(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2020-7315
(P2020-7315A)
(43)公開日　令和2年1月16日(2020.1.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/30	(2006.01)	C07K	14/30	ZNA	4B064
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13		4B065
C12N 15/62	(2006.01)	C12N	15/62	Z	4C085
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	4H045
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		

審査請求 有　請求項の数 15　ＯＬ　（全 62 頁）　最終頁に続く

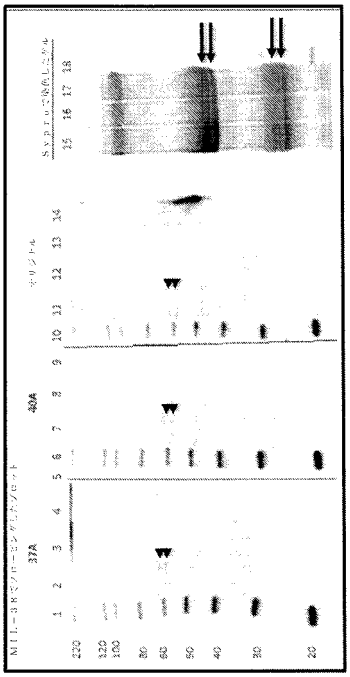
(21)出願番号　特願2019-143109 (P2019-143109)
(22)出願日　令和1年8月2日 (2019.8.2)
(62)分割の表示　特願2017-522028 (P2017-522028)の分割
原出願日　平成26年10月23日 (2014.10.23)

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

(71)出願人　516214180
ミノミック　インターナショナル　リミティド
オーストラリア国，ニューサウスウェールズ　２１１３，マクアリー　パーク，タラベラ　ロード　７５，グランド　フロア，スイート　２
(74)代理人　100126505
弁理士　佐貫　伸一
(74)代理人　100131392
弁理士　丹羽　武司
(72)発明者　キャンベル，ダグラス
オーストラリア　ニューサウスウェールズ　２０６０　ノース　シドニー　キアラ　クローズ　１　ユニット　２６
最終頁に続く

(54)【発明の名称】モノクローナル抗ＧＰＣ－１抗体およびその使用

(57)【要約】　（修正有）
【課題】様々な形態の癌（前立腺癌を含む）を診断および／または治療するためのより有効な作用物質の提供。
【解決手段】特定の重鎖および軽鎖可変領域により規定される第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントを含み、かつ、特定の軽鎖可変領域により規定される第２の抗体を含まない単離抗体集団、前記抗体集団を産生することができるハイブリドーマ細胞、前記抗体集団を含む組成物、前記抗体をコードする核酸分子、前記核酸分子を含むベクター、前記ベクターを含む宿主細胞、ならびに、前記抗体集団を産生するためのプロセス。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントを含む単離抗体集団であって、前記第１の抗体は、
（ａ）下記を含む重鎖可変領域：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置５０－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置６９－８５により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置１１８－１２６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；ならびに
（ｂ）下記を含む軽鎖可変領域：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置４４－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置７０－７６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置１０９－１１７により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；
を含み、
前記抗体集団は下記を含む軽鎖可変領域を含む第２の抗体を含まない、単離抗体集団：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置４８－５８により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置７４－８０により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置１１３－１２１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。
【請求項２】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはグリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに対する結合特異性を有する、請求項１に記載の抗体集団。
【請求項３】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはアイソタイプＩｇＧ１である、請求項１または２に記載の抗体集団。
【請求項４】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはモノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、多量体抗体、および／または合成抗体のいずれか１つ以上である、請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体集団。
【請求項５】
前記抗原結合性フラグメントは、単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）、可変ドメイン（Ｆｖ）フラグメント、フラグメント抗原結合（Ｆａｂ）フラグメント、Ｆ（ａｂ）２フラグメント、ペプチド、またはエピトープ結合領域を含むタンパク質分解フラグメントのいずれか１つ以上である、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体集団。
【請求項６】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントは、
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基２０－４９、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基５５－６８、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基８６－１１７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基１２７－１３７のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の重鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）；ならびに／または
（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基２１－４３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基５５－６９、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基７７－１０８、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基１

１８－１２７のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の軽鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）
をさらに含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の抗体集団。
【請求項７】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントは、
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置１３８－４６１により規定される重鎖定常ドメイン配列；
（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置１２８－２３４により規定される軽鎖定常ドメイン配列；
（ｃ）ヒンジ領域
のいずれか１つ以上をさらに含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体集団。
【請求項８】
前記第１の抗体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置２０－４６１により規定される重鎖配列およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置２１－２３４により規定される軽鎖配列を含む、またはこれから構成される、請求項１～７のいずれか一項に記載の抗体集団。
【請求項９】
請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体集団を産生することができるハイブリドーマ細胞。
【請求項１０】
前記抗体集団は一種類のみの抗体および／またはその抗原結合性フラグメントを含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体集団を産生することができる一種類のハイブリドーマ細胞を含む細胞培養物。
【請求項１１】
前記ハイブリドーマ細胞は、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託されている、請求項９に記載のハイブリドーマ細胞、または請求項１０に記載の細胞培養物。
【請求項１２】
複数種のハイブリドーマ細胞を含む細胞培養物であって、
（ａ）前記細胞培養物は、請求項９または１１に記載のハイブリドーマ細胞を含み；ならびに
（ｂ）前記細胞培養物は、下記のいずれか１つ以上を含む軽鎖可変領域を含む抗体を産生するハイブリドーマ細胞を含まない、細胞培養物：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置４８－５８により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置７４－８０により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置１１３－１２１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。
【請求項１３】
前記細胞培養物は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基２５－４７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基５９－７３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基８１－１１２、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基１２２－１３１のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の軽鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）を含む抗体を産生するハイブリドーマ細胞を含まない、請求項１２に記載の細胞培養物。
【請求項１４】
前記抗体集団は一種類のみの抗体および／またはその抗原結合性フラグメントを含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体集団を含む組成物。
【請求項１５】
前記抗体集団は、複数種の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントを含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体集団を含む組成物。

【請求項１６】
前記複数種の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはそれぞれ、グリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに対する結合特異性を有する、請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
請求項１～８のいずれか一項に記載の第１の抗体またはその抗原結合性フラグメントの少なくとも１つをコードする核酸分子。
【請求項１８】
前記核酸分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１で規定される配列を含む、またはこれから構成される、請求項１７に記載の核酸分子。
【請求項１９】
前記核酸分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２で規定される配列を含む、またはこれから構成される、請求項１７または１８に記載の核酸分子。
【請求項２０】
請求項１７～１９のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項２１】
請求項２０に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項２２】
請求項９または１１に記載のハイブリドーマ細胞、または請求項２１に記載の宿主細胞を、培地中、好適な条件下で培養し、よって、抗体またはその抗原結合性フラグメントを産生させることを含む、抗体またはその抗原結合性フラグメントを産生させるためのプロセス。
【請求項２３】
請求項１０～１３のいずれか一項に記載の細胞培養物を好適な条件下で培養し、よって抗体またはその抗原結合性フラグメントを産生させることを含む、抗体またはその抗原結合性フラグメントを産生させるためのプロセス。
【請求項２４】
前記抗体またはその抗原結合性フラグメントを前記培養物から単離することをさらに含む、請求項２２または２３に記載のプロセス。
【請求項２５】
請求項２２～２４のいずれか一項に記載のプロセスから得られた、または得ることができる、抗体またはその抗原結合性フラグメント。
【請求項２６】
ハイブリドーマ細胞の少なくとも一部分を混合ハイブリドーマ集団から単離することを含む、請求項９または１１に記載のハイブリドーマ細胞を混合ハイブリドーマ集団から得るためのプロセス。
【請求項２７】
前記単離は、混合ハイブリドーマ集団の個々のハイブリドーマ細胞をクローニングし、クローン子孫が請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体集団を産生することができることを決定することを含む、請求項２６に記載のプロセス。
【請求項２８】
前記混合ハイブリドーマ集団はアメリカン組織タイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）で受入番号ＨＢ１１７８５にて寄託されている、請求項２６または２７に記載のプロセス。
【請求項２９】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはキメラである、請求項４に記載の抗体集団。
【請求項３０】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントは、
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の残基１３８－４６７で規定されるアミノ酸配列を含む

またはこれから構成される重鎖定常領域；ならびに
（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の１２８－２３４の残基で規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される軽鎖定常領域
を含むキメラ抗体である、請求項４または２９に記載の抗体集団。
【請求項３１】
前記第１の抗体および／またはそのフラグメントは検出可能な標識を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体集団。
【請求項３２】
前記検出可能な標識は蛍光標識、放射標識、ビオチン、またはアビジンのいずれか１つ以上である、請求項３１に記載の抗体集団。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、一般に免疫学および医薬の分野に関する。より特定的には、本発明は、モノクローナル抗体およびその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
癌は世界中で主な死因であり、肺、乳房、結腸直腸、胃、および前立腺癌が大半の死の原因である。前立腺癌は男性において最も一般的に起こる腫瘍であり、死亡率で、肺癌に次いで第２位である。前立腺癌が早期に診断されている場合、外科手術および／または放射線療法を用いた治療が多くの患者において成功している。しかしながら、進行疾患を有する多くの患者および全前立腺癌患者のかなりの割合が、局所療法後に転移性疾患を最終的に発症する。
【０００３】
抗体（Ａｂ）は、それらの結合特異性／親和性およびそれらの同族抗原との相互作用に対するエフェクター特性の可能性のために、標的療法および診断の分野における主要なツールとなっている。ますます増加するＡｂが医学的用途のために認可されており、多くが臨床評価段階にある。抗体は、前立腺癌などの疾患の素因を有する個体を識別する、および／またはそのような疾患を診断する有効な診断法となり得る。加えて、いくつかの抗体の治療的使用は、腫瘍サイズを低減させ、罹患患者の生存を延ばすことが示されている。
【０００４】
Ｗａｌｋｅｒらの米国特許第５，６２２，８３６号はＢＬＣＡ－３８という名の抗体を開示する（ＢＬＣＡ－「膀胱癌」）。文書は、ＢＬＣＡ－３８は、膀胱がん細胞により発現される未知の抗原に特異的なモノクローナル抗体であることを教示する。ＢＬＣＡ－３８はまた、ヒト卵巣および結腸癌細胞株、ならびにいくつかのメラノーマ細胞株に特異性を示すが、リンパ（ＴリンパまたはＢリンパ）および白血病細胞株には示さないことが教示されている。
【０００５】
その後、Ｒｕｓｓｅｌｌら（２００４）（Ｒｕｓｓｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ　ｏｆ　ｉｍｍｕｎｏｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ　ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ　ｍｅｌｉｔｔｉｎ－ｌｉｋｅ　ｐｅｐｔｉｄｅ　１０１　ａｇａｉｎｓｔ　ｐｒｏｓｔａｔｅ　ｃａｎｃｅｒ：　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　＆　ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｓｔｕｄｉｅｓ”．　Ｃａｎｃｅｒ　ＩｍｍｕｎｏｌＩｍｍｕｎｏｔｈｅｒ　２００４：５３（５）：　４１１－４２１）は、ＢＬＣＡ－３８が、前立腺癌細胞に対して細胞傷害性ペプチドをターゲティングさせるために使用されたという研究を発表した。筆者は、ＢＬＣＡ－３８はヒト膀胱癌細胞株ＵＣＲＵ－ＢＬ－１７ＣＬに対して産生されたマウスモノクローナル抗体であることを示す。
【０００６】
２００４年のＲｕｓｓｅｌｌらによるさらなる刊行物（Ｒｕｓｓｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，“Ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｃａｌ　ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ

of the monoclonal antibody, BLCA38, for the detection of prostate cancer”. Cancer Immunol Immunother 2004: 53: 995－1004）はまた、ＢＬＣＡ－３８は、膀胱がん細胞、前立腺癌細胞、および外陰部類表皮細胞に結合することができるが、乳癌細胞には結合できない、ヒト膀胱細胞株に対して産生されたマウスモノクローナル抗体であることを教示する。論文はＢＬＣＡ－３８は、キャラクタリゼーションまたは同定が困難なサイズがおよそ３０ｋＤａの抗原に特異的であることを示す。

【０００７】

Carterら（２００４）（Carter et al., “Biodistributions of intact monoclonal antibodies and fragments of BLCA38, a new prostate cancer directed antibody”. Cancer Immunol Immunother 2004: 53：533－542）は、治療薬を前立腺癌細胞に、ＢＬＣＡ－３８を用いてターゲティングさせるためのタイミングおよび投与量を分析し、また、それが細胞表面上でおよび細胞質内で発現されるおよそ３０ｋＤａの抗原を標的にするマウスモノクローナル抗体であることを示す。筆者は、抗原の性質は、とらえどころがないと述べており、膀胱および前立腺癌細胞上で発現されることを示している。

【０００８】

２０１０年に発表されたＫｈａｔｒｉらによる論文（Khatri et al. “Promise of BLCA38 as a Targeting Antibody for Tissue－Specific Gene Delivery to Prostate Cancer”. Austral－Asian J. Cancer ２０１０: ９（３）: １９５－２０３）は、ＢＬＣＡ－３８は、前立腺癌細胞に特異的なマウスモノクローナル抗体であると繰り返し言っていた。筆者は、ＢＬＣＡ－３８はその抗原への結合ではインターナライズされないが、ウイルスとのコンジュゲーションにより、抗体のインターナリゼーションが促進され、レポーター遺伝子の発現の増加という結果が得られたことを明らかにしている。

【０００９】

抗体は診断および治療薬として提供されるという約束にもかかわらず、様々な形態の癌（前立腺癌を含む）を診断および／または治療するためのより有効な作用物質に対する要求が存在し続ける。

【発明の概要】

【００１０】

本発明者らは驚いたことに、前記先行技術において言及され、使用されるＢＬＣＡ－３８抗体は、示される別個のモノクローナル抗体ではなく、むしろ、混合された集団での２つの別々のモノクローナル抗体の組み合わせであることを同定した。本発明者らは、ＢＬＣＡ－３８抗体を生成させるために使用されるハイブリドーマ、アメリカン組織タイプカルチャーコレクションで受入番号ＨＢ１１７８５で寄託された代表的な試料はハイブリドーマ細胞の混合集団であり、それは少なくとも２つの別個の抗体種を産生することを決定した。これらの抗体種のたった１つだけが、いくつかの形態の癌細胞上に存在する関連する標的抗原に結合することができ、一方、第２の種は結合できない。

【００１１】

先行技術において言及されるＢＬＣＡ－３８は、混合ハイブリドーマ／抗体集団を表すという予想外の決定は、様々な形態の癌細胞上の標的抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体の単一集団を産生することができるモノクローナルハイブリドーマの作製を促進した。無効の抗体の不必要な産生および適用を回避することとは別に、本明細書の実施例で提供されるデータは本発明によるモノクローナルハイブリドーマ／単一モノクローナル抗体の使用は、同等量の抗体が適用された場合、先行技術の混合集団に比べ、より強いシグナルの生成を可能にすることを示す。

【００１２】
第１の実施形態では、本発明は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単離抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供し、ここで：（ａ）重鎖可変領域は、下記を含み：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置５０－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置６９－８５により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置１１８－１２６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；ならびに（ｂ）軽鎖可変領域は下記を含む：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置４４－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置７０－７６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置１０９－１１７により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。

【００１３】
単離抗体またはその抗原結合性フラグメントは、下記をさらに含み得る：（ａ）下記のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の重鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基２０－４９、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基５５－６８、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基８６－１１７、および／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基１２７－１３７；ならびに／または（ｂ）下記のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の軽鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基２１－４３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基５５－６９、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基７７－１０８、および／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基１１８－１２７。

【００１４】
単離抗体またはその抗原結合性フラグメントは、下記のいずれか１つ以上をさらに含み得る：（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置１３８－４６１により規定される重鎖定常ドメイン配列；（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置１２８－２３４により規定される軽鎖定常ドメイン配列；（ｃ）ヒンジ領域。

【００１５】
単離抗体またはその抗原結合性フラグメントは、グリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに対する結合特異性を有し得る。

【００１６】
抗体はＩｇＧアイソタイプ抗体であってもよい。抗体は、ＩｇＧ１アイソタイプ抗体であってもよい。抗体または抗原結合性フラグメントは検出可能な標識を含み得る。

【００１７】
検出可能な標識は蛍光標識、放射標識、ビオチン、またはアビジンのいずれか１つ以上であってもよい。

【００１８】
抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、多量体抗体、および／または合成抗体のいずれか１つ以上であってもよい。

【００１９】
抗体は、二特異性抗体、アビボディ、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ、ナノボディ、シングルドメイン抗体、ＶＨＨドメイン、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分ヒト化抗体、アンチカリン、アドネクチン、またはアフィボディであってもよい。

【００２０】
抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むキメラ抗体であってもよく、ここで：（ａ）重鎖可変領域は、下記を含み：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の位置５０－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の位置６９－８５により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこ

れから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の位置１１８－１２６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；ならびに（ｂ）軽鎖可変領域は下記を含む：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の位置４４－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の位置７０－７６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の位置１０９－１１７により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。

【００２１】

抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むキメラ抗体であってもよく、ここで：（ａ）重鎖可変領域は、下記を含み：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の位置５０－５４により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の位置６９－８５により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の位置１１８－１２６により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；ならびに（ｂ）軽鎖可変領域は下記を含む：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の位置４４－５４により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の位置７０－７６により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の位置１０９－１１７により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。

【００２２】

抗体は、下記を含むキメラ抗体であってもよい：（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の残基２０－４６７で規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される重鎖；ならびに（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の残基２１－２３４で規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される軽鎖。

【００２３】

抗体は、下記を含むキメラ抗体であってもよい：（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の残基２０－４６７で規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される重鎖；ならびに（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の残基２１－２３４で規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される軽鎖。

【００２４】

キメラ抗体は検出可能な標識を含み得る。検出可能な標識は蛍光標識、放射標識、ビオチン、またはアビジンのいずれか１つ以上であってもよい。

【００２５】

抗原結合性フラグメントは、単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）、可変ドメイン（Ｆｖ）フラグメント、フラグメント抗原結合（Ｆａｂ）フラグメント、Ｆ（ａｂ）２フラグメント、ペプチド、またはエピトープ結合領域を含むタンパク質分解フラグメントのいずれか１つ以上であってもよい。

【００２６】
抗体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置２０－４６１により規定される重鎖配列およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置２１－２３４により規定される軽鎖配列を含み、またはこれから構成され得る。
【００２７】
第２の実施形態では、本発明は、第１の実施形態で規定される抗体の単離抗原結合性バリアントまたは誘導体を提供し、ここで、バリアントまたは誘導体および第１の実施形態で規定される抗体は、同じ抗原に特異的に結合することができる。
【００２８】
バリアントまたは誘導体のいずれか１つ以上の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、および／またはＣＤＲ３アミノ酸配列（複数可）、および／またはバリアントまたは誘導体のいずれか１つ以上の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、および／またはＣＤＲ３アミノ酸配列（複数可）は、第１の実施形態で規定される抗体中に存在するアミノ酸のその他の点では対応するＣＤＲ配列に比べて、１、２、３、４または５つのアミノ酸欠失（複数可）、挿入（複数可）、および／または置換（複数可）を含み得る。
【００２９】
単離バリアントまたは誘導体は重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むことができ、ここで：（ａ）重鎖可変領域は、下記を含み：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置５０－５４により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置６９－８５により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置１１８－１２６により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；ならびに（ｂ）軽鎖可変領域は下記を含む：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置４４－５４により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置７０－７６により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置１０９－１１７により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。
【００３０】
バリアントまたは誘導体は、下記を含み得る：（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基２０－４９と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基５５－６８と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基８６－１１７と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基１２７－１３７と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される重鎖可変領域ＦＲから選択される少なくとも１つの重鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）；ならびに／または（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基２１－４３と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基５５－６９と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基７７－１０８と少なく

とも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性、および／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基１１８－１２７と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される軽鎖可変領域ＦＲから選択される少なくとも１つの軽鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）。

【００３１】

バリアントまたは誘導体は、下記のいずれか１つ以上を含み得る：（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置１３８－４６１により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される重鎖定常ドメイン配列；（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置１２８－２３４により規定されるアミノ酸配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の相同性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される軽鎖定常ドメイン配列；（ｃ）ヒンジ領域。

【００３２】

バリアントまたは誘導体は、グリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに対する結合特異性を有し得る。

【００３３】

バリアントまたは誘導体はＩｇＧアイソタイプ抗体であってもよい。単離抗体バリアントまたは誘導体はＩｇＧ１アイソタイプ抗体であってもよい。

【００３４】

バリアントまたは誘導体は検出可能な標識を含み得る。

【００３５】

検出可能な標識は蛍光標識、放射標識、ビオチン、またはアビジンのいずれか１つ以上であってもよい。

【００３６】

バリアントまたは誘導体はモノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、多量体抗体、および／または合成抗体のいずれか１つ以上であってもよい。

【００３７】

第３の実施形態では、本発明は、第１の実施形態で規定される抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは第２の実施形態で規定される抗原結合性バリアントまたは誘導体を産生することができるハイブリドーマ細胞を提供する。

【００３８】

ハイブリドーマ細胞はオーストラリア細胞バンク（Ｃｅｌｌｂａｎｋ　Ａｕｓｔｒａｌｉａ）に、２０１４年８月２２日に寄託され、受入番号ＣＢＡ２０１４００２６が割り当てられているものであってもよい。

【００３９】

第４の実施形態では、本発明は、第１の実施形態で規定される一種類の抗体またはその抗原結合性フラグメント、または第２の実施形態で規定される一種類の抗原結合性バリアントまたは誘導体を産生することができる一種類のハイブリドーマ細胞を含む細胞培養物を提供する。

【００４０】

ハイブリドーマ細胞は、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託され得る。

【００４１】

第５の実施形態では、本発明は、複数種のハイブリドーマ細胞を含む細胞培養物を提供し、ここで：（ａ）細胞培養物は、第３の実施形態で規定されるハイブリドーマ細胞を含み；ならびに（ｂ）細胞培養物は、下記のいずれか１つ以上を含む軽鎖可変領域を含む抗体を産生するハイブリドーマ細胞を含まない：

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置４８－５８により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置７４－８０により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置１１３－１２１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。

【００４２】
細胞培養物は、下記のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の軽鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）を含む抗体を産生するハイブリドーマ細胞を含まなくてもよい：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基２５－４７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基５９－７３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基８１－１１２、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基１２２－１３１。

【００４３】
細胞培養物中の複数種のハイブリドーマ細胞はそれぞれ、第１の実施形態で規定される一種類の抗体またはその抗原結合性フラグメント、または第２の実施形態で規定される一種類の抗原結合性バリアントまたは誘導体を産生することができ得る。

【００４４】
第６の実施形態では、本発明は、第１の実施形態で規定される一種類の抗体またはその抗原結合性フラグメント、または第２の実施形態で規定される一種類の抗原結合性バリアントまたは誘導体を含む組成物を提供する。

【００４５】
第７の実施形態では、本発明は、異なる抗体種またはその抗原結合性フラグメントの混合物を含む組成物を提供し、ここで：（ａ）組成物は第１の実施形態で規定される一種類の抗体またはその抗原結合性フラグメント、または第２の実施形態で規定される一種類の抗原結合性バリアントまたは誘導体を含み；ならびに（ｂ）組成物は下記のいずれか１つ以上を含む軽鎖可変領域を含む抗体を含まない：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置４８－５８により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置７４－８０により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置１１３－１２１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。

【００４６】
異なる抗体種またはその抗原結合性フラグメントの混合物はそれぞれ、グリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに対する結合特異性を有し得る。

【００４７】
第８の実施形態では、本発明は、第１の実施形態で規定される抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは第２の実施形態で規定される抗原結合性バリアントまたは誘導体をコードする核酸分子を提供する。

【００４８】
核酸分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１で規定される配列を含み、またはこれから構成され得る。

【００４９】
核酸分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２で規定される配列を含み、またはこれから構成され得る。

【００５０】
抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは抗原結合性バリアントまたは誘導体はそれぞれ、グリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに対する結合特異性を有し得る。

【００５１】
第９の実施形態では、本発明は、第８の実施形態で規定される核酸分子を含むベクター

を提供する。
【００５２】
第１０の実施形態では、本発明は、第９の実施形態で規定されるベクターを含む宿主細胞を提供する。
【００５３】
第１１の実施形態では、本発明は、第１の実施形態で規定される抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは第２の実施形態で規定される抗原結合性バリアントまたは誘導体を産生させるためのプロセスを提供し、ここで、プロセスは、第３の実施形態で規定されるハイブリドーマ細胞、または第１０の実施形態で規定される宿主細胞を、培地中、好適な条件下で培養し、よって、抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは抗原結合性バリアントまたは誘導体を産生させることを含む。
【００５４】
プロセスは、抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは抗原結合性バリアントまたは誘導体を培養物から単離することをさらに含み得る。
【００５５】
抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは抗原結合性バリアントまたは誘導体はそれぞれ、グリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに対する結合特異性を有し得る。
【００５６】
第１２の実施形態では、本発明は、第１の実施形態で規定される抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは第２の実施形態で規定される抗原結合性バリアントまたは誘導体を産生させるためのプロセスを提供し、ここで、プロセスは、第４または第５の実施形態で規定される細胞培養物を好適な条件下で培養し、よって、抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは抗原結合性バリアントまたは誘導体を産生させることを含む。
【００５７】
プロセスは、抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは抗原結合性バリアントまたは誘導体を培養物から単離することをさらに含み得る。
【００５８】
抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは抗原結合性バリアントまたは誘導体はそれぞれ、グリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに対する結合特異性を有し得る。
【００５９】
第１３の実施形態では、本発明は、第１１または１２の実施形態で規定されるプロセスから得られた、または得ることができる抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは抗原結合性バリアントまたは誘導体を提供する。
【００６０】
抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは抗原結合性バリアントまたは誘導体は検出可能な標識を含み得る。
【００６１】
検出可能な標識は蛍光標識、放射標識、ビオチン、またはアビジンのいずれか１つ以上であってもよい。
【００６２】
第１４の実施形態では、本発明は、第３の実施形態で規定されるハイブリドーマ細胞を混合ハイブリドーマ集団から得るためのプロセスを提供し、プロセスはハイブリドーマ細胞の少なくとも一部分を混合ハイブリドーマ集団から単離することを含む。
【００６３】
単離は、混合ハイブリドーマ集団の個々のハイブリドーマ細胞をクローニングし、クローン子孫が第１の実施形態で規定される抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは第２の実施形態で規定される抗原結合性バリアントまたは誘導体を産生することができることを決定することを含み得る。

【００６４】
混合ハイブリドーマ集団は、アメリカン組織タイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）で受入番号ＨＢ１１７８５にて寄託され得る。
【００６５】
第１５の実施形態では、本発明は、本発明による、抗体またはその抗原結合性フラグメント、抗原結合性バリアントまたは誘導体、キメラ抗体、またはハイブリドーマ細胞のいずれか１つ以上を含むキットを提供する。
【００６６】
ハイブリドーマ細胞は、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託され得る。
【００６７】
キットは、フラグメント化キットまたは組み合わせキットであってもよい。キットは、細胞培養のための試薬、標準試料、バッファー、標識、およびキットの構成要素を使用してアッセイを実施するための書かれた説明書から選択される１つ以上の追加の構成要素をさらに含み得る。
【００６８】
第１６の実施形態では、本発明は、本発明による、抗体またはその抗原結合性フラグメント、抗原結合性バリアントまたは誘導体、キメラ抗体、またはハイブリドーマ細胞のいずれか１つ以上を含む組成物を提供する。
【００６９】
組成物は医薬組成物であってもよい。医薬組成物は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤および／または担体をさらに含み得る。
【００７０】
第１７の実施形態では、本発明は、被験体におけるＧＰＣ－１の発現を検出および／または定量するための方法を提供し、方法は、（ａ）被験体から細胞、組織試料、および／または体液試料を得ること；（ｂ）細胞、組織試料、および／または体液試料を本発明による、抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体バリアント、抗体誘導体、またはキメラ抗体と接触させること、ならびに（ｃ）前記抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、またはキメラ抗体の被験体の細胞、組織試料、または体液試料への結合を決定および／または定量することを含む。
【００７１】
被験体から得られた細胞、組織および／または体液試料で検出されるＧＰＣ－１発現のレベルは、対照細胞試料またはＧＰＣ－１発現レベルの試料集団標準と比較され得る。いくつかの実施形態では、対照または標準と比較した、被験体における増加したＧＰＣ－１発現の決定は、被験体における疾患、または、疾患を発症する可能性の増加の診断となり得る。疾患は前立腺癌であってもよい。
【００７２】
検出のためのＧＰＣ－１は、細胞の表面上に存在し、および／または内部発現され得る。体液は尿、血液またその成分（例えば、血清または血漿）であってもよい。細胞または組織試料は前立腺細胞または前立腺組織であってもよい。
【００７３】
抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、またはキメラ抗体は本発明によるハイブリドーマ細胞により産生され得る。ハイブリドーマ細胞は、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託され得る。
【００７４】
第１８の実施形態では、本発明は、ＧＰＣ－１に特異的に結合することができる、一種類のモノクローナル抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、またはキメラ抗体を含む溶液を提供し、これは、ＧＰＣ－１を潜在的に含み得る細胞、組織試料、または体液試料に適用され得る。１つの種はオーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託されたハイブリドーマ細胞により産生され得る。

【００７５】
第１９の実施形態では、本発明は、ＧＰＣ－１を潜在的に含み得る細胞、組織試料、または体液試料に適用され得る、複数種の抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、またはキメラ抗体を含む溶液を提供し、ここで、溶液中の複数種の少なくとも１つの種はＧＰＣ－１に特異的に結合することができる。ＧＰＣ－１に特異的に結合することができる種は、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託されたハイブリドーマ細胞により産生され得る。複数種を含む溶液は、下記のいずれか１つ以上を含む軽鎖可変領域を含む抗体を含むことができない：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置４８－５８により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置７４－８０により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置１１３－１２１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。
【００７６】
本発明はまた下記実施形態に関する：
実施形態１：第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントを含む単離抗体集団であって、
第１の抗体は、
（ａ）下記を含む重鎖可変領域：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置５０－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置６９－８５により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置１１８－１２６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；ならびに
（ｂ）下記を含む軽鎖可変領域：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置４４－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置７０－７６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置１０９－１１７により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；
を含み、抗体集団は、下記を含む軽鎖可変領域を含む第２の抗体を含まない、単離抗体集団：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置４８－５８により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置７４－８０により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置１１３－１２１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。
【００７７】
実施形態２：抗体集団は前記第２の抗体の抗原結合性フラグメントを含まない、実施形態１による抗体集団。
【００７８】
実施形態３：第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはグリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに対する結合特異性を有する、実施形態１または実施形態２による抗体集団。
【００７９】
実施形態４：第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはＩｇＧ１アイソ

タイプである、実施形態１～３のいずれか一つによる抗体集団。
【００８０】
実施形態５：第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはモノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、多量体抗体、および／または合成抗体のいずれか１つ以上である、実施形態１～４のいずれか一つによる抗体集団。
【００８１】
実施形態６：抗原結合性フラグメントは単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）、可変ドメイン（Ｆｖ）フラグメント、フラグメント抗原結合（Ｆａｂ）フラグメント、Ｆ（ａｂ）２フラグメント、ペプチド、またはエピトープ結合領域を含むタンパク質分解フラグメントのいずれか１つ以上である、実施形態１～５のいずれか一つによる抗体集団。
【００８２】
実施形態７：第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントは、
（ａ）下記のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の重鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基２０－４９、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基５５－６８、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基８６－１１７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基１２７－１３７；ならびに／または
（ｂ）下記のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の軽鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基２１－４３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基５５－６９、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基７７－１０８、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基１１８－１２７
をさらに含む、実施形態１～６のいずれか一つによる抗体集団。
【００８３】
実施形態８：第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントは、
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置１３８－４６１により規定される重鎖定常ドメイン配列；
（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置１２８－２３４により規定される軽鎖定常ドメイン配列；
（ｃ）ヒンジ領域、
のいずれか１つ以上をさらに含む実施形態１～７のいずれか一つによる抗体集団。
【００８４】
実施形態９：第１の抗体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置２０－４６１により規定される重鎖配列およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置２１－２３４により規定される軽鎖配列を含む、またはこれから構成される、実施形態１～８のいずれか一つによる抗体集団。
【００８５】
実施形態１０：実施形態１～９のいずれか一つによる抗体集団を産生することができるハイブリドーマ細胞。
【００８６】
実施形態１１：抗体集団は一種類のみの抗体および／またはその抗原結合性フラグメントを含む、実施形態１～９のいずれか一つによる抗体集団を産生することができる一種類のハイブリドーマ細胞を含む細胞培養物。
【００８７】
実施形態１２：ハイブリドーマ細胞はオーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託されている、実施形態９によるハイブリドーマ細胞、または実施形態１０による細胞培養物。
【００８８】
実施形態１３：複数種のハイブリドーマ細胞を含む細胞培養物であって
（ａ）細胞培養物は、実施形態１０または実施形態１２によるハイブリドーマ細胞を含み；ならびに
（ｂ）細胞培養物は下記のいずれか１つ以上を含む軽鎖可変領域を含む抗体を産生するハイブリドーマ細胞を含まない、細胞培養物：

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置４８－５８により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置７４－８０により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置１１３－１２１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。

【００８９】
実施形態１４：細胞培養物は、下記のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の軽鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）を含む抗体を産生するハイブリドーマ細胞を含まない、実施形態１３による細胞培養物：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基２５－４７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基５９－７３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基８１－１１２、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基１２２－１３１。

【００９０】
実施形態１５：実施形態１～９のいずれか一つによる抗体集団を含む組成物であって、抗体集団は一種類のみの抗体および／またはその抗原結合性フラグメントを含む、組成物。

【００９１】
実施形態１６：実施形態１～９のいずれか一つによる抗体集団を含む組成物であって、抗体集団は複数種の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントを含む、組成物。

【００９２】
実施形態１７：複数種の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはそれぞれ、グリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに対する結合特異性を有する、実施形態１６による組成物。

【００９３】
実施形態１８：実施形態１～９のいずれか一つによる第１の抗体またはその抗原結合性フラグメントの少なくとも１つをコードする核酸分子。

【００９４】
実施形態１９：核酸分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１で規定される配列を含む、またはこれから構成される、実施形態１８による核酸分子。

【００９５】
実施形態２０：核酸分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２で規定される配列を含む、またはこれから構成される、実施形態１８または実施形態１９による核酸分子。

【００９６】
実施形態２１：実施形態１８～２０のいずれか一つによる核酸分子を含むベクター。

【００９７】
実施形態２２：実施形態２１によるベクターを含む宿主細胞。

【００９８】
実施形態２３：抗体またはその抗原結合性フラグメントを産生させるためのプロセスであって、プロセスは、実施形態１０または実施形態１２によるハイブリドーマ細胞、または実施形態２２による宿主細胞を、培地中、好適な条件下で培養し、よって、抗体またはその抗原結合性フラグメントを産生させることを含む、プロセス。

【００９９】
実施形態２４：抗体またはその抗原結合性フラグメントを産生させるためのプロセスであって、実施形態１１～１４のいずれか一つの細胞培養物を好適な条件下で培養し、よって抗体またはその抗原結合性フラグメントを産生させることを含む、プロセス。

【０１００】
実施形態２５：抗体またはその抗原結合性フラグメントを培養物から単離することをさらに含む、実施形態２３または実施形態２４によるプロセス。

【０１０１】
実施形態２６：実施形態２３～２５のいずれか一つによるプロセスから得られた、また

は得ることができる抗体またはその抗原結合性フラグメント。
【０１０２】
実施形態２７：実施形態１０または実施形態１２によるハイブリドーマ細胞を混合ハイブリドーマ集団から得るためのプロセスであって、ハイブリドーマ細胞の少なくとも一部分を混合ハイブリドーマ集団から単離することを含む、プロセス。
【０１０３】
実施形態２８：単離は、混合ハイブリドーマ集団の個々のハイブリドーマ細胞をクローニングし、クローン子孫が実施形態１～９のいずれか一つによる抗体集団を産生することができることを決定することを含む、実施形態２７によるプロセス。
【０１０４】
実施形態２９：混合ハイブリドーマ集団はアメリカン組織タイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）で受入番号ＨＢ１１７８５にて寄託されている、実施形態２７または実施形態２８によるプロセス。
【０１０５】
実施形態３０：第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはキメラである、実施形態５による抗体集団。
【０１０６】
実施形態３１：第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントは、
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の残基１３８－４６７で規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される重鎖定常領域；ならびに
（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の残基１２８－２３４で規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される軽鎖定常領域
を含むキメラ抗体である、実施形態５または実施形態３０による抗体集団。
【０１０７】
実施形態３２：第１の抗体および／またはそのフラグメントは検出可能な標識を含む、実施形態１～９のいずれか一つによる抗体集団。
【０１０８】
実施形態３３：検出可能な標識は、蛍光標識、放射標識、ビオチン、またはアビジンのいずれか１つ以上である、実施形態３２による抗体集団。
【０１０９】
本発明の好ましい実施形態を以下、ほんの一例として、添付の図面を参照して記載する。
【図面の簡単な説明】
【０１１０】
【図１】ＤＵ－１４５、Ｃ３、およびＣＡ－ＨＰＶ－１０細胞株由来の抽出物に対する様々な起源由来のＭＩＬ－３８抗体を用いたウエスタンブロット分析の結果を示す。矢頭は、異なる抗体調製物のＭＩＬ－３８抗原との等しい反応性を示す。矢印は、３つのｐｒｅｐの各々における重鎖および軽鎖についての二重バンドを示す。略語：３７Ａ＝インハウスＭＩＬ－３８抗体調製物；「オリジナル」（１－Ｏ）＝ＡＴＣＣハイブリドーマ細胞（ＨＢ１１７８５）由来のＭＩＬ－３８抗体調製物；４０Ａ＝インハウスハイブリドーマ細胞由来のＭＩＬ－３８抗体調製物；Ｓｙｐｒｏ＝Ｓｙｐｒｏ（登録商標）ルビータンパク質ゲルステイン。レーン：１（ＭＷマーカー）；２（ＤＵ１４５　ＭＰＥＫ　１６／７／１２）；３（Ｃ３　ＭＰＥＫ　２０／４／１２）；４（ＣＡ－ＨＰＶ－１０　ＭＰＥＫ　２８／３／１２）；５（－）；６（ＭＷマーカー）；７（ＤＵ１４５　ＭＰＥＫ　１６／７／１２）；８（Ｃ３　ＭＰＥＫ　２０／４／１２）；９（ＣＡ－ＨＰＶ－１０　ＭＰＥＫ　２８／３／１２）；１０（ＭＷマーカー）；１１（ＤＵ１４５　ＭＰＥＫ　１６／７／１２）；１２（Ｃ３　ＭＰＥＫ　２０／４／１２）；１３（ＣＡ－ＨＰＶ－１０　ＭＰＥＫ　２８／３／１２）；１４（－）；１５（ＭＩＬ－３８　ｐｒｅｐ　１「オリジナル」）；１６（ＭＩＬ－３８　ｐｒｅｐ　４０Ａ）；１７（ＭＩＬ－３８　ｐｒｅｐ　３７Ａ）；１８（ＭＷマーカー）。

【図２Ａ】インハウスハイブリドーマストック（ＡｕｓＭＡｂハイブリドーマ細胞クローン１）またはＡＴＣＣ由来のオリジナルＨＢ１１７８５ハイブリドーマストックから再クローニングさせた細胞（ＡｕｓＭＡｂハイブリドーマライン３、４および５）を起源とするＭＩＬ－３８抗体調製物のインハウスＭＩＬ－３８抗体調製物３３Ａとの比較を示す。図２ＡはＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動による、各抗体調製物における重および軽鎖構成要素の分離を示す；レーン：１（Ｍａｇｉｃ　Ｍａｒｋｅｒ）；２（ＡｕｓＭａｂ１）；３（ＡｕｓＭａｂ３）；４（ＡｕｓＭａｂ４）；５（ＡｕｓＭａｂ５）；６（ＭＩＬ－３８ｐｒｅｐ　３３Ａ）；７（Ｓｅｅ　Ｂｌｕｅ　Ｐｌｕｓ２）。

【図２Ｂ】インハウスハイブリドーマストック（ＡｕｓＭＡｂハイブリドーマ細胞クローン１）またはＡＴＣＣ由来のオリジナルＨＢ１１７８５ハイブリドーマストックから再クローニングさせた細胞（ＡｕｓＭＡｂハイブリドーマライン３、４および５）を起源とするＭＩＬ－３８抗体調製物のインハウスＭＩＬ－３８抗体調製物３３Ａとの比較を示す。図２ＢはＤＵ－１４５およびＣ３細胞株由来の抽出物に対する様々な調製物由来のＭＩＬ－３８抗体を用いたウエスタンブロット分析の結果を示す。

【図３Ａ】インハウスで作製され、保存された様々なＭＩＬ－３８抗体調製物の比較を示す（１６Ａ、１６Ｂ、１６Ｃ、１７Ｂ、２３Ａ－１、２３Ａ－２、２４Ａ、２５Ａ、２５Ｂ、２６Ｂ、３０Ａ、３１Ａ、３１Ｂ、３１Ｃ、３１Ｄ、３２Ｂ、３２Ｃ、３３Ａ、３３Ｂ、３３Ｃ、３３Ｄ、３４Ａ、３４Ｂ、３５Ａ、３５Ｃ、３５Ｄ、４０Ａ、４０Ｂ、ＡＭ－３、ＡＭ－４）。図３Ａは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動による、各ＭＩＬ－３８抗体調製物における重および軽鎖構成要素の分離を示す。

【図３Ｂ】インハウスで作製され、保存された様々なＭＩＬ－３８抗体調製物の比較を示す（１６Ａ、１６Ｂ、１６Ｃ、１７Ｂ、２３Ａ－１、２３Ａ－２、２４Ａ、２５Ａ、２５Ｂ、２６Ｂ、３０Ａ、３１Ａ、３１Ｂ、３１Ｃ、３１Ｄ、３２Ｂ、３２Ｃ、３３Ａ、３３Ｂ、３３Ｃ、３３Ｄ、３４Ａ、３４Ｂ、３５Ａ、３５Ｃ、３５Ｄ、４０Ａ、４０Ｂ、ＡＭ－３、ＡＭ－４）。図３Ｂは、ＤＵ－１４５細胞抽出物に対する各調製物由来のＭＩＬ－３８抗体を用いたウエスタンブロット分析の結果を示す。

【図４Ａ】ＭＩＬ－３８抗体集団分析の結果を示す。図４Ａは、ＤＵ－１４５およびＣ３細胞由来の抽出物に対する、オリジナルＩＩＡ、Ａｌｆｉｏ　Ｉ、Ａｌｆｉｏ　ＩＩ、３６ＡおよびＡｕｓＭＡｂ４（ＡＭ－４）ＭＩＬ－３８抗体調製物を用いたウエスタンブロット分析の結果を示す。

【図４Ｂ】ＭＩＬ－３８抗体集団分析の結果を示す。図４Ｂは還元Ｓｙｐｒｏｇｅｌを示し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動による、ＭＩＬ－３８抗体調製物（オリジナルＩＩＡ、Ａｌｆｉｏ　Ｉ、Ａｌｆｉｏ　ＩＩ、３６ＡおよびＡｕｓＭＡｂ４（ＡＭ－４））の重および軽鎖構成要素の分離が証明される。オリジナルＩＩＡ＝ＡＴＣＣ受入番号ＨＢ１１７８５（マウスハイブリドーマＢＬＣＡ－３８）のストックに由来するインハウス調製物；Ａｌｆｉｏ　Ｉ＝ＡＴＣＣ受入番号ＨＢ１１７８５に由来する混合ＭＩＬ－３８抗体集団；Ａｌｆｉｏ　ＩＩ＝ＡＴＣＣ受入番号ＨＢ１１７８５の混合集団に由来する単一抗体集団。

【図５Ａ】ＭＩＬ－３８抗体の様々な調製物を用いた免疫蛍光アッセイからの画像を示す。具体的には、図５ＡはＤＵ－１４５細胞についてＭＩＬ－３８抗体の様々な調製物を用いた免疫蛍光アッセイからの画像を示す。パートＡ、Ｄ、Ｇ、ＪおよびＭは染色された細胞の明視野画像を示し；パートＢ（ＡＭ－４）、Ｅ（Ａｌｆｉｏ　Ｉ）、Ｈ（Ａｌｆｉｏ　ＩＩ）、およびＫ（オリジナルＩＩＡ）はＭＩＬ－３８抗体調製物のＤＵ１４５細胞への結合を示し；パートＮはＤＵ－１４５細胞のための二次抗体対照を示す；パートＣ、Ｆ、Ｉ、ＬおよびＯは細胞のＤＡＰＩ染色を示す。

【図５Ｂ】ＭＩＬ－３８抗体の様々な調製物を用いた免疫蛍光アッセイからの画像を示す。具体的には、図５ＢはＣ３細胞についてＭＩＬ－３８抗体の様々な調製物を使用した免疫蛍光アッセイからの画像を示す。パートＡ、Ｄ、Ｇ、ＪおよびＭは染色された細胞の明視野画像を示し；パートＢ（ＡＭ－４）、Ｅ（Ａｌｆｉｏ　Ｉ）、Ｈ（Ａｌｆｉｏ　ＩＩ）、およびＫ（オリジナルＩＩａ）はＭＩＬ－３８抗体調製物のＣ３細胞への結合を示し

；パートＮはＣ３細胞のための二次抗体対照を示し；パートＣ、Ｆ、Ｉ、ＬおよびＯは細胞のＤＡＰＩ染色を示す。
【図６Ａ】異なる抗体調製物を捕捉抗体として使用して実施した比較サンドイッチＥＬＩＳＡの結果を示す。図６Ａは捕捉抗体としてＡＭ－３およびＡＭ－４を使用した比較サンドイッチＥＬＩＳＡを示す。
【図６Ｂ】異なる抗体調製物を捕捉抗体として使用して実施した比較サンドイッチＥＬＩＳＡの結果を示す。図６Ｂは混合調製物（３４Ａ）またはクローン集団（ＡＭ－４１Ｆ５）のいずれかを捕捉抗体として使用する比較サンドイッチＥＬＩＳＡを示す。
【図７】キメラＭＩＬ－３８抗体のＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図７Ａ）およびウエスタンブロット（図７Ｂ）分析を示す。レーンＭ＝タンパク質マーカー；レーン１＝還元条件；レーン２＝非還元条件；レーンＰ＝陽性対照としてのヒトＩｇＧ１、κ（Ｓｉｇｍａ、Ｃａｔ．Ｎｏ１５１５４）。
【図８】キメラＭＩＬ－３８抗体および対照をＤＵ－１４５細胞について使用した免疫蛍光アッセイからの画像を示す。図８Ａ－Ｄは染色された細胞の明視野およびＤＡＰＩ画像を合わせたものを示す。図８Ｅ－Ｈは、ＤＵ－１４５細胞のＭＩＬ－３８　ｐｒｅｐ　３３Ａ（８Ｅ、陽性対照）、キメラＭＩＬ－３８（８Ｆ）、セツキシマブ（８Ｇ、ヒトＩｇＧ１ｋに対する陽性対照）、および陰性対照（８Ｈ、ｎｏ１　抗体）を用いた染色を示す。
【図９】キメラＭＩＬ－３８抗体のウエスタンブロット分析を示す。図９Ａは、マウスＭＩＬ－３８のＤＵ－１４５　ＭＰＥＫ抽出物、Ｃ３　ＭＰＥＫ抽出物およびＮＳ０産生組換えＧＰＣ－１抗原との反応性を示す。図９ＢはキメラＭＩＬ－３８のＤＵ－１４５　ＭＰＥＫ抽出物、Ｃ３　ＭＰＥＫ抽出物およびＮＳ０産生組換えＧＰＣ－１抗原との反応性を示す。図９Ｃはマウスの、ＭＩＬ－３８、ＤＵ－１４５　ＭＰＥＫ抽出物、Ｃ３　ＭＰＥＫ抽出物およびＮＳ０産生組換えＧＰＣ－１抗原との、図９Ｂと等しい条件下での反応性を示す。
【発明を実施するための形態】
【０１１１】
定義
本出願では、単数形「１つの（ａ、ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、文脈で明確に別記されない限り、複数の言及物を含む。例えば、「１つの抗体」という句はまた、複数の抗体を含む。
【０１１２】
本明細書では、「含んでいる」という用語は「含有している」ことを意味する。「含んでいる」という単語の変形、例えば「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ、ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」は、それに応じて様々な意味を有する。よって、例えば、抗体Ａ「を含む」試料は、排他的に、抗体Ａから構成されてもよく、または１つ以上の追加の構成要素（例えば抗体Ｂ）を含んでもよい。
【０１１３】
本明細書では「複数」という用語は１超を意味する。ある一定の特定の態様または実施形態では、複数は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、またはそれ以上、およびその中で誘導可能な任意の整数、およびその中で誘導可能な任意の範囲を意味することができる。
【０１１４】
本明細書では、「抗体（ａｎｔｉｂｏｄｙおよびａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）」という用語は、ＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４を含む）、ＩｇＡ（ＩｇＡ１およびＩｇＡ２を含む）、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、およびＩｇＹ、全抗体、例えば単鎖全抗体、およびその抗原結合性フラグメントを含む。抗原結合性抗体フラグメントとし

ては、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ’）２、Ｆｄ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、単鎖抗体、ジスルフィド架橋Ｆｖ（ｓｄＦｖ）およびＶＬまたはＶＨドメインのいずれかを含むフラグメントが挙げられるが、それらに限定されない。抗体は、任意の動物起源または適切な産生宿主由来であってもよい。抗原結合性抗体フラグメント、例えば単鎖抗体は、可変領域（複数可）を単独で、または下記の全体または一部と組み合わせて含み得る：ヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメイン。可変領域（複数可）およびヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメインの任意の組み合わせもまた、含まれる。抗体はモノクローナル、ポリクローナル、キメラ、多特異性、ヒト化、およびヒトモノクローナルおよびポリクローナル抗体（生体分子に特異的に結合する）であってもよい。抗体は、二特異性抗体、アビボディ、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ、ナノボディ、シングルドメイン抗体、ＶＨＨドメイン、ヒト抗体、完全ヒト化抗体、部分ヒト化抗体、アンチカリン、アドネクチン、またはアフィボディであってもよい。

【０１１５】

本明細書では「モノクローナル抗体」という用語は、単一の抗原エピトープを認識する、かつ、同じ抗原エピトープに特異的に結合し、同一であるが、自然発生突然変異（複数可）が少量存在し得る例外の可能性がある、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を示す。

【０１１６】

本明細書では、「ヒト化抗体」という用語は、ヒト抗体ならびに非ヒト抗体（例えばマウス抗体）由来の配列を含む抗体の形態を示す。例えば、ヒト化抗体は少なくとも１つの、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含むことができ、ここで、超可変ループの全て／実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、ＦＲ領域の全て／実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列に由来する。ヒト化抗体はまた、任意で、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部分を含むことができ、これは典型的には、ヒト免疫グロブリンのものであってもよい。

【０１１７】

本明細書では、「キメラ抗体」という用語は、所望の生物活性を示し、軽鎖および／または重鎖の一部が、ある／特定の種に由来する抗体中の対応する配列と同一であり、または相同であるが、残りの鎖（複数可）が別の異なる種に由来する抗体中の対応する配列と同一であり、または相同である抗体を示す。例えば、キメラ抗体は、第１の種に由来する可変領域を含み、第２の種に由来する定常領域を含み得る。キメラ抗体は、例えば、遺伝子操作により、異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから構築させることができる。

【０１１８】

本明細書では、「ハイブリドーマ」という用語は、不死細胞（例えば、多発性骨髄腫細胞）および抗体産生細胞（例えば、Ｂリンパ球）の融合により生成される細胞を示し、これは、単一結合特異性のモノクローナル抗体を産生することができる。

【０１１９】

本明細書では、抗体、抗体バリアント、抗体誘導体、抗原結合性フラグメント、などに関連した、「特異的に結合する」および「特異的に結合している」という用語は、ある標的分子に、他の非標的分子よりも優先的に結合するその能力を示す。例えば、抗体、抗体バリアント、抗体誘導体、または抗原結合性フラグメント（「分子Ａ」）がある標的分子（「分子Ｂ」）に「特異的に結合する」または「特異的に結合している」ことが可能である場合、分子Ａは、分子Ｂと任意の他の数の潜在的な別の結合パートナー間で区別する能力を有する。したがって、複数の異なるが、潜在的結合パートナーとして等しくアクセス可能な分子に曝露されると、分子Ａは分子Ｂに選択的に結合し、他の別の潜在的結合パートナーは分子Ａにより実質的に結合されていないままである。一般に、分子Ａは、他の潜在的結合パートナーよりも、少なくとも１０倍、好ましくは５０倍、より好ましくは１００倍、最も好ましくは１００倍超、より頻繁に分子Ｂに優先的に結合する。分子Ａは、分子Ｂではない分子に、弱いが、検出可能なレベルで結合することができ得る。これは、バ

ックグラウンド結合として一般に知られており、例えば、適切な対照の使用により、分子Ｂ－特異的結合とは容易に識別可能である。

【０１２０】

本明細書では、「被験体」という用語は、経済的、社会的、または研究的重要性を有する任意の動物を含み、ウシ、ウマ、ヒツジ、霊長類、トリおよび齧歯類種が挙げられる。よって、「被験体」は、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳類などの哺乳類であってもよい。

【０１２１】

本明細書では、生体分子（例えば、抗体）に関連した「単離された」という用語は、天然に起こる成分の少なくともいくらかを含まない生体分子である。

【０１２２】

本明細書では、「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語はそれぞれ、ペプチド結合により一緒に連結されたアミノ酸から構成されるポリマを示し、同じ意味で使用される。本発明の目的のためには、「ポリペプチド」は全長タンパク質または全長タンパク質の一部を構築し得る。

【０１２３】

本明細書では、「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチド塩基、リボヌクレオチド塩基、公知の類似体または天然ヌクレオチド、またはそれらの混合物の一本鎖または二本鎖ポリマを示す。

【０１２４】

本明細書では、「キット」という用語は、材料を送達するための任意の送達系を示す。そのような送達系は、１つの場所から別の場所への、反応試薬（例えば、適切な容器内の標識、標準試料、支持材料、など）および／または支持材料（例えば、バッファー、アッセイを実施するための書かれた説明書など）の保存、輸送、または送達を可能にする系を含む。例えば、キットは、関連する反応試薬および／または支持材料を含む１つ以上のエンクロージャ、例えば箱を含み得る。「キット」という用語は、フラグメント化および組み合わせキットの両方を含む。「フラグメント化キット」は、各々が全キット構成要素の一部分を含む、２つ以上の別々の容器を含む送達系を示す。容器は対象レシピエントに一緒にまたは別々に送達され得る。各々が全キット構成要素のサブ部分を含む２つ以上別々の容器を含む任意の送達系は、「フラグメント化キット」という用語の意味の範囲内に含まれる。「組み合わせキット」は、単一容器内（例えば、所望の構成要素の各々を収容する単一箱内）に反応アッセイの構成要素を全て含む送達系を示す。

【０１２５】

数値の範囲に言及する場合の本明細書における「の間」という用語の使用は、範囲の各終点の数値を包含することが理解されるであろう。例えば、１０残基と２０残基の長さの間のポリペプチドは、１０残基の長さのポリペプチドおよび２０残基の長さのポリペプチドを含む。

【０１２６】

本明細書における先行技術文書の任意の記載、またはそれらの文書から導き出される、もしくはそれらに基づく本明細書における記述は、文書または導き出される記述が関連する技術分野の普通の一般的な知識の一部であることを認めるものではない。説明目的で、本明細書で言及される全ての文書は、別記されない限り、これにより、それらの全体が参照により組み込まれる。

【０１２７】

詳細な説明

前立腺癌などの様々な形態の癌を診断および／または治療するためのより有効な方法および作用物質が必要とされ続けている。抗体は癌のための有用な診断および治療薬であり、血液系腫瘍および固形腫瘍を有する患者を診断および治療するための成功した重要なツールとなっている。腫瘍特異抗原を標的にする新しい関連抗体の同定は、癌患者のための診断および／または治療成績を改善する１つの可能性のある手段を提供する。これらの成績を増強させることができる別の手段は、既存の抗体に基づく診断法および／または療法

の改善によるものである。

【０１２８】

「ＢＬＣＡ－３８抗体」は、癌、例えば膀胱および前立腺癌の診断および／または治療における前の研究の対象であった。先行技術では、「ＢＬＣＡ－３８抗体」は常に、およそ３０ｋＤａのサイズの未知の抗原を標的にするマウスモノクローナル抗体として言及される[1－5]。本発明者らは、驚いたことに、先行技術において開示され使用されるＢＬＣＡ－３８抗体は、前に示された単一のモノクローナル抗体集団ではなく、代わりに、混合集団中の２つの別々のモノクローナル抗体の組み合わせであることを確認した。これは、ＢＬＣＡ－３８抗体を作製させるために使用されるハイブリドーマ（その代表的な試料はアメリカン組織タイプカルチャーコレクションで受入番号ＨＢ１１７８５で寄託されている）はハイブリドーマ細胞のバイクローナル（モノクローナルではない）集団（２つの別個の抗体種の混合物を産生する）であるという本発明者らの決定に起因する。これらの抗体種のうちの１つのみが、前立腺癌細胞上の関連する抗原に結合することができ、一方、第２の種はできない。その上、この抗体が結合した抗原は、先行技術[3－4]で示される３０ｋＤａよりも著しく大きい。

【０１２９】

これらの予想外の所見は、標的抗原に対してのみ結合特異性を有する抗体の単一集団を産生することができるモノクローナルハイブリドーマの作製を促進した。無効の抗体（すなわち、先行技術の混合集団中に存在する第２のモノクローナル抗体集団）の不必要な産生および適用を回避することとは別に、本発明によるモノクローナルハイブリドーマ／単一抗体は、等量の抗体が使用された場合、先行技術の混合集団と比べ、より強いシグナルを提供する。

【０１３０】

したがって、本発明のある一定の実施形態はクローンハイブリドーマ細胞に由来するモノクローナル抗体集団の提供に関し、抗体集団の各メンバーは、ある一定の癌細胞（例えば膀胱および前立腺癌細胞）上に存在する抗原に特異的に結合することができる。本発明はまた、これらの抗体の抗原結合性フラグメント、ならびに同じ結合特異性を維持する抗体の誘導体およびバリアントを提供する。

【０１３１】

本発明の抗体を産生することができるハイブリドーマもまた、提供される。そのようなハイブリドーマの１つの例はブダペスト条約の条項の下、オーストラリア細胞バンク、２１４　Ｈａｗｋｅｓｂｕｒｙ　Ｒｏａｄ、Ｗｅｓｔｍｅａｄ、ＮＳＷ　２１４５、オーストラリアで、２０１４年８月２２日に、受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて、寄託された。

【０１３２】

本発明の抗体を産生および／または単離するための方法、および抗体を利用する検出／診断の方法がさらに提供される。

【０１３３】

モノクローナル抗体

本発明は、モノクローナル抗体、そのような抗体の誘導体、およびその抗原結合性フラグメントを提供する。

【０１３４】

モノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、グリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在する抗原エピトープに特異的に結合することができる。ＧＰＣ－１タンパク質はヒトグリピカン－１タンパク質であってもよい（例えば、下記のいずれか一つに明記される配列により規定される：ＮＣＢＩ参照配列受入番号ＮＰ＿００２０７２．２、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＡＨ５１２７９．１、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＡＡ９８１３２．１、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＥＡＷ７１１８４．１、またはＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ受入番号Ｐ３５０５２．２）。いくつかの実施形態では、ＧＰＣ－１タンパク質は、シグナルペプチドおよび／

またはプロペプチドを含まなくてもよい。加えてまたはその代わりに、モノクローナル抗体、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、ＧＰＣ－１バリアント（例えば、ＧＰＣ－１アイソフォーム、スプライスバリアント、またはアロタイプ）中に存在する抗原エピトープに特異的に結合することができ得る。

【０１３５】

非限定的例として、モノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、重鎖および／または軽鎖、それらの組み合わせ、またはその構成要素（複数可）を含み得る。

【０１３６】

重鎖またはその構成要素（複数可）は、１、２、または３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、および／またはＣＤＲ３）を含み、重鎖超可変（ＨＶ）領域としても当技術分野で知られている重鎖可変領域を含み得る。重鎖ＣＤＲ１は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基５０－５４により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。重鎖ＣＤＲ２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基６９－８５により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。重鎖ＣＤＲ３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基１１８－１２６により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。

【０１３７】

加えてまたはその代わりに、重鎖可変領域は、１、２、３、または４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、および／またはＦＲ４）を含み得る。重鎖ＦＲ１は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基２０－４９により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。重鎖ＦＲ２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基５５－６８により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。重鎖ＦＲ３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基８６－１１７により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。重鎖ＦＲ４は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基１２７－１３７により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。

【０１３８】

加えてまたはその代わりに、重鎖可変領域は、リーダー配列を含み得る。重鎖リーダー配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基１－１９により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。当業者であれば、リーダー配列はシグナル配列であり、これは、新たに合成された重鎖の小胞体中への輸送を促進し、一般にモノクローナル抗体の最終構築形態の重鎖中には存在しないことを認識するであろう。

【０１３９】

加えてまたはその代わりに、軽鎖またはその構成要素（複数可）は、軽鎖超可変（ＨＶ）領域としても当技術分野で知られている、１、２、または３つの相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３）を含む軽鎖可変領域を含み得る。軽鎖ＣＤＲ１は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基４４－５４により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。軽鎖ＣＤＲ２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基７０－７６により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。軽鎖ＣＤＲ３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基１０９－１１７により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。

【０１４０】

加えてまたはその代わりに、軽鎖可変領域は、１、２、３、または４つのフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、ＦＲ４）を含み得る。軽鎖ＦＲ１は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基２１－４３により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。軽鎖ＦＲ２は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基５５－６９により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。軽鎖ＦＲ３は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基７７－１０８により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。軽鎖ＦＲ４は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基１１８－１２７により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。

【０１４１】
加えてまたはその代わりに、軽鎖可変領域は、リーダー配列を含み得る。軽鎖リーダー配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基１－２０により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。当業者であれば、リーダー配列はシグナル配列であり、これは、新たに合成された軽鎖の小胞体中への輸送を促進し、一般にモノクローナル抗体の最終構築形態の軽鎖中には存在しないことを認識するであろう。
【０１４２】
加えてまたはその代わりに、重鎖は、１、２、または３つの重鎖定常領域を含み得る。重鎖定常領域は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基１３８－４６１により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。
【０１４３】
加えてまたはその代わりに、軽鎖は、軽鎖定常領域を含み得る。軽鎖定常領域は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基１２８－２３４により規定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。
【０１４４】
いくつかの実施形態では、本発明によるモノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基２０－１３７により規定されるアミノ酸配列を含む、またはこれから構成される重鎖可変領域を含み得る。モノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、１つまたは２つの重鎖可変領域を含み得る。
【０１４５】
いくつかの実施形態では、本発明によるモノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基２１－１２７により規定されるアミノ酸配列を含む、またはこれから構成される軽鎖可変領域を含み得る。モノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、１つまたは２つの軽鎖可変領域を含み得る。
【０１４６】
いくつかの実施形態では、本発明によるモノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基２０－１３７を含む、またはこれから構成される重鎖可変領域、および、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基２１－１２７を含む、またはこれから構成される軽鎖可変領域を含み得る。モノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、２つの重鎖可変領域および２つの軽鎖可変領域の組み合わせを含み得る。
【０１４７】
いくつかの実施形態では、本発明によるモノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基２０－４６１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される重鎖を含み得る。モノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、１つまたは２つの重鎖を含み得る。
【０１４８】
いくつかの実施形態では、本発明によるモノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基２１－２３４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される軽鎖を含み得る。モノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、１つまたは２つの軽鎖を含み得る。
【０１４９】
いくつかの実施形態では、本発明によるモノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基２０－４６１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される重鎖、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基２１－２３４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される軽

鎖を含み得る。モノクローナル抗体、バリアント、誘導体、および抗原結合性フラグメントは、２つの重鎖および２つの軽鎖の組み合わせを含み、またはこれから構成され得る。

【０１５０】

本発明による、モノクローナル抗体、そのような抗体のバリアントおよび誘導体、ならびにその抗原結合性フラグメントは、任意の特定のアイソタイプに制限されず、よって、ＩｇＡ（ＩｇＡ１またはＩｇＡ２）、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）、またはＩｇＭアイソタイプであってもよい。いくつかの実施形態では、それらはＩｇＧ１アイソタイプである。

【０１５１】

ブダペスト条約の条項の下、２１４Ｈａｗｋｅｓｂｕｒｙ　Ｒｏａｄ、Ｗｅｓｔｍｅａｄ　ＮＳＷ２１４５、オーストラリアのオーストラリア細胞バンクで２０１４年８月２２日に受入番号ＣＢＡ２０１４００２６下にて提出されたハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体は、本発明の範囲内に含まれる。ハイブリドーマは、グリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに特異的な結合を有する単一抗体種を産生するクローン集団である。

【０１５２】

抗体フラグメント、誘導体およびバリアント

本明細書で記載される抗体の「フラグメント」は、本発明の範囲内に含まれる。一般に、フラグメントは、それらが誘導され、または基にする親抗体と同じ抗原／エピトープ（例えばＧＰＣ－１）に特異的に結合することができるという意味では、「抗原結合性フラグメント」である。典型的には、抗原結合性フラグメントは、親抗体の抗原／エピトープ結合能の少なくとも１０％、または、親抗体の抗原／エピトープ結合能の少なくとも２５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％もしくは１００％（またはそれ以上）を保持する。本明細書で記載される抗体の抗原結合性フラグメントは、その抗原／エピトープ結合特異性／能力を実質的に変化させない（例えば、その抗原／エピトープ結合特異性／能力の少なくとも７０％、８０％、９０％、９５％、９９％もしくは１００％（またはそれ以上）が保持され得る）保存的アミノ酸置換を含み得ることも企図される。

【０１５３】

抗原結合性フラグメントの非限定的な例としては、全長抗体の一部、そのペプチドおよび誘導体、例として、例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆ（ａｂ）$_3$、Ｆｖ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、ｄｓＦｖ、Ｆｄフラグメント、ｄＡＢフラグメントＦｓｅ、ＶＨ、ＶＬ、ＶｈＨ、およびＶ－ＮＡＲドメイン、パラトープ、ＣＤＲ領域、単鎖抗体分子（例えばｓｃ－Ｆｖ）、ミニボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、カッパボディ、直鎖抗体、多重特異性抗体、抗体フラグメントから形成されたドメイン抗体、抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体フラグメント、および関連する抗原／エピトープ（例えばＧＰＣ－１）に特異的に結合することができる抗体の任意の部分またはペプチド配列が挙げられる。

【０１５４】

本明細書で記載される抗体の「誘導体」もまた本発明の範囲内に含まれる。本発明の抗体の「誘導体」は、追加の構成要素を組み入れるまたは既存の構成要素（複数可）を変化させるように修飾されるが、これが誘導される親抗体と同じ抗原／エピトープ（例えばＧＰＣ－１）に依然として特異的に結合することができる、本明細書で記載される抗体を示す。典型的には、本明細書で企図される抗体誘導体は、親抗体の抗原／エピトープ結合能の少なくとも１０％、または、親抗体の抗原／エピトープ結合能の少なくとも２５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％もしくは１００％（またはそれ以上）を保持する。

【０１５５】

抗体誘導体を形成させるのに好適な修飾の非限定的な例としては、アミド化、グリコシル化、リン酸化、ペグ化、細胞リガンドまたは他のタンパク質への結合、公知の保護／ブ

ロッキング基による誘導体化、アセチル化、などが挙げられる。加えてまたはその代わりに、誘導体は１つ以上の非古典的アミノ酸を含み得る。

【０１５６】

抗体誘導体としては標識抗体、例として、例えば、放射性ヨウ素、インジウム、硫黄、炭素、トリチウムなどで標識されたモノクローナル抗体；アビジンまたはビオチンとコンジュゲートされたモノクローナル抗体、酵素（例えば西洋ワサビ、グルコース６－リン酸デヒドロゲナーゼグルコースオキシダーゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カルボン酸アンヒドラーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、リゾチーム、またはペルオキシダーゼ）とコンジュゲートされたモノクローナル抗体、ならびに化学発光剤（例えばアクリジンエステル）、生物発光剤（例えばルシフェラーゼ）、または蛍光剤（例えば、フィコビリンタンパク質）とコンジュゲートされたモノクローナル抗体が挙げられる。抗体誘導体のさらなる例としては、二機能性抗体、例えば、２つの異なる抗原基を認識する２つの別々の抗体の部分を組み合わせることにより（例えば、組換え技術または架橋により）作製される二重特異性抗体が挙げられる。

【０１５７】

抗体誘導体は、本明細書で記載される抗体の共有結合的修飾から、例えば、抗体の標的アミノ酸残基を、選択された側鎖または末端残基と反応することができる作用物質と反応させることにより形成させることができる。例えば、二機能性剤による誘導体化は、抗体またはそのフラグメントを巨大分子担体、例えば水－不溶性支持体マトリクスに架橋させるための有用な手段である。本明細書で企図される抗体誘導体は、その半減期をインビボで増加させる（例えば、血流からのクリアランス前の時間の長さを延長させる）ことができる、ベース抗体またはそのフラグメントに付着された作用物質を有し得る。そのような技術の非限定的な例としては、ＰＥＧ部分の付加が挙げられる。

【０１５８】

ある一定の実施形態では、抗体誘導体は、１つ以上のモノマを含む多量体、例えば、例として、二量体であってもよく、各モノマは、（ｉ）本明細書で記載される抗ＧＰＣ－１抗体の抗原結合領域、または（例えば、例として、１つ以上のアミノ酸（複数可）の保存的置換により）それから誘導されるポリペプチド領域、および（ｉｉ）多量体化（例えば二量体化）ポリペプチド領域を含み、そのため抗体誘導体は、ＧＰＣ－１に特異的に結合する多量体（例えばホモ二量体）を形成する。例えば、本明細書で記載される抗ＧＰＣ－１抗体の抗原結合領域、またはそれから誘導されるポリペプチド領域は、異種タンパク質と組換えでまたは化学的に融合させることができ、ここで、異種タンパク質は二量体化または多量体化ドメインを含む。誘導体はホモ二量体またはヘテロ二量体の形成を可能にする条件に供せられ得る。ヘテロ二量体は、同一の二量体化ドメインだが異なる抗ＧＰＣ－１抗原結合領域、同一の抗ＧＰＣ－１抗原結合領域だが異なる二量体化ドメイン、または異なる抗ＧＰＣ－１抗原結合領域および異なる二量体化ドメインを含み得る。好適な二量体化ドメインとしては、転写因子（例えば、塩基性ロイシンジッパー）、塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックスタンパク質、および免疫グロブリン定常領域（例えば重鎖定常領域またはそのドメイン、例えばＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、またはＣＨ３ドメイン）を起源とするものが挙げられる。

【０１５９】

他の実施形態では、抗体誘導体は、第２の抗体にコンジュゲートされた本明細書で記載される抗ＧＰＣ１抗体であってもよい（「抗体ヘテロコンジュゲート」）。

【０１６０】

本明細書で記載される抗体のヒト化誘導体もまた、本明細書で企図される。本明細書で企図される「ヒト化」抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むヒト／非ヒトキメラ抗体である。例えば、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であってもよく、この場合、レシピエントのＣＤＲ領域（複数可）からの残基は、非ヒト種（ドナー抗体）（例えば、ＧＰＣ－１抗原／エピトープに対して所望の特異性および親

和性を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類）のＣＤＲ領域からの残基により置換される。ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（ＦＲ）残基もまた、（任意で）対応する非ヒト残基により置換され得、場合によっては、ヒト化抗体は、抗体性能を増強させるために、レシピエント抗体またはドナー抗体において存在しない残基を含み得る。

【０１６１】

「キメラ」抗体誘導体が本明細書でさらに企図され、この場合、重および／または軽鎖の一部が特定の種に由来する、または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する本明細書で記載される抗体の対応する配列と同一または相同であるが、鎖（複数可）の残りは、別の異なる種に由来する、または別の異なる抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同である。例えば、本明細書で企図されるキメラ抗体は、本明細書で記載される抗ＧＰＣ－１モノクローナル抗体に由来する可変領域、および第２の種に由来する定常領域を含み得る。キメラ抗体は、例えば、異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントの遺伝子操作により、作製され得る。

【０１６２】

非限定的例にすぎないが、本発明によるキメラ抗体は、キメラマウスヒトＣＨ１－ＣＨ３鎖配列マウスＶＨ－ヒトＣＨ１－ＣＨ３鎖（重鎖）および／またはマウスヒトカッパ鎖配列マウスＶＫ－ヒトＣＫ配列ＭＩＬ－３８マウスＶＫ（軽鎖）を含み得る。キメラ抗体の重鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の残基２０－４６７において設定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。キメラ抗体の軽鎖は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の残基２１－２３４において設定されるアミノ酸配列を含み、またはこれから構成され得る。重鎖可変領域は、下記を含み得る：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の位置５０－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；ならびに／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の位置６９－８５により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；ならびに／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の位置１１８－１２６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。加えてまたはその代わりに、軽鎖可変領域は、下記を含み得る：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の位置４４－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；ならびに／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の位置７０－７６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；ならびに／またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の位置１０９－１１７により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。本発明によるキメラ抗体はこのキメラ抗体の「バリアント」であってもよい。

【０１６３】

本明細書で記載される抗体の「バリアント」は本発明の範囲内に含まれる。「バリアント」抗体は、「親」抗ＧＰＣ－１抗体アミノ酸配列とは、親抗体配列における１つ以上のアミノ酸残基（複数可）の付加、欠失、および／または置換のために、アミノ酸配列が異なる抗体を示す。例えば、バリアント抗体は、親抗体の１つ以上のＣＤＲおよび／またはフレームワーク領域（複数可）における１つ以上のアミノ酸置換（複数可）（例えば、親抗体の１つ以上の重および／または軽鎖ＣＤＲおよび／またはフレームワーク領域における１～１０、２～５、または１、２、３、４、もしくは５つの置換）を含み得る。抗体バリアントは、親抗体の対応する可変ドメインと少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９８％のアミノ酸配列相同性（すなわち配列同一性）を有する重鎖可変ドメイン配列および／または軽鎖可変ドメイン配列アミノ酸配列を含み得る。

【０１６４】

２つの配列間の配列相同性または同一性は本明細書では、必要に応じて、最大パーセント配列同一性を達成するために、配列を整列させ、ギャップを挿入した後、親抗体残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして規定される。互いに比較さ

れることになっている２つの配列の長さが異なる場合、配列同一性は、より長い配列のアミノ酸残基と同一である、より短い配列のアミノ酸残基のパーセンテージと関連する。配列同一性は従来、コンピュータプログラム、例えばＢｅｓｔｆｉｔプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ、Ｕｎｉｘのためのバージョン８、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｋ、５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．　５３７１１）および／またはプログラム「ｆａｓｔａ２０ｕ６６」（バージョン２．０ｕ６６、１９９８年９月、Ｗｉｌｌｉａｍ Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎおよび Ｖｉｒｇｉｎｉａ大学による；Ｗ．Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎ（１９９０），Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８３，６３－９８もまた参照されたい）の使用により決定することができる。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、本明細書で記載されるバリアント抗体は、可変抗体の配列における保存的アミノ酸変更（複数可）により、親抗体とは異なり得る。「保存的変更」は、親抗体と比べて、実質的に抗原的にまたは立体構造的に中性であり、バリアント抗体の三次構造において最小変化を生じさせ、またはバリアント抗体の抗原決定基において最小変化を生じさせる変化、誘導体を、親抗体と同じＧＰＣ－１中のエピトープに結合することができないようにしない変化を示す。保存的アミノ酸変更の非限定的な例としては、疎水性アミノ酸の置換および物理化学的に同様のアミノ酸の置換が挙げられる。当業者は、立体構造および抗原中立性を維持しながら、あるアミノ酸置換が可能であるかどうかをルーチン的にかつ難なく評価することができる（例えば、Ｂｅｒｚｏｆｓｋｙ，（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９：９３２－９４０；Ｂｏｗｉｅ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４７：１３０６－１３１０を参照されたい）。タンパク質高次構造における変化は、よく知られたアッセイ、例えば、限定はされないが、マイクロ補体結合方法（Ｗａｓｓｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．（１９６１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．８７：２９０－２９５；Ｌｅｖｉｎｅ ｅｔ ａｌ．（１９６７）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１１：９２８－９３６を参照されたい）を用いて、および高次構造依存モノクローナル抗体を用いた結合研究（Ｌｅｗｉｓ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｂｉｏｃｈｅｍ．２２：９４８－９５４を参照されたい）により達成され得る。保存的アミノ酸変更（複数可）は親抗体の１つ以上のＣＤＲおよび／またはフレームワーク領域（複数可）において起こり得る（例えば、親抗体の１つ以上のＣＤＲおよび／またはフレームワーク領域における１～１０、２～５、または１、２、３、４、もしくは５つの保存的置換）。

【０１６６】

一般に、本明細書で企図されるヒト化、キメラ、誘導体、フラグメントおよびバリアント抗体は依然として、それらが誘導され、またはそれらがその構成要素（複数可）を含む親抗体と同じ抗原／エピトープ（例えばＧＰＣ－１）に特異的に結合することができる。典型的には、それらは、親抗体の抗原／エピトープ結合能の少なくとも１０％、または、親抗体の抗原／エピトープ結合能の少なくとも２５％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％もしくは１００％（またはそれ以上）を保持し得る。例えば、それらは、親抗体と比べて、より強い結合親和性および／または結合特異性を有し得る。

【０１６７】

抗体フラグメント、誘導体、またはバリアントの、親抗体により標的にされる抗原／エピトープ（すなわちＧＰＣ－１抗原／エピトープ）に特異的に結合する能力は、例えば、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、免疫沈降アッセイ、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫拡散法アッセイ、沈降反応、プロテインＡイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、ゲル拡散沈降反応、補体結合アッセイ、免疫放射定量測定法、凝集アッセイ、などの技術を使用する競合的および非競合的アッセイシステムを含む当技術分野において知られている方法を使用して試験することができる（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，編，Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ

in Molecular Biology（John Wiley & Sons, Inc., New York, 第4版 1999）; Harlow & Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual（Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999）を参照されたい）。

【0168】

本明細書で記載される任意の抗体またはその抗原結合性フラグメント、例えば、限定はされないが、本明細書における特定の配列により規定される抗体（キメラ抗体を含む）および抗原結合性フラグメント、および本明細書で記載されるハイブリドーマ、例えば、ブダペスト条約の条項の下、214 Hawkesbury Road、Westmead NSW2145、オーストラリアのオーストラリア細胞バンクで2014年8月22日に受入番号CBA201400026下にて提出されたハイブリドーマにより産生される抗体のバリアントは本発明の範囲内に特定的に含まれる。

【0169】

ハイブリドーマ

本発明は、モノクローナル抗体、そのような抗体の誘導体およびバリアント、ならびにその抗原結合性フラグメントを産生することができるハイブリドーマ細胞を提供する。

【0170】

いくつかの実施形態では、ハイブリドーマは、「モノクローナル抗体」と題する上記セクションで設定されるモノクローナル抗体および／またはその抗原結合性フラグメントを産生することができる。

【0171】

いくつかの実施形態では、ハイブリドーマは、「抗体フラグメント、誘導体およびバリアント」と題する上記セクションで設定される、本明細書で記載されるモノクローナル抗体のフラグメント、誘導体および／またはバリアントを産生することができる。

【0172】

モノクローナル抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞を生成させるための技術は当技術分野でよく知られている。非限定的な例としては、ハイブリドーマ方法（Kohler and Milstein, （1975） Nature, 256：495－497; Coliganet al. section 2.5.1－2.6.7 in Methods In Molecular Biology（Humana Press 1992）;およびHarlow and LaneAntibodies: A Laboratory Manual, page 726（Cold Spring Harbor Pub. 1988）を参照されたい）、ヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV－ハイブリドーマ方法（Cole, et al. 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77－96を参照されたい）、ヒトB－細胞ハイブリドーマ技術（Kozboret al. 1983, Immunology Today 4：72を参照されたい）、およびトリオーマ（trioma）技術が挙げられる。

【0173】

手短に述べると、本発明のモノクローナル抗体は、対象となる免疫原（抗原）（すなわちGPC－1）を、例えば、腹腔内注射により、近交系または野生型マウス（例えばBALB／cまたはC57BL／6マウス）、ウサギ、ラット、もしくは他の動物種、または自然またはヒト抗体を産生することができるトランスジェニックマウスに投与することにより調製することができる。免疫応答を誘導するために、免疫原は、例えば、アジュバントと混合され、単独で投与され、ベクターにより発現され、DNAとして投与され、または融合タンパク質として投与され得る。動物は、例えば、少なくとも2回ブーストさせることができ、脾臓細胞がその後、免疫化された動物から回収され得る。ハイブリドーマは感作脾臓細胞を骨髄腫細胞株と融合させることにより作製することができる（例えば、マ

ウスＳＰ２／Ｏ骨髄腫細胞、例えば、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎおよびＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅにおいて設定される方法を用いて）。

【０１７４】

本発明によるＧＰＣ－１抗原コンストラクト（例えば、ＧＰＣ－１抗原コンストラクトを薬学的に許容される形態で含むワクチン組成物）は、適切な動物に反復投与で（例えば１－１５用量、２－１０用量、３－７用量、４－６用量）、適切な時間間隔の間（例えば、１－１０週、１－６週、１－４週、または２－３週）投与され得る。動物の免疫応答は、血清試料をブースティング後好適な時間（例えば、ブースティング後３－１０日、ブースティング後４－８日、ブースティング後５－６日）にとることによりモニタすることができ、その後、抗原コンストラクトの免疫原性が公知の技術を用いて（例えば、ＥＬＩＳＡにより）決定される。このようにな免疫化により、動物において免疫応答が得られ得る。治療力価を有する動物は一般に、ＥＬＩＳＡにより適切な希釈（例えば１：４０００～１：６０００、１：４５００～１：５５００、または１：５０００）で肯定的な結果を提供するものである。治療力価を有するものは、それらの抗体産生細胞（Ｂ－リンパ球）の連続再生／不死細胞株（例えば、骨髄腫細胞株）との融合のために選択することができる。細胞は、ポリエチレングリコールなどの適切な作用物質を用いて融合するように誘導することができる。得られたハイブリッド細胞はその後、従来通りにクローン化することができ（例えば、限界希釈を用いて）、作製されたクローンは、所望の抗ＧＰＣ－１モノクローナル抗体を培養中に産生する能力に対して試験することができる。ハイブリドーマは、細胞をヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン（ＨＡＴ）を含む選択培地に蒔くことにより化学的に選択することができる。ハイブリドーマは、モノクローナル抗体を産生する能力についてスクリーニングすることができ、陽性ハイブリドーマはその後、クローン化し、増殖させ、保存することができる。

【０１７５】

本発明の好ましい実施形態では、ハイブリドーマはＧＰＣ－１に特異的に結合することができる単一抗体種を産生することができるモノクローナル細胞集団である。そのようなモノクローナル抗体の非限定的な例は、「モノクローナル抗体」ならびに「抗体フラグメント、誘導体およびバリアント」と題する上記セクションで設定される。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、本発明によるハイブリドーマはブダペスト条約の条項の下、２１４Ｈａｗｋｅｓｂｕｒｙ Ｒｏａｄ Ｗｅｓｔｍｅａｄ ＮＳＷ ２１４５オーストラリアのオーストラリア細胞バンクで２０１４年８月２２日に受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて提出されたハイブリドーマであってもよい。本発明によるモノクローナル抗体を産生させるための、これらのハイブリドーマ細胞の培養および増殖のための方法は、当業者によく知られている。

【０１７７】

本発明のハイブリドーマ細胞を含む細胞培養物もまた、本明細書で企図される。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、細胞培養物は、ＧＰＣ－１に特異的に結合する一種類の抗体またはその抗原結合性フラグメントを産生することができる、単一（モノクローナル）種のハイブリドーマ細胞を含む。そのようなモノクローナル抗体の非限定的な例は、「モノクローナル抗体」ならびに「抗体フラグメント、誘導体およびバリアント」と題する上記セクションで設定される。単一（モノクローナル）種のハイブリドーマ細胞は、ブダペスト条約の条項の下、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託され得る。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、細胞培養物は複数種のハイブリドーマ細胞（すなわち混合ハイブリドーマ細胞集団）を含む。ハイブリドーマ細胞の混合集団は、ＧＰＣ－１に特異的に結合する一種類の抗体を産生することができる単一（モノクローナル）種のハイブリドーマ細胞を含み得る。そのようなモノクローナル抗体の非限定的な例は、「モノクローナ

ル抗体」ならびに「抗体フラグメント、誘導体およびバリアント」と題する上記セクションで設定される。単一（モノクローナル）種のハイブリドーマ細胞はブダペスト条約の条項の下、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託され得る。ハイブリドーマ細胞の混合集団は、ＡＴＣＣで受入番号ＨＢ１１７８５にて寄託されたハイブリドーマ細胞および／または下記を含む抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞を含まなくてもよい；

下記のいずれか１つ以上を含む軽鎖可変領域：

ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６の位置４８－５８により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；

ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６の位置７４－８０により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；

ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６の位置１１３－１２１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；

および／または

下記のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の軽鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）：ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６の残基２５－４７、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６の残基５９－７３、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６の残基８１－１１２、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６の残基１２２－１３１。

【０１８０】

抗体産生プロセス

モノクローナル抗体、その誘導体およびバリアント、およびその抗原結合性フラグメントの調製のためのプロセスは当業者により容易に入手でき、難なく実施することができる。

【０１８１】

Ｋｏｈｌｅｒら（１９７５）の、および上記「ハイブリドーマ」と題するセクションで記載されるハイブリドーマ方法とは別に、使用され得る別の非限定的プロセスは組換えＤＮＡ技術（例えば、米国特許第４８１６５６７号を参照されたい）である。例えば、モノクローナル抗体、その誘導体およびバリアント、およびその抗原結合性フラグメントは、任意の確立した発現系、例えば、限定はされないが、バキュロウイルス、酵母（例えばピキア（Ｐｉｃｈｉａ）種、サッカロマイセス種）大腸菌、哺乳類細胞、植物、またはトランスジェニック動物において組換えにより産生させることができる（Ｂｒｅｉｔｌｉｎｇ ａｎｄ Ｄｕｂｅｌ，１９９９，Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ，ｐｐ．１１９－１３２を参照されたい）。

【０１８２】

いくつかの実施形態では、本発明による、モノクローナル抗体、その誘導体およびバリアント、およびその抗原結合性フラグメントをコードする核酸配列は、組換えＤＮＡ技術に基づく産生プロセスにおいて使用され得る。非限定的な例は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１で規定される重鎖ポリヌクレオチド配列またはそのバリアントもしくはフラグメント、および／またはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２で規定される軽鎖ポリヌクレオチド配列またはそのバリアントもしくはフラグメントを含む。

【０１８３】

「バリアント」ポリヌクレオチドは、本明細書では、親または参照ポリヌクレオチドとは配列が異なるポリヌクレオチドを示す。ポリヌクレオチド配列相違は１つ以上のヌクレオチドの欠失、置換、または付加などの突然変異変化に起因する可能性がある。これらの変化の各々は、単独で、または組み合わせて、１回以上、ある配列において起こり得る。「バリアント」ポリヌクレオチドは、親または参照ポリヌクレオチドと実質的に同様の配列を有するポリヌクレオチドを示す。一般に、２つの配列は、２つの配列が同じであるヌクレオチドの特定のパーセンテージ（配列「相同性」または配列「一同性」のパーセンテージ）を有する場合、「実質的に同様」である。２つのポリヌクレオチド配列間の配列相

同性または同一性は、必要に応じて、最大パーセント配列同一性を達成するために、配列を整列させ、ギャップを挿入した後、親／参照ポリヌクレオチド配列と同一である、候補（「バリアント」）配列中のヌクレオチドのパーセンテージとして本明細書で規定される。互いに比較されることになっている２つの配列の長さが異なる場合、配列同一性は、より長い配列のヌクレオチドと同一である、より短い配列のヌクレオチドのパーセンテージと関連する。配列同一性は従来、コンピュータプログラム、例えばＢｅｓｔｆｉｔプログラム（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐａｃｋａｇｅ、Ｕｎｉｘのためのバージョン８、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｐａｒｋ、５７５ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｒｉｖｅ Ｍａｄｉｓｏｎ、Ｗｉｓ．　５３７１１）および／またはプログラム「ｆａｓｔａ２０ｕ６６」（バージョン２．０ｕ６６、１９９８年９月、Ｗｉｌｌｉａｍ Ｒ．　ＰｅａｒｓｏｎおよびＶｉｒｇｉｎｉａ大学による；Ｗ．　Ｒ．　Ｐｅａｒｓｏｎ　（１９９０），　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　１８３，　６３－９８もまた参照されたい）の使用により決定することができる。バリアントポリヌクレオチドと参照／親ポリヌクレオチド間の配列相同性／同一性の程度は、例えば、少なくとも７５％、８０％、８３％８５％、８８％、９０％、９３％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％であってもよい。

【０１８４】

ポリヌクレオチド「フラグメント」は、構成物をコードする、または大きな親／参照ポリヌクレオチドの構成物であるポリヌクレオチド分子である。一般に、フラグメントは、ＧＰＣ－１に特異的に結合することができる本発明の抗体のフラグメントをコードする。

【０１８５】

本発明により産生されるモノクローナル抗体、その誘導体およびバリアント、およびその抗原結合性フラグメントは、様々な起源から、適切な方法、例えば、限定はされないが、免疫グロブリン結合分子（例えば、プロテインＡ、Ｌ、ＧまたはＨ）、抗体または抗体フラグメントに作動的に連結されたタグ（例えば、Ｈｉｓ－ｔａｇ、ｃ－ｍｙｃタグ）、アフィニティークロマトグラフィー、などを用いて単離され得る。

【０１８６】

本明細書で記載されるモノクローナル抗体、その誘導体およびバリアント、およびその抗原結合性フラグメントは、例えば、「ハイブリドーマ」と題する上記セクションで記載されるものを含むハイブリドーマの単一または混合集団を含むハイブリドーマおよび／または細胞培養物により産生され、その後、公知の技術を用いて単離され得る。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、ブダペスト条約の条項の下、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託された単一（モノクローナル）種のハイブリドーマ細胞を培養することにより産生させ、培養物から単離することができる。

【０１８７】

ハイブリドーマ細胞株の調製および培養ならびに産生された抗体の単離のためのプロセスは当業者によく知られており、標準手順である。

【０１８８】

組成物およびキット

本発明によるモノクローナル抗体、その誘導体およびバリアント、およびその抗原結合性フラグメント、例えば、「モノクローナル抗体」ならびに「抗体フラグメント、誘導体およびバリアント」と題する上記セクションで記載されるものはキットおよび／または組成物（例えば医薬組成物）の構成要素として含まれ得る。

【０１８９】

非限定的例として、本発明のキットは、本発明による抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、キメラ抗体、またはハイブリドーマ細胞のいずれか１つ以上を、任意の組み合わせで含み得る。ハイブリドーマ細胞は、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託され得る。

【０１９０】

キットは加えて、任意の数の追加の構成要素、例えば、例として、細胞培養のための試薬、標準試料、バッファー、標識、およびキットの構成要素を使用して検出アッセイを実施するための書かれた説明書を含み得る。

【０１９１】

キットはフラグメント化または組み合わせキットであってもよい。

【０１９２】

本発明はまた、本発明による、抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、キメラ抗体、またはハイブリドーマ細胞のいずれか１つ以上を含む組成物を提供する。

【０１９３】

非限定的例として、本発明による組成物は、本発明による、抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、キメラ抗体、またはハイブリドーマ細胞のいずれか１つ以上を、任意の組み合わせで含み得る。ハイブリドーマ細胞は、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託され得る。

【０１９４】

組成物は医薬組成物であってもよい。医薬組成物は、当業者に知られている、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤および／または担体を含み得る。医薬組成物を調製するために、含まれるべき構成要素（複数可）が薬学的に許容される希釈剤、担体および／または賦形剤と共に混合され得る（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ａｎｄ Ｕ．Ｓ． Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａ：Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｆｏｒｍｕｌａｒｙ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．（１９８４）を参照されたい）。治療薬および診断薬の製剤は、生理的に許容される担体、賦形剤、または安定剤と、例えば、水溶液または懸濁液、凍結乾燥粉末、スラリーの形態で混合することにより調製され得る（Ｇｅｎｎａｒｏ（２０００）Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ，ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．；Ｗｅｉｎｅｒ ａｎｄ Ｋｏｔｋｏｓｋｉｅ（２０００）Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔ Ｔｏｘｉｃｉｔｙ ａｎｄ Ｓａｆｅｔｙ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．；Ａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．（編）（１９９３）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ Ｍｅｄｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，ＮＹ；Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，ｅｔ ａｌ．（編）（１９９０）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｔａｂｌｅｔｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，ＮＹ；Ｈａｒｄｍａｎ，ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｇｏｏｄｍａｎ ａｎｄ Ｇｉｌｍａｎ’ｓ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．；Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，ｅｔ ａｌ．（編）（１９９０）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｄｉｓｐｅｒｓｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，ＮＹを参照されたい）。

【０１９５】

検出のための方法

本発明は、被験体におけるＧＰＣ－１タンパク質の発現（例えば、被験体の細胞による）を検出および／または定量するための方法を提供する。方法は、被験体から細胞、組織試料、および／または体液試料を得ること、細胞、組織および／または体液試料を、本発明による抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、またはキメラ抗体（例えば、「モノクローナル抗体」および「抗体フラグメント、誘導体およびバリアント」と題する上記セクションで記載されるもの）と接触させること、ならびに前記抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、またはキメラ抗体の被験体の細胞、組織試料、または体液試料への結合を決定および／または定量することを含む。

【０１９６】

検出のためのＧＰＣ－１は、細胞の表面上に存在し、および／または内部発現され得る

。体液は尿であってもよい。細胞または組織試料は前立腺細胞または前立腺組織であってもよい。ＧＰＣ－１発現の検出および／または定量は、例えば、フローサイトメトリーおよび／またはＥＬＩＳＡを含む任意の当技術分野で知られている手段を使用して実施され得る。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、方法において使用される抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、またはキメラ抗体は、本発明によるハイブリドーマ（例えば、「ハイブリドーマ」と題する上記セクションで記載されるハイブリドーマ）により産生される。いくつかの実施形態では、抗体は、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託されたハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体である。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、ＧＰＣ－１を検出することができる、一種類の抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、またはキメラ抗体を含む溶液が、ＧＰＣ－１を潜在的に含み得る細胞、組織および／または体液試料に適用される。単一種はオーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託されたハイブリドーマ細胞により産生され得る。

【０１９９】

あるいは、複数種の抗体、抗体バリアント、抗体フラグメント、抗体誘導体、および／またはキメラ抗体を含む溶液は、ＧＰＣ－１を含み得る細胞、組織および／または体液試料に適用され得、ここで、溶液中の少なくとも１つの種はＧＰＣ－１を検出することができる。ＧＰＣ－１を検出することができる種は、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託されたハイブリドーマ細胞により産生され得る。そのような実施形態では、複数種を含む溶液は、アメリカン組織タイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）で受入番号ＨＢ１１７８５にて寄託されたハイブリドーマ細胞および／または下記を含む抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞により産生される抗体を含まない；

下記のいずれか１つ以上を含む軽鎖可変領域：

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置４８－５８により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置７４－８０により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置１１３－１２１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；

および／または

下記のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の軽鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）：ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基２５－４７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基５９－７３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基８１－１１２、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の残基１２２－１３１。

【０２００】

いくつかの実施形態では、被験体から得られた細胞、組織および／または体液試料で検出されるＧＰＣ－１発現のレベルは、対照細胞試料またはＧＰＣ－１発現レベルの試料集団標準と比較され得る。いくつかの実施形態では、対照または標準と比較した、被験体における増加したＧＰＣ－１発現の決定は被験体における疾患、または、疾患を発症する可能性の増加の診断となり得る。疾患は前立腺癌であってもよい。

【０２０１】

特定の実施形態において開示された本発明に対し、広く記載された本発明の精神または範囲から逸脱せずに多くの変更および／または改変が可能であることは、当業者に認識されるであろう。よって、本実施形態は、全ての点において、例示であり、制限するものではないと考えられるべきである。

【０２０２】
実施例
本発明を以下、特定の実施例を参照して記載するが、それらはいかなる点でも制限するものと解釈されるべきではない。
【０２０３】
実施例１：ＭＩＬ－３８ハイブリドーマ集団由来の抗体の分析
１．１材料および方法
－ＭＩＬ－３８抗体調製物
調製物ＭＩＬ－３８抗体ハイブリドーマを下記起源から取得した：
（ｉ）ＢＬＣＡ－３８ハイブリドーマのインハウス細胞ストックを使用して、１６Ａ、１６Ｂ、１６Ｃ、１７Ｂ、２３Ａ－１、２３Ａ－２、２４Ａ、２５Ａ、２５Ｂ、２６Ｂ、３０Ａ、３１Ａ、３１Ｂ、３１Ｃ、３１Ｄ、３２Ｂ、３２Ｃ、３３Ａ、３３Ｂ、３３Ｃ、３３Ｄ、３４Ａ、３４Ｂ、３５Ａ、３５Ｃ、３５Ｄ、４０Ａ、４０Ｂと指定された一連のＭＩＬ－３８抗体調製物を作製した。
（ｉｉ）インハウスストックからの細胞の１つのバッチを使用して、ＭＩＬ－３８ハイブリドーマ調製物ＡｕｓＭＡｂ１および２（ＡＭ－１およびＡＭ－２）を作製した。
（ｉｉｉ）ＢＬＣＡ－３８ハイブリドーマのオリジナル寄託物のバイアルを、ＡＴＣＣから回収した（受入番号ＨＢ１１７８５：マウスハイブリドーマＢＬＣＡ－３８）。これを培養し、インハウス細胞ストックを調製した。このオリジナルストックからの抗体調製物を、「オリジナル」（１－Ｏ）および「オリジナルＩＩＡ」と指定した；
（ｉｖ）「オリジナル」細胞のバイアルを使用して、抗体調製物ＡｕｓＭＡｂ３（ＡＭ－３）を、その後抗体調製物ＡｕｓＭＡｂ４および５（ＡＭ－４、ＡＭ－５）を作製した。ＡｕｓＭＡｂ３を作製するために使用した細胞ならびにＡｕｓＭＡｂ４および５を作製するために使用した細胞を別々に、２バッチで凍結させた。
（ｖ）これらの凍結細胞から、「Ａｌｆｉｏ　Ｉ」と呼ばれる調製物を、ＡＭ－４およびＡＭ－５を調製するために使用される細胞ストックから作製し、「Ａｌｆｉｏ　ＩＩ」と呼ばれる調製物を、ＡＭ－３を作製するために使用される細胞ストックから作製させた。
（ｖｉ）ＢＬＣＡ－３８ハイブリドーマ（ＨＢ１１７８５）のオリジナル寄託物からの細胞の初期継代（＜６）凍結物を使用して、単細胞クローニングを実施し、キャラクタライズするために多くのクローンを提供した。ＭＩＬ－３８　１Ｆ５クローンを選択し、オーストラリア細胞バンクで、寄託番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託した。
【０２０４】
上記（ｉ）－（ｖｉ）において記載される調製物を作製するための基礎として使用されるハイブリドーマストックを、Ｗａｌｋｅｒらへの米国特許第５，６２２，８３６号[1]（その全内容は相互参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように調製した。
【０２０５】
ＭＩＬ－３８抗体の精製のために、凍結細胞ストックを急速解凍し、続いてＲＰＭＩ１６４０培地に再懸濁させ、３７℃で５％CO_2を用いて２４時間成長させた。細胞を連続プロセスで、増殖させ、分裂させ、スケールアップさせた。各工程で、細胞を新鮮培地に再懸濁させ、３７℃で５％CO_2を用いてインキュベートした。スケールアップ後、細胞を無菌の無血清培地に移し、死滅期の開始まで成長させた。上清を回収し、ＭＩＬ－３８抗体を収集し、フィルタ滅菌した。抗体上清を、－８０℃で必要となるまで保存した。抗体を、Ｐｉｅｒｃｅ　ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇを用いて、製造者の推奨に従い精製した。
【０２０６】
ＡｕｓＭａｂクローンＡＭ－１－ＡＭ－５を作製するために使用した細胞を下記の通り調製した。細胞をＤＭＥＭ＋１０％ＦＣＳ中で生き返らせた。十分成長するとすぐに、それらをクローン化し（以下を参照されたい）、増殖させ、凍結させた。細胞をその後、ＦＣＳから離脱させ、Ｇｉｂｃｏ　ＨＳＦＭ無血清培地に移した（離脱は典型的には５日かかった）。
【０２０７】

細胞をバイオリアクター中に播種する前に、改良段階希釈を実施し、９６ウェルプレートにおいて単細胞／ウェルを得た。条件培地を使用して、単細胞成長を促進した。個々のウェルを、蒔いた後３日に観察し、４－８細胞コロニー／ウェルの数をカウントした。単一コロニーを含んだウェルのみ増殖のために選択した。抗体の発現を増殖前に確認した。

【０２０８】

増殖後、細胞の一部を、Ｉｎｔｅｇｒａ２－コンパートメントバイオリアクターに移し、一方、残りの細胞を凍結させた。細胞を、製造者の指示に従い、バイオリアクター中で成長させた。回収後、抗体を標準技術を使用して精製した。

【０２０９】

－ウエスタンブロットおよびＳｙｐｒｏゲル分析

タンパク質抽出：ＤＵ－１４５（ＭＩＬ－３８抗原陽性）またはＣ３（ＭＩＬ－３８抗原陰性）細胞を、標準組織培養技術に従い培養した。細胞膜タンパク質を、Ｍｅｒｃｋ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ ＰｒｏｔｅｏＥｘｔｒａｃｔ Ｎａｔｉｖｅ Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ＭＰＥＫ）を用いて製造者の指示に従い、濃縮させた。

【０２１０】

転写：ゲルを、ニトロセルロースメンブレン上に、１０分間２．５Ａおよび２５Ｖ極大で、Ｔｒａｎｓｂｌｏｔ Ｔｕｒｂｏシステム（Ｂｉｏｒａｄ）を使用して転写させた。

【０２１１】

ウエスタンブロット：簡単に言うと、転写後メンブレンを、５％スキムミルクを含むＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．１％）で２時間室温にてブロックした。一次抗体（５％スキムミルク－ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．１％）中１μｇ／ｍｌを適用し、一晩、４℃でインキュベートした。洗浄後（３×１０分ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．１％））、メンブレンを二次抗体と共に、インキュベートした（５％スキムミルク－ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．１％）中１：２０００ヒツジ－抗マウスＨＲＰ－標識）。洗浄後（３×１０分ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．１％））、抗原を、ＥＣＬ検出キット（Ｂｉｏｒａｄ）を用い、ＬＡＳ４０００ ｍｉｎｉ（ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて画像化することにより検出した。

【０２１２】

Ｓｙｐｒｏゲル：ゲルを固定溶液（１０％エタノール、７％酢酸）中で２時間の間固定し、その後、Ｓｙｐｒｏ（登録商標）ルビータンパク質ステインに移し、一晩室温で、暗闇でインキュベートした。画像化前にゲルをすすぎ、脱染溶液（１０％エタノール、７％酢酸）で最低２時間の間、洗浄した。画像化をＰｈａｒｏｓ Ｘスキャナを用いて実施した。

【０２１３】

－免疫蛍光アッセイ（ＩＦＡ）

ＩＦＡ：細胞をカバーガラス上で、７５％コンフルエントとなるまで成長させ、６つのウェルプレートに入れた。細胞を、ＰＢＳで洗浄し、続いてアセトンで固定した。細胞を再びＰＢＳで洗浄し、続いてＴＢＳと共にインキュベートし、その後、５％スキムミルクを含むＰＢＳでブロックした。細胞をその後、暗闇で、ＭＩＬ－３８、キメラＭＩＬ－３８またはセツキシマブと共にインキュベートし、続いて、ＦＩＴＣまたはＡｌｅｘａ４８８で標識したヤギ抗マウスまたはヤギ抗ヒト抗体と共にと共にインキュベートした。どちらの抗体も１％スキムミルクを含むＰＢＳ中で調製した。ＰＢＳでの洗浄を、一次抗体インキュベーションと二次抗体インキュベーションの間で実施した。二次インキュベーション後、細胞を、ＤＡＰＩを含むＰＢＳで洗浄し、緑色蛍光で可視化した（ＭＩＬ－３８陽性）。

【０２１４】

－ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ：試料を非還元ＳＤＳ含有試料バッファーと混合し、４－１５％プレキャストポリアクリルアミドゲル（Ｃｒｉｔｅｒｉｏｎ ＴＧＸ；Ｂｉｏｒａｄ）上にロ

ードした。ゲルを１０分間８０Ｖで、さらに５０分間２００Ｖで、トリスグリシン泳動用緩衝液中で泳動させた。

【０２１５】

１．２結果

－ウエスタンブロット

下記起源に由来するＭＩＬ－３８抗体の調製物一緒に比較した：

（ｉ）ＡＴＣＣからのハイブリドーマ細胞（調製物１－Ｏ、「オリジナル」）；

（ｉｉ）出願人の会社により維持されたハイブリドーマ細胞から産生させた抗体の２つの別々の調製物（調製物３７Ａおよび４０Ａ）；

【０２１６】

等しいウエスタンブロット反応性が３つ全ての調製物において観察された（図１）。３つ全ての調製物は、重および軽鎖の両方に対して二重バンドを提供し、非クローン集団が示唆された。

【０２１７】

－免疫蛍光アッセイ（ＩＦＡ）

様々な細胞株について使用された異なる抗体調製物（「１－オリジナル」（１－Ｏ）、４０Ａ、および３７Ａ）は等しいＩＦＡ反応性を提供した（表１）。

【０２１８】

【表１】

表１：様々な細胞株に対する異なるＭＩＬ－３８調製物のＩＦＡ反応性

試料	1° Ab (MIL-38)	2° Ab	反応	コメント
DU145	37A	ヤギ抗マウスFITC	3+	
	40A		3+	
	オリジナル		4+	
	-		-	黄色蛍光
PZHPV7	37A		2+	
	40A		2+	
	オリジナル		2+	
	-		-	黄色蛍光
RWPE1	37A		3+	
	40A		2+	
	オリジナル		2+	
	-		-	
T24	37A		2+	
	40A		2+	
	オリジナル		2+	
	-		-	いくらかのバックグラウンド
C3	37A		+	
	40A		+	
	オリジナル		+	
	-		-	黄色蛍光

ＮＢ：－ｐｒｅｐ１－Ｏ（「１－オリジナル」）４０Ａおよび３７Ａ由来の抗体をＩＦＡにおいて、ある範囲の細胞株ついて使用した－同等なＩＦＡ反応性が３つ全てのｐｒｅｐで観察された

－異なるＭＩＬ－３８抗体調製物の分析
調製物ＡＭ－１－ＡＭ－５（ＡｕｓＭＡｂ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄにより作製）を起源とするＭＩＬ－３８抗体調製物およびインハウスＭＩＬ－３８抗体調製物３３Ａのサイズおよび反応性をＳＤＳ－ＰＡＧＥ（図２Ａ）およびウエスタンブロット（図２Ｂ）により比較した。

【０２１９】
抗体のインハウスＭＩＬ－３８調製物は重および軽鎖の両方に対し二重バンドを示し、非クローン集団が示唆された（図２Ａを参照されたい）。ＡｕｓＭＡｂ　ＭＩＬ－３８抗体調製物（ＡｕｓＭａｂ１、ＡｕｓＭａｂ３、ＡｕｓＭａｂ４、ＡｕｓＭａｂ５）は重および軽鎖の両方に対し単一バンドを示した。ＭＩＬ－３８抗体調製物３３Ａは重および軽鎖の両方に対し二重バンドを示し、非クローン集団が示唆された。特に、ＡｕｓＭＡｂ３バンドは、ＡｕｓＭａｂ１、ＡｕｓＭａｂ４、ＡｕｓＭａｂ５、および３３ＡよりもＭＷを示し、起源１－Ｏストック中の２つの別々のクローン集団の存在が示唆された。

【０２２０】
ＡｕｓＭＡｂ３（ＡＭ－３）抗体はまた、ＭＩＬ－３８抗原と反応せず、一方、ＡｕｓＭａｂ１、ＡｕｓＭａｂ４、ＡｕｓＭａｂ５、および調製物３３Ａ抗体は反応した（図２Ｂ）。

【０２２１】
－追加のインハウスＭＩＬ－３８調製物の分析
ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動を使用して、ＢＬＣＡ－３８ハイブリドーマストックから作製し、インハウスで保存した様々な他のＭＩＬ－３８抗体調製物の重および軽鎖ＭＷを分析した。重および軽鎖に対する二重バンドが全ての調製物において観察された（図３Ａ）。対照的に、ＡｕｓＭａｂ４（ＡＭ－４）抗体調製物は重および軽鎖の両方に対し単一バンドを示した。

【０２２２】
様々なインハウスＭＩＬ－３８抗体調製物のＤＵ－１４５　ＭＰＥＫ抽出物に対するウエスタンブロット反応性は調製物全体にわたり一貫していた。ＡｕｓＭａｂ４（ＡＭ－４）はＤＵ－１４５　ＭＰＥＫ抽出物に反応したが、ＡｕｓＭａｂ３（ＡＭ－３）はＤＵ－１４５　ＭＰＥＫ抽出物に反応しなかった（図３Ｂ）。

【０２２３】
１．２考察
これらの結果から、インハウスおよびＡＴＣＣストックの両方からのＭＩＬ－３８ハイブリドーマストックは、細胞の混合集団を含んでいたことが明らかである。２つの同定可能な集団（ＡｕｓＭａｂ集団）のクローニングにより異なる分子量の２つの抗体が得られた。これらの２つの抗体種の１つはＭＩＬ－３８抗原に非反応性であるが、もう一方は混合集団から産生されたＭＩＬ－３８に等しい反応性を示す。

【０２２４】
実施例２：追加のＭＩＬ－３８抗体集団の分析
２．１材料および方法
－ＭＩＬ－３８抗体の調製物
ＡｕｓＭａｂ３（ＡＭ－３）またはＡｕｓＭａｂ４（ＡＭ－４）およびＡｕｓＭａｂ５（ＡＭ－５）に由来する凍結ハイブリドーマ細胞集団の調製物を使用した。ＡＭ－３の誘導で使用される細胞は、「Ａｌｆｉｏ　ＩＩ」と呼ばれた。ＡＭ－３はＤＵ－１４５　ＭＰＥＫ抽出物に対して非反応性であったことを示すスクリーニングに従い、初期継代ストックを調査して、陽性クローンを同定した。これらの初期継代細胞を使用して、ＡＭ－４を誘導し、「Ａｌｆｉｏ　Ｉ」と呼んだ。両方の細胞ストックを保存のために維持し、ＭＩＬ－３８抗体のインハウス産生を可能とした。

【０２２５】
オリジナルＩＩＡ、Ａｌｆｉｏ　ＩおよびＡｌｆｉｏ　ＩＩのＭＩＬ－３８バッチ生産のために、ストックを急速解凍し、続いてＲＰＭＩ１６４０培地に再懸濁させ、３７℃で

５％CO_2を用いて２４時間成長させた。細胞を連続プロセスで、増殖させ、分裂させ、スケールアップさせた。各工程で、細胞を新鮮培地に再懸濁させ、３７℃で５％CO_2を用いてインキュベートした。スケールアップ後、細胞を無菌の無血清培地に移し、死滅期の開始まで成長させた。上清を回収し、ＭＩＬ－３８抗体を収集し、フィルタ滅菌した。抗体上清を、－８０℃で必要となるまで保存した。抗体を、Ｐｉｅｒｃｅ　ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇを用いて、製造者の推奨に従い精製した。

【０２２６】

－ウエスタンブロットおよびＳｙｐｒｏゲル

ウエスタンブロットおよびＳｙｐｒｏゲルの調製を本質的に上記実施例１で設定される方法に従い実施した（セクション１．１を参照されたい）。

【０２２７】

ウエスタンブロッティングを下記条件下で実施した：

４－１２％ビス－トリスゲル

ブロッキング：一晩

ウエスタンブロットレジーム：一次抗体１時間、１０μｇ／メンブレン片、

洗浄３×１０分、

二次抗体１時間、二次抗体１／２０００ヤギ－マウスＨＲＰ

細胞：ＤＵ－１４５およびＣ３　ＭＰＥＫ抽出物に対して試験

【０２２８】

－免疫蛍光アッセイ

免疫蛍光アッセイを本質的に上記実施例１で設定される方法に従い実施した（セクション１．１を参照されたい）。

【０２２９】

２．２結果

－ウエスタンブロット

Ａｌｆｉｏ　Ｉ、Ａｌｆｉｏ　ＩＩ、３６Ａ、ＡｕｓＭＡｂおよび「オリジナルＩＩＡ」（ＡＴＣＣ　ＨＢ１１７８５のハイブリドーマ細胞から調製したＭＩＬ－３８調製物）のウエスタンブロット反応性を、ＤＵ－１４５およびＣ３　ＭＰＥＫ細胞抽出物について試験した。

【０２３０】

Ａｌｆｉｏ　ＩＩのウエスタンブロット反応性は、調製物ＡＭ－３のものに類似した（図４Ａ）。オリジナルＩＩＡおよびＡｌｆｉｏ　Ｉは、調製物３６Ａに類似した（インハウスバイクローナル）（図４Ａ）。

【０２３１】

－Ｓｙｐｒｏゲル分析

分離した重鎖部分における二重バンドは、前に観察されたものほど明確ではなかったが、分離した軽鎖部分における二重バンドは明確に識別できた。オリジナルＩＩＡ、Ａｌｆｉｏ　Ｉ、および３６Ａ　ＭＩＬ－３８抗体調製物の分離した軽鎖部分は全て２つのバンドを含んだ。対照的に、Ａｌｆｉｏ　ＩＩの分離した軽鎖部分は、より高いＭＷを有する単一軽鎖種を含んだ（すなわち、ＡＭ－３　ＭＩＬ－３８抗体調製物の様であった）。軽鎖種についてよりブロードなバンドとなった他の抗体よりも、多くのＡｌｆｉｏ　ＩＩ抗体がゲル上にロードされたことに注意されたい。ＡＭ－４　ＭＩＬ－３８抗体由来の分離した重および軽鎖部分は、バイクローナルまたはＡＭ－３様形態のいずれかとは明確に異なっていた（図４Ｂ）。

【０２３２】

－免疫蛍光アッセイ

ウエスタンブロット結果と一致して、ＤＵ－１４５細胞のＩＦＡ分析は、ＡＭ－４、Ａｌｆｉｏ　ＩおよびオリジナルＩＩＡは良好なＩＦＡ反応性を与えるが、Ａｌｆｉｏ　ＩＩ（ウエスタンブロットではＡＭ－３に等しい）はＩＦＡにおいて反応性を示さないことを示した（図５Ａ）。いずれの調製物にも反応性がないことは、陰性対照細胞株Ｃ３で観

察された（図５Ｂ）。
【０２３３】
２．３考察
これらの分析から、Ａｌｆｉｏ　Ｉは、バイクローナルＭＩＬ－３８抗体集団であるが、Ａｌｆｉｏ　ＩＩはＡＭ－３様（モノクローナル）抗体集団であることが示され、さらに、ＭＩＬ－３８抗体調製物ＡＭ－４はノクローナル抗体集団であることが確認される。
【０２３４】
よって、バイクローナルＭＩＬ－３８抗体集団、例えばＡｌｆｉｏ　Ｉは、別々のＡＭ－３およびＡＭ－４モノクローナル抗体集団の混合物を含むことが明らかである。
【０２３５】
実施例３：ＥＬＩＳＡアッセイに対するＭＩＬ－３８抗体集団の比較
３．１材料および方法
９６ウェルプレートをＭＩＬ－３８ｐｒｅｐＡＭ－３またはＡＭ－４（１μｇ／ウェル）を含む炭酸塩バッファーｐＨ９．５で一晩コートした。プレートを、５％スキムミルクを含むＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．１％）で３７℃にてブロックし、洗浄した。抗原（ＮＳ０細胞から産生された組換えヒトＧＰＣ－１）を、１５０ｍＭ　ＮａＣｌを添加したバッファーＩＩ（２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、０．５％トリトンＸ－１００）で希釈し、一晩３７℃でインキュベートした。検出を、ビオチン化ＡＭ－４を用いて実施し、続いてアビジンＨＲＰ（１μｇ／ｍＬ）を用いて検出した。ＴＭＢ（Ｓｉｇｍａ　ｃａｔ　ｎｏ　Ｔ０４４０）を添加し、ＴＭＢ停止液（Ｓｉｇｍａ　Ｓ５８１４）で停止させた。吸光度を４５０ｎｍで読み取った。結果を、図６Ａに示す。
【０２３６】
第２の実験では、９６ウェルプレートをＭＩＬ－３８ｐｒｅｐ３４ＡまたはＡＭ－４（２．５μｇ／ウェル）を含むＰＢＳ　ｐＨ７．２で１時間、室温にてコートした。プレートを、Ｂｌｏｃｋｅｒ　Ｃａｓｅｉｎ（Ｔｈｅｒｍｏ）を含むＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ（０．０５％）で１時間の間３７℃にてブロックした。洗浄後、抗原（ＧＰＣ－１　ＮＳ０）を、５０ｍＭトリシンおよび１５０ｍＭ　ＮａＣｌを含むＴＢＳ　ｐＨ７．２中で希釈し、３７℃で１時間インキュベートした。検出を、ビオチン化ＡＭ－４クローン１Ｆ５を用いて実施し、続いてアビジンＨＲＰ（１μｇ／ｍＬ）で検出した。ＴＭＢ（Ｓｉｇｍａ　ｃａｔ　ｎｏ　Ｔ０４４０）を添加し、ＴＭＢ停止液（Ｓｉｇｍａ　Ｓ５８１４）で停止させた。吸光度を４５０ｎｍで読み取った。結果を、図６Ｂに示す。
【０２３７】
３．２．１結果
上記で記載した第１のＥＬＩＳＡは、組換えＮＳ０産生ＧＰＣ－１（すなわち、ＭＩＬ－３８抗原）を捕捉するようにＭＩＬ－３８を使用して展開した。この実験は、捕捉のためのモノクローナルＡＭ－３　ＭＩＬ－３８およびモノクローナルＡＭ－４　ＭＩＬ－３８を比較した。ＡＭ－３は、サンドイッチＥＬＩＳＡアッセイでは捕捉剤として機能しなかった（図６Ａ）。
【０２３８】
上記で記載した第２のＥＬＩＳＡは、ＭＩＬ－３８（３４Ａ）の混合集団を、モノクローナルＡＭ－４－１Ｆ５クローンから得られたものと比較した時に得られたＥＬＩＳＡシグナルを比較した。捕捉剤としてＡＭ－４　１Ｆ５を使用すると、混合３４Ａ抗体集団を使用した場合よりも高いＥＬＩＳＡシグナルが提供された（図６Ｂ）。
【０２３９】
３．２．２考察
サンドイッチＥＬＩＳＡ結果により、モノクローナルＭＩＬ－３８抗体のＡＭ－４様形態のみが、捕捉試薬として抗原を検出するのに有用性を有すること、モノクローナル集団を含む捕捉剤は、混合集団からなるものより優れたＥＬＩＳＡシグナルを提供することが証明される。
【０２４０】

実施例４：ＭＩＬ－３８抗体集団の配列解析
４．１材料および方法
－重および軽鎖配列決定（ＤＮＡ）
３つの別々の配列決定実行を実施した。第１の実行（コード２２４９４５）は、１－Ｏ調製物由来のバイクローナルハイブリドーマ細胞を使用した。第２の実行（コード４４９２９５－１）は、ＡＭ－４を作製するために使用されたＡｌｆｉｏ　Ｉ、ハイブリドーマストック由来の細胞を使用した。第３の実行（コード４４９２９５－５）は、Ａｌｆｉｏ　ＩＩ由来の細胞、ＡＭ－３を作製するために使用されたハイブリドーマストックを使用した。

【０２４１】
配列決定実行２２４９４５（１－Ｏ）および４４９２９５－１（Ａｌｆｉｏ　Ｉ）のために、全ＲＮＡを凍結ハイブリドーマ細胞から抽出し、ｃＤＮＡを、ＲＮＡから合成した。ＰＣＲをその後、実施し、抗体の可変領域（重および軽鎖）および定常領域を増幅させ、これをその後、標準クローニングベクターに別々にクローン化し、配列決定した。

【０２４２】
全ＲＮＡを、ＴＲＩｚｏｌ（登録商標）Ｐｌｕｓ　ＲＮＡ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍの技術マニュアルに従い、ハイブリドーマ細胞から単離した。全ＲＮＡを、アガロースゲル電気泳動により分析した。

【０２４３】
全ＲＮＡをｃＤＮＡにアイソタイプ特異的アンチセンスプライマーまたはユニバーサルプライマーを使用してＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ（商標）ＩＩＩ　Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｓｙｓｔｅｍの技術マニュアルに従い逆転写した。V_H、V_L、C_HおよびC_Lの抗体フラグメントを、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔのＲＡＣＥの標準操作手順に従い、増幅させた。

【０２４４】
増幅させた抗体フラグメントを別々に標準クローニングベクターに、標準分子クローニング手順を使用してクローン化した。

【０２４５】
コロニーＰＣＲスクリーニングを実施し、妥当なサイズのインサートを有するクローンを同定した。妥当なサイズのインサートを有する５つもの単一コロニーについて、各抗体フラグメントに対し配列決定した。

【０２４６】
V_HおよびV_Lプラスミドは、抗体の全長可変領域ならびにC_H1およびC_Lの一部をコードした。C_Hプラスミドは、C_H1の一部および全長C_H2およびC_H3をコードした。C_Lプラスミドは、C_Lの一部をコードした。全長定常領域または重／軽鎖を得るために、V_HおよびV_Lプラスミドによりコードされた定常領域の一部ならびにC_HおよびC_Lプラスミドによりコードされた定常領域の一部を、ＰＣＲにより別々に増幅させ、その後、オーバーラップエクステンションＰＣＲを使用して、全長ＤＮＡを得た。妥当なV_H、V_L、C_HおよびC_Lインサートサイズを有する５つの単一コロニーを配列決定のために送った。

【０２４７】
配列決定実行４４９２９５－５（Ａｌｆｉｏ　ＩＩ）は、予想されるＩｇＧ１重鎖配列に対応する配列を得る難しさを経験した。２つのＲＮＡ調製物を実施した。第１のバッチの細胞では、オリゴ－ｄＴプライマーおよびＣＤＳＩＩＩプライマーを逆転写（ＲＴ）のために使用した。V_H／C_HおよびV_K／C_KをＰＣＲによりＩｇＧ１およびＩｇＫ特異的プライマーを使用して増幅させ、部分マウスβ－アクチン遺伝子を陽性対照として増幅させた。標準軽鎖バンドは容易に得られたが、弱いV_Hのみがゲル上で観察することができた。妥当なV_KおよびC_Kインサートサイズを有する５つの個々のコロニーを配列決定のために送った。５つの異なるクローンのV_KおよびC_K遺伝子は、ほぼ同一であることが見出された。Ａｌｆｉｏ　ＩＩハイブリドーマ由来のコンセンサス軽鎖配列は下記で列

挙される。１つの非生産的な重鎖配列が、８つの無作為に配列決定したV_H陽性クローンから得られ、下記で示される。３種類の重鎖定常領域配列が１０の無作為に配列決定したC_H陽性クローン（１つのIgG_1C_H、１つの$IgG_{2a}C_H$および８つの$IgG_{2b}C_H$）から得られた。可能性のあるクラススイッチの影響を回避するために、ＩｇＭ特異的プライマーを使用したC_Hの増幅を実施したが、標的ＰＣＲ産物は得られなかった。全長重鎖（V_H-C_H）を、重鎖ＦＲ１縮重プライマーを使用して増幅した場合も、標的ＰＣＲ産物は存在しなかった。

【０２４８】

いくつかの試みの後、生産的重鎖を得ることができなかったので、Ａｌｆｉｏ　ＩＩ細胞の第２のバイアル由来の重鎖配列の単離を試みた。細胞の第２のバイアルでは、オリゴ－ｄＴプライマーを逆転写のために、最初使用した。V_Hをそれぞれ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＭ、ＩｇＡ特異的プライマーおよびＩｇＧ縮重プライマーを使用して増幅させ、V_KをＩｇＫ特異的プライマーを使用して増幅させた。生産的軽鎖および非生産的重鎖（それらは、前の結果と同一であった）が得られた。Ｒａｎｄｏｍ　６量体プライマーを使用した逆転写もまた試みたが、成功しなかった。

【０２４９】

要約すると、軽鎖および重鎖配列を単離する複数の試みを実施した。１つの再配列させた軽鎖配列が、２つのバッチの細胞についての異なる試み後に一貫して得られた。しかしながら、弱いV_H標的ＰＣＲ産物のみが観察され、配列決定により、一貫した重鎖配列は得られなかった。

【０２５０】

結果

－配列要約表

下記表２は、研究した抗体の重および軽鎖核酸およびタンパク質配列の概観を提供し、様々な内部領域の位置を示す。

【表２】

抗体配列および内部領域の概観

DNA Seq ID#			リーダー	HFR1	HCDR1	HFR2	HCDR2	HFR3	HCDR3	HFR4	CH1-CH3	ヒンジ
1	AM4	重	1-57	58-147	148-162	163-204	205-255	256-351	352-378	379-411	412-1383	703-741
7	キメラ重		1-57	58-147	148-162	163-204	205-255	256-351	352-378	379-411	412-1401	706-750

			リーダー	LFR1	LCDR1	LFR2	LCDR2	LFR3	LCDR3	LFR4	CL
2	AM4	軽	1-60	61-129	130-162	163-207	208-228	229-324	325-351	352-381	382-702
5	AM3	軽	1-72	73-141	142-174	175-219	220-240	241-336	337-363	364-393	394-714
8	キメラ軽		1-60	61-129	130-162	163-207	208-228	229-324	325-351	352-381	382-702

AA Seq ID#			リーダー	HFR1	HCDR1	HFR2	HCDR2	HFR3	HCDR3	HFR4	CH	ヒンジ
3	AM4	重	1-19	20-49	50-54	55-68	69-85	86-117	118-126	127-137	138-461	235-247
9	キメラ重		1-19	20-49	50-54	55-68	69-85	86-117	118-126	127-137	138-467	236-250

			リーダー	LFR1	LCDR1	LFR2	LCDR2	LFR3	LCDR3	LFR4	CL
4	AM4	軽	1-20	21-43	44-54	55-69	70-76	77-108	109-117	118-127	128-234
6	AM3	軽	1-24	25-47	48-58	59-73	74-80	81-112	113-121	122-131	132-238
10	キメラ軽		1-20	21-43	44-54	55-69	70-76	77-108	109-117	118-127	128-234

注：ＨＦＲ＝重鎖フレームワーク領域；ＨＣＤＲ＝重鎖相補性決定領域；ＣＨ＝重鎖定常領域
ＬＦＲ＝軽鎖フレームワーク領域；ＬＣＤＲ＝軽鎖相補性決定領域；ＣＬ＝軽鎖定常領域
灰色箱は列１においてＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯにより規定される配列内の位置を示す。

【０２５１】

－配列決定（ＤＮＡ）

試料の単離全ＲＮＡを１．５％アガロース／ＧｅｌＲｅｄ（商標）ゲル上でＤＮＡマーカー（Ｍａｒｋｅｒ　ＩＩＩ－ＴＩＡＮＧＥＮ、Ｃａｔ．Ｎｏ．：ＭＤ１０３）と同時に実行した。

【０２５２】

各試料の４マイクロリットルのＰＣＲ産物を、１．５％アガロース／ＧｅｌＲｅｄ（商標）ゲル上で、ＤＮＡマーカー（Ｍａｒｋｅｒ　ＩＩＩ）と同時に実行した。ＰＣＲ産物を精製し、－２０℃でさらなる使用まで保存した。

【０２５３】

５つの異なるクローンのV_H、V_L、C_HおよびC_L遺伝子はほぼ同一であった。下記で列挙される、コンセンサス配列は、モノクローナルハイブリドーマ集団（ＡＭ－４）により産生される抗体の配列であることが決定された。

【０２５４】

ＡＭ－４　ＭＩＬ－３８マウスＩｇＧ$_1$重鎖ＤＮＡコンセンサス配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）

ＡＴＧＧＣＴＴＧＧＧＴＧＴＧＧＡＣＣＴＴＧＣＴＡＴＴＣＣＴＧＡＴＧＧＣＴＧＣＴＧ
ＣＣＣＡＡＡＧＴＡＴＣＣＡＡＧＣＡＣＡＧＡＴＣＣＡＧＴＴＧＧＴＧＣＡＧＴＣＴＧＧ
ＡＣＣＴＧＡＧＣＴＧＡＡＧＡＡＧＣＣＴＧＧＡＧＡＧＡＣＡＧＴＣＡＡＧＡＴＣＴＣＣ
ＴＧＣＡＡＧＧＣＴＴＣＴＧＧＴＴＡＴＧＣＣＴＴＣＡＣＡＧＡＣＴＡＴＴＣＡＡＴＧＡ
ＡＣＴＧＧＧＴＧＡＡＧＣＡＧＧＣＴＣＣＡＧＧＡＡＡＧＧＧＴＴＴＡＡＧＧＴＧＧＡＴ
ＧＧＧＣＴＧＧＡＴＡＡＡＣＡＣＴＧＡＧＡＣＴＧＧＴＧＡＧＣＣＡＡＣＡＴＡＴＡＣＡ
ＧＡＴＧＡＣＴＴＣＡＡＧＧＧＡＣＧＧＴＴＴＧＣＣＴＴＣＴＣＴＴＴＧＧＡＡＡＣＣＴ
ＣＴＧＣＣＡＧＣＡＣＴＧＣＣＴＴＴＴＴＧＣＡＧＡＴＣＡＡＣＡＡＣＣＴＣＡＧＡＡＡ
ＴＧＡＡＧＡＣＡＣＧＧＣＴＡＣＡＴＡＴＴＴＣＴＧＴＧＣＴＡＧＡＣＡＣＴＡＴＧＡＴ
ＴＡＣＧＧＧＧＧＧＧＴＴＴＣＣＴＴＡＣＴＧＧＧＧＣＣＡＡＧＧＧＡＣＴＣＴＧＧＴＣＡ
ＣＴＧＴＣＴＣＴＧＣＡＧＣＣＡＡＡＡＣＧＡＣＡＣＣＣＣＣＡＴＣＴＧＴＣＴＡＴＣＣ
ＡＣＴＧＧＣＣＣＣＴＧＧＡＴＣＴＧＣＴＧＣＣＣＡＡＡＣＴＡＡＣＴＣＣＡＴＧＧＴＧ
ＡＣＣＣＴＧＧＧＡＴＧＣＣＴＧＧＴＣＡＡＧＧＧＣＴＡＴＴＴＣＣＣＴＧＡＧＣＣＡＧ
ＴＧＡＣＡＧＴＧＡＣＣＴＧＧＡＡＣＴＣＴＧＧＡＴＣＣＣＴＧＴＣＣＡＧＣＧＧＴＧＴ
ＧＣＡＣＡＣＣＴＴＴＣＣＣＡＧＣＴＧＴＣＣＴＧＣＡＧＴＣＴＧＡＣＣＴＣＴＡＣＡＣＴ
ＣＴＧＡＧＣＡＧＣＴＣＡＧＴＧＡＣＴＧＴＣＣＣＣＴＣＣＡＧＣＡＣＣＴＧＧＣＣＣＡ
ＧＣＧＡＧＡＣＣＧＴＣＡＣＣＴＧＣＡＡＣＧＴＴＧＣＣＣＡＣＣＣＧＧＣＣＡＧＣＡＧ
ＣＡＣＣＡＡＧＧＴＧＧＡＣＡＡＧＡＡＡＡＴＴＧＴＧＣＣＣＡＧＧＧＡＴＴＧＴＧＧＴ
ＴＧＴＡＡＧＣＣＴＴＧＣＡＴＡＴＧＴＡＣＡＧＴＣＣＣＡＧＡＡＧＴＡＴＣＡＴＣＴＧ
ＴＣＴＴＣＡＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣＡＡＡＧＣＣＣＡＡＧＧＡＴＧＴＧＣＴＣＡＣＣＡＴ
ＴＡＣＴＣＴＧＡＣＴＣＣＴＡＡＧＧＴＣＡＣＧＴＧＴＧＴＴＧＴＧＧＴＡＧＡＣＡＴＣ
ＡＧＣＡＡＧＧＡＴＧＡＴＣＣＣＧＡＧＧＴＣＣＡＧＴＴＣＡＧＣＴＧＧＴＴＴＧＴＡＧ
ＡＴＧＡＴＧＴＧＧＡＧＧＴＧＣＡＣＡＣＡＧＣＴＣＡＧＡＣＧＣＡＡＣＣＣＣＧＧＧＡ
ＧＧＡＧＣＡＧＴＴＣＡＡＣＡＧＣＡＣＴＴＴＣＣＧＣＴＣＡＧＴＣＡＧＴＧＡＡＣＴＴ
ＣＣＣＡＴＣＡＴＧＣＡＣＣＡＧＧＡＣＴＧＧＣＴＣＡＡＴＧＧＣＡＡＧＧＡＧＴＴＣＡ
ＡＡＴＧＣＡＧＧＧＴＣＡＡＣＡＧＴＧＣＡＧＣＴＴＴＣＣＣＴＧＣＣＣＣＣＡＴＣＧＡ
ＧＡＡＡＡＣＣＡＴＣＴＣＣＡＡＡＡＣＣＡＡＡＧＧＣＡＧＡＣＣＧＡＡＧＧＣＴＣＣＡ
ＣＡＧＧＴＧＴＡＣＡＣＣＡＴＴＣＣＡＣＣＴＣＣＣＡＡＧＧＡＧＣＡＧＡＴＧＧＣＣＡ
ＡＧＧＡＴＡＡＡＧＴＣＡＧＴＣＴＧＡＣＣＴＧＣＡＴＧＡＴＡＡＣＡＧＡＣＴＴＣＴＴ
ＣＣＣＴＧＡＡＧＡＣＡＴＴＡＣＴＧＴＧＧＡＧＴＧＧＣＡＧＴＧＧＡＡＴＧＧＧＣＡＧ
ＣＣＡＧＣＧＧＡＧＡＡＣＴＡＣＡＡＧＡＡＣＡＣＴＣＡＧＣＣＣＡＴＣＡＴＧＧＡＣＡ
ＣＡＧＡＴＧＧＣＴＣＴＴＡＣＴＴＣＧＴＣＴＡＣＡＧＣＡＡＧＣＴＣＡＡＴＧＴＧＣＡ
ＧＡＡＧＡＧＣＡＡＣＴＧＧＧＡＧＧＣＡＧＧＡＡＡＴＡＣＴＴＴＣＡＣＣＴＧＣＴＣＴ
ＧＴＧＴＴＡＣＡＴＧＡＧＧＧＣＣＴＧＣＡＣＡＡＣＣＡＣＣＡＴＡＣＴＧＡＧＡＡＧＡ
ＧＣＣＴＣＴＣＣＣＡＣＴＣＴＣＣＴＧＧＴＡＡＡＴＧＡ

マウス重鎖コード配列の個々の領域は、交互の網掛け／網掛けなし文字列を用いて強調させる。位置：１－５７＝リーダー配列；５８－１４７＝フレームワーク領域（ＨＦＲ１）；１４８－１６２＝相補性決定領域（ＨＣＤＲ１）；１６３－２０４＝ＨＦＲ２；２０５－２５５＝ＨＣＤＲ２；２５６－３５１＝ＨＦＲ３；３５２－３７８＝ＨＣＤＲ３；３７９－４１１＝ＨＦＲ４；４１２－１３８３＝定常領域（ＣＨ１－ＣＨ３）；７０３－７４１＝ヒンジ領域（下線付き）；１３８４－１３８６＝終止コドン。

【０２５５】

ＡＭ－４　ＭＩＬ－３８マウスκ軽鎖ＤＮＡコンセンサス配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）

ＡＴＧＡＧＴＧＴＧＣＴＣＡＣＴＣＡＧＧＴＣＣＴＧＧＣＧＴＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＴ
ＧＧＣＴＴＡＣＡＧＧＴＧＣＣＡＧＡＴＧＴＧＡＣＡＴＣＣＡＧＡＴＧＡＣＴＣＡＧＴＣ
ＴＣＣＡＧＣＣＴＣＣＣＴＡＴＣＴＧＣＡＴＣＴＧＴＧＧＧＡＧＡＡＡＣＴＧＴＣＡＣＣ
ＡＴＣＡＣＡＴＧＴＣＧＡＧＣＡＡＧＴＧＧＧＡＡＴＧＴＴＣＡＣＡＡＴＴＡＴＴＴＡＧ

ＣＡＴＧＧＴＡＴＣＡＧＣＡＧＡＡＡＣＡＧＧＧＡＡＡＡＴＣＴＣＣＴＣＡＡＣＴＣＣＴ
ＧＧＴＣＴＡＴＡＣＴＧＣＡＡＡＡＡＣＣＴＴＡＧＣＡＧＡＴＧＧＴＧＴＧＣＣＡＴＣＡ
ＡＧＧＴＴＣＡＧＴＧＧＣＡＧＴＧＧＡＴＣＡＧＧＡＡＣＡＣＡＡＴＡＴＴＣＴＣＴＣＡ
ＡＧＡＴＣＡＡＴＡＧＣＣＴＧＣＡＧＣＣＴＧＡＡＧＡＴＴＴＴＧＧＧＡＣＴＴＡＴＴＡ
ＣＴＧＴＣＡＡＣＡＴＴＴＴＴＧＧＡＧＴＡＡＴＣＣＧＴＧＧＡＣＧＴＴＣＧＧＴＧＧＡ
ＧＧＣＡＣＣＡＡＧＣＴＧＧＡＡＡＴＣＡＡＡＣＧＧＧＣＴＧＡＴＧＣＴＧＣＡＣＣＡＡ
ＣＴＧＴＡＴＣＣＡＴＣＴＴＣＣＣＡＣＣＡＴＣＣＡＧＴＧＡＧＣＡＧＴＴＡＡＣＡＴＣ
ＴＧＧＡＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＧＴＧＴＧＣＴＴＣＴＴＧＡＡＣＡＡＣＴＴＣＴＡＣ
ＣＣＣＡＡＡＧＡＣＡＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＧＴＧＧＡＡＧＡＴＴＧＡＴＧＧＣＡＧＴＧ
ＡＡＣＧＡＣＡＡＡＡＴＧＧＣＧＴＣＣＴＧＡＡＣＡＧＴＴＧＧＡＣＴＧＡＴＣＡＧＧＡ
ＣＡＧＣＡＡＡＧＡＣＡＧＣＡＣＣＴＡＣＡＧＣＡＴＧＡＧＣＡＧＣＡＣＣＣＴＣＡＣＧ
ＴＴＧＡＣＣＡＡＧＧＡＣＧＡＧＴＡＴＧＡＡＣＧＡＣＡＴＡＡＣＡＧＣＴＡＴＡＣＣＴ
ＧＴＧＡＧＧＣＣＡＣＴＣＡＣＡＡＧＡＣＡＴＣＡＡＣＴＴＣＡＣＣＣＡＴＴＧＴＣＡＡ
ＧＡＧＣＴＴＣＡＡＣＡＧＧＡＡＴＧＡＧＴＧＴＴＡＧ

マウス軽鎖コード配列の個々の領域は、交互の網掛け／網掛けなし文字列を用いて強調させる。位置：１－６０＝リーダー配列；６１－１２９＝フレームワーク領域（ＬＦＲ１）；１３０－１６２＝相補性決定領域（ＬＣＤＲ１）；１６３－２０７＝ＬＦＲ２；２０８－２２８＝ＬＣＤＲ２；２２９－３２４＝ＬＦＲ３；３２５－３５１＝ＬＣＤＲ３；３５２－３８１ＬＦＲ４；３８２－７０２＝定常領域（ＣＫ）；７０３－７０５＝終止コドン。

【０２５６】

上記重および軽鎖ＡＭ－４　ＭＩＬ－３８コンセンサスＤＮＡ配列は下記重鎖および軽鎖アミノ酸配列に翻訳される：

【０２５７】

ＡＭ－４　ＭＩＬ－３８マウスＩｇＧ１重鎖アミノ酸コンセンサス配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）

ＭＡＷＶＷＴＬＬＦＬＭＡＡＡＱＳＩＱＡＱＩＱＬＶＱＳＧＰＥＬＫＫＰＧＥＴＶＫＩＳ
ＣＫＡＳＧＹＡＦＴＤＹＳＭＮＷＶＫＱＡＰＧＫＧＬＲＷＭＧＷＩＮＴＥＴＧＥＰＴＹＴ
ＤＤＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡＳＴＡＦＬＱＩＮＮＬＲＮＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＨＹＤ
ＹＧＧＦＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＡＡＫＴＴＰＰＳＶＹＰＬＡＰＧＳＡＡＱＴＮＳＭＶ
ＴＬＧＣＬＶＫＧＹＦＰＥＰＶＴＶＴＷＮＳＧＳＬＳＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＤＬＹＴ
ＬＳＳＳＶＴＶＰＳＳＴＷＰＳＥＴＶＴＣＮＶＡＨＰＡＳＳＴＫＶＤＫＫＩＶＰＲＤＣＧ
ＣＫＰＣＩＣＴＶＰＥＶＳＳＶＦＩＦＰＰＫＰＫＤＶＬＴＩＴＬＴＰＫＶＴＣＶＶＶＤＩ
ＳＫＤＤＰＥＶＱＦＳＷＦＶＤＤＶＥＶＨＴＡＱＴＱＰＲＥＥＱＦＮＳＴＦＲＳＶＳＥＬ
ＰＩＭＨＱＤＷＬＮＧＫＥＦＫＣＲＶＮＳＡＡＦＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＲＰＫＡＰ
ＱＶＹＴＩＰＰＰＫＥＱＭＡＫＤＫＶＳＬＴＣＭＩＴＤＦＦＰＥＤＩＴＶＥＷＱＷＮＧＱ
ＰＡＥＮＹＫＮＴＱＰＩＭＤＴＤＧＳＹＦＶＹＳＫＬＮＶＱＫＳＮＷＥＡＧＮＴＦＴＣＳ
ＶＬＨＥＧＬＨＮＨＨＴＥＫＳＬＳＨＳＰＧＫ＊

マウスＩｇＧ１重鎖配列の個々の領域は上記アミノ酸配列において示される。位置１－１９＝リーダー配列；２０－４９＝フレームワーク領域（ＨＦＲ１）；５０－５４＝相補性決定領域１（ＨＣＤ１）；５５－６８＝ＨＦＲ２；６９－８５＝ＨＣＤＲ２；８６－１１７＝ＨＦＲ３；１１８－１２６＝ＨＣＤＲ３；１２７－１３７＝ＨＦＲ４（連結領域またはＪ－領域とも呼ばれる）；１３８－４６１＝ＩｇＧ１鎖定常領域（ＣＨ１－ＣＨ３）＆終止コドン（＊）。ヒンジ領域－上記配列において下線が付けられている。

【０２５８】

ＡＭ－４コンセンサスＭＩＬ－３８軽鎖アミノ酸コンセンサス配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）

ＭＳＶＬＴＱＶＬＡＬＬＬＬＷＬＴＧＡＲＣＤＩＱＭＴＱＳＰＡＳＬＳＡＳＶＧＥＴＶＴ
ＩＴＣＲＡＳＧＮＶＨＮＹＬＡＷＹＱＱＫＱＧＫＳＰＱＬＬＶＹＴＡＫＴＬＡＤＧＶＰＳ
ＲＦＳＧＳＧＳＧＴＱＹＳＬＫＩＮＳＬＱＰＥＤＦＧＴＹＹＣＱＨＦＷＳＮＰＷＴＦＧＧ

ＧＴＫＬＥＩＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧＶＬＮＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡＴＨＫＴＳＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ＊

軽鎖アミノ酸配列の個々の領域は標識されて示される：位置１－２０＝リーダー配列；２１－４３＝フレームワーク領域（ＬＦＲ１）；４４－５４＝相補性決定領域１（ＬＣＤＲ１）；５５－６９＝ＬＦＲ２；７０－７６＝ＬＣＤＲ２；７７－１０８＝ＬＦＲ３；１０９－１１７＝ＬＣＤＲ３；１１８－１２７＝ＬＦＲ４；１２８－２３４＝κ定常領域（ＣＫ）＆終止コドン（＊）

【０２５９】

配列決定実行２２４９４５（１－Ｏ）と４４９２９５－１（Ａｌｆｉｏ　Ｉ）の間のコンセンサス配列の比較により、軽鎖および重鎖に対する配列は同一であったことが示された（下記配列アライメントを参照されたい）。これらの配列はバイクローナル集団（１－Ｏ）とＡＭ－４様Ａｌｆｉｏ　Ｉ集団の間で一致しているので、上記のように「ＡＭ－４コンセンサス配列」と呼ばれる。

【表３】

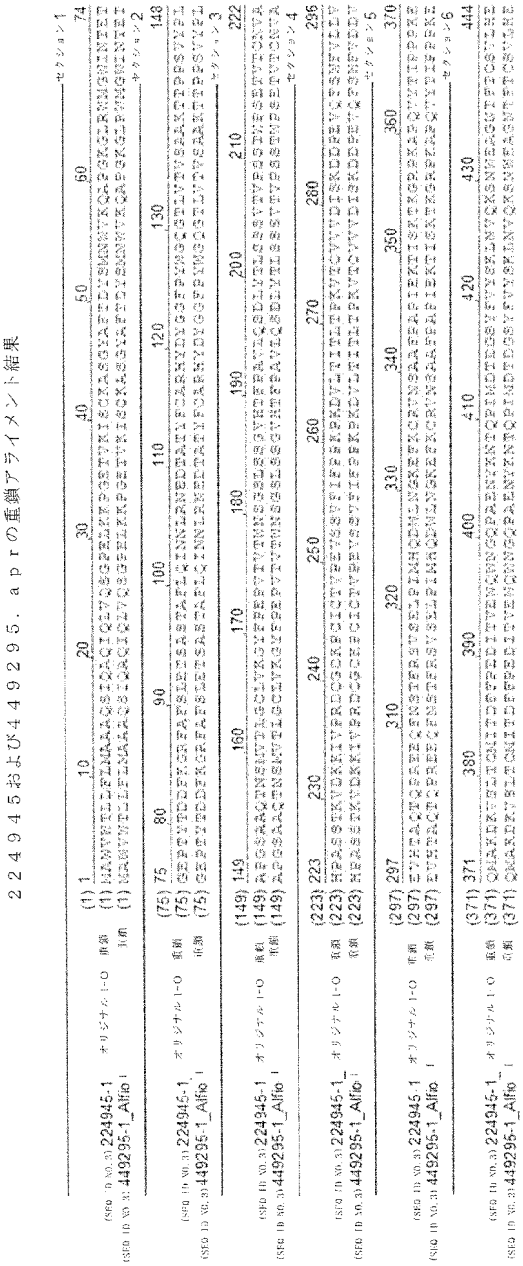
１．軽鎖アライメント：バイクローナル対ＡＭ－４（Ａｌｆｉｏ　Ｉ）対ＡＭ－３（Ａｌｆｉｏ　ＩＩＩ）アライメント

２２４９４５および４４９２９５．ａｐｒの軽鎖アライメント結果

【表４】

２．重鎖アライメント：バイクローナル対ＡＭ－４（Ａｌｆｉｏ　１）、ＡＭ－３（Ａｌｆｉｏ　２）の翻訳配列は決定できなかった。

２２４９４５および４４９２９５．ａｐｒの重鎖アライメント結果



【０２６０】

ＡＭ－３コンセンサス配列

ＡＭ－３様Ａｌｆｉｏ　ＩＩ細胞からは一貫した重鎖配列を得ることはできなかった。配列決定実行４４９２９５－５（Ａｌｆｉｏ　ＩＩ）から得られた軽鎖配列は一貫して得られ、上記アライメントにおいて示されるように、他の２つの配列決定実行に対する配列と比べて、フレームワーク領域および相補性決定領域の両方において明確な違いを示した（「１．上記軽鎖アライメント」を参照されたい）。

【０２６１】

ＡＭ－３　ＭＩＬ－３８κ軽鎖ＤＮＡコンセンサス配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５）

ＡＴＧＧＧＣＡＴＣＡＡＧＡＴＧＧＡＧＴＣＡＣＡＧＡＣＴＣＡＧＧＴＣＴＴＴＧＴＡＴ
ＡＣＡＴＧＴＴＧＣＴＧＴＧＧＴＴＧＴＣＴＧＧＴＧＴＴＧＡＴＧＧＡＧＡＣＡＴＴＧＴ
ＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣＴＣＡＡＡＡＧＴＴＣＡＴＧＴＣＣＡＣＡＴＣＡＡＴＡＧＧＡ
ＧＡＣＡＧＧＧＴＣＡＧＣＧＴＣＡＣＣＴＧＣＡＡＧＧＣＣＡＧＴＣＡＧＡＡＴＧＴＧＧ
ＧＴＴＣＴＣＡＴＧＴＡＧＣＣＴＧＧＴＴＴＣＡＧＣＡＧＡＡＡＣＣＡＧＧＧＣＡＡＴＣ

ＴＣＣＴＡＡＡＧＣＡＣＴＧＡＴＴＴＡＣＴＣＧＧＣＡＴＣＣＴＡＣＣＧＧＴＡＣＡＧＣ
ＧＧＡＧＴＣＡＣＴＧＡＴＣＧＣＴＴＣＡＣＡＧＧＣＡＧＴＧＧＡＴＣＴＧＧＧＡＣＡＧ
ＡＴＴＴＣＡＣＴＣＴＣＡＣＣＡＴＣＡＡＣＡＡＴＧＴＧＣＡＧＴＣＴＧＡＡＧＡＣＴＴ
ＧＧＣＡＧＡＧＴＡＴＴＴＣＴＧＴＣＡＧＣＡＡＴＡＴＡＡＣＡＧＴＴＴＴＣＣＡＴＴＣ
ＡＣＧＴＴＣＧＧＴＴＣＧＧＧＧＡＣＡＡＡＧＴＴＧＧＡＡＡＴＡＡＡＡＣＧＧＧＣＴＧ
ＡＴＧＣＴＧＣＡＣＣＡＡＣＴＧＴＡＴＣＣＡＴＣＴＴＣＣＣＡＣＣＡＴＣＣＡＧＴＧＡ
ＧＣＡＧＴＴＡＡＣＡＴＣＴＧＧＡＧＧＴＧＣＣＴＣＡＧＴＣＧＴＧＴＧＣＴＴＣＴＴＧ
ＡＡＣＡＡＣＴＴＣＴＡＣＣＣＣＡＡＡＧＡＣＡＴＣＡＡＴＧＴＣＡＡＧＴＧＧＡＡＧＡ
ＴＴＧＡＴＧＧＣＡＧＴＧＡＡＣＧＡＣＡＡＡＡＴＧＧＣＧＴＣＣＴＧＡＡＣＡＧＴＴＧ
ＧＡＣＴＧＡＴＣＡＧＧＡＣＡＧＣＡＡＡＧＡＣＡＧＣＡＣＣＴＡＣＡＧＣＡＴＧＡＧＣ
ＡＧＣＡＣＣＣＴＣＡＣＧＴＴＧＡＣＣＡＡＧＧＡＣＧＡＧＴＡＴＧＡＡＣＧＡＣＡＴＡ
ＡＣＡＧＣＴＡＴＡＣＣＴＧＴＧＡＧＧＣＣＡＣＴＣＡＣＡＡＧＡＣＡＴＣＡＡＣＴＴＣ
ＡＣＣＣＡＴＴＧＴＣＡＡＧＡＧＣＴＴＣＡＡＣＡＧＧＡＡＴＧＡＧＴＧＴＴＡＧ

＊軽鎖コード配列の個々の領域は、交互の網掛け／網掛けなし文字列を用いて強調させる。位置：１－７２＝リーダー配列；７３－１４１＝フレームワーク領域（ＬＦＲ１）；１４２－１７４＝相補性決定領域（ＬＣＤＲ１）；１７５－２１９＝ＬＦＲ２；２２０－２４０＝ＬＣＤＲ２；２４１－３３６＝ＬＦＲ３；３３７－３６３＝ＬＣＤＲ３；３６４－３９３＝ＬＦＲ４；３９４－７１４＝定常領域（ＣＫ）；７１５－７１７＝終止コドン

【０２６２】

ＡＭ－３　ＭＩＬ－３８軽鎖アミノ酸コンセンサス配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６）

ＭＧＩＫＭＥＳＱＴＱＶＦＶＹＭＬＬＷＬＳＧＶＤＧＤＩＶＭＴＱＳＱＫＦＭＳＴＳＩＧ
ＤＲＶＳＶＴＣＫＡＳＱＮＶＧＳＨＶＡＷＦＱＱＫＰＧＱＳＰＫＡＬＩＹＳＡＳＹＲＹＳ
ＧＶＴＤＲＦＴＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＮＮＶＱＳＥＤＬＡＥＹＦＣＱＱＹＮＳＦＰＦ
ＴＦＧＳＧＴＫＬＥＩＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬ
ＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧＶＬＮＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳ
ＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡＴＨＫＴＳＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ＊

軽鎖アミノ酸配列の個々の領域は標識されて示される：位置１－２４＝リーダー配列；２５－４７＝フレームワーク領域（ＬＦＲ１）；４８－５８＝相補性決定領域１（ＬＣＤＲ１）；５９－７３＝ＬＦＲ２；７４－８０＝ＬＣＤＲ２；８１－１１２＝ＬＦＲ３；１１３－１２１＝ＬＣＤＲ３；１２２－１３１＝ＬＦＲ４；１３２－２３８＝κ定常領域（ＣＫ）＆終止コドン（＊）

【０２６３】

実施例５：キメラＭＩＬ－３８抗体の調製および試験

５．１材料および方法

－キメラ抗体の調製

２つの最適化ｃＤＮＡ配列をクローニング目的で、開発した。これらは、上記実施例４で同定されたＡＭ－４重鎖および軽鎖コンセンサス配列に基づいた。

【０２６４】

第１の最適化ｃＤＮＡ配列を、マウス－ヒトキメラ重鎖配列の作製において使用した：

ＣＨＯコドン最適化ｃＤＮＡ配列＃１－マウス－ヒトキメラ重鎖１４０４ｂｐ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７）

ＡＴＧＧＣＴＴＧＧＧＴＧＴＧＧＡＣＡＣＴＧＣＴＧＴＴＣＣＴＧＡＴＧＧＣＴＧＣＴＧ
ＣＣＣＡＧＡＧＴＡＴＴＣＡＧＧＣＴＣＡＧＡＴＴＣＡＧＣＴＧＧＴＣＣＡＧＡＧＣＧＧ
ＴＣＣＣＧＡＧＣＴＧＡＡＧＡＡＧＣＣＡＧＧＣＧＡＧＡＣＣＧＴＧＡＡＧＡＴＣＴＣＣ
ＴＧＣＡＡＧＧＣＣＡＧＣＧＧＣＴＡＣＧＣＴＴＴＣＡＣＡＧＡＣＴＡＴＴＣＴＡＴＧＡ
ＡＣＴＧＧＧＴＧＡＡＧＣＡＧＧＣＣＣＣＡＧＧＣＡＡＧＧＧＣＣＴＧＡＧＧＴＧＧＡＴ
ＧＧＧＣＴＧＧＡＴＣＡＡＴＡＣＣＧＡＧＡＣＡＧＧＣＧＡＧＣＣＣＡＣＣＴＡＣＡＣＡ
ＧＡＣＧＡＴＴＴＣＡＡＧＧＧＧＣＣＧＧＴＴＣＧＣＴＴＴＴＴＣＣＣＴＧＧＡＧＡＣＣＴ
ＣＴＧＣＣＴＣＣＡＣＡＧＣＴＴＴＴＣＴＧＣＡＧＡＴＣＡＡＣＡＡＴＣＴＧＡＧＡＡＡ
ＣＧＡＧＧＡＣＡＣＣＧＣＣＡＣＡＴＡＣＴＴＣＴＧＣＧＣＴＡＧＧＣＡＣＴＡＣＧＡＴ

ＴＡＴＧＧＣＧＧＣＴＴＴＣＣＴＴＡＴＴＧＧＧＧＣＣＡＧＧＧＣＡＣＣＣＴＧＧＴＧＡ
ＣＡＧＴＧＴＣＣＡＧＣＧＣＣＴＣＴＡＣＣＡＡＧＧＧＣＣＣＡＴＣＣＧＴＧＴＴＴＣＣ
ＡＣＴＧＧＣＴＣＣＣＴＣＴＴＣＣＡＡＧＡＧＣＡＣＣＴＣＴＧＧＣＧＧＣＡＣＡＧＣＣ
ＧＣＴＣＴＧＧＧＣＴＧＴＣＴＧＧＴＧＡＡＧＧＡＴＴＡＣＴＴＣＣＣＡＧＡＧＣＣＣＧ
ＴＧＡＣＡＧＴＧＧＴＣＴＴＧＧＡＡＣＴＣＣＧＧＣＧＣＣＣＴＧＡＣＣＴＣＣＧＧＡＧＴ
ＧＣＡＴＡＣＡＴＴＴＣＣＣＧＣＴＧＴＧＣＴＧＣＡＧＡＧＣＴＣＴＧＧＣＣＴＧＴＡＣ
ＡＧＣＣＴＧＴＣＣＡＧＣＧＴＧＧＴＧＡＣＣＧＴＧＣＣＴＴＣＴＴＴＣＣＡＧＣＣＴＧＧ
ＧＣＡＣＣＣＡＧＡＣＡＴＡＴＡＴＣＴＧＣＡＡＣＧＴＧＡＡＴＣＡＣＡＡＧＣＣＡＴＣ
ＣＡＡＴＡＣＡＡＡＡＧＧＴＧＧＡＣＡＡＧＡＡＧＧＴＧＧＡＧＣＣＣＡＡＧＡＧＣＴＧＴ
ＧＡＴＡＡＧＡＣＣＣＡＴＡＣＡＴＧＣＣＣＣＣＣＣＴＴＧＴＣＣＴＧＣＴＣＣＡＧＡＧＣ
ＴＧＣＴＧＧＧＡＧＧＡＣＣＴＡＧＣＧＴＧＴＴＣＣＴＧＴＴＴＣＣＡＣＣＣＡＡＧＣＣ
ＴＡＡＧＧＡＣＡＣＣＣＴＧＡＴＧＡＴＣＴＣＴＡＧＧＡＣＣＣＣＣＧＡＧＧＴＧＡＣＡ
ＴＧＣＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＡＣＧＴＧＴＣＣＣＡＣＧＡＧＧＡＴＣＣＴＧＡＧＧＴＧＡ
ＡＧＴＴＣＡＡＣＴＧＧＴＡＣＧＴＧＧＡＴＧＧＣＧＴＧＧＡＧＧＴＧＣＡＴＡＡＴＧＣ
ＴＡＡＧＡＣＣＡＡＧＣＣＴＡＧＧＧＡＧＧＡＧＣＡＧＴＡＣＡＡＣＡＧＣＡＣＣＴＡＴ
ＣＧＧＧＴＧＧＴＧＴＣＴＧＴＧＣＴＧＡＣＡＧＴＧＣＴＧＣＡＣＣＡＧＧＡＣＴＧＧＣ
ＴＧＡＡＣＧＧＣＡＡＧＧＡＧＴＡＴＡＡＧＴＧＣＡＡＧＧＴＧＡＧＣＡＡＴＡＡＧＧＣ
ＣＣＴＧＣＣＣＧＣＴＣＣＴＡＴＣＧＡＧＡＡＧＡＣＣＡＴＣＴＣＴＡＡＧＧＣＣＡＡＧ
ＧＧＣＣＡＧＣＣＴＣＧＧＧＡＧＣＣＡＣＡＧＧＴＧＴＡＣＡＣＡＣＴＧＣＣＴＣＣＡＡ
ＧＣＡＧＡＧＡＣＧＡＧＣＴＧＡＣＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＧＴＧＴＣＴＣＴＧＡＣＡＴＧ
ＴＣＴＧＧＴＧＡＡＧＧＧＣＴＴＣＴＡＴＣＣＴＴＣＴＧＡＴＡＴＣＧＣＴＧＴＧＧＡＧ
ＴＧＧＧＡＧＴＣＣＡＡＴＧＧＣＣＡＧＣＣＡＧＡＧＡＡＣＡＡＴＴＡＣＡＡＧＡＣＣＡ
ＣＡＣＣＣＣＣＴＧＴＧＣＴＧＧＡＣＡＧＣＧＡＴＧＧＣＴＣＴＴＴＣＴＴＴＣＴＧＴＡ
ＴＴＣＣＡＡＧＣＴＧＡＣＣＧＴＧＧＡＴＡＡＧＡＧＣＡＧＧＴＧＧＣＡＧＣＡＧＧＧＣ
ＡＡＣＧＴＧＴＴＣＴＣＣＴＧＴＡＧＣＧＴＧＡＴＧＣＡＣＧＡＧＧＣＡＣＴＧＣＡＣＡ
ＡＣＣＡＣＴＡＣＡＣＴＣＡＧＡＡＡＴＣＣＣＴＧＴＣＣＣＴＧＴＣＡＣＣＴＧＧＣＡＡ
ＡＴＧＡ

マウス－ヒトキメラ重鎖コード配列の個々の領域は、交互の網掛け／網掛けなし文字列を用いて強調させる。位置：１－５７＝リーダー配列；５８－１４７＝フレームワーク領域（ＦＲ１）；１４８－１６２＝相補性決定領域（ＣＤＲ１）；１６３－２０４＝ＦＲ２；２０５－２５５＝ＣＤＲ２；２５６－３５１＝ＦＲ３；３５２－３７８＝ＣＤＲ３；３７９－４１１＝ＦＲ４；４１２－１４０１＝ヒト定常領域（ＣＨ１－ＣＨ３）；７０６－７５０＝ヒンジ領域（下線付き）；１４０２－１４０５＝終止コドン。

【０２６５】

作製した第２の最適化ｃＤＮＡ配列を、マウス－ヒトキメラ軽鎖配列の作製において使用した：

ＣＨＯコドン最適化ｃＤＮＡ配列＃２－マウス－ヒトキメラ軽鎖７０５ｂｐ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）

ＡＴＧＡＧＣＧＴＧＣＴＧＡＣＣＣＡＧＧＴＧＣＴＧＧＣＣＣＴＧＣＴＧＣＴＧＣＴＧＴ
ＧＧＣＴＧＡＣＣＧＧＡＧＣＣＣＧＴＴＧＣＧＡＣＡＴＣＣＡＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＴＣ
ＣＣＣＴＧＣＣＴＣＴＣＴＧＴＣＣＧＣＣＡＧＣＧＴＧＧＧＣＧＡＧＡＣＣＧＴＧＡＣＡ
ＡＴＣＡＣＣＴＧＣＡＧＡＧＣＣＴＣＴＧＧＣＡＡＣＧＴＧＣＡＣＡＡＴＴＡＣＣＴＧＧ
ＣＴＴＧＧＴＡＴＣＡＧＣＡＧＡＡＧＣＡＧＧＧＣＡＡＧＴＣＣＣＣＡＣＡＧＣＴＧＣＴ
ＧＧＴＧＴＡＣＡＣＡＧＣＣＡＡＧＡＣＣＣＴＧＧＣＴＧＡＣＧＧＣＧＴＧＣＣＣＡＧＣ
ＡＧＧＴＴＣＴＣＴＧＧＣＴＣＣＧＧＣＡＧＣＧＧＣＡＣＡＣＡＧＴＡＴＡＧＣＣＴＧＡ
ＡＧＡＴＣＡＡＣＴＣＴＣＴＧＣＡＧＣＣＴＧＡＧＧＡＴＴＴＴＧＧＣＡＣＣＴＡＣＴＡ
ＴＴＧＣＣＡＧＣＡＴＴＴＣＴＧＧＴＣＴＡＡＴＣＣＡＴＧＧＡＣＡＴＴＴＧＧＣＧＧＣ
ＧＧＣＡＣＣＡＡＧＣＴＧＧＡＧＡＴＣＡＡＧＡＧＧＡＣＡＧＴＧＧＣＣＧＣＴＣＣＣＴ
ＣＣＧＴＧＴＴＣＡＴＣＴＴＴＣＣＣＣＣＴＡＧＣＧＡＣＧＡＧＣＡＧＣＴＧＡＡＧＴＣ
ＴＧＧＣＡＣＣＧＣＴＴＣＣＧＴＧＧＴＧＴＧＣＣＴＧＣＴＧＡＡＣＡＡＴＴＴＣＴＡＣ

ＣＣＴＣＧＧＧＡＧＧＣＣＡＡＧＧＴＧＣＡＧＴＧＧＡＡＧＧＴＧＧＡＴＡＡＣＧＣＴＣ
ＴＧＣＡＧＴＣＴＧＧＣＡＡＴＴＣＣＣＡＧＧＡＧＡＧＣＧＴＧＡＣＡＧＡＧＣＡＧＧＡ
ＣＴＣＴＡＡＧＧＡＴＴＣＣＡＣＣＴＡＴＡＧＣＣＴＧＴＣＣＡＧＣＡＣＡＣＴＧＡＣＣ
ＣＴＧＴＣＣＡＡＧＧＣＣＧＡＣＴＡＣＧＡＧＡＡＧＣＡＣＡＡＧＧＴＧＴＡＴＧＣＴＴ
ＧＴＧＡＧＧＴＣＡＣＴＣＡＣＣＡＧＧＧＧＣＴＧＴＣＡＡＧＴＣＣＡＧＴＣＡＣＡＡＡ
ＧＴＣＣＴＴＣＡＡＴＡＧＧＧＧＧＧＡＡＴＧＣＴＧＡ

マウス－ヒトキメラ軽鎖コード配列の個々の領域は、交互の網掛け／網掛けなし文字列を用いて強調させる。位置：１－６０＝リーダー配列；６１－１２９＝フレームワーク領域（ＬＦＲ１）；１３０－１６２＝相補性決定領域（ＬＣＤＲ１）；１６３－２０７＝ＬＦＲ２；２０８－２２８＝ＬＣＤＲ２；２２９－３２４＝ＬＦＲ３；３２５－３５１＝ＬＣＤＲ３；３５２－３８１＝ＬＦＲ４；３８２－７０２＝ヒト定常領域（ＣＫ）；７０３－７０５＝終止コドン。

【０２６６】

キメラＭＩＬ－３８マウスヒトC_H1－C_H3鎖を、懸濁ＣＨＯ－３Ｅ７細胞において、無血清培地を使用して一時的に発現させ、続いて一段階精製を実施した。

【０２６７】

ＣＨＯ－３Ｅ７細胞を無血清ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）ＣＨＯ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ、ＵＳＡ）中で成長させた。細胞をＥｒｌｅｎｍｅｙｅｒ Ｆｌａｓｋ（ＣｏｒｎｉｎｇＩｎｃ．、Ａｃｔｏｎ、ＭＡ）中３７℃で５％ＣＯ２を用いて、オービタルシェーカー（ＶＷＲ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｃｈｅｓｔｅｒ、ＰＡ）上で維持した。トランスフェクションの日に、ＤＮＡおよびＰＥＩ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｅｐｐｅｌｈｅｉｍ、ドイツ）を最適比で混合し、その後、フラスコ中に、トランスフェクションの準備ができた細胞と共に添加した。第６日に収集した上清を使用してさらに精製した。

【０２６８】

細胞培養ブロスを遠心分離し、続いて濾過した。濾過した上清を、５ｍｌプロテインＡ ＣＩＰカラム（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ、Ｃａｔ．Ｎｏ．Ｌ００４３３）上に３．０ｍｌ／分でロードした。洗浄および適切なバッファーによる溶離後、画分を収集し、１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ９．０で中和した。精製タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウエスタンブロットにより、分子量、収率および純度測定のための標準プロトコルを使用することにより分析した。

【０２６９】

－キメラＭＩＬ－３８抗体アッセイ（スライド免疫蛍光）

ＭＩＬ－３８キメラ抗体を、ＤＵ－１４５細胞を用いる免疫蛍光アッセイにおいて使用した。マウスＭＩＬ－３８ ｐｒｅｐ ３３ＡをＧＰＣ－１抗原染色のための陽性対照として使用し、一方、セツキシマブ（ＥＧＦＲを標的にするキメラ抗体）をヒトＩｇＧ定常領域の染色のための陽性対照として使用した。一次抗体を有さないスライドを陰性対照として使用した。染色は、二次抗体をＡｌｅｘａｆｌｕｏｒ４８８で標識したこと、抗ヒト抗体を使用してキメラおよびセツキシマブ試料を染色したことを除き、本質的にセクション１．１で記載されるように実施した。

【０２７０】

－キメラＭＩＬ－３８ウエスタンブロット

キメラＭＩＬ－３８およびマウスＭＩＬ－３８のＤＵ－１４５およびＣ３ ＭＰＥＫ抽出物ならびに組換えＮＳ０産生ＧＰＣ－１抗原に対する反応性をウエスタンブロットにより試験した。ウエスタンブロットをマウスＭＩＬ－３８またはキメラＭＩＬ－３８のいずれかによりプロービングした。キメラＭＩＬ－３８を、ヤギ抗ヒト二次抗体、続いてヒツジ－抗ヤギＨＲＰ抗体により検出した。対照として、マウスＭＩＬ－３８を、ヤギ抗マウス二次抗体、続いてヒツジ－抗ヤギＨＲＰ抗体により検出した。等しい条件下で検出した場合、等しい反応性がキメラＭＩＬ－３８およびマウスＭＩＬ－３８について観察された。図９ＡはマウスＭＩＬ－３８、続いて抗マウスＨＲＰ二次抗体でプロービングしたウエ

スタンブロットを示す。図９Ｂはキメラ ＭＩＬ－３８、続いてヤギ抗ヒト二次抗体でプロービングしたウエスタンブロットを示す。複合体を、ヒツジ－抗ヤギＨＲＰ抗体を用いて検出した。図９Ｃは、マウスＭＩＬ－３８、続いてヤギ抗ヒトマウス抗体でプロービングしたウエスタンブロットを示す。複合体を、ヒツジ－抗マウスＨＲＰ抗体を用いて検出した。

【０２７１】

５．２結果

－キメラ抗体配列の発現

キメラＭＩＬ－３８マウスヒトＣＨ１－ＣＨ３鎖の重鎖および軽鎖をコードする組換えプラスミドを懸濁ＣＨＯ－３Ｅ７細胞培養物中に一過性にトランスフェクトした。標的タンパク質を細胞培養上清からプロテインＡ　ＣＩＰ　５ｍｌカラムにより捕捉させ、続いてバッファー交換を実施した。精製タンパク質を図７Ａおよび７Ｂに示されるＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロットにより分析した。３μｇの試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥ上にロードし、０．３μｇの総タンパク質をウエスタンブロット上にロードした。ウエスタンブロットのための一次抗体はヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＨＲＰ（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ、Ｃａｔ．Ｎｏ．Ａ００１６６）とした。

【０２７２】

－キメラ抗体配列

最適化ｃＤＮＡ配列＃１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７）を使用して、下記アミノ酸配列を有するキメラＭＩＬ－３８抗体重鎖を作製した：

キメラＭＩＬ－３８マウスヒトＣＨ１－ＣＨ３鎖配列マウスＶＨ－ヒトＣＨ１－ＣＨ３鎖（重鎖）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９）

ＭＡＷＶＷＴＬＬＦＬＭＡＡＡＱＳＩＱＡＱＩＱＬＶＱＳＧＰＥＬＫＫＰＧＥＴＶＫＩＳ
ＣＫＡＳＧＹＡＦＴＤＹＳＭＮＷＶＫＱＡＰＧＫＧＬＲＷＭＧＷＩＮＴＥＴＧＥＰＴＹＴ
ＤＤＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡＳＴＡＦＬＱＩＮＮＬＲＮＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＨＹＤ
ＹＧＧＦＰＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡ
ＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹ
ＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣ
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴ
ＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹ
ＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫ
ＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥ
ＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧ
ＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ＊

マウス－ヒトキメラ重鎖配列の個々の領域は上記アミノ酸配列において示される：位置１－１９＝リーダー配列；２０－４９＝フレームワーク領域（ＨＦＲ１）；５０－５４＝相補性決定領域１（ＨＣＤ１）；５５－６８＝ＨＦＲ２；６９－８５＝ＨＣＤＲ２；８６－１１７＝ＨＦＲ３；１１８－１２６＝ＨＣＤＲ３；１２７－１３７＝ＨＦＲ４（連結領域またはＪ－領域とも呼ばれる）；１３８－４６７＝ＩｇＧ１鎖定常領域（ＣＨ１－ＣＨ３）、＆終止コドン（＊）。ヒンジ配列－ヒトＩｇＧ１重鎖ヒンジ配列は上記で下線が付けられている。

【０２７３】

最適化ｃＤＮＡ配列＃２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８）を使用して、下記アミノ酸配列を有するキメラＭＩＬ－３８抗体軽鎖を作製した：

キメラＭＩＬ－３８マウス－ヒトκ軽鎖配列：マウスＶＫ－ヒトＣＫ配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０）

ＭＳＶＬＴＱＶＬＡＬＬＬＬＷＬＴＧＡＲＣＤＩＱＭＴＱＳＰＡＳＬＳＡＳＶＧＥＴＶＴ
ＩＴＣＲＡＳＧＮＶＨＮＹＬＡＷＹＱＱＫＱＧＫＳＰＱＬＬＶＹＴＡＫＴＬＡＤＧＶＰＳ
ＲＦＳＧＳＧＳＧＴＱＹＳＬＫＩＮＳＬＱＰＥＤＦＧＴＹＹＣＱＨＦＷＳＮＰＷＴＦＧＧ
ＧＴＫＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹ

ＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ＊
マウス－ヒトキメラ軽鎖アミノ酸配列の個々の領域は標識されて示される：位置１－２０＝リーダー配列；２１－４３＝フレームワーク領域（ＬＦＲ１）；４４－５４＝相補性決定領域１（ＬＣＤＲ１）；５５－６９＝ＬＦＲ２；７０－７６＝ＬＣＤＲ２；７７－１０８＝ＬＦＲ３；１０９－１１７＝ＬＣＤＲ３；１１８－１２７＝ＬＦＲ４；１２８－２３４＝κ定常領域（ＣＫ）＆終止コドン（＊）

【０２７４】

－キメラＭＩＬ－３８抗体アッセイ（スライド免疫蛍光）

図８Ａ－Ｄは細胞の明視野画像を示す。図８Ｅは３３Ａ陽性対照の染色を示す。図８Ｆは、キメラＭＩＬ－３８抗体の染色を示す。図８Ｇは市販のキメラ（マウス／ヒト）モノクローナル抗体（セツキシマブ）陽性対照を使用した染色を示し、図８Ｈは無一次抗体陰性対照染色を示す。強い染色が図８Ｅ、ＦおよびＧで観察され、染色は図８Ｈでは観察されなかった。これらの結果により、キメラＭＩＬ－３８抗体はＩＦＡにおいてうまくＤＵ－１４５細胞に結合することが証明され、親マウスＭＩＬ－３８抗体の結合特異性が維持されたことが示される。

【０２７５】

－キメラＭＩＬ－３８抗体アッセイ（ウエスタンブロット）

図９ＡはマウスＭＩＬ－３８、続いて抗マウスＨＲＰ二次抗体でプロービングしたウエスタンブロットを示す。図９Ａで示されるウエスタンブロットの曝露時間は３０秒であった。図９Ｂはキメラ ＭＩＬ－３８、続いてヤギ抗ヒト二次抗体でプロービングしたウエスタンブロットを示す。複合体を、ヒツジ－抗ヤギＨＲＰ抗体を用いて検出した。図９Ｂで示されるウエスタンブロットの曝露時間は３０分であった。図９ＣはマウスＭＩＬ－３８、続いてヤギ抗マウス抗体でプロービングしたウエスタンブロットを示す。複合体を、ヒツジ－抗ヤギＨＲＰ抗体を用いて検出した。図９Ｃで示されるウエスタンブロットの曝露時間は３０分であった。

【０２７６】

マウスＭＩＬ－３８抗マウスは、ＤＵ－１４５ライセートおよび組換えＧＰＣ－１　ＮＳ０中の抗原を認識する。反応性はＣ３ライセートでは予想通りに観察されなかった（図９Ａ）。

【０２７７】

３－抗体検出方法が、キメラＭＩＬ－３８のＤＵ－１４５およびＣ３抽出物、ならびに組換えＮＳ０　ＧＰＣ－１との反応性を試験するために必要とされた（図９Ｂ）。３抗体検出方法を使用した対照ウエスタンブロットもまた、マウスＭＩＬ－３８を用いて実施した（図９Ｃ）。３抗体検出方法を使用した場合、検出は、標準２抗体方法を使用するものよりもずっと感度が低かった（図９ＡおよびＣで示されるウエスタンブロットについて、図９Ａで使用された曝露時間は３０秒であり、図９Ｃでは３０分であった）。

【０２７８】

図９Ｂに示されるように、この方法を使用して検出した場合、キメラＭＩＬ－３８は組換えＧＰＣ－１ＮＳ０抗原を認識し、マウスＭＩＬ－３８に対して相当する反応性を示す（図９ＢとＣを比較されたい）。

【０２７９】

５．３考察

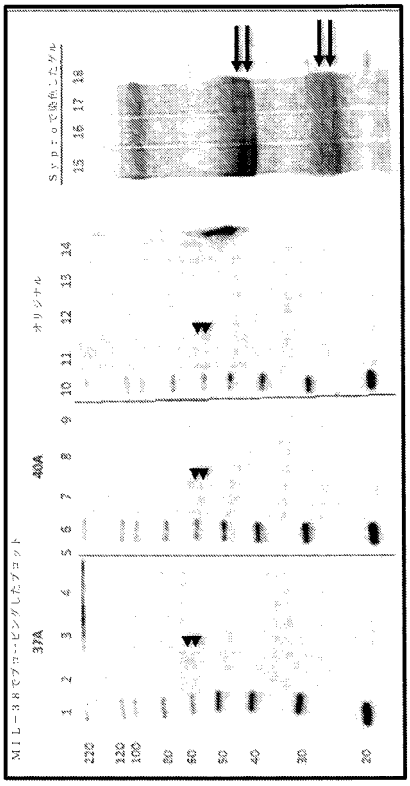
キメラＭＩＬ－３８抗体は、懸濁ＣＨＯ－３Ｅ７細胞においてうまく発現され、精製された。標的抗体のＨおよびＬ鎖は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウエスタンブロット分析に基づき、約５５ｋＤａの推定分子量（Ｃａｌ．Ｍ．Ｗ．約５２ｋＤａ）および２８ｋＤａ（Ｃａｌ．Ｍ．Ｗ．約２６ｋＤａ）で検出された。

【０２８０】

キメラＭＩＬ－３８とマウス親の間の等しい反応性がＩＦＡおよびウエスタンブロッティングにおいて観察され、結合特異性がキメラ抗体の構築において維持されたことが示さ

れる。

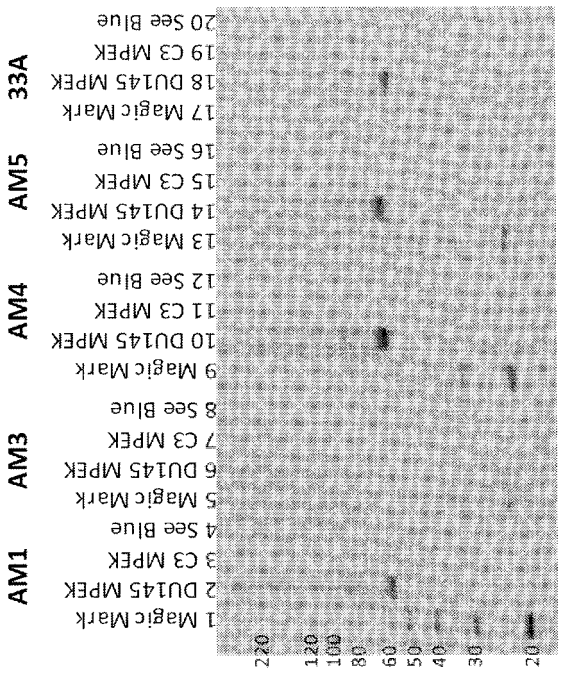
【図１】


MIL-38でブロッティングしたブロット
33A
40A
オリジナル
Strataで取れたゲル
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
220
120
100
80
60
50
40
30
20

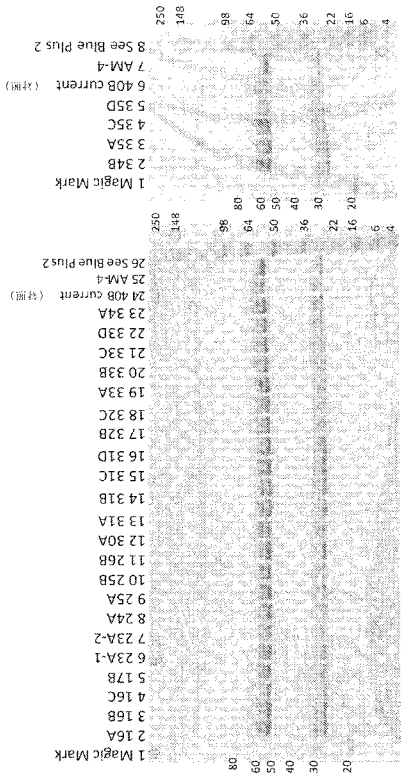
【図２Ａ】

1 Magic Mark
2 AusMAb 1
3 AusMAb 3
4 AusMAb 4
5 AusMAb 5
6 MIL-38 prep 33A
7 See Blue Plus 2

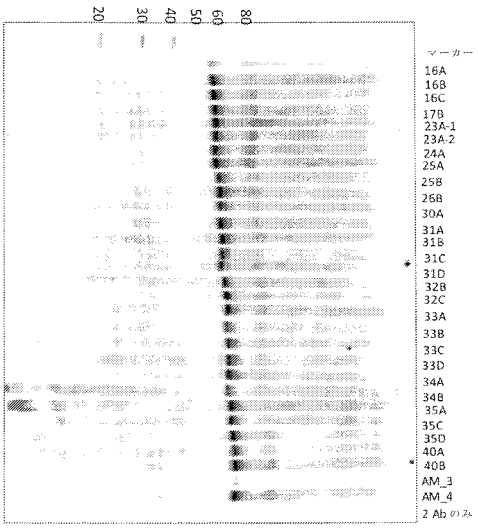
【図２Ｂ】



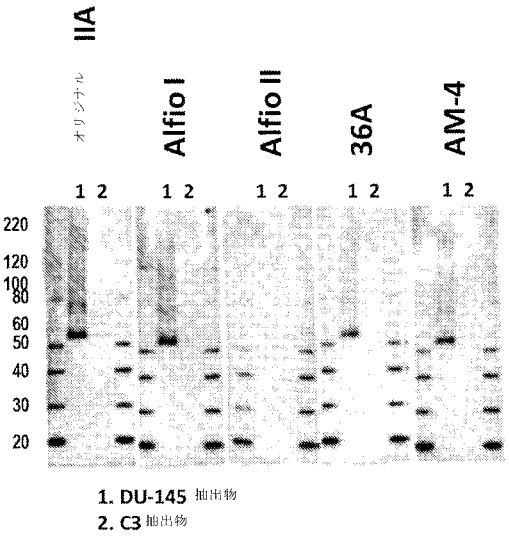
【図３Ａ】



【図３Ｂ】

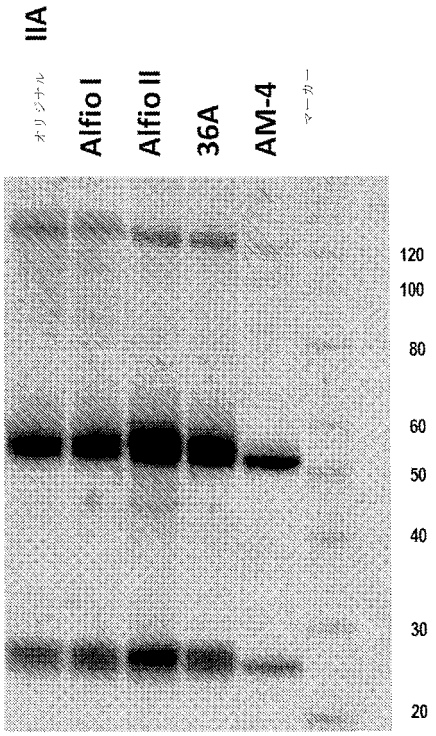


【図４Ａ】

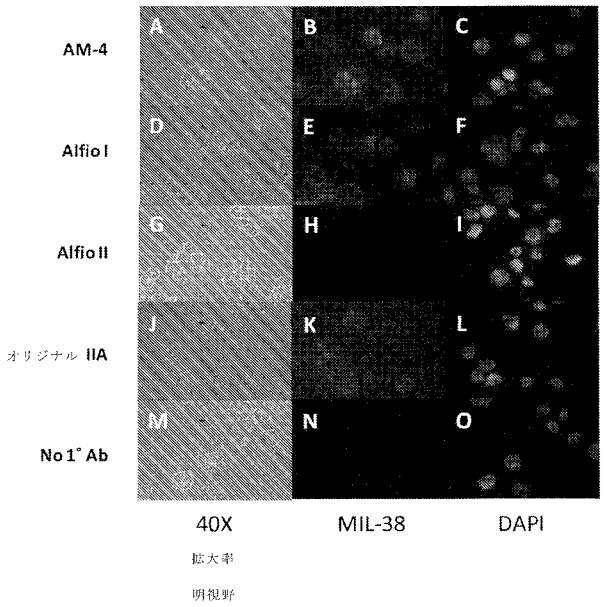


1. DU-145 抽出物
2. C3 抽出物

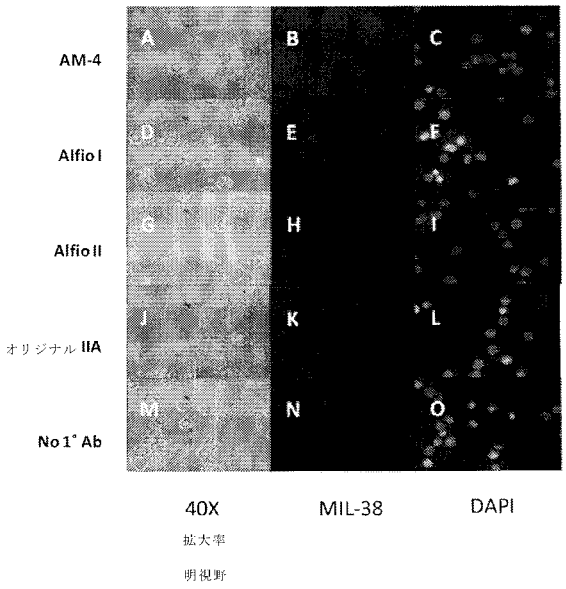
【図４Ｂ】



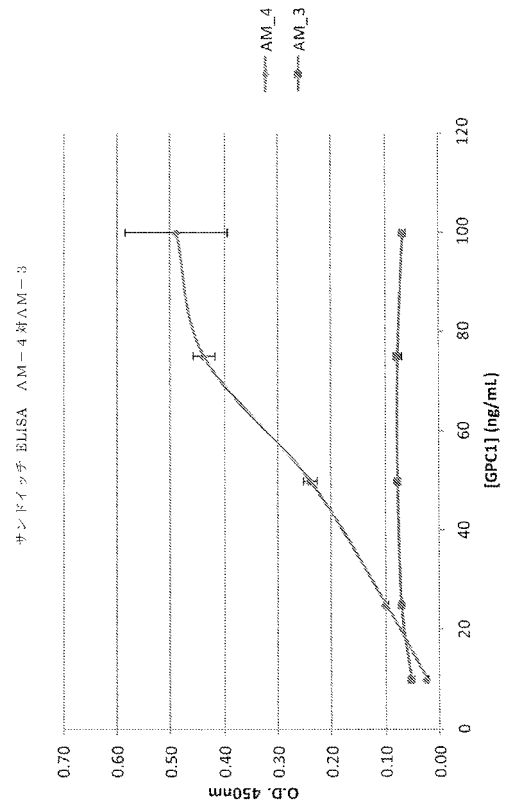
【図５Ａ】



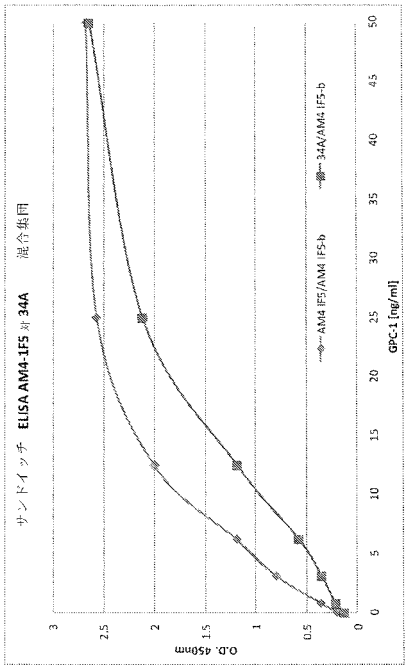
【図５Ｂ】



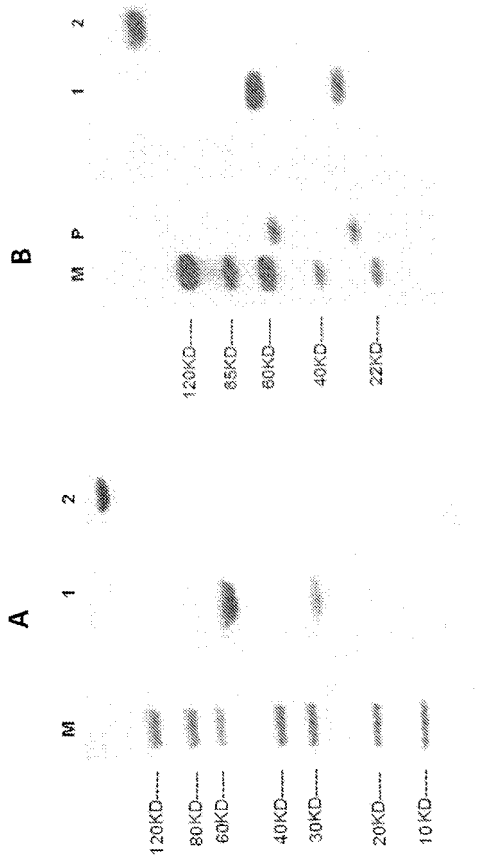
【図６Ａ】



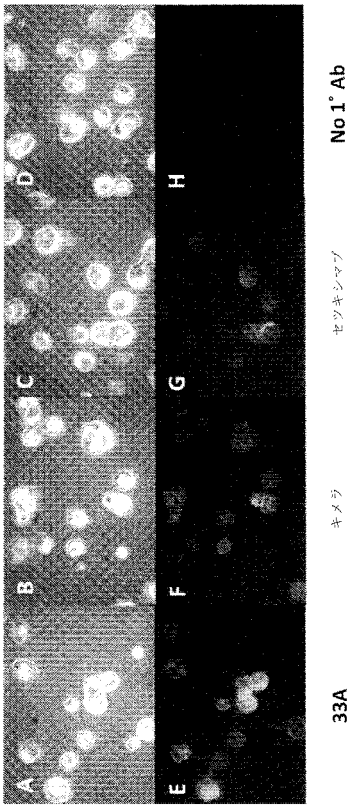
【図６Ｂ】


サンドイッチ ELISA AM4-1F5 対 34A 混合集団
O.D. 450nm
GPC-1 [ng/ml]
AM4 IF5/AM4 IF5-b
34A/AM4 IF5-b

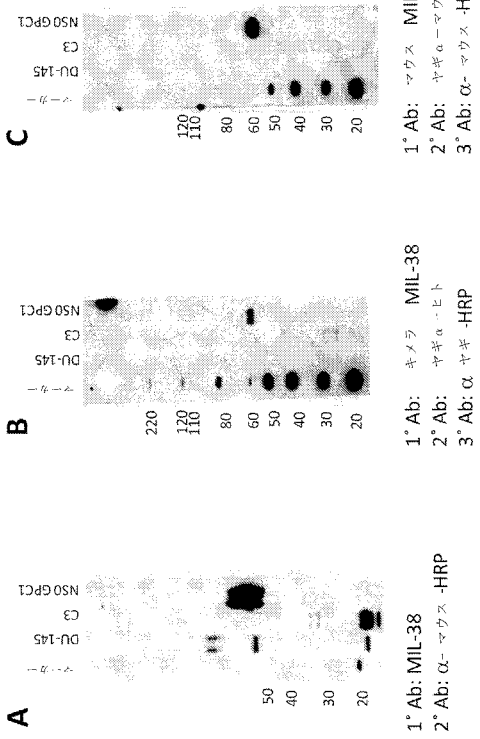
【図７】


A
B
M
P
1
2
120KD
80KD
60KD
40KD
30KD
20KD
10KD
85KD

【図８】


A
B
C
D
E
F
G
H
33A
キメラ
セツキシマブ
No 1° Ab

【図９】


A
B
C
NS0 GPC1
CJ
DU-145
マーカー
1° Ab: MIL-38
2° Ab: α-マウス -HRP
1° Ab: キメラ MIL-38
2° Ab: ヤギα-ヒト
3° Ab: α ヤギ -HRP
1° Ab: マウス MIL-38
2° Ab: ヤギα-マウス
3° Ab: α- マウス -HRP

【配列表】
2020007315000001.app
【手続補正書】
【提出日】令和1年8月29日(2019.8.29)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントを含む単離抗体集団であって、前記第１の抗体は、
（ａ）下記を含む重鎖可変領域：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置５０－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置６９－８５により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置１１８－１２６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；ならびに
（ｂ）下記を含む軽鎖可変領域：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置４４－５４により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置７０－７６により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置１０９－１１７により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）；
を含み、
前記抗体集団は下記を含む軽鎖可変領域を含む第２の抗体を含まない、単離抗体集団：
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置４８－５８により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置７４－８０により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域２（ＣＤＲ２）；
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の位置１１３－１２１により規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される相補性決定領域３（ＣＤＲ３）。
【請求項２】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはグリピカン－１ヘパラン硫酸プロテオグリカン（ＧＰＣ－１）中に存在するエピトープに対する結合特異性を有する、請求項１に記載の抗体集団。
【請求項３】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはアイソタイプＩｇＧ１である、請求項１または２に記載の抗体集団。
【請求項４】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントはモノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、多量体抗体、および／または合成抗体のいずれか１つ以上である、請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体集団。
【請求項５】
前記抗原結合性フラグメントは、単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）、可変ドメイン（Ｆｖ）フラグメント、フラグメント抗原結合（Ｆａｂ）フラグメント、Ｆ（ａｂ）２フラグメント、ペプチド、またはエピトープ結合領域を含むタンパク質分解フラグメントのい

ずれか１つ以上である、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体集団。
【請求項６】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントは、
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基２０－４９、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基５５－６８、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基８６－１１７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の残基１２７－１３７のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の重鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）；ならびに／または
（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基２１－４３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基５５－６９、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基７７－１０８、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の残基１１８－１２７のいずれか１つ以上から選択される配列により規定される１つ以上の軽鎖可変領域ＦＲ（フレームワーク領域）
をさらに含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の抗体集団。
【請求項７】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントは、
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置１３８－４６１により規定される重鎖定常ドメイン配列；
（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置１２８－２３４により規定される軽鎖定常ドメイン配列；
（ｃ）ヒンジ領域
のいずれか１つ以上をさらに含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体集団。
【請求項８】
前記第１の抗体は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３の位置２０－４６１により規定される重鎖配列およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４の位置２１－２３４により規定される軽鎖配列を含む、またはこれから構成される、請求項１～７のいずれか一項に記載の抗体集団。
【請求項９】
請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体集団を産生することができるハイブリドーマ細胞。
【請求項１０】
前記ハイブリドーマ細胞は、オーストラリア細胞バンクで受入番号ＣＢＡ２０１４００２６にて寄託されている、請求項９に記載のハイブリドーマ細胞。
【請求項１１】
請求項１～８のいずれか一項に記載の第１の抗体またはその抗原結合性フラグメントの少なくとも１つをコードする核酸分子。
【請求項１２】
前記核酸分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２で規定される配列を含む、またはこれから構成される、請求項１１に記載の核酸分子。
【請求項１３】
請求項９または１０に記載のハイブリドーマ細胞を、培地中、好適な条件下で培養し、よって、抗体またはその抗原結合性フラグメントを産生させることを含む、抗体またはその抗原結合性フラグメントを産生させるためのプロセス。
【請求項１４】
ハイブリドーマ細胞の少なくとも一部分を混合ハイブリドーマ集団から単離することを含み、前記混合ハイブリドーマ集団はアメリカン組織タイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）で受入番号ＨＢ１１７８５にて寄託されている、請求項９または１０に記載のハイブリドーマ細胞を混合ハイブリドーマ集団から得るためのプロセス。
【請求項１５】
前記第１の抗体および／またはその抗原結合性フラグメントは、
（ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９の残基１３８－４６７で規定されるアミノ酸配列を含むまたはこれから構成される重鎖定常領域；ならびに
（ｂ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の１２８－２３４の残基で規定されるアミノ酸配列を

含むまたはこれから構成される軽鎖定常領域
を含むキメラ抗体である、請求項４に記載の抗体集団。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12P	21/08		
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	１０５	

(72)発明者 ジャスティニアノ フエンマヨール，イレネ
オーストラリア ニューサウスウェールズ ２０７５ セント アイブズ モナ ベール ロード ２１２－２１６ ユニット ２８
(72)発明者 ノコン，アライン
オーストラリア ニューサウスウェールズ ２０４０ ライカート レウス ストリート ５
(72)発明者 スーン，ジュリー
オーストラリア ニューサウスウェールズ ２０２６ ノース ボンディ ブレア ストリート ５８ ユニット ３
(72)発明者 トルオング，コーク
オーストラリア ニューサウスウェールズ ２０４０ ライカート フラッド ストリート １１５ ユニット １
(72)発明者 ウォルシュ，ブラッドリー
オーストラリア ニューサウスウェールズ ２０７４ ターラマラ プリンシズ ストリート ３３
(72)発明者 ウィスムエラー，サンドラ
オーストラリア ニューサウスウェールズ ２５６７ カランズ ヒル カランズ ヒル ドライブ ５６

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01
4B065 AA91X AA91Y AA93Y AB01 AB05 AC14 BA08 CA25 CA44
4C085 AA14 BB11 DD62 DD63 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA28 FA74