

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5601836号  
(P5601836)

(45) 発行日 平成26年10月8日 (2014. 10. 8)

(24) 登録日 平成26年8月29日 (2014. 8. 29)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 26 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-536307 (P2009-536307)	(73) 特許権者	509128247
(86) (22) 出願日	平成19年11月8日 (2007. 11. 8)		マクロジェニックス ウェスト, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2010-508847 (P2010-508847A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, コーポレイト ドライブ 1
(43) 公表日	平成22年3月25日 (2010. 3. 25)	(74) 復代理人	100101982
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/023620		弁理士 久米川 正光
(87) 国際公開番号	W02008/066691	(74) 代理人	230115864
(87) 国際公開日	平成20年6月5日 (2008. 6. 5)		弁護士 永島 孝明
審査請求日	平成22年11月1日 (2010. 11. 1)	(74) 代理人	100149168
(31) 優先権主張番号	60/858, 113		弁理士 若山 俊輔
(32) 優先日	平成18年11月8日 (2006. 11. 8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/993, 882		
(32) 優先日	平成19年9月14日 (2007. 9. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
微生物の受託番号	ATCC PTA-7093		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T E S 7 および T E S 7 に結合する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A T C C 番号 P T A - 7 0 9 3 の宿主細胞により産生された抗体の軽鎖に由来する3つの C D R と重鎖に由来する3つの C D R とを有し、ガン細胞上に発現した B 7 - H 3 の 4 I g 型に特異的に結合し、B 7 - H 3 の 2 I g 型には特異的に結合せず、B 7 - H 3 の 4 I g 型を架橋することができない、実質的に精製された免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片。

【請求項 2】

前記ガン細胞が以下に由来するガン細胞からなる群から選択される、請求項 1 に記載の精製された免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片：副腎腫瘍、A I D S に関連するガン、胞状軟部肉腫、星状細胞系腫瘍、膀胱ガン、骨ガン、脳および脊髄ガン、転移性脳腫瘍、乳ガン、頸動脈小体腫瘍、頸部の癌、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞ガン腫、明細胞ガン腫、大腸ガン、結腸直腸ガン、皮膚の良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣細胞腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液性軟骨肉腫、線維形成不全骨、線維性骨形成異常、胆嚢および胆管ガン、妊娠性絨毛性疾患、生殖細胞腫瘍、頭部および頸部ガン、島細胞腫瘍、カボジ肉腫、腎ガン、白血病、脂肪腫、脂肪肉腫、肝ガン、リンパ腫、肺ガン、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、多発性内分泌腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽腫、神経内分泌腫瘍、卵巣ガン、膵臓ガン、乳頭甲状腺ガン、上皮小体腫瘍、小児ガン、末梢神経鞘腫、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍、前立腺ガン、後方ブドウ膜黒色腫、血液疾患、転移性腎ガン、横紋筋様腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚ガン、軟部

組織の肉腫、扁平細胞ガン、胃ガン、滑膜肉腫、睾丸ガン、胸腺ガン腫、胸腺腫、転移性甲状腺ガン、および子宮ガン。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離された核酸。

【請求項 4】

前記核酸がプロモータに作動可能に連結されている、請求項 3 に記載の核酸。

【請求項 5】

前記プロモータおよび前記核酸が発現ベクターに含まれている、請求項 4 に記載の核酸。

10

【請求項 6】

前記免疫グロブリンポリペプチドがモノクローナル抗体である、請求項 3 に記載の核酸。

【請求項 7】

請求項 3 に記載の核酸を含むベクターでトランスフェクトされたか、形質転換されたか、または感染させられた細胞株。

【請求項 8】

実質的に精製された免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片を産生する方法であって：

a . 該免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片を発現させる条件下で、請求項 3 に記載の核酸で形質転換された細胞株を増殖させる工程；および

20

b . 該発現させた免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片を回収する工程を含む、方法。

【請求項 9】

前記細胞株がハイブリドーマである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ハイブリドーマが ATCC 番号 PTA - 7093 である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記免疫グロブリンポリペプチドがモノクローナル抗体である、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 12】

治療有効用量の請求項 1 に記載の精製された免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片が薬学的に許容される担体とともに含まれている、薬学的組成物。

【請求項 13】

前記組成物にさらに別の治療用部分が含まれている、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

ATCC 番号 PTA - 7093 またはその子孫からなる単離された細胞株。

【請求項 15】

化学療法薬と結合した請求項 1 に記載の精製された免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片が含まれている、化学療法薬をガン細胞に送達するための組成物であって、ここでは、該ガン細胞は、以下に由来するガン細胞からなる群より選択される、組成物：副腎腫瘍、AIDS に関連するガン、胞状軟部肉腫、星状細胞系腫瘍、膀胱ガン、骨ガン、脳および脊髄ガン、転移性脳腫瘍、乳ガン、頸動脈小体腫瘍、頸部の癌、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞ガン腫、明細胞ガン腫、大腸ガン、結腸直腸ガン、皮膚の良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣細胞腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液性軟骨肉腫、線維形成不全骨、線維性骨形成異常、胆嚢および胆管ガン、妊娠性絨毛性疾患、生殖細胞腫瘍、頭部および頸部ガン、島細胞腫瘍、カポジ肉腫、腎ガン、白血病、脂肪腫、脂肪肉腫、肝ガン、リンパ腫、肺ガン、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、多発性内分泌腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽腫、神経内分泌腫瘍、卵巣ガン、膵臓ガン、乳頭甲状腺ガン、上皮小体腫瘍、小児ガン、末梢神経鞘腫、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍

40

50

、前立腺ガン、後方ブドウ膜黒色腫、血液疾患、転移性腎ガン、横紋筋様腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚ガン、軟部組織の肉腫、扁平細胞ガン、胃ガン、滑膜肉腫、睾丸ガン、胸腺ガン腫、胸腺腫、転移性甲状腺ガン、および子宮ガン。

【請求項 16】

前記組成物が個体に投与されることを特徴とする、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記免疫グロブリンポリペプチドが、ATCC 番号 PTA - 7093 のハイブリドーマまたはその子孫によって産生される、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 18】

化学療法薬と結合した請求項 1 に記載の精製された免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片が含まれている有効量の組成物を含む、個体内でのガン細胞の増殖を阻害するための組成物であって、ここでは、該ガン細胞は、以下に由来するガン細胞からなる群より選択される、組成物：副腎腫瘍、AIDS に関連するガン、胞状軟部肉腫、星状細胞系腫瘍、膀胱ガン、骨ガン、脳および脊髄ガン、転移性脳腫瘍、乳ガン、頸動脈小体腫瘍、頸部の癌、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞ガン腫、明細胞ガン腫、大腸ガン、結腸直腸ガン、皮膚の良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣細胞腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液性軟骨肉腫、線維形成不全骨、線維性骨形成異常、胆嚢および胆管ガン、妊娠性絨毛性疾患、生殖細胞腫瘍、頭部および頸部ガン、島細胞腫瘍、カボジ肉腫、腎ガン、白血病、脂肪腫、脂肪肉腫、肝ガン、リンパ腫、肺ガン、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、多発性内分泌腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽腫、神経内分泌腫瘍、卵巣ガン、膵臓ガン、乳頭甲状腺ガン、上皮小体腫瘍、小児ガン、末梢神経鞘腫、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍、前立腺ガン、後方ブドウ膜黒色腫、血液疾患、転移性腎ガン、横紋筋様腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚ガン、軟部組織の肉腫、扁平細胞ガン、胃ガン、滑膜肉腫、睾丸ガン、胸腺ガン腫、胸腺腫、転移性甲状腺ガン、および子宮ガン。

【請求項 19】

前記組成物が前記ガン細胞に送達されることを特徴とする、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記免疫グロブリンポリペプチドが、ATCC 番号 PTA - 7093 のハイブリドーマまたはその子孫によって発現されるモノクローナル抗体である、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 21】

個体由来の細胞を請求項 1 に記載の精製された免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片と接触させる工程、および、存在する場合には、該細胞由来の T E S 7 と該抗体の複合体を検出する工程を含む個体内のガン細胞の有無を検出するためのインビトロ方法であって、ここでは、該ガン細胞は、以下に由来するガン細胞からなる群より選択される、方法：副腎腫瘍、AIDS に関連するガン、胞状軟部肉腫、星状細胞系腫瘍、膀胱ガン、骨ガン、脳および脊髄ガン、転移性脳腫瘍、乳ガン、頸動脈小体腫瘍、頸部の癌、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞ガン腫、明細胞ガン腫、大腸ガン、結腸直腸ガン、皮膚の良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣細胞腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液性軟骨肉腫、線維形成不全骨、線維性骨形成異常、胆嚢および胆管ガン、妊娠性絨毛性疾患、生殖細胞腫瘍、頭部および頸部ガン、島細胞腫瘍、カボジ肉腫、腎ガン、白血病、脂肪腫、脂肪肉腫、肝ガン、リンパ腫、肺ガン、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、多発性内分泌腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽腫、神経内分泌腫瘍、卵巣ガン、膵臓ガン、乳頭甲状腺ガン、上皮小体腫瘍、小児ガン、末梢神経鞘腫、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍、前立腺ガン、後方ブドウ膜黒色腫、血液疾患、転移性腎ガン、横紋筋様腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚ガン、軟部組織の肉腫、扁平細胞ガン、胃ガン、滑膜肉腫、睾丸ガン、胸腺ガン腫、胸腺腫、転移性甲状腺ガン、および子宮ガン。

【請求項 22】

ATCC 番号 PTA - 7093 の宿主細胞またはその子孫によって産生される単離され

10

20

30

40

50

た抗体。

【請求項 23】

A T C C 番号 P T A - 7 0 9 3 の宿主細胞によって産生される抗体に由来する 3 つの重鎖の C D R を含む重鎖可変領域と、3 つの軽鎖の C D R を含む軽鎖可変領域とを含み、B 7 - H 3 の 4 I g 型に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 24】

前記単離された抗体はキメラ抗体である、請求項 23 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 25】

前記単離された抗体はヒト化抗体である、請求項 23 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 26】

前記抗原結合断片は F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F v からなる群から選択される、請求項 23 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学および免疫療法の分野にある。さらに具体的には、本発明は、新規の疾患およびガン関連抗原 T E S 7、ならびに、T E S 7 に結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体と他のポリペプチドに関する。本発明によってはさらに、T E S 7 に結合するアンタゴニスト、調節因子、およびペプチド（抗 T E S 7 抗体を含む）を使用する、T E S 7 が関係している様々なヒトの疾患およびガンの診断ならびに / あるいは処置も提供される。

【背景技術】

【0002】

診断におけるそれらの公知の用途に加えて、抗体は、治療薬として有用であることが示されている。例えば、免疫療法、すなわち、治療目的のための抗体の使用が、近年、ガンを処置するために使用されている。受動免疫療法には、ガンの処置におけるモノクローナル抗体の使用が含まれる。例えば、Cancer : Principles and Practice of Oncology, 第6版 (2001) 20章、495 - 508頁を参照のこと。これらの抗体は、腫瘍細胞の増殖または生存の直接の阻害と、そして体の免疫系の生まれながらの細胞を死滅させる活性を補強するそれらの能力の両方によって、本来備わっている治療的な生物学的活性を有し得る。これらの薬剤は、単独で投与することができ、また、放射線もしくは化学療法薬と組み合わせて投与することもできる。それぞれ、非ホジキンリンパ腫と乳ガンの処置について承認されているリツキシマブとトラスツズマブが、そのような治療の2つの例である。あるいは、抗体は、抗体結合体を作製するために使用することができる。この場合、抗体は、毒物に連結させられ、腫瘍に特異的に結合することによって腫瘍に対してその薬剤を案内する。ゲムツズマブオゾガマイシンは、白血病の処置に使用される承認されている抗体結合体の一例である。ガン細胞に結合し、診断と治療に利用できる可能性があるモノクローナル抗体は、複数の刊行物において開示されている。例えば、以下の特許出願を参照のこと。特に、標的タンパク質のいくつかの分子量を開示しているもの：特許文献1 (200 k D の c - e r b B - 2 ( H e r 2 )、および 40 ~ 200 k D の大きさの他の未知の抗原) および特許文献2 (50 k D および 55 k D の腫瘍胎児タンパク質)。臨床試験の段階にある、および / または充実性腫瘍の処置について承認されている抗体の例としては以下が挙げられる：トラスツズマブ (抗原：180 k D、H E R 2 / n e u)、エドレコロマブ (抗原：40 ~ 50 k D、E p - C A M)、抗ヒト乳脂肪球 (H M F G 1) (抗原 > 200 k D、H M W ムチン)、セツキシマブ (抗原：150 k D および 170 k D、E G F 受容体)、アレムツズマブ (抗原：21 ~ 28 k D、C D 5 2)、およびリツキシマブ (抗原：35 k D、C D 2 0)。

【0003】

10

20

30

40

50

乳ガンの処置に使用されるトラスツズマブ (Her-2 受容体) といくつかの種類のカンの処置についての臨床試験中であるセツキシマブ (EGF 受容体) の抗原標的は、皮膚、結腸、肺、卵巣、肝臓、および膵臓を含む多数の正常なヒトの成人組織上に、ある程度の検出可能なレベルで存在する。このような治療薬を使用する際の安全性の限界は、発現レベル、またはこれらの部位への抗体のアクセスもしくはこれらの部位での抗体活性の違いによって生じると思われる。

【0004】

別のタイプの免疫療法は、特定のガン (単数または複数) に存在する抗原、または抗原の発現を指示する DNA 構築物を用いる、能動免疫療法、すなわち、ワクチン接種である。これによつては、その後、個体において免疫応答が誘発される、すなわち個体自身のガンに対する抗体を産生するように個体が誘導される。能動免疫化は、受動免疫療法または免疫毒素ほど頻繁には使用されていない。

10

【0005】

疾患 (ガンを含む) 進行のモデルがいくつか示唆されている。理論は単なる感染 / 形質転換事象による原因から、「疾患様」または「ガン様」タイプの組織が徐々に増殖して最終的に完全な病原性または悪性の組織になる進行までの範囲に及ぶ。ガンに関する議論がいくつかあり、例えば、悪性になるには単一の変異事象が発生するだけで十分であるとする議論がある一方で、それに続く変化もまた必要であるとする別の議論もある。さらに別の議論もいくつか示唆されている。突然変異の負荷と腫瘍の悪性度の増加が細胞レベルでの突然変異 - 選択事象の連続を介する新生物の組織形成の開始ならびに進行の両方に必要であることが示唆されている。いくつかのガン標的は腫瘍組織の中でのみ発見されているが、他のガン標的は正常組織の中にもあり、腫瘍組織の中ではアップレギュレートされるか、および / または過剰発現される。そのような状況では、悪性の獲得に過剰発現が関連していることを示唆する研究者がいる一方、過剰発現は病状の悪化過程に沿った傾向を示すマーカーに過ぎないと示唆する研究者もいる。

20

【0006】

いくつかの場合には、ガン標的 (例えば、腫瘍の中で発現されるかまたは過剰発現されるガンタンパク質) は、胚発生と胎児の発育の間に存在し、そして増殖および分化の調節因子としての役割を担うことが示されている。一部の研究者らは、胚発生と胎児の発育の間のこれらのガンタンパク質の発現が特異的組織に限定されるようであり、そしてまた、発育の特定の段階にも限定されるようであることを見出した。対照的に、成人でのこれらのガンタンパク質の発現が、腫瘍の増殖における過剰発現、および / または腫瘍サプレッサタンパク質の誤作動に関係することが示されている。

30

【0007】

理想的な診断用および / または治療用抗体は、多数のガンの上に存在するが、いずれの正常組織の上にも存在しないか、または全ての正常な組織上にはわずかしき存在しない抗原に特異的なものである。ガン (単数または複数) に特異的に関係している新規の抗原の発見、特性決定、および単離は、色々な意味で有用であろう。第1に、そのような抗原は、その抗原に対するモノクローナル抗体を作製するために使用することができる。抗体は、ガン細胞に対する生物学的活性を有しており、そして外来抗原に対する免疫系の応答を補強することができることが理想的である。抗体は、治療薬として単独で、もしくは最新の治療法と組み合わせることで投与することができ、また、毒物に連結させられた免疫結合体を調製するために使用することもできる。同じ特異性を有しているが、単独で投与された場合には生物学的活性が低いかまたは生物学的活性を持たない抗体はまた、抗体を放射性同位体、毒素、または化学療法薬もしくは化学療法薬を含むリポソームとの免疫結合体を調製するために使用することができる点でも有用であり得、この場合、結合させられた形態は、抗原を含む細胞に対して毒素を導く抗体によって生物学的に活性である。

40

【0008】

理想的な診断用および / または治療用抗体について望ましい1つの態様は、様々なガンに関係している抗原の発見と特性決定である。多数のタイプのガンの上で発現され、非ガ

50

ン性の細胞の上では限定された発現を有している抗原（汎ガン（pan-cancer）抗原）はわずかしか存在しない。そのような抗原の単離と精製が、抗原を標的化する（例えば、診断用または治療用）抗体の作製に有用であろう。「汎ガン」抗原に結合する抗体は、わずかに1つの特異的なタイプのガンに関係している抗原に対する抗体と比較して、異なる組織の中で見られる様々なガンを標的化することができる。この抗原はまた、薬物（例えば、低分子）の発見に、そしてさらには、細胞の調節、増殖、および分化の特性決定にも有用である。

【0009】

必要なものは、細胞表面の標的を特異的に認識する抗体および他の薬剤で、そのような疾患および/またはガンを診断し、処置するために使用することができる、異常細胞および/またはガン細胞の表面上の新規の標的である。本明細書中に開示される発見に基づく、TES7の疾患を促進する活性を低下させるかまたは増大させるかのいずれかによって調節することができる、細胞表面上の標的を特異的に認識する新規の抗体ならびに他の薬剤が、さらに必要である。本発明の1つの目的は、その疾患に関係している活性を阻害することができる、TES7の調節因子を同定することである。別の目的は、TES7のアッセイで使用される、そして、免疫原として使用される、あるいは、抗ヒトTES7抗体を選択するために使用される、新規の化合物を提供することである。

【0010】

以下に詳細に記載されるように、本発明では、タンパク質のB7-H3ファミリーの新規の抗原（本発明者らは本明細書中で、TES7と呼ぶ）を発見した。類似する複数のポリペプチドが知られている。例えば、マウスB7-H3ホモログの同定が記載されており、T細胞の増殖とIFN- $\gamma$ の生産を媒介することが示されているヒトB7-H3遺伝子が特性決定された、非特許文献1を参照のこと。新規のアンタゴニスト、調節因子、および抗体の他の抗原標的もまた記載されている。例えば、新規の抗原RAAG10と、この新規の抗原標的に対するアンタゴニスト、調節因子、および抗体が記載されている、特許文献3を参照のこと。

【0011】

B7-H3は、Ig様ドメインを有しているI型膜タンパク質である、タンパク質のヒトB7ファミリーのメンバーである。2つのIg様ドメインを有しているとして最初に同定され、他の研究者らにより、樹状細胞上で発現される4個のIg様ドメインを持つ形態が報告された。研究者らは、これを2個のIg様ドメインを持つ形態と区別するために、4個のIg様ドメインを持つB7-H3を、4Ig-B7-H3と命名した。抗4Ig-B7-H3抗体で処理された、4Ig-B7-H3を発現している神経芽腫細胞は、NK細胞に対してより敏感である。しかし、この活性の原因が、4Ig-B7-H3形態だけに対する抗体によるものであり得るかどうかは、4Ig-B7-H3に対して惹起させられた全ての報告されている抗体はまた、B7H3の2つのIg様ドメインを持つ形態にも結合するとの理由から、明らかではない（非特許文献2および非特許文献3）。

【0012】

神経芽細胞腫上での発現に加えて、B7-H3はまた、様々なガン細胞上で発現されていることも知られている。本発明者らは、本明細書中に提供される新規のアンタゴニスト、調節因子、および抗体の抗原標的として同定された、TES7と本明細書中で呼ばれる新規の抗原を発見した。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】米国特許第6,054,561号明細書

【特許文献2】米国特許第5,656,444号明細書

【特許文献3】国際公開第2004/001381号パンフレット

【非特許文献】

【0014】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】Sunら、J. Immunol. 2002, 168: 6294 - 6297

【非特許文献2】Steinbergerら、J. Immunol. 2004, 172(4): 2352 - 2359

【非特許文献3】Castriconiら、PNAS 2004, 101(34): 12640 - 12645

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明により、様々なヒトのガンの上で発現されるTES7に結合する、TES7アンタゴニスト、調節因子、およびモノクローナル抗体が提供される。1つの態様においては、本発明は、TES7に結合するモノクローナル抗体のファミリーである。TES7は、B7-H3の4Ig形態と特徴を共有する。

10

【0016】

別の態様においては、本発明は、特許管理番号PTA-7093として、アメリカンタイプカルチャーコレクションに2005年9月22日に寄託された宿主細胞株Testis.1.2G7.1E11によって生産されるモノクローナル抗体抗TES7である。別の態様においては、本発明は、特許管理番号PTA-8576として、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに2007年8月8日に寄託された宿主細胞株Stomach3.1E10.1G8によって生産される、B7-H3の4IG形態に対するモノクローナル抗体である。

20

【0017】

なお別の態様においては、本発明は、異常細胞および/またはガン細胞と反応するモノクローナル抗体抗TES7を作製する方法であり、この方法には、以下の工程が含まれる：(a)免疫原で哺乳類宿主を免疫化する工程；(b)哺乳類からリンパ球を得る工程；(c)リンパ球(b)を骨髓腫細胞株と融合させてハイブリドーマを作製する工程；(d)(c)のハイブリドーマを培養してモノクローナル抗体を生産する工程；ならびに、(e)抗体をスクリーニングして、異常細胞および/もしくはガン細胞または細胞株に結合するが、非ガン性もしくは正常な細胞または細胞株には結合しないか、あるいはより低いレベルまたは異なる様式で正常細胞に結合するような抗体だけを選択する工程。

30

【0018】

別の態様においては、本発明は、抗TES7抗体を作製する方法であり、この方法には、そのような抗体またはその子孫をコードする宿主細胞を抗体産生が可能な条件下で培養する工程、および、抗TES7抗体を精製する工程が含まれる。

【0019】

別の態様においては、本発明により、本明細書中に記載される任意の抗体(またはポリペプチド)を作製する方法が提供される。この方法は、抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチド(1つの軽鎖または重鎖として別々に発現させることができ、また、軽鎖と重鎖の両方を1つのベクターから発現させられる場合もある)を適切な細胞の中で発現させ、一般的にはその後、目的の抗体またはポリペプチドを回収および/または単離することによる。

40

【0020】

別の態様においては、本発明は、抗TES7抗体のTES7への優先的結合を競合的に阻害する抗TES7抗体またはポリペプチド(抗体である場合も、また、抗体ではない場合もある)である。いくつかの実施形態においては、本発明は、他の抗TES7抗体としてTES7上の同じまたは異なるエピトープ(単数または複数)に優先的に結合する抗体またはポリペプチド(抗体である場合も、また、抗体ではない場合もある)である。

【0021】

別の態様においては、本発明は、抗TES7抗体のTES7への優先的結合を競合的に阻害するTES7調節因子(ポリペプチドである場合も、また、ポリペプチドではない場

50

合もある)である。いくつかの実施形態においては、本発明は、他の抗TES7抗体としてTES7上の同じまたは異なるエピトープ(単数または複数)に優先的に結合する低分子または化合物であり得る。

【0022】

なお別の態様においては、本発明は、TES7のエピトープに特異的な抗体によって結合されたTES7を含む組成物である。1つの実施形態においては、抗体は抗TES7である。他の実施形態においては、2つ以上の抗TES7抗体が、TES7上の2つ以上の異なるエピトープにマッピングするそのような抗体とともに投与される。いくつかの実施形態においては、抗TES7抗体は治療薬または検出標識に連結させられる。

【0023】

別の態様においては、本発明は、抗TES7抗体の断片または領域を含む抗体である。1つの実施形態においては、断片は抗体の軽鎖である。別の実施形態においては、断片は抗体の重鎖である。さらに別の実施形態においては、断片には、抗体の軽鎖および/または重鎖に由来する1つ以上の可変領域が含まれる。なお別の実施形態においては、断片には、抗体の軽鎖および/または重鎖に由来する1つ以上の相補性決定領域(CDR)が含まれる。

【0024】

別の態様においては、本発明により、以下のうちの任意のものを含むポリペプチド(抗体である場合も、また、抗体ではない場合もある)が提供される:抗TES7抗体の(a)軽鎖または重鎖に由来する1つ以上のCDR(またはその断片);(b)軽鎖に由来する3つのCDR;(c)重鎖に由来する3つのCDR;(d)軽鎖に由来する3つのCDRと重鎖に由来する3つのCDR;(e)軽鎖可変領域;(f)重鎖可変領域。

【0025】

別の態様においては、本発明はヒト化抗体である。いくつかの実施形態においては、ヒト化抗体には、非ヒト抗TES7抗体の1つ以上のCDRが含まれる。いくつかの実施形態においては、ヒト化抗体は、他の抗TES7抗体と同じまたは異なるエピトープ(単数または複数)に結合する。一般的には、本発明のヒト化抗体は、元になっている非ヒト抗TES7抗体のCDR(単数または複数)と同じであるかおよび/またはそれに由来する1つ以上(1個、2個、3個、4個、5個、6個、またはその断片)のCDRを含む。いくつかの実施形態においては、ヒト抗体は、別の抗TES7抗体と同じまたは異なるエピトープ(単数または複数)に結合する。別の態様においては、本発明は、非ヒト抗TES7抗体の重鎖および軽鎖の可変領域に由来する可変領域と、ヒト抗体の重鎖および軽鎖の定常領域由来の定常領域が含まれているキメラ抗体である。

【0026】

別の態様においては、本発明は、ATCC寄託管理番号7093の宿主細胞、またはその子孫によって産生される抗体mu-抗TES7をコードする単離されたポリヌクレオチドである。本発明には、上記に特定されている任意のうちの任意のもの固有の結合活性または生物学的活性を有している抗体ポリペプチドが含まれる。別の態様においては、本発明により、任意の抗体(抗体断片を含む)をコードするポリヌクレオチド、ならびに、本明細書中に記載される他の任意のポリペプチドが提供される。

【0027】

別の態様においては、本発明は、任意のポリペプチド(本明細書中に記載される任意の抗体を含む)または本明細書中に記載されるポリヌクレオチドと、薬学的に許容される賦形剤が含まれている薬学的組成物であり、そのような薬学的組成物には、化学療法薬に連結させられた抗TES7抗体、抗TES7抗体の断片が含まれている抗体、非ヒト抗TES7抗体のヒト化抗体、非ヒト抗TES7抗体の可変領域に由来する可変領域とヒト抗体に由来する定常領域が含まれているキメラ抗体、または非ヒト抗TES7抗体の特性を1つ以上有しているヒト抗体、または化学療法薬(放射性成分など)に連結させられた本明細書中に記載される任意の抗TES7抗体が含まれる。

【0028】

10

20

30

40

50

1つの態様においては、本発明は、異常細胞またはガン細胞上にあるT E S 7に結合させられた抗T E S 7抗体が含まれている組成物である。好ましい実施形態においては、ガン細胞は、腎臓、肺、および前立腺のガン細胞からなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、ガン細胞は単離されている。いくつかの実施形態においては、ガン細胞は生物学的試料中にある。一般的には、生物学的試料は、個体（例えば、ヒト）に由来するものである。

#### 【0029】

別の態様においては、本発明は、個体に由来する細胞上のT E S 7を検出することによって個体の疾患、特に、個体の炎症反応または自己免疫応答に関係している疾患または障害を診断する方法である。本発明の他の態様においては、個体の炎症反応または自己免疫応答を調節するための方法が提供される。本発明の組成物および方法を使用する処置を施すことができる炎症および自己免疫性疾患によって生じる疾患および状態としては、例えば、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎、脳卒中、他の大脳外傷、炎症性腸疾患（潰瘍性結腸炎およびクローン病を含む）、重症筋無力症、狼瘡、関節リウマチ、喘息、急性若年型糖尿病、A I D Sによる認知症、アテローム性動脈硬化症、腎炎、網膜炎、アトピー性皮膚炎、乾癬、心筋虚血および白血球媒介性急性肺傷害が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0030】

本発明の抗体および他の治療薬が治療的に使用されるさらに他の適応症としては、臓器または移植片の拒絶のリスクがある個体への投与が挙げられる。近年、組織および臓器（例えば、皮膚、腎臓、肝臓、心臓、肺、膵臓および骨髄）を移植するための外科手術技術の効率性に著しい改善が見られる。特に重要な問題は、移植された同種移植片または臓器に対してレシピエントにおいて免疫トランスを誘導するための薬剤として満足のいく薬剤が得られていないことであると考えられる。同種異系細胞または臓器が宿主（すなわち、提供者および被提供者が同種であるが異なる個体である）に移植される場合は、宿主の免疫系は、おそらく、移植物の外部抗原に対し免疫応答（宿主対移植片病）を開始し、これは、移植された組織の破壊につながる。

#### 【0031】

別の態様においては、本発明は、個体がガンの有しているかどうかを診断するための方法であり、この方法には、個体から選択された細胞上にT E S 7の発現があるかどうか決定する工程が含まれる。この場合、上記細胞上でのT E S 7の発現は、上記ガンの指標である。いくつかの実施形態においては、T E S 7の発現は、抗T E S 7抗体を使用して決定される。いくつかの実施形態においては、この方法には、細胞によるT E S 7発現のレベルを検出する工程が含まれる。本明細書中で使用される場合には、用語「検出」には、対照との対比の有無とは無関係に、質的検出および/または量的検出（測定レベル）が含まれる。

#### 【0032】

なお別の態様においては、本発明は、個体に由来する細胞上または細胞から放出されるT E S 7を検出することによって個体のガンを診断する方法である。この場合、ガンは、以下を含む群より選択されるが、これらに限定されない：副腎腫瘍、A I D Sに関連するガン、胞状軟部肉腫、星状細胞系腫瘍、膀胱ガン（有棘細胞ガン腫および移行上皮ガン腫）、骨のガン（アダマンチノーマ、動脈瘤様（aneurismal）骨嚢腫、骨軟骨腫、骨肉腫）、脳および脊髄ガン、転移性脳腫瘍、乳ガン、頸動脈小体腫瘍、頸部の癌、軟骨肉腫、脊索腫（dhoridoma）、嫌色素性腎細胞ガン腫、明細胞ガン腫、大腸ガン、結腸直腸ガン、皮膚の良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣細胞腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液性軟骨肉腫、線維形成不全骨（fibrogenesis imperfecta ossium）、線維性骨形成異常、胆嚢および胆管ガン、妊娠性絨毛性疾患、生殖細胞腫瘍、頭頸部ガン、島細胞腫瘍、カポジ肉腫、腎ガン（腎芽細胞腫、乳頭状腎細胞ガン腫）、白血病、脂肪腫/良性脂肪性腫瘍、脂肪肉腫/悪性の脂肪性腫瘍、肝ガン（肝芽腫、肝細胞ガン）、リンパ腫、肺ガン、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、多

10

20

30

40

50

発性内分泌腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽細胞腫、神経内分泌腫瘍、卵巣ガン、膵臓ガン、乳頭甲状腺ガン、上皮小体腫瘍、小児ガン、末梢神経鞘腫、褐色細胞腫 (phaeochromocytoma)、下垂体部腫瘍、前立腺ガン、後方ブドウ膜 (posterious unveal) 黒色腫、まれな血液疾患、転移性腎ガン、横紋筋様腫瘍、横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma)、肉腫、皮膚ガン、軟組織の肉腫、扁平細胞ガン、胃ガン、滑膜肉腫、睾丸ガン、胸腺ガン腫、胸腺腫、転移性甲状腺ガン、および子宮ガン (頸部のガン腫、子宮内膜ガン腫、および平滑筋腫)。

【0033】

別の態様においては、本発明は、個体に由来する生物学的試料中の T E S 7 の発現を決定する工程を含む、個体のガン (例えば、腎臓、肺、および前立腺のガンであるが、これらに限定されない) の診断を補助するための方法である。いくつかの実施形態においては、T E S 7 の発現は、抗 T E S 7 抗体を使用して決定される。いくつかの実施形態においては、この方法は、細胞による T E S 7 の発現のレベルを検出することである。ガンから放出された T E S 7 は、体液 (例えば、血液、唾液、または胃粘膜の分泌液) の中で検出することができる T E S 7 の高いレベル、またはその一部の原因となり得る。

10

【0034】

なお別の態様においては、本発明は、ガン細胞の増殖を低下させるために十分な、有効量の T E S 7 に結合する抗体を投与することによってガンを処置する方法である。いくつかの実施形態においては、抗体は抗 T E S 7 抗体である。特定の実施形態においては、ガン細胞は、以下からなる群より選択されるが、これらに限定はされない：副腎腫瘍、A I D S に関連するガン、胞状軟部肉腫、星状細胞系腫瘍、膀胱ガン (有棘細胞ガン腫および移行上皮ガン腫)、骨のガン (アダマンチノーマ、動脈瘤様骨嚢腫、骨軟骨腫、骨肉腫)、脳および脊髄ガン、転移性脳腫瘍、乳ガン、頸動脈小体腫瘍、頸部の癌、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞ガン腫、明細胞ガン腫、大腸ガン、結腸直腸ガン、皮膚の良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣細胞腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液性軟骨肉腫、線維形成不全骨、線維性骨形成異常、胆嚢および胆管ガン、妊娠性絨毛性疾患、生殖細胞腫瘍、頭頸部ガン、島細胞腫瘍、カポジ肉腫、腎ガン (腎芽細胞腫、乳頭状腎細胞ガン腫)、白血病、脂肪腫 / 良性脂肪性腫瘍、脂肪肉腫 / 悪性の脂肪性腫瘍、肝ガン (肝芽腫、肝細胞ガン)、リンパ腫、肺ガン、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、多発性内分泌腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽細胞腫、神経内分泌腫瘍、卵巣ガン、膵臓ガン、乳頭甲状腺ガン、上皮小体腫瘍、小児ガン、末梢神経鞘腫、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍、前立腺ガン、後方ブドウ膜黒色腫、まれな血液疾患、転移性腎ガン、横紋筋様腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚ガン、軟組織の肉腫、扁平細胞ガン、胃ガン、滑膜肉腫、睾丸ガン、胸腺ガン腫、胸腺腫、転移性甲状腺ガン、および子宮ガン (頸部のガン腫、子宮内膜ガン腫、および平滑筋腫)。特定の好ましい実施形態においては、ガン細胞は、乳ガン、大腸ガン、前立腺ガン、肺ガン、肉腫、転移性腎ガン、転移性甲状腺ガン、および明細胞ガン腫を含む充実性腫瘍の群から選択されるが、これらに限定されない。

20

30

【0035】

なお別の態様においては、本発明は、ガン有している個体内での転移の進行を遅らせる方法であり、この方法には、T E S 7 に特異的に結合する抗体の少なくとも1つのファミリーの有効量を投与する工程が含まれる。1つの実施形態においては、抗体は抗 T E S 7 抗体である。別の態様においては、本発明は、インビトロまたは個体内でガン細胞の成長および / または増殖を阻害する方法であり、この方法には、化学療法薬と会合させられた (化学療法薬に連結させられたことを含む) 抗 T E S 7 抗体が含まれている組成物の有効量を、細胞培養物もしくは試料、または個体に投与する工程が含まれる。

40

【0036】

なお別の態様においては、本発明は、T E S 7 に特異的に結合する抗体ファミリーの少なくとも1つのメンバーの有効量を個体に投与することによって、個体内のガン細胞に治療薬を送達する方法である。他の実施形態においては、抗 T E S 7 抗体は、別の治療薬と組み合わせて (別の治療薬に連結させられていることを含む) を個体に送達される。

50

## 【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態においては、抗 T E S 7 抗体は、本明細書中で命名された抗体から誘導されたヒト化抗体である（通常は、抗体の部分的または完全な C D R のうちの 1 つ以上が含まれているが、必ずしもそうであるとは限らない）。いくつかの実施形態においては、抗 T E S 7 抗体は、命名された抗体の 1 つ以上の特性を持っているヒト抗体である。いくつかの実施形態においては、化学療法薬（例えば、毒素または放射性分子）がガン細胞に送達される（インターナライズさせられる）。いくつかの実施形態においては、薬剤はサポリンである。

## 【 0 0 3 8 】

別の態様においては、本発明は個体内のガンを処置する方法であり、この方法には、化学療法薬と会合させられた（化学療法薬に連結させられたことを含む）抗 T E S 7 抗体が含まれている組成物の有効量を個体に投与する工程が含まれる。

10

## 【 0 0 3 9 】

本発明によってはさらに、細胞質シグナル伝達パートナーとの T E S 7 の会合を調節する（強化するかまたは減少させるかのいずれかによる）ための方法が提供される。細胞質シグナル伝達パートナーとの T E S 7 の会合は、細胞表面上に存在している T E S 7 分子を、T E S 7 に対するシグナル伝達パートナーの結合を調節する薬剤と接触させることによって、影響をうけ得る。T E S 7 のその結合パートナーおよび/またはシグナル伝達パートナーとの会合をブロックするかまたは減少させる薬剤を使用して、T E S 7 によって媒介される炎症または免疫応答に関与している生物学および病理学的プロセスを調節することができる。この作用が含まれている病理学的プロセスとしては、腫瘍に関連する細胞増殖が挙げられる。

20

## 【 0 0 4 0 】

薬剤は、結合パートナー（例えば、抗 T E S 7 抗体）との T E S 7 の会合をブロックする、減少させる、強化する、または別の方法で調節するそれらの能力について試験することができる。具体的には、T E S 7 相互作用部位（典型的には、完全な生存している細胞上にそれが存在している場合のその自然な立体構造である）を含むペプチドを結合パートナーおよび試験薬剤とともにインキュベートし、試験薬剤が結合パートナーの T E S 7 ペプチドに対する結合を減少させるかまたは強化するかを決定することによって、薬剤をそのような相互作用を調節する能力について試験することができる。

30

## 【 0 0 4 1 】

T E S 7 機能のアゴニスト、アンタゴニスト、および他の調節因子が、明白に、本発明の範囲に含まれる。これらのアゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子は、T E S 7 の抗原決定基のうちの 1 つ以上を含むか、または、そのような部位の 1 つ以上の断片、そのような部位の変異体、もしくはそのような部位のペプチド模倣物を含むポリペプチドである。これらのアゴニスト化合物、アンタゴニスト化合物、および T E S 7 調節化合物は、直鎖形態または環化された形態で提供され、これには状況に応じて、自然界では一般的には見られない少なくとも 1 つのアミノ酸残基、または少なくとも 1 つのアミド等量式が含まれる。これらの化合物は、グリコシル化される場合がある。本発明の T E S 7 機能のアゴニスト、アンタゴニスト、および他の調節因子は、抗体に関して上記に記載された実施形態と方法の全てにおいて使用されることが望ましい。

40

## 【 0 0 4 2 】

本発明の別の態様は、本明細書中で同定され、T E S 7 と呼ばれる新規の抗原に関する。この抗原は免疫原としての使用に適しており、そして、様々な研究、診断上および治療上の目的に適している。

## 【 0 0 4 3 】

特定の態様においては、本発明は個体の疾患の診断を補助するための方法であり、この方法には以下の工程が含まれる：（ i ）個体から得られた血液または組織試料中の T E S 7 の存在をアッセイする工程；（ i i ）上記試料が、正常な（罹患していない）血液または組織試料と比べて、多量の T E S 7 マーカーを有しているかどうかを決定する工程；お

50

よび ( i i i ) 上記マーカーの量の増加を疾患の陽性診断と関連付けるか、上記マーカーの量の増加が無いことを疾患の陰性診断と関連付ける工程。特定の実施形態においては、マーカーは抗 T E S 7 抗体を使用して検出される。特定の実施形態においては、この方法は、放射性核種イメージング、フローサイトメトリー、および免疫組織化学からなる群から選択される技術によって行われる。

例えば、本発明の好ましい実施形態では、以下が提供される：

(項目 1)

T E S 7 に特異的に結合し、以下の特徴のうちの少なくとも一つ以上を有する、実質的に精製された免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片：

- a . ガン細胞上の T E S 7 に結合する能力；
- b . インピトロまたはインピボで生存している細胞の表面上に露出している T E S 7 の一部に結合する能力；
- c . T E S 7 を発現しているガン細胞に治療薬または検出マーカーを送達する能力；および
- d . T E S 7 を発現しているガン細胞の中に治療薬または検出マーカーを送達する能力。

10

(項目 2)

前記ガン細胞が以下に由来するガン細胞からなる群から選択される、項目 1 に記載の精製された免疫グロブリンポリペプチドまたは抗原結合断片：副腎腫瘍、A I D S に関連するガン、胞状軟部肉腫、星状細胞系腫瘍、膀胱ガン（有棘細胞ガン腫および移行上皮ガン腫）、骨ガン（アダマンチノーマ、動脈瘤様骨嚢腫、骨軟骨腫、骨肉腫）、脳および脊髄ガン、転移性脳腫瘍、乳ガン、頸動脈小体腫瘍、頸部の癌、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞ガン腫、明細胞ガン腫、大腸ガン、結腸直腸ガン、皮膚の良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣細胞腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液性軟骨肉腫、線維形成不全骨、線維性骨形成異常、胆嚢および胆管ガン、妊娠性絨毛性疾患、生殖細胞腫瘍、頭部および頸部ガン、島細胞腫瘍、カボジ肉腫、腎ガン（腎芽細胞腫、乳頭状腎細胞ガン腫）、白血病、脂肪腫 / 良性脂肪性腫瘍、脂肪肉腫 / 悪性の脂肪性腫瘍、肝ガン（肝芽腫、肝細胞ガン）、リンパ腫、肺ガン、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、多発性内分泌腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽腫、神経内分泌腫瘍、卵巣ガン、膵臓ガン、乳頭甲状腺ガン、上皮小体腫瘍、小児ガン、末梢神経鞘腫、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍、前立腺ガン、後方ブドウ膜黒色腫、まれな血液疾患、転移性腎ガン、横紋筋様腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚ガン、軟部組織の肉腫、扁平細胞ガン、胃ガン、滑膜肉腫、睾丸ガン、胸腺ガン腫、胸腺腫、転移性甲状腺ガン、および子宮ガン（頸部のガン腫、子宮内膜ガン腫、および平滑筋腫）。

20

30

(項目 3)

項目 1 に記載の免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片をコードする単離された核酸配列。

(項目 4)

前記核酸がプロモータに作動可能に連結されている、項目 3 に記載の核酸。

(項目 5)

前記プロモータおよび前記核酸が発現ベクターに含まれている、項目 4 に記載の核酸。

40

(項目 6)

前記ポリペプチドがモノクローナル抗体である、項目 3 に記載の核酸。

(項目 7)

項目 3 に記載の核酸を含むベクターでトランスフェクトされたか、形質転換されたか、または感染させられた細胞株。

(項目 8)

実質的に精製された免疫グロブリンポリペプチドまたはその抗原結合断片を産生する方法であって：

- a . 該免疫グロブリンポリペプチドまたは抗原結合断片を発現させる条件下で、項目 3

50

に記載の核酸で形質転換された細胞株を増殖させる工程；および

b . 該発現させた免疫グロブリンポリペプチドまたは断片を回収する工程を含む、方法。

(項目 9 )

前記細胞株がハイブリドーマである、項目 8 に記載の方法。

(項目 10 )

前記ハイブリドーマが A T C C 番号 P T A # 7 0 9 3 である、項目 9 に記載の方法。

(項目 11 )

前記免疫グロブリンポリペプチドがモノクローナル抗体である、項目 8 に記載の方法。

(項目 12 )

治療有効量の項目 1 に記載の精製された免疫グロブリンまたは抗原結合断片が薬学的に許容される担体とともに含まれている、薬学的組成物。

(項目 13 )

T E S 7 に特異的に結合し、以下の特徴のうちの少なくとも一つ以上を有する、治療有効量のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が薬学的に許容される担体とともに含まれている、薬学的組成物：

a . ガン細胞上の T E S 7 に結合する能力、

b . インピトロまたはインピボで生存している細胞の表面上に露出している T E S 7 の一部に結合する能力；

c . T E S 7 を発現しているガン細胞に治療薬または検出マーカーを送達する能力；および

d . T E S 7 を発現しているガン細胞の中に治療薬または検出マーカーを送達する能力。

(項目 14 )

前記組成物にさらに別の治療用部分が含まれている、項目 13 に記載の薬学的組成物。

(項目 15 )

A T C C 番号 P T A # 7 0 9 3 またはその子孫からなる単離された細胞株。

(項目 16 )

化学療法薬と結合した抗 T E S 7 抗体が含まれている組成物を投与する工程を含む、化学療法薬をガン細胞に送達するための方法であって、ここでは、該ガン細胞は、以下に由来するガン細胞からなる群より選択される、方法：副腎腫瘍、A I D S に関連するガン、胞状軟部肉腫、星状細胞系腫瘍、膀胱ガン（有棘細胞ガン腫および移行上皮ガン腫）、骨ガン（アダマンチノーマ、動脈瘤様骨嚢腫、骨軟骨腫、骨肉腫）、脳および脊髄ガン、転移性脳腫瘍、乳ガン、頸動脈小体腫瘍、頸部の癌、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞ガン腫、明細胞ガン腫、大腸ガン、結腸直腸ガン、皮膚の良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣細胞腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液性軟骨肉腫、線維形成不全骨、線維性骨形成異常、胆嚢および胆管ガン、妊娠性絨毛性疾患、生殖細胞腫瘍、頭部および頸部ガン、島細胞腫瘍、カボジ肉腫、腎ガン（腎芽細胞腫、乳頭状腎細胞ガン腫）、白血病、脂肪腫 / 良性脂肪性腫瘍、脂肪肉腫 / 悪性の脂肪性腫瘍、肝ガン（肝芽腫、肝細胞ガン）、リンパ腫、肺ガン、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、多発性内分泌腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽腫、神経内分泌腫瘍、卵巣ガン、膵臓ガン、乳頭甲状腺ガン、上皮小体腫瘍、小児ガン、末梢神経鞘腫、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍、前立腺ガン、後方ブドウ膜黒色腫、まれな血液疾患、転移性腎ガン、横紋筋様腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚ガン、軟部組織の肉腫、扁平細胞ガン、胃ガン、滑膜肉腫、睾丸ガン、胸腺ガン腫、胸腺腫、転移性甲状腺ガン、および子宮ガン（頸部のガン腫、子宮内膜ガン腫、および平滑筋腫）。

(項目 17 )

前記化学療法薬が個体に投与される、項目 16 に記載の方法。

(項目 18 )

ハイブリドーマが、A T C C 番号 P T A # 7 0 9 3 またはその子孫である、項目 16 に

10

20

30

40

50

記載の方法。(項目 19)

化学療法薬と結合した抗 T E S 7 抗体が含まれている有効量の組成物を個体に投与する工程を含む、該個体内でのガン細胞の増殖を阻害する方法であって、ここでは、該ガン細胞は、以下に由来するガン細胞からなる群より選択される、方法：副腎腫瘍、A I D S に関連するガン、胞状軟部肉腫、星状細胞系腫瘍、膀胱ガン（有棘細胞ガン腫および移行上皮ガン腫）、骨ガン（アダマンチノーマ、動脈瘤様骨嚢腫、骨軟骨腫、骨肉腫）、脳および脊髄ガン、転移性脳腫瘍、乳ガン、頸動脈小体腫瘍、頸部の癌、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞ガン腫、明細胞ガン腫、大腸ガン、結腸直腸ガン、皮膚の良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣細胞腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液性軟骨肉腫、線維形成不全骨、線維性骨形成異常、胆嚢および胆管ガン、妊娠性絨毛性疾患、生殖細胞腫瘍、頭部および頸部ガン、島細胞腫瘍、カボジ肉腫、腎ガン（腎芽細胞腫、乳頭状腎細胞ガン腫）、白血病、脂肪腫 / 良性脂肪性腫瘍、脂肪肉腫 / 悪性の脂肪性腫瘍、肝ガン（肝芽腫、肝細胞ガン）、リンパ腫、肺ガン、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、多発性内分泌腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽腫、神経内分泌腫瘍、卵巣ガン、膵臓ガン、乳頭甲状腺ガン、上皮小体腫瘍、小児ガン、末梢神経鞘腫、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍、前立腺ガン、後方ブドウ膜黒色腫、まれな血液疾患、転移性腎ガン、横紋筋様腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚ガン、軟部組織の肉腫、扁平細胞ガン、胃ガン、滑膜肉腫、睾丸ガン、胸腺ガン腫、胸腺腫、転移性甲状腺ガン、および子宮ガン（頸部のガン腫、子宮内膜ガン腫、および平滑筋腫）。

10

20

(項目 20)

前記化学療法薬が前記ガン細胞に送達される、項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

前記抗 T E S 7 抗体が、ハイブリドーマ A T C C 番号 P T A # 7 0 9 3 またはその子孫によって発現されるモノクローナル抗体である、項目 19 に記載の方法。

(項目 22)

個体由来の細胞を抗 T E S 7 抗体と接触させる工程、および、存在する場合には、該細胞由来の T E S 7 と該抗体の複合体を検出する工程を含む個体内のガン細胞の有無を検出するための方法であって、ここでは、該ガン細胞は、以下に由来するガン細胞からなる群より選択される、方法：副腎腫瘍、A I D S に関連するガン、胞状軟部肉腫、星状細胞系腫瘍、膀胱ガン（有棘細胞ガン腫および移行上皮ガン腫）、骨ガン（アダマンチノーマ、動脈瘤様骨嚢腫、骨軟骨腫、骨肉腫）、脳および脊髄ガン、転移性脳腫瘍、乳ガン、頸動脈小体腫瘍、頸部の癌、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞ガン腫、明細胞ガン腫、大腸ガン、結腸直腸ガン、皮膚の良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣細胞腫、ユーイング肉腫、骨外性粘液性軟骨肉腫、線維形成不全骨、線維性骨形成異常、胆嚢および胆管ガン、妊娠性絨毛性疾患、生殖細胞腫瘍、頭部および頸部ガン、島細胞腫瘍、カボジ肉腫、腎ガン（腎芽細胞腫、乳頭状腎細胞ガン腫）、白血病、脂肪腫 / 良性脂肪性腫瘍、脂肪肉腫 / 悪性の脂肪性腫瘍、肝ガン（肝芽腫、肝細胞ガン）、リンパ腫、肺ガン、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、多発性内分泌腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽腫、神経内分泌腫瘍、卵巣ガン、膵臓ガン、乳頭甲状腺ガン、上皮小体腫瘍、小児ガン、末梢神経鞘腫、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍、前立腺ガン、後方ブドウ膜黒色腫、まれな血液疾患、転移性腎ガン、横紋筋様腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚ガン、軟部組織の肉腫、扁平細胞ガン、胃ガン、滑膜肉腫、睾丸ガン、胸腺ガン腫、胸腺腫、転移性甲状腺ガン、および子宮ガン（頸部のガン腫、子宮内膜ガン腫、および平滑筋腫）。

30

40

(項目 23)

T E S 7 と T E S 7 結合パートナーとの間での以下の相互作用のうちの少なくとも 1 つをブロックする薬剤：

a . ガン細胞上の T E S 7 に結合する能力；

b . インピトロまたはインピボで生存している細胞の表面上に露出している T E S 7 の一部に結合する能力；

50

c . T E S 7 を発現しているガン細胞に治療薬または検出マーカーを送達する能力 ; および

d . T E S 7 を発現しているガン細胞の中に治療薬または検出マーカーを送達する能力

。

( 項目 2 4 )

治療有効用量の項目 2 3 に記載の薬剤が薬学的に許容される担体とともに含まれている、薬学的組成物。

( 項目 2 5 )

以下の特徴のうちの少なくとも1つを有している、T E S 7 調節因子 :

a . ヒト T E S 7 と天然の T E S 7 リガンドとの間での相互作用を破壊するかまたはブロックする能力 ;

b . ヒト T E S 7 と抗 T E S 7 抗体との間での相互作用を破壊するかまたはブロックする能力 ;

c . ヒト T E S 7 に結合する能力 ;

d . ヒト T E S 7 の天然のリガンドに結合する能力

e . 抗 T E S 7 抗体に結合する能力 ;

f . ヒト T E S 7 、天然の T E S 7 リガンド、または抗 T E S 7 抗体に結合することができる抗体を惹起させることにおいて使用することができる抗原性部位を含む ;

g . ヒト T E S 7 、天然の T E S 7 リガンド、または抗 T E S 7 抗体に結合することができる抗体のスクリーニングに使用することができる抗原性部位を含む ;

h . ヒト T E S 7 と天然の T E S 7 リガンドとの間、または T E S 7 と抗 T E S 7 抗体との間での相互作用を破壊するかまたはブロックすることができる抗体を惹起させることにおいて使用することができる抗原性部位を含む ;

i . ヒト T E S 7 と天然の T E S 7 リガンドとの間、または T E S 7 と抗 T E S 7 抗体との間での相互作用を破壊するかまたはブロックすることができる抗体のスクリーニングに使用することができる抗原性部位を含む。

( 項目 2 6 )

A T C C 番号 P T A - 8 5 7 6 またはその子孫からなる単離された細胞株。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 4 】

【 図 1 】 図 1 は、ヒトの膵臓腺ガン細胞株 H s 7 0 0 T の増殖に対する m u - 抗 T E S 7 と M a b - Z A P ( サポリンに結合させられた抗 I g G ) の作用のグラフによる結果を示す。

【 図 2 】 図 2 は、抗 T E S 7 抗体、m u - 抗 T E S 7 による単層として増殖させられた、ヒトの結腸直腸腺ガン細胞株 H T 2 9 のインビトロでの阻害を示している実験のグラフによる結果を示す。

【 図 3 】 図 3 は、組み換え体ヒト B 7 H 3 と m u - 抗 T E S 7 抗体を使用したウェスタンブロット実験の結果を示す。

【 図 4 】 図 4 は、4 - I g - ループ B 7 - H 3 に優先的に結合する m u - 抗 T E S 7 抗体を示している E L I S A アッセイのグラフによる結果を示す。

【 図 5 】 図 5 は、m u - 抗 T E S 7 抗体が C S C - B M C 同時培養物の中での V E G F の分泌を減少させたことを示す。

【 図 6 】 図 6 は、m u - 抗 T E S 7 が B M C または C S C - B M C 同時培養物の中での M I P - 1 ( C C L 3 ) の分泌を減少させたことを示す。

【 図 7 】 図 7 は、捕捉抗体でブロックされたプレートの中の 5 マイクログラム / m l の濃度の捕捉抗体では、m u - 抗 T E S 7 が濃度依存性の様式で結合したことを示す ( 四角、左側の図 ) 。

【 図 8 】 図 8 は、インビボで腫瘍の増殖を低下させる m u - 抗 T E S 7 の能力を、皮下異種移植モデルにおいて試験したことを示す。

【 図 9 】 図 9 は、C S C - B M C 同時培養物の中での V E G F の分泌の m u - 抗 T E S 7

10

20

30

40

50

による減少を示す（VEGF発生率：3/7）。

【図10】図10は、BMCまたはCSC-BMC同時培養物の中でのMIP-1（CCL3）の分泌のmu-抗TES7による減少を示す（CCL3、発生率：6/7）。

【図11】図11は、マウス抗TES7抗体（TES7-VK）と2つのヒト化変異体TES7-HuVK1およびTES7-HuVK2の可変軽鎖配列を示す。CDR配列はオレンジ色である。ヒト化バージョンについては、考えられるアミノ酸は、特に明記されない限りは、ヒト配列AAK94808の中に示されるアミノ酸と同じである。

【図12】図12は、マウス抗TES7抗体（TES7-VH）と2つのヒト化変異体TES7-HuVH1およびTES7-HuVH2の可変重鎖配列を示す。CDR配列はオレンジ色である。ヒト化バージョンについては、考えられるアミノ酸は、特に明記されない限りは、ヒト配列AAA18279に示されるアミノ酸と同じである。

【発明を実施するための形態】

【0045】

本発明により、肺ガン、前立腺ガン、および腎臓ガンを含むがこれらに限定されない種々のタイプの組織を起源とするガン細胞上で発現される新規の抗原TES7が提供される。さらに、本発明により、TES7に結合するモノクローナル抗体およびポリペプチドが提供され、ならびに、TES7の発現および/または過剰発現が関係している様々なヒトのガン疾患を診断し、処置するためにこれらの抗体およびポリペプチドを作製し使用方法が提供される。

【0046】

I. 一般的技術

本発明の実施では、特に明記されない限りは、当業者の能力の範囲内にある分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技術が使用されるであろう。そのような技術は、例えば、以下のような文献の中で十分に説明されている：Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second edition (Sambrookら、1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編、1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis編、1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney編、1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell編、1993~8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos編、1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubelら編、1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullisら編、1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coliganら編、1991); Short Protocols in Molecular Biology (WileyおよびSons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty. 編、IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a prac

10

20

30

40

50

tical approach (P. Shepherd および C. Dean 編、Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow および D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra 編、Harwood Academic Publishers, 1995); および Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita ら 編、J. B. Lippincott Company, 1993)。

**【0047】**

10

## II. 定義

「B7-H3」は、Ig 様ドメインを有している I 型膜タンパク質である、タンパク質の B7 ファミリのメンバーである。B7-H3 は、2 つの Ig 様ドメインを有しているとして最初に特性決定され、それから、複数の研究者らにより、ヒト樹状細胞上で発現される、B7-H3 の 4 個の Ig 様ドメインを持つ形態が報告された。研究者らは、これを 2 個の Ig 様ドメインを持つ形態と区別するために、4 個の Ig 様ドメインを持つものを、4 Ig-B7-H3 と命名した。(Steinberger ら、J. Immunol. 2004, 172(4): 2352-2359、および Castriconi ら、PNAS 2004, 101(34): 12640-12645)。

**【0048】**

20

「TES7」は、本発明の抗体がそれに対して向けられる新規の抗原である、B7-H3 の 4 Ig イソ型の特徴を共有している抗原をいう。TES7 は、抗 TES7 抗体によって結合される細胞表面タンパク質であり、正常なヒトの膵臓および肝臓組織と、いくつかのタイプのガン腫の上に存在する。この抗原は、1 つ以上の異なるエピトープを有している場合があり、これらのエピトープは直鎖状ではない場合がある。いくつかの抗 B7-H3 抗体は、4 Ig イソ型上にしか存在しないいくつかのものを含む、直鎖状ではないエピトープに結合することが知られている。現在のところ、TES7 は、それらの正常組織である対照物と比較して、特定のガン細胞の中で過剰発現される場合があると考えられている。

**【0049】**

30

TES7 機能のアゴニスト、アンタゴニスト、および他の調節因子が、明白に、本発明の範囲に含まれる。これらのアゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子は、TES7 の抗原決定基部位のうちの一つ以上を含むか、または、そのような部位の一つ以上の断片、そのような部位の変異体、もしくはそのような部位のペプチド模倣物を含むポリペプチドである。これらのアゴニスト化合物、アンタゴニスト化合物、および TES7 調節化合物は、直鎖形態または環化された形態で提供され、これには状況に応じて、自然界では一般的には見られない少なくとも一つのアミノ酸残基、または少なくとも一つのアミド等式が含まれる。これらの化合物は、グリコシル化される場合がある。

**【0050】**

40

さらに具体的には、用語「TES7 調節因子」は、本明細書中で使用される場合は、以下の化合物のいずれかであると定義される：(1) ヒト TES7 とその天然のリガンドまたは抗 TES7 抗体との間での相互作用を破壊するかまたはブロックすることができる化合物；(2) ヒト TES7 およびその天然のリガンドまたは抗 TES7 抗体に結合することができる化合物；(3) ヒト TES7 およびその天然のリガンドまたは抗 TES7 抗体に結合できる抗体を惹起させることにおいて使用することができる抗原部位を含む化合物；(4) ヒト TES7 およびその天然のリガンドまたは抗 TES7 抗体に結合できる抗体のスクリーニングにおいて使用することができる抗原性部位を含む化合物；(5) ヒト TES7 とその天然のリガンドまたは抗 TES7 抗体との間での相互作用を破壊するかまたはブロックすることができる抗体を惹起させることにおいて使用することができる抗原性部位を含む化合物；(6) ヒト TES7 と天然のリガンドまたは抗 TES7 抗体との間で

50

の相互作用を破壊するかまたはブロックすることができる抗体のスクリーニングにおいて使用することができる抗原性部位を含む化合物。TES7調節因子は、それらの活性が正常なTES7生物学的活性を強化するかまたは阻害するかに応じて、それぞれ、「TES7アゴニスト」である場合も、また、「TES7アンタゴニスト」である場合もある。

【0051】

TESアゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子には、TES7変異体、TES7ペプチドアンタゴニスト、ペプチド模倣物、および低分子、抗TES7抗体および免疫グロブリン変異体、アミノ酸置換、欠失、および付加変異、またはそれらの任意の組み合わせを含むヒトTES7のアミノ酸変異体、ならびにキメラ免疫グロブリンが含まれる。本発明のTES7アゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子は、ヒトTES7のその天然のリガンドまたは抗TES7抗体への結合に關与しているTES7ドメインの本発明者らによる同定に基づく。したがって、本発明により、ヒトTES7の抗TES7結合ドメインの1つ以上を複写するかまたは模倣する分子構造を有しているTES7アゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子が提供される。

10

【0052】

本明細書中で使用される場合は、用語「TES7変異体」は、アミノ酸置換、欠失、および付加変異、またはそれらの任意の組み合わせを含む、ヒトTES7のアミノ酸変異体を示す。この定義には、ヒトTES7/非ヒトキメラのようなキメラ分子、および他のハイブリッド分子も含まれる。その分子の変異体またはハイブリッド領域(単数または複数)を含むTES7変異体分子の任意の断片も、この定義に含まれる。

20

【0053】

「抗体」は、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどの標的に対して、免疫グロブリン分子の可変領域の中に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を介して特異的に結合することができる免疫グロブリン分子である。本明細書中で使用される場合は、この用語には、完全なポリクローナルまたはモノクローナル抗体だけではなく、それらの断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv)、単鎖(ScFv)、それらの突然変異体、天然の変異体、必要とされる特異性がある抗原認識部位をもつ抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、キメラ抗体、および必要とされる特異性がある抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された構造も含まれる。

30

【0054】

「モノクローナル抗体」は、均質な抗体群をいう。この場合、モノクローナル抗体は、抗原の選択的結合に關与するアミノ酸(天然のもの、および自然界には存在しないもの)から構成される。モノクローナル抗体は、特異性が極めて高く、1つの抗原性部位を標的とする。用語「モノクローナル抗体」には、完全なモノクローナル抗体と全長のモノクローナル抗体だけではなく、それらの断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv)、単鎖(ScFv)、それらの突然変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、および必要とされる特異性と抗原に結合する能力がある抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された構造も含まれる。この用語は、抗体の供給源または抗体が作製される方法(例えば、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、トランスジェニック動物など)に関して限定されるようには意図されない。この用語には、免疫グロブリン全体、さらには、「抗体」の定義の中で上記に記載された断片なども含まれる。

40

【0055】

「ヒト化」抗体は、ヒト以外の種に由来する免疫グロブリンから導かれた抗原結合部位を有しており、ヒト免疫グロブリンの構造および/または配列に基づくその分子の残りの免疫グロブリンの構造を有している、組換え技術を使用して一般的に調製されたキメラ分子をいう。抗原結合部位には、定常ドメインに融合させられた完全な可変ドメインが含まれる場合があり、また、可変ドメインの中の適切なフレームワーク領域上に繋がれた相補性決定領域(CDR)だけが含まれる場合もある。抗原結合部位は、野生型である場合も、また、1つ以上のアミノ酸置換によって修飾される場合もある。これによって、ヒト個

50

体の中での免疫原としての定常領域が排除されることになるが、外来性の可変領域に対する免疫応答の可能性は残る (LoBuglio, A. F. ら (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:4220-4224)。別のアプローチでは、ヒト由来の定常領域を提供することだけでなく、可変領域を修飾し、それらをヒト形態にできるだけ近くなるよう形を整えることにも焦点があてられる。重鎖および軽鎖の可変領域はいずれも、問題の抗原に反応して変化し、そして結合能力を決定付ける3つの相補性決定領域(CDR)を含み、相補性決定領域には、任意の種において比較的保存されており、CDRの足場を提供していると推測される四つのフレームワーク領域(FR)が隣接していることが公知である。特定の抗原に対する非ヒト抗体が調製される場合には、非ヒト抗体に由来するCDRを修飾されるヒト抗体の中に存在するFR上に繋ぐことにより、可変領域を「再形成する(reshaped)」または可変領域を「ヒト化する」ことができる。このアプローチの種々の抗体への適用は、例えば、以下によって報告されている: Sato, K. ら (1993) Cancer Res 53:851-856; Riechmann, L. ら (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. ら (1988) Science 239:1534-1536; Kettlborough, C. A. ら (1991) Protein Engineering 4:773-783; Maeda, H. ら (1991) Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. ら (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:4181-4185; Tempest, P. R. ら (1991) Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. ら (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873; Carter, P. ら (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-4289; および Co, M. S. ら (1992) J Immunol 148:1149-1154。いくつかの実施形態においては、ヒト化抗体は、全てのCDR配列を維持する(例えば、マウス抗体に由来する6個のCDRを全て含むヒト化マウス抗体)。他の実施形態においては、ヒト化抗体は、もとの抗体と比較して変化したCDRを1つ以上(1個、2個、3個、4個、5個、6個)有しており、これは、もとの抗体に由来する1つ以上のCDR「に由来する」1つ以上のCDRとも呼ばれる。

#### 【0056】

抗体またはポリペプチドに「特異的に結合する」または「優先的に結合する」(本明細書中では互換的に使用される)エピトープは、当該分野で十分に理解されている用語であり、そのような特異的または優先的結合を決定する方法も当該分野では周知である。分子が、別の細胞または物質よりも、特定の細胞または物質と、より頻繁に、より迅速に、より長い期間、および/またはより強い親和性で反応するか、あるいは会合する場合には、その分子は、「特異的結合」または「優先的結合」を示すと言われる。抗体は、それが、他の物質に結合するよりも、標的に対して強い親和性で、結合力で、より迅速に、および/またはより長い期間結合する場合には、抗体は、標的に対して「特異的に結合する」または「優先的に結合する」。例えば、特異的または優先的にTES7エピトープに結合する抗体は、それが他のTES7エピトープまたは非TES7エピトープに結合するよりも大きな親和力で、より大きな結合力で、より容易に、および/または長い時間、このTES7エピトープに結合する抗体である。例えば、特異的または優先的に第1の標的に結合する抗体(または、部分もしくはエピトープ)は、第2の標的に対して特異的または優先的に結合する場合があります。また、そうではない場合もあることも、この定義を読むことによって理解される。このように、「特異的結合」または「優先的結合」は、排他的結合を必ず必要とするものではない(が、排他的結合が含まれる場合もある)。一般的には、結合との言及は優先的結合を意味するが、必ずしもそうではない。

#### 【0057】

エピトープに関する用語「免疫学的に活性である」、または「免疫学的活性を維持している」は、様々な条件下(例えば、エピトープが還元条件および変性条件に供された後)

でのエピトープに結合する抗体（例えば抗 T E S 7 抗体）の能力をいう。

【 0 0 5 8 】

以下を含むがこれらに限定されない様々な生物学的機能が、抗 T E S 7 抗体に関係している：T E S 7（腎臓、前立腺、または肺のガン細胞を含むがこれらに限定されないガン細胞上の T E S 7 を含む）に結合する能力；インビトロまたはインビボで生存している細胞の表面上に露出している T E S 7 の一部に結合する能力；T E S 7 を発現しているガン細胞（例えば、腎臓、前立腺、または肺のガン細胞）に化学療法薬を送達する能力；T E S 7 を発現しているガン細胞の中へ治療薬または検出マーカーを送達する能力。本明細書中で議論される場合には、本発明のポリペプチド（抗体を含む）は、これらの特徴のうちの任意の 1 つ以上を有することができる。

10

【 0 0 5 9 】

「抗 T E S 7 等価抗体」または「抗 T E S 7 等価ポリペプチド」は、抗 T E S 7 抗体と関係があり、例えば結合特異性のような 1 つ以上の生物学的機能を有している抗体またはポリペプチドをいう。

【 0 0 6 0 】

本明細書中で使用される場合は、「薬剤」は、生物学的、薬学的、または化学的化合物をいう。例として、単純なまたは複雑な有機または無機分子、ペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗体、抗体誘導體、抗体断片、ビタミン誘導體、炭水化物、毒素、または化学療法用の化合物が挙げられるが、これらに限定されない。様々な化合物を合成することができるが、例えば、低分子物およびオリゴマー（例えば、オリゴペプチドおよびオリゴヌクレオチド）、ならびに、様々なコア構造をベースとする合成有機化合物を合成することができる。加えて、様々な天然源（例えば、植物または動物からの抽出物など）により、スクリーニング用の化合物が提供され得る。当業者であれば、本発明の薬剤の構造的特徴に制限がないことは容易に理解できる。

20

【 0 0 6 1 】

本発明の方法に使用される薬剤は、無作為に選択することができ、また、合理的に選択もしくは設計することもできる。本明細書中で使用される場合は、その自然界での結合パートナーまたは公知の抗体との T E S 7 の会合に関係している特異的な配列を考慮することなく薬剤が無作為に選択される場合には、薬剤が無作為に選択されるといわれる。無作為に選択された薬剤の例は、化学的ライブラリまたはペプチド・コンビナトリアル・ライブラリの使用である。

30

【 0 0 6 2 】

本明細書中で使用される場合は、薬剤の作用に関連する標的部位の配列および/またはその立体構造を考慮して薬剤が作為的な基準に基づいて選択される場合に、薬剤が合理的に選択されるまたは設計されるといわれる。抗 T E S 7 剤に関して、それに対して抗体が惹起させることができるエピトープが T E S 7 上に少なくとも 3 つ存在し、したがって、T E S 7 / 抗 T E S 7 の相互作用をブロックする薬剤について少なくとも 3 つの作用部位が存在すると現在考えられている。本発明にはまた、T E S 7 とその天然の結合パートナーとの間での相互作用の部位で作用する薬剤が含まれるが、他のリガンドとそれらの活性のある T E S 7 相互作用部位もまた、これらが現在公知であるか、将来同定されるものかにはかかわらず、本発明の範囲内に含まれる。薬剤は、受容体/リガンドおよび/または T E S 7 / 抗 T E S 7 抗体の複合体の接触部位を構成するペプチド配列を利用することによって、合理的に選択するかまたは合理的に設計することができる。例えば、合理的に選択されたペプチド薬剤は、これが、その本来の環境にある生存している細胞の表面上に露出しているので、そのアミノ酸配列が T E S 7 上に現れるエピトープと同一であるペプチドであり得る。このような薬剤は、所望される場合には、抗 T E S 7 抗体に、または本来のリガンドに結合させることによって、抗 T E S 7 抗体の T E S 7 との会合またはその本来のリガンドとの T E S 7 の会合を減少させるか、あるいは阻止するであろう。

40

【 0 0 6 3 】

本明細書中で使用される場合は、抗体に関する用語「標識される」は、検出可能な物質

50

(例えば、放射性薬剤または蛍光色素分子(例えばフルオレセインイソチオシアネート(FITC)またはフィコエリトリン(PE))を抗体にたいして結合(すなわち、物理的連結)させることによって抗体を直接標識すること、さらには、検出可能な物質との反応性によってプローブまたは抗体を間接的に標識することも含むように意図される。

【0064】

本明細書中で使用される場合は、抗体に関する用語「会合」には、薬剤(例えば、化学療法薬)への共有および非共有的な付着または結合が含まれる。抗体は、抗体が結合するガン細胞にこの薬剤の局在化を抗体が指示するように、共通の基体への付着を介して直接結合または間接的に結合させることによって、薬剤(例えば、化学療法薬)と会合させることができる。この場合、抗体が結合する同じガン細胞に対して薬剤が標的化させられないように、または薬剤の有効性が低下してしまわないように、抗体と薬剤は生理学的条件下で実質的には解離しない。

10

【0065】

「生物学的試料」には、個体から得られた様々なタイプの試料が含まれ、これらは診断アッセイまたはモニタリングアッセイに使用することができる。この定義には、唾液、血液、および生物を供給源とする他の液体試料、固体組織試料(例えば、生検標本または組織培養物またはそれらに由来する細胞)、ならびに、その子孫などの固形組織試料(例えば、ガンの疑いのある個体から収集された組織試料(好ましい実施形態においては、卵巣、肺、前立腺、膵臓、大腸、および乳房の組織から得られた細胞)から得られた細胞)が含まれる。この定義にはまた、それらの入手後に任意の方法(例えば、試薬での処理、可溶化、または特定の成分(例えば、タンパク質またはポリヌクレオチド)についての富化、あるいは、切片化の目的のために半固形または固形のマトリックスの中に包埋すること)で操作された試料も含まれる。用語「生物学的試料」には臨床試料が含まれ、これにはまた、培養物中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、生物学的流体、および組織試料も含まれる。

20

【0066】

「宿主細胞」には、ポリヌクレオチド挿入断片の取り込みをさせるためのベクター(単数または複数)のレシピエントになることができるか、または既にレシピエントである個体の細胞または細胞培養物が含まれる。宿主細胞には単一の宿主細胞の子孫が含まれ、子孫は、自然発生的、偶発的または意図的な突然変異が原因で、必ずしももともとの親細胞と(形態学またはゲノムDNAの相補性において)完全に同じであるとは限らない。宿主細胞には、本発明のポリヌクレオチド(単数または複数)によってインビボでトランスフェクションされた細胞が含まれる。

30

【0067】

本明細書中で使用される場合は、「転移の進行を遅らせる」は、転移の進行を保留する、妨害する、減速させる、抑制する、一定に保つ、および/または後延ばしにすることを意味する。このような遅延の時間の長さは、ガンの病歴および/または処置される個体に応じて様々である可能性がある。当業者に明らかであるように、十分な、または有意な遅延には、事実上、個体が転移を進行させない阻止を含めることができる。

【0068】

薬学的組成物の「有効量」は、1つの実施形態においては、例えば、以下を含むが、これらに限定されない、有効なあるいは処方される臨床結果を得るために十分な量である：腫瘍(ガン(例えば、乳ガンまたは前立腺ガン)の状況において)の大きさを縮める、ガン細胞の増殖を遅らせること、転移の進行を遅らせること、疾患によって生じる症状を軽減すること、疾患に罹患している患者の生活の質を向上させること、疾患を処置するために必要な他の薬剤の投薬量を減らすこと、例えば、標的化および/またはインターナライゼーションなどによって別の投薬の効果を強化すること、疾患の進行を遅らせること、および/または個体の生存を延ばすこと。有効量は、1回以上の投与において投与することができる。本発明の目的について、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効量は、直接または間接的のいずれかによって、ガン細胞の増殖を減少させ(または破壊し)、そして

40

50

ガン細胞の転移の発生または増殖を減少させる、および/または遅らせるために十分な量である。いくつかの実施形態においては、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効量は、別の薬物、化合物、または薬学的組成物と組み合わせて達成される場合も、また、そうではない場合もある。したがって、「有効量」は、1つ以上の化学療法薬を投与する状況において考えられる場合があり、そして、一種類の薬剤を、1つ以上の他の薬剤と組み合わせて所望される結果が達成されると思われるか、または達成される有効量で投与されるように考えられる場合もある。個々のニーズは様々であるので、各成分の有効量の最適範囲の決定は当業者の能力の範囲内である。典型的な投薬量には、0.1から100 mg/kg/体重が含まれる。好ましい投薬量には、1から100 mg/kg/体重が含まれる。最も好ましい投薬量には、10から100 mg/kg/体重が含まれる。

10

## 【0069】

本明細書中で使用される場合は、核酸分子もしくは薬剤、抗体、組成物、または細胞などは、核酸分子もしくは薬剤、抗体、組成物、または細胞などが、そのもともとの供給源から、混入している核酸分子、抗体、薬剤、組成物、または細胞と実質的に分離されている場合には、「単離された」といわれる。

## 【0070】

「個体」とは、脊椎動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物には、家畜、競技用動物、ペット、霊長類、マウスおよびラットが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0071】

用語「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいうように、本明細書中では互換的に使用される。ポリマーは直鎖である場合も、また、分枝鎖である場合もあり、これには、修飾されたアミノ酸が含まれる場合があり、そして、これはアミノ酸以外のものが間に介在している場合もある。この用語にはまた、自然にまたは介入；例えば、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、脂質付加反応、アセチル化、リン酸反応、または任意の他の操作もしくは修飾、例えば標識成分との結合によって既に修飾されているアミノ酸ポリマーも含まれる。この定義には、また、例えば、アミノ酸の1つ以上のアナログ（例えば、自然界には存在しないアミノ酸などを含む）が含まれているポリペプチド、ならびに、当該分野で公知の他の修飾物も含まれる。本発明のポリペプチドは抗体をベースとするものであるので、ポリペプチドは単鎖として存在することも、また、会合した鎖として存在することもできることが理解される。

20

30

## 【0072】

本発明の範囲にはまた、本明細書中に記載されるTES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子（抗TES7抗体を含む）のペプチド模倣物も含まれる。そのようなペプチド模倣物には、少なくとも1つのアミノ酸残基が、アミノ酸のD異性体、またはアミノ酸のNアルキル化された種のような、自然界では一般的には見られないアミノ酸残基で置換されたペプチドが含まれる。他の実施形態においては、ペプチド模倣物は、TES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、または調節因子の中の少なくとも1つのアミド結合（ $-C(=O)-NH-$ ）を、アミド等量式で置き換えることによって構築される。適切なアミド等量式としては、 $-CH_2-NH-$ 、 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2-S(O)_n-$ （式中、nは1または2）、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ （EまたはZ）、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-CH(CN)-NH-$ 、 $-C(OH)-CH_2-$ 、および $-O-C(=O)-NH-$ が挙げられる。アミド等量式での置換についての適切な候補であるTES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、または調節因子の中のアミド結合としては、TES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、または調節因子での処理についての意図される目的の内因性エステラーゼまたはプロテアーゼによって加水分解される結合が挙げられる。

40

## 【0073】

本明細書中で使用される場合は、「実質的に純粋」は、少なくとも50%純粋（すなわ

50

ち混入物がない)、より好ましくは少なくとも90%純粋、より好ましくは少なくとも95%純粋、より好ましくは少なくとも98%純粋、より好ましくは少なくとも99%純粋、またはそれ以上純粋である材料をいう。

#### 【0074】

「毒素」は、細胞内で有害な反応をもたらす任意の物質をいう。例えば、ガン細胞に対する毒素は、ガン細胞に対し有害な効果、時には悪影響を有する。毒素の例として、放射性同位体、カリケアマイシン、およびメイタンシノイドが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0075】

本明細書中で使用される場合は、「処置」または「処置する」は、有用な結果または所望される結果(臨床結果を含む、好ましくは、臨床結果である)を得るためのアプローチである。本発明の目的のためには、有用な結果または所望される臨床結果には、以下の1つ以上が含まれるが、これらに限定されない:ガン細胞または他の異常細胞の増殖を低下させること(または破壊すること)、ガンにおいてみられるガン細胞の転移を減らすこと、腫瘍の大きさを縮めること、疾患によって生じる症状を軽減すること、疾患に罹患している患者の生活の質を向上させること、疾患を処置するために必要な他の薬剤の投薬量を減らすこと、疾患の進行を遅らせること、および/または個体の生存を延ばすこと。

#### 【0076】

##### III. 抗体およびポリペプチドの作製方法

モノクローナル抗体の作製方法は当該分野で公知である。利用できる1つの方法は、KohlerおよびMilstein、Nature 256:495-497(1975)の方法またはそれを改良した方法である。典型的には、モノクローナル抗体は、ヒト以外の種(例えば、マウス)の中で生産させる。一般的には、マウスまたはラットが免疫化に使用されるが、他の動物もまた使用することができる。ヒトTES7を含む、免疫原性を示す量の細胞、細胞抽出物、またはタンパク質調製物でマウスを免疫化することによって抗体が生産される。免疫原は、初代細胞、培養細胞株、ガン細胞、核酸、または組織であり得るが、これに限定されない。1つの実施形態においては、ヒト肺ガン細胞が使用される。免疫化に適している細胞株は実施例1で詳しく説明される。免疫化に使用される細胞(例えば、ヒト精巣細胞または膵臓腺ガン細胞または胃細胞)は、免疫原としてのそれらの使用の前に、一定期間(少なくとも24時間)培養される場合がある。細胞(例えば、ヒト精巣、胃、または膵臓の腺ガン細胞)自体が免疫原として使用される場合があり、また、リビ(Ribi)などの非変性アジュバントと組み合わせて免疫原として使用される場合もある。一般的には、細胞は免疫原として使用される場合には、無傷な状態、そして好ましくは生存可能な状態を維持していなければならない。免疫化された動物によっては、破裂した細胞よりも、無傷な細胞のほうが、良好に抗原を検出することができる。変性剤またはきついアジュバント(例えばフロイトのアジュバント)の使用は、細胞を破裂させてしまうおそれがあり、したがって、回避される。免疫原は、複数回、定期的に、例えば2週間ごと、または毎週投与される場合があり、また、動物(例えば組換え組織)内での生存性を維持できるような方法で投与される場合もある。実施例2は、抗TES7抗体の作製に使用される方法を記載し、これは、TES7に結合する他のモノクローナル抗体を作製するために使用することができる。

#### 【0077】

1つの実施形態においては、TES7に結合するモノクローナル抗体は、免疫原としてTES7を過剰発現する宿主細胞を使用することによって得られる。そのような細胞としては、たとえば、ヒト肺ガン細胞、およびヒト大腸ガン細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0078】

抗体反応をモニターするためには、少量の生物学的試料(例えば血液)を動物から得て、免疫原に対する抗体価を試験することができる。脾臓および/またはいくつかの大きなリンパ節を取り出して単細胞に解離させることができる。必要に応じて、脾臓細胞は、抗

10

20

30

40

50

原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を塗布することによって（非特異的に接着した細胞の除去後に）スクリーニングすることができる。抗原に特異的な膜結合型の免疫グロブリンを発現しているB細胞がプレートに結合することになり、これは懸濁液の残りと一緒に洗い流されることはない。次に、生じたB細胞または全ての解離した脾臓細胞を骨髄腫細胞（例えば、X63-Ag8.653およびSalk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, CAから得られる細胞）と融合させることができる。ポリエチレングリコール（PEG）を使用して、脾臓またはリンパ球を骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマを形成させることもできる。その後、ハイブリドーマが選択培地（例えば、「HAT培地」としても知られているヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンの培地）で培養される。次に、得られたハイブリドーマは限界希釈によってプレーティングされ、FACSまたは免疫組織化学（IHCスクリーニング）を使用することによって、免疫原（例えば、ヒト胎児腎臓細胞の表面、ガン細胞株の表面、胎児性膀胱切片など）に特異的に結合する抗体の産生についてアッセイされる。その後、選択されたモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマが、インビトロで（例えば、組織培養ビンまたは中空繊維型反応器の中で）、またはインビボで（例えば、マウスの腹水の中で）のいずれかで培養される。実施例3には、抗TES7抗体を獲得し、そしてスクリーニングするために利用される方法についてのさらなる詳細が提供される。

10

## 【0079】

細胞融合技術の別の選択肢として、EBV不死化B細胞を使用して、本発明のモノクローナル抗体を生産させることができる。ハイブリドーマが増殖させられ、サブクロニングされ、そして所望される場合には、上清が、従来のアッセイ手順（例えば、FACS、IHC、放射免疫アッセイ、酵素免疫アッセイ、蛍光免疫アッセイなど）によって、抗免疫原活性についてアッセイされる。

20

## 【0080】

別の選択肢では、モノクローナル抗体である抗TES7と、任意の他の等価抗体は配列決定され、当該分野で公知の任意の手段（例えば、ヒト化、完全なヒト抗体を生産させるためのトランスジェニックマウスの使用、ファージディスプレイ技術など）により、組み換えによって生産することができる。1つの実施形態においては、抗TES7モノクローナル抗体が配列決定され、その後、ポリヌクレオチド配列が、発現または増殖のためにベクターにクローニングされる。目的の抗体をコードする配列は、宿主細胞の中のベクター中に保持させることができ、宿主細胞は、その後、将来の使用に備えて、増殖させ、凍結しておくことができる。

30

## 【0081】

親和力または抗体の他の特徴を改善するために、モノクローナル抗体である抗TES7および任意の他の等価抗体のポリヌクレオチド配列を遺伝子操作に使用して、「ヒト化」抗体を作製することができる。抗体のヒト化の一般的な原理には、抗体の抗原結合性部分の基本的な配列を保ったまま、抗体の非ヒトである残りの部分をヒト抗体の配列と交換することが含まれる。モノクローナル抗体のヒト化には4つの一般的な工程がある。これらは以下である：（1）開始抗体の軽鎖および重鎖の可変ドメインのヌクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列を決定する工程、（2）ヒト化抗体を設計する、すなわち、ヒト化のプロセスに使用する抗体のフレームワーク領域を決定する工程、（3）実際のヒト化の方法論/技術、ならびに、（4）ヒト化抗体のトランスフェクションと発現。例えば、米国特許第4,816,567号；同第5,807,715号；同第5,866,692号；および第6,331,415号を参照のこと。

40

## 【0082】

非ヒト免疫グロブリンに由来する抗原結合部位が含まれている多数の「ヒト化」抗体分子がこれまでに記載されている。これには、ヒト定常領域に対して、げっ歯類のV領域または修飾されたげっ歯類のV領域と、それに付随する相補性決定領域（CDR）が融合させられたキメラ抗体が含まれる。例えば、Winterら、Nature 349:29

50

3 - 299 (1991)、Lobugliorà、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 4220 - 4224 (1989)、Shawら、J Immunol. 138: 4534 - 4538 (1987)、およびBrownら、Cancer Res. 47: 3577 - 3583 (1987)を参照のこと。他の参考文献には、適切なヒト抗体の定常領域との融合の前に、ヒトの支持フレームワーク領域(FR)に繋がれたげっ歯類のCDRが記載されている。例えば、Riechmannら、Nature 332: 323 - 327 (1988)、Verhoeyenら、Science 239: 1534 - 1536 (1988)、およびJonesら、Nature 321: 522 - 525 (1986)を参照のこと。別の参考文献には、組み換えによって張りつけられたげっ歯類のフレームワーク領域によって支えられたげっ歯類のCDRが記載されている。例えば、欧州特許出願公開番号第519,596号を参照のこと。これらの「ヒト化」分子は、ヒトであるレシピエントの中のそのような部分の治療的適用の期間および有効性を限定してしまう、げっ歯類抗ヒト抗体分子に対する好ましくない免疫応答が最小限に抑えられるように設計される。それらもまた利用することができる抗体をヒト化する別の方法は、Daughertyら、Nucl. Acids Res.、19: 2471 - 2476 (1991)および米国特許第6,180,377号；同第6,054,297号；同第5,997,867号；および第5,866,692号に開示されている。

#### 【0083】

本発明にはまた、mu - 抗TES7のような、本発明の抗体の単鎖可変領域断片(「scFv」)も含まれる。単鎖可変領域断片は、短い連結ペプチドを使用することにより軽鎖および/または重鎖の可変領域を連結させることによって作製される。Birdら(1988) Science 242: 423 - 426には、1つの可変領域のカルボキシ末端と他の可変領域のアミノ末端との間のおよそ3.5nmを架橋結合する連結ペプチドの例が記載されている。他の配列のリンカーが設計されており、使用されている。Birdら(1988)。リンカーは、同様に、薬物の結合、または固体支持物への結合のようなさらなる機能のために修飾することができる。この単鎖変異体は組み換えによるか、または合成的によるかのいずれかによって産生することができる。scFvの合成による産生のためには、自動化合成装置を使用することができる。scFvの組換えによる産生については、scFvをコードするポリヌクレオチドが含まれている適切なプラスミドを、真核生物(例えば、酵母、植物、昆虫、または哺乳動物)、または原核生物(例えば、大腸菌(E. coli))のいずれかである適切な宿主細胞に導入することができる。目的のscFvをコードするポリヌクレオチドは、日常的に行われている操作(例えば、ポリヌクレオチドのライゲーション)によって作製することができる。得られるscFvは、当該分野で公知の標準的なタンパク質精製技術を使用して単離することができる。

#### 【0084】

本発明には、TES7アゴニスト、アンタゴニスト、調節因子、ならびに抗体への修飾が含まれる。これには、高い活性を有しているか、または低い活性を有している、それらの特性および変異体に有意な影響を及ぼさない機能的に等価な抗体およびポリペプチドが含まれる。ポリペプチドの修飾は、当該分野で日常的に実施されているものであり、本明細書中で詳細に記載される必要はない。修飾されたポリペプチドの例としては、アミノ酸残基の保存的置換、機能的活性が非常に悪化するほど変化させることはないアミノ酸の1つ以上の欠失または付加、または化学的アナログの使用を有しているポリペプチドが挙げられる。互いに保存的に置換することができるアミノ酸残基としては以下が挙げられるが、これらに限定されない：グリシン/アラニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グルタミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；セリン/スレオニン；リジン/アルギニン；およびフェニルアラニン/チロシン。これらのポリペプチドにはまた、グリコシル化されたポリペプチドおよび非グリコシル化ポリペプチド、ならびに、他の翻訳後修飾(例えば、様々な異なる糖でグリコシル化、アセチル化、およびリン酸反応)を有しているポリペプチドも含まれる。好ましくは、アミノ酸置換は保存的であり、すなわち、置換されたアミノ酸は、もとのアミノ酸と類似する化学的特性を有する。そのような保存

的置換は当該分野で公知であり、例は、上記に提供されている。アミノ酸の修飾は、1つ以上のアミノ酸の変化または修飾から、可変領域のような1つの領域の完全な再設計まで範囲にわたり得る。可変領域の中での変化によっては、結合親和力および/または特異性を変化させることができる。他の修飾方法として、当該分野で公知であるカップリング技術の使用が含まれる。これには、酵素的手段、酸化的置換およびキレート化が含まれるが、これらに限定されない。修飾は、例えば、ラジオイムノアッセイのための放射性部分の結合のような、免疫アッセイのための標識の結合のために使用することができる。修飾されたポリペプチドは、当該分野で確立されている手順を使用して作製され、当該分野で公知の標準的なアッセイを使用してスクリーニングすることができる。

**【0085】**

本発明にはまた、本発明のポリペプチドおよび抗体に由来する1つ以上の断片または領域が含まれている融合タンパク質が含まれる。1つの実施形態においては、可変軽鎖領域の少なくとも10個の連続しているアミノ酸と可変重鎖領域の少なくとも10個のアミノ酸が含まれている融合ポリペプチドが提供される。別の実施形態においては、融合ポリペプチドには、異種免疫グロブリンの定常領域が含まれる。別の実施形態においては、融合ポリペプチドには、本明細書中に記載されるように、ATCCに寄託されたハイブリドーマから産生された抗体の軽鎖可変領域と重鎖可変領域が含まれる。本発明の目的のためには、抗体融合タンパク質には、1つ以上の抗TES7ポリペプチドと、天然の分子には結合していない別のアミノ酸配列（例えば、異種配列または別の領域に由来する相同配列）が含まれる。

**【0086】**

抗TES7ポリペプチドは、ならびに、他のTES7アゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子は、当該分野で公知の方法によって、例えば合成により、または組み換えによって作製することができる。TES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子を生産するための1つの方法には、ポリペプチドの化学合成、それに続く、自然な立体構造、すなわち、正確なジスルフィド結合を得るために適している酸化条件下での処理が含まれる。これは、当業者に周知の方法論を使用して行うことができる（Kelly, R. F. & Winkler, M. E., Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow, J. K. 編, Plenum Press, N. Y., 第12巻, pp. 1 - 19 (1990); Stewart, J. M. & Young, J. D. Solid Phase Peptide Synthesis Pierce Chemical Co. Rockford, Ill. (1984)を参照のこと; 米国特許第4, 105, 603号; 同第3, 972, 859号; 同第3, 842, 067号; および同第3, 862, 925号もまた参照のこと）。

**【0087】**

本発明のポリペプチドは、固相ペプチド合成を使用して調製することが便利であり得る（Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1964); Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5132 (1985)）。

**【0088】**

なお別の選択肢では、完全なヒト抗体は、特異的なヒト免疫グロブリンタンパク質を発現するように操作された市販されているマウスを使用することによって得ることができる。さらに望ましい（例えば完全なヒト抗体）またはさらに強い免疫応答を生じるように設計されているトランスジェニック動物もまた、ヒト抗体またはヒト抗体の作製に使用される場合がある。そのような技術の例は、Abgenix, Inc. (Fremont, Calif.) によるXenomouse (商標)、そしてMedarex, Inc. (Princeton, N. J.) によるHuMAb-Mouse (登録商標) およびTC Mouse (商標) である。

**【0089】**

1つの選択肢においては、抗体は、当該分野で公知である任意の方法を使用して、組み

10

20

30

40

50

換えによって作製され、そして発現させることができる。抗体は、最初に、宿主動物から作られた抗体を単離し、遺伝子配列を得て、その遺伝子配列を使用して抗体を宿主細胞（例えば、CHO細胞）の中で組み換えによって発現させることによって、組み換えによって作製することができる。使用することができる別の方法は、植物（例えば、タバコ）またはトランスジェニック乳の中で抗体配列を発現させることである。植物または乳の中で組み換えによって抗体を発現させるための方法は開示されている。例えば、Peetersら（2001）Vaccine 19:2756；Lonberg, N. およびD. H uszar（1995）Int. Rev. Immunol 13:65；およびPoll ockら（1999）J Immunol Methods 231:147を参照のこと。抗体の誘導体（例えば、ヒト化抗体、単鎖抗体など）を作製するための方法は、当該分野で公知である。別の選択肢では、抗体は、ファージディスプレイ技術により組み換えによって作製することができる。例えば、米国特許第5,565,332号；同第5,580,717号；同第5,733,743号；同第6,265,150号；およびWinterら、Annu. Rev. Immunol. 12:433-455（1994）を参照のこと。

10

## 【0090】

目的の抗体またはタンパク質は、当業者に周知であるエドマン分解によって配列決定することができる。質量スペクトル分析またはエドマン分解によって得られたペプチドの情報は、目的のタンパク質のクローニングに使用されるプローブまたはプライマーを設計するために使用することができる。

20

## 【0091】

目的のタンパク質をクローニングする別の方法は、目的の抗体またはタンパク質を発現している細胞に、精製されたTES7またはその一部を使用する「パニング」によるものである。「パニング」手順は、目的の抗体またはタンパク質を発現する組織または細胞からcDNAライブラリを得、第2の細胞タイプにcDNAを過剰発現させ、TES7に対する特異的結合について第2の細胞タイプのトランスフェクトされた細胞をスクリーニングすることによって行われる。「パニング」による細胞表面のタンパク質をコードする哺乳動物の遺伝子のクローニングに使用される方法の詳細な記載は、当該分野で見ることができる。例えば、Aruffo, A. and Seed, B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8573-8577（1987）、およびStephan, J.ら、Endocrinology 140:5841-5854（1999）を参照のこと。

30

## 【0092】

抗TES7抗体、ならびに、他のTES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子をコードするcDNAは、当該分野で標準的である方法に従って特定の細胞型に由来するmRNAを逆転写させることによって得ることができる。具体的には、mRNAは、Sambrookら（前述）に示されている手順に従って様々な溶解酵素または化学溶液を使用して単離することができ、また、製造業者（例えば、Qiagen, Invitrogen, Promega）による添付の説明書に従って市販されている核酸結合樹脂によって抽出することもできる。その後、合成されたcDNAは発現ベクターに導入され、第2のタイプの細胞の中で目的の抗体またはタンパク質が産生される。発現ベクターは、エピソームまたは染色体DNAに組み込まれた部分のいずれかとして宿主細胞中で複製することができなければならないことが意味される。適切な発現ベクターとしては、プラスミド、ウィルスベクター（アデノウィルス、アデノ随伴ウィルス、レトロウィルスを含む）、およびコスミドが挙げられるが、これらに限定されない。

40

## 【0093】

目的のポリヌクレオチドが含まれているベクターは、多数の適切な手段（エレクトロポレーション、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、または他の物質を使用するトランスフェクション；マイクロプロジェクティルボンバードメント；リポフェクション；および感染（例えばベクターがワクシニアウィルスの

50

ような感染性因子である場合) )のうちの任意のものによって宿主細胞に導入することができる。ベクターまたはポリヌクレオチドの導入方法の選択は、多くの場合は、宿主細胞の性質に依存するであろう。

【0094】

目的の抗体、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする遺伝子を単離する目的のためには、異種DNAを過剰発現することができる任意の宿主細胞を使用することができる。哺乳動物の宿主細胞の限定ではない例としては、COS、HeLa、およびCHO細胞が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、宿主細胞は、対応する目的の内因性の抗体またはタンパク質が宿主細胞中に存在するのであれば、その内因性の抗体またはタンパク質のcDNAよりも約5倍以上、より好ましくは10倍以上、さらにより好ましくは20倍以上高いレベルでcDNAを発現する。TES7に対する特異的結合についての宿主細胞のスクリーニングは、免疫アッセイまたはFACSによって行われる。目的の抗体またはタンパク質を過剰発現している細胞を同定することができる。

10

【0095】

もとのTES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、または調節因子と比較して、得られるタンパク質のアミノ酸配列の中に付加、欠失、または変化をコードする、変異体TES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子を生産するために現在使用することができる様々な技術もまた、利用できる。

【0096】

本発明には、本発明の抗体のアミノ酸配列が含まれているポリペプチドが含まれる。本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の手順によって作製することができる。ポリペプチドは、抗体のタンパク質分解または他の分解による分解によって、上記に記載されたような組換え方法(すなわち、1つのポリペプチドまたは融合ポリペプチド)、または化学合成によって、産生することができる。抗体のポリペプチド、特に、約50アミノ酸までの短いポリペプチドは、化学合成によって作製されることが便利である。化学合成の方法は当該分野で公知であり、市販されているものを利用することができる。例えば、抗TES7ポリペプチドは、固相法を使用する自動ポリペプチド合成装置によって生産させることができる。

20

【0097】

IV. ポリペプチドとモノクローナル抗体のスクリーニングのための方法

30

TES7に結合するポリペプチドおよびモノクローナル抗体をスクリーニングするためには、いくつかの方法を使用することができる。「結合」が、生物学的または免疫学的に関連のある結合、すなわち、それについての免疫グロブリン分子がコードされており、ポリペプチドがそれに対して特異的である、特定の抗原に特異的である結合をいうことが理解される。これは、非特異的標的に対して、免疫グロブリンが極めて高濃度で使用された場合に生じ得る非特異的結合は言うものではない。1つの実施形態においては、モノクローナル抗体は、標準的なスクリーニング技術を使用して、TES7に対する結合についてスクリーニングされる。この様式で、抗TES7モノクローナル抗体を得た。ブタベスト条約に従い、抗TES7モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、2005年9月22日に、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)、10801 University Blvd., Manassas VA 20110-2209に、PTA#7093の特許管理番号として寄託した。

40

【0098】

TES7に結合するモノクローナル抗体は、ガン組織およびガンではない細胞への結合についてスクリーニングされる。1つの実施形態においては、TES7に結合し、ヒトのガン細胞または組織に対して交差反応性もあるが、正常な細胞または組織に対しては同じ程度の反応性を示さないモノクローナル抗体が選択される。スクリーニングに使用することができる1つの方法は、免疫組織化学(IHC)である。標準的な免疫組織化学技術は当該分野の平均的な当業者には公知である。例えば、Animal Cell Culture Methods(J.P. Mather and D. Barnes編、Aca

50

demic Press、第57巻、第18章および第19章、314-350ページ、1998年)を参照のこと。生物学的試料(例えば、組織)は、生検、死体解剖、または検視により得ることができる。TES7がガン細胞上にのみ存在しているかどうかを確かめるためには、抗TES7抗体を使用して、ガンを有している個体に由来する組織上にTES7が存在することを検出することができ、他方では、ガンに罹患している個体に由来する他のガンではない組織、またはガンに罹患していない個体に由来する組織が対照として使用される。組織は、凍結中の損傷を防ぐ固体または半固体の物質(例えば、アガロースゲルまたはOCT)に包埋することができ、その後、染色のために切片とすることができる。様々な臓器および異なる段階のガンを使用して、モノクローナル抗体をスクリーニングすることができる。スクリーニングの目的に使用することができる組織の例としては、卵巣、乳房、肺、前立腺、大腸、腎臓、皮膚、甲状腺、脳、心臓、肝臓、胃、神経、血管、骨、上部消化管、および膵臓が挙げられるが、これらに限定されない。スクリーニングの目的に使用することができる様々なガンのタイプの例としては、ガン腫、腺ガン、肉腫、腺肉腫、リンパ腫、および白血病が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0099】

なお別の選択肢では、以下のようなガン細胞株: HMEC (BioWhittaker CC-2251)、HUVEC (初代内皮細胞)、BT-474 (ATCC#HTB-20)、MCF7 (ATCC#HTB22)、MDA-MB-175-VII (ATCC#HB-25)、MDA-MB-361 (ATCC#HB-27)、SKBR3 (ATCC#HTB-30)、9979 (Ravenによって独自開発された肺ガン細胞株)、A549 (ATCC#CCL-185)、CA130 (Ravenによって独自開発された肺小細胞性肺ガン細胞株)、Calu-3 (ATCC#HTB-55)、SKMES-1 (ATCC#HTB-58)、ES-2 (ATCC#CRL-1978)、SKOV3 (ATCC#HTB-77)、9926 (Ravenによって独自開発された膵臓腺ガン細胞株)、AsPC-1 (ATCC#CRL-1682)、HPAF-II (ATCC#CRL-1997)、Hs700T (ATCC#HTB-174)、Colo205 (ATCC#CCL-222)、HT-29 (ATCC#HTB-38)、SW480 (ATCC#CCL-228)、SW948 (ATCC#CCL-237)、293 (ATCC#CRL-1573)、786-O (ATCC#CRL-1932)、A498 (ATCC#HTB-44)、Caki-2 (ATCC#HTB-47)、COS-7 (ATCC#CRL-1651)、RL-65 (ATCC#CRL-10345)、SV-T2 (ATCC#CCL-163.1)、22RV1 (ATCC#CRL-2505)、DU145 (ATCC#HTB-81)、LNCaP (ATCC#CRL-1740)、PC-3 (ATCC#CRL-1435)、TDH (Ravenによって独自開発された前立腺ガン細胞株)、Hs746T (ATCC#HTB-135)、NCI-N87 (ATCC#CRL-5822)、ならびに、それらのそれぞれの組織に由来する正常細胞を、ガン組織に特異的なモノクローナル抗体についてスクリーニングするために使用することができる。腎臓、卵巣、乳房、肺、前立腺、大腸、腎臓、皮膚、甲状腺、大動脈平滑筋、および内皮細胞を含むがこれらに限定されない様々な臓器に由来する正常な組織から導かれた初代細胞、または継代数の低い細胞の細胞培養を、ネガティブ対照として使用することができる。ガン細胞またはガンではない細胞がスライドガラスまたはカバーガラス上で、またはプラスチック表面上で増殖させることができ、国際公開WO01/43869に記載されているように、Cell Array (商標)の中で調製し、組織について上記に記載されたように、IHCを使用して抗体の結合についてスクリーニングすることができる。あるいは、細胞を非タンパク質分解手段を使用して増殖表面から除去し、これを回転させてペレット状にすることができ、これは、その後、上記に記載されたように、IHC分析用の組織として包埋され、処置される。細胞は、免疫不全動物に接種して、腫瘍を増殖させることができ、その後、この腫瘍を回収して包埋し、IHC分析のための組織供給源として使用することができる。別の選択肢では、単細胞を、初代抗体、蛍光分子に連結させられた二次「レポータ」抗体とともにインキュベートすることによってスクリーニングし、次

10

20

30

40

50

に、蛍光活性化細胞選別器 ( F A C S ) を使用して分析することができる。

【 0 1 0 0 】

組織切片に対する抗体の結合を検出するためには、いくつかの様々な検出システムを利用することができる。典型的には、免疫組織化学法には、組織に対して一次抗体を結合させることが含まれ、その後、一次抗体に由来する種に対して反応性のある二次抗体が生産され、検出マーカーに ( 例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、H R P、またはジアミノベンジジン、D A B ) 結合させられる。使用することができる1つの別の方法は、ポリクロノナル鏡像相補抗体またはpolyMICAである。D . C . M a n g h a m a n d P . G . I s a a c s o n ( H i s t o p a t h o l o g y ( 1 9 9 9 ) 3 5 ( 2 ) : 1 2 9 - 3 3 ) によって記載されているPolyMICA (ポリクロノナル鏡像的相補抗体 ( p o l y c l o n a l M i r r o r I m a g e C o m p l e m e n t a r y A n t i b o d y ) ) 技術は、一次抗体 ( 例えば、抗T E S 7 抗体 ) の正常な組織およびガン組織に対する結合を試験するために使用することができる。いくつかの種類のpolyMICA ( 商標 ) 検出キットが、Binding Site Limited ( P . O . B o x 4 0 7 3 B i r m i n g h a m B 2 9 6 A T E n g l a n d ) から市販されている。製品番号HK004 . Dは、D A B色素原を使用するpolyMICA ( 商標 ) 検出キットである。製品番号HK004 . Aは、A E C色素原を使用するpolyMICA ( 商標 ) 検出キットである。あるいは、一次抗体を検出マーカーで直接標識することもできる。

10

【 0 1 0 1 】

適切な抗体を選択するためのIHCスクリーニングの最初の工程は、1つ以上の免疫原 ( 例えば、細胞または組織試料 ) に対する、マウスの中で惹起させられた一次抗体 ( 例えば、抗T E S 7 抗体 ) の結合である。1つの実施形態においては、組織試料は、様々な臓器に由来する凍結組織の切片である。細胞または組織の試料はガン性である場合も、また、非ガン性である場合もある。

20

【 0 1 0 2 】

凍結組織は、当業者には公知である多数の方法のうちのいずれかによって、調製し、固定して、または固定することなく切片化し、そしてIHCを行うことができる。例えば、Stephanら、Dev . B i o l . 2 1 2 : 2 6 4 - 2 7 7 ( 1 9 9 9 )、およびStephanらEndocrinology、1 4 0 : 5 8 4 1 - 5 4 ( 1 9 9 9 ) を参照のこと。

30

【 0 1 0 3 】

V . 抗T E S 7 抗体の特性決定する方法

抗T E S 7 抗体を特性決定するためには、いくつかの方法を使用することができる。1つの方法は、それが結合するエピトープを同定することである。エピトープマッピングが様々な販売元、例えば、Pepsican Systems ( E d e l h e r t w e g 1 5 , 8 2 1 9 P H L e l y s t a d , T h e N e t h e r l a n d s ) から市販されている。エピトープマッピングを使用して、抗T E S 7 抗体が結合する配列を決定することができる。エピトープは、直鎖状のエピトープ ( すなわち、アミノ酸の1つのストレッチの中に含まれる ) である場合も、また、1つのストレッチに必ずしも含まれないアミノ酸の3次元的相互作用によって形成される立体構造的エピトープである場合もある。様々な長さのペプチド ( 例えば、少なくとも4 ~ 6のアミノ酸長 ) を単離または合成して ( 例えば、組み換えによって )、抗T E S 7 抗体の結合アッセイに使用することができる。抗T E S 7 抗体が結合するエピトープは、細胞外配列に由来する重複しているペプチドを使用し、そして抗T E S 7 抗体による結合を決定する系統的なスクリーニングによって決定することができる。

40

【 0 1 0 4 】

抗T E S 7 抗体を特性決定するために使用することができるなお別の方法は、同じ抗原 ( すなわち、T E S 7 ) に結合することが公知である他の抗体を用いて、抗T E S 7 抗体が他の抗体と同じエピトープに結合するかどうかを決定する競合アッセイを使用すること

50

である。市販されている T E S 7 に対する抗体の例をそのまま利用できる場合があり、また、本明細書中に教示される結合アッセイを使用して同定される場合もある。競合アッセイは、当業者に周知であり、そのような手順および具体的なデータは、実施例でさらに詳しく説明される。抗 T E S 7 抗体は、それらが結合する組織、ガンのタイプまたは腫瘍のタイプによってさらに特性決定することができる。

#### 【 0 1 0 5 】

抗 T E S 7 抗体を特性決定する別の方法は、抗体が結合する抗原による方法である。抗 T E S 7 抗体を、様々なヒトガンに由来する細胞溶解物とともにウェスタンブロットにおいて使用した。当業者に公知であるように、ウェスタンブロットティングには、細胞溶解物および/または細胞画分を変性または非変性ゲル上で泳動させる工程、タンパク質をニトロセルロース紙に移動させる工程、その後、抗体（例えば、抗 T E S 7 抗体）でブロットをプローブして、この抗体がどのタンパク質に結合するかを見る工程が含まれ得る。この手順は、実施例 4 でさらに詳しく記載される。T E S 7 は、大腸、乳房、卵巣、膵臓、および肺を含むがこれらに限定されない様々なヒトのガン組織に関係している。T E S 7 についてのさらなる記述は、実施例 5 および 6 に提供される。

#### 【 0 1 0 6 】

##### V I . 抗 T E S 7 抗体と T E S 7 調節因子を使用してガンを診断する方法

本明細書中に開示される方法によって作製された T E S 7 に対するモノクローナル抗体を使用して、卵巣、乳房、肺、前立腺、大腸、腎臓、膵臓、皮膚、甲状腺、脳、心臓、肝臓、胃、神経、血管、骨、および上部消化管を含むがこれらに限定されない様々な組織中のガン細胞の存在、またはガン細胞が存在しないことを、診断目的で同定することができる。また、本明細書中に開示される方法によって作製された T E S 7 に対するモノクローナル抗体を使用し、充実性腫瘍からそれらが放出された後に血液中を循環しているガン細胞の存在、もしくはガン細胞が存在しないこと、またはそのレベルも、同定することができる。このように循環している抗原は、本明細書中に教示された方法に従って検出される能力を保持している、完全な T E S 7 抗原またはその断片であり得る。このような検出は、当該分野で一般に使用される標準的な方法を使用して、F A C S 分析によって行うことができる。

#### 【 0 1 0 7 】

これらの使用には、T E S 7 に特異的に結合する抗体と T E S 7 との間で複合体を形成させる工程が含まれ得る。そのような抗体の例としては、寄託番号 P T A # 7 0 9 3 として A T C C に寄託されたハイブリドーマによって生産される抗 T E S 7 モノクローナル抗体が挙げられるが、これに限定されない。このような複合体の形成は、インビトロでも、またインビボでも可能である。理論には束縛されないが、モノクローナル抗体抗 T E S 7 は、T E S 7 の細胞外ドメインを介して T E S 7 に結合することができ、その結果、インターナライゼーションすることができると考えられる。

#### 【 0 1 0 8 】

本発明の診断法の好ましい 1 つの実施形態においては、抗体は検出可能な標識を有する。使用することができる標識の例としては、フルオロイソチオシアネートまたはフィコエリトリンのような放射性薬剤または蛍光色素分子が挙げられる。

#### 【 0 1 0 9 】

診断および治療の目的のために商業ベースで利用されている他の公知の抗体と同じように、本発明の標的抗原は、正常な組織の中で広く発現されている。これはまた、いくつかの腫瘍中ではアップレギュレートされる。したがって、診断薬または治療薬のために使用される場合には、本発明の抗体の特定の投薬量と送達経路は、現在手がけている特定の腫瘍または病状、ならびに、処置されている特定の個体に合わせられるであろう。

#### 【 0 1 1 0 】

診断のために抗体を使用する 1 つの方法は、放射性または放射線不透過性薬剤に抗体を連結させ、この抗体を個体に投与し、X 線または他の画像処理機械を使用して、抗原をガン細胞表面で発現している標識された抗体の局在化を可視化することによる、インビボで

10

20

30

40

50

の腫瘍の画像処理である。抗体は、生理学的条件下で結合を促進する濃度で投与される。

【0111】

TES7の検出のためのインビトロ技術は、当該分野で日常的に行われており、これには、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫沈降、免疫蛍光、酵素免疫学的検定(EIA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、およびウェスタンブロット分析が含まれる。

【0112】

本発明の複数の態様においては、腫瘍または新生物の放射線画像化方法、または放射線標識された抗体を用いた処理方法の有効性を測定する方法には、本発明の実施にしたがって、放射線標識された腫瘍特異的抗体を個体に投与する工程が含まれる。放射線標識された抗体は、放射線標識(好ましくは、テクネチウム-99m、インジウム-111、ヨウ素-131、レニウム-186、レニウム-188、サマリウム-153、ルテチウム-177、銅-64、スカンジウム-47、イットリウム-90からなる群から選択される放射線標識)が含まれているモノクローナルまたはポリクローナル抗体であり得る。抗体の免疫反応性を損なわず、インビボで壊れない治療用の放射性核種(例えば、ヨウ素-131、レニウム-188、ホルミウム-166、サマリウム-153、およびスカンジウム-47)で標識されたモノクローナル抗体が特に好ましい。当業者は、他の放射性同位体も公知であり、これらが特定の用途に適している場合があることを理解するであろう。放射線画像化方法は、単一光子放射型コンピュータ断層撮影(Single Photon Emission Computer Tomography)(SPECT)、ポジッション放出断層撮影(Position Emission Tomography)(PET)、コンピュータ断層撮影(Computer Tomography)(CT)、または磁気共鳴画像処理(MRI)を使用することができる。放射線免疫画像化法によって決定された転移の位置のさらなる解剖学的定義を可能にする関連画像処理もまた想定される。

【0113】

他の方法では、ガン細胞が取り出され、組織は、当該分野で周知の方法(例えば、凍結化合物の包埋、固定するかもしくは固定しない凍結と切片化;抗原の回収および対比染色法の様々な方法を用いるかもしくは用いない固定およびパラフィン包埋)によって免疫組織化学分析のために準備される。モノクローナル抗体もまた、異なる病期にあるガン細胞を同定するために使用される場合がある。これらの抗体はまた、どの個体の腫瘍がそれらの表面上で所定のレベルで抗原を発現しているのか、したがって、どの個体の腫瘍が上記抗原に特異的な抗体を使用する免疫療法についての候補であるかを決定するために使用される場合もある。この抗体は、TES7を発現する腎臓、卵巣、前立腺、および膵臓の原発性および転移性ガンの両方、ならびに、肺の原発性ガンを認識することができる。本明細書中で使用される場合は、検出には、質的および/または定量的検出が含まれる場合があり、そして/または、ガン細胞中のTES7の高い発現レベルについて、正常細胞に対して測定したレベルを比較することが含まれる場合もある。

【0114】

本発明によってはまた、TES7に結合する任意の抗体を使用して個体内のガン(例えば、前立腺、肺、または腎臓のガンであるが、これらに限定されない)の診断を補助する方法、およびTES7発現のレベルを決定するために使用することができる任意の別の方法も提供される。本明細書中で使用される場合は、「診断を補助する」ための方法は、これらの方法が、ガンの分類または性質に関する臨床的な決定を行うために役に立つことを意味し、そしてこれは、最終的な診断に対して決定的である場合も、またそうではない場合もある。したがって、ガンの診断を補助する方法には、個体に由来する生物学的試料中のTES7のレベルを検出する工程、および/または試料中のTES7発現のレベルを決定する工程が含まれることができる。抗原またはその一部を認識する抗体はまた、体液(血液、唾液、尿、肺液、または腹水液を含むがこれらに限定されない)中の生存しているかもしくは瀕死のガン細胞から放出されたかまたは分泌された抗原を検出するための診断用

10

20

30

40

50

の免疫アッセイを開発するために使用される場合もある。

【0115】

目的の特定の腫瘍中の細胞が全てT E S 7を発現するわけではなく、他の組織の中のガン細胞がT E S 7を発現する場合もあり、したがって、個体は、ガン細胞上のT E S 7の存在、またはガン細胞が存在しないことについてスクリーニングされて、個体における免疫療法の有効性について決定されなければならない。本明細書中に開示される方法によって作製された抗T E S 7抗体は、ガンと診断された個体が、T E S 7に特異的な抗体を使用する免疫療法についての候補と考えられ得るかどうかが決定するために使用することができる。1つの実施形態においては、T E S 7に特異的な抗体を使用して、ガン性の腫瘍または生検試料をT E S 7の発現について試験することができる。T E S 7を発現するガン細胞を有している個体は、T E S 7に特異的な抗体を使用する免疫療法についての適切な候補である。抗T E S 7抗体での染色もまた、ガン組織を正常組織と区別するために使用することができる。

10

【0116】

診断目的のために抗T E S 7抗体を使用する方法は、抗ガン処置の任意の形式（例えば、化学療法または放射線治療の前後の両方で、所定の処置、ガン個体の予後、腫瘍のサブタイプまたは転移性疾患の起源、および疾患の進行または処置への反応に対し、どの腫瘍が最も反応しやすいのかを決定するために有用である。

【0117】

本発明の組成物はまた、他の異常（非ガン性）細胞に関して上記に一般的に記載された方法を私用して、ガン以外の病状を診断するためにも適している。本発明の方法での使用に適している病状としては、個体の炎症反応または自己免疫応答に関係している疾患または障害が挙げられるが、これらに限定されない。上記に記載された方法は、個体の炎症反応または自己免疫応答を調節するために使用することができる。本発明の組成物および方法を使用する診断および/または処置の対象であり得る、炎症障害および自己免疫障害が原因で生じる疾患ならびに病状としては、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎、脳卒中、他の大脳外傷、炎症性腸疾患（潰瘍性結腸炎およびクローン病を含む）、重症筋無力症、狼瘡、関節リウマチ、喘息、急性若年型糖尿病、A I D Sによる認知症、アテローム性動脈硬化症、腎炎、網膜炎、アトピー性皮膚炎、乾癬、心筋虚血および白血球媒介性急性肺傷害が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0118】

本発明の抗体および他の治療薬が診断的および/または治療的に使用されるなお別の適応症としては、臓器または移植片の拒絶のリスクがある個体への投与が挙げられる。近年、組織および臓器（例えば、皮膚、腎臓、肝臓、心臓、肺、膵臓、および骨髄）を移植するための外科技術の効率性に著しい改善が見られている。特に重要な問題は、おそらく、移植された同種移植片または臓器に対して、レシピエントが免疫トレランスを誘導するための十分な薬剤が不足していることである。同種異系細胞または臓器が宿主に移植される（すなわち、提供者および被提供者が同種であるが異なる個体である）場合、宿主の免疫系は、移植物の外部抗原に対し免疫応答（宿主対移植片病）を開始し、移植された組織の破壊を導くと考えられる。

40

【0119】

抗T E S 7抗体についての本出願の範囲に記載された使用にはまた、本明細書中に記載される他のT E S 7アゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子の使用も含まれる。そのような実施形態においては、T E S 7アゴニスト、アンタゴニスト、または他の非抗体調節因子で、記載される工程においてT E S 7抗体が置き換えられ、当業者の能力の範囲内である変更は、置き換えられたT E S 7調節組成物にその方法を合わせるように行われる。

【0120】

本明細書中に開示される方法によって作製されたT E S 7に対するモノクローナル抗体は、様々な組織の中にヒトのガン幹細胞が存在すること、またはそれが存在しないことを

50

同定するために使用することができる。ガン幹細胞(CSC)は、腫瘍の増殖および転移において役割を担っているとの仮説が立てられている。この仮説に基づくと、CSCは、際限なく自己再生することができ、そして複製能力が比較的限られているより成熟した腫瘍細胞(単数または複数)(adult tumor cell)へと成長することができる個々の腫瘍の中の細胞の小さな明白なサブセットを提供する。これらのガン幹細胞は、化学療法薬、放射線、または他の毒性の条件に対してより耐性である可能性があり、したがって、臨床治療後も生き残り、後に二次性の腫瘍、転移へと成長するか、あるいは再発の原因となる可能性があるとの仮説が立てられている。CSCは「正常な」組織幹細胞から、またはより分化した組織前駆細胞からのいずれかから生じ得ると示唆されている。この仮説については、造血幹細胞および前駆細胞、ならびに造血器腫瘍についてサポートする強いデータがあるが、充実性腫瘍およびそれらのそれぞれのCSCについてはほとんど知られていない。

10

#### 【0121】

ヒトのガン幹細胞は、いくつかの決定的な特徴を有する。このような特徴は、米国仮特許出願番号60/972,613に記載されており、これは引用により本明細書中に組み入れられる。ガン幹細胞上の細胞表面標的に対するモノクローナル抗体を使用して、様々な組織の中にガン幹細胞が存在すること、または存在しないことを同定することができる。様々なガン幹細胞上でのTES7の発現の例は、以下の実施例8に示される。本明細書中に開示される方法によって作製されたTES7に対するモノクローナル抗体はまた、試料または組織の中、あるいは、充実性腫瘍からそれらが放出された後の循環の中に、ガン幹細胞が存在することもしくは存在しないことを同定するために、あるいは、ガン幹細胞のレベルを同定するために使用される場合もある。そのような循環している抗原は、完全なTES7抗原であり得、また、本明細書中に教示される方法にしたがって検出される能力を保持しているその断片である場合もある。そのような検出は、当該分野で一般的に使用されている標準的な方法を使用して、FACS分析によって行うことができる。別の実施形態においては、そのような検出は、当該分野で一般的に使用されている標準的な方法を使用して、組織試料の免疫組織化学分析によって行われる場合もある。

20

#### 【0122】

これらの使用には、ガン幹細胞上のTES7に特異的に結合する抗体とTES7との間での複合体の形成を含めることができる。そのような抗体の例としては、寄託番号PTA#7093としてATCCに寄託されたハイブリドーマによって生産される抗TES7モノクローナル抗体が挙げられるが、これに限定されない。このような複合体の形成は、インビトロでも、またインビボでも可能である。

30

#### 【0123】

抗TES7抗体についてそれらの使用が記載された本出願に記載された使用にはまた、ガン幹細胞の同定および処置に使用される、本明細書中に記載される他のTES7アゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子の使用も含まれる。そのような実施形態においては、抗TES7抗体、ならびに、他のTES7アゴニスト、アンタゴニスト、および調節因子が、記載される方法と同様の方法を使用してガン幹細胞の同定、診断、または治療の処置に使用され、そして、当業者の能力の範囲内である変更は、ガン幹細胞の同定/診断または処置のためにその方法を合わせるように行われる。

40

#### 【0124】

##### VII. 本発明の組成物

本発明にはまた薬学的組成物を含む組成物も含まれ、これには、抗TES7抗体、抗TES7抗体に由来するポリペプチド、抗TES7抗体をコードする配列が含まれているポリヌクレオチド、および本明細書中に記載される他の薬剤が含まれる。本明細書中で使用される場合は、組成物にはさらに、TES7、TES7アゴニスト、アンタゴニスト、調節因子に結合する、1つ以上の抗体、ポリペプチド、および/またはタンパク質、ならびに/あるいは、TES7に結合する1つ以上の抗体、ポリペプチド、およびタンパク質をコードする配列が含まれている1つ以上のポリヌクレオチドが含まれる。

50

## 【0125】

本発明によってはさらに、任意のTES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、または調節因子と、特定のTES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、または調節因子の意図される機能（単数または複数）をサポートするさらに別の化学的構造の結合体が提供される。これらの結合体には、マクロ分子（例えば、本明細書中で議論される診断手順、スクリーニング手順、または精製手順において使用される任意の不溶性の固体の支持マトリックス）に共有結合させられたTES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、または調節因子が含まれる。適切なマトリックス材料としては、化学的に不活性であり、高い多孔率を有しており、そしてペプチドリガンドと共有結合を形成することができる多数の官能基を有している任意の物質が挙げられる。マトリックス材料とマトリックス-リガンド結合体の調製のための手順の例は、Deanら（編）Affinity Chromatography: A Practical Approach, IRL Press (1985); Lowe, 「An Introduction to Affinity Chromatography」, Workら（編）Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 第7巻, Part II, North-Holland (1979); Porathら、「Biospecific Affinity Chromatography」, Neurathら（編）, The Proteins, 第3版, 第1巻, pp. 95-178 (1975); および、Schott, Affinity Chromatography, Dekker (1984)に記載されている。

10

20

## 【0126】

TES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、または調節因子の、本明細書中で議論される診断手順において使用される任意のレポーター部分との結合体もまた、本明細書中で提供される。

## 【0127】

本発明のTES7ペプチドアゴニスト、アンタゴニスト、または調節因子、ポリペプチド、およびタンパク質（抗TES7抗体を含む）は、以下の基準の任意のもの（1つ以上）によってさらに同定され、特性決定される：（a）TES7（前立腺、肺、または腎臓のガン細胞を含むがこれらに限定されないガン細胞上のTES7を含む）に結合する能力；（b）公知の抗TES7抗体のTES7に対する優先的結合を競合的に阻害する能力（もともとの抗体が優先的に結合するエピトープと同じTES7エピトープに優先的に結合する能力を含む能力）；（c）インビトロまたはインビボの生存している細胞の表面上に露出しているTES7の一部に結合する能力；（d）生存しているガン細胞（例えば、前立腺、肺、または腎臓のガン細胞を含むが、これらに限定されない）の表面上に露出されるTES7の一部に結合する能力；（e）TES7を発現するガン細胞（例えば、前立腺、肺、または腎臓のガン細胞であるが、これらに限定されない）に化学療法薬または検出マーカーを送達する能力；（f）TES7を発現しているガン細胞（例えば、前立腺ガン細胞であるが、これに限定されない）に治療薬を送達する能力。

30

## 【0128】

いくつかの実施形態においては、本発明の抗体は、ATCC番号PTA#7093の寄託番号をもつ宿主細胞またはその子孫によって産生される抗体である。本発明にはまた、これらの寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体および等価抗体またはポリペプチド断片（例えば、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv、Fcなど）、キメラ抗体、単鎖（ScFv）、それらの突然変異体、抗体部分が含まれている融合タンパク質、ヒト化抗体、および必要とされる特異性の抗原（TES7）認識部位を含む任意の上記抗体または等価抗体の任意の他の修飾された立体構造の様々な処方物も含まれる。本発明によってはまた、抗TES7ファミリーメンバーの生物学的特徴の1つ以上を示すヒト抗体も提供される。抗TES7ファミリー（ヒト化抗体およびヒト抗体を含む）の等価抗体、ポリペプチド断片、および任意のこれらの断片を含むポリペプチドが同定され、上記に記載される5つの基準のうちの任意のもの（1つ以上）によって特性決定される。

40

50

## 【 0 1 2 9 】

抗 T E S 7 抗体のマウス配列と例示的なヒト化可変ドメインの配列が、図 1 1 および 1 2 に提供される（それぞれ、軽鎖および重鎖）。これらの配列は、限定ではなく説明のために提供され、様々な配列、さらには提供される配列の断片や変異体も本発明の範囲に含まれる。いくつかの実施形態においては、本発明のキメラ抗 T E S 7 抗体には、図 1 1 および 1 2 のマウス可変ドメイン配列が含まれる。

## 【 0 1 3 0 】

いくつかの実施形態においては、T E S 7 に結合する本発明の抗体、ポリペプチドおよびタンパク質は、本明細書中で具体的に記載される抗 T E S 7 抗体の T E S 7 に対する優先的結合を競合的に阻害する抗体、ポリペプチドおよびタンパク質である。いくつかの実施形態においては、抗体、ポリペプチドおよびタンパク質は、抗体 m u - 抗 T E S 7 が優先的に結合するエピトープと同じである T E S 7 上のエピトープに優先的に結合する。

## 【 0 1 3 1 】

従って、本発明により、以下のいずれか（または以下のうちの任意のものが含まれている薬学的組成物を含む組成物）が提供される：（ a ）上記に記載された管理番号をもつ宿主細胞またはその子孫によって産生される抗体；（ b ）そのような抗体のヒト化形態；（ c ）そのような抗体の軽鎖および / または重鎖の可変領域の 1 つ以上が含まれている抗体；（ d ）そのような抗体の重鎖および軽鎖の可変領域に相同であるかまたはそれに由来する可変領域と、ヒト抗体の重鎖および軽鎖の定常領域に相同であるかまたはそれに由来する定常領域が含まれているキメラ抗体；（ e ）そのような抗体の軽鎖および / または重鎖の C D R の 1 つ以上（少なくとも 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、または 6 個）が含まれている抗体；（ f ）そのような抗体の重鎖および / または軽鎖が含まれている抗体；（ g ）そのような抗体と等価であるヒト抗体。抗体のヒト化形態は、そのもとの抗体または上記で特定された寄託番号をもつ宿主細胞によって産生される抗体と同じ C D R を有する場合があります、また、有さない場合もある。C D R 領域の決定は当業者に周知である。いくつかの実施形態においては、本発明により、上記で特定された、寄託されたハイブリドーマ（またはいくつかの実施形態においては、これらの抗体のうち 1 つの抗体の 6 個の C D R 全てに実質的に相同であるか、またはこれらの抗体のうち 1 つに由来する）の 1 つによって産生される抗体の少なくとも 1 つの C D R、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、少なくとも 5 つの C D R に実質的に相同である、少なくとも 1 つの C D R を含む抗体、あるいは、上記で特定された寄託番号をもつ宿主細胞によって産生される抗体が提供される。他の実施形態には、本明細書中で特定された寄託されているハイブリドーマから産生される抗体の C D R、またはそのような抗体に由来する C D R を少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、または 6 個に実質的に相同である少なくとも 2 個、3 個、4 個、5 個、または 6 個の C D R（単数または複数）を有する抗体が含まれる。本発明の目的のためには、結合特異性および / または全体的な活性（これは、化学療法薬をガン細胞へまたはガン細胞に送達して、ガン細胞の成長および / または増殖を低下させ、ガン細胞においてアポトーシスによる細胞死を導き、転移の進行を遅延させる、および / または対症的に処置することに関する活性であり得る）は、一般的には維持されるが、寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体に比べ、活性の範囲は（多かれ少なかれ）様々であり得る。本発明によってはまた、これらの抗体のうち任意のものを作製する方法も提供される。抗体を作製する方法は当該分野で公知であり、本明細書中に記載されている。

## 【 0 1 3 2 】

本発明によってはまた、本発明の抗体のアミノ酸配列が含まれているポリペプチドも提供される。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドには、抗体の軽鎖および / または重鎖の可変領域のうち 1 つ以上が含まれる。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドには、抗体の軽鎖および / または重鎖の C D R を 1 つ以上が含まれる。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドには、抗体の軽鎖および / または重鎖の C D R のうちの 3 個が含まれる。いくつかの実施形態においては、ポリペプチドには、以下のいずれか

を有している抗体のアミノ酸配列が含まれる：もとの抗体の配列の少なくとも5個の連続するアミノ酸、少なくとも8個の連続するアミノ酸、少なくとも約10個の連続するアミノ酸、少なくとも約15個の連続するアミノ酸、少なくとも約20個の連続するアミノ酸、少なくとも約25個の連続するアミノ酸、少なくとも約30個の連続するアミノ酸。この場合、アミノ酸のうちの少なくとも3個は、抗体の可変領域に由来する。1つの実施形態においては、可変領域はもとの抗体の軽鎖に由来する。別の実施形態においては、可変領域は抗体の重鎖に由来する。別の実施形態においては、5個（またはそれ以上）の連続するアミノ酸は、抗体の相補性決定領域（CDR）に由来する。

【0133】

本発明のいくつかの実施形態においては、本発明のTES7、TES7の一部、抗TES7抗体、または他のTES7に結合するポリペプチドを発現する本発明の細胞は、それらのインビボでのTES7の生物学的活性を調節するために、個体に直接投与される。

10

【0134】

VIII. 治療目的のためにTES7調節因子および抗TES7抗体を使用する方法

TES7に対するモノクローナル抗体は、ガンまたは他の疾患を有している個体において治療目的で使用することができる。抗TES7抗体を用いる治療には、上記に記載されたように、インビトロおよびインビボの両方での複合体の形成を含めることができる。1つの実施形態においては、モノクローナル抗体抗TES7は、ガン細胞に結合して、ガン細胞の増殖を低下させることができる。抗体は、生理学的（例えば、インビボ）条件下で結合を促進する濃度で投与されることが理解される。別の実施形態においては、TES7モノクローナル抗体は、大腸、肺、乳房、前立腺、卵巣、脾臓、腎臓のような様々な組織のガン細胞、および肉腫のような他のタイプのガンに対する免疫療法のために使用することができる。別の実施形態においては、モノクローナル抗体抗TES7は単独でガン細胞に結合し、ガン細胞の細胞分裂を減少させることができる。別の実施形態においては、モノクローナル抗体抗TES7は、ガン細胞に結合し、転移の進行を遅らせることができる。なお別の実施形態においては、ガンを有している個体には抗TES7抗体を用いる対症療法が行われる。ガン個体の対症療法には、疾患の有害な症状、またはガンの進行には直接影響を及ぼさない疾患のために施された他の処置が原因で生じる医原性症状の処置または低減が含まれる。これには、痛み、栄養的補給、性的問題、心理学的な悩み、抑圧、疲労、精神医学的疾患、吐き気、嘔吐などを緩和するための処置が含まれる。

20

30

【0135】

そのような状況においては、抗TES7抗体は、ADCCを強める薬剤のような、個体自身の免疫応答を強化するかまたは導く薬剤とともに投与される場合がある。

【0136】

なお別の実施形態においては、抗TES7抗体は、放射性分子、毒素（例えば、カリケアマイシン）、化学療法用の分子、化学療法用の化合物を含むリボソームまたは他の小胞と結合させられるかまたは会合させられ、そして、抗体によって認識される抗原を含むガン細胞に対してこれらの化合物を標的化させ、それにより、ガン細胞または異常細胞を排除するために、そのような処置が必要な個体に投与される。いずれの特定の理論にも束縛されないが、抗TES7抗体は、TES7をその表面上にもつ細胞によってインターナライゼーションされ、それにより、結合させられた成分が細胞へと送達され、治療的効果が誘導される。なお別の実施形態においては、抗体を、転移の進行を遅らせるために、抗原を発現しているガンの外科切除時に補助治療として使用することができる。抗体はまた、抗原を発現している腫瘍を有している個体に手術をする前に、腫瘍の大きさを小さくし、それによって、手術を可能にするかまたは容易にするために、手術中に組織を残しておくために、および/または外観の損傷を小さくするために、投与することもできる（ネオアジュバント治療）。

40

【0137】

細胞周期投与（cell cycle dosing）が本発明の実施において意図される。そのような実施形態においては、化学療法薬は、腫瘍または他の標的である異常細

50

胞の細胞周期を、予め決定された段階に同調させるために使用される。その後、本発明の抗 T E S 7 抗体の投与（単独で、または別の治療用部分とともに）が行われる。別の実施形態においては、抗 T E S 7 抗体は細胞周期を同調させ、そして2回目の処置を行うまでの細胞分裂を減らすために使用される；2回目の処置は、抗 T E S 7 抗体および/またはさらに別の治療用部分の投与であり得る。

【 0 1 3 8 】

化学療法薬としては、放射性分子、毒素（ガン細胞の生存に有害である任意の薬剤を含む細胞毒素または細胞毒性薬とも呼ばれる）、薬剤、および化学療法用の化合物が含まれているリポソームまたはその他の小胞が挙げられる。適切な化学療法薬の例としては以下が挙げられるが、これらに限定されない：1 - デヒドロテストステロン、5 - フルオロウ  
10  
ラシルデカルバジン、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、アクチノマイシン D、  
アドリアマイシン、アルデスロイキン、アルキル化剤、アロプリノールナトリウム、アル  
トレタミン、アミフォスチン、アナストロゾール、アントラマイシン（A M C）、抗分  
裂剤、c i s - ジクロロジアミン白金（I I）（D D P）シスプラチン）、ジアミノジク  
ロロ白金、アントラサイクリン、抗生物質、代謝拮抗剤、アスパラギナーゼ、生 B C G（  
小胞内）、リン酸ベタメタゾンナトリウムおよび酢酸ベタメタゾン、ピカルタミド、硫酸  
ブレオマイシン、ブスルファン、カルシウムロイコボリン、カリケアマイシン、カペシタ  
ピン、カルボプラチン、ロムスチン（C C N U）、カルムスチン（B S N U）、クロラム  
ブシル、シスプラチン、クラドリピン、コルヒチン、共役エストロゲン、シクロホスファ  
ミド、シクロフォスファミド（C y c l o t h o s p h a m i d e）、シタラピン、シタ  
20  
ラピン、サイトカラシン B、サイトキサシン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダクチノ  
マイシン（以前は、アクチノマイシン）、ダウノルピシン H C L、クエン酸ダウノルピシ  
ン、デニロイキンジフチトクス、デクスラゾキサシン、ジプロモマンニトール、ジヒドロキ  
シアントラシンジオン、ドセタキセル、メシル酸ドラセトロン、ドキシソルピシン H C L、  
ドロナビノール、大腸菌（E . c o l i）L - アスパラギナーゼ、エメチン、エポエチン  
アルファ、エルビニア L - アスパラギナーゼ、エステル化エストロゲン、エストラジオール、  
リン酸エストラムスチンナトリウム、臭化エチジウム、エチニルエストラジオール、  
エチドロネート、エトポシド・シトロロラン因子、リン酸エトポシド、フィルグラスチム  
、フロクスウリジン、フルコナゾール、リン酸フルダラピン、フルオロウラシル、フルタ  
30  
ミド、フォリン酸、ゲムシタピン H C L、糖質コルチコイド、酢酸ゴセレリン、グラミシ  
ジン D、グラニセトロン H C L、ヒドロキシ尿素、イダルピシン H C L、イホスファミド  
、インターフェロン - 2 b、イリノテカン H C L、レトロゾール、ロイコボリンカルシ  
ウム、酢酸ロイプロリド、レバミゾール H C L、リドカイン、ロムスチン、メイタンシノ  
イド、メクロレタミン H C L、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、メ  
ルファラン H C L、メルカプチプリン（m e r c a p t i p u r i n e）、メスナ、メト  
トレキセート、メチルテストステロン、ミトラマイシン、マイトマイシン C、ミトタン、  
ミトキサントロン、ニルタミド、酢酸オクトレオチド、オンダンセトロン H C L、パクリ  
40  
タキセル、パミドロン酸二ナトリウム、ペントスタチン、ピロカルピン H C L、プリマイ  
シン、カルムスチンインプラントを伴うポリフェプロサン 2 0、ポルフィマーナトリウム  
、プロカイン、プロカルバジン H C L、プロプラノロール、リツキシマブ、サルグラモス  
チム、ストレプトゾトシン、タモキシフェン、タキソール、テニポシド、テノポシド、テ  
ストラクトン、テトラカイン、チオテパクロラムブシル、チオグアニン、チオテパ、トポ  
テカン H C L、クエン酸トレミフェン、トラスツズマブ、トレチノイン、バルルピシン、  
硫酸ピンブラスチン、硫酸ピンクリスチン、および酒石酸ピノレルピン。

【 0 1 3 9 】

好ましい1つの実施形態においては、細胞毒素は、分裂している細胞、または迅速に分  
裂している細胞において特に有効であり、その結果、分裂していない細胞は、毒性効果に  
よっては比較的損傷を受けない。

【 0 1 4 0 】

本発明の抗体は、それらが結合する異常細胞またはガン細胞の中にインターライゼー

10

20

30

40

50

ションさせることができ、したがって、例えば、それらの有害な活性を生じさせるためにはインターナライゼーションされる必要がある毒素を細胞の中へ送達する、治療用途に特に有用である。このような毒素の例としては、サポリン、カリケアマイシン、オーリスタチン、およびメイトンシノイドが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0141】

本発明の抗体またはポリペプチドは、共有的または非共有的に、直接的または間接的に、放射性分子、毒素、または他の治療薬、または治療薬を含むリポソームまたは他の小胞に会合させることができる（結合または連結を含む）。抗体がその標的である T E S 7 に結合できる限りは、抗体は、放射性分子、毒素、または化学療法分子と、抗体に沿った任意の位置で連結させることができる。

10

#### 【0142】

毒素または化学療法薬は、同時に（投与の前、後、または投与の間に）投与される場合があり、また、適切なモノクローナル抗体に対して、直接的または間接的のいずれかで（例えば、リンカー基を介するか、または代わりに、米国特許第 5,552,391 号に記載される基盤分子のような適切な付着部位をもつ連結分子を介して）結合させられる（例えば、共有結合させられる）場合もある。本発明の毒素および化学療法薬は、当該分野で公知の方法を使用して特定の標的タンパク質に直接結合させることができる。例えば、薬剤と抗体が互いに反応することができる置換基を有している場合は、両者の間での直接の反応が可能である。例えば、一方にある求核基（例えば、アミノ基またはスルフヒドリル基）を、他方にあるカルボニルを含む基（例えば、無水物または酸ハロゲン化物）または良好な脱離基（例えば、ハロゲン化物）を含むアルキル基と反応させることができる。

20

#### 【0143】

さらに抗体またはポリペプチドは、マイクロキャリアを介して化学療法薬に連結させることもできる。マイクロキャリアは、生体分解性または非生体分解性の粒子を意味し、これは水に不溶であり、約 150、120、または 100 nm 未満の大きさを有し、より一般的には、約 50 ~ 60  $\mu$ m 未満、好ましくは約 10、5、2.5、2、または 1.5  $\mu$ m 未満の大きさを有する。マイクロキャリアには、約 1  $\mu$ m 未満、好ましくは約 500 nm 未満の大きさを有するマイクロキャリアである「ナノキャリア」が含まれる。このような粒子は当該分野で公知である。固相マイクロキャリアは、生体適合性のある天然のポリマー、合成ポリマーまたは合成コポリマーから形成される粒子であり得る。これには、アガロースまたは架橋されたアガロース、ならびに、当該分野で公知の他の生体分解性材料から形成されるマイクロキャリアが含まれる場合も、また含まれない場合もある。生体分解性である固相マイクロキャリアは、哺乳動物の生理学的条件下で分解されるポリマー（例えば、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）およびそのコポリマー）または浸食性のある（例えば、ポリ（オルトエステル、例えば、3,9-ジエチリデン-2,4,8,10-テトラオキサスピロ[5.5]ウンデカン（DETOSU）、またはセバシン酸のポリ（無水物）、例えば、ポリ（無水物））から形成させることができる。マイクロキャリアは、液相マイクロキャリアが生体分解性である限りは、液相（例えば、油または脂質ベースのもの）であってもよく、例えば、リポソーム、抗原をもたない *iscoms*（コレステロール、およびリン脂質、アジュバント作用のあるサポニンの安定な複合体である免疫刺激複合体（*Immunostimulating complexes*））、あるいは、例えば、水中油型エマルジョンまたは油中水型エマルジョンの中で見られる液滴またはミセルであり得る。生体分解性液相マイクロキャリアには、通常、生体分解性の油が配合され、スクアレンおよび植物性油脂を含む複数のそのような生体分解性の油は当該分野で公知である。マイクロキャリアは、通常は、球状であるが、球状以外のマイクロキャリアも許容される（例えば、エリプソイド（*ellipsoid*）、桿状など）。それらの（水に関して）不溶性の性質が原因で、マイクロキャリアは、水および水をベースとする（水性）溶液から濾過することができる。

30

40

#### 【0144】

本発明の抗体またはポリペプチドの結合体には、毒性物質または化学療法薬に結合させ

50

ることができる基と抗体に結合することができる基の両方を含む二官能性リンカーが含まれる場合がある。リンカーは、結合能力に妨害しないように、薬剤から抗体を間隔を隔てるためのスペーサーとして機能することができる。リンカーは切断できる場合も、また切断できない場合もある。リンカーはまた、薬剤または抗体上の置換基の化学反応性を高め、これによって結合効率を高めるようにも作用することができる。さらに化学反応性の増大により、そうでなければ不可能である、薬剤または薬剤上の官能基の使用を促進する場合もある。二官能性リンカーは、当該分野の公知の手段によって抗体に結合させることができる。例えば、活性なエステル部分（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）が含まれているリンカーを、抗体中のリジン残基に対するアミド結合を介する結合のために使用することができる。別の例においては、求核アミンまたはヒドラジン残基を含むリンカーを、抗体炭水化物残基の糖分解性の酸化によって生じるアルデヒド基に結合させることができる。このような直接的な結合方法に加えて、リンカーは、アミノデキストランなどの媒介担体によって抗体に間接的に結合させることができる。これらの実施形態においては、修飾された連結は、リジン、炭水化物、または媒介担体を介する。1つの実施形態においては、リンカーは、タンパク質中の遊離のチオール残基に対して部位選択的に結合させられる。タンパク質上のチオール基に対する選択的結合に適している部分は、当該分野で周知である。例として、二硫化物、 $\alpha$ -ハロカルボニル、および $\beta$ -ハロカルボキシル化合物、およびマレイミドが挙げられる。求核性アミン官能基が $\beta$ -ハロカルボニルまたはカルボキシル基と同じ分子の中に存在する場合は、アミンの分子内アルキル化を介して環化が起こる可能性がある。この問題を避けるための方法は当業者に周知であり、例えば、望ましくない環化が立体化学的に好ましくないようにする柔軟性のない（例えば、アリール基またはtrans-アルケン基）によって、アミンと $\beta$ -ハロ官能基が間隔を隔てられて配置されている分子を調製することによる。例えば、二硫化物部分を介するメイタンシノイドと抗体との結合体の調製に関する米国特許第6,441,163号を参照のこと。

#### 【0145】

抗体-薬物結合体の調製に使用することのできる切断可能なリンカーの1つは、cis-アコニット酸をベースとする酸に不安定であるリンカーであり、これは、様々な細胞内区画（例えば受容体によって媒介されるエンドサイトシスの際に見られるエンドソーム、およびリソソーム）の酸性環境を活用する。例えば、ダウノルピシンとマクロ分子担体との結合体の調製については、Shenら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 102:1048-1054 (1981)；ダウノルピシンの抗黒色腫抗体に対する結合体の調製については、Yangら、J. Natl. Canc. Inst. 80:1154-1159 (1988)；ダウノルピシンと抗T細胞抗体との結合体を調製するために、酸に不安定なリンカーを同じ方法で使用することについては、Dilimanら、Cancer Res. 48:6097-6102 (1988)；ペプチド・スペーサー・アームを介する抗体へのダウノルピシンの連結については、Touretら、Proc. Natl. Acad. Sci. 79:626-629 (1982)を参照のこと。

#### 【0146】

本発明の抗体（またはポリペプチド）は、当該分野で公知である任意の方法によって放射性分子に結合（連結）させられる場合がある。放射標識抗体の方法についての議論は、「Cancer Therapy with Monoclonal Antibodies」、D.M. Goldenberg編（CRC Press, Boca Raton, 1995）を参照のこと。

#### 【0147】

あるいは、米国特許第4,676,980号にSegalによって記載されているように、抗体を第二抗体に結合させて、抗体ヘテロ結合体を形成させることができる。架橋抗体の形成により、例えば、特定のタイプの細胞（例えば、TES7を発現しているガン細胞または異常細胞）に対する免疫系を標的とすることができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 8 】

本発明によってはまた、抗 T E S 7 抗体を使用するか、または、化学療法薬と一緒に T E S 7 に結合するか、もしくは化学療法薬に連結させられた T E S 7 に結合する他の実施形態を使用して、ガン（前立腺、肺、または腎臓ガンを含むが、これらに限定されない）を有している個体内での転移の進行を遅らせる方法も提供される。いくつかの実施形態においては、抗体は非ヒト抗 T E S 7 抗体のヒト化形態またはキメラ形態である。

## 【 0 1 4 9 】

なおに別の実施形態においては、抗体を、転移の進行を遅らせるために、抗原を発現しているガンの外科切除時に補助治療として使用することができる。また抗体または化学療法薬と結合した抗体は、抗原を発現している腫瘍を有している個体を手術をする前に、腫瘍の大きさを小さくし、これによって、手術を可能または容易にするために、手術中に組織を残しておくために、および/または外観の損傷を小さくする減らすために、投与することもできる（ネオアジュバント治療）。

## 【 0 1 5 0 】

なお別の実施形態においては、本明細書中に記載される T E S 7 結合実施形態の内の任意のものは、T E S 7 を発現しているガン細胞に結合して、T E S 7 を発現しているガン細胞に対し活発な免疫応答を誘導することができる。いくつかの場合には、活発な免疫応答によって、ガン細胞の死を引き起こすことができる（例えば、ガン細胞に対する抗体の結合がアポトーシスによる細胞死を誘導する）か、またはガン細胞の増殖を阻害することができる（例えば、細胞周期の進行を阻止する）。他の場合には、本明細書中に記載される新規の抗体のいずれかが、ガン細胞に結合することができ、抗体依存性細胞傷害性（A D C C）によって、抗 T E S 7 が結合するガン細胞を排除することができる。従って、本発明により、本明細書中に記載される組成物のうちの任意のものを投与する工程を含む、免疫応答を刺激する方法が提供される。

## 【 0 1 5 1 】

いくつかの場合には、抗体の結合によってはまた、細胞性免疫応答と体液性免疫応答の両方を活性化することができ、そして、さらに多くのナチュラルキラー細胞を動員することができるか、またはサイトカイン（例えば、I L - 2、I F N - 、I L - 1 2、T N F - 、T N F - など）の産生を増大させることができる。これらは、ガン細胞を破壊するために、個体の免疫系をさらに活性化させる。なお別の実施形態においては、抗 T E S 7 はガン細胞に結合することができ、マクロファージまたは他の食作用性細胞によってガン細胞をオプソニン化することができる。

## 【 0 1 5 2 】

抗 T E S 7 抗体またはその断片の様々な処方物を、投与のために使用することができる。いくつかの実施形態においては、抗 T E S 7 抗体またはその断片を手際よく投与することができる。薬理的有効成分に加えて、本発明の組成物には、当該分野で周知であり、薬理的に有効な物質の投与を容易にするか、または作用部位への送達のために薬学的に使用することができる調製物になるように活性のある化合物を加工することを容易にする比較的不活性である物質である賦形剤および助剤を含む適切な薬学的に許容される担体を含めることができる。例えば、賦形剤は、剤形または一貫性をもたらすことができる、また、希釈剤として作用することもできる。適切な賦形剤としては、安定化剤、湿潤剤および乳化剤、モル浸透圧濃度を変化させるための塩類、カプセル化剤、緩衝剤、および皮膚浸透促進剤が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【 0 1 5 3 】

非経口投与に適している処方物としては、水溶性の形態（例えば、水溶性の塩）の活性のある化合物の水溶液が挙げられる。加えて、油性の注射用懸濁液に適しているような活性のある化合物の懸濁液を投与することができる。適切な親油性溶媒または媒体としては、脂肪油（例えば、ゴマ油、または合成脂肪酸エステル、例えば、オレイン酸エチルまたはトリグリセリド）が挙げられる。水性の注射用懸濁液には、懸濁液の粘性を高める物質を含めることができ、これには、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソル

10

20

30

40

50

ピトール、および/またはデキストランが含まれる。状況に応じて、懸濁液には安定剤も含めることができる。リポソームもまた、細胞に送達される薬剤をカプセル化するために使用することができる。

【0154】

本発明にしたがう全身投与のための薬学的処方物は、経腸、非経口的、または局所的投与のために処方することができる。実際、これらの3つのタイプの処方物は全て、有効成分の全身投与を行うために同時に使用される場合がある。賦形剤、ならびに、非経口的および非経口的ではない薬物送達のための処方物は、Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第20版, Mack Publishing (2000)の中で説明されている。

10

【0155】

経口投与に適している処方物としては、硬質または軟質ゼラチンカプセル、丸剤、錠剤（コーティングされた錠剤を含む）、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ、またはこれらの吸入式および放出制御式の形態が挙げられる。

【0156】

一般的には、これらの薬剤は、注射（例えば、腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内など）による投与のために処方されるが、他の投与形式（例えば、経口、粘膜など）も使用することができる。したがって、抗TES7抗体は、好ましくは、薬学的に許容される媒体（例えば、食塩水、リンガー溶液、ブドウ糖溶液など）と組み合わせられる。

【0157】

特定の投与レジメ（すなわち、用量、タイミング、および回数）は、特定の個体およびその個体の病歴に応じて様々であろう。一般的には、少なくとも約100ug/kg体重、より好ましくは少なくとも約250ug/kg体重、なおさらに好ましくは少なくとも約750ug/kg体重、なおさらに好ましくは少なくとも約3mg/kg体重、なおさらに好ましくは少なくとも約5mg/kg体重、なおさらに好ましくは少なくとも約10mg/kg体重の用量が投与される。

20

【0158】

投与量の決定には、一般的には、半減期などの経験的な検討が行われるであろう。ヒト免疫系に適合する抗体（例えば、ヒト化抗体または完全なヒト抗体）を使用して、抗体の半減期を延長し、抗体が宿主の免疫系によって攻撃されることを防ぐことができる。治療過程の間を通じて、投与頻度を決定し、調節することができ、回数は、ガン細胞数の減少、ガン細胞減少の維持、ガン細胞の増殖の低下、または転移進行の遅延に基づく。あるいは、抗TES7抗体を持続して連続的に放出させる処方物が適切である場合がある。徐放を実現するための様々な処方物および装置は、当該分野で公知である。

30

【0159】

1つの実施形態においては、抗TES7抗体の投与量は、既に一回以上の投与（単数または複数）を受けた個体から経験的に決定することができる。個体には、漸増量の抗TES7抗体が投与される。抗TES7抗体の有効性を評価するためには、特定のガンの病状のマーカーが追跡される。これらには、触診または視覚的観察による腫瘍サイズの直接測定、X線または他の画像処理技術による腫瘍の大きさの間接的測定；腫瘍の直接生検および腫瘍試料の顕微鏡試験によって評価される改善；間接的腫瘍マーカー（例えば、前立腺ガンについてはPSA）の測定、痛みまたは麻痺の減少；腫瘍に関連する言語、視覚、呼吸または他の能力障害の改善；食欲の増進；あるいは、認可されている試験によって測定される生活の質の向上または生存期間の延長が含まれる。投与量は、個体、ガンのタイプ、ガンの病期に応じて、ガンが個体の他の場所への転移を開始したかどうか、ならびに、使用された過去の処置および同時に使用されている処置に応じて様々であることは、当業者には明らかであろう。

40

【0160】

他の処方物としては、リポソームのような担体を含むがこれに限定されない、当該分野で公知の適切な送達方式が挙げられる。例えば、Mahatoら(1997) Pharm

50

Res. 14: 853 - 859を参照のこと。リポソーム調製物としては、サイトフェクチン(cytofectins)、多重膜小胞および単層の小胞が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0161】

いくつかの実施形態においては、2つ以上の抗体が存在する場合がある。抗体は、モノクローナルである場合も、また、ポリクローナルである場合もある。このような組成物には、ガン腫、腺ガン、肉腫、または腺肉腫に対して反応性がある、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個の異なる抗体を含めることができる。抗TES7抗体は、臓器(卵巣、乳房、肺、前立腺、大腸、腎臓、皮膚、甲状腺、骨、上部消化管、および膵臓を含むがこれらに限定されない)の中のガン腫、腺ガン、肉腫、または腺肉腫に対して反応性がある1つ以上の抗体と混合することができる。1つの実施形態においては、様々な抗TES7抗体の混合物が使用される。当該分野で頻繁に示されるように、抗体の混合物は、広範囲の個体群の処置に特に有用であり得る。

10

#### 【0162】

以下の実施例は、説明のために提供されるものであって、本発明を限定するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0163】

##### (実施例1)

免疫原としてのヒト胎児精巣細胞の調製

20

妊娠週令が10から18週の間であるヒト胎児の精巣を、Advanced Biosciences Research (Alameda County, Calif.)から入手した。精巣を調達し、氷水の上の組織培地の中に入れて状態で実験室に運んだ。到着後すぐに、精巣を洗浄培養液(F12/DME(1:1))に移した。精巣を、乾いた100mm培養皿の中で、外科用はさみを用いて1mm角に切り刻んだ。組織の断片を10mlの定義した無血清培地(精巣用培地と呼ぶ)にプレートした。

#### 【0164】

この実施例で使用した培地には、以下に示し最終濃度で以下の成分を含めた：F12/DME(1:1)、インシュリン $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、トランスフェリン $100\text{mg}/\text{ml}$ 、EGF $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、エタノールアミン $10^{-3}\text{M}$ 、ホスホエタノールアミン $10^{-3}\text{M}$ 、トリヨードサイロニン(T3) $10^{-9}\text{M}$ 、セレンウム $2.5\times 10^{-5}\text{M}$ 、ビタミンE $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、およびゲンタマイシン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 。様々な一般的に使用されている細胞培養培地を本発明の実施のために使用することができるが、本発明の好ましい実施形態では、無血清のものをベースとする細胞培養培地を使用する。

30

#### 【0165】

組織の断片を15mlの遠心管に移し、組織の断片を $1000\times g$ で5分間遠心分離した。組織の断片を精巣用培地、ペニシリン/ストレプトマイシン(1x)、およびコラゲナーゼ/ジスパーゼ(0.1%)の中に再度懸濁させ、そして4で一晩インキュベートした。翌日、酵素消化された組織断片を $1000\times g$ で5分間遠心分離して、精巣用培地で2回洗浄した。ペレットを10mlの精巣用培地の中に再度懸濁させ、フィブロネクチンを予めコーティングしておいた10cmのプレートの中で培養した。

40

#### 【0166】

細胞を回収するために、細胞の単層を、カルシウムおよびマグネシウムが含まれていないハンス生理的食塩水で1回すすぎ、ハンス生理的食塩水に溶かしたAccutase(eBioscience)とともに $37^{\circ}\text{C}$ で15分間インキュベートした。細胞を、軽くピペティングすることによって培養表面から剥がした。細胞懸濁液を $1000\times g$ で5分間の遠心分離にかけてペレットとした。上清を除去し、細胞を適切な非変性アジュバントを含む無血清培地の中に再度懸濁させた。

#### 【0167】

##### (実施例2)

50

## モノクローナル抗体の作製

非変性アジュバント (Ribbi, R730, Corixa, Hamilton MT) を、リン酸緩衝化生理食塩水の中で2mlになるように再水和した。その後、100 $\mu$ lのこの再水和させたアジュバントを、免疫化のために使用する実施例1による細胞ペレットの一部とゆっくりと混合させた。マウス1匹あたり、およそ10<sup>6</sup>個のヒト胎児の精巢細胞を、足蹠からBalb/cマウスに、およそ1週間に1回または2回で注射した。正確な免疫化のスケジュールは、以下のとおりである：0日目、免疫化とRibbi。3日目、免疫化とRibbi。7日目、免疫化とRibbi。24日目、Ribbiを除いた免疫化。29日目、Ribbiを除いた免疫化。32日目、Ribbiを除いた免疫化。36日目、Ribbiを除いた免疫化。44日目、Ribbiを除いた免疫化。51日目、Ribbiを除いた免疫化。69日目、力価試験のための採血。71日目、免疫化とRibbi。74日目、免疫化とRibbi。81日目、免疫化とRibbi。91日目、プレヒュージョンブースト (pre fusion boost) (Ribbiを用いない)。104日目、融合のために節を回収。

## 【0168】

69日目に、血液を1滴、免疫化したそれぞれの動物の尾から採血して、ヒト胎児の腎臓細胞に対する抗体の力価をFACS分析によって試験した。力価が少なくとも1:2000に達していれば、マウスをCO<sub>2</sub>の使用、続いて、頸椎の脱臼によって屠殺した。リンパ節をハイブリドーマの調製のために回収した。

## 【0169】

マウス由来のリンパ球を、35%ポリエチレングリコール4000を使用して、マウスの骨髄腫細胞株X63-Ag8.653と融合させた。融合の10日後に、ハイブリドーマの上清を、ヒト胎児腎臓細胞特異的モノクローナル抗体の存在について蛍光活性化細胞選別装置 (FACS) によってスクリーニングした。それぞれのハイブリドーマによる馴化培地を、ヒト胎児腎臓細胞のアリコートとともに30分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞試料を洗浄し、0.1mlの希釈液の中に再度懸濁させ、そして1 $\mu$ g/mlのヤギ抗マウスIgGのFITC結合F(ab')<sub>2</sub>断片とともに4で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、0.2mlのFACS希釈液の中に再度懸濁させ、そしてFACSscan細胞分析器 (Becton Dickinson; San Jose, Calif.) を使用して分析した。ハイブリドーマクローンを、さらなる増殖、クローニング、およびFACSによるヒト胎児腎臓細胞の表面へのそれらの結合に基づく特性決定のために選択した。Ag-TE57と命名された抗原とその抗原上のエピトープに結合する、mu-抗TE57と命名されたモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを選択した。

## 【0170】

## (実施例3)

## mu-抗TE57を含む抗TE57抗体の精製

ヒト胎児の精巢細胞 (例えば、SKMES-1、786-O、およびColo205細胞株であるが、これらに限定されない) を、10.0mMのEDTAの存在下で組織培養フラスコから剥がし、1400rpmで5分間遠心分離し、1%のBSAと2mMのEDTA (FACS希釈液) を含むPBSの中に再度懸濁させた。細胞数を数えて、10<sup>7</sup>細胞/mlになるように調整した。約0.1mlの細胞を100 $\mu$ lのFACS希釈液とともに、37で30分間インキュベートした。ヒト胎児の精巢細胞に結合するモノクローナル抗体を、プロテイン-Gアフィニティークロマトグラフィーを使用して組織培養上清から精製した。以下の材料を、抗体精製プロセスに使用した：ハイブリドーマ組織培養上清、Immunopure (G) IgG結合緩衝液 (Pierce #21011 Rockford, IL)、Immunopure IgG溶出緩衝液 (Pierce #21009)、濃HCl (pHの調整のため)、Corningの1リットルのPES (ポリエーテルスルホン)、0.22 $\mu$ mのフィルター (Corning #431098, Corning, N.Y.)、Amersham Pharmacia AKTA Ex

10

20

30

40

50

plorerシステム (Amersham Biosciences, Piscataway, N. J.)、Protein-G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences #17-0618-03)、3Mのチオシアン酸カリウム/50mMのTris (pH 7.8)およびPBS (リン酸緩衝化生理食塩水)からなる引き剥がし用緩衝液 (Stripping buffer)、3MのTris (pH 9.0)。

#### 【0171】

マウス抗huTES7抗体 (本明細書中では、mu-抗TES7と呼ぶ)を精製するために、上清の容積を測定し、等量の結合緩衝液を上清に添加した。混合物を室温になるように平衡化させた。上清を0.22µmのフィルターを通過させることによって明澄化させた。上清をAKTA Explorerシステム (Amersham Biosciences)を使用してプロテイン-Gセファロースカラム上にロードし、その後、5~10倍のカラム容量の結合緩衝液で洗浄した。モノクローナル抗体を溶出緩衝液で溶出させ、画分を回収した。画分を、空のチューブへの3MのTris (pH 9.0) (画分の1/60の容量)の添加を用いて溶出の際に中和した。モノクローナル抗体を含むピーク画分をプールした。プールした試料を予め湿らせておいたSlide-A-lyzer (slidealyzer)カセット (10,000のMWカットオフ; Pierce #66810)に注入し、1×PBSで4で透析した (少なくとも4時間で1回の交換で、3回緩衝液を交換した)。精製したモノクローナル抗体を濾過滅菌し (0.2µmのAcrodisc)、そして2~8で保存した。

#### 【0172】

精製した抗体の試料を、UV吸光度 ( $A_{280}$ )による濃度の決定とSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)のために採取した。SDS-PAGEは、分子量の分析、モノクローナル抗体の典型的なバンドパターンの同定、および純度の評価のために、非還元条件と還元条件の両方で行った。

#### 【0173】

ハイブリドーマ上清からのmu-抗TES7モノクローナル抗体を精製した後、これを、ヒト胎児の精巣細胞に対する結合について再度試験した。細胞試料は、上記に記載したように調製し、様々な濃度の精製抗体とともにインキュベートした。インキュベーションの後に、細胞を洗浄し、0.1mlの希釈液の中に再度懸濁させ、1µgのヤギ抗マウス免疫IgGのFITC結合F(ab')<sub>2</sub>断片とともに、4で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、0.5mlのFACS希釈液に再度懸濁させ、そしてFACSscan細胞選別装置 (Becton Dickinson, San Jose, Calif.)を使用し分析した。FACSscanヒストグラム上での右側へのシフトは、精製した抗体が依然としてヒト胎児の精巣細胞に結合していることを示していた。

#### 【0174】

##### (実施例4)

組み換え体4-Ig B7H3を用いたガン細胞株SW948TES7の発現の生化学的分析

結腸直腸腺ガンSW948 (ATCC# CCL-237)細胞を、175cm<sup>2</sup>の培養皿の上でコンフルエントになるまで増殖させた。コンフルエントな単層をハクス平衡塩溶液 (重炭酸ナトリウムまたはフェノールレッドを含まないHBSS+; 10mMのHEPES (pH 7.4)で平衡化した; Sigma Chemicals)で3回洗浄し、200µgのスルホ-NHS-LC-ビオチン (Pierce Endogen)で、室温で30分間ビオチニル化させた。その後、細胞を、0.1MのTris (pH 7.4) (Sigma Chemicals)を含むHBSS+で洗浄し、0.1MのTris (pH 7.4)を含むHBSS+の中で、室温で15分間インキュベートした。細胞を、最後にHBSS+で3回洗浄し、溶解緩衝液 (2%のTriton X-100、2mMのPMSF、0.1%のアジ化ナトリウムを含むHBSS+、および5mlの溶解緩衝液あたり1錠のEDTAを含まない完全なミニ-プロテアーゼ混合物 (Roche

Molecular Biochemicals))の中で、氷上で5分間のインキュベーションによって溶解させた。

【0175】

細胞を、溶解緩衝液中でこすり取り、溶解物を回収した。溶解物は、 $14,000 \times g$ で4で1時間遠心分離した。その後、明澄化させた溶解物を、 $5 \mu l$ のヒトIgG結合( $1 mg/ml$ )CNBr 4MBセファロースビーズ(Amersham Pharmacia)とともに、4で2時間、プレクリアした(pre-cleared)。ヒトIgGビーズを遠心分離して除去し、その後、プレクリアした溶解物を、CNBr 4MBセファロースビーズに結合させた( $1 mg/ml$ で結合させた)モノクローナル抗体mu-抗TES7とともに、4で2時間インキュベートした。mu-抗TES7ビーズを遠心分離し、2時間のインキュベーション後に取り出した。ヒトIgGとmu-抗TES7ビーズの両方を、別々に、 $1 ml$ の溶解緩衝液で3回洗浄し、その後、 $1 ml$ のHBSS+で3回洗浄した。洗浄したビーズを、 $30 \mu l$ のSDS-PAGE試料緩衝液の添加と、99で5分間沸騰させることによって溶出させた。

10

【0176】

その後、試料を、4~20%のNovex勾配ゲル(Invitrogen)上で分離させ、 $0.2 \mu m$ のニトロセルロース膜(Invitrogen)上に移動させ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合ストレプトアビジン(Pierce Endogen)によって視覚化させた。HRP結合ストレプトアビジンでの検出のために、ニトロセルロースを、最初にブロッキング緩衝液( $0.05\%$ のTween-20を含むTris緩衝化食塩水中の5%の無脂肪乳(TBST))で1時間ブロックした。HRP結合ストレプトアビジンを $1 \mu g/ml$ になるようにTBSTの中に希釈し、そしてニトロセルロースを室温で30分間露光させた。ニトロセルロースをTBST中で3回洗浄し、その後、ECL+(Amersham)で視覚化させた。結果は、およそ $110 kDa$ の大きさのmu-抗TES7ビーズを使用した特異的なバンドを示した(結果は示さない)。

20

【0177】

mu-抗TES7の抗原標的がB7H3であることを確認するために、 $100 ng$ の組み換え体4Ig-B7H3タンパク質(HISタグをつけたもの、および担体を含まないもの、R&D Systems)を、上記に記載したものと同様の標準的なプロトコールを利用して、還元条件下と非還元条件下で4~20%の勾配SDSゲル上での電気泳動によって分離させた。タンパク質を $0.2 \mu m$ のニトロセルロース膜(Invitrogen)に移動させ、そしてHBSS中の5%の無脂肪乳の中で、室温で2時間、または4で一晩ブロックした。ブロッキング緩衝液( $0.1\%$ のTween-20を含むHBSS中の5%の無脂肪乳)の中で $5 \mu g/ml$ の濃度で、一次抗体(mu-抗TES7)を、室温で少なくとも1時間かけて添加した。膜を、3回、それぞれ、HBSSの中で10分間洗浄し、 $0.1\%$ のTween-20と二次抗体(ロバ抗マウス、H+L、HRPを結合させたもの、Jackson Laboratories)を、室温で1時間かけて添加した。プロットを、HBSS、 $0.1\%$ のTween-20で3回洗浄し、その後、ECL+(Amersham)で視覚化させた。

30

【0178】

結果は、図3に示すように、mu-抗TES7が、ウェスタンブロット分析においては、非還元条件下でのみヒト組み換え体4Ig-B7H3を認識することを示していた。組み換え体4Ig-B7H3( $80 \sim 85 kDa$ )とピオチニル化された細胞溶解物からmu-抗TES7ビーズを使用して引っ張り出された(pulled down)B7H3(およそ $100$ から $110 kDa$ )の間での大きさの差は、おそらく、組み換え体4Ig-B7H3タンパク質はGly27で始まり、ピオチニル化された細胞溶解物に由来するB7H3タンパク質は全長の分子であることが原因である。

40

【0179】

(実施例5)

免疫組織化学分析の方法

50

抗TES7抗体(例えば、 $\mu$ -抗TES7)を、外科生検および/または解剖標本に由来する凍結させた正常なヒト組織および腫瘍組織試料についてスクリーニングした。凍結させた組織試料をOCT化合物の中に包埋し、ドライアイスを使用してイソペンタンの中で迅速に凍結させた。凍結切片を、8~10 $\mu$ mの厚さになるようにLeica 3050 CMミクロトームを用いて切断し、SuperFrost Plusスライド(VWR #48311-703)上に融解させて取り付け(thaw-mounted)、そして室温で2時間風乾させた。切片を、75%のアセトン/25%のエタノールで、室温で10分間固定し、室温で1~2時間風乾させた。固定した切片を使用するまで-80で保存した。

#### 【0180】

免疫組織化学分析のために、組織切片を取り出し、-80 から室温にまでゆっくりと平衡化させ、0.05%の、Tris緩衝化Tween(TB-T)の中で3回、それぞれ5分間洗浄し、そしてブロッキング緩衝液(TB-T、5%の正常なヤギ血清および100 $\mu$ g/mlのアビジン)の中で、室温で20分間ブロックした。その後、スライドを、ブロッキング緩衝液の中に希釈した $\mu$ -抗TES7抗体および対照であるモノクローナル抗体(1~5 $\mu$ g/ml)とともに、室温で60~90分間、または4で一晩インキュベートした。その後、切片をブロッキング緩衝液で3回洗浄し、続いて、TB-T中で過酸化水素(1~3%)ピオチン(d-ピオチン、30 $\mu$ g/ml)ブロックでのブロックを、室温で20分間行った。TB-Tでの3回目の洗浄を、その後、上記に記載したように3回行った。切片を、二次ピオチニル化ヤギ抗マウスIgG+IgM(H+L)抗体を含むブロッキング緩衝液の中で、室温で30分間インキュベートした。TB-Tを用いて、さらに3回、それぞれ5分間の洗浄を行った。その後、アビジンピオチンペルオキシダーゼ複合体の形成を、製造業者の説明書にしたがって、予め作られたABC溶液(Vectastain ABC Eliteキット)を添加することによって行わせ、スライドを室温で30分間インキュベートした。その後、スライドを、TB-Tで2回、その後、脱イオン水で1回、それぞれ5分間の洗浄を行った。DAB基質(10mlの10x DAB溶液、90mlのTris緩衝液(pH 7.6)、および100 $\mu$ lの3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を、室温で30分かけてスライドに添加して、色のついた沈殿を形成させ、結合した一次抗体を視覚化させた。その後、スライドを、ヘマトキシリンで対比染色した。

#### 【0181】

$\mu$ -抗TES7抗体の、様々な正常なヒト組織および腫瘍組織に対する結合を評価した。結果を、はっきりしない染色については「+/-」、弱いポジティブな染色については「1+」、中程度のポジティブな染色については「2+」、強いポジティブな染色については「3+」としてスコアした。焦点染色を示す。

#### 【0182】

凍結させた組織と正常組織を使用する別のIHCプロトコール(HRPポリマー結合ヤギ抗マウスIgG)もまた、 $\mu$ -抗TES7抗体を使用して行った。アッセイしたガン組織には、前立腺ガン、肺ガン、大腸ガン、および乳ガンを含めた。3つの症例を評価した前立腺を除いて、それぞれのタイプの腫瘍について4つの症例を、この別のIHCプロトコールを使用して評価した。正常組織のパネルには、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、大腸、および皮膚(それぞれの組織型から1つの標本)を含めた。アッセイはH&E染色を使用して定量して、正確な診断とよりよい形態が得られることを確実にした。ポジティブ対照である胎児の前立腺組織もまた使用し、対応するマウスIgG抗体をイソ型対照として使用した。 $\mu$ -抗TES7 IHCを、アセトンで固定した凍結したヒトの標本上で、室温で60分間インキュベートした1 $\mu$ g/mlの抗体濃度を使用して行った。HRPポリマーを結合させたヤギ抗マウスIgG(DAKO)を、連結させた二次抗体として使用した。DABは、抗体の結合を視覚化するために使用した色素原である。

#### 【0183】

便宜上、様々な供給源に由来する凍結させた外科的な正常組織を使用したいいくつかの実験の結果を合わせたもののまとめを、以下の表1に示す(従来のABCプロトコール)。

10

20

30

40

50

表2は、HRPポリマー結合IHC法を使用した、正常組織に対する $\mu$ -抗TES7の結合を示す。表3は、従来のABCプロトコルを使用した、腫瘍組織試料に対する $\mu$ -抗TES7抗体の結合を示す。表4は、HRPポリマー結合IHC法を使用した、腫瘍組織試料に対する $\mu$ -抗TES7抗体の結合を示す。表5には、前立腺組織および膵臓組織の拡大パネルに対する $\mu$ -抗TES7抗体の結合をまとめる。表6には、10~12週、および18~22週のヒト胎児の組織に対する $\mu$ -抗TES7抗体の結合をまとめる。簡単に説明すると、多くの胎児組織はTES7染色についてポジティブであり、特に、新しい臓器の形成および新しい骨の形成の領域においてポジティブであった。

【0184】

【表1】

表1. 標準的なHRP結合二次抗体およびABC増幅プロトコルを使用した、正常なヒト組織の中でのTES7の分布	
組織型	結果
皮膚	基底表皮上での+/-の染色
肺	ネガティブ
腎臓	ネガティブ
肝臓	ネガティブ
膵臓	ネガティブ
腎臓、胎児	尿細管の中での2+の染色、局所的
前立腺、胎児	2+の染色、局所的
子宮	いくつかの局所的な1+の平滑筋

【0185】

【表2】

表2. HRPポリマー結合IHC法を使用した、正常なヒト組織の中でのTES7の分布	
組織型	結果
膵臓	ネガティブ
肺	ネガティブ
肝臓	ネガティブ
腎臓	腎臓の中皮上での2+の細胞質染色
大腸	1+(25%)の膜染色
心臓	ネガティブ
皮膚	ネガティブ

【0186】

10

20

30

40

【表3】

表3. 標準的なABCプロトコールを使用した、ヒト腫瘍組織の中でのTES7の分布	
組織型	結果
肺	ネガティブ
腎臓	+/-
大腸	ネガティブ
前立腺	+ / ++
乳房	ネガティブ
卵巣	ネガティブ
膵臓	ネガティブ

10

【0187】

【表4 - 1】

表4. HRPポリマー結合IHC法を使用した、ヒトの腫瘍組織上でのTES7の分布	
腫瘍のタイプ	結果
肺(扁平上皮ガン)	腫瘍のうちの20%については1~3+の染色(細胞質および膜); 線維芽細胞と間質については3+の染色;炎症細胞については 2+の染色

20

【0188】

【表4 - 2】

肺(扁平上皮ガン)	腫瘍の90%(細胞質および膜)については3+の染色;内皮については1~2+の染色;線維芽細胞については3+の染色;間質については1+の染色;炎症性細胞については2+の染色;神経については1+の染色	
肺(腺ガン)	腫瘍の10%(細胞質)については3+の染色;内皮については2+の染色;線維芽細胞については1+の染色;炎症性細胞については2+の染色	10
肺(大細胞ガン)	腫瘍の5%(細胞質および膜)については2+の染色;内皮については1+の染色;線維芽細胞と間質については3+の染色;そして、炎症性細胞については1+の染色	
乳房(腺ガン)	腫瘍の70%(細胞質および膜)については3+の染色;内皮については2+の染色;平滑筋については2+の染色;線維芽細胞については3+の染色;炎症性細胞については1+の染色	
乳房(浸潤性乳管ガン)	腫瘍の80%(細胞質および膜)については3+の染色;平滑筋については1+の染色;線維芽細胞については3+の染色;炎症性細胞については1+の染色	20
乳房(浸潤性乳管ガン)	腫瘍の100%(細胞質および膜)については3+の染色;内皮、間質、神経、および炎症性細胞については1+の染色;線維芽細胞については3+の染色	
乳房(浸潤性乳管ガン)	腫瘍の80%(細胞質および膜)については3+の染色;線維芽細胞については2+の染色;間質および炎症性細胞については1+の染色	
大腸腺ガン	ネガティブ	30
大腸腺ガン	腫瘍の50%(細胞質)については1~3+の染色;内皮、線維芽細胞、および炎症性細胞については3+の染色;間質については2+の染色	
大腸腺ガン	腫瘍の60%(細胞質および膜)については1~3+の染色;内皮および線維芽細胞については3+の染色;間質および炎症性細胞については2+の染色	
大腸腺ガン	腫瘍の20%(細胞質)については1+の染色;線維芽細胞、間質、および炎症性細胞については3+の染色;内皮については1+の染色	40

【0189】

【表 4 - 3】

前立腺ガン	腫瘍の60%(細胞質および膜)については3+の染色;線維芽細胞については2+の染色;内皮、間質、および炎症性細胞については1+の染色
前立腺ガン	腫瘍の80%(細胞質および膜)については2~3+の染色
前立腺ガン	腫瘍の80%(細胞質および膜)については1~3+の染色;内皮および炎症性細胞については1+の染色

10

【 0 1 9 0 】

【表 5】

表5. 前立腺組織と膵臓組織の拡大パネルの中でのTES7の分布	
組織型	結果
前立腺腺ガン	23/27の組織試料がポジティブであった(85%)
両性の前立腺の肥大	8/12の組織試料がポジティブであった(67%)
膵臓ガン:上皮組織	6/13の組織試料がポジティブであった(46%)
膵臓ガン:間質および血管	11/13の組織試料がポジティブであった(85%)
正常な膵臓:膵腺房および膵島	1/4の組織試料がポジティブであった(25%)
正常な膵臓:線維症/間質組織	1/4の組織試料がポジティブであった(25%)

20

【 0 1 9 1 】

【表 6 - 1】

表6. ヒト胎児の組織の中でのTES7の分布		
組織型	10~12週齢の胎児組織	18~22週齢の胎児組織
	TES7 IHCの結果	
副腎	全ての層上で1~2+の均一な染色	実施しなかった
大動脈および大血管	平滑筋:1+の均一な細胞質染色	実施しなかった
膀胱	移行上皮:2+の均一な細胞質染色	実施しなかった

30

40

【 0 1 9 2 】

【表 6 - 2】

皮膚	表皮:基底層:2+の均一な細胞質染色; 毛細血管および間葉組織:1~2+の均一な細胞質染色	毛嚢/外層:+/-から1+の染色	
小腸	粘膜:10~50%の細胞上での1~2+の細胞質および頂端膜(陰窩のほとんど)の染色	実施しなかった	10
精巣	ライディツヒ細胞:均一な1+の染色	ライディツヒ細胞:均一な1+の染色	
骨盤骨	骨/間充組織の接点:1~2+の均一な細胞質染色	実施しなかった	
前立腺	上皮:1~2の均一な細胞質染色; 間充:+/-から1+の染色	上皮:2~3の均一な細胞質および頂端膜の染色; 間質:1~2+の均一な細胞質染色	20
胸郭	肋骨/間充組織の接点:2~3+の細胞質染色; 間充組織の周辺肋骨:2+の細胞質染色	実施しなかった	
肺	形成されている空隙:細胞の50~75%についての1~2+の均一な細胞質および頂端膜の染色; 周辺の間充組織:+/-から1+の拡散した染色	形成されている空隙:2~3+の均一な染色; 間充組織:+/-から1+の細胞質染色	30
卵巣	実施しなかった	卵子および間質についての1+の染色	

【 0 1 9 3 】

40

【表 6 - 3】

膵臓	主膵管上皮: + / - から1+の均一な細胞質染色	形成されているβ島細胞: 1~2+の細胞質染色; 血管/管: 焦点1~2+の細胞質染色	
心臓	心筋: 1~2の均一な細胞質染色	実施しなかった	
腎臓	ネフロン: 2~3の細胞質および頂端膜の染色(50~75%の細胞) 芽体: 細胞質顆粒および細胞膜についての1+の染色	実施しなかった	10
肝臓	肝細胞: ネガティブ 血球の粉碎: 10~50%の細胞についての1~2+の染色	管の平滑筋: 1~2+の細胞質染色; 血球の破裂: + / - の細胞質染色	20
脳	ネガティブ	ネガティブ	
大腸	大腸粘膜: 1~2+の細胞質および頂端膜の染色; 腸壁/平滑筋/線維芽細胞: 1~2+の細胞質染色	大腸粘膜: 細胞の50~75%についての1~2+の細胞質染色; 腸壁/平滑筋/線維芽細胞: 1~2+の細胞質染色; 血管: 1~2+の染色; 肛門管粘膜/基底層: 1~3+の細胞質染色	30
食道	1+の均一な細胞質染色	実施しなかった	

(実施例6)

免疫細胞化学分析の結果

モノクローナル抗体mu-抗TES7を使用して、様々な組織型に由来する様々な細胞株との反応性を試験した。上記に記載したものと同一免疫組織化学分析のプロトコルを、Cell Arrayの染色に使用した。結果を、弱いポジティブ染色については「+」、中程度のポジティブ染色については「++」、強いポジティブ染色については「+++」、そしてネガティブ染色については「-」とスコアした。

【0194】

免疫組織化学分析の結果を、Cell Array(商標)技術を使用して、国際公開番号WO01/43869に記載されているとおりを得た。様々な確立されている細胞株に由来する細胞を、プロテアーゼを使用することなく増殖表面から取り出し、OCT化合物の中に閉じ込め、包埋した。細胞を凍結させ、切片とし、その後、標準的なIHCプロトコルを使用して染色した。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 5 】

m u - 抗 T E S 7 抗体の様々な確立されているヒトの正常細胞株と腫瘍細胞株に対する結合の結果を、便宜上、表 7 に集めた。

【 0 1 9 6 】

【 表 7 - 1 】

表7. 免疫細胞化学分析の結果—TES7				
細胞株	ATCC#	臓器	細胞型	反応性、 細胞アレイ
HMEC	CC-2251 (BioWhittaker)	乳房	正常な乳房の上皮	-
HuVEC	原発性	内皮細胞	正常な成人	+/-
BT474	HTB-20	乳房	腺管ガン	+
MCF7	HTB-22	乳房	腺ガン	+/-
MDA175	HB-25	乳房	腺管ガン	-
MDA361	HB-27	乳房	腺ガン	-
SK-BR-3	HTB-30	乳房	腺ガン	-
9979	RAVEN	肺	肺ガン株	-
A549	CCL-185	肺	ガン腫	-
CA130	RAVEN	肺	小細胞性ガン	-
CaLu3	HTB-55	肺	腺ガン	n/a
SKMES1	HTB-58	肺	扁平上皮ガン	+

10

20

30

【 0 1 9 7 】

【表 7 - 2】

ES-2	CRL-1978	卵巣	ガン腫	-	
SKOV3	HTB-77	卵巣	腺ガン	-	
9926	RAVEN	膵臓	腺ガン	+	
AsPC-1	CRL-1682	膵臓	腺ガン	-	
HPAFII	CRL-1997	膵臓	腺ガン	-	
Hs700T	HTB-147	膵臓	腺ガン	+++	10
Colo205	CCL-222	大腸	腹水結腸直腸腺腫	-	
HT-29	HTB-38	大腸	結腸直腸腺ガン	-	
SW480	CCL-228	大腸	結腸直腸腺ガン	-	
SW948	CCL-237	大腸	結腸直腸腺ガン	-	20
293	CRL-1573	腎臓	アデノウイルス5 DNAで形質転換した	+/-	
786-O	CRL-1932	腎臓	腎細胞ガン	-	
A498	HTB-44	腎臓	ガン腫	+/-	
Caki2	HTB-47	腎臓	明細胞ガン	+	
Cos 7	CRL-1651	腎臓 (アフリカミドリザル)	SV40で形質転換した	-	30
RL65	CRL-10345	肺(ラット)		-	
SVT2	CCL-163.1	胚(マウス)	線維芽細胞; SV40 で形質転換した	-	
22RV1	CRL-2505	前立腺	ガン腫	-	
DU145	HTB-81	前立腺	明細胞ガン	-	
LNCaP	CRL-1740	前立腺	ガン腫	-	40
PC3	CRL-1435	前立腺	明細胞ガン	-	
TDH-1	RAVEN	前立腺	前立腺ガン株	-	

【 0 1 9 8 】

【表 7 - 3】

Hs746T	HTB-135	胃	ガン腫	-	
NCI-N87	CRL-5822	胃	ガン腫	-	

(実施例 7)

mu - 抗 T E S 7 は様々な腫瘍を起源とするガン幹細胞に結合する。

【 0 1 9 9 】

胎児組織上での T E S 7 の発現の理由により、ヒトのガン幹細胞上での ( ガン幹細胞のマーカーとしての ) T E S 7 の発現を特性決定するための実験を、mu - 抗 T E S 7 抗体と様々な腫瘍組織起源に由来する様々なヒトガン幹細胞を使用して行った。これらのヒトのガン幹細胞上での T E S 7 の分析は、当該分野で一般的に公知であり、行われている標準的な F A C S 分析方法を使用して行った。簡単に説明すると、ヒトのガン幹細胞を、2 m l の 0 . 2 % のコラゲナーゼ / ジスパーゼを使用してフラスコから、5 分間、または細胞がフラスコから解離するか離れるまで、持ち上げた。細胞を、5 m l のピペットを使用してバラバラにして、細胞の塊を全てなくし、その後、1 5 m l の円錐管に移して、1 2 0 0 r p m で 5 分間遠沈させた。上清を除去し、細胞を、分析緩衝液 ( 1 % の B S A を含むハックス平衡塩溶液 ) の 1 m l / T 7 5 フラスコ、または 5 m l / T 1 7 5 フラスコの中に再度懸濁させた。細胞を血球計を使用してカウントした。5 0 , 0 0 0 個の細胞を、1 μ g / m l の濃度の mu - 抗 T E S 7 モノクローナル抗体と、5 0 μ l の容量の中で混合させた。ヤギ抗マウス I g G ( H + L ) - A l e x a F l u o r 5 3 2 二次抗体 ( M o l e c u l a r P r o b e s ) を 2 μ g / m l の濃度で使用した。細胞を F A C S C a l i b u r または G u a v a 機器を使用して分析した。様々な腫瘍組織の供給源に由来するヒトのガン幹細胞上での T E S 7 発現の結果を以下の表 8 にまとめる。「高い」は、蛍光強度の 1 対数以上のシフトを示し、「中程度」は、蛍光強度の 0 . 5 から 1 対数のシフトを示し、「低い」は、蛍光強度の 0 . 5 対数までのシフトを示し、そして「 - 」は、

【 0 2 0 0 】

【表 8】

表8. ヒトのガン幹細胞に対するmu-抗TES7の結合	
ヒトのガン幹細胞	蛍光強度
乳房	高い
結腸直腸	高い
肺	高い
メルケル細胞ガン	中程度から高い
マントル細胞リンパ腫	高い
大腸ガン	中程度から高い
膵臓ガン	高い
前立腺ガン	中程度から高い
基底細胞ガン	高い

表 8 に示したように、mu - 抗 T E S 7 は試験した全てのヒトのガン幹細胞に結合した。mu - 抗 T E S 7 の結合によっては、乳房、結腸直腸、肺、マントル細胞リンパ腫、膵臓、および基底細胞ガンの幹細胞上で 1 対数を超える ( 高い ) シフトが生じた。0 . 5 対数から 1 対数までのシフトは、メルケル細胞ガン、大腸ガン、および前立腺ガンの幹細胞上で見られた。このデータは、4 I g - B 7 H 3 が、抗 T E S 7 抗体を使用するヒトのガン幹細胞の同定のための見込みのあるマーカーとしてそれが有用であるために十分なレベルおよび密度でガン幹細胞上で発現されることを示唆している。

【 0 2 0 1 】

( 実施例 8 )

mu - 抗 T E S 7 抗体を使用する生存細胞の E L I S A アッセイ

mu - 抗TES7抗体のTES7に対する結合を、生存細胞ELISAを使用して試験した。以下の方法を使用した。当該分野で一般的に使用されている他の方法を適用することもできる。細胞（例えば、A375、HT-29、SKOV3、SKMES-1、SW480、SKBR-3、およびHPAFII）を、組織培養物で処理した96ウェルプレート（Falcon）上で、コンフルエントになるまで、10%のウシ胎児血清（FBS）を含む培地の中で増殖させた。細胞をPBSで洗浄し、その後、1%のBSAと0.1%のアジ化ナトリウムを含むハンクス平衡塩溶液（HBSS）の中で所望される濃度の所望される抗体50μlとともに、室温で1時間インキュベートした。その後、細胞を、1ウェルあたり100μlのHBSSで3回洗浄し、その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）二次抗体（HBSS中に希釈したもの、1ウェルあたり50μl）とともに室温で30分間インキュベートした。最後に細胞をHBSSで3回洗浄し、色が変化する基質（TMB基質、KPL）を、各ウェルに1ウェルあたり100μlで添加した。色の変化の反応を、1ウェルあたり100μlの1Mのリン酸の添加によって停止させた。その後、プレートをO.D.450nmで読み取った。TES7は、A375細胞についての生存細胞ELISAにおいてはポジティブであり、B7-H3 4Ig型と関係があることを示す典型的な結合パターンを示していた。

10

## 【0202】

(実施例9)

mu - 抗TES7だけがB7H3の4Ig型に結合する。

## 【0203】

20

mu - 抗TES7の結合特性を決定するために、ELISA実験を、B7H3の2Ig型とB7H3の4Ig型の両方を使用して行った。両方の形態の組み換え体であるヒトB7H3タンパク質を、R&D Systemから購入した（担体を含まないもの）。両方の形態のB7H3タンパク質を96ウェルプレート上に、HBSS+（フェノールレッドを含まないハンクス平衡塩溶液）中で、2μg/ml、50μl/ウェルでコーティングした。プレートを、室温で2時間インキュベートし、その後、HBSS+で洗浄した。続いて、プレートを150μlのブロッキング緩衝液（1.0%（w/v）のBSAを含むHBSS+）で室温で30分間ブロックした。その後、ブロッキング緩衝液を除去し、mu - 抗TES7（ブロッキング緩衝液中で10~20μg/ml、50μl/ウェル）を添加し、室温で1時間インキュベートした。続いて、プレートを150μlのブロッキング緩衝液で3回洗浄した。ブロッキング緩衝液中に1:1000の濃度で希釈した二次抗体（ロバ抗マウスIgG H+L HRP（Jackson Laboratories））を添加し、室温で30分間インキュベートした。その後、プレートを150μlのブロッキング緩衝液で3回洗浄し、TMB基質（KPL）を用いて発色させた。反応を1Mのリン酸で停止させ、プレートをプレートリーダー上でO.D.450nmで読み取った。図4に示すように、mu - 抗TES7（10μg/mlと20マイクログラム/mlの濃度の両方で）だけが、B7H3の4Ig型に結合した。ポジティブ対照（抗B7H3抗体）は、B7H3の2Ig型と4Ig型の両方に結合した。

30

## 【0204】

(実施例10)

40

他のB7H3抗体とのmu - 抗TES7の比較

mu - 抗TES7の結合プロフィールをさらに調べるために、他のB7H3抗体に対してmu - 抗TES7抗体を比較する生化学的分析を行った。B7H3抗体は、当該分野で、例えば、引用により本明細書中に組み入れられるWO04/001381の中に記載されている。その出願では抗体BLA8とPA20が開示されている。BLA8はB7H3に対するモノクローナル抗体であり、これは、4Ig型と2Ig型を両方認識するであろう。PA20は4Ig型だけを認識する、B7H3に対するモノクローナル抗体である。PA20は、登録番号PTA-4244（ハイブリドーマの名称：Panc.1.5C10.5D11）として、2002年4月23日にATCCに寄託された。STO5は、B7H3の4Ig型だけを認識する別の抗B7H3抗体である；STO5は、2007年8

50

月8日にPTA-8576としてATCCに寄託された(ハイブリドーマの名称:Sto mach3.1E10.1G8)。

【0205】

mu-抗TES7が4Ig-B7H3の2つの分子を架橋できるかどうかを調べるために、ELISAを、96ウェルプレート上にコーティングした2.5µg/ml、5µg/ml、または10µg/mlの組み換え体4Ig-B7H3(Hisタグをつけたもの)と、mu-抗TES7抗体またはPA20抗体のいずれかを使用して行った。「0」コーティング条件では、図5に示すように、ウェルをビオチニル化B7H3(4Ig)でコーティングし、mu-抗TES7またはPA20(いずれも、HRP結合口バ抗マウスIgGで検出した)で、あるいはビオチニル化B7H3だけの条件ではストレプトアビジンでコーティングした。マウス抗ポリHis抗体もまた、ポジティブ対照として使用した。結果は、PA20抗体は用量依存性の様式(点線の棒)で4Ig-B7H3を架橋できることを示しているが、mu-抗TES7抗体は3種類の用量のいずれでも、4Ig-B7H3を架橋することはできなかった。これは、TES7エピトープのビオチンによる妨害が原因ではなかった。なぜなら、固定されたビオチニル化4Ig-B7H3(0コーティング条件)はmu-抗TES7によって検出されたからである(実線の灰色の棒)。

10

【0206】

4Ig-B7H3に対するmu-抗TESの結合をさらに調べるために、Hisタグをつけた2Ig-B7H3(R&D Systems)を用いたELISA架橋実験を行った。5µg/mlの捕捉抗体、マウス抗ポリHis抗体を、対照として96ウェルプレート上にコーティングし、コーティングしなかったウェル(裸のウェル)もまた使用した。続いて、捕捉抗体を含むウェルをHBSS+1%のBSAでブロックした。5µg/mlの2Ig-B7H3(His)または4Ig-B7H3(His)を、裸のウェルまたは捕捉抗体をコーティングしたウェルに導入した。対照として、5µg/mlの2Ig-B7H3(Fc)を裸のウェルに導入した。その後、プレートを再びHBSS+1%のBSAでブロックした。次いで、2g/mlのビオチニル化mu-抗TES7、BLA8、PA20、またはSTO5(B7H3の4Ig型だけを認識する別の抗B7H3抗体)をプレートに導入した。結合したビオチニル化抗体を、その後、標準的なプロトコールを使用してストレプトアビジン-HRPを用いて検出した。

20

【0207】

図6に示すように、BLA8抗体は、全ての5種類の条件を認識することができた:2Ig-B7H3(Fc)、2Ig-B7H3(白色の棒、2Ig)、架橋された2Ig-B7H3(薄い灰色の棒、xHis 2Ig)、4Ig-B7H3(中程度の灰色の棒、4Ig)、および架橋された4Ig-B7H3(濃い灰色の棒、xHis 4Ig)。B7H3の2Ig型および4Ig型のいずれを用いた場合にも、架橋されていない抗原(白色の棒と中程度の灰色の棒)と比較して、抗原をマウス抗ポリHis抗体を使用して架橋させると(薄い灰色の棒と濃い灰色の棒)、より多量のBLA8が結合した。

30

【0208】

PA20抗体とSTO5抗体はいずれも、4Ig-B7H3だけに結合した(中程度の灰色の棒と濃い灰色の棒)。また、PA20抗体とSTO5抗体はいずれも、架橋された4Ig-B7H3抗原に対する結合の増加を示した。興味深いことに、mu-抗TES7は4Ig-B7H3に結合したが(中程度の灰色の棒と濃い灰色の棒)、PA20抗体およびSTO5抗体を用いた場合に見られたものと同様に、架橋された4Ig-B7H3に対しては結合の増加を示さなかった。この結果は、4Ig-B7H3に対するmu-抗TES7の結合に関する濃度成分が存在していること、この濃度成分は、PA20およびSTO5のような特定の他の4Ig-B7H3特異的抗体を用いた場合には見られないことを示唆している。この実験の結果は、試験したこれらの3種類の4Ig-B7H3抗体が全て、B7H3の4Ig型の特有のIgドメイン上にあるエピトープに特異的であったこともまた示唆している。なぜなら、3種類の抗体はいずれも、ELISAにおいては架橋された2Ig-B7H3を認識しなかったからである。

40

50

## 【0209】

4 Ig - B7H3 に対する mu - 抗TES7 の結合の抗原密度依存性をさらに調べるために、捕捉のためのマトリックスとコーティング条件を使用してELISAを行った。2つのプレートを0.5 μg/ml、1 μg/ml、または5 μg/mlのマウス抗ポリHis抗体でコーティングした。一方のプレートはHBSS + 1%のBSAでブロックし、一方、他方のプレートは洗浄だけを行った。その後、プレートを、4 Ig - B7H3 (Hisタグをつけたもの) の滴定とともにインキュベーションし、10 μg/ml から0.312 μg/ml まで段階希釈した。次いで、プレートをHBSS + 1%のBSAでブロックし、その後、2 μg/ml のビオチニル化mu - 抗TES7 を用いて検出した。

## 【0210】

図7に示すように、mu - 抗TES7 は、捕捉抗体でブロックしたプレートの中で、5マイクログラム/ml の濃度の捕捉抗体の中で濃度依存性の様式で結合した(四角、左側の図)。mu - 抗TES7 の結合は、ブロックしなかった捕捉抗体のプレートの中では、5マイクログラム/ml の濃度の捕捉抗体の中で減少した(四角、右側の図)。この結果は、ブロックしなかった捕捉プレートが、4 Ig - B7H3 の架橋された分子と、4 Ig - B7H3 の鎖だけの分子の混合物を提示し、抗原のこの混合物はmu - 抗TES7 の結合に適していないことを示唆している。ブロックされた捕捉プレートの中には、架橋された4 Ig - B7H3 抗原だけが存在し、この抗原の密度がmu - 抗TES7 結合をサポートすると見られる。

## 【0211】

また、捕捉抗体がブロックされたプレートの中の1 μg/ml および0.5 μg/ml の濃度の捕捉抗体条件ではmu - 抗TES7 の結合は存在しなかったが(図7、菱形と三角、左側の図)、同じ濃度の捕捉抗体のブロックされていない補足抗体のプレートの中では、mu - 抗TES7 の濃度依存性の結合が存在していた。この結果はほぼおそらく、架橋されていない4 Ig - B7H3 と最適に満たない密度の抗原(1 μg/ml の捕捉抗体は1 μg/ml の4 Ig - B7H3 を捕捉できると推定される)に対するmu - 抗TES7 の優先性が原因である。これらの結果は、4 Ig - B7H3 に対するmu - 抗TES7 の結合が密度依存性であり空間依存性であることを示す他の結果と一致する。mu - 抗TES7 結合についてのこの特有の密度依存性および空間依存性の性質は、おそらく、細胞表面上の4 Ig - B7H3 のクラスターまたは密度に対するmu - 抗TES7 の結合に影響を与えるであろう。

## 【0212】

(実施例11)

mu - 抗TES7 および毒素に結合させた抗マウスIgGのインターナライゼーション Mab - ZAP (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) は、タンパク質合成を阻害する毒素であるサポニンに結合させられた抗マウスIgGである。この毒素は細胞膜を透過することができない。モノクローナル抗体が、インターナライズすることができる細胞表面抗原に結合すると、毒素結合体が、結合したモノクローナル抗体に結合することができ、それにより、インターナライズさせられ、最終的には細胞を死滅させることができる。毒性作用の実証のためのインターナライゼーションに応じて、Mab - ZAP は、所定の表面抗原が細胞の毒性作用を発現するためのインターナライゼーションに依存して任意の毒素の適切な標的となり得るかどうかの評価に役立つことができる。このように、Mab - ZAP は、そのようなインターナライゼーションに依存する毒素(例えば、メイタンシノイドおよびカリケアマイシン)のモデルとなる。

## 【0213】

腫瘍細胞によるmu - 抗TES7 およびサポニン結合抗マウスIgGのインターナライゼーションと、サポニンのインターナライゼーション後の腫瘍細胞の死滅の効果を試験するために、ヒトの膵臓ガン細胞HS700T細胞株を、10 mMのEDTAを含むストックフラスコから取り出し、遠心分離した。細胞を適切な培地の中に50,000/mlに

10

20

30

40

50

なるように再度懸濁させ、96ウェルプレートに1ウェルあたり100 $\mu$ lをプレートした。mu - 抗TES7抗体を、直ちに、適切なウェルに10 $\times$ 濃度として添加して、10 $\mu$ g/mlの最終濃度とした。室温で15分後、Mab - ZAP (Cat. #IT-04, Advanced Targeting Systems, San Diego CA)を適切なウェルに10 $\times$ 濃度として添加して、0.001nMから10nMの最終濃度とした。4日間増殖させた後、MTTを、37 $^{\circ}$ Cで4時間かけて添加した(ストック5mg/ml PBS, ウェルの中で1:10に希釈)。その後、培地を全てのウェルから取り除き、100 $\mu$ l/ウェルのDMSOを添加した。プレートをゆっくりと回転させて青色のMTT沈殿を可溶化させ、プレートをO.D.540nmで読み取った。

#### 【0214】

mu - 抗TES7が存在しない条件下での染色と比較して、mu - 抗TES7の存在下でのHS700T細胞の中のMTT染色は減少した。これは、HS700T細胞の増殖がmu - 抗TES7とMab - ZAPの存在下で阻害されたことを示しており、これらの結果は、mu - 抗TES7と毒素が結合させられた抗マウスIgGがHS700T細胞の中でインターナライズされたことを暗示している。

#### 【0215】

この実施例の方法によるインターナライゼーション実験の結果を図1に示す。

#### 【0216】

(実施例12)

ヒトの結腸直腸腺ガンHT29細胞株に対するmu - 抗TES7の効果

単層として増殖させた場合にインビトロにおいて細胞数を減少させる抗体の能力は、様々な量の精製された試験抗体または対照抗体の存在下、あるいはそれらが存在しない条件下で増殖させた細胞の単層を使用して評価することができ、細胞数の変化はMTTを使用して評価することができる。MTTは、ミトコンドリア酵素の活性を測定する色素であり、これは、相対的な生存している細胞の数と相関関係にある。目的の細胞をプレATINGし、96ウェルプレートの中で、10%のウシ胎児血清を補充したF12/DMEM(1:1)増殖培地の中で増殖させた。HT29細胞株を96ウェル皿の3連のウェルに、1500細胞/ウェルでプレートした。プレATINGの直後に、mu - 抗TES7を添加した。細胞を5%CO<sub>2</sub>/空気の加湿したインキュベーターの中で37 $^{\circ}$ Cで6日間インキュベーションした。アッセイの最後に、MTTをPBS中に溶解させ(5mg/ml)、1:10希釈でウェルに直接添加した。プレートをインキュベーターの中に戻し、4時間置いた。インキュベーション後、培地を除去し、100 $\mu$ lのDMSOを添加してMTT沈殿を可溶化させた。プレートをプレートリーダー上で540で読み取った。

#### 【0217】

図2は、HT29細胞株に対する、様々な濃度のmu - 抗TES7の結果の模式的なグラフを示す。HT29細胞株を用いた他の生体アッセイによって、mu - 抗TES7の増殖阻害作用を確認した。未公開データにおいては、mu - 抗TES7はまた、NCI-H322M肺ガン細胞株とMDA361乳腺ガン細胞株の増殖を阻害することも示された。

#### 【0218】

(実施例13)

腎被膜下移植法(Sub-Renal Capsule Xenograft)と皮下移植法(Subcutaneous Xenograft Model)モデルの両方におけるインビボでのmu - 抗TES7の効果

インビボで腫瘍の増殖を低下させるmu - 抗TES7の能力を、腎被膜下移植法と皮下移植法モデルの両方において試験した。いずれの異種移植モデルも当該分野で周知であり、標準的なプロトコールが、mu - 抗TES7抗体のインビボでの腫瘍増殖の阻害を試験するには適している。

#### 【0219】

腎被膜下移植法モデルについては、雌のnu/nuホモ接合型マウス(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)を使用した。

10

20

30

40

50

動物は、実験の開始時には6から8週齢であり、平均すると20～30グラムの体重を有していた。前立腺ガン細胞株をこの実験で使用した。細胞を腎被膜(sub-renal capsule)部位への移植のためにコラーゲンボタン(collagen buttons)の中に包埋した。移植後、マウスを外科手術から回復させた。処置グループについては、mu-抗TES7をPBS中に50mg/kgの濃度になるように希釈した。対照グループにはPBSを投与した。投与は移植の2日後に開始し、50mg/kgの用量のmu-抗TES7とPBS対照を、1週間に3回、単回の急速注入として、腹腔内に投与した。実験の終了時にマウスを屠殺し、腫瘍と隣接している組織をヒトDNAの定量のために回収した。

#### 【0220】

qRT-PCRは当該分野で周知であり、標準的なプロトコールを使用した。簡単に説明すると、処置したマウスと対照のマウスから取り出した腫瘍を、DNAの単離のために、プロテイナーゼK(1.45mg/ml)とRNase A(0.07mg/ml)を含む消化緩衝液の中で、55℃で一晩インキュベートした。ゲノムDNAを、製造業者の説明書にしたがって、Wizard SV Genomic DNA Purification System(Promega, Wisconsin)を使用して腫瘍から単離した。それぞれのDNA試料を、200μlの最終容量となるように再度懸濁した。ヒトリボソーム遺伝子RPL19に特異的なプライマーを使用して、腫瘍試料に由来するヒトDNAを、Applied Biosystems SDS7000システム(Foster City, California)上でのリアルタイム(real-time) PCRを使用して定量した。試料のDNA濃度は検量線から補間した。それぞれの腫瘍試料を3連のPCR反応において分析し、DNA濃度の平均を決定した。平均のDNA濃度と平均の標準偏差を、腫瘍の試料のそれぞれのグループについて決定した。腫瘍の増殖の阻害は、以下の絶対値として計算した： $[(\text{処置したグループのヒトDNAの平均のng数} / \text{PBS対照グループのヒトDNAの平均のng数}) \times 100] - 100$ 。

#### 【0221】

前立腺ガン細胞株を使用した場合には、mu-抗TES7で処置した腫瘍は、PBSで処理した腫瘍と比較して65.7%の腫瘍増殖の阻害を示した。同様の腫瘍の増殖の阻害が、大腸ガン細胞株、肺ガン細胞株、H322M、および結腸直腸ガン細胞株、HT-29を使用した場合に、mu-抗TES7で処理した腫瘍において見られた。

#### 【0222】

mu-抗TES7のインビボでの腫瘍増殖阻害作用を、また、皮下移植法モデルを使用して試験した。皮下移植モデルは当該分野で周知であり、他の標準的なプロトコールもまた適しているであろう。50%のMatrigel(登録商標)と混合した腫瘍細胞を、マウスの脇腹または背中に、0.1mlの容量で皮下注射した。対照PBSまたは50mg/kgのmu-抗TES7のいずれかの1週間に2回の投与を、腫瘍の接種後10日(腫瘍の容積がおよそ75～100mm<sup>3</sup>に達した時点)で開始した。腫瘍を三次元(高さ×長さ×幅)でデジタルキャリパーによって測定し、腫瘍の容積を、3回の測定の結果の2分の1として計算した。平均の腫瘍容積と平均の標準偏差を、それぞれの測定時にそれぞれのグループについて決定した。統計学的有意性を、Bonferroni post tests(Graphpad Prism version 4.0 for Macintosh, Graphpad Software, San Diego California, USA)を用いて二元ANOVAを使用して決定した。腫瘍増殖の阻害は以下の絶対値として計算した： $[(\text{処置グループの腫瘍容積の平均} / \text{PBS対照グループの腫瘍容積の平均}) \times 100] - 100$ 。

#### 【0223】

膵臓の腺ガン細胞株Hs700Tを、皮下移植法の実験において使用した。500万個の細胞を上記のプロトコールにしたがって注射し、mu-抗TES7抗体の投与を腫瘍の移植後11日で開始した。最後の投与は腫瘍の移植の35日後に行い、腫瘍の測定は投与後さらに1週間続けた。この実験の結果を図8に示し、統計分析を表9にまとめる。

10

20

30

40

50

## 【0224】

mu - 抗TES7で処置した腫瘍は、腫瘍の移植後18日より後に測定した全ての日について、PBS対照と比較して、40～50%小さかった。有意な(0.05未満のp値)腫瘍増殖の障害が、腫瘍の移植後35日目、39日目、および42日目に、mu - 抗TES7で処置した腫瘍について見られた。この結果は、腎被膜下移植モデルを使用した場合に、また、インビトロでの腫瘍細胞の増殖障害を用いた場合にも観察された腫瘍の増殖の障害と一致している。

## 【0225】

## 【表9】

表9. 確立されたHs700T皮下移植に対するmu-抗TES7の効力についての統計分析

腫瘍の接種後の日数	11日目		14日目		18日目		20日目		25日目	
	% TGI	p =	% TGI	p =	% TGI	p =	% TGI	p =	% TGI	p =
50 mg/kg (確立された)	--	--	--	--	46.8	ns	44.6	ns	51.3	ns
腫瘍の接種後の日数	28日目		32日目		35日目		39日目		42日目	
	% TGI	p =	% TGI	p =	% TGI	p =	% TGI	p =	% TGI	p =
50 mg/kg (確立された)	51.7	Ns	48.7	ns	47.9	<0.05	43.6	<0.05	41.7	<0.001

\* 影をつけた四角は、p<0.05の腫瘍増殖障害(TGI)率(%)を示す。

## (実施例14)

サイトカインに対するmu - 抗TES7の効果

サイトカインシグナル伝達を、以下のガン幹細胞(CSC)株を使用したアッセイにおいて試験した: BRCA0312(クローン番号2、乳房CSC)、CA130(肺CSC)、CRCA1115(大腸CSC)、PA9926(膵臓CSC)、PRCA0312-58およびPRCA629A(前立腺CSC)、RECA1208(結腸直腸CSC)。放射線照射されていない骨髄間質細胞(BMC)はLonza(Cat# 2M-302)から入手した。

## 【0226】

骨髄間質細胞(BMC)は、 $6 \times 10^4$ で得られた。細胞を10%のFBSとともに2日間培養した。細胞を2回洗浄し、血清を4時間の間枯渇させ、その後、さらに2回洗浄した。ガン幹細胞(CSC)の単層を、 $1 \sim 2 \times 10^4$ で、50マイクログラム/mlのマウスIgG抗体対照もしくは抗TES7とともに、あるいはそれらを伴わずに、Basal F12 DMEMに3日間かけて添加した。細胞上清をLuminex多重アッセイのために確保した。

## 【0227】

Luminex多重アッセイを、以下の35種類の可溶性因子を使用して行った(Upstate): 増殖因子: EGF、FGF-2、G-CSF、GM-CSF、TNF、PDGF-AA、PDGF-AB/BBおよびVEGF。サイトカイン: IFN、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12(p40)、IL-12(p70)、IL-13、IL-15およびIP-10。ケモカイン: エオタキシン(CCL11)、IL-8(CXCL8)、

10

20

30

40

50

MCP - 1 (CCL2)、MIP - 1 (CCL3) および RANTES (CCL5)。使用した他の可溶性因子には以下が含まれる：FasL、Flt - 3L、IL - 1R、IL - 6R、ICAM - 1、gp130 および VCAM - 1。

【0228】

試料の培地蛍光単位 (Media Fluorescent Unit) (MFU) が 100 (バックグラウンドを 2 ~ 5 倍上回る) であった場合には、TES7 とマウス IgG 対照との間で比較を行った。比較により 2 倍の変化が生じていた場合には、それに応じてアップレギュレーション/ダウンレギュレーションを割り当てた。結果を、Tukey post 試験を用いた ANOVA によってさらに評価し、 $p = 0.05$  である場合に統計学的優位性があると考えた。

10

【0229】

図9に示すように、TES7は、CSC - BMC同時培養物の中でのVEGFの分泌を減少させた(VEGF発生率: 3/7)。図10に示すように、TES7は、BMCまたはCSC - BMC同時培養物の中でのMIP - 1 (CCL3)の分泌を減少させた(CCL3、発生率: 6/7)。VEGFは、腫瘍の血管形成に関係していることが知られているサイトカインである。MIP - 1 (CCL3)は、腫瘍の生物学において役割を担っていることが知られているサイトカインである(例えば、Biecherら、Clin Cancer Res, 2004, Yangら、Int J Cancer, 2006、およびRyschichら、Cancer Res, 2006を参照のこと)。

【0230】

サイトカインプロファイルの分析により、マウス抗TES7抗体がサイトカイン経路と、いくつかの細胞株を横切るサイトカインシグナル伝達を調節することができることの証拠が提供された。これは、腫瘍の増殖を駆動することができるシグナル伝達機構と、ほかの標準的な増殖アッセイにおいては失敗するであろう、本明細書中に教示される方法にしたがって増殖を調節する抗体を同定する能力についての新しい知見を提供する。

20

【0231】

本明細書中に記載された実施例と実施形態は説明の目的だけのためにあり、その範囲内での様々な改良または変更が当業者に示唆されており、それらもまた本出願の精神および範囲に含まれることが理解される。本明細書中で引用された全ての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれの個々の刊行物、特許、または特許出願が具体的かつ個別に、引用により本明細書中に組み入れられることが示されている場合と同じ程度に、全ての目的のためにそれらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる。

30

【 図 1 】

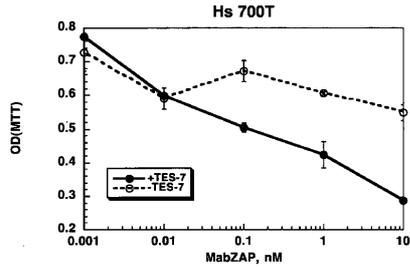


FIGURE 1

【 図 2 】

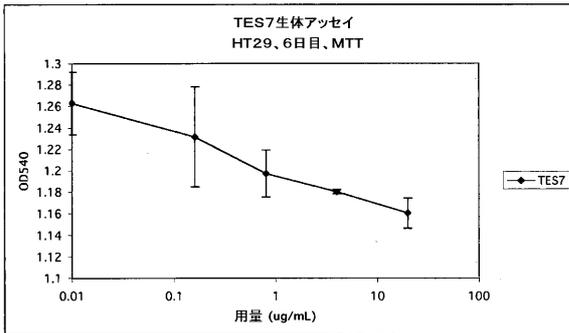


FIGURE 2

【 図 4 】

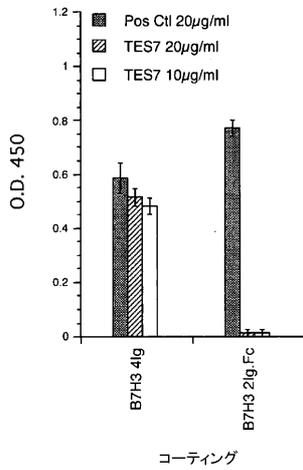


FIGURE 4

【 図 3 】

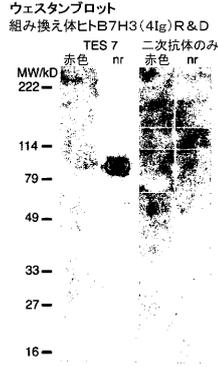


FIGURE 3

【 図 5 】

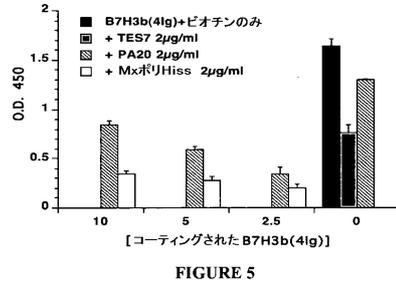


FIGURE 5

【 図 6 】

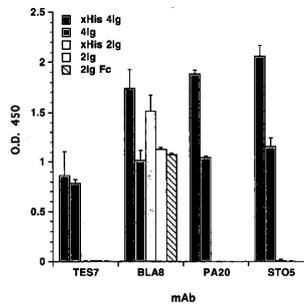


FIGURE 6

【 図 7 】

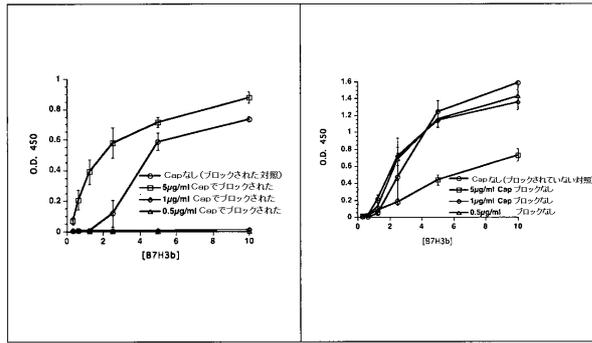


FIGURE 7

【 図 8 】

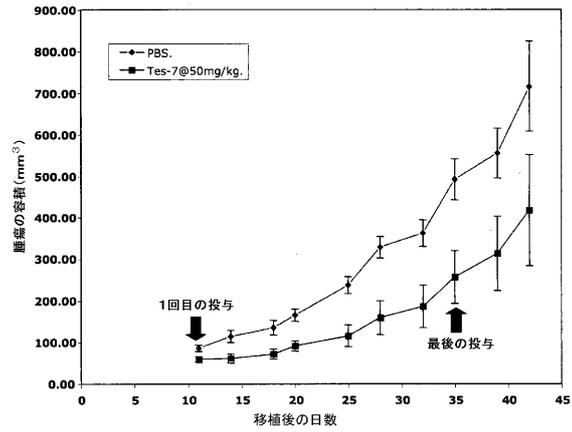


FIGURE 8

【 図 9 】

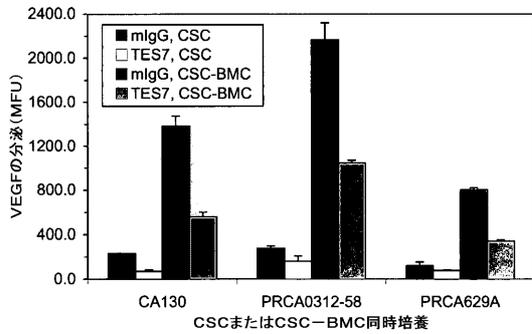


FIGURE 9

【 図 10 】

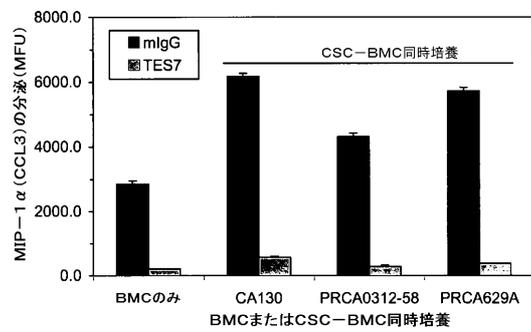


FIGURE 10



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 1 2 N	15/02 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 C
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 2
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 L
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	35/04
		C 1 2 Q	1/02
		G 0 1 N	33/53 D

微生物の受託番号 ATCC PTA-8576

(72)発明者 マザー, ジェニー ピー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 3 0, ミルブレー, ラ プレンダ ドライブ 2 6  
9

(72)発明者 リアン, トニー ダブリュー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 3, サン マテオ, 4 2 エヌディー アベニュー  
- 1 0 2

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 特表2005-532050(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6  
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

专利名称(译)	结合TES7和TES7的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP5601836B2</a>	公开(公告)日	2014-10-08
申请号	JP2009536307	申请日	2007-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	宏基因扫描西公司		
申请(专利权)人(译)	宏基因扫描西公司		
当前申请(专利权)人(译)	宏基因扫描西公司		
[标]发明人	マザージェニーピー リアントニーダブリュー		
发明人	マザー, ジェニーピー, リアン, トニーダブリュー.		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12N15/02 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 C12Q1/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 C07K16/2827 C07K16/30 C07K2317/56 C07K2317 /565 C07K2317/73 C07K2317/77 G01N33/57484		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 C12N15/00. C C12N5/00.102 A61K39/395.T A61K45/00 A61K39/395.L A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 C12Q1 /02 G01N33/53.D		
代理人(译)	忠久米川光		
优先权	60/858113 2006-11-08 US 60/993882 2007-09-14 US		
其他公开文献	JP2010508847A JP2010508847A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了疾病和癌症相关抗原TES7的鉴定和表征。本发明还提供了与抗原TES7结合的单克隆抗体家族，用TES7诊断和治疗各种人类癌症和疾病的方法。

表1. 標準的なHRP結合二次抗体およびABC増幅プロトコールを使用した、正常なヒト組織の中でのTES7の分布	
組織型	結果
皮膚	基底表皮上での+/-の染色
肺	ネガティブ
腎臓	ネガティブ
肝臓	ネガティブ
膵臓	ネガティブ
腎臓、胎児	尿細管の中での2+の染色、局所的
前立腺、胎児	2+の染色、局所的
子宮	いくつかの局所的な1+の平滑筋