

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-145380

(P2015-145380A)

(43) 公開日 平成27年8月13日(2015.8.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/26 (2006.01)	C07K 16/26 ZNA	4B024
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B064
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045

審査請求 有 請求項の数 28 O L 外国語出願 (全 116 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-42849 (P2015-42849)
 (22) 出願日 平成27年3月4日 (2015.3.4)
 (62) 分割の表示 特願2012-533531 (P2012-533531) の分割
 原出願日 平成22年10月15日 (2010.10.15)
 (31) 優先権主張番号 61/252,625
 (32) 優先日 平成21年10月16日 (2009.10.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500287019
 レ ラボラトワール セルヴィエ
 フランス国、エフー92284 シュレス
 ネ・セデックス、リュ・ドゥ・ヴェルダン
 35
 (71) 出願人 591100596
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
 サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
 ディカル
 フランス国、エフー75013 パリ、リ
 ユ・ドゥ・トルビアック 101

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロガストリンに対するモノクローナル抗体及びその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 動物(ヒトを含む)において結腸直腸癌(CRC)を診断及び/又は処置するために有用な組成物及び方法の提供。

【解決手段】 プロガストリンモノクローナル抗体、そのフラグメント、プロガストリンモノクローナル抗体を含む組成物並びにそれらの作製法、該抗体及び該抗体又はそのフラグメントを含む組成物を用いて結腸直腸癌を処置する方法、及び結腸直腸癌を診断する方法並びに結腸直腸癌に苦しむ被験者において抗癌治療の効力をモニタリングする方法を含む、プロガストリンの検出を含む方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトプロガストリン (hPG) に特異的に結合する、モノクローナル抗体。

【請求項 2】

hPG の N 末端領域に特異的に結合する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

配列番号 25 に相当するアミノ酸配列を有するペプチド抗原を含む免疫原を使用して入手可能である、請求項 2 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

hPG と、43B9G11、WE5H2G7、6B5B11C10、20D2C3G2、1E9A4A4、1E9D9B6、1C8D10F5、1A7C3F11、1B3B4F11、及び 1C11F5E8 からなる群より選択されるハイブリドーマから入手可能な参照抗 hPG モノクローナル抗体との結合について競合する、請求項 2 記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 5】

43B9G11、WE5H2G7、6B5B11C10、20D2C3G2、1E9A4A4、1E9D9B6、1C8D10F5、1A7C3F11、1B3B4F11、及び 1C11F5E8 からなる群より選択されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体の V_L 及び V_H CDR に配列において相当する V_L 及び V_H の CDR を含む、請求項 2 記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項 6】

V_L 及び V_H CDR 配列の以下の群：

【表 30】

- (i) V_H CDR1.3, V_H CDR 2.3, V_H CDR 3.3, V_L CDR 1.3, V_L CDR 2.3, 及び V_L CDR 3.3;
- (ii) V_H CDR 1.4, V_H CDR 2.4, V_H CDR 3.4, V_L CDR 1.4, V_L CDR 2.4, 及び V_L CDR 3.4;
- (iii) V_H CDR 1.16, V_H CDR 2.16, V_H CDR 3.16, V_L CDR 1.16, V_L CDR 2.16, 及び, V_L CDR 3.16; 及び
- (iv) V_H CDR 1.19, V_H CDR 2.19, V_H CDR 3.19, V_L CDR 1.19, V_L CDR 2.19, 及び V_L CDR 3.19

30

の 1 つより選択される配列を有する V_L 及び V_H CDR を含む、請求項 2 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

ヒト化されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

40

【請求項 8】

V_H 及び V_L 配列の以下の群：

【表 3 1】

- (i) hV_H 3 (配列番号 21) 及び hV_L 3 (配列番号 22);
- (ii) hV_H 4 (配列番号 23) 及び hV_L 4 (配列番号 24);
- (iii) hV_H 16a (配列番号 84) 及び hV_L 16a (配列番号 85);
- (iv) hV_H 16b (配列番号 86) 及び hV_L 16b (配列番号 87);
- (v) hV_H 16c (配列番号 88) 及び hV_L 16c (配列番号 89);
- (vi) hV_H 19a (配列番号 90) 及び hV_L 19a (配列番号 91);
- (vii) hV_H 196b (配列番号 92) 及び hV_L 19b (配列番号 93); 及び
- (viii) hV_H 19c (配列番号 94) 及び hV_L 19c (配列番号 95)

10

の 1 つより選択される配列を有する V_H 及び V_L 鎖を含む、請求項 7 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

h P G の C 末端領域に特異的に結合する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 10】

配列番号 27 に相当するアミノ酸配列を有するペプチド抗原を含む免疫原を使用して入手可能である、請求項 9 記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項 11】

h P G と、1 B 4 A 1 1 D 1 1、1 B 6 A 1 1 F 2、1 B 1 1 E 4 B 1 1、1 C 1 0 D 3 B 9、1 D 8 F 5 B 3、1 E 1 C 7 B 4、2 B 4 C 8 C 8、2 B 1 1 E 6 G 4、2 C 6 C 3 C 7、2 H 9 F 4 B 7、1 F 1 1 F 5 E 1 0、1 F 1 1 F 5 G 9、及び 1 A 1 1 F 2 C 9 からなる群より選択されるハイブリドーマから入手可能な参照抗 h P G モノクローナル抗体との結合について競合する、請求項 9 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 12】

1 B 4 A 1 1 D 1 1、1 B 6 A 1 1 F 2、1 B 1 1 E 4 B 1 1、1 C 1 0 D 3 B 9、1 D 8 F 5 B 3、1 E 1 C 7 B 4、2 B 4 C 8 C 8、2 B 1 1 E 6 G 4、2 C 6 C 3 C 7、2 H 9 F 4 B 7、1 F 1 1 F 5 E 1 0、1 F 1 1 F 5 G 9、及び 1 A 1 1 F 2 C 9 からなる群より選択されるハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体の V_L 及び V_H C D R に配列において相当する V_L 及び V_H C D R を含む、請求項 9 記載のモノクローナル抗体。

30

【請求項 13】

V_H 及び V_L C D R 配列の以下の群：

【表 3 2】

- (i) V_H CDR 1.8, V_H CDR 2.8, V_H CDR 3.8, V_L CDR 1.8, V_L CDR 2.8, 及び V_L CDR 3.8; 及び
- (ii) V_H CDR 1.13, V_H CDR 2.13, V_H CDR 3.13, V_L CDR 1.13, V_L CDR 2.13, 及び V_L CDR 3.13

40

の 1 つより選択される配列を有する V_H 及び V_L C D R を含む、請求項 9 のモノクローナル抗体。

【請求項 14】

ヒト化されている、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 15】

V_H 及び V_L 配列の以下の群：

50

【表 3 3】

- (i) hV_H 8a (配列番号 75) 及び hV_L 8a (配列番号 76);
- (ii) hV_H 8b (配列番号 77) 及び hV_L 8b (配列番号 78);
- (iii) hV_H 8c (配列番号 79) 及び hV_L 8c (配列番号 76);
- (iv) hV_H 13a (配列番号 80) 及び hV_L 13a (配列番号 81); 及び
- (v) hV_H 13b (配列番号 82) 及び hV_L 13b (配列番号 83)

10

の 1 つより選択される配列を有する V_H 及び V_L 鎖を含む、請求項 1 4 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 6】

約 1 pM ~ 約 7 nM の範囲内の親和性を有する、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 7】

配列番号 2 8、2 9、3 0、3 1、及び 3 2 からなる群より選択される配列に相当するアミノ酸配列を含むエピトープに結合する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 8】

配列番号 3 3、3 4、3 5、及び 3 6 からなる群より選択される配列に相当するアミノ酸配列を含むエピトープに結合する、請求項 1、及び 9 ~ 1 5 のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項 1 9】

h P G と、抗 h P G M A b 1、抗 h P G M A b 2、抗 h P G M A b 3、抗 h P G M A b 4、抗 h P G M A b 1 5、抗 h P G M A b 1 6、抗 h P G M A b 1 7、抗 h P G M A b 1 8、抗 h P G M A b 1 9、及び抗 h P G M A b 2 0 からなる群より選択される参照抗体との結合について競合する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 2 0】

h P G と、抗 h P G M A b 5、抗 h P G M A b 6、抗 h P G M A b 7、抗 h P G M A b 8、抗 h P G M A b 9、抗 h P G M A b 1 0、抗 h P G M A b 1 1、抗 h P G M A b 1 2、抗 h P G M A b 1 3、抗 h P G M A b 1 4、抗 h P G M A b 2 1、抗 h P G M A b 2 2、及び抗 h P G M A b 2 3 からなる群より選択される参照抗体との結合について競合する、請求項 1、及び 9 ~ 1 5 のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

30

【請求項 2 1】

L S 1 7 4 T 細胞を用いて行ったインビトロアッセイにおいて h P G 活性を中和する、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項記載のモノクローナル抗体ならびに賦形剤、担体、及び/又は希釈剤を含む、組成物。

40

【請求項 2 3】

医薬的使用のために製剤化される、請求項 2 2 記載の組成物。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項記載の抗 h P G モノクローナル抗体についての可変軽鎖 (V_L) をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項記載の抗 h P G モノクローナル抗体についての可変重鎖 (V_H) をコードする、ポリヌクレオチド。

50

【請求項 26】

請求項 1 記載の抗 h P G モノクローナル抗体についての可変軽鎖 (V_L) をコードするポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 27】

請求項 1 記載の抗 h P G モノクローナル抗体についての可変重鎖 (V_H) をコードするポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項記載の抗 h P G モノクローナル抗体を発現させるために適したポリヌクレオチドの対を用いて形質転換した宿主細胞。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項記載の抗 h P G モノクローナル抗体を分泌することが可能なハイブリドーマ。

10

【請求項 30】

以下：

【表 34】

43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11,
1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7,
1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10,
1F11F5G9, 及び 1A11F2C9

20

からなる群より選択される、請求項 29 記載のハイブリドーマ。

【請求項 31】

以下：

【表 35】

43B9G11, WE5H2G7, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1D8F5B3, 1E1C7B4,
2B4C8C8, 2B11E6G4, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1C11F5E8,
1F11F5E10, 1F11F5G9, 及び 1A11F2C9

30

からなる群より選択される、請求項 29 記載のハイブリドーマ。

【請求項 32】

1 B 4 A 1 1 D 1 1、1 B 6 A 1 1 F 2、1 B 1 1 E 4 B 1 1、2 B 4 C 8 C 8、2 B 1 1 E 6 G 4、及び 1 E 9 A 4 A 4 からなる群より選択される、請求項 29 記載のハイブリドーマ。

【請求項 33】

抗 h P G モノクローナル抗体を得る方法であって、以下：

(a) 請求項 29 記載のハイブリドーマを適した条件下で培養すること、及び
(b) 培養培地又はハイブリドーマ細胞から抗 h P G モノクローナル抗体を回収することを含む、方法。

40

【請求項 34】

被験体に、結腸直腸癌を処置するために効果的なヒト化中和抗 h P G モノクローナル抗体の量を投与することを含む、結腸直腸癌を処置する方法。

【請求項 35】

中和抗 h P G モノクローナル抗体が、

【表 3 6】

43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10,
 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4,
 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5,
 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, 及び 1A11F2C9

からなる群より選択されるハイブリドーマから入手可能な抗 h P G モノクローナル抗体との結合について競合する、請求項 3 4 記載の方法。

10

【請求項 3 6】

中和抗 h P G モノクローナル抗体が、

【表 3 7】

抗 hPG MAb1, 抗 hPG MAb2, 抗
 hPG MAb3, 抗 hPG MAb4, 抗 hPG MAb5, 抗 hPG MAb6, 抗 hPG MAb7, 抗
 hPG MAb8, 抗 hPG MAb9, 抗 hPG MAb10, 抗 hPG MAb11, 抗 hPG MAb12,
 抗 hPG MAb13, 抗 hPG MAb15, 抗 hPG MAb16, 抗 hPG MAb17, 抗 hPG
 MAb18, 抗 hPG MAb19, 抗 hPG MAb20, 抗 hPG MAb21, 抗 hPG MAb22, 又は
 抗 hPG MAb23

20

からなる群より選択される抗 h P G モノクローナル抗体の C D R に配列において相当する C D R を有する、請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 7】

中和抗 h P G モノクローナル抗体に結腸直腸腫瘍細胞を曝露させることを含む、結腸直腸腫瘍細胞の増殖を阻害する方法。

【請求項 3 8】

中和抗 h P G モノクローナル抗体が、

30

【表 3 8】

43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10,
 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4,
 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11,
 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, 及び 1A11F2C9

からなる群より選択されるハイブリドーマから入手可能な抗 h P G モノクローナル抗体との結合について競合する、請求項 3 7 記載の方法。

40

【請求項 3 9】

中和抗 h P G モノクローナル抗体が、

【表 3 9】

抗 hPG MAb1, 抗 hPG MAb2, 抗 hPG MAb3, 抗 hPG MAb4, 抗 hPG MAb5, 抗 hPG MAb6, 抗 hPG MAb7, 抗 hPG MAb8, 抗 hPG MAb9, 抗 hPG MAb10, 抗 hPG MAb11, 抗 hPG MAb12, 抗 hPG MAb13, 抗 hPG MAb15, 抗 hPG MAb16, 抗 hPG MAb17, 抗 hPG MAb18, 抗 hPG MAb19, 抗 hPG MAb20, 抗 hPG MAb21, 抗 hPG MAb22, 又は 抗 hPG MAb23

10

からなる群より選択される抗 h P G モノクローナル抗体の C D R に配列において相当する C D R を有する、請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 4 0】

インビトロで行われる、請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 4 1】

インビボで行われる、請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 4 2】

請求項 2 記載の N 末端抗 h P G モノクローナル抗体及び h P G の C 末端領域に特異的に結合する抗体を含む、h P G を検出するために有用なキット。

20

【請求項 4 3】

h P G の C 末端領域に特異的に結合する抗体がポリクローナル抗体である、請求項 4 2 記載のキット。

【請求項 4 4】

請求項 9 記載の C 末端抗 h P G モノクローナル抗体及び h P G の N 末端領域に特異的に結合する抗体を含む、h P G を検出するために有用なキット。

【請求項 4 5】

h P G の N 末端領域に特異的に結合する抗体がポリクローナル抗体である、請求項 4 4 記載のキット。

【請求項 4 6】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体を使用して、被験者からの血清サンプル中のプロガストリンの量を定量化することを含み、それにおいて約 2 0 ~ 4 0 0 pM の範囲のプロガストリンの量が結腸直腸癌を示す、被験体において結腸直腸癌を診断する方法。

30

【請求項 4 7】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体を使用して、結腸直腸癌を伴う患者からの血清サンプル中のプロガストリンの量を定量化することを含み、それにおいて約 2 0 ~ 4 0 0 pM の範囲のプロガストリンの量が抗 h P G 治療についての適切性を示す、抗 h P G 治療のために適した患者を選択する方法。

【請求項 4 8】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体を使用して、時間の関数として、結腸直腸癌のための処置を受けている被験者の血中プロガストリンレベルを定量化することを含み、そこで被験者の血清中プロガストリンレベルにおける時間依存的な減少が処置が効果的であることを示す、結腸直腸癌処置の有効性をモニタリングする方法。

40

【請求項 4 9】

プロガストリン依存性シグナル伝達を阻害するために効果的な中和抗 P G モノクローナル抗体の量を用いて h P G を分泌する細胞を曝露することを含み、細胞中のプロガストリン依存性シグナル伝達カスケードを阻害する方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

1. 関連出願の相互参照

本願では、2009年10月16日を出願された仮出願の35 U.S.C. § 119(e)の下での利益を主張し、その全ての内容が、参照により、その全体において本明細書に組み入れられる。

【0002】

2. 連邦支援研究に関する記述

なし。

【0003】

3. 共同研究契約の当事者

なし。

【0004】

4. 配列表、表、又はコンピュータープログラムの参照

配列表が本明細書と共に含まれる。

【0005】

5. 発明の属する技術分野

本開示は、とりわけ、プロガストリンに対するモノクローナル抗体、そのような抗体を作製するための組成物及び方法、ならびに、例えば結腸直腸癌の診断及び/又は処置においてそのような抗体を使用する方法に向けられる。

【0006】

6. 背景

結腸直腸癌(CRC)は主要な公衆衛生の問題であり、毎年100万人を超える人々に罹患し、毎年50万人を超える死亡の主な原因となる。CRCは、癌による第2位の死亡原因である。米国だけでも、2009年には、およそ147,000の新たな症例及び49,900を上回るCRCによる死亡が報告された。3形態：散発性CRC；遺伝性非ポリポーシス大腸癌(HNPCC)(DNAミスマッチ修復遺伝子中の生殖系列変異を原因とする)；及び家族性腺腫性ポリポーシス(FAP)(APC遺伝子中の生殖系列変異による)のCRCがある。散発的CRCが症例の85%近くを占め、HNPCCが約5%を占め、FAPが約1%を占める(Heyer et al., 1999, Oncogene 18: 5325-5333)。

【0007】

CRCの臨床管理は、典型的には、化学療法をしばしば伴う、腫瘍の外科的切除を含む。現在、CRC患者の約50%が、診断の5年以内に死亡する。信頼できるスクリーニングテストの欠如及び現在利用可能な治療の無効性が、高い死亡率の主要な原因である。CRCを診断するための新たな臨床アプローチ、ならびに、本来なら健常である組織に最小限の有害作用を有する結腸直腸癌腫瘍に対して効果的な処置についての緊急の必要性がある。

【0008】

7. 要約

本願は、動物(ヒトを含む)において結腸直腸癌(CRC)を診断及び/又は処置するために有用な組成物及び方法を提供する。本願に記載する種々の発明は、部分的には、プロガストリン(PG)、例えば、ヒトプロガストリン(hPG)(CRC腫瘍細胞により産生されるポリペプチド)に特異的に結合し、CRCのインビトロモデルにおいて抗増殖特性を示すモノクローナル抗体の出願人の発見に基づく。

【0009】

プロガストリンが結腸直腸腫瘍細胞により産生され、細胞の正常な分化プロセス(細胞死に導くそれらのプロセスを含む)を遮断するシグナル伝達経路を引き起こすことにより、これらの細胞の増殖を刺激すると考えられる。プロガストリンをコードするガストリン遺伝子転写物の枯渇が、インビトロ及びインビボCRCモデルにおいて腫瘍細胞の細胞分化及びプログラム細胞死を誘導し、腫瘍細胞増殖を低下させる。操作の任意の理論により

10

20

30

40

50

拘束されることを意図しないが、PGの結合を通じて、抗hPG抗体は、そのシグナル伝達パートナーと相互作用するその能力を遮断又は阻害すると考えられる。これは、次に、本来なら増殖に導きうる、結腸直腸腫瘍細胞におけるシグナル伝達経路を阻害する。

【0010】

したがって、一局面において、本開示は、PG、例えば、hPGに特異的に結合するが、しかし、ガストリン遺伝子の他の産物には結合しないモノクローナル抗体を提供する。図1を参照し、ガストリン遺伝子は、101アミノ酸ポリペプチド(プレプロガストリンと呼ばれる)に翻訳され、それは、切断され、プロガストリン(80アミノ酸ポリペプチド)を生じるシグナル配列(下線)を含む。プロガストリンは、順に、切断され、34アミノ酸産物(プロガストリンの残基38~71に相当する)を生成し、それは、次に、そのカルボキシ末端でグリシン残基を用いて伸長され、グリシン伸長G34(「G34-Gly」)を生成する。この切断の副産物は、5アミノ酸ペプチド(C末端隣接ペプチド又はCTFPと呼ばれる)であり、プロガストリンの残基75~80を含む。G34-Glyは次にさらに切断され、17残基ポリペプチド(プロガストリンの残基55~71に配列において相当し、G17-Glyとして言及される)を生成する。G34-Gly及びG17-GlyのC末端グリシンの除去、それに続くC末端アミド化は、それぞれG34及びG17をもたらし、その両方がC末端アミド化される。このように、プロガストリンの最初の37残基はそれに固有であり(即ち、そのプロセシング産物、例えばG34、G34-Gly、G17、G17-Gly、又はCTFPなどに存在しない)、残基38~80もガストリン遺伝子の翻訳後産物中に存在する。

10

20

【0011】

出願人は、抗PGモノクローナル抗体を当業者に公知の方法を使用して産生させることができ、抗原の選択が重要であることを発見している。hPGに由来する全ての抗原が、生理学的条件下でhPGに特異的に結合するモノクローナル抗体の産生を刺激するわけではない。以下に記載する通り、hPGに対するポリクローナル抗体を産生するために使用される種々の抗原、例えば全長組換えヒトプロガストリン(例、Singh WO 08/076454を参照のこと)及びhPGのC末端の最後の10アミノ酸に相当するペプチド(例、Hollande WO 07/135542を参照のこと)などは、抗hPGモノクローナル抗体を生成しなかった。出願人は、しかし、hPGに特異的に結合するモノクローナル抗体を生成するために使用することができるhPG配列内の抗原性N及びC末端配列を発見している。非常に驚くべきことに、出願人は、PGに特異的に結合するが、他のガストリン遺伝子由来産物には結合しないモノクローナル抗体を得るために、抗原配列を、それに固有であるPG配列のストレッチに限定する必要がないことを発見している。ガストリン遺伝子の他の産物(例えば、G17、G34、及びCTFP)と共通の配列を有するペプチド抗原は、hPGに結合するだけでなく、それに特異的に結合するモノクローナル抗体をもたらした。

30

40

【0012】

出願人は、hPG分子の異なる領域に由来する抗原を使用してモノクローナル抗体を生成している。hPGのN末端領域に相当する配列を有する、及び/又はhPGのN末端領域に結合するペプチド抗原を使用して入手可能なモノクローナル抗PG抗体は、本明細書において「N末端抗hPGモノクローナル抗体」として言及される。N末端抗PGモノクローナル抗体を得るために有用な免疫原を構築するために使用することができる特定の例示的な抗原性領域は、hPGの残基1~14:SWKPRSQQPDAPLG(配列番号25)に相当する。N末端抗PGモノクローナル抗体を得るために有用なこの抗原を含む例示的な免疫原が、表1A及び実施例セクションに記載されている。

【0013】

hPGのC末端領域に相当する配列を有する、及び/又はhPGのC末端領域に結合するペプチド抗原を使用して入手可能なモノクローナル抗PG抗体は、本明細書において「C末端抗hPGモノクローナル抗体」として言及される。C末端抗PGモノクローナル抗体を得るために有用な免疫原を構築するために使用することができる特定の例示的な抗原

50

性領域は、hPGの残基55～80：QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN（配列番号27）に相当する。C末端抗PGモノクローナル抗体を得るために有用なこの抗原を含む例示的な免疫原が、表1B及び実施例セクションに記載されている。

【0014】

一部の使用のために、hPGへの高親和性を伴う抗hPGモノクローナル抗体を有することが望ましい。特定の使用（例えば治療的使用など）のために、少なくとも約100nMの親和性が望ましいが、より大きな親和性、例えば、少なくとも約90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.1nM、0.01nM、又はそれより大きな親和性を有する抗体が望ましいであろう。本明細書に開示する種々の特定の例示的な抗PGモノクローナル抗体は、 $10^{-6}M \sim 10^{-12}M$ の範囲の親和性を示す（表6を参照のこと）。特定の所望の適用のために特に適した親和性を有する抗PGモノクローナル抗体は、これらの内から容易に選択することができる、あるいは、本明細書に記載する種々の免疫原、相補性決定領域（CDR）配列、可変重鎖 V_H 及び可変軽鎖 V_L 配列ならびに方法を使用して生成又は設計することができる。任意の特定の抗PGモノクローナル抗体の親和性は、当技術分野において周知である又は本明細書に記載する技術（例えば、ELISA、等温滴定熱量測定（ITC）、BIAcore、又は蛍光偏光アッセイなど）を使用して決定することができる。

10

【0015】

hPGは比較的小さなポリペプチドであり、わずか80アミノ酸の長さである。比較的高い親和性（例、少なくとも約10nM）でhPGに特異的に結合する任意のモノクローナル抗体は、そのシグナル伝達パートナーと相互作用するPGの能力を妨害し、結果として、CRC細胞の増殖を阻害しうることが期待されていたであろう。しかし、出願人は、全ての抗PGモノクローナル抗体が中和するとは限らない（即ち、PGに結合する全てのモノクローナル抗体が、その生物学的シグナル伝達活性を妨害又は阻害するわけではない）ことを発見している。実際に、実施例セクションにおいて詳細に考察する通り、出願人は、一部の抗PGモノクローナル抗体が、PGについて高い特異性及び高い親和性を示すにもかかわらず、PGを中和しないことを発見している。例えば、抗hPGMAb14は約6pMのKDでhPG結合するが、しかし、以下の実施例セクションにおいて詳述する通り、インビトロでのCRC細胞の成長を阻害しない。hPGに特異的に結合する非中和モノクローナル抗体は、診断目的のために有用であるが、PGを中和するそれらの抗hPGモノクローナル抗体は、CRCを処置するための治療的適用に特に適している。

20

30

【0016】

本明細書において使用する通り、「中和抗hPGモノクローナル抗体」は、非特異的モノクローナル抗体を用いて処理された対照サンプルと比較して、抗hPGモノクローナル抗体を用いて処理されたテストサンプルにおいて生CRC細胞数の統計的に有意な低下をもたらす抗hPGモノクローナル抗体である。hPGを中和する任意の特定の抗hPGモノクローナル抗体の能力を評価するための特定のアッセイが、以下の詳細な説明のセクションに記載されている。このアッセイにおいて生細胞数において少なくとも約50%低下を示すそれらの抗hPGモノクローナル抗体は、CRCの処置において特に有用であると考えられるが、中和活性のより低いレベル（例えば、このアッセイにおける生細胞数の40%、30%、20%、15%、又はさらに10%の統計的に有意な低下）を示す抗hPGモノクローナル抗体が治療的利益を提供することが期待される。

40

【0017】

したがって、一部の実施態様において、抗PGモノクローナル抗体は中和抗PGモノクローナル抗体である。PGを中和する抗PGモノクローナル抗体の能力がエピトープ依存性ではないことが発見されている。実施例セクションにおいて例示される通り、N末端及びC末端抗PG抗体の両方が中和活性を有する。このように、一部の実施態様において、中和抗PGモノクローナル抗体はN末端中和抗体であり、他の実施態様において、抗PGモノクローナル抗体はC末端中和抗体である。

50

【0018】

エピトープマッピングによって、N末端抗PGモノクローナル抗体は、同じ免疫原に対して産生された場合でさえ、全てが同じエピトープに結合するわけではないことが明らかになる。同じことが、C末端抗hPGモノクローナル抗体にも当てはまる。例示的なN末端及びC末端抗hPGモノクローナル抗体により結合されるエピトープが、アラニンスクヤニング及びSPO T技術を介して同定され、実施例セクションに、表8及び表9に示される。

【0019】

一部の実施態様において、抗hPGモノクローナル抗体は、hPGのN末端部分に相当するアミノ酸配列を含むエピトープに結合する。特定の実施態様において、N末端抗hPGモノクローナル抗体は、hPGの残基10~14(配列番号28)、hPGの残基9~14(配列番号29)、hPGの残基4~10(配列番号30)、hPGの残基2~10(配列番号31)、又はhPGの残基2~14(配列番号32)を含むエピトープに結合する。

10

【0020】

一部の実施態様において、抗hPGモノクローナル抗体は、hPGのC末端領域の部分に相当するアミノ酸配列を含むエピトープに結合する。特定の実施態様において、C末端抗hPGモノクローナル抗体は、hPGの残基71~74(配列番号33)、hPGの残基69~73(配列番号34)、hPGの残基76~80(配列番号35)、又はhPGの残基67~74(配列番号36)を含むエピトープに結合する。

20

【0021】

およそ同じエピトープに結合する抗hPGモノクローナル抗体の相当するCDR及び/又はV_H及びV_L鎖を交換して、新たな抗hPGモノクローナル抗体をもたらすことが期待される。例えば、表9に記述する通り、例示的な抗hPGモノクローナル抗体MAb 5及びMAb 6は同じエピトープに結合する。そのV_L鎖においてこれらの2つの抗体のV_L CDRの種々の組み合わせ、及び/又はそのV_H鎖においてこれらの2つの抗体のV_H CDRの種々の組み合わせを含む抗hPGモノクローナル抗体を設計することができる。具体的な例として、種々の可能な組み合わせを例証するために、そのような抗体は、そのV_L鎖においてMAb 5のCDR 1及び2(それぞれV_L CDR 1.5及びV_L CDR 2.5)及びMAb 6のCDR 3(V_L CDR 3.6)ならびに、そのV_H鎖において、MAb 6のCDR 1(V_H CDR 1.6)及びMAb 5のCDR 2及び3(それぞれV_H CDR 2.5及びV_H CDR 3.5)を含みうる。

30

【0022】

hPGについての高い特異性及び親和性を有し、インビトロアッセイにおいて良好な抗腫瘍活性を示すいくつかの抗hPGモノクローナル抗体が同定されており、一部の例において、それらのCDRの配列、それらのV_H及びV_L鎖の配列、及び/又はヒト化バージョンについての提示されたV_H及びV_L鎖が決定されている。いくつかのハイブリドーマも寄託されている。これらの例示的な抗hPGモノクローナル抗体の全て、ならびに本明細書に記載する種々のキット及び方法において有用な抗hPGモノクローナル抗体、例えば、PG結合について参照抗体と競合するモノクローナル抗体の他の特定の実施態様が、詳細な説明のセクションにより詳細に記載されている。

40

【0023】

開示の抗hPGモノクローナル抗体は、hPG結合について参照抗hPGモノクローナル抗体と競合する抗体を含む。参照抗hPGモノクローナル抗体は、本明細書に記載する抗hPGモノクローナル抗体のいずれでもよい。非限定的な例は以下：本明細書に記載する3つのV_L CDR及び3つのV_H CDRを含む抗体；本明細書に示すアミノ酸配列を有するV_H鎖及びV_L鎖を含む抗体；本明細書に示すヒト化重鎖及び軽鎖ポリペプチドを含む抗体；本明細書に開示するハイブリドーマのいずれか1つにより産生される抗体；本明細書に開示するhPG内のエピトープに結合する抗体を含む。

【0024】

50

本明細書に記載する抗PGモノクローナル抗体は、全長抗体、複数鎖又は一本鎖抗体、PGに選択的に結合するそのような抗体のフラグメント（限定しないが、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、及びscFvを含む）、サロボディ（代替軽鎖コンストラクトを含む）、単ドメイン抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体などの形態でありうる。それらは、また、任意のアイソタイプ、例えば、IgA（例、IgA1又はIgA2）、IgD、IgE、IgG（例、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4）、又はIgMでありうる、あるいは、それに由来しうる。一部の実施態様において、抗PG抗体はIgG（例、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4）である。

【0025】

抗PGモノクローナル抗体はヒト又は非ヒト由来でありうる。非ヒト由来の抗PG抗体の例は、しかし、限定しないが、哺乳動物（例、サル、齧歯類、ヤギ、及びウサギ）由来のものを含む。ヒトにおける治療的使用のための抗PGモノクローナル抗体は、好ましくはヒト化される。

10

【0026】

別の局面において、本開示は、抗PGモノクローナル抗体を産生するために使用することが可能な核酸を提供する。本明細書に記載する抗hPGモノクローナル抗体についての免疫グロブリン軽鎖及び重鎖ポリペプチドをコードする核酸、ならびに、この核酸を含むベクターを提供する。加えて、そのようなベクターを用いて形質転換された原核生物及び真核生物宿主細胞を本明細書において提供し、ならびに、抗hPGモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖ポリペプチドを発現するように操作された真核生物、例えば、哺乳動物の宿主細胞を提供する。また、軽鎖及び重鎖の両方を発現し、宿主細胞が培養される培地中に本明細書に記載するモノクローナル抗体を分泌することが可能な宿主細胞も提供する。一部の実施態様において、宿主細胞はハイブリドーマである。宿主細胞を培養することにより抗hPGモノクローナル抗体を産生する方法も提供する。

20

【0027】

中和抗PGモノクローナル抗体（例えば抗hPGモノクローナル抗体など）は、PGに結合し、PG依存性シグナル伝達を遮断し、CRC腫瘍細胞においてPG誘導性応答の阻害をもたらす。したがって、CRC細胞のPG誘導性応答（細胞分化の抑制、細胞死の抑制、及び/又は細胞増殖の刺激を含む）を阻害する方法も提供する。一般的に、この方法は、CRC細胞の1つ又は複数のPG誘導性応答を阻害するために効果的な量で、中和抗PGモノクローナル抗体に、CRC細胞を接触させる、又は細胞集団を曝露させることを含む。この方法は、CRC細胞を含む環境（細胞培養又は腫瘍中でありうる）に中和抗hPGモノクローナル抗体を投与することにより、インビトロ又はインビボで行うことができる。

30

【0028】

本明細書に記載する中和抗PGモノクローナル抗体は、CRC腫瘍細胞のPG依存性増殖を阻害し、それらを結腸直腸癌の処置のための有用な治療用薬剤にする。したがって、中和抗PGモノクローナル抗体を含む医薬組成物ならびに中和抗PGモノクローナル抗体及び/又はCRCを処置するための医薬的組成物を使用する方法も提供する。医薬的組成物は、任意の便利な投与経路（例、非経口、皮下、又は静脈内注射を含む）のために製剤化することができ、典型的には、中和抗hPGモノクローナル抗体、及び1つ又は複数の許容可能な担体、賦形剤、及び/又は所望の投与様式に適した希釈剤を含み、詳細な説明のセクションにおいてさらに記載する通り、他の任意の成分を含むことができる。治療的使用のために、組成物は、使用しやすいように単位投与形態にパッケージ化することができる。

40

【0029】

処置方法は、一般的に、処置を必要とする被験体、例えば、CRCと診断された被験体に、治療的利益を提供するために効果的な中和抗PGモノクローナル抗体及び/又はその医薬的組成物の量を投与することを含む。治療的利益を、以下により詳細に記載し、CRCの任意の寛解、例えば、CRCの進行を遅くする又は止めること、CRCの重症度を低

50

下させること、CRC腫瘍の成長又はCRC細胞の増殖を阻害すること、CRC腫瘍のサイズを低下させること、及び/又はCRC患者においてPG血清レベルを低下させることを含む。被験体は、ヒト又は非ヒト（家畜化動物（例、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、ウマ）又は非家畜化動物を含む）でありうる。好ましくは、抗PGモノクローナル抗体は、処置されている種のPGに特異的である。例えば、抗hPG抗体はヒト患者に投与され、抗イヌPG抗体はイヌの患者に投与される、など。抗hPGモノクローナル抗体治療が有用である被験体は、以下：疾患進行の任意のステージ（例、CRCステージ0、I、II、III、又はIV）の患者、CRC治療（例、化学療法、放射線治療、外科的切除）を受けてきた患者、又はCRCのための他の治療を受けている患者でありうる。

【0030】

本明細書に記載する抗PGモノクローナル抗体を用いた処置は、他の治療と組み合わせる又はそれに補助的であることができる。CRCのための他の治療の非限定的な例は、本明細書に記載する化学療法的処置、放射線治療、外科的切除、及び抗体治療を含む。具体的な例において、抗hPGモノクローナル抗体は、化学療法剤と組み合わせて投与される。別の具体的な例において、抗hPGモノクローナル抗体は、外科的切除に補助的に投与される。抗PGモノクローナル抗体は、また、互いに組み合わせて使用することができる。

【0031】

CRC腫瘍を伴う個人は、頻繁に、循環PG（例、血清又は血漿中）の上昇レベルを有する。したがって、抗hPGモノクローナル抗体を使用し、CRCを診断する目的のためにPGレベルを検出することができる。加えて、CRCと既に診断された患者において、抗hPGモノクローナル抗体を使用し、抗PG治療を受ける、又は、処置効力をモニタリングするために適した被験体を選択することができる。本明細書に開示する通り、被験体において結腸直腸癌を診断する方法は、本開示に従って抗hPGモノクローナル抗体を使用して測定された、被験体からのサンプル、例えば、血液サンプル又は血清サンプル中のプロガストリンの量が、閾値レベルを上回るか否かを決定することを含む。特定の実施態様において、閾値レベルは50pMである。一部の実施態様において、2つの抗PG抗体：PGのC末端領域を認識するもの及びPGのN末端領域を認識する別のものが使用される。この実施態様において、N末端又はC末端抗体の1つ又は両方は、本明細書に記載する抗PGモノクローナル抗体である。好ましくは、N末端及びC末端抗PGモノクローナル抗体が使用される。抗体は、中和しうるが、しかし、中和する必要はない。

【0032】

処置効力をモニタリングする目的のために、抗PGモノクローナル抗体を使用し、プロガストリンのレベルが、CRCについて処置されてきた又は処置されている被験体からのサンプル中で、異なる時間点で採取されたサンプル中でのPGの量と比較することにより、経時的に減少しているか否かを決定することができる。先行するパラグラフに記載する抗PG抗体の特定の実施態様を、また、このアッセイにおいて使用することができる。

【0033】

また、本明細書に記載する種々の診断方法、モニタリング方法、及び他の方法を行うために適したキットを提供する。そのようなキットは、典型的には、本明細書に記載する抗PGモノクローナル抗体、ならびに、場合により、特定のアッセイを実施するために適した追加の抗PG抗体及び/又は試薬を含む。一部の実施態様において、キットに含まれる1つ又は複数の抗PG抗体は、検出可能な標識（例えばフルオロフォアなど）を用いて標識される。特定の実施態様において、キットは、PGのN末端領域に特異的に結合する抗PG抗体、PGのC末端領域に特異的に結合する抗PG抗体、及び、場合により、診断アッセイを実施するために適した試薬を含み、ここで、N末端特異的抗体は、N末端抗体、本明細書に記載するN末端抗PGモノクローナル抗体であり、及び/又は、C末端特異的抗体は、本明細書に記載するC末端抗PGモノクローナル抗体である。

【0034】

本明細書に記載する種々の発明の特徴及び利点が、その例示的な実施態様の以下の詳細

10

20

30

40

50

な説明からさらに明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、プレプロガストリン、プロガストリン、及びプロガストリンプロセシングの産物（G34、G34-Gly、G17、G17-Gly、及びC末端隣接ペプチドCTFPを含む）のアミノ酸配列を提供する。

【図2A】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3（それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で）（図2A、2B）、抗hPG MA b 4（それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で）（図2C、2D）、抗hPG MA b 8（それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で）（図2E、2F）、抗hPG Ma b 13（それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で）（図2G、2H）、抗hPG MA b 16（それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で）（図2I、2J）、及び抗hPG MA b 19（それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で）（図2K、2L）を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

【図2B】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3（それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で）（図2A、2B）、抗hPG MA b 4（それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で）（図2C、2D）、抗hPG MA b 8（それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で）（図2E、2F）、抗hPG Ma b 13（それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で）（図2G、2H）、抗hPG MA b 16（それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で）（図2I、2J）、及び抗hPG MA b 19（それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で）（図2K、2L）を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

【図2C】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3（それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で）（図2A、2B）、抗hPG MA b 4（それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で）（図2C、2D）、抗hPG MA b 8（それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で）（図2E、2F）、抗hPG Ma b 13（それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で）（図2G、2H）、抗hPG MA b 16（それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で）（図2I、2J）、及び抗hPG MA b 19（それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で）（図2K、2L）を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

【図2D】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3（それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で）（図2A、2B）、抗hPG MA b 4（それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で）（図2C、2D）、抗hPG MA b 8（それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で）（図2E、2F）、抗hPG Ma b 13（それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で）（図2G、2H）、抗hPG MA b 16（それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で）（図2I、2J）、及び抗hPG MA b 19（それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で）（図2K、2L）を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

【図2E】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3（それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で）（図2A、2B）、抗hPG MA b 4（それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で）（図2C、2D）、

10

20

30

40

50

抗hPG MA b 8 (それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で) (図2E、2F)、抗hPG MA b 13 (それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で) (図2G、2H)、抗hPG MA b 16 (それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で) (図2I、2J)、及び抗hPG MA b 19 (それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で) (図2K、2L)を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

【図2F】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3 (それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で) (図2A、2B)、抗hPG MA b 4 (それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で) (図2C、2D)、抗hPG MA b 8 (それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で) (図2E、2F)、抗hPG MA b 13 (それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で) (図2G、2H)、抗hPG MA b 16 (それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で) (図2I、2J)、及び抗hPG MA b 19 (それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で) (図2K、2L)を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

10

【図2G】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3 (それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で) (図2A、2B)、抗hPG MA b 4 (それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で) (図2C、2D)、抗hPG MA b 8 (それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で) (図2E、2F)、抗hPG MA b 13 (それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で) (図2G、2H)、抗hPG MA b 16 (それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で) (図2I、2J)、及び抗hPG MA b 19 (それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で) (図2K、2L)を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

20

【図2H】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3 (それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で) (図2A、2B)、抗hPG MA b 4 (それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で) (図2C、2D)、抗hPG MA b 8 (それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で) (図2E、2F)、抗hPG MA b 13 (それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で) (図2G、2H)、抗hPG MA b 16 (それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で) (図2I、2J)、及び抗hPG MA b 19 (それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で) (図2K、2L)を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

30

【図2I】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3 (それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で) (図2A、2B)、抗hPG MA b 4 (それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で) (図2C、2D)、抗hPG MA b 8 (それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で) (図2E、2F)、抗hPG MA b 13 (それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で) (図2G、2H)、抗hPG MA b 16 (それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で) (図2I、2J)、及び抗hPG MA b 19 (それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で) (図2K、2L)を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

40

【図2J】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3 (それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で) (図2A、2B)、抗hPG MA b 4 (それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で) (図2C、2D)、

50

抗hPG MA b 8 (それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で) (図2E、2F)、抗hPG MA b 13 (それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で) (図2G、2H)、抗hPG MA b 16 (それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で) (図2I、2J)、及び抗hPG MA b 19 (それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で) (図2K、2L)を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

【図2K】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3 (それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で) (図2A、2B)、抗hPG MA b 4 (それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で) (図2C、2D)、抗hPG MA b 8 (それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で) (図2E、2F)、抗hPG MA b 13 (それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で) (図2G、2H)、抗hPG MA b 16 (それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で) (図2I、2J)、及び抗hPG MA b 19 (それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で) (図2K、2L)を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

【図2L】図2は、ポリペプチド、及び相当するポリヌクレオチド、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖及びV_L鎖の配列：抗hPG MA b 3 (それぞれ配列番号16、12、17、及び13、出現の順番で) (図2A、2B)、抗hPG MA b 4 (それぞれ配列番号18、14、19、及び15、出現の順番で) (図2C、2D)、抗hPG MA b 8 (それぞれ配列番号67、59、71、及び63、出現の順番で) (図2E、2F)、抗hPG MA b 13 (それぞれ配列番号68、60、72、及び64、出現の順番で) (図2G、2H)、抗hPG MA b 16 (それぞれ配列番号69、61、73、及び65、出現の順番で) (図2I、2J)、及び抗hPG MA b 19 (それぞれ配列番号70、62、74、及び66、出現の順番で) (図2K、2L)を提供し、それにおいて、各鎖の3つのCDRに下線を引いている。

【図3A】図3A～Cは、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体、MA b 1～4 (図3A)；MA b 5～14及び20～23 (図3B)；ならびにMA b 3及び15～19 (図3C)の増加する抗体濃度(μg/ml)での相対的な結合親和性(492nmでの吸光度として測定)を例証するグラフを提供する。

【図3B】図3A～Cは、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体、MA b 1～4 (図3A)；MA b 5～14及び20～23 (図3B)；ならびにMA b 3及び15～19 (図3C)の増加する抗体濃度(μg/ml)での相対的な結合親和性(492nmでの吸光度として測定)を例証するグラフを提供する。

【図3C】図3A～Cは、例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体、MA b 1～4 (図3A)；MA b 5～14及び20～23 (図3B)；ならびにMA b 3及び15～19 (図3C)の増加する抗体濃度(μg/ml)での相対的な結合親和性(492nmでの吸光度として測定)を例証するグラフを提供する。

【図4】図4は、ウシ血清アルブミン(任意単位)の対照試料と比較し、4つの異なる例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体についての280nM及び330nMでの吸光度(光学密度)の比率を例証するグラフを提供する。

【図5A】図5A～Cは、以下と比較し、25又は50ngのhPGに対する23の異なる例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体の結合を例証するグラフ：緩衝剤のみ(陰性対照)、250ngのK L H (陰性対照)、及びガストリン遺伝子に由来するペプチド(50及び250ngのC T F P、G 17、又はG 17 - G 1 y (「G - G 1 y」として図中に言及される)) (示す通り)を提供する。図5Aは抗hPG MA b 1～4の結合を示し、図5Bは抗hPG MA b 5～14及び21～23の結合を示し、ならびに、図5Cは抗hPG MA b 3及び15～20の結合を示す。

【図5B】図5A～Cは、以下と比較し、25又は50ngのhPGに対する23の異なる例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体の結合を例証するグラフ：緩衝剤のみ(陰性

10

20

30

40

50

対照)、250 ngのKLH(陰性対照)、及びガストリン遺伝子に由来するペプチド(50及び250 ngのCTFP、G17、又はG17-Gly(「G-Gly」として図中に言及される))(示す通り)を提供する。図5Aは抗hPG MA b 1~4の結合を示し、図5Bは抗hPG MA b 5~14及び21~23の結合を示し、ならびに、図5Cは抗hPG MA b 3及び15~20の結合を示す。

【図5C】図5A~Cは、以下と比較し、25又は50 ngのhPGに対する23の異なる例示的なマウス抗hPGモノクローナル抗体の結合を例証するグラフ：緩衝剤のみ(陰性対照)、250 ngのKLH(陰性対照)、及びガストリン遺伝子に由来するペプチド(50及び250 ngのCTFP、G17、又はG17-Gly(「G-Gly」として図中に言及される))(示す通り)を提供する。図5Aは抗hPG MA b 1~4の結合を示し、図5Bは抗hPG MA b 5~14及び21~23の結合を示し、ならびに、図5Cは抗hPG MA b 3及び15~20の結合を示す。

【図6】図6は、抗hPG MA b 3の増加濃度でのhPGに対するポリクローナルN末端抗hPG抗体の結合を例証するグラフを提供する。

【図7A】図7は、以下の通りに、抗hPGモノクローナル抗体を用いて処理された代表的なCRC細胞株の増殖を例証するグラフ：例示的な抗hPGモノクローナル抗体MA b 3及びMA b 4(図7A、7B、7Cは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す)、又は抗hPGポリクローナル抗体(図7D、7E、7Fは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す)を用いて処理されたSW480、HCT-116、LS174T(示す通り)；抗hPG MA b 5~MA b 23を用いて処理されたCRC細胞株SW620の増殖(図7Gは、処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す)；抗hPG MA b 8、13、14、16、及び19を用いて処理されたLS174T細胞の増殖(図7Hは、処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す)；及び、抗hPGモノクローナル抗体MA b 8、13、14、16、19を用いて処理されたHCT-116細胞の増殖(図7Iは、処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す)を提供する。

【図7B】図7は、以下の通りに、抗hPGモノクローナル抗体を用いて処理された代表的なCRC細胞株の増殖を例証するグラフ：例示的な抗hPGモノクローナル抗体MA b 3及びMA b 4(図7A、7B、7Cは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す)、又は抗hPGポリクローナル抗体(図7D、7E、7Fは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す)を用いて処理されたSW480、HCT-116、LS174T(示す通り)；抗hPG MA b 5~MA b 23を用いて処理されたCRC細胞株SW620の増殖(図7Gは、処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す)；抗hPG MA b 8、13、14、16、及び19を用いて処理されたLS174T細胞の増殖(図7Hは、処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す)；及び、抗hPGモノクローナル抗体MA b 8、13、14、16、19を用いて処理されたHCT-116細胞の増殖(図7Iは、処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す)を提供する。

【図7C】図7は、以下の通りに、抗hPGモノクローナル抗体を用いて処理された代表的なCRC細胞株の増殖を例証するグラフ：例示的な抗hPGモノクローナル抗体MA b 3及びMA b 4(図7A、7B、7Cは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す)、又は抗hPGポリクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体（図7D、7E、7Fは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）を用いて処理されたSW480、HCT-116、LS174T（示す通り）；抗hPG MA b 5～MA b 23を用いて処理されたCRC細胞株SW620の増殖（図7Gは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；抗hPG MA b 8、13、14、16、及び19を用いて処理されたLS174T細胞の増殖（図7Hは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；及び、抗hPGモノクローナル抗体MA b 8、13、14、16、19を用いて処理されたHCT-116細胞の増殖（図7Iは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）を提供する。

10

【図7D】図7は、以下の通りに、抗hPGモノクローナル抗体を用いて処理された代表的なCRC細胞株の増殖を例証するグラフ：例示的な抗hPGモノクローナル抗体MA b 3及びMA b 4（図7A、7B、7Cは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）、又は抗hPGポリクローナル抗体（図7D、7E、7Fは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）を用いて処理されたSW480、HCT-116、LS174T（示す通り）；抗hPG MA b 5～MA b 23を用いて処理されたCRC細胞株SW620の増殖（図7Gは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；抗hPG MA b 8、13、14、16、及び19を用いて処理されたLS174T細胞の増殖（図7Hは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；及び、抗hPGモノクローナル抗体MA b 8、13、14、16、19を用いて処理されたHCT-116細胞の増殖（図7Iは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）を提供する。

20

【図7E】図7は、以下の通りに、抗hPGモノクローナル抗体を用いて処理された代表的なCRC細胞株の増殖を例証するグラフ：例示的な抗hPGモノクローナル抗体MA b 3及びMA b 4（図7A、7B、7Cは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）、又は抗hPGポリクローナル抗体（図7D、7E、7Fは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）を用いて処理されたSW480、HCT-116、LS174T（示す通り）；抗hPG MA b 5～MA b 23を用いて処理されたCRC細胞株SW620の増殖（図7Gは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；抗hPG MA b 8、13、14、16、及び19を用いて処理されたLS174T細胞の増殖（図7Hは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；及び、抗hPGモノクローナル抗体MA b 8、13、14、16、19を用いて処理されたHCT-116細胞の増殖（図7Iは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）を提供する。

30

40

【図7F】図7は、以下の通りに、抗hPGモノクローナル抗体を用いて処理された代表的なCRC細胞株の増殖を例証するグラフ：例示的な抗hPGモノクローナル抗体MA b 3及びMA b 4（図7A、7B、7Cは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）、又は抗hPGポリクローナル抗体（図7D、7E、7Fは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）を用いて処理されたSW480、HCT-116、LS174T（示す通り）；抗hPG MA b 5～MA b 23を用いて処理されたCRC細胞株SW620の増殖（図7Gは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；抗hPG MA b 8、13、14、16、及び19を用いて処理されたLS174T細胞の増殖（図7Hは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；及び、抗hPGモノクローナル抗体MA b 8、13、14、16、19を用いて処理されたHCT-116細胞の増殖（図7Iは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）を提供する。

50

T - 116、LS174T（示す通り）；抗hPG MA b 5～MA b 23を用いて処理されたCRC細胞株SW620の増殖（図7Gは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；抗hPG MA b 8、13、14、16、及び19を用いて処理されたLS174T細胞の増殖（図7Hは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；及び、抗hPGモノクローナル抗体MA b 8、13、14、16、19を用いて処理されたHCT-116細胞の増殖（図7Iは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）を提供する。

10

【図7G】図7は、以下の通りに、抗hPGモノクローナル抗体を用いて処理された代表的なCRC細胞株の増殖を例証するグラフ：例示的な抗hPGモノクローナル抗体MA b 3及びMA b 4（図7A、7B、7Cは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）、又は抗hPGポリクローナル抗体（図7D、7E、7Fは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）を用いて処理されたSW480、HCT-116、LS174T（示す通り）；抗hPG MA b 5～MA b 23を用いて処理されたCRC細胞株SW620の増殖（図7Gは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；抗hPG MA b 8、13、14、16、及び19を用いて処理されたLS174T細胞の増殖（図7Hは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；及び、抗hPGモノクローナル抗体MA b 8、13、14、16、19を用いて処理されたHCT-116細胞の増殖（図7Iは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）を提供する。

20

【図7H】図7は、以下の通りに、抗hPGモノクローナル抗体を用いて処理された代表的なCRC細胞株の増殖を例証するグラフ：例示的な抗hPGモノクローナル抗体MA b 3及びMA b 4（図7A、7B、7Cは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）、又は抗hPGポリクローナル抗体（図7D、7E、7Fは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）を用いて処理されたSW480、HCT-116、LS174T（示す通り）；抗hPG MA b 5～MA b 23を用いて処理されたCRC細胞株SW620の増殖（図7Gは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；抗hPG MA b 8、13、14、16、及び19を用いて処理されたLS174T細胞の増殖（図7Hは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）；及び、抗hPGモノクローナル抗体MA b 8、13、14、16、19を用いて処理されたHCT-116細胞の増殖（図7Iは、処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す）を提供する。

30

【図7I】図7は、以下の通りに、抗hPGモノクローナル抗体を用いて処理された代表的なCRC細胞株の増殖を例証するグラフ：例示的な抗hPGモノクローナル抗体MA b 3及びMA b 4（図7A、7B、7Cは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）、又は抗hPGポリクローナル抗体（図7D、7E、7Fは、それぞれ、抗体を用いた処理の開始（T0）と比べた、処理の終了時での生細胞数における変化を示す）を用いて処理されたSW480、HCT-116、LS174T（示す通り）；抗hPG MA b 5～MA b 23を用いて処理されたCRC細胞株SW620の増殖（図7Gは、処理の開始（T0）と比べた、処

40

50

理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す) ; 抗hPG MA b 8、13、14、16、及び19を用いて処理されたLS174T細胞の増殖(図7Hは、処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す) ; 及び、抗hPGモノクローナル抗体MA b 8、13、14、16、19を用いて処理されたHCT-116細胞の増殖(図7Iは、処理の開始(T0)と比べた、処理の終了時での対照抗体で処理された細胞数のパーセンテージとしての生きた抗hPG処理細胞を示す)を提供する。

【図8】図8は、対照モノクローナル抗体、抗hPG MA b 8(5 µg/ml)、hPGを用いてプレインキュベートされた抗hPG MA b 8、hPGを用いてプレインキュベートされた対照抗体、又はhPG単独を用いた4回の処理から48時間後での生きたLS174T細胞数を例証するグラフを提供する。

【図9A】図9は、対照ポリクローナル抗体と比較した、抗hPG抗体を用いて処置されたマウスにおけるマウス1匹当たりの腫瘍数(図9A)ならびに平均的な腫瘍の長さ及び高さ(図9B)を例証するグラフを提供する。

【図9B】図9は、対照ポリクローナル抗体と比較した、抗hPG抗体を用いて処置されたマウスにおけるマウス1匹当たりの腫瘍数(図9A)ならびに平均的な腫瘍の長さ及び高さ(図9B)を例証するグラフを提供する。

【0036】

9. 例示的な実施態様の詳細な説明

9.1. 詳細な説明

プロガストリン(PG)はガストリン(胃酸分泌を刺激する腸ペプチドホルモン)の前駆体として最初に同定された。ガストリンは、プロガストリンに由来する多くの異なる分子形態(G17、G34、グリシン伸長G17、グリシン伸長G34)で存在する。図1を参照のこと。ガストリン遺伝子は101アミノ酸産物プレプロガストリンをコードする。最初の切断は、21アミノ酸残基のシグナルペプチド(図1の下線部)を除去し、PG(80個のアミノ酸ペプチド)をもたらす。理解され、公知であるヒトPG(hPG)のポリペプチド配列を、配列番号20に提供する。図1に例証する通り、hPGのアミノ酸残基に1~80まで番号を付け、アミノ末端残基が位置1である。プロガストリンの最初の40アミノ酸内の配列は「N末端」として言及され、残基41~80内の該当する配列は「C末端」として言及される。

【0037】

最近の試験では、プロガストリンレベルがCRCを伴う患者において上昇していることが示されている。正常な生理学的条件下では、プロガストリンがヒトにおける総分泌ペプチドの10%未満を占める。結腸直腸癌において、プロガストリンレベルは、恐らくは遺伝子産物の不完全なプロセッシングと共役したガストリン遺伝子の増加発現の結果として、血漿及び腫瘍組織の両方において有意に上昇している。1つの試験では、対照患者と比較して、CRC患者における有意に高い血清プロガストリンレベルが示されたが、しかし、ガストリンのよりプロセッシングされた形態についてそのような差は示されなかった(Siddheshwar et al., 2001, Gut 48: 47-52)。テストされたCRC腫瘍サンプルにおいて、サンプルの80~100%が増加したPGレベルを示した。例えば、Ciccotosto et al., 1995, Gastroenterology 109: 1142-1153; Baldwin et al., 1998, Gut 42:581-584; Van Solinge, 1993, Gastroenterology 104: 1099-1107を参照のこと。CRCにおけるPGの役割は、野生型マウス又はアミド化ガストリンを発現するマウスと比較して、発癌物質アゾキシメタンを用いて処置された組換えヒトPGを発現するマウスが、結腸において有意に多い数の異常腺窩巢、腺腫、及び腺癌を有することを示す実験によりさらに実証されている(Singh et al.2000, Gastroenterology 119: 162-171)。

【0038】

最近、Hollandeらは、プロガストリンが、ICAT(ベータ-カテニン/Tcf4シグナル伝達の負の調節因子)を抑制することによりベータ-カテニン/Tcf4経路を刺激

すること、及び、プロガストリンを遮断することにより I C A T のデノボ発現に導くことを実証した。W O 2007/135542 を参照のこと。操作の任意の理論により拘束されることを意図しないが、プロガストリンシグナル伝達を遮断することによって、増加した I C A T 発現の結果として、ベータ - カテニン / T C F 4 誘導性増殖の抑制に導くと考えられる。継続的な P G 依存性シグナル伝達の非存在において、細胞増殖が阻害され、細胞分化及び / 又は細胞死 (アポトーシスを含む) が引き起こされる。

【 0 0 3 9 】

C R C の処置及び診断への新たな臨床的アプローチについての緊急の必要性、P G が C R C 腫瘍細胞の増殖を刺激するという証拠にもかかわらず、及び、癌の処置におけるモノクローナル抗体治療についての増加した焦点にもかかわらず、今日まで、P G 依存性腫瘍細胞増殖を遮断すること、又は、さらに、P G に結合することが可能な任意のモノクローナル抗体を実証する報告はない。そのような抗体は、本明細書に初めて提示され、開発が困難であることが証明された。最初の課題として、出願人は、組換えヒトプロガストリンが、ポリクローナル抗 h P G 抗体を生成するために使用することができ、テストマウスにおいてモノクローナル免疫原性応答を誘導しないことを見出した。従って、P G のペプチドフラグメントだけを使用して免疫原を設計し、プロガストリンに特異的であり、及び、他のガストリン遺伝子産物に特異的ではない抗体を生成することが必要であった。一旦、ハイブリドーマクローンが抗原ペプチドに結合する抗体をもたらしても、ペプチドへの結合が、P G に結合する能力を特異的に又は全く予測することができないことを見出された。以下の実施例においてより詳細に示す通り、多くのハイブリドーマは、免疫原において使用される P G 抗原ペプチドに結合するが、しかし、P G に結合しない抗体をもたらした。本開示は、それらが産生されたペプチド抗原に結合するだけでなく、しかし、また、h P G に特異的に結合する抗 h P G モノクローナル抗体を提供する。非常に驚くべきことに、そのプロセシング産物 (例、G 3 4、G 3 4 - G l y、G 1 7、G 1 7 - G l y、C T F P) と比べて、h P G に高度に特異的なモノクローナル抗体が、一部の場において h P G に固有ではないが、しかし、プロガストリンプロセシング産物の 1 つ又は複数に共通のアミノ酸配列の領域を含む抗原を用いて得られた。さらに、また、驚くべきことに、h P G の比較的小さなサイズ (8 0 アミノ酸) にもかかわらず、全ての抗 h P G モノクローナル抗体が、h P G について高い程度の親和性及び特異性を示すものでさえ、その生物学的活性を中和することが発見された。

【 0 0 4 0 】

抗 h P G モノクローナル抗体

出願人は、抗 h P G モノクローナル抗体を産生するために有用なペプチド抗原を発見している。本開示の抗 h P G 抗体を産生するために有用なペプチドは、ポリペプチドのより多くのプロセシング形態 (例えばグリシン伸長もしくはアミド化ガストリン又は C T F P など) において見出されないプロガストリン特異的な配列を含むが、しかし、また、h P G のプロセシング形態において見出される配列を含むことができる。一部の実施態様において、抗 h P G モノクローナル抗体は、h P G の N 末端領域に相当するアミノ酸配列を有するペプチド抗原に対して産生され、N 末端抗 h P G モノクローナル抗体として指定される。N 末端抗 P G モノクローナル抗体を得るために有用な免疫原を構築するために使用することができる特定の例示的な抗原性領域は、リンカー配列に共役された h P G の残基 1 ~ 1 4 (S W K P R S Q Q P D A P L G (配列番号 2 5)) に相当する。他の実施形態において、抗 h P G モノクローナル抗体は、h P G の C 末端領域に相当するアミノ酸配列を有するペプチド抗原に対して産生され、C 末端抗 h P G モノクローナル抗体として指定される。C 末端抗 P G モノクローナル抗体を得るために有用な免疫原を構築するために使用することができる特定の例示的な抗原性領域は、リンカー配列に共役された h P G の残基 5 5 ~ 8 0 (配列番号 2 7) に相当する。表 1 を参照のこと。

【 0 0 4 1 】

本開示の抗 P G モノクローナル抗体は P G に結合し、複雑な混合物から P G を検出及び単離するために有用である。加えて、開示の抗 P G モノクローナル抗体は、結腸直腸癌の

ための治療的及び/又は診断的適用に固有に適する。種々の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体は、(1)他のガストリン遺伝子産物と対比して、PGに特異的に結合し、(2)hPGに高い親和性を有し、(3)結腸直腸癌細胞の増殖をインビトロ及びインビボで阻害し、(4)腫瘍のサイズ及び数をインビボで低下させ、(5)他のガストリン遺伝子由来ペプチドを含む複雑な混合物中でPGを検出する。

【0042】

ガストリン遺伝子が発現され、広範にプロセシングされ、正常なホメオスタシスにおいて役割を有するいくつかのタンパク質産物をもたらす。プロガストリンは、他方で、典型的には、健常な被験体の循環において検出可能ではない。本開示のモノクローナル抗体は、プロガストリンを標的とするが、しかし、ガストリン遺伝子由来する他のペプチドは標的としないことを意図する。したがって、抗hPGモノクローナル抗体は、ヒト及び他の動物からのプロガストリンに特異的に結合するが、しかし、他のガストリン遺伝子産物(例えば、限定しないが、グリシン伸長もしくはアミド化ガストリン、又はC末端隣接ペプチド(CTFP)など)には結合しない。

10

【0043】

抗hPGモノクローナル抗体の特異性は、以下の通りにELISAを使用して決定することができる: 96ウェルプレートは、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の適切な濃度のテストポリペプチド(例、25及び50ngの組換えヒトPG、ならびに50及び250ngのCTFP又は他のガストリン由来の遺伝子産物)を用いて4で一晚インキュベートし、その後、ウェルを、洗浄溶液(PBS及び0.1%Tween-20)を用いて3回洗浄し、次に、1ウェル当たり100µLのブロッキング溶液(PBS、0.1%Tween-20、0.1%ウシ血清アルブミン又はカゼイン加水分解物)を用いて22で2時間にわたりインキュベートする。ブロッキング後、ウェルを3回洗浄し、アッセイする抗体(テスト抗体)を加える。PBS及び0.1%Tween-20中の100µLのテスト抗体(0.3~1ng/mL)を各ウェルに加える。プレートを、次に、22で2時間にわたりインキュベートし、その後、テスト抗体溶液を捨て、洗浄段階(3×100µL洗浄溶液、上に記述する通り)後、二次抗体(ホースラディッシュペルオキシダーゼに共役させたヤギ抗マウスIgG(Fc)抗体)を含むブロッキング溶液を用いて交換する。二次抗体を用いた1時間のインキュベーション後、100µLの基質溶液(例、Fast OPD、又はO-フェニレンジアミン二塩酸塩、Sigma-Aldrich Co.から入手可能、製造業者の指示に従って調製する)を各ウェルに加え、暗所で20分間にわたり22でインキュベートする。反応を、50µLの4N硫酸を加えることにより停止させ、触媒された基質の量を492nmでの光学密度(OD)を測定することにより決定する。基質変換は、抗原に結合した一次(テスト)抗体の量に比例する。実験を二通りに実行し、OD測定値を抗原濃度の関数としてプロットする。テスト抗体は、測定されたODがhPGについて0.2~1.5の間であり、CTFP又は他のガストリン遺伝子由来ペプチドのいずれかを用いたバックグラウンドを上回る統計的に有意なシグナルがなく、そこで、バックグラウンドが、PBSだけを含む対照ウェルからの平均シグナルである場合、PGについて特異的としてスコアされる。

20

30

【0044】

本開示のいくつかの抗hPGモノクローナル抗体は、高度に特異的であることが見出された。一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体は、他のガストリン遺伝子産物と比較して、プロガストリンについて100倍大きい特異性を示す。そのような実施形態において、100倍多い抗原(例、グリシン伸長又はアミド化ガストリン)は、抗原がプロガストリンである場合に観察されるのと同じ結合をもたらすために要求される。

40

【0045】

結合を決定するための他の方法は、しかし、限定しないが、免疫蛍光方法、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、放射性物質標識イムノアッセイ(RIA)、サンドイッチELISA(モノクローナル抗体実験マニュアル(講談社サイエンティフィックにより出版、1987)、第二シリーズ生化学実験講座、第5巻、免疫生化学研究方法、東京化学同人により出版(1986))を含む。

50

【0046】

P Gについての高い親和性を伴う抗h P Gモノクローナル抗体は、治療的使用及び診断的使用の両方のために望ましい。特定の使用、例えば治療的使用などのために、少なくとも約100nMの親和性が望ましいが、より大きな親和性、例えば、少なくとも約90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.1nM、0.01nM、10pM、1pM又はそれよりさらに大きな親和性を有する抗体が望まれうる。一部の実施形態において、モノクローナル抗体は、約1pM～約100nMの範囲の親和性、又は前述の値のいずれかの間の範囲の親和性を用いてh P Gに特異的に結合する。

【0047】

h P Gについての抗h P Gモノクローナル抗体の親和性は、当技術分野において周知の又は本明細書に記載する技術、例えば、しかし、限定しないが、ELISA、等温滴定熱量測定(ITC)、BIAcore、Proteon、又は蛍光偏光アッセイなどを使用して決定することができる。

【0048】

h P GのN又はC末端領域からの抗原を使用して、h P Gの異なるエピトープを認識する抗体を生成することができる。モノクローナル抗体により認識されるエピトープは、抗体を産生するために使用される特定の抗原に依存しうるが、当業者に公知の技術、例えばアラニンスキャンニング及びS P O T分析(以下の実施例セクションを参照のこと)などを使用してマッピングすることができる。例えば、エピトープマッピングによって、抗h P G M A b 2及びM A b 4が同じエピトープに結合することが明らかになる。抗h P G M A b 1及びM A b 3は、およそ同じエピトープに結合する；M A b 17、M A b 18、M A b 19、及びM A b 20は、およそ同じエピトープに結合する；M A b 15及びM A b 16は、およそ同じエピトープに結合する；抗h P G M A b 5、M A b 6、M A b 7、M A b 9、及びM A b 12は、同じエピトープに結合し、抗h P G M A b 10とおよそ同じエピトープに結合する；ならびに、抗h P G M A b 11及びM A b 14は、およそ同じエピトープに結合する。

【0049】

抗h P Gモノクローナル抗体が特定のエピトープを認識するか否かは、本明細書に記載する競合アッセイを使用して決定することができ、それにおいて、参照抗体により結合されるエピトープは公知である。一部の実施態様において、抗h P Gモノクローナル抗体は、h P GのN末端領域に相当するアミノ酸配列を有するエピトープに結合する参照抗体と競合する。特定の実施態様において、抗h P Gモノクローナル抗体は、h P Gの残基10～14(配列番号28)、h P Gの残基9～14(配列番号29)、h P Gの残基4～10(配列番号30)、h P Gの残基2～10(配列番号31)、又はh P Gの残基2～14(配列番号32)を含むエピトープに結合する参照抗体と競合する。一部の実施態様において、抗h P Gモノクローナル抗体は、h P GのC末端領域に相当するアミノ酸配列を有するエピトープに結合する参照抗体と競合する。特定の実施態様において、抗h P Gモノクローナル抗体は、h P Gの残基71～74(配列番号33)、h P Gの残基69～73(配列番号34)、h P Gの残基76～80(配列番号35)、又はh P Gの残基67～74(配列番号36)を含むエピトープに結合する参照抗体と競合する。

【0050】

抗P Gモノクローナル抗体は、中和することができる。操作の任意の理論により拘束されることを意図しないが、P Gの結合を通じて、中和抗h P Gモノクローナル抗体は、そのシグナル伝達パートナーと相互作用するその能力を遮断又は阻害すると考えられる。これは、順に、本来なら増殖、低下した細胞分化、及び細胞死に導く結腸直腸腫瘍細胞におけるシグナル伝達経路を阻害する。一部の実施形態において、中和抗P Gモノクローナル抗体は、h P GのN末端領域に結合する。特定の実施形態において、中和抗P Gモノクローナル抗体は、P Gと、抗h P G M A b 1、M A b 2、M A b 3、M A b 4、M A b 15、M A b 16、M A b 17、M A b 18、M A b 19、又はM A b 20の結合

10

20

30

40

50

について競合する。他の実施形態において、中和抗PGモノクローナル抗体は、hPGのC末端領域に結合する。特定の実施形態において、中和抗PGモノクローナル抗体は、PGと、抗hPG MA b 5、MA b 6、MA b 7、MA b 8、MA b 9、MA b 10、MA b 11、MA b 12、MA b 13、MA b 21、MA b 22、又はMA b 23の結合について競合する。

【0051】

抗PGモノクローナル抗体が中和するか否かについての特定のテストは、以下の通りに実施することができる。CRC LS174T細胞を、以下の実施例7に記載する通り、1ウェル当たりおよそ50,000個の細胞で6ウェルプレート中に播種する。細胞を、次に、約5 µg/mlの抗体濃度で、実施例7に記述する通りに、テスト抗PGモノクローナル抗体又は対照モノクローナル抗体を用いて、48時間にわたり12時間間隔で処理する。テスト抗体は、テスト抗体を用いて処理したCRC癌細胞の数が、両側マンホイットニー検定 ($p < 0.05$ の場合、差が有意であると考えられる) を使用し、対照の非特異的抗体を用いて処理した細胞の数と比較して、生存細胞数の少なくとも10%の統計的に有意な低下を示す場合、アッセイにおいて中和しているとして定義される。総細胞数を、処置期間の開始時での細胞数 (T0として言及する) について補正する。

10

【0052】

本明細書において使用する通り、抗体 (Ab) は、特定の抗原に特異的に結合する、又は、それと免疫学的に反応性である免疫グロブリン分子を指し、ポリクローナル、モノクローナル、遺伝子組換え、及び他の方法での改変形態の抗体 (しかし、限定しないが、キメラ抗体、ヒト化抗体、及び抗体の抗原結合フラグメント (例、Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG、及びscFvフラグメントを含む)) を含む。種々の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体は、抗体の定常領域の全部又は部分を含む。一部の実施態様において、定常領域は、以下: IgA (例、IgA1又はIgA2)、IgD、IgE、IgG (例、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4)、及びIgMより選択されるアイソタイプである。

20

【0053】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書において使用する通り、ハイブリドーマ技術を通じて産生された抗体に限定しない。モノクローナル抗体は、利用可能な又は当技術分野において公知の任意の手段により、単クローン (任意の真核生物、原核生物、又はファージクローンを含む) に由来する。本開示を用いて有用なモノクローナル抗体は、当技術分野において公知の多種多様の技術 (ハイブリドーマ、組換え、及びファージディスプレイ技術、又はそれらの組み合わせの使用を含む) を使用して調製することができる。本開示の多くの使用 (ヒトにおける及びインビトロ検出アッセイにおける抗hPGモノクローナル抗体のインビボ使用を含む) において、キメラ、霊長類化、ヒト化、又はヒト抗体を適切に使用することができる。

30

【0054】

用語「scFv」は、伝統的な抗体からの重鎖及び軽鎖の可変ドメインが、結合されて、1つの鎖を形成している一本鎖Fv抗体を指す。

【0055】

「V_H」への参照は、抗体の免疫グロブリン重鎖 (Fv、scFv、又はFabの重鎖を含む) の可変領域を指す。「V_L」への参照は、免疫グロブリン軽鎖 (Fv、scFv、dsFv、又はFabの軽鎖を含む) の可変領域を指す。抗体 (Ab) 及び免疫グロブリン (Ig) は、同じ構造特徴を有する糖タンパク質である。抗体は特定のターゲットへの結合特異性を示し、免疫グロブリンは、抗体及び標的特異性を欠く他の抗体様分子の両方を含む。天然抗体及び免疫グロブリンは、普通は、2つの同一の軽 (L) 鎖及び2つの同一の重 (H) 鎖で構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各々の重鎖は、一端に、可変ドメイン (V_H) を有し、多数の定常ドメインが続く。各々の軽鎖は、一端に可変ドメイン (V_L) 及びその他端に定常ドメインを有する。

40

【0056】

50

開示の抗hPGモノクローナル抗体は、相補性決定領域(CDR)を含む。CDRは、また、軽鎖及び重鎖可変ドメインの両方における超可変領域として公知である。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク(FR)と呼ばれる。当技術分野において公知の通り、抗体の超可変領域を描写するアミノ酸位置/境界は、文脈及び当技術分野において公知の種々の定義に依存して変動しうる。可変ドメイン内の一部の位置は、これらの位置が1組の基準下で超可変領域内にあると見なすことができ、異なる組の基準下で超可変領域の外側にあるとみなされる点でハイブリッド超可変位置として見てもよい。これらの位置の1つ又は複数は、また、伸長された超可変領域において見出すことができる。開示は、これらのハイブリッド超可変位置において改変を含む抗体を提供する。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、各々が、3つのCDRにより接続されたシート配置を主に採用することにより、4つのFR領域を含み、シート構造を接続する、及び、一部の場合において、その一部を形成するループを形成する。各々の鎖中のCDRは、FR領域により、他の鎖からのCDRと近接して一緒に保持され、抗体の標的結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md.1987)を参照のこと)。

10

【0057】

hPGについて高い特異性及び親和性ならびに良好な抗腫瘍活性を有するいくつかの抗hPGモノクローナル抗体が同定されており、それらのCDRならびに可変重鎖及び軽鎖が配列決定されている。マウスの重鎖及び軽鎖可変ドメインは本明細書においてmV_H及びmV_Lと言及され、相当するモノクローナル抗体の番号が続く(例えば、抗hPG MAb 3についてはmV_H.3及びmV_L.3)。抗hPGモノクローナル抗体は、3つの可変軽鎖CDR及び3つの可変重鎖CDR(それぞれV_H CDR 1、2、又は3及びV_L CDR 1、2、又は3として言及する)を有し、例示的な抗hPGモノクローナル抗体の番号が続く。例えば、MAb 3のV_L CDR 1はV_L CDR 1.3と表示され、及び、MAb 3のV_H CDR 1はV_H CDR 1.3と表記される。同様に、ヒト重鎖及び軽鎖可変ドメインは本明細書においてhV_HとhV_Lとして言及され、相当するモノクローナル抗体の数が続く。

20

【0058】

一部の実施態様において、hPGのN末端部分に対して産生された抗hPG抗体は、3つの可変軽鎖CDR及び3つの可変重鎖CDRを有し、それにおいて、V_L CDR 1は、QSIVHSNGNTY(「V_L CDR 1.3」;配列番号4)、QSLVHSSGVTY(「V_L CDR 1.4」;配列番号10)、QSLLDSDGKTY(「V_L CDR 1.16」;配列番号50)、及びSQHRTYT(「V_L CDR 1.19」;配列番号51)より選択される;V_L CDR 2は、KVS(「V_L CDR 2.3」及び「V_L CDR 2.4」;配列番号5)、LVS(「V_L CDR 2.16」;配列番号53)、及びVKKDGSH(「V_L CDR 2.19」;配列番号54)より選択される;V_L CDR 3は、FQGSHPVPT(「V_L CDR 3.3」;配列番号6)、SQSTHVPT(「V_L CDR 3.4」;配列番号11)、WQGTHSPYT(「V_L CDR 3.16」;配列番号57)、及びGVGDAIKGQSVFV(「V_L CDR 3.19」;配列番号58)より選択される;V_H CDR 1は、GYIFTSYW(「V_H CDR 1.3」;配列番号1)、GYTFSSW(「V_H CDR 1.4」;配列番号7)、GYTFTSYY(「V_H CDR 1.16」;配列番号39)、及びGYSITSDYA(「V_H CDR 1.19」;配列番号40)より選択される;V_H CDR 2は、FYPGNSDS(「V_H CDR 2.3」;配列番号2)、FLPGSGST(「V_H CDR 2.4」;配列番号8)、INPSNGGT(「V_H CDR 2.16」;配列番号43)、及びISFSGYT(「V_H CDR 2.19」;配列番号44)より選択される;ならびに、V_H CDR 3は、TRRDS PQY(「V_H CDR 3.3」;配列番号3)、ATDGN YDWFAY(「V_H CDR 3.4」;配列番号9)、TRGGYYPFDY(「V_H CDR 3.16」;配列番号47)、及びAREVN YGDSYHFDY(

30

40

50

「V_H CDR 3.19」；配列番号48)より選択される。表1Aを参照のこと。

【0059】

一部の実施態様において、PGのC末端部分に対して産生された抗hPG抗体は、3つの可変軽鎖CDR及び3つの可変重鎖CDRを有し、それにおいて、V_L CDR1は、KSLRHTKGI TF (「V_L CDR 1.8」；配列番号49)及びQSLLDS DGKTY (「V_L CDR 1.13」；配列番号50)より選択される；V_L CDR2は、QMS (「V_L CDR 2.8」；配列番号52)及びLVS (「V_L CDR 2.13」；配列番号53)より選択される；V_L CDR3は、AQNLELPLT (「V_L CDR 3.8」；配列番号55)及びWQGTHFPQT (「V_L CDR 3.13」；配列番号56)より選択される；V_H CDR1は、GFTFTTYA (「V_H CDR 1.8」；配列番号37)及びGFIFSSYG (「V_H CDR 1.13」；配列番号38)より選択される；V_H CDR2は、ISSGGTYT (「V_H CDR 2.8」；配列番号41)及びINTFGDRT (「V_H CDR 2.13」；配列番号42)より選択される；ならびに、V_H CDR3は、ATQGNYS LDF (「V_H CDR 3.8」；配列番号45)及びARGTGTY (「V_H CDR 3.13」；配列番号46)より選択される。表1Bを参照のこと。

【0060】

【表 1】

表 1A						
N 末端抗 hPG モノクローナル抗体						
免疫原	ハイブリドーマ (寄託#)	MAb	マウス CDR 配列	マウス V _H 及び V _L 配列	ヒト化 V _H 及び V _L 配列 (投影)	
N1	43B9G11	MAb1				
N1	WE5H2G7	MAb2				
N2	6B5B11C10	MAb3	V _H CDR 1.3 GYIFTSYW (配列番号 1) V _H CDR 2.3 FYPGNSDS (配列番号 2) V _H CDR 3.3 TRRDSPOQY (配列番号 3) V _L CDR 1.3 QSIVHSNGNTY (配列番号 4) V _L CDR 2.3 KVS (配列番号 5) V _L CDR 3.3 FQGSHPFT (配列番号 6)	mV _H 3 (SEQ ID NO.12) mV _L 3 (配列番号 13)	hV _H 3 (配列番号 21) hV _L 3 (配列番号 22)	
N2	20D2C3G2	MAb4	V _H CDR 1.4 GYTFSSW (配列番号 7) V _H CDR 2.4 FLPGSGST (配列番号 8) V _H CDR 3.4 ATDGNVDWFAY (配列番号 9) V _L CDR 1.4 QSLVHSSGVTY (配列番号 10) V _L CDR 2.4 KVS (配列番号 5) V _L CDR 3.4 SQSTHVPPPT (配列番号 11)	mV _H 4 (配列番号 14) mV _L 4 (配列番号 15)	hV _H 4 (配列番号 23) hV _L 4 (配列番号 24)	
N2	IE9A4A4 (I-4376)	MAb15				
N2	IE9D9B6	MAb16	V _H CDR 1.16 GYTFTSYY (配列番号 39) V _H CDR 2.16 INPSNGGT (配列番号 43) V _H CDR 3.16 TRGGYYPFDY (配列番号 47) V _L CDR 1.16 QSLDSDGKTY (配列番号 50) V _L CDR 2.16 LVS (配列番号 53) V _L CDR 3.16 WQGTSPYT (配列番号 57)	mV _H 16 (配列番号 61) mV _L 16 (配列番号 65)	hV _H 16a (配列番号 84) hV _H 16b (配列番号 86) hV _H 16c (配列番号 88) hV _L 16a (配列番号 85) hV _L 16b (配列番号 87) hV _L 16c (配列番号 89)	
N2	IC8D10F5	MAb17				
N2	1A7C3F11	MAb18				

10

20

30

40

【 0 0 6 1 】

表 1A
N 末端抗 hPG モノクローナル抗体

免疫原	ハイブリドーマ (寄託#)	MAb	マウス CDR 配列	マウス V _H 及び V _L 配列	ヒト化 V _H 及び V _L 配列 (投影)
N2	1B3B4F11	MAb19	V _H CDR 1.19 GYSITSDYA (配列番号 40) V _H CDR 2.19 ISFSGYT (配列番号 44) V _H CDR 3.19 AREVNYGDSYHFDY (配列番号 48) V _L CDR 1.19 SQHRITYT (配列番号 51) V _L CDR 2.19 VKKDGSH (配列番号 54) V _L CDR 3.19 GVGDAIKGQSVFV (配列番号 58)	mV _H 19 (配列番号 62) mV _L 19 (配列番号 66)	hV _H 19a (配列番号 90) hV _H 19b (配列番号 92) hV _H 19c (配列番号 94) hV _L 19a (配列番号 91) hV _L 19b (配列番号 93) hV _L 19c (配列番号 95)
N2	1C11F5E8	MAb20			

免疫原 N1 = SWKPRSQQPDAPLG Ahx Cys BSA, (配列番号 25) Ahx Cys BSA としても表される。
免疫原 N2 = SWKPRSQQPDAPLG Ahx Cys KLH, (配列番号 25) Ahx Cys KLH としても表される。

表 1A において、全てのアミノ酸配列は、従来の N→C 方向を使用して表される。各々の免疫原について、プロガストリンペプチドは、1 つのアミノヘキサノ酸 (Ahx) 残基、それに続くシステインのリンカーを用いて合成され、次に、ウシ血清アルブミン (「BSA」) 又はキーホールリンペットヘモシアニン (「KLH」) 担体のいずれかに結合した。

10

20

30

40

【表 2】

表 1B C 末端抗 hPG モノクローナル抗体						
免疫原	ハイブリドーマ (寄託 #)	MAb	マウス CDR 配列	マウス V _H 及び V _L 配列	ヒト化 V _H 及び V _L 配列 (投影)	
C1	1B4A11D11 (I-4371)	MAb5				
C1	1B6A11F2 (I-4372)	MAb6				
C1	1B11E4B11 (I-4373)	MAb7				
C1	1C10D3B9	MAb8	V _H CDR 1.8 GFTFTTYA (配列番号 37) V _H CDR 2.8 ISSGGTYT (配列番号 41) V _H CDR 3.8 ATQGNYSLDF (配列番号 45) V _L CDR 1.8 KSLRHTKGIHF (配列番号 49) V _L CDR 2.8 QMS (配列番号 52) V _L CDR 3.8 AQNLELPLT (配列番号 55)	mV _H 8 (配列番号 59) mV _L 8 (配列番号 63)	hV _H 8a (配列番号 75) hV _H 8b (配列番号 77) hV _H 8c (配列番号 79) hV _L 8a (配列番号 76) hV _L 8b (配列番号 78) hV _L 8c (配列番号 76)	
C1	1D8F5B3	MAb9				
C1	1E1C7B4	MAb10				
C1	2B4C8C8 (I-4374)	MAb11				
C1	2B11E6G4 (I-4375)	MAb12				
C1	2C6C3C7	MAb13	V _H CDR 1.13 GFIFSSYG (配列番号 38) V _H CDR 2.13 INTFGDRT (配列番号 42) V _H CDR 3.13 ARGTGTY (配列番号 46) V _L CDR 1.13 QSLDSDGKTY (配列番号 50) V _L CDR 2.13 LVS (配列番号 53) V _L CDR 3.13 WQGHFPQT (配列番号 56)	mV _H 13 (配列番号 60) mV _L 13 (配列番号 64)	hV _H 13a (配列番号 80) hV _H 13b (配列番号 82) hV _L 13a (配列番号 81) hV _L 13b (配列番号 83)	
C1	2H9F4B7	MAb14				
C2	1F11F5E10	MAb21				

10

20

30

40

表 1B

C 末端抗 hPG モノクローナル抗体

免疫原	ハイブリドーマ (寄託 #)	MAb	マウス CDR 配列	マウス V _H 及び V _L 配列	ヒト化 V _H 及び V _L 配列 (投影)
C2	1F11F5G9	MAb22			
C2	1A11F2C9	MAb23			
免疫原 C1 = KLH Cys Ahx QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, KLH Cys Ahx Ahx (配列番号 27) としても表される。 免疫原 C2 = DT Cys Ahx Ahx QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, DT Cys Ahx Ahx (配列番号 27) としても表される。					

表 1B において、全てのアミノ酸配列は、従来の N→C 方向を使用して表される。各々の免疫原について、プロガストリンペプチドは、2つのアミノヘキサノ酸 (Ahx) 残基、それに続くシステインのリンカーを用いて合成され、次に、キーホールリンペプチドへモシアニン (「KLH」) 又はジフテリリア毒素 (「DT」) 担体のいずれかにかに結合した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

一部の実施形態において、抗 hPG モノクローナル抗体の V_H 鎖の CDR は、V_H CDR 1 . 3、V_H CDR 2 . 3、及び V_H CDR 3 . 3 である。特定の実施形態において、抗 hPG モノクローナル抗体の V_H 鎖は、mV_H . 3 (配列番号 12) に相当するアミノ酸配列を有する。図 2A を参照のこと。

【 0 0 6 3 】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.3、V_L CDR 2.3、及びV_L CDR 3.3である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖は、mV_L.3（配列番号13）に相当するアミノ酸配列を有する。図2Bを参照のこと。

【0064】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖のCDRは、V_H CDR 1.4、V_H CDR 2.4、及びV_H CDR 3.4である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖は、mV_H.4（配列番号14）に相当する配列を有する。図2Cを参照のこと。

【0065】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.4、V_L CDR 2.4、及びV_L CDR 3.4である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖は、mV_L.4（配列番号15）に相当するアミノ酸配列を有する。図2Dを参照のこと。

【0066】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖のCDRは、V_H CDR 1.8、V_H CDR 2.8、及びV_H CDR 3.8である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖は、mV_H.8（配列番号59）に相当する配列を有する。図2Eを参照のこと。

【0067】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.8、V_L CDR 2.8、及びV_L CDR 3.8である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖は、mV_L0.8（配列番号63）に相当するアミノ酸配列を有する。図2Fを参照のこと。

【0068】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖のCDRは、V_H CDR 1.13、V_H CDR 2.13、及びV_H CDR 3.13である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖は、mV_H.13（配列番号60）に相当する配列を有する。図2Gを参照のこと。

【0069】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.13、V_L CDR 2.13、及びV_L CDR 3.13である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖は、mV_L.13（配列番号64）に相当するアミノ酸配列を有する。図2Hを参照のこと。

【0070】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖のCDRは、V_H CDR 1.16、V_H CDR 2.16、及びV_H CDR 3.16である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖は、mV_H.16（配列番号61）に相当する配列を有する。図2Iを参照のこと。

【0071】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.16、V_L CDR 2.16、及びV_L CDR 3.16である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖は、mV_L.16（配列番号65）に相当するアミノ酸配列を有する。図2Jを参照のこと。

【0072】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖のCDRは、V_H CDR 1.19、V_H CDR 2.19、及びV_H CDR 3.19である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖は、mV_H.19（配列番号62）に相当する配列を有する。図2Kを参照のこと。

【0073】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.19、V_L CDR 2.19、及びV_L CDR 3.19である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_L鎖は、mV_L.19（配列番号66）に相当するアミノ酸配列を有する。図2Lを参照のこと。

【0074】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖のCDRは、V_H CDR 1.3、V_H CDR 2.3、及びV_H CDR 3.3であり、V_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.3、V_L CDR 2.3、及びV_L CDR 3.3である。特定の実施形態において、抗PGモノクローナル抗体のV_H鎖は、mV_H.3（配列番号12）に相当するアミノ酸配列を有し、V_L鎖は、mV_L.3（配列番号13）に相当する配列を有する。

10

【0075】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖のCDRは、V_H CDR 1.4、V_H CDR 2.4、及びV_H CDR 3.4であり、V_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.4、V_L CDR 2.4、及びV_L CDR 3.4である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖は、mV_H.4（配列番号14）に相当するアミノ酸配列を有し、V_L鎖は、mV_L.4（配列番号15）に相当するアミノ酸配列を有する。

【0076】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖のCDRは、V_H CDR 1.8、V_H CDR 2.8、及びV_H CDR 3.8であり、V_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.8、V_L CDR 2.8、及びV_L CDR 3.8である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体は、本明細書に記載する抗hPG MA b 8であり、mV_H.8（配列番号59）に相当するアミノ酸配列及びmV_L.8（配列番号63）に相当するアミノ酸配列を含む。

20

【0077】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖のCDRは、V_H CDR 1.3、V_H CDR 2.13、及びV_H CDR 3.13であり、V_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.13、V_L CDR 2.13、及びV_L CDR 3.13である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体は、本明細書に記載する抗hPG MA b 13であり、mV_H.13（配列番号60）に相当するアミノ酸配列及びmV_L.13（配列番号64）に相当するアミノ酸配列を含む。

30

【0078】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖のCDRは、V_H CDR 1.16、V_H CDR 2.16、及びV_H CDR 3.16であり、V_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.16、V_L CDR 2.16、及びV_L CDR 3.16である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体は、本明細書に記載する抗hPG MA b 16であり、mV_H.16（配列番号61）に相当するアミノ酸配列及びmV_L.16（配列番号65）に相当するアミノ酸配列を含む。

40

【0079】

一部の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体のV_H鎖のCDRは、V_H CDR 1.19、V_H CDR 2.19、及びV_H CDR 3.19であり、V_L鎖のCDRは、V_L CDR 1.19、V_L CDR 2.19、及びV_L CDR 3.19である。特定の実施形態において、抗hPGモノクローナル抗体は、本明細書に記載する抗hPG MA b 19であり、mV_H.19（配列番号62）に相当するアミノ酸配列及びmV_L.19（配列番号66）に相当するアミノ酸配列を含む。

【0080】

開示の抗hPGモノクローナル抗体は、hPGに特異的に結合することが可能であるインタクトな分子、及び抗体フラグメント（例えば、Fab及びF(ab')₂フラグメントなど）の両方を含む。Fab及びF(ab')₂フラグメントは、インタクトな抗体の

50

Fcフラグメントを欠き、インタクトな抗体よりも、動物及び植物の循環からより迅速に消え、より低い非特異的な組織結合を有しうる (Wahl et al., 1983, J. Nucl. Med. 24: 316)。抗体フラグメントは、従って、他の適用の間で、治療用適用において有用である。

【0081】

用語「抗体フラグメント」は、全長抗体の部分、一般的には、標的結合領域又は可変領域を指す。抗体フラグメントの例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFvフラグメントを含む。「Fv」フラグメントは、完全な標的認識及び結合部位を含む最小限の抗体フラグメントである。この領域は、堅固な非共有結合における1つの重鎖及び1つの軽鎖可変ドメインの二量体 (V_H-V_L二量体) からなる。この配置において、各々の可変ドメインの3つのCDRが相互作用し、V_H-V_L二量体の表面上の標的結合部位を定義する。しばしば、6つのCDRが、抗体に標的結合特異性を与える。しかし、一部の例において、単一の可変ドメイン (標的について特異的な3つのCDRだけを含むFvの半分) でさえ、標的を認識し、それに結合する能力を有することができるが、結合部位全体よりも親和性は低い。「一本鎖Fv」又は「scFv」抗体フラグメントは、抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、それにおいて、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖中に存在する。一般的には、Fvポリペプチドは、さらに、scFvが標的結合のための所望の構造を形成することを可能にする、V_H及びV_Lドメインの間にポリペプチドリンカーを含む。「単一ドメイン抗体」は、hPGに十分な親和性を示す、単一のV_H又はV_Lドメインで構成される。特定の実施形態において、単一ドメイン抗体はラクダ化抗体である (例、Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231: 25-38を参照のこと)。

10

20

【0082】

Fabフラグメントは、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1定常ドメイン (CH₁) を含む。Fab'フラグメントは、抗体ヒンジ領域からの1つ又は複数のシステインを含む、重鎖CH₁ドメインのカルボキシル末端での数個の残基の付加により、Fabフラグメントとは異なる。F(ab')₂フラグメントは、F(ab')₂ペプシン消化産物のヒンジシステインでのジスルフィド結合の開裂により産生される。抗体フラグメントの追加の化学共役は、当業者に公知である。

【0083】

開示の抗hPGモノクローナル抗体は、キメラ抗体でありうる。用語「キメラ」抗体は、本明細書において使用する通り、非ヒト免疫グロブリン (例えばラット又はマウス抗体など) 及びヒト免疫グロブリン定常領域 (典型的には、ヒト免疫グロブリン鑄型から選ばれる) に由来する可変配列を有する抗体を指す。キメラ抗体を産生するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、Morrison, 1985, Science 229 (4719): 1202-7; Oi et al., 1986, BioTechniques 4: 214-221; Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125: 191-202; 米国特許第5,807,715号; 第4,816,567号; 及び第4,816,397号を参照のこと。それらは、参照により、その全体において本明細書に組み入れられる。

30

【0084】

開示の抗hPGモノクローナル抗体は、ヒト化することができる。非ヒト (例、マウス) 抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそのフラグメント (例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂又は抗体の他の標的結合部分配列など) である。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、及び、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、それにおいて、CDR領域の全て又は実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのものに相当し、FR領域の全て又は実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものであり、「CDR移植」として言及することができる。ヒト化抗体は、また、免疫グロブリン定常領域 (Fc) の少なくとも部分、典型的にはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものを含むことができる。抗体ヒト化の方法 (ヒト化抗体を設計する方法を含む) は、当技術分野において公知である。例えば、Lefranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27

40

50

: 55-77 ; Lefranc et al., 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012 ; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111 ; Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-7 ; 米国特許第 5, 530, 101 号 ; 第 5, 585, 089 号 ; 第 5, 693, 761 号 ; 5, 693, 762 ; 及び第 6, 180, 370 号、Queen et al. ; EP 2 394 000 ; PCT 公開 WO 91 / 099 67 ; 米国特許第 5, 225, 539 号 ; EP 5 92 106 ; EP 5 195 96 ; Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28: 489-498 ; Studnicka et al., 1994, Prot. Eng. 7: 805-814 ; Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 969-973 ; 及び米国特許第 5, 565, 332 号を参照のこと。その全てが、参照により、その全体において本明細書により組み入れられる。

【 0085 】

ヒト化抗 h P G モノクローナル抗体についての配列は、以下の実施例に記載する通り、本開示のマウス抗 h P G モノクローナル抗体から設計された。ヒト化抗体の特定の実施態様は、以下：(1) 本明細書に開示する任意の 3 つの V_L CDR 及び任意の 3 つの V_H CDR ; (2) 配列番号 21 に相当するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 22 に相当するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ; (3) 配列番号 23 に相当するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 24 に相当するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ; (4) 配列番号 75、77、及び 79 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ならびに配列番号 76 及び 78 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ; (5) 配列番号 80 及び 82 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ならびに配列番号 81 及び 83 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ; (6) 配列番号 84、86、及び 88 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ならびに配列番号 85、87、及び 89 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ; (7) 配列番号 90、92、及び 94 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域ならびに配列番号 91、93、及び 95 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ; を含む抗体を含む。

【 0086 】

開示の抗 h P G モノクローナル抗体は、霊長類化することができる。用語「霊長類化抗体」は、サル可変領域及びヒト定常領域を含む抗体を指す。霊長類化抗体を産生するための方法は、当技術分野において公知である。例、米国特許第 5, 658, 570 号 ; 第 5, 681, 722 号 ; 及び第 5, 693, 780 号を参照のこと。それらは、参照により、その全体において本明細書に組み入れられる。

【 0087 】

抗 h P G モノクローナル抗体内には、参照抗体と競合する抗体 (例えば、ポリクローナル抗 h P G 抗体など)、又は本明細書に開示する抗 h P G モノクローナル抗体のいずれかが含まれる。開示の抗 h P G モノクローナル抗体と競合する抗体は、診断及び治療の種々のアプリケーションのために有用である。適した参照抗 h P G モノクローナル抗体の特定の実施態様は、例えば、限定はしないが、本明細書に記載する抗体 : 本明細書に開示する任意の 3 つの V_L CDR 及び任意の 3 つの V_H CDR を含む抗体 ; V_H 鎖が配列番号 12 に相当するアミノ酸配列 ($mV_H.3$) を有し、 V_L 鎖が配列番号 13 に相当するアミノ酸配列 ($mV_L.3$) を有する抗体 ; V_H 鎖が配列番号 14 に相当するアミノ酸配列 ($mV_H.4$) を有し、 V_L 鎖が配列番号 15 に相当するアミノ酸配列 ($mV_L.4$) を有する抗体、 V_H 鎖が配列番号 59 に相当するアミノ酸配列 ($mV_H.8$) を有し、 V_L 鎖が配列番号 63 に相当するアミノ酸配列 ($mV_L.8$) を有する抗体 ; V_H 鎖が配列番号 60 に相当するアミノ酸配列 ($mV_H.13$) を有し、 V_L 鎖が配列番号 64 に相当するアミノ酸配列 ($mV_L.13$) を有する抗体 ; V_H 鎖が配列番号 61 に相当するアミノ酸配列 ($mV_H.16$) を有し、 V_L 鎖が配列番号 65 に相当するアミノ酸配列 ($mV_L.16$) を有する抗体 ; V_H 鎖が配列番号 62 に相当するアミノ酸配列 ($mV_H.19$) を有し、 V_L 鎖が配列番号 66 に相当するアミノ酸配列 ($mV_L.19$) 又は本明細書に開示する V_H 及び V_L 鎖の任意の組み合わせを有する抗体を含む。

【 0088 】

10

20

30

40

50

適した参照抗体は、また、以下よりなる群より選択されるハイブリドーマにより産生される抗体：43B9G11、WE5H2G7、6B5B11C10、20D2C3G2、1B4A11D11、1B6A11F2、1B11E4B11、1C10D3B9、1D8F5B3、1E1C7B4、2B4C8C8、2B11E6G4、2C6C3C7、2H9F4B7、1E9A4A4、1E9D9B6、1C8D10F5、1A7C3F11、1B3B4F11、1C11F5E8、1F11F5E10、1F11F5G9、及び1A11F2C9；hPGの残基10～14（配列番号28）、hPGの残基9～14（配列番号29）、hPGの残基4～10（配列番号30）、hPGの残基2～10（配列番号31）、又はhPGの残基2～14（配列番号32）を含むエピトープに結合する抗体；及び、hPGの残基71～74（配列番号33）、hPGの残基69～73（配列番号34）、hPGの残基76～80（配列番号35）、又はhPGの残基67～74（配列番号36）を含むエピトープに結合する抗体を含む。

【0089】

PG、例えば、hPGへの結合について本開示のモノクローナル抗体と競合する能力は、以下の通りに、競合アッセイを使用してテストすることができる。96ウェルプレートに、捕捉抗体（参照モノクローナル抗体により認識されるエピトープとは異なる、プロガストリンのN又はC末端領域を認識するポリクローナル又はモノクローナル抗体）を用いて、1～10 µg/mlの範囲内で選ばれる濃度で、一晚4でコーティングする（0.1～1 µg/ウェル）。PBS中の0.1% Tween-20/0.1% BSA（ブロッキング緩衝剤）を用いて22で2時間にわたりブロッキングした後、組換えヒトプロガストリンを、10 pM～1 nM（10～1000 pg/ウェル）で加え、22で2時間にわたりインキュベートする。その後、ビオチン化した参照抗hPGモノクローナル抗体又は参照モノクローナル抗体を含む混合物を、増加濃度の非標識テスト抗体と共に加え、22で1時間にわたりインキュベートする。洗浄後、検出は、22で1時間にわたりホースラディッシュペルオキシダーゼ用の蛍光発生基質を用いてインキュベートすることにより実施し、ルミノメーターにおける相対光単位（RLU）の定量化が続く。アッセイは二通り実施する。本開示の参照抗hPGモノクローナル抗体と競合する抗体は、hPGに対する参照抗体の結合を阻害する。対照抗体と同じエピトープに結合する抗体は、結合について効果的に競合することができ、このように、結合標識における低下により証明される通り、参照抗体結合を有意に低下させる（例えば、少なくとも50%だけ）。完全に無関係の抗体の非存在における（標識された）参照抗体の反応性は、対照の高値になりうる。対照の低値は、非標識テスト抗体を、プロガストリンを発現する細胞とインキュベートすることにより得られ、競合が生じ、標識抗体の結合を低下させる場合、細胞/抗体混合物を、正確に同じ型の標識対照抗体とインキュベートする。テストアッセイにおいて、テスト抗体の存在における標識抗体の反応性の有意な低下は、実質的に同じエピトープを認識するテスト抗体の指標である。

【0090】

結合阻害は、以下の式：

$$K_i = IC_{50} / (1 + [参照Ab濃度] / K_d)$$

に従って計算される、阻害定数、又は K_i として表現することができる。

ここで、テスト抗体の IC_{50} は、参照抗体の結合における50%低下をもたらすテスト抗体の濃度であり、 K_d は、参照抗体の解離定数（プロガストリンについてのその親和性の測定値）である。本明細書に開示する抗hPGモノクローナル抗体と競合する抗体は、本明細書に記載するアッセイ条件下で、10 pM～10 nMの K_i を有しうる。

【0091】

種々の実施態様において、開示の非標識抗hPGモノクローナル抗体は、標識した参照抗体の結合を、少なくとも40%だけ、少なくとも50%だけ、少なくとも60%だけ、少なくとも70%だけ、少なくとも80%だけ、少なくとも90%だけ、100%だけ、あるいは、抗hPGモノクローナル抗体が濃度0.01 µg/ml、0.08 µg/ml、0.4 µg/ml、2 µg/ml、10 µg/ml、50 µg/ml、100 µg/ml又は前述の値のいずれかの間の範囲

の濃度で（例、 $2 \mu\text{g/ml} \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の範囲の濃度で）使用される場合、前述の値（例、開示の抗hPGモノクローナル抗体が、標識された参照抗体の結合を50%～70%だけ低下させる）のいずれかの間の範囲のパーセンテージだけ低下させる。

【0092】

参照抗体と任意のテスト抗体（種又はアイソタイプに無関係）の間での抗体競争試験を行う際、人は、最初に、標識可能な標識、例えばビオチン又は酵素（又はさらには放射性）標識を用いて標識し、その後の同定を可能にする。この場合において、標識した参照抗体（固定又は増加濃度）を、既知量のプロガストリンとインキュベートする。非標識テスト抗体を、プロガストリンと標識抗体の事前に結合させた複合体に加える。結合標識の強度を測定する。テスト抗体が、重複するエピトープに結合することにより、標識抗体と競合する場合、強度は、テスト抗体の非存在において、対照標識抗体の結合と比べて減少する。

10

【0093】

競合についてのアッセイは公知であり、適応させて、上に記載するアッセイと同程度の結果をもたらすことができる。アッセイは、抗体競合に基づく免疫学的アッセイの範囲のいずれか1つでありうる。参照抗体は、それらの標識を検出する手段により、例えば、ビオチン化抗体の場合にはストレプトアビジンを使用することにより、又は、酵素標識（例えば、ペルオキシダーゼ酵素を伴う3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）基質など）に関連する発色基質を使用することにより、又は、単に放射性標識もしくは蛍光標識を検出することにより、検出されうる。

20

【0094】

また、診断的及び治療的適用における使用のために、誘導体化された、共有結合的に修飾された、又は他の分子に結合された抗hPGモノクローナル抗体が本明細書に含まれる。例えば、しかし、限定しないが、誘導体化された抗体は、例えば、細胞リガンド又は他のタンパク質などへの公知の保護/遮断基、タンパク質分解的切断、連結によるグリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、誘導体化により修飾されている抗体を含む。多数の化学修飾のいずれかを、公知の技術（しかし、限定しないが、特定の化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成など）により行うことができる。加えて、誘導体は、1つ又は複数の非古典的アミノ酸を含むことができる。

【0095】

別の例において、本開示の抗体は、ポリ（エチレングリコール）（PEG）部分に付着させることができる。特定の実施態様において、抗体は抗体フラグメントであり、PEG部分は、抗体フラグメント中に位置付けられる利用可能な任意のアミノ酸側鎖又は末端アミノ酸官能基、例えば、任意の遊離アミノ基、イミノ基、チオール基、ヒドロキシル基、又はカルボキシル基を通じて付着される。そのようなアミノ酸は、抗体フラグメント中で自然に生じうる、又は、組換えDNA方法を使用してフラグメントに操作することができる。例えば、米国特許第5,219,996号を参照のこと。複数の部位を使用して、2つ又はそれ以上のPEG分子を結合することができる。PEG部分は、抗体フラグメント中に位置付けられる少なくとも1つのシステイン残基のチオール基を通じて共有結合的に連結することができる。チオール基を付着点として使用する場合、適切に活性化されたエフェクター部分、例えば、チオール選択的誘導体（例えばマレイミド及びシステイン誘導体など）を使用することができる。

30

40

【0096】

具体的な例において、抗hPGモノクローナル抗体コンジュゲートは、PEG化された、即ち、EP0948544に開示される方法に従って、それに共有結合的に付着されたPEG（ポリ（エチレングリコール））を有する修飾Fab'フラグメントである。また、Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications, (J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, New York, 1992); Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications, (J. Milton Harris and S. Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington D.C., 1997); 及びBioconjugation Protein Coupling

50

Techniques for the Biomedical Sciences, (M. Aslam and A. Dent, eds., Grove Publishers, New York, 1998); 及びChapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54: 531-545を参照のこと。PEGを、ヒンジ領域のシステインに付着させることができる。1つの例において、PEG修飾Fab'フラグメントは、修飾されたヒンジ領域内の単一のチオール基に共有結合的に連結されたマレイミド基を有する。リジン残基をマレイミド基に共有結合的に連結することができ、リジン残基上のアミン基の各々に、およそ20,000Daの分子量を有するメトキシポリ(エチレングリコール)ポリマーを付着することができる。Fab'フラグメントに付着されているPEGの総分子量は、従って、およそ40,000Daでありうる。

【0097】

抗hPGモノクローナル抗体は、診断的適用において有用な標識抗体を含む。抗体を診断的に使用することができ、例えば、特定の細胞、組織、又は血清における目的の標的の発現を検出する；又は、臨床テスト手順の一部として、免疫学的応答の発生又は進行をモニターし、例えば、所与の処置計画の効力を決定する。検出は、検出可能な物質又は「標識」へ抗体を共役させることにより促進することができる。標識は、開示の抗hPGモノクローナル抗体に直接的又は間接的に結合させることができる。標識はそれ自体が検出可能であり(例、放射性同位体標識、同位体標識、又は蛍光標識)、あるいは、酵素標識の場合において、基質化合物又は検出可能な組成物の化学変化を触媒することができる。検出可能な物質の例は、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々のポジトロン放出断層撮影を使用した陽電子放出金属、及び非放射性常磁性金属イオンを含む。検出可能な物質は、中間体(例えば、当技術分野において公知のリンカーなど)を通じて、当技術分野において公知の技術を使用して、抗体(又はそのフラグメント)に直接的に又は間接的に共役又は結合させることができる。酵素標識の例としては、ルシフェラーゼ(例、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4737456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼ、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)など、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ(例、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環オキシダーゼ(例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなど)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどを含む。適した補欠分子族複合体の例は、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンを含む；適した蛍光物質の例は、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン、フルオレセイン、ダンシルクロリド、ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリスリンなどを含む；発光物質の例は、ルミノールを含む；生物発光物質の例は、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンを含む；適した同位体物質の例は、 ^{13}C 、 ^{15}N 、及び重水素を含む；及び、適した放射性物質の例は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、又は ^{99}Tc を含む。

【0098】

全ての種に由来する抗hPGモノクローナル抗体が本発明に含まれる。非限定的な例示的な自然抗体は、ヒト、サル、ニワトリ、ヤギ、ウサギ、及び齧歯類(例、ラット、マウス、及びハムスター)に由来する抗体を含む(例、Lonberg et al., WO 93/12227；米国特許第5,545,806号；及び、Kucherlapati, et al., WO 91/10741；米国特許第6,150,584号、それらは、参照により、その全体において本明細書に組み入れられる)。自然抗体は、抗原(例えばポリペプチドなど)を用いて免疫化された後に宿主動物により産生される抗体である。

【0099】

核酸及び発現系

本開示は、抗hPGモノクローナル抗体についての免疫グロブリン軽鎖及び重鎖遺伝子をコードする核酸分子、そのような核酸を含むベクター、及び開示の抗hPGモノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体を産生することが可能である宿主細胞を包含する。

【 0 1 0 0 】

開示の抗 h P G モノクローナル抗体は、宿主細胞における免疫グロブリン軽鎖及び重鎖遺伝子の組換え発現により調製することができる。抗体を組換え的に発現させるために、宿主細胞を、抗体の免疫グロブリン軽鎖及び重鎖をコードする DNA フラグメントを保有する 1 つ又は複数の組換え発現ベクターを用いてトランスフェクトし、軽鎖及び重鎖が宿主細胞において発現され、場合により、宿主細胞が培養される培地中に分泌され、その培地から抗体を回収することができる。標準的な組換え DNA 方法論を使用して、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子を得て、組換え発現ベクター中にこれらの遺伝子を組み込み、宿主細胞中にベクターを導入する。例えば、Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition (Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F. M. et al., eds., Greene Publishing Associates, 1989) 及び米国特許第 4, 8 1 6, 3 9 7 号に記載されるものなどである。

10

【 0 1 0 1 】

そのような抗 h P G モノクローナル抗体をコードする核酸を生成するために、軽鎖及び重鎖可変領域をコードする DNA フラグメントを最初に得る。これらの DNA は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を使用して、軽鎖及び重鎖可変配列をコードする生殖系列 DNA 又は c D N A の増幅及び改変により得ることができる。ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列 DNA 配列は、当技術分野において公知である (例、Lefranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77 ; Lefranc et al., 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012 ; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111; the "VBASE" human germline sequence database を参照のこと ; また、Kabat, E. A. et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 ; Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 22T: 116-198 ; 及び Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24: 827-836 を参照のこと。それらの各々の内容は、参照により本明細書に組み入れられる) 。

20

【 0 1 0 2 】

一旦、抗 h P G モノクローナル抗体関連 V_H 及び V_L セグメントをコードする DNA フラグメントが得られれば、これらの DNA フラグメントは、例えば、可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子に、F a b フラグメント遺伝子に、又は s c F v 遺伝子に変換するために、標準的な組換え DNA 技術によりさらに操作することができる。これらの操作において、 V_L 又は V_H をコードする DNA フラグメントを、別のタンパク質をコードする別の DNA フラグメント (例えば抗体定常領域又はフレキシブルリンカーなど) に作動可能的に連結する。用語「作動可能に連結する」は、本文脈で使用する通り、2 つの DNA フラグメントが、2 つの DNA フラグメントによりコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように結合されていることを意味することを意図する。

30

【 0 1 0 3 】

V_H 領域をコードする単離 DNA を、 V_H をコードする DNA を、重鎖定常領域 (CH_1 、 CH_2 、 CH_3 、及び、場合により、 CH_4) をコードする別の DNA 分子に作動可能に連結することにより全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において公知である (例、Kabat, E.A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 を参照のこと) 。これらの領域を包含する DNA フラグメントは、標準的な P C R 増幅により得ることができる。重鎖定常領域は、I g G ₁、I g G ₂、I g G ₃、I g G ₄、I g A、I g E、I g M、又は I g D 定常領域でありうるが、しかし、特定の実施形態において、I g G ₁ 又は I g G ₄ 定常領域である。F a b フラグメント重鎖遺伝子について、 V_H をコードする DNA を、重鎖 CH_1 定常領域だけをコードする別の DNA 分子に作動可能に連結することができる。

40

【 0 1 0 4 】

50

V_L領域をコードする単離DNAを、V_LをコードするDNAを、軽鎖定常領域C_Lをコードする別のDNA分子に作動可能に連結することにより、全長軽鎖遺伝子（ならびにFab軽鎖遺伝子）に変換することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において公知である（例、Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)を参照のこと）。これらの領域を包含するDNAフラグメントは、標準的なPCR増幅により得ることができる。軽鎖定常領域は、カッパ又はラムダ定常領域でありうるが、しかし、特定の実施形態において、カッパ定常領域である。scFv遺伝子を作製するために、V_H及びV_LをコードするDNAフラグメントを、フレキシブルリンカーをコードする、例えば、アミノ酸配列(Gly4~Ser)3（配列番号99）をコードする別のフラグメントに作動可能に連結し、V_H及びV_L配列を近接する単鎖タンパク質として発現させることができ、V_L及びV_H領域がフレキシブルリンカーにより結合されるようにする（例、Bird et al., 1988, Science 242: 423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., 1990, Nature 348: 552-554を参照のこと）。

10

20

30

40

50

【0105】

開示の抗hPGモノクローナル抗体を発現させるために、上に記載する通りに得られた、部分的な又は全長の軽鎖及び重鎖をコードするDNAを、遺伝子が転写及び翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、発現ベクター中に挿入する。本文脈において、用語「作動可能に連結された」は、ベクター内の転写及び翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写及び翻訳を制御するそれらの意図した機能を果たすように、抗体遺伝子がベクター中に連結されていることを意味することを意図する。発現ベクター配列及び発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するように選ばれる。抗体軽鎖遺伝子及び抗体重鎖遺伝子は、別々のベクター中に挿入することができる、又は、より典型的には、両方の遺伝子が同じ発現ベクター中に挿入される。

【0106】

抗体遺伝子は、標準的な方法により発現ベクター中に挿入される（例、抗体遺伝子フラグメント及びベクター上の相補的制限部位のライゲーション、又は、制限部位が存在しない場合には平滑末端のライゲーション）。抗hPGモノクローナル抗体関連の軽鎖又は重鎖配列の挿入に先立ち、発現ベクターは、既に抗体定常領域配列を保有しうる。例えば、抗hPGモノクローナル抗体に関連するV_H及びV_L配列を、全長抗体遺伝子に変換するための1つのアプローチは、重鎖定常領域及び軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクター中にそれらを挿入することであり、V_Hセグメントがベクター内のCHセグメントに作動可能に連結され、V_Lセグメントがベクター内のCLセグメントに作動可能に連結される。加えて又は代わりに、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、ベクター中にクロニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチド又は異種シグナルペプチド（即ち、非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド）でありうる。

【0107】

抗体鎖遺伝子に加えて、開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞において抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を保有する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、及び抗体鎖遺伝子の転写又は翻訳を制御する他の発現制御エレメント（例、ポリアダニル化シグナル）を含むことを意図する。そのような調節配列は、例えば、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990)に記載されている。発現ベクターの設計（調節配列の選択を含む）が、形質転換する宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの要因に依存しうるが、当業者により理解されるであろう。哺乳動物宿主細胞での発現のための適した調節配列は、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現に向けるウイルスエレメント、例えばサ

イトメガロウイルス (CMV) (例えばCMVプロモーター/エンハンサーなど)、シミアンウイルス40 (SV40) (例えばSV40プロモーター/エンハンサー)、アデノウイルス (例、アデノウイルス主要後期プロモーター (AdMLP))、及びポリオマに由来するプロモーター及び/又はエンハンサーなどを含む。ウイルス調節エレメント及びそれらの配列のさらなる記載については、例えば、米国特許第5,168,062号 (Stinskiによる)、米国特許第4,510,245号 (Bell et al.による)、及び米国特許第4,968,615号 (Schaffner et al.による)を参照のこと。

【0108】

抗体鎖遺伝子及び調節配列に加えて、開示の組換え発現ベクターは、追加配列、例えば宿主細胞においてベクターの複製を調節する配列 (例、複製起点) 及び選択可能なマーカー遺伝子などを保有することができる。選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を促進させる (例、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号、及び第5,179,017号 (Axel et al.))。例えば、典型的には、選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、薬物 (例えばG418、ハイグロマイシン、又はメトトレキサートなど) への耐性を与える。適した選択可能なマーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子 (メソトレキサート選択/増幅を伴うDHFR - 宿主細胞内での使用のため) 及びネオ遺伝子 (G418選択のため) を含む。軽鎖及び重鎖の発現のために、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターを、標準的な技術により宿主細胞中にトランスフェクトする。用語「トランスフェクション」の種々の形態は、原核生物又は真核生物の宿主細胞中への外来DNAの導入のために一般的に使用される多種多様の技術 (例、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなど) を包含することを意図する。

【0109】

原核生物又は真核生物のいずれかの宿主細胞において開示の抗体を発現させることが可能である。特定の実施態様において、抗体の発現は、適当に折り畳まれ、免疫学的に活性な抗体の最適な分泌が、真核細胞 (例、哺乳動物宿主細胞) において実施される。開示の組換え抗体を発現させるための例示的な哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO細胞) (DHFR - CHO細胞を含む。Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220に記載され、DHFR選択可能マーカーと使用される。例、Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159: 601-621に記載される)、NSOミエロマ細胞、COS細胞、及びSP2細胞を含む。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞中に導入する場合、抗体は、宿主細胞における抗体の発現又は宿主細胞を成長させる培養培地中への抗体の分泌を許すために十分な時間にわたり宿主細胞を培養することにより産生される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を使用して培養培地から回収することができる。宿主細胞を使用して、インタクトな抗体の部分 (例えばFabフラグメント又はscFv分子など) を産生することもできる。上の手順に関するバリエーションは、本開示の範囲内であることが理解される。例えば、宿主細胞を、本開示の抗hPGモノクローナル抗体の軽鎖又は重鎖のいずれか (しかし両方ではない) をコードするDNAを用いてトランスフェクションすることが望ましい。

【0110】

組換えDNA技術を使用して、hPGへの結合のために必要とされない軽鎖及び重鎖のいずれか又は両方をコードするDNAの一部又は全てを除去することもできる。そのような切断DNA分子から発現される分子も、開示の抗体に包含される。

【0111】

開示の抗hPGモノクローナル抗体の組換え発現のために、宿主細胞を、開示の2つの発現ベクターを用いて同時トランスフェクトすることができ、第1ベクターは重鎖由来ポリペプチドをコードし、第2ベクターは軽鎖由来ポリペプチドをコードする。2つのベクターは同一の選択可能なマーカーを含むことができ、又は、それらは、各々、別々の選択可能なマーカーを含むことができる。あるいは、重鎖及び軽鎖の両方のポリペプチドをコ

10

20

30

40

50

ードする単一ベクターを使用することができる。

【0112】

一旦、抗hPGモノクローナル抗体の1つ又は複数の部分をコードする核酸が、さらなる変化又は変異をコード配列中に導入して、例えば、異なるCDR配列を伴う抗体、Fc受容体に対する低下した親和性を伴う抗体、又は異なるサブクラスの抗体をコードする核酸を生成することができる。

【0113】

開示の抗hPGモノクローナル抗体は、また、化学合成により(例、Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Illに記載されている方法により)産生することができる。異型抗体は、また、無細胞プラットフォーム(例、Chu et al., Biochemia No. 2, 2001 (Roche Molecular Biologicals)を参照のこと)を使用して生成することができる。

10

【0114】

一旦、開示の抗hPGモノクローナル抗体が組換え発現により産生されれば、それは、例えば、免疫グロブリン分子の精製のための当技術分野において公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー(例、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、及びサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度差により、又は、タンパク質の精製のための他の標準的な技術により精製することができる。さらに、本開示の抗hPGモノクローナル抗体又はそのフラグメントを、本明細書に記載する、又は、そうでなければ、当技術分野において公知の異種ポリペプチド配列に融合して、精製を促進することができる。

20

【0115】

一旦、単離されれば、抗hPGモノクローナル抗体を、所望の場合、例えば、高速液体クロマトグラフィー(例、Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980)を参照のこと)により、又は、Superdex(商標)75カラム(Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)上でのゲル濾過クロマトグラフィーによりさらに精製することができる。

【0116】

本発明は、抗hPGモノクローナル抗体を産生することが可能である宿主細胞を提供する。宿主細胞は、重鎖及び軽鎖遺伝子をコードする遺伝子を発現するように組換えDNA技術を使用して操作された細胞又は適した生物に由来し、所望の抗体を産生する能力について選択されたハイブリドーマでありうる。

30

【0117】

抗PGモノクローナル抗体を産生することが可能な宿主細胞は、ハイブリドーマでありうる。ハイブリドーマを生成するための方法は、当技術分野において公知であり(例、Kohler and Milstein, 1975, Nature 256: 495を参照のこと)、例を以下に提供する。一般的には、宿主動物(例えばマウスなど)を、免疫原(例えば目的のペプチドなど)を用いて免疫化し、免疫原に特異的に結合することが可能な抗体を産生する、リンパ球、例えば、脾臓細胞の発生を誘発する。あるいは、単離リンパ球(脾臓細胞、リンパ節細胞、又は末梢血リンパ球を含む)は、インビトロで免疫化することができる。リンパ球を、次に、適した融合薬剤(例、ポリエチレングリコール)を使用して、不死化細胞株(例えばミエロマ細胞株など)と融合させて、ハイブリドーマ細胞株を形成する。適した不死化細胞株は、哺乳動物(例えばマウス、ウシ、又はヒトなど)に由来しうる。ハイブリドーマ細胞を、次に、非融合、不死化細胞の成長又は生存を阻害する1つ又は複数の物質を含む任意の適した培地中で培養する。例えば、酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRRT)を欠く親細胞が使用される場合、融合体を、親の非融合細胞の成長を阻害するヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン(「HAT」培地)を含む培地中で増殖させることができる。

40

【0118】

一部の実施形態において、N末端抗hPGモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ43

50

B 9 G 1 1 (抗 h P G M A b 1 を産生する)、W E 5 H 2 G 7 (抗 h P G M A b 2 を産生する)、6 B 5 B 1 1 C 1 0 (抗 h P G M A b 3 を産生する)、2 0 D 2 C 3 G 2 (抗 h P G M A b 4 を産生する)、1 E 9 A 4 A 4 (抗 h P G M A b 1 5 を産生する)、1 E 9 D 9 B 6 (抗 h P G M A b 1 6 を産生する)、1 C 8 D 1 0 F 5 (抗 h P G M A b 1 7 を産生する)、1 A 7 C 3 F 1 1 (抗 h P G M A b 1 8 を産生する)、1 B 3 B 4 F 1 1 (抗 h P G M A b 1 9 を産生する)、及び 1 C 1 1 F 5 E 8 (抗 h P G M A b 2 0 を産生する) から入手可能なモノクローナル抗体の V_L に相当する可変軽鎖 (V_L) C D R を有する。

【 0 1 1 9 】

一部の実施形態において、N 末端抗 h P G モノクローナル抗体は、上のハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体の V_L 及び V_H C D R に相当する V_L 及び V_H C D R を有する。

10

【 0 1 2 0 】

一部の実施形態において、C 末端抗 h P G モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ 1 B 4 A 1 1 D 1 1 (抗 h P G M A b 5 を産生する)、1 B 6 A 1 1 F 2 (抗 h P G M A b 6 を産生する)、1 B 1 1 E 4 B 1 1 (抗 h P G M A b 7 を産生する)、1 C 1 0 D 3 B 9 (抗 h P G M A b 8 を産生する)、1 D 8 F 5 B 3 (抗 h P G M A b 9 を産生する)、1 E 1 C 7 B 4 (抗 h P G M A b 1 0 を産生する)、2 B 4 C 8 C 8 (抗 h P G M A b 1 1 を産生する)、2 B 1 1 E 6 G 4 (抗 h P G M A b 1 2 を産生する)、2 C 6 C 3 C 7 (抗 h P G M A b 1 3 を産生する)、2 H 9 F 4 B 7 (抗 h P G M A b 1 4 を産生する)、1 F 1 1 F 5 E 1 0 (抗 h P G M A b 2 1 を産生する)、1 F 1 1 F 5 G 9 (抗 h P G M A b 2 2 を産生する)、及び 1 A 1 1 F 2 C 9 (抗 h P G M A b 2 3 を産生する) から入手可能なモノクローナル抗体の V_L に相当する V_L C D R を有する。

20

【 0 1 2 1 】

一部の実施形態において、C 末端抗 h P G モノクローナル抗体は、上のハイブリドーマから入手可能なモノクローナル抗体の V_L 及び V_H C D R に相当する V_L 及び V_H C D R を有する。

【 0 1 2 2 】

実施態様において、配列番号 1 2 を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 3 を含む軽鎖可変領域を含む抗 h P G 抗体を産生することが可能な宿主細胞を提供する。実施態様において、配列番号 1 4 を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 5 を含む軽鎖可変領域を含む抗 h P G 抗体を産生することが可能な宿主細胞を提供する。実施態様において、配列番号 5 9 を含む重鎖可変領域及び配列番号 6 3 を含む軽鎖可変領域を含む抗 h P G 抗体を産生することが可能な宿主細胞を提供する。実施態様において、配列番号 6 0 を含む重鎖可変領域及び配列番号 6 4 を含む軽鎖可変領域を含む抗 h P G 抗体を産生することが可能な宿主細胞を提供する。実施態様において、配列番号 6 1 を含む重鎖可変領域及び配列番号 6 5 を含む軽鎖可変領域を含む抗 h P G 抗体を産生することが可能な宿主細胞を提供する。実施態様において、配列番号 6 2 を含む重鎖可変領域及び配列番号 6 6 を含む軽鎖可変領域を含む抗 h P G 抗体を産生することが可能な宿主細胞を提供する。

30

40

【 0 1 2 3 】

一部の実施態様において、開示の宿主細胞は、以下：配列番号 1 2、1 4、5 9、6 0、6 1、及び 6 2 の重鎖可変領域ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；ならびに、配列番号 1 3、1 5、6 3、6 4、6 5、及び 6 6 の軽鎖可変領域ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列より選択される核酸より選択される核酸を含む。一部の実施態様において、重鎖可変領域は、配列番号 1 6、1 8、6 7、6 8、6 9、及び 7 0 より選択される核酸配列によりコードされる。一部の実施態様において、軽鎖可変領域は、配列番号 1 7、1 9、7 1、7 2、7 3、及び 7 4 より選択される核酸配列によりコードされる。

【 0 1 2 4 】

50

一部の実施形態において、ヒト化抗hPGモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列を提供する。特定の実施態様は、配列番号21、23、75、77、79、80、82、84、86、88、90、92、及び94からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、ヒト化抗hPGモノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列を提供する。特定の実施態様は、配列番号22、24、76、78、81、83、85、87、89、91、93、及び95からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0125】

抗hPGモノクローナル抗体の生物学的活性

PGは、CRC腫瘍細胞の生存及び/又は増殖に関与している。操作の任意の理論により拘束されることを意図しないが、PGの結合を通じて、中和抗hPGモノクローナル抗体は、そのシグナル伝達パートナーと相互作用するPGの能力を遮断又は阻害すると考えられる。これは、順に、プロガストリンへの細胞応答、例えば細胞増殖、低下した細胞分化及び/又は低下した細胞死、及び/又は腫瘍成長などを遮断又は阻害する。これらの活性の結果として、開示の中和抗hPGモノクローナル抗体を、種々のインビトロ、インビボ、及びエキスビボの文脈において使用して、PGに結合し、PG依存性シグナル伝達を遮断することができる。

【0126】

したがって、本開示は、CRC細胞におけるPG依存性応答を阻害する方法を提供する。一般的に、この方法は、CRC細胞の1つ又は複数のPG誘導性応答(例、CRC細胞の増殖及び/又は生存)を阻害するために効果的な量で、中和抗PGモノクローナル抗体に、CRC細胞を接触させる、又は細胞集団を曝露させることを含む。インビトロ及びインビボでのその増殖又は阻害は、細胞数、腫瘍数、又は腫瘍サイズにおける増加を経時的に測定するためのアッセイに従って決定することができる。細胞及び腫瘍の増殖の阻害のためのアッセイは、当技術分野において周知である。

【0127】

PG依存性シグナル伝達の遮断は、細胞死を増加させることによりCRC細胞の生存を阻害することができる。インビトロ又はインビボでのCRC細胞生存の阻害は、経時的(例、24又は48時間)に生癌細胞数の低下を測定することにより決定することができる。細胞死のためのアッセイは当技術分野において周知である。加えて、細胞生存アッセイの例を本明細書に提供する。

【0128】

試験は、さらに、CRC腫瘍細胞におけるPG依存性の阻害が、シグナル伝達プログラム細胞死又はアポトーシスを引き起こすことによりCRC細胞の生存を阻害することができることを示唆する。アポトーシスの誘導は、しかし、限定しないが、プロ又は抗アポトーシス活性を有する遺伝子の発現における変化を測定する、当技術分野において公知の任意の手段により決定することができる。例えば、プロアポトーシス遺伝子(例えばBaxなど)の経時的な(例、48時間)発現増加は、アポトーシスにおける増加を示唆している。同様に、抗アポトーシス遺伝子(例えば、しかし、限定しないが、Bcl-2など)の経時的な(例、72又は96時間)発現減少は、アポトーシスにおける増加を示唆している。遺伝子発現における変化を測定するための技術(例えばリアルタイム定量PCRなど)は、当技術分野において周知である。例えば、Hollande et al., WO 2007/135542を参照のこと。

【0129】

プロガストリン依存性シグナル伝達の阻害は、また、細胞分化を刺激する。したがって、CRC細胞の増殖及び/又は生存を阻害する方法は、インビトロ又はインビボでCRC細胞の分化を誘導するために効果的な中和抗PGモノクローナル抗体の量を投与することを含む。CRC細胞の分化は、細胞分化についての遺伝子マーカー、例えば、しかし、限定しないが、Muc-2又は分化した腸細胞(例、杯細胞)についての他のマーカーなど

10

20

30

40

50

の発現における経時的（例、24又は48時間）増加を測定することにより決定することができる。遺伝子発現における変化は、当技術分野において公知の任意の手段により測定することができる。例えば、Hollande et al., WO 2007/135542を参照のこと。発現又は抑制がPG（例えばICATなど）に依存している他の遺伝子も標準的な方法を使用してアッセイすることができる。同上を参照のこと。

【0130】

医薬組成物

抗PGモノクローナル抗体を、組成物中で製剤化することができる。場合により、組成物は、1つ又は複数の追加の治療用薬剤、例えば、以下に記載する第2の治療用薬剤などを含むことができ、本明細書において提供する。組成物は、普通は、医薬的に許容され得る担体を通常含む、無菌の医薬組成物の一部として提供する。この組成物は、任意の適切な形態にすることができる（患者へのその投与の所望の方法に依存して）。

10

【0131】

開示の抗hPGモノクローナル抗体は、種々の経路により、例えば経口、経皮、皮下、鼻腔内、静脈内、筋肉内、眼内、局所、髄腔内、及び脳室内などに患者に投与することができる。任意の所与の場合における最も適した投与のための経路は、特定の抗体、被験体、ならびに疾患の性質及び重症度ならびに被験体の身体的状態に依存しうる。抗体は、水溶液として製剤化し、皮下注射により投与することができる。

【0132】

医薬組成物は、1用量あたりに、開示の抗hPGモノクローナル抗体の所定量を含む単位用量形態で便利に提示することができる。そのようなユニットは、例えば、限定はしないが、5mg~5g、10mg~1g、又は20~50mgを含むことができる。開示における使用のための医薬的に許容可能な担体は、多種多様の形態を、例えば、処置すべき状態又は投与経路に依存して取りうる。

20

【0133】

開示の医薬組成物は、所望の純度を有する抗体を、当技術分野において典型的に利用される任意の医薬的に許容可能な担体、賦形剤、又は安定剤（その全てが本明細書において「担体」と言及される）、即ち、緩衝化薬剤、安定化薬剤、保存剤、等張剤、非イオン性界面活性剤、酸化防止剤、及び他の種々の添加剤と混合することにより、凍結乾燥製剤又は水溶液として保存のために調製することができる。Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed.1980)を参照のこと。そのような添加剤は、利用する投与量及び濃度でレシピエントに非毒性でなければならない。

30

【0134】

緩衝化薬剤は、生理学的条件に近似する範囲内のpHに維持するために役立つ。それらは約2mM~約50mMの範囲の濃度で存在しうる。本開示を用いた使用のための適した緩衝剤は、有機酸及び無機酸の両方ならびにその塩、例えばクエン酸緩衝剤（例、クエン酸一ナトリウム-クエン酸二ナトリウム混合物、クエン酸-クエン酸三ナトリウム混合物、クエン酸-クエン酸一ナトリウム混合物など）、コハク酸緩衝剤（例、コハク酸-コハク酸一ナトリウム混合物、コハク酸-水酸化ナトリウム混合物、コハク酸-コハク酸二ナトリウム混合物など）、酒石酸緩衝剤（例、酒石酸-酒石酸ナトリウム混合物、酒石酸-酒石酸カリウム混合物、酒石酸-水酸化ナトリウム混合物など）、フマル酸緩衝剤（例、フマル酸-フマル酸一ナトリウム混合物、フマル酸-フマル酸二ナトリウム混合物、フマル酸一ナトリウム-フマル酸二ナトリウム混合物など）、グルコン酸緩衝剤（例、グルコン酸-グルコン酸ナトリウム混合物、グルコン酸-水酸化ナトリウム混合物、グルコン酸-グルコン酸カリウム混合物など）、シュウ酸緩衝剤（例、シュウ酸-シュウ酸ナトリウム混合物、シュウ酸-水酸化ナトリウム混合物、シュウ酸-シュウ酸カリウム混合物など）、乳酸緩衝剤（例、乳酸-乳酸ナトリウム混合物、乳酸-水酸化ナトリウム混合物、乳酸-乳酸カリウム混合物など）、及び酢酸緩衝剤（例、酢酸-酢酸ナトリウム混合物、酢酸-水酸化ナトリウム混合物など）などを含む。加えて、リン酸緩衝剤、ヒスチジン緩衝剤、及びトリメチルアミン塩（例えばトリスなど）を使用することができる。

40

50

【0135】

保存剤を加えて、微生物の成長を遅らせることができ、0.2%~1%(w/v)の範囲の量で加えることができる。本開示を用いた使用のために適する保存剤は、フェノール、ベンジルアルコール、メタ-クレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、ベンザルコニウムハロゲン化物(例、塩化物、臭化物、ヨウ化物)、ヘキサメトニウムクロライド、及びアルキルパラベン(例えばメチル又はプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、及び3-ペンタノールなど)を含む。「安定剤」として時折公知である等張剤を加えて、本開示の液体組成物の等張性を確実にすることができ、多価糖アルコール、例えば、三価又はそれより高い糖アルコール、例えばグリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、及びマンニトールなどを含む。安定剤は、増量剤から、治療用薬剤を可溶化する、あるいは、変性又は容器壁への付着を予防するために有用な添加物までの機能の範囲に及びうる賦形剤の広範なカテゴリーを指す。典型的な安定剤は、多価糖アルコール(上に列挙する);アミノ酸(例えばアルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L-ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニンなど)、有機糖又は糖アルコール(例えばラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイニトール、ガラクトール、グリセロールなど)、(シクリトール、例えばイノシトールなどを含む);ポリエチレングリコール;アミノ酸ポリマー;硫黄を含有する還元剤、例えば尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロール、及びナトリウムチオ硫酸塩など;低分子量ポリペプチド(例、10残基又はそれより少ないペプチド);タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリンなど;親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン単糖類など、例えばキシロース、マンノース、フルクトース、グルコースなど;二糖類、例えばラクトース、マルトース、スクロースなど、及び、三糖類、例えばラフィノースなど;及び、多糖類、例えばデキストランなどでありうる。安定剤は、活性タンパク質量の0.1~10,000重量部の範囲で存在しうる。

10

20

30

40

50

【0136】

非イオン性サーファクタント又は界面活性剤(「湿潤剤」としても公知である)を加えて、治療用薬剤を可溶化させ、ならびに、攪拌誘導性凝集に対して治療用タンパク質を保護するために役立つが、また、製剤が、タンパク質の変性を起こすことなく圧力が加えられたせん断面に曝露されることを許す。適した非イオン性サーファクタントは、ポリソルベート(20、80など)、ポリオキサマー(184、188など)、プルロニックポリオール、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル(TWEEN(登録商標)-20、TWEEN(登録商標)-80など)を含む。非イオン性サーファクタントは、約0.05mg/ml~約1.0mg/ml、例えば、約0.07mg/ml~約0.2mg/mlの範囲で存在しうる。

【0137】

追加の種々の賦形剤は、増量剤(例、デンプン)、キレート剤(例、EDTA)、酸化防止剤(例、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE)、及び共溶媒を含む。

【0138】

抗PGモノクローナル抗体は、単独で、1つ又は複数の抗PGモノクローナル抗体の混合物として、CRCを処置するために有用な他の薬剤との混合物又は組み合わせで、あるいは、CRCのための他の治療への補助として投与することができる。適した組み合わせ及び補助療法の例を、以下に提供する。

【0139】

開示の中和抗hPGモノクローナル抗体(抗体コンジュゲートを含む)を含む医薬的キットが、本開示により包含される。医薬的キットは、中和抗hPGモノクローナル抗体(例、凍結乾燥形態又は水溶液のいずれか)及び以下:

- ・第2の治療用薬剤(例えば、以下に記載する);
- ・抗hPGモノクローナル抗体を投与するためのデバイス(例えば、ペン、ニードル、及

びノ又はシリンジ) ; 及び

・抗体が凍結乾燥形態である場合、抗体を再懸濁するための医薬品グレードの水又は緩衝剤

のいずれか1つ又は複数を含むパッケージである。

【0140】

抗hPGモノクローナル抗体の各々の単位用量を、別々にパッケージ化することができる。キットは1つ又は複数の単位用量(例、2単位用量、3単位用量、4単位用量、5単位用量、8単位用量、10単位又はそれ以上)を含むことができる。特定の実施形態において、1つ又は複数の単位用量を、各々、シリンジ又はペンに収容する。

【0141】

効果的な投与量

中和抗PGモノクローナル抗体、又はその組成物は、一般的に、意図した結果を達成するために効果的な量で、例えば、それを必要とする被験体においてCRCを処置するために効果的な量で使用される。中和抗PGモノクローナル抗体を含む医薬的組成物は、治療的に効果的な投与量で患者(例、ヒト被験体)に投与することができる。本明細書において使用する通り、「治療的に効果的な」投与量は、治療的利益を与える量である。CRC治療の文脈において、治療的利益は、CRCの任意の寛解を意味し、以下：CRCの進行(例、結腸直腸癌の1段階から次の段階への)を止める又は遅くすること、CRCの症状又は徴候の憎悪又は悪化を止める又は遅くすること、CRCの重症度を低下させること、CRCの緩和を誘導すること、CRC腫瘍増殖、CRC腫瘍サイズ、もしくはCRC腫瘍数を阻害すること、又はPG血清レベルを低下させることの任意の1つ又は組み合わせを含む。

【0142】

投与される中和抗PGモノクローナル抗体の量は、種々の因子(処置されているCRCの性質及び段階、投与の形態、経路、及び部位、治療計画(例、第2の治療用薬剤が使用されているか否か)、処置されている特定の被験体の年齢及び状態、処置されている患者の抗PGモノクローナル抗体への感受性を含む)に依存しうる。適切な投与量は、当業者により容易に決定されることができる。最終的には、医師が使用する適切な投与量を決定する。この投与量は、しばしば、適切な場合、反復することができる。副作用が発生した場合、投与の量及びノ又は頻度は、通常臨床診療に従って変更又は低下させることができる。適当な投与量及び治療計画は、当業者に公知の従来技術を使用して、治療の進行をモニターすることにより確立することができる。

【0143】

効果的な投与量は、インビトロアッセイから最初に推定することができる。例えば、動物における使用のための初期用量を製剤化し、インビトロで測定されたプロガストリンについての抗体の結合親和性である又はそれを上回る、抗PGモノクローナル抗体の循環血液中又は血清中濃度を達成してもよい。特定の抗体のバイオアベイラビリティを考慮に入れて、そのような循環血液中又は血清中濃度を達成するための投与量を算出することは、当業者の能力の範囲内である。ガイダンスについては、読者は、Fingl & Woodbury, "General Principles" in Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Chapter 1, latest edition, Pagamonon Press及びそれに引用される参考文献を参照する。

【0144】

初期投与量は、インビボデータ(例えば動物モデルなど)から推定することができる。CRCを処置するための化合物の効力をテストするために有用な動物モデルが、当技術分野において周知である。加えて、CRCの動物モデルが、以下の実施例に記載される。当業者は、そのような情報を日常的に適応させ、ヒトへの投与のために適した投与量を決定することができる。

【0145】

開示の中和抗hPGモノクローナル抗体の効果的な用量は、1回(例、ボラス)投与

10

20

30

40

50

、複数回投与、又は連続投与当たり約 0.001 ~ 約 75 mg/kg の範囲でありうる、あるいは、1 回（例、ボラス）投与、複数回投与、又は連続投与当たり 0.01 ~ 5000 µg/ml 血清濃度の血清濃度を達成するためであり、あるいは、処置されている状態、投与経路、ならびに被験体の年齢、体重、及び状態に依存した本明細書における任意の効果的な範囲又は値である。特定の実施形態において、各用量は、体重 1 kg 当たり約 0.5 µg ~ 約 50 µg、例えば、体重 1 kg 当たり約 3 µg ~ 約 30 µg の範囲でありうる。

【0146】

投与の量、頻度、及び持続時間は、種々の因子、例えば患者の年齢、体重、疾患状態などに依存しうる。投与のための治療計画は、2 週間 ~ 無期限にわたり、2 週間 ~ 6 ヶ月間にわたり、3 ヶ月間 ~ 5 年間、6 ヶ月間 ~ 1 又は 2 年間、8 ヶ月間 ~ 18 ヶ月間などで継続しうる。場合により、治療計画は、反復投与（例、週 1 回、週 2 回、2 日、3 日、5 日、1 週間、2 週間、又は 1 ヶ月に 1 回）を提供する。反復投与は同じ用量又は異なる用量でありうる。投与は、1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回、10 回又はそれ以上反復することができる。抗 h P G モノクローナル抗体の治療的に効果的な量を、単一用量として、又は、治療計画の経過にわたり、例えば、2 週間、3 週間、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、1 年又はそれより長い経過にわたり投与することができる。

10

【0147】

治療方法

P G 依存性応答（細胞増殖を含む）を遮断する本発明の中和抗 h P G モノクローナル抗体の能力によって、それらが結腸直腸癌を処置するために有用になる。したがって、別の局面において、本開示は、それを必要とする患者において C R C を処置する方法を提供する。一般的に、方法は、治療的に効果的な量の開示の中和抗 h P G モノクローナル抗体を患者に投与することを含む。

20

【0148】

開示の抗 h P G モノクローナル抗体が投与される「被験体」又は「患者」は、好ましくは、哺乳動物、例えば非霊長類（例、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）又は霊長類（例、サル又はヒト）である。被験体又は患者は、ヒト、例えば成人患者又は小児患者などでありうる。

【0149】

抗 h P G モノクローナル抗体治療に適した患者は、C R C と診断された患者である。C R C は、任意の型及び任意の臨床段階又は顕在化でありうる。適した被験体は、C R C 腫瘍（手術可能又は手術不可能）を伴う患者、腫瘍が外科的に除去又は切除されている患者、癌遺伝子（例えば R A S 又は A P C など）における変異を保有する細胞を含む C R C 腫瘍を伴う患者、抗 h P G モノクローナル抗体治療と組み合わせた又はそれに補助的な C R C のための他の治療を受けてきた又は受ける患者を含む。C R C のための他の治療は、しかし、限定しないが、化学療法的処置、放射線治療、外科的切除、及び 1 つ又は複数の他の治療用抗体を用いた処置（以下に詳述する）を含む。

30

【0150】

抗 h P G 抗体治療は、1 つ又は複数の他の治療と組み合わせる、又は補助となることができる。他の処置は、限定しないが、化学療法的処置、放射線治療、外科的切除、及び抗体治療を含む（本明細書に記載する通り）。

40

【0151】

抗 h P G モノクローナル抗体治療は、他の処置（外科的切除を含む）の補助になりうる。

【0152】

組み合わせ治療は、本明細書に提供する通り、患者への少なくとも 2 つの薬剤の投与を含み、その第 1 は開示の中和抗 h P G モノクローナル抗体であり、その第 2 は第 2 の治療用薬剤である。中和抗 h P G モノクローナル抗体及び第 2 の治療用薬剤は、同時に、連続的に、又は別々に投与することができる。

【0153】

50

本明細書において使用する通り、中和抗hPGモノクローナル抗体及び第2の治療用薬剤は、それらが同じ日に、例えば、同じ患者来診の間に患者に投与される場合、連続的に投与されると言う。連続的投与は、1、2、3、4、5、6、7、又は8時間離して生じうる。対照的に、開示の抗hPGモノクローナル抗体及び第2の治療用薬剤は、それらが異なる日に患者に投与される場合、例えば、開示の抗hPGモノクローナル抗体及び第2の治療用薬剤が、1日、2日、又は3日、1週間、2週間、又は1ヶ月間隔で投与することができる場合、別々に投与すると言う。本開示の方法において、開示の抗hPGモノクローナル抗体の投与は、第2の治療用薬剤に先行しうる又は続きうる。

【0154】

非限定的な例として、中和抗hPGモノクローナル抗体及び第2の治療用薬剤を一時期にわたり同時に投与ことができ、開示の抗hPGモノクローナル抗体及び第2の治療用薬剤の投与が代替される第2の時期が続く。

10

【0155】

本開示の組み合わせ治療は、相加又は相乗効果よりも大きな効果をもたらし、治療的利益を提供し、そこでは中和抗hPGモノクローナル抗体及び第2の治療用薬剤のいずれも、単独で治療的に効果的である量で投与されない。このように、そのような薬剤はより低用量で投与ことができ、有害作用の可能性及び/又は重症度を低下させる。

【0156】

第2の治療用薬剤は、化学療法剤でありうる。化学療法剤は、しかし、限定しないが、放射性分子、毒素（細胞の生存に有害であり、任意の薬剤を含む細胞毒素又は細胞毒性薬剤とも言及される）、薬剤、及び化学療法用化合物を含むリポソーム又は他の小胞を含む。適した化学療法剤の例は、しかし、限定しないが、1-デヒドロテストステロン、5-フルオロウラシルデカルバジン（decabazine）、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、アクチノマイシンD、アドリアマイシン、アルデスロイキン、アルキル化剤、アロプリノールナトリウム、アルトレタミン、アミフォスチン、アナストロゾール、アントラマイシン（AMC）、有糸分裂阻害剤、シス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、ジアミノジクロロ白金、アントラサイクリン、抗生物質、代謝拮抗剤、アスパラギナーゼ、生BCG（膀胱内）、リン酸ベタメタゾンナトリウム及び酢酸ベタメタゾン、ピカルタミド、硫酸プレオマイシン、ブスルファン、ロイコウオリン（leucouorin）カルシウム、カリケアマイシン、カペシタピン、カルボプラチン、ロムスチン（CCNU）、カルムスチン（BSNU）、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、コルヒチン、抱合型エストロゲン、シクロホスファミド、シクロトスファミド（cyclophosphamide）、シタラビン、シタラビン、サイトカラシンB、サイトキサン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ダウニルビシンHCL（daunirubicin）、クエン酸ダウニルビシン、デニロイキンジフチトックス、デキストラゾキサ（dextrazoxane）、ジプロモマンニトール、ジヒドロキシアントラシンジオン、ドセタキセル、メシル酸ドラセトロン、ドキシソルビシンHCL、ドロナビノール、E.coli L-アスパラギナーゼ、エメチン、エボエチン、エルウィニアL-アスパラギナーゼ、エステル型エストロゲン、エストラジオール、リン酸エストラムスチンナトリウム、エチジウムプロマイド、エチニルエストラジオール、エチドロネート、エトボシドシトロラムファクター（citrororum factor）、リン酸エトボシド、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルコナゾール、リン酸フルダラビン、フルオロウラシル、フルタミド、フォルリン酸、ゲムシタピンHCL、グルココルチコイド、酢酸ゴセレリン、グラミシジンD、グラニセトロンHCL、ヒドロキシ尿素、イダルビシンHCL、イホスファミド、インターフェロン-2b、イリノテカンHCL、レトロゾール、ロイコボリンカルシウム、酢酸ロイプロリド、レバミソールHCL、リドカイン、ロムスチン、メイタンシノイド、メクロレタミンHCL、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、メルファランHCL、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキセート、メチルテストステロン、ミトラマイシン、マイトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、酢酸オクトレオチド、オندانセトロンHCL、オキサリプラチン、バクリタキセル、

20

30

40

50

パミドロネート二ナトリウム、ペントスタチン、ピロカルピンHCL、プリマイシン (pimycin)、カルムスチンインプラントを伴うポリフェプロザン20、ポルフィマーナトリウム、プロカイン、プロカルバジンHCL、プロプラノロール、リツキシマブ、サルグラモスチン、ストレプトゾトシン、タモキシフェン、タキソール、テガフル、テニボシド、テノボシド、テストラクトン、テトラカイン、チオテパ (thioepa) クロラムブシル、チオグアニン、チオテパ、トポテカンHCL、クエン酸トレミフェン、トラスツズマブ、トレチノイン、バルルピシン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンクリスチン、及び酒石酸ピノレルピンを含む。

【0157】

本明細書に開示する中和抗モノクローナル抗体を、結腸直腸癌のための処置を必要とする、化学療法剤の組み合わせを受けている患者に投与することができる。化学療法剤の例示的な組み合わせは、ロイコボリン (フォリン酸又はLV) と組み合わせた5-フルオロウラシル (5FU) ; ウラシル (UFT) 及びロイコボリンと組み合わせたカペシタピン ; ウラシル (UFT) 及びロイコボリンと組み合わせたテガフル ; 5FUと組み合わせた又はカペシタピンと組み合わせたオキサリプラチン ; カペシタピンと組み合わせたイリノテカン、5FU、イリノテカン、又はカペシタピンと組み合わせたマイトマイシンCを含む。本明細書に開示する化学療法剤の他の組み合わせの使用も可能である。

10

【0158】

関連する技術分野において公知の通り、異なる化学療法剤の組み合わせを使用した結腸直腸癌の化学療法計画が、臨床試験において標準化されている。そのような計画はしばしば略語により公知であり、5FU Mayo、5FU Roswell Park、LVFU2、FOLFOX、FOLFOX4、FOLFOX6、bFOL、FUFOX、FOLFIRI、IFL、XELOX、CAPOX、XELIRI、CAPIRI、FOLFOLFOXIRIを含む。例えば、Chau, I., et al., 2009, Br. J. Cancer 100: 1704-19及びField, K., et al., 2007, World J. Gastroenterol. 13: 3806-15を参照のこと。その両方が、参照により組み入れられる。

20

【0159】

中和抗hPGモノクローナル抗体は、また、他の治療用抗体と組み合わせることができる。したがって、抗hPGモノクローナル抗体治療は、異なるモノクローナル抗体、例えば、しかし、限定しないが、抗EGFR (EGF受容体) モノクローナル抗体又は抗VEGFモノクローナル抗体などと組み合わせる又は補助的に投与することができる。抗EGFR抗体の具体的な例は、セツキシマブ及びパニツムマブを含む。抗VEGF抗体の具体的な例は、ベバシズマブである。

30

【0160】

抗hPG抗体を使用したプロガストリンの検出

抗PGモノクローナル抗体は、中和又は非中和を問わず、PG検出、例えばCRCを診断すること又は被験体のCRCの処置の効果をモニターすることなどに依存する適用のためにも有用である。したがって、局面において、本開示は、本開示の抗hPGモノクローナル抗体を使用して患者からのサンプル中のプロガストリンの量を決定することを含む、患者において結腸直腸癌を診断する方法を提供する。一般的には、患者において結腸直腸癌を診断する方法は、開示の抗hPGモノクローナル抗体を使用して患者から得られたサンプル中のプロガストリンを測定することを含み、それにおいてサンプル中の20pM~400pMプロガストリンの測定値は結腸直腸癌を示す。プロガストリンは、サンプル、例えば、血液、血清、血漿、組織、及び/又は細胞中で測定することができる。hPG検出は、当技術分野において公知の及び/又は本明細書に記載するアッセイ、例えばELISA、サンドイッチELISA、イムノプロットティング (ウエスタンプロットティング)、免疫沈降、BIACORE技術などを使用して行うことができる。

40

【0161】

本明細書に記述する通り、プロガストリンは、ガストリン遺伝子産物の翻訳後プロセッシングに起因する多くの異なるポリペプチドの1つに過ぎない。本明細書に記載する診断、

50

モニタリング、及び他の方法は、他のガストリン遺伝子産物（分解産物を含む）とは対照的に、h P Gを特異的に検出する。したがって、特定の実施形態において、h P Gは、本明細書に開示する通り、E L I S Aを使用して検出され、それにおいてh P Gに対する2つの抗体（h P GのN及びC末端をそれぞれ標的とする）を使用する。一部の実施形態において、検出のために使用される2つの抗体の1つは、本明細書中に記載する抗h P Gモノクローナル抗体である。20 pM ~ 400 pMの範囲のh P Gレベルは、結腸直腸癌を示す。

【0162】

一般的に、抗h P Gモノクローナル抗体を使用してh P Gレベルを決定するための手順は、以下の通りである。表面（例えば96ウェルプレート中のウェルなど）を調製し、それに、公知の量のh P Gに対する第1の「捕捉」抗体を結合させる。捕捉抗体は、例えば、h P GのC又はN末端と結合する抗h P G抗体でありうる。ブロッキング後、テストサンプルを表面に適用し、インキュベーション期間が続く。表面を次に洗浄し、非結合抗原を除去し、h P Gに対する第2の「検出」抗体を含む溶液を適用する。検出抗体は、本明細書に記載する抗h P Gモノクローナル抗体のいずれかでありうる（検出抗体が、捕捉抗体と異なるエピトープに結合するという条件で）。例えば、捕捉抗体がh P GのC末端ペプチド領域に結合する場合、次に、適した検出抗体はh P GのN末端ペプチド領域を結合するものである。プロガストリンレベルを、次に、直接的（例えば、検出抗体が検出可能な標識に結合されている場合）又は間接的（検出抗h P G抗体に結合する標識二次抗体を通じて）のいずれかで検出することができる。

10

20

【0163】

特定の実施態様において、h P Gレベルを、以下の通りに、テストサンプルから測定する。96ウェルマイクロタイタープレートを、0.5 ~ 10 µg/mLのウサギC末端抗h P Gモノクローナル抗体を用いてコーティングし、一晚インキュベートする。プレートを、次に、P B S - Tween (0.05%) 中で3回洗浄し、P B S - Tween (0.05%) 中の2% (w/v) 脱脂粉乳を用いてブロッキングする。別々に、テストサンプル、対照サンプル（ブランク又はP G陰性血漿又は血清サンプル）、及び、約5 pM (0.5×10^{-11} M) ~ 約0.1 nM (1×10^{-10} M) のh P G参照基準（P G陰性血漿又は血清中に希釈した凍結乾燥h P G）を、適切な希釈剤（例、P B S - Tween 0.05%）中に調製する。サンプルを、コーティングしたプレート上で、37 °Cで2 ~ 4時間、又は、代わりに、21 °Cで12 ~ 16時間インキュベートする。インキュベーション後、プレートを、P B S - Tween (0.05%) を用いて3回洗浄し、0.001 ~ 0.1 µg/mLの本明細書に記載するN末端抗h P Gモノクローナル抗体（ホースラディッシュペルオキシダーゼ（H R P）に共役している）（Nakane et al., 1974, J. Histochem. Cytochem. 22(12): 1084-1091）と21 °Cで30分間にわたりインキュベートする。プレートを、次に、P B S - Tween (0.05%) 中で3回洗浄し、H R P基質を21 °Cで15分間にわたり加える。反応を、100 µLの0.5 M硫酸を加えることにより停止させ、光学密度測定値を405 nmで取得する。テストサンプルのh P Gレベルを、h P G参照基準に由来する測定値から構築された標準曲線との比較により決定する。

30

40

【0164】

典型的には、患者は、侵襲的手順（例えば生検組織の組織学的評価など）ならびに他の侵襲的手順（例えば結腸内視鏡検査など）に基づいて診断される。C R Cは、ステージ0（結腸又は直腸の最内膜に限定される癌）、ステージ1（結腸又は直腸の内壁中の癌）、ステージ2（結腸の壁に広がっているが、しかし、隣接するリンパ節では見出されない癌）、ステージ3（リンパ節及び結腸又は直腸周辺の組織で見出される癌）、及びステージ4（体の他の部位に広がっている癌）の範囲の5ステージに分けられる。組織学的観点から、直腸結腸腫瘍は、広範囲の新生物（良性の成長から浸潤癌まで及ぶ）を提示し、主に上皮由来腫瘍（即ち、腺腫又は腺癌）である。病変は3群：非新生物ポリープ、新生物ポリープ（腺腫性ポリープ、腺腫）、及び癌に分類することができる。腺腫性ポリープは、悪性形質転換を受けうる良性腫瘍であり、3つの組織型：管状、腺管絨毛、及び絨毛に分

50

類され、悪性度が増加する。腺癌は、また、それらの組織像に従って、粘液性（コロイド）腺癌；印環腺癌；スキルス腫瘍；及び神経内分泌に分類されている。

【0165】

CRCを診断するための現行の手段とは対照的に、本開示は、血液サンプルから決定することができるhPGレベルの測定に基づく、任意の組織学的分析又は病期分類の非存在においてCRCを伴う被験体を診断するための方法を提供する。さらに、本開示の方法は、患者がどのように診断されたのかに関わらず、抗hPGモノクローナル治療に適したCRC患者を選択するのに有用である。

【0166】

血清PGレベルは、また、CRC処置の効力を評価するのに有用である。したがって、本開示は、CRCについて処置されている患者においてPGレベルを決定することを含む、結腸直腸癌治療の有効性をモニタリングするための方法を提供する。結腸直腸癌治療の有効性をモニタリングするための方法は、結腸直腸癌について処置を受けている結腸直腸癌患者において本開示の抗PGモノクローナル抗体を使用してhPGレベルを反復的に決定することを含み、それにおいて処置の間隔にわたる患者の循環hPGレベルにおける減少は処置効力を示す。例えば、患者の循環hPGレベルの第1の測定値を取得することができ、患者が結腸直腸癌についての処置を受けている間又はその後での第2の測定値が続く。2つの測定値を次に比較し、hPGレベルにおける減少は治療的利益を示す。

10

【0167】

局面において、本開示は、抗hPGモノクローナル抗体（抗体コンジュゲートを含む）を含む診断キットを提供する。診断キットは、開示の少なくとも1つの抗hPGモノクローナル抗体（例、凍結乾燥形態又は水溶液のいずれか）及び診断アッセイを実施するために有用な1つ又は複数の試薬（例、希釈剤、抗hPGモノクローナル抗体に結合する標識抗体、標識抗体のための適切な基質、陽性対照及び参照標準、陰性対照としての使用のために適切な形態のhPG）を含むパッケージである。特定の実施態様において、キットは2つの抗hPG抗体を含み、それにおいて抗体の少なくとも1つが抗hPGモノクローナル抗体である。場合により、二次抗体はポリクローナル抗hPG抗体である。一部の実施形態において、本開示のキットは、本明細書に記載するN末端抗hPGモノクローナル抗体を含む。

20

【0168】

抗hPG抗体を、上に記載する通りに標識することができる。あるいは、キットは、抗hPGモノクローナル抗体に結合し、酵素に結合されている標識抗体を含むことができる。抗hPGモノクローナル抗体又は他の抗体が検出用酵素に結合されている場合、このキットは基質及び酵素により要求される補因子（例、検出可能な発色団又はフルオロフォアを提供する基質前駆体）を含むことができる。また、他の添加剤は、例えば安定剤、緩衝剤（例、ブロッキング緩衝剤又は溶解緩衝剤）などを含むことができる。診断キットに含まれる抗hPGモノクローナル抗体は、固体表面上に固定化することができ、又は、代わりに、抗体を固定化することができる固体表面（例、スライド）がキットに含まれる。種々の試薬の相対量を広く変動させて、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中での濃度を提供することができる。抗体及び他の試薬は、通常凍結乾燥された乾燥粉末として、（個別に又は組み合わせで）提供することができ、溶解時に適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む。

30

40

【0169】

キットは、診断方法の実践のための指示（例、プロトコール）を含む指示資料を含みうる。指示資料は、典型的には、書面による又は印刷された資料を含むが、それらに限定しない。そのような指示を記憶し、それらをエンドユーザーに伝えることが可能である媒体が、本発明により熟慮される。そのような媒体は、しかし、限定しないが、電子記憶媒体（例、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例、CD ROM）などを含む。そのような媒体は、そのような指示資料を提供するインターネットサイトへのアドレスを含みうる。

50

【 0 1 7 0 】

1 0 . 実施例

以下の実施例は、例示的であり、限定することを意図しない。

【 0 1 7 1 】

実施例 1 : プロガストリンに対するモノクローナル抗体の生成

ヒトプロガストリンについての免疫原

いくつかの免疫原を生成して、ヒトプロガストリンに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを開発した。ポリクローナル抗体を生成するために以前に使用された抗原、例えば全長ヒトプロガストリン及びhPGの残基70~80に基づく免疫原などは、モノクローナルな免疫応答に導かず、又は、PG特異的モノクローナル抗体を生じなかった。以下により詳細に記載する通り、抗原(14アミノ酸及びそれより長い)は、タンパク質のN末端及びC末端のいずれかにhPGに固有の配列を含み、動物において適切な免疫応答を誘導することが可能であり、hPGに対する20を超える異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生成するために使用された。驚くべきことに、hPGの残基55~80を含むいくつかの免疫原は、それらの一部が他のガストリン遺伝子由来ペプチドにおいても見出されており、hPGに特異的であるモノクローナル抗体を生成するために成功裏に使用された。以下の表に、テストした免疫原をまとめる。

【 0 1 7 2 】

【表 3】

実験	免疫原	陽性クローンの数
1	ヒトプロガストリン(配列番号20)	0*
1	(配列番号26)-Ahx-Cys-BSA	2
2	(配列番号26)-Ahx-Cys-KLH	2
3	(配列番号26)-Ahx-Cys-KLH	8
1	BSA-Cys-Ahx-Ahx(配列番号97)	0
2	KLH-Cys-Ahx-Ahx(配列番号97)	0
3	KLH-Cys-Ahx-Ahx(配列番号96)	10
	DT-Cys-Ahx-Ahx(配列番号96)	3

* 免疫原化されたマウスは、いかなる免疫応答も示さなかった。

【 0 1 7 3 】

表 2 に列挙する免疫原は、ペプチド配列及びリンカーの化学合成を使用して、当技術分野において公知の技術に従って作製され、適切な架橋剤(例、MBS(m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロスクシンイミドエステル)、グルタルアルデヒド又はスルホ-SMCC(スルホスクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート)を使用したウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、又はジフテリア毒素(DT)担体への架橋が続いた。(Coligan JE et al., Current protocols in Immunology, Vol. 2, New York: John Wiley and Sons; 1996, p 9.0.1-9.0.15; Harlow DL. Antibodies: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998, p72-87) 使用されたリンカーは、システイン残基に共役された1つ又は2つのアミノヘキサン酸(Ahx)残基であった。

【 0 1 7 4 】

3つの実験の各々において、Balb/cマウスに、N末端免疫原については4~5回、及びC末端免疫原については2~4回注射した。各々の注射では、Ribi、Alun

、又はフロイントアジュバントを伴う10 µgの免疫原を投与した。

【0175】

細胞融合及びハイブリドーマスクリーニング

各々のマウスからの血清を、免疫原及び最も強い免疫応答を伴うマウスから収集された脾細胞に対するELISAによりテストした。脾細胞を、ポリエチレングリコールを使用してSP2ミエローマ細胞と融合させ、15,000~35,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート中に播種した。融合細胞は、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含む培地(HAT培地)を使用して選択した。

【0176】

ハイブリドーマの上清を、免疫原及び全長プロガストリンに結合する能力についてELISAによりスクリーニングした。3ラウンドのスクリーニングを実施して、全長hPG及び免疫原を認識する抗体を安定的に産生するハイブリドーマだけが選択されることを確実にした。

10

【0177】

異なるPGペプチドへの結合を決定するためのハイブリドーマ及びモノクローナル抗体のスクリーニングは、以下に記載する通り、ELISA技術を使用して実施した。このプロトコールを使用して、他のガストリン遺伝子由来ペプチドと比較し、融合脾細胞(第1及び第2ラウンドのサブクローン)のPG結合について、ならびに、PGへの抗体の特異性を検証するためにスクリーニングした。

【0178】

簡単には、96ウェルプレートを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の適切な濃度のテストペプチドを用いて4で一晚インキュベートし、その後、ウェルを、洗浄溶液(PBS及び0.1%Tween-20)を用いて3回洗浄し、1ウェル当たり100 µLのブロッキング溶液(PBS、0.1%Tween-20、0.1%ウシ血清アルブミン又はカゼイン加水分解物)を用いて22で2時間にわたりインキュベートした。ブロッキング後、ウェルを3回洗浄し、一次抗体(アッセイする抗体)を加えた。融合脾細胞の初期スクリーニングのために、アッセイする各々の培養からの50 µLの培養上清を、プレート中の各ウェルに加えた。モノクローナル抗体で実施されたアッセイにおいて、PBS及び0.1% Tween-20中の100 µLのテスト抗体を各ウェルに加えた。プレートを、次に、22で2時間にわたりインキュベートし、その後、一次抗体溶液を捨て、洗浄段階(3×100 µL洗浄溶液、上に記述する通り)後、二次抗体(一次抗体に結合し、酵素に共役されている)を含むブロッキング溶液を用いて交換した。二次抗体は、ホースラディッシュペルオキシダーゼに共役したヤギ抗マウスIgG(Fc)抗体であった。二次抗体を用いた1時間のインキュベーション後、100 µLの基質溶液(例、Fast OPD、又はO-フェニレンジアミン二塩酸塩、Sigma-Aldrich Co.から入手可能、製造業者の指示に従って調製する)を各ウェルに加え、暗所で20分間にわたり22でインキュベートした。反応を、次に、50 µLの4N硫酸を加えることにより停止させ、触媒された基質の量を492 nmでの光学密度(OD)を測定することにより決定した。基質変換は、抗原に結合した一次(テスト)抗体の量に比例する。実験を二通りに実行し、OD測定値を、実験の目的に依存して、抗原又は抗体濃度の関数としてプロットした。サンプルを、測定されたODが0.2~1.5の間であった場合、抗PG抗体について陽性としてスコア化した。同じODブラケットを使用して、テスト動物に接種するために使用された免疫原ペプチドに結合する抗体を同定した。

20

30

40

【0179】

アッセイにおいて使用する例示的な材料及び試薬は、以下の通りである：

【0180】

【表 4】

項目	供給源	参考文献
Greiner Microlon 96 ウェルプレート	Dutscher	# 655092
10X DPBS	Dutscher	# P04-53500
Tween-20	Sigma	# 63158
BSA (ブロッキング用)	Euromedex	# 04-100-810-C
加水分解カゼイン (BSA の代わりに使用した場合)	Sigma	22090
ハイブリドーマ上清又は N 末端もしくは C 末端モノクローナル抗体	BioRéalités	本明細書に記載する通り
ヤギ抗マウス IgG (Fc), ペルオキシダーゼ共役	Thermo	# 31439
Fast OPD	Sigma	# P9187
95-97% 硫酸	Sigma	# 30743

10

【0181】

ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体のスクリーニングにおいて使用する例示的なペプチドは、以下の通りである：

【0182】

【表 5】

スクリーニングペプチド	供給源	参考文献
BSA	Euromedex	# 04-100-810-C
組換えヒトプロガストリン	BioRéalités	McQueen et al., 2002, J. Protein Chem., 21(7):465-471.
ヒトガストリン I (G-17)	Sigma	# 53673
グリシン伸長ガストリン 17 (G-Gly)	Auspep	# S10082
KLH	Pierce (Perbio)	# 77653
C 末端隣接ペプチド (CTFP)	Auspep	# R41345

20

【0183】

組換えヒトプロガストリンを、McQueen et al, 2002, J. Protein Chem. 21: 465-471) に記載される通りに (わずかな改変を伴う) 産生した。簡単には、BL21 DE3 Star 細菌細胞 (Invitrogen) を、PGE_X-GST-TEV 骨格 (GE Healthcare) 中に全長ヒトプロガストリン配列を含むベクターを用いて形質転換した。細菌を、0.5 mM IPTG を含む LB 培地中で 3 時間にわたり 37 °C で成長させた。細菌ペレットを、フレンチプレスを使用して破壊し、可溶性ならびに非可溶性画分を遠心分離により分けた。その後、GST タグ付き hPG を、グルタチオン親和性カラムを使用して単離し、PG を、タバコエッチ病ウイルス NIa (TEV) プロテアーゼを用いて GST から切断した。最後に、PG を、最終緩衝剤 (10 mM Hepes, 0.5% BSA, pH 7.4) に対して透析した。

30

【0184】

ハイブリドーマを最初にクローン化し、次に、サブクローン化し、増殖させた。陽性ハイブリドーマを以下：(1) PG 及び免疫原特異性、(2) 抗体の相対的親和性、(3) ハイブリドーマ細胞の成長、(4) 抗体分泌、及び (5) ハイブリドーマのモノクローナル性の基準に基づいて選択した。アッセイ及び選択基準は以下の通りであった。

40

【0185】

特異性について、テストハイブリドーマの上清を、上に記載する通りに ELISA によりアッセイした (アッセイ培地 PBS 中への上清の 2 希釈中 1 の 50 µL)。ハイブリドーマを、OD 測定値が、hPG 又はテストマウスに接種するために使用された免疫原を用いたアッセイにおいて 0.2 ~ 1.5 の間である場合、陽性としてスコア化した。特異性についてのさらなる基準として、クローンを、他のガストリン遺伝子由来ペプチドへの結合性の欠如に基づいて選択した。結合の欠如は、テストウェルからのシグナルと PBS だけを含む対照ウェルからの平均シグナルの間に統計的な有意差がないとして測定した。

【0186】

親和性の特徴付けについては、抗体の希釈系列は、上に記載する通り、hPG への結合

50

についての E L I S A によりアッセイした。N 末端抗体のアッセイにおいて使用される標準的な希釈は、0、0.1、0.3、1、3、10、30、100 ng/mL であった。C 末端抗体のアッセイにおいて使用される標準的な希釈は、0、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30 ng/mL であった。

【0187】

複数ラウンドの連続培養を通じたハイブリドーマ細胞の成長を、播種から2日後に顕微鏡観察により評価した。細胞が増殖し、播種後48時間までにウェルを満たすと予測される。連続希釈（典型的には、1:5での最初の希釈、少なくとも2回の1:10でのさらなる希釈が続く）を実施し、48時間目での顕微鏡観察が続き、適切な成長を確認した。この基準を満たすハイブリドーマからの細胞を希釈し、再び播種し、48時間後に顕微鏡下で観察した。そのようなラウンドの「希釈 - 播種 - 観察」を、ハイブリドーマが「成長」基準を満たすとしてスコア化される前に3回反復した。

10

【0188】

抗体分泌を、無細胞上清の希釈系列（1/2、1/20、1/200、1/500、1/1000、1/2000）で、上に記載する通りに、hPGを使用したE L I S Aを実施することによりテストした。

【0189】

モノクローン性を、0.6細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート中にクローン又はハイブリドーマを播種し、2週間にわたりインキュベートすることにより決定した。2週間目に、上清を、hPG結合について、E L I S Aによりアッセイし、集団のクローン性質を、生細胞を含むウェルの少なくとも90%にわたり一貫したOD値を有することに基づいて決定した。

20

【0190】

全長プロガストリンに対するモノクローナル抗体

3匹のマウスの各々に、組換えヒトプロガストリン（上に記載する）を用いて接種した。免疫原は、マウスにおいて任意の検出可能な免疫応答を誘発しなかった：PGへの結合は、上に記載する通り、E L I S Aを使用して検出することができなかった。融合は実施しなかった。

【0191】

プロガストリンに対するN末端モノクローナル抗体

上に記述する通り、N末端モノクローナル抗体を、14残基抗原のC末端上のAhx-Cysリンカー（SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys（配列番号26））によって、ウシ血清アルブミン（BSA）又はキーホールリンペットヘモシアニン（KHL）のいずれかに連結された、hPGの残基1~14を含む抗原に対して生成した。

30

【0192】

第1の実験において、3匹のマウスに、BSA連結N末端ペプチドを用いて接種した。3匹のマウスの2匹からの脾細胞を用いて実施した3つの融合から、1つの融合は、PGまたは免疫原への結合を示すクローンはもたらされなかった。96ウェルプレート中に播種された2つの他の融合体の内、1つが4つのPG結合及びPG特異的ハイブリドーマを生成し、そこから単一の安定なIgG産生サブクローンが回収された。第2の融合体は、また、単一の安定なIgG1産生、PG結合及びPG特異的ハイブリドーマサブクローンをもたらした。全体として、3匹のマウスから、17の第1ラウンドのハイブリドーマ、又はスクリーニングされたハイブリドーマの0.74%が、PG及び免疫原結合について陽性であり、そこから9つの陽性細胞株がサブクローン化され、その内の2つが陽性のIgG産生細胞株であった。このように、第1の実験では、2~3ラウンドのサブクローニング後、免疫原及びhPGに対して強い陽性シグナルを保持し（「PG結合」について陽性）、他のガストリン遺伝子由来ペプチドには結合しない（「PG特異性」について陽性）2つのクローン：抗hPG MA b 1及び抗hPG MA b 2をそれぞれ産生するハイブリドーマ43B9G11及びWE5H2G7を生成した。

40

【0193】

50

第2の実験において、マウスに、K L H 連結 N 末端ペプチドを用いて接種する。2つの融合を、S p 2 ミエローマ細胞を用いて実施した。これらの内、1つの融合体だけが、P G 及び免疫原陽性クローンを生成し、それらは P G 特異的でもあった。これから、1920のハイブリドーマを播種した。多くのハイブリドーマが、免疫化ペプチドを用いて陽性とテストされたが、プロガストリンではされず、又は、P G 特異的ではなかった。具体的には、297のハイブリドーマが、免疫化ペプチドについて強い陽性を示し(1920のおよそ15.5%)、その内の124がプロガストリン結合についても陽性であった(6.5%)。プロガストリンについて陽性であるが、しかし、使用した免疫原については陽性ではない36のハイブリドーマ(又は1.8%)があった。播種した1920の内の12のハイブリドーマだけが、プロガストリンに特異的に結合するが、しかし、他のガストリン遺伝子産物にはしない抗体をもたらした(全ハイブリドーマの0.6%、第1スクリーニングでペプチド及び/又はプロガストリンについて陽性であったクローンの3.6%)。12の選択したクローンの内、2つだけが、永久クローンとして樹立し、長期保存のために凍結させるために十分に安定であった。このように、この第2の実験において、播種したほぼ2000のハイブリドーマの内、h P G 及び免疫化ペプチドに結合することが可能であるモノクローナル抗体を発現する2クローン6 B 5 B 1 1 C 1 0 (抗 h P G M A b 3を産生する)及び2 0 D 2 C 3 G 2 (抗 h P G M A b 4を産生する)(抗 h P G M A b 3及びM A b 4をそれぞれ産生し、及び、他のガストリン遺伝子産物を上回るプロガストリンへの特異性及びh P G への高い親和性を有する)だけが回収された。両方の例示的な抗体は、I g G 1 アイソタイプである。

10

20

【0194】

第3の実験において、マウスを、第2の実験と同じ免疫原を用いて接種した。S p 2 ミエローマ細胞への融合を、最も強い免疫応答を伴う2匹のマウスからの脾細胞を用いて実施した。融合からのハイブリドーマを播種し(マウス1匹当たり、1つの融合の各々からの3840のハイブリドーマ)、上清を、P G 及び免疫原結合、ならびにP G 特異性についてテストした。各々の融合から、6つのハイブリドーマがP G 特異性を示し、そこから、成長、モノクローン性、抗体分泌、相対的親和性についてのさらなる選択を満たす3つのサブクローンが選択された。このように、全体で、播種後にテストされたハイブリドーマの2.9%(220/7680)が、P G 及び免疫原陽性であり、その内の0.15%が陽性クローンであり(12/7680)、回収された最終的なサブクローンは、播種された最初のハイブリドーマの0.15%を構成した(6/7680)。この実験では、ハイブリドーマ1 E 9 A 4 A 4 (抗 h P G M A b 15を産生する)、1 E 9 D 9 B 6 (抗 h P G M A b 16を産生する)、1 C 8 D 1 0 F 5 (抗 h P G M A b 17を産生する)、1 A 7 C 3 F 1 1 (抗 h P G M A b 18を産生する)、1 B 3 B 4 F 1 1 (抗 h P G M A b 19を産生する)、及び1 C 1 1 F 5 E 8 (抗 h P G M A b 20を産生する)が生成された。

30

【0195】

以下の表は、各々の実験のために播種したクローンの数、使用した免疫原、及び免疫原及び全長プロガストリンの両方を認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの数及びパーセンテージを示す。

40

【0196】

【表 6】

表 3					
実験	免疫原	播種したクローン	PG ⁺ ハイブリドーマ 上清	PG 特異的 クローン	PG 特異的, IgG 産生 サブクローン
1	(配列番号 26)-Ahx- Cys-BSA	2304	17 (0.74%)	9 (0.39%)	2 (0.087%)
2	(配列番号 26)-Ahx- Cys-KLH	1920	124 (6.5%)	12 (0.6%)	2 (0.1%)
3	(配列番号 26)-Ahx- Cys-KLH	7680	220 (2.9%)	12 (0.15%)	6 (0.1%)

10

【0197】

プロガストリンに対する C 末端モノクローナル抗体

C 末端モノクローナル抗体を、26 残基抗原の N 末端上の Cys - Ahx - Ahx リンカー (Cys - Ahx - Ahx - QGPLEEEEEAYGWDFGRRSAEDEN (配列番号 96)) により KLH 又は DT のいずれかに連結された hPG の残基 55 ~ 80 を含む抗原に対して生成した。hPG の残基 70 ~ 80 だけを含むより小さな抗原を用いてハイブリドーマを生成する試みで、BSA 又は KLH のいずれかに結合した Cys - Ahx - Ahx - FGRRSAEDEN (配列番号 97) は、任意のクローンを生成しなかった。

20

【0198】

3 つの実験を実施した。最初の 2 つの実験において、それにおいてより短いペプチドを使用し、ゼロのサブクローンを回収した。具体的には、第 1 の実験において、4 匹のマウスに、BSA に連結された、配列番号 97 に相当する C 末端ペプチドを用いて注射した。融合のいずれも、任意の IgG 産生ハイブリドーマを生成しなかった。第 2 の実験において、6 匹のマウスに注射し、3 匹の各々に、その N 末端で KLH に連結された、配列番号 97 に相当するペプチド、又は、その C 末端で KLH に連結された、配列番号 97 に相当するペプチドを用いた。第 1 の免疫原について、融合を実施し、ハイブリドーマを回収したが、しかし、PG 結合及び PG 特異性について陽性であるサブクローンは単離されなかった。第 2 の免疫原について、マウスのいずれも免疫応答を発生せず、融合は実施しなかった。

30

【0199】

第 3 の実験において、hPG に固有ではない C 末端配列を含む 26 アミノ酸ペプチドを使用した。免疫原 (KLH 又は DT のいずれかに連結された、配列番号 96 に相当するペプチドを含む) をマウスに注射した。Sp2 ミエローマ細胞への融合を、最も強い応答を有する 2 匹のマウスからの脾細胞を用いて実施した。3840 のハイブリドーマを、マウス 1 匹あたり 1 つの融合から播種した。全体では、スクリーニングした 7680 のハイブリドーマから、その内の 382 (5%) が PG 陽性及び PG 特異的であり、13 (0.17%) の安定な陽性サブクローン: 1B4A11D11 (抗 hPG MA b 5 を産生する)、1B6A11F2 (抗 hPG MA b 6 を産生する)、1B11E4B11 (抗 hPG MA b 7 を産生する)、1C10D3B9 (抗 hPG MA b 8 を産生する)、D8F5B3 (抗 hPG MA b 9 を産生する)、1E1C7B4 (抗 hPG MA b 10 を産生する)、2B4C8C8 (抗 hPG MA b 11 を産生する)、2B11E6G4 (抗 hPG MA b 12 を産生する)、2C6C3C7 (抗 hPG MA b 13 を産生する)、2H9F4B7 (抗 hPG MA b 14 を産生する)、1F11F5E10 (抗 hPG MA b 21 を産生する)、1F11F5G9 (抗 hPG M

40

50

A b 22を産生する)、及び1A11F2C9(抗hPG MA b 23を産生する)が回収された。

【0200】

以下の表は、各々の実験のために播種したクローンの数、使用した免疫原、スクリーニングしたハイブリドーマの数、PG及び免疫原結合モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ(PG特異的であり、3ラウンドのサブクローン化後に選択基準(成長、モノクローン性、相対的親和性など)を満たしている)の数及びパーセンテージを示す。

【0201】

【表7】

実験	免疫原	播種したクローン	PG ⁺ ハイブリドーマ上清	PG特異的クローン	PG特異的, IgG産生サブクローン
1	BSA-リンカー-(配列番号97)	3072	10 (0.32%)	9 (0.29%)	0
2	KLH-リンカー-(配列番号97)	1920	27 (0.47%)	4 (0.07%)	0
	(配列番号97)-リンカー-KLH		0	0	0
3	KLH-リンカー-(配列番号96)	3840	192 (5%)	17 (0.44%)	10 (0.26%)
	DT-リンカー-(配列番号96)	3840	190 (4.95%)	13 (0.34%)	3 (0.08%)

10

20

【0202】

モノクローナル抗体、及びそれらを産生する安定なハイブリドーマを、以下の表に詳述する：

【0203】

【表8】

モノクローナル抗体	ハイブリドーマ	マウス Ig
MAb 1	43B9G11	IgG1
MAb 2	WE5H2G7	IgG1
MAb 3	6B5B11C10	IgG1
MAb 4	20D2C3G2	IgG1
MAb 5	1B4A11D11	IgG1
MAb 6	1B6A11F2	IgG1
MAb 7	1B11E4B11	IgG1
MAb 8	1C10D3B9	IgG1
MAb 9	1D8F5B3	IgG1
MAb 10	1E1C7B4	IgG1
MAb 11	2B4C8C8	IgG1
MAb 12	2B11E6G4	IgG1
MAb 13	2C6C3C7	IgG1
MAb 14	2H9F4B7	IgG1
MAb 15	1E9A4A4	IgG1
MAb 16	1E9D9B6	IgG1
MAb 17	1C8D10F5	N.D.
MAb 18	1A7C3F11	IgG2
MAb 19	1B3B4F11	IgG2
MAb 20	1C11F5E8	IgG2
MAb 21	1F11F5E10	IgG2
MAb 22	1F11F5G9	IgG2
MAb 23	1A11F2C9	IgG2

30

40

【0204】

50

ハイブリドーマ細胞株 1 B 4 A 1 1 D 1 1 (M A b 5、登録番号 C N C M I - 4 3 7 1)、1 B 6 A 1 1 F 2 (M A b 6、登録番号 C N C M I - 4 3 7 2)、1 B 1 1 E 4 B 1 1 (M A b 7、登録番号 C N C M I - 4 3 7 3)、2 B 4 C 8 C 8 (M A b 1 1、登録番号 C N C M I - 4 3 7 4)、2 B 1 1 E 6 G 4 (M A b 1 2、登録番号 C N C M I - 4 3 7 5)、及び 1 E 9 A 4 A 4 (M A b 1 5、登録番号及び C N C M I - 4 3 7 6) を、Treaty of Budapest に従って寄託し、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, France により 2 0 1 0 年 1 0 月 6 日に受理された。

【 0 2 0 5 】

抗 h P G モノクローナル抗体のクローニング及び配列決定

ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体は、当業者に公知の技術を使用して、クローン化及び配列決定することができる。上の表 5 に列挙するハイブリドーマからのモノクローナル抗体を、下に記載する通りに配列決定した。

【 0 2 0 6 】

ハイブリドーマ 6 B 5 B 1 1 C 1 0 及び 2 0 D 2 C 3 G 2 により産生されるモノクローナル抗体をコードする配列を、標準的な技術を使用して、クローン化及び配列決定した。簡単には、全 R N A を、製造業者の指示に従って使用した RNABee 試薬、AMSBio カタログ n o . C S - 1 0 4 B を使用して、凍結細胞ペレットから単離した。V 領域についての c D N A を、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) を使用して m R N A から調製し、c D N A 末端の 5 ' 迅速増幅 (R A C E) が続いた。c D N A 合成を、定常領域特異的プライマーを使用して行い、その後、第 1 鎖産物を精製し、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼを使用し、c D N A の 3 ' 末端にホモポリマーテールを加えた。「テール付き」c D N A 配列を、次に、プライマー対 (ホモポリマーテール及び V H 又は V L 領域のいずれかのそれぞれについて各々 1 つのプライマー) を使用した P C R により増幅させた。重鎖及び軽鎖可変領域の P C R 産物を、次に、標準的な手順を使用して、「T A」クローニングベクター (p-GEM-T easy, Promega cat. no A 1360) 中にクローン化し、配列決定した。図 2 A - B (M A b 3)、図 2 C - D (M A b 4) を参照のこと。

【 0 2 0 7 】

ハイブリドーマ 1 C 1 0 D 3 B 9、2 C 6 C 3 C 7、1 B 3 B 4 F 1、及び 1 E 9 D 9 B 6 1 により産生されるモノクローナル抗体をコードする配列を、以下の通りに決定した。全 R N A を、製造業者の指示に従って使用した RNAqueous (登録商標) - 4 P C R キット (Ambion cat. No. AM1914) を使用して、凍結細胞ペレットから単離した。重鎖 V 領域の m R N A を、6 つの縮重プライマープールのセット (H A から H F) を使用して増幅し、軽鎖 V 領域の m R N A を、8 つの縮重プライマープールのセット (クラスター用の 7 つ (K A から K G) 及び クラスター用の 1 つ (L A)) を使用して増幅した。可変領域についての c D N A を、R T - P C R を使用して m R N A から調製した。c D N A 合成を、定常領域特異的プライマーを使用して行い、I g G V H、I g V L、及び I g V L の各々についての 5 ' マウスシグナル配列についての縮重プライマー及び 3 ' 定常領域へのプライマーのプールを使用した P C R が続いた (Jones et al., 1991, Rapid PCR cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions, Bio/Technology 9: 88-89)。重鎖及び軽鎖可変領域の P C R 産物を、次に、標準的な手順を使用して、「T A」クローニングベクター (p-GEM-T easy, Promega cat. no A 1360) 中にクローン化し、配列決定した。図 2 E - F (M A b 8)、2 G - H (M A b 1 3)、2 I - J (M a b 1 6)、及び 2 K - L (M a b 1 9) を参照のこと。

【 0 2 0 8 】

実施例 2 : 抗 h P G 抗体の結合親和性

A . 相対的親和性

例示的なモノクローナル抗体の相対的親和性を、上に記載する E L I S A 方法を使用して測定し、それにおいて、ウェルを、5 0 ng のプロガストリンを含むペプチド溶液を用いてコーティングし、次に、増加濃度の各モノクローナル抗体の存在においてインキュベ

10

20

30

40

50

トした（以下の通り）：

【0209】

【表9】

モノクローナル抗体	テストした濃度範囲
N末端抗hPGモノクローナル抗体 MAbs 1-4	0.001-1 µg/mL
N末端抗hPGモノクローナル抗体 MAbs 3, 15-20	0.1-100 ng/mL
C末端抗hPGモノクローナル抗体 MAbs 5-14, 21-23	0.03-30 ng/mL

10

【0210】

図3Aは、1 ng/mLから1 µg/mlの濃度でテストした、4つの抗hPGモノクローナル抗体 MAbs 1~4の相対的親和性を示す。図3Bは、0.1~100 ng/mLの抗体濃度でテストした、N末端抗hPGモノクローナル抗体 MAbs 3及び15~20の相対的親和性を示す。図3Cは、0.03~30 ng/mLの抗体濃度でテストした、C末端抗hPGモノクローナル抗体 MAbs 5~14及び21~23の相対的親和性を示す。

【0211】

B. 親和性定数の測定

モノクローナル抗体についての親和性のより絶対的な定量化を提供するために、親和性定数を、Proteon Technique (BioRad) を使用し、Nahshol et al., 2008, Analytical Biochemistry 383: 52-60 (その全体において本明細書により組み入れられる) に従い測定した。簡単には、抗マウスIgG抗体(50 µg/ml)を最初にセンサーチップ上にコーティングし、抗体の注射後にチップにより検出されるシグナルが10,000~11,500 RU(応答単位)の間にあることを確実にした。テストするマウスモノクローナル抗体を次に注射した(典型的な濃度: 30 µg/ml)。テストする抗体の十分な結合を、センサーチップ上の少なくとも500 RUのさらなるシグナルに基づいて決定した。モノクローナル抗プロガストリン抗体とプロガストリンの間での相互作用の時間経過を、次に、例えば、200、100、50、25、及び12.5 nMの変動濃度のプロガストリンを注射することにより測定し、会合のレベルを検出した。典型的には、いくつかのチャンネルが、単一の実験において並行して複数の抗体をテストするために利用可能であり、PGの変動濃度で並行してテスト抗体の結合をアッセイすることが可能になる。典型的には、1つのチャンネルが、PGに特異的ではないマウスモノクローナル抗体について、非特異的結合についての対照として確保され、別のチャンネルには、バックグラウンドシグナルについてのベースラインとしての希釈緩衝剤単独を用いて注射する。一般的には、結合は、非特異的マウス抗体を用いて注射したチャンネルにおいて検出可能ではない。この設定において高レベルの会合を示す抗体は、プロガストリンにより捕捉モノクローナル抗体の飽和をもたらさうが、より低いプロガストリン濃度(50、25、12.5、6.25、及び3.125 nM)に対してテストすることができ、より緻密な測定を可能にする。

20

30

【0212】

親和性定数(KD)を、解離定数(kd)と会合定数(ka)の間の比率として算出した。実験値を、結合測定値に基づく実験曲線と理論上のプロファイルの間での統計的に関連する類似性を分析することにより確認した。実験曲線が理論モデルに適合するか否かを選択するためにProteon実験において使用される数学的モデルは、プロガストリン分子と抗プロガストリンモノクローナル抗体の間での1:1の相互作用に基づくラングミュアモデルであった。

40

【0213】

【表 10】

表 6	
モノクローナル抗体	親和性定数 測定 K _D (M)
抗 hPG MAb 1	2.5 μM (2.5 × 10 ⁻⁶ M)
抗 hPG MAb 2	185 nM (1.85 × 10 ⁻⁷ M)
抗 hPG MAb 3	6.4 nM (6.4 × 10 ⁻⁹ M)
抗 hPG MAb 4	3.5 nM (3.5 × 10 ⁻⁹ M)
抗 hPG MAb 5	13 pM (1.30 × 10 ⁻¹¹ M)
抗 hPG MAb 6	0.6 nM (6.38 × 10 ⁻¹⁰ M)
抗 hPG MAb 7	58 pM (5.84 × 10 ⁻¹¹ M)
抗 hPG MAb 8	0.1 nM (1.08 × 10 ⁻¹⁰ M)
抗 hPG MAb 10	3.6 nM (3.62 × 10 ⁻⁹ M)
抗 hPG MAb 11	0.3 nM (3.12 × 10 ⁻¹⁰ M)
抗 hPG MAb 12	0.4 nM (4.43 × 10 ⁻¹⁰ M)
抗 hPG MAb 13	0.6 nM (6.12 × 10 ⁻¹⁰ M)
抗 hPG MAb 14	6.8 pM (6.86 × 10 ⁻¹² M)
抗 hPG MAb 15	0.2 nM (2.11 × 10 ⁻¹⁰ M)
抗 hPG MAb 16	0.2 nM (2.78 × 10 ⁻¹⁰ M)
抗 hPG MAb 17	8.3 nM (8.29 × 10 ⁻⁹ M)
抗 hPG MAb 18	1.2 nM (1.24 × 10 ⁻⁹ M)
抗 hPG MAb 19	0.7 nM (7.79 × 10 ⁻¹⁰ M)
抗 hPG MAb 20	0.2 nM (2.47 × 10 ⁻¹⁰ M)
抗 hPG MAb 21	3.9 nM (3.90 × 10 ⁻⁹ M)
抗 hPG MAb 22	5 nM (4.94 × 10 ⁻⁹ M)
抗 hPG MAb 23	0.4 μM (3.99 × 10 ⁻⁷ M)

10

20

30

40

【 0 2 1 4 】

実施例 3 : 抗 h P G 抗体の凝集

抗体の凝集は、標的タンパク質に結合するために利用可能な抗体の量を低下させることにより治療効力を低下させることができる。非常に低レベルの凝集を伴う抗体は、治療適用のために好ましい。抗体の各バッチは、同じモノクローナル抗体の他のバッチと比較して変動しうる。一般的に、低凝集を伴うバッチを使用することが望ましい。抗体凝集を定量化するために、抗体溶液を分光蛍光光度計 (Photon Technology International) 中に置き、280 nMで照射した。拡散を280 nMで測定し、芳香族アミノ酸 (大部分がトリプトファン) に起因する発光を330 nMで測定した。凝集のレベルを、次に、280 nM対330 nMでのOD測定値間の比率を算出することにより定量化した (Nomine et al., 2003, Biochemistry 42: 4909-4917に記載する通り)。より高い280 / 330 nM比率は、より高い量の凝集を示す。使用した抗体の濃度は、15 μg/ml (インビトロでの処置のために使用される5 ~ 15倍を上回る) であった。

【 0 2 1 5 】

結果を以下の表及び図4に示す。

【 0 2 1 6 】

【表 1 1】

表 7

サンプル	280/330 nm 比率
ウシ血清アルブミン (n=1)	6.4
抗 hPG MAb 1 (n=1)	15.42
抗 hPG MAb 2 (n=2)	9.81
抗 hPG MAb 3 (n=2)	3.08
抗 hPG MAb 4 (n=2)	1.94

【 0 2 1 7 】

10

実施例 4：抗 h P G モノクローナル抗体の結合特異性

P G は、ガストリン遺伝子のペプチド産物の一つに過ぎない。他のガストリン遺伝子産物は、通常ホメオスタシスにおいて役割を有するが、しかし、それは、それを治療及び診断目的のために有用な標的とする、C R C における P G の役割である。本明細書に記載するモノクローナル抗体は、ガストリン遺伝子の発現及びプロセッシングに起因する全ての他のペプチド、例えばグリシン伸長 (G 1 7 - g l y)、アミド化 (ガストリン 1 7) ガストリンなど、及び C 末端隣接ペプチド (C T F P) を上回り、全長プロガストリンに特異的である。これらのペプチドは、循環中に存在する。抗 h P G モノクローナル抗体の結合特異性は、実施例 1 において上に記載する E L I S A アッセイを使用して、ヒトプロガストリン及び他のガストリン遺伝子由来ペプチドに対する抗体をアッセイすることにより決定した。

20

【 0 2 1 8 】

具体的には、ウェルを、以下：プロガストリン、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、アミド化ガストリン 1 7 (G 1 7)、グリシン伸長ガストリン 1 7 (G g l y)、又は C 末端隣接ペプチド (C T F P) のペプチドの一つを示した量で含む溶液を用いてコーティングした：

【 0 2 1 9 】

【表 1 2】

スクリーニングペプチド	テスト量
組換えプロガストリン	50 ng (実験 1) 25 ng (実験 2)
ヒトアミド化ガストリン I (G-17)	50 及び 250 ng
グリシン伸長ガストリン 17 (G17-Gly)	50 及び 250 ng
KLH	50 及び 250 ng
C 末端隣接ペプチド (CTFP)	50 及び 250 ng

30

【 0 2 2 0 】

第 1 の実験において、3 ng/mL (0 . 3 ng) の抗 h P G M A b 3 及び 1 µg/ml (0 . 1 µg) の各々の抗 h P G M A b 1、2、及び 4 を使用した。図 5 A を参照のこと。第 2 の実験において、抗 h P G M A b 5 ~ 1 4 及び 2 1 ~ 2 3 の結合特異性を 0 . 3 ng/mL でテストし (図 5 B を参照のこと)、抗 h P G M A b 3、1 5 ~ 2 0 の結合特異性を 1 ng/mL でテストした (図 5 C を参照のこと)。

40

【 0 2 2 1 】

抗体は、上の実施例 1 においてマウスを免疫化するために免疫原の一部において使用した抗原ペプチドに共役させた高い量の K L H に弱い反応を示した。任意の抗体 (担体として B S A を含む免疫原に対して産生されたものを含む) の P G 結合に対する B S A の検出可能な効果はなかった。

【 0 2 2 2 】

全ての抗体は、他のガストリン遺伝子由来ペプチド (例えばアミド化ガストリン 1 7、グリシン伸長ガストリン 1 7、C 末端隣接ペプチド、ガストリンを形成するポリペプチドの通常のプロセッシングの間にプロガストリンから切断される 5 アミノ酸ペプチドなど) と

50

比較し、全長 h P G (2 5 ng、次に 5 0 ng でテストした) への結合についての高い特異性を示した。例示的な抗体は、h P G 以外の任意のガストリン遺伝子由来ペプチドへの検出可能な結合 (「 P B S 単独」バックグラウンドを上回るシグナル) を示さなかった。

【 0 2 2 3 】

実施例 5 : 競合アッセイ

プロガストリンへの結合について抗 h P G ポリクローナル抗体と競合する抗 h P G モノクローナル抗体の能力を、「捕捉」抗 h P G 抗体及び「検出」抗 h P G 抗体を用いた E L I S A を使用して決定した。抗 h P G M A b 3 を以下の通りにアッセイした : 9 6 ウェルプレートを、h P G の残基 7 1 から 8 0 からなるペプチドに対して産生された C 末端プロガストリンポリクローナル抗体を用いてプレコーティングした。プレートを、次に、1 0 0 p M プロガストリンを用いてインキュベートし、1 0 μ g / m l のビオチン化 N 末端抗 h P G ポリクローナル抗体 (配列番号 2 5 のアミノ酸配列からなるペプチドに対して産生された)、及び増加濃度の抗 h P G M A b 3 モノクローナル抗体の添加が続いた。ビオチン化 N 末端抗 h P G ポリクローナル抗体の結合を、標準的なプロトコールに従って、ストレプトアビジン - H R P、それに続く O P D を用いてプレートをインキュベートすることにより検出した。結合を、発光を定量化することにより測定した。

10

【 0 2 2 4 】

結果は、増加濃度 (μ g / m l) の抗 h P G M A b 3 が、プロガストリンに結合するポリクローナル抗 h P G 抗体の能力を減少させることを示し、モノクローナル抗体がポリクローナル抗体と競合することを示している。図 6 を参照のこと。

20

【 0 2 2 5 】

実施例 6 : エピトープマッピング

例示的なモノクローナル抗体により結合された特定のエピトープを、S P O T 技術及びアラニンスキャンニング (それぞれ Laune, D., et al., 2002, J. Immunol. Methods 267: 53-70 及び Laune, D., 1997, J. Biol. Chem. 272: 30937-30944 を参照のこと) を使用してマッピングした。S P O T 技術において、推定エピトープにわたる 1 5 アミノ酸ペプチド配列が生成され、ニトロセルロース膜上にスポットし、それを、抗体により認識される最小エピトープ配列を決定するためのテスト抗体を用いてプローブする。アラニンスキャンを使用して、抗体結合のために重要であるエピトープ内の残基を決定する : 推定エピトープ内の各残基を、1 つずつアラニンに変異させ、アラニン含有ペプチドを、次に、テスト抗体を用いてプローブする。

30

【 0 2 2 6 】

エピトープのファミリーを、本開示の例示的な抗体について同定した。h P G M A b 1 ~ 4 及び 1 5 ~ 2 0 への N 末端モノクローナル抗体については、エピトープは、少なくとも以下の配列 : D A P L G (配列番号 2 8)、P D A P L G (配列番号 2 9)、P R S Q Q P D (配列番号 3 0)、W K P R S Q Q P D (配列番号 3 1)、又は W K P R S Q Q P D A P L G (配列番号 3 2) (以下の表 8 に示す通り) を含む。

【 0 2 2 7 】

【表 13】

表 8		
MAb	PG ペプチド抗原: SWKPRSQQPDAPLG	配列番号
MAb 2	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb 4	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb 1	PDAPLG	29
MAb 3	DAPLG	28
MAb 17	WKPRSQQPD	31
MAb 18	WKPRSQQPD	31
MAb 19	WKPRSQQPD	31
MAb 20	WKPRSQQPD	31
MAb 15	PRSQQPD	30
MAb 16	PRSQQPD	30

10

【0228】

hPG MAb 5~7、9~12、14、及び21~23へのC末端モノクローナル抗体について、エピトープは少なくとも以下の配列：FGRR（配列番号33）、MDFGR（配列番号34）、AEDEN（配列番号35）、及びGWMDFGRR（配列番号36）（以下の表9に示す通り）を含む。

【0229】

【表 14】

20

表 9		
MAb	PG ペプチド抗原: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN	配列番号
MAb 14	GWMDFGRR	36
MAb 11	MDFGR	34
MAb 5	FGRR	33
MAb 6	FGRR	33
MAb 7	FGRR	33
MAb 9	FGRR	33
MAb 10	FGRR..E	33
MAb 12	FGRR	33
MAb 23	AEDEN	35

30

【0230】

実施例7：癌細胞株に対する抗hPG抗体の中和活性

(A) 抗hPGモノクローナル抗体の中和活性

抗hPGモノクローナル抗体は、代表的な結腸直腸癌細胞株において細胞生存率を減少させる。適した結腸直腸癌細胞株は、当技術分野において公知である。例えば、HCT116、LS174T、SW480、及びSW620は、結腸癌を試験するために一般的に使用される細胞株であり、プロガストリンを産生及び分泌する。PGに対するモノクローナル抗体を、これらの異なる細胞株において増殖を阻害するそれらの能力についてテストした。各HCT116、LST174T、SW480、及びSW620からの細胞の生存率を、異なる抗hPGモノクローナル抗体を使用してテストした。

40

【0231】

各々の実験について、50,000個の細胞を、6ウェルプレート中にウシ胎児血清を含む培地中に播種し、8時間インキュベートした。細胞を一晩血清飢餓状態にし、播種後24時間目（時間「T0」）に開始し、細胞を、48時間にわたり12時間毎に、ウシ胎児血清の非存在において、1µg/mlのモノクローナル対照抗体（マウス抗ヒトIgG1、Calbiochem、Ref #411451）（CT mAb）を用いて、又は、1µg/mlの抗hPG MAb 1-4を用いて二通りに処理した。モノクローナル抗体のさらなる定量化時に、抗体が、およそ3~5µg/mlの濃度で使用されたと決定した。T0での細胞の数を、各実験に

50

ついて、対照ウェル中でカウントした。HCT116細胞について、実験を、0.5%ウシ胎児血清の存在において行った。処置の開始から48時間後、各ウェル中の生存細胞の数を、盲検実験において3回カウントした。CRC細胞の増殖又は生存率における低下は、対照MAbで処理した細胞のパーセンテージとして、生存している抗hPG MAb処理した細胞を算出することにより決定した。処理の開始時(T0)での細胞数を、48時間目に測定したテスト細胞数及び対照細胞数から減算した。具体的には、対照ウェル及び抗hPG MAb処理ウェルの両方における生細胞の数を、48時間目にカウントし、次に、各々の細胞数とT0に決定された細胞数の間の差を算出した。結果として得られた抗hPG MAb処理細胞の数を、次に、対照MAb処理細胞の数のパーセンテージとして表した。

10

【0232】

図7A~Cは、代表的な実験からのSW480細胞、LS174T細胞、及びHCT116細胞の生存に対する抗hPG MAb 3及び抗hPG MAb 4の効果を示す。結果は、2つの独立した実験から得られた4ウェルからの平均±S.E.である。抗hPGモノクローナル抗体を用いた処理は、対照抗体を用いた処理と比較して、細胞数を有意に低下させた。統計的有意性を、スチューデントのt検定を使用して決定した： $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ 、及び $*** = p < 0.001$ 。各細胞株において、抗hPG抗体は細胞の生存率を低下させた。1つの細胞株(LST174T)において、抗hPG抗体を用いた48時間の処理の終了時での細胞数は、実験の開始時での細胞数よりも低く、抗体が、細胞増殖の阻害に加えて、細胞死の原因となったことを示唆する。

20

【0233】

表10は、対照モノクローナル抗体(マウス抗ヒトIgG1、Calbiochem、Ref #411451)(CT mAb)と比較した、4つのモノクローナル抗hPG抗体の各々を用いて処理されたSW480結腸直腸癌細胞の生存率を示す。

【0234】

【表15】

表 10			
SW480 (T0 = 26 667)	細胞数 - T0	対照の%	p (処理対対照) マンホイットニー、 両側
対照 mAb	36050 +/- 3228		
抗 hPG MAb 1	30425 +/- 3098	84.4	0.3556
抗 hPG MAb 2	28925 +/- 2757	80.2	0.0476
抗 hPG MAb 3	6050 +/- 1788	16.8	<0.0001
抗 hPG MAb 4	17560 +/- 3439	48.7	0.0002

30

【0235】

対照と比較して、抗hPGモノクローナル抗体を用いた処置は、83.2%(抗hPG MAb 3)、51.3%(抗hPG MAb 4)、19.8%(抗hPG MAb 2)、及び15.6%(抗hPG MAb 1)だけ癌細胞の生存率を低下させた。

【0236】

以下の表は、対照モノクローナル抗体に比較した、抗hPG MAb 3及び4を用いて処理したLS174T及びHCT-116細胞の生存率を示す。データを、図7の相当パネル中にグラフィカルに示す。

40

【0237】

【表 16】

表 11			
HCT-116 (T0 = 42 750)	細胞数-T0	対照の%	P (処理対対照) マンホイトニー, 両側
対照 MAb	151 250 +/- 9071		
MAb3	62 750 +/- 9194	41.5 %	< 0.0001
MAb4	82 250 +/- 7435	54.4 %	< 0.0001

10

【0238】

【表 17】

表 12			
LS 174T (T0 = 51 666)	細胞数-T0	対照の%	P (処理対対照) マンホイトニー, 両側
対照 MAb	85 334 +/- 7520		
MAb3	-6666 +/- 5000	- 8 %	0.0084
MAb4	+8334 +/- 2500	7 %	0.0085

20

【0239】

インビトロアッセイ条件下で、細胞成長の完全な阻害は予測されない。細胞培養において、プロガストリンは、癌細胞により継続的に分泌され、細胞培養培地中に蓄積する。プロガストリンレベルは、体内の循環において生じうるより多く経時的に増加すると予想され、抗体に対する標的タンパク質の比率を増加させ、抗体の中和効果を希釈する。このように、インビトロで抗体を用いて観察された中和効果は、インビボで強くなると予測され、そこで、腫瘍細胞により分泌されるプロガストリンが血流中で運び去られ、インサイツでのその蓄積を少なくする。

【0240】

抗hPG MAb 5~23による細胞増殖の阻害を、CRC細胞株SW620、HCT116、及びLS47Tの1つ又は複数において決定した。アッセイを、6ウェルプレート中で、上に記載する通り、5 µg/mlの対照及びテスト(抗hPG)モノクローナル抗体を使用して実施した。50,000個の細胞を、HCT116及びLS174Tについて1ウェル当たりに、SW620細胞については100,000個播種した。以下の表は、代表的な実験からの対照処理と比べた、処理細胞の生存率を提供する。平均的な結果を、細胞株SW620、LS174T、及びHCT-116について、それぞれ図7G~Iにグラフ化する。

【0241】

30

40

【表 18】

表 13			
	細胞数-T0	対照の%	P (処理対対照) マンホイットニー, 両側
実験 1			
SW 620 (T0 = 103 067)			
対照 MAb	82 100 +/- 15489	-	
MAb 5	54 511 +/-8292	66 %	< 0.0001
MAb 6	44367 +/- 9321	54 %	< 0.0001
MAb 7	49279 +/- 8009	60 %	< 0.0001
MAb 8	32673 +/- 4680	40 %	< 0.0001
MAb 9	73283 +/- 3835	89%	0.1305
MAb 10	70178 +/- 4173	85 %	0.0618
実験 2			
SW 620 (T0 = 118 553)			
対照 MAb	81 347 +/-6062		
MAb 11	46 974 +/-7422	58 %	0.0003
MAb 12	52 980 +/- 10529	65 %	0.0002
MAb 13	38 933 +/- 5284	48 %	0.0003
MAb 14	83 767 +/- 9484	103 %	0.21
MAb 21	59 497 +/- 2828	73 %	0.0002
MAb 22	64 227 +/- 7123	79 %	0.0013
MAb 23	83 914 +/- 5629	103 %	0.82
実験 3			
SW 620 (T0 = 116 283)			
対照 MAb	101 333 +/- 17 626	-	
MAb 15	66 052 +/-7739	65 %	< 0.0001
MAb 16	58 883 +/- 9950	58 %	< 0.0001
MAb 17	76 688 +/- 5578	75.5 %	0.0014
MAb 18	75 874 +/- 10129	75 %	0.0005
MAb 19	70 242 +/- 10 851	69 %	< 0.0001
MAb 20	66 470 +/- 7557	66 %	< 0.0001

10

20

30

【 0 2 4 2 】

【表 19】

表 14			
	細胞数 -T0	対照の%	P (処理対対照) マンホイットニー、 両側
実験 1			
LS 174T (T0 = 60 944)			
対照 MAb	107 956 +/- 5859		
MAb 13	62 341 +/- 10 683	58 %	0.0003
MAb 16	65 389 +/- 8185	61 %	0.0002
実験 2			
LS 174T (T0 = 86 389)			
対照 Mab	241 711 +/- 11 620		
MAb 14	246 444 +/- 19563	102 %	ns
MAb 19	204 433 +/- 8946	84.5 %	0.0005
実験 3			
LS 174T (T0 = 79 667)			
対照 MAb	135 800 +/- 18 338		
MAb 8	57 333 +/- 12657	42 %	<0.001

10

20

【 0 2 4 3 】

【表 20】

表 15			
	細胞数 -T0	対照の%	P (処理対対照) マンホイットニー、 両側
実験 1			
HCT-116 (T0 = 49 286)			
対照 MAb	78 214 +/- 6230		
MAb 13	28 805 +/- 3477	36 %	<0.0001
MAb 16	56 484 +/- 8333	72 %	<0.0001
MAb 19	68 945 +/- 8795	88 %	0.0302
実験 2			
HCT-116 (T0 = 60 944)			
対照 MAb	122 456 +/- 1697		
MAb 8	75 867 +/- 15627	62 %	<0.0001
MAb 16	87011 +/- 5091	71 %	<0.0001

30

【 0 2 4 4 】

(B) 抗 h P G ポリクローナル抗体の中和活性

アッセイを、以下の改変を伴い、上に記載する通りに行った。N末端抗 h P G ポリクローナル抗体 (実施例 5 に記載する通り) を使用した。対照として、3 µg/ml のポリクローナル (ポリクローナルウサギ抗ヒト I g G、Affinity BioReagents、Ref #SA1-600) (C T p A B) を使用した。抗 P G 処理のために、3 µg/ml の抗 h P G ポリクローナル抗体を、全ての細胞株について使用した。S W 4 8 0 及び L S 1 7 4 T を、対照又は N 末端抗 h P G ポリクローナル抗体を用いて、24 ~ 48 時間にわたり、F C S を伴わない D M E M 中で処理し、H C T 1 1 6 を、抗 h P G ポリクローナル抗体を用いて、48 時間にわたり、0.5% F C S を伴う D M E M 中で処理した。生存細胞を、次に、トリプシン処理及びカウントし、等しい濃度の対照 (抗ヒト I g G) ポリクローナル抗体を用いて処理した

40

50

細胞と比較した。

【 0 2 4 5 】

代表的な実験の結果を、以下の表及び図 7 D ~ F に示す。抗 h P G ポリクローナル抗体を用いた処理は、対照抗体を用いた処理と比較して、細胞数を有意に低下させた。統計的有意性をスチューデントの t 検定を使用して決定した：* = $p < 0.05$ 、** = $p < 0.01$ 、*** = $p < 0.001$ 。細胞数を、実験の開始時 (T 0) に、培養中の細胞数と比べて表現する。各実験について、4 ウェルの各々の細胞を 3 回カウントした。抗 h P G モノクローナル抗体と同様に、結腸直腸癌細胞の増殖は抗 h P G ポリクローナル抗体により阻害され、プロガストリンに対するポリクローナル抗体を用いて見られた抗腫瘍効果が、癌細胞に対するプロガストリンの遮断効果においてモノクローナル抗体活性を合理的に予測することを実証している。

【 0 2 4 6 】

【表 2 1】

	細胞数-T0	対照の%	P (処理対対照) マンホイットニー, 両側
実験 1			
SW 480 (T0 = 26 667)			
対照 PAb	37 580 +/- 4233		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	0.0001
実験 2			
HCT-116 (T0 = 58 750)			
対照 PAb	105 350 +/- 8660		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	<0.05
実験 3			
LS174T (T0 = 112 500)	細胞数-T0	対照の%	P (処理対対照) マンホイットニー, 両側
対照 PAb	207 500 +/- 10 000		
PG PAb	102 500 +/- 5000	49.5 %	<0.01

【 0 2 4 7 】

実施例 8：抗 h P G モノクローナル抗体の中和効果は、抗体を、精製 h P G を用いてプレインキュベートした場合に除去される。

抗 h P G モノクローナル抗体の中和効果が h P G への結合により媒介されることを実証するために、L S 1 7 4 T 細胞を、h P G を伴わずにプレインキュベートした例示的な抗体 (抗 h P G M A b 8) の存在において培養した。陽性対照及び陰性対照として、細胞を、h P G 単独、対照抗体単独、及び h P G を用いてプレインキュベートした対照抗体を用いて培養した。

【 0 2 4 8 】

具体的には、3 3 . 3 nM (5 μ g/ml) 抗 h P G M A b 8 を、2 0 倍モル過剰の組換え h P G、又は 6 6 7 nM (6 . 6 7 μ g/ml) を用いて室温で 1 時間にわたりプレインキュベートした。組換えヒトガストを、実施例 1 に記載する通りに調製し、使用した。並行して、3 3 . 3 nM (5 μ g/ml) のマウス抗ヒト I g G 1 (General BioScience、reference no.AB23420) を、同様に、h P G の有無でプレインキュベートした。

【 0 2 4 9 】

5 0 0 0 個の L S 1 7 4 T 細胞を、9 6 ウェルプレート中の各ウェル中に、1 0 %ウシ胎児血清を含む培地中に播種し、8 時間にわたりインキュベートし、その後、細胞を無血清培地に切り替え、さらに 1 2 時間にわたり培養した。無血清培地中での 1 2 時間にわた

る成長後、細胞を、以下：対照抗体、hPGを用いてプレインキュベートした対照抗体、抗hPG MAb 8単独、hPGを用いてプレインキュベートした抗hPG MAb 8、及びhPG単独の1つを用いて、12時間毎に処理した。最初の処理から48時間後、残りの生細胞を、Promega CellTiter 96 Aqueous One Solutionを用いてプレートをインキュベートし、490nmで吸光度を記録することにより定量化した。対照モノクローナル抗体（「対照mAb」）を用いて処理した細胞について測定した吸光度を100%に設定し、全ての他の実験条件を、対照mAbを用いて処理した細胞の吸光度に対して測定した。結果を以下の表及び図8に示す。

【0250】

【表22】

	吸光度	対照の%	p (処理対対照) マンホイットニー、 両側
PG処理単独	0.244 +/- 0.088	132.5%	0.099 (n.s.)
対照 MAb	0.184 +/- 0.084	100%	N.A.
抗hPG MAb 8	0.057 +/- 0.06	31%	0.001
対照 MAb +hPG	0.321 +/- 0.079	174.5%	0.002
抗hPG MAb8 +hPG	0.271 +/- 0.076	147.6%	0.0229

10

20

【0251】

hPGの添加、又はhPGを用いた抗体のインキュベーションは、培養中の生細胞数を増加させる。対照的に、抗hPG MAb 8単独を用いた細胞の処理は、生存細胞数の有意な低下を起こす。このように、PG活性を中和する抗hPGモノクローナル抗体の能力は、抗体に結合し、それを飽和すると考えられるhPGの添加により無効になる。この結果によって、抗hPGモノクローナル抗体の中和活性の特異性が確認される。

【0252】

実施例9：抗hPG抗体のインビボでの抗腫瘍活性

多くの実験的インビボモデルが、結腸直腸癌の試験のために開発されてきた。マウス異種移植片試験（それにおいて腫瘍組織又はヒト癌細胞株からの細胞を免疫不全（いわゆる「ヌード」）マウス中に移植する）が開発されてきた。Pocard M., et al., *In vivo* (1996) 10(5): 463-469.いくつかのトランスジェニックマウスモデルも開発されてきた。マウスモデルは、大腸腺腫性ポリポーシス（APC）遺伝子におけるヘテロ接合変異（例えばApc Min、Apc 1638N、Apc 716、又はApc 14など）を含む。APC腫瘍抑制遺伝子は、細胞質タンパク質APCをコードし、それは、インタクトである場合、分解のためにプロテアソームにカテニンを標的化する多タンパク質複合体内のサイトゾルにおいてカテニンに結合及び捕捉し、それにより、核においてカテニンが核内転写因子Tcf-4を活性化することを妨げる。Heyer et al., *Oncogene* 18:5325-5333 (1999). APC 14マウスは、大腸腺腫性ポリポーシス（APC）遺伝子内のエクソン14のヘテロ接合欠失を保有する。散发性結腸直腸癌を伴う患者の70%超において生じるものと同様に、第2のAPC対立遺伝子における体細胞性のヘテロ接合性の消失（LOH）が腸細胞において生じ、カテニン/Tcf-4転写複合体の構成的活性化、及びこれらの動物における腸腫瘍の自然発生に導く。これらの腺腫及び癌腫の分子起源、ならびに腫瘍の形態（血管新生、炎症応答、及び免疫細胞の存在を含む）は、マウス異種移植モデルと比較して、ヒト腫瘍のものと同じく大きな類似性を伴い、APC 14を、ヒト結腸直腸癌治療試験のための高度に関連するモデルにする。Colnot et al., 2004, *Lab. Invest.* 84: 1619-1630.他のトランスジェニックマウスモデルは、遺伝子（例えばMSH2、MSH6、CDX2、K-RASなど）における変異、ならびにAPCにおける変異と他の癌遺伝子における変異との組み合わせた系統に基づく。Heyer et al., 1999, *Onco*

30

40

50

gene 18:5325-5333, Janssen KP et al., 2002, Gastroenterology 123: 492-504. これらのモデルを広く使用して、結腸直腸癌を試験し、結腸直腸癌の処置に関する仮説をテストする。

【0253】

大腸腺腫性ポリポーシス遺伝子を伴うエクソン14のヘテロ接合欠失を保有するトランスジェニックマウス(APC 14)は、結腸直腸癌についてのモデルとしての役割を果たし、ヒト結腸癌において見出されるものと類似の腫瘍を発生する。第1の実験において、APC 14マウスを、(1)配列番号25に相当するペプチド及び(2)Hollande et al., WO 07/135542に記載されるC末端ペプチドに対して産生された等量の抗hPGポリクローナル抗体を含む調製物を用いて処置した。3.5ヶ月齢のマウスを、対照ポリクローナル抗体又は抗hPGポリクローナル抗体のいずれかを用いて5週間にわたり処置した(1処置当たり2匹のマウス)。抗体を、10mg/kg(150µL注射容積)の用量で週2回腹腔内注射により投与した。処置の終了時に、マウスを屠殺し、腸を、PBSを用いて洗浄し、デジタル画像のために切開し、免疫組織化学的分析のために4%パラホルムアルデヒド中で固定した。腫瘍数及び結腸直腸組織の画像を記録した。

10

【0254】

腸組織の形態学的評価は、抗hPG抗体が健常マウスの腸管上皮の再生に影響を与えないことを示した。腫瘍を、処置群及び対照群においてカウントした。対照抗体を用いて処置したマウスについての腫瘍の総数は、抗hPG抗体を用いて処置したマウスにおける4個と比較して、27個であった。このように、抗hPG抗体は、対照抗体と比較して、6.5倍超だけ腫瘍数を低下させ、マウス腸における健常上皮の再生に影響を与えない。

20

【0255】

第2の実験において、APC 14マウス及び正常(対照)マウス(C57BL/6J)における抗hPG抗体の効果を検討した。4ヶ月齢のマウスを、6週間にわたり週2回、対照ポリクローナル抗体(ウサギ抗ヒトIgG抗血清(Jackson Immuno Research(reference no. 309-005-0089))又は抗hPGポリクローナル抗体のいずれかを用いて、9mg/kg(150µL注射容積)の用量で週2回の腹腔内注射により処置した。処置の6週間後、屠殺の2時間前に、マウスに、プロモデオキシウリジン(BrdU)を用いて注射した(マウス1匹当たり2mg、腹腔内注射)。6匹のAPC 14マウスを、抗hPGポリクローナル抗体を用いて処置し、4匹を、対照ポリクローナル抗体を用いて処置した。対照抗体及び抗hPG抗体を、6匹の正常(C57BL/6J)マウスの各々に投与した。腸の異常はどちらの群からのマウスのいずれでも検出されず、正常腸組織に対する抗hPG抗体の安全性及び有害作用の欠如をさらに実証した。

30

【0256】

腫瘍の数及びサイズ(高さ及び長さ)を、APC 14マウスの処置群対対照群において検討した。腫瘍のサイズは、以下の通りに調製した各動物の腸から撮った画像の測定により決定した。腸を、上に記載する通りにリンスし、縦方向に切開し、パラフィン中に包埋し、「スイスロール」技術を使用して免疫組織化学のために処理した。腫瘍の長さとお高さの測定は、Image Jソフトウェアを使用して実施した。

【0257】

結果を表18ならびに図8A及びBに示す。腫瘍サイズについての結果は、対照処置群と抗hPG投与群の間での統計的有意差を示す。統計的有意性を、マンホイットニー検定を使用して決定した： $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ 、及び $*** = p < 0.001$ 。対照抗体を用いて処置したマウスは、合計125個の腫瘍を示し、マウス1匹当たりの平均で31.25個の腫瘍を伴った。抗hPG処置マウスは46個の腫瘍を示し、又はマウス1匹当たり平均7.6個の腫瘍であった。この差は統計的に有意であり(マンホイットニー検定、 $P = 0.0095$)、抗hPG抗体がインビボでの結腸直腸癌腫瘍の数を有意に低下させることを示す。

40

【0258】

【表 2 3】

表 18						
処置 (マウス数)	マウス 1 匹当たりの腫瘍数					
対照 PAb (4)	23	48	28		26	
抗 hPG PAb (6)	2	16	15	9	2	2

【 0 2 5 9 】

10

抗 h P G 抗体は、結腸直腸癌のマウスモデルにおける腫瘍数及び腫瘍サイズの両方における低下により測定される通り、インビボでの結腸直腸癌腫瘍を、正常結腸直腸上皮に対する任意の明かな有害作用を伴わず、有意に低下させる。このように、抗 h P G を用いた結腸直腸癌腫瘍の処置は、インビボで治療効果を提供する。

【 0 2 6 0 】

実施例 1 0 : ヒト化抗 h P G 抗体の設計

ヒト化抗体を、マウス抗 h P G モノクローナル抗体 M A b 3、4、8、13、16、及び 19 から「インシリコ」で設計した。ヒト化抗体の設計は、Lefranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77 ; Lefranc et al., 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012 ; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111 に記載される方法論に従って行った。マウスモノクローナル抗体の各々について、相当するヒト化 V_H 及び V_L ペプチド配列を以下 : IMGT-ONTOLOGY データベース (Duroux et al., 2008, Biochimie, 90: 570-583 ; Giudicelli and Lefranc, 1999, Bioinformatics, 15: 1047-1054) ならびに I M G T (登録商標) データベース及びツール (Ehrenmann et al., 2010, Nucl. Acids. Res., 38: D301-307 ; Brochet et al., 2008, Nucl. Acids. Res., 36: W503-508) を使用してマウス配列における C D R 及びフレームワーク領域を同定すること、それに続く I M G T / G E N E - D B (Giudicelli et al., 2005, Nucl. Acids. Res., 33: D256-261) における最も近いヒトフレームワーク領域配列のアミノ酸配列の同定、及びヒトフレームワーク領域上へのマウス C D R 配列の移植により決定した。特に、マウス V_H 及び V_L ドメインのヌクレオチド及びアミノ酸配列を、I M G T / V - Q U E S T 及び I M G T / D o m a i n G a p A l i g n を使用して分析し、マウス C D R 及びフレームワーク領域を区切り、C D R の長さを定め、アンカーアミノ酸を同定した。アンカーアミノ酸は C D R 1 - I M G T、C D R 2 - I M G T、C D R 3 - I M G T を支持する I M G T 「Collier de Perles」の位置 26、39、55、66、104、及び 118 の残基である (Kaas and Lefranc, 2007, Current Bioinformatics, 2: 21-30 ; Kaas et al., Brief. Funct. Genomic Proteomic, 2007, 6: 253-264)。マウス配列に最も近いヒト V (可変) 及び J (連結) 遺伝子が同定され、最も適した遺伝子が選ばれた。マウスフレームワーク領域中の個々のアミノ酸は、2 層に対して IMGT Collier de Perles を使用し、それらが、公知の 3 次元構造 (Kaas et al., 2004, Nucl. Acids. Res. 32: 208-210) と比較して、抗体の特異性に恐らくは寄与すると考えられる場合、維持された。

20

30

40

【 0 2 6 1 】

M A b 3 についての V_H C D R を、C D R 1、2、及び 3 についてそれぞれ 8、8、及び 8 アミノ酸長であると決定した。マウス M A b 3 V_H、I G H V 1 - 5 * 0 1 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、10 残基で異なり、その内の 3 つが C D R にマッピングされ、ヒト化抗 h P G モノクローナル抗体の設計において保存された (C D R 1 中の I 2 9、C D R 2 中の F 5 6 及び S 6 5)。また、V 3 9、G 5 5、及び R 6 6 が、特異性を保存するために潜在的に重要と考えられ、設計において保持された。最も近いヒト生殖系列遺伝子は I G H V 1 - 3 * 0 1 であった (I M G T / D o m a i n G a p A l i g n に基づいて、アミノ酸レベルで 63.3% 同一である)。フレームワーク領域 1 ~ 3 における 27 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。フレーム

50

ワーク領域 4 において、スレオニン 1 2 3 及びロイシン 1 2 4 をロイシン 1 2 3 及びバリン 1 2 4 に変えて、ヒトIGHJ1*01 遺伝子と一致させた。全体的に、MAb 3 についてのヒト化V_Hは、IGHV1-46*03 についての可変領域と 87.8% 同一であり、4 つのフレームワーク領域における 91 アミノ酸中 88 が同一である。

【0262】

MAb 3 についてのV_L CDR を、CDR 1、2、及び 3 についてそれぞれ 11、3、及び 9 アミノ酸長であると決定した。マウスMAb 3 V_L、IGKV1-117*01 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、フレームワーク領域にマッピングされる単一残基で異なった。最も近いヒト生殖系列遺伝子はIGKV2-30*02 であった (IGMT/DomainGapAlign に基づいて、アミノ酸レベルで 81% 同一である)。フレームワーク領域 1~3 における 14 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。残基 E40 及び F68 は、投影ヒト化配列中で維持される。フレームワーク領域 4 において、ロイシン 1 2 4 をバリン 1 2 4 に変えて、ヒトIGKJ4*01 遺伝子と一致させた。全体的に、MAb 3 についてのヒト化V_H配列は、IGKV2D-29*02 と 93% 同一であり、4 つのフレームワーク領域における 89 アミノ酸中 87 が同一である。

10

【0263】

予測されるV_H及びV_L配列を以下の表に提供する。

【0264】

【表 2 4】

20

表 19		
配列番号	アミノ酸配列	V鎖
21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSYVHWVRQAP GQRLEWMGGFYPGNSDSRYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMEL SSLRSEDTAVYYCTRRDSPQYWGQGLVTVSS	hV _H 3
22	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQ QRPGQSFRRLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCFQGSHPVFTFGGGTKVEIK	hV _K 3

【0265】

MAb 4 についてのV_H CDR を、CDR 1、2、及び 3 についてそれぞれ 8、8、及び 11 アミノ酸長であると決定した。マウスMAb 4 V_H、IGHV1-9*01 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、11 残基で異なり、その内の 4 つが CDR にマッピングされ、ヒト化抗 hPG モノクローナル抗体の設計において保存された (CDR 1 中の S35、S36、及び S37、CDR 2 中の F56)。また、D66 が、特異性を保存するために潜在的に重要と考えられ、設計において保持された。最も近いヒト生殖系列遺伝子はIGHV1-46*03 であった (IGMT/DomainGapAlign に基づいて、アミノ酸レベルで 64.9% 同一である)。フレームワーク領域 1~3 における 27 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。フレームワーク領域 4 において、アラニン 1 2 8 をセリン 1 2 8 に変えて、ヒトIGHJ5*01 遺伝子と一致させた。全体的に、MAb 4 についてのヒト化V_Hは、IGHV1-46*03 についての可変領域と 91.8% 同一であり、4 つのフレームワーク領域における 91 アミノ酸中 90 が同一である。

30

40

【0266】

MAb 4 についてのV_L CDR を、CDR 1、2、及び 3 についてそれぞれ 11、3、及び 9 アミノ酸長であると決定した。マウスMAb 4 V_L、IGKV1-110*01 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、3 残基で異なり、その内の 2 つが CDR 1 にマッピングされ (セリン 34 及びバリン 36)、ヒト化抗 hPG モノクローナル抗体の設計において保存された。最も近いヒト生殖系列遺伝子はIGKV2D-29*02 であった (IGMT/DomainGapAlign に基づいて、アミノ酸レベルで 81

50

%同一である)。フレームワーク領域 1～3 における 11 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。フレームワーク領域 4 において、セリン 120 をグルタミン 120 に変えて、ヒト I G K J 2 * 0 1 遺伝子と一致させた。全体的に、M A b 4 についてのヒト化 V 配列は、I G K V 2 D - 2 9 * 0 2 と 9 2 %、4 つのフレームワーク領域について 1 0 0 %同一である。

【 0 2 6 7 】

予測される V_H 及び V 配列を以下の表に提供する。

【 0 2 6 8 】

【表 2 5】

表 20		
配列番号	アミノ酸配列	V鎖
23	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSSSWMHWRQAPG QGLEWMMGI FLPGSGSTDYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSED TAVYYCATDGN YDWFAYWGQGT LVT VSS	hV _H 4
24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSSGVTYLYWYL QKPGQSPQLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK	hV _K 4

10

【 0 2 6 9 】

M A b 8 についての V_H C D R を、C D R 1、2、及び 3 についてそれぞれ 8、8、及び 10 アミノ酸長であると決定した。マウス M A b 8 V_H、I G H V 5 - 9 - 3 * 0 1 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、5 残基で異なり、その内の 4 つが C D R にマッピングされ、ヒト化抗 h P G モノクローナル抗体の設計において保存された。最も近いヒト生殖系列遺伝子は I G H V 3 - 2 1 * 0 1 及び * 0 2 であった (I G M T / D o m a i n G a p A l i g n に基づいて、アミノ酸レベルで 80.4%同一である)。フレームワーク領域 1～3 における 12 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。フレームワーク領域 4 において、セリン 123 及びロイシン 124 を、それぞれ、スレオニン 123 及びバリン 124 に変えて、ヒト I G H J 6 * 0 1 遺伝子と一致させた。全体的に、M A b 8 についてのヒト化 V_H は、I G H V 3 - 2 1 * 0 1 及び * 0 2 についての可変領域と 92.8%、4 つのフレームワーク領域について 1 0 0 %同一である。M A b 8 についてのマウス V_H C D R 3 中に潜在的な N グリコシル化部位がある。

20

30

【 0 2 7 0 】

M A b 8 についての V_L C D R を、C D R 1、2、及び 3 についてそれぞれ 11、3、及び 9 アミノ酸長であると決定した。マウス M A b 8 V_L、I G K V 2 - 1 0 9 * 0 1 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、6 残基で異なり、その内の 4 つが C D R 1 にマッピングされ、ヒト化抗 h P G モノクローナル抗体の設計において保存された。最も近いヒト生殖系列遺伝子は I G K V 2 - 2 8 * 0 1 及び I G K V 2 D - 2 8 * 0 1 であった (I G M T / D o m a i n G a p A l i g n に基づいて、アミノ酸レベルで 75%同一である)。フレームワーク領域 1～3 における 12 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。フレームワーク領域 4 において、アラニン 120、ロイシン 124、及びロイシン 126 を、それぞれ、グリシン 120、バリン 124、及びイソロイシン 126 に変えて、ヒト I G K J 4 * 0 1 遺伝子と一致させた。全体的に、M A b 8 についてのヒト化 V 配列は、I G K V 2 - 2 8 * 0 1 及び I G K V 2 D - 2 8 * 0 1 と 87%、4 つのフレームワーク領域について 1 0 0 %同一である。

40

【 0 2 7 1 】

予測される V_H 及び V 配列を以下の表に提供する。

【 0 2 7 2 】

【表 26】

表 21		
配列番号	アミノ酸配列	V 鎖
75	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FTTYAMNWRQAPGKGLEWVSSISSGGT YTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGT VTVSS	hV _H 8a
76	DIVMTQSPLSLPVTPEPEA SISCRSSKSLRHTKGITFLD WYLQKPGQSPQLLIYQMSNRASGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELPLTFGGGKVEIK	hV _K 8a
77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVS SISGGTYTTYADSVKG RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCATQGNYSLDFWGQGTTVTVSS	hV _H 8b
78	DIVMTQSPLSLPVTPEPEASISC RSSKSLRHTKGITFLYWYLQKPG QSPQLLIYQMSNRASGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCAQNLELPLTFGGGKVEIK	hV _K 8b
79	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSG GTYYYADSVKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGTTVTVSS	hV _H 8b

10

20

【0273】

MAb 13 についての V_H CDR を、CDR 1、2、及び 3 についてそれぞれ 8、8、及び 7 アミノ酸長であると決定した。マウス MAb 13 V_H、IGHV5-6-3*01 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、10 残基で異なり、その内の 5 つが CDR にマッピングされ、ヒト化抗 hPG モノクローナル抗体の設計において保存された。最も近いヒト生殖系列遺伝子は IGHV3-7*01 及び *02 であった (IGMT / Domain Gap Align に基づいて、アミノ酸レベルで 78.6% 同一である)。フレームワーク領域 1~3 における 13 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。フレームワーク領域 4 において、スレオニン 123 及びロイシン 124 を、それぞれ、ロイシン 123 及びパリン 124 に変えて、ヒト IGHJ4*01 遺伝子と一致させた。全体的に、MAb 13 についてのヒト化 V_H は、IGHV3-7*01 及び *02 についての可変領域と 91.8%、4 つのフレームワーク領域について 100% 同一である。

30

【0274】

MAb 13 についての V_L CDR を、CDR 1、2、及び 3 についてそれぞれ 11、3、及び 9 アミノ酸長であると決定した。マウス MAb 13 V_L、IGKV1-135*01 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、フレームワーク領域中に位置づけられる単一残基で異なった。最も近いヒト生殖系列遺伝子は IGKV2-30*01 及び *02 であった (IGMT / Domain Gap Align に基づいて、アミノ酸レベルで 81% 同一である)。フレームワーク領域 1~3 における 13 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。フレームワーク領域 4 において、ロイシン 124 をパリン 124 に変えて、ヒト IGKJ4*01 遺伝子と一致させた。全体的に、MAb 13 についてのヒト化 V 配列は、IGKV2-30*01 及び *02 と 94%、4 つのフレームワーク領域について 100% 同一である。

40

【0275】

予測される V_H 及び V 配列を以下の表に提供する。

【0276】

【表 27】

表 22		
配列番号	アミノ酸配列	V 鎖
80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAP GKGLEWVANINTEFGDRTYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGTGTYYWQGT LVTVSS	hV _H 13a
81	DVVMTQSPPLSLPVTTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNWFQ QRPGQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCWQGT HFPQT FGGGTKVEIK	hV _κ 13a
82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQ APGKLEWVASINTEFGDRTYYVDSVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNLSLRAEDTAVYYCARGTGTYYWQGT LVTVSS	hV _H 13b
83	DVVMTQSPPLSLPVTTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNW FQQRPGQSPRRLIYLVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCWQGT HFPQT FGGGTKVEIK	hV _κ 13b

10

【0277】

MAb 16 についての V_H CDR を、CDR 1、2、及び 3 についてそれぞれ 8、8、及び 10 アミノ酸長であると決定した。マウス MAb 16、V_H、IGHV1-53*01 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、7 残基で異なり、その内の 2 つが CDR にマッピングされ、ヒト化抗 hPG モノクローナル抗体の設計において保存された。最も近いヒト生殖系列遺伝子は IGHV1-46*01 及び *03 であった (IGMT / Domain Gap Align に基づいて、アミノ酸レベルで 71.4% 同一である)。フレームワーク領域 1~3 における 25 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。フレームワーク領域 4 において、ロイシン 124 をバリン 124 に変えて、ヒト IGHJ6*01 遺伝子と一致させた。全体的に、MAb 16 についてのヒト化 V_H は、IGHV1-46*01 及び *03 についての可変領域と 96.9%、4 つのフレームワーク領域について 100% 同一である。

20

【0278】

MAb 16 についての V_L CDR を、CDR 1、2、及び 3 についてそれぞれ 11、3、及び 9 アミノ酸長であると決定した。マウス MAb 16、V_L、IGKV1-135*01 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、フレームワーク領域中に位置づけられる 4 残基で異なった。最も近いヒト生殖系列遺伝子は IGKV2-30*01 及び *02 であり (IGMT / Domain Gap Align に基づいて、アミノ酸レベルで 79% 同一である)、それらは CDR 1 中の 1 アミノ酸だけ異なった。フレームワーク領域 1~3 における 15 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。フレームワーク領域 4 において、グリシン 120 をグルタミン 120 に変えて、ヒト IGKJ2*01 遺伝子と一致させた。全体的に、MAb 16 についてのヒト化 V 配列は、IGKV2-30*01 及び *02 と 94%、4 つのフレームワーク領域について 100% 同一である。

30

【0279】

予測される V_H 及び V 配列を以下の表に提供する。

40

【0280】

【表 28】

表 23		
配列番号	アミノ酸配列	V鎖
84	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWVRQAPG QGLEWMGIINPSNGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTITVTVSS	hV _H 16a
85	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNWFQQ RPGQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGYYCWQGTHTSPYTFGQGTKLEIK	hV _κ 16a
86	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMYWVRQAPGQG LEWMGIINPSNGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTITVTVSS	hV _H 16b
87	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLYWFQQR GQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHTSPYTFGQGTKLEIK	hV _κ 16b
88	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMYWVRQAPGQGL EWMGEINPSNGGTYAQAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE TAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTITVTVSS	hV _H 16c
89	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLYWFQQR GQSPRRLIYLVSERDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHTSPYTFGQGTKLEIK	hV _κ 16c

10

【0281】

MAb 19 についての V_H CDR を、CDR 1、2、及び 3 についてそれぞれ 9、7、及び 14 アミノ酸長であると決定した。マウス MAb 19 V_H、IGHV 3 - 2 * 01 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、5 残基で異なり、その内の 2 つが CDR にマッピングされ、ヒト化抗 hPG モノクローナル抗体の設計において保存された。最も近いヒト生殖系列遺伝子は IGHV 4 - 30 - 4 * 01 であった (IGMT / Domain Gap Align に基づいて、アミノ酸レベルで 72.4% 同一である)。しかし、この遺伝子は多型性であるため、IGHV 4 - 31 * 02 及び * 03 (IGMT / Domain Gap Align に基づいて、アミノ酸レベルで 71.4% 同一である) を選択した。フレームワーク領域 1 ~ 3 における 21 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。フレームワーク領域 4 において、イソロイシン 123 をロイシン 123 に変えて、ヒト IGHJ 4 * 01 遺伝子と一致させた。全体的に、MAb 19 についてのヒト化 V_H は、IGHV 4 - 31 * 02 及び * 03 についての可変領域と 91.9%、4 つのフレームワーク領域について 100% 同一である。

20

30

【0282】

MAb 19 についての V_L CDR を、CDR 1、2、及び 3 についてそれぞれ 7、7、及び 13 アミノ酸長であると決定した。マウス MAb 19 V_L、IGLV 3 * 01 の配列に最も近い生殖系列マウス遺伝子は、8 残基で異なり、その内の 5 つが CDR 中に位置づけられた。最も近いヒト生殖系列遺伝子は IGLV 4 - 69 * 01 及び * 02 であった (IGMT / Domain Gap Align に基づいて、アミノ酸レベルで 69.9% 同一である)。フレームワーク領域 1 ~ 3 における 23 の配列差が、マウスとヒトの生殖系列遺伝子の間で見出された。フレームワーク領域 4 において、バリン 124 をロイシン 124 に変えて、ヒト IGLJ 3 * 01 遺伝子と一致させた。あるいは、IGJK 4 * 01 遺伝子をフレームワーク 4 領域について使用することができる。全体的に、MAb 19 についてのヒト化 V_L 配列は、IGLV 4 - 69 * 01 及び * 02 と 92.4%、4 つのフレームワーク領域について 100% 同一である。

40

【0283】

予測される V_H 及び V_L 配列を以下の表に提供する。

【0284】

【表 29】

表 24		
配列番号	アミノ酸配列	V鎖
90	QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGYSITSDYAWSWIRQH PGKGLEWIGYISFSGYTYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGLVTVSS	V _H 19a
91	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRITYTIAWHQQQPEK GPRYLMKVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSE DEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	V _K 19a
92	QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGYSITSDYAWNWRQHP GKGLEWIGYISFSGYTYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGLVTVSS	V _H 19b
93	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRITYTIEWHQQQPEKG PRYLMKVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSED EADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	V _K 19b
94	QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGK GLEWIGYISFSGYTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGLVTVSS	V _H 19c
95	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRITYTIEWHQQQPEKGP RYLMEVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDE ADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	V _K 19c

10

【0285】

本願において引用される全ての刊行物、特許、特許出願が、各々の個々の刊行物、特許、特許出願、又は他の文書が、全ての目的のために参照により組み入れられることが個々に示される場合と同じ範囲で、全ての目的のために、それらの全体において参照により本明細書により組み入れられる。種々の特定の実施態様が例証及び記載されており、種々の変化を、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく作製することができることが理解されるであろう。

20

プロプロガス トリン: M ORLCVYVLIF ALALAAFSEA SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG
 -21 -11 -1 1 11 21
PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FGRRSAEDEN
 31 41 51 61 71

 プロガス トリン: SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG
 1 11 21
PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FGRRSAEDEN
 31 41 51 61 71

 G34: QLG PQGPPHLVAD PSKKEGPWLE EEEEAYGWMD F-NH₂
 41 51 61 71
 G34-Gly: QLG PQGPPHLVAD PSKKEGPWLE EEEEAYGWMD FG
 41 51 61 71
 G17: EGPWLE EEEEAYGWMD F-NH₂
 61 71
 G17-Gly: EGPWLE EEEEAYGWMD FG
 61 71
 CTFP: SAEDEN
 75

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTTCAGTCTTGGAGATCAAGCCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCAATTGTACATAGTAAATG
 D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N
mV₁CDR 1.3

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GAAACACCTATTTAGAAATGGTACCTGCAGAAAACCAGGCCAGTCTCCAAAAGCTCCTGATCTACAAAAGTTTCCAAACCGATTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT
 G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F
mV₁CDR 2.3
mV₁CDR 1.3
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGACTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCCACATGTTCCG
 S G S G S G T D F T L K I S R L E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P
mV₁CDR 3.3

310 320 330
 TTCACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
 F T F G G G T K L E I K
mV₁CDR 3.3

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CAGGTTGAGTTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCAGGGCCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACACATTCAGTAGCTCCTGGA
 Q V Q L Q Q S G A E L M K P G A S V K I S C K A T G Y T F S S S W

mV_HCDR 1.4

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TAGAGTGGTTAAACACAGAGGCCCTGGACATGGCCCTTGAGTGGATTGGAGAGTTTTTACCTGGAAGTGGTAGTACAGACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAA
 I E W L K Q R P G H G L E W I G E F L P G S G S T D Y N E K F K G K

mV_HCDR 2.4

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGCCACATTCACCTGCAGACACATCCCTCCGACACAGCCCTACATGCTACTCAGCAGCCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAACTSATGGT
 A T F T A D T S S D T A Y M L L S S L T S E D S A V Y C A T D G

mV_HCDR 3.4

310 320 330 340 350
 AATTATGACTGGTTTGTCTTACTGGGGCCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
 N Y D W F A Y W G Q G T L V T V S A

mV_HCDR 3.4

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GATCTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCGTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCCTTGTACACAGTAGTG
 D L V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V H S S

mV_LCDR 1.4

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GAGTCACCTATTACATTGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCGATCTACAAAAGTTTCCAACCCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT
 G V T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F

mV_LCDR 2.4

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTTCCT
 S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P

mV_LCDR 3.4

310 320 330
 CCCACGTTGGCTCGGGACAAAAGTTGGAAAATAAAA
 P T F G S G T K L E I K

mV_LCDR 3.4

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAAGTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCACCTACCTATGCCA
 E V Q L V E S G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F T T Y A

mV_HCDR 1.8

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TGTCITGGGTTCCGCCAGACTCCGGGAGAGAGGCTGGAGTGGGTGGCAACCATTAGTAGTGGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCCG
 M S W V R Q T P E K R L E W V A T I S S G G T Y T Y Y P D S V K G R

mV_HCDR 2.8

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAGCCCTATACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCCATGTATTACTGTGCAACACACAGGGG
 F T I S R D N A K N A L Y L Q M S S L R S E D T A M Y Y C A T Q G

mV_HCDR 3.8

310 320 330 340
 AATTACTCTTTGGACTTCTGGGGCCCAAGGCACCTCTCTCACAGTCTCCTCA
 N Y S L D F W G Q G T S L T V S S

mV_HCDR 3.8

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GACATTTGATGACGCAGGCTGCATCCTCTAATCCAGTCACCTTTGGAACATCCGCTTCCATCTCCTGCAGGCTTAGTAAGAGTCTCCGACATACTAAAG
 D I V M T Q A A S S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L R H T K

mV_LCDR 1.8

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GCATCACCTTTTGTATTTGGTATCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTT
 G I T F L Y W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P D R F

mV_LCDR 1.8

mV_LCDR 2.8

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CAGTAGCAGTGGGTCAGGAACTGATTTACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAAATCTAGAACTTCCG
 S S S G S G T D F T L R I S R V E A E D L G V Y Y C A Q N L E L P

mV_LCDR 3.8

310 320 330
 CTCACGTTCCGGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
 L T F G A G T K L E L K

mV_LCDR 3.8

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGTCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAITTTTCAGTAGCTATGGCA
 E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F I F S S Y G

mV_HCDR 1.13

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TGTCTTGGTTCCGCCAGTCTCCAGACAGGAGGCTGGAGTTGGTCGCAAGTATTAATACITTTTGGTGATAGAACCTATTTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCG
 M S W V R Q S P D R R L E L V A S I N T F G D R T Y Y P D S V K G R

mV_HCDR 2.13

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAAAATGACCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATTTTACTGTGCAAGAGGGACC
 F T I S R D N A K N T L Y L Q M T S L K S E D T A I Y C A R G T

mV_HCDR 3.13

310 320 330 340
 GGAACCTACTGGGGCCAGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA
 G T Y W G Q G T T L T V S S

mV_HCDR 3.13

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCACTCACATTTGTTCGGTTAACATTGGACAACCAGCCTCCATCTCCTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATG
D V V L T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D
                                     mVLCDR 1.13

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAAGACATATTTGAATTTGGTTGTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTT
G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F
mVLCDR 1.13
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCT
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P
                                     mVLCDR 2.13

310     320     330
CAGACGTTCCGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAAAATCAAA
Q T F G G G T K L E I K
mVLCDR 3.13

```

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAGGTCCAACATGCAGCAGTCTGGGGCTGAAC TGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCCITCACCAGCTACTATA
Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y Y
                                     mVHCDR 1.16
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGTA TGGGTGAAGCAGAGGCCCTGGACAAGGCCCTTGAGTGGATGGAGAGATTAATCCCTAGCAATGGTGGTACTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGAGCAA
M Y W V K Q R P G Q G L E W I G E I N P S N G G T N F N E K F K S K
                                     mVHCDR 2.16
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCACACTGACTGTAGACAAATCCCTCCAGCACAGCATAACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAGGCGGT
A T L T V D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C T R G G
                                     mVHCDR 3.16
310     320     330     340     350
TACTACCCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCCACCCTCTCACAGTCTCCTCA
Y Y P F D Y W G Q G T T L T V S S
mVHCDR 3.16

```

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTGATGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTTCGGTTTACCATTTGGCGCCAGCCCTCCATCTCTTGC AAGTCAAGTCAGAGCCCTCTTAGACAGTGATG
D V V M T Q T P L T L S V T I G R P A S I S C K S S Q S L L D S D
                                     mVLCDR 1.16
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAAGACATATTTGTATTTGGTTGTACAGAGGCCAGGCTCCAAAGCGCCCTAATCTATCTGGTGTCTGAGCTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGAT
G K T Y L Y W L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S E L D S G V P D R I
mVLCDR 1.16
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CACTGGCAGTGGGTCGGGGACAGATTTACACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGAGTTTATTTATTTGTCGCAAGGAACACACATTTCTCCG
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H S P
                                     mVLCDR 2.16
310     320     330
TACAGGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
Y T F G G G T K L E I K
mVLCDR 3.16

```

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GATGTCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACATGCACCTGTCACTGGCTACTCAATCACCCAGTGATTATG
 D V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C T V T G Y S I T S D Y

mV_HCDR 1.19

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 CCTGGAATTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTTCAGTGGTTACACTAGTTACAACCCCATCTCTCAAAAAGTCG
 A W N W I R Q F P G N K L E W M G Y I S F S G Y T S Y N P S L K S R

mV_HCDR 2.19

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 AATCTGTCACTCGGGACACATCCAGGAACCAATTTCTTCCCTCCAGTTGACTTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTTACTGTGCAAGAGAGGTC
 I S V T R D T S R N Q F F L Q L T S V T T E D T A T Y Y C A R E V

mV_HCDR 3.19

310 320 330 340 350 360
 AACTATGGGGACTCCTACCACTTTTGACTACTGGGGCCCAAGGCACCAATTTGTCACAGTCTCCCTCA
 N Y G D S Y H F D Y W G Q G T I V T V S S

mV_HCDR 3.19

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CAACTTGGGCTCACTCAGTCATCTTTCAGCCCTCTTTCCTCCCTGGGAGCCCTCAGCAAAACTAACGGTGCACITTTGAGTAGTCAACACAGAACGTCACCCATTG
 Q L A L T Q S S A S F S L G A S A K L T C T L S S Q H R T Y T I

mV₁CDR 1.19

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 AATGGTATCAGCAACAGTCACCTCAAGCCCTCCTAAGTATGTGATGGAGGTTAAGAAAGATGGAAGCCACAGCACAGGTCATGGGATTCCTGATCGCTTCTC
 E W Y Q Q Q S L K P P K Y V M E V K K D G S H S T G H G I P D R F S

mV₁CDR 2.19

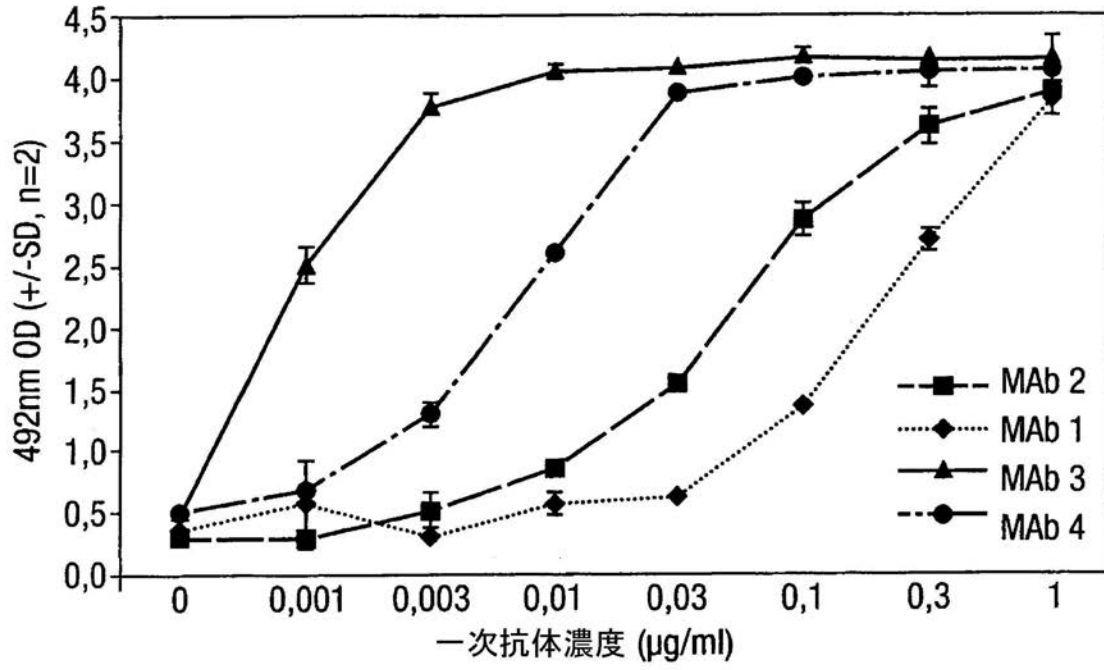
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 TGGATCCAGTTCTGGTGCTGATCGCTACCTCAGCATTTCCCAACATCCAGCCCTGAAGATGAAGCAATATACATCTGTGGTGTGGGTGATGCAATTAAGGGA
 G S S S G A D R Y L S I S N I Q P E D E A I Y I C G V G D A I K G

mV₁CDR 3.19

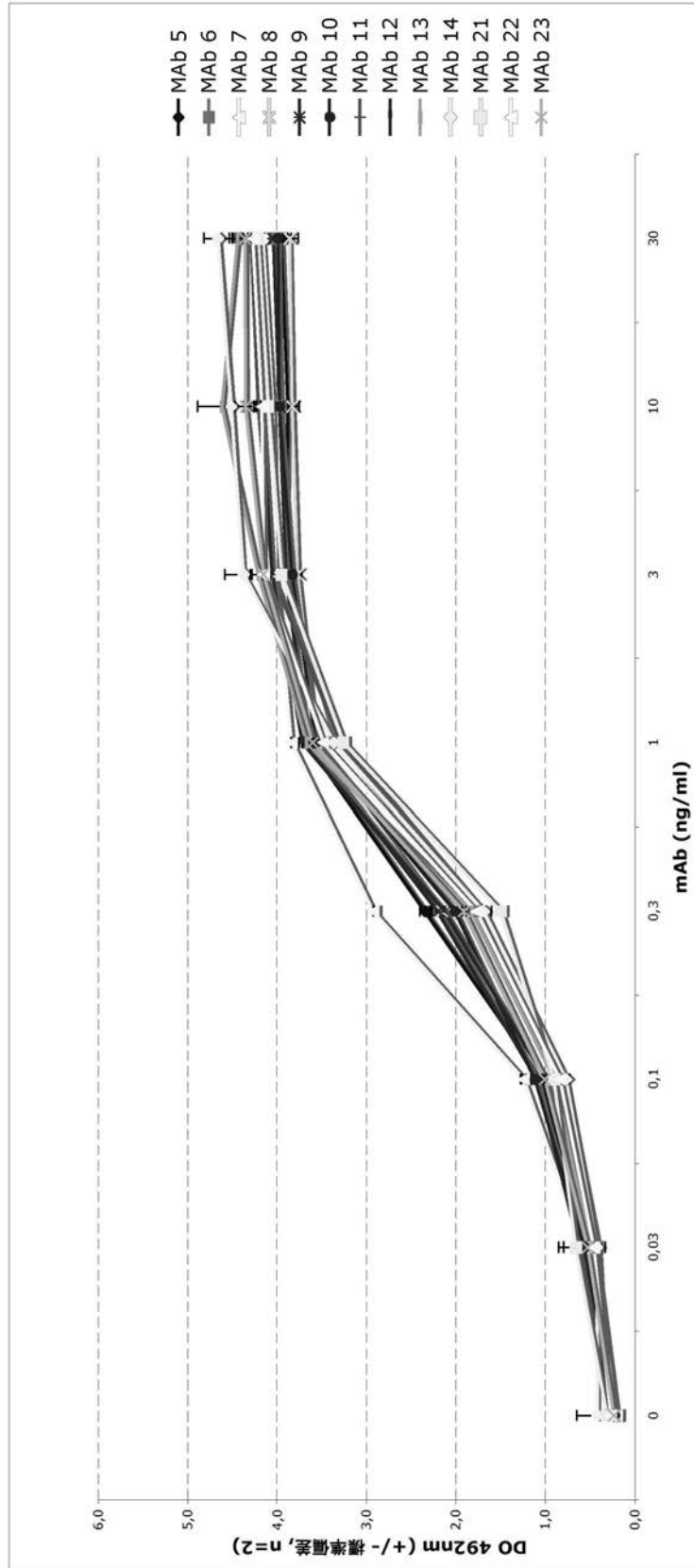
310 320 330 340
 CAATCTGTGTTTTCGGGGTGGCACCAAGGTCACCTGTCCTA
 Q S V F V F G G G T K V T V L

mV₁CDR 3.19

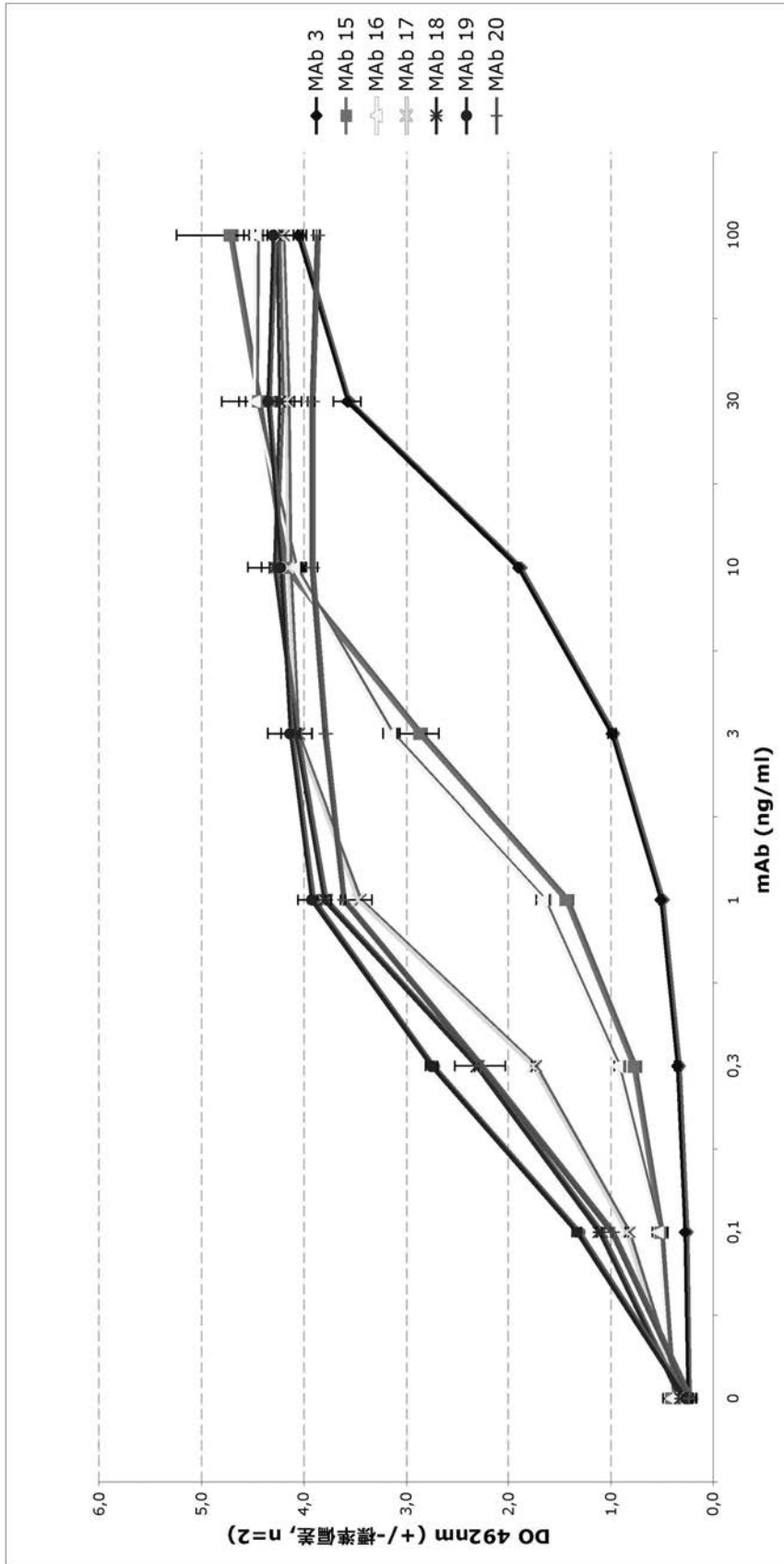
【 図 3 A 】



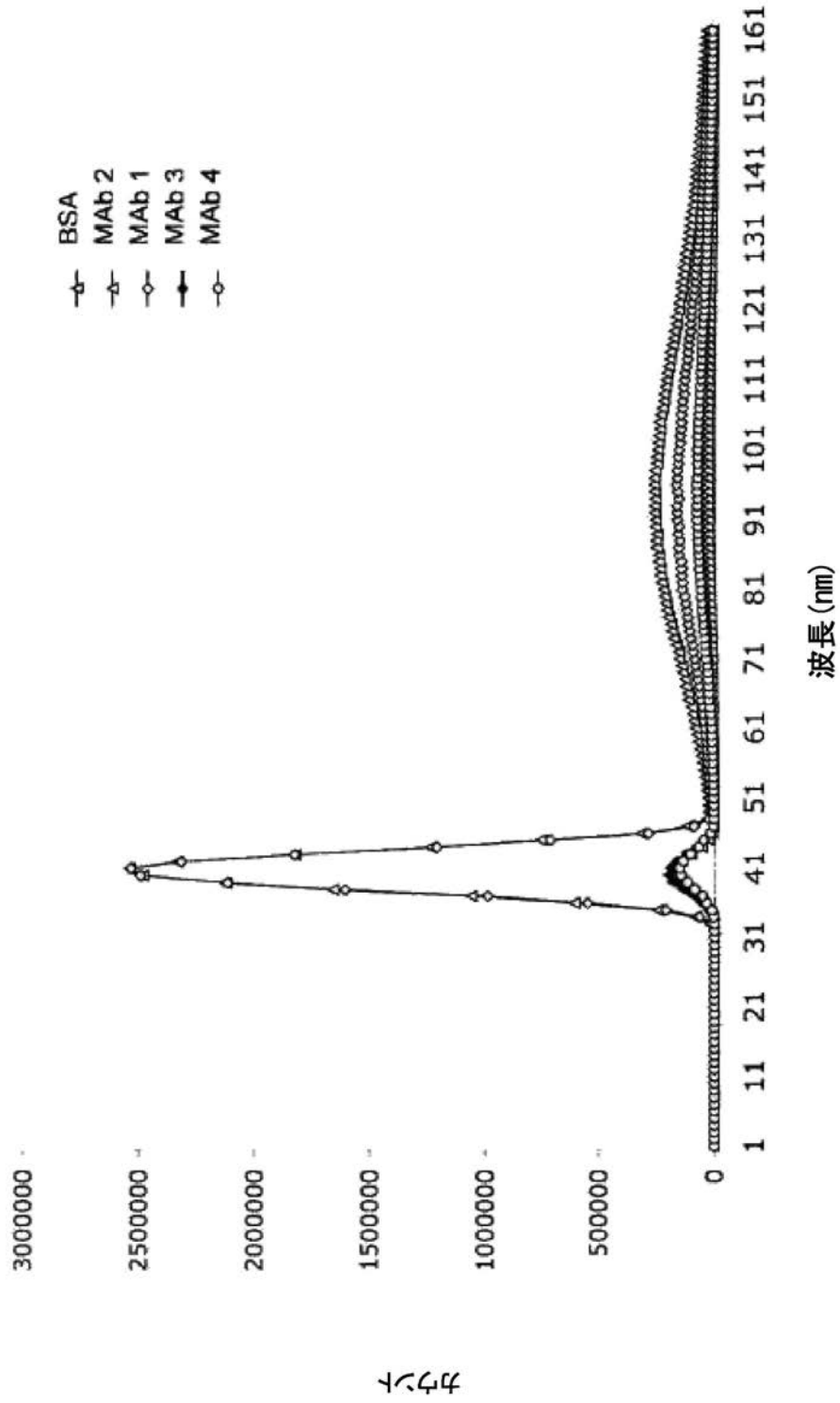
【 図 3 B 】



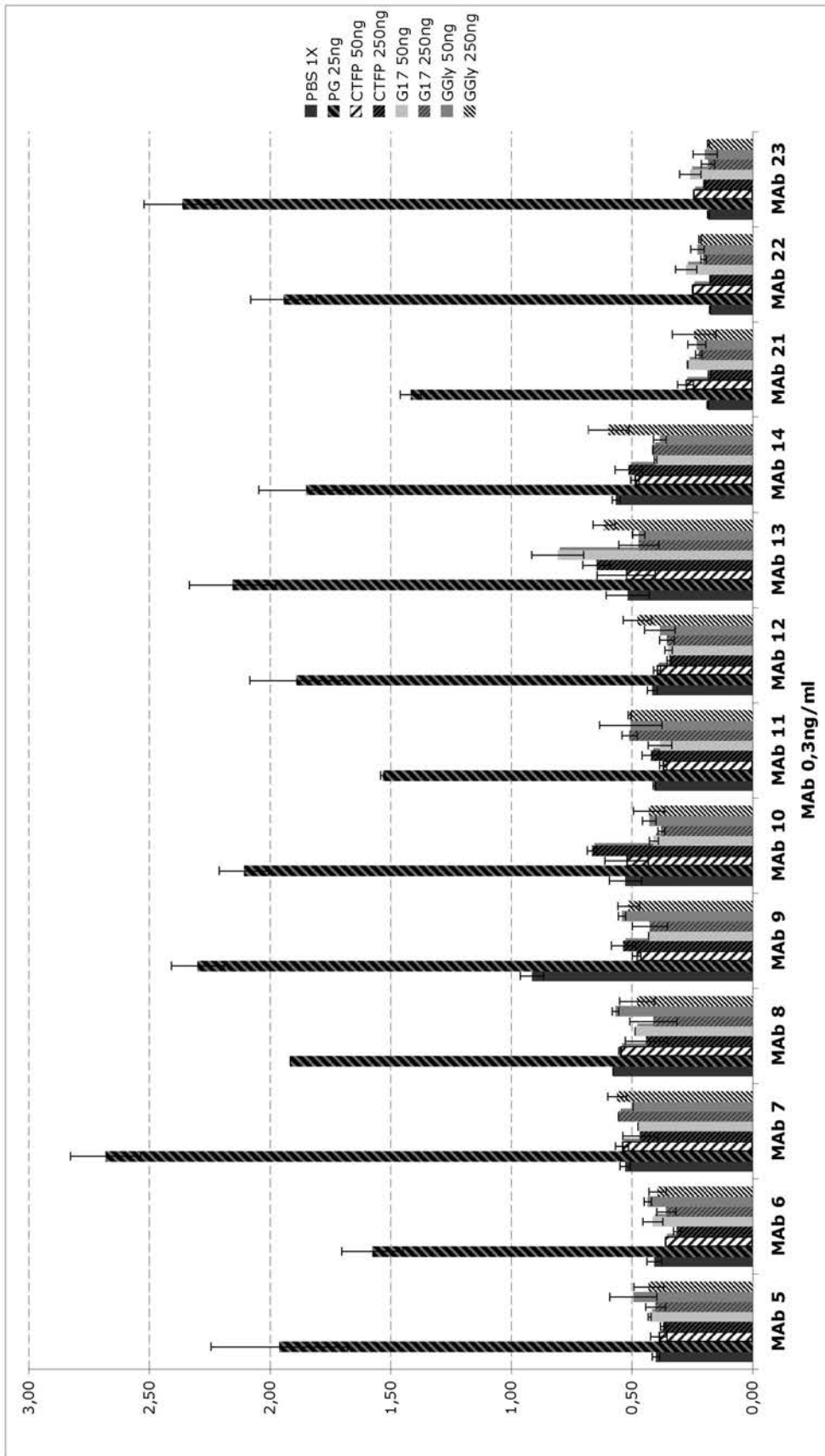
【 図 3 C 】



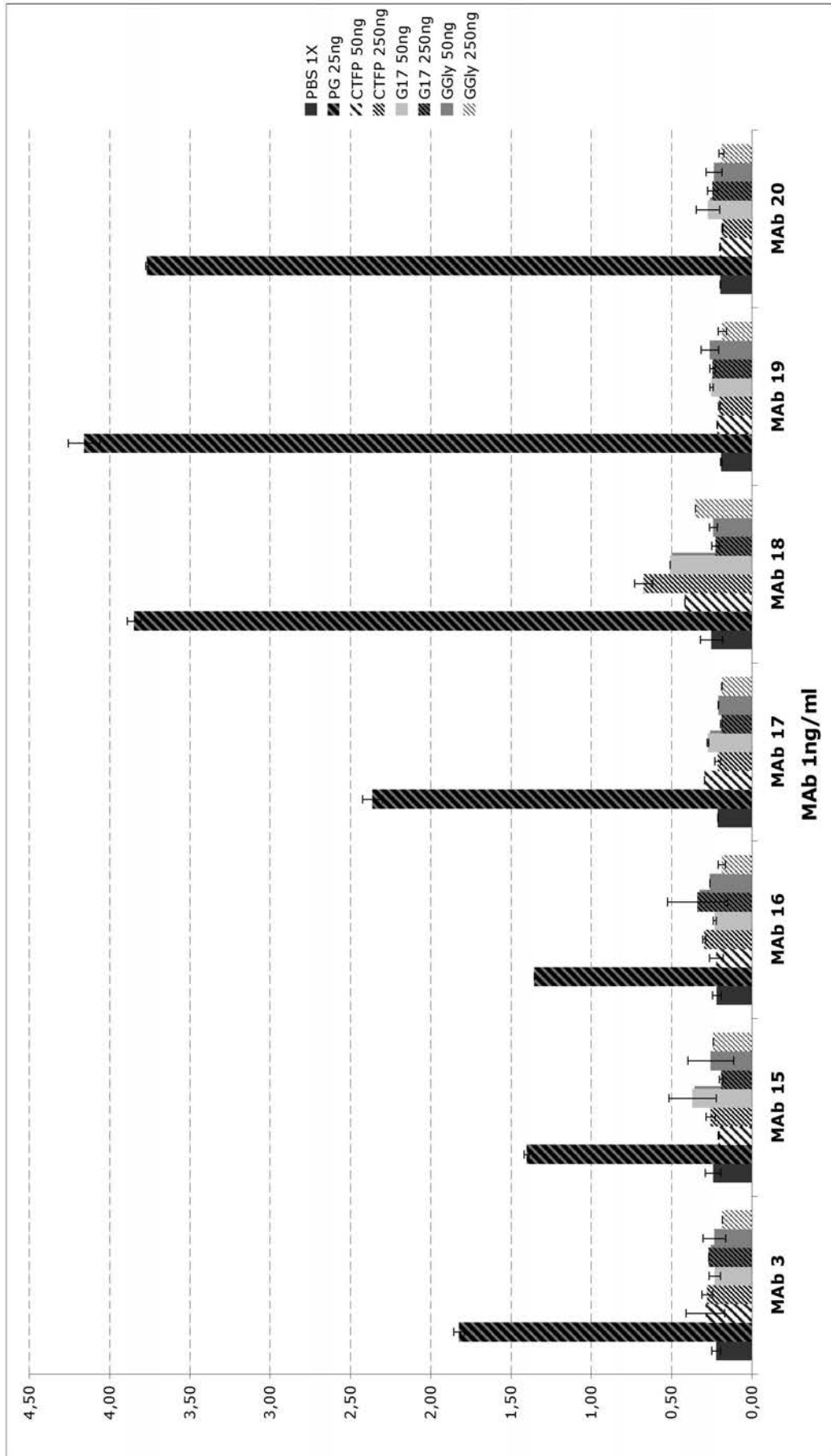
【 図 4 】



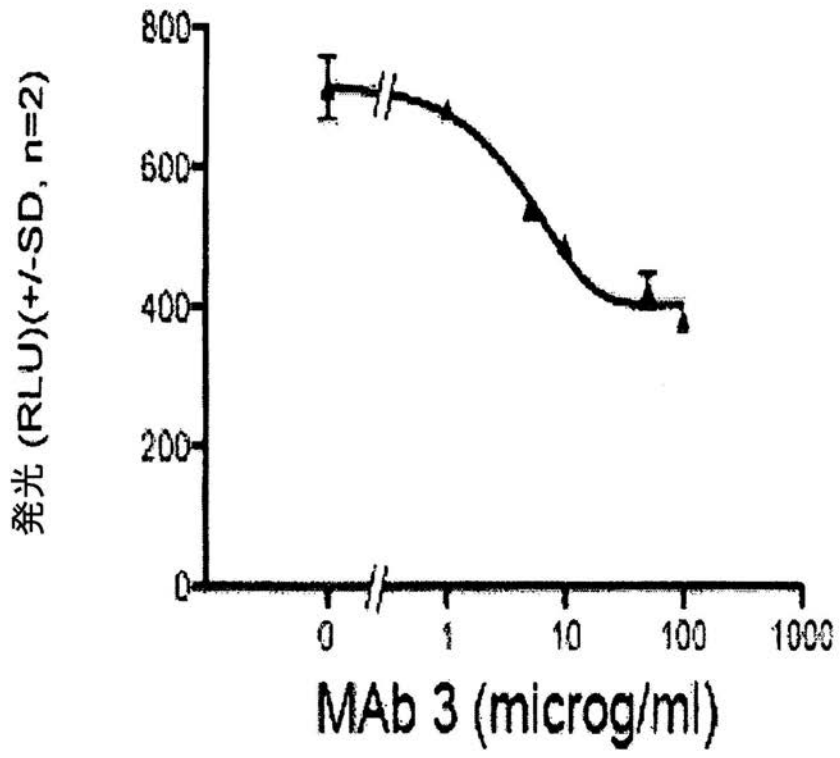
【 図 5 B 】



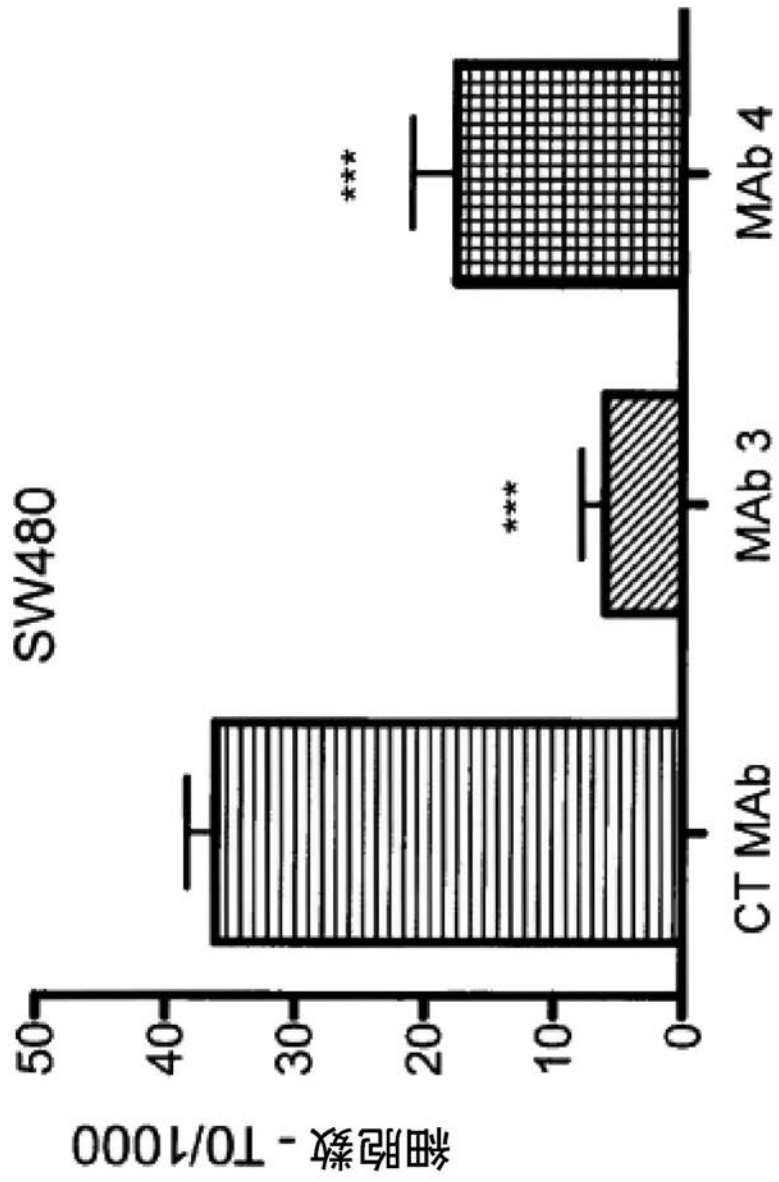
【 図 5 C 】



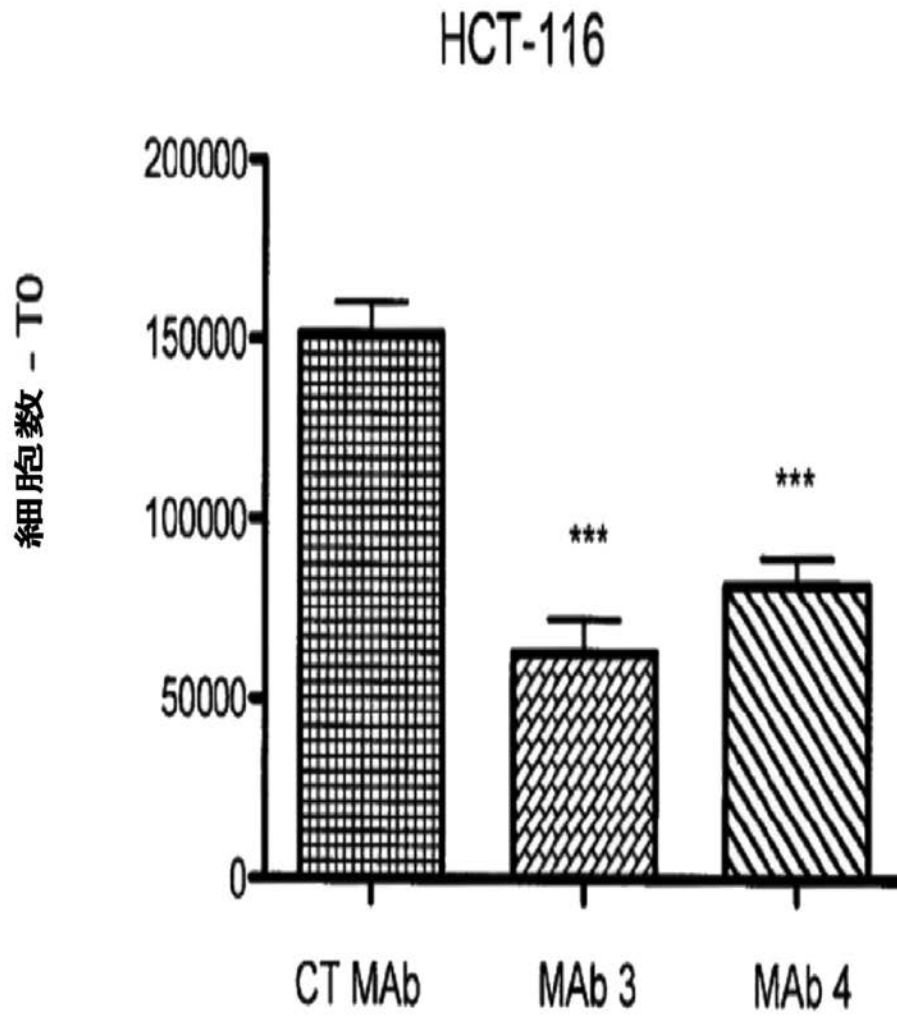
【 図 6 】



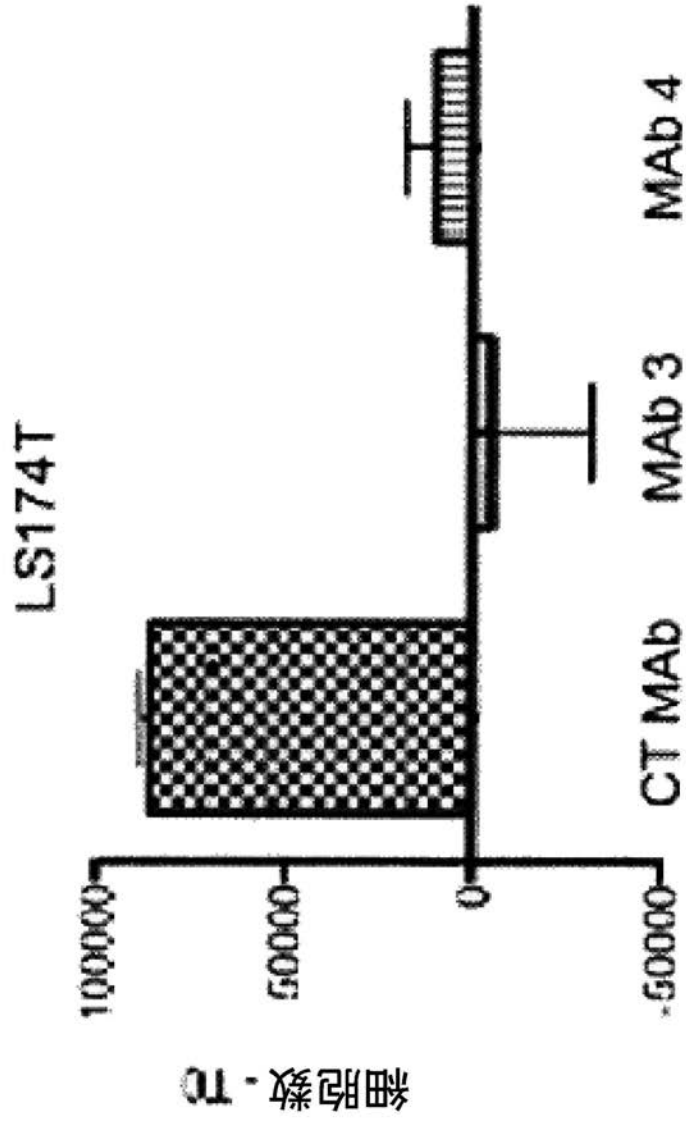
【 図 7 A 】



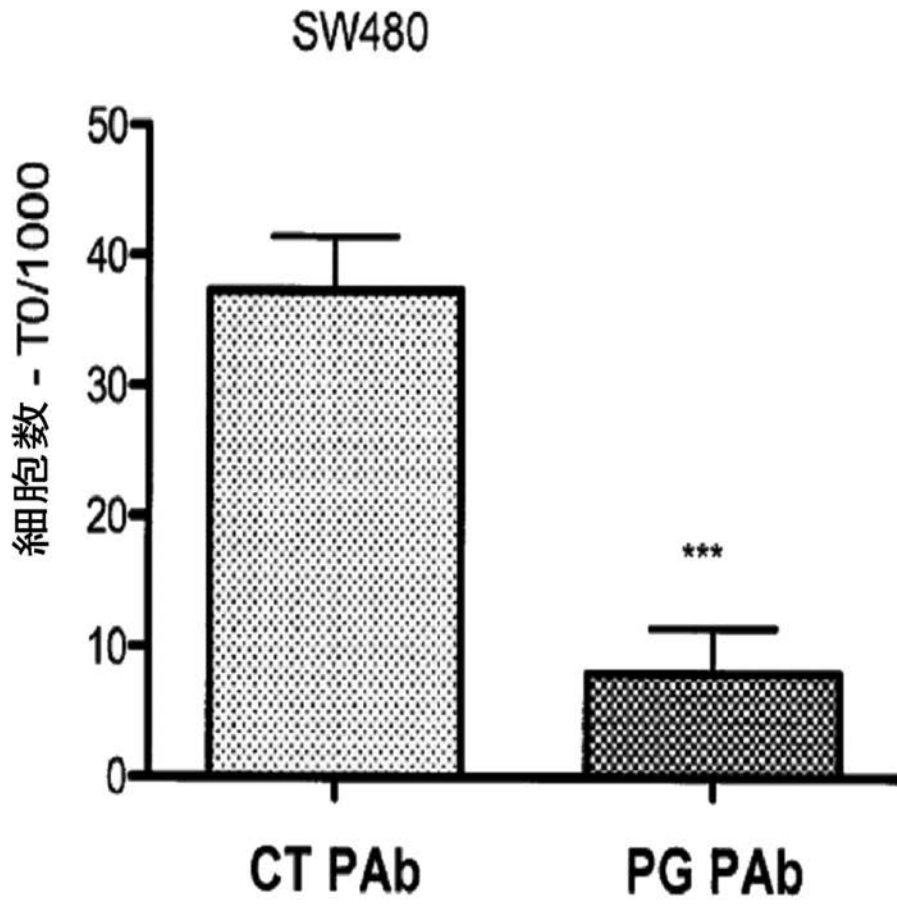
【 図 7 B 】



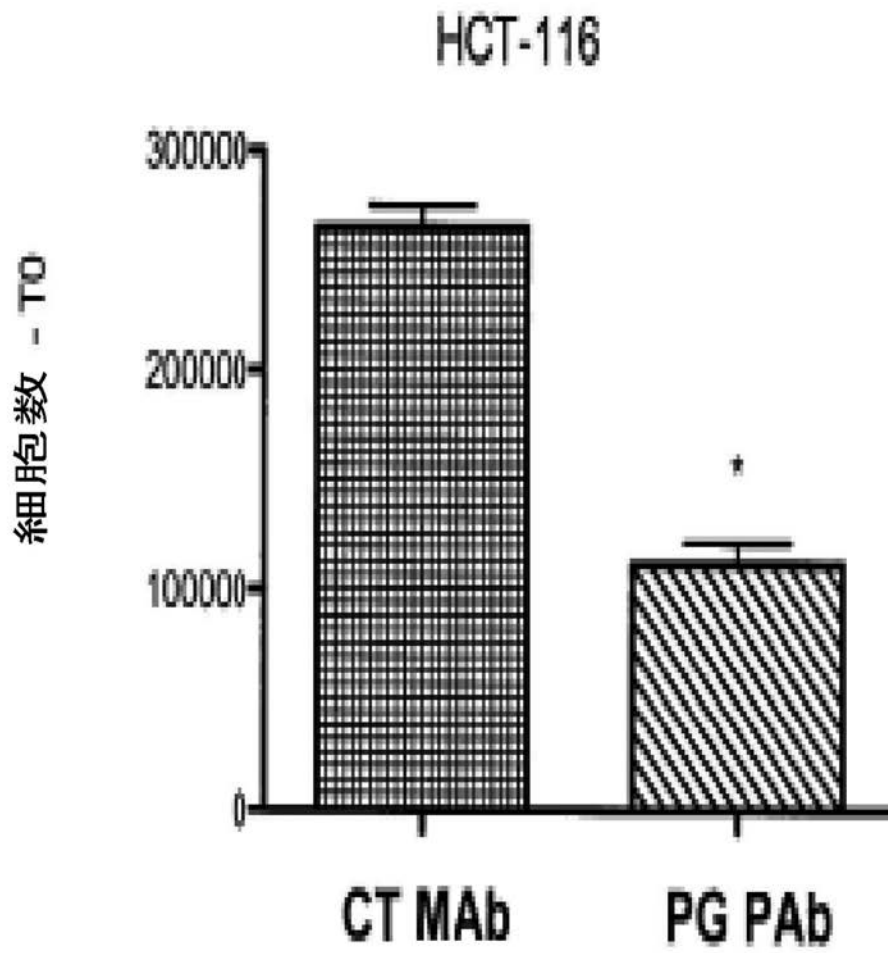
【 図 7 C 】



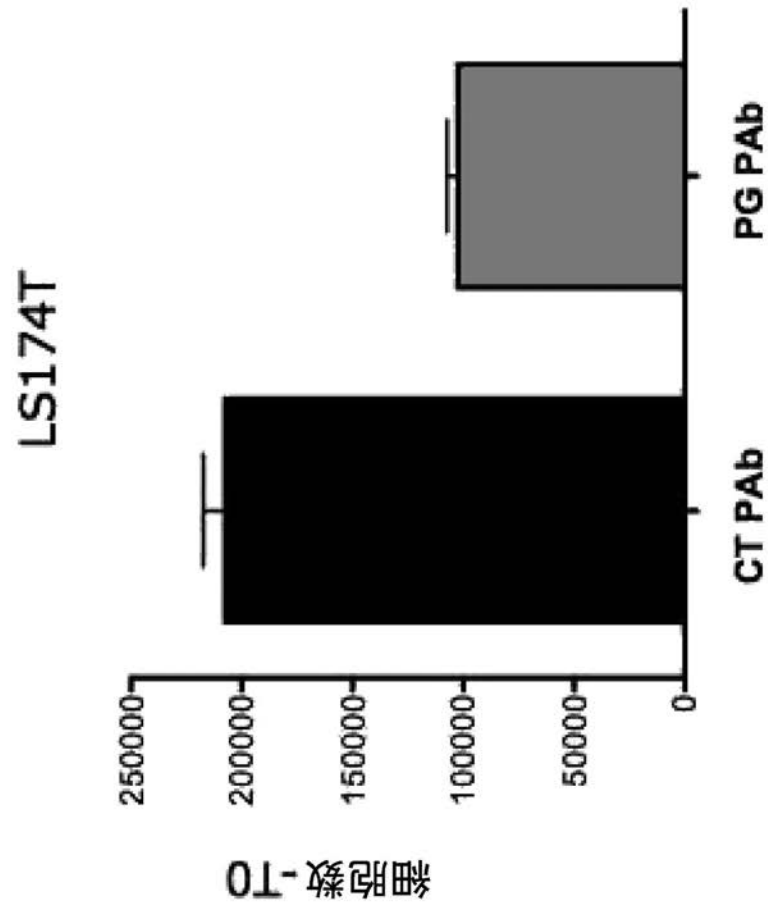
【 図 7 D 】



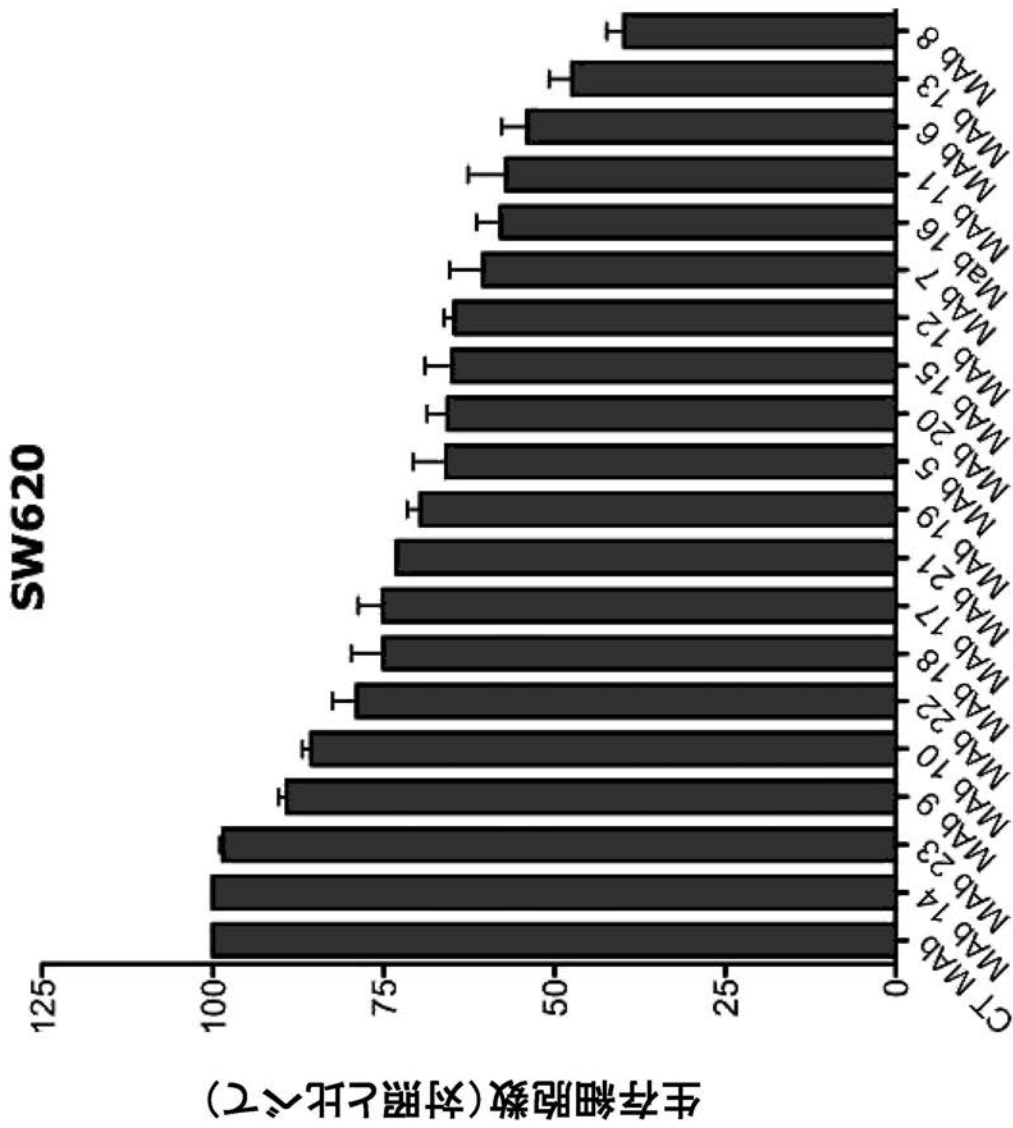
【 図 7 E 】



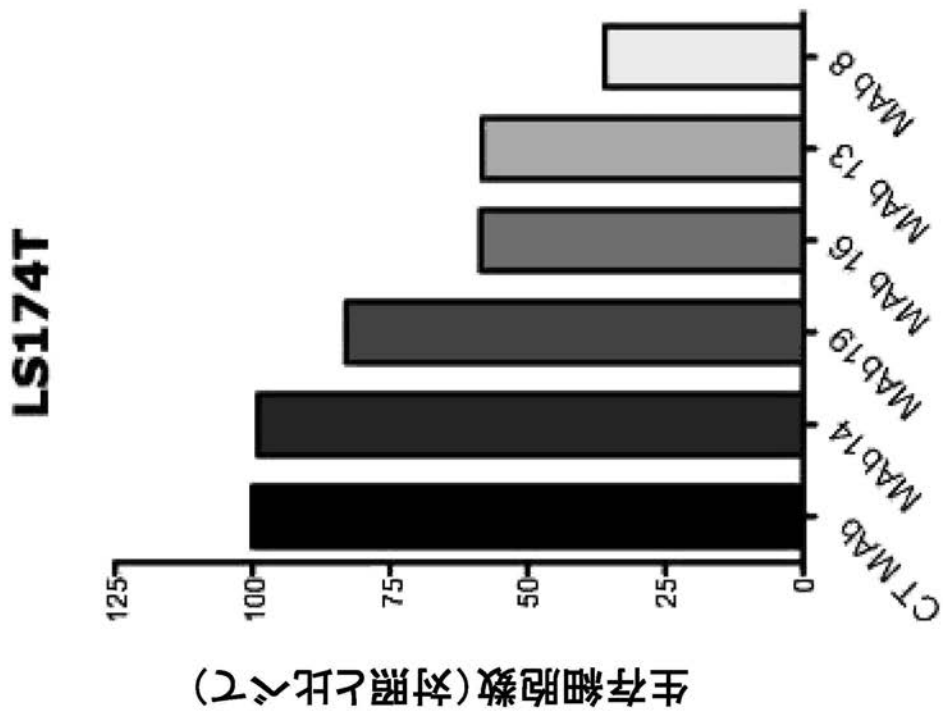
【 図 7 F 】



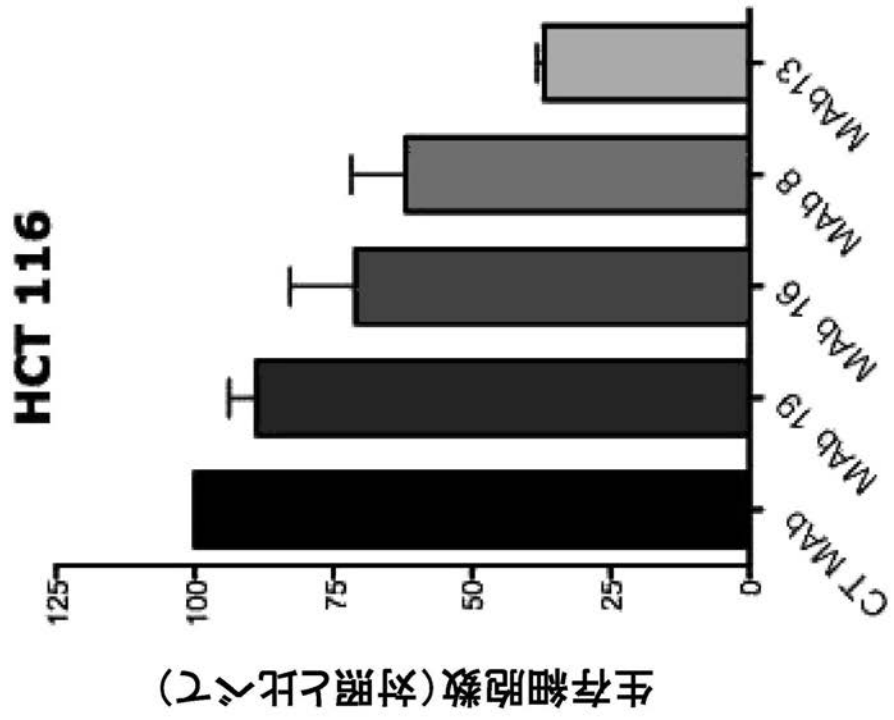
【 図 7 G 】



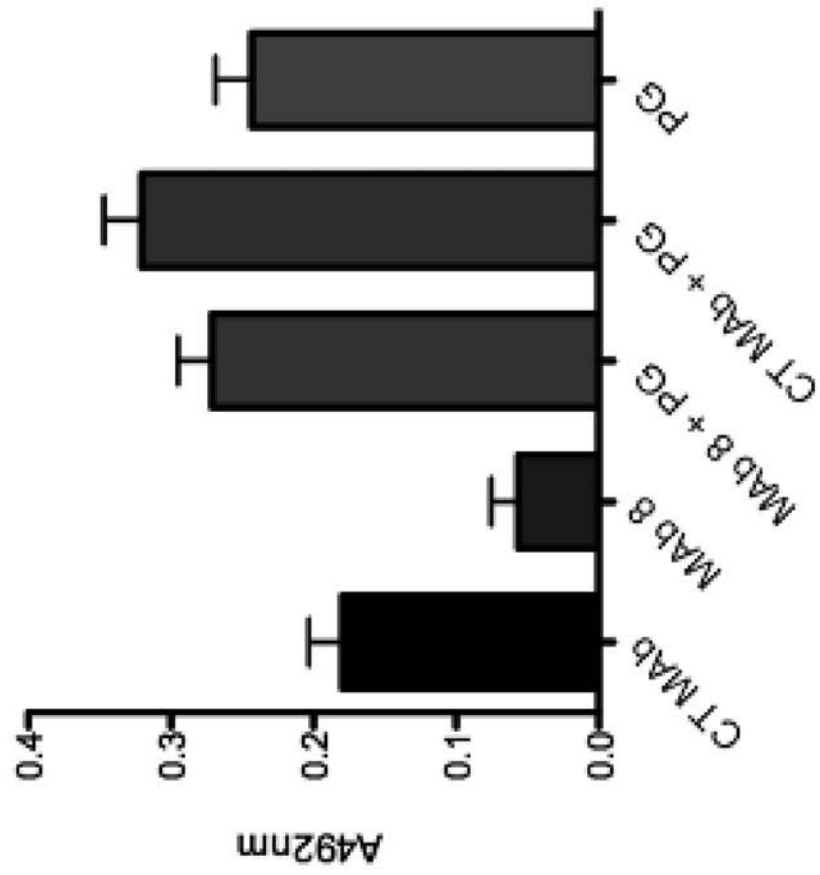
【 図 7 H 】



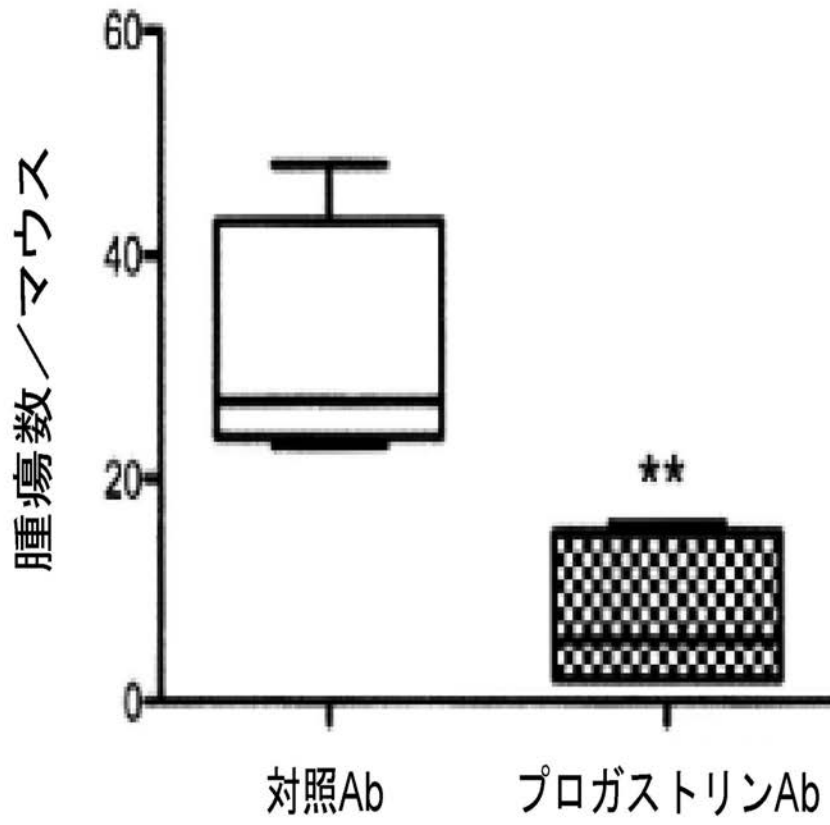
【 図 7 I 】



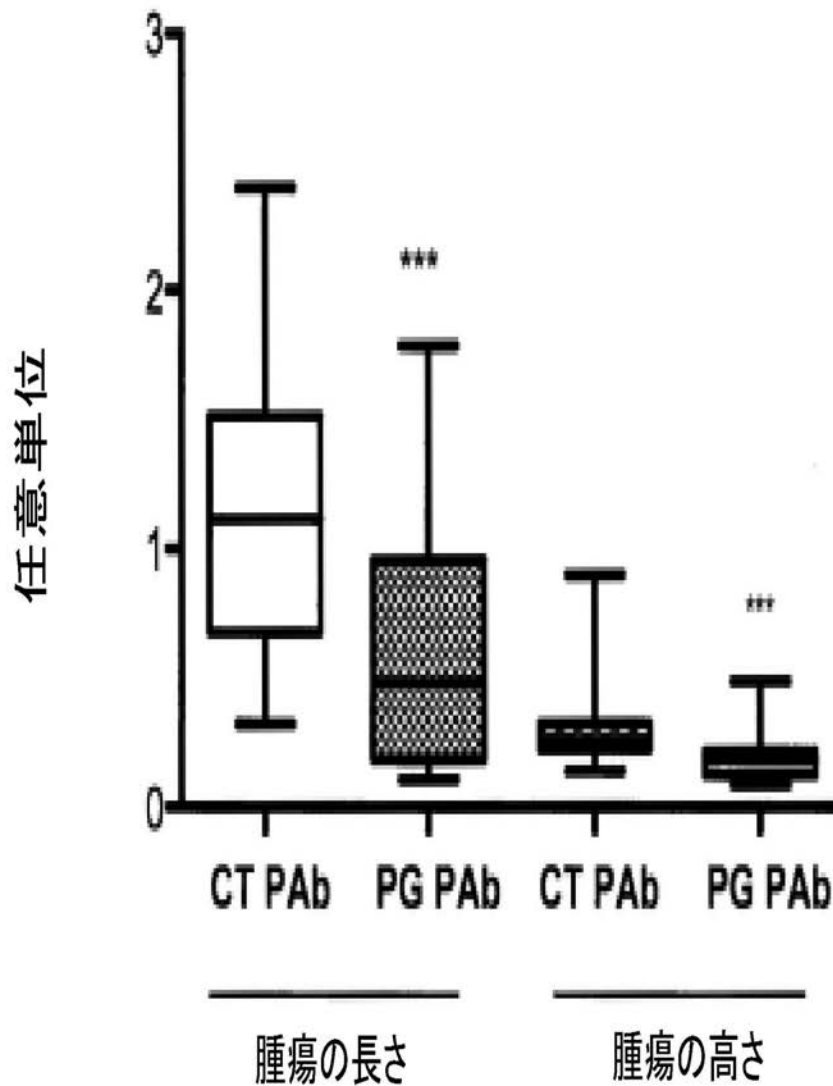
【 図 8 】



【 図 9 A 】



【 図 9 B 】



【 配列表 】

2015145380000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成27年4月3日 (2015.4.3)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ヒトプロガストリン (hPG) の N 末端領域に特異的に結合する、抗 hPG モノクローナル抗体。

【請求項 2】

非特異的モノクローナル抗体を用いて処理された対照サンプルと比較して、テストサンプルのインビトロ処理後に生CRC細胞数の統計的に有意な低下をもたらす、請求項1記載の抗hPGモノクローナル抗体。

【請求項 3】

配列番号25に相当するアミノ酸配列を有するペプチド抗原を含む免疫原を使用して入手可能である、請求項1又は2記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

hPGと、番号CNCM I - 4376の元で登録されているハイブリドーマ1E9A4A4から入手可能な参照抗hPGモノクローナル抗体との結合について競合する、請求項1～3のいずれか1項記載の抗hPGモノクローナル抗体。

【請求項 5】

V_L 及び V_H CDR 配列の以下の群：

(i) 配列番号1の V_H CDR 1, 配列番号2の V_H CDR 2, 配列番号3の V_H CDR 3, 配列番号4の V_L CDR 1, 配列番号5の V_L CDR 2, 及び配列番号6の V_L CDR 3; 及び

(ii) 配列番号7の V_H CDR 1, 配列番号8の V_H CDR 2, 配列番号9の V_H CDR 3, 配列番号10の V_L CDR 1, 配列番号5の V_L CDR 2, 及び配列番号11の V_L CDR 3

(iii) 配列番号39の V_H CDR 1, 配列番号43の V_H CDR 2, 配列番号47の V_H CDR 3, 配列番号50の V_L CDR 1, 配列番号53の V_L CDR 2, 及び配列番号57の V_L CDR 3

(iv) 配列番号40の V_H CDR 1, 配列番号44の V_H CDR 2, 配列番号48の V_H CDR 3, 配列番号51の V_L CDR 1, 配列番号54の V_L CDR 2, 及び配列番号58の V_L CDR 3

の1つより選択される配列を有する V_H 及び V_L CDR を含む、請求項1～4のいずれか1項記載の抗hPGモノクローナル抗体。

【請求項 6】

ヒト化されている、請求項1～5のいずれか1項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

V_L 及び V_H 配列の以下の群：

(i) 配列番号21の V_H 及び配列番号22の V_L ;

(ii) 配列番号23の V_H 及び配列番号24の V_L ;

(iii) 配列番号84の V_H 及び配列番号85の V_L ;

(iv) 配列番号86の V_H 及び配列番号87の V_L ;

(v) 配列番号88の V_H 及び配列番号89の V_L ;

(vi) 配列番号90の V_H 及び配列番号91の V_L ;

(vii) 配列番号92の V_H 及び配列番号93の V_L ;

(viii) 配列番号94の V_H 及び配列番号95の V_L ;

の1つより選択される配列を有する V_H 及び V_L 鎖を含む、請求項6記載の抗hPGモノクローナル抗体。

【請求項 8】

1 pM ~ 7 nMの範囲内の親和性を有する、請求項1～7のいずれか1項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

配列番号28、29、30、31及び32からなる群より選択される配列に相当するアミノ酸配列を含むエピトープに結合する、請求項1～8のいずれか1項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 10】

hPGと、番号CNCM I - 4376として寄託されているハイブリドーマにより産

生される参照抗体 m A b 1 5 との結合について競合する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 1】

前記結腸直腸癌細胞株が L S 1 7 4 T 細胞である、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載のモノクローナル抗体ならびに賦形剤、担体、及び/又は希釈剤を含む、組成物。

【請求項 1 3】

医薬的使用のために製剤化される、請求項 1 2 記載の組成物。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の抗 h P G モノクローナル抗体の軽鎖可変領域 (V_L) をコード化するポリヌクレオチド。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の抗 h P G モノクローナル抗体の重鎖可変領域 (V_H) をコード化するポリヌクレオチド。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の抗 h P G モノクローナル抗体の軽鎖可変領域 (V_L) をコード化するポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の抗 h P G モノクローナル抗体の重鎖可変領域 (V_H) をコード化するポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の抗 h P G モノクローナル抗体を発現させるために適したポリヌクレオチドの対を用いて形質転換した宿主細胞。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の抗 h P G モノクローナル抗体を分泌することが可能なハイブリドーマ。

【請求項 2 0】

番号 C N C M I - 4 3 7 6 の元で登録されているハイブリドーマ 1 E 9 A 4 A 4 からなる群から選択される請求項 1 9 記載のハイブリドーマ。

【請求項 2 1】

抗 h P G モノクローナル抗体を得る方法であって、以下：

- (a) 請求項 1 9 記載のハイブリドーマを適した条件下で培養すること、及び
- (b) 培養培地又はハイブリドーマ細胞から抗 h P G モノクローナル抗体を回収することを含む、方法。

【請求項 2 2】

結腸直腸癌の処置のための、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の抗 h P G モノクローナル抗体。

【請求項 2 3】

結腸直腸癌処置用医薬の製造における請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に規定される抗 h P G モノクローナル抗体の使用。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の N 末端抗 h P G モノクローナル抗体及び h P G の C 末端領域に特異的に結合する抗体を含む、h P G を検出するために有用なキット。

【請求項 2 5】

前記 h P G の C 末端領域に特異的に結合する抗体はポリクローナル抗体である、請求項 2 4 記載のキット。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体を使用して

、被験者からの血清サンプル中のプロガストリンの量を定量化すること含み、それにおいて約 20 ~ 400 pM の範囲のプロガストリンの量が結腸直腸癌を示す、被験体において結腸直腸癌を診断するためのデータを提供する方法。

【請求項 27】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体を使用して、結腸直腸癌を伴う患者からの血清サンプル中のプロガストリンの量を定量化すること含み、それにおいて約 20 ~ 400 pM の範囲のプロガストリンの量が抗 h P G 治療についての適切性を示す、抗 h P G 治療のために適した患者を選択するためのデータを提供する方法。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 11 のいずれか一項記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体を使用して、時間の関数として、結腸直腸癌のための処置を受けている被験者の血中プロガストリンレベルを定量化することを含み、そこで被験者の血清中プロガストリンレベルにおける時間依存的な減少が処置が効果的であることを示す、結腸直腸癌処置の有効性をモニタリングするためのデータを提供する方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	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	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00		A
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		B
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574		A
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		T
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		

(71)出願人 595040744

サントル・ナショナル・ドウ・ラ・ルシエルシュ・シャンティフィク
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
フランス国、7 5 0 1 6 パリ、リュ・ミシェル・アンジュ 3

(74)代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72)発明者 バネカン, ジュリー

フランス国、エフ - 3 4 2 0 0 セット、リュ・アンリ・バルピュス 1 3

(72)発明者 ブディエ, ロール

フランス国、エフ - 0 3 2 7 0 ビュセ、リュウ - ディ・シャモワルー 9

(72)発明者 ジュベール, ドミニク

フランス国、エフ - 3 4 2 0 0 セット、リュ・ガブリエル・ペリ 1 0

(72)発明者 オランド, フレデリク

フランス国、エフ - 3 4 7 9 0 グラベル、リュ・デ・カプリエール 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA01 BA53 CA04 CA20 DA02 DA06 EA04 GA03 GA11
HA03 HA15
4B064 AG15 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA05 DA14
4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AB05 BA02
BA08 CA25 CA44 CA46
4C085 AA14 BB31 BB41 BB43 BB44 CC02 CC23 DD62 EE01 GG01
GG02 GG03 GG08 GG10
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA30 DA76 DA86 EA28
EA51 FA74 GA26

【外国語明細書】

2015145380000001.pdf

专利名称(译)	用于推进的单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2015145380A	公开(公告)日	2015-08-13
申请号	JP2015042849	申请日	2015-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	施维雅药厂 法国国家健康医学研究院 法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	莱斯LABORATOIRES漩渦施维雅 Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 中心法国国家, 香提网络点击		
[标]发明人	パネカンジュリー ブディエロール ジュベールドミニク オランドフレデリク		
发明人	パネカン,ジュリー ブディエ,ロール ジュベール,ドミニク オランド,フレデリク		
IPC分类号	C07K16/26 C07K16/46 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/574 A61K39/395 A61P1/00 A61P35/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P35/00 C07K16/26 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317 /565 C07K2317/567 C07K2317/73 C07K2317/92 C07K2317/76 G01N33/57419 G01N33/57488 G01N2333/595		
FI分类号	C07K16/26.ZNA C07K16/46 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N15/00.A G01N33/53.B G01N33/574.A A61K39/395.T A61P1/00 A61P35/00 C12N15/06.100 C12N15/13 C12N15 /62.Z C12N15/63.Z C12N5/10 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA01 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024 /EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA15 4B064/AG15 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065 /AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065 /AB01 4B065/AB05 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085 /EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045 /EA28 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	61/252625 2009-10-16 US		
其他公开文献	JP6272793B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于诊断和/或治疗动物（包括人）的结肠直肠癌（CRC）的组合物和方法。使用包含前胃泌素单克隆抗体，其片段，前胃泌素单克隆抗体，其制备方法，包含该抗体和抗体或其片段的组合物的组合物治疗结肠直肠癌的方法，和一种包括检测前胃泌素的方法，包括诊断结肠直肠癌的方法和监测患有结肠直肠癌的受试者中抗癌疗法的功效的方法。【选择图】无

(21) 出願番号	特願2015-42849 (P2015-42849)	(71) 出願人	500287019
(22) 出願日	平成27年3月4日 (2015.3.4)		レ ラボラトワール セルヴィエ
(62) 分割の表示	特願2012-533531 (P2012-533531) の分割		フランス国、エフ-92284 シュレス ネ・セザックス、リュ・ドゥ・ヴェルダン 35
原出願日	平成22年10月15日 (2010.10.15)		
(31) 優先権主張番号	61/252,625	(71) 出願人	591100596
(32) 優先日	平成21年10月16日 (2009.10.16)		アンステイチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メ ディカル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		フランス国、エフ-75013 パリ、リ ュ・ドゥ・トルビアク 101

最終頁に続く