

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4124486号
(P4124486)

(45) 発行日 平成20年7月23日(2008.7.23)

(24) 登録日 平成20年5月16日(2008.5.16)

(51) Int. Cl.	F I	
C 0 7 K 1 6 / 3 0	(2006. 01)	C O 7 K 1 6 / 3 0
C 1 2 N 1 5 / 0 9	(2006. 01)	C 1 2 N 1 5 / 0 0 Z N A A
C 1 2 N 1 / 1 5	(2006. 01)	C 1 2 N 1 / 1 5
C 1 2 N 1 / 1 9	(2006. 01)	C 1 2 N 1 / 1 9
C 1 2 N 1 / 2 1	(2006. 01)	C 1 2 N 1 / 2 1

請求項の数 28 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-542853	(73) 特許権者	500020807
(86) (22) 出願日	平成9年5月22日(1997.5.22)		ビベンティア バイオテック インコーポ レイテッド
(65) 公表番号	特表2000-511421(P2000-511421A)		カナダ国 エル4ダブリュー 5エヌ5 オンタリオ, ミシサーガ, スペクトラム ウェイ 5060, スイート 405
(43) 公表日	平成12年9月5日(2000.9.5)	(74) 代理人	100078282
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/008962		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W01997/044461	(74) 代理人	100062409
(87) 国際公開日	平成9年11月27日(1997.11.27)		弁理士 安村 高明
審査請求日	平成16年5月20日(2004.5.20)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	08/657, 449		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成8年5月22日(1996.5.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ガン細胞を特異的に検出する抗原結合フラグメント、このフラグメントをコードするヌクレオチド、ならびにガンの予防および検出のためのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体の抗原結合フラグメントを含有する組成物であって、
該抗体は、
配列番号2に示されるH11抗体のH鎖V領域のアミノ酸配列と、配列番号5において示されるH11抗体のL鎖V領域のアミノ酸配列とを含むか；
配列番号14に示されるH11-scfvのH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含むか；あるいは
配列番号17に示されるH11-scfvのH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列を含む、組成物。

【請求項2】

少なくとも神経膠腫細胞、黒色腫細胞、乳ガン細胞、肺ガン細胞、卵巣ガン細胞、リンパ腫細胞、胃ガン細胞、結腸ガン細胞または前立腺ガン細胞のいずれか1つ以上に特異的に結合するが、少なくとも脳組織、皮膚組織、胸部組織、肺組織、卵巣組織、リンパ節組織、大腸組織および前立腺組織の正常な非ガン性細胞には結合しない、請求項1に記載の抗体の抗原結合フラグメントを含有する組成物。

【請求項3】

抗体の抗原結合フラグメントを含有する組成物であって、
該抗体が、配列番号2に示されるH11抗体のH鎖V領域と、配列番号5において示されるH11抗体のL鎖V領域とを含むか；配列番号14に示されるH11-scfvのH鎖

V領域およびL鎖V領域を含むか；あるいは配列番号17に示されるH11-scfvのH鎖V領域およびL鎖V領域を含み；

該抗原結合フラグメントは、少なくとも神経膠腫細胞、黒色腫細胞、乳ガン細胞、肺ガン細胞、卵巣ガン細胞、リンパ腫細胞、胃ガン細胞、結腸ガン細胞または前立腺ガン細胞のいずれか1つ以上に存在する細胞表面抗原への抗体の特異的な結合を阻害し得；

該抗原結合フラグメントが、該抗体の結合を減少するように該抗原に特異的に結合し、そして

該抗原結合フラグメントが、少なくとも脳組織、皮膚組織、胸部組織、肺組織、卵巣組織、リンパ節組織、大腸組織および前立腺組織の正常な非ガン性細胞に特異的には結合しない、

組成物。

【請求項4】

前記抗原結合フラグメントが、ネイティブな抗体全体、二重特異性抗体、キメラ抗体、Fab、F(ab')₂、単鎖V領域フラグメント(scfv)および融合ポリペプチドからなる群より選択される、請求項1～3に記載の組成物。

【請求項5】

前記抗原結合フラグメントが、配列番号14もしくは17において記載されるH11-scfvのH鎖V領域およびL鎖V領域のアミノ酸配列と同一である、アミノ酸配列を含むscfvである、請求項1～3に記載の組成物。

【請求項6】

前記抗原結合フラグメントが、シグナルペプチド、免疫学的反応性を増強する因子、固体支持体へのカップリングを容易にする因子、キャリア、生体応答調節因子、トキシン、検出可能な標識、常磁性標識、および薬物からなる群より選択される部分に融合されている、請求項1～3に記載の組成物。

【請求項7】

前記固体支持体へのカップリングを容易にする因子が、ビオチンおよびアビジンからなる群より選択される、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

前記キャリアは、多糖類、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、不活性ウイルス粒子または弱毒化細菌、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、Ig分子、チログロブリン、オボアルブミン、および破傷風トキソイドからなる群より選択される、請求項6～7のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項9】

前記薬物が、放射性同位元素、ピンカアルカロイド、アドリアマイシン、硫酸ブレオマイシン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、塩酸デュアノルピシン、塩酸ドキシソルピシン、エトポシド、フルオロウラシル、ロムスチン、塩酸メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトーテン、ペントスタチン、ピボプロマン、塩酸プロカルバジン、ストレプトゾトシン、タキソール、チオグアニンおよびウラシルマスタードからなる群より選択される抗腫瘍剤である、請求項6に記載の組成物。

【請求項10】

前記ピンカアルカロイドが、硫酸ピンプラスチン、硫酸ピンクリスチンおよび硫酸ピンデシンからなる群より選択される、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

前記トキシゲンが、リシン、放射性核種、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュードモナスエキソトキシンA、ジフテリアトキシン、リシンA鎖、レストリクトシンおよびホスホリパーゼ酵素からなる群より選択される、請求項6に記載の組成物。

【請求項12】

請求項1～11のいずれかに記載の複数の抗原結合フラグメントを含む、ポリマーペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記抗原結合フラグメントをコードする発現ベクターを使用し、細胞において該抗原結合フラグメントを発現させることによって、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の抗原結合フラグメントを作製するための、プロセス。

【請求項 14】

前記抗原結合フラグメントが、少なくとも神経膠腫細胞、黒色腫細胞、乳ガン細胞、肺ガン細胞、卵巣ガン細胞、リンパ腫細胞、胃ガン細胞、結腸ガン細胞または前立腺ガン細胞のいずれか 1 つ以上を特異的に結合するが、少なくとも脳組織、皮膚組織、胸部組織、肺組織、卵巣組織、リンパ節組織、大腸組織および前立腺組織の正常な非ガン性細胞には結合しない、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 15】

前記抗原結合フラグメントが、前記抗体によって特異的に結合される腫瘍に特異的に結合する、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の複数の抗原結合ポリペプチドフラグメントを含む、ポリマーペプチド。

【請求項 17】

前記抗原結合ポリペプチドフラグメントが、ヒト免疫グロブリン配列を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記抗原結合ポリペプチドフラグメントが、ヒト化抗原結合ポリペプチドフラグメントである、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 19】

請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の抗原結合フラグメントの H 鎖 V 領域を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、および請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の抗原結合フラグメントの L 鎖 V 領域を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 20】

発現ベクターである、請求項 19 に記載の 2 つのポリヌクレオチド。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の 2 つのポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。

30

【請求項 22】

新形成を処置するための個体への投与のための薬剤の製造における、有効量の請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の抗原結合フラグメントの、使用。

【請求項 23】

試料中の抗原を検出するための方法であって、以下の工程：

a) 安定な抗体 - 抗原複合体の形成を可能にする条件下で、請求項 1 ~ 18 のいずれかに規定される抗原結合フラグメントと該試料とを接触させる工程；および

b) 工程 a) で形成されたあらゆる安定な複合体を検出する工程を包含し、ここで該抗原は、配列番号 2、5、14、もしくは 17 に記載される H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域を含む H 11 抗体もしくは H 11 - s c F v 抗体に、特異的に結合する抗原である、方法。

40

【請求項 24】

前記抗原結合フラグメントをコードする発現ベクターを使用し、細胞において該抗原結合フラグメントを発現させることによって、請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の抗原結合フラグメントを作製するための、プロセス。

【請求項 25】

前記細胞が、E. coli 細菌細胞であり、そして前記発現ベクターが、該細菌細胞の周辺腔への該抗原結合フラグメントの標的化をするシグナル配列を、該抗原結合フラグメントのコード配列のすぐ上流に含む、請求項 24 のプロセス。

50

【請求項 26】

請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の抗原結合フラグメントに特異的に結合するエピトープを有する、ファージディスプレイによってファージ上でディスプレイされる、ポリペプチド。

【請求項 27】

請求項 1 ~ 5 に記載の抗原結合フラグメントを含む、ダイアボディ。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 5 に記載の抗原結合フラグメントを含む、ダイマー。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、新生物細胞で検出されるが正常細胞では検出されない抗原に特異的な抗体に関する。この抗原を、本明細書中では「C抗原」と呼ぶ。C抗原は、「H11」と呼ばれるヒトモノクローナル抗体 (Mab) によって認識される。本発明は、H11の免疫学的特異性を保持しそして本明細書中で「C」と呼ばれる広範な種々の抗体およびその機能的誘導体を包含する。例示的抗体のH11、H11を含む組成物、およびH11を産生するハイブリドーマは、本明細書中に含まれる。H11V領域ポリヌクレオチドおよびそれによってコードされるポリペプチドおよびこれらのポリヌクレオチドを含む組換え分子もまた、本発明に包含される。C抗体の治療および診断を含む使用方法もまた、本発明に包含される。

背景技術

医学的調査における多くの進歩にもかかわらず、ガンは、米国における死亡の2番目に主要な原因のままである。先進国においては、ほぼ5人に1人がガンで死亡する。外科的切除、放射線療法、および化学療法のような伝統的態様の臨床的ケアは、特に固形腫瘍に対して顕著な失敗率を有する。失敗は、最初の腫瘍が非応答性であるため、または元の部位および/または転移での再増殖による再発のためのいずれかで生じる。死亡率が減少している乳ガンのようなガンでさえ、好結果の介入は、ガン性細胞の早期検出に頼る。ガンの病因、診断、剥離は、医学的調査および開発の中心的焦点のままである。

良性腫瘍を生じる新形成は、通常、外科的に塊を除去することによって完全に治療され得る。腫瘍が、周辺組織の侵襲によって表されるように、悪性になる場合、根絶することが非常に困難になる。一旦悪性腫瘍が転移すると、ましてや根絶されることはないようである。

罹病率および死亡率の見地から、3つの主要なガンは、結腸ガン、乳ガン、および肺ガンである。新しい外科的手順は、結腸ガンに対して増加した生存率を与える。改善されたスクリーニング方法は、乳ガンの検出を増加させ、より初期でより攻撃的でない治療を可能にする。多くの研究は、早期検出が生存および処置の選択を増加させることを示している。肺ガンは、処置に対してたいがい不応性のままである。

基底細胞ガンを除いて、米国だけでも1年当たり100万を越えるガンの新症例があり、そしてガンがこの国での1年当たり50万を越える死亡の原因である。世界全体では、5つの最も普通のガンは、肺ガン、胃ガン、乳ガン、結腸/直腸ガン、および子宮頸ガンであり、そして1年当たりの新症例の合計数は600万を越える。ガンを発症する人々の約半数のみが、ガンで死亡する。

黒色腫は、新しい治療様式の緊急の必要性があるヒトの疾患の1つである。これは、特に攻撃的な形態の皮膚ガンであり、そして通常の無防備の日光曝露を受けた個体では頻度の増加を生じる。初期の疾患段階では、黒色腫は、真皮 - 上皮連結部での増殖によって特徴づけられ、これは隣接組織をすぐに侵襲しそして広く転移する。一旦これが転移すると、これは根絶することがしばしば不可能であり、そして結果的に死に至る。世界中では、70,000名の患者が黒色腫と診断され、そして各年の25,000名の報告された死亡の原因である。アメリカガン学会は、2000年までに、75名のアメリカ人あたり1名が黒色腫と診断されると見積もる。

神経芽細胞腫は、乳児期および初期幼児期に生じる非常に悪性の腫瘍である。ウィルムス腫瘍を除いて、これは子供において最も普通の腹膜後腫瘍である。この腫瘍は初期に転移

10

20

30

40

50

し、リンパ節、肝臓、骨、肺、および骨髄の広い併発を伴う。原発腫瘍は切除によって解決可能であるが、再発率は高い。

肺ガンの推定178,100の新しい症例が1997年に診断され、これはガンの診断の13%を占める。肺ガンによる推定160,400の死亡が1997年に生じ、すべてのガンでの死亡の29%を占める。肺ガンの1年生存率は、1973年の32%から1993年の41%に増加し、これは主として外科的技術の改善による。組み合わせたすべての段階についての5年生存率は、わずかに14%である。疾患がまだ局在しているときに検出された症例についての生存率は48%であるが、肺ガンの15%のみがその初期に発見される。

小細胞肺ガンは、最も悪性でかつ最も速く増殖する形態の肺ガンであり、そして肺ガンの新しい症例の20~25%を占める。60,000症例が、1996年に米国で診断される。原発腫瘍は、一般的に、化学療法に応答性であるが、広範に広がった転移が続く。診断での生存時間中央値は、約1年であり、5年生存率は5~10%である。

乳ガンは、最も普通のガンの1つであり、そして米国におけるガンによる死亡の3番目に主要な原因であり、1997年の間の米国における女性のなかで約180,200の新症例の1年出現率である。乳ガンの約1,400の新症例は、1997年に男性において診断される。先進国においては、8名の女性中約1名は、乳ガンを発現すると予測され得る。乳がんについての全体の死亡率は、1930年以外変わらないままである。これは、1年当たり平均0.2%増加しているが、65歳未満の年齢の女性では1年当たり平均0.3%減少している。予備データは、おそらく、インサイチュで局在化したガンおよびガン腫の診断が増加した結果として、乳ガン死亡率が減少し始め得ることを示唆する。例えば、Marchant (1994) Contemporary Management of Breast Disease II: Breast Cancer, Obstetrics and Gynecology Clinics of North America 21:555-560; および Colditz (1993) Cancer Suppl. 71:1480-1489を参照のこと。1997年に推定44,190名の死亡(43,900名の女性、290名の男性)が乳ガンによって生じる。女性では、肺ガンに次ぐ、ガン死亡の2番目の主要な原因である。局在化した乳ガンの5年生存率は、1940年代の72%から今日の97%まで増加している。しかし、ガンが局部的に広がった場合、生存率は76%であり、そして遠位に転移を有する女性については生存率は20%である。乳ガンの診断後の生存は、5年を越えて低下し続ける。乳ガンと診断された女性の65%が10年間生存し、そして56%が15年間生存する。

非ホジキンB細胞リンパ腫は、1996年に米国で約225,000名の患者を苦しめることが予測される、免疫系のガンである。これらのガンは、予後および処置に関して異なり、そして一般的に3つの等級の1つに分類される。最も低い等級の生存中央値は6.6年であり、より高い等級のガンは、ずっと低い平均余命を有する。事実上、すべての非ホジキンB細胞リンパ腫は不治である。非ホジキンリンパ腫の新しい診断は、過去10年にわたり毎年約7%増加しており、1996年には52,700名の新しい診断が見積もられる。この増加は、一部は、AIDS患者集団におけるリンパ腫の増加している流行による。

結腸ガンおよび直腸ガンは、1997年には推定131,200症例を数え、94,100の結腸ガンおよび37,100の直腸ガンを含む。直腸結腸ガンは、新しいガン診断の約9%を占める。直腸結腸ガンによる推定54,900名の死亡が1997年に生じ、ガンの死亡の約10%を占める。直腸結腸ガンについての死亡率は、過去20年の間に女性では32%および男性では14%下がり、このことは、発生率の減少および生存率の増加を反映する。しかし、アフリカ系アメリカ人男性における死亡率は上昇し続けている。結腸ガンおよび直腸ガンの患者についての1年間および5年間の相対生存率は、それぞれ、82%および61%である。直腸結腸ガンが、初期の局在化した段階で検出される場合、5年生存率は91%である;しかし、直腸結腸ガンの37%のみがその段階で発見される。隣接する器官またはリンパ節を含むようにガンが局部的に広がった後では、生存率は63%に下がる。遠位転移を有する人の生存率は7%である。生存は、5年を越えて低下し続け、そして50%が10年間生存する。

困難にもかかわらず、(単独または他の処置との組合せで)抗ガン薬を使用する有効な治療法は、いくつかの以前は高度に致死性であったガンについて考え出されている。これらの中で最も著名なものは、ホジキンリンパ腫、精巣ガン、絨毛ガン、ならびにいくつかの白血病および他の子供のガンである。より普通のガンのいくつかについては、早期診断、

10

20

30

40

50

適切な外科手術、または局所放射線治療が、大部分の患者の回復を可能にする。

ガン処置の現在の方法は、比較的非選択的である。外科手術は、患部組織を除去し、放射線治療は固形腫瘍を縮小させ、そして化学療法は速く分裂する細胞を殺傷する。化学療法は、特に、多くの副作用を生じ、いくつかの場合では、非常に重篤なので、潜在的に有効な薬物の使用を不可能にする。さらに、ガンは、しばしば、化学療法薬に対する耐性を発現する。

多くの努力が、ガン治療の特異性を増強するために行われている。総説については、kohn および Liotta (1995) Cancer Res. 55:1856-1862 を参照のこと。特に、ある腫瘍で排他的にまたは優先的に発現される細胞表面抗原の同定は、より選択的な処置ストラテジーの処方を可能にする。これらの抗原に対する抗体は、いくつかのタイプのガンの免疫療法で使用されている。

10

脊椎動物系における基本的な免疫グロブリン (Ig) 構造単位は、2つの同一の軽 (「L」) ポリペプチド鎖 (約23kDa)、および2つの同一の重 (「H」) 鎖 (約53~70kDa) から構成される。4つの鎖は、「Y」の立体配置にジスルフィド結合によって連結される。Yの基部では、2つのH鎖は、共有ジスルフィド結合によって結合される。

図1は、抗体難の概略図を示す。L鎖およびH鎖は、各々、N末端の可変 (V) 領域、およびC末端の定常 (C) 領域から構成される。L鎖では、V領域 (「V_LJ_L」と呼ぶ) は、連結 (J_L) 領域を通してC領域 (C_L) に連結されたV (V_L) 領域から構成される。H鎖では、V領域 (V_HD_HJ_H) は、多様性 (D_H) 領域および連結 (J_H) 領域の組合せを通してC領域 (C_H) へ連結された可変 (V_H) 領域から構成される。L鎖およびH鎖のV_LJ_L領域およびV_HD_HJ_H領域は、それぞれ、Yの先端で会合して抗原結合部分を形成しそして抗原結合特異性を決定する。

20

(C_H) 領域は、イソタイプ、すなわち、抗体のクラスまたはサブクラスを規定する。異なるイソタイプの抗体は、補体を活性化し、広範な種々の細胞タイプに存在する特異的レセプター (例えば、Fcレセプター) に結合し、粘膜および胎盤バリアを横断し、そして基本的な4鎖IgG分子のポリマーを形成する能力のようなそのエフェクター機能が顕著に異なる。

抗体は、免疫グロブリン分子 (IgM、IgG、IgD、IgE、またはIgA) で利用されるC_Hタイプに従って「クラス」に分類される。少なくとも5つのタイプのC_H遺伝子 (C_μ、C_γ、C_α、C_δ、およびC_ε) があり、そしていくつかの種は、複数のC_Hサブタイプ (例えば、ヒトではC_{γ1}、C_{γ2}、C_{γ3}、およびC_{γ4}) を有する。ヒトの半数体ゲノムには合計9つのC_H遺伝子があり、マウスおよびラットでは8つ、および多くの他の種ではいくつか少ない。対照的に、正常には、ほんの2つのタイプのL鎖C領域 (C_L) (カッパ ()) およびラムダ ()) しかなく、そしてこれらのC領域の1つしか単一のL鎖タンパク質に存在しない (すなわち、産生されるあらゆるV_LJ_Lについて可能なL鎖C領域が1つしかない)。各H鎖クラスは、L鎖クラスのいずれかと会合し得る (例えば、C_H領域は、またはのL鎖のいずれかと同じ抗体に存在し得る) が、特定のクラス内のH鎖およびL鎖のC領域は、抗原特異性によって変化しない (例えば、IgG抗体は、抗原特性にかかわらず、いつもC_H鎖C領域を有する)。

30

H鎖およびL鎖のV領域、D領域、J領域、およびC領域の各々は、別々のゲノム配列によってコードされる。抗体多様性は、H鎖における異なるV_H、D_H、およびJ_H遺伝子のセグメントと、L鎖におけるV_LおよびJ_L遺伝子のセグメントとの間の組換えによって生成される。異なるV_H、D_H、およびJ_H遺伝子の組換えは、B細胞の分化の間のDNA組換えによって達成される。簡単には、H鎖配列は、最初に組換わってD_HJ_H複合体を生成し、次いで、第2の組換え事象はV_HD_HJ_H複合体を産生する。機能的H鎖は、転写、それに続くRNA転写産物のスプライシングの際に産生される。機能的H鎖の産生は、L鎖配列における組換えを誘発して、再配列したV_LJ_L領域を産生し、これが次には機能的V_LJ_LC_L領域、すなわち、機能的L鎖を形成する。

40

診断試薬および治療試薬としての抗体の価値および可能性は、当該技術分野で長く認識されてきた。不運にも、この分野は、所望の特異性の大量の抗体を産生するために必要とさ

50

れる遅い退屈なプロセスによって妨げられてきた。古典的細胞融合技術は、抗体を産生するB細胞を不死化細胞株と融合することによって、Mabの効率的産生を可能にした。得られる細胞株は、ハイブリドーマ細胞株である。

抗体およびその機能的誘導体は、種々の臨床環境で使用されてきた。例えば、ジゴキシン特異的Fab抗体フラグメントを使用して、生命を脅かすジギタリス中毒を処置した。抗体は、結腸ガンの放射免疫診断のような診断技術で、より日常的に有用になっている。Kodara (1995) *Am. J. Gastroenterol.* 90:1644。これまで受け入れ難いと考えられていたMabの多くの使用は、最近、実行されている。例えば、Hall (1995) *Science* 279:915-916を参照のこと。

多くの自己抗体(自己抗原を認識しそしてこれに結合する抗体)がヒトで見られる。これらの多くは、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、原発性胆汁性肝硬変、多発性筋炎、全身性脈管炎、特発性壊死性および半月形系球体腎炎、ならびに筋萎縮性側索硬化症のような特定の疾患に関連する。総説については、Shattner (1986/1987) *Immunol. Lett.* 14:143-153を参照のこと。他の自己抗体は天然に存在する。LutzおよびWipp (1982) *J. Immunol.* 128:1965; およびGuilbertら (1982) *J. Immunol.* 128:2779-2787。最近、特定のガン抗原に対するヒト自己抗体が検出されており、そしていくつかの場合、ハイブリドーマ技術によって産生される。これらの抗体はまた、能動免疫によって産生されている。米国特許第5,474,755号。初めは、ヒトB細胞が、エプスタイン-バーウイルスまたはマウス骨髄腫を使用して不死化された。総説については、Buckら (1984) 「*Monoclonal Antibodies*」 NY, Plenum Pressを参照のこと。さらに最近の技術は、この潜在的に有害なウイルスを使用せずに不死化を可能にした。例えば、米国特許第4,618,477号; およびGlassy (1987) *Cancer Res.* 47:5181-5188を参照のこと。ほとんどの場合、抗体は、1つに対して、またはいくつかの場合には、少数のガンのタイプに対して特異的である。例えば、Mabは、神経膠腫細胞を特異的に認識するが、他の腫瘍または正常細胞を認識しないことが記載されている。これらの抗体を使用して、患者の脳における神経膠腫を画像化した。Fischerら (1991) *Immunobiol. Prot. Pep. VI* (M. Atassi編) Plenum Press, NY, 263-270頁。広範囲の種々の腫瘍を認識し得るが正常な非ガン性細胞を認識できないかまたはほんのわずかに認識する抗体は、記載されていない。

組換え遺伝子技術は、抗体、その機能的フラグメント、および認識される抗原のクローニングおよび発現を可能にした。これらの操作された抗体は、新規な産生方法および処置様式を提供する。例えば、機能的免疫グロブリンフラグメントは、細菌ならびにトランスジェニックタバコ種子および植物で発現されている。Skerra (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5:256-262; FiedlerおよびConrad (1995) *Bio/Technology* 13:1090-1093; Zhangら (1993) *Cancer Res.* 55:3384-3591; Maら (1995) *Science* 268:916; および合成抗体の総説については、Barbas (1995) *Nature Med.* 1:836-839を参照のこと。

腫瘍関連抗原に対するいくつかのヒトMabが、産生されそして特徴付けされている。ヒトMabによって認識される腫瘍関連抗原には、細胞表面、細胞質、および核の抗原が含まれる。Yoshikawaら (1989) *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 80:546-553; Yamaguchiら (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2416-2420; Haspelら (1985) *Cancer Res.* 45:3951-3961; Coteら (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2959-2963; Glassy (1987) *Cancer Res.* 47:5181-5188; Borup-Christensenら (1987) *Cancer Detect. Prevent. Suppl.* 1:207-215; Haspelら (1985) *Cancer Res.* 45:3951-3961; Kan-Mitchellら (1989) *Cancer Res.* 49:4536-4541; Yoshikawaら (1986) *Jpn. J. Cancer Res.* 77:1122-1133; およびMcKnightら (1990) *Human Antibod. Hybridomas* 1:125-129。

ヒトMabは、ガン画像化、診断、および治療に使用されている。Olsson (1985) *J. Nat. Cancer Inst.* 75:397-404; LarrickおよびBourla (1986) *J. Biol. Resp. Mod.* 5:379-393; McCabeら (1988) *Cancer Res.* 48:4348-4353; Research News (1993) *Science* 262:841; Ditzelら (1994) *Cancer* 73:858-863; およびAlonso (1991) *Am. J. Clin. Oncol.* 4:463-471。高い腫瘍細胞毒性を有する組換え単鎖二特異性抗体が報告されている。この分子は、ヒトT細胞CD3抗原とEpCAMとの両方を認識し、これは、最小の残留した直腸結腸ガンを有する患者に

10

20

30

40

50

おける散在性の腫瘍細胞に関連する。Mackら(1995) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:7021-7025。

いくつかのマウスモノクローナル抗GD2抗体は、無胸腺症(nu/nu)マウスにおいて神経外胚葉起源の腫瘍の増殖を抑制するか、または転移性黒色腫の患者において寛解を生じることが報告された。ヒト-マウスキメラ抗GD2抗体は、転移性神経芽細胞腫の患者での寛解を生じた。抗体の作用機序は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)または補体媒介性細胞傷害(CMC)を含むと考えられる。臨床的応答は、GM2、GD2、およびGD3に対するMabで黒色腫を処置することによって得られている。Chereshら(1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:5155-5159。GM2を含むガングリオシドワクチンでの能動免疫は、50/58の患者で抗GM2抗体を産生し、これらの患者は、検出可能な抗GM2抗体を有さない患者よりも平均して長く生存した。

10

GD2に対するMabはまた、小細胞肺ガンと特異的に反応することが見いだされている。Chereshら(1986) Cancer Res.46:5112-5118。肺ガン、黒色腫、胃ガン、扁平上皮ガン、頸ガン、および乳ガンを含む他のガンに特異的なヒトMabもまた産生されている。Murakami(1985) in Vitro Cell.Dev.Biol.21:593;Schadendorf(1989) J.Immunol.142:1621-1625;Yoshikawara(1986) Jpn.J.Cancer Res.77:1122-1133;PickeringおよびMisra(1984) Clin.Immunol.Immunopathol.32:253-260;HagiwaraおよびSato(1983) Mol.Biol.Med.1:245-252;およびSchlomら(1980) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:6841-6845。ヒト抗ガンMabおよびこれらが認識する抗原もまた、ワクチンでの使用について示唆されている。例えば、Finnら(1995) Immunol.Rev.145:61-89を参照のこと。悪性脳腫瘍に対するヒトMabを、有害な副作用なく第I相臨床試験で使用した。Matsumotoら(1994) The Clinical Report 28:118-126。第II相臨床試験結果は、転移性胃腸ガンにおいてマウスMabおよびコロニー刺激因子での組合せた処置について報告されている。Salehら(1995) Cancer Res.55:4339-4346。単鎖イムノトキシンはまた、ラットモデルにおいてガン性髄膜炎を治療することが見いだされている。Pastanら(1995) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:2765-2769。卵巣ガン細胞を特異的に認識するヒトMabは、このガンを効果的に画像化することが示されている。Chaudhuriら(1994) Cancer 73:1098-1104。

20

ガン特異的免疫ではなくこれらのガンに普通の抗原に対する免疫反応性を提供するための単純でかつ信頼できるストラテジーがある場合、ガンの臨床的見通しが一般に改善される。本明細書中に引用されるすべての参考文献は、これによって、その全体が参考として援用される。

30

発明の開示

本発明は、抗体の抗原結合フラグメントを含む組成物を包含し、ここでこの抗体は、配列番号2のアミノ酸配列を有するH鎖V領域および配列番号4のアミノ酸配列を有するL鎖V領域を含む抗体によって認識される抗原を、特異的に認識する。好ましくは、抗体はH11である。本発明は、さらに、H11のH鎖V領域およびL鎖V領域(それぞれ、配列番号2および4)を含む抗体を包含する。H11は、広範な種々のガン由来のガン細胞を特異的に認識するが、正常な非ガン性細胞を認識しない。「認識しない」とは、非ガン細胞が、H11によって特異的に結合されないか、またはこの抗体によってほんのわずかにしか認識されないかのいずれかであることを意味する。抗体は、Cと呼ばれ、そしてH11およびH11の「免疫学的特異性」(すなわち、H11によって認識される抗原を認識し、そして少なくとも1つのタイプのガン細胞に対して特異的であるが正常細胞を認識しない)を有する任意の抗体を含む。これらの抗原結合フラグメントには、H11によって例示される、ネイティブな抗体全体;二特異性抗体;キメラ抗体;Fab、Fab'、単鎖V領域フラグメント(scFv)、および融合ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

40

本発明は、さらに、H11抗体融合分子(H鎖C領域、単鎖V_H-V_LまたはV_L-V_HV領域に結合した抗原性分子、治療分子、毒性分子、または標識分子を有するポリペプチド領域)、およびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを包含する。

本発明はまた、H11の免疫学的特異性を有するポリペプチドを包含し、ここで、このポリペプチドは、C抗体のV領域からの少なくとも5つの連続するアミノ酸を含む。V領域

50

は、L鎖またはH鎖由来であり得る。5つの連続するアミノ酸は、好ましくは、免疫学的特異性での役割を果たし、そしてCDR(抗体の相補性決定領域)由来であり得る。インタクトなH11、H11の機能的に活性なフラグメント、融合タンパク質、キメラ抗体、複数の抗原タンパク質、およびC抗体の他のポリペプチド誘導体が含まれる。単鎖V領域および融合タンパク質が特に興味深い。

本発明の化合物および組成物は、特に、このようなガンの治療、および予防的ケアを含むガンを検出または処置するために、特に、再発の危険性を減少させるために使用され得る。

本発明は、さらに、C抗原結合フラグメントを産生する細胞および細胞株を包含する。本発明の別々の実施態様は、H11の免疫学的特異性を有するポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドであり、ここで、コードされたポリペプチドは、H11のV領域からの少なくとも5つの連続するアミノ酸を含む。V領域は、H11のL鎖またはH鎖のいずれかが由来であり得る。5つの連続するアミノ酸は、好ましくは、H11免疫学的反応性において役割を果たし、そしてCDR由来であり得る。H11のV領域は、A6と命名された抗体への相同性の小領域を有することが見いだされている。この相同性領域のみを含みそして他のH11特異的アミノ酸残基を含まないペプチドは、特に本発明から排除される。A6は、WO953574に記載される。

本発明はまた、H11のL鎖コード配列またはH鎖コード配列と安定な二重鎖を形成し得るが、他の既述の免疫グロブリン分子についての配列とは形成しない少なくとも20の連続するヌクレオチドの単離されたポリヌクレオチドを包含する。これらのポリヌクレオチドのいずれかは、クローニングベクター、発現ベクターの形態であり得、または宿主細胞にトランスフェクトされ得る。

本発明のさらなる実施態様は、少なくとも1つのC抗原結合フラグメントでのガン患者の予防的処置を包含する。好ましくは、Cは、治療分子のガン細胞への送達をもたらすために治療分子に融合される。個体は、臨床的に検出可能な腫瘍を有し得、または腫瘍は、予め処置されそして検出不可能にされていてもよい。この方法は、疾患を緩和するため、または再発の危険性を減少させるためであり得る。

本発明のさらなる実施態様は、試料中のCによって認識される抗原(本明細書では以下、「C抗原」)の検出または定量的ためのキットであり、適切な包装の中に本発明のH11またはポリペプチドを含む。本発明に包含される試薬またはキットを用いることによるC抗原またはC抗原を発現する細胞を検出するための方法もまた、本発明に包含される。発明を実施するための最良の形態

本発明は、ガン性細胞を特異的に認識する新たに同定されたヒトMabによって例示される抗原結合フラグメントを包含する。この特異性は、ガン細胞にのみ及び、そして抗体は非ガン性細胞を認識しない。例示的抗体は、H11と命名され、そして可変領域は配列番号1および4(配列番号3および6は、それぞれ1および4の相補鎖である)によってコードされ、そして「C抗原」と命名された抗原を認識する。H11の特異性には、神経膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、悪性黒色腫、乳房腺ガン、肺腺ガン、小細胞肺ガン、結腸腺ガン、および前立腺腺ガンが含まれるが、これらに限定されない。

本明細書中の実施例に示すように、H11およびH11-scFvは、試験したすべての正常組織由来の非ガン性細胞を認識しない。それゆえ、H11およびC抗原結合フラグメントは、広範な種々のガンに関連する臨床状態を緩和することに有用である。本発明は、H11が特異的である抗原(C抗原と命名された)を認識する抗原結合フラグメントを包含する。本発明は、さらに、H11のポリペプチド誘導体、ならびに新規試薬の診断、処置、および製造においてこれらの組成物を使用するための方法を包含する。本発明は、さらに、C、H11、およびその誘導体をコードするポリヌクレオチドを包含する。その使用方法もまた、本発明に包含される。

本発明は、さらに、C抗原に対して免疫学的特異性を有するC誘導体を包含する。これらの誘導体は、H11VDJ連結の一部を含むポリペプチド配列の領域を含む。少なくとも1、好ましくは2、およびより好ましくは3以上のH11CDRアミノ酸配列にわたる領域も

10

20

30

40

50

包含される。

H11のL鎖C領域およびH鎖C領域の全長配列は決定されていないが、他のヒト免疫グロブリン分子の配列と同一またはほぼ同一であると予測される。さらに、V領域アミノ酸配列の知見は、どのC領域とのサブクローニングをも可能にする。このようなサブクローニング技術は、当該分野で周知である。これらのクローニング技術によって産生されるキメラ分子もまた、本発明に包含される。

H11 IgMクローンおよびscFV抗体クローンで市販のヘプタペプチドファージライブラリーをスクリーニングすることにより、以下のアミノ酸配列を有するN末端で非常に強いコンセンサス配列が示されている：Phe-His-Arg-Tyr-Ser/Thr。結果を表1に示す。

【表1】

表1

IgM H11パンニング	M1 Phe-His-Arg-Tyr-Ser-Leu-Pro
	M2 Phe-His-Arg-Tyr-Ser-Asp-Tyr
	M3 Phe-His-Arg-Tyr-Ser-Leu-Pro
	M4 Phe-His-Arg-Tyr-Ser-Pro-Thr
	M7 Phe-His-Arg-Tyr-Thr-Pro-Gly
	M8 Phe-His-Arg-Tyr-Ser-Leu-Pro
	M10 Phe-His-Arg-Tyr-Ser-Pro-Thr
sfFv H11パンニング	S2 Phe-His-Arg-Tyr-Ser-Leu-Pro
	S5 Met-His-Arg-Tyr-Thr-Pro-Leu

DNA配列は、複数のコドンを使用し、これは全く異なるファージ起源を示している。例えば、Argは、トリプレットCGxおよびAGxファミリーによってコードされる。さらに、H11ペプタペプチドコンセンサスと配列データベースとの比較は、Ca²⁺結合タンパク質のS100ファミリーに対する相同性を示した。結果を表2に示す。

【表2】

表2

H11ペプタペプチド	Phe-His-Arg-Tyr-Ser/Thr
<i>S. griseus</i>タンパク質	Phe-His-Arg-Tyr-Ser (アミノ酸251~255)
ピーナッツ萎縮病ウイルス	Phe-His-Arg-Tyr-Ser (アミノ酸540~544)
ヒトカルサイクリン (calcyclin)	Phe-His-Lys-Tyr-Ser (アミノ酸16~20)
囊胞性線維症Ag	Tyr-His-Lys-Tyr-Ser (アミノ酸16~21)

本明細書中に記載のコンセンサスペプタペプチド配列は、本発明に包含される。

本出願で記載される特定の化合物、組成物、および方法は、一般的に、免疫化学の古典的技術によって日常的に生成される C およびその誘導体に関する。これには、化学結合によって、または賦形剤もしくはアジュバントと混合することによって、別の化合物に結合されている C が含まれる。用語、抗原結合フラグメントは、ガン細胞に特異的な様式で C 抗原に結合する任意のペプチドを含む。代表的には、これらの誘導体は、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv (モノマーおよびポリマーの両方の形態)、および単離されたH鎖およびL鎖のような、免疫グロブリンフラグメントを含む。抗原結合フラグメントは、H11の特異性を保持するが、アビディティおよび/または親和性は変更され得る。本明細書中に記載のH11-scFvが特に好ましい。

抗原結合フラグメント (本明細書中では「誘導体」とも呼ばれる) は、代表的には、遺伝子操作によって生成されるが、これらは他の方法および方法の組合せによって代わりに得

10

20

30

40

50

られ得る。この分類は、操作されたペプチドフラグメントおよび融合タンパク質を含むが、これらに限定されない。好ましい化合物には、H11 CDRのポリペプチドフラグメント、サイトカインエフェクター成分を含む抗体融合タンパク質、アジュバントまたは薬物を含む抗体融合タンパク質、および単鎖V領域タンパク質が含まれる。

本発明は、さらに、H11抗体V領域およびその誘導体をコードするポリヌクレオチドを含む。これらには、単離されたポリヌクレオチドフラグメント、組換えポリヌクレオチド、ならびにこのポリヌクレオチドを含む治療プラスミドおよびベクター（例えば、ワクシニアベクター）が含まれる。これらのポリヌクレオチドは、配列番号1、3、4、6、13、15、16、および18によって例示される。

本発明の薬学的組成物および処置様式は、新生物に対する免疫応答を誘起するために適切である。神経膠芽細胞腫、黒色腫、神経芽細胞腫、腺ガン、神経膠腫、軟組織肉腫、および種々のガン（小細胞肺ガンを含む）を含むがこれらに限定されないヒトガンの患者は、特に適切な被験体である。

H11は種々のガンを特異的に認識することが示されているので、H11はガンの診断、画像化、および処置に特に有用である。適切なガンには、腫瘍学の分野で公知の任意のガンが含まれ、これには、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、脳室上衣腫、髄芽細胞腫、原始神経外胚葉腫瘍（PNET）、膵管腺ガン、小細胞肺腺ガンおよび大細胞肺腺ガン、扁平上皮ガン、気管支肺胞ガン、上皮腺ガン、およびそれらの肝臓転移、肝ガン、胆管ガン、腺管腺ガンおよび小葉腺ガンのような乳ガン、子宮頸部の扁平上皮および腺ガン、子宮上皮ガンおよび卵巣上皮ガン、前立腺腺ガン、膀胱の移行性扁平上皮細胞ガン、B細胞リンパ腫およびT細胞リンパ腫、（結節性およびびまん性）形質細胞腫、急性および慢性の白血病、悪性黒色腫、軟組織肉腫、ならびに平滑筋肉腫を含むが、これらに限定されない。

被験体は、進行した形態の疾患を有し得、この場合、処置目的は、疾患の進行の緩和または逆転、および副作用の改善を含み得る。被験体は、既に処置されている状態についての病歴を有し得、この場合、目的は、代表的には、再発の危険性の低下または遅延を含む。さらに、本発明の抗原結合フラグメントは、診断試薬および画像化試薬として使用され得る。これらの適用は、以下の節でさらに詳細に記載される。

「H11」は、低い等級の神経膠腫を有する64歳の男性の末梢血リンパ球（ヒト骨髄腫細胞株に融合されてNBGM1/H11と命名されたハイブリドーマを産生する）の融合体から得られる抗体である。H11の生成および特徴付けは、実施例1に記載される。「C」は、C抗原を特異的に認識しそしてガンと非ガン細胞との間を識別する、モノクローナル、ポリクローナル、またはその誘導体のいずれかの、任意の抗体、またはその抗原結合フラグメントを示す。CにはH11が含まれる。

Cの「免疫学的活性」とは、C抗原を特異的に結合する能力をいう。このような結合は、免疫応答を惹起してもしなくてもよい。特異的免疫応答は、抗体、B細胞、T細胞、およびそれらの任意の組合せ、ならびにそれらから生じるエフェクター機能を含み得る。抗体媒介機能ADCCおよび補体媒介細胞溶解（CDC）が含まれる。T細胞応答には、Tヘルパー細胞機能、細胞傷害性T細胞機能、炎症/インデューサーT細胞機能、およびT細胞媒介抑制が含まれる。これらの基準のいずれかに従って特異的免疫応答を惹起し得る化合物は、「免疫原性」といわれる。

C「活性」またはC「機能」とは、Cの任意の免疫学的活性、または本開示においてH11に起因するとされる任意の他の生物学的活性をいい、ガンの検出、改善、または軽減におけるH11の役割を含む。

H11の「V領域」とは、H11L鎖のV領域またはH11H鎖のV領域の、単独または組合せのいずれかをいう。これらのV領域は、配列番号2および5に示され；これらの領域をコードするDNAは、それぞれ配列番号1および4に示される。

本明細書中で言及されるGM-CSF、IL-2、および他の生物学的活性分子とは、同じ生物学的機能または生理学的機能を有するそれぞれの親分子に基づくフラグメントおよび誘導体を含むことを意味する。

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸

10

20

30

40

50

残基のポリマーを言及するために本明細書中では交換可能に使用される。ポリマーは、直線状または分枝状であり得、改変されたアミノ酸またはアミノ酸アナログを含み得、そしてアミノ酸以外の化学部分によって中断され得る。これらの用語はまた、自然にまたは介在によって改変されているアミノ酸ポリマーを包含する；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、あるいは、標識または生物活性成分との結合のような任意の他の操作または改変。他の記述または暗示がない限り、用語 C または H11 は、H11 免疫学的特異性を有する任意のポリペプチドモノマーまたはポリペプチドポリマーを含み、インタクトな C 抗体、ならびにより小さいおよびより大きい機能的に等価なポリペプチドを含む。

「融合ポリペプチド」は、天然に存在するものとは配列の異なる位置に領域を含むポリペプチドである。この領域は、正常には別々のタンパク質に存在し得、そして融合ポリペプチド中に一緒にもたらされる；これらは正常には同じタンパク質に存在し得るが、融合ポリペプチド中では新しい配置で置かれる；またはこれらは合成によって配置され得る。例えば、以下に記載のように、本発明は、C の機能的部分およびトキシンから構成される組換えタンパク質（およびこのタンパク質をコードするポリヌクレオチド）を包含する。これらの融合タンパク質を製造する方法は、当該分野で公知であり、そして例えば WO93/07286 に記載される。

C ポリペプチドの「機能的に等価なフラグメント」は、付加、欠失、または置換の任意の組合せによってネイティブな配列とは異なるが、それが使用されている状況に関してフラグメントの少なくとも 1 つの機能的特性を維持している。C ポリヌクレオチドの機能的に等価なフラグメントは、発現系によって産生される場合は H11 に機能的に等価であるポリペプチドをコードするか、またはハイブリダイゼーションアッセイで使用される場合は H11 ポリヌクレオチドと類似のハイブリダイゼーション特異性を有するかのいずれかである。C ポリペプチドの機能的に等価なフラグメントは、代表的には、1 つ以上の以下の特性を有する：C 抗原を結合する能力；特異的様式で少なくとも 1 つのタイプのガン細胞を結合する能力；および H11 によって惹起されるのと類似の抗原特異性で免疫応答を惹起する能力。

「ポリヌクレオチド」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態であり、これはデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、およびアナログを任意の組合せアナログで含む。ポリヌクレオチドは、任意の 3 次元構造を有し得、そして公知または未知の任意の機能を果たし得る。用語「ポリヌクレオチド」は、二本鎖、一本鎖、および三重らせんの分子を含む。他に明記または要求されない限り、本明細書中に記載の発明の、ポリヌクレオチドである任意の実施態様は、二本鎖形態と、DNA、RNA、またはハイブリッド分子のいずれかの二本鎖形態を作り上げることが公知かまたは予測される 2 つの相補的な一本鎖形態の各々との両方を包含する。

以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子フラグメント、エキソン、イントロン、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離された DNA、任意の配列の単離された RNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、改変されたヌクレオチド（例えば、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログ）、ウラシル、他の糖および連結基（例えば、フルオロリボースおよびチオエート）、ならびにヌクレオチド分枝を含み得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、重合の後、例えば、標識成分との結合によって、さらに改変され得る。この定義に含まれる他のタイプの改変は、キャップ、1 つ以上の天然に存在するヌクレオチドのアナログでの置換、およびタンパク質、金属イオン、標識成分、他のポリヌクレオチド、または固体支持体にポリヌクレオチドを接着させるための手段の導入である。

用語「組換え」ポリヌクレオチドは、天然に存在しないかまたは天然にない配置で別のポリヌクレオチドに連結されているかのいずれかの、ゲノム、cDNA、半合成、または合成起源のポリヌクレオチドを意味する。

10

20

30

40

50

「ベクター」とは、インビトロまたはインビボのいずれかで、標的細胞に伝達される異種ポリヌクレオチドを含む、組換えのDNAまたはRNAのプラスミドまたはウイルスをいう。異種ポリヌクレオチドは、治療の目的のための目的の配列を含み得、そして必要に応じて発現カセットの形態であり得る。本明細書中で使用される場合、ベクターは、最終的な標的細胞または被験体において複製し得る必要はない。この用語は、ポリヌクレオチドの複製のためのクローニングベクター、およびポリヌクレオチドがコードする配列の翻訳のための発現ベクターを含む。ウイルス粒子にキャプシド化またはエンベロープ化されたポリヌクレオチドを含むウイルスベクターもまた含まれる。

「細胞株」または「細胞培養物」は、インビトロで増殖または維持された細菌、植物、昆虫、または高等真核生物細胞を示す。細胞の子孫は、(形態学的に、遺伝子型、表現型でのいずれかで)親細胞と完全に同一でなくてもよい。Mabは、ハイブリドーマまたは他の細胞によって産生され得る。マウスおよびヒトの両方のハイブリドーマを作製する方法は、当該分野で公知である。ヒトハイブリドーマを産生する特定の方法は、明細書全体を通して記載されそして参照される。

「宿主細胞」は、遺伝的に変更されている。または組換えプラスミドもしくは組換えベクターのような外因性ポリヌクレオチドの投与によって遺伝的に変更され得る、原核生物または真核生物の細胞を示す。遺伝的に変更された細胞をいう場合、この用語は、元の変更された細胞およびその子孫の両方をいう。

「異種」とは、比較されている実在物の残りの部分とは遺伝子型が異なる実体物に由来することを意味する。例えば、ポリヌクレオチドは、異なる供給源に由来するプラスミドまたはベクターに遺伝子操作法によって配置され得、そして異種ポリヌクレオチドである。そのネイティブなコード配列型から除去され、そしてネイティブな配列以外のコード配列に作動可能に連結されたプロモーターは、異種プロモーターである。

「シグナルペプチド」または「リーダー配列」は、新しく合成されたタンパク質を、細胞膜、通常は真核生物細胞の小胞体、および細菌の内膜または内膜と外膜の両方のいずれか、を通るように指示する短いアミノ酸配列である。シグナルペプチドは、代表的にはポリペプチドのN末端部分にあり、そして代表的にはポリペプチドの生合成と分泌との間に細胞から酵素的に除去される。シグナルペプチドは、タンパク質産生中にのみ、分泌されたタンパク質に存在しない。

「単離された」ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、ネイティブな環境に関連する物質を実質的に含まないものである。実質的に含まないとは、これらの物質の少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、およびさらにより好ましくは少なくとも90%含まないことを意味する。

ポリヌクレオチドの「安定な二重鎖」、または生化学反応で任意の2つ以上の成分間で形成される「安定な複合体」とは、二重鎖または複合体の形成とその後の検出(あらゆる任意の洗浄工程またはその間に起こり得る他の操作を含む)との間に持続するために十分に長く持続している二重鎖または複合体をいう。

「生物学的試料」は、血液および他の生物学的起源の液体試料、生検標本または組織培養物のような固体組織試料、あるいはそれに由来する細胞およびその子孫を含む、種々の試料タイプを包含する。この定義はまた、試薬での処置、溶解、またはある成分(例えば、タンパク質またはポリヌクレオチド)の富化によるような、その獲得後のあらゆる方法で操作されている試料を包含する。この用語は、任意の種から得られる種々の臨床試料を包含し、そしてまた、培養物中の細胞、細胞上清、および細胞溶解物も包含する。特に、本明細書に記載の目的のために、生物学的試料は、腫瘍組織または腫瘍性であると考えられる組織を含み、そして例えば、外科手術的切除、生検、吸引、または当該分野で公知の任意の方法によって得られる。

「免疫原」とは、ヒトまたは動物使用のための組成物をいい、これは、特定の抗原に対するある程度の特異的免疫学的反応性をレシピエントに与える強度で投与される。免疫学的反応性は、抗体、または標的に対して免疫学的に反応性である細胞(特に、B細胞、形質細胞、Tヘルパー細胞、および細胞傷害性Tリンパ球、およびそれらの前駆体)、あるい

10

20

30

40

50

はその任意の組合せによって行われ得る。本発明の目的のために、標的は、主として腫瘍随伴C抗原またはその腫瘍特異的部分である。免疫学的反応性は、実験的目的のために、特定の症状の処置のために、特定の物質の排除のために、または予防のために所望され得る。活性な免疫原は、ワクチン成分の不在下で持続する免疫応答を誘起することを意図する。

本明細書で使用される場合、「アジュバント」は、いくつかの意味を有し、そのすべては用語が使用される状況に依存して明らかである。薬学的調製物の場合では、アジュバントは、抗原の免疫原性を増強するために抗原と組合せて提供されるまたは抗原に組換えで融合された化学的または生物学的因子である。ガン診断または処置の場合では、アジュバントとは、臨床的には腫瘍塊を検出できないが、再発の危険性の疑いがあるガン患者のクラスをいう。

10

正常には固形腫瘍として現れるガンのタイプをいう場合、「臨床的に検出可能な」腫瘍は、腫瘍塊に基づいて、すなわち、CATスキャン、X線、または触診のような手順によって、検出可能である腫瘍である。生化学的、組織学的、または免疫学的所見単独では、この定義に適合するためには不十分であり得る。

本明細書で使用される場合、「処置」とは、処置される個体または細胞の天然の経過を変化させるための試みにおける臨床的媒介をいい、そして予防のためかまたは臨床的病理の経過中のいずれかで行われ得る。処置の所望の効果には、病気の発生または再発を抑制すること、徴候の緩和、病気の何らかの直接的または間接的な病理学的結果の縮小、転移を妨害すること、病気の進行速度を減少させること、病気の症状の緩和または軽減、および鎮静または改善した予後が含まれる。

20

病気の状態に関連した「病状」は、病気に冒された個体の健康、正常な生理、またはQOLを損なう任意の状態である。これには、冒された組織のまだ侵されていない領域への破壊的侵襲、正常組織機能を犠牲にした増殖、不規則なまたは抑制された生物学的活性、炎症性応答または免疫学的応答の悪化または抑制、他の病原性生物または病原体への感受性の増加、ならびに疼痛、発熱、悪心、疲労、気分変化、担当医によって決定され得るような他の特徴のような望ましくない臨床的徴候が含まれるが、これらに限定されない。

「有効量」は、有益な結果または所望の臨床的結果をもたらすために十分な量である。有効量は、1回以上の用量で投与され得る。処置に関して、有効量は、病気の進行を緩和、軽減、安定化、逆転、または遅延させるために、または他に病気の病理学的結果を減少させるために十分な量である。アジュバントに関しては、有効量は、免疫原に対する免疫応答を増強するために十分な量である。有効量は、一般的には、症例毎に基づいて医師によって決定され、そして当業者の技術範囲内である。代表的には、いくつかの要因が、適切な用量を決定する場合に考慮される。これらの要因には、患者の年齢、性、および体重、処置される症状、症状の重篤度、および投与される抗体の形態が挙げられる。例えば、sc Fvの濃度は、治療に効果的であるためにはネイティブな抗体の濃度と同じくらい高い必要はない。

30

「個体」、「患者」、または「被験体」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物には、ヒト、家畜、競技動物、およびペットが含まれるが、これらに限定されない。

40

本発明の実施は、他に示されない限り、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の従来技術を使用し、これらは当該分野の範囲内である。このような技術は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版（Sambrookら、1989）；「Oligonucleotide Synthesis」（M.J.Gait編、1984）；「Animal Cell Culture」（R.I.Freshney編、1987）；「Methods in Enzymology」（Academic Press, Inc.）；「Handbook of Experimental Immunology」（D.M.WeiおよびC.C.Blackwell編）；「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」（J.M.MillerおよびM.P.Calos編、1987）；「Current Protocols in Molecular Biology」（F.M.Ausubelら編、1987）；「PCR: The Polymerase Chain Reaction」（Mullisら編、1994）；「Current Protocols in Immunology」（J.E.Coliganら編、1991）のような文献に十分に説明されている。これらの技術は、本

50

発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの産生に適用可能であり、そして例えば、本発明を製造し実施することにおいて考慮され得る。特定の実施態様に特に有用な技術は、以下の節に議論する。

本発明はまた、化学的機能部分に結合した C を包含する。代表的には、この部分は、検出可能なシグナルを産生し得る標識である。これらの結合した C は、例えば、腫瘍負荷の定量のような検出システム、ならびに転移病巣の画像化および腫瘍画像化に有用である。このような標識は当該分野で公知であり、そして放射性同位元素、酵素、蛍光化合物、化学発光化合物、生体発光化合物基質補因子およびインヒビターが含まれるが、これらに限定されない。このような標識の使用を教示する特許の例としては、米国特許第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；および第4,366,241号を参照のこと。この部分は、C に共有結合され、組換え連結され、あるいは第2の抗体、プロテインA、またはビオチン - アビジン複合体のような第2の試薬を介して C に結合され得る。

他の機能的部分には、シグナルペプチド、免疫学的反応性を増強する因子、固体支持体へのカップリングを容易にする因子、ワクチンキャリア、生体応答調節剤、常磁性標識、および薬物が挙げられる。シグナルペプチドは、以上に記載され、そして原核生物および真核生物の形態を含む。免疫学的反応性を増強する薬剤は、細菌スーパー抗原を含むが、これに限定されない。固体支持体へのカップリングを容易にする薬剤には、ビオチンまたはアビジンが含まれるが、これらに限定されない。免疫原キャリアには、任意の生理学的に受容可能な緩衝剤が含まれるが、これに限定されない。生体応答調節因子には、サイトカイン、特に腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン2、インターロイキン4、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、および インターフェロンが挙げられる。

適切な薬物部分は、抗腫瘍剤を含む。これらには、放射性同位元素、ピンカアルカロイド (例えば、硫酸ピンプラスチン、硫酸ピンクリスチン、および硫酸ピンデシン)、アドリアマイシン、硫酸ブレオマイシン、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、塩酸デュアノルビシン (duanorubicin)、塩酸ドキシソルビシン、エトポシド、フルオロウラシル、ロムスチン、塩酸メクロレタミン (mechlororethamine)、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトーテン、ペントスタチン、ピボプロマン、塩酸プロカルバジン (proc arbaze)、ストレプトゾトシン、タキソール、チオグアニン、およびウラシルマスタードが挙げられるが、これらに限定されない。

単鎖分子を含むイムノトキシンは、組換え手段によって産生され得る。種々のイムノトキシンの産生は当該分野で周知であり、そして方法は、例えば、「Monoclonal Antibody-toxin Conjugates:Aiming the Magic Bullet.」Thorpeら (1982) Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, 168-190頁 ; Vitatta (1987) Science 238:1098-1104 ; およびWinterおよびMilstein (1991) Nature 349:293-299に見いだされ得る。適切なトキシンには、リシン、放射性核種、ヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュードモナスエキソトキシンA、ジフテリアトキシン、リシンA鎖、レストリクトシン (rest orictocin) およびホスホリパーゼ酵素のような菌類トキシンが含まれるが、これらに限定されない。一般的には、「Chimeric Toxins」OlsnesおよびPihl, Pharmac. Ther. 15:355-381 (1981) ; および「Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy」BaldwinおよびByers編, 159-179頁, 224-266頁, Academic Press (1985) を参照のこと。

化学的に機能的な部分は、例えば、他の遺伝子 (例えば、酵素) からの抗原結合フラグメントおよび機能的領域をコードする融合遺伝子を生成することによって、組換えによって作製され得る。遺伝子融合物の場合、2つの成分が同じポリペプチド遺伝子内に存在する。あるいは、C 抗原結合フラグメントは、種々の周知の化学手順のいずれかによってその部分に化学的に結合され得る。例えば、その部分がタンパク質である場合、連結は、異種二官能性交差リンカー (例えば、SPDP、カルボジイミドグルタルアルデヒドなど) によって得られる。この部分は、共有結合され、あるいは第2の抗体、プロテインA、またはビオチン - アビジン複合体のような第2の試薬を介して結合され得る。常磁性部分およ

10

20

30

40

50

びその抗体への結合は、当該分野で周知である。例えば、Miltenyiら(1990) Cytometry 11:231-238を参照のこと。

本発明の C 抗体は、いくつかの方法で調製され得る。これは、配列番号 1 および 5 または C 結合フラグメントをコードする他のポリヌクレオチドを含む抗原結合フラグメントを発現するように操作された細胞から最も都合よく得られる。例えば、細胞は、適切な培地中で培養され得、そして使用した培地は、抗体供給源として使用され得る。必要に応じて、マトリクスコートしたチャンネルまたはビーズおよび細胞同時培養物は、抗体産生細胞の増殖を増強するために含まれ得る。大量の抗体の産生のためには、一般的には、腹水を得ることがより好都合である。腹水産生方法(method of raising ascites)は、一般的には、免疫学的に純粋な組織適合性または免疫耐性の哺乳動物、特にマウスに、ハイブリドーマ細胞を注入する工程を包含する。哺乳動物は、適切な組成物(例えば、Pristane)の前投与によって腹水産生のために初回刺激され得る。

あるいは、C は、タンパク質合成の標準的方法とともに、配列データおよびこの開示で提供される他の情報を使用して化学的に合成され得る。適切な方法は、固相メリフィールド技術である。自動化ペプチド合成機は、例えば、Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA) によって製造される合成機のように、市販されている。

C はまた、Sambrookら(1989)に記載されるような日常的な組換え方法を用いて得られ得る。例えば、アミノ酸およびポリヌクレオチド(配列番号 1 ~ 6、および 13 ~ 18)配列ならびに本明細書で提供される情報を使用して、C の H または L のいずれかの鎖をコードするポリヌクレオチドは、適切な発現ベクター(これは、プロモーターのような、転写のための制御配列を含む)にクローニングされ得る。次に、発現ベクターは、宿主細胞に導入される。宿主細胞は、ポリヌクレオチドが転写されそしてタンパク質に翻訳されるような適切な条件下で増殖される。C の H および L 鎖は、別々に産生され得、次いでジスルフィド結合再生列によって組み合わされ得る。あるいは、C の各鎖をコードする別々のポリヌクレオチドを有するベクター、または別々の転写物としての両方の鎖をコードする一本のポリヌクレオチドを有するベクターは、単一の宿主細胞にトランスフェクトされ得、次いで分子全体を産生し、そして会合し得る。好ましくは、宿主細胞は、分子の正常な炭水化物補体を提供し得るより高等な真核生物に由来する。したがって、産生された C は、当該分野での標準的な技術を使用して精製され得る。次に、C の産生における使用のための C をコードするポリヌクレオチドは、C 抗体を産生するハイブリドーマから得られ得るか、あるいは本明細書中で提供される DNA 配列から合成によってまたは組換えによって産生され得る。

C を得る他の方法は、C 抗原で適切な動物を免疫することそしてポリクローナルまたは Mab 産生のための標準的な手順に従うことである。したがって、産生した Mab は、当該分野で公知の方法によって「ヒト化」され得る。ヒト化抗体の例は、例えば、米国特許第 5,530,101 号および第 5,585,089 号に提供される。

「ヒト化」抗体は、配列の少なくとも一部分が、最初の形態からヒト免疫グロブリンにより類似するように変更されている抗体である。1 つの型では、H 鎖および L 鎖 C 領域が、ヒト配列に置換される。これは、H11 V 領域および異種免疫グロブリン C 領域を含む融合ポリペプチドである。他の型では、CDR 領域が、H11 アミノ酸配列を含むが、V フレームワーク領域はまた、変換されたヒト配列である。例えば、EP0329400 を参照のこと。第 3 の型では、V 領域は、ヒトおよびマウス V 領域のコンセンサス配列を設計すること、およびコンセンサス配列間で異なる CDR の外側の残基を変換することによってヒト化される。本発明は、ヒト化 Mab を包含する。

ヒト化抗体を作製する際に、フレームワーク残基の選択は、高い結合親和性を保持するために重要であり得る。理論上は、任意の HuAb からのフレームワーク配列は、CDR 移植のためのテンプレートとして利用し得る；しかし、このようなフレームワークへの直接的な CDR 置換は、抗原への結合親和性の著しい喪失を導き得る。Glaserら(1992) J. Immunol. 149:2606; Tempestら(1992) Biotechnology 9:266; および Shalabyら(1992) J. Exp. Med. 17:217. HuAb が元来の muAb により類似するほど、ヒトフレームワークは、親和性を減少し得

10

20

30

40

50

る、マウスCDRへの歪曲を導入しないようになる。抗体配列データベースに対する配列相同性検索に基づくと、HuAb1C4もまた、muM4TS.22への良好なフレームワーク相同性を提供するが、他の高い相同性のHuAbは、特にヒト亜群IからのL鎖またはヒト亜群IIIからのH鎖に、さらに適切である。Kabatら(1987)。ENCAD(Levittら(1983)J.Mol.Biol.168:595)のような種々のコンピュータプログラムが、V領域についての理想的配列を予測するために利用可能である。したがって、本発明は、種々のV領域を有するHuAbを包含する。適切なV領域配列を決定することおよびこれらの配列を最適化することは、当業者の範囲内である。減少した免疫原性を有する抗体を得るための方法もまた、米国特許第5,270,202号及びEP699,755に記載される。

抗体産生および単離方法は、当該分野で周知である。例えば、HarlowおよびLane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold SpringHarbor Laboratory,New Yorkを参照のこと。H11抗体は、IgMサブクラスのヒト免疫グロブリンであり、そしてこのイソタイプの免疫グロブリンに適切な任意の技術によって単離され得る。精製法には、塩沈降法(例えば、硫酸アンモニウムを用いる)、イオン交換クロマトグラフィー(例えば、カチオンまたはアニオン交換カラムを用いて、中性pHで流され、そして漸増イオン強度の段階グラジエントで溶出される)、ゲル濾過クロマトグラフィー(ゲル濾過HPLCを含む)、およびプロテインA、プロテインG、ヒドロキシアパタイト、および抗免疫グロブリンのようなアフィニティー樹脂でのクロマトグラフィーが含まれ得る。H11はまた、例えば、精製されたAb1またはAb3の形態で、C抗原を含むアフィニティーカラムで精製され得る。好ましくは、H11は、プロテインA-CL-Sepharose™4Bクロマトグラフィー、次いでDEAE-Sepharose™4Bイオン交換カラムでのクロマトグラフィーを使用して精製される。

本発明はまた、ハイブリッド抗体を包含し、ここで、HおよびL鎖の1つの対は、第1の抗体から得られるが、HおよびL鎖の他方の対は、異なる第2の抗体から得られる。本発明の目的のためには、LおよびH鎖の1つの対は、Cからである。1つの実施態様では、各L-H鎖対は、C抗原の異なるエピトープを結合する。このようなハイブリッドはまた、ヒト化HまたはL鎖を使用して形成され得る。

本発明に包含される別のCは、HまたはL鎖がさらなる特性を提供するように改変されている抗体である。例えば、アミノ酸配列の変化は、得られるポリペプチドの免疫原性の現象を生じ得る。この変化は、1つ以上のアミノ酸の変化からC領域ドメインのような領域の完全な再設計までに及ぶ。代表的な変化には、補体結合反応、膜レセプターとの相互作用、および他のエフェクター機能に関連する変化が含まれるが、これらに限定されない。組換え抗体はまた、物質(例えば、サイトカイン)の腫瘍細胞への特異的送達を援助するように設計され得る。種々の免疫グロブリンドメインが、天然に存在するもの以外の順で配置されているペプチドもまた、本発明に包含される。

Cが個体に投与されるならば、好ましくは少なくとも80%純粋であり、より好ましくは少なくとも90%純粋であり、さらにより好ましくは少なくとも95%純粋でありそして発熱物質および他の夾雑物を含まない。この状況では、パーセント純度は、調製物の総タンパク質含量の重量パーセントとして算出され、そしてCが精製された後に組成物に計画的に添加される構成成分を含まない。

C抗体は、多くの目的について使用され得る。これらは、次にCまたはC抗原に対するT細胞応答を誘起するために使用され得るCを産生するために抗体応答を誘起することおよび種々のタイプのガンを処置することを包含する。これらの使用は、後の節でさらに十分に詳述される。

本発明は、CのV領域の少なくとも一部を含むCのポリペプチドフラグメントを包含する。好ましいフラグメントは、H11の免疫学的活性を有するものである。他の免疫グロブリンとは実質的に異なるアミノ酸配列を含むフラグメント、およびCDRを含むフラグメントもまた好ましい。1つの実施態様では、本発明は、CH鎖V領域のポリペプチドフラグメントを包含し、配列番号2の少なくとも25の連続したアミノ酸、より好ましくは30の連続したアミノ酸、またはそのCDR1の5つの連続したアミノ酸、またはそのCDR2またはCDR3の少なくとも7つの連続したアミノ酸、好ましくは少なくとも9つの連続したアミノ

10

20

30

40

50

酸を含む。本発明はまた、CのL鎖V領域のポリペプチドフラグメントを包含し、配列番号5の少なくとも25の連続したアミノ酸、より好ましくは30の連続したアミノ酸、またはそのCDR2の7つの連続したアミノ酸、またはそのCDR1またはCDR3の少なくとも8つの連続したアミノ酸、好ましくは10の連続したアミノ酸を含む。

Cポリペプチドのサイズは、所望の機能を提供するために必要な最小のサイズのみであり得る。ポリペプチドは、所望であれば、必要に応じて、Cに固有の、または異種供給源からのいずれかのさらなる配列を含み得る。Cペプチドは、A6の相同領域と同じではないH11のV領域配列からのほんの5つの連続したアミノ酸を含み得る。CのL鎖V領域またはC H鎖V領域からの7アミノ酸、より好ましくは約10アミノ酸、より好ましくは約15アミノ酸、より好ましくは約25アミノ酸、より好ましくは約50アミノ酸、より好ましくは約75アミノ酸を含むポリペプチドも包含される。全体のCのL鎖V領域またはCのH鎖V領域を含むポリペプチドは、さらにより好ましい。好ましくは、ポリペプチドはH11由来である。好ましくは、ポリペプチドは、配列番号14および配列番号17に示されるscFvである。

本発明は、H11と機能的に等価である、または変更されているが測定可能なH11免疫学的活性を有する、改変されたCポリペプチドを包含する。改良されたH11免疫学的活性を有する改変されたポリペプチドが好ましい。改変されたポリペプチドの例には、アミノ酸残基の保存的置換、および免疫学的活性を著しく有害に変更しないアミノ酸の1つ以上の欠失または付加を有するペプチドが含まれる。

この1つの例は、プロトタイプH11配列と比較して、1つ以上のアミノ酸置換を含むH11ポリペプチドである。置換は、1つ以上のアミノ酸残基を変化または改変することから、V領域のような領域の完全な再設計までの範囲であり得る。アミノ酸置換は、存在するならば、好ましくは、ペプチドのフォールディングまたは機能特性に有害な影響を及ぼさない保存的置換である。保存的置換が行われ得る機能的に関連するアミノ酸の群は、グリシン/アラニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グルタミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；セリン/トレオニン/メチオニン；リジン/アルギニン；およびフェニルアラニン/チロシン/トリプトファンである。本発明のポリペプチドは、グリコシル化または非グリコシル化形態であり得、翻訳後改変（例えば、アセチル化、およびリン酸化）され得、または合成（例えば、標識基の付加）によって改変され得る。

H11 L鎖およびH11H鎖の両方を含むH11ポリペプチド誘導体は、別々のLおよびH鎖として形成され得、次いで会合され、または両方の鎖についての発現系によってインサイチュで会合され得る。このような発現系は、LおよびH鎖について別々の転写可能な領域を含むプラスミドで適切な細胞をトランスフェクトすることによって、または各鎖についてのプラスミドで同じ細胞を同時トランスフェクトすることによって、生成され得る。第3の方法では、H鎖コード領域を有する適切なプラスミドがH鎖のない変異体にトランスフェクトされる。

H鎖のない変異体は、供給者の指示に従って蛍光標識したウサギ抗マウスIgG（H鎖特異的、DAKO Corporation, Carpinteria, CA）で約 2×10^7 のH11産生細胞を処理することによって得られ得る。染色したおよび染色していない細胞群を、蛍光活性化セルソーターで分析する。染色していない細胞を、滅菌したチューブに集め、そして限界希釈によって1細胞/ウェルで96ウェルプレートにプレーティングする。次いで、培養上清を、ヤギ抗マウスIgG（H鎖特異的）およびヤギ抗マウスを使用するELISAによってアッセイする。陽性かつIgG陰性表現型のクローンを、少なくとも3回サブクローニングして、安定なH11^(-H)変異体を得る。推定のH鎖のない変異体H11^(-H)クローンからのmRNAが単離され得、そしてL鎖V領域cDNAの配列が決定され得る。H11V_HについてのmRNAの逆転PCRを、H11^(-H)cDNAのクローニングのために使用される、2セットの5'-および3'-プライマーで行う（実施例7）。H鎖のない変異体は、検出可能なDNAバンドを得ない。細胞のトランスフェクションは、適切なH鎖プラスミドで行う。

本発明により包含される別のC誘導体は、C HまたはL鎖がさらなる特性を提供するように改変されている抗体である。例えば、アミノ酸配列の変化は、得られるポリペ

10

20

30

40

50

チドのより大きな免疫原性を生じ得る。この変化は、1つ以上のアミノ酸の変化からC領域ドメインのような領域の完全な再設計までに及ぶ。意図された変化は補体結合反応、膜レセプターとの相互作用、および他のエフェクター機能に影響を及ぼす。組換えH11抗体はまた、物質（例えば、リンホカイン）のエフェクター細胞への特異的伝達を援助するように設計され得る。種々の免疫グロブリンドメインが天然に存在する以外の順で配置されているタンパク質がまた、本発明に包含される。

本発明はまた、H11の単鎖V領域フラグメント（「scFv」）を包含する。単鎖V領域フラグメントは、短い連結ペプチドを使用することによってLおよび/またはH鎖V領域を連結することによって作製される。Birdら（1988）Science 242:423-426。十分な可撓性および長さを有する任意のペプチドが、scFvにおいてリンカーとして使用され得る。通常、リンカーは、免疫原性がほとんどない～全くないように選択される。連結ペプチドの例は、（GGGGS）₃であり、これは、一方のV領域のカルボキシ末端ともう一方のV領域のアミノ末端との間の約3.5nmを架橋する。他のリンカー配列もまた使用され得、そして薬物または固体支持体を接着するための手段のようなさらなる機能を提供し得る。

H鎖またはL鎖のすべてまたは任意の部分は、任意の組合せで使用され得る。代表的には、全体のV領域はscFvに含まれる、例えば、L領域およびV領域は、H鎖V領域に連結され得る。あるいは、L鎖V領域の一部は、H鎖V領域またはその一部に連結され得る。H鎖V領域がH11由来であり、そしてL鎖V領域が他の免疫グロブリン由来であるscFvもまた、意図される。1つの成分がH11ポリペプチドであり、そしてもう1つの成分がT細胞エピトープのような異なるポリペプチドである、2相性のscFvを構築することもまた可能である。

scFvは、例えば、V_H - （リンカー） - V_LまたはV_L - （リンカー） - V_Hの、任意の順で会合され得る。例えば、配列番号13および16は、形態V_L - （リンカー） - V_Hを有するH11-scFv2構築物を示す。しかし、配列番号13に示される構築物はモノマーを形成する一方、配列番号16に示される構築物はダイマーを形成する。特定の発現系におけるこれらの2つの形状の発現レベルに差があり得、この場合、これらの形態の1つが好ましくあり得る。タンデムscFvもまた、（X） - （リンカー） - （X） - （リンカー） - （X）のように作製され得、ここで、XはCポリペプチド、またはCポリペプチドと他のポリペプチドとの組合せである。他の実施態様では、単鎖抗体ポリペプチドは、全くリンカーを有さないか、またはほんの短い非可撓性リンカーを有する。例示的な立体配置には、V_L - V_HおよびV_H - V_Lが含まれる。この連結は、鎖内のV_LとV_Hとの間の相互作用を可能にするには短すぎ、そしてこの鎖は各末端のV_L/V_H抗原結合部位とのホモダイマーを形成する。このような分子は、当該分野では「ダイアボディ（diabody）」と呼ばれる。

scFvは、組換え的かまたは合成的かのいずれかで産生され得る。scFvの合成産生については、自動合成機が使用され得る。scFvの組換え産生については、scFvをコードするポリヌクレオチドを含む適切なプラスミドが、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞のような真核生物、あるいはEscherichiacoliのような原核生物のいずれかの適切な宿主細胞に導入され得、そしてポリヌクレオチドによって発現されたタンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用して単離され得る。

scFvの産生に特に有用な系は、E.coli中のプラスミドpET-22b（+）（Novagen, Madison, WI）である。pET-22b（+）は、6つの連続するヒスチジン残基からなるニッケルイオン結合ドメインを含み、これは発現したタンパク質の適切なアフィニティー樹脂での精製を可能にする。適切なベクターの他の例は、上記のpcDNA3（Invitrogen, San Diego, CA）である。

発現条件は、scFvが、機能的、および好ましくは最適な三次元構造をとることを確実にすべきである。使用されるプラスミド（特にプロモーターの活性）および宿主細胞によっては、産生の速度を調節するために必要であり得る。例えば、より弱いプロモーターの使用、またはより低い温度での発現は、原核生物系において適切に折り畳まれたscFvの産生を最適にすることが必要であり得、または、真核生物細胞においてはscFvを発現することが好ましくあり得る。

10

20

30

40

50

好ましいscFvは、配列番号2の少なくとも10の連続したアミノ酸および配列番号5の少なくとも10の連続したアミノ酸を含み、特に配列番号2のアミノ酸および配列番号5のアミノ酸は、5~20アミノ酸のリンカーポリペプチドによって連結され、またはH11のL鎖V領域およびH鎖V領域を含む。

本発明はまた、複数のCポリペプチドを含む、Cポリペプチドのポリマー形態を包含する。1つの実施態様は、必要に応じてキャリアに結合したCポリペプチドの直線状ポリマーである。これらの直線状ポリマーは、単一のCポリペプチドの複数のコピー、または異なるCポリペプチドの組合せを含み得、そしてタンデムCポリペプチド、または他のアミノ酸配列によって分離されたCポリペプチドを有し得る。別の実施態様は、

C複数抗原ペプチド(MAP)である。MAPは、放射状に分枝しているリジン樹状突起を有する小さな免疫学的不活性コアを有し、そこでは多くのCポリペプチドが共有結合される。例えば、Posnettら(1988)J.Biol.Chem.263:1719-1725;およびTam(1989)Meth.Enz.168:7-15を参照のこと。この結果は、コアに対するCポリペプチドの高いモル比を有する大きな巨大分子である。MAPは、有効な免疫原であり、そしてイムノアッセイに有用な抗原である。CMAPを生成するためのコアは、標準的なペプチド合成技術によって作製され得るか、または、例えば、Quality Controlled Biochemicals, Inc., Hopkinton, MAから市販で得られ得る。代表的なコアマトリクスは、3つのレベルのリジンおよび8つのアミノ酸から作製される。

Cポリペプチドを免疫原として使用する場合、好ましくは、ポリペプチドは、キャリアとともに送達される。宿主に対して有害ではない任意のキャリアが使用され得る。適切なキャリアは、代表的には、タンパク質;多糖類(例えば、ラテックス機能化Sephacrose、アガロース、セルロース、セルロースビーズなど);ポリマーアミノ酸(例えば、ポリグルタミン酸、ポリリジンなど);アミノ酸コポリマー;および不活性ウイルス粒子または弱毒化細菌(例えば、Salmonella)のような、大きな、緩徐に代謝される巨大分子である。特に有用なキャリアタンパク質は、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、特定のIg分子、チログロブリン、オボアルブミン、および破傷風トキソイドである。KLHが特に好ましい。

本発明のCポリペプチドは、多くの方法で同定され得る。例えば、LおよびH鎖のV領域は、全体のV領域アミノ酸配列に一緒にわたる一連の短いポリペプチドを調製することによって、スクリーニングされ得る。一連の20または50アミノ酸長のポリペプチドを使用して、各C V領域は、有用な機能的特性について調査され得る。D2の形状を有するかまたはイディオタイプ-抗イディオタイプ接触に関連するような、潜在的に興味深いポリペプチドを同定するためにタンパク質配列のコンピュータ分析を行うこともまた可能である。

本発明は、さらに、所望の特性を有する他のCポリペプチドを得るための種々の様式に組み合わせた、この項に記載のCの種々の適応を包含する。例えば、改変されたアミノ酸残基を有するCポリペプチドは、MAPに含まれ得る。他の実施態様では、C scFvは、IL-2のようなサイトカインに融合される。すべてのこのような組合せは、本発明に包含される。

本発明のポリペプチドは、C抗体のタンパク質分解を含む任意の適切な手順によるか、組換え方法によるか、または化学合成によって作製され得る。これらの方法は当該分野で公知であり、そして本明細書に詳細に記載する必要はない。タンパク質分解酵素の例には、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、サブチリシン、プラスミン、およびトロンピンが挙げられるが、これらに限定されない。インタクトなCは、1つ以上のプロテイナーゼと同時にまたは連続してインキュベートされ得る。あるいは、またはさらに、インタクトな抗体は、ジスルフィド還元剤で処理され得る。次いで、ペプチドは、当該分野で公知の技術によって互いに分離され得、これには、ゲル濾過クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および逆相HPLCが挙げられるが、これらに限定されない。

Cポリペプチドはまた、適切な発現系で、本明細書の他に提供される情報に従ったペプ

10

20

30

40

50

チドをコードするポリヌクレオチドからの発現によって作製され得る。代表的には、C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、適切なプロモーターの制御下で発現ベクターに連結され、そして所定の宿主細胞を遺伝子変化させるために使用され得る。真核生物および原核生物の両方の宿主系が使用され得る。次いで、ポリペプチドは、溶解した細胞からかまたは培養培地から単離され、そして所定の使用に必要な程度に精製される。本発明での使用に適切な原核生物宿主細胞の例には、E.coliが挙げられる。真核生物宿主細胞の例には、鳥類の細胞、昆虫細胞、植物細胞、および動物細胞が挙げられ、動物細胞としては、COS7、HeLa、およびCHO細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

H11ポリペプチドが植物種子のような適切な貯蔵媒体で発現される場合のような一定の適用では、H11ポリペプチドは、精製せずに使用され得る。Fiedlerら(1995) *Biotechnology* 13:1090-1093。ほとんどの適用については、一般的に、ポリペプチドが、他の細胞構成成分から少なくとも部分的に精製されることが好ましい。好ましくは、ポリペプチドは、総タンパク質の重量パーセントとして少なくとも約50%純粋である。より好ましくは、タンパク質は、少なくとも約50~75%純粋である。臨床的使用については、ポリペプチドは、好ましくは、少なくとも約80%純粋である。

本発明はまた、生物学的試料においてC抗原を検出する方法を包含する。この方法は、生物学的試料を得る工程、抗体を抗原結合させる条件下でこの試料をCと接触させる工程、および、もしあるなら、抗体の抗原への結合を検出する工程を包含する。

本発明はまた、生物学的試料において抗H11または抗Cを検出する方法を包含する。抗Cは、H11と交差反応する場合は検出可能である。この活性を有する抗Cは、腫瘍随
伴疾患の経過中に自然に生じ得る。この活性を有する抗Cは、特に、Cでの治療の過
程を受けている個体にありそうである。これらの方法は、例えば、個体における抗体レ
ベルをモニターするための、臨床的環境に、ならびに抗H11または抗Cの商業的産生にお
けるような、工業的環境に、適用可能である。

アッセイ方法は、標的とH11との間の安定な複合体の形成を可能にするために適切な条件
下で、試料中の任意の抗H11または抗C標的抗体をH11抗体またはポリペプチドと接触さ
せる工程、および形成された任意の安定な複合体を検出する工程を伴う。試料は、必要に
応じて、抗体濃度を富化することによって、アッセイを行う前に適切に調製される。イン
タクトなマウスCを使用する場合、一般的に、存在し得る任意の抗マウス免疫グロブリン
活性の試料を枯渇させることが好ましい。抗マウス免疫グロブリン抗体は、例えば、正
常マウスIgGとの沈降またはマウスIg吸着剤との吸着によって、試料から除去され得る。
抗マウス免疫グロブリン抗体、特にFc領域に特異的な抗体の結合は、アッセイの試薬の賢
明な選択によって最少にされ得る。マウスCのF(ab')₂またはFabフラグメントおよ
びヒト化CまたはH11のようなマウス抗原決定基を有する他の試薬が、適切である。

試料が適切に調製された後、試料を、Cと存在し得る何らかの標的抗体との複合体の形
成を可能にする条件下で、過剰のCと混合する。次いで、複合体の量を決定し、そして
予測される範囲の公知の量の標的抗体を含む標準試料と形成された複合体と比較する。複
合体形成は、免疫沈降法または比濁分析のような当該分野で公知の任意の方法によって観
察され得るが、一般的に、放射性同位元素(例えば、¹²⁵I)、酵素(例えば、ペルオキシ
ダーゼおよび-ガラクトシダーゼ)、または蛍光色素(例えば、フルオレセイン)のよ
うな標識で標識された試薬を用いることは、より感受性が良好である。

本発明は、本明細書で提供されるポリヌクレオチド配列(配列番号1および4)に基づいて、
抗体H11またはH11のフラグメントをコードする種々のポリヌクレオチドを提供する。
種々の実施態様がこの項に記載され、H11 H鎖V領域配列またはH11 L鎖V領域配列の多
くの異なる組合せを含む。一般的に、本発明のH11ポリヌクレオチドは、H11分子に独特
である(他の免疫グロブリンおよび特にA6抗体と比較して)少なくとも1つの特徴をコード
する。好ましくは、この特徴は、H11の免疫学的反応性に何らかの点に関連する。

本発明は、H11 L鎖V領域の一部をコードするポリヌクレオチドを包含し、配列番号4の
、少なくとも約70の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも約80の連続したヌクレ
オチド、より好ましくは少なくとも約100の連続したヌクレオチド、さらにより好ましく

10

20

30

40

50

は少なくとも約150ヌクレオチドを含む。本発明はまた、H11 L鎖V領域の一部をコードするポリヌクレオチドを包含し、そのCDR1をコードする配列の少なくとも約25の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも約30の連続したヌクレオチド、およびさらにより好ましくは少なくとも約35の連続したヌクレオチドを含む。本発明はまた、H11 L鎖V領域の一部をコードするポリヌクレオチドを包含し、そのCDR2またはCDR3をコードする配列の少なくとも約20の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも約25の連続したヌクレオチド、およびさらにより好ましくは少なくとも約35の連続したヌクレオチドを含む。

本発明はまた、H11 H鎖V領域の一部をコードするポリヌクレオチドを包含し、配列番号1の、少なくとも約70の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも約80の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約100の連続したヌクレオチド、およびさらにより好ましくは少なくとも約150の連続したヌクレオチドを含む。本発明はまた、H11 L鎖V領域の一部をコードするポリヌクレオチドを包含し、そのCDR1をコードする配列の15の連続したヌクレオチドを含む。本発明はまた、H11 L鎖V領域の一部をコードするポリヌクレオチドを包含し、そのCDR2またはCDR3をコードする配列の少なくとも約20の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも約25の連続したヌクレオチド、およびさらにより好ましくは少なくとも約35の連続したヌクレオチドを含む。

本発明は、H11の免疫学的活性を有するポリペプチドをコードする単離されたH11ポリヌクレオチドを包含し、ここで、このポリペプチドは、配列番号5に示すようなH11のV L鎖の少なくとも5アミノ酸をコードする。本発明はまた、H11の免疫学的活性を有するポリペプチドをコードする単離されたH11ポリヌクレオチドを包含し、ここで、このポリペプチドは、配列番号2に示すようなH11のV H鎖の少なくとも5アミノ酸をコードする。ポリヌクレオチド配列は、コドン使用頻度、安定性、促進クローニング、または任意の他の目的を最適にするように設計された変化を有する配列番号1または配列番号4に示される配列と類似し得る。このようなポリヌクレオチドを設計するために、配列番号2または配列番号5でアミノ酸配列を与えることは、当業者の技術の範囲内である。好ましいポリヌクレオチドは、H11CDRの少なくとも5つのアミノ酸をコードする。

本発明はまた、機能的に等価なH11の改変体および誘導体ならびにその機能的に等価なフラグメントをコードするポリヌクレオチドを包含する。これは、これによってコードされるポリペプチドの特性を増強させ得るか、減少させ得るか、または有意には影響し得ない。これらの機能的に等価な改変体、誘導体、およびフラグメントは、C抗原を特異的に認識する能力を提示する。例えば、コードされたアミノ酸配列が変化しないDNA配列の変化、ならびにアミノ酸残基の保存的置換、1または2、3のアミノ酸欠失または付加、およびアミノ酸アナログによるアミノ酸残基の置換を生じる変化は、コードされたポリペプチドの特性に著しい影響を及ぼさない変化である。保存的アミノ酸置換は、グリシン/アラニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グルタミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；セリン/トレオニン/メチオニン；リジン/アルギニン；およびフェニルアラニン/チロシン/トリプトファンである。

本発明のポリヌクレオチドは、同じ転写ユニット内のさらなるコード配列、制御エレメント（例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、およびポリアデニル化部位）、同じまたは異なるプロモーターの制御下のさらなる転写ユニット、クローニング、発現、および宿主細胞の形質転換を可能にする配列、ならびに本発明の実施態様を提供することが所望され得るような任意のこのような構築物のような、さらなる配列を含み得る。

本発明は、H11のL鎖またはH鎖V領域をコードするポリヌクレオチドと安定なハイブリッドを形成するが、本発明の出願時に公知の他の免疫グロブリンをコードする領域とは形成しない、少なくとも約15の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも約20ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約25の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約35の連続したヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも約75ヌクレオチド、なおより好ましくは少なくとも約100ヌクレオチド、さらにより好ましくは約200ヌクレオチド、およびさらにより好ましくは少なくとも約300ヌクレオチドのポリヌクレオチドを包含する。少なくとも1セットの

10

20

30

40

50

条件が存在する限り、任意のセットの条件がこの試験に使用され得、ここで、試験ポリヌクレオチドは必要とされる特異性を証明する。好ましくは、試験ポリヌクレオチドが結合するH11コード配列は、配列番号1および4に示される配列である。公知の免疫グロブリン配列は、H11の分類段階と類似の分類段階に分かれるので、試験は、試験ポリヌクレオチドのH11配列とのハイブリダイゼーションを、最も密接に関連する配列とのハイブリダイゼーションと比較することによって行われ得る。約10の最も密接に関連する配列の配列番号1、3、4、または5に対するパネルが好ましい。

ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジェンシー」の条件下で行われ得る。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーを増加させる条件は周知である。例えば、SambrookおよびManiatisを参照のこと。関連した条件の例には、（増加するストリンジェンシーの順で）25、37、50、および68のインキュベーション温度；10×SSC、6×SSC、1×SSC、0.1×SSC（ここでSSCは0.15MNaClおよび15mMクエン酸緩衝液）の緩衝液濃度および他の緩衝液系を使用するその等価物；0%、25%、50%、および75%のホルムアルデヒド濃度；5分から24時間までの洗浄インキュベーション時間；1、2、またはそれより多い洗浄工程；1、2、または15分の洗浄インキュベーション時間；ならびに6×SSC、1×SSC、0.1×SSC、または脱イオン化水の洗浄溶液が挙げられる。

H11のフラグメントをコードする有用なH11ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドフラグメント（例えば、配列番号1または配列番号4に基づく）を生成する工程、およびそれによってコードされるポリヌクレオチドを目的の機能について試験する工程によって、同定され得る。あるいは、特定のポリペプチドによってコードされるポリペプチドフラグメントが調製され得、そして目的の機能について試験され得る。あるいは、所望の特性を有するCポリペプチドが与えられると、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが設計され得る。

H11ポリマー、融合タンパク質、ヒト化免疫グロブリン、単鎖V領域、および目的の他の特定のポリペプチドについてのコード領域を有するポリヌクレオチドは、すべてのこれらの実施態様に包含される。これらのポリペプチドは以上に記載される。

本発明はまた、検出可能な標識と共有結合したポリヌクレオチドを提供する。このようなポリヌクレオチドは、例えば、関連のヌクレオチド配列の検出のためのプローブとして有用である。

本発明のポリヌクレオチドは、化学合成法、組換えクローニング法、PCR、またはこれらの任意の組合せを使用して得られ得る。化学的ポリヌクレオチド合成方法は当該分野で周知であり、そして本明細書に詳細に記載される必要はない。当業者は、本明細書で提供される配列データを使用して、DNA合成機を用いることによってまたは商業サービスから注文することによって所望のポリヌクレオチドを得ることができる。

あるいは、Cポリヌクレオチド配列は、C抗体産生細胞株、Cクローニングベクター、またはC発現ベクターから得られ得る。所望の配列をコードするRNAまたはDNAは、標準的組換え技術によって単離され得、増幅され得、そしてプロセッシングされ得る。このような技術には、制限ヌクレアーゼでの切断、およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅、またはこれらの適切な組合せが含まれる。PCR技術は、米国特許第4,683,195号、第4,800,159号、第4,754,065号および第4,683,202号、ならびにPCR:The Polymerase Chain Reaction, Mullisら編, Birkauser Press, Boston (1994)に記載される。

所望の配列を含むポリヌクレオチドは、適切なベクターに挿入され得、そしてベクターは、順に、複製および増幅に適切な宿主細胞に導入され得る。ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の任意の手段によって宿主細胞に導入され得る。細胞は、直接取込、エンドサイトーシス、トランスフェクション、f接合、またはエレクトロポレーションにより外因性ポリヌクレオチドを導入することによって形質転換される。一旦導入されると、外因性ポリヌクレオチドは、非組込みベクター（例えば、プラスミド）として細胞内に維持されるかまたは宿主細胞ゲノムに組み込まれ得る。増幅されたDNAは、標準的方法によって宿主細胞から単離され得る。例えば、Sambrookら（1989）を参照のこと。RNAはまた、形質転換された宿主細胞から得られ得るか、またはDNA依存性RNAポリメラーゼを使用すること

10

20

30

40

50

によってDNAから直接的に得られ得る。

本発明はさらに、H11ポリヌクレオチドを含む種々のベクターを包含する。これらのベクターは、H11ポリヌクレオチドの供給源でもある組換えポリペプチドの発現に使用され得る。クローニングベクターは、それらが含むH11ポリヌクレオチドの複製コピーを得るために、または将来の回収のための貯蔵庫でポリヌクレオチドを保存する手段として使用され得る。発現ベクター（およびこれらの発現ベクターを含む宿主細胞）は、それらが含むポリヌクレオチドから産生されるポリペプチドを得るために使用され得る。それらはまた、個体でH11を発現し、したがって遺伝子治療におけるようなポリペプチドを合成し得るインタクトな細胞を有することが所望される場合に使用され得る。適切なクローニングおよび発現ベクターには、当該分野で公知のもの、例えば、細菌、哺乳動物、酵母、および昆虫発現系での使用のためのベクターが含まれる。特異的ベクターおよび適切な宿主細胞は当該分野で公知であり、そして本明細書で詳細に記載されない。例えば、GacesaおよびRamji, Vectors, John Wiley & Sons (1994) を参照のこと。

クローニングおよび発現ベクターは、代表的には、選択可能なマーカー（例えば、ベクターで形質転換された宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする遺伝子）を含むが、このようなマーカー遺伝子は、宿主細胞に同時に導入された他のポリヌクレオチド配列に有され得る。選択可能な遺伝子が導入されている宿主細胞のみが、選択的条件下で増殖する。代表的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質または他のトキシン、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートに対する耐性を与えるか；(b) 栄養要求性欠失を補うか；または(c) 複合培地から利用可能でない重要な栄養を供給するかのいずれかである。適切なマーカー遺伝子の選択は、宿主細胞に依存し、そして種々の宿主に適切な遺伝子は当該分野で公知である。ベクターはまた、代表的には、宿主によって認識される複製系を含む。

適切なクローニングベクターは、標準的な技術に従って構築され得るか、または当該分野で利用可能な多数のクローニングベクターから選択され得る。選択されたクローニングベクターは、使用されることが意図される宿主細胞に従って変化し得るが、有用なクローニングベクターは、一般的に、自己複製する能力を有し、特定の制限エンドヌクレアーゼに対する単一の標的を有し得、またはマーカー遺伝子を有し得る。適切な例には、プラスミドおよび細菌ウイルス、例えば、pUC18、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、ファージDNA、およびシャトルベクター（例えば、pSA3およびpAT28）が挙げられる。これらおよび他のクローニングベクターは、BioRad、Stratagen、およびInvitrogenのような商業供給者から入手可能である。

発現ベクターは、一般的には、目的の C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む複製可能なポリヌクレオチド構築物である。C ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、プロモーター、エンハンサー、およびターミネーターのような適切な転写制御エレメントに作動可能に連結される。発現（すなわち、翻訳）については、リボソーム結合部位、翻訳開始部位、および停止コドンのような1つ以上の翻訳制御エレメントもまた、通常必要とされる。これらの制御エレメント（転写および翻訳）は、H11遺伝子、または異種遺伝子（すなわち、他の遺伝子または他の生物に由来する）に由来し得る。シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列はまた、C ポリペプチドが細胞膜を通過または細胞膜に埋まることを可能にするため、または細胞から分泌されるために含まれ得る。酵母細胞、鳥類細胞、および哺乳動物含む真核生物の細胞での発現に適切な多くの発現ベクターは、当該分野で公知である。発現ベクターの1つの例は、pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) であり、そこで転写はサイトメガロウイルス (CMV) 初期プロモーター/エンハンサーによって駆動する。このベクターはまた、目的の C ポリヌクレオチドの挿入のための複数の制限酵素についての認識部位を含む。発現ベクター（系）の別の例は、パキユロウイルス/昆虫系である。

C ポリヌクレオチドを含む抗体標的遺伝子治療での使用に適切な発現系もまた、本発明に包含される。適切な発現系は、例えば、Brownら (1994) *Virol.* 198:477-488；およびMiyamuraら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8507-8511に記載される。

10

20

30

40

50

目的のポリヌクレオチドを含むベクターは、エレクトロポレーション；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、または他の物質を用いるトランスフェクション；マイクロプロジェクトイルボンパートメント；リポフェクション；および感染（ここで、ベクターは、ワクシニアウイルスのような感染因子であり、これは以下に記載する）を含む、多くの適切な手段のいずれかによって宿主細胞に導入され得る。導入するベクターまたは C ポリヌクレオチドの選択は、しばしば、宿主細胞の特徴に依存する。

一旦適切な宿主細胞に導入されると、C ポリペプチドの発現は、当該分野で公知の任意のアッセイを使用して決定され得る。例えば、C ポリペプチドの存在は、培養上清（H11 ポリペプチドが分泌される場合）または細胞溶解物のRIAまたはELISAによって検出され得る。

10

H11ポリヌクレオチドに特に有用な発現ベクターは、H11ポリヌクレオチド配列から構成されるワクシニアウイルスであり、これはまた、ワクチン調製物で使用され得る。Moss (1991) Science 252:1662-1667。H11ポリペプチドフラグメントを含むH11ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列をワクシニアに導入するために、目的のポリヌクレオチド配列は、最初に、複製に必要とされないワクシニアDNAに相同なフランキング配列とともにワクシニアウイルスプロモーターを含むプラスミドに挿入される。次いで、プラスミド含有細胞は、ワクシニアで感染され、これは、プラスミドとウイルスとの間の低レベルの相同組換えを導き、ワクシニアウイルスゲノム中へのワクシニアプロモーターおよびH11ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのトランスファーを結果として生じる。代表的には、H11ポリヌクレオチド配列は、ウイルスTK（チミジンキナーゼ）遺伝子に挿入される。TK部位への挿入は、野生型と比較して10,000倍以上ウイルスを弱毒化する。Flexnerら (1980) Vaccine 8 (Cold Spring Harbor Laboratory), 179-184頁。組換えウイルスは、TK表現型によって同定される。好ましくは、H11ポリヌクレオチドの発現は、ワクシニア初期/後期プロモーター（7.5K）の制御下であり、これによって、得られるH11ポリペプチドは、ウイルスの生活環を通して感染した細胞で発現され得る。しかし、pH6または合成プロモーターのような、当該分野で公知の他のプロモーターが使用され得る。H11ポリペプチドの発現は、組換えワクシニアで感染した細胞または生組換えワクシニアウイルスで免疫した個体で生じる。WR、ALVAC、NYVACを含むいくつかの株のワクシニアのいずれか1つが使用され得るが、これらに限定されない。

20

30

本発明のベクターは、C ポリペプチドをコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含み得る。これはまた、リンホカイン（IL-2、IL-4、GM-CSF、TNF- α 、およびIFN- γ を含むが、これらに限定されない）のような所望の産物を増強、促進、または調節する他のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列も含み得る。好ましいリンホカインは、GM-CSFである。好ましいGM-CSF構築物は、3'非翻訳領域からのAUリッチエレメント、およびヘアピンループを形成し得る5'非翻訳領域の配列が欠失されている構築物である。scFv、キメラ、およびポリマーのような組換え C 改変体をコードするワクシニアベクターも、本発明に包含される。

本発明の他の実施態様は、上記のように、C ポリヌクレオチド、または C ポリヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換された宿主細胞である。原核生物および真核生物宿主細胞の両方が使用され得る。原核生物宿主には、細菌細胞、例えば、E. coli および Mycobacteria が挙げられる。真核生物宿主の中には、酵母細胞、昆虫細胞、鳥類細胞、植物細胞、および哺乳動物細胞がある。宿主系は当該分野で公知であり、そして本明細書に詳細に記載する必要はない。哺乳動物宿主細胞の例には、CHO および NSO が挙げられ、European Collection of Cell Cultures (England) から入手可能である。例えば、CMVプロモーターで、次いでグルタミンシンセターゼを使用するこのプラスミドの増幅によって駆動される、NSO細胞のプラスミドでのトランスフェクションは、タンパク質産生に有用な系を提供する。Cockettら (1990) Bio/Technology 8:662-667。

40

本発明の宿主細胞は、特に、C ポリヌクレオチドの貯蔵所として、または C ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの産生のためのビヒクルとして、使用され得る。これらはま

50

た、 Cポリペプチドのインビボベクターとして使用され得る。本発明のH11ポリヌクレオチドは、以下に記載のような、H11ポリペプチド、未処理H11、またはH11の組換え形態を産生するために発現系で使用され得る。

本発明のポリヌクレオチドは、いくつかの用途を有する。これらは、例えば、 Cの産生のための発現系で有用である。これらはまた、当該分野で周知の方法を使用して試料中の Cポリヌクレオチドまたは関連する配列の存在についてアッセイするためのハイブリダイゼーションプローブとして有用である。さらに、ポリヌクレオチドはまた、所望のポリヌクレオチドの増幅をもたらすためのプライマーとして有用である。本発明のポリヌクレオチドはまた、ワクチンを含む薬学的組成物においておよび遺伝子治療のために有用である。

ポリヌクレオチドはまた、 Cコード配列の検出のためのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。適切な試料には、遺伝子治療での使用のためにエクスピボで形質転換された細胞が含まれる。1つの例では、DNAまたはRNAは、試料から抽出され、そして必要に応じて、ゲル上で流されおよび/または制限エンドヌクレアーゼで切断される。プロセッシングされた試料ポリヌクレオチドは、代表的には、洗浄に適切な培地に移される。次いで、試料ポリヌクレオチドは、試料が適合する C配列を含む場合、安定な二重鎖が形成されることを可能にする条件下でH11ポリヌクレオチドプローブと接触させる。形成された任意の安定な二重鎖が、任意の適切な手段によって検出される。例えば、 Cポリヌクレオチドプローブは、標識された形態で供給され得、そして洗浄後の試料に残っている標識は、形成された安定な二重鎖の量を直接的に反映する。第2の例では、ハイブリダイゼーションはインサイチュで行われる。適切に調製された組織試料は、 Cコード配列の位置を示すために標識されたプローブに重ねる。

短い Cポリヌクレオチドはまた、特にプライマーとハイブリダイズする領域を含むより長い配列を増幅するために、PCR反応のためのプライマーとして使用され得る。これは、さらなる遺伝子操作のためのポリヌクレオチドを産生するために、調製的に行われ得る。これはまた、 Cコードポリヌクレオチドが、例えば、診断目的の試料中に存在するかどうかを決定するために、分析的に行われ得る。

ポリヌクレオチドの別の用途は、ワクチンおよび遺伝子治療においてである。一般的原理は、そこにコードされたポリペプチドの発現を促進または減弱するようにポリペプチドを投与することである。したがって、本発明は、免疫応答を惹起する方法、および有効量の Cポリヌクレオチドの個体への投与を含む処置の方法を包含する。これらの方法では、 Cポリペプチドをコードする Cポリヌクレオチドは、直接的にまたは Cポリヌクレオチドでトランスフェクトされた細胞によってのいずれかで、個体に投与される。好ましくは、 Cポリヌクレオチドは、環状プラスミドの形態で、好ましくはスーパーコイル立体配置である。好ましくは、 Cポリヌクレオチドは、細胞内部で複製される。したがって、 Cポリヌクレオチドは、標識組織タイプの細胞で本来活性である異種プロモーターのような、適切なプロモーターに作動可能に連結される。好ましくは、一旦細胞核にあると、プラスミドは、環状非複製エピソーム分子として存続する。インビトロ変異は、例えば、より大きな親和性および/またはアビディティを有する分子をコードするためのプラスミド構築物で行われ得る。

Cポリヌクレオチドを含むプラスミドが、真核生物細胞で C発現をし得るかどうかを決定するために、COS-7、CHO、またはHeLaのような細胞は、プラスミドでトランスフェクトされ得る。次いで、 Cの発現は、イムノアッセイによって、例えば、ウェスタンブロットによって決定される。より小さな Cポリペプチドは、例えば、プラスミドを構築することによって検出され得、その結果得られる Cポリペプチドは、標的エピトープまたは酵素標識のようなタグと融合される。発現された Cポリペプチドのさらなる特徴付けは、ペプチドを精製すること、次いで、本明細書に記載の機能的アッセイの1つを行うことによって、達成され得る。

遺伝子治療の1つの態様では、本発明のポリペプチドは、エクスピボで細胞を遺伝的に変更するために使用される。この方策では、ドナーから取り出されたまたは細胞株から得ら

10

20

30

40

50

れた細胞は、Cポリペプチドをコードするベクターでトランスフェクトまたは形質導入され、次いでレシピエントに投与される。トランスフェクションに適切な細胞には、末梢血単核細胞が挙げられる。

遺伝子治療の他の態様では、本発明のポリヌクレオチドは、インビボで細胞を遺伝的に変更するために使用される。この目的には、種々のタイプのガンを処置することが含まれるが、これらに限定されない。

Cポリペプチドは、いくつかの方法で特徴付けされ得る。例えば、Cポリペプチドは、ガン細胞に特異的に結合するその能力について、ガン細胞とインタクトなH11との間の結合を特異的に阻害するその能力について、試験され得る。Cポリペプチドはまた、抗CDR3ポリペプチドと反応し得る。Cポリペプチドはまた、ガンのような新生物疾患を緩和するまたは改善するその能力について試験され得る。これらの特性の1つのみが、本発明の範囲内になるようにポリペプチドについての順で存在する必要があるが、好ましくは1つより多くのこれらの特性が存在することが、理解される。

Cポリペプチドのガン細胞またはその抗原性画分への結合能力は、イムノアッセイによって試験され得る。任意の形態の直接結合アッセイが適切である。このようなアッセイの1つにおいて、ガン細胞または推定Cポリペプチドが標識化される。適切な標識には、 ^{125}I のような放射性同位元素、ペルオキシダーゼのような酵素、フルオレセインのような蛍光標識、および化学発光標識が挙げられる。代表的に、他の結合パートナーは、洗浄を容易にするために不溶化される（例えば、マイクロタイタープレート上にコーティングすることによる）。標識化成分を不溶化成分と組み合わせた後、固相は洗浄され、そして結合した標識の量が測定される。別のこのようなアッセイはサンドイッチアッセイであり、ここで、推定Cポリペプチドは固相上の1次抗免疫グロブリンにより捕獲され、そしてC抗体で発色させられる。これらの例のいずれにおいても、Cの結合程度は、固相に結合した標識の量に正比例する。

阻害アッセイを行うために、推定Cポリペプチドは、ガン細胞へのH11の結合を減少させる能力について力価測定される。阻害される反応における結合ペアのいずれかが標識化される一方、他方は洗浄を容易にするために代表的には不溶化される。推定Cポリペプチドは、代表的には標識化成分と混合され、次いで混合物は固相と合わされる。H11の特性を有するポリペプチドは、コントロールポリペプチドと比較して、固相に付着した標識の量を比例して減少させる。この試験は直接結合を測定するよりも高感度であり得る。なぜなら、十分な濃度で存在する場合、CとC抗原との間のより低い親和性相互作用が、安定な結合を形成するには弱すぎるが、別のリガンド-レセプター対の結合を妨げるには適切であり得るからである。

本発明は、Cを単独または組み合わせのいずれかで含む薬学的組成物および免疫原性組成物を包含する。このような薬学的組成物およびワクチンは、単独または他の形態の治療（例えば、化学治療または放射線治療）との組合せのいずれかで、免疫応答を惹起するためおよび新生物疾患を処置するために有用である。

活性成分としてC抗体またはそのポリヌクレオチドもしくはポリペプチド誘導体を含む薬学的組成物の調製または、薬学的調製物の調製のための一般的に受け入れられた手順に従って行われる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 第18版（1990）、E.W. Martin編、Mack Publishing Co., PAを参照のこと。意図される使用および投与方法に依存して、薬学的組成物の調製において活性成分をさらに加工することが所望され得る。適切な加工には、滅菌、適切な非毒性および非干渉成分との混合、用量単位への分割、および送達デバイスへの封入が挙げられ得る。

薬学的受容可能な液体組成物は、例えば、本明細書中に具現化されるポリペプチドを液体賦形剤（例えば、水、生理食塩水、水性デキストロース、グリセロール、またはエタノール）中に溶解または分散させることにより調整され得る。組成物はまた、他の医用薬剤（medicinal agent）、製薬剤（pharmaceutical agent）、アジュバント、キャリア、および補助基質（例えば、湿潤剤または乳化剤、およびpH緩衝化剤）を含み得る。

本発明の薬学的組成物は、組成物を形態に適切な方法により投与される。代表的な経路は

10

20

30

40

50

、皮下、筋肉内、腹腔内、皮内、経口、鼻腔内、および肺内（すなわち、エアロゾルによる）を含む。ヒトへの使用のための本発明の薬学的組成物は、代表的には非経口経路、最も代表的には皮内経路、皮下経路、または筋肉内経路により投与される。

経口投与、鼻腔内投与、または局所投与のための薬学的組成物は、固体形態、半固体形態、または液体形態（錠剤、カプセル、パウダー、液体、および懸濁液を含む）で供給され得る。注射のための組成物は、液体溶液または懸濁液として、エマルジョンとして、または注射の前に液体に溶解もしくは懸濁するに適切な固体形態として、供給され得る。気道を介する投与のために好ましい組成物は、固体、パウダー、または液体エアロゾル（適切なエアロゾル化デバイスと共に使用する場合）を提供する組成物である。必須ではないが、薬学的組成物は、好ましくは正確な量の投与のために適切な単位投薬形態で供給される。また、本発明により意図される形態は、徐放形態または持続性放出形態であり、それにより、比較的一定レベルの活性化合物が長期間にわたって提供される。

本発明に具体化される組成物は、新生物形成を特異的に認識するその能力について評価され得る。従って、試験化合物は適切な薬学的組成物として調製され、そして試験被験体に投与される。初期の研究は、好ましくは、マウスまたはウサギのような小動物において、次いで必要に応じて非ヒト霊長類、次いで最終的にヒトにおいて行われる。免疫原性は、好ましくは、事前の抗体応答のない、個体において試験される。適切な用量の試験組成物が、適切な処置計画において投与される。予想範囲内の異なる用量および計画を比較することが適切であり得る。このような試験は当業者の技術の範囲内にある。

本発明の組成物は、新生物疾患を有するヒトへの投与のために特に適切である。特に関連するのは、メラノーマ、神経芽細胞腫、神経膠腫、肉腫、リンパ腫、および小細胞肺癌である。

また、本発明はガンを処置するための方法を含む。この方法は、所望の効果を達成するために有効な量の Cを含む薬学的組成物を投与する工程を含む。所望の効果とは、存在する腫瘍塊の緩和または再発の予防である。ガンの処置のために投与される薬学的組成物の量は、所望の効果を生じるに有効な量である。有効な量は、単回投与または一連の投与で提供され得る。

投与される C抗原結合性フラグメントの有効な量は、投与経路、個体の状態、および所望の目的のような幾つかの要素に依存する。用語「治療の有効」は、使用される抗原結合性フラグメントの量が、ガンを改善するために十分な量であることを意味する。「改善する」は、個体におけるガンの有害な影響を減少させることを意味する。代表的には、直接的に投与される場合、1回の投与量は、約10 µg ~ 20mg、好ましくは250 µg ~ 10mg、より好ましくは300 µg ~ 5mg、さらにより好ましくは500 µg ~ 2.5mgである。投与は、代表的には、1週間ごとにまたは2週間ごとに、所望の測定可能なパラメーター（例えば、疾患症状の減少）が検出されるまで行われる。次いで投与は、適宜に頻度を下げて（例えば、2週間ごとに、または1ヶ月ごとに）継続され得る。

本発明の種々の組成物は、単独でもしくは所望の目的を促進する他の活性な薬剤と組合わせて使用され得るか、または所望の補助治療を提供し得る。適切な活性薬剤には、抗腫瘍薬、および上記の生体応答調節因子、ならびにDouillardら（1986）Hybridomas（Supp.1:139）により記載される細胞のようなエフェクター細胞が挙げられる。

免疫療法のために使用される場合、Cは、上記の治療薬剤で標識され得るか、または標識され得ない。これらの薬剤は、本発明のポリペプチドと直接または間接的のいずれかで結合され得る。間接的結合の1つの例は、スパーサー部分の使用による。これらのスパーサー部分は、不溶性または可溶性で有り得（Dienerら（1986）Science 231:148）、そして標的部位でのCからの薬物放出を可能にするように選択され得る。あるいは、Cおよび治療薬剤は、翻訳され得、合成され得、連結され得、または他にCおよび治療薬剤の両方の機能を有する単一分子として作製され得る。免疫療法のためにCに結合され得る治療薬剤の例には、生体応答調節因子、薬物、放射性同位元素、レクチン、およびトキシンが挙げられるが、これらに限定されない。生体応答調節因子には、リンホカイン（腫瘍壊死因子、インターロイキン1、2、および3、リンホトキシン、マクロファージ活性化

10

20

30

40

50

因子、遊走阻害因子、コロニー刺激因子、およびインターフェロンを含むが、これらに限定されない)が挙げられる。Cを標識化し得るインターフェロンには、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、および γ -インターフェロン(IFN- γ)およびそのサブタイプが挙げられる。

免疫療法のために放射性同位元素を結合したCを使用することにおいて、特定のインタタイプが、インタタイプ安定性および放出と同様に、白血球分布のような因子に依存して、他のものより好ましくあり得る。所望であれば、悪性細胞の分布は、下記のインビボ診断技術により評価され得る。悪性度に依存して、特定のエミッターが他のエミッターより好ましくあり得る。一般に、 α および β 粒子放出放射性同位元素が免疫療法において好ましい。例えば、ガンのように、動物が固形腫瘍病巣を有する場合、数ミリメートルの組織を透過することが可能な高エネルギーエミッター(例えば、 ^{90}Y)が好ましくあり得る。他方で、白血病の場合のように、悪性疾患が単一の標的細胞からなる場合、短射程の高エネルギーエミッター(例えば、 ^{212}Bi)が好ましくあり得る。治療目的のために本発明の抗原結合フラグメントに結合され得る放射性同位元素には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pb 、および ^{188}Re が挙げられるが、これらに限定されない。

10

レクチンは、通常、植物材料から単離されるタンパク質であり、これは特定の糖部分に結合する。多くのレクチンがまた細胞を凝集させ得、そしてリンパ球を刺激し得る。しかし、リシンは免疫療法に使用されている毒性レクチンである。これは、好ましくは、リシンのD-ペプチド鎖(毒性を担う)を抗体分子に結合させて、毒性効果の部位特異的な送達を可能にすることにより達成される。

20

トキシンは、植物、動物、または微生物により産生される有毒物質であり、十分な用量でしばしば致死である。ジフテリアトキシンは、治療的に使用され得る、*Corynebacterium diphtheriae*により産生される物質である。このトキシンは、 α および β サブユニットからなり、適切な条件下で分離され得る。毒性A鎖成分は、抗体に結合され、そして新生物細胞への部位特異的な送達のために使用され得る。

従って、例えば、Cは、 α -インターフェロンとの組合せで使用され得る。この治療様式は、メラノーマ細胞によるMab反応性抗原の発現を増加させることによりMabのメラノーマ標的化を増強する。Greinerら(1987) *Science* 235:895。あるいは、Cは、例えば、IFN- γ との組合せで使用され得、このことによってエフェクター細胞によるFcレセプターの発現を活性化および増加し、これは、次いで、抗原結合フラグメントのエフェクター細胞への結合および標的悪性細胞の殺滅の増強を生じる。当業者は、種々の生物学的応答調節因子から選択して、Cの効力を増強する所望のエフェクター機能を産生し得る。

30

Cが、本明細書中に記載されるような種々の治療薬剤との組合せで使用される場合、両薬剤の投与は、通常、実質的に同時に生じる。用語「実質的に同時」とは、それらが時間に関して合理的に近して一緒に投与されることを意味する。通常は、Cの前に治療薬剤を投与することが好ましい。例えば、治療薬剤は、Cの1~6日前に投与され得る。治療薬剤の投与は、毎日であるか、またはその他の適切な間隔で、例えば、悪性疾患の性質、患者の状態、および薬剤の半減期のような因子に依存し得る。

Cを使用して、組合せ療法の設計が可能である。エフェクター細胞および同一もしくは異なる治療薬剤との組合せでのCの投与の前に、治療薬剤を投与することが望ましくあり得る。例えば、患者は、最初にIFN- γ およびインターロイキン-2(IL-2)を毎日、3日~5日間投与し、そして5日目にエフェクター細胞、IFN- γ 、およびIL-2との組合せでCを投与することにより処置され得る。

40

本発明はまた、C抗原を発現する腫瘍または新生物細胞の場所に、リポソームを特異的に送達するために、膜結合Cを有するリポソームの使用を包含する。これらのリポソームは、それらが、Cに加えて上記のような、疾患の悪性部位で放出される免疫療法薬剤を含むように産生され得る。Wolffら(1984) *Biochem. Biophys. Acta* 802:259。別のこのような送達系は、Brownら(1994) *Virology* 198:477-488; およびMiyamuraら(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8507-8511に記載されており、キメラパルボウイルスB19キャプシ

50

ドを、抗原結合性フラグメントの提示のために利用する。このようなキメラ系は、本願方法における使用のために包含される。

Cの投与のための投与量範囲は、所望の効果を生成するために十分大きく、ここで、悪性疾患の症状は、不都合な副作用（例えば、所望でない交差反応、アナフィラキシー反応、など）を起こすことなく改善される。一般に、投与量は、患者の年齢、状態、性別、および疾患の程度により変化し、そして当業者により決定され得る。投与量は、合併症の場合には、各々の医師によって調製され得る。投与量は、1日または数日間、毎日1用量以上の投与で、約0.1mg/kg～約2000mg/kg、好ましくは約0.1mg～約500mg/kgで変化し得る。一般に、Cが治療薬剤と組み合わせられて投与される場合、インビボでの免疫診断画像化のために使用される投与量に匹敵する低投与量が使用され得る。

10

Cの治療的組成物は、注射または漸進的灌流により投与され得る。C抗原結合性フラグメントは、静脈内、腹腔内、筋内、皮下、腔内、硬膜下腔内、または経皮的に、単独またはエフェクター細胞との組合せで投与され得る。

投与の別の方法は病巣内投与であり、例えば、腫瘍への直接注射による。ガン患者への種々の形態の免疫療法の病巣内投与は、免疫学的薬剤の全身投与で見られる毒性を引き起こさない。Fletcherら（1987）*Lymphokine Res.*6:45;Rabinowichら（1987）*Cancer Res.*47:173;Rosenbergら（1989）*Science* 233:1318；およびPizzら（1984）*Int.J.Cancer* 34:359

Cは、脳ガンを処置および画像化することにおける使用に特に適切である。送達の部位が脳である場合、治療薬剤は、脳に送達されなければならない。血液-脳関門は、全身循環から脳および脊髄への多くの治療薬剤の取り込みを制限する。血液-脳関門を通過する分子は、2つの主要なメカニズム自由拡散および促進された輸送を使用する。血液-脳関門の存在のために、CNSにおける所定の治療薬剤の有益な濃度の達成は、特定の薬物送達戦略の使用を必要とし得る。CNSへの治療薬剤の送達は、幾つかの方法により達成され得る。

20

1つの方法は神経外科的技術に依存する。重大な病気の患者の場合、外科的介入は、それに付随する危険性にもかかわらず正当化される。例えば、治療薬剤は、CNSへの直接的な物理的導入（例えば、脳室内、病巣内、または硬膜下腔内注射）により送達され得る。脳室内注射は、例えば、オマヤレザバーのようなレザバーに装着した脳室内カテーテルにより容易にされ得る。導入の方法はまた、再装填可能デバイスまたは生分解性デバイスにより提供される。別のアプローチは、血液-脳関門の透過性を増大させる物質による血液-脳関門の崩壊である。例として、マンニトールのような拡散性の乏しい薬剤の、エトポシドのような脳血管透過性を増大させる製剤、またはロイコトリエンのような血管作用性薬剤の動脈内注入が挙げられる。NeuweltおよびRappoport（1984）*Fed.Proc.*43:214-219;Babaraら（1991）*J.Cereb.Blood Flow Metab.*11:638-643；およびGennusoら（1993）*Cancer Invest.*11:638-643。

30

さらに、処置の必要な場所に局所的に組成物を投与することが望ましくあり得；これは、例えば、手術の間の局所注入、注射、カテーテル、または移植体（この移植体は多孔性、非多孔性、またはゼラチン性物質（例えば、シラスティック膜のような膜またはファイバーを含む））により達成され得る。適切なこのような膜は、Guilford Pharmaceuticals Inc.により提供されるGliadel（登録商標）である。

40

別の方法は、血液-脳関門を通過するアナログを提供するためのCの修飾または選択のような薬理学的技術を含む。例として、例えば、通常に血液-脳関門を通して輸送される分子に似せるために、分子の疎水性の増加、分子の正味電荷もしくは分子量の減少、または分子の修飾が挙げられる。Levin（1980）*J.Med.Chem.*23:682-684;Pardridge（1991）：*Peptide Drug Delivery to theBrain*；およびKostisら（1994）*J.Clin.Pharmacol.*34:989-996。

Cの、リポソームのような疎水性環境へのカプセル化もまた、CNSへの薬物送達において有効である。例えば、WO91/04014は、リポソーム送達系を記載する。ここで、薬物は、通常に血液-脳関門を通して輸送される分子が付加されたりリポソーム内にカプセル化される

50

血液-脳関門を通過するように Cを処方する別の方法は、シクロデキストリンへのカプセル化である。血液-脳関門を通過する任意の適切なシクロデキストリンが使用され得、これには、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、およびそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。一般には、米国特許第5,017,566号、同第5,002,935号および同第4,983,586号を参照のこと。このような組成物はまた、米国特許第5,153,179号により記載されるようなグリセロール誘導体を含み得る。

なお別の方法は、新規な輸送可能なキメラ Cを産生するための Cと輸送可能な薬剤との結合のような生理学的技術を利用する。例えば、血管作用性腸ペプチドアナログ (VIPa) は、特異的なキャリア分子であるトランスフェリンレセプターに対するMabへの結合後にのみその血管作用性効果を発揮する。トランスフェリンレセプターは、血液-脳関門を通してのVIPa-Mab結合体の取り込みを容易にする。Pardridge (1991) ; およびBickelら (1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2618-2622。幾つかの他の特異的な輸送系が同定されており、これらには、インスリンまたはインスリン様増殖因子 I および II を移入するための系が挙げられるが、これらに限定されない。他の適切な非特異的なキャリアには、ピリジニウム、脂肪酸、イノシトール、コレステロール、およびグルコース誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。特定のプロドラッグが米国特許第5,017,566号に記載されており、それにより、中枢神経系に侵入する際に、薬物はキャリアから切断され、活性薬物を放出する。

適切な被験体は、本発明の薬学的組成物での処置に適切である任意の新生物形成 (特に、ガン) の病理学的効果の危険にあると疑われる被験体を含む。ガンの病歴を有する被験体は、特に適切である。治療に適切なヒト被験体は、臨床的基準により区別され得る 2つのグループを含む。「進行した疾患」または「高い腫瘍荷重」を有する患者は、臨床的に測定可能な腫瘍を有する患者である。臨床的に測定可能な腫瘍は、腫瘍塊に基づいて検出され得る腫瘍である (例えば、触診、CATスキャン、またはX-線により ; それら自体のポジティブな生化学的または組織病理学的マーカーは、この集団を同定するために不十分であり得る)。本発明に具現化される薬学的組成物は、患者の状態を緩和する目的で、これらの患者に投与され、抗腫瘍応答を惹起する。理想的には、腫瘍塊の減少が結果として起こるが、いかなる臨床的改善も有益である。臨床的改善は、腫瘍の病理学的結果の進展の危険もしくは速度の減少または腫瘍の減少を含む。

適切な被験体の第2のグループは、「アジュバントグループ」として当該分野において公知である。これらは、ガンの病歴を有したが他の治療方法に応答性であった個体である。以前の治療には、外科的切除、放射線治療、および従来の化学療法が挙げられるが、これらに限定されない。結果的に、これらの個体は、臨床的に測定可能な腫瘍を全く有さない。しかし、それらは、元の腫瘍部位の近傍でまたは転移により、疾患の進展について危険であると疑われる。

このグループは、さらに、高いリスクの個体および低いリスクの個体に再分割され得る。再分割は、最初の処置の前または後で観察される特徴に基づいて行われる。これらの特徴は臨床分野において公知であり、そして異なるガンそれぞれについて適切に定義される。高いリスクのサブグループに典型的な特徴は、腫瘍が隣接組織を侵襲していることか、またはリンパ節の関与を示していることである。

被験体の別の適切なグループは、ガンに対する遺伝的素因を有するがガンの臨床的徴候をまだ示さないグループである。例えば、乳ガンに関連した遺伝的変異について陽性とされたがまだ出産可能な年齢である女性は、予防的手術を行うに適するまでは、ガンの発症を防ぐために予防的に C処置を受けることを望むかもしれない。

本発明に具現化される薬学的組成物は、抗ガン応答を惹起するために、アジュバントグループのまたはこれらのサブグループのいずれかの患者に投与される。理想的には、組成物はガンの再発を遅延するか、またはより良好には、再発の危険性を減少する (すなわち、治癒速度を改善する)。このようなパラメーターは、他の患者集団および他の治療方法との比較において決定され得る。

10

20

30

40

50

もちろん、これらの2つの患者グループ間のクロスオーバーが起こり、そして本発明の薬学的組成物は、適切な任意の時期に投与され得る。例えば、C治療は、高い腫瘍荷重を有する患者の従来の治療の前または間に行われ得、そして腫瘍が臨床的に検出不可能になった後まで継続され得る。C治療は、最初はアジュバントグループに分類されたが、再発の徴候を示している患者において継続され得る。担当医は、本発明の組成物が使用される方法または時期を決定する裁量を有する。

本発明の種々の化合物および組成物は、他の臨床的適応を有し、以下のセクションはこの適応の概観のみを提供する。

1つの適応は、エキソピボでの細胞の処置である。これは、または新生物形成疾患を有する個体の実験目的または処置のために望ましくあり得る。1つの例において、Cは、細胞（例えば、ドナーから得られた末梢血細胞、または適切な細胞株）の培養物に投与される。約0.5~2 μg/mLのH11が、この目的のための有効用量である。第2の例において、ドナー細胞は、本発明の発現ベクターを用いて遺伝的に改変され、レシピエントへの細胞の投与後、Cの進行中の分泌を提供する。

本発明はさらに、ガン細胞のインピボでの検出のための方法を包含する。診断的に有効な量の検出可能に標識化されたCは、腫瘍画像化を必要とする被験体に与えられる。用語「診断的に有効」とは、所定量の検出可能に標識化されたCが新生物形成の検出を可能にするために十分な量で投与されることを意味する。

投与される検出可能に標識化されたCの濃度は、C抗原を有する細胞への結合が、バックグランドに比較して検出可能であるように十分であるべきである。さらに、検出可能に標識化されたCは、最良の標的対バックグランドシグナル比を与えるために、循環系から迅速に除去されることが望ましい。

原則として、インピボ診断のための検出可能標識化Cの投与量はいくらか患者特異的であり、そして年齢、性別、および疾患の程度のような因子に依存する。このCの投与量は、約0.01mg/m²~約500mg/m²、好ましくは0.1mg/m²~約200mg/m²、最も好ましくは約0.1mg/m²~約10mg/m²で変化し得る。このような投与量は、例えば、投与される注入の数、腫瘍負荷、および当業者に公知の他の要素に依存して変化し得る。例えば、腫瘍はインピボでシアニン結合Mabを用いて標識されている。Ballouら(1995) Cancer Immunol. Immunother. 41:257-263。

インピボ診断画像化のために、所定の放射性同位体を選択することにおいて、利用可能な検出機の型が主要な要素である。選択された放射性同位体は、所定の型の機器で検出可能な型の崩壊を有さなければならない。インピボ診断のための放射性同位体を選択することにおいてなお別の重要な要素は、標的による最大取り込みの時点で放射性同位体の半減期がなお検出可能であるように十分に長く、しかし個体に関して有害な放射が最小限になるように十分に短いことである。理想的には、インピボ画像化に使用される放射性同位体は粒子放出を欠き、しかし140~250keVの範囲で多数の光子を産生し、従来のガンマカメラによって容易に検出される。画像化のためには、投与される範囲の¹¹¹In-H11-scFv（例えば、5mCiの¹¹¹In-インジウムで標識された2mgのscFv）の用量は、1人の患者当たり約0.01mg~20mg、より好ましくは約0.1~10mg、そしてなおより好ましくは約1~5mgである。

インピボ診断のために、放射性同位体は、中間官能基を用いることによって、直接的または間接的かのいずれかでCに結合され得る。金属イオン放射性同位体を免疫グロブリンに結合するためにしばしば使用される中間官能基は、二機能性キレート剤（例えば、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）、およびエチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）および類似の分子）である。Cに結合され得る金属イオンの代表的な例は、¹¹¹In、⁹⁷Ru、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁷²As、⁸⁹Zr、⁹⁰Y、および²⁰¹Tlである。

Cはまた、例えば磁気共鳴画像法（MRI）または電子スピン共鳴（ESR）などでのインピボ診断の目的のために、常磁性同位体で標識され得る。一般に、診断画像を可視化するための任意の従来の方法が利用され得る。通常、ガンマおよびポジトロン放射放射性同位体がカメラ画像化のために、そして常磁性同位体がMRIのために使用される。このような技術に特に有用な元素は、¹⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、¹⁶²Dy、⁵²Cr、および⁵⁶Feを含む。Cはまた、

10

20

30

40

50

インビボ診断の目的のために蛍光染料で標識され得る。

Cはまた、インビトロアッセイを用いて新生物を検出するために使用され得る。試料は患者から収集され、そしてC抗原の存在を検出するためにCを用いる任意の適切なイムノアッセイに供される。これは、C抗原を保有する腫瘍細胞が患者の血流中を循環しているリンパ腫および白血病を検出することにおいて、特に有用である。

Cはまた、個体における悪性度の緩解の過程をモニターするために使用され得る。従って、C抗原を発現する細胞の数の増大もしくは減少、または種々の体液に存在するC抗原の濃度における変化を測定することによって、悪性度を緩解することが意図された特定の治療レジメが効果的であるかどうかを決定し得る。

本発明は、Cを含むキットを含む。Cを用いる診断手順は、診断研究室、実験研究室、実施者、または個人によって実施され得る。臨床試料は、必要に応じて試験されるべき標的の富化のために事前に処理される。次いで、使用者は、診断成分における変化したレベルまたは改変を検出するために、キットに含まれる試薬を適用する。

各キットは、試料中のC抗原を検出するために使用されるCを含む。必要に応じて、試料中の標的と形成された任意の複合体の検出を可能にするために、試薬は標識と結合され得る。別の選択において、標的を見出した後の第1の試薬に結合し得、それによって検出可能標識を供給する2次試薬が提供される。例えば、インタクトなCの使用のための標識化抗マウスIgGが、第2の試薬として提供され得る。1次試薬がビオチンに結合されている場合に、標識化アビジンが2次試薬として提供され得る。

キットは、種々の生物学的試料（液体試料、細胞懸濁液、および組織試料の両方を含む）を試験するために使用され得る。キット形態で供給され得るCを用いる適切なアッセイは、本明細書中に記載されるアッセイを含む。各試薬は固形形態、または在庫貯蔵のため、および後に試験が実施されるときに反応培地の交換もしくは反応培地への添加のために適切な液体緩衝液中に溶解/懸濁されて供給される。適切な包装が提供される。キットは、必要に応じて、手順において有用であるさらなる成分を提供し得る。これらの任意の成分は、緩衝液、捕捉試薬、発色試薬、標識、反応表面、検出のための手段、コントロール試料、指導書、および説明情報を含むが、これらに制限されない。

先述の記載は、とりわけ、H11ならびにH11コードポリヌクレオチド、H11ポリペプチドフラグメント、および他の誘導体を調製するための詳細な方法を提供する。当該分野の実施者は、本明細書中に提供されるH11の配列データを参照することによって、本発明の実施態様を実施し得る。以下の実施例は本願発明を例示するために提供され、制限するためではない。

【実施例】

実施例 1

Mab H11を得る方法

MabNBGM1/H11（「H11」）は、以下のヒト腫瘍組織および対応する腫瘍細胞株に対して反応性のヒトモノクローナルIgM抗体である：神経膠腫、悪性黒色腫、結腸腺ガンおよび乳房腺ガン。MabNBGM1/H11のインビトロ特徴付けを実施例2に示す。

H11の融合を、低い等級の神経膠腫を有する64歳男性から得た 8×10^6 末梢血リンパ球をTM-H2-SP2ヒト骨髓腫細胞株と融合することによって達成した。TM-H2-SP2細胞株は、6-チオグアニン（ $6 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）への耐性について0.8%メチルセルロース中で選択された未知のヒト骨髓腫様株のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（EC2.4.2.8）欠損誘導体であるIgG（）親細胞株TM-H2の、免疫グロブリン非分泌亜株である。そしてこれはヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地中では増殖し得ない。TM-H2-SP2の核型は、 $46 \pm 2, XX$ である。

生じた生存ハイブリドーマ細胞を40個のマイクロウェルに 2×10^5 細胞/mLおよび0.2mL/ウェルの密度で分割した。融合H11からの増殖の頻度は、40個の潜在的なハイブリドーマ含有ウェルの内12個（30%）であった。維持増殖から生じた増殖を、3カ月より長い期間の培養拡大を伴う長期の増殖として定義する；融合後3カ月よりも後にハイブリドーマ増殖の失敗が生じる例は、観察されなかった。

10

20

30

40

50

ハイブリドーマクローンのスクリーニングを、マイクロタイタープレートにおいてポリクローナル抗ヒトIgMまたはIgGをコート抗原として用いて、抗原捕捉酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって行った。ハイブリドーマ培養上清は、測定した光学密度(O.D.)値がコントロール培養上清の平均バックグラウンドレベルを2標準偏差より大きく超える場合に陽性であった。

ハイブリドーマクローンNBGM1/H11の選択を細胞固定ELISAによって行った。6つのマイクロタイターウェル(それらは、IgMまたはIgG分泌について高い試験結果であった)からの培養上清を、事前に結合および固定したヒト腫瘍細胞株に対してスクリーニングした:神経膠芽細胞腫(SKMG-1およびD-54MG);黒色腫(A-375);および結腸腺ガン(SK-CO-1)。測定したO.D.値がコントロール培養上清の平均バックグラウンドレベルを2標準偏差より大きく超える場合に、ハイブリドーマ上清を陽性であると見なした。ハイブリドーマNBGM1/H11により産生されたMabは、これらの腫瘍細胞株に対して反応性であり続ける。「H11」抗体は、IgM()である。

10

ハイブリドーマNBGM1/H11シードバンクの特徴付けを、Microbiological Associates(Rockville, MD)によって行った。この細胞の、(1)細菌および真菌汚染、(2)マイコプラズマ汚染、(3)HIV-1およびHIV-2抗原ならびに(4)HTLV-1およびHTLV-2抗原についての試験結果は陰性であった。

MabNBGM1/H11の特徴付けに使用した方法は、以下を含む:抗原捕捉ELISA、抗原ELISA、細胞固定ELISA、フローサイトメトリー、ヒト腫瘍細胞株の免疫ペルオキシダーゼ染色ならびにヒト腫瘍および正常組織の免疫組織化学(以下の実施例を参照のこと)。

20

フローサイトメトリー、免疫ペルオキシダーゼ染色、細胞固定ELISA、および抗原ELISA(すなわち、腫瘍細胞凍結融解抽出物)によって決定したこのヒトMabのヒト腫瘍細胞株への結合特徴は、以下に示す。

実施例 2

フローサイトメトリー分析によるヒト神経膠芽細胞腫(SKMG-1)細胞株および黒色腫(A375)細胞株へのMab H11の結合

腫瘍細胞へのMabH11の結合を決定するために、Tフラスコ中で増殖する腫瘍細胞を、PBS-EDTAとのインキュベーションにより剥離させた。細胞を低速度遠心分離により収集し、氷冷PBS-1%FBSで洗浄し、遠心分離し、そして上清を吸引した。以下のうちの1つでスパイクした培養培地に細胞ペレットを再懸濁し、そして氷上で30分間インキュベートした:コントロールヒト黒色腫IgM;ハイブリドーマNBGM1/H11培養上清;または精製MabH11を含むPBS。インキュベーションの後、細胞を遠心分離によって収集し、PBS-FBS中での再懸濁によって洗浄し、そして遠心分離した。次いで、細胞ペレットをFITC結合ヤギ抗ヒトIgMと30分間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞をPBS-FBSで洗浄した。最後に、細胞をヨウ化プロピジウム(PI)を添加したPBS-FBSに再懸濁し、そして細胞を洗浄した。PI陽性細胞およびFITC陽性細胞を、フローサイトメトリーによって分析した。

30

フローサイトメトリー分析の結果を、図2、3、および4に示す。これらの結果は、粗精製および精製形態のMab H11が、生ヒト腫瘍細胞株(神経膠芽細胞腫、黒色腫、乳房腺ガンおよび結腸腺ガンを含む)上に発現される細胞表面結合抗原に結合することを示す。

実施例 3

40

ELISA分析による、ヒト腫瘍細胞株の凍結融解抽出物へのMabH11の結合

ヒト腫瘍抗原に特異的に結合するH11の能力を決定するために、神経膠芽細胞腫(SKMG-1)細胞、乳房腺ガン(BT-20、MB-468、およびMB-453)細胞、結腸腺ガン(SK-CO-1およびHT-29)細胞の反復した凍結および融解によって調製したヒト腫瘍細胞抽出物でELISAプレートをコートした。

コートELISAプレートを、2~8 で16~18時間インキュベートした。プレートを、PBS-3%BSAで1時間室温でブロックした。次いで、プレートをPBS中のMabH11またはPBS中のコントロールIgMまたは培養培地のいずれかと、室温で2時間インキュベートした。プレートを洗浄し、そしてビオチン化抗ヒトIgMとインキュベートし、続いてビオチン化抗ヒトIgMとインキュベートし、次いでストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼと1

50

時間インキュベートした。洗浄後、p-ニトロフェニルリン酸基質を各プレートに添加し、そして、インキュベーションの後に、プレートをELISAプレートリーダーにおいて405nmで読んだ。

腫瘍細胞抽出物へのMab H11の結合を、図5および6に示す。これらの結果は、Mab H11が、神経膠芽細胞腫細胞、乳房腺ガン細胞、および結腸腺ガン細胞から調製された腫瘍細胞抽出物に、用量依存様式において結合することを示す。

実施例4

免疫ペルオキシダーゼ染色によって決定したヒト腫瘍細胞へのMab H11の結合

H11の免疫反応性を決定するために、以下の実験を行った。腫瘍細胞を、24ウェルプレートにおいて、カバーガラス上で48~96時間増殖させた。細胞をPBSで洗浄し、ホルムアルデヒドで固定し、そしてPBS中の5%正常ヤギ血清と30分間インキュベートした。洗浄後、細胞をハイブリドーマNBGM1/H11培養上清、またはPBS中の精製MabH11(10µg/mL)、またはコントロールヒト骨髄腫IgM(10µg/mL)でスパイクした培養培地のいずれかと、2時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、そしてHRPに結合した抗ヒトIgMとインキュベートした。最後に、細胞を洗浄し、MabH11結合を可視化するためにDAB基質とインキュベートし、ヘマトキシリンで対比染色し、そしてGVAにおいてマウントした。

Mab H11の免疫反応性の結果を、表3に示す。ここで、反応性を陰性(--)、弱い陽性(+)、陽性(++)、強い陽性(+++)として示す。これらの結果は、免疫ペルオキシダーゼ染色によって決定されたように、MabH11によって認識されるエピトープが多数の異なる型のヒト腫瘍細胞および細胞株によって発現されることを示す。

【表3】

表3

細胞株/腫瘍の型	反応性	
	コントロールIgM	Mab H11
<u>ヒト神経膠芽細胞腫</u>		
SKMG 1		+++
U-118 MG	--	++
U-87 MG	--	++
<u>ヒト悪性黒色腫</u>		
A-375	--	+++
SK-MEL-5	--	++
<u>ヒト結腸腺ガン</u>		
SK-CO-1	--	++
<u>ヒト乳房腺ガン</u>		
MG-468	--	++
MB-453	--	+
BT-20	--	++
BT-474	--	++
<u>ヒト腎臓腺ガン</u>		
SW-839	--	++
<u>ヒト骨原性肉腫</u>		
SAOS-2	--	++
<u>ヒト卵巣腺ガン</u>		
SK-OV-3	--	++

実施例5

細胞固定ELISAによって決定したヒト腫瘍細胞株へのMabH11の結合

ヒト腫瘍細胞および細胞株へのH11の結合もまた、細胞固定ELISAによって決定した。EDTA-PBSとのインキュベートによって、増殖腫瘍細胞をTフラスコ表面から剥離させた。細胞を遠心分離によって収集し、PBSで洗浄し、培養培地に再懸濁し、計数し、そして5,000~

10

20

30

40

50

10,000細胞を含む50 μ lの細胞懸濁液を、96ウェルELISAプレートの各ウェルにおいた。細胞をプレートに接着させた後に、培養上清を除去し、そしてプレートをPBS-BSAでブロックした。次いで、細胞を異なる濃度（1～20 μ l/mL）のMabH11またはコントロールヒト骨髄腫IgMのいずれかと2時間インキュベートした。インキュベーションの後、プレートを洗浄し、ビオチン結合ヤギ抗ヒトIgMとインキュベートし、再び洗浄し、そしてストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼとインキュベートした。最後に、プレートを洗浄し、p-ニトロフェニルリン酸基質とインキュベートし、そしてプレートをELISAプレートリーダーにおいて405nmで読んだ。

Mab H11のヒト腫瘍細胞株への反応性の細胞固定ELISAによる結果を、表4および図7に示す。表4において、反応性を試験するためにコントロールIgM10 μ g/mLおよびH11 10 μ g/mLを使用した。そして値を405nmでの吸光度 \pm 標準偏差として示す。これらの結果は、1) Mab H11は1 μ g/mLの低濃度でも神経膠芽細胞腫細胞（SKMG-1）と強度に反応し、一方20 μ g/mLでのコントロールIgMはSKMG-1細胞と反応しない：および2) MabH11は多数の腫瘍細胞株（乳房腺ガン、結腸腺ガン、悪性骨髄腫、神経芽細胞腫、神経膠芽細胞腫、肺腺ガン、小細胞肺ガン、および前立腺腺ガン）上に存在する腫瘍抗原を認識することを示す。Mab反応性の程度は、ガンおよび腫瘍細胞株の両方で異なる。ガンの型および腫瘍細胞についてのMabH11の反応性は、コントロールIgMの反応性よりも3～10倍高かった。

【表4】

表 4

細胞株/腫瘍型	反応性 (405nm での O.D.)	
	コントロール IgM	Mab H11
ヒト神経膠芽細胞腫		
SKMG-1	0.21 ± 0.01	0.95 ± 0.06
D-54-MG	0.13 ± 0.02	0.43 ± 0.07
U-87MG	0.13 ± 0.02	0.60 ± 0.01
神経芽細胞腫		
SK-N-SH	0.14 ± 0.02	0.96 ± 0.06
SK-N-MC	0.17 ± 0.03	1.00 ± 0.05
悪性黒色腫		
SK-MEL-5	0.18 ± 0.03	1.42 ± 0.04
SK-MEL-28	0.19 ± 0.03	1.79 ± 0.05
乳房腺ガン		
MB-453	0.68 ± 0.18	2.85 ± 0.14
MB-468	0.60 ± 0.03	2.39 ± 0.10
SK-BR-3	0.60 ± 0.03	2.14 ± 0.13
T47D	0.58 ± 0.01	2.13 ± 0.04
BT-20	0.57 ± 0.02	2.07 ± 0.13
BT-474	0.61 ± 0.03	2.20 ± 0.17
肺腺ガン		
SW-900	0.20 ± 0.02	0.68 ± 0.10
SK-LU-1	0.19 ± 0.02	0.57 ± 0.07
A-427	0.22 ± 0.01	0.88 ± 0.07
小細胞肺ガン		
NCI-H69	0.25 ± 0.04	1.42 ± 0.20
NCI-H82	0.20 ± 0.09	1.16 ± 0.13
結腸腺ガン		
SK-Co-1	0.27 ± 0.03	0.98 ± 0.11
HT-29	0.37 ± 0.02	1.78 ± 0.20
前立腺腺ガン		
PC-3	0.17 ± 0.01	0.60 ± 0.01
DU-145	0.15 ± 0.01	0.52 ± 0.01
腎臓腺ガン		
SW-839	0.2 ± 0.01	1.43 ± 0.01
骨原性肉腫		
SAOS-2	0.24 ± 0.02	1.22 ± 0.07
U-2 OS	0.13 ± 0.04	1.93 ± 0.05
膀胱細胞ガン		
T-24	0.13 ± 0.01	1.25 ± 0.03
卵巣腺ガン		
SKOOV-3	0.12 ± 0.01	1.14 ± 0.02
咽頭ガン		
HEP-2	0.25 ± 0.01	1.25 ± 0.01
正常ヒト線維芽細胞		
GM-8333	0.13 ± 0.01	0.39 ± 0.01

実施例 6

H11の免疫解剖学的分布および免疫病理学的分析

微小解剖学的詳細についてのH11特異性ならびに組織および腫瘍における不均一性を決定するために、免疫組織化学を使用した。この技術の制限は、研究している分子の低レベルの発現による擬陰性結果の可能性、ならびに類似のエピトープまたは他の抗原によって共有されるエピトープへの抗体結合による擬陽性結果（交差反応性）の可能性を含む。これらの制限にとりくむために、非特異的結合を示さなかった最も高い抗体の濃度で本研究を行った。これは、異なる組織における全てのレベルの交差反応性の検出を可能にした。また、固定分析は、抗原染色強度と形態学的保存との最良の組合せを確立した。この実施例は、IMPATH Inc., New Yorkから得られた、H11の細胞特異性および抗原発現を研究するために維持された、正常組織および腫瘍組織のクリオスタット切断凍結切片の選択されたパネル上の結果を提示する。この研究では、間接的な免疫ペルオキシダーゼ技術を使用した。組織学的に正常なヒト組織を、外科試料および部検試料から得た。これらの新鮮な組織を、クリオモールド中でOCT (Miles Laboratories, Inc., Naperville, IL) に包埋し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で瞬間凍結した。IMPATHの凍結組織バンクからの組織を5ミ

10

20

30

40

50

クロンに切断し、ポリ-L-リジンコートスライド上におき、風乾させ、そして-70 で保存した。

濡れた氷上におかれ、そして2～8 で保存した非ビオチン化H11を、200 µg/mLの濃度で、3.0mLの総容量で供給した。ヒト骨髄腫IgM (Pierceカタログ番号31146) (これもNovop harmから供給された) を、陰性コントロールとして使用した。両方の抗体を、抗体H11の力価測定分析によって予測されたのと同じ作用濃度まで、リン酸緩衝化生理食塩水に希釈した。ペルオキシダーゼ標識2次抗体は、PBSに500:1に希釈したヤギ抗ヒトIgM (AmericanQualex, San Clemente, CA, ロット番号A112PN) であった。

免疫ペルオキシダーゼ技術：間接的免疫ペルオキシダーゼ法を用いて、免疫組織化学的研究を行った。クリオスタット切断切片を-70 冷凍庫から取り出し、風乾し、そして固定
10
プロトコル(固定の詳細は、以下に提供する)に従って固定した。組織切片をPBSに希釈した5%正常ヤギ血清で10分間ブロックし、次いで1次抗体と4 で一晩インキュベートした。スライドをPBSで洗浄し、続いて0.5% Tween/PBS溶液、次いでPBSで再度洗浄した。内因性ペルオキシダーゼ活性を、30分間の3%過酸化水素/メタノールインキュベーションでブロックし、続いてPBSで3回洗浄した。次いで、切片を、ヤギ抗ヒトIgM(ペルオキシダーゼ標識)2次抗体で15分間室温にてインキュベートし、そして上記のようにPBSで洗浄した。

ペルオキシダーゼ反応を、組織切片を3,3-ジアミノベンジジン-テトラヒドロクロライド (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) と2～5分間インキュベートすることによって可視化した。組織切片をよく洗浄し、改変Harrisヘマトキシリン (FisherScientific
20
, Fairlawn, NJ) で対比染色し、段階的アルコールで脱水し、キシレンで清澄化し、そしてカバーガラスをかけた。陰性コントロール抗体で高レベルのバックグラウンド染色を示す組織には、さらに徹底的な洗浄を繰り返した。IMPATHによって供給されたヒト乳ガン (F95-036) は、H11の陽性コントロールであった。陰性コントロールでは、1次試験抗体を精製ヒト骨髄腫IgMに交換した。

固定分析の目的は、抗原染色強度と形態学的保存との最適な組合せを提供する条件を確立することであった。陽性コントロール組織を、固定なしを含む5つの固定プロトコルで試験した。試験した固定プロトコルは、10%中性緩衝化ホルマリン(23～25)、アセトン
(2～8)メチル/アセトン(1:1V/V、2～8)、および95%エタノール(23～2
5)であった。この研究において、H11について10%中性緩衝化ホルマリン(NBF)が最
30
適な結果を生じた。

固定剤として10%NBFを用いて、連続抗体希釈物(20.0 µg/mL～0.1 µg/mL)を、陽性コントロールのヒト乳ガンにおいて試験した。抗体H11の10.0 µg/mLの濃度が最適な結果 - 陰性コントロールの有意なバックグラウンド染色を伴わない最高染色強度を生じた。

得られた結果を表5および表6に示す。表5は正常組織におけるH11反応性を示し、表6はヒト腫瘍におけるH11反応性を示す。

【表5】

表5

<u>組織</u>	<u>陽性/試験した総数</u>	<u>反応性の 範囲(0~3+)</u>	
副腎	0/3	0	
膀胱	0/3	0	
骨髄	1/3	1+	
脳	0/3	0	
乳房	0/3	0	
頸部	0/3	0	10
食道	0/3	0	
眼	0/3	0	
心臓	0/3	0	
腎臓	0/3	0	
大腸	0/3	0	
肝臓	0/3	0	
肺	0/3	0	
リンパ節	0/3	0	
筋肉	0/3	0	
卵巣	0/3	0	
膵臓	0/2	0	20
月下腺	0/3	0	
下垂体	0/3	0	
前立腺	0/1	0	
皮膚	0/3	0	
小腸	0/3	0	
脊髄	0/3	0	
脾臓	0/3	0	
胃	0/3	0	
精巣	0/3	0	
胸腺	0/3	0	
甲状腺	0/3	0	30
扁桃腺	1/3	1+	
子宮	0/3	0	
WBC	0/3	0	
	0/3	0	

【表6】

表6

<u>腫瘍</u>	<u>陽性/ 試験した総数</u>	<u>染色腫瘍 細胞の%</u>	<u>反応性の 範囲(0~3+)</u>	
乳ガン	2/3	30-90	1-3+	
結腸ガン	3/3	40-70	1-2+	40
神経膠腫	4/6	30-90	1-2+	
胃ガン	3/3	30-50	1-2+	
肺腺ガン	3/4	10-70	1-2+	
肺扁平上皮ガン	3/3	10-95	1-3+	
肺小細胞ガン	1/2	30	1+	
リンパ腫	8/8	10-95	1-3+	
黒色腫	3/3	20-95	1-2+	
卵巣ガン	3/3	20-30	1-3+	
前立腺ガン	3/3	20-95	1-2+	
肉腫	0/3	0	0	50

得られた結果は、70%を越える陽性コントロール試料において、弱い(1+)～強い(3+)反応性が観察されたことを示す。H11によって認識された抗原は、分布の限定されたパターンを有する。H11は、IMPATHシステムにおいて試験した正常ヒト組織において主として非反応性であった。全ての単層上皮細胞、ならびに異なる器官の重層上皮および扁平上皮が非反応性であることが見出された。反応性はまた、神経外胚葉細胞(脳、脊髄、および末端神経における細胞を含む)においても見出されなかった。間葉要素(例えば、骨格筋細胞および平滑筋細胞、線維芽細胞、ならびに内皮細胞)は陰性であった。リンパ起源の組織(骨髄、リンパ節、脾臓、および胸腺を含む)は、抗体H11に主として非反応性であった。弱い(1+)反応性が、1つの骨髄標本のまれな細胞において、および試験した3つの扁桃腺標本のうちの1つの胚中心において観察された。

10

陽性な免疫反応性が、試験した腫瘍標本(乳房、結腸、神経膠、胃、肺(腺、扁平上皮、および小細胞)、リンパ腫、黒色腫、卵巣、および前立腺を含む)のほとんど全てにおいて観察された。反応性は、これらの標本に存在する腫瘍細胞の10%～95%以上で観察された;染色強度は、弱い(1+)から強い(3+)の範囲であった。しかし、抗体H11は、試験した3つの肉腫全ての標本において非反応性であった。腫瘍細胞の正常対応物の全てではないがいくつかは、標本中に存在する場合、H11に反応性であった。乳ガン、胃ガンおよび前立腺ガンに存在するいくつかの正常細胞が、抗体H11に反応性であった。抗体H11に反応性であった巨大顆粒細胞は、好酸球-マスト細胞系の炎症細胞であると考えられる。要約すると、抗体H11は、腫瘍に存在するいくつかの正常組織を除いて、正常ヒト組織には主として非反応性である。H11抗体は、試験したほとんど全ての腫瘍において発現される抗原を検出する。

20

実施例 7

H11クローニング、発現、および免疫学的反応性

H11-scFv抗体フラグメントがガン細胞に特異的に結合する能力を決定するために、以下の実験を行った。

単鎖抗体構築物を、以下の手順によって作製した。H11の V領域およびμ V領域の5'末端および3'末端に特異的なプライマーをApplied Biosystems DNA合成機で合成した。全てのプライマーは、クローニングのための制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいた。プライマー5および6はまた、(SGGGG)₃リンカーをコードするさらなるヌクレオチドを含んでいた。使用したプライマーを表7に列記し、ここで、導入した制限エンドヌクレアーゼ部位に下線を付す。

30

【表7】

表7

プライマー	配列 (5'→3')	導入された部位
1.	TATGAAGACACCAGGCCGATATTGTGTTGACGCAG (配列番号 7)	BbsI
2.	TATCCGGATGCAGCCACAGTTCGTTT (配列番号 8)	BspEI
3.	TATTCGGACAGGTGCAGCTGGTGGAG (配列番号 9)	BspEI
4.	TATGGATCCTGAGGAGACGGTGACCGT (配列番号 10)	BamHI
5.	TATATAICCGGAGGTGGTGGATCAGGTGGAGGTGGCTC CCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT(配列番号 11)	BspEI
6.	ACCTCCGGAACCGCCACCGCCAGAGACAGATGGTGCA GCCACATTC (配列番号 12)	BspEI

40

PCR反応を、ダイマーのためにはプライマー1および2を、μダイマーのためにはプライマー3および4を、モノマーのためにはプライマー1および6を、そしてμモノマー

50

のためにはプライマー 4 および 5 を用いて実施した。次いで、PCRフラグメントを精製し、そしてそれらの対応する制限エンドヌクレアーゼで消化した。それぞれ、コードするヌクレオチドを配列番号13および16に示し、そして相補的ヌクレオチドを配列番号15および18に示す。

リボゾーム結合部位、OmpAシグナルペプチド配列、c-myc (9E10) 検出タグおよびヒスチジンテイルを含有する発現ベクターpSJF1 (図 8 を参照のこと) を、Bbs1 および BamH1 で切断することにより調製した。モノマーおよびダイマーの構築物を、それぞれのおよび μ フラグメントをpSJF1中に連結し、そしてこれらをコンピテントなTG1E.coliに形質転換することにより組み立てた。得られたコロニーを、コロニーPCRおよび制限エンドヌクレアーゼ消化によりスクリーニングして適正な大きさのインサートを確認し、そしてジデオキシ蛍光配列決定により配列を確認した。

10

H11のモノマーまたはダイマーの発現プラスミドのいずれかを含有する形質転換されたTG1を、26にて24時間振盪し、続いて0.1 μ Mの最終濃度にIPTGを添加した。細胞をさらに16時間インキュベートし、次いで遠心分離により収集した。H11抗体を含有する周辺質タンパク質を、スクロース緩衝液 (25%スクロース、1mMEDTA、10mM Tris pH8.0)、それに続く氷冷ショック緩衝液 (10mM Tris 8.0、0.5mM $MgCl_2$) での処理により放出させた。発現を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロットティングにより確認した。抗体を、ニッケルチャージカラム (PharmaciaHiTrapキレーティングカラム) を用いて精製し、そして結合した抗体を漸増勾配のイミダゾールを用いて溶出した。精製抗体を、PBS/0.02%アジ化ナトリウムに対して透析し、そして0.5mg/mLまで濃縮した。

20

Mab H11とH11-scFvとの間の抗原性の類似性もまた、細胞固定ELISAにより決定した。A375細胞を用いてコートしたELISAプレートを、MabH11、コントロールIgM、H11-scFv、またはコントロールBGA-scFvとともにインキュベートし、続いてウサギ抗ヒトIgM抗体またはウサギ抗scFv抗体とともに適切にインキュベートした。検出を、ヤギ抗ウサギIgG-西洋ワサビペルオキシダーゼ、それに続く基質により行なった。図 9 に示す結果は、H11IgMおよびH11-scFvの両方の高親和性、ならびにコントロールIgMおよびBGA-SL-6の両方の低親和性を実証する。

ビオチン化コントロールscFvと比較してのビオチン化H11-scFvの特異性を決定するために、以下の実験を実施した。ヒト腫瘍細胞をELISAプレートに固定し、そしてビオチン化H11-scFvまたはビオチン化BGAscFv (コントロール) のいずれかとともに上記のようにインキュベートした。

30

ビオチン化H11-scFvはまた、腫瘍細胞株に対してコントロールよりもずっと大きな親和性 (8倍~50倍) を細胞固定ELISAにおいて実証した。2.5 μ g/mLのH11-scFvまたはBGAscFvの濃度に対応するデータを、表 8 および図10に示す。

図11は、リンパ腫細胞Daudi、Ramos、CA-46、およびCCRF-CEM細胞への結合についてのビオチン化H11-scFvの反応性の力価測定に関連する、表 8 の部分を例示する。試験した全ての濃度 (1.25~10 μ g/mL) で、H11-scFvはリンパ腫細胞に対する高親和性を実証したが、BGAscFvは実証しなかった。

【表 8】

表 8

腫瘍細胞株	反応性 (405nm での O.D. \pm SD)	
	ビオチン化 BGA scFv	ビオチン-H11-scFv
ヒト神経膠芽細胞腫		
SKMG-1	0.01 \pm 0.01	0.56 \pm 0.04
U-118MG	0.01 \pm 0.02	0.47 \pm 0.03
D-54MG	0.01 \pm 0.00	0.50 \pm 0.02
神経芽細胞腫		
SK-N-MC	0.01 \pm 0.00	0.50 \pm 0.02
悪性黒色腫		
SK-MEL-5	0.02 \pm 0.01	0.61 \pm 0.04
A-375	0.12 \pm 0.03	0.97 \pm 0.03
SK-MEL-28	0.02 \pm 0.00	0.71 \pm 0.04
乳房腺ガン		
T47D	0.02 \pm 0.00	0.64 \pm 0.03
MB-468	0.01 \pm 0.00	0.65 \pm 0.01
SK-BR-3	0.01 \pm 0.00	0.58 \pm 0.02
BT-20	0.01 \pm 0.00	0.54 \pm 0.06
BT-474	0.01 \pm 0.00	0.60 \pm 0.01
肺腺ガン		
SW-9000	0.01 \pm 0.00	0.41 \pm 0.02
SK-LU-1	0.01 \pm 0.00	0.45 \pm 0.03
A-427	0.01 \pm 0.00	0.40 \pm 0.05
結腸腺ガン		
SK-Co-1	0.01 \pm 0.00	0.56 \pm 0.01
HT-29	0.01 \pm 0.00	0.53 \pm 0.06
LS17T	0.01 \pm 0.00	0.57 \pm 0.02
骨原性肉腫		
SAOS-2	0.02 \pm 0.00	0.88 \pm 0.06
U-2 OS	0.02 \pm 0.00	0.93 \pm 0.01
膀胱細胞ガン		
T-24	0.02 \pm 0.01	0.97 \pm 0.05
卵巣腺ガン		
SK-OV-3	0.01 \pm 0.00	0.77 \pm 0.02
喉頭ガン		
HEP-2	0.02 \pm 0.00	0.08 \pm 0.04
前立腺ガン		
DU-145	0.01 \pm 0.00	0.42 \pm 0.02
PC-3	0.01 \pm 0.00	0.36 \pm 0.01

10

20

30

40

腫瘍細胞株	反応性 (405nm での O.D. \pm SD)	
	ビオチン化 BGA scFv	ビオチン-H11-scFv
小細胞肺ガン		
NCI-H82	0.01 \pm 0.00	0.44 \pm 0.02
NCI-69	0.01 \pm 0.00	0.44 \pm 0.01
リンパ腫細胞株		
慢性骨髄性白血病		
K-562	0.02 \pm 0.00	0.65 \pm 0.00
急性リンパ芽球性白血病		
CEM	0.04 \pm 0.00	1.4 \pm 0.03
パーキットリンパ腫		
CA-46	0.02 \pm 0.00	1.2 \pm 0.02
RAMOS	0.04 \pm 0.00	1.3 \pm 0.02
DAUDI	0.02 \pm 0.00	1.38 \pm 0.01

10

ビオチン化H11-scFvのガン性細胞に対する特異性を確認するために、以下の実験を実施した。悪性組織標本および正常組織標本を調製し、そして上記のようにビオチン化H11-scFv

20

とともにインキュベートした。

H11-scFvを用いて、腫瘍組織および正常組織の切片を染色した。結果を、正常組織について表8に、そして腫瘍組織について表9に示す。

図12は、腫瘍細胞株に対するH11-scFvおよびコントロールscFvの相対蛍光強度を示す。

表9のデータは、ビオチン化H11-scFvが、一般的に正常組織と反応しないことを実証する。試験した正常組織のほぼ全ては、正常な脾臓および末梢神経組織により生じた弱い陽性シグナルのみを有して、測定可能な反応性が存在しないことを実証した。表9では、-veは測定可能な活性がないことを示し、そして+/-は弱い陽性活性を示す。

【表9】

表9

正常組織	ビオチン化H11-scFvの反応性 (50 μ g/mL)	
皮質	-ve	
乳房	-ve	
結腸	-ve	
心臓	-ve	
肝臓	-ve	10
リンパ節	-ve	
前立腺	-ve	
甲状腺	-ve	
副腎	-ve	
小脳	-ve	
肺	-ve	
脾臓	+/-	
末梢神経	+/-	
皮膚	-ve	20
脾臓	-ve	
平滑筋	-ve	
胃	-ve	
胸腺	-ve	

表10

組織型	陽性試料数/試験した総試料	腫瘍細胞染色の%	反応性の範囲 (0~+3)	
乳ガン	27/31	40/60	1~3+	30
結腸ガン	23/26	80/100	1~3+	
黒色腫	13/14	50/70	1~3+	
前立腺ガン	17/20	20/70	1~2+	
頸部扁平上皮ガン	22/24	nd	1~2+	
頸部腺ガン	9/9	nd	1~2+	
カポージ肉腫	7/8	nd	1~2+	
良性結腸	0/2	0	0	40

nd: 測定せず

表10に表される結果は、陽性染色が、試験したほとんどの乳ガン(27/31)および結腸ガン(23/26)および前立腺ガン(17/20)の試料に見出されたことを示す。陽性染色は、H11-scFvの25 μ g/mL濃度で見出された。染色は腫瘍細胞で優先的に検出されたが、種々の程度の反応性はまた、支質および隣接組織に見出された。H11-scFvをまた、正常組織に対するその特異性について試験した。得られた結果を表11に示す。表11は、正常ヒト組織切片についてのH11-scFvの免疫組織化学染色を要約する。

【表11】

表11

組織	H11-scFv (25 μ g/mL)	3B1 scFv (25 μ g/mL)	
副腎	±	—～±	
小脳	—	—	
皮質	—	—	
結腸	±	—	10
乳房	—～±	—	
腎臓	±	—～±	
大動脈	—～±	—	
心臓	±	—～±	
肝臓	±～+	±	
肺	—	—	
リンパ節	—	—	20
膵臓	—～±	—	
下垂体	±～+	—	
前立腺	— (局所的に±)	— (局所的に±)	
末梢神経	—～±	—	
皮膚	— (汗腺±)	— (汗腺±)	
脾臓	—～±	—	
小腸	—～±	—	30
胃	—～±	—	
St.筋 (St. muscle)	—～±	—～±	
胸腺	—～±	—	
甲状腺	—～±	—	
S94-7474-2	++	—	
(結腸ガンコントロール)			

実施例 8

フローサイトメトリーにより決定した場合の生存腫瘍細胞に対するH11-scFvの反応性生存腫瘍細胞に対するH11-scFvの反応性を試験するために、腫瘍細胞株由来の細胞を、実施例2で上記したように、フローサイトメトリーのために調製した。腫瘍細胞を、ビオチン化H11-scFvまたはコントロールのビオチン化scFvのいずれかとともに、上記のように、100 μ g/mLまたは200 μ g/mLのタンパク質濃度でインキュベートした。反応性を、平均蛍光および陽性細胞の%として決定した。ビオチン化H11-scFvを、上記のように、そして100 μ g/mLまたは200 μ g/mLのいずれかのタンパク質濃度で調製した。平均蛍光および陽性細胞の%を、表12に示す。ここで、#はコントロールscFvとしてのビオチン化3B1であり；*はコントロールscFvとしてのビオチン化BGASL-6であり；**はコントロールとしてのPBS 5% FCSであり；そして***はコントロールscFvとしてのBiotin-5B1である。

40

50

【表 1 2】

表12

細胞株	タンパク質 濃度 ($\mu\text{g}/$ mL)	平均蛍光		陽性細胞の%	
		ビオチン化 3B1 scFv #	ビオチン化 H11-scFv	ビオチン化 3B1 scFv #	ビオチン化 H11-scFv
SK-BR-3 (乳房腺ガ ン)	200	149	233	11	36
MB-468 (乳房腺ガ ン)	200	144	156	9	11
A-375 (黒色腫)	200	111	207	10	80
A-375 (黒色腫)	200	161*	235	28	76
LS-174T (結腸腺ガ ン)	200	182	233	24	37
HT-29 (結腸腺ガ ン)	200	141	179	12	18
SKMG-1 (神経膠腫)	100 100	148** 189**	206 224	9 14	31 27
H9 (T細胞リ ンパ腫)	100	185***	145	20	13
WI-38 (ヒト二倍 体肺ガン)	100	293***	255	26	15

^{125}I 標識したH11-scFvは、LS174T細胞に対して $3 \times 10^8 \text{L/mol}$ の結合親和性 (K_a) (図13に示す特異的結合) を実証した。 ^{111}In -H11-scFvは、A-375細胞に対して $3.6 \times 10^8 \text{L/mol}$ およびSKMG1細胞に対して $1.4 \times 10^9 \text{L/mol}$ の結合親和性 (K_a) を実証した。結果を、図14に示す。A-375細胞についておよそ24,000結合部位/細胞、およびSKMG1についておよそ5000結合部位/細胞が存在する。

これらの結果は、精製形態のMab H11が、乳房腺ガン細胞株 (SK-BR-3)、神経膠芽細胞腫細胞株 (SKMG-1)、および黒色腫細胞株 (A-375)、リンパ腫細胞株上に発現される細胞表面結合抗原 (単数または複数) に結合することを示す。

10

20

30

40

50

生存リンパ腫細胞へのビオチン化H11-scFvの反応性をさらに試験するために、腫瘍細胞株由来の細胞を調製し、そしてビオチン化H11-scFvとともに100 µg/mLまたは200 µg/mLのいずれかのタンパク質濃度でインキュベートし、そして実施例2で上記のようにフローサイトメトリーにより分析した。平均蛍光および陽性細胞の%を、フローサイトメトリーにより測定した。scFv結合のコントロールは、ビオチン化BGAscFvであった。結果を表13に示す。

【表13】

表13

細胞株	試料	濃度 (µg/mL)	平均蛍光	蛍光増加 の%	陽性細胞 の%
バーキット リンパ腫 CA-46	PBS		123		10
	ビオチン-	200	126		9
	BGA scFv	100	133		14
	ビオチン-	200	262	108	76
	H11-scFv	100	221	66	58
T細胞リン パ腫 H9	PBS		150		6
	ビオチン-	200	155		8
	BGA scFv	100	149		7
	ビオチン-	200	186	20	13
	H11-scFv	100	171	15	9
急性リンパ 芽球腫白血 病 CCRF-CEM	PBS		151		8
	ビオチン-	200	171		14
	BGA scFv	100	159		10
	ビオチン-	200	231	35	34
	H11-scFv	100	242	52	38
バーキット リンパ腫 RAMOS	PBS		151		10
	ビオチン-	200	174		15
	BGA scFv	100	169		13
	ビオチン-	200	423	143	95
	H11-scFv	100	316	87	67

実施例9

免疫ペルオキシダーゼ染色により決定した、ヒト腫瘍細胞へのビオチン化H11-scFvの結合H11-scFvの免疫反応性を決定するために、以下の実験を実施した。腫瘍細胞を、T型フラスコにおいて増殖させ、そして細胞遠心物(cytospin)を調製し、そしてビオチン化H11-scFvまたはPBSとともにインキュベートして結合を決定した。

H11-scFvの免疫反応性の結果を表14に示す。ここで、反応性を、陰性(--)、弱陽性(±)、陽性(+または++)として示す。これらの結果は、免疫ペルオキシダーゼ染色により決定した場合、MabH11により認識されるエピトープは多くの異なる型のヒト腫瘍細胞およ

10

20

30

40

50

び細胞株により発現されることを示す。

【表14】

表14

細胞株/腫瘍の型	反応性		
	PBS	H11-scFv (50 μg/mL)	
<u>ヒト神経膠芽細胞腫</u>			
SKMG1	--	+	
U-87MG	--	+	
<u>ヒト悪性黒色腫</u>			
A-375	--	+	
Sk-MEL-5	--	++	10
<u>ヒト結腸腺ガン</u>			
SK-CO-1		+	
HT-29	--	+	
174T	--	+	
<u>ヒト乳房腺ガン</u>			
SK-BR-3	--	+	20
BT-20	--	+	
<u>ヒトリンパ腫細胞株</u>			
U-937組織球リンパ腫	--	±	
H9 T細胞リンパ腫	--	+	
CEM急性リンパ芽球性白血病	--	-	
MOLT-3急性リンパ芽球性白血病	--	±	
HL-60前骨髄球性白血病	--	+	
KG-1急性骨髄性白血病	--	+	30
K-562慢性骨髄性白血病	--	+	
<u>胃ガン</u>			
KATO III	--	++	
<u>ヒト骨原性肉腫</u>			
SAOS-2	--	±	
<u>ヒト卵巣腺ガン</u>			
SK-OV-3	--	±	
<u>膀胱細胞ガン</u>			
T-24	--	+	40
<u>喉頭腺ガン</u>			
Hep-2	--	+	

実施例10

組換えにより産生されたH11 IgG1の反応性

H11 IgG1を、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞において、以下の通りに産生した。H11の軽鎖および重鎖の配列をコードするcDNAを含むいくつかのベクターを調製した。これらの構築物の方向、DNAインサート、および抗生物質選択基準を表15に示す。ここで、CMVはサイトメガロウイルスであり；DHFRはジヒドロ葉酸リダクターゼであり；HCは重

鎖であり、そしてLCは軽鎖である。

【表15】

表15

ベクター	DNA インサート	HC+LC プロモーター	プロモーターの 方向	抗生物質選択	増幅
pNB1	cDNA 重鎖および 軽鎖	CMV*	HC-時計回り LC-反時計回り	ネオマイシン	DHFR
pNB2	cDNA 重鎖および 軽鎖	CMV	HC-時計回り LC-時計回り	ゼオシン (zeocin)	DHFR
pNB3	cDNA 重鎖および 軽鎖	CMV	HC-時計回り LC-反時計回り	ゼオシン	DHFR

これらの発現ベクターは、抗体軽鎖および抗体重鎖をコードする配列のための離れた挿入部位を有する。重鎖および軽鎖の両方の高レベルの構成的発現は、サイトメガロウイルス即時型 (CMV) エンハンサー/プロモーターにより指向される。ヒト γ -グロブリンの最初のイントロンの5' ドナー部位および免疫グロブリン遺伝子のイントロン由来の3' アクセプター部位 (重鎖可変領域) を含むキメライントロンを、遺伝子発現レベルを増強することが頻りに示されているプロモーターの下流に配置する。mRNAのポリアデニル化は、シミアンウイルス40 (SV40) からのポリアデニル化シグナルにより提供される。

プラスミドはまた、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) をコードする遺伝子を含み、従ってチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) DHFR欠損細胞において増殖し得る。メトトレキサート (葉酸アナログおよび強力なDHFRインヒビター) を用いる増幅は、DHFR遺伝子およびその隣接配列 (すなわち、構築物中の抗体の軽鎖および重鎖) の増幅をもたらす。メトトレキサート濃度 (約0.01nM ~ 約800nM) の段階的増加は、標的遺伝子 (単数または複数) から非常に高レベルのタンパク質を産生し得る。構築物はまた、選択マーカーとして抗生物質耐性を与える遺伝子 (ネオマイシンまたはゼオマイシン (zeomycin) のいずれかが用いられる) を含む。ベクターを図15および図16に示す。

組換えにより産生されたH11 IgG1のフローサイトメトリー分析の結果を表16に示し、そしてSK-BR-3乳ガン細胞上で抗原に結合するH11 IgG1がCHO細胞において産生され得ることを例示する。

【表16】

10

20

30

40

表16

細胞株 / I.D.	試料中の IgG1 の 濃度 (mg/L)	平均蛍光 (MF)	IgG1 コントロールを 上回るMFの増加%
PBS		156	
コントロールIgG1	5	169	
1129 / pNB1	2	172	2
1233 / pNB1	2	184	9
KL-13 / pNB2	3.3	192	14
KL-14 / pNB2	3.3	186	10
Sb2 / pNB3	4.0	224	33
3sB3 / pNB3	3.9	200	18

実施例11

ガン細胞株に対するH11結合

種々のヒトガン細胞株に対するH11 IgMおよびH11-scFvの結合親和性を、H11抗体を放射性ヨウ素または放射性インジウム of いずれかで標識することにより、決定した。¹²⁵I-H11-scFvを7、20、または150 μ Ci/ μ gの比活性で調製し、そして0.6 μ Ci/ μ gを有する¹²⁵I-H11IgMを得た。さらに、13および38 μ Ci/ μ gの比活性を有する¹¹¹In-H11-scFvを、実施例12に記載のように調製した。scFv3B1 (これは、C抗原を認識しない) をコントロールとして用いて非特異的結合を示し、そして150 μ Ci/ μ gで標識した。

¹²⁵I-H11-scFvを、P-2ミニカラムを用いて精製し、そして図17に示すように、85%メタノールにおけるペーパークロマトグラフィーにより分析した。¹²⁵I-H11IgMを、Sephadex G-50ミニカラム (Pharmacia) を用いて精製し、そして図18に示すように85%メタノールにおけるペーパークロマトグラフィーにより分析した。SephadexG-50カラムを用いて¹¹¹In-H11-scFv精製し、これを次いで図19に示すように0.1Mクエン酸塩中のITLC-SGにより分析した。

H11結合の結果を図13および図14に示す。図13は、LS174Tヒト結腸ガン細胞に対する¹²⁵I-H11-scFvの特異的結合を示す。図14は、A375細胞に対する¹¹¹In-H11-scFvの全結合を示す。

得られた結果は、H11が、LT174Tおよびヒト黒色腫細胞の両方に特異的に結合することを示す。H11はまた、低い親和性でだが、乳ガン細胞株に結合する。

実施例12

¹¹¹インジウム-DTPA-H11-scFvでの腫瘍画像化

H11-scFvを、ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA) の二環式 (bicyclic) 無水物と、10:1のモル比 (DTPA:H11-scFv) で結合させ、H11-scFvの1モルあたりDTPAの2モルの置換レベルとなった。DTPA-H11-scFvを、SephadexG-25 (Pharmacia) ミニカラムで過剰なDTPAから精製し、そしてCentricon-30マイクロコンセンレーター (Amicon) を用いて10mg/mLまで再濃縮した。DTPA-H11-scFvを、酢酸¹¹¹インジウムで25mCi/mgの比活性に放射標識した。取り込まれなかった¹¹¹Inを、SephadexG-25ミニカラムを用いて除去した。酢酸¹¹¹インジウムを、塩化¹¹¹インジウム (Nordion) およびpH6.0の1M酢酸緩衝液から調製した。最終¹¹¹In-DTAP-H11-scFvの放射化学的純度は、100mMクエン酸ナトリウム (pH5.0) において薄層シリカゲルクロマトグラフィーにより測定した場合、99%より高かった。図19は、精製およびTLCを示す。

右側面に存在する皮下A375黒色腫異種移植片および中央腹部領域に皮下HT-29ヒト結腸ガン異種移植片を有する雌性ヌードマウスに、尾静脈中に100 μ Ciの¹¹¹In-DTAP-H11-scFvを

10

20

30

40

50

静脈内注射した。マウスを、GEStar 4000iコンピュータに接続したガンマ線カメラ (Siemens ZL3700) の下に直ちに配置し、そして動的な捕捉を、120分間、各15秒間の計480フレームで得た。次いで、フレームを、12×10分間の画像に組み合わせた。A375腫瘍は、早くも注射後30分間でマウスの右側面で可視であった。

2つの腫瘍の目的領域分析は、A375腫瘍は120分間の研究を通して放射能を蓄積したが、一方、HT-29腫瘍は、最初の1時間に放射能を蓄積し、次いで放射能濃度は比較的一定なままであることを示した。図20は、12フレームを示し、そして120分目に撮った右側下フレームの2つの矢印は、2つの腫瘍における放射能の蓄積を示す。細い矢印はA375腫瘍を指し、そして太い矢印はHT-29腫瘍を指す。画像上で可視の正常組織は、心臓、肝臓、腎臓、および膀胱を含む。心臓は循環量の放射能に起因して可視であり、そして腎臓および膀胱は¹¹¹In-DTAP-H11-scFvの腎臓での排泄に起因して可視である。少量の肝臓への取込みは、肝臓への血流または肝臓への¹¹¹In-DTAP-H11-scFvの部分的結合に起因し得る。先述の発明は、明瞭さおよび理解の目的で図および実施例によりいくらか詳細に記載してきたが、当業者には、特定の変更および改変が実施され得ることが明らかである。それゆえ、説明および実施例は、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではなく、本発明の範囲は、添付の請求の範囲により描写される。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、一般的な抗体構造の概略図を示す。

【図2】図2は、H11によって認識される細胞のフローサイトメトリー分析を示す。

【図3】図3は、H11によって認識される細胞のフローサイトメトリー分析を示す。

【図4】図4は、H11によって認識される細胞のフローサイトメトリー分析を示す。AはA-375 (黒色腫) であり、BはSKMG-1 (神経膠腫) であり、CはSK-BR-3 (乳房腺ガン) であり、DはHT-29 (結腸腺ガン) であり、EはMB-468 (乳ガン) であり、そしてFはT47D (乳ガン) である。

【図5】図5は、腫瘍細胞抽出物へのH11の結合を示す。明るい色のバーはH11を示し、そして暗い色のバーはコントロール抗体を示す。

【図6】図6は、腫瘍細胞抽出物へのH11の結合を示す。

【図7】図7は、細胞固定ELISAによるヒト腫瘍細胞株へのH11の結合を示す。明るい色のバーはH11 IgMを示し、そして暗い色のバーはコントロールIgMを示す。

【図8】図8は、発現ベクターpSJF1の概略図を示す。

【図9】図9は、細胞固定ELISAによるMab H11とH11-scFvとの間の抗原性類似性の決定を示す。反応性を、H11 scFvに対するウサギ抗体によって決定した。

【図10】図10は、ビオチン化H11-scFv (太線) およびBGAscFv (細線) のリンパ腫細胞に対する相対蛍光強度を示す。

【図11】図11は、細胞固定ELISAによって決定された場合の、リンパ腫細胞、RAMOS、Da udi、CA-46、およびCCRF-CEM細胞への結合についての、ビオチン化H11-scFvの反応性の滴定を示す。抗体濃度は、最初の10 μg/mL (白抜きのバー) から5 μg/mL、次いで2.5 μg/mL、最後に1.25 μg/mL (二重斜交平行線模様) まで減少する。

【図12】図12は、H11-scFvおよびコントロールscFv結合の腫瘍細胞株に対する相対蛍光強度を示す。AはA-375 (黒色腫) であり、BはSK-BR-3 (乳房腺ガン) であり、CはHT-29 (結腸腺ガン) であり、DはCA-46 (パーキットリンパ腫) であり、EはRAMOS (パーキットリンパ腫) であり、FはH9 (T細胞リンパ腫) であり、そしてGはCCRF-CEM (急性リンパ芽球リンパ腫) である。

【図13】図13は、LS174T細胞への¹²⁵I-H11-scFvの結合を示す。

【図14】図14は、A375への¹¹¹In-H11-scFvの結合を示す。

【図15】図15は、組換えH11-IgGをトランスフェクトしそして発現するために使用される哺乳動物発現ベクターpNB2を示す。

【図16】図16は、組換えH11-IgGをトランスフェクトしそして発現するために使用される哺乳動物発現ベクターpNB3を示す。

【図17】図17は、P-2ミニカラムでの¹²⁵I-H11-scFvの精製 (A) および85%メタノール

10

20

30

40

50

にけるペーパークロマトグラフィーによる¹²⁵I-H11-scFvの分析(B)を示す。

【図18】図18は、SephadexG-25ミニカラムでの¹²⁵I-H11 IgMの精製(A)および85%メタノールにおけるペーパークロマトグラフィーによる¹²⁵I-H11IgMの分析(B)を示す。

【図19】図19は、SephadexG-50ミニカラムでの¹¹¹In-DTPA-H11-scFvの精製(A)およびITLC-SG/0.1Mクエン酸による¹¹¹In-DTPA-H11-scFvの分析(B)を示す。

【図20】図20は、ヌードマウスにおけるA375異種移植腫瘍への¹¹¹In-H11-scFvのインビボ結合を示す。

(配列表)

【化1】

配列表

10

(1) 一般的情報:

(i) 出願人: ダン, マイケル ディー,

マイティ, プラディップ ケイ,

カプラン, ハーワード エー.

(ii) 発明の名称: ガン細胞を特異的に検出する抗原結合フラグメントH11、このフラグメントをコードするヌクレオチド、ならびにガンの予防および検出のためのその使用

(iii) 配列数: 18

(iv) 通信住所:

(A) 名称: モリソン アンド フォレスター

(B) 番地: ページ ミル ロード755

20

(C) 市: パロ アルト

(D) 州: カリフォルニア

(E) 国: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 94304-1018

(v) コンピューター読み出し形態:

(A) 媒体型: フロッピー ディスク

(B) コンピューター: IBM PC互換用

(C) OS: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.30

(vi) 現在の出願データ:

30

(A) 出願番号:

(B) 出願日:

(C) 分類:

(viii) 代理人/事務所情報:

(A) 名称: レーンハルト, スーザン ケイ,

(B) 登録番号: 33,943

(C) 照会/記録番号: 31608-20001.20

(ix) 通信情報

(A) 電話: (415) 813-5600

(B) テレファックス: (415) 494-0792

40

(C) テレックス: 706141

(2) 配列番号1の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 543塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 1..543

50

(xi) 配列：配列番号 1：

CAAGCTATTT AGGTGACACT ATAGAATACT CAAGCTATGC ATCCAACGCG TTGGGAGCTC 60
 TCCCATATGG TCGACCTGCA GCGCGCCGCA CTAGTGATTT CAAGCTTCAT CACTGAACAC 120
 AGAGGACTCA CCATGGAGTT TGGGCTGAGC TGGGTTTTCC TCGTTGCTCT TTTAAGAGGT 180
 ATCCAGTGTC AGGTGCAGCT GGTGGAGTCT GGGGGAGGCG TGGTCCAGCC TGGGAGGTCC 240
 CTGAGACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTC CCTTCAGAA GCTTTGCTAT GCACTGGGTC 300
 CGCCAGGCTC TAGGCAAGGG GCTGGAGTGG GTGGCAGTTA TATCATATGA TGAAGCACT 360
 AAATACTACG CAGACTCCGT GAAGGGGCGA TTCACCATCT CCAGAGACAC TTCCAAGAAC 420
 ACGGTGTATC TAARAATGAA CAGGCTGAGA ACTGAGGACA CGGCTGTCTT TTACTTGTGC 480
 GAAAGACAGA GCCTGCTGGG TGACTIONGAC CACTACTACG GNTTGGACGC TTGGGGAAAG 540
 GGA 543

10

(2) 配列番号 2 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：179アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

20

(xi) 配列：配列番号 2：

Gln Ala Ile Val Thr Leu Asn Thr Gln Ala Met His Pro Thr Arg Trp
 1 5 10 15
 Glu Leu Ser His Met Val Asp Leu Gln Ala Ala Ala Leu Val Ile Ser
 20 25 30
 Ser Phe Ile Thr Glu His Arg Gly Leu Thr Met Glu Phe Gly Leu Ser
 35 40 45
 Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly Ile Gln Cys Gln Val Gln
 50 55 60
 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg
 65 70 75 80
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Arg Ser Phe Ala Met His
 85 90 95
 Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile
 100 105 110
 Ser Tyr Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 115 120 125
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Lys Met
 130 135 140
 Asn Arg Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Leu Cys Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Ser Leu Leu Gly Asp Tyr Asp His Tyr Tyr Gly Leu Asp Ala Trp
 165 170 175
 Gly Lys Gly

30

40

(2) 配列番号 3 の情報：

50

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：543塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 3：

TCCCTTTCCC CAAGCGTCCA ANCCGTAGTA GTGGTCATAG TCACCCAGCA GGCTCTGTCT	60	
TTCGCACAAG TAAAAGACAG CCGTGTCCCTC AGTTCCTCAGC CTGTTTCATTT TTAGATACAC	120	
CGTGTCTCTG GAAGTGTCTC TGGAGATGGT GAATCGCCCC TTCACGGAGT CTGCGTAGTA	180	10
TTTAGTGCTT CCATCATATG ATATAACTGC CACCCACTCC AGCCCCTTGC CTAGAGCCTG	240	
GCGGACCCAG TGCATAGCAA AGCTTCTGAA GGGGAATCCA GAGGCTGCAC AGGAGAGTCT	300	
CAGGGACCTC CCAGGCTGGA CCACGCCTCC CCCAGACTCC ACCAGCTGCA CCTGACACTG	360	
GATACCTCTT AAAAGAGCAA CGAGGAAAAC CCAGCTCAGC CCAAACCTCCA TGGTGAGTCC	420	
TCTGTGTTCA GTGATGAAGC TTGAAATCAC TAGTGCGGCC GCCTGCAGGT CGACCATATG	480	
GGAGAGCTCC CAACCGGTTG GATGCATAGC TTGAGTATTC TATAGTGTC ACTAAATAGC	540	20
TTG	543	

(2) 配列番号 4 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：450塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ix) 配列の特徴：

(A) 特徴を表す記号：CDS

(B) 存在位置：1..450

(xi) 配列：配列番号 4：

CTCGAGATGG ACATGGAGTT CCAGGCGCAG CTTCTCTTCC TCCTGCTACT CTGGCTCCCA	60	
GATATCACCG GAGATATTGT GTTGACGCAG TCTCCAGSCA CCCTGTCTTT GTCTCCAGGG	120	
GAAAGAGCCA CCCTCTCCTG CAGGGCCAGT CAGAGTGTTA GTAGCAGCTA CTTAGCCTGG	180	
TACCAGCAGA AACCTGGCCA GGCTCCCAGG CTCCTCATCT ATGGTGCATC CACCAGGGCC	240	
ACTGGCATGC CAGACAGGTC CAGTGGCAGT GGGTCCGGGA CAGACTTCAC TCTCACCATC	300	
AGTAGACTGG AGCCTGAAGA TTTTGCACTG TATTACTGTC AGCAGTATGG TAGCTCACCT	360	40
CAGACACCTC AGATCACTTT CGGCGGAGGG ACCAAGGTGG AGATCAAACG AACTGTGGCT	420	
GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT	450	

(2) 配列番号 5 の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：150アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号 5：

50

Leu Glu Met Asp Met Glu Phe Gln Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Trp Leu Pro Asp Ile Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
 20 25 30
 Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
 35 40 45
 Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala
 65 70 75 80
 Thr Gly Met Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Thr Pro Gln Ile Thr Phe Gly
 115 120 125
 Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 145 150

10

20

(2) 配列番号6の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 450塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号6:

AGATGGCGGG AAGATGAAGA CAGATGGTGC AGCCACAGTT CGTTTGATCT CCACCTGGT 60
 CCCTCCGCCG AAAGTGATCT GAGGTGCTG AGGTGAGCTA CCATACTGCT GACAGTAATA 120
 CACTGCAAAA TCTTCAGGCT CCAGTCTACT GATGGTGAGA GTGAAGTCTG TCCCGGACCC 180
 ACTGCCACTG AACCTGTCTG GCATGCCAGT GGCCCTGGTG GATGCACCAT AGATGAGGAG 240
 CCTGGGAGCC TGGCCAGGTT TCTGCTGGTA CCAGGCTAAG TAGCTGCTAC TAACACTCTG 300
 ACTGGCCCTG CAGGAGAGGG TGGCTCTTTC CCCTGGAGAC AAAGACAGGG TGCCTGGAGA 360
 CTGCGTCAAC ACAATATCTC CGGTGATATC TGGGAGCCAG AGTAGCAGGA GGAAGAGAAG 420
 CTGCGCCTGG AACTCCATGT CCATCTCGAG 450

30

40

(2) 配列番号7の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 34塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号7:

TATGAAGACA CCAGGCCGAT ATTGIGTTGA CGCA

34

50

(2) 配列番号8の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 26塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号8:

TATCCGGATG CAGCCACAGT TCGTTT 26

(2) 配列番号9の情報:

(i) 配列の特徴:

10

(A) 長さ: 26塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号9:

TATTCGGACA GGTGCAGCTG GTGGAG 26

(2) 配列番号10の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 27塩基対

(B) 型: 核酸

20

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号10:

TATGGATCCT GAGGAGACGG TGACCGT 27

(2) 配列番号11の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 60塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

30

(xi) 配列: 配列番号11:

TATATATCCG GAGGTGGTGG ATCAGGTGGA GGTGGCTCCC AGGTGCAGCT GGTGGAGTCT 60

(2) 配列番号12の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 46塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号12:

40

ACCTCCGGAA CCGCCACCGC CAGAGACAGA TGGTGCAGCC ACATTC 46

(2) 配列番号13の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 918塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

50

(B) 存在位置 : join (1..906,913..918)

(xi) 配列 : 配列番号13 :

GAA TTC ATG AAA AAA ACC GCT ATC GCG ATC GCA GTT GCA CTG GCT GGT	48	
Glu Phe Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly		
1 5 10 15		
TTC GCT ACC GTT GCG CAG GCC GAT ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC	96	
Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly		
20 25 30		
ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC	144	10
Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala		
35 40 45		
AGT CAG AGT GTT AGT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT	192	
Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro		
50 55 60		
GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC ACC AGG GCC ACT	240	
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr		
65 70 75 80		
GGC ATG CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCC GGG ACA GAC TTC ACT	288	20
Gly Met Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
85 90 95		
CTC ACC ATC AGT AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT	336	
Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys		
100 105 110		
CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCT CAG ACA CCT CAG ATC ACT TTC GGC GGA	384	
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Thr Pro Gln Ile Thr Phe Gly Gly		
115 120 125		
GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TCT	432	
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Ser		
130 135 140		
GGC GGT GGC GGT TCC GGA GGT GGT GGA TCA GGT GGA GGT GGC TCC CAG	480	30
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gln		
145 150 155 160		
GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC	528	
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser		
165 170 175		
CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC CCC TTC AGA AGC TTT GCT	576	
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Arg Ser Phe Ala		
180 185 190		
ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CTA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA	624	40
Met His Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala		
195 200 205		
GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC ACT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG	672	
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
210 215 220		

GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC ACT TCC AAG AAC ACG GTG TAT CTA Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu 225 230 235 240	720	
AAA ATG AAC AGC CTG AGA ACT GAG GAC ACG GCT GTC TAT TAC TGT GCG Lys Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 245 250 255	768	
AGA GAT CAG AGC CTG TTG GGT GAC TAT GAC CAC TAC TAC GGT TTG GAC Arg Asp Gln Ser Leu Leu Gly Asp Tyr Asp His Tyr Tyr Gly Leu Asp 260 265 270	816	
GTC TGG GGC AAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGA TCC GAA CAA Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Glu Gln 275 280 285	864	10
AAA CTG ATC AGC GAA GAA GAT CTG AAC CAT CAC CAT CAC CAT Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn His His His His His 290 295 300	906	
TAGTGA AAG CTT Lys Leu	918	

(2) 配列番号14の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 304アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号14:

20

Glu Phe Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
 20 25 30
 Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
 35 40 45
 Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 65 70 75 80
 Gly Met Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Thr Pro Gln Ile Thr Phe Gly Gly
 115 120 125
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln
 145 150 155 160
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
 165 170 175
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Arg Ser Phe Ala
 180 185 190
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 195 200 205
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 210 215 220
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 225 230 235 240
 Lys Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 245 250 255
 Arg Asp Gln Ser Leu Leu Gly Asp Tyr Asp His Tyr Tyr Gly Leu Asp
 260 265 270
 Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Glu Gln
 275 280 285
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn His His His His His Lys Leu
 290 295 300

10

20

30

40

(2) 配列番号15の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 918塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号15:

50

AAGCTTTTCAC TAATGGTGAT GGTGATGGTT CAGATCTTCT TCGCTGATCA GTTTTTGTTC 60
GGATCCTGAG GAGACGGTGA CCGTGGTCCC TTTGCCCCAG ACGTCCAAAC CGTAGTAGTG 120
GTCATAGTCA CCCAACAGGC TCTGATCTCT CGCACAGTAA TAGACAGCCG TGTCCCTCAGT 180
TCTCAGGCTG TTCATTTTTA GATACACCGT GTTCTTGAA GTGTCTCTGG AGATGGTGAA 240
TCGGCCCTTC ACGGAGTCTG CGTAGTATTT AGTGCTTCCA TCATATGATA TAACTGCCAC 300
CCACTCCAGC CCCTTGCCTA GAGCCTGGCG GACCCAGTGC ATAGCAAAGC TTCTGAAGGG 360
GAATCCAGAG GCTGCACAGG AGAGTCTCAG GGACCTCCCA GGCTGGACCA CGCCTCCCC 420
AGACTCCACC AGCTGCACCT GGGAGCCACC TCCACCTGAT CCACCACCTC CGGAACCGCC 480
ACCGCCAGAG ACAGATGGTG CAGCCACAGT TCGTTTGATC TCCACCTTGG TCCCTCCGCC 540
GAAAGTGATC TGAGGTGTCT GAGGTGAGCT ACCATACTGC TGACAGTAAT ACACTGCAAA 600
ATCTTCAGGC TCCAGTCTAC TGATGGTGAG AGTGAAGTCT GTCCCGGACC CACTGCCACT 660
GAACCTGTCT GGCATGCCAG TGGCCCTGGT GGATGCACCA TAGATGAGGA GCCTGGGAGC 720
CTGGCCAGGT TTCTGCTGGT ACCAGGCTAA GTAGCTGCTA CTAACACTCT GACTGGCCCT 780
GCAGGAGAGG GTGCCTCTTT CCCCTGGAGA CAAAGACAGG GTGCCTGGAG ACTGCGTCAA 840
CACAATATCG GCCTGCACAA CGGTAGCGAA ACCAGCCAGT GCAACTGCGA TCGCGATAGC 900
GGTTTTTTTC ATGAATTC 918

10

20

(2) 配列番号16の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 867塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

30

(ix) 配列の特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: join(1..855,862..867)

(xi) 配列: 配列番号16:

GAA TTC ATG AAA AAA ACC GCT ATC GCG ATC GCA GTT GCA CTG GCT GGT 48
Glu Phe Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15
TTC GCT ACC GTT GCG CAG GCC GAT ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC 96
Phe Ala Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
20 25 30
ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC 144
Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
35 40 45

40

AGT CAG AGT GTT AGT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 50 55 60	192	
GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC ACC AGG GCC ACT Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr 65 70 75 80	240	
GGC ATG CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCC GGG ACA GAC TTC ACT Gly Met Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr 85 90 95	288	
CTC ACC ATC AGT AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys 100 105 110	336	10
CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCT CAG ACA CCT CAG ATC ACT TTC GGC GGA Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Thr Pro Gln Ile Thr Phe Gly Gly 115 120 125	384	
GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA TCC GGA CAG GTG Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Ser Gly Gln Val 130 135 140	432	
CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu 145 150 155 160	480	20
AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC CCC TTC AGA AGC TTT GCT ATG Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Arg Ser Phe Ala Met 165 170 175	528	
CAC TGG GTC CGC CAG GCT CTA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT His Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val 180 185 190	576	
ATA TCA TAT GAT GGA AGC ACT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly 195 200 205	624	30
CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC ACT TCC AAG AAC ACG GTG TAT CTA AAA Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Lys 210 215 220	672	
ATG AAC AGC CTG AGA ACT GAG GAC ACG GCT GTC TAT TAC TGT GCG AGA Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg 225 230 235 240	720	
GAT CAG AGC CTG TTG GGT GAC TAT GAC CAC TAC TAC GGT TTG GAC GTC Asp Gln Ser Leu Leu Gly Asp Tyr Asp His Tyr Tyr Gly Leu Asp Val 245 250 255	768	
TGG GGC AAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGA TCC GAA CAA AAA Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Glu Gln Lys 260 265 270	816	40
CTG ATC AGC GAA GAA GAT CTG AAC CAT CAC CAT CAC CAT TAGTGA AAG Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn His His His His His Lys 275 280 285	864	
CTT Leu	867	

(2) 配列番号17の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：287アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列：配列番号17：

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

(2) 配列番号18の情報：

(i) 配列の特徴：

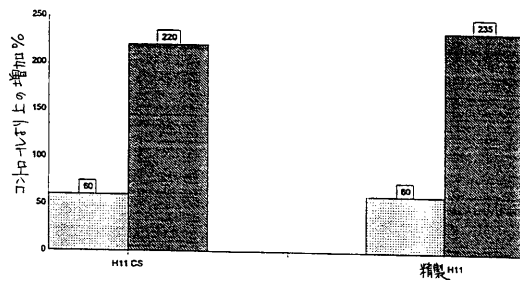
(A) 長さ：867塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

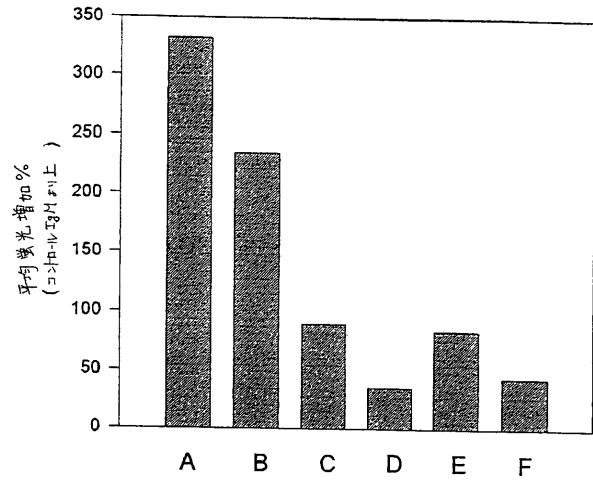
【 図 3 】

Figure 3



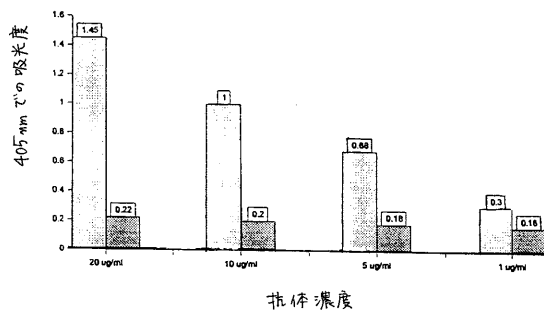
【 図 4 】

Figure 4



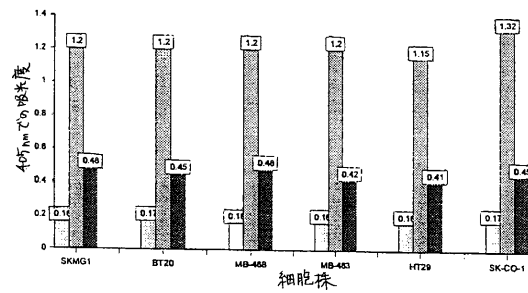
【 図 5 】

Figure 5



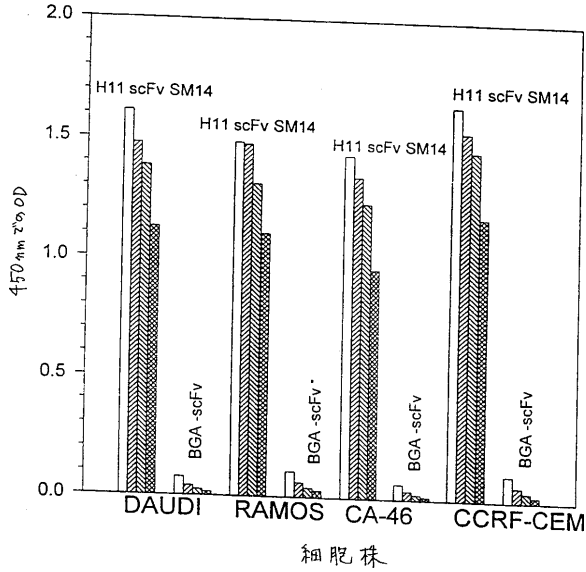
【 図 6 】

Figure 6



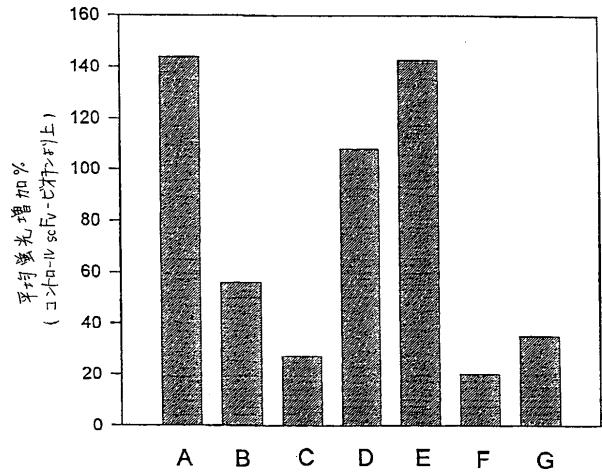
【 図 1 1 】

Figure 11



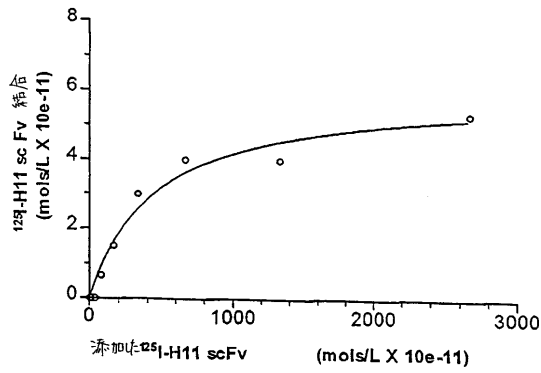
【 図 1 2 】

Figure 12



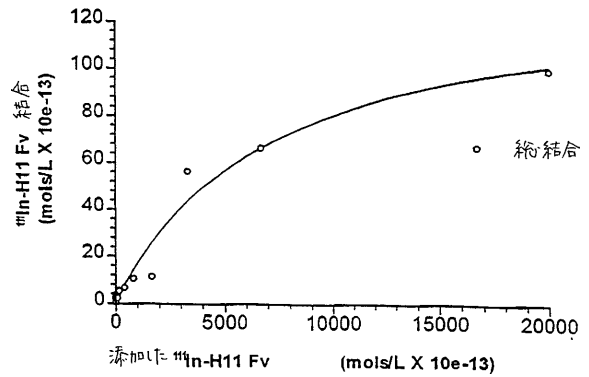
【 図 1 3 】

Figure 13



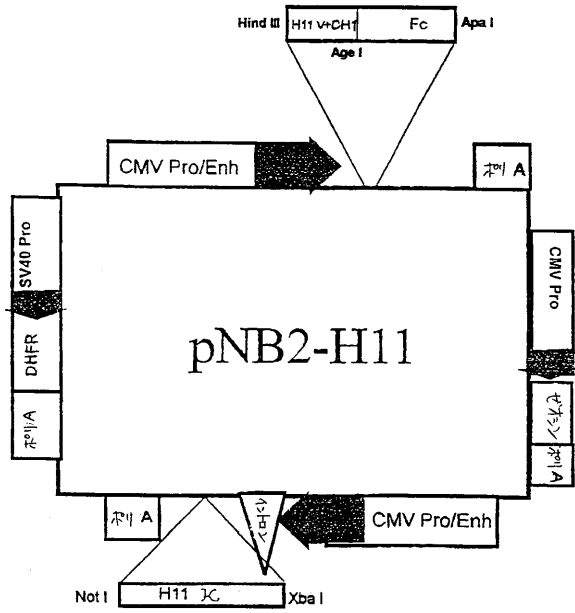
【 図 1 4 】

Figure 14



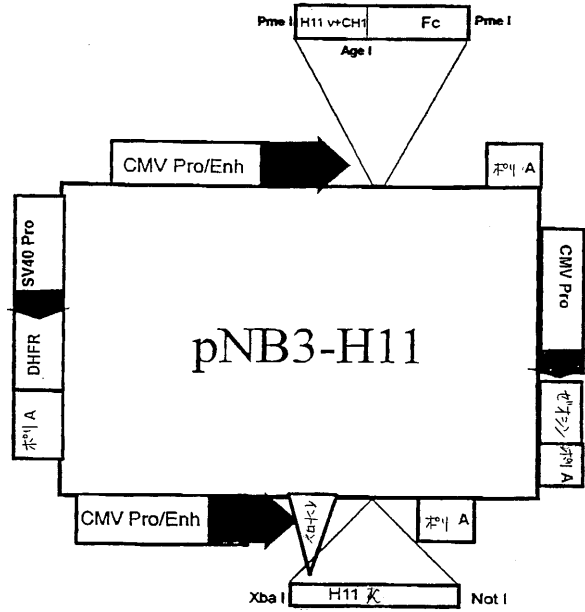
【 図 1 5 】

Figure 15



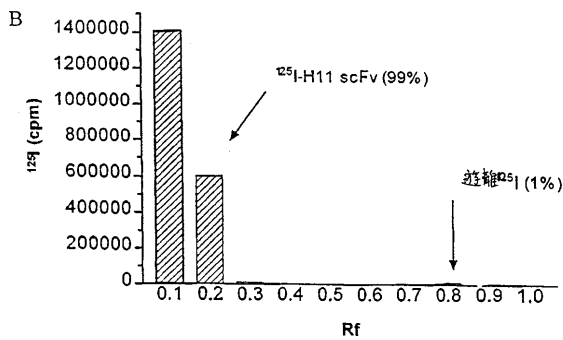
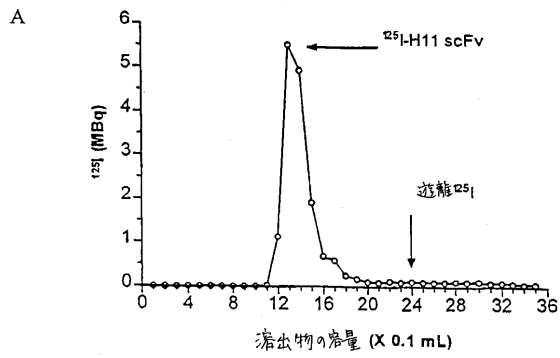
【 図 1 6 】

Figure 16



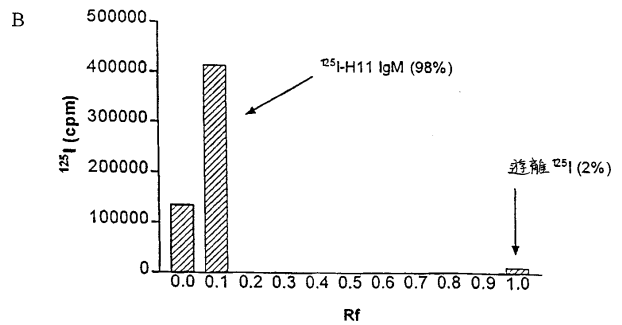
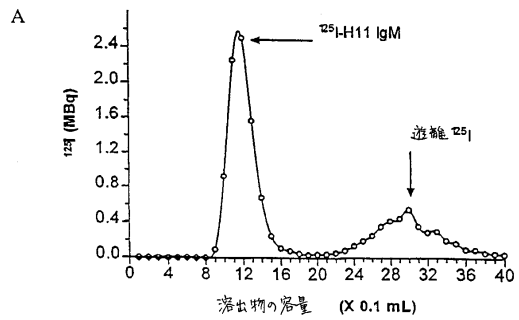
【 図 1 7 】

Figure 17



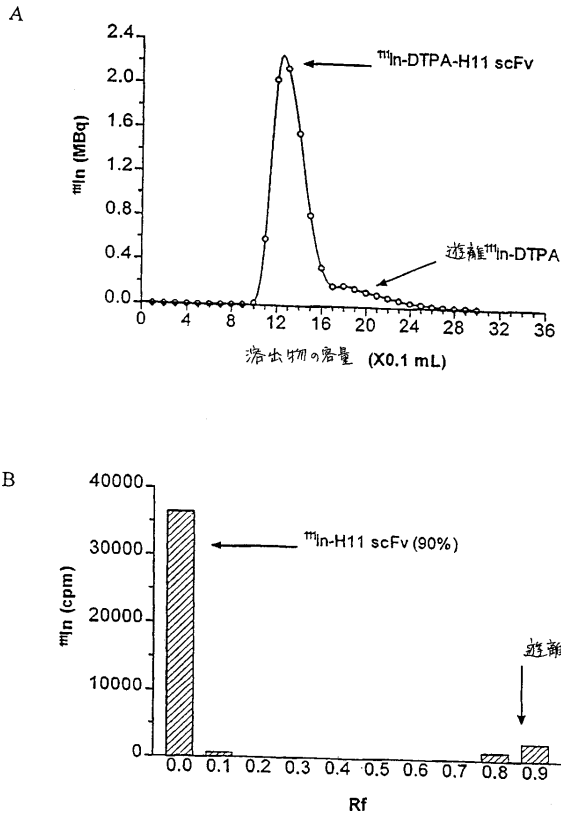
【 図 1 8 】

Figure 18



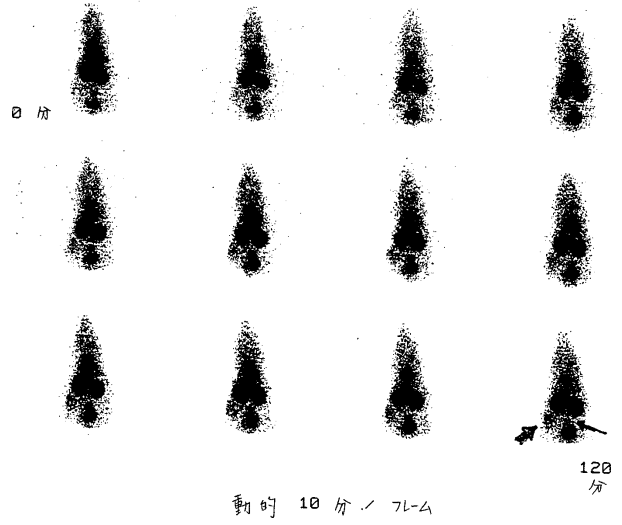
【 図 19 】

Figure 19



【 図 20 】

Figure 20



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 14/82	(2006.01)	C 0 7 K 14/82	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	

(72)発明者 ダン, マイケル ディー .

カナダ国 エム1ビー 2ケイ9 オンタリオ, スカボロー, ナプリー コート 30

(72)発明者 マイティ, プラディップ ケイ .

カナダ国 アール3ティー 4ダブリュー1 マニトバ, ウィニペグ, スワン レイク 38

(72)発明者 カプラン, ハワード エイ .

カナダ国 アール2ブイ 2ブイ9 マニトバ, ウィニペグ, ヒルハウス ロード 18

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 The Journal of biological chemistry. 1996 Mar, Vol.271, No.13, p.7630-7634
 Cancer research. 1995, Vol.55, No.16, p.3584-3591
 Journal of immunological methods. 1995, Vol.178, No.2, p.201-209

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07K 14/00 - 19/00

C12N 15/00 - 15/90

PubMed

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CA(STN)

CAplus(STN)

JICST-EPLUS(STN)

SCISEARCH(STN)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/GeneSeq