

(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 - 513024

(P2003 - 513024A)

(43)公表日 平成15年4月8日(2003.4.8)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード ( 参考 )
C 0 7 K 16/30	ZNA	C 0 7 K 16/30	ZNA 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/395	E 4 C 0 8 4
39/395			T 4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
		35/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 82数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 533851(P2001 - 533851)

(86) (22)出願日 平成12年10月26日(2000.10.26)

(85)翻訳文提出日 平成14年4月30日(2002.4.30)

(86)国際出願番号 PCT/SE00/02082

(87)国際公開番号 W001/030854

(87)国際公開日 平成13年5月3日(2001.5.3)

(31)優先権主張番号 9903895 - 2

(32)優先日 平成11年10月28日(1999.10.28)

(33)優先権主張国 スウェーデン(SE)

(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

(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  
ンデングスガタン 10

(72)発明者 カールストレーム、ピア・ジェイ  
スウェーデン国、エス - 227・36 ルンド、  
フィエリエベーゲン 10エー

(72)発明者 オールソン、レナート・ジー  
スウェーデン国、エス - 226・55 ルンド、  
ルーデボクスベーゲン 898

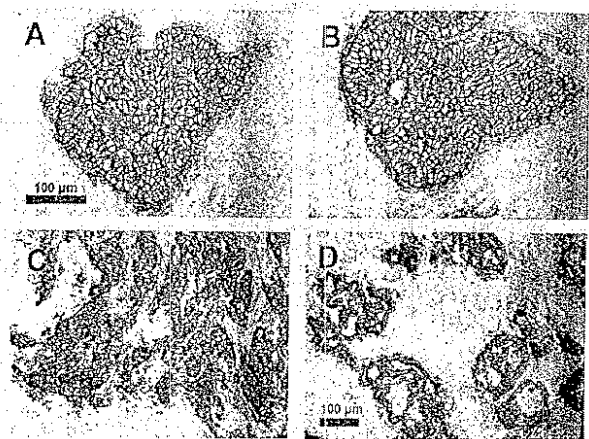
(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 ( 外 3 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規化合物

(57)【要約】

標的構造に対する結合構造を有する抗体、またはその誘導体、またはその断片が記載される。前記抗体は、ヒト胃腸上皮性腫瘍細胞の中および該細胞の表面、並びに正常ヒト胃腸上皮細胞のサブポピュレーションの中に提示される。前記結合構造は、配列番号2に示されたアミノ酸配列のアミノ酸番号23 - 33 ( C D R 1 )、49 - 55 ( C D R 2 )、88 - 98 ( C D R 3 )を必須要素として含む軽鎖の相補性決定領域 ( C D R )、および配列番号2に示されたアミノ酸配列のアミノ酸番号158 - 162 ( C D R 1 )、177 - 193 ( C D R 2 )、226 - 238 ( C D R 3 )を必須要素として含む重鎖の C D R 配列、或いは類似のユニークな結合特性を有する結合構造を具備する。ヒト悪性疾患に関連した方法とともに、腫瘍細胞の中または該細胞の表面に提示される標的構造、ワクチン組成物、薬学的組成物もまた記載される。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 ヒト胃腸管上皮腫瘍細胞の中および該細胞の表面、並びに正常なヒト胃腸管上皮細胞のサブポピュレーションの中に提示される標的構造に対する結合構造、または類似のユニークな結合特性を有する他の結合構造を有する抗体、またはその誘導体もしくは断片であって、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23-33(CDR1)、49-55(CDR2)、88-98(CDR3)を必須要素として含む軽鎖の相補性決定領域(CDR)、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158-162(CDR1)、177-193(CDR2)、226-238(CDR3)を必須要素として含む重鎖のCDR配列を含む抗体、またはその誘導体もしくは断片。

【請求項2】 ファージ選択される、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】 前記配列が *Macaca fascicularis* に由来する、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】 ヒトに由来する、請求項1に記載の抗体の誘導体。

【請求項5】 前記配列がヒト由来の相当する配列に対して少なくとも84%の同一性を有する、請求項1に記載の抗体。

【請求項6】 ヒトにおいて低免疫原性または非免疫原性を有する、請求項1に記載の抗体。

【請求項7】 他のポリペプチドに対する遺伝的な連結により、および/または、有機または非有機の化学分子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若しくはマルチメリゼーションにより誘導された、請求項1に記載の抗体。

【請求項8】 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の化学分子に対して、遺伝的に連結されまたは化学的に結合された請求項1に記載の抗体。

【請求項9】 生物学的に活性な分子に対して遺伝的に連結された、或いは、化学的に結合された、請求項1に記載の抗体。

【請求項10】 免疫活性分子に対して遺伝的に連結され、または化学的に

結合された、請求項1に記載の抗体。

【請求項11】 請求項1に記載の抗体であって、そのアビディティーおよび/またはアフィニティーを増加または減少するために変更されている抗体。

【請求項12】 請求項1に記載の抗体であって、その産生量を増加するために変更されている抗体。

【請求項13】 請求項1に記載の抗体であって、その薬物動態学的な特性に影響を及ぼすために変更されている抗体。

【請求項14】 請求項1に記載の抗体であって、これに新規の薬物動態学的な特性を付与するために変更されている抗体。

【請求項15】 請求項1に記載の抗体であって、該抗体は標識されており、その結合は前記抗体の非標識型によって阻害されるが、他の結合構造によっては阻害されず、また他の結合特異性を有する他の結合構造の結合を阻害しない抗体。

【請求項16】 前記結合構造が 6 4 インテグリンの非還元型を認識する、請求項1に記載の抗体。

【請求項17】 腫瘍細胞の中もしくは該細胞表面の上に提示される標的構造であって、

a) 請求項1～14の何れか1項で定義された抗体の結合構造および類似の結合特性を有する他の結合構造によって特異的にブロックされる能力、並びにこれら結合構造を特異的にブロックする能力を有し、

b) ヒト胃腸上皮細胞の中および該細胞の表面に提示され、

c) 6 および/または 4 インテグリン鎖、或いはその変異体（これらは共通もしくはユニークなエピトープを提示する）との十分なホモロジーを有し、

d) 腫瘍細胞の表面に高度に発現され、そして、

e) 細胞障害性エフェクター機構に対する標的となる

標的構造。

【請求項18】 請求項17に記載の標的構造であって、前記結合構造が標識され、その結合は前記結合構造の非標識型によって阻害されるが、他の結合構造によっては阻害されず、また他の結合特異性を有する他の結合構造の結合を阻

害しない標的構造。

【請求項19】 請求項17に記載の標的構造であって、前記結合構造が、配列番号2に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号23-33、49-55、88-98、158-162、177-193、226-238を必須要素として含む1以上の相補性決定領域(CDR)配列、或いは、これに類似するユニークな結合特性を有する他の結合構造を含んでなる標的構造。

【請求項20】 前記結合構造が抗体である、請求項17に記載の標的構造。

【請求項21】 請求項20に記載の標的構造であって、前記抗体が、配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号1-109を必須要素として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128-249を必須要素として含む重鎖の可変領域を含んでなる標的構造。

【請求項22】 ヒト結腸上皮細胞に均質に発現し、また膵管および胆管の細胞にはより少なく発現している、請求項17~21の何れか1項に記載の標的構造。

【請求項23】 請求項17~22の何れか1項に記載の標的構造であって、その発現が胃腸の上皮の分化に関連する標的構造。

【請求項24】 請求項17~23の何れか1項に記載の標的構造であって、それが配列番号3に示した6インテグリンおよび/または配列番号4に示した4インテグリンのアミノ酸配列、および/または1以上のそれらの断片、および/または変異体もしくはスプライス変異体、および/またはサブユニットを必須要素として含んでなる標的構造。

【請求項25】 請求項24に記載の標的構造であって、それが前記64インテグリンのホモもしくはヘテロモノマーまたはホモもしくはヘテロマルチマー、および/または前記1以上のそれらの断片、および/または変異体および/またはサブユニットのホモもしくはヘテロモノマーまたはホモもしくはヘテロマルチマーを含んでなる標的構造。

【請求項26】 請求項24に記載の標的構造であって、それが非還元型において90~140kDa、最も好ましくは80~160kDaのみかけ上の分

子量を有する標的構造。

【請求項27】 請求項24に記載の標的構造であって、それが配列番号5-51に示したアミノ酸配列の何れか1つを必須要素として含むペプチドまたはポリペプチド(群)を含むか、或いは、前記ポリペプチド(群)に対して複合体化した分子を含んでなる標的構造。

【請求項28】 請求項24~27の何れか1項に記載の標的構造であって、その非還元型において、請求項1~16の何れか1項で定義された抗体を含んでなる前記結合構造によって、排他的または非排他的に認識される標的構造。

【請求項29】 請求項17~28の何れか1項で定義された標的構造に結合する物質であって、その物質が有機化学分子またはペプチドである物質。

【請求項30】 請求項17~28の何れか1項で定義された前記標的構造に対する結合構造の抗イデオタイプである物質。

【請求項31】 前記抗イデオタイプが、前記標的構造に対する結合特異性を有する結合構造によって特異的にブロックされ、またこれを特異的にブロックする請求項30に記載の物質。

【請求項32】 請求項17~28の何れか1項で定義された標的構造の機能をブロックする物質であって、有機化学分子またはペプチドである物質。

【請求項33】 請求項17~28の何れか1項で定義された標的構造を認識する結合構造であって、有機化学性質のものである結合構造。

【請求項34】 有効成分として請求項1~16の何れか1項で定義された抗体を含有する、薬学的組成物。

【請求項35】 有効成分として請求項17~28の何れか1項で定義された標的構造を含む、薬学的組成物。

【請求項36】 有効成分として請求項29~32の何れか1項で定義された物質を含む、薬学的組成物。

【請求項37】 有効成分として、請求項1~16の何れか1項で定義された抗体、または請求項17~28の何れか1項で定義された標的構造、または請求項29~32の何れか1項で定義された物質を含む、ワクチン組成物。

【請求項38】 抗血管形成機構に基づく症状を治療する方法であって、請

請求項1～16の何れか1項で定義された抗体、または請求項17～28の何れか1項で定義された標的構造、または請求項29～32の何れか1項で定義された物質をヒト患者に投与する方法。

【請求項39】 請求項1～16の何れか1項で定義された抗体がヒト患者に投与される、ヒト転移性疾患を治療する方法。

【請求項40】 試料を請求項1～17の何れか1項で定義された抗体および指示薬と接触させることによる、ヒト悪性疾患のインビトロでの組織病理学的診断および予後予測方法。

【請求項41】 請求項40に記載の方法であって、腫瘍タイピングを含む方法。

【請求項42】 請求項40に記載の方法であって、腫瘍スクリーニングを含む方法。

【請求項43】 請求項40に記載の方法であって、腫瘍の診断および予後の予測を含む方法。

【請求項44】 請求項40に記載の方法であって、前悪性状態のモニタリングを含む方法。

【請求項45】 請求項17～28の何れか1項で定義された標的構造を含む抗原の体液中の濃度による、ヒト悪性疾患のインビトロの診断および予後を予測するための方法。

【請求項46】 請求項1～16の何れか1項で定義された抗体の体液中の濃度がアッセイされることによる、ヒト悪性疾患のインビトロでの診断および予後予測方法。

【請求項47】 ヒト悪性疾患のインビトロでの診断および予後予測方法であって、体液中において、a) 請求項17～28の何れか1項で定義された標的構造もしくは請求項29～32の何れか1項で定義された構造を含む抗原と、b) 請求項1～16の何れか1項で定義された抗体との複合体の濃度をアッセイすることによる方法。

【請求項48】 ヒト悪性疾患のインビトロの診断および予後予測方法であって、ヒト患者の腫瘍沈着に対する請求項1～16の何れか1項で定義された

抗体の局在を決定することによる方法。

【請求項49】 前記抗体が、前記決定より前に前記患者に投与されることによる、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 前記抗体が腫瘍沈着に集積されることによる、請求項48に記載の方法。

【請求項51】 請求項48～50の何れか1項に記載の方法であって、それが定量的である方法。

【請求項52】 請求項1～16の何れか1項で定義された抗体がヒト患者に投与されることによる、ヒト悪性疾患の治療のための方法。

【請求項53】 請求項52に記載の方法であって、前記抗体が分子に遺伝的に連結されることによって変更されており、当該結合された分子に対して変更された薬物動態学的特性を与える方法。

【請求項54】 前記抗体が誘導体形成により変更されている、請求項52に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、ヒト悪性疾患に関連した方法とともに、ヒト胃腸上皮性腫瘍細胞の中および該細胞の表面、並びに正常なヒト胃腸上皮細胞のサブpopulationの中に提示される標的構造のための、並びに腫瘍細胞中およびその表面に提示される標的構造に対する結合構造を有する抗体、またはその誘導体、またはその断片、ワクチン組成物、薬学的組成物に関する。

**【0002】****【発明の背景】**

外科手術は、デュークス段階AからCへの腫瘍進展状態に依存して5年生存率を90-40%に導く直腸癌の主要な治療法である。放射療法および化学療法を含む従来のアジュバンド療法は、死亡率を更に約30%まで減少させることができている(1)。こうした目的成就にもかかわらず、結腸(colon)および直腸(rectum)の癌はヒト癌疾患の主な死亡原因の一つである。免疫療法も広範囲に試みられてきた。しかしながら、結腸癌は一般に免疫療法には抵抗性であり、低免疫原性であると考えられる。結腸癌患者は、メラノーマのような免疫原性が悪性である患者においては別段の活性を示すIL-2療法あるいは試験管で培養した癌浸潤リンパ球の養子移植(adoptive transfer)のいずれに対しても応答しない。しかしながら、とても勇気付けられることに、Rietz Mullerらは、デュークス段階Cの結腸癌で、主要な腫瘍の切除の後、腫瘍および正常上皮関連抗原(Ep-CAM)に対する生の(naked)マウスmAbで治療を施すと、7年死亡率を32%低下させられると報じており(2)、これはその他の免疫療法による治療様式(modalities)が効果的であり得ることを示している。

**【0003】**

アジュバンド免疫療法および癌のより進行した段階の治療法の顕著な改善には、生のmAbによって供給されるより、より強力なエフェクター機構を必要とするはずである。原理的には、強度の増強は標的抗体の腫瘍選択性の増強を必要とする。

## 【0004】

ヒト腫瘍細胞の異種免疫 (xenogenic immunisation) によってハイブリドーマで作られたマウスmAbを使って、今日確定されている限られた数の結腸癌関連抗原が発見されている(3)。

## 【0005】

新規の腫瘍関連抗原の同定のために大規模なファージディスプレイライブラリーの使用が、腫瘍の免疫治療および診断のための有効な標的分子の発見過程を有意に加速させることが期待される。こうした標的分子の同定は、インビトロおよびインビボで発現する抗原を決める特異的な試薬を作り出すために、培養腫瘍細胞および組織切片上で抗体ファージライブラリーの選択およびスクリーニングによって成し遂げられる(4)。ファージディスプレイ技術は、様々な精製抗原に対するモノクローナル抗体を作る有効な手段として確立されており、その構築および、免疫、ナイーブおよび合成抗体ファージライブラリーからの成功的な選択結果が、いくつかの研究で詳述されている(5)。

## 【0006】

非免疫ライブラリーは、それらの一般的な適用性という観点から望ましく、それぞれの単一の標的に対するユニークなライブラリーを不必要とする。一方、十分に大きく高品質の非免疫ライブラリーは構築するのが困難で、そして、これらのライブラリーを用いた標的発見工程は複合抗原に依拠する際に効率的なサブトラクティブ(減法)選択法を必要とするはずである。

## 【0007】

より適度なサイズのファージライブラリーが、複雑なヒト抗原で免疫したヒトに近い霊長類から現在構築されている。これはインビボであらかじめ選択されたレパートリーの利点を利用するアプローチを代表している。そうしたライブラリーは、異種抗原に対する減弱したバックグラウンド反応性において、腫瘍特異的のエピトープに対する特異性が高められるべきである(6)。更に、マウスに比較して、ヒト抗体と近い配列ホモロジーを示す霊長類抗体は、人類(man)において免疫原性を示さないはずである(7)。

## 【0008】

選択的に発現した結腸癌関連抗原を規定するファージライブラリーから得られた新規霊長類抗体を今回同定した。加工されたスーパーアンチゲン（超抗原）と融合させた二つのこれらの抗体でコートされた培養結腸癌細胞のT細胞依存的細胞死によって示されたその治療潜在能力は、以前に実験的なシステムでその治療能力が確立されているEP-CAMのような結腸癌関連抗原に対する特異的なマウスFab断片と融合させた超抗原と比較しうるものである（8）。

#### 【0009】

大規模なファージライブラリーからの抗体を用いて腫瘍関連抗原を含有する新規のフェノタイプ特異的抗原の将来の同定を促進することができるファージ抗体の有効な細胞のポジティブおよびサブトラクティブな細胞選択のための方法もまた提供される。

#### 【0010】

##### 【発見の概要】

本発明は、第一の側面として、ヒト胃腸上皮性腫瘍細胞の中および該細胞の表面、並びに正常なヒト胃腸上皮細胞のサブポピュレーションの中に提示される標的構造に対する結合構造、または類似のユニークな結合特性を有する他の結合構造を有する抗体、またはその誘導体もしくはその断片であって、前記結合構造は配列番号2に示されたアミノ酸配列中のアミノ酸番号23-33（CDR1）、49-55（CDR2）、88-98（CDR3）を必須要素として含む軽鎖の相補性決定領域（CDR）、および配列番号2に示されたアミノ酸配列中のアミノ酸番号158-162（CDR1）、177-193（CDR2）、226-238（CDR3）を必須要素として含む重鎖のCDR配列を含む抗体、またはその誘導体もしくはその断片に関する。

#### 【0011】

一つの態様において、前記抗体はファージ選択されたものである。別の態様において、前記配列は*Macaca fascicularis*由来のものである。本発明の更なる態様は前記抗体の誘導体であり、その誘導体はヒト由来のものである。前記配列は好ましくはヒト起原の相当する配列に対して少なくとも84%の同一性を有する。好ましくは、前記抗体はヒトにおいて低免疫源性または非

免疫源性を有する。

【0012】

更なる態様において、前記抗体は、他のポリペプチドに対する遺伝的な連結により、および/または有機または非有機の化学分子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若しくはマルチメリゼーションにより誘導される。

【0013】

なお更なる態様において、前記抗体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の化学分子に対して、遺伝的に連結されまたは化学的に結合される。

【0014】

更なる態様において、前記抗体は生物学的に活性な分子に対して遺伝的に連結される、或いは、化学的に結合される。

【0015】

なお更なる態様において、前記抗体は免疫活性分子 (immune activating molecules) に対して遺伝的に連結されまたは化学的に結合される。

【0016】

もう一つの態様において、前記抗体は、そのアビディティおよび/またはアフィニティを増加または減少するために変更される。

【0017】

なおもう一つの態様において、前記抗体は、その産生量を増大するために変更される。

【0018】

更なる態様において、前記抗体は、その薬物動態学的な特性に影響を及ぼすために変更される。

【0019】

なお、更なる態様において、前記抗体は、これに新規の薬物動態学的な特性を付与するために変更される。

## 【0020】

更なる態様において、前記抗体は標識されており、その結合は前記抗体の非標識型によって阻害されるが、他の結合構造によっては阻害されず、また他の特異性を有する他の結合構造の結合を阻害しない。

## 【0021】

更なる態様は、その結合構造が 6 4 インテグリンの非還元型を認識する抗体。

## 【0022】

別の側面において、本発明は腫瘍細胞の中もしくは該細胞表面の上に提示される標的構造に関するものであって、

a) 請求項 1 ~ 14 の何れか 1 項で定義された抗体の結合構造および類似の結合特異性を有する他の結合構造によって特異的にブロックされる能力、並びにこれら結合構造を特異的にブロックする能力を有し、

b) ヒト胃腸上皮細胞の中および該細胞の表面に提示され、

c) 6 および / または 4 インテグリン鎖、或いはその変異体（これらは共通もしくはユニークなエピトープを提示する）との十分なホモロジーを有し、

d) 腫瘍細胞の表面に高度に発現され、そして、

e) 細胞障害性エフェクター機構に対する標的となる標的構造である。

## 【0023】

この文章中に使われる十分なホモロジーという表現は、抗体の結合に関連した標的構造の部分におけるホモロジーを指す。

## 【0024】

前記標的構造の 1 つの態様において、前記結合構造は標識され、その結合は前記結合構造の非標識型によって阻害されるが、他の結合構造によっては阻害されず、また他の結合特異性を有する他の結合構造の結合を阻害しない。

## 【0025】

前記標的構造の更なる態様において、前記結合構造は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 23 - 33、49 - 55、88 - 98、158 - 1

62、177-193、226-238を必須要素として含む1以上の相補性決定領域(CDR)配列、或いは、これに類似するユニークな結合特性を有する他の結合構造を含む。

【0026】

前記標的構造のなお更なる態様において、前記結合構造は抗体であり、更なる態様における該抗体は、配列番号2に示したアミノ酸配列のアミノ酸番号1-109を必須要素として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128-249を必須要素として含む重鎖の可変領域を具備する。

【0027】

更なる態様において前記標的構造は、ヒト結腸上皮細胞に均質に発現し、また膵管および胆管の細胞にはより少なく発現している。

【0028】

なお更なる態様において、前記標的構造の発現は胃腸の上皮の分化に関連する。

【0029】

もう1つの態様において、前記標的構造は64インテグリンのアミノ酸配列を含む、そのうち6部分は配列番号3に示され、4部分は配列番号4に示される。前記標的構造のもう1つの態様は、前記64インテグリンの、および/または、前記1以上のその断片、および/または、その変異体、および/または、そのサブユニットのホモもしくはヘテロモノマーまたはホモもしくはヘテロマルチマーを具備する。好ましくは、前記標的構造はそれが非還元型において90-140 kDa、最も好ましくは80-160 kDaのみかけ上の分子量を有する。

【0030】

なお更なる態様において、前記標的構造は、配列番号5-51に示したアミノ酸配列の何れか1つを必須要素として含むペプチドまたはポリペプチド(群)を含むか、或いは、前記ポリペプチド(群)に対して複合体化した分子を具備する。

## 【0031】

6 4 インテグリンのアミノ酸配列を含む標的構造の場合には、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排他的または非排他的に、上記で定義された抗体によって構成される結合構造によって認識される。

## 【0032】

更なる側面において本発明は上記で定義されたような標的構造に結合する物質に関する、その物質は有機化学分子またはペプチドである。一つの態様において、前記物質は前記標的構造の抗イデオタイプである。前記抗イデオタイプは特異的にブロックされ、前記標的構造に対して類似の結合特異性を有する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されたような標的構造の機能をブロックする物質に関し、その物質は有機分子またはペプチドである。

## 【0034】

もう一つの側面において、本発明は上記で定義されたような標的構造を認識する結合構造に関し、その物質は有機化学的性質を持つ。

## 【0035】

もう一つの側面において、本発明は有効成分として上記で定義されたような抗体、または上記で定義されたような標的構造、または上記で定義されたような物質を含む薬学的組成物に関する。

## 【0036】

なお更なる側面において、本発明は有効成分として上記で定義されたような抗体、または上記で定義されたような標的構造、または上記で定義されたような物質を含むワクチン組成物に関する。

## 【0037】

更なる側面において、本発明は上記のような抗体、または上記のような標的構造、または上記のような物質がヒト患者に投与されることによる抗アンジオジェニック機構に基づく症状を治療する方法に関する。

## 【0038】

もう一つの側面において、本発明は上記で定義されたような抗体がヒト患者に投与されるヒト転移性疾患を治療する方法に関する。

【0039】

更なる側面において、本発明は試料が上記で定義されたような抗体および指示薬と接触させることによる、ヒト悪性疾患のインビトロでの組織病理学的診断および予後予測方法に関する。

【0040】

前記方法の態様は、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、および前悪性状態のモニタリングを含む。

【0041】

なお更なる側面において、本発明は上記で定義されたような標的構造、また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を含む抗原の体液中の濃度がアッセイされることによる、ヒト悪性疾患のインビトロでの診断および予後予測のための方法に関する。

【0042】

本発明の更なる側面は、上記で定義されたような抗体の体液中の濃度がアッセイされることによる、ヒト悪性疾患のインビトロでの診断および予後予測のための方法に関する。

【0043】

本発明のなお更なる側面は、a)上記で定義されたような標的構造を含む抗原、または上記で定義されたような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抗体の複合体の体液中の濃度をアッセイすることによる、ヒト悪性疾患のインビトロでの診断および予後予測のための方法に関する。

【0044】

なお更なる側面において、本発明は、ヒト患者の腫瘍沈着に対する上記で定義されたような抗体の局在を決定することによる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に関する。前記抗体は、好ましくは決定より前に前記患者に投与される。一つの態様において、前記抗体は腫瘍沈着に集積される。更なる態様において、前記方法は定量的なものである。

## 【0045】

本発明のもう1つの側面は、上記で定義されたような抗体がヒト患者に投与されることによるヒト悪性疾患の治療のための方法に関する。この方法の一つの態様において、前記抗体は分子に遺伝的に連結されることによって変更されており、当該結合された分子に対して変更された薬物動態学的特性を与える。もう一つの態様において、前記抗体は誘導体形成により変更される。

## 【0046】

## 【発明の詳述】

新規の腫瘍関連抗原 (TAA s) の同定は、腫瘍の免疫療法および診断の分野の進展に極めて重要である。本発明に関連して、フローサイトメトリックな評価法および異なる抗生物質抵抗性マーカーにリンクした特異的抗体クローンを含むミニライブラリーの使用を基礎に、抗原ソースとしてインタクトな細胞を適用することによってファージ抗体のポジティブおよびサブトラクティブ選択の方法を初めて開発した。s c F v ファージライブラリー ( $2.7 \times 10^7$ ) がプールされたヒト結腸の癌腫 (c a r c i n o m a s) で免疫された霊長類 (M a c c a c a f a s c i c u l a r i s) から構築された。このライブラリーはC o l o 2 0 5 結腸アデノカルシノーマ細胞への結合を3巡させ、タンパク分解溶出とそれに続くファージ増殖によって選択した。

## 【0047】

結腸癌腫細胞と反応し、いくつかの正常上皮組織とは制限的に反応するいくつかの抗体が免疫組織化学によって同定された。一つのクローン、A 3 s c F v、は調べた範囲で結腸癌腫の11 / 11 および膵癌腫の4 / 4 に均一に発現するエピトープを認識した、そして正常組織での発現は、胃腸管にある上皮系細胞のサブタイプに限定されていた。A 3 s c F v は A 3 F a b よりも明らかに全体として約100倍高い親和性を有し、s c F v ホモダイマーの結合を示している。A 3 エピトープの細胞表面密度は、F a b 結合に基づいて計算すると、細胞当たり300万に近い。

## 【0048】

低いMHCクラスII結合スーパーアンチゲン変異体S E A (D 2 2 7 A) と

融合したA3-scFvでコートした結腸癌細胞の効率的なT細胞依存性細胞死もまた示された。同定されたA3分子はこのように結腸癌および膵臓癌の免疫療法における、その使用可能性を示唆する特性を有するTAAを代表している。

#### 【0049】

##### 【考察】

本発明に関連して、大規模なファージライブラリーから細胞フェノタイプ特異的な抗体断片の同定に使用されるファージ選択に対する効率的なプロトコールが開発された。例示されるように適用の標的特異性は結腸腫瘍関連抗原に対するものであった。

#### 【0050】

最初に、ここで示されたファージ増殖のためのファージミド構築物を用いて、ファージポピュレーション中に提示されるPIII-scFv融合タンパク質表面の頻度が調べられた。以前の報告に比べて、より高いレベルのC215-scFv提示が達成された。この結果はサブラクティブ選択の効率を支持するが、ライブラリーからの低親和性抗体のアビディティ選択の可能性をも増加させるものである。

#### 【0051】

C215-scFvファージの結腸アデノカルシノーマColo205細胞への結合の特異性が明らかに示された。結合ファージは溶出後インタクト状態で細胞を分離する、ファージタンパク質IIIとscFv抗体の間で標的配列を特異的に切断するプロテアーゼであるジェネネース (genenase) の使用によって効率的に溶出された。この非化学的溶出方法は、それらの結合親和性にかかわらず同じくらい効率的にファージ抗体を溶出し、そしてscFv相互作用によって結合したファージのみを溶出し、このプロセスの特異性を高めているはずである。

#### 【0052】

この選択プロトコールを使用して、Colo205細胞(500,000X)で3巡の選択後に達成される濃縮化は、他の研究者によって複合抗原の選択に対して報告されたそれと類似する結果であった。

## 【0053】

様々な方法的ステップによる成果の検定後に、この組み合わせ方法がC o l o 2 0 5細胞を用いたライブラリー選択に適用された。前記ライブラリーはヒト腫瘍で免疫されたヒトに近い種から構築された。このように作られた抗体プールは、広く分布したヒト正常組織抗原に対して異種間反応性 ( x e n o r e a c t i v i t i e s ) の制限されたバックグラウンドのなかで、腫瘍特異抗原に対する親和性の成熟した抗体を潜在的に含有しているだろう ( 6 )。この同定された抗体は、限定的な正常組織分布する腫瘍および組織分化抗原を認識した。最初のスクリーニングで結腸癌組織への反応性を持つものとして同定されたすべての選択された抗体は、C o l o 2 0 5 生細胞ともフローサイトメトリーで反応した。この細胞表面特異性の制限は、腫瘍組織成分の混合物の懸濁液が免疫に使用されたので、選択過程を反映しており、ライブラリーの構成を反映していないはずである。

## 【0054】

同様な以前の研究において、同様に作られた、および抗原ソースとして組織切片を使用して選択された抗メラノーマライブラリーで細胞外および細胞内の特異性が同定された ( 4 )。切除したヒト結腸腫瘍および正常結腸の組織切片 ( 同じウェルにマウントされる ) が、効率性を高め、フローサイトメトリースクリーニングに比較してより質的に高い情報を得るため、選択された特異性の臨床的意味付けを確認するために免疫組織化学をもちいた最初のスクリーニングに使用された。

## 【0055】

選択された抗体は、4つの抗体特異性グループに分類され、異なる器官の上皮細胞に対するそれらの反応パターンによって区別された ( 実施例 1、表 1 を参照 )。これらの特異性グループのなかで、A 3 s c F v はほとんどの腫瘍選択的抗原 ( t u m o u r s e l e c t i v e a n t i g e n ) を同定した。この A 3 T T A は高度に、均質および頻繁に、原発および転移結腸癌並びに膵臓癌のサンプルに発現している。更に、A 3 F a b 融合タンパク質で決定したその細胞表面発現レベル ( 3 0 0 万エピトープ / 細胞 ) は、例外的に高く、細胞表面

を介した細胞障害性効果に許容的なものであった。

【0056】

頻繁に発現される明示されたヒト腫瘍抗原のうち腫瘍特異的なものはあってもごく少数で、一般にはA3およびEp-CA Mのような組織分化に関連している。しかしながら、腫瘍におけるこれらの抗原の亢進した発現は、治療的な活性投与量の大小に対する基礎的知見を提供するはずである。前記抗原を発現している正常組織部分の循環からの有効性もまた、限定された毛細血管透過性および身体におけるその発現部位によって制限を受ける（たとえば、循環している抗体に対する消化管上皮細胞のアピカル（apical）側への露出は非常に制限されているはずである）。

【0057】

上皮に普遍的なEp-CA Mに反応する17-1A mAbを用いての臨床的経験は、効果的な非毒性抗体投与量の決定の実現可能性をサポートするものである。上皮組織におけるこの研究の選択されたscFvクローンの全ての限定した発現は、例えば全長mAbとして、17-1Aとのアナロジーにおいて、これらのクローンが原理的に免疫療法的適用の候補として評価されることを示している。しかしながら、Ep-CA Mに比してA3 TAAの特記すべき利点は、結腸における発現は同様であるが、肺および腎臓などのたいていの正常上皮での発現の欠如にある。

【0058】

正常上皮のサブタイプに対する組織分布は、胃腸管から発生した癌腫のサブタイプでの選択的な発現によってサポートされる（実施例2、表2を参照）。

【0059】

以前から周知の結腸癌関連抗原（CEA，CA50，CA19-9，CA242，Tag-72）（3）のいくつかは、A3エピトープに比較して、正常組織において均等に、またはより制限的に発現される。しかしながら、A3およびC215 Ep-CA Mと対比して、それらは腫瘍でより不均一に発現される。

【0060】

E p - C A Mに対する抗体の使用は、アジュバンドセッティングにおける結腸直腸 ( c o l o r e c t a l ) 癌患者に対して生存上の利点 ( s u r v i v a l a d v a n t a g e ) を含む良好な臨床結果を示した ( 2 ) 。

【 0 0 6 1 】

より進行したステージの患者でさえ腫瘍応答を導くという目的で、この抗体と組み合わせた強力なエフェクター分子の導入は、生の 1 7 - 1 A m A b 治療で見られる「正常組織耐性」にチャレンジし得る。前臨床的には、このことは、この抗原のマウスバージョンに特異的な毒素結合抗体を使用したモデル系、またはヒト結腸癌関連抗原に対するトランスジェニック動物において研究することができる。

【 0 0 6 2 】

以前、抗体イムノトキシンが、マウス組織には発現していない異種 ( ヒト ) 腫瘍抗原を発現している転移増殖する腫瘍でのモデルにおいてマウスを治療するために使用され成功した ( 1 0 ) 。しかしながら、使用した前記 T A A 群は本当に腫瘍特異的であり、そして前記モデルは正常組織を標的にした毒性に対しての潜在性を反映したものではない。

【 0 0 6 3 】

以前の研究で、我々は腫瘍免疫療法に対する免疫刺激的トキシンとしての超抗原の潜在能力を報告した ( 8 ) 。抗体を介した超抗原のターゲティングは、大量の細胞障害性およびサイトカイン産生 T 細胞を腫瘍部位に誘引した。低 M H C クラス I I 結合親和性の変異を起こした超抗原 S E A ( D 2 2 7 A ) は、遺伝的に腫瘍ターゲティング抗体に連結された。この「癌選択的」薬剤は腫瘍における M H C 発現とは無関係に T 細胞をリクルートするために適用され、こうして、他の有効な免疫療法的アプローチに対する有意な障害を代表する M H C ダウンレギュレーションおよびポリモルフィズムの問題を避けることができる。

【 0 0 6 4 】

確立された「癌選択的」 1 F s c F v ファージ、「広反応性」 C 2 1 5 ファージおよび非特異的 D 1 . 3 ファージ抗体クローンの小ライブラリーは、効率的なサブトラクティブ細胞選択においてのプロトコールの開発のために必須な手段

である。この選択原理に必要とされるのは、高頻度に発生する非発現性 (non-displaying) ファージ粒子のため、ファージレスキューおよび増幅前にサブトラクティブ選択に引き続いてポジティブ選択が実施されることである。もう一つは、非発現性ファージを選択的タンパク分解によって非感染性にし得ることである (G. Winter, 私信)。こうした技術は「不活性ライブラリー」、すなわち広範囲にネガティブな前選択されたライブラリー (例えば、休止状態の細胞あるいはトランスフェクト可能な親細胞に対して) の作成を可能にし得る。

#### 【0065】

結論として、「不必要な」モデルファージ特異性は、それぞれの選択ラウンドで、およそ100のファクターによりファージポピュレーションから選択的に取り除くことができた。特異的 (differentially) に発現した細胞表面抗原の同定のため、大規模な非免疫性ファージライブラリーの使用との組み合わせた改善プロトコールを使用する将来のサブトラクティブ選択法は、そのようなアプローチが我々がこの研究で使用した (すなわちイムノドミナンスのような制限とバイアスを含むインビボで前選択された免疫レパートリーを使用したポジティブ選択) 戦略に対して優れたものであるかどうかを示すことになるだろう (4)。A3 s c F v 融合タンパク質と比較して A3 F a b の腫瘍細胞に対する結合で示された低親和性および高エピトープ密度は、細胞表面でクラスターを作るエピトープと結合する s c F v マルチマーの形成を示唆するものである。より高い親和性を持つ A3 F a b の 1 価性変異体、あるいはもう一つのものとして、A3 の推測上の低免疫原性と適合しうる全長 A3 F v 移植 m A b のような安定な 2 価性構築物が開発されるべきである。そうした構築物は、この高度に発現した胃腸腫瘍関連抗原に対して適したエフェクター分子のターゲティングに適切であろう。

本発明は以下の実施例によって更に例示されるが、それらに限定されない。

#### 【0066】

##### 【実施例】

<材料と方法>

## [動物]

カニクイザル (*Macaca fascicularis*) を飼育して、Swedish Institute for Infectious Disease Control (SIIDC, スtockホルム) において免疫した。水と食餌は常に任意にとれる状態に置かれた。4匹のサルが、10%正常なカニクイザル (*cynomolgus*) 血清を含有するPBS中の結腸癌組織の粗懸濁液2mlの経皮的に免疫された。ブースターのための投与量が、21、35および49日目に投与された。抗体反応は2匹のサルにおいて示された、ここで抗原はアルム (alum) アジュバンドと混合されて使用された。すべての動物はスウェーデンの法律に従って飼育され、実験は現地の倫理委員会で承認された。

## 【0067】

## [組織と細胞]

ヒト腫瘍および正常組織サンプルはスウェーデンのLund大学およびMalmo総合病院から得られた。ヒト結腸直腸細胞株Colo205、ヒトB細胞リンパ種細胞株RajiおよびマウスB16メラノーマ細胞株は、American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) から入手した。Ep-CAM-1遺伝子(C215)を含有する発現ベクターpKGE839でトランスフェクションされたマウスメラノーマB16-C215<sup>+</sup>細胞は、以前に記載されている(9)。

## 【0068】

ヒト細胞を10%熱不可活性化ウシ胎児血清(Gibco)および0.1mg/mlゲンタマイシン硫酸(Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, イスラエル)を添加したRPMI 1640培養液(Gibco, Middlesex, UK)で培養した。マウス細胞を、1mM グルタミン(Hyclone, Cramlington, UK)、 $5 \times 10^{-5}$  M -メルカプトエタノール(ICN, Costa Mesa, CA)、0.2% NaHCO<sub>3</sub> (Seromed Biochrome, ベルリン、ドイツ)、 $1 \times 10^{-2}$  M HEPES (Hyclone, UT) および $1 \times 10^{-3}$  M ソディウム ピロベイト(HyC

lone) を付加的に添加した培養液で培養した。前記細胞は反復的に Gene - Probe Mycoplasma T. C. 試験 (サンディエゴ、CA) を用いてマイコプラズマ混在に関して検査された。

#### 【0069】

[ファージミッドベクターおよびファージライブラリー構築]

全脾臓RNAは反応したサルの1匹から Promega (Mannheim、ドイツ)のRNA分離キットを用いて抽出した、そしてcDNAはPE Biosystems (ストックホルム、スウェーデン)のRNA PCR キットを用いて増幅した。ラムダ軽鎖および重鎖遺伝子のcDNA合成のための、および、scFv遺伝子に対するそれらの遺伝子の組み込みのためのプライマーは、以前に記載されている(4)。前記scFv cDNAをファージミッドベクター(4)にM13遺伝子IIIの残基249-406と融合しライゲーションした。前記scFv-gIII遺伝子は、phoAプロモーターで発現され、そして生じたタンパク質は大腸菌(E. Coli)熱安定トキシンIIのシグナルペプチドにより輸送されるようにした。

#### 【0070】

scFv遺伝子挿入物を有する7μgのライブラリーベクターを繰り返し電気穿孔することで、最少寒天培地プレート上でコロニーとして増殖したトータル $2.7 \times 10^7$ の一次トランスフォームされたE. Coli TG-1が得られた。前記コロニーはプレートからかきとられ、37℃で1時間150 rpmで2xYT中で増殖させた。この培養を50倍過剰のM13K07ヘルパーファージ(Promega)でスーパーtransフェクションした。100mg/lの濃度でアンピシリンを添加し、更にもう1時間増殖させた。70mg/lの濃度のカナマイシン添加後、15時間30、250 rpmで培養した。ファージ粒子は培養上清からPEG/NaCl沈澱を2回繰り返して回収した。沈澱ファージはPBS 1%BSAに溶かした。

#### 【0071】

[ウエスタンブロット解析]

scFv-C215ファージ粒子(PEG沈澱/濃縮ファージの未希釈のスト

ックから)の2倍希釈シリーズを1% SDSおよび2% -メルカプトエタノールを有する還元12%ポリアクリルアミドゲル、で分離にかけた。タンパク質はニトロセルロース膜(Bio-Rad、Hercules、CA)に電気泳動でトランスファーされた。前記膜を5%の低脂肪ミルク(Semper AB, ストックホルム、スウェーデン)でブロックした、そしてkeyhole limpetヘモシアニンにコンジュゲートしたプロテインIII由来のペプチド配列、AEGDDPAKAAFNSLQASATEC、に対するウサギ抗血清とインキュベートした。西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)をコンジュゲートした2次抗体であるヤギの抗ウサギ抗体(Bio-Rad)で30分間インキュベーションした。すべてのステップ間で、前記膜はPBS/0.5% Tween 20で5分間3回洗浄した。前記膜は基質(Amersham Pharmacia Biotech、Little Chalfon Buckinghamshire、UK)中で1分間インキュベーションした。光感受性フィルム(BCL hyperfilm、Amersham)に前記膜を感光させ0.5-5分間現像した。

#### 【0072】

同様に、精製したFab(A3、cynomolgus CH1およびCラムダ(Clambda)ドメインを含む)、scFv-およびFab(マウスCH1およびC kappa)を含む)-SEA(D227A)融合タンパク質(以前に記載されたように生産された(9))の信頼性を分析するために、12% SDS-PAGEを実施した。トランスファーしたタンパク質を保持する前記膜を精製したポリクローナルウサキ抗SEA抗体とインキュベーションし、引き続いて上述のような試薬ステップで処理した。

#### 【0073】

##### [モデルと細胞上でのライブラリーファージ選択]

ラムダ軽鎖ライブラリー(あるいはモデルファージの)のファージ懸濁液、100 $\mu$ lのPBS/1% BSA中に10<sup>12</sup>、を300万のColo205細胞と1時間氷上でインキュベーションした。前記細胞はそれぞれの洗浄で2mlのPBS/1% BSAを使用した10分間のインキュベーションを含めて3回洗

浄された。前記ファージは $33 \mu\text{g}/\text{ml}$ のジェネネースを $50 \mu\text{l}$ 細胞のペレットに添加し、そして15分間インキュベーションして溶出した。ジェネネース(ズブチリシンBPN変異体、S24C/H64A/E156S/G169A/Y217L)はPoul Carter博士(San Francisco, CA)から供与された。遠心後、上清を新しい試験管に移し、PBS中の1%BSA  $250 \mu\text{l}$ を添加した。選択されたライブラリー(およびmulti-pass実験におけるモデルファージ粒子)をレスキューおよび増幅するために、溶出されたファージ粒子を1mlのE. Coli DH5 F'(OD<sub>600 nm</sub> = 1.0)に感染させた。感染細菌培養は適当な抗生物質を添加した2xYTで100倍希釈し、OD > 1.0になるまで培養した(2日間まで)。

#### 【0074】

最後に、可溶性scFvを生産するために、大腸菌アンバーサプレッサー株HB2151を2ラウンド、3ラウンド目の選択されたライブラリーで感染させた。アンピシリンを含有する寒天プレート上で増殖させた後、単一コロニーを96穴マイクロウェルプレートでアンピシリン添加した2xYT培地で30、17時間培養した。遠心後、上清を除き等量のPBS/1%BSAを加え、個々のscFvのヒト腫瘍および正常組織切片での免疫反応性が分析された。簡単に説明すると、C末端タグ、ATPAKSE、をウサギ抗血清とそれに続くビオチン化ヤギ抗ウサギ抗体(DAKO A/S、コペンハーゲン、デンマーク)およびStreptABC complex HRP(DAKO A/S)を使用して検出した(免疫組織化学の項を参照)。

#### 【0075】

##### [免疫組織化学]

凍結クリオ切片( $8 \mu\text{m}$ )をスライド上で風乾し、アセトン中で-20、10分間固定し、そしてPBS中の20%ウシ胎児血清(FBS)中で再水和した。内在性ビオチンはアビジン(1/6希釈)で15分間ブロックし、それからビオチン(1/6希釈)で15分間ブロックした(Vector Laboratories、Burlingame、CA)。 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアフィニティー精製したビオチン化ウサギ抗SEA抗体で30分間インキュベーションし、引き

続き50mM Tris pH 7.6中で1/110に希釈したStrept ABC Complex HRP (DAKO A/S、コペンハーゲン、デンマーク)で30分間インキュベーションした。すべてのステップの間で、切片をTBS中で3回洗浄した。染色反応は、0.01%過酸化水素を含むTris pH 7.6中に溶解した0.5mg/mlの3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (Sigma) 中で8分間行った。10分間の0.5%メチルグリーンのカウンター染色のあと、スライドを10分間水道水で洗浄し、DPX溶液 (Sigma) にマウントする前に70-99%のエタノールおよびキシレンで徐々に脱水した。

#### 【0076】

##### [フローサイトメトリー]

Colo205結腸癌細胞を0.02% w/v EDTAで解離し、PBSで洗浄した。サルにおける抗体反応の進展をフォローするために、細胞は連続的に希釈血清で4、1時間、ビオチン化ウサギ抗ヒトIgG抗体 (Southern Biotechnology Ass. Inc., Al, USA) で30分間、そして最後にアビジン-PE (Becton Dickinson、Mountain View, CA) で30分間インキュベーションした。

#### 【0077】

モデルファージの細胞に対する結合は、ウサギ抗M13-抗体 (ウサギをM13粒子で免疫して産生) およびFITCをコンジュゲートしたロバ抗ウサギ抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) を使用して分析した。SEA (D227A) と融合した抗体の結合は、ビオチン化したウサギ抗SEA抗体およびアビジン-PEを使用して検出した。すべての試薬はPBS/1% BSAで希釈した。細胞は、試薬とのインキュベーション後にPBS/1% BSAで2回洗浄し、そしてファージ粒子の結合後、10分間のインキュベーションを含む3回の洗浄を行った。

#### 【0078】

フローサイトメトリー分析はFACS Sort フローサイトメーター (Bec

ton Dickinson) を使用して実施した。

【0079】

[培養細胞上での親和性決定]

A3 scFv-SEA (D227A)、A3 Fab-SEA (D227A) および 1F scFv SEA (D227A) 融合タンパク質のそれぞれ 80 µg づつを Bolton と Hunter によって記載されたように比活性が 10 - 15 µCi / µg でヨード標識した。Colo205 細胞および Raji 細胞、30000 / サンプルを 1% BSA 中の 2 倍希釈シリーズ 100 µl / 試験管でヨード化融合タンパク質と 1 時間のインキュベーションし、結合活性を測定する前に PBS で 3 回洗浄した。添加した、および結合した融合タンパク質の濃度をスキッチャード分析に使用した。Colo205 細胞に対する特異的結合を計算するために Raji 細胞に対するバックグラウンド結合が差し引かれた。

【0080】

[細胞毒性アッセイ]

超抗原融合タンパク質の T 細胞依存性細胞毒性 (superantigen antibody dependent cellular cytotoxicity、SADCC) を、<sup>51</sup>Cr - 標識の Colo205 細胞を標的細胞として、およびヒト T 細胞をエフェクター細胞として使用した標準的な 4 時間クロミウム放出アッセイによって測定した (9)。特異的リシス%は次のように計算した。

【0081】

$$100 \times \frac{\text{cpm 実験放出} - \text{cpm バックグラウンド放出}}{\text{cpm 全放出} - \text{cpm バックグラウンド放出}}$$

<実施例 1 >

[腫瘍結合モノクローナルカニクイザル抗体の作成]

4 匹のカニクイザル、Macaca fascicularis、を反復的にヒト結腸癌腫で隔週 4 回免疫した。サルにおける抗体応答の順次の進展は、免疫前および免疫血清の希釈シリーズを用いて、結腸直腸細胞 Colo205 培養細

胞のフローサイトメトリーによる染色によって追跡された。I g G抗体応答は、アルムで沈澱させた腫瘍組織懸濁液を用いた場合のみ誘発された(2匹)。

#### 【0082】

免疫前血清抗体に対する免疫血清の最大結合レベルを示したサルが、約 $2.7 \times 10^7$ (一次トランスフォーマントの数から推定して)の大規模なコンビナトリアルs c F vファージライブラリーの構築に使用された。霊長類のファージライブラリーはC o l o 2 0 5細胞を使用して選択された。3回の連続的な選択ラウンドからの全ファージ収量(コロニー形成単位(CFU)として計数された溶出/添加ファージ数)は、 $1.9 \times 10^{-7}$ 、 $1.4 \times 10^{-5}$ から $1.2 \times 10^{-3}$ へと次第に増加した。第3ラウンドの選択の後、ファージライブラリーから作られたモノクローナル可溶性s c F vの5%(12/246)が、ヒト結腸直腸癌組織の切片およびインタクトなC o l o 2 0 5細胞と結合することがフローサイトメトリーによって示された。選択されたすべての抗体は、それぞれユニークな核酸配列を持つことが、1%アガロースゲル電気泳動で分析されたH i n f I制限酵素分解パターンによって示された。

#### 【0083】

抗体遺伝子は、5  $\mu$  lの細菌カルチャーおよびファージミッドベクターのs c F v遺伝子の5'と3'領域(p h o AプロモーターおよびM13遺伝子I I I領域)に相補的なプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって増幅された。

#### 【0084】

[選択されたs c F vは正常組織の上皮とそれぞれユニークな反応性を示す]

結腸直腸癌反応性s c F vは、正常組織での免疫組織化学的反応パターンに基づいて、それぞれの特異性グループに分類された(表1)。今回詳細に調べられた抗体は、A3 s c F v(およびA3 s c F v - S E A (D227A))、A10 s c F v、3D s c F v、および1D s c F vである。代表的な抗体はお互いから、それらの異なる組織の上皮に対する良好な特異性、および、それらの白血球に対する結合によって区別することができた。1D s c F vは消化管上皮と強く反応し、多形核顆粒球の形態を持つ細胞と反応する唯一の抗体

であった。また、1D scFvは腎管の管腔表面(luminal surface)および集尿細管(collecting ducts)の染色性から他の抗体とは異なっており、一方、A10 scFvはこれらの上皮細胞と均質(非極性、non-polarly)に反応し、3D scFvおよびA3 scFvは反応しなかった。1D, A10、および3Dは肺のマクロファージ様細胞とも反応したが、A3 scFvはネガティブであった。

【0085】

第5の抗体グループは、今回あまり研究されなかったので表1にも含まれていないが、結腸上皮、白血球および肝臓のクッパー細胞と反応した。

【0086】

A3 scFvは、使用した正常細胞のパネルと最も限定的な反応しか示さない点で際立っていた。A3の最もはっきりした正常組織反応性は、正常結腸上皮の染色であった。弱い染色性が膵臓および胆汁管の、肝臓の、小腸(small bowel)上皮の下構造の細管(small duct)においても検出された。二つの胃のサンプルのうち一つの表面上皮はA3抗体で強く染色された。

【0087】

A3 scFvの反応パターンは、融合タンパク質A3 scFv-SEA(D227A)を使用して確認された。このフォーマットはポリクローナルウサギ抗SEA抗体を免疫組織化学的検出に使用することを認めており、それはscFvのC末端に存在するペプチドタグ、ATPAKSE、に対する2次抗体の使用に比べて、より低いバックグラウンドと組織交差反応性を示す、より感受性の高い検出システムである。

【0088】

【表1】

表1 選択された結腸直腸癌ファージライブラリーからの  
可溶性 scFv 断片の正常ヒト細胞に対する免疫組織化学的反応性

組織/下部構造	数*	scFvクローンの名称				
		A3 **	A10	2D	1D	
食道	1	0	ND	ND	ND	
/上皮組織						
/非上皮組織	0		ND	ND	ND	
結腸	5	++	+	-	++	
/上皮						
/非上皮組織	0	0	0	0	顆粒球 ++	
小腸	2	(+)	非均一性 +	+	非均一性 (+)	
/絨毛上皮						
/基底腺細胞	+	+	+	+	++	
/非上皮性組織	0	0	0	0	0	
室	2	0, ++	0	0, +	++	
/表面上皮						
/腺上皮	0		+, ++	0	++	
/非上皮性組織	0	0	0	0	0	
膵臓	1	0	(+)	+	++	
/腺房						
/小管	(+)	(+)	+	++		
/大管	0	(+)	+	++		
/非上皮性組織	0	0	0	0		
/内分泌組織	0	0	0	0		
肝臓	2	0	ND	ND	ND	
/肝実質細胞						
/クッパー細胞	0	ND	ND	ND		
/胆汁管	(+)	ND	ND	ND		
腎臓	1	0	+	0	管腔側表面 ++	
/近位曲尿細管						
/遠位曲尿細管	0	+	0	0	管腔側表面 ++	
/集細管	0	+	0	0	管腔側表面 ++	
/糸球体	0	0	0	0		
/非上皮性組織	0	0	0	0		
膀胱	1	0	ND	ND	ND	
/上皮組織						
/非上皮性組織	0	ND	ND	ND		
前立腺	1	0	++	+	および分泌物 ++	
/上皮組織						
/非上皮性組織	0	0	0	0	0	
肺	1	0	(+)	(+)	0	
/気管支上皮						
/肺胞上皮	0	(+)	(+)	0	0	
/非上皮性組織	0	マクロファージ+	マクロファージ+	顆粒球 ++, マクロファージ+		
中枢神経系(CNS)	1	0	ND	ND	ND	
/灰白質						
/白質(脳)	0	ND	ND	ND		
骨格筋	1	0	ND	ND	ND	

表1の注釈:

0 = なし、(+) = 弱い、+ = 中間、++ = 強い、ND = 未検定、

\* 調べられた組織サンプルの数

\*\* A3 scFvの反応性がA3 scFv SEA(D227A) 融合タンパクで確認された。

【0089】

<実験例2>

[A3 腫瘍関連抗原は結腸直腸および膵臓腫瘍に均質および頻繁に発現される]

A3 scFv - SEA (D227A) 融合タンパク質を上皮由来の様々な腫瘍の免疫組織化学的染色に使用した(表2および図1)。融合タンパク質は、原発性結腸癌組織では11/11サンプル、そして卵巣、リンパ節および肝臓から切除した転移結腸癌では4/4を均質にしかも強力に染色した。膵臓癌では4/4サンプルが均質で強い陽性を示した。対照的に、胃、前立腺、乳房の組織サンプルおよびノンスモール細胞肺癌腫では陰性を示した。

【0090】

【表2】

表2 A3 scFv SEA(D227A)の腫瘍組織反応性

腫瘍組織	数	反応性
原発性結腸癌	11	全ての腫瘍細胞は強く均一に染色される リンパ節、肝臓と卵巣に転移した
結腸癌	4	上記同様
膵臓癌	4	上記同様
咽頭癌	2	なし
前立腺癌	2	なし
乳癌	2	なし
肺固形癌 (ノンスモール細胞)	2	なし
悪性メラノーマ	2	なし

<実験例3>

[A3 TAAは結腸癌細胞表面上に高発現される]

融合タンパク質A3 scFv - SEA (D227A)、A3 Fabおよび1F scFv - SEA (D227A) (1FはA3特異的グループに分類される)のColo205細胞に対する結合を基礎にした、親和性決定のためのいくつかのスキッチャードプロットから得られた結果が表3に要約されている

。特異的結合はC o l o 2 0 5細胞への結合から、A 3および1 F T A Aを発現していない細胞株であるヒトB細胞リンフォーマR a j i細胞への非特異的結合を差し引いて計算された。

#### 【0091】

直線回帰 ( l i n e a r r e g r e s s i o n ) がスキャッチャード解析における外挿線の傾きおよび切片の計算に使用された。A 3 s c F v - S E A ( D 2 2 7 A ) 融合タンパク質は、A 3 F a b 融合タンパク質 ( 細胞当たり約300万結合サイト ) に比して細胞当たり約10倍も少ない結合サイトで飽和した、これはs c F vには2価 (あるいは多価の) 結合が含まれていたことを示している。このことは、A 3 F a b ( 5 8 0 - 7 8 0 n M ) に比べて、全体としての親和性がA 3 s c F v 融合タンパク質 ( 3 . 6 - 5 . 5 n M ) の方が100倍以上高いことによっても支持される。

#### 【0092】

1 F s c F v - S E A ( D 2 2 7 A ) 融合タンパク質を使用して実行した単回の実験は、A 3 s c F v - S E A ( D 2 2 7 A ) 融合タンパク質と同様な結合親和性および結合部位の飽和を示した。

#### 【0093】

#### 【表3】

表3 Colo205細胞に結合するヨード化融合タンパク質のスキャッチャード分析

融合タンパク	数 *	Kd (nM)	100万箇所/細胞
A3 Fab-SEA(D227A)	2	580-780	3.0-3.9
A3 scFv-SEA(D227A)	3	3.6-5.5	0.11-0.39
1F scFv-SEA(D227A)	1	4.2	0.18

\* 実施された実験の数

#### <実験例4>

[ A 3および1 F s c F v - S E A ( D 2 2 7 A ) はC o l o 2 0 5細胞のT細胞リシス ( T c e l l l y s i s ) を媒介する ]

二つの融合タンパク質A 3および1 F s c F v - S E A ( D 2 2 7 A ) のC o l o 2 0 5細胞に対する超抗原抗体依存的細胞障害性 ( S A D C C ) を媒介す

る能力が調べられ、ポジティブコントロールのC215 Fab-SEA (D227A) およびネガティブコントロールのD1.3 scFv-SEA (D227A) 融合タンパク質と比較された。A3 scFv-SEA (D227A) 融合タンパク質タイトレーションは、10倍高い濃度ではあるのだが、C215 Fab-SEA (D227A) 融合タンパク質で示された値と同様(4時間のアッセイで約50%程度)の最大融解のプラトーに達する(図2)。1F scFv-SEA (D227A) は、A3 scFv-SEA (D227A) に比較してわずかに高い濃度で同じ程度の細胞障害性を媒介した。

#### 【0094】

ネガティブコントロールのD1.3 scFv-SEA (D227A) 融合タンパク質は如何なる細胞障害性も媒介しなかった。

#### 【0095】

##### <実験例5>

[結腸癌反応性抗体A3によって認識される腫瘍関連抗原の精製]

腫瘍抽出液は異種間移植腫瘍細胞株Colo205から作出された。抽出物をC215 Fab-SEAm9をカップリングしたプレカラムおよびA3 scFv-SEAm9をカップリングしたカラムにアプライした。カラムはサンプルをアプライしている間は連続して配置されるが、アルカリ条件下での溶出の前には分離された。

#### 【0096】

単一のピークが溶出の間にUV分光によって検出された(図3)。後者のA3カラムからの溶出分画が集められ、中和され、濃縮され、それから非還元状態でのSDS-PAGEで分析された(図4)。銀染色で認められ、みかけ上の分子量が約90-140kDaの2本のバンド(図4ではIおよびIIとラベルされる)が切り取られ、そして標準的なペプチドマッピングの方法によって調べられた。これら2本のバンドはウェスタンブロットでA3によって検出されるバンドに相当する(実施例8を参照)。バンドIからは47の別々のトリプシン分解によるペプチド質量(peptide masses)が得られ(配列および相当する質量は配列番号3、表4、および図5を参照のこと)、それらはヒト6

インテグリンまたは 4 インテグリンのMALDI-TOFによって決定された異なるトリプシン分解ペプチド質量に完全に一致する(それぞれ配列番号5-51および3-4、およびそれぞれ図3AおよびBを参照のこと、図3Aで下線は図3B/配列番号5-51に表したペプチドに一致する)。

## 【0097】

バンドIIからは22の別々のトリプシン分解によるペプチド質量が得られ、それらは4インテグリンの異なるトリプシン分解ペプチド質量に完全に一致する(データ示さず)。このデータは64インテグリンヘテロダイマーが特異的にA3-アフィニティカラムから分離されたことを示している。

## 【0098】

## 【表4】

表4 ヒト $\alpha 6\beta 4$  インテグリンから由来するペプチド/ポリペプチドおよびその質量

配列番号	配列	測定質量	計算上の質量
5	LLVGAPR	838.568	838.551
6	ANRTGGLYSCDITARGPCTR	2226.131	2226.050
7	VVTCARHYEK	1262.637	1262.631
8	RQHVNTK	882.524	882.490
9	CYVLSQNLK	1152.618	1152.583
10	FGSCQQGVAATFTK	1501.706	1501.710
11	DFHYIVFGAPGTYNWK	1914.881	1914.917
12	DEITFVSGAPR	1191.625	1191.600
13	ANHSGAVVLLK	1108.600	1108.647
14	DGWQDIVIGAPQYFDR	1879.865	1879.897
15	DGEVGGAVYVYMNQGR	1842.811	1842.844
16	WNNVKPIR	1026.608	1026.584
17	NIGDINQDGYPDIAVGAPYDDLK	2520.213	2520.189
18	GISPYFGYSIAGNMDLDR	1975.913	1975.922
19	NSYPDVAVGSLSDSVTIFR	2026.992	2027.008
20	SRPVINIQK	1054.644	1054.637
21	LRPIPTASVEIQEPSSR	1993.066	1993.108
22	VNSLPEVLPILNSDEPK	1863.920	1864.006
23	TAHIDVHFLK	1180.665	1180.647
24	FSYLPIQK	995.601	995.556
25	DIALEITVTNSPSNPR	1726.866	1726.897
26	SEDEVGSLIEYEFR	1672.764	1672.770
27	VESKGLEKVTCEPOK	1731.866	1731.895

表4 (つづき)

28	REITEKQIDDRK	1644.792	1644.866
29	FSLFAER	869.476	869.452
30	YQTLNCSVNVNVCVNR	1954.003	1953.927
31	LNULDILMR	1150.644	1150.629
32	AFIDVTAAAENIR	1390.739	1390.733
33	LPNAGTQVR	955.523	955.532
34	VSVPTQDMRPEK	1386.727	1386.705
35	EPWPNSDPPFSFK	1547.730	1547.717
36	NVISLTEDVDEFR	1536.744	1536.754
37	TQDYPSVPTLVR	1375.718	1375.722
38	RGEVGIYQVQLR	1417.801	1417.791
39	ALEHVDGTHVCQLPEDQK	2075.965	2075.981
40	GNIHLKPSFSDGLK	1512.749	1512.817
41	MDAGIICDVCTCELQK	1928.901	1928.822
42	YEGQFCEYDNFQCPR	2012.795	2012.790
43	SCVQCQAWGTGEKKGR	1879.865	1879.890
44	DEDDCTYSYTMEGDGAPGNSTVL VHK	3103.229	3103.278
45	QEVEENLNEVYR	1521.779	1521.718
46	VAPGYTTLTADQDAR	1640.779	1640.791
47	VPLFIRPEDDDEK	1572.778	1572.790
48	DVVSFEQPEFSVSR	1625.758	1625.781
49	LLELQEVDSLRL	1427.760	1427.810
50	VCAYGAGGEGPYSSLVSCR	2060.883	2060.916
51	VLVDNPKNR	1054.644	1054.600

## &lt;材料および方法&gt;

## [腫瘍組織の可溶化]

A3抗原を発現しているヒト結腸癌組織は、スウェーデンの病院から供給され、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、外科用メスでスライスし、1% (v/v) ノニデット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、ベーリンガーマンハイム) を含有する冷却等調スクロース緩衝液 (0.25 M スクロース、10 mM KCl、1.5 M MgCl<sub>2</sub>、50 mM Tris-HCl 25 でpH7.4) の入った試験管に移した。

## 【0099】

組織をUltra-Turraxホモジナイザーでホモジナイズし、可溶化の

ため0 に放置した。細胞細片をとり除くために、可溶化調製物を11,000 rpm (Hettich centrifuge Universal 30 RF ローター)で遠心した。上清は更に108,000g、4 (Beckman Ultracentrifuge Ti-60 ローター)で遠心し、最終的に0.2µm Minisart プラス フィルター (Sartorius AG ゲッチンゲン ドイツ)でろ過した。

#### 【0100】

##### [組織抗原のアフィニティ精製]

製造会社の推奨する方法に従って、A3 scFv - SEAm9をNHS活性化HiTrap (登録商標)カラム (Pharmacia Biotech ウプサラ スウェーデン)とカップリングした。コントロールおよびプレカラムをC215 Fab - SEAm9とカップリングし、コントロール、プレカラム、およびカラムを連続的にセットアップした。すべてのカラムは前洗浄緩衝液 (0.2% NP-40を含有する20mM Tris HCl、4 でpH 7.5)で洗浄した。抽出物をカラムに0.1ml/minでロードし、フロースルーは再循環させた。そして、カラムを開始時の緩衝液で洗浄した。結合した抗原はpH 7.5から始まり11.0までのジエチルアミンのpH勾配で溶出した。2.5 mlの溶出液を集めて、75µlに濃縮した。精製を4 でAKTA FPLCシステム (Amersham Pharmacia Biotech, ウプサラ スウェーデン)により実施した。溶出タンパク質をSDS-PAGEおよび銀染色で分析した。それぞれのバンドは切り出され、トリプシン分解され、ペプチドの質量をProtana A/S製 (オーデンセ、デンマーク)のMALDI-TOF装置を使用して決定した。そして、ペプチド質量はSWISSPROTデータベースにおけるそれぞれのタンパク質の全てのトリプシン分解ペプチド質量をもちいたコンピューター検索において比較された (Protana A/S (オーデンセ、デンマーク)より提供されるサービス)。

#### 【0101】

##### <実験例6>

[A3 scFv - SEAm9は新規の 6 4インテグリンのエピトープを検

出する]

ヒト  $\alpha 6$  インテグリンおよび  $\alpha 4$  インテグリンに対する市販の抗体を、正常および悪性結腸切片上の  $\alpha 3$  と比較した。図6に示された反応性は、 $\alpha 3$  が結腸上皮(図6 [ i ] )、および腫瘍の悪性細胞(図6 [ i i ] )に限局されていることを示している。 $\alpha 6$  インテグリンに対する市販の抗体NKI - GoH3もまた正常結腸(図6 [ i i i ] )および結腸癌(図6 [ i v ] )と反応する。反応は結腸および悪性細胞の上皮細胞で認められたが(矢印)、血管壁(BV)、いくつかのストローマ領域(S)、そして粘膜筋(mm)においても観察された。市販のASC - 3抗  $\alpha 4$  インテグリン抗体で観察された反応は、抗  $\alpha 6$  抗体で見られたのと似ているが、正常結腸(v)および結腸癌(vi)双方でより弱かった。

#### 【0102】

<材料および方法>

[抗体]

$\alpha 3$  scFvはM fascicularisライブラリーより選択した。ここから得られたVHおよびVL遺伝子は制限酵素消化によって遊離され、 $\alpha 3$  scFv - SEAm9を作成するためにStaphylococcal エンテロトキシン AE キメラ変異体(D227A)と融合された。このことは、非特異的結合レベルが非常に低いことを示し、そして2次抗体による高感度検出を許容した。ASC - 3抗ヒト  $\alpha 4$  インテグリン抗体およびNKI - GoH3抗ヒト  $\alpha 6$  インテグリン抗体は、Becton Dickinson (コペンハーゲン、デンマーク)から購入した。

#### 【0103】

[免疫組織化学]

腫瘍および正常組織サンプルは、Lund病院の外科から得た。これらは、あらかじめ液体窒素で冷却したイソペンタン中でrate凍結(rate-frozen)した。サンプルは切片を作るまで-70で保存した。凍結切断後切片を一晩風乾し、冷却アセトン中で固定し、そしてアビジン/ビオチン(Vector Burlingame CA)でブロックした。そして、一次抗体をこの

切片に1時間添加した。

#### 【0104】

二次抗体と30分間インキュベーションした後、ストレプトアビジン-ビオチン/HRP (Dakopatts、コペンハーゲン、デンマーク)を更に30分間加えインキュベーションした。これらすべてのステップ間において、Tris pH7.6, 0.15M NaCl液での執拗な洗浄がなされた。ジアミノベンジジン(DAB)を色素原(chromogen)として使用し、切片を0.5%メチルグリーンでカウンター染色した。コントロールには非組織反応性FabおよびSEA-D227Aまたは一次抗体なしのものを含む。すべての抗体は5µg/mlの最終濃度で使用した。結果を、反応なし、弱い、中間あるいは強い、染色として表わした。

#### 【0105】

##### <実験例7>

[A3腫瘍関連抗原はキャプチャー(捕縛)エライザで6および4インテグリン抗体と反応した]

腫瘍粗抽出物またはA3アフィニティークロマトグラフィー(実施例5を参照)によって精製したA3抗原をキャプチャーエライザで分析した。4インテグリンに特異的な市販のASC-3抗体をキャプチャー抗体として使用し、それに異なる希釈の腫瘍粗抽出物をアプライした。これをA3 scFv-SEAm9でチェイスした。そして、結合A3 scFv-SEAm9を抗SEA-HRPで検出した(図7A)。図7Bでは、市販の抗6インテグリン抗体NKI-GoH3がA3アフィニティー精製された濃縮溶出物の異なる希釈物を捕縛するのに使用された。図7Aと同様に、捕縛タンパク質をA3 scFv-SEAm9でチェイスし、抗SEA-HRPで検出した。両方の実験で濃度依存性シグナルを検出した。これらの結果により、6-4インテグリンヘテロダイマーに対するA3の特異性が確認され、それは実施例5でA3アフィニティカラムから特異的に分離されることによっても示された。

#### 【0106】

##### <材料と方法>

市販抗体のNKI - GoH3またはASC - 3 ( B e c t o n D i c k i n s o n C o p e n h a g e n D e n m a r k ) の  $100\mu\text{l}$  が、E . I . A . / R . I . A . - プレート ( C o s t e r ) のウェルをコートするのに、 $0.05\text{M NaHCO}_3$ 、 $\text{pH } 9.6$  の条件で使用された。反応はオーバーナイト、4 で続けられ、その後、プレートをDPBS +  $0.05\%$  Tween 20 中で4回洗浄した。それからウェルをDPBS +  $0.05\%$  Tween 20 に溶かした $3\%$  ノンファットミルクパウダー  $200\mu\text{l}$  で室温 ( RT ) で1 - 2時間震盪させてブロックした。ウェルを再び上記のように洗浄し、DPBS +  $0.05\%$  Tween 20 に溶かした $3\%$  ノンファットミルクパウダー液で希釈した抗原抽出物  $100\mu\text{l}$  をアプライして、2時間RTで浸透した。ウェルを再び洗浄 (  $4\times$  DPBS +  $0.05\%$  Tween 20 ) し、その後DPBS +  $0.05\%$  Tween 20 に溶かした $3\%$  ノンファットミルクパウダー液に希釈した1次抗体  $100\mu\text{l}$  で2時間RTで震盪しながらインキュベーションした。ウェルを再び上記のように洗浄し、DPBS +  $0.05\%$  Tween 20 に溶かした $3\%$  非脂肪ミルクパウダー液に希釈した2次抗体  $100\mu\text{l}$  を加えて、1時間RTで震盪した。ウェルを再び上記のように洗浄し、 $100\mu\text{l}$  のペルオキシダーゼ基質 ( S i g m a F a s t O P D ペルオキシダーゼ基質錠剤セット P - 9187 ) を加え発色した。反応を、RT暗所で震盪させながら  $50\mu\text{l}$  の  $3\text{M H}_2\text{SO}_4$  を加えて止めるまで30分間続けた。吸光度を  $490\text{nm}$  で測定した。

#### 【0107】

##### <実験例8>

##### [A3 腫瘍抗原のウエスタンブロット解析]

A3 - アフィニティ精製の腫瘍抗原抽出物をSDS - PAGEで分離し、ウエスタンブロット解析のため膜にトランスファーした。抽出物を直接、または100、5分間熱して、またはメルカプトエタノール ( B M E ) 存在下で100、5分間熱してアプライした ( 図8 ) 。それから膜をA3 s c F v - S E A m 9 および抗S E A - H R P、または抗ヒト 6 インテグリン抗体あるいは抗ヒト 4 インテグリン抗体で検査 ( プローブ ) した。抗ヒト 4 インテグリン抗体は

膜上のいかなるタンパク質とも反応しなかった(図8〔ii〕)。抗ヒト 6 インテグリン抗体は、A3アフィニティ精製した腫瘍抗原抽出物の中にある、みかけ上の分子量90 - 140 kDaの主要なバンドと反応した(図8〔iii〕)。同じ分子種はA3 scFv - SEAm9によっても検出でき、それは加熱処理後でも検出されるが還元条件下(BME存在下)ではるかに弱かった(図8〔i〕)。90 - 140 kDaの範囲に検出された主要バンドは、ペプチドマッピングで 6 インテグリンおよび 4 インテグリンを含有することが分かった実施例5のバンドに相当する。

#### 【0108】

##### <材料と方法>

ASC-3抗ヒト 4 インテグリン抗体およびNKI-GoH3抗ヒト 6 インテグリン抗体は、Becton Dickinson (コペンハーゲン、デンマーク)から購入した。サンプルは0.25M tris-glycine pH 8.9および0.1% SDS中で、上層ゲルは100 Vで、そして分離ゲルでは170 VのSDS-PAGEで分離した。分子量マーカー(Biorad broad Range, Biorad)をすべてのゲルに含めた。分離したサンプルはトランスファー溶液(10mM Tris base、2M グリシン、40%(v/v)メタノール)中で100 V、1時間でニトロセルロース(バイオラッド)にトランスファーした。膜を5%(w/v)BSA/TBSで少なくとも2時間、4 でブロックし、それから5%BSA/TBS/0.2%アザイド中に希釈された適当な抗体とともにインキュベーションした。この反応は少なくとも2時間RTで続けられ、その後、膜をTBS-Tで執拗に洗浄した。結合抗体は膜を1時間、5% ミルクパウダーを含有するTBS-Tに希釈したHRP結合抗体とインキュベーションすることで検出した。それから、膜を高感度化学発光検出試薬(Renaissance(登録商標) NEN™ Life Science Products, Boston MA)と1分間インキュベーションし、1時間以上フィルムに感光させた。

#### 【0109】

##### 【参考文献】

参考文献

1. DeCosse JJ, Tsioulis GJ, Jacobson JS. Colorectal cancer: detection, treatment, and rehabilitation. *CA Cancer J Clin* 1994; 44: 27-42.
2. Riethmuller G, et al. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1788-1794.
3. Kuhn JA, Thomas G. Monoclonal antibodies and colorectal carcinoma: a clinical review of diagnostic applications. *Cancer Invest* 1994; 12: 314-323.
4. Tordsson J, et al. Efficient selection of scFv antibody phage by adsorption to in situ expressed antigens in tissue sections. *J Immunol Methods* 1997; 210: 11-23.
5. Aujame L, Geoffroy F, Sodoyer R. High affinity human antibodies by phage display. *Hum Antibodies* 1997; 8: 155-168.
6. Clark RK, Trainer DL, Bailey DS, Greig RG. Immunohistochemical analysis of antiserum from rhesus monkeys immunized with human colon carcinoma. *Cancer Res* 1989; 49: 3656-3661.
7. Lewis AP, et al. Cloning and sequence analysis of kappa and gamma cynomolgus monkey immunoglobulin cDNAs. *Dev Comp Immunol* 1993; 17: 549-560.
8. Brodin TN, et al. Man-made superantigens: Tumor-selective agents for T-cell-based therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 31: 131-142.
9. Dohlsten M, et al. Monoclonal antibody-superantigen fusion proteins: tumor-specific agents for T-cell-based tumor therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8945-8949.
10. Liu C, et al. Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8618-8623.

【0110】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Active Biotech AB

&lt;120&gt; Novel compounds

&lt;130&gt; 2002163

&lt;150&gt; SE 9903895-2

&lt;151&gt; 1999-10-28

&lt;160&gt; 51

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 747

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Macaca fascicularis

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(747)

<223> Coding sequence VL (1-109) - modified Huston  
linker (110-127) - VH (128-249)

&lt;400&gt; 1

tct tct gag ctg act cag ggc cct gca ttg tct gtg gcc ttg gga cat	48
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Gly Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Gly His	
1 5 10 15	
aca gtc agg atg acc tgc caa gga gac agc ctc aaa acc tat tat gca	96
Thr Val Arg Met Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Lys Thr Tyr Tyr Ala	
20 25 30	
agc tgg tac cag cag aag cca ggc cag gtc cct gtg ctg gtc atc tat	144
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Val Leu Val Ile Tyr	
35 40 45	
ggt aac aac tac cgg ccc tca ggg atc cca ggc cga ttc tct ggc tcc	192
Gly Asn Asn Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser	
50 55 60	
tgg tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act gcg gct cag gtg gaa	240
Trp Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Ala Ala Gln Val Glu	
65 70 75 80	
gat gag gct gac tat tac tgt aac tcc tgg gac agc agc ggt acc cat	288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Trp Asp Ser Ser Gly Thr His	
85 90 95	
ccg gta ttc ggc gga ggg acc cgg gtg acc gtc cta ggt caa gcc aac	336
Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly Gln Ala Asn	
100 105 110	
ggt gaa ggc ggc tct ggt ggc ggg gga tcc gga ggc ggc ggt tct gag	384
Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu	
115 120 125	

gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta aag cct ggg ggg tcc 432  
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser  
 130 135 140

ctg aga ctc tct tgt gta gcc tct ggg tcc atc ttc agt agc tct gtt 480  
 Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Ser Val  
 145 150 155 160

atg cac tgg gtc cgc cag gct cca gga aag ggt ctg gag tgg gtc tca 528  
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
 165 170 175

gtt att agt gaa aat ggg cgt acc att aac tac gca gac tct gtg aag 576  
 Val Ile Ser Glu Asn Gly Arg Thr Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 180 185 190

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg ttt ctg 624  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe Leu  
 195 200 205

cag atg aac agc ctg aca ggc gag gac acg gcc gtc tat tac tgt agt 672  
 Gln Met Asn Ser Leu Thr Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser  
 210 215 220

aga gag ggg gga cct gga aca acg tcc aac cgg ctc gat gcc tgg ggc 720  
 Arg Glu Gly Gly Pro Gly Thr Thr Ser Asn Arg Leu Asp Ala Trp Gly  
 225 230 235 240

ccg gga gtc ctg gtc acc gtt tcc tca 747  
 Pro Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser  
 245

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 249

&lt;212&gt; PRT

<213> *Macaca fascicularis*<223> Coding sequence VL (1-109) - modified Huston  
 linker (110-127) - VH (128-249)

&lt;400&gt; 2

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

Thr Val Arg Met Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Lys Thr Tyr Tyr Ala  
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Gly Asn Asn Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Trp Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Ala Ala Gln Val Glu  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Trp Asp Ser Ser Gly Thr His  
 85 90 95

Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly Gln Ala Asn  
 100 105 110

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

<210> 3  
 <211> 1073  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> TA6-Human integrin alpha-6A

<400> 3  
 Met Ala Ala Ala Gly Gln Leu Cys Leu Leu Tyr Leu Ser Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Arg Leu Gly Ala Ala Phe Asn Leu Asp Thr Arg Glu Asp Asn  
 20 25 30  
 Val Ile Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Gly Ser Leu Phe Gly Phe Ser Leu  
 35 40 45  
 Ala Met His Trp Gln Leu Gln Pro Glu Asp Lys Arg Leu Leu Leu Val  
 50 55 60  
 Gly Ala Pro Arg Gly Glu Ala Leu Pro Leu Gln Arg Ala Asn Arg Thr  
 65 70 75 80  
 Gly Gly Leu Tyr Ser Cys Asp Ile Thr Ala Arg Gly Pro Cys Thr Arg  
 85 90 95  
 Ile Glu Phe Asp Asn Asp Ala Asp Pro Thr Ser Glu Ser Lys Glu Asp  
 100 105 110  
 Gln Trp Met Gly Val Thr Val Gln Ser Gln Gly Pro Gly Gly Lys Val  
 115 120 125

Val Thr Cys Ala His Arg Tyr Glu Lys Arg Gln His Val Asn Thr Lys  
 130 135 140  
 Gln Glu Ser Arg Asp Ile Phe Gly Arg Cys Tyr Val Leu Ser Gln Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Arg Ile Glu Asp Asp Met Asp Gly Gly Asp Trp Ser Phe Cys Asp  
 165 170 175  
 Gly Arg Leu Arg Gly His Glu Lys Phe Gly Ser Cys Gln Gln Gly Val  
 180 185 190  
 Ala Ala Thr Phe Thr Lys Asp Phe His Tyr Ile Val Phe Gly Ala Pro  
 195 200 205  
 Gly Thr Tyr Asn Trp Lys Gly Ile Val Arg Val Glu Gln Lys Asn Asn  
 210 215 220  
 Thr Phe Phe Asp Met Asn Ile Phe Glu Asp Gly Pro Tyr Glu Val Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Glu Thr Glu His Asp Glu Ser Leu Val Pro Val Pro Ala Asn Ser  
 245 250 255  
 Tyr Leu Gly Phe Ser Leu Asp Ser Gly Lys Gly Ile Val Ser Lys Asp  
 260 265 270  
 Glu Ile Thr Phe Val Ser Gly Ala Pro Arg Ala Asn His Ser Gly Ala  
 275 280 285  
 Val Val Leu Leu Lys Arg Asp Met Lys Ser Ala His Leu Leu Pro Glu  
 290 295 300  
 His Ile Phe Asp Gly Glu Gly Leu Ala Ser Ser Phe Gly Tyr Asp Val  
 305 310 315 320  
 Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Asp Gly Trp Gln Asp Ile Val Ile Gly  
 325 330 335  
 Ala Pro Gln Tyr Phe Asp Arg Asp Gly Glu Val Gly Gly Ala Val Tyr  
 340 345 350  
 Val Tyr Met Asn Gln Gln Gly Arg Trp Asn Asn Val Lys Pro Ile Arg  
 355 360 365  
 Leu Asn Gly Thr Lys Asp Ser Met Phe Gly Ile Ala Val Lys Asn Ile  
 370 375 380  
 Gly Asp Ile Asn Gln Asp Gly Tyr Pro Asp Ile Ala Val Gly Ala Pro  
 385 390 395 400  
 Tyr Asp Asp Leu Gly Lys Val Phe Ile Tyr His Gly Ser Ala Asn Gly  
 405 410 415  
 Ile Asn Thr Lys Pro Thr Gln Val Leu Lys Gly Ile Ser Pro Tyr Phe  
 420 425 430  
 Gly Tyr Ser Ile Ala Gly Asn Met Asp Leu Asp Arg Asn Ser Tyr Pro  
 435 440 445

Asp Val Ala Val Gly Ser Leu Ser Asp Ser Val Thr Ile Phe Arg Ser  
 450 455 460  
 Arg Pro Val Ile Asn Ile Gln Lys Thr Ile Thr Val Thr Pro Asn Arg  
 465 470 475 480  
 Ile Asp Leu Arg Gln Lys Thr Ala Cys Gly Ala Pro Ser Gly Ile Cys  
 485 490 495  
 Leu Gln Val Lys Ser Cys Phe Glu Tyr Thr Ala Asn Pro Ala Gly Tyr  
 500 505 510  
 Asn Pro Ser Ile Ser Ile Val Gly Thr Leu Glu Ala Glu Lys Glu Arg  
 515 520 525  
 Arg Lys Ser Gly Leu Ser Ser Arg Val Gln Phe Arg Asn Gln Gly Ser  
 530 535 540  
 Glu Pro Lys Tyr Thr Gln Glu Leu Thr Leu Lys Arg Gln Lys Gln Lys  
 545 550 555 560  
 Val Cys Met Glu Glu Thr Leu Trp Leu Gln Asp Asn Ile Arg Asp Lys  
 565 570 575  
 Leu Arg Pro Ile Pro Ile Thr Ala Ser Val Glu Ile Gln Glu Pro Ser  
 580 585 590  
 Ser Arg Arg Arg Val Asn Ser Leu Pro Glu Val Leu Pro Ile Leu Asn  
 595 600 605  
 Ser Asp Glu Pro Lys Thr Ala His Ile Asp Val His Phe Leu Lys Glu  
 610 615 620  
 Gly Cys Gly Asp Asp Asn Val Cys Asn Ser Asn Leu Lys Leu Glu Tyr  
 625 630 635 640  
 Lys Phe Cys Thr Arg Glu Gly Asn Gln Asp Lys Phe Ser Tyr Leu Pro  
 645 650 655  
 Ile Gln Lys Gly Val Pro Glu Leu Val Leu Lys Asp Gln Lys Asp Ile  
 660 665 670  
 Ala Leu Glu Ile Thr Val Thr Asn Ser Pro Ser Asn Pro Arg Asn Pro  
 675 680 685  
 Thr Lys Asp Gly Asp Asp Ala His Glu Ala Lys Leu Ile Ala Thr Phe  
 690 695 700  
 Pro Asp Thr Leu Thr Tyr Ser Ala Tyr Arg Glu Leu Arg Ala Phe Pro  
 705 710 715 720  
 Glu Lys Gln Leu Ser Cys Val Ala Asn Gln Asn Gly Ser Gln Ala Asp  
 725 730 735  
 Cys Glu Leu Gly Asn Pro Phe Lys Arg Asn Ser Asn Val Thr Phe Tyr  
 740 745 750  
 Leu Val Leu Ser Thr Thr Glu Val Thr Phe Asp Thr Pro Asp Leu Asp  
 755 760 765

Ile Asn Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Asn Gln Asp Asn Leu Ala Pro  
 770 775 780  
 Ile Thr Ala Lys Ala Lys Val Val Ile Glu Leu Leu Leu Ser Val Ser  
 785 790 795 800  
 Gly Val Ala Lys Pro Ser Gln Val Tyr Phe Gly Gly Thr Val Val Gly  
 805 810 815  
 Glu Gln Ala Met Lys Ser Glu Asp Glu Val Gly Ser Leu Ile Glu Tyr  
 820 825 830  
 Glu Phe Arg Val Ile Asn Leu Gly Lys Pro Leu Thr Asn Leu Gly Thr  
 835 840 845  
 Ala Thr Leu Asn Ile Gln Trp Pro Lys Glu Ile Ser Asn Gly Lys Trp  
 850 855 860  
 Leu Leu Tyr Leu Val Lys Val Glu Ser Lys Gly Leu Glu Lys Val Thr  
 865 870 875 880  
 Cys Glu Pro Gln Lys Glu Ile Asn Ser Leu Asn Leu Thr Glu Ser His  
 885 890 895  
 Asn Ser Arg Lys Lys Arg Glu Ile Thr Glu Lys Gln Ile Asp Asp Asn  
 900 905 910  
 Arg Lys Phe Ser Leu Phe Ala Glu Arg Lys Tyr Gln Thr Leu Asn Cys  
 915 920 925  
 Ser Val Asn Val Asn Cys Val Asn Ile Arg Cys Pro Leu Arg Gly Leu  
 930 935 940  
 Asp Ser Lys Ala Ser Leu Ile Leu Arg Ser Arg Leu Trp Asn Ser Thr  
 945 950 955 960  
 Phe Leu Glu Glu Tyr Ser Lys Leu Asn Tyr Leu Asp Ile Leu Met Arg  
 965 970 975  
 Ala Phe Ile Asp Val Thr Ala Ala Ala Glu Asn Ile Arg Leu Pro Asn  
 980 985 990  
 Ala Gly Thr Gln Val Arg Val Thr Val Phe Pro Ser Lys Thr Val Ala  
 995 1000 1005  
 Gln Tyr Ser Gly Val Pro Trp Trp Ile Ile Leu Val Ala Ile Leu Ala  
 1010 1015 1020  
 Gly Ile Leu Met Leu Ala Leu Leu Val Phe Ile Leu Trp Lys Cys Gly  
 1025 1030 1035 1040  
 Phe Phe Lys Arg Asn Lys Lys Asp His Tyr Asp Ala Thr Tyr His Lys  
 1045 1050 1055  
 Ala Glu Ile His Ala Gln Pro Ser Asp Lys Glu Arg Leu Thr Ser Asp  
 1060 1065 1070  
 Ala

<210> 4  
 <211> 1875  
 <212> PRT  
 <213> Human  
  
 <223> Integrin beta-4 (precursor)  
  
 <400> 4  
 Met Ala Gly Pro Arg Pro Ser Pro Trp Ala Arg Leu Leu Leu Ala Ala  
   1                  5                  10                  15  
  
 Leu Ile Ser Val Ser Leu Ser Gly Thr Leu Ala Asn Arg Cys Lys Lys  
           20                  25                  30  
  
 Ala Pro Val Lys Ser Cys Thr Glu Cys Val Arg Val Asp Lys Asp Cys  
           35                  40                  45  
  
 Ala Tyr Cys Thr Asp Glu Met Phe Arg Asp Arg Arg Cys Asn Thr Gln  
           50                  55                  60  
  
 Ala Glu Leu Leu Ala Ala Gly Cys Gln Arg Glu Ser Ile Val Val Met  
   65                  70                  75                  80  
  
 Glu Ser Ser Phe Gln Ile Thr Glu Glu Thr Gln Ile Asp Thr Thr Leu  
           85                  90                  95  
  
 Arg Arg Ser Gln Met Ser Pro Gln Gly Leu Arg Val Arg Leu Arg Pro  
           100                  105                  110  
  
 Gly Glu Glu Arg His Phe Glu Leu Glu Val Phe Glu Pro Leu Glu Ser  
   115                  120                  125  
  
 Pro Val Asp Leu Tyr Ile Leu Met Asp Phe Ser Asn Ser Met Ser Asp  
   130                  135                  140  
  
 Asp Leu Asp Asn Leu Lys Lys Met Gly Gln Asn Leu Ala Arg Val Leu  
   145                  150                  155                  160  
  
 Ser Gln Leu Thr Ser Asp Tyr Thr Ile Gly Phe Gly Lys Phe Val Asp  
           165                  170                  175  
  
 Lys Val Ser Val Pro Gln Thr Asp Met Arg Pro Glu Lys Leu Lys Glu  
           180                  185                  190  
  
 Pro Trp Pro Asn Ser Asp Pro Pro Phe Ser Phe Lys Asn Val Ile Ser  
   195                  200                  205  
  
 Leu Thr Glu Asp Val Asp Glu Phe Arg Asn Lys Leu Gln Gly Glu Arg  
   210                  215                  220  
  
 Ile Ser Gly Asn Leu Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Leu  
   225                  230                  235                  240  
  
 Gln Thr Ala Val Cys Thr Arg Asp Ile Gly Trp Arg Pro Asp Ser Thr  
           245                  250                  255  
  
 His Leu Leu Val Phe Ser Thr Glu Ser Ala Phe His Tyr Glu Ala Asp  
           260                  265                  270  
  
 Gly Ala Asn Val Leu Ala Gly Ile Met Ser Arg Asn Asp Glu Arg Cys  
   275                  280                  285

His Leu Asp Thr Thr Gly Thr Tyr Thr Gln Tyr Arg Thr Gln Asp Tyr  
 290 295 300

Pro Ser Val Pro Thr Leu Val Arg Leu Leu Ala Lys His Asn Ile Ile  
 305 310 315

Pro Ile Phe Ala Val Thr Asn Tyr Ser Tyr Ser Tyr Tyr Glu Lys Leu  
 325 330 335

His Thr Tyr Phe Pro Val Ser Ser Leu Gly Val Leu Gln Glu Asp Ser  
 340 345 350

Ser Asn Ile Val Glu Leu Leu Glu Glu Ala Phe Asn Arg Ile Arg Ser  
 355 360 365

Asn Leu Asp Ile Arg Ala Leu Asp Ser Pro Arg Gly Leu Arg Thr Glu  
 370 375 380

Val Thr Ser Lys Met Phe Gln Lys Thr Arg Thr Gly Ser Phe His Ile  
 385 390 395 400

Arg Arg Gly Glu Val Gly Ile Tyr Gln Val Gln Leu Arg Ala Leu Glu  
 405 410 415

His Val Asp Gly Thr His Val Cys Gln Leu Pro Glu Asp Gln Lys Gly  
 420 425 430

Asn Ile His Leu Lys Pro Ser Phe Ser Asp Gly Leu Lys Met Asp Ala  
 435 440 445

Gly Ile Ile Cys Asp Val Cys Thr Cys Glu Leu Gln Lys Glu Val Arg  
 450 455 460

Ser Ala Arg Cys Ser Phe Asn Gly Asp Phe Val Cys Gly Gln Cys Val  
 465 470 475 480

Cys Ser Glu Gly Trp Ser Gly Gln Thr Cys Asn Cys Ser Thr Gly Ser  
 485 490 495

Leu Ser Asp Ile Gln Pro Cys Leu Arg Glu Gly Glu Asp Lys Pro Cys  
 500 505 510

Ser Gly Arg Gly Glu Cys Gln Cys Gly His Cys Val Cys Tyr Gly Glu  
 515 520 525

Gly Arg Tyr Glu Gly Gln Phe Cys Glu Tyr Asp Asn Phe Gln Cys Pro  
 530 535 540

Arg Thr Ser Gly Phe Leu Cys Asn Asp Arg Gly Arg Cys Ser Met Gly  
 545 550 555 560

Gln Cys Val Cys Glu Pro Gly Trp Thr Gly Pro Ser Cys Asp Cys Pro  
 565 570 575

Leu Ser Asn Ala Thr Cys Ile Asp Ser Asn Gly Gly Ile Cys Asn Gly  
 580 585 590

Arg Gly His Cys Glu Cys Gly Arg Cys His Cys His Gln Gln Ser Leu  
 595 600 605

Tyr Thr Asp Thr Ile Cys Glu Ile Asn Tyr Ser Ala Ile His Pro Gly  
 610 615 620  
 Leu Cys Glu Asp Leu Arg Ser Cys Val Gln Cys Gln Ala Trp Gly Thr  
 625 630 635 640  
 Gly Glu Lys Lys Gly Arg Thr Cys Glu Glu Cys Asn Phe Lys Val Lys  
 645 650 655  
 Met Val Asp Glu Leu Lys Arg Ala Glu Glu Val Val Val Arg Cys Ser  
 660 665 670  
 Phe Arg Asp Glu Asp Asp Asp Cys Thr Tyr Ser Tyr Thr Met Glu Gly  
 675 680 685  
 Asp Gly Ala Pro Gly Pro Asn Ser Thr Val Leu Val His Lys Lys Lys  
 690 695 700  
 Asp Cys Pro Pro Gly Ser Phe Trp Trp Leu Ile Pro Leu Leu Leu Leu  
 705 710 715 720  
 Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Cys Trp Lys Tyr Cys  
 725 730 735  
 Ala Cys Cys Lys Ala Cys Leu Ala Leu Leu Pro Cys Cys Asn Arg Gly  
 740 745 750  
 His Met Val Gly Phe Lys Glu Asp His Tyr Met Leu Arg Glu Asn Leu  
 755 760 765  
 Met Ala Ser Asp His Leu Asp Thr Pro Met Leu Arg Ser Gly Asn Leu  
 770 775 780  
 Lys Gly Arg Asp Val Val Arg Trp Lys Val Thr Asn Asn Met Gln Arg  
 785 790 795 800  
 Pro Gly Phe Ala Thr His Ala Ala Ser Ile Asn Pro Thr Glu Leu Val  
 805 810 815  
 Pro Tyr Gly Leu Ser Leu Arg Leu Ala Arg Leu Cys Thr Glu Asn Leu  
 820 825 830  
 Leu Lys Pro Asp Thr Arg Glu Cys Ala Gln Leu Arg Gln Glu Val Glu  
 835 840 845  
 Glu Asn Leu Asn Glu Val Tyr Arg Gln Ile Ser Gly Val His Lys Leu  
 850 855 860  
 Gln Gln Thr Lys Phe Arg Gln Gln Pro Asn Ala Gly Lys Lys Gln Asp  
 865 870 875 880  
 His Thr Ile Val Asp Thr Val Leu Met Ala Pro Arg Ser Ala Lys Pro  
 885 890 895  
 Ala Leu Leu Lys Leu Thr Glu Lys Gln Val Glu Gln Arg Ala Phe His  
 900 905 910  
 Asp Leu Lys Val Ala Pro Gly Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Asp Gln Asp  
 915 920 925

Ala Arg Gly Met Val Glu Phe Gln Glu Gly Val Glu Leu Val Asp Val  
930 935 940

Arg Val Pro Leu Phe Ile Arg Pro Glu Asp Asp Asp Glu Lys Gln Leu  
945 950 955 960

Leu Val Glu Ala Ile Asp Val Pro Ala Gly Thr Ala Thr Leu Gly Arg  
965 970 975

Arg Leu Val Asn Ile Thr Ile Ile Lys Glu Gln Ala Arg Asp Val Val  
980 985 990

Ser Phe Glu Gln Pro Glu Phe Ser Val Ser Arg Gly Asp Gln Val Ala  
995 1000 1005

Arg Ile Pro Val Ile Arg Arg Val Leu Asp Gly Gly Lys Ser Gln Val  
1010 1015 1020

Ser Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Thr Ala Gln Gly Asn Arg Asp Tyr Ile  
1025 1030 1035 1040

Pro Val Glu Gly Glu Leu Leu Phe Gln Pro Gly Glu Ala Trp Lys Glu  
1045 1050 1055

Leu Gln Val Lys Leu Leu Glu Leu Gln Glu Val Asp Ser Leu Leu Arg  
1060 1065 1070

Gly Arg Gln Val Arg Arg Phe His Val Gln Leu Ser Asn Pro Lys Phe  
1075 1080 1085

Gly Ala His Leu Gly Gln Pro His Ser Thr Thr Ile Ile Ile Arg Asp  
1090 1095 1100

Pro Asp Glu Leu Asp Arg Ser Phe Thr Ser Gln Met Leu Ser Ser Gln  
1105 1110 1115 1120

Pro Pro Pro His Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gln Asn Pro Asn Ala Lys  
1125 1130 1135

Ala Ala Gly Ser Arg Lys Ile His Phe Asn Trp Leu Pro Pro Ser Gly  
1140 1145 1150

Lys Pro Met Gly Tyr Arg Val Lys Tyr Trp Ile Gln Gly Asp Ser Glu  
1155 1160 1165

Ser Glu Ala His Leu Leu Asp Ser Lys Val Pro Ser Val Glu Leu Thr  
1170 1175 1180

Asn Leu Tyr Pro Tyr Cys Asp Tyr Glu Met Lys Val Cys Ala Tyr Gly  
1185 1190 1195 1200

Ala Gln Gly Glu Gly Pro Tyr Ser Ser Leu Val Ser Cys Arg Thr His  
1205 1210 1215

Gln Glu Val Pro Ser Glu Pro Gly Arg Leu Ala Phe Asn Val Val Ser  
1220 1225 1230

Ser Thr Val Thr Gln Leu Ser Trp Ala Glu Pro Ala Glu Thr Asn Gly  
1235 1240 1245

Glu Ile Thr Ala Tyr Glu Val Cys Tyr Gly Leu Val Asn Asp Asp Asn  
 1250 1255 1260  
 Arg Pro Ile Gly Pro Met Lys Lys Val Leu Val Asp Asn Pro Lys Asn  
 1265 1270 1275 1280  
 Arg Met Leu Leu Ile Glu Asn Leu Arg Glu Ser Gln Pro Tyr Arg Tyr  
 1285 1290 1295  
 Thr Val Lys Ala Arg Asn Gly Ala Gly Trp Gly Pro Glu Arg Glu Ala  
 1300 1305 1310  
 Ile Ile Asn Leu Ala Thr Gln Pro Lys Arg Pro Met Ser Ile Pro Ile  
 1315 1320 1325  
 Ile Pro Asp Ile Pro Ile Val Asp Ala Gln Ser Gly Glu Asp Tyr Asp  
 1330 1335 1340  
 Ser Phe Leu Met Tyr Ser Asp Asp Val Leu Arg Ser Pro Ser Gly Ser  
 1345 1350 1355 1360  
 Gln Arg Pro Ser Val Ser Asp Asp Thr Gly Cys Gly Trp Lys Phe Glu  
 1365 1370 1375  
 Pro Leu Leu Gly Glu Glu Leu Asp Leu Arg Arg Val Thr Trp Arg Leu  
 1380 1385 1390  
 Pro Pro Glu Leu Ile Pro Arg Leu Ser Ala Ser Ser Gly Arg Ser Ser  
 1395 1400 1405  
 Asp Ala Glu Ala Pro Thr Ala Pro Arg Thr Thr Ala Ala Arg Ala Gly  
 1410 1415 1420  
 Arg Ala Ala Ala Val Pro Arg Ser Ala Thr Pro Gly Pro Pro Gly Glu  
 1425 1430 1435 1440  
 His Leu Val Asn Gly Arg Met Asp Phe Ala Phe Pro Gly Ser Thr Asn  
 1445 1450 1455  
 Ser Leu His Arg Met Thr Thr Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Gly Thr His  
 1460 1465 1470  
 Leu Ser Pro His Val Pro His Arg Val Leu Ser Thr Ser Ser Thr Leu  
 1475 1480 1485  
 Thr Arg Asp Tyr Asn Ser Leu Thr Arg Ser Glu His Ser His Ser Thr  
 1490 1495 1500  
 Thr Leu Pro Arg Asp Tyr Ser Thr Leu Thr Ser Val Ser Ser His Gly  
 1505 1510 1515 1520  
 Leu Pro Pro Ile Trp Glu His Gly Arg Ser Arg Leu Pro Leu Ser Trp  
 1525 1530 1535  
 Ala Leu Gly Ser Arg Ser Arg Ala Gln Met Lys Gly Phe Pro Pro Ser  
 1540 1545 1550  
 Arg Gly Pro Arg Asp Ser Ile Ile Leu Ala Gly Arg Pro Ala Ala Pro  
 1555 1560 1565

Ser Trp Gly Pro Asp Ser Arg Leu Thr Ala Gly Val Pro Asp Thr Pro  
 1570 1575 1580

Thr Arg Leu Val Phe Ser Ala Leu Gly Pro Thr Ser Leu Arg Val Ser  
 1585 1590 1595 1600

Trp Gln Glu Pro Arg Cys Glu Arg Pro Leu Gln Gly Tyr Ser Val Glu  
 1605 1610 1615

Tyr Gln Leu Leu Asn Gly Gly Glu Leu His Arg Leu Asn Ile Pro Asn  
 1620 1625 1630

Pro Ala Gln Thr Ser Val Val Val Glu Asp Leu Leu Pro Asn His Ser  
 1635 1640 1645

Tyr Val Phe Arg Val Arg Ala Gln Ser Gln Glu Gly Trp Gly Arg Glu  
 1650 1655 1660

Arg Glu Gly Val Ile Thr Ile Glu Ser Gln Val His Pro Gln Ser Pro  
 1665 1670 1675 1680

Leu Cys Pro Leu Pro Gly Ser Ala Phe Thr Leu Ser Thr Pro Ser Ala  
 1685 1690 1695

Pro Gly Pro Leu Val Phe Thr Ala Leu Ser Pro Asp Ser Leu Gln Leu  
 1700 1705 1710

Ser Trp Glu Arg Pro Arg Arg Pro Asn Gly Asp Ile Val Gly Tyr Leu  
 1715 1720 1725

Val Thr Cys Glu Met Ala Gln Gly Gly Gly Pro Ala Thr Ala Phe Arg  
 1730 1735 1740

Val Asp Gly Asp Ser Pro Glu Ser Arg Leu Thr Val Pro Gly Leu Ser  
 1745 1750 1755 1760

Glu Asn Val Pro Tyr Lys Phe Lys Val Gln Ala Arg Thr Thr Glu Gly  
 1765 1770 1775

Phe Gly Pro Glu Arg Glu Gly Ile Ile Thr Ile Glu Ser Gln Asp Gly  
 1780 1785 1790

Gly Pro Phe Pro Gln Leu Gly Ser Arg Ala Gly Leu Phe Gln His Pro  
 1795 1800 1805

Leu Gln Ser Glu Tyr Ser Ser Ile Thr Thr Thr His Thr Ser Ala Thr  
 1810 1815 1820

Glu Pro Phe Leu Val Asp Gly Pro Thr Leu Gly Ala Gln His Leu Glu  
 1825 1830 1835 1840

Ala Gly Gly Ser Leu Thr Arg His Val Thr Gln Glu Phe Val Ser Arg  
 1845 1850 1855

Thr Leu Thr Thr Ser Gly Thr Leu Ser Thr His Met Asp Gln Gln Phe  
 1860 1865 1870

Phe Gln Thr  
 1875

<210> 5  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Human

<223> Amino acids 61-68 of SEQ ID NO: 3

<400> 5  
Leu Leu Leu Val Gly Ala Pro Arg  
1 5

<210> 6  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Human

<223> Amino acids 77-96 of SEQ ID NO: 3

<400> 6  
Ala Asn Arg Thr Gly Gly Leu Tyr Ser Cys Asp Ile Thr Ala Arg Gly  
1 5 10 15

Pro Cys Thr Arg  
20

<210> 7  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Human

<223> Amino acids 128-137 of SEQ ID NO: 3

<400> 7  
Val Val Thr Cys Ala His Arg Tyr Glu Lys  
1 5 10

<210> 8  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Human

<223> Amino acids 138-144 of SEQ ID NO: 3

<400> 8  
Arg Gln His Val Asn Thr Lys  
1 5

<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Human

<223> Amino acids 154-162 of SEQ ID NO: 3

<400> 9  
Cys Tyr Val Leu Ser Gln Asn Leu Arg  
1 5

<210> 10  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 185-198 of SEQ ID NO: 3

<400> 10  
 Phe Gly Ser Cys Gln Gln Gly Val Ala Ala Thr Phe Thr Lys  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 199-214 of SEQ ID NO: 3

<400> 11  
 Asp Phe His Tyr Ile Val Phe Gly Ala Pro Gly Thr Tyr Asn Trp Lys  
 1 5 10 15

<210> 12  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 272-282 of SEQ ID NO: 3

<400> 12  
 Asp Glu Ile Thr Phe Val Ser Gly Ala Pro Arg  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 283-293 of SEQ ID NO: 3

<400> 13  
 Ala Asn His Ser Gly Ala Val Val Leu Leu Lys  
 1 5 10

<210> 14  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 328-343 of SEQ ID NO: 3

<400> 14  
 Asp Gly Trp Gln Asp Ile Val Ile Gly Ala Pro Gln Tyr Phe Asp Arg  
 1 5 10 15

<210> 15  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 344-360 of SEQ ID NO: 3

<400> 15  
 Asp Gly Glu Val Gly Gly Ala Val Tyr Val Tyr Met Asn Gln Gln Gly  
 1 5 10 15

Arg

<210> 16  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 361-368 of SEQ ID NO: 3

<400> 16  
 Trp Asn Asn Val Lys Pro Ile Arg  
 1 5

<210> 17  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 383-406 of SEQ ID NO: 3

<400> 17  
 Asn Ile Gly Asp Ile Asn Gln Asp Gly Tyr Pro Asp Ile Ala Val Gly  
 1 5 10 15

Ala Pro Tyr Asp Asp Leu Gly Lys  
 20

<210> 18  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 427-444 of SEQ ID NO: 3

<400> 18  
 Gly Ile Ser Pro Tyr Phe Gly Tyr Ser Ile Ala Gly Asn Met Asp Leu  
 1 5 10 15

Asp Arg

<210> 19  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 445-463 of SEQ ID NO: 3

<400> 19  
 Asn Ser Tyr Pro Asp Val Ala Val Gly Ser Leu Ser Asp Ser Val Thr  
 1 5 10 15

Ile Phe Arg

<210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 464-472 of SEQ ID NO: 3

<400> 20  
 Ser Arg Pro Val Ile Asn Ile Gln Lys  
 1 5

<210> 21  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 577-594 of SEQ ID NO: 3

<400> 21  
 Leu Arg Pro Ile Pro Ile Thr Ala Ser Val Glu Ile Gln Glu Pro Ser  
 1 5 10 15

Ser Arg

<210> 22  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 597-613 of SEQ ID NO: 3

<400> 22  
 Val Asn Ser Leu Pro Glu Val Leu Pro Ile Leu Asn Ser Asp Glu Pro  
 1 5 10 15

Lys

<210> 23  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Human

<223> Amino acids 614-623 of SEQ ID NO: 3

<400> 23  
Thr Ala His Ile Asp Val His Phe Leu Lys  
1 5 10

<210> 24  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Human

<223> Amino acids 652-659 of SEQ ID NO: 3

<400> 24  
Phe Ser Tyr Leu Pro Ile Gln Lys  
1 5

<210> 25  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Human

<223> Amino acids 671-686 of SEQ ID NO: 3

<400> 25  
Asp Ile Ala Leu Glu Ile Thr Val Thr Asn Ser Pro Ser Asn Pro Arg  
1 5 10 15

<210> 26  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Human

<223> Amino acids 822-835 of SEQ ID NO: 3

<400> 26  
Ser Glu Asp Glu Val Gly Ser Leu Ile Glu Tyr Glu Phe Arg  
1 5 10

<210> 27  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Human

<223> Amino acids 871-885 of SEQ ID NO: 3

<400> 27  
Val Glu Ser Lys Gly Leu Glu Lys Val Thr Cys Glu Pro Gln Lys  
1 5 10 15

<210> 28  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 902-914 of SEQ ID NO: 3

<400> 28  
 Arg Glu Ile Thr Glu Lys Gln Ile Asp Asp Asn Arg Lys  
 1 5 10

<210> 29  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 915-921 of SEQ ID NO: 3

<400> 29  
 Phe Ser Leu Phe Ala Glu Arg  
 1 5

<210> 30  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 923-938 of SEQ ID NO: 3

<400> 30  
 Tyr Gln Thr Leu Asn Cys Ser Val Asn Val Asn Cys Val Asn Ile Arg  
 1 5 10 15

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 968-976 of SEQ ID NO: 3

<400> 31  
 Leu Asn Tyr Leu Asp Ile Leu Met Arg  
 1 5

<210> 32  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 977-989 of SEQ ID NO: 3

<400> 32  
 Ala Phe Ile Asp Val Thr Ala Ala Ala Glu Asn Ile Arg  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 990-998 of SEQ ID NO: 3

<400> 33  
 Leu Pro Asn Ala Gly Thr Gln Val Arg  
 1 5

<210> 34  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 178-189 of SEQ ID NO: 4

<400> 34  
 Val Ser Val Pro Gln Thr Asp Met Arg Pro Glu Lys  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 192-204 of SEQ ID NO: 4

<400> 35  
 Glu Pro Trp Pro Asn Ser Asp Pro Pro Phe Ser Phe Lys  
 1 5 10

<210> 36  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 205-217 of SEQ ID NO: 4

<400> 36  
 Asn Val Ile Ser Leu Thr Glu Asp Val Asp Glu Phe Arg  
 1 5 10

<210> 37  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 301-312 of SEQ ID NO: 4

<400> 37  
 Thr Gln Asp Tyr Pro Ser Val Pro Thr Leu Val Arg  
 1 5 10



<210> 43  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 631-646 of SEQ ID NO: 4

<400> 43  
 Ser Cys Val Gln Cys Gln Ala Trp Gly Thr Gly Glu Lys Lys Gly Arg  
 1 5 10 15

<210> 44  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 675-702 of SEQ ID NO: 4

<400> 44  
 Asp Glu Asp Asp Asp Cys Thr Tyr Ser Tyr Thr Met Glu Gly Asp Gly  
 1 5 10 15

Ala Pro Gly Pro Asn Ser Thr Val Leu Val His Lys  
 20 25

<210> 45  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 845-856 of SEQ ID NO: 4

<400> 45  
 Gln Glu Val Glu Glu Asn Leu Asn Glu Val Tyr Arg  
 1 5 10

<210> 46  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 916-930 of SEQ ID NO: 4

<400> 46  
 Val Ala Pro Gly Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Asp Gln Asp Ala Arg  
 1 5 10 15

<210> 47  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 946-958 of SEQ ID NO: 4

<400> 47  
 Val Pro Leu Phe Ile Arg Pro Glu Asp Asp Asp Glu Lys  
 1 5 10

<210> 48  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 990-1003 of SEQ ID NO: 4

<400> 48  
 Asp Val Val Ser Phe Glu Gln Pro Glu Phe Ser Val Ser Arg  
 1 5 10

<210> 49  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 1061-1072 of SEQ ID NO: 4

<400> 49  
 Leu Leu Glu Leu Gln Glu Val Asp Ser Leu Leu Arg  
 1 5 10

<210> 50  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 1196-1214 of SEQ ID NO: 4

<400> 50  
 Val Cys Ala Tyr Gly Ala Gln Gly Glu Gly Pro Tyr Ser Ser Leu Val  
 1 5 10 15

Ser Cys Arg

<210> 51  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Human

<223> Amino acids 1273-1281 of SEQ ID NO: 4

<400> 51  
 Val Leu Val Asp Asn Pro Lys Asn Arg  
 1 5

## 【図面の簡単な説明】

### 【図1】

図1はA3 scFv-SEA(D227A)およびC215 Fab-SEA(D227A)を用いて調べた、ヒト腫瘍組織の切片の免疫組織化学的染色の

写真である。

A3 癌関連抗原は原発および転移癌に均質に発現している

70 nMの濃度で、A3 scFv-SEA (D227A) およびC215 Fab-SEA (D227A) を用いて調べた、凍結およびアセトン固定したヒト腫瘍組織の切片の免疫組織化学的染色。A3 scFv融合タンパク質は、腫瘍患者から切除した原発性の結腸および膵臓癌腫の双方に強くしかも均質に反応した。原発性直腸癌のC215 Fab-SEA (D227A) に対する代表的な染色像を(A)に、A3 scFv-SEA (D227A) に対するものを(B)に示した。A3 scFv-SEA (D227A) による結腸癌の肝臓への転移の染色像を(C)に、そして原発性膵臓癌を(D)に示した。

### 【図2】

図2はColo205細胞に対する超抗原抗体依存的細胞障害性(SADCC)を媒介する能力を示すグラフである。

A3 scFv-SEA (D227A) でコートされたColo205腫瘍細胞はT細胞によって効果的に殺傷される

A3 scFv-SEA (D227A) に媒介されたColo205に対する超抗原抗体依存性細胞障害性(SADCC)は、10倍高い濃度ではあるが、抗Ep-CAM融合タンパク質C215 Fab-SEA (D227A) と同一の最大細胞障害性を達成した。D1.3 scFv-SEA (D227A) により媒介される細胞障害性の欠如は、融合タンパク質中の腫瘍ターゲティング抗体部分の必要性を示している。

### 【図3】

図3はA3 scFv-SEAm9をカップリングしたカラムでの腫瘍抽出物の免疫アフィニティクロマトグラフィー上での溶出プロファイルを示すグラフである。

A3カップリングカラムに結合したタンパク質は十分に洗浄後、実施例5の材料および方法に記載したように溶出された。溶出分画をUV光度計(矢印)で調べ、単一ピークが同定された。サンプルはxで示されるようにpH勾配で溶出された。

## 【図4】

図4はA3抗原調製液を非還元SDS-PAGEで分離して銀染色したゲルの写真である。

A3抗原調製液は非還元SDS-PAGEで分離され、銀染色された。事前のウエスタン分析でA3抗原の存在する分子量領域はすでに決定されていた。この領域内のはっきりしたバンド(IおよびIIとラベル)をペプチドマッピング分析にかけた。

## 【図5A】

図5Aは6インテグリンのアミノ酸配列を示す図である。

上皮細胞のインテグリン64:6および4バリエーションフォーム(前駆体)の完全な一次構造(Tamuraら、J. Cell Biol. 111: 1593-1604 (1990))。配列番号5-51に示された一致したペプチドを公表されているヒト6インテグリンの配列中に下線を引いて示した。

## 【図5B】

図5Bは4(前駆体)インテグリンのアミノ酸配列を示す図である。

上皮細胞のインテグリン64:6および4バリエーションフォーム(前駆体)の完全な一次構造(Tamuraら、J. Cell Biol. 111: 1593-1604 (1990))。配列番号5-51に示された一致したペプチドを公表されているヒト4(前駆体)インテグリンの配列中に下線を引いて示した。

## 【図6】

図6はA3 scFvおよび市販の抗ヒト6および4インテグリンモノクローナル抗体を用いた正常結腸および悪性腫瘍結腸(malignant colon)の免疫組織化学の写真である。

## 【図7】

図7はキャプチャーエライザのグラフである。

図7Aにおいて、4インテグリンに特異的なモノクローナル抗体ASC-3が捕縛抗体として使用され、それに対して腫瘍粗抽出物の異なる希釈物がアブラ

イされた。図7Bでは、抗6インテグリンモノクローナル抗体NKI-GoH3が、A3アフィニティ精製された濃縮溶出物の異なる希釈物を捕縛するために使用された。図7Aおよび7Bの両方において、捕縛されたインテグリン抗原はA3 scFv-SEAm9で成功的に検出された。

【図8A】

図8AはA3-アフィニティカラムからの溶出物のウエスタンブロット解析の写真である。

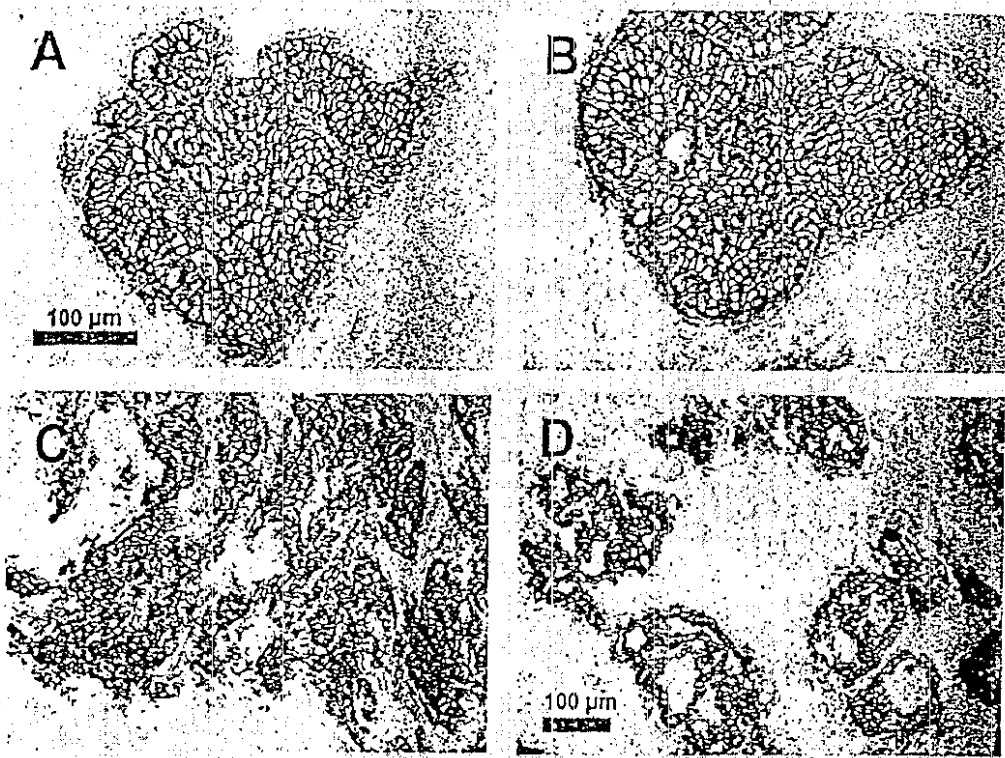
使用された一次抗体は(i)および(ii)ではA3 scFv-SEAm9、(iii)ではASC-3抗ヒト4インテグリン抗体、および(iv)ではNKI-GoH3抗ヒト6インテグリン抗体である。レーンA-溶出物は直接アプライされた、レーンB-溶出物は100、5分加熱された、レーンC-溶出物はメルカプトエタノール存在下で100、5分加熱された。分子量マーカーの位置が示される。

【図8B】

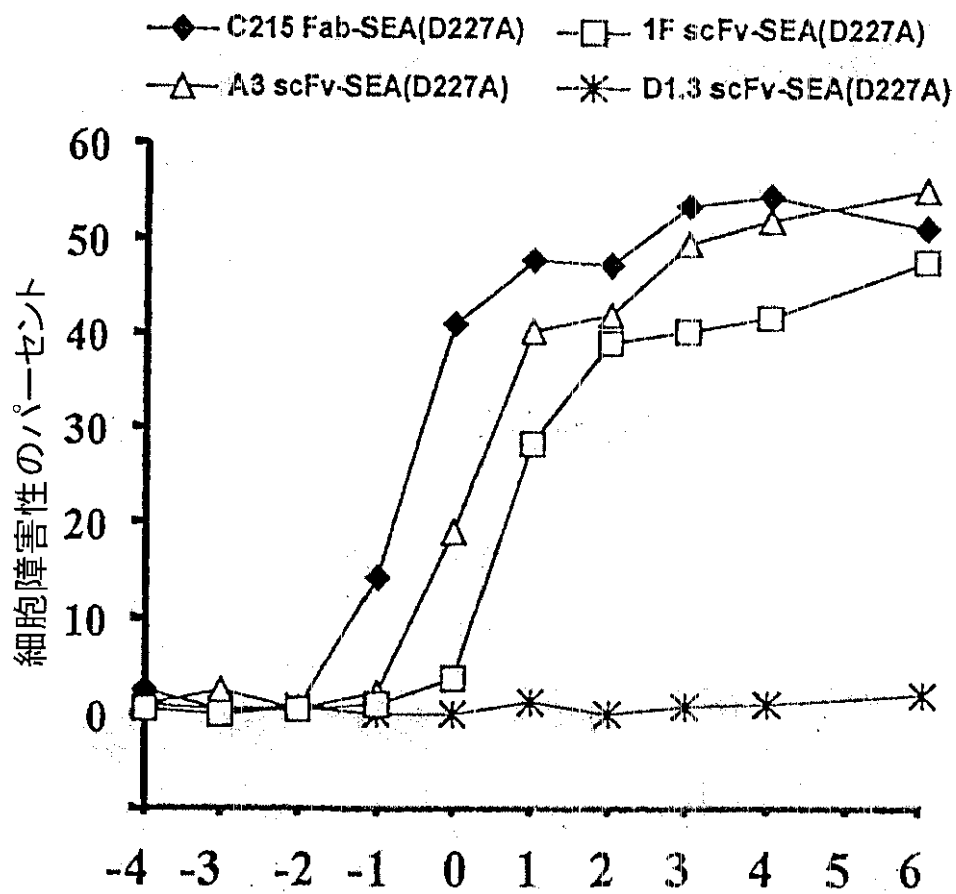
図8BはA3-アフィニティカラムからの溶出物のウエスタンブロット解析の写真である。

使用された一次抗体は(i)および(ii)ではA3 scFv-SEAm9、(iii)ではASC-3抗ヒト4インテグリン抗体、および(iv)ではNKI-GoH3抗ヒト6インテグリン抗体である。レーンA-溶出物は直接アプライされた、レーンB-溶出物は100、5分加熱された、レーンC-溶出物はメルカプトエタノール存在下で100、5分加熱された。分子量マーカーの位置が示される。

【図1】



【図2】







## 【図5A】

TA6-ヒトインテグリン ALPHA-6A

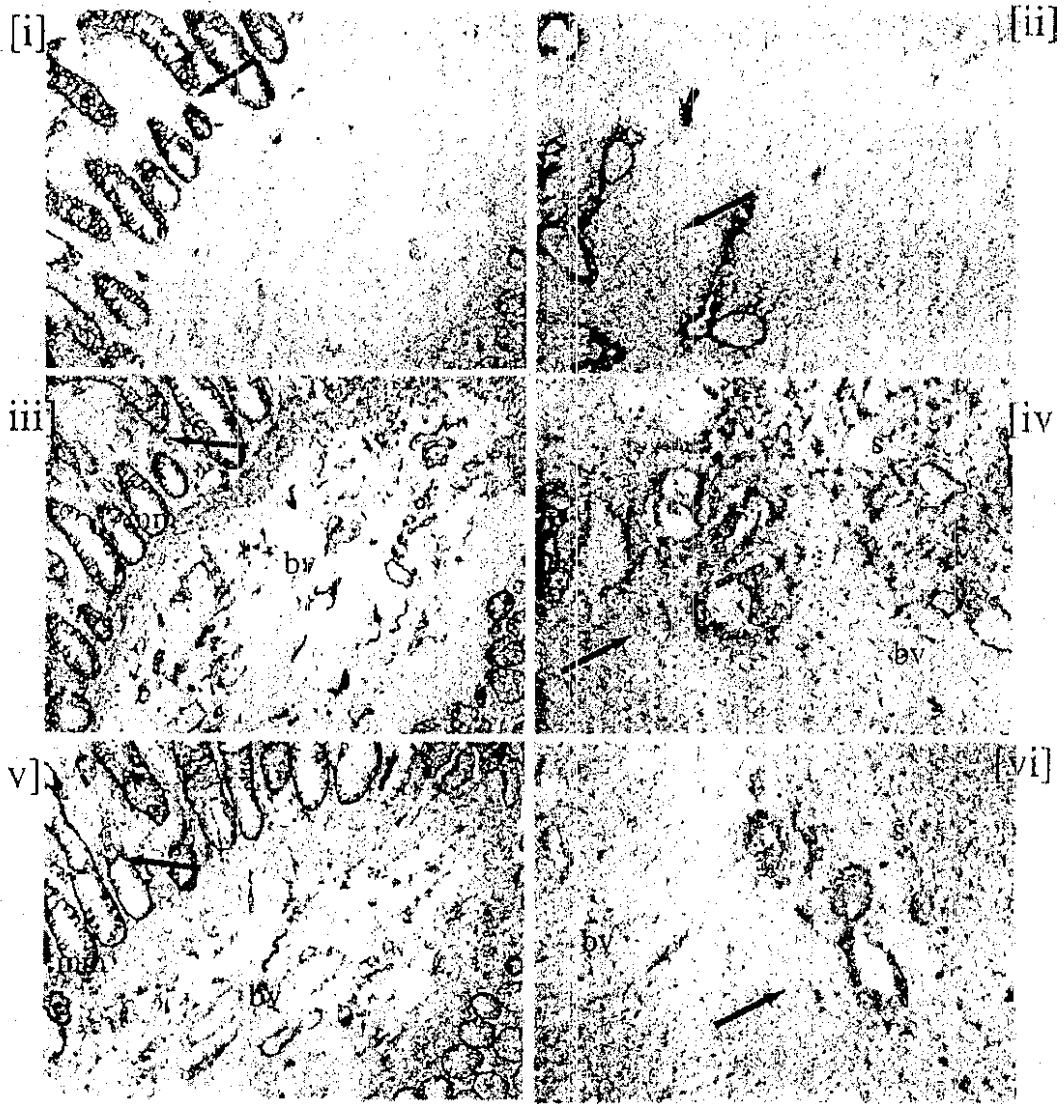
MAAAGQLCLLYLSAGLLSRLGAAFNLDTREDNVIRKYGDPGSLFGFSLAMHWQLQP  
EDKRLLLVGAPRGEALFLQRANRTGGLYSCDITARGPCTRIEFDNDADPTSESKEDQ  
WMGVTVQSQGGKVVTCAHRYEKROHVNFKQESRDIFGRCYVLSO~~N~~LRIEDDMD  
GGDWSFCDGRLRGHEKFGSCOOGVAATFTKDFHYVFGAPGTYNWKGIVRVEQKN  
NTFFDMNIFEDGPYEVGGETEHD~~S~~LVPVPANSYLGFSLD~~S~~GKGVSKDEITFVSGAPR  
ANHSGAVVLLK~~R~~DMKSAHLLPEHIFDGEGLASSFGYDVAVVDLNKDGWODIVIGAP  
OYFDRDGEVGGAVVYVMNOQGRWNNVKPIRLNGTKDSMFGLAVKNIGDINODGYP  
DIAVGAPYDDL~~G~~KVFTYHGSANGINTKPTQVLKGISPYEGYSIAGNMDLDRNSYPDV  
AVGSLSDSVTIFRSRPVNIQKTITVTPNRIDL~~R~~QKTACGAPSGICLQVKSCFEYTANPA  
GYNPSISIVGTLEAEKERRKSGLSSRVQFRNQGSEPKYTQELTLKRQKQKVCMEETL  
WLQDNIRD~~K~~L~~R~~PIPTASVEIQEPSSRRRVNSLPEVLPILNSDEPKTAHIDVHFLKEGCG  
DDNVCNSNLKLEYKFC~~T~~REGNQDKFSYLP~~I~~QKGVPELV~~L~~KDQKDIALEITVTNSPSNP  
RNPTKDGDDAHEAKLIATFPDLTY~~S~~AYRELRAFPEKQLSCVANQNGSQADCELGNP  
FKRNSNVTFYLVLSTTEVTFDTPDL~~D~~INL~~K~~LETTSNQDNLAPITAKAKVVI~~L~~LLSVSG  
VAKPSQVYFGGTVVGEQAMKSEDEVGSLIEYEF~~R~~VINLGKPLTNLGTATLNQWPKEI  
SNGK~~W~~LLYL~~V~~KVESKGLEKVTCEPOKEINSLNLTESHNSRKKREITEKQIDDNRK~~F~~SL  
FAERKYOTL~~N~~CSVNV~~N~~CVNIR~~C~~PLRGLDSKASLLRSRLWNSTFLEEYSKLN~~Y~~LDILM  
RAFIDV~~T~~AAAENIRLPNAGTOVRVTVFPSKTVAQYSGVPWWIILVAILAGILMLALLV  
FILWKCGFFKR~~N~~KKDHYDATYHKA~~E~~IHAQPSIDKERL~~T~~SDA

## 【図5B】

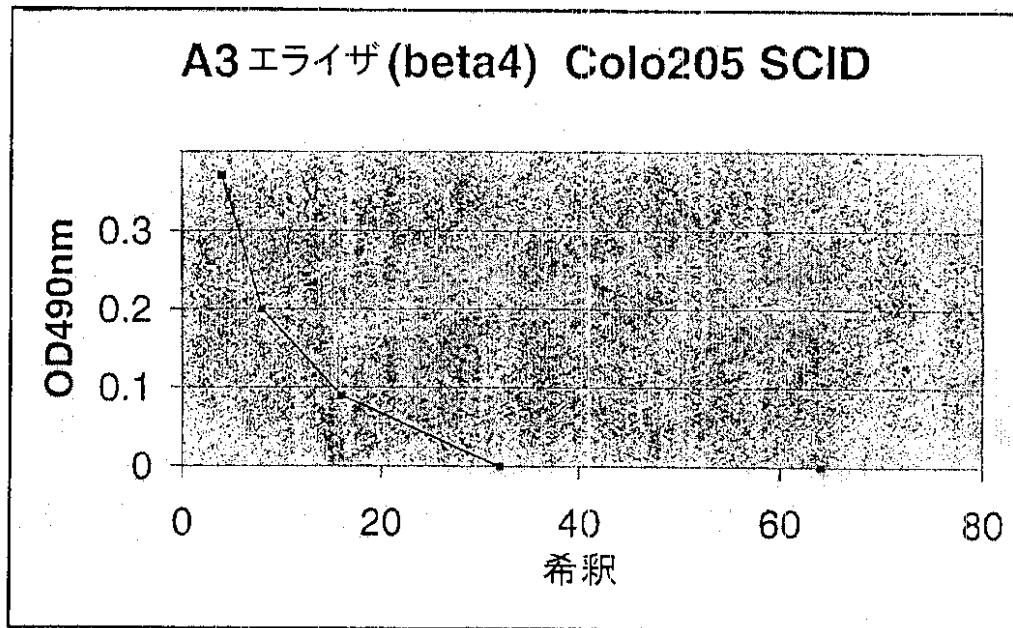
インテグリン BETA-4 (前駆体)

MAGPRPSPWARLLLAALISVSLSGTLANRCKKAPVKSCTECVRVDKDCAYCTDEMF  
 RDRRCNTQAELLAAGCQRESIVMESSFQITEETQIDTTLRRSQMSPQGLRVRLRPGE  
 ERHFELEVFEPLVLDL YLMDFSNSMSDDLNLKMGONLARVLSQLTSDYTIGFG  
KFVDKVSVPQOTDMRPEKLKEPWPNSDPPFSEFKNVISLTEDVDEFRNKLQGERISGNLD  
 APEGGFDAILOAVCTRDIGWRPDSTHLLVFSTESAFHYEADGANVLAGIMSRNDER  
 CHLDTTGTYTQYRTODYPSVPTLVRLAKHNIPIFAVTNYSYSYIEKLHTYFPVSSLG  
 VLQEDSSNIVELLEAFNRIRSNLDIRALDSPRGLRTEVTSKMFQKTRTGSFHRRGEV  
GIYQVQLRALEHVDGTHVCOLPEDOKGNHLLKPSFSDGLKMDAGIICDVCTCELOKE  
 VRSARCSFNGDFVCGQCVCSEGWGQTNCSTGSLSDIQPCREGEDKPCSGRGECQ  
 CGHCVCYGEGRYEGQFCEYDNFQCPRTSGLCNDRGRCSMGQCVCEPGWTGPSCDC  
 PLSNATCIDSNGGICNGRGHCECGRCHCHQQSLYTDTICEINYSAIHPGLCEDLRSCVQ  
COAWGTGEKKGRTCEECNFKVKMVDELKRAEEVVRCSEFRDEDDDDCTYSYTMEGD  
GAPGPNSTVLVHKKKDCPPGSFWWLIPLLLLLLPLLALLLLLCWKYCACCKACLALL  
 PCCNRGHMVGFKEDHYMLRENLMASDHLDTPMLRSGNLKGRDVVRWKVTNNMQR  
 PGFATHAASINPTLVYGLSLRLARLCTENLLKPDTRCAQLRQEVENLNEVYRQI  
 SGVHKLQQTFRQQPNAGKKQDHTIVDTVLMAPRSAKPALLKLTEKQVEQRAFHDL  
 KVAPGYTLTADQDARGMVEFQEGVELVDVRFVPLFIRPEDDDEKQLLVEAIDVPAG  
 TATLGRRLVNITIIKEQARDVYSFEQPEFSVSRGDQVARIPVIRRVLDGGKSQVSYRTQ  
 DGTAQGNRDYIPVEGELLFQPGEAWKELQVKLLELOEVDSLLRGRQVRRFHVQLSNP  
 KFGAHLGQPHSTTHIRDPDELDRSFTSQMLSSQPPPHGDLGAPQNPNAKAAGSRKIH  
 NWLPPSGKPMGYRVKYWIQGDSESEAHLLDSKVPSVELTNLYPYCDYEMKVCAYG  
AOGEGPYSSLVSCRTHQVPEPGRALAFNVVSSVTQLSWAEPATNGEITAYEVCY  
 GLVNDNRPIGPMKKVLVDNPKNRMLLIENLRESQPYRYTVKARNGAGWGPEREAI  
 NLATQPKRPMSPIDIPVDAQSGEDYDSFLMYSDDVLRSPSGSQRPSVSDDTGCGW  
 KFEPLLGEELDLRRVTWRLPELIPRLSASSGRSDAEAPTAPRTTAARAGRAAAVPR  
 SATPGPPGEHLVNGRMDFAFPGSTNSLHRMTTTSAAAYGTHLSPHVPHRVLSTSSLT  
 RDYNSLTRSEHSHSTLPRDYSTLTSVSSHGLPPIWEHGRSRLPLSWALGSRRAQMK  
 GFPPSRGPRDSIILAGRPAAPSWGPDRLTAGVPDTPTRLVFSALGPTSLRVSWQEP  
 ERPLQGYVVEYQLLNGGELHRLNIPNAQTSVVVEDLLPNHSYVFRVRAQSQEGWGR  
 EREGVITIESQVHPQSPLCPLPGSAFTLSTPSAPGLVFTALSPDSLQLSWERPRRPN  
 IVGYLVTCEMAQGGGPATAFRVDGDSPESTRTPGLSENVYPYKFKVQARTTEGFGPE  
 REGITIESQDGGPFPQLGSRAGLFQHPQLQSEYSSITTTHTSATEPFLVDGPTLGAQHL  
 AGGSLTRHVTQEFVSRTLTTSGLSTHMDQQFQFQT

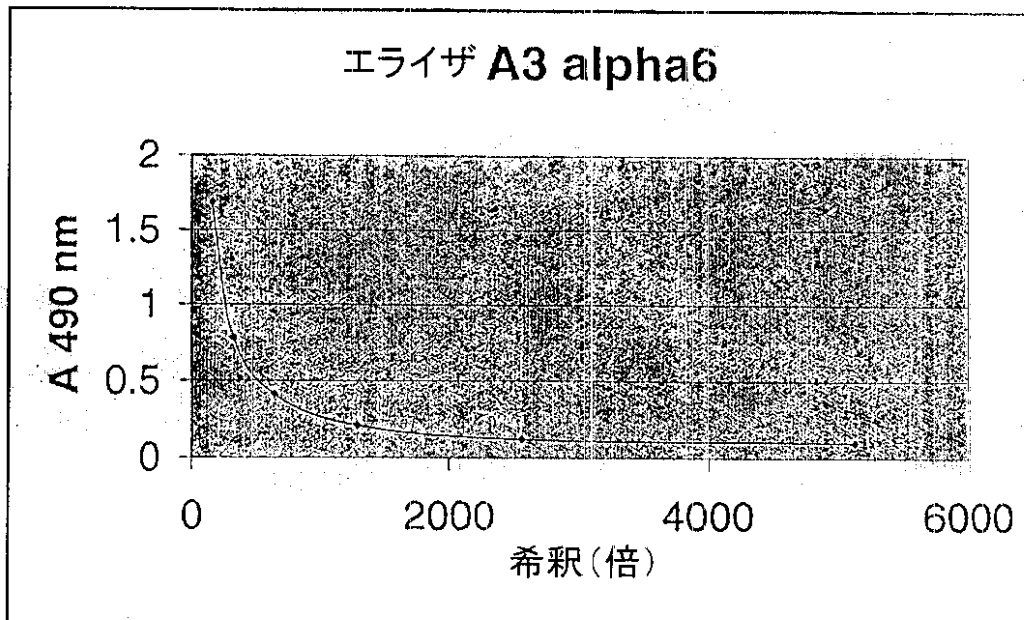
【图6】




【図7】



7A

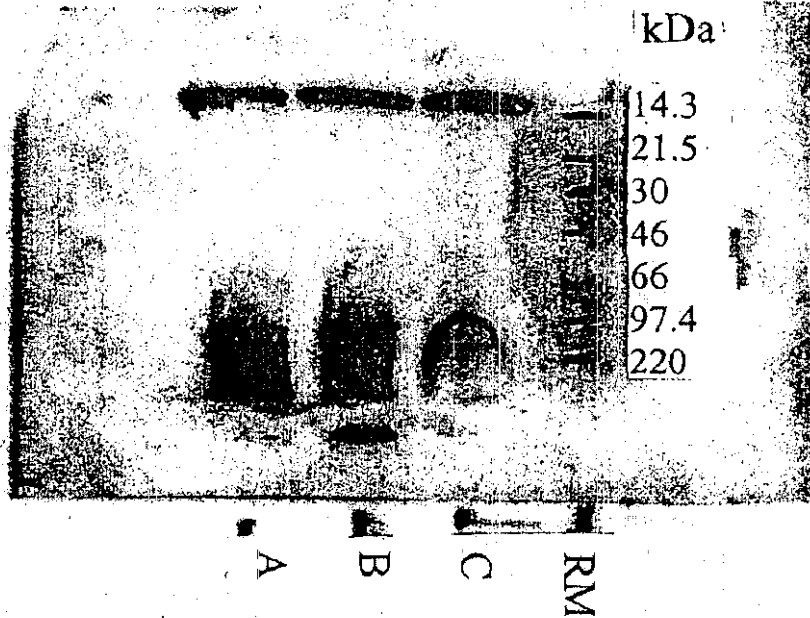


7B

【 8 A】

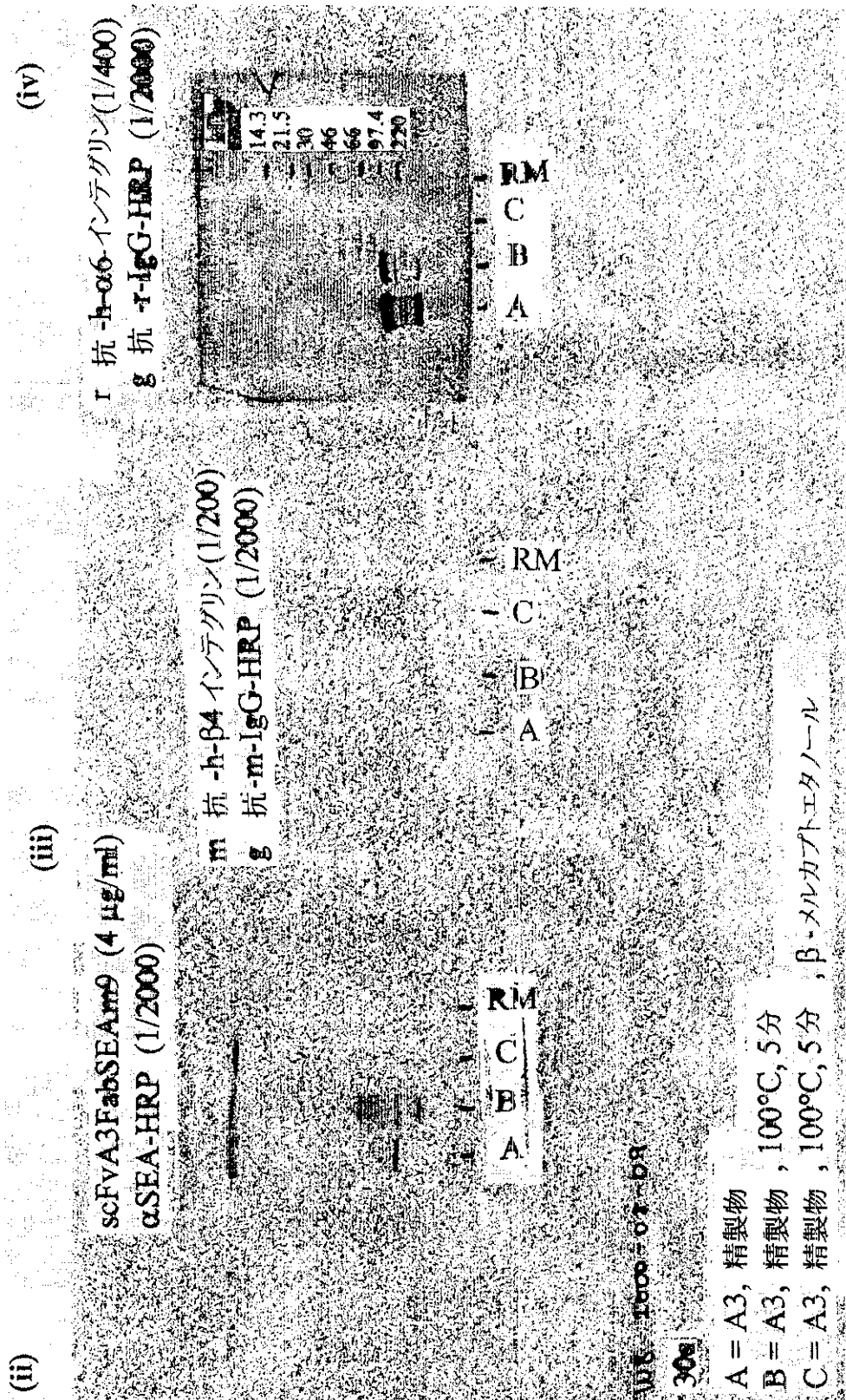
scFvA3FabSEAm9 (4  $\mu\text{g/ml}$ )

$\alpha\text{SEA-HRP}$  (1/2000)



(i)

【図8B】



## 【国際調査報告】

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 00/02082

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: C07K 16/30, C07K 16/14, G01N 33/574, A61K 39/00 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: C07K, G01N, A61K		
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)		
MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9906834 A2 (IXSYS, INCORPORATED), 11 February 1999 (11.02.99), see claim 15 and page 60, SEQ ID NO:106 --	1-15
A	WO 9404679 A1 (GENENTECH, INC.), 3 March 1994 (03.03.94), see claim 16 and fig. 1b --	1-15
A	GB 2305921 A (CAMBRIDGE ANTIBODY TECHNOLOGY LIMITED), 23 April 1997 (23.04.97), see fig. 1b (ii), fig. 19 (ii) and claims 15-17 --	1-15
A	US 5320942 A (VITO QUARANTA ET AL), 14 June 1994 (14.06.94), see columns 7-11 --	1-23,38,39
<input 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "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 "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 May 2001		22-05-2001
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/SE00/02082**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.: **38, 39, 52-54**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**see extra sheet \***
2.  Claims Nos.: **1-54**  
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 extra 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 extra 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/SE00/02082**

## Box I.1\*

Claims 7-9 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\*\*

Claims 1-54 directly or indirectly refer to compounds (antibody, "target structure" etc.) that "comprise essentially" certain amino acid sequences. E.g. claim 1 also relates to a "fragment" of the claimed antibody "with similar unique binding properties". Neither the wording "comprise essentially", nor "similar unique properties" define features that can be adequately searched as they are not clear and concise. This also concerns claim 17 that refer to a "target structure .... having substantial homology with" alpha 6 and/or beta 4 integrin chains. According to PCT Rule 6 claims shall relate to

Claim 27 does not refer to structures that can be adequately searched as the sequences are not restricted to a reasonable number of sequences focusing on the part of the structures (the epitope) that enables a binding of an antibody. Compound claims 29-33 (reach through claims) only provide indirect definitions of the compounds and therefore cannot be adequately searched.

Consequently, the search has been restricted to antibodies as defined by SEQ ID NO:2 and related sequences comprising all CDRs . The target structures according to claims 17-23 and 28 have not been searched unless covered by the search for the claimed antibodies. This is due to the lack of a searchable definition of the epitope.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE00/02082

## Box II\*\*\*

The present application refers to an antibody and a corresponding target structure. The antibody has been sequenced but the antigen has only been defined in general terms by reference to its binding to an alpha-6-beta-4 integrin (a complex structure). No precise definition of the epitope on the antigen has been revealed. Thus, no clear and concise link (common feature) exists between the antibody and the many different antigens covered by claims 24-27.

According to PCT Rule 13.1 and 13.2, the international application shall relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept ("requirement of unity of invention"). In order to achieve unity of invention the single general inventive concept must involve a "special technical feature" i.e. a technical feature that is common to the inventions and defines a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

The claims refer to four groups of inventions:

- 1 Antibody according to claims 1-16 and corresponding antigen/target structure according to claims 17-23.
- 2 Target structure according to claims 24-26 (partially) with the amino acid sequence of alpha 6 integrin according to SEQ ID NO: 3
- 3 Target structure according to claims 24-26 (partially) with the amino acid sequence of alpha 4 integrin according to SEQ ID NO: 4
- 4 Dimers or multimers comprising target structures of 2 and/or 3 as above according to claim 25.
- 5-?? Target structures according to claim 27 with amino acid sequences according to SEQ ID NO: 5-51 or a "molecule complexed to said polypeptide(s)"

Inventions 5-51 cannot be searched as none of the 50 sequences has been linked to any particular feature. Further non-unity is likely to evolve if combinations of the peptides are involved.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 Information on patent family members

30/04/01

International application No.

PCT/SE 00/02082

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9906834 A2	11/02/99	AU 8691398 A	22/02/99
		EP 1007967 A	14/06/00
WO 9404679 A1	03/03/94	AU 675916 B	27/02/97
		AU 2250992 A	12/01/93
		EP 0590058 A	06/04/94
		JP 6508267 T	22/09/94
		US 6054297 A	25/04/00
		CA 2103059 A	15/12/92
		EP 0940468 A	08/09/99
		US 5821337 A	13/10/98
		WO 9222653 A	23/12/92
		AU 5083193 A	15/03/94
GB 2305921 A	23/04/97	AT 190650 T	15/04/00
		AT 199091 T	15/02/01
		AU 702049 B	11/02/99
		AU 7140596 A	30/04/97
		CA 2233042 A	17/04/97
		DE 69607191 D,T	28/09/00
		DE 69611766 D	00/00/00
		EP 0853661 A,B	22/07/98
		SE 0853661 T3	
		EP 0945464 A,B	29/09/99
		SE 0945464 T3	
		ES 2146020 T	16/07/00
		GB 9520486 D	00/00/00
		GB 9601081 D	00/00/00
		GB 9620920 D	00/00/00
		GR 3033436 T	29/09/00
		JP 2000500643 T	25/01/00
PT 853661 T	31/08/00		
WO 9713844 A	17/04/97		
US 5320942 A	14/06/94	CA 1339709 A	10/03/98
		DE 3854821 D,T	23/05/96
		DK 88288 A	20/08/88
		EP 0279669 A,B	24/08/88
		IL 85471 D	00/00/00
		JP 2792651 B	03/09/98
		JP 63301899 A	08/12/88
		US 4962048 A	09/10/90
		US 5344919 A	06/09/94
US 5665864 A	09/09/97		

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P 35/04		A 6 1 P 37/02	
	37/02	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 14/705		A 6 1 K 37/02	
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(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、 イリオングレンデン ケー120		
(72)発明者	キアニー、フィリップ・ピー スウェーデン国、エス - 226・49 ルンド、 クルグレンデン 15シー		
(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		
Fターム(参考)	4B024 AA01 AA12 BA45 CA04 DA06 EA04 GA11 HA01 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA17 MA01 NA14 ZB072 ZB262 4C085 AA03 AA13 AA14 BB44 CC32 EE01 GG01 4H045 AA11 AA30 BA10 CA41 DA50 DA75 EA28 EA54 FA74		

专利名称(译)	新規化合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003513024A</a>	公开(公告)日	2003-04-08
申请号	JP2001533851	申请日	2000-10-26
[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 カールストレームピアジェイ オールソンレナートジー トルドソンエムイエスパー キアニーフィリップピー ニルソンポーエイチケー		
发明人	プロデイン、トーマス・エヌ カール・ストレーム、ピア・ジェイ オールソン、レナート・ジー トルドソン、エム・イエスパー キアニー、フィリップ・ピー ニルソン、ポー・エイチ・ケー		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/30 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	C07K16/3046 A61K2039/505 C07K16/2839 C07K16/303 C07K2317/21 C07K2317/622 C07K2317/732 C07K2319/00 G01N33/57446 Y02P20/582		
FI分类号	C07K16/30.ZNA A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 C07K14/705 A61K37 /02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024 /HA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085 /BB44 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA54 4H045/FA74		
优先权	9903895 1999-10-28 SE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

描述了具有与靶结构的结合结构的抗体或其衍生物或其片段。该抗体存在于人胃肠道上皮肿瘤细胞内和表面以及正常人胃肠道上皮细胞的亚群中。结合结构是轻链的互补决定区，该轻链的互补决定区包含SEQ ID NO: 2中所示氨基酸序列的氨基酸编号23-33 (CDR1)，49-55 (CDR2)，88-98 (CDR3) 作为必需元件 (CDR) 和含有SEQ ID NO: 2所示氨基酸序列的氨基酸编号158-162 (CDR1)，177-193 (CDR2)，226-238 (CDR3) 的重链CDR序列为必需元素，或类似的它具有独特的粘附特性。还描述了存在于肿瘤细胞内或之上的靶结构，疫苗组合物，药物组合物，以及与人类恶性肿瘤相关的方法。

