

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-513171

(P2006-513171A)

(43) 公表日 平成18年4月20日(2006.4.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 B 0 6 4
<b>C 0 7 K 16/28 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/28	4 H 0 4 5
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-553854 (P2004-553854)	(71) 出願人	505184654 エイアンドジー ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 メリーランド州 210 45 コロンビア レッド ブランチ ロ ード 9130 スイート ユー/ヴィー
(86) (22) 出願日	平成15年11月18日 (2003.11.18)	(74) 代理人	100072051 弁理士 杉村 興作
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月19日 (2005.7.19)	(74) 代理人	100100125 弁理士 高見 和明
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/036792	(74) 代理人	100101096 弁理士 徳永 博
(87) 国際公開番号	W02004/045544	(74) 代理人	100086645 弁理士 岩佐 義幸
(87) 国際公開日	平成16年6月3日 (2004.6.3)		
(31) 優先権主張番号	60/427, 220		
(32) 優先日	平成14年11月19日 (2002.11.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オートクライン成長因子受容体抗体および方法

## (57) 【要約】

成長因子 ( P C D G F )、抗PCDGF受容体抗体、及びその断片、から誘導された P C 細胞の生物活性を阻害する抗腫瘍組成物及び方法、並びに、 P C D G F 受容体抗体を製造する方法。この方法は、当該細胞の表面とPCDGF受容体抗体との接触によって P C D G F 受容体を発現する腫瘍細胞の増殖を阻害することを含む。抗PCDGF受容体抗体は、細胞の表面へ結合し、その受容体への抗 P C D G F 受容体抗体結合を妨害することが可能である。また、提供されるものは、抗 P C D G F 受容体抗体及び細胞傷害性分子 (例えば、トキシン、オンコトキシン、マイトトキシン、イムノトキシン、及びアンチセンスオリゴヌクレオチド)を含む組成物である。本発明は、また、腫瘍形成組織標本又は生物液における P C D G F のレベルを測定することによって腫瘍形成傾向を診断する方法も提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

PCDGF受容体を発現する細胞の表面に結合し、そのPCDGF受容体に対するPCDGFの結合を妨害することが可能な抗体、または抗体断片を含む組成物。

**【請求項 2】**

抗PCDGF受容体抗体または抗体断片、および細胞傷害性分子を含む組成物であって、前記抗PCDGF受容体抗体または抗体断片は、前記細胞傷害性分子に付着している、または結合が可能であることを特徴とする組成物。

**【請求項 3】**

PCDGFの生物活性を抑制する方法であって、抗PCDGF受容体抗体または抗体断片を、PCDGF受容体を発現する細胞と接触させることを含み、それによって前記抗体または断片がPCDGFの生物活性を抑制することを特徴とする方法。 10

**【請求項 4】**

腫瘍細胞増殖を抑制する方法であって、腫瘍形成細胞を、抗PCDGF受容体抗体または抗体断片と接触させることを含み、それによって前記抗体または断片が腫瘍細胞増殖を抑制することを特徴とする方法。

**【請求項 5】**

PCDGF受容体を発現する腫瘍形成細胞の増殖を抑制する方法であって、前記腫瘍形成細胞に抗PCDGF受容体抗体または抗体断片を、前記腫瘍形成細胞の増殖を少なくとも約60%低下させるのに十分な量において接触させることを含む方法。 20

**【請求項 6】**

6G8 (ATCCアクセス番号PTA-5263) および5A8 (ATCCアクセス番号PTA-5594) から成るグループから選ばれるハイブリドーマ細胞系統によって生産される、モノクロナール抗PCDGF受容体抗体または抗体断片。

**【請求項 7】**

抗イディオタイプ抗体または抗体断片を製造する方法であって、6B3 (ATCCアクセス番号PTA-5262)、6B2 (ATCCアクセス番号PTA-5261)、6C12 (ATCCアクセス番号PTA-5597)、5B4 (ATCCアクセス番号PTA-5260)、5G6 (ATCCアクセス番号PTA-5595)、4D1 (ATCCアクセス番号PTA-5593)、3F8 (ATCCアクセス番号PTA-5591)、3F5 (ATCCアクセス番号PTA-5259)、3F4 (ATCCアクセス番号PTA-5590)、3G2 (ATCCアクセス番号PTA-5592)、および2A5 (ATCCアクセス番号PTA-5589) から成るグループから選ばれるハイブリドーマ細胞系統によって生産されるモノクロナール抗PCDGF抗体または抗体断片によって動物を免疫化すること、前記免疫化された動物から脾臓細胞を単離すること、前記脾臓細胞からハイブリドーマを生産すること、および、前記ハイブリドーマをスクリーニングし、PCDGF受容体を発現する細胞の表面に結合し、そのPCDGF受容体に対するPCDGFの結合を妨害することが可能な抗イディオタイプ抗体または抗体断片を特定することを含む方法。 30

**【請求項 8】**

抗イディオタイプ抗体または抗体断片を製造する方法であって、PCDGFによって動物を免疫化すること、前記免疫化された動物から脾臓細胞を単離すること、前記脾臓細胞からハイブリドーマを生産すること、および、前記ハイブリドーマをスクリーニングし、PCDGF受容体を発現する細胞の表面に結合することが可能な、抗イディオタイプ抗体または抗体断片を特定することを含む方法。 40

**【請求項 9】**

抗PCDGF受容体抗体または抗体断片を製造する方法であって、PCDGF受容体を過剰発現する細胞、またはPCDGF受容体を過剰発現する細胞から得られた細胞断片によって動物を免疫化すること、前記免疫化された動物から脾臓細胞を単離すること、前記脾臓細胞からハイブリドーマを生産すること、および、前記ハイブリドーマをスクリーニングし、PCDGF受容体を発現する細胞の表面に結合することが可能な、抗PCDGF受容体抗体または抗体断片を特定することを含む方法。

**【請求項 10】**

PCDGF受容体を有する腫瘍形成細胞、その細胞の表面およびPCDGF受容体に結合する抗体または抗体断片とを含む組成物。

【請求項 1 1】

腫瘍形成傾向を診断する方法であって、腫瘍形成組織標本または生物液におけるPCDGF受容体のレベルを測定すること、対応する正常または末梢組織におけるPCDGF受容体のレベルを測定すること、および、前記腫瘍形成組織標本または生物液におけるPCDGF受容体の測定レベルが、対応する正常または末梢組織におけるレベルと比較して、腫瘍形成傾向を示すに十分なほどの量よりも高いかどうかを判定することによって腫瘍形成傾向を診断することを含む方法。

10

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

本出願は、2002年11月19日出願仮出願番号60/427,220に対する優先権を主張する。なお、この出願全体を参照することにより本明細書に含まれる。

【0002】

PC細胞由来成長因子（"PCDGF"）は、正常細胞では極めて緊密にその発現が制御されるが、腫瘍形成細胞では過剰発現され、発現が制御されなくなる、88-kDaの糖タンパクオートクライン成長因子である。PCDGFの抑制は、腫瘍形成細胞の成長を抑制する。PCDGFは、68-kDaのタンパクコアと20-kDaの炭水化物成分から構成される。PCDGFは、二重システインに富むポリペプチドの新規のファミリーであり、元々、極めて腫瘍形成性の高い、マウス奇形腫細胞系統PCの培養液から単離されたものである。PCDGFは、肝臓、腎臓、乳房、骨、骨髄、睾丸、脳、卵巣、皮膚、および肺を含む、マウスおよびヒトの腫瘍において過剰に発現することが明らかにされている。

20

【0003】

アミノ酸およびcDNA配列研究から、PCDGFは、エピテリン/グラヌリンの前駆物質で、最初にラット腎臓またはヒト顆粒球抽出物から、6-kDaの、二重システインに富むポリペプチドとして精製された物質と同一であることが示された。グラヌリン/エピテリン前駆物質は以前は不活性と考えられていた。特許文献1を参照されたい。しかしながら、Serre ro等は、PCDGFは極めて活性の高い、各種腫瘍細胞タイプと関連する腫瘍形成タンパクであることを証明した。特許文献2を参照されたい。PCDGFの過剰発現の程度は、細胞の腫瘍形成傾向と正の相関を持つ。

30

【0004】

PCDGFは、線維芽細胞、PC細胞、および哺乳類上皮細胞を含む各種細胞系統の成長修飾因子である。極めて腫瘍形成傾向の高いPC細胞と、親の1246細胞のPCDGF発現を比較したところ、PCDGF発現は、非腫瘍形成細胞では極めて低く、腫瘍形成度の高い細胞では過剰に発現することが示された。同じ結果がヒト乳ガンでも観察された。すなわち、PCDGF発現は、非腫瘍形成の乳房上皮細胞では極めて低く、乳ガン細胞では増加していた。

【0005】

PCDGF拮抗剤（例えば、抗PCDGF抗体およびPCDGFアンチセンス核酸）は、PCDGFの活性および腫瘍形成細胞の成長を抑制または妨害する。非特許文献1および2を参照されたい。奇形腫由来細胞および乳ガン細胞のいずれにおいても、それらの細胞を抗PCDGF中和抗体で処置することによって、または、細胞をアンチセンスPCDGF cDNAでトランスフェクトすることによって、PCDGF活性は抑制された。奇形腫細胞または乳ガン細胞において細胞をPCDGF拮抗剤で処置すると、インビボにおいて細胞増殖と腫瘍形成は完全に抑制された。上記文献を参照されたい。

40

【0006】

抗体は、高い特異性をもって標的分子に結合することができる特殊なタンパクである。元々、動物免疫系の天然に生産されるタンパク産物として特定されたものであるが、抗体は、微生物およびその他の外来物質に結合して、それらの微生物や物質の体外への排除を

50

促進する、免疫系の主要支柱の一つである。抗体は、別に免疫グロブリン(Ig)とも呼ばれるが、一般に、2本の「軽」鎖と2本の「重」鎖から形成される。この鎖のカルボキシ末端は、抗体の定常またはFc領域を形成し、一方、アミノ末端は、可変、または抗原結合ドメインを形成する。抗体には少なくとも5種の異性形カテゴリーが存在する。すなわち、IgG、IgE、IgA、IgM、およびIgDである。各Ig異性形は、様々なエフェクター細胞と相互作用を持ち、様々な生物学的活性をもたらす。例えば、IgGは外来抗原をマークし、白血球(例えば、T細胞)による排除を促進する。一方、IgEは、マスト細胞の表面に局在するが、特定の抗原に対してアレルギー反応を引き起こす。

#### 【0007】

抗体を生成する動物モデルは、ある所望の抗原に向けた抗体を大量に生産するのに有用である。しかしながら、「外来の」抗体に対するヒトの免疫反応は、動物で開発された抗体の治療的有用性を限定する。「ヒト化」抗体は、動物抗体の相補性決定領域("CDR")を、ヒトCDRで置換したものであるが、これは、「外来の」抗体に対するヒトの免疫反応を大きく低下させる。例えば、特許文献3を参照されたい。

#### 【0008】

抗イディオタイプ抗体(「抗IdAb」)は、一般に、抗体の抗原結合部位と関連する特有の決定基を認識する。抗IdAbは、mAbの供給源として同一種および同一遺伝型(例えば、同系マウス)の動物を、それに対して抗IdAbが調製されるmAbによって免疫化することによって調製が可能である。この免疫化された動物は、免疫化抗体のイディオタイプ決定基に対して抗体(抗IdAb)を生産することによって、この決定基を認識し、それに反応する。この抗IdAbはまた、免疫原物質として使用されて、さらに別の動物に免疫反応を引き起こし、所謂抗抗IdAbを生産することも可能である。この抗抗IdAbは、抗IdAbを誘発した元のmAbとエピトープ的には同一である。従って、mAbのイディオタイプ決定基に向けられた抗体は、元のmAbに対して同一の特異性を持つ抗体を生産するのに使用することが可能である。

#### 【0009】

特許文献4は、哺乳類上皮細胞系統C57MG、1246とPC細胞系統、ミンク肺上皮細胞系統CC L64を含めた、いくつかの細胞系統の細胞表面にPCDGF受容体が存在することに言及している。この研究では、標識PCDGFをPCDGF受容体に結合させ、細胞表面のその受容体に結合したPCDGFの存在を検出することによってPCDGF受容体を検出した。必要なものは、PCDGF受容体抗体と、細胞表面に結合させて、PCDGF受容体の活性とPCDGFの腫瘍増進活性を妨害する方法である。

【特許文献1】米国特許第5,416,192号

【特許文献2】米国特許第6,309,826号

【特許文献3】英国出願GB2188538A

【特許文献4】米国特許第6,309,826号

【非特許文献1】Zhang, H., and G. Serrero, 1998, PNAS 95, no. 24:14202

【非特許文献2】Lu, R., and G. Serrero, 2000, PNAS 97 no. 8:3993

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明は、PCDGF受容体を発現する細胞の表面に結合し、PCDGFのPCDGF受容体への結合を妨害することが可能な抗腫瘍組成物を提供する。我々は、PCDGF受容体に結合し、PCDGFによって誘発される腫瘍細胞増殖を含むが、それに限定されない、PCDGFの生物学的活性を抑制する抗体を発見した。抗PCDGF受容体抗体および/または抗体断片は、動物を、抗PCDGF抗体で免疫化することによって製造することが可能である。得られた抗PCDGF受容体抗体または抗体断片は、インビボおよびインビトロにおいて腫瘍細胞の増殖を抑えるのに使用することが可能である。

#### 【0011】

一つの実施態様において、本発明は、PCDGF受容体を発現する細胞の表面に結合し、PCD

10

20

30

40

50

GFのPCDGF受容体への結合を妨害することが可能な抗体、または抗体断片を含む抗腫瘍組成物を提供する。本発明のもう一つの実施態様は、細胞傷害性分子に付着される抗PCDGF受容体抗体であって、その細胞傷害性分子を、PCDGF受容体を発現する細胞に輸送する抗体を含む組成物を提供する。この抗体-細胞傷害性分子組成物は、PCDGF受容体を発現する細胞を破壊するのに使用することが可能である。本発明のさらに別の実施態様では、腫瘍形成細胞を、抗PCDGF受容体抗体の有効量と接触させることによって腫瘍細胞増殖を抑制する方法を提供する。

#### 【0012】

本発明の、その他の実施態様および利点は、一部は下記の説明に記載されており、一部は説明から明らかとなり、あるいは、本発明を実施することによって学び取ることにも可能である。本発明の目的および利点は、特に付属の特許請求項に指摘される手段と組み合わせによって実現される。

10

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0013】

PCDGFは、極めて腫瘍形成傾向の高いオートクライン成長因子であり、広範な腫瘍の原因因子である。米国特許第6,309,826号に記載されるように - この特許の全体を引用することにより本明細書に含める - PCDGFの過剰発現は、細胞成長を制御不能とし、腫瘍形成を増大させる。PCDGFの過剰発現の程度は細胞の腫瘍形成傾向と直接相関する。PCDGFを過剰発現する細胞は無制御の細胞成長を維持するのに外来のシグナルを必要としない。細胞成長の調節欠如、例えば、インスリンおよび/またはエストロゲンに対する反応性の喪失は、悪性の増大および細胞成長の過度の調整不備を招く。従って、PCDGFの腫瘍形成活性を妨害する方法および組成物の開発は、ガンの治療にとって重大な関心事である。

20

#### 【0014】

PCDGF拮抗剤、例えば、抗PCDGF抗体は、PCDGFに直接結合することによって、また、PCDGFが細胞成長シグナルを標的細胞（例えば、乳ガン細胞）に伝達するのを阻止することによって、PCDGFの生物活性（例えば、腫瘍形成活性）を妨害する。抗PCDGF抗体は、PCDGFの活性部位（例えば、PCDGF受容体結合部位）に結合したり、PCDGFがその受容体に結合するのを阻止する。別に、抗PCDGF抗体は、PCDGFの、活性部位以外の部位に結合し、活性部位の立体配置を変え、そうすることによってPCDGFがその受容体に結合できないようにする。抗PCDGF抗体はPCDGF中和抗体を含む。「中和」抗体とは、PCDGFの細胞増殖を刺激する能力、生存率を増す能力、アポトーシスを阻止する能力、あるいは、動物およびヒトにおいて腫瘍成長を誘発する能力を含めた、PCDGFの正常な生物活性を抑制または阻止する能力を持つ。

30

#### 【0015】

我々は、PCDGFの生物活性を妨害するためのもう一つの有用な標的は、PCDGF受容体であることを見出した。「受容体」という用語は、一つのリガンドから別のリガンドへとシグナルを伝達することができるタンパクを指す。一般に、受容体は、細胞外、膜貫通、および細胞内の各ドメインを持つ膜貫通タンパクである。例えば、成長因子のようなリガンドは、その受容体の細胞外ドメインに結合することが可能で、それによって受容体は立体配置を変化させる。立体配置を変更された細胞内ドメインは、細胞内分子と結合することが可能となり、この分子はシグナルを、別の細胞位置にいる別の分子（例えば、核転写因子）に伝達する。受容体の生物活性を妨害することは、細胞外リガンドから細胞内リガンドへのシグナル連鎖を断つことである。別に、受容体を標的とする分子は、ある特定の受容体を発現する細胞を不活性化または破壊するように設計することが可能である（例えば、細胞傷害性分子を抗受容体抗体に連結させる）。

40

#### 【0016】

我々は最初に、米国特許第6,309,826号において、ミンク肺上皮細胞系統CCL64を用いてPCDGF受容体の存在を証明した。<sup>125</sup>I-PCDGFの結合に関するスカッチャード分析によって、2クラスの細胞表面受容体の存在が明らかにされた。すなわち、Kdが $4.3 \pm 1.5 \times 10^{-11}$  Mで560 ± 170部位 / 細胞の高親和クラス、および、Kdが $3.9 \pm 1.9 \times 10^{-9}$  Mで17,000 ± 5900部

50

位/細胞の低親和クラスである。架橋実験およびオートラジオグラフィ分析から、分子量190-195kDaを持つ一つの大きな架橋バンドの存在が明らかにされた。これは、大バンドにおいて未結合受容体の約110kDaの分子量に対応する。我々は、PCDGF受容体は、チロシンキナーゼファミリーの受容体であることを示した。PCDGFが細胞表面に結合すると、PCDGF受容体は、チロシン残基のリン酸化によって活性化され、IRS-1, SHC、およびGrb2を含めたいくつかのシグナル分子のリン酸化を招き、これがMAPキナーゼERK-2の活性化をもたらす。

#### 【0017】

本明細書で用いる抗体という用語は、ヒトおよび非ヒトポリクロナール抗体、ヒトおよび非ヒトモノクロナール抗体(mAb)、キメラ抗体、抗イディオタイプ抗体(抗IdAb)、中和抗体、非中和抗体、および、ヒト化抗体を含むが、ただしそれらに限定されない。ポリクロナール抗体は、抗原によって免疫化された動物の血清から、または、ニワトリ卵から得られるヘテロな抗体分子から成る集団である。モノクロナール抗体("mAb")は、特定の抗原に対する抗体から成る実質的に均一な集団である。mAbは、適切であればどのような方法で獲得されたものであってもよい。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDを含めた、どの免疫学的クラス、およびサブクラスのものであってもよい。PCDGF受容体に対するヒトおよび非ヒト抗体を生産するハイブリドーマは、インビトロで、またはインビボで培養してよい。大量のmAbの生産のためには、インビボが現在のところ好ましい生産法である。簡単に言うと、個別のハイブリドーマから得られた細胞を、早期に体性を整えさせたBalb/cマウスまたはヌードマウスの腹腔内に注入すると、所望のmAbを高濃度に含む腹水液を生産することが可能である。mAbは、このような腹水液から、または、培養上清から、従来技術で既知の様々なクロマトグラフィ方法を用いて精製することが可能である。

10

20

30

#### 【0018】

ヒトPCDGF受容体に対するヒトモノクロナール抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを免疫化することによって調製することが可能である。このトランスジェニック動物から得られたリンパ球によって生産されるハイブリドーマは、マウス免疫グロブリンではなく、ヒト免疫グロブリンを生産する。大抵のモノクロナール抗体は、げっ歯類および他の非ヒト供給源から得られるのであるから、その臨床効果は、ヒトに投与された場合のげっ歯類mAbの免疫原性、エフェクター召集機能の貧弱性、および、血清からの急速な排除によって比較的限定されたものとなる可能性がある。これらの問題を回避するために、げっ歯類抗体の抗原結合性を、ヒト化と呼ばれる過程を通じて、ヒト抗体に付与することが可能である。ヒト化抗体は、ヒト抗体の枠組みに移植した、親のげっ歯類mAbの少なくとも6個の相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列を含む。ヒト化抗体における非ヒト配列含有量を低レベル(約5%)とすることは、ヒトにおける免疫原性下げる点でも、血清半減期を延長する点でも効果的であることが判明している。モノクロナール抗体のヒト化のために行われる一価ファージディスプレイおよび組み合わせライブラリー戦略は従来技術で既知である。ヒト化抗体、および前述のようにしてトランスジェニック動物を通じて生成されるヒト抗体は、ガンを含めた病気の治療に利用される。

40

#### 【0019】

キメラ抗体は、異なる動物種由来の異なる部分を有する。例えば、キメラ抗体は、げっ歯類mAbの変領域、および、ヒト免疫グロブリンの定常領域を持つことがある。キメラ抗体と、その生産法も従来技術に熟練した当業者には既知である。

#### 【0020】

ハイブリドーマ上清を、従来技術でよく知られるドットプロットおよび標準的イムノアッセイ(ELISAまたはELISA)を含めたイムノアッセイから選ばれる任意の数のアッセイによって、PCDGF受容体に対して特異的な抗体の有無に関してスクリーニングしてもよい。一旦上清が興味のある抗体を含むことが特定されたならば、ウェスタンブロットによってさらにスクリーニングしてその抗体が結合する抗原のサイズを特定してもよい。従来技術に通常に熟達している当業者であれば、本明細書の教示を示されれば、面倒な実験をせずとも、

50

所望のポリクロナール抗体またはmAbを得るようにハイブリドーマを調製しスクリーニングすることが可能であろう。

#### 【0021】

本発明のある好ましい実施態様では、動物をPCDGFで免疫化し、その動物に抗ID PCDGF抗体を生産させ、この免疫化マウスの脾臓細胞を利用して抗PCDGF受容体抗体のスクリーニングを可能とするハイブリドーマ細胞系統を生産することによって、抗PCDGF受容体抗体を製造することが可能である。例えば、米国特許第5,144,010号参照。なお、本特許の全体を参照することにより本明細書に含める。例えば、抗PCDGF受容体抗体は、(a)動物(例えば、マウス、ウサギ)にPCDGFの有効量を注入し、免疫反応を惹起すること；(b)動物から周期的に血液サンプルを収集すること；(c)血液サンプルをスクリーニングして、動物が、PCDGFに向けた抗体、および/または、PCDGF受容体に対する抗体を製造しているかどうかを判定すること；(d)動物が抗PCDGF抗体を製造することを止め、抗PCDGF受容体抗体を連続製造するようになった後にハイブリドーマを製造すること(例えば、動物の脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合する)；(e)選択されたハイブリドーマ細胞系統によって生産される抗PCDGF受容体抗体を精製することによって製造することが可能である。

10

#### 【0022】

最初は、動物は、抗PCDGF抗体を生産することによって反応する。抗体価の高い抗PCDGF IgGの出現後約15から30日後に、動物は、抗PCDGF抗体に対する抗体を生産し、抗PCDGF抗体の生産を停止、または低下させる。例えば、動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ)に、約10から約100  $\mu$ gの精製PCDGF(例えば、組み換えPCDGF)を注入することが可能である。動物には、約30から60日の経過の際に約3から5回PCDGFを注入してもよい。抗Id PCDGFの抗体価は、血液サンプル(例えば、尾部出血)を、高レベルのPCDGF受容体を発現する細胞(例えば、C57MG、1246、PC細胞、CCL64)に対してスクリーニングすることによって監視することが可能である。高抗体価の抗PCDGF抗体が形成されて約15から30日後に、抗Id抗体が動物によって生産される。免疫化されたマウスの脾臓細胞を用いて、抗PCDGF受容体抗体を分泌するハイブリドーマを生産することが可能である。抗PCDGF受容体抗体は、プロテインAまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィーカラムによる精製を含むが、それらに限定されない、いくつかの十分に確立した方法によってハイブリドーマ細胞から精製することが可能である。

20

#### 【0023】

別に、抗PCDGF抗体を用いて、適当な動物にヒトおよび非ヒト抗IdAbを誘発することが可能である。動物を抗PCDGF抗体によって免疫化することが可能であり、そして動物は抗PCDGF抗体に対する抗体を生産することとなる。抗イディオタイプ抗PCDGF受容体抗体を製造するのに使用が可能な抗PCDGF抗体としては、6B3、6B2、6C12、5B4、5G6、4D1、3F8、3F5、3F4、3G2、および2A5が挙げられる。これらのPCDGF抗体を生産するハイブリドーマ細胞系統は、アメリカ標準培養株保存施設(ATCC)、10801 University Blvd., Manassas, VA, VA20110-2209に預託されており、下記の表示を持つ。すなわち、6B3ハイブリドーマ細胞系統(ATCCアクセス番号PTA-5262)、6B2ハイブリドーマ細胞系統(ATCCアクセス番号PTA-5261)、6C12ハイブリドーマ細胞系統(ATCCアクセス番号PTA-5597)、5B4ハイブリドーマ細胞系統(ATCCアクセス番号PTA-5260)、5G6ハイブリドーマ細胞系統(ATCCアクセス番号PTA-5595)、4D1ハイブリドーマ細胞系統(ATCCアクセス番号PTA-5593)、3F8ハイブリドーマ細胞系統(ATCCアクセス番号PTA-5591)、3F5ハイブリドーマ細胞系統(ATCCアクセス番号PTA-5259)、3F4ハイブリドーマ細胞(ATCCアクセス番号PTA-5590)、3G2ハイブリドーマ細胞(ATCCアクセス番号PTA-5592)、および、2A5ハイブリドーマ細胞系統(ATCCアクセス番号PTA-5589)である。上に参照したハイブリドーマ細胞系統はそれぞれ、その細胞系統をDMEMプラス10%FBSの中に、所望の量の抗PCDGF抗体が細胞培養液に分泌されるまで維持することによって、表示の抗PCDGF抗体を発現するように誘導することが可能である。抗PCDGF抗体は、プロテインAまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィーカラムによる精製のような十分に確立した方法によってハイブリドーマ細胞から精製することが可能である。この抗PCDGF抗体は、例えば、PCDGFの存在を検出する、腫瘍

30

40

50

形成性を診断する、および/または、米国特許第6,309,826号に記載されているように腫瘍細胞増殖を抑制するのに使用することが可能である。

【0024】

PCDGF受容体を過剰に発現する細胞はまた、動物において、ヒトおよび非ヒト抗PCDGF抗体を誘発するための抗原として使用することが可能である。動物を、PCDGF受容体を過剰発現する全体細胞（例えば、C57MG、1246、PC細胞、CCL64細胞）、または細胞分画（例えば、膜）で免疫化することが可能である。例えば、百万か千万個の細胞を適当な動物に注入してもよい。抗PCDGFの抗体価は、血液サンプル（例えば、尾部出血）を、高レベルのPCDGF受容体を発現する細胞（例えば、C57MG、1246、PC細胞、CCL64）に対してスクリーニングすることによって監視することが可能である。免疫化マウスの脾臓細胞を用いて、抗PCDGF受容体抗体を分泌するハイブリドーマを生産することが可能である。ハイブリドーマの培養上清を、酵素免疫測定法（ELISA）によってガン細胞に対してスクリーニングすることも可能である。抗PCDGF受容体抗体は、PCDGF受容体を過剰発現する細胞への表面結合を求めて精製PCDGFと競合する。選択された抗PCDGF受容体抗体は、プロテインAまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィーカラムによる精製を含むがそれらに限定されない、いくつかの十分に確立した方法によってハイブリドーマ細胞から精製することが可能である。

10

【0025】

抗体という用語はまた、無処置の分子と同様、抗原と結合が可能なその断片、例えば、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片も含むことが意図される。FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片は、無処置の元のFc断片を欠き、無処置の抗体よりも循環から速やかに排除され、組織結合の特異性は低い。このような断片は、通常、パパイン（Fab断片を生成）やペプシン（F(ab')<sub>2</sub>を生成）のような酵素によるタンパク分解切断によって生産される。

20

【0026】

本発明の一つの実施態様は、PCDGF受容体を発現する細胞表面に結合し、PCDGFのPCDGF受容体に対する結合を妨害することが可能な抗体、または抗体断片を含む、抗腫瘍組成物を提供する。この抗PCDGF受容体抗体は抗イディオタイプ抗体であってもよい。抗PCDGF受容体抗体6G8、4H1、2C1、5A8、2F8および2B12は、マウスをPCDGFによって免疫化することによって製造される抗イディオタイプ抗体の例である。これらの抗PCDGF受容体抗体を生産するハイブリドーマ細胞系統は、アメリカ標準培養株保存施設（ATCC）に預託されており、下記の表示を持つ、すなわち、6G8（ATCCアクセス番号PTA-5263）および5A8（ATCCアクセス番号PTA-5594）。上に参照したハイブリドーマ細胞系統は、その細胞系統を、DMEMプラス10%FBS中に、所望の量の抗PCDGF受容体抗体が細胞から細胞培養液中に分泌されるまで維持することによって誘導することが可能である。抗PCDGF受容体抗体は、プロテインAまたはプロテインGカラムによるアフィニティークロマトグラフィーのような - といって、それらに限定されないが - いくつかの十分に確立した方法によって細胞培養液から精製することが可能である。他の抗イディオタイプ抗体も前述のようにして調製することが可能である。

30

【0027】

本明細書で用いる場合、「結合」という用語は、一つの分子ともう一つの分子の間の、特異的または非特異的相互作用を指す。「結合」の例としては、抗体の抗原結合部位と、その抗原の抗原決定基の間の直接相互作用、または、分子同士の非特異的会合（例えば、局地的共存、静電的相互作用、および相相互作用）が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。

40

【0028】

「接触」という用語は、細胞の環境に抗PCDGF受容体抗体を供給し、そのために、その抗PCDGF受容体抗体が、その表面にPCDGF受容体を持つ細胞に対して結合可能となる、そのような供給を指す。例えば、抗PCDGF受容体抗体を直接腫瘍に注入し、そのために抗体が腫瘍の中に拡散する注入は、その抗PCDGF受容体抗体が細胞表面の受容体に結合したか否かに関わらず、細胞に抗PCDGF受容体抗体を「接触させた」と考えられる。

50

## 【0029】

抗PCDGF受容体抗体および組成物の投与

抗PCDGF受容体抗体は、インビトロ、インビボいずれでも細胞に供給することが可能である。インビトロ応用では、抗PCDGF受容体抗体は、通常、約0.01 ngから約500 μg/ml、好ましくは約10 ngから約100 μg/mlの範囲の濃度で細胞培養液に添加することが可能である。抗体は、単独で、または、同じ病気に向けられた他の治療薬と共に投与されてもよい。細胞は、抗PCDGF受容体抗体または抗体断片をコードするDNAまたはRNA、あるいは、そのようなDNAまたはRNA配列を含むベクターでトランスフェクトすることも可能である。トランスフェクト細胞は、任意の適当な技術を用いて（例えば、誘導性プロモーター、および多数プラスミドコピー）、抗PCDGF受容体抗体または抗体断片を製造するように誘導

10

## 【0030】

抗PCDGF受容体抗体組成物はまた、体外法を用いて細胞に投与することも可能である。腫瘍形成細胞または正常細胞を被験体（例えば、ヒト、イヌ、ウシ、ヤギ、マウス、ラット、ウサギ、ウマ、またはニワトリ）から取り出し、培養することが可能である。この細胞を、抗PCDGF受容体抗体をコードするDNAまたはRNAでトランスフェクトし、抗PCDGF受容体抗体を生産するように誘導する。次に、このトランスフェクト細胞を、PCDGF活性を抑制し、腫瘍細胞増殖を抑えるために、被験体に再導入することが可能である。

## 【0031】

インビボ応用では、抗PCDGF受容体抗体を、様々な投与ルートおよび剤形にて被験体に供給することが可能である。PCDGF発現増加に関連する疾病に罹患している被験体は、好ましくはヒトの被験者は、抗PCDGF受容体抗体または断片によって治療される。別に、被験者の細胞は、抗PCDGF受容体抗体をコードするポリヌクレオチド、またはその断片によってトランスフェクトされる。典型的治療スケジュールは、抗PCDGF受容体抗体の有効量を、1または数週、および、約1から6ヶ月の間を含む期間に渡って投与することを含む。本発明の抗体は、その意図した目的を実現するものであれば、どのような手段を用いて投与してもよい。例えば、投与は、皮下、静脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、および経口を含むがそれらに限定されない、各種ルートを通じて行われてよい。非経口投与は、ボーラス投与でも、あるいは、時間をかけた低速の輸液でもよい。非経口投与用製剤としては、無菌の水性、または非水性溶液、懸濁液、および乳剤が挙げられる。これらの製剤は、従来

技術で既知の補助剤または賦形剤を含んでもよい。錠剤やカプセルのような製薬組成物も、通例法に従って調製することが可能である。用量は、受容者（レシピエント）の年齢、性別、および体重、もしあれば同時治療の種類、投薬の頻度、および、所望の効果の性質に依存することが理解される。後述する効果的用量の範囲は、本発明を限定することを意図するものではなく、単に例示の用量範囲を表すものであるに過ぎない。しかしながら、もっとも好ましい用量は、理解されるように、個々の被験体に合わせて調節されるが、本明細書の教示を与えられれば、従来技術に通常に熟達している当業者であれば決定可能である。各治療に必要な合計用量は、複数用量として、または、単一用量として投与が可能である。抗体の有効用量は、通常、約0.01 ngから約500 μg/ml、好ましくは約10 ngから約100 μg/mlである。抗体は、単独で、または、同じ病気に向けられた他の治療薬と共に

20

30

40

## 【0032】

図1および2に示すように、抗PCDGF受容体抗体は、MCF-7乳ガン細胞の表面に結合する。免疫染色アッセイでは、6G8, 2F8, 5A8, 1E1, 2C1、および3B3と表示される抗PCDGF受容体抗体を、96ウェルプレートにおいてMCF-7細胞に加え、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）に連結された二次抗体とインキュベートした。結果は、抗PCDGF受容体抗体は、MCF-7細胞の表面に強力に結合することを示した（図1）。図2は、抗PCDGF受容体抗体がMCF-7細胞の細胞表面を染めるところを示す。

## 【0033】

図3に示すように、抗PCDGF受容体抗体6G8, 4H1, 2C1, 5A8, 2F8、および2B12は、ELISA

50

(酵素免疫測定法)において精製PCDGFに結合しない。一方、抗PCDGF抗体6B3はPCDGFに結合する。従って、抗PCDGF受容体抗体はPCDGFには結合しない。

#### 【0034】

PCDGF受容体抗体は、PCDGF誘発による生物機能を阻止する

一つの実施態様において、PCDGF受容体抗体は、PCDGF誘発性サイクリンD1発現を特異的に阻止する。図4に示すように、PCDGFとエストラジオールはいずれも、MCF-7細胞においてサイクリンD1発現を刺激する。抗PCDGF受容体抗体6G8は、PCDGF誘発性サイクリンD1発現を特異的に阻止するが、エストラジオール誘発性サイクリンD1発現は阻止しない。図4のレーン4と5を比較されたい。図5は、抗PCDGF受容体抗体5B4が、MCF-7細胞において、PCDGF誘発性サイクリンD1発現を特異的に阻止するところを示す。抗PCDGF受容体抗体はまた、MAPKのPCDGF誘発性リン酸化をも阻止する。図6に示すように、抗フォスフォp44/p42抗体によるウェスタンブロット分析により、PCDGFはMAPKのリン酸化を誘発する(レーン2)。抗PCDGF受容体抗体(例えば6G8)の添加は、MAPKのPCDGF誘発性リン酸化を阻止する(レーン4)。抗PCDGF抗体単独では、MAPKのリン酸化を誘発しない。

10

#### 【0035】

理論に拘束されることを望むものではないが、抗PCDGF受容体抗体はPCDGFには結合しないが(図1および2)、細胞表面に結合してPCDGF誘発性生物活性(例えば、サイクリンD1の誘発およびMAPKのリン酸化)を阻止するのであるから、我々は、この抗PCDGF受容体抗体は、PCDGF受容体に特異的に結合すると考える。

#### 【0036】

抗PCDGF受容体抗体は、腫瘍形成細胞には結合可能であるが、正常細胞には結合しない。図7に示すように、抗PCDGF受容体抗体は、10マイクログラム/mlの6G8抗PCDGF受容体抗体を用いた免疫染色プロトコールにおいて、乳ガン組織には強力に結合するが(パネルBおよびC)、正常組織には結合しない(パネルA)。従って、抗PCDGF受容体抗体は、組織サンプルまたは生検におけるPCDGF受容体のレベルを、正常組織におけるPCDGF受容体のレベルと比較することによって、腫瘍形成性を診断するのにも使用することができる。PCDGF受容体のレベルの上昇は、細胞が腫瘍形成傾向を持つことを示す。

20

#### 【0037】

本発明のある好ましい実施態様によれば、抗PCDGF受容体抗体は、腫瘍形成細胞の増殖を抑えるのに利用される。図8に示すように、抗PCDGF受容体抗体は、最大約60%までヒト乳ガン細胞の増殖を抑えることが判明した(6G8)。抗PCDGF受容体抗体は、本発明の別の実施態様に従って用いられ、細胞を、抗PCDGF受容体抗体の有効量と接触させることによって腫瘍形成細胞の増殖を抑えた。抗PCDGF受容体抗体の有効量は、通常、約0.01 ngから約500  $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは約10 ngから約100  $\mu\text{g/ml}$ の範囲である。「腫瘍形成細胞」は、血液、脳脊髄液、血清、血漿、尿、乳首吸引標本、肝臓、腎臓、乳房、骨、骨髄、睾丸、脳、卵巣、皮膚、前立腺、結腸/直腸、胃、子宮頸部、子宮内膜、膵臓、鼻咽頭、神経、および肺由来の細胞を含むが、ただしそれらに限定されない。

30

#### 【0038】

本発明の教示を特定の問題または環境に応用することは、本明細書に含まれる教示に照らせば、従来技術に通常に熟練した当業者の能力の範囲内にあることを理解すべきである。本発明は、下記の非限定的実施例によってさらに十分に例示される。

40

#### 【実施例1】

#### 【0039】

ヒト乳ガン細胞MCF-7細胞系統におけるPCDGF受容体抗体の細胞表面染色

$1 \times 10^5$ 個/ウェルのMCF-7細胞を96ウェルプレートに撒き、5%CO<sub>2</sub>中にて37℃で一晩インキュベートした。精製抗id-PCDGFmAb 6G8, 2F8, 1E1, 2C1、および3B2を、DMEM, 5%FBSにて50  $\mu\text{g/ml}$ に希釈した。200  $\mu\text{l}$ /ウェルの各モノクローナル抗体(mAb)を、二重ウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。次に、細胞をPBSにて3回洗浄し、1:2000希釈率の、西洋ワサビペルオキシダーゼ("HRP")に接合したヤギ抗マウスIgGまたはIgM(6G8に対してのみ)とインキュベートした。さらにPBSによる3回の洗浄後、TMBマイクロ

50

ウェル成分ペルオキシダーゼ基質を各ウェルに加えた。プレートは、620ナノメートルの波長に設定されたプレートリーダーにて読み取った。抗PCDGF受容体抗体はMCF-7細胞表面を染めた(図1)。

【0040】

抗PCDGF受容体抗体によるMCF-7細胞の免疫染色

固定MCF-7細胞を3%BSA/PBSにてブロックし、10  $\mu$ g/mlの抗PCDGF受容体抗体6G8と、3%BSA/PBS中で25  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。3回の洗浄後、細胞を、HRP接合ヤギ抗マウスIgMと25  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。さらに1回の洗浄後、細胞をHRP基質とインキュベートした。MCF-7細胞は6G8によって特異的に染められた(図2)。

【0041】

PCDGF受容体抗体は、乳ガン細胞は染めるが、正常組織は染めない

正常乳房の組織切片(左下パネル)と乳ガンの組織切片(右上と右下パネル)を、前述の免疫組織化学的技術を用いて、10  $\mu$ g/mlの6G8 mAbによって染色した。ヒトの正常乳房組織では目立った染色は観察されなかった。一方、抗PCDGF受容体抗体6G8は、図7に示すように、ガン組織を特異的に染色した。

【実施例2】

【0042】

PCDGFに結合しないPCDGF受容体抗体

精製PCDGFタンパクをPBSで希釈し、100 ng/ウェルおよび50 ng/ウェルの濃度で96ウェルELISAプレートにコートした。この処置されたプレートを4  $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。PBSで3回洗浄した後、プレートを、室温で1時間5%脂肪無添加ミルクPBSでブロックした。PCDGF受容体mAbの2  $\mu$ g/ml精製、または1:10希釈のBioRx液を各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。このプレートをPBSで3回洗浄し、さらに1時間、HRP接合ヤギ抗マウスIgG二次抗体とインキュベートした。PBSによるさらに3回の洗浄後、TMBマイクロウェル1成分ペルオキシダーゼ基質を各ウェルに加えた。プレートは、620ナノメートルの波長に設定されたプレートリーダーにて読み取った。図3に示すように、抗PCDGF受容体抗体はPCDGFには結合しなかった。

【実施例3】

【0043】

PCDGF受容体抗体6G8は、ヒト乳ガンMCF-7細胞においてPCDGF誘発性サイクリンD1発現を抑制する

DME/F12培養液プラス5%FBSにおいて、 $2 \times 10^5$ 個/mlのMCF-7細胞を6ウェルプレートに撒き一晩インキュベートした。この細胞培養液を、5%木炭除去処理FBSを添加したフェノールレッド無添加DMEM/F12によって置換し、1  $\mu$ Mタモキシフェンで48時間処理することにより同期化した。次に、この細胞培養液を、血清無添加、フェノールレッド無添加のDME/F12によって置換し、 $10^{-9}$ Mエストラジオール(E2)、200 ng/ml PCDGF、または6G8 (50  $\mu$ g/ml)単独、またはE2またはPCDGFにて5時間処理した。処理後、細胞を、RIPAバッファープラスプロテアーゼ阻害剤によって溶解した。60  $\mu$ gの全体細胞溶解物を10%SDS-PAGEゲルで展開し、タンパクをニトロセルロース膜に電気転送した。サイクリンD1発現のプロット検出を、抗サイクリンD1/2クローン5D4モノクローナル抗体を用いて実行した(図4)。図4に示されるように、PCDGFまたはE2はMCF-7細胞においてサイクリンD1発現を誘発した。抗PCDGF受容体抗体単独では、サイクリンD1発現に対して目立った作用をもたらさない。しかしながら、6G8の添加は、E2またはPCDGFいずれによって誘発されるサイクリンD1発現も抑制する。

【実施例4】

【0044】

抗PCDGF Mab 5B4の、サイクリンD1発現に及ぼす作用

DME/F12培養液プラス5%FBSにおいて、 $2 \times 10^5$ 個/mlのMCF-7細胞を6ウェルプレートに撒き一晩インキュベートした。この細胞培養液を、5%木炭除去処理FBSを添加したフェノールレッド無添加DMEM/F12によって置換し、1  $\mu$ Mタモキシフェンで48時間処理することに

10

20

30

40

50

より同期化した。次に、この細胞培養液を、血清無添加、フェノールレッド無添加のDME/F12によって置換し、200 ng/ml PCDGF、または5B4 (100 μg/ml)および5B4とPCDGFにて5時間処理した。処理後、細胞を、RIPAバッファープラスプロテアーゼ阻害剤によって溶解した。60 μgの全体細胞溶解物を10%SDS-PAGEゲルで展開し、タンパクをニトロセルロース膜に電気転送した。サイクリンD1発現のウェスタンブロット検出は、抗サイクリンD1/2クローン5D4モノクローナル抗体を用いて実行した。抗PCDGF抗体は、PCDGF誘発性サイクリンD1発現を阻止する(図5)。

【実施例5】

【0045】

PCDGF受容体抗体6G8の、MAPKのリン酸化に及ぼす作用

10

DME/F12培養液プラス5%FBSにおいて、 $2 \times 10^5$ 個/mlのMCF-7細胞を6ウェルプレートに撒き一晩インキュベートした。この細胞培養液を、5%木炭除去処理FBSを添加したフェノールレッド無添加DMEM/F12によって置換し、1日培養した。次に、この細胞培養液を、血清無添加、フェノールレッド無添加の培養液によって置換しさらに1日培養した。PCDGF(200 ng/ml)、6G8(50 μg/ml)、または6G8付きPCDGFによって10分処理後、細胞を、RIPAバッファープラスプロテアーゼ阻害剤によって溶解した。60 μgの全体細胞溶解物を10%SDS-PAGEゲルで展開し、タンパクをニトロセルロース膜に電気転送した。フォスフォ-MAPK発現のウェスタンブロット検出は、抗フォスフォ-p44/42MAPK(Thr202/Thr204)E10モノクローナル抗体を用いて実行した(図6)。コントロールレーンでは、フォスフォリル化MAPKは検出されなかった。PCDGFは、細胞における最重要シグナルタンパクであるMAPKのリン酸化を刺激した。6G8抗体単独は作用を及ぼさなかった。しかしながら、6G8の添加は、PCDGF誘発によるMAPKのリン酸化を阻止した。

20

【実施例6】

【0046】

PCDGF受容体抗体の、ヒト乳ガン細胞の増殖に及ぼす作用

DME/F12培養液プラス5%FBSにおいて、MCF-7細胞を $10^5$ 個/ウェルで24ウェルプレートに撒いた。2日後、この培養液を、5%木炭除去処理FBSを添加したフェノールレッド無添加DMEM/F12によって置換した。さらに24時間のインキュベーション後、この培養液を、血清無添加、フェノールレッド無添加のDME/F12培養液によって置換した。200 ng/mlのPCDGF、または50 μg/mlの6G8、4H11、または50 μg/mlの非免疫IgGを、3重にウェルに加えた。24時間後、 $^3\text{H}$ チミジンを加え、5時間の標識処理後、細胞を溶解し、放射活性を、液体シンチレーションカウンターにてカウントした。図8に示すように、抗PCDGF受容体抗体は、MCF-7細胞の増殖を有意に減少させた。

30

【実施例7】

【0047】

PCDGFおよびPCDGF抗体の癌細胞への結合

PCDGFまたはPCDGF受容体抗体のいずれかに結合する細胞のパーセンテージを定量するために、各種腫瘍細胞系統をテストした。細胞は、2 mM EDTAと0.5%ウシ血清アルブミンを含むPBSに懸濁し、精製PCDGF、またはPCDGF受容体抗体6G8のいずれかと、室温で1時間インキュベートした。精製PCDGFはビオチンで標識した。PCDGF受容体抗体6G8はビオチンで標識した。下の表1に示すように、PCDGF受容体抗体6G8は、MCF-7(乳ガン)、04EM(乳ガン)、HL60(ヒト急性前骨髄球白血病)、ARP-1(ヒト多発性骨髄腫)、およびRPMI9226(ヒト多発性骨髄腫)を含む各種細胞系統において、高いパーセンテージの細胞に顕著に結合することが可能であった。この結果は、これらの細胞表面におけるPCDGF受容体の存在を示す。さらに、ビオチニル化6G8に結合した同じ細胞が、ビオチニル化PCDGFに結合することが可能であった。

40

【0048】

【表 1】

細胞タイプ	全細胞の PCDGF 結合%	全細胞の 6G8 結合%
MCF-7	3-5%	20-25%
O4EM	50-60%	80-90%
HL-60	40-50%	70-80%
A431	1-2	3-5
ARP-1	3-8%	15%
RPMI8226	2-4	10-15
U937	0	0
Jurkat	0	0

10

## 【0049】

GP88受容体抗体6G8による細胞表面結合を下記のように実行した。腫瘍細胞を、2 mM EDTA-0.5%BSA-PBS (バッファー1) に、 $5 \times 10^6$  個 / 500  $\mu$ l の濃度 (少なくとも200  $\mu$ l バッファー1において $2 \times 10^6$  個の細胞) で懸濁させた。6G8。バッファー1に溶解した5-40  $\mu$ g/ml のビオチニル化6G8抗体を、この細胞懸濁液に加え、室温で1時間インキュベートした。細胞をバッファーで2度洗浄した。ストレプトアビジン-HRPを、バッファー1に対し1:5000の希釈率で加え、1時間インキュベートした。細胞を1から3回バッファー1で洗浄し、基質 (DMPDA+4-CN) を加えた ( $5 \times 10^6$  個 / 500  $\mu$ l)。基質中の細胞を室温で1時間インキュベートし、バッファー1で1回洗浄した。この細胞懸濁液をスライドに滴下し、光学顕微鏡にて検査し、6G8抗体に結合する細胞のパーセンテージを求めた。

20

## 【0050】

PCDGFとの細胞表面結合は下記のように実行した。腫瘍細胞を、PBS 0.5%BSA (バッファー2) に、 $5 \times 10^6$  個 / 500  $\mu$ l の濃度で懸濁させた。ビオチニル化PCDGF (2  $\mu$ g /  $1 \times 10^7$  個/ml のバッファー2) を加え、得られた混合液を室温で1時間インキュベートした。細胞をバッファー2で2度洗浄し、その後ストレプトアビジンを、バッファー2に対し1:5000で希釈で加え ( $5 \times 10^6$  個 / 500  $\mu$ l)、室温で30分インキュベートした。新鮮な基質 (DMPDA+4-CN) を調製した。細胞を2回バッファー2で洗浄し、基質に加えた ( $5 \times 10^6$  個 / 500  $\mu$ l)。細胞を、基質と室温で15分インキュベートした。細胞を1回バッファー2で洗浄し、バッファー2に再懸濁した。得られた細胞懸濁液をスライドに滴下し、光学顕微鏡にて検査し、PCDGFに結合する細胞のパーセンテージを求めた。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0051】

【図1】図1は、抗PCDGF受容体抗体が、ヒト乳ガン細胞MCF-7の表面に結合するところを示す。抗体6G8、IgM抗体は、細胞表面に対するもっとも強力な結合を示した (レーン1および2)。

【図2】図2は、抗PCDGF受容体抗体6G8によって免疫染色されたMCF-7細胞を示す。

【図3】図3は、ELISAアッセイにおいて、PCDGF受容体抗体6G8、4H11、および5A8が、PCDGFタンパクと反応しないことを示す (レーン2、3、および6)。

【図4】図4は、抗PCDGF受容体抗体が、PCDGF誘発性サイクリンD1発現を阻止することを示す。

40

【図5】図5は、抗PCDGF受容体抗体が、PCDGF誘発性サイクリンD1発現を阻止することを示す。

【図6】図6は、抗PCDGF受容体抗体がPCDGF誘発性のMAPKのリン酸化を阻止することを示す。

【図7】図7は、抗PCDGF受容体抗体6G8による、乳ガンおよび正常乳房組織の免疫染色を示す。抗PCDGF受容体抗体は6G8は、乳ガン組織を強力に染色するが、正常組織を顕著には染色しない。

【図8】図8は、MCF-7細胞の増殖に対する抗PCDGF受容体抗体の抑制作用を示す。抗PCDGF受容体抗体6G8と4H11は、MCF-7細胞増殖を最大約60% (カラム2と3) 抑制した。

【 図 1 】

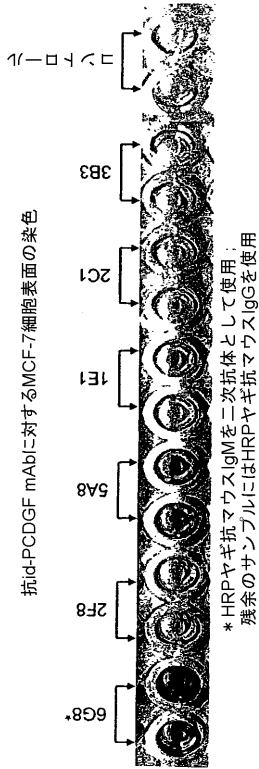


FIG.1

【 図 2 】

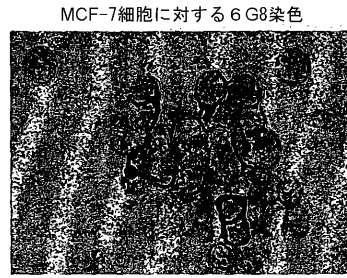


FIG.2

【 図 3 】

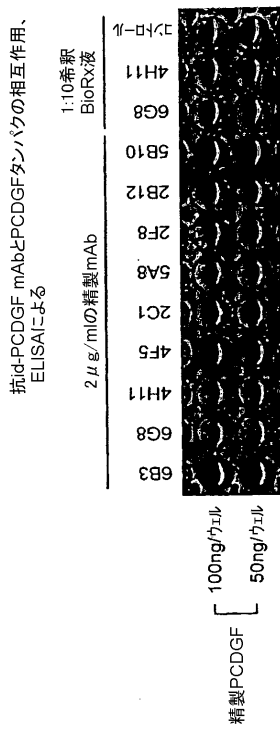


FIG.3

【 図 4 】

抗id-PCDGF抗体6G8は、  
ヒト乳ガン細胞MCF-7において  
PCDGF誘発サイクリンD1発現を抑制する。

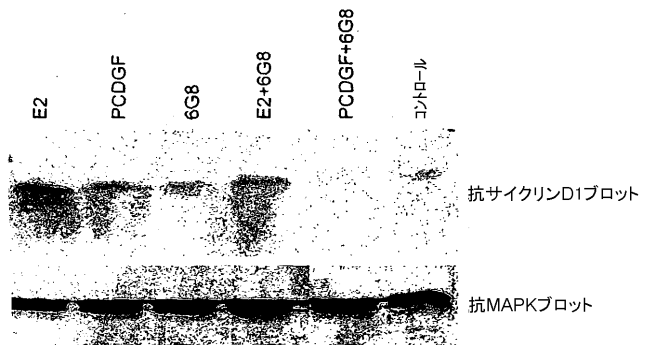


FIG.4

【 図 5 】

抗PCDGF mAbのサイクリンD1の発現に及ぼす作用

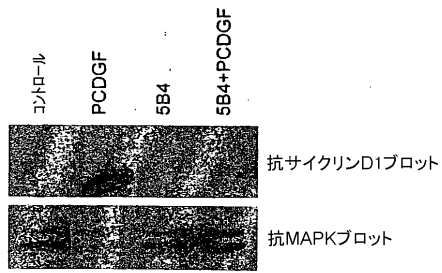


FIG.5

【 図 6 】

抗-id-PCDGF mAb 6G8のフォスフォMAPKの発現に及ぼす作用

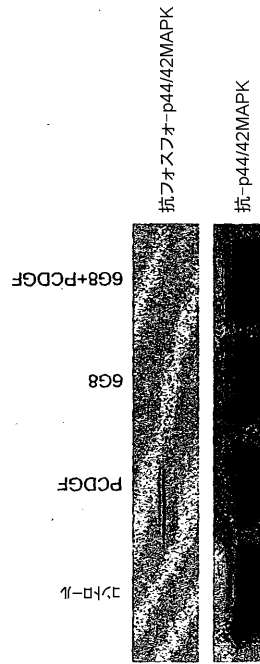
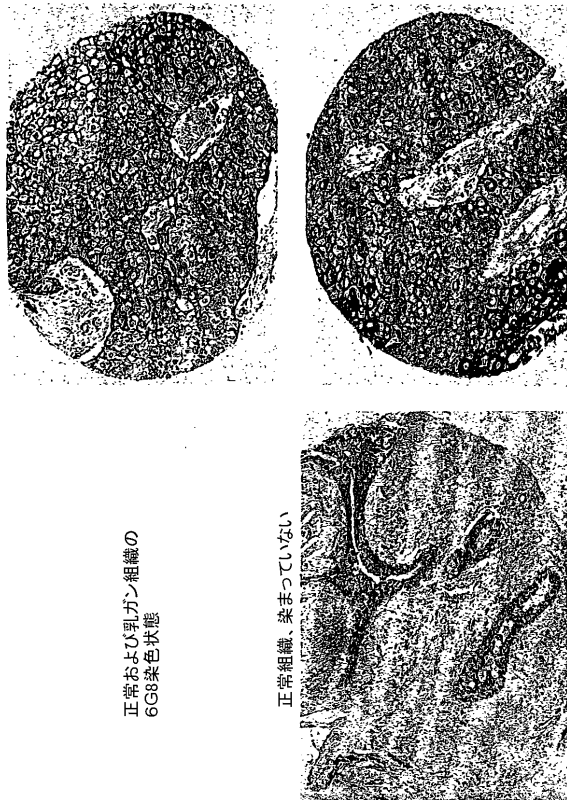


FIG.6

【 図 7 】



【 図 8 】

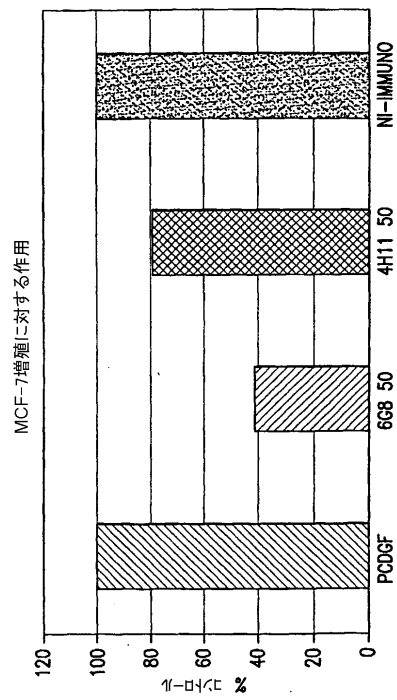


FIG.8

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/36792
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : C12N 15/00; A61K 39/395; C07K 16/00; G01N 33/53 US CL : 530/387.1, 387.2, 387.3, 388.85, 389.1, 391.3; 424/130.1133.1, 156.1; 435/69.1, 7 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/387.1, 387.2, 387.3, 388.85, 389.1, 391.3; 424/130.1133.1, 156.1; 435/69.1, 7		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 98/52607 A1 (SERRERO, G.) 26 November 1998 (26.11.1998), see entire document, especially page 8, 9, 10, 11, 56.	1-9, 11-12, 15-21, 23, 25-26, 28, 31, 33-39, 41-47 ----- 13, 32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		"J" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date		"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
"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)		"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"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 10 August 2004 (10.08.2004)	Date of mailing of the international search report 19 AUG 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Larry R. Helms Telephone No. 571-272-1600	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/56792

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

CAPLUS, MEDLINE, WEST, BIOSIS

Search terms: FCDGF, GP88, antibody, anti-idiotypic, FCDGF receptor, inventor name

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)  
**C 1 2 N 15/02 (2006.01)** G 0 1 N 33/53 N  
 C 1 2 N 15/00 C

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100107227  
 弁理士 藤谷 史朗

(74) 代理人 100114292  
 弁理士 来間 清志

(74) 代理人 100119530  
 弁理士 富田 和幸

(72) 発明者 スン リー  
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 0 4 5 コロンビア レッド ブランチ ロード 9 1 3  
 0 スイート ユーノヴィー エイアンドジー ファーマスーティカルズ インコーポレイテッド  
 内

(72) 発明者 ジネット セルレロ  
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 0 4 2 エリコット シティ サヴォイ コート 1 0 2  
 0 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA44 GA03 GA18 HA01 HA15  
 4B064 AG27 CA20 CC24 CE12 DA05 DA14  
 4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 DD88 EE01  
 4H045 AA11 CA40 DA76 EA28 EA51 FA72 GA26

专利名称(译)	Autocrine生长因子受体抗体和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006513171A</a>	公开(公告)日	2006-04-20
申请号	JP2004553854	申请日	2003-11-18
[标]申请(专利权)人(译)	A & G制药公司		
申请(专利权)人(译)	Eiandoji制药公司		
[标]发明人	スンリー ジネットセルレロ		
发明人	スンリー ジネットセルレロ		
IPC分类号	A61K39/395 A61P35/00 C07K16/28 C12P21/08 G01N33/53 C12N15/02 A61K38/00 C07K14/475 C07K16/22 C12N15/00 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61P35/00 C07K14/475 C07K16/22 C07K16/2863 C07K2317/73 C07K2317/76 C12N2799/026 G01N33/57484 G01N33/6872		
FI分类号	A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 C07K16/28 C12P21/08 G01N33/53.N C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/GA03 4B024/GA18 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA05 4B064/DA14 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	高见和明 徳永博 藤四郎 克利马清		
优先权	60/427220 2002-11-19 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

生长因子 (PCDGF), 抗PCDGF受体抗体, 和抗肿瘤组合物和用于抑制从或其片段诱导细胞PC的生物活性的方法, 以及制造该PCDGF受体抗体的方法。该方法包括通过使细胞表面与PCDGF受体抗体接触来抑制表达PCDGF受体的肿瘤细胞的增殖。抗PCDGF受体抗体可以结合细胞表面并干扰抗PCDGF受体抗体与其受体的结合。还提供了包含抗PCDGF受体抗体和细胞毒性分子(例如, 毒素, 毒素, 线粒体毒素, 免疫毒素和反义寡核苷酸)的组合物。本发明还提供了通过测量致瘤组织样本或生物流体中PCDGF水平来诊断致瘤倾向的方法。

(P2006-1)  
(43) 公表日 平成18年4月20日 (20)

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参)
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395	D 4B024
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61K 39/395	N 4B064
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	A61P 35/00	4C085
<b>C12P 21/08 (2006.01)</b>	C07K 16/28	4H045
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	C12P 21/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) 最終		
(21) 出願番号	特願2004-553854 (P2004-553854)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成15年11月18日 (2003.11.18)	エイアンドジー ファーマスーティ
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月19日 (2005.7.19)	インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/036792	アメリカ合衆国 メリーランド州
(87) 国際公開番号	W02004/045544	45 コロンビア レッド ブラン
(87) 国際公開日	平成18年6月3日 (2004.6.3)	ード 9130 스위트 ユーノ
(31) 優先権主張番号	60/427, 220	(74) 代理人
(32) 優先日	平成14年11月18日 (2002.11.18)	100072051
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 杉村 興作
		(74) 代理人
		100100125
		弁理士 高見 和明
		(74) 代理人
		100101096
		弁理士 徳永 博
		(74) 代理人
		100086645
		弁理士 岩佐 義幸