

(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 - 508355

(P2003 - 508355A)

(43)公表日 平成15年3月4日(2003.3.4)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 0 7 K 16/30		C 0 7 K 16/30	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/28		A 6 1 K 35/28	4 B 0 6 4
39/395		39/395	L 4 B 0 6 5
			T 4 C 0 8 4
45/00		45/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 69数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 517572(P2001 - 517572)

(86)(22)出願日 平成12年8月8日(2000.8.8)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月13日(2002.2.13)

(86)国際出願番号 PCT/US00/21574

(87)国際公開番号 W001/012674

(87)国際公開日 平成13年2月22日(2001.2.22)

(31)優先権主張番号 09/374,367

(32)優先日 平成11年8月13日(1999.8.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 モレキュラー・ディスカヴァリーズ・エル
エルシー

アメリカ合衆国ニューヨーク州10017, ニュー
ヨーク, レキシントン・アベニュー 360
, トウエンティファースト・フロア

(72)発明者 ゲルバー, コハヴァ

アメリカ合衆国ニューヨーク州10530, ハー
ツデール, クラブウェイ 11

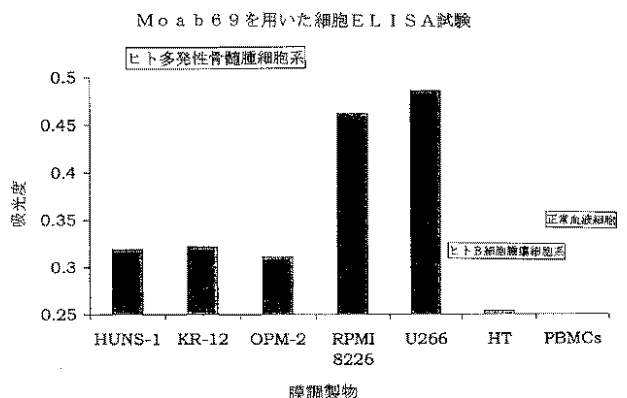
(74)代理人 弁理士 社本 一夫 (外 5 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 卵巣癌細胞及び骨髄腫細胞の表面糖タンパク質、それへの抗体及びその使用

(57)【要約】

本発明は、記載のように、モノクローナル抗体により認識される、骨髄腫細胞及び卵巣癌細胞の上に見出される細胞表面抗原、及びその抗体結合フラグメントに関する。本発明のモノクローナル抗体は、治療、スクリーニング、診断、及び細胞精製の目的に使用され得る。本発明の代表的で例示されたモノクローナル抗体は、多発性骨髄腫細胞上で発現される表面抗原と卵巣癌細胞上で発現される表面抗原とに共通したエピトープを認識し、それへ結合する。このモノクローナル抗体の機能が in v
itro と in vivo の両方で示される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 モノクローナル抗体又はその結合フラグメントであって、ヒト骨髓腫細胞の表面上の抗原へ特異的に結合し、前記抗原が、

(a) 還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約78kDa～約120kDaの分子量を有する単一ポリペプチドであること；

(b) ヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、そしてヒトB細胞骨髓性白血病細胞に不在であること；及び

(c) グリコシル化していること

でさらに特徴づけられる、前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメント。

【請求項2】 卵巣癌細胞の表面上に存在する抗原を認識する、請求項1に記載のモノクローナル抗体又はそのフラグメントであって、前記抗原が還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約76kDa～約213kDaの分子量を有する単一グリコシル化ポリペプチドである、前記モノクローナル抗体又はそのフラグメント。

【請求項3】 前記抗原が乳癌細胞、前立腺癌細胞、及び頸部癌細胞に不在である、請求項1に記載のモノクローナル抗体又はそのフラグメント。

【請求項4】 アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により産生される、請求項1に記載のモノクローナル抗体又はそのフラグメント。

【請求項5】 アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系から産生されるモノクローナル抗体であって、ヒト骨髓腫瘍細胞の細胞表面糖タンパク抗原へ結合する前記抗体；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有する前記ハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と同一の抗原決定基へ結合することが可能である抗体；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系の結合フラグメント；並びにアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有する前記ハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクロー

ナル抗体と同一の抗原決定基へ結合することが可能であるモノクローナル抗体の結合フラグメント、

からなる群から選択される、モノクローナル抗体又はそのフラグメント。

【請求項6】 前記細胞表面糖タンパク質がヒト骨髓腫細胞上に存在し、ヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、そしてヒトB細胞骨髓性白血病細胞に不在である、請求項5に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメント。

【請求項7】 前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントにより認識される前記細胞表面糖タンパク質が、ヒト卵巣癌細胞上に存在し、前記細胞表面糖タンパク質が還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約76 kDa～約213 kDaの分子量を有する単ーグリコシル化ポリペプチドである、請求項5に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメント。

【請求項8】 多発性骨髓腫細胞の前記細胞表面糖タンパク質が、還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約78 kDa～約120 kDaの分子量を有する単ーポリペプチドである、請求項5に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメント。

【請求項9】 前記結合フラグメントがF(ab')₂、Fab'、Fv、Fd'、又はFdを含む、請求項1又は請求項5に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメント。

【請求項10】 請求項5に記載の抗体の結合部位を鏡映する抗イディオタイプモノクローナル抗体。

【請求項11】 ヒト骨髓腫細胞の表面抗原へ特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ技術により産生される細胞系であって、前記抗原が、

(a)還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約78 kDa～約120 kDaの分子量を有する単ーポリペプチドであること；

(b)ヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、そして及びヒトB細胞骨髓性白血病細胞に不在であること；及び

(c)グリコシル化していること

でさらに特徴づけられる、前記細胞系。

【請求項12】 ヒト卵巣癌細胞の表面抗原へ特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する、請求項11に記載の細胞系。

【請求項13】 アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系。

【請求項14】 ヒト骨髓腫細胞の単離された表面抗原であって、

(a)還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約78kDa～約120kDaの分子量を有する単一ポリペプチドであること；

(b)ヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、そしてヒトB細胞骨髓性白血病細胞に不在であること；及び

(c)グリコシル化していること

でさらに特徴づけられる、前記抗原。

【請求項15】 アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体へ結合することでさらに特徴づけられる、請求項14に記載の単離された表面抗原。

【請求項16】 ヒト卵巣癌細胞の単離された表面抗原であって、

(a)還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約76kDa～約213kDaの分子量を有する単一ポリペプチドであること；

(b)ヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、そしてヒトB細胞骨髓性白血病細胞に不在であること；及び

(c)グリコシル化していること

でさらに特徴づけられる、前記抗原。

【請求項17】 アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体へ結合することでさらに特徴づけられる、請求項16に記載の単離された表面抗原。

【請求項18】 モノクローナル抗体又はそのフラグメントであって、以下の抗原：

(i) ヒト骨髓腫細胞の表面上に存在するグリコシル化抗原、ここにおいて、前記骨髓腫表面抗原は還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約78kDa～約120kDaの分子量を有する単一ポリペプチドである；及び

(i i) 卵巣癌細胞の表面上に存在するグリコシル化抗原、前記抗原は還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約76kDa～約213kDaの分子量を有する単一グリコシル化ポリペプチドである

ここで前記抗原群はヒト末梢血液単核細胞、ヒトB細胞、ヒトB細胞骨髓性白血病細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞及び頸部癌細胞に不在であるに特異的に結合する、前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメント。

【請求項19】 アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により產生される、請求項18に記載のモノクローナル抗体又はそのフラグメント。

【請求項20】 請求項1に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントの、骨髓腫瘍細胞又は卵巣癌腫瘍細胞の増殖を阻害するか又はそれらを殺傷することにおける使用の医薬の製造における使用であって、ここで前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントは、当該モノクローナル抗体又はその結合フラグメントが前記腫瘍細胞へ結合し、それにより患者の免疫細胞による前記腫瘍細胞の増殖阻害又は殺傷を引き起こすのに十分な条件下で患者へ投与される、前記使用。

【請求項21】 請求項18又は請求項19に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントの、骨髓腫瘍細胞又は卵巣癌腫瘍細胞の増殖を阻害するか又はそれらを殺傷することにおける使用の医薬の製造における使用であって、ここで前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントは、当該モノクローナル抗体又はその結合フラグメントが前記腫瘍細胞へ結合し、それにより患者の免疫細胞による前記腫瘍細胞の増殖阻害又は殺傷を引き起こすのに十分な条件下で患者へ投与される、前記使用。

【請求項22】 請求項1又は請求項5に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントの、骨髓腫瘍細胞又は卵巣癌腫瘍細胞の増殖を阻害するか又はそれらを殺傷することにおける使用の医薬の製造における使用であって、ここ

で前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントは、当該モノクローナル抗体又はその結合フラグメントが前記腫瘍細胞へ結合するのに十分な条件下で細胞毒性部分にコンジュゲートし、それを必要とする患者へ投与されて、それにより前記腫瘍細胞の増殖阻害又は殺傷を引き起こす、前記使用。

【請求項 23】 請求項 18 又は請求項 19 に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントの、骨髄腫瘍細胞又は卵巣癌腫瘍細胞の増殖を阻害するか又はそれらを殺傷することにおける使用の医薬の製造における使用であって、前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントは、当該モノクローナル抗体又はその結合フラグメントが前記腫瘍細胞へ結合するのに十分な条件下で細胞毒性部分にコンジュゲートし、それを必要とする患者へ投与されて、それにより前記腫瘍細胞の増殖阻害又は殺傷を引き起こす、前記使用。

【請求項 24】 前記細胞毒性部分が化学療法剤、光活性化毒素、又は放射活性剤である、請求項 22 又は請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】 単離された細胞サンプルから骨髄腫細胞を除去する方法であって、請求項 1、請求項 5、又は請求項 18 に記載の前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントが結合している固形マトリックスへ、前記骨髄腫細胞が前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントへ付着する条件の下で、前記細胞サンプルを曝露し、そして、前記マトリックスへ結合しない前記細胞サンプルの細胞分画を単離する、工程を含む、前記方法。

【請求項 26】 前記細胞サンプルが骨髄細胞を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】 前記骨髄腫細胞が除去される前記骨髄細胞が移植に使用される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】 前記移植が自己骨髄移植である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】 単離された細胞サンプルにおいて骨髄腫細胞を阻害するか又は殺傷する方法であって、細胞毒性部分にコンジュゲートした請求項 1、請求項 5、又は請求項 18 に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントへ、前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントの前記骨髄腫細胞への結合

が十分な条件下で前記細胞サンプルを曝露し、前記骨髓腫細胞を阻害するか又は殺傷することを引き起こす工程を含む、前記方法。

【請求項30】 前記細胞毒性部分が化学療法剤、光活性化毒素、又は放射活性剤である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 前記細胞サンプルが骨髓細胞を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項32】 前記骨髓腫細胞が除去される前記骨髓細胞が移植に使用される、請求項31に記載の方法。

【請求項33】 前記移植が自己骨髓移植である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 固形支持体へ結合した、請求項1、請求項5、又は請求項18に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメント。

【請求項35】 請求項1、請求項5、又は請求項18に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントの、骨髓腫又は卵巢癌細胞を患者において定位する医薬の製造における使用であって、ここで前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントは検出可能に標識化され、患者の内部で前記細胞へ結合するように患者へ投与され、そしてさらに標識化モノクローナル抗体又はその結合フラグメントの位置が前記患者の内部で決定される、前記使用。

【請求項36】 モノクローナル抗体又はその結合フラグメントがフルオロホア、発色団、放射性核種、又は酵素で標識化される、請求項35に記載の使用。

【請求項37】 患者における卵巢癌の存在及び程度を検出する方法であって、患者からの体液のサンプルにおける請求項16に記載の抗原のレベルを決定し、そして、前記抗原の量を患者における前記卵巢癌の存在及び程度と関連づけることを含む、前記方法。

【請求項38】 卵巢癌への治療の有効性をモニターする方法であって、治療を受けている患者からの体液サンプルにおける請求項16に記載の抗原のレベルにおける変化を測定し、そして、このレベルの変化を前記治療の有効性と関連づけることを含む、前記方法。

【請求項39】 ヒト骨髓腫細胞の表面上の抗原へ特異的に結合するモノクローナル抗体又はその結合フラグメント、及び製剤的に許容される担体又は希釈剤を含んでなる、医薬組成物であって、前記抗原が、

(a) 還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約78kDa～約120kDaの分子量を有する単一ポリペプチドであること；

(b) ヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、そしてヒトB細胞骨髓性白血病細胞に不在であること；及び

(c) グリコシル化していること

でさらに特徴づけられる、前記医薬組成物。

【請求項40】 前記モノクローナル抗体又はその前記結合フラグメントが、卵巣癌細胞上に見出されるが、乳癌細胞上、ある細胞系からの前立腺癌細胞上、さらにある細胞系からの頸部癌細胞上には見出されない抗原を認識する、請求項39に記載の医薬組成物。

【請求項41】 アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系から産生されるモノクローナル抗体であって、ヒト骨髓腫瘍細胞又はヒト卵巣癌細胞の細胞表面糖タンパク抗原へ結合する、前記抗体；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有する前記ハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と同一の抗原決定基へ結合することが可能である抗体；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系の結合フラグメント；及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有する前記ハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と同一の抗原決定基へ結合することが可能であるモノクローナル抗体の結合フラグメントからなる群から選択される、モノクローナル抗体又はそのフラグメント；及び製剤的に許容される担体又は希釈剤を含んでなる、医薬組成物。

【請求項42】 請求項18又は請求項19に記載のモノクローナル抗体、及び製剤的に許容される担体又は希釈剤を含んでなる、医薬組成物。

【請求項 4 3】 検出可能部分で標識化された、請求項 1 又は請求項 1 8 に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメント。

【請求項 4 4】 前記検出可能部分がフルオロホア、発色団、放射性核種、又は酵素である、請求項 4 3 に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメント。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本出願は、ヒト骨髓腫細胞及びヒト卵巣腫瘍細胞の新しい表面糖タンパク質、それへの抗体、及びそれに基づいた骨髓腫及び卵巣癌の診断及び治療の方法に関する。

【0002】**発明の背景**

多発性骨髓腫（MM）は、モノクローナル免疫グロブリン、通常モノクローナルIgG又はIgAの産生に關与する形質細胞の単クローンの新生物増殖により特徴づけられる、形質細胞の障害を具現化する。MMは全悪性疾患の1%、そして、すべての血液学的悪性疾患の10%を占める。多発性骨髓腫の年間発症率は10万人に4人である。この年間発症率は高齢人口に連関している。診断時の患者のメジアン年齢は61歳である。MMは、男性、そしてアフリカ人を祖先とする人々にきわめて多い。

【0003】

MMは、依然として治癒が稀な疾患である。ほとんどの患者は診断時から36～48ヶ月以内にその疾患で死亡する。MMへの有効な治療の限界は、低い細胞増殖速度と多剤耐性に主として関連する。多発性骨髓腫の治療には、誘導、維持、及び支持の側面が含まれる。治療の誘導部分は腫瘍体積を低減させること、及びプラトー相を達成することを目標とする。様々な薬物と、骨髓移植のような治療様式が考慮され、この疾患や全生存へのさしたる影響のないままに使用されてきた。

【0004】

多発性骨髓腫における支持療法はこの2、3年間で大いに発展した。エリスロポエチン置換を用いた成長因子支持と白血球（WBC）集団を刺激するGM-CSFは、好中球減少症の発生又は重篤化を減少させるか又は予防するのに安全で有効な方法である。さらに、高用量化学療法に次いで自己骨髓又は末梢血前駆細胞（PBMC）移植は、最近、完全な退縮率及び退縮期間を増加させてきた。し

かしながら、全生存期間はわずかに延長しただけであり、治療の証拠は1つも得られていない。すべての患者は、インターフェロン- α (IFN- α) 単独、又はステロイドとの併用の維持療法下にあっても、結局は再発する。能動予防接種よりは養子免疫療法のほうがMM患者により有効な治療法であることが証明される可能性がある。抗体指令療法に適している形質細胞上の既知表面抗原は、相対的にほとんど知られていない。可能性がある分子には、HM1.24、CD38、ICAM-1 (CD54)、CD40、CD45、CD20、及びシンデカン1が含まれる。今日まで、MMについて報告された専用マーカーはない。CD20、CD38、CD56及びCD130は、いずれも正常なB細胞、T細胞、又はナチュラルキラー (NK) 細胞上で発現されているマーカーである。

【0005】

卵巣癌は米国女性の癌死の5番目に多い原因であり、婦人科系の癌種のなかで最高の死亡数を有する。それは、1995年度において、推定26,600の新たな症例と14,500の死亡を占めた。全体の5年生存率は、この癌が卵巣に制限されていれば少なくとも75%であるが、遠隔転移を有すると診断された女性では17%へ減少する。通常、症状は、腫瘍が近くの諸構造を圧迫するか又はそれに侵入する、又は腹水が発生する、又は転移が臨床的に明らかになるまで、明確にならない。この結果として、卵巣癌を有する女性の2/3は、診断時にすでに進行した (ステージIII又はIV) 疾患を有する。卵巣の癌がきわめて多いのは60歳以上の女性である。他の重要な危険因子には、低い出産数と卵巣癌の家族歴が含まれる。遺伝性卵巣癌症候群に罹患する女性は0.1%より少ないが、これらの女性では、卵巣癌を発症する終生リスクが40%である可能性がある。

【0006】

卵巣癌に可能なスクリーニング検査には、両手骨盤診査、パパニコロー (Pap) 塗抹標本、腫瘍マーカー、及び超音波造影が含まれる。骨盤診査は多種多様な婦人科系の障害を検出し得るが、卵巣癌を検出するときの感度についてははっきりしていない。骨盤診査は、時には卵巣癌を検出し得るが、小さな、初期の卵巣腫瘍は、卵巣が深部の解剖学的位置にあるために、触診では検出されないこと

が多い。従って、骨盤診査により検出される卵巣癌は一般に進行性で、不良な生存期間と関連する。骨盤診査はまた、良性の付属器の塊（例、機能性の嚢胞）が見出される場合に、偽陽性を生じ得る。P a p 塗沫標本も悪性卵巣細胞を明らかにする場合があるが、これは卵巣癌の正しいスクリーニング検査であると考えられていない。超音波造影は、卵巣癌のサイズを推定し、1 c mほどに小さい塊を検出し、固形の病巣を嚢胞から区別することが可能であるので、卵巣癌のスクリーニング検査としても評価されてきた。

【0007】

血清腫瘍マーカーは、卵巣癌を有する女性においてしばしば上昇している。これらマーカーの例には、それぞれ癌胎児性抗原、卵巣嚢胞腺癌抗原、脂質関連シアル酸、N B / 7 0 K、T A G 7 2 . 3、C A 1 5 - 3、及びC A - 1 2 5が含まれる。腫瘍マーカーが、潜在性卵巣癌の自然経過においてスクリーニングに十分な感度を提供するほど十分早くから上昇するかどうかについての証拠は限られている。腫瘍マーカーは限定された特異性を有する場合がある。C A - 1 2 5は、健常女性の1%、良性の塊（例、子宮平滑筋腫、子宮内膜症、脾臓偽性嚢胞、肺過誤腫）を有する女性の6 ~ 4 0%、及び非婦人科系癌（例、脾臓、胃、結腸、乳房）を有する女性の2 9%において上昇すると報告されている。しかしながら、スクリーニング検査として使用される血清検査の性能特性に関する決定的なデータを提供するには、無症候性の女性に関するプロスペクティブ試験が必要とされている。

【0008】

発明の概要

その最も広い側面において、本発明は、ヒト骨髓腫細胞及び卵巣癌細胞の表面上に存在する共通エピトープを共有する抗原へ特異的に結合する、モノクローナル抗体、又はその結合フラグメントに関する。多発性骨髓腫細胞上の抗原は、還元条件下のS D S - P A G Eにより決定されるような、約7 8 k D a ~ 約1 2 0 k D aの分子量を有する単ーグリコシル化ポリペプチドである。卵巣癌細胞上の抗原は、還元条件下のS D S - P A G Eにより決定されるような、約7 6 k D a ~ 約2 1 3 k D aの分子量を有する単ーグリコシル化ポリペプチドである。この

抗原群は、ヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、ヒト慢性骨髄性白血病細胞に不在である。さらに、この抗原群は、乳癌腫瘍からの細胞に存在せず、前立腺癌細胞系に存在せず、神経芽細胞腫細胞系に存在せず、頸部癌細胞系に存在しない。この抗原群はエプシュタイン・バー・ウイルスで形質転換したB細胞腫瘍にも見出されない。

【0009】

本発明のモノクローナル抗体の非限定的な例は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)(20110-2209 VA, マナッサス、ブルヴァール大学、10801)に1999年8月3日に寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により産生されるものである。このATCC受託番号PTA-450を有する寄託されたハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体は、本明細書では、MoAb69とVAC69のいずれでも呼ばれる。

【0010】

さらに本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有する前記ハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と同一の抗原決定基へ結合することが可能である抗体；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系の結合フラグメント；並びに、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と同一の抗原決定基へ結合することが可能であるモノクローナル抗体の結合フラグメントに関する。

【0011】

そのようなモノクローナル抗体、又は抗体フラグメントは、ヒト由来であり得るか、又はそれらはげっ歯類のような他の哺乳動物種から誘導され得るか、それらのハイブリッド、キメラ抗体などであり得る。本発明のモノクローナル抗体の結合フラグメントには、限定しないが、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fv 、 Fd' 、又は Fd フラグメントが含まれる。

【0012】

もう1つの側面では、本発明は、ヒト骨髓腫細胞及び卵巢癌細胞の表面抗原へ特異的に結合するモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ技術により産生される細胞系に関する。多発性骨髓腫細胞上の抗原は、還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約78kDa～約120kDaの分子量を有する単ーグリコシル化ポリペプチドである。卵巢癌細胞上の抗原は、還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような、約76kDa～約213kDaの分子量を有する単ーグリコシル化ポリペプチドである。この抗原群は、ヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、ヒト慢性骨髓性白血病細胞に不在である。本発明によるモノクローナル抗体の非限定的な例は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により産生されるものである。さらに、この抗原群は、乳癌腫瘍からの細胞に存在せず、前立腺癌細胞系に存在せず、神経芽細胞腫細胞系に存在せず、頸部癌細胞系に存在しない。この抗原群はエプシュタイン・バー・ウイルスで形質転換したB細胞腫瘍にも見出されない。

【0013】

本発明のさらなる側面は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)(20110-2209 VA, マナッサス、ブルヴァール大学、10801)に1999年8月3日に寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系である。

【0014】

本発明のもう1つの広い側面では、ヒト多発性骨髓腫細胞の単離された表面抗原が記載され、この抗原は、還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約78kDa～約120kDaの分子量を有する単ーグリコシル化ポリペプチドであり；この抗原はヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、及びヒト急性骨髓性白血病細胞に不在である。この抗原は、乳癌腫瘍からの細胞に存在せず、前立腺癌細胞系に存在せず、神経芽細胞腫細胞系に存在せず、頸部癌細胞系に存在しない。それはエプシュタイン・バー・ウイルスで形質転換したB細胞腫瘍にも見出されない。この単離された多発性骨髓腫の表面抗原

は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体へ結合する。

【0015】

本発明のもう1つの広い側面では、ヒト卵巣癌細胞の単離された表面抗原が記載され、この抗原は、還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約76kDa～約213kDaの分子量を有する単ーグリコシル化ポリペプチドであり；この抗原はヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、及びヒト急性骨髄性白血病細胞に不在である。この抗原は、乳癌腫瘍からの細胞に存在せず、前立腺癌細胞系に存在せず、神経芽細胞腫細胞系に存在せず、頸部癌細胞系に存在しない。それはエプシュタイン-バー・ウイルスで形質転換したB細胞腫瘍にも見出されない。この単離された卵巣癌の表面抗原は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体へ結合する。

【0016】

本発明はまた、患者において骨髄腫細胞の増殖を阻害するか又はそれを殺傷する方法であって、上記のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントが骨髄腫細胞へ結合し、患者の免疫細胞による癌細胞の阻害又は殺傷を引き起こすのに十分な条件下で、上記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントを投与することによる、前記方法に関する。もう1つの側面では、患者において骨髄腫細胞を阻害するか又は殺傷する方法であって、上記のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントが癌細胞へ結合し、その細胞の増殖を阻害するか又は殺傷するのに十分な条件下で、細胞毒性部分にコンジュゲートした上記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントを投与することによる、前記方法が提供される。細胞毒性部分は、非限定的な例によれば、化学療法剤、光活性化毒素、又は放射活性剤であり得る。

【0017】

本発明のさらにもう1つの側面では、本明細書に記載される、モノクローナル抗体又は結合フラグメントと細胞毒性部分との上記コンジュゲートは、骨髄サン

ブルのような細胞サンプルにおいて骨髓腫細胞の増殖を阻害するか又はそれを殺傷するために *in vitro* で使用され得る。

【0018】

本発明はまた、本発明のモノクローナル抗体の結合部位を鏡映し、本発明の抗体により認識される骨髓腫及び卵巣癌の配座エピトープに特異的である、抗イディオタイプ抗体に関する。さらに本発明は、上記抗イディオタイプ抗体の、能動免疫化によるMM又は卵巣癌の治療への使用に関する。

【0019】

本発明のさらなる側面では、非限定的に骨髓細胞のような単離された細胞サンプルから骨髓腫細胞を除去する方法であって、上記のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントが結合している固形マトリックスへ、骨髓腫細胞がモノクローナル抗体又は結合フラグメントへ付着する条件の下で細胞サンプルを曝露し、そしてマトリックスへ結合しない前記細胞サンプルの細胞分画を単離することによる、前記方法が提供される。この方法は、例えば、自己骨髓移植用骨髓サンプルからの骨髓腫細胞の除去において使用され得る。

【0020】

本発明はまた、固形支持体へ結合した、上記のようなモノクローナル抗体、又は結合フラグメントに関する。

本発明のさらにもう1つの側面では、骨髓腫細胞若しくは腫瘍細胞、又は卵巣の癌細胞若しくは腫瘍細胞を患者において定位する方法であって、上記のモノクローナル抗体又は結合フラグメントを患者に投与し、モノクローナル抗体又はその結合フラグメントを前記患者の内部で癌細胞へ結合させ、そしてモノクローナル抗体又はその結合フラグメントの位置を患者の内部で決定することによる、前記方法が提供される。もう1つの関連した側面では、モノクローナル抗体、又は結合フラグメントは、例えば放射性核種で検出可能に標識化される。

【0021】

さらに本発明は、患者において卵巣癌細胞の増殖を阻害するか又はそれを殺傷する方法であって、上記のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントが卵巣癌細胞へ結合し、患者の免疫細胞による卵巣癌細胞の増殖阻害又は殺傷を引き起

こすのに十分な条件下で、上記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントを投与することによる、前記方法に関する。もう1つの側面では、患者において卵巣癌細胞を阻害するか又は殺傷する方法であって、上記のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントが卵巣癌細胞へ結合し、卵巣癌細胞の増殖阻害か又は殺傷を引き起こすのに十分な条件下で、細胞毒性部分にコンジュゲートした上記モノクローナル抗体又は結合フラグメントを投与することによる、前記方法が提供される。細胞毒性部分は、非限定的な例によれば、化学療法剤、光活性化毒素、又は放射活性剤であり得る。

【0022】

本発明のさらにもう1つの側面では、卵巣癌細胞を患者において定位する方法であって、上記のモノクローナル抗体又は結合フラグメントを患者に投与し、モノクローナル抗体又はその結合フラグメントを前記患者の内部で卵巣癌細胞へ結合させ、そして前記モノクローナル抗体又はその結合フラグメントの位置を前記患者の内部で決定することによる、前記方法が提供される。もう1つの関連した側面では、モノクローナル抗体、又は結合フラグメントは、例えば放射性核種で検出可能に標識化される。

【0023】

本発明のもう1つの側面は、本明細書の抗体群により認識されるエピトープを有する糖タンパク質を発現する多発性骨髄腫、卵巣癌又は他の癌細胞の診断を支援するために、血液のような体液へ癌細胞から流出した糖タンパク抗原の検出により、本明細書に記載される細胞表面糖タンパク質の体液サンプルにおける検出を可能にすることである。さらに、流出した表面タンパク質の血液のような体液におけるレベル、又はレベルの経時変化を決定することによって、疾患のステージをモニターし得て、抗癌療法の有効性をモニターすることが可能である。

【0024】

さらにもう1つの側面では、本発明は、上記のようなモノクローナル抗体又は結合フラグメントと製剤的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤を含んでなる医薬組成物に関する。

【0025】

もう1つの側面では、本発明は、非限定的な例によれば、フルオロホア、発色団、放射性核種、又は酵素のような検出可能部分で標識化される、上記のようなモノクローナル抗体又は結合フラグメントに関する。

【0026】

本発明の上記側面と他の側面は、以下の図面と「詳細な説明」を参照すればさらくによく理解されるだろう。

【0027】

発明の詳細な説明

ユニークな癌抗原の同定は、新生物疾患への選択的免疫療法の設計を可能にする。癌細胞により専ら発現されて、正常組織にはない決定基を利用する能力は、正常細胞の機能を隔離しながら新生物細胞をターゲティングして一掃することを保証する。この数十年間は様々な新生物疾患についての新規な癌抗原を求める多大な活動と重大な成功の場となってきたが、多くの悪性疾患について、癌特異抗原はまだ明確にされていない。癌抗原の大部分は正常な対照細胞から誘導され、それにより発現される自己抗原である。しばしば、癌抗原は、たとえより高いレベルで発現されても正常な抗原に同一であるか、又は自己抗原からの区別には不十分な無視し得る突然変異しか与えられていない。悪性細胞が免疫系から逃れる機序の1つは、その正常対照細胞との類似性であり、その結果、免疫系による悪性細胞の低認知をもたらす。

【0028】

本発明により、ヒト骨髓腫細胞とヒト卵巣癌腫瘍細胞に存在するが、正常細胞や白血病細胞には不在である新しい表面糖タンパク抗原群が提供される。そのような抗原群は骨髓腫及び卵巣癌における治療介入、並びに診断や細胞精製の目的のターゲットを示す。これらの抗原群は少なくとも1つの共通エピトープを共有する。

【0029】

本明細書に記載の抗原へのモノクローナル抗体の入手と新規癌抗原の同定には、対比 (contrasting) 又は示差 (differential) 免疫化として知られる技術を利用した。以下の実施例に記載されるように、異なる場所で提供される2種の

分岐免疫原を使用した。この二重免疫化は、個別免疫細胞集団の別々の排水（draining）リンパ節への移動を分極化させる。本明細書の実施例では、ヒト骨髓腫細胞の混合物を免疫原として使用して、骨髓腫細胞表面抗原へのマウスモノクローナル抗体を得た。この実施例における対照細胞、即ち関連した骨髓性白血病細胞系を使用して免疫応答を分極化し、所望の抗原を用いた免疫化の部位に近いリンパ節から、所望されない細胞を効果的に除去した。免疫化部位に近い排水リンパ節から所望の新生物を用いて抽出した免疫細胞を、マウス骨髓腫細胞との融合により不死化した。この対掌排水リンパ節は所望されない（対照）免疫原へ特異的な免疫細胞で満ちていた。

【0030】

先述のプロトコールの使用により、ヒト骨髓腫細胞及び卵巣癌細胞の表面上の抗原へ特異的に結合することが見出されるモノクローナル抗体の系列を調製した。上記の抗原群は少なくとも1つのエピトープを共有する。この抗原群は、多発性骨髓腫細胞上の抗原が還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約78kDa～約120kDaの分子量を有する単ーグリコシル化ポリペプチドであること；及びそれがヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、及びヒトB細胞骨髓性白血病細胞に不在であることにおいて、さらに特徴づけられる。

【0031】

卵巣癌細胞上の抗原は、還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約76kDa～約213kDaの分子量を有する単ーグリコシル化ポリペプチドであり；及びそれはヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、及びヒトB細胞骨髓性白血病細胞に不在である。本発明の抗体により認識される抗原はまた肝臓癌細胞にも存在している；従って、肝臓癌細胞の表面抗原は、骨髓腫及び卵巣癌の糖タンパク質と共通した少なくとも1つのエピトープを有する。上記の抗原群を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系の例は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）（20110-2209 VA, マナッサス、ブルヴァール大学、10801）に1999年8月3日に寄託され、ATCC受託番号PTA-450を与えられた

。

【0032】

上記の抗原群は乳癌腫瘍からの細胞に存在しないことが見出され、前立腺癌細胞系、又は神経芽細胞腫、又は頸部癌細胞系にも存在しなかった。それらはまた、エプシュタイン - バー・ウイルスで形質転換したB細胞腫瘍にも見出されなかった。

【0033】

本明細書でさらに具体化されるように、VAC69、ATCC受託番号PTA-450の下で寄託されたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体は、約78kDa～約120kDaのMr（分子量）を有する単鎖細胞表面糖タンパク質と反応することが示された。VAC69 MoAbは、肺、前立腺、乳房、頸部、神経芽細胞腫、リンパ腫、及び白血病のような一群のヒト癌と反応しなかった。さらに、この抗原は、乳房、卵巣、前立腺、結腸、又は肺に由来するようなヒト正常組織に検出されなかった。興味深いことに、VAC69は、ヒト悪性疾患のパネルで試験すると、卵巣癌と反応した。卵巣癌細胞により発現されるVAC69反応性抗原は、その発現のパターンにより、MMにより発現されるものとは異なるように見える。即ち、単一の高Mr糖タンパク質（約200kDa）であるか又は約76kDa～約213kDaのMrを有する糖タンパク質のセットのいずれかである。ある卵巣腫瘍は単一の高Mrバンドを発現し、それにより多重サブユニット抗原の存在はありそうにないことを示す。従って、より低いMrのバンドはより大きい糖タンパク質の分解産物を表す可能性がある。卵巣癌により発現される糖タンパク質の、MM抗原により発現されるものと比較したMrの増加は、VAC69が2種の異なる抗原上の共有エピトープを認識することを示唆するかもしれない。

【0034】

本発明は、先述の骨髓腫細胞及び卵巣癌細胞の表面糖タンパク質を認識するモノクローナル抗体、及びその結合フラグメントに関する。このように、本発明には、上記の寄託されたモノクローナル抗体と、先述の抗原への結合特異性を有するモノクローナル抗体、及びその結合フラグメントが含まれる。先述の抗原へ結

合し得るような抗体フラグメントには、限定しないが、 $F(ab')_2$ フラグメント、 Fab' フラグメント、 Fv フラグメント、 Fd' フラグメント、又は Fd フラグメントが含まれる。抗体は、ヒト、マウスのような哺乳動物からであり得るか、ハイブリッド又はキメラの抗体であり得る。この抗体フラグメントと、抗体からそれらを調製する手段は当業者に知られている。

【0035】

本発明のモノクローナル抗体及び抗体結合フラグメントは、1) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系から産生される；2) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と同一の抗原決定基へ結合することが可能である；3) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系の結合フラグメントである；あるいは、4) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体と同一の抗原決定基へ結合することが可能であるモノクローナル抗体の結合フラグメントであるものとして特徴づけられる場合がある。

【0036】

従って、先述のモノクローナル抗体及び結合フラグメントは、ヒト骨髓腫細胞とヒト卵巣癌細胞に存在するが、ヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、及びヒトB細胞骨髓性白血病細胞に不在である細胞表面糖タンパク質の共通エピトープを認識する。さらに、骨髓腫細胞上の細胞表面糖タンパク質は、還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約78kDa～約120kDaの分子量を有する単一ポリペプチドである。卵巣癌細胞上の細胞表面糖タンパク質は、還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約76kDa～約213kDaの分子量を有する単一ポリペプチドである。骨髓腫、卵巣癌、及び肝臓癌の細胞表面糖タンパク質が本発明の抗体により認識される共通エピトープを共有するので、そのような抗体は上記の病態への治療及び診断

に使用され得る。上記のように、この抗原はまた肝臓癌細胞の表面にも存在するが、乳癌腫瘍からの細胞に存在せず、前立腺癌細胞系に存在せず、神経芽細胞腫細胞系に存在せず、及び頸部癌細胞系に存在しない。それはまた、エプシュタイン・バー・ウイルスで形質転換したB細胞腫瘍にも見出されない。

【0037】

本発明はまた、本明細書に記載されて特徴づけられるような、ヒト骨髓腫細胞及び卵巣癌細胞の表面抗原へ特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系に関する。これらの抗原は、上記新生物の細胞表面糖タンパク質に含まれる共通の領域又はエピトープを有する。そのようなハイブリドーマの調製法は当業者に知られている。本明細書に記載の対比免疫化法は、所望の抗体を入手する様々な手段の一例にすぎない。本明細書に記載の表面糖タンパク質に対するモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系による抗体分子の培養における産生を提供する任意の技術が使用され得る。例えば、そのような技術には、限定しないが、Kohler 及び Milstein (Nature, 256: 495-497, 1975) によりはじめて開発されたハイブリドーマ技術、並びにトリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al., Immunology Today, 4: 72, 1983; Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80: 2026-2030, 1983)、及びヒトモノクローナル抗体を産生するEBV-ハイブリドーマ技術 (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss 社、770-96 頁、1985) が含まれる。

【0038】

本発明のもう1つの態様では、国際特許出願第WO98/02545号に記載の技術を利用して、モノクローナル抗体が無菌動物において産生され得る。また、本発明によれば、「キメラ抗体」の産生に開発された技術が使用に適している。好ましいのは、上記のようなヒトの疾患又は障害の治療に使用される、ヒト抗体か又はヒト化キメラ抗体である。なぜなら、ヒト抗体又はヒト化抗体そのものは、免疫応答、特にアレルギー反応を誘発する可能性が異種抗体よりずっと低いからである。

【0039】

本発明によれば、単鎖抗体の産生について記載される技術（Hustonの米国特許第5,476,786号及び5,132,405号；及び米国特許第4,946,778号）が、骨髓腫表面抗原特異的な単鎖抗体を産生するために適用され得る。本発明の追加の態様は、Fab発現ライブラリーの構築について記載の技術（Huse et al., Science, 246: 1275-1281, 1989）を利用して、所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメント、又はフラグメント誘導体、又は類似体の迅速かつ容易な同定を可能にする。

【0040】

抗体分子のイディオタイプを含有する抗体フラグメントは既知の技術によっても産生され得る。例えば、そのようなフラグメントには、限定しないが、抗体分子のペプシン消化により産生し得るF(ab')₂フラグメント；F(ab')₂フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって産生し得るFab'フラグメント、及び抗体分子をパパイン及び還元剤で処理することによって産生し得るFabフラグメントが含まれる。

【0041】

上記のように、本発明はまたヒト骨髓腫細胞及びヒト卵巢癌細胞の単離された表面抗原に関し、ここでヒト骨髓腫細胞により発現される抗原は、還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約78kDa～約120kDaの分子量を有する単ーグリコシル化ポリペプチドとして特徴づけられ、ヒト卵巢癌細胞により発現される抗原は、約76kDa～約213kDaの分子量を有するものとして特徴づけられる。これらの抗原はヒト末梢血液単核細胞に不在であり、ヒトB細胞に不在であり、及びヒトB細胞骨髓性白血病細胞に不在である。これらの抗原はまた、新鮮な腫瘍組織を使用して決定されるように、乳癌細胞に不在であり；前立腺癌細胞系を使用して決定されるように、前立腺癌細胞に不在であり；神経芽細胞腫細胞系を使用して決定されるように、神経芽細胞腫細胞に不在であり；及び頸部癌細胞系を使用することによって決定されるように頸部癌細胞に不在である。この糖タンパク質は新鮮に単離した肝臓癌腫瘍からの細胞の表面上に存在することが見出されてきた。従って、上記の方法は、肝臓癌の治療及び診断にも適用可能である。この単離された表面抗原は、アメリカン・タイプ・カル

チャー・コレクションに寄託され、受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により産生されるモノクローナル抗体へ結合することにおいてさらに特徴づけられる。

【0042】

モノクローナル抗体MA69は、多発性骨髄腫(MM)細胞上にある分子量78~120kDaの1つの単鎖糖タンパク質と首尾一貫して反応する。しかしながら、卵巣癌細胞上では、MA69は76~213kDaのサイズの範囲に及び1種又はそれ以上の糖タンパク質を認識する。上記の結果は、MA69がMM及び卵巣癌の細胞上で発現される2種の異なる分子と、これら新生物の細胞表面糖タンパク質に含まれる共通領域又はエピトープの認識を介して反応することを示唆する。このエピトープは卵巣及びMMの悪性疾患の細胞上で特有に発現され、肺癌、頸部癌、神経芽細胞腫、乳癌、前立腺癌、白血病及びリンパ腫のようなヒト腫瘍のパネルの細胞表面には見出されなかった。このように、本発明はまた概して、本発明の抗体により認識されるエピトープを含む細胞表面糖タンパク質にも関する。上記で注目されたように、このエピトープを含んでなる細胞表面糖タンパク質は、試験して上記にリストした様々な正常細胞及び癌細胞に不在である。

【0043】

本発明はまた、本発明の抗体群を使用する、多発性骨髄腫、並びに卵巣癌を含む、ヒトの骨髄腫及び関連した増殖異常疾患の処置の治療法に関する。本明細書に記載される治療及び診断の諸使用には原発腫瘍だけでなく転移腫瘍が含まれる。例えば、骨髄腫細胞又は卵巣癌細胞を患者において阻害するか又は殺傷する方法は、患者内の腫瘍細胞へのモノクローナル抗体、又は結合フラグメントの結合にとって十分な条件下で、上記のようなモノクローナル抗体、又は抗体結合フラグメントを単回用量か又は連続用量で患者へ投与することによって実行され得る。抗体の腫瘍細胞への結合が患者の免疫細胞による腫瘍細胞の増殖阻害及び/又は殺傷を誘発する。

【0044】

先述の治療は、化学療法、放射線等のような腫瘍細胞に対する他の治療、並び

に、上記の方法の後でオプソニン処置された腫瘍細胞に対する免疫系の攻撃を増強する補助療法を伴う場合がある。例えば、エリスロポエチン及び/又はGM-CSFのような増殖因子が、白血球を刺激して、患者の免疫適格性を支援するために患者へ同時投与され得る。

【0045】

さらに、本発明のキメラ又は他の組換え抗体は治療に使用され得る。例えば、抗腫瘍効果を有する第二のタンパク質（例、リンホカイン又はオンコスタチン）の少なくとも機能活性部分が結合した、本発明の抗体の抗原結合領域を少なくとも含んでなる融合タンパク質がヒト腫瘍を *in vivo* で治療するために使用され得る。さらに、ヒトFc領域、例えばIgG1へ抗原結合部位が結合しているキメラ抗体は、抗体依存型の仲介性細胞毒性又は補体仲介性細胞毒性を促進するために使用され得る。さらに、当技術分野で知られている組換え技術は、結合特異性の1つが本発明の抗体のそれである二重特異性抗体を構築するために使用され得る（例えば、米国特許第4,474,893号を参照のこと）。

【0046】

本発明の糖タンパク抗原が細胞表面上に存在する他の増殖異常疾患も、本明細書に記載の方法により治療可能であることが当業者には理解されるだろう。

上記の方法では、抗体又は結合フラグメントが修飾することなく利用され、骨髄腫又は卵巢癌細胞の表面抗原へ抗体又はフラグメントが結合し、それに対する免疫攻撃をその場で刺激することに依存する。治療法のもう1つの側面では、細胞毒性薬が結合しているモノクローナル抗体又は結合フラグメントを使用して、上記の方法が実行され得る。細胞毒性の抗体又は抗体フラグメントの腫瘍細胞への結合はその細胞の増殖を阻害するか又はそれを殺傷する。非限定的な例によれば、好適な細胞毒性薬は化学療法剤、光活性化毒素、又は放射活性剤である。例えば、細胞毒性薬は、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、ゲロニン（gelonin）、メルファラン、ブレオマイシン、アドリアマイシン、ダウノマイシン、又はアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質（PAP, PAPII, PAP-S）のようなものである。

【0047】

当業者が理解するように、よく知られた技術により腫瘍特異抗体ヘカプサルされ、腫瘍組織を特異的に破壊するために運搬され得る、数多くの放射性同位体及び化学細胞毒性薬がある。例えば、Blattlerらの米国特許第4,542,225号を参照のこと。光活性化毒素の例には、ジヒドロピリジン-及びオメガ-コノトキシンが含まれる(Schmidt et al., J Biol. Chem., 1991, 266 (27): 18025-33)。使用され得る造影剤及び細胞毒試薬の例には、 ^{125}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^3H 、及び ^{14}C ；フルオレセイン及びローダミンのような蛍光ラベル、及びルシフェリンのような化学発光剤が含まれる。抗体は、当技術分野で知られている技術を使用して、そのような試薬で標識化され得る。例えば、抗体の放射標識に関する技術については Wenzel and Meares, Radioimmunomaging and Radioimmunotherapy 「放射免疫造影と放射免疫療法」、エルセヴィエ、ニューヨーク(1983)を参照のこと(また、Colcer et al., 「ヒトガン異種移植片をヌードマウスにおいて局在化する放射医薬品としてのモノクローナル抗体の使用」, Methods Enzymol., 121: 802-16, 1986: 「放射標識抗体の癌療法における治療使用の順序、分析、結果及び将来展望」 Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. (編) 303-16 頁(アカデミックプレス、1985)も参照のこと)。

【0048】

本発明の抗体又は抗体フラグメントの他の共有及び非共有修飾物が本明細書で考慮され、それには、抗体又はフラグメントがすでに結合した細胞の増殖阻害又は殺傷を誘発するための薬剤であって、同時投与されるか又は抗体又はフラグメントの後で投与される前記薬剤が含まれる。

【0049】

本発明の抗体群への抗イディオタイプモノクローナル抗体はまた、能動腫瘍免疫化及び腫瘍療法において治療的に使用され得る(例えば、Hellstrom ら、「抗イディオタイプ」 Covalently Modified Antigens and Antibodies in Diagnosis and Therapy, 同上、35-41 頁、を参照のこと)。

【0050】

多発性骨髄腫の分野では、本発明の抗体又は抗体フラグメントは、骨髄腫細胞

が除去された細胞サンプルの調製においてさらなる有用性を有する。この使用が特に重要であるのは自己骨髄移植においてであり、ここでは骨髄のサンプルが、患者が高用量化学療法を受けることに先立って、癌患者から採取される。高用量化学療法の目標は癌細胞を破壊することであるが、それはまた骨髄細胞の枯渇をもたらす。そのような処置の後で、採取した骨髄細胞が患者へ再導入される。

【0051】

骨髄腫及び関連疾患では、採取された骨髄に骨髄腫細胞が混入しているので、無処置の骨髄を再導入すれば疾患を再導入するだけのことである。癌細胞の再導入を防ぐための従来法には、骨髄サンプルを化学療法剤や他の抗新生物薬で *in vitro* 処置することが含まれた。他の方法には、癌細胞のサンプルをパージする (*purging*) ことが含まれる。

【0052】

本発明のさらなる実施では、本発明のモノクローナル抗体及びフラグメントが、患者の骨髄サンプルから、患者への再導入の前に骨髄腫細胞を除去するために使用され得る。1つの非限定的な例では、モノクローナル抗体又は結合フラグメントが、ビーズのようなマトリックスへ付着される。このことは、抗体又はその結合フラグメントを含んでなるアフィニティーマトリックスを調製するいくつかの既知方法のいずれでも達成し得る。次いで、サンプル中の骨髄細胞とマトリックスへ付着した抗体又は結合フラグメントとの抗原/抗体相互作用を介した結合を促進する条件下で、マトリックスを含むカラムへの当該細胞の通過によるように、骨髄サンプルをマトリックスへ曝露する。サンプル中の骨髄腫細胞がこのマトリックスに付着する一方、カラム流出液、即ち非吸着性の細胞集団には骨髄腫細胞が枯渇している。この方法の有効性は、以下に記載のような検出可能標識化抗体を使用することによるように、残存した骨髄腫細胞について細胞を検査することによってモニターされ得る。この方法は、有効性を高めるために繰り返されるか又は変更され得る。

【0053】

このパージング法(例えば、Ramsay et al., J. Clin. Immunol., 8 (2): 81-88, 1988 を参照のこと)は、癌細胞を除去するか又は殺傷する他の方法とともに

に実施され得るが、それには、限定しないが、精製された骨髓細胞を化学療法剤へ曝露することが含まれる。そのような化学療法剤には、*in vivo* の治療的処置についてすでに記載されたもののような化学療法剤にコンジュゲートした本発明の抗体又は抗体結合フラグメントの使用が含まれる。従って、本発明の抗体又は抗体フラグメントの細胞毒性薬とのコンジュゲートは、細胞サンプル中の腫瘍細胞の体外 (*ex vivo*) 殺傷に使用され得る。さらにこの方法には、骨髓腫細胞が迅速に分化して、それによりその細胞表面上での癌特異抗原の発現をアップレギュレートするように刺激するために、サイトカイン (例、GM-CSF, IL-6)、サイトカイン受容体 (例、IL-6 受容体)、マイトジェン (例、アメリカマゴボウマイトジェン (PWM))、又は接着分子 (例、CD40 リガンド) へ細胞を曝露することが含まれる。これらの治療様式は、本発明によるモノクローナル抗体又はそのフラグメントとのインキュベーションにより達成される *in vitro* 仲介性細胞毒性を骨髓腫細胞が受けやすくなるように意図されている。

【0054】

本発明の関連した側面では、本発明によるモノクローナル抗体が、標識化されないか、又は治療薬で標識化されるかのいずれかで、免疫療法に使用され得る。上記の治療薬は、当技術分野で定常的に実施される技術を使用して、記載のモノクローナル抗体へ直接的にか、又は間接的にカップルされ得る。間接カップリングの1例は、スペーサー部分の使用による。スペーサー部分はまた、不溶性又は可溶性のいずれかであり得て (Dieher et al., 1986, Science, 231: 148)、ターゲット部位でのモノクローナル抗体分子からの薬物放出を可能にするように選択され得る。抗癌免疫療法のために本発明のモノクローナル抗体へカップルされ得る治療薬の例は、薬物、放射性同位体、レクチン、及び毒素である。

【0055】

本発明のモノクローナル抗体にコンジュゲートされ得る薬物には、タンパク様化合物だけでなく非タンパク様化合物が含まれる。「非タンパク様薬物」という用語には、薬物と典型的に言われる化合物、例えば、マイトマイシンC、ダウノマイシン、及びビンブラスチンが含まれる。本発明のモノクローナル抗体が標識化され得るタンパク様薬物には免疫調節剤と他の生物学的応答調節剤が含まれる

。

【0056】

「生物学的応答調節剤」という用語は、本発明のモノクローナル抗体に特異的である担抗原腫瘍の破壊を増強するようなやり方で免疫応答を調節することに関わる物質を含むことを意味する。免疫応答調節剤の例には、リンホカインのような化合物が含まれる。リンホカインには、腫瘍壊死因子、インターロイキン（例えば、IL-1～IL-15）、リンホトキシン、マクロファージ活性化因子（MAF）、遊走阻止因子（MIF）、コロニー刺激因子（CSF）、及びインターフェロンが含まれる。本発明のモノクローナル抗体が標識化され得るインターフェロンには、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、及び γ -インターフェロン、及びそれらのサブタイプが含まれる。

【0057】

放射同位体がコンジュゲートした、本発明のモノクローナル抗体を免疫療法に使用するには、白血球分布及び、同位体の安定性及び放射などの要因に依存して、ある種の同位体が他のものより好ましい場合がある。所望されるならば、腫瘍細胞の分布が、上記の *in vivo* 診断技術により評価され得る。悪性疾患によっては、ある放射体のほうが他のものより好ましい場合がある。一般に、 α 及び β 粒子を放出する放射性同位体が免疫療法に好ましい。例えば、動物が癌腫にあるような固形腫瘍の病巣を有するならば、 ^{90}Y のように、数ミリメートルの組織を貫通し得る高エネルギー β 放射体が好ましい場合がある。一方、悪性疾患が、白血球の場合のように、単純なターゲット細胞からなるとすれば、 ^{212}Bi のように、より短いレンジの高エネルギー α 放射体が好ましい場合がある。治療目的のために本発明のモノクローナル抗体へ結合され得る放射性同位体の例は、 ^{251}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd 、及び ^{188}Re である。

【0058】

レクチンは、通常植物材料から単離される、特定の糖部分へ結合するタンパク質である。多くのレクチンはまた、細胞を凝集させ、リンパ球を刺激することが

できる。リシンは免疫療法において使用されてきた誘導レクチンである。このことは、好ましくは、毒性の原因となるリシンの α -ペプチド鎖を抗体分子へ結合し、有毒効果の部位特異的デリバリーを可能にすることによって達成される。

【0059】

毒素は、植物、動物、又は微生物により産生される有毒物質であり、十分な用量では、しばしば致死性である。ジフテリア毒素(DT)は、ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheria*)により産生される物質であり、治療に使用され得る。DTは、適当な条件下で分離され得る α サブユニット及び β サブユニットからなる。有毒な α 成分を抗体へ結合し、本発明のモノクローナル抗体に特異的である担抗原細胞への部位特異的運搬のために使用し得る。本発明のモノクローナル抗体へカップルされ得る他の治療薬は既知であるか、又は当業者により容易に確定され得る。

【0060】

本発明の標識化又は非標識化モノクローナル抗体はまた、上記のような治療薬と組み合わせても使用し得る。特に好ましいのは、本発明のモノクローナル抗体と免疫調節剤及び他の生物学的応答調節剤を含んでなる治療用の組み合わせである。従って、例えば、本発明のモノクローナル抗体は α -インターフェロンと組み合わせて使用し得る。この治療様式は、癌細胞によるモノクローナル抗体反応性抗原の発現を高めることによって、モノクローナル抗体の癌腫ターゲティングを増強する(Greiner et al., 1987, Science, 235: 895)。あるいは、本発明のモノクローナル抗体を γ -インターフェロンと組み合わせて使用し、エフェクター細胞によるFc受容体の発現を活性化して増加させ、それによりモノクローナル抗体のエフェクター細胞への結合とターゲット腫瘍細胞の殺傷の増強をもたらしてもよい。当業者は、本発明のモノクローナル抗体の効力を増強させる所望のエフェクター機能を創出するために、様々な生物学的応答調節剤を選択し得るだろう。

【0061】

本発明のモノクローナル抗体が本明細書に記載されるもののような様々な治療薬と組み合わせて使用される場合、モノクローナル抗体と治療薬の投与は、通常

、実質的に同時的に生じる。「実質的に同時的に (substantially contemporaneously)」という用語は、モノクローナル抗体と治療薬が時間に関して適度に近い間でもに投与されることを意味する。通常、モノクローナル抗体の前に治療薬を投与することが好ましい。例えば、治療薬はモノクローナル抗体より1～6日前に投与され得る。治療薬の投与は、例えば、腫瘍の性質、患者の状態、及び薬剤の半減期のような要因によって、連日であるか、又は他の間隔であり得る。

【0062】

本発明のモノクローナル抗体を使用すれば、本明細書に記載の特性をすべて組み合わせる治療法を設計することが可能である。ある状況では、本発明のモノクローナル抗体の投与に先立って、1つの治療薬、又は治療薬群を、エフェクター細胞及びその同等物、又は異なる治療薬又は治療薬群と組み合わせて投与することが所望される場合もある。例えば、はじめに γ -インターフェロンとインターロイキン-2を連日、3～5日間投与し、5日目に本発明のモノクローナル抗体を、エフェクター細胞、並びに γ -インターフェロン及びインターロイキン-2と組み合わせて投与することによって、悪性疾患を有する患者を治療することが所望され得る。

【0063】

また、本発明のモノクローナル抗体をその膜内に有するリポソームを利用して、SCLC-特異抗原を発現する腫瘍の領域特異的にこのリポソームを運搬することも可能である。これらリポソームは、モノクローナル抗体に加えて、上記のような免疫治療薬を含有し、それらが腫瘍部位で放出され得るように製造され得る(例えば、Wolff et al., 1984, Biochem. et Biophys. Acta, 802: 259 を参照のこと)。

【0064】

本発明のモノクローナル抗体の投与についての投与量範囲は、悪性疾患の症状が改善される所望の効果を産生するのに十分に大きいものである。投与量は、所望されない交差反応、アナフィラキシー反応、及びその同等物のような不都合な副作用を引き起こすほどに多くてはならない。一般に、投与量は、患者の年齢、

状態、性、及び病気の程度に応じて変化し、当業者により決定され得る。投与量は合併症の発生時に担当医により調整され得る。投与量は、1日又は数日の間、1日1回又は数回の用量投与において、約0.1mg/kg～約2000mg/kg、好ましくは約0.1mg/kg～約500mg/kgで変化し得る。

【0065】

一般に、本発明のモノクローナル抗体が治療薬とコンジュゲートされて投与される場合、*in vivo* 免疫診断造影について使用されるものに比較して、より低い投与量が使用され得る。本発明のモノクローナル抗体は、注射により非経口か又は経時的な漸次灌流により投与され得る。本発明のモノクローナル抗体は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内、又は経皮的に、単独でか又はエフェクター細胞と組み合わせて、投与され得る。非経口投与用の調製物には、無菌の水性又は非水性溶液、懸濁液、及びエマルジョンが含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、及びオレイン酸エチルのような、注射可能な有機エステルである。水性の担体には、生理食塩水及び緩衝化培地を含む、水、アルコール/水性溶液、エマルジョン又は懸濁液が含まれる。非経口担体には、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンガー、又は脂肪油が含まれる。静脈内担体には、体液及び栄養分の補充物、(リンガーデキストロースに基づくもののような)電解質補充物などが含まれる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス、等のような保存剤や他の添加物も存在し得る。

【0066】

本発明の治療法のもう1つの側面では、化学療法剤、光活性化毒素、又は放射性核種のような細胞毒性薬とコンジュゲートした抗体、又はその結合フラグメントが、上記パージング技術の不在下で、骨髓サンプル由来の骨髓腫細胞を阻害するか又は殺傷するために、*in vitro* 又は *ex vivo* で使用され得る。細胞毒性抗体、又は抗体フラグメントを用いたサンプルの処置は、移植される組織から細胞を除去することによって、骨髓移植、特に自己骨髓移植の有効性を高めるために、癌細胞を殺傷する他の方法と組み合わせ得る。上記の方法には、細胞をサイトカイン等へさらに曝露することが含まれる。このように、本明細書には、本明細

書に記載のモノクローナル抗体又はその結合フラグメントが結合している固形マトリックスへ、骨髓腫細胞がモノクローナル抗体又はその結合フラグメントへ付着する条件の下で、細胞サンプルを曝露し、そして、マトリックスへ結合しない細胞サンプルの細胞分画を単離する、工程を含む、単離された細胞サンプルから骨髓腫細胞を除去する方法が記載される。非限定的な例によれば、骨髓腫細胞は、特に移植に、及び好ましくは、自己骨髓移植に使用される。

【0067】

本発明のさらなる側面では、固形支持体へ結合した、本明細書に記載のモノクローナル抗体、又は抗体結合フラグメントを含む組成物が提供される。本発明において使用される固形支持体は結合の反応条件にとって不活性である。本発明に使用される固相支持体は、モノクローナル抗体又はその結合パートナーへ付くために反応基又は活性化基を有さなければならない。もう1つの態様では、固相支持体は、炭水化物ポリマーであるSEPHAROSE（登録商標）、SEPHADEX（登録商標）、又はアガロースのような、有用なクロマトグラフィー支持体であり得る。本明細書で使用されるように、固相支持体は特定の支持体の形式に限定されない。むしろ、非常に多くの支持体が利用可能であり、当業者に知られている。固相支持体には、例えば、シリカゲル、樹脂、誘導化プラスチック膜、ガラスビーズ、コットン、プラスチックビーズ、アルミナゲル、磁性ビーズ、膜（限定しないが、ニトロセルロース、セルロース、ナイロン、及びグラスウールが含まれる）、プラスチック及びガラスのディッシュ又はウェル、等が含まれる。

【0068】

本発明はまた、上記のモノクローナル抗体とその結合フラグメントを使用する、多発性骨髓腫及び卵巣癌の診断及び造影法に関する。本発明の表面抗原を担う他の癌もこれらの診断法へ適用可能である。この方法には、放射性核種のような検出可能部分にコンジュゲートしているか又はしていない、本明細書に記載のモノクローナル抗体又は結合フラグメントの投与又は注入が関わる。投与又は注入の後で、抗体又は抗体フラグメントが腫瘍細胞へ結合し、その後で抗体又はフラグメントの位置が検出される。放射性核種で標識化されたもののような、検出可

能に標識化された抗体又はその結合フラグメントについては、造影機器を使用して体内における薬剤の位置を同定し得る。標識されない抗体又はフラグメントの使用については、抗体又は抗体フラグメントを定位する第2の検出可能試薬が投与され、それにより好適にも検出され得る。これらの方法は他の抗体についても使用されていて、当業者は、抗体又はフラグメントの体内における位置を造影するこれら様々な方法を十分認知するであろう。

【0069】

卵巣癌、並びに本明細書に記載の抗原を発現する他の癌の場合、本発明は、血液、血清、又は血漿のような体液に流出した細胞表面糖タンパク質の同定及び測定による癌の診断に関する。卵巣癌はその初期段階で診断することが特に困難な癌であり、従って早期治療の機会を逸するので、早期診断の方法が特に必要とされている。例えば、本発明の抗体又はそのフラグメントの使用による、全血サンプル中の流出表面糖タンパク質の測定はそのような早期診断と治療機会を提供する。そのような治療は、他の薬剤と組み合わせた先述の抗体をベースとする療法、又は本発明の抗体の不在下でのそのような薬剤の使用を含み得る。

【0070】

さらに、血液又は他の体液において測定される流出卵巣癌抗原のレベルは、外科、化学療法、放射線療法、及び本発明の治療法を含む卵巣癌治療の経過をモニターする手段を提供する。流出抗原のレベルを疾患の重度と関連づけることによって、流出抗原のレベルを使用して、原発性腫瘍及び/又は転移の成功した除去、及び他の治療法の経時的な有効性を示すことができる。レベルの経時的な減少は患者における腫瘍負荷の低減を示す。対照的に、レベルの無変化又は増加は、治療の無効性か又は腫瘍の継続増殖を示す。

【0071】

本発明はまた、ヒト骨髓腫細胞の表面上の抗原、即ち、上記に記載のようにさらに特徴づけられる抗原へ特異的に結合するモノクローナル抗体又はその結合フラグメントを、製剤的に許容される担体又は希釈剤とともに含んでなる医薬組成物に関する。さらに本発明は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系が

ら產生されるモノクローナル抗体；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により產生されるモノクローナル抗体と同一の抗原決定基へ結合することが可能である抗体；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系の結合フラグメント；及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC受託番号PTA-450を有するハイブリドーマ細胞系により產生されるモノクローナル抗体と同一の抗原決定基へ結合することが可能であるモノクローナル抗体の結合フラグメントを包含する、モノクローナル抗体又はそのフラグメント；及び製剤的に許容される担体、賦形剤又は希釈剤を含んでなる医薬組成物に関する。抗体フラグメントには、限定しないが、 $F(ab')_2$ フラグメント、 Fab' フラグメント、 Fv フラグメント、 Fd' フラグメント、又は Fd フラグメントが含まれる。

【0072】

医薬組成物には、製剤的に許容される担体、賦形剤又は希釈剤が含まれる。好ましくは、抗体又はその結合フラグメントは、静脈内投与のように非経口で運搬される。他の投与形式には、限定しないが、皮下、腹腔内、経口、経鼻、鞘内、直腸内、筋肉内の投与などが含まれる。当業者に知られた好適な緩衝液、担体、及び他の成分が、好適な製品寿命と投与との適合性のために本発明の抗体又はフラグメントを含んでなる組成物を製剤化するとき使用される。これらの物質には、緩衝化剤やタンパク安定化剤（例、多糖）のような補助剤が含まれ得る。

【0073】

本発明の抗体はまた、抗体が特異的である抗原を保有するヒト多発性骨髄腫及び卵巣癌の細胞の検出についての、*in vitro* と *in vivo* の両方の診断応用に有用である。*in vitro* 診断法には、（例えば、切除腫瘍標本のヒト組織細胞に関する）腫瘍細胞の免疫組織学的検出、又は（例えば、血液サンプル又は他の生物学的流体における）腫瘍関連抗原の血清学的検出が含まれる。免疫組織化学の技術は、組織標本のような生物学的標本を本発明の抗体で染色し、次いで、その抗原へ複合した抗体の存在を抗体-抗原複合体として検出することを含む。標本に

関するそのような抗体 - 抗原複合体の形成は、その組織における多発性骨髄腫細胞の存在を示す。抗体の標本上での検出は、免疫酵素技術、例えば免疫ペルオキシダーゼ染色技術、又はアビジン - ビオチン技術、又は免疫蛍光技術のような当技術分野で知られている技術を使用して達成され得る（例えば、Ciocca et al., 「モノクローナル抗体を使用する免疫組織化学技術」Methods Enzymol, 121: 562-79, 1986 及び Kimball (編)「免疫学入門」(第2版)113-117頁(マクミラン出版社、1986)を参照のこと)。

【0074】

血清学的診断技術は、多発性骨髄腫に罹患していると考えられる患者の血清又は他の生物学的流体へ分泌されたか又は「流出した」腫瘍関連抗原の検出及び定量に関わる。そのような抗原は、放射免疫定量法(RIA)又は酵素結合性免疫吸着剤検定(ELISA)のような当技術分野で知られている技術を使用して、体液において検出され得るが、ここでは「流出した」抗原と反応性の抗体を使用して抗原の体液サンプル中の存在を検出する(例えば、Uotila et al., 「ヒトAFPへのモノクローナル抗体を用いた2部位サンドイッチELISA」J. Immunol. Methods, 42: 11, 1981 及び Allum et al., 同上、48-51頁を参照のこと)。流出した卵巣癌抗原の検出も上記のように実施し得る。

【0075】

さらに上記のように、本発明の抗体群は、流出した卵巣癌細胞抗原の全血、血清、又は血漿のような体液における測定、卵巣癌の診断、及び治療法の有効性のモニターにも有用である。

【0076】

本発明のなおさらなる側面では、上記のように、骨髄腫表面糖タンパク質及び卵巣癌糖タンパク質への特異性を有するモノクローナル抗体、又はその結合フラグメントが、先述の抗原を有する細胞を診断するか又は同定するために使用されるように検出可能部分で標識化される。そのようなラベルの非限定的な例には、フルオレセインイソチオシアネートのようなフルオロホア；発色団、放射性核種、又は酵素が含まれる。そのような標識化された抗体又は結合フラグメントは、抗原の組織学的定位、ELISA、細胞分取、及び他の免疫学的技術のために使

用されて、例えば、抗原、その抗原を担う細胞を検出及び/又は定量し得る。上記のように、そのような標識化された抗体、又はそのフラグメントの特殊な使用は、移植、特に自己骨髄移植に先立って、骨髄組織から骨髄腫細胞を枯渇させることの有効性を決定することにある。

【0077】

実施例

本発明は、以下の非限定的な実施例を参照にしてさらによく理解され得るが、これらは本発明の例示として提供される。以下の実施例は本発明の好ましい態様をより十分に示すために提示されるのであって、決して本発明の広範な特許請求の範囲を制限するものと解釈されてはならない。

【0078】

実施例1：ハイブリドーマの調製及びスクリーニング

1. 細胞の供給源：ヒト骨髄腫細胞系（U266, OPM, RPMI 1860, KR12及びNCI H929）と慢性骨髄性白血病細胞系（K562）はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）から購入した。新鮮なヒト卵巣癌、乳癌、及び肝臓癌の標本を使用した。前立腺癌細胞系、LnCaP（ATCC）；神経芽細胞腫細胞系、NCI H2106（ATCC）；及び頸部癌細胞系、Caski（ATCC）、並びにEBV形質転換B細胞腫瘍、Namalwa（ATCC）も同様に評価した。

【0079】

2. 免疫化：形質細胞腫の細胞、U266、RPMI 1860及びOPMのプール（Ribiaアジュバント、50%を含有する50µlにおいて全部で 5×10^6 個）を用いて左のフットパッドにおいて、及びK562細胞（Ribiaアジュバント、50%を含有する50µlにおいて全部で 5×10^6 個）を用いて右のフットパッドにおいて、マウスを免疫化した。この免疫化を14日後に繰り返した。左膝窩リンパ節を除去し、抽出した細胞を、第二の免疫化から3日後に融合した。

【0080】

3. B細胞ハイブリドーマの産生：多発性骨髄腫細胞に特異的なモノクロー

ナル抗体を従来法により産生した。免疫化したマウスからの膝窩（左）リンパ節細胞を、ポリエチレングリコール（PEG）の存在下でマウス骨髓腫細胞系（Sp2/0）と融合し、ヒト形質細胞腫細胞へ特異的に結合するモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを形成した。

【0081】

4．細胞性ELISA - フローサイトメトリー分析：in vitro 培養で増殖させた様々なヒト腫瘍細胞系を洗浄し、細胞性ELISAスクリーンに基づいて選択されたモノクローナル抗体のパネルで染色した。氷上で30分のインキュベーションの後、この細胞を洗浄し、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）がコンジュゲートしたウサギ抗マウスIgGモノクローナル抗体とともにインキュベートした。蛍光の平均強度を、FACScaliber（ベクトン・アンド・ディキンソン）を使用するフローサイトメトリーにより決定した。細胞カウントに相関する染色強度をプロットするヒストグラムにより、モノクローナル抗体69（MA69）のヒト形質細胞腫細胞への特異性が示された。

【0082】

5．ウェスタンブロット分析：30%アクリルアミド/0.8%ビスアクリルアミドのストック溶液から、SDS-PAGEを調製した。標準法に従って、TRIS-HCl/SDS、pH8.8、滅菌蒸留H₂O、10%（w/v）過硫酸アンモニウム、及びTEMEDを加えた。サンプル容量が10μlより多い場合、スタッキングゲルを加えた。以下のプロトコールにより、細胞由来の表面膜タンパク質を電気泳動用に調製した：in vitro 培養物由来の細胞を回収して洗浄した。凍結融解サイクル（-80 と37）を3回繰り返した後で、この細胞を溶解させた。溶解液は使用まで-20 で保存した。2500rpmで30分遠心分離した後で、細胞溶解液から膜を調製した。細胞質のタンパク質と膜を含む上澄液を、超遠心を使用する40,000rpmでの遠心分離によりさらに分離した。膜分画を含有するペレットを回収し、-20 で保存した。

【0083】

4、約1.5時間、150Vでタンパク質を分離した。分離後、4、一晚、22Vのランで、トランスファーボックスにおいて、このタンパク質をニトロ

セルロース上に転移させた。室温で45分間、BLOTT O A（登録商標）を使用してニトロセルロースをブロックし、はじめ室温で45分間一次抗体と反応させた後、洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートした適切な二次抗体と反応させた。洗浄後、検出にアマーシャムECL試薬を使用した。

【0084】

上記のように免疫化したマウスから産生されるB細胞ハイブリドーマの一次スクリーンの結果を図1に示す。このスクリーンの方法は、B細胞ハイブリドーマ培養物から除去した上澄液の、ヒト形質細胞腫細胞の1ウェルプールへの結合を試験する細胞性ELISAであって、対照として役立つヒト骨髄性白血病細胞系（K562）への結合と比較した。正味結合性を、K562対照細胞系への結合性を引いた後のヒト形質細胞腫細胞のプールへの結合性について記録した吸光度として算出した。初回スクリーンでは4種のハイブリドーマのプールを各ウェルで試験した。高レベルの示差結合性を記録するハイブリドーマプールを選択し、次いで、各ハイブリドーマを個別に試験した。

【0085】

新鮮な乳癌腫瘍、前立腺癌細胞系、神経芽細胞腫細胞系、さらに頸部癌細胞系への結合は少しも検出されなかった。さらに、EBVで形質転換したB細胞腫瘍への結合も検出されなかった。図2は、選択されたハイブリドーマの二次スクリーンについての結果を示す。ハイブリドーマ番号69、75、及び194、即ちMoAb69、75、及び184は、K562細胞と比較して、特異性を示した。

【0086】

上記データのさらなる分析において、二次スクリーンに比較した一次スクリーンの正味結合値（O.D.）を図3に示す。

【0087】

実施例2：モノクローナル抗体の特異性評価

モノクローナル抗体7/16/99のパネルを使用し、フローサイトメトリーにより分析した細胞表面染色を図4に示す。パネルFにMA69（本明細書ではVAC69とも呼ばれる）による形質細胞腫細胞の強い染色が示される一方で、

ヒトB細胞腫瘍系のIM9及びHT（アイソタイプ対照の付いたIM9、パネルA；MA69の付いたIM9、パネルB；アイソタイプ対照の付いたHT、パネルC；MA69の付いたHT、パネルD）、及びアイソタイプ対照モノクローナル抗体の付いた骨髓腫細胞系U266（パネルE）を含む対照細胞系では陰性の染色が示された。さらに、正常個体由来の末梢血液細胞（PBMC）は抗体へのわずかな結合を示した。

【0088】

モノクローナル抗体のMA69を産生するハイブリドーマ細胞系、IMM002.69.47.4は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（20110-2209 VA, マナッサス、ブルヴァール大学、10801）に1999年8月3日に寄託され、受託番号PTA-450を割当てられた。

【0089】

実施例3：モノクローナル抗体の細胞表面糖タンパク質への結合

MA69と呼ばれる（本明細書ではVAC69とも呼ばれる）B細胞ハイブリドーマの培養物は、ウェスタンブロットを使用すると、5種のヒト骨髓腫細胞系（RPMI1860, U266, KR12, OPM-1及びNCIH929）由来の骨髓腫膜上に明瞭なバンドを検出することが示された。この5種の骨髓腫細胞系のうち4種は、約78～約120kDaの近似分子量を有する細胞表面糖タンパク質への結合を示した。陰性対照として役立つPBMCはこの抗体への結合を示さなかった。さらに、2種のヒトB細胞腫瘍（HT及びIM9）の染色は観察されなかった（図5）。

【0090】

図6は、細胞性ELISA法を使用する、図5に記載の実験の反復結果を示す。この実験では、MA69は5種の骨髓腫細胞系のうち5種において様々な強度で明瞭なバンドを検出した。正常PBMC及びヒトB細胞腫瘍（HT）からなる対照膜調製物は、この抗体により染色されなかった。

【0091】

実施例4：培養骨髓腫細胞から流出した表面糖タンパク質の検出

ヒト骨髓腫細胞を、AIM-V無血清培地において5日間増殖させた。この培

地を回収し、Centricon装置（アマーシャム）を使用して10倍濃縮した。対照として、in vitro で培養したMMから細胞溶解液を調製し、SDS-PAGEにより分画した。濃縮した増殖培地も対照として同時に分画した。プロットして、MA69を用いてプローブすると、表面糖タンパク質が培地に存在することが示された（図7、左レーン）。

【0092】

上記の結果は、VAC69反応性の糖タンパク質が培養MMの増殖培地に検出され得ることを示す。さらに、さらなる実験は卵巣癌についても同様の結果を示した。より具体的には、VAC69反応性の糖タンパク質が卵巣癌細胞の増殖培地中に、及びより重要には、卵巣癌患者の血清中に検出された。このように、VAC69は、血清中の癌特異糖タンパク質（群）を検出するために利用される可能性がある。卵巣癌の検出についての早期スクリーンは今のところ存在しないので、この悪性疾患によりもたらされる死亡数を低減することに有用であろう。

【0093】

実施例5：ヒト卵巣癌細胞の表面上に存在する表面糖タンパク質

3名の患者に由来する3種の卵巣癌腫瘍をトリプシンで消化し、ホモジェナイズした。この細胞溶解液をSDS-PAGEにより分画した。このゲルをニトロセルロース上にプロット（ウェスタンブロット）し、MA69モノクローナル抗体でプローブした。図8に示されるように、本発明の表面糖タンパク質が上記の細胞上で発現されている。卵巣癌細胞上の抗原は、還元条件下のSDS-PAGEにより決定されるような約76kDa～約213kDaの分子量を有する単一グリコシル化ポリペプチドである。この卵巣癌細胞抗原は、先述の多発性骨髄腫表面抗原と少なくとも1つのエピトープを共有する。

【0094】

実施例6：本発明のVAC69モノクローナル抗体を用いた in vitro 養子免疫療法は、SCIDマウス中の定着腫瘍の除去を誘発した

VAC69モノクローナル抗体が卵巣癌及びMMを処置する治療可能性を、ヒト腫瘍、即ちヒトMM細胞系（U266）又は新鮮卵巣腫瘍から定着された一次培養物を移植（マウス1匹あたり 1×10^6 個をi.p.注射）したSCIDマ

ウスにおいて評価した。腫瘍細胞を増殖させ、処置開始に先立つ7日間、大量の悪性腹水を誘導した。

【0095】

VAC69モノクローナル抗体、又はアイソタイプ適合(matched)(IgG1)対照の200 μ gでマウスを処置したが、これは3週間にわたり全9回(各週3回)投与された。アイソタイプ対照で処置した対照群では大きな腹膜腫瘍が発生し、その運動と摂食能力を不能にした。そこで、これらの動物は処置開始から14~16日後に安楽死させた。他のマウスでは、腫瘍の増殖と生存率をモニターした。35日後に実験を終了した。

【0096】

この養子免疫療法実験の結果を以下の表1~4に示す。表1及び2は、多発性骨髄腫細胞を受けた後に、本発明によるVAC69モノクローナル抗体、又はアイソタイプ適合対照抗体でそれぞれ処置したSCIDマウスの結果を示す。表3及び4は、卵巣癌細胞を受けた後に、本発明によるVAC69モノクローナル抗体、又はアイソタイプ適合対照抗体でそれぞれ処置したSCIDマウスの結果を示す。表1~4に示される結果は、MM及び卵巣癌実験群のマウスの100%がVAC69の処置へ他覚的な反応をしたことを示す。被験群では、卵巣癌細胞を受けたマウスの60%(3/5)(表3)、MM細胞を受けたマウスの40%(2/5)に完全応答が認められた(表1)。これらの結果は、VAC69が腫瘍細胞に対して細胞毒性であり、奔放な癌を抑制し、ある場合は、すでに定着した悪性腫瘍を完全に駆逐することができることを示す。

【0097】

【表1】

表1
多発性骨髄腫

抗体	マウス番号	腹水	生存	応答
VAC69	1	—	>35	CR
VAC69	2	—	>35	CR
VAC69	3	+	>35	PR
VAC69	4	++	>35	PR
VAC69	5	+	>35	PR

他覚的応答、表X：100%（5/5）；部分応答（PR）：60%（3/5）；
完全応答（CR）：40%（2/5）

【0098】

【表2】

表2
多発性骨髄腫—アイソタイプ適合対照

抗体	マウス番号	腹水	生存	応答
アイソタイプ適合 対照	1	+++	14	NR
アイソタイプ適合 対照	2	+++	15	NR
アイソタイプ適合 対照	3	+++	16	NR
アイソタイプ適合 対照	4	+++	14	NR
アイソタイプ適合 対照	5	+++	14	NR

他覚的応答：0%（0/5）；応答なし（NR）

【0099】

【表3】

表3
卵巣癌

抗体	マウス番号	腹水	生存	応答
VAC69	1	—	>35	CR
VAC69	2	—	>35	CR
VAC69	3	—	>35	CR
VAC69	4	++	>35	PR
VAC69	5	+	>35	PR

他覚的応答、表X：100%（5/5）；部分応答（PR）：40%（2/5）；
完全応答（CR）：60%（3/5）

【0100】

【表4】

表4
 卵巣癌－アイソタイプ適合対照

抗体	マウス番号	腹水	生存	応答
アイソタイプ適合 対照	1	+++	14	NR
アイソタイプ適合 対照	2	+++	15	NR
アイソタイプ適合 対照	3	+++	16	NR
アイソタイプ適合 対照	4	+++	14	NR
アイソタイプ適合 対照	5	+++	14	NR

他覚的応答：0% (0/5)；応答なし (NR)

【0101】

実施例7：本発明のモノクローナル抗体の正常ヒト組織及び腫瘍標本における性能の分析

材料と方法

A．組織の供給源

組織学的に正常なヒト組織と腫瘍を外科及び剖検の標本から得た。新鮮組織を冷凍成型 (cryomold) のOCT化合物 (マイルズラボラトリーズ社、ナパービル、IL) に埋め込み、液体窒素で冷却したイソペンタンにおいて瞬間冷凍した。標本は必要とされるまで - 80 で保存した。分析時に、標本を5ミクロンで切断し、陽電荷スライド上に置き、風乾した。

【0102】

陽性及び陰性の対照細胞系を使用した。U266、ヒト多発性骨髄腫細胞系 (ATCC受け入れ番号TIB - 196) を陽性対照として役立て、IM9 (ATCC受託番号CCL - 159) 及びHT (ATCC受託番号CRL - 2260) の2種のB細胞系を陰性対照として役立てた。

【0103】

B．試薬

VAC69マウスモノクローナル抗体を上記のように特徴づけた。この種と抗体アイソタイプは、1.15mg/mlの濃度でマウスIgG_{1/2a}であった。VAC69は必要とされるまで - 80 で保存した。いったん解凍したならば、2～8 で保存した。陰性の試薬対照であるマウスIgG₁はDAKOコーポレー

ション、カーピンテリア、CAから購入し、 0.1 mg/ml の濃度で供給し、 $2\sim 8^\circ\text{C}$ で保存した。抗体を、「一次抗体希釈液」(リサーチジェネティクス、ハンツヴィル、AL)を用いて(滴定分析により指示されるような)作業濃度へ希釈した。マウスIgG₁対照もVAC69 MoAbと同じ作業濃度へ希釈した。

【0104】

試薬、細胞系、及び標本の情報を以下の表5に要約する。

【0105】

【表5】

表5

試験品：	マウスIgG _{1/2A} , VAC69 モノクローナル抗体
試験品力価：	$5\text{ }\mu\text{g/ml}$
アイソタイプ対照：	マウスIgG ₁ (DAKO社)
陽性標本対照：	ヒト多発性骨髄腫細胞系、U266 (ATCC受入れ番号TIB-196)
陰性標本対照：	ヒトB細胞系、IM9及びHT

表5：すべての細胞はフラスコあたり50%の生細胞を含むフラスコにおいて提供した。記載の結果は5回の反復実験を表す。

【0106】

C. 免疫組織化学

DAKO Envision+™システム(DAKOコーポレーション、カーピンテリア、CA)と呼ばれる間接ペルオキシダーゼ共役(conjugated)免疫組織化学検出技術を製造業者の指示により使用して、免疫組織化学試験を実施した。クリオスタット切断片を -80°C のフリーザーから取り出し、30分、風乾した。このスライドを5分間4℃でアセトンに固定し、次いでpH7.2のリン酸緩衝化生理食塩水(PBS; アムレスコ, ソロン, OH)において洗浄した。内因性ペルオキシダーゼの活性を、Envision+™キットとともに提供される過酸化水素溶液5分間で阻止し、PBSで洗浄した。このスライドをVAC69抗体又はアイソタイプ適合対照抗体とともに室温で30分インキュベートした後に、PBSで洗浄した。次いで、このスライドを、Envision+™キッ

トにおいて提供される、ペルオキシダーゼ標識デキストランポリマー共役抗マウス抗体とともに室温で30分インキュベートした。次いで、このスライドをPBSで洗浄した。3,3'-ジアミノベンジジン四塩化水素基質溶液とともに5±1分インキュベートすることによって、このペルオキシダーゼ反応を視覚化した。このスライドを覆水で十分洗浄し、改良ハリスヘマトキシリン（アメリカン・マスター・テク・サイエンティフィック社、ロディ、CA）で対比染色し、0.25%の酸アルコールに浸漬し、0.2%アンモニアにおいて青色をつけ、特級アルコールを通して脱水し、キシレンにおいて澄明化し、カバーガラスをかけた。

【0107】

D. 対照

陽性対照の切片は、U266細胞系から調製した冷凍細胞ブロックから導いた。陰性対照の切片は、上記のIM9及びHT細胞系から調製した冷凍細胞ブロックから導いた。

【0108】

陰性試薬対照は、一次抗体の代わりに、試験品と同じ抗体濃度でアイソタイプ適合対照抗体を含んだ。陰性対照切片とは、アイソタイプ対照抗体を適用した組織切片を意味する。

【0109】

E. スライドの解釈

染色したスライドの解釈は顕微鏡検査により実施した。概して言えば、スライド上の組織を形態学的に視察して、十分量の組織が存在しているか、さらに、指定された組織が適切に表現されているかを決定した。上記の基準に合致しないサンプルを分析から棄却した。

【0110】

評点システムには染色強度の分析が含まれた。試験品の染色強度は、試験品に種 - 及びアイソタイプ適合している無関係の陰性対照抗体で染色された隣接切片を含有する対照スライドの強度に比較して判定した。陰性試薬対照で標識した切片の染色を「バックグラウンド」とみなした。「0」はバックグラウンドに比較

して染色がないことを示し、「1+」は最少の染色又はごくわずかな染色を示し、「2+」は中等度に強い染色を示し、「3+」はかなり強い染色を示した。標準的な病理学の慣習に従って、観察される最高レベルの強度で染色強度を記録した。

【0111】

F．固定分析

固定分析の根底にある合理的根拠は、陽性染色細胞の最高比率、最大染色強度、及び最良の形態学的保存を可能にする固定液を選択することである。

【0112】

固定分析を、陽性及び陰性対照の細胞系、それぞれU266及びIM9を使用して実施した。評価した固定液（非固定、アセトン、エタノール、メタノール/アセトン、及び10%中性緩衝化ホルマリン）のなかでは、アセトン、4、5分が形態学的保存と染色強度の最良の組み合わせを示した。

【0113】

G．滴定分析

滴定分析の目的は、低レベルを発現するかもしれないが、非特異結合を最少にする抗原を組織内に検出するために、VAC69モノクローナル抗体の最高力価を選択することである。さらに、染色強度と陽性染色細胞比率の最高の組み合わせを保証するように試験品の力価を選択する。アセトンを固定液として使用して、抗体希釈系列（20 µg/ml ~ 1.25 µg/ml）を陽性及び陰性のターゲット対照、それぞれU266及びIM9について試験した。U266細胞染色の最高比率、最大の染色強度、及び有意なバックグラウンド染色無しという最良の結果を示したのは、5 µg/ml濃度のVAC69である。この同じ濃度で、IM9細胞では染色が観察されなかった。

【0114】

この実施例に記載の実験の目的は、本発明によるモノクローナル抗体であるVAC69の正常組織及び腫瘍のパネルにおける発現を、間接免疫組織化学を使用して試験することであった。鋭敏な、無ビオチン検出システムである、EnvisionTM（DAKOコーポレーション、カーピンテリア、CA）を使用して

この試験を実施した。このシステムは、多数のペルオキシダーゼ酵素分子と二次抗体が結合しているデキストラン分子を利用する。生成するポリマーコンジュゲートは、高められた感度と最少化された非特異的バックグラウンド染色を提供する。この検出システムの感度により、より低い抗体力価の使用が可能になり、ノイズに対するシグナルの比が高められる。

【0115】

固定及び滴定の分析は、4、5分間のアセトン固定と $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の力価が最適の結果を提供することを示した。U266及びIM9細胞を、それぞれ陽性及び陰性の細胞系対照として使用した。予測されたように、U266細胞は強い(3+)染色を示し、IM9細胞は全例で陰性に染色された。

【0116】

最適な固定及び力価を使用して、正常ヒト組織の選択物を染色した(表6)。正常な乳房、結腸、肺、リンパ節、卵巣、及び前立腺組織のサンプルは有意な染色を示さなかったが、リンパ節の1標本は形質細胞の(1+)染色を有した。ある標本では、中等度(2+)~強い(3+)染色の稀な組織球及び単核細胞が観察された。正常な内皮、平滑筋、線維芽細胞、間質、神経細胞には染色が記録されなかった(表6を参照のこと)。

【0117】

正常組織に加えて、4種の乳癌標本、4種の結腸癌標本、3種の非小胞性肺癌標本、3種の骨髄腫標本、6種の卵巣癌標本、及び3種の前立腺癌標本についても試験した(表7を参照のこと)。表7に観察されるように、乳癌や前立腺癌の標本の腫瘍細胞成分では染色が観察されなかった。試験した結腸癌標本のなかでは4つのうち1つで中等度染色の腫瘍細胞を50%含有したが、残りの標本は陰性であった。試験した非小胞性肺癌例のなかでは、3つのうち1つが弱い染色の腫瘍細胞を20%含有し、第二の例が中等度染色の腫瘍細胞を40%含有したが、第三の例は陰性であった。試験した3種の骨髄腫標本ではすべて陽性で、腫瘍細胞の80%が強い強度で染色した。試験した6種の卵巣癌標本では、1つが中等度染色の腫瘍細胞を10%未満含有し、第二の例が中等度染色の腫瘍細胞を約20%含有した、第三の例が弱い染色の腫瘍細胞を約10%未満含有したが、残

りの卵巣癌標本は陰性であった。正常組織と同様に、ある標本では、中等度（2+）～強い（3+）染色の稀な組織球及び単核細胞が観察された。

【0118】

【表6】

表6
正常ヒト組織のVAC69染色の免疫組織化学結果

組織タイプ	発生率	陽性%	染色強度	註
乳房	0/3	0	0	稀な組織球又は単核細胞の副次染色
結腸	0/3	0	0	稀な組織球又は単核細胞の副次染色
肺	0/3	0	0	稀な組織球又は単核細胞の副次染色
リンパ節	2/3	<10	3+CM (形質細胞)	稀な組織球又は単核細胞の副次染色
卵巣	0/3	0	0	稀な組織球又は単核細胞の副次染色
前立腺	0/3	0	0	稀な組織球又は単核細胞の副次染色

【0119】

【表7】

表7
ヒト腫瘍のVAC69染色の免疫組織化学結果

組織タイプ	発生率	陽性%	染色強度	註
多発性骨髄腫	3/3	80	3+CM	稀な組織球又は単核細胞の副次染色
卵巣	3/6	10~20	1~2+CM	稀な組織球又は単核細胞の副次染色
前立腺	0/3	0	0	稀な組織球又は単核細胞の副次染色
乳房	0/4	0	0	稀な組織球又は単核細胞の副次染色
結腸	1/4	50	2+CM	稀な組織球又は単核細胞の副次染色
非SCLS	2/3	20~40	1~2+CM	稀な組織球又は単核細胞の副次染色

【0120】

要約すると、モノクローナル抗体のVAC69は、試験したいいくつかの結腸癌、非小胞性肺癌、及び卵巢癌サンプルと試験したすべての骨髓腫サンプルに存在する抗原を認識する。この抗体はまた、形質細胞、組織球及び単核細胞も認識するが、このことは同一であるか又は交差反応性のエピトープがこれら細胞型の上に存在することを反映する可能性がある。この抗体が1つの卵巢癌標本の約20%を中等度に染色し、別の標本の細胞の約10%を弱く染色したということは、概ね正常細胞と散発数の腫瘍細胞から構成される多くの癌組織で腫瘍組織がごくわずかな数(%)しか存在しないことによる。対照的に、MMでは、集団が単一クローンであり、骨髓に蓄積する。また、当業者により理解されるように、卵巢癌は多様な起源(例えば完全に分化したもの、わずかに~中等度に分化したもの、さらに腹膜癌から卵巢腫瘍になったもの)から導かれ得る。さらに、卵巢癌のVAC69エピトープは細胞染色に先立って使用される固定法の影響を受けやすい可能性がある。実際、ウェスタンブロット分析では、試験した全4種の卵巢癌は高レベルのVAC抗原を発現した。実施例7の結果は、特定の腫瘍細胞型のVAC69モノクローナル抗体による有意かつ特異的な染色を示す。

【0121】

実施例8：VAC69は卵巢癌の細胞膜に見出される抗原と交差反応する

本発明のVAC69モノクローナル抗体の癌特異性又は組織分布をさらに検証するために、ヒト前立腺癌、乳癌、卵巢癌、肺癌、神経芽細胞腫、正常末梢血液単核細胞(PBMC)、及び多発性骨髓腫(MM)細胞系のプールからの抽出液をSDS-PAGEにかけた。図9に表されるウェスタンブロットの結果は、VAC69 MoAbが前立腺癌、乳癌、肺癌、又は神経芽細胞腫の抽出液と反応しなかったことを示す。さらに、免疫組織化学試験は、卵巢、前立腺、肺及び結腸のような正常ヒト組織への抗体結合の不在を示し(実施例7を参照のこと)、VAC69の癌特異性を確認した。さらに、78~120kDaの範囲のMrを有する単鎖分子がMM及び卵巢癌を含有するレーンで検出された。卵巢癌において視覚化されたバンドはより高いMrのものであるらしく、このバンドがMM抗原と共通のエピトープを発現する別の分子を表し得ることを示唆した。

【0122】

実施例9：ヒト卵巣の新鮮腫瘍の表面にはVAC69反応性の糖タンパク質が存在する

VAC69モノクローナル抗体のヒト卵巣癌における発現を決定するために、3種の新鮮切除した卵巣癌をトリプシンで消化し、ホモジェナイズした。生成した細胞溶解液をSDS-PAGEにより分画した。このゲルをブロットし、VAC69 MoAbでプローブした。図8に示されるように、VAC69は3種の卵巣癌すべてと反応した。卵巣癌細胞により発現される抗原は、単一の高Mr糖タンパク質(約200kDa)であるか又は76kDa~213kDaの範囲にあるMrを有する糖タンパク質のセットのいずれかである。ある卵巣腫瘍は単一の高Mrバンドだけを発現したので、その抗原が多重サブユニットからなるという見込みは少ない。従って、より低いMrのバンドはより大きい糖タンパク質の分解産物を表す可能性がある。

【0123】

実施例10：VAC69はin vitroで癌特異的細胞毒性を誘発する

VAC69モノクローナル抗体の癌細胞を殺傷する能力を解明し、その細胞毒性の特異性を明確化するために、ヒトMM、慢性骨髄性白血病(CML)細胞、(K562)、及びB細胞リンパ腫細胞(Namalwa)の培養物をVAC69及び補体とともに1時間インキュベートした。図10は、VAC69の10µg/ml及び1µg/mlの処置により、MM細胞のそれぞれ100%及び70%の殺傷が生じたことを示す。ヒトリンパ腫と白血病細胞を対照として使用し、それらは影響を受けなかった。VAC69はまた、卵巣癌細胞の腫瘍特異的な殺傷を誘発するその能力についても試験した。卵巣癌細胞を補体及びVAC69 10µg/mlとともにインキュベーションすると、補体とのインキュベーションの1時間後に細胞の50%の殺傷が誘発された。細胞毒性の対照は、補体単独で約20%の殺傷、VAC69単独で0%の殺傷を示した。従って、VAC69は卵巣癌細胞と多発性骨髄腫細胞の両方の癌特異的殺傷を始動させることが示された。この結果は、結合特異性の結果に一致する。

【0124】

VAC69の治療有効性をin vitro(本実施例)とin vivo(上記の実施例

6)の両方で示した。VAC69 MoAbでの処置は腫瘍増殖を排除し、処置マウスの生存を延長した。さらに、VAC69での処置は、ヒトMM及び卵巣癌を担うSCIDマウスのそれぞれ40%及び60%において大きな腹膜腫瘍の完全退縮を誘発した。このように、VAC69は、放射性同位体や毒素の助けがなくともそのままの形態でMM及び卵巣癌に対して細胞毒となる。進行癌を有する動物モデルにおいて癌を駆逐することにVAC69が有効であったという事実は、ヒトMM及び卵巣癌への治療介入におけるその潜在能力を示唆する。

【0125】

本発明は本明細書に記載の特定の態様によりその特許請求範囲が制限されるものではない。実際、当業者には、上記の記載と添付の図面から、本明細書に記載のものに加えて本発明の様々な変更が明らかであろう。そのような変更は本発明の特許請求の範囲内に含まれると考えられる。

【0126】

様々な刊行物、特許、参考文献等が本明細書に引用され、その開示内容はそのまま参照により本明細書に組込まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、3種のヒト形質細胞種のプールで免疫化したマウスから産生されるB細胞ハイブリドーマの、対照として役立つヒト骨髓性白血病細胞系(K562)への結合と比較した、一次スクリーンを示す。

【図2】

図2は、選択されたハイブリドーマの二次スクリーンについての結果を示す。

【図3】

図3は、二次スクリーンに比較して、一次スクリーンについて得られた全結合値を示す。

【図4】

図4は、モノクローナル抗体のパネルを使用し、フローサイトメトリーにより分析した細胞表面染色の結果を示す。

【図5】

図5は、個別に試験した5種のヒト骨髓腫細胞系から抽出された膜タンパク質と対照をSDS-PAGEで分画して使用する、ウェスタンブロット法を使用して選択されたモノクローナル抗体のさらなる評価を表す。

【図6】

図6は、細胞性ELISA法を使用する、図5について記載されるものと類似の結果を示す。

【図7】

図7は、無血清培地で5日間増殖させた多発性骨髓腫細胞由来の濃縮培養液をブロットし、本発明の抗体でプローブした、SDS-PAGEを示す。

【図8】

図8は、3名の患者に由来する3種の卵巣癌腫瘍細胞からの細胞溶解液のSDS-PAGEの結果を示す。ゲルをブロットし、本発明の抗体でプローブした。

【図9】

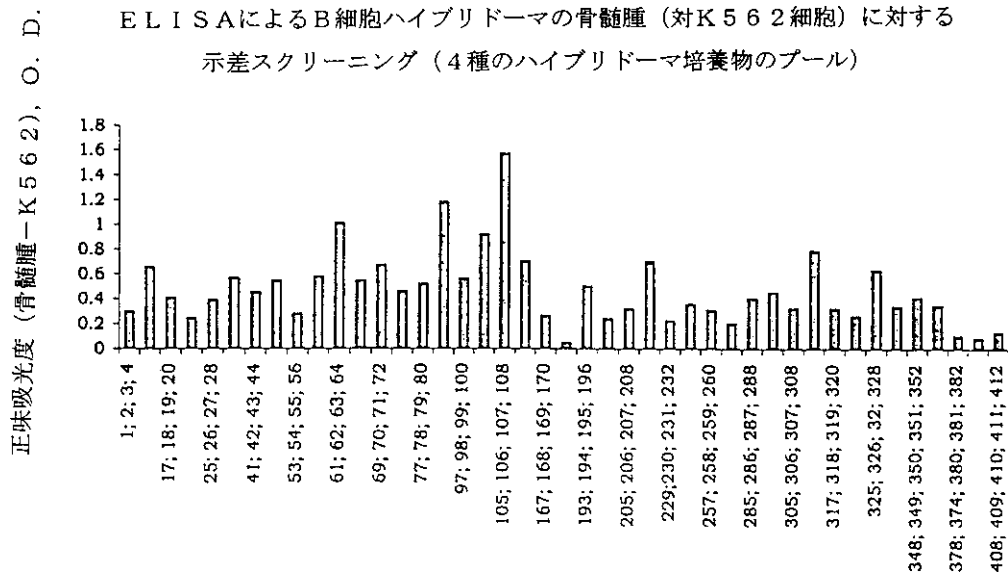
図9は、前立腺癌細胞系(LnC a P)、乳癌(新鮮な腫瘍)、卵巣癌(新鮮な腫瘍)、肺癌(新鮮な腫瘍)、神経芽細胞腫(細胞系)、正常PBMC、及びヒトMM細胞系のプール(RPMI-8226, U266, OPM-2, KR-12及びHuns-1)から調製した細胞溶解液をSDS-PAGE(8%ゲル)により分画したウェスタンブロットの結果を示す。ゲルをニトロセルロース上にブロットし、VAC69抗体とともにインキュベートした。レーンD(ブロット番号:5)及びE(ブロット番号6)において曲がったバンドのように見え得るものが実はゲル内の裂け目であることに注意すること。

【図10】

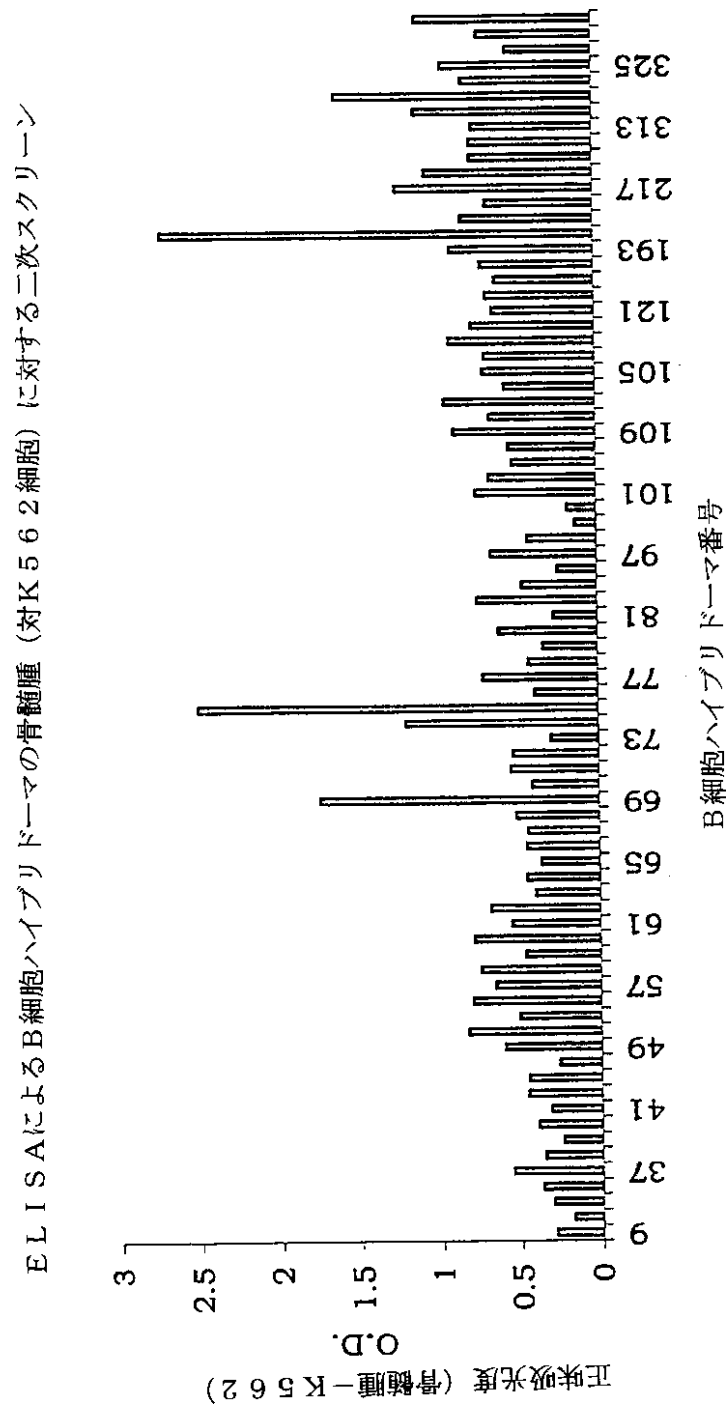
図10は、ヒトMM細胞系(RPMI-8226)、ヒトリンパ腫細胞(Nam alwa)、及び慢性骨髓性白血病細胞系(K562)を使用して実施した*in vitro*細胞毒性アッセイの結果を示す。腫瘍細胞は、実施例10に記載のように、ヒト補体の存在下、10 µg/ml又は1 µg/mlの濃度でVAC69抗体とともにインキュベートした。細胞毒性のバックグラウンドレベルを評価するために、腫瘍細胞を培地単独(無処理)、補体単独、又はVAC69単独とともにインキュベートした。この培養液を³H-チミジンでパルスし、さらに16時

間インキュベートした。癌細胞の殺傷率(%)を、培地対照(無処理)に比較した、試験サンプルについて記録した³H-チミジン取込みの数値から算出した。

【図1】

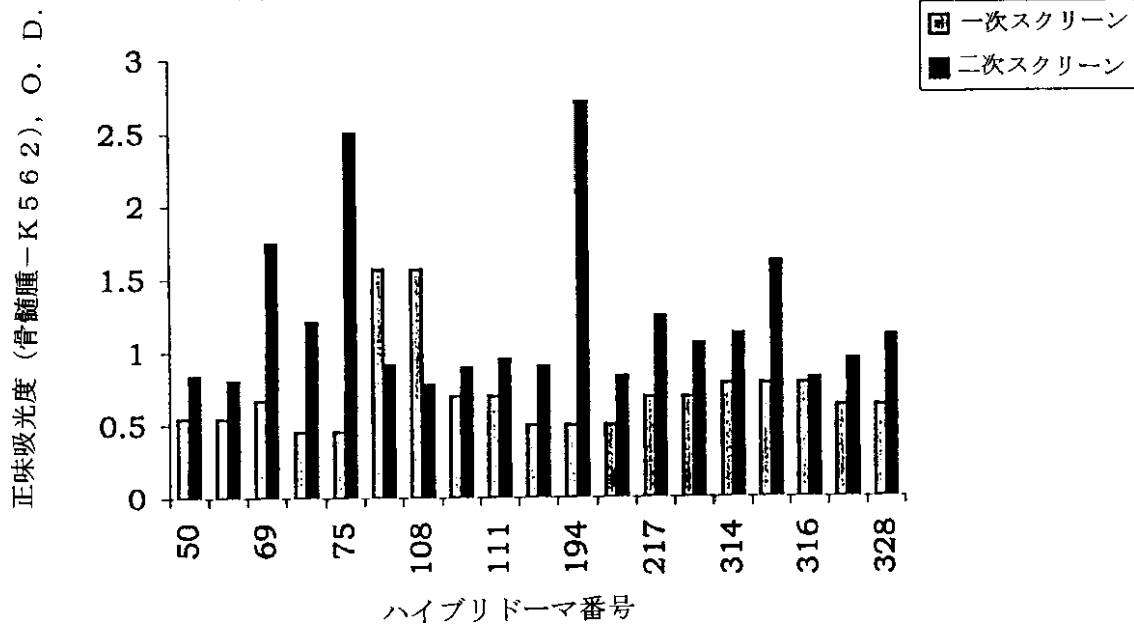


【図2】



【図3】

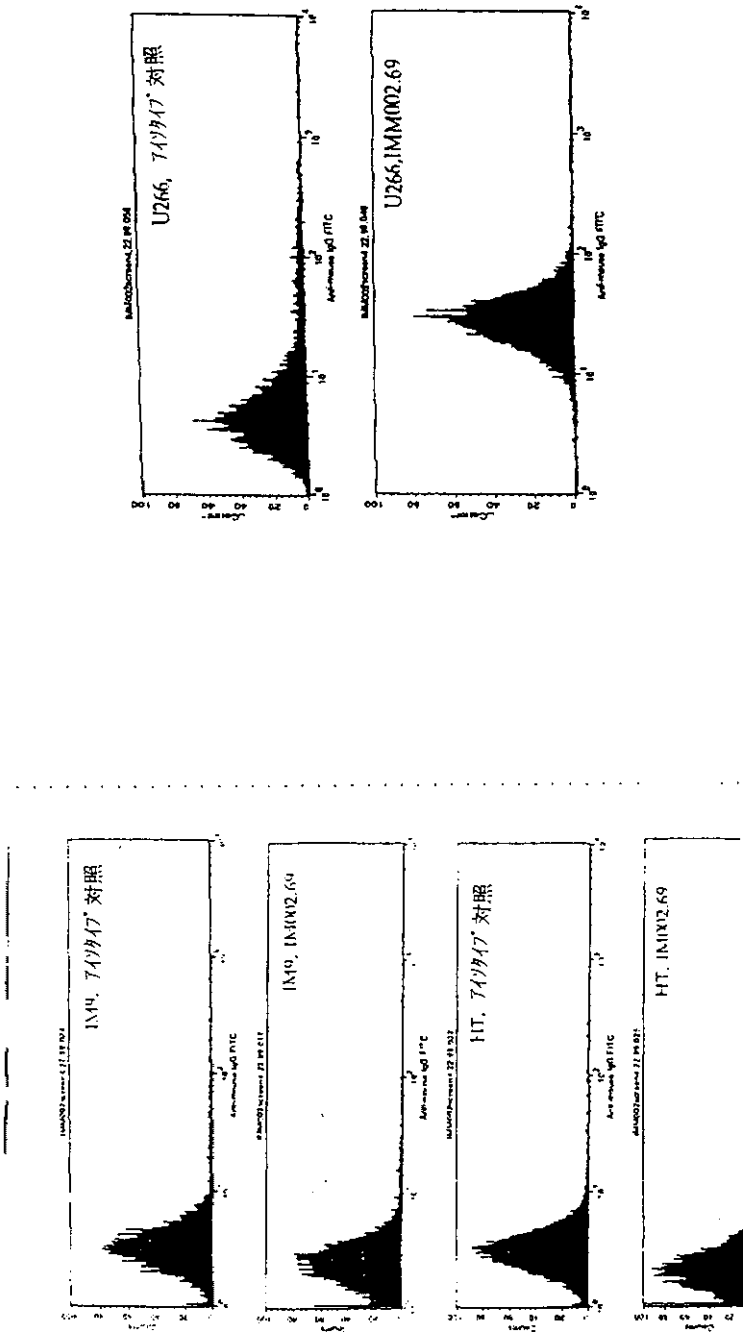
IMM002の二次単一ハイブリドーマスクリーン
 (対4ハイブリドーマ・プールの一次スクリーン)



【図4】

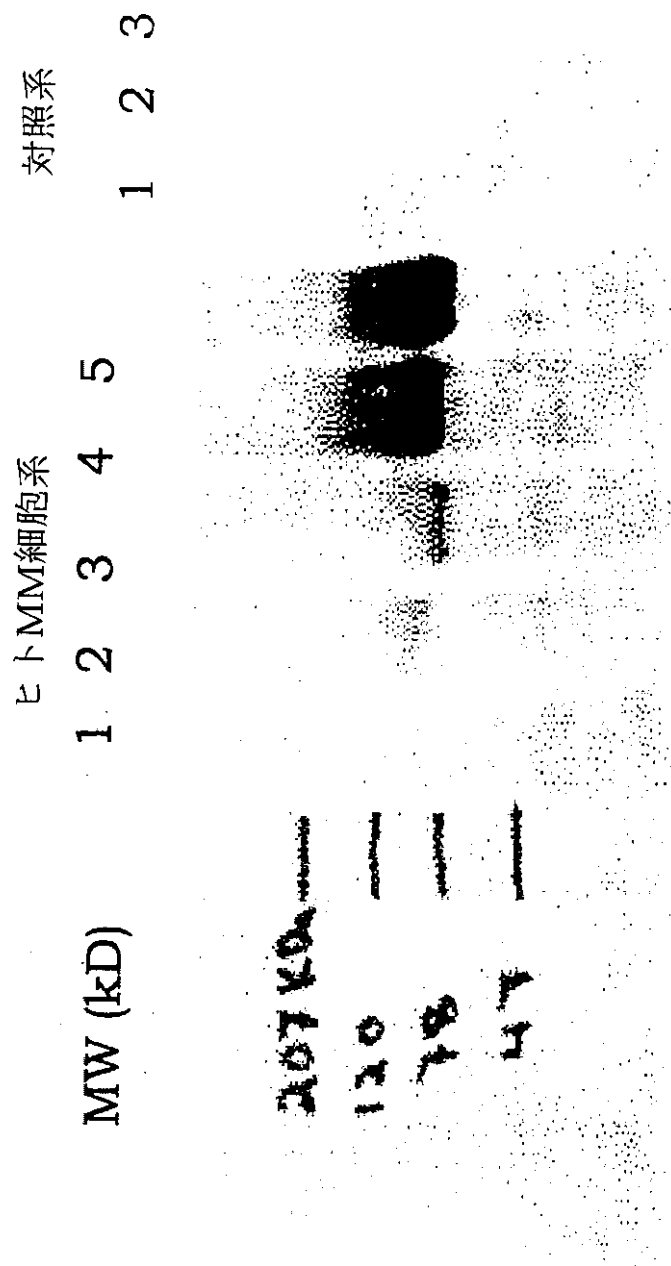
多発性骨髄腫に特異的なM o a b の産生：

FACSによる特異性評価

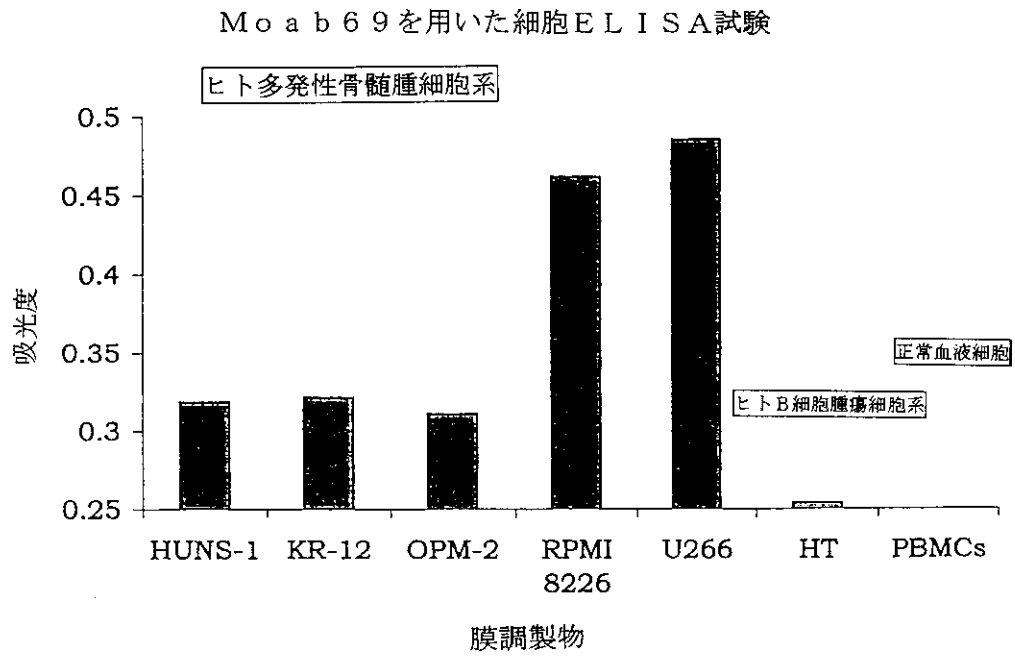


【図 5】

多発性骨髄腫に特異的なMoabの産生：

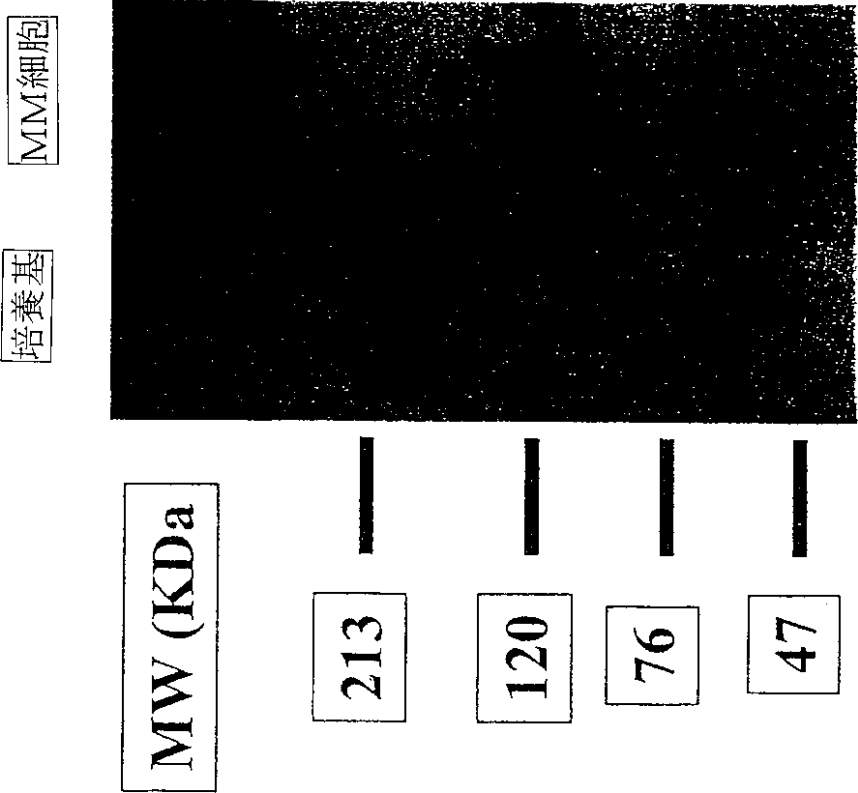


【図6】

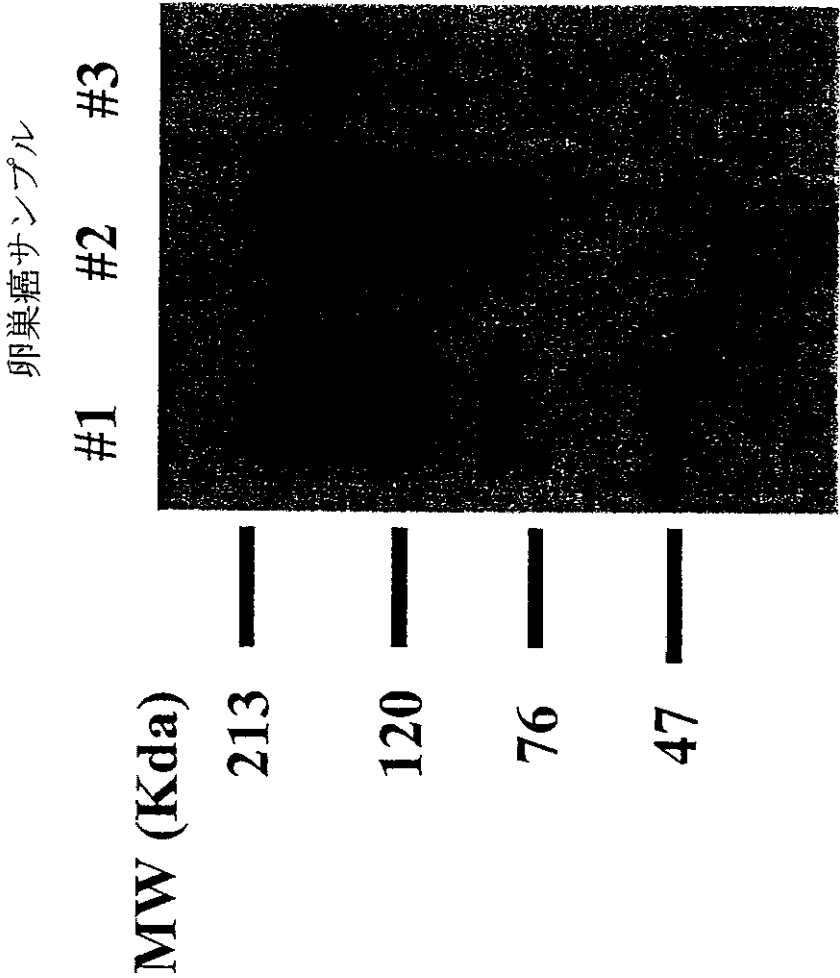


【図7】

Maob (69) 特異抗原はMM細胞により培養基へ流出される

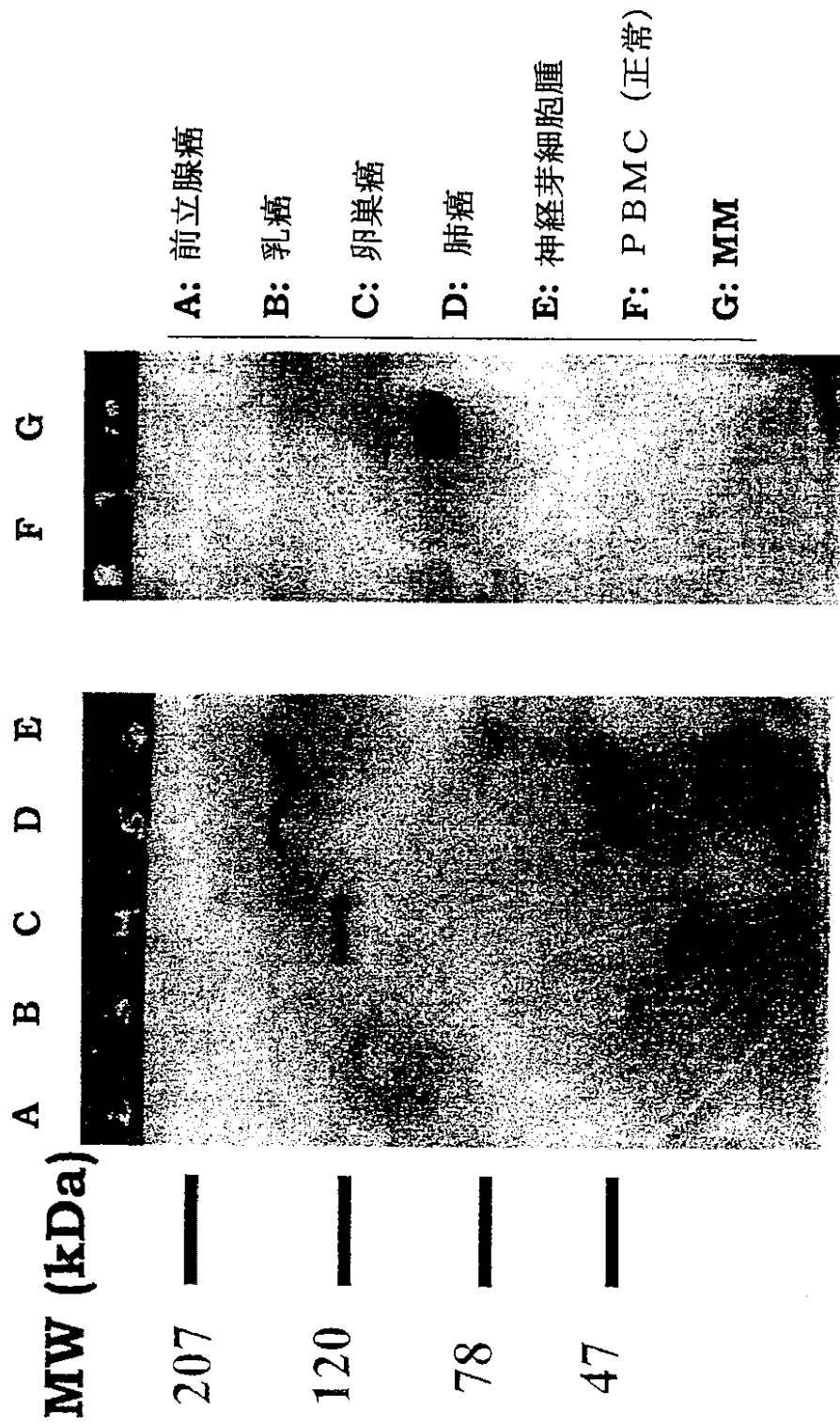


【図8】
VAC69特異抗原が3種の新鮮卵巣癌の上で発現される

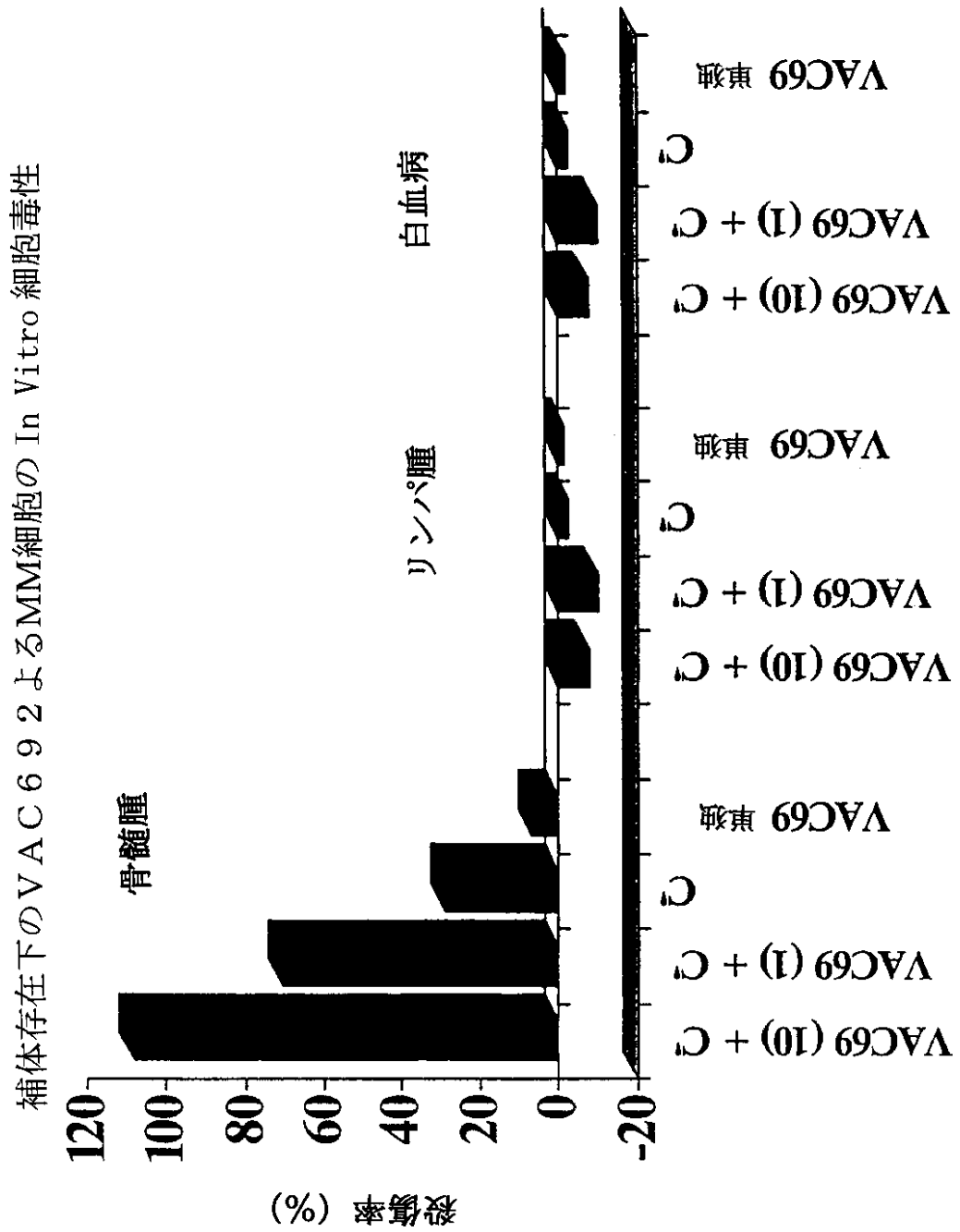


【図 9】

VAC69は卵巣癌と反応する



【図10】



【手続補正書】

【提出日】平成 1 4 年 2 月 1 4 日 (2 0 0 2 . 2 . 1 4)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の名称】 卵巣癌細胞及び骨髄腫細胞の表面糖タンパク質、それへの
抗体及びその使用

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/21574		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/30 C12N5/06 C07K14/47 G01N33/53 B01D15/08 A61K39/395 A61P35/00		
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) IPC 7 C07K A61P		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.	
A	WO 88 03954 A (CENTOCOR INC) 2 June 1988 (1988-06-02) page 1, line 1 -page 4, line 22 page 20, line 19 -page 35, line 4; claims 1-22 ---	2,7,16, 20-23, 25,35, 37,40
A	WO 96 26964 A (PROTEIN DESIGN LABS INC ;IOWA IMMUNOTHERAPY INVESTIGATO (US)) 6 September 1996 (1996-09-06) page 11, line 26 -page 27, line 21 ---	1,6,8,9, 11,18, 20-23, 35,39,42
A	WO 94 05329 A (JENNER TECHNOLOGIES) 17 March 1994 (1994-03-17) page 3, line 23 -page 11, line 29 --- -/--	10
☒ Further documents are listed in the continuation of box C.		☒ Patent family members are listed in 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 document 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. 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 January 2001	Date of mailing of the international search report 23/01/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Mateo Rosell, A.M.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/21574

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 40295 A (KOSTAKOGLU LALE ;DIVGI CHAITANYA R (US); SLOAN KETTERING INST CANC) 19 December 1996 (1996-12-19) page 12, paragraph 2 -page 18, paragraph 1 page 69-78 page 89-123 ---	2,7,16, 20-24, 35-38, 40,42-44
A	PARTINGTON K M ET AL: "A novel method of cell separation based on dual parameter immunomagnetic cell selection" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, vol. 223, no. 2, 4 March 1999 (1999-03-04), pages 195-205, XP004158718 ISSN: 0022-1759 abstract page 195, left-hand column, paragraph 1 -page 196, left-hand column, paragraph 3 page 204, right-hand column, paragraph 2 -page 205, left-hand column, paragraph 1 ---	18
A	OZAKI S ET AL: "IMMUNOTHERAPY OF MULTIPLE MYELOMA WITH A MONOCLONAL ANTIBODY DIRECTED AGAINST A PLASMA CELL-SPECIFIC ANTIGEN, HMI. 24" BLOOD,W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA,US, vol. 90, no. 8, 15 October 1997 (1997-10-15), pages 3179-3186, XP002918597 ISSN: 0006-4971 the whole document ---	2,7,16, 20-23, 35,37,40
P,A	TAI Y -T ET AL: "Isolation and characterization of human multiple myeloma cell enriched populations" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, vol. 235, no. 1-2, February 2000 (2000-02), pages 11-19, XP004188227 ISSN: 0022-1759 the whole document -----	1,14,25, 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/21574

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8803954 A	02-06-1988	US 5059680 A	22-10-1991
		AT 97448 T	15-12-1993
		CA 1305416 A	21-07-1992
		DE 3788229 D	23-12-1993
		DE 3788229 T	21-04-1994
		EP 0332651 A	20-09-1989
		JP 2501258 T	10-05-1990
WO 9626964 A	06-09-1996	US 6129914 A	10-10-2000
		AU 710125 B	16-09-1999
		AU 5090496 A	18-09-1996
		CA 2212750 A	06-09-1996
		EP 0812333 A	17-12-1997
		JP 11506310 T	08-06-1999
WO 9405329 A	17-03-1994	AU 5097393 A	29-03-1994
		CA 2139743 A	17-03-1994
		EP 0666761 A	16-08-1995
		JP 8502954 T	02-04-1996
WO 9640295 A	19-12-1996	AU 6167296 A	30-12-1996

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K	49/00	A 6 1 K 49/00	A 4 C 0 8 7
	51/00		Z 4 H 0 4 5
A 6 1 P	15/00	A 6 1 P 15/00	
	19/00	19/00	
	35/00	35/00	
	37/02	37/02	
C 0 7 K	14/705	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 N	5/10	G 0 1 N 33/532	A
	15/02	33/574	D
G 0 1 N	33/532	C 1 2 P 21/08	
	33/574	C 1 2 N 15/00	B
// C 1 2 P	21/08	5/00	B
		A 6 1 K 49/02	A
(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,			
D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I			
T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J			
, C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,			
M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K			
E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G			
, Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,			
R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T ,			
A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C			
A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M			
, D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H ,			
G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K			
E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S			
, L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N ,			
M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R			
U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M			
, T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N ,			
Y U , Z A , Z W			

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA45 DA02 GA05
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA05
DA14
4B065 AA90 AB04 BA08 CA44 CA46
4C084 AA02 AA14 AA19 BA44 CA18
CA59 CA62 MA02 MA55 NA05
NA10 NA14 ZA812 ZA962
ZB072 ZB262
4C085 AA13 AA14 AA25 BB11 CC02
CC21 CC23 EE01 EE03 GG01
HH03 HH13 KA04 KA26 KA29
KB28 LL18
4C087 AA01 AA02 BB44 BB63 CA04
MA55 NA05 NA14 ZA81 ZA96
ZB07 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA41
DA86 EA28 EA51 FA72 HA04
HA05

专利名称(译)	卵巢癌细胞和骨髓瘤细胞的表面糖蛋白，其抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2003508355A	公开(公告)日	2003-03-04
申请号	JP2001517572	申请日	2000-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	分子磁盘卡瓦利兹LLC		
申请(专利权)人(译)	本分子利兹静脉，LLC		
[标]发明人	ゲルバーコハヴァ		
发明人	ゲルバー,コハヴァ		
IPC分类号	G01N33/532 A61K35/28 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K49/00 A61K51/00 A61P15/00 A61P19/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/705 C07K16/30 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/574		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P15/00 A61P19/00 C07K16/3061 C07K16/3069 G01N2800/52		
FI分类号	C07K16/30 A61K35/28 A61K39/395.L A61K39/395.T A61K45/00 A61K49/00.A A61K49/00.Z A61P15/00 A61P19/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/705 G01N33/532.A G01N33/574.D C12P21/08 C12N15/00.B C12N5/00.B A61K49/02.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/DA02 4B024/GA05 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA90 4B065/AB04 4B065/BA08 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA14 4C084/AA19 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/CA59 4C084/CA62 4C084/MA02 4C084/MA55 4C084/NA05 4C084/NA10 4C084/NA14 4C084/ZA812 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/HH03 4C085/HH13 4C085/KA04 4C085/KA26 4C085/KA29 4C085/KB28 4C085/LL18 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB44 4C087/BB63 4C087/CA04 4C087/MA55 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZA81 4C087/ZA96 4C087/ZB07 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/HA04 4H045/HA05		
优先权	09/374367 1999-08-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

如上所述，本发明涉及在骨髓瘤和卵巢癌细胞上发现的被单克隆抗体识别的细胞表面抗原及其抗体结合片段。本发明的单克隆抗体可用于治疗，筛选，诊断和细胞纯化目的。本发明的代表性和示例性单克隆抗体识别并结合多发性骨髓瘤细胞和卵巢癌细胞上表达的表面抗原共有的表位。该单克隆抗体的功能在体外和体内均得到证实。

