酸配列を図示する。同様に、図面6Bは、同じ抗PTK7抗体由来の21種の新規マウス重鎖可変領域(配列番号21~61、偶数)とヒト化軽鎖を提供するのと同じマウス抗体由来の4種のヒト化重鎖可変領域(配列番号63~69、偶数)の連続アミノ酸配列を図示する。このように、一緒にすると、図面6A及び6Bは、21種のマウス抗PTK7抗体(SC6.2.35、SC6.10.2、SC6.4.1、SC6.50.1、SC6.3、SC6.4、SC6.6、SC6.7、SC6.13、SC6.14、SC6.15、SC6.19、SC6.20、SC6.21、SC6.23、SC6.24、SC6.26、SC6.29、SC6.41、SC6.58、及びSC6.59と呼称される)と4種のヒト化抗体(hSC

40

50

6.23、hSC6.24、hSC6.41、及びhSC6.58と称される)の注釈付き配列を提供する。SC6.4.1とSC6.4という呼称は、命名上の変則を単に反映するのであって、これらのモジュレーターは、実際には、新規の重鎖及び軽鎖可変領域がある2つの別個の抗体を含むことに留意されたい。

#### 【0292】

[0304] 本出願の目的では、それぞれの特別な抗体の配列番号が連続している。従って、mAb SC6.2.35は、軽鎖可変領域と重鎖可変領域にそれぞれ配列番号20と配列番号21を含む。この関連で言えば、SC6.10.2は、配列番号22及び23を含み、SC6.4.1は、配列番号24及び25を含む、といった具合である。さらに、本出願では、図面6A及び6B中のそれぞれの抗体アミノ酸配列に対応する核酸配列が付帯の配列表として含まれる。この含まれる核酸配列は、対応するアミノ酸配列(重鎖又は軽鎖)より100大きい配列番号を含む。mAb SC6.2.35の重鎖及び軽鎖可変領域アミノ酸配列(即ち、配列番号20及び21)をコードする核酸配列は、配列番号120及び121を含む。他の抗体核酸配列も、ヒト化構築体をコードするものも含めて、同等に番号付けされる。

10

#### 【0293】

[0305] 例示のモジュレーターを配列決定することの第一工程として、RNAを調製するために、選択したハイブリドーマ細胞をTrizol(登録商標)試薬(Life Technologies)に溶解させた。この点に関して言えば、 $10^4 \sim 10^5$ 個の細胞を1ml Trizolに再懸濁させて、200 $\mu$ lのクロロホルムの添加後に激しく振り混ぜた。次いで、試料を4で10分間遠心分離させて、水相を新鮮な微量遠心管へ移して、ここに等量のイソプロパノールを加えた。この管を再び激しく振り混ぜて、そのまま室温で10分間インキュベートした後で、4で10分間遠心分離させた。生じるRNAペレットを1mlの70%エタノールで1回洗浄して、室温で少しの間乾燥させた後で、40 $\mu$ LのDEPC処理水に再懸濁させた。RNA調製物の量は、1%アガロースゲルに3 $\mu$ Lを分画することによって定量して、その後、使用するまで、-80で保存した。

20

#### 【0294】

[0306] 完全なマウスVHレパートリーに標的指向するように設計された、32種のマウス特異的リーダー配列プライマーを含んでなる5'プライマーミックスをすべてのマウスIgアイソタイプに特異的な3'マウスCプライマーと組み合わせて使用して、それぞれのハイブリドーマのIg重鎖の可変領域を増幅した。同じPCRプライマーを使用して、VHの400塩基対PCR断片を両端より配列決定した。同様に、Vkマウスファミリーのそれぞれを増幅するように設計された32種の5'Vkリーダー配列プライマーミックスをマウス定常領域へ特異的な単一のリバースプライマーと組み合わせて使用して、軽鎖を増幅して配列決定した。このV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>転写物は、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を使用して、100ngの全RNAより増幅した。

30

#### 【0295】

[0307] それぞれのハイブリドーマにつき全部で8回のRT-PCR反応(V軽鎖についての4回と、V重鎖(1)についての4回)を実行した。増幅には、QIAGENワンステップRT-PCRキット(Qiagen社)を使用した。このキットは、Sensiscript及びOmniscriptの逆転写酵素、HotStarTaq DNAポリメラーゼ、dNTPミックス、緩衝液及びQ-溶液、「困難な」(例えば、GCリッチ)鑄型の効率的な増幅を可能にする新規添加剤の混和物を提供する。抽出したPCR産物を、特異的V領域プライマーを使用して、直接的に配列決定した。IMG Tを使用してヌクレオチド配列を解析して、最高の配列相同性がある生殖細胞株V、D、及びJ遺伝子メンバーを同定した。V-BASE 2(Retter et al., 上掲)を使用して、そしてV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>遺伝子のマウス生殖細胞株データベースへの並置によって、この導いた配列をIg V及びJ領域の既知の生殖細胞株DNA配列と比較した。

40

#### 【0296】

[0308] 3 $\mu$ LのRNA、100 $\mu$ Mの重鎖又は軽鎖いずれかのプライマーの0.5

50

$\mu\text{L}$ 、 $5\mu\text{L}$ の $5\times\text{RT-PCR}$ 緩衝液、 $1\mu\text{L}$  dNTP、逆転写酵素及びDNAポリメラーゼを含有する $1\mu\text{L}$ の酵素ミックス、及び $0.4\mu\text{L}$ のリボヌクレアーゼ阻害剤 RNasin (Promega BioSystems) が含まれる反応混合物を調製した。この反応混合物は、逆転写とPCRの両方に必要とされる試薬のすべてを含有する。熱サイクルプログラムは、RT(逆転写)工程、 $50^\circ\text{C}$ で30分間、 $95^\circ\text{C}$ で15分間に、30サイクルの( $95^\circ\text{C}$ で30秒間、 $48^\circ\text{C}$ で30秒間、 $72^\circ\text{C}$ で1.0分間)を続けた。次いで、 $72^\circ\text{C}$ で10分間の最終インキュベーションがあった。

【0297】

[0309] 直接的なDNA配列決定用のPCR産物を産生するために、QIAquick<sup>TM</sup> PCR精製キットを製造業者のプロトコールに従って使用して、それらを精製した。このDNAを、 $50\mu\text{L}$ の無菌水を使用してスピンカラムより溶出させてから、両鎖より直接的に配列決定した。再び、生じるDNA配列についてVBASE2を使用して解析し(データ示さず)、図面6A及び6Bに示す注釈付き配列を得た。より具体的には、上記に考察したように、21種のマウス抗PTK7抗体の重鎖及び軽鎖可変領域の注釈付きアミノ酸配列を図面6A及び6Bに示す。

10

【0298】

8(b) ヒト化:

[0310] 実施例7において作製したマウス抗体のうち4つを、相補性決定領域(CDR)移植法を使用してヒト化した。機能性ヒト生殖細胞株遺伝子に関する配列及び構造の類似性に基づいて、重鎖及び軽鎖のヒトフレームワークを選択した。この点に関して言えば、Chothia et al. (上掲)に記載のように、マウスカノニカルCDR構造を同じカノニカル構造のあるヒト候補物と比較することによって、構造類似性を評価した。

20

【0299】

[0311] より具体的には、コンピュータ支援CDR移植法(Abysis Database, UCL Business Plc.)と標準分子工学技術を使用してマウスの抗体: SC6.23、SC6.24、SC6.41、及びSC6.58をヒト化して、hSC6.23、hSC6.24、hSC6.41、及びhSC6.58のモジュレーターを得た。マウスフレームワーク配列とそのカノニカル構造に対するその最高の配列相同性に基づいて、可変領域のヒトフレームワーク領域を選択した。この解析の目的では、CDRドメインそれぞれへのアミノ酸の帰属は、Kabat et al. の番号付けに準拠する。最適のヒト化抗体を産生するためにいくつかのヒト化抗体変異体を作製したが、このヒト化抗体は、ヒトフレームワーク領域に関連する、マウスハイブリドーマ由来の抗原結合性の相補性決定領域(CDR)を概して保持していた。最終的には、Biacoreシステムを使用して測定されるように、ヒト化SC6.23、SC6.24、SC6.41、及びSC6.58のmAbは、そのマウス対照物と同様の親和性でヒトPTK7抗原へ結合することがわかった。

30

【0300】

[0312] 当該技術分野で認められた技術を使用して、分子工学手順を実行した。そのために、製造業者のプロトコール(Trizol(登録商標)Plus RNA精製システム、Life Technologies)に従って、先のハイブリドーマより全mRNAを抽出した。それぞれのハイブリドーマを増幅するように設計された配列特異的5'リーダー配列プライマーを3'ヒトC<sub>1</sub>プライマーと組み合わせて使用して、それぞれのヒト化抗体の可変領域を増幅してクローン化した。同様に、Vk領域のそれぞれを増幅するように特異的に設計された5'Vkリーダー配列を、ヒト定常領域に特異的な単一のリバースプライマーと組み合わせて使用して、軽鎖を増幅してクローン化した。この増幅した断片をキメラのヒト $\lambda$ 鎖としてクローン化して、それぞれのヒト化mAbのベンチマークとして役立てた。

40

【0301】

[0313] このヌクレオチド配列情報より、SC6.23、SC6.24、SC6.41、及びSC6.58の重鎖及び軽鎖のV、D、及びJ遺伝子セグメントに関するデータを入手した。この配列データに基づいて、抗体のIgV<sub>H</sub>及びV<sub>K</sub>鎖のリーダー配列に特

50

異的な新しいプライマーセットを組換えモノクローナル抗体のクローニングのために設計した。引き続き、このV-(D)-J配列をマウスIg生殖細胞株配列と並置した。SC6.23の重鎖遺伝子は、VH36096(V)、DSP2.3(D)、及びJH3として同定された。SC6.24の重鎖遺伝子は、VHJ558(V)、DSP2.7(D)、及びJH4として同定された。SC6.41の重鎖遺伝子は、IGHV14-4(V)、DFL16.1(D)、及びJH2として同定された。SC6.58の重鎖遺伝子は、IGHV4-1(V)、DFL16.1(D)、及びJH4として同定された。4つの軽鎖は、いずれもKクラスであった。軽鎖遺伝子については、SC6.23 mAbではIGKV14-111及びJK5として、SC6.24 mAbではIGKV3-5及びJK1として、SC6.41 mAbではIGKV2-137及びJK4生殖細胞株配列として、そしてSC6.58 軽鎖ではIGKV17-121及びJK4生殖細胞株配列として同定された。これらの結果をすぐ下の表1に要約する。

【0302】

【表2】

表1

クローン	VH	DH	JH	VL	JL
SC6.23	VH3609	DSP2.3	JH3	IGKV14-111	JK5
SC6.24	VHJ558	DSP2.7	JH4	IGKV3-5	JK1
SC6.41	IGHV14-4	DFL16.1	JH2	IGKV2-137	JK4
SC6.58	IGHV4-1	DFL16.1	JH4	IGKV17-121	JK4

【0303】

[0314] 全4つのクローンより入手した重鎖及び軽鎖配列を機能性ヒト可変領域配列へ並置して、相同性とカノニカル構造について検討した。この重鎖及び軽鎖解析の結果を下記の表2及び3にそれぞれ示す。

【0304】

【表3】

表2

mAb	ヒト VH	ヒト DH	ヒト JH	ヒト生殖細胞株配列に対する相同性 (%)	マウス配列に対する相同性 (%)
hSC6.23	VH2-5	IGHD5-5	JH4	91	81
hSC6.24	VH1-3	IGHD4-23	JH6	82	82
hSC6.41	VH1-46	IGHD4-23	JH4	79	88
hSC6.58	VH3-7	IGHD2-8	JH6	86	88

【0305】

【表4】

表3

mAb	ヒトVK	ヒトJK	ヒト生殖細胞株配列に対する相同性 (%)	マウス配列に対する相同性 (%)
hSC6.23	O8	JK5	91	81
hSC6.24	L6	JK1	82	82
hSC6.41	A3/A19	JK1	79	88
hSC6.58	B2	JK4	86	88

【0306】

[0315] この生殖細胞株選択とCDR移植の方法により、その結合特性を概ね保持する抗体が提供されたので、この構築体のほとんどでマウスの残基を挿入する必要は、ほとんどないようであった。

【0307】

[0316] 上記に述べたように、全4種の抗体のヒト化重鎖可変領域及びヒト化軽鎖のアミノ酸配列を図面6A及び6B(配列番号62~69)に示して、対応する核酸配列(配列番号162~169)を付帯の配列表に示す。

【0308】

[0317] より具体的には、ヒト化SC6.23軽鎖のアミノ酸配列と対応する核酸配列(配列番号62及び162)とヒト化重鎖のそれ(配列番号63及び163)を図面6A及び6Bと配列表に示す。同様に、ヒト化SC6.24軽鎖のアミノ酸配列と対応する核酸配列(配列番号64及び164)とヒト化重鎖のそれ(配列番号65及び165)を同じ方法で示す。本発明の別の態様をヒト化SC6.41軽鎖のアミノ酸配列と対応する核酸配列(配列番号66及び166)とヒト化重鎖のそれ(配列番号67及び167)によって例示する。なお別の態様では、ヒト化SC6.58軽鎖のアミノ酸配列と対応する核酸配列(配列番号68及び168)とヒト化重鎖のそれ(配列番号69及び169)を図示する。下記の実施例で証明されるように、上述のヒト化抗体のそれぞれは、本明細書の教示に従って、有効なPTK7モジュレーターとして機能する。

10

【0309】

[0318] いずれにしても、当該技術分野で認められた技術を使用して、開示モジュレーターを発現させて単離した。そのために、両方の重鎖の合成ヒト化可変DNA断片(Integrated DNA Technologies)をヒトIgG1発現ベクター中へクローン化した。可変軽鎖断片は、ヒトC-発現ベクター中へクローン化した。この重鎖と軽鎖のCHO細胞への同時トランスフェクションによって、抗体を発現させた。

20

【0310】

[0319] より具体的には、抗体産生のために、マウス及びヒト化の可変遺伝子PCR産物のヒト免疫グロブリン発現ベクター中への一方向性クローニングを行った。Ig遺伝子特異的PCRに使用されるすべてのプライマーには、制限部位(IgHではAgeIとXhoI、IgKではXmaIとDraIII)が含まれ、これらによりヒトIgG1及びIGKの定常領域をそれぞれ含有する発現ベクター中への直接的なクローニングを可能にした。簡潔に言えば、PCR産物をQiaquick PCR精製キット(Qiagen社)で精製して、AgeIとXhoI(IgH)、XmaIとDraIII(IgK)のそれぞれでの消化を続けた。発現ベクターへのライゲーションに先立って、消化されたPCR産物を精製した。全量10µLにおいて、200U T4-DNAリガーゼ(New England Biolabs)、7.5µLの消化及び精製済み遺伝子特異的PCR産物、及び25ngの線状化ベクターDNAでライゲーション反応を実施した。コンピテント大腸菌:DH10B細菌(Life Technologies)を42°Cでの熱ショックにより3µLのライゲーション産物で形質転換させて、アンピシリンプレート(100µg/mL)上へ播いた。次いで、V<sub>H</sub>領域のAgeI-EcoRI断片をpEE6.4HuIgG1(Lonza AG)発現ベクターの同じ部位へ挿入する一方、合成のXmaI-DraIII V<sub>K</sub>挿入物をそれぞれのpEE12.4Hu-発現ベクターのXmaI-DraIII部位へクローン化した。

30

40

【0311】

[0320] 293フェクチンを使用する、適正なプラスミドでのHEK293細胞のトランスフェクションによって、ヒト化抗体を産生する細胞を作製した。この点に関しては、プラスミドDNAをQIAprep Spinカラム(Qiagen)で精製した。10%熱不活性化FCS、100µg/mLストレプトマイシン、100U/mLペニシリンG(いずれもLife Technologiesより)を補充したダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)中の標準条件下で150mmプレート(Falcon, Becton Dickinson)においてヒト胚性腎(HEK)293T(ATCC番号: CRL-11268)細胞を培養した。

【0312】

50

[0321] 一過性トランスフェクションのために、細胞を80%の集密度まで増殖させた。1.5 mL Opti-MEM中50  $\mu$ LのHEK293トランスフェクション試薬と混合した1.5 mL Opti-MEMへ等量のIgHと対応するIgL鎖ベクターDNA(各ベクターDNAの12.5  $\mu$ g)を加えた。この混合物を室温で30分間インキュベートして、培養プレートへ均等に分配した。トランスフェクションの3日後に上清を採取し、10% FBSを補充した20 mLの新鮮なDMEMに置き換えて、トランスフェクション後6日目に再び採取した。800  $\times$  gで10分間の遠心分離によって培養上清から細胞残渣を除いて、4  $^{\circ}$ Cで保存した。組換えキメラ抗体とヒト化抗体をプロテインGビーズ(GE Healthcare)で精製した。

### 【0313】

#### 実施例9

#### PTK7モジュレーターの特性

#### 9(a) 全般的なモジュレーター特性

[0322] 様々な方法を使用して、上記に説明したように産生した、選択したPTK7モジュレーター(マウスとヒト化の両方)の免疫化学特性を分析した。具体的には、上記抗体のいくつかについて、親和性、動態、ビンニング(binching)、並びにカニクイザル及びマウスの相同体との交差反応性に関して(例えば、ForteBioによって)特性決定した。このモジュレーターの反応性は、還元及び非還元試料を使用するウェスタンブロットによっても測定して、エピトープが線状であるかないかに関するいくつかの示唆を得た。図面7Aに示すマウス及びヒトの抗原結合データに加えて、選択したマウスモジュレーターについての抗体特性決定の結果を図面7Bにおいて表形式で示す。最後に、図面7C~7Eに示すように、選択したマウス-ヒト化モジュレーターの親和性について、ForteBio RED(ForteBio社)での生体層干渉法分析を標準抗原濃度系列とともに使用して、測定した。一般に、選択したモジュレーターは、相対的に高い親和性をナノモル濃度範囲で示した。

### 【0314】

[0323] 本発明に従って、精度を確実にするために3つの様式でモジュレーター親和性を測定した。第一に、ELISAにおいて、抗原の系列希釈液に対してプローブされる一定量の抗体について結合シグナルを測定して、相対的なモジュレーター活性を決定した(データ示さず)。第二に、次いで、標準抗原濃度系列での生体層干渉測定分析をForteBio RED(ForteBio社)で使用して、選択したエフェクターの親和性及び運動定数( $k_{on}$ 及び $k_{off}$ )を測定した。最後に、選択したモジュレーターの親和性を表面プラズモン共鳴法(Biacore System, GE Healthcare)によって測定した。標準抗原濃度系列に基づいて、そして1:1ラングミュア結合モデルを使用して、抗原への抗体結合の $K_d$ と運動定数( $k_{on}$ 及び $k_{off}$ )を、当該技術分野で通常の技術を使用して決定した(例えば、図面7C及び7Eを参照のこと)。全般に、選択したエフェクターは、マウスのもでもヒト化のもでも、相対的に高い親和性をナノモル濃度範囲で明示した。図面7Bの表において、上付きのBは、Biacoreで行った親和性測定値を示して、上付きのFは、ForteBioで行った測定値を示す。

### 【0315】

[0324] PTK7エフェクターによって認識されるエピトープが連続アミノ酸を含むのか、又は抗原の二次構造によって並列される不連続アミノ酸によって形成されるのかを決定するために、予備研究も行った。この点に関しては、還元条件(例えば、0.5 M DTTを使用する)と非還元条件の下でウェスタンブロットを行った。より具体的には、当該技術分野で周知の標準の電気泳動技術を使用して、両方の状態のPTK7抗原をゲル上に泳動させてプロットした後で、選択したモジュレーターへ曝露した。図面7Bに示すように、ジスルフィド結合がインタクトである場合(NR)のみ抗原と見かけ上反応する2つのPTK7モジュレーターについて試験した。残りのPTK7モジュレーターについては、ウェスタンブロット活性を試験しなかった。

### 【0316】

10

20

30

40

50

【0325】 抗体ピニングに関しては、F o r t e B I O O c t e t R e d 9 6 分析機 (ForteBio 社) を製造業者の説明書と当該技術分野で認められたサンドイッチ法 [Analytical Biochemistry 386:172-180 (2009)] に従って使用して、同じ又は異なるピン (bins) へ結合する抗体を同定した。簡潔に言えば、抗体 (A b 1) を抗マウス捕捉チップ上に捕捉させた後で、高濃度の非結合抗体を  $15 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $100 \text{nM}$ ) で使用してそのチップをブロックして、ベースライン値を確定した。次いで、実施例 6 において提供されたような単量体の組換え h P T K 7 - H i s (アイソフォーム a) を特異抗体 (A b 1) によって捕捉させて、そのチップを、対照としての同一抗体 (A b 1) のあるウェルが又は異なる抗体 (A b 2) のあるウェルのいずれかへ浸漬した (ここでは、いずれの抗体も  $4 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $25 \text{nM}$ ) である)。新しい抗体との追加の結合が観測されたならば、A b 1 と A b 2 は、異なるピンにあるものと判定された。対照の A b 1 と同様に、さらなる結合が生じなければ、A b 2 は同じピンにあると判定された。この方法を拡張して、96 ウェルプレートにおいて独自のピンを表す完全列の抗体を使用して、独自抗体の大きなライブラリーについてスクリーニングすることができる。ヒトとマウスの両方の P T K 7 抗原について、3 種の代表的なモジュレーターの例示データを図面 7 A に示す。図面 7 A は、S C 6 . 1 0 . 2 がマウスへ全く結合しなかったのに対し、S C 6 . 2 . 3 5 がヒトの約 10% で結合して、S C 6 . 2 5 . 1 がマウスの P T K 7 - H i s へ同一の親和性で結合したことを例証する (註; 抗体は、図面 7 A では、H 2 . 3 5、H 1 0 . 2、及び H 2 5 . 1 と表示した)。さらに、これらの試験した抗体のそれぞれは、異なるピンに属すると判定された。同様の方法で、9 つの追加の P T K 7 モジュレーターについてピニング分析を実施して、図面 7 B に示す結果を得た。これらのデータにより、試験したモジュレーターによって認識される少なくとも 7 種の別個のピンが同定された。表中の N D は、データが判定不能であったことを示す。

【0317】

【0326】 最後に、カニクイザル及びマウスの P T K 7 相同体に関する交差反応性について、組換え的に発現される単量体抗原を含んでなる濃度系列を使用して、F o r t e B I O において評価した。図面 7 B に収載されるように、きわめて似ているカニクイザル P T K 7 とはすべての抗体が交差反応したのに対し、マウス P T K 7 と反応性であったのは、いくつかの例示モジュレーターであった。

【0318】

#### 9 ( b ) ヒト化モジュレーターの特性

【0327】 本実施例において上記に説明した技術を使用して、ヒト化構築体の h S C 6 . 2 3、h S C 6 . 2 4、h S C 6 . 4 1、及び h S C 6 . 5 8 について分析して、それらの結合特性を判定した。加えて、ヒト化抗体の結合性を親マウスの抗体と直接比較して、両方の抗体について、ヒト化の方法によって生じる速度定数の微妙な変化を同定した。

【0319】

【0328】 より具体的には、表面プラズモン共鳴法 (S P R) を使用する B i a c o r e によってマウス S C 6 . 2 3 の親和性を測定して、図面 7 C に示す結果を得た。2 5、1 2 . 5、及び 6 . 2 5 n M の濃度系列 (図面 7 C 及び 7 D 中の最上部から最下部への曲線を作成する) に基づいて、そして 1 : 1 ラングミュア結合モデルを使用して、抗原への抗体結合の  $K_d$  が 2 . 3 n M であると推定した。次いで、ヒト化 S C 6 . 2 3 構築体で行った同様の実験は、ヒト化の方法が親和性に悪影響を及ぼさなかったことを示唆する、同等の結果を示した (図面 7 D)。この点に関して言えば、この測定値は、ヒト化構築体が、治療用抗体の許容可能限界内に十分にある、3 . 9 n M の親和性を有することを示した。実施例 8 において記載したヒト化構築体のそれぞれについての同様の測定値を図面 7 E に示して、本実施例において示した他の技術と共に、この開示したヒト化 P T K 7 モジュレーターが治療用抗体に望ましい特質を保有することを示す。

【0320】

実施例 1 0

選択した P T K 7 モジュレーターのエピトープ決定

[0329] ビニングデータをさらに洗練させて、上記に示したように作製した選択PTK7モジュレーターによって規定されるエピトープ領域を決定するために、PTK7 ECDのいくつかの異なる変異体を構築して、発現させた。より具体的には、様々なPTK7 Igドメインを増幅するプライマーを使用してPTK7欠失変異体を設計して、これらを、合成遺伝子(DNA 2.0)として注文されるヒトIgG2 Fcドメインの上流にあるBg1II制限部位へ融合した。次いで、これらのFc融合タンパク質を、HindIII及びEcoRI制限部位を使用して、pEE12.4発現ベクター(Lonza AG)中へクローン化した。293フェクチン(Life Technologies)を使用する接着性293細胞のトランスフェクションに、単離した内毒素フリーのプラスミドDNA(Qiagen社)を使用した。トランスフェクションから72時間後に、293トランスフェクト細胞からの上清を採取した。具体的には、Fc領域へ融合させる以下の欠失構築体を設計した：

1. PTK7 ECD Igドメイン1~2 (配列番号70) 図面8A
2. PTK7 ECD Igドメイン3~7 (配列番号71) 図面8B
3. PTK7 ECD Igドメイン1~5 (配列番号72) 図面8C
4. PTK7 ECD Igドメイン6~7 (配列番号73) 図面8D
5. PTK7 ECD Igドメイン2~3 (配列番号74) 図面8E
6. PTK7 ECD Igドメイン1~4 (配列番号75) 図面8F
7. PTK7 ECD Igドメイン1~7 (配列番号3) 図面1C-ECD

[0330] 上記構築体の最初の6つのアミノ酸配列を図面8A~8F(選択したPTK7 ECDをFc領域と共に含んでなる)に示す。第七の構築体の配列は、Fcドメインへ融合した、図面1Cに示すようなアイソフォームaの細胞外ドメイン(配列番号3)を含む。

#### 【0321】

[0331] 上記構築体を使用して、いくつかのモジュレーターについて、定義されたIgドメインの欠失があるPTK7タンパク質を認識する能力を試験した。ドメイン欠失構築体の使用を含んでなるELISAアッセイにより、標準条件の下で行った。この点に関して言えば、ヤギ抗ヒトIgG Fc特異抗体(Jackson Immunoresearch)でコートしたELISAプレート上で、PTK7 IgドメインFc融合物を捕捉した。次いで、様々な欠失Fc融合タンパク質へ結合するそれぞれのマウス抗PTK7抗体の能力を、HRP標識化ヤギ抗マウスFc特異抗体で検出した。

#### 【0322】

[0332] このアッセイを使用して、特別なPTK7 Igドメインに対して指向されているものとして例示のモジュレーターを同定した。ELISA結果の1例は、それぞれの代表的な検出エピトープ又は結合パターンを明確にして、すぐ下の表4に含まれる。

#### 【0323】

#### 【表5】

表4

Igドメイン	1-2	2-3	1-4	1-5	3-7	6-7	1-7	結合ドメイン
SC6. 2. 35	+	-	+	+	-	-	+	Igドメイン1-2
SC6. 39	+	+	+	+	-	-	+	Igドメイン2
SC6. 25. 1	-	+	+	+	-	-	+	Igドメイン2-3
SC6. 10. 2	-	-	+	+	-	-	+	Igドメイン1-4
SC6. 18	-	-	-	-	+	-	+	Igドメイン3-7
SC6. 11	-	-	-	-	-	-	+	Igドメイン1-7

#### 【0324】

[0333] ELISAアッセイにおける陽性結合の異なるパターン(表4及び図面8G)

に基づけば、抗 P T K 7 モノクローナル抗体は、いくつかの異なるエピトープを認識するらしい。図面 8 G において、モジュレーターは、S C 6 ではなくて 6 M として収載されており、S C 6 . 2 . 3 5 と S C 6 . 1 0 . 2 が H 2 . 3 5 と H 1 0 . 2 として収載されていることに留意されたい。I g ドメイン 6 ~ 7 内のエピトープだけへ結合する抗体はないが、これら 2 つのドメインは、S C 6 . 1 8 と S C 6 . 3 1 ( 表中になし ) が結合した I g 3 - 7 F c 融合構築体の二次 / 三次構造へ貢献する可能性がある。さらに、3 つの抗体 ( S C 6 . 2 . 3 5 、 S C 6 . 4 . 1 、 及び S C 6 . 1 0 . 2 ) は、最初の 4 つの I g ドメイン中のエピトープを認識して、これら抗体のいずれも、I g ドメイン 6 ~ 7 内のエピトープへ結合しない。最初の 4 つの I g ドメインにおいて、S C 6 . 2 . 3 5 は、ドメイン 1 ~ 2 内のエピトープへ結合する。S C 6 . 4 . 1 は、I g ドメイン 2 及び 3 の境界内のエピトープを認識する。逆に、S C 6 . 1 0 . 2 は、最初の 4 つの I g ドメイン内のどの欠失にも影響されるように見えるので、4 つの I g 様ドメインは、いずれも S C 6 . 1 0 . 2 のエピトープを規定することに関与している可能性がある。同様に、いくつかの抗体は、全長構築体、I g ドメイン 1 ~ 7 だけへ結合して、I g 欠失により、これらエピトープの結合部位又は二次構造の一部が破壊された可能性があることを示唆する。図面 8 G は、追加の抗体と開示モジュレーターの結合局在化を示す比較可能データが含まれる、上記結合パターンの概略表示を提供し、ここでは、P T K 7 E C D の 7 つの I g ドメインをブロック形式で表示して、括弧を使用して、それぞれの抗 P T K 7 抗体のこの E C D 内の解明されたエピトープ位置に注目する。

10

20

30

40

50

#### 【 0 3 2 5 】

##### 実施例 1 1

##### 例示の腫瘍試料における P T K 7 タンパク質の発現

[0334] 先の実施例において、上昇した遺伝子発現レベルを報告して P T K 7 に対する抗体を作製した後で、選択した患者腫瘍集団における対応する P T K 7 タンパク質の発現についての証拠を探求した。この点に関して言えば、1 1 の腫瘍型からの 4 3 2 の組織溶解物、又はそのそれぞれの正常隣接組織の 4 つの希釈液を含んでなる逆相癌タンパク質溶解物アレイ ( ProteoScan<sup>T M</sup> Arrays ; OriGene Technologies ) を、外因性プロモーターによって推進される T P 5 3 過剰発現の有り無しの H E K 2 9 3 細胞からなる対照と共に提供した。実施例 7 に示すように作製して P T K 7 タンパク質を認識するマウスモノクローナル P T K 7 抗体 ( 例えば、クローン S C 6 . 2 . 3 5 ) を使用して、ウェスタンブロットによって、このアレイ上の溶解物中の P T K 7 タンパク質発現を検出した。比色検出試薬とプロトコールは、ProteoScan Arrays の製造業者によって提供されて、BZScan2 Java Software ( INSERM-TAGC ) を使用する平底型スキャナーを使用して、製作したアレイ上のスポットをデジタル画像へ変換して、スポット強度を定量した。

#### 【 0 3 2 6 】

[0335] そのようなアッセイの結果は、P T K 7 タンパク質の発現が、メラノーマ、非小細胞肺癌 ( N S C C L )、小細胞肺癌 ( S C L C )、結直腸癌、膵臓癌、乳癌、及び卵巣癌患者由来の腫瘍試料の亜集合において上方調節されていることを示す。選択した腫瘍についてのこれらアッセイからの例示データを図面 9 A ~ 9 D に示す。より具体的には、図面 9 A は、P T K 7 タンパク質発現が結直腸腫瘍標本の亜集合において有意に上昇しているように見える ( 特に、病期 I V 疾患の患者において、正常隣接組織、又はより初期の疾患より入手した標本由来の腫瘍組織と比較した場合 ) ことを示す。図面 9 B に示すように、P T K 7 タンパク質の発現は、ほとんどの神経内分泌膵臓腫瘍において、並びに乳癌 ( 図面 9 C ) 及び卵巣癌 ( 図面 9 D ) の患者それぞれの亜集合においても上昇していた。上記の記載のようにデータを作成して、スポットあたりの平均ピクセル強度 ( スポット強度 ) として表した。各試料中の水平の黒いバーは、それぞれのカテゴリーの標本についての平均を表す。

#### 【 0 3 2 7 】

[0336] 上記のデータは、P T K 7 の過剰発現が結直腸癌中の T I C 及び / 又は T P C に関連していて、増殖及び / 又は生存に関与している可能性があるという上記実施例での

観測事実を裏付ける。a) PTK7 遺伝子発現が結直腸癌中の TPC 細胞亜集団と膵臓腫瘍中の TG 細胞亜集団に主に関連していること；b) その PTK7 タンパク質発現が TIC 細胞亜集団上でより高いこと；c) PTK7 タンパク質発現が後期結直腸癌由来の腫瘍標本全体で上昇していること；及び d) 全般的な観測事実は、後期腫瘍において TIC がより頻繁であるということを示す上述の実施例に照らせば、PTK7 は、腫瘍増殖、療法への抵抗性、及び腫瘍再発の根本原因であるそれらの細胞に関連しているように見えて、上記に言及した腫瘍の TPC 及び / 又は TIC を支援するのに PTK7 が不可欠な役割を担う可能性があるとする仮説を補強する。

#### 【0328】

[0337] 上記の結果を考慮して、ヒトの乳房 (BR)、肺 (LU)、卵巣 (OV)、結腸 (CR) 及び腎臓 (KDY) 腫瘍異種移植片の非腫瘍形成 (NTG) 及び癌幹細胞 (CSC) 集団内で、フローサイトメトリーを使用して、PTK7 の発現について評価した。実施例 1 に示されるように、表現型マーカーの CD46<sup>-</sup>/CD324<sup>-</sup> 及び CD46<sup>hi</sup>CD324<sup>+</sup> をそれぞれ使用して、NTG 集団と CSC 濃縮集団を同定し、モニターして、濃縮することができる。従って、免疫不全マウス由来のヒト腫瘍異種移植片を採取し、解離させて、市販の抗 CD46、抗 CD324、及び抗 PTK7 抗体 (Miltenyi Biotech) で同時染色した後で、CD46<sup>-</sup>/CD324<sup>-</sup> NTG 集団と CD46<sup>hi</sup>CD324<sup>+</sup> CSC 集団において、フローサイトメトリーを使用して PTK7 発現について評価した。より具体的には、BD FACScan<sup>TM</sup> II フローサイトメーター (BD Biosciences) で、アイソタイプ染色された蛍光マイナスワン (FMO) 対照を、染色特異性を確定するために利用して、標準技術を使用して、フローサイトメトリー分析を実施した。

#### 【0329】

[0338] 例示の乳房、肺、卵巣、結直腸、及び腎臓の腫瘍試料についての結果を図面 9 E に示し、ここでは、アイソタイプ対照を灰色部分で印し、NTG 細胞集団を破線によって表して、CSC 濃縮集団を実線によって示す。これら腫瘍のそれぞれの NTG 集団では表面 PTK7 染色が相対的に低かったのに対し、CSC 濃縮集団では表面 PTK7 染色が顕著に上昇していたことが理解されよう。上記の結果は、いくつかの開示モジュレーターを使用してこれまでに追認されてきて (データ示さず)、試験した 25 種より多い独自の NTX 系 (様々な固形腫瘍が含まれる) を代表している。

#### 【0330】

[0339] TPC の他の表面マーカーと PTK7 の発現パターンとの相関性について、NSCLC と卵巣癌における腫瘍形成試験において機能的にさらに明確化した。上記のように染色した、解離したヒト腫瘍異種移植片より、蛍光活性化細胞選別 (FACS) によって PTK7<sup>-</sup> 及び PTK7<sup>+</sup> 腫瘍集団を単離して、同数を Matrigel (BD Biosciences) と混合して、NOD/SCID レシピエントマウス中へ皮下移植した。PTK7<sup>-</sup> 細胞がレシピエントマウスにおいて腫瘍を産生し得なかった一方で、PTK7<sup>+</sup> 腫瘍細胞は、NSCLC と卵巣の両方の癌腫で、迅速に増殖する腫瘍を一貫して産生した。従って、本明細書の教示によれば、PTK7 は、卵巣癌と NSCLC において TPC を機能的に描写して、開示モジュレーターの診断剤及び診断・治療剤としての有用性についてのさらなる裏付けを提供する。

#### 【0331】

##### 実施例 12

選択された PTK7 モジュレーターは、K562 細胞と G401 細胞によって内在化される。

#### 【0332】

[0340] 上記の記載のようにマウスを免疫化することによって産生したハイブリドーマからの PTK7 モジュレーターについて、K562 細胞と G401 細胞に内在化するその能力をスクリーニングした。

#### 【0333】

【0341】 この点に関して言えば、 $10^6$  個/ml (単一細胞懸濁液) の出発濃度での K562 細胞を Human TruStain (BioLegend 社、422302) で、室温で 10 分間ブロックした。細胞を反応あたり  $50 \times 10^3$  個の細胞へ希釈した。同一 2 検体の試料を、最終容量  $50 \mu\text{l}$  の抗体上清で、氷上にて 30 分間染色してから、FACS 染色培地 (FSM; 2% 胎仔ウシ血清 / ハンクス緩衝化生理食塩水溶液 /  $25 \text{ mM}$  HEPES [pH 7.4] Mediatech 社) で洗浄して、非結合抗体を除去した。これに、ロバ抗マウス Alexa 647 (Life Technologies) での氷上で 30 分間の第二染色を続けた。次いで、細胞を再び洗浄して未結合抗体を除去して、試料を内在化培地 (2% 胎仔ウシ血清 / イスコブ (Iscove's) 改良ダルベッコ培地) に再懸濁させて、内在化を可能にするために、5%  $\text{CO}_2$  において 37 で (又は、対照では 4 で) 1 時間インキュベートした。試料を氷へ移して氷冷 FSM を加えることによって、この反応を止めた。内在化せずに細胞表面に残ったあらゆる抗体を除去するために、試料を低 pH のリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS [pH 2.0]) で、氷上で 10 分間処理した。この「酸ストリップ」手順に続いて、試料を FSM で十分洗浄し、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  の DAPI (Life Technology) を含有する  $150 \mu\text{l}$  の FSM に再懸濁させて、BD FACS Canto フローサイトメーターで分析した。本実験において氷上でインキュベートした細胞より検出されるものに優る、どの蛍光の増加も、[ 蛍光分子が低 pH リン酸緩衝液処理の間に細胞表面より剥がれ落ちることを護る ] 抗体内在化の能力より生じたものである。すべてのインキュベーションは、他に述べなければ、FACS 染色培地において実施した。

10

【0334】

20

【0342】 上記に記載の酸ストリッププロトコールを使用して、PTK7 抗体含有ハイブリドーマ上清の個別クローンについてスクリーニングするとき、いくつかの上清は、非染色細胞と IgG 陰性対照抗体に対して蛍光のポジティブシフトを示した (図面 10A 及び 10B)。いくつかの抗 PTK7 抗体では、Alexa 二次抗体を酸ストリッピングから護って、蛍光の右方へのシフトをもたらす、これら抗体の能力によって証明されるように、抗体内在化が観測された。抗体クローン、SC6.10.2 (即ち、図面 10C 中の H10) は、この活性のある抗 PTK7 抗体による典型的な内在化能力の例である。IgG 対照と比較すると、PTK7 抗体含有上清のほぼ 15% (27 のうち 4) が内在化を引き起こした。K562 細胞を使用すると、このデータは、PTK7 ECD へ結合することが可能な抗体の垂集合が細胞上に提示されるままの抗原へ結合して効率的に内在化することが可能であることを証明する。

30

【0335】

【0343】 開示モジュレーターが様々な例示の細胞株において内在化に媒介し得ることを示すさらなる証拠を図面 10D に示す。より具体的には、膠芽腫細胞株 (G401 ウィルムス腫瘍細胞) は、高レベルの PTK7 を発現することが見出され (データ示さず)、この細胞株が選択されたアッセイ条件の下でより感受性がある、それ故に、内在化を誘発することが可能なモジュレーターをより効果的に同定することが可能であり得ることを示唆した。これらの細胞を上述した酸ストリップ手順で概ね使用して、実施例 7 からの 170 の独自ハイブリドーマ上清についてスクリーニングして、それらが内在化抗体を含有するかどうかを判定した。上述のスクリーニングにおいて同定された精製抗体、SC6.2.35、SC6.10.2、及び SC6.25.3 (図面 10D において、H2.35、H10.2、及び H25.3 と表示される) を陽性対照として使用した (図面 10D)。6 種の例示の上清 (ウェル表記によって同定される) に存在するモジュレーターの内在化能力を対照の真下に示す。このより洗練されたアッセイを用いると、このデータは、上記に考察した免疫化手順によって提供される数多くのモジュレーターが、PTK7 へ結合して内在化することができることを示す (1A02、1F02、2A03、及び 2F10 によって裏付けられるように)。但し、どのクローン (2F11 と 2F09) も、この能力を保有したわけではない。

40

【0336】

【0344】 開示モジュレーターの特質に関するなおさらなる証明において、G401 細胞

50

へ結合したすべてのスクリーニングされた抗体は、有意な方法で、ある程度は内在化することが見出された（図面 10 E）。図面 10 E 中の破線によって表されるように、0 ~ 3 % の細胞の非特異的な染色を示すマウスアイソタイプ対照抗体に基づいて、陽性細胞染色を 4 % へ設定した。それぞれの抗体で染色した G 4 0 1 細胞の平均蛍光強度を酸ストリップ工程の後で（即ち、内在化の後で）37 と 4 で測定して、既知数の蛍光分子を含有する 8 色虹ビーズ（BD Spherotech # 559123）を使用して、細胞あたりの相対受容体数へ内挿した。内在化工程を 4 で行った試料より得られる受容体数（対照）を 37 でのそれより差し引くことによって、内在化受容体の数を計算した。内在化される受容体の数が細胞結合のレベルとは無関係に 10 倍も異なること（図面 10 E の右上象限）を考慮すると、PTK7 特異抗体は、内在化を誘発するその能力において不均質であることが注目された。

10

## 【0337】

## 実施例 13

PTK7 モジュレーターは、細胞傷害剤の送達を促進する

[0345] 抗体へ安定的に連結した細胞傷害薬の標的化は、固形腫瘍のある患者へ大きな治療利益を与える可能性がある、強化された抗体アプローチを代表する。上記に記載の内在化する PTK7 特異抗体が細胞傷害剤の生細胞への送達を媒介することができるかどうかを判定するために、リボソーム不活性化タンパク質、サポリン（Advanced Targeting Systems）へコンジュゲートしたストレプトアビジンをビオチニル化 PTK7 抗体へ結合させる *in vitro* 細胞殺傷アッセイを実施して、これらのサポリン複合体が内部化して細胞を殺傷する能力を、細胞生存度を測定することによって、72 時間後に測定した。

20

## 【0338】

[0346] 具体的には、ウェルあたり  $1 \times 10^4$  個の G 4 0 1 ウィルムス腫瘍細胞を 96 ウェルプレートのウェルに播いた。上記に記載の抗 PTK7 抗体の形態で PTK7 モジュレーターを上清より精製し、ビオチニル化してから、 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  へ希釈した。それぞれの抗体のアリコートにストレプトアビジン - ZAP（Advanced Targeting Systems）と 1 : 1 で混合し、5 秒間激しく振り混ぜてから、室温で 1 時間インキュベートした。次いで、抗体 - サポリン複合体の 3 つの異なる 10 倍系列希釈液を作製して、各混合物のそれぞれ  $50 \mu\text{L}$  を G 4 0 1 細胞含有ウェルへ加えた。次いで、この細胞 / 抗体 - サポリン混合物を 37 / 5 %  $\text{CO}_2$  で 24 時間インキュベートした。このインキュベーションに続いて、細胞を丸底 96 ウェルプレートにおいてスピンドウンさせ、上清を除去して、 $100 \mu\text{L}$  の新鮮な培養基を各ウェルへ加えた。次いで、この細胞をさらに 72 時間インキュベートした後で、CellTiter-Glo（プロメガ社）を製造業者のプロトコールに従って使用して、生存細胞数を計数した。

30

## 【0339】

[0347] 上記に記載の細胞殺傷アッセイを使用して、クローン：SC6.2.35、SC6.10.2、及び SC6.25.3（図面 11 A において、H2.35、H10.2、及び H25.3 と表示される）由来の抗体を含んでなる例示の内在化 PTK7 モジュレーターがサポリン毒素内在化と細胞殺傷とを媒介することが示された。より特別には、図面 11 A は、非特異的なアイソタイプ対照抗体（即ち、MOPC）とは対照的に、PTK7 媒介内在化による細胞殺傷をもたらす上記モジュレーターの能力を明らかに証明する。このようなデータは、開示モジュレーターが PTK に免疫特異的であって、細胞傷害性ペイロードの送達を媒介して細胞表面会合を介して PTK7 陽性細胞を殺傷することが効果的に可能であることを証明する。

40

## 【0340】

[0348] 上述した殺傷アッセイの延長において、PTK7 特異抗体を介した細胞傷害性ペイロードの送達を、さらに 4 種の例示モジュレーター（SC6.23、SC6.41、SC6.51、及び SC6.58）を使用して（陽性対照として SC6.10.2 を使用する）証明した。このために、以下の細胞種を、抗体と毒素の添加の 1 日前に、それぞれの培養基中の 96 ウェル組織培養プレートへ播いた（500 細胞 / ウェル）：G 4 0

50

1 ウィルムス腫瘍細胞、レトロウイルス形質導入を使用してその細胞表面にPTK7分子を発現するように工学処理したHEK293T（ここでは、293.PTK7細胞として表示する）、及び対照として機能するHEK293T。

【0341】

[0349] このアッセイのために、プレート培養細胞を含有するウェルへ精製済みのPTK7モジュレーターを様々な濃度で加えた。モジュレーターの添加に続いて、サポリン（Fab-ZAP, Advanced Targeting Systems, #IT-48）へ共有結合した一定量の抗マウスIgG Fab断片を4nMの濃度でこのウェルへ加えて、この培養物を72時間インキュベートした。生存細胞数を、CellTiter-Gloを使用して、上記に記載のように定量した。サポリン-Fab断片とともに細胞を含有する培養物（但し、モジュレーター無し）を使用する未処理（raw）発光カウントを100%基準値として設定して、他のすべてのカウントをそれに従って計算した（「正規化RLU」として言及する）。

10

【0342】

[0350] このアッセイを使用して、（アイソタイプ対照抗体以外の）試験したすべてのPTK7抗体が標的細胞を殺傷することが可能であることを証明した（図面11B~11D）[ここで図面11B、11C、及び11Dは、それぞれG401細胞、293.PTK7細胞、及びHEK293T細胞に対するモジュレーターの影響を例解する]。モジュレーター媒介性の内在化及び殺傷は、細胞種（図面11B-G401細胞と11D-HEK293T細胞を比較すること）、PTK7の標的細胞上での発現レベル（図面11C-293.PTK7細胞と11D-HEK293T細胞を比較すること）、及び様々なモジュレーターの内在化する固有能力に依存することが理解されよう。本アッセイは、内在化が主としてPTK7特異抗体の細胞表面への結合により、追加の架橋形成の必要なく生じることさらに証明する。図面11B~11Dの用量応答曲線を作成するために使用するデータ（並びに、追加のモジュレーターについて同様に導いた数値-示さず）に基づいて、試験したモジュレーター/標的細胞の組合せそれぞれについて、50%有効濃度（「EC50」）を決定した。より具体的には、すぐ下の表5は、すぐ上記に記載のアッセイを使用して3種の標的細胞のそれぞれについて決定した13種のモジュレーターのEC50を（pMで）収載する。NDは、数値を決定しなかったことを示す。

20

【0343】

【表6】

30

表5

PTK7モジュレーター媒介性の細胞傷害剤の送達

モジュレーター	G401 細胞	293. PTK7 細胞	HEK293T 細胞
IgG2b 対照	殺傷無し	殺傷無し	殺傷無し
SC6. 2. 35	1. 1	0. 65	0. 45
SC6. 10. 2	4. 7	1. 1	156
SC6. 25. 1	223	10. 9	97. 6
SC6. 8	2. 8	3. 5	ND
SC6. 21	~200	30. 6	ND
SC6. 23	2. 6	1. 1	3. 0
SC6. 24	6. 7	2. 3	11. 0
SC6. 30	314	19. 7	ND
SC6. 41	2. 6	2. 3	5. 7
SC6. 51	105	12. 6	8100
SC6. 53	4. 5	1. 9	14. 2
SC6. 55	8. 8	4. 2	ND
SC6. 58	35. 1	10. 4	86. 8

40

【0344】

50

【0351】 個々のモジュレーターの間では、殺傷に関してのいくらかの変動が注目されたが、表5のデータより明白であるいくつかの全般的な傾向があった。この点に関連すると、当該モジュレーターは、G401細胞又は野性型293細胞のいずれかより、工学処理されたPTK過剰発現293細胞の細胞殺傷を仲介することにおいて、全般により有効であった。興味深いことに、試験したモジュレーターの多くは、PTK7を細胞表面で発現することが知られている非工学処理G401腫瘍細胞の殺傷に媒介することに比較的有効であった。このような再現可能な結果は、本明細書に例示した広範囲の内在化するPTK7モジュレーターの治療ポテンシャルに関して示唆的である。

【0345】

実施例14

PTK7モジュレーターは、細胞傷害剤の腫瘍形成細胞への送達を促進する

【0352】 先の実施例の結果を確認して、PTK7モジュレーターが毒素内在化と原発性ヒト腫瘍細胞の細胞殺傷に媒介し得ることを証明するために、マウスの系統枯渇 (lineage-depleted) NTX細胞 (即ち、免疫不全マウス中の低継代異種移植片として増殖させたヒト腫瘍細胞) をプレート培養して、その後、抗PTK7抗体とFab-ZAPへ曝露した。

【0346】

【0353】 具体的には、肺 (LU)、卵巣 (OV) 癌、及びメラノーマ (SK) 患者由来のNTX腫瘍を単一細胞懸濁液へ解離させて、癌幹細胞増殖に有利である、当該技術分野で認められた技術を使用する、増殖因子補充無血清培地において、Primary<sup>TM</sup>プレート (BD Biosciences) に播いた。37 / 5% CO<sub>2</sub> / 5% O<sub>2</sub> で3~5日の培養後、上記細胞を、先の実施例において概ね示したように、アイソタイプ対照 (IgG2a) 抗体又は3種のマウス抗PTK7抗体 (0.1 nMでのSC6.2.35、SC6.10.2、又はSC6.25.1; SC6.H2、SC6.H10、及びSC6.H25と標示) の1つ、及びFab-ZAP (40 nMで) と接触させた。次いで、モジュレーター媒介性サボリン細胞傷害性について、CellTiter Glo を製造業者の説明書に従って5~7日後に使用して残存細胞数を定量することによって評価した。この結果は、未処置細胞へ正規化した。

【0347】

【0354】 図面12に見られるように、試験したモジュレーター (但し、アイソタイプ対照を除く) のそれぞれへの曝露は、すべての腫瘍型で生細胞数の低下をもたらした。この点に関連して言えば、細胞殺傷の量は、一見して、特定の腫瘍細胞株と、並びに特別なモジュレーターに依存していると理解されよう。上記のデータは、本発明のモジュレーターが、様々な腫瘍型由来の様々な抗原発現細胞と免疫特異的に会合し、内在化して、それによって構成細胞の殺傷に媒介することができることを示す。さらに、先に記載のような癌幹細胞増殖に有利である条件の下で培養したNTX腫瘍細胞株に関してそれをなし得る、開示モジュレーターの能力は、癌幹細胞を選択的に消失させるそれらの能力を強く示唆している。

【0348】

実施例15

PTK7モジュレーターは、癌幹細胞の腫瘍形成性を低下させる

【0355】 癌幹細胞の頻度を低下させてそれらの腫瘍形成ポテンシャルに影響を及ぼす、開示モジュレーターの能力をさらに確かめるために、NTX乳房腫瘍細胞をSC6.2.35で処理して、その後、免疫不全マウスへ移植した。

【0349】

【0356】 この点に関して言えば、2種の乳癌患者由来NTX腫瘍 (BR13及びBR64) を解離させて、このヒト腫瘍細胞を、腫瘍形成細胞を維持することが当該技術分野で知られている条件の下で培養して、先の実施例において示したように、PTK7モジュレーター (とアイソタイプ対照) 及びFab-ZAPで処理した。次いで、細胞生存度に関して、処理の14日後に CellTiter Glo を製造業者の説明書に従って使用して、細胞傷

10

20

30

40

50

害性を測定した。再び、この結果は、未処置細胞へ正規化した。

【0350】

[0357] 図面13A及び13Bにそれぞれ見られるように、BR13(図面13A)とBR64(図面13B)に由来する乳房腫瘍細胞は、PTK7モジュレーター媒介性の免疫特異的な会合とサポリン細胞傷害剤の内在化を介してほぼ消失した。より具体的には、IgG2a対照処理細胞がほとんど影響されなかったのに対して、PTK7モジュレーター、C6.2.35(SC6.H2)の0.2nMでの処理は、該細胞のほぼ70~80%の消失をもたらした。この知見は、実施例13で見られた結果と一致していて、多様な腫瘍に由来する腫瘍永続化細胞を消失させる、開示モジュレーターの能力に基づいた、本発明の広い応用可能性をさらに証明する。

10

【0351】

[0358] 開示モジュレーターが腫瘍始原細胞を消失させることを確かめるために、2種の乳癌細胞株からの処理済み調製物をマウスへ移植して、腫瘍始原細胞が生きたままでいるかどうかを判定した。より具体的には、同一3検体のウエルからの細胞をそれぞれ独立的に採取し、2%BSA含有PBSにおいて洗浄し、100µlに再懸濁させてから、実施例1に示した手順を概ね使用して、個々の免疫不全マウスへ移植した。マウスについて腫瘍増殖を毎週モニターして、生じる腫瘍を測定して、その体積を計算した。IgG対照で処理されたNTXBR13及びBR64細胞が移植されたマウスだけが腫瘍を発現したのに対して、PTK7モジュレーターと接触させた細胞を移植したものは、腫瘍を発現しなかった。これらの結果は、毒素送達に媒介することができるPTK7モジュレーターによってTICが消失されることを証明する(図面13C)。

20

【0352】

[0359] 上記データの検討は、いずれかの乳癌細胞株のPTK7モジュレーター及びサポリンでの処理後に残っている生細胞を移植しても腫瘍の形成を生じないことを示す。逆に、両方の乳癌細胞株由来の対照細胞(即ち、アイソタイプ対照抗体で処理したものは、移植時に腫瘍増殖を再始動させることができた。特に、それぞれの対照細胞株(BR22及びBR64)が移植された3匹のマウスのうち2匹は、適度の腫瘍を発現して、移植された細胞に腫瘍永続化細胞が含まれることを示した。より重要にも、モジュレーター処理済み細胞が腫瘍を形成し得ないことより、移植された細胞に腫瘍永続化細胞が含まれなかったことが強く推量される。即ち、PTK7モジュレーター/サポリンの組合せでの処理は、本発明による腫瘍永続化細胞に選択的に標的指向して、これを消失させた可能性がある。いずれにしても、上記データは、開示モジュレーターでの処理が腫瘍細胞の腫瘍形成ポテンシャルを低下させるのに有効であることを証明する。

30

【0353】

実施例16

ヒト化PTK7モジュレーターは、細胞傷害剤の送達を媒介する

[0360] 本発明の好ましい態様では、治療現場においてヒト化PTK7モジュレーターが利用される可能性があるので、ヒト化抗PTK7抗体(実施例8に示すように作製する)が細胞傷害剤の送達を介した細胞殺傷の有効なメディエーターとして機能することを証明する研究を実施した。

40

【0354】

[0361] より特別には、3種の例示ヒト化PTK7モジュレーター(hSC6.23、hSC6.58、及びhSC6.24)を利用して、本明細書の教示に従って、細胞傷害性ペイロードの導入に媒介して腫瘍形成細胞を消失させた。上記の実施例13に示したプロトコルを概ね使用して、PTK7を発現するように工学処理したHEK293細胞(即ち、293.PTK7細胞)を、様々な濃度の選択モジュレーターと抗ヒトFab(Fab-ZAPヒト、Advanced Targeting Systems)へ連結したサポリンへ曝露した。インキュベーションに続いて、この細胞を洗浄してから、モジュレーター媒介性サポリン細胞傷害性について、CellTiter Gloを製造業者の説明書に従って5~7日後に使用して残存細胞数を定量することによって評価した。この結果を未処置細胞へ正規化して、図面14

50

にグラフ表示する。

【0355】

[0362] 図面14に示す曲線の検証は、試験したPTK7モジュレーターの全3種が、細胞生存度を低下させる細胞傷害性ペイロードの内在化を誘発するのにきわめて有効であったことを示す。この点に関して言えば、このモジュレーターのそれぞれは、細胞生存度の50%低下を1pMと10pMの間の濃度で、そして細胞生存度の80%より多い低下を100pMの濃度でもたらした。再び、本開示によれば、上記のデータは、選択される細胞集団への細胞傷害剤の送達を免疫特異的に媒介することができる、きわめて有効なモジュレーターのことを示唆する。

【0356】

[0363] 当業者は、本発明が、その精神又は主要属性より逸脱することなく他の特定の形態で具現化し得ることをさらに理解されよう。上記の本発明の記載は、その例示態様だけを開示したのであって、他の変更態様も本発明の範囲内にあると考慮されると理解されたい。従って、本発明は、本明細書において詳しく記載した特別な態様に限定されない。むしろ、本発明の範囲及び内容を示すものとしては、付帯の特許請求項を参照にすべきである。

【図1-1】

FIG. 1A

>gi|27886610|ref|NM\_002821.3| ホモ・サビエンス PTK7 プロテインチロシンキナーゼ7 (PTK7), 転写物変異体 PTK7-1, mRNA

(配列番号1)

GCGGCGCGGGGACTCGGAGTACTGGGCGCGGGGCTCCGGCTGGGACGCTCGGACGCTCGGACGCTCGG  
GTGGGCTCGGGCTGGGCTGCTGCTGGGCGCGGGGCTCCGGTGGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGG  
GGAGCGAGTCTGCGCGCGCGGCTGGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGG  
CGGGATCCCGCGGACCGCGCGGCTGGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGGCTCGG  
CCAGACAGCCATTGCTTCATCAAGCAGCGCTCCGCCAGGATGCACTGCGAGGGGCGCGGGGCTGCT  
TCGCTGTAGGTTGAGCTCCGGGCGCGGTACATGTGTACTGGCTGCTGATGGGCGCGCTGTCCAGGAC  
ACGGAGCGCGGCTTCGCGCGAGGGCAGCAGCTGAGCTTTGCAAGCTGGGACCGGCTGCAGGACTCGGCA  
CCTTCAGTGTGGCTCGGGATGATGTCACCTGGGAGAGAGCCCGCAGTCCCAACGCTCCTTCAACAT  
CAATGGATTGAGGAGGCTCGTGGTCTGAAGCATCCAGCTCGGAAGCTGAGATCCAGCCAGACAGC  
CAGGTCACACTTCGTTGCCACATGATGGGCACCTCGGCCCACTACCAATGTTCCGAGATGGGACCC  
CCCTTCGATGTTGAGCAACACACAGTCCAGCAGCAAGGAGCGGCACTGACGCTCCGCGCGAGCTGG  
TCCTGAGCATAGTGGGCTGTAFTTCGCTGCGGCCACAGTCTTTGGCCAGGCTTGCAGCAGCAGAAC  
FTCACTTGAAGCATGCTGATGAAAGCTTTCAGAGGTTGGTCTGCGCACCCAGGAGCTGGTAGTAGCA  
GGTATGAGGAGGCGCATGTTCCATTGCCAGTTCCTCAGCCAGCCACCCCGGAGCTGCACTGGCTTTGA  
GGATGAGACTCCCATCACTAACCGCAGTGGCGCCCGCACACTCCGAGAGCCACAGTGTTCGCAACGGG  
TCTCTGCTGTGACCCAGTTCGCGCCAGCAATGAGGAGTACTCCGCTGCAATGGCCAGGGGAGAGGG  
GCCACCCATCCTCGAAGCCACACTTCACCTAGCAGAGATTGAAGCATGCGCTATTGGAGCCAGC  
GGTGTTCACAGCTGGCAGCGAGGAGGCTGTGACCTGCCCTCCCGCCAGGGTGTGCGCAGAGCCAGCGTG  
TGGTGGGACAGCGGGAGTCCGGCTCGCCACCCATGGCAGGCTCACCAGAGGGCCACAGCTGGTGT  
TGGCCAATATTGCTGAAAGTGTGCTGGTGTCTACACTGCCACCGGCCAACCTGGCTGGTCAAGCGGAG  
ACAGGATGTCAACATCACTGTGGCCACTGTGGCTCCTGGCTGAAGAGCCCAACAGACAGCAGCTGGAG  
GAGGCAACCCGGTACTTGGATTGCTGACCCAGGCCACACCAAAACCTACAGTGTCTGTGTCAGAA  
ACCAGATGCTCATCTCAGAGGACTCACGTTGAGGTTTCAAGAAATGGGACCTTGGCCATCAACAGCGT  
GGAGGTGATGATGGGACATGCTACCGTGTGATGAGCAGCACCAGCCCGGCGAGCAGTCCGAGCGCAAGCC  
CGTGGCAAGTCTGGAAAGCTCAAGTCCACACCCACCCAGCCAGCCAGCAGTGGAGTGTGGAGTTTGA  
AGGAGCCAGGTCGCTGTGACCCAGCGGAGAGAGCCCATATTAAAGTGGGAGCGGCGAGATGG  
GAGCAGCTCCAGAGTGGGTGAGCAGCAACGCTGGGACCTGCATTTGGCGGGTGACTGGAGATGAC  
CTGGCACTACACTTGCATTGCTCCCAACGGGCGGAGGGCCAGATTGCTGCCATGTCCAGCTCACTG  
TGGCAGTTTTTATCACCTTCAAAGTGAAGCAGAGGCTGACAGCTGTGTACCAGGGCCACACAGCCCTACT  
GCAAGTGGAGCCAGGGGAGCCCAAGCGCTGATTCAGTGGAAAGGCAAGGACCCATCTGGAACCC  
ACCAAGTGGGACCCAGGATGCACATCTCCAGAAATGGCTCCCTGGTATCATGAGTGGGCGCGCTGAGG  
ACTCAGGCGCCATCACCTGCATTGACAGGCAACAGCTGCAACATCAAGCACACAGGAGGCGCCCTCATGG  
CGTGGCAAGCTGTGCCAGGAGGCTGGAGGGCCCTGGCAGCCCTCCCGCCCAAGATGATCCAGAC

【図1-2】

FIG. 1A (CONT.)

(配列番号1) 続き

ATTGGGTTGTCGGTGGTGGCGCTGGCCCTACATCATTGGCGTGTGGGCTCATGTTCTACTGCAAGA  
AGCGCTGCAAGCCAGCGGCTGCAGAGCAGCCCGAGGGCGAGGAGCCAGAGATGGAATGCCCAACGG  
TGGGCTTTGCAAGACGGCAGCCCTCAGCAGATGCCAAGAAAGTGGGCTTGAACAGCTTGGGCTCC  
GGCCCGCGGCCCAACAAACGCCACAGCACAAGTGAATGCACTTCCACGGTCTAGCTGCAGC  
CCATCACAGCTGGGGAAGAGTGAAGTTGGGAGGTTTCCTGGCAAGGCTCAGGGCTTGGAGGAGG  
AGTGGCAGAGACCTGGTACTTGTGAAGAGCTGCAGAGCAAGGATGAGCAGCAGCAGCTGGACTCCGG  
AGGAGTTGGAGATGTTGGGAAGTGAACACGCCAACCTGGTGGGCTCCCTGGGCTGTGCCGGGAGG  
CTGAGCCCACTACATGGTGTGGAATATGTTGATCTGGGAGCTCAAGCAGTTCCTGAGGATTTCCAA  
GAGCAAGGATGAAAATGAAGTACAGCCCTCAGCACCAGCAGAAAGTGGCCATGACCCAGGTA  
GCCCTGGGATGGAGCACCTGCCAACAACCCCTTTGGCAAAAGGACTTGGCTGCCGTAACCTGCCCTG  
TCAGTCCAGAGACAAGTGAAGTGTCTGCCCTGGCCCTCAGCAAGGATGTTACACAGTGAAGTACTA  
CCACTCCGCGAGGCTGGGTCGCCCTGGCTGGATGTCGCCCGAGCCATCTGGAGGGTGACTTCTCT  
ACCAAGTCTGATGCTGGGCTTCGGTGTGCTGATGTTGGAAAGTGTTCACATGAGGAGATGCCCGAT  
GTGGCAGGCAAGTATGAAGTACTGGCAGATTTCAGGCTGGGAAGCTAGACTTCTCAGCCAGCGAGG  
CTGCCCTTCCAAACTTATCGGCTGATGAGGCTGTGGGCGCTCAGCCCAAGGACCGGCTCCCTC  
AGTGAAGTGGCAGGCGCTGGGAGCAGCAGCTGGCAGCAGCCGCTGAGGGAGGCGCGCTCAGGA  
TGGCTGGGAGGGGAGGACATCTTAGAGGGAAGCTCACAGCATGATGGGGAAGTCCCTGCTCCTCTG  
GGCCCTGAGGCGCCCTGCCCTAGTCAACAGGCTTGTGAGGCTGAGCAGGCGCTGGCCTTTCCTCCTC  
TTCCTCAGCCCTATCCTTTGGGAGGCTGACTGGACCAACTGGGCGACTAGGCTTTGAGCTGGGAG  
TTTTCTCCCTCAGCCCTTCTCTATCAGGAGCAGTGTGGTGGCAGAGTAACCCCAATTTCTGGCCTC  
AACTTCTCCCTTGACCGGGTCCAACCTGCGCCATCTGCCCACTTTCCTGGGAGGGCTAGGCTG  
GGATGAGCTGGGTTTGTGGGAGTTCCTAATATCTCAAGTCTGGGACACAGGGTAAATGAGTCTCT  
TGGCCACTGGTCCACTTGGGGTCTGAGCCAGGATATAGAGGACACAGCAAGTGAATCCTCCCACT  
CTGGGCTGTGCACACTGACCCAGACCCAGCTTCCCAACCTTCTCTCTTCTCATCTCAAGTGGC  
TGGCAGATGAAGGAGTTTCAGGAGCTTTGACACTATATAAACCGCCCTTTTTGTATGCCACCCGGGG  
GCTTTTATGTAATTCAGCGTGGGGTGGTGGGATGGGAGTAGGGGTTGGGCTGGAGATGAGGAG  
GGTGGGCACTCTTACCCACACTTTTATGTTGCTGTTTTTGTGTTTTTGTGTTTTTGTGTTTTTGT  
TGTGTTTTTCACTCGCTCTCAATAAATAGCCCTTTTTCACACTG



【 図 3 】

結直腸TPC及び膵臓TPCにおけるPTK7過剰発現を Taqman PCRにより確認する

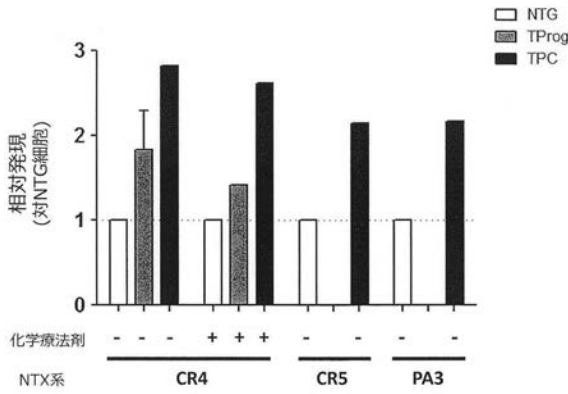


FIG. 3

【 図 4 】

異なる病期での結直腸腫瘍標本における 上昇したPTK7過剰発現をTaqman PCRにより確認する

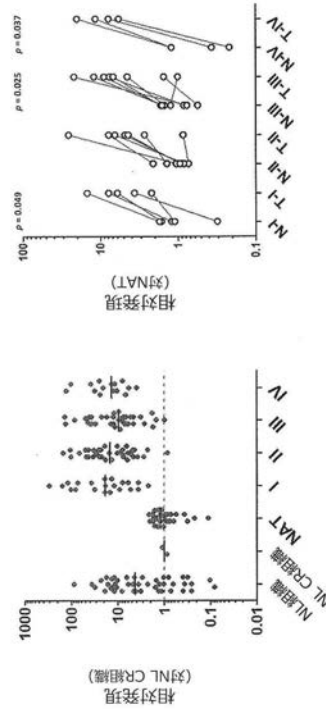


FIG. 4B

FIG. 4A

【 図 5 】

副腎、結直腸、子宮内膜、食道、肝臓、及び膀胱の癌における PTK7過剰発現をTaqman PCRにより証明する

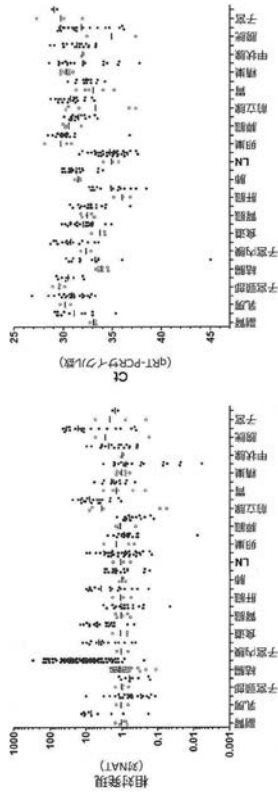


FIG. 5A

FIG. 5B

【 図 6 - 1 】

例示のマウス及びヒトPTK7モジュレーター-軽鎖可変領域のタンパク質配列

マウス軽鎖可変領域		ヒト軽鎖可変領域	
マウス	ヒト	マウス	ヒト
MSL.3	MSL.3	MSL.3	MSL.3
MSL.3.1	MSL.3.1	MSL.3.1	MSL.3.1
MSL.4	MSL.4	MSL.4	MSL.4
MSL.5	MSL.5	MSL.5	MSL.5
MSL.6	MSL.6	MSL.6	MSL.6
MSL.7	MSL.7	MSL.7	MSL.7
MSL.8	MSL.8	MSL.8	MSL.8
MSL.9	MSL.9	MSL.9	MSL.9
MSL.10	MSL.10	MSL.10	MSL.10
MSL.11	MSL.11	MSL.11	MSL.11
MSL.12	MSL.12	MSL.12	MSL.12
MSL.13	MSL.13	MSL.13	MSL.13
MSL.14	MSL.14	MSL.14	MSL.14
MSL.15	MSL.15	MSL.15	MSL.15
MSL.16	MSL.16	MSL.16	MSL.16
MSL.17	MSL.17	MSL.17	MSL.17
MSL.18	MSL.18	MSL.18	MSL.18
MSL.19	MSL.19	MSL.19	MSL.19
MSL.20	MSL.20	MSL.20	MSL.20
MSL.21	MSL.21	MSL.21	MSL.21
MSL.22	MSL.22	MSL.22	MSL.22
MSL.23	MSL.23	MSL.23	MSL.23
MSL.24	MSL.24	MSL.24	MSL.24
MSL.25	MSL.25	MSL.25	MSL.25
MSL.26	MSL.26	MSL.26	MSL.26
MSL.27	MSL.27	MSL.27	MSL.27
MSL.28	MSL.28	MSL.28	MSL.28
MSL.29	MSL.29	MSL.29	MSL.29
MSL.30	MSL.30	MSL.30	MSL.30
MSL.31	MSL.31	MSL.31	MSL.31
MSL.32	MSL.32	MSL.32	MSL.32
MSL.33	MSL.33	MSL.33	MSL.33
MSL.34	MSL.34	MSL.34	MSL.34
MSL.35	MSL.35	MSL.35	MSL.35
MSL.36	MSL.36	MSL.36	MSL.36
MSL.37	MSL.37	MSL.37	MSL.37
MSL.38	MSL.38	MSL.38	MSL.38
MSL.39	MSL.39	MSL.39	MSL.39
MSL.40	MSL.40	MSL.40	MSL.40
MSL.41	MSL.41	MSL.41	MSL.41
MSL.42	MSL.42	MSL.42	MSL.42
MSL.43	MSL.43	MSL.43	MSL.43
MSL.44	MSL.44	MSL.44	MSL.44
MSL.45	MSL.45	MSL.45	MSL.45
MSL.46	MSL.46	MSL.46	MSL.46
MSL.47	MSL.47	MSL.47	MSL.47
MSL.48	MSL.48	MSL.48	MSL.48
MSL.49	MSL.49	MSL.49	MSL.49
MSL.50	MSL.50	MSL.50	MSL.50
MSL.51	MSL.51	MSL.51	MSL.51
MSL.52	MSL.52	MSL.52	MSL.52
MSL.53	MSL.53	MSL.53	MSL.53
MSL.54	MSL.54	MSL.54	MSL.54
MSL.55	MSL.55	MSL.55	MSL.55
MSL.56	MSL.56	MSL.56	MSL.56
MSL.57	MSL.57	MSL.57	MSL.57
MSL.58	MSL.58	MSL.58	MSL.58
MSL.59	MSL.59	MSL.59	MSL.59
MSL.60	MSL.60	MSL.60	MSL.60

FIG. 6A

例示のマウス及びヒトPTK7モジュレーター-重鎖可変領域のタンパク質配列

【 図 6 - 2 】

マウス重鎖可変領域										
残基番号	FEI	CEM1	FE2	FE3	CEM3	残基番号	FEI	FE2	FE3	CEM3
204.2.35	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	21	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.36	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	22	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.37	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	23	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.38	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	24	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.39	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	25	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.40	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	26	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.41	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	27	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.42	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	28	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.43	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	29	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.44	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	30	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.45	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	31	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.46	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	32	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.47	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	33	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.48	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	34	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.49	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	35	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.50	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	36	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.51	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	37	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.52	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	38	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.53	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	39	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.54	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	40	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.55	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	41	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.56	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	42	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.57	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	43	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.58	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	44	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
204.2.59	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	45	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV

ヒト重鎖可変領域										
残基番号	FEI	CEM1	FE2	FE3	CEM3	残基番号	FEI	FE2	FE3	CEM3
404.2.35	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	41	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.36	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	42	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.37	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	43	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.38	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	44	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.39	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	45	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.40	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	46	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.41	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	47	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.42	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	48	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.43	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	49	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.44	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	50	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.45	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	51	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.46	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	52	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.47	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	53	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.48	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	54	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.49	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	55	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.50	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	56	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.51	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	57	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.52	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	58	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.53	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	59	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV
404.2.54	QVQVGGGALVQVAVLCAV	QVTFYVW	EVVAVGQVPHQVAVV	LVNDEK	EVVAVGQVPHQVAVV	60	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV	AVVAVGQVPHQVAVV

FIG. 6B

【 図 7 - 2 】

クローン	ピン	親和性(nM)	ウエスタン反応性	カニクイザルXR	マウスXR
SC6.2.35	B	<0.1 <sup>B</sup>	NR	有り	無し
SC6.10.2	A	5.6 <sup>B</sup>	ND	有り	無し
SC6.25.1	C	21 <sup>B</sup>	NR	有り	有り
SC6.18	D	2 <sup>F</sup>	ND	有り	有り
SC6.21	E	<0.1 <sup>F</sup>	ND	有り	有り
SC6.23	F	2.3 <sup>B</sup>	ND	有り	有り
SC6.24	A	0.6 <sup>B</sup>	ND	有り	有り
SC6.30	A	<0.1 <sup>F</sup>	ND	有り	無し
SC6.41	H	1.0 <sup>B</sup>	ND	有り	有り
SC6.55	A	2 <sup>F</sup>	ND	有り	有り
SC6.57	ND	0.2 <sup>F</sup>	ND	有り	有り
SC6.58	B	0.5 <sup>B</sup>	ND	有り	有り

FIG. 7B

B - Biacore  
F - ForteBio

【 図 7 - 3 】

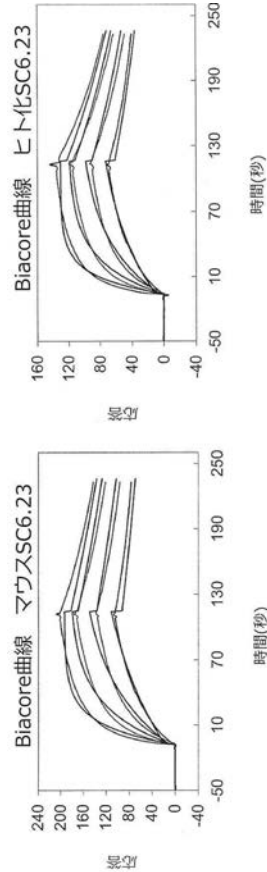


FIG. 7D

FIG. 7C

クローン	ピン	Hu Ag親和性 (マウスmAb)	Hu Ag親和性 (ヒトmAb)
SC6.23	F	2.3 nM	3.9 nM
SC6.24	A	0.6 nM	1.2 nM
SC6.41	H	1.0 nM	2.1 nM
SC6.58	B	0.5 nM	1.0 nM

FIG. 7E

【 図 7 - 1 】

選択したPTK7モジュレーター-のピンニング及び交差反応性分析

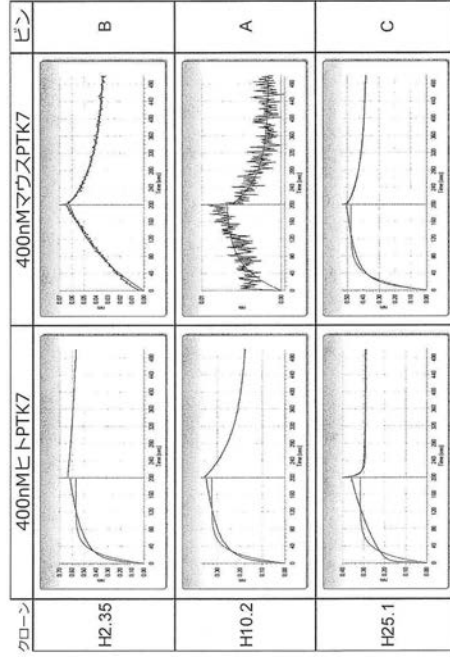


FIG. 7A

【 図 8 - 1 】

pEE12.4\_ScRx6\_2IgGs::IgG2Fc (Igドメイン1&2)の翻訳

(配列番号 70)

```

1 AIVFIKQPSQ QDALQRRAL LRCEVEAPG VHVYWLDDA PVQDTERREA
51 QGSSLSFAAV DRLQDSGTFC CVARDDVTGE EARSANASFN IKWIEAGPVV
101 LKHPASEAEI QPOTQVTLRC HIDGHPRPTV QWFRDGTPLS DGQSNHTVSS
151 KERNTLRLPA GPEHSGLYSC CAHSAFQAC SSQNFNTLSIA DESFARVLLA
201 PQDVVVARYE EAMFHCQFSA QPPPSLQWL EDETFITNRS RPHLRARAT
251 FANGSLLLTQ VRPRNAGIYR CIGQGQRPPI ILEATLALA EIEDMPLFE
301 RVFTAGSEER VTCLPKGLP EPSVWHEHAG VRLPTHGRVY QKGHELVLAN
351 IAESDAGVYT CHAANLAGQR RQDQNVITAT VPSMLKPKQD SGLSEGKPYI
401 LDCLTQATK FTWVYRWQM LISEDSEFV FKNGFLRMS VEYDGTWIR
451 CMSSTPAGSI EAQARVQVLE KLKFTPPQP HPVRSVECPG PAPPVAGPS
501 VFLFPPKPDQ TLMISRTPEV TCVVVDSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNATK
551 KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDNLNGKEY CKVSNKGLP APIERTISKT
601 KGQPREQVYI TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV ESNNGOPEN
651 NYKTFPMLD SDGSFFLYSKL LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK
701 SLSLSPGK

```

FIG. 8A

【 図 8 - 2 】

pEE12.4\_ScRx6\_IgG6&7\_IgG2Fc (Igドメイン6&7)の翻訳

(配列番号 7)

```

1 KFTPPPOPOQ CMEFDKEATV PCSATGREPK TIKWERADGS SLPFWTNDNA
51 GTLHFARVTR DDAGNYTCIA SNGPQGQIRA HVQLTVAVFI TKVEPERTT
101 VYQGHATLALQ CEAQGDPKPL IQWKGKDRIL DPTKLGPRMH IFQNGSLVIH
151 DVAPEDSDGRY TCIAGNSCNI KHTEAPLVVY DKPVEESEEG PGSPPYPMI
201 QHPVRSVECP PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK DTLMSRTPE VTCVVVDSH
251 EDPEVQFNWY VDGVEVHNATK TKFREQFNIS FRVSVLTVV HQDNLNGRE
301 YKCVSNKGL PAPIERTISK TKGQPREQV YTLPPSREEM TRWQVSLTCL
351 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTFPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
401 QGNVFCVSMV HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

FIG. 8D

pEE12.4\_ScRx6\_IgG3~7\_IgG2Fc (Igドメイン3~7)の翻訳

(配列番号 71)

```

1 APQDVVARYE EAMFHCQFSA QPPPSLQWL FEDETFITNR SRPHLRARAT
51 VFANGSLLLT QVRFNAGIY RCIGQGQRPPI ILEATLALA EIEDMPLFE
101 PRVFTAGSEER VTCLPKGLP EPSVWHEHAG VRLPTHGRVY QKGHELVLAN
151 NIAESDAGVY TCHANLAGQR RQDQNVITAT VPSMLKPKQD SGLSEGKPYI
201 YLDCLTQATP KFTVYRWQM LISEDSEFV FKNGFLRMS VEYDGTWIR
251 RCMSSTPAGS IEAQRVQVLE KLKFTPPQP HPVRSVECPG PAPPVAGPS
301 EKPTIKWERA DGSLSPEWVT DNAGTLFARF VTRDDAGNYT CIASNGPQQQ
351 IRAHVOLTVA VEITFKVEPE RTVVQGHATA LLQCEAQQDP KFLIQWKGKD
401 RILDPTKLPQ RMHIFQNSL VHDVAPEDS GRPTCIAGNS CNIKHTEAPL
451 VVVDKVPBEE SEGPGSPPIY KTIQHPVRSV ECPKPAIPI AGPSVFLFPP
501 KFKDTLMSIR TEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYDQVEVH NAKTKPREEQ
551 FNSTFRVSVV LTVVHQDMLN GKEYCKVSN KGLPAPIEKT ISKTGQPRE
601 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCVVDSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNATK
651 PMLDSDGSFF LYSLKTLVDS RWQQNVFSCV SVMHEALHNH YTKSLSLSP
701 GK*

```

FIG. 8B

pEE12.4\_ScRx6\_IgG2&3\_IgG2Fc (Igドメイン2&3)の翻訳

(配列番号 7)

```

1 EARSANASFN NIKWIEAGPV VLKHPASEAE IQPOTQVTLR CHIDGHPRPT
51 YQWFRDGTPL SDGQSNHTVS SKERNLTLRP AGPEHSGLYS CCAHSAFQAC
101 CSSQNFNTLSI ADESARVVLV APQDVVARYE EAMFHCQFSA QPPPSLQWL
151 FEDETFITNR SRPHLRARAT VFANGSLLLT QVRFNAGIY RCIGQGQRPPI
201 PILEATLALA AHPVRSVECP PCPAPPVAGP SVFLFPPKPK KDTLMSRTPE
251 EVTCVVVDVS HEDEPQFNW YVDGVEVHNA KTKFREQFN STFRVSVLTI
301 VVHQDNLNGR EYCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREP VYTLPPSREY
351 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTFPML LQSDGSFFLY
401 SKLTVDKSRW QGNVFCVSMV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

FIG. 8E

pEE12.4\_ScRx6\_5IgGs::IgG2Fc (Igドメイン1~5)の翻訳

(配列番号 72)

```

1 AIVFIKQPSQ QDALQRRAL LRCEVEAPG VHVYWLDDA PVQDTERREA
51 QGSSLSFAAV DRLQDSGTFC CVARDDVTGE EARSANASFN IKWIEAGPVV
101 LKHPASEAEI QPOTQVTLRC HIDGHPRPTV QWFRDGTPLS DGQSNHTVSS
151 KERNTLRLPA GPEHSGLYSC CAHSAFQAC SSQNFNTLSIA DESFARVLLA
201 PQDVVVARYE EAMFHCQFSA QPPPSLQWL EDETFITNRS RPHLRARAT
251 FANGSLLLTQ VRPRNAGIYR CIGQGQRPPI ILEATLALA EIEDMPLFE
301 RVFTAGSEER VTCLPKGLP EPSVWHEHAG VRLPTHGRVY QKGHELVLAN
351 IAESDAGVYT CHAANLAGQR RQDQNVITAT VPSMLKPKQD SGLSEGKPYI
401 LDCLTQATK FTWVYRWQM LISEDSEFV FKNGFLRMS VEYDGTWIR
451 CMSSTPAGSI EAQARVQVLE KLKFTPPQP HPVRSVECPG PAPPVAGPS
501 VFLFPPKPDQ TLMISRTPEV TCVVVDSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNATK
551 KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDNLNGKEY CKVSNKGLP APIERTISKT
601 KGQPREQVYI TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV ESNNGOPEN
651 NYKTFPMLD SDGSFFLYSKL LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK
701 SLSLSPGK

```

FIG. 8C

pEE12.4\_ScRx6\_4IgGs\_IgG2Fc (Igドメイン1~4)の翻訳

(配列番号 7)

```

1 AIVFIKQPSQ QDALQRRAL LRCEVEAPG VHVYWLDDA PVQDTERREA
51 QGSSLSFAAV DRLQDSGTFC CVARDDVTGE EARSANASFN IKWIEAGPVV
101 LKHPASEAEI QPOTQVTLRC HIDGHPRPTV QWFRDGTPLS DGQSNHTVSS
151 KERNTLRLPA GPEHSGLYSC CAHSAFQAC SSQNFNTLSIA DESFARVLLA
201 PQDVVVARYE EAMFHCQFSA QPPPSLQWL EDETFITNRS RPHLRARAT
251 FANGSLLLTQ VRPRNAGIYR CIGQGQRPPI ILEATLALA EIEDMPLFE
301 RVFTAGSEER VTCLPKGLP EPSVWHEHAG VRLPTHGRVY QKGHELVLAN
351 IAESDAGVYT CHAANLAGQR RQDQNVITAT VPSMLKPKQD SGLSEGKPYI
401 FFLFPPKPDQ TLMISRTPEV TCVVVDSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNATK
501 PREEQFNST FRVSVLTVV HQDNLNGKEY CKVSNKGLP APIERTISKT
551 GQPREQVYI TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV ESNNGOPEN
601 YKTFPMLD SDGSFFLYSKL LTVDKSRWQQ GNVFSCVSMV EALHNHYTQK
601 LSLSPGK

```

FIG. 8F

【 図 8 - 3 】

モジュレーターピーニングを例解する PTK7タンパク質の概略図

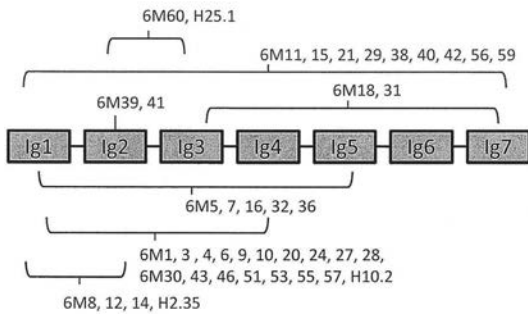


FIG. 8G

【 図 9 - 1 】

結直腸癌及び膵臓癌の腫瘍溶解液の亜集合では PTK7タンパク質の発現が上昇している

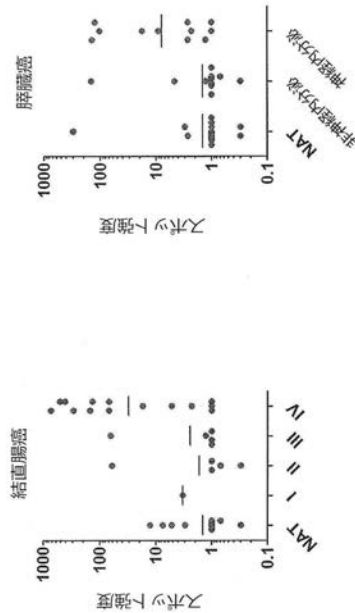


FIG. 9B

FIG. 9A

乳癌及び卵巣癌の腫瘍溶解液の亜集合ではPTK7タンパク質の発現が上昇している

【 図 9 - 2 】

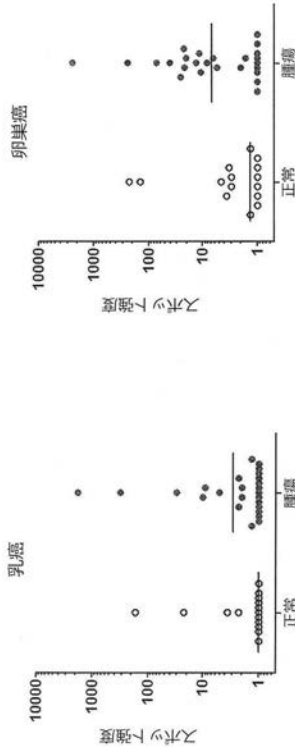


FIG. 9D

FIG. 9C

【 図 9 - 3 】

NTX試料ではPTK7タンパク質の発現が上昇している

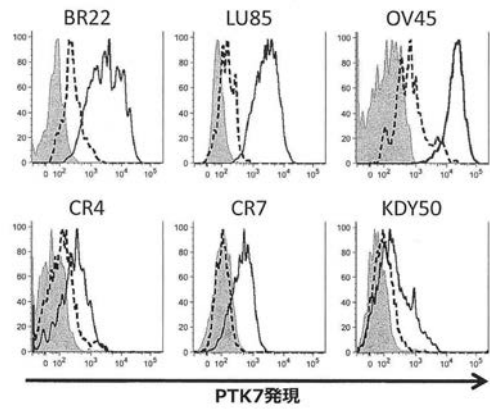


FIG. 9E

PTK7モジュレーターはK562細胞と会合して内在化する

【 図 10 - 1 】

FIG. 10A

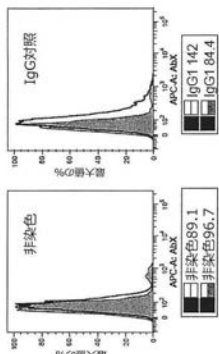


FIG. 10B

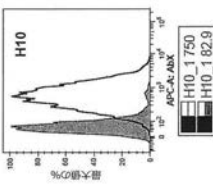


FIG. 10C

【 図 10 - 2 】

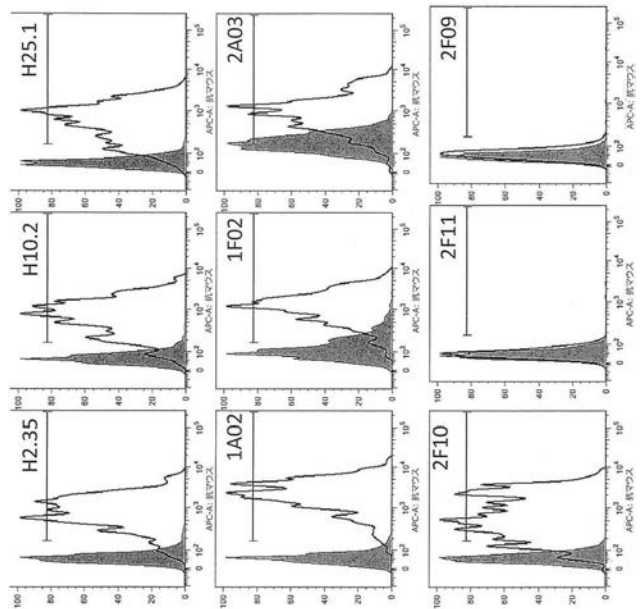


FIG. 10D

PTK7モジュレーターはG401細胞と会合して内在化する

【 図 1 0 - 3 】

PTK7モジュレーターの不均質な内在化

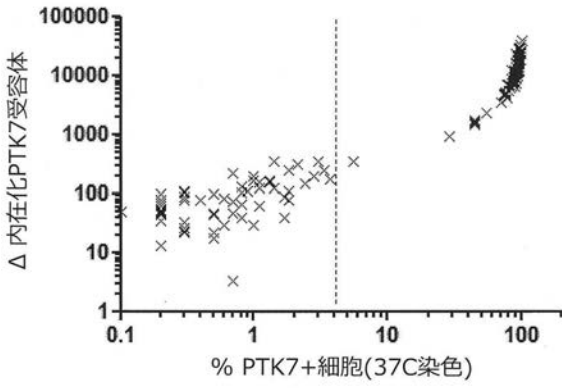


FIG. 10E

【 図 1 1 - 1 】

PTK7モジュレーターはin vitroでの毒素送達を媒介する

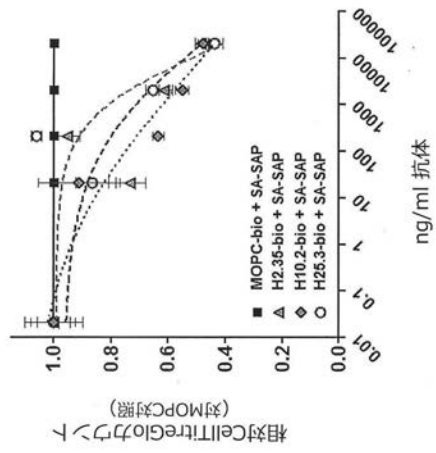


FIG. 11A

【 図 1 1 - 2 】

PTK7モジュレーターは細胞殺傷を媒介する

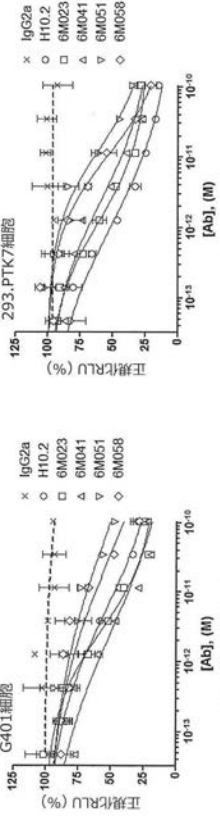


FIG. 11B

FIG. 11C

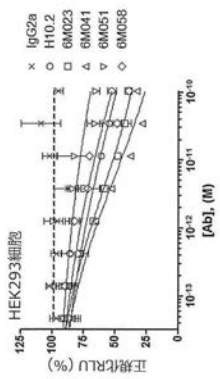


FIG. 11D

【 図 1 2 】

PTK7モジュレーターは腫瘍細胞生存度を低下させる

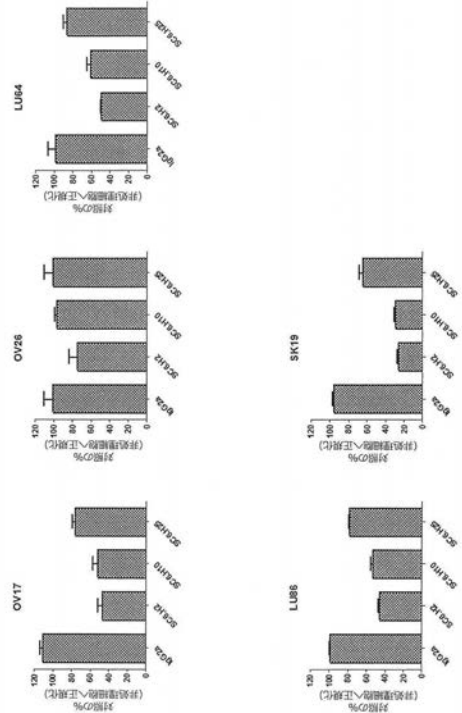


FIG. 12

【 図 1 3 】  
PTK7モジュレーターは  
細胞の腫瘍形成性を  
抑制する

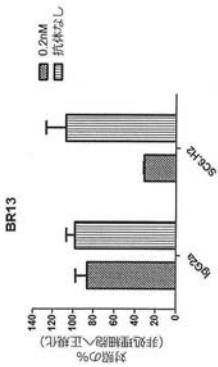


FIG. 13A

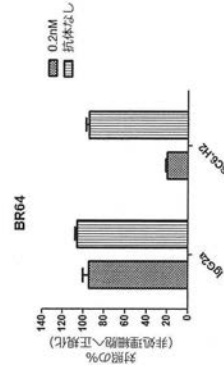


FIG. 13B

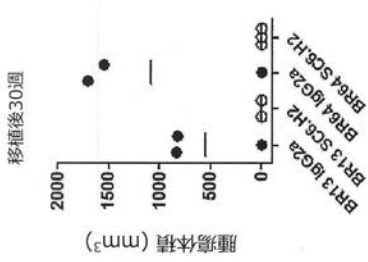


FIG. 13C

【 図 1 4 】  
ヒト化PTK7モジュレーターは細胞殺傷を誘発する

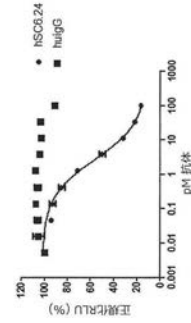
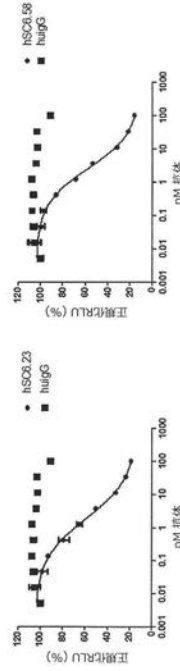


FIG. 14

【 配 列 表 】

2018104409000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 29 年 12 月 20 日 (2017.12.20)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

単 離 さ れ た P T K 7 モ ジ ュ レ ー タ ー 。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/483 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/483	C
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
	G 0 1 N 33/574	A
	C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 フォード, オリット

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 4 0 4, フォスター・シティ, ケイマン・レーン 7 1 2

(72)発明者 ディラ, スコット・ジェイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3, マウンテン・ビュー, ウェイク・フォレスト・ドライブ 7 4 3

(72)発明者 スタル, ロバート・エイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 0 1, アラメダ, フィフス・ストリート 1 5 1 9

(72)発明者 パンコビッチ, アレックス

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, テネシー・ストリート 6 3 5, ナンバー 2 0 4

(72)発明者 ラゼティク, アレクサンドラ・レイダ・リアナ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 0, サン・ノゼ, エコー・リッジ・コート 1 2 5 6

(72)発明者 パーンスタイン, ジェフリー

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 1 4, サンフランシスコ, クリッパー・ストリート 7 0

F ターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA36 FA37

4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 DA05 DA14

4C084 AA02 AA07 AA19 MA13 MA17 MA23 MA28 MA31 MA35 MA37

MA41 MA43 MA52 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA05 NA14

ZB26 ZB27 ZC75

4C085 AA14 AA26 CC23 DD62 EE01 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04

GG08 GG10

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	新的调制器和使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018104409A</a>	公开(公告)日	2018-07-05
申请号	JP2017223676	申请日	2017-11-21
[标]发明人	フォードオリット デイラスコットジェイ スタルロバートエイ バンコビッチアレックス ラゼテイクアレクサンドラレイダリアナ バーンスタインジェフリー		
发明人	フォード,オリット デイラ,スコット・ジェイ スタル,ロバート・エイ バンコビッチ,アレックス ラゼテイク,アレクサンドラ・レイダ・リアナ バーンスタイン,ジェフリー		
IPC分类号	C07K16/40 C12N15/09 C07K16/46 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 A61K45/00 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/574 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/30 C07K16/32 C07K16/40 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/92 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 A61K47/6803 A61K47/6851 C07K2317/34 C07K2317/56 C12N2740/15043 A61K47/6871 C07K16/42 C12N15/63		
FI分类号	C07K16/40.ZNA C12N15/00.A C07K16/46 A61K39/395.N A61K39/395.T A61K39/395.L A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00.121 A61K45/00 G01N33/483.C G01N33/53.Y G01N33/574.A C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA37 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/ /CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA19 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/ /MA52 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C084/ZC75 4C085/AA14 4C085/AA26 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/ /EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/ /FA74		
代理人(译)	山本修 宫前彻 中西 基晴		
优先权	61/444614 2011-02-18 US PCT/US2011/050451 2011-09-02 WO		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供用于预防，治疗或改善过度增殖性疾病及其任何扩张，复发，复发或转移的组合物和方法。溶剂：本发明涉及蛋白酪氨酸激酶7 (PTK7) 调节剂的用途，包括抗PTK7抗体和融合构建体，用于治疗，诊断或预防肿瘤性疾病。特别地，本发明提供了这种PTK7调节剂在恶性肿瘤的免疫治疗中的用途，包括降低肿瘤起始细胞频率。附图：无

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C O 7 K 16/40 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/40	Z N A 2 G O 4 5
<b>C 1 2 N 15/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 6 4
<b>C O 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	N 4 C O 8 5
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	T 4 H O 4 5
	審査請求 有	請求項の数 1 O L (全 109 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-223676 (P2017-223676)	(71) 出願人	516324537
(22) 出願日	平成29年11月21日 (2017.11.21)		アウヴィ・システムセントリックス・エルエルシー
(62) 分割の表示	特願2013-554656 (P2013-554656) の分割		アメリカ合衆国イリノイ州60064-6400、ノース・シカゴ、ノース・ウキガン・ロード 1
原出願日	平成24年2月17日 (2012.2.17)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	61/444,614		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成23年2月18日 (2011.2.18)	(74) 代理人	100118902
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 修
(31) 優先権主張番号	PCT/US2011/050451	(74) 代理人	100106208
(32) 優先日	平成23年9月2日 (2011.9.2)		弁理士 百前 徹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100120112
			弁理士 中西 基晴
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規モジュレーターと使用の方法