

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 523213

(P2003 - 523213A)

(43)公表日 平成15年8月5日(2003.8.5)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7088	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7088		39/00	H 4 B 0 2 4
39/00		39/385	4 B 0 5 0
39/385		39/39	4 C 0 7 6
39/39		39/395	T 4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 90数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 561350(P2001 - 561350)	(71)出願人	アクティブ バイオテック エイビー スウェーデン ルンド エス - 220 07 ピ ー.オー.ボックス 724
(86)(22)出願日	平成13年2月23日(2001.2.23)	(72)発明者	プロディン、トーマス・エヌ スウェーデン国、エス - 252・71 ラー、リ デングスガタン 10
(85)翻訳文提出日	平成14年8月23日(2002.8.23)	(72)発明者	カールストレム、ピア・ジェイ スウェーデン国、エス - 227・36 ルンド、 フィエリーベーゲン 10エー
(86)国際出願番号	PCT/SE01/00395	(72)発明者	ニルソン、ポー・エイチ・ケー スウェーデン国、エス - 223・62 ルンド、 セルベガタン 11
(87)国際公開番号	W001/062286	(74)代理人	弁理士 鈴江 武彦 (外3名) 最終頁に続く
(87)国際公開日	平成13年8月30日(2001.8.30)		
(31)優先権主張番号	0000597 - 5		
(32)優先日	平成12年2月24日(2000.2.24)		
(33)優先権主張国	スウェーデン(SE)		

(54)【発明の名称】 結腸癌に対して特異性を有する新規抗体

(57)【要約】

腫瘍細胞の中および/または表面に結合する結合構造；
 腫瘍細胞の中、もしくは表面に提示および/または発現
 される標的構造； 前記標的構造を認識およびブロックす
 る結合構造； 前記標的構造に結合する、もしくは前記標
 的構造の発現をブロックする物質； 活性成分として前記
 結合構造、標的構造もしくは物質を含む薬学的組成物；
 活性成分として前記標的構造を含むワクチン組成物；
 ファージ選択のための方法； 並びに、インビトロおよび
 インビボの診断および予後予測の方法、および上記の発
 明の使用を含むヒト悪性疾患を治療する方法、が記載さ
 れる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 腫瘍細胞の中および/または表面に結合する結合構造であって、その結合構造は配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号160-165 (CDR1), 180-195 (CDR2), 228-238 (CDR3)により本質的に定義される重鎖CDR構造により主に決定され、一方、付加的な結合特異性が配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号23-36 (CDR1), 52-58 (CDR2), 91-100 (CDR3)により本質的に定義される1以上の軽鎖CDR構造により提供される結合構造。

【請求項2】 腫瘍細胞の中および/または細胞表面に結合する結合構造であって、該結合構造が、配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号23-36 (CDR1), 52-58 (CDR2), 91-100 (CDR3)を本質的に含む軽鎖に抗体の1以上の相補性決定領域(CDR)配列、および配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号160-165 (CDR1), 180-195 (CDR2), 228-238 (CDR3)を本質的に含む重鎖に該CDR配列を含む結合構造。

【請求項3】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が前記CDR配列の全てを含む結合構造。

【請求項4】 請求項1~3の何れか1項に記載の結合構造であって、該結合構造が抗体および/またはその断片である結合構造。

【請求項5】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号1-110を本質的に含む軽鎖の可変領域、および配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号130-249を本質的に含む重鎖の可変領域、を含む抗体および/またはその断片である結合構造。

【請求項6】 請求項5に記載の結合構造であって、前記抗体が配列番号2に示したアミノ酸配列を含む結合構造。

【請求項7】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が原発性および/または転移性の結腸直腸、膵臓、乳房(胸部)および肺のカルシ

ノーマ細胞を含むグループから選択された上皮腫瘍細胞の中および/または細胞表面に強程度および/または均質に結合する結合構造。

【請求項8】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が腎臓および/または前立腺カルシノーマおよび/または悪性メラノーマ細胞に対して低程度および/または不均質に結合する、および/または結合しない結合構造。

【請求項9】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が結腸表面上皮および小腸 (small bowel) の上皮の先端部分に強程度に結合する結合構造。

【請求項10】 請求項9に記載の結合構造であって、該結合構造が結腸表層上皮細胞の微小絨毛および/または刷子縁の細胞表面の先端側に結合する結合構造。

【請求項11】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が乳腺上皮および/またはその周囲の結合組織に低程度から中程度で結合する結合構造。

【請求項12】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が脾臓、腎臓、肝臓、肺、皮膚、膵臓、甲状腺、心筋、および/またはCNSを含む正常組織に、低程度および/または不均質に結合する、および/または結合しない結合構造。

【請求項13】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造がファージ選択により提供される結合構造。

【請求項14】 請求項13に記載の結合構造であって、前記ファージ選択が、ファージ粒子上に提示されるインビボで免疫学的に予め選択されたレパトリーの結合構造と、異なる表現型の組織ペアの使用によるファージ粒子のサブトラクション選択との組み合わせを含む結合構造。

【請求項15】 請求項1または2に記載の結合構造であって、前記配列がオナガザル (*Macaca fascicularis*) 起源である結合構造。

【請求項16】 請求項1または2に記載の結合構造であって、前記配列がヒト起源の対応する配列に対して、少なくとも78% (V1) および86% (V

h) のアミノ酸同一性を有する結合構造。

【請求項17】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造がヒトにおいて低免疫原性もしくは非免疫原性を有する結合構造。

【請求項18】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、ポリペプチドに対する遺伝子的な連結により、および/または有機もしくは非有機化学物質に対する化学的結合により、および/またはダイメリゼーション、オリゴメリゼーションもしくはマルチメリゼーションにより、誘導体化されている結合構造。

【請求項19】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、細胞毒性ポリペプチドまたは細胞毒性有機もしくは非有機化学分子に遺伝子的に連結した、または化学的に結合した結合構造。

【請求項20】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、生物学的活性分子 (biologically active molecules) と遺伝子的に連結した、または化学的に結合した結合構造。

【請求項21】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、免疫活性化分子 (immune activating molecules) と遺伝子的に連結した、または化学的に結合した結合構造。

【請求項22】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、そのアビディティー (avidity) および/またはアフィニティー (affinity) を増加または減少するために変更されている結合構造。

【請求項23】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、その生産高を増加するために変更されている結合構造。

【請求項24】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、その薬物動態特性に影響するために変更されている結合構造。

【請求項25】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、それに新規薬物動態特性を付与するために変更されている結合構造。

【請求項26】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造は標識されており、その結合は特異的であると共に、非ラベル型の該結合構造により阻止可能で且つ他の結合構造により阻止不可能であり、また該結合構造は他

の特異性を有する他の結合構造の結合を阻止しない結合構造。

【請求項27】 請求項6で定義した抗体をコードするDNA配列であって、該DNA配列が配列番号1に示す配列を含むDNA配列。

【請求項28】 腫瘍細胞の中もしくは表面に提示および/または発現される標的構造であって、該標的構造は、請求項1～26の何れか1項で定義された結合構造により特異的に結合される能力、該結合構造に対して特異的に結合する能力、および類似する結合特性を有する他の結合構造に特異的に結合する能力を有する標的構造。

【請求項29】 請求項28に記載の標的構造であって、前記結合構造により特異的にブロックされる能力、および前記結合構造を特異的にブロックする能力を有する標的構造。

【請求項30】 請求項28に記載の標的構造であって、該標的構造は原発性および/または転移性の結腸直腸、膵臓、乳房(胸部)および肺のカルシノーマ細胞を含むグループから選択された上皮腫瘍細胞の中および/または細胞表面に強程度および/または均質に提示および/または発現される標的構造。

【請求項31】 請求項28に記載の標的構造であって、該標的構造は腎臓および/または前立腺のカルシノーマおよび/または悪性メラノーマにおいて、低程度および/または不均質に提示および/または発現される、および/または提示および/または発現されない標的構造。

【請求項32】 請求項28に記載の標的構造であって、該標的構造は結腸表面上皮および小腸(small bowel)の上皮の先端部位に強く提示および/または発現される標的構造。

【請求項33】 請求項32に記載の標的構造であって、該標的構造は結腸表層上皮細胞の微小絨毛および/または刷子縁の細胞表面の先端側に関連して提示および/または発現される標的構造。

【請求項34】 請求項28に記載の標的構造であって、該標的構造は乳房の腺上皮および/またはその周囲の結合組織に低程度から中程度に提示および/または発現される標的構造。

【請求項35】 請求項28に記載の標的構造であって、該標的構造は膵臓

、腎臓、肝臓、肺、皮膚、膵臓、甲状腺、心筋、および/またはCNSを含む正常組織に、低程度および/または不均質に提示および/または発現され、および/または提示および/または発現されない標的構造。

【請求項36】 請求項28に記載の標的構造であって、該標的構造の提示および/または発現が上皮組織に関連する標的構造。

【請求項37】 請求項28に記載の標的構造であって、該標的構造は、その非還元型において90および/または220キロダルトンの見掛けの分子量を有している標的構造。

【請求項38】 請求項28～37の何れか1項で定義した標的構造の抗イデオタイプであって、該抗イデオタイプは前記標的構造に対して同様の結合特異性を有する結合構造によって特異的に結合され、および該結合構造に対して特異的に結合する抗イデオタイプ。

【請求項39】 請求項38に記載の抗イデオタイプであって、該抗イデオタイプは前記結合構造によって特異的にブロックされ、および前記結合構造を特異的にブロックする抗イデオタイプ。

【請求項40】 請求項28～37の何れか1項で定義した標的構造を認識する結合構造であって、該結合構造が有機化学性質のものである結合構造

【請求項41】 請求項40に記載の結合構造であって、該結合構造は請求項1～26の何れか1項で定義した結合構造の結合をブロックする結合構造。

【請求項42】 請求項28～37の何れか1項で定義した標的構造の発現をブロックする物質。

【請求項43】 請求項42に記載の物質であって、該物質がアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび/またはリボザイム分子である物質。

【請求項44】 請求項28～37の何れか1項で定義した標的構造の機能をブロックする物質。

【請求項45】 請求項1～26もしくは40～41の何れか1項で定義した結合構造を有効成分として含む薬学的組成物。

【請求項46】 請求項28～37の何れか1項で定義した標的構造、または請求項38もしくは39で定義した前記標的構造の抗イデオタイプを有効成分

として含む薬学的組成物。

【請求項47】 請求項42～44の何れか1項で定義した物質を有効成分として含む薬学的組成物。

【請求項48】 請求項28～37の何れか1項で定義した標的構造、または請求項38もしくは39で定義した前記標的構造の抗イデオタイプを有効成分として含むワクチン組成物。

【請求項49】 ファージ粒子上に提示されるインビボで免疫学的に予め選択されたレパートリーの結合構造、および異なる表現型の組織ペアの使用によるファージ粒子のサブトラクション選択の組み合わせを含むファージ選択の方法。

【請求項50】 請求項49に記載の方法であって、前記「予め選択されたレパートリーの結合構造」が霊長類に由来する抗体である方法。

【請求項51】 請求項49に記載の方法であって、前記組織ペアがマッチするものである方法。

【請求項52】 請求項51に記載の方法であって、前記「マッチした組織ペア」が同一の個体に由来するものである方法。

【請求項53】 請求項49に記載の方法であって、前記組織が凍結および/またはホルマリン固定/パラフィン包埋した組織切片および/または断片および/または細胞懸濁液の形態で使用される方法。

【請求項54】 ヒト悪性疾患のインビトロの組織病理学的な診断および予後予測の方法であって、サンプルが請求項1～26もしくは40～41の何れか1項で定義された結合構造および指示薬と接触する方法。

【請求項55】 請求項54に記載の方法であって、前記サンプルが切断 (sectioning) 前に凍結および/またはホルマリン固定およびパラフィン包埋されている組織サンプルである方法。

【請求項56】 腫瘍タイピングを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項57】 腫瘍スクリーニングを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項58】 腫瘍の診断および予後予測を含む、請求項54に記載の方法。

【請求項59】 前悪性状態 (pre-malignant condition)

ons)のモニタリングを含む、請求項54に記載の方法。

【請求項60】 ヒト悪性疾患のインビトロ診断および予後予測のための方法であって、請求項1～26もしくは40～41の何れか1項で定義した結合構造の体液中の濃度がアッセイされる方法。

【請求項61】 ヒト悪性疾患のインビトロ診断および予後予測のための方法であって、請求項28～37の何れか1項で定義した標的構造、または請求項38もしくは39で定義した前記標的構造の抗イデオタイプを含む抗原の体液中の濃度がアッセイされる方法。

【請求項62】 ヒト悪性疾患のインビトロ診断および予後予測のための方法であって、a)請求項28～37の何れか1項で定義した標的構造、または請求項38もしくは39で定義した前記標的構造の抗イデオタイプを含む抗原、とb)請求項1～26もしくは40～41の何れか1項で定義した結合構造、との複合体の体液中の濃度がアッセイされる方法。

【請求項63】 ヒト悪性疾患のインビボ診断および予後予測のための方法であって、ヒト被験者中の腫瘍沈着に対する結合構造(請求項1～26もしくは40～41の何れか1項で定義された)の局在が決定される方法。

【請求項64】 請求項63に記載の方法であって、前記結合構造が前記決定の前に前記被験者に投与される方法。

【請求項65】 請求項64に記載の方法であって、前記結合構造が腫瘍沈着に蓄積する方法。

【請求項66】 定量的である、請求項63～65の何れか1項に記載の方法。

【請求項67】 ヒト悪性疾患の治療のための方法であって、請求項1～26もしくは40～41の何れか1項で定義された結合構造がヒト被験者に投与される方法。

【請求項68】 請求項67に記載の方法であって、前記結合構造が分子と遺伝子的に連結されることにより変更されており、変更された薬物動態特性を有する複合分子を提供する方法。

【請求項69】 請求項67に記載の方法であって、前記結合構造が誘導体

化により変更されている方法。

【請求項70】 ヒト悪性疾患の治療のための方法であって、請求項28～37の何れか1項で定義した標的構造がヒト被験者に投与される方法。

【請求項71】 請求項70に記載の方法であって、前記標的構造に対する免疫反応が誘導される方法。

【請求項72】 請求項70に記載の方法であって、前記標的構造が遺伝子のおよび/または化学的に分子と連結されることにより変更されており、変更された薬物動態特性を有する複合分子を提供する方法。

【請求項73】 請求項70に記載の方法であって、前記標的構造が遺伝子のおよび/または化学的に分子と連結されることにより変更されており、変更された免疫原性および/または抗原性の特性を有する複合分子を提供する方法。

【請求項74】 請求項70に記載の方法であって、前記標的構造が誘導体化により変更されている方法。

【請求項75】 請求項70に記載の方法であって、前記標的構造が遺伝子の修飾により変更されている方法。

【請求項76】 請求項70に記載の方法であって、前記標的構造は変更された免疫原特性を有する混合物を提供するために他の分子と混合されている方法。

【請求項77】 請求項70に記載の方法であって、前記標的構造がアジュバンドと混合されている方法。

【請求項78】 ヒト悪性疾患の治療のための方法であって、請求項42～44の何れか1項で定義した物質がヒト被験者に投与される方法。

【請求項79】 請求項78に記載の方法であって、前記物質は遺伝子のおよび/または化学的に分子と連結されることにより変更されている、変更された薬物動態特性を有する複合分子を提供する方法。

【請求項80】 請求項78に記載の方法であって、前記物質が誘導体化により変更されている方法。

【請求項81】 請求項78に記載の方法であって、前記物質に対する免疫反応が誘導される方法。

【請求項82】 請求項78に記載の方法であって、前記物質が遺伝子のおよび/または化学的に分子に連結されることにより変更されており、変更された免疫原性および/または抗原性の特性を有する複合分子を提供する方法。

【請求項83】 請求項78に記載の方法であって、前記物質が遺伝子的修飾により変更されている方法。

【請求項84】 請求項78に記載の方法であって、前記物質が変更された免疫原性の特性を有する混合物を提供するために他の分子と混合されている方法。

【請求項85】 請求項78に記載の方法であって、前記物質がアジュバントと混合されている方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、腫瘍細胞の中および/または表面に結合する結合構造；腫瘍細胞の中、もしくは表面に提示および/または発現される標的構造；前記標的構造を認識およびブロックする結合構造；前記標的構造に結合する、もしくは前記標的構造の発現をブロックする物質；活性成分として前記結合構造、標的構造もしくは物質を含む薬学的組成物；活性成分として前記標的構造を含むワクチン組成物；ファージ選択のための方法；並びに、インビトロおよびインビボの診断および予後予測の方法、および上記主題の使用を含むヒト悪性疾患を治療する方法、に関するものである。

【0002】**【発明の背景】**

正常細胞の癌細胞への形質転換は、形質転換細胞および成長する腫瘍の微小環境の双方の遺伝子型および/または表現型の変化と関連する(Kerbel RS, 1995)。第一に、これらの変化のいくつかは腫瘍特異的な抗原(TSAs)として免疫系によって認識され得る、従って腫瘍特異的免疫療法のための基礎を形作る。腫瘍プライミングおよび腫瘍発生の基礎をなす突然変異イベント自体がTSAsの発現を導く可能性があるが、正常抗原の非制御発現および翻訳後修飾のような二次的变化が免疫療法の標的として有効な多数の腫瘍関連抗原を含む可能性がある。

【0003】

腫瘍表現型と関連する分子は、分子修飾および発現レベル変化の同定のために標的自身に直接的に関与する、現代のゲノミクスおよびプロテオミクス技術を使用して同定できる(Williams KL, 1999)。より間接的には、腫瘍表現型の特徴を表わす腫瘍関連抗原(TAAs)は、ハイブリドーマ由来の単クローン抗体の使用によっても同定されている(Kohler G, Milstein C, 1976)。

【0004】

ファージ・ディスプレイ技術は、ハイブリドーマ技術に対する確立された代替

技術となっており、またある種の適用においては、純粋なスクリーニングによらずに、抗原駆動の選択原理による単クローン抗体生成のための選択方法となっている(Hoogenboom HR et al, 1998)。この技術は、ファージ表面にそのゲノムにコードされた特定の抗体断片を提示するバクテリオファージ粒子に基づくものであり、ファージおよびそのコード化DNAを遺伝子パッケージとして選択することを可能にする。抗体可変部の重鎖および軽鎖の遺伝子に対して相補的なプライマーが利用できると仮定するならば、ファージベクターに挿入すべき抗体遺伝子は、任意種の免疫もしくは非免疫動物からポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅でき、大きなファージ抗体ライブラリーが構築される。

【0005】

細胞、組織切片、および他の生体物質上でのファージ・ライブラリーの選択によって、使用された複合抗原物質内の構成要素に結合する単クローン抗体またはペプチドが生成されている(Hoogenboom HR et al 1998, Tordsson J et al 1997)。複合抗原を使用した直接のポジティブ選択は、全組織反応性レパートリー(repertoire)から、高発現抗原および免疫優性抗原、並びに高親和性相互作用に偏った特異性の一群を選択する結果となる。異なった様式で発現する抗原(特定の表現型を表す)を同定するためには、むしろサブトラクティブなアプローチが使用されなければならない。

【0006】

【発明の概要】

本発明によれば、腫瘍細胞、特に上皮腫瘍細胞、例えば結腸直腸(colorectal)、膵臓、乳房(胸部; breast)および肺のカルシノーマ細胞に結合する結合構造(例えば、抗体)が提供される。また、かかる腫瘍細胞の中および/または表面上に提示および/または発現する標的構造が提供される。

【0007】

また、ファージ選択の材料(materials)として組織切片、或いは組織切片および細胞の組み合わせを使用した、新規のサブトラクション選択方法が提供される。

【0008】

従って、一つの側面において、本発明は腫瘍細胞の中および/または細胞表面に結合する結合構造に関するものであり、その結合構造は配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号160-165 (CDR1), 180-195 (CDR2), 228-238 (CDR3)により本質的に定義される重鎖CDR構造により主に決定され、一方、付加的な結合特異性は、配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号23-36 (CDR1), 52-58 (CDR2), 91-100 (CDR3)により本質的に定義される1以上の軽鎖CDR構造により提供される。

【0009】

更なる側面において、本発明は腫瘍細胞の中および/または細胞表面に結合する結合構造に関するものであり、前記結合構造は、配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号23-36 (CDR1), 52-58 (CDR2), 91-100 (CDR3)を本質的に含む軽鎖において、抗体の相補性決定領域(CDR)の1以上を含み、および配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号160-165 (CDR1), 180-195 (CDR2), 228-238 (CDR3)を本質的に含む重鎖CDR配列を含む。

【0010】

一態様において、前記結合構造は前記CDR配列の全てを含む。

【0011】

更なる態様において、前記結合構造は抗体および/またはその断片であり、それは更なる態様において、配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号1-110を本質的に含む軽鎖の可変領域、および配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号130-249を本質的に含む重鎖の可変領域を含む。なおまた別の態様において、前記抗体は配列番号2に示される全アミノ酸配列を含む。

【0012】

一態様において、前記結合構造は、原発性および/または転移性の結腸直腸、膵臓、乳房(胸部)および肺のカルシノーマ細胞を含むグループから選択された上皮腫瘍細胞の中および/または細胞表面に、強程度および/または均質に結合する。更なる態様において、前記結合構造は腎臓および/または前立腺のカルシノーマおよび/または悪性メラノーマ細胞に、低程度および/または不均質に結合する、および/または結合しない。別の態様において、前記結合構造は結腸表

面上皮および小腸(small bowel)上皮の先端部位に強く結合する。更なる態様において、前記結合構造は、結腸表層上皮細胞 (*the colonic superficial epithelial cells*) の微小絨毛および/または刷子縁の細胞表面の先端側に結合する。なお更なる態様において、前記結合構造は、乳房の腺上皮および/またはその周囲の結合組織に低から中程度 (*weakly to moderately*) に結合する。

【0013】

更なる態様において、前記結合構造は、脾臓、腎臓、肝臓、肺、皮膚、膵臓、甲状腺、心筋、および/またはCNSを含む正常組織に低程度および/または不均質に結合する、および/または結合しない。

【0014】

一態様において、前記結合構造はファージ選択によって提供される。更なる態様において、該ファージ選択は、ファージ粒子上に提示された、インビボで免疫学的に予め選択されたレパートリーの結合構造と、異なる表現型の組織ペアを用いたファージ粒子のサブトラクション選択との組み合わせを含む。更なる態様において、前記配列はオナガザル (*Macaca fascicularis*) 起源であり、その配列はヒト起源の対応する配列に対して、少なくとも78% (V1) および86% (Vh) のアミノ酸同一性を有してもよい。

【0015】

なお更なる態様において、前記結合構造は、ヒトにおいて低免疫原性もしくは非免疫原性を有する。

【0016】

一態様において、前記結合構造は、ポリペプチドへの遺伝子的連結 (*genetically linking*) により、および/または有機もしくは非有機化学分子への化学的な結合により、および/またはダイメリゼーション、オリゴメリゼーション、マルチメリゼーションにより誘導体化される。

【0017】

更なる態様において、前記結合構造は、細胞障害性ポリペプチドに対して、または細胞障害性の有機もしくは非有機化学分子に対して；または生物学的活性分子に対して；または免疫活性分子に対して、遺伝的に連結されるか、または化

学的に結合される。

【0018】

更なる態様において、前記結合構造は、そのアビディティおよび/またはアフィニティを増加もしくは減少するため；またはその生産高を増加するため；またはその薬物動態学的な特性に影響するため；またはそれに新規の薬物動態的な特性を付与するために変更される。

【0019】

なお更なる態様において、前記結合構造は標識されており、その結合は特異的であると共に、非ラベル型の該結合構造により阻止可能で且つ他の結合構造により阻止不可能であり、また別の特異性を有する他の結合構造の結合を阻害することがない。

【0020】

別の側面において、本発明は上記で定義したような抗体をコードするDNA配列に関する、前記抗体は配列番号2に示したアミノ酸配列を含む、そのDNA配列は配列番号1に示した配列を含む。

【0021】

別の側面において、本発明は腫瘍細胞の中、もしくは表面上に提示および/または発現される標的構造に関するものであり、該標的構造は上記で定義したような結合構造により特異的に結合される能力、および該結合構造に対して特異的に結合する能力、および類似する結合特性を有する他の結合構造に特異的に結合する能力を有する。

【0022】

一態様において、前記標的構造は前記結合構造により特異的にブロックされる能力、および前記結合構造を特異的にブロックする能力を有する。

【0023】

更なる態様において、前記標的構造は原発性および/または転移性の結腸直腸、膵臓、乳房（胸部）および肺のカルシノーマ細胞を含むグループから選択された上皮腫瘍細胞の中および/または細胞表面上に強程度および/または均質に提示および/または発現される。

【0024】

なお更なる態様において、前記標的構造は腎臓および/または前立腺のカルシノーマおよび/または悪性メラノーマにおいて、低程度および/または不均質に提示および/または発現され、および/または提示および/または発現されない。

【0025】

更なる態様において、前記標的構造は、結腸表面上皮および小腸(small bowel)上皮の先端部位に強く提示および/または発現される。

【0026】

なお更なる態様において、前記標的構造は結腸表層上皮細胞の微小絨毛および/または刷子縁の細胞表面の先端側に関連して提示および/または発現される。

【0027】

更なる態様において、前記標的構造は、乳房の腺上皮および/またはその周囲の結合組織に低から中程度に提示および/または発現される。

【0028】

なお更なる態様において、前記標的構造は脾臓、腎臓、肝臓、肺、皮膚、膵臓、甲状腺、心筋、および/またはCNSを含む正常組織に、低程度および/または不均質に提示および/または発現され、および/または提示および/または発現されない。

【0029】

別の態様において、前記標的構造の前記提示および/または発現は、上皮組織に関連するものである。

【0030】

更なる態様において、前記標的構造は、その非還元型において90および/または220キログルトンの見掛けの分子量を有する。

【0031】

更なる側面において、本発明は上記で定義したような標的構造の抗イデオタイプに関連し、その抗イデオタイプは、前記標的構造に対して類似する結合特異性を有する結合構造によって特異的に結合され、および該結合構造に対して特異的

に結合する。

【0032】

一態様において、前記抗イデオタイプは前記結合構造により特異的にブロックされ、および前記結合構造を特異的にブロックする。

【0033】

なお更なる側面において、本発明は上記で定義したような標的構造を認識する結合構造に関するものであり、それは有機化学的な性質のものである。一態様において、この結合構造は上記で定義したような結合構造の前記結合をブロックする。

【0034】

なおまた別の側面において、本発明は上記で定義したような標的構造の発現をブロックする物質に関する。

【0035】

一態様において、前記物質はアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび/またはリボザイム分子である。

【0036】

更なる側面において、本発明は上記で定義したような標的構造の機能をブロックする物質に関する。

【0037】

なお更なる側面において、本発明は、上記で定義したような少なくとも1つの結合構造を活性成分として含む薬学的組成物に関する。

【0038】

更なる側面において、本発明は、上記で定義したような標的構造、もしくは上記の前記標的構造の抗イデオタイプを活性成分として含む薬学的組成物に関する。

【0039】

なお更なる側面において、本発明は、上記で定義したような物質を活性成分として含む薬学的組成物に関する。

【0040】

更なる側面において、本発明は、上記で定義したような標的構造、もしくは上記で定義したような前記標的構造の抗イデオタイプを活性成分として含むワクチン組成物に関する。

【0041】

なお更なる側面において、本発明は、ファージ粒子上に提示される、インビボで免疫学的に予め選択された結合構造のレポーターと、異なる表現型の組織ペアを用いたファージ粒子のサブトラクション選択との組み合わせを含んだ、ファージ選択の方法に関する。

【0042】

前記方法の一態様において、前記「予め選択されたレポーターの結合構造」は、霊長類に由来する抗体である。

【0043】

前記方法の更なる態様において、前記組織ペアはマッチする。好ましくは、前記「マッチした組織ペア」は同一の個体に由来するものである。

【0044】

更なる態様において、前記組織は、凍結および/またはホルマリン固定/パラフィン包埋された組織切片および/または断片および/または細胞懸濁液の形態で使用される。

【0045】

更なる側面において、本発明は、上記で定義されたような少なくとも1つの結合構造および指示薬とサンプルが接触される、ヒト悪性疾患のインビトロの組織病理学的診断および予後予測の方法に関する。好ましくは、前記サンプルは、切片作成前に凍結および/またはホルマリン固定およびパラフィン包埋された組織サンプルである。

【0046】

いくつかの態様において、前記方法は、腫瘍タイピング、腫瘍スクリーニング、腫瘍診断および予後予測、前悪性状態のモニタリングを含む。

【0047】

なお更なる側面において、本発明は、上記で定義したような少なくとも1つの

結合構造の体液濃度がアッセイされる、ヒト悪性疾患のインビトロ診断および予後予測の方法に関する。

【0048】

なおまた別の側面において、本発明は、上記で定義したような標的構造、もしくは上記で定義したような前記標的構造の抗イデオタイプを含む抗原の体液濃度がアッセイされる、ヒト悪性疾患のインビトロ診断および予後予測の方法に関する。

【0049】

なお更なる側面において、本発明は、ヒト悪性疾患のインビトロ診断および予後予測の方法に関するものであり、該方法においてa)上記で定義されたような標的構造を含む抗原、もしくは上記で定義されたような前記標的構造の抗イデオタイプ、およびb)上記で定義されたような少なくとも1つの結合構造、の複合体の体液濃度がアッセイされる。

【0050】

なおまた別の側面において、本発明は、ヒト悪性疾患のインビトロ診断および予後予測の方法に関するものであり、該方法においてヒト被験者の腫瘍沈着 (tumour deposits) に対する上記で定義したような少なくとも1つの結合構造の局在が決定される。一態様において、前記結合構造は前記決定前に前記被験者に投与される。更なる態様において、前記結合構造は腫瘍沈着に蓄積する。なお更なる態様において、前記方法は定量的である。

【0051】

更なる側面において、本発明は、上記で定義されたような少なくとも1つの結合構造がヒト被験者に投与される、ヒト悪性疾患の治療の方法に関する。

【0052】

前記方法の更なる態様において、前記結合構造は、分子に遺伝子的に連結して変更された薬物動態的特性を有する複合分子 (combined molecule) を与えることにより、または誘導体化されることにより変更される。

【0053】

なおまた別の側面において、本発明はヒト悪性疾患の治療の方法に関し、該方

法において上記で定義したような標的構造はヒト被験者に投与される。前記方法の一態様において、前記標的構造に対する免疫応答が誘導される。

【0054】

更なる態様において、前記標的構造は、分子に遺伝子的および/または化学的に連結して変更された薬物動態的特性を有する複合分子を提供することにより、或いは分子に遺伝子的および/または化学的に連結して変更された免疫原性および/または抗原性の特徴を有する複合分子を提供することにより、或いは誘導体化されることにより、或いは遺伝子的に修飾されることにより、変更される。前記方法の更なる態様において、前記標的構造は、変更された免疫原性特徴を有する混合物を提供するために他の分子と混合され、またはアジュバンドと混合される。

【0055】

更なる側面において、本発明は、ヒト悪性疾患の治療の方法に関し、該方法において上記で定義されたような物質がヒト被験者に投与される。前記方法の更なる態様において、前記物質は、分子に遺伝子的および/または化学的に連結して変更された薬物動態的特性を有する複合分子を提供することにより、或いは誘導体化されることにより変更される。一態様において、前記物質に対する免疫応答が誘導される。前記方法の更なる態様において、前記物質は、分子に遺伝子的および/または化学的に連結して変更された免疫原性および/または抗原性の特徴を有する複合分子を提供することにより；或いは遺伝子的に修飾されることにより変更される。なお更なる態様において、前記物質は、変更された免疫原性の特徴を有する混合物を提供するために他の分子と混合される、またはアジュバンドと混合される。

【0056】

【発明の詳細な記述】

本発明による選択方法において、組織切片或いは組織切片および細胞の組み合わせが、ファージ選択の材料として使用される。穏やかに固定された組織切片は、高度に保存されたオリジナルの構造および表現型を有する生体物質であるはずである。

【0057】

前記方法は、6個体の異なる患者から抽出した結腸および結腸癌のマッチする自己組織ペアにおけるサブトラクション選択のために、免疫結腸癌ファージライブラリーを使用して開発および適用される。ここでK293と命名される選択された特異性の1つは、選択に使用された全ての腫瘍と均質に反応するが、正常結腸とは非常に限定的に反応するものである。K293特異性パターンを有するクローンは、最終の選択ラウンド(selection rounds)において頻繁に見出された。このことは組織に基づくサブトラクション的なアプローチの機能性を示唆している。

【0058】

インビトロで培養された腫瘍細胞株よりもむしろ患者において発生した腫瘍表現型において、K293で定義される腫瘍関連抗原(TAA)が優先的に発現されるという事実は、新規且つ治療上適切な腫瘍関連抗原に対する試薬の同定を目指す際の選択材料として、組織切片を使用することの有効性および妥当性を強調するものである。

【0059】

さらに、K293抗体は、結腸直腸、膵臓、肺、乳房(胸部)のカルシノーマへの強い反応性を示し、また正常組織の多数例において試験した際に高度に限定された反応性を示した。細胞表面の反応性が調査され、循環系中に調査し得るレベルが認められないことも調べられ、この抗原の腫瘍ターゲティングに対する適切性が示唆された。このことはK293 Fabスーパー抗原SEA(D227A)によっても支持され、異種間移植されたヒト腫瘍細胞を使用したヒト化SCIDモデルにおいて標的化治療活性(targeted therapeutic activity)の予備的な証拠を示している。

【0060】

最終的に、固定化K293抗体断片を使用したアフィニティークロマトグラフィーにより蛋白質画分の精製が達成できた。前記画分は非還元SDSゲルクロマトグラフィーによりMW 35-45 kDaの1バンドとして示され、ペプチド消化およびシーケンスが3つのペプチド断片配列を明らかにし、それはグリセ

ロアルデヒド - 3 - リン酸脱水素酵素 (GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate de hydrogenase) との相同性を支持している。

【0061】

本発明は正常組織および疾患組織間の表現型の差異を同定し、また間接的には異なった様式で発現する分子をコードする遺伝子の差異を同定するための戦略を提案するものである。この戦略は結腸癌関連抗原、およびこれらの抗原と反応する抗体の同定に適用するものである。より広範な展望として、この開発された方法は、炎症性疾患または発生段階マーカーおよび標的の同定のために、例えば正常組織と炎症組織、もしくは成熟組織と未成熟組織などの組織ペアを使用した他の研究分野に同様に適用し得る。

【0062】

ファージライブラリーのサブトラクションのための抗原ソースとしての組織切片の使用効率をモデル系において評価した。1つの結合ファージ抗体を他から明確にサブトラクションすることが、広域反応性 (C215) 及び腫瘍特異的 (1F) の特異性を有する scFv 抗体をコードするファージを使用して達成できた。後者は若干単純である。何故なら、1F 抗原は小腸 (small bowel) において若干発現しており、完全に欠如しているわけではないからである (Tordsson 等、投稿中)。結果的に、1F ファージのマイナーなサブトラクションもまた、二つの特異的なファージの分離を困難にし得る。

【0063】

さらに、SCIDマウスにおいて成長させた Colo 205 腫瘍のアセトン固定組織切片を、培養したインタクトな Colo 205 細胞の代わりにポジティブ選択工程 (及び、子宮組織切片をネガティブ選択工程) に使用した場合、1F ファージの収量 (yield) は12から16倍減少し、それはC215ファージ収量の減少よりも顕著であった (図2、および記載しないデータ)。1F 抗原は固定に敏感であるか、または1F scFv ファージの結合は組織に基づく選択方法において使用される粗雑な洗浄操作に敏感であるとの解釈が可能であろう。

【0064】

子宮切片を使用したネガティブ選択工程の付加は、ポジティブ選択のみ (Tord

sson 等、投稿中)と比較して、細胞からのC215及び1F ファージの相対的収量を変化させなかった。このことは、系の特異性、またこれらの特異性を使用した免疫組織化学により以前見つけられた子宮とのネガティブな反応性を確認するものである。

【0065】

結論として、前記モデルにおいて最適な腫瘍特異的ファージが欠如しているにもかかわらず、組織に基づくファージ吸着において効率性および特異性が示され、従ってサブトラクション発見プロトコルの基礎が提供される。また、各選択ラウンド(ファージ収量の最少の損失で)中、または選択ラウンド間の吸着工程の反復は、吸着の効率を増大する。

【0066】

以前からライブラリー選択は実施されていたので、各サブトラクション選択ラウンドにおけるネガティブ吸着工程の反復はより効率的であることが示され、従って1回の吸着が7つの選択ラウンドの全てにおいて使用された。これは障害とはならなかったであろう。各選択ラウンドにおいて様々な回数の吸着を実施することにより達成される異なる強度のネガティブ選択が、チューナーのように作用するだろうことが期待できた。これにより、高度に(広範に)発現する抗原に対する抗体(ネガティブ吸着なし)から、厳密に異なって発現する抗原に対する抗体(反復ネガティブ選択)へと選択結果を徐々に片寄らせることができた。

【0067】

しかしながら、モデル実験による今回のデータは、ポジティブ選択の力はネガティブ選択の力を大きく上回るものであることを示している。また、特異性のいくつかは、1から2回の限られた範囲(narrow window)の選択ラウンドにおいて低い頻度で見つけられた、その後に継続した選択ラウンドは選択フィルターを飽和したようであり、特異性の構成はより広域反応性の抗体へと変化した。

【0068】

結合ファージの高い割合を得るためには多くの選択ラウンドが必要であることが、サブトラクションライブラリー選択の期間の観察において見出された。これは、細胞もしくは組織切片上でポジティブな選択をする際には通常十分である、

2～3ラウンドと比較するべきである。このことは、前記選択がライブラリー中の特異性の多くに対して効率的なフィルターとして作用し、そして最適な選択戦略デザインの基礎を提供するだろうことを示している。例えば、より小さな濃縮因子は、最適な選択ラウンドに到達する前に多数の腫瘍が使用されることを許容する。このことは共通に発現する腫瘍限定抗原の同定に選択を片寄せらるだろう。

【0069】

腫瘍関連抗原に対するモノクローナル抗体の多くは、ハイブリドーマ技術により作成されたマウス抗体である。一方、例えばアロ抗原のように正常ヒト抗原のマイナーな変異を識別する抗体反応が、ヒト及びヒト近縁種において度々首尾よく誘導された。

【0070】

頻出するTAAのみが、巨大な患者集団の免疫療法における実際上有効な標的である。この標的設定により本当に腫瘍特異的な抗原を代表するのであってもユニークな個々の腫瘍特異的な変異を排除される。

【0071】

多くのケースにおいて頻繁に発現する腫瘍関連抗原は、正常もしくは最小限の変化をうけた（例えば、翻訳後修飾された）抗原なので、ヒト腫瘍で免疫された霊長類はかかる腫瘍関連抗原のすぐれた供給源となりえる。

【0072】

そのようなレパートリーとサブトラクションファージ選択の組み合わせにより、更なるレパートリーの分析が可能であろう、そして特異性の選択の結果はより制御され得る。直接のポジティブ選択（Tordsson等、投稿中）と比較して、本発明の組織に基づくサブトラクション選択を使用した際に免疫結腸癌ライブラリーから完全に異なるセットの抗腫瘍抗体が同定されたことは、この仮説を支持するものである。

【0073】

K293特異性により代表される選択クローンは、選択プロトコールに含まれる全ての結腸直腸カルシノーマ組織において高度に均質な染色性を示し、そして

正常結腸上皮とは非常に限定された反応性を示した。サブトラクション選択フィルターは、継代を許容する狭い表現型特異性を規定するものであり、これは6個体（すなわち、各々のかかるマッチした組織ペアが由来する患者）において共通する正常および悪性結腸上皮の間では小さな差異で存在する。前記フィルターに設定される基準がK293タイプの特異性によってほとんど完全に成就したことは特異性分析から明白であった。

【0074】

真核細胞は、細胞表面抗原を同定するためにサブトラクション選択に以前から使用されてきた。しかしながら、ファージ選択に細胞を使用する場合と比較して、組織切片は組織環境因子、またはインビトロにおいて再現が不可能もしくは困難な構造により制御される抗原を含む、インビボにおいて発現する全ての組織成分に対する試薬の同定を可能とするであろう。

【0075】

4つの試験した結腸直腸癌細胞株中の2つは、インビトロで培養した細胞において、またはSCIDマウスにおいてインビボで成長させた際にも検出可能なK293抗原を発現していなかった。加えて、インビトロで培養した別の5系統の細胞株は、抗原発現陰性だった（示さず）。

【0076】

患者由来の腫瘍におけるK293抗原の頻繁且つ均質な発現は、結腸癌細胞がインビトロで培養される際には大幅に失われるようである。加えて、異種宿主においてインビボで前記細胞を成長させても前記発現を誘導することができなかった。

【0077】

K293 Fab SEA/E11融合蛋白質は、増大した感受性および減弱したバックグラウンドを可能とする、K293特異性分析を拡大するための一形式であった。この構築物が多数の結腸、乳房（胸部）および肺のカルシノーマと反応することが示された。これらの腫瘍の多くで、K293 Fab SEA/E11は90%以上の悪性細胞において陽性である。前記反応は原発性の腫瘍に限定されない、なぜなら結腸癌の転移の多くも強い反応性を示すからである。一方、前立腺

または腎細胞癌においては如何なる反応も得られず、そして悪性メラノーマにおいては限定的な反応のみが認められた。

【0078】

正常組織反応性は、結腸および小腸 (small intestinal) 上皮の先端部、並びに正常乳房 (胸部) の腺上皮およびその周囲のストローマ部位にのみ認められた。

【0079】

K293 Fab SEA / E11が、正常および悪性細胞双方の細胞表面上に発現する抗原に結合することを電子顕微鏡検査は明瞭に示した。正常結腸粘膜において、前記反応は表在性の上皮細胞の微小絨毛の輪郭を形作る頂端細胞表面 (apical cell surface) に局在する。また、先端部染色は高度に分化した腫瘍において優勢であり、一方、低 中程度の腫瘍は細胞表面の全ての側面上で均質に陽性である傾向にある。

【0080】

K293 Fab SEA / E11が新生物性 (neoplastic) の腺形成においてムチン様物質と反応するにもかかわらず、前記抗原は結腸癌患者のプラズマプール中で検出されなかった。このプールはCA242 結腸癌抗原の高レベルを示し、患者の高い腫瘍荷重 (tumour burden) を示している。K293 Fab SEA / E11は12例の原発性腫瘍中の12例、また転移性結腸癌の3/4において強く陽性なので、これは循環性の抗原上にエピトープが高度に提示されていないことを示している。

【0081】

K293 Fab SEA / E11は、腫瘍ターゲティング (tumour targeting) の候補として興味深いいくつかの特性を呈する、すなわち、1) 陽性の原発性腫瘍および転移を高率に認識する、2) 限定された正常組織反応性を示す、3) 腫瘍細胞表面に発現する抗原に結合する、および4) 癌患者の末梢血液中で検出されない抗原に結合する。

【0082】

腫瘍ターゲティングに対するK293 Fab SEA / E11の使用の可能性は

、ヒト化腫瘍を保持するSCIDマウスを使用した治療実験により更に支持された。ターゲティングされないコントロールFabSEA融合蛋白質と比較して、K293FabSEA/E11は腹腔内で成長するLS174T腫瘍の80%を越える減少を示した。SCIDマウス中で成長した未治療のLS174T腫瘍の免疫組織化学検査は、悪性細胞の50%のみがK293FabSEA/E11陽性であることを示した(データ示さず)。この結果は、K293Fab陰性の腫瘍細胞のいくつかは、潜在的にTリンパ球からのサイトカイン放出によるような傍観者効果(bystander effect)により殺傷され得ることを示している。従って、陽性細胞の割合が高い結腸直腸癌患者から摘出した腫瘍においては、治療効率は潜在的に増大すべきである。

【0083】

K293抗原は、常に正常組織に存在するが、通常の状態においては免疫系に暴露されない「隔離された」抗原のグループにマッチするだろう。結腸および小腸(small intestine)において、前記抗原は、それが循環抗体および免疫応答性細胞(immunocompetent cells)に暴露されるだろう細胞の基底面(basal surface)上に存在しない。しかしながら、多くの腫瘍サンプルにおいて、K293抗原は細胞膜全体に分布することが見出されており、従って循環系に暴露されるだろう。

【0084】

K293FabSEA/E11は、現存し頻繁に使用される結腸癌結合抗体の特異性プロファイルとは区別されるようである。従って、それがこういった既知の標的分子に結合することはありそうもない。K293FabSEA/E11による正常結腸の先端部の染色は、抗CEA抗体で認められる反応と類似性を示した。しかしながら、CEAに対する抗体は、顆粒球および/またはマクロファージとも反応すると報告されている。さらに、CEA抗原は循環系において容易に検出され、ゆえに結腸直腸癌の血清マーカーとして使用される。結腸癌反応性抗体B3、19-9およびB72.3全ては、正常結腸において限定された不均質な反応性を有し、またK293の特異性とも区別されるようである。このことはMUC-1、-2、-3、-4抗原についてもまた真実であり、これらはK29

3に認識される抗原と比較して正常結腸において異なる分布を有する。

【0085】

本発明により開発された組織に基づくサブトラクションファージ選択法は、標的発見技術に新たな局面をもたらすであろう。ゲノミクスおよびプロテオミクスは、異なって発現される遺伝子および蛋白質の同定に基づいている。これらの方法は直接的に標的自体の提示に関与するが、本発明の技術は細胞および組織に発現する標的を分析するためにファージ上に提示される試薬のライブラリーを使用する。

【0086】

新規標的に対する試薬の同定は、エピトープの組織分布を分析するための、並びに対応する抗原(類)の精製および特性評価のための効率的な手段を提供する。アフィニティー精製の実施が可能であったこと、またK293抗体の想定される標的抗原の配列分析による特性評価は、かかる抗体の効率的且つ迅速な標的同定のためのプローブとしての強力な潜在能力を例証するものである。3つの10アミノ酸長ペプチドは、グリセロアルデヒド 3リン酸脱水素酵素分子との同一性が示され、この分子がK293の標的であることを示唆している。

【0087】

ゲノミクスは標的遺伝子の同定にいたるであろうが、この技術は蛋白質レベルで付加される翻訳後修飾における変化を保証できない。様々な組織における遺伝的発現の有用な情報は、遺伝子発現データベース(電子的なノーザンプロット)を検索することで提供し得るが、直接的な実施はインサイチューハイブリダイゼーションの使用を必要とするだろう。

【0088】

プロテオミクスは何タイプかの翻訳後修飾の検出に使用できる。しかしながら、同定された蛋白質の組織分布の分析は、そのアミノ酸配列に基づいたインサイチューハイブリダイゼーションに使用されるDNAプローブの作成、或いは蛋白質に対する抗体試薬の作成の何れかを必要とするだろう。

【0089】

ゲノミクスもプロテオミクスも、例えば炭水化物および脂質および非蛋白

質性の他の生体分子をカバーしない。強力な自動化技術が実施されており、それはファージ・ディスプレイ技術とプロテオミックスを組み合わせたもので、さらに特定するとこの技術は二次元ゲル上の蛋白質スポットに対する抗体ファージの選択を意味している (CaT、Cambridge、U. K. から提供される)。この技術は疑いなく新規抗原に対する試薬を生成することが可能であるが、プロテオミックスの技術制限、並びに変性蛋白質上に暴露する多くのエピトープはインビボでは暴露されなく、またインビボの折りたたまれた蛋白質上で暴露される多くのエピトープは検出されないという問題を内包するものである。もちろん、かかる技術は、標的蛋白質スポットを検出するためにサブトラクションファージ選択アプローチにより作成される試薬を用いて逆の様式でも使用することができる、スポット検出後には標的特定のためにマスペクトルおよびシーケンス分析がなされる。

【0090】

選択された抗体 (特にK293特異性) は、腫瘍をターゲティングする部分としての使用において、いくつかの有利な特性を有している。これらには、結腸直腸カルシノーマの大部分の腫瘍および潜在的に他の通常認められる腫瘍タイプに対する、高度に均質な結合パターンでの腫瘍反応性が含まれる。重要なことは、正常組織の反応性は非常に限定されていること、そして癌患者の循環系において標準的な方法論を用いての標的抗原の検出は不可能であるということである。また、霊長類の抗体はヒト免疫グロブリンの配列と高度に相同性があり、ヒトで強い異種抗体反応 (免疫複合体形成を生じて排除される) を誘導しないことが期待される。

【0091】

ファージ選択に対する本戦略は、サブトラクション選択のための狭いフィルターと共に、インビボで予め選択されたレパートリーの霊長類結合構造 (抗体) を利用することに基づくものである。

【0092】

本発明の更に意図される適用は、免疫優勢 (immunodominance) のような免疫のバイアスをさけるための大きい非免疫ライブラリーに関連するものであり、これはデザインした選択戦略の分析力に挑むものである。これら適用には、組織切

片により提示される信憑性のあるインビボ表現型を使用したサブトラクション選択、表現型の「共通因子」の抗原提示を促進する抗原環境のバックグラウンドの変更、および頻繁に同定されるエピトープの特異的なブロッキング（クローン化した抗体の使用による）が含まれる。

【0093】

本研究は、ファージ選択が規定の標的指向性戦略のための発見手段として使用できること、並びに選択計画基準が成功に重要であることを明確に示している。

【0094】

本発明は添付の図面を参照して、以下に記載する限定されることのない実施例によって説明される

【0095】

【実施例】

<実施例1>

《効率的なサブトラクティブモデル選択》

本発明によるファージミド・ライブラリーのサブトラクション選択の原理を図1に示す。サブトラクション選択された（腫瘍関連抗原を同定する目的で）ライブラリーのプールにおける個々のファージは、理想的にはそれらのコードする抗体の特異性パターンに従い分類される、すなわち1）広域組織反応性、2）腫瘍限定、および3）非特異的に分類される。また、ファージミド・ライブラリーは、それらのコードする抗体を提示しない多数のファージを有している。これらのファージは、ネガティブ選択工程において特異的に吸着されないが、細菌中でのファージ増殖の前のポジティブ選択工程において洗浄除去される。

【0096】

上皮細胞接着分子E p - C A Mと反応性の広域反応性ファージC 2 1 5 s c F v、および、より腫瘍に限定したファージ特異性1 F s c F v（以前にファージライブラリーから同定された）が混合（ 2.5×10^7 C 2 1 5 および 1.3×10^6 1 F s c F v ファージ）され、そして図2 Aに示されるモデル実験に使用された。これらのファージ特異性をC 2 1 5 発現組織（小腸 small bowel）または両抗原の発現が陰性の組織（子宮）のどちらかの切片上でインキュベーション

した。組織切片吸着後に、上清に残存する特異的ファージがC o l o 2 0 5 細胞を使用してポジティブ選択された。

【0097】

非選択および選択されたファージプールにおける異なる抗生物質耐性導入単位（異なるファージクローン）の相対的構成を、コロニータイトレーションおよび各々のファージ特異性に対して明らかにされたファージの収量を用いて分析した。データは、小腸(small bowel)の切片上の吸着は広域反応性C 2 1 5 ファージの収量を子宮上の吸着と比較して3.3倍減少させたことを示している。

【0098】

他の特異性1 Fの対応する減少は、ほんの1.2倍であった。オリジナルの混合物と比較したファージの比率（1 F / C 2 1 5）は、小腸(small bowel)切片を使用した選択後に5.0倍変化した（子宮切片の使用では1.8倍）。

【0099】

反復実験において、ファージ比率は小腸(small bowel)切片を使用した際に1.7倍変化した（子宮切片においては1.4倍）。両選択工程での組織切片の使用は、サブトラクション効率の減少を示した。小腸(small bowel) / C o l o 2 0 5 S C I D 腫瘍および小腸(small bowel) / 原発性結腸カルシノーマの切片の組み合わせによる使用は、吸着に子宮を使用した対応する設定と比較して、それぞれ4倍および3倍C 2 1 5 特異的ファージ収量を減らした。しかしながら、2回吸着工程を繰り返すことにより、吸着効率は2.5倍に増大した（データ示さず）。特異的ファージの多数がこれらの実験に使用された（ 6.1×10^{10} の非特異的D 1 . 3 ファージのバックグラウンドにおいて、 3.8×10^9 および 1.2×10^{10} のC 2 1 5 および 1 F ファージ）、これは小腸(small bowel)組織切片の高い吸着能力を示している。

【0100】

図2 Bに示される実験において、同等に多数のファージ（ 7.2×10^9 C 2 1 5 , 2.2×10^{10} 1 F および 4.2×10^{10} D 1 . 3 ファージ）が、子宮、小腸(small bowel)、もしくは肺の切片を使用したネガティブ組織吸着の2回の反復に使用され、続いてC o l o 2 0 5 腫瘍切片を使用したポジティブ選択が行われた。小腸

(small bowel)および肺の組織切片吸着は、子宮吸着と比較して夫々1.1および2.2倍C215ファージ濃縮(C215/D1.3ファージ収量)を顕著に($p < 0.05$, $n=4$)減少化した(図2B)。

【0101】

対照的に、1Fファージ濃縮(D1.3ファージに対して55-64倍)は、吸着に使用する組織の選択には影響されなかった(それぞれ小腸(small bowel)および子宮に対して1.1および0.9倍減少)。

【0102】

結果として、C215ファージのネガティブ組織切片吸着は、Ep-CAM組織抗原依存的であり、33倍までの効率化を示した。前記データはサブトラクション選択がネガティブおよびポジティブ選択工程の双方の効率に依存したことを示している。

【0103】

<材料および方法>

[動物]

オナガザル(*Macaca fascicularis*)は、ストックホルムのスウェーデン感染症制御研究所(Swedish Institute for Infectious Disease Control)で維持した。前記サルをアルムアジュバンド(alum adjuvant)を添加もしくは非添加(各々2個体)したヒト結腸直腸腫瘍の粗懸濁液(a crude suspension)で経皮的に免疫した。追加免疫用量を21、35および49日に投与した。

【0104】

重症複合免疫不全症(SCID)雌マウス(C. B-17)をBommice(Ry, Denmark)から入手した。前記マウスをMacrolone ケージ(III)中で病原体フリーの条件で維持し、自由にSpecial Diets Services(Essex, UK)の滅菌ネズミ餌および滅菌水を与えた。8-12週齢のマウス(細胞株ごと2匹のマウス)の各わき腹の皮下に1% Balb/c血清200 μ lに懸濁した 2×10^6 の結腸癌細胞、Colo205、WiDr、HT29もしくはLS174Tを注射した。腫瘍を直径4~5mmのサイズに成長させ、そして摘出し、免疫組織化学検査のために凍結した。

【0105】

全ての動物はスウェーデンの法律に従って維持され、そして実験は地域委員会により承認された。

【0106】

[細胞および組織]

ヒト結腸直腸細胞株Colo201, Colo205, Colo320DM, SW480, SW620, WiDr, HT29およびLS174Tはアメリカン・タイプ・ティッシュ・カルチャー・コレクション(American Type Tissue Culture Collection, Rockville, MD)から入手し、そしてColo137はCanAg AB(Gothenburg, Sweden)から入手した。細胞をGibcoの10%熱不活化牛胎児血清(FBS)および0.1 mg/mlゲンタマイシン硫酸(Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)を添加したRPMI 1640培地中(Gibco)で培養した。ヒトの腫瘍および正常組織はスウェーデンのLund大学病院およびMalm総合病院から入手した。サブトラクションライブラリー選択のために、6個体から得た原発性結腸直腸カルシノーマおよび正常結腸上皮組織(腫瘍病巣から少なくとも5 cmの距離に位置する)のペアが使用された。

【0107】

[ライブラリーおよびモデルファージ]

ライブラリーおよびモデルファージに使用するファージミドベクター、増幅並びにファージミドベクターに挿入されるラムダ軽鎖および重鎖遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるscFv遺伝子の組み立てのためのプライマーは、以前に記載されている(Tordsson等、1997およびTordsson等、投稿中)。簡潔に説明すると、cDNAをプロメガのRNA単離キットおよびPE Biosystems(ストックホルム、スウェーデン)のRNA PCRキットを使用して総脾臓RNAから増幅した。本研究に使用したD1.3、C215および1F scFvモデルファージは、各々アンピシリン、クロラムフェニコールおよびテトラサイクリン抗生物質耐性遺伝子をコードしており、これにより異なる抗生物質を含有する寒天プレートを使用したコロニータイトレーションによるファージ混合物中での個々のファージ力価の分析が可能となる。提示した抗体は、

鶏卵リゾチーム(D1.3)、抗上皮接着分子(C215)および今まで知られていなかった上皮腫瘍細胞表面分子(1F、Tordsson等、投稿中)に反応性のものである。

【0108】

[サブトラクション選択]

ネガティブ選択組織(結腸、小腸(small bowel)もしくは子宮)の切片をスライド上で空気乾燥し、氷冷アセトン中で固定し、そして20%FBS含有TBS中で再水和した。必要としないファージ特異性を吸着するために、ライブラリーファージ(20%FBS中に 10^{10} もしくは 10^{11})またはモデルファージクロールン混合物(ミニライブラリー)を湿度を与えられた空気中で切片と共に4で15-24hインキュベーションした。

【0109】

吸着操作したファージ溶液を移し、結腸癌腫瘍(colon cancer tumours)の切片上でポジティブ選択のために上記のようにインキュベーションした。前記切片をTBS緩衝液中で10分間6回、そしてゲネネース緩衝液(Genenase buffer, 1M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 6 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, pH 8.0)中で5分間2回洗浄した。ファージを室温でゲネネース緩衝液中の400μlの33μg/mlゲネネースで30分間溶出した。溶出したファージを1mlの10X濃縮大腸菌株DH5aF' O.D.₆₀₀ 1.0を使用してレスキューした。感染した細菌を0.1mg/mlアンピシリンもしくはクロラムフェニコール(50μg/ml)を添加した2xYT中に希釈し、24~37で124h培養した(O.D.₆₀₀が0.5に達するまで)。

【0110】

ヘルパーファージM13K07(MOI 約10)を添加し、2hインキュベーションを継続して、その後70μg/ml最終濃度までカナマイシンを添加し、O.D.₆₀₀が2~3に達するまで(1~2日)28、250rpmで培養液を振とうする。細菌を遠心分離でペレットにし、そして上清中のファージを2回のPEG/NaCl沈殿および遠心分離でペレット化した。前記ファージペレットをTBS中で希釈した。

【0111】

テトラサイクリンおよびクロラムフェニコールモデルファージに対しては、コロニータイトレーションの前に37℃で45分インキュベーションした。クロラムフェニコール耐性ライブラリーファージミド構築物に対しては、耐性発現期間を2hに延長した。

【0112】

組織切片とは別に、1%BSAを含むPBS中の生細胞をモデル実験のポジティブ選択に使用した。吸着したファージを移し、1時間300万のColo205細胞上でインキュベーションした。細胞を10分間3回洗浄し、そして上記のように100μlのゲネネースで溶出した。上記の実験において、減弱した感染能力および抗生物質耐性遺伝子を有するファージ(10^{12} /ml)を潜在的な非特異的結合部位を減らすために添加した。

【0113】

ネガティブおよびポジティブ選択工程の双方に組織切片を使用したモデル実験において、非特異的ファージD1.3 scFvを特異的ファージと同じ濃度範囲で使用した。

【0114】

<実施例2>

《ライブラリー特異性の後期濃縮が認められ、最適な多様性が最後から2番目の選択ラウンドにおいて認められた》

内部標準としてのファージD1.3 scFvと比較したライブラリーファージの収量は、少ないけれども6番目と7番目の選択ラウンドの間で増加し、ライブラリー内の組織特異的ファージの濃縮を示している。

【0115】

scFv抗体を最後の4回の選択ラウンド(260~280 クローン/選択ラウンド)からのライブラリーファージで感染させた細菌クローンを培養して生産した。結腸癌および結腸の組織切片に結合するscFv抗体の頻度、並びに内部標準ファージ(ライブラリー濃縮)に対するライブラリーファージの相対的収量を図3に示した。組織反応性scFv抗体(29/280)は第5選択ラウンド

まで示すことができず、ネガティブ吸着が共通に広域に反応性する特異性の濃縮を抑制したことを示唆している。

【0116】

結腸癌細胞上でのポジティブ選択に対して同じライブラリーを使用した研究(Tordsson 等、投稿中)、メラノーマ組織切片上でのポジティブ選択に対してメラノーマライブラリーを使用した研究(Tordsson 等、1997)並びに様々な腫瘍細胞上でのポジティブ選択の研究(未発表の結果)などの以前の研究において、特異的ファージの高頻度の選択は2もしくは3番目の選択ラウンドで既に達成された。

【0117】

加えて、結腸癌ライブラリーから以前に選択されていない新規特異性が、サブトラクション組織切片選択の開発された方法を用いて今回同定された。6つの同定された特異性グループを提示するs c F v抗体クローンの免疫組織染色パターンを図4に示した。抗体K302 s c F vは結腸癌組織(A)と強く反応するが、結腸(B、C)の上皮、固有層(lamina propria)およびパイエル板細胞とも広範に反応する。K293 s c F vは、腫瘍組織(D)中の細胞および沈着物質(おそらくムチン)と反応し、また正常結腸上皮の管腔側(luminal side)のみと反応したが、パイエル板(E、F)とは反応しなかった。K320 s c F v抗体は、結腸癌組織(G)内の腫瘍細胞および浸潤細胞(infiltrating cells)と推測される細胞と反応した。この抗体は陰窩(crypts)深く正常結腸上皮と強く反応したが、固有層(lamina propria)(H)の細胞とは反応しなかった。K294 s c F vは、結腸(I)および結腸癌(示さず)の細胞内の認識抗原位置を示唆するパターンで反応した。クローンI I I D 9 s c F vは結腸癌細胞と反応するが、沈着物質もしくは浸潤細胞(J)とは反応しない。それはK293 s c F vよりも結腸陰窩深く反応するが、K320 s c F v(K)よりもより限定しているように思われた。最後の抗体特異性、I I D 1 1 s c F vは血管(内皮細胞が最もあり得る、L)の内部を裏打ちする表層を染色する。

【0118】

特異性パターンの構成は、最後の3回の選択ラウンド(表1)で変化した。2

つのパターンのみが第5の選択ラウンドにおいて認められた、すなわち大部分腫瘍限定的なグループK293、及びより広域反応性のK302グループである。最終ラウンド後に高頻度のK293グループは減少し、そしてK302グループは増大した、第5と第6選択ラウンドの間でそれらの頻度は顕著に変化しなかったのではあるが。4つの付加的な特異性パターンが、第6選択ラウンドで出現した。これらのパターンのうち3つは最終ラウンドで消失した。

【0119】

結果として、最後から2番目の選択ラウンドは、ライブラリー中の非特異的ファージに対して特異的ファージの多数を提示する特異性グループの最適多様性を示した、一方、広域反応性K302特異性グループは最終選択ラウンド後に優勢となった。

【0120】

これは特異性の広範な多様性を見つけるために最適な選択ラウンドをスクリーニングする重要性を示しており、ネガティブ選択フィルターが第6選択ラウンドまで効率的であったが、その後は飽和したことを示唆している。

【0121】

【表1】

表1. 結合 scFv の頻度(%)

選択ラウンド(R)毎の特異性

特異性 グループ:	R 5	R 6	R 7
K293	69	65	28
K302	31	31	71
K320	0	1.1	0
K294	0	1.1	1.7
IID9	0	0.6	0
IID11	0	0.6	0
結合体の総頻度:	10	65	89

<実施例3>

《頻繁および均質な腫瘍選択抗原発現が、K293スーパー抗原融合蛋白質により示された》

多くの腫瘍限定特異性グループの代表、K293を免疫エフェクター分子（スーパー抗原StaphylococcalエンテロトキシンAのD227A変異体）であるSEA（D227A）と遺伝子的に連結するため再クローン化した。この融合蛋白質を発酵槽で培養し、精製し、そして使用した5つの腫瘍と均質な反応性を示すために使用した。融合蛋白質K293 scFv-SEA（D227A）の反応性は、Ep-CAM特異的融合蛋白質C215 Fab-SEA（D227A）と比較して図5に示される結腸癌腫瘍において等しく均質な染色性を示した。腫瘍ダクトの内部の沈着物質の染色および表面上皮への限定的な結腸反応性は、K293 scFv-SEA（D227A）融合蛋白質を使用して確認された。

【0122】

[材料および方法]

《ScFv抗体及びscFv-SEA（D227A）の生産》

第6および第7ライブラリー選択ラウンドからのファージを導入した大腸菌の非サブレッサー株HB2151の個々のクローンを100 μg/mlアンピシリンを添加した2xYT培地を分注したマイクロウェルプレート中で37℃で17時間培養した。アリオットをphAプロモーターからscFvを発現するための低リン酸培地および抗生物質を分注したマイクロウェルプレート中に移し、そして30℃で17時間培養する。前記細胞を2200rpm、7分間の遠心分離により沈降させ、そして上清を等しい容量/ウェルの1%牛血清アルブミン（BSA、PBS中に溶解）を含むプレートに移す。ScFv-SEA（D227A）融合蛋白質をTordsson等（1997）および標準法に従って、発酵により生産し、ウサギ抗SEA結合アフィニティーカラムを使用して精製した。精製融合蛋白質を、捕捉および検出抗体として抗SEA抗体およびビオチン化・抗SEA抗体を使用したサンドウィッチタイプELISAで定量した。融合蛋白質の完全性をビオチン化ウサギ抗SEA抗体を使用したイムノブロット分析により確認した。

【0123】

免疫組織化学

切片（6～8 μm）を氷冷アセトン中で固定し、20%FBSを添加した150

mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.6 (TBS)中で再水和した。内在性のビオチンをアビジンおよびビオチン(Vector Laboratories, Burlingame, CA)でブロックした。最初のs c F v (培養上清)もしくはs c F v - S E A (D 2 2 7 A)融合蛋白質、5 μ g / ml、を切片と1時間インキュベーションした。C末端タグA T P A K S Eに対するウサギ抗血清、続いてビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体(DAKO A / S)、1 μ g / ml、をs c F vの検出のために使用した。融合蛋白質をアフニティー精製した抗体およびビオチン化ウサギ抗S E A抗体5 μ g / mlを使用して検出した。

【0124】

これらの試薬および50 mM トリス pH 7.6に1 / 110に希釈したS t r e p t A B C o m p l e x H R P (D A K O A / S)を30分間インキュベーションした。全ての工程間で前記切片をT B S中で3回洗浄した。0.01パーセントH₂O₂を含有するトリスpH7.6に溶解した0.5 mg / mlの3,3'-ジアミノベンチジン・テトラヒドロクロライド(S i g m a)中で染色反応を8分間行った。0.5%メチルグリーン中での10分間の対比染色後、D P Xメディウム(S i g m a)中にマウントする前に前記スライドを水道水中で10分間リンスし、70~99%エタノールおよびキシレン中で徐々に脱水した。

【0125】

s c F vのフィンガープリント

S c F v 遺伝子(s c F v 特異性の代表)をポリメラーゼ連鎖反応により増幅した。マイクロウェルの細菌培養物のアリクオット(5 μ l)、並びに形質転換した細菌のファージミドベクター中の(p h o AプロモーターおよびM13遺伝子I I Iの領域)s c F v 遺伝子の5'および3'領域に相補的なプライマーを使用した。

【0126】

増幅したs c F v 遺伝子のH i n f I制限酵素パターンを1%アガロースゲル電気泳動により分析する。ユニークなパターンもしくは原型のパターンを有するクローンを選び、各々の免疫組織化学特異性グループの代表として保存した。

【0127】

<実施例4>

《インビトロでのK293抗原の発現の欠如もしくはダウンレギュレーションは、組織に基づく（本物のインビボの表現型の保存物を代表する）選択原理の利点を反映する》

患者から摘出した腫瘍（培養腫瘍細胞と比較して）の穏和に固定した凍結組織切片は、オリジナルの腫瘍表現型と密接に類似する複合抗原（ファージ選択のための）の供給源である。患者由来の腫瘍との均質および頻繁な反応性と対照的に、K293 scFv-SEA(D227A)抗体は、フローサイトメトリーにより2/9(HT29およびLS174T)と弱く反応し、7/9(Colo201, Colo205, Colo137, Colo320DM, SW480, SW620, およびWiDr)の結腸癌細胞株とは反応しなかった、対照的にC215 Fab-SEA(D227A)は中程度から強程度の反応性を示した(表2、および未記載結果)。2つのネガティブな細胞株(Colo205 および WiDr)および2つの低反応性細胞株をSCIDマウスの皮下で成長させた。

【0128】

免疫組織化学を用いて、これらの腫瘍とK293 scFv-SEA(D227A)の反応性を分析した。Colo205腫瘍は完全にネガティブであり、一方、WiDr腫瘍の腫瘍細胞はネガティブだが沈着物質はポジティブであった。HT29腫瘍は少数の細胞(約5~10%)および沈着物質に対してポジティブであった。LS174T腫瘍は細胞の約50%に対して不均質にポジティブで、また沈着物質に対してもポジティブであった。従って、原発性の患者腫瘍におけるK293エピトープの頻繁および均質な発現は、インビトロで培養した腫瘍細胞株または異種宿主中で成長した細胞株に由来する腫瘍の何れにおいても観察されなかった。この結果は、ファージ選択の抗原ソースとしての組織切片の使用が腫瘍に限定したK293の特異性を見つけるために必須であったことを示している。

【0129】

フローサイトメトリーによって検出される2つの細胞株上のK293エピトープの低い発現は、認識されるTAAが腫瘍細胞の表面に発現され得ることを示唆している。インビボの表面発現は、原発性結腸カルシノーマに由来する腫瘍細胞、並びに腫瘍を細胞懸濁液に乖離するためにディスパーゼ(天然のプロテアーゼ)およびコラゲナーゼで処理した腫瘍細胞におけるフローサイトメトリーの実施により確認された。mAb C215で検出されるEp-CAM+細胞のような他の細胞(例えば、線維芽細胞、血液細胞および平滑筋細胞)から区別される腫瘍細胞は、K293scFv-SEA(D227A)反応性に対して2重染色された(図6)。Ep-CAM陽性腫瘍細胞の多数は、細胞の抽出に必要とされる一晩(o.n.)の酵素処理後にK293反応性(約60%)であった。

【0130】

K293scFv-SEA(D227A)反応性は、様々な強度ではあるが抽出した原発性腫瘍の細胞を使用した3つの追加実験において示され、これはK293 TAAが同種ホストの腫瘍細胞表面上に発現することを支持している。

【0131】

【表2】

表2. K293抗体は原発性の結腸カルシノーマを均質に染色するが、インビトロもしくは異種ホスト(即ち、SCIDマウスの皮下)において培養した結腸癌細胞株を弱くおよび不均質に染色する。

細胞株	フローサイトメトリー	SCIDマウス中でのS.c成長	原発性結腸カルシノーマ
Colo205	陰性	陰性	選択に使用した5つの原発性結腸カルシノーマの均質性の染色*
WiDr	陰性	陰性*	
HT29	低陽性	5-10% 陽性細胞*	
LS174T	低陽性	50% 不均質陽性*	

* 沈着した物質は強く陽性

[材料及び方法]

フローサイトメトリー

培養腫瘍細胞または新たに用意された腫瘍細胞に対する、Staphylococcal エンテロトキシンA (SEA) に遺伝子的に連結された抗体の反応性がビオチン化ウサギ抗SEA抗体およびアビジン-PEを使用して示された。

【0132】

原発性ヒト結腸癌細胞は、同日に摘出された結腸直腸癌腫瘍 (colorectal cancer tumours) に由来し、使用まで150 mM NaCl中で氷冷維持された (4時間未満)。前記腫瘍は小片に切断され、RPMI 1640培地 (Gibco, Middlesex, UK)中に希釈した1 mg/ml コラゲナーゼ (Sigma), 0.1 mg/ml ヒアルロニダーゼ (hialuronidase、Sigma), 2.4 mg/ml ディスパーゼ (Boehringer Mannheim) および 20 µg/ml デオキシリボヌクレアーゼ (Sigma) を含有する溶液中で一晩ゆっくりと室温で振とうした。前記腫瘍細胞を濾過により組織碎片から分離し、PBS / 1% BSAで1度洗浄し、そして5 µg/ml C215 mAb / ウサギ抗マウスFITC (Dakopatts)の1 / 20希釈物および5 µg/ml K293scFv-SEA (D227A) / ビオチン化ポリクローナルウサギ抗SEA抗体の1 / 1000希釈物 / アビジン-PEの1 / 20希釈物で染色した。

【0133】

<実施例5>

《K293FabSEA / E11は上皮腫瘍を強く且つ頻繁に染色する》

様々なヒト腫瘍における免疫組織化学反応性を表3に要約する。K293FabSEA / E11は、結腸、膵臓、肺および乳房 (胸部) のアデノカルシノーマにおいて強い陽性反応を示す (図7)。強い反応が腺構造における悪性細胞および粒状構造のムチン様 / シェッド (shed) 物質の双方で認められた。腎臓もしくは前立腺癌においては如何なる反応も得られてないが、一方、2つの悪性メラノーマのうち1つは低程度から中程度の反応性を示した。結腸癌において、試験した腫瘍12例の全てが強く陽性に染色された。

【0134】

個々の腫瘍の中で陽性悪性細胞の頻度は、75から100%まで変化する。6例の乳房 (胸部) 腫瘍のうち5例は、75 ~ 100%の陽性悪性の頻度で強く陽

性であった。結腸および乳房（胸部）のカルシノーマ中の陽性細胞の頻度は75から100%まで変化するが、大多数の腫瘍は90%を越える陽性反応を示す。2例の試験した膵臓腫瘍のうち2例も、90%を越える悪性細胞において強い反応性を示す。

【0135】

非小細胞肺カルシノーマ(NSCLC ; non small lung carcinomas)の中で2例は、扁平上皮細胞カルシノーマで、4例は肺アデノカルシノーマである。全例とも悪性細胞の強い染色性を示した。試験した扁平上皮細胞カルシノーマ双方において、90%を越える腫瘍細胞において陽性染色が認められた。アデノカルシノーマにおいて、2例は90%腫瘍細胞反応性を示し、そして2例は10%未満の陽性率であった。

【0136】

異なる結腸癌におけるK293FabSEA/E11の反応性パターンは、腫瘍の分化程度と相関しているようである。高度に分化した腫瘍において、悪性細胞の先端の染色性が優勢である。これらの高度に分化した腫瘍のいくつかにおいて、腫瘍細胞の基底外側部分(baso-lateral parts)は完全に陰性だが、一方、先端部分は強く陽性である。低程度および中程度に分化した腫瘍において、免疫反応は特定部位に対して分極することはなく、むしろ悪性細胞において一様に分布している。

【0137】

【表3】

表3. 腫瘍組織反応性、K293FabSEA/E11

結腸癌、原発性腫瘍	12/12腫瘍において強程度の染色。75-100%腫瘍細胞反応性。強程度の反応性がムチン様/シェッド(shed)物質においても観察された。
結腸癌、転移性	3/4腫瘍*において強程度の染色。75-100%腫瘍細胞反応性。
膵臓癌	2/2腫瘍において強程度の染色。約90%腫瘍細胞反応性。
乳癌(胸部癌)	5/6腫瘍において強程度の反応(75-100%腫瘍細胞反応性)。反応はムチン様/シェッド(shed)物質においても観察された。
非小細胞肺カルシノーマ(NSCLC; Non small cell lung carcinoma)	6/6において強程度の反応。2/6において<10%腫瘍細胞反応性、4/6において>90%。反応はムチン様/シェッド(shed)物質においても観察された。
悪性メラノーマ	1/2(約90%腫瘍細胞反応性)において低-中程度の反応性。1/2において陰性。
前立腺癌	陰性 2/2
腎臓癌	2/2において陰性

*転移性陽性の1例はホルマリン固定およびパラフィン包埋された。

<実施例6>

《K293FabSEA/E11は、非常に限定した正常組織反応性を示した》

正常組織反応性は、研究した器官の一群のなかで結腸、小腸(small intestine)および乳房(胸部)に限定している。上皮細胞の先端部分の強い染色は、結腸において認められた(図8)。これは、小腸(small intestine)からの2例の試験したバイオプシーのうちの1例においても認められる。多分、これらのバイオプシーは異なる領域から採取されたものであり、K293FabSEA/E11が小腸(small intestine)の特定部位のみと反応することを示している。乳房(胸部)組織において、低程度から中程度の反応が腺上皮細胞(glandular epithelial cells)および周囲ストローマ部分に認められる(図8)。如何なる反応も胃、脾臓、腎臓、肝臓、肺、皮膚、膵臓、甲状腺、心筋もしくはCNSにおいて認められなかった(表4)。

【0138】

【表4】

表4. 正常組織反応性、K293FabSEA/E11

結腸	上皮の先端部分において強程度の反応。5/5
小腸	1/2の上皮において強程度の反応。
胃	陰性 2/2
乳房(胸部)	腺上皮および周囲のストローマ部位において低から中程度の反応。2/2
脾臓	陰性 2/2
腎臓	陰性 2/2
肝臓	陰性 2/2
肺	陰性 2/2
皮膚	陰性 2/2
膵臓	陰性 2/2
甲状腺	陰性 1/1
心筋	陰性 1/1
CNS	陰性 1/1

[材料及び方法]

免疫組織化学

《光学顕微鏡法のための凍結切片》

ルンド大学病院の外科から提供された腫瘍および正常組織を液体窒素中で前冷却したイソペンタン中で急速冷凍 (snap frozen) し、そして -70 °C で保存した。凍結切片作成後、切片を一晩空気乾燥した。前記切片を冷却アセトン中で固定し、内在性のビオチンをアビジン/ビオチン (Vector, Burlingame CA) でブロックし、そして一次抗体 K293FabSEA/E11 で1時間インキュベーションした。K293 VH および VL 遺伝子 (ライブラリーから選択した scFv より得た) をカニクイザル (cynomolgus) CH1 および C-ラムダ遺伝子に遺伝子的に融合して融合蛋白質を調製した。結合した Fab をスーパー抗原 Staphylococcal エンテロトキシン AE キメラ変異体 (D227A、(非常に減弱した MHC クラス II 結合を示す) E11 と連結した。この構築物、K293FabSEA/E11 は、非常に低レベルの非特異的結合を示し、そして標準方法により

生産され、ビオチン化された二次抗体ポリクローナル・ウサギ抗SEA抗血清による高感度検出を可能とした。

【0139】

前記二次抗体を30分間インキュベーションし、続いてストレプトアビジン-ビオチン/HRP (Dakopatts, Copenhagen)による別の30分間の工程でインキュベーションされた。全ての工程間で洗浄を0.05 M Tris pH 7.6 および 0.15 M NaClにより3回実施した。ジアミノベンチジン(DAB)を色素原として使用し、前記切片を0.5%メチルグリーン中で対比染色した。ポジティブコントロールとして、汎上皮反応性融合蛋白質C215FabSEA(D227A)を使用した。ネガティブコントロールとして、組織非反応性FabとSEA-D227Aの融合蛋白質を使用するか、または如何なる一次抗体も使用しなかった。全ての抗体は5 µg/mlの濃度で使用した。結果をそれぞれ陰性、低程度、中程度もしくは強程度の染色性と表記した。

【0140】

《光学顕微鏡法のためのパラフィン切片》

リンパの結腸癌転移の腫瘍組織を4%ホルムアルデヒド(Sigma, St. Louis MO)中、4℃で一晩固定した。PBS中で洗浄後、前記組織を脱水し、パラフィン(Histolab AB, Gothenburg, Sweden)中に包埋した。パラフィン切片を調製し、37℃で一晩乾燥させた。前記切片を脱パラフィンし、脱水し、そして上記の通り免疫組織化学的に染色した。

【0141】

<実施例7>

《K293FabSEA/E11は表面発現抗原を認識する》

免疫反応のサブセルラー局在を8 µm凍結切片と比較して薄層切片上でより正確に実施した。2 µmの合成樹脂包埋切片において、結腸癌細胞の基底外側に加えて先端部の細胞膜染色の実施が可能であった(図9A)。この腫瘍標本は電子顕微鏡用にも処理された。電子顕微鏡の解像度で免疫反応は悪性細胞の外側表面に位置することを示すことが可能であった。正常結腸の染色後の2 µm準薄切片(semithin sections)の顕微鏡検査および電子顕微鏡検査は、免疫反応が管腔

上皮 (luminal epithelium) 中の微小絨毛の外側表面のレベルにも位置することを示した(図9B および C)。

【0142】

[材料及び方法]

《光学顕微鏡法および電子顕微鏡法のための合成樹脂包埋切片》

腫瘍および正常組織物質を以下の記載に従って処理した。新鮮な摘出物を4%ホルムアルデヒド(Sigma, St. Louis MO)および0.25%グルタルアルデヒド(TAAB, Berkshire)の混合物中で2時間固定した。PBSでの洗浄後、前記組織を30%スクロース含有のPBS中でリンスして一晩凍結保護(cryoprotected)し、そして上記のようにイソペンタン/液体窒素中で急速凍結した。自由浮遊した50μm凍結切片を光学顕微鏡法で記載した同一の抗体とインキュベーションした、しかしインキュベーション時間は異なる。一次抗体で一晩、二次抗体で3時間、そしてstreptavidin-biotin-HRPでもう3時間インキュベーションした。DAB中で反応後、前記切片を1% OsO₄ (Standard supplies, Kallered)中で後固定し、脱水してEpon (Agar Scientific Ltd, Stansted, U. K.)中に包埋した。

【0143】

光学顕微鏡法のための準薄切片(2μm)および電子顕微鏡法のための超薄切片(50-60nm)をウルトラミクロトーム(LKB, Bromma, Sweden)で調製した。準薄切片を1%メチレンブルーで対比染色した。超薄切片を2%酢酸ウラニル(uranylacetate)およびクエン酸鉛(lead citrate)中のultrastainer (LKB, Bromma)で染色した。

【0144】

<実施例8>

《K293FabSEA/E11は結腸癌患者の血清中の循環する抗原を検出しない》

図10は、それぞれ結腸癌患者群および一人の健常人ボランティアのプラズマサンプルとインキュベーションした後の、放射性同位元素標識SEA融合蛋白質構築物および循環する腫瘍抗原のフラクションのサイズを示す。

【0145】

健常人個体のプラズマとインキュベーションした場合と比較して、癌患者のプラズマとインキュベーションした場合には1.5倍未満のK293Fab-SEA/E11が蛋白質複合体として認められた。一方、C242-Fab構築物(ポジティブコントロール)においては、癌患者のプラズマとインキュベートした場合、8倍を越えるものが複合体型であった。従って、K293Fab-SEA/E11は、癌患者中の如何なる循環する抗原をも認識しなかった。

【0146】

[材料及び方法]

試験混合物の処方

K293Fab-SEA/E-11, C215Fab-SEA_{mut.9} および C242Fab-SEA_{mut.23}の50 μ gを、Iodogenプレコートチューブ(Pharmacia-Amersham Biotech)を使用して10 μ Ci/ μ gの比放射能にまで¹²⁵Iでラベルした(Fraker and Speck, 1978)。HPLCによりラベルした試験混合物の蛋白質濃度および比放射活性を決定した(以下を参照)。

【0147】

プラズマサンプルを市販のアッセイ(CanAG Diagnostics AB, Gothenburg, Sweden)により高レベルの循環CA242抗原を示した結腸直腸癌患者(n=12)、および非常に低レベルのプラズマCA242を有する一人の健常人ボランティアから採取した。

【0148】

プラズマの被験液の分析

50 μ lの未希釈プラズマサンプルを1 μ g/mlの試験混合物(PBST中に希釈)とインキュベーション混合液を振とうして周辺温度(ambient temperature)で60分間インキュベーションした。全てのサンプルをHPLCで分析した(以下を参照)。

【0149】

前記プラズマサンプルはSEAに対する抗体を含有し、偽陽性相互作用シグナルを提示したので、免疫グロブリンを除くためにそれらをプロテインAとインキ

キューベーションした。この除去工程後に抗SE A含量は $< 10 \text{ pmol/ml}$ であった。プロテインAとインキューベーションした後に癌患者からプールしたプラズマ中のCA 242のプラズマ含量は 479 U/ml で、健常人ドナーのサンプル中では 20 U/ml 未満であった。

【0150】

ラベルした試験混合物および調製したサンプルをサイズ排除HPLCにより分析した。 $50 \mu\text{l}$ のサンプルを注入 (Waters 717 Auto Sampler) し、TSK G3000SW カラム ($7.5 \times 600 \text{ mm}$, Toso Haas)上で分離した。前記サンプルを周辺温度、流速 1.0 ml/分 で 10 mM PBS, $\text{pH} = 7.4$ により溶出した。直列に連結したUV検出器 (280 nm , Waters 486)および放射活性検出器(Flo-One, A-515-AX)により検出を行った、そしてサンプルによりデータを $35 - 60$ 分間収集した。試験混合物を結合した複合体を含有するフラクションは、試験混合物自身より早くクロマトグラム中に出現する高分子量ピークとして観察される。ヨウ素化した断片もしくはフリーのヨウ素を含有するフラクションは、低分子量ピークとして観察された。放射活性クロマトグラムを統合し、複合体化した試験混合物および低分子量ピークの領域を全領域のパーセントとして表示した。

【0151】

<実施例9>

結腸癌反応性抗体K293により認識される腫瘍関連抗原の精製

腫瘍抽出物をヒト結腸癌組織から作成した。前記抽出物を2つのカラム、C215 Fab - SE Am9を結合したコントロールおよびプレカラム、並びにK293 Fab - SE Am9を結合したカラムにアプライした。組織抽出物を前記カラムにアプライする場合は、前記カラムを直列に連結したが、結合蛋白質のアルカリ溶出の間は分離した。

【0152】

K293 Fab - SE Am9 結合カラムから溶出したフラクションを収集し、中和し、濃縮し、そして非還元条件下SDS - PAGEにより分析した(図11)。高pHで溶出したフラクション中に約 $35 - 45 \text{ kDa}$ のメジャーバンド

(図11でAと表示)が認められた。メジャーバンドを切り取り、トリプシンによる蛋白質分解を実施した。生成したトリプシンペプチド断片を分離し、それらの分離したペプチドの3つについてN末端アミノ酸残基の最初の10配列を決定した(図12)。配列決定した3つの短いN末端ペプチド配列(配列番号3-5)は、ヒト蛋白質グリセロアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(GADPH)の部分配列と完全な相同性を示した(図13)。

【0153】

[材料及び方法]

腫瘍組織の可溶化

K293抗原を発現するヒト結腸癌組織は、スウェーデンの病院から提供され、ABRの組織バンクで-70℃で凍結保存された。凍結結腸癌組織をメスでスライスし、そして1%(v/v)Nonidet P-40(NP-40)およびプロテアーゼ阻害剤(Complete™プロテアーゼ阻害剤カクテル錠, Boehringer Mannheim)を含有する4℃で冷却した等張スクロース緩衝液(0.25Mスクロース, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 7.4)を含むチューブに移した。組織スライスをUltra-Turraxホモジナイザーでホモジナイズし、0℃で静置して可溶化した。大部分の細胞残渣を取り除くために、前記可溶化溶液を11000rpm(Hettich centrifuge, Universal 30 RF ローター)で遠心分離した。前記上清を4℃、108000xg(Beckman ultracentrifuge, Ti-60 ローター)で更に遠心分離し、そして最終的に0.2µmのMinisart plus フィルター(Sartorius AG, ゲッチンゲン, ドイツ)を通して濾過した。

【0154】

組織抗原のアフィニティー精製

抗体、K293Fab-SEAm9およびC215Fab-SEAm9を製造者の指示に従ってNHS-活性化HiTrap(登録商標)カラム(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)に結合した。C215Fab-SEAm9を結合したコントロールおよびプレカラム、並びにK293Fab-SEAm9を結合したカラムを直列に連結し、スタート緩衝液(0.2% NP-40を含有する20mM Tris-HCl, 4℃でpH7.5)で前洗浄した。そして、前

記抽出液をカラムに0.1ml/分の流速でロードし、フロースルーを再循環し、続いてスタート緩衝液でカラムを洗浄した。各々のカラムに結合した抗原をジエチルアミンのグラジエント(20分間でpH7からpH11に至る)により溶出した。0.5mlのフラクションを集めて、0.1mlの1M Tris-HCl, pH6.7で中和し、そして-20℃で保存した。精製をアマシャム・ファルマシア・バイオテック(ウプサラ、スウェーデン)のAKTA FPLCシステムを使用して4℃で実施した。溶出したフラクションをプールし、濃縮し、そしてSDS-PAGEで分析した。同定した蛋白質バンドを切り取り、4℃で保存した。そして蛋白質をトリプシンで消化し、個々のペプチドのN末端ペプチド配列を蛋白質分析センター(カロリンスカ研究所、ストックホルム、スウェーデン)で決定した。

【0155】

<実施例10>

《K293FabSEA/E11は重症複合免疫不全症(SCID)マウスにおける腫瘍成長を抑制することができる》

スーパー抗原SEAは、サイトカイン産生および細胞毒性を担うTリンパ球を活性化する能力を有する。スーパー抗原を腫瘍反応性抗体と融合した際、それは腫瘍細胞にターゲットされた。そして腫瘍領域中のスーパー抗原の局在は、腫瘍細胞の選択的な殺傷を誘導する。

【0156】

実験結果は図14に示す、そこではK293FabSEA/E11で処理した動物の腫瘍容積が、ターゲット化されていないNRML-05(抗メラノーマ)FabSEA(D227A)で処理されたコントロール動物と比較して80%減少したことを示している。

【0157】

[材料及び方法]

重症複合免疫不全症(SCID)マウス(Bomnice, Ry, デンマーク)に0.2mlのビークル(PBS-1% Balb/c 血清)中に懸濁した 5×10^6 のLS174T結腸癌細胞(ATCC, Rockville, MD)を腹腔内注射した。24時間後

、スウェーデンのルンド大学病院の血液提供者から得たバフィコートのフィコールハイパーク分離により調製した 20×10^6 ヒト末梢血単核球細胞 (P B M C) を前記マウスの腹腔内に注射した。腫瘍注射後の1、3および6日目に前記動物を $100 \mu\text{g}$ のNRML - 05 F a b S E A / D 2 2 7 A (6動物個体) もしくは $100 \mu\text{g}$ のK 2 9 3 F a b S E A / E 1 1 (7動物個体)で処理した。51日目に前記動物を供試し、腫瘍節 (tumour nodules) を除去して質量を決定した。

【0158】

【参照文献】

- Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. (1998) Immunotechnology 4: 1
- Kerbel RS. Significance of tumor-host interactions in cancer growth and metastases. (1995) Cancer Metastasis Rev 14: 259
- Kohler G, Milstein C. Derivation of specific antibodyproducing tissue culture and tumor lines by cell fusion. (1976) Eur J Immunol 6: 511
- Tordsson J, Abrahmsen L, Kalland T, Ljung C, Ingvar C Brodin T. Efficient selection of scFv antibody phage by adsorption to in situ expressed antigens in tissue sections. (1997) J Immunol Methods 210: 11
- Tordsson J, Lavasani S, Ohlsson L, Karlstrom P, Svedberg H, Abrahmsen L and Brodin T. A3-a novel colon and pancreatic cancer reactive antibody from a primate phage library selected using intact tumor cells. Submitted to Int J Cancer.
- Williams KL. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology. (1999) Electrophoresis 20: 678

【図面の簡単な説明】

【図1】

サブトラクション選択の原理を説明する図である。

広域反応性ファージ (黒) の特異的吸着、そしてポジティブ選択の間の洗浄による非提示および非特異的ファージ (白) の減少。そして腫瘍限定ファージ (チ

エック)が溶出される

【図2】

効率的なサブトラクション選択を示すグラフである。

子宮もしくは小腸(small bowel)組織切片上のネガティブ吸着に続くC o l o 2 0 5細胞上でのポジティブ選択(A)。子宮、小腸(small bowel)もしくは肺の組織切片上での2回の反復吸着、そしてC o l o 2 0 5腫瘍組織切片上でのポジティブ選択(B)。

【図3】

サブトラクション選択したライブラリーからの組織特異的ファージの一群の後期濃縮を示すグラフである。

【図4】

ライブラリー選択したs c F vの免疫組織化学染色パターンを示す顕微鏡写真である。

K 3 0 2 s c F vおよびK 2 9 3 s c F v (D - F)で染色した結腸カルシノーマ(A)、結腸上皮(B)およびパイエル板(C)の染色像。K 3 2 0 s c F vおよびI I I D 9 s c F v (J、K)で染色した結腸カルシノーマ(G)および結腸上皮(H)の染色像。K 2 9 4 s c F v (I)で染色した結腸上皮、およびI I D 1 1 s c F v (L)で染色した結腸血管。

【図5】

1 0 0 n Mでの結腸癌(A)および結腸(B)に対するK 2 9 3 s c F v - S E A (D 2 2 7 A)の免疫組織化学的反応性、並びに結腸癌(C)および結腸(D)に対するC 2 1 5 F a b - S E A (D 2 2 7 A)の免疫組織化学的反応性を示す写真である。

(A)のバーは1 0 0 μ mである。

【図6】

摘出した原発性ヒト結腸カルシノーマから新規に調製した結腸癌細胞のフローサイトメトリー分析を示す図である。

サイズ、顆粒性(A, B)および上皮細胞のマーカースとしてE p - C A M発現に対してゲートされた細胞は、5 μ g / m l K 2 9 3 s c F v - S E A (D

227A) (グレーライン)で染色されるか、または一次抗体を有さない融合蛋白質ネガティブコントロール(黒ライン)によって染色された(C)。

【図7】

異なる腫瘍のK293FabSEA/E11染色を示す顕微鏡写真である。

A. 腺構造中で悪性細胞(矢印)およびムチン様物質(m)の双方の強い染色性を示す中程度に分化した結腸癌の染色。B. 悪性細胞の強い先端部染色(矢印)を示す高度に分化した結腸癌の染色、一方、新生物性の小腺(neoplastic glands)(b)の基底部分是非反応性である。C. 乳房(胸部)腫瘍(矢印)における悪性細胞の強程度染色。D. 肺アデノカルシノーマ(矢印)における悪性細胞の強程度染色。Aでのバーは50µmを示し、B-Dに対しても同様である。

【図8】

K293FabSEA/E11染色を示す写真である。

A. 正常結腸のK293FabSEA/E11染色。上皮細胞の先端部染色(矢印)に注意。免疫反応は結腸の管腔(lumen)に面する上皮に認められたが、陰窩(c)では陰性である。B. 正常乳房(胸部)のK293FabSEA/E11染色。低程度から中程度の染色性が腺上皮(g)、および周囲のストローマ部位(s)に認められた。C. 汎上皮マーカーC215とSEAD(227A)(FabC215SEA-D227A)のFabSEA融合蛋白質で染色した正常乳房(胸部)。腺上皮細胞(g)の強いラベルに注意。ストローマ部位(s)では如何なる反応も認められない。D. 腺上皮細胞(g)およびストローマ部位(s)において如何なる反応をも示さない正常乳房(胸部)のネガティブコントロール(一次抗体なし)。Aにおけるバーは50µmを表す。Bにおけるバーは50µmを表し、CおよびDに対しても同様である。

【図9A】

K293FabSEA/E11で染色した結腸癌(A)の準薄切片の顕微鏡写真である。

結腸癌切片において、腫瘍細胞の基底(矢印b)、先端(矢印a)および側面部分の各部位は陽性に染色された。バーは30µmを表す。

【図9B】

K293 FabSEA/E11で染色した正常結腸(B)の準薄切片の顕微鏡写真である。

正常結腸において、上皮細胞の先端表面(矢印)に陽性染色が認められる。図9Aにおけるバーは30 μ mを表しており、本図においても同様である。

【図9C】

正常結腸上皮細胞の電子顕微鏡写真である。

電子顕微鏡法は正常結腸上皮細胞(C、矢印)の微小絨毛の表面に免疫反応が局在することを示す。

【図10】

結腸癌患者および健常者個体のプラズマ成分に対する抗体SEA融合蛋白質の複合体形成の分析結果を示すグラフである。

高分子量領域で溶出された放射活性のパーセンテージをプロットした。結腸癌患者のプラズマに対するC242 FabSEAの高い結合に注意。

【図11】

K293結合アフィニティーカラムから溶出したフラクションの非還元SDS-PAGE分析(レーン1)を示す写真である。

Aとマークされたメジャーバンドがアミノ酸配列分析のために切り取られた。使用した分子量標準の位置が示される。

【図12】

K293アフィニティー精製で分離された35~45 kDa蛋白質バンド(Aとラベル)の3つのトリプシン消化ペプチド断片のN末端配列(配列番号3~5)を示す図である(図1を参照)。

【図13】

配列番号2の1、2および3のペプチド配列をグリセロアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(スイスプロット・データベースのアクセッション番号P04406)の蛋白質配列と整列させた図である。

【図14】

ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)を供給されたSCIDマウス中のLS-1

tct gag gtg cag ctg cag gag tgg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg 432
 Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Trp Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 130 135 140

gag acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tct ggt ttc tcc atc agc agt 480
 Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Ser
 145 150 155 160

ggt tat ggc tgg agc tgg atc cgt cag tcc cca ggg aag gga ctg gaa 528
 Gly Tyr Gly Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 165 170 175

tgg att gga gac atc tct tat agt ggg aac tcc agg tac aac ccg tcc 576
 Trp Ile Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Ser Arg Tyr Asn Pro Ser
 180 185 190

ctc aag agt cga gtc acc att tca aga gac acg tcc aag aac cag ttc 624
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 195 200 205

tcc ctg aag ctg acc tct gtg acc gcc gcg gac acg gcc gtg tat tac 672
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 210 215 220

tgt gcg aga cat gat aga ggc tgg cac gaa tac ttc gac ttc tgg ggc 720
 Cys Ala Arg His Asp Arg Gly Trp His Glu Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
 225 230 235 240

cag gga gtc ctg gtc acc gtt tcc tca 747
 Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 2

<211> 249

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 2

His Val Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Ile Gly Gly Tyr
 20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asn Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Glu Arg Phe
 50 55 60

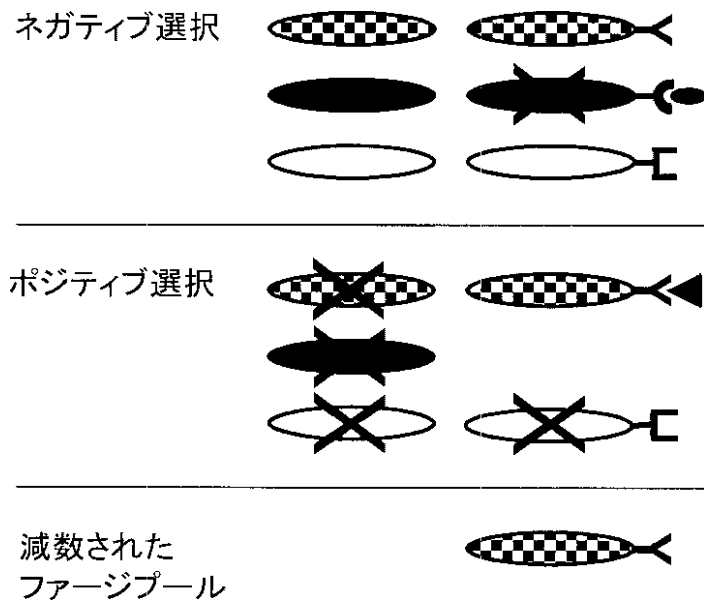
Ser Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Asp Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Arg Arg
 85 90 95

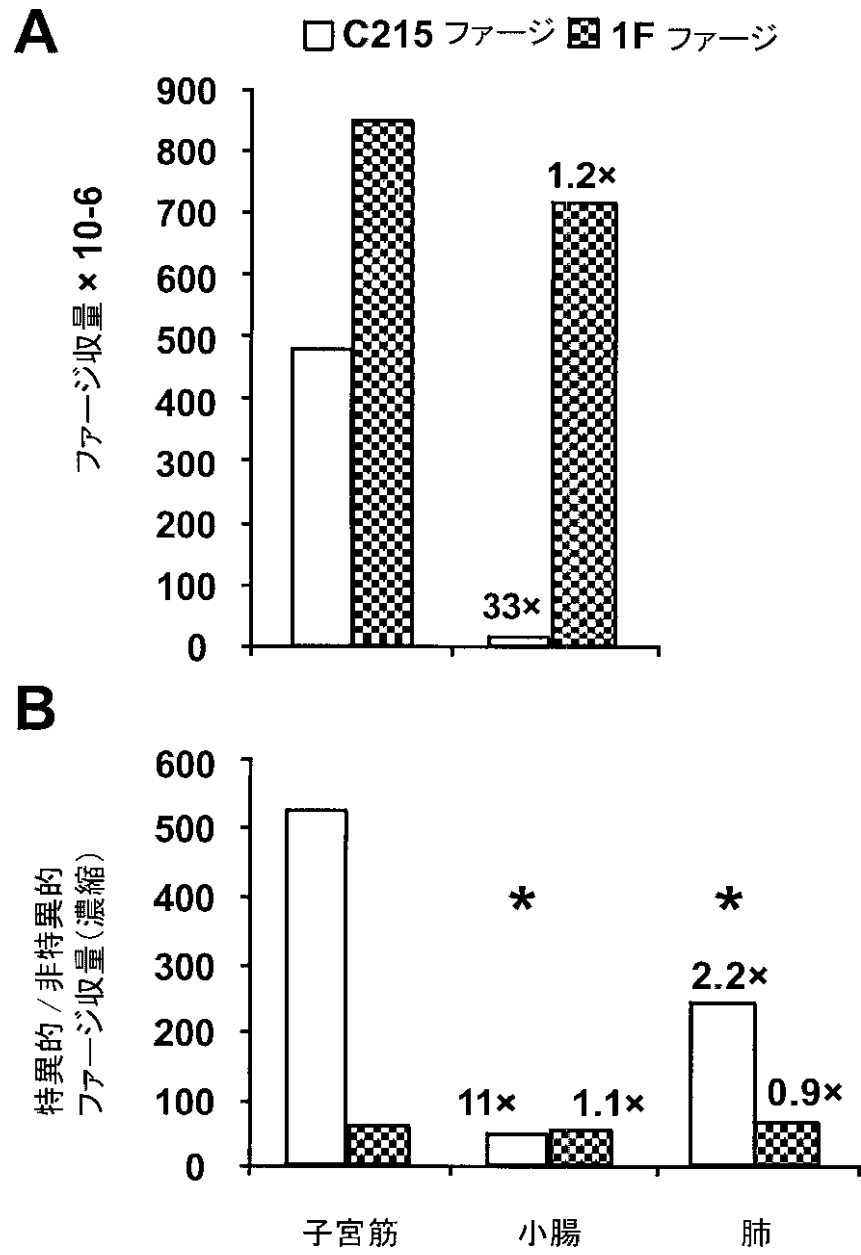
Asp Thr Tyr Ile Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Ala Asn Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Glu Val Gln Leu Gln Glu Trp Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 130 135 140
 Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Ser
 145 150 155 160
 Gly Tyr Gly Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 165 170 175
 Trp Ile Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Ser Arg Tyr Asn Pro Ser
 180 185 190
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 195 200 205
 Ser Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Ala Arg His Asp Arg Gly Trp His Glu Tyr Phe Asp Phe Trp Gly
 225 230 235 240
 Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

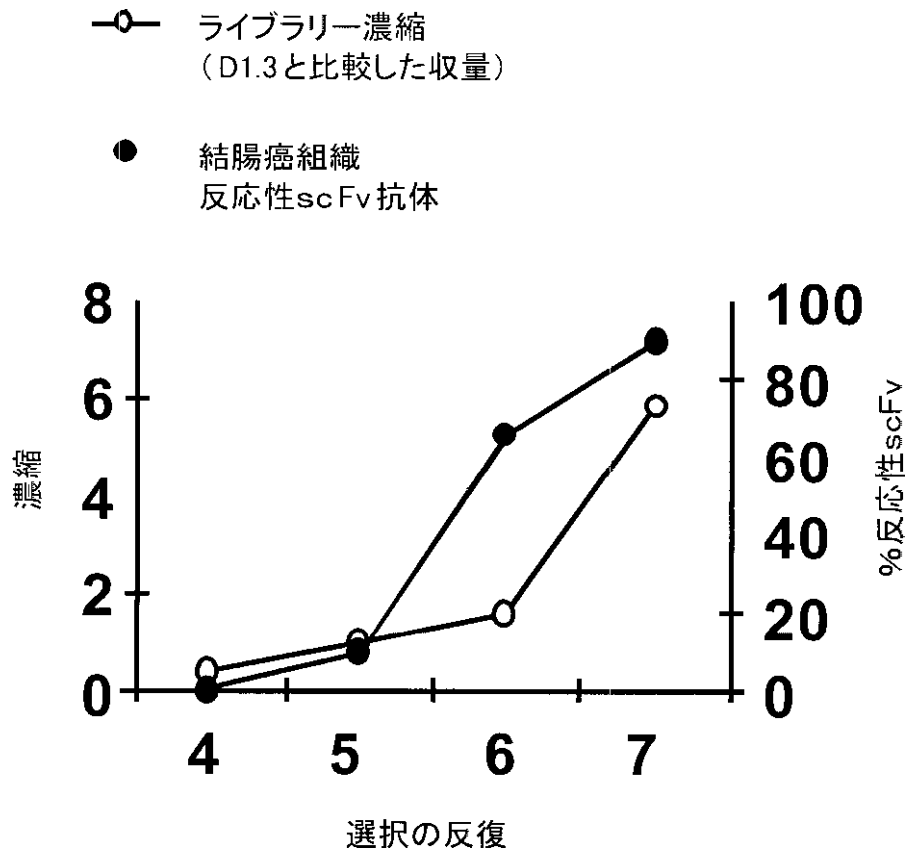
【図1】



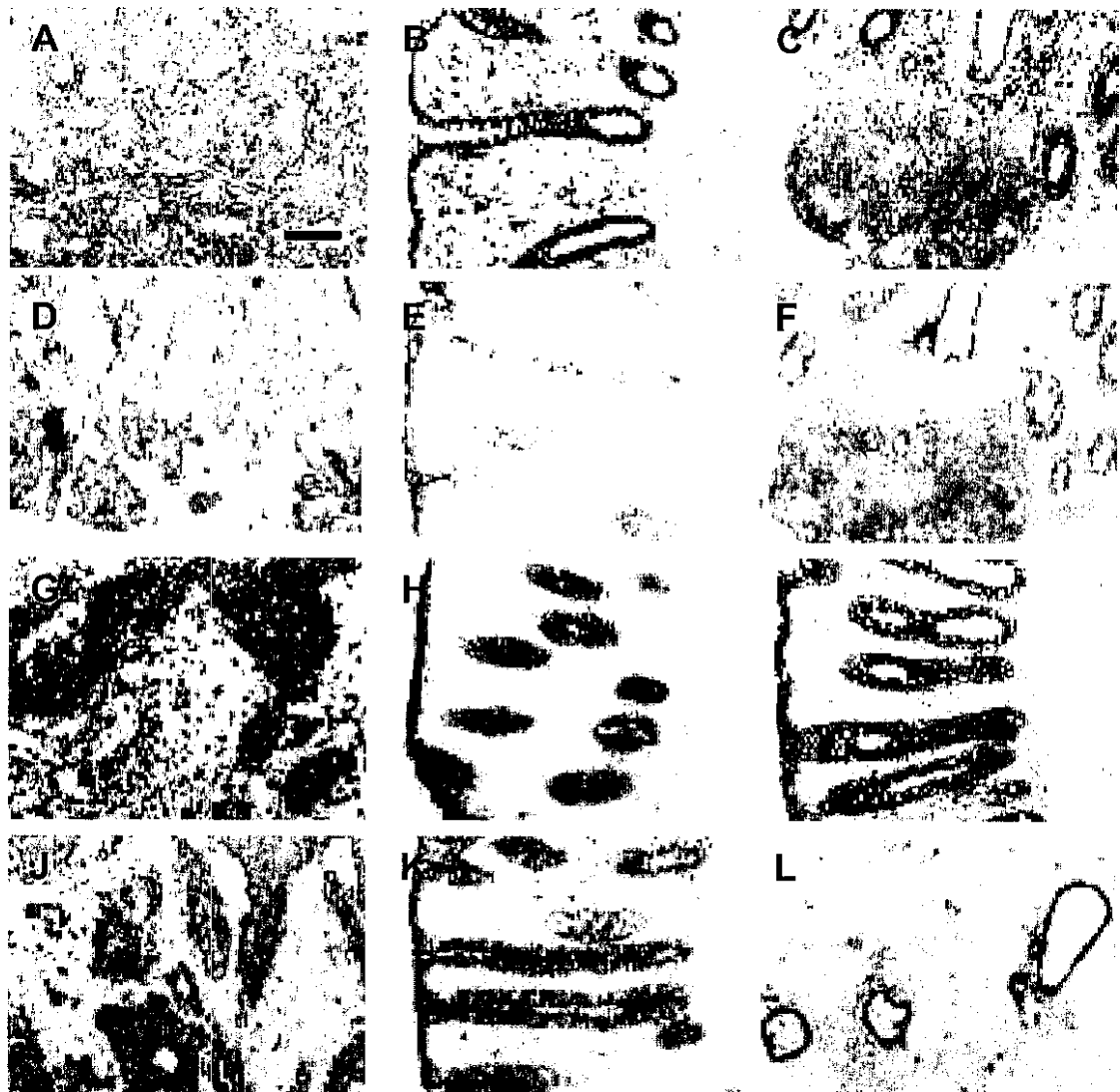
【図2】



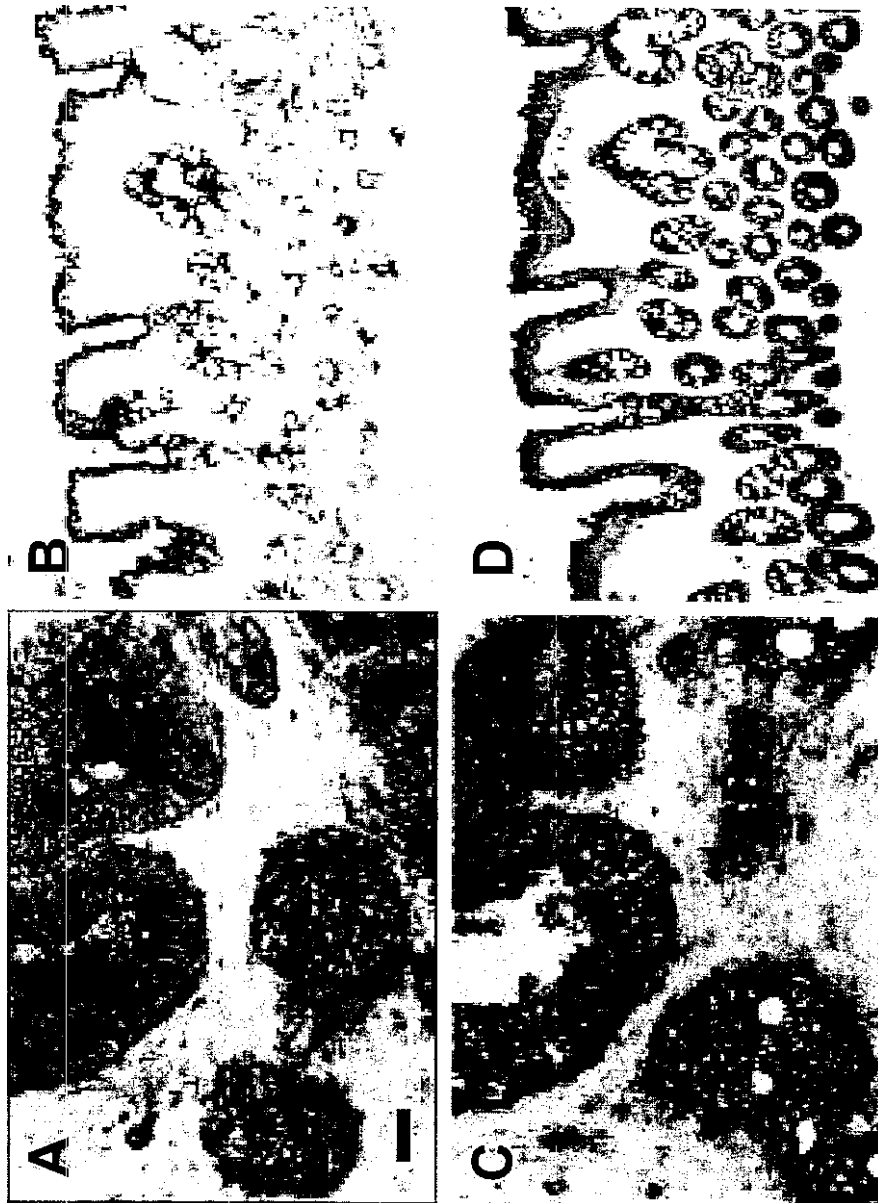
【図3】



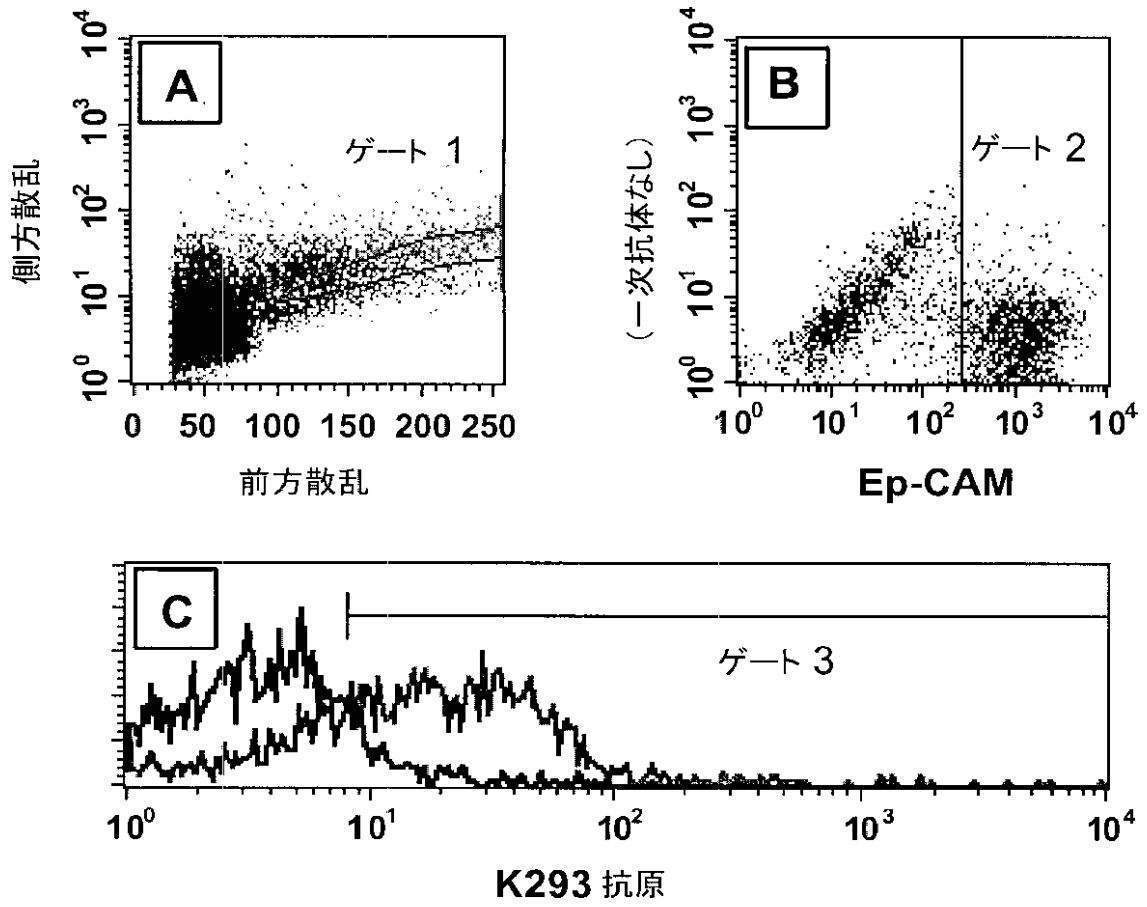
【图4】



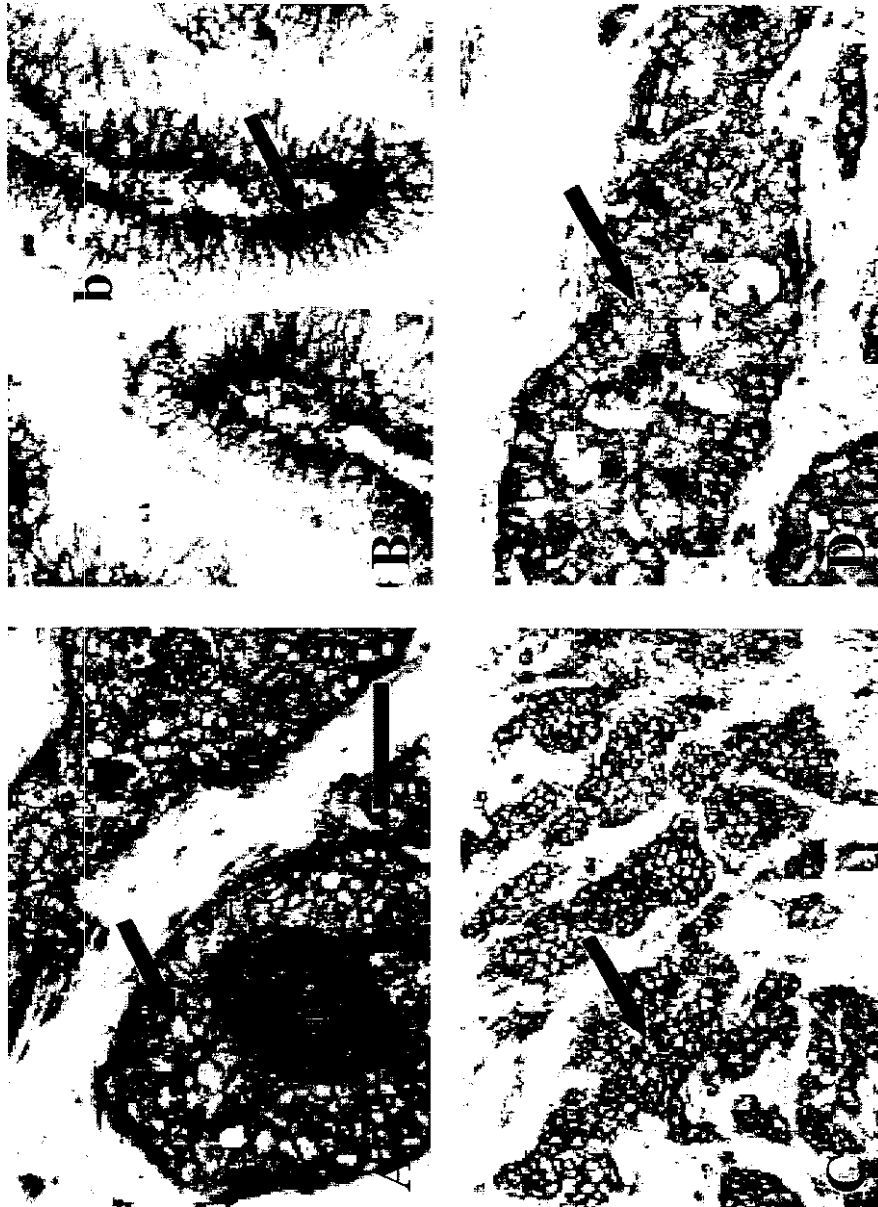
【図5】



【図6】



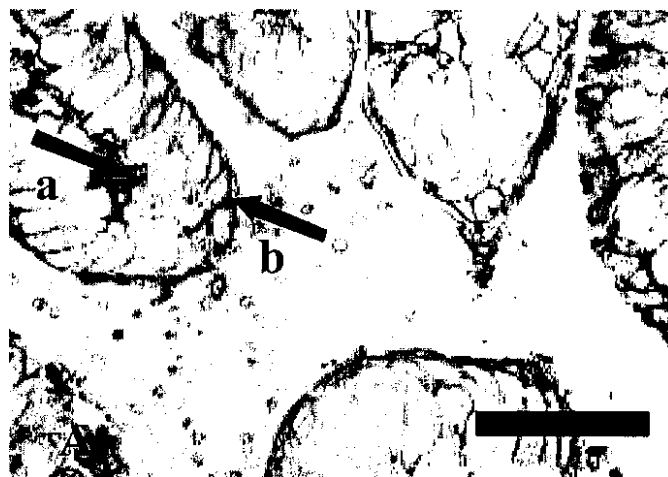
【图7】



【图8】



【图9A】



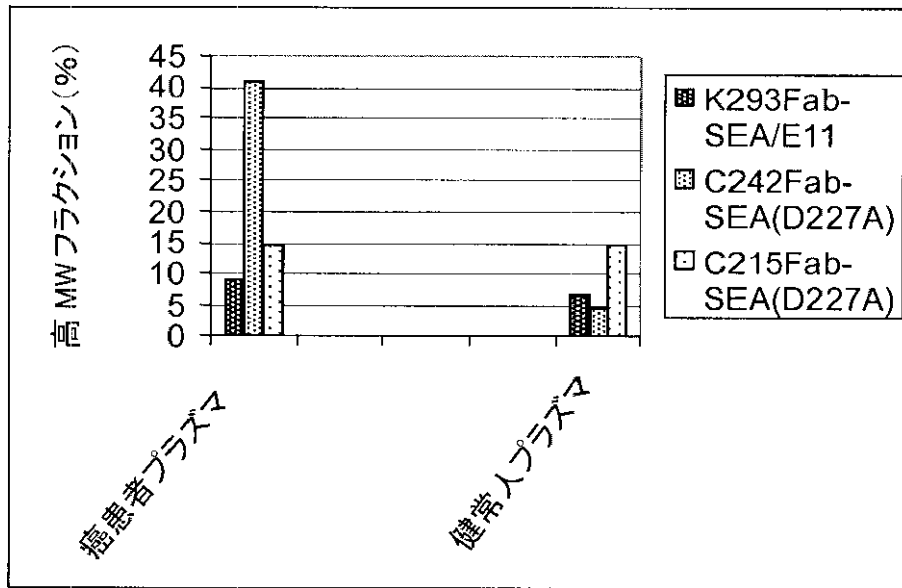
【図9B】



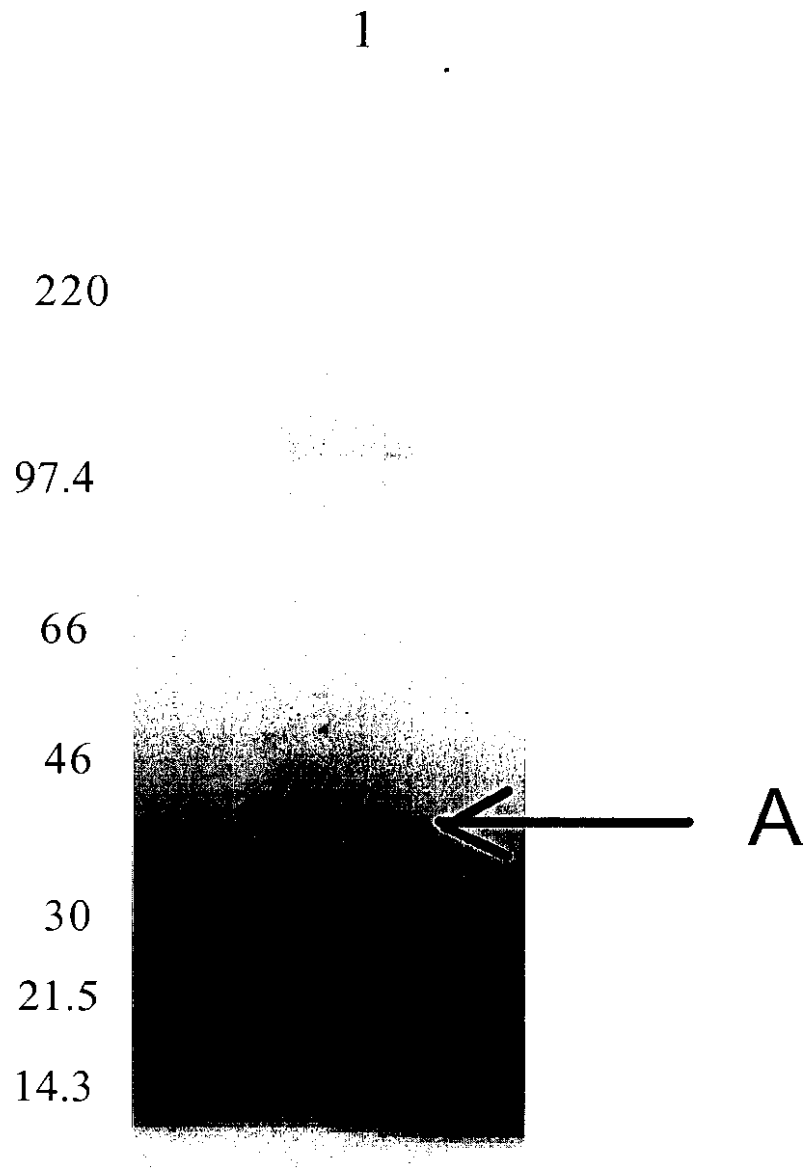
【図9C】



【図10】



【図11】



【図12】

- 配列番号 : 1 GALQNIIPAS
- 配列番号 : 2 VIISAPSADA
- 配列番号 : 3 VPTANVSVVD

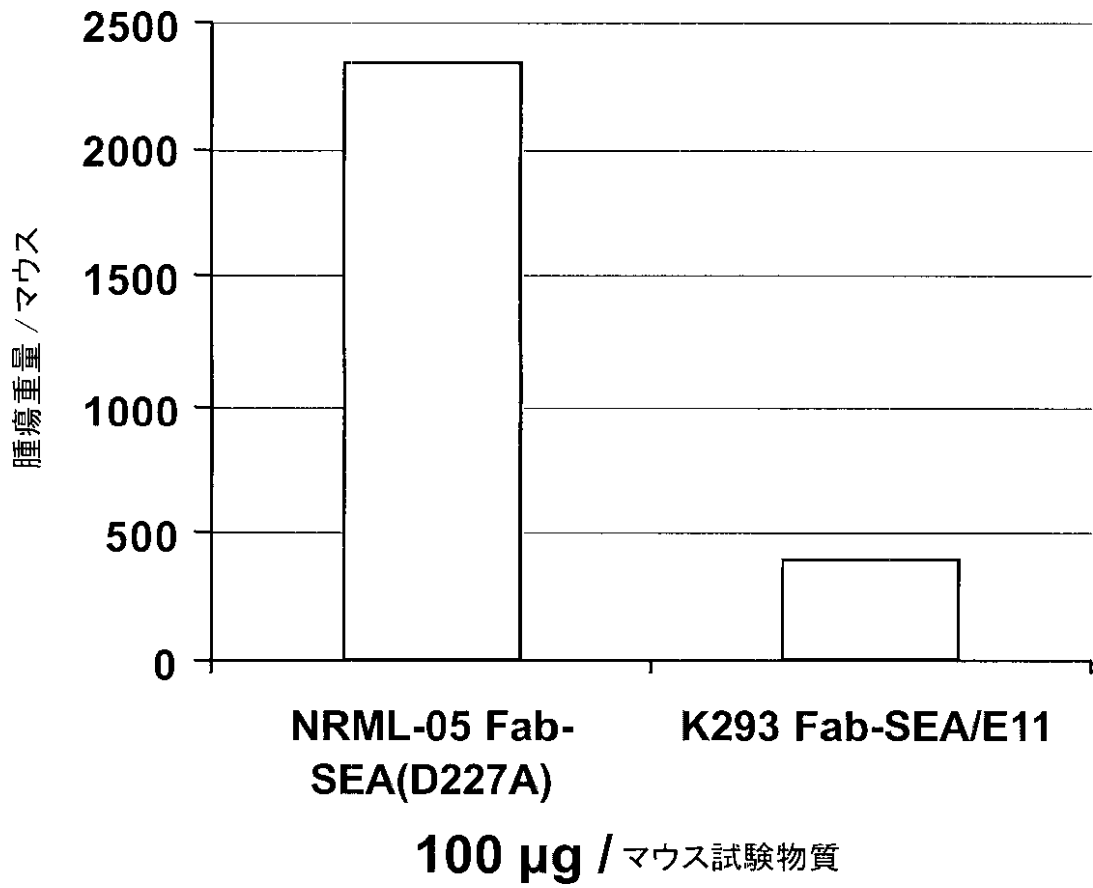
K293-アフィニティー精製で分離された 35-45 kDa 蛋白質バンド(Aとラベル)の3つのトリプシン消化ペプチド断片のN末端配列(図1を参照)。

【図13】

1 MGKVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNSGKVDIVAINDPFIDLNYMVYMFQYD
51 STHGKFHGTVKAENGKLVINGNPITIFQERDPSKIKWGDAGAEYVVESTG
101 VFTTMEKAG AHLQGGAKRVII SAPSADAPMFVMGVNHEKYDNSLKIISNA
VIISAPSADA
151 SCTTNCLAPLAKVIHDNFGIVEGLMTTVHAI TATQKTVDGPGSKLWRDGR
201 GALQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMAFRVPTANVSVVDLTCRLE
GALQNIIPAS VPTANVSVVD
251 KPAKYDDIKKVKQASEGPLKGILGYTEHQVVSSDFNSDTHSSTFDAGAG
301 IALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMAHMASKE

配列番号1から3(図12で定義)のペプチド配列をグリセロアルデヒド3-リン酸
デヒドロゲナーゼ(アクセッション番号P04406)の蛋白質配列と整列させた。

【図14】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成14年6月3日(2002.6.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 腫瘍細胞の中および/または表面に結合する結合構造であって、その結合構造は配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号160-165(CDR1), 180-195(CDR2), 228-238(CDR3)により本質的に定義される重鎖CDR構造により主に決定され、一方、付加的な結合特異性が配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号23-36(CDR1), 52-58(CDR2), 91-100(CDR3)により本質的に定義される1以上の軽鎖CDR構造により提供される結合構造。

【請求項2】 腫瘍細胞の中および/または細胞表面に結合する結合構造であって、該結合構造が、配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号23-36(CDR1), 52-58(CDR2), 91-100(CDR3)を本質的に含む軽鎖に抗体の1以上の相補性決定領域(CDR)配列、および配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号160-165(CDR1), 180-195(CDR2), 228-238(CDR3)を本質的に含む重鎖に該CDR配列を含む結合構造。

【請求項3】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が前記CDR配列の全てを含む結合構造。

【請求項4】 請求項1~3の何れか1項に記載の結合構造であって、該結合構造が抗体および/またはその断片である結合構造。

【請求項5】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号1-110を本質的に含む軽鎖

の可変領域、および配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号130-249を本質的に含む重鎖の可変領域、を含む抗体および/またはその断片である結合構造。

【請求項6】 請求項5に記載の結合構造であって、前記抗体が配列番号2に示したアミノ酸配列を含む結合構造。

【請求項7】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が原発性および/または転移性の結腸直腸、膵臓、乳房（胸部）および肺のカルシノーマ細胞を含むグループから選択された上皮腫瘍細胞の中および/または細胞表面に強程度および/または均質に結合する結合構造。

【請求項8】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が腎臓および/または前立腺カルシノーマおよび/または悪性メラノーマ細胞に対して低程度および/または不均質に結合する、および/または結合しない結合構造。

【請求項9】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が結腸表面上皮および小腸（small bowel）の上皮の先端部分に強程度に結合する結合構造。

【請求項10】 請求項9に記載の結合構造であって、該結合構造が結腸表層上皮細胞の微小絨毛および/または刷子縁の細胞表面の先端側に結合する結合構造。

【請求項11】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が乳腺上皮および/またはその周囲の結合組織に低程度から中程度で結合する結合構造。

【請求項12】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が脾臓、腎臓、肝臓、肺、皮膚、膵臓、甲状腺、心筋、および/またはCNSを含む正常組織に、低程度および/または不均質に結合する、および/または結合しない結合構造。

【請求項13】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造がファージ選択により提供される結合構造。

【請求項14】 請求項13に記載の結合構造であって、前記ファージ選択

が、ファージ粒子上に提示されるインビボで免疫学的に予め選択されたレポーターの結合構造と、異なる表現型の組織ペアの使用によるファージ粒子のサブトラクション選択との組み合わせを含む結合構造。

【請求項15】 請求項1または2に記載の結合構造であって、前記配列がオナガザル (*Macaca fascicularis*) 起源である結合構造。

【請求項16】 請求項1または2に記載の結合構造であって、前記配列がヒト起源の対応する配列に対して、少なくとも78% (V1) および86% (Vh) のアミノ酸同一性を有する結合構造。

【請求項17】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造がヒトにおいて低免疫原性もしくは非免疫原性を有する結合構造。

【請求項18】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、ポリペプチドに対する遺伝子的な連結により、および/または有機もしくは非有機化学物質に対する化学的結合により、および/またはダイメリゼーション、オリゴメリゼーションもしくはマルチメリゼーションにより、誘導体化されている結合構造。

【請求項19】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、細胞毒性ポリペプチドまたは細胞毒性有機もしくは非有機化学分子に遺伝子的に連結した、または化学的に結合した結合構造。

【請求項20】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、生物学的活性分子 (*biologically active molecules*) と遺伝的に連結した、または化学的に結合した結合構造。

【請求項21】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、免疫活性化分子 (*immune activating molecules*) と遺伝的に連結した、または化学的に結合した結合構造。

【請求項22】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、そのアビディティー (*avidity*) および/またはアフィニティー (*affinity*) を増加または減少するために変更されている結合構造。

【請求項23】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、その生産高を増加するために変更されている結合構造。

【請求項24】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、その薬物動態特性に影響するために変更されている結合構造。

【請求項25】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造が、それに新規薬物動態特性を付与するために変更されている結合構造。

【請求項26】 請求項1または2に記載の結合構造であって、該結合構造は標識されており、その結合は特異的であると共に、非ラベル型の該結合構造により阻止可能で且つ他の結合構造により阻止不可能であり、また該結合構造は他の特異性を有する他の結合構造の結合を阻止しない結合構造。

【請求項27】 請求項6で定義した抗体をコードするDNA配列であって、該DNA配列が配列番号1に示す配列を含むDNA配列。

【請求項28】 請求項1～26の何れか1項で定義した結合構造を有効成分として含む薬学的組成物。

【請求項29】 ヒト悪性疾患のインビトロの組織病理学的な診断および予後予測の方法であって、サンプルが請求項1～26の何れか1項で定義された結合構造および指示薬と接触する方法。

【請求項30】 請求項29に記載の方法であって、前記サンプルが切断 (sectioning) 前に凍結および/またはホルマリン固定およびパラフィン包埋されている組織サンプルである方法。

【請求項31】 腫瘍タイピングを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項32】 腫瘍スクリーニングを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項33】 腫瘍の診断および予後予測を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項34】 前悪性状態 (pre-malignant conditions) のモニタリングを含む、請求項29に記載の方法。

【請求項35】 ヒト悪性疾患のインビトロ診断および予後予測のための方法であって、請求項1～26の何れか1項で定義した結合構造の体液中の濃度がアッセイされる方法。

【請求項36】 ヒト悪性疾患のインビボ診断および予後予測のための方法であって、ヒト被験者中の腫瘍沈着に対する結合構造 (請求項1～26の何れか

1項で定義された)の局在が決定される方法。

【請求項37】 請求項36に記載の方法であって、前記結合構造が前記決定の前に前記被験者に投与される方法。

【請求項38】 請求項37に記載の方法であって、前記結合構造が腫瘍沈着に蓄積する方法。

【請求項39】 定量的である、請求項36～38の何れか1項に記載の方法。

【請求項40】 ヒト悪性疾患の治療のための方法であって、請求項1～26の何れか1項で定義された結合構造がヒト被験者に投与される方法。

【請求項41】 請求項40に記載の方法であって、前記結合構造が分子と遺伝子的に連結されることにより変更されており、変更された薬物動態特性を有する複合分子を提供する方法。

【請求項42】 請求項40に記載の方法であって、前記結合構造が誘導体化により変更されている方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】

サブトラクション選択の原理を説明する図である。

広域反応性ファージ(黒)の特異的吸着、そしてポジティブ選択の間の洗浄による非提示および非特異的ファージ(白)の減少。そして腫瘍限定ファージ(チェック)が溶出される

【図2】

効率的なサブトラクション選択を示すグラフである。

子宮もしくは小腸(small bowel)組織切片上のネガティブ吸着に続くC o l o 2 0 5細胞上でのポジティブ選択(A)。子宮、小腸(small bowel)もしくは肺

の組織切片上での2回の反復吸着、そしてC o l o 2 0 5 腫瘍組織切片上でのポジティブ選択 (B)。

【図3】

サブトラクション選択したライブラリーからの組織特異的ファージの一群の後期濃縮を示すグラフである。

【図4】

ライブラリー選択した s c F v の免疫組織化学染色パターンを示す顕微鏡写真である。

K 3 0 2 s c F v および K 2 9 3 s c F v (D - F) で染色した結腸カルシノーマ (A)、結腸上皮 (B) およびパイエル板 (C) の染色像。K 3 2 0 s c F v および I I I D 9 s c F v (J、K) で染色した結腸カルシノーマ (G) および結腸上皮 (H) の染色像。K 2 9 4 s c F v (I) で染色した結腸上皮、および I I D 1 1 s c F v (L) で染色した結腸血管。

【図5】

1 0 0 n M での結腸癌 (A) および結腸 (B) に対する K 2 9 3 s c F v - S E A (D 2 2 7 A) の免疫組織化学的反応性、並びに結腸癌 (C) および結腸 (D) に対する C 2 1 5 F a b - S E A (D 2 2 7 A) の免疫組織化学的反応性を示す写真である。

(A) のバーは 1 0 0 μ m である。

【図6】

摘出した原発性ヒト結腸カルシノーマから新規に調製した結腸癌細胞のフローサイトメトリー分析を示す図である。

サイズ、顆粒性 (A , B) および上皮細胞のマーカーとしての E p - C A M 発現に対してゲートされた細胞は、5 μ g / m l K 2 9 3 s c F v - S E A (D 2 2 7 A) (グレーライン) で染色されるか、または一次抗体を有さない融合蛋白質ネガティブコントロール (黒ライン) によって染色された (C)。

【図7】

異なる腫瘍の K 2 9 3 F a b S E A / E 1 1 染色を示す顕微鏡写真である。

A . 腺構造中で悪性細胞 (矢印) およびムチン様物質 (m) の双方の強い染色

性を示す中程度に分化した結腸癌の染色。B．悪性細胞の強い先端部染色（矢印）を示す高度に分化した結腸癌の染色、一方、新生物性の小腺（neoplastic glands）（b）の基底部分是非反応性である。C．乳房（胸部）腫瘍（矢印）における悪性細胞の強程度染色。D．肺アデノカルシノーマ（矢印）における悪性細胞の強程度染色。Aでのバーは50 μmを示し、B - Dに対しても同様である。

【図8】

K293 Fab SEA / E11染色を示す写真である。

A．正常結腸のK293 Fab SEA / E11染色。上皮細胞の先端部染色（矢印）に注意。免疫反応は結腸の管腔（lumen）に面する上皮に認められたが、陰窩（c）では陰性である。B．正常乳房（胸部）のK293 Fab SEA / E11染色。低程度から中程度の染色性が腺上皮（g）、および周囲のストローマ部位（s）に認められた。C．汎上皮マーカーC215とSEAD（227A）（Fab C215 SEA - D227A）のFab SEA融合蛋白質で染色した正常乳房（胸部）。腺上皮細胞（g）の強いラベルに注意。ストローマ部位（s）では如何なる反応も認められない。D．腺上皮細胞（g）およびストローマ部位（s）において如何なる反応をも示さない正常乳房（胸部）のネガティブコントロール（一次抗体なし）。Aにおけるバーは50 μmを表す。Bにおけるバーは50 μmを表し、CおよびDに対しても同様である。

【図9A】

K293 Fab SEA / E11で染色した結腸癌（A）の準薄切片の顕微鏡写真である。

結腸癌切片において、腫瘍細胞の基底（矢印b）、先端（矢印a）および側面部分の各部位は陽性に染色された。バーは30 μmを表す。

【図9B】

K293 Fab SEA / E11で染色した正常結腸（B）の準薄切片の顕微鏡写真である。

正常結腸において、上皮細胞の先端表面（矢印）に陽性染色が認められる。図9Aにおけるバーは30 μmを表しており、本図においても同様である。

【図9C】

正常結腸上皮細胞の電子顕微鏡写真である。

電子顕微鏡法は正常結腸上皮細胞（C、矢印）の微小絨毛の表面に免疫反応が局在することを示す。

【図10】

結腸癌患者および健常者個体のプラズマ成分に対する抗体S E A融合蛋白質の複合体形成の分析結果を示すグラフである。

高分子量領域で溶出された放射活性のパーセンテージをプロットした。結腸癌患者のプラズマに対するC 2 4 2 F a b S E Aの高い結合に注意。

【図11】

K 2 9 3 結合アフィニティーカラムから溶出したフラクションの非還元S D S - P A G E分析（レーン1）を示す写真である。

Aとマークされたメジャーバンドがアミノ酸配列分析のために切り取られた。使用した分子量標準の位置が示される。

【図12】

K 2 9 3 アフィニティー精製で分離された35 - 45 k D a蛋白質バンド（Aとラベル）の3つのトリプシン消化ペプチド断片のN末端配列（配列番号3 - 5）を示す図である（図1を参照）。

【図14】

ヒト末梢血単核球細胞（P B M C）を供給されたS C I Dマウス中のL S - 1 7 4 T腫瘍細胞の成長におけるF a b S E A融合蛋白質の免疫療法効果を示すグラフである。

K 2 9 3 F a b S E A / E 1 1 の処理後の腫瘍重量（m g）の減少に注目。

【手続補正3】

【補正対象書類名】 図面

【補正対象項目名】 図12

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【図12】

配列番号3 GALQNIIPAS
配列番号4 VIISAPSADA
配列番号5 VPTANVSVVD

K293 アフィニティー精製で分離された 35-45 kDa 蛋白質バンド(Aとラベル)
の3つのトリプシン消化ペプチド断片のN末端配列(図11を参照)。

【手続補正4】

【補正対象書類名】 図面

【補正対象項目名】 図13

【補正方法】 削除

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 01/00395

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: A61K 39/395, C07K 16/30, G01N 33/574 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: A61K, C07K, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO INTERNAL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9850431 A2 (GENENTECH, INC.), 12 November 1998 (12.11.98) --	1,2,7-36, 45-48,54-85
X	Database Pir, accession no. S44105, 13 January 1995, Hawkins, R.E. et al: "Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma: rescue of variable region gene sequences from biopsy material for assembly as single chain fv "personal" vaccine"; & EMBL Data Library, March 1994 --	1,2,7-36, 45-48,54-85
X	Database Pir, accession no. A01971, 4 December 1986, Tonoike, H. et al: "Amino acid sequence of an amyloidogenic Bence Jones protein in myeloma-associated systemic amyloidosis"; & FEBS Lett. 185, 139-141, 1985 --	1,2,7-36, 45-48,54-85
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
6 July 2001	10-07-2001	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Carl-Olof Gustafsson/EÖ Telephone No. +46 8 782 25 00	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 01/00395

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database Geneseq, accession no. W24062, 17 March 1998, Genentech Inc.: "Human WSX receptor agonist antibody clone 4"; & WO,A1,59725425, 19970717; & WPI accession no. 1997-372864/34 --	1,2,7-36, 45-48,54-85
X	Database Geneseq, accession no. R49216, 31 August 1994, Cytel Corp.: "HLA-A11 HCV antigen peptide fragment 14-23"; & WO,A,9403205, 1994-02-17; & WPI accession no. 1994-065403/08 --	1,2,7-36, 45-48,54-85
X	Database Geneseq, accession no. Y43523, 26 January 2000, Hutchinson cancer res cent fred. et al: "Human CCCTC-binding factor (CTCF) protein"; & US,S,5972643, 1999-10-26; & WPI accession no. 1999-610244/52 --	1,2,7-36, 45-4854-85
X	Database Geneseq, accession no. Y43520, 26 January 2000, Hutchinson cancer res cent fred. et al: "Chicken CCCTC-binding factor (CTCF) protein"; & US,A,5972643; 1999-10-26; & WPI accession no. 1999-610244/52 --	1,2,7-36, 45-48,54-85
X	Database Geneseq, accession no. W74043, 4 May 1999, Cytogen Corp.: "Human D2H binding protein DCX26"; & WO,A2,9851325, 19981119; & WPI accession no. 1999-009568/01 --	1,2,7-36, 45-48,54-85
X	Database Geneseq, accession no. Y05274, 21 June 1999, Idec Pharm Corp.: "Antibody 24-31 humanised VH chain sequence"; & WO,A1,9912566, 1999-03-18; WPI accession no. 1999-229142/19 --	1,2,7-36, 45-4854-85

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 01/00395

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Cancer Research, Volume 47, 1987, Katsuo Tokunaga et al, "Enhanced Expression of a Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene in Human Lung Cancers", page 5616 - page 5619 --	28-36,46,62, 63
X	Dialog Information Services, File 155, MEDLINE, Dialog accession no. 06275160, Medline accession no. 89028276, Schek N et al: "Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human pancreatic adenocarcinoma"; & Cancer research (UNITED STATES) Nov 15 1988, 48 (22), p6354-9 --	28-36,46,62, 63
X	Dialog Information Services, File 155, MEDLINE, Dialog accession no. 07838915, Medline accession no. 93245181, Epner DE et al: "Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression with cell motility and metastatic potential of rat prostatic adenocarcinoma"; & Cancer research (UNITED STATES) May 1 1993, 53 (9) p1995-7 --	28-36,46,62, 63
X	Dialog Information Services, File 155, MEDLINE, Dialog accession no. 09030061, Medline accession no. 96230096, Gong Y et al: "Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28s- ribosomal RNA gene expression in human hepatocellular carcinoma (see comments); & Hepatology (UNITED STATES) Apr 1996, 23 (4) p734-7 --	28-36,46,62, 63
X	WO 9834110 A1 (PHARMACIA & UPJOHN AB), 6 August 1998 (06.08.98), see example 8 --	49-53
X	WO 9815833 A1 (UNIVERSITEIT UTRECHT), 16 April 1998 (16.04.98), see page 8, line 21 - page 11, example 2 --	49-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 01/00395

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9910485 A1 (SELECTIVE GENETICS, INC.), 4 March 1999 (04.03.99), see pages 10-12 --	49,51-53
P,X	WO 0052054 A2 (GENENTECH, INC.), 8 Sept 2000 (08.09.00), see example 1, page 37, "Discussion" --	49-53
A	WO 9702479 A2 (YALE UNIVERSITY), 23 January 1997 (23.01.97), see page 4, line 27 - page 5, pages 8-9 --	49-53
A	EP 0934953 A2 (BOEHRINGER MANNHEIM CORPORATION), 11 August 1999 (11.08.99) -- -----	49-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE01/00395**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **66-68**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see next sheet
2. Claims Nos.: **38-44, 46, 48, 54-69 and 78-85.**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see next sheet
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see next sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE01/00395

Box I.1

Claims 66-88 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy/ diagnostic methods practised on the human or animal body/Rule 39.1.(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds/compositions.

Box I.2

The wording "anti-idiotypic of target structure". "binding structure" and "substance which blocks" relate to general features of non-specified substances. Claims relying on such definitions cannot be adequately searched and are not supported by examples in the description for the whole of the claimed scope.

Box II

- Inventions 1-6: Binding and target structures corresponding to the six different CDRs. Claims 1-37, 48-51 and 57-80
- Invention 7: Anti-idiotypic of a target structures according to claims 38-41
- Invention 8: Substance blocking expression of target structures according to claims 42 and 43
- Invention 9: Substance blocking function of target structures according to claim 44
- Invention 10: Method for phage selection according to claims 49-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

28/05/01

International application No.

PCT/SE 01/00395

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO	9850431	A2	12/11/98	AU	7270998 A	27/11/98
				EP	0979281 A	16/02/00
WO	9834110	A1	06/08/98	AU	5887998 A	25/08/98
				EP	0975964 A	02/02/00
				SE	9700291 D	00/00/00
				ZA	9800795 A	05/08/98
WO	9815833	A1	16/04/98	AU	4474497 A	05/05/98
				EP	0934526 A	11/08/99
WO	9910485	A1	04/03/99	AU	9039898 A	16/03/99
				EP	1009819 A	21/06/00
				NO	20000992 A	27/03/00
WO	0052054	A2	08/09/00	AU	3389800 A	21/09/00
WO	9702479	A2	23/01/97	US	6140470 A	31/10/00
EP	0934953	A2	11/08/99	JP	11266884 A	05/10/99

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K	45/00	4 C 0 8 5
	45/00		47/48	4 C 0 8 6
	47/48		48/00	4 H 0 4 5
	48/00	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/00	C 0 7 K	14/82	
C 0 7 K	14/82		16/32	
	16/32	C 1 2 N	9/00	
C 1 2 N	9/00	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15		33/50	Z
	33/50		33/53	D
	33/53			M
			33/566	
	33/566	C 1 2 N	15/00	Z N A A
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			
(72)発明者	オールソン、レナルト・ジー スウェーデン国、エス - 226・55 ルンド、 ルーデボクスベージェン 898			
(72)発明者	トルドソン、エム・イエスパー スウェーデン国、エス - 224・74 ルンド、 イリオングレнден ケー120			

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA13 FB02
FB03
4B024 AA01 AA12 BA45 CA04 HA15
4B050 CC10 DD11 LL01 LL03
4C076 AA95 CC27 EE59
4C084 AA13 AA16 NA14 ZB262
4C085 AA03 AA15 BB01 EE01 EE05
EE06 FF24
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04
MA05 NA14 ZB26
4H045 AA11 AA30 CA41 DA76 DA86
EA28 EA31 EA51 HA06 HA07

专利名称(译)	具有结肠癌特异性的新型抗体		
公开(公告)号	JP2003523213A	公开(公告)日	2003-08-05
申请号	JP2001561350	申请日	2001-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	活跃生物技术股份公司		
申请(专利权)人(译)	活跃生物科技艾比		
[标]发明人	プロデイントーマスエヌ カールストレムピアジェイ ニルソンポーエイチケー オールソンレナルトジー トルドソンエムイエスパー		
发明人	プロデイン、トーマス・エヌ カールストレム、ピア・ジェイ ニルソン、ポー・エイチ・ケー オールソン、レナルト・ジー トルドソン、エム・イエスパー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K39/00 A61K39/385 A61K39/39 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/30 C07K16/32 C12N9/00 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/ /53 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A61K47/6863 A61K2039/505 A61P35/00 C07K16/30 C07K16/3046 C07K2317/21 C07K2317/55 C07K2317/622 C07K2319/00 G01N33/57419		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/00.H A61K39/385 A61K39/39 A61K39/395.T A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61P35/00 C07K14/82 C07K16/32 C12N9/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/ /AA12 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/HA15 4B050/CC10 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/EE59 4C084/AA13 4C084/AA16 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C085/ /AA03 4C085/AA15 4C085/BB01 4C085/EE01 4C085/EE05 4C085/EE06 4C085/FF24 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/ /AA11 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA31 4H045/EA51 4H045/HA06 4H045/HA07		
优先权	0000597 2000-02-24 SE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

与肿瘤细胞结合和/或在肿瘤细胞上结合的结合结构；在肿瘤细胞之上或之中呈现和/或表达的靶结构；识别并阻断靶结构的结合结构；与靶结构结合，或阻断靶标结构表达的物质；包含结合结构，靶标结构或物质作为活性成分的药物组合物；包含靶标结构作为活性成分的疫苗组合物；噬菌体选择方法；或以所述靶标结构为靶的疫苗组合物。描述了体外和体内诊断和预后的方法，以及治疗人恶性肿瘤的方法，包括使用上述本发明。

特異性 グループ:	R 5	R 6	R 7
K293	69	65	28
K302	31	31	71
K320	0	1.1	0
K294	0	1.1	1.7
IID9	0	0.6	0
IID11	0	0.6	0
結合体の総頻度:	10	65	89