(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6928602号
(P6928602)
(45)発行日　令和3年9月1日(2021.9.1)　(24)登録日　令和3年8月11日(2021.8.11)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13	ZNA
C07K 16/30	(2006.01)	C07K	16/30	
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46	
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	

請求項の数 23　(全 61 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-510883(P2018-510883)
(86)(22)出願日　平成28年8月25日(2016.8.25)
(65)公表番号　特表2018-529328(P2018-529328A)
(43)公表日　平成30年10月11日(2018.10.11)
(86)国際出願番号　PCT/GB2016/052647
(87)国際公開番号　WO2017/033020
(87)国際公開日　平成29年3月2日(2017.3.2)
審査請求日　令和1年7月24日(2019.7.24)
(31)優先権主張番号　1515094.9
(32)優先日　平成27年8月25日(2015.8.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

前置審査

(73)特許権者　520104123
スキャンセル　リミテッド
イギリス国，オーエックス４　４ジーピー，オックスフォード　サイエンス　パーク，ロバート　ロビンソン　アベニュー，ジョン　エクルズ　ハウス
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡　亮一
(72)発明者　デュラン，リンディー　ジリアン
イギリス国，エヌジー７　２アールディー，ノッティンガムシャー，ノッティンガム，ユニバーシティ　パーク，ザ　ユニバーシティ　オブ　ノッティンガム

最終頁に続く

(54)【発明の名称】機能的な癌標的として、糖脂質ではなく糖タンパク質上で発現させたシアリル－ジ－ルイスａ及びそれに対する抗体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
シアリル－ジ－ルイス^{a}、シアリル－ルイス$^{a-x}$、及び糖タンパク質に結合しているモノ－シアリル－ルイス^{a}に結合することができ、糖脂質に結合しているモノ－シアリル－ルイス^{a}には結合しない、単離された抗体又は抗体断片であって、前記抗体又は抗体断片は以下の６つのＣＤＲ：
ａ）ＧＦＴＦＮＴＹＡ（ＣＤＲＨ１）、ＩＲＳＫＳＮＮＹＡＴ（ＣＤＲＨ２）及びＶＧＹＧＳＧＧＮＹ（ＣＤＲＨ３）；並びに
ｂ）ＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹ（ＣＤＲＬ１）、ＷＡＳ（ＣＤＲＬ２）及びＱＮＤＹＳＳＰＦＴ（ＣＤＲＬ３）
を含む、抗体又は抗体断片。
【請求項２】
前記モノ－シアリル－ルイス^{a}が、少なくとも４つのグリカンモノマー単位を含むグリカン鎖によって前記糖タンパク質に連結されている、請求項１に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項３】
前記抗体又は抗体断片が二重特異性である、請求項１又は２に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項４】
前記二重特異性抗体又は抗体断片が、さらにＣＤ３に特異的である、請求項３に記載の抗

体又は抗体断片。
【請求項５】
前記抗体又は抗体断片が、
前記ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３を含む軽鎖可変配列、並びに
前記ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む重鎖可変配列を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項６】
前記ＣＤＲが、ヒト抗体フレームワークによって支持されている、請求項１～５のいずれか１項に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項７】
前記抗体又は抗体断片が、アミノ酸配列：
ａ）ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＫＧＳＬＫＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＮＴＹＡＭＮＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＲＩＲＳＫＳＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤＲＦＴＩＳＲＤＤＳＱＳＭＬＹＬＱＭＮＮＬＫＫＥＤＴＡＭＹＹＣＶＧＹＧＳＧＧＮＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ；
若しくは、
ｂ）ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＫＧＳＬＫＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＮＴＹＡＭＮＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＲＩＲＳＫＳＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤＲＦＴＩＳＲＤＤＳＱＳＭＬＹＬＱＭＮＮＬＫＫＥＤＴＡＭＹＹＣＶＧＹＧＳＧＧＮＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ；

を含むＶＨドメイン、及び／又はアミノ酸配列：
ｃ）ＤＩＶＭＴＱＳＰＳＳＬＴＶＴＡＧＥＫＶＴＭＳＣＫＳＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＶＬＩＹＷＡＳＴＲＥＳＧＶＰＤＲＦＴＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＶＱＡＥＤＬＡＶＹＹＣＱＮＤＹＳＳＰＦＴＦＧＳＧＴＫＬＥＩＫＲ；若しくは、
ｄ）ＤＩＶＭＴＱＳＰＳＳＬＴＶＴＡＧＥＫＶＴＭＳＣＫＳＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＶＬＩＹＷＡＳＴＲＥＳＧＶＰＤＲＦＴＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＶＱＡＥＤＬＡＶＹＹＣＱＮＤＹＳＳＰＦＴＦＧＳＧＴＫＬＥＩＫＲ
を含むＶＬドメインを含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項８】
前記抗体又は抗体断片が、ヒト抗体定常領域を含むか、または、前記抗体又は抗体断片が、Ｆａｂ、（Ｆａｂ’）２、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆｄ又はダイアボディである、請求項１～７のいずれか１項に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項９】
前記抗体又は抗体断片が、次の順序で、
（ａ）１）リーダー配列、２）重鎖可変領域、３）３×ＧＧＧＧＳスペーサー、４）軽鎖可変領域、及び５）ポリ－Ａｌａ及び精製のための６×Ｈｉｓタグを含むｓｃＦｖである、または、
（ｂ）１）リーダー配列、２）軽鎖可変領域、３）３×ＧＧＧＧＳスペーサー、及び４）重鎖可変領域を含むｓｃＦｖである、請求項１～８のいずれか１項に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項１０】
前記ｓｃＦｖが、さらに５’又は３’精製タグのいずれかを含む、請求項９に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項１１】
前記抗体又は抗体断片が、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）の形態で提供される、請求項１～１０のいずれか１項に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項１２】
前記抗体又は抗体断片が、重鎖－軽鎖配向又は軽鎖－重鎖配向のいずれかでキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）の形態で提供されるｓｃＦｖである、請求項１１に記載の抗体又は抗体断片。

【請求項１３】
前記抗体が、
（ａ）モノクローナル抗体である、および／または、
（ｂ）ヒト化、キメラ又はベニヤ抗体である、および／または、
（ｃ）抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）などの薬物コンジュゲートである、
請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項１４】
前記抗体が、（ｉ）重鎖アミノ酸配列：
ＭＬＬＧＬＫＷＶＦＦＶＶＦＹＱＧＶＨＣＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＫＧＳＬＫＬＳ
ＣＡＡＳＧＦＴＦＮＴＹＡＭＮＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＲＩＲＳＫＳＮＮＹＡＴＹ
ＹＡＤＳＶＫＤＲＦＴＩＳＲＤＤＳＱＳＭＬＹＬＱＭＮＮＬＫＫＥＤＴＡＭＹＹＣＶＧＹ
ＧＳＧＧＮＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳＳＡＫＴＴＰＰＳＶＹＰＬＡＰＧＳＡＡＱＴＮＳＭＶ
ＴＬＧＣＬＶＫＧＹＦＰＥＰＶＴＶＴＷＮＳＧＳＬＳＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＥＳＤＬＹＴ
ＬＳＳＳＶＴＶＰＳＳＰＲＰＳＥＴＶＴＣＮＶＡＨＰＡＳＳＴＫＶＤＫＫＩＶＰＲＤＣＧ
ＣＫＰＣＩＣＴＶＰＥＶＳＳＶＦＩＦＰＰＫＰＫＤＶＬＴＩＴＬＴＰＫＶＴＣＶＶＶＤＩ
ＳＫＤＤＰＥＶＱＦＳＷＦＶＤＤＶＥＶＨＴＡＱＴＱＰＲＥＥＱＦＮＳＴＦＲＳＶＳＥＬ
ＰＩＭＨＱＤＷＬＮＧＫＥＦＫＣＲＶＮＳＡＡＦＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＲＰＫＡＰ
ＱＶＹＴＩＰＰＰＫＥＱＭＡＫＤＫＶＳＬＴＣＭＩＴＤＦＦＰＥＤＩＴＶＥＷＱＷＮＧＱ
ＰＡＥＮＹＫＮＴＱＰＩＭＮＴＮＧＳＹＦＶＹＳＫＬＮＶＱＫＳＮＷＥＡＧＮＴＦＴＣＳ
ＶＬＨＥＧＬＨＮＨＨＴＥＫＳＬＳＨＳＰＧＫ
及び軽鎖アミノ酸配列：
ＭＥＳＱＴＱＶＬＭＳＬＬＦＷＶＳＴＣＧＤＩＶＭＴＱＳＰＳＳＬＴＶＴＡＧＥＫＶＴＭ
ＳＣＫＳＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＶＬＩＹＷＡＳＴＲＥ
ＳＧＶＰ　ＤＲＦＴＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＶＱＡＥＤＬＡＶＹＹＣＱＮＤＹＳＳ
ＰＦＴＦＧＳＧＴＫＬＥＩＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣ
ＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧＶＬＮＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳ
ＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡＴＨＫＴＳＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ
を有するか、又は、（ｉｉ）重鎖アミノ酸配列：
ＭＬＬＧＬＫＷＶＦＦＶＶＦＹＱＧＶＨＣＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＫＧＳＬＫＬＳ
ＣＡＡＳＧＦＴＦＮＴＹＡＭＮＷＶＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶＡＲＩＲＳＫＳＮＮＹＡＴＹ
ＹＡＤＳＶＫＤＲＦＴＩＳＲＤＤＳＱＳＭＬＹＬＱＭＮＮＬＫＫＥＤＴＡＭＹＹＣＶＧＹ
ＧＳＧＧＮＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡ
ＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹ
ＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣ
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴ
ＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹ
ＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥ
ＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧ
ＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ
及び軽鎖アミノ酸配列：
ＭＥＳＱＴＱＶＬＭＳＬＬＦＷＶＳＴＣＧＤＩＶＭＴＱＳＰＳＳＬＴＶＴＡＧＥＫＶＴＭ
ＳＣＫＳＳＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹＬＴＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＶＬＩＹＷＡＳＴＲＥ
ＳＧＶＰ　ＤＲＦＴＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＶＱＡＥＤＬＡＶＹＹＣＱＮＤＹＳＳ
ＰＦＴＦＧＳＧＴＫＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣ
ＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳ
ＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ
を有する、請求項１～１３のいずれか１項に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項１５】
医薬として使用するための、または癌の予防、治療又は診断に使用するための、請求項

１～１４のいずれか１項に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項１６】
前記癌が、結腸直腸癌、胃癌、膵臓癌、肺癌、卵巣癌又は乳癌である、請求項１５に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項１７】
前記抗体又は抗体断片が、単独で又は他の治療と組み合わせて投与されるか、又は投与されるように整えられる、請求項１６に記載の抗体又は抗体断片。
【請求項１８】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体又は抗体断片をコードする配列を含む、核酸。
【請求項１９】
前記核酸が、プラスミド、ベクター、転写又は発現用カセットの形態の構築物である、請求項１８に記載の核酸。
【請求項２０】
請求項１８又は１９に記載の核酸を含む組換え宿主細胞。
【請求項２１】
請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗体又は抗体断片、及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
【請求項２２】
さらに少なくとも１つの他の医薬活性物質を含む、請求項２１に記載の医薬組成物。
【請求項２３】
癌の治療に使用するための、請求項２１又は２２に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、癌におけるシアリルーｊールイス^{a}の標的化、及び脂質ではなく、糖タンパク質上で発現させた時にこのグリカンに結合するモノクローナル抗体（ｍＡｂ）などの結合メンバーに関する。
【背景技術】
【０００２】
グリカン構造は、タンパク質と糖脂質骨格の両方に存在し、グリコシルトランスフェラーゼの発現変化に起因する癌において大規模に過剰発現し得る。Ｎ結合グリコシル化の間に、ＥＲ中のタンパク質は、分枝状の９マンノース糖（ｍａｎ）$_{9}$複合体で修飾される。該タンパク質がＥＲを出るときに、マンノシダーゼＩは、マンノース糖（ｍａｎ）$_{5}$のうちの４つを除去し、次いで、マンノシダーゼＩＩがさらなる２（ｍａｎ）$_{3}$を除去する。次いで、グリコシルトランスフェラーゼは、このマンノースコア上に複雑なグリカン構造を構築する。これらのグリカンは、タンパク質の折りたたみ及び機能に不可欠である。タンパク質上に発現したグリカンに対するｍＡｂの作製は問題となっており、該ｍＡｂは、単に小さなグリカンを見ることはまれで、通常は、非常に発現が限られている特定タンパク質上のグリカンを認識する。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００３】
腫瘍形成時に、グリコシル化プロセスが高度に調節不全になると、癌細胞の表面でのグリカン発現が変わり、腫瘍関連糖鎖抗原（ＴＡＣＡ）をもたらす。腫瘍では、ＴＡＣＡは、異常に発現し、正常組織に比べて密な分布を有するだけでなく、タンパク質の折りたたみ及び輸送、接着、並びに細胞増殖などの多くの生理学的プロセスに関与するので、治療用ｍＡｂの魅力的な標的となる。
【０００４】

ルイス糖鎖は、正常組織では非常に限られた分布を有しており、上皮細胞起源の癌、特に、膵臓癌及び胃腸癌において過剰発現しているので、ｍＡｂ治療の理想的な候補である。ルイス糖鎖は、グリコシルトランスフェラーゼの作用を介して、糖タンパク質及び糖脂質上のオリゴ糖前駆体鎖へのフコースの逐次付加によって形成され、Ｌｅ^{a}及びＬｅ^{b}を形成するタイプＩ鎖並びにルイス^{X}及びルイス^{y}を形成するタイプＩＩ鎖に分けることができる。

【０００５】

シアリルールイス^{a}は、内皮白血球接着に関与するＥ－セレクチンのリガンドであり、肝胆道系、膵臓及び胃腸管の癌で過剰発現しているが、その天然型の、余分なシアル酸糖を有するジーシアリルールイス^{a}は、非悪性上皮細胞に見られる。シアリルールイス^{a}の発現は、膵臓腺癌（１６、２７）及び結腸癌（１４、１５）において転移の可能性を増加させることが見出された。膵臓癌及び結腸癌において、シアリルールイス^{a}はまた、治療（１３、１７、１８）への応答を監視するための腫瘍マーカーとして使用される。シアリルージールイス^{a}（これは癌に見られる単一のシアル酸を有するだけでなく、重複ルイス^{a}を有し、タンパク質上でのみ見られる）は、広い範囲の膵臓腫瘍で発現するが、非常に制限された正常組織発現を有する。より最近では、ヒトのシアリルールイス^{a}　ｍＡｂが患者のワクチン接種法を用いて生成され、これは、シアリルールイス^{a}への特異的結合を示し、異種移植モデルにおいてＡＤＣＣ、ＣＤＣ及び抗腫瘍活性を示す（２０）。これらのｍａｂの１つである５Ｂ１は、ノイラミン酸が内因的に生成される（Ｎ－アセチル－ノイラミン酸）か又は外来（Ｎ－グリコリル－ノイラミン酸）であるのかに関わらず、長いスペーサー又は短いスペーサー上にあるかどうかに関わらず、主にシアリルルイス^{a}に結合するヒトＩｇＧ１である。シアリルージールイス^{a}又はシアリルルイス$^{a-x}$への結合は、弱く、少ない。第２のｍａｂ　７Ｅ３は、ノイラミン酸が内因的に生成される（Ｎアセチルノイラミン酸）か又は外来（Ｎ－グリコリル－ノイラミン酸）であるのかに関わらず、長いスペーサー又は短いスペーサー上にあるかどうかに関わらず、シアリルルイス^{a}、及びシアリルージールイス^{a}又はシアリルルイス$^{a-x}$に等しく結合するヒトＩｇＭである。そのような抗シアリルルイス^{a}　ｍａｂが許容できない正規分布を有することは、ＧｉｖａＲｅｘ（マウスモノクローナル抗体）及びその特許（ＷＯ０１９１７９２）が前臨床試験で放棄された見解によって支持される。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

本発明の目的は、シアリルージールイス^{a}に改善された結合メンバーを提供することである。

【発明の効果】

【０００７】

本発明の第一の態様によれば、シアリルージールイス^{a}に結合可能な単離された特異的結合メンバーが提供される。

【０００８】

該結合メンバーは、シアリルージールイス^{a}に特異的であり得る。一実施形態において、該結合メンバーは、シアリルージールイス^{a}及びシアリルールイス$^{a-x}$に特異的であり得る。該結合メンバーは、シアリルージールイス^{a}に特異的であり得る。一実施形態において、該結合メンバーは、腫瘍組織中に存在するシアリルージールイス^{a}及びシアリルールイス$^{a-x}$に特異的であり得る。該結合メンバーは、糖脂質に結合したモノ－シアリルールイス^{a}に結合することができないか、又は著しく結合することができない。さらに又は代替的に、該結合メンバーは、ジーシアリルールイス^{a}に結合することができないか、又は著しく結合することができない。該結合メンバーは、健康な（非腫瘍）組織中に存在するジーシアリルールイス^{a}に結合することができないか、又は著しく結合することができない。

【０００９】

合成（すなわち、非天然）分子は、結合メンバーの結合特異性を特徴付けるために提供

されてよい。そのような形態は、タンパク質又は脂質（例えば、糖タンパク質又は糖脂質）上に提示されたシアリルーラクトースアミン、シアリルーテトラサッカライド、ジーシアリルーテトラサッカライド又はモノーシアリルーテトラサッカライド分子のうちのいずれか１つを含むことができる。該合成分子は、外来のＮ－グリコリルーノイラミン酸又は内因性のＮ－アセチルーノイラミン酸と共にシアリルーテトラサッカライドを含んでよい。一実施形態において、該結合メンバーは、モノーシアリルーテトラサッカライドに結合することができ、その際、モノーシアリルーテトラサッカライドは糖タンパク質上に提示されている。該結合メンバーは、シアリルーラクトースアミン、シアリルーテトラサッカライド、及びモノーシアリルーテトラサッカライドに特異的であり得、その際、モノーシアリルーテトラサッカライドは糖タンパク質上に提示されている。該結合メンバーが、糖タンパク質上に提示されたモノーシアリルーテトラサッカライドに結合する一実施形態において、モノーシアリルーテトラサッカライドは、ポリマーなどのスペーサーによってタンパク質に連結することができる。該ポリマーは、シアリルーテトラサッカライドが結合メンバーの溝に入って結合するのを可能にする任意の天然又は合成の分子を含むことができる。該ポリマー鎖は、グリカン鎖又はアミノ酸（すなわち、ポリペプチド）を含むことができる。糖タンパク質にモノーシアリルーテトラサッカライドを連結するグリカン鎖は、少なくとも４つのグリカンモノマー単位を含むことができる。あるいは、糖タンパク質にモノーシアリルーテトラサッカライドを連結するグリカン鎖は、少なくとも５つのグリカンモノマー単位を含むことができる。あるいは、糖タンパク質にモノーシアリルーテトラサッカライドを連結するグリカン鎖は、少なくとも６つのグリカンモノマー単位を含むことができる。あるいは、糖タンパク質にモノーシアリルーテトラサッカライドを連結するグリカン鎖は、少なくとも７つのグリカンモノマー単位を含むことができる。あるいは、糖タンパク質にモノーシアリルーテトラサッカライドを連結するグリカン鎖は、少なくとも８つのグリカンモノマー単位を含むことができる。糖タンパク質にモノーシアリルーテトラサッカライドを連結するポリペプチドは、少なくとも４個のアミノ酸を含むことができる。あるいは、糖タンパク質にモノーシアリルーテトラサッカライドを連結するポリペプチドは、少なくとも５個のアミノ酸を含むことができる。あるいは、糖タンパク質にモノーシアリルーテトラサッカライドを連結するポリペプチドは、少なくとも６個のアミノ酸を含むことができる。あるいは、糖タンパク質にモノーシアリルーテトラサッカライドを連結するポリペプチドは、少なくとも７個のアミノ酸を含むことができる。あるいは、糖タンパク質にモノーシアリルーテトラサッカライドを連結するポリペプチドは、少なくとも８個のアミノ酸を含むことができる。

【００１０】

本発明は、都合の良いことに、シアリルーラクトースアミン及びシアリルーテトラサッカライドに高い特異性を示すモノクローナル抗体などの結合メンバーを提供する。該結合メンバーはまた、グリカン鎖によって糖タンパク質に連結される時に、モノーシアリルーテトラサッカライドにも結合することができることから、結合するために正しい立体構造で提示される少なくとも４つの糖鎖及び抗体の溝への挿入を可能にするスペーサー（グリカン鎖など）が必要であることが示唆される。この制約により、他のモノーシアリルーテトラサッカライド結合ｍａＡｂとは対照的に、糖脂質ではなく、糖タンパク質に結合する特有の能力が該結合メンバーに与えられる。他のｍａｂとは対照的に、シアリルルイスだけを認識することができないことから、糖脂質上のこの糖への結合が妨げられ、特有の非常に制限された正常（すなわち非癌性）組織結合プロファイルが与えられる。理論によって束縛されるものではないが、脂質があまりにも疎水性で、抗体の深い溝へのグリカンの挿入ができないので、該結合メンバーは、糖脂質結合シアリルルイスに結合することができない。

【００１１】

本発明は、本明細書において、ＦＧ１２９　ｍＡｂなどの結合メンバーを提供し、特徴付けて、キメラ化した。このｍＡｂは、新規グリカンのシアリルーテトラサッカライド（これは癌に見られる単一のシアル酸を有するだけでなく、重複ルイスを有し、タンパク質上にのみ見られる）を標的とし、膵臓腫瘍の広い範囲で発現するが、非常に制限された正常な組織発現を有する。キメラＦＧ１２９（ＣＨ１２９）は、腫瘍上で強いＡＤＣＣ及びＣＤＣ応答を誘導するので、該抗原が免疫媒介性死滅に良好な標的であることが示唆される。これは、Ｔ細胞を認識し、活性化する第２のｍＡｂとＦＧ１２９の組換えによるＴ細胞死

滅を再指示することによってさらに増強することができる。従って、ＡＤＣＣを誘導する抗体に加えて、ヒト化ｍＡｂは、さらに、ＦＧ１２９及びＣＤ３抗原を標的とする二重特異性ｍＡｂの生成に適用される。このような二重特異性の適用はあり得るが、膵臓癌に限定されない。ｍＡｂ　ＦＧ１２９はまた、内部移行し、腫瘍細胞を効率的に死滅させる薬物を送達することから、ＡＤＣの可能性が実証された。

【００１２】

本発明はまた、糖タンパク質にのみ付着するシアリルーじーるイス^{a}及びシアリルーるイス$^{a-x}$のＮｅｕ５Ａｃａ２－３Ｇａｌｂ１－３（Ｆｕｃａ１－４）ＧｌｃＮＡｃｂ１－３Ｇａｌｂ１－４（Ｆｕｃａ１－３）ＧｌｃＮＡｃｂ－及びモノーシアリルーるイス^{a}のＮｅｕ５Ａｃａ２－３Ｇａｌｂ１－３（Ｆｕｃａ１－４）ＧｌｃＮＡｃｂに結合することができる単離された特異的結合メンバーを提供する。このような結合メンバーは、癌を治療する方法において使用するためのものであり得る。本発明はまた、癌治療用の薬剤の製造における、そのような結合パートナーの使用を提供する。本発明はまた、癌を治療する方法であって、そのような治療を必要とする対象に、本発明の結合パートナーを投与することを含む方法を提供する。

【００１３】

一態様において、本発明は、糖タンパク質にのみ付着するシアリルーじーるイス^{a}及びシアリルーるイス$^{a-x}$及びモノーシアリルーるイス^{a}に結合するｍＡｂ　ＦＧ１２９を提供する。

【００１４】

別の態様において、本発明は、糖タンパク質にのみ付着するシアリルーじーるイス^{a}及びシアリルーるイス$^{a-x}$及びモノーシアリルーるイス^{a}に結合するキメラｈＩｇＧ１１２９を提供する。

【００１５】

本発明において、発明者らは、シアリルーじーるイス^{a}に結合し、腫瘍原形質膜の脂質抽出物でＢａｌｂ／ｃマウスを免疫することによって作製したマウスＩｇＧ１ｋ　ｍＡｂのＦＧ１２９を示す。それらは、ある程度の腫瘍細胞株の細胞表面に結合するが、血液又は血管内皮細胞には結合しない。

【００１６】

該結合メンバーは、患者の集団における一部の膵臓腫瘍、例えば、膵臓腫瘍の少なくとも７０％又は７４％に結合することが可能であり得る。該結合メンバーは、患者の集団における一部の胃の腫瘍、例えば、胃の腫瘍の少なくとも４５％又は５０％に結合することが可能であり得る。該結合メンバーは、患者の集団における一部の結腸直腸腫瘍、例えば、結腸直腸腫瘍の少なくとも３０％又は３６％に結合することが可能であり得る。該結合メンバーは、患者集団における一部の卵巣腫瘍、例えば、卵巣腫瘍の少なくとも２５％又は２７％に結合することが可能であり得る。該結合メンバーは、患者の集団における一部の非小細胞肺癌、例えば、非小細胞肺癌の少なくとも５％又は７％に結合することが可能であり得る。該結合メンバーに結合する腫瘍組織は、腫瘍組織マイクロアレイ（ＴＭＡ）での免疫組織化学（ＩＨＣ）によって評価することができる。

【００１７】

一実施形態において、該結合メンバーは、非癌性の心臓、脳、胃、又は腎臓の組織などの非癌組織に結合しないか、又は顕著に結合しない。さらに又はあるいは、該結合メンバーは、胆嚢、回腸、肝臓、肺、食道、膵臓、皮膚又は胸腺の非癌性組織に低い親和性を有するか、又は顕著に結合しない。

【００１８】

該結合メンバーは、約10^{-6}Ｍ未満の親和性（ＫＤ）で糖タンパク質提示シアリルーるイス^{a}に結合することが可能であり得る。該結合メンバーは、約10^{-7}Ｍ未満の親和性（ＫＤ）で糖タンパク質提示シアリルーるイス^{a}に結合することが可能であり得る。該結合メンバーは、約10^{-8}Ｍ、10^{-9}Ｍ、10^{-10}Ｍ、10^{-11}Ｍ又は10^{-12}Ｍ未満の親和性（ＫＤ）で糖タンパク質提示シアリルーるイス^{a}に結合することが可能

であり得る。該結合メンバーは、約10^{-13}M未満の親和性（ＫＤ）で糖タンパク質提示シアリルールイス^{a}に結合することが可能であり得る。該結合メンバーは、10^{-8}　１／ｓ未満の解離速度（Ｋｄ）で糖タンパク質提示シアリルールイス^{a}に結合することが可能であり得る。該結合メンバーは、少なくとも約10^4　１／Ｍｓの会合速度（Ｋａ）で糖タンパク質提示シアリルールイス^{a}に結合することが可能であり得る。結合親和性は、表面プラズモン共鳴ビアコアＸによって測定することができる。

【００１９】

本発明のさらなる態様は、重鎖結合ドメインＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３、並びに軽鎖結合ドメインＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む単離された特異的結合メンバーを提供する。本発明は、図１ａ又は２ａの残基２６～３３（ＣＤＲＨ１）、５０～５９（ＣＤＲＨ２）及び９８～１０６（ＣＤＲＨ３）のアミノ酸配列から選択される１以上の結合ドメインを含む単離された特異的結合メンバーを提供することができる。

【００２０】

結合ドメインは、実質的に、図１ａ又は２ａの１～１１７（ＶＨ）として記載されるアミノ酸配列を含み得る。一実施形態において、該メンバーは、実質的に、図１ａ又は２ａのアミノ酸配列の残基９８～１０６（ＣＤＲＨ３）として記載されるアミノ酸配列を含む結合ドメインを含む。本実施形態において、単離された特異的結合メンバーは、実質的に、図１ａ及び２ａに示すアミノ酸配列の残基２６～３３（ＣＤＲＨ１）及び残基５０～５９（ＣＤＲＨ２）として記載される結合ドメインの一方又は両方、好ましくは両方をさらに含み得る。

【００２１】

別の態様において、本発明は、図１ｂ又は２ｂの残基２７～３８（ＣＤＲＬ１）、５６～５８（ＣＤＲＬ２）及び９５～１０３（ＣＤＲＬ３）のアミノ酸配列から選択される１以上の結合ドメインを含む単離された特異的結合メンバーを提供する。

【００２２】

該結合ドメインは、実質的に、図１ｂ及び２ｂのアミノ酸配列の残基９５～１０３（ＣＤＲＬ３）として記載されるアミノ酸配列を含み得る。本実施形態において、単離された特異的結合メンバーは、実質的に、図１ｂ及び２ｂに示すアミノ酸配列の残基２７～３８（ＣＤＲＬ１）及び残基５６～５８（ＣＤＲＬ２）として記載される結合ドメインの一方又は両方、好ましくは両方をさらに含み得る。

【００２３】

一実施形態において、可変重鎖及び／又は軽鎖は、抗体ＦＧ１２９のＨＣＤＲ１－３及びＬＣＤＲ１－３を含み得る。別の実施形態において、可変重鎖及び／又は軽鎖は、抗体ＦＧ１２９のＨＣＤＲ１－３及びＬＣＤＲ１－３、並びにＦＧ１２９のフレームワーク領域を含むことができる。

【００２４】

同じ若しくは異なる配列、又はそれらの組み合わせの複数の結合ドメインを含む特異的結合メンバーは、本発明の範囲内に含まれる。各結合ドメインは、ヒト抗体フレームワークによって保有され得る。例えば、１以上のフレームワーク領域は、全ヒト抗体又はその可変領域のフレームワーク領域に置換することができる。

【００２５】

本発明の一つの単離された特異的結合メンバーは、実質的に、図１ｂ又は図２ｂに示されるアミノ酸配列の残基１～１１４（ＶＬ）として記載される配列を含む。

【００２６】

いくつかの実施形態において、図１ａ又は図２ａのＣＤＲの配列を有する結合メンバーは、図１ｂ又は２ｂのＣＤＲの配列を有する結合メンバーと組み合わせることができる。

【００２７】

一実施形態において、該結合メンバーは、
ＬＣＤＲ１がＱＳＬＬＮＳＧＮＱＫＮＹを含み、
ＬＣＤＲ２がＷＡＳを含み、及び

ＬＣＤＲ３がＱＮＤＹＳＳＰＦＴを含む、
ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２及びＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変配列、並びに
ＨＣＤＲ１がＧＦＴＦＮＴＹＡを含み、
ＨＣＤＲ２がＩＲＳＫＳＮＮＹＡＴを含み、
ＨＣＤＲ３がＶＧＹＧＳＧＧＮＹを含む、
ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２及びＨＣＤＲ３を含む重鎖可変配列、を含むことができる。

【００２８】

さらなる態様において、本発明は、図１ａ又は２ａのアミノ酸配列の残基１～１１７を含むＶＨドメイン、及び図１ｂ又は２ｂのアミノ酸配列の残基１～１１４を含むＶＬドメインを含む結合メンバーを提供する。本発明はまた、上記の結合パートナーを包含するが、該結合ドメインの配列は、実質的に、図１又は２に記載されている通りである。したがって、上記の結合パートナーが提供されるが、１以上の結合ドメインにおいて、１～５、１～４、１～３、２又は１個の置換によって、図１又は２に示したものと異なる。

【００２９】

本発明はまた、図１及び図２に示されるＶＨ及びＶＬ配列と同一のエピトープに結合する能力を有する結合パートナーを包含する。ｍＡｂのエピトープは、ｍＡｂが結合する抗原の領域である。２つの抗体は、それぞれが抗原への他方の結合を競合的に阻害（阻止）する場合、同じ又は重複するエピトープに結合する。つまり、１つの抗体の１倍、５倍、１０倍、２０倍又は１００倍過剰は、競合抗体を欠く対照と比較して競合的結合アッセイで測定した時に少なくとも５０％、しかし好ましくは７５％、９０％又はさらには９９％他方の結合を阻害する（例えば、参照により本明細書に組み込まれるＪｕｎｇｈａｎｓら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５０：１４９５，１９９０を参照されたい）。

【００３０】

したがって、本発明は、さらに、図１ａ又は図２ａの残基１～１１７のアミノ酸配列を有するＶＨ鎖及び図１ｂ又は図２ｂの残基１～１１４のアミノ酸配列を有するＶＬ鎖を含む抗体と、糖タンパク質にのみ付着するシアリルーｇールイス^{a}及びシアリルールイス$^{a-x}$及びモノーシアリルールイス^{a}への結合について競合する結合メンバーを提供する。

【００３１】

好ましい実施形態において、該競合結合パートナーは、図１ａ又は図２ａの残基１～１１７のアミノ酸配列を有するＶＨ鎖及び図１ｂ又は図２ｂの残基１～１１４のアミノ酸配列を有するＶＬ鎖を含む抗体と、糖タンパク質にのみ付着するシアリルーｇールイス^{a}への結合について競合する。

【００３２】

さらなる実施形態において、該競合結合パートナーは、図１ａの残基１～１１７のアミノ酸配列を有するＶＨ鎖及び図１ｂの残基１～１１４のアミノ酸配列を有するＶＬ鎖を含む抗体、又は図２ａの残基１～１１７のアミノ酸配列を有するＶＨ鎖及び図２ｂの残基１～１１４のアミノ酸配列を有するＶＬ鎖を含む抗体と、糖タンパク質にのみ付着するシアリルーｇールイス^{a}及びシアリルールイス$^{a-x}$及びモノーシアリルールイス^{a}への結合について競合する。

【００３３】

好ましくは、競合結合パートナーは、抗体、例えば、モノクローナル抗体、又は本文書全体に記載の抗体の変異体又は断片のいずれかである。

【００３４】

本明細書に記載の所望の特性を有する単一の原型ｍＡｂ、例えば、ＦＧ１２９　ｍＡｂが単離されると、当技術分野で既知の方法を用いて、類似の特性を有する他のｍＡｂを作製することは簡単である。例えば、参照により本明細書に組み込まれるＪｅｓｐｅｒｓら，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１２：８９９，１９９４の方法は、原型ｍＡｂと同じエピトープ、従って類似の性質を有するｍＡｂの選択を導くために使用することができる。ファージディスプレイを用いて、最初に、原型抗体の重鎖は、グリカン結合ｍＡｂを選択するために（好ましくは、ヒトの）軽鎖のレパートリーと対にされ、その後、新しい軽鎖

は、原型ｍＡｂと同じエピトープを有する、（好ましくは、ヒトの）グリカン結合ｍＡｂを選択するために（好ましくは、ヒトの）重鎖のレパートリーと対にされる。

【００３５】

糖タンパク質にのみ付着するシアリルーｇールイス^{a}及びシアリルールイス$^{a-x}$及びモノーシアリルールイス^{a}と結合することが可能で、ＡＤＣＣを誘導するか、又は内部移行し、ＶＨ及び／又はＶＬドメインにおいて図１若しくは２のＶＨ又はＶＬドメインと少なくとも９０％、９５％又は９９％同一であるｍＡｂは、本発明に含まれる。９０％、９５％又は９９％の同一性への言及は、ＶＨ及び／又はＶＬドメインのフレームワーク領域に対するものであり得る。特に、ＣＤＲ領域は同一であり得るが、フレームワーク領域は、１％、５％、又は１０％まで変動し得る。好ましくは、そのような抗体は、いくつかの機能的に重要でないアミノ酸置換（例えば、保存的置換）、欠失、又は挿入により、図１又は２の配列と異なる。本発明の任意の実施形態において、該特異的結合対は、抗体又は抗体断片、Ｆａｂ、（Ｆａｂ’）２、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆｄ又はダイアボディであり得る。いくつかの実施形態において、該抗体はポリクローナル抗体である。他の実施形態において、該抗体はモノクローナル抗体である。本発明の抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体若しくはベニヤ抗体であり得、又は任意の種の非ヒト抗体であり得る。一実施形態において、本発明の特異的結合パートナーは、図１ａに示す重鎖及び図１ｂに示す軽鎖を含むマウス抗体ＦＧ１２９である。

【００３６】

別の実施形態において、本発明の特異的結合パートナーは、図２ａに示す重鎖及び図２ｂに示す軽鎖を含むキメラ抗体ＦＧ１２９である。

【００３７】

本発明の特異的結合メンバーは、検出可能又は機能性標識を保有し得る。

【００３８】

さらなる態様において、本発明は、本発明の態様の特異的結合メンバーをコードする配列を含む単離核酸、並びに前記結合メンバーの発現をもたらす条件下で前記核酸を発現すること、及び前記結合メンバーを回収すること、を含む本発明の特異的結合メンバーを調製する方法を提供する。

【００３９】

本発明による特異的結合メンバーは、患者（好ましくはヒト）における腫瘍の治療方法などのヒト若しくは動物の身体の治療又は診断の方法であって、有効量の本発明の特異的結合メンバーを前記患者に投与することを含む方法において使用することができる。本発明はまた、医薬に使用するための本発明の特異的結合メンバー、並びに腫瘍の診断又は治療のための医薬の製造における本発明の特異的結合メンバーの使用を提供する。

【００４０】

本発明はまた、本発明の特異的結合メンバーが結合する抗原を提供する。一実施形態において、好ましくは特異的に、本発明の特異的結合メンバーによって結合することが可能であるシアリルーｇールイス^{a}が提供される。シアリルーｇールイス^{a}は、単離形態で提供することができ、かつそのためのさらなる特異的結合メンバーを開発するためのスクリーニングで使用することができる。例えば、化合物のライブラリーは、シアリルーｇールイス^{a}に特異的に結合するライブラリーのメンバーについてスクリーニングすることができる。シアリルーｇールイス^{a}は、タンパク質骨格上に存在し得る。タンパク質骨格上に存在する時、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって決定された場合、シアリルーｇールイス^{a}は約５０～１５０ｋＤａの分子量を有することができる。

【００４１】

さらなる態様において、本発明は、結腸直腸、胃、膵臓、肺、卵巣及び乳房の腫瘍の診断又は予後における使用のための、シアリルーｇールイス^{a}及びシアリルールイス$^{a-x}$に特異的に結合することが可能な単離された特異的結合メンバーを提供する。さらなる態様において、本発明は、結腸直腸、胃、膵臓、肺、卵巣及び乳房の腫瘍の診断又は予後における使用のための、糖タンパク質にのみ付着するシアリルーｇールイス^{a}及びシアリル

－ルイス$^{a-x}$及びモノ－シアリル－ルイス^{a}に特異的に結合することが可能な単離された特異的結合メンバーを提供する。

【００４２】

本発明はさらに、癌の診断方法であって、個体からの試料中の糖タンパク質にのみ付着するシアリル－ジ－ルイス^{a}及びシアリル－ルイス$^{a-x}$及びモノ－シアリル－ルイス^{a}を検出するために、本発明の特異的結合パートナーを使用することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、該診断方法において、結合パートナーによって検出されるグリカンのパターンは、個体の治療オプションを層別化するために使用される。

【００４３】

本発明のこれらの及び他の態様は、以下にさらに詳細に記載されている。

【００４４】

本明細書で使用する「特異的結合メンバー」は、互いに対する結合特異性を有する分子対のメンバーである。特異的結合対のメンバーは、天然由来であるか、又は全体的若しくは部分的に合成することができる。分子対の一方のメンバーは、特異的に結合し、したがって、分子対の他方のメンバーの特定の空間的及び極性の組織に相補的である突起又は空洞であり得る領域をその表面上に有する。したがって、該対のメンバーは、互いに特異的に結合する性質を有する。特異的結合対の種類の例としては、抗原－抗体、ビオチン－アビジン、ホルモン－ホルモン受容体、受容体－リガンド、酵素－基質が挙げられる。本明細書で定義される抗原に結合する小分子にも関係するが、本発明は、一般的に抗原－抗体の種類の反応に関係する。

【００４５】

本明細書で使用する「治療」は、ヒト又は非ヒト動物、好ましくは、哺乳動物に恩恵をもたらすことができる任意のレジメンを含む。治療は、既存の状態に関するものであるか、又は予防的（予防的治療）であり得る。

【００４６】

本明細書で使用する「腫瘍」は、組織の異常成長である。腫瘍は、局在化（良性）するか、又は近くの組織に侵入する（悪性）か又は遠隔組織に侵入する（転移性）ことができる。腫瘍は、癌を引き起こす腫瘍成長を含み、食道、結腸直腸、胃、乳房及び子宮内膜の腫瘍だけでなく、白血病細胞を含むがこれらに限定されない癌組織又は細胞株を含む。本明細書で使用する「腫瘍」はまた、その範囲内に子宮内膜症を含む。

【００４７】

本明細書で使用する用語「抗体」は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性のある部分、すなわち、天然のものであるか、又は部分的若しくは全体的に合成されたものかどうかに関わらず、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子を指す。該用語はまた、抗体結合ドメインであるか、又は抗体結合ドメインに相同である結合ドメインを有する任意のポリペプチド又はタンパク質を含む。これらは、天然の供給源から得ることができるか、又は部分的若しくは全体的に合成することができる。抗体の例としては、免疫グロブリンアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ及びＩｇＡ）及びそのアイソタイプのサブクラス；Ｆａｂ、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、ｄＡｂ、Ｆｄなどの抗原結合ドメインを含む断片；並びにダイアボディが挙げられる。抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであり得る。モノクローナル抗体は、「ｍＡｂ」と呼ぶことができる。

【００４８】

モノクローナル抗体及び他の抗体を取得し、元の抗体の特異性を保持する他の抗体又はキメラ分子を生成するために組換えＤＮＡテクノロジーの技術を使用することが可能である。このような技術は、抗体の免疫グロブリン可変領域又はＣＤＲをコードするＤＮＡを、異なる免疫グロブリンの定常領域、又は定常領域＋フレームワーク領域に導入することを含むことができる。例えば、ＥＰ－Ａ－１８４１８７、ＧＢ　２１８８６３８Ａ又はＥＰ－Ａ－２３９４００を参照されたい。ハイブリドーマ又は抗体を生成する他の細胞を、生成される抗体の結合特異性を変更しても、若しくはしなくてもよい遺伝子変異又は他の

変化に供することができる。

【００４９】

抗体はいくつかの方法で修飾することができるように、用語「抗体」は、必要な特異性を有する結合ドメインを有する任意の特異的結合メンバー又は物質を包含するものとして解釈されるべきである。したがって、この用語は、天然であるか、又は全体的若しくは部分的に合成されているかに関わらず、免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含む抗体断片、誘導体、機能的等価物及び抗体のホモログ、ヒト化抗体を含む。したがって、別のポリペプチドに融合した免疫グロブリン結合ドメインを含むキメラ分子、又は等価物が含まれる。キメラ抗体のクローニング及び発現は、ＥＰ－Ａ－０１２０６９４及びＥＰ－Ａ－０１２５０２３に記載されている。ヒト化抗体は、非ヒト、例えば、マウス抗体の可変領域及びヒト抗体の定常領域を有する修飾された抗体であり得る。ヒト化抗体を作製する方法は、例えば、米国特許第５２２５５３９号に記載されている。

【００５０】

完全抗体の断片は、結合抗原の機能を実行できることが示されている。結合断片の例としては、（ｉ）ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ及びＣＨ１ドメインからなるＦａｂ断片；（ｉｉ）ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片；（ｉｉｉ）単一抗体のＶＬ及びＶＨドメインからなるＦｖ断片；（ｉｖ）ＶＨドメインからなるｄＡｂ断片［２５］；（ｖ）単離されたＣＤＲ領域；（ｖｉ）２つの連結されたＦａｂ断片を含む二価断片であるＦ（ａｂ’）２断片；（ｖｉｉ）２つのドメインが抗原結合部位を形成するように会合するのを可能にするペプチドリンカーによってＶＨドメイン及びＶＬドメインが連結されている単鎖Ｆｖ分子（ｓｃＦｖ）［２６、２７］；（ｖｉｉｉ）二重特異性単鎖Ｆｖ二量体（ＰＣＴ／ＵＳ９２／０９９６５）；並びに（ｉｘ）遺伝子融合により構築された多価又は多重特異性断片である「ダイアボディ」（ＷＯ９４／１３８０４；［２８］）が挙げられる。

【００５１】

ダイアボディは、ポリペプチドの多量体であり、各ポリペプチドは、免疫グロブリン軽鎖の結合領域を含む第１のドメイン及び免疫グロブリン重鎖の結合領域を含む第２のドメインを含み、２つのドメインは（例えば、ペプチドリンカーによって）連結されているが、抗原結合部位を形成するために互いに結合することはできず：抗原結合部位は、多量体内の１つのポリペプチドの第１ドメインと多量体内の別のポリペプチドの第２のドメインの会合により形成される（ＷＯ９４／１３８０４）。

【００５２】

二重特異性抗体が使用される場合、これらは、様々な方法で製造することができる従来の二重特異性抗体であり得［２９］、例えば、化学的に若しくはハイブリッドハイブリドーマから調製されるか、又は上記の二重特異性抗体断片のいずれかであり得る。完全抗体よりもｓｃＦｖ二量体又はダイアボディを使用することが好ましい場合がある。ダイアボディ及びｓｃＦｖは、Ｆｃ領域を含めないで、可変ドメインのみを使用して構築すると、潜在的に抗イディオタイプ反応の影響を低減することができる。

【００５３】

二重特異性抗体の他の形態は、［３０］に記載の単鎖「ジャヌシン（Ｊａｎｕｓｉｎ）」を含む。

【００５４】

二重特異性ダイアボディはまた、二重特異性完全抗体とは対照的に、容易に構築し、大腸菌内で発現させることができるので、有用であり得る。適切な結合特異性のダイアボディ（及び抗体断片などの多くの他のポリペプチド）は、ライブラリーからファージディスプレイ（ＷＯ９４／１３８０４）を使用して容易に選択することができる。ダイアボディの一方のアームが、例えば、抗原Ｘに指向された特異性を有して一定に維持される場合、他方のアームを変化させたライブラリーを作製し、適切な特異性の抗体を選択することができる。

【００５５】

用語「シアリルージールイス^{a}」は構造：

Ｎｅｕ５Ａｃα２－３Ｇａｌβ１－３（Ｆｕｃα１－４）ＧｌｃＮＡｃβ１－３Ｇａｌβ１－３（Ｆｕｃα１－４）ＧｌｃＮＡｃβを指す。

【００５６】

用語「モノシアリルールイス^{a}」は、構造：
Ｎｅｕ５Ａｃａ２－３Ｇａｌｂ１－３（Ｆｕｃａ１－４）ＧｌｃＮＡｃｂを指す。

【００５７】

用語「シアリルールイス$^{a-x}$」は、構造：
Ｎｅｕ５Ａｃａ２－３Ｇａｌｂ１－３（Ｆｕｃａ１－４）ＧｌｃＮＡｃｂ１－３Ｇａｌｂ１－４（Ｆｕｃａ１－３）ＧｌｃＮＡｃｂを指す。

【００５８】

「抗原結合ドメイン」は、抗原に特異的に結合し、抗原の一部又は全てに相補的である領域を含む抗体の一部である。抗原が大きい場合、抗体は、エピトープと呼ばれる抗原の特定の部分にのみ付着することができる。抗原結合ドメインは、１以上の抗体可変ドメインによって提供され得る。抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）及び抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含み得る。

【００５９】

「特異的」は、一般に、特異的結合対の一方のメンバーが、その特異的結合パートナー（複数可）以外の分子への有意な結合を示さず、例えば、任意の他の分子と約３０％未満の交差反応性を有する状況を指すために使用される。他の実施形態において、特異的は、任意の他の分子と２０％、１０％、又は１％未満の交差反応性を有する。この用語はまた、例えば、抗原結合ドメインがいくつかの抗原によって保有される特定のエピトープに特異的である場合にも適用可能であり、そのような場合、抗原結合ドメインを保有する特異的結合メンバーは、エピトープを保有する様々な抗原に結合することができる。

【００６０】

「単離された」とは、本発明の特異的結合メンバー又はそのような結合メンバーをコードする核酸が、好ましくは、本発明によるものである状態を指す。メンバー及び核酸は、一般に、天然環境、又はそのような調製が組換えＤＮＡ技術によってインビトロ若しくはインビボで実施される時に調製される環境（例えば、細胞培養）で見られる他のポリペプチド又は核酸などの自然界で関連付けられている物質を含まない、又は実質的に含まない。特異的結合メンバー及び核酸は、希釈剤又はアジュバントと共に製剤化することができ、さらに、実用的な目的のために単離され、例えば、該メンバーは、イムノアッセイで使用するためのマイクロタイタープレートをコーティングするために使用される場合には、通常、ゼラチン若しくは他の担体と混合されるか、又は診断若しくは治療で使用される時には、薬学的に許容される担体若しくは希釈剤と混合される。特異的結合メンバーは、自然界で若しくは異種真核細胞の系によってグリコシル化されてもよく、又はグリコシル化されなくてもよい（例えば、原核細胞内での発現によって生成される場合）。

【００６１】

「実質的に記載される」とは、本発明のＣＤＲ領域が、図１若しくは２の特定領域と同一又は高度に相同性があることを意味する。「高度に相同性がある」とは、１～５、１～４、１～３、２又は１個の置換がＣＤＲ内で行われ得ることを企図する。

【００６２】

本発明はまた、その範囲内に、図１又は２に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド、図Ａ又はＢに記載の核酸配列及びそれと実質的同一性、例えば、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％又は９９％の同一性を有する配列を有するポリヌクレオチドを含む。２つのアミノ酸配列又は２つの核酸配列の％同一性は、一般に、最適な比較目的のために配列を整列させ（例えば、第２の配列との最良のアライメントのために、ギャップを第１の配列に導入することができる）、対応する位置のアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較することによって決定される。「最良のアライメント」は、最高の％同一性をもたらす２つの配列のアライメントである。％同一性は、配列内の同一のアミノ酸残基又はヌクレオチドの数を比較することにより決定される（すなわち、％同一性＝同一の位置の数／位置

の合計数×１００）。

【００６３】

２つの配列間の％同一性の決定は、当業者に公知の数学的アルゴリズムを用いて達成することができる。２つの配列を比較するための数学的アルゴリズムの例としては、Ｋａｒｌｉｎ及びＡｌｔｓｃｈｕｌ（１９９３）［３２］で改変されたＫａｒｌｉｎ及びＡｌｔｓｃｈｕｌ（１９９０）［３１］のアルゴリズムが挙げられる。Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９０）［３３］のＮＢＬＡＳＴ及びＸＢＬＡＳＴプログラムは、そのようなアルゴリズムを組み込んでいる。ＢＬＡＳＴヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得るために、ＮＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝１００、ワード長＝１２を用いて行うことができる。ＢＬＡＳＴタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得るために、ＸＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝５０、ワード長＝３を用いて行うことができる。比較の目的でギャップ付きアライメントを得るために、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９７）［３４］に記載されているように、Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴを利用することができる。あるいは、ＰＳＩ－Ｂｌａｓｔを用いて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実行することができる（同上）。ＢＬＡＳＴ、ＧａｐｐｅｄＢＬＡＳＴ、及びＰＳＩ－Ｂｌａｓｔプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴ及びＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメータを使用することができる。ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖを参照されたい。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の例としては、Ｍｙｅｒｓ及びＭｉｌｌｅｒ［３５］のアルゴリズムが挙げられる。ＧＣＧ配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）は、そのようなアルゴリズムを組み込んでいる。Ｔｏｒｅｌｌｉｓ及びＲｏｂｏｔｔｉ（１９９４）［３６］に記載されているように、当技術分野で公知の配列解析のための他のアルゴリズムは、ＡＤＶＡＮＣＥ及びＡＤＡＭ、並びにＰｅａｒｓｏｎ及びＬｉｐｍａｎ（１９８８）［３７］に記載のＦＡＳＴＡを含む。ＦＡＳＴＡでは、ｋｔｕｐは、検索の感度及び速度を設定する制御オプションである。

【００６４】

本発明の単離された特異的結合メンバーは、タンパク質部分上にあるシアリルーシールイス^{a}であり得るシアリルーシールイス^{a}糖鎖に結合することが可能である。一実施形態において、実質的に図１ａ及び２ａの残基９８～１０６（ＣＤＲＨ３）並びに図１ｂ及び図２ｂの残基９５～１０３として記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３領域は、これらの領域がシアリルーシールイス^{a}糖鎖に結合するのを可能にする構造中に保有される。

【００６５】

本発明のＣＤＲ３を保有する構造は、一般に、抗体の重鎖若しくは軽鎖配列又はその実質的な部分の構造であり、その中のＣＤＲ３領域は、再構成された免疫グロブリン遺伝子によってコードされる天然のＶＨ及びＶＬ抗体可変ドメインのＣＤＲ３領域に対応する位置に位置する。免疫グロブリン可変ドメインの構造及び位置は、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／を参照することによって決定することができる。実質的に図１ａ及び２ａの残基９８～１０６として記載されるアミノ酸配列は、ヒト重鎖可変ドメイン又はその実質的な部分にＣＤＲ３として保有され、実質的に図１ｂ及び２ｂの残基９５～１０３として記載されるアミノ酸配列は、ヒト軽鎖可変ドメイン又はその実質的な部分にＣＤＲ３として保有され得る。

【００６６】

可変ドメインは、任意の生殖系列若しくは再構成されたヒト可変ドメインに由来するか、又は既知のヒト可変ドメインのコンセンサス配列に基づく合成可変ドメインであり得る。本発明のＣＤＲ３由来の配列は、組換えＤＮＡテクノロジーを使用して、ＣＤＲ３領域を欠く可変ドメインのレパートリーに導入することができる。

【００６７】

例えば、Ｍａｒｋｓら、（１９９２）［３８］は、抗体可変ドメインのレパートリーを生成する方法を記載しており、可変ドメイン領域の５’末端又はそれに隣接するように作

られたコンセンサスプライマーは、ＣＤＲ３を欠くＶＨ可変ドメインのレパートリーを提供するために、ヒトＶＨ遺伝子の第３のフレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーと併せて使用される。Ｍａｒｋｓら（１９９２）［３８］は、このレパートリーが特定の抗体のＣＤＲ３と組み合わせることができる方法をさらに記載している。類似の技術を使用して、本発明のＣＤＲ３由来の配列を、ＣＤＲ３を欠くＶＨ又はＶＬドメインのレパートリーとシャッフルすることができ、シャッフルされた完全ＶＨ又はＶＬドメインは、本発明の特異的結合メンバーを提供するように、同族のＶＬ又はＶＨドメインと組み合わされる。次いで、適切な特異的結合メンバーを選択することができるように、該レパートリーは、ＷＯ９２／０１０４７のファージディスプレイシステムなどの適切な宿主系で提示され得る。レパートリーは、10^4個を超える個々のメンバー、例えば、10^6～10^8又は10^{10}個のメンバーからのものからなり得る。

【００６８】

類似のシャッフリング又はコンビナトリアル技術もＳｔｅｍｍｅｒ（１９９４）［３９］によって開示され、βラクタマーゼ遺伝子に関連する技術が記載されているが、この方法は、抗体の生成のために使用することができることが判明している。さらなる代替方法は、全可変ドメイン内に変異を生成するために、例えば、ＦＧ１２９　ＶＨ又はＶＬ遺伝子のランダム変異誘発を用いて、本発明のＣＤＲ３由来の配列を保有する新規ＶＨ又はＶＬ領域を生成することである。エラープローンＰＣＲを使用したそのような技術が、Ｇｒａｍら（１９９２）［４０］によって記載されている。

【００６９】

使用することができる別の方法は、ＶＨ又はＶＬ遺伝子のＣＤＲ領域に変異を誘発することである。そのような技術は、Ｂａｒｂａｓら（１９９４）［４１］及びＳｃｈｉｅｒら（１９９６）［４２］に開示されている。

【００７０】

免疫グロブリン可変ドメインの実質的な部分は、一般に、介在するフレームワーク領域と共に、少なくとも３つのＣＤＲ領域を含む。該部分はまた、第１と第４のフレームワーク領域のいずれか又は両方の少なくとも約５０％を含むことができ、該５０％は、第１のフレームワーク領域のＣ末端５０％及び第４のフレームワーク領域のＮ末端５０％である。可変ドメインの実質的な部分のＮ末端又はＣ末端の追加の残基は、通常、天然の可変ドメイン領域と関連付けられていないものであり得る。例えば、組換えＤＮＡ技術により作られた本発明の特異的結合メンバーの構築は、以下でより詳細に説明するように、免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン（例えば、ダイアボディの生成における）又はタンパク質標識を含むさらなるタンパク質配列に本発明の可変ドメインを連結するためのリンカーの導入を含むクローニング又は他の操作工程を容易にするために導入されるリンカーによってコードされるＮ又はＣ末端残基の導入をもたらし得る。

【００７１】

本発明の一実施形態は、実質的に図１に記載のＶＬ及びＶＨ領域のアミノ酸配列、すなわち、図１ａ及び２ａのアミノ酸１～１１７（ＶＨ）並びに図１ｂ及び図２ｂのアミノ酸１～１１４（ＶＬ）に基づく結合ドメインの対を含む特異的結合メンバーを提供する。これらの配列のいずれかに基づく単一結合ドメインは、本発明のさらなる態様を形成する。免疫グロブリンＶＨドメインが特異的に標的抗原に結合することができることが知られているので、実質的に図１ａ及び２ａに記載のＶＨ領域のアミノ酸配列に基づく結合ドメインの場合には、このような結合ドメインは、標的化剤として使用することができる。

【００７２】

単鎖特異的結合ドメインのいずれかの場合には、これらのドメインは、本明細書に開示するＦＧ８８抗体と同じくらい良好か又は同等のインビボ特性を有する２つのドメイン特異的結合メンバーを形成することが可能な相補的ドメインについてスクリーニングするために使用することができる。

【００７３】

これは、ＷＯ９２／０１０４７に開示されている、いわゆる層別的二重コンビナトリア

ルアプローチを用いたファージディスプレイスクリーニング法によって達成することができ、Ｈ又はＬ鎖のクローンのいずれかを含有する個々のコロニーは、他の鎖（Ｌ又はＨ）をコードするクローンの完全ライブラリーを感染させるために使用され、得られた二本鎖特異的結合メンバーは、その参考文献に記載されているものなどのファージディスプレイ技術に従って選択される。この技術はまた、Ｍａｒｋｓら［３８］に開示されている。

【００７４】

本発明の特異的結合メンバーはさらに、抗体定常領域又はその一部を含んでよい。例えば、図１ｂ及び２ｂに示すＶＬ領域に基づく特異的結合メンバーは、そのＣ末端でヒトＣκ又はＣλ鎖を含む抗体軽鎖定常ドメインに結合させることができる。同様に、図ｂ及び図２ｂに示されるＶＨ領域に基づく５つの特異的結合メンバーは、そのＣ末端で、任意の抗体アイソタイプ、例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＥ及びＩｇＭ並びにアイソタイプサブクラス、特にＩｇＧ１、ＩｇＧ２及びＩｇＧ４のいずれかに由来する免疫グロブリン重鎖の全部又は一部に結合させることができる。

【００７５】

一実施形態において、該結合メンバーは、次の順序で、１）リーダー配列、２）重鎖可変領域、３）３×ＧＧＧＧＳスペーサー、４）軽鎖可変領域、並びに５）ポリ－Ａｌａ及び精製のための６×Ｈｉｓタグを含むｓｃＦｖである。別の実施形態において、該結合メンバーは、次の順序で、１）リーダー配列、２）軽鎖可変領域、３）３×ＧＧＧＧＳスペーサー、及び４）重鎖可変領域を含み、必要に応じてさらに５’又は３’精製タグのいずれかを含むｓｃＦｖである。別の実施形態において、該結合メンバーは、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）の形態で提供される。ＣＡＲはまた、人工的なＴ細胞受容体、キメラＴ細胞受容体、又はキメラ免疫受容体として知られ得る。一実施形態において、該結合メンバーが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）の形態で提供されるｓｃＦｖである場合、重鎖－軽鎖配向又は軽鎖－重鎖配向のいずれかで提供され得る。

【００７６】

本発明の特異的結合メンバーは、ヒト又は動物対象における腫瘍の診断及び治療の方法で使用することができる。診断で使用される場合、本発明の特異的結合メンバーは、抗体イメージングの分野で公知の従来の化学を用いて、本発明の特異的結合メンバーに結合させることができる検出可能な標識、例えば、^{131}Ｉ又は^{99}Ｔｃなどの放射性標識で標識することができる。標識はまた、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素標識を含む。標識はさらに、特定の同族の検出可能な部分、例えば、標識されたアビジンへの結合を介して検出され得るビオチンなどの化学部分を含む。

【００７７】

本発明の特異的結合メンバーは、それ自体、癌細胞を死滅させるのに有効であることが示されているが、さらに機能性標識で標識することができる。機能性標識は、癌の破壊を引き起こすために、癌部位を標的にするように設計される物質を含む。そのような機能性標識は、リシンなどの毒素及び活性薬物にプロドラッグを変換することが可能な細菌のカルボキシペプチダーゼ又はニトロ還元酵素などの酵素を含む。加えて、特異的結合メンバーは、メイタンシン（ＤＭ１及びＤＭ４）、オニド（ｏｎｉｄｅ）、アウリスタチン、カリケアマイシン、デュオカマイシン、ドキソルビシンなどの化学療法薬若しくは細胞傷害性薬、又は^{90}Ｙ若しくは^{131}Ｉなどの放射性標識に結合するか、又はそうでなければ会合し得る。

【００７８】

さらに、本発明の特異的結合メンバーは、単独で又は他の治療と組み合わせて、治療すべき症状に依存して同時に又は順次投与することができる。したがって、本発明はさらに、腫瘍の治療における、同時、別々又は逐次使用のための組合せ製剤として本発明の特異的結合メンバー及び活性剤を含有する生成物を提供する。活性剤は、本発明の結合メンバーと相乗的に機能することができる、５－フルオロウラシル、シスプラチン、マイトマイシンＣ、オキサリプラチン及びタモキシフェンを含む化学療法剤又は細胞傷害性薬を含むことができる。他の活性剤は、適切な用量の非ステロイド性抗炎症薬（例えば、アスピリ

ン、パラセタモール、イブプロフェン又はケトプロフェン）などの疼痛緩和薬物又はモルヒネなどのオピエート、又は制吐薬を含むことができる。

【００７９】

理論に束縛されることを望まないが、腫瘍の死滅を高めるために活性剤と相乗作用する本発明の結合メンバーの能力は、免疫エフェクターメカニズムに起因するのではなく、むしろ糖タンパク質にのみ付着するシアリル－ジ－ルイス^{a}及びシアリル－ルイス$^{a-x}$及びモノ－シアリル－ルイス^{a}が結合した細胞表面への結合メンバーの結合の直接的な結果であり得る。

【００８０】

本発明の特異的結合メンバーは、通常、特異的結合メンバーに加えて少なくとも１つの成分を含み得る医薬組成物の形態で投与される。

【００８１】

該医薬組成物は、有効成分に加えて、当業者に周知の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、担体、緩衝剤、安定剤又は他の材料を含み得る。このような材料は、非毒性であるべきであり、有効成分の有効性に干渉すべきでない。担体又は他の材料の正確な性質は、経口、又は例えば、静脈内の注射によるものであり得る投与経路に依存する。

【００８２】

カテーテル又は他の外科チューブを通した送達も使用されるが、注射は、組成物の治療的投与のための主要経路であると考えられる。投与のいくつかの適切な経路には、静脈内、皮下、腹腔内及び筋肉内投与が含まれる。液体製剤は、粉末製剤から再構成した後に利用することができる。

【００８３】

静脈内注射、又は罹患部位での注射については、有効成分は、発熱物質を含まず、適切なｐＨ、等張性及び安定性を有する非経口的に許容される水溶液の形態である。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸加リンゲル注射液などの等張性ビヒクルを使用して適切な溶液を調製することが十分可能である。必要に応じて、防腐剤、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤及び／又は他の添加剤が含まれ得る。

【００８４】

経口投与のための医薬組成物は、錠剤、カプセル、粉末又は液体の形態であり得る。錠剤は、ゼラチン又はアジュバントなどの固体担体を含み得る。液体医薬組成物は、一般に、水、石油、動物油若しくは植物油、鉱油又は合成油などの液体担体を含む。生理食塩水、デキストロース又は他の糖類溶液又はエチレングリコール、プロピレングリコール又はポリエチレングリコールなどのグリコールが含まれてよい。製剤が液体である場合は、例えば、ｐＨ６．８～７．６の非リン酸緩衝液を含有する生理的食塩水又は凍結乾燥粉末であり得る。

【００８５】

該組成物はまた、ミクロスフェア、リポソーム、他の微粒子送達系又は血液を含む特定の組織に配置された徐放性製剤を介して投与することができる。徐放性担体の適切な例は、共有品、例えば、坐剤又はマイクロカプセルの形態の半透性ポリマーマトリックスを含む。移植可能な又はマイクロカプセル徐放マトリックスは、Ｌ－グルタミン酸及びγエチル－Ｌ－グルタメートのポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号；ＥＰ－Ａ－００５８４８１）共重合体［４３］、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）を含む。ポリペプチドを含有するリポソームは、周知の方法によって調製される：ＤＥ　３，２１８，１２１Ａ；Ｅｐｓｔｅｉｎら，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ，８２：３６８８－３６９２，１９８５；Ｈｗａｎｇら，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ，７７：４０３０－４０３４，１９８０；ＥＰ－Ａ－００５２５２２；ＥＰ－Ａ－００３６６７６；ＥＰ－Ａ－００８８０４６；ＥＰ－Ａ－０１４３９４９；ＥＰ－Ａ－０１４２５４１；ＪＰ－Ａ－８３－１１８０８；米国特許第４，４８５，０４５号及び同第４，５４４，５４５号。通常、リポソームは、コレステロールの脂質含量が約３０モル％を超える小さな（約２００～８００オングストローム）単層タイプのものであり、選択される割合は、ポリペプチド漏出の最適速度に調整さ

れる。

【００８６】

該組成物は、腫瘍部位又は他の所望の部位に局所的に投与されるか、又は腫瘍若しくは他の細胞を標的とする様式で送達され得る。

【００８７】

該組成物は、好ましくは、「治療有効量」で個体に投与され、これは個体に恩恵をもたらすのに十分である。投与される実際の量、並びに投与の速度及び時間間隔は、治療されるものの性質及び重症度に依存する。治療の処方、例えば、投与量の決定などは、一般開業医及び他の医師の責任の範囲内であり、典型的には、治療される障害、個々の患者の状態、送達部位、投与方法及び開業医に公知の他の要因を考慮する。本発明の組成物は、既存の腫瘍、特に癌の治療に特に関連しており、初期治療又は手術後のそのような症状の再発の予防にある。上記の技術及びプロトコルの例は、レミントンの薬学、１６版、Ｏｓｌｏ，Ａ．（編）、１９８０［４５］に見出すことができる。

【００８８】

最適用量は、例えば、年齢、性別、体重、治療される状態の重症度、投与される有効成分及び投与経路を含むいくつかのパラメータに基づいて医師によって決定することができる。一般に、受容体の飽和を可能にするポリペプチド及び抗体の血清濃度が望ましい。約０．１ｎＭを超える濃度は、通常十分である。例えば、１００ｍｇ／ｍ^{2}の抗体用量は、約８日間、約２０ｎＭの血清濃度を提供する。

【００８９】

大まかなガイドラインとして、抗体の用量は、１０～３００ｍｇ／ｍ^{2}の量で毎週与えられ得る。抗体断片の等価用量が、ＬｅｃＬｅ^{X}糖鎖の飽和を可能にする濃度を超える血清レベルを維持するために、より頻繁に使用されるべきである。

【００９０】

該組成物の用量は、結合メンバー、例えば、その結合活性及びインビボ血漿半減期、製剤におけるポリペプチドの濃度、投与経路、投与の部位及び速度、関与する患者の臨床寛容、及び患者を苦しめる病的状態などの特性に依存し、十分に医師の技術の範囲内でもある。例えば、投与あたり、患者あたり３００□ｇの用量の抗体が好ましいが、投薬量は、用量当たり約１０μｇ～６ｍｇの範囲であり得る。異なる投薬量が、一連の逐次接種の間に利用される。施術者は、最初の接種を施し、次いで、比較的少ない用量の抗体で追加免疫することができる。

【００９１】

本発明はまた、癌に対する保護的免疫応答を高めるための免疫化スケジュールの最適化に関する。

【００９２】

本発明の結合メンバーは、化学合成によって全体的又は部分的に生成されてよい。該結合メンバーは、十分に確立された標準的な液体、又は、好ましくは、固相のペプチド合成法に従って容易に調製することができ、その一般的な説明は、広く利用可能である（例えば、Ｊ．Ｍ．Ｓｔｅｗａｒｔ及びＪ．Ｄ．Ｙｏｕｎｇ，（１９８４）［４６］、Ｍ．Ｂｏｄａｎｚｓｋｙ及びＡ．Ｂｏｄａｎｚｓｋｙ，（１９８４）［４７］を参照されたい）。あるいは、該結合メンバーは、液相法により、若しくは固相、液相及び溶液化学の任意の組み合わせによって、例えば、最初にそれぞれのペプチド部分を完成させ、次いで、所望及び適切な場合、存在する任意の保護基を除去した後、それぞれの炭酸若しくはスルホン酸又はその反応性誘導体の反応によって残基Ｘを導入することにより溶液中で調製することができる。

【００９３】

本発明に係る結合メンバーを生成する別の便利な方法は、発現系における核酸の使用によって、それをコードする核酸を発現させることである。

【００９４】

本発明はさらに、本発明の特異的結合メンバーをコードする単離核酸を提供する。核酸

は、ＤＮＡ及びＲＮＡを含む。好ましい態様において、本発明は、上記で定義した本発明の特異的結合メンバーをコードする核酸を提供する。そのような核酸の例は、図１及び２に示している。当業者は、本発明の特異的結合メンバーを依然として提供するそのような核酸への置換、欠失及び／又は付加を決定することができる。

【００９５】

本発明はまた、上記の少なくとも１つの核酸を含むプラスミド、ベクター、転写又は発現カセットの形態の構築物を提供する。本発明はまた、上記の１以上の構築物を含む組換え宿主細胞を提供する。上述の通り、コードしている核酸からの発現を含む特異的結合メンバーの生成方法と同様に、本発明の特異的結合メンバーをコードする核酸は、本発明の態様を形成する。適切な条件下で、核酸を含有する組換え宿主細胞を培養することによって、発現を都合よく達成することができる。発現による生成の後に、特異的結合メンバーを任意の適切な技術を用いて単離及び／又は精製し、次いで、適宜使用することができる。

【００９６】

様々な異なる宿主細胞におけるポリペプチドのクローニング及び発現のための系は周知である。適切な宿主細胞には、細菌、哺乳動物細胞、酵母及びバキュロウイルス系が含まれる。異種ポリペプチドの発現のために当技術分野で利用可能な哺乳動物細胞株には、チャイニーズハムスター卵巣細胞、ＨｅＬａ細胞、ベビーハムスター腎細胞、ＮＳＯマウス黒色腫細胞及び多くの他の物が含まれる。一般的な、好ましい細菌宿主は大腸菌である。大腸菌などの原核細胞における抗体及び抗体断片の発現は、当技術分野で十分に確立されている。総説に関しては、例えば、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（１９９１）［４８］を参照されたい。培養中の真核細胞における発現はまた、特異的結合メンバーの生成のための選択肢として当業者に利用可能であり、最近の総説については、例えば、Ｒｅｆｆ（１９９３）［４９］；Ｔｒｉｌｌら（１９９５）［５０］を参照されたい。

【００９７】

プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子及び必要に応じて他の配列を含む適切な調節配列を含有する適切なベクターを、選択又は構築することができる。ベクターは、必要に応じて、プラスミド、ウイルス、例えば、ファージ、又はファージミドであり得る。さらなる詳細については、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９）［５１］を参照されたい。例えば、核酸構築物、変異誘発、配列決定、細胞へのＤＮＡの導入及び遺伝子発現、並びにタンパク質の分析の調製における核酸の操作のための多くの既知の技術及びプロトコルは、Ａｕｓｕｂｅｌら（１９９２）［５２］に詳細に記載されている。

【００９８】

したがって、本発明のさらなる態様は、本明細書に開示される核酸を含有する宿主細胞を提供する。さらに別の態様は、宿主細胞中にそのような核酸を導入することを含む方法を提供する。導入は、任意の利用可能な技術を採用することができる。真核細胞用の適切な技術には、リン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン、エレクトロポレーション、リポソーム媒介トランスフェクション及びレトロウイルス又は他のウイルス、例えば、ワクシニア又は昆虫細胞についてはバキュロウイルスを用いた形質導入が含まれ得る。細菌細胞用の適切な技術には、バクテリオファージを用いた塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション及びトランスフェクションが含まれ得る。導入は、核酸からの発現を引き起こすか、又は可能にすることによって、例えば、遺伝子の発現のための条件下で宿主細胞を培養することによって行うことができる。

【００９９】

一実施形態において、本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム（例えば、染色体）に組み込まれる。組み込みは、標準的な技術に従って、ゲノムとの組換えを促進する配列を含めることによって促進することができる。

【０１００】

本発明の別の態様によれば、本発明による結合メンバーと同じエピトープへの結合につ

いて競合する結合メンバーが提供される。競合結合メンバーは、本明細書に記載の本発明による結合メンバーと同じ形式であるが、異なるＣＤＲ又は可変領域配列を有する。

【０１０１】

本発明はまた、上記の特異的結合メンバー又はポリペプチドを発現するために、発現系において上述した構築物を使用することを含む方法を提供する。

【０１０２】

本発明の各態様の好ましい特徴は、必要な変更を加えて他の態様のそれぞれの場合と同様である。本明細書に述べた先行技術文献は、法律で許される最大限の範囲まで組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【０１０３】

【図１ａ－１】図１ａ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのマウスＩｇＧ１重鎖のためのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す［５９］。

【図１ａ－２】図１ａ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのマウスＩｇＧ１重鎖のためのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す［５９］。

【図１ａ－３】図１ａ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのマウスＩｇＧ１重鎖のためのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す［５９］。

【図１ａ－４】図１ａ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのマウスＩｇＧ１重鎖のためのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す［５９］。

【図１ｂ－１】図１ｂ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのマウスκ鎖のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す

【図１ｂ－２】図１ｂ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのマウスκ鎖のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す

【図２ａ－１】トランスフェクト細胞株によって生成されたＦＧ１２９　ｍＡｂのキメラバージョン（ヒト定常領域配列に連結された元のマウス可変領域）は、標的細胞株（ＨＣＴ－１５）に結合する。図２ａ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのヒトＩｇＧ１重鎖のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す［５９］。

【図２ａ－２】トランスフェクト細胞株によって生成されたＦＧ１２９　ｍＡｂのキメラバージョン（ヒト定常領域配列に連結された元のマウス可変領域）は、標的細胞株（ＨＣＴ－１５）に結合する。図２ａ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのヒトＩｇＧ１重鎖のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す［５９］。

【図２ａ－３】トランスフェクト細胞株によって生成されたＦＧ１２９　ｍＡｂのキメラバージョン（ヒト定常領域配列に連結された元のマウス可変領域）は、標的細胞株（ＨＣＴ－１５）に結合する。図２ａ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのヒトＩｇＧ１重鎖のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す［５９］。

【図２ａ－４】トランスフェクト細胞株によって生成されたＦＧ１２９　ｍＡｂのキメラバージョン（ヒト定常領域配列に連結された元のマウス可変領域）は、標的細胞株（ＨＣＴ－１５）に結合する。図２ａ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのヒトＩｇＧ１重鎖のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す［５９］。

【図２ｂ－１】トランスフェクト細胞株によって生成されたＦＧ１２９　ｍＡｂのキメラバージョン（ヒト定常領域配列に連結された元のマウス可変領域）は、標的細胞株（ＨＣＴ－１５）に結合する。図２ｂ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのヒトκ鎖のアミノ酸配列及びヌク

レオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す［５９］。
【図２ｂ－２】トランスフェクト細胞株によって生成されたＦＧ１２９　ｍＡｂのキメラバージョン（ヒト定常領域配列に連結された元のマウス可変領域）は、標的細胞株（ＨＣＴ－１５）に結合する。図２ｂ：ＦＧ１２９　ｍＡｂのヒトκ鎖のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列。番号は、抗体配列の番号付けのための標準化されたＩＭＧＴシステムを指す［５９］。
【図３ａ】ＣＦＧによってガラススライド上に配列された６００を超えるグリカンに対するＦＧ１２９のＥＬＩＳＡスクリーニング。正方形はグルコシルアミンを表し、円はガラクトースを表し、三角はフコースを表し、ひし形はシアル酸を表す。
【図３ｂ】ｍＡｂ　ＦＧ１２９及びｍＡｂ　ｃｈ　１２９（１μｇ／ｍｌ）によって認識される抗原の間接的なウェスタンブロット分析。レーンＭ：分子量マーカー（赤）。レーン１：Ｃｏｌｏ２０５細胞溶解物（１×１０^{5}個の細胞）；レーン２：Ｃｏｌｏ２０５　ＴＧＬ（１×１０^{6}個の細胞）；レーン３：ＨＣＴ－１５細胞溶解物（１×１０^{5}個の細胞）；レーン４：ＨＣＴ－１５　ＴＧＬ（１×１０^{6}個の細胞）；レーン５：ＢｘＰｃ３細胞溶解物（１×１０^{5}個の細胞）；レーン６：ＢｘＰｃ３　ＴＧＬ（１×１０^{6}個の細胞）；レーン７：ＬＳ１８０細胞溶解物（１×１０^{5}個の細胞）；レーン８：ＬＳ１８０　ＴＧＬ（１×１０^{6}個の細胞）。陰性対照には一次抗体を含めなかった。ＣＡ１９．９は、糖脂質並びに糖タンパク質上のシアリルールイス^{a}を認識する陽性対照として使用した。
【図４】シアリルールイス^{a}－ＨＳＡに結合するＦＧ１２９及びＣＨ１２９のＥＬＩＳＡ分析。ＣＡ１９．９を、糖脂質並びに糖タンパク質上のシアリルールイス^{a}を認識する陽性対照として使用した。陰性対照は、シアリルールイス^{a}を認識しないアイソタイプ抗体、ＨＳＡコーティングウェル、抗原を含めない非コーティングウェル、及びＦＧ１２９を含めないウェルからなっていた。エラーバーは、重複ウェルの平均±ＳＤを表す。
【図５ａ】結腸直腸、膵臓、胃、卵巣及び肺のＴＭＡへのＩＨＣによるＦＧ１２９（１μｇ／ｍｌ）の結合。異なるｉ）陰性、ｉｉ）弱い、ｉｉｉ）中程度及びｉｖ）強い染色レベルの代表的な画像（倍率２０倍）が示されている。
【図５ｂ】ＦＧ１２９　ｍＡｂで染色した膵臓癌患者の無病生存期間のカプラン－マイヤー分析。低いカットオフに対する高いカットオフをＸ－タイルによって決定した。
【図５ｃ】１）胆嚢；２）回腸；３）肝臓；４）食道；５）膵臓；６）甲状腺（倍率２０倍）において非常に限られた結合を示すＦＧ１２９の正常ヒト組織（ＡＭＳＢＩＯ）結合。
【図６ａ】腫瘍細胞株の細胞表面に結合するＦＧ１２９及びＣＨ１２９（５μｇ／ｍｌ）ｍＡｂの間接的免疫蛍光染色並びにフローサイトメトリー分析。
【図６ｂ】ＨＵＶＥＣ正常臍帯細胞の細胞表面に結合するＦＧ１２９（５μｇ／ｍｌ）ｍＡｂの間接的免疫蛍光染色及びフローサイトメトリー分析。抗ＣＤ５５　ｍＡｂを陽性対照として使用し、抗ＩｇＧアイソタイプ抗体を陰性対照として使用した。
【図６ｃ】全血に結合するＦＧ１２９及びｃｈ１２９（５μｇ／ｍｌ）ｍＡｂの間接的免疫蛍光染色及びフローサイトメトリー分析。抗ＨＬＡ　ｍＡｂ　ｗ６／３２を陽性対照として使用し、抗ＩｇＧアイソタイプ抗体を陰性対照として使用した。
【図７】Ｃｏｌｏ２０５（７ａ）、ＨＣＴ－１５（７ｂ）、ＢｘＰｃ３（７ｃ）及びＬＳ１８０（７ｄ）細胞の細胞表面に結合するＦＧ１２９　ｍＡｂ及びＣＨ１２９　ｍＡｂの滴定の間接的免疫蛍光染色及びフローサイトメトリー分析。
【図８】ＦＧ１２９及びＣＨ１２９によるＣｏｌｏ２０５（８ａ）及びＨＣＴ－１５（８ｂ）のＡＤＣＣ死滅。アービタックスを陽性対照として使用し、ＰＢＭＣ及び細胞単独を陰性対照として使用した。Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ６を使用して実行したＡｎｏｖａ検定は、各濃度とＰＢＭＣのみを有する細胞からなる陰性対照の間の有意差を示す。
【図９】ＦＧ１２９及びＣＨ１２９によるＣｏｌｏ２０５のＣＤＣ死滅。アービタックスを陽性対照として使用し、ＰＢＭＣ及び細胞単独を陰性対照として使用した。Ｇｒａｐｈ

ｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ６を使用して実行したＡｎｏｖａ検定は、各濃度とＰＢＭＣのみを有する細胞からなる陰性対照の間の有意差を示す。
【図１０】生存Ｃｏｌｏ２０５、ＢｘＰＣ３及びＨＣＴ－１５においてリソソームと共局在を示すアレクサフルオロ（登録商標）４８８（緑色）標識ＦＧ１２９（パネル１０ａ）及びＣＨ１２９（パネル１０ｂ）内部移行のＺスタック共焦点顕微鏡。原形質膜は、ＣｅｌｌＭａｓｋ（商標）オレンジ（赤／Ｃ）で標識し、リソソームをＬｙｓｏＴｒａｃｋｅｒ（登録商標）ディープレッド（紫／Ｄ）で標識し、核をヘキスト３３２５８（青／Ａ）（倍率６０倍）で標識した。
【図１１ａ】抗原陽性（ＨＣＴ１５、Ｃｏｌｏ２０５、ＢｘＰＣ３、ＡＳＰＣ１）及び抗原陰性（ＬｏＶｏ、ＬＳ１８０）癌細胞株におけるＦａｂ－ＺＡＰ－ＦＧ１２９の細胞傷害性。サポリン結合抗マウスＩｇＧ　Ｆａｂ断片とプレインキュベートした内部移行済みＦＧ１２９の細胞傷害性を、^{3}Ｈ－チミジン取り込みを用いて評価した。結果を、一次ｍＡｂのみで処理した細胞の増殖率として示す。エラーバーは、４つの独立した実験からの平均±ＳＤを示す。
【図１１ｂ】Ｆａｂ－ＺＡＰ－ＩｇＧアイソタイプの内部移行アッセイ。結果を、正規化した、一次ｍＡｂのみで処理した細胞の増殖率として示す。エラーバーは、３つの独立した実験からの平均±ＳＤを示す。
【図１１ｃ】ＨＣＴ１５、Ｃｏｌｏ２０５、ＢｘＰＣ３癌細胞株に対するＦａｂ－ＺＡＰ－ＣＨ１２９の細胞傷害性。サポリン結合抗ヒトＩｇＧ　Ｆａｂ断片とプレインキュベートした内部移行済みＣＨ１２９の細胞傷害性を、^{3}Ｈ－チミジン取り込みを用いて評価した。結果を、正規化した、一次ｍＡｂのみで処理した細胞の増殖率として示す。エラーバーは、４つの独立した実験からの平均±ＳＤを示す。
【図１１ｄ】Ｆａｂ－ＺＡＰ－ＩｇＧアイソタイプの内部移行アッセイ。結果を、正規化した、一次ｍＡｂのみで処理した細胞の増殖率として示す。エラーバーは、３つの独立した実験からの平均±ＳＤを示す。
【図１１ｅ】Ｃｏｌｏ２０５上のＣＨ１２９－ＡＤＣ構築物のインビトロ有効性を示すＷＳＴ８細胞傷害性アッセイ。全３つのＣＨ１２９－ＡＤＣ構築物は細胞を１００％死滅させ、ｖｃＥ構築物は最も高い有効性を与え（Ｅｃ５０～10^{-11}Ｍ）、続いてＤＭ１及びＤＭ４構築物は同様の有効性（Ｅｃ５０～10^{-10}Ｍ）を示す。
【図１１ｆ】ＨＣＴ－１５上のＣＨ１２９－ＡＤＣ構築物のインビトロ有効性を示すＷＳＴ８細胞傷害性アッセイ。ＣＨ１２９構築物は５０～６０％の細胞死滅を示す。リツキシマブ－ＡＤＣ構築物は、特異的死滅のための対照として使用した。Ｒｉｔｕｘ－ｖｃＥ及びＲｉｔｕｘ－ＤＭ１は細胞死滅を示さない。Ｒｉｔｕｘ－ＤＭ４は、ＣＨ１２９構築物に類似した死滅活性を示し、非特異的細胞死滅を示す。
【図１１ｇ】ＣＨ１２９－ｖｃＥ構築物のバイスタンダー死滅を示すＷＳＴ８細胞傷害性アッセイ。
【図１１ｈ】ＣＨ１２９－ＤＭ４構築物のバイスタンダー死滅を示すＷＳＴ８細胞傷害性アッセイ。
【図１１ｉ】ＣＨ１２９－ＤＭ１構築物のバイスタンダー死滅を示すＷＳＴ８細胞傷害性アッセイ。
【図１２ａ】膵臓癌患者の血清において分泌シアリルールイス^{a}を検出するためのＦＧ１２９を用いたサンドイッチＥＬＩＳＡ。陰性対照は、健康なドナーの正常血清試料及び２％ＢＳＡ－ＰＢＳのみからなっていた。シアリルールイス^{a}－ＨＳＡを陽性対照として使用した。
【図１２ｂ】膵臓ＴＭＡコホートの患者の血清とプレインキュベートしたＦＧ１２９のＨＣＴ－１５細胞株への結合を示す競合ＦＡＣＳアッセイ。陽性対照は、５人の健康なドナーの正常血清試料（５人の平均として示される）、及びＦＧ１２９とプレインキュベートした２％ＢＳＡ－ＰＢＳからなっていた。陰性対照は、ＦＧ１２９とプレインキュベートしたシアリルールイス^{a}－ＨＳＡ及び２％ＢＳＡ－ＰＢＳのみからなっていた。
【図１３ａ－１】１）リーダー配列、２）重鎖可変領域、３）３×ＧＧＧＧＳスペーサー

、４）軽鎖可変領域、５）ポリ－Ａｌａ及び精製のための６×Ｈｉｓタグで構成されるＦＧ１２９－ｓｃＦｖの配列。
【図１３ａ－２】１）リーダー配列、２）重鎖可変領域、３）３×ＧＧＧＧＳスペーサー、４）軽鎖可変領域、５）ポリ－Ａｌａ及び精製のための６×Ｈｉｓタグで構成されるＦＧ１２９－ｓｃＦｖの配列。
【図１３ｂ】シアリル－ルイス^{a}－ＨＳＡに結合するＦＧ１２９－ｓｃＦｖ及びＣＨ１２９のＥＬＩＳＡ分析。エラーバーは、重複ウェルの平均±ＳＤを表す。
【図１３ｃ】Ｃｏｌｏ２０５の細胞表面に結合するＦＧ１２９－ｓｃＦｖの滴定の間接的免疫蛍光染色及びフローサイトメトリー分析。
【発明を実施するための形態】
【０１０４】
ここで、本発明を、以下の非限定的な実施例及び添付の図面でさらに説明する。
【０１０５】
方法
腫瘍細胞株への結合：１×１０^{5}癌細胞を、１時間、４℃で５０μｌの一次抗体とインキュベートした。細胞を、２００μｌのＲＰＭＩ　１０％新生仔ウシ血清（ＮＢＣＳ：Ｓｉｇｍａ，Ｐｏｏｌｅ，ＵＫ）で洗浄し、５分間、１，０００ｒｐｍで回転させた。上清を廃棄し、５０μｌのＦＩＴＣコンジュゲート抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ特異的ｍａｂ（Ｓｉｇｍａ、ＲＰＭＩ　１０％ＮＢＣＳ中１／１００）を二次抗体として使用した。細胞を暗所で、４℃で１時間インキュベートし、次いで、２００μｌのＲＰＭＩ　１０％ＮＢＣＳで洗浄し、５分間、１，０００ｒｐｍで回転させた。上清を廃棄した後、０．４％ホルムアルデヒドを用いて、細胞を固定した。試料を、ベックマン・コールターＦＣ－５００フローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｈｉｇｈ　Ｗｙｃｏｍｂｅ，ＵＫ）で分析した。生データを分析し、プロットするために、ＷｉｎＭＤＩ　２．９ソフトウェアを使用した。ＦＧ１２９の細胞抗体結合部位（３０μｇ／ｍｌで使用）を、製造業者の推奨に従ってＱＩＦＩＫＩＴ（登録商標）（Ｄａｋｏ　ＵＫ社）を用いて計算した。アイソタイプ対照の非特異的結合を差し引いて、特異的抗体結合能（ＳＡＢＣ）を得た。
【０１０６】
血液への結合：５０μｌの健康なドナーの血液を１時間、４℃で５０μｌの１次抗体とインキュベートした。血液を１５０μｌのＲＰＭＩ　１０％ＮＢＣＳで洗浄し、５分間、１，０００ｒｐｍで回転させた。上清を廃棄し、５０μｌのＦＩＴＣコンジュゲート抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ特異的ｍＡｂ（ＲＰＭＩ　１０％ＮＢＣＳで１／１００）を二次抗体として使用した。細胞を暗所で、４℃で１時間インキュベートし、次いで、１５０μｌのＲＰＭＩ　１０％ＮＢＣＳで洗浄し、５分間、１，０００ｒｐｍで回転させた。上清を廃棄した後、５０μｌ／ウェルのＣａｌ－Ｌｙｓｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｐａｉｓｌｅｙ，ＵＫ）を用い、その後、５００μｌ／ウェルの蒸留水を用いて、赤血球を溶解した。血液を、その後、５分間、１，０００ｒｐｍで回転させた。上清を廃棄し、０．４％ホルムアルデヒドを用いて、細胞を固定した。試料を、ＦＣ－５００フローサイトメーター（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）で分析した。生データを分析し、プロットするために、ＷｉｎＭＤＩ　２．９ソフトウェアを使用した。
【０１０７】
原形質膜糖脂質抽出：Ｃｏｌｏ２０５細胞ペレット（５×１０^{7}個の細胞）を５００μｌのマンニトール／ＨＥＰＥＳ緩衝液（５０ｍＭのマンニトール、５ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．２、両方ともＳｉｇｍａ）に再懸濁し、３０パルスで３本の針（２３Ｇ、２５Ｇ、２７Ｇ）それぞれに通した。５μｌの１Ｍ　$CaCl_2$を細胞に添加し、上記のように３０パルスで３本の針それぞれに通した。剪断細胞を２０分間、氷上でインキュベートし、次いで、室温で１５分間、３，０００ｇで回転した。上清を回収し、４℃で３０分間、４８，０００ｇで回転させ、上清を廃棄した。ペレットを１ｍｌのメタノール、続いて、１ｍｌのクロロホルムに再懸濁し、室温で３０分間、回転させながらインキュベートした。次いで、試料を１０分間、１，２００ｇで回転させ、沈殿したタンパク質を除去した。

原形質膜糖脂質を含有する上清を収集し、－２０℃で保存した。

【０１０８】

グライコーム分析：さらにＦＧ１２９　ｍＡｂの細かい特異性を明確にするために、該抗体を機能的グライコミクスのためのコンソーシアムに送り、そこで、６００以上の天然及び合成グリカンに対してスクリーニングした。簡単に説明すると、アミノリンカーを有する合成及び哺乳類グリカンを、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）活性化ガラス顕微鏡スライド上にプリントし、アミド結合を形成させた。プリントしたスライドを、１時間、１μｇ／ｍｌの抗体とインキュベートし、その後、アレクサ４８８コンジュゲートヤギ抗マウスＩｇＧを用いて結合を検出した。次いで、スライド乾燥させ、スキャンし、スクリーニングデータを、機能的グライコミクスのためのコンソーシアムのデータベースと比較した。

【０１０９】

親和性解析

表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ、ビアコアＸ又は３０００、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）分析を用いて、ＦＧ１２９　ｍＡｂのリアルタイム結合動態を調べた。多価シアリルＬｅ^{a}－ＨＳＡ（Ｉｓｏｓｅｐ　ＡＢ、Ｔｕｌｌｉｎｇｅ、Ｓｗｅｄｅｎ）を、製造業者の説明書に従って、ＣＭ５バイオセンサーチップ上に結合させ、参照細胞を同様に処理するが、シアリルＬｅ^{a}コンジュゲートを省いた。ＨＢＳ－Ｐ緩衝液（１０ｍｍｏｌ／ＬのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１５０ｍｍｏｌ／ＬのＮａＣｌ、０．００５％（ｖ／ｖ）の界面活性剤Ｐ２０）で希釈したＦＧ１２９、ＣＨ１２９及びｓｃＦｖ１２９　ｍＡｂを、５０μｌ／分の流速でチップに通して流し、ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェア４．１を用いて、動態結合パラメータを決定し、それから親和性を計算した。

【０１１０】

ルイス抗原及び唾液サンドイッチＥＬＩＳＡ

ＥＬＩＳＡプレートを、１００ｎｇ／ウェルのルイス－ＨＳＡ抗原（Ｉｓｏｓｅｐ）と４℃で一晩コーティングし、ＰＢＳ／ＢＳＡでブロックし、一次ｍＡｂとインキュベートした（直接ＥＬＩＳＡ）。抗体又はルイス抗原の結合は、ビオチン化二次ｍＡｂ（Ｓｉｇｍａ）を用いて検出した。プレートを、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰＯ）コンジュゲート（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）とインキュベーションした後に、ＴｅｃａｎのインフィニットＦ５０により４５０ｎｍで読み取った。

【０１１１】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びウェスタンブロット分析：簡単に説明すると、Ｃｏｌｏ２０５細胞溶解物、原形質膜、総脂質抽出物、原形質膜の脂質抽出物又はＨＣＴ－１５細胞溶解物の1×10^{5}又は10^{6}個の細胞当量を、ＦＧ１２９結合について分析した。腫瘍細胞総数及び原形質膜の脂質抽出物及び細胞溶解物を、ジチオスレイトール（ＤＴＴ；Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，Ｌｏｕｇｈｂｏｒｏｕｇｈ，ＵＫ）で還元し、ＮＯＶＥＸ　４％～１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてＳＤＳ－ＰＡＧＥに供し、１時間、３０Ｖで、１×トランスファー緩衝液（２０倍、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及び２０％（ｖ／ｖ）のメタノールを用いてイモビロン－ＦＬ　ＰＶＤＦ膜（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｗａｔｆｏｒｄ，ＵＫ）に移した。膜を、０．０５％（ｖ／ｖ）のＴｗｅｅｎ－ＰＢＳ中５％（ｗ／ｖ）の脱脂粉乳で１時間ブロッキングし、次いで、Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで希釈した一次抗体、２％ＢＳＡで１時間プローブした。一次抗体結合を、ビオチンコンジュゲート抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ特異的二次抗体（Ｓｉｇｍａ；Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳ、２％ＢＳＡで１／２０００希釈）を用いて１時間検出し、ＩＲＤｙｅ　８００ＣＷストレプトアビジン（ＬＩＣＯＲ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＵＫ；Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳ　２％ＢＳＡで１／１０００）を用いて可視化した。

【０１１２】

ＦＧ１２９重鎖及び軽鎖可変領域の同定

細胞供給源及びトータルＲＮＡの調製：ハイブリドーマＦＧ１２９の約5×10^{6}個の

細胞を、組織培養物から採取し、ＰＢＳで１回洗浄し、細胞ペレットを５００μｌのトリゾール（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で処理した。製造業者のプロトコルに従って、細胞を試薬で分散させた後、ＲＮＡ調製まで－８０℃で保存した。ＲＮＡ濃度及び純度を、ナノドロップによって決定した。ｃＤＮＡ合成に先立ち、ＲＮＡをＤＮアーゼＩ処理し、製造業者の推奨に従って、ゲノムＤＮＡ混入物を除去した（ＤＮアーゼＩ組換え、ＲＮアーゼ含まない、Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｂｕｒｇｅｓｓ　Ｈｉｌｌ，ＵＫ）。

【０１１３】

ｃＤＮＡ合成：製造業者（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）のプロトコルに従って、第１鎖ｃＤＮＡ合成キット及びＡＭＶ逆転写酵素を用いて、３μｇのトータルＲＮＡから第１鎖ｃＤＮＡを調製した。ｃＤＮＡ合成後、１０分間、９０℃でインキュベートすることによって逆転写酵素活性を止め、ｃＤＮＡを－２０℃で保存した。

【０１１４】

ｃＤＮＡの品質を評価するためのＧＡＰＤＨ　ＰＣＲ：ＰＣＲを用いて、ｃＤＮＡの質を評価した。マウスＧＡＰＤＨハウスキーピング遺伝子に特異的なプライマー（５’－ＴＴＡＧＣＡＣＣＣＣＴＧＧＣＣＡＡＧＧ－３’及び５’－ＣＴＴＡＣＴＣＣＣＴＴＧＧＡＧＧＣＣＡＴＧ－３’）を、３５サイクル（９５℃で３分、続いて、９４℃／３０秒、５５℃／３０秒、７２℃／１分の３５サイクル、７２℃で１０分の最終研磨工程）で、ホットスタートＴａｑポリメラーゼ（ＡｍｐｌｉＴａｑゴールド３６０、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と共に用いた。増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって評価した。

【０１１５】

ＦＧ１２９可変領域をクローニングするためのＰＣＲプライマー設計：プライマーを、ＰＣＲ産物の配列データに基づいて、重鎖及び軽鎖可変領域を増幅するように設計した。プライマーを、ｈＩｇＧ１／カッパ二重発現ベクターｐＤＣＯｒｉｇ－ｈＩｇＧ１中の特有の制限酵素部位への関連する鎖のクローニングを可能にするように設計した。各５’プライマーは、定義された可変領域の開始コドン及びリーダーペプチドを標的化し、コザックコンセンサスは開始コドンのすぐ５’側に存在した。各３’プライマーは、鎖のクローニング後に読み枠を維持するため、及び接合領域／定常領域接合部に通常見られるアミノ酸配列を保存するために、抗体配列の接合領域に相補的となるように設計した。全てのプライマーは、Ｅｕｒｏｆｉｎｓ　ＭＷＧ（Ｅｂｅｒｓｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）から購入した。

【０１１６】

重鎖可変領域ＰＣＲ：免疫グロブリン重鎖可変領域の使用を、以前に公開されたプライマーのセット［６０］を用いてＰＣＲを用いて決定した。マウスｍＡｂアイソタイピングテストキット（Ｓｅｒｏｔｅｃ，Ｏｘｆｏｒｄ，ＵＫ）を使用した以前の結果は、ＦＧ１２９が両方のマウスＩｇＧ３抗体であることを示した。したがって、適切な定常領域リバースプライマーを用いて、定常領域から増幅した。以前に決定した抗体サブクラスに特異的な１２匹のマウスのＶＨ領域特異的５’プライマー及び３’プライマーを用いて、３５サイクル（９４℃で５分、続いて、９４℃／１分、６０℃／１分、７２℃／２分の３５サイクル、７２℃で２０分の最終研磨工程）で、ホットスタートＴａｑポリメラーゼを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって評価した。積極的な増幅がＶＨ４プライマーについて得られた。

【０１１７】

軽（κ）鎖可変領域のＰＣＲ：免疫グロブリン軽鎖可変領域の使用を、以前に公開されたプライマーのセット［６０］を用いてＰＣＲを用いて決定した。マウスｍＡｂアイソタイピングテストキットを使用した以前の結果は、ＦＧ１２９が、κ軽鎖を使用したことを示した。マウスＶκ領域特異的５’及び３’マウスＣκ特異的プライマーを用いて、３５サイクル（９４℃で５分、続いて、９４℃／１分、６０℃／１分、７２℃／２分の３５サイクル、７２℃で２０分の最終研磨工程）で、ホットスタートＴａｑポリメラーゼを用いてＰＣＲ増幅を行った。増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって評価した。ＦＧ１２９のＶκ１及びＶκ２のプライマーを用いて積極的な増幅が得られた。

【０１１８】
ＰＣＲ産物の精製及び配列決定：ＰＣＲ産物をＱｉａｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｃｒａｗｌｅｙ，ＵＫ）を用いて精製した。得られたＤＮＡの濃度を、ナノドロップによって決定し、アガロースゲル電気泳動によって純度を評価した。ＰＣＲ産物を、ノッティンガム大学のＤＮＡ配列決定施設（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｏｔｔｉｎｇｈａｍ．ａｃ．ｕｋ／ｌｉｆｅ－ｓｃｉｅｎｃｅｓ／ｆａｃｉｌｉｔｉｅｓ／ｄｎａ－ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ／ｉｎｄｅｘ．ａｓｐｘ）で元の５’及び３’ＰＣＲプライマーを用いて配列決定した。ＩＭＧＴデータベース検索機能（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴ＿ｖｑｕｅｓｔ／ｖｑｕｅｓｔ？ｌｉｖｒｅｔ＝０＆Ｏｐｔｉｏｎ＝ｍｏｕｓｅＩｇ）を用いて配列を解析した（Ｖ領域同定、接合分析）。配列決定により、ＦＧ１２９が以下のファミリーの重鎖及び軽鎖可変領域：重鎖；ＩＧＨＶ６－６＊０１、ＩＧＨＪ１＊０１、軽鎖；ＩＧＫＶ１２－４１＊０１、ＩＧＫＪ１＊０１を有することが示された。十分な残留定常領域が重鎖配列中に存在し、ＦＧ１２９がｍＩｇＧ１サブクラスのものであることが確認された。

【０１１９】
クローニング方法：クローニングのためのＰＣＲ産物を、プルーフリーディングポリメラーゼ（Ｐｈｕｓｉｏｎ，Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を用いて作製し、ＴＡベクター（ｐＣＲ２．１；インビトロジェン）にクローニングした。

【０１２０】
クローニングのためのＦＧ１２９重鎖／軽鎖ＰＣＲ：ＰＣＲ増幅をプルーフリーディングポリメラーゼ（Ｐｈｕｓｉｏｎ；ＮＥＢ）及び上記のクローニングプライマーを用いて、以前に記載したＦＧ１２９　ｃＤＮＡテンプレートを用いて、３５サイクル（９８℃で３分、続いて、９８℃／３０秒、５８℃／３０秒、７２℃／４５秒の３５サイクル、７２℃で３分の最終研磨工程）で行った。増幅の成功が、アガロースゲル電気泳動により確認された。

【０１２１】
ＴＯＰＯ軽鎖クローニング：増幅したＦＧ１２９軽鎖を、ＴＡクローニングと適合する「Ａ」オーバーハングを付加するために、７２℃で１５分間、Ｔａｑポリメラーゼ（ＮＥＢ）で処理した。処理したＰＣＲ産物を、ＴＯＰＯ　ＴＡベクターｐＣＲ２．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）とインキュベートし、製造業者の説明書に従って、化学的コンピテントＴＯＰ１０Ｆ’細胞に形質転換した。形質転換した細菌を、アンピシリン（８０μｇ／ｍｌ）補充ＬＢ寒天プレート上に広げ、次いで、３７℃で一晩インキュベートした。コロニーを液体培養（８０μｇ／ｍｌのアンピシリンを補充したＬＢ）で増殖させ、プラスミドＤＮＡを調製した（スピンミニプレップキット、Ｑｉａｇｅｎ）。インサートの存在を、ＢｓｉＷＩ及びＢａｍＨＩで逐次消化し、アガロースゲル電気泳動により確認した。配列決定を、Ｔ７及びＭ１３ｒｅｖプライマーを用いてコロニーからのミニプレップＤＮＡにて行った。１つのそのようなコロニーからのＤＮＡインサートは、予測されたＦＧ１２９軽鎖配列を有していた。３００ｍｌの細菌ＬＢ／アンピシリン培養物を一晩増殖させ、プラスミドＤＮＡをマキシプレップ（プラスミドマキシキット、Ｑｉａｇｅｎ）により調製した。マキシプレップＤＮＡインサートを配列決定により確認した。

【０１２２】
ＴＯＰＯ重鎖のクローニング：増幅したＦＧ１２９重鎖を、「Ａ」オーバーハングを付加するために、７２℃で１５分間、Ｔａｑポリメラーゼ（ＮＥＢ）で処理した。処理したＰＣＲ産物を、ＴＯＰＯ　ＴＡベクターｐＣＲ２．１とインキュベートし、上記の化学的コンピテントＴＯＰ１０Ｆ’細胞に形質転換した。形質転換した細菌を、アンピシリン補充ＬＢ寒天プレート上に広げ、次いで、３７℃で一晩インキュベートした。コロニーを液体培養（ＬＢ／アンピシリン）で増殖させ、プラスミドＤＮＡを調製した（スピンミニプレップキット）。インサートの存在を、ＨｉｎｄＩＩＩ及びＡｆｅＩで消化し、アガロースゲル電気泳動により確認した。配列決定を、Ｔ７及びＭ１３ｒｅｖプライマーを用いていくつかのコロニーからのミニプレップＤＮＡにて行った。１つのそのようなコロニーか

らのＤＮＡインサートは、予測されたＦＧ１２９重鎖配列を有していた。３００ｍｌの細菌ＬＢ／アンピシリン培養物を一晩増殖させ、プラスミドＤＮＡをマキシプレップ（プラスミドマキシキット、Ｑｉａｇｅｎ）により調製した。マキシプレップＤＮＡインサートを配列決定により確認した。

【０１２３】

ｐＤＣＯｒｉｇ－ｈＩｇＧ１二重発現ベクター軽鎖クローニング：ＦＧ１２９軽鎖を、ＢｓｉＷＩ及びＢａｍＨＩでの逐次消化により、ＴＯＰＯベクターｐＣＲ２．１から消化し、４００ｂｐのインサートＤＮＡを、製造業者の推奨に従ってＱＩＡｑｕｉｃｋゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いてアガロースゲルから精製した。このインサートを、予め調製したｐＤＣＯｒｉｇ－ｈＩｇＧ１ベクター（上記参照）に連結し、化学的コンピテントＴＯＰ１０Ｆ’細胞に形質転換した。形質転換体を、３５μｇ／ｍｌのゼオシンを補充したＬＢ寒天プレート上に広げ、次いで、３７℃で一晩インキュベートした。コロニーを液体培養（３５μｇ／ｍｌのゼオシンを補充したＬＢ）で増殖させ、プラスミドＤＮＡを調製した（スピンミニプレップキット、Ｑｉａｇｅｎ）。配列決定を、ヒトκ定常領域内に位置する配列決定用プライマーを使用して、全てのコロニーからのミニプレップＤＮＡにて行った。それらのコロニーの１つからのＤＮＡインサートは、ｐＤＣＯｒｉｇ－ｈＩｇＧ１に正しく挿入されたＦＧ１２９軽鎖予測配列を有していた。３００ｍｌの細菌ＬＢ／ゼオシン培養物を一晩増殖させ、プラスミドＤＮＡをマキシプレップ（プラスミドマキシキット、Ｑｉａｇｅｎ）により調製した。

【０１２４】

ｐＤＣＯｒｉｇ－ｈＩｇＧ１二重発現ベクター重鎖クローニング：ＦＧ１２９重鎖インサートを、ＨｉｎｄＩＩＩ及びＡｆｅＩでの消化により、ＴＯＰＯベクターｐＣＲ２．１から消化した。ＦＧ１２９κ軽鎖を含有するベクター（ｐＤＣＯｒｉｇ－ｈＩｇＧ１－１２９ｋ）（上記の調製）も、ＨｉｎｄＩＩＩ及びＡｆｅＩで消化した。次いで、ベクターＤＮＡを、製造業者の推奨に従ってホスファターゼ処理した（Ａｎｔａｒｃｔｉｃ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ，ＮＥＢ）。アガロースゲル電気泳動後、６．５ｋｂのｐＤＣＯｒｉｇ－ｈＩｇＧ１ベクターバンド及び４００ｂｐのＦＧ１２９Ｈのインサートバンドを、製造業者の推奨に従ってＱＩＡｑｕｉｃｋゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて単離した。このインサートを、ｐＤＣＯｒｉｇ－ｈＩｇＧ１ベクターに連結し、化学的コンピテントＴＯＰ１０Ｆ’細胞に形質転換した。形質転換体を、３５μｇ／ｍｌのゼオシンを補充したＬＢ寒天プレート上に広げ、次いで、３７℃で一晩インキュベートした。コロニーを液体培養（３５μｇ／ｍｌのゼオシンを補充したＬＢ）で増殖させ、プラスミドＤＮＡを調製した（スピンミニプレップキット、Ｑｉａｇｅｎ）。インサートの存在を、ＨｉｎｄＩＩＩ及びＡｆｅＩでの消化及びアガロースゲル電気泳動により確認した。配列決定を、ヒトＩｇＧ１定常領域内に位置する配列決定用プライマーを使用して、いくつかのコロニーからのミニプレップＤＮＡにて行った。それらのコロニーの１つからのＤＮＡインサートは、ｐＤＣＯｒｉｇ－ｈＩｇＧ１に正しく挿入されたＦＧ１２９重鎖予測配列を有していた。３００ｍｌの細菌ＬＢ／ゼオシン培養物を一晩増殖させ、プラスミドＤＮＡをマキシプレップ（プラスミドマキシキット、Ｑｉａｇｅｎ）により調製した。配列決定を用いて、重鎖と軽鎖の両方の座を確認した。

【０１２５】

キメラ抗体構築物の発現、精製及び特徴付け

本発明に記載のキメラ抗体の発現及び精製のための方法は、当技術分野で周知の方法を用いて達成することができる。簡単に説明すると、抗体を、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら［６１］の標準プロトコルに基づいて、プロテインＡ又はプロテインＧアフィニティークロマトグラフィーにより一過的に安定なトランスフェクト細胞又はその後に安定したトランスフェクト細胞から収集した上清から精製することができる。

【０１２６】

ＦＧ１２９－ｓｃＦｖのクローニング、発現、精製及び特徴付け

重鎖及び軽鎖可変領域を、リーダー；重鎖可変ドメイン；スペーサー（３×ＧＧＧＧＳ

）；軽鎖可変ドメイン；スペーサー（６×Ａｌａ）；精製タグ（６×Ｈｉｓ）の配向の単一ｓｃＦｖ配列中にインシリコで組み入れ、合成した。真核生物の発現ベクターにクローニングした後、Ｅｘｐｉ２９３細胞をトランスフェクトし、一過的に（６日間）タンパク質を生成させた。Ｈｉｓタグ付きｓｃＦｖを、固定化コバルトクロマトグラフィー（ＨｉＴｒａｐ　Ｔａｌｏｎ　１ｍｌカラム；ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いてＥｘｐｉ２９３上清から精製した。結合アッセイにおいて、ビオチン化抗Ｈｉｓタグ抗体を二次抗体（６×Ｈｉｓエピトープタグ抗体；ビオチンコンジュゲート、クローンＨＩＳ．Ｈ８；Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）として用いた。

【０１２７】

ＦＧ１２９の免疫組織化学的評価：ＦＧ１２９の治療的価値を決定するために、免疫組織化学（ＩＨＣ）によって膵臓、肺、胃、卵巣、結腸直腸癌組織マイクロアレイ上でスクリーニングした。

【０１２８】

方法：標準的なアビジン－ビオチンペルオキシダーゼ法を用いて、免疫組織化学を行った。パラフィン包埋組織切片を６０℃の熱ブロック上に置き、パラフィンを溶融した。組織切片をキシレンで脱パラフィン化し、段階的アルコールを通して再水和した。次いで、切片を、５００ｍｌのクエン酸緩衝液（ｐＨ６）に浸漬し、マイクロ波（Ｗｈｉｒｌｐｏｏｌ）で２０分間加熱して、抗原を回収した。内因性ペルオキシダーゼ溶液（Ｄａｋｏ社，Ｅｌｙ，ＵＫ）を用いて、５分間、組織切片をインキュベートすることによって内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。正常ブタ血清（ＮＳＳ；Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｓ，ＣＡ，ＵＳＡ；１／５０　ＰＢＳ）を２０分間の各切片に添加し、非特異的一次抗体結合をブロッキングした。アビジン及びビオチンの非特異的結合をブロックするために、全ての切片を、それぞれ１５分間、アビジンＤ／ビオチンブロッキングキット（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂ）とインキュベートした。切片を５分間、ＮＳＳ（１／５０　ＰＢＳ）で再ブロッキングした。次いで、組織切片を室温で１時間、一次抗体とインキュベートした。抗β－２－ミクログロブリン（Ｄａｋｏ社；ＰＢＳ中１／１００）ｍＡｂ及びＰＢＳ単独を、それぞれ陽性対照及び陰性対照として使用した。組織切片をＰＢＳで洗浄し、室温で３０分間、ビオチン化ヤギ抗マウス／ウサギ免疫グロブリン（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｓ；ＮＳＳ中１／５０）とインキュベートした。組織切片をＰＢＳで洗浄し、室温で３０分間、予備成形済み１／５０（ＰＢＳ）ストレプトアビジンビオチン／西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体（Ｄａｋｏ社）とインキュベートした。３，３’－ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド（ＤＡＢ）を基質として使用した。各切片を、５分間、１００μｌのＤＡＢの溶液で２回インキュベートした。最後に、切片を軽くヘマトキシリン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｐｏｏｌｅ　Ｄｏｒｓｅｔ，ＵＫ）と対比染色した後、段階的アルコールで脱水し、キシレンに浸漬することによって洗浄し、ジスチレン、可塑剤、キシレン（ＤＰＸ）マウント剤（Ｓｉｇｍａ）を用いてスライドにマウントした。

【０１２９】

患者コホート：研究集団は、ノッティンガム又はダービー大学病院で組織学的に証明された癌の待機手術摘出を受けた患者から得られた４６２個の記録された結腸直腸癌（２９）標本（１９９４～２０００年；経過観察４２ヶ月の中央値、２００３年１２月検閲；リンパ節陽性疾患を有する患者は、日常的に、５－フルロウラシル／フォリン酸を用いたアジュバント化学療法を受けた）、３５０個の卵巣癌（２８）試料（１９８２～１９９７年；経過観察１９２ヶ月の中央値：２００５年１１月検閲：ステージＩＩ～ＩＶの疾患を有する患者は、後年に白金系となる標準的なアジュバント化学療法を受けた）、１４２個の胃癌（２６）試料（２００１～２００６年；経過観察６６ヶ月の中央値、２００９年1月検閲、無化学療法）、６８個の膵臓癌及び１２０個の胆管癌／膨大部癌（２７）試料（１９９３～２０１０年：４５ヶ月の中央値；２０１２年検閲；患者の２５～４６％は、５－フルオロウラシル／フォリン酸及びゲムシタビンを用いたアジュバント化学療法を受けた）、２２０個の非小細胞肺癌（１９９６年1月～２００６年7月：３６ヶ月の経過観察の中央値、２０１３年5月検閲；手術前に化学療法を受けた患者はいなかったが、１１人の

患者は放射線治療を受け、９人の患者は、手術後にアジュバンド化学療法の少なくとも１サイクルを受けた）の一連の治療継続コホートを含む。関連する臨床病理学的材料／データが入手できなかった場合を除き、いかなる場合も除外しなかった。

【０１３０】

共焦点顕微鏡：ＦＧ１２９及びＣＨ１２９のｍＡｂを、製造業者（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）のプロトコルに従ってアレクサ－４８８フルオロフォア（Ａ－ＦＧ１２９、Ａ－ＣＨ１２９）で標識した。１．５×10^5個のＨＣＴ－１５細胞を、２４時間、３７℃、５％CO_2で、６ウェルプレート中の無菌円形カバースリップ（直径２２ｍｍ、厚さ０．１６～０．１９ｍｍ）上で増殖させた。２４時間後、カバースリップ上の細胞を暗所で、３７℃で２時間、５μｇ／ｍｌのｍＡｂで処理した。２時間後、過剰／未結合のｍＡｂを、ＰＢＳを用いて洗い流した。次いで、細胞を、暗所で２０分間、０．４％パラホルムアルデヒドを用いて固定した。０．４％パラホルムアルデヒドを、ＰＢＳを用いて洗い流した。カバースリップを、ＰＢＳ：グリセロール（１：１）でスライドにマウントした。カバースリップのエッジを、透明なマニキュアで密封した。Ａ－ＦＧ１２９及びＡ－ＣＨ１２９ｍＡｂの局在を共焦点顕微鏡（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ，Ｊｅｎａ，Ｇｅｒｍａｎｙ）下で可視化した。

【０１３１】

ＡＤＣＣ及びＣＤＣ：細胞（５×10^3）を、１００μｌのＰＢＭＣ、１０％自己血清又は培地単独、又はある濃度範囲のｍＡｂと同時インキュベートした。自発的な最大放出を、培地単独、又は１０％　トリトンＸ－１００を含む培地それぞれと標識細胞をインキュベートすることによって評価した。インキュベーションの４時間後に、各ウェルからの上清５０μｌを、９６ウェルのｌｕｍａプレートに移した。プレートを一晩乾燥させ、トップカウントＮＸＴカウンター（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＵＫ）上でカウントした。標的細胞の平均％溶解を、以下の式：

平均％溶解＝１００×（平均実験数－平均自然数）／（平均最大数－平均自然数）

に従って計算した。

【０１３２】

ＡＤＣアッセイ

ＡＤＣを、マウスのＦａｂ－ＺＡＰ二次コンジュゲートを有する免疫複合体ｍＡｂ（Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）（３０）の細胞傷害性を測定することにより評価した。細胞を一晩９６ウェルプレート（２，０００細胞、９０μｌ／ウェル）に３連で播種した。５０ｎｇのＦａｂ－ＺＡＰコンジュゲートとある濃度範囲のＦＧ１２９又はＣＨ１２９　ｍＡｂとのプレインキュベーション（室温で３０分）後に、１０μｌのコンジュゲートｍＡｂ又は遊離ｍＡｂをウェルに添加し、７２時間インキュベートした。対照ウェルは、コンジュゲートを含めないでインキュベートした細胞からなっており、一次ｍＡｂを含めないで二次Ｆａｂ－ＺＡＰとインキュベートし、Ｆａｂ－ＺＡＰの存在下で対照ｍＡｂとインキュベートした。細胞生存率を、最後の２４時間の間、^{3}Ｈ－チミジン取り込みによって測定した。結果を、一次ｍＡｂのみと比較した、コンジュゲートとインキュベートした細胞による^{3}Ｈ－チミジン取り込み率として表す。

【０１３３】

ＣＨ１２９が臨床現場での有望なＡＤＣ候補になるかどうかをさらに調べるために、該ｍａｂを、前臨床で及び臨床的に検証された異なるペイロード／リンカー構築物に化学的にコンジュゲートさせた。したがって、切断可能なジペプチドバリン－シトルリンリンカー及びパラ－アミノベンジルアルコール（ＰＡＢＡ）自己犠牲スペーサーを介して連結されたアウリスタチンＭＭＡＥを有するもの、中程度に切断可能なヒンダードジスルフィドリンカーＳＰＤＢを介して連結されたＤＭ４メイタンシノイドを有するもの、及び切断可能ではないＳＭＣＣリンカーを介して連結されたＤＭ１メイタンシノイドを有するものの３つのＣＨ１２９構築物を、ＡＤＣバイオテクノロジーにより生成した。適合させた対照ＡＤＣ構築物のセットも、関連するアッセイ対照に使用するための非標的化ｍａｂリツキシマブを用いて生成した。

【０１３４】
ＣＨ１２９－ＡＤＣ構築物の細胞傷害性効果を、生存細胞の数に正比例するヒドロゲナーゼの活性を測定するために、水溶性のテトラゾリウム塩ＷＳＴ－８（Ｓｉｇｍａ）を用いて評価した。細胞を、ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｓｉｇｍａ）を有する１０％ＦＢＳ－ＲＰＭＩ中２０００個の細胞／９０μｌ／ウェルの密度で９６ウェルプレートに播種し、３７℃、５％ＣＯ２で一晩インキュベートした。次いで、ＡＤＣ構築物を１０μｌ／ウェルの最終体積で異なる濃度で細胞に添加し、このプレートを３７℃、７２時間、５％ＣＯ２で抗体構築物とインキュベートした。次いで、ＷＳＴ－８を添加し（１０μｌ／ウェル）、このプレートをさらに３７℃、３時間、５％ＣＯ２でインキュベートした。３時間のインキュベーション後、このプレートを、Ｔｅｃａｎのインフィニット Ｆ５０により４５０ｎｍで読み取った。結果を、抗体を含まない、細胞のみからなる対照ウェルの百分率として表す。細胞傷害性を、高い細胞表面密度の標的抗原シアリル－ルイス^{a}を発現する２つの結腸直腸細胞株Ｃｏｌｏ２０５及びＨＣＴ－１５上で検討した。

【０１３５】
実施例１
ＦＧ１２９　ｍＡｂの作製及び初期の特徴付け
２ヶ月の期間にわたって２週間間隔で、リポソームに組み込まれたＬＳ１８０細胞（結腸直腸細胞株）からの原形質膜脂質抽出物でＢａｌｂ／ｃマウスを免疫することによってＦＧ１２９を生成し、アルファガラクトシルセラミドを第１、第３及び第４の免疫化にアジュバントとして使用し、抗ＣＤ４０　ｍＡｂを第２の免疫化の間に使用した。

【０１３６】
免疫に対する抗体応答の分析：抗体価を、最初に、脂質酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）により監視した。フローサイトメトリー分析（ＦＡＣＳ）もＬＳ１８０腫瘍細胞を用いて行い、ウェスタンブロットを、ＬＳ１８０を使用して行った。採血前の血清対照と比較して、最適な応答を有すると考えられるマウスに、融合前にＬＳ１８０原形質膜脂質抽出物を静脈内（ｉ．ｖ．）に追加免疫した。融合後８日目に、上清を収集し、フローサイトメトリーによって新鮮なＬＳ１８０腫瘍細胞に対してスクリーニングした。間接免疫蛍光アッセイを用いて、細胞表面結合を示したハイブリドーマを収集し、完全培地で洗浄し、ウェルあたり０．３個の細胞を９６ウェルプレートに播種し、クローンを取得した。次いで、このプレートを陽性ウェルについてスクリーニングし、十分な数の細胞が得られるまで成長させ、第２の期間、ウェル当たり０．３個の細胞を９６ウェルプレートに播種した。得られたコロニーの数が約３０に相当し、全てのハイブリドーマが陽性であった場合、ハイブリドーマをクローンとみなした。クローン増殖、バルク培養及び抗体又は抗体断片の抗体精製の方法は、当業者に公知の従来の技術を使用して利用可能である。

【０１３７】
実施例２
ＦＧ１２９のキメラ化
用語「キメラ抗体」は、可変領域配列が一方の種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体であって、例えば、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を指すことが意図される。本発明のキメラ（又はヒト化）抗体は、上記のように調製されたマウスｍＡｂの配列に基づいて調製することができる。ＦＧ１２９ｍＡｂの重鎖（図１ａ）の可変領域及び定常領域と軽鎖（図１ｂ）の可変領域及び定常領域のアミノ酸配列並びにヌクレオチド配列を、図１に示す。番号は、抗体配列のナンバリングのための標準化ＩＭＧＴシステム［４９］を指す。ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３領域が示されている。ＦＧ１２９重鎖は、マウス重鎖ファミリーＩＧＨＶ１０－１＊０２（ＩＧＨＤ１－１＊０１，ＩＧＨＪ４＊０１）に属し、親の生殖細胞系遺伝子と比較して３つの変異を有する。ＦＧ１２９軽鎖は、マウスκ鎖ファミリーＩＧＫＶ８－１９＊０１（ＩＧＫＪ４＊０１）に属し、親の生殖細胞系遺伝子と比較して２つの変異を有する。

【０１３８】
ＦＧ１２９重鎖及び軽鎖可変領域を、ヒトＩｇＧ１発現ベクターにクローニングした。

これをＣＨＯ－Ｓ又はＨＥＫ２９３細胞にトランスフェクトし、ヒト抗体をプロテインＧにて精製した。キメラｍＡｂ　ＣＨ１２９は、結腸直腸細胞株のＣｏｌｏ２０５に結合した。ヒトｃｈ１２９　ｍＡｂの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列並びにヌクレオチド配列を、それぞれ図２ａ及び図２ｂに示す。

【０１３９】

実施例３

ＦＧ１２９及びＣＨ１２９のｍＡｂによって認識されるエピトープの定義

ｍＡｂ　ＦＧ１２９は、結腸直腸細胞株ＬＳ１８０の糖脂質抽出物でＢａｌｂ／ｃマウスを免疫することによって作製されたマウスＩｇＧ１ｋアイソタイプである。６００以上の天然及び合成グリカンにてＣＦＧによって行われるグリカンプロファイリング分析から、シアリルージーラクトースａ（１００％）及びシアリルーラクトースａ－ｘ（８９％）に結合するＦＧ１２９の高い特異性が示される。短い担体（ｓｐ０）ではなく、長い担体（ｓｐ８）上に存在する場合にのみモノーシアリルーラクトースａ（８９％）にも結合することができ、結合するための正しい立体構造で提示される抗体配列に３つの糖鎖残基を挿入するのを可能にするには少なくとも４つの糖鎖又は十分なスペースが必要であることが示唆される（図３ａ）。

【０１４０】

これらのグリカンが腫瘍細胞株の糖タンパク質又は糖脂質上で発現するかどうかを分析するために、ＦＧ１２９結合をウェスタンブロッティングによって評価した（図３ｂ）。結腸直腸からの腫瘍溶解物又は腫瘍糖脂質抽出物（Ｃｏｌｏ２０５　ＨＣＴ－１５及びＬＳ１８０）並びに膵臓細胞株（ＢｘＰｃ３）を、ＦＧ１２９、ＣＨ１２９　ｍＡｂ、二次抗体単独又はＣＡ１９．９（抗シアリルルイスａのＭａｂ）でブロットした。ＦＧ１２９及びＣＨ１２９は、Ｃｏｌｏ２０５及びＨＣＴ－１５溶解物中の広い範囲の糖タンパク質に結合し、ＢｘＰｃ３及びＬＳ１８０溶解物ではより少ない数の糖タンパク質に結合した。ＦＧ１２９は、腫瘍糖脂質抽出物のいずれにも結合しなかった。対照的に、ＣＡ１９．９は、ＢｘＰｃ３、Ｃｏｌｏ２０５及びＬＳ１８０においてより広い範囲の糖タンパク質並びにＢｘＰｃ３及びＨＣＴ－１５細胞からの糖脂質への結合を示した。これらの結果は、ＦＧ１２９が、６つの糖鎖残基に結合することを好み、タンパク質上に主に発現するシアリルージーラクトースａを好むことを示唆する。対照的に、３つの糖鎖残基グリカンのシアリルーラクトースａを好むＣＡ１９．９は、脂質及びタンパク質の両方に結合する。

【０１４１】

ｍＡｂが腫瘍内に局在化するのに強い親和性を必要とするので、ＦＧ１２９　ｍＡｂの親和性を、ビアコア及びＥＬＩＳＡにより評価した。シアリルーラクトースａ（シアリルージーラクトースａが利用できない場合）結合チップ上でＳＰＲ（ビアコアＸ又は３０００）を用いる親和性測定により、２つの可能性のある機能的親和性－集団の８０％を占める優位な親和性（約10^{-7}ＭのＫ$_d$）及び別の非常に高い親和性（約10^{-13}ＭのＫ$_d$）で、速い会合速度（約10^{4}　１／Ｍｓ）及び非常に遅い解離速度（約10^{-8}　１／ｓのＫ$_d$）が明らかになった（表１ａ）。特に、親和性測定により、ＦＧ１２９のナノモル以下の機能的親和性及びＣＨ１２９のナノモル親和性が明らかになり、両方ともシアリルーラクトースａ結合について比較的速いオン速度及び遅いオフ速度を示す（表１ｂ）。ｓｃＦｖ１２９の一価の結合親和性は、より低く（10^{-7}Ｍ）、より遅いオン速度だが、オフ速度は似ていることから、ＦＧ１２９及びＣＨ１２９によるチップ上での二価結合が示唆された。

【０１４２】

【表１】

表１ａ．ＳＰＲによる動態シアリルールイス^{a}結合パラメータの決定

平衡解離速度K_d（Ｍ）	会合速度 k_a（１／Ｍｓ）	解離速度 k_d（１／ｓ）
主要K_{d1}（８０％）	約1.3×10^{-7}	k_{a1}約1.97×10^{4}	k_{d1}約2.57×10^{-3}
マイナーK_{d2}（２０％）	約1.4×10^{-13}	k_{a2}約8.85×10^{4}	k_{d2}約1.35×10^{-8}

表１ｂ．ＳＰＲによる動態シアリルールイス^{a}結合パラメータの決定

	SPR リアルタイムシアリルＬｅ^a－ＨＳＡ結合		
mAb	会合速度 k_{on} (1/Ms)	解離速度 k_{off} (1/s)	解離定数 Kd (M)
FG129	6.2×10^{5}	1.1×10^{-4}	0.2×10^{-9}
CH129	1.3×10^{5}	2.6×10^{-4}	2.1×10^{-9}
FG129-scFv	3.0×10^{3}	5.0×10^{-4}	1.7×10^{-7}

【０１４３】

加えて、抗原結合を、ＦＧ１２９及びＣＨ１２９用量依存性応答を明らかにしたシアリルールイス^a－ＨＳＡを用いてＥＬＩＳＡによって評価し、ナノモル以下のＥＣ$_{50}$（約１０$^{-10}$Ｍ）での特異的シアリルールイス^{a}結合が確認され、ＨＳＡ及びプラスチックへの結合がないことも示された（図４）。

【０１４４】

実施例４

ＦＧ１２９及びＣＨ１２９のｍＡｂの免疫組織化学的評価

ＦＧ１２９の治療的価値を決定するために、免疫組織化学（ＩＨＣ）によって、結腸直腸、胃、膵臓、肺、及び卵巣の腫瘍の組織マイクロアレイ（ＴＭＡ）上でスクリーニングした。

【０１４５】

ＦＧ１２９の腫瘍組織結合を、腫瘍ＴＭＡ上でＩＨＣにより評価した。該ｍＡｂは、膵臓腫瘍の７４％（１３５／１８２）、胃の腫瘍の５０％（４６／９２）、結腸直腸腫瘍の３６％（１００／２８１）、卵巣腫瘍の２７％（８９／３２７）及びＮＳＣＬＣ腫瘍の２１％（４２／２０１）に結合した（表１）。

【０１４６】

【表２】

表２．ＩＨＣによる染色強度による胃、結腸直腸、膵臓、卵巣及び肺のＴＭＡへのＦＧ１２９（１μｇ／ｍｌ）の結合

	胃		結腸直腸		膵臓＋胆管／膨大部		卵巣		肺（腺癌）	
染色	数	%	数	%	数	%	数	%	数	%
陰性	４６	５０	１８１	６４	４５	２５	２３８	７３	１５９	７９
弱い	２５	２７	７２	２６	３７	２１	６３	１９	２１	１０
中程度	１０	１１	２５	９	６１	３４	２１	６	９	４
強い	１１	１２	３	１	３７	２１	５	２	１２	６

【０１４７】

ＦＧ１２９での腫瘍組織の異なる染色レベルの代表を、図５ａに示す。膵臓癌コホートにおいて、膵臓癌患者の無病生存期間のカプラン－マイヤー分析により、より低いＦＧ１２９結合群（平均生存期間：９０ヶ月（ｎ＝８２））と比較して、高いＦＧ１２９結合群で有意により低い平均生存期間（平均生存期間：３０ヶ月（ｎ＝９４））が明らかになった（ｐ＝０．００４、ログランク検定）。Ｃｏｘ回帰を用いる多変量解析において、膵臓癌における高いＦＧ１２９抗原発現は、神経周囲浸潤から独立した予後不良のマーカーであった（ｐ＝０．００３）（図５ｂ）。

【０１４８】

正常な組織において、ＦＧ１２９は、非常に制限された結合パターンを有しており、心臓、脳、胃、及び腎臓のようなほとんどの正常組織に結合しなかった（表１）。非常に限定された結合が、胆嚢（弱）、回腸（１％）、肝臓（１％）、食道（５％）、膵臓（１０％）、及び甲状腺（弱）においてみられた（図５ｃ）。これは、脂質とタンパク質の両方の上のシアリルルイス^{a}を認識するＣＡ１９．９　ｍＡｂとは全く対照的であった。ＦＧ１２９は、食道、胆嚢及び肝臓に強く（３＋）、乳房に中程度に（２＋）及び直腸に弱く（１＋）結合する。ＦＧ１２９は、低い正常組織反応性で強い腫瘍組織結合を示し、膵臓癌患者の予後不良と関連する。

【０１４９】

【表３】

表３．パラフィン固定切片を用いた正常組織のパネルへのＦＧ１２９及びＣＡ１９．９結合のまとめ。染色の強度は、陰性、弱い、中程度又は強い結合に関連して、０、１、２又は３として示される。

組織の種類	FG129	CA19.9
食道	0	3
食道	1	3
直腸	0	1
直腸	0	1
胆嚢	1	3
胆嚢	1	1
皮膚	0	0
皮膚	0	0
脂肪	0	0
脂肪	0	0
心臓	0	0
心臓	0	0
骨格	0	0
骨格	0	0
膀胱	0	0
膀胱	0	0
回腸	1	0
回腸	1	0
脾臓	0	0
脾臓	0	0
脳	0	0
脳	0	0
空腸	0	0
空腸	0	0
胃	0	0
胃	0	0
乳房	0	2
乳房	0	2
腎臓	0	0

腎臓	0	0
精巣	0	0
精巣	0	0
小脳	0	0
小脳	0	0
肝臓	1で3%	3
肝臓	1で3%	3
胸腺	0	1
胸腺	0	2
子宮頸部	0	0
子宮頸部	0	0
肺	0	0
肺	0	0
平滑筋	0	0
平滑筋	0	0
結腸	0	2
結腸	0	1
卵巣	0	0
卵巣	0	0
扁桃	0	1
扁桃	0	0
横隔膜	0	0
横隔膜	0	0
膵臓	1	3
膵臓	1	2
子宮	0	0
子宮	0	0
十二指腸	0	0
十二指腸	0	0
甲状腺	1	0
甲状腺	1	0

【０１５０】

正常な組織において、ＣＨ１２９は、非常に制限された結合パターンを有しており、心臓、脳、胃、及び腎臓のようなほとんどの正常組織に結合しなかった（表１）。非常に限定された結合が、胆嚢（弱）、回腸（１％）、肝臓（１％）、食道（５％）、膵臓（１０％）、及び甲状腺（弱）においてみられた（図５ａ）。

【０１５１】
実施例５
ＦＧ１２９及びＣＨ１２９のｍＡｂの結合研究
いずれの細胞株がシアリルーラクーリルイス^{a}を発現する腫瘍の良好なモデルであるかどうかを決定するために、ある範囲の細胞株及び正常細胞を、ＦＧ１２９の細胞表面結合についてスクリーニングした。ＦＧ１２９及びＣＨ１２９は、腫瘍細胞株ＨＣＴ－１５、Ｃｏｌｏ２０５に強い結合（幾何平均（Ｇｍ）１０００以上）を示し、ＢｘＰｃ３、ＡＳＰＣ１、ＬＳ１８０、ＤＬＤ１、及びＤＭＳ７９に中程度の結合（Ｇｍ約１００）を示し、ＡＧＳ、ＳＷ４８０、ＥＫＶＸ、ＭＣＦ－７、ＬｏＶｏ、ＤＵ４４７５、ＯＶＣＡＲ３、ＯＶＣＡＲ４及びＯＶＣＡ４３３には結合しなかった。このことから、ＨＣＴ－１５、Ｃｏｌｏ２０５、ＡＳＰＣ１、ＢｘＰｃ３、ＬＳ１８０、ＤＬＤ１、及びＤＭＳ７９が、ＦＧ１２９療法に対する、異なる細胞密度のシアリルーラクーリルイス^{a}を有する腫瘍細胞の感受性を評価するための良好なモデルであることが示唆される（図６ａ）。ＦＧ１２９は、正常ＨＵＶＥＣ細胞に結合することができなかった（図６ｂ）。比較のために、抗ＣＤ５５　ｍＡｂを陽性対照として、及び抗ＩｇＧアイソタイプ抗体を陰性対照として使用した。重要なことに、ＦＧ１２９及びＣＨ１２９は、ある程度の健康なドナーのＰＢＭＣに結合しなかった（図６ｃ）。これらの結果から、インビトロ試験用のヒト腫瘍のモデルとしてのいくつかの細胞株が特定され、ＦＧ１２９が正常な血液又は内皮細胞に結合しなかったことが示されたため、それらが腫瘍内のＦＧ１２９局在化を妨げないことが示唆された。

【０１５２】
抗原密度（ＳＡＢＣ）は、ＨＣＴ－１５及びＣＯＬＯ２０５それぞれについて、９８５，８１３及び１，５７０，５６３であると計算された。中程度の結合細胞には、ＢｘＰｃ３及びＬＳ１８０（それぞれのＳＡＢＣ：３００，０３６及び４６９，２７２）が含まれた。

【０１５３】
腫瘍細胞系への結合の親和性を推定するために、様々な濃度のＦＧ１２９及びＣＨ１２９　ｍＡｂをＣｏｌｏ２０５、ＨＣＴ－１５、ＢｘＰＣ３及びＬＳ１８０に添加し、結合を、間接免疫蛍光分析及びフローサイトメトリー分析によって検出した（図７）。ＦＧ１２９とＣＨ１２９の両方は、６～２０ｎＭのＫｄで高発現細胞株に結合し、３０～５０ｎＭのＫｄで低発現細胞株に結合した。これは、シアリルルイス^{a}－ＨＳＡへの結合よりも高く、おそらく、細胞表面上のグリカン発現の複雑さを反映する。

【０１５４】
抗原密度（ＳＡＢＣ）は、ＨＣＴ－１５及びＣＯＬＯ２０５それぞれについて、９８５，８１３及び１，５７０，５６３であると計算された。中程度の結合細胞には、ＢｘＰＣ３及びＬＳ１８０（それぞれのＳＡＢＣ：３００，０３６及び４６９，２７２）が含まれた。

【０１５５】
実施例６
ＦＧ１２９及びＣＨ１２９のインビトロ抗腫瘍活性
ヒトＰＢＭＣの存在下でＡＤＣＣを経てＣｏｌｏ２０５及びＨＣＴ－１５腫瘍細胞死を誘導するＦＧ１２９及びＣＨ１２９の能力を調べた。マウスＦＧ１２９とキメラＣＨ１２９　ｍＡｂの両方は、濃度依存的に両方の細胞株の強力な細胞溶解を誘導した。約10^{-10}ＭのＥＣ$_{50}$値を有するマウスｍＡｂと比較した場合、ＣＨ１２９は、死滅を２～４倍高めた（図８）。補体の存在下で、ＣＤＣを経てＣｏｌｏ２０５腫瘍細胞死を誘導するＦＧ１２９及びＣＨ１２９の能力を調べた。マウスｍａｂではなく、キメラｍａｂは良好なＣＤＣを示した（図９）。

【０１５６】
実施例７
内部移行及びＡＤＣ（抗体依存性細胞傷害性薬物（ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｄｒｕｇ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）

ＦＧ１２９及びＣＨ１２９の治療能力をさらに決定するために、ｍＡｂを、内部移行及びリソソームへの薬物送達による薬物担体として作用する能力についてスクリーニングした。細胞内部移行を共焦点顕微鏡により評価し、９０分間での両方の１２９　ｍＡｂの内部移行及びリソソーム内の共局在化を示した。核を青で、原形質膜を赤で、リソソーム区画を紫で、１２９抗体を緑色で染色した。内部移行は、高い細胞表面抗原密度の結腸直腸細胞株Ｃｏｌｏ２０５及びＨＣＴ－１５並びに膵臓細胞株ＢｘＰＣ３で見られる（図１０ａ及びｂ）。

【０１５７】

Ｆａｂ－ＺＡＰ－ＦＧ１２９／ＣＨ１２９免疫複合体が内部移行した細胞を死滅させるが、内部移行しなかった細胞には影響を与えないリボソーム不活性化タンパク質サポリンと連結したＦａｂ－ＺＡＰ、抗マウスＩｇＧ又は抗ヒトＩｇＧを使用するＡＤＣアッセイにより内部移行を確認した。Ｆａｂ－ＺＡＰ－ＦＧ１２９又はＣＨ１２９の内部移行は、ＢｘＰｃ３又はＡＳＰＣ１ではなく高い結合細胞Ｃｏｌｏ２０５及びＨＣＴ－１５において細胞生存率（約10^{-12}ＭのＩｃ５０）の用量依存的減少をもたらした（図１１ａ及び１１ｃ）。低発現細胞株ＬＳ１８０又は抗原陰性細胞株ＬｏＶｏの死滅は観察されなかった（図１１ａ）。Ｆａｂ－ＺＡＰ単独又は細胞が発現しない抗原に対するアイソタイプ適合ＩｇＧ１抗体とプレインキュベートしたＦａｂ－ＺＡＰは、細胞を死滅させなかった（図１１ｂ及び１１ｄ）。

【０１５８】

加えて、ＣＨ１２９が臨床現場での有望なＡＤＣ候補になるかどうかを調べるために、該ｍａｂを、前臨床で及び臨床的に検証された異なるペイロード／リンカー構築物に化学的にコンジュゲートさせた。したがって、切断可能なジペプチドバリン－シトルリンリンカー及びパラ－アミノベンジルアルコール（ＰＡＢＡ）自己犠牲スペーサーを介して連結されたアウリスタチンＭＭＡＥを有するもの（ＣＨ１２９－ｖｃＥ）、中程度に切断可能なヒンダードジスルフィドリンカーＳＰＤＢを介して連結されたＤＭ４メイタンシノイドを有するもの（ＣＨ１２９－ＤＭ４）、及び切断不能ＳＭＣＣリンカーを介して連結されたＤＭ１メイタンシノイドを有するもの（ＣＨ１２９－ＤＭ１）の３つのＣＨ１２９構築物を、ＡＤＣバイオテクノロジーにより生成した。適合させた対照ＡＤＣ構築物のセットも、関連するアッセイ対照に使用するための非標的化ｍａｂのリツキシマブを用いて生成した。細胞傷害性を、高細胞表面密度の標的化抗原シアリル－ルイス^{a}を発現する２つの結腸直腸細胞株Ｃｏｌｏ２０５及びＨＣＴ－１５上で検討した。

【０１５９】

ＣＨ１２９－ＡＤＣ構築物は、高いインビトロ標的依存性の有効性を与える。結果は、両方の細胞株における抗体濃度の減少と直接関連する細胞死の用量依存的な減少を示す。細胞死滅も標的依存性であり、より高い死滅が、ＨＣＴ－１５と比較してより高い抗原発現細胞株Ｃｏｌｏ２０５にて見られた。Ｃｏｌｏ２０５において（図１１ｅ）、全３つのＣＨ１２９－ＡＤＣ構築物は細胞を１００％死滅させ、ｖｃＥ構築物は最も高い有効性（約10^{-11}ＭのＥｃ５０）を与え、続いて、ＤＭ１及びＤＭ４構築物は類似の有効性（約10^{-10}ＭのＥｃ５０）を示した。

【０１６０】

ＨＣＴ－１５において（図１１ｆ）、細胞の５０～６０％のみが最高濃度で死滅し、ＣＨ１２９－ＤＭ４は2×10^{-9}Ｍの最良のＥｃ５０を与え、ＤＭ１は6×10^{-9}ＭのＥｃ５０を与え、ｖｃＥは10^{-8}ＭのＥｃ５０を与えた。死滅の特異性を評価するために、細胞株に結合しなかった、適合させたリツキシマブ－ＡＤＣ構築物を対照として使用した。ｖｃＥ及びＤＭ１リツキシマブ構築物の活性の欠如は、標的化構築物で見られる活性が特異的であり、遊離薬物の全身放出によるものではないことを示す。しかし、リツキシマブ－ＤＭ４は、ＣＨ１２９構築物に対して類似の活性を示したことから、非特異的死滅が示唆される。

【０１６１】

切断可能なリンカーを有するＡＤＣが、抗原陽性細胞の周囲から抗原陰性細胞を死滅さ

せるかどうかを決定するために、該ＡＤＣ構築物を、抗原陽性細胞と抗原陰性細胞の混合物、及び同様に異種腫瘍抗原発現を有する細胞株にて試験した。

【０１６２】

切断可能リンカーを有するＡＤＣは切断不能リンカーと比較してバイスタンダー死滅を与える

ＡＤＣ構築物のバイスタンダー死滅効果を、抗原を発現しない細胞ＡＧＳと高腫瘍抗原発現細胞Ｃｏｌｏ２０５の混合物を異なる細胞比で評価した。細胞を、ＡＧＳ対Ｃｏｌｏ２０５の２：１、５：１及び１０：１の比率で混合した。Ｃｏｌｏ２０５のみ及びＡＧＳのみを、それぞれ陽性対照及び陰性対照として使用した。ＡＧＳは、抗原陰性細胞株であるので、この細胞株で見られる死滅は、非特異的であり、したがって、死滅がＡＧＳで観察される濃度は、バイスタンダー死滅を評価する際に考慮しなかった。特異的死滅は、四角形で強調させた図１１ｇ、１１ｈ及び１１ｉに示す。ＤＭ１は、１０ｎＭより高い濃度で死滅を示したので、この態様において最も安定しているが、ＤＭ４は３ｎＭで死滅を示し、ｖｃＥは、あまり安定ではなく、１ｎＭから非特異的死滅を示した。

【０１６３】

ＤＭ１は、非切断可能なリンカーと連結しているので、バイスタンダー死滅のための陰性対照を構成した。丸の濃度でＤＭ１とＤＭ４／ｖｃＥによって与えられる死滅の違いは、バイスタンダー死滅が原因であり得る。したがって、ＤＭ４は細胞の約９０％、ｖｃＥは細胞の約５０～８０％の特異的死滅を与えるが、ＤＭ１は細胞の約２０％の特異的死滅を与えた。

【０１６４】

実施例８

癌患者からの血清中の分泌抗原上でのシアリルールイスＡの発現

膵臓癌患者の血清中の分泌されたＦＧ１２９抗原の存在をサンドイッチＥＬＩＳＡによって調べ、ＦＧ１２９が血清の３３％（７／２１）に結合することが示された（図１２ａ）。これらの患者からの腫瘍を、腫瘍細胞上又は間質内でのシアリルージールイス^{a}の結合についてＩＨＣにより分析すると、１つを除く全腫瘍が陽性であるが、６つの腫瘍のみが間質染色を示した。分泌抗原の存在は、これらの患者から切除した腫瘍の間質組織染色と著しく関連した（ｐ＝０．０２３、相関係数＝０．６２１）ことにより、切除した腫瘍の染色から、抗原が血清中に存在し得る患者を予測できることが示唆された（表４）。

【０１６５】

【表４】

表４．ＩＨＣによる腫瘍及び間質のＨスコア並びにＦＧ１２９のサンドイッチＥＬＩＳＡによる膵臓癌患者の血清の結合

	腫瘍　Ｈスコア	間質　Ｈスコア	ｻﾝﾄﾞｲｯﾁ ELISA による FG129 に結合する膵臓癌患者の血清の OD
P4	200	100	0.2
P5	180	0	0.05
P9	285	150	0.11
P10	120	0	0.07
P11	60	0	0.05
P12	150	100	0.06
P18	250	40	0.13
P20	0	0	0.05
P23	260	0	0.06
P32	110	0	0.05
P36	120	0	0.06
P40	280	25	0.06
P41	130	70	0.13

【０１６６】

インビボ設定を模倣するために、３７℃で、ＦＧ１２９が分泌抗原又は腫瘍細胞表面に優先的に結合するかどうかを調べた。分泌抗原又は腫瘍細胞へのＦＧ１２９の結合を、３

７℃でＨＣＴ－１５細胞上での競合ＦＡＣＳアッセイで分析した。全ての血清は、ＨＣＴ－１５細胞への結合を低下させたが、分泌されたシアリルールイス^{a}抗原とは関連がなかったことから、血清の粘度がｍＡｂ結合の反応速度を低下させたことが示唆された。シアリルールイス^{a}抗原を分泌しなかった正常ドナー由来の血清はまた、ＨＣＴ－１５細胞への結合の減少を示した（Ｇｍ　ｘ～１２００）。抗原陽性患者の血清も、抗原陰性患者の血清（Ｇｍ６５０～１５００）と同様に、結合を低下させた（Ｇｍ６００～１０００）。ＦＧ１２９を膵臓癌患者の血清とプレインキュベートしたにも関わらず、該ｍＡｂは、血清から分泌された抗原ではなく、細胞への結合に強い嗜好性を示した（図１２ｂ）。このことから、分泌抗原はＦＧ１２９が腫瘍内で局在化するのを妨げないであろうことが示唆される。

【０１６７】

実施例９

ＦＧ１２９－ｓｃＦｖのクローニング、発現、精製及び特徴付け

限定された正常組織結合及び非常に高い腫瘍組織結合により、ＦＧ１２９抗体は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）との関連で、抗腫瘍Ｔ細胞応答を誘導するためのｓｃＦｖとして使用される魅力的候補となる。

【０１６８】

ｓｃＦｖがＦＧ１２９完全抗体の結合特性を維持するかどうかを決定するために、重鎖及び軽鎖可変領域を、リーダー、重鎖可変ドメイン、スペーサー（３×ＧＧＧＧＳ）、軽鎖可変ドメイン、スペーサー（６×Ａｌａ）；精製タグ（６×Ｈｉｓ）の配向で、単一ｓｃＦｖ配列にインシリコで組み込み、合成した（図１３ａ）。真核生物の発現ベクターにクローニングした後、Ｅｘｐｉ２９３細胞をトランスフェクトし、一過的に（６日間）タンパク質を生成させた。Ｈｉｓタグ付きｓｃＦｖを、固定化したコバルトクロマトグラフィーを用いてＥｘｐｉ２９３上清から精製した。次いで、ｓｃＦｖを、シアリルールイス^{a}抗原又は抗原を発現する細胞へのその結合特性に関して特徴付けた。

【０１６９】

ＦＧ１２９－ｓｃＦｖの抗原結合親和性を、シアリルールイス^{a}上でＳＰＲ及びＥＬＩＳＡによって測定した。ＥＬＩＳＡによる抗原結合アッセイにおいて、ＦＧ１２９－ｓｃＦｖは、ｓｃＦｖの濃度を低下させて滴定した特異的シアリルールイス^{a}結合を示した（Ｅｃ５０＝１０$^{-6}$Ｍ）（図１３ｂ）。抗原結合親和性も、ＳＰＲによって測定し、１０$^{-7}$ＭのＫｄが得られた（表１）。Ｃｏｌｏ２０５における細胞結合アッセイにおいて、ＦＧ１２９－ｓｃＦｖは、高い結合（Ｇｍ　約４００）を示し、マイクロモル以下のＫｄ（１０$^{-7}$Ｍ）で用量依存性応答が得られた（図１３ｃ）。したがって、ＦＧ１２９－ｓｃＦｖは、完全ＦＧ１２９　ｍａｂの２つの結合アームのかわりに１つのみの結合を有するにもかかわらず、完全抗体の結合に匹敵する高い特異的結合を維持し、また高い結合親和性（約１０$^{-7}$ＭのＫｄ）も示す。

【０１７０】

配列

【表５】

マウスＦＧ１２９／２９　ＩｇＧ１重鎖

atg ctg ttg ggg
ctg aag tgg gtt ttc ttt gtt gtt ttt tat caa ggt gtg cat tgt
gag gtg cag ctt gtt gag tct ggt gga ... gga ttg gtg cag cct
aaa ggg tca ttg aaa ctc tca tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc
... ... aat acc tac gcc atg aac tgg gtc cgc cag gct
cca gga aag ggt ttg gaa tgg gtt gct cgc ata aga agt aaa agt
aat aat tat gca aca tat tat gcc gat tca gtg aaa ... gac agg
ttc acc ata tcc aga gat gat tca caa agc atg ctc tat ctg caa
atg aac aac ttg aaa aag gag gac aca gcc atg tat tac tgt gta
ggg tac ggt agt ggg gga aac tac tgg ggt caa gga ... ...
acc tca gtc acc gtc tcc tca gcc aaa acg aca ccc cca tct gtc
tat cca ctg gcc cct gga tct gct gcc caa act aac tcc atg gtg
acc ctg gga tgc ctg gtc aag ggc tat ttc cct gag cca gtg aca
gtg acc tgg aac tct gga tcc ctg tcc agc ggt gtg cac acc ttc
cca gct gtc ctg gag tct gac ctc tac act ctg agc agc tca gtg
act gtc ccc tcc agc cct cgg ccc agc gag acc gtc acc tgc aac
gtt gcc cac ccg gcc agc agc acc aag gtg gac aag aaa att gtg
ccc agg gat tgt ggt tgt aag cct tgc ata tgt aca gtc cca gaa
gta tca tct gtc ttc atc ttc ccc cca aag ccc aag gat gtg ctc
acc att act ctg act cct aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac atc
agc aag gat gat ccc gag gtc cag ttc agc tgg ttt gta gat gat
gtg gag gtg cac aca gct cag acg caa ccc cgg gag gag cag ttc
aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctt ccc atc atg cac cag
gac tgg ctc aat ggc aag gag ttc aaa tgc agg gtc aac agt gca
gct ttc cct gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggc
aga ccg aag gct cca cag gtg tac acc att cca cct ccc aag gag
cag atg gcc aag gat aaa gtc agt ctg acc tgc atg ata aca gac

ttc ttc cct gaa gac att act gtg gag tgg cag tgg aat ggg cag
cca gcg gag aac tac aag aac act cag ccc atc atg aac acg aat
ggc tct tac ttc gtc tac agc aag ctc aat gtg cag aag agc aac
tgg gag gca gga aat act ttc acc tgc tct gtg tta cat gag ggc
ctg cac aac cac cat act gag aag agc ctc tcc cac tct cct ggt
aaa

【表６】
マウスＦＧ１２９／２９カッパ鎖

atg gaa tca cag
act cag gtc ctc atg tcc ctg ctg ttc tgg gta tct acc tgt ggg
gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc ctg act gtg aca gca
gga gag aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agt ctg tta
aac agt gga aat caa aag aac tac ttg acc tgg tac cag cag aaa
cca ggg cag cct cct aaa gtg ttg atc tac tgg gca ... ...
... ... tcc act agg gaa tct ggg gtc cct ... gat cgc
ttc aca ggc agt gga ... ... tct gga aca gat ttc act ctc acc
atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag
aat gat tat agt tct cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg
gaa ata aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca
cca tcc agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc
ttc ttg aac aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag
att gat ggc agt gaa cga caa aat ggc gtc ctg aac agt tgg act
gat cag gac agc aaa gac agc acc tac agc atg agc agc acc ctc
acg ttg acc aag gac gag tat gaa cga cat aac agc tat acc tgt
gag gcc act cac aag aca tca act tca ccc att gtc aag agc ttc
aac agg aat gag tgt

【表７】

ｈＩｇＧ１定常領域へキメラ化したマウスＦＧ１２９／２９重鎖

atg ctg ttg ggg

ctg aag tgg gtt ttc ttt gtt gtt ttt tat caa ggt gtg cat tgt

gag gtg cag ctt gtt gag tct ggt gga ... gga ttg gtg cag cct

aaa ggg tca ttg aaa ctc tca tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc

... ... aat acc tac gcc atg aac tgg gtc cgc cag gct

cca gga aag ggt ttg gaa tgg gtt gct cgc ata aga agt aaa agt

aat aat tat gca aca tat tat gcc gat tca gtg aaa ... gac agg

ttc acc ata tcc aga gat gat tca caa agc atg ctc tat ctg caa

atg aac aac ttg aaa aag gag gac aca gcc atg tat tac tgt gta

ggg tac ggt agt ggg gga aac tac tgg ggt caa gga ... ...

acc tca gtc acc gtc tcc agc gct tcc acc aag ggc cca tcg gtc

ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg

gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg

gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc

ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc

aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt

gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca

gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca

aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca

tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc

aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag

ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc

ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc

atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc

ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg

acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag

tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct

ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc

acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc

ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa

【表８】
ｈＩｇｋ定常領域へキメラ化したマウスＦＧ１２９／２９カッパ鎖

atg gaa tca cag

act cag gtc ctc atg tcc ctg ctg ttc tgg gta tct acc tgt ggg

gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc ctg act gtg aca gca

gga gag aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agt ctg tta

aac agt gga aat caa aag aac tac ttg acc tgg tac cag cag aaa

cca ggg cag cct cct aaa gtg ttg atc tac tgg gca ... ...

... ... tcc act agg gaa tct ggg gtc cct ... gat cgc

ttc aca ggc agt gga ... ... tct gga aca gat ttc act ctc acc

atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag

aat gat tat agt tct cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg

gaa ata aaa cgt acg gta gcg gcc cca tct gtc ttc atc ttc ccg

cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc

ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag

gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca

gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg

acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc

gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc

aac agg gga gag tgt

【表９】
図１ａ：マウスＦＧ１２９／２９　ＩｇＧ１重鎖の完全アミノ酸配列

-19 MLLGLKWVFFVVFYQGVHC
1 EVQLVESGG GLVQPKGSLKLSCAASGFTF
31 NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKS
61 NNYATYYADSVK DRFTISRDDSQSMLYLQ
91 MNNLKKEDTAMYYCVGYGSGGNYWGQG
121 TSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMV
151 TLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF
181 PAVLESDLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCN
211 VAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPE
241 VSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDI
271 SKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQF
301 NSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA
331 AFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKE
361 QMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQ
391 PAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNVQKSN
421 WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG
451 K

【表１０】

図１ｂ：マウスＦＧ１２９／２９カッパ鎖の完全アミノ酸配列

-19 MESQTQVLMSLLFWVSTCG

1 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLL

31 NSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKVLIYWA

61 STRESGVP DRFTGSG SGTDFTLT

91 ISSVQAEDLAVYYCQNDYSSPFTFGSGTKL

121 EIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVC

151 FLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWT

181 DQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTC

211 EATHKTSTSPIVKSFNRNEC

【表１１】
図２ａ：ヒトＩｇＧ１重鎖定常領域へキメラ化したマウスＦＧ１２９／２９重鎖可変領域の完全アミノ酸配列

-19 ·MLLGLKWVFFVVFYQGVHC·
1 EVQLVESGG GLVQPKGSLKLSCAASGFTF
31 NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKS
61 NNYATYYADSVK DRFTISRDDSQSMLYLQ
91 MNNLKKEDTAMYYCVGYGSGGNYWGQG
121 TSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
151 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
181 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
211 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
241 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
271 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
301 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
331 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
361 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
391 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
421 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
451 LSLSPGK

【表１２】
図２ｂ：ヒトカッパ鎖定常領域へキメラ化したマウスＦＧ１２９／２９カッパ鎖可変領域の完全アミノ酸配列

-19 MESQTQVLMSLLFWVSTCG
1 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLL
31 NSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKVLIYWA
61 STRESGVP DRFTGSG SGTDFTLT
91 ISSVQAEDLAVYYCQNDYSSPFTFGSGTKL
121 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
151 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
181 EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
211 EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

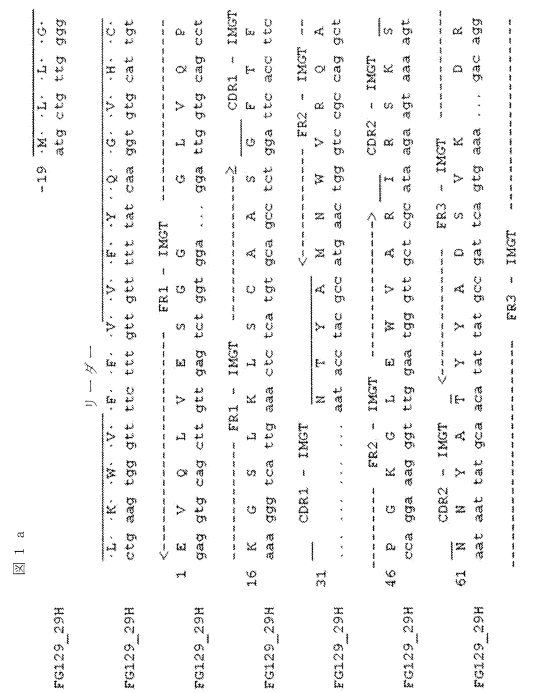
本明細書で引用した参考文献
1. Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:10231-3.
2. Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. Nat Rev Cancer. 2005;5:526-42.
3. Varki A, Kannagi R, Toole BP. Glycosylation Changes in Cancer. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2010/03/20 ed: Cold Spring Harbor (NY); 2009.
4. Pour PM, Tempero MM, Takasaki H, Uchida E, Takiyama Y, Burnett DA, et al. Expression of blood group-related antigens ABH, Lewis A, Lewis B, Lewis X, Lewis Y, and CA 19-9 in pancreatic cancer cells in comparison with the patient's blood group type. Cancer Res. 1988;48:5422-6.
5. Rabu C, McIntosh R, Jurasova Z, Durrant L. Glycans as targets for therapeutic antitumor antibodies. Future Oncol. 2012;8:943-60.
6. Tang H, Singh S, Partyka K, Kletter D, Hsueh P, Yadav J, et al. Glycan motif profiling reveals plasma sialyl-lewis x elevations in pancreatic cancers that are negative for sialyl-lewis a. Molecular & cellular proteomics : MCP. 2015;14:1323-33.
7. Inagaki H, Sakamoto J, Nakazato H, Bishop AE, Yura J. Expression of Lewis (a), Lewis(b), and sialated Lewis(a) antigens in early and advanced human gastric cancers. J Surg Oncol. 1990;44:208-13.
8. Sakamoto J, Furukawa K, Cordon-Cardo C, Yin BW, Rettig WJ, Oettgen HF, et al. Expression of Lewisa, Lewisb, X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines. Cancer Res. 1986;46:1553-61.
9. Hakomori S, Andrews HD. Sphingoglycolipids with Leb activity, and the co-presence of Lea-, Leb-glycolipids in human tumor tissue. Biochim Biophys Acta. 1970;202:225-8.
10. Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colo

rectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. Somatic cell genetics. 1979;5:957-71.
11. Stanley P, Cummings RD. Structures Common to Different Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2010/03/20 ed: Cold Spring Harbor (NY); 2009.
12. Kannagi R. Carbohydrate antigen sialyl Lewis a--its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. Chang Gung medical journal. 2007;30:189-209.
13. Kishimoto T, Ishikura H, Kimura C, Takahashi T, Kato H, Yoshiki T. Phenotypes correlating to metastatic properties of pancreas adenocarcinoma in vivo: the importance of surface sialyl Lewis(a) antigen. International journal of cancer Journal international du cancer. 1996;69:290-4.
14. Sato M, Narita T, Kimura N, Zenita K, Hashimoto T, Manabe T, et al. The association of sialyl Lewis(a) antigen with the metastatic potential of human colon cancer cells. Anticancer research. 1997;17:3505-11.
15. Matsui T, Kojima H, Suzuki H, Hamajima H, Nakazato H, Ito K, et al. Sialyl Lewisa expression as a predictor of the prognosis of colon carcinoma patients in a prospective randomized clinical trial. Japanese journal of clinical oncology. 2004;34:588-93.
16. Nakayama T, Watanabe M, Katsumata T, Teramoto T, Kitajima M. Expression of sialyl Lewis(a) as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. Cancer. 1995;75:2051-6.
17. O'Brien DP, Sandanayake NS, Jenkinson C, Gentry-Maharaj A, Apostolidou S, Fourkala EO, et al. Serum CA19-9 is significantly upregulated up to 2 years before diagnosis with pancreatic cancer: implications for early disease detection. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2015;21:622-31.
18. Sawada R, Sun SM, Wu X, Hong F, Ragupathi G, Livingston PO, et al. Human monoclonal antibodies to sialyl-Lewis (CA19.9) with potent CDC, ADCC, and antitumor activity. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2011;17:1024-32.
19. Huehls AM, Coupet TA, Sentman CL. Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. Immunology and cell biology. 2015;93:290-6.
20. Kontermann RE. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. mAbs. 2012;4:182-97.
21. Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli. Nature. 1989;341:544-6.
22. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, et al. Single-chain antigen-binding proteins. Science. 1988;242:423-6.
23. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85:5879-83.
24. Holliger P, Prospero T, Winter G. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:6444-8.
25. Holliger P, Winter G. Engineering bispecific antibodies. Current opinion in biotechnology. 1993;4:446-9.
26. Traunecker A, Lanzavecchia A, Karjalainen K. Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells. The EMBO jo

urnal. 1991;10:3655-9.
27. Karlin S, Altschul SF. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87:2264-8.
28. Karlin S, Altschul SF. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:5873-7.
29. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology. 1990;215:403-10.
30. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research. 1997;25:3389-402.
31. Myers EW, Miller W. Approximate matching of regular expressions. Bulletin of mathematical biology. 1989;51:5-37.
32. Torelli A, Robotti CA. ADVANCE and ADAM: two algorithms for the analysis of global similarity between homologous informational sequences. Computer applications in the biosciences : CABIOS. 1994;10:3-5.
33. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85:2444-8.
34. Marks JD, Griffiths AD, Malmqvist M, Clackson TP, Bye JM, Winter G. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. Bio/technology. 1992;10:779-83.
35. Stemmer WP. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature. 1994;370:389-91.
36. Gram H, Marconi LA, Barbas CF, 3rd, Collet TA, Lerner RA, Kang AS. In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89:3576-80.
37. Barbas CF, 3rd, Hu D, Dunlop N, Sawyer L, Cababa D, Hendry RM, et al. In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:3809-13.
38. Schier R, McCall A, Adams GP, Marshall KW, Merritt H, Yim M, et al. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. Journal of molecular biology. 1996;263:551-67.
39. Sidman KR, Steber WD, Schwope AD, Schnaper GR. Controlled release of macromolecules and pharmaceuticals from synthetic polypeptides based on glutamic acid. Biopolymers. 1983;22:547-56.
40. Langer R, Brem H, Tapper D. Biocompatibility of polymeric delivery systems for macromolecules. Journal of biomedical materials research. 1981;15:267-77.
41. R.P. R. Remington's Pharmaceutical Sciences. 16th ed: Mack Pub. Co; 1980.
42. Stewart JM. Solid Phase Peptide Synthesis. 2nd ed: Pierce Chemical Co; 1984.
43. Miklos Bodanszky AB, Barry M. Trost The Practice of Peptide Synthesis 1984.
44. Pluckthun A. Antibody engineering: advances from the use of Escherichia coli expression systems. Bio/technology. 1991;9:545-51.
45. Reff ME. High-level production of recombinant immunoglobulins in mammalian cells. Current opinion in biotechnology. 1993;4:573-6.
46. Trill JJ, Shatzman AR, Ganguly S. Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. Current opinion in biotechnology. 1995;6:553-60.

47. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed; 1989.
48. Ausubel FM. Short Protocols in Molecular Biology; 1992.
49. Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Jabado-Michaloud J, Folch G, Bella hcene F, et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. Nucle ic acids research. 2009;37:D1006-12.
50. Jones ST, Bendig MM. Rapid PCR-cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions. Bio/technology. 1991;9:579.
51. Simpson JA, Al-Attar A, Watson NF, Scholefield JH, Ilyas M, Durrant LG. I ntratumoral T cell infiltration, MHC class I and STAT1 as biomarkers of good pro gnosis in colorectal cancer. Gut. 2010;59:926-33.
52. Duncan TJ, Rolland P, Deen S, Scott IV, Liu DT, Spendlove I, et al. Loss of IFN gamma receptor is an independent prognostic factor in ovarian cancer. Cli nical cancer research : an official journal of the American Association for Canc er Research. 2007;13:4139-45.
53. Abdel-Fatah T, Arora A, Gorguc I, Abbotts R, Beebeejaun S, Storr S, et al . Are DNA repair factors promising biomarkers for personalized therapy in gastri c cancer? Antioxidants & redox signaling. 2013;18:2392-8.
54. Storr SJ, Zaitoun AM, Arora A, Durrant LG, Lobo DN, Madhusudan S, et al. Calpain system protein expression in carcinomas of the pancreas, bile duct and a mpulla. BMC cancer. 2012;12:511.
55. Kohls MD, Lappi DA. Mab-ZAP: a tool for evaluating antibody efficacy for use in an immunotoxin. BioTechniques. 2000;28:162-5.

【図１ａ－１】



【図１ａ－２】

【図１ａ－３】

図１ａ（続き）

```
FG129_29H     ccc agg gat tgt ggt tgt aag cct tgc ata tgt aca gtc cca gaa
          241 V  S  S  V  F  I  F  P  P  K  P  K  D  V  L
FG129_29H     gta tca tct gtc ttc atc ttc ccc cca aag ccc aag gat gtg ctc
          256 T  I  T  L  T  P  K  V  T  C  V  V  V  D  I
FG129_29H     acc att act ctg act cct aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac atc
          271 S  K  D  D  P  E  V  Q  F  S  W  F  V  D  D
FG129_29H     agc aag gat gat ccc gag gtc cag ttc agc tgg ttt gta gat gat
          286 V  E  V  H  T  A  Q  T  Q  P  R  E  E  Q  F
FG129_29H     gtg gag gtg cac aca gct cag acg caa ccc cgg gag gag cag ttc
          301 N  S  T  F  R  S  V  S  E  L  P  I  M  H  Q
FG129_29H     aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctt ccc atc atg cac cag
          316 D  W  L  N  G  K  E  F  K  C  R  V  N  S  A
FG129_29H     gac tgg ctc aat ggc aag gag ttc aaa tgc agg gtc aac agt gca
          331 A  F  P  A  P  I  E  K  T  I  S  K  T  K  G
FG129_29H     gct ttc cct gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa acc aaa ggc
          346 R  P  K  A  P  Q  V  Y  T  I  P  P  P  K  E
FG129_29H     aga ccg aag gct cca cag gtg tac acc att cca cct ccc aag gag
          361 Q  M  A  K  D  K  V  S  L  T  C  M  I  T  D
FG129_29H     cag atg gcc aag gat aaa gtc agt ctg acc tgc atg ata aca gac
          376 F  F  P  E  D  I  T  V  E  W  Q  W  N  G  Q
FG129_29H     ttc ttc cct gaa gac att act gtg gag tgg cag tgg aat ggg cag
          391 P  A  E  N  Y  K  N  T  Q  P  I  M  N  T  N
```

【図１ａ－４】

図１ａ（続き）

```
FG129_29H     cca gcg gag aac tac aag aac act cag ccc atc atg aac acg aat
          406 G  S  Y  F  V  Y  S  K  L  N  V  Q  K  S  N
FG129_29H     ggc tct tac ttc gtc tac agc aag ctc aat gtg cag aag agc aac
          421 W  E  A  G  N  T  F  T  C  S  V  L  H  E  G
FG129_29H     tgg gag gca gga aat act ttc acc tgc tct gtg tta cat gag ggc
          436 L  H  N  H  H  T  E  K  S  L  S  H  S  P  G
FG129_29H     ctg cac aac cac cat act gag aag agc ctc tcc cac tct cct ggt
          451 K
FG129_29K     aaa
```

【図１ｂ－１】

図１ｂ

```
                                                    -20 M  E  S  Q  T
                                                        atg gaa tca cag act
                                  リーダー
          -15 Q  V  L  M  S  L  L  F  W  V  S  G  T  C  G
FG129_29K     cag gtc ctc atg tcc ctg ctg ttc tgg gta tct ggt acc tgt ggg

              <------------------------ FR1 - IMGT ---------------------
            1 D  I  V  M  T  Q  S  P  S  S  L  T  V  T  A
FG129_29K     gac att gtg atg aca cag tct cca tcc tcc ctg act gtg aca gca

              ---------------  FR1 - IMGT  ------------>  CDR1 - IMGT
           16 G  E  K  V  T  M  S  C  K  S  S  Q  S  L  L
FG129_29K     gga gag aag gtc act atg agc tgc aag tcc agt cag agt ctg tta

              ---------  CDR1 - IMGT  ----------  <--------  FR2 - IMGT  ----
           31 N  S  G  N  Q  K  N  Y  L  T  W  Y  Q  Q  K
FG129_29K     aac agt gga aat caa aag aac tac ttg acc tgg tac cag cag aaa

              -------------  FR2 - IMGT  ------------>  CDR2 - IMGT  ---
           46 P  G  Q  P  P  K  V  L  I  Y  W  A
FG129_29K     cca ggg cag cct cct aaa gtg ttg atc tac tgg gca ... ... ...

              ---  CDR2 - IMGT  ---  <--------------  FR3 - IMGT  ----------
           61                 S  T  R  E  S  G  V  P        D  R
FG129_29K     ... ... ... ... tcc act agg gaa tct ggg gtc cct ... gat cgc

              -------------------------  FR3 - IMGT  ----------------------
           76 F  T  G  S  G              S  G  T  D  F  T  L  T
FG129_29K     ttc aca ggc agt gga ... ... tct gga aca gat ttc act ctc acc
```

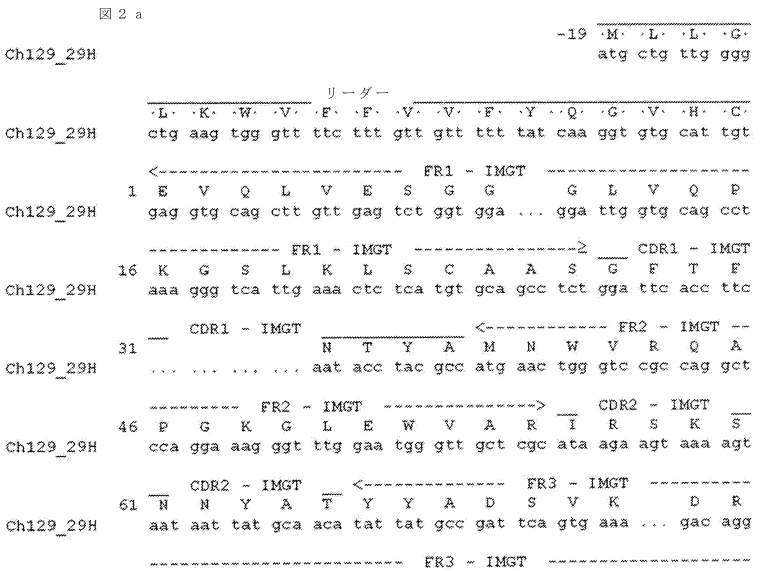
【図１ｂ－２】

図１ｂ（続き）

```
              ---------------------  FR3 - IMGT  --------------------->  ---
           91 I  S  S  V  Q  A  E  D  L  A  V  Y  Y  C  Q
FG129_29K     atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag

              --------  CDR3 -  IMGT  ---------
          106 N  D  Y  S  S  P  F  T  F  G  S  G  T  K  L
FG129_29K     aat gat tat agt tct cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg

          121 E  I  K  R  A  D  A  A  P  T  V  S  I  F  P
FG129_29K     gaa ata aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca

          136 P  S  S  E  Q  L  T  S  G  G  A  S  V  V  C
FG129_29K     cca tcc agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc

          151 F  L  N  N  F  Y  P  K  D  I  N  V  K  W  K
FG129_29K     ttc ttg aac aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag

          166 I  D  G  S  E  R  Q  N  G  V  L  N  S  W  T
FG129_29K     att gat ggc agt gaa cga caa aat ggc gtc ctg aac agt tgg act

          181 D  Q  D  S  K  D  S  T  Y  S  M  S  S  T  L
FG129_29K     gat cag gac agc aaa gac agc acc tac agc atg agc agc acc ctc

          196 T  L  T  K  D  E  Y  E  R  H  N  S  Y  T  C
FG129_29K     acg ttg acc aag gac gag tat gaa cga cat aac agc tat acc tgt

          211 E  A  T  H  K  T  S  T  S  P  I  V  K  S  F
FG129_29K     gag gcc act cac aag aca tca act tca ccc att gtc aag agc ttc

          226 N  R  N  E  C
FG129_29K     aac agg aat gag tgt
```

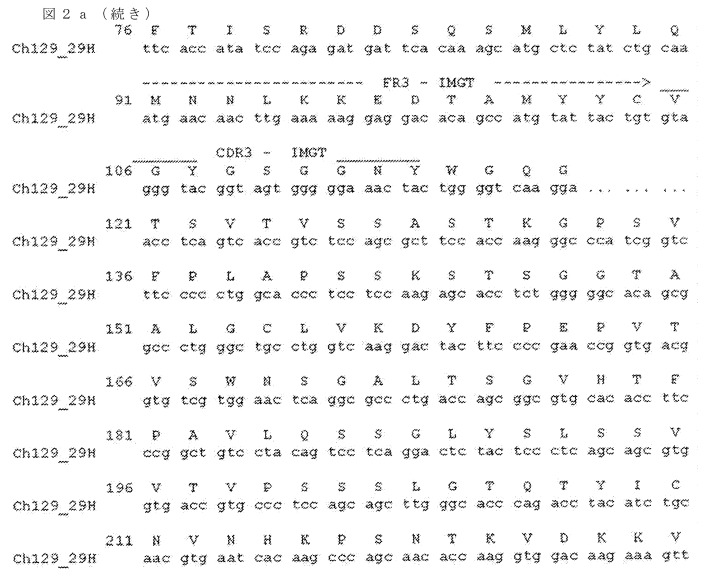
【図２ａ－１】

図２ａ



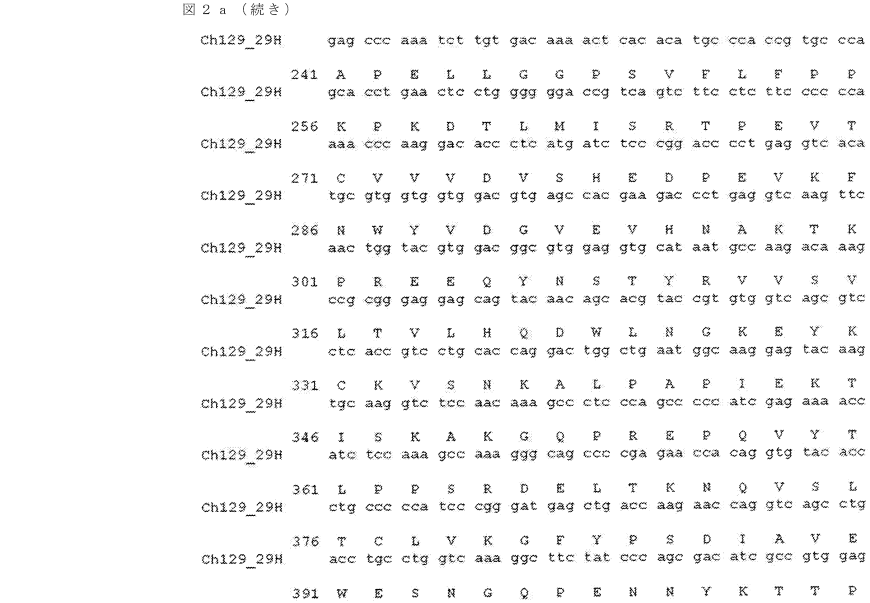
【図２ａ－２】

図２ａ（続き）



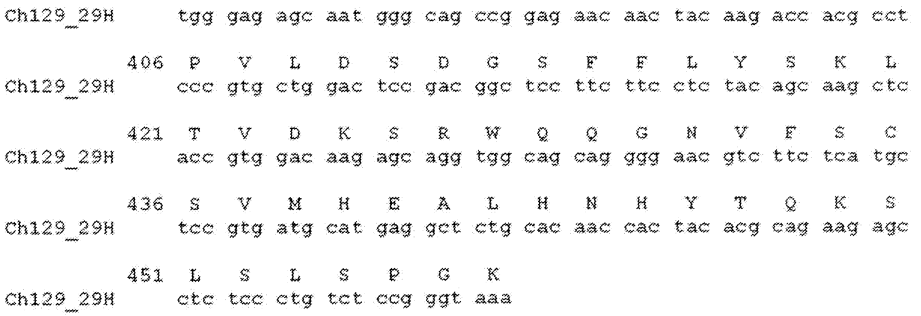
【図２ａ－３】

図２ａ（続き）

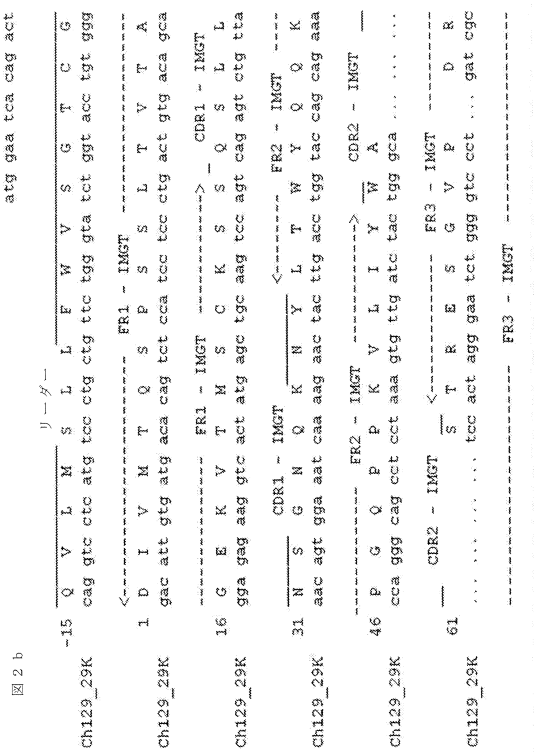


【図２ａ－４】

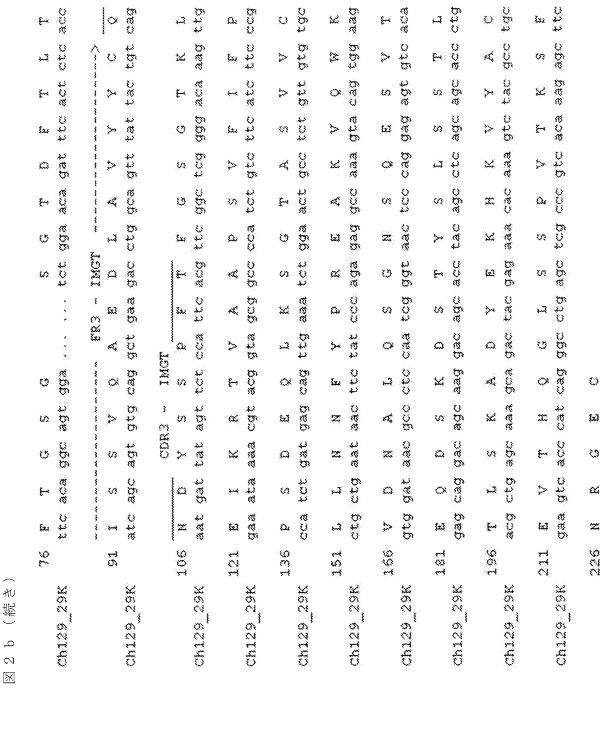
図２ａ（続き）



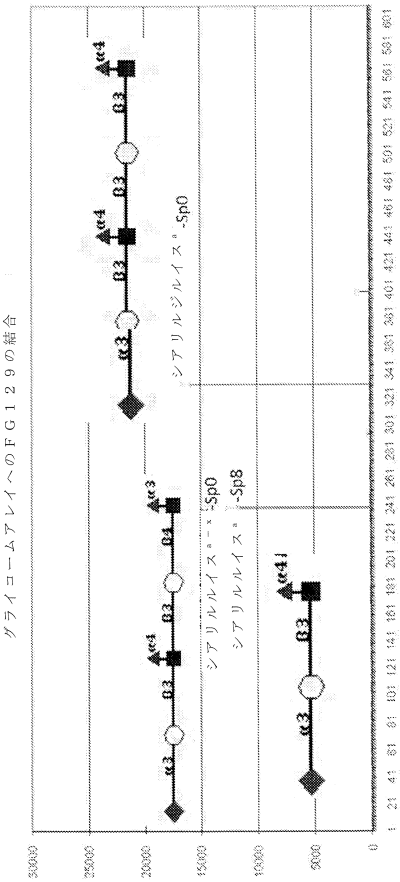
【図２ｂ－１】



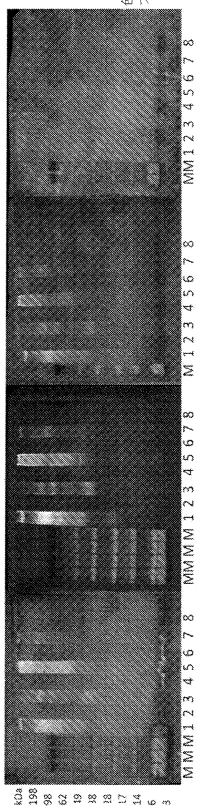
【図２ｂ－２】



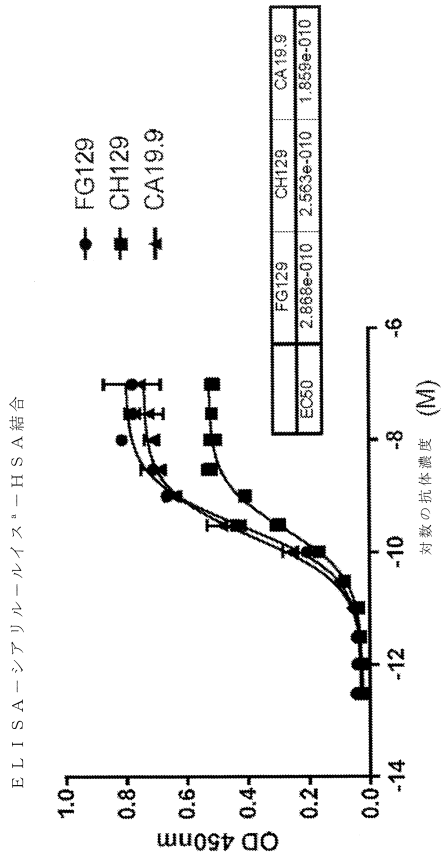
【図３ａ】



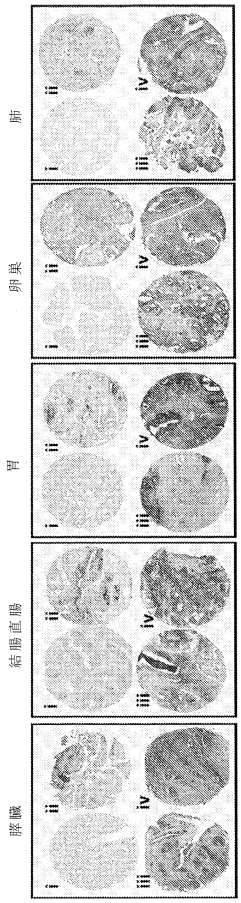
【図３ｂ】



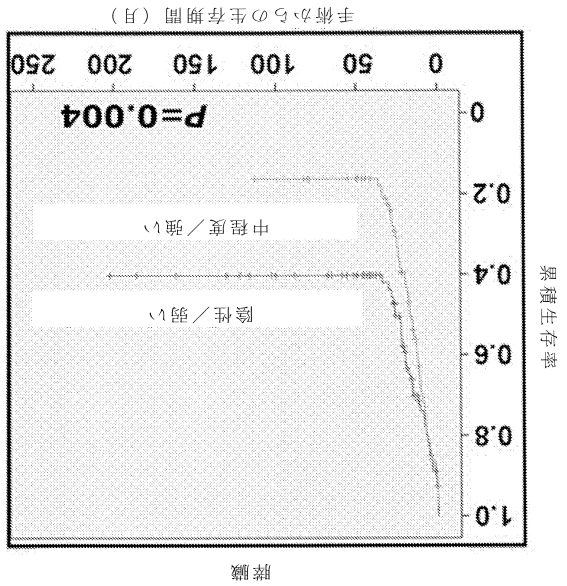
【図４】



【図５ａ】



【図５ｂ】



【図５ｃ】

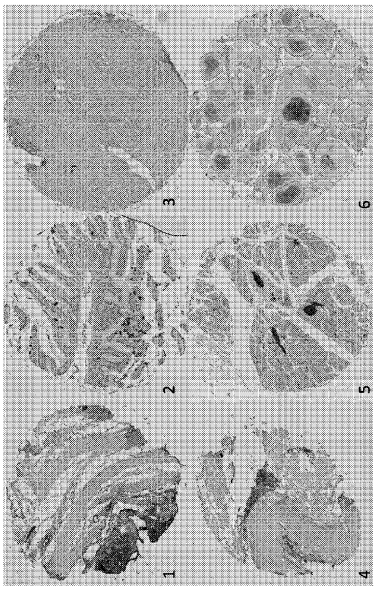
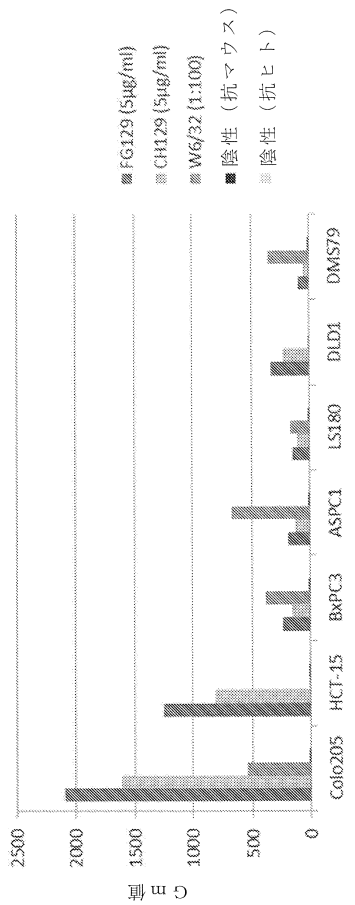
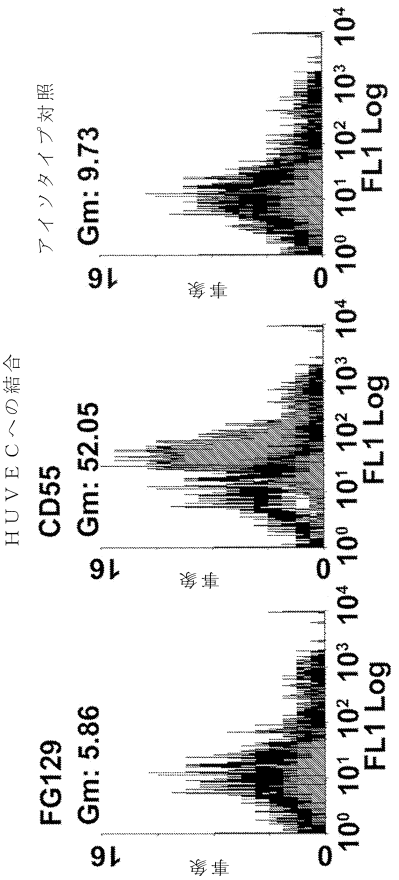


Figure 5c

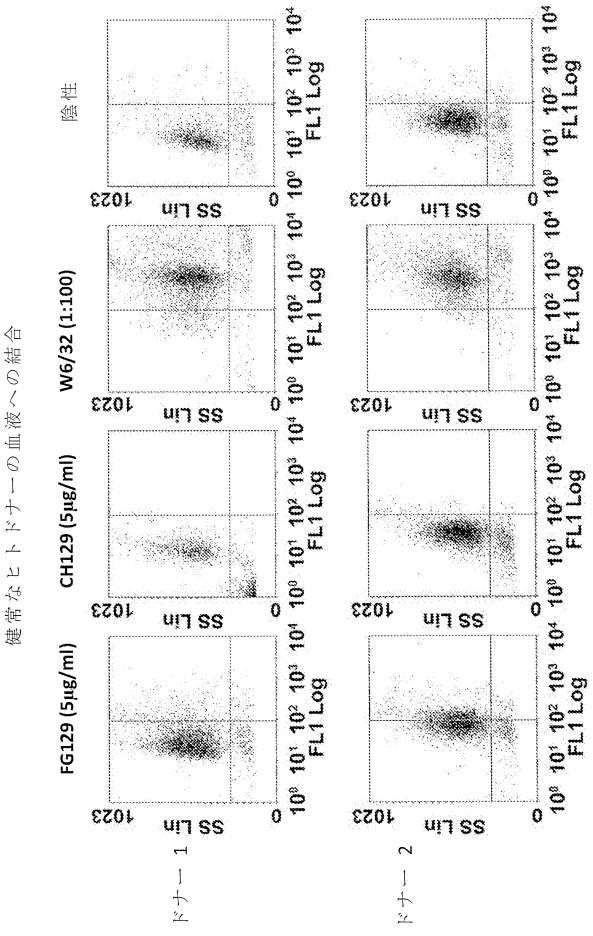
【図６ａ】



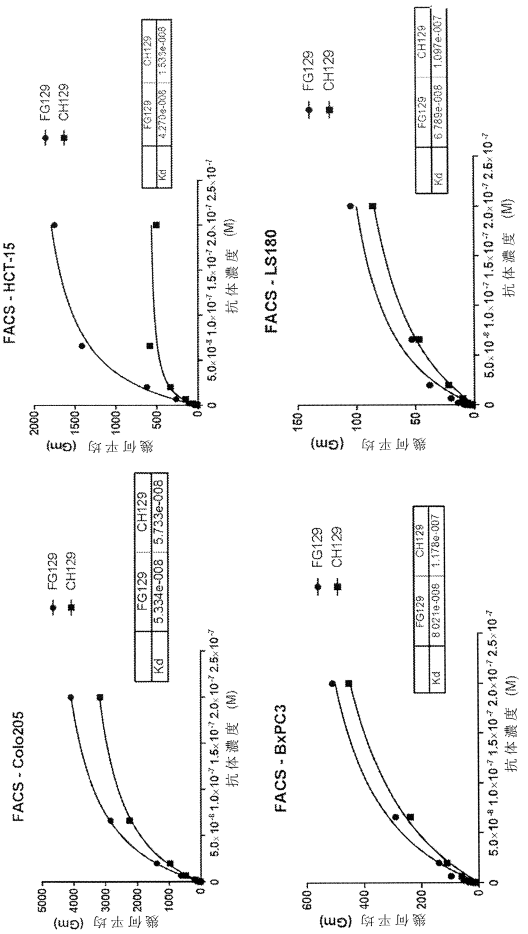
【図６ｂ】



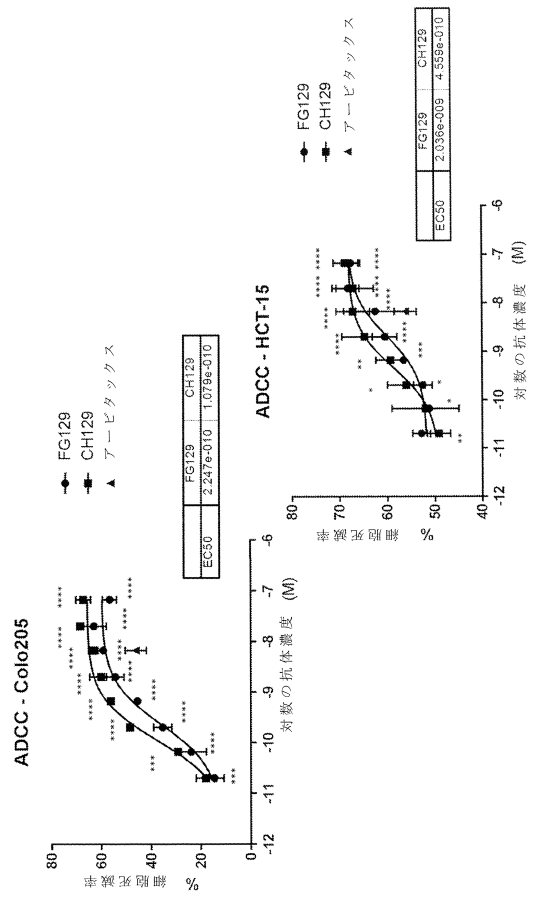
【図６ｃ】



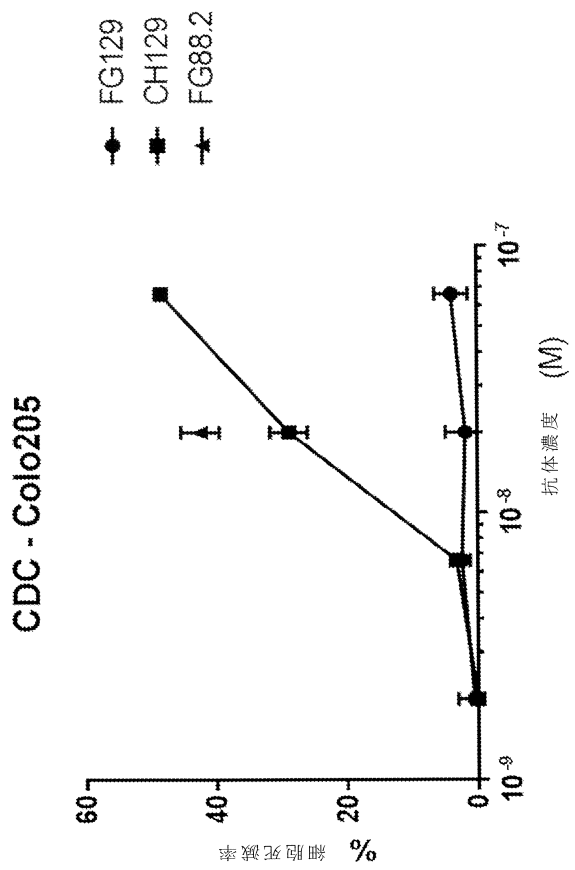
【図７】



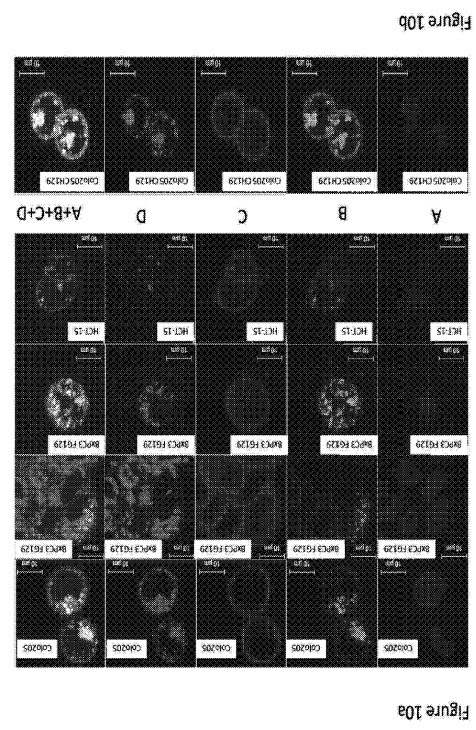
【図８】



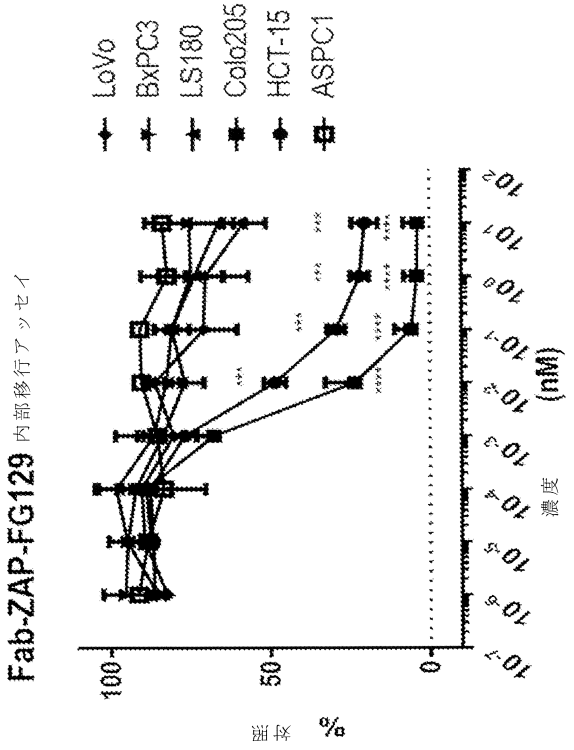
【図９】



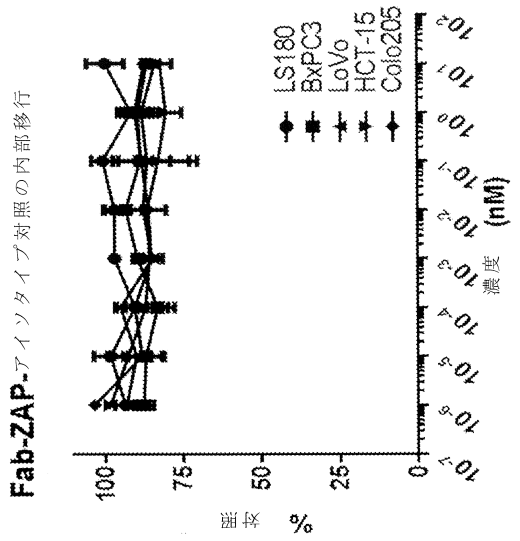
【図１０ａ－１０ｂ】



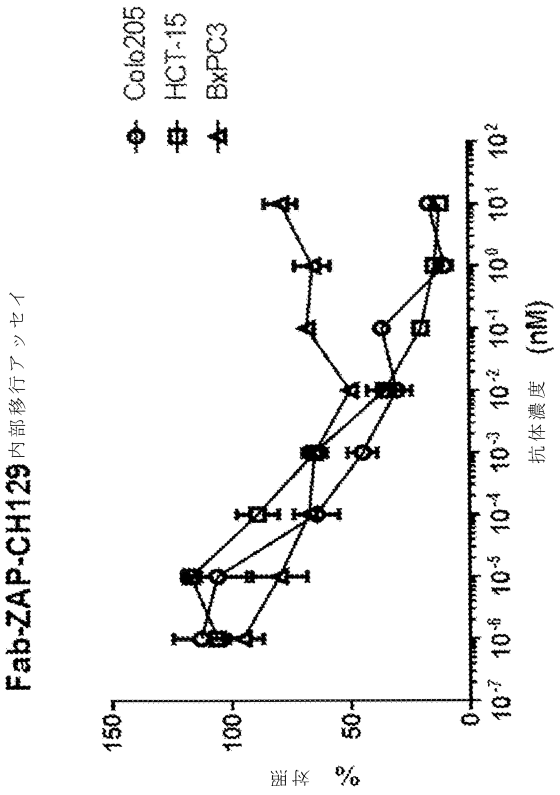
【図１１ａ】



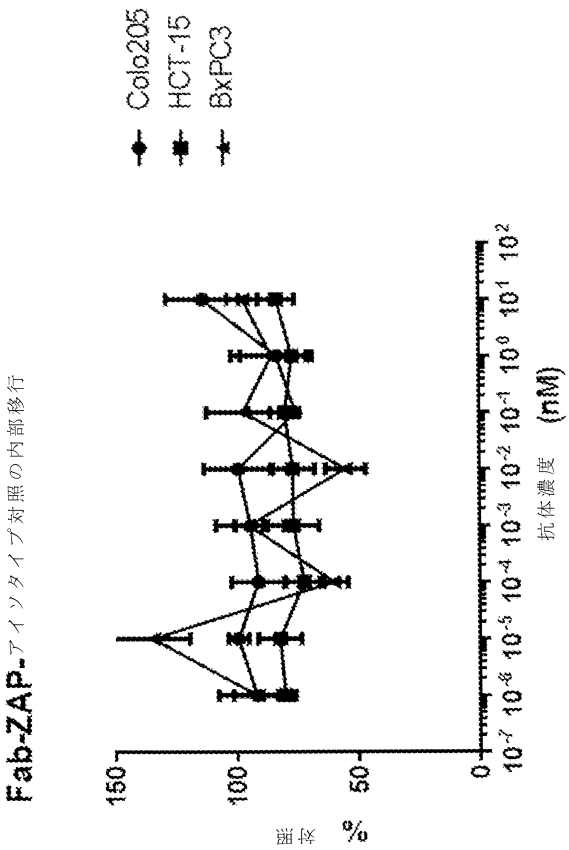
【図１１ｂ】



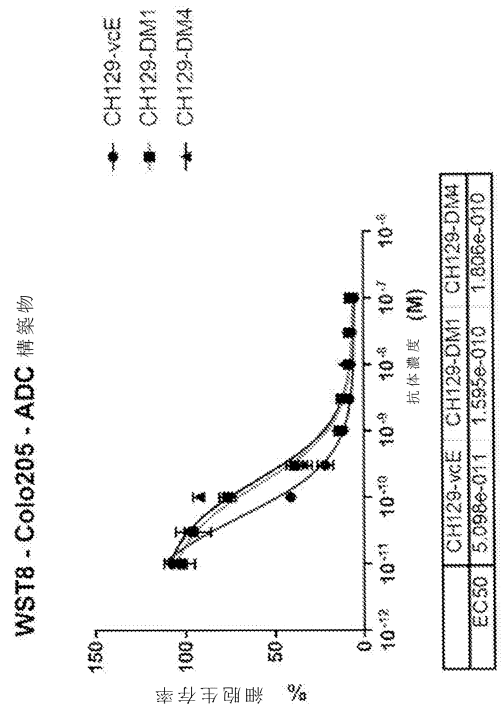
【図１１ｃ】



【図１１ｄ】

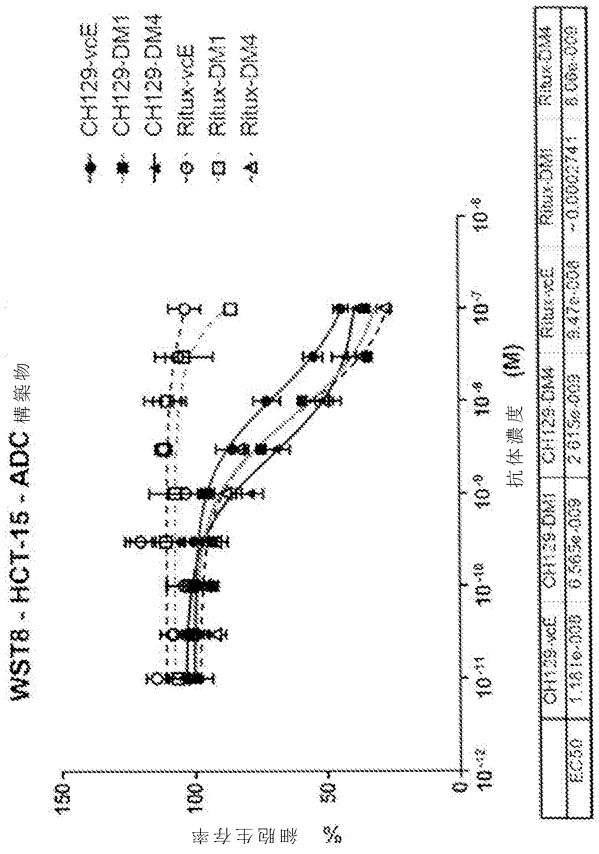


【図１１ｅ】



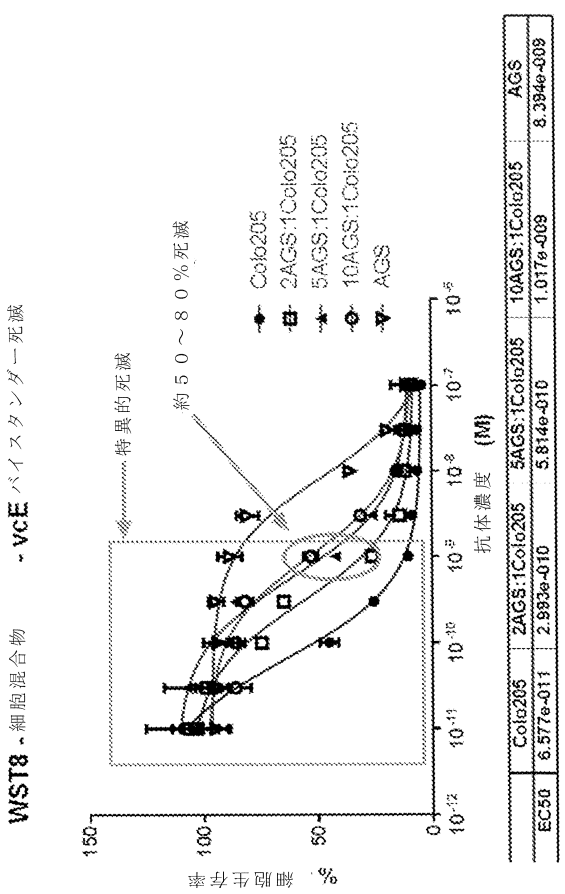
	CH129-vcE	CH129-DM1	CH129-DM4
EC50	5.098e-011	1.595e-010	1.806e-010

【図１１ｆ】



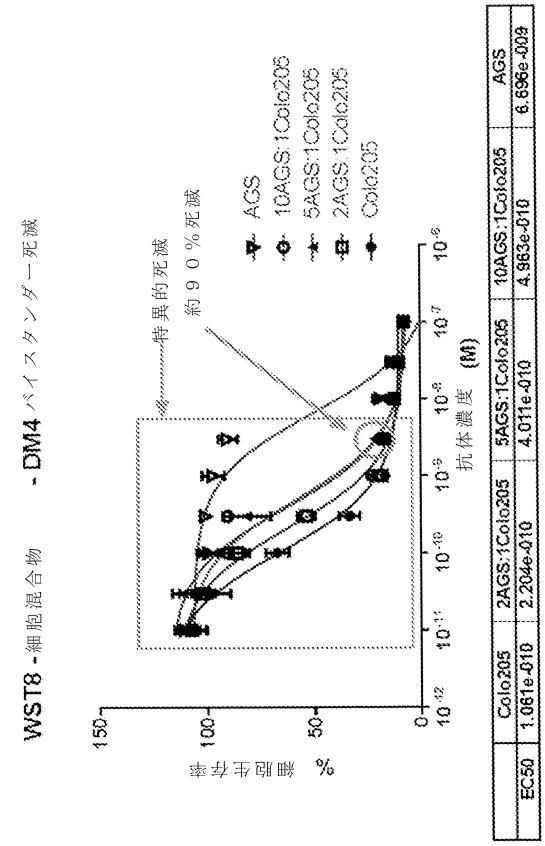
	CH129-vcE	CH129-DM1	CH129-DM4	Rilux-vcE	Rilux-DM1	Rilux-DM4
EC50	1.181e-008	6.565e-009	2.815e-009	8.477e-008	~0.0002741	8.068e-009

【図１１ｇ】



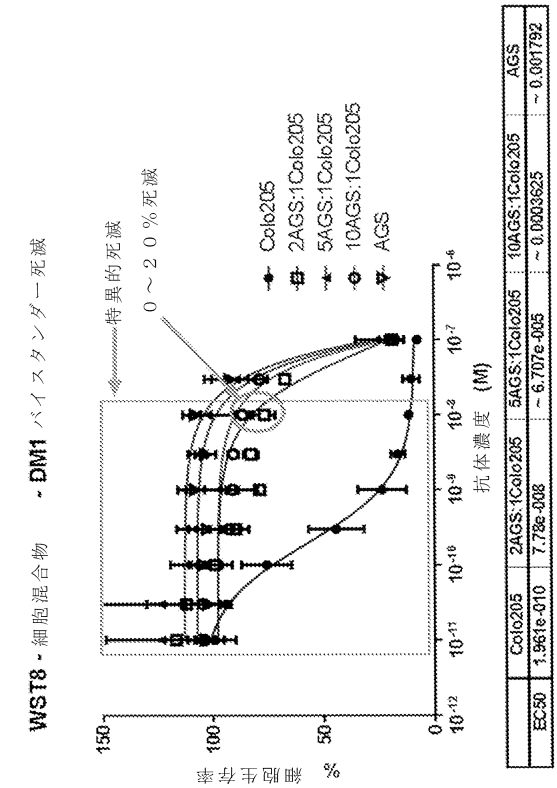
	Colo205	2AGS:1Colo205	5AGS:1Colo205	10AGS:1Colo205	AGS
EC50	6.577e-011	2.993e-010	5.814e-010	1.017e-009	8.394e-009

【図１１ｈ】



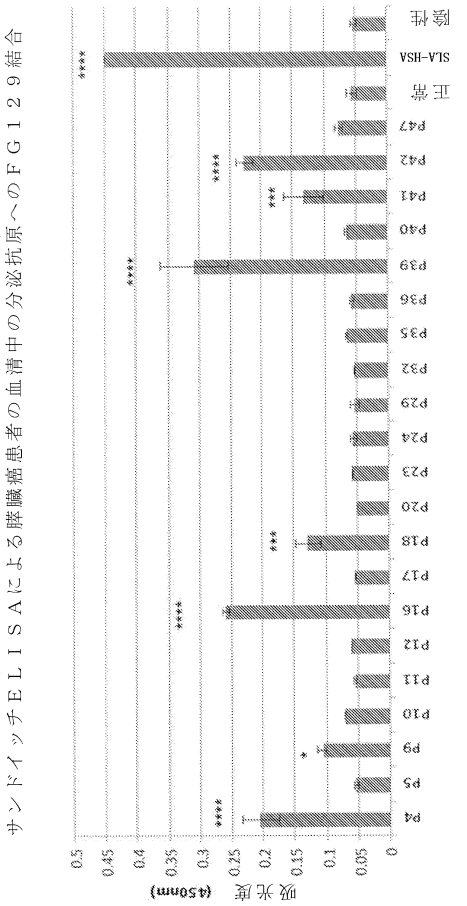
	Colo205	2AGS:1Colo205	5AGS:1Colo205	10AGS:1Colo205	AGS
EC50	1.061e-010	2.204e-010	4.011e-010	4.963e-010	6.696e-009

【図１１ｉ】

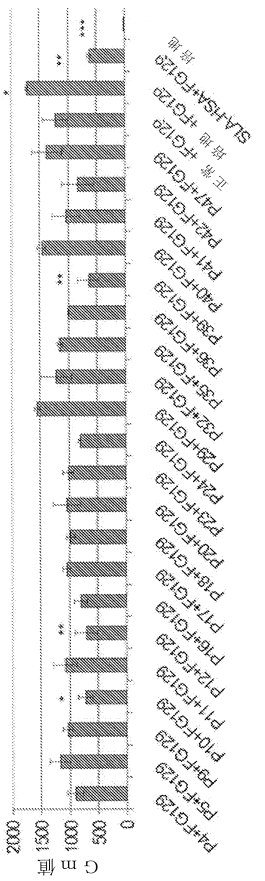


	Colo205	2AGS:1Colo205	5AGS:1Colo205	10AGS:1Colo205	AGS
EC50	1.961e-010	7.78e-008	~6.707e-005	~0.0003625	~0.001792

【図１２ａ】



【図１２ｂ】



膵臓癌患者の血清

【図１３ａ－１】

図１３ａ

FG129-scFv
<---------- リーダー ----------->
atgctgctgggcctgaagtgggttttcttttgttttatcaagtgtgcatctatcg
MetLeuLeuGlyLeuLysTrpValPhePheValValIleSerValHisSerIleS

FG129-scFv
<---------- 重鎖可変領域 ----------->
atggaggtgcagcttgttgagtctgggggaggattggtgcagcctaaaagggtcattgaaa
MetGluValGlnLeuValGluSerGlyGlyGlyLeuValGlnProLysGlySerLeuLys

FG129-scFv
<---------- 重鎖可変領域 ----------->
ctcttcattgtagcagcctcaactggattcaccttcagtgactatgccatgagctgggtccgc
LeuSerCysAlaAlaSerGlyPheThrPheSerAspTyrAlaMetSerTrpValArgGln

FG129-scFv
<---------- 重鎖可変領域 ----------->
gctccagggaaaggggttgtggaatgggtttcatcgcataagaagcaaagcaaatagtatgcga
AlaProGlyLysGlyLeuGluTrpValAlaPheIleArgSerLysSerAsnAsnTyrAla

FG129-scFv
<---------- 重鎖可変領域 ----------->
acaatatatgccgattcagtgaaaggcaggttcaccatctccagagatgattcacaaagtc
ThrTyrTyrAlaAspSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAspSerGlnSer

FG129-scFv
<---------- 重鎖可変領域 ----------->
atgctcatctatgcaaatgaacaactgaaagaggacacagccatgtatttactatgtgta
MetLeuTyrLeuGlnMetAsnAsnLeuLysGluAspThrAlaMetTyrTyrCysVal

FG129-scFv
<---------- 重鎖可変領域 ----------><--
gggtacgcggtagtgggggaaactactgggtccaggaaactcagtcaccgtctcctcagtct
GlyTyrGlySerGlyGlyAsnTyrTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSerGly

FG129-scFv
<---- 3×GGGGSリンカー ----><----------
ggaggcggttcaggcggaggtggctctgggggaggcggatcaagacattgtgatgacacag
GlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerAspIleValMetThrGln

FG129-scFv
<---------- 軽鎖可変領域 ----------->
tctgcatctcccggactgtcagcaggagagaagtcactatgagctgcaagtccagt
SerProSerLeuProValThrAlaGlyGluLysValThrMetSerCysLysSerSer

【図１３ａ－２】

図１３ａ（続き）

FG129-scFv
<---------- 軽鎖可変領域 ----------->
cagagtctgttaaacagtggaaatcaaaagaactacttgacctggtaccagcagaaaccca
GlnSerLeuLeuAsnSerGlyAsnGlnLysAsnTyrLeuThrTrpTyrGlnGlnLysPro

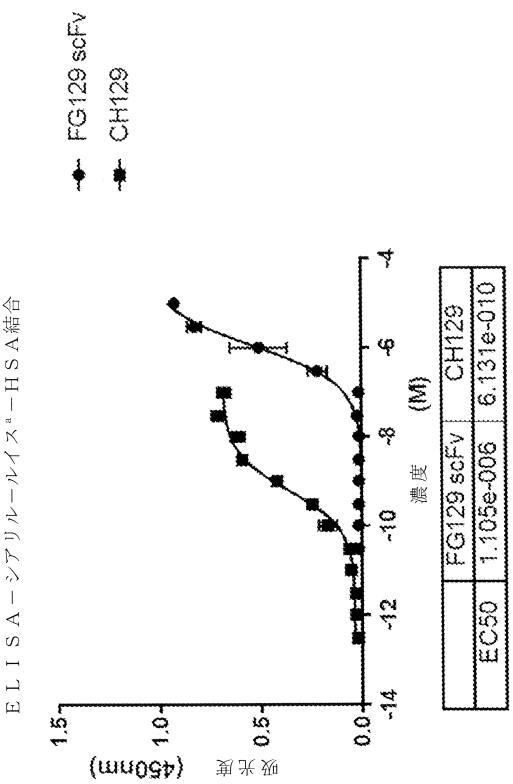
FG129-scFv
<---------- 軽鎖可変領域 ----------->
gggcagcctcctaaagtgttgatctacttgggcatctagggaatctgggtccctgat
GlyGlnProProLysValLeuIleTyrTrpAlaSerThrArgGluSerGlyValProAsp

FG129-scFv
<---------- 軽鎖可変領域 ----------->
cgcttcacaggcagtggatctggaacagatttcactctcaccatcagcagtgtgcaggct
ArgPheThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerValGlnAla

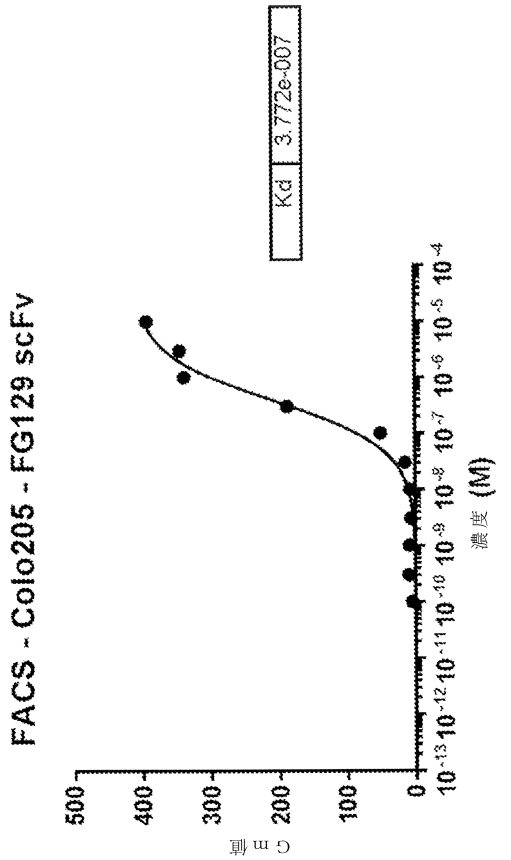
FG129-scFv
<---------- 軽鎖可変領域 ----------->
gaagacctggcagtttatactgtcagaatgattatagttctccattcacgttcggctcg
GluAspLeuAlaValTyrTyrCysGlnAsnAspTyrSerSerProPheThrPheGlySer

FG129-scFv
<---------- ><--- ポリ－Ala及び6×Hisタグ --->
gggacaaagttggaaataaacgggcgccgctgcaggccatcaccatcaccatcacca
GlyThrLysLeuGluIleLysArgAlaAlaAlaAlaHisHisHisHisHisOc*

【図１３ｂ】


ＥＬＩＳＡ－シアリルールイスａ－ＨＳＡ結合
FG129 scFv
CH129
吸光度 (450nm)
濃度 (M)
FG129 scFv
CH129
EC50
1.105e-006
6.131e-010

【図１３ｃ】


FACS - Colo205 - FG129 scFv
Kd
3.772e-007
G m 値
濃度 (M)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10	
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00	
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	E

(72)発明者 ヴァンケムメルベイク, ミレイユ
イギリス国, エヌジー7 2アールディー, ノッティンガムシャー, ノッティンガム, ユニバーシティ パーク, ザ ユニバーシティ オブ ノッティンガム
(72)発明者 ティヴァダル, シルヴァナ
イギリス国, エヌジー7 2アールディー, ノッティンガムシャー, ノッティンガム, ユニバーシティ パーク, ザ ユニバーシティ オブ ノッティンガム
(72)発明者 パーソンズ, ティナ
イギリス国, エヌジー7 2アールディー, ノッティンガムシャー, ノッティンガム, ユニバーシティ パーク, ザ ユニバーシティ オブ ノッティンガム
(72)発明者 マッキントッシュ, リチャード
イギリス国, エヌジー7 2アールディー, ノッティンガムシャー, ノッティンガム, ユニバーシティ パーク, ザ ユニバーシティ オブ ノッティンガム

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 Philip, W. N., Characterisation of anti-glycan monoclonal antibodies, [online], 2011.01.01., [retrieved on 2020.05.20], <URL:http://eprints.nottingham.ac.uk/12071/1/Final_Thesis_for_Submission_16.6.11.pdf>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
CAplus/REGISTRY(STN)