

(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2018-138058

(P2018-138058A)

(43) 公開日 平成30年9月6日(2018.9.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/09 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/09 Z N A	2 G O 4 5
<b>G O 1 N 33/48 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/48 P	4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/48 M	4 B O 6 5
<b>G O 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
<b>C O 7 K 16/30 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/574 D	

審査請求 有 請求項の数 12 O L 外国語出願 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-109484 (P2018-109484)	(71) 出願人	500039463 ボード・オブ・リーゼンツ, ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム アメリカ合衆国 テキサス 78701, オースティン, ウェスト 7ティールエイチ ストリート 210
(22) 出願日	平成30年6月7日(2018.6.7)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(62) 分割の表示	特願2015-561585 (P2015-561585) の分割	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
原出願日	平成26年3月5日(2014.3.5)	(72) 発明者	アルン サテッリ アメリカ合衆国 テキサス 77054, ヒューストン, ケンブリッジ ストリート 8450, アpartment 1186
(31) 優先権主張番号	61/772, 973		
(32) 優先日	平成25年3月5日(2013.3.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 間葉及び上皮間葉形質転換循環腫瘍細胞のための特異的検出ツール

## (57) 【要約】

【課題】 間葉及び上皮間葉形質転換循環腫瘍細胞のための特異的検出ツール

【解決手段】 本発明は、癌患者の血液から間葉及び上皮間葉形質転換循環腫瘍細胞を検出及び単離するための新規バイオマーカーとしての細胞表面ビメンチンの発見を含む。加えて、循環腫瘍細胞上の細胞表面ビメンチンの検出に特異的な抗体ならびにCTCを検出し、計数し、かつ単離するための該抗体の使用が提供される。一実施形態では、本発明は、単離されたモノクローナル抗体を提供し、この抗体は、ビメンチンポリペプチドに特異的に結合し、この抗体は、このポリペプチドの結合に対して84-1モノクローナル抗体と競合する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

固形腫瘍の生循環転移性腫瘍細胞を単離する方法であって、  
 ( a ) 患者から以前に得られた生血液細胞またはその成分を、前記細胞の細胞表面ピメンチンに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片とインキュベートすることと、  
 ( b ) 前記抗体結合循環腫瘍細胞または前記抗原結合断片結合循環腫瘍細胞を分離し、これによって固形腫瘍の循環転移性腫瘍細胞を単離することとを含む、方法。

## 【請求項 2】

( i ) サンプルの、細胞表面ピメンチンに結合する抗体との前記インキュベートに先立って、前記サンプルから C D 4 5 陽性細胞を枯渇させること；  
 ( i i ) 前記サンプルを E p C A M または サイトケラチン抗体とインキュベートすること；  
 ( i i i ) フローサイトメトリー、免疫組織化学法、蛍光顕微鏡法、ラジオイムノアッセイ、または E L I S A を用いて、前記抗体結合細胞を検出すること；  
 ( i v ) 前記サンプルをタンパク質チロシンホスファターゼ阻害物質とインキュベートすることによって、細胞表面ピメンチンの発現のレベルを増加させること；または  
 ( v ) 前記単離された循環転移性腫瘍細胞を遺伝子型特定すること  
 をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

単離することが、免疫磁気捕捉、接着に基づく細胞選別法、磁気活性化細胞選別法、または蛍光活性化細胞選別法 ( F A C S ) を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記タンパク質チロシンホスファターゼ阻害物質が、オルトバナジウム酸ナトリウム、デホスタチン、m p V ( p i c )、フェニルアルシンオキシド、スチボグルコン酸ナトリウム、B A Y U 6 7 5 1、チロシンホスファターゼ阻害物質カクテル ( バナジウム酸ナトリウム、モリブデン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、及びイミダゾールを含む)、ならびに R K - 6 8 2 である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記患者における循環転移性腫瘍細胞の数を定量化することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

癌患者における循環転移性腫瘍細胞の数を、前記患者における療法に対する応答をモニタリングするための指標とする方法としてさらに定義される、請求項 5 に記載の方法であって、循環転移性腫瘍細胞の前記数が経時的に減少することは、前記患者が療法に対して肯定的な応答を有したことの指標である、方法。

## 【請求項 7】

( i ) 前記患者が、以前に癌と診断されておらず、前記方法が、癌患者における循環転移性腫瘍細胞の数を早期癌検出のための指標とする方法であるか；または  
 ( i i ) 前記患者が、寛解期にあり、前記方法が、癌患者における循環転移性腫瘍細胞の数を再発の検出のための指標とする方法である、  
 請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

1 ミリリットルの血液当たり少なくとも 1、2、または 3 個の循環転移性腫瘍細胞を検出することが、前記患者が腫瘍を有することの指標である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記方法が、癌患者における循環転移性腫瘍細胞の数を予後の指標とする方法であり、1 ミリリットルの血液当たり少なくとも 1、2、または 3 個の循環転移性腫瘍細胞を検出することが、前記患者が予後不良を有することの指標である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 10】

10

20

30

40

50

前記患者が、上皮腫瘍または間葉腫瘍を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記循環転移性腫瘍細胞が、上皮腫瘍細胞、間葉腫瘍細胞、非上皮性腫瘍細胞、または上皮間葉形質転換腫瘍細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

固形腫瘍の循環転移性腫瘍細胞を選択的に捕捉する方法であって、癌患者から以前に得られた血液サンプルからの循環転移性腫瘍細胞を、細胞表面ビメンチンに結合する抗体によって捕捉することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本出願は、2013年3月5日に出願された米国特許仮出願第61/772,973号の優先権の利益を主張するものであり、この仮出願の全体の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

3KBであり(Microsoft Windows(登録商標)において測定)、2014年2月18日に作成されたファイル名「UTFCP1208WO\_\_ST25.txt」中に含まれている配列表は、電子申請によって本明細書と共に提出され、参照により本明細書に組み込まれる。

発明の背景

20

【0003】

本発明は、合衆国国立衛生研究所から与えられた助成金CA120295による合衆国政府の援助を受けてなされたものである。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0004】

本発明は、全般的には、癌生物学の分野に関する。より具体的には、本発明は、腫瘍、転移、及び再発の早期検出において補助となる循環腫瘍細胞の計数及び単離に関する。

【背景技術】

【0005】

転移は、癌関連死の主な原因である。循環腫瘍細胞(CTC)は、転移の根源であると考えられ、それら自体が原発腫瘍から血流中に分離し、遠隔の臓器に向かって移動し、コロニー形成して転移に至る希少な細胞として定義される(Pantel and Brakenhoff, 2004)。癌療法の分野における最近の進歩は、原発癌が拡散することを封じ込めることができるが、転移性癌の早期の検出、診断、及び治療モニタリングのための信頼できるバイオマーカーに対する要求がある。CTCは、癌患者の末梢血液中に存在し、早期検出及び抗癌剤の治療有効性をモニタリングするための有望な標的として浮かび上がってきた(Parkinson et al., 2012)。現在、CTCを検出するための許容可能なマーカーは、EpCAM及びサイトケラチンが挙げられる(Parkinson et al., 2012)。しかしながら、これらのマーカーは、上皮CTCのみを検出することができるために、EpCAMの発現を喪失した上皮間葉形質転換(EMT)CTC(Sieuwert et al., 2009)及び成人の癌のタイプの約10%及び小児の癌のタイプの約20%を構成する、間葉腫瘍に源を発するいずれの他の非上皮CTC(Mackall et al., 2002)も除外する。現行の検出ツールのこの限界は、これらの要求を満足させ得る新規ツールに対する切実な必要性を示唆している。

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Pantel and Brakenhoff, Dissecting the metastatic cascade, Nat. Rev. Cancer, 4: 448 - 456, 2004

50

## 【発明の概要】

## 【0007】

本発明は、いくつかの実施形態において、循環腫瘍細胞上の細胞表面ビメンチンの検出に対する新規抗体を提供する。一実施形態では、本発明は、単離されたモノクローナル抗体を提供し、この抗体は、ビメンチンポリペプチドに特異的に結合し、この抗体は、このポリペプチドの結合に対して84-1モノクローナル抗体と競合する。特定の態様では、本発明のモノクローナル抗体は、84-1モノクローナル抗体と同一のエピトープに結合し得る。

一態様では、本発明のモノクローナル抗体は、84-1の $V_H$ CDR1（配列番号3）と少なくとも80%同一の第1の $V_H$ CDR、84-1の $V_H$ CDR2（配列番号4）と少なくとも80%同一の第2の $V_H$ CDR、84-1の $V_H$ CDR3（配列番号5）と少なくとも80%同一の第3の $V_H$ CDR、84-1の $V_L$ CDR1（配列番号6）と少なくとも80%同一の第1の $V_L$ CDR、84-1の $V_L$ CDR2（配列番号7）と少なくとも80%同一の第2の $V_L$ CDR、及び84-1の $V_L$ CDR3（配列番号8）と少なくとも80%同一の第3の $V_L$ CDRを含み得る。

10

## 【0008】

別の態様では、本発明のモノクローナル抗体は、配列番号3と同一である第1の $V_H$ CDR、配列番号4と同一である第2の $V_H$ CDR、配列番号5と同一である第3の $V_H$ CDR、配列番号6と同一である第1の $V_L$ CDR、配列番号7と同一である第2の $V_L$ CDR、及び配列番号8と同一である第3の $V_L$ CDRを含み得る。

20

## 【0009】

さらに別の態様では、本発明のモノクローナル抗体は、84-1の $V_H$ ドメイン（配列番号1）と少なくとも約80%同一の $V_H$ ドメイン、及び84-1の $V_L$ ドメイン（配列番号2）と少なくとも約80%同一の $V_L$ ドメインを含み得る。特定の態様では、本発明のモノクローナル抗体は、84-1の $V_H$ ドメイン（配列番号1）と同一の $V_H$ ドメイン、及び84-1の $V_L$ ドメイン（配列番号2）と同一の $V_L$ ドメインを含み得る。別の特定の態様では、本発明のモノクローナル抗体は、84-1抗体であってもよい。

## 【0010】

いくつかの態様では、本明細書に開示されるモノクローナル抗体は、組換え体であってもよい。いくつかの態様では、本実施形態のモノクローナル抗体は、IgG、IgM、IgA、またはこれらの抗原結合断片であってもよい。いくつかの態様では、本発明のモノクローナル抗体は、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')<sub>3</sub>、一価scFv、二価scFv、または単ドメイン抗体であってもよい。いくつかの態様では、本明細書のモノクローナル抗体は、ヒト、ヒト化抗体、または脱免疫化抗体であり得る。特定の態様では、こうしたヒト化または脱免疫化抗体は、ヒトIgG（例えば、IgG1またはIgG2）骨格上に前述のCDRを含み得る。

30

## 【0011】

特定の態様では、本実施形態のモノクローナル抗体は、造影剤、化学療法剤、毒素、または放射性核種に抱合されることができる。特定の態様では、本明細書に開示されるモノクローナル抗体は、薬学的に許容し得る担体中に含まれてもよい。

40

## 【0012】

一実施形態では、本発明は、本発明のモノクローナル抗体をコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。

## 【0013】

一実施形態では、本発明は、84-1の $V_H$ ドメインのCDR1~3（配列番号3、4、及び5）を含む抗体の $V_H$ ドメインを含む組換えポリペプチドを提供する。別の実施形態では、本発明は、84-1の $V_L$ ドメインのCDR1~3（配列番号6、7、及び8）を含む抗体の $V_L$ ドメインを含む組換えポリペプチドを提供する。別の実施形態では、本発明は、84-1の $V_H$ ドメインのCDR1~3（配列番号3、4、及び5）を含む抗体の $V_H$ ドメイン及び/または84-1の $V_L$ ドメインのCDR1~3（配列番号6、7、

50

及び 8 ) を含む抗体の  $V_L$  ドメインを含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。

【 0 0 1 4 】

一実施形態では、本発明は、本実施形態のモノクローナル抗体または組換えタンパク質をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド分子を含む宿主細胞を提供する。特定の態様では、この宿主細胞は、哺乳動物細胞、酵母細胞、細菌細胞、繊毛虫類細胞、または昆虫細胞であり得る。

【 0 0 1 5 】

一実施形態では、本発明は、抗体を製造する方法を提供し、本方法は、細胞中で、本発明の抗体の  $V_L$  及び  $V_H$  ポリペプチド鎖をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド分子を発現させることと、抗体を細胞から精製することと、を含む。

10

【 0 0 1 6 】

一実施形態では、本発明は、単離された抗体を提供し、この抗体は、84 - 1 の  $V_H CDR 1$  (配列番号 3) と少なくとも 80 % 同一の第 1 の  $V_H CDR$ 、84 - 1 の  $V_H CDR 2$  (配列番号 4) と少なくとも 80 % 同一の第 2 の  $V_H CDR$ 、84 - 1 の  $V_H CDR 3$  (配列番号 5) と少なくとも 80 % 同一の第 3 の  $V_H CDR$ 、84 - 1 の  $V_L CDR 1$  (配列番号 6) と少なくとも 80 % 同一の第 1 の  $V_L CDR$ 、84 - 1 の  $V_L CDR 2$  (配列番号 7) と少なくとも 80 % 同一の第 2 の  $V_L CDR$ 、及び 84 - 1 の  $V_L CDR 3$  (配列番号 8) と少なくとも 80 % 同一の第 3 の  $V_L CDR$  を含む。

【 0 0 1 7 】

一実施形態では、本発明は、循環腫瘍細胞を特異的に検出する方法を提供し、本方法は、( a ) 患者から血液サンプルを得ることと、( b ) このサンプルを細胞表面ビメンチンに結合する抗体とインキュベートすることと、( c ) 抗体結合細胞を検出することと、を含む。特定の態様では、細胞表面ビメンチンに結合する抗体は本明細書に開示される抗体であり得る。いくつかの態様では、この抗体は、細胞表面ビメンチンに結合する、アプタマーなどの抗体様分子であってもよい。いくつかの態様では、抗体結合細胞を検出することは、フローサイトメトリー、免疫組織化学法、蛍光顕微鏡法、ラジオイムノアッセイ、または E L I S A を用いることを含み得る。

20

【 0 0 1 8 】

特定の態様では、本方法は、サンプルを細胞表面ビメンチンに結合する抗体とインキュベートするのに先立って C D 4 5 陽性細胞のサンプルを枯渇させることをさらに含む。特定の態様では、本方法は、サンプルをタンパク質チロシンホスファターゼ阻害物質とインキュベートすることによって、細胞表面ビメンチンの発現のレベルを増加させることをさらに含む。いくつかの態様では、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害物質は、オルトバナジウム酸ナトリウムである。他の態様では、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害物質は、デホスタチン、m p V ( p i c )、フェニルアルシンオキシド、スチボグルコン酸ナトリウム、B A Y U 6 7 5 1、チロシンホスファターゼ阻害物質カクテル ( バナジウム酸ナトリウム、モリブデン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、及びイミダゾールを含む )、または R K - 6 8 2 であってもよい。

30

【 0 0 1 9 】

特定の態様では、本方法は、生循環腫瘍細胞を単離する方法としてさらに定義され、サンプルから ( c ) の抗体結合循環腫瘍細胞を分離することをさらに含む。いくつかの態様では、分離することは、免疫磁気捕捉、接着に基づく細胞選別法、磁気活性化細胞選別法、または蛍光活性化細胞選別法 ( F A C S ) を含んでもよい。特定の態様では、本方法は、単離された生循環腫瘍細胞を遺伝子型特定することをさらに含んでもよい。

40

【 0 0 2 0 】

特定の態様では、本方法は、サンプルを E p C A M または サイトケラチン抗体とインキュベートすることをさらに含んでもよい。特定の態様では、患者における循環腫瘍細胞の数を定量化することをさらに含んでもよい。特定の態様では、血液サンプルは、以前に癌と診断されていない患者からのサンプルであり、本方法は、早期癌検出の方法である。別

50

の態様では、血液サンプルは、寛解期にある患者からのサンプルであり、本方法は、再発を検出する方法である。いくつかの態様では、1ミリリットルの血液当たり少なくとも約3個の循環腫瘍細胞を検出することが、患者が腫瘍を有する指標である。他の態様では、1ミリリットルの血液当たり少なくとも約1個または少なくとも約2個の循環腫瘍細胞を検出することが、患者が腫瘍を有する指標である。

【0021】

特定の態様では、本方法は、癌患者において療法に対する応答をモニタリングする方法であってもよく、循環腫瘍細胞の数が経時的に減少する場合、この患者は療法に対して肯定的な応答を有したと言われる。特定の態様では、本方法は、予後の方法であってもよく、1ミリリットルの血液当たり少なくとも約5個の循環腫瘍細胞を検出することが、患者が予後不良を有する指標である。他の態様では、本方法は予後の方法であってもよく、1ミリリットルの血液当たり少なくとも約1個、少なくとも約2個、少なくとも約3個、または少なくとも約4個の循環腫瘍細胞を検出することが、患者が予後不良を有する指標である。

10

【0022】

特定の態様では、患者は、上皮腫瘍を有し得る。他の態様では、患者は間葉腫瘍を有し得る。特定の態様では、この腫瘍は、乳癌、肺癌、頭頸部癌、前立腺癌、食道癌、気管癌、皮膚癌、脳癌、肝臓癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、精巣癌、結腸癌、直腸癌、及び皮膚癌を含み得る。特定の態様では、この腫瘍は、骨肉腫、血管肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、ユーイング肉腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、及び白血病を含み得る。

20

【0023】

一実施形態では、本発明は、本発明の方法により循環腫瘍細胞を有することが判定された患者を治療する方法を提供し、本方法は、本明細書に開示される抱合抗体の有効量を投与することを含む。いくつかの態様では、この抱合抗体は、薬学的に許容し得る組成物中に含まれてもよい。

【0024】

一態様では、抗体は、全身的に投与されてもよい。追加の態様では、抗体は、静脈内、皮内、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、皮下、または局所で投与されてもよい。本方法は、少なくとも第2の抗癌療法を対象に施すことをさらに含む。第2の抗癌療法の例としては、外科療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン療法、免疫療法、またはサイトカイン療法が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0025】

さらなる態様では、本方法は、本発明の組成物を、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20回またはそれ以上の回数などの複数回で対象に投与することをさらに含んでもよい。

【0026】

一実施形態では、対象において癌の治療で使用するための本実施形態の抗体を含む組成物が提供される。この対象は、本実施形態の方法により循環腫瘍細胞を有することが判定されている。いくつかの態様において、この対象は、ヒトであり得る。いくつかの態様では、この対象は、非ヒト哺乳動物であってもよい。いくつかの態様では、この組成物は、薬学的に許容し得る組成物である。

40

【0027】

特定の態様では、この対象は上皮腫瘍を有し得る。他の態様では、この対象は、間葉腫瘍を有し得る。他の態様では、この対象は、転移性腫瘍を有し得る。特定の態様では、この腫瘍は、乳癌、肺癌、頭頸部癌、前立腺癌、食道癌、気管癌、皮膚癌、脳癌、肝臓癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、精巣癌、結腸癌、直腸癌、及び皮膚癌を含み得る。特定の態様では、この腫瘍は、骨肉腫、血管肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、ユーイング肉腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、及び白血病を含み得る。

【0028】

50

いくつかの態様では、この組成物は、化学療法剤、放射線療法剤、遺伝子療法剤、または第2選択免疫療法剤などの少なくとも1つの他の抗癌剤をさらに含んでもよい。いくつかの態様では、この組成物は、全身、静脈内、皮内、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、皮下、または局所投与用に製剤化され得る。

【0029】

一実施形態では、対象における癌の治療のための医薬品の製造における本実施形態の抗体の使用が本明細書に提供され、この対象は、循環腫瘍細胞を含むことが判定されている。

【0030】

特定の実施形態は、細胞表面ピメンチンに特異的に結合する単離された及び/もしくは組換え抗体またはポリペプチドを含む、抗体または組換えポリペプチド組成物を目的とする。特定の態様では、この抗体またはポリペプチドは、本明細書で提供される任意のモノクローナル抗体の全てまたは一部と80、85、90、95、96、97、98、99、または100%（もしくはこれらの派生し得る任意の範囲で）同一である配列を有し、少なくとも、または最大でもこれらである。さらに他の態様では、単離された及び/もしくは組換え抗体またはポリペプチドは、本明細書に提供される配列のいずれかまたはこうした配列の組み合わせからの、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100個またはそれ以上の隣接するアミノ酸を有し、少なくとも、または最大でもこれらを有する。

【0031】

さらに他の態様では、本実施形態の抗体またはポリペプチドは、本明細書に開示されるアミノ酸配列のいずれかの1つ以上のアミノ酸セグメントを含む。例えば、この抗体またはポリペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のアミノ酸セグメントを含むことができ、このアミノ酸セグメントは、本明細書に開示されたアミノ酸配列のいずれかと少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一である、約、少なくとも、または最大で、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、または200個のアミノ酸の長さ（これらの間にある全ての値及び範囲を含める）を含む。特定の態様では、このア

10

20

30

40

50

ミノセグメント（複数可）は、表7に提供される細胞表面ビメンチン結合抗体のアミノ酸配列のうちの一つから選択される。

【0032】

さらに他の態様では、本実施形態の抗体またはポリペプチドは、本明細書に開示されるアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸セグメントを含み、このセグメントは、本明細書に提供されるいずれかの配列中のアミノ酸位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、または200で開始し、同一の提供される配列中のアミノ酸位置4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25～25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、または200で終了する。特定の態様では、このアミノセグメント（複数可）、またはそれらの一部は、表7に提供される細胞表面ビメンチン結合抗体のアミノ酸配列のうちの一つから選択される。

【0033】

さらに他の態様では、本実施形態の抗体またはポリペプチドは、細胞表面ビメンチン結合抗体（表7に提供される）のV、VJ、VDJ、D、DJ、J、またはCDRドメインと少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一である（もしくはこれらの中で導き出せる任意の範囲の）アミノ酸セグメントを含む。例えば、ポリペプチドは、表7に提供される細胞表面ビメンチン結合抗体のCDR1、2、及び/または3と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、または1

10

20

30

40

50

00%同一である（もしくはこれらの中で導き出せる任意の範囲の）1、2、または3個のアミノ酸セグメントを含んでもよい。

【0034】

本発明の方法及び/または組成物に関して説明される実施形態は、本明細書に記載される任意の他の方法または組成物に対して使用されてもよい。したがって、1つの方法または組成物に関連するある実施形態が、本発明の他の方法及び組成物に同様に適用されてもよい。

【0035】

本明細書で使用される「a」または「an」は、1つ以上を意味することがある。単語「含む」と共に使用されるとき、特許請求の範囲で使用される単語「a」または「an」は、1つまたは複数を意味することがある。

【0036】

特許請求の範囲における用語「または」の使用は、選択肢のみを指すよう明示的に示されない限りかつ選択肢が相互排他的でない限り、「及び/または」を意味するよう使用されるが、本開示は、選択肢及び「及び/または」のみを指す定義を支持する。本明細書で使用される「別の」は、少なくとも2番目またはそれ以上を意味することがある。

【0037】

本明細書の全体を通して、用語「約」は、値が、この値を決定するために使用される装置、方法についての誤差の固有の変動、もしくは試験対象間で存在する変動を含むことを示すために使用される。

【0038】

本発明の他の目的、特徴、及び利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、この詳細な説明及び特定の例は、本発明の好ましい実施形態を示してはいるが、例示としてのみ行われるものであって、この詳細な説明によって当業者に明らかになる各種の変更や修正は、本発明の趣旨及び範囲内にあることを理解するべきである。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目1)

単離されたモノクローナル抗体であって、前記抗体がビメンチンポリペプチドに特異的に結合し、前記抗体が前記ポリペプチドの結合に対して84-1モノクローナル抗体と競合する、前記抗体。

(項目2)

前記抗体が、

(a) 84-1のV<sub>H</sub>CDR1(配列番号3)と少なくとも80%同一の第1のV<sub>H</sub>CDRと、

(b) 84-1のV<sub>H</sub>CDR2(配列番号4)と少なくとも80%同一の第2のV<sub>H</sub>CDRと、

(c) 84-1のV<sub>H</sub>CDR3(配列番号5)と少なくとも80%同一の第3のV<sub>H</sub>CDRと、

(d) 84-1のV<sub>L</sub>CDR1(配列番号6)と少なくとも80%同一の第1のV<sub>L</sub>CDRと、

(e) 84-1のV<sub>L</sub>CDR2(配列番号7)と少なくとも80%同一の第2のV<sub>L</sub>CDRと、

(f) 84-1のV<sub>L</sub>CDR3(配列番号8)と少なくとも80%同一の第3のV<sub>L</sub>CDRと、を含む、項目1に記載の前記抗体

(項目3)

前記抗体が、

(a) 配列番号3と同一である第1のV<sub>H</sub>CDRと、

(b) 配列番号4と同一である第2のV<sub>H</sub>CDRと、

(c) 配列番号5と同一である第3のV<sub>H</sub>CDRと、

(d) 配列番号6と同一である第1のV<sub>L</sub>CDRと、

10

20

30

40

50

( e ) 配列番号 7 と同一である第 2 の  $V_L$  CDR と、  
 ( f ) 配列番号 8 と同一である第 3 の  $V_L$  CDR と、を含む、項目 2 に記載の前記単離された抗体。

( 項目 4 )

前記抗体が、84 - 1 の  $V_H$  ドメイン ( 配列番号 1 ) と少なくとも約 80 % 同一の  $V_H$  ドメインと、84 - 1 の  $V_L$  ドメイン ( 配列番号 2 ) と少なくとも約 80 % 同一の  $V_L$  ドメインと、を含む、項目 2 に記載の前記抗体。

( 項目 5 )

前記抗体が、前記 84 - 1 の  $V_H$  ドメイン ( 配列番号 1 ) と同一の  $V_H$  ドメインと、前記 84 - 1 の  $V_L$  ドメイン ( 配列番号 2 ) と同一の  $V_L$  ドメインと、を含む、項目 4 に記載の前記抗体。

( 項目 6 )

前記抗体が、前記 84 - 1 抗体である、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の前記抗体。

( 項目 7 )

前記抗体が組換え体である、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の前記抗体。

( 項目 8 )

前記抗体が、IgG、IgM、IgA、またはこれらの抗原結合断片である、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の前記抗体。

( 項目 9 )

前記抗体が、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')<sub>3</sub>、一価 scFv、二価 scFV、または単ドメイン抗体である、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の前記抗体。

( 項目 10 )

前記抗体が、ヒト、ヒト化抗体、または脱免疫化抗体である、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の前記抗体。

( 項目 11 )

前記抗体が、造影剤、化学療法剤、毒素、または放射性核種に抱合される、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の前記抗体。

( 項目 12 )

薬学的に許容し得る担体中に項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体を含む、組成物。

( 項目 13 )

項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体をコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド分子。

( 項目 14 )

前記 84 - 1 の  $V_H$  ドメインの CDR 1 ~ 3 ( 配列番号 3、4、及び 5 ) を含む抗体の  $V_H$  ドメインを含む、組換えポリペプチド。

( 項目 15 )

前記 84 - 1 の  $V_L$  ドメインの CDR 1 ~ 3 ( 配列番号 6、7、及び 8 ) を含む抗体の  $V_L$  ドメインを含む、組換えポリペプチド。

( 項目 16 )

項目 14 または 15 に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド分子。

( 項目 17 )

項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体または項目 14 もしくは 15 に記載の組換えポリペプチドをコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド分子を含む、宿主細胞。

( 項目 18 )

前記宿主細胞が、哺乳動物細胞、酵母細胞、細菌細胞、繊毛虫類細胞、または昆虫細胞である、項目 17 に記載の前記宿主細胞。

( 項目 19 )

抗体を製造する方法であって、

( a ) 項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体の  $V_L$  及び  $V_H$  鎖をコードする 1 つ以上

10

20

30

40

50

のポリヌクレオチド分子を、細胞中で発現させることと、

(b) 前記抗体を前記細胞から精製することと、を含む、前記方法。

(項目20)

単離された抗体であって、前記抗体が、

(a) 84-1のV<sub>H</sub>CDR1(配列番号3)と少なくとも80%同一の第1のV<sub>H</sub>CDRと、

(b) 84-1のV<sub>H</sub>CDR2(配列番号4)と少なくとも80%同一の第2のV<sub>H</sub>CDRと、

(c) 84-1のV<sub>H</sub>CDR3(配列番号5)と少なくとも80%同一の第3のV<sub>H</sub>CDRと、

(d) 84-1のV<sub>L</sub>CDR1(配列番号6)と少なくとも80%同一の第1のV<sub>L</sub>CDRと、

(e) 84-1のV<sub>L</sub>CDR2(配列番号7)と少なくとも80%同一の第2のV<sub>L</sub>CDRと、

(f) 84-1のV<sub>L</sub>CDR3(配列番号8)と少なくとも80%同一の第3のV<sub>L</sub>CDRと、を含む、前記抗体。

(項目21)

循環腫瘍細胞を選択的に検出する方法であって、

(a) 患者から血液サンプルを得ることと、

(b) 前記サンプルを細胞表面ビメンチンに結合する抗体とインキュベートすることと

(c) 前記抗体結合細胞を検出し、これによって循環腫瘍細胞を選択的に検出することと、を含む、前記方法。

(項目22)

生循環腫瘍細胞を単離する方法としてさらに定義され、前記サンプルから(b)の前記抗体結合循環腫瘍細胞を分離することをさらに含む、項目21に記載の前記方法。

(項目23)

前記サンプルの、細胞表面ビメンチンに結合する抗体との前記インキュベートに先立って、CD45陽性細胞の前記サンプルを枯渇させることをさらに含む、項目21に記載の前記方法。

(項目24)

フローサイトメトリー、免疫組織化学法、蛍光顕微鏡法、ラジオイムノアッセイ、またはELISAを用いて、前記抗体結合細胞を検出することをさらに含む、項目21に記載の前記方法。

(項目25)

前記単離された生循環腫瘍細胞を遺伝子型特定することをさらに含む、項目22に記載の前記方法。

(項目26)

分離することが、免疫磁気捕捉、接着に基づく細胞選別法、磁気活性化細胞選別法、または蛍光活性化細胞選別法(FACS)を含む、項目22に記載の前記方法。

(項目27)

前記サンプルをタンパク質チロシンホスファターゼ阻害物質とインキュベートすることによって、細胞表面ビメンチンの発現のレベルを増加させることをさらに含む、項目21に記載の前記方法。

(項目28)

前記タンパク質チロシンホスファターゼ阻害物質が、オルトバナジウム酸ナトリウム、デホスタチン、mpV(pic)、フェニルアルシノキシド、スチボグルコン酸ナトリウム、BAY U6751、チロシンホスファターゼ阻害物質カクテル(バナジウム酸ナトリウム、モリブデン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、及びイミダゾールを含む)、ならびにRK-682である、項目27に記載の前記方法。

10

20

30

40

50

(項目29)

前記サンプルをEpCAMまたはサイトケラチン抗体とインキュベートすることをさらに含む、項目21に記載の前記方法。

(項目30)

前記患者における循環腫瘍細胞の数を定量化することをさらに含む、項目21に記載の前記方法。

(項目31)

癌患者において療法に対する応答をモニタリングする方法としてさらに定義され、循環腫瘍細胞の前記数が経時的に減少する場合、前記患者が療法に対して肯定的な応答を有したと言われる、項目30に記載の前記方法。

10

(項目32)

前記患者が、以前に癌と診断されておらず、前記方法が、早期癌検出の方法である、項目30に記載の前記方法。

(項目33)

前記患者が、寛解期にあり、前記方法が、再発の検出方法である、項目30に記載の前記方法。

(項目34)

1ミリリットルの血液当たり少なくとも約3個の循環腫瘍細胞を検出することが、前記患者が腫瘍を有する指標である、項目32及び33に記載の前記方法。

20

(項目35)

前記方法が、予後の方法であり、1ミリリットルの血液当たり少なくとも約5個の循環腫瘍細胞を検出することが、前記患者が予後不良を有する指標である、項目30に記載の前記方法。

(項目36)

前記患者が、上皮腫瘍を有する、項目21に記載の前記方法。

(項目37)

前記患者が、間葉腫瘍を有する、項目21に記載の前記方法。

(項目38)

項目21に記載の前記方法に従って循環腫瘍細胞を有することが判定された患者の治療方法であって、項目11に記載の抗体の有効量を投与することを含む、前記方法。

30

(項目39)

前記抗体が、薬学的に許容し得る組成物中に含まれる、項目38に記載の前記方法。

(項目40)

対象における癌の治療で使用するための、項目11に記載の抗体を含む組成物であって、前記対象が、循環腫瘍細胞を有すると判定されている、前記組成物。

(項目41)

前記癌が、乳癌、肺癌、頭頸部癌、前立腺癌、食道癌、気管癌、皮膚癌、脳癌、肝臓癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、精巣癌、結腸癌、直腸癌、及び皮膚癌である、項目40に記載の前記組成物。

40

(項目42)

前記対象が、上皮腫瘍を有する、項目40に記載の前記組成物。

(項目43)

前記対象が、間葉腫瘍を有する、項目40に記載の前記組成物。

(項目44)

前記対象が、転移性腫瘍を有する、項目40に記載の前記組成物。

(項目45)

化学療法剤、放射線療法剤、遺伝子療法剤、または第2選択免疫療法剤をさらに含む、項目40に記載の前記組成物。

(項目46)

対象における癌の前記治療のための医薬品の製造での項目11に記載の抗体の使用であ

50

って、前記対象が、循環腫瘍細胞を含むことが判定されている、前記使用。

【0039】

以下の図面は本明細書の一部をなし、かつ本発明の特定の態様をさらに裏付けるために含まれる。本発明は、これらの図面を本明細書に提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて参照することによって、より深く理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1A】84-1、細胞表面ピメンチン(CSV)特異的抗体の単離及び特性評価である。図1Aは、CSV特異的抗体の抗体スクリーニングの概略的表現である。異なるハイブリドーマ上清からのモノクローナル抗体のプールを、フローサイトメトリーを用いてCSV結合について分析し、癌特異的結合について選択した。選択された抗体を、ELISA及びウェスタンブロット法を用いて、ピメンチンについて特性化した。図1Bは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの発現の免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株SKNBE-2(神経芽細胞腫)、患者の血液から単離されたAML細胞、及びLM7(骨肉腫)細胞でのみ検出可能であるが、一方、非上皮性正常細胞HUVEC、HF0B、及びPBMCはCSVの発現に対してネガティブであった。イソタイプ対照を陰性対照に使用した。図1Cは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株MDA-MB-453(乳癌)、DLD-1(結腸癌)、及びHLM-6(肝臓癌)でのみ検出可能であるが、一方、正常な上皮細胞株HEK-293、NCM-356、及びMCF-10Aは、CSVの発現に対してネガティブであった。図1Dは、共焦点顕微鏡を用いる、正常細胞及び癌細胞株中のCSVについての細胞表面染色分析である。HLM-3(肝臓癌)及びNCM-356(正常な結腸)細胞を、CSV、WGA(細胞表面マーカー)、及び核染色剤DRAQ5に対して染色した。84-1への結合は、白色の矢印で示されている図の拡大部分から明らかのように、WGAと同時局在化する細胞表面ピメンチンを示す。スケールは10µmを示す。図1Eは、フローサイトメトリーを用いるヒト原発癌及び転移性癌中のCSVの免疫学的評価であり、ヒト原発性結腸癌(HPC1)及びヒト肝臓転移性癌(HLM3)の分析は、原発性HPC1細胞と比べて、HLM3上のCSVの大量の発現を示した。図1Fは、共焦点顕微鏡を用いる、Geltrexの薄いコーティングが施されたウェル上のHPC1由来スフェア中のCSVの検出である。CSVは、スフェアの周辺部でほとんどの細胞で検出されなかった。核染色液DRAQ5を用いて、細胞を分離した。スケールは20µmを示す。

【図1B】84-1、細胞表面ピメンチン(CSV)特異的抗体の単離及び特性評価である。図1Aは、CSV特異的抗体の抗体スクリーニングの概略的表現である。異なるハイブリドーマ上清からのモノクローナル抗体のプールを、フローサイトメトリーを用いてCSV結合について分析し、癌特異的結合について選択した。選択された抗体を、ELISA及びウェスタンブロット法を用いて、ピメンチンについて特性化した。図1Bは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの発現の免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株SKNBE-2(神経芽細胞腫)、患者の血液から単離されたAML細胞、及びLM7(骨肉腫)細胞でのみ検出可能であるが、一方、非上皮性正常細胞HUVEC、HF0B、及びPBMCはCSVの発現に対してネガティブであった。イソタイプ対照を陰性対照に使用した。図1Cは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株MDA-MB-453(乳癌)、DLD-1(結腸癌)、及びHLM-6(肝臓癌)でのみ検出可能であるが、一方、正常な上皮細胞株HEK-293、NCM-356、及びMCF-10Aは、CSVの発現に対してネガティブであった。図1Dは、共焦点顕微鏡を用いる、正常細胞及び癌細胞株中のCSVについての細胞表面染色分析である。HLM-3(肝臓癌)及びNCM-356(正常な結腸)細胞を、CSV、WGA(細胞表面マーカー)、及び核染色剤DRAQ5に対して染色した。84-1への結合は、白色の矢印で示されている図の拡大部分から明らかのように、WGAと同時局在化する細胞表面

10

20

30

40

50

ビメンチンを示す。スケールは10  $\mu\text{m}$ を示す。図1 Eは、フローサイトメトリーを用いるヒト原発癌及び転移性癌中のCSVの免疫学的評価であり、ヒト原発性結腸癌(HPC1)及びヒト肝臓転移性癌(HLM3)の分析は、原発性HPC1細胞と比べて、HLM3上のCSVの大量の発現を示した。図1 Fは、共焦点顕微鏡を用いる、Gel trexの薄いコーティングが施されたウェル上のHPC1由来スフェア中のCSVの検出である。CSVは、スフェアの周辺部でほとんどの細胞で検出されなかった。核染色液DRAQ5を用いて、細胞を分離した。スケールは20  $\mu\text{m}$ を示す。

【図1 C】84-1、細胞表面ビメンチン(CSV)特異的抗体の単離及び特性評価である。図1 Aは、CSV特異的抗体の抗体スクリーニングの概略的表現である。異なるハイブリドーマ上清からのモノクローナル抗体のプールを、フローサイトメトリーを用いてCSV結合について分析し、癌特異的結合について選択した。選択された抗体を、ELISA及びウェスタンブロット法を用いて、ビメンチンについて特性化した。図1 Bは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの発現の免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株SKNBE-2(神経芽細胞腫)、患者の血液から単離されたAML細胞、及びLM7(骨肉腫)細胞でのみ検出可能であるが、一方、非上皮性正常細胞HUVEC、HF0B、及びPBMCはCSVの発現に対してネガティブであった。イソタイプ対照を陰性対照に使用した。図1 Cは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株MDA-MB-453(乳癌)、DLD-1(結腸癌)、及びHLM-6(肝臓癌)でのみ検出可能であるが、一方、正常な上皮細胞株HEK-293、NCM-356、及びMCF-10Aは、CSVの発現に対してネガティブであった。図1 Dは、共焦点顕微鏡を用いる、正常細胞及び癌細胞株中のCSVについての細胞表面染色分析である。HLM-3(肝臓癌)及びNCM-356(正常な結腸)細胞を、CSV、WGA(細胞表面マーカー)、及び核染色剤DRAQ5に対して染色した。84-1への結合は、白色の矢印で示されている図の拡大部分から明らかのように、WGAと同時局在化する細胞表面ビメンチンを示す。スケールは10  $\mu\text{m}$ を示す。図1 Eは、フローサイトメトリーを用いるヒト原発癌及び転移性癌中のCSVの免疫学的評価であり、ヒト原発性結腸癌(HPC1)及びヒト肝臓転移性癌(HLM3)の分析は、原発性HPC1細胞と比べて、HLM3上のCSVの大量の発現を示した。図1 Fは、共焦点顕微鏡を用いる、Gel trexの薄いコーティングが施されたウェル上のHPC1由来スフェア中のCSVの検出である。CSVは、スフェアの周辺部でほとんどの細胞で検出されなかった。核染色液DRAQ5を用いて、細胞を分離した。スケールは20  $\mu\text{m}$ を示す。

【図1 D】84-1、細胞表面ビメンチン(CSV)特異的抗体の単離及び特性評価である。図1 Aは、CSV特異的抗体の抗体スクリーニングの概略的表現である。異なるハイブリドーマ上清からのモノクローナル抗体のプールを、フローサイトメトリーを用いてCSV結合について分析し、癌特異的結合について選択した。選択された抗体を、ELISA及びウェスタンブロット法を用いて、ビメンチンについて特性化した。図1 Bは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの発現の免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株SKNBE-2(神経芽細胞腫)、患者の血液から単離されたAML細胞、及びLM7(骨肉腫)細胞でのみ検出可能であるが、一方、非上皮性正常細胞HUVEC、HF0B、及びPBMCはCSVの発現に対してネガティブであった。イソタイプ対照を陰性対照に使用した。図1 Cは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株MDA-MB-453(乳癌)、DLD-1(結腸癌)、及びHLM-6(肝臓癌)でのみ検出可能であるが、一方、正常な上皮細胞株HEK-293、NCM-356、及びMCF-10Aは、CSVの発現に対してネガティブであった。図1 Dは、共焦点顕微鏡を用いる、正常細胞及び癌細胞株中のCSVについての細胞表面染色分析である。HLM-3(肝臓癌)及びNCM-356(正常な結腸)細胞を、CSV、WGA(細胞表面マーカー)、及び核染色剤DRAQ5に対して染色した。84-1への結合は、白色の矢印で示されている図の拡大部分から明らかのように、WGAと同時局在化する細胞表面

10

20

30

40

50

ビメンチンを示す。スケールは10 μmを示す。図1 Eは、フローサイトメトリーを用いるヒト原発癌及び転移性癌中のCSVの免疫学的評価であり、ヒト原発性結腸癌(HPC1)及びヒト肝臓転移性癌(HLM3)の分析は、原発性HPC1細胞と比べて、HLM3上のCSVの大量の発現を示した。図1 Fは、共焦点顕微鏡を用いる、Gel trexの薄いコーティングが施されたウェル上のHPC1由来スフェア中のCSVの検出である。CSVは、スフェアの周辺部でほとんどの細胞で検出されなかった。核染色液DRAQ5を用いて、細胞を分離した。スケールは20 μmを示す。

【図1 E】84-1、細胞表面ビメンチン(CSV)特異的抗体の単離及び特性評価である。図1 Aは、CSV特異的抗体の抗体スクリーニングの概略的表現である。異なるハイブリドーマ上清からのモノクローナル抗体のプールを、フローサイトメトリーを用いてCSV結合について分析し、癌特異的結合について選択した。選択された抗体を、ELISA及びウェスタンブロット法を用いて、ビメンチンについて特性化した。図1 Bは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの発現の免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株SKNBE-2(神経芽細胞腫)、患者の血液から単離されたAML細胞、及びLM7(骨肉腫)細胞でのみ検出可能であるが、一方、非上皮性正常細胞HUVEC、HF0B、及びPBMCはCSVの発現に対してネガティブであった。イソタイプ対照を陰性対照に使用した。図1 Cは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株MDA-MB-453(乳癌)、DLD-1(結腸癌)、及びHLM-6(肝臓癌)でのみ検出可能であるが、一方、正常な上皮細胞株HEK-293、NCM-356、及びMCF-10Aは、CSVの発現に対してネガティブであった。図1 Dは、共焦点顕微鏡を用いる、正常細胞及び癌細胞株中のCSVについての細胞表面染色分析である。HLM-3(肝臓癌)及びNCM-356(正常な結腸)細胞を、CSV、WGA(細胞表面マーカー)、及び核染色剤DRAQ5に対して染色した。84-1への結合は、白色の矢印で示されている図の拡大部分から明らかのように、WGAと同時局在化する細胞表面ビメンチンを示す。スケールは10 μmを示す。図1 Eは、フローサイトメトリーを用いるヒト原発癌及び転移性癌中のCSVの免疫学的評価であり、ヒト原発性結腸癌(HPC1)及びヒト肝臓転移性癌(HLM3)の分析は、原発性HPC1細胞と比べて、HLM3上のCSVの大量の発現を示した。図1 Fは、共焦点顕微鏡を用いる、Gel trexの薄いコーティングが施されたウェル上のHPC1由来スフェア中のCSVの検出である。CSVは、スフェアの周辺部でほとんどの細胞で検出されなかった。核染色液DRAQ5を用いて、細胞を分離した。スケールは20 μmを示す。

【図1 F】84-1、細胞表面ビメンチン(CSV)特異的抗体の単離及び特性評価である。図1 Aは、CSV特異的抗体の抗体スクリーニングの概略的表現である。異なるハイブリドーマ上清からのモノクローナル抗体のプールを、フローサイトメトリーを用いてCSV結合について分析し、癌特異的結合について選択した。選択された抗体を、ELISA及びウェスタンブロット法を用いて、ビメンチンについて特性化した。図1 Bは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの発現の免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株SKNBE-2(神経芽細胞腫)、患者の血液から単離されたAML細胞、及びLM7(骨肉腫)細胞でのみ検出可能であるが、一方、非上皮性正常細胞HUVEC、HF0B、及びPBMCはCSVの発現に対してネガティブであった。イソタイプ対照を陰性対照に使用した。図1 Cは、フローサイトメトリーを用いる異なる非上皮性正常細胞及び癌細胞株中のCSVの免疫学的評価である。CSVは、癌細胞株MDA-MB-453(乳癌)、DLD-1(結腸癌)、及びHLM-6(肝臓癌)でのみ検出可能であるが、一方、正常な上皮細胞株HEK-293、NCM-356、及びMCF-10Aは、CSVの発現に対してネガティブであった。図1 Dは、共焦点顕微鏡を用いる、正常細胞及び癌細胞株中のCSVについての細胞表面染色分析である。HLM-3(肝臓癌)及びNCM-356(正常な結腸)細胞を、CSV、WGA(細胞表面マーカー)、及び核染色剤DRAQ5に対して染色した。84-1への結合は、白色の矢印で示されている図の拡大部分から明らかのように、WGAと同時局在化する細胞表面

10

20

30

40

50

ビメンチンを示す。スケールは10 μmを示す。図1Eは、フローサイトメトリーを用いるヒト原発癌及び転移性癌中のCSVの免疫学的評価であり、ヒト原発性結腸癌(HPC1)及びヒト肝臓転移性癌(HLM3)の分析は、原発性HPC1細胞と比べて、HLM3上のCSVの大量の発現を示した。図1Fは、共焦点顕微鏡を用いる、Gel trexの薄いコーティングが施されたウェル上のHPC1由来スフェア中のCSVの検出である。CSVは、スフェアの周辺部でほとんどの細胞で検出されなかった。核染色液DRAQ5を用いて、細胞を分離した。スケールは20 μmを示す。

【図2-1】84-1 mAbを用いてCTCを単離し、計数するための方法論である。図2Aは、84-1 媒介CTC検出、単離、計数、及び分析の概略的表現である。図2Bは、蛍光顕微鏡を用いる血液中にスパイクされた単一細胞の検出である。単一のLM8細胞を段階希釈及びスポット分析を用いて単離し、1 mlの血液中にスパイクした。RBC溶解後に、単核化細胞集団を84-1 mAb及びAlexa Fluor-488二次抗体について染色し、CSV陽性細胞を検出した。高倍率は、CSV陽性である全血集団数の単一細胞の検出を示す。図2Cは、全血からの単一細胞の単離である。全血中にスパイクされた単一細胞を、Easy Sepに基づく84-1陽性及びCD45陰性選択を用いて単離した。この単一細胞を、37 °Cでインキュベーション後に、培養皿上で2時間観察した。図2Dは、血液から単離された細胞を、CSV、CD45に対する抗体及び核染色DRAQ5を用いて共染色した顕微鏡写真である。スケールは、10 μmを示す。図2Eは、健常者、原発性及び転移性癌患者の血液検体からのCSV陽性CTCの計数である。原発性癌患者からの血液を使用して、検出の閾値(点線)を選択した。転移性癌患者のサンプルは、比較的高いCTC計数を示した。

【図2-2】84-1 mAbを用いてCTCを単離し、計数するための方法論である。図2Aは、84-1 媒介CTC検出、単離、計数、及び分析の概略的表現である。図2Bは、蛍光顕微鏡を用いる血液中にスパイクされた単一細胞の検出である。単一のLM8細胞を段階希釈及びスポット分析を用いて単離し、1 mlの血液中にスパイクした。RBC溶解後に、単核化細胞集団を84-1 mAb及びAlexa Fluor-488二次抗体について染色し、CSV陽性細胞を検出した。高倍率は、CSV陽性である全血集団数の単一細胞の検出を示す。図2Cは、全血からの単一細胞の単離である。全血中にスパイクされた単一細胞を、Easy Sepに基づく84-1陽性及びCD45陰性選択を用いて単離した。この単一細胞を、37 °Cでインキュベーション後に、培養皿上で2時間観察した。図2Dは、血液から単離された細胞を、CSV、CD45に対する抗体及び核染色DRAQ5を用いて共染色した顕微鏡写真である。スケールは、10 μmを示す。図2Eは、健常者、原発性及び転移性癌患者の血液検体からのCSV陽性CTCの計数である。原発性癌患者からの血液を使用して、検出の閾値(点線)を選択した。転移性癌患者のサンプルは、比較的高いCTC計数を示した。

【図3A】単離されたCTCの分子の特性化である。図3Aは、CTC及び適合する白血球中のKRASの突然変異分析である。CTCは、均一な(中央パネル)及び不均一なコドン13突然変異(右側パネル)保有したが、白血球は、野生型配列を有した(左側パネル)。図3Bは、ユーイング肉腫(EWS)及び平滑筋肉腫(LMS)サンプルからのCTCの分析である。EWS CTCは、CD99マーカーを用いて検証し、LMS CTCは、α-SMA染色を用いて検証した。スケールは10 μmを示す。図3Cは、分子特異的マーカーについてのCTCの分析である。84-1 mAbを用いて単離されたCTCを、EqCAM(上皮マーカー)、SLUG(EMT特異的調節因子)、及びE-カドヘリンについて染色した。スケールは10 μmを示す。図3Dは、ビメンチン、β-カテニン、及びc-myc発現についてのCTCの分析である。CTCをヒト結腸癌サンプルから単離し、総ビメンチン、β-カテニン、c-myc及び核染色DRAQ5について染色し、これは患者サンプル中でβ-カテニン及びc-mycの完全な核の局在化を示した。スケールは10 μmを示す。図3Eは、オルトバナジウム酸ナトリウム(SOV)のLM8及びWBCに及ぼす効果である。LM8及びWBCをSOVで処理し、共焦点顕微鏡を用いてCSVの発現について分析した。細胞をCSV、細胞表面マーカーのWGA、及び

10

20

30

40

50

核染色 D R A Q 5 について染色した。癌細胞の S O V による 15 分間の処理は、未処理細胞のものとは比べると、C S V 発現を増強することが明らかである。W B C に及ぼす S O V の効果は観察されなかった。図 3 F は、患者由来の C T C に及ぼす S O V の効果の分析である。溶解後の患者の血液を S O V 処理にかけて、84-1 及び核染色 D R A Q 5 を用いてビメンチンについて染色した。S O V 処理は、腫瘍細胞中の C S V の発現を特異的に増強した。スケールは 10  $\mu$ m を示す。

【図 3 B】単離された C T C の分子の特性化である。図 3 A は、C T C 及び適合する白血球中の K R A S の突然変異分析である。C T C は、均一な（中央パネル）及び不均一なコドン 13 突然変異（右側パネル）保有したが、白血球は、野生型配列を有した（左側パネル）。図 3 B は、ユーイング肉腫（EWS）及び平滑筋肉腫（LMS）サンプルからの C T C の分析である。EWS C T C は、CD99 マーカーを用いて検証し、LMS C T C は、 $\alpha$ -SMA 染色を用いて検証した。スケールは 10  $\mu$ m を示す。図 3 C は、分子特異的マーカーについての C T C の分析である。84-1 mAb を用いて単離された C T C を、E q C A M（上皮マーカー）、S L U G（EMT 特異的調節因子）、及び E - カドヘリンについて染色した。スケールは 10  $\mu$ m を示す。図 3 D は、ビメンチン、 $\beta$ -カテニン、及び c - m y c 発現についての C T C の分析である。C T C をヒト結腸癌サンプルから単離し、総ビメンチン、 $\beta$ -カテニン、c - m y c 及び核染色 D R A Q 5 について染色し、これは患者サンプル中で  $\beta$ -カテニン及び c - m y c の完全な核の局在化を示した。スケールは 10  $\mu$ m を示す。図 3 E は、オルトバナジウム酸ナトリウム（S O V）の L M 8 及び W B C に及ぼす効果である。L M 8 及び W B C を S O V で処理し、共焦点顕微鏡を用いて C S V の発現について分析した。細胞を C S V、細胞表面マーカーの W G A、及び核染色 D R A Q 5 について染色した。癌細胞の S O V による 15 分間の処理は、未処理細胞のものとは比べると、C S V 発現を増強することが明らかである。W B C に及ぼす S O V の効果は観察されなかった。図 3 F は、患者由来の C T C に及ぼす S O V の効果の分析である。溶解後の患者の血液を S O V 処理にかけて、84-1 及び核染色 D R A Q 5 を用いてビメンチンについて染色した。S O V 処理は、腫瘍細胞中の C S V の発現を特異的に増強した。スケールは 10  $\mu$ m を示す。

【図 3 C】単離された C T C の分子の特性化である。図 3 A は、C T C 及び適合する白血球中の K R A S の突然変異分析である。C T C は、均一な（中央パネル）及び不均一なコドン 13 突然変異（右側パネル）保有したが、白血球は、野生型配列を有した（左側パネル）。図 3 B は、ユーイング肉腫（EWS）及び平滑筋肉腫（LMS）サンプルからの C T C の分析である。EWS C T C は、CD99 マーカーを用いて検証し、LMS C T C は、 $\alpha$ -SMA 染色を用いて検証した。スケールは 10  $\mu$ m を示す。図 3 C は、分子特異的マーカーについての C T C の分析である。84-1 mAb を用いて単離された C T C を、E q C A M（上皮マーカー）、S L U G（EMT 特異的調節因子）、及び E - カドヘリンについて染色した。スケールは 10  $\mu$ m を示す。図 3 D は、ビメンチン、 $\beta$ -カテニン、及び c - m y c 発現についての C T C の分析である。C T C をヒト結腸癌サンプルから単離し、総ビメンチン、 $\beta$ -カテニン、c - m y c 及び核染色 D R A Q 5 について染色し、これは患者サンプル中で  $\beta$ -カテニン及び c - m y c の完全な核の局在化を示した。スケールは 10  $\mu$ m を示す。図 3 E は、オルトバナジウム酸ナトリウム（S O V）の L M 8 及び W B C に及ぼす効果である。L M 8 及び W B C を S O V で処理し、共焦点顕微鏡を用いて C S V の発現について分析した。細胞を C S V、細胞表面マーカーの W G A、及び核染色 D R A Q 5 について染色した。癌細胞の S O V による 15 分間の処理は、未処理細胞のものとは比べると、C S V 発現を増強することが明らかである。W B C に及ぼす S O V の効果は観察されなかった。図 3 F は、患者由来の C T C に及ぼす S O V の効果の分析である。溶解後の患者の血液を S O V 処理にかけて、84-1 及び核染色 D R A Q 5 を用いてビメンチンについて染色した。S O V 処理は、腫瘍細胞中の C S V の発現を特異的に増強した。スケールは 10  $\mu$ m を示す。

【図 3 D】単離された C T C の分子の特性化である。図 3 A は、C T C 及び適合する白血球中の K R A S の突然変異分析である。C T C は、均一な（中央パネル）及び不均一なコ

10

20

30

40

50

ドン13突然変異(右側パネル)保有したが、白血球は、野生型配列を有した(左側パネル)。図3Bは、ユーイング肉腫(EWS)及び平滑筋肉腫(LMS)サンプルからのCTCの分析である。EWS CTCは、CD99マーカーを用いて検証し、LMS CTCは、 $\alpha$ -SMA染色を用いて検証した。スケールは10 $\mu$ mを示す。図3Cは、分子特異的マーカーについてのCTCの分析である。84-1mAbを用いて単離されたCTCを、EqCAM(上皮マーカー)、SLUG(EMT特異的調節因子)、及びE-カドヘリンについて染色した。スケールは10 $\mu$ mを示す。図3Dは、ビメンチン、 $\beta$ -カテニン、及びc-myc発現についてのCTCの分析である。CTCをヒト結腸癌サンプルから単離し、総ビメンチン、 $\beta$ -カテニン、c-myc及び核染色DRAQ5について染色し、これは患者サンプル中で $\beta$ -カテニン及びc-mycの完全な核の局在化を示した。スケールは10 $\mu$ mを示す。図3Eは、オルトバナジウム酸ナトリウム(SOV)のLM8及びWBCに及ぼす効果である。LM8及びWBCをSOVで処理し、共焦点顕微鏡を用いてCSVの発現について分析した。細胞をCSV、細胞表面マーカーのWGA、及び核染色DRAQ5について染色した。癌細胞のSOVによる15分間の処理は、未処理細胞のものとは比べるとき、CSV発現を増強することが明らかである。WBCに及ぼすSOVの効果は観察されなかった。図3Fは、患者由来のCTCに及ぼすSOVの効果の分析である。溶解後の患者の血液をSOV処理にかけて、84-1及び核染色DRAQ5を用いてビメンチンについて染色した。SOV処理は、腫瘍細胞中のCSVの発現を特異的に増強した。スケールは10 $\mu$ mを示す。

【図3E】単離されたCTCの分子の特性化である。図3Aは、CTC及び適合する白血球中のKRASの突然変異分析である。CTCは、均一な(中央パネル)及び不均一なコードン13突然変異(右側パネル)保有したが、白血球は、野生型配列を有した(左側パネル)。図3Bは、ユーイング肉腫(EWS)及び平滑筋肉腫(LMS)サンプルからのCTCの分析である。EWS CTCは、CD99マーカーを用いて検証し、LMS CTCは、 $\alpha$ -SMA染色を用いて検証した。スケールは10 $\mu$ mを示す。図3Cは、分子特異的マーカーについてのCTCの分析である。84-1mAbを用いて単離されたCTCを、EqCAM(上皮マーカー)、SLUG(EMT特異的調節因子)、及びE-カドヘリンについて染色した。スケールは10 $\mu$ mを示す。図3Dは、ビメンチン、 $\beta$ -カテニン、及びc-myc発現についてのCTCの分析である。CTCをヒト結腸癌サンプルから単離し、総ビメンチン、 $\beta$ -カテニン、c-myc及び核染色DRAQ5について染色し、これは患者サンプル中で $\beta$ -カテニン及びc-mycの完全な核の局在化を示した。スケールは10 $\mu$ mを示す。図3Eは、オルトバナジウム酸ナトリウム(SOV)のLM8及びWBCに及ぼす効果である。LM8及びWBCをSOVで処理し、共焦点顕微鏡を用いてCSVの発現について分析した。細胞をCSV、細胞表面マーカーのWGA、及び核染色DRAQ5について染色した。癌細胞のSOVによる15分間の処理は、未処理細胞のものとは比べるとき、CSV発現を増強することが明らかである。WBCに及ぼすSOVの効果は観察されなかった。図3Fは、患者由来のCTCに及ぼすSOVの効果の分析である。溶解後の患者の血液をSOV処理にかけて、84-1及び核染色DRAQ5を用いてビメンチンについて染色した。SOV処理は、腫瘍細胞中のCSVの発現を特異的に増強した。スケールは10 $\mu$ mを示す。

【図3F】単離されたCTCの分子の特性化である。図3Aは、CTC及び適合する白血球中のKRASの突然変異分析である。CTCは、均一な(中央パネル)及び不均一なコードン13突然変異(右側パネル)保有したが、白血球は、野生型配列を有した(左側パネル)。図3Bは、ユーイング肉腫(EWS)及び平滑筋肉腫(LMS)サンプルからのCTCの分析である。EWS CTCは、CD99マーカーを用いて検証し、LMS CTCは、 $\alpha$ -SMA染色を用いて検証した。スケールは10 $\mu$ mを示す。図3Cは、分子特異的マーカーについてのCTCの分析である。84-1mAbを用いて単離されたCTCを、EqCAM(上皮マーカー)、SLUG(EMT特異的調節因子)、及びE-カドヘリンについて染色した。スケールは10 $\mu$ mを示す。図3Dは、ビメンチン、 $\beta$ -カテニン、及びc-myc発現についてのCTCの分析である。CTCをヒト結腸癌サンプルか

10

20

30

40

50

ら単離し、総ビメンチン、 $\alpha$ -カテニン、c-myc及び核染色DRAQ5について染色し、これは患者サンプル中で $\alpha$ -カテニン及びc-mycの完全な核の局在化を示した。スケールは10 $\mu$ mを示す。図3Eは、オルトバナジウム酸ナトリウム(SOV)のLM8及びWBCに及ぼす効果である。LM8及びWBCをSOVで処理し、共焦点顕微鏡を用いてCSVの発現について分析した。細胞をCSV、細胞表面マーカーのWGA、及び核染色DRAQ5について染色した。癌細胞のSOVによる15分間の処理は、未処理細胞のものとは比べると、CSV発現を増強することが明らかである。WBCに及ぼすSOVの効果は観察されなかった。図3Fは、患者由来のCTCに及ぼすSOVの効果の分析である。溶解後の患者の血液をSOV処理にかけて、84-1及び核染色DRAQ5を用いてビメンチンについて染色した。SOV処理は、腫瘍細胞中のCSVの発現を特異的に増強した。スケールは10 $\mu$ mを示す。

【図4-1】図4Aは、市販の抗体を用いる、骨肉腫細胞株LM7中のCSVの免疫学的評価である。フローサイトメトリーを用いるLM7細胞上のCSVの検出のために、AMF-17B、EC-40、CS、及びV-9抗体を利用したが、これらの抗体を用いて観察された結合はなかった。図4Bは、フローサイトメトリーを用いるLM7骨肉腫細胞株に対するCHP-TAMRAペプチドの免疫学的評価である。CHP-TAMRAペプチドはLM7細胞に結合し、これはこれらの細胞上のCSVの存在を示している。図4Cは、ウェスタンブロット法を用いる84-1及び12-1のrhVimタンパク質への結合の評価である。10、100及び1000ngのrhVimを、4~20%の勾配ゲル上に充填し、ウェスタンブロット法を行った。プロットを84-1及び12-1抗体でプローブ探査した。この抗体が総ビメンチンに非常に高い親和性を有することが観察された。図4Dでは、LM7細胞からの細胞溶解物を調製し、84-1及び12-1抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロット法を行った。プロットを、細胞シグナル伝達抗体(IgGバンドを除外するために、ウサギ起源)でプローブ探査した。図4Eは、共焦点顕微鏡を用いる癌細胞株における細胞内及び細胞外ビメンチン染色分析である。HLM-3(肝臓癌)細胞を、CSV、WGA、及び核染色DRAQ5について染色した。非透過処理細胞中の84-1結合は、専ら膜に特異的であったが、透過処理細胞は、総ビメンチンレベルを示した。スケールは、20 $\mu$ mを示す。

【図4-2】図4Aは、市販の抗体を用いる、骨肉腫細胞株LM7中のCSVの免疫学的評価である。フローサイトメトリーを用いるLM7細胞上のCSVの検出のために、AMF-17B、EC-40、CS、及びV-9抗体を利用したが、これらの抗体を用いて観察された結合はなかった。図4Bは、フローサイトメトリーを用いるLM7骨肉腫細胞株に対するCHP-TAMRAペプチドの免疫学的評価である。CHP-TAMRAペプチドはLM7細胞に結合し、これはこれらの細胞上のCSVの存在を示している。図4Cは、ウェスタンブロット法を用いる84-1及び12-1のrhVimタンパク質への結合の評価である。10、100及び1000ngのrhVimを、4~20%の勾配ゲル上に充填し、ウェスタンブロット法を行った。プロットを84-1及び12-1抗体でプローブ探査した。この抗体が総ビメンチンに非常に高い親和性を有することが観察された。図4Dでは、LM7細胞からの細胞溶解物を調製し、84-1及び12-1抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロット法を行った。プロットを、細胞シグナル伝達抗体(IgGバンドを除外するために、ウサギ起源)でプローブ探査した。図4Eは、共焦点顕微鏡を用いる癌細胞株における細胞内及び細胞外ビメンチン染色分析である。HLM-3(肝臓癌)細胞を、CSV、WGA、及び核染色DRAQ5について染色した。非透過処理細胞中の84-1結合は、専ら膜に特異的であったが、透過処理細胞は、総ビメンチンレベルを示した。スケールは、20 $\mu$ mを示す。

【図4-3】図4Aは、市販の抗体を用いる、骨肉腫細胞株LM7中のCSVの免疫学的評価である。フローサイトメトリーを用いるLM7細胞上のCSVの検出のために、AMF-17B、EC-40、CS、及びV-9抗体を利用したが、これらの抗体を用いて観察された結合はなかった。図4Bは、フローサイトメトリーを用いるLM7骨肉腫細胞株に対するCHP-TAMRAペプチドの免疫学的評価である。CHP-TAMRAペプチ

10

20

30

40

50

ドはLM7細胞に結合し、これはこれらの細胞上のCSVの存在を示している。図4Cは、ウェスタンブロット法を用いる84-1及び12-1のrhVimタンパク質への結合の評価である。10、100及び1000ngのrhVimを、4~20%の勾配ゲル上に充填し、ウェスタンブロット法を行った。ブロットを84-1及び12-1抗体でプローブ探査した。この抗体が総ビメンチンに非常に高い親和性を有することが観察された。図4Dでは、LM7細胞からの細胞溶解物を調製し、84-1及び12-1抗体を用いて免疫沈降を行い、ウェスタンブロット法を行った。ブロットを、細胞シグナル伝達抗体(IgGバンドを除外するために、ウサギ起源)でプローブ探査した。図4Eは、共焦点顕微鏡を用いる癌細胞株における細胞内及び細胞外ビメンチン染色分析である。HLM-3(肝臓癌)細胞を、CSV、WGA、及び核染色DRAQ5について染色した。非透過処理細胞中の84-1結合は、専ら膜に特異的であったが、透過処理細胞は、総ビメンチンレベルを示した。スケールは、20µmを示す。

【図5-1】図5Aは、ヒト血液からのPBMC集団の免疫蛍光画像を用いるCSV染色についての評価である。PBMC集団をヒト血液から単離し、CD3e、CD11b、及びCD45染色を含む異なるマーカーについて、84-1と共に評価した。これらの細胞は、84-1抗体によっていかなる強い免疫染色も示さなかった。スケールは10µmを示す。図5Bは、共焦点顕微鏡を用いる正常細胞及び癌細胞株の細胞内ビメンチン染色分析である。HLM-3(肝臓癌)及びNCM-356(正常な結腸)細胞を、CSV、WGA(細胞表面マーカー)及び核染色DRAQ5について染色した。84-1の結合は、NCM-356細胞と比べて、HLM3細胞中のみのビメンチンの存在を示す。スケールは10µmを示す。図5Cは、フローサイトメトリーを用いる、骨肉腫患者のサンプルから単離したCSV細胞の免疫学的評価であって、OST-DL-391(転移なし)及びOST-DL-396A(脳への転移)の分析は、OST-DL-396A上のCSVで、OST-DL-391細胞のものに比べて細胞の分画の増加を示した。図5Dはフローサイトメトリーを用いるヒトの原発性癌細胞及び転移性癌細胞におけるCSVの免疫学的評価であり、ヒト原発性結腸癌(HPC)及びヒト肝臓転移性癌(HLM)の分析は、原発性HPC1細胞と比べて、HLM3上のCSVの大量の発現を示した。CPM-1は、結腸から転移した肺癌から単離された細胞を表し、原発性癌細胞のものに比べて増加するCSVを示した。図5Eは、共焦点顕微鏡を用いる、Geltrex被覆ウェル上のHPC1由来のスフェア中のビメンチン及びβ-カテニンの発現である。総ビメンチンは、スフェアの周辺部においてほとんどの細胞で検出可能ではなく、これはβ-カテニンの核蓄積と関連した。核染色DRAQ5を用いて細胞を分離した。スケールは20µmを示す。

【図5-2】図5Aは、ヒト血液からのPBMC集団の免疫蛍光画像を用いるCSV染色についての評価である。PBMC集団をヒト血液から単離し、CD3e、CD11b、及びCD45染色を含む異なるマーカーについて、84-1と共に評価した。これらの細胞は、84-1抗体によっていかなる強い免疫染色も示さなかった。スケールは10µmを示す。図5Bは、共焦点顕微鏡を用いる正常細胞及び癌細胞株の細胞内ビメンチン染色分析である。HLM-3(肝臓癌)及びNCM-356(正常な結腸)細胞を、CSV、WGA(細胞表面マーカー)及び核染色DRAQ5について染色した。84-1の結合は、NCM-356細胞と比べて、HLM3細胞中のみのビメンチンの存在を示す。スケールは10µmを示す。図5Cは、フローサイトメトリーを用いる、骨肉腫患者のサンプルから単離したCSV細胞の免疫学的評価であって、OST-DL-391(転移なし)及びOST-DL-396A(脳への転移)の分析は、OST-DL-396A上のCSVで、OST-DL-391細胞のものに比べて細胞の分画の増加を示した。図5Dはフローサイトメトリーを用いるヒトの原発性癌細胞及び転移性癌細胞におけるCSVの免疫学的評価であり、ヒト原発性結腸癌(HPC)及びヒト肝臓転移性癌(HLM)の分析は、原発性HPC1細胞と比べて、HLM3上のCSVの大量の発現を示した。CPM-1は、結腸から転移した肺癌から単離された細胞を表し、原発性癌細胞のものに比べて増加するCSVを示した。図5Eは、共焦点顕微鏡を用いる、Geltrex被覆ウェル上のHPC1由来のスフェア中のビメンチン及びβ-カテニンの発現である。総ビメンチンは、ス

10

20

30

40

50

フェアの周辺部においてほとんどの細胞で検出可能ではなく、これは - カテニンの核蓄積と相関した。核染色 D R A Q 5 を用いて細胞を分離した。スケールは 20  $\mu$ m を示す。

【図 5 - 3】図 5 A は、ヒト血液からの P B M C 集団の免疫蛍光画像を用いる C S V 染色についての評価である。P B M C 集団をヒト血液から単離し、C D 3 e、C D 1 1 b、及び C D 4 5 染色を含む異なるマーカーについて、8 4 - 1 と共に評価した。これらの細胞は、8 4 - 1 抗体によっていかなる強い免疫染色も示さなかった。スケールは 10  $\mu$ m を示す。図 5 B は、共焦点顕微鏡を用いる正常細胞及び癌細胞株の細胞内ビメンチン染色分析である。H L M - 3 (肝臓癌) 及び N C M - 3 5 6 (正常な結腸) 細胞を、C S V、W G A (細胞表面マーカー) 及び核染色 D R A Q 5 について染色した。8 4 - 1 の結合は、N C M - 3 5 6 細胞と比べて、H L M 3 細胞中のみのビメンチンの存在を示す。スケールは 10  $\mu$ m を示す。図 5 C は、フローサイトメトリーを用いる、骨肉腫患者のサンプルから単離した C S V 細胞の免疫学的評価であって、O S T - D L - 3 9 1 (転移なし) 及び O S T - D L - 3 9 6 A (脳への転移) の分析は、O S T - D L - 3 9 6 A 上の C S V で、O S T - D L - 3 9 1 細胞のものに比べて細胞の分画の増加を示した。図 5 D はフローサイトメトリーを用いるヒトの原発性癌細胞及び転移性癌細胞における C S V の免疫学的評価であり、ヒト原発性結腸癌 (H P C) 及びヒト肝臓転移性癌 (H L M) の分析は、原発性 H P C 1 細胞と比べて、H L M 3 上の C S V の大量の発現を示した。C P M - 1 は、結腸から転移した肺癌から単離された細胞を表し、原発性癌細胞のものに比べて増加する C S V を示した。図 5 E は、共焦点顕微鏡を用いる、G e l t r e x 被覆ウェル上の H P C 1 由来のスフェア中のビメンチン及び - カテニンの発現である。総ビメンチンは、スフェアの周辺部においてほとんどの細胞で検出可能ではなく、これは - カテニンの核蓄積と相関した。核染色 D R A Q 5 を用いて細胞を分離した。スケールは 20  $\mu$ m を示す。

【図 5 - 4】図 5 A は、ヒト血液からの P B M C 集団の免疫蛍光画像を用いる C S V 染色についての評価である。P B M C 集団をヒト血液から単離し、C D 3 e、C D 1 1 b、及び C D 4 5 染色を含む異なるマーカーについて、8 4 - 1 と共に評価した。これらの細胞は、8 4 - 1 抗体によっていかなる強い免疫染色も示さなかった。スケールは 10  $\mu$ m を示す。図 5 B は、共焦点顕微鏡を用いる正常細胞及び癌細胞株の細胞内ビメンチン染色分析である。H L M - 3 (肝臓癌) 及び N C M - 3 5 6 (正常な結腸) 細胞を、C S V、W G A (細胞表面マーカー) 及び核染色 D R A Q 5 について染色した。8 4 - 1 の結合は、N C M - 3 5 6 細胞と比べて、H L M 3 細胞中のみのビメンチンの存在を示す。スケールは 10  $\mu$ m を示す。図 5 C は、フローサイトメトリーを用いる、骨肉腫患者のサンプルから単離した C S V 細胞の免疫学的評価であって、O S T - D L - 3 9 1 (転移なし) 及び O S T - D L - 3 9 6 A (脳への転移) の分析は、O S T - D L - 3 9 6 A 上の C S V で、O S T - D L - 3 9 1 細胞のものに比べて細胞の分画の増加を示した。図 5 D はフローサイトメトリーを用いるヒトの原発性癌細胞及び転移性癌細胞における C S V の免疫学的評価であり、ヒト原発性結腸癌 (H P C) 及びヒト肝臓転移性癌 (H L M) の分析は、原発性 H P C 1 細胞と比べて、H L M 3 上の C S V の大量の発現を示した。C P M - 1 は、結腸から転移した肺癌から単離された細胞を表し、原発性癌細胞のものに比べて増加する C S V を示した。図 5 E は、共焦点顕微鏡を用いる、G e l t r e x 被覆ウェル上の H P C 1 由来のスフェア中のビメンチン及び - カテニンの発現である。総ビメンチンは、スフェアの周辺部においてほとんどの細胞で検出可能ではなく、これは - カテニンの核蓄積と相関した。核染色 D R A Q 5 を用いて細胞を分離した。スケールは 20  $\mu$ m を示す。

【図 6 - 1】図 6 A は、腫瘍細胞と免疫細胞との間の相互作用である。血液から単離された単核化集団を、8 4 - 1、C D 4 5、及び D R A Q 5 染色について評価した。C D 4 5 陽性である免疫細胞は、核のサイズによって決定されたように、8 4 - 1 陽性腫瘍細胞と相互作用していた。図 6 B 及び C は、マウスにおける C T C の連続分析である。マウスに L M 8 (図 6 B) または C T - 2 6 (図 6 C) 細胞を移植した。約 200  $\mu$ l の血液を、顎下頰出血法によって得た。マウスが腫瘍負荷のために安楽死されるまで、サンプルを約一週間間隔で得た。左側パネルは、対照として正常なマウスで毎週計数された C T C を示す。図 6 B 及び C の右側パネルの代表的なデータは、各々がそれぞれ L M 8 または C T -

10

20

30

40

50

26腫瘍を有する1匹のマウスからのデータを示す。ここで表されたデータは、1週間の間隔で得られたCTC対腫瘍体積のプロットである。図6Dは、血液から単離された細胞をCSV、CD45に対する抗体及び核染色DRAQ5を用いて共染色した顕微鏡写真である。スケールは10 $\mu$ mを示す。図6Eは、細胞コロニーの形成について8日間にわたって監視された、LM8(上部パネル)及びCT-26(下部パネル)から単離したCTCの単離及び培養である。スケールは10 $\mu$ mを示す。図6Fは、イヌモデルにおける84-1陽性CTCの検出である。血液サンプルからCTCを単離し、明視野及び蛍光顕微鏡によって分析した。CTCを単離し、96ウェルプレート上で培養し、明視野画像を獲得した。蛍光画像については、CTCをCSV、CD45、及び核染色DRAQ5について染色し、共焦点顕微鏡によって分析した。細胞生存能をカルセイン-AM染色を用いてテストした。スケールは10 $\mu$ mを示す。

【図6-2】図6Aは、腫瘍細胞と免疫細胞との間の相互作用である。血液から単離された単核化集団を、84-1、CD45、及びDRAQ5染色について評価した。CD45陽性である免疫細胞は、核のサイズによって決定されたように、84-1陽性腫瘍細胞と相互作用していた。図6B及びCは、マウスにおけるCTCの連続分析である。マウスにLM8(図6B)またはCT-26(図6C)細胞を移植した。約200 $\mu$ lの血液を、顎下頬出血法によって得た。マウスが腫瘍負荷のために安楽死されるまで、サンプルを約一週間間隔で得た。左側パネルは、対照として正常なマウスで毎週計数されたCTCを示す。図6B及びCの右側パネルの代表的なデータは、各々がそれぞれLM8またはCT-26腫瘍を有する1匹のマウスからのデータを示す。ここで表されたデータは、1週間の間隔で得られたCTC対腫瘍体積のプロットである。図6Dは、血液から単離された細胞をCSV、CD45に対する抗体及び核染色DRAQ5を用いて共染色した顕微鏡写真である。スケールは10 $\mu$ mを示す。図6Eは、細胞コロニーの形成について8日間にわたって監視された、LM8(上部パネル)及びCT-26(下部パネル)から単離したCTCの単離及び培養である。スケールは10 $\mu$ mを示す。図6Fは、イヌモデルにおける84-1陽性CTCの検出である。血液サンプルからCTCを単離し、明視野及び蛍光顕微鏡によって分析した。CTCを単離し、96ウェルプレート上で培養し、明視野画像を獲得した。蛍光画像については、CTCをCSV、CD45、及び核染色DRAQ5について染色し、共焦点顕微鏡によって分析した。細胞生存能をカルセイン-AM染色を用いてテストした。スケールは10 $\mu$ mを示す。

【図6-3】図6Aは、腫瘍細胞と免疫細胞との間の相互作用である。血液から単離された単核化集団を、84-1、CD45、及びDRAQ5染色について評価した。CD45陽性である免疫細胞は、核のサイズによって決定されたように、84-1陽性腫瘍細胞と相互作用していた。図6B及びCは、マウスにおけるCTCの連続分析である。マウスにLM8(図6B)またはCT-26(図6C)細胞を移植した。約200 $\mu$ lの血液を、顎下頬出血法によって得た。マウスが腫瘍負荷のために安楽死されるまで、サンプルを約一週間間隔で得た。左側パネルは、対照として正常なマウスで毎週計数されたCTCを示す。図6B及びCの右側パネルの代表的なデータは、各々がそれぞれLM8またはCT-26腫瘍を有する1匹のマウスからのデータを示す。ここで表されたデータは、1週間の間隔で得られたCTC対腫瘍体積のプロットである。図6Dは、血液から単離された細胞をCSV、CD45に対する抗体及び核染色DRAQ5を用いて共染色した顕微鏡写真である。スケールは10 $\mu$ mを示す。図6Eは、細胞コロニーの形成について8日間にわたって監視された、LM8(上部パネル)及びCT-26(下部パネル)から単離したCTCの単離及び培養である。スケールは10 $\mu$ mを示す。図6Fは、イヌモデルにおける84-1陽性CTCの検出である。血液サンプルからCTCを単離し、明視野及び蛍光顕微鏡によって分析した。CTCを単離し、96ウェルプレート上で培養し、明視野画像を獲得した。蛍光画像については、CTCをCSV、CD45、及び核染色DRAQ5について染色し、共焦点顕微鏡によって分析した。細胞生存能をカルセイン-AM染色を用いてテストした。スケールは10 $\mu$ mを示す。

【図7-1】図7Aでは、患者の血液から単離された単核化細胞を、84-1について染

10

20

30

40

50

色した。これらの細胞が、血液中のP B M C集団とは明確に区別されることを観察することができた。図7 Bは、C R C患者から単離されたC T Cの細胞培養である。結腸癌患者の血液から単離された8 4 - 1 + C T Cを、インビトロで9 6ウェルプレートにて培養し、単一細胞分析用に利用した。図7 Cは、フローサイトメトリー分析による、8 4 - 1の結合についてのM D A - M B - 4 6 8分析である。M D A - M B - 4 6 8細胞を、8 4 - 1について染色し、C S Vに結合する細胞の陽性分画について分析した。図7 Dでは、オルトバナジウム酸ナトリウム(S O V)処理は、フローサイトメトリーによって見ることができるよう、L M 7細胞上のC S Vの発現を誘発する。

【図7 - 2】図7 Aでは、患者の血液から単離された単核化細胞を、8 4 - 1について染色した。これらの細胞が、血液中のP B M C集団とは明確に区別されることを観察することができた。図7 Bは、C R C患者から単離されたC T Cの細胞培養である。結腸癌患者の血液から単離された8 4 - 1 + C T Cを、インビトロで9 6ウェルプレートにて培養し、単一細胞分析用に利用した。図7 Cは、フローサイトメトリー分析による、8 4 - 1の結合についてのM D A - M B - 4 6 8分析である。M D A - M B - 4 6 8細胞を、8 4 - 1について染色し、C S Vに結合する細胞の陽性分画について分析した。図7 Dでは、オルトバナジウム酸ナトリウム(S O V)処理は、フローサイトメトリーによって見ることができるよう、L M 7細胞上のC S Vの発現を誘発する。

【図8】1 2 - 1モノクローナル抗体を用いて抽出されたL M 7細胞を、1 2 - 1モノクローナル抗体を用いて細胞表面ピメンチンについて、及びD R A Q 5(核染色)について染色した。スケールバーは1 0 μ mを示す。

【図9】8 4 - 1、C e l l S e a r c h、及び8 4 - 1 + C e l l S e a r c hを用いる乳癌C T C検出法の比較である。各転移性乳癌患者からの1本の採血管を用いて、8 4 - 1法(図9 A)及びC e l l S e a r c h法(図9 B)によってC T Cを計数した。C T Cの平均数を、8 4 - 1法及びC e l l S e a r c h法の両方から計算した(図9 C)。これらの患者を安定性集団(療法に应答する)及び進行性集団(療法に应答せず、腫瘍進行を示す)に分類した。

【図10】8 4 - 1及びC e l l S e a r c hを用いる前立腺癌C T Cの検出法の比較である。各前立腺癌患者からの1本の採血管を用いて、8 4 - 1法及びC e l l S e a r c h法によってC T Cを計数した。これらの患者を安定性集団(療法に应答する)及び進行性集団(療法に应答せず、腫瘍進行を示す)に分類した。

【図11】抗体1 2 - 1強度のプロットである。データの定量化に続いて、ペプチドの生成及び強度マップならびに左側の1 0 a aのペプチド、中央の1 2 a aのペプチド、及び右側の1 5 a aのペプチドを用いて、前染色(下のプロット)及び主アッセイ(1 : 5 0 0 0 - 中央のプロット、1 : 1 0 0 0 - 上のプロット)に関する強度プロットを行った。

【図12】抗体8 4 - 1の強度プロットである。データの定量化に続いて、ペプチドの生成及び強度マップならびに左側の1 0 a aのペプチド、中央の1 2 a aのペプチド、及び右側の1 5 a aのペプチドを用いて、前染色(下のプロット)及び主アッセイ(1 : 5 0 0 0 - 中央のプロット、1 : 1 0 0 0 - 上のプロット)に関する強度プロットを行った。

【図13】組み合わせた抗体1 2 - 1及び8 4 - 1の強度プロットである。マウスモノクローナル抗体1 2 - 1(中央のプロット)及び8 4 - 1(上のプロット)の強度プロットの比較は、左側の1 0 a aのペプチド、中央の1 2 a aのペプチド、及び右側の1 5 a aのペプチドで、両サンプルの明白な類似性を明らかにした。

【図14】抗体1 2 - 1についてのM E M Eモチーフである。

【図15】抗体8 4 - 1についてのM E M Eモチーフである。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 1】

癌患者の末梢血液中の循環腫瘍細胞(C T C)の検出は、いくつかの型の転移性癌の早期診断及び予後における新規のツールとして浮かび上がっている。現段階では、C T Cマーカーは上皮癌に限定され、非上皮癌(すなわち、間葉性)及び上皮間葉形質転換(E M T)癌細胞型を検出することができない。本明細書において、本発明者は、非上皮及びE

10

20

30

40

50

MT CTCに向かう高度の特異性及び感度を示す(100万個の血液細胞から1つのCTCが検出できる)、新規の癌細胞表面ビメンチン(CSV)に特異的なモノクローナル抗体、すなわち84-1を報告する。このことが、84-1を、CTC検出及び単離のための理想的なツールにする。さらに、本発明者は、ホスファターゼ阻害物質を用いてCTC上のビメンチンの細胞表面発現を刺激し、これによって検出及び単離の効率を増加させる方法論も発見した。CTCの検出及び分子の特性化は、癌のトランスレーショナルリサーチの急激な成長を遂げる領域のうちの1つである。本発明者の細胞表面マーカーを利用することで、本発明者は、腫瘍、転移、及び再発の早期検出において役立つために、CTCを計数し、単離し、かつ分析することができる。同様に、84-1は、癌患者における個別化された療法の効率性をモニタリングしかつ評価するための可能性のあるツールである。さらに、84-1抗体を用いて単離されるCTCは、ゲノム配列決定によって任意の突然変異を検出するための分子の特性化を含めて、詳細に研究されることができ、これが特異的に標的化される療法の開発、個別化された医薬品の最終的な目標に寄与するであろう。

10

#### 【0042】

本発明は、A)癌患者の血液から間葉及び上皮間葉形質転換循環腫瘍細胞を検出かつ単離するための新規バイオマーカーとしての細胞表面ビメンチンの発見、B)循環腫瘍細胞上の細胞表面ビメンチンの検出に特異的な抗体、及びC)CTC上の細胞表面ビメンチンの発現を増強し/刺激し、それによってパートB)の抗体の検出能を増強させるための特異的ホスファターゼ阻害物質の使用を含む。

20

#### I. 本発明の抗体

#### 【0043】

特定の実施形態では、細胞表面ビメンチンの少なくとも一部に結合し、循環腫瘍細胞の表面上のビメンチンを特異的に検出する抗体またはそれらの断片、ならびに疾患の診断及び治療におけるその関連する使用が企図される。本明細書で使用される、用語「抗体」は、広くは、IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEならびに抗原結合活性を保持する抗体CDRドメインを含むポリペプチドなどの任意の免疫学的結合作用物質を指すよう意図される。抗体は、キメラ抗体、親和性成熟抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、もしくは抗原結合抗体断片または天然あるいは合成リガンドからなる群から選択され得る。好ましくは、抗ビメンチン抗体は、モノクローナル抗体またはヒト化抗体である。既知の手段によってまたは本明細書に記載されるように、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、抗体断片、ならびに結合ドメイン及びCDR(前述のいずれかの操作された形態を含む)は、これらが細胞表面ビメンチンに、その対応のエピトープのうちの一つ以上に、または前述のいずれかの抱合体に対して、こうした抗原またはエピトープが天然源から単離されようが、もしくはこれらが合成誘導体またはこの天然化合物の変異体であろうが、特異的であるように作成され得る。

30

#### 【0044】

本発明に好適な抗体断片の例としては、限定されないが、(i)VL、VH、CL、及びCH1ドメインからなるFab断片、(ii)VH及びCH1ドメインからなる「Fd」断片、(iii)単一抗体のVL及びVHドメインからなる「Fv」断片、(iv)「dAb」断片(これはVHドメインからなる)、(v)単離されたCDR領域、(vi)F(ab')<sub>2</sub>断片(2つの結合したFab断片を含む二価の断片)、(vii)単鎖Fv分子(「scFv」)(ここでは、VHドメイン及びVLドメインは、2つのドメインを結合させて結合ドメインを形成するペプチドリンカーによって結合される)(viii)二重特異的単鎖Fv二量体(米国特許第5,091,513号を参照)、及び(ix)二重特異性抗体(遺伝子融合によって構築される多価または多重特異的断片)(米国特許出願公開第20050214860号)が含まれる。Fv、scFv、または二重特異性抗体分子は、VHドメインとVLドメインとを結合するジスルフィド架橋の組み込みによって安定化され得る。CH3ドメインに結合されるscFvを含むミニボディも生成され得る(Huet al., 1996)。

40

50

## 【0045】

抗体様結合ペプチド疑似体もまた実施形態において企図される。Liu et al. (2003)は、「抗体様結合ペプチド疑似体」(ABiP)を記載しており、これは、少しずつ減少する抗体として作用し、より長い血清半減期ならびに面倒な合成法が少ないという特定の利点を有するペプチドである。アプタマー(例えば、DNAまたはRNA分子から生成される)、小ペプチド、及びナノ粒子が含まれるCTC上の細胞表面ビメンチンを検出するために使用され得る追加のツールも企図される。

## 【0046】

ビメンチンタンパク質に特異的な抗体を生成するために、動物に、6-Hisタグ可溶性ビメンチン(NCBI受入番号P08670、参照により本明細書に組み込まれる)などの抗原を接種することができる。頻繁に、免疫応答を増強するために、抗原は別の分子と結合されまたは抱合される。本明細書で使用される抱合体は、抗原に結合された任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または非タンパク質性物質であり、これは動物において免疫応答を誘起するために使用される。抗原接種に反応して動物において生成される抗体は、Bリンパ球を生成する多様な個々の抗体から生成された多様な非同分子(ポリクローナル抗体)を含む。ポリクローナル抗体は、抗体種の混合集団であり、このそれぞれが、同一の抗原上の異なるエピトープを認識することができる。動物におけるポリクローナル抗体の生成のための適正な条件があれば、動物の血清中の大部分の抗体は、動物が免疫化された抗原化合物上の集団的エピトープを認識するであろう。この特異性は、関心の抗原またはエピトープを認識するこれらの抗体だけを選択するための親和性精製によってさらに増強される。ビメンチンに対する抗体の場合、細胞表面ビメンチンを検出するための選択性は、ビメンチンをそれらの表面上で発現するかまたは発現しない細胞に対する差別的結合をアッセイすることによって決定することができる。

## 【0047】

モノクローナル抗体は、抗体の単一種であり、ここでは、全ての抗体生成細胞が単一のBリンパ球細胞株に由来するために、全ての抗体分子が、同一のエピトープを認識する。モノクローナル抗体(MAb)を生成するための方法は、一般的に、ポリクローナル抗体を調製するためのものと同じの株で開始する。いくつかの実施形態では、マウス及びラットなどの齧歯類が、モノクローナル抗体を生成するために使用される。いくつかの実施形態では、ウサギ、ヒツジ、またはカエルの細胞が、モノクローナル抗体を生成するために使用される。ラットの使用が周知であり、特定の利点を提供する場合がある。マウス(例えば、BALB/cマウス)は日常的に使用され、一般的に高比率の安定した融合を提供する。

## 【0048】

ハイブリドーマ技術は、前もってビメンチン抗原で免疫化されたマウスからの単一のBリンパ球の不死化骨髓細胞(通常はマウス骨髓)との融合を伴う。この技術は、単一抗体生成細胞を無限の世代数まで増殖させる方法を提供することで、同一の抗原またはエピトープへの特異性を有する構造的に同一の無制限の量の抗体(モノクローナル抗体)が生成され得る。

## 【0049】

一実施形態では、この抗体はキメラ抗体、例えば、異種非ヒト、ヒト、またはヒト化配列(例えば、枠組配列及び/または定常ドメイン配列)に移植された非ヒトドナーからの抗原結合配列を含む抗体である。モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖定常ドメインをヒト起源の類似のドメインで置き換えて、外来抗体の可変ドメインを無傷で残存させるための方法が開発されている。あるいは、「完全なヒト」モノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対してトランスジェニックのマウスにおいて生成される。齧歯類、例えばマウスとヒトのアミノ酸配列の両方を有する抗体可変ドメインを組換えにより構築することによって、モノクローナル抗体の可変領域をよりヒト型に変換するための方法も開発されている。「ヒト化」モノクローナル抗体においては、超可変的CDRのみがマウスモノクローナル抗体に由来し、枠組及び定常領域がヒトアミノ酸配列に由来する(米国特許第

10

20

30

40

50

5, 091, 513号及び同第6, 881, 557号を参照)。齧歯類に特徴的である抗体中のアミノ酸配列をヒト抗体の対応する位置で見出されるアミノ酸配列で置き換えることは、治療的使用の際の有害な免疫反応の傾向性を低減することになるであろう。ハイブリドーマまたは他の抗体生成細胞は、遺伝子突然変異または他の変化を受ける場合もあり、これは、ハイブリドーマによって生成された抗体の結合特異性を変更することもまたは変更しないこともある。

#### 【0050】

様々な動物種においてポリクローナル抗体を生成するための方法、ならびにヒト化、キメラ、及び完全ヒト抗体を含む種々のタイプのモノクローナル抗体を生成するための方法は当該技術分野において周知であり、容易に予想可能である。例えば、以下の米国特許及び特許出願は、こうした方法を可能にする説明を提供する：米国特許出願公開第2004/0126828号及び同第2002/0172677号、ならびに米国特許第3, 817, 837号、同第3, 850, 752号、同第3, 939, 350号、同第3, 996, 345号、同第4, 196, 265号、同第4, 275, 149号、同第4, 277, 437号、同第4, 366, 241号、同第4, 469, 797号、同第4, 472, 509号、同第4, 606, 855号、同第4, 703, 003号、同第4, 742, 159号、同第4, 767, 720号、同第4, 816, 567号、同第4, 867, 973号、同第4, 938, 948号、同第4, 946, 778号、同第5, 021, 236号、同第5, 164, 296号、同第5, 196, 066号、同第5, 223, 409号、同第5, 403, 484号、同第5, 420, 253号、同第5, 565, 332号、同第5, 571, 698号、同第5, 627, 052号、同第5, 656, 434号、同第5, 770, 376号、同第5, 789, 208号、同第5, 821, 337号、同第5, 844, 091号、同第5, 858, 657号、同第5, 861, 155号、同第5, 871, 907号、同第5, 969, 108号、同第6, 054, 297号、同第6, 165, 464号、同第6, 365, 157号、同第6, 406, 867号、同第6, 709, 659号、同第6, 709, 873号、同第6, 753, 407号、同第6, 814, 965号、同第6, 849, 259号、同第6, 861, 572、同第6, 875, 434号、及び同第6, 891, 024号。本明細書及びそれらで引用される全ての特許、特許出願公開、及び他の刊行物は、本出願において参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0051】

抗体は、鳥類及び哺乳動物を含む任意の動物源から生成されてもよい。好ましくは、この抗体は、ヒツジ、ネズミ（例えば、マウス及びラット）、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリの抗体である。加えて、最新の技術が、ヒトコンビナトリアル抗体ライブラリーからのヒト抗体についての開発及びスクリーニングを可能にする。例えば、バクテリオファージ抗体発現技術は、米国特許第6, 946, 546号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、特異的抗体を動物免疫化の不在下で生成することを可能にする。これらの技術は、Marks (1992)、Stemmer (1994)、Gram et al. (1992)、Barbas et al. (1994) 及び Schier et al. (1996) においてさらに記述されている。

#### 【0052】

細胞表面ピメンチンに対する抗体が、動物種、モノクローナル細胞株、または抗体の他の供給源に無関係に、CTCに結合する能力を有するという見込みが確実である。特定の動物種は、抗体の「Fc」部分を通しての補体系の活性に起因して、これらがアレルギー反応を引き起こす可能性が高いために、治療的抗体を生成するために好ましさの程度は比較的低い場合がある。しかしながら、全抗体が「Fc」（補体結合）断片に、かつ結合ドメインまたはCDRを有する抗体断片に酵素により消化されることが可能である。Fc部分の除去は、抗原抗体断片が望ましくない免疫学的応答を誘発する傾向性を低減し、これによって、Fcを含まない抗体は、予防または治療的処置のために優位的であり得る。上述のように、抗体はまた、他の種で生成された、または他の種からの配列を有する抗体を

動物に投与することから生じる有害な免疫学的結果を低減または排除するために、キメラもしくは部分的にまたは完全にヒトとなるように構築され得る。

【0053】

置換型変異体は、典型的には、タンパク質内の1つ以上の部位における1つのアミノ酸の別のアミノ酸への交換を含有し、ポリペプチドの1つ以上の特性を、他の機能または特性の損失の有無で、修飾するよう設計されてもよい。置換は、保存的であってもよく、すなわち、1つのアミノ酸が同様な形状または電荷の1つで置き換えられる。保存的置換は、当該技術分野において周知であり、例えば、アラニンのセリンへの変更、アルギニンのリジンへの変更、アスパラギンのグルタミンまたはヒスチジンへの変更、アスパラギン酸のグルタミンへの変更、システインのセリンへの変更、グルタミンのアスパラギンへの変更、グルタミン酸のアスパラギン酸への変更、グリシンのプロリンへの変更、ヒスチジンのアスパラギンまたはグルタミンへの変更、イソロイシンのロイシンまたはバリンへの変更、ロイシンのバリンまたはイソロイシンへの変更、リジンのアルギニンへの変更、メチオニンのロイシンまたはイソロイシンへの変更、フェニルアラニンのチロシンへの変更、ロイシンのメチオニンへの変更、セリンのスレオニンへの変更、スレオニンのセリンへの変更、トリプトファンのチロシンへの変更、チロシンのトリプトファンまたはフェニルアラニンへの変更、及びバリンのイソロイシンまたはロイシンへの変更が含まれる。あるいは、置換は、ポリペプチドの機能または活性が影響を受けるように、非保存的であってもよい。非保存的变化は、典型的には、残基を化学的に異なるもので置換すること、例えば、極性または荷電アミノ酸を非極性または非荷電アミノ酸で置換することを伴い、逆もまた同様である。

10

20

【0054】

タンパク質は組換え体であっても、またはインビトロで合成されてもよい。あるいは、非組換えまたは組換えタンパク質が、細菌から単離されてもよい。こうした変異体を含有する細菌が、組成物及び方法において実現され得ることも企図される。その結果、タンパク質は単離される必要がない。

【0055】

組成物中に、ml当たり約0.001mg～約10mgの総ポリペプチド、ペプチド、及び/またはタンパク質が存在することが企図される。したがって、組成物中のタンパク質の濃度は、約、少なくとも約または最大で約0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0mg/mlまたはそれ以上（もしくはこれらの中で誘導可能な任意の範囲）であり得る。このうちの、約、少なくとも約、または最大で約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%が、細胞表面ビメンチンに結合する抗体であってもよい。

30

40

【0056】

抗体または好ましくは抗体の免疫学的部分は、他のタンパク質と化学的に抱合されるか、または融合タンパク質として発現され得る。本明細書及び添付の特許請求の範囲の目的のために、全てのこうした融合タンパク質は、抗体または抗体の免疫学的部分の定義に含まれる。

【0057】

実施形態は、抗体抱合体またはペイロードを形成するために、少なくとも1つの作用物

50

質に結合する、細胞表面ピメンチン、ポリペプチド、及びペプチドに対する抗体及び抗体様分子を提供する。診断薬または治療薬としての抗体分子の有効性を増加させるために、少なくとも1つの所望の分子または部分と結合するか、共有結合するか、または複合体を形成することが慣習的である。こうした分子または部分としては、限定されないが、少なくとも1つのエフェクターまたはレポーター分子が含まれる。エフェクター分子は、所望の活性、例えば、細胞毒性活性を有する分子を含む。抗体に取り付けられたエフェクター分子の非限定的な例としては、毒素、治療的酵素、抗生物質、放射標識ヌクレオチド等が含まれる。対照的に、レポーター分子は、アッセイを用いて検出され得る任意の部分として定義される。抗体に抱合されたレポーター分子の非限定的な例としては、酵素、放射標識、ハプテン、蛍光標識、燐光分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色粒子、またはビオチンなどのリガンドが含まれる。

10

#### 【0058】

抗体のその抱合体部分への取付けまたは抱合のためのいくつかの方法が当該技術分野において既知である。一部の取付け方法は、抗体に取り付けられる有機キレート剤、例えば、ジエチレントリアミンペンタ酢酸無水物(DTPA)、ジエチレントリアミンテトラ酢酸、N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド、及び/またはテトラクロロ-3-6-ジフェニルグリコウリル-3を使用する金属キレート錯体の使用を伴う。モノクローナル抗体はまた、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩などのカップリング剤の存在下で酵素と反応させてもよい。フルオレセインマーカ-との抱合体は、これらのカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアネートとの反応によって調製される。

20

#### II. 循環腫瘍細胞

#### 【0059】

CTCは、任意の好適なサンプル型において検出され得る。本明細書で使用される用語「サンプル」とは、本発明によって提供される方法に好適な任意のサンプルを指す。このサンプルは、検出に好適なCTCを含む任意のサンプルであってもよい。サンプルの供給源としては、全血、骨髄、胸水、腹水、中枢脊髄液、尿、唾液、及び気管支洗浄液が含まれる。一態様では、このサンプルは、例えば、全血またはそれらの任意のフラクションもしくは成分を含む血液サンプルである。本発明での使用に好適な血液サンプルは、例えば静脈血、動脈血、末梢血液、組織、脊髄等の血液細胞またはそれらの成分を含むことが知られている任意の供給源から抽出され得る。例えば、サンプルは、周知であり慣用的な臨床的方法(例えば、全血を取り出し、処理するための手法)を用いて得られ、処理されてもよい。一態様では、例示のサンプルは、癌を有する対象から取り出された末梢血液であってもよい。

30

#### 【0060】

本明細書で使用される用語「癌」は、異形成、過形成、固形腫瘍、及び造血癌を含むがこれらに限定されない、当該技術分野において周知である多様な癌の型を含む。癌の多くの型が、転移して循環腫瘍細胞を排出し、または転移性、例えば転移した原発性癌から生じる二次性癌になることが知られている。追加の癌としては、限定されないが、以下の臓器または系の癌が含まれる：脳、心臓、肺、胃腸管系、泌尿生殖器、肝臓、骨、神経系、婦人科系、血液、皮膚、乳房、及び副腎。癌細胞の追加の型は、グリオーマ(シュワン細胞腫、膠芽腫、神経膠星状細胞腫)、神経芽細胞腫、クロム親和細胞腫、傍神経節腫、髄膜腫、副腎皮質癌、髄芽腫、横紋筋肉腫、腎臓癌、種々の型の血管癌、骨芽球性骨肉腫、前立腺癌、卵巣癌、子宮筋腫、唾液腺癌、脈絡膜叢癌、乳癌、膵臓癌、結腸癌、及び巨核芽球性白血病、ならびに悪性黒色腫、基底細胞癌、扁平細胞癌、カボジ肉腫、ほくろ異形成母斑、脂肪腫、血管腫、皮膚線維腫、ケロイド、肉腫(線維肉腫または血管肉腫など)、及び黒色腫を含む皮膚癌が含まれる。

40

#### 【0061】

CTC集団中に含まれる検出されたCTCの総数は、部分的には、初期サンプルの容量に依存する。様々な態様では、広範囲の初期サンプル容量におけるCTCの検出は、臨床的に有意な結果を提供することが可能なCTCの検出数を生成するのに十分なものである

50

。したがって、初期サンプル容量は、約25 $\mu$ l、50 $\mu$ l、75 $\mu$ l、100 $\mu$ l、125 $\mu$ l、150 $\mu$ l、175 $\mu$ l、200 $\mu$ l、225 $\mu$ l、250 $\mu$ l、300 $\mu$ l、400 $\mu$ l、500 $\mu$ l、750 $\mu$ l、1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、6ml、7ml、8ml、9ml未満、または約10mlを超えるものであり得る。例示の態様では、初期サンプル容量は、約100~200 $\mu$ lである。別の例示の態様では、本明細書に記載されるように処理されるサンプルは、約1、2、5、7、10、15、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、またはさらには1000個を超える明らかにされたCTCを含む。

#### 【0062】

本明細書で使用される分析は、CTCの直接的または間接的な可視化を可能にし、インビボまたはエクビボであってもよい任意の方法を含む。例えば、分析としては、エクスピボ顕微鏡法または細胞数測定検出及び固体基材に結合した細胞の可視化、フローサイトメトリー、蛍光画像診断法等が含まれるが、これらに限定されない。例示の態様では、CTCは細胞表面ビメンチンに向けられる抗体を用いて検出され、続いて固体基材に結合され、顕微鏡法または細胞数測定検出法を用いて可視化される。

10

#### 【0063】

別の実施形態では、CTCは、CTCに対してサンプルを濃縮するために通常使用される技術、例えば、免疫磁性捕捉などの免疫特異的相互作用を伴うものによって捕捉される。免疫磁性捕捉は、免疫磁性細胞分離としても知られ、典型的には、特定の細胞型上で見出されるタンパク質に向けられる抗体を、小さい常磁性ビーズに付着させることを伴う。抗体被覆ビーズが、血液などのサンプルと混合されると、これらは特定の細胞に付着し、これらを包囲する。次いでサンプルを強磁場に置き、ビーズをペレット化させ、一方に寄せる。血液を除去後に、捕捉された細胞が、ビーズ内に保持される。この一般法の多くの変形が当該技術分野において周知であり、CTCを単離するために好適である。

20

#### 【0064】

本発明の方法を使用するCTCの検出、単離、及び特性化は、癌の予後を評価することにおいて、及び疾患の再発に繋がり得る治療の失敗の早期検出のための治療有効性をモニタリングすることにおいて有用である。加えて、本発明によるCTCの分析は、治療の過程を完了した前駆症状性の患者における早期の再発の検出を可能にする。これは、CTCの存在が、腫瘍の進行ならびに蔓延、治療に対する応答不良、疾患の再発、及び/またはある期間にわたる生存率の低下に関連付けられる及び/または相関するために可能である。したがって、CTCの計数及び特性化は、治療に対する応答に基づいて、初期リスク及び後続のリスクを予測するベースライン特性化に対して患者を層別化するための方法を提供する。

30

#### 【0065】

本明細書で使用される用語「対象」は、主題の方法が実施される任意の個体または患者を指す。一般的に、この対象はヒトであるが、当業者に理解されるように、この対象は動物であってもよい。したがって、齧歯類（マウス、ラット、ハムスター、及びモルモットを含む）、ネコ、イヌ、ウサギ、家畜動物（ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ等を含む）、ならびに霊長類（サル、チンパンジー、オラウータン、及びゴリラ）などの哺乳動物を含む他の動物が、対象の定義に含まれる。

40

#### 【0066】

したがって、別の実施形態において、本発明は、対象において癌を診断し予後の判断を行うための方法を提供する。本明細書に開示された方法により単離されたCTCは、対象において癌を診断し予後の判断を行うために分析され得る。然して、本発明の方法は、例えば、癌患者を評価し、癌患者及び癌発生のリスクがある人々を評価するために使用され得る。本明細書に記載される診断または予後判断の方法のいずれかにおいて、癌細胞などの癌の、または任意の他の障害の1つ以上の指標の存在または不在のいずれかが、診断または予後判断を行うために使用されてもよい。

#### 【0067】

50

一態様では、血液サンプルが患者から取り出され、CTCが本明細書に記載されるように検出される。本発明の方法を使用して、血液サンプル中のCTCの数が決定され、その後CTCが分析されてもよい。例えば、細胞が、細胞表面ビメンチン、サイトケラチン、またはEpCAMに結合する1つ以上の抗体で標識されてもよく、この抗体は、共有結合した蛍光標識を有してもよい。次いで、サンプル中のCTCの数及び特性化を決定するために分析を行うことができ、この測定値から、初期血液サンプル中に存在するCTCの数を決定することができる。CTCの数は、細胞数測定検出または顕微鏡技法によって決定され、CTCを可視的に定量化かつ特性化することができる。

#### 【0068】

様々な態様では、対象のCTCの数の分析及び特性化は、対象の進行及び病리를評価するために、様々な間隔で特定の時間的経過にわたって行われてもよい。例えば、CTCのレベル及び特性化を時間の関数として追跡するために、分析は1日間、2日間、3日間、1週間、2週間、1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、6ヶ月間、または1年間などの規則的な間隔で行われてもよい。既存の癌患者の場合、これは疾患の進行の有用な指標を提供し、医療実施者がCTCにおける増加、減少、または無変化に基づいて、適切な治療的選択を行うことを補助する。CTCにおける、経時的な2倍、5倍、10倍またはそれ以上のいかなる増加も、患者の予後を低下させ、患者が治療を変更するべきであるとの早期指標である。同様に、2倍、5倍、10倍またはそれ以上のいかなる増加も、患者が、予後及び治療に対する応答をさらに評価するために、画像診断法などのさらなる検査を受けるべきであることを示している。CTCにおける、経時的な2倍、5倍、10倍またはそれ以上のいかなる減少も、疾患の安定化及び患者の治療への応答を示し、治療を変更する必要がないことの指標である。癌発生のリスクがある人については、検出されたCTCの数における急激な増加は、患者が腫瘍を発現しており、したがって早期診断を提供することの早期警告を提供することができる。一実施形態では、CTCの検出は、癌の病期分類を向上させる。

#### 【0069】

本明細書に提供される方法のいずれかにおいて、CTCを特性化し、さらなる臨床的評価を提供するために、追加の分析が行われてもよい。例えば、画像分析及びバルク数測定に加えて、CTCが起源を発する腫瘍の型、転移状態、及び悪性の程度などの情報を得るために特定の癌マーカーに特異的なプライマーとの多重化などのPCR技術が使用されてもよい。さらに、細胞サイズ、DNAまたはRNA分析、プロテオーム解析、もしくはメタボローム解析が、患者の癌の特性化に関する追加の情報を評価する上での尺度として実施されてもよい。

#### 【0070】

例えば、追加の分析は、特定の治療計画に対する対象の応答性の決定を行うために、または癌の治療における候補薬剤の有効性を決定するために、十分なデータを提供し得る。したがって、本発明は、本明細書に記載される対象のCTCを検出/単離し、該CTCを分析することによって、特定の治療計画に対する対象の応答性の決定をするための、または癌の治療における候補作用物質の有効性を決定するための方法を提供する。例えば、一旦薬剤治療が患者に施されると、本発明の方法を使用して、薬剤治療の有効性を決定することが可能である。例えば、薬剤治療前に患者から採取されたサンプル、ならびに薬剤治療と同時にまたは薬剤治療に引き続いて患者から採取された1つ以上の細胞サンプルが、本発明の方法を用いて処理され得る。それぞれの処理されたサンプルの分析の結果を比較することによって、薬剤治療の有効性または患者の薬剤に対する応答性を決定することができる。このようにして、無効な化合物の早期発見を行うことが可能であり、または有望な化合物の早期検証を行うことが可能である。

#### III. 疾患の治療

#### 【0071】

本発明の特定の態様は、循環腫瘍細胞に関連付けられる疾患または障害を予防しまたは治療するために使用され得る。CRCの転移力は、CTCの増殖及び組織のコロニー形成

10

20

30

40

50

を防止するための任意の好適な薬剤によって低減され得る。好ましくは、こうした物質は、抗細胞表面ピメンチン抗体を含むであろう。

【0072】

「治療」及び「治療する」は、対象への治療薬の投与または適用、もしくは疾患または健康に関連する状態の治療上の利益を得る目的のための対象への処置または治療形態の実行を指す。例えば、治療は、CTCの増殖及び組織のコロニー形成を阻害する抗体の薬学的有効量の投与を含み得る。

【0073】

本出願全体を通して使用される用語「治療上の利益」または「治療的に有効」とは、対象の健康状態をこの状態の医療に関して促進または増強するいかなるものも指す。これらは、疾患の徴候または症状の頻度または重症性における減少が含まれるが、これらに限定されない。例えば、癌の治療は、例えば、腫瘍の浸潤性における減少、癌の増殖速度における減少、または転移の予防を伴い得る。癌の治療はまた、癌を有する対象の生存期間の延長を指してもよい。

A. 薬学的調製物

【0074】

抗細胞表面ピメンチン抗体を含有する治療用組成物の臨床用途が実施される場合、一般的に、意図される用途に適切な薬学的または治療用組成物を調製することが有益となる。特定の実施形態では、薬学的組成物は、例えば、少なくとも約0.1%の活性化化合物を含み得る。他の実施形態では、活性化化合物は、約2重量%～約75重量%の、例えば約25%～約60%、またはこの中で誘導可能な任意の範囲の単位を含んでもよい。

【0075】

本発明の治療用組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして注射可能な組成物の形態で好都合に投与され、注射前に液体溶液、または液体懸濁液にするのに好適な固形形態も調製されてもよい。これらの調製物は、乳化されてもよい。

【0076】

フレーズ「薬学的にまたは薬理的に許容し得る」とは、適切な方法でヒトなどの動物に投与される際に、有害反応、アレルギー反応、または他の不必要な反応を生成することがない分子実体及び組成物を指す。抗体または追加の活性成分を含む薬学的組成物の調製は、本開示を考慮すれば、当業者に知るところとなる。さらに、動物（例えば、ヒト）の投与については、FDA事務所の生物学的標準によって要求される無菌、発熱原性、一般的安全性、及び純度標準に適合するべきであることが理解されよう。

【0077】

本明細書で使用される「薬学的に許容し得る担体」は、当業者に既知であるように、任意の及び全ての水性溶媒（例えば、水、アルコール性/水性溶液、生理食塩溶液、塩化ナトリウムなどの非経口ビヒクル、リンガー溶液等）、非水性溶媒（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステル等）、分散媒体、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、防腐剤（例えば、抗細菌剤または抗真菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス）、等張剤、吸収遅延剤、塩、薬剤、薬剤安定化剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、風味剤、染料、流体及び栄養補充物、これらの類似の材料及びこれらの組み合わせを含む。薬学的組成物中の種々の成分のpH及び正確な濃度は、周知のパラメータに従って調整される。薬学的に許容し得る担体は、特にヒトへの投与のために製剤化されるが、特定の実施形態では、非ヒト動物への投与のために製剤化されるが、しかしヒトへの投与には許容し得ない（例えば、政府の規制のために）薬学的に許容し得る担体を使用することが望ましい場合がある。いかなる慣用の担体も活性成分と不適合でない限り、治療用組成物または薬学的組成物に使用することが企図される。

【0078】

用語「単位用量」または「投与量」は、対象において使用するために好適な物理的に個別の単位を指し、各単位は、その投与、すなわち、適切な経路及び治療計画に関連付けて

上述の所望の応答を起こすよう計算された治療用組成物の所定の量を含有する。治療の回数及び単位用量の両方に従う投与される量は、所望の効果に依存する。患者または対象に投与される本発明の組成物の実際の投与量は、対象の体重、年齢、健康状態、及び性別、治療される疾患の種類、疾患の侵入の程度、以前または同時的な治療的介入、患者の突発性疾患、投与の経路、ならびに特定の治療用物質の効力、安定性、及び毒性などの物理的ならびに生理学的因子によって決定され得る。例えば、用量はまた、1回の投与当たり約  $1 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重} \sim$  約  $1000 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$  (このような範囲は、介在する用量を含む) またはそれ以上、及びその中で誘導可能な任意の範囲を含むことができる。本明細書に列挙した数字からの誘導可能な範囲の非限定的な例では、約  $5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重} \sim$  約  $100 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$  の範囲、約  $5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重} \sim$  約  $500 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$  の範囲等が投与され得る。投与を担当する施術医は、いずれにしても、組成物中の活性成分(複数可)の濃度及び個々の対象に適切な用量(複数可)を決定するであろう。

10

**【0079】**

活性化化合物は、非経口投与用に製剤化され得、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、またはさらには腹腔内経路を介する注射用に製剤化され得る。典型的には、こうした組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして調製することができ、また、注射に先立って液体の添加時に溶液または懸濁液を調製するよう使用するために好適な固形形態を調製することができ、この調製物はまた乳化され得る。

**【0080】**

注射可能な用途に好適な製剤の形態としては、無菌の水溶液または分散液、ゴマ油、ピーナッツ油、または水性プロピレングリコールを含む製剤、ならびに無菌注射可能溶液または分散液の即時調製用の無菌粉末が含まれる。全ての場合で、この形態は無菌であらねばならず、これが容易に注射可能な程度に流体でなければならない。これはまた、製造及び貯蔵の条件下で安定であるべきであり、細菌または真菌などの微生物の汚染作用に対して保存されねばならない。

20

**【0081】**

タンパク質性組成物は、中性または塩形態に製剤化されてもよい。薬学的に許容し得る塩としては、酸添加塩(タンパク質の遊離アミノ基で形成される)が含まれ、これは、例えば塩酸またはリン酸などの無機酸で、もしくは酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデリン酸等の有機酸で形成される。遊離カルボキシル基で形成される塩もまた、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、ならびにイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基から誘導され得る。

30

**【0082】**

薬学的組成物は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体プロピレングリコール等)、これらの好適な混合物、ならびに植物油を含有する溶媒、または分散媒体を含むことができる。例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合、必要とされる粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって、適切な流動性が維持され得る。微生物の作用の抑制は、種々の抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によってもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物の吸収の延長は、吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの組成物中の使用によってもたらされ得る。

40

**B. 併用治療****【0083】**

特定の実施形態では、本発明の組成物及び方法は、二次療法または追加の療法と組み合わせ、CTCに選択的に結合するために、細胞表面ビメンチンに対する抗体または抗体断片を伴う。こうした療法は、CTCに関連付けられる任意の疾患の治療において適用することができる。

50

## 【 0 0 8 4 】

併用療法を含む方法及び組成物は、治療的または保護的效果を増強し、及び/または別の抗癌療法または抗過剰増殖性疾患療法の治療的效果を増加させる。治療法ならびに予防法及び組成物は、CTCの殺傷及び/または転移の予防などの所望の効果を達成するために有効な組み合わせられた量で提供され得る。このプロセスは、細胞を抗体もしくは抗体断片及び二次療法の両方と接触させることを伴い得る。組織、腫瘍、または細胞は、作用物質（すなわち、抗体もしくは抗体断片または抗癌剤）のうちの1つ以上を含む、1つ以上の組成物または薬理的製剤と接触させることができ、組織、腫瘍、及び/または細胞を2つまたはそれ以上の別個の組成物または製剤と接触させることも可能で、この一方の組成物は、1)抗体または抗体断片、2)抗癌剤、もしくは3)抗体または抗体断片と抗癌剤の両方を提供する。また、こうした併用療法が化学療法、放射線療法、外科的療法、または免疫療法と併せて使用され得ることも企図される。

10

## 【 0 0 8 5 】

用語「接触させる」及び「曝露させる」は、細胞に適用されるときに、治療的構築物及び化学療法剤または放射線療法剤が標的細胞に送達されるか、もしくは標的細胞と直接並置して配置される処理を説明するために本明細書で使用される。細胞殺傷を達成するために、例えば、両方の作用物質が、細胞を殺傷し、または細胞が分裂することを防止するために有効な組み合わせられた量で、細胞に送達される。

## 【 0 0 8 6 】

抗細胞表面ビメンチン抗体は、抗癌治療の前に、抗癌治療中に、抗癌治療後に、または抗癌治療に対して種々の組み合わせで、投与されてもよい。投与は、同時的から数分、数日、数週間に至る範囲の間隔で行われてもよい。抗体または抗体断片が、抗癌剤とは別個に患者に提供される実施形態では、通常、かなりの長時間の送達によって各々の送達間に有効期限が切れてしまわないことを保証することで、2つの化合物は、有利に組み合わせられた効果をなおいっそう患者に及ぼすことができる。こうした例では、抗体療法と抗癌療法を互いに対して約12～24時間または72時間以内に、より具体的には互いに対して約6～12時間以内に患者に提供し得ることが企図される。いくつかの状況では、それぞれの投与の間に、数日間（2、3、4、5、6、または7日間）から数週間（1、2、3、4、5、6、7、または8週間）が経過する状態で、治療のための期間をかなり延長させることが望ましい場合がある。

20

30

## 【 0 0 8 7 】

特定の実施形態では、治療のコースは、1～90日間またはそれ以上（このような範囲は介在する数日間を含む）続くであろう。1つの作用物質が1日目から90日目（このような範囲は介在する数日間を含む）のいかなる日にも、またはこれらの日の任意の組み合わせで投与されてもよく、もしくは別の作用物質が1日目から90日目（このような範囲は介在する数日間を含む）のいかなる日にも、またはこれらの日の任意の組み合わせで投与されることが企図される。一日以内（24時間の期間）に、患者は作用物質（複数可）の1回または複数回投与を受けてもよい。さらには、治療のコース後に、抗癌治療が施されない期間があることが考えられる。この期間は、例えば、患者の予後、耐久力、健康状態等の患者の状態に応じて、1～7日間、及び/または1～5週間、及び/または1～12ヶ月間またはそれ以上（このような範囲は介在する数日間を含む）続いてもよい。治療周期は、必要に応じて繰り返されるであろう。

40

## 【 0 0 8 8 】

種々の組み合わせが使用され得る。例えば、以下で、抗体療法は「A」であり、抗癌療法は「B」である。

## 【 化 1 】

**A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B**

**B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A**

**B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A**

50

## 【 0 0 8 9 】

本発明の任意の化合物または療法の患者への投与は、もしあるなら、作用物質の毒性を考慮して、こうした化合物の投与のための一般的プロトコルに従うであろう。したがって、いくつかの実施形態では、併用療法に寄与し得る毒性をモニタリングするステップがある。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 9 0 】

## I V . 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を裏付けるために含まれる。以下に続く実施例において開示された技術は、本発明の実行において良好に機能するように本発明者によって発見された技術を表し、したがって、その好適な実行のモードを構成すると考えられ得ることを、当業者に理解されるべきである。しかしながら、当業者は、本開示に照らして、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、多くの変更が開示される特定の実施形態においてなされるが、それでも同様なまたは類似する結果を得ることができることを理解するべきである。

## 実施例 1 - 材料及び方法

## 【 0 0 9 1 】

細胞株。D L D - 1、G E O、及びH U V E C細胞をL e e E l l i s博士(M D A n d e r s o n C a n c e r C e n t e r)から賜った。L M 7、S A O S - 2、K 7、K 7 M 3、L M - 8、及びD U N N細胞は、E u g e n i e S K l e i n e r m a n博士(M D A n d e r s o n C a n c e r C e n t e r)により提供していただいた。H O S、M G - 2 6 3、O S - D、O S - O、及びO S - 2 5細胞は、D e n n i s H u g h e s博士(M D A n d e r s o n C a n c e r C e n t e r)により提供していただいた。S N U 3 9 8、H E P 3 B、及びS N U 4 4 9細胞は、L o p a M i s h r a博士(M D A n d e r s o n C a n c e r C e n t e r)により提供していただいた。S K N A S、S K N B E 2、S K - N - S H、N G P、C H P 1 3 4、S H - S Y 5 Y、L A N 5、及びK C N細胞は、P a t r i c k Z w e i d l e r - M c K a y博士(M D A n d e r s o n C a n c e r C e n t e r)により提供していただいた。本研究で使用した全ての他の細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)(Manassas, VA, USA)から得た。骨肉腫患者からの一次細胞培養物は、D i n a L e v博士(M D A n d e r s o n C a n c e r C e n t e r)により提供していただいた。全ての細胞株は、ATCC推奨基準に従って増殖した。特定の推奨基準を有さない細胞は、10%のウシ胎児血清(FBS)(Gibco, Invitrogen)、1%のL-グルタミン(Gibco, Invitrogen)、及び0.1%のペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco, Invitrogen)を含むDMEM-F12(Sigma Aldrich)中で増殖させた。全ての細胞は、指定がない限り、5%のCO<sub>2</sub>のインキュベータ内で37℃にて維持した。ヒトの結腸癌、肝臓癌、肺癌、及び骨癌から得た一次培養物は、10%の熱不活性化FBS、1%のL-グルタミン、100µg/mLのプリモシン(Invitrogen)、及び0.1%のペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM/F-12培地中で培養した。

## 【 0 0 9 2 】

8 4 - 1抗体を用いて単離されたCTCを、10%の熱不活性化血清(Invitrogen)を含み、増殖因子が補充されたDMEM/F-12培地中、フィブロネクチン被覆プレート(Thermo Fisher)上で培養した。骨肉腫患者から得たCTCは、10ng/mLのヒト上皮増殖因子(hEGF)(Cell Signaling)及びインスリン増殖因子(hIGF)(R&D Systems)を補充して培養した。結腸癌及び肝臓癌患者から単離されたCTCは、10ng/mLのヒトEGF、IGF、及び塩基性線維芽細胞増殖因子(hFGF2)を補充して培養した。イヌ及びマウス血液から単離されたCTCは、上皮、インスリン、及び線維芽細胞増殖因子(Cell Sig

10

20

30

40

50

nal ing)を含む上述の培地中で培養した。培地は、4日毎に1回交換した。全ての細胞は、5%のCO<sub>2</sub>のインキュベータ内で37℃にて維持した。

【0093】

Geltrex薄層法。HPC-1細胞を、Engelbreth-Holm-Swarm腫瘍から精製された基底膜の可溶性型であり、37℃でゲル化し、細胞の培養物に対してマトリックスを提供する再構成された基底膜を形成する、Geltrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Invitrogen)上で増殖させた。Geltrexの主成分は、種々の増殖因子及びラミニン、コラーゲンIV、エンタクチンを含む。製造業者の推奨に従って、Geltrexを氷上で融解し、細胞を平板培養する1時間前に、100μLのGeltrexを用いて、Lab Tekチャンバースライド(Thermo)をコーティングした。その後、2%のGeltrexを含む冷無血清DMEM/F-12培地100μL中の1000個のHPC-1細胞を、薄いゲルコーティングを備えたチャンバースライド上で平板培養した。細胞を、大気中、5%のCO<sub>2</sub>の加湿した雰囲気において、37℃で増殖させて、顕微鏡を通して、スフェアの形成を観察した。

10

【0094】

血液採集及び処理。マウスサンプルについては、顎下頰出血法を用いて、所定の時間で、血液をマウスから採集し、毎週の追跡治療中に、200μLの血液をEDTAチューブ(Fisher)内に採集した。試験終了時に、左心室穿刺法を用いて、少なくとも800μLの血液を採集した。次いで採集された血液を、製造業者の推奨に従って、RBC溶解緩衝液(eBioscience)を用いてRBC溶解にかけた。その後、細胞をPBS中で洗浄し、さらなる分析のために使用した。

20

【0095】

CTC分析のためのヒト血液サンプルを、MD Anderson Cancer CenterにおいてIRBプロトコルに従って、インフォームドコンセントを得た後に取得した。最大で8mLの血液を、CPTバキューター(BD Bioscience)を用いて、任意の所定の採血で得た。健常者の血液サンプルは、Gulf Coast Blood Centerから得た。単一の有核細胞を製造業者の推奨に従って単離した。その後、細胞をPBS中で洗浄し、さらなる分析のために用いた。

30

【0096】

イヌの血液サンプルは、Gulf Coast Veterinaryクリニックから得た。Gulf Coast Veterinaryクリニックで指示された個人所有のイヌを、本試験用に選択した。組織学的に確認された新生物疾患を有することを除いて、選択基準は、顕在性の心臓、腎臓、または他の生命を脅かす疾患が認められないことを含んだ。イヌを、全体的な既往歴、理学検査所見、完全な血液細胞計数、血清の生化学プロファイル、尿検査、心電図、胸部X線検査(三次元ビューの転移チェック)、及び必要な場合、腹部超音波検査を得ることによって、病期分類した。腫瘍型の確認については、原発腫瘍からの切除生検を、麻酔下で外科的に得て、10%の中性緩衝ホルマリン中に配置した。固定した後に、組織を切断し、パラフィンに埋包し、断面を作り、スライドガラスに接着させて、ヘマトキシリン及びエオシンにより染色し、カバーガラスで覆い、公認獣医病理学者により評価した。

40

【0097】

抗体生成。6-Hisを含む組換えヒトビメンチン(rhVim)(R&D Systems)を、抗体生成のための抗原として用いた。抗ビメンチン力価を、ELISAアッセイによって決定した。簡単に言うと、rhVimを、ELISAにおいて固相抗原として用いた。2倍段階希釈した血清を、rhVimで被覆したELISAウェル中で2時間インキュベートした。洗浄、及びペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG抗体とのインキュベーション後に、着色反応を行い、オルトフェニレンジアミン(OPD)で分析した。より低い希釈でより高いODを示した抗体は、さらなるスクリーニングにかけるとみなされた。スクリーニング用に選択された抗体を、細胞表面上のビメンチンの有無で骨肉腫

50

細胞と共にインキュベートした。CSVに対して非常に高い親和性を有する抗体を選択し、さらなる分析を行った。84-1は、細胞表面ピメンチンを高親和性及び高感度で検出するために利用可能な最適なクローンである。次いで、この抗体を、ELISA、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、免疫細胞化学法、及び免疫組織化学法によって、ピメンチン結合についてさらに特性化した。抗体12-1もまた、CTCの検出及び単離について特性化した。

#### 【0098】

84-1陽性細胞の選択。まず初めに、EasySep(商標)Human CD45 Depletion Kitを製造業者の推奨に従って用いて、CD45陽性細胞を除去した。次に、CD45-ve細胞フラクションを、84-1陽性選択にかけた。簡単に言うと、細胞を84-1抗体で標識し、その後マウスIgG結合マイクロビーズを、この混合物に添加した。次いで、84-1+ve細胞を、Miltenyi Biotecからの磁性カラムを用いて抽出した。このように得られた細胞は、84-1陽性及びCD45陰性であり、さらなる分析に使える状態である。

10

#### 【0099】

フローサイトメリー。50万個の細胞をトリプシン化によって取り出し、洗浄し、暗所において氷上で20分間染色した。CSV分析については、細胞を84-1mAb(1:100)で染色し、イソタイプ対照(Invitrogen)として、マウス一次抗体を用いた。その後、細胞をPBS中で2回濯ぎ、AlexaFluor-405、-488、及び-555二次抗体(Invitrogen)を用いて二次抗体について標識した。次いで細胞をPBS中で2回洗浄し、Attuneフローサイトメーター(Appplied Biosystems)を用いての即時のデータ取得のために用いた。分析用に10~50,000個の細胞を計数した。その後、FlowJoソフトウェア(TreeStar)を用いて、データを分析した。平均蛍光強度を、FlowJoソフトウェアによって提供されるアルゴリズムを用いて測定し、その後、表面上のCSVの存在について評価した。あるいは、RBC溶解後に得られた細胞を、CSVに対する84-1抗体及びCD45抗体を用いて二重染色にかけた。サンプルを、抗体捕捉Abcビーズ(Invitrogen)を用いて補正した。所定サンプル中のCTCを計数するために、点のプロットを、CSV陽性ゲーティング及びCD45陰性ゲーティングでプロットした。イソタイプ対照を利用して、未染色かつ非特異的染色細胞をゲートした。細胞集団全体を、Attuneフローサイトメーターを用いてCTCについて分析し、FlowJoソフトウェアを用いて分析した。

20

30

#### 【0100】

顕微鏡画像の取得及び分析。チャンパー当たり合計で5,000個の細胞を、上述のように、Lab-Tek 8-ウェル permanoxチャンパースライド(Thermo Scientific, Rochester, NY, USA)上で増殖させた。細胞表面染色については、細胞を4%のパラホルムアルデヒドを用いて15分間固定し、PBS(pH7.4)で洗浄し、10%のウシ胎児血清(FCS)(Gibco, Invitrogen)中で1時間ブロックし、対応の一次抗体(1:100)で4に overnight 標識した。その後、細胞をPBS(pH7.4)で洗浄し、対応の一次抗体に対して、Alexafluor-488、及び-555二次抗体(1:250)(Invitrogen)を用いて染色した。

40

#### 【0101】

核染色については、DRAQ5(Cell Signaling)(1:500)を、二次抗体と共に60分間組み込んだ。WGA(Invitrogen)を、1:1000で5分間、細胞表面を染色するために用いた。次いで、細胞をPBS(pH7.4)で(3x15分)洗浄し、Slowfade antifade(Invitrogen)内に装着した。細胞内染色については、細胞を上述の通りに固定し、PBS(pH7.4)で洗浄し、PBS(pH7.4)/0.2%NP40(Sigma Aldrich)中で20分間透過性にした。ブロッキング、一次、及び二次抗体のインキュベーションなら

50

びに装着化は、上述の通りである。3D培養スフェアの染色については、上記の細胞外及び細胞内染色法を、一次抗体では36時間の、二次抗体では4時間の修正されたインキュベーション時間で利用した。

#### 【0102】

細胞のインビボ標識付については、RBC溶解後に得られた総細胞混合物を、PBS (pH 7.4) 中で2回洗浄し、84-1抗体を用いて氷上で20分間標識し、次いで染色された細胞をPBS (pH 7.4) 中で2回洗浄し、84-1に対する二次抗体AlexaFluor-488について20分間染色し、PBS (pH 7.4) 中で2回洗浄した後に、細胞を培養皿上で平板培養し、Epi蛍光倒立顕微鏡下でAlexaFluor-488陽性細胞を視覚化し、供給されたソフトウェアを用いて顕微鏡写真を取得した。高強度の緑色蛍光細胞のみがこの分析用に検討された。このアッセイの感度を、細胞スパイキングアッセイによって確認した。生細胞画像診断については、光漂白及び光毒性を最小限に抑えるために、レーザー強度を、画像を取得するのに必要とされる最小値に保持した。あるいは、CD45除去後に、細胞を、84-1及びCD45 (AbCAM) について、対応する抗体を用いて染色し、Cytofuge (Iris) を用いてスライドガラス上で平板培養し、共焦点顕微鏡を用いて84-1+及びCD45-細胞について分析した。

10

#### 【0103】

共焦点分析については、LSM 53.2画像捕捉器及び分析ソフトウェア (Zeiss) を用いて、Zeiss LSM 510共焦点顕微鏡で8ビットにおいて取得した。画像所得のために、63倍の水浸型対物レンズ (NA、1.0) をデジタルズームと共に利用した。異なるサンプル間の免疫反応性の相対的レベルの量的な比較を可能にするために、同一のユーザーが同一の強度及び光検出器ゲインを使用することによって全ての画像を取得した。

20

#### 【0104】

スパイキングアッセイ。84-1抗体による捕捉精度及び再現性を立証するために、培養された細胞を純粋なマウスから採集した血液中にスパイクした。精度の立証のために、約5、約25、及び約50個のK7M3、K7、LM8、及びDUNNを1mLの全血に三通りでスパイクした。細胞計数については、細胞を培養基中で採取し、次いで、必要な計数まで段階希釈し、次いでこれを顕微鏡下で一連の5µLのスポットで確認した。より少数/より多数の細胞が観察される状況では、計算を行い、混合して、スパイクするのに要求される細胞の必要な計数を得た。スパイキング実験を三通り行い、この方法の感度及び特異性を明確にした。陰性対照については、CSV陰性細胞を血液中にスパイクし、陽性選択に関して分析した。

30

#### 【0105】

突然変異分析。少数のCTC細胞または単一細胞からの全ゲノム増幅を、REPLI-g Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて行った。簡単に言うと、4µlのPBS中の細胞材料を、微小遠心管内で3µlのBuffer D2を添加することによって溶解させ、65で10分間インキュベートした。全ゲノム増幅を、製造業者の推奨に従って同じ管内で行った。得られたDNAを、異なる染色体上のプライマーを用いるPCRによって品質についてテストした。増幅されたDNAの分取物を、1:10に希釈し、その後PCR分析用に用いた。遺伝子突然変異の検出については、Q5 (登録商標) 高忠実度DNAポリメラーゼ (NEB, Ipswich, MA) を用いて特異的突然変異部位に対する特異的遺伝子断片を増幅した。PCR生成物を、Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いてゲル精製し、MDA Sequencing and Microarray Facility (MD Anderson Cancer Center) によりサンガー配列決定した。

40

#### 【0106】

マーカー分析。特異的マーカーに対する抗体を、各タイプの癌、CD99 (Abcam

50

)、 $\alpha$ -SMA (Abcam)、CD-31 (eBioscience) 及び EpCAM、Slug、E-カドヘリン、 $\beta$ -カテニン、c-myc (Cell signaling) に対して用いた。

#### 【0107】

ウェスタンブロット法及び免疫沈降法。組換えヒトビメンチン (rhVim) (R&D Systems) を、3つの異なるレーンに充填し (1、10、及び1000 ng)、SDSゲルを用いて分離し、ニフツ化ポリピロリデン膜上に移した。rhVimの検出を、84-1抗体 (1:1000) を用いる膜のインキュベーションによって行った。二次ヤギ抗マウスIgG:HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) (Promega) を用いて84-1抗体を検出した。免疫沈降法については、LM7細胞を、免疫沈降緩衝液 (Thermo Scientific) を用いて溶解させ、84-1及び12-1抗体を用いてビメンチンを免疫沈降させた。マウスIgGを、対照抗体として用いた。免疫沈降物を、ウサギモノクローナル抗ビメンチン抗体 (Cell Signaling) を用いてブロットした。

10

#### 【0108】

オルトバナジウム酸ナトリウム処理。8-ウェルチャンバースライド上で平板培養したLM8細胞及び懸濁液中のWBCを、オルトバナジウム酸ナトリウム (SOV) (100  $\mu$ M) または対照としてのPBSに曝露した。18時間のインキュベーション後に、細胞外染色のための上述した方法を用いて、次に細胞を免疫蛍光染色用に処理した。フローサイトメトリー検出法については、6ウェルプレート中の細胞を、SOV (100  $\mu$ M) または対照としてのPBSで処理した。一晚のインキュベーションの後に、細胞を、上述の通りにフローサイトメトリー分析用に処理した。ヒト血液検体については、CPTチューブから得られた単核化細胞を、SOV (100  $\mu$ M) または対照としてのPBSで15分間処理した。次いで細胞を、細胞外染色法を用いて、免疫蛍光染色に直接曝露した。

20

#### 【0109】

動物試験。5匹の6~8週齢のC3H及びBalb/c (NCI) マウスを、NIHガイドラインに従って維持した。全ての動物のプロトコルは、テキサス大学のMD Anderson Cancer Centerの動物管理使用委員会によって確認された後承認されている。マウスを施設必要条件に従って収容した。LM8及びCT-26癌細胞株をインビボ接種用に用いて、10%のFBS及び0.1%のペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM/F-12中で維持した。集密状態のCT-26及びLM8細胞を培養プレートから分離し、 $1 \times 10^5$ 個の細胞を、骨内 (i.o.) 接種のために15  $\mu$ LのPBS中に懸濁させた。27ゲージ、 $1/2$ インチの注射針のインスリン用シリンジ (BD Bioscience) を右脛骨に直接挿入し、次いでプランジャーをシリンジに押し付けることによって、骨内接種を行った。腫瘍体積を、上述のように採血によって毎週測定した。最小侵襲的方法である、顎下出血法を用いて、マウスから繰り返し血液を採集した。この方法を利用して、200  $\mu$ Lの血液サンプルをCTCの分析用に採集した。上皮または間葉細胞は、腫瘍の存在に関わりなく、これらの血液サンプル中では検出不能であった。アッセイ及び採血の経路の最適化の後に、LM8及びCT-26細胞で移植されたマウス中のCTCを計数した。

30

40

実施例2 - 細胞表面ビメンチン、新規ユニバーサル循環腫瘍細胞マーカー

#### 【0110】

ビメンチンの過発現は、細胞が上皮から間葉表現型への移行を介して増加性の浸潤性及び転移力を獲得するプロセスである、EMTとの関連頻度が高い (Satelli及びLi、2011によって検討)。癌患者から単離されたCTCの単一細胞プロファイリングは、樹立細胞株と比較するときに、ビメンチン転写物の過発現を示し (Powell et al., 2012)、これらのCTC中のEMT表現型の可能性を示唆しているが、白血球細胞 (WBC) の大部分を含む正常な間葉細胞中のビメンチンの細胞内発現は、このCTCマーカーとしての利用能を制限している。本発明者のグループを含めるいくつかのグループは、癌細胞の表面上のビメンチンの検出を以前に報告している (Satelli

50

i and Li, 2011, Cutrera et al., 2011, Huet et al., 2006)。細胞内ビメンチンとは異なり、細胞表面ビメンチン(CSV)の発現は、主として癌細胞に関連し、上皮及び間葉癌の両方で見出された。したがって、本発明者は、CSVがCTCに対する潜在的マーカーとしての機能を果たすという仮説を提唱した。しかしながら、CSV結合ペプチドの制限及びCSVに特異的に結合する市販の抗体の非可用性のために(図4A)、本発明者は、CSV特異的モノクローナル抗体を生成することを目指した。この観点において、本発明者は、正常細胞を除外しながら、癌細胞のみに結合するCSV特異的抗体を単離するための戦略を設計した(図1A)。簡単に言うと、多数のハイブリドマクローンを、完全長ヒトビメンチン(NCBI:NP\_003371.2)に対して生成し、骨肉腫(LM7)細胞株上のCSVを標的化することによって、フローサイトメトリーを利用して、抗体をCSV結合についてスクリーニングし、これは、CSV特異的ペプチドに対して肯定的な結合を示した(図4B)。ネガティブな結合については、正常細胞株HFOB及びNCM-356を利用した。この戦略を利用して、本発明者は、ビメンチンに特異的に結合したハイブリドマ84-1から、モノクローナル抗体(表7)、またはそれらの細胞表面ビメンチン結合断片を同定した。84-1のビメンチンに対する特異性は、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、及び免疫蛍光法を用いてさらに確認された(図4C、D、及びE)。

10

#### 【0111】

異なる上皮、非上皮癌、及び正常細胞株の細胞表面スクリーニングは、癌細胞の表面上のみにビメンチンが存在することを示した(図1A及びB)。重要なことに、マクロファージ、内皮細胞、好中球、血小板、及びアポトーシスTリンパ球は、CSVを発現することがこれまでに報告されているが(Moisan及びGirard, 2006, Bhattacharya et al., 2009, Mor-Vaknin et al., 2003)、この発現は、84-1によってほとんど検出不可能であり(図5A)、84-1の癌CSVに対する特異性を示している。

20

#### 【0112】

本発明者は、乳房、膀胱、脳、結腸、肝臓、肺、膵臓、皮膚組織、及び血液に源を発する様々な癌細胞株をテストし、これはCSV発現を有する細胞の明確な集団を示している(表1)。ヒトの肝臓の転移性細胞(HLM-3)の免疫細胞化学分析は、細胞表面マーカー小麦胚芽凝集素(WGA)と同時局在化する細胞の表面上のビメンチンの存在を示している(図1D)、これは正常な結腸上皮細胞(NCM-356)においては検出不可能である。これらの細胞の透過性化は、HLM-3細胞中でのみ細胞質ビメンチンの存在を示したが、NCM-356細胞は、ネガティブであった(図5B)。ヒト骨肉腫患者サンプルから生成した原発性癌細胞株の分析(図5C)は、転移性細胞株中でCSVの発現を示すが、一方原発性細胞株はネガティブであった(表2)。ヒト結腸及び転移性肝臓(結腸からの転移)組織から単離され癌細胞のCSVについてのさらなる分析は、原発性結腸癌細胞サンプルと比べて肝臓転移性サンプル中の非常に高い発現を示し(図1E及び5D)、これは、CSVが転移性癌細胞に対する潜在的バイオマーカーとして機能を果たし得ることを示唆している。しかしながら、原発性結腸癌細胞は、CSVのより低い発現を有する細胞のサブタイプを示し、これらの細胞が、遠隔臓器に拡散するために、血液循環に流れ込んでいる浸潤性/転移性表現型の細胞である可能性がある。この仮説は、3Dスフェアモデルにおけるスフェアの周囲におけるCSV陽性細胞の存在によって支持され(図1F)、これらの細胞がより攻撃的かつ浸潤性表現型の細胞である可能性を示唆し、このことは、これらの細胞の浸潤性表現型を表す - カテニンの核蓄積の増加によって支持される(Brabl et al., 2005)(図5E)。

30

40

#### 【0113】

上皮及び非上皮起源の様々な癌細胞株中のCSVの検出に基づいて、本発明者は、CSVがCTCを検出するためのバイオマーカーとしての機能を果たし得るとする仮説を提唱した。この仮説をテストするために、本発明者は、十分に特性化されたマウス転移性LM8細胞の検出をテストし、このLM8細胞を、7.5mLの血液中にスパイクし、84-

50

1 抗体を用いて免疫蛍光染色にかけた（図 2 A の概略的表現）。顕微鏡写真から、蛍光顕微鏡法を利用して、単一細胞が全血中で検出可能であることが明らかである（図 2 B）。8 4 - 1 抱合ビーズを用いる磁性分離を利用して、本発明者は、全血から単一細胞を単離し（図 2 C）、これを培養皿で可視化することができ、これは生細胞の単離を示唆している。さらに、単離された細胞を、共焦点画像診断法を用いてさらに特性化し、核のサイズ（ $> 8 \mu\text{m}$ ）及び C S V についての陽性染色ならびに C D 4 5、白血球マーカーについての陰性染色に基づいて癌細胞であることを確認した（図 2 D）。稀な例において、本発明者は、腫瘍細胞と免疫細胞との間の相互作用の観察を行った（図 6 A）。本発明者は、8 4 - 1 染色に対して陽性である H L M 3 及び L M 7 細胞を用いて、8 4 - 1 抗体の感度及び特異性をさらに評価した（表 5）。この結果は、この抗体の C T C 検出における非常に高い感度及び約 1 0 0 % の特異性を示した。追加のスパイクングアッセイを、別の単離された細胞表面ピメンチン結合抗体、1 2 - 1 を用いて行った（表 6）。この結果は、この抗体の C T C 検出における非常に高い特異性及び約 4 0 % の感度を示した。さらには、1 2 - 1 抗体を用いる L M 7 細胞抽出物を、1 2 - 1 抗体及び D R A Q 5（核染色）を使用して、細胞表面ピメンチンについて染色した（図 8）。

【 0 1 1 4 】

8 4 - 1 を用いて行ったスパイクングアッセイは、本発明者が L M 8 骨肉腫細胞を非上皮モデルに、C T 2 6 結腸腺癌細胞を上皮モデルに利用したインビボ試験によってさらに確認された。これらのマウスは、所定の期間にわたって C T C における変化について監視され（図 6 B 及び C）、試験の終了時に、細胞を単離し、培養皿内で培養し（図 6 D）、C S V +、C D 4 5 -、及び大きな核を確認した（図 6 E）。本発明者はまた、p 5 3 突然変異型マウスの自発性腫瘍モデルを利用し、所定の期間にわたって自発的に発現する、腫瘍中の異なる型の C T C の存在を示した（表 4）。さらに、本発明者は自発性腫瘍を有するイヌの血液中の C T C についてテストし、興味深いことに、8 4 - 1 は、このモデルにおいて C T C を検出することができ、このことは、C D 4 5 陰性ならびに C S V 陽性によって、及び核のサイズに基づいて確認された（図 6 F）。

【 0 1 1 5 】

8 4 - 1 抗体がスパイクされた細胞及び血中の C T C を高い特異性で検出したために、本発明者は、健康なボランティア、骨肉腫を含む非上皮癌、平滑筋肉腫、多形肉腫、未確認多形肉腫（U P S）及び結腸癌ならびに肝臓癌を含む上皮癌からのヒト血液サンプルを、蛍光画像診断法を用いて C T C についてテストし（表 3）、C T C の同定を成功裏に行った。健康者の血液サンプルでは、C T C は検出不可能であった。全体として、C T C 計数における増加は、原発性癌サンプルと比べて転移性癌患者サンプルで観察され、これは、高度に転移性の C T C の可能な検出を示している（図 2 E）。結腸癌患者からの C T C も、8 4 - 1 + C D 4 5 - 細胞の磁性分離の前に、蛍光顕微鏡下で可視化された（図 7 A）。磁性ビーズを用いて単離された 8 4 - 1 + C D 4 5 - 細胞は、数週間ほど生存したために、これらを F I S H 及び突然変異アッセイを用いてさらに分析することを可能にし、これによって、それら細胞のアイデンティティを癌細胞として確認した（図 7 B）。単一細胞を、突然変異分析によって、腫瘍表現型について特性化した。この分析については、結腸癌患者から単離された C T C を用いた。C T C 中の K R A S（v - K i - r a s 2 カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ）についての突然変異分析は、C T C が、コドン 1 3 上に K R A S 突然変異を特異的に有するが、一方単離された C D 4 5 + 細胞が、野生型の K R A S 遺伝子を有する対照として用いられることを示した（図 3 A）。原発性腫瘍はコドン 1 2 上に K R A S 突然変異を有したが、C T C はコドン 1 3 上の突然変異に対して陽性であるとテストされたことは興味深い。以前の研究は、同一の患者から単離された C T C 中の K R A S 突然変異の検出における不均一性を報告している（G a s c h e t a l . , 2 0 1 2）。さらに、K R A S の状態に依存する転移性結腸直腸癌を有する患者の臨床的特性化は、コドン 1 3 突然変異型転移性結腸直腸癌が、臨床疾患が先ず初めに明らかになった時点で局所的及び遠隔の転移に対して関連頻度が高いより攻撃的かつ浸潤性の疾患を表すことを示した（M o d e s t e t a l . , 2 0 1 1）。また、骨

10

20

30

40

50

髄転移におけるKRAS突然変異及び結腸直腸癌中の原発性腫瘍の分析は、コドン12突然変異が原発性腫瘍内にあるのに比べてコドン13突然変異が播種性細胞内にあることを示し、これによって、CTCの不均質な性質を強調している(Tortola et al., 2001)。したがって、これらの結果は、攻撃的表現型及び結腸直腸癌における転移能を有するCTCのための潜在的な突然変異ホットスポットマーカーを示している。間葉腫瘍CTCについては、その後血液から単離された84-1+CTCを、所定の腫瘍に対する特異的マーカーを利用することによって検証した(CD99は、ユーイング肉腫CTCについてのマーカーとして使用され、SMAは平滑筋肉腫について使用された(図3B))。集団の大きな集合を用いる今後の試験は、CSV陽性CTCと臨床転帰との間の任意の相関を引き出すことが保証される。

10

## 【0116】

Siewarts et al., (2009)は、MDA-MB-231及びMDA-MB-468細胞が正常な乳房に似た癌細胞であり、浸潤性表現型で特徴付けられるが、EpCAM媒介検出を逃れることを示すことを以前に報告した。興味深いことに、これらの細胞は、フローサイトメトリーを利用する本発明者の抗体を用いて検出可能であり(図7C)、このことは、EMTを引き起こす可能性があったEpCAM陰性CTCの検出を示唆している。我々の抗体は、結腸癌患者サンプルからCTCを検出することができたために、本発明者は、これらの細胞がEMTを引き起こしたかどうか、したがってCSV発現の増加に起因して容易に検出可能であるかどうかをテストすることを希望した。単離された84-1+CD45-CTCを、共焦点顕微鏡を用いて、EpCAM、E-カドヘリン、ビメンチン、及びSlugの免疫蛍光標識についてテストを行った(図3C)。この結果は、これらのCTCは、上癌細胞の皮表現型についてのマーカーであるEpCAMの発現を喪失したことを示した。しかしながら、内部ビメンチンについてのさらなる特性化は、それらの上皮表現型から間葉表現型への移行を確認した。この移行は、EMTの転写調節因子であるSlugの発現及び上皮表現型についてのマーカーである膜E-カドヘリンのダウンレギュレーションによって確認される。ビメンチン及びSlugの発現における増加を伴うEpCAM及びE-カドヘリンのダウンレギュレーションは、CTCのEMTの性質を示している。Slugの過発現は、結腸直腸腺癌患者における低生存率に関する独立した予後パラメータであることが示されている(Shioiri et al., 2006)。さらに、本発明者は、活性EMT細胞の指標である(Brablet et al., 2001)、単離されたCTCの核中のβ-カテニンの存在を検出した(図3D)。核中のC-Myc蓄積は、β-カテニンの核進入についての証拠を提供する(図3D)。全体として、これらの結果は、84-1抗体を使用しての、現行のCTC検出技術において主要な欠陥を引き起こす上皮癌細胞からのEMT CT Cの単離を確認している。

20

30

## 【0117】

上皮癌の細胞表面上のビメンチンの発現は、癌細胞のステージ、すなわちEMTステージに依存するために、本発明者は、これらが特定の作用物質を用いて癌細胞の表面上のビメンチンの発現を誘発できるかどうかをテストすることを望んだ。既報は、ビメンチンの細胞表面への移行が、リン酸化依存性であることを示唆している(Satelli and Li, 2011において検討)。本発明者は、特異的なホスファターゼを阻害することが、ビメンチンのリン酸化を増加させ、これによってCSV発現を増加するという仮説を提唱した。この仮説をテストするために、本発明者は、特異的なホスファターゼを阻害し、癌細胞中のCSVの発現を増加させる阻害物質である、オルトバナジウム酸ナトリウム(SOV)を用いたが(図3E、中央パネル)、正常な白血球のCSVにおいて変化はなかった。(図3E、下部パネル)。さらに、SOVで処理されたLM7は、CSVにおける増加を示し、これによってCSVの検出を非常に高い効率性で増強させる(図7D)。さらに、本発明者は、ヒト結腸癌血液検体をSOVの効果についてテストし、これは、蛍光顕微鏡によって検出可能であるCSVにおける増加を明確に示した(図3F)。したがってSOVは、CTCの検出における主要な要件である、CTCの収量を増加させるC

40

50

S V ブースティング剤として使用することができる。したがってこれらの結果は、C T C 中のC S V 発現を増強されるためのS O V のブースティング剤としての使用を示唆している。

#### 【0118】

C T C 検出は、病院でその使用が非常に増加する傾向にあり、治療現場で適用されているが、現行の技術を使用するC T C 検出の効率全体にわたる不確実性は、検出の効率を増大させ、患者の治療の評価における有用なツールとして補助する、C T C に対する新しいマーカーの発見を必要としている。本明細書において、本発明者は、非上皮細胞型及びE M T 細胞型の両方のC T C の細胞表面上のビメンチンの存在を報告している。C T C 中のC S V 検出は、現行のマーカーに基づく検出技術を超えるいくつかの利点を提供する。第1には、間葉腫瘍由来C T C の検出のための特異的マーカーの存在に関する文献における報告がないために、C S V を1つだけの特異的なマーカーとして使用することが、マーカーの組み合わせの使用を超えるその優れた優位性を際立たせることである。第2には、上皮腫瘍からE M T C T C を検出する能力が、市場において現行のC T C 検出技術の検出能力を増強することである。第3には、ヒトからのみならず、さらにイヌ及びマウスモデルからのさらなる分子特性化のための生C T C の単離が、臨床研究ツールとしてのその使用を際立たせることである。

10

#### 【0119】

結論として、本発明者は、C S V 特異的モノクローナル抗体84-1を発見し、この84-1は、検出に役立つばかりでなく、さらなる分析用に利用され得る、上皮及び非上皮癌の両方からの生C T C の単離に役立つ。Cell Search、Magsweeper、C T C Chip、及び他の技術によるC T C の計数は、C T C の分野に革命をもたらした。しかしながら、これらのツールを利用する検出は、広範囲の癌におけるC T C の検出でさらに支援することができる強力なバイオマーカーを必要とする。E M T 形質転換細胞は、一次マーカーとしてE p C A M 及びサイトケラチンを利用するツールによる検出を逃れることが知られているために、84-1との併用は、これらの方法論の感度及び信頼度を高めることができる。この抗体を単独で利用すること(間葉癌に対して)、または現行のマーカーと共に利用すること(E M T 癌に対して)が、これらの転移性前駆体サブ集団についての理解を向上させることができ、治療モニタリングに基づいて新規の診断、治療、及び予後選択を提供することで役立つ技術が、C T C 検出において非常に有効であり得る。

20

30

実施例3：ビメンチンに対するマウスモノクローナル抗体12-1及び84-1のエピトープマッピング

#### 【0120】

ビメンチン配列を、9、11、及び14個のアミノ酸のペプチド間重複を有する10、12、及び15個のアミノ酸(aa)ペプチドに翻訳した。このペプチドをペプチドアレイ上にスポットした。得られたペプチドマイクロアレイは、1,406個の異なるペプチドを二重に含有し(2812個のペプチドスポット)、Flag及びHA制御ペプチド(それぞれ116のスポット)によってフレームされた。

#### 【0121】

標準緩衝液中での10分間の前膨潤後に、ペプチドアレイの前染色を、1:5000希釈の二次ヤギ抗マウスIgG(H+L)DyLight680抗体で、室温で60分間行い、アッセイを妨害する可能性がある抗原由来のペプチドとのバックグラウンド相互作用を調べた。7のスキャン強度値においては、ビメンチン由来ペプチドとの顕著なバックグラウンド相互作用は観察されなかった。

40

#### 【0122】

引き続き、インキュベーション緩衝液(0.05%のTween20及び10%のRocklandブロッキング緩衝液を含むPBS(pH7.4))中で、ペプチドアレイのマウスモノクローナル抗体12-1及び84-1(1µg/mlの濃度)とのインキュベーションを行い、その後、二次ヤギ抗マウスIgG(H+L)DyLight690抗

50

体(1:5000)による染色を行い、LI-COR Odyssey Imaging Systemを用いて、7のスキャン強度値で読み取った。特に抗体84-1による、高強度で複雑な染色パターンのために、アッセイを抗体の0.2 µg/mlの低濃度において繰り返して行った。染色パターンの全般的な強度は低下したが、バックグラウンドもスポットパターンの複雑性も減少しなかった。種々のペプチド長への明確な依存性を有する隣接するペプチドの連続した列によって形成されるエピトープ様スポットは、同定されなかった。その後、Flag及びHA制御ペプチドを、対応する対照抗体で染色した。

#### 【0123】

スポット強度及びペプチドアノテーションの定量化を、PepSlide(登録商標)アナライザーで行った。ソフトウェアアルゴリズムは、各スポットの蛍光強度を、生信号、フォアグラウンド信号、及びバックグラウンド信号に分解し、フォアグラウンド中央値強度の標準偏差を計算する。平均化フォアグラウンド中央値強度に基づいて、強度マップを作成し、ペプチドマップ内のバインダーを強度カラーコードによって強調させた。

#### 【0124】

二次抗体による前染色及びN末端からC末端までのビメンチン配列に対する各マウス抗体による主アッセイの平均化スポット強度をプロットし、全体のスポット強度及び信号対ノイズ比を可視化した。強度プロットを、ペプチド及び強度マップとならびにマイクロアレイスキャンの目視検査と関連させて、抗体サンプルと相互作用したコンセンサスモチーフ及び特有のペプチドを同定した。

#### 【0125】

マイクロアレイスキャン及び強度マップによると、明確なエピトープ様パターンがなく、抗体12-1(図11)及び抗体84-1(図12)の交差反応性に起因する複雑かつノイズな応答が観察された。マウスモノクローナル抗体12-1(1 µg/ml)及び84-1(0.2 µg/ml)の強度プロットの比較は、両サンプルの明白な類似性を明らかにした(図13)。両抗体は、ほぼ2倍のスポット強度で抗体84-1との類似の交差反応性を示し、重複するコンセンサスモチーフを有する隣接するペプチドによってエピトープ様スポットパターンは形成されなかった。

#### 【0126】

両抗体の可能な生モチーフ及びアミノ酸指向性の同定は、MEME部位(モチーフに基づく配列分析ツール)によって支持された(図14及び15)。MEME分析については、各アッセイの上位100個のペプチドを選択し、2つのみのアミノ酸の最小モチーフ長さを規定した。得られたE値は、所与の対数尤度比(またはそれ以上)、ならびに類似の大きさのランダム配列で見出されるであろう同じ幅及び部位係数を持ち、コンセンサスモチーフの統計的有意性と対応する。1のE値は、ランダムペプチドの集合中である特定のモチーフの偶然の同定と予想され、E値の減少は、統計的有意性の増加と相関する。

#### 【0127】

MEME分析は、上位モチーフxLQE[LE]E[DM]Rでならびに非常に高い統計的有意性で、両抗体12-1及び84-1の明白な類似性を強調した。このサンプルは、アミノ酸D及びEに対するならびに疎水性アミノ酸M、F、A、及び特にLに対する明確な指向性を示した。MEME分析は、疎水性アミノ酸Lと産生アミノ酸DまたはEとの間の1つのアミノ酸の好ましいスペーサーをさらに示した。これに基づいて、LQE、QEL、QEE、QE[xx]E[xx]R、E[x]E[M]R、L[x]E、及びxLxExxDを含むいくつかの可能なサブモチーフが存在する。

実施例4 - 癌患者からの血液中のCTCの検出

#### 【0128】

乳癌患者の血液中のCTCを検出するための能力をテストするために、転移性乳癌を有する62人の患者からそれぞれ2本の採血管(それぞれ7.5 mL)を得た。それぞれ1本の管を、84-1法によりCTCを計数し(図9A)、CellSearch法によりCTCを計数する(図9B)ために用いた。CTCの平均数を、84-1法及びCellSearch法の両方から計算し、組み合わせた方法の平均値を発生させた(図9C)。

患者を、安定性（療法に应答している）及び進行性（療法に应答せず、腫瘍進行を示している）集団に分類した。検出の感度及び特異性を、各方法について計算し、84-1法（それぞれ83.3%及び95%）、Cell Search法（それぞれ50%及び85%）、及び組み合わせた方法の平均値（それぞれ83.3%及び95%）であった。

【0129】

前立腺癌患者の血液中のCTCを検出するための能力をテストするために、転移性前立腺癌を有する21人の患者からそれぞれ2本の採血管（それぞれ7.5mL）を得た。それぞれ1本の管を、84-1法及びCell Search法によりCTCを計数する（図10）ために用いた。患者を、安定性（療法に应答している）及び進行性（療法に应答せず、腫瘍進行を示している）集団に分類した。検出の感度を、各方法について計算し、84-1法（95%）及びCell Search法（50%）であった。検出の特異性は、入手可能なサンプルの数が制限されたために、計算しなかった。

【表 1 - 1】

表 1. 異なる細胞株中の細胞表面ビメンチンの発現

細胞株	細胞表面ビメンチン	細胞株	細胞表面ビメンチン	細胞株	細胞表面ビメンチン
乳房		結腸		膀胱	
MCF-7 (H)	+	DLD-1 (H)	++	RT4V6 (H)	+
SKBR3 (H)	+	GEO (H)	++	J82 (H)	-
BT-474 (H)	-	OS-187 (H)	++	T24 (H)	++
MDA-MB-231 (H)	+	SW620 (H)	+	UC9 (H)	-
MDA-MB-453 (H)	+	SW480 (H)	+	膵臓	
MDA-MB-458 (H)	++	HCT-116 (H)	+	PANC-1 (H)	++
EMT-6 (M)	-	HT-29 (H)	++	MiaPACA-2 (H)	+
4T1 (M)	+	Caco-2 (H)	+	その他	
肝臓		CT-26 (M)	+	HeLa (H)	-
SNU398 (H)	-	骨		PC-3M (H)	-
HEP3B (H)	-	OS-25 (H)	++	B16F10 (M)	-
SNU499 (H)	-	HOS (H)	++	FBL3 (M)	+++
AMC14 (M)	++	MG-263 (H)	++	SCCVII (M)	+
脳		LM7 (H)	+		
SKNAS (H)	++	SAOS-2 (H)	+		
SKNBE2 (H)	++ +	OS25 (H)	+		
SK-N-SH (H)	-	OS-O (H)	++		
NGP (H)	+	OS-D	+		

10

20

30

40

【表 1 - 2】

		(H)			
CHP134 (H)	—	U2OS (H)	+		
SH-SY5Y (H)	++	CCH-OS D (H)	+		
LAN5 (H)	++	K7 (M)	++		
KCN (H)	+	K7M2 (M)	+++		
DBT (M)	+	DUNN (M)	+		
U87 MG (H)	—	LM8 (M)	+++		
U251 (H)	+				

(H) : ヒト、(M) : マウス。細胞表面ビメンチンを、CSVの平均蛍光強度を測定することによって、フローサイトメトリー分析を用いて計数した。「—」 : 検出不能、「+、++、+++」 : イソタイプ対照と比べて<2、<4、>4倍存在する。

10

【表 2】

表 2. 原発骨肉腫細胞株中の細胞表面ビメンチン (CSV) の評価

細胞株	疾患変異型	転移	CSV
OST-DL-390	骨肉腫	なし	—
OST-DL-391	骨肉腫	肺に転移あり	+
OST-DL-393	骨肉腫	肺に転移あり	+
OST-DL-396a	骨肉腫	脳に転移あり	++
OST-DL-399	骨肉腫	なし	—

30

MFI : 平均蛍光強度

(-) MFI 変化なし、(+) MFI の < 2 倍の増加、(++) MFI の > 2 倍の増加

【表 3 - 1】

表 3. 異なる癌患者サンプル中の CTC 計数

患者番号	腫瘍位置	疾患変異型	疾患状態	前治療	CTC /mL
骨肉腫					
OB 1	上腕骨	高グレード	LNへの転移	C h e m o	8
OB 2	脛骨	高分化型 髄内	原発性	なし	0
OB 3	膝、肺	高グレード 骨芽球性	肺に転移性	C h e m o	3
OB 4	大腿骨、肺	線維芽細胞性 巨細胞に富む	肺に転移性	C h e m o	4
OB 5	大腿骨	線維芽細胞性	肺に転移性	C h e m o	6

【表 3 - 2】

		巨細胞に富む			
UPS					
UP 1	背部	生存腫瘍無し	原発性	XRT	1
UP 2	後腹膜	生存腫瘍無し	原発性	Chem o、 XRT	0
UP 3	胸壁		原発性	XRT	2
UP 4	胸壁		局所再発性	なし	4
UP 5	膝	腫瘍無し	残余の原発性	XRT	2
UP 6	骨盤、肝臓、 肺		肝臓、肺へ転 移性	Chem o、 XRT	6
平滑筋肉腫					
LM 1	骨盤	子宮	局所再発性	Chem o	4
LM 2	腕、肺		肺に転移性	Chem o	8*
LM 3	腹部／骨盤	子宮	原発性	Chem o	5
肝臓					
L 1	肝臓	再発性HCC	LI検出	Chem o	5
結腸					
CRC 1	結腸	浸潤性線癌	肝臓、肺へ転 移性	Chem o	8
CRC 2	結腸直腸	浸潤性線癌	肝臓、肺へ転 移性	Chem o	12
CRC 3	結腸	粘液性腺癌	原発性	Chem o	4
CRC 4	結腸	結腸癌	転移性	Chem o	8
CRC 5	結腸	腺癌	肝臓、肺へ転 移性	Chem o	16
CRC 6	結腸	腺癌	肺、骨、脳、 筋肉に転移性	Chem o	12

LN：リンパ節、HCC：肝細胞腺癌、LI：リンパ管浸潤、Chem o：化学療法、XRT：体外照射療法、UPS：未同定の多形性肉腫、\*：肝細胞画像診断法に基づく検出

【表 4 - 1】

表 4. 自発性腫瘍を有するマウス中のCTCの計数

マウス番号	疾患変異型	転移	CTC/mL
DD 5 5 4	正常	なし	0
DD 6 1 6	リンパ腫	なし	0
DD 5 9 6 # 3	乳腺リンパ腫	なし	0
DD 7 0 5	胸腺	なし	0
DD 7 3 2	骨肉腫	なし	1
DD 6 7 4	肉腫	なし	1
DD 7 2 9	胸腺	なし	1
DD 4 4 6	肝臓腫瘍	リンパ節に転移あり	2
DD 6 0	腸	なし	2
DD 7 5 3	骨肉腫	なし	3

【表 4 - 2】

DD 2 9 9 2	肝臓腫瘍	なし	4
DD 5 9 6 # 7 7	卵巣	なし	7
DD 7 0 1	胸腺	肝臓に転移あり	7
DD 6 3 6	胸腺	肝臓に転移あり	9
DD 6 3 7	胸腺	肝臓に転移あり	9
DD 7 3 0	胸腺	肺に転移あり	3 1
DD 4 3	骨肉腫	肺に転移あり	4 5
DD 5 9 2	骨肉腫	肺に転移あり	5 6
DD 4 7 0	骨肉腫	肺に転移あり	8 0
DD 9 3	腸	あり	1 5 4
DD 4 9 3	血管肉腫	肝臓、肺に転移あり	1 7 5
DD 5 9 6 # 4	骨肉腫	肺に転移あり	2 5 8

10

【表 5】

表 5. スパイキング分析を用いる 8 4 - 1 感受性及び特異性の評価

方法	P BMC	スパイク	抽出	バックグラウンド
感受性				
8 4 - 1 抜き取り	$1 0 \times 1 0^6$	2	1	0
8 4 - 1 抜き取り	$1 0 \times 1 0^6$	5	3	0
8 4 - 1 抜き取り	$1 0 \times 1 0^6$	1 0	7	0
特異性				
8 4 - 1 抜き取り	$1 0 \times 1 0^6$	5	3	0
8 4 - 1 抜き取り	$2 0 \times 1 0^6$	5	2	0
8 4 - 1 抜き取り	$2 0 \times 1 0^6$	5	3	0

20

30

【表 6】

表 6. スパイキング分析を用いる 1 2 - 1 感受性及び特異性の評価

方法	P BMC	スパイク	抽出	バックグラウンド
1 2 - 1 抜き取り	$1 0 \times 1 0^6$	5	2	0
1 2 - 1 抜き取り	$1 0 \times 1 0^6$	5	1	0
1 2 - 1 抜き取り	$1 0 \times 1 0^6$	5	2	0

40

## 【表 7】

表 7. 84-1 の VH 及び VL CDR 領域

重鎖配列			軽鎖配列		
CDR 1	CDR 2	CDR 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3
アミノ酸配列			アミノ酸配列		
G F S L T R Y G V H (配列番号 3)	V I W S G G S T D Y N A A F I S (配列番 号 4)	R S Y Y Y A M D Y (配列番号 5)	R S S Q S I V H R I G N T Y L E (配列番 号 6)	K V S N R F S (配列 番号 7)	F Q G S H V P L T (配列番号 8)
Q V Q L K Q S G P G L V Q P S Q S L S I T C T V S G F S L T R Y G V H W V R Q S P G K G L E W L G V I W S G G S T D Y N A A F I S R L S F S K D N S K S Q V F F K M N S L Q A N D T A I Y Y C A R R S Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S (配列番号 1)			D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H R I G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P L T F G A G T K L E L (配列 番号 2)		

10

20

\* \* \*

## 【 0 1 3 0 】

本明細書に開示され主張される方法の全ては、本開示に照らして、過度の実験なしに実行かつ達成される。本発明の組成物及び方法が、好ましい実施形態に関して記述されてきたが、様々な変形が、本発明の概念、趣旨、または範囲から逸脱することなく、本明細書に記載される方法に及びステップにおいてまたは方法のステップの順序において適用されてもよいことが、当業者には明らかであろう。より具体的には、同一または類似の結果が達成される限り、化学的及び生理学的の両方に関連する特定の作用物質が、本明細書に記載される作用物質に置き換えられてもよいことが明らかであろう。当業者に明確な全てのこうした類似の置換及び修正は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の趣旨、範囲、及び概念の範囲内にあるとみなされる。

30

## 【化 2 - 1】

## 参考文献

以下の参考文献は、これらが例示的な手法または他の細部の補足を本明細書に記載されるものに提供する限りにおいて、特に参考により本明細書に組み込まれる。

Bhattacharya et al., Recruitment of vimentin to the cell surface by beta3 integrin and plectin mediates adhesion strength, *J. Cell Sci.*, 122:1390-1400, 2009.

Brabletz et al., Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98:10356-10361, 2001.

Brabletz et al., Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression, *Nat. Rev. Cancer*, 5:744-749, 2005.

Cutrera et al., Discovery of a linear peptide for improving tumor targeting of gene products and treatment of distal tumors by IL-12 gene therapy. *Mol. Ther.*, 19:1468-1477, 2011.

Gasch et al., Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer, *Clin. Chem.*, 59:252-260, 2013.

Huet et al., SC5 mAb represents a unique tool for the detection of extracellular vimentin as a specific marker of Sezary cells, *J. Immunol.*, 176:652-659, 2006.

Mackall et al., Focus on sarcomas, *Cancer Cell*, 2:175-178, 2002.

Modest et al., Clinical characterization of patients with metastatic colorectal cancer depending on the KRAS status, *Anticancer Drugs*, 22:913-918, 2011.

Moisan and Girard, Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis, *J. Leukoc. Biol.*, 79:489-498, 2006.

10

20

30

40

## 【化 2 - 2】

Mor-Vaknin et al., Vimentin is secreted by activated macrophages, *Nat. Cell Biol.*, 5:59-63, 2003.

Pantel and Brakenhoff, Dissecting the metastatic cascade, *Nat. Rev. Cancer*, 4:448-456, 2004.

Parkinson et al., Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use, *J. Transl. Med.*, 10:138, 2012. 10

Powell et al., Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines, *PLoS One*, 7:e33788, 2012.

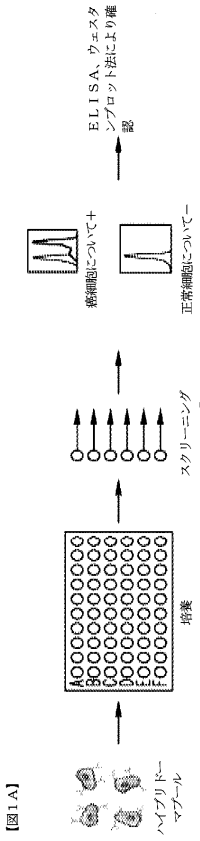
Satelli and Li, Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy, *Cell Mol. Life Sci.*, 68:3033-3046, 2011. 20

Shioiri et al., Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients, *Br. J. Cancer*, 94:1816-1822, 2006.

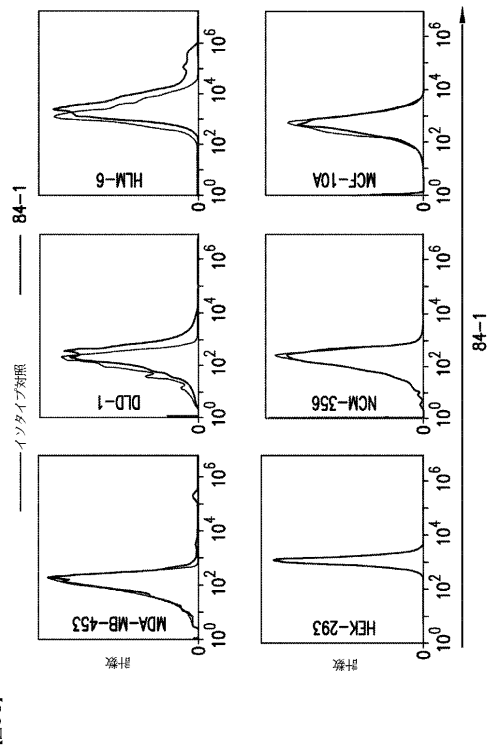
Sieuwert et al., Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, 101:61-66, 2009. 30

Tortola et al., Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.*, 19:2837-2843, 2001.

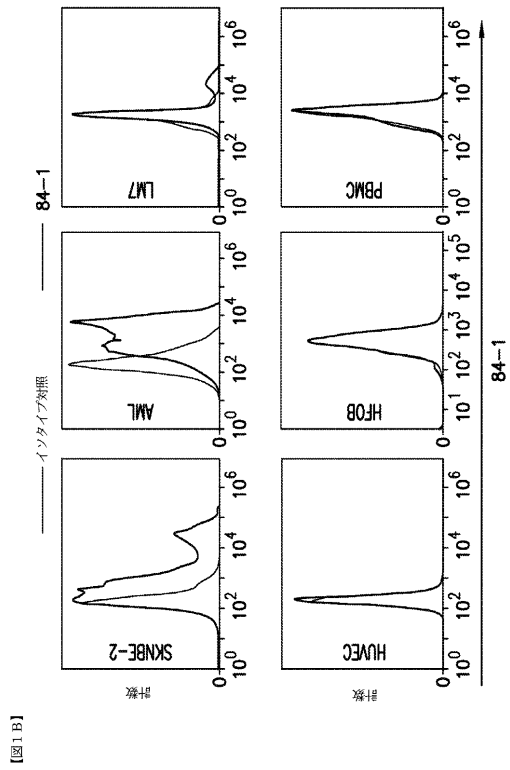
【図1A】



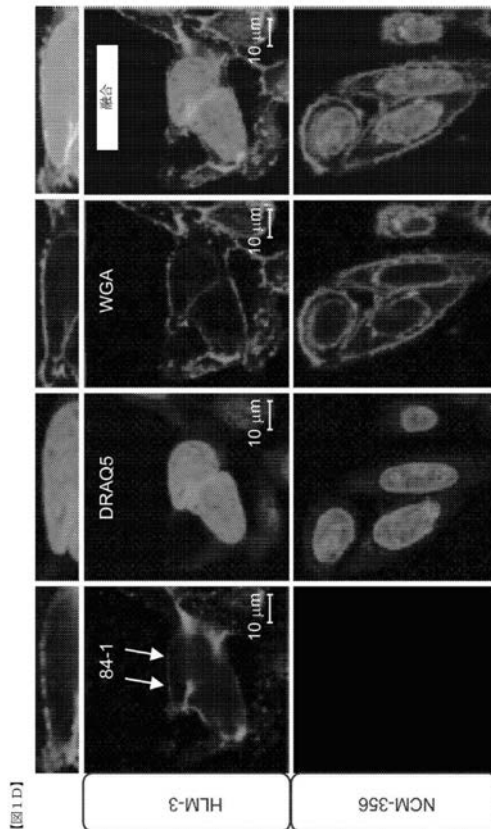
【図1C】



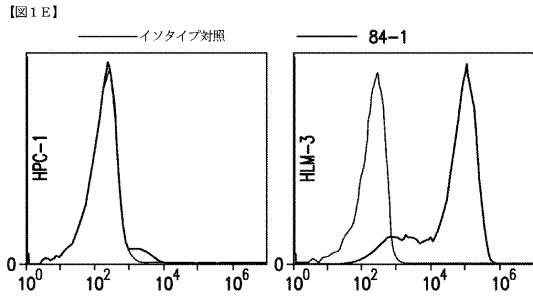
【図1B】



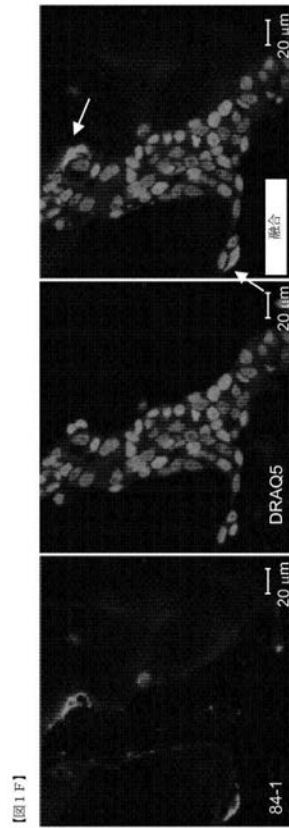
【図1D】



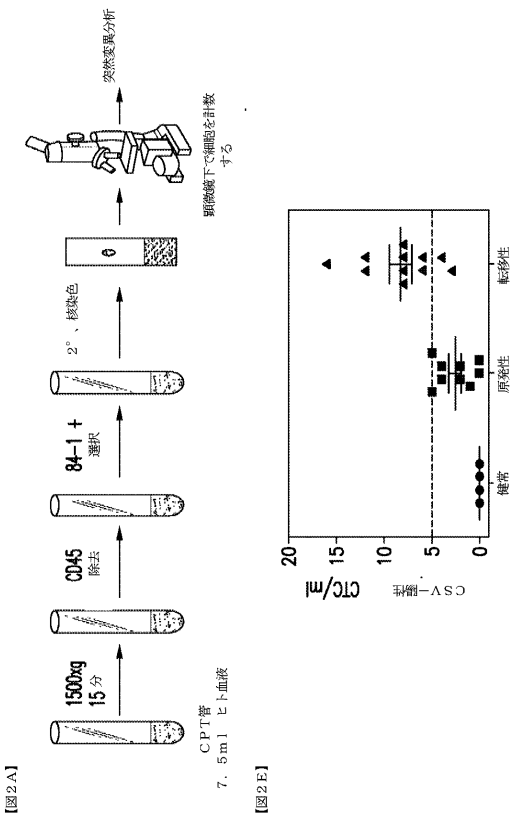
【 図 1 E 】



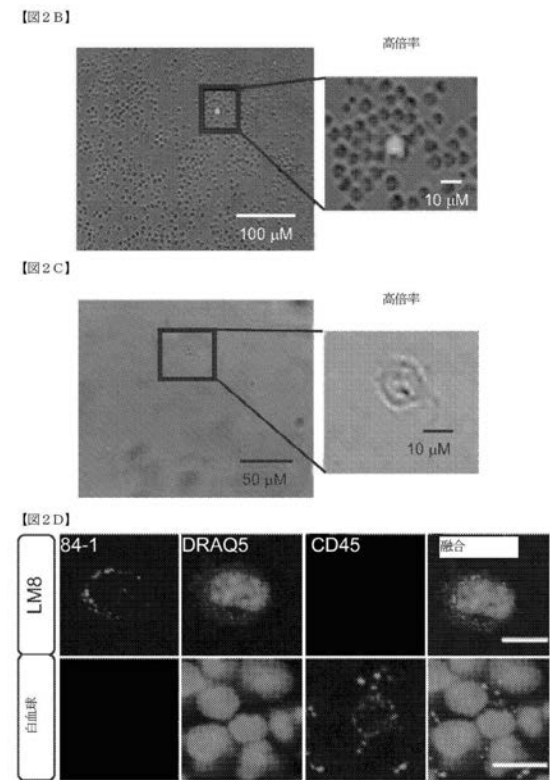
【 図 1 F 】



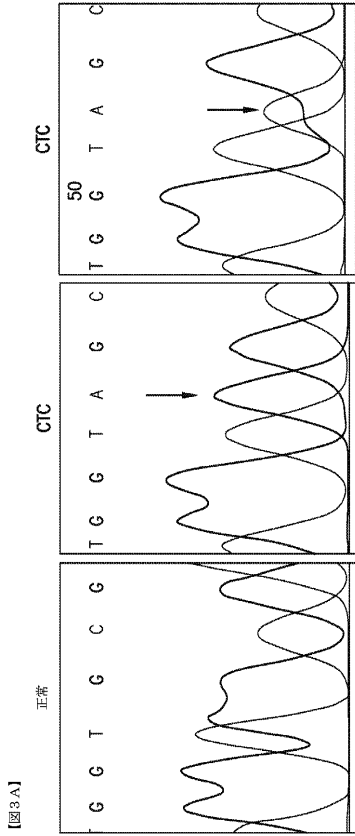
【 図 2 - 1 】



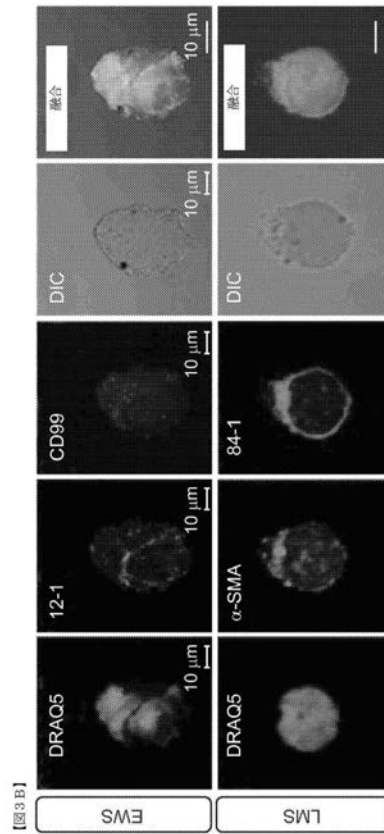
【 図 2 - 2 】



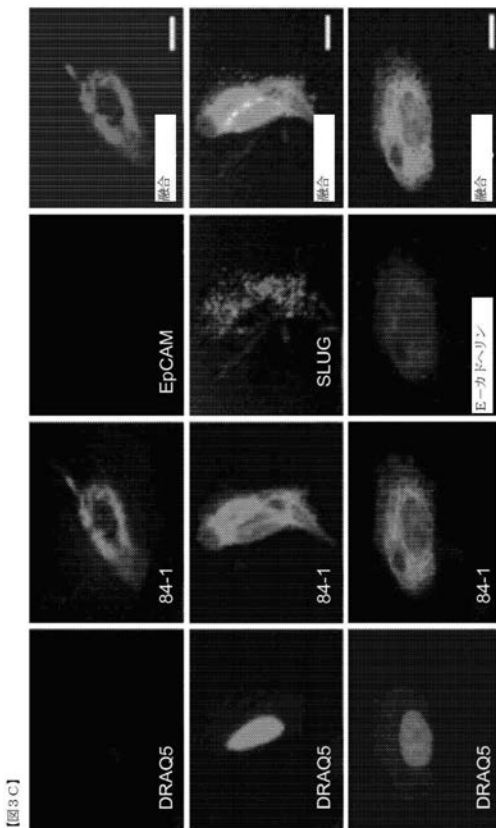
【 図 3 A 】



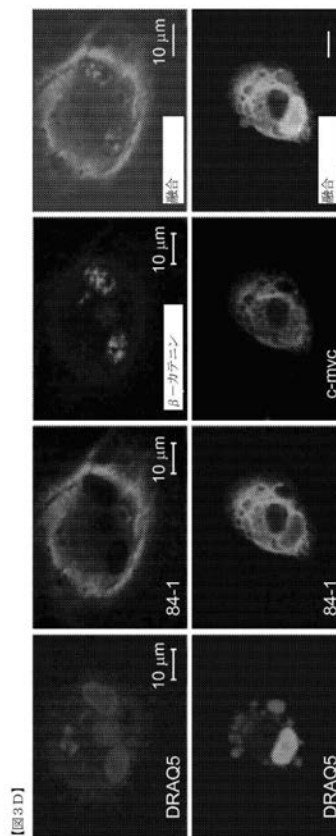
【 図 3 B 】



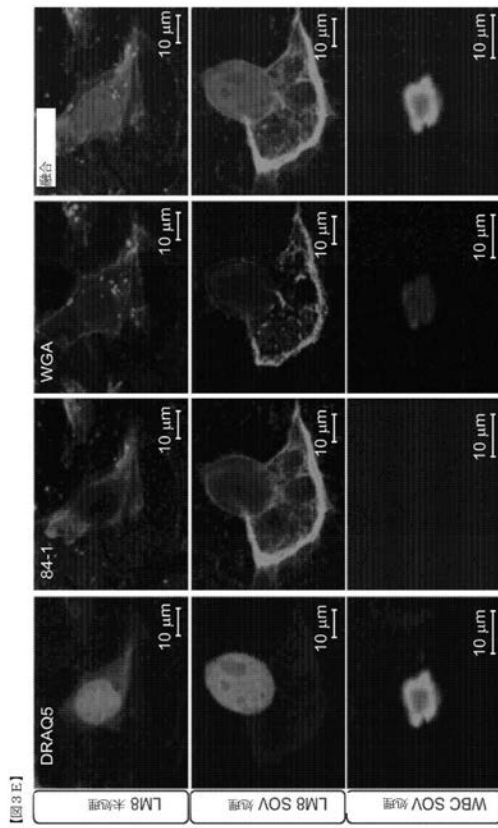
【 図 3 C 】



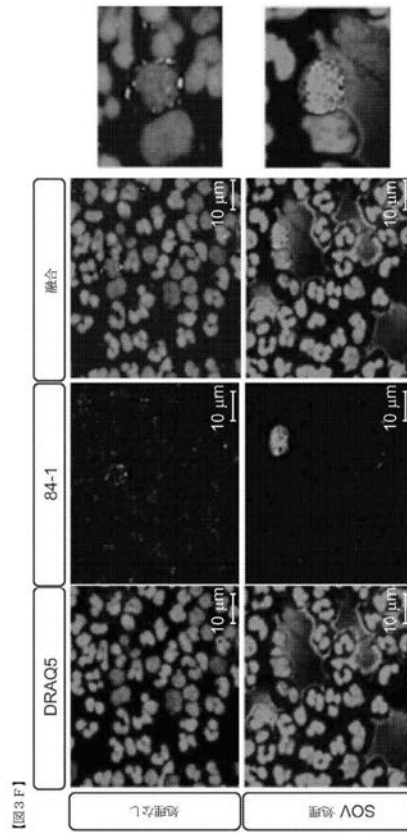
【 図 3 D 】



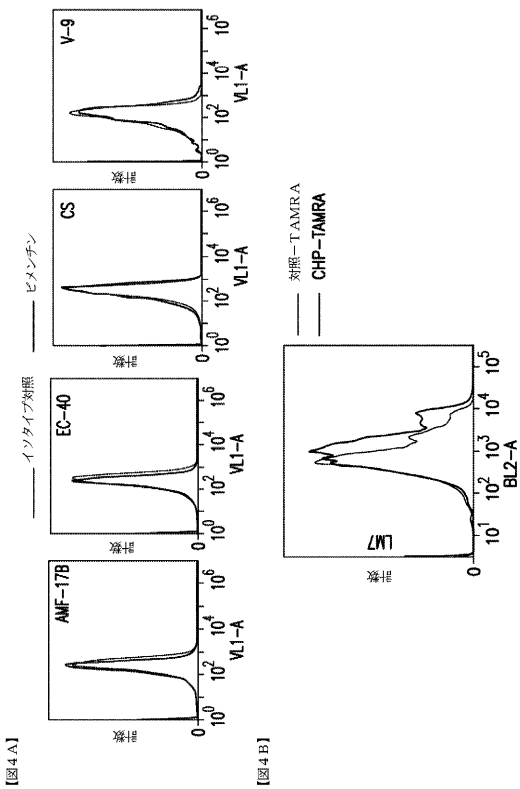
【 図 3 E 】



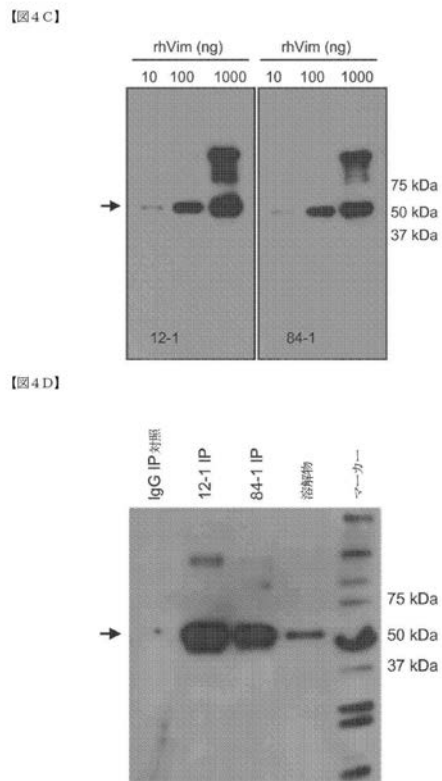
【 図 3 F 】



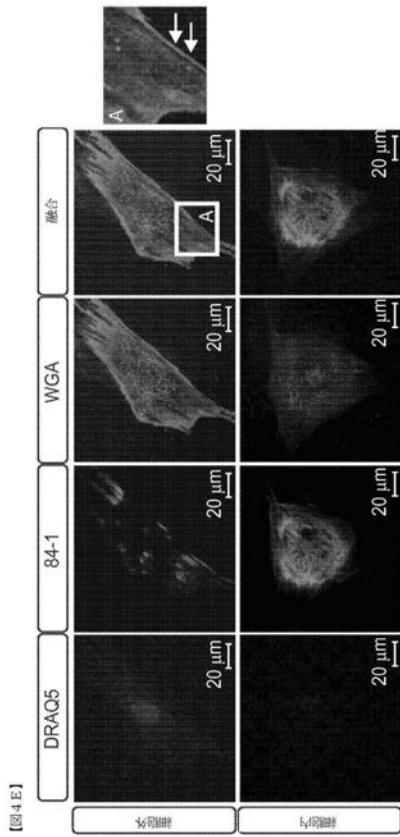
【 図 4 - 1 】



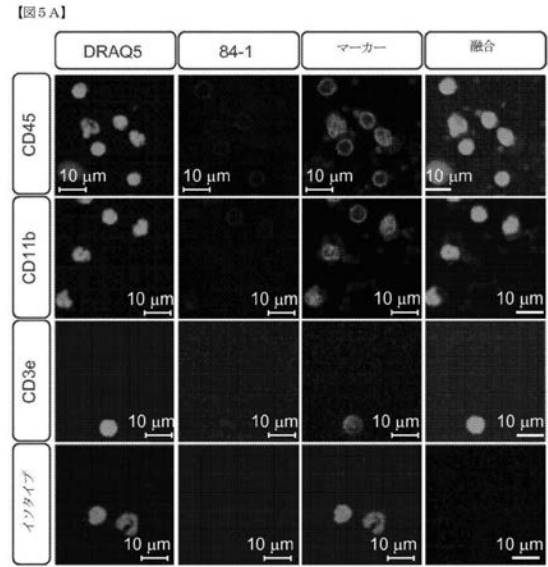
【 図 4 - 2 】



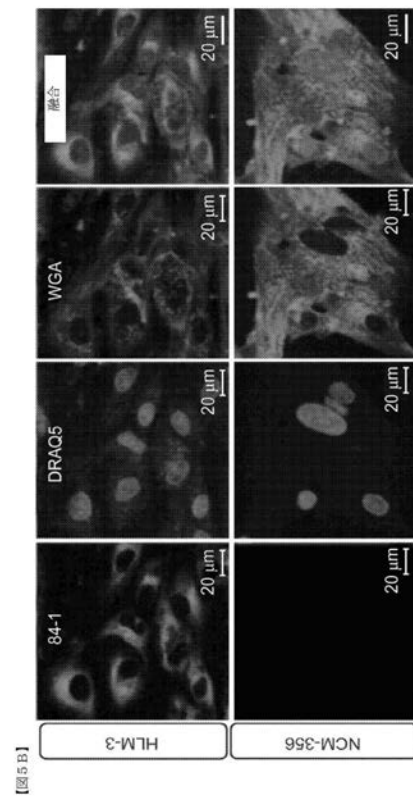
【 図 4 - 3 】



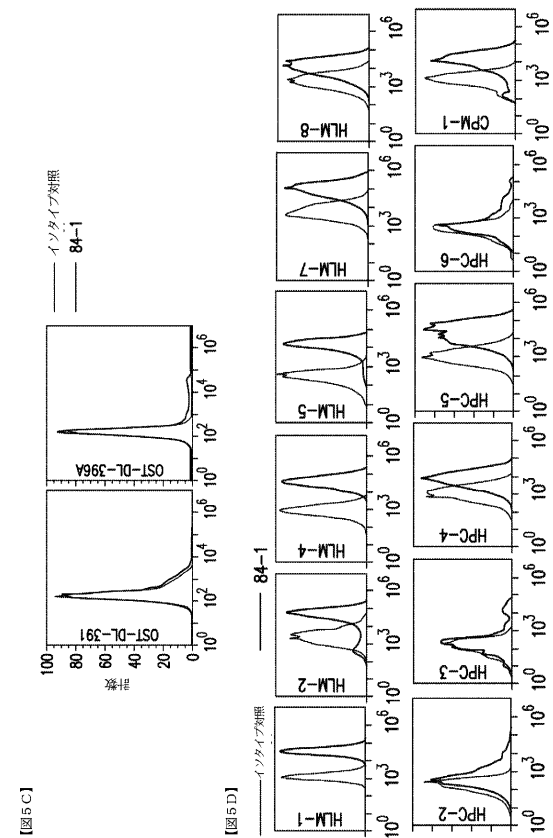
【 図 5 - 1 】



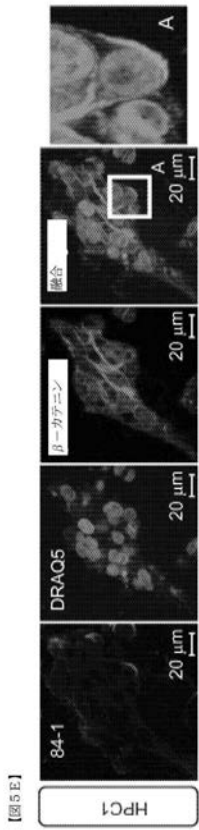
【 図 5 - 2 】



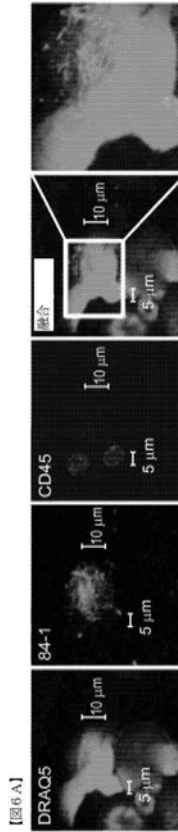
【 図 5 - 3 】



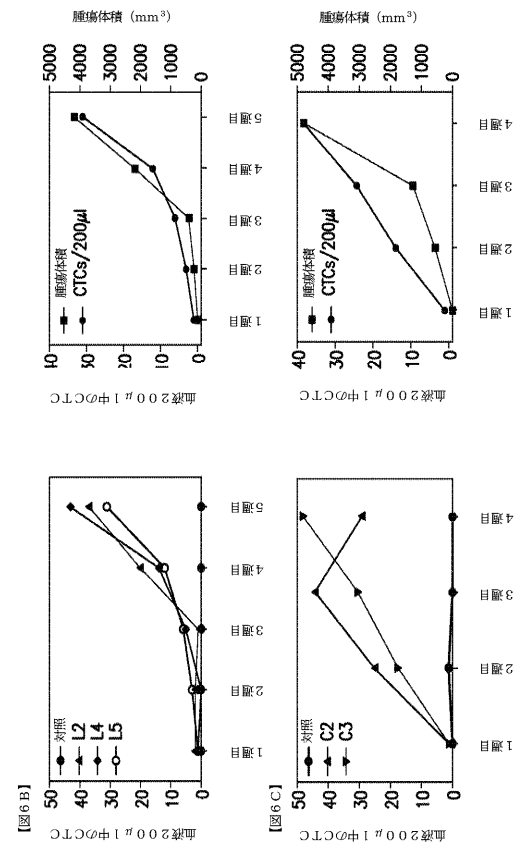
【図5-4】



【図6-1】

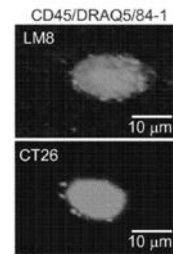


【図6-2】

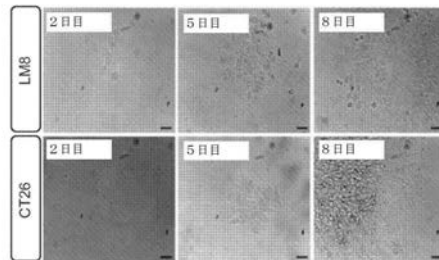


【図6-3】

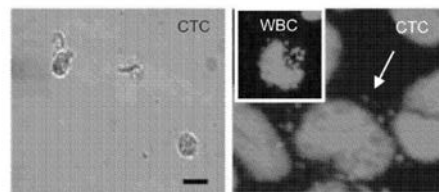
【図6D】



【図9E】



【図9F】



【 図 7 - 1 】

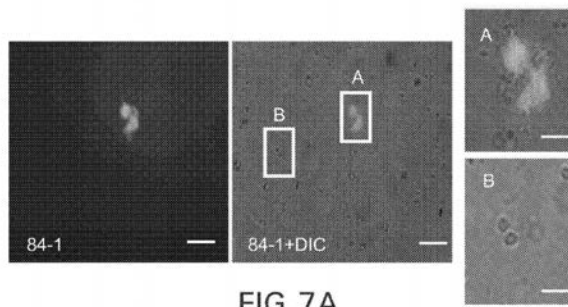


FIG.7A

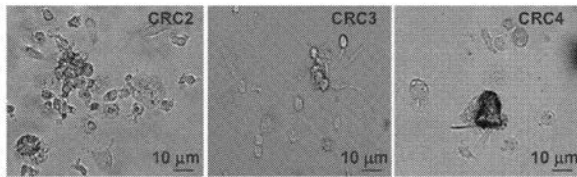
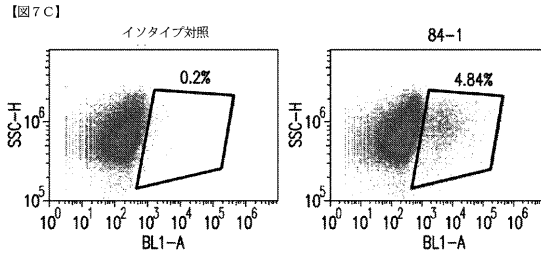
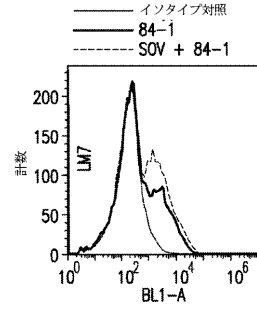


FIG.7B

【 図 7 - 2 】



【 図 7 D】



【 図 8 】

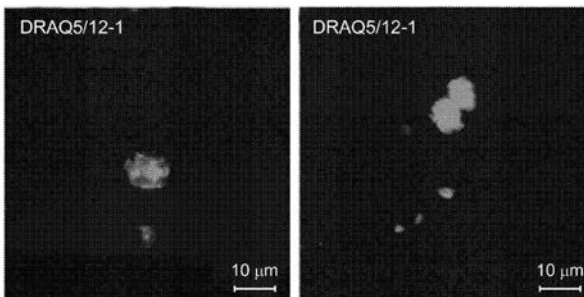
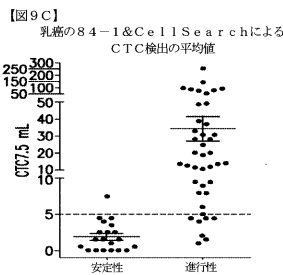
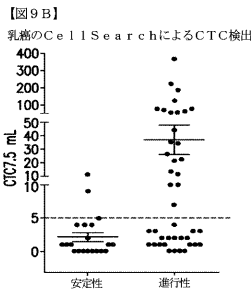
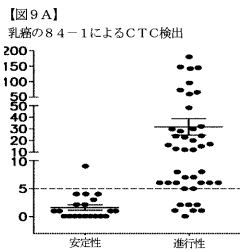


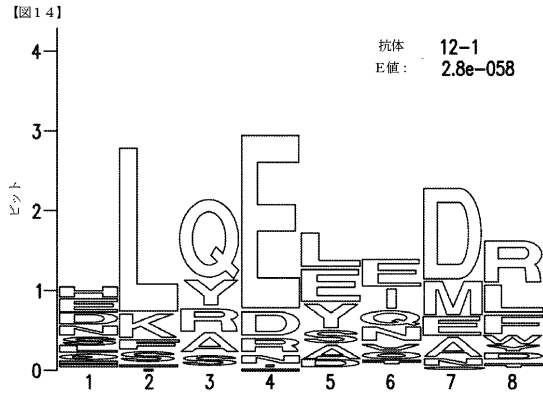
FIG.8

【 図 9 】

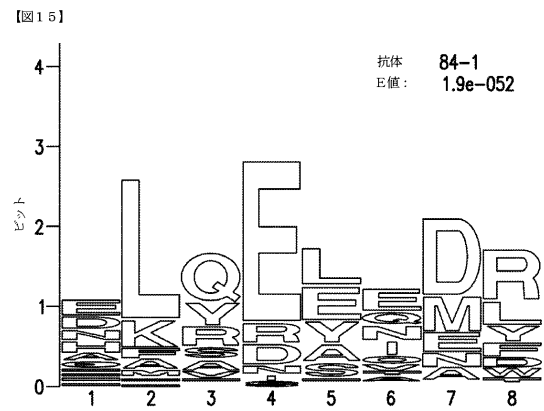




【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 配 列 表 】

2018138058000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 Q 1/06 (2006.01) C 0 7 K 16/30  
C 1 2 Q 1/06

(72)発明者 シュリン リ

アメリカ合衆国 テキサス 7 7 0 3 0 , ヒューストン , ホルコム プールバード 5 1 5 ,  
ユニット 0 8 5 3 気付

Fターム(参考) 2G045 AA01 AA24 AA26 AA29 AA40 BA13 BA14 BB24 CA11 CA25  
CA26 CB01 CB02 CB17 DA36 FA16 FA19 FA37 FB01 FB02  
FB03 FB12 GC15 GC22 JA01  
4B063 QA01 QA19 QQ03 QR72 QS33 QS36 QX01  
4B065 AA93X AC20 BD14 CA46  
4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA50 FA74

【外国語明細書】

2018138058000001.pdf

专利名称(译)	用于间充质和上皮间充质转化循环肿瘤细胞的特异性检测工具		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018138058A</a>	公开(公告)日	2018-09-06
申请号	JP2018109484	申请日	2018-06-07
申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会, 德州系统的通用名称		
[标]发明人	アルンサテツリ シュリンリ		
发明人	アルン サテツリ シュリン リ		
IPC分类号	C12N5/09 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/574 C07K16/30 C12Q1/06		
CPC分类号	A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 C07K16/18 C07K16/30 C07K2317/34 A61K39/39558 A61K45/06 A61K2039/505 C07K16/28 C07K16/3053 C07K2317/76 G01N33/577		
FI分类号	C12N5/09.ZNA G01N33/48.P G01N33/48.M G01N33/53.D G01N33/574.D C07K16/30 C12Q1/06 C12N15/13 C12P21/08 C12Q1/04		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CA11 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA19 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/GC22 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QR72 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01 4B065/AA93X 4B065/AC20 4B065/BD14 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/772973 2013-03-05 US		
其他公开文献	JP6672383B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：为间充质和上皮间充质过渡肿瘤细胞提供特异性检测工具 本发明包括发现细胞表面波形蛋白作为用于检测和分离癌症患者血液中的间充质和上皮间充质转化循环肿瘤细胞的新型生物标记物。此外，提供了所述抗体用于检测，计数和分离对循环肿瘤细胞和CTC上的细胞表面波形蛋白的检测特异的抗体的用途。在一个实施方案中，本发明提供了特异性结合波形蛋白多肽的分离的单克隆抗体，其中所述抗体包含用于结合多肽的84-1单克隆抗体。与...竞争。【选择图】无

(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2018-138058 (P2018-138058A)
		(43) 公開日 平成30年9月6日(2018.9.6)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C12N 5/09 (2010.01)</b>	C12N 5/09 ZNA	2G045
<b>GO1N 33/48 (2006.01)</b>	GO1N 33/48 P	4B063
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/48 M	4B065
<b>GO1N 33/574 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	4H045
<b>CO7K 16/30 (2006.01)</b>	GO1N 33/574 D	
	審査請求 有 請求項の数 12 O L 外国語出願 (全 63 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2018-109484(P2018-109484)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成30年6月7日(2018.6.7)	ボード・オブ・リージェンツ、サ・ユニバ
(62) 分割の表示	特願2015-561585(P2015-561585)の分割	ーシティ・オブ・テキサス・システム
原出願日	平成26年3月5日(2014.3.5)	アメリカ合衆国 テキサス 78701、
(31) 優先権主張番号	61/772,973	オースティン、ウエスト 7ティーエイチ
(32) 優先日	平成25年3月5日(2013.3.5)	ストリート 210
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人
		弁理士 山本 秀策
		100113413
		(74) 代理人
		弁理士 森下 夏樹
		アルン サテツリ
		(72) 発明者
		アメリカ合衆国 テキサス 77054、
		ヒューストン、ケンブリッジ ストリ
		ート 8450、アパートメント 11
		86
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	間葉及び上皮間葉形質転換循環腫瘍細胞のための特異的検出ツール	