

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5339676号
(P5339676)

(45) 発行日 平成25年11月13日(2013.11.13)

(24) 登録日 平成25年8月16日(2013.8.16)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 Y

請求項の数 25 (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願2006-501372 (P2006-501372)	(73) 特許権者	505315362
(86) (22) 出願日	平成16年2月23日(2004.2.23)		メドベット サイエンス ピーティーワイ リミテッド
(65) 公表番号	特表2006-518453 (P2006-518453A)		オーストラリア国 サウス オーストラリ ア ステップニー ペインハム ロード 38
(43) 公表日	平成18年8月10日(2006.8.10)	(74) 代理人	100102978
(86) 国際出願番号	PCT/AU2004/000223		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開番号	W02004/073739	(74) 代理人	100128048
(87) 国際公開日	平成16年9月2日(2004.9.2)		弁理士 新見 浩一
審査請求日	平成18年9月7日(2006.9.7)	(72) 発明者	ブラウン マイケル ポール
(31) 優先権主張番号	2003900777		オーストラリア国 サウス オーストラリ ア セイント ジョージズ アングルシー アヴェニュー 83
(32) 優先日	平成15年2月21日(2003.2.21)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)		
(31) 優先権主張番号	2003901126		
(32) 優先日	平成15年3月6日(2003.3.6)		
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞を検出する方法、およびこれに有用な薬剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象または該対象由来の生物試料における膜完全性を喪失したアポトーシス性新生物細胞を検出するための検出剤であって、該検出剤はLaまたはその抗原性部分に対する相互作用分子を含み、Laまたはその抗原性部分と前記相互作用分子との複合体の細胞質局在性によって前記新生物細胞であることが示される、前記検出剤。

【請求項2】

生物試料中のアポトーシス性新生物細胞を検出するアッセイ法であって、該細胞は膜完全性の喪失を特徴とし、

(1) Laまたはその抗原決定基に対する相互作用分子を、細胞で発現する該Laを含む疑いがある生物試料と接触させる段階；および

(2) 段階(1)で確認された複合体をシグナル検出段階に供する段階を含み、細胞質の相互作用分子-La複合体形成を検出することによってアポトーシス細胞であることが示される、前記アッセイ法。

【請求項3】

レポーター分子で標識した、請求項1に記載の検出剤。

【請求項4】

対象における新生物の状態を診断またはモニターする方法において使用するための、請求項1又は3に記載の検出剤。

【請求項5】

請求項 1 又は 3 に記載の検出剤を含む、患者由来の生物試料におけるアポトーシス性新生物細胞を検出するための定量的、半定量的、または定性的診断キット。

【請求項 6】

相互作用分子が免疫相互作用分子である、請求項1、3、または4のいずれか一項記載の剤。

【請求項 7】

免疫相互作用分子が抗体である、請求項6記載の剤。

【請求項 8】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項7記載の剤。

【請求項 9】

アポトーシス細胞が、アポトーシス性心臓細胞、神経系細胞、またはリンパ系細胞である、請求項1、3、4、または6~8のいずれか一項記載の剤。

【請求項 10】

新生物細胞が、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫もしくは他の小児腫瘍、頭頸部癌、乳癌および前立腺癌、肺癌、腎臓癌、食道胃癌、肝細胞癌、膵胆管新形成、結腸直腸癌、子宮頸癌および肛門癌、子宮癌および他の生殖器官の癌、尿路癌、胚細胞癌、卵巣癌、原発不明の癌腫、ヒト免疫不全関連悪性腫瘍、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、肉腫、内分泌腫瘍、中皮腫および他の胸膜腫瘍、神経内分泌腫瘍、又はカルチノイド腫瘍の細胞である、請求項1、3、4、または6~8記載のいずれか一項記載の剤。

【請求項 11】

頭頸部癌が扁平細胞癌であり、肺癌が小細胞肺癌または非小細胞肺癌であり、腎臓癌が腎細胞腺癌であり、膵胆管新形成が腺癌島細胞腫瘍であり、胚細胞癌が精巣癌または卵巣癌であり、卵巣癌が卵巣上皮癌であり、ヒト免疫不全関連悪性腫瘍がカポジ肉腫であり、および内分泌腫瘍が甲状腺の腫瘍である、請求項10記載の剤。

【請求項 12】

状態が、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫または他の小児腫瘍、頭頸部癌、乳癌および前立腺癌、肺癌、腎臓癌、食道胃癌、肝細胞癌、膵胆管新形成、結腸直腸癌、子宮頸癌および肛門癌、子宮癌および他の生殖器官の癌、尿路癌、胚細胞癌、卵巣癌、原発不明の癌腫、ヒト免疫不全関連悪性腫瘍、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、肉腫、内分泌腫瘍、中皮腫および他の胸膜腫瘍、神経内分泌腫瘍、ならびにカルチノイド腫瘍である、請求項4記載の剤。

【請求項 13】

頭頸部癌が扁平細胞癌であり、肺癌が小細胞肺癌および非小細胞肺癌であり、腎臓癌が腎細胞腺癌であり、膵胆管新形成が腺癌島細胞腫瘍であり、胚細胞癌が精巣癌または卵巣癌であり、卵巣癌が卵巣上皮癌であり、ヒト免疫不全関連悪性腫瘍がカポジ肉腫であり、および内分泌腫瘍が甲状腺の腫瘍である、請求項12記載の剤。

【請求項 14】

対象が哺乳動物である、請求項1、3、4、または6~13のいずれか一項記載の剤。

【請求項 15】

哺乳動物がヒトである、請求項14記載の剤。

【請求項 16】

新生物が転移癌であり、かつ新生物細胞の増殖の下方制御のために使用される、請求項6~15のいずれか一項記載の剤。

【請求項 17】

エフェクター機構が以下から選択される、請求項6~16のいずれか一項記載の剤：

- サイトカイン
- ケモカイン
- マクロファージ、樹状細胞、もしくはT細胞活性化因子；または
- 毒素。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

マクロファージ活性化因子が、N-ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニンまたは細菌リポペプチドである、請求項17記載の剤。

【請求項19】

細菌リポペプチドが、JBT 2002またはその誘導体もしくは類似体である、請求項18記載の剤。

【請求項20】

毒素が放射性同位元素である、請求項17記載の剤。

【請求項21】

放射性同位元素が、線放射体、線放射体、または線放射体である、請求項20記載の剤。

10

【請求項22】

放射体がTb-149またはBi-213である、請求項21記載の剤。

【請求項23】

毒素が、リシン、プロドラッグ、または生物学的薬物である、請求項17記載の剤。

【請求項24】

プロドラッグが、抗体指向性プロドラッグ変換酵素である、請求項23記載の剤。

【請求項25】

生物学的薬物が触媒抗体である、請求項23記載の剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

発明の分野

本発明は一般に、対象または対象由来の生物試料における異常細胞、より詳細にはアポトーシス細胞を検出する方法、およびこれに有用な薬剤に関する。異常細胞または異常細胞群の存在は、特定の疾患もしくは状態、または疾患もしくは状態を発症する傾向の指標となる。より詳細には、本発明は、核外の核分子、特にLaの存在、または核外の核分子レベルの相対的増加を検出することによる、アポトーシス細胞を検出する方法を意図する。本発明はさらに、1個または複数の細胞における核外核分子レベルの上方制御をスクリーニングすることによる、対象または対象由来の生物試料における異常な、望ましくない、またはさもないければ不適当な細胞アポトーシスを特徴とする状態を診断またはモニターする方法を提供する。本発明は、これらの分子を検出するのに有用な診断薬も提供する。そのような診断薬には、抗体等の免疫相互作用分子が含まれる。

30

【0002】

本発明はさらに、インビトロまたはインビボでの治療的標的指向化の手段に関する。本発明はさらに、対象分子上に存在するエピトープと特異的に相互作用する抗体、特にモノクローナル抗体を提供する。アポトーシス細胞を標的する能力は、とりわけ、アポトーシス細胞の存在を特徴とする一連の診断治療、免疫療法治療、免疫学的予防治療において有用である可能性がある。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

本明細書において本発明者らが言及する出版物の書誌的詳細は、本記載の末尾にアルファベット順に記載する。

【0004】

本明細書におけるいかなる先行技術への言及も、その先行技術がオーストラリアにおける共通の一般知識の一部を形成するとの認識またはいかなる形での示唆ではなく、またそのように解釈されるべきではない。

【0005】

悪性腫瘍または癌は無制御な様式で増殖し、正常組織に浸潤し、多くの場合、転移して元の組織から離れた部位で増殖する。一般に、癌は悪性形質転換と称する、よく理解され

50

ていない過程を起こした1つまたはわずかな正常細胞に由来する。癌は、体内のほとんどすべての組織から生じ得る。癌腫と称する、上皮細胞に由来する癌は、最も多く見られる癌の種類である。肉腫は、線維芽細胞、筋細胞、および脂肪細胞等の細胞から生じる、間葉組織の悪性腫瘍である。リンパ組織の固形悪性腫瘍はリンパ腫と称され、リンパ球および他の造血細胞の髄および血液由来悪性腫瘍は白血病と称される。

【0006】

癌は、先進工業国における3つの主要な死因の1つである。感染症の治療および心疾患の予防は改良が続けられ、平均寿命も伸びているため、これらの国々では癌が最も頻度の高い致死性疾患になる可能性がある。このため、癌治療の成功は、患者が死亡することなく、悪性細胞がすべて除去または破壊されることを必要とする。これを実現する理想的な方法は、腫瘍の細胞とそれらの正常な細胞対応物とを識別する、腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導することにある。しかし、癌治療に対する免疫学的アプローチは、結果が立証できないまま100年以上にわたり試みが続けられている。

10

【0007】

したがって、癌を治療する現行の方法は、外科的切除（可能であれば）の後に、必要に応じて放射線治療および/または化学療法を行うという、長い間用いられている手順に依然として従っている。この幾分未完成な形の治療の成功率は非常に幅があり、一般に、腫瘍が進行し転移するにつれて顕著に減少する。さらに、これらの治療は重篤な副作用を伴い、これには、手術による美観の問題および瘢痕（例えば、乳房切除、四肢の切断）、重篤な嘔気および嘔吐、化学療法、ならびに最も顕著には、ほとんどの癌治療の一部を形成する毒性薬の比較的の特異的な標的機構の結果として誘導される、毛包、腸、および骨髄等の正常組織の損傷が含まれる。

20

【0008】

さらに、細胞毒性化学療法薬、シグナル伝達阻害剤、放射線治療、モノクローナル抗体、および細胞障害性リンパ球を含むほとんどの抗癌治療は、癌細胞をアポトーシスによって死滅させる。抗癌治療を施す前に、腫瘍はある割合のアポトーシス細胞および壊死領域さえも含み得るが、抗癌治療に反応した腫瘍では、アポトーシス細胞数の増加および壊死領域の拡大が予測される。しかし、進行癌の治療に細胞毒性化学療法薬を用いる場合、細胞死滅の程度、ひいては最初の治療に対する腫瘍の反応は、評価が困難であることが多い。慣習的に、患者は化学療法を最低3サイクル受け、その後、腫瘍反応の臨床学的および放射線学的評価が行われる。通常、進行癌を有する患者の一部しか細胞毒性薬に反応せず、そのため、患者は、恩恵を受けることなく、治療の副作用に悩む可能性がある。したがって、治療反応が予測され、ひいては生存が予測されることの多い、1サイクル目の治療後の腫瘍細胞の死滅を、迅速、簡便、かつ確実に検出できるようにする診断法の、まだ対処されていない医学的必要性が存在する。例えば、手術前に放射線化学療法を受けた、食道腺癌を有する患者において、フルオロデオキシグルコースを用いた陽電子放射断層撮影（FDG-PET）を使用したところ、治療に反応した患者と反応しなかった患者が、>90%の感度および特異性で区別され、その後腫瘍の治癒的切除を受ける患者を予測しやすい傾向があった。腫瘍が反応するかどうかを早く知ることにより、多くの患者に、効果がなく場合によっては毒性である治療を行わずにすむ。次いで、反応しなかった患者には、二次治療または治験薬の臨床試験を提供することができる。

30

40

【0009】

したがって、標的様式で癌を診断および治療する新たな方法を開発する、差し迫った現行の必要性が存在する。悪性細胞を効果的に標的にして死滅させるというこの概念は、今日まで達成されていない。

【0010】

本発明に通じる研究において、免疫相互作用分子等の相互作用分子を利用して、核分子が実際に、確実にかつ検出可能な程度にスクリーニングされ得ることが意外にも決定され、これにより、インビトロまたはインビボにおいて非常に特異的な様式でアポトーシス細胞を検出する正確かつ確実な手段が提供される。特に、ある割合のアポトーシス細胞の存

50

在によって特徴づけられることの多い、腫瘍および転移の診断およびモニタリングが、現在容易になった。さらに、本発明の相互作用分子を使用することにより、高度に標的されかつ非常に特異的な状況での抗腫瘍治療が容易になることが、現在決定づけられた。

【発明の開示】

【0011】

発明の概要

本発明の1つの局面は、対象または対象由来の生物試料におけるアポトーシス細胞を検出する方法であって、対象または生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、核分子またはその抗原性部分に対する相互作用分子と接触させる段階、および相互作用分子-核分子複合体の形成をスクリーニングする段階を含み、複合体の非核局在性によってアポトーシス細胞であることが示される方法を意図する。

10

【0012】

本発明の別の局面は、対象または対象由来の生物試料におけるアポトーシス細胞を検出する方法であって、対象または生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、核分子またはその抗原性部分に対する免疫相互作用分子と接触させる段階、および免疫相互作用分子-核分子複合体の形成をスクリーニングする段階を含み、複合体の非核局在性によってアポトーシス細胞であることが示される方法を意図する。

【0013】

さらに別の局面では、対象または対象由来の生物試料におけるアポトーシス性新生物細胞を検出する方法であって、対象または生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、Laまたはその抗原性部分に対する免疫相互作用分子と接触させる段階、および免疫相互作用分子-La複合体の形成をスクリーニングする段階を含み、複合体の非核局在性によってアポトーシス性新生物細胞であることが示される方法を提供する。

20

【0014】

さらに別の局面では、対象または対象由来の生物試料におけるアポトーシス性新生物細胞を検出する方法であって、対象または生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、Laまたはその抗原性部分に対する抗体と接触させる段階、および抗体-La複合体の形成をスクリーニングする段階を含み、複合体の非核局在性によってアポトーシス細胞であることが示される方法を提供する。

【0015】

本発明の別の局面は、対象における異常な、望ましくない、またはさもなければ不適当な細胞アポトーシスを特徴とする状態を診断またはモニターする方法であって、対象または対象由来の生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、核分子またはその抗原決定基もしくはエピトープに対する相互作用分子の核分子結合有効量と接触させる段階、および核分子-免疫相互作用分子複合体の形成を定量的または定性的に検出する段階を含み、複合体の非核局在性によって細胞のアポトーシスが示される方法を対象とする。

30

【0016】

本発明のさらに別の局面は、対象における新生物状態を診断またはモニターする方法であって、対象または対象由来の生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、Laまたはその抗原決定基もしくはエピトープに対する免疫相互作用分子のLa結合有効量と接触させる段階、およびLa-免疫相互作用分子複合体の形成を定量的または定性的に検出する段階を含み、複合体の非核局在性によって細胞のアポトーシスが示され、細胞のアポトーシスによって新生物状態が示される方法を対象とする。

40

【0017】

本発明はさらに、生物試料中のアポトーシス細胞を検出するアッセイ法であって、
(1) 核分子またはその抗原決定基に対する相互作用分子を、そのような核分子を含む疑いがある生物試料と接触させる段階；および
(2) 段階(1)で形成された複合体をシグナル検出段階に供する段階
を含み、相互作用分子-核分子複合体の非核形成を検出することによってアポトーシス細胞であることが示されるアッセイ法を意図する。

50

【 0 0 1 8 】

本発明の別の局面は、ヒトにおけるアポトーシス細胞を検出する方法であって、レポーター分子で標識した、核分子またはその抗原決定基に対する相互作用分子を患者に導入する段階、標識相互作用分子を循環系全体または循環系の選択された部分に散在させる段階、および次いで患者をレポーター分子検出手段に供して、相互作用分子の位置を同定する段階を含む方法を意図する。

【 0 0 1 9 】

本発明のさらなる局面は、試料中のLaまたはその断片、変種、もしくは誘導体を検出する方法であって、試料を抗体またはその断片もしくは誘導体と接触させる段階、ならびに抗体およびLaまたはその断片、変種、もしくは誘導体を含む複合体の形成を検出する段階を含み、Laの非核局在性によってアポトーシスが示される方法を提供する。

10

【 0 0 2 0 】

本発明はさらに、患者由来の生物試料におけるアポトーシス細胞を検出するための定量的または半定量的診断キットの製造における、核分子に対する相互作用分子の使用を意図する。キットは使用に関する説明書を備え得り、自動化もしくは半自動化してもよく、または自動化機器もしくはソフトウェアと適合する形態にあってもよい。

【 0 0 2 1 】

本発明のさらに別の局面は、対象における、細胞アポトーシスを特徴とする状態を治療的および/または予防的に処置する方法であって、状態を処置するのに十分な時間および条件の下で、治療的または予防的エフェクター機構と連結、結合、またはさもなければ会合している、核分子またはその抗原性部分に対する相互作用分子の有効量を対象に投与する段階を含む方法を対象とする。

20

【 0 0 2 2 】

本発明は、より詳細には、対象における新生物状態を治療的および/または予防的に処置する方法であって、新生物の増殖を抑制する、減少させる、またはさもなければ下方制御するのに十分な時間および条件の下で、治療的エフェクター機構と連結、結合、またはさもなければ会合している、Laまたはその抗原性部分に対する免疫相互作用分子の有効量を対象に投与する段階を含む方法を提供する。

【 0 0 2 3 】

さらなる局面においては、対象における転移癌を治療的に処置する方法であって、転移癌の増殖を抑制する、減少させる、またはさもなければ下方制御するのに十分な時間および条件の下で、治療的エフェクター機構と連結、結合、またはさもなければ会合している、Laまたはその抗原性部分に対する免疫相互作用分子の有効量を対象に投与する段階を含む方法を提供する。

30

【 0 0 2 4 】

本発明の別の局面は、対象における、細胞アポトーシスを特徴とする状態を処置するための医薬品の製造における、エフェクター機構に結合している抗核分子相互作用分子の使用であって、エフェクター機構によって状態が処置される使用を意図する。

【 0 0 2 5 】

さらに別の局面において、本発明は、本明細書において先に規定した調節剤を、1つまたは複数の薬学的に許容される担体および/または希釈剤と共に含む薬学的組成物を意図する。そのような薬剤は活性成分と称される。

40

【 0 0 2 6 】

本発明のさらに別の局面は、本発明の方法に用いる場合の、本明細書において先に規定した薬剤に関する。

【 0 0 2 7 】

発明の詳細な説明

本発明は、免疫相互作用分子を利用した核外の核分子発現のスクリーニングにより、インビトロまたはインビボにおいてアポトーシス細胞の存在を検出する、非常に特異的でありかつ確実な手段が提供されるという驚くべき決定を一部前提とする。アポトーシス細胞

50

に関連する抗原のスクリーニング（およびそれによる同定）を対象とした以前の実験研究では、核分子、特にLaを候補抗原であると同定していなかったため、この知見は特に重要である。むしろ、ホスファチジルセリン等の他の非関連抗原が繰り返し同定された。残念なことに、これらの非関連分子は顕著な不利点、特に、細胞の機械的破壊または他の破壊のような非アポトーシス事象に起因して一過性の細胞外発現が起こり得るという事実を示す。さらに、細胞染色が、一部のアポトーシス細胞による、細胞表面の抗体-抗原複合体の内部取り込みという活発な過程の結果であると考えられたことに基づき、La等の以前に解析された核分子は、それ自体アポトーシス細胞のマーカーとして却下された。すなわち、細胞への抗体移入の経路としての膜透過性が却下されていた。したがって、アポトーシス細胞自体を1つの種類として同定する手段は開発されていなかった。しかし、今、抗核免疫相互作用分子、特に抗La/SS-B免疫相互作用分子を用いて、後期アポトーシス細胞およびアポトーシス小体をインビトロおよびインビボ検出する方法が開発された。本方法は直接的であり、本発明の出現以前に必要とされていたような、結合を実証するための透過処理等のさらなる段階を必要としない。以前は、抗核抗体結合はアポトーシス誘導に関連がない、その結合は細胞の透過処理に依存する、その結合は表面膜に関連し、受動的移入およびアポトーシス小体に含まれる抗原への特異的結合以外の結合機構に依存すると理解されていた。

【0028】

La等の核分子が、アポトーシス細胞の非常に特異的であり、検出可能であり、かつ唯一のマーカーであるという驚くべき同定により、アポトーシス細胞集団、特に腫瘍およびその転移の診断およびモニタリングを対象とする一連の薬剤および方法の開発が可能になる。さらに、これらの核分子に対する免疫相互作用分子を使用することにより、アポトーシス細胞の存在を特徴とする状態に対する標的治療処置および/または標的予防処置の非常に特異的な手段が提供されることが決定された。腫瘍治療という特定状況において特に重要なのは、例えば腫瘍内のアポトーシス細胞に対する抗La免疫相互作用分子の標的化をうまく利用して、例えば毒性分子の送達により、バイスタンダー非アポトーシス性腫瘍細胞の死滅を達成する手段が提供され得るという事実である。

【0029】

したがって、本発明の1つの局面は、対象または対象由来の生物試料におけるアポトーシス細胞を検出する方法であって、対象または生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、核分子またはその抗原性部分に対する相互作用分子と接触させる段階、および相互作用分子-核分子複合体の形成をスクリーニングする段階を含み、複合体の非核局在性によってアポトーシス細胞であることが示される方法を意図する。

【0030】

より詳細には、本発明は、対象または対象由来の生物試料におけるアポトーシス細胞を検出する方法であって、対象または生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、核分子またはその抗原性部分に対する免疫相互作用分子と接触させる段階、および免疫相互作用分子-核分子複合体の形成をスクリーニングする段階を含み、複合体の非核局在性によってアポトーシス細胞であることが示される方法を意図する。

【0031】

「核分子」への言及は、アポトーシスの前に、アポトーシスの対象となる細胞の核内に持続的にまたは一過性に存在する任意のタンパク質性または非タンパク質性分子への言及として理解されるべきである。好ましくは、核分子は、Ro52、Ro60、La/SS-B、ゲルソリン、 α -フォドリン、フィブリラリン、U1核内低分子リボ核タンパク質（U1 snRNP）、ヘテロ核リボ核タンパク質（hnRNP）、ラミンB、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ（PARP）、増殖性細胞核抗原（PCNA）、SC-35プライシング因子、スミス（Sm）抗原である。さらにより好ましくは、核分子はLaである。

【0032】

本発明を何らかの方法に限定するわけではないが、抗La抗体はアポトーシスを特異的に検出する。Laの非核局在性およびその後のアポトーシス突起（bleb）の外面上におけるその

10

20

30

40

50

検出についての以前の理解は、アポトーシスの特異的な結果であるカスパーゼの活性化に依存すると見なされていた。しかし、カスパーゼ活性は後期アポトーシス細胞において検出されないが (P. Smolewski et al. IJ Immunol Methods 2002)、La等の核分子はなお検出されることが決定された。後期アポトーシス細胞は、他の診断法では容易に検出されない。

【0033】

「非核局在性」への言及は、原型の核内以外の、細胞の任意の領域またはその一部に局在している核分子への言及として理解されるべきである。好ましくは、非核局在性とは、例えば、核分子がアポトーシス細胞の細胞質に移行し、その細胞の膜が透過性になる場合、またはその分子が、アポトーシス細胞内で生じるアポトーシス小体内で発現され、最終的にアポトーシス細胞の完全な崩壊に際して細胞外環境に放出される場合に起こるような、本明細書において「細胞外局在性」と称する、Laが細胞外環境に曝露されることである。

10

【0034】

「アポトーシス」細胞への言及は、アポトーシスを起こしているまたは起こした細胞への言及として理解されるべきである。本発明を何らかの1つの理論または作用機序に限定するわけではないが、アポトーシスは死滅しかけている細胞による代謝活性を必要とする活発な過程である。アポトーシスは、多くの場合、細胞の収縮、DNAの断片への切断 (ゲル上で「ラダーパターン」を生じる)、ならびにクロマチンの凝縮および辺縁化を特徴とする。細胞アポトーシスは、多岐にわたる状況において起こる。したがって、例えば、Laを発現する細胞種の性質および位置に加えて、この分子の非核局在性を同定することにより、心筋 (心発作) もしくは脳 (脳卒中) の梗塞、または自己免疫疾患および他の炎症性疾患、またはAIDS等のウイルス性疾患、またはアルツハイマー病もしくはパーキンソン病等の神経変性疾患、または急性固形臓器移植拒絶もしくは急性骨髄移植拒絶、または化学療法もしくは放射線誘導性組織損傷 (「粘膜炎」)、または新生物を含む多種多様な状態をモニターおよび/または診断する手段が提供される。1つの好ましい態様において、本アポトーシス細胞はアポトーシス性新生物細胞である。

20

【0035】

この好ましい態様により、対象または対象由来の生物試料におけるアポトーシス性新生物細胞を検出する方法であって、対象または生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、Laまたはその抗原性部分に対する免疫相互作用分子と接触させる段階、および免疫相互作用分子-La複合体の形成をスクリーニングする段階を含み、複合体の非核局在性によってアポトーシス性新生物細胞であることが示される方法を提供する。

30

【0036】

好ましくは、非核局在性は、アポトーシス細胞の細胞質内、またはアポトーシス細胞によって形成されるアポトーシス小体内で起こる。

【0037】

「新生物細胞」への言及は、異常な増殖を示す細胞への言及と理解されるべきである。「増殖 (growth)」という用語はその最も広い意味で理解されるべきであり、これには増殖 (proliferation) への言及が含まれる。この関連で、異常な細胞増殖 (growth) の例は、細胞の無制御な増殖 (proliferation) である。新生物細胞は、良性細胞であっても悪性細胞であってもよい。本新生物細胞は、上皮細胞または非上皮細胞等の任意の細胞種であってよい。

40

【0038】

「新形成」という用語の一般的な医学的意味は、正常な増殖制御に対する応答性の欠如に起因する「新生細胞の増殖」、例えば新生物細胞の増殖を指す。「過形成」とは、異常に急速な増殖を起こしている細胞を指す。しかし、本明細書で用いる場合、「新形成」および「過形成」という用語は互換的に用いることができ、一般に、異常な細胞増殖速度を示す細胞を指す。新形成および過形成には「腫瘍」が含まれ、これは良性、前癌性、または悪性であってよい。「新生物」という用語は、新生物細胞を含む病変、腫瘍、または他

50

の被包性もしくは非被包性の塊または他の形態の増殖物への言及と理解されるべきである。

【0039】

本明細書で用いる場合、「過剰増殖性」および「新形成性」という用語は互換的に用いられ、急速な増殖または新生物を特徴とする異常な状況または状態にある細胞を指す。これらの用語には、組織病理学的な型および浸潤性の状態にかかわらず、あらゆる種類の癌性増殖または発癌過程、転移性組織または悪性形質転換した細胞、組織、もしくは臓器が含まれるものとする。「病的過剰増殖性」細胞は、悪性腫瘍増殖を特徴とする疾患状態を生じる。

【0040】

「癌腫」という用語は当業者に認識されており、呼吸器系癌、消化器系癌、泌尿生殖器系癌、精巣癌、乳癌、前立腺癌、内分泌系癌、および黒色腫を含む、上皮組織または内分泌組織の悪性腫瘍を指す。例示的な癌腫には、乳房組織から形成されるものが含まれる。この用語には癌肉腫も含まれ、これには例えば、癌性および肉腫性の組織から構成される悪性腫瘍が含まれる。「腺癌」とは、腺組織に由来する癌腫、または腫瘍細胞が認識し得る腺構造を形成する癌腫を指す。

【0041】

本明細書で用いる「新生物」という用語は、前記3つの段落で考察した用語すべてを含む。

【0042】

本発明に含まれる新生物および新生物細胞の例には、これらに限定されないが、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫および他の小児腫瘍、頭頸部癌（例えば扁平細胞癌）、乳癌および前立腺癌、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、腎臓癌（例えば腎細胞腺癌）、食道胃癌、肝細胞癌、膵胆管新形成（例えば、腺癌および島細胞腫瘍）、結腸直腸癌、子宮頸癌および肛門癌、子宮癌および他の生殖器官の癌、尿路癌（例えば、尿管および膀胱の）、胚細胞癌（例えば、精巣胚細胞腫瘍または卵巣胚細胞腫瘍）、卵巣癌（例えば卵巣上皮癌）、原発不明の癌腫、ヒト免疫不全関連悪性腫瘍（例えばカポジ肉腫）、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、肉腫、内分泌腫瘍（例えば甲状腺の）、中皮腫および他の胸膜腫瘍、神経内分泌腫瘍、ならびにカルチノイド腫瘍が含まれる。

【0043】

本明細書における「La」への言及には、すべての形態のLa、またはそれらの相同体もしくはオースログもしくは誘導体への言及が含まれる。「La」への言及は、La mRNAの選択的スプライシングによって生じる任意のアイソフォーム、またはLaの変異体もしくは多型変種への言及が含まれると理解されるべきである。「La」は別名SS-Bという分子であることも理解されるべきである。

【0044】

「相互作用分子」とは、Laまたはその抗原性部分またはその相同体もしくは誘導体に対する特異性（必ずしも排他的特異性とは限らないが、そうであることが好ましい）および結合親和性を有する任意の分子である。相互作用分子の例には、免疫相互作用分子およびペプチド模倣体が含まれる。好ましい免疫相互作用分子は免疫グロブリン分子であるが、本発明は、抗体断片、一本鎖抗体、ヒト化抗体を含む非免疫化抗体、およびT細胞関連抗原結合分子（TABM）等の他の免疫相互作用分子にまで及ぶ。最も好ましくは、免疫相互作用分子は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体等の抗体である。本免疫相互作用分子は、任意の他のタンパク質性もしくは非タンパク質性の分子または細胞に連結、結合、またはさもなければ会合され得ることが理解されるべきである。最も好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。

【0045】

相互作用分子は、核分子、例えばLaを、または相互作用分子が免疫相互作用分子である範囲では、抗原決定基もしくはエピトープを「対象とする」。分子は必ずしも完全な排他性を示す必要はないが、そうであることが好ましいことが理解されるべきである。例えば

10

20

30

40

50

、抗体は他の抗原と交差反応する場合がある。抗原決定基またはエピトープは、免疫応答が対象とし得る分子の一部を含む。抗原決定基またはエピトープは、B細胞エピトープであっても、または必要に応じてT細胞受容体結合分子であってもよい。「抗原性部分」という用語には、抗原決定基またはエピトープが含まれる。

【0046】

好ましくは、本免疫相互作用分子は抗体である。

【0047】

さらにより好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。

【0048】

この好ましい態様により、対象または対象由来の生物試料におけるアポトーシス性新生物細胞を検出する方法であって、対象または生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、Laまたはその抗原性部分に対する抗体と接触させる段階、および抗体-La複合体の形成をスクリーニングする段階を含み、複合体の非核局在性によってアポトーシス細胞であることが示される方法を提供する。

10

【0049】

好ましくは、非核局在性は、アポトーシス細胞の細胞質内、またはアポトーシス細胞によって形成されるアポトーシス小体内で起こる。

【0050】

「生物試料」への言及は、これらに限定されないが、粘液、便、尿、血液、血清、細胞抽出物、生検標本、および、例えば肺洗浄後に肺から取り出した食塩液または腸洗浄によって回収した溶液等の、個体の体内に導入した後に採取した液体等の、個体に由来する生物物質の任意の試料への言及と理解されるべきである。本発明の方法に従って試験する生物試料は、直接試験してもよく、または試験の前に何らかの形態の処理を必要としてもよい。例えば、生検試料は、試験の前にホモジネート化または切片作製を必要とする場合がある。

20

【0051】

本発明を踏まえて、アポトーシス性悪性または非悪性新生物細胞を含むアポトーシス細胞は、Laを細胞外に発現することが提唱される。したがって、細胞外Laを定量的または定性的に検出することにより、細胞がアポトーシス性であって、細胞アポトーシスを特徴とする状態と関連があるという指標が提供される。

30

【0052】

したがって、本発明は、異常な、望ましくない、またはさもなければ不適当な細胞アポトーシスを特徴とする状態を診断またはモニターする方法を提供する。「異常な、望ましくない、またはさもなければ不適当な」とは、本アポトーシスが過剰なレベル、不適切なレベル、または正常レベルであるがそのレベルが不適当もしくはさもなければ望ましくないことを意味する。本明細書において詳述するように、例えば、心筋もしくは脳組織の梗塞、または自己免疫疾患および他の炎症性疾患、またはAIDS等のウイルス性疾患、またはアルツハイマー病もしくはパーキンソン病等の神経変性疾患、または急性固形臓器移植拒絶もしくは急性骨髄移植拒絶、または化学療法もしくは放射線誘導性組織損傷（「粘膜炎」）、および腫瘍等の新生物といった、ある程度の細胞アポトーシスの存在を特徴とする多くの状態が存在する。

40

【0053】

本発明の好ましい態様は、特定の疾患状態の発症を示す、アポトーシスの発生のスクリーニングを対象とするが、細胞アポトーシスのレベルの低下またはアポトーシスの完全な非存在をスクリーニングする臨床的状況もまた存在し得る。後者の状況は、例えば、臨床治療計画の進行をモニターし、アポトーシスのレベルの減少により、治療下での疾患が軽減状態に移行していることが示される場合に起こり得る。場合によっては、細胞アポトーシス事象の非存在が、疾患状態の発症を示し得ることも理解されるべきである。例えば、正常な胸腺細胞の発生過程では、胸腺に存在する胸腺細胞の大部分が、自己/非自己の識別を生じるために必要な陽性および陰性選択事象の過程において、アポトーシスを起こす

50

。したがって、幼児の胸腺において正常レベルの細胞アポトーシス事象が存在しないことは、幼児が自己免疫状態を発症する傾向を示し得る。したがって、本発明は主として、疾患状態の診断を可能にするために、特定の細胞アポトーシス事象の存在をスクリーニングするという状況で適用される可能性が高いが、本発明の方法はそれにもかかわらず、ある種の疾患状態の発症またはこれを発症する傾向を示す、アポトーシス事象の非存在をスクリーニングする場合にも適用され得ることが理解されるべきである。本発明の方法はまた、疾患状態または治療もしくは予防処置計画の進行をモニターする状況において、細胞アポトーシスのレベルの変化をスクリーニングする場合にも適用され得る。

【 0 0 5 4 】

したがって、本発明の別の局面は、対象における異常な、望ましくない、またはさもなければ不適当な細胞アポトーシスを特徴とする状態を診断またはモニターする方法であって、対象または対象由来の生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、核分子またはその抗原決定基もしくはエピトープに対する相互作用分子の核分子結合有効量と接触させる段階、および核分子-免疫相互作用分子複合体の形成を定量的または定性的に検出する段階を含み、複合体の非核局在性によって細胞のアポトーシスが示される方法を対象とする。

10

【 0 0 5 5 】

好ましくは、核分子はLaである。

【 0 0 5 6 】

好ましくは、相互作用分子は免疫相互作用分子であり、より好ましくは抗Laモノクローナル抗体等の抗La抗体である。

20

【 0 0 5 7 】

最も好ましくは、非核局在性は細胞外局在性であり、さらにより好ましくは、アポトーシス細胞の細胞質内、またはアポトーシス細胞によって形成されるアポトーシス小体内である。

【 0 0 5 8 】

別の好ましい態様において、状態は、心筋もしくは脳組織の梗塞、自己免疫疾患および他の炎症性疾患、AIDS等のウイルス性疾患、アルツハイマー病もしくはパーキンソン病等の神経変性疾患、急性固形臓器移植拒絶もしくは急性骨髄移植拒絶、化学療法もしくは放射線誘導性組織損傷（「粘膜炎」）、または腫瘍等の新生物である。

30

【 0 0 5 9 】

最も好ましい態様において、本発明は、対象における新生物状態を診断またはモニターする方法であって、対象または対象由来の生物試料に由来する細胞または細胞抽出物を、Laまたはその抗原決定基もしくはエピトープに対する免疫相互作用分子のLa結合有効量と接触させる段階、およびLa-免疫相互作用分子複合体の形成を定量的または定性的に検出する段階を含み、複合体の非核局在性によって細胞のアポトーシスが示され、細胞のアポトーシスによって新生物状態が示される方法を対象とする。

【 0 0 6 0 】

好ましくは、新生物は、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫および他の小児腫瘍、頭頸部癌（例えば扁平細胞癌）、乳癌および前立腺癌、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、腎臓癌（例えば腎細胞腺癌）、食道胃癌、肝細胞癌、膵胆管新形成（例えば、腺癌および島細胞腫瘍）、結腸直腸癌、子宮頸癌および肛門癌、子宮癌および他の生殖器官の癌、尿路癌（例えば、尿管および膀胱の）、胚細胞癌（例えば、精巢胚細胞腫瘍または卵巣胚細胞腫瘍）、卵巣癌（例えば卵巣上皮癌）、原発不明の癌腫、ヒト免疫不全関連悪性腫瘍（例えばカポジ肉腫）、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、肉腫、内分泌腫瘍（例えば甲状腺の）、中皮腫および他の胸膜腫瘍、神経内分泌腫瘍、ならびにカルチノイド腫瘍である。

40

【 0 0 6 1 】

最も好ましくは、免疫相互作用分子は抗体であり、さらにより好ましくはモノクローナル抗体である。

50

【0062】

本明細書における「対象」への言及は、ヒト、霊長動物、家畜動物（例えば、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ）、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット）、ペット動物（例えば、イヌ、ネコ）、および捕獲野生動物（例えば、キツネ、カンガルー、シカ）を含むと理解されるべきである。哺乳動物はヒトであることが好ましい。

【0063】

La等の核分子を検出するために、本明細書において上記したような抗体、特にモノクローナル抗体を用いることは、本発明の好ましい方法である。抗体は、多くの手段のいずれかによって調製し得る。ヒトLaを検出するためには、例えば、全身性エリテマトーデス（SLE）またはシェーグレン症候群等の全身性自己免疫疾患を有するために、抗La自己抗体
10
を作製する患者から得られたB細胞から、ヒト-ヒトモノクローナル抗体ハイブリドーマを導出することができる（Ravirajan et al., *Lupus* 1(3):157-165, 1992）。抗体は、必然的ではないが一般に、霊長動物、家畜動物（例えば、ヒツジ、ウシ、ブタ、ヤギ、ウマ）、実験動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ）、およびペット動物（例えば、イヌ、ネコ）等の非ヒト動物に由来する。一般に、抗体に基づくアッセイ法は、細胞または組織生検試料においてインビトロで行われる。しかし、抗体が適切に非免疫化されれば、またはヒトに使用する場合にはヒト化されれば、抗体を例えば核タグで標識し、患者に投与し、放射線学的技法によって核標識の蓄積部位を決定することができる。このため、La抗体は細胞アポトーシス標的化剤と見なされる。したがって、本発明は、ヒト患者
20
および非ヒト罹患生物におけるアポトーシス画像化に用いるための非免疫化型の抗体にまで及ぶ。これについては以下にさらに説明する。

【0064】

このため、本発明は、Laの免疫アッセイ法で用いるため、またはインビボにおける細胞アポトーシス画像化のための抗体、特にモノクローナル抗体を提供する。現在入手可能な抗体には、SW3および3B9が含まれる。

【0065】

Laに対する抗体を作製するためには、この分子を、これがヒト組織を含む動物由来のものであれば生物試料から、または組換え手段によって産生される場合には細胞培養物から抽出する必要がある。Laは、任意の適切な手段により生物試料から分離することができる。例えば、分離には、Laの表面荷電特性、大きさ、密度、生物活性、および別の実体（例
30
えば、それが結合するかまたはさもなければ会合する別のタンパク質または化合物）に対する親和性のうちの任意の1つまたは複数を利用してよい。したがって、例えば、生体液からのLaの分離は、超遠心分離、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー）、電気泳動（例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動）、サイズ分離（例えば、ゲル濾過、限外濾過）、および親和性を介した分離（例えば、これらに限定されないが、ダイナビーズ（商標）分離等の磁気ビーズ分離、免疫クロマトグラフィー、免疫沈降を含む免疫親和性分離）のうちの任意の1つまたは複数によって達成することができる。用いる分離法の選択は、
40
求めているLaの生物活性もしくは物理的特性、またはそれを得るための組織に依存し得る。

【0066】

生体液からLaを分離する際には、タンパク質上に存在する高次構造エピトープが保たれることが好ましく、したがって、酵素の変性を引き起こす方法を回避することが適切である。当業者は、動物に対して曝露されるLa上の抗原決定基または活性部位が天然タンパク質のものと構造的に同一であることを確実にするために、Laにとって固有の生理的条件（例えば、それを得た生体液）にできるだけ近い条件を維持または模倣する重要性を認識していると考えられる。これにより、免疫した動物において、天然タンパク質を認識する適切な抗体が産生されることが確実となる。好ましい態様においては、アフィニティー分離、ゲル濾過、および限外濾過のうちの任意の1つまたは複数を用いて、Laを生体液から分離する。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

免疫化およびその後のモノクローナル抗体の産生は、例えばKohler and Milstein, *Nature* 256: 495-499, 1975 ; Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6(7): 511-519, 1976 ; Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., 1991-1997、またはKodansha Scientific出版のToyama et al., 「Monoclonal Antibody, *Experiment Manual*」, 1987によって記載される標準的な手順を用いて行うことができる。本質的には、標準的な方法により、Laを含む生体液またはその画分を動物に免疫し、抗体産生細胞、特に抗体産生体細胞（例えばBリンパ球）を産生させる。次いで、免疫した動物からこれらの細胞を採取して不死化させる。

【 0 0 6 8 】

抗体作製のためにLaの断片を用いる場合には、それをまず担体と会合させる必要がある場合がある。「担体」とは、免疫原性がないかまたは乏しい物質（例えばハプテン）と自然にまたは人為的に結合することによってその免疫原性を高める、典型的に高分子量である任意の物質を意味する。

【 0 0 6 9 】

抗体産生細胞の不死化は、当技術分野で周知の方法を用いて行うことができる。例えば、不死化は、エプスタイン・バーウイルス（EBV）を用いる形質転換法（Kozbor et al., *Methods in Enzymology* 121: 140, 1986）によって達成することができる。好ましい態様においては、抗体産生細胞は細胞融合法（Coligan et al., 1991-1997, 前記に記載されている）を用いて不死化させるが、これはモノクローナル抗体の作製のために広く用いられている。この方法では、抗体産生能を有する抗体産生体細胞、特にB細胞を骨髓腫細胞株と融合させる。これらの体細胞は、循環しているLa反応性抗体を有するヒト、および感作動物、好ましくはマウスおよびラット等の齧歯類動物のリンパ節、脾臓、および末梢血に由来してもよい。マウス脾細胞が特に有用である。しかし、ラット、ウサギ、ヒツジ、もしくはヤギの細胞、または他の動物種由来の細胞を代わりに用いることも可能であると考えられる。

【 0 0 7 0 】

ハイブリドーマを作製する融合手順に用いるために特化した骨髓腫細胞株がリンパ球性腫瘍から開発されている（Kohler and Milstein, 1976, 前記 ; Shulman et al., *Nature* 276: 269-270, 1978 ; Volk et al., *J. Virol.* 42(1): 220-227, 1982）。これらの細胞株は少なくとも3つの理由から開発された。第1の理由は、融合しておらず同様に無限に自己増殖する骨髓腫細胞からの、融合したハイブリドーマの選択を容易にするためである。これは通常、ハイブリドーマの増殖を支持するある種の選択培地における増殖を不可能にする酵素欠損を有する骨髓腫を用いることによって達成される。第2の理由は、リンパ球性腫瘍細胞が自らの抗体を産生する固有の能力に起因する。ハイブリドーマによる腫瘍細胞抗体の産生が起こらないように、内因性免疫グロブリン軽鎖または重鎖を産生することができない骨髓腫細胞株を用いる。これらの細胞株の選択に関する第3の理由は、それらに融合に対する適性があり、効率が高いことによる。

【 0 0 7 1 】

融合細胞雑種の作製には、例えば、P3X63-Ag8、P3X63-AG8.653、P3/NS1-Ag4-1（NS-1）、Sp2/0-Ag14、およびS194/5.XX0.Bu.1を含む、多くの骨髓腫細胞株を用いることができる。P3X63-Ag8およびNS-1細胞株は、Kohler and Milstein（1976、前記）によって記載されている。Shulman et al.（1978、前記）は、Sp2/0-Ag14骨髓腫株を開発した。S194/5.XX0.Bu.1株は、Trowbridge, *J. Exp. Med.* 148(1): 313-323, 1978によって報告されている。

【 0 0 7 2 】

抗体産生脾細胞またはリンパ節細胞と骨髓腫細胞との雑種を作製する方法は、通常、細胞膜の融合を促進する1つまたは複数の作用因子（化学的、ウイルス的、または電氣的）の存在下で、体細胞と骨髓腫細胞をそれぞれ10:1の割合（この割合は約20:1から約1:1まで変動し得る）で混合する段階を含む。融合方法は以前に記載されている

10

20

30

40

50

(Kohler and Milstein, 1975, 前記; Gafter et al., Somatic Cell Genet. 3: 231-236, 1977; Volk et al., 1982, 前記)。このような研究者らによって用いられた融合促進性の作用因子は、センダイウイルスおよびポリエチレングリコール(PEG)であった。

【0073】

融合手順によって生存可能な雑種が生じるのは極めて低い頻度であるため(例えば、脾臓を体細胞の供給源として用いる場合、約 1×10^5 個の脾細胞当たり1個の雑種しか得られない)、融合していない残りの細胞、特に融合していない骨髄腫細胞から融合細胞雑種を選択する手段を有することが好ましい。所望の抗体産生ハイブリドーマを、生じた他の融合細胞雑種の中から検出する手段もまた必要である。一般に、融合細胞雑種を選択は、ハイブリドーマの増殖は支持するが、通常は無限に分裂を続けると考えられる融合していない骨髄腫細胞の増殖は阻止する培地中で、細胞を培養することによって達成される。融合に用いる体細胞はインビトロ培養下では長期的な生存性を維持せず、このため問題とはならない。本発明の実施例においては、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼを欠く(HPRト陰性の)骨髄腫細胞を用いた。これらの細胞に対する選択は、ヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン(HAT)培地中で行われ、融合細胞雑種はこの培地中で脾細胞のHPRト陽性遺伝子型のために生存する。遺伝子型の点で適格性のある雑種の増殖を支持する培地中で選択し得る、種々の遺伝子欠陥(薬剤感受性等)を有する骨髄腫細胞を用いることも可能である。

10

【0074】

融合細胞雑種を選択的に培養するには数週間を要する。この期間の初期には、その後クローニングし増殖できるように、所望の抗体を産生する雑種を同定することが必要である。一般に、得られた雑種の約10%が所望の抗体を産生するが、約1~約30%の範囲であることも珍しくない。抗体を産生する雑種の検出は、例えばKennet et al. (eds) Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, pp. 376-384, Plenum Press, New York, 1980に記載されているような、酵素結合免疫測定法および放射免疫測定法を含むいくつかの標準的なアッセイ方法のうちのいずれか1つによって、およびFACS解析によって達成することができる。

20

【0075】

ひとたび所望の融合細胞雑種を選択し、個々の抗体産生細胞株へのクローニングを行ったならば、各細胞株を2種類の標準的な方法のいずれかにより増殖させることができる。ハイブリドーマ細胞の懸濁液を組織適合性のある動物に注入し得る。その後、注入された動物は、融合細胞雑種によって産生される特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍を生じることになる。血清または腹水等の動物の体液を採取することにより、高濃度のモノクローナル抗体を得ることができる。または、個々の細胞株をインビトロにおいて実験用培養容器内で増殖させ得る。単一の特異的モノクローナル抗体を高濃度に含む培地を、デカンテーション、濾過、または遠心分離によって回収し、その後精製することができる。

30

【0076】

任意の適切な免疫検出手段により、Laを検出する特異性に関して細胞株を試験する。例えば、細胞株を多数のウェルに分注し、インキュベートしてもよく、各ウェルからの上清を、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、間接蛍光抗体法等により解析する。標的Laを認識し得るが非標的エピトープは認識しないモノクローナル抗体を産生する細胞株を同定し、次いでインビトロで直接培養するか、または組織適合性のある動物に注入して腫瘍を形成させ、必要な抗体を産生させ、回収し、精製する。

40

【0077】

これらの抗体はLa特異的である。このことは、抗体がLaと他の分子を区別し得ること意味する。正常細胞内の分子と交差反応しない限り、さらに広域性の抗体を用いることも可能である。

【0078】

好ましい態様において、本抗体は、抗ヒトLaモノクローナル抗体、8G3および9A5(Bachmann et al. Proc Natl Acad Sci USA 83 (20):7770-7774, 1986)、抗ヒトモノクローナ

50

ル抗体 (mAb)、La1B5 (Mamula et al. J Immunol 143(9):2923-2928, 1989)、抗ヒトLaモノクローナル抗体 (Carmo-Fonseca et al. ExpCell Res 185(1):73-85, 1989)、抗ヒト-抗ウシLaモノクローナル抗体、SW1、SW3、およびSW5 (Prujm et al. Eur J Biochem 232(2):611-619, 1995)、抗ヒトおよび抗齧歯類La mAb、La4B6 (Troster et al. J Autoimmunity 8(6):825-842, 1995)、または抗ヒトおよび抗マウスLa mAb、3B9 (Tran et al. Arthritis Rheum 46(1):202-208, 2002)、またはそれらの誘導体、相同体、類似体、化学的等価物、変異体、もしくは模倣体である。

【0079】

本発明はまた、免疫相互作用分子、および本免疫相互作用分子を発現する細胞株、特にモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマにまで及ぶと理解されるべきである。

10

【0080】

モノクローナル抗体をインビボでの画像化または治療に用いることを予定している場合、抗体を導入しようとする宿主 (例えばヒト) に対してこれを非免疫化することが必要であると考えられる。非免疫化過程は、本発明に従って調製したモノクローナル抗体と同じまたは類似の特異性を有するキメラ抗体の調製を含む、多くの形態のいずれかをとり得る。キメラ抗体とは、その軽鎖および重鎖遺伝子が、典型的には遺伝子操作によって、異なる種に属する免疫グロブリン可変領域遺伝子および定常領域遺伝子から構築された抗体である。したがって、本発明に従い、所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られたところで、1つの種の結合領域が別の種の抗体の非結合領域と組み合わせられた種間モノクローナル抗体を作製するための技術を用いる (Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443, 1987)。例えば、非ヒト (例えばマウス) モノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR) をヒト抗体に移植し、それによりマウス抗体を「ヒト化」することができる (欧州特許公開公報第0 239 400号; Jones et al., Nature 321: 522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536, 1988; Richmann et al., Nature 332: 323-327, 1988)。この場合、非免疫化過程はヒトに対して特異的である。より詳細には、CDRを、ヒト定常領域を有するまたは有さないヒト抗体可変領域に移植する。CDRを提供する非ヒト抗体は一般に「ドナー」と称され、フレームワークを提供するヒト抗体は一般に「アクセプター」と称される。定常領域は存在する必要はないが、存在する場合には、それらはヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一でなければならず、すなわち、少なくとも約85% ~ 約90% 同一、好ましくは約95% またはそれ以上同一でなければならない。このため、おそらくはCDRを除く、ヒト化抗体のすべての部分は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に同一である。したがって、「ヒト化抗体」とは、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。ドナー抗体は「ヒト化」の過程によって「ヒト化」されたと言われるが、これは結果として生じるヒト化抗体が、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合すると予想されるためである。本明細書における「ヒト化」への言及には、特定の宿主、この場合にはヒト宿主に対して非免疫化された抗体への言及が含まれる。

20

30

【0081】

非免疫化抗体が、抗原結合または他の免疫グロブリン機能に対して実質的に影響を及ぼさない、さらなる保存的アミノ酸置換を有し得ることは理解されることが考えられる。表1に従って、例示的な保存的置換を行うことができる。

40

【0082】

(表1)

元の残基	例示的な置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

10

20

【 0 0 8 3 】

30

本発明による非免疫化抗体を作製するために用い得る例示的な方法は、例えば、参考文献、Richmann et al., 1998, 前記；欧州特許公開公報第0 239 400号；Chou et al.（米国特許第6,056,957号）；Queen et al.（米国特許第6,180,370号）；Morgan et al.（米国特許第6,180,377号）に記載されている。

【 0 0 8 4 】

したがって、1つの態様において、本発明は、Laに対するモノクローナル抗体によって認識されるエピトープに対する特異性を有する非免疫化抗体分子であって、非免疫化抗体の可変ドメインのCDRのうち少なくとも1つがLaに対するモノクローナル抗体に由来し、非免疫化抗体分子の残りの免疫グロブリン由来部分が、抗体を非免疫化しようとする対象である宿主からの免疫グロブリンまたはその類似体に由来する抗体分子を意図する。

40

【 0 0 8 5 】

本発明のこの局面は、非ヒト抗体のフレームワーク領域の操作を含む。

【 0 0 8 6 】

本発明は、Laに対する特異性を依然として保持する、本抗体の変異体、類似体、および誘導体にまで及ぶ。

【 0 0 8 7 】

「変異体」または「誘導体」という用語には、1つまたは複数のアミノ酸置換、付加、および/または欠失が含まれる。

【 0 0 8 8 】

本明細書で用いる「CDR」という用語には、分子の結合部分にある鎖を架橋する、抗

50

体フレームワーク領域の可変部分における3つの軽鎖領域および3つの重鎖領域にわたるCDR構造ループが含まれる。これらのループは特徴的な限界構造を有する(Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901, 1987; Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799, 1992)。

【0089】

「フレームワーク領域」とは、CDRとも称される3つの超可変領域によって分断された、免疫グロブリン軽鎖または重鎖可変領域の領域を意味する。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、厳密に規定されている(例えば、Kabat et al., 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, 米国保健社会福祉省(U.S. Department of Health and Human Services)、1983を参照のこと)。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種の内部では比較的保存されている。本明細書で用いる「ヒトフレームワーク領域」とは、天然ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域と実質的に同一(約85%またはそれ以上、通常は90~95%またはそれ以上)であるフレームワーク領域である。抗体のフレームワーク領域、すなわち構成要素である軽鎖および重鎖による複合的なフレームワーク領域は、CDRの配置および整列化に役立つ。CDRは、Laのエピトープに対する結合の主な原因となる。

【0090】

本明細書で用いる「重鎖可変領域」という用語は、アミノ酸配列が本発明のモノクローナル抗体の重鎖のアミノ酸配列に対応し、重鎖のアミノ末端(N末端)アミノ酸残基から始まる、約110~125アミノ酸残基長のポリペプチドを意味する。同様に、「軽鎖可変領域」という用語は、アミノ酸配列が本発明のモノクローナル抗体の軽鎖のアミノ酸配列に対応し、軽鎖のN末端アミノ酸残基から始まる、約95~130アミノ酸残基長のポリペプチドを意味する。全長免疫グロブリン「軽鎖」(約25 Kdまたは214アミノ酸)は、NH₂末端は可変領域遺伝子(約110アミノ酸)にコードされ、COOH末端は または 定常領域遺伝子によってコードされる。全長免疫グロブリン「重鎖」(約50 Kdまたは446アミノ酸)も同様に、可変領域遺伝子(約116アミノ酸)および他の前述の定常領域遺伝子の1つ、例えば(約330アミノ酸をコードする)によってコードされる。

【0091】

「免疫グロブリン」または「抗体」という用語は、本明細書において、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされる1つまたは複数のポリペプチドからなるタンパク質を指すために用いられる。認知されている免疫グロブリン遺伝子には、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ (IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)、 α 、 β 、および μ 定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。免疫グロブリンの1つの形態が、抗体の基本構造単位を構成する。この形態は四量体であり、それぞれの対が軽鎖1本および重鎖1本を有する、免疫グロブリン鎖の2つの同一な対からなる。各対において、軽鎖および重鎖の可変領域はともに抗原に対する結合を担い、定常領域は抗体エフェクター機能を担う。免疫グロブリンは、抗体に加えて、例えばFv、Fab、Fab'、および(Fab')₂を含む様々な他の形態で存在し得る。

【0092】

本発明は、例えばFv、Fab、Fab'、およびF(ab')₂断片を含む、本発明の方法によって作製されるモノクローナル抗体の断片の使用および作製もまた意図する。このような断片は、例えばColigan et al. (1991-1997、前記)によって記載される標準的な方法によって調製することができる。

【0093】

本発明はまた、本発明のモノクローナル抗体と同じまたは類似の特異性を有する合成または組換え抗原結合分子を意図する。この種の抗原結合分子には、安定化された合成Fv断片が含まれ得る。この種の例示的な断片には、ペプチドリinkerを用いてV_HドメインのN末端またはC末端をV_LドメインのそれぞれC末端またはN末端と架橋した一本鎖Fv断片(sFv、多くの場合scFvと称される)が含まれる。ScFvは抗体全体のうち定常部分をすべて欠いており、補体を活性化する能力がない。V_HおよびV_Lドメインを連結するのに適したペプチドリinkerは、V_HドメインおよびV_Lドメインが折りたたまれて、Fv断片の由来となった抗

10

20

30

40

50

体全体の抗原結合部位と類似した三次元構造を備えた抗原結合部位を有する単一のポリペプチド鎖となることを可能にするリンカーである。所望の特性を有するリンカーは、米国特許第4,946,778号に開示されている方法によって得ることができる。しかし、場合によってはリンカーは存在しない。ScFvは、例えば、Krebber et al. (Krebber et al., *J. Immunol. Methods* 201(1): 35-55, 1997) に概説されている方法に従って調製することができる。または、ScFvは、米国特許第5,091,513号、欧州特許第239,400号、またはWinter and Milstein (Winter and Milstein, *Nature* 349: 293, 1991) およびPluckthun et al. (Pluckthun et al., *Antibody engineering: A practical approach* 203-252, 1996) による論文に記載されている方法によって調製することもできる。

【0094】

または、安定化された合成Fv断片には、 V_H および V_L ドメイン内にシステイン残基が導入されて、完全に折りたたまれたFv分子において2つの残基間にジスルフィド結合が形成される、ジスルフィド安定化Fv (dsFv) も含まれる。dsFvを作製するのに適した方法は、例えば、(Glockshuber et al., *Biochem.* 29: 1363-1367, 1990; Reiter et al., *Biochem.* 33: 5451-5459, 1994; Reiter et al., *Cancer Res.* 54: 2714-2718, 1994; Reiter et al., *J. Biol. Chem.* 269: 18327-18331, 1994; Webber et al., *Mol. Immunol.* 32: 249-258, 1995) に記載されている。

【0095】

合成または組換え抗原結合分子として同様に意図しているのは、例えば、(Ward et al., *Nature* 341: 544-546, 1989; Hamers-Casterman et al., *Nature* 363: 446-448, 1993; Davies & Reichmann, *FEBS Lett.* 339: 285-290, 1994) に開示されている、単一の可変領域ドメイン (dAbと称される) である。

【0096】

または、合成または組換え抗原結合分子には「ミニボディ (minibody)」も含まれ得る。この点に関して、ミニボディは抗体全体の小型版であり、抗体全体のうちの必須成分を一本鎖内にコードしている。ミニボディは、例えば米国特許第5,837,821号に開示されているように、免疫グロブリン分子のヒンジ領域およびCH3ドメインに融合された、天然抗体の V_H および V_L ドメインからなることが適している。

【0097】

代替的な態様において、合成または組換え抗原結合分子には、非免疫グロブリン由来のタンパク質フレームワークが含まれ得る。例えば (Ku & Schutz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6552-6556, 1995) に言及することができるが、これは、抗原結合に関して選択されたCDRを生じるように、ランダム化した2つのループを有する4本ヘリックスバンドルタンパク質シトクロムb562を開示している。

【0098】

合成または組換え抗原結合分子は、多価 (すなわち、1つを超える抗原結合部位を有する) であってもよい。このような多価分子は、1つまたは複数の抗原に対して特異的である可能性がある。この種の多価分子は、例えば (Adams et al., *Cancer Res.* 53: 4026-4034, 1993; Cumber et al., *J. Immunol.* 149: 120-126, 1992) によって開示されているように、システイニル含有ペプチドを介した2つの抗体断片の二量体化によって調製することができる。または、二量体化は、抗体断片と、自然に二量体化する両親媒性ヘリックスとの融合 (Pluckthun, *Biochem.* 31: 1579-1584, 1992) によって、または優先的にヘテロ二量体化するドメイン (ロイシンジッパー-junおよびfos等) の使用 (Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547-1553, 1992) によって促進してもよい。

【0099】

本発明はさらに、本抗体におけるアミノ酸の化学的類似体も含む。アミノ酸の化学的類似体の使用は、特に、対象に投与する必要がある場合などに分子を安定化するために有用である。本明細書において意図するアミノ酸の類似体には、これらに限定されないが、側鎖の修飾、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質の合成時における非天然アミノ酸および/またはその誘導体の取り込み、ならびにタンパク質性分子またはその類似体に対

10

20

30

40

50

して高次構造上の制約を課す架橋剤および他の方法の使用が含まれる。

【0100】

本発明の意図する側鎖修飾の例には、アルデヒドとの反応後に NaBH_4 で還元することによる還元的アルキル化；メチルアセトイミデートによるアミド化；無水酢酸によるアシル化；シアン酸によるアミノ基のカルバモイル化；2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）によるアミノ基のトリニトロベンジル化；無水コハク酸および無水テトラヒドロフタル酸によるアミノ基のアシル化；およびピリドキサル-5-リン酸によりリジンをピリドキシル化し、その後 NaBH_4 により還元する等のアミノ基の修飾が含まれる。

【0101】

アルギニン残基のグアニジン基は、2,3-ブタンジオン、フェニルグリオキサール、およびグリオキサール等の試薬を用いた複素環式縮合産物の形成により修飾し得る。

10

【0102】

カルボキシル基は、O-アシルイソウレアの形成を介してカルボジイミドを活性化し、その後、例えば、対応するアミドに誘導化することにより修飾することができる。スルフィドリル基は、ヨード酢酸またはヨードアセトアミドによるカルボキシメチル化；システイン酸への過ギ酸酸化；他のチオール化合物による混合ジスルフィドの形成；マレイミド、無水マレイン酸、または他の置換マレイミドとの反応；4-クロロ水銀安息香酸、4-クロロ水銀フェニルスルホン酸、塩化フェニル水銀、2-クロロ水銀-4-ニトロフェノール、および他の水銀剤を用いる水銀誘導体の形成；アルカリ性pHにおけるシアン酸によるカルバモイル化等の方法により修飾し得る。

20

【0103】

トリプトファン残基は、例えば、N-ブロモスクシンイミドによる酸化、または2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルプロミドもしくはハロゲン化スルフェニルによるインドール環のアルキル化によって修飾し得る。一方、チロシン残基は、テトラニトロメタンによるニトロ化により改変されて3-ニトロチロシン誘導体を形成し得る。

【0104】

ヒスチジン残基のイミダゾール環の修飾は、ヨード酢酸誘導体によるアルキル化またはジエチルピロカルボネートによるN-カルベトキシル化によって達成し得る。

【0105】

ペプチド合成中に非天然アミノ酸および誘導体を取り込む例には、これらに限定されないが、ノルロイシン、4-アミノ酪酸、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸、6-アミノヘキサ酸、t-ブチルグリシン、ノルバリン、フェニルグリシン、オルニチン、サルコシン、4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルヘプタン酸、2-チエニルアラニン、および/またはアミノ酸のD-異性体の使用が含まれる。本明細書において意図する非天然アミノ酸の一覧を表2に示す。

30

【0106】

(表2)

非保存的アミノ酸	記号	非保存的アミノ酸	記号	
α -アミノ酪酸	Abu	L-N-メチルアラニン	Nmala	
α -アミノ- α -メチル酪酸	Mgabu	L-N-メチルアルギニン	Nmarg	
アミノシクロプロパン-	Cpro	L-N-メチルアスパラギン	Nmasn	
カルボキシレート		L-N-メチルアスパラギン酸	Nmasp	10
アミノイソ酪酸	Aib	L-N-メチルシステイン	Nmcys	
アミノノルボルニル-	Norb	L-N-メチルグルタミン	Nmgln	
カルボキシレート		L-N-メチルグルタミン酸	Nmglu	
シクロヘキシルアラニン	Chexa	L-N-メチルヒスチジン	Nmhis	
シクロペンチルアラニン	Cpen	L-N-メチルイソロイシン	Nmile	
D-アラニン	Dal	L-N-メチルロイシン	Nmleu	
D-アルギニン	Darg	L-N-メチルリジン	Nmlys	20
D-アスパラギン酸	Dasp	L-N-メチルメチオニン	Nmmet	
D-システイン	Dcys	L-N-メチルノルロイシン	Nmnle	
D-グルタミン	Dgln	L-N-メチルノルバリン	Nmnva	
D-グルタミン酸	Dglu	L-N-メチルオルニチン	Nmorn	
D-ヒスチジン	Dhis	L-N-メチルフェニルアラニン	Nmphe	
D-イソロイシン	Dile	L-N-メチルプロリン	Nmpro	
D-ロイシン	Dleu	L-N-メチルセリン	Nmser	
D-リジン	Dlys	L-N-メチルスレオニン	Nmthr	30
D-メチオニン	Dmet	L-N-メチルトリプトファン	Nmtrp	
D-オルニチン	Dorn	L-N-メチルチロシン	Nmtyr	
D-フェニルアラニン	Dphe	L-N-メチルバリン	Nmval	
D-プロリン	Dpro	L-N-メチルエチルグリシン	Nmetg	
D-セリン	Dser	L-N-メチル-t-ブチルグリシン	Nmtbug	
D-スレオニン	Dthr	L-ノルロイシン	Nle	
D-トリプトファン	Dtrp	L-ノルバリン	Nva	40

D-チロシン	Dtyr	α -メチル - アミノイソ酪酸	Maib	
D-バリン	Dval	α -メチル- γ -アミノ酪酸	Mgabu	
D- α -メチルアラニン	Dmala	α -メチルシクロヘキシルアラニン	Mchexa	
D- α -メチルアルギニン	Dmarg	α -メチルシクロペンチルアラニン	Mcpen	
D- α -メチルアスパラギン	Dmasn	α -メチル- α -ナフチルアラニン	Manap	
D- α -メチルアスパラギン酸	Dmasp	α -メチルペニシラミン	Mpen	
D- α -メチルシステイン	Dmcys	N-(4-アミノブチル)グリシン	Nglu	10
D- α -メチルグルタミン	Dmgln	N-(2-アミノエチル)グリシン	Naeg	
D- α -メチルヒスチジン	Dmhis	N-(3-アミノプロピル)グリシン	Norn	
D- α -メチルイソロイシン	Dmile	N-アミノ- α -メチル酪酸	Nmaabu	
D- α -メチルロイシン	Dmleu	α -ナフチルアラニン	Anap	
D- α -メチルリジン	Dmlys	N-ベンジルグリシン	Nphe	
D- α -メチルメチオニン	Dmmet	N-(2-カルバミルエチル)グリシン	Ngln	
D- α -メチルオルニチン	Dmorn	N-(カルバミルエチル)グリシン	Nasn	20
D- α -メチルフェニルアラニン	Dmphe	N-(2-カルボキシエチル)グリシン	Nglu	
D- α -メチルプロリン	Dmpro	N-(カルボキシメチル)グリシン	Nasp	
D- α -メチルセリン	Dmser	N-シクロブチルグリシン	Ncbut	
D- α -メチルスレオニン	Dmthr	N-シクロヘプチルグリシン	Nchep	
D- α -メチルトリプトファン	Dmtrp	N-シクロヘキシルグリシン	Nchex	
D- α -メチルチロシン	Dmty	N-シクロデシルグリシン	Ncdec	
D- α -メチルバリン	Dmval	N-シクロドデシルグリシン	Ncdod	30
D-N-メチルアラニン	Dnmala	N-シクロオクチルグリシン	Ncoct	
D-N-メチルアルギニン	Dnmarg	N-シクロプロピルグリシン	Ncpro	
D-N-メチルアスパラギン	Dnmasn	N-シクロウンデシルグリシン	Ncund	
D-N-メチルアスパラギン酸	Dnmasp	N-(2,2-ジフェニルエチル)グリシン	Nbhm	
D-N-メチルシステイン	Dnmcys	N-(3,3-ジフェニルプロピル)グリシン	Nbhe	
D-N-メチルグルタミン	Dnmgln	N-(3-グアニジノプロピル)グリシン	Narg	
D-N-メチルグルタミン酸	Dnmglu	N-(1-ヒドロキシエチル)グリシン	Nthr	40
D-N-メチルヒスチジン	Dnmhis	N-(ヒドロキシエチル)グリシン	Nser	
D-N-メチルイソロイシン	Dnmile	N-(イミダゾリルエチル)グリシン	Nhis	

D-N-メチルロイシン	Dnmleu	N-(3-インドリルエチル)グリシン	Nhtrp	
D-N-メチルリジン	Dnmlys	N-メチル- γ -アミノ酪酸	Nmgabu	
N-メチルシクロヘキシルアラニン	Nmchexa	D-N-メチルメチオニン	Dnmmet	
D-N-メチルオルニチン	Dnmorn	N-メチルシクロペンチルアラニン	Nmcpen	
N-メチルグリシン	Nala	D-N-メチルフェニルアラニン	Dnmphe	
N-メチルアミノイソ酪酸	Nmaib	D-N-メチルプロリン	Dnmpro	
N-(1-メチルプロピル)グリシン	Nile	D-N-メチルセリン	Dnmser	10
N-(2-メチルプロピル)グリシン	Nleu	D-N-メチルスレオニン	Dnmthr	
D-N-メチルトリプトファン	Dnmtrp	N-(1-メチルエチル)グリシン	Nval	
D-N-メチルチロシン	Dnmtyr	N-メチル α -ナフチルアラニン	Nmanap	
D-N-メチルバリン	Dnmval	N-メチルペニシラミン	Nmpen	
γ -アミノ酪酸	Gabu	N-(<i>p</i> -ヒドロキシフェニル)グリシン	Nhtyr	
L- <i>t</i> -ブチルグリシン	Tbug	N-(チオメチル)グリシン	Ncys	
L-エチルグリシン	Etg	ペニシラミン	Pen	20
L-ホモフェニルアラニン	Hphe	L- α -メチルアラニン	Mala	
L- α -メチルアルギニン	Marg	L- α -メチルアスパラギン	Masn	
L- α -メチルアスパラギン酸	Masp	L- α -メチル- <i>t</i> -ブチルグリシン	Mtbug	
L- α -メチルシステイン	Mcys	L-メチルエチルグリシン	Metg	
L- α -メチルグルタミン	Mgln	L- α -メチルグルタミン酸	Mglu	
L- α -メチルヒスチジン	Mhis	L- α -メチルホモフェニルアラニン	Mhphe	
L- α -メチルイソロイシン	Mile	N-(2-メチルチオエチル)グリシン	Nmet	30
L- α -メチルロイシン	Mleu	L- α -メチルリジン	Mlys	
L- α -メチルメチオニン	Mmet	L- α -メチルノルロイシン	Mnle	
L- α -メチルノルバリン	Mnva	L- α -メチルオルニチン	Morn	
L- α -メチルフェニルアラニン	Mphe	L- α -メチルプロリン	Mpro	
L- α -メチルセリン	Mser	L- α -メチルスレオニン	Mthr	
L- α -メチルトリプトファン	Mtrp	L- α -メチルチロシン	Mtyr	
L- α -メチルバリン	Mval	L-N-メチルホモフェニルアラニン	Nmhpe	40
N-(N-(2,2-ジフェニルエチル)カルバミルメチル)グリシン	Nnbhm	N-(N-(3,3-ジフェニルプロピル)カルバミルメチル)グリシン	Nnbhe	
1-カルボキシ-1-(2,2-ジフェニルエチルアミノ)シクロプロパン	Nmbc			

【 0 1 0 7 】

架橋剤を用いて、例えば、 $n=1 \sim n=6$ の $(\text{CH}_2)_n$ スペーサー基を有する二官能性イミドエステル類等のホモ二官能性架橋剤、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエス

テル、ならびにN-ヒドロキシスクシンイミド等のアミノ反応性部分およびマレイミドまたはジチオ部分(SH)またはカルボジイミド(COOH)等の別の基に特異的な反応性部分を通常含むヘテロ二官能性試薬により、3D高次構造を安定化することができる。

【0108】

本発明はさらに、生物試料中のアポトーシス細胞を検出するアッセイ法であって、

(3) 核分子またはその抗原決定基に対する相互作用分子を、そのような核分子を含む疑いがある生物試料と接触させる段階；および

(4) 段階(1)で形成された複合体をシグナル検出段階に供する段階

を含み、相互作用分子-核分子複合体の非核形成を検出することによってアポトーシス細胞であることが示されるアッセイ法を意図する。

【0109】

好ましくは、核分子はLaである。

【0110】

より好ましくは、相互作用分子は免疫相互作用分子であり、さらにより好ましくは、モノクローナル抗体SW3または3B9等の抗La抗体である。

【0111】

最も好ましくは、非核局在性は細胞外局在性であり、さらにより好ましくは、アポトーシス細胞の細胞質内、またはアポトーシス細胞によって形成されるアポトーシス小体内局在性である。

【0112】

シグナル検出段階には、ELISAまたは任意の他のレポーター分子に基づくアッセイ法が含まれ得る。この検出段階の一部として、最初にシグナルを増幅することが必要な場合がある。このアッセイ法は、インビボまたはインビトロで行い得ることが理解されるべきである。

【0113】

本発明の非免疫化モノクローナル抗体もまた、インビボでのアポトーシスの画像化のため、およびアポトーシス細胞をバスタンダー細胞増殖遅延剤または殺バスタンダー細胞剤、すなわち細胞分裂停止剤または細胞破壊剤と接触させことを目的としてアポトーシス細胞を標的するために有用であると考えられる。

【0114】

抗La抗体は、インビボにおけるアポトーシス細胞の検出に関して、Apomate(商標)(North American Scientific, Inc.)等の現在知られている製品よりも優れている。Apomate(商標)は放射標識アネキシンVを用いてアポトーシス細胞に結合するものであり、特に化学療法に対する癌の応答性を確定する。アネキシンVは、アポトーシスの初期に形質膜外層に「フリップフロップする」ホスファチジルセリンに結合する。しかし、Apomate(商標)による化学療法誘導性腫瘍細胞アポトーシスの検出は、投与のタイミングが鍵を握ると考えられるため一貫性に欠ける(Blankenberg et al. Clin. Cancer Res 2002)。抗La抗体を使用する場合、抗体がアポトーシス細胞をマクロファージへと誘導し、これが癌の部位に蓄積するため、タイミングはそれほど重要ではない。さらに、アネキシンVは、インビトロにおいてアポトーシス性胸腺細胞のマクロファージ媒介性食作用を阻害するが、表面に露出したホスファチジルセリンを有する、抗体の結合した赤血球のFc受容体媒介性取り込みは阻害しない(Callahan et al. Cell Death Different 7(7):645-653, 2000; Krahlung et al. Cell Death Different 6(2):183-189, 1999)。よって、抗La抗体はアポトーシス細胞をオプソニン化し、マクロファージによる食作用を促進し、特にその結果、以下に詳述するように、診断および/または治療のためにマクロファージが標的化される。したがって、抗La抗体を使用する利点の1つは、アネキシンVの検出に基づくような現在知られている診断法とは対照的に、アポトーシス細胞のオプソニン化およびマクロファージによるこの細胞の取り込みにより、アポトーシス細胞の部位においてマクロファージ内に抗体が蓄積し、それにより画像化が支援される点である。

10

20

30

40

50

【0115】

画像化に関しては、レポーター分子を非免疫化モノクローナル抗体に結合させ、次いでこれをヒト等の宿主に導入する。レポーター分子を検出することにより、腫瘍に関連するような細胞アポトーシスの集団を可視化することができる。特に有用な形態のレポーター分子は核タグである。いくつかの放射性同位元素によって陽電子放射断層撮影(PET)による画像化が可能になり、いくつかのリガンドによって磁気共鳴映像法(MRI)による標的結合の検出が容易になる。

【0116】

したがって、本発明の別の局面は、ヒトにおけるアポトーシス細胞を検出する方法であって、レポーター分子で標識した、核分子またはその抗原決定基に対する相互作用分子を患者に導入する段階、標識相互作用分子を循環系全体または循環系の選択された部分に散在させる段階、および次いで患者をレポーター分子検出手段に供して、相互作用分子の位置を同定する段階を含む方法を意図する。

10

【0117】

好ましくは、核分子はLaである。

【0118】

より好ましくは、相互作用分子は免疫相互作用分子であり、さらにより好ましくは抗La抗体である。

【0119】

最も好ましくは、非核局在性は細胞外局在性であり、好ましくは、アポトーシス細胞の細胞質内、またはアポトーシス細胞によって形成されるアポトーシス小体内局在性である。

20

【0120】

アポトーシス細胞は新生物に特徴的であることが好ましい。

【0121】

新生物細胞は、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫および他の小児腫瘍、頭頸部癌(例えば扁平細胞癌)、乳癌および前立腺癌、肺癌(小細胞肺癌および非小細胞肺癌)、腎臓癌(例えば腎細胞腺癌)、食道胃癌、肝細胞癌、膵胆管新形成(例えば、腺癌および島細胞腫瘍)、結腸直腸癌、子宮頸癌および肛門癌、子宮癌および他の生殖器官の癌、尿路癌(例えば、尿管および膀胱の)、胚細胞癌(例えば、精巢胚細胞腫瘍または卵巢胚細胞腫瘍)、卵巣癌(例えば卵巣上皮癌)、原発不明の癌腫、ヒト免疫不全関連悪性腫瘍(例えばカポジ肉腫)、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、肉腫、内分泌腫瘍(例えば甲状腺の)、中皮腫および他の胸膜腫瘍、神経内分泌腫瘍、ならびにカルチノイド腫瘍に特徴的なものであることが好ましい。

30

【0122】

免疫学に基づくLa検出手順は、様々な形態をとり得る。例えば、特定の抗原またはLaを含む癌細胞に対して異なる特異性をそれぞれが有する多数の抗体をアレイ内に固定化してもよい。次いで、生検試料由来の細胞を抗体アレイと接触させ、固定化された細胞に基づいて新生物の種類に関する診断を行うことができる。

【0123】

ELISA、ウェスタンブロット解析、免疫沈降解析、免疫蛍光解析、免疫化学解析、またはFACS解析によるなど、他のより慣習的なアッセイを行うことも可能である。

40

【0124】

したがって、本発明は、試料中のLaまたはその断片、変種、もしくは誘導体を検出する方法であって、試料を抗体またはその断片もしくは誘導体と接触させる段階、ならびに抗体およびLaまたはその断片、変種、もしくは誘導体を含む複合体の形成を検出する段階を含み、Laの非核局在性によってアポトーシスが示される方法を提供する。

【0125】

好ましくは、非核局在性は細胞外局在性であり、より好ましくは、アポトーシス細胞の細胞質内、またはアポトーシス細胞によって形成されるアポトーシス小体内局在性である

50

【0126】

以上に考察した通り、複合体の形成を判定するのに適した任意の方法を用いることができる。例えば、レポーター分子を付随させた本発明による抗体を、免疫測定法に用いてもよい。そのような免疫測定法には、これらに限定されないが、当業者に周知である放射免疫測定法（RIA）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、および免疫クロマトグラフィー法（ICT）、ウェスタンブロッティング法が含まれる。例えば、本発明に従って用い得る種々の免疫測定法を開示している「Current Protocols in Immunology」、1994に言及することができる。免疫測定法には競合アッセイ法も含まれ得る。本発明が定性的および定量的な免疫測定法を含むことは理解されると考えられる。

10

【0127】

適切な免疫測定法は、例えば、米国特許第4,016,043号、米国特許第4,424,279号、および米国特許第4,018,653号に記載されている。これらには、非競合型の一部位および二部位アッセイ法、ならびに従来の競合結合アッセイ法が含まれる。これらのアッセイ法には、標識した抗原結合分子の標的抗原との直接結合も含まれる。この場合、抗原はLaまたはその断片である。

【0128】

二部位アッセイ法は本発明における使用に特に好ましい。これらのアッセイ法には多くの変法が存在し、これらはすべて本発明に含まれるものとする。簡潔に説明すると、典型的な順方向アッセイ法では、非標識抗体等の非標識抗原結合分子を固相単体上に固定化し、被験試料を、結合してある分子と接触させる。抗体-抗原複合体を形成するのに十分である適当な期間インキュベーションした後、検出可能なシグナルを生じ得るレポーター分子で標識した別の抗原結合分子（抗原に対して特異的な二次抗体が適している）を添加してインキュベートし、抗体-抗原-標識抗体という別の複合体が形成されるのに十分な時間をおく。未反応の物質を洗浄除去し、レポーター分子によって生じるシグナルを観察することにより、抗原の存在を判定する。結果は視認し得るシグナルの単純な観察による定性的なものでもよく、または既知量の抗原を含む対照試料との比較によって定量化してもよい。順方向アッセイ法の変法には、結合してある抗体に対して試料および標識抗体の両方を同時に添加する同時アッセイ法が含まれる。容易に明白であると考えられるわずかな変更を含め、これらの技術は当業者には周知である。

20

30

【0129】

典型的な順方向アッセイ法では、抗原またはその抗原性部分に対する特異性を有する一次抗体を、固相表面に対して共有結合させるかまたは受動的に結合させる。固相表面は典型的にはガラスまたはポリマーであり、最もよく用いられるポリマーはセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、塩化ポリビニル、またはポリプロピレンである。固相支持体は、チューブ、ビーズ、マイクロプレートのディスク、または免疫測定を行うのに適した任意の他の表面の形態であってよい。結合過程は当技術分野において周知であり、一般に架橋共有結合または物理的吸着からなり、被験試料の調製時にポリマー-抗体複合体を洗浄する。次いで被験試料の一定分割量を固相複合体に添加し、十分な期間および適切な条件下でインキュベートして、存在する抗原を抗体に結合させる。インキュベーション期間の後に、抗原-抗体複合体を洗浄して乾燥させ、抗原の一部分に対して特異的な二次抗体と共にインキュベートする。二次抗体には一般に、二次抗体と抗原との結合を示すために用いられるレポーター分子が付随している。付随するレポーター分子によって測定される、結合する標識抗体の量は、固定化した一次抗体と結合した抗原の量に比例する。

40

【0130】

代替的な方法では、生物試料中の抗原を固定化する段階、および次いで固定化抗原を特異的抗体（レポーター分子で標識してもしなくてもよい）に対して曝露する段階を含む。標的の量およびレポーター分子のシグナルの強さに依存して、抗体による直接標識化により、結合した標的を検出することができる。または、一次抗体に対して特異的な標識二次

50

抗体を標的-一次抗体複合体に対して曝露し、標的-一次抗体-二次抗体という三次複合体を形成させる。この複合体は、レポーター分子が発するシグナルにより検出される。

【0131】

上記の内容から、抗原結合分子に付随するレポーター分子には以下が含まれ得ることが理解されると考えられる：

- (a) レポーター分子と抗体との直接的な結合；
- (b) レポーター分子と抗体との間接的な結合；すなわち、レポーター分子と後に抗体に結合させる別のアッセイ試薬との結合；および
- (c) 抗体の以後の反応産物との結合。

【0132】

レポーター分子は、色素原、触媒、酵素、蛍光色素、化学発光分子、常磁性イオン、ユーロピウム (Eu^{3+}) 等のランタニドイオン、他の核標識タグを含む放射性同位体、半導体量子ドット (Wu et al. Nature Biotechnol 2000)、および直接観察用標識を含む群より選択され得る。改変型緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 等のパートナーに融合することにより、組換え抗体様分子を作製してもよい。

【0133】

直接観察用標識の場合には、コロイド状の金属性もしくは非金属性粒子、色素粒子、酵素もしくは基質、有機ポリマー、ラテックス粒子、リポソーム、またはシグナル生成物質を含む他の小胞等を用い得る。

【0134】

レポーター分子として用いるのに適した数多くの酵素が、米国特許第4,366,241号、米国特許第4,843,000号、および米国特許第4,849,338号に開示されている。本発明において有用である適切な酵素には、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ等が含まれる。酵素は単独で用いてもよく、または溶液中の二次酵素と組み合わせて用いてもよい。

【0135】

適切な蛍光色素には、これらに限定されないが、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC)、R-フィコエリトリン (RPE) およびテキサスレッドが含まれる。他の例示的な蛍光色素には、Dower et al., 国際公開公報第93/06121号によって考察されたものが含まれる。米国特許第5,573,909号 (Singer et al.) および米国特許第5,326,692号 (Brinkley et al.) に記載された蛍光色素に言及することもできる。または、米国特許第5,227,487号、米国特許第5,274,113号、米国特許第5,405,975号、米国特許第5,433,896号、米国特許第5,442,045号、米国特許第5,451,663号、米国特許第5,453,517号、米国特許第5,459,276号、米国特許第5,516,864号、米国特許第5,648,270号、および米国特許第5,723,218号に記載された蛍光色素に言及することも可能である。

【0136】

酵素免疫測定法の場合には、一般にグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸により、酵素を二次抗体と結合させる。しかし、容易に認識されるように、当業者が容易に利用し得る広範な種々の結合技法が存在する。特異的な酵素と共に用いられる基質は、一般に、対応する酵素による加水分解により、検出可能な色の変化を生じるように選択される。適切な酵素の例には前記のものが含まれる。また、上記の発色基質ではなく、蛍光産物を生じる蛍光基質を用いることも可能である。いずれの場合にも、酵素標識抗体を一次抗体-抗原複合体に対して添加し、結合させ、次いで過剰な試薬を洗浄除去する。続いて、適切な基質を含む溶液を抗体-抗原-抗体という複合体に対して添加する。この基質は二次抗体に連結されている酵素と反応して定性的な視覚シグナルを生じるが、これをさらに定量すること (通常は分光測定で) により、試料中に存在した抗原の量の指標を得ることができる。

【0137】

または、フルオレセイン、ローダミン、およびランタニド、ユーロピウム (EU) 等の蛍

10

20

30

40

50

光化合物を、抗体に対して、その結合能を変化させることなく化学的に結合させてもよい。特定波長の光の照射により活性化されると、蛍光色素標識抗体は光エネルギーを吸収して分子の励起状態を誘導し、その後、光学的顕微鏡により視覚的に検出できる特徴的な色調の光を放射する。蛍光標識抗体を、一次抗体-抗原複合体と結合させる。結合していない試薬を洗浄除去した後、残存する三次複合体に適当な波長の光を照射する。観察される蛍光は、関心対象の抗原の存在を示す。免疫蛍光アッセイ法（IFMA）は当技術分野において十分に確立されており、本方法にとっても特に有用である。しかし、放射性同位元素、化学発光分子、または生物発光分子等の他のレポーター分子を用いることも可能である。

【0138】

10

本発明の方法は、細胞アポトーシスを特徴とする状態（例えば新生物）の発症リスクがあると考えられる個体の単回検査もしくは継続的なモニターとして、またはそのような状態の進行の抑制またはさもなければ遅延を対象とした治療または予防処置計画の有効性のモニターとして有用である。これらの状況において、任意の1つまたは複数のクラスの生物試料におけるLaレベルの変化をマッピングすることは、個体の状態または現在行っている治療または予防処置計画の有効性の有意義な指標となる。したがって、本発明の方法は、正常レベル（本明細書において先に規定した）に対する、または個体の生物試料で測定された1つもしくは複数の以前のマーカーレベルに対する、個体におけるマーカーレベルの上昇または低下のモニタリングにまで及ぶことが理解されるべきである。

【0139】

20

本発明はさらに、患者由来の生物試料におけるアポトーシス細胞を検出するための定量的または半定量的診断キットの製造における、核分子に対する相互作用分子の使用を意図する。キットは使用に関する説明書を備え得り、自動化もしくは半自動化してもよく、または自動化機器もしくはソフトウェアと適合する形態にあってもよい。

【0140】

好ましくは、核分子はLaである。

【0141】

好ましくは、アポトーシス細胞はアポトーシス性新生物細胞である。

【0142】

キットの用途を何らかの方法に限定するわけではないが、診断および研究用途におけるアポトーシスの検出は有用である。現在、インビトロでアポトーシスを検出するための多くの試薬が市販されており、これにはアネキシンV、ミトコンドリア透過性色素、APO2.7（アポトーシス時にのみミトコンドリアタンパク質を認識するモノクローナル抗体）、ヨウ化プロビジウムおよび7-アミノ-アクチノマイシンD（7-AAD）等のDNA結合蛍光色素、ならびに蛍光発生カパーゼ阻害剤が含まれる。しかし、これらの試薬はアポトーシス細胞と壊死細胞を識別することができず（H. Lecoœur et al. J Immunol Methods 2002）、後期アポトーシス細胞を特異的に同定するには1つより多くを必要とする（P. Smolewski et al. J. Immunol Methods 2002 ; Hamel et al. Cytometry 25(2):173-181, 1996）。

30

【0143】

本発明に従って、Laに対する抗体の作製は、この分子の活性型または不活性型を対象とし得る。

40

【0144】

本発明の方法の診断における明らかな利点に加えて、アポトーシス細胞を正確に標的する能力により、限局的かつ高度な標的様式の治療および/または予防処置を実現する手段が提供される。今日まで、そのような処置（「魔法の弾丸」と称される場合が多い）は達成されていなかった。特に、腫瘍治療の状況においては、抗体が対象とし得る適切な腫瘍特異的抗原の同定ができていないという事実に起因して、標的治療という概念は達成されていなかった。しかし、本発明は、腫瘍を含むアポトーシス細胞に治療または予防処置を誘導することによって、これらの欠点を克服する。抗La免疫相互作用分子に結合させることができ、非アポトーシス性腫瘍細胞である、アポトーシス細胞の近傍に位置する細胞に

50

機能する治療的または予防的エフェクター機構を選択することにより、腫瘍の効果的な死滅が達成され得る。本エフェクター機構は任意の適切な形態をとってよいが、毒性分子を送達するか、または別の方法で近傍に位置する非アポトーシス性腫瘍細胞を死滅させることが好ましい。

【0145】

さらに、抗La抗体によりオプソニン化されたアポトーシス細胞の食作用は、ヒトIgG1およびIgG3等の抗体によって促進される。本発明を何らかの1つの理論または作用機序に限定するわけではないが、抗La抗体は、インビボにおいてマクロファージまたは他の食細胞に対して標的化されるようになり、その細胞内に蓄積する。アポトーシスを起こした細胞は、まず膜結合小胞またはアポトーシス小体に分割され、その後周囲の細胞、特にマクロファージとして知られるプロフェッショナルスカベンジャーによって処分される。抗La抗体は、インビトロおよびインビボにおいて、アポトーシス過程の特定の時期に特異的にアポトーシス細胞を認識する。さらに、抗La抗体はインビボにおいて、アポトーシス細胞を貪食するマクロファージに優先的に局在する。マクロファージは、心発作、脳卒中、および臓器移植拒絶で生じる組織損傷の治療に寄与する。癌は腫瘍関連マクロファージとして知られるマクロファージを多量に有し、このマクロファージは癌の増殖を遅延または促進させ得る。したがって、抗La抗体は、治療効果のある技術を癌に送達するための媒体として役立つ。

10

【0146】

したがって、本発明の別の局面は、対象における、細胞アポトーシスを特徴とする状態を治療的および/または予防的に処置する方法であって、状態を処置するのに十分な時間および条件の下で、治療的または予防的エフェクター機構と連結、結合、またはさもなければ会合している、核分子またはその抗原性部分に対する相互作用分子の有効量を対象に投与する段階を含む方法を対象とする。

20

【0147】

好ましくは、核分子はLaである。

【0148】

より好ましくは、相互作用分子は免疫相互作用分子であり、さらにより好ましくは抗La抗体である。

【0149】

別の好ましい態様において、状態は、心筋もしくは脳組織の梗塞、自己免疫疾患および他の炎症性疾患、AIDS等のウイルス性疾患、アルツハイマー病もしくはパーキンソン病等の神経変性疾患、急性固形臓器移植拒絶もしくは急性骨髄移植拒絶、化学療法もしくは放射線誘導性組織損傷（「粘膜炎」）、または腫瘍等の新生物である

30

【0150】

本発明に含まれる新生物および新生物細胞の例には、これらに限定されないが、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫および他の小児腫瘍、頭頸部癌（例えば扁平細胞癌）、乳癌および前立腺癌、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、腎臓癌（例えば腎細胞腺癌）、食道胃癌、肝細胞癌、膵胆管新形成（例えば、腺癌および島細胞腫瘍）、結腸直腸癌、子宮頸癌および肛門癌、子宮癌および他の生殖器官の癌、尿路癌（例えば、尿管および膀胱の）、胚細胞癌（例えば、精巢胚細胞腫瘍または卵巣胚細胞腫瘍）、卵巣癌（例えば卵巣上皮癌）、原発不明の癌腫、ヒト免疫不全関連悪性腫瘍（例えばカポジ肉腫）、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、肉腫、内分泌腫瘍（例えば甲状腺の）、中皮腫および他の胸膜腫瘍、神経内分泌腫瘍、ならびにカルチノイド腫瘍が含まれる。

40

【0151】

「核分子」、「La」、「免疫相互作用分子」、「対象」、および「アポトーシス」への言及は、本明細書において先に提供した意味と同じ意味を有すると理解されるべきである。

【0152】

本発明は、より詳細には、対象における新生物状態を治療的および/または予防的に処

50

置する方法であって、新生物の増殖を抑制する、減少させる、またはさもなければ下方制御するのに十分な時間および条件の下で、治療的エフェクター機構と連結、結合、またはさもなければ会合している、Laまたはその抗原性部分に対する免疫相互作用分子の有効量を対象に投与する段階を含む方法を提供する。

【0153】

好ましくは、新生物状態は悪性腫瘍である。

【0154】

「エフェクター機構」への言及は、アポトーシス細胞の部位に局在する場合に、直接または間接的に問題の状態を治療する、例えば腫瘍細胞の増殖を下方制御する、任意の適切な機構への言及として理解されるべきである。この好ましい態様との関連において、エフェクター機構は、この結果を達成するタンパク質性もしくは非タンパク質性の分子または分子群である可能性が最も高い。本発明の方法において使用するのに適したエフェクター機構の例には、これに限定されないが以下のものが含まれる：

(i) 作用して免疫応答の1つまたは複数の局面を誘導または増強し、それによりパイスタウンダーの死滅を増大させる、マクロファージ、樹状細胞、および/またはT細胞活性化因子等のサイトカイン、ケモカイン、または他の因子に結合している抗体の使用。例えば、走化性ペプチド、N-ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニン (FMLP) (Morikawa et al. *Cancer Immunol Immunother* 27(1):1-6, 1998) および新規細菌リポペプチド、JBT 2002 (Shinohara et al. *J Immunother* 23(3):321-331, 2000) はどちらも、腫瘍関連マクロファージの活性化因子である。

(ii) 毒素に結合している抗体の使用。

【0155】

「毒素」への言及は、細胞の増殖、分化、または維持を減少させる、阻止する、またはさもなければ抑制する（本明細書においては、細胞の「増殖を下方制御すること」と称する）シグナルを提供するという目的を達成する、任意の適切なタンパク質性または非タンパク質性分子への言及として理解されるべきである。本毒素は、対象細胞と直接接触することによりそのシグナルを提供する段階、またはシグナルを対象細胞に提供する分子もしくは粒子（放射性同位元素毒素の場合の放射線等）を放射する段階を含む、様々な手段によって作用し得る。毒素は放射性同位元素であることが好ましく、近距離で毒性が高くかつ半減期が短く、よって近傍に位置する非腫瘍細胞に対する不用意な毒性の発生を最小限に抑える放射性同位元素であることがさらにより好ましい。最も顕著には、放射性同位元素は線放射放射性同位元素である。しかし、放射性同位元素は線放射放射性同位元素に限定されず、臨床状況に応じて線および線放射放射性同位元素も含まれ得ることが理解されるべきである。本発明の方法において使用するのに適した線放射放射性同位元素の例には、これらに限定されないがTb-149またはBi-213が含まれる。本発明の方法において利用される毒素は、精製形態、部分精製形態、または未精製形態であってよいことが理解されるべきである。これはまた、より大きな分子の成分を形成してもよい。毒素は天然であってもよいし、合成または組換えで産生されてもよい。

【0156】

「毒素」の範囲に入ると理解されるべき分子の他の例には、リシン、colicheamiciin、プロドラッグ（抗体指向性プロドラッグ変換酵素療法 [antibody-directed prodrug converting enzyme therapy: ADEPT] として）、および触媒抗体等の新規の生物学的薬物が含まれる。

【0157】

本発明の方法は、インビボまたはインビトロで実行し得ることが理解されるべきである。インビトロでの用途の例には、新生物細胞を含む生物試料の体外癌細胞排除 (in vitro purging) が含まれるが、これに限定されない。例えば、骨髄および/または血液を患者から採取し、本発明の方法に従って腫瘍細胞を死滅させて排除し、その後これを患者に戻す。このような手順は、標的様式が著しく低いにもかかわらず現在行われており、MHC不適合骨髄の移植に付随する顕著なリスクが回避されている。

【0158】

抗La、例えば抗体または他の免疫相互作用分子と「連結、結合、またはさもなければ会合している」エフェクター機構への言及は、2つの分子の結合を達成する任意の共有結合性または非共有結合性相互作用機構への言及として理解されるべきである。これには、ペプチド結合、イオン結合、水素結合、ファンデルワールス力、または任意の他の相互作用結合機構が含まれるが、これらに限定されない。

【0159】

細胞または新生物の「増殖 (growth)」への言及は、本細胞の増殖 (proliferation)、分化、および/または生存度の維持への言及として理解されるべきであり、細胞または新生物の「増殖 (growth) を下方制御すること」とは、細胞の老化の過程、または本細胞の増殖 (proliferation)、分化、および/もしくは生存度の維持を減少させること、阻止すること、もしくは抑制することへの言及である。好ましい態様において、増殖 (growth) は増殖 (proliferation) であり、下方制御は死滅である。この関連において、死滅は、細胞に致死打撃を送達することにより、または細胞のアポトーシスを誘導するシグナルを細胞に送達することにより達成され得る。

10

【0160】

本明細書における「治療的」または「予防的」「処置」への言及は、その最も広い文脈で考えるべきである。「処置」という用語は必ずしも対象を完全に回復するまで処置することを意味するわけではない。同様に、「予防」は必ずしも対象が結果的に疾患状態にからないことを意味するわけではない。したがって、治療および予防には、特定の状態における症状の改善、または特定の状態を発症するリスクを妨げるもしくはさもなければ軽減することを含む。「予防」という用語は、特定の状態の重症度または発症を軽減することと見なし得る。「処置」もまた、既存の状態の重症度を軽減し得る。

20

【0161】

本発明を何らかの1つの理論または作用機序に限定するわけではないが、抗癌治療は通常はアポトーシスにより死滅させるものであるが、進行癌の多くの症例では、一部の癌細胞は特定の癌治療によって誘導され得るアポトーシスに耐性を示す。これらのアポトーシス耐性腫瘍細胞は疾患の臨床的再発の原因であり、この再発のために、進行癌患者のほとんどおよびそれよりも初期段階の癌患者のかなりの割合が最終的に死亡する。腫瘍細胞の死滅がインビボで実証され得たために、最初の治療様式に反応することが示され得た進行癌患者においては、別の非交差耐性の治療様式も利用することができれば、生存および生活の質をさらに高めることが可能である。したがって、本発明の方法を用いて反応性の癌患者を診断することにより、詳述した治療的複合体または雑種融合タンパク質を用いた補助的治療が有用であると考えられる患者を同定することができる。

30

【0162】

抗La抗体の使用はまた、補助的臨床設定においても好ましい。早期の乳癌および結腸癌はいずれも手術によって治療し得るが、原発腫瘍が何らかのリスクの高い特徴を有するおよび/または所属リンパ節が転移を含む患者では、検出不可能な全身性微小転移巣が既に存在する可能性があるために、明白かつ治療不能な全身再発のリスクは増大する。そのため、補助化学療法および/または補助ホルモン療法 (乳癌の場合) によって、おそらくは全身性微小転移巣がうまく除去されるために、さらに一部の割合の患者が治癒する。

40

【0163】

さらに、休眠腫瘍は血液供給の欠如のために小さいままであるが、病変内の腫瘍細胞は細胞分裂速度とアポトーシス速度の平衡を保ちながら急速にターンオーバーしている。したがって、休眠腫瘍でさえも本技術に適した標的となる。臨床的に明らかな転移および微小転移巣ではいずれの場合も、アポトーシス耐性癌細胞は感受性癌細胞と混在し得る。最初の治療によってアポトーシス性となった癌細胞の近傍に殺腫瘍の非交差耐性および/または相乗的手段が送達されれば、これらの残存癌細胞の殺バースタンダーが起こり得る。殺バースタンダー能を有するこの技術を備えたさらなる技術によって、治療効果が改善され得る。

50

【0164】

したがって、本発明の最も好ましい態様は転移癌の治療を対象とする。

【0165】

この好ましい態様により、対象における転移癌を治療的に処置する方法であって、転移癌の増殖を抑制する、減少させる、またはさもなければ下方制御するのに十分な時間および条件の下で、治療的エフェクター機構と連結、結合、またはさもなければ会合している、Laまたはその抗原性部分に対する免疫相互作用分子の有効量を対象に投与する段階を含む方法を提供する。

【0166】

本明細書において先に詳述したように、本発明がインビトロ環境における新生物細胞の増殖の下方制御にまで及ぶことも理解されるべきである。例えば、自家移植する前に、骨髓または末梢血幹細胞の接種物から新生物細胞を排除することができる。

10

【0167】

「有効量」とは、少なくともある程度、所望の応答を達成するため、または治療しようとする特定の状態の発症を遅延させるため、もしくは進行を抑制するため、もしくはその発症もしくは進行を完全に停止させるために必要な量を意味する。その量は治療しようとする個体の健康状態および身体状態、治療しようとする個体の分類群、所望の防御の程度、組成物の処方、医学的状态の評価、ならびに他の関連要因に応じて変動する。その量は比較的広い範囲にわたり、日常的試験によって決定し得ると考えられる。

【0168】

本発明はさらに、癌の治療において、哺乳動物の体内に細胞毒性薬を循環させることまたは哺乳動物に放射線療法を行うことと共に抗体を投与するといった、治療法の組み合わせも意図する。

20

【0169】

薬学的組成物の形態としての相互作用分子（本明細書において「調節剤」と称する）の投与は、任意の簡便な手段によって行うことができる。薬学的組成物の調節剤は、ある量を投与した場合に治療活性を示すと考えられ、その量は個々の場合に依って決まる。その差異は、例えば、ヒトであるか動物であるか、および選択した調節剤に依存する。広範囲にわたる用量が適用できる。例えば、患者を考えた場合には、体重1kg当たり1日につき約0.1 mg～約1 mgの調節剤を投与することができる。投与計画は、最適な治療応答が得られるように調節することができる。例えば、数回に分割した用量を毎日、毎週、毎月、もしくはは他の適切な間隔で連続して投与してもよいし、または状況の必要性によって示される程度に比例して用量を減らしてもよい。

30

【0170】

調節剤は、経口、静脈内（水溶性の場合）、腹腔内、筋肉内、皮下、皮内、または座薬経路もしくは移植（例えば、徐放性分子を用いる）等の簡便な方法で投与することができる。調節剤は、酸付加塩または例えば亜鉛、鉄等との金属複合体（この用途のための塩と見なされる）等の、薬学的に許容される非毒性塩の形態で投与してもよい。このような酸付加塩の例には、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、リンゴ酸塩、アスコルビン酸塩、酒石酸塩等がある。活性成分を錠剤の形態で投与する場合には、錠剤は、トラガカント、コーンスターチ、またはゼラチン等の結合剤；アルギン酸等の崩壊剤；およびステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤を含んでもよい。

40

【0171】

投与経路には、これらに限定されないが、気道、気管内、鼻咽頭、静脈内、腹腔内、皮下、頭蓋内、皮内、筋肉内、眼内、くも膜下腔内、脳内、鼻腔内、注入、経口、直腸内、静脈内点滴、パッチ、および埋め込みが含まれる。

【0172】

これらの方法によると、本発明により規定される薬剤は、1つまたは複数の他の化合物または分子と同時投与することができる。「同時投与」とは、同一もしくは異なる経路に

50

よる同一製剤もしくは2つの異なる製剤での同時投与、または同一もしくは異なる経路による連続投与を意味する。例えば、本製剤は、その効果を増強するために作動性薬と共に投与することができる。「連続」投与とは、2種類の分子の投与間に数秒、数分、数時間、または数日の時間差があることを意味する。これらの分子は任意の順序で投与することができる。

【0173】

本発明の別の局面は、対象における、細胞アポトーシスを特徴とする状態を処置するための薬剤の製造における、エフェクター機構に結合している抗核分子相互作用分子の使用であって、エフェクター機構によって状態が処置される使用を意図する。

【0174】

好ましくは、核分子はLaである。

【0175】

好ましくは、相互作用分子は免疫相互作用分子であり、さらにより好ましくはモノクローナル抗体等の抗La抗体である。

【0176】

最も好ましくは、非核局在性は、本明細書において先に規定した細胞外局在性である。

【0177】

別の好ましい態様において、状態は、心筋もしくは脳組織の梗塞、自己免疫疾患および他の炎症性疾患、AIDS等のウイルス性疾患、アルツハイマー病もしくはパーキンソン病等の神経変性疾患、急性固形臓器移植拒絶もしくは急性骨髄移植拒絶、化学療法もしくは放射線誘導性組織損傷（「粘膜炎」）、または腫瘍等の新生物である。

【0178】

本発明に含まれる新生物および新生物細胞の例には、これらに限定されないが、中枢神経系腫瘍、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫および他の小児腫瘍、頭頸部癌（例えば扁平細胞癌）、乳癌および前立腺癌、肺癌（小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、腎臓癌（例えば腎細胞腺癌）、食道胃癌、肝細胞癌、膵胆管新形成（例えば、腺癌および島細胞腫瘍）、結腸直腸癌、子宮頸癌および肛門癌、子宮癌および他の生殖器官の癌、尿路癌（例えば、尿管および膀胱の）、胚細胞癌（例えば、精巣胚細胞腫瘍または卵巣胚細胞腫瘍）、卵巣癌（例えば卵巣上皮癌）、原発不明の癌腫、ヒト免疫不全関連悪性腫瘍（例えばカポジ肉腫）、リンパ腫、白血病、悪性黒色腫、肉腫、内分泌腫瘍（例えば甲状腺の）、中皮腫および他の胸膜腫瘍、神経内分泌腫瘍、ならびにカルチノイド腫瘍が含まれる。

【0179】

さらに別の局面において、本発明は、本明細書において先に規定した調節剤を、1つまたは複数の薬学的に許容される担体および/または希釈剤と共に含む薬学的組成物を意図する。そのような薬剤は活性成分と称される。

【0180】

注射用途に適した薬学的形態には、滅菌水溶液（水溶液の場合）または分散液および滅菌注射用溶液または分散液を即時調製するための滅菌粉末が含まれ、これはクリーム形態または局所塗布に適した他の形態であってもよい。それは、製造および保存条件下において安定でなければならず、細菌および真菌等の微生物の汚染作用を受けないように保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、適切なそれらの混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒であってもよい。例えば、レシチン等のコーティングを使用することによって、分散液の場合には必要な粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって、適当な流動性を維持することができる。微生物作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によって行い得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖類または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に使用することによって行うことができる。

10

20

30

40

50

【0181】

滅菌注射液は、必要な量の活性化化合物を、必要に応じて上記に列挙した種々の他の成分と共に適切な溶媒に組み入れ、濾過滅菌することによって調製される。一般に、分散液は、滅菌した種々の活性成分を、基本的な分散媒および上記に列挙したもののうち必要な他の成分を含む滅菌媒体に組み入れることによって調製される。滅菌注射液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は真空乾燥法および凍結乾燥法であり、これらの方法により、あらかじめ濾過滅菌したその溶液から活性成分および補足的な所望の成分の粉末が得られる。

【0182】

活性成分が適切に保護されている場合には、例えば不活性希釈剤もしくは吸収性の可食担体と共に経口投与することができ、または硬ゼラチンカプセルもしくは軟ゼラチンカプセルに封入することができ、または錠剤に打錠成型することができ、または食材に直接組み入れることもできる。経口治療投与では、活性化化合物を賦形剤と共に組み入れて、摂取可能な錠剤、パッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、オブラート等の形態で使用することができる。このような組成物および調製物は、少なくとも1重量%の活性化化合物を含むべきである。組成物および調製物の割合は当然ながら変動してよく、約5~約80重量%の単位であるのが好都合である。このような治療上有用な組成物中の活性化化合物の量は、適した用量が得られるような量である。本発明による好ましい組成物または調製物は、経口投与単位剤形が約0.1 μg ~ 約2000 mgの活性化化合物を含むように調製される。

【0183】

錠剤、トローチ、丸剤、カプセル等は、以下に記載する成分も含み得る：ゴム、アカシアゴム、コーンスターチ、またはゼラチン等の結合剤；第二リン酸カルシウム等の賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸等の崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤；およびショ糖、乳糖、またはサッカリン等の甘味剤を添加することができ、ペパーミント、ウィンターグリーン油、またはチェリー香味料等の香料添加剤を添加することもできる。投与単位剤形がカプセルである場合には、上記の種類の物質に加えて液体担体を含めてもよい。コーティングとしての、またはさもなければ投与単位の物理的形態を改良するための他の様々な物質が存在してもよい。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセルは、シェラック、糖、またはその両方でコーティングすることができる。シロップまたはエリキシル剤は、活性化化合物、甘味剤としてのショ糖、保存剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、色素、ならびにチェリーまたはオレンジフレーバー等の香味料を含み得る。当然のことながら、いかなる投与単位剤形を調製する際に使用されるいかなる物質も、薬学的に純粋であり、かつ使用される量では実質的に無毒であるべきである。さらに、1つまたは複数の活性化化合物を、徐放性の調製物および製剤に組み入れることも可能である。

【0184】

本発明のさらに別の局面は、本発明の方法に用いる場合の、本明細書において先に規定した薬剤に関する。

【0185】

本発明を以下の非制限的な例によってさらに規定する。

【0186】

実施例1

本明細書において用いた抗La抗体はマウスモノクローナル抗体ハイブリドーマ3B9であり、これはヒト型およびマウス型の低分子リボ核タンパク質抗原、La/SS-Bを認識する。この抗体はTom Gordon教授、Flinder Medical Centre、南オーストラリア州、アデレードから分与されたものであり、この教授はこの抗体をM. Bachmann博士、Oklahoma Medical Research Foundation、米国、オクラホマ州、オクラホマシティーから入手した。3B9は、Dr. Gordonのグループによって公表された(Tran et al. 2002a)。対応するアイソタイプ対照抗体ハイブリドーマはSa15である。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 7 】

野生型 (ST) C57BL/6雄マウス (7週齢) 6匹、または6月齢のトランスジェニックマウス前立腺腺癌 (TRAMP) マウス2匹 (列1) に、400 μ l の正常ヒト血清 (NHS) またはLa反応性自己抗体を含むヒト血清 (La血清) を1日ごとに2回静脈内注射した。マウスはそのままにしておくか、または1回目の注射を行った日に外科的に去勢した (列2)。2回目の注射をしてから2日後、マウスを屠殺し解析した。La血清を注射したマウスすべてにおいて、マウスLaと交差反応する高レベルのhIgGがELISAによって検出された。NHSを注射した陰性対照は、注射をしていない正常マウス血清 (NMS) と同程度に低いバックグラウンドレベルを示した (列3)。ニワトリ卵白リゾチーム (HEL) をELISAの陰性対照として用いた (列4)。hIgGの血清レベルを定量的ELISAにより直接測定したが、そのレベルは以前に行われた実験 (Tran et al, 2002b) の場合よりもはるかに高いことが判明した。妊娠BALB/cマウスにLa血清を注射したところ、血清hIgGは0.01~0.4 g/Lに及び、胎児アポトーシス性心筋細胞の良好なオプソニン化を生じた (列5)。TUNEL⁺アッセイにより前立腺上皮アポトーシスの程度を測定した。表に示した数字は、切片全体に得られた前立腺上皮層において検出されたTUNEL⁺核を表す。ほぼすべてのマウスの前立腺管腔において検出された多数のTUNEL⁺粒子はカウントしなかった。無傷のマウスと比較して、去勢したマウスではアポトーシスの増加傾向が見られた (列6)。3匹のマウスのうち1匹においてアポトーシス性前立腺上皮細胞に対するhIgGの結合が検出されたが、そのマウスは去勢しLa血清を注射したマウスであった (列7)。この場合、前立腺管腔において、明るい粒子性hIgGで覆われた多数のTUNEL⁺細胞が検出された。TUNEL⁺細胞に対するhIgGの結合は、上皮内およびその表面上においても認められた。連続 (隣接) 切片の免疫標識から、これらの免疫複合体の近傍にMHC-II⁺細胞およびF4/80⁺細胞が存在することが示唆された (データは示さず)。顕著なことには、hIgGの結合は、NHSを注したマウス、またはLa血清を注射したが去勢していないマウスでは検出されなかった。さらなる対照として、La血清またはNHSを注射したマウスすべてにおいて十分なバックグラウンドの間質性および血管内hIgGが検出され (前立腺、脾臓、肝臓、唾液腺)、これはhIgGの検出可能な血清レベルと一致した。予想通り、多くのアポトーシス細胞が脾臓および胸腺において検出された。特に、脾臓はTUNEL染色を伴わずにhIgGの顕著な斑点状の染色を示した (この組織において血液組織関門は低かった)。アポトーシス細胞は去勢後に唾液腺において辛うじて検出され、腺上皮における去勢誘導性アポトーシスが前立腺特異的であるという考えと一致した。

【 0 1 8 8 】

(表3) 実験結果の概要の一覧表

マウス ID	処置	組換え抗原に結合した血清 hIgG (ELISA OD ₄₀₅)		hIgG の血清レベル (g/L)	切片当たりの前立腺上皮層における TUNEL(+)核	アポトーシス細胞に結合した hIgG
		6HisLa	6HisHEL			
WT	無傷、La 血清	1.850	0	3.2	2, 3	-
WT	無傷、La 血清	1.684	0	2.5	1	-
WT	去勢、La 血清	1.534	0	1.8	>30	+
WT	去勢、La 血清	1.685	0	2.7	8, 10	-
WT	無傷、NHS	0.007	0	1.5	N/A	-
WT	去勢、NHS	0.014	0	0.9	1, 3, 10	-
TRAMP	去勢、La 血清	1.588	0	2.4	>30	-
TRAMP	無傷、La 血清	1.389	0	1.6	5	-
NMS	N/A	0.016	0	N/A	N/A	N/A

【 0 1 8 9 】

実施例2

抗La抗体はアポトーシス細胞および壊死細胞と結合する

インビトロにおいてアポトーシスが誘導され進行するにつれて、アポトーシス細胞は膜の完全性を失うために次第に漏出性となり、これが核酸およびDNA結合色素、それぞれヨウ化プロビジウム (PI) および7-アミノ-アクチノマイシンD (7AAD) の結合活性の増加として現れる。アポトーシス細胞に対する抗La抗体の結合は、PI結合よりも緩やかな時間経過を有する。しかし、観察される抗La抗体染色の蛍光強度から、この抗体は、PI染色の強度が高いかまたは中程度であるかにかかわらず、同様の結合活性でアポトーシス細胞と結合することが示される (図3)。以下に示すように、PI^{中程度}亜集団はアポトーシス小体を含む。中程度の染色はPI濃度の変化にかかわらず存在するため、これはクエンチングによる人為的結果によるものではない。

【0190】

したがって、アポトーシス細胞に結合した抗La抗体は、インビトロにおけるアポトーシスの進行に伴う膜完全性の喪失の関数である。しかし、アイソタイプ対照mAbであるSa15による染色の蛍光強度は3B9 (抗モノクローナル抗体) 蛍光強度よりも1対数分低いことから、アポトーシス細胞に結合した抗La抗体は単なるmAbの受動的結合事象ではなく、3B9がその標的抗原、ヒトLa/SS-Bに特異的に結合したことが示される (図4、上段および中段パネル)。細胞骨格の成分を認識する抗チューブリンmAbもまたアポトーシス細胞に対する高レベルの結合を示したが、3B9よりもPI^{中程度}アポトーシス小体への結合は少なかった (全PI⁺事象の46%、69%と比較されたい) (図2、下段パネル)。

【0191】

図4に示したデータの一部をグラフ表示し、細胞生存度の喪失の別の指標であるトリパンプルーを排除する細胞の割合と各時点で比較する (図5)。アポトーシス細胞に対する抗La抗体結合の動力学は細胞透過性の既知マーカー (チューブリン) および細胞生存度の喪失 (トリパンプルー) と匹敵することが明白であり、アポトーシスに付随する膜完全性の喪失によって抗La抗体結合が可能になるという概念が支持される。

【0192】

図6に示されるように、アポトーシス性Jurkat細胞に由来するアポトーシス小体は、約4日間の期間にわたって、同程度の3B9の染色強度を保ったまま (図6、上段パネル) 大きさも安定していた (図6、下段パネル)。

【0193】

アポトーシスの初期の特徴である形質膜外面に露出されたホスファチジルセリンをプロービングするアネキシンV、および後期アポトーシスの特徴である漏出性細胞のDNAに結合する7AADを用いて、アポトーシス性Jurkat細胞に対する抗La抗体結合のさらなる動力学的解析を行った。この解析により、やはり抗La抗体結合は7AAD結合と対応し、アネキシンV結合よりも遅れて起こることが示される (図7)。この概念を図8において別の方法で示す。抗La抗体結合は、細胞がアネキシンV陽性であるが7AAD陰性である初期アポトーシス過程においてはわずかであるが (図8、左のパネルのR3)、細胞が7AADに対して透過性となった時点で抗La抗体結合は高レベルに増加する (図8、左のパネルのR1)。

【0194】

細胞膜完全性の喪失が抗La抗体結合に必要であることを強調するためには、初期壊死細胞もまた抗La抗体に対する高結合を示す (図9)。抗La抗体染色はDNAとも (図9A) 壊死細胞の膜上に露出されるホスファチジルセリンとも (図9B) 共存しないことに留意されたい。

【0195】

実施例3

アポトーシス小体に対する抗La抗体結合はカスパーゼ3に依存する

実施例2に述べたように、より詳細なフローサイトメトリー解析により抗La抗体がアポトーシス小体に結合することが示されたが、アポトーシス小体は核成分および細胞小器官の膜結合残遺物を様々な比率で含むために、小さなサイズ、および内部複雑度の減少を特徴とする (図10)。さらに、抗La抗体結合にはアポトーシス小体の形成が必要であることが示される。MCF-7細胞は、プロカスパーゼ3の遺伝子を欠くヒト乳癌細胞株である。

10

20

30

40

50

【0196】

プロカパーゼ3は決定的な実行カパーゼ、カパーゼ3の酵素前駆体型であり、死滅しかけている細胞において多くの機能タンパク質および構造タンパク質の切断を触媒する。これらのタンパク質のカパーゼ3媒介性切断は、アポトーシス細胞がアポトーシス小体として知られる数個（またはそれ以上）の小さな膜結合小胞に分裂する、アポトーシス小体形成の形態学的な外観に寄与する。MCF-7細胞は細胞死の過程においてアポトーシス小体形成を示さないが、この表現型は、プロカパーゼ3の遺伝子をMCF-7細胞にトランスフェクションすることによってレスキューされ得る。

【0197】

図10に示すように、プロカパーゼ3遺伝子によるMCF-7細胞の一過性トランスフェクションによってアポトーシス小体が形成され、結果として抗La抗体の結合が起こる。したがって、アポトーシス小体に対する抗La抗体結合はカパーゼ3に依存する。これらのアポトーシス小体は、RNAよりも優先的にDNAを染色する7AADに染まらなかった（図10、左下のパネル）。さらに、散乱光基準によって評価した場合、アポトーシス小体はサイズが小さかった（図10、右下のパネル）。

10

【0198】

次に、プロカパーゼ3遺伝子を安定にトランスフェクションしたMCF-7細胞について検討した。図11に示すように、対照ベクターまたはプロカパーゼ3遺伝子を含むMCF-7細胞をアポトーシス性にし、緑色蛍光色素、Alexa488で標識した3B9およびヨウ化プロピジウムで染色した（図11A）。この場合もやはり、アポトーシス小体に対する抗La抗体の結合にカパーゼ3活性が必要であることが示された。これらの細胞の蛍光顕微鏡観察から、プロカパーゼ3を発現しているMCF-7トランスフェクタントは出芽し、3B9⁺アポトーシス小体にはっきりと分割されることが実証された（図11C）。一方、ベクター対照MCF-7細胞は分離の低い3B9染色パターンを示し（図11C）、これはフローサイトメトリーによって観察されたベクター対照MCF-7細胞における3B9染色の広範な分布と一致する（図11A、右上のパネル）。対照的に、図10と同様に、カパーゼ3活性は3B9染色の限局的パターンをもたらす（図11A、右下のパネル）、これによりカパーゼ3の活性によってアポトーシス小体内でLa/SS-B抗原の均一な分配が起こったことが示唆された。

20

【0199】

図12に示すように、アポトーシス性Jurkat細胞の共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡観察により、抗La抗体染色が、ホスファチジルセリンが反転したアポトーシス細胞膜についての染色とも（アネキシンVにより検出）DNAについての染色とも（TOPRO3により検出）重複しないことが示された（図13A）。さらに、連続垂直断片から、抗La抗体染色が死細胞の細胞質領域の全体にわたって起こることが確認された。アイソタイプ対照mAb、Sa15を用いた場合に染色がほとんど観察されなかったことから、3B9による染色は特異的であった（図13B）。豊富な核抗原（核タンパク質の約2%を含む）であり、やはりアポトーシス過程においてカパーゼ3によって切断されるPARPは、特異的mAbを用いて検出した場合に3B9に対する染色と類似のパターンを示した（図12C）。総合して、これらのデータから、抗La抗体は死細胞の細胞質に「負荷される」ことが示唆された（図13）。

30

【0200】

同様にカパーゼ3によって切断され、アポトーシス小体の形成に寄与するフォドリン等の核抗原に特異的な他のmAbは、3B9によって示される染色パターンと類似したパターンでアポトーシス性Jurkat細胞を染色した（図14）。類似の染色パターンは、PCNAおよびラミンに特異的なmAbについても観察された。これらのmAbにより、7AADによって検出されるDNAとは共存しない、広範囲に及ぶ細胞質染色が実証された。実際に、7AADは周辺のアポトーシス突起に限局する傾向があった。対照的に、抗-チューブリンmAbによる染色はアポトーシス細胞の全体にわたって明らかであり、ある程度7AAD染色と共存した。

40

【0201】

抗La抗体はまた、末梢血単核細胞（PMBC）の大部分を含むアポトーシス性初期T細胞と結合する。しかし、初期T細胞に対する抗La抗体結合の蛍光強度は、PBMCをあらかじめT細

50

胞マイトジェン、コンカナバリンAで活性化した場合でも、悪性Jurkat T細胞に対して見られる蛍光強度の約1/2対数分低い(図15)。

【0202】

実施例4

他の核抗原およびリボ核抗原に対する他のモノクローナル抗体もまたアポトーシス細胞と結合する

共焦点スキャンレーザー顕微鏡観察研究において観察されたのと同様に、フローサイトメトリーによっても、核抗原およびリボ核抗原に特異的な多くのmAbの類似の結合動力学および結合パターンが示される。抗チューブリンmAbを、透過性アポトーシス細胞における細胞質結合の対照として含める(図16)。同様に、これらのmAbのいくつかは、MCF-7細胞にプロカスペーゼ3遺伝子をトランスフェクションした後に形成されるアポトーシス小体に特異的に結合する(図17)。

10

【0203】

実施例5

ヒトLa/SS-Bに対する他の抗体もまたアポトーシス細胞を検出する

ヒト抗La自己抗体(図18)、およびヒトLa/SS-Bに特異的な別のmAb、クローンSW3(図19)のアポトーシス細胞に対する結合について検討した。

【0204】

実施例6

抗La抗体はヒト種および齧歯類種の初期および悪性アポトーシス性細胞と結合する

20

抗La抗体は、アポトーシス性初期ヒト細胞との結合に加えて(図15)、デキサメタゾンまたはスタウロスポリンによりインビトロにおいてアポトーシスを誘導したマウスおよびラットの胸腺に由来するアポトーシス性初期細胞とも結合する。抗La抗体は、どちらの刺激によって誘導されたアポトーシスにも応答して、PI⁺胸腺細胞と特異的に結合する(図20)。増殖性細胞核抗原(PCNA)に対するmAbを用いた場合にも、同様の結合パターンが観察された。抗La抗体はまた、細胞毒性薬に応答してインビボでアポトーシスを起こした腫瘍細胞を含む齧歯類種のアポトーシス性腫瘍細胞(図21)、および多くのアポトーシス性ヒトおよびサル腫瘍細胞株(図22)とも結合する。

【0205】

当業者は、本明細書に記載した本発明が具体的に記載した以外の変更および修飾を受け得ることを理解すると考えられる。本発明はそのような変更および修飾のすべてを含むものと理解されるべきである。本発明はまた、本明細書に引用するまたは示す段階、特徴、組成物、および化合物のすべてを個別にまたはまとめて含み、ならびにそのような段階または特徴の任意の2つまたはそれ以上の様々な組み合わせを含む。

30

【0206】

参考文献

Adams *et al.*, *Cancer Res.* 53: 4026-4034, 1993.

Bachmann *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (20):7770-7774, 1986

Blankenberg *et al.* *Clin Cancer Res* 2002

Brinkley *et al.*, U.S. Patent No. 5,326,692.

10

Callahan *et al.* *Cell Death Different* 7(7):645-653, 2000

Carmo-Fonseca *et al.* *ExpCell Res* 185(1):73-85, 1989

Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196: 901, 1987.

20

Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227: 799, 1992.

Chou *et al.* (U.S. Patent No. 6,056,957).

Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., 1991-1997.

Cumber *et al.*, *J. Immunol.* 149: 120-126, 1992.

30

Davies & Riechmann, *FEBS Lett.* 339: 285-290, 1994.

Gefter *et al.*, *Somatic Cell Genet.* 3: 231-236, 1977.

Glockshuber *et al.*, *Biochem.* 29: 1363-1367, 1990.

H. Lecoeur *et al.* *J Immunol Methods* 2002.

40

- Hamel *et al.* *Cytometry* 25(2):173-181, 1996.
- Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363: 446-448, 1993.
- Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525, 1986.
- Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Department of Health and Human Services, 1983. 10
- Kennet *et al.* (eds) *Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, pp. 376-384, Plenum Press, New York, 1980.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6(7): 511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495-499, 1975. 20
- Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1547-1553, 1992.
- Kozbor *et al.*, *Methods in Enzymology* 121: 140, 1986.
- Krahlung *et al.* *Cell Death Different* 6(2):183-189, 1999. 30
- Krebber *et al.*, *J. Immunol. Methods* 201(1): 35-55, 1997.
- Ku & Schutz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6552-6556, 1995.
- Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443, 1987.
- Mamula *et al.* *J Immunol* 143(9):2923-2928, 1989. 40

Morgan *et al.* (U.S. Patent No. 6,180,377).

Morikawa *et al.* *Cancer Immunol Immunother* 27(1):1-6, 1988.

P. Smolewski *et al.* *J. Immunol Methods* 2002.

Plückthun *et al.*, In *Antibody engineering: A practical approach* 203-252, 1996.

10

Plünckthun, *Biochem. 31*: 1579-1584, 1992.

Pruijn *et al.* *Eur J Biochem* 232(2):611-619, 1995.

Queen *et al.* (U.S. Patent No. 6,180,370).

20

Ravirajan *et al.* *Lupus* 1(3):157-165, 1992.

Reiter *et al.*, *Biochem. 33*: 5451-5459, 1994.

Reiter *et al.*, *Cancer Res. 54*: 2714-2718, 1994.

Reiter *et al.*, *J. Biol. Chem. 269*: 18327-18331, 1994.

30

Richmann *et al.*, *Nature* 332: 323-327, 1988.

Shinohara *et al.* *J Immunother* 23(3):321-331, 2000.

Shulman *et al.*, *Nature* 276: 269-270, 1978.

Singer *et al.*, U.S. Patent No. 5,573,909.

40

Toyama *et al.*, "Monoclonal Antibody, Experiment Manual", published by Kodansha Scientific, 1987.

Tran *et al. Arthritis Rheum* 46(1):202-208, 2002.

Troster *et al. J Autoimmunity* 8(6):825-842, 1995.

10

Trowbridge, *J. Exp. Med.* 148(1): 313-323, 1978.

Verhoeyen *et al., Science* 239: 1534-1536, 1988.

Volk *et al., J. Virol.* 42(1): 220-227, 1982.

Ward *et al., Nature* 341: 544-546, 1989.

20

Webber *et al., Mol. Immunol.* 32: 249-258, 1995.

Winter and Milstein, *Nature* 349: 293, 1991.

Wu *et al. Nature Biotechnol* 2002.

【図面の簡単な説明】

30

【0207】

【図1】血清ありまたはなしで24時間培養した後に、組織培養フラスコから剥がし、フローサイトメトリーによって解析した前立腺癌細胞株LNCaPのグラフ表示である。細胞をヨウ化プロビジウム(PI)および(A)アネキシンV-FITC、(B)正常ヒト血清(NHS)またはアフィニティー精製したヒトLa自己抗体(hLa)およびマウス抗ヒトIgG-FITC、(C)マウスアイソタイプ対照またはマウス抗hLa mAbクローンSW3および抗マウスIgG-FITC、(D)マウスアイソタイプ対照またはマウス抗hLa mAbクローン3B9および抗マウスIgG-FITCで染色した。PI中程度(すなわち後期アポトーシス細胞)にゲートを設定した細胞のヒストグラムを示す。青線、NHSまたはマウスアイソタイプ対照；黒線、血清中で培養したLNCaPのアネキシンVまたは抗La染色；赤線、血清を欠乏させたLNCaP細胞のアネキシンVまたは抗La染色

40

【図2】抗La機能の略図である。抗La抗体によって癌細胞のうち化学療法によって誘導されたアポトーシスが診断されたならば(図2A)、次に死細胞の近傍に残存している生存癌細胞に、非交差耐性の作用機序を有する他の癌治療様式を送達する(図2B)。図2Aは、一次化学療法後に抗La抗体(黄色)によってアポトーシス性癌細胞(濃灰色)が検出され、これが生存癌細胞(薄灰色)の近傍に存在することを示す。図2Bは、非交差耐性抗癌治療を備えた抗La抗体(紫色)によって、残存する生存癌細胞(赤色)に殺バースタンダーを送達されることを示す。

【図3】インビトロにおいて徐々に形成され抗La抗体と結合するアポトーシス小体を示すグラフ表示である。アポトーシスは、0.5 μMスタウロスポリン(STS)を用いてJurkatヒ

50

トT細胞白血病細胞株において誘導した。FITC標識3B9および核非透過性核酸結合色素、ヨウ化プロピジウム (PI) で細胞を染色した。経時的に進行するアポトーシス小体の形成を矢印で示す。象限カーソルは、アイソタイプ対照、Sa15による染色が<3%となるように設定する。

【図4】アポトーシス性Jurkat細胞に対する抗La抗体の結合が膜透過性の増加と関連することを示すグラフ表示である。アポトーシスは、0.5 μ M STSを用いてJurkat細胞において誘導した。FITC標識Sa15 (アイソタイプ対照) またはFITC標識3B9 (抗La抗体) またはFITC標識抗-チューブリンmAb (チューブリン) およびPIで細胞を染色した。

【図5】アポトーシス性Jurkat細胞に対する抗La抗体結合の経時変化のグラフ表示である。アポトーシスは、0.5 μ M STSを用いてJurkat細胞において誘導した。FITC標識Sa15 (アイソタイプ対照) またはFITC標識3B9 (抗La抗体) またはFITC標識抗-チューブリンmAb (チューブリン) トリパンプルーで細胞を染色した。これらの各指標による染色に関して陽性であった、各時点での全細胞に対する割合を縦軸に示す。データは、単純線(A)としてまたはPrism v3.0において最小二乗法を用いた近似曲線として(B)プロットする。

【図6】アポトーシス小体およびアポトーシス小体に対する抗La抗体の結合がインビトロにおいて安定であることを示すグラフ表示である。アポトーシスは、0.5 μ M STSを用いてJurkat細胞において誘導した。FITC標識3B9およびヨウ化プロピジウム (PI) で細胞を染色した (上段)。アポトーシス小体のサイズおよび内部複雑度は、それぞれ前方散乱光 (forward scatter : FSC) および側方散乱光 (side scatter : SSC) を用いて示した (下段)。

【図7】インビトロにおけるアポトーシス過程において、アポトーシス細胞に対するアネキシンV、7AAD、および抗La抗体の結合が相互に関係し、時間とともに変化することを示すグラフ表示である。アポトーシスは、0.5 μ M STSを用いてJurkat細胞において誘導した。FITC標識ヒトアネキシンV (annV-FITC)、R-フィコエリトリン標識3B9 (PE-3B9)、および7AADで細胞を染色した。

【図8】インビトロにおけるアポトーシス過程において、アポトーシス細胞に対するアネキシンV、7AAD、および抗La抗体の時間依存的結合が相互に関係することを示すグラフ表示である。アポトーシスは、0.5 μ M STSを用いてJurkat細胞において誘導した。FITC標識ヒトアネキシンV (annV-FITC)、R-フィコエリトリン標識3B9 (3B9)、および7AADで細胞を染色した。領域R1~3における事象 (左側のパネル) を、サイズ (前方散乱光またはFSC) および内部複雑度 (側方散乱光またはSSC) (中央のパネル) ならびに7AADおよび3B9での染色 (右側のパネル) に関して解析した。

【図9】抗La抗体が壊死性Jurkat細胞に結合することを示す画像およびグラフ表示を含む。56 で1時間加熱することにより、Jurkat細胞において壊死を誘導した。A. 細胞をAlexa488標識3B9 (抗La抗体) (緑色) および核非透過性DNA結合色素、7-アミノ-アクチノマイシンD (7AAD) (赤色) またはB. Alexa488標識3B9 (抗La抗体) (緑色) およびR-フィコエリトリン標識アネキシンV (赤色) で染色し、レーザースキャン共焦点顕微鏡下で可視化した。C. FITC標識Sa15 (アイソタイプ対照) またはFITC標識3B9 (抗La抗体) およびPIで細胞を染色系、フローサイトメトリーにより解析した。

【図10】抗La抗体が後期アポトーシス細胞およびアポトーシス小体と優先的に結合することを示すグラフ表示である。アポトーシスは、0.5 μ M STSを用いてJurkat細胞において誘導した。FITC標識3B9およびPIで細胞を染色した。アポトーシス誘導後20時間または48時間において、PIにより異なって染色された3B9⁺亜集団 (左側のパネルそれぞれにおける1および2) にゲートを設定し、散乱光特性を解析した。散乱光解析 (右側のパネル) によって、時間とともに蓄積する3B9⁺ PI^{中程度}事象のサイズが小さく (前方散乱光 [FSC] によって測定されるサイズの減少) 顆粒性が低いこと (前方散乱光 [SSC] によって測定される内部複雑度の減少) が示される (右下のパネル)。象限カーソルは、アイソタイプ対照、Sa15による染色が<3%となるように設定する。

【図11】抗La抗体結合がカスパーゼ3依存的でありアポトーシス小体の形成と関連することを示すグラフ表示である。MCF-7細胞に、改変型緑色蛍光タンパク質 (EGFP) のみま

10

20

30

40

50

たはプロカスパーゼ3およびEGFPを発現するプラスミドDNAベクターを一過性にトランスフェクションした。0.5 μ M STSにより一過性にトランスフェクションしたMCF-7細胞においてアポトーシスを誘導し、FITC標識3B9および7AADで細胞を染色した。散布図（左側のパネル）に示す細胞は、緑色蛍光にゲートを設定したものである。次いで、各散布図（左側のパネル）の象限1および2における事象にゲートを設定し、散乱光特性を解析した。散乱光解析（右側のパネル）により、アポトーシス小体はサイズが小さく（前方散乱光 [FSC] によって測定されるサイズの減少）顆粒性が低いこと（前方散乱光 [SSC] によって測定される内部複雑度の減少）（右下のパネル）から、3B9結合がカスパーゼ3依存的でありアポトーシス小体の形成と関連することが示される。象限カーソルは、アイソタイプ対照、Sa15による染色が<3%となるように設定する。

10

【図12】抗La抗体結合がカスパーゼ3依存的でありアポトーシス小体の形成と関連することを示す画像およびグラフ表示を含む。MCF-7細胞に、ベクター対照（B）またはプロカスパーゼ3を発現するベクター（CおよびC'）を安定にトランスフェクションした。1 μ M STSで24時間処理することにより、MCF-7トランスフェクタントをアポトーシス性にした。A. フローサイトメトリーのため、Alexa488標識3B9およびヨウ化プロピジウム（PI）で細胞を染色した。B、C、およびC'。蛍光顕微鏡検査のため、Alexa488標識3B9（緑色）および核色素DAPI（青色）で細胞を染色した。アポトーシス小体を示す（矢印）。

【図13】死細胞の細胞質に負荷される抗La抗体の画像である。0.5 μ M STSで24時間処理することにより、Jurkat細胞においてアポトーシスを誘導した。核非透過性色素TOPRO3（青色）、Alexa488標識3B9または抗La抗体、アイソタイプ対照Sa15または抗PARP mAb（緑色）、およびR-フィコエリトリン（PE）標識ヒトアネキシンV（赤色）で細胞を染色し、共焦点レーザーสキャン顕微鏡下で可視化した。Alexa488標識3B9染色については、A. 低倍率およびA'。高倍率を示す；B. Sa15を用いた抗La抗体の陰性アイソタイプ対照染色；C. 抗PARP染色。

20

【図14】他の核抗原およびリボ核抗原に対する他のモノクローナル抗体もまたアポトーシス小体と結合することを示す画像である。0.5 μ M STSで24時間処理することにより、Jurkat細胞においてアポトーシスを誘導した。Alexa488標識抗 γ -フォドリンmAb（緑色）および7AAD（赤色）で細胞を染色し、レーザーสキャン共焦点顕微鏡下で可視化した。

【図15】アポトーシス性初期T細胞と比較して、悪性Jurkat T細胞のアポトーシス後にLa/SS-B発現が上方制御されることを示すグラフ表示である。フィコール精製した末梢血単核細胞（PBMC）を10% ウシ胎児血清を添加したRPMI-1640中で4d期間培養し、最後の培養24時間において1 μ M STSにより処理した。同様に、PBMCをT細胞マイトジェンコンカナバリンA（PBMC-ConA）10 μ g/mLで4d期間活性化し、最後の培養24時間において1 μ M STSにより処理した。Jurkat細胞（Jurkat）は、0.5 μ M STSで24時間処理することによりアポトーシス性にした。象限カーソルは、アイソタイプ対照、Sa15による染色が<3%となるように設定する。

30

【図16】他の核抗原およびリボ核抗原に対する他のモノクローナル抗体もまたアポトーシス小体と結合することを示すグラフ表示である。アポトーシスは、0.5 μ M STSを用いてJurkat細胞において誘導した。PIおよび様々なFITC標識mAb：アイソタイプ対照、Sa15、抗La/SS-Bクローン3B9（抗La抗体）、抗 γ -チューブリンククローンTUB2.1 FITCコンジュゲート（Sigma F 2043）、増殖性細胞核抗原（PCNA）クローンPC10（Oncogene cat#NA03）、マウス γ -フォドリン（非赤血球系抗スペクトリン）Chemicon MAB1622、抗ラミンBクローン101-B7（Oncogene cat#NA12）、および抗PARPクローンC2-10（Oncogene cat# AM30）で細胞を染色した。象限カーソルは、対応するアイソタイプ対照抗体による染色が<3%となるように設定する。

40

【図17】他の核抗原およびリボ核抗原に対する他のモノクローナル抗体もまたアポトーシス小体と結合することを示すグラフ表示である。MCF-7細胞に、EGFPのみまたはプロカスパーゼ3およびEGFPを発現するプラスミドDNAベクターを一過性にトランスフェクションした。0.5 μ M STSにより一過性にトランスフェクションしたMCF-7細胞においてアポトーシスを誘導し、7AADとFITC標識アイソタイプ対照mAb、Sa15、ならびにLa/SS-B（3B9）、

50

ラミンB、および増殖性細胞核抗原 (PCNA) に対するmAbで細胞を染色した。上列のパネルはトランスフェクションしていないMCF-7細胞を示す (EGFP陽性にゲートを設定)。トランスフェクションしていないMCF-7細胞の様相は、EGFPのみを発現するDNAベクターをトランスフェクションしたMCF-7細胞のものとはほぼ同一である (データは示さず)。

【図18】アポトーシス性ヒト細胞がヒト抗La自己抗体によって検出されることを示すグラフ表示である。0.5 μ M STSによる処置によってアポトーシス性にしたJurkat細胞を、Laアフィニティー精製したヒト抗La自己抗体 (上列のパネル) またはヒトLaに対するマウスmAb 3B9 (下列のパネル) で染色した。PI⁺細胞にゲートを設定し、アポトーシス誘導後の各時点に関するヒストグラムとしてデータを表す。陰性対照、ヒトIgG (太線) ; ヒト抗hLa抗体および3B9 (細線)。

10

【図19】アポトーシス性ヒト細胞が別の抗ヒトLa/SS-Bモノクローナル抗体によっても検出されることを示すグラフ表示である。Jurkat細胞をインビトロでの培養において未処理のままにしておくか (未処理)、または0.5 μ M STSで17時間処理してアポトーシスを誘導した (処理済)。PIおよびFITC標識抗マウス二次抗体またはmAbクローンSW3またはmAbクローン3B9で細胞を染色した。

【図20】抗La抗体が齧歯類種に由来する初期アポトーシス細胞と結合することを示すグラフ表示である。マウス (A~C) またはラット (D~F) 胸腺細胞を添加物なしで (A、D)、または1 μ Mデキサメタゾン (B、E) もしくは0.5 μ M STS (C、F) を添加してインビトロで21時間~24時間培養した。FITC標識アイソタイプmAb、Sa15 (対照) またはFITC標識3B9 (抗La抗体) およびヨウ化プロピジウム (PI) で細胞を染色した。

20

【図21】抗La抗体が齧歯類種に由来するアポトーシス性腫瘍細胞と結合することを示すグラフ表示である。マウス胸腺リンパ芽球性細胞株、EL4 (A~E) またはラット前立腺癌細胞株、AT-3.1 (F) を、0.5 μ M STS (A、F)、エトポシド (B)、もしくはエトポシドおよびシクロホスファミド (C) と共にインビトロで24時間培養した (A~C、F)、または未処理のままにしておいた (D) もしくはシクロホスファミドおよびエトポシドによりインビトロで48時間処理して腫瘍アポトーシスを誘導した (E) 同質遺伝子的なC57BL/6マウスにおける皮下移植片からEL-4腫瘍細胞を回収した。FITC標識アイソタイプmAb、Sa15 (対照) またはFITC標識3B9 (抗La抗体) およびヨウ化プロピジウム (PI) で細胞を染色した。

【図22】抗La抗体が多くのアポトーシス性ヒトおよびサル腫瘍細胞株と結合することを示すグラフ表示である。細胞株を0.5~1 μ M STSで24時間処理してアポトーシスを誘導した: A. Jurkat T細胞白血病; B. U2OS骨肉腫細胞; C. HeLa子宮頸癌細胞; D. MG63骨肉腫細胞; E. COS-7サル腎臓線維芽細胞。FITC標識アイソタイプmAb、Sa1 (対照) またはFITC標識3B9 (抗La抗体) およびヨウ化プロピジウム (PI) で細胞を染色した。

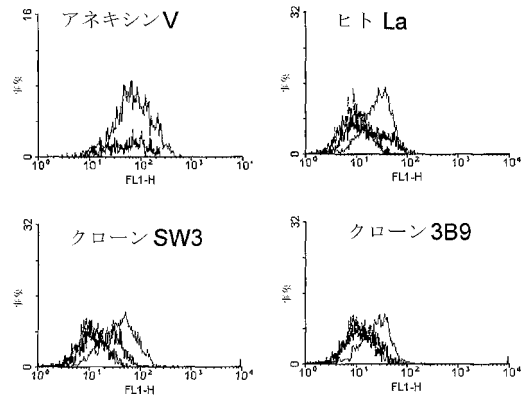
30

【図23】インビトロにおいて様々な段階を経るアポトーシスの進行の略図である。アポトーシス刺激の後、アポトーシス細胞は収縮し、アポトーシス小体として知られる膜結合小胞に断片化し、アポトーシス小体は徐々に漏出性となるかまたは時間とともに二次的に壊死性となる。最終的に、アポトーシス小体は崩壊し、オリゴヌクレオソーム、ひいては遊離のDNAとなる。

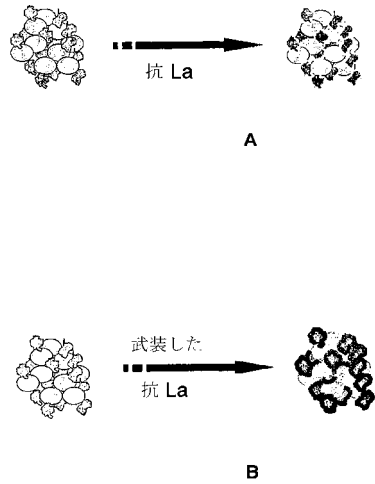
【図24】アポトーシスの段階がアネキシンVおよび7AAD等の核非透過性色素による染色によって従来通りに定義されることのグラフ表示である。0.5 μ Mスタウロスポリンで16時間処理することによりJurkat細胞をアポトーシス性にし、アネキシンV (AV) および7-アミノ-アクチノマイシンD (7AAD) で染色した。1、生細胞 (AV⁻、7AAD⁻) ; 2、初期アポトーシス細胞 (AV⁺、7AAD⁻) ; 3、後期アポトーシス細胞 (AV⁺、7AAD⁺) 。

40

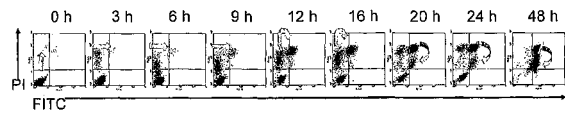
【 図 1 】



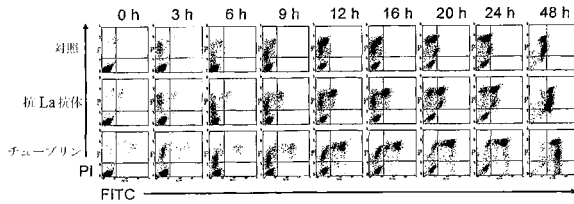
【 図 2 】



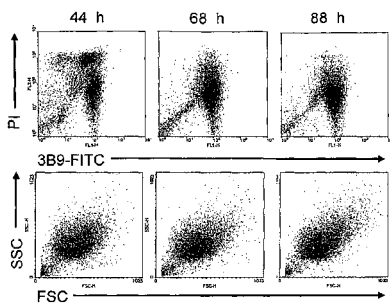
【 図 3 】



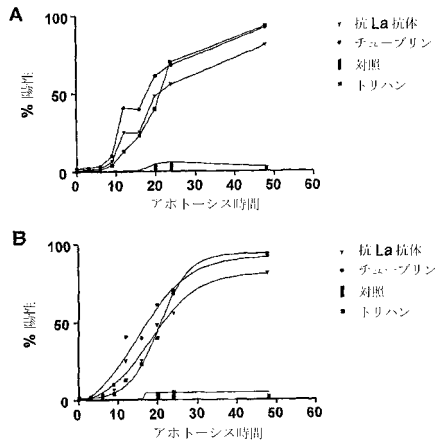
【 図 4 】



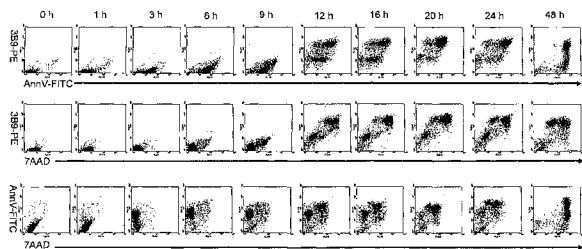
【 図 6 】



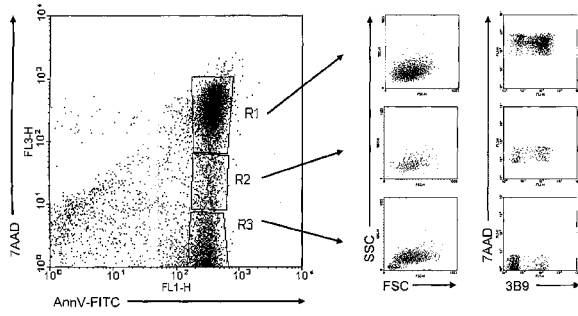
【 図 5 】



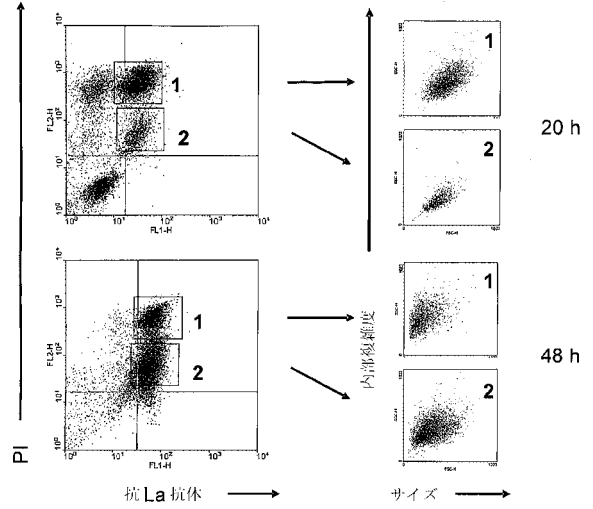
【 図 7 】



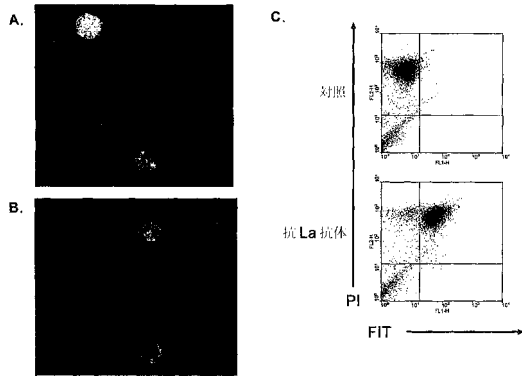
【図 8】



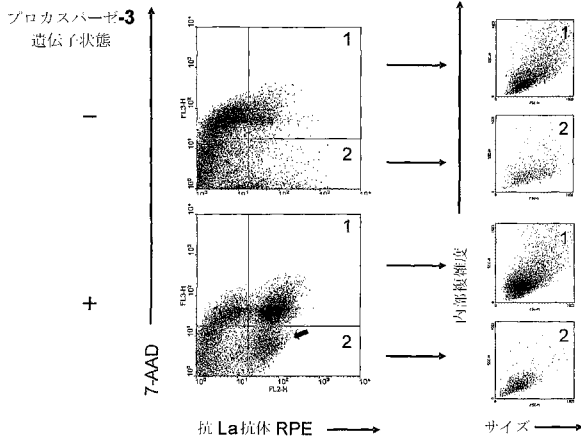
【図 10】



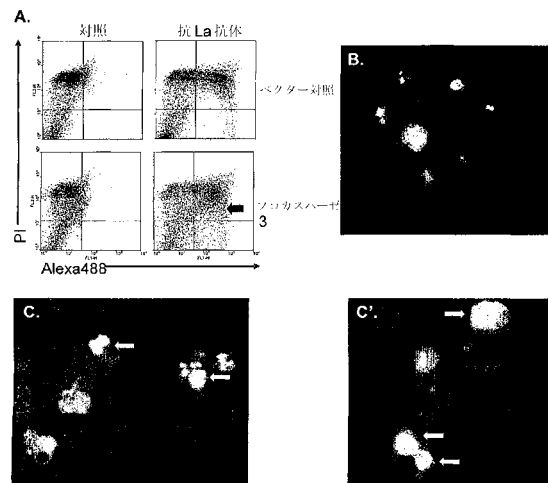
【図 9】



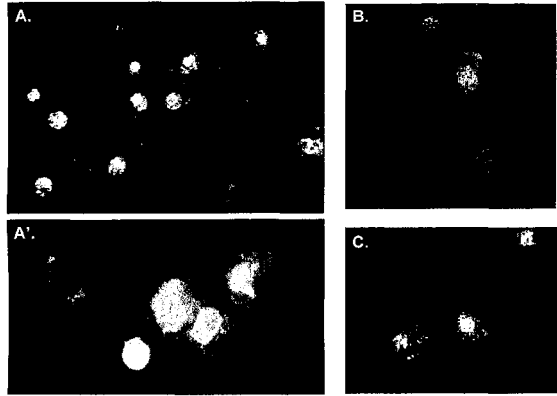
【図 11】



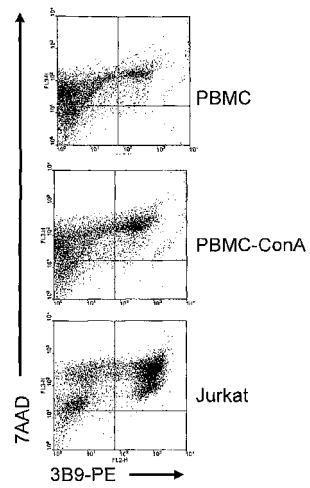
【図 12】



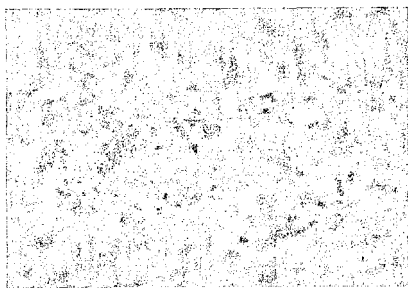
【 図 1 3 】



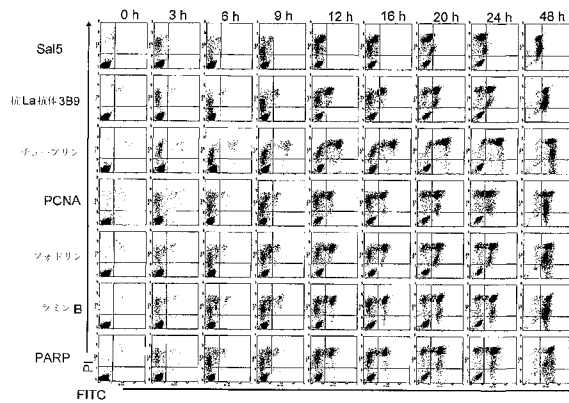
【 図 1 5 】



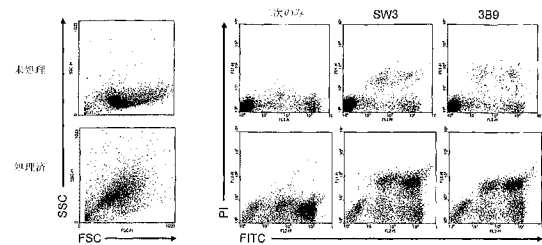
【 図 1 4 】



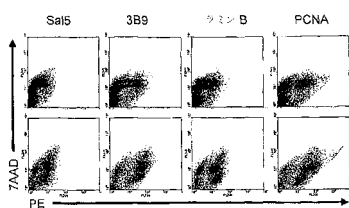
【 図 1 6 】



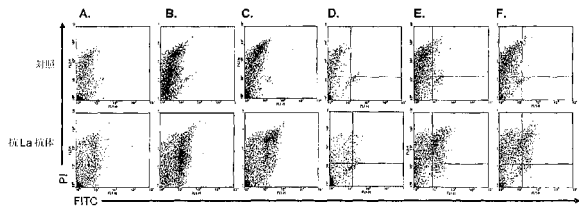
【 図 1 9 】



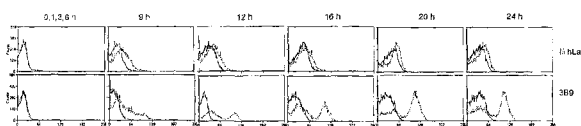
【 図 1 7 】



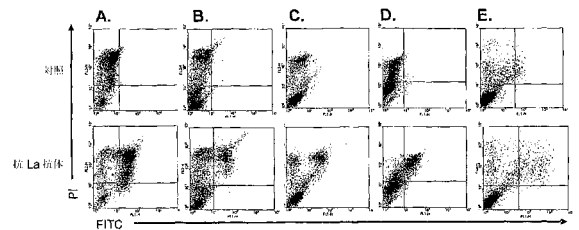
【 図 2 0 】



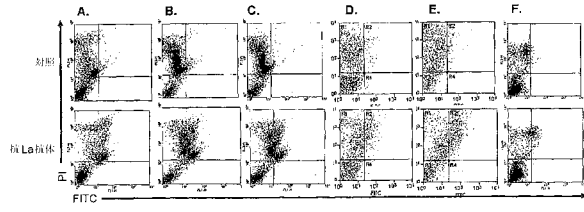
【 図 1 8 】



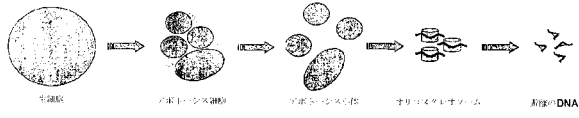
【 図 2 1 】



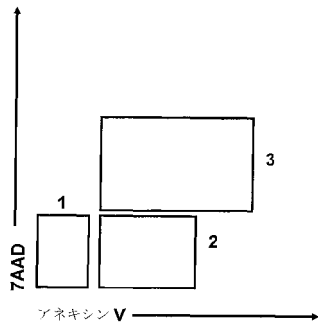
【 2 2 】



【 2 3 】



【 2 4 】



フロントページの続き

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 国際公開第95/012814(WO, A1)
国際公開第01/033229(WO, A1)
国際公開第02/036151(WO, A1)
CASCIOLA-ROSEN L. et al., Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes, *J. Exp. Med.*, 1994年, Vol.179, P.1317-1330
MCARTHUR C. et al., Intracellular trafficking and surface expression of SS-A(Ro), SS-B(La), poly(ADP-ribose)polymerase and -fodrin autoantigens during apoptosis in human salivary gland cells induced by tumour necrosis factor-, *Archives of oral biology*, 2002年, Vol.47, P.443-448
TRAN H. et al., Subcellular redistribution of La/SSB autoantigen during physiologic apoptosis in the fetal mouse heart and conduction system, *Arthritis & rheumatism*, 2002年, Vol.46, No.1, P.202-208

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

CAplus(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	用于检测细胞的方法和对其有用的药物		
公开(公告)号	JP5339676B2	公开(公告)日	2013-11-13
申请号	JP2006501372	申请日	2004-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	梅德维特科学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Medobetto科技控股.有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Medobetto科技控股.有限公司		
[标]发明人	ブラウンマイケルポール		
发明人	ブラウン マイケル ポール		
IPC分类号	G01N33/53 A61K47/48 A61K51/10 A61P35/00 C07K16/18 G01N33/50 G01N33/68		
CPC分类号	A61K47/6843 A61K51/1018 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/28 A61P29/00 C07K16/18 G01N33/5017 G01N33/6875 G01N2510/00 G01N33/57488		
FI分类号	G01N33/53.Y		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2003900777 2003-02-21 AU 2003901126 2003-03-06 AU		
其他公开文献	JP2006518453A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明一般涉及检测受试者或来自所述受试者的生物样品中的异常细胞，更具体地是凋亡细胞的方法，以及对其有用的试剂。异常细胞或异常细胞群的存在提供了特定疾病或病症或疾病或病症发展倾向的指示。更具体地，本发明涉及通过检测核外核分子，特别是La的存在或核外核分子水平的相对增加来检测凋亡细胞的方法。本发明进一步提供了一种诊断或监测病症的方法，所述病症的特征在于受试者或来自所述受试者的生物样品中的异常，不需要或不适当的细胞凋亡，通过筛选细胞或组中的核外核分子水平的上调。细胞。本发明提供了用于检测这些分子的诊断剂。此类诊断剂包括免疫相互作用分子，例如抗体。

元の残基	例示的な置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu