

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-502517

(P2011-502517A)

(43) 公表日 平成23年1月27日(2011.1.27)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|------------------|-----------------|
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 T | 4 B 0 6 4 |
| A 6 1 K 51/00 (2006.01) | A 6 1 K 49/02 A | 4 B 0 6 5 |
| A 6 1 K 49/00 (2006.01) | A 6 1 K 49/00 A | 4 C 0 8 5 |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | 4 H 0 4 5 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 | | (全 62 頁) 最終頁に続く |

(21) 出願番号 特願2010-533279 (P2010-533279)
 (86) (22) 出願日 平成20年11月7日 (2008.11.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年5月10日 (2010.5.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/082821
 (87) 国際公開番号 W02009/062050
 (87) 国際公開日 平成21年5月14日 (2009.5.14)
 (31) 優先権主張番号 60/996,255
 (32) 優先日 平成19年11月8日 (2007.11.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507339928
 ネオジェニックス オンコロジー, イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国 メリーランド 2085
 O, ロックビル, グレート セネカ
 ハイウェイ 9700
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100127638
 弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結腸癌および膵臓癌に対する組み換えモノクローナル抗体および対応抗原

(57) 【要約】

本発明は、ヒト結腸直腸癌および膵臓癌 - 関連抗原に結合する組み換えモノクローナル抗体を提供し、ならびに該抗体鎖をコードする核酸配列を、そして該核酸に対応するアミノ酸配列を、そしてこれらの抗体、核酸およびアミノ酸の使用を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2本の軽鎖部分および2本の重鎖部分を含む、単離された組み換えモノクローナル抗体であって、該軽鎖部分のそれぞれが図4（配列番号：14）に示されるアミノ酸またはこの配列の変異体、バリエーション、ホモログ、部分、フラグメントもしくは誘導体を含み、そして該重鎖部分のそれぞれが図5（配列番号：15）に示されるアミノ酸またはこの配列の変異体、バリエーション、ホモログ、部分、フラグメントもしくは誘導体を含み、結腸直腸癌細胞および膵臓癌細胞に特異的なADCC活性を示す、抗体。

【請求項 2】

請求項1記載の抗体を含む、診断キット。

10

【請求項 3】

請求項1記載の抗体および担体を含む、組成物。

【請求項 4】

ラベルに連結された、請求項1記載の抗体。

【請求項 5】

ヒト免疫グロブリンガンマ-1およびカッパの定常領域に連結された、請求項1記載の組み換え抗体の軽鎖および重鎖の可変領域を含む、キメラ抗体。

【請求項 6】

請求項5記載の抗体を含む、診断キット。

【請求項 7】

請求項5記載の抗体および担体を含む、組成物。

20

【請求項 8】

ラベルに連結された、請求項5記載の抗体。

【請求項 9】

アミノ酸残基GASENIYGALN（配列番号：1）またはQASENIYGALN（配列番号：4）からなる軽鎖相補性決定領域（CDR）1；

アミノ酸残基GASNLAAD（配列番号：2）またはGASNLAAT（配列番号：5）からなる軽鎖CDR2；

アミノ酸残基QNVLS SPY T（配列番号：3）またはQQVLS SPY T（配列番号：6）からなる軽鎖CDR3；

30

アミノ酸残基GYTF TDY AMH（配列番号：7）からなる重鎖CDR1；

アミノ酸残基LISTYSGDTKYNQNF KG（配列番号：8）またはLISTYSGDTKYNQNF QG（配列番号：10）からなる重鎖CDR2；および

アミノ酸残基CDYSGSR YWF AY（配列番号：9）またはGDYSGSR YWF AY（配列番号：11）からなる重鎖CDR3；

を含む、抗体または抗体の部分、あるいは該抗体または該抗体の部分が16C3により認識される抗原を結合する、前記CDRのいずれかを有する機能的均等物。

【請求項 10】

請求項9記載の抗体を含む、診断キット。

【請求項 11】

請求項9記載の抗体および担体を含む、組成物。

40

【請求項 12】

ラベルに連結された、請求項9記載の抗体。

【請求項 13】

図4（配列番号：14）および図5（配列番号：15）、または図6（配列番号：16～21）および図7（配列番号：22～27）、または図12（配列番号：28～29）に示される配列、あるいはこれらの配列のいずれかの変異体、バリエーション、ホモログ、部分、フラグメントもしくは誘導体から得られた、ヒト化モノクローナル抗体。

【請求項 14】

請求項13記載の抗体を含む、診断キット。

50

【請求項 15】

請求項 13 記載の抗体および担体を含む、組成物。

【請求項 16】

ラベルと連結された、請求項 13 記載の抗体。

【請求項 17】

図 2 (配列番号: 12) に示される核酸を有するオリゴヌクレオチド、図 2 記載の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、図 3 (配列番号: 13) 記載の配列を有するオリゴヌクレオチド、図 3 記載の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、これらのいずれかの変異体、バリエーション、ホモログ、部分、フラグメントおよび誘導体、の少なくとも 1 つを含む群より選択される、単離されたオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 18】

ベクター中に存在する、請求項 17 記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 19】

該オリゴヌクレオチドの発現を指令する遺伝領域をさらに含む、請求項 17 記載の単離されたオリゴヌクレオチド。

【請求項 20】

ベクター中に存在する、請求項 19 記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 21】

宿主細胞中に含まれる、請求項 20 記載のベクター。

【請求項 22】

当該オリゴヌクレオチドによりコードされるポリペプチド (群) を発現させるために使用できる、請求項 21 記載の宿主細胞。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2007年11月8日に提出された米国仮出願番号第60/996,255号(出典明示により本明細書に包含される)の優先権の利益を主張する。

【0002】

本発明は、組み換えモノクローナル抗体およびペプチド、そして診断手順を含む臨床手順および科学的手順におけるそれらの使用の分野に関し、特にそのような過程はヒト結腸直腸癌および膵臓癌 - 関連抗原 (CPAA) の検出、および該組み換えモノクローナル抗体およびペプチドにより認識されるエピトープの特性評価、を含む。本発明はまた、結腸直腸癌および膵臓癌に関連する病的状態を診断および/または処置するための本発明の診断方法および/または治療方法に有用な、診断化合物および/または医薬組成物の形式の、抗CPAA抗体およびペプチドを提供する。

30

【背景技術】

【0003】

世界保健機構による最新のデータによれば、世界での総死亡数5800万人のうち、癌は死亡全体の13パーセントを占めた。世界の癌による死亡は、2015年には癌死者は該算で900万人に、そして2030年の死者は1100万人を超えるまでに増えると予測されている。すべての癌のうち、結腸直腸癌は米国での癌に関連する死亡の第3の主要原因であるのに対し、膵臓癌は11番目に最も一般的な癌であり、そして男性と女性の両方での癌での死亡の第4の主要原因である。この恐ろしいシナリオは、新たな癌診断および治療の大きな必要性を示す。

40

【0004】

現行の技術、例えばハイブリドーマの使用に関する技術は、研究者および臨床医に利用可能であり、一般的な診断手順および臨床手順に有用な高い特異性の強力なモノクローナル抗体の供給源となっている。例えば、FDAにより結腸直腸癌の処置について現在承認されている治療抗体には、例えばアバスタチン (AVASTIN (登録商標)) (ペバシズ

50

マブ (bevacizumab)、ジェネンテック社 (Genentech, Inc.)、エルピタックス (E R B I T U X (登録商標)) (セツキシマブ (cetuximab) 注射剤、インクローンシステムズ社 (ImClone Sys. Inc.) /Merck/Bristol-Myers Squibb) およびベクチビックス (V E C T I B I X (登録商標)) (パニツムマブ (panitumumab)、アムジェン社 (Amgen Inc.)) がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

それにもかかわらず、癌に対抗するにあたっての最も重要な挑戦は、早期診断を追求することのままである。診断されたときに癌が進行していればしているほど、治療はあまり効果的なものではなくなっているであろう。米国癌学会は、ステージ1の結腸癌と診断されたアメリカ人の90パーセントは診断の5年後もまだ生存しているが、ステージ3の癌と診断された人々はわずか68パーセントが診断の5年後に生存しているのみであると、評価する。

10

このように、癌研究の進歩にもかかわらず、結腸直腸癌と膵臓癌の早期診断および処置に有用な組み換えモノクローナル抗体に対する必要性は残っている。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の目的は、ヒト結腸直腸癌および膵臓癌 - 関連抗原 (C P A A) の抗原およびエピトープに対する特異性を有する組み換えモノクローナル抗体、または組み換えモノクローナル抗体の部分 (ペプチド) を提供する。従って、C P A A 蛋白質およびペプチド、例えばそれらの蛋白質またはペプチド上のエピトープに対する特異性を有する組み換えモノクローナル抗体またはその部分、例えばパラトープを提供することが、本発明の目的である。

20

【0007】

本発明のさらなる目的は、そのヌクレオチド配列 (遺伝子) が前記組み換え抗体の重鎖および軽鎖の部分または全部をコードするオリゴヌクレオチド、例えば c D N A を提供することである。したがって、本発明の態様は、C P A A を、特に特定の C P A A に共通して存在する抗原決定基またはエピトープを特異的に認識するモノクローナル抗体の可変領域をコードする遺伝子を提供する。

30

本発明のさらなる目的は、上記遺伝子を含む組み換えベクターを提供する。本発明のさらなる目的は、上記組み換えベクターを用いて得られる形質転換体を提供する。

【0008】

研究、診断および臨床目的のために C P A A に特異的な組み換え抗体を用いる際にそれらを容易に単離できるようにし並びに多用途化できるマーカーがタグ付けされた、C P A A に特異的な組み換え抗体を提供することは、本発明のよりさらなる目的である。本発明のさらなる態様は、ヒト免疫グロブリンガンマ - 1 およびカッパ定常領域にそれぞれ連結された C P A A に特異的なネズミ抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を含む、キメラ抗体を提供する。本発明の他の目的は、C P A A に特異的な完全ヒト化組み換え抗体を提供する。この実施形態の態様において、完全ヒト化組み換え抗体は、その反応性を維持しつつヒトにおけるその免疫原性を低下させるために最適化される。

40

【発明の効果】

【0009】

研究、診断および臨床用途のために本明細書で開示される組み換え抗体を用いる方法を提供することは、本発明の他の目的である。特に、本発明の目的は、おそらく疾病の症状のない患者における癌の早期発見のための診断ツールを提供する。他の態様は、緩徐型の膵臓癌と悪性の膵臓癌とを区別するための免疫組織化学的ツールを提供する。

【0010】

本発明の他の目的は、その必要性のある患者に C P A A 抗原に結合する抗体、その部分、フラグメント、ペプチドもしくは誘導体を投与することを含む、腫瘍縮小を促進するた

50

めの方法または形質転換された細胞の死を引き起こすための方法であって、該抗体が腫瘍縮小または細胞死を促進するのに十分な量で投与される、方法を提供する。

本発明のさらに別の目的は、抗CPAA抗体および/または抗CPAAペプチドを用いた、CPAAの存在と関連する動物細胞、組織または病理の試験管内（インビトロ）、その場（インシトゥー）および/または生体内（インビボ）診断および/または処置に有用性のある方法を提供する。本発明はまた、CPAA関連の病的状態を診断および/または処置するための本発明の診断および/または治療方法に有用な、医薬のおよび/または診断の化合物および/または組成物の形式の抗CPAA抗体およびペプチドを提供する。

【0011】

本発明は、2個の軽鎖および2個の重鎖を含み、その各々の鎖が少なくとも一部のヒトの定常領域と少なくとも一部のCPAAに対する特異性を有するヒト起源以外の可変領域（V）とを含む、抗CPAAキメラ抗体またはヒト化抗体であって、該抗体は高い親和性（アフィニティー）および/または高い結合活性（アビディティー）をもってCPA関連細胞の阻害エピトープ（inhibiting epitope）および/または中和エピトープに結合する、抗CPAAキメラ抗体またはヒト化抗体に関する。本発明はまた、そのような抗体のフラグメントまたは誘導體、例えば一部分または複数部分の抗体鎖、例えば重鎖の定数領域、連結領域、多様な領域（diversity region）もしくは可変領域、または軽鎖の定数領域、連結領域もしくは可変領域を含む。該抗体の例示的な部分には、CPAAに対する特異的な結合性を規定する、一部または複数の抗体の相補性決定領域（CDR）がある。

モノクローナル抗体またはその部分により特定されるCPAAペプチドを特性評価することは、本発明のさらなる目的である。そのような抗原ペプチドは、さらなる抗原結合性リガンドを創製する際に有用でありうるし、あるいはワクチンまたは他の免疫賦活手法として用いられうる。

【0012】

本発明のさまざまな有用性に関する抗CPAA抗体およびペプチドを製作および使用する方法、例えば、限定するものではないが、本発明に関する抗CPAA抗体または抗CPAAペプチドを産生するためのハイブリドーマ法、組み換えもしくはキメラ合成法；溶液または細胞におけるCPAAを検出する方法；試験管内で、その場で、または生体内でCPAA保有細胞の1つまたは複数の生物活性を阻害する（該CPAA保有細胞を殺すことを含む）方法もまた、提供される。それ故、そのような阻害および殺すことは、CPAA保有細胞、例えば悪性腫瘍が関与する症状または病的状態を緩和するため、本発明の治療法を包含しうる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、ホリンシェッド（Hollinshead）「ワクチン」である結腸直腸癌および膵臓癌の細胞膜の精製された調製物のHPLC溶出プロファイルを示すトレース図である。

【図2】図2は、16C3ネズミ抗体カップ軽鎖のDNA配列を示す。推定されるATG開始コドンは太字/下線付きで示され、推定されるTAG終止コドンは斜字体/下線付きで示される。

【図3】図3は、16C3抗体IgG重鎖のDNA配列を示す。推定されるATG開始コドンは太字/下線付きで示され、推定されるTAG終止コドンは斜字体/下線付きで示される。

【図4】図4は、16C3抗体のカップ軽鎖のアミノ酸配列を表す。CDR領域は、太字/下線付きの書体で示される。

【図5】図5は、16C3重鎖のアミノ酸配列を表す。CDR領域は、太字/下線付きの書体で示される。

【図6】図6は、いくつかのヒト化16C3可変軽鎖を示す。16C3はネズミ抗体の配列であり、ven16C3はヒトの枠組み構造配列を用いてベニアされた（veneered）ものであり、cdr16C3はヒトCDRアミノ酸を用いてリモデルされたものであり、a

10

20

30

40

50

b b 1 6 C 3 は短縮型 C D R グラフティング (abbreviated CDR grafting) を表し、s d r 1 6 C 3 は部位決定アミノ酸変化 (site determining amino acid change) を示し、f r a 1 6 C 3 は、ヒト可変領域のさまざまな「ピース」の組み合わせを用いることにより可変領域をリモデルする「フランケンシュタイン (Frankenstein)」アプローチを表す。数字は、カバット番号付けを反映する。

【図 7】図 7 は、いくつかのヒト化 1 6 C 3 の可変重鎖を示す。略語は、図 6 のものと同意義である。

【図 8】図 8 は、未処理の 1 6 C 3 腫瘍抗原に対する 1 6 C 3 抗体を用いた、さまざまな細胞系のウェスタンブロット解析の放射線写真である。T U = 患者の摘出された腫瘍試料 (結腸直腸) ; L S = L S 1 7 4 ; C F = C F P A C - 1 ; A S = A S P C - 1 ; H T - H T 2 9。

10

【図 9】図 9 は、蛋白質分解酵素 V 8 処理した 1 6 C 3 腫瘍抗原を表すウェスタンブロットの放射線写真である。L S 1 7 4 細胞系からの 1 6 C 3 抗原の蛋白質分解酵素 V 8 処理およびウェスタンブロットを用いた抗原の検出。L S = 未処理の抗原 ; V 8 1 = 室温 (R T) での蛋白質分解酵素 V 8 による 1 時間のインキュベーション ; V 8 3 = R T での蛋白質分解酵素 V 8 による 3 時間のインキュベーション ; V 8 2 4 = R T での蛋白質分解酵素 V 8 による 2 4 時間のインキュベーション。

【図 10】図 10 は、P N G a s e - F 処理された 1 6 C 3 腫瘍抗原を表すウェスタンブロットを示す。C F P A C - I からの 1 6 C 3 抗原を、P N G a s e - F (N 連結型糖鎖付加を切り出す) でさまざまな時間処理した。C F C = 酵素なしで R T にて 2 4 時間インキュベートされた抗原 ; C F = 未処理の対照抗原 ; C F 1 = R T にて 1 時間酵素処理された抗原 ; C F 5 = 5 時間酵素処理された抗原 ; C F 2 4 = 2 4 時間酵素処理された抗原。高分子量のバンドは影響を受けるが、低分子量のバンドは影響を受けない。

20

【図 11】図 11 は、1 6 C 3 抗体を用いた、さまざまな胎児組織抽出物中に発現されている 1 6 C 3 腫瘍抗原を表すウェスタンブロットを示す。レーン : 1 = 胎児の腸、F x I I I (ヘム (H e m))、8 / 2 2 / 7 2 ; 2 = 胎児の腸、F x I I I (ヘム)、8 / 2 2 / 7 2 ; 3 = 胎児の消化管、F x I I I、2 / 2 6 / 7 3 ; 4 = 胎児の消化管、F x I I I、H B 1 1 / 1 / 7 2 ; 5 = 胎児の消化管、F x I I I、1 2 / 2 0 / 7 2 ; 6 = 胎児の腸、F x I、6 / 2 4 / 7 5 ; 7 = 胎児の消化管、F x I、1 2 / 2 0 / 7 2 ; 8 = 胎児の消化管、F x I I、3 / 1 / 7 3 ; 9 = 胎児の腸レグ (R e g) 2 およびレグ 3 A、8 / 3 / 7 4。

30

【図 12】図 12 は、最適化されたヒト化 1 6 C 3 抗体のアミノ酸配列を示す。下線付き太字のアミノ酸は C D R を示し、「/」はリーダーペプチド / 成熟 N 末端の連結部および可変ドメイン / 定常ドメインの連結部を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

(発明の詳しい説明)

本発明が、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコルおよび試薬、その他のものに限定されることはなく、またそれらが改変されてもよいことは理解されるべきである。本明細書中で用いられる専門用語は、特定の実施形態を記載することのみを目的とするものであって、本発明の範囲を限定する意図はなく、それは特許請求の範囲によってのみ規定される。

40

特に定義されない限り、本明細書記載の抗体に関連して用いられる科学用語および技術用語は、当業者により一般に理解される意味を有するものである。さらに、文脈により特に要求されない限り、単数形の用語は複数形を含みうるし、複数形の用語は単数形を含みうる。一般に、本明細書記載の、細胞培養および組織培養、分子生物学ならびに蛋白質およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド化学およびハイブリッド形成に関連して用いられる命名法ならびに技術は、当分野で周知であり、通常用いられるものである。

【0015】

標準的な技術が、組み換え D N A、オリゴヌクレオチド合成ならびに組織培養および形

50

質転換（例えばエレクトロポレーション、リポフェクション）に用いられる。酵素反応および精製技術は、製造業者の仕様書に従って、あるいは当分野で一般に行われるように若しくは本明細書に記載されるように実施される。前述の技術および手順は、概して、当分野で周知の従来法に従って、また本明細書を通じて引用され、記述される様々な一般的な文献およびより専門的な文献に記載されるように、実施される。例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: LAB. MANUAL（第3版、Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001）を参照のこと。本明細書記載の分析化学、有機合成化学ならびに医薬品化学および薬化学に関連して用いられる命名法、ならびにそれらの研究室手順および技術は、当分野で周知であり、当分野で通常用いられるものである。標準的な技術が、化学合成、化学分析、医薬品製造、製剤および送達、そして患者の処置に用いられる。

10

【0016】

実施例中、または特に断らない限り、本明細書中で用いられる原料または反応条件の量を表す数字はすべて、用語「約」により全例示についてモディファイされると理解されるべきである。

特定された特許および他の刊行物はすべて、例えば、本発明と関連して用いられうる該文献記載の方法論を記述するおよび開示する目的のために、出典明示により明確に本明細書の一部とされる。これらの刊行物は、本出願の出願日前の開示内容を単に提供するものである。この点に関し、本発明者らが、先行発明によりまたは他のいかなる理由についても、そのような開示に先行する権利を与えられないという承認であると介されるものはない。これらの文書の内容に関する日付または表示に関する記載はすべて、出願人に利用可能な情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正当性に関するいかなる承認も構成しない。

20

【0017】

本発明は、組み換えモノクローナル抗体およびペプチド、診断手順を含む臨床手順および科学的手順における使用を提供し、特にそのような過程はヒト結腸直腸癌および膵臓癌-関連抗原（CPAA）の検出、および該組み換えモノクローナル抗体およびペプチドにより認識されるエピトープの特性評価を提供する。本発明はまた、結腸直腸癌および膵臓癌に関連する病的状態を診断および/または処置するための本発明の診断方法および/または治療方法に有用な、診断化合物および/または医薬組成物の形態の、抗CPAA抗体およびペプチドを提供する。そのような抗CPAAモノクローナル抗体の1つはすでに特性評価されており、米国特許第7,314,622号を参照のこと。しかしながら、本明細書記載の抗原結合タンパク質は、新規である。

30

【0018】

一般に、モノクローナル抗体は診断法においてかけがえのない試薬として用いられる。実際、その高い特異性のため、それらは隠れた生合成経路中のさまざまな生体分子の機能を説明するのに大きな役割を果たしている。これらはまた、腫瘍特異抗原の特定および特性評価に関する選択的な試薬でもあり、癌分類における有用なツールでもある。

【0019】

分子生物学および組み換え技術の方法の出現により、抗体および抗体様分子は組み換え手法により産生され、それによって、抗体のポリペプチド構造に見出される特定のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列の創出が可能である。そのような抗体は、該抗体のポリペプチド鎖をコードする遺伝子配列のクローニングによって、あるいは合成ポリペプチド鎖を特定のエピトープおよび抗原決定基に対して親和性を有する活性型の4量体（ H_2L_2 ）構造を形成させるためにアSEMBルさせる該ポリペプチドの直接的な合成のいずれかによって、作製することができる。これにより、別の種および異なる供給源からの中和抗体特有の配列を有する抗体の容易な産生が可能となった。

40

【0020】

抗体の供給源、あるいはそれらがどのように組み換え技術により構築されたか、またはそれらが試験管内で、もしくはトランスジェニック動物、研究室のもしくは商業的な大きさの大規模な細胞培養を用いて、トランスジェニック植物を用いて生体内で合成されたか

50

、またはその工程のいずれの段階でも生物を用いない直接的な化学合成によって合成されたかにかかわらず、すべての抗体は、全体的に類似する3次元構造を有する。この構造は、しばしば H_2L_2 として与えられ、抗体が一般に2個の軽鎖アミノ酸(L)および2個の重鎖アミノ酸(H)を含むという事実を意味する。両方の鎖は、構造的に相補的な抗原性の標的と相互作用できる領域を有する。標的と相互作用する領域は、「可変」領域または「V」領域と称され、別の抗原特異性を有する抗体のアミノ酸配列の差異により特徴づけられる。H鎖もしくはL鎖のいずれかの可変領域は、抗原性の標的に特異的に結合できるアミノ酸配列を含む。

【0021】

本明細書で用いられる用語「抗原結合領域」は、抗原と相互作用し、抗体にその抗原に対する特異性と結合性を与えるアミノ酸残基を含む、抗体分子の部分を意味する。抗体領域は、抗原に結合する残基の適当な構造を維持するのに必要な「枠組み構造」アミノ酸残基を含む。

抗原結合領域を与えるH鎖またはL鎖の可変領域中に、種々の特異性を有する抗体間での極めて大きな多様性のために「超可変」と称される小さい配列が存在する。この超可変領域はまた、「相補性決定領域」または「CDR」領域と称されることもある。これらのCDR領域が、特有の抗原決定構造に関する抗体の基本的な特異性の主たる原因となる。

【0022】

CDRは、可変領域内のアミノ酸中で隣接しないで展開するが、種に抛らず、重鎖可変領域および軽鎖可変領域中のこれらの重要なアミノ酸配列の位置的場所は、可変鎖のアミノ酸配列内で類似の場所にあることが見出された。すべての抗体の重鎖可変および軽鎖可変はそれぞれ、軽鎖(L)および重鎖(H)について他の領域と各々隣接していない3個のCDR領域を有する(L1、L2、L3、H1、H2、H3と称される)。一般に認められているCDR領域は、Kabatら、252 J. Biol. Chem. 6609-16 (1977)により記述され、CDRループは直線状アミノ酸配列の検査の間この規則を適用することにより定義されてよい。しかしながら、CDR-H3ループを特定する規則は変更されてよいが(第4章、ANTIBODY ENGIN. METHODS & PROTOCOLS、(Lo編. Humana Press, Totowa, NJ, 2004)を参照のこと)、いくつかのCDR-H3ループの実際の境界は、実験技術、例えば円偏光二色性、核磁気共鳴またはX線結晶学なくして特定することはできない。

【0023】

すべての哺乳動物種において、抗体ペプチドは、定常領域(すなわち、高度に保存されている)および可変領域を含み、後者の中には、CDRと、重鎖または軽鎖の可変領域内にあるがCDRの外側のアミノ酸配列からなるいわゆる「枠組み構造領域」とがある。

抗体のCDR領域により認識される抗原決定に関して、これは「エピトープ」とも称される。換言すれば、エピトープは、抗体により認識され、結合されうるいずれかの分子の部分を意味する(相対する抗体の結合領域は、パラトープと称されることもある)。一般に、エピトープは、分子の化学的に活性な表面配置、例えばアミノ酸または糖側鎖からなり、特異的な三次元構造上の特性ならび特異的な荷電特性を有する。

【0024】

「抗原」は、抗体に結合されうる分子または分子の部分であり、それらは、その抗原のエピトープに結合できる抗体を産生するために動物にさらに導入することができる。抗原は、1個または複数のエピトープを有しうる。上記の特異的な反応は、抗原が高い選択的様式で対応する抗体と反応するが、他の抗原により惹起され得た多くの他の抗体とは反応しないことを示すことを意味する。

かくして、用語「抗体」は、完全免疫グロブリン分子、ならびにその部分、フラグメント、ペプチドおよび誘導體、例えば抗原もしくはエピトープと結合できる抗体のFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fsc、CDR領域、パラトープまたはいずれかの部分もしくはペプチド配列、の両方を含むことを意味する。抗体は、それが分子と特異的に反応し、それによって分子を抗体に束縛できる場合に、分子を「結合できる」という。

【0025】

抗体はまた、可溶形式 (soluble form) もしくは結合形式 (bound form) で標識されていてもよい、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗体に対する抗イデオタイプ (抗 Id) 抗体、ならびに、いずれかの既知技術、例えば限定するものではないが酵素切断、ペプチド合成もしくは組み換え技術により提供される、それらのフラグメント、部分、領域、ペプチドもしくは誘導体を含む。本発明のそのような抗体は、C P A A または C P A A を保有する細胞の部分と結合できる。抗体フラグメントまたは一部は、完全抗体の F c フラグメントを欠いていてもよく、循環系からより迅速に除去され、また完全抗体よりもさらに低い非特異的な組織結合性を有していてもよい。抗体フラグメントの例としては当分野で周知の方法、例えば酵素 (例えばパイン (F a b フラグメント) またはペプシン (F (a b ')₂ フラグメント) による蛋白質切断を用いて完全抗体から作製できる。Wahlら、24 J. Nucl. Med. 316-25 (1983) を参照のこと。抗体の部分は、上記方法のいずれかにより作製されうるし、あるいは組み換え分子の一部を発現することによって作製されうる。例えば、組み換え抗体の C D R 領域 (群) を単離し、適当な発現ベクター中にサブクローン化してもよい。例えば、米国特許第 6, 680, 053 号を参照のこと。

10

【0026】

クローン 16C3 のオリゴヌクレオチドおよびアミノ酸配列

本発明は、C P A A と特異的に結合する新規のモノクローナル抗体を提供する。このモノクローナル抗体は、「16C3」と称され、それは、ハイブリドーマ・クローンに割り当てられた数字を意味する。本明細書において、16C3 はまた、特異的に 16C3 抗体と結合するその能力のために 16C3 と特定された C P A A エピトープと特異的に結合するモノクローナル抗体の部分、パラトープまたは C D R も意味する。本明細書記載の 16C3 の組み換え体およびヒト型のいくつかは、同じ名前により示されることがありうる。

20

本発明は、その範囲内に、本発明の抗 C P A A 抗体の軽鎖および重鎖の可変領域をコードする D N A 配列を含む。16C3 抗体の軽鎖の可変領域をコードする核酸配列は、図 2 に示される。16C3 抗体の重鎖の可変領域をコードする核酸配列は、図 3 に示される。

【0027】

本発明は、その範囲内に、図 4 および図 12 に表されるアミノ酸配列を含む 16C3 軽鎖のペプチド；および、図 5 および図 12 に表されるアミノ酸配列を含む 16C3 重鎖のペプチド、を包含する。さらに、本発明は、16C3 カッパ軽鎖について示される C D R 領域を包含し、それらは、C D R 1 : G A S E N I Y G A L N (配列番号 : 1) ; C D R 2 : G A S N L A D (配列番号 : 2) ; および C D R 3 : Q N V L S S P Y T (配列番号 : 3) のアミノ酸である、図 4 中の下線付きで示される残基；ならびに、C D R 1 : Q A S E N I Y G A L N (配列番号 : 4) ; C D R 2 : G A S N L A T (配列番号 : 5) ; および C D R 3 : Q Q V L S S P Y T (配列番号 : 6) を含む、図 12 中下線付きで示される軽鎖のアミノ酸である。本発明は、C D R 1 : G Y T F T D Y A M H (配列番号 : 7) ; C D R 2 : L I S T Y S G D T K Y N Q N F K G (配列番号 : 8) ; および C D R 3 : C D Y S G S R Y W F A Y (配列番号 : 9) を含む、図 5 中下線付きで示される重鎖の C D R 領域、ならびに、C D R 1 : G Y T F T D Y A M H (配列番号 : 7) ; C D R 2 : I S T Y S G D T K Y N Q N F Q G (配列番号 : 10) ; および C D R 3 : G D Y S G S R Y W F A Y (配列番号 : 11) を含む、図 12 中下線付きで示される重鎖のアミノ酸を同様に同定する。

30

40

【0028】

本発明の範囲内には、16C3 またはそのペプチドのアミノ酸配列をコードするいずれかのオリゴヌクレオチド配列もまた含まれる。遺伝暗号の縮重のため、複数のコドンがある特定のアミノ酸をコードするために用いられうる。この遺伝暗号を用いると、1個または複数の異なるオリゴヌクレオチドが認められることがあり、その各々はそのアミノ酸をコードするであろう。特定のオリゴヌクレオチドが、事実上、実際の X X X のコード配列を構成することになる確率は、異常な塩基対形成の関係と、ある特定のコドンが抗 C P A A 抗体または部分を発現する真核細胞または原核細胞において実際に (ある特定のアミノ酸をコードするために) 用いられる頻度とを考慮することによって見積もることができる

50

。そのような「コドン使用頻度規則」は、Latheら、183 J. Molec. Biol. 1-12 (1985) により記載されている。Latheの「コドン使用頻度規則」を用いることで、抗C P A A配列をコードしうる理論的な「最確の」ヌクレオチド配列を含む、単一のオリゴヌクレオチドまたは一組のオリゴヌクレオチドが特定される。

【0029】

時には、あるアミノ酸配列が単一のオリゴヌクレオチドのみによってコードされることがあるが、ほとんどの場合、そのアミノ酸配列は一組の類似するオリゴヌクレオチドのいずれにもコードされる。重要なことは、その組の全メンバーが、そのペプチドフラグメントをコードしうるオリゴヌクレオチドを含んでおり、かくして潜在的にそのペプチドフラグメントをコードする遺伝子と同じオリゴヌクレオチド配列を含むのに対し、その組の1個のメンバーだけが、その遺伝子のヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列を含むことである。このメンバーはその組中に存在し、そして、その組の他のメンバーが存在してもDNAにハイブリダイズできるため、そのタンパク質をコードする遺伝子をクローニングするためにある単一のオリゴヌクレオチドを用いるかのごとく、同じ様式で、その未分画の一組のオリゴヌクレオチドを用いることができる。

10

【0030】

抗C P A A抗体または可変領域または定常領域を含むペプチドをコードしうる理論的な「最確の」配列を含むオリゴヌクレオチドまたは一組のオリゴヌクレオチドは、その「最確の」配列または一組の配列とハイブリダイズできる相補的なオリゴヌクレオチド配列または一組のオリゴヌクレオチドの配列を特定するために、用いられる。そのような相補配列を含むオリゴヌクレオチドは、可変領域または定常領域の抗C P A A遺伝子を特定し、そして単離するためのプローブとして用いることができる (Sambrookら、1989)。

20

【0031】

16C3のペプチドをコードしうる適切なオリゴヌクレオチドまたは一組のオリゴヌクレオチド(または、そのようなオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの組と相補的なもの)は、特定され(上記の手順を用いることで)、合成され、そして、当分野で周知の方法により、抗C P A A抗体またはその可変領域もしくは定常領域を発現できる細胞から誘導されたDNAまたはcDNA調製物に対してハイブリダイズされる。「最確の」抗C P A A領域のペプチドのコード配列と相補的な一本鎖オリゴヌクレオチド分子は、当業者に周知の手順を用いて合成される。Belagajeら、254 J. Biol. Chem. 5765-80 (1979); Maniatisら、in MOLEC. MECH. IN CONTROL OF GENE EXPRESSION (Nierlichら編、Acad. Press, NY, 1976); Wuら、1978; Khorana, 203 Science 614 25 (1979)を参照のこと。

30

【0032】

加えて、DNA合成は、自動合成装置の使用により実現できる。核酸ハイブリッド形成技術は、Sambrookら、1989により、そしてHaynesら、NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, A PRACTICAL APPROACH (IRL Press, DC 1985)において開示されている。ハイブリッド形成の洗浄条件は、0.2 x SSC / 0.1% SDSの洗浄溶液と回転させながら室温で10分間のインキュベーション(低ストリンジェント洗浄)、予熱した(42°C) 0.2 x SSC / 0.1% SDSの洗浄溶液と回転させながら42°Cで15分間のインキュベーション(中ストリンジェント洗浄)、そして、予熱した(68°C) 0.1 x SSC / 0.1% SDSの洗浄溶液と回転させながら68°Cで15分間のインキュベーション(高ストリンジェント洗浄)を含む。Ausubelら、ANTIBODIES: A LAB. MANUAL, (HarlowおよびLane編、Cold Spring Harbor Lab., 1988)を参照のこと。上記技術または類似の技術により、ヒト・アルデヒド脱水素酵素(Hsuら、82 P.N.A.S. USA 3771-75 (1985))、フィブロネクチン(Suzukiら、4 Bur. Mol. Biol. Organ. J. 2519-24 (1985))、ヒト・エストロゲン受容体遺伝子(Walterら、82 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 7889-93 (1985))、組織型プラスミノゲン活性化因子(Pennicaら、301 Nature 214 21 (1983))およびヒト満期胎盤性(human term placental)アルカリホスファターゼ相補DNA(Keunら、82 P.N.A.S. USA 8715-19 (1985))の遺伝子のクローニングに成功した。

40

50

【0033】

本発明で使用する抗体コード領域はまた、標準的な分子生物学的技術を用いた既存の抗体遺伝子の改変によって提供され、結果として本明細書記載の抗体およびペプチドのバリエーション（アゴニスト）を与えうることにも目的とする。そのようなバリエーションは、限定するものではないが、抗CPAA抗体またはペプチドのアミノ酸配列における欠失、付加および置換を含む。

【0034】

例えば、置換の1つの種類に、保存的アミノ酸置換がある。そのような置換は、抗CPAA抗体ペプチド中の所定のアミノ酸を類似する特徴を有する別のアミノ酸に置換するものである。同類置換（保存的置換）として典型的に見られるものには、脂肪族アミノ酸Ala、Val、LeuおよびIle中で、あるアミノ酸から別のアミノ酸への置換；ヒドロキシル残基SerとThrの交換；酸性残基AspとGluの交換；アミド残基AsnとGln間の置換；塩基性残基LysとArgの交換；芳香族残基Phe、Tyrおよびその類似物の間での置換がある。アミノ酸変化が表現型でサイレントとなりうるものに関するガイダンスは、Bowieら、247 Science 1306-10 (1990)において見出される。

10

【0035】

抗CPAA抗体またはペプチドのバリエーションまたはアゴニストは、完全に機能的であってもよいし、あるいは1つまたは複数の活性における機能を失っていてもよい。完全に機能的なバリエーションは、典型的には、保存的変異のみを含むか、あるいは決定的でない残基にまたは決定的でない領域に変異を含む。機能的バリエーションはまた、結果的に機能に変化を及ぼさないもしくは決定的な変化とならない類似アミノ酸の置換を含んでいてよい。あるいは、そのような置換は、機能に幾分か正または負の影響を及ぼしてもよい。非機能的バリエーションは、1つまたは複数の非保存的アミノ酸置換、欠失、挿入、逆位もしくは切断、またはある決定的な残基もしくは決定的な領域への挿入、逆位もしくは欠失を、典型的に含む。

20

【0036】

機能に必須のアミノ酸は、当分野で既知の方法、例えば部位特異的変異導入またはアラニン・スキニング変異導入により同定されうる。Cunninghamら、244 Science 1081-85 (1989)。後者の手順は、分子中の残基ごとに単一のアラニン突然変異を導入する。次いで、その結果として生じたバリエーション分子は、生物学的活性、例えばエピトープ結合性または試験管内でのADCC活性について試験される。リガンド-受容体結合に決定的な部位はまた、構造解析、例えば結晶学、核磁気共鳴または光親和性標識によって決定することができる。Smithら、224 J. Mol. Biol. 899-904 (1992)；de Vosら、255 Science 306-12 (1992)。

30

【0037】

さらに、ポリペプチドは、しばしば20個の「天然の」アミノ酸以外のアミノ酸を含む。さらに、末端のアミノ酸を含む複数のアミノ酸は、本来の過程、例えばプロセッシングおよび他の翻訳後修飾または当分野で周知の化学修飾技術によって、モディファイされてよい。既知のモディファイは、限定するものではないが、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋化、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチン形成、ピログルタミン酸塩の形成、ホルミル化、ガンマ・カルボキシル化、糖鎖付加、GP Iアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、蛋白分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイレーション (selenoylation)、硫酸化、蛋白質に対するアミノ酸の転移RNA媒介付加、例えばアルギニル化およびユビキチン化を含む。

40

【0038】

そのようなモディファイは当業者に周知であり、科学文献にさらに詳細に記載されている。特に共通するいくつかのモディファイ、例えば、糖鎖付加、脂質付加、硫酸化、グル

50

タミン酸残基のガンマ・カルボキシル化、ヒドロキシル化およびADPリボシル化は、例えば、多くの基本書、例えばProteins-Structure and Molecular Properties (第2版、T. E. Creighton, W. H. Freeman & Co., NY, 1993)に記載されている。多くの詳細な概説が、この項目に関して利用可能であり、例えばWold, Posttranslational Covalent Modification of proteins, 1-12 (Johnson編、Academic Press, NY, 1983); Seifterら、182 Meth. Enzymol. 626-46 (1990); およびRattanら、663 Ann. NY Acad. Sci. 48-62 (1992)によるものがある。

【0039】

したがって、本発明の抗体およびペプチドはまた、置換されたアミノ酸残基が遺伝暗号によってコードされたものではなく、既述したような置換基のペグ化を含む、誘導体または類似体も包含する。

同様に、アミノ酸配列における付加および置換そして変異ならびに上記のモディファイは、CPAA抗原および/またはそのエピトープもしくはペプチドのアミノ酸配列に同じように適用でき、かくして、それらは本発明に包含される。上記のように、本発明に関するモノクローナル抗体をコードする遺伝子は、CPAAの認識に特に効果的である。

【0040】

抗体の組み換え発現

モノクローナル抗体は、典型的には、ネズミ・ハイブリドーマ系において天然分子として産生される。その技術に加えて、以下に概説されるように、本発明は、モノクローナル抗体の組み換えDNA発現を提供する。これは、選択された宿主種におけるヒト化抗体ならびに広範囲の抗体誘導体および融合タンパク質の産生を可能にする。最近では、細菌、酵母、トランスジェニック動物および鶏卵における抗体の産生が、ハイブリドーマに基づく生産系の有望な代替手段として出現してきた。トランスジェニック動物の主な利点には、再生可能な資源からの潜在的に高い収量がある。

【0041】

本発明の抗CPAA抗体、部分またはポリペプチドを少なくとも1つコードする核酸配列は、ライゲーションのための平滑化末端もしくは付着化末端、適当な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて付着端を埋めること、望ましくない連結を防ぐためのアルカリホスファターゼ処理、および適当なりガーゼによるライゲーションを含む標準的な技術に従い、ベクターDNAを用いて組み換えることができる。そのような操作に関する技術は、例えば、Maniatisら、MOLECULAR CLONING, LAB. MANUAL, (Cold Spring Harbor Lab. Press, NY, 1982および1989)およびAusubel, 1987, 1993に開示されており、それらを用いて、モノクローナル抗体分子またはその抗原結合領域をコードする核酸配列を構築できる。

【0042】

DNAなどの核酸分子は、それが転写調節および翻訳調節情報を含むヌクレオチド配列を含み、該配列がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と「作動可能に連結」されている場合、ポリペプチドを「発現できる」と称される。作動可能な連結は、調節DNA配列と発現しようとするDNA配列とが、回収可能な量で抗CPAAペプチドまたは抗体部分としての遺伝子発現を可能にする方法で繋がれた連結をいう。遺伝子発現に必要とされる調節領域の正確な性質は、類似の分野で周知のように、生物によって異なりうる。例えば、Sambrookら、1989; Ausubelら、1987-1993を参照のこと。

【0043】

したがって、本発明は、原核生物細胞または真核生物細胞のいずれかにおける、抗CPAA抗体またはペプチドの発現を包含する。適切な宿主は、生体内もしくはその場のいずれかの細菌、酵母、昆虫、真菌、鳥および哺乳動物細胞を含む細菌宿主または真核宿主を含むか、あるいは哺乳動物、昆虫、鳥もしくは酵母起源の宿主細胞を含む。哺乳動物細胞または組織は、ヒト、霊長類、ハムスター、ウサギ、齧歯動物、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、ヤギ、イヌまたはネコ起源のものであってよいが、その他の哺乳動物の細胞が用いられてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 4 】

さらに、例えば酵母のコピキチン加水分解酵素系の使用により、コピキチン膜貫通ポリペプチド融合タンパク質の生体内合成が達成されてもよい。こうして産生された融合タンパク質は、生体内で処理されるか、あるいは試験管内で精製され、処理されて、特定のアミノ末端配列を有する本発明の抗C P A A抗体またはポリペプチドの合成を可能にする。さらに、直接の酵母（もしくは細菌）発現において開始コドンにより導入されるメチオニン残基が残るという問題は、避けられるであろう。Sabinら、7(7) Bio/Technol. 705-09 (1989) ; Millerら、7(7) Bio/Technol. 698-704 (1989)。

【 0 0 4 5 】

酵母がグルコースに富む培地中で生育した場合に活発に発現される遺伝子で大量に産生される解糖系酵素をコードする遺伝子からのプロモーターおよび終結エレメント (termination elements) を組み込んだ一連の酵母遺伝子発現系のいずれも、本発明の抗C P A A抗体またはペプチドを得るために利用できる。既知の解糖系遺伝子もまた非常に効率的な転写調節シグナルを提供できる。例えば、ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子のプロモーターおよびターミネーター・シグナルが利用されてもよい。

昆虫における抗C P A A抗体またはそのペプチドもしくは機能的誘導体の産生は、例えば昆虫宿主を当業者に既知の方法により膜貫通ポリペプチドを発現するよう改変されたバキュロウイルスを用いて感染させることによって、実施することができる。Ausubelら、1987, 1993を参照のこと。

【 0 0 4 6 】

1つの実施形態において、導入されるヌクレオチド配列は、受容宿主において自己複製可能なプラスミドまたはウイルスベクターに組み込まれよう。多種多様なベクターのいずれも、この目的に関して用いることができる。Ausubelら、1987, 1993を参照のこと。特定のプラスミドまたはウイルスベクターを選択する際に重要な要素には、ベクターを含む受容細胞が、そのベクターを含まない受容細胞から見分けられ、そして選択される際の容易性；特定の宿主において所望されるベクターのコピー数；そして、異種の宿主細胞間でベクターを「往来（シャトル）」できることが望ましいかどうか、が挙げられる。

【 0 0 4 7 】

当分野で既知の例示的な原核生物ベクターは、プラスミドを含み、例えば大腸菌 (E. coli) 中で複製可能なものを含む (例えば p B R 3 2 2、C o l E 1、p S C 1 0 1、p A C Y C 1 8 4、V X)。そのようなプラスミドは、例えば、Maniatisら、1989 ; Ausubelら、1987, 1993により開示されている。パチルス (Bacillus) プラスミドは、p C 1 9 4、p C 2 2 1、p T 1 2 7、その他のものを含む。そのようなプラスミドは、Gryczan、THE MOLEC. BIO. OF THE BACILLI 307-329 (Academic Press, NY, 1982)に開示されている。適切なストレプトミセス (Streptomyces) プラスミドは、p I J 1 0 1 (Kendallら、169 J. Bacteriol. 4177-83 (1987))およびストレプトミセス・バクテリオファージ、例えば C 3 1 (Chaterら、SIXTH INT ' L SYMPOSIUM ON ACTINOMYCETALES BIO. 45-54 (Akademiai Kaido, Budapest, Hungary 1986)を含む。シュードモナス (Pseudomonas) プラスミドは、Johnら、8 Rev. Infect. Dis. 693-704 (1986) ; Izaki, 33 Jpn. J. Bacteriol. 729 42 (1978) ; およびAusubelら、1987, 1993において概説される。

【 0 0 4 8 】

あるいは、抗C P A A抗体またはペプチドをコードするc D N Aの発現に有用な遺伝子発現エレメントは、限定するものではないが (a) ウイルス転写プロモーターおよびそのエンハンサーエレメント、例えばS V 4 0初期プロモーター (Okayamaら、3 Mol. Cell. Biol. 28)、ラウス肉腫ウイルスL T R (Gormanら、79 P.N.A.S. USA 6777 (1982))、およびマローニー・マウス白血病ウイルスL T R (Grosschedlら、41 Cell 885 (1985)) ; (b) スプライス領域およびポリアデニル化部位、例えばS V 4 0後期領域 (late region) から導入されたもの (Okayamaら、1983)、および (c) ポリアデニル化部位、例えばS V 4 0における部位 (Okayamaら、1983) を含む。

【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

50

免疫グロブリン c D N A 遺伝子は、Liuら（後掲）、およびWeidleら、51 Gene 21 (1987)に記載されるように、発現エレメントとして S V 4 0 初期プロモーターとそのエンハンサー、マウス免疫グロブリン H 鎖プロモーター・エンハンサー、S V 4 0 後期領域 m R N A スプライシング、ラビット S グロビン介在配列、免疫グロブリンおよびラビット S グロビンポリアデニル化部位、およびポリアデニル化エレメントを用いて、発現される。

一部の c D N A および一部のゲノム D N A からなる免疫グロブリン遺伝子については（Whittleら、1 Protein Engin. 499 (1987)）、転写プロモーターはヒト・サイトメガロウイルスであってよく、プロモーター・エンハンサーはサイトメガロウイルスおよびマウス/ヒト免疫グロブリンであってよく、そして m R N A スプライシングおよびポリアデニル化領域は本来の染色体免疫グロブリン配列であってよい。

10

【 0 0 5 0 】

1つの実施形態において、齧歯動物細胞における c D N A 遺伝子の発現に関し、転写プロモーターはウイルス L T R 配列であり、転写プロモーター・エンハンサーはマウス免疫グロブリン重鎖エンハンサーおよびウイルスの L T R エンハンサーのいずれかもしくは両方であり、スプライス領域は 3 1 b p を超えるイントロンを含み、そして、ポリアデニル化および転写終結領域は合成される免疫グロブリン鎖に対応する本来の染色体配列から導入される。他の実施形態において、他のタンパク質をコードする c D N A 配列は、哺乳動物細胞においてそのタンパク質の発現を達成するために、上述の発現エレメントと組み合わせられる。

【 0 0 5 1 】

各融合遺伝子は、ある発現ベクターにおいて組み合わせられるかまたは挿入される。次いで、キメラ免疫グロブリン鎖の遺伝子産物の発現を可能にする受容細胞は、抗 C P A A ペプチドまたはキメラ H 鎖もしくはキメラ L 鎖のコード遺伝子を用いて個々にトランスフェクトされるか、あるいはキメラ H 鎖およびキメラ L 鎖遺伝子を用いて同時にトランスフェクトされる。トランスフェクトされた受容細胞は、組み込まれた遺伝子の発現を可能にする条件下で培養され、そしてその発現された免疫グロブリン鎖または完全抗体もしくはフラグメントは、その培地から回収される。

20

【 0 0 5 2 】

1つの実施形態において、抗 C P A A ペプチドまたはキメラ H 鎖および L 鎖またはその部分をコードする融合遺伝子は、後に受容細胞を同時トランスフェクトするために用いられる、別個の発現ベクターにおいて組み合わせられる。

30

各ベクターは、2個の選択可能な遺伝子、すなわち、細菌系における選択のために設計された第1の選択可能な遺伝子、そして真核系における選択のために設計された第2の選択可能な遺伝子を含んでいてよく、各ベクターは異なる遺伝子ペアを有する。このストラテジーは、結果として、細菌系において融合遺伝子の産生を最初に導き、そして増幅を可能にするベクターを生じる。このように細菌宿主において産生され増幅される遺伝子は、続いて、真核細胞を同時トランスフェクトするために用いられ、所望のトランスフェクト遺伝子を保有する同時トランスフェクトされた細胞の選択を可能にする。

【 0 0 5 3 】

細菌系での使用のための選択可能な遺伝子の例には、アンピシリン耐性を与える遺伝子およびクロラムフェニコール耐性を与える遺伝子がある。真核生物のトランスフェクタンでの使用のための選択可能な遺伝子は、キサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（g p t と称される）および T n 5 由来のホスホトランスフェラーゼ遺伝子（n e o と称される）を含む。

40

g p t を発現する細胞の選択は、この遺伝子にコードされた酵素がプリンヌクレオチド合成の基質としてキサンチンを利用することができるが、類似の内因性の酵素は利用することができないという事実に基づいている。（1）イノシンーリン酸塩のキサチンーリン酸塩への転換をブロックするミコフェノール酸と（2）キサンチンを含む培地においては、g p t 遺伝子を発現する細胞のみが生存できる。n e o 産物は、抗生物質 G 4 1 8 およびネオマイシン類の他の抗生物質による蛋白質合成の阻害をブロックする。

50

【 0 0 5 4 】

この2つの選択手順は、2個の別個のDNAベクターに導入された免疫グロブリン鎖遺伝子の真核細胞中への発現に関し、同時にもしくは連続して選択するために、用いることができる。真核細胞に対する別の選択可能なマーカーを含む必要はなく；各々が同じ選択可能なマーカーを含むH鎖ベクターおよびL鎖ベクターが、同時トランスフェクトされてもよい。適当な耐性細胞を選択した後は、その大部分のクローンは、H鎖ベクターとL鎖ベクターの両方および/または抗CPAAペプチドの統合されたコピーを含むであろう。

あるいは、キメラH鎖およびL鎖をコードする融合遺伝子は、同じ発現ベクター上で組み合わされてよい。

【 0 0 5 5 】

発現ベクターのトランスフェクションおよびキメラ抗体の産生に関して、受容細胞系は骨髄腫細胞であってよい。骨髄腫細胞は、形質転換された免疫グロブリン遺伝子にコードされる免疫グロブリンを合成し、アSEMBルし、そして分泌することができ、さらに、免疫グロブリンの糖鎖付加に関する機構を備えている。例えば、受容細胞は、組み換えIgを産生する骨髄腫細胞SP2/0(ATCC#CRL8287)である。SP2/0細胞は、トランスフェクトされた遺伝子にコードされる免疫グロブリンだけを産生する。骨髄腫細胞は、培地中で、または、マウスの腹腔において生育することができ、そこで分泌された免疫グロブリンを腹水から得ることができる。他の適切な受容細胞は、リンパ球様細胞、例えば、ヒト起源もしくはヒト起源以外のBリンパ球、ヒト起源もしくはヒト起源以外のハイブリドーマ細胞、または種間のヘテロハイブリドーマ細胞を含む。

【 0 0 5 6 】

本発明のキメラ抗体もしくはヒト化抗体の構築物または抗CPAAポリペプチドを運ぶ発現ベクターは、形質転換、トランスフェクト、接合、原形質融合、リン酸カルシウム沈殿法およびジエチルアミノエチル(DEAE)デキストランなどのポリカチオンを用いた応用法のような生化学的手法、ならびにエレクトロポレーション(電気穿孔法)、直接的なマイクロインジェクション(顕微注入)およびマイクロプロジェクトイル・ボンバードメント(微粒子銃)のような機械的手法を含む様々な適切な方法のいずれかにより、適当な宿主細胞に導入することができる。Johnstonら、240 Science 1538 (1988)。

【 0 0 5 7 】

リンパ球にDNAを導入する別の方法は、エレクトロポレーションによるものがある。Potterら、81 P.N.A.S. USA 7161 (1984) ; Yoshikawaら、77 Jpn. J. Cancer Res. 1122 33 (1986)。この手法において、受容細胞は、取り込まれるべきDNAの存在下で電気パルスを受ける。典型的には、トランスフェクト後に細胞は、完全培地中で約24時間回復させられ、次いで、選択培地を含む96ウェルの培養プレートに撒かれる。約0.4mg/ml~0.8mg/mlのG418を用いたG418選択が行われる。ミコフェノール酸選択は、約6μg/mlに加えて約0.25mg/mlのキサンチンを利用する。エレクトロポレーション技術は、Sp²/0細胞について約10⁻⁵~約10⁻⁴のトランスフェクション効率が見られると期待される。原形質融合法において、リゾチームを用いて、キメラ抗体遺伝子を含む組み換えプラスミドを保持するカタル(catarrhal)から細胞壁を剥ぎ取る。この結果得られたスフェロプラストを、ポリエチレングリコールと一緒に骨髄腫細胞と融合させる。本発明の免疫グロブリン遺伝子はまた、非リンパ系の哺乳動物細胞において、または他の真核細胞、例えば酵母、あるいは原核細胞、特定の細菌において発現させることもできる。

【 0 0 5 8 】

酵母は、免疫グロブリンH鎖およびL鎖の産生に関して、細菌に勝る実質的な利点を有する。酵母は、糖鎖付加を含む翻訳後ペプチド修飾を行う。現在、多くの組み換えDNAストラテジーが存在し、それらは酵母において所望のタンパク質の産生に使用できる強力なプロモーター配列およびハイコピー数のプラスミドを利用する。酵母は、クローン化された哺乳動物遺伝子産物のリーダー配列を認識し、リーダー配列を有するペプチド(すな

10

20

30

40

50

わちプレペプチド)を分泌する。Hitzmanら、11th Int'l Conference on Yeast, Genetics & Molec. Biol. (Montpellier, France, 1982)。

【0059】

酵母遺伝子発現系は、抗CPAAペプチド、抗体およびアセンブルされたネズミ抗体およびキメラ抗体またはヒト化抗体、それらのフラグメントおよび領域の産生レベル、分泌レベルおよび安定性のレベルに関して一般的に評価されうる。酵母がグルコースに富む培地中で生育した場合に活発に発現される遺伝子で大量に産生される解糖系酵素をコードする遺伝子からのプロモーターおよび終結エレメントを含む一連の酵母遺伝子発現系のいずれも、利用できる。既知の解糖系遺伝子もまた、非常に効率的な転写調節シグナルを提供しうる。例えば、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)遺伝子のプロモーターおよびターミネーター・シグナルが利用されてもよい。クローン化された免疫グロブリンcDNAの酵母における発現に最適な発現プラスミドを評価するための、多くのアプローチをとることができる。II DNA Cloning, 45-66, (Glover編、IRL Press, 1985)を参照のこと。

10

【0060】

細菌株もまた、本発明記載の抗体分子またはペプチドの産生のための宿主として利用することができる。大腸菌(E. coli) K12株、例えば大腸菌(E. coli) W3110(ATCC 27325)、そして他の腸内細菌、例えばサルモネラチフィムリウム(Salmonella typhimurium)またはセラチアマルセセンス(Serratia marcescens)、また、さまざまなシュードモナス(Pseudomonas)種を用いることができる。

【0061】

レプリコンおよび宿主細胞に適合する種から誘導された制御配列を含有するプラスミドベクターが、これらの細菌宿主と関連して用いられる。ベクターは、複製部位と形質転換細胞において表現型選択を提供できる特異的な遺伝子とを運ぶ。クローン化された免疫グロブリンcDNAにコードされたネズミ抗体およびキメラ抗体またはヒト化抗体、フラグメントおよび領域または抗体鎖の細菌における産生に関し、その発現プラスミドを評価するための多くのアプローチをとることができる(Glover, 1985; Ausubel, 1987, 1993; Sambrook, 1989; Colligan, 1992-1996を参照のこと)。

20

【0062】

宿主哺乳動物細胞は、試験管内もしくは生体内で生育しうる。哺乳動物細胞は、リーダーペプチドの除去、H鎖とL鎖の折りたたみおよびアセンブル、抗体分子の糖鎖付加および機能的な抗体タンパク質の分泌を含む、免疫グロブリンタンパク質分子に対する翻訳後修飾を提供する。

30

抗体タンパク質産生に関し、宿主として有用でありうる哺乳動物細胞は、上記のリンパ球起源の細胞に加えて、線維芽細胞起源の細胞、例えばベロ(Vero)細胞(ATCC CRL 81)またはCHO-K1細胞(ATCC CRL 61)を含む。

【0063】

多くのベクター系が、クローン化された抗CPAAペプチドH鎖およびL鎖の哺乳動物細胞における遺伝子発現に利用できる(Glover, 1985を参照)。別のアプローチでは、完全なH₂L₂抗体を得ることが後に行われうる。上記のように、H鎖とL鎖を同一の細胞内で共発現させ、H鎖とL鎖の細胞内会合および連結を行わせ、完全な4量体H₂L₂抗体および/または抗CPAAペプチドとさせることが可能である。共発現は、同一かもしくは別個のプラスミドを用いることにより同一宿主内で生じさせうる。H鎖とL鎖両方の遺伝子および/または抗CPAAペプチドの遺伝子を、同一のプラスミド中に配置することができる。次いで、それを細胞にトランスフェクトし、それによって両方の鎖を発現する細胞を直接選択することができる。あるいは、細胞は、1個の鎖、例えばL鎖をコードするプラスミドで最初にトランスフェクトされ、続いて、その結果得られた細胞系を第2の選択可能なマーカーを含むH鎖のプラスミドを用いてトランスフェクトされてよい。いずれかの経路を経由して抗CPAAペプチドおよび/またはH₂L₂分子を産生する細胞系は、増強された特徴、例えばアセンブルされたH₂L₂抗体分子のより高い産生量またはトランスフェクション細胞系の増強された安定性を示す細胞系を作製するために、さらな

40

50

る選択可能なマーカーと連結された付加的なコピーのペプチド、H鎖、L鎖、またはH鎖とL鎖をコードするプラスミドを用いてトランスフェクトされてよい。

【0064】

加えて、植物が、微生物または動物細胞の大量培養に基づく組み換え抗体産生についての主流であった発現システムの簡便で安全かつ経済的な代替手段として、最近現れてきた。抗体は、植物細胞培養または通常に生育された植物において発現されうる。植物における発現は、全体であっても、細胞内の色素体に限られていても、または種（胚乳）に限られていてもよい。例えば、米国特許出願公開番号第20030167531号；米国特許第6,080,560号および第6,512,162号；および国際公開番号WO0129242を参照のこと。いくつかの植物誘導型抗体は、臨床試験を含み、実用化に近い開発段階に達している（例えば、Biolex, Pittsboro, NCを参照のこと）。

10

【0065】

ハイブリドーマ技術

本発明は、CPAAに対する高い特異性と親和性を有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を提供する。本発明はまた、上記で詳細に特性評価されたハイブリドーマ細胞系のパリアントおよび変異体に関し、それらは、自然に生じたものであってもあるいは既知方法を用いて人工的に作製されたものであってもよいが、出発材料の特徴的な性質をいまだに有しているもの、すなわち、本発明に関する抗体またはその誘導体をいまだに産生でき、そしてそれらを周囲の培地中に分泌できるパリアントおよび変異体に関する。

20

【0066】

本発明はまた、該ハイブリドーマ細胞系の作製方法を含み、そして該モノクローナル抗体の産生方法も含む。ハイブリドーマ細胞系のクローンおよびサブクローンは、最初のクローンを繰り返しクローニングすることによって産出され、そして本発明に必須の最初のクローンの特徴をいまだに有するハイブリドーマであると、理解されるべきである。

より詳細には、本発明の核酸、タンパク質またはペプチド分子は、CPAAを結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を開発するのに利用できる。本発明のCPAAを結合する抗体の調製のために、培養中の連続継代性細胞系による抗体分子の産生を提供するいずれかの技術が、用いられてよい。例えば、KohlerおよびMilstein (256 Nature 495-497 (1975)) により最初に開発されたハイブリドーマ技術が用いられてもよい。また、米国特許第4,376,110号；Ausubelら、1988；CURR. PROT. IMMUNOL. (Colliganら、編、Greene Pub. Assoc. & Wiley Interscience NY, 1992-1996)を参照のこと。

30

【0067】

高親和性および/または高結合活性のヒト抗体を創出するための別の好都合な手段は、米国特許第6,537,809号に記載されるように、試験管内で天然ヒト脾細胞を抗原初回免疫し、その結果得られる試験管内で抗原初回免疫された脾細胞を免疫抑制状態のドナー、例えばSCIDマウスに移し、その免疫抑制状態のドナーに抗原を用いて追加免疫し、そのドナーからヒト抗体を分泌する(IgG分泌)B細胞を単離し、そしてその単離されたヒト抗体分泌細胞をEBVにより形質転換すること、を含む。

40

【0068】

キメラヒト化抗体および完全ヒト化抗体

本発明の抗体は、ヒト抗体由来の定常領域がマウス由来の軽鎖および重鎖の可変領域にクローン化された、ヒト抗体の一部とマウス抗体の一部を含むキメラ抗体を包含する。いくつかの例において、ヒト配列の70%が保たれている。ヒト化抗体は、ヒト抗体の枠組み構造の約90%が保たれており、マウスの相補決定領域とのみ組み合わせられた、キメラ抗体である。完全ヒト化抗体もまた、本発明において考慮される。

CPAAのアミノ酸残基中に含まれる16C3エピトープを結合する組み換えネズミ抗体またはキメラ・ネズミ・ヒト抗体もしくはヒト・ヒト抗体が、本明細書中で提供され、本明細書中で提供される教示に基づき既知の技術を用いて産生されうる。例えば、Ausubelら、1987、1992および1993；Sambrookら、を参照のこと。例えば、抗体は、EP023

50

9400に従い、所望のCDRをヒト枠組み構造と接ぎ合わせることによってヒト化されてもよい。

【0069】

本発明の抗CPAA抗体をコードするDNAは、重鎖定常領域(H_c)、重鎖可変領域(H_v)、軽鎖可変領域(L_v)および軽鎖定常領域(L_c)のうちの少なくとも1個をコードするゲノムDNAまたはcDNAであってよい。ネズミV領域の抗原結合セグメントをコードするDNAの供給源として染色体遺伝子フラグメントの使用に対する便利な代替手段には、キメラ免疫グロブリン遺伝子の構築のためのcDNAの使用がある。Liuら、84 P.N.A.S., USA 3439 (1987); 139 J. Immunol. 3521 (1987)を参照のこと。cDNAの使用は、その所望のタンパク質合成を達成するために、その遺伝子と宿主細胞に適した遺伝子発現エレメントが組み合わせられることを要する。このcDNA配列の使用は、cDNA配列が適当なRNAスプライシング系がない細菌または他の宿主においても発現されうる点で、ゲノム配列(イントロンを含む)よりも有利である。

10

【0070】

例えば、抗CPAA活性を有するネズミV領域およびC領域の抗原結合セグメントをコードするcDNAは、図2~図5で示されるDNAの使用に基づく既知の方法を用いて、提供されうる。図2または図3で示されるDNA配列の一部を結合するプローブは、本明細書中で示されるように、既知の方法により、本発明に関する抗CPAA抗体、フラグメントもしくは領域を発現するハイブリドーマからDNAを単離するために用いることができる。

20

図2および図3で示されるCPAA結合性抗体の軽鎖および重鎖を表すオリゴヌクレオチドは、相同遺伝子の存在に関するスクリーニングに、そして抗CPAA抗体の可変領域もしくは定常領域をコードする該遺伝子のクローニングに有用である。そのようなプローブは、CPAAのエピトープと結合する軽鎖もしくは重鎖のCDR領域についての図4および図5中で下線付きで示されたアミノ酸配列をコードするDNA配列(cDNA、ゲノムDNAまたは他のいずれかのDNA)と通常結合する。そのようなオリゴヌクレオチドを合成する技術は、周知である。例えば、Wuら、21 Prog. Nucl. Acids Res. Molec. Biol. 101 41 (1978); Ausubelら、1987, 1993を参照のこと。

【0071】

抗CPAA可変領域または定常領域をコードするポリヌクレオチドをクローニングする代替法においては、発現ベクターライブラリーは、(抗CPAA抗体または可変領域もしくは定常領域を発現しうる細胞からの)DNAまたはcDNAが、ある発現ベクター中にクローニングされることによって調製される。次いで、そのライブラリーは、抗CPAA抗体、例えばA2またはcA2の結合を競合的に阻害するタンパク質を発現しうるメンバーに関してスクリーニングされ、それらは、抗CPAA抗体またはそのフラグメントと同じアミノ酸配列を示すペプチドをコードしうるヌクレオチド配列を有する。この実施形態において、DNA、例えばcDNAは、抗CPAA抗体またはフラグメントを発現しうる細胞から抽出され、そして精製される。その精製されたcDNAは、DNAまたはcDNAフラグメントのプールを作製するために、フラグメント化(断裂、エンドヌクレアーゼ消化、その他の方法によって)される。次いで、このプールからのDNAまたはcDNAフラグメントを発現ベクター中にクローン化し、その各メンバーが特有のクローン化されたDNAまたはcDNAフラグメントを有するゲノムライブラリー(例えばラムダファージ・ライブラリーにおける)発現ベクターを、原核細胞(例えば細菌)または真核細胞(例えば哺乳動物、酵母、昆虫または真菌)における発現のために作製する。例えば、Ausubel, 1987, 1993; Harlow, 1988; Colligan, 1992-1996; Nyssonenら、11 Bio/Technology 591-95 (1993); Marksら、11 Bio/Technology 1145-49 (1993)を参照のこと。

30

40

【0072】

そのような抗CPAA可変領域または抗CPAA定常領域をコードする核酸がひとたび単離されると、その核酸は、CPAAと結合し阻害活性を示す組み換えモノクローナル抗体を提供するために、他の定常重鎖もしくは定常軽鎖または可変重鎖もしくは可変軽鎖を

50

コードする核酸と一緒に宿主細胞で適当に発現されうる。そのような抗体は、枠組み構造の残基を含み、抗原結合を担う相補性決定領域を有するネズミまたはヒト抗C P A A可変領域を含みうる。1つの実施形態において、上記の核酸によりコードされる抗C P A A可変軽鎖もしくは可変重鎖は、少なくとも5個のアミノ酸からなるエピトープに結合する。そのような抗C P A A可変軽鎖または可変重鎖のアミノ酸配列は、図4、図5および図12において下線付きで示される。

【0073】

本発明のネズミ抗体およびキメラ抗体、フラグメントおよび領域の定常(C)領域をコードするヒト遺伝子は、既知の方法によりヒト胎児肝臓ライブラリーから得ることができる。ヒトC領域の遺伝子は、ヒト免疫グロブリンを発現し産生する細胞を含む、いずれかのヒト細胞から得ることができる。ヒトC_H領域は、 μ 、 γ 、 α 、 δ 、 ϵ 、または ζ およびそのサブタイプ、例えばG1、G2、G3およびG4を含む、ヒトH鎖の既知のクラスまたはアイソタイプのいずれかに由来するものであってよい。H鎖のアイソタイプは、抗体のさまざまなエフェクター機能を担うため、C_H領域の選択は、所望のエフェクター機能、例えば補体結合または抗体依存性細胞障害(ADCC)の活性によって導かれる。例えば、C_H領域は、1(IgG1)、3(IgG3)、4(IgG4)または μ (IgM)に由来する。ヒトC_L領域は、ヒトL鎖アイソタイプ、カッパまたはラムダのいずれかに由来しうる。

【0074】

ヒト免疫グロブリンC領域をコードする遺伝子は、標準的なクローニング技術によりヒト細胞から得られる(Sambrookら、1989; Ausubelら、1987, 1993)。ヒトC領域の遺伝子は、2つのL鎖のクラス、5つのH鎖のクラスおよびそれらのサブクラスを示す遺伝子を含む既知のクローンから、容易に入手可能である。キメラ抗体フラグメント、例えばF(ab')₂ およびFabは、適切に切断されるキメラH鎖遺伝子を設計することによって調製できる。例えばF(ab')₂ フラグメントのH鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、H鎖のC_H1ドメインおよびヒンジ領域に続いて、切断型分子を産生するための翻訳終止コドンコードするDNA配列を含みうる。

【0075】

一般に、本発明のネズミ抗体、ヒト抗体またはネズミおよびキメラ抗体、フラグメントおよび領域は、C P A A特異抗体のH鎖およびL鎖の抗原結合領域をコードするDNA断片をクローニングし、それらのDNA断片を、ネズミ、ヒトもしくはキメラ免疫グロブリンのコード遺伝子を産出することによって作製するために、C_H領域およびC_L領域をそれぞれコードするDNA断片に連結することで作製される。

このように、1つの実施形態において、融合キメラ遺伝子は、少なくともヒト起源以外の抗原結合領域をコードする第1のDNA断片、例えばジョイニング(J)断片と機能的に再編成されたV領域を含み、少なくともヒトC領域の一部をコードする第2のDNA断片に連結されて、作り出される。

【0076】

従って、cDNAが抗体V領域およびC領域をコードし、本発明に関するキメラ抗体を産生する方法には、いくつかの工程があり、それを以下に概説する：

1. 抗C P A A抗体を産生する細胞系からの、そして重鎖定常領域および軽鎖定常領域を供給する任意の付加的な抗体からのメッセンジャーRNA(mRNA)の単離；クローニングおよびcDNA作製；

2. L鎖遺伝子およびH鎖遺伝子の適当なV領域および/またはC領域が、(i)適当なプローブを用いて特定され、(ii)配列決定され、そして(iii)他の抗体由来のC遺伝子断片またはV遺伝子断片を用いてキメラ抗体に適合される、精製されたmRNAからの全長cDNAライブラリーの調製；

3. 上記のように、クローン化された特定のV領域遺伝子断片をクローン化されたC領域遺伝子に連結することによる、完全なH鎖またはL鎖のコード配列の構築；

4. ネズミ-ネズミ抗体、ヒト-ネズミ抗体、ヒト-ヒト抗体またはヒト-ネズミ抗体

10

20

30

40

50

を提供するため、原核生物および真核生物細胞を含む選択された宿主における L 鎖および H 鎖の発現および産生。

【 0 0 7 7 】

すべての免疫グロブリン H 鎖および L 鎖の遺伝子ならびにそれらがコードされた mRNA に共通する 1 つの特徴は、J 領域である。H 鎖と L 鎖の J 領域は、異なる配列を有するが、高い相同性 (8 0 % を超える) が各グループに、特に C 領域付近に存在する。この相同性は、本方法で利用されるし、H 鎖と L 鎖の J 領域の共通配列は、後の V 領域断片とヒト C 領域断片との連結に有用な制限酵素部位を J 領域に導入するためのプライマーとして使用するオリゴヌクレオチドを設計するために、用いることができる。

【 0 0 7 8 】

ヒト細胞から調製される C 領域の cDNA ベクターは、ヒト配列中の類似部位に制限酵素部位を配置するために、部位特異的変異導入によりモディファイされてよい。例えば、完全なヒト・カッパ鎖 C (C_k) 領域および完全なヒト・ガンマ - 1 C 領域 ($C_{\gamma 1}$) をクローン化できる。この場合、C 領域ベクターの供給源としてゲノム C 領域クローンに基づく代替法では、これらの遺伝子は、介在配列を取り除くために必要とされる酵素が存在しない細菌系では発現できないであろう。クローン化された V 領域断片は、切り出されて、L 鎖または H 鎖の C 領域ベクターと連結される。あるいは、ヒト $C_{\gamma 1}$ 領域は、終止コドンを導入することによってモディファイされてよく、それによって Fab 分子の H 鎖部分をコードする遺伝子配列を作り出せることとなる。次いで、連結された V 領域および C 領域を有するコード配列は、適当な宿主、原核生物もしくは真核生物中での発現のために、適当な発現ビヒクルに移される。

【 0 0 7 9 】

2 つのコード DNA 配列は、連結の結果として 3 塩基の読み枠の改変または遮断を伴うことなく連続的な転写配列が生じる場合、「作動可能に連結されている」と称される。連結の結果として、その遺伝子発現エレメントの正確な機能がもたらされ、そのコード配列の発現がもたらされる場合、DNA コード配列は遺伝子発現エレメントと作動可能に連結されている。

発現ビヒクルは、プラスミドまたは他のベクターを含む。とりわけ、適当な付着末端を有するいずれかの V_H 鎖もしくは V_L 鎖配列が容易に挿入されるような適当な制限酵素部位を有する、機能的に完全なヒト C_H 鎖もしくは C_L 鎖配列を運ぶビヒクルがある。かくして、ヒト C_H 鎖もしくは C_L 鎖の配列を含むビヒクルは、いずれかの適当な宿主中で所望の完全な H 鎖または L 鎖のいずれかを発現する中間物質として提供される。

【 0 0 8 0 】

キメラ抗体、例えばマウス - ヒトまたはヒト - ヒトは、構築物に用いられるマウス H 鎖および L 鎖 V 領域の本来の染色体遺伝子プロモーターにより指令される遺伝子から典型的には合成され；スプライシングは、マウス J 領域にあるスプライス供与部位とヒト C 領域の前にあるスプライス受容部位との間で、またヒト C 領域内で生じるスプライス領域でも生じる；ポリアデニル化および転写終結は、ヒト・コード領域下流の天然の染色体部位で生じる。米国特許第 6, 835, 823 号を参照のこと。

【 0 0 8 1 】

C P A A に対する「完全ヒト化抗体」もまた、本発明において考慮される。完全ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリンの可変領域と定常領域の両方を含む分子である。完全ヒト化抗体は、治療上の使用として、自己免疫疾患のような慢性および再発性疾病に対する反復治療が要求される場合に、潜在的に使用されうる。完全ヒト化抗体の調製法の 1 つは、マウス体液性免疫系の「ヒト化」、すなわち、ヒト免疫グロブリン (I g) 遺伝子座を内因性 I g 遺伝子が不活性化されたマウスに導入することによる、ヒト I g (ゼノマウス (X e n o m i c e)) を産生できるマウス株の作製からなる。この I g 遺伝子座は、その物理的な構造ならびに最終的に広範囲の免疫応答を与えるために要求される遺伝子の再編成と発現プロセスの両方の点で、極めて複雑である。抗体の多様性は、I g 遺伝子座に存在する種々の V 遺伝子、D 遺伝子および J 遺伝子間の組み合わせによる再編成によって主と

10

20

30

40

50

してもたらされる。これらの遺伝子座はまた、散在された調節エレメントを含み、それは、抗体発現、対立遺伝子排除、クラススイッチおよび親和性の成熟を制御する。マウスへの再編成されていないヒトIgトランス遺伝子の導入は、マウスの組み換え機構がヒト遺伝子と互換性を有することを実際に示す。さらに、さまざまなアイソタイプの抗原特異的なh u - m A bを分泌するハイブリドーマは、抗原を用いたゼノマウス免疫によって得ることができる。完全ヒト化抗体およびその産生方法は、当分野で既知である。米国特許第7, 276, 239号および第6, 835, 823号を参照のこと。

【0082】

本発明の態様は、本発明に従い、ヒト化抗体の軽鎖をコードする第1の発現ベクターで、およびヒト化抗体の重鎖をコードする発現ベクターで形質転換された宿主を、それぞれの鎖が発現される条件下で維持し、そして発現された鎖のアセンブリにより形成されるヒト化抗体を単離することを含む工程により調製される、ヒト化抗体の産生を提供する。第1および第2の発現ベクターは、同一のベクターであってよい。本発明は、さらに、ヒト化抗体の軽鎖または重鎖をコードするDNA配列、該DNA配列を一部とする発現ベクターおよび該発現ベクターで形質転換された宿主を提供する。

【0083】

本明細書中で提供される配列からヒト化抗体を作り出すことは、当業者であれば過度の実験なしに実施することができる。1つのアプローチにおいて、モノクローナル抗体をヒト化するために用いられる4つの一般的な工程があり、例えば米国特許第5, 585, 089号；第6, 835, 823号；および第6, 824, 989号を参照のこと。これらには、(1)開始の抗体の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインのヌクレオチド配列および予測されるアミノ酸配列を決定すること；(2)ヒト化抗体を設計すること、すなわちヒト化過程で使用する抗体の枠組み構造領域を決定すること；(3)実際のヒト化方法論/技術；および(4)ヒト化抗体のトランスフェクションおよび発現、がある。

【0084】

ヌクレオチド配列および予測されるアミノ酸配列に関して、所定の抗体の重鎖および軽鎖可変ドメインcDNAをクローニングする2つの一般的な方法としては、(a)慣用のcDNAライブラリーを介するもの、または(b)ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)を介するものがある。これらの方法は両方とも広く知られており、例えば米国特許出願公開番号第20030166871号を参照のこと。cDNAのヌクレオチド配列が与えられた場合に、その情報を、抗体可変ドメインの予測されるアミノ酸配列に翻訳することは簡単な作業である。本発明の場合、16C3抗体の軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列は、図2および図3のそれぞれに示される。16C3抗体の軽鎖および重鎖の予測されるアミノ酸配列は、図4および図5にそれぞれ示される。

【0085】

ヒト化抗体の設計に関して、ヒト化の間に使用するためのヒト抗体配列をどれにするかを決定する際に考慮する要素がいくつかある。軽鎖および重鎖のヒト化は互いに独立していると認められるが、その論理は基本的には互いに類似する。この選択の過程は、以下の論理的解釈、すなわち、所定の抗体の抗原特異性および結合性は主として可変領域CDRのアミノ酸配列によって決定される、ということに基づく。可変ドメインの枠組み構造残基は、直接的な貢献はほとんどないか全くない。枠組み構造領域の主な機能は、抗原を認識するための適切な空間配置でCDRを保持することである。このように、ヒト可変ドメインの枠組み構造が、その起源であるネズミ可変ドメインと同一性が高い場合には、ネズミCDR、例えば図4または図5において下線が引かれたCDRをヒトの可変ドメインの枠組み構造に置換することが、最もその正確な空間配置を保存する結果となるであろう。したがって、ネズミ可変ドメイン(群)と同一性が高いヒト可変ドメインが、選ばれるであろう。

【0086】

適切なヒト抗体の可変ドメイン配列は、以下のように選択されうる。

1. コンピュータプログラムを用いて、すべての利用可能なプロテイン(およびDN

A) データベースを、ネズミ抗体の可変ドメインに対して最も相同性があるヒト抗体の可変ドメイン配列を探索する。適切なプログラムの出力は、ネズミ抗体に対して最も相同な配列の列記と、各配列に対する相同性パーセント、そして各配列のそのネズミ配列に対するアライメントである。これは、重鎖および軽鎖の可変ドメイン配列の両方に対して独立して行われる。ヒト免疫グロブリン配列が含まれていさえすれば、上記分析はさらに容易に達成される。

2. ヒト抗体の可変ドメイン配列を列記し、相同性を比較する。主として、この比較は、極めて可変的な重鎖のCDR3を除き、CDRの長さにおいて行われる。ヒト重鎖およびカッパ軽鎖そしてラムダ軽鎖は、サブグループ、すなわち重鎖の3つのサブグループ、カッパ鎖の4つのサブグループ、ラムダ鎖の6つのサブグループに分けられる。各サブグループ内のCDRの大きさは類似するが、サブグループ間では異なる。相同性の第一近似として、ネズミ抗体のCDRをヒト・サブグループのいずれかとマッチすることが通常行われる。次いで、類似の長さのCDRを有する抗体は、アミノ酸配列の相同性について、特にCDR内の相同性について比較されるが、周辺の枠組み構造領域についても比較される。最も相同性があるヒト可変ドメインが、ヒト化のための枠組み構造に選ばれる。

【0087】

実際のヒト化の方法論および技術はまた、当業者に把握できる範囲内にある。従って、所望の再構築された抗体(reshaped antibody)をコードするDNA配列は、そのCDRを再構築することが望まれるヒトDNAから出発して作製されうる。所望のCDRを含むネズミ可変ドメインのアミノ酸配列を、選択されたヒト抗体可変ドメインの配列と比較する。ヒト可変領域にネズミCDRを組み込むために、そのネズミの対応する残基に変更する必要があるヒト可変ドメインの残基をマークする。ヒト配列において置換すること、付加すること、または除去することが必要とされる残基もまた存在しうる。

ヒト可変部分ドメイン枠組み構造に所望の残基を含めるための突然変異を導入するために用いられうるオリゴヌクレオチドは、合成される。それらのオリゴヌクレオチドは、いずれかの好都合なサイズであってよい。それは、通常、利用することができる特定の合成装置の能力によってのみ長さが制限される。オリゴヌクレオチドに直接的に試験管内で変異導入する方法は、当分野で周知である。

【0088】

あるいは、ヒト化は、米国特許第5,858,725号の組み換えポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)の方法論を用いて達成されうる。この方法論を用いれば、CDRは、ヒト抗体の枠組み構造領域の間で接ぎ合わせることができる。一般に、米国特許第5,858,725号の技術は、2つのヒト枠組み構造領域であるABおよびCD、そしてそれらの間にドナーCDRにより置き換えられることとなるCDRを含むテンプレートを用いることにより、実施されうる。プライマーAおよびBを用いて、枠組み構造領域CDを増幅する。しかしながら、プライマーBおよびCの各々はまた、その5'端にドナーCDR配列の全部もしくは少なくとも一部に相当する付加的な配列も含む。プライマーBおよびCは、実施されるべきPCRを可能にする条件下で、互いにその5'端のアニールを可能とするのに十分な長さで重なり合う。このように、増幅される領域ABおよびCDは、単一の反応でオーバーラップ伸長により遺伝子の接ぎ合せを受け、ヒト化産物を産生することができる。

【0089】

あるいは、ヒト化は、ヒト化免疫グロブリンタンパク質またはそのフラグメントをコードするDNAの化学合成し、そして標準的な分子生物学的技術を用いて、その合成遺伝子を増幅し、適当な発現ベクター中にサブクローン化することによって達成できる。この場合、ヒト化抗体遺伝子の完全なコード領域を包含する、オーバーラップ配列を有する複数のセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが、化学的に合成され、精製される。次いで、そのオリゴヌクレオチドは、オーバーラップするセンス鎖オリゴヌクレオチドが、それらのアンチセンス鎖のパートナーとアニールし、完全な遺伝子がポリメラーゼ連鎖反応法を用いて十分な量にまで増幅されうるよう、混合される。次いで、その標的遺伝子は

、好都合に改変された制限酵素を用いて、発現プラスミド中にクローン化することができる。

【0090】

本明細書記載のさまざまな技術に従って設計されたヒト化16C3抗体の軽鎖および重鎖配列のいくつかは、図6、図7および図12に表される。より詳細には、ネズミ16C3抗体を治療上有用なヒト化抗体に変換するための5つの異なる設計が示される。この設計は、既知のネズミ抗体およびヒト抗体の配列に関する構造情報に基づく。例えば、図6および図7に関して、「ven16C3」は、ヒト枠組み構造配列とベニアされた(venered)ものであり、「cdr16C3」はヒトCDRアミノ酸を用いて再構築されたものであり、「abb16C3」は短縮型CDRのグラフィングを表し、「sdr16C3」は部位決定アミノ酸変化を表し、そして、「fral6C3」はヒト可変領域のさまざまな「ピース」の組み合わせを用いることにより可変領域を再構築する「フランケンシュタイン」アプローチを表す。ヒト生殖細胞系IgG配列が、枠組み構造配列に用いられた。

10

【0091】

加えて、下記の実施例に記載されるように、組み換えヒト化抗体は、ヒト治療のための機能的性を維持しつつ潜在的な免疫原性を低下させるために、さらに最適化されうる。この点に関しては、機能活性は、本発明の16C3抗体に関連した1つまたは複数の既知の機能活性を示しうるポリペプチドを意味する。そのような機能活性は、生物学的活性および16C3ポリペプチドに対するリガンドと結合する能力を含む。加えて、機能活性を有するポリペプチドは、用量依存性の有無にかかわらず、特定のアッセイ、例えば生物アッセイにおいて測定された場合に、成熟型を含む本発明の16C3ポリペプチドの活性と同一である必要はないが類似する活性を示すポリペプチドを意味する。用量依存性がある場合には、本発明の16C3ポリペプチドと比較して、所定の活性の用量依存と16C3ポリペプチドの用量依存とが同一である必要はなく、むしろ実質的に類似であればよい(すなわち、候補ポリペプチドは、本発明の16C3ポリペプチドと比べて、より大きな活性、あるいは最大で25倍まで、約10倍まで、もしくは3倍までの活性を示すであろう)。

20

最適化されたヒト化16C3抗体(H16C3-Abb*と称される)は、図12に示されるアミノ酸残基を含む。その抗体のCDR中のアミノ酸残基のいくつかは、元のネズミCDRに存在したものと変わっている点に注意されたい。異なるCDRは、機能的に同等であるため、本発明の範囲内では相互のバリエーションの例と考えられる。

30

【0092】

抗体を再構築するための変異導入反応に続いて、その変異導入されたDNAは、軽鎖または重鎖の定常領域をコードする適当なDNAと連結され、発現ベクターにクローン化され、そして宿主細胞、例えば哺乳動物細胞にトランスフェクションされうる。これらの工程は、通常の様式で実施することができる。従って、再構築された抗体は、以下の過程により、すなわち、

(a) 少なくともIgの重鎖または軽鎖の可変ドメインであって、ヒト抗体からの枠組み構造領域および本発明のヒト化抗体に必要なとされるCDRを含む可変ドメインをコードするDNA配列と作動可能に連結された適切なプロモーターを含む、第一の複製可能な発現ベクターを調製すること；

40

(b) 少なくとも相補的なIg軽鎖または重鎖それぞれの可変ドメインをコードするDNA配列と作動可能に連結された適切なプロモーターを含む、第二の複製可能な発現ベクターを調製すること；

(c) 第一のまたは両方の調製されたベクターを用いて細胞系を形質転換すること；および

(d) 該形質転換された細胞系を、該改変された抗体を産生させるために培養すること、

により調製されうる。

50

【0093】

工程(a)のDNA配列は、ヒト抗体鎖の可変ドメインおよび/または定常ドメインの両方をコードしてよい。ヒト化抗体は、いずれかの適切な組み換え発現系を用いて調製される。改変抗体を産生させるために形質転換される細胞系は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞系または不死化哺乳動物細胞系であってよく、それらはリンパ系起源のものが有利であり、例えば、骨髄腫、ハイブリドーマ、トリオーマ(trioma)またはクアドローマ(quadroma)細胞系がある。細胞系は、ウイルス、例えばエプスタインバー(Epstein-Barr)ウイルスによる形質転換により不死化された通常のリンパ系細胞、例えばB細胞を含みうる。例えば、不死化細胞系は、骨髄腫細胞系またはその派生物である。

10

【0094】

本発明に関する抗体の発現に用いられるCHO細胞は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(dhfr)欠乏性であり、それ故、生育はチミジンおよびヒポキサンチンに依存しうる。Urlaubら、77 P.N.A.S. U.S.A. 4216-20 (1980)を参照のこと。親dhfr CHO細胞系は、抗体とdhfr陽性表現型のCHO細胞トランスフェクタントの選択を可能にするdhfrとをコードするDNAを用いて、トランスフェクトされる。選択は、チミジンとヒポキサンチンを欠く培地でコロニーを培養することによって実施され、それらの欠如は、トランスフェクトされていない細胞が成育することを妨げるし、また形質転換された細胞が葉酸経路をリサルベージし、それにより選択系を回避することを妨げる。これらのトランスフェクタントは、形質転換される興味対象のDNAとdhfrをコードするDNAの同時の組み込みのために、通常、低レベルで興味対象DNAを発現する。抗体をコードするDNAの発現レベルは、メトトレキセート(MTX)を用いた増幅により増大させることができる。この薬剤は、dhfr酵素の直接的な阻害剤であり、この条件下で生存するのに十分なdhfr遺伝子のコピー数を増幅して耐性を示すコロニーの単離を可能にする。dhfrおよび抗体をコードするDNA配列は、元のトランスフェクタントにおいて密接に結び付いているため、通常、付随して増幅が起こり、したがって所望の抗体の増加された発現となる。

20

【0095】

CHOまたは骨髄腫細胞を用いる別の発現系には、例えば米国特許第5,122,464号に記載されるグルタミン合成酵素(GS)増幅系がある。この系は、酵素GSをコードするDNAおよび所望の抗体をコードするDNAを用いた細胞のトランスフェクションを含む。次いで、細胞は、グルタミンを含まない培地中で生育し、かくしてGSをコードするDNAが組み込まれたと推測されるものについて選択される。次いで、これらの選択されたクローンは、メチオニンスルホキシミン(Msx)を用いて酵素GSの阻害にかけられる。細胞は、生存するために、その抗体をコードするDNAの増幅を伴ってGSをコードするDNAを増幅するようになる。

30

【0096】

ヒト化抗体を産生するために用いられる細胞系は、哺乳動物細胞であってもよいが、他の適切な細胞系のいずれか、例えば細菌株または酵母株が代わりに用いられてもよい。例えば、生体内での翻訳後修飾が要求されない場合(例えば、糖鎖付加が要求されない場合)、大腸菌由来の細菌株が用いられうることが想定される。得られた抗体は、機能について確認される。機能が喪失している場合、工程(2)に戻って、抗体の枠組み構造を変更する必要がある。

40

【0097】

ひとたび発現されると、本発明の完全な抗体、その2量体、個々の軽鎖および重鎖、または免疫グロブリン型は、既知の技術、例えば免疫吸着または免疫親和性クロマトグラフィ、例えばHPLC(高性能液体クロマトグラフィ)などのクロマトグラフィ方法、硫酸沈殿、ゲル電気泳動またはこれらのいずれかの組み合わせによって回収され、そして精製されてよい。一般には、Scopes, Prot. Purif. (Springer-Verlag, NY, 1982)を参照のこと。少なくとも約90%~95%均質な実質的に純粋な免疫グロブリンは有利であり、

50

98%～99%もしくはさらに均質なものは、医薬での使用に特に有利である。所望する均質性にまでもしくは部分的にでも精製されると、次に、ヒト化抗体は、治療に、あるいはアッセイ手順、免疫蛍光染色、その他の手順を開発するために、および実施するために用いることができる。一般には、*Vol. I & II Immunol. Meth.* (LefkovitsおよびPernis編、Acad. Press, NY, 1979および1981)を参照のこと。

【0098】

ファージライブラリーおよび他の組み換え発現系

上記の生産技術に加えて、試験管内の系、例えば完全ヒト抗体および抗体ペプチドのファージディスプレイ法、診断法および治療法としてのヒト抗体の多くの利点が、現在認められている。

本発明の組み換え抗体およびその配列は、抗PCAA結合活性を有する無数の誘導体およびリガンド結合分子の構築を可能にする。例えば、そのCDRは、ヒト抗体ライブラリー、例えばn-CoDeRヒトscFvライブラリーと組み合わせ、高特異性および高機能性の抗体フラグメントを作り出すことができる。Moore, 426 Nature, 725-31 (2003)を参照のこと。

完全なヒト抗体またはその部分のライブラリーもまた、米国特許出願公開番号第20030232333に記載されるように、一本鎖DNAの部位特異的な切断に基づくクローニング法に従って作り出すことができる。

【0099】

本明細書に含まれるDNA配列情報および本明細書記載の発明により提供されるPCAAエピトープから得られる関係する知識から構築されうる別のリガンド結合分子は、化学的に敏感なもしくは不溶性の化合物の生理学的な輸送または貯蔵に通常関与する、広範囲に及ぶ集団の小さく頑強な(robust)タンパク質であるANTICALINS(登録商標)リポカリンの構築を含む。いくつかの天然リポカリンは、ヒト組織または体液に存在している。互いの配列相同性が低いにもかかわらず、リポカリンは、一端にあって、結合ポケットへの入り口を形成する4つのループを支える構造的に保存されたバレルを共有する。そのループは、個々のリポカリン間で大きく異なる立体配置を示し、様々な天然リガンド特異性を生じさせている。このタンパク質構造は、堅い枠組み構造の上部にある超可変領域ループを有する免疫グロブリンを思い起こさせる。抗体やいくつかの抗体フラグメントとは異なり、リポカリンは、160～180アミノ酸残基の一本鎖ポリペプチドからなり、単一の免疫グロブリンドメインよりもわずかに大きいだけである。結合ポケットを構成する一組の4つのループは、構造的な可塑性を示し、さまざまな側鎖を許容する。したがって、この結合部位は、高い親和性および特異性をもって所定の標的分子の個別の形を認識するために、再構築されうる。ハプテン様分子、ペプチドおよびタンパク質標的、例えば、細胞表面受容体の細胞外ドメインを認識する、ANTICALINS(登録商標)リポカリンが作り出された。酵素との融合タンパク質、また二重特異性結合タンパク質(別名、DUOCALINS(登録商標)二重特異性結合タンパク質、Pieris AG, Freising-Weihenstephan、ドイツ)の作製にも成功している。臨床前実験が行われた。例えば、Korndorferら、330 J. Mol. Biol. 385-96 (2003)を参照のこと。

【0100】

本明細書記載の本発明に応用可能な他の抗体型は、機能的な重鎖を有するが軽鎖を欠く、ラクダ科の免疫グロブリンを含む。これらの抗体は、専用のVおよびCガンマ遺伝子からアセンブルされる。それらは、クローン化され、そして本質的に高い安定性を示す抗原特異的な一本鎖ドメインの抗体フラグメントを産生するために、ファージディスプレイ技術を用いて応用されている。米国特許出願公開番号第20030088074号。

別の関連する誘導体は、抗原と抗体のエフェクター分子(Fc領域の分子)を架橋できる細菌で産生された抗体フラグメント(PEPBODIES(登録商標)抗体フラグメントと称される)を提供するため、新しい技術の利点を有する。米国特許出願公開番号第20040101905号を参照のこと。それゆえ、抗PCAA部位の抗原結合部位を含む結合分子は、概して、Fc領域と関連する1つまたは複数のエフェクター機能を示すペプ

10

20

30

40

50

チドと融合され、そして細胞受容体との相互作用および補体活性化などの機能を提供する。

【0101】

サメ由来の新しい抗原受容体 (I g N A R) 分子もまた、抗体分子の「誘導体」であると考えられうる。N A R は、2 個のタンパク質鎖がジスルフィド結合された 2 量体であり、それぞれが、1 個の可変ドメインと 5 個の定常ドメインを含み、そして抗体として機能する。Nuttallら、270 Eur. J. Biochem., 3543-54 (2003)。本発明の P C A A 結合抗体の配列は、N A R 可変領域中に構築され、合成的に C D R 領域を組み込んだ試験管内ライブラリーを作り出すことができる。結果として、一本鎖ドメインの結合試薬が得られることとなる。

10

【0102】

癌細胞生物学の最近の進歩の 1 つは、癌細胞マーカーを提示しうる前駆細胞系の発見を伴う。例えば、ヒト臍臓上皮前駆細胞が、同定され、培地中で生育された。次いで、これらの細胞は、とりわけ、モノクローナル抗体の開発に有用な抗原の創出に用いることができる。米国特許第 6, 436, 704 号。このように、P C A A 結合抗体は、前駆細胞を同定するために用いることができる。これらの前駆細胞は、マウスなどの異種の受容者に、さらなる系統の P C A A 結合抗体を誘導するために投与される免疫原として用いることができる。

結論として、本明細書中で提供されるヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、無数の生じうる分子が C P A A 結合活性を有することを可能にし、本発明の範囲はこれらの物質を得る方法により制限されない。

20

【0103】

抗体誘導体

抗体の「誘導体」は、付加的な化学部分を含むが、通常はタンパク質の一部は含まない。タンパク質の共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれる。そのような修飾 (モディフィケーション) は、標的とする抗体のアミノ酸残基を、選択された側鎖もしくは末端の残基と反応できる有機誘導体化剤と反応させることによって、その分子に導入することができる。例えば、当分野で周知の、二官能性物質による修飾は、抗体またはフラグメントを、水に不溶性のサポート・マトリックスにまたは他の高分子担体に架橋するのに有用である。

30

【0104】

誘導体はまた、例えば、放射性ヨウ素 (^{125}I 、 ^{131}I)、炭素 (^{14}C)、硫黄 (^{35}S)、インジウム (^{111}In)、トリチウム (^3H) またはその他のものを用いて標識化された放射活性物質で標識化されたモノクローナル抗体 ; ビオチンもしくはアビジン、酵素、例えば西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、カルボキシル酸アンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸脱水素酵素またはグルコース 6 リン酸脱水素酵素を用いたモノクローナル抗体コンジュゲート ; さらに、生物発光試薬 (例えばルシフェラーゼ)、化学発光試薬 (例えばアクリジンエステル) または蛍光物質 (例えばフィコピリンタンパク質) を用いたモノクローナル抗体コンジュゲートも含む。本発明の抗体の誘導体の例は、細胞毒性活性を示す、抗体 - 小分子薬物コンジュゲート、例えば、抗体 - マイトンシノイドコンジュゲートがある。米国特許出願公開番号第 20040039176 号を参照のこと。前臨床的評価は、このコンジュゲートが異種移植モデルにおいて強力な抗腫瘍活性を示す腫瘍活性型プロドラッグとして作用することを示した。さらに、細胞毒性抗体誘導体を後述する。

40

【0105】

本発明の他の誘導体の二重機能性抗体は、2 つの別の抗原群を認識する 2 つの別個の抗体部分を組み合わせることによって作り出される、二重特異性抗体である。これは、架橋または組み換え技術により達成することができる。加えて、部分は、(例えば、血流からのクリアランス時間を延ばすことによって) 生体内での半減期を増加させるために、抗体

50

またはその一部に加えられうる。そのような技術は、例えば、PEG部分を付加すること（別名、ペグ化）が挙げられ、当分野で周知である。例えば、米国特許出願公開番号第20030031671号を参照のこと。

【0106】

抗イディオタイプA b

モノクローナルもしくはキメラ抗CPAA抗体に加えて、本発明はまた、本発明の抗CPAA抗体に特異的な抗イディオタイプ（抗Id）抗体にも関する。抗Id抗体は、一般に、他の抗体の抗原結合領域に関連する固有の決定基を認識する抗体である。CPAAに特異的な抗体は、イディオタイプ抗体もしくはId抗体と称される。抗Idは、Id抗体の供給源と同じ種でかつ同じ抗原型の動物（例えばマウス株）を、Id抗体またはその抗原結合領域を用いて免疫することによって調製されうる。免疫された動物は、免疫した抗体のイディオタイプ決定基を認識して応答し、抗Id抗体を産生することとなる。この抗Id抗体はまた、さらに別の動物において免疫応答を引き起こす「免疫原」として用いられ、いわゆる抗-抗Id抗体を産生することもできる。この抗-抗Id抗体は、抗Idを誘導した元の抗体と、エピトープの点で同一でありうる。したがって、あるmAbのイディオタイプ決定基に対する抗体を用いることによって、同一の特異性を有する抗体を発現する別のクローンを特定することが可能である。

10

【0107】

したがって、本発明に従い、CPAAに対して創出されたモノクローナル抗体は、適切な動物、例えばBALB/cマウスにおいて抗Id抗体を誘導するために用いることができる。このように免疫されたマウスからの脾臓細胞は、抗Id抗体を分泌する抗Idハイブリドーマを作製するために用いることができる。さらに、抗IdmAbは、担体、例えばキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）にカップリングされ、さらなるBALB/cマウスを免疫するために用いることができる。これらのマウスからの血清は、CPAAエピトープに特異的な元のmAbの結合特性を有する抗-抗Id抗体を含むであろう。

20

【0108】

イディオタイプ、抗イディオタイプ

加えて、CPAAに対する抗体、その類似体、それらの部分、フラグメント、ペプチドまたは誘導体は、適切な動物、例えば、BALB/cマウスにおいて抗Id抗体を誘導するために用いることができる。そのように免疫されたマウスからの脾臓細胞は、抗Idモノクローナル抗体を分泌する抗Idハイブリドーマを作製するために用いられる。さらに、抗Id抗体は、担体、例えばキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）にカップリングされ、さらなるBALB/cマウスを免疫するために用いることができる。これらのマウスからの血清は、CPAAのエピトープに特異的な元のモノクローナル抗体の結合特性を有する抗-抗Id抗体、またはその類似体、フラグメントおよび誘導体を含むであろう。かくして、抗Id抗体は、それ自身がイディオタイプエピトープを有しており、また、評価されるべきエピトープと構造的に類似する「イディオタイプ」を有する。

30

【0109】

抗イディオタイプ（抗Id）抗体は、一般に、ある抗体の抗原結合領域に関連する固有の決定基を認識する抗体である。Id抗体は、mAbの供給源と同じ種でかつ同じ抗原型の動物（例えばマウス株）を、抗Idが調製されることとなるmAbを用いて免疫することによって調製できる。その免疫された動物は、免疫した抗体のイディオタイプ決定基に対する抗体（抗イディオタイプ抗体）を産生することによって、これらのイディオタイプ決定基を認識し、そして応答することとなるであろう。例えば、米国特許第4,699,880号および第6,835,823号を参照のこと。この抗Id抗体はまた、さらに別の動物において免疫応答を引き起こす「免疫原」として用いられ、いわゆる抗-抗Id抗体を産生することもできる。この抗-抗Id抗体は、抗Idを誘導した元のmAbと、エピトープの点で同一でありうる。したがって、あるmAbのイディオタイプ決定基に対する抗体を用いることによって、同一の特異性を有する抗体を発現する別のクローンを特定することが可能である。

40

50

【0110】

抗CPAA抗体および抗CPAAペプチドの構造類似体

本発明の抗CPAA抗体およびペプチドの構造類似体は、本明細書で示される教示およびガイダンスに基づいて既知の方法工程により提供される。

タンパク質の三次元構造に関する知識は、それらが機能する様式を理解する際に決定的に重要である。タンパク質構造データベースにおいて（配列データベースの既知のタンパク質配列の数千と対照的に）、何百ものタンパク質の三次元構造が現在利用可能である。これらの構造の解析は、それらが、認識できる種類のモチーフに折り畳まれることを示す。このように、タンパク質の相同性に基づき関連するタンパク質の既知構造に対し、あるタンパク質の三次元構造のモデルを作ることが可能である。比較的低い配列相同性を有する2つのタンパク質が、類似性の高い三次元構造またはモチーフを有しうる例も多く知られている。

10

【0111】

近年、核磁気共鳴（NMR）におり最高で約15kDaのタンパク質の三次元構造を決定することが可能となってきた。この技術では、純粋なタンパク質の濃縮溶液を必要とし、結晶または同形の誘導体は必要ではない。多くのタンパク質の構造が、この方法により決定された。NMR構造決定の詳細は、当該分野で周知である。例えば、Wuthrich, NMR OF PROTEINS & NUCLEIC ACIDS (Wiley, N.Y., 1986); Wuthrich, 243 Science 45-50 (1989); Cloreら、24 Critical Rev. Biochem. Molec. Biol. 479 564 (1989); Cookeら、8 Bioassays 52 56 (1988)を参照のこと。

20

【0112】

このアプローチを適用する際に、さまざまな¹H-NMR 2Dデータセットが、本発明の抗CPAA抗体および/または抗CPAAペプチドに対して集められる。これには、2つの主要な形式がある。1つの形式であるCOSY（相関分光分析）は、化学結合によって連結された陽子共鳴を特定する。これらのスペクトルは、3つもしくはそれ未満の共有結合によって連結されたプロトンの情報を与える。NOESY（核オーバーハウザー・エンハンスメント分光法）は、空間的に近接する（0.5nm未満）陽子を特定する。完全なスピン系の帰属（アサイメント）後に、二次構造がNOESYにより特定される。交差ピーク（核オーバーハウザー効果またはNOE's）が、ペプチドの一次配列の隣接する残基間に見られ、0.5nm未満離れたプロトンに見られうる。アミドプロトン結合定数および二次構造で隣接する非隣接アミノ酸からのNOE'sと組み合わせたシーケンシャルNOE'sから集められたデータは、ペプチドの二次構造を特徴づけるために用いられる。二次構造予測とは別に、NOE'sは、一次アミノ酸配列と二次構造の両方の空間的な距離を示す。全てのデータを「ベスト・フィット」外挿法により考慮した後に、三次構造予測が決定される。

30

【0113】

アミノ酸の種類は、距離情報（through-bond connectivity）を用いて最初に特定される。次に、特定のアミノ酸が、既知のアミノ酸配列と一緒に隣接する残基との空間的な距離情報を用いて割り当てられる。NOEは空間的に近接する陽子のペアを特定し、結合定数は二面角における情報を与え、低交換性（slowly exchanging）アミドプロトンは水素結合の場所に関する情報を与える。これらの拘束（restraint）は、距離幾何学タイプの計算を用いて構造をコンピューターにより計算した後に、拘束された分子の動力学を用いた改善をコンピューターにより計算するために、用いられる。これらのコンピュータプログラムの出力は、実験データ（すなわち、ペアワイズ<0.5nmの距離拘束のセット）に適合する構造ファミリーである。その構造がデータにより規定されればされるほど、その構造ファミリーはよりよく重畳される（すなわち、構造の分解能がますますよくなる）。NMRを用いてよりよく規定された構造における、バックボーン（すなわち、アミド、Cおよびカルボニル原子）と分子の中心に埋もれている状態のアミノ酸の側鎖の多くの位置が、結晶学により得られる構造と同じくらい明確に特定されうる。しかしながら、表面に曝されたアミノ酸残基の側鎖は、ほとんどの場合明確ではない。このことは、これら

40

50

表面の残基はより可動的であり、決まった位置にないであろうという事実を、おそらく反映する（結晶構造においては、これは散漫的な電子密度（diffuse electron density）として観察されうる）。

【0114】

かくして、本発明に基づいた、NMR分光データの使用は、トポグラフィーの構造理解に基づく少なくとも抗CPAA抗体およびペプチドの一部分の構造類似体を出すために、コンピューターモデリングと組み合わせられる。当業者であれば、この情報を用いることで、抗CPAA抗体またはペプチドの構造類似体を得る方法、例えば、CPAA結合親和性または結合活性が分子に期待される治療上もしくは診断上の使用に対する要求、例えばCPAA結合のより高い特異性の達成に一致するモジュレートされたペプチドの産生を可能にする、理論的なアミノ酸置換を知ることができるであろう。

10

【0115】

あるいは、抗CPAA治療および診断に適切な構造上の特徴または化学的特徴を有する化合物は、選択的CPAA親和性を有する構造類似体を提供する。マクロモデル（Macromodel）（登録商標）（Schrodinger, LLC, NY）、インサイト（Insight）（登録商標）I Iおよびディスカバー（Discover）（登録商標）（Accelrys Software Inc., Burlington, MA）を用いた、CPAA結合性の化合物、例えばCPAA受容体、抗CPAA抗体または他のCPAA結合分子の分子モデリング研究は、本発明に関する抗CPAA抗体および/またはペプチドの空間的要求および幾何学的配置を提供する。このように、本発明のそのような構造類似体は、選択的な定性的かつ定量的な試験管内、その場および/または生体内における抗CPAA活性を提供する。

20

【0116】

診断応用

本発明はまた、膵臓癌または結腸癌であることが分かっている患者もしくは罹患していることが疑われる患者においてCPAAを検出するための診断方法での使用のための、上記の抗CPAA抗体およびペプチドを提供する。本発明の他の態様において、本抗体は、形態学的に正常な細胞において分子マーカーを検出することができ、無症状の個体の早期発見スクリーニングを提供する。

本発明の抗CPAA抗体および/またはペプチドは、試料中のCPAAまたは抗CPAA抗体を検出するもしくは定量する免疫アッセイに有用である。CPAAの免疫アッセイは、典型的には、臨床試料または生物試料を、選択的にCPAAと結合できる本発明の検出可能に標識化された高親和性（もしくは高い結合活性）の抗CPAA抗体またはポリペプチドの存在下でインキュベートすること、および試料中で結合される標識化されたペプチドまたは抗体を検出すること、を含む。さまざまな臨床アッセイ手順が当分野で周知である。例えば、IMMUNOASSAYS FOR THE 80'S (Vollerら、編、Univ. Park, 1981)を参照のこと。そのような試料は、生検、血液、血清および糞試料、または、浣腸、結腸内視術もしくは経口緩下剤の液剤後の結腸直腸トラック（colorectal track）から回収される液体を含み、後述するELISA分析を受ける。

30

【0117】

かくして、抗CPAA抗体またはポリペプチドは、細胞、細胞粒子または可溶性タンパク質を固定することができるニトロセルロースまたは他の固体サポートに固定されてもよい。次いで、そのサポートは、適切な緩衝液を用いて洗浄された後、検出可能に標識化されたCPAA特異ペプチドまたは抗体により処理されてよい。次いで、その固相サポートは、結合していないペプチドまたは抗体を取り除くために、緩衝液で二度目の洗浄がなされてもよい。次に、固体サポート上に結合された標識の量を、既知の方法工程により検出することができる。

40

【0118】

「固相サポート」または「担体」は、ペプチド、抗原または抗体を結合できるいずれかのサポートを意味する。周知のサポートまたは担体は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリビニリデンフルオライド（PVDF）、デキストラン、ナイ

50

ロン、アミラーゼ、天然のセルロースおよび加工セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよびマグネタイトを含む。担体の性質は、ある程度可溶性であるか、本発明の目的に関して不溶性のいずれかであってよい。サポート物質は、カップルされる分子がC P A Aまたは抗C P A A抗体に結合できる限り、事実上可能ないずれの形状を有していてもよい。このように、サポートの形状は、ビーズのように球形であってもよいし、あるいは試験管の内部表面もしくは棒の外部表面のように円筒形であってもよい。あるいは、その表面は、シート、培養皿、試験紙などのように平面であってよい。例えば、サポートは、ポリスチレンビーズを含みうる。当業者であれば、抗体、ペプチドまたは抗原を結合するための多くの他の適切な担体を知っているであろうし、また通常の実験により同様のものを確認することができる。

10

【0119】

周知の方法工程は、所定のロットの抗C P A Aペプチドおよび/または抗体の結合活性を決定することができる。当業者であれば、通常の実験により、有効で最適なアッセイ条件を決定することができる。

C P A A特異ペプチドおよび/または抗体の検出可能な標識化は、酵素免疫定量法(E I A)または酵素免疫吸着測定法(E L I S A)での使用のための酵素と連結することによって達成することができる。その連結された酵素は、曝された基質と反応し、例えば分光光度法、蛍光分光法により、または可視化手段によって検出できる化学部分を生成する。本発明のC P A A - 特異抗体を検出可能に標識化するために用いられうる酵素は、限定するものではないが、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌のヌクレアーゼ、デルタ - 5 - ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、アルファ - グリセロリン酸脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ - ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース - 6 - リン酸脱水素酵素、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼを含む。

20

【0120】

C P A A特異抗体を放射標することによる放射免疫測定法(R I A)の使用を通じて、C P A Aを検出することが可能である。Workら、LAB. TECHNIQUES & BIOCHEM. IN MOLEC. BIO. (No. Holland Pub. Co., NY, 1978)を参照のこと。放射性同位体は、ガンマ計数器またはシンチレーション計数器の使用のような手段により、またはオートラジオグラフィにより検出できる。本発明の目的に特に有用な同位体は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C および ^{125}I を含む。

30

C P A A特異抗体を、蛍光化合物を用いて標識することも可能である。蛍光標識された抗体は、適切な波長の光に曝された場合、次いで、その存在は蛍光によって検出できる。なかでも最も一般的に用いられる蛍光標識化合物は、フルオレセイン・イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、O - フタルアルデヒドおよびフルオレサミンである。

【0121】

C P A A特異抗体はまた、蛍光発光金属、例えば ^{125}Eu または他の一連のランタノイドを用いて検出可能に標識化することができる。これらの金属は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(D T P A)またはエチレンジアミン四酢酸(E D T A)のような金属キレート基を用いて、C P A A特異抗体に結合させることができる。

40

C P A A特異抗体はまた、化学発光化合物とカップリングすることにより検出可能に標識化できる。次いで、化学発光で標識化された抗体の存在は、化学反応の間に生じる発光の存在を検出することにより決定される。有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマティック・アクリジニウムエステル(theromatic acridinium ester)、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。

【0122】

同様に、生物発光化合物が、本発明のC P A A特異抗体、部分、フラグメント、ポリペプチドまたは誘導体を標識化するために用いられてもよい。生物発光は、触媒タンパク質

50

が化学発光反応の効率を上昇させる生物系に見られるある種の化学発光である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって決定される。標識化の目的に重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

C P A A 特異抗体、部分、フラグメント、ポリペプチドまたは誘導体の検出は、例えば検出可能な標識が放射性ガンマ放射体の場合にはシンチレーション計数器により、例えば標識が蛍光物質の場合には蛍光光度計により、達成することができる。酵素標識の場合には、検出は、その酵素に対する基質を用いる比色法により達成することができる。検出はまた、同様にして調製された標準に対して、基質の酵素反応の程度を視覚的に比較することにより、達成することができる。

【 0 1 2 3 】

本発明の目的に関して、上記のアッセイにより検出される C P A A は、生物試料中に存在していてもよい。C P A A を含むいずれの試料も用いることができる。例えば、試料は、体液、例えば血液、血清、リンパ、尿、糞、炎症性滲出液、脳脊髄液、羊水、組織抽出液または組織ホモジネート、その他の類似物である。しかしながら、本発明は、これらの試料のみを用いるアッセイに限定されず、当業者は本明細書に照らして、他の試料の使用を可能にする適切な条件を決定することが可能であろう。

【 0 1 2 4 】

インシトゥー検出は、患者から組織標本を取り出し、そして本発明の標識化抗体と該標本との組み合わせを提供することにより達成できる。抗体（またはその部分）は、生物試料に対して標識化抗体（または部分）を適用することによって、または覆うことによって提供することができる。そのような手順の使用を通じて、C P A A の存在だけでなく試験した組織における C P A A の分布もまた決定できる。当業者であれば、本発明を用いることで、多種多様な組織学的方法のいずれか（例えば、染色手順）がこのようなインシトゥー検出を行うためにモディファイされうることは、容易に認められよう。

本発明の抗体、フラグメントまたは誘導体は、「トゥー・サイト (two-site)」または「サンドイッチ」アッセイとしても知られている、免疫測定法での利用のために用いることができる。典型的な免疫測定法においては、ある量の未標識の抗体（または抗体のフラグメント）が試験される液体中で不溶性の固体サポートに結合され、ある量の検出可能に標識化された可溶性抗体が加えられ、固相の抗体、抗原そして標識化抗体の間で形成される三者複合体を検出および/または定量化が可能となる。

【 0 1 2 5 】

典型的な免疫測定法は、固相に結合された抗体が、試験される試料と最初に接触し、固相抗体 - C P A A の 2 者複合体の形成によりその試料中から C P A A を抽出する、「フォワード」アッセイを含む。適切なインキュベーション時間後に、その固相を、未反応の C P A A がたとえ存在してもそれを含む液体試料の残留物を取り除くために洗浄し、次いで、既知量の標識化抗体（「レポーター分子」として機能する）を含む溶液と接触させる。その標識化抗体が未標識の抗体を介して固体サポートに結合された C P A A と複合体形成することを可能にする第 2 のインキュベーション時間の後、その固相を第 2 の洗浄を行い、未反応の標識化抗体を取り除く。この種のフォワード・サンドイッチアッセイは、C P A A が存在するかどうかを決定できる単純な「ある/なし」のアッセイであってもよいし、あるいは、標識化抗体の測定値と既知量の C P A A を含む標準試料で得られた測定値とを比較することによって定量化することもできる。そのような「トゥー・サイト」または「サンドイッチ」アッセイは、Wide、RADIOIMMUNE ASSAY METHODS, 199-206 (Kirkham 編、Livingstone, Edinburgh, 1970) に記載されている。

【 0 1 2 6 】

C P A A を用いる有用でありうる別の種類の「サンドイッチ」アッセイは、「同時 (simultaneous)」アッセイおよび「リバーズ」アッセイとも称される。同時アッセイは、固相に結合された抗体と標識化抗体の両方を試験される試料に同時に加える、一回のインキュベーション工程を含む。そのインキュベーションが完了した後に、その固相を、液体試料の残留物および複合体形成していない標識化抗体を取り除くために洗浄する。次いで、

10

20

30

40

50

固相に捕捉された標識化抗体の存在は、一般的な「フォワード」サンドイッチアッセイにおいてなされるように決定される。

「リバース」アッセイにおいては、液体試料に標識化抗体溶液を最初に添加し、続いて適切なインキュベーション時間後に、固体サポートに結合した未標識の抗体を添加する、段階的な添加が用いられる。第2のインキュベーション後に、固相は、試験される試料中のおよび未反応の標識化抗体溶液中の残留物をそこから取り除くために、通常の様式で洗浄される。次いで、固体サポートと会合した標識化抗体の決定は、「同時」アッセイおよび「フォワード」アッセイのように決定される。1つの実施形態において、別々のエピトープに特異的な本発明の抗体の組み合わせは、センシティブ・スリー・サイト免疫放射定量測定法 (sensitive three-site immunoradiometric assay) を実施するために用いることができる。

10

【0127】

加えて、例示的な抗体は、T細胞タイピングのために、特定のCPAA保有細胞またはフラグメントを単離するために、ワクチン調製のために、またはその他類似の目的のために、利用することができる。抗体は、試料中のCPAAを定量的にもしくは定性的に検出するために、あるいはCPAAを発現する細胞の存在を検出するために、用いられてよい。これらは、蛍光標識された抗体（下記を参照のこと）を、蛍光顕微鏡、フローサイトメトリーまたは蛍光分析検出と組み合わせて用いる、免疫蛍光技術により達成することができる。診断の目的について、抗体は、標識されていても、標識されていなくてもよい。未標識の抗体は、ヒト免疫グロブリンの定常領域に特異的な抗体などの、ヒト化抗体と反応する他の標識化抗体（第2の抗体）と組み合わせて用いられてよい。あるいは、抗体は、直接標識されていてもよい。放射性核種、フルオロ、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、リガンド（特にハプテン）などの、多種多様な標識を用いることができる。多くの種類の免疫測定法、例えば、上述のものが利用可能であり、当業者には周知である。

20

【0128】

本発明に有用な抗体は、免疫蛍光顕微鏡または免疫電子顕微鏡の場合のように、本発明のCPAAのインシトゥー検出に関して、組織学的に用いることができる。インシトゥー検出は、患者から組織標本を取り出し、そして本発明の標識化抗体を該標本に提供することにより達成することができる。抗体（またはフラグメント）は、生物試料に対して標識化抗体（またはフラグメント）を適用することによって、または覆うことによって提供することができる。そのような手順の使用を通じて、CPAAの存在だけでなく試験される組織におけるその分布もまた決定できる。当業者であれば、本発明を用いることで、多種多様な組織学的方法のいずれか（例えば、染色手順）がこのようなインシトゥー検出を行うためにモディファイされてよいことは、容易に認められよう。

30

重要なことに、本発明の抗体は、ある種の大腸癌および膵臓癌の侵襲性を診断するのに有効でありうる。より詳細には、本発明の抗体は、非常に急速に進行する悪性の癌と対照的に、幾年もかけて成長する緩徐型の癌 (slow cancer) の患者に存在するCPAAを特定しうる。このように、本発明の抗体は、重要な免疫組織学的ツールを提供しうる。

【0129】

本発明の抗体は、翻訳後修飾を含む遺伝子発現プロファイルを測定することに特に好ましく、ペプチドホルモンおよび炭水化物などの小分子を検出することにも有用な、抗体アレイに用いることができる。いくつかのアプローチが、最近、抗体アレイの安定性および効果を決定するために用いられている。いくつかの例において、ファージディスプレイされた抗体が、アレイを調製する際に用いられ、検出および解析は、SELDI（表面増強レーザー脱離イオン化法）により、またはフィルターに基づく酵素免疫吸着測定法 (filter-based enzyme-linked immunosorbent assay) (ELISA) によるハイスループット形式にて行われる。検出系の別の例としては、蛍光タグおよびナノ電極 (nanoelectrodes)、ならびにより小さいアレイについては表面プラズモン共鳴およびMALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型）質量分析を含む。プロテオーム解析はまた、結合された抗原のアレイを最初に生成し、続いて抗体による捕捉、そして親和

40

50

性リガンド、例えば検出プローブに結合されたプロテインLまたはプロテインAを用いた検出により実施されうる。

【0130】

第3のアプローチは、抗体遺伝子を含む細菌をフィルターに高密度でグリディング (gridding) し、続いてELISAなどの検出プローブを付着された親和性リガンドまたは抗原を含む別のフィルターと相互作用することを含む。この方法は、液体操作の必要がないし、そして何万もの抗体の複数抗原に対する平行したスクリーニングが、別々に発現されるタンパク質を最終的に特定するために実施されうる。最後の方法は、コンビナトリアルケミストリーを用いて、チップ上で直接抗体を合成する可能性を包含する。しかしながら、あらかじめ合成されたポリペプチド結合ブロックを用いて抗体の枠組み構造を創出し、続いて個々のアミノ酸を加えない限り、現在の技術では、最小の120アミノ酸からなる抗原結合抗体ドメインでさえ合成するのに幾分か無理がある。

10

【0131】

抗CPAA活性を決定するためのスクリーニング方法はまた、本発明において提供される。詳細には、実施例6においてさらに記述されるように、本発明の抗体は、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性を伴う。CPAA保有細胞の死を試験管内、その場合もしくは生体内で引き起こす、抗体、そのフラグメントまたは部分、ペプチド、ペプチド模倣化合物または有機模倣化合物からなる群より選択されうる抗CPAA化合物が、本発明に包含される。抗CPAA化合物のADCC活性を決定するために用いられうるスクリーニング方法は、試験管内アッセイまたは生体内アッセイを含みうる。そのような試験管内アッセイは、単離されたもしくは組み換え型のチンパンジーCPAAまたはヒトCPAAなどのCPAAとの接触による細胞死の低下を決定する (ここで、CPAA中和化合物が同時に存在することで、細胞死の程度または速度は低下する)、CPAA細胞毒性アッセイ、例えば、放射免疫測定法を含みうる。

20

【0132】

診断キット

キットもまた、被検抗体を細胞活性に対する保護もしくは検出に、または選択された抗原の存在に関して使用するために供給されてよい。かくして、本発明の抗体は、通常、単独あるいは所望の細胞型に対して特異的なさらなる抗体と組み合わせられ、容器中で凍結乾燥形式にて提供されうる。抗体は、ラベルもしくは毒素とコンジュゲートされていてもコンジュゲートされていなくてもよく、それらは、緩衝液、例えばトリス溶液、リン酸溶液、炭酸溶液、その類似の溶液、安定剤、殺生物剤、不活性なタンパク質、例えば血清アルブミンまたはその類似物を含むキットに、含まれる。該して、これらの物質は、活性な抗体量に基づいて5%wt未満存在してよく、通常、抗体濃度に対して全量の少なくとも約0.001%wtで存在してよい。しばしば、活性成分を希釈するために、不活性な増量剤または賦形剤を含んでいることが望ましく、賦形剤は全組成物の約1%~99%wtまで存在してもよい。第1の抗体に結合できる第2の抗体がアッセイにおいて用いられる場合、それは、通常、別のバイアル中に入っているであろう。第2の抗体は、典型的にはラベルとコンジュゲートされており、そして上記の抗体製剤と類似する様式で製剤化される。キットは、一般に一組の使用説明書もまた含みうる。

30

40

【0133】

医薬応用

本発明の抗CPAA抗体またはペプチドは、例えば癌腫および関連する状態の処置に用いられうる。より詳細には、本発明は、医薬的に許容される担体もしくは希釈剤および活性成分として本発明に関する抗体もしくはペプチドを含む、医薬組成物を提供する。免疫毒素の送達成分は、本発明に関するヒト化抗体である。完全免疫グロブリンまたはそれらの結合フラグメント、例えばFabもまた想定される。典型的には、免疫毒素における抗体は、ヒトIgA、IgMまたはIgGアイソタイプのものであってよいが、望ましい場合には別の哺乳動物の定常領域が用いられてもよい。この成分はまた、本発明に関する免疫毒素を含んでいてよい。本発明のヒト化抗体、免疫毒素および医薬成分は、非経口投与

50

、例えば皮下、筋肉内もしくは静脈内投与に有用である。

本発明の抗C P A A抗体および/またはペプチドは、個別の治療剤として、または別の治療物質との組み合わせのいずれかにおいて、投与されてよい。それらは、単独で投与されてもよいが、一般的には、選ばれた投与経路および標準的な業務に基づいて選択された医薬担体と一緒に投与される。

【0134】

非経口投与に関し、抗C P A A抗体またはペプチドは、医薬的に許容される非経口ビヒクルとともに液剤、懸濁剤、エマルジョンまたは凍結乾燥粉剤として製剤化されてよい。例えば、ビヒクルは、許容される担体、例えば水性の担体中に溶解された抗体溶液もしくはそのカクテルであってよく、そのようなビヒクルは、水、食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液または5%ヒト血清アルブミンおよび0.4%食塩水、0.3%グリシンおよび他の類似物である。リポソームおよび非水性ビヒクル、例えば固定油もまた用いることができる。これらの溶液は、滅菌状態であり、一般に微粒子物質を含まない。これらの組成物は、慣用の周知の滅菌技術により滅菌されうる。組成物は、生理的な条件に近づく必要性に応じて医薬的に許容される補助物質、例えばpH調整物質および緩衝剤、毒性調整物質(toxicity adjustment agent)およびその類似物、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含んでいてよい。これらの製剤中の抗体濃度は、例えば重量あたり約0.5%未満、通常、約1%もしくは少なくとも約1%から、15%もしくは20%程度でさまざまに変化してよく、それは選択された特定の投与様式に従い、主として液量、粘性などに基づいて選択されるであろう。ビヒクルまたは凍結乾燥粉剤は、等張性(例えば、塩化ナトリウム、マンニトール)および化学的な安定性(例えば、緩衝剤および保存剤)を維持する添加剤を含んでいてよい。製剤は、通常用いられる技術により滅菌される。

10

20

【0135】

かくして、筋肉内注射の典型的な医薬組成物は、1mlの滅菌緩衝用水および50mgの抗体を含んで作製されうる。静脈注射のための典型的な組成物は、250mlの滅菌リンガー溶液および150mgの抗体を含んで作製されうる。非経口投与可能な組成物を調製する実際の方法は、知られているし、または当業者には明らかであろうし、そして、例えばREMINGTON'S PHARMA. SCI. (第15版、Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980)に詳細に記載されている。

30

本発明の抗体は、貯蔵のために凍結乾燥されてよく、使用前に適切な担体中で再構成されてよい。この技術は、通常免疫グロブリンに対して有効であることが示されている。いずれかの適切な凍結乾燥技術および再構成技術が、行われうる。当業者であれば、凍結乾燥および再構成が、異なる程度の抗体活性の喪失を導きうること(例えば、一般的な免疫グロブリン、IgM抗体は、IgG抗体よりも大きく活性を損なう傾向にある)、ならびに埋め合わせのために使用レベルが調整されなければならないであろうことは、認められよう。

【0136】

本ヒト様抗体またはそのカクテルを含む組成物が、再発の予防のためにおよび/または罹患している病気の治療的処置のために投与されてよい。適切な医薬担体は、最新版のREMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、当分野の標準的な参考書に記載されている。例えば、注射による投与に適切な非経口組成物は、重量あたり1.5%の活性成分を0.9%塩化ナトリウム溶液中に溶解することによって調製される。本発明の抗C P A Aペプチドおよび/または抗体は、その表面に会合したC P A Aを有する細胞に対して、抗体依存性細胞障害(ADCC)および/またはアポトーシスおよび/または補体依存性細胞障害(CDC)を媒介するその能力ゆえに、治療効果のために適用されうる。これらの活性については、エフェクター細胞(ADCCのための)または相補成分(CDCのための)の内因性の供給源かもしくは外因性の供給源のいずれが利用されてよい。

40

【0137】

治療応用において、組成物は、疾病に既に罹患している患者に、その疾病およびその合

50

併症を治癒するのに、あるいは部分的に停止させるのに、または緩和するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適当な量は、「治療上の有効用量」と定義される。この使用のために有効な量は、悪性度および患者自身の免疫系の全般的な状態に依存しうが、一般的には、投薬あたり約1mg～約200mgの抗体の範囲であり、患者あたり5mg～25mgの投薬量をもっとも一般的に用いられる。本発明の物質は、通常、重症な病的状態、しばしば致命的な状態もしくは潜在的に致命的な状態に用いられうることを考慮に入れておく必要がある。このような場合において、本発明の現在のヒト様抗体により達成される、異物の最小化および「外来物質」拒絶の低い可能性の観点から、実質的に過剰量のこれらの抗体を投与することが可能であり、そして処置を施す医師により好ましいと感じられるであろう。

10

【0138】

投与される投薬量は、もちろん、既知の因子、例えば、特定の物質の医薬特性、そしてその投与様式および投与経路；受容者の年齢、健康状態および体重；症状の性質および程度、併用療法の種類、処置の頻度、および望まれる効果に応じて変化しうる。通常、活性成分の1日投与量、週投与量、隔週投与量は、4時間～6時間かけて送達される体重の約100mg/m²～250mg/m²でありうる。

非制限的な例として、CPAA関連病状のヒトもしくは動物の処置は、本発明の抗CPAAペプチド、モノクローナルキメラ抗体および/またはネズミ抗体の1日投与量、週投与量または隔週投与量として、1日あたり、1週あたりまたは隔週あたり0.1mg/kg～100mg/kgの範囲の投与量で提供されてよい。

20

【0139】

ヒト治療での使用のための例示的な抗体は、本発明に従い、高親和性（高結合活性であってもよい）のネズミ抗体およびキメラ抗体、そして生体内で強力な抗CPAA活性を有するフラグメント、領域および誘導体である。

内部への投与に適した投薬製剤（組成物）は、一般には、ユニットあたり約0.1mg～約500mgの活性成分を含む。これらの医薬組成物において、活性成分は、組成物の全重量に基づく重量あたり約0.5%～95%の量で通常存在するであろう。

組成物の単回投与または複数回投与は、処置を施す医師により選択される服用レベルとパターンで行われうる。いずれにしても、医薬製剤は、患者を効果的に処置するのに十分な量の本発明の抗体（類）を提供すべきである。

30

抗体はまた、化学療法剤または免疫抑制剤と併用される場合、別個に投与される組成物として用いられてもよい。典型的には、その試薬は、サイクロスポリンAまたはプリン類似体（例えばメトトレキセート、6-メルカプトプリンまたはその類似物）を含んでいてよいが、当業者に周知の多くのさらなる試薬（例えばシクロホスファミド、プレドニゾン、その類似物）が利用されてもよい。

【0140】

本発明の抗体は、免疫毒性の一部を構成しうる。免疫毒性は、2個の成分により特徴付けられ、試験管内でもしくは生体内で選択された細胞を殺すのに有用である。1つ目の成分は、付着されるか吸着された場合に細胞に対して通常致命的な細胞毒性試薬である。2つ目の成分は、「送達ビヒクル」としても知られており、特定の細胞型、例えば癌腫を含む細胞に毒性試薬を送達する手段を提供する。この2個の成分は、通常、さまざまな周知の化学手順のいずれかにより、化学的に結合されて一緒になっている。例えば、細胞毒性試薬がタンパク質であり、第2の成分が完全免疫グロブリンである場合、その連結は、ヘテロ二官能性架橋剤、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド、およびその類似物によりなされてよい。さまざまな免疫毒性の産生が当分野で周知であり、例えばThorpeら、Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet, in MONOCLONAL ANTIBODIES IN CLIN. MED. 168 90 (Acad. Press, 1982) において見出すことができる。

40

【0141】

さまざまな細胞毒性試薬が、免疫毒性での使用に好ましい。細胞毒性薬は、DNA、R

50

NAおよびタンパク質合成を含む決定的な細胞プロセスを干渉する。細胞毒性試薬は、²₁₂Bi、¹³¹I、¹⁸⁸Reおよび⁹⁰Yなどを含む放射性核種；ビンデシン、メトトレキセート、アドリアマイシンおよびシスプラチンなどの、さまざまな化学療法薬；ならびに、細胞障害性蛋白質、例えばヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュードモナス外毒素A、リシン、ジフテリア毒素、リシンA鎖、その他の類似物のようなりボソーム抑制タンパク質、または細胞表面で活性な物質、例えばホスホリパーゼ酵素（例えばホスホリパーゼC）を含みうる。一般的には、Olsnes & Phil, Chimeric Toxins, 25 Pharmac. Ther. 335-81 (1982)；MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CANCER DETECTION & THERAPY, 159 79, 224-66 (BaldwinおよびByers編、Acad. Press, 1985)を参照のこと。

【0142】

抗体またはペプチドおよび誘導体は、免疫複合体として治療上用いることができる。Dillman, 111 Ann. Internal Med. 592-603 (1989)を参照のこと。そのような抗体またはペプチドは、限定するものではないが、リシンA、シュードモナス毒素およびジフテリア毒素を含む細胞毒性タンパク質とカップリングされていてもよい。抗体または他のリガンドもしくはペプチドにコンジュゲートされる毒素は、当分野で周知である。例えば、Olsnesら、10 Immunol. Today 291-95 (1989)を参照のこと。植物および細菌毒素は、典型的には、タンパク質合成装置を乱すことによって細胞を殺す。抗CPAAペプチドおよび/または抗体にコンジュゲートされ、続いて生体内での治療に用いられうる細胞毒性薬は、限定するものではないが、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、メトトレキセートおよびマイトマイシンCを含む。この種の試薬の詳細に関しては当分野で周知であり、その作用機序は、Goodman & GilmanのPharmacological Basis of Therapeutics (第8版、Macmillan Pub. Co., 1990)を参照のこと。

【0143】

加えて、本発明の抗体は、オキサリプラチン、イリノテカン、トポテカン、ロイコボリン、カルムスチン、ピンクリスチン、フルオロウラシル、ストレプトゾシンおよびゲムシタピンなどの化学療法剤と組み合わせて、送達されうる。他の抗体と該化合物の組み合わせは、進行性の大腸癌患者において用いられている。例えば、米国特許出願公開番号第20020187144号を参照のこと。

本発明の抗CPAA抗体および/またはペプチドは、他のモノクローナル抗体またはネズミ抗体およびキメラ抗体、フラグメントおよび領域と組み合わせて、あるいは抗体と相互作用するエフェクター細胞の数および活性を増大させるリンフォカインまたは造血成長因子、その他の類似物と組み合わせて、有利に利用することができる。例えば、本発明の抗体は、疾患に対応する細胞上の別のマーカーと反応性があるヒトモノクローナル抗体と同時に投与されてよい。例えば、適切なT細胞マーカーは、白血球タイピングにおける第1回国際白血球分化に関するワークショップ (Bernardら、編、Springer Verlag, NY, 1984)により名付けられるように、いわゆる「分化抗原群 (Clusters of Differentiation)」に分類されるものを含みうる。

【0144】

16C3抗原

16C3抗体が結合する抗原は、全てではないがいくつかの培養ヒト腫瘍細胞系において、全てではないがいくつかの正常なヒト胎児消化管組織において、そして大部分の結腸と膵臓の腫瘍組織で発現されているようである。以下の実施例において詳細に記載されるように、さまざまな腫瘍試料のウェスタンブロットにおいて、16C3抗体は、~200 kDaのペプチド種および~110 kDaのペプチド種の両方を認識した。特定の試料の各種のタンパク質種の量を反映しうる染色強度は、大腸腫瘍試料と膵臓腫瘍試料の間で異なっているようである。16C3抗原は、大部分の大腸と膵臓の腫瘍組織で発現されているようであり、腫瘍胎児抗原 (oncofetal origin) であるかもしれない。16C3抗原は、細胞表面に発現されており、糖タンパク質である。16C3抗体が認識する同じ抗原の関連する2種類のものである可能性があり、各種類の相対的な量は、大腸腫瘍組織と膵臓腫瘍組織との間で異なっている。

10

20

30

40

50

【0145】

ウェスタンブロットによる16C3抗原の結合は、SDSおよびNP-40などの洗浄剤か、ジチオスレイトールおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤のいずれかの処理によっては乱されず、このことは、この特異的なエピトープに対する結合は、立体構造依存的ではなく、16C3抗体はCPAA上の直線状エピトープを認識しうることを示唆する。さらに、16C3エピトープは、V8蛋白質分解酵素、トリプシン、PNGase-Fを用いた処理により影響を受けないが、免疫応答性抗原のSDS-PAGEにおける全体的な移動度は変化し、このことは、タンパク質分解および脱グリコシル化による修飾を反映している。ベータ脱離化学反応における水酸化ナトリウムを用いた処理は、結果として免疫応答の喪失を導いた、このことは、16C3エピトープがO-グリコシル化修飾を伴っているか、あるいはO-グリコシル化部位に隣接していることを示唆する。さらなる研究により、16C3抗体が反応する正確なエピトープは特定される。

10

【0146】

16C3エピトープの特徴付けはまた、CPAAの遺伝子(群)の特定にも繋がり、それは、翻訳のアンタゴニスト(translation antagonist)の標的を、または発現をブロックする別の方法を、あるいは機能的な活性(例えば、その類似のリガンド(群)による受容体の結合;輸送機能;シグナル伝達機能)をブロックするアンタゴニスト、特に小分子または抗体の標的となりうるCPAA活性の理解を、提供しうる。

【0147】

癌ワクチン

本発明の他の態様は、癌ワクチンを提供する。「ワクチン」により、生体組織の免疫系を刺激するために用いられる試薬を意味する。これに関して、免疫応答は、予防を提供することができるか、あるいは病的な組織に、例えば既存の状態を軽減することにより良い影響を提供することができる。詳細には、癌ワクチンは、既存の悪性腫瘍を治療的に処置することおよび/または既存の悪性腫瘍の進行または転移を妨げることが意図される。

20

【0148】

その具体的な能動免疫療法は、周知の腫瘍関連抗原を用いて達成することができる。実際、本明細書で与えられるさらなる発明を可能にするモノクローナル抗体を誘導するために用いられる半精製された抗原調製物は、ヒトに、特異的で活性な長期間持続する防御免疫を与えることが示された。Hollinsheadら、1985。その際に、患者は、腫瘍切除を受け、次いで付加的な0.2mlのフロイントアジュバンドが混合された0.2ml懸濁液中の200μg、300μgまたは500μg量の腫瘍の膜から誘導された抗原性物質を用いてワクチン接種された。

30

【0149】

本明細書に記載される組み換え抗体を用いることで、現在では、これらの癌に対するワクチン接種にさらに適切な高度に精製されたCPAA抗原またはエピトープペプチドを特定することができる。例えば、16C3を用いて、組織もしくは細胞試料に結合させ、そこからCPAAタンパク質およびその対応するアミノ酸配列を、多くの既知の方法により特定することができる。エピトープは、さらにマッピングされ、分子の性質はより詳細に決定されうる。例えば、Baerga-Oritzら、11 Protein Sci. 1300-08 (2002); JemersonおよびPaterson, 4 BioTechniques 18 31 (1986)を参照のこと。

40

【0150】

有効な抗原性のペプチドを特定するための別の技術は、16C3抗体に認識される模倣タンパク質またはミモトープについての発現ライブラリー(例えばファージディスプレイライブラリー)をスクリーニングするために、16C3抗体またはペプチドの使用を必要とする。この技術は、生体内で防御免疫応答を引き起こす抗原性ペプチドを特定するために用いられる。Beenhouwerら、169 J. Immunol. 6992-99 (2002)を参照のこと;また米国特許第5,837,550号も参照のこと;Visvanathanら、48 Arthritis & Rheumatism, 737-45 (2003);Satoら、371 Biochem. J. 603 08 (2003)。この技術は、糖鎖抗原および糖タンパク質抗原のタンパク質模倣体を、すなわち本来の糖鎖対照物よりも高い免疫

50

原性が見られるタンパク質種を、特定するために用いられる点に注目されたい。実際に、産生能、安全性、半減期もしくは他の問題を含む要因のために、既知の抗原に勝る利点がある模倣体が単離されうる。

【0151】

C P A A 免疫原性タンパク質は、例えば皮下もしくは粘膜ワクチンとして単独でか、あるいはアジュバントもしくは単体と組み合わせられるか、またはアジュバントまたはタンパク質コンジュゲートの一部として調製され、送達されてよい。リボソーム微小粒子、ウイルス様粒子、DNA ワクチン、エス・チフィムリウム (*S. typhimurium*) などの生の組み換えベクター、そして可能であれば I S C O M による送達が、想定される。これらの系はすべて当業者には周知であり、過度の実験なしに実施されうる。例えば、Michalek ら、MU COSAL IMMUNOLOGY (Mestecky ら、編、Elsevier, 2005) を参照のこと。

10

【0152】

加えて、C P A A ペプチドは、トキシイド担体、例えばコレラトキシイド、エンテロトキシイドまたはリシントキシイドと遺伝子工学的にもしくは化学的にコンジュゲートされてよい。例えば、米国特許第 6, 846, 488 号を参照のこと。細菌から誘導された別の有利なタンパク質担体は、P o r B タンパク質担体である。例えば、米国特許第 6, 613, 336 号を参照のこと。別の見込みのあるタンパク質に基づく粘膜アジュバントは、エス・チフィムリウムからのフラジュリタンパク質である。本発明の態様において、C P A A タンパク質は、フラジュリタンパク質 (F l j B) とともに、例えば、鼻腔内粘膜経路を経由して同時投与される。アヒル肝炎コア抗原を含む有利なタンパク質プラットフォームはまた、米国特許出願公開番号第 20040219164 号に示されている。

20

【0153】

本発明の C P A A は、免疫原構築物の生体内発現のために、DNA ワクチンとして送達されてもよい。例えば、陽イオン微小粒子を用いて、鼻腔内ワクチン中の DNA 発現カセットを送達してもよい。そのような系では、例えば、H I V - 1 ギャップタンパク質をコードする DNA を含むワクチンの鼻腔内送達に続いて、免疫応答が誘発されうる。Michalek ら、2005。本発明の態様において、C P A A 免疫原ペプチドは、生体内で実質的に発現される DNA 発現カセットを介して送達される。

【0154】

加えて、免疫原調製物を用いて、生体外 (エクスピボ) でドナーから誘導された樹状細胞を「チャージ」し、次いで、それらを患者に戻し、そこで、該細胞はリンパ器官に戻り、有効な免疫応答を組み込むことができる。例えば、Liau ら、9(6) Neurosurg. Focus, e8 (2000); Baar, 4(2) Oncologist 140-44 (1999) を参照のこと。このワクチンアプローチは、例えば、メラノーマおよび脳腫瘍を処置するための臨床試験中である。さらなる情報は、例えば、臨床試験に関する国立衛生研究所のウェブサイトにてオンラインで確認することができる。あるいは、上記のような DNA ワクチンは、皮膚パッチを介してランゲルハンス細胞に送達されてよく、次いで、それらは樹状細胞に成熟し、リンパ器官に戻りうる。米国特許第 6, 420, 176 号。

30

【0155】

本発明の免疫原組成物の送達は、非経口注入、皮下注入または筋肉内注入、静脈内注射、腸内、皮内、挿管、または鼻腔、経口もしくは腸ワクチン接種によってなされてよい。ワクチンはまた、口蓋扁桃に、鼻腔内を含んで局所に送達されてもよいし、あるいは、唾液腺に送達してもよい。換言すれば、本発明により想定されるワクチンは、患者に、既知のもしくは標準的な技術により投与されてよい。

40

本発明は、次いで、非制限的な実施例によりさらに記載される。

【0156】

実施例

実施例 1 . ヒト腫瘍試料からの膵臓癌および結腸直腸癌 - 関連抗原 (C P A A) の調製。

免疫原性の腫瘍関連抗原調製物は、Hollinshead ら、56 Cancer 480 (1985); 米国特許第 5, 688, 657 号に記載の方法に従って、プールされた結腸直腸癌メンバーから得

50

られた。この抗原性物質は、そのメンバーの分画が H L - A 抗原を含まず、多くの非免疫原性糖タンパク質分画から分離される程度に精製された。

【 0 1 5 7 】

食塩水中の腫瘍細胞懸濁液は、新しい操作標本室で調製された。固形腫瘍を細分化することにより得られた均一の細胞懸濁液は、400 × 重力にて10分間遠心分離され、その上清は保持された。その細胞ペレットは、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に再懸濁され、再び遠心分離された。膜材料は、膜材料のみが存在するか (また、無傷の細胞が存在しないか) を確かめるために、電子顕微鏡により評価され、そのタンパク質含有量はローリー法により測定された。次に、膜材料は、低頻度の連続超音波処理にかけられ、可溶性の膜タンパク質のプールとして再懸濁された。可溶性の超音波調製物は、セファデックス (Sephadex) 6 2 0 0 によるゲルろ過により分離された。2 m l 分画が集められ、2 2 0 n m と 2 8 0 n m の吸光プロフィールが記録された。個別のタンパク質ピークを含む分画がプールされ、そのプールはディアフロ (Diaflo) 限外ろ過により濃縮された。Hollinsheadら、1985により規定された、セファデックス G 2 0 0 フラクシオン I B および I I A は、さらにグラジエント・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (P A G E) によってさらに精製された。その分画は、結腸直腸癌の患者において陽性の遅延型皮膚過敏症反応を誘発するそれらの能力について試験された。免疫原性の活性を有する分画は、結腸直腸癌関連抗原を有すると称され、モノクローナル抗体作製における免疫原として、そしてスクリーニング物質として用いられた。

10

【 0 1 5 8 】

グラジエント P A G E により、癌胎児性抗原から異なるダブルバンドの抗原が、特定され、そして単離された。Goldら、122 J. Exp. Med. 467-81 (1965) ; Hollinsheadら、1985 ; Hollinsheadら、1(7658) Lancet 1191-1195 (1970) ; Hollinsheadら、177 Science 887-89 (1972)。この抗原を含むバンドは、追跡用色素から 6 . 3 c m および 6 . 6 c m の距離に移動した。この抗原の生化学的な分析により、このタンパク質が糖タンパク質であることが示された。この抗原の分子量は、トランスフェリンの電気泳動の移動度 (6 . 4 c m ~ 6 . 5 c m) に基づいて見積もられ、1つの単離物は 7 6 . 5 k D a の分子量であった。半精製された抗原は、血清抗体評価、細胞性免疫、および患者生存を含み、詳細に研究された。Hollinsheadら、Abstract, Ann. Meeting Am. Soc ' y Clin. Oncol., Washington, DC (1990) ; Hollinsheadら、56 Proc. 6th Int ' l Conf. Adjuvant Therapy Cancer (Salmon編、W.B. Saunders Inc., Phila., PA, 1990)。併用免疫化学療法の有用性を評価するため、さらなる研究が行われた。Hollinsheadら、1990a ; Hollinsheadら、1990b ; Hollinshead, 7 Semin. Surg. Oncol. 199-210 (1991) ; Hollinsheadら、10(1) J. Exper. Clin. Cancer 43-53 (1991) ; また、HollinsheadおよびHerberman, Proc. 2nd Int ' l Symp. Cancer Detection & Prevent. 616-20, (Bologna, Italy, 1973) ; Hollinshead, Experience with combo. immuno-chemotherapy of colon cancer: steps pertinent to successful therapy based upon dosage & timing of admin. of 5-FU. NIH Workshop on Levamisole: Mechanism of anti-tumor action (Bethesda, MD, June 11, 1990) ; Hollinshead, 7 Semin. Surg. Oncol., 199-210 (1991) ; Hollinshead, 8(153) Clin. Exper. Metastasis 89 (1990) を参照のこと。

20

30

40

【 0 1 5 9 】

実施例 2 . 免疫付与およびハイブリドーマの作製。

ヒト脾臓癌および結腸直腸癌 - 関連抗原に対するモノクローナル抗体は、マウス骨髄腫細胞 S p 2 / 0 - A g 1 4 と上記の C P A A を用いて免疫された B A L B / c マウスからの脾臓細胞とを融合させた結果得られる、ハイブリドーマの作製およびクローニングによって得られる。ハイブリッド・クローンが樹立され、そして E L I S A により評価された場合に C P A A および結腸癌腫細胞系 (L S 1 7 4 T) と強く反応した。

【 0 1 6 0 】

免疫付与および細胞融合 : B A L B / c マウスは、完全フロイントアジュバンド中に乳化した 1 0 0 μ g の C P A A の腹腔内注射により免疫付与された。その C P A A は、臨

50

床試験用にHollinsheadにより記載されたように調製された。4週間後に、不完全フロイントアジュバンドに乳化された50 µgのCPAAを用いて第2の免疫付与が行われた。14日後に、マウスは、不完全フロイントアジュバンドに乳化された50 µgのCPAAの腹腔内ブスター注射を受けた。マウスを3日後に犠牲にし、均一の脾細胞懸濁物が調製された。細胞融合は、5e7マウス脾臓細胞を40%ポリエチレングリコール(MW=1500)中で10e7Sp2/0-Ag14骨髓腫細胞と一緒にインキュベートすることにより行われた。

【0161】

ハイブリドーマ・クローンのスクリーニング：酵素免疫吸着測定法(ELISA)を用いて、PCAAに特異的な抗体を産生するハイブリドーマ・クローンを検出した。結腸腫瘍細胞膜抽出物(LS174TまたはHT-29を10 ng/ウェル)を、大腸癌抗原の別の供給源として供給し、ポリスチレン・マイクロプレート上に固定した。試験上清中に存在する抗体を、その固定化した抗原に1時間結合させた。結合したネズミmAbの存在は、マウス免疫グロブリンに特異的なホスファターゼ・コンジュゲート二次抗体を用いて検出された。次いで、ウェルを洗浄し、アルカリホスファターゼ用の発色基質(pNPP)を加えた。0.500ユニットより大きいもしくは等しい吸光度を示す呈色反応を示したウェルを、陽性とスコアした。陰性対照は、吸光度の単位で0.01~0.09の値を与えた。ELISAにより陽性とスコアされたハイブリドーマのウェルは、展開および限界希釈クローニング法による細胞のクローニング手順を繰返すために、選択された。陽性のmAb産生ハイブリドーマ細胞の選択は、ELISAにより決定された。陽性のモノクローナル細胞は、培養液中に展開され、その細胞の一部標本が長期間の保存のために液体窒素中で凍結された。

10

20

【0162】

実施例3. 16C3 mAbのアイソタイプ。

ネズミ免疫グロブリンは、重鎖(55 kD)および軽鎖(25 kD~29 kD)をコードする別個の遺伝子から発現される。ネズミ免疫グロブリンのレパートリーを与えるために再編成可能な、4個の重鎖IgGサブクラス(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3)および2個の軽鎖(カッパ、ラムダ)がある。

16C3 mAbのアイソタイプは、サザンバイオテクノロジー社(Southern Biotechnology, Inc.)のマウス・アイソタイプング・キットを用いて決定された。16C3 mAbは、IgG1重鎖およびカッパ軽鎖であると決定された。

30

【0163】

実施例4. 16C3抗体をコードする特有のDNA配列。

既述の他のすべてのmAbの既知のアミノ酸配列と比較して、このmAbの直線状のアミノ酸配列によりその特異性が認められる。直線状のアミノ酸配列は、そのポリペプチド分子をコードするDNAの直線配列を最初に決めることにより決定できる。16C3 mAbをコードするDNA配列が決定されると、次に、その読み枠は、共通の哺乳動物コドン使用頻度表を用いてアミノ酸配列に翻訳され、このようにして16C3分子の直線配列のアイデンティティーが表されることとなる。

ネズミIgG1重鎖、カッパ軽鎖クローニングに用いたオリゴヌクレオチドプライマーは、文献のRapid cloning of any rearranged mouse immunoglobulin variable genes, Dattamajumdarら、43 Immunogenetics 141-51 (1996)に基づいて得られた。

40

【0164】

16C3の核酸の単離：リボ核酸(RNA)は、製品に記載されるようにアールエヌイージー・メディ・キット(RNeasy-Midi kit)(カタログ番号74104、キアゲン(Qiagen), Valencia, CA)を用いて、16C3産生ハイブリドーマ細胞から単離した。4百万の細胞を、円錐管にて遠心分離し、細胞を溶解し、RNAを含む核内および細胞質内の核酸を放出させた。次いで、RNAを、アールエヌイージー・スピンカラムを用いてその溶菌液から精製した。最終的に、RNAは、水を用いて溶出され、分光器を用いて260 nmと280 nmの吸光度により収量と精製度について分析された。単離されたRNA

50

は、- 80 で保存された。

【0165】

cDNA調製：RNA (2 μg) は、最初に、デオキシヌクレオチド三リン酸 dNTP 混合液 (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、cDNA合成用緩衝液、RNase阻害剤、逆転写酵素およびオリゴ (dT)₂₀ を用いて逆転写され、cDNAとされた。そのcDNA合成反応は、インビトロジェン (Invitrogen) のスーパースク립ト (Superscript) IIIキット (カタログ番号18080-051) の使用説明書に従って、実施された。標的のcDNA (マウスIgG1重鎖およびカッパ軽鎖) は、その重鎖および軽鎖の両方に対して上記のフォワードプライマーおよびリバースプライマーを用いて、インビトロジェンのアキュプライム (Accuprime) Pfx DNAポリメラーゼキット (カタログ番号12344-024) により推奨される指示に従い、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により配列決定を目的として増幅された。この混合液は、94 で2分間、続いて94 で15秒、58 で30秒、68 で30秒のサイクルを30回、続いて68 で10分間処理された。次いで、増幅された重鎖DNAフラグメントおよび軽鎖DNAフラグメントは、4% NuSieve 3:1を含むアガロースゲル (Lonza-Rockland、カタログ番号54925) 上で電気泳動された。標的DNAバンドは、ゲルから切り出され、キアquick (QIAquick) ゲル・エクストラクション・キット (カタログ番号28704、キアゲン) を用いてアガロースから精製された。

10

【0166】

DNA配列決定および分析：16C3抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を表す増幅された標的DNAは、使用説明書 (インビトロジェン・カタログ番号K4530-20) に従って、配列決定のためにTOPOクローニングした。幾つかのTOPOクローンを選択し、DNA配列決定にかけた。16C3抗体の全長の配列が、使用説明書 (ロッシュ・アプライド・サイエンス (Roche Applied Sci) カタログ番号03-353) に従い、5' / 3' RACEキットを用いて得られた。得られたDNA配列は、3つの読み枠に翻訳され、終止コドンを含まない読み枠であって、他のネズミ重鎖および軽鎖と相同的にアライメントされた読み枠が、本来の読み枠であると決定された。そのDNA配列を、国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information; NCBI) データベース (ジーンバンク (GenBank) + RefSeqヌクレオチド + EMBL + DDBJ + PDB配列のすべて) を探索するために、クエリー配列として用いた。BLASTサーチは、16C3のクエリー配列と類似するヌクレオチド配列を有する15のデータベース・エントリを返した。16C3 DNA配列と一致したDNA配列はなく、このことは、本明細書記載の16C3 mAbが特有であることを実際に示す。

20

30

【0167】

実施例5 . BLASTデータベース検索により確認された16C3抗体は特有。

16C3抗体の配列は、国立衛生研究所の国立医学図書館 (National Library of Medicine) の一部門の国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) のタンパク質と核酸のデータベースに対して、BLASTサーチ (Basic Local Alignment Search Tool) にかけた。16C3 mAb重鎖または16C3 mAb軽鎖のクエリー配列のいずれかを用いたBLASTサーチにより見出された類似の配列の調査によって、16C3重鎖と軽鎖の両方の可変領域が特有な配列であることが示された。かくして、16C3 mAb重鎖配列および軽鎖配列は、新規かつ特有な抗体分子であることを示す。

40

【0168】

実施例6 . 16C3 mAbの特異的な細胞結合。

ハイブリドーマにより産生される16C3 mAbは、プロテインL-アガロース・マトリクスを用いた親和性カラムクロマトグラフィーにより精製された。精製された16C3 mAbは、以下の表1で特定されるように、様々な腫瘍細胞を用いた間接免疫蛍光法により特性評価された。腫瘍細胞系はすべて、ATCCから入手した。細胞は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に希釈された精製された16C3 mAbと一緒に、4 で1時間インキュベートされた。細胞を洗浄した後、蛍光標識ヤギ抗マウスmAbと一緒にインキュ

50

ベートされた。次いで、これらの細胞をPBSで3回洗浄し、ベックマン・ディキソン (Becton-Dickinson) のファックスキャリバー (FACSCalibur) (登録商標) およびセルクエスト (CellQuest) 解析ソフトウェアを用いたフローサイトメトリーにより試験された。その結果は、表1に示される (FACSデータ)。このデータは、16C3mAbが大腸腫瘍細胞系および膵臓腫瘍細胞系に特異的に結合するが、前立腺腫瘍細胞系および扁平上皮癌細胞系には結合しないことを示す。

【0169】

表1. 16C3mAb FACSデータ：腫瘍細胞系への結合

【表1】

| 腫瘍細胞系 | 細胞染色 % (mfi) | |
|------------|--------------|-------------------|
| | FITC-Abのみ | Rockland 16C3-E12 |
| LS174T結腸直腸 | 0.94 (15) | 40.56 (59) |
| HT-29結腸直腸 | 0.84 (10) | 90.99 (78) |
| CFPAC-1膵臓 | 0.83 (14) | 96.19 (323) |
| AsPC-1膵臓 | 2.68 (30) | 69.90 (36) |
| 22Rv-1前立腺 | 2.74 (61) | 1.62 (30) |
| PC-3前立腺 | 0.28 (20) | 2.44 (22) |
| H226扁平上皮 | 0.90 (18) | 0.62 (14) |
| SiHa扁平上皮 | 1.07 (19) | 1.08 (20) |

10

20

【0170】

実施例6. 抗腫瘍細胞毒性を示す16C3のADCC活性。

免疫原性腫瘍抗原に特異的な、治療上有効なmAbは、少なくとも以下の特徴；(a) 高い腫瘍組織特異性、(b) 正常なヒト組織への交差反応がないこと、および(c) 腫瘍の破壊に関連する生物活性、例えば、抗体依存性細胞障害 (ADCC)、の1つを備えているであろう。16C3mAbのADCC活性は、標的細胞として結腸癌系SW1463および膵臓癌系CFPAC-1とAsPC-1において試験された。メラノーマ細胞系、SK-MELは、特異な対照 (specificity control) として提供された。ADCCは、正常なヒトPBMCをエフェクター細胞として用い、一般的な4時間の¹¹¹In放出アッセイを用いて評価され、その結果は、表2 (ADCCデータ) にてアイソタイプ放出パーセント (溶解%) として示される。陰性対照抗体であるUPC-10と比べて、データは、ネズミIgG1抗体の適度な殺活性を示すが、重要なことは、その殺活性が大腸腫瘍系および膵臓腫瘍系に明らかに特異的な点である。この抗体の殺活性は、このADCCアッセイにおいてヒト・エフェクター細胞と相互作用するFc領域を含むヒト枠組み構造配列を有するヒト化抗体またはキメラ化抗体により、増強しうる。

30

40

【0171】

表2. ネズミ16C3mAbを用いたADCCアッセイ

【表 2】

| 腫瘍標的 | エフェクター： 標的の比 | 特異的なADCC活性 % (±SEM) | |
|--------------------|-----------------|---------------------|----------|
| | | 16C3mAb | UPC-10 |
| SW1463 (結腸直腸腺腫) | 50:1 | 4.1±0.4 | 1.6±0.3 |
| | 25:1 | 5.2±0.3 | -0.2±0.1 |
| CFPAC-1 (膵臓腺癌) | 50:1 | 11.1±2.7 | 0.2±0.6 |
| | 25:1 | 1.4±0.7 | -0.2±0.3 |
| AsPC-1 (膵臓腺癌) | 50:1 | 16.1±0.8 | 0.9±0.3 |
| | 25:1 | 10.6±1.0 | 0.4±0.2 |
| SK-MEL (メラノーマ) | 50:1 | -3.0±0.2 | -0.5±0.2 |
| | 25:1 | -3.3±0.1 | -2.0±0.2 |

10

20

111 In 標識された標的細胞、5 μg / ウェルで用いられた抗体、エフェクター細胞として用いられた IL-2 活性化ヒト PBMC、回収前に 37 °C で 4 時間のインキュベーション。

【0172】

実施例 7 . 16C3 抗体の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析。

ネズミ免疫グロブリンガンマ (IgG1) の本来の立体構造は、重鎖と軽鎖のポリペプチドをそれぞれ 2 個含む、4 個のポリペプチドからなる。1 個の重鎖 (55 kDa) は 1 個の軽鎖 (25 kDa ~ 29 kDa) と会合し、その 2 量体がジスルフィド結合により同じ 2 量体を連結して機能的な 4 量体高分子を完成させる。IgG 分子は、変性剤 (SDS、ドデシル硫酸ナトリウム) と 2 個のヘテロダイマーを連結するジスルフィド架橋を還元する試薬 (DTT、ジチオトレイトール) の存在下で、その成分の重鎖と軽鎖に脱会合され、ポリアクリルアミドゲル・マトリクス上で大きさによって分離される。ゲル電気泳動は、抗体などのタンパク質性物質の分子量を決定するために用いられる一般的な分析方法である。

30

【0173】

精製された 16C3mAb は、還元剤 (DTT) の存在下で SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析にかけられた。5 μg の精製 16C3mAb は、DTT と、SDS、グリセロールおよびプロモフェノールブルー色素を含む 4 × サンプルバッファーとで混合された。その混合液を、95 °C で 2 分間加熱し、氷上で冷却し、次いで、SDS グラジエント・ポリアクリルアミドゲル (4% - 20% 勾配) にロードし、そして電流をかけて、16C3 調製物の変性した分子種を分離した。電気泳動に続いて、そのゲルを、ゲル上のタンパク質を可視化するためにクマシーブルー色素を用いて染色し、水で脱染し、そして多孔性のプラスチックシートの間で乾燥させた。このデータは、重鎖を表す分子量 55 kDa と、軽鎖の分子種を表す 28 kDa の 2 つのタンパク質バンドを示した。これらのデータは、精製された物質が、ネズミ IgG1 の重鎖および軽鎖タンパク質の既知の分子サイズに相当することを示す。

40

【0174】

50

実施例 8 . 1 6 C 3 およびヒト悪性組織を用いた免疫組織学的染色。

1 6 C 3 m A b により示される抗原結合の特異性は、さまざまなヒト組織試料、癌および正常標本の両方の免疫組織学的染色により、測定された。パラフィンおよび新鮮凍結ヒト組織試料は、精製マウス 1 6 C 3 M a b (I g G 1) を $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ で染色し、次いで、ペルオキシダーゼ・コンジュゲート抗マウス I g G 二次抗体を用いて検出された。その染色強度は表 3 に示され、0 は、所定の標本における抗原もしくは高発現の抗原との交差反応がないことを示し；4 は、非常に強い交差反応があることを示す、0 ~ 4 の評価系を反映する。

【 0 1 7 5 】

表 3 . 1 6 C 3 特異性を示す免疫組織学的染色。

10

【表 3 - 1】

| 試料の調製方法 | 陽性の数／総数 | 染色強度 |
|---|---------|--------|
| パラフィン-結腸癌 | 31 / 33 | 3+, 4+ |
| パラフィン-正常な結腸 | 0 / 18 | 0 |
| パラフィン-膵臓癌 | 17 / 18 | 3+, 4+ |
| パラフィン-正常な膵臓 | 0 / 8 | 0 |
| パラフィン-結腸癌 | 2 / 2 | 2+, 3+ |
| パラフィン-肺腺癌 | 2 / 2 | 1+, 2+ |
| パラフィン-粘液性卵巣癌 | 2 / 2 | 2+, 3+ |
| パラフィン-肝門部胆管癌 (Liver-Cholangiocarcinoma) | 2 / 2 | 1+ |
| パラフィン-胃癌 | 2 / 2 | 3+, 4+ |
| パラフィン-子宮頸癌 (Uterus-Cervix cancer) | 2 / 2 | 1+, 2+ |
| パラフィン-子宮膜癌 (Uterus-Endometrial cancer) | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-前立腺癌 | 0 / 40 | 0 |
| パラフィン-漿液性卵巣癌 (Serous Ovary cancer) | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-膀胱移行細胞癌 | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-腎臓癌 | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-肺扁平上皮癌 (Lung-squamous cancer) | 0 / 2 | 0 |

20

30

40

【 0 1 7 6 】

【表 3 - 2】

| | | |
|------------------------------------|--------|--------|
| パラフィン-腎臓癌 | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-肺扁平上皮癌 | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-食道扁平上皮癌 (Esophagus-Squamous) | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-肝癌-肝細胞癌(Liver-Hepatoma) | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-甲状腺乳頭癌(Thyroid, papillary) | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-甲状腺濾胞癌(Thyroid, follicular) | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-乳管癌(Breast, ductal) | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-皮膚平上皮癌(Skin-Squamous) | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-胃印環細胞癌(Stomach, signet ring) | 0 / 2 | 0 |
| パラフィン-さまざまな正常細胞 | 0 / 54 | 0 |
| 新鮮凍結-結腸癌 | 2 / 3 | 2+, 3+ |
| 新鮮凍結-正常な結腸 | 0 / 2 | 0 |
| 新鮮凍結-膵臓癌 | 2 / 3 | 2+, 3+ |
| 新鮮凍結-正常な膵臓 | 0 / 2 | 0 |

10

20

30

【0177】

まとめて考慮すると、これらのデータは、結腸癌組織(35/38)および膵臓癌組織(19/21)に対する90%を超える結合特異性を示すのに対し、いずれの正常なヒト組織に対しても交差反応がないこと(58試験中、0)を示す。いくつかの交差反応もまた、肺腺癌(2/2)、粘液性卵巣癌(2/2)、肝門部胆管癌(2/2)、胃癌(2/2)および子宮頸癌(2/2)を含む他の腫瘍型にあった。これらのデータは、腺癌に存在する抗原との一般的な交差反応を示唆する。

40

【0178】

実施例9. ネズミ16C3モノクローナル抗体のヒト化。

ヒト悪性腫瘍を処置するための治療薬としての有用性を改善するため、その薬物が、繰り返しのそして低毒性の両方で投与されるよう、マウスモノクローナル抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体に変換されてよい。当分野では、ネズミタンパク質の投与は、ときどき、その外来タンパク質に対する重度の免疫応答および毒性反応の結果を伴っていることが知られている。したがって、ヒト化抗体が、ヒト治療により効果的であることは明らかであろう。

【0179】

治療適用のためのマウス抗体のヒト化は周知であり、ヒト化mAbを作製する複数の技術が上述される。例えば、フランケンシュタイン・アプローチによれば、ヒト枠組み構造

50

領域は、ヒト以外の抗体の関連する枠組み構造領域のそれぞれと実質的な配列相同性を有していると特定されており、そしてそのヒト以外の抗体のCDRは、別のヒト枠組み構造領域の合成物に移植（グラフト）される。例えば、米国特許出願公開番号第20060088522号を参照のこと。本発明の抗体の調製にも有用な関連する方法は、米国特許出願公開番号20030040606号に記載されている。

【0180】

ネズミ16C3抗体を治療上有効なヒト化抗体に変換するための5つの異なる選択的配列が、設計された。その設計は、既知のネズミおよびヒト抗体配列に関する構造情報に基づいた。これらの可変領域はそれぞれ、別の治療抗体、例えばCC49およびCC83に共通して用いられた既知のヒトIgG1枠組み構造の抗体にインフレームで融合された。この遺伝子は化学的に合成され、その配列が確認された後に、その重鎖および軽鎖遺伝子挿入部は、CMVプロモーターの制御下にある哺乳動物発現プラスミドにクローン化された。VEN16C3およびCDR16C3の可変軽鎖の設計は同一であるため、この配列設計により特定される1個の軽鎖遺伝子のみが合成される点に注意すべきである。それぞれの重鎖および軽鎖をコードするプラスミドは、標準的なリポフェクトアミンに基づく方法および試薬を用いて、ヒト293T細胞に同時トランスフェクトされた。

10

【0181】

図6（軽鎖配列）および図7（重鎖配列）に示されるヒト化mAb配列は、ヒト悪性腫瘍を処置する際に使用する16C3抗体の潜在的な治療形態を示す。ヒト生殖細胞系のIgG配列が、その枠組み構造配列に用いられた。略語は、以下のとおりである：16C3はネズミ抗体配列であり、ven16C3はヒト枠組み構造配列を用いてベニアされ、cdr16C3はヒトCDRアミノ酸を用いてリモデルされ、abb16C3は短縮型CDRグラフトングを表し、sdr16C3は部位決定アミノ酸変化を示し、そしてfra16C3は、ヒト可変領域のさまざまな「ピース」の組み合わせを用いることにより可変領域をリモデルする「フランケンシュタイン」アプローチを表す。数字は、カバット番号付けを反映する。

20

【0182】

実施例10．組み換えマウス16C3mAbの特異的な細胞結合

ハイブリドーマにより産生されるマウス16C3mAbは、プロテインLアガロース・マトリクスを用いる親和性クロマトグラフィにより精製された。チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）により産生された組み換えマウス16C3mAbは、プロテインAセファロース（Sepharose）マトリクスによる親和性クロマトグラフィにより精製された。この精製された16C3調製物またはトランスフェクトされた細胞上清は、以下に示されるようにヒト大腸腫瘍細胞LS174Tまたはヒト膵臓腫瘍細胞AsPC-1を用いた間接免疫蛍光法により、特性評価された。細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に希釈された精製16C3（マウスもしくはヒト化）とともに、4℃で1時間インキュベートされた。その細胞は洗浄され、そして蛍光標識化ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体とともにインキュベートされた。次いで、細胞は、PBSにより洗浄され、そしてベクトン・ディッキンソン・ファックスキャリバー（Becton-Dickinson FACScalibur）およびセルクエスト（CellQuest）分析ソフトウェアを用いたフローサイトメトリーにより試験された。そのデータは、ハイブリドーマ由来のマウス16C3と組み換えCHO由来のマウス16C3の両方の大腸腫瘍細胞系および膵臓腫瘍細胞系に対する類似した結合性を示すが、前立腺腫瘍または扁平上皮癌細胞系に結合しないことを示した。

30

40

【0183】

表4．ハイブリドーマ・マウス16C3に対する、組み換えマウス16C3の腫瘍細胞系に対する結合性のFACSデータ。

【表 4】

| 抗体試料 | LS174T腫瘍細胞結合 % (MFI) |
|--|----------------------|
| ヤギ抗マウスIgG-FITC対照 | 1.63 (43) |
| H12ハイブリドーマ525からの精製された m16C3、2 μ g | 43.11 (118) |
| H12ハイブリドーマ712からの精製された m16C3、2 μ g | 43.56 (113) |
| H12ハイブリドーマ713からの精製された m16C3、2 μ g | 37.79 (110) |
| H12ハイブリドーマ840からの精製された m16C3、2 μ g | 35.72 (92) |
| 組み換えCHO1019からの精製されたm1 6C3、2 μ g | 41.45 (112) |
| 組み換えCHO1115からの精製されたm1 6C3、2 μ g | 42.51 (114) |
| 組み換えCHO1220からの精製されたm1 6C3、2 μ g | 37.46 (110) |
| 抗体試料 | AsPC-1細胞染色 % (mfi) |
| ヤギ抗マウスFITC対照 | 1.01 (8) |
| マウス16C3ハイブリドーマ対照、712、 1 μ g | 89.50 (138) |
| マウス16C3ハイブリドーマ対照、713、 5 μ L | 81.42 (34) |
| 組み換えCHOm16C3上清 (supe) #1 | 82.66 (28) |
| 組み換えCHOm16C3上清#2 | 83.86 (27) |
| 組み換えCHOm16C3上清#3 | 79.50 (18) |
| 組み換えCHOm16C3上清#4 | 83.08 (25) |

【0184】

実施例11. 組み換えマウス16C3抗体を用いたヒト組織の免疫組織学的染色。

10

20

30

40

50

16C3mAbにより示される抗原結合の特異性は、さまざまなヒト組織試料、癌および正常標本の両方の免疫組織学的染色により、測定された。組織マイクロアレイ、パラフィン包埋組織および新鮮凍結ヒト組織試料は、精製マウス16C3抗体(IgG1)を5 μ g/mlで用いて染色し、次いで、ペルオキシダーゼ・コンジュゲート抗マウスIgG二次抗体を用いて検出された。その染色強度は0~4の評価系を用いて示され、0は、所定の標本における抗原もしくは高発現の抗原との交差反応がないことを示し、そして4は、非常に強い交差反応があることを示す。ハイブリドーマ由来16C3抗体および組み換え16C3抗体のいずれも試験された。この結果を、表5および6にまとめた。

【0185】

表5. ハイブリドーマ細胞から精製されたマウス16C3を用いた染色。

10

【表5】

| ヒト組織試料 | 陽性の数/染色数 | 染色強度 |
|-----------------|----------|-------|
| 結腸癌 | 17/18 | +3~+4 |
| 結腸癌メツ (mets) | 18/18 | +3~+4 |
| 膵臓癌 | 28/33 | +1~+3 |
| さまざまな別の癌組織 | 8/18 | +1~+3 |
| 正常な結腸、膵臓および別の組織 | 0/74 | |

20

【0186】

表6. CHO細胞から精製された組み換えマウス16C3を用いた染色。

【表6】

| ヒト組織試料 | 陽性の数/染色数 | 染色強度 |
|-----------------|----------|-------|
| 結腸癌 | 45/45 | +2~+3 |
| 膵臓癌 | 24/30 | +1~+3 |
| さまざまな別の癌組織 | 116/191 | 弱い~+4 |
| 正常な結腸、膵臓および別の組織 | 22/50 | 弱い~+2 |

30

【0187】

まとめて考慮すると、これらのデータは、結腸癌(80/81)に対する95%を超える結合特異性を、膵臓癌(52/63)に対するおよそ80%~85%の結合特異性を、および別の型の癌(大部分は腺癌)に対する40~60%の結合特異性を示した。いくつかの集団の正常組織、最も注目すべきは肺組織および卵巣組織に対して幾分か交差反応があり、全体的な交差反応は約44%(22/50)であった。興味深いことに、16C3抗体に対して交差反応を示した正常なヒト組織はすべて、組み換え技術により産生された抗体を用いて実施されており(正常なヒト組織に対する交差反応は、ハイブリドーマ産生16C3を用いた場合には観察されなかった)、このことは、この交差反応が、抗体自体に関係する効果というより、CHO細胞生産過程に対する人為的な影響に関係していることを示す。

40

【0188】

実施例12. 16C3ヒト化バリエーションの試験

ネズミ16C3抗体を治療上有効なヒト化抗体に変換するための5つの異なる設計物が、図5および図6に示される。293T細胞において発現される組み換えヒト化16C3、マトリクス実験の5つのバリエーションの同時トランスフェクション。一過性トランスフェクションからの上清を、2ng/mlに標準化し、次いで、希釈し、精製された組み換え

50

マウス16C3と比較される親和性を評価し、次に、FACSによりAsPC-1膀胱腫瘍細胞に対する潜在的な抗原結合性について試験し、そして組み換えマウス16C3抗体と比較した。表7に示されたデータは、重鎖の5個のバリエーションが、4個の軽鎖バリエーションのそれぞれと共に正確に折りたたまれ、その結果抗原結合活性を得ることができたことを実際に示す。ヒト化重鎖および軽鎖のそれぞれの組み合わせの結合は、元のマウス16C3抗体による結合性と同等であった。データは、16C3免疫グロブリンを5つの異なる方法のいずれかでヒト化しても、その結果得られる抗体の抗原認識部位を変化させないことを示す。それぞれの結合性は、各組み合わせでの抗体量を用いて滴定し、それらは類似の滴定プロファイルを実際に示した。

【0189】

10

表7. 組み換えヒト化16C3のFACSデータ

【表7-1】

| 抗体試料 | AsPC-1腫瘍細胞結合 % (MFI) |
|-------------------------------------|----------------------|
| ヤギ抗マウスIgG-FITC対照 | 1.55 (70) |
| RECM16C3対照、100ng | 61.66 (228) |
| RECM16C3対照、20ng | 47.91 (69) |
| RECM16C3対照、4ng | 4.26 (52) |
| RECM16C3対照、0.8ng | 1.28 (615) |
| | |
| ウサギ抗ヒトIgG-FITC対照 | 2.05 (59) |
| (重鎖/軽鎖) | |
| Rh16C3上清 (supe) 8:VE N/VEN-100μL | 68.14 (1090) |
| Rh16C3上清8:VEN/VE N-20μL | 65.93 (240) |
| Rh16C3上清8:VEN/VE N-4μL | 46.11 (65) |

20

30

【0190】

【表 7 - 2】

| | | |
|------------------------------------|-------------|----|
| Rh16C3上清10:VEN/A BB-100 μ L | 64.19 (549) | |
| Rh16C3上清10:VEN/A BB-20 μ L | 62.24 (122) | |
| Rh16C3上清10:VEN/A BB-4 μ L | 22.10 (52) | 10 |
| | | |
| Rh16C3上清11:VEN/S DR-100 μ L | 67.99 (808) | |
| Rh16C3上清11:VEN/S DR-20 μ L | 66.45 (191) | |
| Rh16C3上清11:VEN/S DR-4 μ L | 32.30 (57) | 20 |
| | | |
| Rh16C3上清12:VEN/F RA-100 μ L | 67.22 (674) | |
| Rh16C3上清12:VEN/F RA-20 μ L | 64.11 (143) | |
| Rh16C3上清12:VEN/F RA-4 μ L | 25.65 (51) | 30 |

【0191】

【表 7 - 3】

| | | |
|------------------------------------|-------------|----|
| Rh16C3上清14:CDR/V EN-100 μ L | 62.66 (568) | |
| Rh16C3上清14:CDR/V EN-20 μ L | 59.92 (112) | |
| Rh16C3上清14:CDR/V EN-4 μ L | 16.89 (49) | 10 |
| | | |
| Rh16C3上清16:CDR/A BB-100 μ L | 64.49 (254) | |
| Rh16C3上清16:CDR/A BB-20 μ L | 49.61 (73) | |
| Rh16C3上清16:CDR/A BB-4 μ L | 5.85 (70) | 20 |
| | | |
| Rh16C3上清17:CDR/S DR-100 μ L | 68.02 (376) | |
| Rh16C3上清17:CDR/S DR-20 μ L | 54.78 (89) | |
| Rh16C3上清17:CDR/S DR-4 μ L | 10.21 (53) | 30 |
| | | |
| Rh16C3上清18:CDR/F RA-100 μ L | 61.54 (557) | |
| Rh16C3上清18:CDR/F RA-20 μ L | 57.34 (98) | |
| Rh16C3上清18:CDR/F RA-4 μ L | 17.55 (51) | 40 |

【0192】

【表 7 - 4】

| | | |
|------------------------------------|-------------|----|
| Rh16C3上清20:ABB/V EN-100 μ L | 65.72 (374) | |
| Rh16C3上清20:ABB/V EN-20 μ L | 57.34 (89) | |
| Rh16C3上清20:ABB/V EN-4 μ L | 6.39 (54) | 10 |
| | | |
| Rh16C3上清22:ABB/A BB-100 μ L | 66.31 (318) | |
| Rh16C3上清22:ABB/A BB-20 μ L | 50.30 (78) | |
| Rh16C3上清22:ABB/A BB-4 μ L | 7.63 (50) | 20 |
| | | |
| Rh16C3上清23:ABB/S DR-100 μ L | 66.33 (293) | |
| Rh16C3上清23:ABB/S DR-20 μ L | 52.12 (75) | |
| Rh16C3上清23:ABB/S DR-4 μ L | 6.58 (59) | 30 |
| | | |
| Rh16C3上清24:ABB/F RA-100 μ L | 65.15 (403) | |
| Rh16C3上清24:ABB/F RA-20 μ L | 57.63 (98) | |
| Rh16C3上清24:ABB/F RA-4 μ L | 12.29 (50) | 40 |

【0193】

【表 7 - 5】

| | | |
|------------------------------------|-------------|----|
| Rh16C3上清26:SDR/V EN-100 μ L | 67.94 (495) | |
| Rh16C3上清26:SDR/V EN-20 μ L | 62.15 (140) | |
| Rh16C3上清26:SDR/V EN-4 μ L | 12.69 (59) | 10 |
| | | |
| Rh16C3上清28:SDR/A BB-100 μ L | 66.58 (314) | |
| Rh16C3上清28:SDR/A BB-20 μ L | 54.71 (87) | |
| Rh16C3上清28:SDR/A BB-4 μ L | 8.59 (51) | 20 |
| | | |
| Rh16C3上清29:SDR/S DR-100 μ L | 67.95 (503) | |
| Rh16C3上清29:SDR/S DR-20 μ L | 61.56 (114) | |
| Rh16C3上清29:SDR/S DR-4 μ L | 15.87 (56) | 30 |
| | | |
| Rh16C3上清30:SDR/F RA-100 μ L | 65.87 (702) | |
| Rh16C3上清30:SDR/F RA-20 μ L | 64.45 (156) | |
| Rh16C3上清30:SDR/F RA-4 μ L | 29.29 (53) | 40 |

【0194】

【表 7 - 6】

| | | |
|------------------------------------|-------------|----|
| Rh16C3上清32:FRA/V EN-100 μ L | 66.03 (585) | |
| Rh16C3上清32:FRA/V EN-20 μ L | 63.64 (147) | |
| Rh16C3上清32:FRA/V EN-4 μ L | 22.69 (52) | 10 |
| | | |
| Rh16C3上清34:FRA/A BB-100 μ L | 67.38 (395) | |
| Rh16C3上清34:FRA/A BB-20 μ L | 58.89 (99) | |
| Rh16C3上清34:FRA/A BB-4 μ L | 12.30 (51) | 20 |
| | | |
| Rh16C3上清35:FRA/S DR-100 μ L | 68.01 (465) | |
| Rh16C3上清35:FRA/S DR-20 μ L | 61.35 (114) | |
| Rh16C3上清35:FRA/S DR-4 μ L | 14.23 (59) | 30 |
| | | |
| Rh16C3上清36:FRA/F RA-100 μ L | 67.88 (432) | |
| Rh16C3上清36:FRA/F RA-20 μ L | 59.15 (99) | |
| Rh16C3上清36:FRA/F RA-4 μ L | 8.68 (53) | 40 |

【0195】

実施例 13 . 組み換えヒト化 16C3 抗体の最適化および試験

加えて、コンピューター内（インシリコ）分析ツールは、タンパク質中の潜在的な T 細胞エピトープを予測する際に有用である。そのようなアルゴリズムは、ヒトにおける免疫原性が低下する公算の高い改良型組み換えタンパク質を設計するのに有用である。この予測技術の利点を用いて、5つのヒト化 16C3 重鎖および軽鎖遺伝子バリエーションが、分析され、そして特定の HLA 八口タイプを持つヒトにおける免疫原性反応を誘導する可能性がある 1つまたは複数の T 細胞エピトープを有することが示された。そのような分析は、ソフトウェア、例えばエピマー（Epimer）またはエピマトリックス（EpiMatrix）、イン

シリコ・エピトープマッピング・ツール (in silico epitope-mapping tool) を用いて行われてもよいし、あるいは商業メーカー、例えばアンチトープ社 (Antitope, Ltd. (Cambridge, UK)) により行われてもよい。潜在的な治療上の 16C3 抗体の起こりうる免疫原性を低下させるためにこれらの T 細胞エピトープを取り除く試みにおいては、結果的に完全に機能的であるが免疫原性が低い抗体分子となるような、特定の部位特異的変異が、T 細胞エピトープを取り除き、そして特定のアミノ酸を置換するために行われた。最適化されたヒト化 16C3 抗体のタンパク質配列は、図 12 に示され、太字のアミノ酸は CDR を示し、「/」はリーダーペプチド/成熟 N 末端の連結部、および可変ドメイン/定常ドメインの連結部を示す。

【0196】

h16C3 - Ab b* 抗体の遺伝子は、所望の DNA 配列を作り出すために既存のバリアント遺伝子の変異導入により作製された。次に、h16C3 - Ab b* 重鎖および軽鎖遺伝子は、哺乳動物発現プラスミド中にクローン化され、CHO 細胞にトランスフェクトされた。結果的に得られたクローンの種々の上清は、ラビット抗ヒト IgG - FITC を対照として用い、FACS により、LS174T (結腸) および CFPAC - 1 (膵臓) 腫瘍細胞に対する結合性について試験された。表 8 に示されるデータは、この最適化されたヒト化 16C3 (H16C3) 遺伝子設計が、結果として非常によい抗原認識活性を有する抗体となっていることを、実際に示す。この特定の h16C3 - Ab b* 設計は、標的抗原を発現する癌に使用するための治療上の抗体として、潜在的に低い免疫原性および/または毒性を示す、高い結合活性を有する抗体を表す。

【0197】

表 8 . ヒト化 16C3 - Ab b* トランスフェクション上清における FACS 実験の結果

【表 8】

| 抗体試料 | LS174T細胞に対する結合性 % (m f i) | CFPAC-1細胞に対する結合性 % (m f i) |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 対照 | 3. 49 (33) | 2. 10 (20) |
| H16C3-Ab b* 上清 (supe) 1 | 54. 40 (374) | 98. 62 (411) |
| H16C3-Ab b* 上清 2 | 51. 10 (299) | 97. 70 (299) |
| H16C3-Ab b* 上清 3 | 55. 20 (402) | 98. 60 (486) |
| H16C3-Ab b* 上清 4 | 53. 75 (333) | 98. 68 (371) |
| H16C3-Ab b* 上清 5 | 56. 24 (407) | 99. 14 (447) |

【0198】

h16C3 - Ab b* の ADCC 活性は、標的細胞として膵臓癌系 CFPAC - 1 および AsPC - 1 に対して試験された。メラノーマ細胞系である SK - MEL は、腫瘍細胞の特異的な対照として提供された。ADCC は、正常なヒト PBMC をエフェクター細胞として用い、一般的な 4 時間の ^{111}In 放出アッセイを用いて評価され、その結果は、

アイソタイプ放出パーセント（溶解％）として以下に示す。陰性対照抗体であるUPC-10と比べて、データは、ヒト化16C3抗体による抗体特異的な殺活性を示す。この殺活性は、メラノーマ陰性対照細胞に対する溶解が観察されなかったことから、脾臓腫瘍系に特異的であるようだ。これらのデータは、抗体の殺活性はマウス16C3抗体のヒト化を通じて改変しうることを示す。マウス16C3抗体に比べて、ヒト化16C3抗体は優れた殺活性を実際に示し、これは、最もありうることとしてマウスFc領域よりもヒトのエフェクター細胞とより効率的に相互作用しうるヒトFc領域によるものであろう。

【0199】

表9. h16C3-Abb*抗体を用いたADCCアッセイ

【表9】

| 腫瘍標的 | エフェクター : 標的の比 | 特異的なADCC活性 % (±SEM) h16C3-Abb* | 特異的なADCC活性 % (±SEM) UPC-10対照 |
|---------|------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| AsPC-1 | 100 | 32.2±0.56 | 0.4±0.38 |
| (脾臓) | 50 | 18.4±2.67 | -0.1±0.54 |
| | 25 | 14.4±1.66 | 0.2±0.36 |
| CFPAC-1 | 100 | 48.7±3.22 | 1.9±0.26 |
| (脾臓) | 50 | 40.9±4.11 | 2.6±0.49 |
| | 25 | 19.4±2.07 | 2.1±0.20 |
| SK-MEL | 100 | 0.1±1.28 | -0.6±0.18 |
| (メラノーマ) | 50 | -1.2±0.78 | -1.8±0.34 |
| | 25 | 0.1±0.2 | -1.1±0.83 |

111In標識された標的細胞、5µg/ウェルで用いられた抗体、エフェクター細胞として用いられたIL-2活性化ヒトPBMC、回収前に37℃で4時間のインキュベーション。

【0200】

実施例14. 16C3により認識されるCPAAの特性評価。

16C3抗体が結合する抗原のいくつかの特性評価は、さまざまな処理をおこなったウェスタンブロットにより試験された。表10のデータは、16C3抗原が、全部ではないが培養された大腸腫瘍細胞および脾臓腫瘍細胞のいくつかに存在することを実際に示す。重要なことは、16C3抗原が、消化管および腸から得られた胎児組織抽出物中に存在することである。分画Iの陽性標本は、膜タンパク質抽出および精製のホリンシェッド法(hollinshead method)により切断され、処理された胚組織を用いた、セファデックスG-200カラムクロマトグラフィー試行からの溶出液(分画I)を表す。大腸腫瘍標本は、外科的処置から得られた。その組織を細分化し、洗浄剤を用いて全タンパク質抽出物とした。表10は、これらの細胞抽出物のウェスタンブロットによる種々の腫瘍細胞における16C3腫瘍抗原の発現に関するデータを示す。これらのデータは、16C3腫瘍抗原が、生体の胚形成期の間、ならびに癌において発現されうることを示唆する。したがって、16C3抗原の発現は、胚組織発生中、そして癌進行中に再び発現されるように発生上制御される可能性がある。

10

20

30

40

50

【0201】

表10. さまざまな腫瘍細胞における16C3腫瘍抗原の発現。

【表10】

| 細胞系： | 16C3抗原： |
|--------------------|---------------------------|
| SW1116 (結腸直腸) | 陽性 (MW~220kDa) |
| SW480 (結腸直腸) | 陰性 |
| SW1463 (結腸直腸) | 陰性 |
| COLO205 (結腸直腸) | 陽性 (MW~220kDa) |
| CALU1 (肺) | 陰性 |
| PANC1 (膵臓) | 陰性 |
| PR22 (前立腺) | 陰性 |
| HT29 (結腸直腸) | 陽性 (MW~220kDaおよび110kDa) |
| LS174T (結腸直腸) | 陽性 (MW~220kDaおよび110kDa微量) |
| CFPAC1 (膵臓) | 陽性 (MW~220kDaおよび110kDa) |
| ASPC1 (膵臓) | 陽性 (MW~220kDaおよび110kDa) |
| ヒト組織調製： | |
| 胎児消化管、分画I、12/20/72 | 陽性 (MW~220kDaおよび110kDa) |
| 胎児腸、分画I、6/24/75 | 陽性 (MW~220kDaおよび110kDa) |
| 大腸腫瘍組織、切除された | 陽性 (MW~220kDaおよび110kDa) |

10

20

30

【0202】

大腸と膵臓の腫瘍細胞系により発現される16C3腫瘍抗原の定性的記述は、さまざまな化学的処理後のウェスタンブロット分析を用いて行われた。これらの知見は、図8~図11、そして表11に示される。

【0203】

表11. さまざまな化学的処理後のウェスタンブロット分析。

【表 1 1】

| 特徴 | 腫瘍細胞系 | | |
|------------------------------------|---|---------------------|---------------------|
| | LS174T | CFPAC | ASPC-1 |
| 上清中の抗原発現の半定量 (LS174を100%と表す) | ウェスタンブロットによる相対量100% | ウェスタンブロットによる相対量300% | ウェスタンブロットによる相対量~30% |
| 細胞ペレットにおける抗原発現の半定量 (LS174を100%と表す) | ウェスタンブロットによる相対量100% | ウェスタンブロットによる相対量200% | ウェスタンブロットによる相対量80% |
| 細胞ペレット中、に対する上清中の存在の比 | 100/20 | 100/20 | 100/20 |
| ウェスタンブロットにより決定されたSDSゲルにおける~MW | ~200kDaおよび110kDa (微量成分) | ~200kDaおよび110kDa | ~200kDaおよび110kDa |
| 還元剤DDTまたは2-MEの効果 | 抗原性または分子量における効果はない | 抗原性または分子量における効果はない | 抗原性または分子量における効果はない |
| グリコシダーゼ処理 | 抗原性は、グリコシダーゼ処理により影響を受けないが、PNGase Fは、分子量200kDaのバンドを~130kDaに低下させた。低(110kDa)バンドは、PNGase Fにより影響を受けない。 | | |
| NaOHを用いたペータ脱離 | 抗原性の喪失 | | |
| 25℃または37℃で24時間のトリプシン処理 | 抗原性は影響を受けないが、分子量は減少する (広がったブロードバンド) | | 未実施 |
| 25℃で24時間のプロテアーゼV8処理 | 抗原性は影響を受けないが、分子量は減少する (広がったブロードバンド) | | 未実施 |

10

20

30

40

【0204】

本発明は、その特定の実施形態と関連して記載されるが、さらなるモディフィケーションが可能であることは理解されよう。本出願は、一般に、本発明の本質に従う、ならびに本発明が関係する分野で既知であるかもしくは慣例で生じるような、および添付する請求の範囲の目的に従い上記の本質的特徴に適用されうるような、本開示内容からの派生を含む本発明の変法、使用または応用のいずれにも及ぶことが意図される。

【 図 1 】

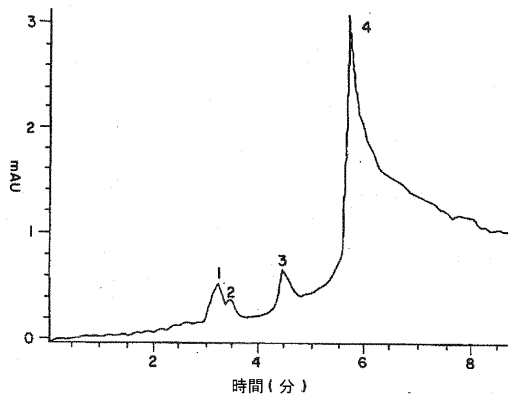


FIG. 1

【 図 2 】

16C3ハイブリドーマ・カップ軽鎖DNAの全長配列：
 GCGGGGCAGCCTCACACAGAACACACACAGATATGGGTGTAACCCACTCA
 GCTCCTGTGTGCTGGCTTACAGTCTGATGTGICAGATGTGACATCCAGAT
 GACTCAGTCTCCAGCTTCACTGTTCGATCTGTGGGAGAAACTGTACCATT
 CACATGTGGAGCAAGTGAGAATATTTACGGTGTCTTAAATTTGGTATCAGC
 GGAACAGGGAAATCTCCTCAGTCTCTGATTTATGGCCGCAAGTAATTTG
 GCAGATGGCATGTATCGAGGTTTCACTGGCAGTGGATCTGGTAGACAGTA
 TTCTCTAAGATCAGTAGCCTGCACTCTGACGATGTTGCAACGTAATCTG
 TCAAAATGTATTAAGTAGTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGG
 AAATAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCACCATCC
 AGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCTCAGTCCGTGTCTTGAACAA
 CTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAAC
 GACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAAGACAG
 CACTACAGCATGAGCAGCCTTCACTGTTGACCAAGGACAGATATGAC
 GACATAACAGCTATACCTGTGAGGCTCAACAAGACACCAACTCACCC
 ATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT
 TAGAGACAAAGTCTGAGACGCCACCAACAGCTCCCAAGCTCCATCTTA
 TCTTCCCTTCTAAGGCTTGGAGGCTTCCCAACAGGCACTACCACTGTT
 GCGGTGCTCCAAACCTCTCCCACTCTCTCTCCCTCCCTCTCTCTCTCT
 GGCTTTTATCATGCTAATATTTGCAGAAAAATTTCAATAAAGTGAAGTCTT
 GCACAAAAA (配列番号 :12)

FIG. 2

【 図 3 】

16C3ハイブリドーマ1g G重鎖DNAの全長配列：
 ACGCGGGACACAGTAGTCTCTACAGTACAGGAGTACACAGGACATTGCC
 ATGGGTGGAGCTGATCATCTTCTTCTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTG
 CACTCCAGGTCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGGTGGTGGAGCCCTGG
 GGCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGGTCCGGCTACACATCACTGATTA
 TGCTATGACTGGGTGAAGCAGAGTCACTGCAAAAGAGTCTCGAGTGGATTG
 GACTTATTAGTACTTACAGTGGTATACAAAGTACAACAGAACTTTAAG
 GGCAAGGCCAAATGACTGTAGACAAATCTTCAACACAGCCTATATGGA
 ACTTGCCAGATTGACATCTGAGGATTTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAG
 GGATATTCCGGTAGTAGTACTGGTTTGTCTACTGGGGCAAGGGACTCT
 GGTCAGTGTCTGCGAGCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGC
 CCCTGGATCTGTGCCAAACTAATCTTCAATGGTGACCTGGGATGCCTGGT
 CAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTACAGTGAACCTGGAACTCTGGATCCC
 TGTCCAGCGGTGTGACACCTTCCCACTGCTCTGACTGTGACCTCTACA
 CTCTGAGCAGCTCAGTACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCACGGAGACC
 GTCACTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAA
 AATTGTGCCAGGATTTGGTGTGAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGA
 AGTATCATCTGTCTTCACTTCCCCCAAAGCCAAAGGATGTGCTCACCAT
 TACTCTGACTCTCAAGTCACTGTGTGTGGTAGACATCAGCAAGGATG
 ATCCCGAGGTCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACA
 GCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCACAGCCTTCCGCTCAGT
 CAGTGAACCTCCATATGCAACAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTCA
 AATGCAAGGTTCAACAGTGCAGCTTCCCTGCCCATCGAGAAAACCATC
 TCCAAAACCAAGGAGCAGACCAAGGCTCCACAGGTGACACCATCCACC
 TCCCAAGGAGCAGATGGCAAGGATAAAGTCACTGCTGACTGCATGATAA
 CAGACTCTTCCCTGAAGACATTAAGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAG
 CCAGCGGAGAACTACAAGAACTCAGCCATCATGGACACAGATGGCTC
 TTACTTCGCTACAGCAAGCTCAATGTGCAAGAACTGGGAGGAGCAG
 GAAATACTTTACCTGCTCTGTGTACATGAGGGCCTGCACAAACCATTA
 CTGAGAAAGCCTTCCCACTTCCCTGGTAAAZGATCCCAAGTGTCTTGA
 GCCCTGTGGCCCTACAGGACTTTGACACCTACCTCCACCCCTCCCTGTATA
 AATAAAGCACCCAGCAGCTGCTCCGGACCTGCATAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAA (配列番号 :13)

FIG. 3

【 図 4 】

LMTQSPASLSASVGETVITTCGASENIYALNWKYORKQKSPQLLIYGASNL
 ADGMSSRFSGSGSRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNVLSSPYTFGGGKLEIK
 KG (配列番号 :14)

FIG. 4

【 図 5 】

LEESGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTFDYAMHWKQSHAKSLEWIGLISTYS
 GDTKYNONFKGKATMTVDKSSNTAYMELARLTSEDSAIYFCARGDYSGSR
 YWFAYWGQGTIVR (配列番号 :15)

FIG. 5

【 図 6 】

VL:

| | | | | | | | | | |
|---------|-------------------------|-----------|--------|----------------|-----|----|----|----|----|
| | 10 | 20 | 27 | abc | def | 30 | 35 | 40 | 49 |
| 16C3 | DIQMTQSPASLSASVGETVITTC | GASE----- | NIYALN | WYORKQKSPQLLIY | | | | | |
| ven16C3 | DIQMTQSPASLSASVDRVITTC | GASE----- | NIYALN | WYORKPKSPKLLIY | | | | | |
| cdr16C3 | DIQMTQSPASLSASVDRVITTC | GASE----- | NIYALN | WYORKPKSPKLLIY | | | | | |
| abl16C3 | DIQMTQSPASLSASVDRVITTC | QASE----- | NIYALN | WYORKPKSPKLLIY | | | | | |
| sdr16C3 | DIQMTQSPASLSASVDRVITTC | QASE----- | NIYALN | WYORKPKSPKLLIY | | | | | |
| fra16C3 | DIQMTQSPASLSASVDRVITTC | GASE----- | NIYALN | WYORKPKSPKLLIY | | | | | |

| | | | | | |
|---------|---------|---------------------------------|-------------|----|----|
| | 60 | 70 | 80 | 88 | 95 |
| | | | | | ab |
| 16C3 | GASNLAD | GMSSRFSGSGSRQYSLKISSLHPDDVATYYC | QNVLSSP--YT | | |
| ven16C3 | GASNLAD | GMSSRFSGSGSRQYSLKISSLHPDDVATYYC | QNVLSSP--YT | | |
| cdr16C3 | GASNLAD | GMSSRFSGSGSRQYSLKISSLHPDDVATYYC | QNVLSSP--YT | | |
| abl16C3 | GASNLAT | GMSSRFSGSGSRQYSLKISSLHPDDVATYYC | QNVLSSP--YT | | |
| sdr16C3 | GASNLAT | GMSSRFSGSGSRQYSLKISSLHPDDVATYYC | QNVLSSP--YT | | |
| fra16C3 | GASNLAD | GMSSRFSGSGSRQYSLKISSLHPDDVATYYC | QNVLSSP--YT | | |

| | | |
|---------|-----------------------|-----|
| | 98 | 107 |
| | | |
| 16C3 | FGGGTKLEIK (配列番号:16) | |
| ven16C3 | FGGGTKLEIK (配列番号:17) | |
| cdr16C3 | FGGGTKLEIK (配列番号:18) | |
| abl16C3 | FGGGTKLEIK (配列番号:19) | |
| sdr16C3 | FGGGTKLEIK (配列番号:20) | |
| fra16C3 | FGGGTKLEIK (配列番号:21) | |

FIG. 6

【 図 7 】

```

VH:
      10      20      30 ab  35  40  49
16C3  QVQLQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYTF --DYAMH WVKQSHAKSLEWIG
ven16C3 QVQLWQSGAEVKKPGASVKVSKCKGSGYTF --DYAMH WVRQAPGQGLEWIG
cdr16C3 QVQLWQSGAEVKKPGASVKVSKCKGSGYTF --DYAMH WVRQAPGQGLEWIG
abb16C3 QVQLWQSGAEVKKPGASVKVSKCKGSGYTF --DYAMH WVRQAPGQGLEWIG
sdr16C3 QVQLWQSGAEVKKPGASVKVSKCKGSGYTF --DYAMH WVRQAPGQGLEWIG
fra16C3 QVQLWQSGAEVKKPGASVKVSKCKGSGYTF --DYAMH WVRQVHAQGLEWIG

      52abc  60  66  70      82abc  90  94
16C3  LIST--YSGDTRYNQNFKG KATMTVDKSSNTAYMELARLTSEDSAIYYCAR
ven16C3 LIST--YSGDTRYNQNFKG KATMTVDKSSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
cdr16C3 LIST--YSGDTRYNQNFKG KATMTVDKSSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
abb16C3 LIST--YSGDTRYNQNFKG KATMTVDKSSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
sdr16C3 LIST--YSGDTRYNQNFKG KATMTVDKSSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
fra16C3 LIST--YSGDTRYNQNFKG KATMTVDKSSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR

      100abcdefghij 103      113
16C3  GDYSGSRYWF-----AY WCGGTLVTVSA (配列番号:22)
ven16C3 GDYSGSRYWF-----AY WCGGTLVTVSS (配列番号:23)
cdr16C3 GDYSGSRYWF-----AY WCGGTLVTVSS (配列番号:24)
abb16C3 GDYSGSRYWF-----AY WCGGTLVTVSS (配列番号:25)
sdr16C3 GDYSGSRYWF-----AY WCGGTLVTVSS (配列番号:26)
fra16C3 GDYSGSRYWF-----AY WCGGTLVTVSS (配列番号:27)

```

FIG. 7

【 図 8 】

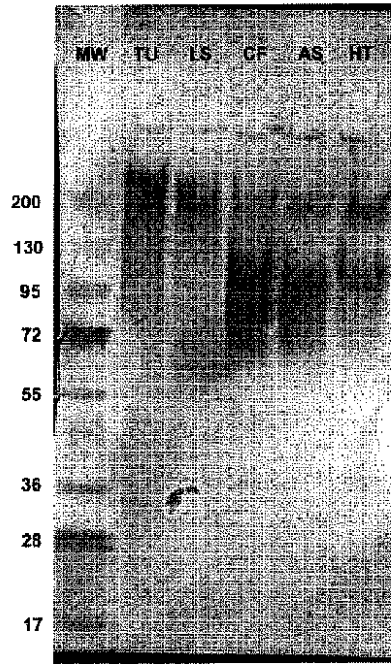


FIG. 8

【 図 9 】

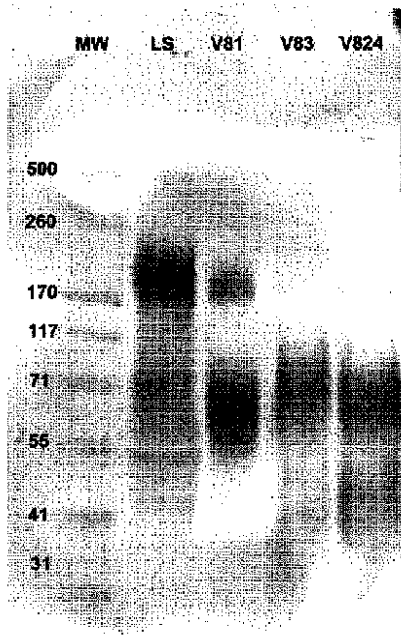


FIG. 9

【 図 10 】

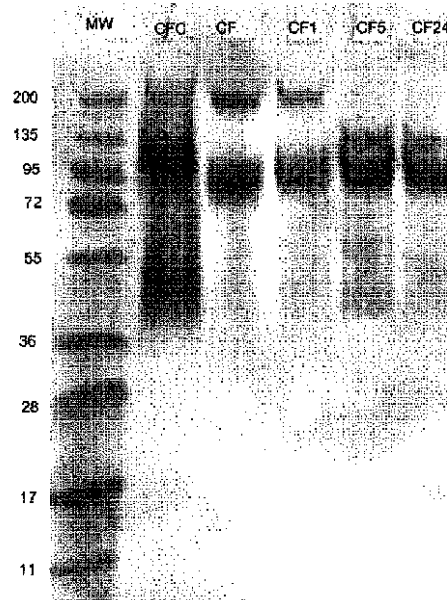


FIG. 10

【 図 1 1 】

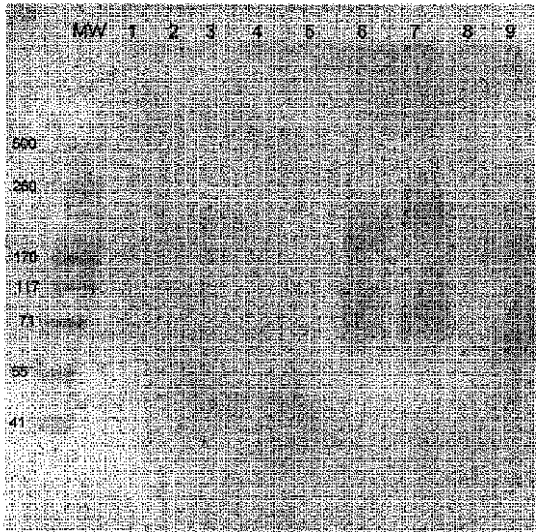


FIG. 11

【 図 1 2 】

H16C3-Abb* 重鎖 :

MGWSCIIFFLVATATGVHS/QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDY
AMHWVRQAPGQRLEWMGLISTYSGDTKYNONFOGRVTMTVDKSASTAY
 MELSSLRSEDTAVYYCARGDYSGSRYWFAYWGQGLTVTVSS/ASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHFTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIIS
 KAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK (配列番号 :28)

H16C3-Abb* 軽鎖 :

MGVPTQLLLWLTVVVVRC/DIQMTQSPSSLASVGDRTVITTCQASENIYGAL
 NWYQRKPGKSPKLLIYGASNLATGMPSRFSGSGSIDYFTISSLQPEDIATY
 YC
QQVLSSPYTFGGGKLEIKR/TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYP
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLISKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 :29)

FIG. 12

【 配列表 】

2011502517000001.xml

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成22年5月10日 (2010.5.10)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2011502517000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | テーマコード(参考) |
|-------------|------------------|----------------|------------|
| A 6 1 P | 1/18 (2006.01) | A 6 1 P 1/18 | |
| A 6 1 P | 1/00 (2006.01) | A 6 1 P 1/00 | |
| C 0 7 K | 16/32 (2006.01) | C 0 7 K 16/32 | Z N A |
| C 1 2 P | 21/08 (2006.01) | C 1 2 P 21/08 | |
| C 1 2 N | 1/15 (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | |
| C 1 2 N | 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N | 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | |
| C 1 2 N | 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 | 1 0 1 |
| G 0 1 N | 33/531 (2006.01) | G 0 1 N 33/531 | A |

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

(74)代理人 100144923

弁理士 中川 将之

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(72)発明者 ジェイ・アンドリュー・プリストル

アメリカ合衆国 2 0 8 1 4 メリーランド州ベセスダ、ダンベリー・ロード 5 3 0 3 番

(72)発明者 ジュディス・エイ・カンター

アメリカ合衆国 2 0 8 5 0 メリーランド州ロックビル、ラークスパー・テラス 1 0 9 6 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA45 CA01 DA02

4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA05 DA14

4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 BA02 BA08 CA25 CA44 CA46

4C085 AA14 AA16 BB31 CC23 DD62 EE01 GG02 GG03 GG04 HH03

HH11 JJ02 JJ03 KA05 KA27 KA29 LL18

4H045 AA11 AA30 BA09 BA41 CA40 DA76 EA20 EA51 FA74

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 针对结肠癌和胰腺癌以及相应抗原的重组单克隆抗体 | | |
| 公开(公告)号 | JP2011502517A | 公开(公告)日 | 2011-01-27 |
| 申请号 | JP2010533279 | 申请日 | 2008-11-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 新的转基因扫描肿瘤有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 新的转基因扫描肿瘤有限公司 | | |
| [标]发明人 | ジェイアンドリユー・プリストル ジュディス・エイ・カンター | | |
| 发明人 | ジェイ・アンドリユー・プリストル ジュディス・エイ・カンター | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 A61K39/395 A61K51/00 A61K49/00 A61P35/00 A61P1/18 A61P1/00 C07K16/32 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/531 | | |
| CPC分类号 | A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/18 A61K47/6859 A61K47/6863 C07K16/303 C07K2317/24 C07K2317/32 A61K39/39558 A61K45/06 C07K16/18 C07K16/3046 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/52 C07K2317/565 G01N33/57419 G01N33/57438 G01N33/577 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.A A61K39/395.T A61K49/02.A A61K49/00.A A61P35/00 A61P1/18 A61P1/00 C07K16/32.ZNA C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 G01N33/531.A | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/CA01 4B024/DA02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB31 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/JJ02 4C085/JJ03 4C085/KA05 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 田中，三夫 山崎 宏 富田健二 中川正幸 | | |
| 优先权 | 60/996255 2007-11-08 US | | |
| 其他公开文献 | JP5710978B2 JP2011502517A5 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供一种重组单克隆抗体，其与人结肠直肠癌和胰腺癌相关抗原结合，并且包含编码所述抗体链的核酸序列和对应于所述核酸的氨基酸序列，核酸和氨基酸。

| 腫瘍細胞系 | 細胞染色 % (m f i) | |
|------------|----------------|-----------------------|
| | FITC-Abのみ | Rockland 16 C3-E12 |
| LS174T結腸直腸 | 0.94 (15) | 40.56 (59) |
| HT-29結腸直腸 | 0.84 (10) | 90.99 (78) |
| CFPAC-1膵臓 | 0.83 (14) | 96.19 (323) |
| AsPC-1膵臓 | 2.68 (30) | 69.90 (36) |
| 22Rv-1前立腺 | 2.74 (61) | 1.62 (30) |
| PC-3前立腺 | 0.28 (20) | 2.44 (22) |
| H226扁平上皮 | 0.90 (18) | 0.62 (14) |
| SiHa扁平上皮 | 1.07 (19) | 1.08 (20) |